

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES
ALCALOÍDICAS DE *Abuta grandifolia* (Menispermaceae)

Bolsista: Jéssica Burlamaque Maciel, CNPq

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL
PIB-E/0125/2015
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES
ALCALOÍDICAS DE *Abuta grandifolia* (Menispermaceae)

Bolsista: Jéssica Burlamaque Maciel, CNPq
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Colaborador: Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

MANAUS
2016

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao e Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia – NEQUIMA e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa-CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida no Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia – NEQUIMA.

RESUMO

Na Amazônia, as plantas medicinais são muito utilizadas popularmente para o tratamento de diversas doenças. Dentre as plantas medicinais utilizadas, destaca-se *Abuta grandifolia* (Mart.) (Sandwith), que faz parte da família Menispermaceae. Esta espécie é conhecida por suas propriedades medicinais, tais como atividade anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana e antimalárica. Neste trabalho realizou-se a caracterização química dos constituintes alcaloídicos das folhas e galhos da espécie. As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD) e Espectrometria de Massas (EM) utilizando ionização tipo APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), e comparando-se os espectros de massas dos íons selecionados foi possível propor a presença dos alcaloides coclaurina, estefarina, reticulina, (S-S)-O4''-metil, N β -nor-O6'-dimetil-(+)-curina, krukovina, bem como três outros alcaloides cujas estruturas ainda não foram identificadas.

Palavras-chave: *Abuta*, alcaloide, proaporfínico, benziltetrahidroisoquinolínico, bisbenzilisquinolínico.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1 Plantas Medicinais	6
2.2 Gênero <i>Abuta</i>	7
2.3 <i>Abuta grandifolia</i>	7
2.4 Atividade Biológica	9
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	9
3.1 Levantamento bibliográfico	9
3.2 Coleta	10
3.3 Obtenção da fração alcaloídica	10
3.4 Análise das frações por LC-DAD-MS	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1 Extração Alcaloídica	10
4.2 Análise das frações por Espectrometria de Massas.....	11
4.3 Análise das frações por LC_DAD_MS	16
5. CONCLUSÃO	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
7. CRONOGRAMA EXECUTADO	20

1. INTRODUÇÃO

Muitas comunidades e grupos étnicos têm como único recurso terapêutico para tratamento de doenças e cura de enfermidades o uso de plantas medicinais. Nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e eficácia de plantas medicinais contribuem consideravelmente para despertar o interesse de pesquisadores de diversas áreas, como por exemplo botânica, farmacologia e fitoquímica, quanto à comprovação das virtudes terapêuticas dos vegetais. (MACIEL *et al*, 2002). Assim, este trabalho propõe-se a realizar uma pesquisa fitoquímica da espécie *Abuta grandifolia* (Mart.) (Sandwith), que se destaca entre plantas medicinais utilizadas popularmente. A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. (SIMÕES *et al*, 2003)

A espécie *A. grandifolia* faz parte da família Menispermaceae, é usada em vários países da América do Sul como fitoterápico, complemento alimentar, corante e outros usos. Na forma de corante, seus caules produzem uma tintura amarelada que pode chegar à cor de vinho, contudo seu uso mais comum é na forma de fitoterápico (REVILLA, 2001).

Alcaloides são muito encontrados na família Menispermaceae. Alcaloides tipo isoquinolínicos, tropoisoquinolínicos, e bisbenzilisquinolínicos são descritos em espécies do gênero *Abuta* entre eles pode-se mencionar os alcaloides krukovina e limacina, que exibem atividade antiplasmódica (STEELE *et al.*, 1999).

Neste projeto, destaca-se o estudo da composição química, através de análises de Cromatografia de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas. Assim, o estudo desta espécie auxiliará tanto na identificação da composição química quanto na confirmação de quais constituintes conferem as atividades biológicas indicadas em estudos anteriores.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas Medicinais

Na Amazônia Legal estão identificadas cerca de 650 espécies vegetais com propriedades fitoterápicas, de valor econômico. O estado do Pará se destaca com aproximadamente 540 espécies, seguido dos estados do Amazonas, com 488; Mato

Grosso, 397; Amapá, 380; Rondônia, 370; Acre, 368; Roraima, 367; Maranhão, 261. (FIEAM, 2016)

As plantas medicinais são muito usadas como fonte de compostos químicos com atividade farmacológica. Uma planta pode ter dezenas de metabólitos secundários que se tornam fontes de produtos naturais biologicamente ativos. (MARI, 2007). O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. (SIMÕES *et al*, 2003)

A exploração dos constituintes químicos presentes em produtos naturais possibilitou a descoberta de substâncias com as mais variadas estruturas, classes químicas, propriedades físico-químicas e biológicas que se tornaram modelos para síntese de inúmeros fármacos (BRESOLIN & FILHO, 2003).

2.2 Gênero *Abuta*

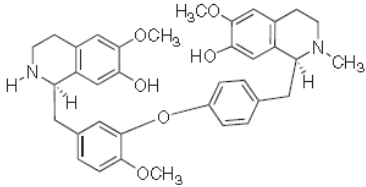
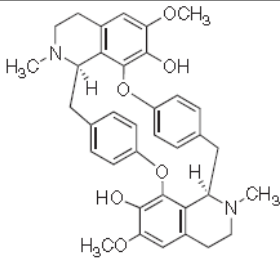
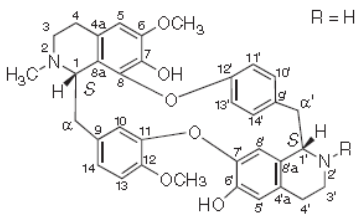
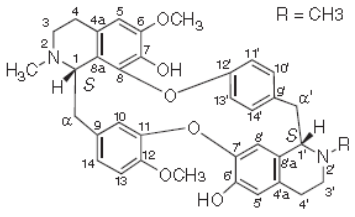
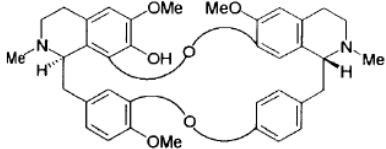
O gênero *Abuta* foi descrito por Aublet e compreende cerca de 35 espécies tropicais. Ocorrem nas florestas tropicais, do sul do México a Bolívia, passando pelo Brasil, tendo maior diversidade na Amazônia, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. No Brasil, o gênero está representado por 16 espécies. (SOUSA *et al*, 2013).

2.3 *Abuta grandifolia*

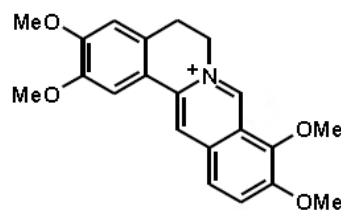
Abuta grandifolia (Mart.) Sandwith, também conhecida como abuta, abuta-branca, abota, abutua, barbasco, butua, cipó-abuta, parreira-brava-branca, dentre outros nomes populares (MARI, 2007 apud REVILLA, 2002), pertence à família Menispermaceae e é considerada como uma planta medicinal tradicional em toda a América do Sul. O caule e as folhas possuem muitas propriedades medicinais, como atividade anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana e antimalárica. (SAYAGH, 2012).

Estudos fitoquímicos relataram a presença de alcaloides na espécie *Abuta grandifolia*, estes são mostrados na tabela 1. Segundo os estudos realizados, é possível que esses alcaloides sejam os responsáveis pelas diversas propriedades medicinais observadas na espécie.

Tabela 1: Alcaloides isolados da espécie *Abuta grandifolia*

Espécie	Alcaloides Isolados	Estrutura	Referência
	(<i>R,S</i>)-2 N-Norberbamunina		Cometa <i>et al</i> (2012)
<i>Abuta grandifolia</i>	(<i>R,R</i>)-Isochondodendrina		Cometa <i>et al</i> (2012)
	(<i>S,S</i>)-O4''-methyl-Nb-nor-O6'-demethyl-(+)-curina		Cometa <i>et al</i> (2012)
	(<i>S,S</i>)-O4''-methyl, O6'-demethyl-(+)-curina ou Krukovina		Cometa <i>et al</i> (2012) e Steele <i>et al</i> (1999)
	Limacina		Steele <i>et al.</i> ,1999

Palmatina



Rocha, *et al.* (1967)

2.4 Atividade Biológica

Segundo Cometa *et al* (2012) a família Menispermaceae é uma boa fonte de alcaloides bisbenzylisoquinólicos, caracterizada por diferentes atividades farmacológicas, incluindo atividade inibitória da enzima colinesterase (ChE).

Abuta grandifolia (Mart.) Sandwith é usada em etnomedicina contra várias doenças, e, em particular, contra as febres da malária. Este uso popular foi confirmado por isolamento de alcaloides bisbenzylisoquinólicos com atividade antiplasmódica. (COMETA *et al*, 2012)

O extrato em metanol dos galhos dessa espécie e suas respectivas frações mais polares, também apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) (MUNIZ *et al*, 2007). Essa enzima está envolvida na transmissão de impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, através da hidrólise da acetilcolina. Trabalhos da literatura demonstraram que inibidores de AChE podem apresentar atividade antiinflamatória (NIZRI *et al*, 2006).

Além disso, a inibição dessa enzima também pode ser uma estratégia para o tratamento de doenças como o mal de Alzheimer, de Parkinson e outras doenças que afetam o sistema nervoso central (MUKHERJEE *et al*, 2007).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Levantamento bibliográfico

Foi realizado o levantamento de trabalhos científicos em bases de dados especializadas e obtenção de trabalhos publicados em livros e revistas especializadas, relacionados à área de química de produtos naturais. As principais ferramentas de busca foram as bases de dados disponíveis no Portal Periódicos da CAPES (SciFinder, Scopus, Web of Science, Medline pub, Biological e CAB Abstracts).

3.2 Coleta

Os galhos e folhas de *Abuta grandifolia* foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

3.3 Obtenção da fração alcaloídica

Para obtenção das frações alcaloídicas de galhos e folhas de *Abuta grandifolia*, o material vegetal foi macerado em NH_4OH 10 %, seguida de partição em diclorometano. Posteriormente, a fase aquosa foi neutralizada com solução de ácido acético 10% e depois, adicionou-se à fase aquosa diferentes volumes de NH_4OH concentrado a fim de alcançar o pH 10. A fase aquosa foi então, extraída com diclorometano e essa fase orgânica foi submetida a análises.

3.4 Análise das frações por LC-DAD-MS

A identificação de perfis cromatográficos das frações alcaloídicas foi realizada inicialmente em placas prontas (Merck F254) usando gel de sílica ou sílica derivatizada (RP-18) com auxílio de diferentes reveladores (UV a 254 ou 366 nm e revelador químico específico para a classe de alcaloides tais como Dragendorff). Em seguida, essas frações foram analisadas por injeção direta em Espectrômetro de massas do tipo *Íon-trap* modelo LCQ *Fleet* (Thermo Scientific) com ionização APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) no modo positivo. Posteriormente, foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD) e Espectrometria de Massas (EM) utilizando ionização tipo APCI para identificação dos alcaloides presentes na espécie. Para a análise cromatográfica utilizou-se um cromatógrafo Surveyor® (Thermo Scientific), com fluxo de 1ml/min, em sistema gradiente com as fases móveis: A (água ultrapura 0,1% ácido fórmico) e B (Metanol grau HPLC). A coluna cromatográfica utilizada foi a coluna Luna C18 (5 μ , 100 Å, tamanho 150 x 4,6 mm). O gradiente ocorreu de 0-20 minutos, de 20% a 50%, de 20-30 minutos, isocrático a 50%, de 30-40 minutos, de 50% a 100% e mais 10 minutos de MeOH 100%, totalizando 50 minutos. Foram utilizados solventes grau HPLC (Tedia®) para as análises cromatográficas em modo normal de eluição, bem como para o preparo dos extratos. A identificação dos alcaloides também foi realizada com auxílio de alguns padrões disponíveis em nosso grupo de pesquisa e comparação com dados da literatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração Alcaloídica

O método de extração desenvolvido busca fazer uma triagem dos metabólitos secundários totais contidos no material vegetal. Assim, ao adicionar a solução de hidróxido de amônio 10% ao material vegetal, houve a extração de vários compostos de caráter ácido, tais como ácidos graxos, devido ao meio ser básico. Esses constituintes ficaram retidos na fase aquosa básica na forma de sais orgânicos. Com a adição de diclorometano, esse solvente orgânico de baixa polaridade extraiu as moléculas de baixa polaridade do material vegetal. Como o interesse dessa extração não são os compostos ácidos e de alta polaridade, a fase aquosa básica foi descartada. E a extração prosseguiu com a fase apolar (DCM).

A adição de ácido acético 10% teve como objetivo fazer uma nova triagem, pois como esse solvente é ácido, este reagiu com os compostos básicos formando sais, ou seja, os alcaloides de baixa polaridade que possivelmente estavam na fase apolar foram removidos para a fase aquosa ácida na forma de sais. A fase apolar foi removida e à fase aquosa ácida adicionou-se NH_4OH até o pH 10. O hidróxido de amônio reage com os sais, e assim, regenera a forma molecular dos alcaloides. E por último, com a adição de diclorometano foi possível extrair os alcaloides que estavam na forma molecular para uma fase apolar, finalizando assim a extração e obtendo as frações alcaloídicas.

As frações obtidas tiveram os seguintes resultados:

Material Vegetal	Fração	Rendimento
Folha	4,2 mg	0,21%
Galho	1,2 mg	0,06%

Tabela 2: Frações e Rendimentos da extração alcaloídica dos galhos e folhas de *Abuta grandifolia*

4.2 Análise das frações por Espectrometria de Massas

No espectro de íons totais (Fig. 1) da fração das folhas e galhos foram verificados íons de m/z par, característicos de alcaloides, tais como: 286, 298 e 330. Também foram observados outros de m/z 569, 581, 583, 595 e 597 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

O íon m/z 286 apresentou uma perda inicial de 17 Da (NH_3) (m/z 286 $\rightarrow$ m/z 269), assim como apresentou fragmentos de m/z 107 e 175 (Fig. 2A). O íon de m/z 330 teve perda inicial de 31 Da (CH_3NH_2) (m/z 330 $\rightarrow$ m/z 299), e um fragmento de m/z 192 (Fig. 2B). As perdas iniciais e os fragmentos observados nos dois íons são coerentes

com esqueletos de alcaloides benzilisoquinolínicos (SCHMIDT *et al*, 2005). O fragmento de m/z 192 é um fragmento chave frequentemente observado em esqueletos benzilisoquinolínico-N-metil contendo substituintes metoxila e hidroxila no anel A (SCHMIDT *et al.*, 2005).

No espectro de MS^2 do íon de m/z 298 (Fig. 4) observou-se perdas características de 17 Da, atribuída a NH_3 e 31 Da, atribuída a CH_3NH_2 . Essas perdas foram anteriormente reportadas em estruturas aporfínicas (STÉVIGNY *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2014).

Nos espectros de MS^2 foram observados picos com m/z 569 (Fig. 6A), m/z 583 (Fig. 6C) e m/z 597 (Fig. 6E), que apesar de apresentarem m/z ímpar, apresentaram perdas características como de NH_3 (17 Da) (m/z 569 $\rightarrow$ m/z 552, m/z 583 $\rightarrow$ m/z 566 e m/z 597 $\rightarrow$ m/z 580, respectivamente), e CH_3NH_2 (31Da) (m/z 552 $\rightarrow$ m/z 538, m/z 566 $\rightarrow$ m/z 552 e m/z 580 $\rightarrow$ m/z 566, respectivamente), sugerindo tratar-se de alcaloides contendo dois átomos de nitrogênio, coerentes com dímeros. Além disso, observou-se nos espectros dos três íons a presença de um fragmento de íon m/z 192 e no espectro do íon de m/z 569 observou-se um fragmento de íon m/z 178, indicativo de esqueletos benzilisoquinolínicos. Segundo Shim *et al* (2013), os fragmentos de m/z 178 e 192 também são característicos de fragmentações de alcaloides bisbenzilisoquinolínicos.

No espectro de MS^2 dos íons de m/z 581 e 595 (Fig. 6 B e D), foi observada perda inicial de 15 Da (m/z 581 $\rightarrow$ m/z 566 e m/z 595 $\rightarrow$ m/z 580). Também se notou nos espectros de fragmentação dos dois íons a presença discreta do íon de m/z 192, já mencionado anteriormente como fragmento chave de alcaloides benzilisoquinolínicos e bisbenzilisoquinolínicos (SCHMIDT *et al*, 2005; SHIM *et al*, 2013).

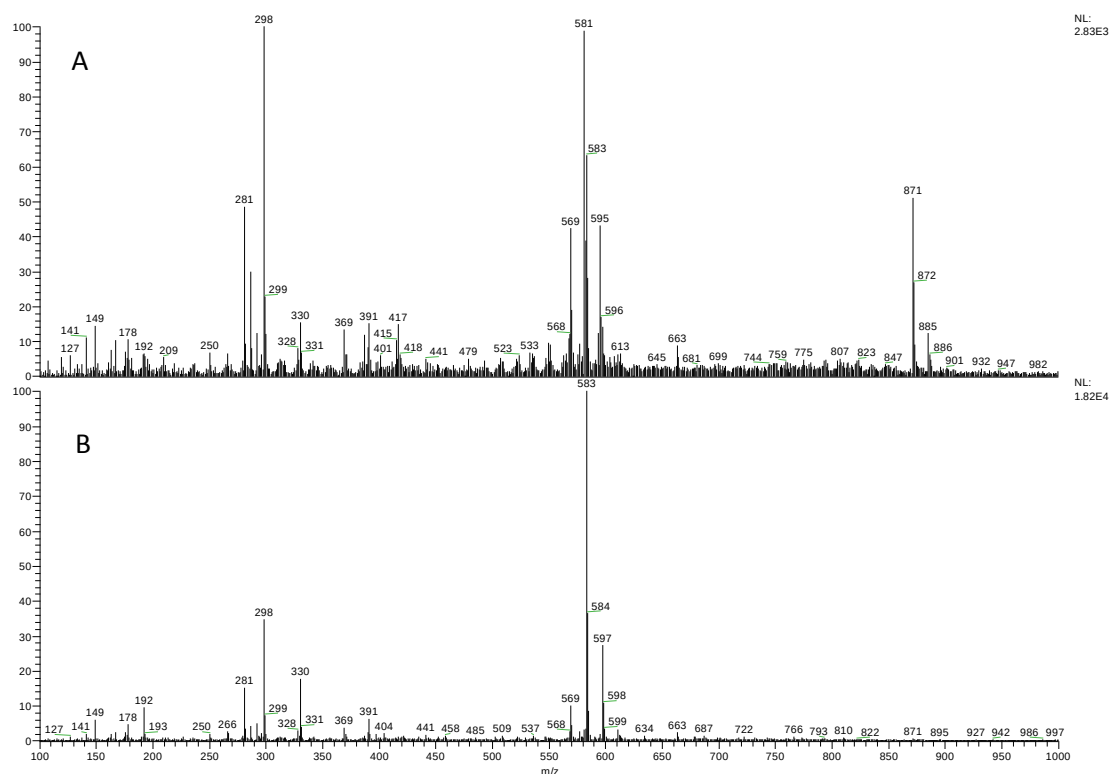


Figura 1: Espectro de Massas em *full scan* das Frações Alcalóidicas das Folhas (A) e galhos (B) de *Abuta grandifolia*

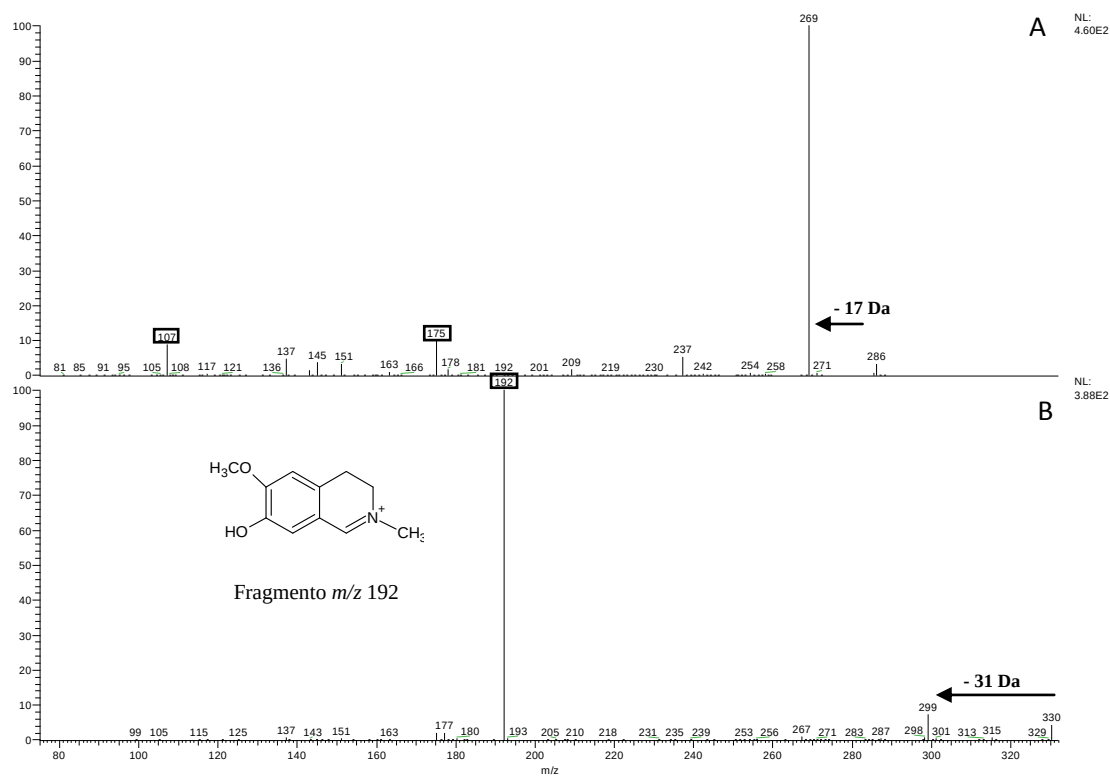


Figura 2: Espectro de Massas em MS² dos íons de m/z 286 e 330

O íon de massa m/z 286 $[M+1]^+$, corrobora, de acordo com a literatura (ALARCON *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2005) com o alcaloide benziltetrahydroisoquinolínico coclaurina, já relatado em Menispermaceae (DUTE *et al.*, 1987). Através de dados da literatura sugere-se que o pico $[M + H]$ 330 se trata do alcaloide benziltetrahydroisoquinolínico reticulina (SCHMIDT *et al.*, 2007).

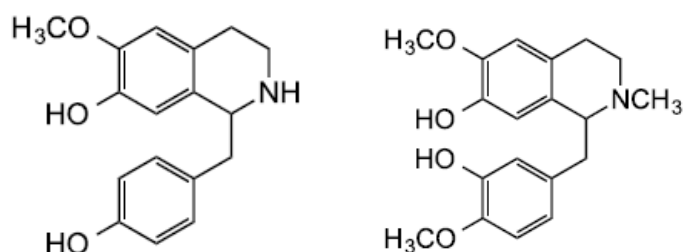


Figura 3: Estrutura dos alcaloides Coclaurina e Reticulina

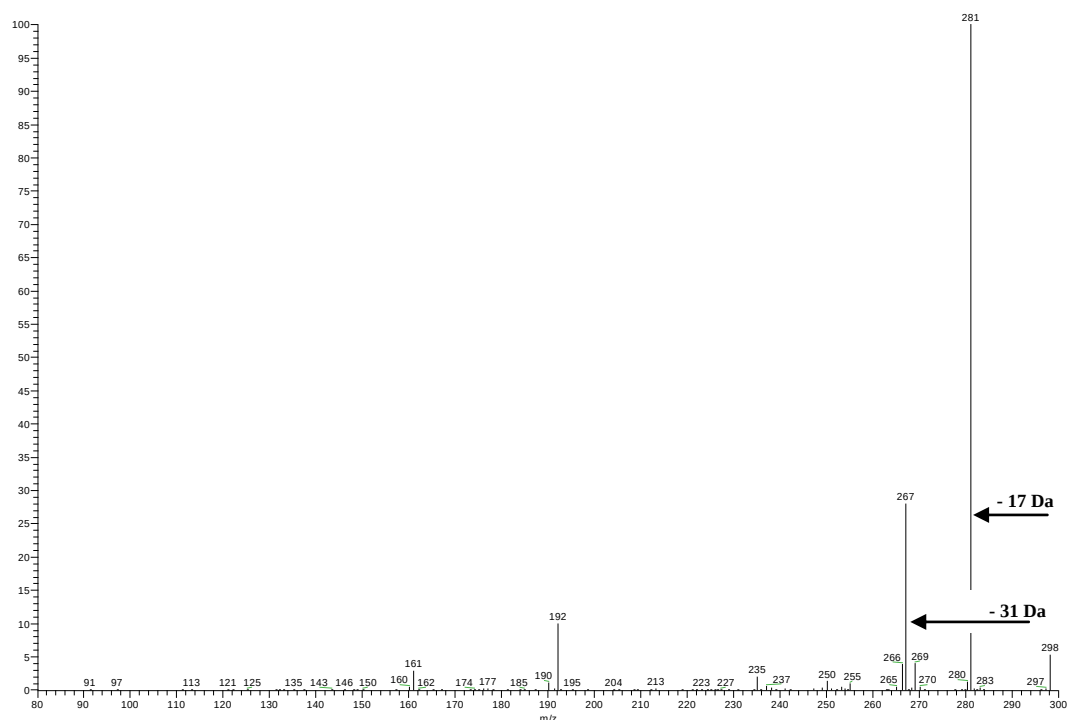


Figura 4: Espectro de Massas em MS^2 do íon de m/z 298

Comparado com a literatura (KOPYLOV *et al.*, 2014), o pico de $[M + H]$ 298 indica possivelmente a estrutura do alcaloide proaporfínico estefarina. O alcaloide estefarina foi mencionado por Thornber (1970); Sayagh *et al.* (2012) como presente na família Menispermaceae e na espécie *Abuta grandifolia*.

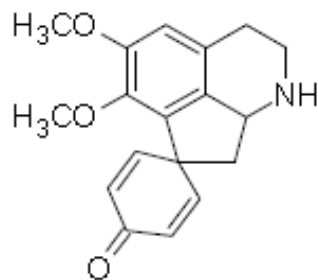


Figura 5: Estrutura do alcaloide proaporfínico Estefarina

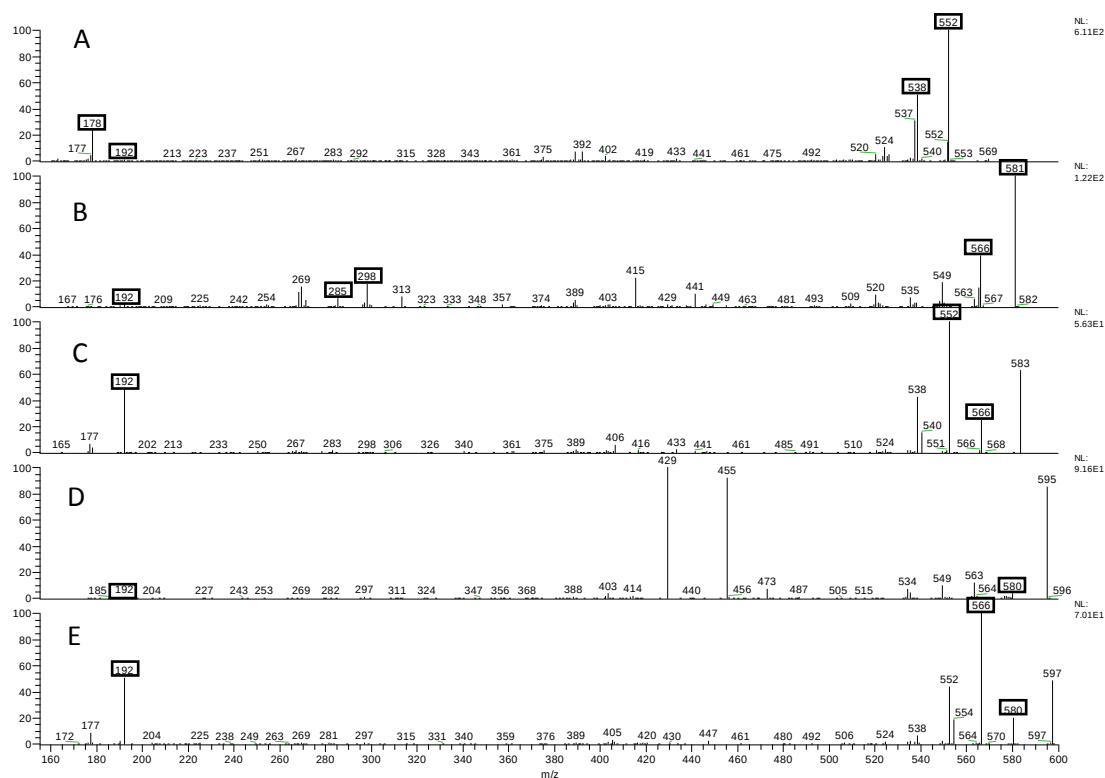


Figura 6: Espectro de Massas em MS^2 do íon de m/z 569, 581, 583 595 e 597

Ao observar os íons m/z 569 e 583 no espectro percebeu-se que eles poderiam ser dímeros de alcaloides benzilisoquinolínicos (bisbenzilisoquinolínicos), e dados da literatura mostram o isolamento de tais moléculas em *Abuta grandifolia* (COMETA *et al.*, 2012). Porém, os dados obtidos para esses íons não foram suficientes para confirmar a estrutura de tais alcaloides.

Cometa *et al* (2012) relatou o alcaloide com m/z 581 como sendo o bisbenzilisoquinolínico (S-S)-O4''-metil, Nb-nor-O6'-dimetil-(+)-curina (Fig. 7A). O íon de m/z 595 foi relatado por Steele *et al* (1999) como sendo o alcaloide bisbenzilisoquinolínico Krukovina, que foi isolado da espécie *Abuta grandifolia*. Cometa *et al* (2012) também relataram a presença de um alcaloide

bisbenzilisoquinolínico na espécie *A. grandifolia* com m/z 595, e atribuíram o nome de (S-S)-O4''-metil, O6'-dimetil-(+)-curina (Fig. 7 B).

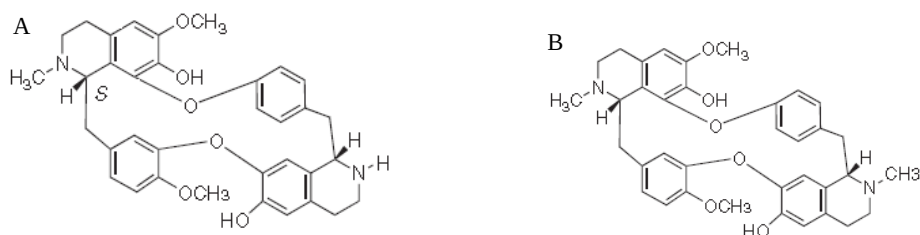


Figura 7: Estrutura dos alcaloides bisbenzilisoquinolínicos A e B

O íon de m/z 597 foi relatado por Steele et al (1999) apenas como um tipo de alcaloide bisbenzilisoquinolínico, presente na espécie *Abuta grandifolia*.

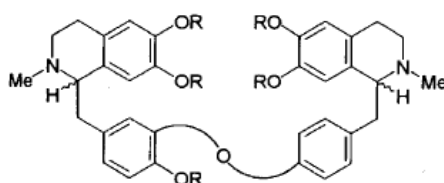


Figura 8: Estrutura do alcaloide bisbenzilisoquinolínico m/z 597

4.3 Análise das frações por LC-DAD-MS

A análise por LC-DAD-APCI-MS confirmou a presença da maioria dos alcaloides observados na análise por Espectrometria de Massas. No cromatograma referente às folhas (Fig. 9A), foram observados picos majoritários de m/z 298, 286, 583 e 569, coerentes com os íons observados no espectro de massas em *full scan* das folhas (Figura 1A). No cromatograma referente aos galhos (Fig. 9B), evidenciou-se os picos com m/z 298, 330, 583 e 569, também semelhantes ao verificado no espectro de massas em *full scan* dos galhos (Figura 1B).

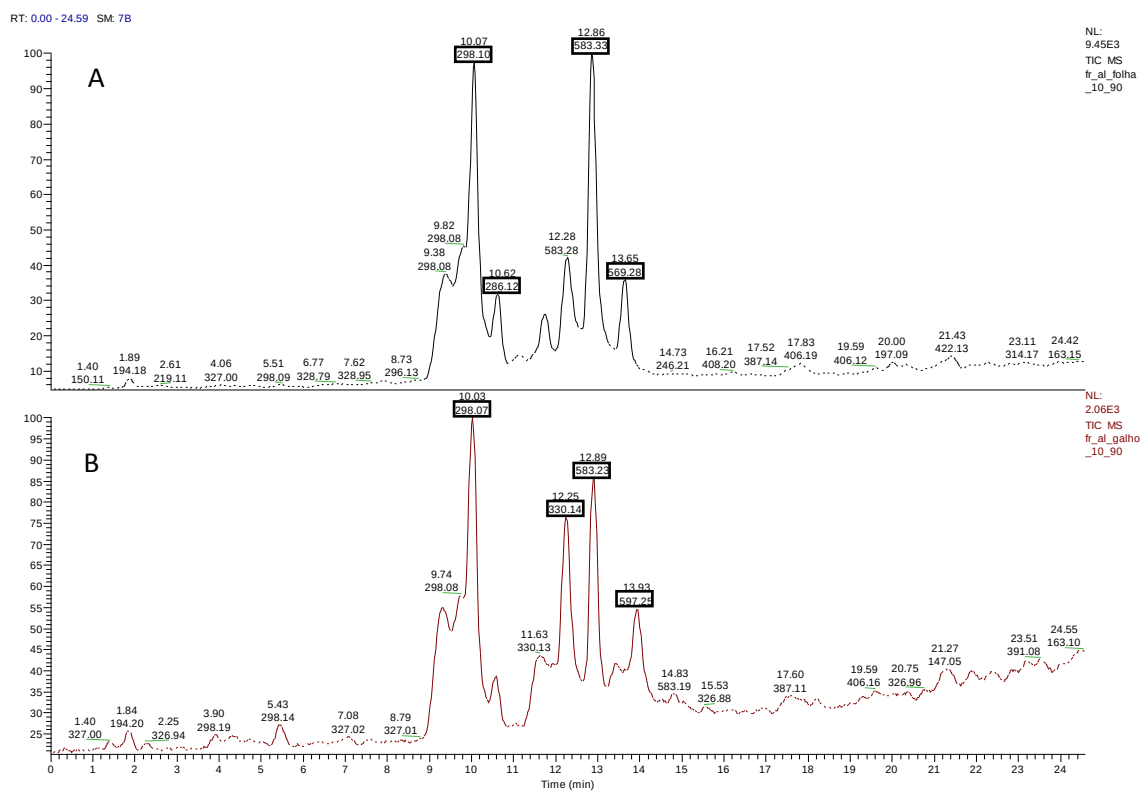


Figura 9: Cromatograma obtido por LC-DAD-MS da fração alcaloídica das folhas (A) e galhos (B). de *Abuta grandifolia*.

5. Conclusão

Os dados obtidos através deste trabalho contribuíram significativamente para o conhecimento fitoquímico da espécie *Abuta grandifolia*. As investigações instrumentais utilizadas auxiliaram na confirmação da natureza alcaloídica das folhas e galhos da espécie, sendo identificados os seguintes alcaloides: dois benziltetrahydroisoquinolínicos (Coclaurina e Reticulina), um proaporfínico (Estefarina) e cinco bisbenzylisoquinolínicos. Dos bisbenzylisoquinolínicos identificados, apenas três haviam sido relatados em literaturas anteriores ((S-S)-O4"-metil, Nb-nor-O6'-dimetil-(+)-curina, Kruvovina e o alcaloide de m/z 597, que não teve nenhum nome atribuído) e os outros dois alcaloides identificados na espécie não foram reportados na literatura, e para confirmação de suas estruturas se faz necessário o isolamento dos mesmos e a continuação dos estudos com o auxílio de outras técnicas de alta resolução.

Os testes de atividade biológica para confirmação das propriedades medicinais da espécie *A. grandifolia* foram iniciados, porém há a necessidade de repetições e tratamento dos dados. Essas atividades, bem como o isolamento e elucidação estrutural dos alcaloides e avaliação do potencial biológico destas substâncias serão desenvolvidas posteriormente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON, J.; MOLINA, S.; VILLALOBOS, N.; LILLO, L.; LAMILLA, C.; CESPEDES, C. L.; SEIGLER, D. S. **Insecticidal activity of Chilean Rhamnaceae: *Talguenea quinquenervis*** (Gill. et Hook). *BLACPMA*, 10, p. 389. 2011.
- BRESOLIN, R. M. T.; FILHO, V. C. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Editora: UNIVALI – SC, p. 11-18. 2003.
- COMETA, Maria Francesca; FORTUNA, Stefano; PALAZZINO, Giovanna; VOLPE, Maria Teresa; SALGADO, Elsa Rengifo; NICOLETTI, Marcello; TOMASSINI, Lamberto. **New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia***. *Fitoterapia*. p. 476–480, 2012.
- DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. CRC Press, Florida, 215 pp, 1994.
- DUTE, P.; WEBER, J. F.; FOURNET, A.; CAVÉ, A.; BRUNETON, J. **Bzs-benzylisoquinoline alkaloids from *Abuta pahni***. *Phytochemistry*. 26, p. 2136, 1987.
- FIEAM. **Informações Gerais sobre plantas Medicinais na Amazônia Legal**. Disponível em: <<http://www.fieam.org.br/plantasmedicinais.php>>. Acesso em 22/01/2016.
- KOPYLOV, A. T.; KUZNETSOVA, K. G.; MIKHAILOVA, O.; MOSHKIN, A. G.; TURKIN, V. V.; ALIMOV, A. A. Development of Mass Spectrometry Selected Reaction Monitoring Method for Quantitation and Pharmacokinetic Study of Stepharine in Rabbit Plasma. *Advances in Pharmacological Sciences*. pp. 9. 2014.
- MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Angelo C.; VEIGA JR., Valdir F. Plantas Medicinais: **A necessidade de estudos multidisciplinares**. *Química Nova*, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.
- MARI, Adriana de Oliveira. **Aspectos etnofarmacológicos de *Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith (Menispermaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da Amazônia**. Manaus: [s.n.], 2007.
- MUKHERJEE, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J.. **Acetylcholinesterase inhibitors from plants**. *Phytomedicine*, 14, pp. 289-300, 2007.
- MUNIZ, M. P., Souccar, C., Lapa, A. J., Pinheiro, M. L., Nunomura, S. M., Nunomura, R. C. S. . **Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity from stems of *Abuta grandifolia***. *Anal. of 1st Brazilian Conference on Natural Products & XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology*, São Pedro – SP, Brazil, 2007.
- NIZRI, E., Hamra-Amitay, Y., Sicisic, C., Lavon, I, Brenner, T. **Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors**. *Neuropharmacology*, 50, pp. 540-547, 2006.
- REVILLA, J. **Plantas da Amazônia – oportunidades econômicas e sustentáveis**. 3ª ed. SEBRAE – AM/INPA, Manaus. p. 405, 2001
- ROCHA, A. I. da; BESSHO, K.; CAVA, M. P. **Presença de palmatina em *Abuta grandifolia***. INPA, 1967. (INPA. Química. Publicação n. 11).

- SAYAGH, Charlotte; LONG, Christophe; MORETTI, Christian; LAVAUD, Catherine. **Saponins and alkaloids from *Abuta grandifolia***. Elsevier. *Phytochemistry Letters* 5, p. 188–193, 2012.
- SCHMIDT, J.; BOETTCHER, C. KUHN, C.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. **Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [ring-¹³C₆]-tyramine feeding**. *Phytochemistry*, 68, p. 189-202, 2007.
- SCHMIDT, Jurgen.; RAITH, Klaus; BOETTCHER, Clotima; ZENK, Meinhard H. **Analysis of benzylisoquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization**. *Eur. J. Mass Spectrom.* 11, p. 325-333, 2005.
- SHIM, Hee Jung; LEE, Ji Ye; Kim, Byungjoo; HONG, Jongki. **General Fragmentations of Alkaloids in Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry**. *Mass Spectrometry Letters*. v. 4, no. 4, 2013.
- SILVA, F.M.A., SOUZA, A.D.L., KOOLEN, H.H.F., BARISON, A., VENDRAMIN, M.E., COSTA, E.V., FERREIRA, A.G., PINHEIRO, M.L.B. **Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis ducnei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionisation Ion-trap Tandem Mass Spectrometry**. *Phytochemical Analysis*, V.25, 45-49, 2014.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 5.ed, 2003.
- SIQUEIRA, Carlos Alberto Theodoro. **Aspectos Químicos e atividade antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)**. São Paulo, 2010.
- SOARES, Elzalina Ribeiro. **Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica de *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae)**. Universidade Federal do Amazonas – Manaus, 2014.
- SOUSA, Julio S.; BASTOS, Maria N. C.; GURGE, Ely S. C.; CRUZ, Ana P. O. **Nova Ocorrência de *Abuta aubl.* (Menispermaceae) em Mato Grosso, Brasil**. 64º Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte, 2013.
- STEELE, Jonathan C. P.; SIMMONDS, Monique S. j.; VEITCH, Nigel C.; WARHURST, David C. **Evaluation of the Anti-Piasmodial Activity of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Abuta grandifolia***. *Planta Medica* v. 65, p. 413-416, 1999.
- STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. LECLERCQ, J. Q. **Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry**. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 18, p. 523-528, 2004.
- THORNER, C. W. **Alkaloids of the Menispermaceae**. *Phytochemistry*, 9, p. 157-187, 1970.

7. Cronograma Executado

		2015					2016						
Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Coleta material botânico	X	X										
3	Obtenção das Frações Alcaloídicas		X	X	X								
4	Análise das frações alcaloídicas por LC-DAD-MS			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	Ensaio de atividade inibitória da AChE										X	X	X
6	Ensaio químicos de atividade antioxidante							X	X	X	X		
7	Ensaio de atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>											X	X
8	- Elaboração do Resumo e Relatório Final - Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X