

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DE**
Tabernaemontana catharinensis

CARLA NICOLA

Caxias do Sul

2013

CARLA NICOLA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DE
*Tabernaemontana catharinensis***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul
visando a obtenção do Grau de Mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

**Co-Orientadores: Prof^ª. Dra. Adriana Del C. E.Gower
Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva**

Colaboradora: Prof^ª. Dra. Mirian Salvador

Caxias do Sul

2013

CARLA NICOLA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DE
*Tabernaemontana catharinensis***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia.**


Orientador: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna


Co-Orientadora: Profa. Dra. Adriana Del Carmen E. Gower


Co-Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25 DE JANEIRO DE 2013

Comissão Examinadora:


Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare


Prof. Dr. Leandro Tasso


Profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

N634e Nicola, Carla
Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica de *Tabernaemontana catharinensis* / Carla Nicola. – 2013.
xi,48 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
“Orientação: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray”

1. Apocinácea – Atividade antioxidante. 2. Biotecnologia.
3. Botânica. I. Título.

Índice para o catálogo sistemático:

1. Apocinácea – Atividade antioxidante	582.923.5
2. Biotecnologia	57.08
3. Botânica	581

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Servi Gonçalves – CRB 10/1500

“... lembre sempre que todos fazemos parte dessa maravilhosa teia chamada vida criada por alguém bem superior a todos nós, e que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e sim nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós...”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

- À Universidade de Caxias do Sul e a Coordenação do PPGB pela oportunidade de realização desse trabalho de pesquisa;
- Ao Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray muito obrigada pela acolhida, orientação, dedicação e ensinamentos durante a realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva muito obrigada pela dedicação, co-orientação e oportunidades de aprendizado neste período;
- À Prof^a. Dra. Adriana Del C. E. Gower muito obrigada pelo apoio, co-orientação, amizade, dedicação e oportunidades de aprendizado neste período;
- À Prof^a. Dra. Mirian Salvador muito obrigada pelos ensinamentos e pela colaboração;
- Aos integrantes da minha banca de acompanhamento Prof^a Dra. Ana Paula Longaray Delamare e Prof. Dr. Diego Bonatto pelas idéias, atenção e ensinamentos;
- Ao Engenheiro Florestal Jorge Schirmer por ter me ajudado na etapa inicial do trabalho, obrigada pela amizade e disponibilidade;
- Ao Prof. Dr. Ronaldo A. Wasum do departamento de Botânica pela identificação da planta;
- Aos professores Dra. Maria Helena Sarragiotto e Dr. Willian Ferreira da Costa da Universidade Estadual de Maringá pela ajuda com análises por GC/MS;
- A todos os colegas e funcionários de Laboratório de Óleos Essenciais pela amizade, ajuda e disponibilidade em especial Fabiana Dagostini, alunas Josiane Boschetti e Ramone do Amaral Bertussi;
- A todos os colegas e funcionários do laboratório de Biotecnologia Vegetal pelo apoio, ajuda e amizade em especial Jucimar Zacaria;
- A toda a equipe do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes pela cooperação e amizade em especial Cátia Branco;
- Ao Prof Dr. Marcelo Rossato pela atenção dedicada nos primeiros meses do mestrado;
- Aos funcionários da UCS em especial integrantes da secretaria de pós graduação, vigilantes, bibliotecários e dos setores de manutenção;
- Aos amigos, familiares e colegas do PPGB pelo companheirismo e amizade em especial Claire Elise Chies e Gustavo Scola pelo grande apoio e amizade;
- Vera Maria Lorscheider, Iracema Elsa Gunsch, Marlene Torres dos Santos Selent, Nicolau Liscano Gomes por terem me ajudado a questionar os relatos do uso popular da *Tabernaemontana*;
- Ignez Tizatto Nicola e René Luiz Nicola (in memorian) pelo apoio incondicional e incentivo em todos os momentos ;
- A todos os demais que de alguma maneira estiveram ao meu lado na realização deste trabalho;

Muito Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Tabernaemontana catharinensis</i> : classificação e propriedades farmacológicas	3
2.2 Características químicas e extração de alcalóides indólicos	5
2.3 Espectrometria de massas na análise de alcalóides	11
2.4 A doença de Alzheimer e a abordagem terapêutica	11
2.5 Alcalóides como inibidores da acetilcolinesterase e métodos de avaliação.....	14
2.6 Atividade antioxidante de compostos presentes em <i>Tabernaemontana</i>	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral:.....	18
3.2 Objetivos específicos :	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Métodos de extração e purificação.....	19
4.2 Identificação dos alcalóides por espectrometria de massas.....	20
4.3 Determinação da atividade antioxidante	21
4.4 Atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase (AChE) e avaliação de parâmetros cinéticos.....	21
4.5 Análises estatísticas.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Extração e identificação de alcalóides.....	23
5.2 Atividade antioxidante do extrato bruto de <i>T. catharinensis</i> e suas frações	30
5.3 Atividade inibitória sobre a Acetilcolinesterase (AChE) e avaliação de parâmetros cinéticos.....	32
6. CONCLUSÕES.....	36
7. PERSPECTIVAS	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Pg
1	Classificação dos alcalóides indólicos presentes em <i>Tabernaemontana</i> adaptado de Van Beek <i>et al.</i> (1984) de acordo com a numeração atribuída para ioimbina	8
2	Compostos identificados no extrato de <i>T. catharinensis</i> por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS relacionados com a literatura	25
3	Atividade antioxidante das diferentes frações de <i>T. catharinensis</i>	31

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pg
1	Aspecto de muda (A), planta adulta (B, C) e flor (D) de <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	4
2	Origem biossintética resumida dos principais grupos de metabólitos secundários de plantas	6
3	Estrictosidina como precursor na biossíntese de alcalóides indólicos monoterpênicos	7
4	Estrutura química do alcalóide ioimbina para o modelo de classificação proposto por Le Men e Tailor 1965	7
5	Estrutura química dos principais alcalóides descritos em <i>Tabernaemontana spp.</i>	9
6	Representação da sinapse colinérgica nicotínica e ação dos anticolinesterásicos	13
7	Reações envolvidas na determinação da atividade da acetilcolinesterase	15
8	Diagrama do fracionamento do extrato de <i>T. catharinensis</i>	20
9	Espectro de massas [ESI(+)-MS] do extrato bruto de <i>T. catharinensis</i>	24
10	Espectro de massas [ESI(+)-MS/MS] da affinisina e fragmentações sugeridas	26
11	Espectro de massas [ESI(+)-MS] das frações B1(A), B2 (B) e B3 (C) do extrato de <i>T. catharinensis</i>	28
12	Espectro de massas [ESI(+)-MS] das frações C1(A), C2 (B), C3 (C), C4 (D), C5 (E) e C6 (F) do extrato de <i>T. catharinensis</i>	29
13	Concentração inibitória (IC ₅₀) do extrato e frações de <i>T. catharinensis</i> sobre a acetilcolinesterase de enguia elétrica	32
14	Cinética de Michaelis-Menten para a fração C6 (A), modelo linear para a fração C6 (B) e modelo linear para o controle galantamina (C).....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh- acetilcolina

AChE- acetilcolinesterase

APP- proteína precursora de amilóide

ATCI- iodeto de acetiltiocolina

CAT- colina-acetiltransferase

CCD- cromatografia em camada delgada

DPPH[•]- 1,1-difenil 2-picrilhidrazil

DTNB- ácido 5,5' ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EROS- espécies reativas de oxigênio

ESI- ionização por spray de elétrons

ESI(+)-MS/MS- espectrometria de massas por electrospray no modo positivo de 2^o ordem

ESI(+)-MS - espectrometria de massas de alta resolução por electrospray no modo positivo com injeção direta

IC₅₀- concentração de amostra (µg/ml) necessária para inibir 50% da atividade enzimática (AChE), ou concentração de amostra (µg/ml) necessária para varrer 50% do radical livre DPPH[•]

m/z - relação massa/carga

RESUMO

Tabernaemontana catharinensis ADC é uma planta arbórea da família *Apocynaceae* encontrada no Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. O gênero *Tabernaemontana* tem despertado interesse devido à importante atividade biológica dos seus extratos, particularmente, atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, anticolinesterásica, anti-inflamatória, entre outras, as quais têm sido associadas à presença de alcalóides indólicos. Embora diversas atividades biológicas tenham sido relatadas em extratos de *T. catharinensis*, poucas substâncias que combinem atividade antioxidante e anticolinesterásica têm sido descritas. A associação destas propriedades pode representar uma das alternativas para estudos visando o controle de desordens neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o conteúdo de alcalóides presentes em extrato etanólico e frações de *T. catharinensis*, assim como avaliar a sua atividade antioxidante e anticolinesterásica. A análise do extrato etanólico de *T. catharinensis* por espectrometria de massas permitiu identificar a presença dos alcalóides 16-epi-affinina, coronaridina-hidroxiindolenina, voachalotina, voacristina-hidroxiindolenina e 12-metoxi-n-metilvoachalotina, além de um alcalóide com m/z 385,21 cujo espectro é compatível com derivado de voacristina ou voacangina. O extrato e suas frações ricas em alcalóides apresentaram atividade antioxidante, especialmente aquelas contendo o alcalóide com m/z 385,21 ou com 16-epi-affinina com capacidade de varredura de 50% do radical DPPH^{*} da ordem de 37,18 a 74,69 $\mu\text{g/ml}$. Da mesma forma, tanto o extrato como as suas frações apresentaram atividade anticolinesterásica, sobressaindo as frações caracterizadas pela presença de 12-metoxi-n-metilvoachalotina, com IC_{50} de 2,1 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Frações contendo 16-epi-affinina combinaram boa atividade antioxidante (IC_{50} = 65,59 a 74,69 $\mu\text{g/ml}$) e anticolinesterásica (IC_{50} = 7,7 a 8,3 $\mu\text{g/ml}$), representando uma opção para futuras pesquisas envolvendo o tratamento de doenças neurodegenerativas.

ABSTRACT

Tabernaemontana catharinensis A.D.C. is a small tree of the *Apocynaceae* family currently found in Brazil, Argentina, Uruguay, Paraguay and Bolivia. The genus *Tabernaemontana* has evoked interest due to the important biological activity of their extracts, particularly, antimicrobial, anti-tumoral, antioxidant, anti-cholinesterasic and anti-inflammatory activities, most of which have been associated to indolic alkaloids. Although several biological activities of *T. catharinensis* extracts have been reported, few substances with both antioxidant and anticholinesterasic activities have been identified. The association of these properties may represent an alternative for the studies involving the control of neurodegenerative disorders as Alzheimer disease. In this context, the present work aimed to analyze the alkaloid content of the ethanolic extract of *T. catharinensis* and its fractions, as well as to evaluate their antioxidant and anticholinesterasic activities. The analyses of the ethanolic extract of *T. catharinensis* by mass spectrometry allowed identifying the presence of the alkaloids 16-epi-affinine, coronaridine-hydroxyindolenine, voachalotine, voacristine-hydroxyindolenine, and 12-methoxy-n-methyl-voachalotine, as well as an alkaloid with m/z 385.21 which spectrum suggest a derivative of voacristine or voacangine. The extract and its alkaloid rich fractions showed antioxidant activity, especially those that contain the alkaloid m/z 385.21 or 16-epi-affinine with DPPH scavenging activity (IC_{50}) between 37.18 and 74.69 $\mu\text{g/ml}$. Moreover, the extract and its fractions exhibited anticholinesterasic activity, particularly the fractions characterized by the presence of 12-methoxy-n-methyl-voachalotine, with $IC_{50} = 2.1$ e 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Fractions with 16-epi-affinine combined good antioxidant ($IC_{50} = 65.59$ to 74.69 $\mu\text{g/ml}$) and anticholinesterasic ($IC_{50} = 7.7$ to 8.3 $\mu\text{g/ml}$) activities, representing an option for further studies aimed at treating neurodegenerative diseases.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva relacionada com a predisposição genética que se caracteriza pela presença de emaranhados neurofibrilares, formação da deposição extracelular do peptídeo β -amilóide, estresse oxidativo, produção elevada de radicais superóxido e a diminuição dos níveis de neurotransmissores (Mattson, 2004; Verri *et al.*, 2012). Os tratamentos disponíveis para combater os sintomas desta patologia são complexos e incluem o aumento dos níveis de acetilcolina em regiões cerebrais como córtex frontal e hipocampo, além da possível prevenção da degeneração neuronal com o uso de antioxidantes (Youdim *et al.*, 2005).

Os produtos naturais derivados de plantas representam uma alternativa viável para a descoberta de novas substâncias potencialmente ativas, tendo em vista as limitadas opções existentes para o tratamento de Alzheimer. O gênero *Tabernaemontana* (família *Apocynaceae*) apresenta cerca de 100 espécies, 27 delas encontradas no Brasil (Leeuwenberg, 1994). Pesquisas com extratos de *T. catharinensis* A.D.C., conhecida popularmente como cobrina ou leiteira, mostraram uma série de efeitos biológicos, entre eles a atividade antioxidante (Pereira *et al.*, 2005) e a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (Andrade *et al.*, 2005).

Alcalóides indólicos monoterpênicos foram identificados como responsáveis pela atividade anticolinesterásica em várias espécies de *Tabernaemontana* (Vieira *et al.*, 2008). Entretanto, poucas substâncias com atividade anti-acetilcolinesterásica e capazes de minimizar danos causados pelo estresse oxidativo têm sido descritas em *T. catharinensis*.

Alguns estudos atribuem a atividade antioxidante de *Tabernaemontana* ao possível sinergismo existente entre as substâncias presentes em seus extratos, entre elas, triterpenos, esteroides, ácidos graxos (Pereira *et al.*, 2005) enquanto outros sugerem que a atividade poderia estar relacionada com a presença de alcalóides indólicos do tipo

iboga (Santos *et al.*, 2009). Da mesma maneira que a atividade antioxidante nestes extratos requer maiores esclarecimentos, a busca por compostos que apresentem associação de propriedades farmacológicas pode representar uma alternativa promissora para a descoberta de terapias medicamentosas mais completas para doenças como Alzheimer.

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição do extrato etanólico obtido de partes aéreas de *T. catharinensis*, verificar a atividade antioxidante e anticolinesterásica *in vitro* do extrato e das suas principais frações, e relacionar as atividades biológicas com os compostos identificados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Tabernaemontana catharinensis*: classificação e propriedades farmacológicas

Apocynaceae é uma das grandes famílias do grupo das angiospermas, com aproximadamente 375 gêneros distribuídos mundialmente em regiões tropicais e subtropicais (Souza e Lorenzi, 2005; Simões et al, 2010). Pertencente à esta família, o gênero *Tabernaemontana*, descoberto por Linnaeus em 1753 na Asia Central (apud. Simões et al., 2010), apresenta cerca de 44 espécies encontradas principalmente nas Américas. No Brasil são descritas 27 espécies do gênero *Tabernaemontana* (Pereira et al., 1999; Souza et al., 2006).

A similaridade morfológica de *Tabernaemontana* com os gêneros *Bonaifousia* e *Peschiera* sugeridos por de Candolle em 1844 (apud. Simões et al., 2010), assim como o gênero *Stemmadenia* descrito por Bentham em 1845 (apud. Simões et al., 2010) propiciaram questionamentos quanto à classificação botânica do grupo. Autores como Miers (1878) consideraram *Tabernaemontana* restrita à regiões Neotropicais e segregaram as espécies Africanas em gêneros diferentes (apud. Simões et al., 2010). Por outro lado, Pichot em 1948 (apud. Simões et al., 2010) sugeriu a união das espécies Neotropicais e Paleotropicais. Leeuwenberg (1994) revisou as publicações anteriores e com novos estudos definiu a situação atual do gênero atribuindo sinonímias para espécies anteriormente separadas.

Ao considerar a complexidade de classificação botânica em *Tabernaemontana*, as avaliações fitoquímicas muitas vezes foram utilizadas para dar suporte à classificação morfológica (Van Beek et al., 1984). Com a limitação de que diferenças quimiotaxonômicas entre gêneros próximos confirmam-se pela presença de metabólitos pouco abundantes nos vegetais (Allorge, 1985 apud. Rates et al., 1988), os estudos moleculares atualmente vêm contribuindo para a elaboração de hipóteses filogenéticas mais abrangentes. Avaliações de características morfológicas e moleculares de 104

espécies da tribo *Tabernaemontaneae*, sugeriram algumas alterações na classificação revisada por Leeuwemberg (1994) entre elas a união dos gêneros *Stemmadenia* e *Tabernaemontana* (Simões *et al.*, 2010).

De acordo com Leeuwemberg (1994), *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C é sinônimo de *Peschiera catharinensis* ADC, mas também já foi denominada de *T. affinis*, *T. australis*, *P. australis*, *T. hilariana*, *T. hydrida*, *T. acummiata*, *P. albidiflora* e *T. salicifolia*.

T. catharinensis é descrita como uma planta arbustiva de 0,8 a 6m de altura com ramos glabros, folhas estreito-lanceoladas a lanceoladas com lâmina membranácea, base aguda e margem levemente ondulada a plana. Inflorescência terminal, cimóide corimbiforme com 5 a 6 flores. As flores com 1 cm de comprimento, albas e glabras (Figura 1). Esta espécie tem sido descrita na Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil (Matozinhos e Konno, 2011).



Figura 1. Aspecto de muda (A), planta adulta (B, C) e flor (D) de *Tabernaemontana catharinensis*.

Avaliações fitoquímicas do gênero *Tabernaemontana* constataram a presença de alcalóides indólicos, triterpenos, esteróides e ácidos fenólicos (Van Beek, 1984). Entre estes, os alcalóides indólicos constituem a maioria dos metabólitos secundários encontrados neste gênero (Van Der Heyden *et al.*, 1987; Munoz *et al.*, 1994; Pelletier, 1999).

Os alcalóides indólicos têm sido associados à atividade de extratos de *Tabernaemontana* contra *Plasmodium falciparum* (Federici *et al.*, 2000), *Leishmania amazonensis* (Soares *et al.*, 2007), *Trypanosoma cruzi* (Bradacs *et al.*, 2010), assim como atividade antitumoral (Pereira *et al.*, 2006; Meschini *et al.*, 2005, 2008; Sertel *et al.*, 2011; Mansoor *et al.*, 2012), anti-acetilcolinesterásica (Andrade *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008), ação depressora sobre o sistema nervoso central (Taesotikul *et al.*, 1998), atividade antiofídica (Batina *et al.*, 1997, 2000; Veronese *et al.*, 2005), antifúngica (Steenkamp *et al.*, 2007), antibacteriana (Suffredini *et al.*, 2002; Guida *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005), antioxidante (Pereira *et al.*, 2005), analgésica e anti-inflamatória (Henriques *et al.*, 1996).

2.2 Características químicas e extração de alcalóides indólicos

Alcalóides representam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, em particular de origem vegetal, que se caracterizam pela presença de nitrogênio, em geral com propriedades básicas (Pelletier, 1986; Costa, 2002; Wink, 2010). São classificados de acordo com a sua molécula precursora (Aniszewski, 2007), como os derivados de aminoácidos, peptídeos, acetato e ácido nicotínico, ou em alguns casos, a classificação procede de acordo com a estrutura molecular exclusiva do metabolismo secundário de determinadas famílias ou espécies.

Os alcalóides indólicos, principais compostos presentes em *Tabernaemontana*, são substâncias derivadas do metabolismo do triptofano que se caracterizam por apresentar um núcleo indol (anel benzênico acoplado a um anel de pirrol) ou seus derivados (Cordell, 1981). Os alcalóides indólicos podem ser subdivididos em cinco grupos: alcalóides indólicos simples, carbonílicos, pirroloindólicos, ergolinas e indolmonoterpênicos (Dewick, 2006).

Os alcalóides indólicos monoterpênicos (de maior prevalência em *Tabernaemontana*) são produtos da condensação de secologanina com triptamina. Neste caso, o triptofano é usualmente convertido em triptamina pela enzima triptofano descarboxilase (Wink, 2010). Esta enzima, assim como as enzimas strictosidina sintase, strictosidina glicosidase, isopentenil pirofosfato isomerase e geraniol 10-hidroxilase, foram isoladas de *T. divaricata* por Dagnino *et al.* (1994) permitindo alguns esclarecimentos sobre a origem biossintética dos diversos alcalóides indólicos deste gênero.

De um modo geral, a strictosidina sintase é responsável por catalisar a condensação da triptamina com o secoiridóide secologanina, que é formado a partir do monoterpene pirofosfato de geranila, com a consequente formação de strictosidina, um alcalóide glicosilado (Figura 2) (Simões *et al.*, 2004). Por sua vez, a eliminação da glicose pode levar a formação de distintas estruturas moleculares (Figura 3) (Van Beek *et al.*, 1984a).

Apesar da descoberta dos sistemas enzimáticos descritos (Luijendijk *et al.*, 1996; Kroon *et al.*, 1997; Ramas-Valdivia *et al.*, 1998), a origem de muitos alcalóides indólicos presentes em *Tabernaemontana* ainda requer maiores esclarecimentos.

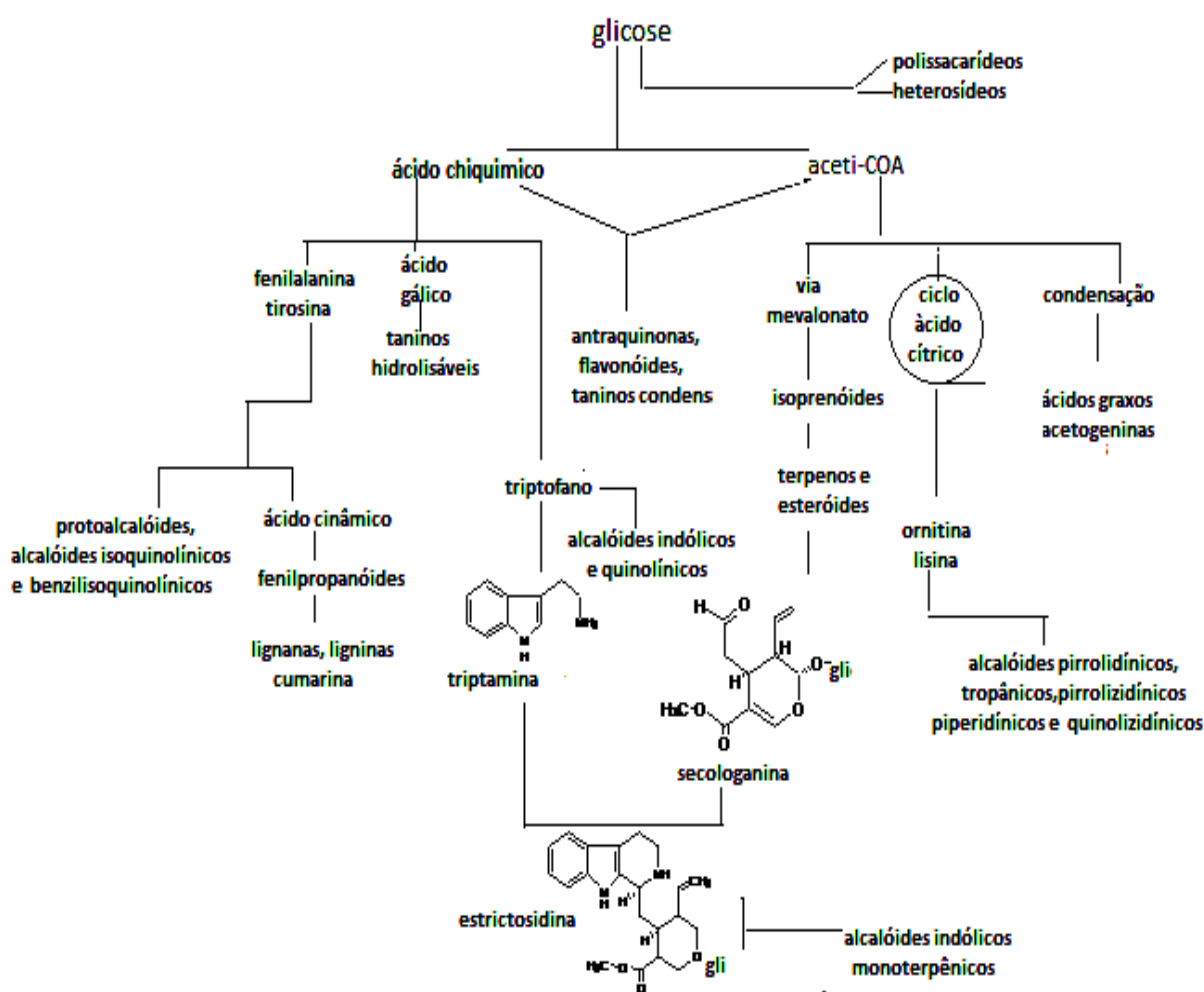


Figura 2. Origem biossintética resumida dos principais grupos de metabólitos secundários de plantas (adaptado de Simões *et al.*, 2004).

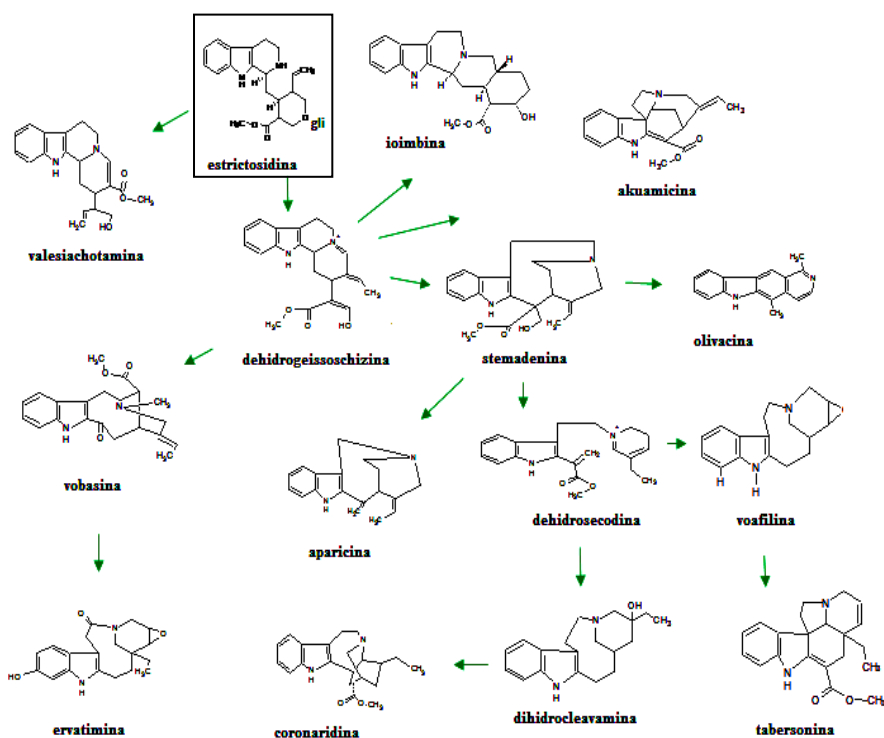


Figura 3. Estrictosidina como precursor na biossíntese de alcalóides indólicos monoterpênicos (adaptado de Van Beek *et al.*, 1984).

A classificação dos alcalóides indólicos encontrados no gênero *Tabernaemontana* tem como base o modelo proposto por Le Men e Taylor (1965) que descreveu a numeração das estruturas de acordo com o esqueleto da ioimbina (Figura 4). A classificação inicial foi revisada e ampliada por Van Beek *et al.*, (1984) que separou os alcalóides de *Tabernaemontana* nas classes Vincosa, Corinantea, Vallesiachotama, Estrictina, Aspidospermata, Plumera, Eburá, Iboga, Tacama, Bis-indólica e Carbazólica (Tabela 1).

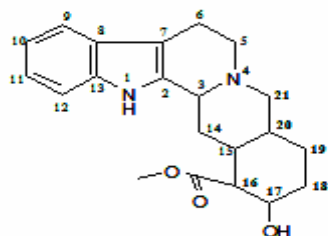


Figura 4. Estrutura química do alcalóide ioimbina para o modelo de classificação proposto por Le Men e Taylor (1965)

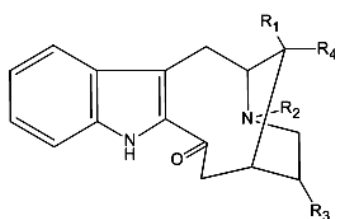
Tabela 1. Classificação dos alcalóides indólicos presentes em *Tabernaemontana* de acordo com a numeração atribuída para ioimbina (adaptada de Van Beek *et al.*, 1984).

Classe	Característica estrutural
Aspidospermata	Unidade C ₂ -C ₁₆ -C ₁₅ ; ausência de C ₃ -C ₇
Bis-indólica	Dois alcalóides indólicos unidos um ao outro
Corinantea	Unidade C ₂ -C ₃ -C ₁₄ e N ₄ -C ₂₁
Eburna	Unidade N ₁ -C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀
Estricna	Unidade C ₂ -C ₁₆ -C ₁₅ e C ₃ -C ₇
Iboga	Unidade C ₂ -C ₁₆ -C ₁₇ -C ₁₄
Plumera	Unidade C ₂ -C ₁₆ -C ₁₇ -C ₂₀
Tacama	Unidade N ₁ -C ₁₆ -C ₁₇ -C ₁₄
Vallesiachotama	Unidade C ₂ -C ₃ -C ₁₄ e N ₄ -C ₁₇
Vincosa	Unidade C ₂ -C ₃ -C ₁₄ ; ausência de N ₄ -C ₁₇ ou N ₄ -C ₂₁

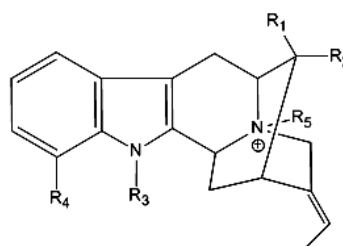
Avaliações de extratos obtidos de ramos de *T. catharinensis* levaram a confirmação da presença em maior quantidade de alcalóides da classe Iboga, com destaque para coronaridina, voacangina além de ibogamina, voacristina e seus derivados (Guida *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004-2007; Soares *et al.*, 2007). A estrutura dos principais alcalóides de *Tabernaemontana sp.* de acordo com Van Beek *et al.* (1984), são apresentadas na Figura 5.

A extração de alcalóides indólicos é realizada considerando o fato de que estas substâncias apresentam caráter básico e habitualmente podem formar sais com ácidos (Costa, 2002). Em pH baixo, os alcalóides presentes em extratos vegetais são convertidos na forma da sal, tornando-se solúveis em soluções aquosas. Subsequentemente, adições de soluções aquosas alcalinas promovem o desprendimento dos alcalóides de suas combinações salinas, que tornam assim os alcalóides livres e solúveis em solventes orgânicos (Brossi, 1986; Bruneton, 2001). Muitas modificações têm sido feitas com a finalidade de isolar diferentes tipos de alcalóides, entre elas, a partição fase orgânica/fase aquosa a diferentes valores de pH. Reativos cromogênicos tais como Dragendorff, solução de iodo-iodeto e iodoplatinato podem ser utilizados para identificar a presença de alcalóides em extratos ou frações (Simões *et al.*, 2004).

Classe Corinantea

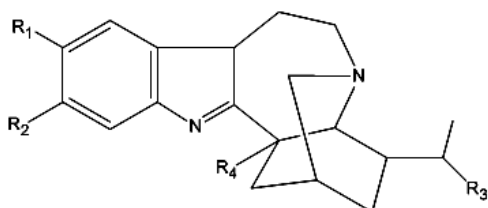


	R1	R2	R3	R4
Affinina	CH ₂ OH	CH ₃	CHMe	H
16-epi-affinina	H	CH ₃	CHMe	CH ₂ OH
Histrixnina	H	CH ₃	CHMe	CH ₂ OMe
Perivina	COOMe	H	CHMe	H
Vobasina	COOMe	CH ₃	CHMe	H
Tabernaemontanina	COOMe	CH ₃	CH ₂ Me	H



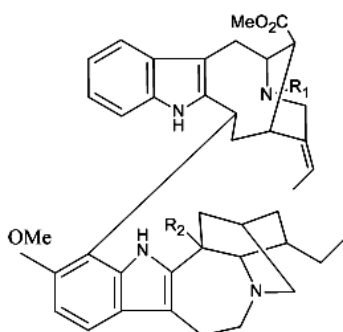
	R1	R2	R3	R4	R5
Affinisina	H	CH ₂ OH	Me	H	-
n-metilaffinisina	H	CH ₂ OH	Me	H	Me
n-metil-voachalotina	CH ₂ OH	COOMe	Me	H	Me
12-metoxi-n _b -metilvoachalotina	CH ₂ OH	COOMe	Me	OMe	Me
Periciclivina	COOMe	H	H	H	-
Voachalotina	CH ₂ OH	COOMe	Me	H	-

Classe Iboga



	R1	R2	R3	R4
Coronaridina	H	H	H	COOMe
Conofaringina	OMe	OMe	H	COOMe
Heineanina	H	H	_B OH	COOMe
Ibogaina	OMe	H	H	H
Ibogamina	H	H	H	H
Iboxigaina	OMe	H	_B OH	H
Isovoacangina	H	OMe	H	COOMe
19-epi-isovoacristina	H	OMe	_a OH	COOMe
Tabernantina	H	OMe	H	H
Voacristina	OMe	H	OH	COOMe
Voacangina	OMe	H	H	COOMe

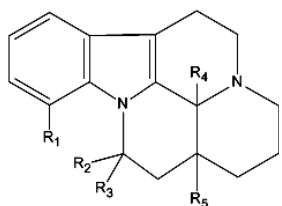
Classe Bis-indólica



	R1	R2
Voacamina	CH ₃	COOMe
16-decarbometoxivoacamina	CH ₃	H
Tabernamina	H	H

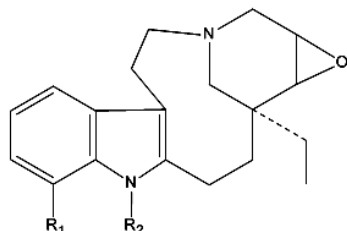
Figura 5. Estrutura química dos principais alcalóides de *Tabernaemontana spp*

Classe Eburna

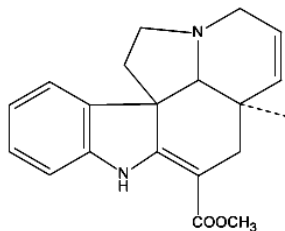


	R1	R2	R3	R4	R5
Vincamina	H	OH	COOCH ₃	H	C ₂ H ₅
Dehidro-metoxi-vincamina	OCH ₃	OH	COOCH ₃	H	C ₂ H ₅

Classe Plumera

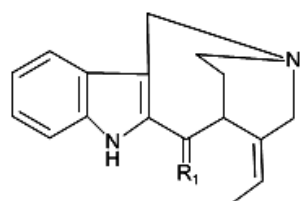


	R1	R2
Voafilina	H	H
n-metilvoafilina	H	CH ₃



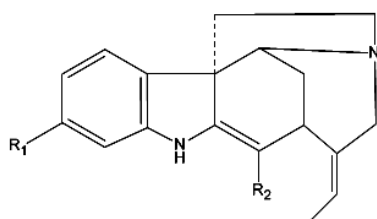
tabersonina

Classe Aspidorpermata



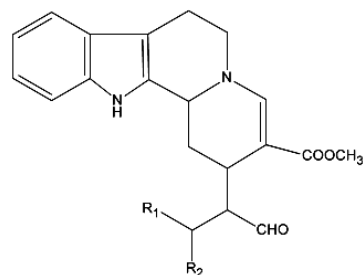
	R1
Aparicina	CH ₂
Valesamina	CH ₂ OH, COOCH ₃

Classe Estricna



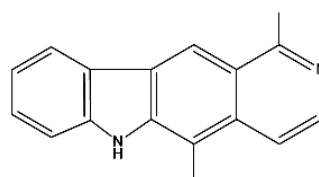
	R1	R2
Akuamicina	H	COOCH ₃
Vincanidina	OH	CHO

Classe Valesiachotoma



	R1	R2
Valesiachotamina	CH ₃	H
Isovalesiachotamina	H	CH ₃

Classe Carbazólica



olivacina

Figura 5. Estrutura química dos principais alcalóides de *Tabernaemontana spp.* (cont.).

2.3 Espectrometria de massas na análise de alcalóides

Desde os primeiros relatos de análises espectrométricas de alcalóides descritos por Bieman *et al.* em 1960 (apud Budzikiewicz *et al.*, 1964) até as recentes investigações, pode-se considerar a espectrometria de massas como um dos métodos indispensáveis para análise e elucidação química, pois além de proporcionar a massa molar, permite a obtenção de informação estrutural da molécula (Vekey, 2001).

O princípio básico da espectrometria é o processo de conversão de um átomo em um íon adicionando ou removendo partículas carregadas com elétrons. A ionização pode ser promovida por diferentes técnicas, entre as quais a ionização por spray de elétrons (ESI). Neste caso, um solvente volátil contendo os analitos é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Uma alta tensão é aplicada à ponta desse capilar e como consequência desse forte campo elétrico a amostra que sai pelo capilar estará dispersa em um aerossol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas (Yamashita e Fenn, 1984). Ao observar a complexa constituição dos extratos brutos de plantas, Lépine *et al.* (2002) consideraram a cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas por electrospray (HPLC-ESI-MS) um método eficiente na determinação e quantificação de compostos, e em especial, alcalóides presentes em *Tabernaemontana*.

Existem duas principais razões a serem consideradas nas investigações espectrométricas de alcalóides indólicos. A primeira delas é que estes compostos apresentam dois centros: o núcleo indólico e o nitrogênio básico com considerável capacidade de estabilizar cargas positivas. A segunda delas é que apresentam estrutura cíclica de carbonos propensas a ruptura, proporcionando a formação de fragmentos iônicos. Leves mudanças nas estruturas cíclicas de carbono proporcionam a formação de diferentes fragmentos iônicos e permitem a identificação do composto, ou no caso de compostos não descritos, permite verificar se pertencem a um determinado sub-grupo (Budzikiewicz *et al.*, 1964; Silverstein, 2006).

2.4 A doença de Alzheimer e a abordagem terapêutica

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada por manifestações neuropsiquiátricas (Giacobini *et al.*, 2003; Parihar e

Hemnani, 2004). Nos países desenvolvidos atinge 1,5% da população em torno dos 65 anos e podem alcançar 30% em média ao redor dos 80 anos (Ritchie e Lovestone, 2002). Diversos fatores estão relacionados com esta neuropatologia, sendo o fator genético o principal. Os fatores genéticos mais relacionados com esta patologia são mutações do gene da proteína precursora do amilóide (cromossomo 21), dos genes pré-senilinas 1 e 2 (cromossomo 14 e 1, respectivamente), bem como o polimorfismo da apolipoproteína E (cromossomo 19) que participa do transporte de colesterol para os neurônios. Além disso, agentes como, alumínio, radicais livres de oxigênio, aminoácidos neurotóxicos (Cummings *et al.*, 1998; Kawahara e Kato-Negishi, 2011) e condições como hipertensão e hiperlipidemia (Casserly, 2004; Patterson *et al.*, 2008) são considerados fatores desencadeantes desta neuropatologia.

A deposição extracelular de peptídeo β -amilóide, ou $A\beta$, derivado da proteína precursora de amilóide (APP), em placas senis (agregados amorfos de $A\beta$), a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFI) contendo uma proteína associada à microtúbulos (TAU) hiperfosforilada, são características moleculares presentes na doença de Alzheimer, que envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio. Quando o acúmulo de $A\beta$ acontece na região da membrana plasmática, ocorre lipoperoxidação como consequência do estresse oxidativo com produção de 4-hidroxinonenal, um aldeído neurotóxico, e também oxidação de proteínas como ATPases e canais iônicos. Além disso, alterações na homeostase quanto à permeabilidade celular para íons Ca^{+2} podem estar relacionadas com a disfunção e morte neuronal. (Siems *et al.*, 1992; Montine *et al.*, 1997; Shipling *et al.*, 2000; Mattson, 2004).

A deficiência nas funções cognitivas como perda de memória, distúrbios de linguagem e instabilidade emocional, característicos da doença de Alzheimer, são resultados da neurotransmissão prejudicada no Sistema Nervoso Central (Maelicke e Albuquerque, 2000).

Como os mecanismos biológicos envolvidos na neuropatologia da doença de Alzheimer são complexos, não é surpreendente que diferentes abordagens terapêuticas envolvendo distintos aspectos da doença estejam sob investigação. Estas abordagens incluem a prevenção da agregação e/ou deposição amilóide, a prevenção da degeneração neuronal e o aumento do nível de neurotransmissores, entre outras.

A acetilcolina (ACh) é biossintetizada a partir da acetil coenzima A (AcCoa) e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase (CAT). Este neurotransmissor é

encontrado no cérebro e junções neuromusculares e seus efeitos incluem a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos. No cérebro está envolvido nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição (Viegas Jr *et al.*, 2004). As vesículas colinérgicas acumulam ACh através de uma proteína de transporte específica. Após sua liberação, a ACh sofre difusão através da fenda sináptica para combinar-se com receptores (nicotínicos ou muscarínicos) na célula pós sináptica. Parte da ACh pode ser hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE), enzima ligada a membrana basal da terminação nervosa, situada entre as membranas pré e pós sinápticas (Rang *et al.*, 2001).

Entre as estratégias que promovem o aumento de acetilcolina na fenda sináptica destacam-se os inibidores da degradação da acetilcolina, agonistas específicos de receptores muscarínicos (M_1) e nicotínicos, ou antagonistas muscarínicos (M_2). Os fármacos inibidores da degradação da acetilcolina (exemplo: tacrina, donepezil e galantamina) alteram a função colinérgica central, reduzem a velocidade de hidrólise da acetilcolina de forma reversível e aumentam o tempo de meia-vida da acetilcolina, proporcionando assim maior estímulo da acetilcolina aos receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (Hock, 1995; Maelicke e Albuquerque 2000; Grossberg, 2003; Hansen *et al.*, 2008). O esquema da Figura 6 mostra a ação de agentes anticolinesterásicos.

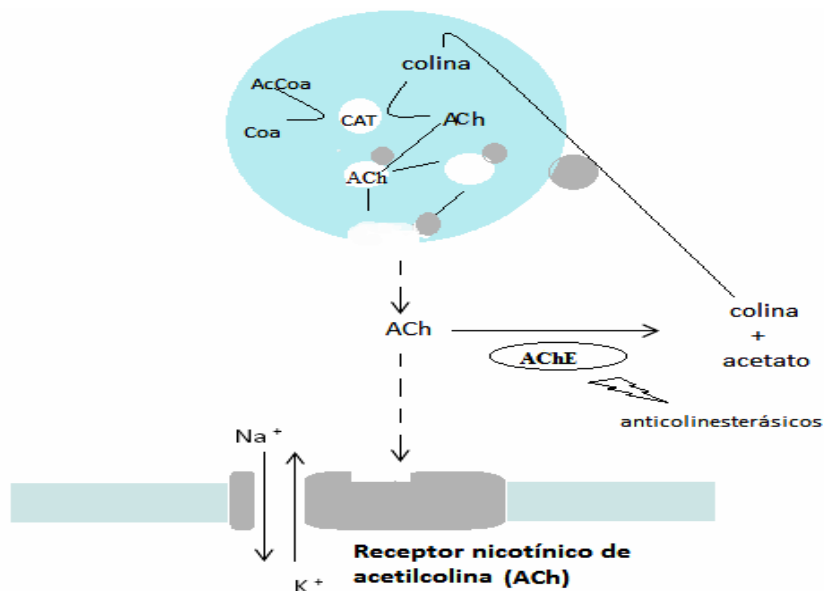


Figura 6. Representação da sinapse colinérgica nicotínica e ação dos anticolinesterásicos (adaptado de Rang *et al.*, 2001).

Os fármacos inibidores da degradação da acetilcolina representam uma das alternativas terapêuticas mais utilizadas, pois apresentam os melhores resultados clínicos no controle da doença de Alzheimer. No entanto, deve-se considerar que neurônios colinérgicos intactos são necessários para sintetizar acetilcolina, de modo que maiores benefícios são observados antes que ocorra a grande neurodegeneração. Além disso, não são capazes de impedir a evolução da desordem degenerativa em nenhum de seus níveis (Hock, 1995; Maelicke e Albuquerque, 2000; Grossberg, 2003).

2.5 Alcalóides como inibidores da acetilcolinesterase e métodos de avaliação

As buscas por novas alternativas farmacológicas capazes de reestabelecer o sistema de neurotransmissão colinérgica mostram que os alcalóides são grupo de destaque entre os inibidores de acetilcolinesterase de origem vegetal. A galantamina, alcalóide isolado de espécies da família das *Amaryllidaceae*, é utilizado na terapêutica por promover a modulação alostérica de receptores nicotínicos cerebrais pré e pós-sinápticos e aumentar a liberação de acetilcolina e glutamato, além de inibir a enzima acetilcolinesterase (Fennel e Staden, 2001).

Assim como os alcalóides triterpênicos isolados de *Buxus hyrcana* (Orthan *et al.*, 2004), os alcalóides esteroidais de *Buxus papillosa* (Babar *et al.*, 2006) e os glicoalcalóides indólicos de *Chimarrhis turbinata* que apresentaram importante atividade anticolinesterásica (Cardoso *et al.*, 2004), os resultados obtidos com alcalóides do gênero *Tabernaemontana* indicam que podem ser futuros candidatos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer (Andrade *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008). Neste sentido, estudos com extrato de *T. divaricata* em modelos animais comprovaram a inibição seletiva e reversível da enzima acetilcolinesterase, com resultados semelhantes aos observados com galantamina (Chattipakorn *et al.*, 2007).

O alcalóide 18-metoxicoronaridina mostrou ser um efetivo inibidor nicotínico do tipo $\alpha 3\beta 4$ e não efetivo em receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Ibogaína e 18-metoxicoronaridina inibiram receptores nicotínicos e bloquearam receptores de serotonina do tipo 5HT₃ em baixa potência. Ibogaína inibiu o receptor nicotínico do tipo $\alpha 4\beta 2$ e o receptor NMDA (Glick *et al.*, 2002) e mostrou ser um fraco inibidor da enzima AChE em testes *in vitro* quando comparado com fisostigmina (Alper *et al.*, 2012). Ainda assim, 18-metoxicoronaridina e enantiômeros foram equipotentes em promover a

modulação alostérica de receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 4$ de forma não competitiva e voltagem independente (King *et al.*, 2000).

Assim como podemos encontrar diferenças de mecanismos entre compostos pertencentes a mesma classe, como a ibogaína e a 18-metoxicoronaridina (classe Iboga), ainda não estão descritos os mecanismos de ação de outras classes de alcalóides indólicos presentes em *Tabernaemontana* e as possíveis interações destes compostos com subtipos de receptores.

Os estudos *in vitro* sugerem que alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana* pertencentes à classe Iboga são os principais responsáveis por inibir a enzima acetilcolinesterase. No entanto, compostos como affinisina, voachalotina (classe Corinantea) (Andrade *et al.*, 2005), assim como olivacina (classe Carbazólica) (Vieira *et al.*, 2008) mostraram considerável atividade anticolinesterásica. Algumas contradições existem também com relação aos alcalóides bis-indólicos para os quais Ingkaninan *et al.* (2006) sugeriram que substituições nos carbonos 11, 12 e 16 poderiam afetar a atividade destes compostos, o que não foi confirmado por Vieira *et al.* (2008).

Mesmo com estas comprovações e levando em conta a biodiversidade existente entre espécies, existe a necessidade da busca por novas moléculas e o estudo da sua atividade e estrutura molecular. A triagem de compostos bioativos pode ser realizada com testes simples e rápidos utilizando metodologias *in vitro*. Os métodos mais utilizados para determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase empregam ésteres de acilticolina como substratos, os quais são hidrolisados aproximadamente na mesma velocidade que os ésteres de colina, e a tiocolina formada pode ser dosada pela reação com dissulfetos cromogênicos, como a 4-4'-ditiopiridina ou o DTNB [ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzóico); reagente de Ellman] (Figura 7). Num procedimento típico, a atividade da enzima é determinada pela taxa de hidrólise da butiril- ou propionilticolina na presença de DTNB (incolor) formando um produto corado com absorção em 410nm (Burtis e Ashwood, 1998).

Enzimas não alostéricas como a acetilcolinesterase podem apresentar propriedades cinéticas similares e seguir o modelo proposto por Michaelis e Menten em 1913 (apud. Nelson e Cox, 2006), onde a enzima liga-se ao substrato para formar um complexo e seguir com a formação do produto. Os gráficos relacionando a velocidade de formação de produto com concentração de substrato, que fornecem uma curva hiperbólica podem ser simplificados com a inversão das variáveis de acordo com modelo de Lineweaver e Burk (1934) (apud Nelson e Cox, 2006) fornecendo um gráfico

de linha reta com intercepto no eixo Y proporcionando a obtenção de valores mais precisos. Estes modelos são amplamente utilizados quando se procura verificar o mecanismo de ação de inibidores da acetilcolinesterase tendo em vista as mudanças observadas na inclinação da reta no gráfico de Lineweaver-Burk (Huang *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2010; Raza *et al.*, 2012).

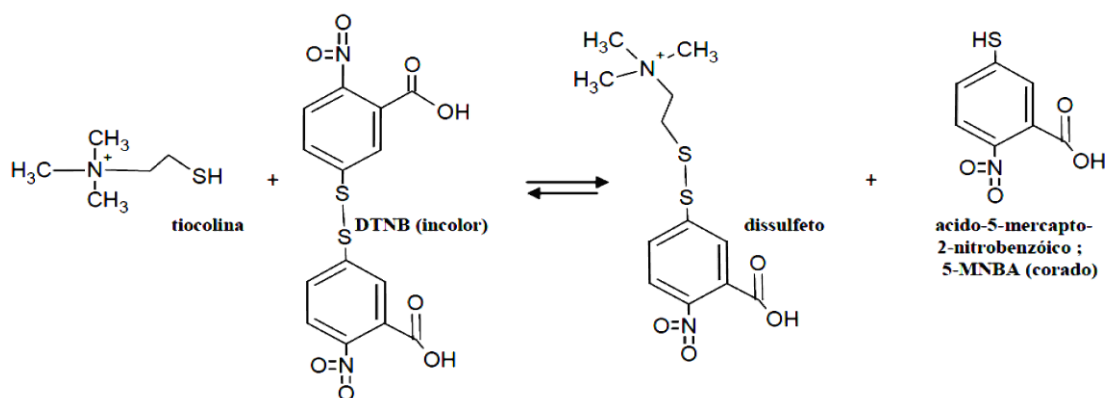


Figura 7. Reações envolvidas na determinação da atividade da acetilcolinesterase (Burtis e Ashwood, 1998).

2.6 Atividade antioxidante de compostos presentes em *Tabernaemontana*

Evidências consideráveis sugerem que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo contribuem para a progressão de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (McManus *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Assim, a identificação de novas substâncias derivadas do metabolismo secundário de espécies vegetais com capacidade de bloquear os processos óxido-redutivos desencadeados por espécies reativas de oxigênio é um tópico de interesse atual (Clark *et al.*, 2010; Pocernich *et al.*, 2011).

Estudo realizado por Gupta *et al.* (2004) mostrou que o extrato metanólico das folhas de *T. divaricata* apresentou atividade de proteção contra danos como lipoperoxidação induzida por tetracloreto de carbono. Por sua vez, extrato bruto proveniente de ramos de *T. catharinensis*, assim como as suas frações derivadas (hexânica, alcaloídica e aquosa) foram capazes de diminuir a oxidação do ácido linoléico *in vitro* (Pereira *et al.*, 2005).

Ao mesmo tempo em que se observou a atividade antioxidante em extratos etanólicos e aquosos de flores de *T. divaricata*, foi possível identificar nestes extratos a presença de flavonóides, taninos, alcalóides e esteróides (Jain *et al.*, 2010). Em extratos etanólicos de *T. coronaria* a atividade antioxidante foi atribuída principalmente ao

conteúdo de compostos fenólicos (Surya *et al.*, 2011). Já em folhas de *T. catharinensis*, constatou-se a presença de óleo essencial, e neste, 18 substâncias (sesquiterpenos 83%, monoterpenos 5%, e triterpenos 4,56%) com atividade antioxidante *in vitro* (Bologna *et al.*, 2012).

Experimentos mostraram que variações no conteúdo dos alcalóides indólicos coronaridina e voacangina nos extratos de *T. catharinensis* não alteram o potencial antioxidante *in vitro* (Pereira *et al.*, 2005). No entanto, em outros relatos, isovoacristina-hidroindolenina e voacangina mostraram atividade antioxidante *in vitro* (Santos *et al.*, 2009).

Maiores esclarecimentos sobre os reais responsáveis pelas atividades descritas tornam-se necessários em virtude de que grande parte destes estudos mencionaram a atividade em extratos. É de fundamental importância experimentos envolvendo a atividade antioxidante com extratos fracionados bem como com compostos isolados .

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para obter avaliações, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de substâncias. De acordo com as reações químicas envolvidas, os métodos empregados para avaliar a capacidade antioxidante podem ser divididos em duas categorias: (1) baseados na reação de transferência de átomo de hidrogênio e (2) ensaios baseados na transferência de elétrons. Os métodos baseados na transferência de elétrons incluem o método de avaliação de fenóis totais com uso do reagente de Folin-Ciocalteu, a capacidade antioxidante relativa ao Trolox, ensaios de redução de íon férrico, potencial antioxidante utilizando complexo Cu(II) como oxidante e capacidade de varredura do radical DPPH[•] (Huang *et al.*, 2005).

Ao considerar os testes *in vitro* existentes, a medida de capacidade de varredura do radical DPPH[•] é bastante utilizada, sendo considerado um método fácil, rápido e econômico, além de gerar um radical estável e de fácil mensuração. Os antioxidantes reagem com o DPPH[•] e provocam a diminuição da coloração indicando o potencial de varredura da solução antioxidante (Chies *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Determinar os principais alcalóides encontrados em partes aéreas de *Tabernaemontana catharinensis* e avaliar a atividade antioxidante e anticolinesterásica do extrato etanólico bruto e de frações do mesmo.

3.2 Objetivos específicos :

- Verificar a composição do extrato etanólico de partes aéreas de *T. catharinensis*;
- Obter frações do extrato etanólico de *T. catharinensis* ricas em alcalóides;
- Determinar as estruturas químicas e identificar os alcalóides presentes no extrato etanólico de partes aéreas de *T. catharinensis* e suas frações;
- Analisar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de partes aéreas de *T. catharinensis* e de suas frações;
- Investigar a atividade anticolinesterásica *in vitro* do extrato etanólico de partes aéreas de *T. catharinensis* e de suas frações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte exemplares de *Tabernaemontana catharinensis* foram coletados na divisa dos municípios de Santo Ângelo e Santa Rosa no RS, Brasil (28°27'59" S, 54°29'37" O) no mês de novembro de 2008. As plantas foram identificadas pelo professor Dr. Ronaldo A. Wasum e depositados no herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS 34038-34057/guia 1669).

Após remoção das inflorescências, regiões terminais de partes aéreas (folhas e caules), foram desidratados em estufa sob circulação forçada de ar à temperatura de 30°C por 4 dias. O material seco foi moído em moinho de facas tipo Willey TE 650 e agrupado em recipiente protegido da luz para posterior análise.

4.1 Métodos de extração e purificação

O material vegetal moído foi submetido a extração em aparelho Soxhlet utilizando etanol como solvente de extração (10 ml etanol/g) por um período de 12 horas a uma temperatura aproximada de 70°C. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotatório a pressão reduzida até a completa remoção do solvente.

De acordo com a metodologia descrita por Guida *et al.* (2003), a cada 10 gramas de extrato seco foi adicionado 150ml de ácido clorídrico a 2% e extraído com 200ml de clorofórmio (fração denominada B1). A fase aquosa ácida foi adicionado hidróxido de sódio 10% até obter pH 7,8 e extraída com 200 ml de clorofórmio (fração B2). A fase aquosa foi alcalinizada até pH 11,2 com solução de hidróxido de sódio 10% e extraída com 200ml de clorofórmio (fração B3) (Figura 8).

As frações B1, B2 e B3, após remoção do solvente, foram monitoradas através da cromatografia em camada delgada analítica (CCD) utilizando cromatoplasmas de alumínio revestidas de sílica gel F₂₅₄ 0,2 mm (Merck) com sistema eluente

$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (93:7). A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta (254 e 365nm) após coloração com o reagente de Dragendorff.

As frações B2 e B3 apresentaram perfil cromatográfico semelhante por CCD, e foram reunidas. A mistura destas frações foi submetida à cromatografia em coluna utilizando sílica gel Merck (0,06-0,2) como suporte e diclorometano, diclorometano com percentagens crescentes de metanol e metanol como eluente de acordo com Gower *et al.* (1986). Um total de 14 frações de 100 ml foram coletadas. Estas foram monitoradas através da cromatografia em camada delgada (CCD) com o mesmo procedimento descrito anteriormente e reunidas conforme similaridades observadas, obtendo-se 6 frações (C1-C6).

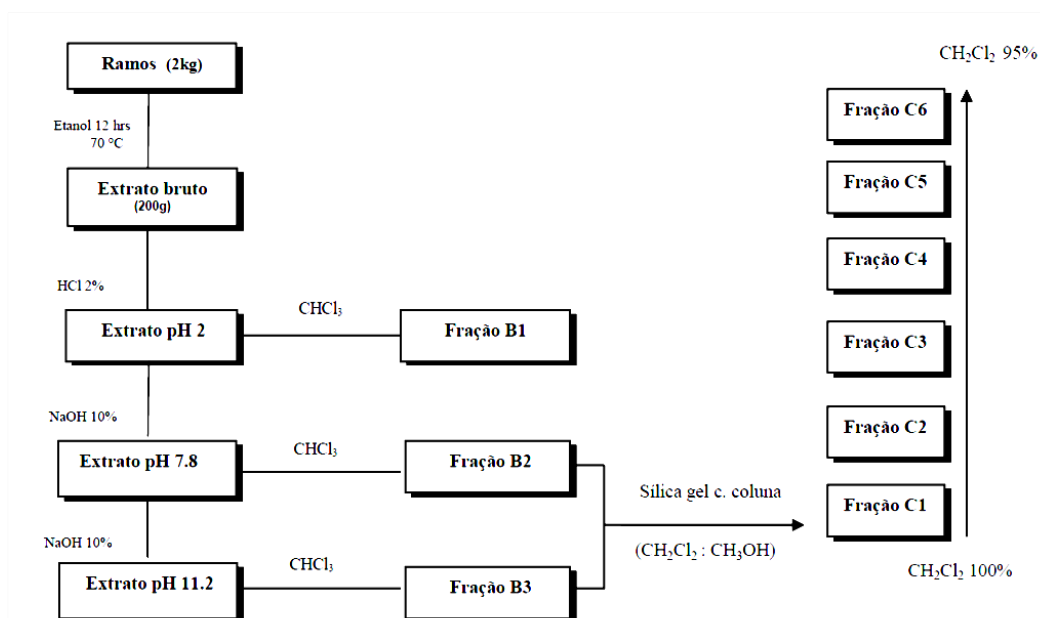


Figura 8. Diagrama do fracionamento do extrato de *Tabernaemontana catharinensis*

4.2 Identificação dos alcalóides por espectrometria de massas

Extrato e frações de *Tabernaemontana catharinensis* foram dissolvidos em uma solução de acetonitrila 50% (v/v) (Tedia, Fairfield, OH, USA), acidificada com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram aplicadas por injeção direta no espectrômetro de massas utilizando uma bomba de infusão (Harvard Apparatus) a um fluxo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

As análises de espectrometria de massa de alta resolução por spray de elétrons [ESI(+)-MS] e a análise posterior de segunda ordem [ESI(+)-MS/MS] foram adquiridas utilizando um sistema de alta resolução e precisão (5 $\mu\text{l}/\text{l}$) Orbitrap XL mass

spectrometer (Thermo Fisher Scientific) sob as seguintes condições: voltagem do capilar e cone de dissociação +3500 V e +40 V, respectivamente, com a temperatura de de-solvatação de 100°C. A energia de colisão para induzir a dissociação (CID) foi determinada para cada um dos componentes. Os diferentes íons nas amostras foram identificados em comparação com os compostos listados em estudos anteriores. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Os dados foram coletados em m/z 70 até 700, obtendo resolução de 50.000 (FWHM) em m/z 200. Nenhum íon foi observado abaixo de m/z 200 e acima de m/z 650.

4.3 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada através do método da redução do radical 1,1-difenil 2-picrilhidrazil ou DPPH[•] (Yamaguchi *et al.*, 1998). Uma alíquota de extrato e frações (B1-B3, C1-C6) de *T. catharinensis* (200 µl) foi misturada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4, 800 µl) e adicionada em 1 mL de DPPH[•] (500 µM em etanol). A mistura foi levemente agitada e incubada por 20 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Amostras, controle negativo e controle positivo (ácido ascórbico) em diferentes concentrações foram avaliados em triplicata. A absorbância foi medida em 517 nm (espectrofotômetro SHIMADZU 1700 UV, Kyoto, Japan). Os resultados foram expressos em IC₅₀, ou seja, a concentração de extrato (µg/ml) necessária para varrer 50 % do radical livre DPPH[•], valores obtidos a partir de regressão quadrática.

4.4 Atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase (AChE) e avaliação de parâmetros cinéticos.

A atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase foi determinada pelo método de Ellman *et al.* (1961). O iodeto de acetiltiocolina (ATCI) e o DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) foram utilizados como substrato e reagente para determinação da atividade acetilcolinesterásica, respectivamente. Nos experimentos foi utilizada acetilcolinesterase de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*), Sigma C2888.

Em microplacas de 96 orifícios, a mistura reacional contendo 185µl de tampão fosfato 0,1M pH 8,0, 5µl de DTNB (concentração final de 0.3mM), 5µl de ATCI

(concentração final de 0,5mM) e 5µl da solução a ser avaliada foram mantidas a temperatura de 25°C. A reação de hidrólise do ATCI foi iniciada pela adição de 20 µl de suspensão enzimática numa concentração final de 0,032 U/ml e imediatamente leituras da absorbância a 405nm a cada 30 segundos por 2 minutos foram realizadas utilizando um leitor de ELISA (Biochrom Libra S12) . Amostras, brancos e controle positivo (galantamina) foram avaliados em triplicata e em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos como IC₅₀, ou seja, a concentração de amostra (µg/ml) necessária para inibir 50 % da atividade enzimática, valores obtidos a partir de regressão logarítmica.

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos utilizou-se a mesma metodologia descrita acima para a atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase, com exceção do conteúdo de DTNB (concentração final de 1mM) e múltiplas concentrações de ATCI (0,5, 0,6, 0,9, 1,35, 1,8 e 3 mM) (Raza *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2010). Controle negativo, positivo (galantamina 0,2 e 1µg/ml) e a fração C6 (0,25, 1 e 100µg/ml) foram avaliados em triplicata. Os valores obtidos foram graficados de acordo com o modelo de Michaelis-Menten e de Lineweave-Burk utilizando o programa Prism 5.0 (Graph Pad, San Diego California USA).

4.5 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise estatística através da análise de variância e pós-teste de Tuckey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa SPSS16.0 for Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e identificação de alcalóides

As partes aéreas (sem flor) de *Tabernaemontana catharinensis* secas e moídas foram submetidas a extração com etanol a quente e o rendimento de extrato seco obtido foi de 10% (p/p). Parte deste extrato foi dissolvida em etanol na concentração final de 10 mg/ml, sendo denominado de extrato bruto. Considerando a complexa constituição dos extratos brutos de plantas e a importância de identificar os compostos presentes no extrato de *T. catharinensis*, foi realizada análise por espectrometria de massa com ionização por spray de elétrons [ESI(+)-MS]. Esta técnica já foi descrita anteriormente para a análise de produtos naturais, particularmente aqueles com elevada concentração de alcalóides (Zhou *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2011).

A análise por ESI(+)-MS do extrato bruto de *T. catharinensis* mostrou a presença de substâncias com peso molecular que variaram de 203 até 487 (Figura 9). Os resultados obtidos neste estudo, e considerando relatos anteriores no gênero *Tabernaemontana* (Zocoler *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2008), indicaram a presença dos alcalóides: 16-epi-affinina (m/z 325,1911), coronaridina-hidroindolenina (m/z 355,2019), voachalotina (m/z 367,2020), voacristina-hidroindolenina (m/z 401,2072), 12-metoxi-n-metil-voachalotina (m/z 411,2280) e de um composto com m/z de 385,2125 com estrutura com perfil de fragmentação que sugere um derivado de voacristina ou de voacangina. Porém, outras análises são necessárias para confirmar a estrutura deste composto.

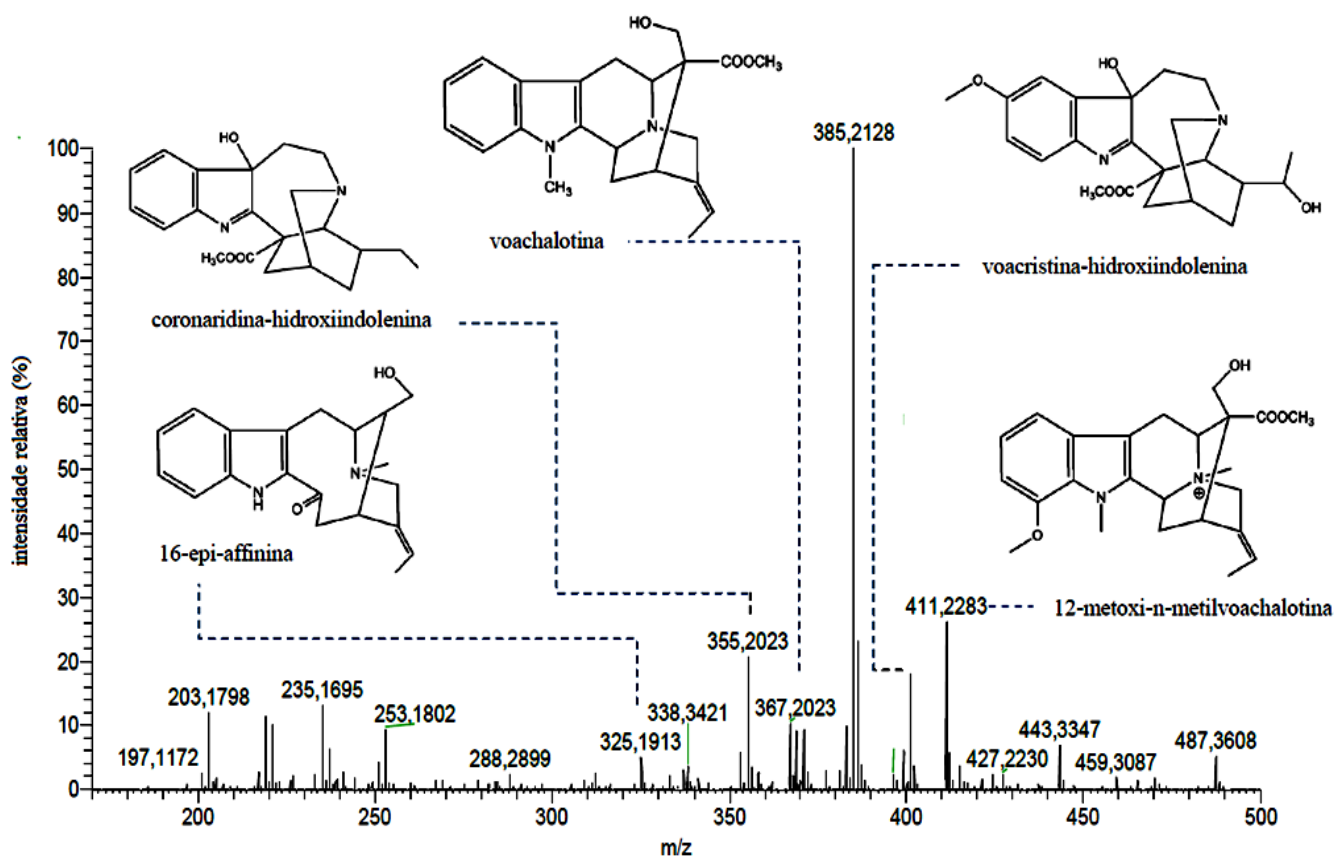


Figura 9. Espectro de massas de alta resolução com ionização por spray de elétrons do extrato bruto de *T. catharinensis*.

Fragmentos iônicos fornecem importantes informações para identificação, e em muitas situações inclusive a possibilidade de diferenciar compostos isóbaros. Na Tabela 2 são listados os compostos detectados no extrato bruto de *T. catharinensis* por ESI(+)-MS no modo positivo, assim como as análises dos principais íons precursores por ESI(+)-MS/MS.

Alcalóides indólicos foram descritos pela importante capacidade do átomo de nitrogênio estabilizar cargas positivas e pela presença de grupamentos carbocíclicos que podem ser submetidos à rupturas em situações de ionização. Estas características podem ser evidenciadas na Figura 10, onde através do isolamento e das fragmentações iônicas foi possível confirmar a estrutura química do composto affinisina.

Tabela 2 Compostos identificados no extrato bruto de *T. catharinensis* por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS, associados com referências bibliográficas em *Tabernaemontana sp.*

Registro	Íon precursor m/z	Fragmentos iônicos ms/ms (%) [MS2]{MS3}	Identificação	Elem. comp.	Diff ppm	Fragmentações sugeridas	Referências
1	309.1963	291.1864(35); 202.1232(5); 158.0968(17); 138.0917(16)	affinisina	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	0.646	291.1864[M-OH]; 202.1232[M-C ₇ H ₈ N]; 158.0968[M-C ₉ H ₁₂ NO]	Zocoler <i>et al.</i> 2005 Vieira <i>et al.</i> 2008
2	325.1918	308.1891(15); 307.1814(13) [289.1706(4); 265.1700(100) {234.1281(11); 122.0966(8)} 176.1071(5)]; 265.1706(5); 152.1074(12)	16-epi-affinisina	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	2.460	308.1891[M-OH]; 265.1700[M-C ₂ H ₃ O ₂]; 152.1074[M-C ₁₁ H ₁₀ NO]	Van Beek <i>et al.</i> 1984b
3	353.1866	322.1443(9); 321.1606(33); [293.1654(65); 275.1548(22) 264.1388(100). 221.1078(24) 211.0870(65); 183.0921(98)] 290.1184(6)	vobasina	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	1.981	322.1443[M-C ₂ H ₆]; 293.1654[M-C ₂ H ₄ O ₂]; 275.1548[M-C ₂ H ₆ O ₃]; 264.1388[M-C ₃ H ₇ NO ₂]	Munigunti <i>et al.</i> 2011
4	355.2023	337.1920(100) [305.1656(60); 277.1706(21); 216.1024(8); 144.0811(9)]; 323.1762(7); 305.1657(60) [290.1418(22); 277.1704(100) {207.0921(10)}]; 235.0869(67); 184.0760(36); 174.0916(33)]	coronaridina-hidroxiindolenina	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	1.970	337.1920[M-OH]; 323.1762[M-CH ₃ O]; 305.1657[M-CH ₄ O ₂]; 277.1704[M-C ₂ H ₅ O ₃]	Pereira <i>et al.</i> 2008
5	367.2023	337.1921(100) [305.1655(28); 172.1125(16); 158.0967(34)]; 335.1765(7); 305.1658(23); 172.1126(31); 166.0868(5); 158.0969(7)	voachalotina	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	1.906	337.1921[M-CH ₃ OH]; 305.1655[M-C ₂ H ₄ O ₂]; 172.1125[M-C ₁₂ H ₁₂ NO ₃]; 158.0969[M-C ₁₁ H ₁₃ NO ₃]	Van Beek <i>et al.</i> 1984
6	385.2128	367.2024(100); [335.1761(100); {307.1812(40); 265.0977(21), 214.0867(9); 174.0917(15)}]; 307.1810(100) 246.1130(19); 174.0918(10)]; 335.1765(20); 307.1815(7)	possível derivado de voacristina ou voacangina	n.d			
7	401.2075	383.1975(100) [365.1867(100); {333.1604(20); 201.1026(26)} 351.1711(21); 337.1553(21); 201.0976(23)]; 365.1867(62); [351.1711(21); 337.1553(21); 333.1605(7); 323.1760(8); 201.1027(23)]; 351.1715(7); 201.1029(6)	voacristina-hidroxiindolenina	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₅	1.246	383.1975[M-OH]; 365.1867[M-O ₂ H ₄]; 351.1711[M-CH ₇ O ₂]; 333.1604[M-CH ₇ O ₃]; 201.1027[M-C ₁₀ H ₁₅ O ₄]	Zocoler <i>et al.</i> 2005
8	411.2283	381.2181(100); 349.1917(100); [334.1681(16); 321.1966(10); 317.1654(15); 266.1544(35)]; {251.1309(21); 237.1151(44)}]; 200.1076(100); [185.0839(14); 169.0890(12)]; 180.1024(25)	12-metoxi-n-metil-voachalotina	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₄	1.215	381.2181[M-CH ₄ O]; 349.1917[M-C ₂ H ₆ O ₂]; 334.1681[M-C ₃ H ₆ O ₂]; 321.1966[M-C ₃ H ₇ O ₃]; 200.1076[M-C ₁₁ H ₁₅ NO ₃]	Lepine <i>et al.</i> 2002
9	415.2126		ni				

ni = não identificado

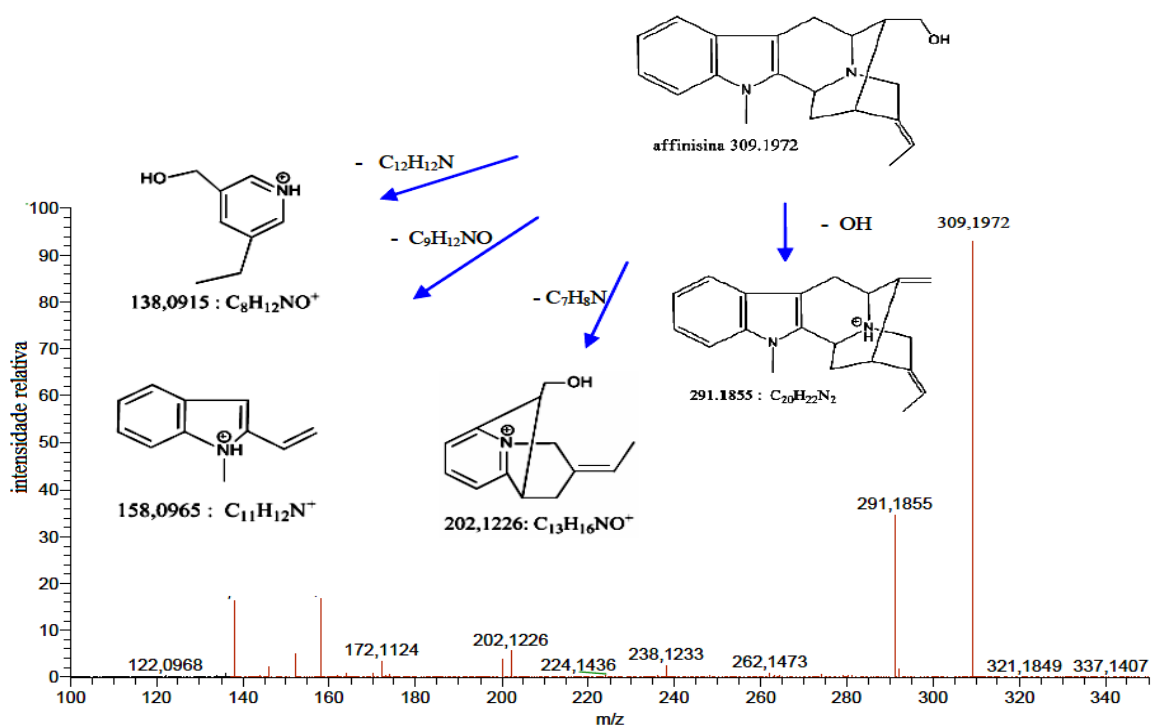


Figura 10 Espectro ESI-MS/MS no modo positivo e fragmentos propostos para o composto affinisina.

Dos compostos identificados no extrato bruto de *T. catharinensis* (Tabela 2), a affinisina foi descrita previamente em extratos de *T. catharinensis* (Andrade *et al.*, 2005), assim como em *T. buchtieni* (Azoug *et al.*, 1995), *T. fuchsiaefolia* (Zolocer *et al.*, 2005) e *T. histrix* (Vieira *et al.*, 2008). Por sua vez, a 16-epi-affinisina foi identificada em *T. catharinensis*, *T. latea*, *T. pachysiphon* e *T. psychotrifolia* (rev Van Beek *et al.*, 1984b) e *T. fuchsiaefolia* (Lépine *et al.*, 2002). Segundo a revisão de Van Beek *et al.* (1984a), a vobasina está presente em diversas espécies do gênero *Tabernaemontana*, inclusive *T. catharinensis*. Já coronaridina-hidroxiindolenina foi identificada em extratos de *T. catharinensis* (Pereira *et al.*, 2008) e foi encontrada também em *T. divaricata* (Rastogi *et al.*, 1980), *T. buchtieni* (Azoug *et al.*, 1995) e *T. heyneana* (Srivastava *et al.*, 2001). A voachalotina e a 12-metoxi-n-metil-voachalotina foram constatadas em extratos de *T. catharinensis* (Pereira *et al.*, 2008), *T. fuchsiaefolia* (Zolocer *et al.*, 2005), entre outras espécies do gênero. Já a voacristina-hidroxiindolenina foi descrita em *T. apoda* e *T. dichotoma* (rev Van Beer *et al.*, 1984), *T. buchtieni* (Azoug *et al.*, 1995) e *T. heyneana* (Srivastava *et al.*, 2001).

Assim sendo, de um modo geral, os compostos identificados no extrato etanólico bruto de *T. catharinensis* são consistentes com estudos anteriores desta espécie vegetal.

Entretanto, os alcalóides indólicos majoritários, voacangina e coronaridina, descritos em extratos de ramos obtidos por CO₂ supercrítico (Pereira *et al.*, 2006, Soares *et al.*, 2007) e em extratos etanólicos de folhas (Soares *et al.*, 2007), não foram constatados no presente trabalho. A ausência destes compostos pode ser atribuída a diferenças ambientais e genéticas do material avaliado, ou aos métodos de análise utilizados, já que estes autores empregaram HPLC-MS e GC-MS, respectivamente. Cabe ressaltar que coronaridina-hidroxiindolenina e um possível derivado de voacristina ou de voacangina, foram detectados no extrato bruto e em algumas das suas frações.

Além dos compostos majoritários acima relacionados, Soares *et al.* (2007) identificaram também a presença de voacristina, voacristina-hidroxiindolenina, voacangina-hidroxiindolenina e 3-hidroxi-coronaridina. Por outro lado, Araújo *et al.* (1984) analisaram extratos metanólicos de cascas de *T. catharinensis* através de espectrometria de massas e ressonância (NMR) estabelecendo a estrutura de catarinensina, assim como a presença de coronaridina, decarbometoxi-voacamina, isovoacangina, heineanina, 16-epi-affinina e conodurina. Rates *et al.*, (1993) também identificaram catarinensina, coronaridina, decarbometoxi-voacamina além de tabersonina, olivacina, coronaridina-hidroxiindolenina e tabernamina. Já Pereira *et al.*, (2008) analisando extrato etanólico de raízes de *T. catharinensis* através de espectrometria de massas e ressonância (NMR) identificaram a presença de coronaridina-hidroxiindolenina, 12-metoxi-n-metil-voachalotina, voachalotina, voacristina-hidroxiindolenina, coronaridina, voacangina, voacangina-hidroxiindolenina, ibogamina, heineanina, 3-oxo-coronaridina, 3-hidroxi-coronaridina hidroxiindolenina e vobasina, dos quais os primeiro quatro compostos também foram identificados na presente análise em extrato da parte aérea desta espécie.

Ao utilizar o processo de separação de alcalóides do extrato seco através de partições fase orgânica, fase aquosa a diferentes variações de pH (2, 7,8 e 11,2) foram obtidas as frações B1, B2 e B3. As duas últimas (0,4% p/p do material inicial), com resultados positivos para Dragendorff e comportamentos cromatográficos semelhantes (CCD), foram reunidas e submetidas a cromatografia em coluna, resultando nas frações C1 a C6 (0,03%, 0,11%, 0,08%, 0,04%, 0,05% e 0,02% p/p do material inicial respectivamente).

Na figura 11 é possível visualizar as análises por ESI(+)-MS das frações B1, B2 e B3. Conforme pode ser evidenciado, a fração B1 apresentou uma quantidade elevada de compostos com predominância daqueles com *m/z* de 425,2127, 437,1953, 288,2907 e

453,1674. As frações B2 e B3, que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, mostraram diferenças importantes no espectro obtido por ESI(+)-MS, sendo que a fração B2 os picos maiores foram correspondentes a compostos com m/z de 325,1911 (16-epi-affinina), 411,2171 (12-metoxi-n-metil-voachalotina) e 385,2134 (possível derivado de voacristina ou voacangina). Já a fração B3 apresentou picos sobressalente de 12-metoxi-n-metil-voachalotina (m/z 411,2171) e o possível derivado de voacristina ou voacangina (m/z 385,2134).

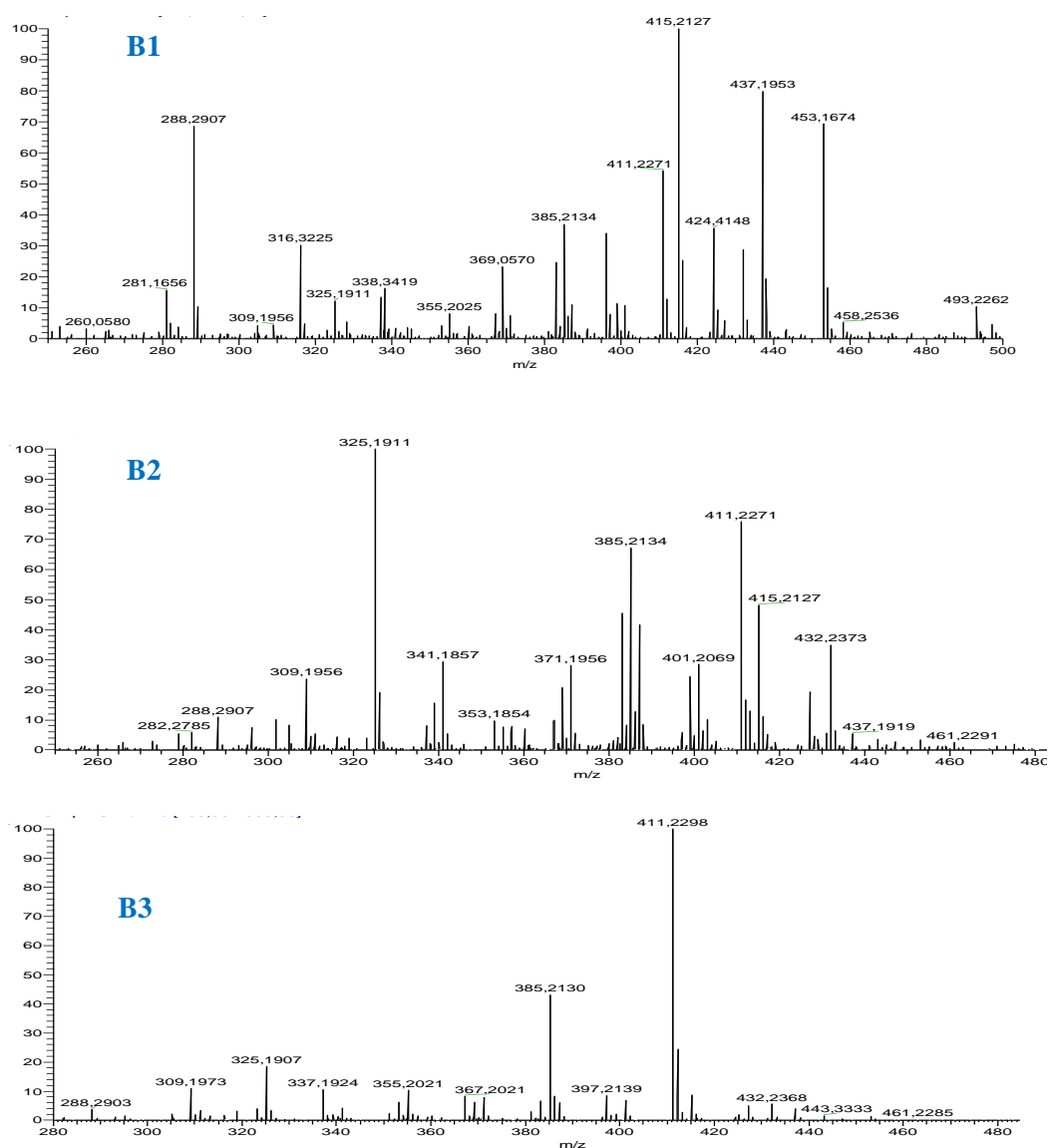


Figura 11 - Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por spray de elétrons das frações B1, B2 e B3 .

As frações (C1-C6) obtidas após separação por cromatografia de coluna a partir da mistura das frações B2 e B3, apresentaram perfis próprios conforme pode ser observado na Figura 12.

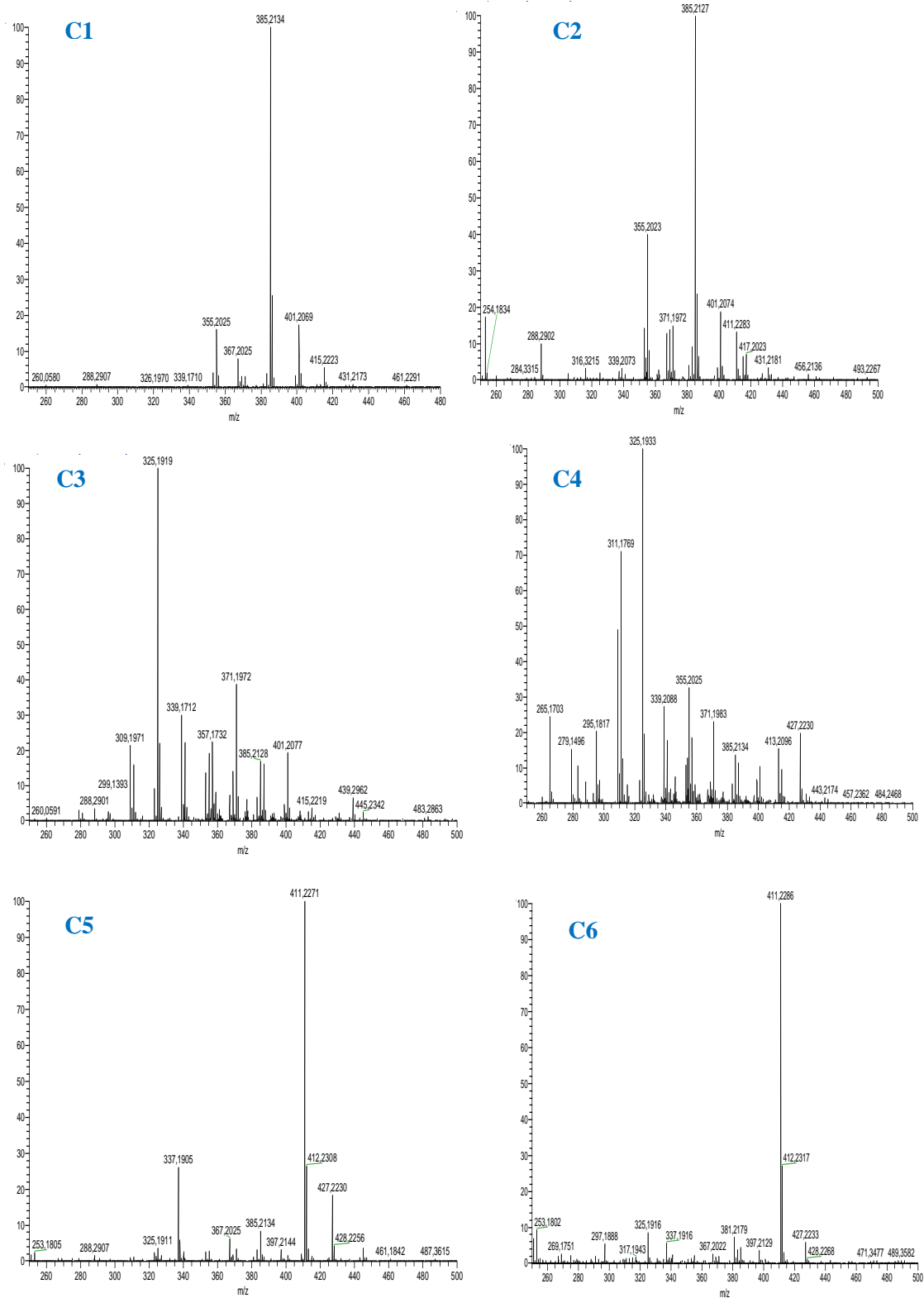


Figura 12 - Espectrometria de massas [ESI(+)-MS] das frações C1, C2, C3, C4, C5 e C6.

As frações C1 e C2 caracterizaram-se pela presença do possível derivado de voacristina ou voacangina (m/z 385,2134) além de outros compostos. Por outro lado, as frações C3 e C4 apresentaram um pico maior correspondente a 16-epi-affinina (m/z 325-1911) além de um composto com m/z de 311,1769, não identificado. Já as frações C5 e C6 exibiram 12-metoxi-n-metil-voachalotina (m/z 411, 2171) como pico evidente no espectro. Análise quantitativa dos distintos compostos identificados no extrato de *T. catharinensis* seria de grande valor para avaliações comparativas entre tecidos e órgãos da planta, assim como para o acompanhamento de distintos sistemas de fracionamento e purificação dos compostos.

5.2 Atividade antioxidante do extrato bruto de *T. catharinensis* e suas frações

Extratos e frações de *Tabernaemontana catharinensis* foram avaliados quanto à capacidade de varredura do radical DPPH[•], método rotineiramente utilizado e reconhecido pela sua praticidade e rapidez (Yamaguchi *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2006). De acordo com os resultados da Tabela 3, o extrato bruto apresentou capacidade de redução do radical DPPH[•] com IC₅₀ de 313,46 µg/ml. A fração B1, a qual pela análise cromatográfica apresentou baixo conteúdo de alcalóides, exibiu menor atividade antioxidante do que o extrato bruto, com IC₅₀ de 1590,00 µg/ml. Por outro lado, as frações B2 e B3 apresentaram maior atividade do que o extrato bruto, com IC₅₀ de 60,75 e 67,28 µg/ml, respectivamente. A atividade antioxidante destas frações pode ser atribuída ao seu maior conteúdo de alcalóides indólicos.

As frações C1 e C2, que apresentaram espectros semelhantes com presença de um possível derivado de voacristina ou voacangina exibiram diferença significativa nas suas atividades antioxidantes. Sugerimos que a maior atividade observada na fração C2 pode ser atribuída a outros compostos não identificados ou ao seu conteúdo de coronaridina-hidroxiindolenina (Figura 12). Já as frações C3 e C4, caracterizadas pela presença de 16-epi-affinina e de um composto não identificado com m/z de 311,1769, apresentaram atividade antioxidante semelhante, próxima àquela das frações B2 e B3. A menor atividade antioxidante entre as frações obtidas por separação cromatográfica foi

observada nas frações C5 e C6, as quais se caracterizaram pela presença de 12-metoxi-n-metil-voachalotina.

Tabela 3 - Atividade antioxidante das diferentes frações de *T. catharinensis*

Amostras		DPPH - IC ₅₀ (µg/ml)*
	extrato bruto	313,46 ± 0,5 ^b
Frações fase orgânica/aquosa	B1	1590,00 ± 1,4 ^a
	B2	60,75 ± 0,5 ^e
	B3	67,28 ± 0,6 ^e
Frações c.coluna	C1	94,92 ± 0,05 ^d
	C2	37,18 ± 0,1 ^f
	C3	74,69 ± 0,9 ^e
	C4	65,59 ± 0,3 ^e
	C5	230,25 ± 0,1 ^c
	C6	249,61 ± 0,9 ^c
	ácido ascórbico	20,13 ± 0,45 ^g

(IC₅₀) Concentração de amostra necessária para varrer 50% do radical 1,1-difenil 2-picrilhidrazil

* Médias ± desvio padrão. Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05)

A atividade antioxidante do extrato bruto de partes aéreas de *T. catharinensis* foi inferior ao observado por Santos *et al.* (2009) em extratos etanólicos de raízes desta espécie (IC₅₀ = 100 µg/ml), porém maior do que a detectada por Sathishkumar *et al.* (2012) em extratos etanólicos de folhas de *T. heyneana* (IC₅₀ = 537µg/ml).

Alcalóides indólicos foram descritos anteriormente por apresentar atividade antioxidante (Fragoso *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). Estudos mostraram que a atividade de captura de ROS em derivados indólicos pode estar relacionada com a excepcional propriedade redox do anel indólico, em particular conferida ao nitrogênio indólico (Estevão *et al.*, 2011).

Entre os alcalóides indólicos presentes em *Tabernaemontana*, atividade antioxidante tem sido identificada para isovoacristina-hidroxiindolenina e voacangina (Santos *et al.*, 2009). Por outro lado, Pereira *et al.* (2005) mostraram que variações no conteúdo de coronaridina e voacangina em extratos de *T. catharinensis* não alteraram o potencial antioxidante *in vitro*.

Análise da atividade antioxidante dos compostos isolados é necessária para confirmação da atividade dos distintos alcalóides indólicos de *T. catharinensis*, e associação das estruturas moleculares com a atividade antioxidante neste importante grupo de metabólitos secundários.

5.3 Atividade inibitória sobre a Acetilcolinesterase (AChE) e avaliação de parâmetros cinéticos

Extrato e frações de *Tabernaemontana catharinensis* foram avaliados quanto a atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificado (Nostrandt *et al.*, 1993). O extrato bruto apresentou capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase ($IC_{50} = 261,55 \mu\text{g/ml}$). Esta atividade antiacetilcolinesterásica foi previamente reportada em extrato etanólico de raízes de *Tabernaemontana divaricata* ($IC_{50} = 2,56 \mu\text{g/ml}$) onde também ficou relatada a inibição enzimática de forma seletiva e reversível (Chattipakorn *et al.*, 2007).

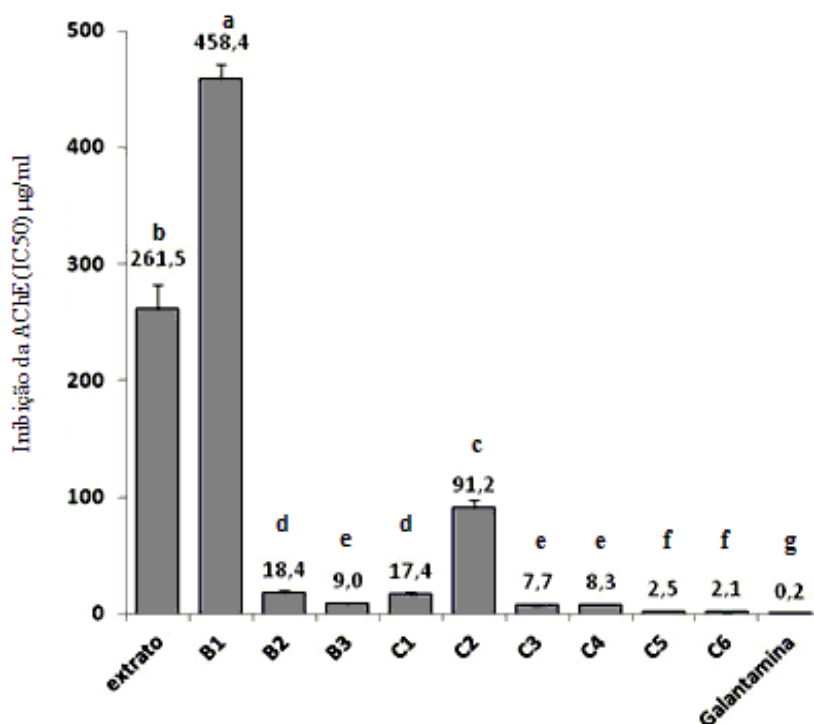


Figura 13 Concentração necessária para inibir 50% da atividade da acetilcolinesterase de enguia elétrica (IC_{50}) do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* e suas frações ($\mu\text{g/ml}$).

Letras distintas correspondem a valores estatisticamente diferentes de acordo com o pós teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

As frações B2 e B3, assim como as amostras obtidas no fracionamento em coluna apresentaram valores superiores de inibição enzimática da AChE quando comparadas com o valor observado para o extrato bruto (Figura 13). As frações C5 e C6 foram as que obtiveram os melhores resultados de inibição da acetilcolinesterase com IC₅₀ de 2,50 µg/ml e 2,10 µg/ml, respectivamente. Estes valores são comparáveis aos obtidos com a galantamina, alcalóide natural ou sintético utilizado no tratamento da doença de Alzheimer. Por outro lado, a fração B1, caracterizada por baixo conteúdo de alcalóides, apresentou baixa atividade anticolinesterásica (IC₅₀ 458,40 µg/ml). Estes resultados corroboram relatos anteriores que mencionaram o potencial anticolinesterásico dos alcalóides encontrados no gênero *Tabernaemontana* e a possibilidade de utilização destes compostos para estudos envolvendo o tratamento de doenças neurodegenerativas (Andrade *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008).

Atividades consideráveis de inibição enzimática foram observadas nas frações C3 (IC₅₀ 7,71 µg/ml), C4 (IC₅₀ 8,34 µg/ml) e B₃ (IC₅₀ 9,0 µg/ml). Estas frações caracterizaram-se por apresentar em comum os compostos affinisina, 16-epi-affinina, vobasina e coronaridina-hidroxiindolenina. Em relatos anteriores, affinina e affinisina inibiram a enzima AChE (Andrade *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008). Por outro lado, a vobasina e a coronaridina-hidroxiindolenina apresentaram resultados negativos de inibição nas concentrações avaliadas por Zhan *et al.* (2010).

Recentes estudos relacionaram a estrutura molecular de alcalóides indólicos com a capacidade inibitória da enzima AChE, tendo como base compostos semelhantes à coronaridina. Observou-se que estruturas com substituintes hidrofóbicos ou substituintes doadores de elétrons apresentaram maior atividade inibitória quando comparado a seus derivados hidroxilados (Zhan *et al.*, 2010). No entanto, estas atribuições não foram observadas com isovoacangina e seu derivado hidroxilado (Vieira *et al.*, 2008). Representantes de classe Corinantea, como a 12-metoxi-n-metilvoachalotina, foram descritos por apresentar atividade antiacetilcolinesterásica em estudo realizado por Andrade *et al.* (2005). Cabe ressaltar nesse caso, que esclarecimentos tornam-se necessários quando relacionamos estrutura com o potencial de atividade, tendo em vista que n-metil-voachalotina em relatos anteriores obteve resultados negativos de inibição enzimática (Vieira *et al.*, 2008).

Na tentativa de compreender os resultados de inibição encontrados para as frações C5 e C6, foram realizados estudos cinéticos, que podem sugerir os possíveis modelos de interação entre a acetilcolinesterase e seus inibidores (Khan *et al.*, 2009).

Sabe-se até o momento que a acetilcolinesterase, enzima pertencente a família das $\alpha\beta$ hidrolases, apresenta dois sítios principais de ligação: um sítio ativo (ACS) e um sítio aniônico (PAS) (Dvir *et al.*, 2010). Os modelos de cinética enzimática, assim como o modelo linear descrito por Lineweaver–Burk com diferentes concentrações de inibidor (fração C6) são apresentados na Figura 14.

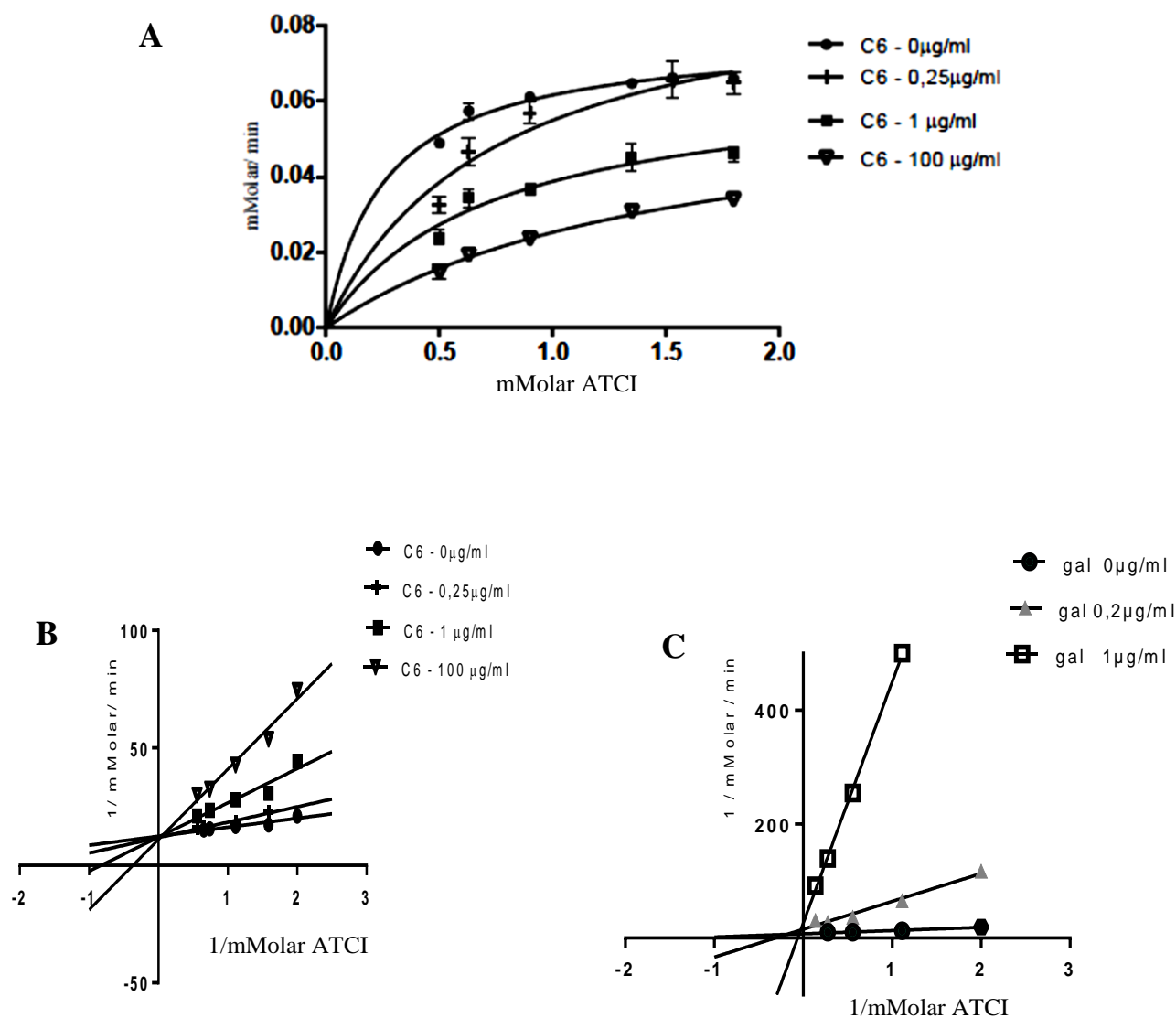


Figura 14- A- Cinética de Michaelis-Menten para a fração C6, B- modelo linear para a fração C6 e C- modelo linear para o controle galantamina. Os modelos lineares foram calculados pelo método de Lineweaver-Burk.

De acordo com o gráfico que relacionou concentrações variadas de substrato (1/mMolar ATCI) com velocidades de formação de produto (1/mMolar/min) (Figura 14-B), é possível verificar que concentrações elevadas de substrato deslocaram o equilíbrio da reação e favoreceram a formação do complexo enzima substrato diminuindo assim a probabilidade do inibidor (C6) se ligar no sítio ativo da enzima. Esta característica pode ser observada tendo em vista a interseção no eixo y entre a reação com e sem o inibidor. Este comportamento é característico de inibidores do tipo competitivo como a galantamina (Figura 14- C) conforme descrito por Khan *et al.* (2009). Além disso, a velocidade máxima de formação de produto obtida na ausência ou presença do inibidor C6 em diferentes concentrações permaneceu constante ($V_{max} = 0,076$ mMolar/ min) e foram observados os diferentes valores de K_m na ausência do inibidor ($K_m = 0,28$ mMolar ATCI) e na presença de C6 (C6 concentração $1\mu\text{g/ml}$ $K_m = 1,20$ mMolar ATCI). Este é o primeiro relato de estudo cinético envolvendo o modelo de interação entre a acetilcolinesterase e frações contendo alcalóides indólicos encontrados em *Tabernaemontana*, sugerindo ação inibitória competitiva.

Estruturas que apresentam nitrogênio quaternário apresentam importante atividade de ligação a resíduos aromáticos no sítio ativo da AChE (Harel *et al.*, 1993), fato que justifica a atividade da fração C6 de acordo com as características estruturais do composto 12-metoxi-n-metil-voachalotina, pico evidente no espectro de C6. Cabe ressaltar, no entanto, a necessidade de purificação deste composto a fim de confirmar estes resultados. Ainda assim, existe a possibilidade dos alcalóides descritos neste trabalho também apresentarem conexão de ligação a subtipos de receptores a exemplo de outros compostos já avaliados, portanto, também tornam-se necessários estudos *in vitro* a fim de verificar estes possíveis mecanismos.

Extratos, frações ou compostos capazes de minimizar danos causados pelo estresse oxidativo e que ao mesmo tempo tenham capacidade de inibir a enzima AChE como aqueles descritos no presente trabalho podem ser uma possível alternativa para o tratamento de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas.

Dado o potencial dos extratos de *T. catharinensis* e os compostos neles presentes, novos trabalhos devem ser realizados no sentido de purificação, identificação e confirmação das propriedades biológicas, com vista a sua utilização terapêutica.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que :

- 1) Os alcalóides identificados em extrato de partes aéreas de *Tabernaemontana catharinensis* foram: 16-epi-afinina, coronaridina-hidroindolenina, voachalotina, voacristina-hidroindolenina e 12-metoxi-n-metil-voachalotina.
- 2) Um alcaloide com m/z 385,2134 encontrado no extrato e em algumas frações pode ser um derivado de voacristina ou voacangina, mas a sua estrutura deve ser confirmada.
- 3) As frações clorofórmicas neutralizadas ou alcalinas apresentaram maior conteúdo de alcaloides do que a fração ácida.
- 4) Separação por cromatografia de coluna permitiu a obtenção de frações ricas em alguns alcalóides: C1 e C2 – o possível derivado de voacristina ou voacangina; C3 e C4 - 16-epi-affinina; e C5 e C6 - 12-metoxi-n-metil-voachalotina.
- 5) O extrato bruto de *Tabernaemontana catharinensis* e suas frações apresentaram atividade antioxidante, sobressaindo as frações B2, B3, C2, C3 e C4 com capacidade de varredura de 50% do radical DPPH da ordem de 37,18 a 74,69 $\mu\text{g/ml}$.
- 6) O extrato bruto de *Tabernaemontana catharinensis* e suas frações apresentaram atividade anticolinesterásica sendo a melhor atividade observada nas frações C5 e C6 caracterizadas pela presença do alcalóide 12-metoxi-n-metilvoachalotina.
- 7) Frações contendo 16-epi-affinina combinaram boa atividade antioxidante (IC_{50} = 65,59 a 74,69 $\mu\text{g/ml}$) e anticolinesterásica (IC_{50} = 7,7 a 8,3 $\mu\text{g/ml}$) porém menos pronunciadas do que os controles.
- 8) O comportamento de inibição anticolinesterásica da fração C6 mostrou ser do tipo competitivo, semelhante ao descrito para galantamina

7. PERSPECTIVAS

- Realizar avaliação quantitativa dos alcalóides presentes em extratos de *T. catharinensis*.
- Identificar os outros alcalóides presentes nos extratos de *T. catharinensis*, em particular aquele com m/z 385,2134.
- Avaliar a atividade citotóxica e genotóxica dos alcalóides indólicos de *T. catharinensis*.
- Estudar os mecanismos de ação dos alcalóides indólicos de *T. catharinensis* utilizando o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* com ou sem superexpressão da proteína precursora de amilóide.
- Estudar os alcalóides indólicos em modelos animais com o enfoque em receptores nicotínicos e muscarínicos a fim de compreender o mecanismo de ação.
- Realizar estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos visando a utilização terapêutica de extratos e/ou alcalóides indólicos de *T. catharinensis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alper, K.; Reith, M.E.A.; Sershen, H. (2012) Ibogaine and the inhibition of acetylcholinesterase. **J Ethnopharmacol** 139: 879-882
- Andrade, M.T.; Lima, J.A; Pinto, A.C; Rezende, C.M.; Carvalho, M.P; Epifanio, R.A. (2005) Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell.Arg) Miersthat Inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorg Med Chem** 13: 4092-4095
- Aniszewski, T. (2007) **Alkaloids- secrets of life: Alkaloids chemistry, biological significance applications and ecological role**. First Ed. Elsevier Sc , Amsterdam.
- Araujo, A.R.; Kacheres, C.; Fujiwara, F.Y.; Marsaioli, A.J. (1984) Catharinensine, an oxindole alkaloid from *Peschiera catharinensis*. **Phytochem**. 23: 2359-2361
- Azoug, M.; Loukaci, A.; Richard, B.; Nuzillard, J.M.; Moretti, C.; Zeches Hanrot, M.; Le Men-Oliver, L. (1995). Alkaloids from stem bark and leaves of *Peschiera buchtieni*. **Phytochem** 39: 1223-1228
- Babar, Z.V.; Ata, A.; Meskatalsadat, M.M. (2006) New bioactive alkaloids from *Buxus hyrcana*. **Steroids** 71: 13-14
- Batina, M.F.C.; Giglio, J.R.; Sampaio, S.V. (1997) Methodological care in the evaluation of LD50 and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaefolia*. **J Venom Anim Toxins** 3: 22-31
- Batina, M.F.C.; Cintra, A.C., Veronese, E.L.; Lavrador, M.A.; Giglio, J.R.; Pereira, P.S.; Dias, D.A. (2000) Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus dirissu sterrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis* : Identification of one of the active components. **Planta Med** 66: 424-428
- Boligona, A.A.; Schuwznzb, T.G.; Pianna, M.; Bandeira, R.V.; Frohlich, J.K.; De Bruma, T.F.; Zaadra, M.; Athaydea, M.L. (2012) Chemical composition and

- antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* leaves. **Nat Prod Res** 8:1-4
- Bradacs, G.; Maes, L.; Heilmann, J. (2010) *In vitro* cytotoxic, antiprotozoal and antimicrobial activities of medicinal plants from Vanatu. **Phyther Res** 24: 800-809
- Brossi, A. (1986) **The alkaloids chemistry and pharmacology** Vol. 40. Academic Press Inc., USA
- Bruneton, J. (2001) **Farmacognosia: Fitoquímica Plantas medicinales**. 2º Edition. Zaragoza: Acribia.
- Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D.H. (1964) **Structure elucidation of natural products by mass spectrometry** Vol. 1: Alkaloids. Holden-Day Inc., USA
- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. (1998) **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. 4ª Edição. Guanabara Koogan S.A.
- Cardoso, C.L.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D.H.S.; Furlan, M.; Epifanio, R.A.; Pinto, A.C.; Rezende, C.M.; Lima, J., Bolzani, A. (2004) Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. **J Nat Prod** 67: 1882-1885.
- Cassery, I. (2004) Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol and misfolded proteins. **Lancet** 415: 1139-1146
- Chattipakorn, S.; Pongpanparadorn, A.; Pratchayasakul, W.; Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K.; Chattipakon, N. (2007) *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. **J Ethnopharmacol** 110: 61-68
- Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. (2006) High-throughput relative DPPH' radical scavenging capacity assay. **J Agric Food Chem** 54: 7429-7436
- Chies, C.E. (2011) Atividade antioxidante neuroprotetora e hepatoprotetora de *Lippia alba* (Miller) N.E.Brown. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Brasil.
- Clark, T.A.; Lee, H.P.; Robston, R.K.; Zhu, X.; Marlatt, M.W.; Castellani, R.J.; Nunomira, A.; Casadesus, O.; Smith, M.A.; Lee, H.G.; Perry, G. (2010) Oxidative stress and the implications for future treatments and management of Alzheimer disease. **Int J Biomed Sc** 6: 225-227

- Cordel, G.A. (1981) **Alkaloids derived from tryptophan. In introduction to alkaloids a biogenetic approach.** First Ed. Wiley, New York.
- Costa, A.F. (2002) **Farmacognosia.** volume II. 5º Edição. Fundação Calouste Gulbenkian
- Cummings, J.L.; Vinters, H.V.; Cole, G.M. (1998) Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve and treatment opportunities **Neurology** 1: S2-S67
- Dagnino, D.; Schripsema, J.; Verpoorte, R. (1994) terpenoid indole alkaloid biotransformation capacity of suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* **Phytochem** 35: 671-676
- Dewick, P.M. (2006) **Alkaloids. In Medicinal Natural Products** 2 Ed. John Wiley Sons Chichester
- Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T.L.; Sussman, J.L. (2010) Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chem-Biol Interact** 187: 10-22
- Ellman, G.L.; Courtney, D.K.; Andres, V.; Fetherstone, R.M. (1961) A new colorimetric of acetylcholinesterase activity...**Biochem.Pharmacol.** 7: 88-95
- Estevão, H.S.; Carvalho, L.C.; Ferreira, L.M.; Fernandes, E.; Marques, M.M.B. (2011) Analysis of the antioxidant activity of the indole library: cyclic voltammetry versus ROS scavenging activity. **Tetrahedron Lett** 52: 101-106
- Federici, E.; Palazzino, G.; Nicoletti, M.; Galeffi, C. (2000) Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaeifolia*. **Planta Med** 66: 93-95
- Fennel, C.V.; Van Staden, J. (2001) *Crinum* species in traditional and modern medicine. **J Ethnopharmacol** 78: 15-26
- Fragoso, V.; Nascimento, N.C.; Moura, D.J.; Romano e Silva, A.C.; Richter, F.M.; Seffi, J., Fatt-n, A.G. (2008) Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpenic indole alkaloids psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* **Toxicol in vitro** 22: 559-566
- Giacobini, E. (2003) Cholinergic functions and Alzheimer's disease. **Int J Geriatr Psych** 18: 51-55
- Glick, S.D.; Maisonneuve, M.; Kitchen, A.; Fleck, M.W. (2002) Antagonism of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors as a strategy to reduce opioid and stimulant self-administration. **Eur J Pharmacol** 438: 99-105

- Gower, A.E.; Pereira, B.D.S.; Marsaioli, A.J. (1986) Indole alkaloids from *Peschiera campestris*. **Phytochem** 25: 2908-2910
- Grossberg, G.T. (2003) Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Curr The Res** 64: 216-235
- Guida, A.; De Battista, G.; Bargardi, S. (2003) Actividad antibacteriana de alcalóides de *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. **Ars Pharm** 44: 167-173
- Gupta, M.; Mazumber, U.K.; Kumar, R.S.; Sivakumar, T.; Gomathi, P. (2004) Antioxidant and protective effects of *Ervatamia coronaria* stape leaves against tetrachloride induced liver injury. **Eur Bull Drug Res** 12:13-22
- Hansen, R.A.; Gartlehner, G.; Webb, A.P.; Morgan, L.C.; Moore, C.G.; Jonas, D.F. (2008) Efficacy and safety of donepezil, galantamine and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Clin Interv Aging** 3: 211-225
- Harel, M.; Schalkt, I.; Ehret-Sabatiert, L.; Bouett, F.; Goeldnert, M.; Hirths, C.; Axelsen, P. H.; Silmanii, I.; Sussman, J.L. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 9031-9035
- Hebert, L.E.; Scheer, P.A.; Bierrlas, J.R.; Bennett, D.A.; Evans, D.A. (2003) Alzheimer disease in the USA population. **Arch Neurol-Chicago** 60: 1119-1122
- Henriques, A.T.; Melo, A.A.; Mouno, P.R.; Ene, L.L.; Henriques, J.A.; Schapoval, E.E. (1996) *Ervatamia coronária* chemical constituents and some pharmacological activities **J Ethnopharmacol** 50: 19-25
- Hock, F.J. (1995) Therapeutic approaches for memory impairments. **Behav Brain Res** 66:143-150
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Agric Food Chem** 23: 1841-1856
- Huang, L.; Shi, A.; He, F.; Li, X. (2010) Synthesis biological evaluation and molecular modeling of berberine derivates as potent acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorgan Med Chem** 18: 1244-1251
- Ingkaninan, K.; Changwijit, K.; Suwanborirux, K. (2006) Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acethylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. **J Pharm Pharmacol** 58: 847-852

- Jain, S.; Jain, A.; Jain, N.; Jain, D.K.; Balekar, N. (2010) Phytochemical investigation and evaluation of in vitro free radical scavenging activity of *Tabernaemontana divaricata*. **Nat Prod Res** 24: 300-304
- Kawahara, M.; Kato-Negishi, M. (2011) Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. **Int J Alzheimers Dis** 27:6393
- Khan, M.T.H.; Orhan, I.; Senol, F.S.; Kartal, M.; Sener, B.; Dvorska, M.; Smykal, K.; Slapetova, T. (2009) Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. **Chem-Biol Interact** 181: 383-389
- King, C.R.; Meckler, H.; Herr, R.J.; Trova, M.P.; Glick, S.D.; Maisonneuve, I.M. (2000). Synthesis of enantiomerically pure (+) and (-) 18-methoxycoronaridine hydrochloride and their preliminary assessment as anti-addictive agents. **Bio-org Med Chem Lett** 10: 473-476
- Kroon, P.A.; Threlfall, D.R. (1997) Squalene synthase from cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* **Phytochem** 45: 1157-1163
- Lee, H-P.; Pancholi, N.; Esposito, L.; Preville, L.A.; Wang, X.; Zhu, X.; Smith, M.A.; Lee, H-G. (2012) Early induction of oxidative stress in mouse model of Alzheimer disease with reduced mitochondrial superoxide dismutase activity. **Plos One** 7: e28033
- Le Men, L.; Taylor, W.I. (1965) A uniform numbering system for indole alkaloids **Experientia** 21: 508-510
- Leeuwenberg, A.J.M. (1994) **A revision of Tabernaemontana: The New World species and Stemmadenia**. Volume II Kew Royal Botanic Gardens.
- Lépine, F.; Milot, S.; Zamir, L.; Morel, R. (2002) Liquid chromatographic/mass spectrometric determination of biologically active alkaloids in extracts of *Peschiera fuschiaefolia*. **J Mass Spectrom** 37: 216-222
- Lopez, M.D.; Pascual-Villalobos, M.J. (2010) Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Ind Crop Prod** 31: 284-288
- Luijendijk, T.J.C.; Nowak, A.; Verpoorte, R. (1996) Strictosidine glucosidase from suspension cultured cells of *Tabernaemontana divaricata*. **Phytochem** 41: 1451-1456

- Maelicke, A.; Albuquerque, E.X. (2000) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol** 393: 167-170
- Mansoor, T.A.; Dewanjee, S.; Borralho, P.M.; Mulhovo, S.; Rodrigues C.M.P.;Ferreira, M.J.U. (2012) Cytotoxic alkaloids from the roots of *Tabernaemontan elegans*. **Planta Med** 78: 177
- Matozinhos, C.N.; Konno, T.U.P. (2011) Diversidade taxonômica de Apocynaceae na Serra Negra, MG, Brasil. **Hoehnea** 38: 4
- Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature** 430: 631-640
- McManus, M.J.; Murphy, M.P.; Franklin, J.L. (2011) The mitochondria target antioxidant Mito Q prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci** 31: 15703-15715
- Meschini, S.; Marra, M.; Calcabrini, A.; Federici, E.; Galeffi, C.; Arancia, G. (2005) Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia* inhibits P-glycoprotein action in multidrug- resistant tumor cells. **Int J Oncol** 27: 1597-1603
- Meschini, S.; Condello, M.; Calabrini, A.; Marra, M.; Formisano, G.; Lista, P.; De Milito, A.; Federici, E.; Arancia, G. (2008) The plant alkaloid voacamine induces apoptosis independent autophagic cell death on both sensitive and multidrug resistant human osteosarcoma cells. **Autophagy** 4: 1020-1033
- Montine, K.S.; Olson, S.J.; Amarnath, V.; Whettsel, J.R.; Graham, D.G.; Montine, T. (1997) Immunohistochemical detection of 4-hidroxi-2-nonenal adductsin Alzheimer's disease is associated with inheritance of ApoE4. **Am J Pathol** 150: 437-443
- Munigunti, R.; Mulabagal, V.; Calderon, A.I. (2011) Screening of natural compounds for ligands to PfTrxR by ultrafiltration and LC-MS based binding assay. **J Pharmaceut Biomed** 55: 265-271
- Munoz, V.; Moretti, C.; Sauvain, M.; Caron, C.; Porzel, A.; Massiot, G.; Richard, B.; Le Men-Oliver, L. (1994) Isolation of Bis – indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkll*. **Planta Med** 60: 455-459

- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2006) **Lehninger princípios de bioquímica**. 4 Edição São Paulo: Sarvier.
- Orthan, I.; Sener, B.; Choudhary, M.J.; Khalid, A. (2004) Acetylcholinesterase and butirilcholinesterase inhibitory activity of some medicinal plants of Turks. **J Ethnopharmacol** 91: 57-60
- Parihar, M.S.; Hemnani, T. (2004) Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **J Clin Neurosci** 11: 456-467
- Patterson, C.; Feightner, J.W.; Garcia, A.; Hsing, R.; Machnight, C.; Sadovnick, A.D. (2008) Diagnosis and treatment of dementia Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. **CMAJ** 178 548-556
- Pelletier, S.W.; Chokshi, H.P.; Desai, H.K. (1986) Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid-chromatography. **J Nat Prod** 49: 892-900
- Pelletier, S.W. (1999) **Alkaloids: Chemical e Biological Perspectives** Vol.13 Oxford: Elsevier Science Ltd.
- Pereira, C.G.; Marques, M.O.M.; Barreto, A.S.; Siani, A.C.; Fernandes, E.C.; Meireles M.A.A. (2004) Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical fluid + ethanol : an evaluation of the process variables and the raw material origin. **J Supercrit Fluid** 30: 51-61
- Pereira, C.G.; Leal, P. F.; Sato, D.N.; Meireles, A.A. (2005) Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. **J Med Food** 8: 533-538
- Pereira, C.G.; Carvalho, J.E.; Meireles, M.A.A. (2006), Anticancer activity of *Tabernaemontana catharinensis* extract obtained by supercritical fluid extraction. **Rev Bras Pl Med** 4: 144-149
- Pereira, C.G.; Rosa, P.T.V.; Meireles, A.A. (2007) Extraction and isolation for índole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. Technical and economical analysis. **J Supercrit Fluid** 40: 232-238
- Pereira, P.S.; Dias, D.A.; França, S.C.; Sampaio, S.V. (1999) Indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticult** 501: 171
- Pereira, P.S.; França, S.C.; Oliveira, P.V.A.; Breves, C.M.S.; Pereira, S.I.V.P. (2008) Chemical constituents from *T. catharinensis* root bark: a brief NMR review of índole alkaloids and in vitro cytotoxicity. **Quim Nova** 31: 20-24

- Pocernich, C.B.; Lange, M.L.; Sultana, R.; Butterfield, D.A. (2011) Nutritional approaches to modulate oxidative stress an Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res** 8: 452-469
- Ramas-Valdívia, A.C., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., (1998) Isopentenil diphosphate isomerase and prenyltransferase activities in rubiaceous and apocynaceous cultures. **Phytochem** 48: 961-969
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. (2001) **Farmacologia** 4ª edição Guanabara Koogan
- Rastogi, K.; Kapil, R.S.; Papli, S.T. (1980) New alkaloids from *T. divaricata*. **Phytochem** 19: 1209-1212
- Rates, S.M.K.; Cauduro., A.D.; Salazar, V.; Moreno, P.R.H.; Henriques, A.T. (1988); Alcalóides indólicos em *Peschiera australis* (Muell Arg) Miers. Var *Australis*. Caderno de Farmácia 4: 1/2
- Rates, S.M.K.; Schapoval, E.E.S.; Souza, La.; Henriques, A.T. (1993) Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*. **Pharm Biol** 31: 288-294
- Raza, A.; Saeed, A.; Ibrar, A.; Muddassar, M.; Khan, A. A.; Iqbal, J. (2012) Pharmacological evaluation and docking studies of 3- thiadiazol and thioxo 1,2,4 – triazolylcoumarin derivates as cholinesterase inhibitors. **ISRN Pharmacol** ID 707932
- Ritchie, K.; Lovestone, S. (2002) The dementias. **Lancet** 360: 1759-1766
- Santos, A.K.; Magalhães, T.S.; Monte, F.J.; De Mattos, C. (2009) Alcalóides iboga de *Peschiera affinis* atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono e atividade antioxidante. **Quim Nova** 32: 1834-1838
- Sathishkumar, T.; Baskar, R. (2012) Evaluation of antioxidant properties of *Tabernaemontana heyneana* wall leaves. **IJNPR** 3: 197-207
- Sertel, S.; Fu, Y.; Zu, Y.; Rebacz, B.; Konkimalla, B.; Kramer, A.; Plinkert, P.K.; Gertsch J.; Efferth T. (2011) Molecular docking and pharmacogenomics of Vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine **Biochem Pharmacol** 81: 723-735
- Shippling, S.; Kontush, A.; Arlt, S.; Buhmann,C.; Sturenburg, H. J.; Mann, U.; Thomsen, T.M.; Beisiegel, U. (2000) Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. **Free Radical Bio Med** 28: 351-360

- Siems, W.G.; Grune, T.; Beier, B.; Zolliner, H.; Esterbauer, H. (1992) The metabolism of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product is dependent on tumor age in Ehrlich mouse ascites cells. **EXS** 62: 124-135
- Silverstein, R.M. (2006) **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro. LTC.
- Simões, A.O.; Endress, H. E.; Conti, E. (2010) Systematic and character evolution of Tabernaemontaneae based on molecular and morphological evidence. **Taxon** 59: 772-790
- Simões, C.M.O., Schenke, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.O. (2004) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3ª edição. UFSC
- Soares, D.C.; Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A.; Saraiva, E.M.B. (2007) Anti-*Leishmania amazonensis* activity of supercritical CO₂ + ethanol extracts from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasit Int** 56: 135-139
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. (2005) **Botânica Sistemática : Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiosperma da flora brasileira baseado em APG II**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA São Paulo.
- Souza, J. J.; Vieira, I. J.; Mathias, L.; Braz Filho, R. (2006) Alcalóides indólicos de *Tabernaemontana hystrix* In: 29º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. **Resumos**. Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ, 2006
- Srivastava, S.; Singh, M.M.; Kulshreshtha, D.K. (2001) A new alkaloid and other anti-implantation principles from *Tabernaemontana heyneana*. **Planta Med** 67: 577-579
- Steenkamp, V.; Fernands, A.C.; Van Rensburg, C.E.J. (2007) Screening of medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* isolated from South African AIDS patients. **S Afr J Bot** 9: 256-258
- Suffredini, I.B.; Bacchi, E.M.; Sakuda, T.M.K.; Ohara, M.T.; Younes, R. N.; Varella, A.D. (2002) Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. **Rev Bras Ciên Farm** 38: 89-94
- Sun, J.; Baker, A.; Chen, P. (2011) Profiling the indole alkaloids in yohimbe bark with ultra-performance liquid chromatography coupled with ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 25: 2591-2602

- Surya, S.; Poornima, K.; Kalaiasehi, M.; Gomathi, D.; Golapakrishnan, V.K.; Uma, C. (2011) In vitro antioxidant activity and phytochemical screening of ethanolic extract of *Tabernaemontana coronaria*. **Pharmacol online** 2: 212-218
- Taesotikul, T.; Panthong, A.; Kanjanapothi, D.; Verpoorte, R.; Scheffer, J.J. (1998) Neuropharmacological activities of the crude alkaloidal fraction from stems of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. **J Ethnopharmacol** 62: 229-234
- Van Beek, T.A.; Verpoorte, R.; Baerheim Svendsen, A.; Leeuwenberg, A.J.M.; Bisset, N.G. (1984a) *Tabernaemontana* L.: A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. **J Ethnopharmacol** 10: 01-156
- Van Beek, T.A.; Kuijbaars, F.L.C.; Thomassen, P.H.A.M.; Verpoorte, R.; Svendsen B. (1984b) Antimicrobially active alkaloids from *Tabernaemontana pachysiphon*. **Phytochem** 23: 1771-1778
- Van Der Heyden, R.; Lokkerbol, H.; Verpoorte, R.; Baerheim, S.A. (1987) Pharmacognostical studies of *Tabernaemontana* species XX Lon pair culture. **J Chromatogr A** 396: 410-415
- Vekey, K. (2001) Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography **J Chromatogr A** 921: 227-236
- Veronese, E.L.G.; Esmeraldino, L.E.; Trombone, A.P.F.; Santana, A.E.; Bechara, G.H.; Kettelhut, I.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Sampaio, S.V. (2005) Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Phytomed** 12: 123-130
- Verri, M.; Pastoris, O.; Dossena, M.; Aquilani, R.; Guerriero, F.; Cuzzoni, G.; Venturini, L.; Ricevuti, G.; Bongiorno, A.I. (2012) Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer disease. **Int J Immunopathol Pharmacol**. 25:345-353
- Viegas Jr, C.; Bolzani, V.S.; Furlan, M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. (2004) Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. **Quim Nova** 27: 655-660
- Vieira, I.J.C.; Medeiros, W.L.B.; Monnerat, C.S. (2008) Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic alkaloids in complex mixtures. **An Acad Bras Ciênc** 80: 3
- Wink, M. (2010) **Annual plant review: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Vol 40, Second Edition, Blackwell Publishing L.

- Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.C.; Terão, J. (1998) HPLC method for evaluation on the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenil-2-picrilhydrazyl. **Biosc Biotechnol Biochem** 62: 1201-1204
- Yamashita, M.; Fenn, J.B. (1984) Electrospray ion source another variation on the free jet theme. **J Phys Chem** 88: 4451-4459
- Youdim, M.B.H.; Buccafusco, J.J. (2005) Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. **Trends Pharmacol Sci** 26:1
- Zhan Z-J, YU Q, Wang Z-L, Shan W-G (2010) Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. **Bio-org Med Chem Lett** 20: 6185-6187
- Zhou, H.; Tai, Y.; Sun, C.; Pan, Y. (2005) Rapid identification of Vinca alkaloids by direct-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry and confirmation by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. **Phytochem Anal** 16: 328-333
- Zocoler, M.A.; Oliveira, A.J.B.; Sarragiotto, M.H.; Grzesuik, V.L; Vidotti G. (2005) Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia*. **J Braz Chem Soc** 16: 1372-1377