



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA - LABB

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch
(RUBIACEAE)**

GABRIEL SANTANA CRISPIM

MANAUS, AMAZONAS

2022



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA - LABB

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch
(RUBIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre em ciências biológicas (Botânica).

Orientadora: Dra. Cecília Veronica Nunez

MANAUS, AMAZONAS

2022



DIVISÃO DO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BOTÂNICA

UNIDADE DE PESQUISA DO

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL



**ATA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DISCENTE DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BOTÂNICA) DO INSTITUTO
NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA.**

Aos vinte dias do mês de dezembro de 2021 às 13:30 horário de Manaus-Am, no ambiente virtual Google Meet, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dra. Patrícia Sartorelli- Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema (UNIFESP), Dr. Geone Maia Corrêa - Universidade Federal do Amazonas, Unidade Acadêmica Permanente de Itacoatiara (UFAM), e Dra. Daiane Martins Ramos - Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia (UFAM), tendo como suplentes os seguintes membros: Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque- Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia (UEA), e Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura- Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química (UFAM), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, intitulada: **“ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *WARSZEWICZIA COCCINEA* (VAHL) KLOTZSCH (RUBIACEAE)”** do discente: **Gabriel Santana Crispim**, sob orientação: da professora Dra. Cecília Verônica Nunez. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES

PARECER

ASSINATURA

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
PATRÍCIA SARTORELLI	(X) APROVADO () REPROVADO	
GEONE MAIA CORRÊA	() APROVADO () REPROVADO	<i>Geone - J. Corrêa</i>
DAIANE MARTINS RAMOS	() APROVADO () REPROVADO	<i>Daiane Martins Ramos</i>
PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE	() APROVADO () REPROVADO	
RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA	() APROVADO () REPROVADO	

Documento assinado digitalmente
gov.br PATRÍCIA SARTORELLI
Data: 24/01/2022 09:32:58-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Manaus (AM), 20 de dezembro de 2021.

OBS:

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

C932e Crispim, Gabriel Santana
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Warszewiczia*
coccinea (Vahl) Klotzsch (RUBIACEAE) / Gabriel
Santana Crispim; orientadora Cecília Verônica Nunez
Nunez. -- Manaus:[s.l], 2022.
88 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação
em Botânica) -- Coordenação do Programa de Pós-
Graduação, INPA, 2022.

1. escopoletina. 2. alcaloides indólicos. 3. RMN.
4. atividade antimicrobiana. 5. atividade
antiangiogênica. I. Nunez, Cecília Verônica Nunez,
orient. II. Título.

CDD: 580

“Space the final frontier, around us, above us,
with in us. We have always looked to the stars to
discover who we are”. (Star Trek: Discovery)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado concluir esse trabalho e a todas as pessoas que conheci e contribuíram com a minha formação até aqui.

A minha família, meus irmãos e minha mãe que me deram tanto apoio quando eu mais precisei. Minha mãe é uma professora fenomenal, esse trabalho com certeza tem um pouco dela.

A minha orientadora Dra. Cecília Veronica Nunez, um exemplo de mulher cientista em química de produtos naturais. Sou muito grato por ter sido aceito no seu grupo de pesquisa e por toda confiança e ensinamentos. Espero que de alguma forma eu sempre possa retribuir todo o investimento que foi dado a minha formação pela senhora.

A Maria Tereza (Maitê), cuja tese de Doutorado norteou boa parte do meu trabalho. Sou eternamente grato por ter me recebido no laboratório e compartilhado os ensinamentos dos ensaios e cromatografia.

A minha mais estimada amiga, Luana (carinhosamente “Babilônia”). Ela foi parceira desde a coleta, intermináveis colunas, plaquinhas no laboratório e no drama diário.

A todos os meus colegas que conheci no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia – LABB. Em ordem alfabética: Allana, Amanda, André (menino sapo), Andrei, Bel, Fran, Lana, Laila, Júlio (rúlio), Stefhania, Tais, Wendel e Weison.

As minhas amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – LCTV/LABB. A Fabiele, Laísley e Priscila, para vocês eu sou parceiro pra tudo.

Aos meus colegas e professores do PPG-BOT. A Dandara, minha amiga que conheci no mestrado e que sempre estava a postos pra qualquer conversa quando eu precisava.

Aos meus amigos Hudson, Amauri, Rapha, Ana, Fernando, Matheus, Junior, Rocha, Vítor, Agnes, Meadys, Edu e até mesmo você Riguel. Cada um de um canto do Brasil, mas que sempre me proporcionaram ótimas conversas e horas de jogo. Parte dos meus espectros eu analisava escutando vocês durante o isolamento social. Sou muito grato a vocês.

Aos técnicos da Central Analítica do INPA, em especial ao Magno, pela aquisição de tantos espectros de RMN e MS.

A CAPES, CNPq e FAPEAM, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesse trabalho e contribuíram a minha formação.

RESUMO

A família Rubiaceae é reconhecida por possuir uma quimiodiversidade de metabólitos, apresentando alcaloides indólicos, triterpenos, iridoides, antraquinonas e outras classes de metabólitos os quais possuem atividade biológica. A espécie em estudo *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch (Rubiaceae) apresenta relatos na literatura de atividade *in vitro* leishmanicida, antioxidante e inibição de acetilcolinesterase, também é descrito o isolamento de triterpenos e uma antocianidina, respectivamente: ácido 6 β ,19 α -diidroxiursólico, ácido sumaresinólico e cianidina 3-*O*-glucosídeo. No entanto, até o momento não foram relatadas a caracterização de alcaloides ou outras classes químicas, nem a avaliação de outras atividades biológicas dessa espécie. As folhas, ramos e brácteas foram coletados, secos, triturados e extraídos em maceração por banho de ultrassom com solventes hexano e metanol, seguindo ordem de polaridade crescente. Para avaliar as atividades biológicas *in vitro* foram utilizadas as metodologias: microdiluição em caldo (sensibilidade antimicrobiana), métodos de inibição do radical livre DPPH e Fe³⁺/fenantrolina (atividade antioxidante), toxicidade frente ao crustáceo *Artemia salina* e o modelo membrana corioalantóica de embrião de ovo de galinha (*Gallus domesticus*) (atividade angiogênica *in vivo*). Após o fracionamento do extrato metanólico de folhas foi possível isolar uma cumarina, a escopoletina (substância I). O mesmo extrato também foi ativo para atividade antimicrobiana frente à quatro cepas avaliadas: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Candida albicans* (ATCC 10231). O extrato hexânico de ramos apresentou atividade antiangiogênica e tanto os extratos hexânicos quanto metanólicos de folhas apresentaram toxicidade nas concentrações avaliadas. Os resultados mostram a atividade antimicrobiana e antiangiogênica para os extratos de *Warszewiczia coccinea* e isolamento de escopoletina a partir das folhas, o que demonstra o primeiro relato dessa cumarina para o gênero.

Palavras-chave: escopoletina, alcaloides indólicos, RMN, atividade antimicrobiana, atividade antiangiogênica, farmacognosia.

ABSTRACT

The Rubiaceae family is recognized for having a chemodiversity of metabolites, indole alkaloid, triterpenes, iridoids, anthraquinones and other classes of metabolites which have biological activity. The specie in study *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch (Rubiaceae) presents reports in the literature of *in vitro* antileishmania activity, antioxidant and acetylcholinesterase inhibition, also described the isolation of triterpenes and an anthocyanidin, respectively: 6 β , 19 α -dihydroxyursolic acid, sumaresinolic acid and cyanidin 3-*O*-glucoside. However, so far, the characterization of alkaloids or other classes involved, nor the evaluation of other biological activities of this specie has not been reported. Leaves, branches and bracts were collected, dried, crushed and extracted in maceration assisted by ultrasound bath with hexane and methanol solvents, following the order of increasing polarity. To evaluate the biological activities *in vitro*, the following methodologies were used: broth microdilution (antimicrobial sensitivity), method of free radical inhibition DPPH and Fe³⁺/phenanthroline (antioxidant activity), toxicity against the brine shrimp *Artemia salina* and the chorioallantoic embryo model of a chicken egg embryo (*Gallus domesticus*) (angiogenic activity *in vivo*). After fractionation of the methanolic extract of leaves, it was possible to isolate a coumarin, the scopoletin (substance I). The extract was also active for antimicrobial activity against four strains evaluated: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) and *Candida albicans* (ATCC 10231). The hexane extract of branches has antiangiogenic activity and both the hexane and methanol extracts of leaves show toxicity in all concentrations evaluated. The results show the antimicrobial and antiangiogenic activity for *Warszewiczia coccinea* extracts and isolation of scopoletin from the leaves, which demonstrates the first report of this coumarin for the entire genus.

Keywords: scopoletin, indole alkaloids, NMR, antimicrobial activity, antiangiogenic activity, pharmacognosy.

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição das espécies da família Rubiaceae	17
Figura 2: Algumas substâncias isoladas de Rubiaceae	19
Figura 3: Exemplos de alguns metabólitos que ocorrem nas subfamílias.....	20
Figura 4. Imagem do fruto de <i>Genipa americana</i>	26
Figura 5: Imagens da espécie <i>Warszewiczia coccinea</i> . (A) Folha seca, (B) ramos com representação das estípulas, (C) brácteas das inflorescências.	28
Figura 6: Metabólitos descritos em <i>Warszewiczia coccinea</i>	30
Figura 7: Etiquetas das exsicatas depositadas em herbário.	33
Figura 8: Fluxograma da preparação dos extratos.	34
Figura 9: Fluxograma do fracionamento do extrato MeOH das brácteas.	36
Figura 10: Fluxograma do fracionamento do extrato MeOH das folhas.	40
Figura 11: Fotografia da placa de CCDC demonstrando a banda com intensa fluorescência azulada.	44
Figura 12: Reação antioxidante com o radical de DPPH	47
Figura 13: Análise em CCDC dos extratos hexânicos de ramos e folhas de <i>Warszewiczia coccinea</i>	50
Figura 14: Análise em CCDC dos extratos metanólicos de ramos, folhas e brácteas de <i>Warszewiczia coccinea</i>	51
Figura 15: Análise em CCDC de algumas frações dos extratos metanólicos de folhas e brácteas de <i>Warszewiczia coccinea</i>	46
Figura 16: Espectros de RMN de ^1H (em CDCl_3) dos extratos hexânicos de folhas e ramos de <i>Warszewiczia coccinea</i>	56
Figura 17: Espectros de RMN de ^1H (em DMSO-d_6) dos extratos metanólicos de brácteas, folhas e ramos de <i>Warszewiczia coccinea</i>	58
Figura 18: Expansão da região de 0,5 a 2,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia coccinea</i>	59
Figura 19: Expansão da região de 2,5 a 5 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia coccinea</i>	59
Figura 20: Expansão da região de 5 a 8 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia coccinea</i>	60

Figura 21: Expansão da região de 8,5 a 11,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de <i>Warszewiczia coccinea</i> .	60
Figura 22: Alcaloides isolados de <i>Warszewiczia schwackei</i> , demonstrado os deslocamentos químicos dos hidrogênios do grupo indol e de amina.	61
Figura 23: Estrutura molecular da substância I, escopoletina.	63
Figura 24: Cromatograma da substância I.	63
Figura 25: Espectro de massas da substância I ionizada por ESI em modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$.	64
Figura 26: Espectro de massas da substância I ionizada por ESI em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$.	65
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H da substância I (CDCl_3 , 300 MHz).	67
Figura 28: Expansão da região de 6 a 8 ppm do espectro de ^1H da substância I (CDCl_3 , 300 MHz).	68
Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C da substância I (CDCl_3 , 75 MHz).	69
Figura 30: Espectro de DEPT 135° da substância I (CDCl_3 , 75 MHz).	70
Figura 31: Mapa de correlação bidimensional HSQC da substância I (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).	71
Figura 32: Mapa de correlação bidimensional HMBC da substância I (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).	72
Figura 33: Mapa de correlação bidimensional COSY da substância I (CDCl_3 , 300 MHz).	73
Figura 34: Expansões das correlações observadas da substância I no espectro bidimensional HMBC	74
Figura 35: Correlações observadas nos espectros bidimensionais da substância I	75
Figura 36: análise das frações 33-35 por CCDC.	76
Figura 37: Cromatograma da fração 33-35.	76
Figura 38: Espectro de massas do pico 2 e fragmentação do íon com m/z 545 $[\text{M}+\text{H}]^+$.	78
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H da fração 33-35 ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).	79
Figura 40: Expansão da região entre 6 a 11,5 ppm do espectro de RMN de ^1H da fração 33-35, indicando deslocamentos característicos de um núcleo indólico.	80
Figura 41: Histograma da atividade antimicrobiana do extrato de folhas MeOH	82
Figura 41: Curva de ácido ascórbico com Fe^{3+} .	84
Figura 42: Curva de ácido ascórbico com DPPH.	84
Figura 44: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato hexânico dos ramos.	86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Substâncias e atividades biológicas reconhecidas na literatura das espécies do gênero <i>Warszewiczia</i> Klotzsch.	29
Tabela 2: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 15-18.	37
Tabela 3: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 1-3.	38
Tabela 4: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 6-7.	39
Tabela 5: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fase DCM.	41
Tabela 6: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 11-12.	42
Tabela 7: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 5-6.	43
Tabela 8: Rendimento dos extratos obtidos.	49
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 1 (em CDCl_3) e comparação com a literatura (Shah et al. 2014; El-Demerdash et al. 2009).	66
Tabela 10: Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Warszewiczia coccinea</i>	81
Tabela 11: Resultados da atividade antioxidante dos extratos MeOH em valores médios de absorbância.	83
Tabela 12: Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martins et al. 2014).	83
Tabela 13: Mortalidade observada no ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	85

Lista de Siglas e abreviações

^{13}C	Isótopo de carbono-13
^1H	Hidrogênio
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
H_2O	Água
ACN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de etila
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry
m/z	Razão massa/carga
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CA	Cromatografia em coluna aberta
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
COSY	espectroscopia de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$
UV	Ultravioleta
ACN	Acetonitrila
HSQC	Correlação heteronuclear singular-quântica
HMBC	Correlação heteronuclear múltiplo- quântica
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
NP/PEG	difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	Sulfato cérico
FeCl_3	Cloreto férrico
CAM	Ensaio em membrana corioalantóica de embrião de galinha.
ATCC	American Type Culture Collection
CL_{50}	Concentração letal média
Fol	Folhas
Bra	Brácteas
Ram	Ramos

Sumário

Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	11
Lista de Siglas e abreviações	12
INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Família Rubiaceae.....	17
2.1.1 Aspectos fitoquímicos	18
2.1.2 Atividade antimicrobiana	22
2.1.3 Atividade antioxidante.....	23
2.1.4 Atividade de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	24
2.1.5 Atividade Angiogênica	24
2.2 Subfamília Ixoroideae	25
2.3 Gênero <i>Warszewiczia</i>	27
2.3.1 Aspectos fitoquímicos e atividades biológicas.....	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral:	31
3.2 Objetivos específicos:	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Especificação de equipamentos e materiais	32
4.2 Coleta e Identificação	33
4.3 Obtenção dos Extratos	33
4.4 Análises fitoquímicas.....	34
4.4.1 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada comparativa.....	34
4.4.2 Análise dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H).35	
4.5 Fracionamento cromatográfico dos extratos.....	35
4.5.1 Fracionamento dos extratos metanólicos das brácteas	35
4.5.2 Fracionamento dos extratos metanólicos das folhas.....	39
4.6 Análise química de frações e substância isolada.	44
4.7 Atividade antimicrobiana.....	44
4.8 Atividade Antioxidante.....	46

4.9	Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	47
4.10	Angiogênese.....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Rendimento dos extratos.....	49
5.2	Análises cromatográfica dos extratos brutos e frações	50
5.3	Análises dos extratos brutos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio....	53
5.4	Identificação da substância I: escopoletina.....	62
5.5	Análise da Fração 33-35: indício de alcaloides indólicos.....	76
5.6	Atividades biológicas.....	81
5.6.1	Atividade Antimicrobiana	81
5.6.2	Atividade Antioxidante	83
5.6.3	Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	85
5.6.4	Atividade Antiangiogênica	85
6.	CONCLUSÃO	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

INTRODUÇÃO

Muitos organismos possuem a capacidade de sintetizar substâncias, como forma de se adaptarem aos ambientes que estão inseridos. Essas substâncias são extremamente úteis em diversas interações, como busca por alimento, reprodução e defesa (Evert e Eichhorn 2014). Logo, organismos que possuem essas adaptações químicas podem produzir metabólitos capazes de interagir com diversos alvos das células de outros organismos, como: DNA, RNA, síntese proteica, funções da membrana celular, transporte de elétrons, esporulação, germinação e muitos outros alvos celulares (Demain 2000).

Em espécies de plantas pode-se observar que determinadas espécies possuem adaptações químicas, fornecendo a capacidade para produção de metabólitos secundários que afetam: polinizadores, alvos moleculares de predadores ou outras plantas, desencadeando atividades biológicas. Dessa forma, a grande diversidade de metabólitos com capacidade de interação com alvos moleculares, pode influenciar diretamente a pesquisa em produtos naturais bioativos (Ferreira e Pinto 2010).

O interesse por substâncias com diferentes estruturas químicas, é alimentado diretamente pela necessidade da disposição de medicamentos para tratamento de patologias. A caracterização de atividades biológicas de novas substâncias ou daquelas já conhecidas, podem auxiliar diretamente no propósito de responder efetivamente a progressão de certas patologias, como por exemplo, doenças infecciosas que necessitam de substâncias antimicrobianas (Kurapati et al. 2016), diversos tipos de câncer e outras patologias.

Nesse aspecto, investigações direcionadas a produtos naturais podem fornecer o aprimoramento no atual arsenal de medicamentos (Newman e Cragg 2020). Newman e Cragg (2020) exemplificam que no período de 1981 a 2019 foram aprovadas 1881 drogas pelo FDA, ressaltando que dessas, 441 correspondem a substâncias derivadas de produtos naturais, como plantas, demonstrando que produtos naturais possuem grande contribuição histórica ao arsenal de medicamentos (Ferreira e Pinto 2010).

Os metabólitos produzidos por plantas que possuem atividade biológica apresentam estruturas complexas. Alguns deles, não participam ativamente do metabolismo energético (metabolismo primário) e são produzidos obedecendo condições específicas, estes estão relacionados diretamente com o potencial farmacológico de produtos naturais. No entanto, possuem ocorrência restrita a determinados grupos de plantas. O que pode direcionar estudos

sobre quimiosistemática desses metabólitos em espécies de plantas (Dewick 2009; Simões et al. 2017).

Adotar estratégias para selecionar plantas, promissoras a bioprospecção, é essencial para a busca de determinadas espécies vegetais que estão inseridas em uma grande biodiversidade. Gottlieb (1982) demonstra que a quimiotaxonomia pode ser utilizada como ferramenta para a seleção de plantas para estudos fitoquímicos. No entanto, embora existam limitações reconhecidas a essa estratégia, Simões e colaboradores (2017) ressaltam que aliar os conhecimentos sobre quimiotaxonomia, etnobotânica e etnofarmacologia forneça subsídio para a pesquisa de novos candidatos a fármacos. Portanto, através dessas pesquisas podem ser obtidos classes de metabólitos com atividade, os quais fornecem estruturas utilizadas na sua conformação normal ou modificada para a produção de fármacos.

Na busca por plantas com substâncias bioativas, destaca-se a família Rubiaceae, possuindo grande relevância econômica principalmente relacionada a plantas ornamentais e medicinais (Mongrand et al. 2005). Nessa família botânica são relatados entre as espécies: alcaloides indólicos, triterpenos, antraquinonas, iridoides e outras classes de substâncias (Bolzani et al. 2001, Martins e Nunez 2015). Contudo, algumas espécies da família Rubiaceae ainda permanecem desconhecidas quanto ao seu potencial químico e biológico.

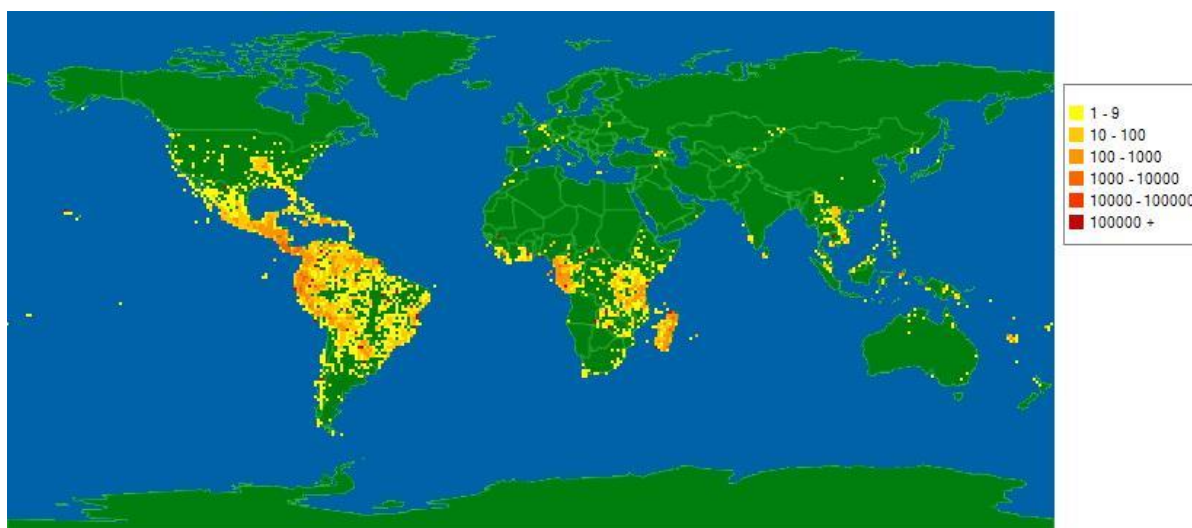
No presente estudo, realizamos um estudo químico e biológico da espécie *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch, com a finalidade de caracterizar metabólitos presente nos extratos, avaliar as atividades biológicas e isolar substâncias bioativas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae é considerada uma das maiores famílias de dicotiledôneas em número de espécies e ampla distribuição geográfica. São conhecidas cerca de 13.673 espécies e 609 gêneros (The Plant List 2022). Possuindo distribuição cosmopolita, concentrando-se nos trópicos (Pereira e Meireles 2010). No Brasil as espécies ocorrem nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Flora do Brasil 2022). Na Amazônia é a segunda maior família em número de espécies que ocorrem na constituição da flora (Cardoso et al. 2017). Demonstrando ser uma das famílias botânicas que contribui com grande número de espécies para a biodiversidade brasileira.

Figura 1: Distribuição das espécies da família Rubiaceae



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Acesso em 30 de agosto de 2021. Disponível: < <https://tropicos.org/name/42000315> >.

As espécies da família Rubiaceae possuem grande contribuição científica quanto a sua importância econômica, farmacobotânica e etnobotânica. Algumas delas são utilizadas na indústria alimentícia (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamental (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp. etc.) e farmacêutica (*Cinchona pubescens* Vahl.). Algumas espécies apresentam atividades biológicas, como a toxicidade de metabólitos nos gêneros *Palicourea* e *Psychotria* (Coelho et al. 2006). Ressaltando que para o gênero *Psychotria*, Souza e colaboradores (2013) relatam o uso de espécies em rituais religiosos, na obtenção da ayahuasca.

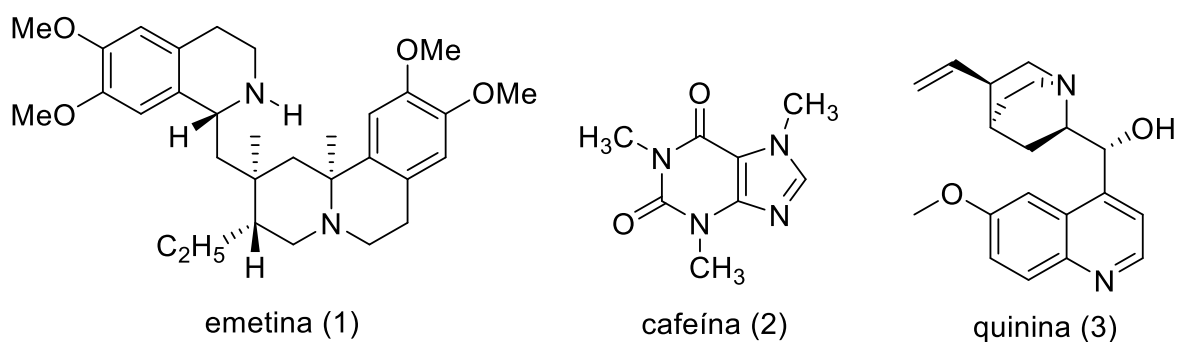
Algumas características botânicas são essenciais para reconhecer as plantas da família Rubiaceae. As espécies podem se apresentar em diferentes tipos de hábitos como: árvores, arvoretas, ervas, lianas ou epífitas (Taylor et al. 2007). As plantas podem ser reconhecidas morfológicamente pelas folhas opostas ou raramente verticiladas, estípulas interpeciolares e ausência de látex (Ribeiro et al. 1999).

Conforme Bremer (2009), a família Rubiaceae está subdivida em 3 grandes subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. Sendo que nos estudos de Martins e Nunez (2015) foi observado que cada subfamília possui uma ocorrência majoritária de metabólitos secundários. Corroborando com achados de Bolzani e colaboradores (2001) o que ressalta a importância em estudar quimicamente as espécies, a fim de contribuir com o conhecimento quimiotaxonômico.

2.1.1 Aspectos fitoquímicos

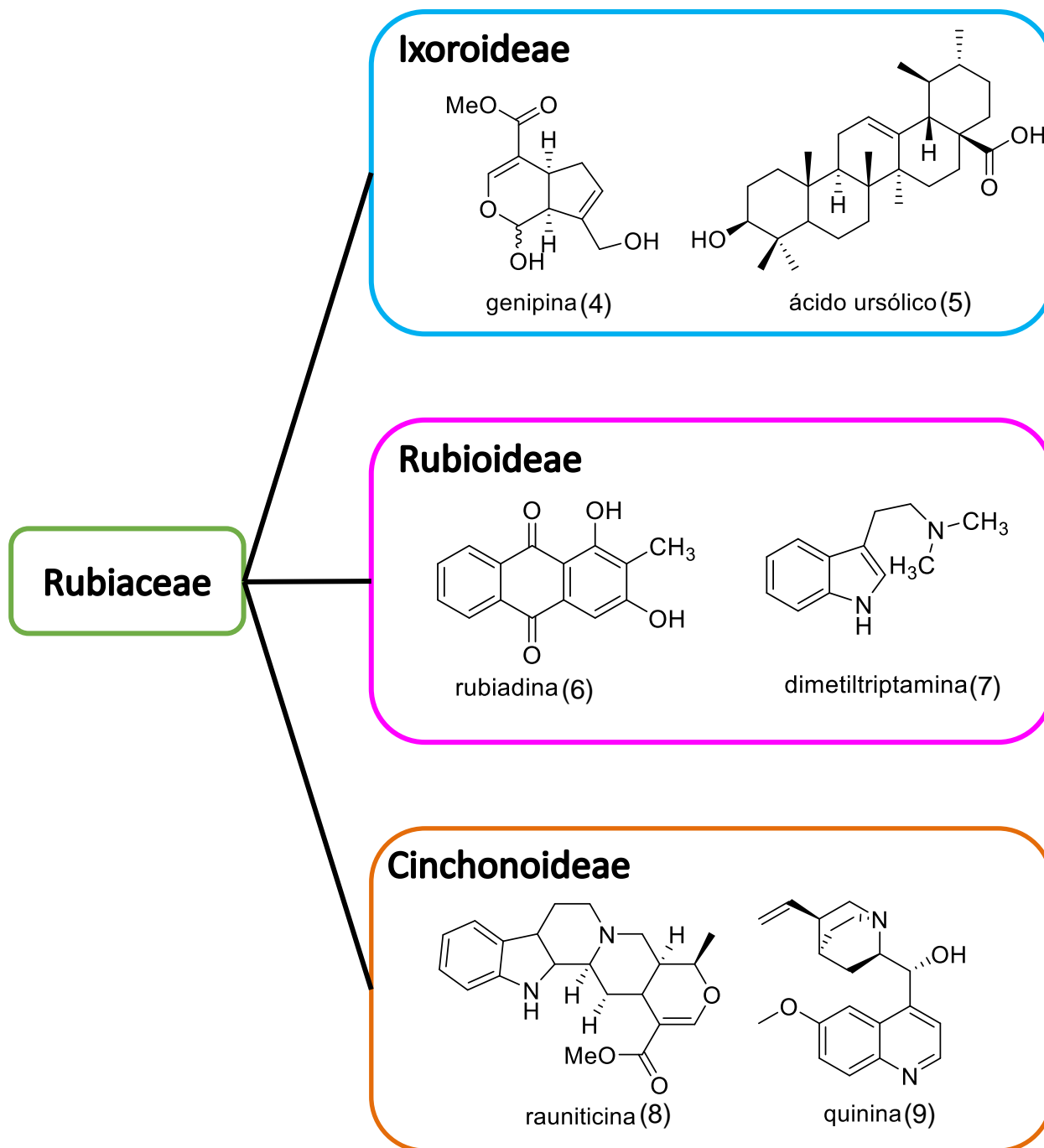
Algumas espécies da família Rubiaceae possuem importância histórica para a química de produtos naturais. Pode-se destacar notáveis exemplos de alcaloides isoladas desta *taxa*, como: cafeína (2) (*Coffea arabica*), quinina (3) (*Cinchona ledgeriana*) e a emetina (1) (*Cephaelis ipecacuanha*) (Figura 2). Na literatura estas substâncias são atribuídas a importantes atividades farmacológicas, como atividades: estimuladoras do sistema nervoso central atribuídas a cafeína, atividade antimalárica atribuída a quinina e atividade antiemética atribuída a emetina. O que justifica a relevância na prospecção química das espécies de Rubiaceae (Souza et al. 2013; Cordell et al. 2001).

Figura 2: Algumas substâncias isoladas de Rubiaceae. As quais apresentam importância histórica a química de produtos naturais.



Avaliar a constituição química entre as espécies da família Rubiaceae pode fornecer a compreensão sobre a disposição dos metabólitos secundários entre os *taxa*, que facilitaria o início de investigações químicas das suas espécies. Em seu estudo Martins e Nunez (2015) observaram que são encontrados majoritariamente os metabólitos das classes antraquinonas, triterpenos, alcaloides indólicos, outras classes de alcaloides e iridoides, os quais ocorrem o distribuídos entre as subfamílias.

Figura 3: Exemplos de alguns metabólitos que ocorrem nas subfamílias.



Em cada subfamília como exemplificado na Figura 3, pode-se notar a ocorrência majoritária de determinadas classes de metabólitos. Na subfamília Ixoroideae ocorrem majoritariamente metabólitos das classes: iridoides e triterpenos; em Cinchonoideae são observados alcaloides indólicos e outras classes de alcaloides; a subfamília Rubioideae é a que apresenta maior quimiodiversidade e a única subfamília que apresenta antraquinonas em maior ocorrência em comparação a outros metabólitos (Bolzani et al. 2001; Martins e Nunez 2015). Em um ponto de vista evolutivo, Rubioideae é considerada a subfamília ancestral, o que justifica sua quimiodiversidade (Bremer 2009).

As famílias Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae (ordem Gentianales) são reconhecidas quimicamente por apresentarem alcaloides indólicos em algumas de suas espécies. Em Rubiaceae os alcaloides são considerados quimiomarcadores para essa família. Dentre as classes de alcaloides reconhecidos nela, os alcaloides indólicos podem ser encontrados em algumas espécies das subfamílias de Rubiaceae, no entanto na subfamília Cinchonoideae são relatados em maior número (Larsson 2007; Singh 2016).

Em Cinchonoideae, a exemplo de alcaloides indólicos pode-se citar a rauniticina (8) considerada um alcaloide indólico monoterpênico, isolada da espécie *Uncaria glabrata* (Arbain et al. 1998). Como exemplos de outras classes de alcaloides, a quinina (9) um alcaloide quinolínic que pode ser encontrado tanto na espécie *Cinchona ledgeriana*, quanto no fungo endofítico *Diaporthe* sp. associado a esta planta (Maehara et al. 2012). A quinina é uma das substâncias com importância histórica para a indústria de medicamentos, devido a sua atividade antimalárica (Cordell et al. 2001).

Rubioideae apresenta grande ocorrência de antraquinonas, como a rubiadina (6) encontrada na espécie *Rubia tinctorum* (Marec et al. 2001). Nesta subfamília também podem ser observadas a presença de outras classes de metabólitos secundários, destacando-se os alcaloides indólicos como a dimetilriptamina (7) relatada na espécie *Psychotria viridis* (Blackledge e Taylor 2003). A dimetilriptamina possui atividade biológica no sistema nervoso central quando em sinergismo com alcaloides indólicos β -carbonílicos de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), a qual é utilizada junto com a espécie *Psychotria viridis* no preparo da Ayahuasca, uma bebida utilizada em cerimônias religiosas com propriedades psicoativas (Freedland e Mansbach 1999).

Dentre os iridoides conhecidos de Ixoroideae, exemplifica-se a genipina (4), um iridoide monoterpênico, o qual foi isolado dos frutos de *Genipa americana* (Djerassi et al. 1960; Ono et

al. 2005). Este metabólito apresenta reconhecida atividade anti-inflamatória e antiangiogênica (Koo et al. 2004) e capacidade de induzir apoptose em células de hepatoma (Kim et al. 2005). Em Ixoroideae, apesar da ocorrência majoritária de iridoides e triterpenos, também são conhecidos a presença de outras classes de metabólitos, como os alcaloides indólicos.

Diversas investigações feitas por nosso grupo de pesquisa evidenciam que espécies do gênero *Duroia* apresentam metabólitos que contribuem para o conhecimento químico da família Rubiaceae. A espécie *Duroia macrophylla* Huber apresentou um alcaloide indólico, a raunitidine (Nunez et al. 2009), triterpenos e alcaloides com importante atividade anti-tuberculose (Martins et al. 2013; Martins e Nunez 2014), ressaltando que um alcaloide indólico isolado dessa espécie, demonstrou grande potencial para linhagens de células tumorais e para *Mycobacterium tuberculosis*, gerando duas patentes (Nunez e Vasconcelos 2012; Nunez et al. 2014). A espécie *D. macrophylla* apresentou atividade antioxidante, dos extratos analisados também foram identificados terpenos e alcaloides (Martins e Nunez 2014; Martins et al. 2014). Reis e colaboradores (2016) demonstraram a capacidade antifúngica, antimicrobiana e larvicida dos extratos de *D. macrophylla* e *D. saccifera*. Em *Duroia longiflora*, Cruz e colaboradores (2019) isolaram um biflavanoide com atividade antioxidante a partir das folhas, as autoras evidenciaram que era o primeiro relato da ocorrência desse metabólito na família Rubiaceae.

2.1.2 Atividade antimicrobiana

A capacidade de microrganismos de se tornarem resistentes a drogas antimicrobianas é uma das problemáticas que mais incentiva a busca por novas substâncias e estudos sobre seus mecanismos de ação. Ressaltando o fato de algumas dessas drogas podem apresentar toxicidade, há um interesse constante na descoberta de novas substâncias bioativas que sejam seletivas aos microrganismos e não a células saudáveis (Kurapati et al. 2016). Devido ao interesse nessas substâncias, diversos métodos para a pesquisa dessas substâncias são apresentados pela literatura (Ostrosky et al. 2008; Balouiri et al. 2016).

As plantas possuem uma grande quimiodiversidade de metabólitos que podem ser explorados quanto as suas propriedades antimicrobianas. Para o reconhecimento de suas atividades biológicas podem ser estudados extratos brutos, misturas ou metabólitos isolados de plantas afim de se observar atividades antagonistas ou sinérgicas (Vashist e Jindal 2012; Eloff et al. 2008).

Em Rubiaceae, algumas espécies possuem atividade antimicrobiana, o que indica a possibilidade de descoberta de substâncias bioativas produzidas pelas plantas dessa família. Como observado nos trabalhos de Rodrigues et al. (2014) e Mesquita et al. (2015) algumas espécies de *Ferdinandusa* spp. apresentaram atividade antimicrobiana quando seus extratos foram avaliados frente a fungos. Contudo, as substâncias bioativas dessas espécies, até o presente momento não foram caracterizadas.

2.1.3 Atividade antioxidante

As plantas são uma notável fonte de substâncias com potencial atividade antioxidante. Dentre as principais classes, pode-se citar as substâncias fenólicas, polifenóis e cumarinas (Xu et al. 2017; Adam et al. 2009). Substâncias com atividade antioxidante são de grande relevância pois são capazes de inibir a ação de radicais livres, como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Xu et al. 2017).

A importância em estudar a propriedade antioxidante de produtos naturais se justifica pelo fato que algumas respostas celulares podem ser mediadas por radicais livres. O desequilíbrio de radicais livres pode ser extremamente danoso para células saudáveis, causando danos ao material genético e oxidação de lipídeos e proteínas nas membranas celulares. Esse comprometimento celular está diretamente ligado a outras fisiopatologias como complicações cardiovasculares, hepáticas, envelhecimento precoce e outras que estejam relacionadas (Fang et al. 2002; Li et al. 2015).

Dentre os produtos naturais com atividade antioxidante, as substâncias fenólicas ganham destaque. Muitas são relatadas com a capacidade de inibir radicais livres ou se ligarem a íons, para impedir a oxidação de outros alvos celulares (Ahmadi et al. 2019; Adam et al. 2009).

A atividade antioxidante dessas substâncias pode servir como triagem para investigar outras atividades biológicas relacionadas a danos celulares, como neoplasias. Em seu estudo, Ahmadi e colaboradores (2019) demonstram que extratos de *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) que possuíam a substâncias fenólicas, apresentaram atividade antitumoral para linhagens de células leucêmicas.

2.1.4 Atividade de toxicidade frente a *Artemia salina*

Em estudos fitoquímicos, em que são obtidas várias amostras de extratos e frações torna-se imprescindível o uso de ensaios que consigam triar de maneira preliminar quais amostras apresentam indícios de substâncias ativas, facilitando a monitoramento das atividades biológicas das amostras e possibilitando resultados promissores para outras atividades que podem estar relacionadas (González et al. 2007). Dentre esses ensaios pode-se citar o ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* Leach, proposto por Meyer e colaboradores (1982).

Os resultados obtidos nesse ensaio são diretamente relacionados a citotoxicidade observada em modelos utilizando células. Uma vez que, amostras que apresentam alta toxicidade podem possuir substâncias que também sejam ativas a células tumorais. Em contrapartida, em amostras que não sejam observadas nenhuma toxicidade pode indicar que para células saudáveis as substâncias presentes possam ser inofensivas. Tornando esse ensaio de extrema utilidade para o direcionamento de estudos fitoquímicos visando substâncias bioativas (Meyer et al. 1982; Cavalcante et al. 2000; Amarante et al. 2011).

Este ensaio é fundamental para reconhecer extratos promissores para outras atividades biológicas. Resultados de toxicidade podem direcionar para ensaios de angiogênese e citotoxicidade. Pela facilidade e custo-benefício oferecidos pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*, várias amostras podem ser rapidamente avaliadas sem a necessidade de equipamentos sofisticados, instalações especializadas ou ambientes esterilizados.

No modelo de ensaio, são avaliadas a letalidade das amostras frente aos náuplios de *Artemia salina*. Amostras que apresentam atividade conseguem ser atingir uma mortalidade maior que 50% dos indivíduos de *A. salina* (Nguta et al. 2012).

No gênero *Warszewiczia*, a espécie *W. schwackei* apresentou atividade tóxica frente a *Artemia salina*, onde Fachin-Espinar e Nunez (2019) observaram que os extratos hexânicos e metanólicos de folhas e galhos possuíam toxicidade aos náuplios. Sendo que, os extratos de galhos que apresentaram toxicidade nesse ensaio, também foram ativos a linhagens de células macrofágicas.

2.1.5 Atividade Angiogênica

A angiogênese é um processo fisiológico da formação de vasos sanguíneos promovida por células e sinalizadores celulares. Nesses ensaios, as duas respostas são interessantes, pois a

atividade pro-angiogênica, onde ocorre o crescimento dos vasos, indica o potencial cicatrizante do extrato ou da substância avaliada e a atividade antiangiogênica, onde ocorre a inibição dos vasos, pode indicar a presença de substâncias antitumorais (Nguyen et al. 1994, Koo et al. 2004, Carmeliet 2005, Ahmadi et al. 2019).

Algumas metodologias podem ser utilizadas para otimizar a identificação de amostras com potencial atividade angiogênica. Nguyen e colaboradores (1994) propõem um modelo de ensaio utilizando a membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM). Em que são utilizados ovos fertilizados de *Gallus domesticus*. Com o desenvolvimento ao longo do tempo, a membrana corioalantóica vascularizada pode ser utilizada para avaliar o potencial de amostras, como extratos ou substâncias.

Koo e colaboradores (2004) utilizaram o modelo de CAM para analisar a atividade antiangiogênica da genipina, um iridoide isolado de *Genipa americana* (Rubiaceae) e observaram que pode ser possível constatar que essa substância conseguia inibir a formação de novos vasos. O que demonstra que essa metodologia pode ser utilizada para proporcionar o reconhecimento de produtos naturais com atividade angiogênica.

2.2 Subfamília Ixoroideae

Ixoroideae é considerada uma das 3 subfamílias que subdividem a família Rubiaceae. As espécies que estão classificadas nessa subfamília possuem ocorrência pantropical e pan-subtropical. Nos continentes da América do Sul e na América Central, ocorrem a maioria dos gêneros da tribo Condamineeae, a qual está incluída o gênero *Warszewiczia* (Bremer e Eriksson 2009).

As espécies que pertencem a Ixoroideae estão classificadas de acordo com estudos filogenéticos baseados em semelhança genética (Bremer e Eriksson 2009). No entanto, a relevância dos metabólitos produzidos pelas espécies ainda é importante para o suporte de diversas classificações taxonômicas, auxiliando na classificação botânica correta (Bolzani et al. 2001). Portanto, dessa forma a ocorrência de metabólitos secundários em Ixoroideae obedece a uma destruição taxonômica o que pode ser usado para facilitar a prospecção química.

Observando os estudos de Martins e Nunez (2015), juntamente com os estudos de Bolzani e colaboradores (2001) pode-se notar que em Ixoroideae os iridoides são a classe de metabólitos que ocorrem em maior número de relatos, sendo considerados marcadores, seguidos de triterpenos e em menor número de relatos também ocorrem alcaloides.

Dentre os iridoides que possuem pronunciadas atividades biológicas e que ocorrem em Ixoroideae pode-se citar a genipina. Segundo os estudos de Djerassi e colaboradores (1960) a genipina pode ser encontrada nos frutos de *Genipa americana* e em investigações posteriores Ono e colaboradores (2005) também observaram a presença outros iridoides glicosilados presentes nos frutos. Dentre as atividades biológicas da genipina destaca-se a atividade antiangiogênica, Koo e colaboradores (2004) observaram que frente ao ensaio utilizando membrana corioalantóica (CAM) de ovos fertilizados de *Gallus domesticus*, a genipina possuía a capacidade de inibir o crescimento vascular ao redor do disco em que estava impregnada e na concentração de 10 µg/ovo tinha a mesma atividade que o controle positivo utilizado (ácido retinóico na concentração de 1 µg/ovo).

Figura 4. Imagem do fruto de *Genipa americana*.



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Acesso em 30 de agosto de 2021. Disponível: < <http://www.tropicos.org/Image/81840>>. Fotografia: O.M. Montiel CC-BY-NC-AS.

Além dos iridoides, são encontradas outras classes de metabólitos entre as espécies de Ixoroideae. Em sua revisão Moreira e colaboradores (2015) observaram que na tribo Condamineeae a maioria dos gêneros que apresentavam atividade biológica possuíam indícios ou a presença de alcaloides que poderiam estar relacionados às atividades constatadas, sendo que dos alcaloides relatados a maioria é baseada no esqueleto de alcaloides indólicos, os quais são considerados marcadores quimiotaxonômicos para a família (Bolzani et al. 2001). No

entanto, algumas espécies da tribo Condamineae carecem de estudos químicos e biológicos, tendo em vista o interesse nos metabólitos bioativos que podem ser encontrados entre os gêneros dessa tribo.

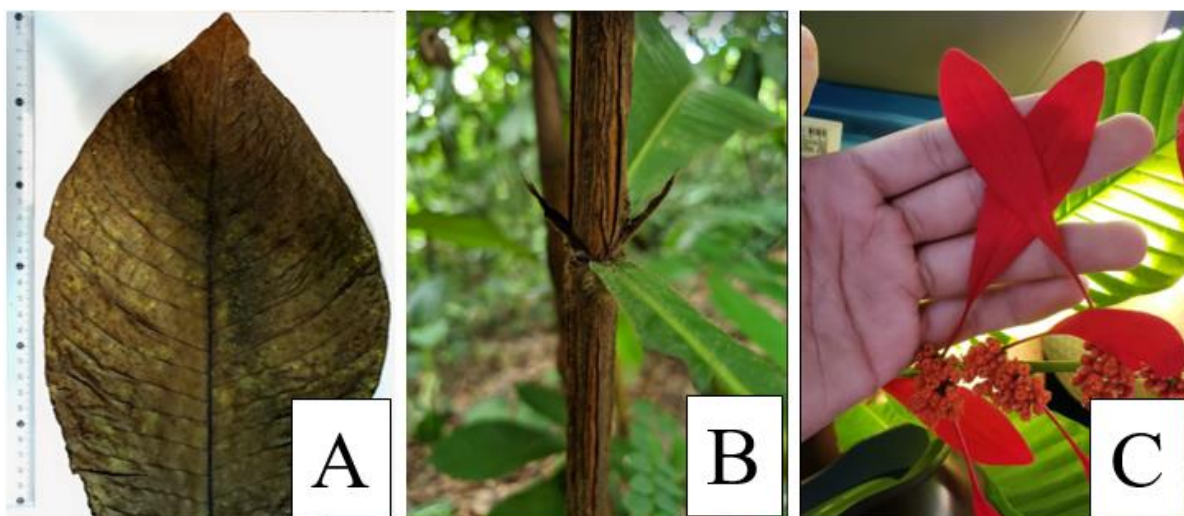
2.3 Gênero *Warszewiczia*

Em Ixoroideae, pode-se citar o gênero *Warszewiczia* spp., pertencente a tribo Condamineae (Kainulainen et al. 2010). Segundo as informações contidas em Flora do Brasil 2020 (2022), o gênero possui 8 espécies atualmente descritas: *Warszewiczia ambigua* Standl., *W. coccinea* (Vahl) Klotzsch, *W. elata* Ducke, *W. cordata* Spruce ex K.Schum., *W. longistaminea* K.Schum., *W. schwackei* K.Schum., *W. peltata* Wedd., *W. uxpanapensis* (Lorence) C.M.Taylor.

As plantas deste gênero possuem aspectos morfológicos característicos. Em geral, podem ser encontradas como árvores ou arbustos. Suas folhas são opostas, pecioladas, decussadas (quando as folhas formam cruz com os nós contíguos, inferior e superior). As inflorescências são terminais e as vezes surgem nas axilas das folhas distais, frequentemente com eixos racemosos ou espiciformes. Os frutos podem se apresentar capsulares, globosos, subglobosos ou turbinados, lenhosos ou cartáceos, deiscência septícida. As sementes podem ser numerosas, comprimidas ou angulosas (Taylor et al. 2007).

Para a espécie alvo deste estudo: *Warszewiczia coccinea*, são relatadas árvores pequenas ou arbustos, as folhas podem possuir tamanho de 40 a 65 cm, com bases agudas e ápices em formato de lança, as estípulas surgem entre as folhas que são suportados por um pecíolo curto com aumento na base. As flores são hermafroditas e as inflorescências da espécie são extremamente chamativas, possuindo brácteas avermelhadas (Duncan 2007). Na Figura 5 é representada a folha seca, estípulas e a inflorescência.

Figura 5: Imagens da espécie *Warszewiczia coccinea*. (A) Folha seca, (B) ramos com representação das estípulas, (C) brácteas das inflorescências.



Fonte: Acervo pessoal.

2.3.1 Aspectos fitoquímicos e atividades biológicas do gênero *Warszewiczia*.

Na literatura consultada nas bases de pesquisa acadêmicas CAS SciFinder, ScienceDirect e PubMed sobre estudos químicos e biológicos das espécies do gênero *Warszewiczia* estão indicados na Tabela 1. Somente as espécies *Warszewiczia coccinea*, *W. cordata* e *W. schwackei* apresentam estudos prévios. Para o gênero são encontrados somente 6 estudos.

A espécie escolhida para a presente dissertação, a *Warszewiczia coccinea*, apresenta poucos estudos químicos e biológicos prévios (Tabela 1). Mohammed e Seaforth (1981) relatam a identificação de um flavonoide: cianidina 3-*O*-glucosídeo (12) presente nos extratos. Calderón e colaboradores (2009) isolaram dois triterpenos a partir de fracionamento bioguiado dos ramos, denominados ácido 6 β ,19 α -diidroxirsólico (10) e ácido sumaresinólico (11) (Figura 6), os quais de acordo com os autores foram capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, alvo farmacológico no tratamento de Alzheimer.

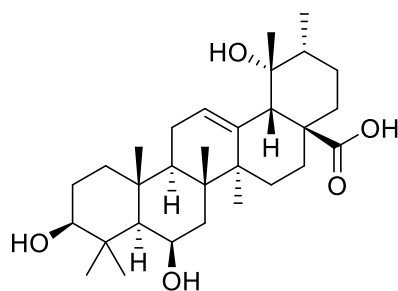
Rahgozar e colaboradores (2018) observaram em seu estudo, com abordagem de quimioinformática, que o ácido sumaresinólico poderia apresentar atividade antimicobacteriana ou sinergismo com outras drogas frente a *Mycobacterium bovis*, visto que esta substância apresentava semelhança estrutural ao ácido oleanólico, que segundo os autores apresenta a

atividade biológica. No entanto, considerando os dados publicados na literatura, até o momento não há estudos que relatem atividade antimicobacteriana para a espécie *W. coccinea*.

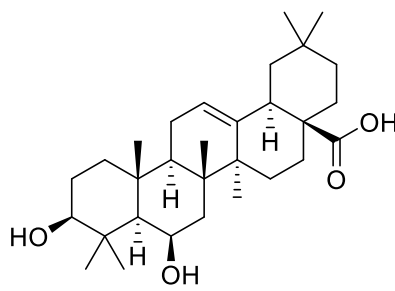
Tabela 1: Substâncias e atividades biológicas disponíveis na literatura consultada para as espécies do gênero *Warszewiczia* Klotzsch.

Espécie	Parte estudada	Atividade biológica	Substâncias	Referências
<i>Warszewiczia coccinea</i>	Folhas	Antioxidante	Presença de polifenóis	(Radice et al. 2017)
<i>Warszewiczia coccinea</i>	Cascas	Atividade antileishmania frente a <i>Leishmania amazonensis</i> (<i>in vitro</i>)	-	(Céline et al. 2009)
<i>Warszewiczia coccinea</i>	Caules	Antioxidante e Inibição de acetilcolinesterase, <i>in vitro</i>	Terpenos: ácido 6 β ,19 α -diidroxirsólido e ácido sumaresinólico	(Calderón et al. 2009)
<i>Warszewiczia coccinea</i>	-	-	Antocianidina: cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo	(Mohammed e Seaforth 1981)
<i>Warszewiczia cordata</i>	Ramos	Atividade antileishmania frente a <i>Leishmania amazonensis</i> (<i>in vitro</i>)	-	(Estevez et al. 2007)
<i>Warszewiczia schwackei</i>	Folhas	Atividade antioxidante frente à DPPH e Fe ³⁺ /Fenantrolina; Atividade antimicobacteriana frente a <i>M. tuberculosis</i> ; Atividade antimalárica frente a <i>P. falciparum</i> ; Atividade antiangiogênica.	Esteróide: β -sitosterol Terpenos: Esqualeno Alcaloides: Triptamina; Tetrahydroharmano; Ochrolifuanina; 1- (2 - aminofenil) etanol Flavonoide: catequina	(Fachin-Espinar e Nunez. 2019)

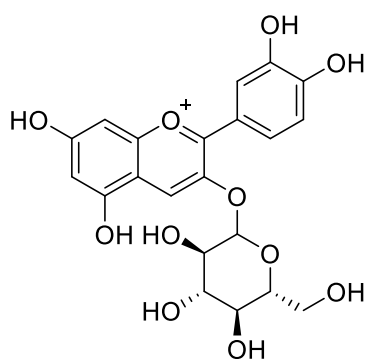
Figura 6: Metabólitos descritos em *Warszewiczia coccinea*.



ácido 6β, 19α – diidroxiursólico (10)



ácido sumaresinólico (11)



cianidina 3- O – glicosídeo (12)

As atividades biológicas que são observadas na espécie *Warszewiczia coccinea* são: antioxidante (Calderón et al. 2009; Radice et al. 2017, inibição da acetilcolinesterase (*in vitro*) (Calderón et al. 2009) e atividade antileishmania frente a formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (*in vitro*) (Estevez et al. 2007). Radice e colaboradores (2017) apresentam em seu estudo que o extrato hidroalcólico das folhas apresentou atividade antioxidante, frente ao padrão de ácido gálico, a qual poderia estar relacionada com os polifenóis presentes no extrato avaliado. Calderón e colaboradores (2009) relatam em seu estudo que o extrato etanólico dos caules mostrou fraca atividade antioxidante (utilizando o ensaio de sequestro de radicais livres - DPPH) e forte inibição da acetilcolinesterase *in vitro*. Céline e colaboradores (2009) observaram que os extratos preparados a partir das cascas em maceração com etanol (95%) em temperatura ambiente, também demonstraram moderada atividade antileishmania.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Investigar a composição química e avaliar o potencial biológico dos extratos e frações obtidos de *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os extratos quanto a composição química e as atividades biológicas: antimicrobiana, antioxidante, toxicidade frente a *Artemia salina* e angiogênese.
- Analisar as frações provenientes dos extratos que apresentarem atividade biológica significativas ou que possuam indícios de classes químicas de metabólitos interessantes para bioprospecção.
- Identificar ou elucidar a estrutura molecular de metabólitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS



4.1 Especificação de equipamentos e materiais

- **Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN):** Fabricante Bruker BioSpin AG, Modelo Fourier 300 UltraShield, com frequência de 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C). Sonda EASYPROBE DUL 300MHz S1 5mm Z-GRADIENT.
- **Espectrômetro de massas:** Fabricante Bruker Daltonics, Modelo Amazon Speed, analisador de massas: Ion Trap, Fonte: ESI em modo positivo e negativo.
- **Cromatógrafo líquido (hifenado ao Espectrômetro de Massas – UPLC/MS):** Modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20A.
- **Espectrofotômetro para leitura de placas de 96 poços:** Thermo Scientific, Multiskan GO.
- **Espectrofotômetro:** Femto, modelo Cirrus 80ST.
- **Banho de ultrassom:** UNIQUE, modelo USC-2800, Frequência US: 40 MHz.
- **Balança analítica:** Shimadzu, modelo: AUY220.
- **Rota evaporador:** Fisatom®, modelo 550.
- **Incubadora de ovos:** Juli, Chocmaster®.
- **Estufa com circulação e renovação de ar:** Tecnal, Modelo TE-394-2.
- **Solventes:** Foram utilizados os solventes Hexano, Diclorometano, Acetato de etila, Etanol, Metanol e Acetona grau comercial, sendo estes destilados no laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).
- **Cromatoplasmas de sílica gel 60:** MACHEREY-NAGEL-MN®. Com indicador de fluorescência 254 nm, espessura de 0,20 mm em folhas de alumínio.
- **Sílica para fase estacionária:** Sílica gel 60, 230-400 Mesh (MERCK®)
- **Sephadex para fase estacionária:** Sigma-Aldrich, Sephadex LH-20.
- **Florisil para fase estacionária:** Sigma-Aldrich, Florisil® 100-200 Mesh.
- **Alumina para fase estacionária:** Sigma-Aldrich, Oxide Aluminum type WN-3, Neutra.

4.2 Coleta e Identificação

Foram coletados folhas, ramos e brácteas de dois indivíduos da espécie *Warszewiczia coccinea*, localizados no campus I do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. O indivíduo que foram coletados folhas e ramos, teve sua exsicata depositada com o número de coletor CRISPIM, G.S 11 e número de registro 283507, sendo coletado no dia 30 de março de 2019 (3°05'46''S 59°59'17''W ao lado do prédio da fitoquímica-CPPN). O indivíduo que foram coletadas as brácteas das inflorescências, teve sua exsicata depositada no mesmo herbário com o número de coletor CRISPIM, G.S 12 e número de registro 285835, sendo coletado no dia 25 de setembro de 2019 (3°05'50''S 59°59'11''W atrás da Casa da Ciência, Bosque da Ciência). O trabalho foi registrado no SISGEN sob o número: A85ED6B.

Figura 7: Etiquetas das exsicatas depositadas em herbário.

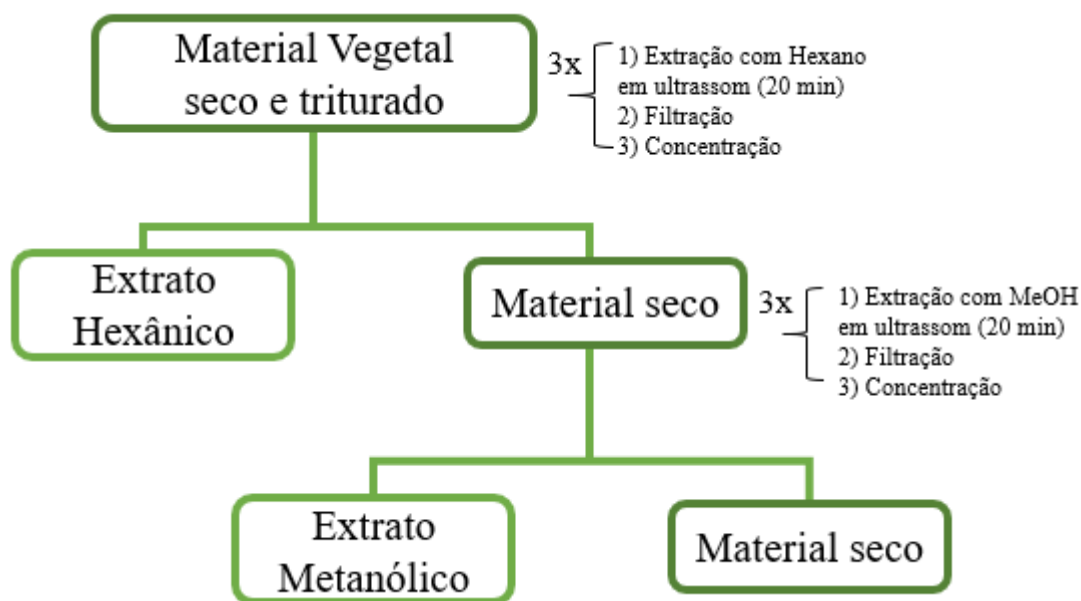
 INPA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA		 INPA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA	
Plantas - Amazonas		Plantas - Amazonas	
INPA Nº 283507		INPA Nº 285835	
RUBIACEAE		RUBIACEAE	
<i>Warszewiczia coccinea</i> (Vahl) Klotzsch		<i>Warszewiczia coccinea</i> (Vahl) Klotzsch	
Arbustiva, 5m de altura; Inflorescência associada com brácteas florais avermelhadas, muito chamativas; Folhas jovens apresentam tricomas; Sem látex.		Det: 0	
Brasil, Amazonas, Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Campus Aleixo I; Ao Lado do prédio da fitoquímica-CPPN.		Arvoreta; 15m de altura; Fértil; Inflorescências com brácteas vermelhas; Folhas jovens com tricomas; Sem látex.	
Terra marrom, recoberto por folhas.		Brasil, Amazonas, Manaus, Campus do INPA; Bosque da Ciência, atrás da Casa da Ciência, lanchonete.	
3°05'46" S, 59°59'17" W		Terra firme, solo argiloso	
Crispim, G.S. 11		3°05'50" S, 59°59'11" W	
com: Carvalho, A.B.		Crispim, G.S. 12	
		com: Carvalho, A.B.	
Data: 30 Mar 2019		Data: 25 set 2019	

4.3 Obtenção dos Extratos

O material vegetal (MV) coletado foi separado em folhas, ramos e das inflorescências foram separadas as brácteas, os quais foram secos em sala de temperatura controlada. Após a secagem foi utilizado moinho de martelo para triturar as folhas e os ramos e moinho de facas para triturar as brácteas. As partes vegetais foram extraídas com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano (Hex) e metanol (MeOH) utilizando maceração em banho de ultrassom (40 MHz) por 20 min, adotando-se no mínimo 3 extrações e obedecendo a proporção

de 1 g de MV para 3 mL de solvente (1 g/3 mL). Os extratos foram concentrados em rotaevaporador, em temperatura >50 °C. Ao final os extratos foram armazenados na extratoteca do Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção – INPA (LABB/INPA).

Figura 8: Fluxograma da preparação dos extratos.



4.4 Análises fitoquímicas

4.4.1 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada comparativa

Inicialmente, os extratos obtidos foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) para detecção das classes químicas presentes e avaliar o perfil de separação. As amostras foram solubilizadas em solventes voláteis e aplicadas em cromatoplasas que posteriormente foram eluídas em sistemas de solvente apropriados às características químicas das mesmas. Em sequência, as cromatoplasas eluídas foram submetidas a reveladores físicos e químicos para identificação preliminar das substâncias e perfil cromatográfico dos extratos.

Utilizaram-se reveladores físicos: luz ultravioleta (λ : 254 e 365 nm) para a detecção de cromóforos que indicam duplas ligações ou duplas conjugadas e reveladores químicos: anisaldeído sulfúrico para detecção de terpenos e outras substâncias, FeCl_3 para detecção de substâncias fenólicas, AlCl_3 e NP-PEG para observar indícios de flavonoides, KOH para

detecção de quinonas e reagente de Dragendorff para detecção de substâncias nitrogenadas como alcaloides. Portanto, ao final da revelação foi possível observar indícios de classes químicas presentes nos extratos (Collins et al. 2006).

4.4.2 Análise dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H)

Os extratos brutos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) operando a 300 MHz para núcleos de ^1H . Para o preparo das amostras foram utilizados 30 mg de cada extrato bruto que foram dissolvidos em 500 μL de solventes deuterados contendo TMS para referência interna, sendo utilizado CDCl_3 para os extratos hexânicos e $\text{DMSO}-d_6$ para os extratos metanólicos. Os espectros obtidos foram processados e analisados através do software Bruker® TopSpin (v3.6.4). As análises foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN/INPA).

Para auxiliar na interpretação dos espectros foram utilizados dados da literatura sobre a quimiossistemática da família para caracterização química dos extratos brutos.

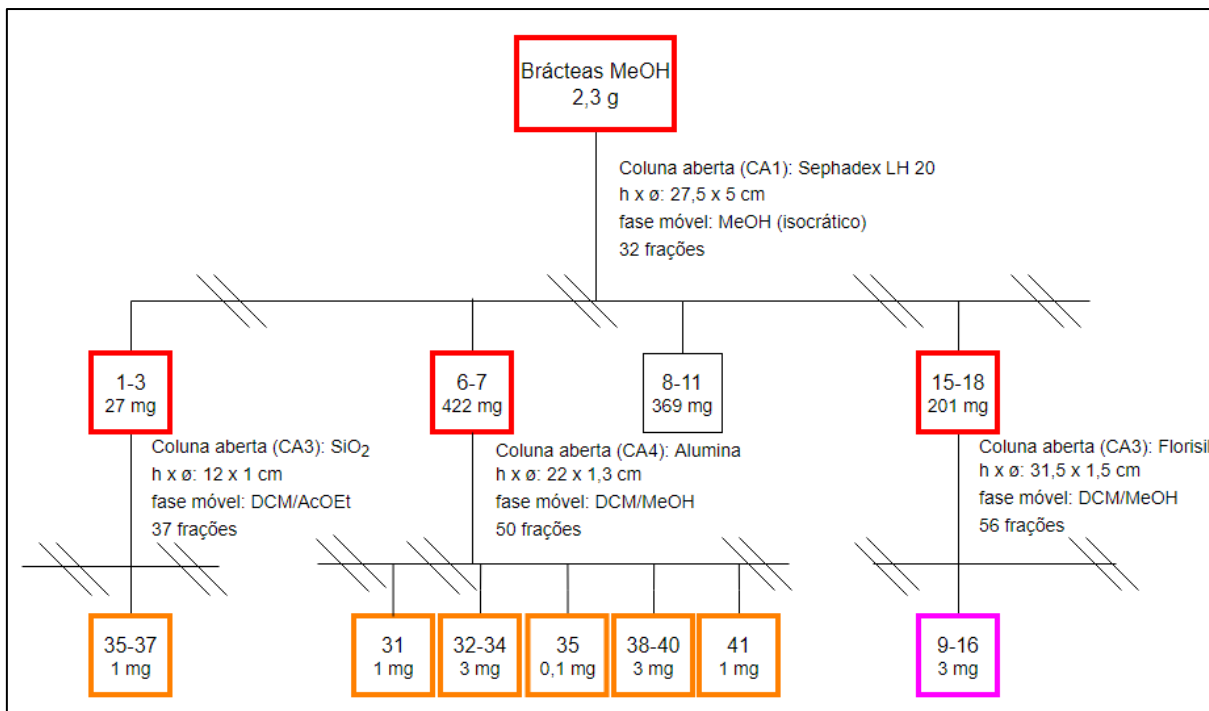
4.5 Fracionamento cromatográfico dos extratos

Os extratos metanólicos de folhas e brácteas foram fracionados através de métodos cromatográficos, como cromatografia líquida em coluna aberta (CCA), em camada delgada preparativa (CCDP), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a partição líquido-líquido, visando a obtenção de frações que apresentassem indícios de substâncias presentes nos respectivos extratos.

4.5.1 Fracionamento dos extratos metanólicos das brácteas

O extrato metanólico das brácteas (2,3 g) foi selecionado para o primeiro fracionamento em coluna aberta (h x ϕ : 27,5 x 5 cm) utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel MeOH em eluição isocrática. Sendo coletada 100 mL para cada fração e obtendo-se 32 frações que foram analisadas por CCDC e reunidas por semelhanças na constituição química (Figura 9).

Figura 9: Fluxograma do fracionamento do extrato MeOH das brácteas.



A fração 15-18 foi analisada por CCDC e apresentava indícios de substâncias aromáticas e terpenos, e em sequência foi fracionada 201 mg da amostra em coluna aberta (h x ø: 31,5 x 1,5 cm) utilizando com fase estacionária Florisil (26 g), e fase móvel sistemas binários de DCM/MeOH, com eluição em ordem crescente de polaridade. Para cada sistema utilizado na eluição, foi utilizado 100 mL. Sendo coletado 20 mL em cada fração e obtendo-se 56 frações (Tabela 2).

Tabela 2: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 15-18.

Sistema de eluição	Frações coletadas
DCM/MeOH 9:1	1-15
DCM/MeOH 8:2	16-25
DCM/MeOH 7:3	26-34
DCM/MeOH 1:1	35-43
DCM/MeOH 3:7	44-48
MeOH 100 %	49-56

Ao final da coluna cromatográfica, as frações 9 a 16 foram analisadas por CCDC e quando reveladas com anisaldeído, vanilina sulfúrica e $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ indicaram a presença de terpenos. No entanto a pouca quantidade massa da amostra (3 mg) obtida não permitiu a caracterização da substância a partir das análises por RMN.

Em sequência, as frações 1-3 obtidas da primeira coluna, foram analisadas por CCDC e reunidas para serem fracionadas (Figura 9). Essa fração (27 mg) foi submetida a cromatografia em coluna aberta (h x ø: 12 x 1 cm) utilizando sílica gel (3 g) como fase estacionária e como fase móvel sistema binário de solventes DCM, AcOEt e MeOH, com eluição em ordem crescente de polaridade. Para cada sistema utilizado na eluição, foi utilizado 50 mL, sendo coletado 10 mL em cada fração e obtendo-se 37 frações (Tabela 3).

Tabela 3: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 1-3.

Sistema de eluição	Frações coletadas
DCM/AcOEt 9:1	1-5
DCM/AcOEt 8:2	6-9
DCM/AcOEt 7:3	10-13
DCM/AcOEt 1:1	14-18
DCM/AcOEt 3:7	19-21
AcOEt 100%	22-24
AcOEt/MeOH 9:1	25-29
AcOEt/MeOH 7:3	30-32
AcOEt/MeOH 1:1	33-34
MeOH 100 %	35-37

As frações resultantes 35-37 foram analisadas por CCDC e quando reveladas com Dragendorff, apresentavam bandas na coloração laranja, que sugeriu a presença de alcaloides. Contudo, o fracionamento resultou em pouca quantidade de massa, inviabilizando a caracterização por análises em RMN.

Também foi realizado o fracionamento das frações 6-7, reunidas da primeira coluna (Figura 10). Essas frações (422 mg) foram submetidas a cromatografia em coluna aberta (h x ø: 22 x 1,3 cm) utilizando Alumina (45 g) como fase estacionária, e como fase móvel mistura de sistema binário dos solventes DCM e MeOH, com eluição em ordem crescente de polaridade. Para cada sistema utilizado na eluição, foi utilizado 100 mL, sendo coletado 20 mL em cada fração e obtendo-se 50 frações (Tabela 4).

Tabela 4: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 6-7

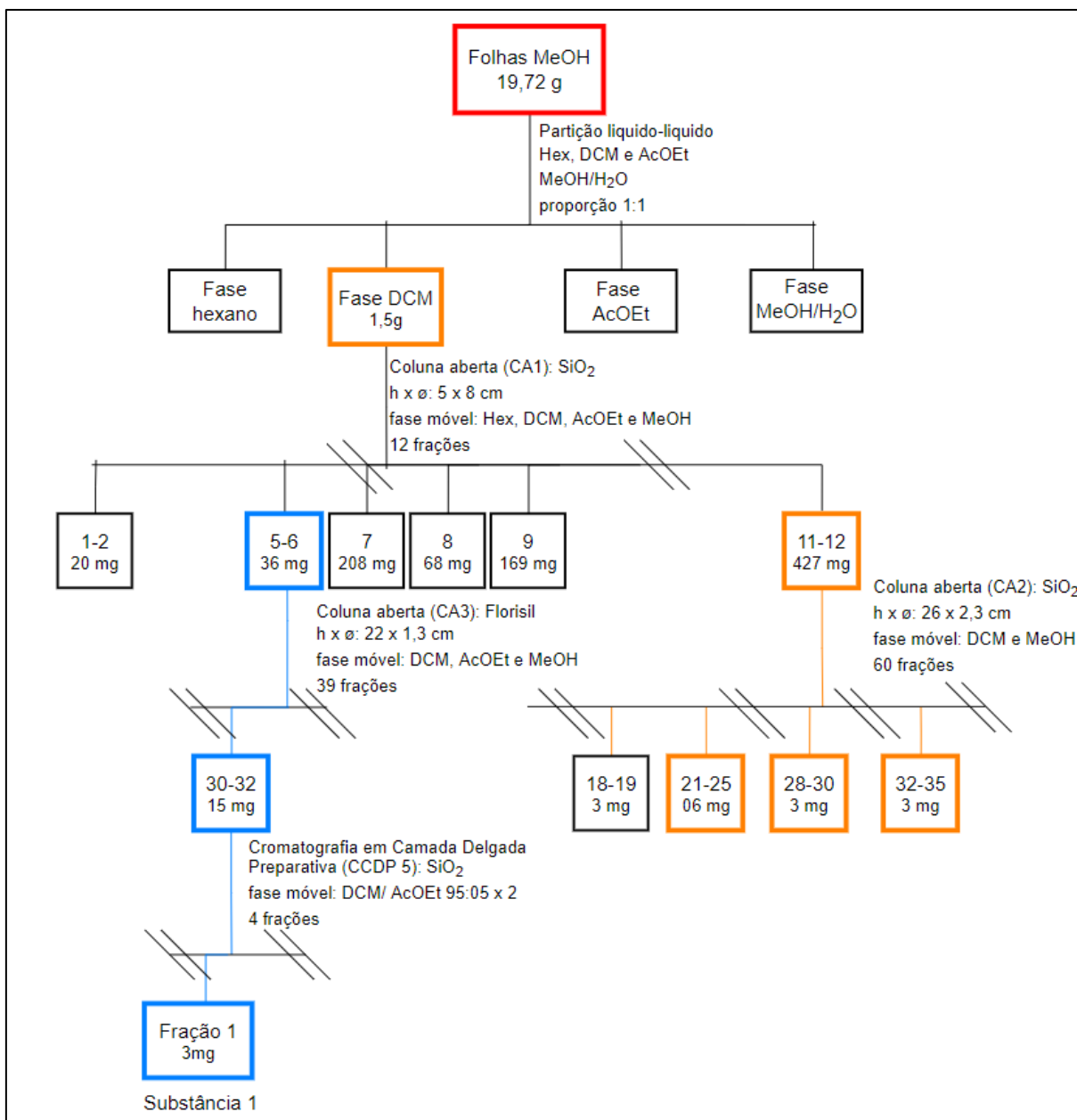
Sistema de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-3
DCM/MeOH 99:01	4-9
DCM/MeOH 97:03	10-14
DCM/MeOH 95:05	15-19
DCM/MeOH 9:1	20-24
DCM/MeOH 8:2	25-29
DCM/MeOH 7:3	30-34
DCM/MeOH 1:1	35-39
MeOH 100 %	40-50

As frações resultantes 31, 32-34, 35, 38-40, 41 foram analisadas por CCDC e quando reveladas com Dragendorff, apresentavam bandas na coloração laranja o que sugere a presença de alcaloides. Contudo, o fracionamento resultou em pouca quantidade de massa (menos que 3 mg) e as frações ainda apresentavam intensa mistura, inviabilizando a caracterização por análises em RMN.

4.5.2 Fracionamento dos extratos metanólicos das folhas

O extrato metanólico das folhas foi submetido ao fracionamento cromatográfico (Figura 10). Inicialmente 19,72 gramas desse extrato foi utilizado para ser fracionado em partição líquido-líquido, onde a amostra foi solubilizada em uma mistura de MeOH/H₂O (1:1 v/v), obedecendo a proporção de 1 g de amostra para 50 mL de mistura hidrometanólica. Posteriormente, a fase hidrometanólica foi particionada com solventes hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) obtendo-se 4 fases ao final.

Figura 10: Fluxograma do fracionamento do extrato MeOH das folhas.



Após análises por CCDC, a fase DCM foi fracionada em cromatografia por coluna aberta, com 1,5 g da amostra em uma coluna larga (h x ø: 5 x 8 cm) para separação inicial, utilizando sílica gel (150 g) como fase estacionária, e fase móvel mistura de sistemas binários de Hex, DCM, AcOEt e MeOH, com eluição em ordem crescente de polaridade. Para cada sistema utilizado na eluição, foi utilizado 300 mL, sendo coletado 200 mL em cada fração e obtendo-se 12 frações (Tabela 5).

Tabela 5: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fase DCM

Sistema de eluição	Frações coletadas
HEX/DCM 1:1	1
DCM 100%	2
DCM/AcOEt 9:1	3
DCM/AcOEt 7:3	4-6
DCM/AcOEt 1:1	7
AcOEt 100%	8
AcOEt/MeOH 9:1	9
AcOEt/MeOH 7:3	10
AcOEt/MeOH 1:1	11
MeOH 100%	12

As frações 11 e 12 foram analisadas por CCDC e quando reveladas com reagente de Dragendorff apresentava bandas de coloração laranja, indicando a presença de alcaloides, sendo reunidas e em sequência foi fracionada a amostra (427 mg) em coluna aberta (h x ø: 26 x 2,3 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (45,38 g), e fase móvel sistemas binários de DCM e MeOH, com eluição em ordem crescente de polaridade. Foi utilizado 100 mL de volume para cada sistema de eluição, sendo coletado 20 mL em cada fração e obtendo-se 60 frações (Tabela 6).

Tabela 6: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 11-12

Sistema de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-10
DCM/MeOH 95:05	11-20
DCM/MeOH 9:1	21-28
DCM/MeOH 85:15	29-37
DCM/MeOH 8:2	38-46
DCM/MeOH 7:3	47-50
DCM/MeOH 1:1	51-54
MeOH 100%	55-60

As frações resultantes 21-25, 28-30, 33-35 foram analisadas por CCDC e quando reveladas com Dragendorff, apresentaram bandas na coloração laranja o que sugere a presença de alcaloides nessas amostras. Contudo, o fracionamento resultou em pouca quantidade de massa (menos que 3 mg) e as frações ainda apresentavam intensa mistura, inviabilizando a caracterização por análises em RMN.

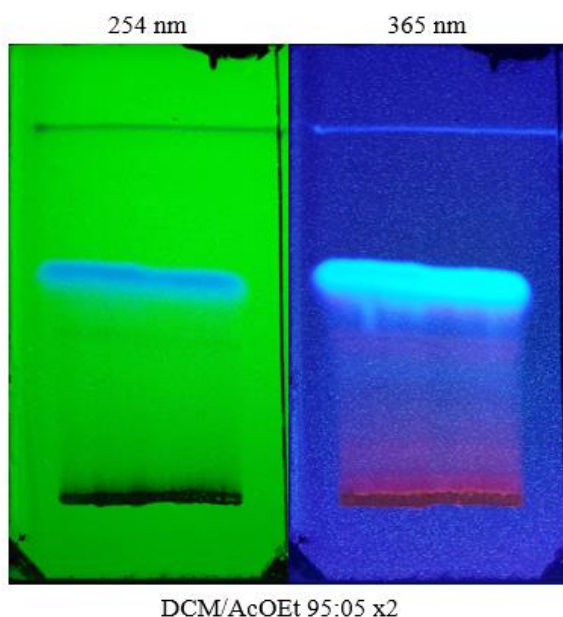
Em sequência: as frações 5-6, obtidas da primeira coluna, foram analisadas por CCDC e reunidas para serem fracionadas (Figura 10). Essas frações (36 mg) foram submetida a cromatografia em coluna aberta (h x ø: 22 x 1,3 cm) utilizando Florisil (11,71 g) como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de sistema binário dos solventes DCM, AcOEt e MeOH, com eluição em ordem crescente de polaridade. Para cada sistema utilizado na eluição, foi utilizado 50 mL. Sendo coletado 10 mL em cada fração e obtendo-se 39 frações (Tabela 7).

Tabela 7: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento das frações 5-6.

Sistema de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-7
DCM/AcOEt 95:05	8-18
DCM/AcOEt 9:1	19-22
DCM/AcOEt 8:2	23-24
DCM/AcOEt 7:3	25-27
DCM/AcOEt 1:1	27-29
AcOEt 100%	30-33
AcOEt/MeOH 9:1	34-35
AcOEt/MeOH 7:3	36-37
AcOEt/MeOH 1:1	38
MeOH 100%	39

Ao final do fracionamento, as frações 30-32 foram submetidas a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando sílica gel com 13% de gesso, sendo utilizada 15 mg de amostra eluída duas vezes em DCM/AcOEt 95:05 em uma placa preparativa com 20 cm de altura por 10 cm de largura. Ao final da eluição, a placa foi colocada sob luz ultravioleta 365 nm e 254 nm e foram observadas 4 bandas, sendo que a banda que possuía Rf: 0,5 e intensa fluorescência azul foi delimitada e retirada da placa, sendo denominada como fração 1, como observada na Figura 11. A amostra resultante foi analisada por LC/MS e RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais e pode-se identificar a substância I: escopoletina.

Figura 11: Fotografia da placa de CCDP demonstrando a banda com intensa fluorescência azulada.



Fonte: Acervo pessoal

4.6 Análise química de frações e substância isolada.

A caracterização substância isolada foi realizada através de análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, aliada a dados de literatura. Para a análise da massa molecular foi utilizada a espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC/MS) em modo positivo e negativo com fonte Electrospray (ESI), sendo eluída em coluna C18 com sistema de eluição em H_2O (0,1% Ácido Fórmico) /ACN (81,25: 18,75).

A fração 33-35 foi analisada por CCDC e RMN de ^1H , aliada a dados de literatura. Para análise da massa molecular foi utilizada a espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC/MS) em modo positivo e o íon mais abundante foi fragmentado. A amostra foi eluída em coluna C18 com sistema de eluição em H_2O (0,1% Ácido Fórmico) /MeOH (69,25: 30,75).

4.7 Atividade antimicrobiana

Foi adotado o ensaio de micro diluição em caldo (MIC), que apresenta 30% mais sensibilidade em comparação a outras metodologias (Eloff 1998). Embora, o MIC apresente

limitações, suas vantagens o tornam um método rápido e sensível para avaliar a sensibilidade de substâncias antimicrobianas a partir de plantas (Ostrosky et al. 2008).

As linhagens de microrganismos utilizadas neste ensaio foram: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Edwardsella tarda* (ATCC 15947), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os quais foram doados pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz. Armazenadas no Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção – INPA (LABB/INPA). Os microrganismos foram reativados previamente através de uma incubação em caldo Müeller-Hinton por 16 a 24 horas.

Para esse ensaio foram utilizadas as orientações adaptadas que são recomendadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015) para ensaios *in vitro* de sensibilidade à antimicrobianos.

Após o crescimento dos microrganismos foram preparados os respectivos inóculos padronizados. Com auxílio de um espectrofotômetro a 625 nm realizou-se a padronização dos inóculos com turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland, tendo uma absorbância entre 0,08 a 0,10 que representa uma suspensão de microrganismos à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, em seguida os inóculos padronizados foram diluídos 20 vezes para retirar as alíquotas para o ensaio em micro poços, em placa de 96 poços.

As amostras de extratos foram solubilizadas previamente em DMSO a 5% e em seguida diluídas sucessivamente em caldo Müeller-Hinton, sendo utilizado uma concentração de 1000 µg/mL dos extratos para análise. Utilizando placas de 96 poços, foram adicionados aos poços testes 90 µL de caldo Müeller-Hinton com os extratos na concentração de 1000 µg/mL e uma alíquota de 10 µL dos inóculos dos microrganismos, para avaliação. Para o controle positivo (CP) foram utilizados 90 µL do antimicrobiano oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL e 10 µL de inóculo. Para o controle negativo (CN) foram utilizados 90 µL de caldo Müeller-Hinton com DMSO a 5% e 10 µL de inóculo. As amostras analisadas e os controles foram preparados em triplicata.

Em seguida, as placas de 96 poços foram incubadas a $\pm 37^\circ\text{C}$ por 16 à 24 horas. As placas preparadas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro (λ : 625 nm) antes e depois

da incubação apropriada. Sendo ao final, reveladas com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (MTT) para verificar a viabilidade celular.

Os dados obtidos foram processados e analisados com auxílio dos softwares GraphPad Prism (v5.01) e Excel®.

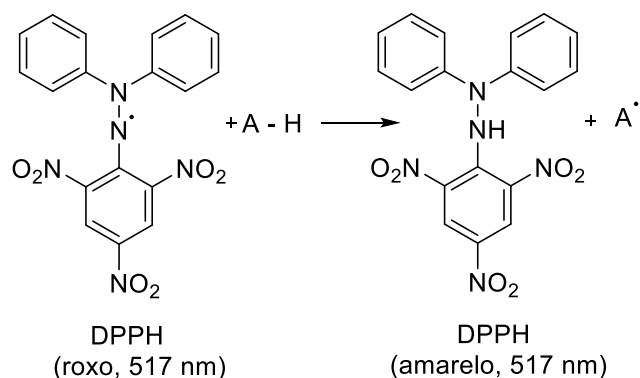
4.8 Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada a partir dos modelos de bioensaios: DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina, conforme utilizado por Novaes e Nunez (2008). As atividades antioxidante das amostras testadas foram comparadas com as do ácido ascórbico, como referência de antioxidante para o ensaio. Cada amostra foi avaliada em triplicata (Martins et al. 2014).

Para iniciar o ensaio foi obtida a curva de calibração para o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) e para Fe^{3+} /fenantrolina. Sendo preparadas as soluções de: DPPH (28 $\mu\text{g/mL}$), Fe^{3+} , 1,10-fenantrolina 0,25%. Uma solução estoque de ácido ascórbico com água deionizada na concentração de 900 $\mu\text{g/mL}$ foi preparada, a partir da qual foram feitas seis alíquotas nas concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e 720 $\mu\text{g/mL}$. Para obtenção da curva de calibração com DPPH, adicionou-se em seis micro tubos 990 μL de DPPH, mais 10 μL das alíquotas de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm. Para a obtenção da curva de calibração de Fe^{3+} /fenantrolina, foram adicionados em seis novos microtubos 10 μL das alíquotas de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, mais 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} e 980 μL da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 1 hora, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 508 nm.

A avaliação da atividade antioxidante das amostras frente a radical livre foi realizada utilizando o método com DPPH, o qual é considerado um radical estável que permite avaliar a capacidade de substâncias como sequestradores de radicais livres. Quando o DPPH recebe um elétron, ou um radical hidrogênio, torna-se um composto mais estável e sua absorbância diminui. Para determinação da absorbância da reação entre o DPPH e os extratos foram utilizados 990 μL de DPPH (28 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) e 10 μL da solução das amostras teste (de extratos ou frações) a uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. Como controle negativo foram utilizados 990 μL de DPPH (28 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) e 10 μL de água deionizada. Após 30 minutos, foi realizada uma leitura da absorbância em espectrofotômetro (λ : 517 nm).

Figura 12: Reação antioxidante com o radical de DPPH



Foi utilizado adicionalmente o método com Fe^{3+} /fenantrolina para avaliar a atividade antioxidante. Esta metodologia justifica-se por permitir avaliar a capacidade que tem alguns tipos de antioxidantes de agirem como agentes quelantes, complexando íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhados na sua estrutura promove a ação de complexação. Para esta metodologia foram utilizados 980 μL da solução de 1,10-fenantrolina, adicionando-se 10 μL da solução de Fe^{3+} , e ao final, foi adicionado 10 μL da solução das amostras teste (extratos ou frações) a uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo foi utilizado uma solução de 1,10-fenantrolina mais 10 μL da solução de Fe^{3+} e 10 μL de água deionizada. Após 1 hora, foi realizada uma leitura da absorbância em espectrofotômetro (λ : 508 nm).

Em ambas as metodologias as amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos em equivalência com ácido ascórbico (Martins e colaboradores (2014)).

4.9 Toxicidade frente a *Artemia salina*

O ensaio foi executado segundo a metodologia de Meyer et al. (1982), utilizando cistos de *Artemia salina* em solução salina (3,8%) para eclosão em temperatura ambiente por 48 horas, sob iluminação com lâmpada fluorescente. Após a eclosão, 10 larvas foram distribuídas em cada poço teste, aos quais foram adicionadas as amostras, em concentrações na ordem decrescente, iniciando com 1000 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. Todos os poços permaneceram sob as mesmas condições para avaliação de sobrevivência das larvas após 24 h. Adotando-se como controle negativo a solução salina com DMSO 5%.

Os resultados do ensaio foram expressos em porcentagem de letalidade, sendo consideradas ativas quanto a toxicidade as amostras que apresentam letalidade igual ou superior a 50%.

4.10 Angiogênese

A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada baseada na metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994) utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião de ovo de galinha (*Gallus domesticus*). Utilizando-se concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL dos extratos, sendo implantados em discos de metilcelulose, seguindo a metodologia descrita por Falcão-Bücker (2012).

Ovos fertilizados foram postos em uma incubadora automática e digital, na posição horizontal, à temperatura de 37,5 °C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação, uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo para que fosse possível aspirar aproximadamente 3 mL de clara para inibição da aderência dos embriões nas membranas ovulares. A quantidade de ovos teste fora em triplicata para cada tratamento e controles. Outra janela de 15 mm de diâmetro também foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões, sendo fechadas com fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72 h até a idade embrionária de 6 dias. Nesse momento foi colocado sobre a membrana corioalantóica um disco de metilcelulose (1,5%) embebido com uma alíquota de 10 µL dos extratos, nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL, diluídos com álcool etílico, sendo este disco implantado sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a mesma fita. A incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de 8 dias.

Para a análise da atividade angiogênica, a fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco, foram registrados com uma câmera fotográfica para posterior contagem de vasos sanguíneos que interceptaram o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão, sendo os valores representados em gráficos de histograma com auxílio do software GraphPad Prism (v5.01).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

Dos extratos obtidos, o extrato metanólico das brácteas apresentou o maior rendimento (17,34%) e em seguida o extrato metanólico das folhas (8,9%). Os extratos hexânicos de todas as partes vegetais tiveram pouco rendimento (inferior a 2%), sendo obtido 6,54 g de extrato hexânico a partir das folhas. Apesar do maior rendimento dos extratos metanólicos das brácteas, a quantidade de matéria prima vegetal utilizada para extração era menor, considerando a disponibilidade das brácteas nas inflorescências coletadas. O extrato metanólico das folhas apresentou a maior massa absoluta de material obtida após extração.

A quantidade de massa obtida em cada extrato está relacionada à composição e quantidade de substâncias presentes nas partes vegetais. O hexano consegue extrair substâncias apolares como ácidos graxos, terpenos, esteroides ou outras classes de substâncias que possam ter interação com esse solvente. É possível extrair substâncias de média e alta polaridade utilizando o metanol como solvente extrator, a exemplo: açúcares, clorofila, metabólitos glicosilados e substâncias polares que podem possuir abundância nas amostras e resultar na quantidade de massa obtida.

Tabela 8: Rendimento dos extratos obtidos

Parte Vegetal	Massa Material seco (g)	Massa Extrato Hex. (g)	Rendimento Hex. (%)	Massa Extrato MeOH (g)	Rendimento MeOH (%)
Folhas	501,1	6,54	1,3	32,78	6,56
Ramos	500	0,96	0,19	8,9	1,81
Brácteas	15,45	0,03	0,19	2,68	17,34

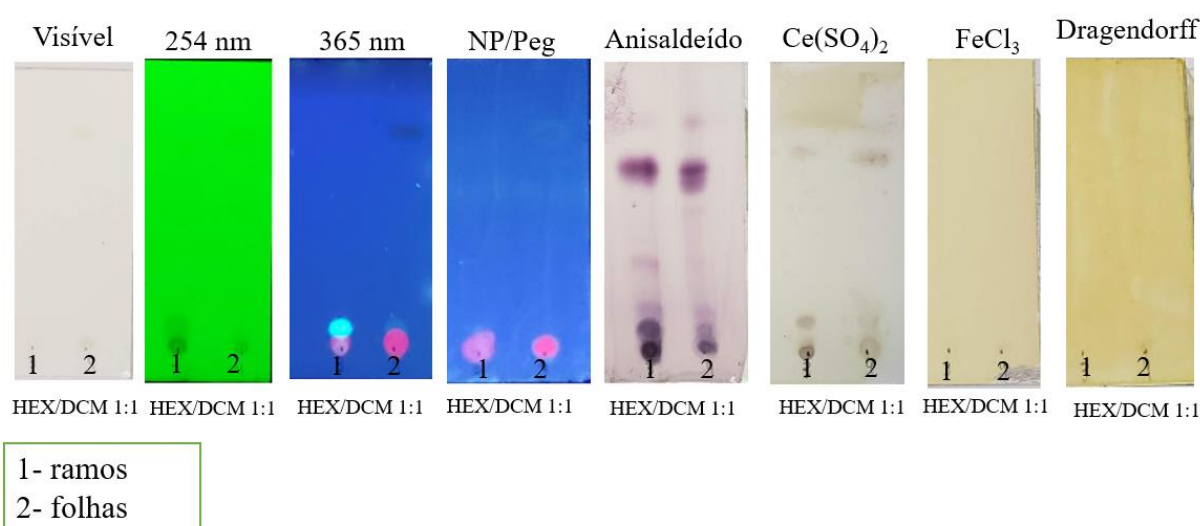
Diferentes órgãos vegetais podem apresentar semelhanças e diferenças nos rendimentos dos extratos dependendo da composição química em cada órgão. Nos extratos hexânicos dos ramos e das brácteas o rendimento foi semelhante e em ambos foi obtido uma massa menor que 1 g. Nos extratos metanólicos, todos os extratos apresentaram diferentes massas e rendimentos o que sugere diferenças quali e quantitativas nos metabólitos extraídos.

5.2 Análises cromatográfica dos extratos brutos e frações

Os extratos e frações foram analisados utilizando CCDC e revelados com reveladores químicos e físicos para observar o perfil cromatográfico e indícios das classes químicas presentes nas amostras.

Foi observado que após a eluição nas cromatoplas, os extratos hexânicos de ramos e folhas apresentaram indícios de terpenos. Quando reveladas em anisaldeído sulfúrico foi observada a presença de bandas cromatográficas na coloração lilás e rosa, indicativo de terpenos e quando revelados com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ foram observadas bandas na coloração marrom, confirmando a presença de terpenos nos extratos hexânicos de folhas e ramos (Figura 13).

Figura 13: Análise em CCDC dos extratos hexânicos de ramos e folhas de *Warszewiczia coccinea*

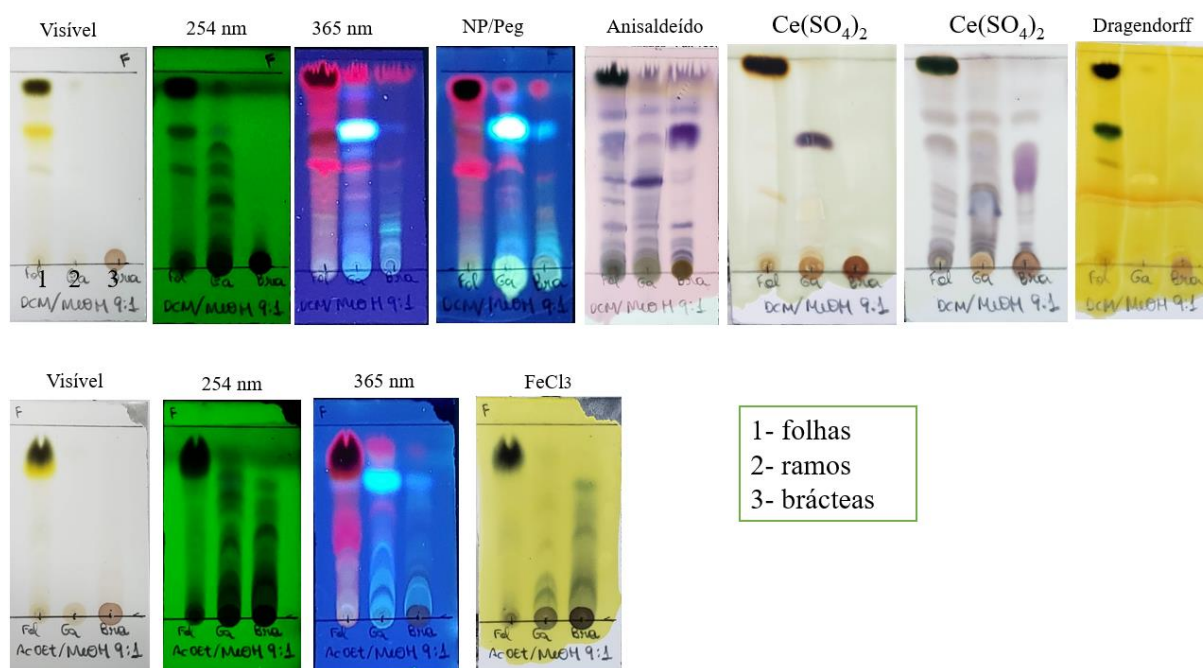


Após a eluição em CCDC, os extratos metanólicos de folhas, ramos e brácteas apresentaram substâncias com intensos cromóforos quando revelados com as luzes 254 nm e 365 nm, o que seria indicativo de duplas conjugadas ou substâncias com anel aromático. Pode-se observar que os extratos de folhas, ramos e brácteas apresentaram manchas escuras em FeCl_3 e quando revelados com NP/PEG observou-se um aumento da intensidade dos cromóforos o que sugere a presença de substâncias com anel aromático, conforme demonstrado nas cromatoplas da Figura 14.

Quando revelados em anisaldeído sulfúrico, ambos os extratos de folhas, ramos e brácteas apresentavam manchas na coloração lilás, rosa e azul, indicando a presença de

terpenos. Em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ observaram-se algumas bandas cromatográficas na coloração marrom e manchas na cor rosa, característica de terpenos. Os extratos de ramos apresentaram uma banda na coloração lilás onde havia um intenso cromóforo azul, antes do aquecimento da placa. No extrato de folhas metanólico observou-se que no local de aplicação da amostra na placa, houve fraca formação de manchas laranjas quando reveladas com reagente de Dragendorff não sendo possível observar nos extratos brutos a presença de alcaloides.

Figura 14: Análise em CCDC dos extratos metanólicos de ramos, folhas e brácteas de *Warszewiczia coccinea*.

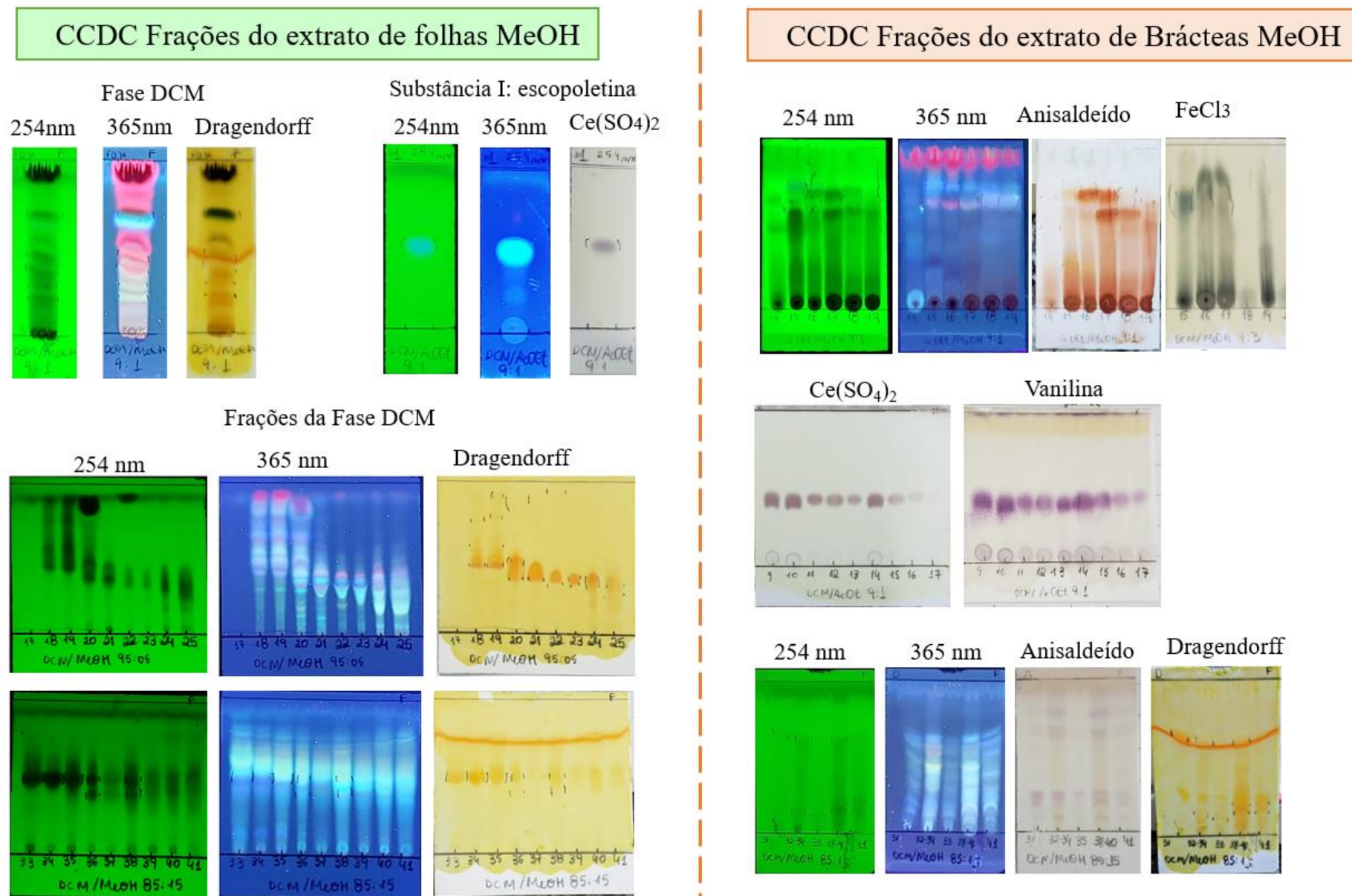


Após o fracionamento cromatográfico algumas frações dos extratos metanólicos das folhas proporcionaram uma melhor visualização das classes de substâncias que poderiam estar presentes na amostra. Após o extrato ser particionado, a fase DCM quando analisada em CCDC apresentou indícios de alcaloides quando revelada com reagente de Dragendorff e após o fracionamento da fase DCM, algumas frações também demonstravam a presença de alcaloides. Esses resultados corroboram com a literatura acerca da família Rubiaceae, que relata a ocorrência dessa classe entre as espécies (Bolzani et al. 2001; Martins e Nunez 2015). Sendo que para *Warszewiczia* spp. são relatados alguns alcaloides em *Warszewiczia schwackei* (Fachin-Espinar e Nunez. 2019).

Como observado, somente após o fracionamento do extrato metanólico das folhas foi possível observar os indícios de alcaloides entre as amostras obtidas desse extrato, visto que anteriormente no extrato bruto não foi possível observar tais indícios visualmente. Em hipótese, esses metabólitos no extrato bruto das folhas encontravam-se em concentrações baixas e após o fracionamento cromatográfico pode ser possível observar a presença a partir das análises por CCDC, reforçando que ao final do fracionamento obteve-se pouca massa nas frações em que se encontravam (Figura 15).

As frações de 15 a 18 advindas do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das brácteas quando reveladas em anisaldeído mostraram bandas na coloração avermelhadas e após serem reveladas sob luz 254 nm e em FeCl_3 pode ser possível observar indícios de substâncias com anel aromático nessas frações, nas frações 9 a 17 foram observados bandas marrons e roxas quando reveladas em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ e vanilina sulfúrica, sendo características de terpenos. Também foram observados indícios de alcaloides nas frações 31; 32-34; 35; 38-40 e 41, que após serem reveladas com reagente de Dragendorff apresentaram bandas na cor laranja. No entanto, o fracionamento do extrato metanólico de brácteas não resultou no isolamento das substâncias das respectivas frações, pois ainda se encontravam em intensa mistura e em pouca quantidade de massa para serem analisadas através da RMN, impossibilitando a caracterização estrutural das substâncias presentes nessas frações.

Figura 15: Análise em CCDC de algumas frações dos extratos metanólicos de folhas e brácteas de *Warszewiczia coccinea*.

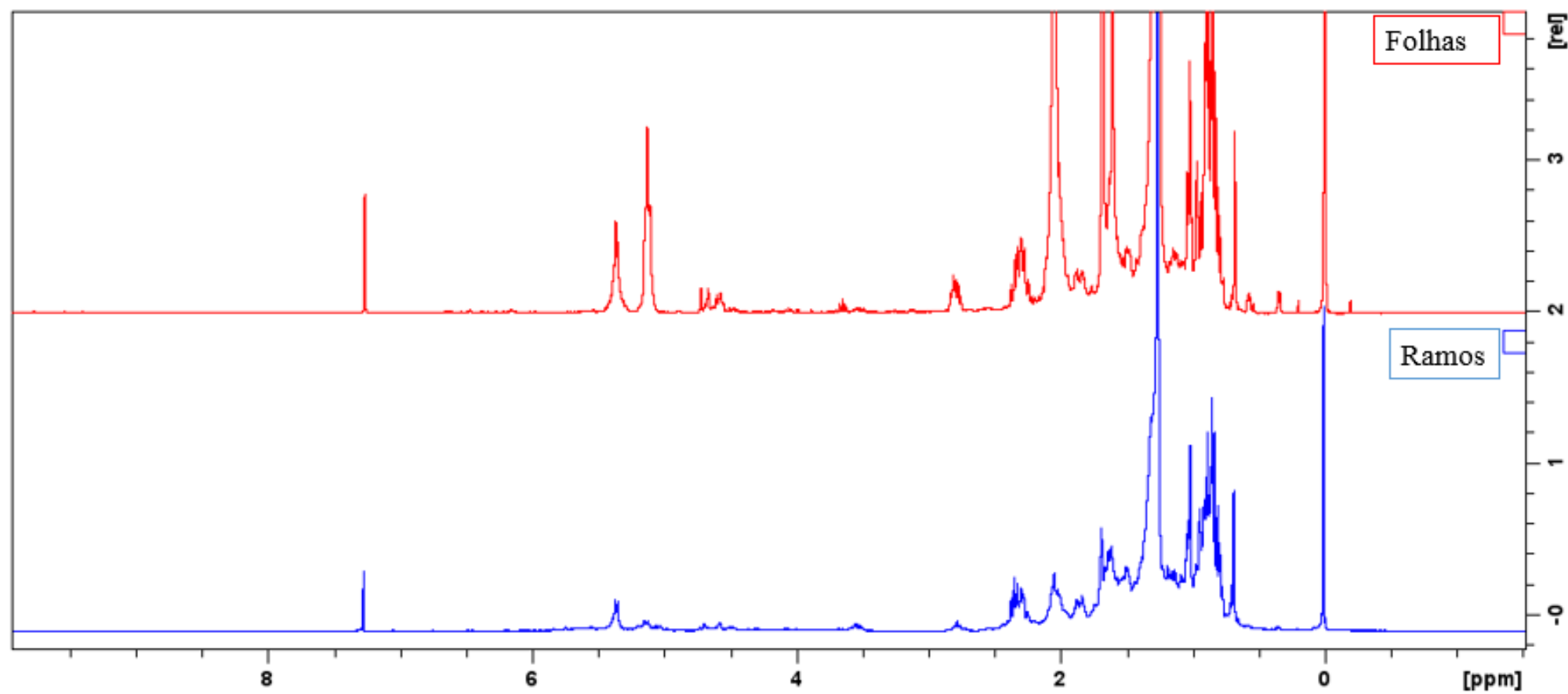


5.3 Análises dos extratos brutos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos hexânicos e metanólicos foram analisados sobrepostos para verificar a constituição química e comparação baseada nos hidrogênios observáveis (Figuras 16 e 17).

Os extratos hexânicos de folhas e ramos apresentaram sinais entre 0,3 a 1,5 ppm característicos de metilas que estão presentes em terpenos. Também pode-se observar a presença de um sinal intenso em 1,25 ppm que corresponde a hidrogênios metilênicos de cadeia alifática linear (“graxa”). Entre 1,5 e 2,8 ppm observaram-se sinais característicos de hidrogênios metilênicos e metínicos com deslocamentos semelhantes entre os dois extratos. Foram observados sinais entre 3 a 4 ppm que indicam a presença de metoxilas. Em ambos os extratos pode-se observar a presença de sinais de hidrogênios olefínicos em 5,36; 5,31 e 5,11 ppm semelhantes aos encontrados em esqueletos de esteroides de plantas como β -sitosterol e estigmasterol (Lozano et al. 2020, Pedroza et al. 2020). Entre 6 a 8 ppm ambos os extratos apresentaram pouco sinais e com baixa intensidade de hidrogênios de anéis aromáticos, demonstrando que nos extratos brutos hexânicos as substâncias fenólicas ou com anel aromático não estavam em quantidades observáveis através de RMN de ^1H (Figura 16).

Figura 16: Espectros de RMN de ^1H (em CDCl_3) dos extratos hexânicos de folhas e ramos de *Warszewiczia coccinea*.



Os extratos metanólicos de folhas, ramos e brácteas apresentaram algumas semelhanças espectrais entre os sinais observados. No entanto os extratos metanólico de folhas mostraram algumas diferenças interessantes quando analisados em sobreposição aos outros extratos analisados (Figura 17).

Como observados na região de 0,5 a 2,5 ppm a presença de hidrogênios protegidos, que sugerem a presença de metilas indicando a presença de terpenos, em 1,22 ppm estava presente um intenso sinal correspondente a hidrogênios metilênicos de cadeia alifática linear (“graxa”) (Figura 18). Entre 2,5 a 5 ppm, observaram-se possíveis hidrogênios metilênicos, metínicos e presença de metoxilas, sendo que nessa região (3 a 4 ppm) alguns multipletos podem estar relacionados a açúcares livres ou ligados a outros metabólitos extraídos através do MeOH (Figura 19).

Na região de 6 a 8 ppm, nota-se a presença de hidrogênios aromáticos com intensidade que sugerem a presença de substâncias fenólicas, com anel aromático na estrutura ou duplas ligações conjugadas (Figura 20).

Entre 8,5 a 11,5 ppm (Figura 21) notaram-se alguns hidrogênios desprotegidos nessa região, também sendo indicativos de hidroxilas queladas, aldeídos ou hidrogênios ligados a nitrogênio de alcaloides indólicos. Destacando que, algumas frações e a fase DCM dos extratos metanólicos das folhas revelaram indícios de alcaloides quando analisadas em CCDC e reveladas com reagente de Dragendorff.

A sugestão da presença de alcaloides indólicos nas folhas, está baseada na revisão bibliográfica sobre a quimiotaxonomia da família Rubiaceae e literatura do gênero *Warszewiczia*.

Em estudo prévio realizado com a espécie *Warszewiczia schwackei*, foram isolados alcaloides indólicos, os quais apresentam hidrogênios ligados a nitrogênios de núcleos indólicos. Alguns alcaloides quando solubilizados em DMSO-*d*₆, podem apresentar exibir os deslocamento químico desses hidrogênios entre 9 a 11 ppm, conforme a Figura 22 (Fachin-Espinar e Nunez. 2019). O que sugere que esta classe química possa estar presente nos extratos metanólicos das folhas de *Warszewiczia coccinea*.

Figura 17: Espectros de RMN de ^1H (em $\text{DMSO-}d_6$) dos extratos metanólicos de brácteas, folhas e ramos de *Warszewiczia coccinea*.

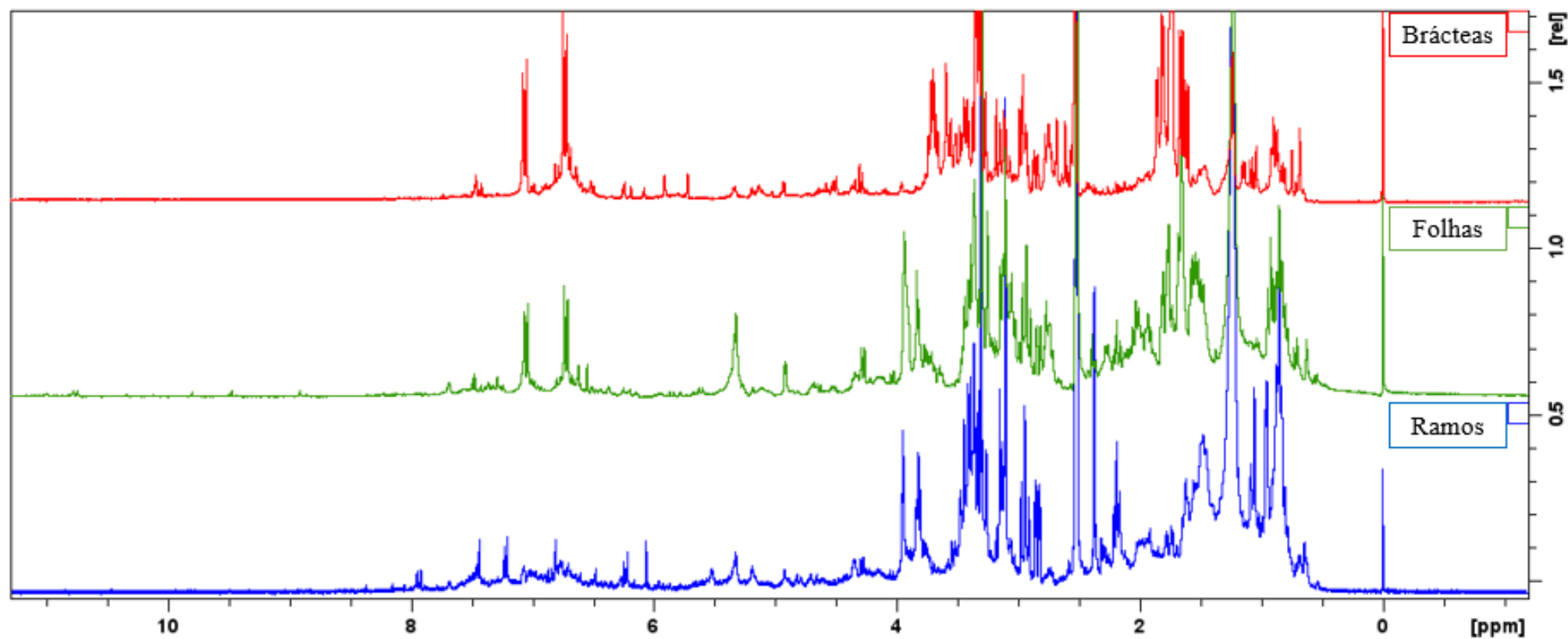


Figura 18: Expansão da região de 0,5 a 2,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia coccinea*.

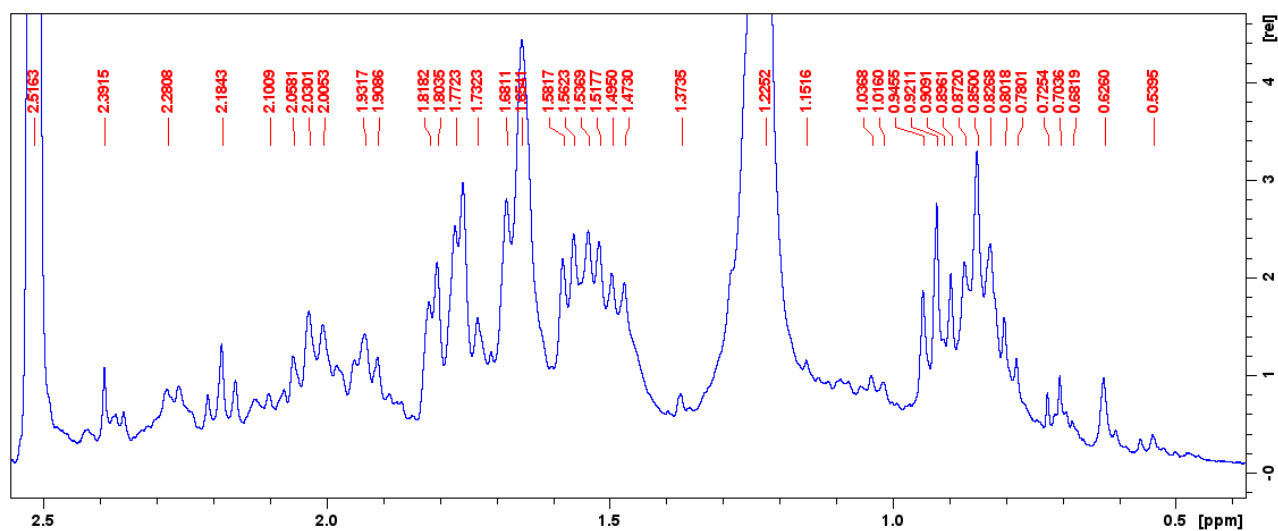


Figura 19: Expansão da região de 2,5 a 5 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia coccinea*.

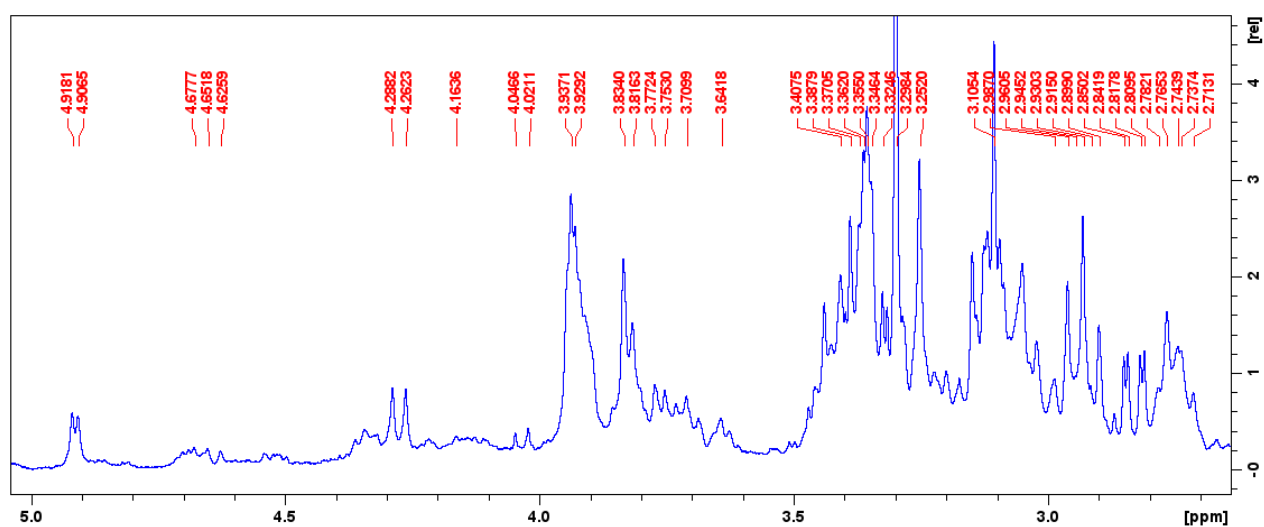


Figura 20: Expansão da região de 5 a 8 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia coccinea*.

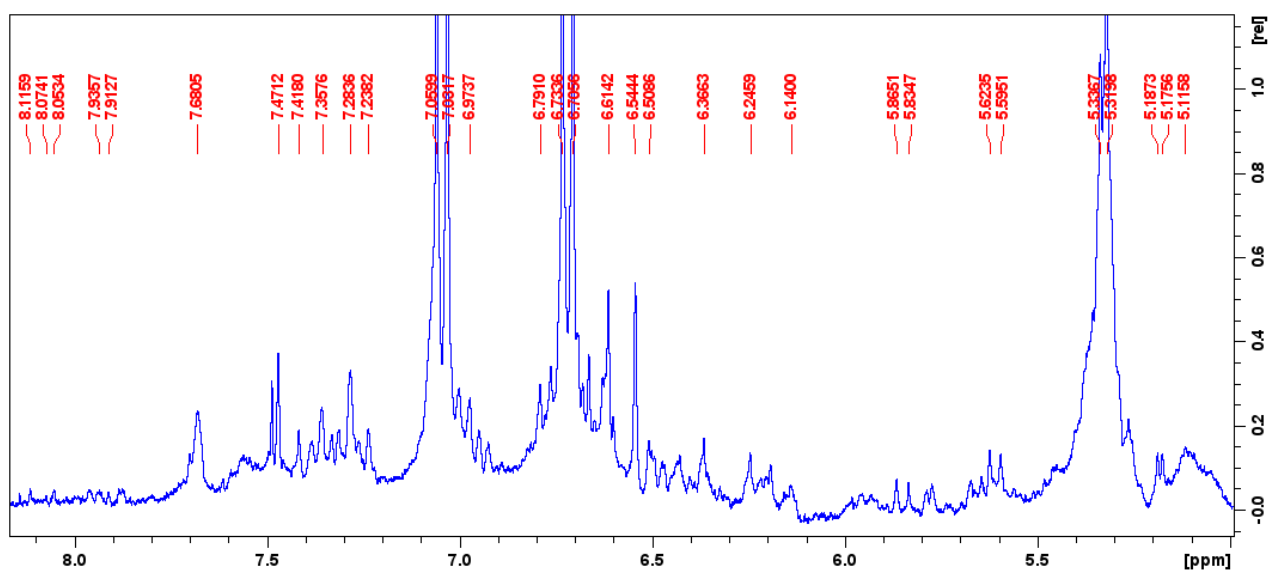


Figura 21: Expansão da região de 8,5 a 11,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico das folhas de *Warszewiczia coccinea*.

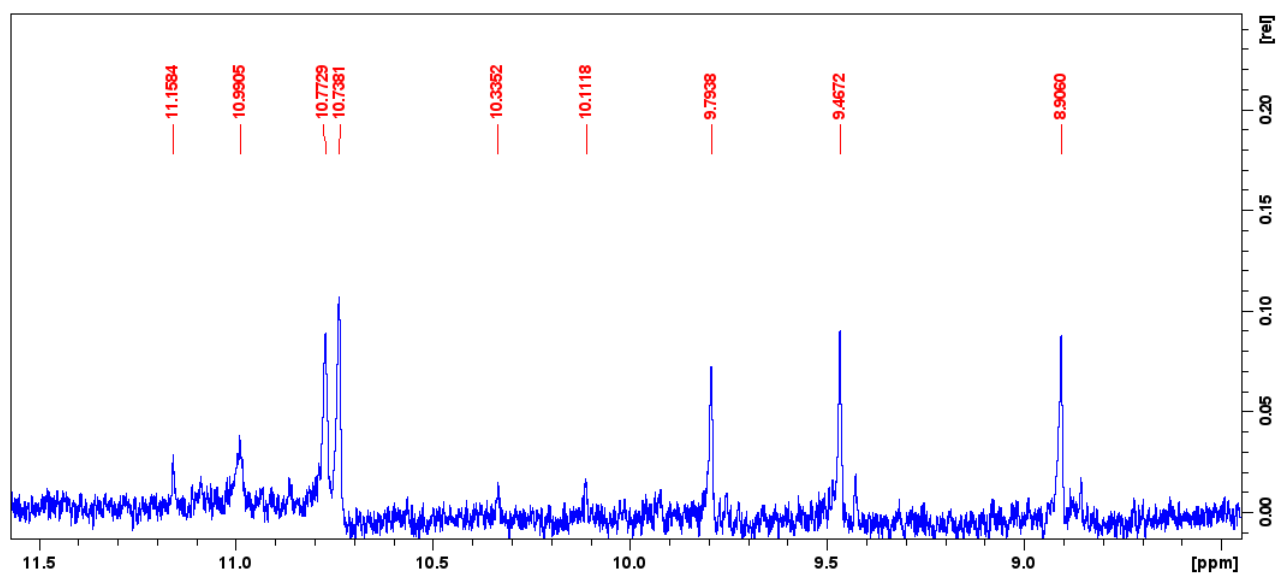
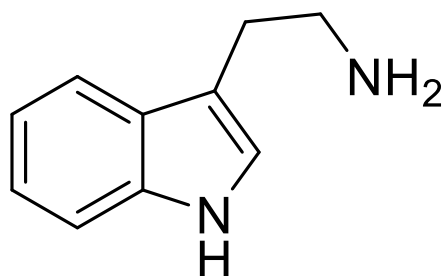
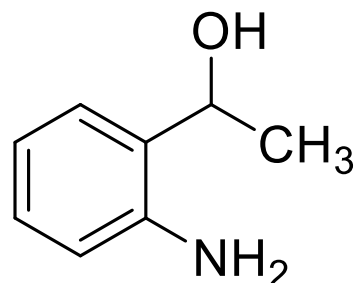


Figura 22: Alcaloides isolados de *Warszewiczia schwackei*, demonstrado os deslocamentos químicos dos hidrogênios do grupo indol e de amina, em destaque.



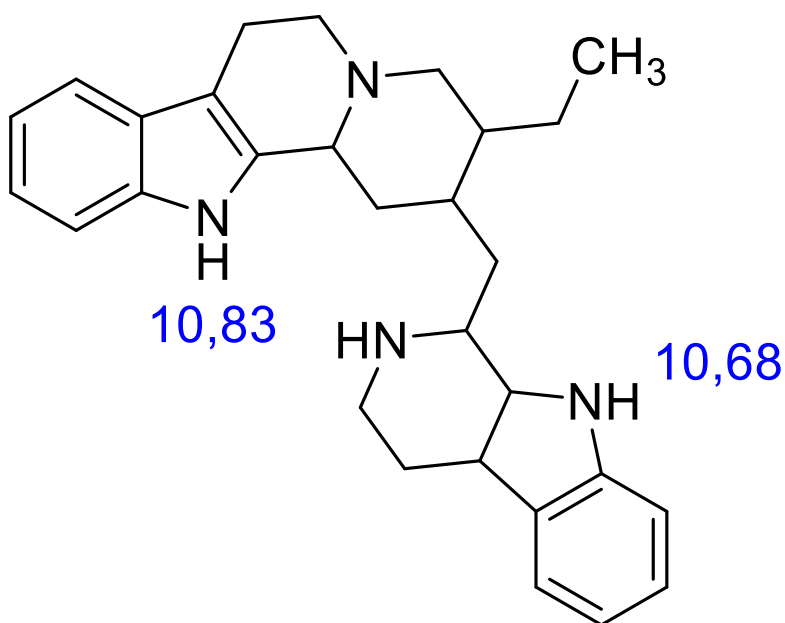
10,98

triptamina (13)



10,79

1-(2-aminofenil) (14)



10,83

10,68

ochrolifuanina (15)

Fonte: (Fachin-Espinar e Nunez. 2019).

5.4 Identificação da substância I: escopoletina

A substância I foi obtida na forma de cristais amarelos, quando analisada através de CCDC apresentou o R_f de 0,5 eluída em DCM/AcOEt (9:1), apresentando uma intensa fluorescência azulada sob UV 365 nm e quando revelada em $Ce(SO_4)_2$ apresentou coloração lilás, antes do aquecimento da cromatoplaça. Sua caracterização estrutural foi baseada em experimentos de RMN de 1H e ^{13}C aliada a dados da literatura (Shah et al. 2014; El-Demerdash et al. 2009) e análises de espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC/MS).

Através das análises por LC/MS foi possível observar uma banda cromatográfica com tempo de retenção de 2,7 minutos e nos espectros de MS que apresentava os adutos ionizados com m/z 191,57 ($[M-H]^-$ em modo negativo) e 193,57 ($[M+H]^+$ em modo positivo) que sugeriram a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$ com massa molecular de 192 u.

Através das análises de RMN de 1H , foi observado um singlete em 3,95 ppm (s , 3H) característico de uma metoxila presente na molécula. Na região dos aromáticos, foram observados sinais em 6,92 ppm (1H, s , H-8) e 6,85 ppm (1H, s , H-5), correspondentes a hidrogênios aromáticos na posição *meta*. Também foram observados sinais em 6,27 ppm (1H, d , $J = 9,57$ Hz, H-3) e 7,60 ppm (1H, d , $J = 9,57$ Hz, H-4), correspondentes a hidrogênios de uma dupla conjugada. Esses sinais sugeriram a presença de um esqueleto cumarínico.

Nos espectros de RMN de ^{13}C foi possível observar sinais em 103,19 (C-8); 107,44 (C-5) e 113,5 ppm (C-3) que reforçavam a presença de um anel aromático na estrutura. Em 56,41 ppm apresentava-se um sinal característico de metoxila e em 143,33 ppm o sinal de um carbono desprotegido. Através dos experimentos de DEPT 135 não foi observado a presença de carbonos metilênicos.

No espectro bidimensional de HMBC, observaram-se as correlações entre o hidrogênio em 6,85 ppm com os carbonos 143,33, 149,7 e 150,5 ppm confirmando a posição em C-5; as correlações do hidrogênio em 6,92 ppm com os carbonos 115,5, 149,7 e 150,5 ppm confirmaram a posição em C-8. O hidrogênio em 7,6 ppm apresentou correlações com os carbonos 107,44; 161,68 e 150,5 ppm, confirmando a posição em C-4. O hidrogênio em 6,27 ppm apresentou uma única correlação com o carbono 111,5 ppm, confirmando a posição em C-3. Os hidrogênios em 3,95 ppm apresentaram correlação com o carbono em 144,11 ppm, no entanto não apresentaram correlação com o carbono em 149,7 ppm caracterizando que a

metoxila estava na posição C-6. Demonstrando que a estrutura correspondia a escopoletina e não ao seu isômero, a isoescopoletina.

No espectro bidimensional de COSY observou-se a correlação dos hidrogênios em 7,6 e 6,27 ppm, reforçando que se encontravam nas posições H-4 e H-3, respectivamente, em uma dupla conjugada.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, foram comparados com a literatura (Shah et al. 2014; El-Demerdash et al. 2009) possibilitando propor a substância I como escopoletina. Este é o primeiro relato de uma cumarina para o gênero *Warszewiczia*. A escopoletina é uma cumarina que ocorre entre diversas espécies de plantas, em Rubiaceae pode-se observar a ocorrência nas folhas de *Morinda citrifolia* (Ahmadi et al. 2019).

Em consulta ao site comercial Merck KGaA (2022) no dia 16 de fevereiro de 2022, 1 g da substância (padrão analítico Sigma-Aldrich ®) encontra-se no valor de R\$ 9793,00.

Figura 23: Estrutura molecular da substância I, escopoletina.

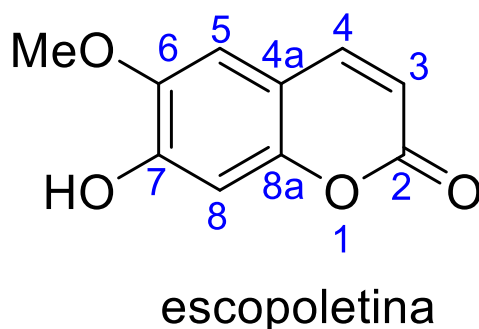


Figura 24: Cromatograma da substância I.

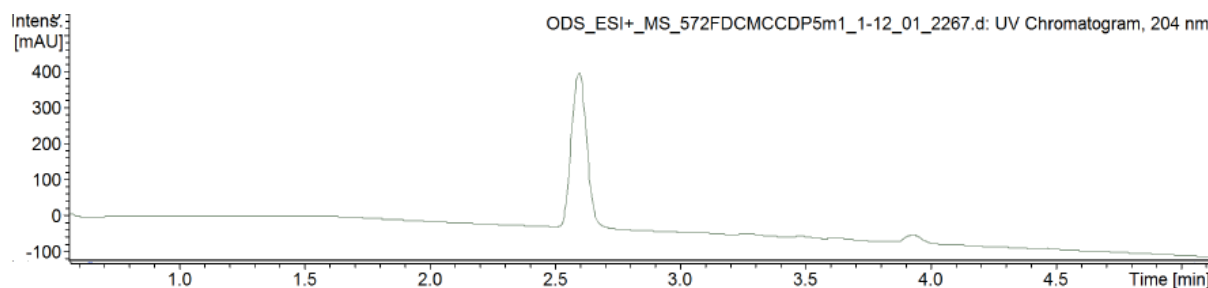


Figura 25: Espectro de massas da substância I ionizada por ESI em modo negativo $[M-H]^-$.

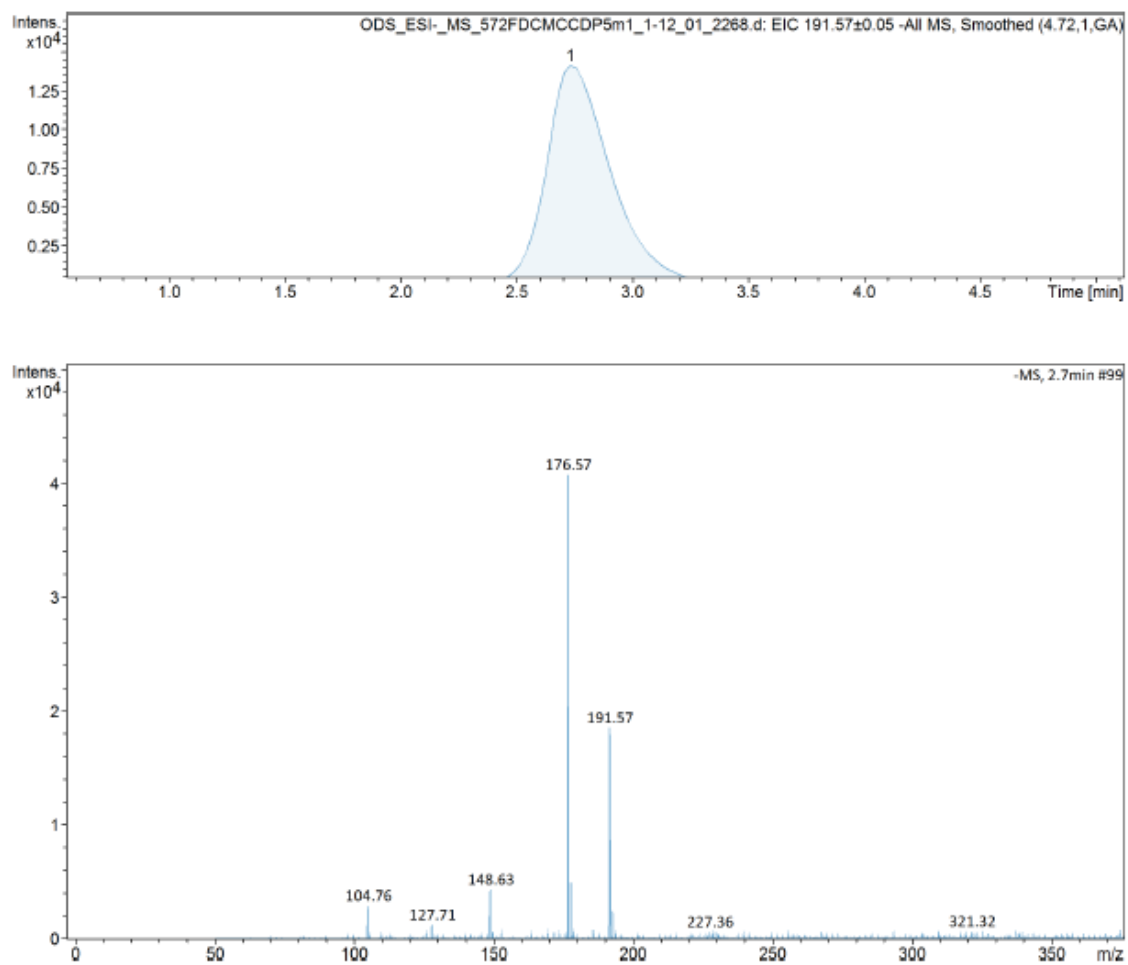


Figura 26: Espectro de massas da substância I ionizada por ESI em modo positivo $[M+H]^+$.

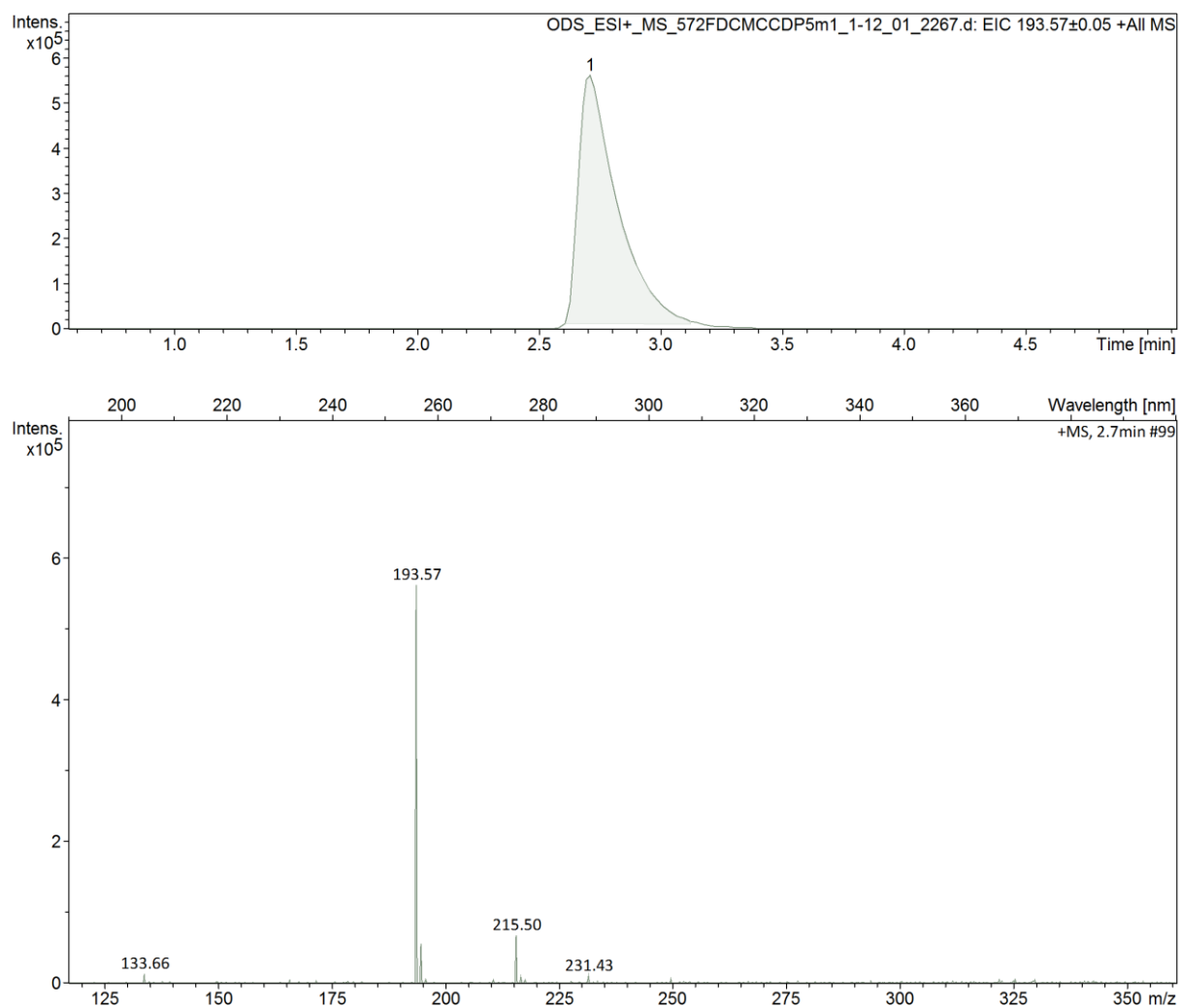


Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 1 (em CDCl_3) e comparação com a literatura (Shah et al. 2014; El-Demerdash et al. 2009).

Posição	Observado		Literatura	
	$\delta\ ^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$	$\delta\ ^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$
MeO	3, 95 (3H, <i>s</i>)	56,41	3,96 (3H, <i>s</i>)	56,3
2	-	161,6*	-	161,4
3	6,27 (1H, <i>d</i> , $J=9,57\text{ Hz}$)	113,4	6,2 (1H, <i>d</i> , $J=9,3\text{ Hz}$)	113,4
4	7,60 (1H, <i>d</i> , $J=9,57\text{ Hz}$)	143,3	7,5 (1H, <i>d</i> , $J=9,3\text{ Hz}$)	143,2
4a	-	111,5*	-	111,4
5	6,85 (1H, <i>s</i>)	107,4	6,8 (1H, <i>s</i>)	107,4
6	-	144,11*	-	143,2
7	-	149,7*	-	149,6
8	6,92 (1H, <i>s</i>)	103,2	6,92 (1H, <i>s</i>)	103,1
8a	-	150,5*	-	150,2

*Observados através do mapa de correlação HMBC.

Figura 27: Espectro de RMN de ^1H da substância I (CDCl_3 , 300 MHz).

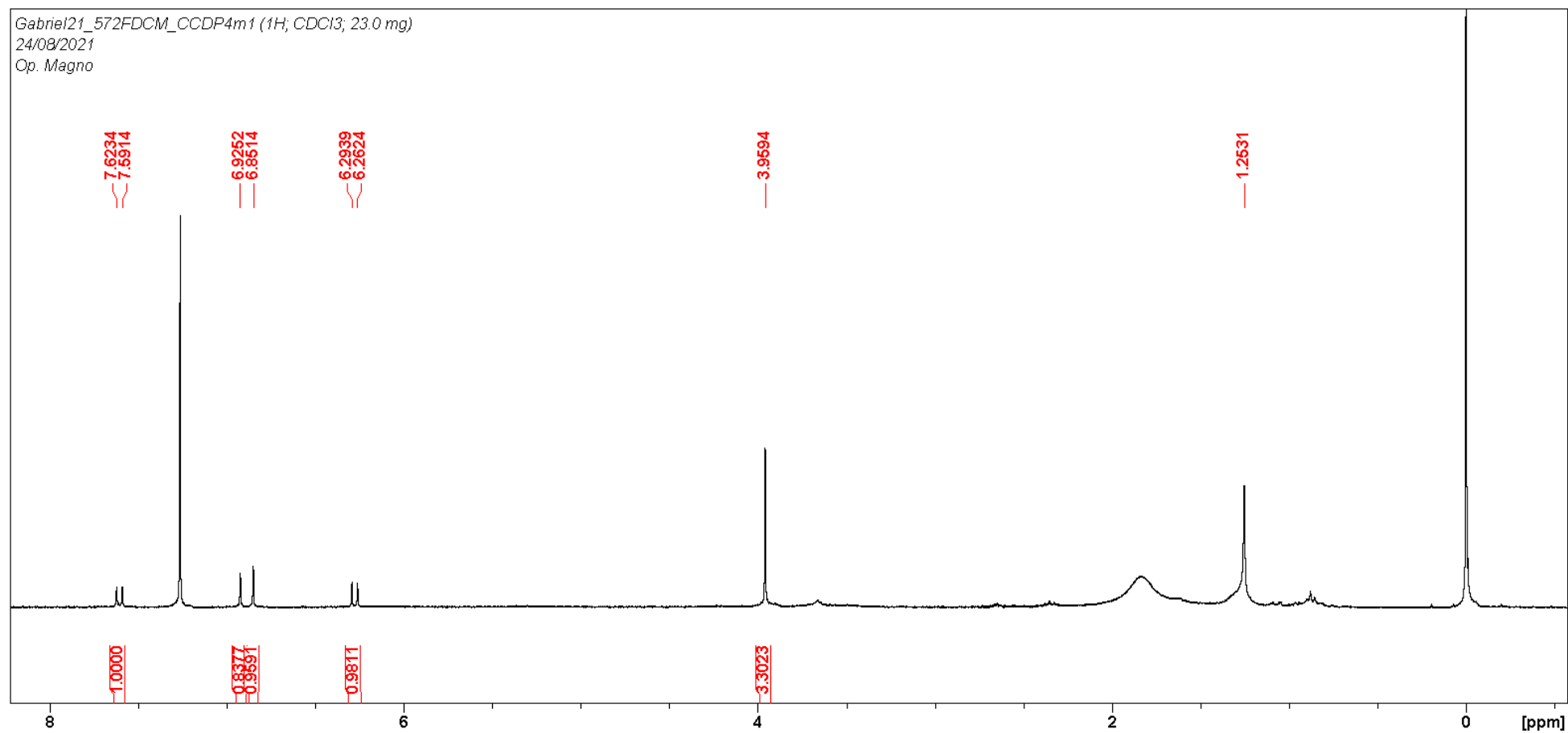


Figura 28: Expansão da região de 6 a 8 ppm do espectro de ^1H da substância I (CDCl_3 , 300 MHz).

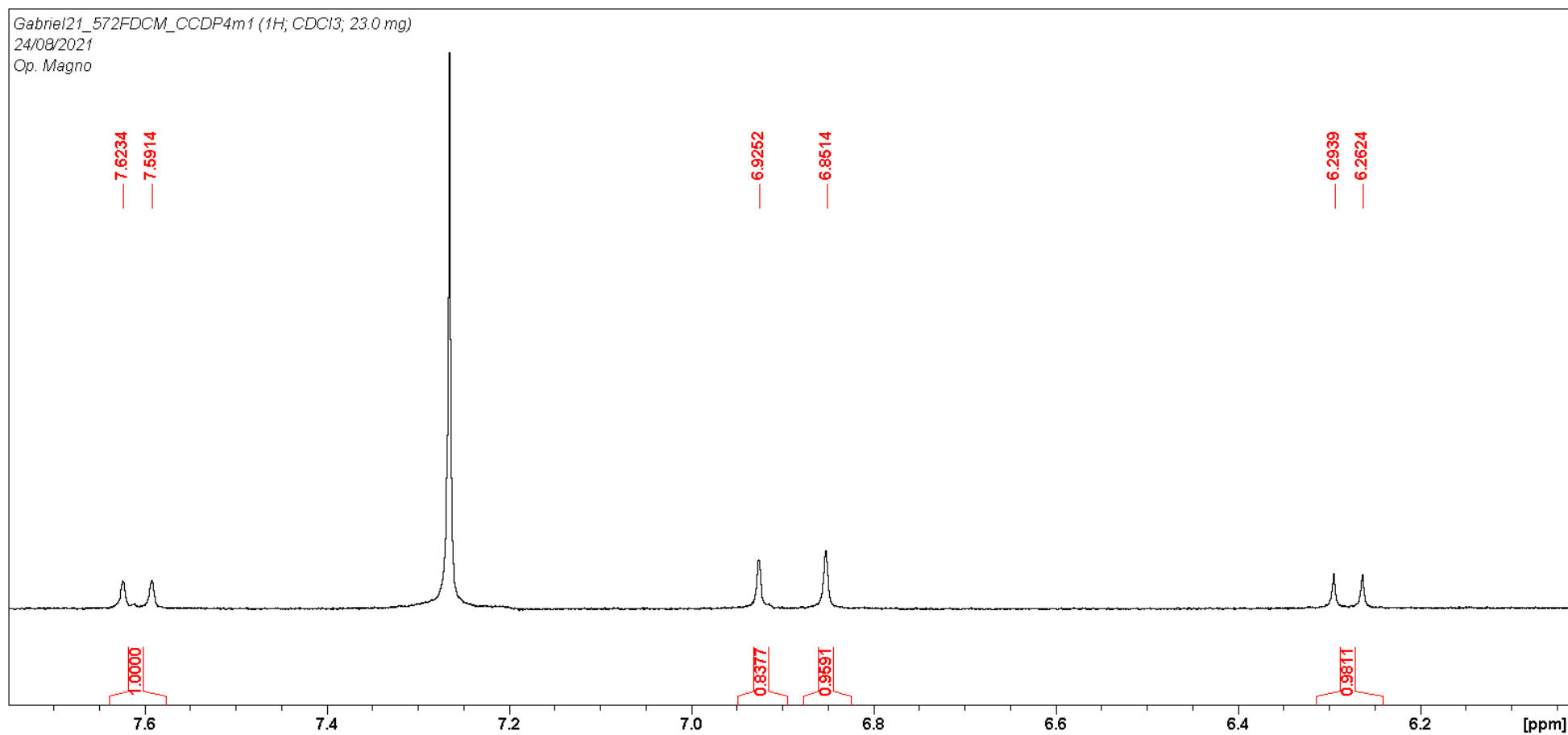


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C da substância I (CDCl_3 , 75 MHz).

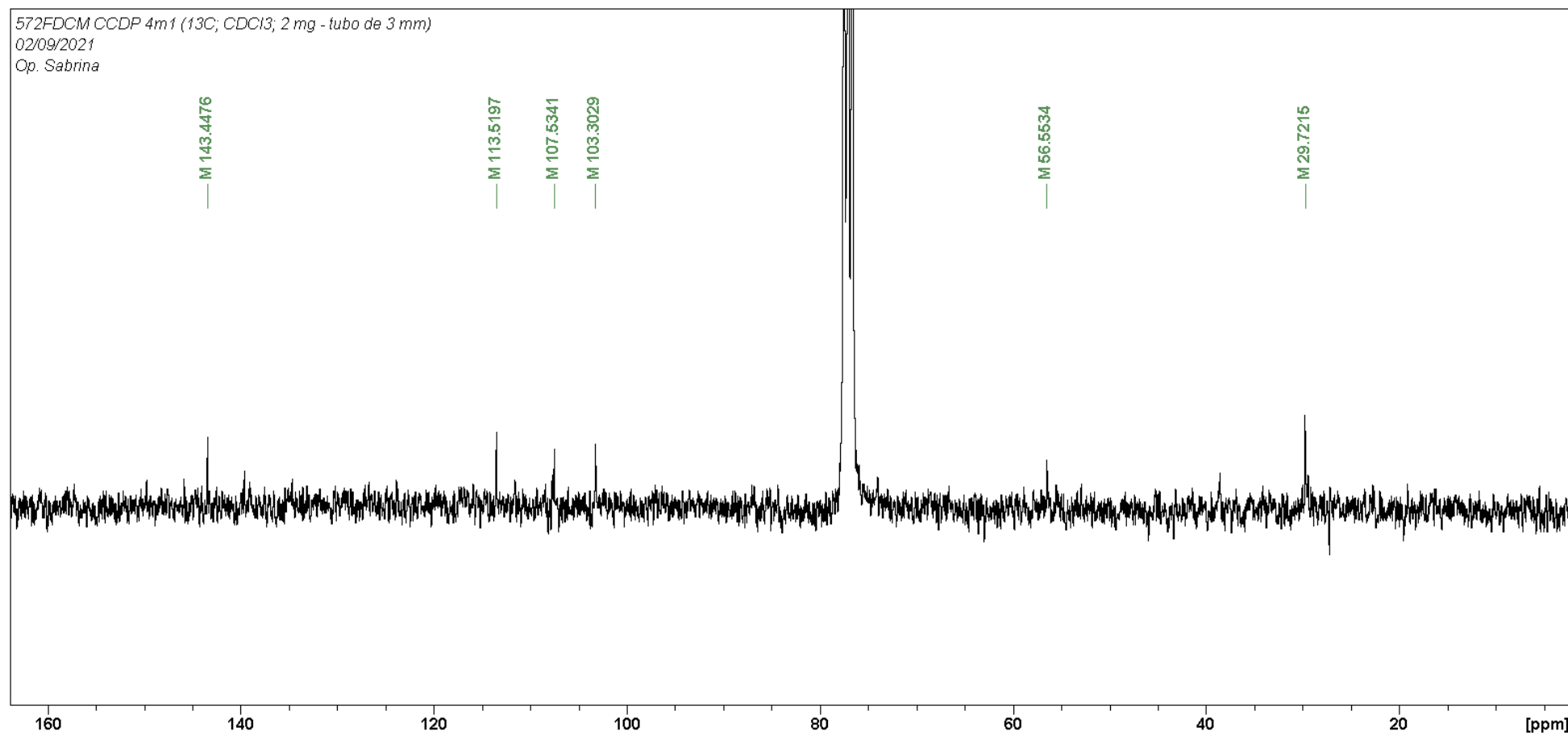


Figura 30: Espectro de DEPT 135° da substância I (CDCl₃, 75 MHz).

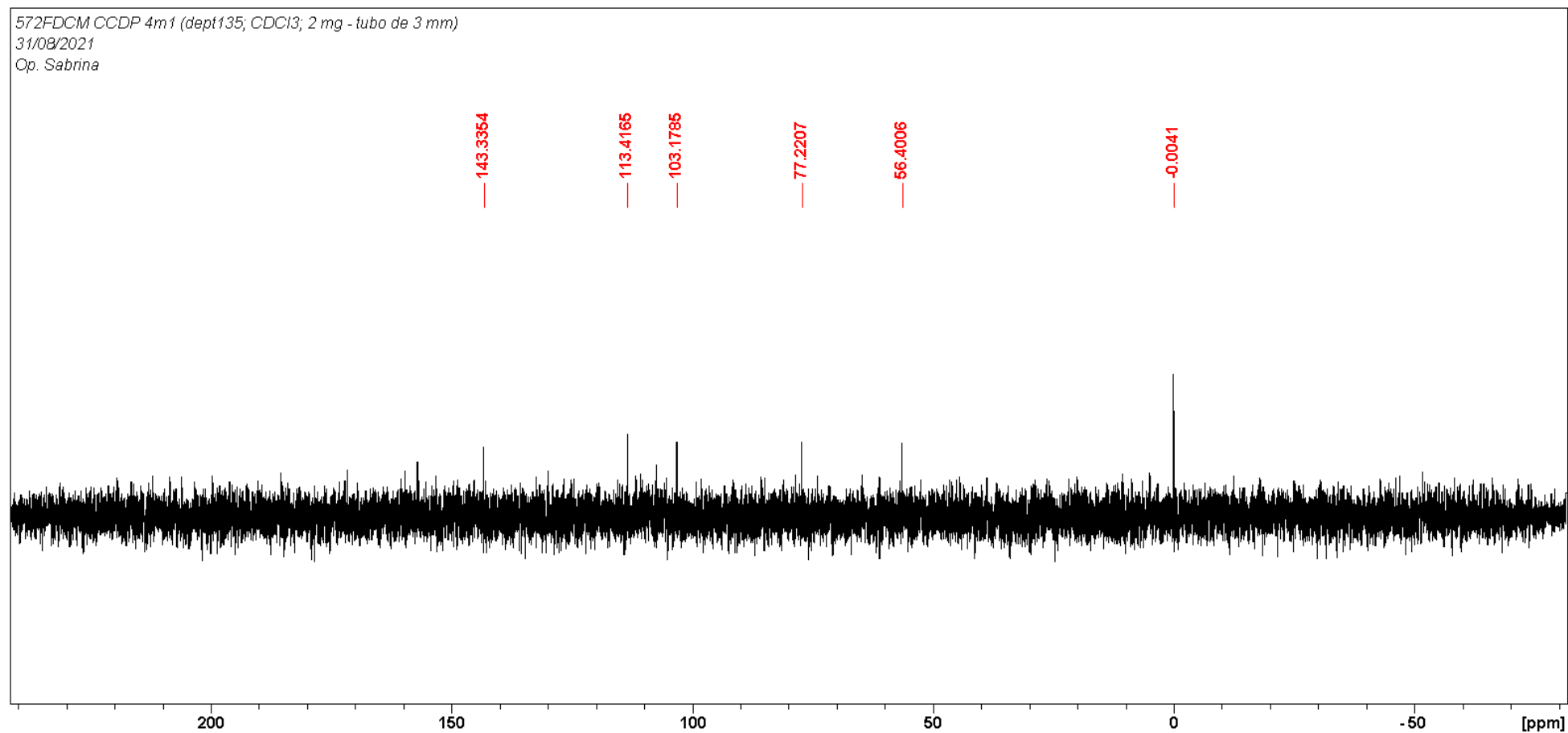


Figura 31: Mapa de correlação bidimensional HSQC da substância I (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

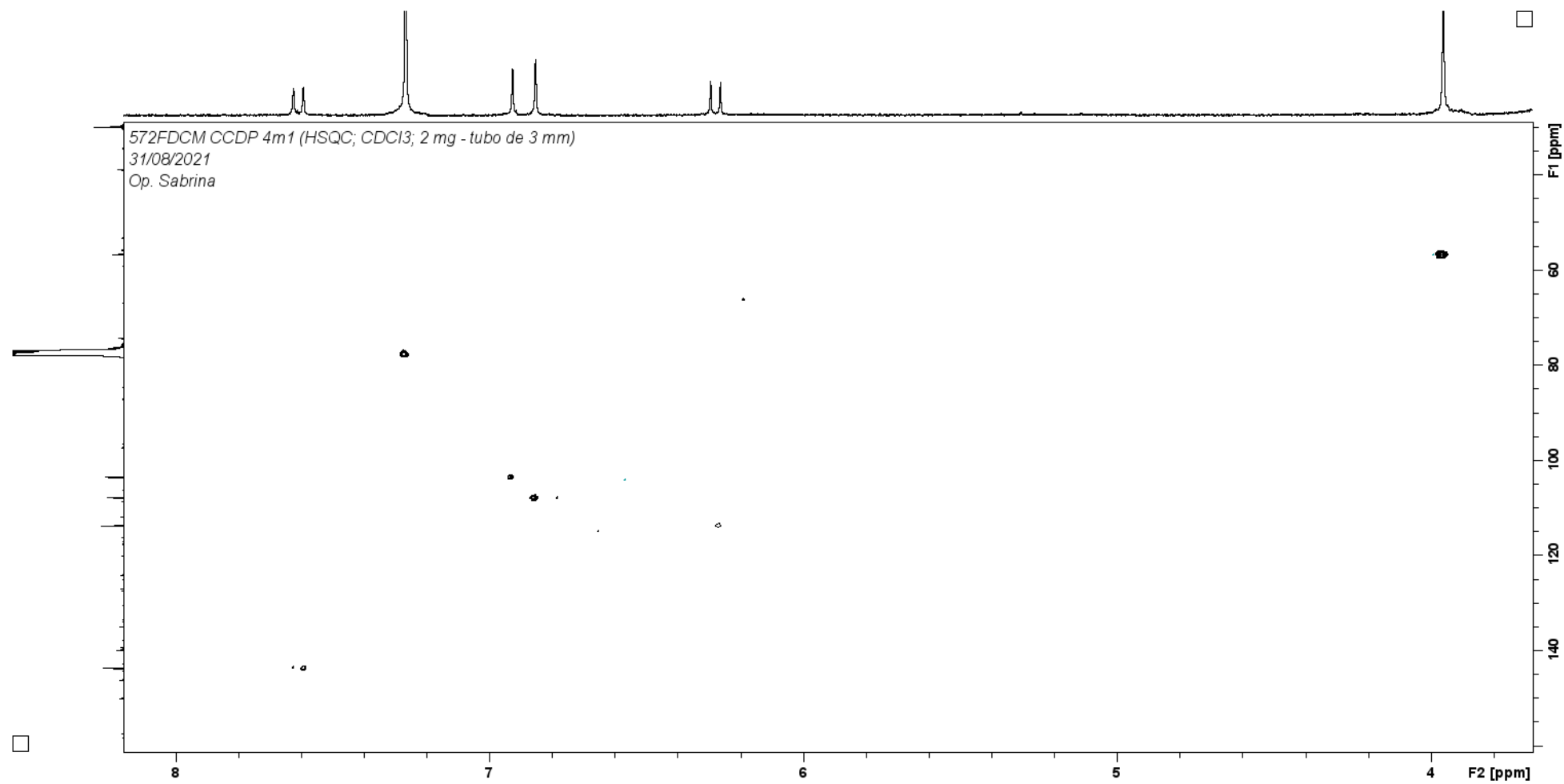


Figura 32: Mapa de correlação bidimensional HMBC da substância I (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

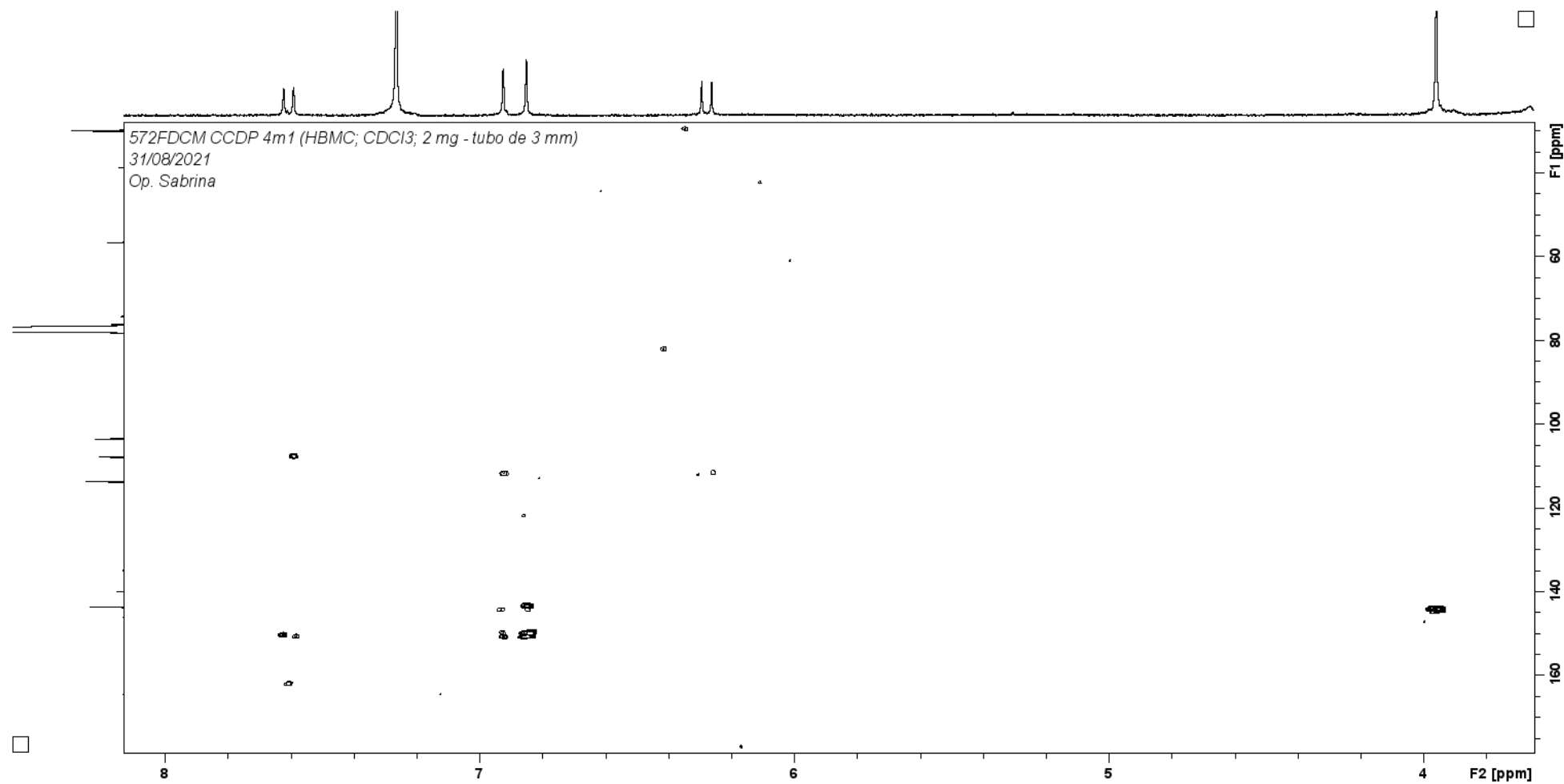


Figura 33: Mapa de correlação bidimensional COSY da substância I (CDCl_3 , 300 MHz).

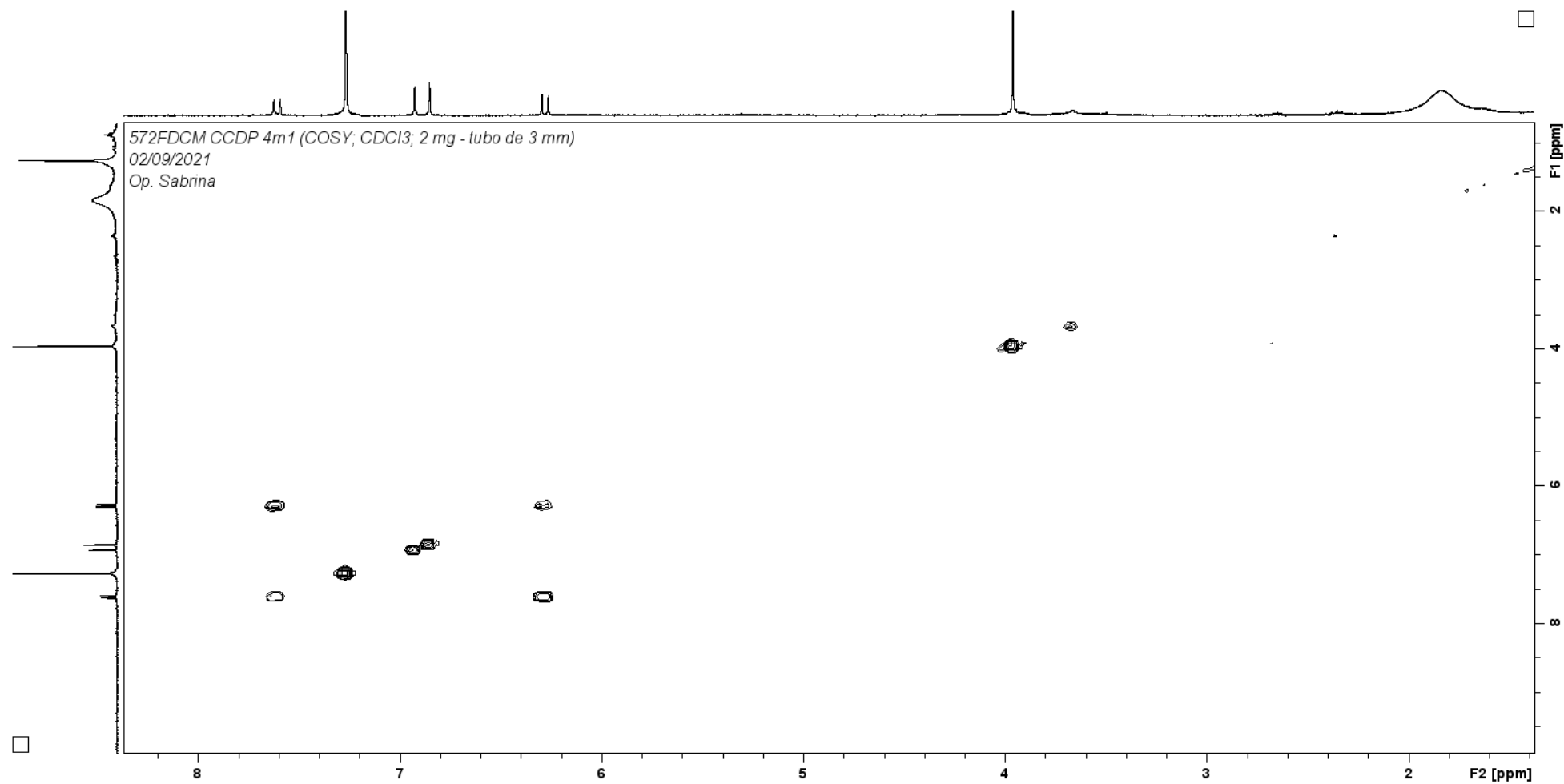


Figura 34: Expansões das correlações observadas da substância I no mapa de correlação bidimensional HMBC.

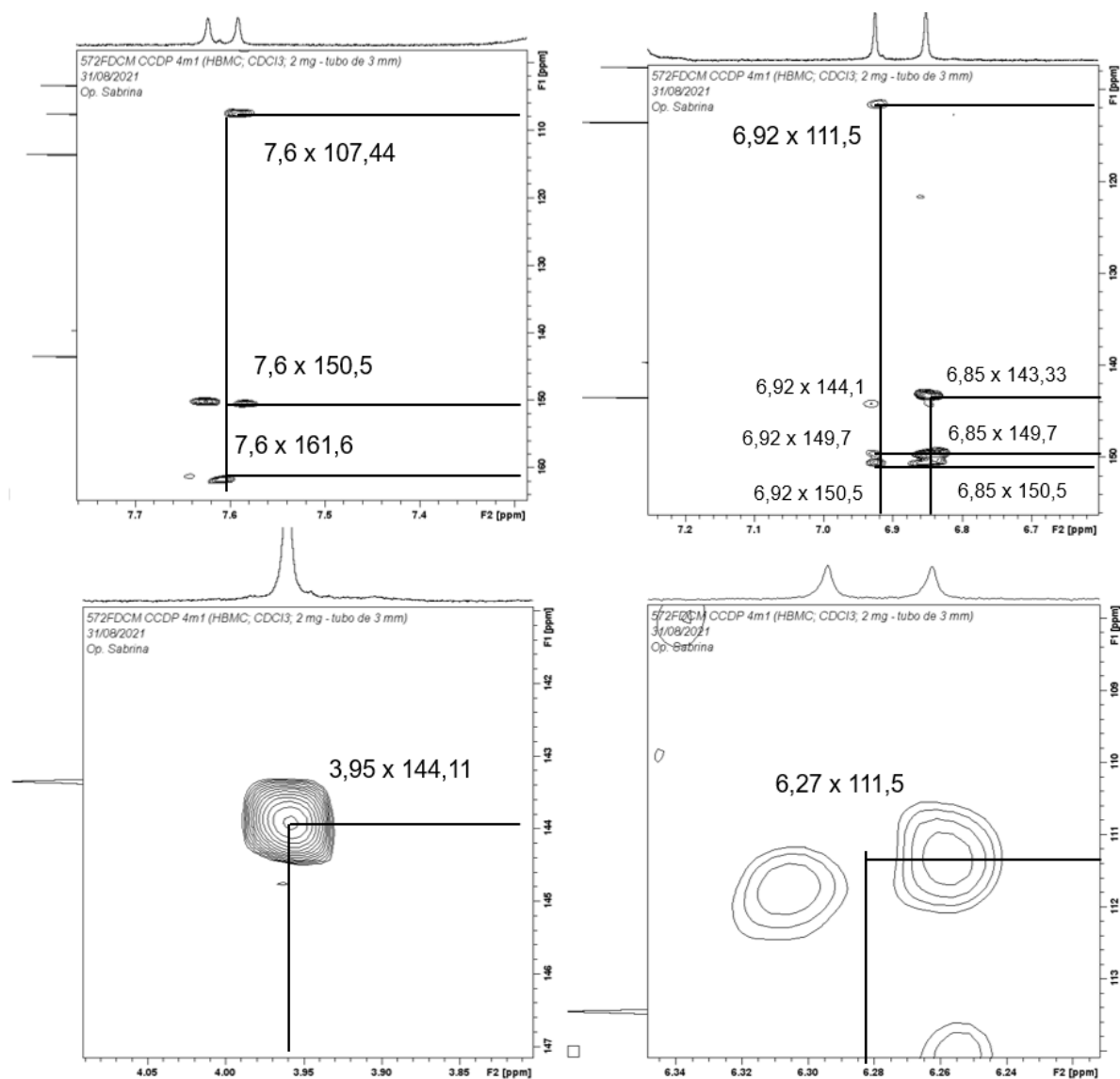
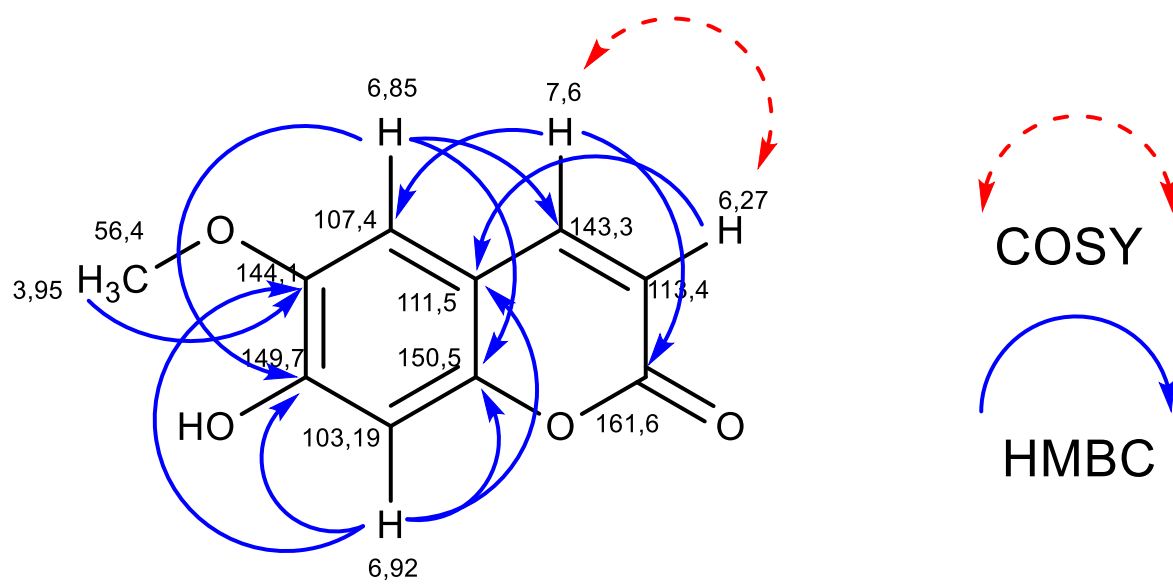


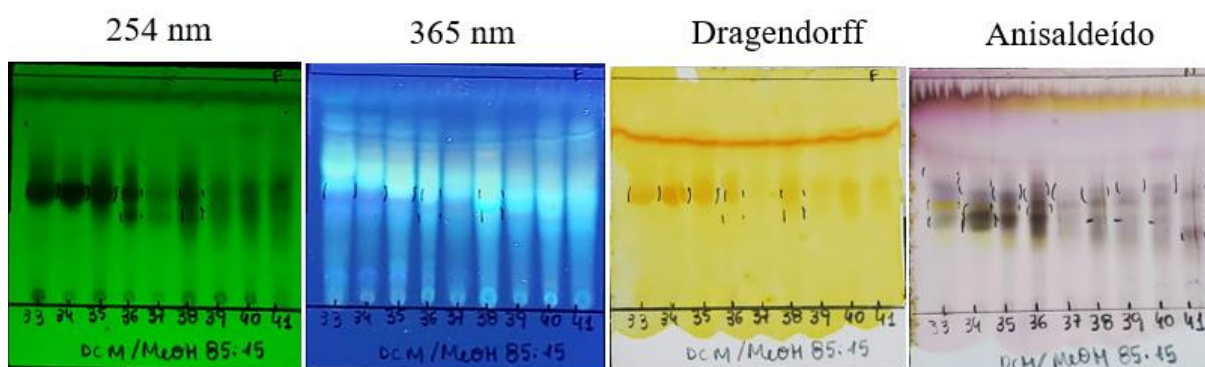
Figura 35: Correlações observadas nos espectros bidimensionais da substância I



5.5 Análise da Fração 33-35: indício de alcaloides indólicos.

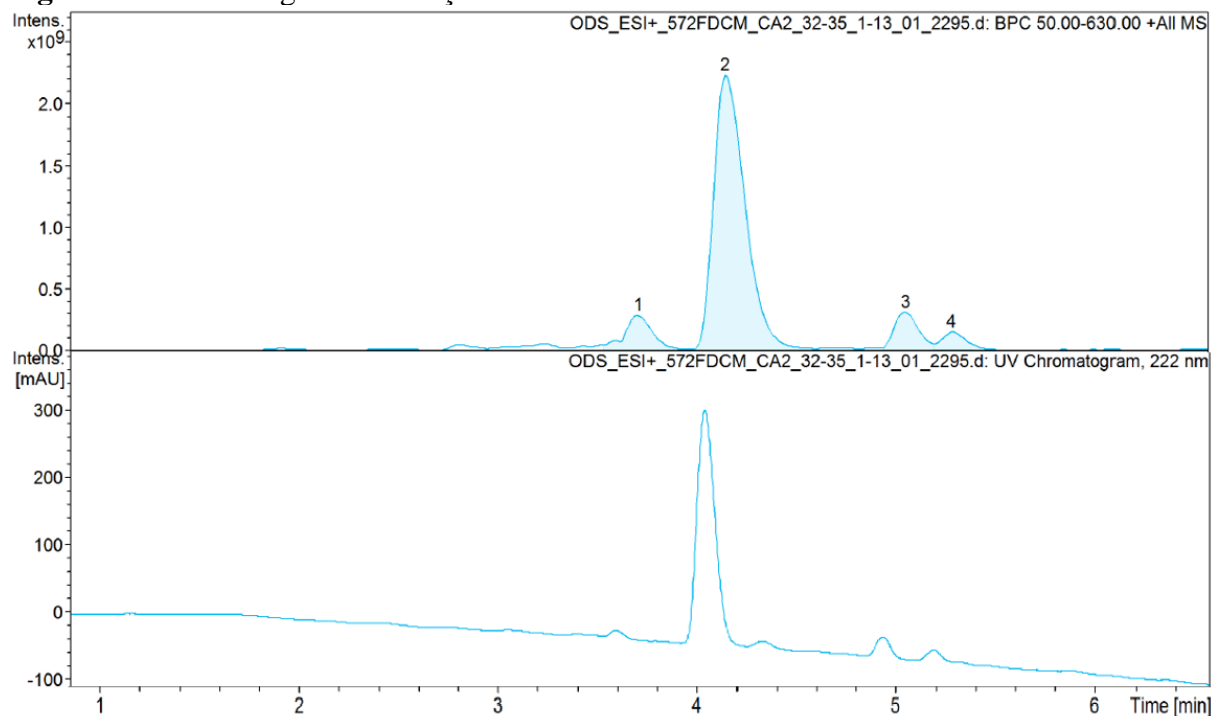
A fração 33-35 (3 mg) quando analisada através de CCDC eluída em DCM/MeOH (85:15) apresentou bandas cromatográficas que puderam ser observadas sob UV 254 e 365 nm, quando revelada em Dragendorff observou-se a presença de bandas na coloração laranja. Indicando a presença de alcaloides, como observado na Figura 36.

Figura 36: análise das frações 33-35 por CCDC.



Legenda: sistema de eluição: DCM/MeOH 85:15.

Figura 37: Cromatograma da fração 33-35.



Através das análises por LC/MS em modo positivo, foi possível observar quatro bandas cromatográficas como observado na Figura 37. Sendo que dentre os constituintes dessa fração, o pico 2 apresentou maior intensidade observada tanto nos espectros obtidos usando o detector de ultravioleta quanto nos espectros usando o detector de massa.

Foi observado que o pico 2 apresentava o aduto ionizado com m/z 545 ($[M+H]^+$ em modo positivo) com tempo de corrida em 4,2 minutos. Esse íon foi selecionado para ser fragmentado e observou-se em sequência o íon com m/z 383, com diferença de 162 u, provável perda de um açúcar da molécula (Figura 38), o que sugere que a aglicona da substância tenha massa molecular de 382 u.

Comparando esse resultado com outra espécie vegetal que foi estudada pelo grupo de pesquisas, observa-se que 6 dos alcaloides indólicos isolados de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae) apresentam o mesmo peso molecular de 382 u. Sendo eles: 10-metoxi-ajmalicina, 9-metoxi-3-isoajmalicina, 9-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, 10-metoxi-19-epi-3-isoajmalicina, 10-metoxi-3-isorauniticina e 10-metoxi-rauniticina, (Martins e Nunez 2014). Apesar da coincidência da massa molecular da parte da aglicona, ainda não é possível propor a estrutura química do constituinte majoritário da fração 33-35. Seria necessária a purificação do constituinte, mas a massa de 3 mg da fração restringe o seu fracionamento.

Os espectros de RMN de 1H revelaram sinais característicos para esqueleto de alcaloides indólicos. Foram observados dois singletos em 11,11 ppm e 10,72 ppm que são característicos de hidrogênios ligados ao nitrogênio do núcleo indólico. Na região entre 6 a 8 ppm foram observados sinais de hidrogênios de anéis aromáticos, corroborando com a presença de um anel benzênico presente no núcleo indólico. Entretanto, os deslocamentos químicos desses hidrogênios não correspondiam aos dos alcaloides já relatados em *D. macrophylla*, indicando a possibilidade de se tratar de alcaloides distintos com algumas diferenças na estrutura molecular.

Contudo, as análises de LC/MS e RMN de 1H demonstraram que ainda havia mistura e pouca abundância de massa na amostra, que impossibilitava realizar a caracterização estrutural exata. Sendo necessária obtenção em maior quantidade de massa e purificação adicional na amostra.

Portanto, com base nas análises obtidas, sugere-se que na fração 33-35 a presença de alcaloides indólicos em mistura e que podem apresentar algumas diferenças dos já reconhecidos em *Duroia macrophylla*.

Figura 38: Espectro de massas do pico 2 e fragmentação do íon com m/z 545 $[M+H]^+$.

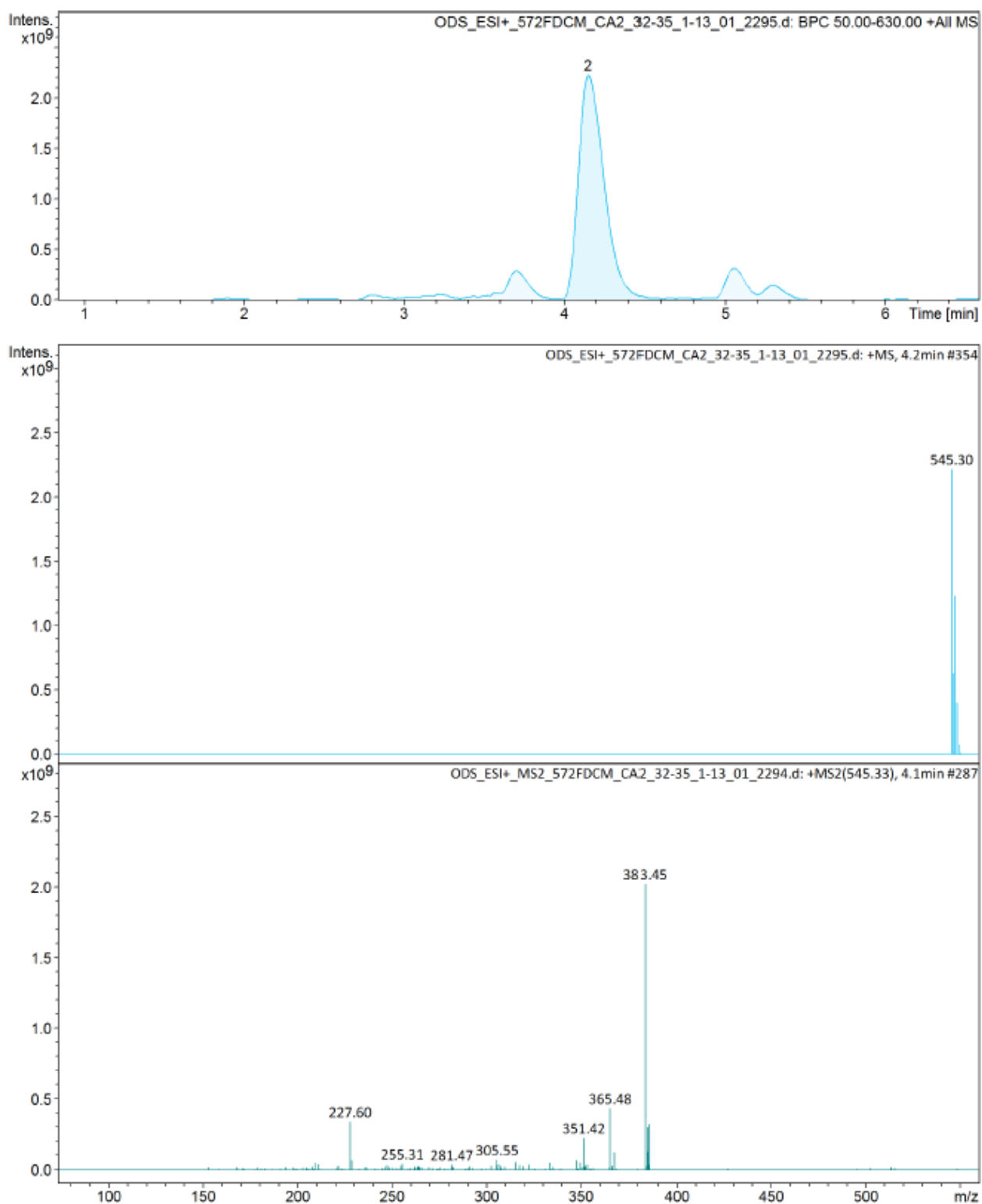


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H da fração 33-35 (DMSO- d_6 , 300 MHz).

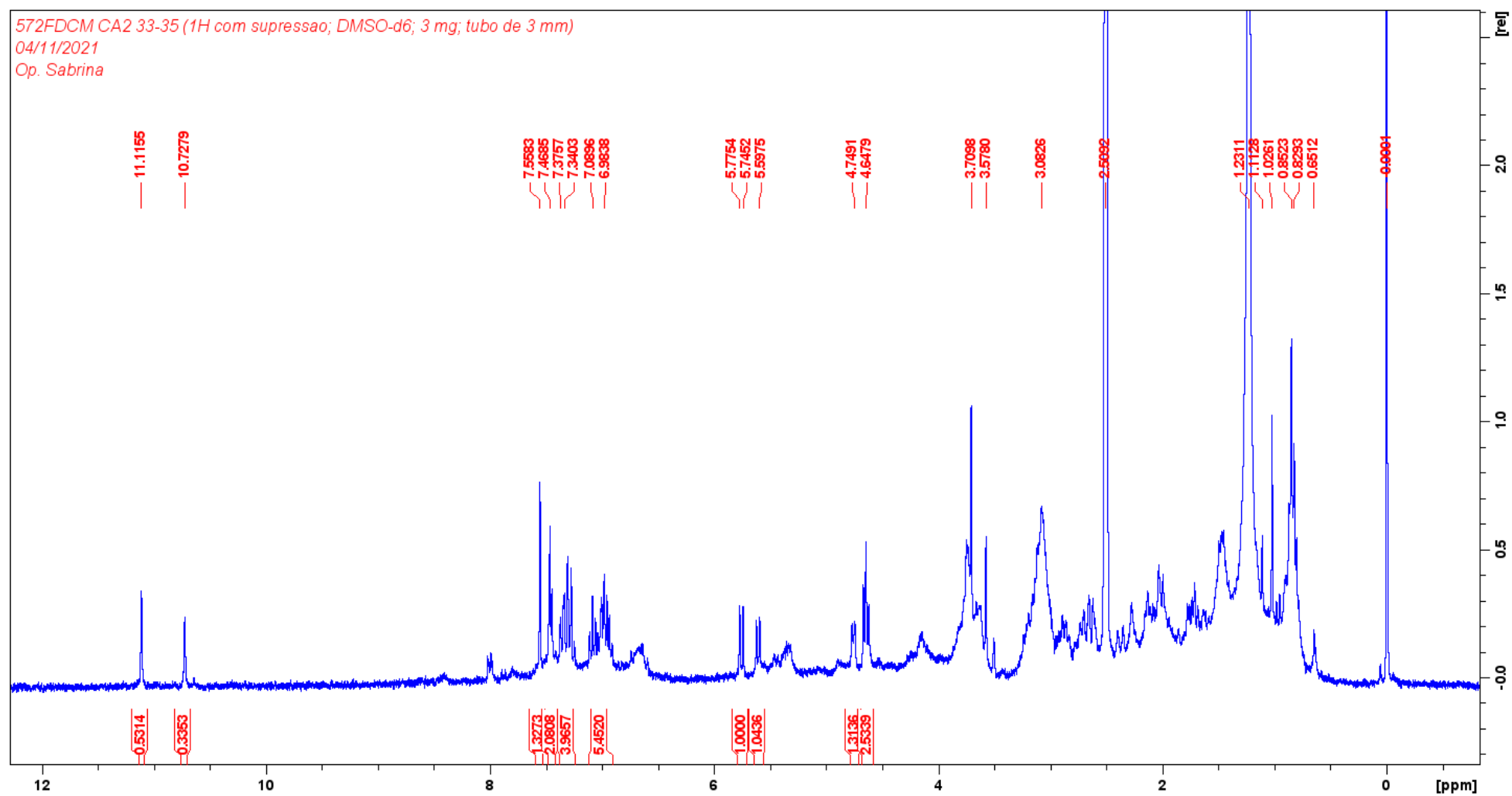
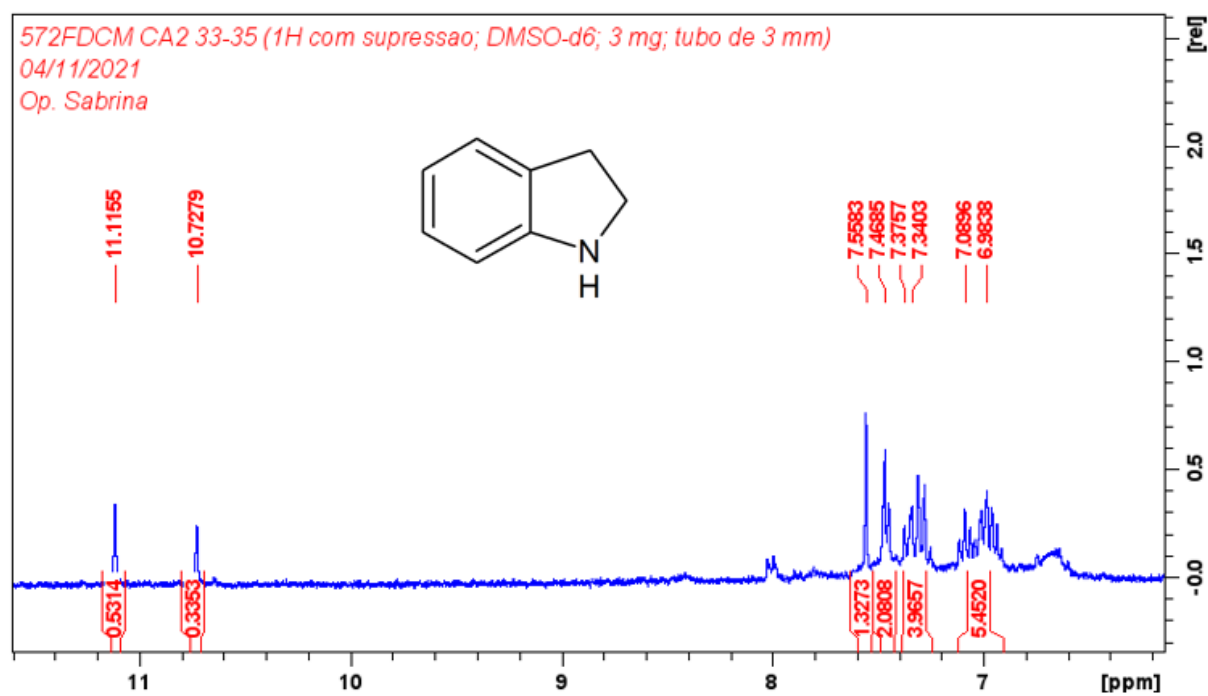


Figura 40: Expansão da região entre 6 a 11,5 ppm do espectro de RMN de ^1H da fração 33-35, indicando deslocamentos característicos de um núcleo indólico.



5.6 Atividades biológicas

5.6.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana pode ser observada nos extratos metanólico das folhas, como demonstrado na Tabela 10. Esse extrato foi ativo para os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) na concentração de 1000 µg/mL. Os demais extratos não apresentaram inibição dos microrganismos avaliados.

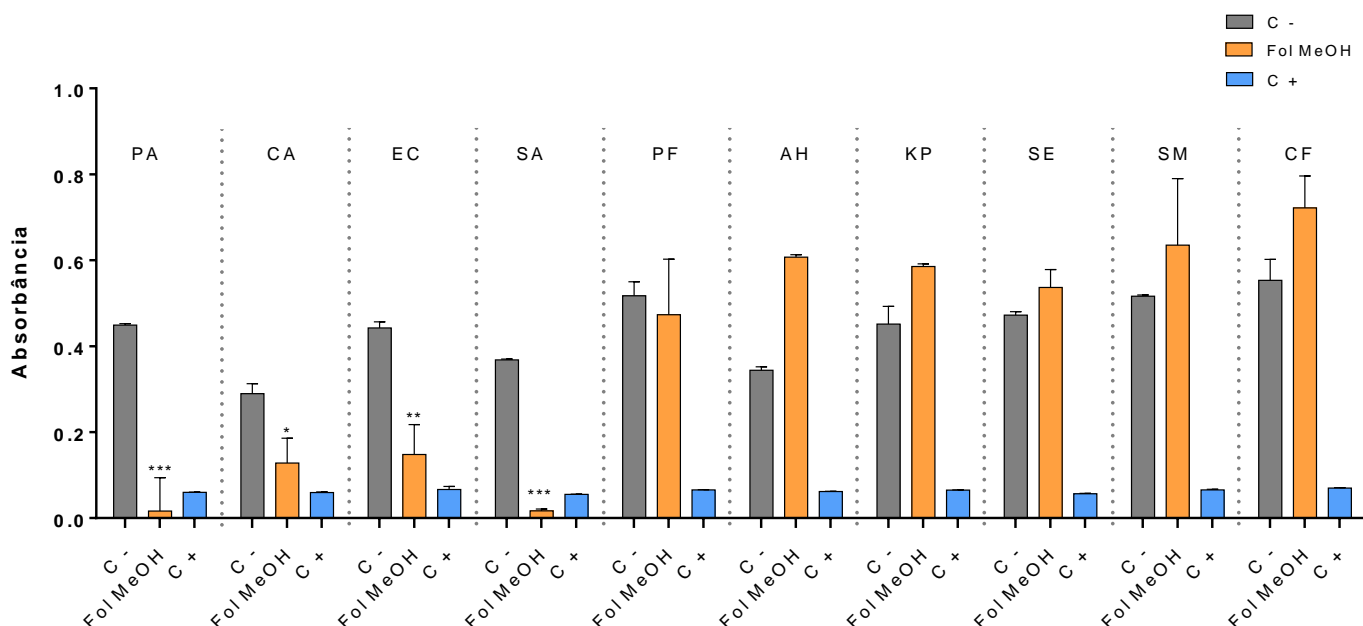
Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Warszewiczia coccinea*.

Extratos	AH	CF	EC	KP	PA	PF	SA	SE	SM	CA
Fol-MeOH	*	*	62%	*	96%	*	96%	*	*	78%
Fol- Hex	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ram-MeOH	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ram-Hex	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Bra-MeOH	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Legenda: (*) amostras que não apresentaram atividade, com valores de inibição menores que 20%. AH (*Aeromonas hydrophila*), CF (*Citrobacter freundii*), EC (*Escherichia coli*), KP (*Klebsiella pneumoniae*), PA (*Pseudomonas aeruginosa*), PF (*Pseudomonas fluorescens*), SA (*Staphylococcus aureus*), SE (*Salmonella enterica*), SM (*Serratia marcescens*), CA (*Candida albicans*); Ram: ramos, Fol: folhas; Bra: brácteas.

O extrato metanólico das folhas apresentou inibição dos microrganismos com diferenças significativas como observado no histograma da Figura 41. Nas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* pode ser observada uma grande inibição do crescimento, similar ao controle positivo (antibiótico padrão Oxitetraciclina 125 µg/mL). Também foi observada inibição para a levedura *Candida albicans* e para a bactéria *Escherichia coli*. Para os outros microrganismos o extrato não conseguiu inibir o crescimento.

Figura 41: Histograma da atividade antimicrobiana do extrato de folhas MeOH



Legenda: PA (*Pseudomonas aeruginosa*), CA (*Candida albicans*), EC (*Escherichia coli*), PF (*Pseudomonas fluorescens*), AH (*Aeromonas hydrophila*), KP (*Klebsiella pneumoniae*), SE (*Salmonella enterica*), SM (*Serratia marcescens*), CF (*Citrobacter freundii*), SA (*Staphylococcus aureus*); *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,5$.

Os resultados obtidos demonstram que no extrato metanólico das folhas há a presença de substâncias com atividade antimicrobiana na matriz desse extrato bruto. Conforme a literatura, os autores Rahgozar e colaboradores (2018) descrevem em seu estudo baseado em quimioinformática, que em *Warszewiczia coccinea* o ácido sumaresinólico possa apresentar atividade antimicobacteriana por apresentar similaridade estrutural com o ácido oleanólico, o qual possui forte sinergismo antimicobacteriano contra *Mycobacterium bovis*. No entanto, até o momento não foram relatados estudos sobre atividade antimicobacteriana dos extratos, frações ou substâncias isoladas de *W. coccinea*.

Após o fracionamento do extrato metanólico das folhas foi possível obter a substância escopoletina. Essa cumarina apresenta atividade antimicrobiana frente aos biofilmes de *Candida tropicalis* e outros receptores farmacológicos (Lemos et al. 2020), o que poderia justificar a atividade observada no extrato para *Candida albicans*. Contudo, outras substâncias presentes no extrato poderiam ser responsáveis pela atividade antimicrobiana.

5.6.2 Atividade Antioxidante

Os extratos metanólicos de folhas, ramos e brácteas que foram avaliados em ambas as metodologias utilizando DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina e não apresentaram atividade antioxidante quando avaliados na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

De acordo com a escala de interpretação (Tabela 12) baseada no trabalho de Martins e colaboradores (2014), observa-se que quanto mais próxima de 1 for a equivalência com o antioxidante padrão maior é a atividade antioxidante da amostra. Dentre os extratos avaliados, não foram observadas equivalências para atividade antioxidante, pois os valores de equivalência observados encontravam-se acima de 3,1.

Tabela 11: Resultados da atividade antioxidante dos extratos MeOH em valores médios de absorbância.

Extrato	Método usando DPPH•			Método usando Fe^{3+} /fenantrolina		
	[DABS ₅₁₇]	[AA] _{eq}	Equiv.	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.
Brácteas MeOH	0,105 \pm 0,011	1,068 \pm 0,094	4,704 \pm 0,406	0,612 \pm 0,018	1,219 \pm 0,018	4,10 \pm 0,061
Ramos MeOH	0,028 \pm 0,003	0,419 \pm 0,022	11,963 \pm 0,622	0,157 \pm 0,015	0,431 \pm 0,015	11,62 \pm 0,073
Folhas MeOH	0,069 \pm 0,014	0,765 \pm 0,118	6,637 \pm 0,950	0,432 \pm 0,045	0,908 \pm 0,078	5,53 \pm 0,492

Legenda: AA: ácido ascórbico; Equiv.: equivalência representada pela razão entre o resultado do extrato e o controle padrão (ácido ascórbico).

Tabela 12: Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martins et al. 2014).

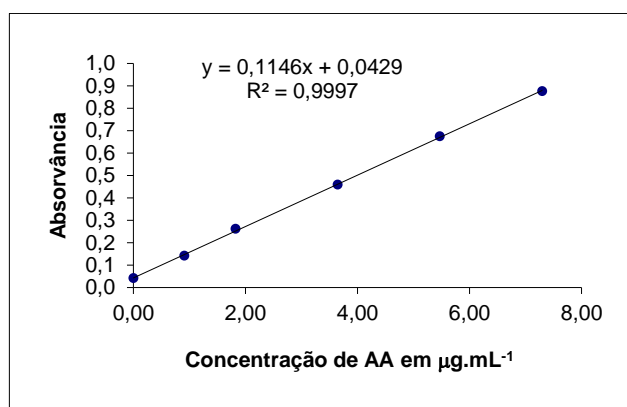
Escala de comparação	Atividade antioxidante
Menor que 1,0	Muito ativo
Entre 1,1 a 2,0	Ativo
Entre 2,1 a 3,0	Atividade moderada
Maior que 3,1	Inativo

Em todos os extratos avaliados, foi possível observar a presença de metabólitos com anel aromático, através das análises por CCDC e RMN de ^1H . O que poderia sugerir a presença de substâncias fenólicas que costumam apresentar atividade antioxidante (Silva e colaboradores 2010). Contudo, algumas substâncias podem conter o anel aromático, mas não serem fenólicas:

ausência de hidroxilas no anel ou substituição de hidroxilas por metoxilas, o que é muito comum na natureza. Para serem antioxidantes, substâncias fenólicas precisam apresentar capacidade de estabilização da carga positiva gerada via ressonância, conseguindo neutralizar agentes oxidantes.

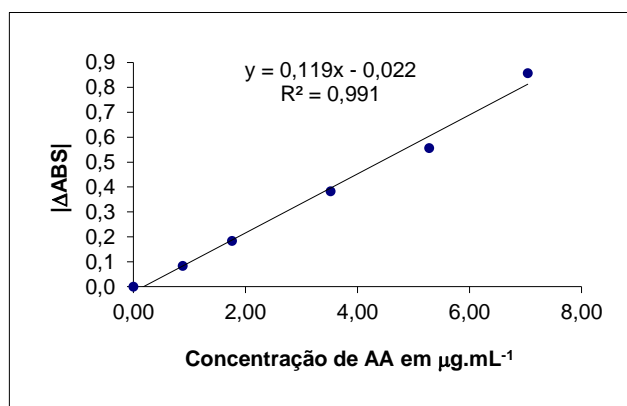
Apesar de ter sido isolada a cumarina escopoletina que contém uma hidroxila ligada ao anel aromático e dessa substância possuir potencial redutor frente ao radical livre DPPH (Adam et al. 2009, Jeong et al. 2011, Firmansyah et al. 2021), apenas a presença dela não garante a atividade antioxidante do extrato. As demais substâncias presentes ou são apenas aromáticas sem conterem hidroxilas ligadas aos anéis, ou as hidroxilas não estão livres, ou seja, podem estar ligadas a metilas, formando metoxilas.

Figura 42: Curva de ácido ascórbico com Fe^{3+} .



Legenda: AA: ácido ascórbico.

Figura 43: Curva de ácido ascórbico com DPPH.



Legenda: AA: ácido ascórbico.

5.6.3 Toxicidade frente a *Artemia salina*

Após os extratos serem submetidos ao ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach, foi possível observar pouca mortalidade entre as amostras avaliadas, como pode-se observar na Tabela 13.

Tabela 13: Mortalidade observada no ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*.

Extratos	Concentração avaliada ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (%)
Folhas MeOH	1000	27,8
Folhas Hexano	1000	9,72
Ramos MeOH	1000	2,77
Ramos Hexano	1000	9,72

Os extratos metanólicos e hexânicos de folhas e ramos apresentaram uma mortalidade menor que 50% quando avaliados na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Sendo que o extrato de folhas metanólico apresentou 27,8% de mortalidade.

De acordo com o estabelecido por Meyer e colaboradores (1982) e Nguta e colaboradores (2012) os resultados podem estar relacionados outras atividades biológicas. Ambos os autores preconizam que valores de mortalidade menores que 50% são considerados não tóxicos para o modelo do ensaio. Adicionalmente, recomendam que em extratos de plantas a concentração inicial para análise seja de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para que seja constatada toxicidade entre as amostras. A baixa toxicidade poderia sugerir baixa toxicidade em outros modelos experimentais, pois este ensaio é para uma triagem inicial dos extratos. Outros ensaios são necessários para verificar essa baixa toxicidade dos extratos testados.

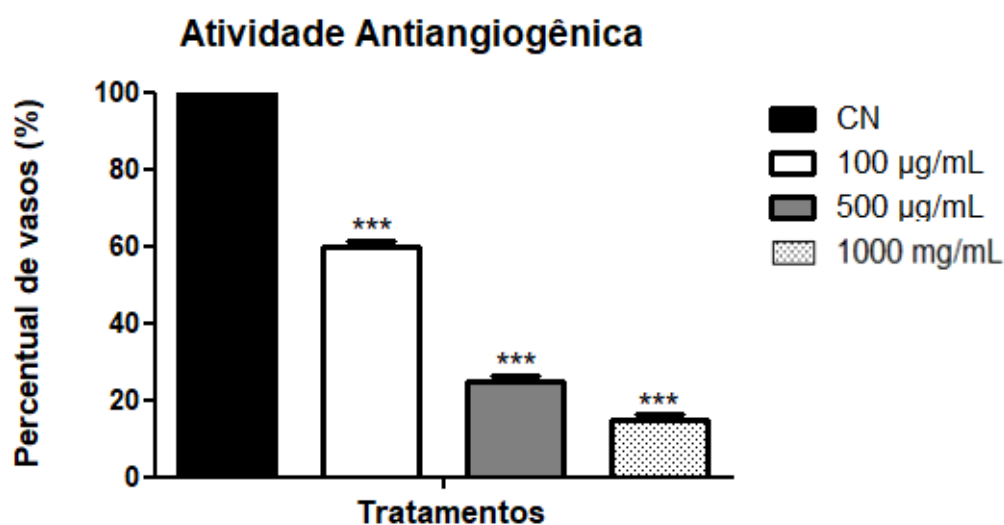
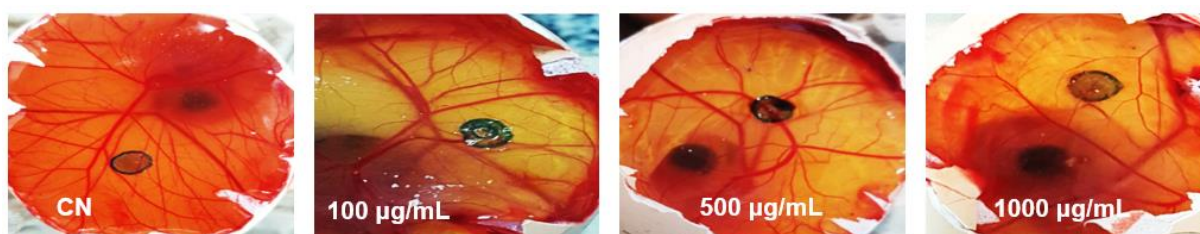
5.6.4 Atividade Antiangiogênica

Os extratos avaliados para a atividade angiogênica utilizando o modelo de membrana corioalantoica (CAM) mostraram resultados de inibição da formação de vasos e toxicidade nos

embriões de *Gallus domesticus*. Os extratos que puderam ser avaliados foram os extratos: hexânico de ramos, hexânico e metanólicos das folhas.

Como observado na Figura 44 o extrato hexânico dos ramos apresentou inibição da formação dos vasos em relação ao controle negativo (CN). Sendo observada que com o aumento da concentração do extrato. Pode se observar que nas concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ houve aumento da inibição em 40%, 70% e 80%, respectivamente. Portanto, para o extrato hexânico dos ramos foi constatada atividade antiangiogênica dose-dependente.

Figura 44: Atividade Antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato hexânico dos ramos.



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

Os extratos hexânicos e metanólicos de folhas apresentaram toxicidade em todas as concentrações testadas, com a viabilidade do grupo controle negativo. Segundo as recomendações de Nguyen e colaboradores (1994) a viabilidade dos embriões é necessária para descrever a atividade angiogênica, assim como a viabilidade do controle negativo para

validação do ensaio. Nesses extratos por conta da alta toxicidade, não foi possível observar a atividade angiogênica, sendo necessário avaliar concentrações menores, no entanto esses experimentos não puderam ser realizados por causa da pandemia. Mas conter substâncias tão tóxicas é um resultado muito promissor na busca por substâncias antitumorais.

O fracionamento do extrato metanólico das folhas permitiu o isolamento da escopoletina. Segundo Ahmadi e colaboradores (2019), essa substância e a epicatequina presentes nos extratos das folhas de *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) são potenciais agentes supressores da angiogênese. Ressaltando que os autores observaram os efeitos em ensaio utilizando modelo em células humanas e não constataram que as substâncias causaram toxicidade em linhagens saudáveis.

Portanto, a toxicidade que os extratos das folhas apresentaram poderia estar relacionada a atividade de outras substâncias presentes neles, como terpenos e alcaloides observados nas análises por CCDC e RMN de ^1H .

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, nos relatamos as atividades biológicas: antimicrobiana e antiangiogênica de folhas, ramos e brácteas de *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch. Dentre os extratos ativos, os extratos metanólicos das folhas apresentou atividade antimicrobiana inclusive para uma cepa de levedura: *Candida albicans*, o mesmo extrato apresentou toxicidade para o modelo de angiogênese (CAM). Através das análises de CCDC e RMN de ^1H , foram observados indícios de terpenos, substâncias aromáticas e alcalóides presentes nas frações e extratos metanólicos de folhas e brácteas. A partir do fracionamento dos extratos metanólicos das folhas, pode ser possível isolar uma substância bioativa: a escopoletina. Sendo esse, o primeiro relato de uma cumarina para o gênero *Warszewiczia*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, M.; Dobiáš, P.; Eisner, A.; Ventura, K. 2009. Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. *Journal of Separation Science* 32: 288–294.
- Ahmadi, N.; Mohamed, S.; Sulaiman Rahman, H.; Rosli, R. 2019. Epicatechin and scopoletin-rich *Morinda citrifolia* leaf ameliorated leukemia via anti-inflammatory, anti-angiogenesis, and apoptosis pathways in vitro and in vivo. *Journal of Food Biochemistry* 43: 1–12.
- Amarante, C.B. do; Müller, A.H.; Póvoa, M.M.; Dolabela, M.F. 2011. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica* 41: 431–434.
- Arbain, D.; Afrida; Ibrahim, S.; Sargent, M. V.; Skelton, B.W.; White, A.H. 1998. The Alkaloids of *Uncaria* cf. *glabrata*. *Australian Journal of Chemistry* 51: 961.
- Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79.
- Blackledge, R.D.; Taylor, C.M. 2003. *Psychotria viridis* - a botanical source of dimethyltryptamine (DMT). *Microgram Journal* 1: 18–22.
- Bolzani, V. da S.; Young, M.C.M.; Furlan, M.; Cavaleiro, A.J.; Araujo, A.R.; Silva, D.H.S.; et al. 2001. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. *Section Title: Plant Biochemistry* 5: 19–31.
- Bremer, B. 2009. A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 4–26.
- Bremer, B.; Eriksson, T. 2009. Time tree of rubiaceae: Phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766–793.
- Calderón, A.I.; Simithy, J.; Quaggio, G.; Espinosa, A.; López-Pérez, J.L.; Gupta, M.P. 2009. Triterpenes from *Warszewiczia coccinea* (Rubiaceae) as Inhibitors of Acetylcholinesterase. *Natural Product Communications* 4: 1934578X0900401.
- Cardoso, D.; Särkinen, T.; Alexander, S.; Amorim, A.M.; Bittrich, V.; Celis, M.; et al. 2017. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 10695–10700.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932–936.

- Cavalcante, M.F.; Oliveira, M.C.C. de; Velandia, J.R.; Echevarria, V. 2000. Síntese de 1,3,5-Triazinas preparadas e utilizadas no bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova* 23: 20–22.
- Céline, V.; Adriana, P.; Eric, D.; Joaquina, A.C.; Yannick, E.; Augusto, L.F.; et al. 2009. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 413–422.
- Chaturvedula, V.S.P.; Prakash, I. 2012. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* 1: 239–242.
- CLSI. 2015. *M100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute*. Vol. 32.1–184p.
- Coelho, V.P. de M.; Agra, M. de F.; Barbosa, M.R. de V. 2006. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 170–177.
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. 2006. *Fundamentos de cromatografia*. UNICAMP, Campinas, 452p.
- Cordell, G.A.; Quinn-Beattie, M. Lou; Farnsworth, N.R. 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research* 15: 183–205.
- Cruz, F.S. da; Pacheco de Araújo, M.G.; Nunez, C.V. 2019. Leaves of *Duroia longiflora*: Isolation of a Biflavanoid and Histochemical Analysis. *Natural Product Communications* 14.
- Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18: 499–514.
- Dewick, P.M. 2009. *Medicinal Natural Products Medicinal: a biosynthetic approach*. 3rd ed.
- Djerassi, C.; Gray, J.D.; Kincl, F.A. 1960. Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX.1 Isolation and Characterization of Genipin². *Journal of Organic Chemistry* 25: 2174–2177.
- Duncan, E.J. 2007. A Review on *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch—the ‘Chaconia.’ *Living World, Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists’ Club*: 1–7.
- El-Demerdash, A.; Dawidar, A.M.; Keshk, E.M.; Abdel-Mogib, M. 2009. Coumarins From *Cynanchum Acutum*. *Rev. Latinomer. Quim.* 1: 65–69.
- Eloff, J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711–713.

- Eloff, J.N.; Katerere, D.R.; McGaw, L.J. 2008. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 686–699.
- Estevez, Y.; Castillo, D.; Pisango, M.T.; Arevalo, J.; Rojas, R.; Alban, J.; et al. 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 254–259.
- Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 2014. *Raven / Biologia vegetal*. 8th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, .
- Fachin-Espinar, M.T.; Nunez., C.V. 2019. *Estudo Químico e Biológico de Warszewiczia schwackei (Rubiaceae)*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Amazônia.
- Falcão-Bücker, N.C. 2012. *Efeito antitumoral e antiangiogênico de extratos bruto e supecrítico de Bidens Pilosa L. e Casearia sylvestris Swartz*. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 113p, (<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/96382/310448.pdf?sequence=1&isAllowed=y>).
- Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872–879.
- Ferreira, V.F.; Pinto, A.C. 2010. A FITOTERAPIA NO MUNDO ATUAL. *Química Nova* 33: 3–4.
- Firmansyah, A.; Winingsih, W.; Manobi, J.D.Y. 2021. Review of scopoletin: Isolation, analysis process, and pharmacological activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11: 12006–12019.
- Flora do Brasil 2020. 2022. *Rubiaceae em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (acesso em 19/01/2022). (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB24621>). .
- Freedland, C.S.; Mansbach, R.S. 1999. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug and Alcohol Dependence* 54: 183–194.
- González, A.M.; Presa, M.; Latorre, M.G.; Lurá, M.C. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre Artemia salina. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 59–61.
- Gottlieb, O.R. 1982. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. *Journal of Ethnopharmacology* 6: 227–238.
- Gwak, M.-K.; Choi, H.-S.; Manochai, B.; Hong, J.-H. 2011. Extraction Procedures for Free Radical Scavenging Activity from Noni Fruit (*Morinda citrifolia*). *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 19: 38–46.

- Jeong, C.H.; Kwak, J.H.; Kim, J.H.; Choi, G.N.; Kim, D.O.; Heo, H.J. 2011. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. *Food Chemistry* 125: 417–422.
- Kainulainen, K.; Persson, C.; Eriksson, T.; Bremer, B. 2010. Molecular systematics and morphological character evolution of the Condamineeae (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 97: 1961–1981.
- Kim, B.C.; Kim, H.G.; Lee, S.A.; Lim, S.; Park, E.H.; Kim, S.J.; et al. 2005. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. *Biochemical Pharmacology* 70: 1398–1407.
- Koo, H.J.; Song, Y.S.; Kim, H.J.; Lee, Y.H.; Hong, S.M.; Kim, S.J.; et al. 2004. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology* 495: 201–208.
- Kurapati, K.R. V.; Atluri, V.S.; Samikkannu, T.; Garcia, G.; Nair, M.P.N. 2016. Natural products as Anti-HIV agents and role in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND): A brief overview. *Frontiers in Microbiology* 6: 1–14.
- Larsson, S. 2007. The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2904–2908.
- Lemos, A.S.O.; Florêncio, J.R.; Pinto, N.C.C.; Campos, L.M.; Silva, T.P.; Grazul, R.M.; et al. 2020. Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Li, S.; Tan, H.Y.; Wang, N.; Zhang, Z.J.; Lao, L.; Wong, C.W.; et al. 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 26087–26124.
- Lozano, S.A.; de Sousa, A.B.B.; de Souza, J.C.; da Silva, D.R.; Salazar, M.G.M.; Halicki, P.C.B.; et al. 2020. *Duroia saccifera*: In vitro germination, friable calli and identification of β -sitosterol and stigmasterol from the active extract against *Mycobacterium tuberculosis*. *Rodriguesia* 7.
- Maehara, S.; Simanjuntak, P.; Kitamura, C.; Ohashi, K.; Shibuya, H. 2012. Bioproduction of Cinchona alkaloids by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. associated with *Cinchona ledgeriana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 60: 1301–1304.
- Marec, F.; Kollárová, I.; Jegorov, A. 2001. Mutagenicity of Natural Anthraquinones from *Rubia tinctorum* in the *Drosophila* Wing Spot Test. *Planta Medica* 67: 127–131.

- Martins, D.; Nunez, C.V. 2014. *Estudo químico de Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae)*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, 231p, (<https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/4325/2/Tese - Daiane Martins.pdf>).
- Martins, D.; Nunez, C.V. 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20: 13422–13495.
- Martins, D.; Carrion, L.L.; Ramos, D.F.; Salomé, K.S.; Da Silva, P.E.A.; Barison, A.; et al. 2013. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *duroia macrophylla huber* (Rubiaceae). *BioMed Research International* 2013.
- Martins, D.; Fachin-Espinar, M.T.; Oliveira, T.A. de; Lima, K.C.S.; Cavalcanti, R.M.; Ronchi-Teles, B.; et al. 2014. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy Phamacognosy Research* 2: 158–171.
- Merck KGaA. 2022. *Scopoletin*. (Acesso em 16/02/2022). (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/s2500>).
- Mesquita, D.W.O.; Mesquita, A.S.S.; Cursino, L.M.C.; Souza, E.S.; Oliveira, A.C.; Pinheiro, C.C.S.; et al. 2015. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 17: 604–613.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.A.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. 1982a. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. Vol. 45.31–34p.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. 1982b. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. *Journal of Medicinal Plant Research* 45: 31–34.
- Mohammed, M.J.; Seaforth, C.E. 1981. Extractives of *Warszewiczia coccinea* Klotzch. *Revista Latinoamericana de Quimica* 12: 72–73.
- Mongrand, S.; Badoc, A.; Patouille, B.; Lacomblez, C.; Chavent, M.; Bessoule, J.J. 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 66: 549–559.
- Moreira, V.F.; Vieira, I.J.C.; Braz-Filho, R. 2015. Chemistry and Biological Activity of Condamineeae Tribe: A Chemotaxonomic Contribution of Rubiaceae Family. *American Journal of Plant Sciences* 06: 2612–2631.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 79: 629–661.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 83: 770–803.

- Nguta, J.M.; Mbaria, J.M.; Gakuya, D.W.; Gathumbi, P.K.; Kabasa, J.D.; Kiama, S.G. 2012. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal* 3: 30–34.
- Nguyen, M.; Shing, Y.; Folkman, J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular Research* 47: 31–40.
- Novaes, J. de A.P.; Nunez, C.V. 2008. *Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais* Ficha Catalográfica secos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas.
- Nunez, C.; Santos, P.; Roumy, V.; Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Mesquita, A.; et al. 2009. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Planta Medica* 75.
- Nunez, C. V.; Vasconcelos, M.C. 2012. Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. *Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.*
- Nunez, C. V.; Martins, D.; Ramos, D.F.; Silva, P.E.A. 2014. Uso de composto, método ex-vivo, processo e extrato purificado. *Patente: Privilégio de Inovação. Número de registro: BR1020140308636, data de depósito: 09/12/2014, Instituição de Registro INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.*
- Ono, M.; Ueno, M.; Masuoka, C.; Ikeda, T.; Nohara, T. 2005. Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53: 1342–1344.
- Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. 2008a. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 301–307.
- Ostrosky, E.A.; Muzumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. 2008b. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 301–307.
- Pedroza, L. da S.; Salazar, M.G.M.; Osorio, M.I.C.; Fachin-Espinar, M.T.; Paula, R.C. de; Nascimento, M.F.A. de; et al. 2020. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. *Revista Fitos* 14: 476–491.
- Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A. 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology* 3: 340–372.

- Radice, M.; Bravo, L.; Perez, M.; Cerda, J.; Tapuy, A.; Riofrío, A.; et al. 2017. Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología* 6: 55–64.
- Rahgozar, N.; Khaniki, G.B.; Sardari, S. 2018. Evaluation of antimycobacterial and synergistic activity of plants selected based on cheminformatic parameters. *Iranian Biomedical Journal* 22: 401–407.
- Reis, A.J.; Carrion, L.L.; Rodrigues, K.; Fenalti, J.M.; Mata-santos, T.; Scaini, C.J.; et al. 2016. Evaluation of antifungal, antimycobacterial and larvicide activity of the *Duroia macrophylla* and *D. saccifera*. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção* 1: 108–124.
- Ribeiro, J.E.L. da S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A. da S.; Brito, J.M. de; et al. 1999. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. In: INPA (Ed.) Manaus, .
- Rodrigues, K.; Ramos, D.F.; Carrion, L.L.; Cursino, L.M.C.; Jefreys, M.F.; Pedroza, L.S.; et al. 2014. Antifungal activity of Brazilian amazon plantas extracts against some species of *Candida* spp. *International Journal of Phytopharmacology* 5: 445–453.
- Shah, M.R.; Shamim, A.; White, L.S.; Bertino, M.F.; Mesaik, M.A.; Soomro, S. 2014. The anti-inflammatory properties of Au-scopoletin nanoconjugates. *New Journal of Chemistry* 38: 5566–5572.
- Silva, M.L.C.; Costa, R.S.; Dos Santos Santana, A.; Koblitz, M.G.B. 2010. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias* 31: 669–682.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P. de; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2017. *Farmacognosia do produto natural ao medicamento*. Artmed, Porto Alegre, .
- Singh, R. 2016. Chemotaxonomy: A Tool for Plant Classification. *Journal of Medicinal Plants Studies* 4: 90–93.
- Souza, R.K.D.; Mendonça, A.C.A.M.; Silva, M.A.P. da. 2013. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18: 140–156.
- Taylor, C.M.; Campos, M.T.V.A.; Zappi, D. 2007. FLORA DA RESERVA DUCKE, AMAZONAS, BRASIL: RUBIACEAE. *Rodriguesia* 58: 549–616.
- The Plant List. 2022. *Version 1.1. Published on the Internet*. (acesso em 20/01/2022). (<http://www.theplantlist.org/>). .
- Tropicos.org. 2021a. *Missouri Botanical Garden*. (acesso em 30/08/2021). (<https://tropicos.org/name/42000315>). .

- Tropicos.org. 2021b. *Missouri Botanical Garden*. (acesso em 30/08/2021). (<http://www.tropicos.org/Image/81840>). .
- Vashist, H.; Jindal, A. 2012. Antimicrobial Activities of Medicinal Plants – Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 3: 222–230.
- Xu, D.P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; et al. 2017. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 20–31.