

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

GUSTAVO SILVA QUEIROZ

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FRAÇÕES
ALCALOÍDICAS DE ESPÉCIES DE *PSYCHOTRIA*
(RUBIACEAE) APLICANDO TÉCNICAS HIFENADAS DE
HPLC**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para obtenção do Título de Doutor em
Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ines Maria Costa Brighente
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

**Florianópolis
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Queiroz, Gustavo Silva

Estudo fitoquímico e biológico das frações
alcaloídicas de espécies de Psychotria (Rubiaceae)
aplicando técnicas hífenadas de HPLC / Gustavo
Silva Queiroz ; orientadora, Ines Maria Costa
Brighente; coorientador, Ricardo José Nunes - SC,
2017.

287 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

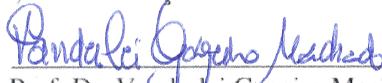
1. Química. 2. Natural Product Research. 3. high
performance liquid chromatography - HPLC. 4. Anti
inflammatory. 5. Nuclear Magnetic Resonance - NMR.
I. Costa Brighente, Ines Maria. II. Nunes, Ricardo
José. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Gustavo Silva Queiroz

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FRAÇÕES
ALCALOÍDICAS DE ESPÉCIES DE *Psychotria* (RUBIACEAE)
APLICANDO TÉCNICAS HIFENADAS DE HPLC**

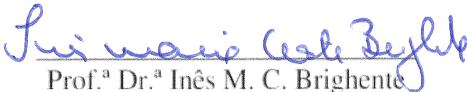
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, 17 de março de 2017.



Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Inês M. C. Brighente
(Orientadora – UFSC)



Prof.^a Dr.^a Michele Debiasi Alberton
(Relatora – FURB)



Prof. Dr. Cristian Soldi
(Examinador – UFSC)



Prof. Dr. Heros Horst
(Examinador – UFSC)



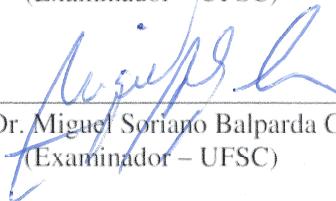
Prof. Dr. Ricardo José Nunes
(Co-orientador – UFSC)



Prof.^a Dr.^a Lucília Kato
(Examinadora – UFG)



Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
(Examinador – UFSC)



Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
(Examinador – UFSC)

DEDICATÓRIA

"O movimento proletário é o movimento autônomo da imensa maioria no interesse da imensa maioria".

Karl Marx e Friedrich Engels

Quero dedicar este trabalho à toda a classe trabalhadora mundial pela sua luta histórica por igualdade de direitos, permitindo que hoje cidadãos de várias camadas da sociedade possam ter acesso a educação pública, gratuita e de qualidade desde do nível básico ao superior.

Dedico também aos meus pais Isabel e Enedino e meus irmãos, que inculcaram em mim os valores de caráter que foram se solidificando lentamente durante a minha história de conquistas.

Também dedico este trabalho aos meus tios Áurea e Pio que contribuíram na luta dos trabalhadores na redemocratização do Brasil, arriscando suas vidas e sendo exilados por anos durante os chamados “anos de chumbo” da ditadura civil-militar que nosso país viveu, uma época em que ter opinião era crime.

Por fim, dedico este trabalho à minha esposa e companheira cujo suporte emocional e incentivo ajudaram a me manter firme no desenvolvimento deste projeto com equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à sociedade brasileira pela conquista dos direitos coletivos à classe trabalhadora brasileira. Aos servidores técnico-administrativos, servidores terceirizados, professores e estudantes da universidade pela sua histórica luta na manutenção desta universidade como pública, gratuita e de qualidade.

Aos Professores e Servidores do Departamento de Química da UFSC, aos funcionários das bibliotecas central e setoriais e aos funcionários do Restaurante Universitário.

Aos órgãos de fomento: CNPq, pela bolsa de doutorado no Brasil; à CAPES, pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE / Ciência Sem Fronteiras e Departamento de Química – CFM – UFSC, através do processo Nº BEX5319/14-5.

Ao Governo Federal na Gestão da Presidenta Dilma Rousseff, deposta por um golpe em 2016, pela criação do Programa Institucional de Bolsas “Ciência Sem Fronteiras” através do decreto Nº 7.642, de 13 de dezembro de 2011.

À minha esposa, amiga e companheira de vida Juliana Ried por todo seu incentivo, suporte emocional e apoio incondicional que aceitou o desafio de se lançar comigo para a Dinamarca para a realização do meu doutorado sanduíche.

À Professora Ines Maria Costa Brighente pela orientação durante o doutorado assim como por sua contribuição na minha formação profissional de docente e pesquisador.

Ao Professor Ricardo José Nunes pela co-orientação e ao seu grupo de pesquisa LEAT – Laboratório Estrutura e Atividade.

Ao botânico taxonomista Ademir Reis pela identificação das espécies *Psychotria suterella* e *P. stenocalyx* assim como à botânica Juliana Amaral de Oliveira pela coleta e identificação da espécie *P. rhytidocarpa*.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais – LQPN que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concretizado: Prof. Moacir, Ana Paula, Leandro, Thiago, Marcos e os egressos Henrique, Handriela, Lizandra, Luciana, Heros, Giovanna. Agradeço à Giovanna pela execução dos testes alelopáticos e inibitório da enzima acetilcolinesterase. Também sou muito grato por todos os momentos de muita descontração que tornaram nossos dias de cientistas muito mais prazerosos.

Ao Professor Antonio Gilberto Ferreira (Giba) e aos membros do seu laboratório de RMN na UFSCar: Prof. Thiago Venâncio, Sérgio Thomasi, Rodrigo Garcia e os técnicos Luciana Vizotto e Paulo Lambertuci. Obrigado a todos pelo acolhimento.

Ao Professor Dan Stærk pelo incomparável acolhimento, respeito, orientação e apoio técnico durante meu estágio em seu grupo de pesquisas na Universidade de Copenhagen. Também agradeço aos membros do *Bioanalytical Chemistry and Metabolomics research group*: Arife Önder, Bingrui Liu, Joachim Vinther, Kenneth Kongstad, Nazikussabah Zaharudin, Nils Nyberg, Sileshi Wubshet, Urška Čotar, Yousof Tahtah, Yueqiu Liu, especialmente os colegas e amigos brasileiros Rita Lemos e Eder Silva.

Ao Professor Eduardo Dalmarco e aos membros do Laboratório de Pesquisa em Imunologia – LAPI: Prof.^a Beatriz Mendes, Bruno, Marcus Vinícius, Ana Beatriz e Fábio.

À toda a equipe da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, especialmente aos amigos Ângelo e Eliane.

À equipe do Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural – CEBIME coordenado pelo Prof. Hernán Terenzi, especialmente à amiga Elis Rosa, técnica responsável, e ao Pós-doc egresso Paulo Leal.

Aos amigos e parceiros colaboradores deste projeto, Prof.^a Michele Debiasi Alberton (FURB) e Diogo Siebert (LABEC – UFSC), pela amizade e contribuição.

Às parceiras colaboradoras deste projeto, Prof^{as} Susana Johann e Beatriz Martins Borelli do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelos testes antifúngicos.

Também agradeço aos criadores e aos responsáveis pelo repositório pirata Sci-Hub, que armazena mais de 62 milhões de artigos científicos, número que só aumenta a cada dia, que são distribuídos gratuitamente por todo o globo possibilitando conhecimento sem fronteiras com livre acesso a qualquer pesquisador no planeta. Seu slogan é: *To remove all barriers in the way of science* ("Para remover todas as barreiras no caminho da ciência").

Agradeço também ao meu núcleo familiar, meu pai Enedino, minha mãe Isabel e meus irmãos Elaine, Ismar, Priscyla e Laize. Às minhas sobrinhas Janaína, Júlia e Clarinha que me ajudaram a trocar a vestimenta de cientista pela de “tio Gugu” e viver o lado cênico de mim. Também agradeço à minha família de Florianópolis, meus tios Aurea e Pio, tia Marizete, meu primo-irmão Marcos.

Também sou muito grato por todo o apoio dado pela família da minha esposa (e também minha), Waldir, Lucilene e Mariana assim como toda a família materna e paterna.

Meus grandes amigos de Florianópolis Diogo e Fernanda, Ramon e Erisson por sempre estarem presentes em minha vida. Meu grupo musical “Nós & Vozes” composto pelos meus grandes amigos Angela, Mariana, Paulo Sol, Marisa, Cristina, Karla, Caio, Gabriel, Sid, Sylvain, Jeaninne, Luciano.

Um agradecimento especial à querida amiga Angela Campos, minha grande incentivadora e conselheira para assuntos científicos e pessoais.

Aqueles que tornaram a temporada na Dinamarca mais alegre, especialmente os casais Aga e Hans e Ronaldo e Flávia e os parceiros de aventuras: Rita, Ricardo, Eder, Kamila, Adurinanda, Filip e Natasha, André, Zé Simão. Claro que não posso esquecer do meu anjo-da-guarda na Dinamarca, que foi nos receber no aeroporto sem me conhecer e se tornou uma grande amiga para a vida toda, a Maria Amélia Dias. Também agradeço a todos os membros do GEEAK, especialmente a Sônia, a Vera, a Malu e Fredi.

À todas as equipes do Laboratório de Novas Tecnologias – LANTEC do CED/UFSC, especialmente à minha ex-supervisora Sila Marisa e colegas de equipe José Oliveira, Marcos Martins e Mariana Hennemann. Foi um período de grande acúmulo de conhecimentos sobre ferramentas didáticas para serem aplicadas no ensino de química.

Por fim agradeço aos amigos que, assim como alguns já citados, estiveram presentes em muitos momentos importantes da minha vida nesta jornada: Solomon Amoah, Diogo Pereto, Simone Schmidt, Bárbara Giese e todos aqueles que eu tenha esquecido de mencionar.

Gratidão!
Thank you!
Tusind Tak!

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado é o fruto de uma jornada de grande dedicação e aprendizados. A ideia deste projeto surgiu de um desejo desafiador de desenvolver um estudo fitoquímico com plantas que apresentassem alcaloides, uma vez que eu já havia estudado esteroides e triterpenos durante meu período de iniciação científica e, durante o mestrado, estudei sobre chalconas e flavonoides.

A jornada se iniciou de um encontro com o botânico taxonomista Prof Ademir Reis que, além de sugerir as espécies *Psychotria suterella* e *P. stenocalyx*, foi a campo para identificá-las e coletá-las conosco. A espécie *P. rhytidocarpa* foi coletada, identificada e registrada pela botânica Juliana Amaral que conheci ao visitar o centro de pesquisas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Durante o período do meu doutorado tive a oportunidade de desenvolver uma parte do projeto do doutorado em parceria com o então doutorando Sérgio Scherrer Thomasi no LabRMN sob supervisão do Prof Antonio Gilberto Ferreira da UFSCar. Também tive a oportunidade desenvolver outra parte do projeto no *Department of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen*, em Copenhague – Dinamarca, com a colaboração do então Pós-Doc Sileshi Wubshet e supervisão do Prof Dan Stærk, sendo contemplado com uma bolsa do programa PDSE – CAPES por um ano. Este trabalho também contou com a colaboração de outros grupos de pesquisas da própria UFSC e de outras universidades brasileiras como FURB e UFMG, os quais foram cuidadosamente mencionados no corpo desta tese.

A apresentação escrita da tese foi estruturada de forma clássica, sendo composta por Introdução, Revisão bibliográfica, Objetivos, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas, Apêndices e Anexos.

Com o objetivo de dinamizar a leitura da discussão das elucidações estruturais, estão disponíveis na parte dos anexos, encartes coloridos contendo os esquemas de correlações bidimensionais para as estruturas dos alcaloides isolados neste trabalho.

Desejo uma ótima leitura!
Com gratidão,

Gustavo Silva Queiroz

RESUMO

Psychotria L. é o maior gênero na tribo Psychotrieae (Rubiaceae) e o terceiro maior gênero dentro das angiospermas, compreendendo cerca de 2000 espécies em todo o planeta, distribuídos em regiões tropicais. Este gênero é comumente associado à presença de alcaloides bioativos, principalmente os alcaloides monoterpênicos indólicos, MIAs. Muitas investigações biológicas e farmacológicas com foco nos MIAs de *Psychotria* já mostraram um número significativo de atividades, especialmente relacionadas ao sistema nervoso central. Os MIAs representam o maior grupo de alcaloides em plantas tendo sido identificados mais de 3000 moléculas estruturalmente diversas, muitas delas encontradas em três famílias de plantas: Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae. O objetivo deste trabalho foi avaliar algumas atividades biológicas nos extratos e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* e executar um estudo fitoquímico visando o isolamento e elucidação estrutural dos MIAs da fração rica em alcaloides, FRA, de três espécies de *Psychotria*: *P. rhytidocarpa*, *P. stenocalyx* e *P. suterella*. Os extratos brutos das folhas, EB, e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram submetidos aos ensaios antioxidantes, alelopático, antimicrobianos, anti-acetilcolinesterásico e anti-inflamatório. A espécie *P. rhytidocarpa* não foi submetida aos ensaios biológicos por ter sido incluída no final do projeto. As frações acetato de etila, FAe, e FRA de ambas as espécies apresentaram efeitos antioxidantes considerados bons. Os EBs de ambas as espécies inibiram significativamente a germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas de alface e pepino. Os EBs de *P. stenocalyx* e *P. suterella* a 1 mg.mL^{-1} inibiram em 52,6% e 51,8% e as FRAs inibiram em 54,3% e 63,6% a atividade da enzima AchE, respectivamente. Os EBs de ambas as espécies foram considerados inativos contra os fungos e bactérias testadas. Os EBs de ambas as espécies se mostraram bons inibidores do processo inflamatório nos modelos estudados. O EB de *P. stenocalyx* reduziu em 57,1% a migração de leucócitos na dose 200 mg.kg^{-1} e 30,1% na formação de exsudato apenas na dose 400 mg.kg^{-1} , uma redução significativa. O EB de *P. suterella* inibiu em 64,7% na dose 400 mg.kg^{-1} , porém não reduziu significativamente a formação de exsudato. O estudo fitoquímico foi aplicado às FRAs utilizando as técnicas hífenadas HPLC-SPE-NMR e HPLC-HRMS e os dados espectrométricos comparados com a literatura. Da espécie *P. rhytidocarpa* foram isolados quatro alcaloides conhecidos e três inéditos. Da espécie *P. suterella* foram isolados cinco alcaloides conhecidos e um inédito. As FRAs das espécies *P. stenocalyx*, *P. suterella*

e *P. rhytidocarpa* foram submetidas ao estudo fitoquímico comparativo aplicando a técnica de HPLC-HRMS. Os MIAs *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**), strictosamida (**32**), (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**), lialosídeo (**54**), e uma proposta de estrutura inédita derivada de strictosidina (**145**) foram identificados nas três espécies estudadas. Os MIAs inéditos ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (**143**) e 2'-siringil-strictosamida (**144**) foram identificados na espécie *P. rhytidocarpa*. Os MIAs pauridiantosídeo (**55**), vallesiachotamina lactona (**11**) foram identificados nas espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*. Este é o primeiro relato do alcaloide pauridiantosídeo (**55**) na espécie *P. suterella*. Este foi o primeiro estudo desenvolvido com as espécies *P. rhytidocarpa* e *P. stenocalyx*.

Palavras-chave: *Psychotria*, anti-inflamatório, antioxidantes, alelopatia, alcaloides monoterpênicos indólicos, HPLC-SPE-NMR, HPLC-HRMS

ABSTRACT

Psychotria L. is the largest genus in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae) and the third largest genus within the angiosperms, comprising about 2000 species worldwide distributed in tropical regions. This genus is commonly associated with the presence of bioactive alkaloids, especially the monoterpene indole alkaloids, MIAs. Many biological and pharmacological investigations focusing on *Psychotria* MIAs have already shown a significant number of activities, especially related to the central nervous system. MIAs represent the largest group of alkaloids in plants with more than 3000 structurally diverse molecules identified, many of them found in the families Loganiaceae, Apocynaceae and Rubiaceae. The aim of this work was to evaluate some biological activities in the extracts and fractions of the species *P. stenocalyx* and *P. suterella* and to perform a phytochemical study aiming the isolation and structural elucidation of the MIAs in the alkaloid rich fraction, ARF, of three *Psychotria* species: *P. rhytidocarpa*, *P. stenocalyx*, and *P. suterella*. The leaf extracts, LE, and fractions of *P. stenocalyx* and *P. suterella* species were submitted to antioxidant, allelopathic, antimicrobial, anti-acetylcholinesterase and anti-inflammatory assays. *P. rhytidocarpa* was not submitted to biological tests because it was included at the end of the project. The ethyl acetate fraction, EAF, and ARF of both species showed good antioxidant effects. Both LEs significantly inhibited seed germination and plant development of lettuce and cucumber. The LEs of *P. stenocalyx* and *P. suterella* at 1 mg.mL⁻¹ inhibited 52.6% and 51.8%, and the ARF inhibited 54.3% and 63.6% of the activity of the AChE enzyme, respectively. Both LEs were considered inactive against the fungi and bacteria tested. Both LEs proved to be good inhibitors of the inflammatory process in the studied models. The *P. stenocalyx* LE reduced leukocyte migration at the dose 200 mg.kg⁻¹ and 30.1% in exudate formation only at the dose 400 mg.kg⁻¹, a significant reduction. The *P. suterella* LE inhibited 64.7% at dose 400 mg.kg⁻¹, but did not significantly reduce the exudate formation. The phytochemical study was applied to ARFs using the hyphenated techniques HPLC-SPE-NMR and HPLC-HRMS and the spectrometric data were compared to the literature. Four known and three unpublished alkaloids were isolated from *P. rhytidocarpa* species. Five known and one unpublished alkaloids were isolated from *P. suterella* species. The *P. stenocalyx*, *P. suterella* and *P. rhytidocarpa* ARFs were submitted to the comparative phytochemical study applying the HPLC-HRMS technique. The MIAs *E/Z*-vallesiachotamine (**12** and **13**), strictosamide (**32**), (E)-O-(6'-)-cinnamoyl-

4-hydroxy-3,5-dimethoxy-lysoside (**53**), lyaloside (**54**), and a proposal for an unknown structure from strictosidine derivative (**145**) were identified in the three species. The unknown MIAs 2'-(3,4,5-trimethoxybenzoate-N4-methyl-stitosidinic acid (**143**) and 2'-syringyl-strytosamide (**144**) were identified in the *P. rhytidocarpa* species. The MIAs pauridiantosídeo (**55**), vallesiachotamine lactone (**11**) were identified in the species *P. stenocalyx* and *P. suterella*. This is the first study developed with the species *P. rhytidocarpa* and *P. stenocalyx*. This is the first report of the pauridiantosídeo (**55**) in the species *P. suterella*.

Keywords: *Psychotria* species, anti-inflammatory, antioxidant, allelopathy, monoterpene indole alkaloids, HPLC-SPE-NMR, HPLC-HRMS

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero <i>Psychotria</i> | 49 |
| Figura 2. Fotos das espécies vegetais <i>P. rhytidocarpa</i> , <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 63 |
| Figura 3. Exemplos de alcaloides biossintetizados à partir dos esqueletos provenientes de rearranjos do iridoide secologanina [6] | 67 |
| Figura 4. Esquema do particionamento líquido-líquido ácido-base dos extratos brutos | 79 |
| Figura 5. Formação do complexo entre Al^{3+} e um flavonoide (acima) e o deslocamento batocrômico provocado no espectro de UV/VIS | 95 |
| Figura 6. Reação entre um flavonoide e o radical livre DPPH | 96 |
| Figura 7. Gráfico de porcentagens de inibição, em relação aos controles, da germinação de sementes utilizando as sementes de alface, rabanete e pepino em função da concentração de extrato bruto das espécies <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 99 |
| Figura 8. Gráfico de porcentagens de inibição, em relação aos controles, do desenvolvimento de hipocótilo utilizando as sementes de alface, rabanete e pepino em função da concentração de extrato bruto das espécies <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 99 |
| Figura 9. Gráficos de porcentagens de inibição, em relação aos controles, do desenvolvimento de radícula utilizando as sementes de alface, rabanete e pepino em função da concentração de extrato bruto das espécies <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 100 |
| Figura 10. Sequência de reações envolvidas no método proposto por Ellman para detecção de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase por substâncias naturais | 102 |
| Figura 11. Esquema da reação do TCC (branco) produzindo o formazan (cristais vermelhos) em meio enzimático | 105 |
| Figura 12. Esquema da reação do MTT (amarelo) produzindo o formazan (cristais púrpura) em meio enzimático | 107 |
| Figura 13. Efeito do extrato bruto das folhas de <i>Psychotria stenocalyx</i> (100-400 mg.kg ⁻¹) quanto à (a) migração de leucócitos, (b) migração de | |

polimorfonucleares e (c) concentração de exudato quando administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina em camundongos..... 111

Figura 14. Efeito do extrato bruto das folhas de *Psychotria suterella* (100-400 mg.kg⁻¹) quanto à (a) migração de leucócitos, (b) migração de polimorfonucleares e (c) concentração de exudato quando administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina em camundongos..... 112

Figura 15. Esquema das etapas de (1) isolamento, *trapping*, e (2) transferência para os microtubos de NMR (imagem adaptada [107]). 114

Figura 16. Cromatograma extraído a 254 nm da separação executada na fração rica em alcaloides do extrato bruto de *P. rhytidocarpa* através da técnica hifenada HPLC-HRMS-SPE-*tt*NMR..... 116

Figura 17. Sobreposição dos espectros de NMR ¹H dos picos isolados de *P. rhytidocarpa* por HPLC-SPE. (as letras indicadas próximas aos picos referem-se às multiplicidades dos sinais, sendo d=dupletto, q=quarteto, s=simpleto e t=tripleto)..... 117

Figura 18. Esquema que mostra (a) a proximidade do H5a com a carbonila C22 e (b) o efeito de doação eletrônica do par isolado do orbital sp³ do nitrogênio N4 para o orbital molecular antiligante (LUMO – σ*) da ligação C5–H5a 119

Figura 19. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente para o sinal do hidrogênio (a) H3 e os sinais hidrogênicos sobrepostos (b) H2'/H6b e os simulados através do software FOMSC3 (pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*) 120

Figura 20. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente para os sinais de hidrogênios sobrepostos (a) H20/H6a e do sinal do (b) H15 e os simulados através do software FOMSC3 (pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*) 122

Figura 21. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente para os multipletos sobrepostos H3' e H5' e os simulados através do software FOMSC3 (pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*) 123

Figura 22. Representação, através de setas vermelhas, das correlações homonucleares H-H observadas no espectro COSY com os respectivos valores de constante de acoplamento e, através de setas azuis, das

correlações mútuas C21-H1' e C1'-H21 observadas no espectro HMBC para a aglicona da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*..... 125

Figura 23. Representação, através de setas vermelhas, das correlações homonucleares H-H observadas no espectro COSY com os respectivos valores de constante de acoplamento para o β -glicosídeo da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*..... 125

Figura 24. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*..... 128

Figura 25. Estruturas dos alcaloides monoterpene indólicos isômeros *E*-vallesiachotamina (12) e *Z*-vallesiachotamina (13), picos 6 e 7 isolados da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*..... 133

Figura 26. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente e o simulado através do software FOMSC3 para o hidrogênio H6b dos isômeros *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolados da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*..... 135

Figura 27. Comparação entre as regiões de campo baixo ampliadas dos espectros dos alcaloides isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (12 e 13), picos 6 e 7 isolados da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*, onde se encontram o quarteto atribuído ao H19 e o duplete atribuído ao H18 138

Figura 28. Sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC na região onde se encontram os sinais de açúcar do composto correspondente ao pico 2 e estrictosamida (32), pico 4 isolado da espécie *P. rhytidocarpa* 146

Figura 29. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico inédito ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa* 147

Figura 30. Comparação entre os multipletos os obtidos experimentalmente para os pares de sinais de hidrogênios sobrepostos (a) H5b/H2' e (b) H6a/H6b e os simulados através do software FOMSC3 (pico 5 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*) .. 153

Figura 31. Sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC na região onde se encontram os sinais de açúcar dos picos 5 e alcaloide 143 (a) e do pico 5 e estrictosamida (32) (b)..... 155

| | |
|---|-----|
| Figura 32. Estrutura do alcaloide monoterpeneo indólico inédito 2'-siringil-strictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 156 |
| Figura 33. Sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC na região onde se encontram os sinais de açúcar coincidentes para o composto correspondente ao pico 3 e o lialosídeo (54), pico 1 isolado da espécie <i>P. rhytidocarpa</i> | 162 |
| Figura 34. Demonstração das correlações observadas nos espectros COSY, em vermelho, HMBC, em azul, e NOESY, em laranja, para a porção da secologanina e da ligação C-glicosídica com a primeira unidade glicosídica do alcaloide correspondente ao pico 2 isolado da espécie <i>P. rhytidocarpa</i> | 164 |
| Figura 35. Proposta de estrutura para o alcaloide monoterpeneo indólico derivado da strictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 165 |
| Figura 36. Cromatograma extraído a 280 nm da separação executada na fração rica em alcaloides do extrato bruto de <i>P. suterella</i> através da técnica hifenada HPLC-SPE-NMR..... | 170 |
| Figura 37. Estrutura do alcaloide monoterpeneo indólico pauridiantosídeo (55), pico3 isolado da fração alcaloídica de <i>P. suterella</i> | 172 |
| Figura 38. Sobreposição dos espectros HSQC dos alcaloides pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da espécie <i>P. suterella</i> , e lialosídeo (54), pico 1 isolado da espécie <i>P. rhytidocarpa</i> | 173 |
| Figura 39. Comparação entre os multipletos sobrepostos H19/H15 obtidos experimentalmente para composto (55) e os simulados através do software FOMSC3 (pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>P. suterella</i>)..... | 174 |
| Figura 40. Região ampliada do espectro de NMR de ¹ H do alcaloide pauridiantosídeo (55), onde se encontram os sinais sobrepostos para os hidrogênios H20, H2', H4' e H5'. Em vermelho e azul são apresentados os multipletos simulados através do FOMSC3 para H20 e H2' e a região em cinza é atribuída aos hidrogênios H4' e H5' (pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>P. suterella</i>)..... | 175 |

| | |
|---|-----|
| Figura 41. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>P. suterella</i> | 179 |
| Figura 42. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente e os simulados através do software FOMSC3 para os hidrogênios metilênicos H6a e H6b do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da espécie <i>P. suterella</i> | 181 |
| Figura 43. Comparação entre o multipletos obtido experimentalmente e o simulado através do software FOMSC3 para o hidrogênio H3 do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da espécie <i>P. suterella</i> | 182 |
| Figura 44. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente e os simulados através do software FOMSC3 para os hidrogênios H15 e H19 do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da espécie <i>P. suterella</i> | 183 |
| Figura 45. Cromatogramas extraídos a 280 nm sobrepostos para as espécies <i>P. rhytidocarpa</i> , <i>P. suterella</i> e <i>P. stenocalyx</i> . Acima dos picos encontram-se os números dos respectivos alcaloides isolados ou identificados neste trabalho | 188 |
| Figura 46. Espectro de massas MS/MS executado para a massa selecionada em m/z 733,3, referente ao alcaloide (<i>E</i>)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (53) | 189 |
| Figura 47. Esquema da biossíntese da strictosidina, o precursor do esqueleto tipo corinanto, e dos subtipos vincosan, vincosan lactama e vallesiachotaman | 191 |
| Figura 48. Biossíntese dos alcaloides strictosamida e vallesiachotamina a partir da reação da triptamina e secologanina tendo como intermediário a strictosidina (17)..... | 192 |
| Figura 49. Sequência de reações ocorrentes no grupo β -butenaldeído da enamina proposta para a biossíntese do alcaloide vallesiachotamina lactona (11)..... | 192 |
| Figura 50. Biogênese proposta para os alcaloides isolados e/ou identificados nas espécies de <i>Psychotria</i> estudadas | 193 |

INDICE DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Compostos isolados ou identificados em espécies do gênero <i>Psychotria</i> | 44 |
| Tabela 2. Breve classificação botânica das espécies <i>P. rhytidocarpa</i> , <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 62 |
| Tabela 3. Estrutura dos principais alcaloides e seus respectivos aminoácidos precursores | 65 |
| Tabela 4. Rendimentos do extrato e das frações obtidas do particionamento líquido-líquido | 91 |
| Tabela 5. Atividades antioxidantes e conteúdos de fenólicos e flavonoides de <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 93 |
| Tabela 6. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos extratos brutos de <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 103 |
| Tabela 7. Valores de CIM para extratos e frações das folhas de <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> contra três bactérias | 105 |
| Tabela 8. Porcentagens de inibição dos extratos brutos de <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> contra leveduras patogênicas..... | 107 |
| Tabela 9. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR da strictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 126 |
| Tabela 10. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 131 |
| Tabela 11. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 139 |
| Tabela 12. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 141 |
| Tabela 13. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 148 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 14. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do 2'-siringil-strictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 157 |
| Tabela 15. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide inédito derivado da strictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>P. rhytidocarpa</i> | 166 |
| Tabela 16. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>P. suterella</i> | 177 |
| Tabela 17. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>P. suterella</i> | 185 |
| Tabela 18. Relação dos compostos identificados através do estudo comparativo utilizando a técnica HPLC-HRMS para cada uma das três espécies de <i>Psychotria</i> | 190 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA** – ácido ascórbico
AchE – enzima acetilcolinesterase
AcOEt – acetato de etila
AcOH – ácido acético
AG – ácido gálico
ANOVA – *Analysis of variance* (análise de variância)
APCI – *atmospheric-pressure chemical ionization* (ionização química à pressão atmosférica)
ATCC – *American type culture collection*
CapNMR – *Capillary NMR* (NMR capilar)
CCD – cromatografia em camada delgada
CE₅₀ – concentração efetiva 50% (DPPH)
Cg – carragenina
CIM – concentração inibitória mínima
CI₅₀ – concentração inibitória 50%
CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*
COSY – *correlation spectroscopy* (espectroscopia de correlação – homonuclear de ¹H NMR)
δ_H – deslocamento químico de hidrogênio (em espectro de NMR)
δ_C – deslocamento químico de carbono (em espectro de NMR)
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EB – extrato bruto
ERO – espécies reativas de oxigênio
EPM – erro padrão da média
ESI – *electrospray ionization* (ionização por electrospray)
FAe – fração acetato de etila
FH – fração hexano
FRA – fração rica em alcaloides
HMBC – *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy* (espectroscopia de correlação heteronuclear por múltiplas ligações)
HPLC – *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
HRMS – *high resolution mass spectroscopy* (espectroscopia de massas de alta resolução)
HSQC – *heteronuclear single quantum correlation* (correlação heteronuclear com operação de single quantum)
i.p. – intraperitoneal

IPP – *isopentenyl diphosphate* (difosfato de isopentenila)
i.pl. – intrapleural
J – constante de acoplamento (em espectros de NMR)
MeCN – acetonitrila
MeOH – metanol
MeOD – metanol deuterado
MEP – *methylerythritol phosphate* (fosfato de metil-eritritol)
MIA – *monoterpene indole alkaloid* (alcaloides monoterpêno indólicos)
MS – *mass spectroscopy/spectra* (espectroscopia/espectro de massas)
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difeniltetrazólio
MVA – *mevalonic acid* (ácido mevalônico)
NMR ¹³C – *nuclear magnetic resonance ¹³C* (ressonância magnética nuclear de carbono treze)
NMR ¹H – *nuclear magnetic resonance ¹H* (ressonância magnética nuclear de hidrogênio)
NOESY – *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (espectroscopia de efeito Overhauser)
ppm – partes por milhão
RPMI – 1640 *Roswell Park Memorial Institute culture medium*
SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SPE – *solid phase extraction* (extração em fase sólida)
TTC – cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
TOF – *time of light* (tempo de voo – analisador de massas)
ttNMR – *tube transfer NMR* (transferidor de tubo de NMR)
UFC – unidades formadoras de colônia
UFLC – *ultra fast liquid chromatograph* (cromatografia líquida ultra-rápida)
UV – ultravioleta
UV/VIS – ultravioleta visível

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 37 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 41 |
| 2.1. Aspectos gerais da Família Rubiaceae | 41 |
| 2.2. Gênero <i>Psychotria</i> | 41 |
| 2.3. Aspectos gerais das espécies <i>Psychotria rhytidocarpa</i> , <i>Psychotria stenocalyx</i> e <i>Psychotria suterella</i> | 62 |
| 2.4. Classificação e aspectos gerais da biossíntese dos alcaloides | 64 |
| 2.4.1. <i>Biossíntese de alcaloides monoterpênicos indólicos.</i> | 66 |
| 2.5. Hifenação de técnicas de HPLC no estudo de produtos naturais | 68 |
| 2.6. Justificativa do trabalho..... | 71 |
| 3. OBJETIVOS..... | 73 |
| 3.1. Objetivos específicos..... | 73 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 75 |
| 4.1. Materiais, Solventes e Reagentes | 75 |
| 4.2. Equipamentos | 75 |
| 4.3. Material vegetal | 78 |
| 4.4. Obtenção e particionamento do extrato bruto hidroalcoólico | 78 |
| 4.5. Ensaio de bancada e avaliação das atividades biológicas | 79 |
| 4.5.1. <i>Determinação do conteúdo de fenólicos totais</i> | 80 |
| 4.5.2. <i>Determinação do conteúdo de flavonoides</i> | 80 |
| 4.5.3. <i>Determinação do poder redutor</i> | 81 |
| 4.5.4. <i>Determinação da ação sequestradora de radicais livres</i> | 81 |
| 4.5.5. <i>Teste de alelopatia</i> | 82 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.6. Teste de inibição da enzima Acetilcolinesterase ... | 83 |
| 4.5.7. Atividade antibacteriana..... | 84 |
| 4.5.8. Atividade antifúngica..... | 85 |
| 4.5.9. Atividade anti-inflamatória: método da pleurisia induzida pela carragenina..... | 87 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 91 |
| 5.1. Ensaios biológicos aplicados aos extratos brutos e frações de <i>P. stenocalyx</i> e <i>P. suterella</i> | 92 |
| 5.1.1. Conteúdos de fenólicos e flavonoides e atividades antioxidantes | 92 |
| 5.1.2. Atividade Alelopática..... | 98 |
| 5.1.3. Atividade inibitória da enzima Acetilcolinesterase..... | 101 |
| 5.1.4. Atividade antimicrobiana | 104 |
| Atividade inibitória do crescimento bacteriano | 104 |
| Atividade inibitória do crescimento fúngico | 106 |
| 5.1.5. Atividade anti-inflamatória..... | 108 |
| 5.2. Estudo fitoquímico das frações alcalóidicas utilizando técnicas hifenadas com HPLC..... | 114 |
| 5.2.1. Isolamento e elucidação estrutural dos alcaloides da fração alcaloídica da espécie <i>Psychotria rhytidocarpa</i> através de HPLC-HRMS-SPE-ttNMR | 115 |
| Elucidação estrutural do pico 4..... | 118 |
| Elucidação estrutural do pico 1..... | 128 |
| Elucidação estrutural dos picos 6 e 7..... | 133 |
| Elucidação estrutural do pico 2..... | 143 |
| Elucidação estrutural do pico 5..... | 151 |
| Elucidação estrutural do pico 3..... | 160 |
| 5.2.2. Isolamento e elucidação estrutural dos alcaloides da fração alcaloídica da espécie <i>Psychotria suterella</i> através de HPLC-SPE-NMR | 169 |
| Elucidação estrutural do pico 3..... | 171 |
| Elucidação estrutural do pico 4..... | 179 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.3. Estudo fitoquímico comparativo entre as frações alcaloídicas das espécies <i>P. rhytidocarpa</i> , <i>P. suterella</i> e <i>P. stenocalyx</i> através de HPLC-ESI-TOF-MS..... | 187 |
| 5.3. Discussão da biogênese dos alcaloides monoterpênicos indólicos identificados nas espécies de <i>Psychotria</i> estudadas | 190 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 195 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 199 |
| 8. APÊNDICES | 215 |
| APÊNDICE 1. Espectros de massas de alta resolução obtidos em equipamento ESI-HRMS e extraídos do cromatograma de íons totais da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 216 |
| APÊNDICE 2. Espectros de ultravioleta obtidos em equipamento HPLC-DAD Agilent e extraídos do cromatograma da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 217 |
| APÊNDICE 3. Espectro de NMR de ¹³ C da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 218 |
| APÊNDICE 4. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 219 |
| APÊNDICE 5. Espectro de NMR de ¹ H da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 220 |
| APÊNDICE 6. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 221 |
| APÊNDICE 7. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 222 |
| APÊNDICE 8. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 223 |

| | |
|--|-----|
| APÊNDICE 9. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 224 |
| APÊNDICE 10. Espectro de NMR de ¹ H do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 225 |
| APÊNDICE 11. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 226 |
| APÊNDICE 12. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 227 |
| APÊNDICE 13. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 228 |
| APÊNDICE 14. Espectros de NMR de ¹ H da <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 6 isolados da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 229 |
| APÊNDICE 15. Espectros de NMR de ¹ H da <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 7 isolados da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 230 |
| APÊNDICE 16. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 231 |
| APÊNDICE 17. Espectros de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 232 |
| APÊNDICE 18. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY da <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 233 |
| APÊNDICE 19. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY da <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 234 |
| APÊNDICE 20. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 235 |

| | |
|--|-----|
| APÊNDICE 21. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 236 |
| APÊNDICE 22. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC da <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 237 |
| APÊNDICE 23. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC da <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 238 |
| APÊNDICE 24. Espectro de NMR de ¹ H do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 239 |
| APÊNDICE 25. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 240 |
| APÊNDICE 26. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 241 |
| APÊNDICE 27. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 242 |
| APÊNDICE 28. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 243 |
| APÊNDICE 29. Espectro de NMR de ¹ H do 2'-siringil-strictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 244 |
| APÊNDICE 30. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do 2'-siringil-strictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 245 |

| | |
|--|-----|
| APÊNDICE 31. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 246 |
| APÊNDICE 32. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 247 |
| APÊNDICE 33. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 248 |
| APÊNDICE 34. Espectro de NMR de ¹ H do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 249 |
| APÊNDICE 35. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 250 |
| APÊNDICE 36. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 251 |
| APÊNDICE 37. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 252 |
| APÊNDICE 38. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria rhytidocarpa</i> | 253 |
| APÊNDICE 39. Espectros de massas de alta resolução obtidos em equipamento ESI-HRMS e extraídos do cromatograma de íons totais da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 254 |
| APÊNDICE 40. Espectros de ultravioleta obtidos em equipamento HPLC-DAD Agilent e extraídos do cromatograma da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 255 |
| APÊNDICE 41. Espectros de massas obtidos em equipamento LC-MS/MS da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 256 |

| | |
|---|-----|
| APÊNDICE 42. Espectro Espectro de NMR de ^1H do derivado de strictosidina (145), pico 1 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 257 |
| APÊNDICE 43. Espectro de NMR de ^1H da strictosamida (32), pico 2 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> . | 258 |
| APÊNDICE 44. Espectro de NMR de ^1H da <i>E</i> -vallesiachotamina (12), pico 5 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 259 |
| APÊNDICE 45. Espectro de NMR de ^1H da <i>Z</i> -vallesiachotamina (13), pico 6 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 260 |
| APÊNDICE 46. Espectro de NMR de ^1H do pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 261 |
| APÊNDICE 47. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 262 |
| APÊNDICE 48. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 263 |
| APÊNDICE 49. Espectros de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 264 |
| APÊNDICE 50. Espectro de NMR de ^1H da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 265 |
| APÊNDICE 51. Espectros de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 266 |
| APÊNDICE 52. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 267 |
| APÊNDICE 53. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de <i>Psychotria suterella</i> | 268 |

9. ANEXOS269

ANEXO 1. Comparação entre os dados de NMR de ¹³C para os alcaloides strictosamida (32), lialosídeo (54), *E/Z*-vallesiachotamina (12 e 13), pauridiantosídeo (55) e vallesiachotamina lactona (11) com os dados disponíveis na literatura270

ANEXO 2. Comparação entre os dados de NMR de ¹H para os alcaloides strictosamida (32) e lialosídeo (54) com os dados disponíveis na literatura.....272

ANEXO 3. Comparação entre os dados de NMR de ¹H para os alcaloides *E*-vallesiachotamina (12) e *Z*-vallesiachotamina (13) com os dados disponíveis na literatura274

ANEXO 4. Comparação entre os dados de NMR de ¹H para os alcaloides pauridiantosídeo (55) e vallesiachotamina lactona (11) com os dados disponíveis na literatura276

ANEXO 5. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide strictosamida (32), pico 4 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*278

ANEXO 6. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide (54), pico 1 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*.....279

ANEXO 7. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*280

ANEXO 8. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide *Z*-vallesiachotamina (13), pico 7 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*281

ANEXO 9. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoateo-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*.....282

ANEXO 10. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide 2'-siringil-strictosamida (144), pico 5 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*283

ANEXO 11. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide derivado de strictosidina (145), pico 3 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*284

ANEXO 12. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide pauridiantoside (55), pico 3 isolado de *Psychotria suterella*.....285

| | |
|---|-----|
| ANEXO 13. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado de <i>Psychotria suterella</i> | 286 |
| ANEXO 14. Artigo intitulado “Phytochemical study and anti-inflammatory effect of <i>Psychotria stenocalyx</i> (Rubiaceae)” aceito para publicação no periódico <i>Journal of Applied Pharmaceutical Science</i> | 287 |

1. INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais pela humanidade se confunde com a história da sua própria existência. O ser humano, como parte da natureza, sempre obteve dela tudo o que teve necessidade, desde o seu sustento, artefatos de caça, matéria prima para construção de abrigos, etc. As plantas também tinham um papel importante dentre os recursos disponíveis. Os povos primitivos já as utilizavam para os mais variados fins como nutricionais, medicinais, tóxicos e também como corantes em seus rituais. O vasto conhecimento acumulado por estes povos acerca das propriedades terapêuticas das plantas foi de fundamental importância para que os cientistas, dentre eles os químicos, pudessem investigar a qual ou quais substâncias tais propriedades poderiam ser atribuídas.

As plantas, através do seu metabolismo secundário, produzem uma variedade imensa de substâncias que desempenham diferentes papéis como defesa contra predadores, moduladores hormonais, para atrair polinizadores ou mesmo como corantes fenotípicos. Muitas destas substâncias podem ser reconhecidas por outros organismos apresentando alguma propriedade biológica ou farmacológica, podendo ser benéfica ou tóxica.

A maioria das plantas utilizadas na terapêutica moderna é proveniente dos costumes de povos primitivos, como os indígenas, que se valiam das propriedades das plantas para cuidar de seus doentes, para caça ao utilizarem algumas plantas com toxinas em flechas e dardos e em rituais como os que utilizam chás de plantas alucinógenas, nos quais os indígenas acreditavam ter contato com os seus antepassados. Dentre estas plantas, muitas apresentam alcaloides como responsáveis pelas atividades biológicas [1].

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais e é ainda hoje a principal motivação para o seu estudo [2]. Entre os produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, encontra-se uma ampla e diversificada arquitetura molecular, como é o caso de alguns alcaloides, em especial os alcaloides terpênicos, formados apenas por átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio com diversos centros estereogênicos [3], e que apresentam atividades biológicas diversas dependendo de sua estrutura.

Os produtos naturais contribuem com uma parcela significativa como fonte de novos fármacos sendo que, dos compostos licenciados pela FDA como fármacos entre 1981 e 2014, 4% são produtos naturais, 21% são provenientes de semi-síntese utilizando produtos naturais, 4% são

produtos sintéticos baseados em um farmacóforo natural e os 48% restantes se referem a substâncias baseadas em farmacóforo não-natural, mimetizados principalmente através de química computacional. Apesar disso, os compostos puramente sintéticos são responsáveis por 30% dos compostos que são disponibilizados para tratamento de doenças [4].

Alcaloides, de maneira geral, podem ser definidos como sendo compostos heterocíclicos nitrogenados de baixa massa molecular, biossintetizados a partir de aminoácidos, podendo conter um ou mais átomos de nitrogênio em sua estrutura na forma de aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que normalmente confere um caráter básico (salvo algumas exceções como a colchicina, piperina, oximas e alguns sais quaternários como cloridrato de laurifolina), geralmente apresentam atividades no sistema nervoso central e que ocorrem principalmente em plantas superiores das quais pelo menos 25% contém alcaloides, mas também podem ocorrer em vegetais marinhos e micro-organismos como bactérias e fungos e em alguns animais. A palavra alcaloide foi utilizada pela primeira vez em 1819 pelo farmacêutico W. Meissner para designar substâncias com caráter levemente básico (*like alkali*) [1, 5, 6].

Nas plantas, os alcaloides podem atuar como hormônios reguladores de crescimento, auxiliar no equilíbrio iônico devido ao seu caráter alcalino, na defesa contra invasão de micro-organismos e vírus, também podem atuar como protetores de radiação ultravioleta e oxidação devido ao fato de que muitos alcaloides são aromáticos com atividade antioxidante e absorvem a radiação ultravioleta. Além disso, muitas plantas que produzem alcaloides são evitadas na dieta de animais e insetos devido à sua toxicidade e/ou ao gosto amargo [1].

Os alcaloides apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, atribuídas em parte à grande variedade estrutural devido à presença de diferentes grupos funcionais que podem aumentar sua interação em sítios ativos de enzimas, como enzimas receptoras de neurotransmissores. Na maioria dos alcaloides, as funções amina conferem propriedades básicas que facilitam sua absorção e transporte nos organismos após protonação em pH fisiológico. A basicidade dos alcaloides varia de acordo com a estrutura e a posição de grupos funcionais. Estas propriedades básicas conferidas à maioria dos alcaloides também são úteis para o seu isolamento e purificação, uma vez que seus ácidos conjugados tornam-se solúveis em soluções aquosas de ácidos minerais [6].

Atualmente, existem vários alcaloides utilizados como medicamentos na terapêutica convencional dos quais se pode destacar o Atropion[®], cuja substância ativa é a atropina, um alcaloide tropânico que

foi inicialmente isolado de *Atropa belladonna* (beladona) e é utilizado como agente que combate arritmias, alivia a dor, diminui o fluxo salivar e a secreção excessiva do trato respiratório. O medicamento Buscopan®, cuja substância ativa é o alcaloide tropânico escopolamina, obtido a partir de plantas da família Solanaceae, é utilizado tratamento dos sintomas de cólicas gastrintestinais (estômago e intestinos), cólicas e movimentos involuntários anormais das vias biliares e cólicas dos órgãos sexuais e urinários, além de ser usado em procedimentos como endoscopia, pois reduz as contrações involuntárias dos órgãos e músculos. Outro medicamento usado é o Higroton Reserpina®, cuja substância ativa é a reserpina, um alcaloide indólico presente na espécie *Rauwolfia serpentina* e que foi o primeiro fármaco a atuar no sistema nervoso simpático dos humanos.

Os alcaloides podem ser divididos em diferentes grupos e subgrupos de acordo com os aminoácidos precursores e suas rotas biossintéticas. Os alcaloides monoterpene indólicos, maior subgrupo dentro dos alcaloides indólicos, representam um dos maiores grupos de alcaloides encontrados em plantas tendo sido reportados mais de 3000 compostos. A família Rubiaceae está entre as três famílias de plantas mais recomendadas como melhores fontes desta subclasse de alcaloides [6].

O gênero *Psychotria*, o maior gênero de plantas da família Rubiaceae, despertou interesse da comunidade científica devido à atividade apresentada no sistema nervoso central pela sua principal representante, a espécie *P. viridis*, que é utilizada como componente no chá de “Santo D’Aime” no ritual “Ayahuasca”. A atividade desta planta foi atribuída à presença do alcaloide indólico N,N-dimetil-triptamina. Dentre outras espécies deste gênero, uma espécie que merece destaque é a *P. ipecacuanha*, nome popular ipeca, cujas raízes são utilizadas na formulação de xaropes expectorantes. Esta espécie também é muito utilizada pelos povos indígenas brasileiros e que tem uma série de aplicações na terapêutica convencional como no tratamento de disenteria, amebíase, bronquite, tosse aguda e coqueluche, além de ser uma planta emética.

Como é possível observar, plantas contendo alcaloides, em especial os alcaloides indólicos, apresentam diferentes aplicações na medicina tradicional e na terapêutica convencional moderna. Além disso, existe uma demanda grande de substâncias com boa atividade e baixa toxicidade para serem investigadas em mais estudos farmacológicos. Neste sentido, este trabalho se propõe a estudar três espécies de *Psychotria*, gênero pertencente à família de plantas Rubiaceae e que é

reconhecido pelos alcaloides que apresenta, avaliar algumas de suas atividades biológicas e descobrir novos alcaloides.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da Família Rubiaceae

A família Rubiaceae, constituída por árvores de grande, médio e pequeno porte, arbustos, subarbustos e ervas anuais ou perenes, distribuídas em regiões tropicais dos dois hemisférios, é composta por aproximadamente 650 gêneros e 13000 espécies, sendo a quarta maior família de plantas presentes no Brasil, ficando atrás apenas das famílias Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae [7].

O representante mais conhecido desta família é o café (*Coffea arabica*) que é usado para preparar a bebida mais consumida no mundo. Outras espécies economicamente importantes são as do gênero *Cinchona*, que produzem a quinina (1) [8], utilizada no tratamento da malária e a *Psychotria ipecacuanha* (ipeca), que tem suas raízes amplamente exploradas pela indústria farmacêutica para produção de xaropes expectorantes e vermífugos, devido à presença dos alcaloides cefaelina (2) e emetina (3) [9].

Mais de 10 % das espécies vegetais desta família são consideradas nativas e estão presentes em todas as regiões do Brasil, sendo representadas por 124 gêneros e quase 1400 espécies distribuídas entre vegetações da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal [10].

Apesar dos alcaloides serem os metabólitos secundários mais representativos da família Rubiaceae, também há alguns relatos científicos da presença de outros metabólitos como esteroides, flavonoides, iridoides, saponinas, taninos e triterpenos [11-15]. Neste projeto foram estudadas três espécies da família Rubiaceae pertencentes ao gênero *Psychotria*.

2.2. Gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria* foi descrito por Linneaus em 1759, através da avaliação botânica da espécie *Psychotria asiatica* [16]. *Psychotria* é um gênero, morfologicamente, bastante complexo e abrange quase 2000 espécies de árvores e arbustos [17], amplamente distribuídos no estrato arbustivo das matas tropicais [18]. Com esta quantidade de espécies, o gênero é considerado o maior dentro da família Rubiaceae e o terceiro maior gênero de plantas no mundo, atrás apenas dos gêneros *Astragalus* L. (Leguminosae) com cerca de 3200 espécies e *Bulbophyllum Thouars* (Orchidaceae) com cerca de 2000 espécies [19, 20].

No estado de Santa Catarina o gênero *Psychotria* é representado pelas espécies *P. carthagenensis*, *P. fractistipula*, *P. hoffmannseggiana*, *P. laciniata*, *P. leiocarpa*, *P. longipes*, *P. myriantha*, *P. nemorosa*, *P. nuda*, *P. stachyoides*, *P. stenocalyx*, *P. suterella* e *P. vellosiana* [21].

O gênero *Psychotria* possui inúmeras atividades farmacológicas descritas na literatura, dentre as quais se destaca a atividade sobre o sistema nervoso central [22, 23]. O interesse etnobotânico atribuído a este gênero está no conteúdo de N,N-dimetiltriptamina (4) apresentado por *P. viridis*, utilizada no preparo do chá alucinógeno “Santo D’Aime” no ritual “Ayahuasca”, juntamente com os extratos de *Psychotria carthagenensis* e *Banisteriopsis caapi* [24].

Nos últimos 12 anos de estudos com espécies vegetais deste gênero, foram relatadas as atividades antioxidante [25-29], emética [30], antibacteriana [31-33], antiparasitária [34-37], antitumoral [25, 34, 35, 38], anti-inflamatória [28, 39], ansiolítica e antidepressiva [40, 41], anti-epilética [42]. Também foram encontrados estudos contra problemas cardíacos, tosse, asma e bronquite [43]. Foram avaliadas quando à proteção contra toxicidade intracelular amiloide e contra diferenciação induzida [44].

Simões-Pires e colaboradores (2006) [39] reportaram que o extrato alcaloídico das folhas de *Psychotria myriantha* demonstrou atividade inibitória sobre a quimiotaxia de polimorfonucleares através da técnica da câmara de Boyden. Esta atividade foi atribuída aos alcaloides monoterpeno indólicos ácido strictosidínico (5) e myriantosina A (6), os quais foram isolados e avaliados através da mesma técnica e também apresentaram atividade.

Nascimento e colaboradores (2007) [25] desenvolveram um estudo com o extrato bruto das folhas de *Psychotria brachyceras* assim como o alcaloide monoterpeno indólico brachicerina (7), presente neste extrato, e demonstraram que ambos apresentam atividade antioxidante em radicais hidroxila usando o teste de hipoxantina / xantina oxidase e antimutagênica avaliados utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Gregianini e colaboradores (2003) [26] demonstraram que o alcaloide brachicerina (7) apresenta atividade sequestradora de oxigênio singlete e que sua produção é estimulada nas folhas de *Psychotria brachyceras* sob incidência de radiação UV. Estes autores também mencionaram que o alcaloide brachicerina (7) mostrou atividade anti-inflamatória específica em testes de migração de leucócitos em ratos por meio de um ensaio de quimiotaxia (F. Farias & A. T. Henriques, dados não publicados).

Matsuura e colaboradores (2013) [27] reportaram atividade antioxidantes *in vitro* contra o oxigênio singlete, ânions superóxido e o

radical hidroxila do N- β -D-glicopiranosil vincosamida (**8**), alcaloide monoterpene indólico majoritário presente nas folhas da espécie *Psychotria leiocarpa* com rendimento de até 2,5 % da massa de folhas secas.

Moraes e colaboradores (2011) [32] desenvolveram estudos com os extratos brutos foliares de dez espécies do gênero *Psychotria*, dos quais foi aplicado ensaio de inibição de *Mycobacterium tuberculosis*, foi avaliada a redução na produção de óxido nítrico, NO, em macrófagos no processo inflamatório e se estas espécies apresentam atividade sequestrante de radicais livres. As espécies *P. pubigera*, *P. ruelliifolia* e *P. stachyoides* foram as mais ativas contra *Mycobacterium tuberculosis*. As espécies *P. suterella*, *P. stachyoides* e *P. capitata* foram as mais eficientes em inibir a produção de óxido nítrico, porém não foram consideradas espécies antioxidantes, pois não foram eficazes no teste que avalia a atividade sequestrante de radicais livres. Além disso, foi observado que as dez espécies estudadas apresentavam alcaloides do tipo 5,6-dihidro- β -carbolina e alcaloides do tipo monoterpene indólicos nas espécies *P. suterella* e *P. nuda*.

Passos e colaboradores (2013) [45] desenvolveram um estudo envolvendo treze alcaloides indólicos, isolados de diferentes espécies de *Psychotria* estudadas em seu grupo de pesquisas. Neste estudo foram avaliadas a capacidade destes alcaloides em inibir a atividade das enzimas monoamino oxidase A e B (MAO-A e B), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), que são enzimas relacionadas a doenças neurodegenerativas. O estudo concluiu que os alcaloides β -carbolíneos quaternários prunifoleína (**9**) e 14-oxo-prunifoleína (**10**), presentes na espécie *P. prunifolia*, inibiram as enzimas AChE, BChE e MAO-A. Os alcaloides monoterpene indólicos vallesiachotamina lactona (**11**), E-vallesiachotamina (**12**) e Z-vallesiachotamina (**13**), todos já identificados nas espécies *P. laciniata* e *P. suterella* [46], inibiram as enzimas BChE e MAO-A.

Os alcaloides são considerados os principais metabólitos secundários encontrados em espécies do gênero *Psychotria*, sendo reportados na grande maioria das espécies mencionadas na presente revisão. Em 2014, Klein-Júnior e colaboradores publicaram uma revisão sobre o gênero *Psychotria* reunindo dados de 1974 a 2013. Foi observado que 60 % dos metabólitos identificados em diferentes espécies de *Psychotria* é formado de alcaloides [47]. Esta revisão deu conta de que os alcaloides indólicos representam uma parcela bastante significativa com 87 % de todos os alcaloides identificados.

Dos alcaloides isolados ou identificados em espécies deste gênero nos últimos 12 anos, mais da metade são do tipo monoterpene indólicos, como por exemplo os compostos **5** a **18** [37, 48-53], em segundo lugar estão os alcaloides do tipo pirrolidinoindol, como por exemplo os compostos **19** a **22** [33, 54], ambos os tipos pertencentes ao grupo dos alcaloides indólicos. Em terceiro lugar, em quantidade, foram identificados os alcaloides do tipo tetrahydroisoquinolina, como por exemplo os compostos **2**, **3** e **23** a **26** [36, 55, 56].

Além dos alcaloides também foi reportada a presença de flavonoides, esteroides, triterpenos, iridoides e alguns compostos fenólicos. A Tabela 1 relaciona os compostos isolados ou identificados nas diferentes espécies do gênero *Psychotria* nos últimos 12 anos e a Figura 1 mostra as respectivas estruturas químicas.

Tabela 1. Compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria*

| Espécie | Substância isolada ou identificada | Ref. |
|----------------------|---|-------------|
| <i>P. acuminata</i> | 5 α -carboxistrictosidina (14), ácido estrictosidínico (5), bahienosida A (15), desoxicordifolina (16), estrictosidina (17), <i>E</i> -vallesiachotamina (12), lagambosida (18), palicosida (27) | [57] |
| <i>P. alliance</i> | alstrostina A (28), rudgeifolina (29) | [58] |
| <i>P. bahiensis</i> | angustina (30), bahienosida A (15), bahienosida B (31), <i>E</i> -vallesiachotamina (12), estrictosamida (32), 5 α -carboxistrictosidina (14), Z-vallesiachotamina (13) | [59] |
| <i>P. barbiflora</i> | ácido estrictosidínico (5), harmano (33) | [51] |
| <i>P. borucana</i> | 6-O-metil-ipecosida (34), 6-O-metil- <i>trans</i> -cefaelosida (35), borucosida (36), cefaelina (2), emetina (3), ipecosida (37) | [60] |

Tabela 1. Compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

| | | |
|-----------------------|---|-------------|
| <i>P. brachyceras</i> | brachicerina (7) | [26, 61-64] |
| <i>P. calocarpa</i> | psychotriasina (19) | [54] |
| <i>P. camponutans</i> | 1-hidroxi-benzoisocromanquinona (38) | [31] |
| <i>P. crocea</i> | 3,4-diidro-1-(1-β- <i>D</i> -glicopiranosiloxi-1,4α,5,7α-tetrahidro-4-metoxi-carbonil-ciclopenta[c]piran-7-il)-β-carbolina N ₂ -óxido (39), croceaína A (40), psychollatina (41) | [65] |
| <i>P. emetica</i> | 6α-hidroxigeniposide (42), ácido deacetil-asperulosídico (43), asperuloside (44), ácido asperulosídico (45) | [66] |
| <i>P. gitingensis</i> | vomifoliol (46) | [67] |
| <i>P. hainanensis</i> | canferol 3-O-α- <i>L</i> -rhamnopiranosil-(1→6)-β- <i>D</i> -glicopiranosídeo (47), canferol 7-O-β- <i>D</i> -glicopiranosídeo (48), daucosterol (β-sitosterol 3-O-β- <i>D</i> -glicopiranosídeo) (49), quercetina (50), rutina (quercetina 3-O-α- <i>L</i> -rhamnopiranosil-(1→6)-β- <i>D</i> -glicopiranosídeo) (51), β-sitosterol (52) | [68] |
| <i>P. henryi</i> | alcaloide polindólico 01 e 02 (20 e 21), psychotriasina (19) | [69, 70] |
| <i>P. ipecacuanha</i> | cefaelina (2), emetina (3) | [55, 56] |
| <i>P. klugii</i> | 7'-O-demetil-isocefaelina (23), 7'-O-metil-ipecosídeo (24), cefaelina (2), isocefaelina (25), klugina (26) | [36] |

Tabela 1. Compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

| | | |
|------------------------|---|------------------|
| <i>P. laciniata</i> | <i>E</i> - <i>O</i> -(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (53), angustina (30), <i>E</i> -vallesiachotamina (12), lialosídeo (54), pauridiantosídeo (55), estrictosamida (32), vallesiachotamina lactona (11), <i>Z</i> -vallesiachotamina (13) | [45, 46] |
| <i>P. leiocarpa</i> | N- β - <i>D</i> -glicopiranosil vincosamida (8) | [27, 52] |
| <i>P. myriantha</i> | ácido estrictosidínico (5), myriantosina A (6), myriantosina B (56) | [39, 40, 50, 71] |
| <i>P. nilgiriensis</i> | 2-hidroxi-N,2-dimetiloctanamida (57), (<i>Z</i>)-2-metilhex-4-en-3-il N-fenilcarbamato (58), 3,4-epoxi-7-octen-2-ona (59), nakijiquinona B (60) | [28] |
| <i>P. nuda</i> | estrictosamida (32) | [72] |
| <i>P. pilífera</i> | (-)-eburnamenina (61), 10-hidroxiacuamidina (62), 16,17,19,20-tetrahydro-2,16-dehidro-18-deoxi-isoestriquinina (63), 9-(β - <i>D</i> -glicopranosiloxi)tetrahydro-alstonina (64), alcaloide 376 (65), calicantina (66), deoxivincamina (67), dímero N-metil-triptamina (68), estemadenina-N(4)-óxido (69), estrictosamida (32), isocalicantina (70), N-metil-carbazol (71), N-metil-tetrahydrocarbolina (72), psychotripina (73), quadrigemina I (74), vincanol (75) | [53, 73] |
| <i>P. prunifolia</i> | 10-hidroxi-antirina (76), 10-hidroxi-isodepeanol (77), 14-oxo-prunifoleína (10), estrictosamida (32), prunifoleína (9) | [37, 45, 74] |

Tabela 1. Compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

| | | |
|-----------------------|--|--------------|
| <i>P. reevesii</i> | 1-Octacoseno (78), asperglaucideo (79), estigmasterol (80), β -sitosterol (52) | [75] |
| <i>P. rostrata</i> | psychopentamina (22), psychotrimina (81) | [33] |
| <i>P. rubra</i> | luteolina-7-O-rutinosídeo (82), 6-hidroxi-luteolina-7-O-rutinosídeo (83), 6 α -hidroxigeniposide (42), psyrubrina A (84) | [76] |
| <i>P. spectabilis</i> | cumarina (85), deoxi-solidagenona (86), psoraleno (87), quercetina (50), quercitrina (quercetina 3-O- α -L-rhamnopiranosídeo) (88), solidagenona (89), umbelliferona (90) | [77] |
| <i>P. stachyoides</i> | ácido barbinervico (91), bizantionosídeo B (92), correantosina E (93), correantosina F (94), daucosterol (β -sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo) (49), escopoletina (95), estigmasterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo (96), éter 1-metil-alizarina (97), nor-metil-23-oxo-correantosídeo (98), rubiadina (99), estachiosídeo (100), α -amirina (101) | [48, 49, 78] |
| <i>P. suterella</i> | <i>E</i> -O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (53), <i>E</i> -vallesiachotamina (12), lialosídeo (54), estrictosamida (32), vallesiachotamina lactona (11), <i>Z</i> -vallesiachotamina (13) | [45, 46] |
| <i>P. umbellata</i> | psychollatina (41), umbellatina (102), 3,4-dehidro-18,19- β -epoxi-psychollatina (103), N ⁴ -[1-((R)-2-hidroxiopropil)]-psychollatina (104), N ⁴ -[1-((S)-2-hidroxiopropil)]-psychollatina (105) | [41, 79-83] |

Tabela 1. Compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

| | | |
|-----------------------|--|-------------|
| <i>P. viridis</i> | N-N-dimetil-triptamina (4), N,N-dimetil-triptamina-N-óxido (106) | [22, 84-92] |
| <i>P. vellosiana</i> | β -sitosterol (52), estigmasterol (80), escopoletina (95), esqualeno (107), lupeol (108) | [93] |
| <i>Psychotria sp.</i> | 11-O-siringil-bergenina (109), ácido gálico (110), ardisianosídeo D (111), bergenina (112), galato de metila (113), psychotramida A (114), psychotramida B (115), psychotramida C (116), psychotramida D (117), psychotrianosida A (118), psychotrianosida B (119), psychotrianosida C (120), psychotrianosida D (121), psychotrianosida E (122), psychotrianosida F (123), psychotrianosida G (124) | [94-96] |
| <i>P. yunnanensis</i> | psycacoraona A (125), ácido salicílico (126), ácido 4-hidroxibenzóico (127), resorcinol (128), ácido vanílico (129), coriandrol (130), (-)-butina (131), ácido siríngico (132), β -hidroxipropiovanilona (133), protocatecuato de etila (134), (-)-loliolida (135), (+)-siringaresinol (136), blumenol A (137), 3 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxi-7-megastigmen-9-ona (138), drumondol (139), β -hidroxipropiosiringona (140), 3-hidroxi-1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-propanona (141) | [97, 98] |

Alcaloides

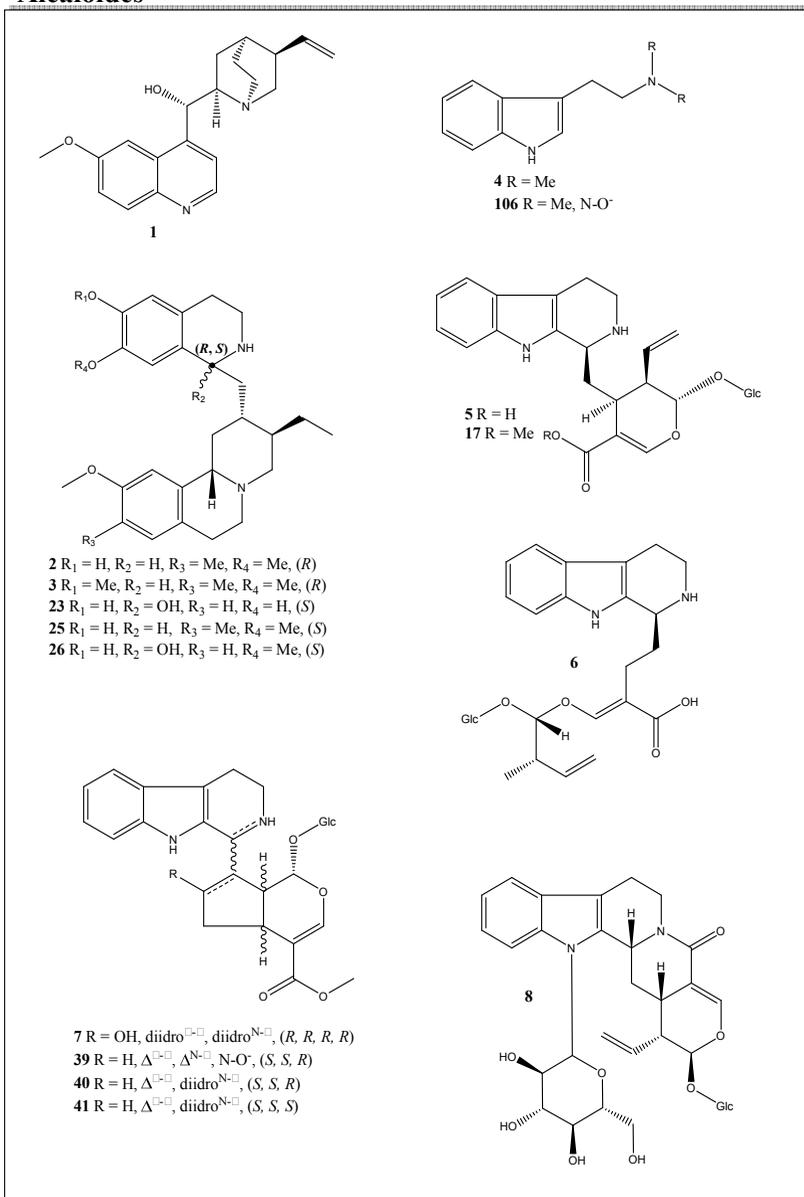


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria*

Alcaloides

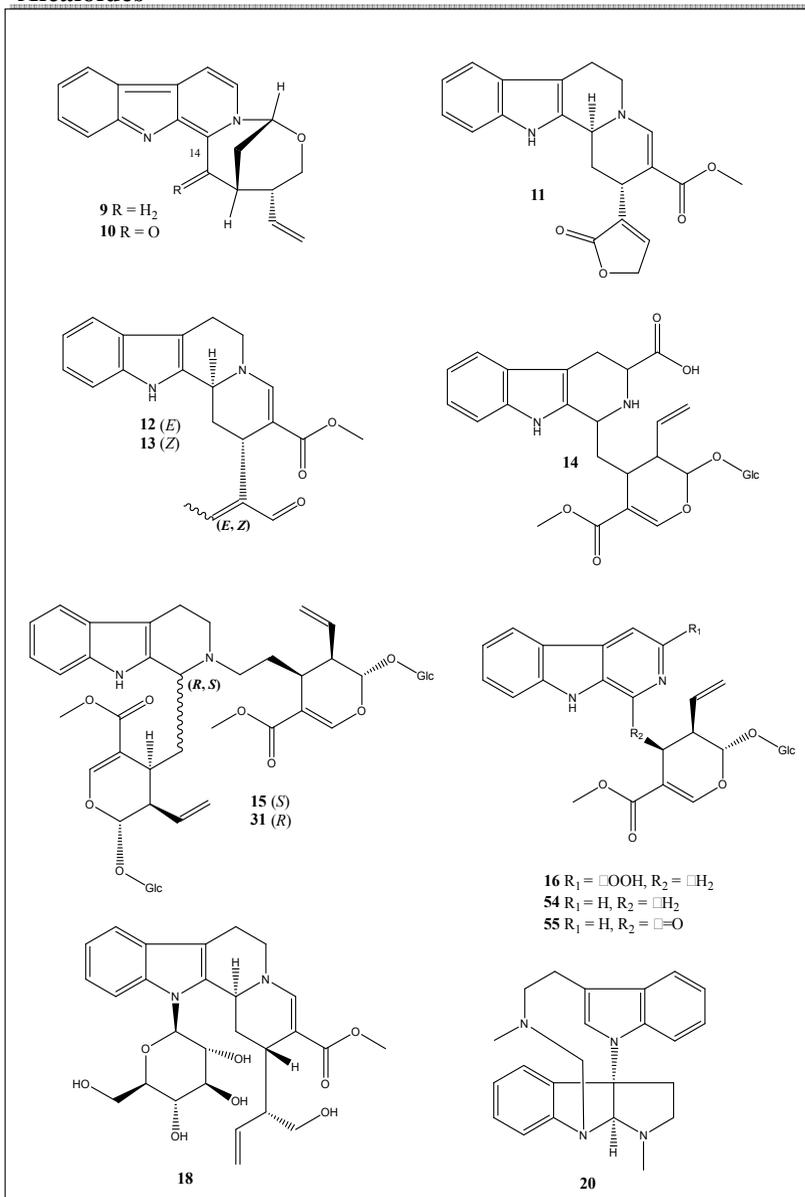


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Alcaloides

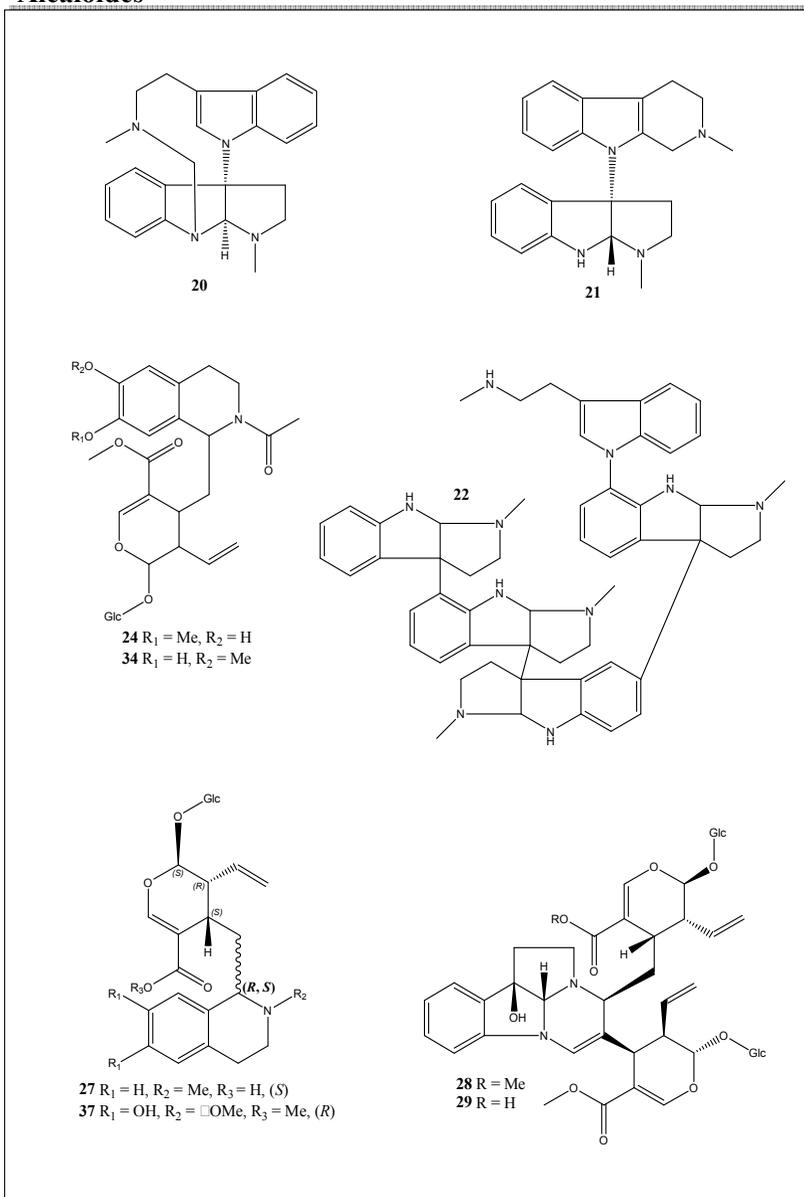


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Alcaloides

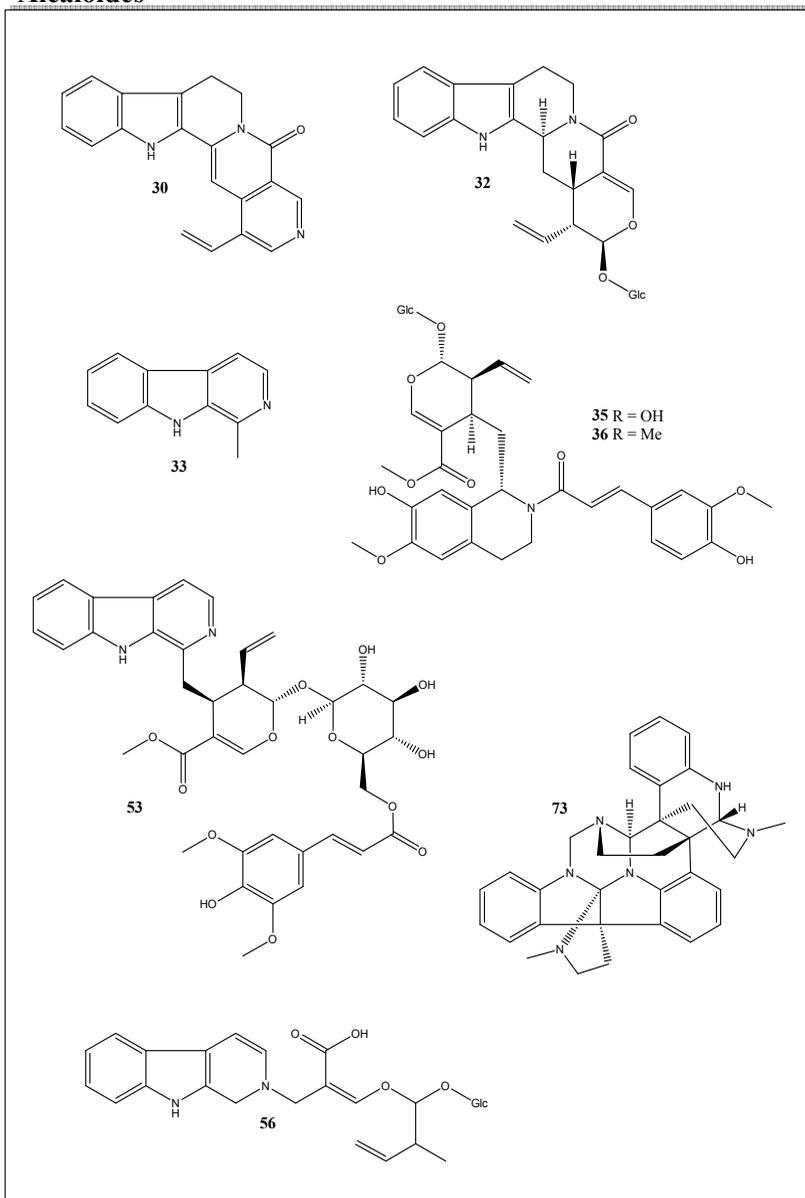


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Alcaloides

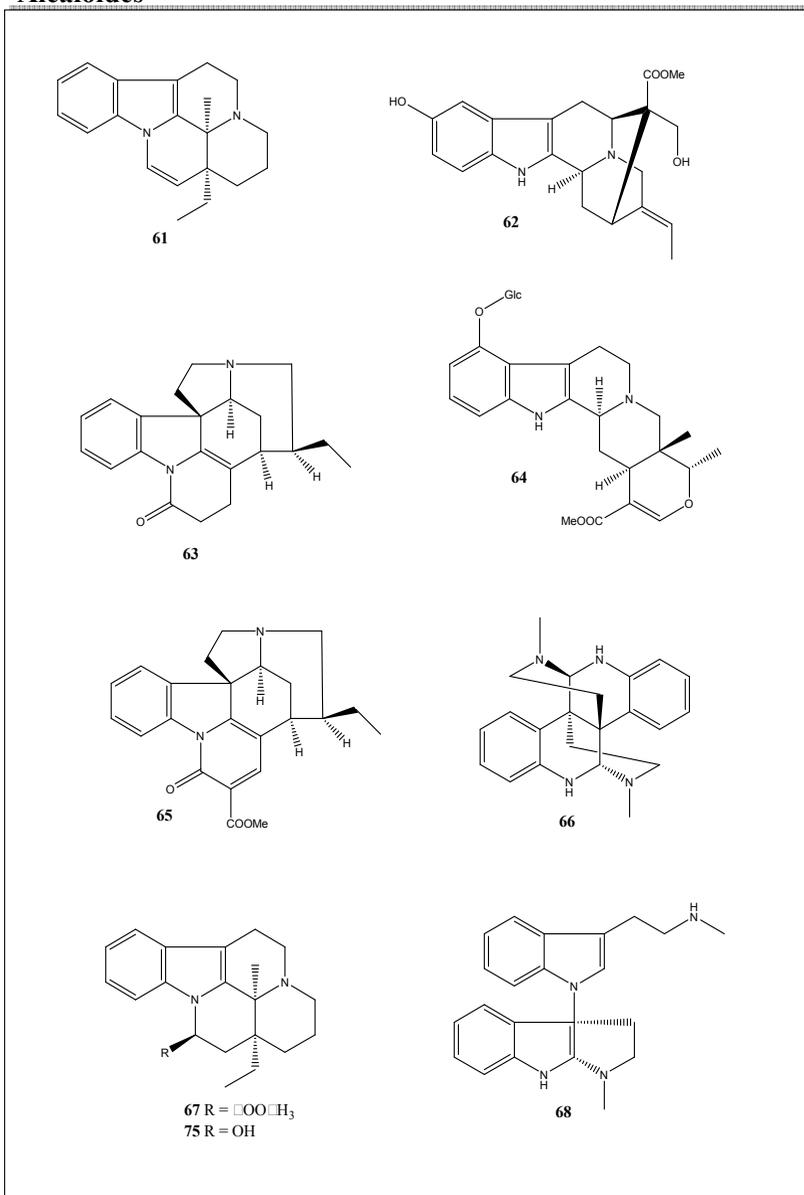


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Alcaloides

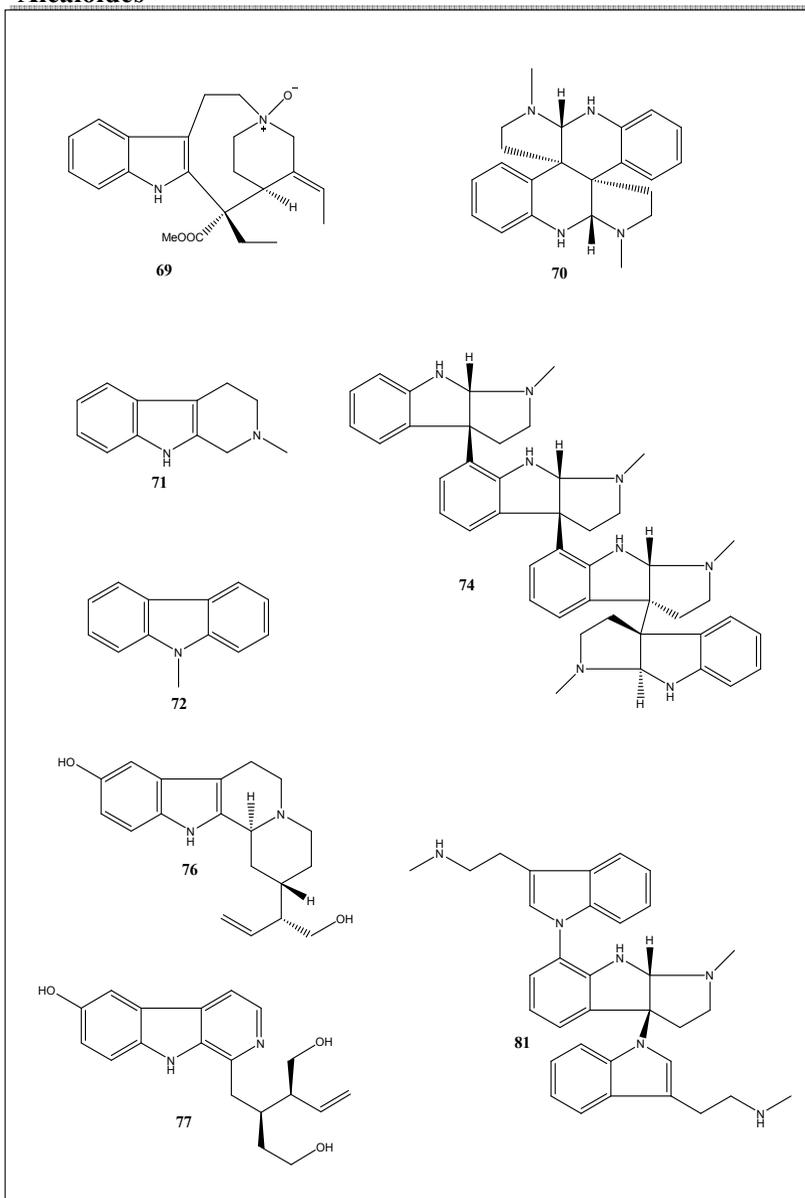
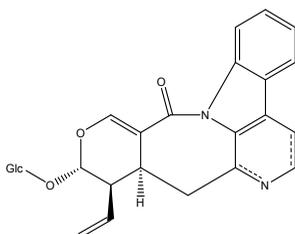


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

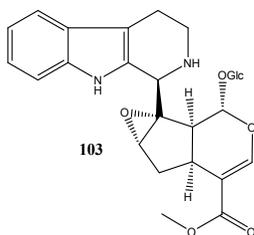
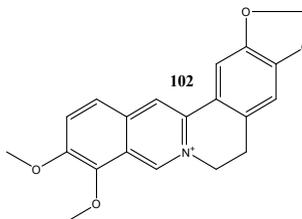
Alcaloides



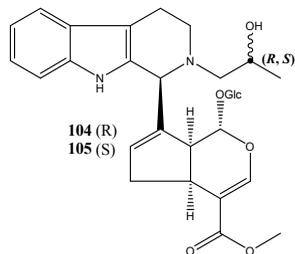
93 dihydro $\Delta^{\square-N}$, $\Delta^{\square-\square}$, $\square = (R)$

94 $\Delta^{\square-N}$, $\Delta^{\square-\square}$

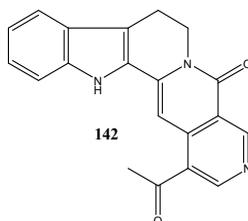
98 diidro $\Delta^{\square-N}$, dihidro $\Delta^{\square-\square}$, N(CHO), $\square = (R)$



103



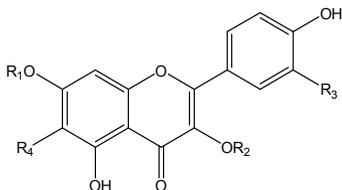
104 (R)
105 (S)



142

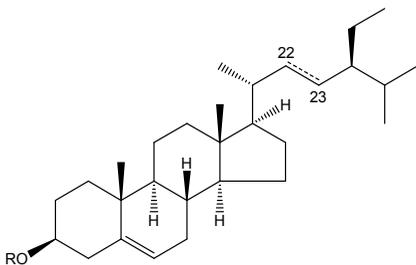
Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Flavonoides



- 47 $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosil-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-glicopiranosideo}, R_3 = R_4 = H$
 48 $R_1 = \beta\text{-D-glicopiranosideo}, R_2 = R_3 = R_4 = H$
 50 $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H$
 51 $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosil-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-glicopiranosideo}, R_3 = OH, R_4 = H$
 82 $R_1 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosil-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-glicopiranosideo}, R_2 = H, R_3 = R_4 = H$
 83 $R_1 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosil-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-glicopiranosideo}, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H$
 88 $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosideo}, R_3 = OH, R_4 = H$

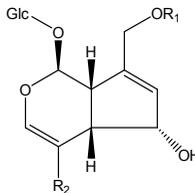
Esteroides



- 49 diidro²²⁻²³, $R = \beta\text{-D-glicopiranosideo}$
 52 diidro²²⁻²³, $R = H$
 80 Δ^{22-23} , $R = H$
 96 Δ^{22-23} , $R = \beta\text{-D-glicopiranosideo}$

Iridoid

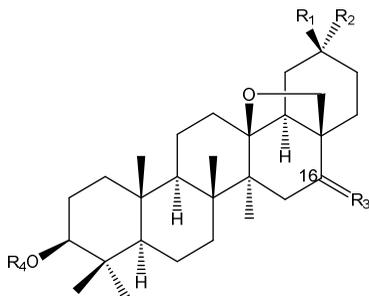
es



- 42 $R_1 = H, R_2 = \square\text{O}_2\text{Me}$
 43 $R_1 = H, R_2 = \square\text{O}_2\text{H}$
 45 $R_1 = \text{Ac}, R_2 = \square\text{O}_2\text{H}$
 84 $R_1 = \text{Ac}, R_2 = \text{OEt}$

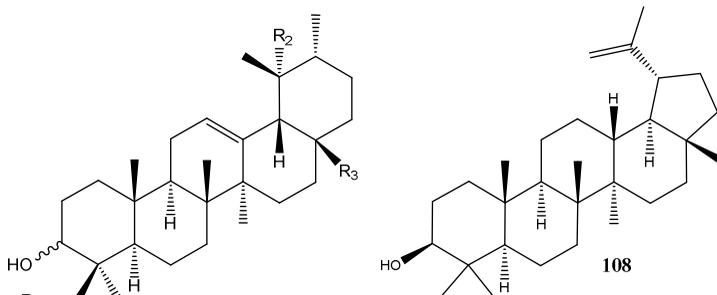
Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Triterpenos e Saponinas triterpênicas



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|-----|----------------|----------------|------------------------|---|
| 111 | Me | Me | β H, α OH | β -D-Xyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -L-Ara- |
| 118 | MeOH | Me | β H, α OH | α -L-Ara- |
| 119 | Me | CHO | β H, α OH | β -D-Xyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-Ara- |
| 120 | Me | Me | O | β -D-Xyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-Ara- |
| 121 | Me | Me | β H, α OH | α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-[O- β -D-Xyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Glc]-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-Ara- |
| 122 | Me | Me | β H, α OH | β -D-Xyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Ara- |
| 123 | MeOH | Me | β H, α OH | β -D-Xyl-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-6-acetil-Glc-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-Ara- |
| 124 | Me | Me | β H, α OH | α -L-Ara- |

Ara = arabinopiranosil; Glc = glicopiranosil; Rha = ramnopiranosil; Xyl = xilopiranosil



91 3 α -OH, R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = COOH

101 3 β -OH, R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Me

Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Outras substâncias

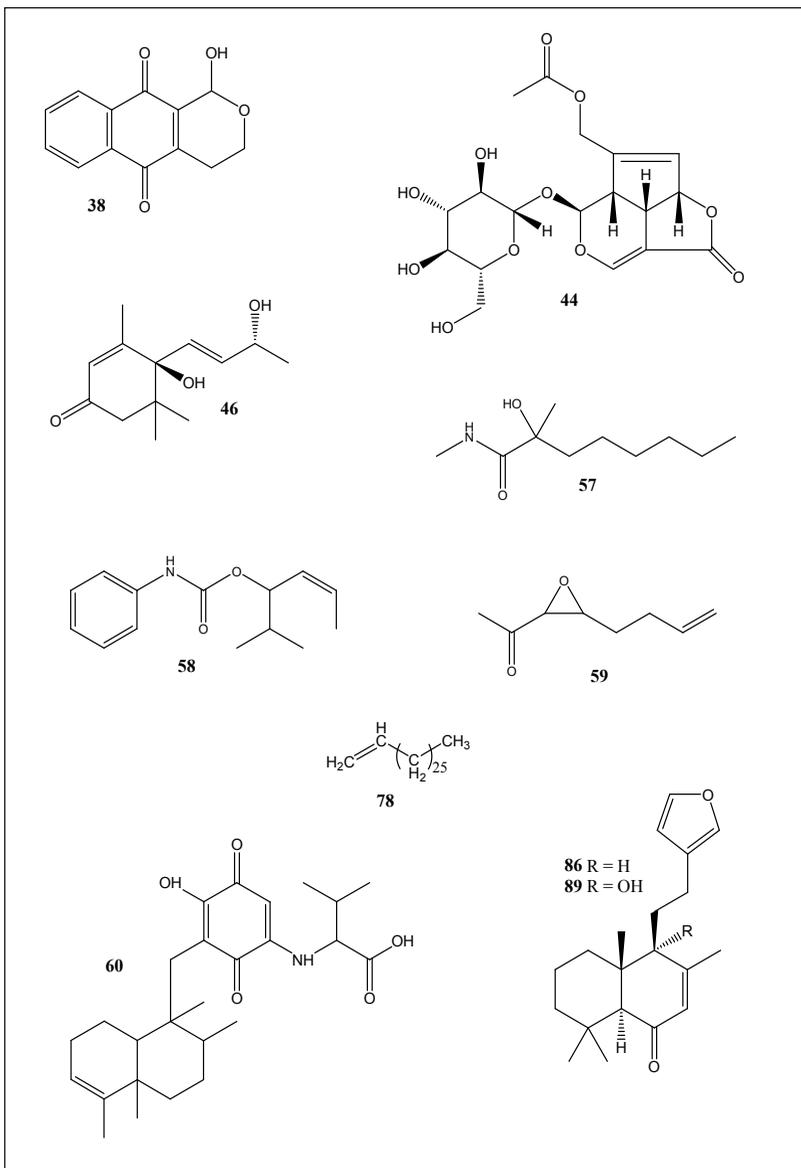


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Outras substâncias

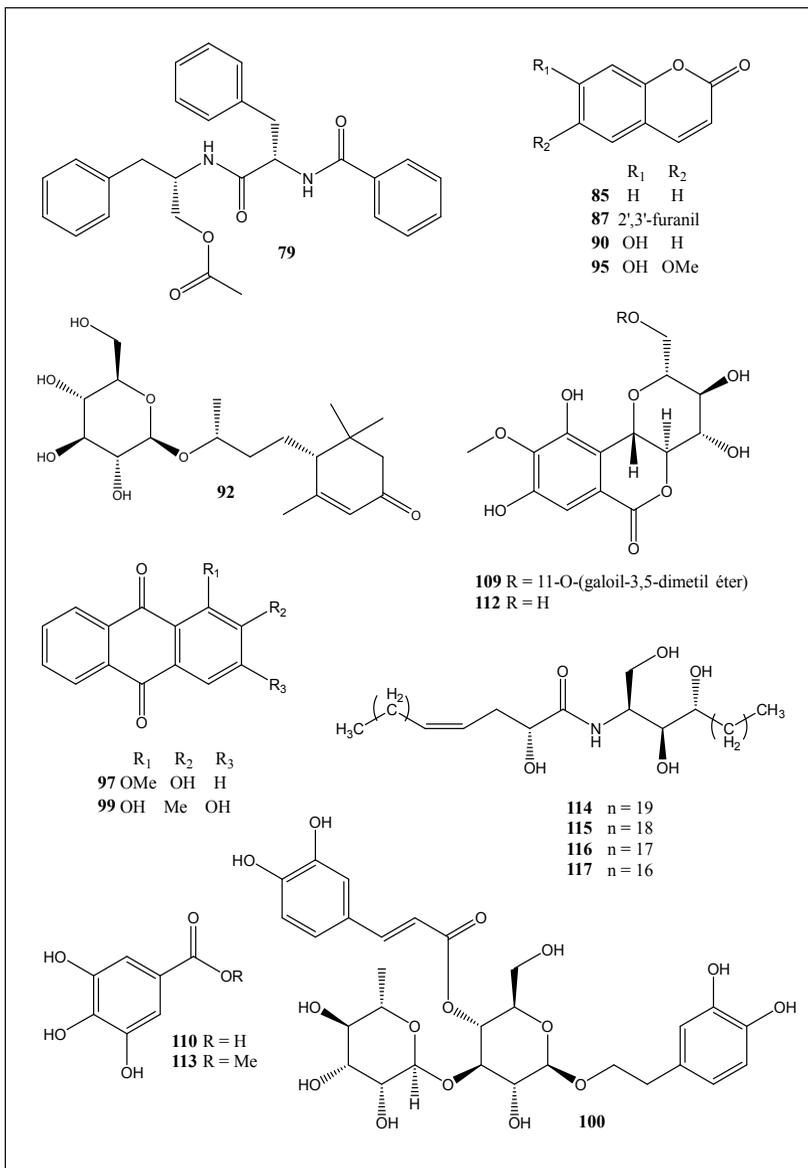


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Outras substâncias

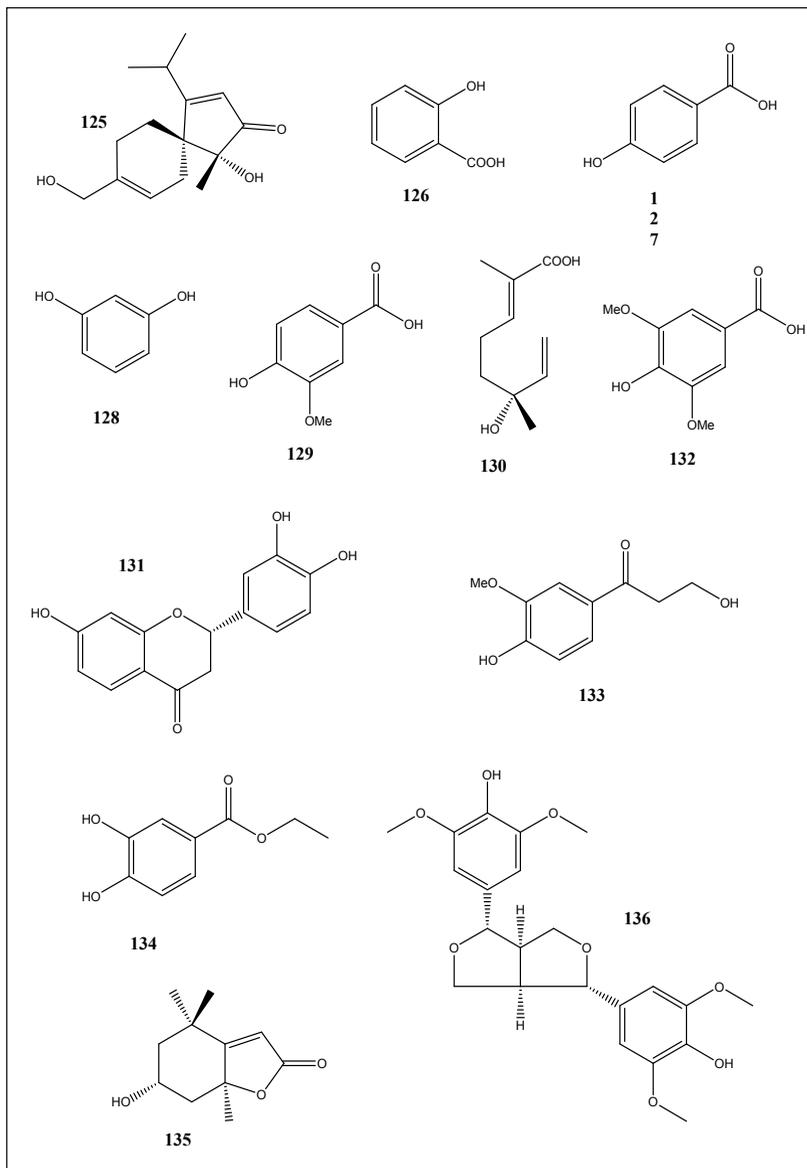


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

Outras substâncias

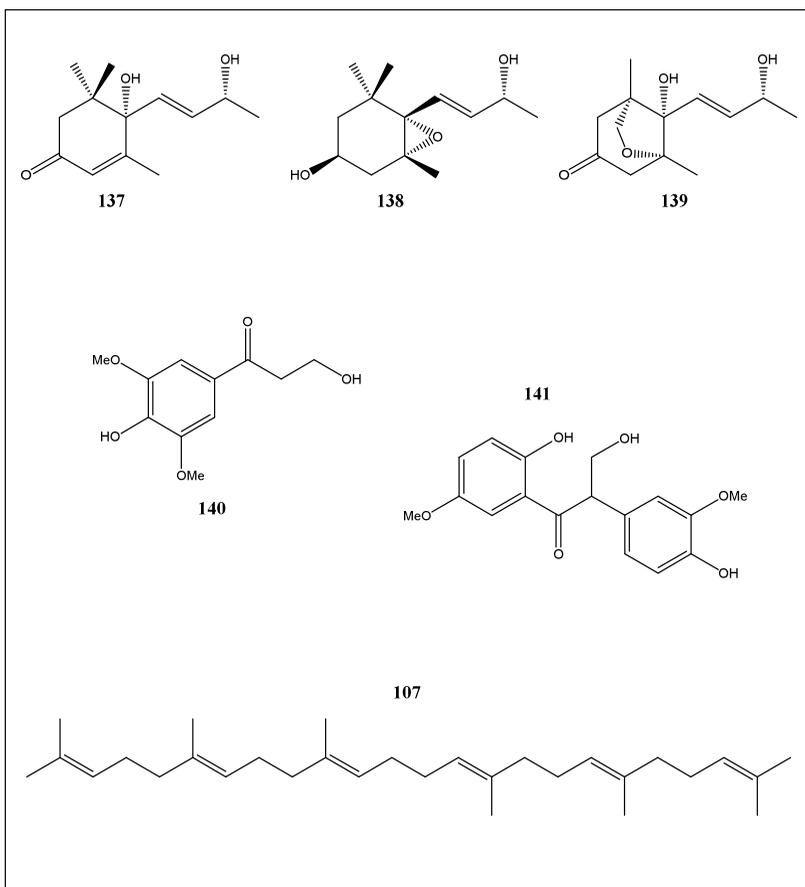


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados ou identificados em espécies do gênero *Psychotria* (continuação)

2.3. Aspectos gerais das espécies *Psychotria rhytidocarpa*, *Psychotria stenocalyx* e *Psychotria suterella*

Estas espécies são compostas de arbustos ou pequenas árvores atingindo cerca de 2 metros de altura. Por serem muito semelhantes, são conhecidas popularmente como gandiúva-d'anta, café-d'anta, pimenteira-do-mato, buta, cravo-de-negro, erva-de-anta ou pasto-de-anta [99].

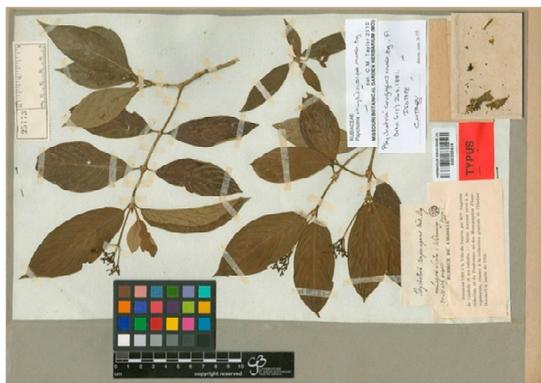
As três espécies de *Psychotria* estudadas neste projeto são plantas nativas sendo que a espécie *Psychotria rhytidocarpa* é encontrada em todos os estados da região Sudeste e na Bahia [100]; a espécie *Psychotria stenocalyx* é encontrada nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio de Janeiro [101] e a espécie *Psychotria suterella* é encontrada em todos os estados das regiões Sul e Sudeste [102]. Na Tabela 2 se encontra uma breve classificação botânica das espécies com seus respectivos sinônimos botânicos e na Figura 2 são apresentadas as imagens das plantas.

Tabela 2. Breve classificação botânica das espécies *P. rhytidocarpa*, *P. stenocalyx* e *P. suterella*

| Família | Rubiaceae |
|--|---|
| Gênero | <i>Psychotria</i> |
| Espécie | Sinônimos Relevantes |
| <i>Psychotria rhytidocarpa</i> Müll. Arg. [100] | heterotípico <i>Psychotria conjugens</i> Müll.Arg. heterotípico <i>Psychotria conjugens</i> Müll.Arg. heterotípico <i>Psychotria densevenosa</i> Müll.Arg. heterotípico <i>Psychotria densivenosa</i> Müll.Arg. heterotípico <i>Psychotria obtegens</i> Müll.Arg. homotípico <i>Uragoga rhytidocarpa</i> (Müll.Arg.) Kuntze <i>Psychotria opaca</i> Müll.Arg. |
| <i>Psychotria stenocalyx</i> Müll. Arg. [101] | homotípico <i>Uragoga stenocalyx</i> (Müll. Arg.) Kuntze |
| <i>Psychotria suterella</i> Müll. Arg. [102] | heterotípico <i>Psychotria estrellana</i> Müll. Arg. heterotípico <i>Psychotria estrellana</i> var. <i>lanceolata</i> Müll. Arg. heterotípico <i>Uragoga estrellana</i> (Müll. Arg.) Kuntze homotípico <i>Suteria parviflora</i> Gardner homotípico <i>Uragoga suterella</i> (Müll. Arg.) Kuntze |

Apesar do gênero *Psychotria* ser de bastante interesse para a comunidade científica e na terapêutica devido às atividades que apresenta, para as espécies *P. rhytidocarpa* e *P. stenocalyx* não foram encontrados, até o presente momento, nenhum estudo publicado na literatura científica.

Das três espécies estudadas neste projeto, apenas a espécie *Psychotria suterella* apresentou estudos publicados na literatura científica. Considerando o potencial apresentado pelas espécies deste gênero, o estudo da espécie *P. suterella* se justifica pela possibilidade descoberta de novas atividades biológicas assim como novas substâncias químicas bioativas, em especial alcaloides.



Psychotria rhytidocarpa [100]



Psychotria stenocalyx



Psychotria suterella



Figura 2. Fotos das espécies vegetais *P. rhytidocarpa*, *P. stenocalyx* e *P. suterella*

Recentemente, um estudo mostrou que os alcaloides monoterpênicos indólicos *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**) e vallesiachotamina lactona

(11), encontrados na espécie *P. suterella*, foram capazes de inibir as enzimas butirilcolinesterase (BchE), com CI_{50} entre 3,47 e 14 μ M, e monoamino oxidase A (MAO A), com CI_{50} entre 0,85 e 2,14 μ M [45]. Moraes e colaboradores [32] também reportaram que *P. suterella* apresenta atividade seletiva contra *Mycobacterium tuberculosis* e também reduz a produção de óxido nítrico (NO) pelos neutrófilos no processo inflamatório.

Da espécie *P. suterella* já foram isolados os alcaloides monoterpeno indólicos *E*-vallesiachotamina (12), *Z*-vallesiachotamina (13), vallesiachotamina lactona (11), lialosídeo (54), estrictosamida (32), além do derivado (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (53) dos quais foi avaliada a atividade da monoamino-oxidase A e B (MAO A e B) [46]. Em 2001, Van de Santos e colaboradores [103] já haviam relatado a presença dos alcaloides monoterpeno indólicos lialosídeo (54) e estrictosamida (32) além da naucletina (142) nas folhas de *P. suterella*.

2.4. Classificação e aspectos gerais da biossíntese dos alcaloides

Os alcaloides, principais substâncias encontradas em espécies de *Psychotria*, podem ser agrupados com base em seus aminoácidos precursores. Há relativamente poucos aminoácidos que são precursores na biossíntese dos alcaloides, sendo os principais ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico, e histidina. Sua classificação é muitas vezes feita de acordo com a natureza do heterociclo nitrogenado presente em sua estrutura, por exemplo, pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc. Porém esta classificação tem seu número de subdivisões expandida devido à complexidade estrutural. Alguns alcaloides quinolínicos e pirroloquinolínicos, por exemplo, podem ser formados a partir de rearranjos em alcaloides indólicos. Os átomos de nitrogênio são provenientes, em sua maioria, de um aminoácido do qual o esqueleto carbonado normalmente é preservado na estrutura alcaloídica, porém o grupo carboxílico do aminoácido é, muitas vezes, eliminado através de reação de descarboxilação [6].

Alguns blocos construtores procedentes da rota do chiquimato, acetato e do fosfato de metil-eritritol (MEP) são frequentemente incorporados à estrutura dos alcaloides, no entanto, para boa parte deles, o átomo de nitrogênio é adicionado através de reações entre um aminoácido e um α -cetoácido na presença de uma enzima transaminase em uma reação de transaminação, formando um novo α -cetoácido e um

novo aminoácido, sendo que o restante da molécula do alcaloide pode ser derivado da via do acetato, chiquimato ou de origem terpenoídica ou esteroidal [6]. A tabela a seguir relaciona as principais classes de alcaloides com seus aminoácidos precursores (Tabela 3).

Tabela 3. Estrutura dos principais alcaloides e seus respectivos aminoácidos precursores

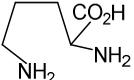
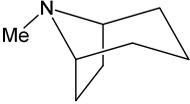
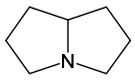
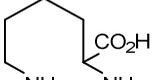
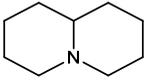
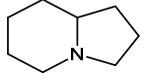
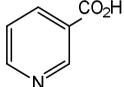
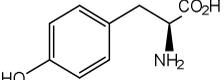
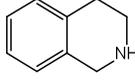
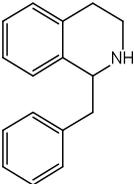
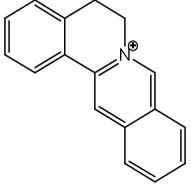
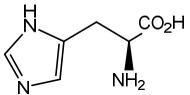
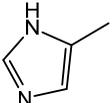
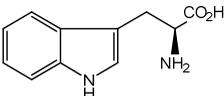
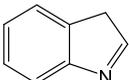
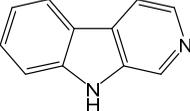
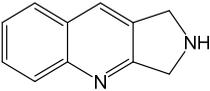
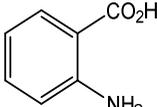
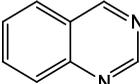
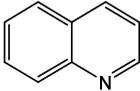
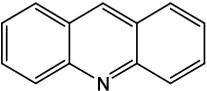
| Aminoácido precursor | Principais classes de alcaloides | | |
|--|---|---|---|
|  <p data-bbox="218 555 330 582">L-ornitina</p> |  <p data-bbox="431 555 532 582">pirrolidina</p> |  <p data-bbox="677 571 750 598">tropano</p> |  <p data-bbox="907 555 1030 582">pirrolizidina</p> |
|  <p data-bbox="229 715 319 742">L-lisina</p> |  <p data-bbox="431 715 532 742">piperidina</p> |  <p data-bbox="649 715 772 742">quinolizidina</p> |  <p data-bbox="901 715 1024 742">indolizidina</p> |
|  <p data-bbox="207 861 341 885">ácido nicotínico</p> |  <p data-bbox="688 861 778 885">piridina</p> | | |
|  <p data-bbox="229 1053 319 1077">L-tirosina</p> |  <p data-bbox="431 1053 610 1077">tetrahidroisoquinolina</p> |  <p data-bbox="610 1109 834 1133">benziltetrahidroisoquinolina</p> |  <p data-bbox="879 1109 1002 1133">protoberberina</p> |
|  <p data-bbox="218 1260 330 1284">L-histidina</p> |  <p data-bbox="688 1268 778 1292">imidazol</p> | | |

Tabela 3 (continuação). Estrutura dos principais alcaloides e seus respectivos aminoácidos precursores

| Aminoácido precursor | Principais classes de alcaloides | | |
|---|---|--|---|
|  <p data-bbox="124 464 221 485">L-triptofano</p> |  <p data-bbox="398 373 443 394">indol</p> |  <p data-bbox="589 400 686 421">β-carbolina</p> |  <p data-bbox="807 384 955 405">pirroloquinolina</p> |
|  <p data-bbox="94 708 255 729">ácido antranílico</p> |  <p data-bbox="374 699 471 719">qinazolina</p> |  <p data-bbox="602 703 686 724">quinolina</p> |  <p data-bbox="852 703 925 724">acridina</p> |

2.4.1. Biossíntese de alcaloides monoterpeneo indólicos

A rota do chiquimato é responsável, dentre outras, pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos *L*-fenilalanina, *L*-tirosina e *L*-triptofano, os quais são precursores de uma vasta gama de alcaloides. O *L*-triptofano, por sua vez, é precursor dos alcaloides indólicos, β-carbolíneos, terpeno indólicos, pirrolindólicos e, devido à possibilidade de ocorrência de reações de rearranjo, o sistema de anel indol pode ser convertido em anel quinolina através de rearranjo gerando assim os alcaloides do tipo quinolínicos e pirroloquinolínicos [104].

As rotas biossintéticas para algumas classes de alcaloides terpeno indólicos são bem conhecidas, onde, em alguns casos, as enzimas envolvidas no processo biossintético foram clonadas para execução de estudos mecanísticos *in vitro*. Em outros casos, as rotas foram propostas baseadas no isolamento e identificação de intermediários biossintéticos formados pela administração de substratos isotopicamente marcados [105].

Os alcaloides monoterpeneo indólicos são formados pela reação do tipo Mannich entre a triptamina e a secologanina. A triptamina é formada por uma reação de descarboxilação do aminoácido triptofano pela enzima triptofano descarboxilase [6]. A secologanina é um produto natural,

principal representante dos secoirídois e é precedido pelo monoterpene geraniol na sequência de reações biossintéticas. O geraniol, assim como todos os terpenos, é biossintetizado a partir do difosfato de isopentenila (IPP) pela rota do mevalonato (MVA) e do fosfato de metil-eritritol (MEP) [106].

Em praticamente todas as estruturas deste grupo é possível reconhecer a porção da triptamina e o fragmento restante é, normalmente um resíduo C9 ou C10 proveniente do iridoide secologanina. Deste fragmento, três tipos principais de estrutura são reconhecidos de acordo com o rearranjo a que a secologanina é submetido: o tipo corinanto como na ajmalicina e acuamicina, o tipo iboga como na catarantina e o tipo aspidoesperma, como na tabersonina. Os tipos iboga e aspidoesperma são provenientes dos rearranjos do tipo corinanto. A figura a seguir mostra, de maneira simplificada, que a descarboxilação do triptofano produz a triptamina. Esta reage com os diferentes tipos de estrutura provenientes dos rearranjos da secologanina gerando os principais tipos de alcalóides monoterpene indólicos (Figura 3) [6].

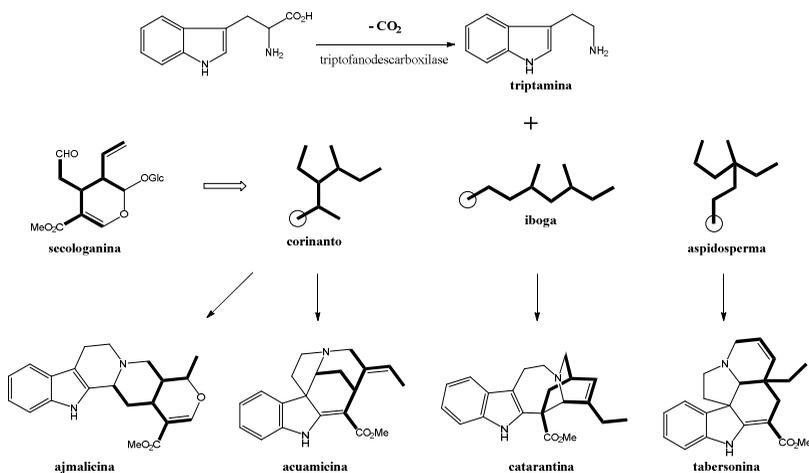


Figura 3. Exemplos de alcalóides biossintetizados à partir dos esqueletos provenientes de rearranjos do iridoide secologanina [6]

Apesar de quase todos os alcalóides monoterpene indólicos serem biossintetizados a partir de uma unidade de triptamina e da secologanina, os rearranjos do esqueleto original aumentam muito a variedade e a complexidade estrutural, o que acaba tornando, em muitos casos, inviável

sua obtenção através de síntese. Sendo assim, os compostos deste grupo utilizados na terapêutica são, normalmente, obtidos de fonte vegetal [1].

2.5. Hifenação de técnicas de HPLC no estudo de produtos naturais

Nos últimos anos as técnicas analíticas passaram por grandes avanços tecnológicos que permitiram, sobretudo, a sua hifenação. Este fato tem trazido mais eficácia no estudo de amostras com matrizes muito complexas como é o caso dos extratos vegetais. No campo dos produtos naturais, o avanço da hifenação de técnicas proporcionou maior agilidade no isolamento e na elucidação estrutural de compostos devido ao aumento na qualidade e na quantidade de informações obtidas.

O termo “hifenação” é originado pelo hífen entre as siglas das técnicas e se refere ao acoplamento de uma técnica de separação com uma ou mais técnicas espectroscópicas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida do que as técnicas convencionais. Para o estudo de produtos naturais, as técnicas mais comumente empregadas são cromatografia líquida ou gasosa acoplada com espectrometria de massas. O uso de detectores de UV/VIS é padrão em todos os equipamentos de cromatografia líquida, porém as informações estruturais obtidas são bastante limitadas para a elucidação completa. A versatilidade da técnica de espectrometria de massas, que apresenta diferentes métodos de ionização e de separação e detecção de íons, facilita o acoplamento desta com as técnicas cromatográficas.

A espectrometria de massas é um dos métodos mais sensíveis e também um dos mais comumente acoplados às técnicas cromatográficas. Em cromatografia gasosa, onde normalmente é utilizada a ionização por impacto de elétrons, os espectros de massas são como *fingerprints* que auxiliam na elucidação estrutural de compostos inéditos baseando-se em seus respectivos padrões de fragmentação assim como identificação de compostos conhecidos através de comparação com uma base de dados. Já na cromatografia líquida as técnicas de ionização mais utilizadas são ionização por *electrospray* (ESI) ou ionização química à pressão atmosférica (APCI), as quais permitem a ionização de substâncias de uma larga faixa de polaridade e fornecem informações muito importantes acerca da massa molecular, especialmente quando acoplado com um espectrômetro de massas de alta resolução. As informações da massa exata dos compostos separados por cromatografia são acrescidas do padrão isotópico que facilita a obtenção da fórmula molecular exata [107].

Apesar da grande importância que a espectrometria de massas apresenta, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) é indispensável para a elucidação estrutural completa e inequívoca de compostos orgânicos, sejam provenientes de síntese ou de origem natural. A hifenação da cromatografia com esta técnica é mais complicada do que com as técnicas de espectrometria de massas por alguns motivos, tais como, menor sensibilidade, necessidade de tempo para aquisição, uso de solvente deuterado, etc.

A combinação de métodos de separação com espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi introduzida no final da década de 1970, uma época em que o uso de NMR em química orgânica já era bastante difundido. O primeiro artigo publicado foi em 1978, no qual Watanabe e Nike adquiriram espectros de NMR em equipamento LC-NMR com interrupções de fluxo, hoje denominado de *stopped-flow*, utilizando misturas de compostos conhecidos [108]. No ano seguinte, Bayer e colaboradores também utilizaram uma mistura de compostos conhecidos, porém testaram o método com interrupções de fluxo e com fluxo contínuo, hoje chamado de *on-flow* ou *continuous-flow* [109]. Apesar da qualidade dos espectros obtidos através da hifenação direta LC-NMR ser muito menor quando comparados com os espectros obtidos da maneira convencional com os compostos purificados, estes trabalhos marcaram o início de uma forma de acoplamento de técnicas de separação com técnicas espectroscópicas.

As duas décadas que se seguiram ao primeiro trabalho publicado foram de grandes avanços necessários para a implementação da técnica de LC-NMR. O principal objetivo foi obter espectros com qualidade competitiva com os experimentos de NMR convencionais e a questão da sensibilidade foi um grande desafio, pois seria necessária a adaptação de uma sonda modificada que permitisse o fluxo contínuo da solução em estudo. Além disso, houve avanços em aspectos como técnicas de supressão de solvente, compatibilidade de solventes entre os aparelhos acoplados assim como o volume do pico cromatográfico em relação ao volume da cela de NMR, etc. [107].

As separações em HPLC e espectros de NMR apresentam uma grande diferença em sua escala de tempo, pois a aquisição de espectros em 2D pode levar muitas horas o que dependeria até vários dias para aquisição de espectros de NMR para vários picos de um cromatograma. Devido a esta diferença, atualmente existem diferentes modos de hifenação para LC-NMR que são classificados de acordo com o modo através do qual são adquiridos estes espectros que podem ser: *on-flow*,

stopped-flow, *loop storage* e *CapNMR* assim como hifenação com unidade de extração em fase sólida, HPLC-SPE-NMR.

No modo *on-flow* as aquisições são feitas sem interrupções de fluxo e o espectrômetro de NMR funciona de forma semelhante a um detector de UV do HPLC. O limite de detecção é de até cerca de 10 µg e é limitado a rápidas aquisições em 1D. Mesmo assim é utilizado para obtenção de dados preliminares sobre compostos majoritários extratos vegetais [110]. No modo *stopped-flow*, o fluxo da fase móvel é interrompido quando um pico de interesse alcança a cela de detecção de NMR. A seleção e o posicionamento do pico no interior da cela de detecção são guiados pelo cromatograma de absorção de UV ou sinal de massas levando em consideração um tempo de atraso necessário para que o pico esteja exatamente dentro da cela onde está a sonda. Este modo tem como vantagem proporcionar tempo para otimização da homogeneidade do campo magnético assim como os parâmetros de aquisição, mas tem eficiência na separação cromatográfica prejudicada devido às constantes paradas de fluxo que causam difusão e alargamento de banda na coluna e até mesmo difusão do analito na cela de detecção [107]. O modo *loop-storage*, com tradução literal para armazenamento em *loop*, pode ser caracterizado como um intermediário entre hifenação direta e indireta, pois a separação cromatográfica não é interrompida e as frações são armazenadas em *loops* capilares para posterior aquisição dos espectros. Assim como no modo *stopped-flow*, também é necessário se conhecer o tempo de atraso para que o pico de interesse alcance o *loop* [111, 112].

O modo *CapNMR* ou *microflow NMR*, constituído de uma microsonda solenoidal que envolve o tubo capilar do fluxo da amostra orientada transversalmente ao campo magnético estático, é o mais promissor dentre os modos de hifenação direta [113]. Este modo apresenta uma sensibilidade bastante aumentada em comparação com os métodos anteriores com um limite de detecção de 1-2 µg, volume de cela de 1,5 µL. Além disso apresenta menor consumo de solvente, o que torna economicamente viável o uso de solventes deuterados eliminando a necessidade de supressão do sinal do solvente [113, 114]. Outra característica do modo *CapNMR* é que ele pode operar tanto em *continuous-flow* quanto em *stopped-flow*, aumentando ainda mais sua aplicabilidade e a qualidade dos dados adquiridos [114].

A técnica HPLC-SPE-NMR é a mais nova no campo das técnicas hifenadas apresentando uma unidade de extração em fase sólida (SPE) automatizada, *SPE post-column*, entre o equipamento de HPLC e o espectrômetro de NMR, etapa esta que representa o grande avanço das técnicas de hifenação direta de HPLC-NMR. Esta técnica supera uma

série de limitações das técnicas de hifenção direta de LC-NMR como a necessidade de se utilizar solvente deuterado na separação cromatográfica, os efeitos de difusão devido às interrupções de fluxo da fase móvel, baixa sensibilidade e limite de detecção relativamente alto, etc. Apesar de ainda haver a necessidade de supressão dos sinais do solvente, é possível se adquirir espectros em alta resolução em 1D e 2D [107, 113].

A unidade SPE *post-column* foi a estratégia chave para superar as limitações supracitadas. Durante sucessivas separações cromatográficas utilizando solventes não deuterados, os picos de interesse são capturados nos respectivos cartuchos de SPE constituídos de adsorvente adequado de acordo com as características das substâncias isoladas, etapa de isolamento (*trapping*). Na etapa seguinte, os picos concentrados nos cartuchos são eluídos com solventes deuterados para os microtubos de NMR para serem adquiridos os espectros. Os sistemas de HPLC-SPE-NMR mais modernos operam totalmente automatizados utilizando um software com interface adaptada para esta hifenção [107]. Atualmente, a etapa de eluição para os microtubos de NMR também é automatizada como é o caso dos trabalhos publicados por Stærk e colaboradores [115-117].

2.6. Justificativa do trabalho

Como se pode observar, o gênero *Psychotria* apresenta diversas atividades biológicas em sua maioria atribuídas aos alcaloides monoterpeneo indólicos, seus principais metabólitos secundários. Além disso, trata-se de um gênero com bastantes espécies que apresentam relativamente poucos estudos. Conforme mencionado anteriormente, para a espécie *P. suterella* foram publicados dois trabalhos reportando estudo fitoquímico e mais dois reportando atividades biológicas atribuídas aos seus alcaloides. Para as espécies *P. rhytidocarpa* e *P. stenocalyx* não foram publicados estudos até o presente momento.

Considerando que o gênero *Psychotria* é bastante promissor devido às atividades reportadas e considerando que as novas tecnologias de hifenção de HPLC aumentam ainda mais as chances de se encontrar substâncias inéditas, pretende-se, neste trabalho, efetuar o estudo fitoquímico e biológico de três espécies de *Psychotria* focando na busca de novos alcaloides monoterpeneo indólicos.

3. OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como objetivos principais a avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Psychotria rhytidocarpa*, *Psychotria stenocalyx* e *Psychotria suterella* (Rubiaceae) e o estudo fitoquímico das suas frações ricas em alcaloides para proceder o isolamento e elucidação estrutural dos alcaloides através da aplicação das técnicas hífenadas de HPLC com espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS), extração em fase sólida (SPE) e ressonância magnética nuclear (NMR).

3.1. Objetivos específicos

- Obter e particionar os extratos brutos das folhas das espécies *P. rhytidocarpa*, *P. stenocalyx* e *P. suterella*;
- Fazer uma prospecção inicial dos metabólitos secundários dos extratos brutos através de uma marcha analítica preliminar;
- Avaliar as atividades antioxidantes, utilizando o ensaio do poder redutor e o ensaio da abstração de radicais livres com DPPH, nos extratos brutos e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*;
- Aplicar o teste alelopático, que avalia a germinação de sementes e desenvolvimento de plântula, aos extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*;
- Avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase dos extratos brutos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos brutos e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*;
- Proceder ao isolamento dos alcaloides presentes nas frações alcaloídicas através da técnica hífenada de HPLC-HRMS-SPE-NMR da fração rica em alcaloides das espécies *P. rhytidocarpa* e *P. suterella*;;
- Elucidar as estruturas dos compostos isolados utilizando os dados de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e da análise dos espectros de NMR 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, NOESY, HSQC e HMBC);

- Efetuar um estudo fitoquímico comparativo através da técnica hifenada HPLC-HRMS para identificar a coincidência de substâncias presentes nas frações alcaloídicas das três espécies de *Psychotria* estudadas;
- Discutir a biogênese dos alcaloides isolados nas espécies de *Psychotria* estudadas baseada na biossíntese já preconizada para alcaloides monoterpênicos indólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais, Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados foram os álcoois etílico e metílico, acetona, hexano, acetato de etila, diclorometano, ácido acético e álcool de cereais. Foram utilizados os reagentes sulfato de sódio anidro (Cromaline), como sal dessecante, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e Folin-Ciocalteu (Aldrich). Os demais reagentes químicos para os testes biológicos foram de pureza analítica e utilizados sem tratamento prévio. Todos os reagentes foram obtidos de fonte comercial (Aldrich, Vetec e Synth).

Para a realização do ensaio de inibição da acetilcolinesterase foram utilizadas as seguintes soluções tampões: Tampão A – solução de Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH = 8,0; Tampão B – solução de Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH = 8,0 acrescido de 0,1 % de soro albumina bovina; Tampão C – solução de Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH = 8,0 acrescido de NaCl 0,1 M e MgCl₂.6H₂O 0,02 mol.L⁻¹. Foram utilizados também soluções de iodeto de acetiltiocolina, reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico – DTNB) e a enzima acetilcolinesterase liofilizada (Tipo VI-S obtida de *Electroparus electricus*).

Para cromatografia em camada delgada (CCD) analítica foram usadas cromatoplasas de alumínio cobertas com sílica gel 60 em uma camada de 0,2 mm de espessura (Merck). Os reveladores utilizados foram: iodo, soluções reagentes de anisaldeído sulfúrico 5% em metanol, sulfato de cério 2% em ácido sulfúrico 2 mol.L⁻¹, cloreto férrico 5% em etanol, reagente de Dragendorff, Meyer e Bertrand (reagentes reveladores de alcaloides em CCD) [118].

4.2. Equipamentos

Diversos equipamentos foram utilizados para a realização deste trabalho, tais como: estufa, rota- evaporador, balança analítica, câmara com luz UV, banho ultrassônico, espectrofotômetro UV/VIS PERKIN ELMER Lambda2S.

Alguns métodos foram otimizados no laboratório de Pesquisa em Imunologia – LAPI sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo M. Dalmarco do Departamento de Análises Clínicas – CCS/UFSC. Especificações do equipamento: HPLC modelo LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão), amostrador automático SIL-20A, bomba quaternária LC-20AT conectadas a um desgaseificador DGU-20A5R, controlador CBM-20A,

detector UV/VIS de arranjo de diodos SPD-M20A. Sistema interfaceado com o software LC-Solution 1.25SP2.

O estudo fitoquímico da fração alcaloídica do extrato das folhas da espécie *P. suterella*, aplicando a técnica hífenada HPLC-SPE-NMR, foi conduzido pelo doutorando Sérgio Scherrer Thomasi no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – LabRMN sob a orientação do Professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Especificações do equipamento: cromatógrafo Agilent (série 1200), equipado com desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (Bruker Daltonik GmbH®, G1311A), detector de arranjos de diodos com comprimento de onda variável (Agilent, G1315D) e amostrador automático (*Autosampler Bruker Daltonik GmbH*®, G1329A). Os picos de interesse são adsorvidos em cartuchos de extração por fase sólida (Hysphere™-resin General Phase, 10mm x 2 mm, 10 µm, formato esférico e fase estacionária de polidivinilbenzeno) através de uma unidade trocadora de cartuchos (ACE – *Automatic Cartridges Exchanger* – LC-SPE-NMR Interface, *Prospeket 2*, Bruker Biospin GmbH©) que direciona o fluxo para os cartuchos automaticamente. As análises de NMR dos picos isolados foram executadas em um equipamento Bruker Avance Ultrashield III (14,1 Tesla / 600 MHz) equipado com trocador automático de amostra, ressonância tripla ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) gradiente de campo (*z-field*) e criosonda. A sonda é equipada com uma unidade de *tuning* e *matching* automático e um conversor *Cryo-FIT* para acoplamento à unidade de sistema LC-SPE.

A fração alcaloídica e os alcaloides de *P. suterella*, isolados no LabRMN da UFSCAR, foram analisados no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural – CEBIME / UFSC pela técnica Elis Amaral Rosa sob supervisão do professor Hernán Terenzi. Foi utilizado um equipamento multiusuário Shimadzu Prominence LC-20AD sistema UFLC (Kyoto, Japan), consistindo de um desgaseificador DGU-20A3, compartimento termostatizado de coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-AC HT e controlador de sistema CBM-20A. Foi usado uma peça em “T” para direcionar 1% do fluxo da coluna do HPLC para um espectrômetro de massas micrOTOF-Q II (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Os espectros de massas foram adquiridos utilizando método ESI-TOF, em modo positivo, temperatura de secagem de 200 °C, voltagem capilar de 4500 V, pressão do nebulizador de 3,0 bar e fluxo de gás de secagem de 12 L.min⁻¹.

Os espectros de MS/MS dos alcaloides identificados nas espécies *P. suterella* e *P. stenocalyx* foram obtidos no Laboratório de Eletroforese Capilar – LABEC sob a supervisão do Professor Gustavo Amadeu Mücke

utilizando técnica LC-MS/MS. Foi utilizado um equipamento de HPLC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) acoplado a um espectrômetro de massas triploquadropolar API 3200™, Applied Biosystems/MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA) equipado com cela de colisão LINAC® e fonte de ionização Turbo V™ operada no modo TurboIonSpray®. Os experimentos foram realizados em modo de ionização positivo. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas com o software Analyst versão 1.6.2. Foi utilizada uma coluna cromatográfica Phenomenex modelo Synergi Polar-RP (150 mm x 2 mm, 4 µm) equipada com uma pré – coluna da mesma marca modelo Polar-RP (4 x 2,0 mm). Foi utilizado o modo isocrático de eluição e os experimentos foram realizados utilizando uma fase móvel constituída de 50% de solvente A (H₂O + ácido fórmico 0,1 %) e 50 % de solvente B (MeOH:H₂O 95:5, v/v). A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 350 µL.min⁻¹. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 10 µL e a temperatura da coluna foi ajustada em 40 °C.

O estudo fitoquímico da fração alcaloídica do extrato das folhas da espécie *P. rhytidocarpa*, aplicando a técnica hifenada HPLC-HRMS-SPE/NMR, foi executado sob supervisão do Pós-Doc Sileshi Wubshet e Prof. Dan Stærk no *NMR Centre, Department of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen*, em Copenhague – Dinamarca. Especificações dos Equipamentos: HPLC Agilent 1200 system, equipado com desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (Bruker Daltonik GmbH®, G1311A), detector de arranjos de diodos com comprimento de onda variável (Agilent, G1315D) e amostrador automático (*Autosampler Bruker Daltonik GmbH®, G1329A*), acoplado a espectrômetro de massas Bruker QIII *high-resolution* ESI-TOF-MS (Bruker, 2010) acurácia de 2 ppm (permitindo determinação da fórmula molecular com precisão). A saída do HPLC está acoplada a uma unidade SPE que consiste de: bomba Knauer K100 Wellchrom (Berlim, Alemanha), um dispositivo extrator de fase sólida Spark Holland Prospekt 2 (Emmen, The Netherlands) e um Liquid Handler Gilson 215 equipado com uma agulha de 1-mm para preenchimento automático de microtubos de 1,7 mm Bruker Match (Middelton, Wisconsin, USA). As unidades HPLC, HRMS e SPE foram controlados usando o software HyStar versão 3.2 (Bruker, Fällanden, Suíça). A etapa de secagem, na unidade SPE, e de transferência automática para os microtubos é controlada por software específico dos respectivos equipamentos. Equipamento de NMR: 600 MHz Bruker Avance III, magneto ultra-shielded standard-bore equipado com uma sonda criogênica refrigerada de 1,7 mm, uma cabeça de sonda ¹H/¹³C/¹⁵N TCI com a maior sensibilidade de massa possível. A cabeça de sonda

desenhada para tubos capilares de 1,7 mm. O volume é de somente 30 μ L em comparação com os tubos de 5 mm que comportam 400-700 μ L. O instrumento é equipado com um easy accessible Bruker SampleCase autosampler com 24 posições. Todas as operações são controladas pelo software Bruker IconNMR.

4.3. Material vegetal

As espécies *Psychotria suterella* e *Psychotria stenocalyx* foram coletadas no morro da Lagoa da Conceição (27°35'34,1"S, 48°28'28,1"W) na cidade de Florianópolis e identificadas pelo botânico taxonomista, professor Dr. Ademir Reis do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina e depositadas no Herbário "Barbosa Rodrigues" na cidade de Itajaí-SC sob os *voucher numbers* HBR55427 e HBR55428, respectivamente. A espécie *Psychotria rhytidocarpa* foi coletada no Parque Nacional da Tijuca na cidade do Rio de Janeiro (22°57'31,8"S, 43°16'36,7"W) e identificada pela botânica Juliana Amaral de Oliveira, a qual foi depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o *voucher number* RB602109.

4.4. Obtenção e particionamento do extrato bruto hidroalcoólico

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa e em seguida trituradas e maceradas em álcool etílico. O extrato bruto (EB) foi obtido evaporando-se o álcool a 60 °C em evaporador rotatório à pressão reduzida. O extrato bruto obtido foi solubilizado em uma solução de HCl em EtOH:H₂O (20 %, v/v; pH ~ 2), deixado na geladeira por 24 horas e filtrado posteriormente, rendendo uma fração insolúvel (INS). O filtrado foi submetido a particionamento líquido-líquido, inicialmente com hexano e acetato de etila, para render as respectivas frações hexano (FH) e acetato de etila (FAe). Em seguida, o resíduo foi alcalinizado com NH₄OH até pH ~ 10 e extraído novamente com acetato de etila para render a fração rica em alcaloides (FRA). Finalmente, o resíduo aquoso foi neutralizado com CaCO₃ até pH ~ 7, filtrado e liofilizado, para render a fração aquosa (FAq) (Figura 4).

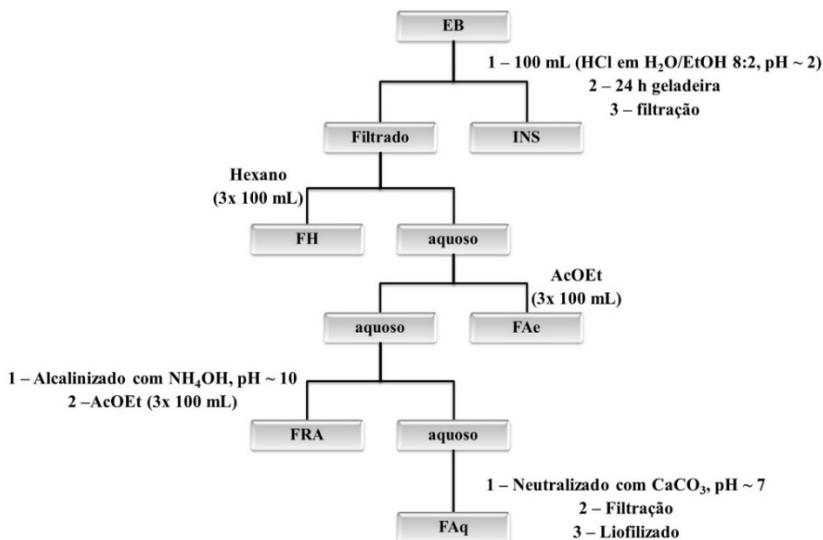


Figura 4. Esquema do particionamento líquido-líquido ácido-base dos extratos brutos

Nos extratos brutos foi aplicada uma marcha analítica, conforme preconizado por Matos (1997) [119], para detectar a presença das diferentes classes de metabólitos secundários em plantas. Aos extratos brutos e frações foram aplicados diferentes ensaios de bancada para determinar os conteúdos de fenólicos e flavonoides, testes antioxidantes e ensaios biológicos como: testes antibacteriano, antifúngico, alelopático, inibitório da enzima acetilcolinesterase e anti-inflamatório.

4.5. Ensaios de bancada e avaliação das atividades biológicas

Os testes antioxidantes, de conteúdos de fenólicos e flavonoides e atividades alelopática e inibitória da enzima acetilcolinesterase foram executados em nosso grupo de pesquisa, Laboratório de Química de Produtos Naturais – LQPN – UFSC, sob a supervisão minha e da Professora Ines Maria Costa Brighente. Os ensaios anti-inflamatórios foram executados pela Mestre Ana Beatriz Gobbo Luz no Laboratório de Pesquisa em Imunologia – LAPI, do Departamento de Análises Clínicas do Ciências Farmacêuticas da UFSC sob a supervisão do Professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco. Os ensaios antibacterianos foram realizados sob a supervisão da Professora Michele Debiasi Alberton do

Departamento de Ciências Farmacêuticas da Fundação Universidade Regional de Blumenau – FURB. Os ensaios antifúngicos foram realizados por Beatriz Martins Borelli grupo de pesquisa da Professora Susana Johann do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.5.1. Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado de acordo com o método já descrito [120, 121] utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu, composto por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico ($H_3MO_{12}PO_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3W_{12}PO_{40}$), onde o molibdênio e o tungstênio são reduzidos por compostos fenólicos presentes no extrato vegetal.

A cada 0,5 mL de uma solução metanólica $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da amostra vegetal, foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos foi adicionado 1,0 mL de solução saturada de Na_2CO_3 e a solução foi deixada em repouso por uma hora. As absorbâncias destas soluções foram determinadas em um espectrofotômetro de UV/VIS a 725 nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme descrito acima, porém sem a presença da amostra. O aparecimento da coloração azul-escuro é indicativo da presença de compostos fenólicos na amostra testada. Foi construída uma curva analítica com solução padrão de ácido gálico, nas concentrações de 50 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($y = 6,4894 x$; $r^2 = 0,9984$), para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico, ou seja, mg AG / g de amostra.

4.5.2. Determinação do conteúdo de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides baseia-se em método já descrito [121, 122], onde os flavonoides presentes na amostra reagem com Al^{3+} formando anéis estáveis de cinco e seis membros e a leitura das absorbâncias é feita em um espectrofotômetro de UV/VIS a 415 nm. O aparecimento de coloração verde é indicativo da presença de flavonoides.

A cada 0,5 mL da amostra vegetal ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol) foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de $AlCl_3$ 2 %. Após uma hora de repouso, foram feitas as leituras das absorbâncias das misturas em um espectrofotômetro UV/VIS a 415 nm. O teste foi feito em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada como

descrito acima, porém sem a presença de AlCl_3 . O conteúdo de flavonoides foi obtido através de uma curva de calibração com solução de quercetina ($y = 7,7088 x$; $r^2 = 0,9985$) e expresso em mg QE / g de amostra vegetal.

4.5.3. Determinação do poder redutor

A avaliação da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler (1977) [121, 123, 124], que se baseia na redução do ferro III a ferro II promovida por agentes redutores presentes na amostra. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de amostra com potencial atividade redutora e é quantificada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro de UV/VIS a 720 nm.

Foram preparadas soluções metanólicas compostas por 100 μL de amostra a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 8,5 mL de água deionizada e 1,0 mL de uma solução de FeCl_3 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em HCl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Após três minutos, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de ferrocianeto de potássio 0,008 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Após 15 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro de UV/VIS a 720 nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme descrito acima, porém na ausência de amostra. Foi construída uma curva analítica utilizando solução de ácido ascórbico nas concentrações de 150 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para comparação ($y = 1,3004 x$; $r^2 = 0,9943$). O potencial redutor das amostras é expresso em equivalente de ácido ascórbico, mg AA / g amostra.

4.5.4. Determinação da ação sequestradora de radicais livres

A avaliação da ação sequestradora de radicais livres usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), um radical livre estável, baseia-se em método já descrito [121, 125], onde amostras com maior atividade antioxidante diminuem a absorbância do DPPH medida em um espectrofotômetro de UV/VIS a 517 nm.

A cada 1,0 mL de solução etanólica das amostras em diferentes concentrações (10-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados 2,0 mL de uma solução metanólica de DPPH 4×10^{-3} % (m/v). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro de UV/VIS a 517 nm após 30 minutos. O teste foi feito em triplicata e, como branco, foi utilizada uma solução preparada como descrito acima, sem a presença de DPPH. Os valores obtidos foram plotados num gráfico da % da absorbância de DPPH em

função da concentração de amostra, onde se determinou a concentração necessária para diminuir em 50% a absorvância do DPPH, ou seja, a concentração efetiva 50 % (CE₅₀). A porcentagem de DPPH na amostra foi determinada com base na equação abaixo:

$$\% Abs_{DPPH} = \frac{Abs_0 - Abs_i}{Abs_0} \cdot 100\%$$

Onde: Abs_0 é a absorvância do DPPH na ausência de amostra, Abs_i é a absorvância do DPPH em diferentes concentrações de amostra.

4.5.5. *Teste de alelopatia*

Para o teste de alelopatia, foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* (alface), de *Raphanus sativus* (rabanete) e de *Cucumis sativus* (pepino). Estas sementes foram utilizadas como indicadoras da presença de aleloquímicos, segundo a metodologia proposta por Nishimura e colaboradores (1984) [126] com algumas modificações de Colla e colaboradores [127]. As sementes foram previamente esterilizadas por imersão com uma solução de hipoclorito de sódio (10%) por 5 minutos e deixado secar por um dia. As amostras foram preparadas nas concentrações de 0,25 a 2,0 % (g / 100 mL) dissolvendo-se os extratos vegetais em etanol. Foram utilizados papéis-filtro Whatman n° 1 (5,5 cm de diâmetro), os quais foram impregnados com 1,0 mL de amostra. Após a evaporação do solvente com o auxílio de um secador, o papel filtro foi depositado em placa Petri (6,0 de diâmetro), e assim adicionou-se 1,5 mL de solução 100 µg.mL⁻¹ de tweem 80. Após 24 h, cada papel filtro recebeu 25 sementes de alface, 15 sementes de rabanete ou 10 de pepino sem obedecer a um espaçamento uniforme, mas espalhado por toda placa. A testemunha ou controle negativo, seguiu o mesmo procedimento, porém com água destilada no lugar dos extratos ou frações. A germinação foi conduzida em uma estufa com fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro a 25 °C e os papéis filtro foram regados diariamente com aproximadamente 5 gotas água destilada. As leituras para avaliação da germinação de sementes foram diárias sendo que, para padronização do teste da germinação, foi observada até o 5º dia. O critério estabelecido para a germinação foi a profusão radicular. Ao final do 5º dia mediu-se o comprimento da radícula e do hipocótilo com o auxílio de uma folha milimetrada. Todos os testes foram desenvolvidos em triplicata e os

resultados expressos em porcentagem em relação à testemunha, da qual os dados foram considerados como o 100 %.

A germinação foi avaliada pelo cálculo do índice de velocidade de germinação,

$$IVG = \sum_n \frac{N_n}{t_n},$$

onde N_n é o número sementes germinadas na enésima contagem e após t_n horas após a contar da semeadura. A observação do desenvolvimento da plântula é verificada medindo-se o tamanho do caulículo (hipocótilo) e radícula que também é um indicador do efeito inibitório ou estimulante do extrato da planta que se deseja testar. Os dados obtidos de IVG, e comprimentos de radícula e hipocótilo foram plotados em gráficos de porcentagem inibição na germinação de sementes, do crescimento da radícula e do hipocótilo, respectivamente, em função das concentrações dos extratos brutos de *P. suterella* e *P. stenocalyx*.

4.5.6. *Teste de inibição da enzima Acetilcolinesterase*

Este ensaio seguiu o método de Ellman [128] com alterações feitas por Magina e colaboradores (2012) [129]. Foram preparadas soluções tampões: Tampão A (solução de Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 8); Tampão B (Tampão A acrescido de 0,1 % de soroalbumina bovina); Tampão C (Tampão A acrescido de NaCl 0,1 mol.L⁻¹ e MgCl₂.6H₂O 0,02 mol.L⁻¹). Também foi preparada uma solução de 15 mmol.L⁻¹ de iodeto de acetilcolina em água milipore deionizada. A solução do reagente de Ellman 3 mmol.L⁻¹ foi dissolvida no tampão C e uma solução da enzima acetilcolinesterase 0,25 U.mL⁻¹ diluída no Tampão A. Em cada cubeta foram adicionados 325 µL de Tampão A, 100 µL de cada amostra vegetal (1 mg.mL⁻¹) e 25 µL da enzima. Após 15 minutos, à temperatura ambiente, foram acrescentados 75 µL de iodeto de acetilcolina e 475 µL do reagente de Ellman. Após 30 minutos à temperatura ambiente, fez-se a leitura a 405 nm em um espectrofotômetro UV/VIS. Como controle positivo foi utilizada uma solução preparada a partir do medicamento Reminyl[®] que contém o fármaco galantamina (0,1 mg.mL⁻¹). O controle negativo consistiu de 100 µL do solvente com o qual foram preparadas as amostras, etanol. O branco consistiu de todos os reagentes com exceção da enzima. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado dado em termos de % de inibição enzimática (I%):

$$I_{\%} = \frac{Abs_{Amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{branco}} \cdot 100\%$$

4.5.7. Atividade antibacteriana

As atividades antibacterianas dos extratos e frações das espécies de *Psychotria* foram avaliadas utilizando a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, com microplacas de 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) [130].

As amostras vegetais diluídas a 2 mg.mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %, foram colocadas nos primeiros micropoços, e em seguida transferidas para os micropoços adjacentes, os quais continham caldo Müller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, com concentrações da amostra variando de 1.000 µg.mL⁻¹ até 7,81 µg.mL⁻¹. O inóculo bacteriano (5 µL), preparado em 0,5 da escala de McFarland, foi adicionado em cada poço, resultando em uma concentração de 5 x 10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC) do microrganismo a ser testado. Alguns poços de cada microplaca, foram reservados para realização do controle negativo (MH + H₂O / DMSO 10 % + bactéria em estudo) e para controle de meio de cultura (MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico gentamicina, com concentrações variando de 40 a 0,31 µg.mL⁻¹.

As microplacas foram incubadas aerobiamente a 37 ± 1 °C, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 µL em cada micropoço de uma solução metanólica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TCC) (5 mg.mL⁻¹), observando-se a presença do “botão” bacteriano avermelhado no fundo de cada micropoço. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4.5.8. Atividade antifúngica

Micro-organismos: Para este teste foram utilizados os seguintes micro-organismos: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida krusei* (ATCC 20298), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Cryptococcus gattii* (ATCC 24065), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 24067) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb 18).

Preparação dos inóculos: Para as espécies de *Candida*, os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), durante 24 h, a 35 °C em 5 mL de solução salina estéril. A suspensão resultante foi agitada por 15 s e a densidade celular ajustada pelo método espectrofotométrico a 75 % (530 nm) a uma concentração final de $1,0 - 1,5 \times 10^3$ células/mL (CLSI, 2008) [131].

Para as espécies de *Cryptococcus* foram coletadas colônias dos isolados cultivados e, então, dispersos em tubos contendo solução salina (0,85 %) estéril. A absorbância da amostra foi ajustada para 85 % sob o comprimento de onda de 530 nm. Em seguida, foi realizada a diluição em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) ajustando-se à concentração de leveduras a $1 - 5 \times 10^3$ células/mL, de acordo com o protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008) [131].

Para a utilização nos ensaios biológicos o isolado *PB 18* foi repicado 3 vezes sucessivamente em meio YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose) a partir da cultura mantida em crescimento exponencial a cerca de 36°C por 7 a 10 dias. As células leveduriformes em fase exponencial foram coletadas assepticamente com alça de Henle e suspensas em solução salina estéril (0,85 %). O inóculo foi homogeneizado e deixado em repouso para a decantação e o sobrenadante coletado. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm e ajustada para 70 % equivalente a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ células/mL. As suspensões foram diluídas em caldo RPMI (1:10) para obtenção do inóculo final $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ células/mL [132].

Triagem: Os ensaios de triagem com os extratos brutos foram realizados em placas de 96 poços contra o fungo *Pb 18* em duplicata. Estes extratos foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹ e diluídos em RPMI, a uma concentração de 1 mg.mL⁻¹. Cada poço da placa recebeu então 100 µL do extrato diluído e 100 µL do

inóculo padronizado, totalizando um volume de 200 µL por poço. A concentração final dos extratos em cada poço foi de 500 µg.mL⁻¹. Em todos os ensaios foram feitos os controles de toxicidade do DMSO (0,5%), do crescimento fúngico, da esterilidade dos meios de cultura e da susceptibilidade à droga controle, o itraconazol (0,5 µg.mL⁻¹) (Sigma-EUA).

Finalizado o preparo das placas, as mesmas foram incubadas a 37 °C por 10 dias. Após o período de incubação, as placas foram avaliadas visualmente e posteriormente em cada poço foram acrescentados 10 µL de brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT / Amresco – 5 mgmL⁻¹). As placas foram novamente incubadas por 4 horas. Após o metabolismo do MTT, foram adicionados 100 µL/poço de SDS/isopropanol (5 %). A leitura das placas foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax pelo programa Softmax[®] Pro 5 (Molecular Devices), com a absorvância de 530 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do poço controle contendo apenas o micro-organismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{controle}}} \cdot 100\%$$

Foram considerados ativos e selecionados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) os extratos que apresentaram valor de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 70 %.

Concentração inibitória mínima: Este teste foi feito utilizando a metodologia da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrito no documento do CLSI M27-A3 (CLSI, 2008) [131] com modificações sugeridas por Johann e colaboradores (2010) [133]. Os extratos selecionados foram dissolvidos em DMSO e diluídos em caldo RPMI 1640 na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Posteriormente foi feita uma diluição seriada a fim de se obter 10 concentrações que variaram entre 500-0,9 µg.mL⁻¹. A partir de cada diluição, alíquotas de 100 µL foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição. Como controle de crescimento foi utilizado o RPMI com o inóculo e o de esterilidade foi usado somente o RPMI.

Após a montagem das placas, os poços teste contendo as diferentes concentrações e os de controle de crescimento receberam 100µL do inóculo microbiano. As placas foram incubadas na temperatura de cerca

de 36°C e as leituras feitas após 10 dias para o *Pb 18* e 48 horas para as espécies de *Cryptococcus*. As CIMs foram consideradas como a menor concentração da amostra que inibiu totalmente o crescimento do micro-organismo alvo, em relação ao controle de crescimento após a incubação e foram expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e em duplicata. Para as espécies de *Candida*, as placas foram incubadas a 35 °C durante 72 h e a leitura realizada visualmente, sendo que a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle.

4.5.9. Atividade anti-inflamatória: método da pleurisia induzida pela carragenina

Animais: No delineamento desta pesquisa foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas, com aproximadamente 1 mês de idade e peso entre 18-25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais mencionados foram acomodados em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem, em condições de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz controladas (ciclos claro/escuro de 12h) no Biotério Setorial. Receberam alimentação (ração) e água *ad libitum* em bebedouros e comedouros apropriados, trocados com frequência, durante todos os experimentos. Para a realização deste estudo, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo nº PP00965, e os experimentos realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongo: O modelo experimental foi realizado de acordo com o protocolo proposto por Saleh, Calixto e Medeiros (1996) [134].

No dia dos experimentos, à cavidade pleural de cada animal foi administrado 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,9%, i.pl.) ou 0,1 mL do agente flogístico λ -carragenina (Cg, 1%, i.pl.) utilizando-se de uma seringa de insulina com agulha de 12,7 x 0,33 mm adaptada com cânula de poliestireno. Transcorridas 4 h de pleurisia, a morte indolor assistida dos animais foi realizada por overdose de pentobarbital (120 mg.kg^{-1} , i.p.). Os animais foram afixados em mesa cirúrgica e através de incisão transversal na pele e músculos abdominais, o tórax foi exposto, o processo xifoide pinçado e o acesso a cavidade pleural foi feito por uma incisão na porção inferior do esterno. A cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) contendo heparina (20 UI.mL^{-1}). O lavado obtido foi

utilizado para a quantificação de leucócitos total e seu diferencial, exsudação.

Procedimento anestésico e eutanásia dos animais: Quando necessária a administração do corante Azul de Evans, os animais foram previamente anestesiados com pentobarbital (40 mg.kg⁻¹, i.p.). Decorridas as 4 h do modelo da pleurisia, os animais foram submetidos à morte indolor assistida através de uma overdose de pentobarbital (120 mg.kg⁻¹, i.p.).

Quantificação de leucócitos totais e diferencial celular: Para a quantificação dos leucócitos totais nas amostras de lavado pleural foi utilizado contador hematológico veterinário (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Para a contagem diferencial entre polimorfonucleares e mononucleares, uma alíquota (50 µL) das amostras foram submetidas à citocentrifugação (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) e então corados pelo método May-Grünwald-Giemsa. Os resultados foram expressos como total de células por mililitro de amostra ($\times 10^6$ células/mL).

Coloração dos esfregaços celulares: As lâminas confeccionadas após citocentrifugação foram secas à temperatura ambiente e posteriormente coradas pela técnica utilizando eosinato de azul de metileno (May-Grünwald) e azul-eosina (Giemsa). Em suporte apropriado, foi adicionado a cada lâmina 1 mL de corante May-Grünwald mantido em contato com o sedimento célula por 2 min e, em seguida, adicionou-se 1 mL de água deionizada. Transcorridos 3 min, o corante foi removido e então adicionou-se o corante Giemsa (1:20), que recobriu as lâminas por 15 min. Ao término desse tempo, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente.

Análise estatística: Os resultados de todos os parâmetros inflamatórios estudados foram analisados pelos testes estatísticos utilizando o programa de estatística GraphPad Prism® versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA) e foram expressos como a média \pm EPM. Diferenças estatísticas entre os grupos controle e os grupos tratados com as amostras foram avaliadas por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico bicaudal de duas vias), complementado pelos testes *post-hoc* de Dunnett. Quando necessário utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado) e o teste de correlação de Pearson. Para todas as análises

estatísticas, valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as espécies de *Psychotria* estudadas neste trabalho foram obtidos os extratos brutos etanólicos das folhas secas. Estes extratos foram dissolvidos em uma solução a pH aproximadamente 2 rendendo uma fração insolúvel (INS) e um resíduo aquoso. Este resíduo aquoso foi submetido a um particionamento líquido-líquido rendendo as frações hexano (FH) e acetato de etila (FAe) e uma etapa de basificação, para extrair uma fração rica em alcaloides (FRA). O resíduo aquoso final deste particionamento foi neutralizado, liofilizado e denominado de fração aquosa (FAq). A Tabela 4 mostra as massas de folhas secas utilizadas para preparar os extratos brutos e os rendimentos da extração e das frações resultantes do particionamento líquido-líquido.

Tabela 4. Rendimentos do extrato e das frações obtidas do particionamento líquido-líquido

| | <i>P. stenocalyx</i> | <i>P. suterella</i> | <i>P. rhytidocarpa</i> |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Folhas secas | 449,0 g | 484,0 g | 206 g |
| EB^a | 5,54 % | 8,16 % | 9,16 % |
| INS^b | 49,48 % | 58,93 % | 25,52 % |
| FH^b | 174,4 x 10 ⁻³ % | 101,14 x 10 ⁻³ % | Não obtido |
| FAe^b | 4,41 % | 1,72 % | 4,53 % |
| FRA^b | 3,24 % | 2,51 % | 4,43 % |
| FAq^b | 39,84 % | 24,02 % | Não obtido |

^a g/100g folhas secas, ^b g/100g EB.

Os extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram submetidos a uma marcha analítica que consiste de uma sequência de testes que avaliam, de forma qualitativa, a presença de diferentes classes de metabólitos secundários em plantas utilizando reações que apresentam mudança de coloração ou formação de precipitado. A espécie *P. stenocalyx* apresentou teste positivo para a presença de alcaloides, esteroides, leucoantocianidinas e taninos e a espécie *P. suterella* apresentou teste positivo para a presença de alcaloides, esteroides e leucoantocianidinas.

5.1. Ensaios biológicos aplicados aos extratos brutos e frações de *P. stenocalyx* e *P. suterella*

Os extratos brutos e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram submetidos aos ensaios de bancada que avaliam a quantidade de compostos fenólicos e flavonoides assim como a atividade antioxidante através dos testes do poder redutor e da capacidade sequestradora de radicais livres. Também foram avaliadas as atividades alelopática, antibacteriana, antifúngica, inibitória da enzima acetilcolinesterase e anti-inflamatória. A espécie *P. rhytidocarpa* não foi submetida aos testes mencionados por ter sido incluída no decorrer do projeto.

5.1.1. Conteúdos de fenólicos e flavonoides e atividades antioxidantes

A atividade antioxidante de uma amostra vegetal, geralmente está relacionada ao seu conteúdo de compostos que possuem a capacidade de estabilizar melhor um elétron desemparelhado do que a maioria dos radicais livres que geralmente apresentam alta reatividade e, dentro de um organismo vivo podem causar sérios danos se estiverem em excesso. A formação exacerbada de radicais livres é resultado de um processo oxidativo natural do organismo, geralmente de defesa contra microrganismos invasores, mas, por outro lado está relacionado à gênese de várias doenças como aterosclerose, doenças cardíacas e do sistema nervoso central, entre outras. Neste fato reside a importância de se buscar extratos vegetais e/ou substâncias com potencial antioxidante.

São consideradas como antioxidantes as substâncias que, numa concentração menor que o substrato oxidável, retardam o processo oxidativo diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução. Entre os antioxidantes de baixa massa molecular, estão algumas vitaminas (A, C e E), outros produtos naturais como compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides, alcaloides, etc [135]. Neste sentido foram aplicados testes para avaliar os conteúdos de fenólicos e flavonoides assim como os potenciais redutores e a ação sequestrante de radicais livres nos extratos brutos e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Atividades antioxidantes e conteúdos de fenólicos e flavonoides de *P. stenocalyx* e *P. suterella*

| Extrato/ Fração | Fenólicos ^(a) | Flavonoides ^(b) | Poder Redutor ^(c) | DPPH ^(d) | |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------|
| <i>P. stenocalyx</i> | EB | 51,73 ± 3,31 | 43,20 ± 3,82 | 99,46 ± 12,97 | 80,28 ± 2,22 |
| | INS | 59,33 ± 5,64 | 35,28 ± 2,14 | 132,01 ± 21,86 | - |
| | FH | 43,25 ± 6,97 | 9,64 ± 0,94 | 153,29 ± 19,35 | - |
| | FAe | 235,87 ± 18,51 | 50,12 ± 4,26 | 516,51 ± 51,71 | - |
| | FRA | 158,41 ± 4,65 | * | 755,15 ± 42,15 | 22,10 ± 3,14 |
| | FAq | 54,35 ± 2,54 | 6,44 ± 0,37 | 86,13 ± 7,05 | - |
| <i>P. suterella</i> | EB | 53,37 ± 1,75 | 55,52 ± 0,39 | 138,42 ± 3,84 | 149,41 ± 1,95 |
| | INS | 67,34 ± 9,14 | 46,66 ± 1,30 | 168,41 ± 5,04 | - |
| | FAe | 117,06 ± 1,25 | 3,46 ± 0,33 | 234,54 ± 14,12 | - |
| | FRA | 108,54 ± 0,98 | * | 486,26 ± 12,07 | 37,74 ± 2,52 |
| | FAq | 32,41 ± 0,09 | 4,19 ± 0,40 | 45,88 ± 3,11 | - |

^(a)mg ácido gálico (AG) /g amostra, ^(b)mg quercetina (QUE) /g amostra,

^(c)mg ácido ascórbico (AA) /g amostra, ^(d)CE₅₀ (μg.mL⁻¹). *Não avaliado.

A determinação do conteúdo de fenólicos foi avaliado pela técnica mais comumente empregada, a qual utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdico (H₃Mo₁₂PO₄₀) e fosfotúngstico (H₃W₁₂PO₄₀), no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺. Em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação destes metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica [136]. As frações acetato de etila (FAe) e alcaloídica (FRA) de *P. stenocalyx* apresentaram melhores resultados do que as demais frações com valores 235,87 e 158,41 mg AG / g amostra, respectivamente. Estes resultados também foram maiores do que os apresentados para a espécie *P. suterella*, onde os fenólicos estão mais concentrados nas frações acetato de etila e

alcaloídica com valores de 117,06 e 108,54 mg AG / g amostra, respectivamente. Estes valores podem ser considerados baixos quando comparados aos obtidos de espécies previamente estudadas em nosso grupo de pesquisas, como é o caso da espécie *Eugenia brasiliensis* (grumixama) [137], que apresentou um valor de 494,51 mg AG / g da fração acetato de etila.

Na literatura foram identificados alguns poucos alcaloides que apresentam grupos fenólicos no gênero *Psychotria*, como nas espécies *P. borucana* [60], *P. ipecacuanha* [56], *P. klugii* [36], *P. prunifolia* [37]. Não foi reportada na literatura a presença de alcaloides contendo grupos fenólicos nas espécies *P. suterella* e *P. stenocalyx*. Sendo assim, os valores de conteúdo de fenólicos obtidos para ambas as frações alcaloídicas pode representar um falso-positivo no teste uma vez que os alcaloides podem apresentar atividades antioxidantes que podem estar reduzindo os metais de molibdênio e tungstênio.

O conteúdo de flavonoides se fundamenta na formação de anéis estáveis de cinco e seis membros com o alumínio, proveniente do reagente $AlCl_3$, com os flavonoides presentes na amostra vegetal. A formação desse complexo entre o alumínio e o flavonoide provoca um deslocamento batocrômico (Figura 5). Desta maneira é possível determinar a quantidade de flavonoides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais, pois estes apresentam comprimentos de onda bastante inferiores se comparados com o complexo flavonoide-Al.

No teste que avalia o conteúdo de flavonoides, foram observados valores de 43,20 e 55,52 mg QUE / g EB e valores de 35,28 e 46,66 mg QUE / g fração INS, respectivamente, para as espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*. Estes valores são maiores do que os valores apresentados para o extrato bruto da espécie *Eugenia brasiliensis* [137], que apresentou um valor de 14,44 mg QUE / g de EB.

Para a espécie *P. stenocalyx*, os flavonoides estão mais concentrados na fração acetato de etila (FAe) com valor de 50,12 mg QUE / g, respectivamente. Para a fração acetato de etila da espécie *Eugenia brasiliensis* [137] foi observado um valor de 54,12 mg QUE / g. Estes resultados dão indícios da presença de flavonoides nesta espécie que não foram observados na marcha analítica, porém se fazem necessários estudos fitoquímicos neste sentido para identificação/quantificação, por exemplo através de técnicas hífenadas como HPLC-MS, por exemplo, comparando-se com padrões.

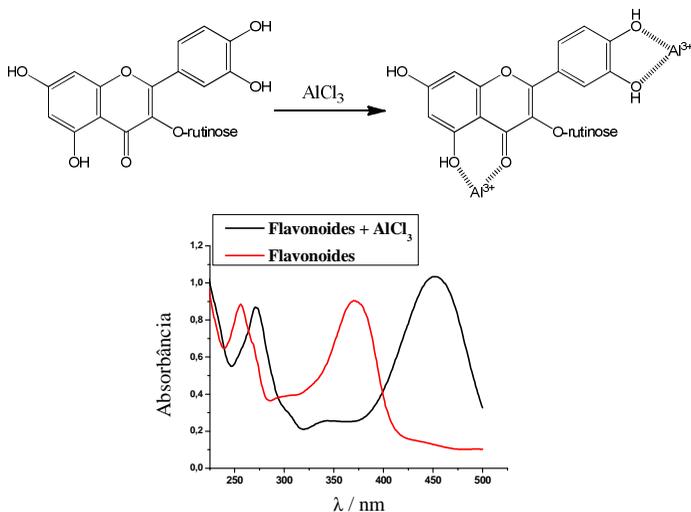


Figura 5. Formação do complexo entre Al³⁺ e um flavonoide (acima) e o deslocamento batocrômico provocado no espectro de UV/VIS

O outro teste aplicado para a avaliação da atividade antioxidante é o potencial redutor que se fundamenta na redução de íons férricos a íons ferrosos pela oxidação do substrato. Quando a amostra apresenta atividade redutora, esta reduz os íons ferricianeto (Fe³⁺) a ferrocianeto (Fe²⁺) que, por sua vez, formam um complexo com os íons ferro III, provenientes do FeCl₃, de coloração azul (azul da Prússia), o ferrocianeto férrico. Quanto maior a absorbância medida no espectrofotômetro UV/VIS a 720 nm, maior é o potencial redutor do substrato.

As frações acetato de etila (FAe) e alcaloídicas (FRA) das duas espécies apresentaram melhores resultados que as demais, sendo que a espécie *P. stenocalyx* apresentou valores de 516,51 e 755,15 mg AA / g amostra, respectivamente, e a espécie *P. suterella* apresentou valores de 234,54 e 486,26 mg AA / g amostra, respectivamente. Estes resultados podem ser considerados bons, mas ainda são menores que os obtidos para a *Eugenia brasiliensis* [137], que apresentou um valor de 834,99 mg AA / g para a fração acetato de etila.

Comparando-se os resultados obtidos para as frações acetato de etila das duas espécies de *Psychotria* observa-se que a espécie *P. suterella* apresenta um valor menor de conteúdos de fenólicos e flavonoides, o que reflete em um valor menor de poder redutor do que a FAe da espécie *P. stenocalyx*.

Radical livre é qualquer espécie capaz de existir contendo um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas de oxigênio (ERO), radicais livres de maior importância no organismo, incluem todos os radicais gerados a partir do oxigênio como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$); os radicais hidroxila ($\cdot OH$), alcóxila ($RO\cdot$) e peróxila ($ROO\cdot$). Espécies reativas incluem, não só os radicais, mas também intermediários neutros ou carregados (H_2O_2 e $ONOO^-$) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano (1O_2 , O_3 , Fe e Cu).

Os radicais livres atacam lipídios insaturados das biomembranas, iniciando o processo de peroxidação lipídica. Estes radicais podem também atacar o DNA, causando mutação, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer. A atividade antimutagênica de alguns antioxidantes deve-se, muitas vezes, à capacidade de capturarem radicais livres ou induzirem enzimas antioxidantes [138].

Existem evidências de que espécies reativas do metabolismo do oxigênio estejam envolvidas em uma série de doenças [139]. Em um processo inflamatório, por exemplo, ocorrem reações catalisadas por uma enzima chamada mieloperoxidase que utiliza H_2O_2 e íons haletos (normalmente Cl^-) para produzir hipohalitos, uma substância tóxica, que pode se decompor espontaneamente para produzir oxigênio singlete. O resultado dessas reações é a produção de hipoclorito (OCl^-) e oxigênio singlete (1O_2) [140]. Quando o processo inflamatório está muito exacerbado podem ocasionar danos ao tecido inflamado devido à presença das substâncias formadas, então os antioxidantes podem atuar convertendo-as em suas formas reduzidas.

Os extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* e as frações mais ativas foram submetidas ao teste que utiliza o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, DPPH, um radical livre relativamente estável, de forte coloração azul e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água. A ação sequestrante de radicais livres pelos compostos presentes na amostra deve-se a reação destes com o DPPH, o qual abstrai um átomo de hidrogênio de acordo com equação mostrada na Figura 6.

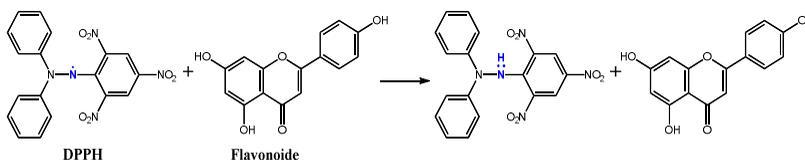


Figura 6. Reação entre um flavonoide e o radical livre DPPH

Os resultados da ação sequestrante foram expressos como a concentração efetiva 50 %, CE_{50} , concentração necessária para reduzir em 50 % a absorvância do DPPH. A espécie *P. stenocalyx* apresentou melhor ação sequestrante de radicais livres com valores de CE_{50} de 80,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato bruto e 22,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a fração alcaloídica. A espécie *P. suterella* apresentou valores de CE_{50} de 149,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato bruto e 37,74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a fração alcaloídica.

Moraes e colaboradores (2011) [32] desenvolveram estudos com os extratos brutos foliares de dez espécies do gênero *Psychotria*, dentre elas a *P. suterella*, dos quais foi avaliada a atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos brutos a 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e os resultados expressos em porcentagem de redução do radical livre e não em EC_{50} . A espécie *P. suterella* não foi considerada antioxidante, pois não foi eficaz no teste que avalia a atividade sequestrante de radicais livres apresentando redução de 52,19 % na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos brutos das espécies *P. racemosa*, *P. pubigera*, *P. capitata*, e *P. ruellifolia*, a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram melhores resultados com porcentagens de redução, respectivamente, de 83,08; 82,63; 82,3 e 80,41 %. Os autores também observaram que as dez espécies apresentam alcaloides do tipo 5,6-dihidro- β -carbolina, com maiores quantidades encontradas em *P. capitata* e *P. racemosa*, e as espécies *P. suterella* e *P. nuda* apresentam alcaloides do tipo monoterpene indólicos.

Formagio e colaboradores (2014) [141] desenvolveram um estudo com os extratos brutos das folhas das espécies *P. carthagenensis*, *P. leiocarpa*, *P. capillacea* e *P. deflexa* e encontraram bons resultados. Sendo que o melhor resultado para o conteúdo de fenólicos foi observado para o extrato bruto da espécie *P. capillacea* que obteve 148,42 mg AG / g extrato. O melhor conteúdo de flavonoides foi observado para a espécie *P. carthagenensis* que apresentou um valor de 182,07 mg QUE / g extrato. Todos os extratos apresentaram atividade sequestrante de radical livre DPPH sendo que a espécie com maior atividade foi a espécie *P. carthagenensis* com valor de CE_{50} de 16,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados observados para as frações acetato de etila e alcaloídicas das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* são incentivadores para o desenvolvimento de estudos de atividades biológicas relacionadas a doenças nas quais estejam envolvidos processos oxidativos, como o processo inflamatório. Com destaque para a fração alcaloídica da espécie *P. stenocalyx* que apresentou maior atividade redutora.

5.1.2. Atividade Alelopática

Alelopatia pode ser definida como um processo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados, afetando a germinação e o desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas podendo este efeito ser inibitório ou estimulante. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica específica de cada espécie.

Os extratos brutos de *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram testados nas concentrações de 0,25 – 2,0 g / 100 mL utilizando sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), *Raphanus sativus* L. (rabanete) e *Cucumis sativus* L. (pepino). O ensaio foi desenvolvido através da observação da germinação de sementes de dicotiledôneas assim como o desenvolvimento das plântulas.

Uma das sementes mais utilizadas são as sementes de alface devido ao seu período curto de germinação, sendo que a nova planta se desenvolve em poucos dias, de 3 a 5 dias. A observação do desenvolvimento da plântula é verificada medindo-se o tamanho do caulículo (hipocótilo) e radícula que também é um indicador do efeito inibitório ou estimulante do extrato da planta que se deseja testar.

Nas figuras a seguir estão apresentados os gráficos das porcentagens de inibições na germinação (Figura 7) e desenvolvimento de hipocótilo (Figura 8) e radícula (Figura 9) das sementes de alface, rabanete e pepino observados para os extratos brutos de *P. stenocalyx* e *P. suterella* em relação aos valores observados para os controles negativos (testemunha). Abaixo de cada gráfico são apresentados os valores das respectivas porcentagens de inibição, sendo que uma porcentagem negativa significa que a amostra estimulou a germinação ou desenvolvimento.

No teste de germinação das sementes de alface, os extratos de ambas as espécies inibiram em torno de 100 %. Das sementes que germinaram, ambos os extratos inibiram o desenvolvimento das plântulas em torno de 100 %, exceto para o extrato de *P. suterella* a 1,0 g / 100 mL que apresentou inibição de 85,6 % no crescimento do hipocótilo.

No teste de germinação das sementes de rabanete, o extrato de *P. stenocalyx* apresentou melhores valores de inibição na velocidade de germinação, 94,9 %, e no desenvolvimento de radícula e hipocótilo, 87,7 e 79,6 %, na concentração 2,0 g / 100 mL. O extrato de *P. suterella* apresentou melhores valores de inibição na velocidade de germinação, 93,2 %, e no desenvolvimento de radícula e hipocótilo, 82,5 e 82,5 %, na concentração 0,5 mg / 100 mL.

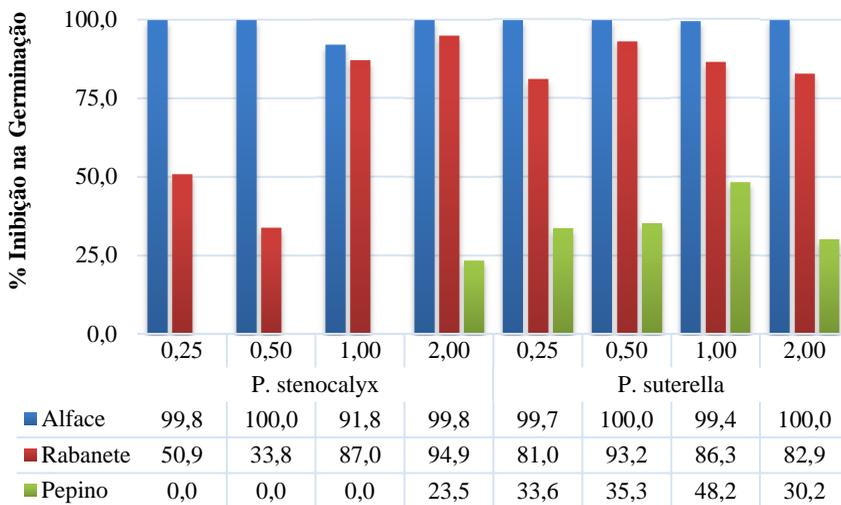


Figura 7. Gráfico de porcentagens de inibição, em relação aos controles, da germinação de sementes utilizando as sementes de alfaca, rabanete e pepino em função da concentração de extrato bruto das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*

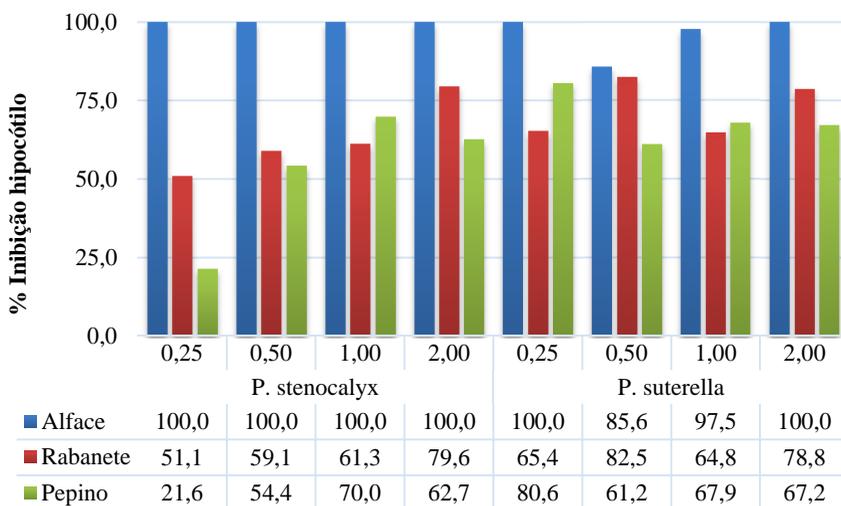


Figura 8. Gráfico de porcentagens de inibição, em relação aos controles, do desenvolvimento de hipocótilo utilizando as sementes de alfaca, rabanete e pepino em função da concentração de extrato bruto das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*

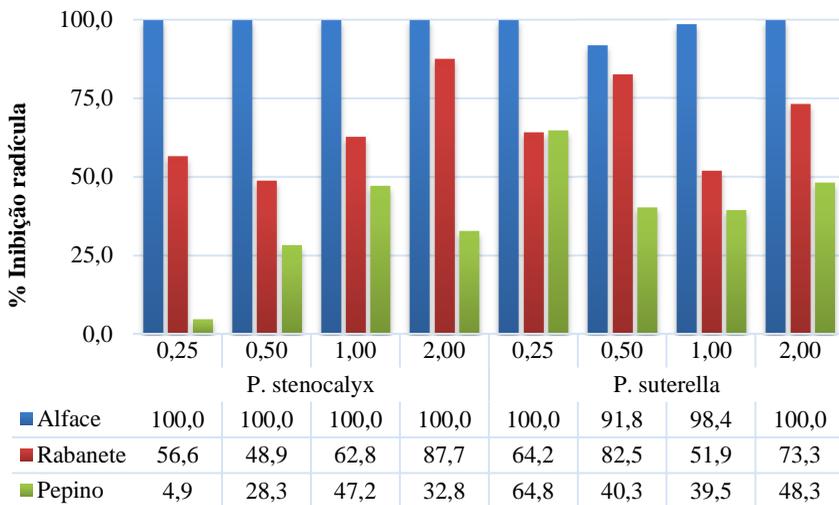


Figura 9. Gráficos de porcentagens de inibição, em relação aos controles, do desenvolvimento de radícula utilizando as sementes de alfaca, rabanete e pepino em função da concentração de extrato bruto das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*

No teste de germinação das sementes de pepino, o extrato de *P. stenocalyx* apresentou um comportamento mais estimulante do que inibitório. Na concentração de 0,25 g / 100 mL, foi observado uma porcentagem negativa significando que houve estímulo de 79,7 % na germinação. Este extrato apresentou inibição apenas na concentração 2,0 g / 100 mL, com valor de 23,5 %. Em relação ao desenvolvimento de radícula e hipocótilo o extrato apresentou maiores inibições na concentração 1,0 mg / 100 mL, com valores de 47,2 e 70 %, respectivamente.

O extrato de *P. suterella* apresentou melhor valor de inibição na velocidade de germinação das sementes de pepino na concentração 1,0 g / 100 mL com valor de 48,2 %. No desenvolvimento de radícula e hipocótilo, os maiores valores de inibição foram apresentados na concentração 0,25 g / 100 mL, cujos valores foram de 64,8 e 80,6 %, respectivamente.

Estes resultados mostram que, de uma maneira geral, os extratos brutos de ambas as espécies estudadas são fitotóxicos para todas as sementes testadas, porém as sementes de alfaca são mais sensíveis aos

aleloquímicos presentes nos extratos, seguidas pelas sementes de pepino e, por fim, pelas sementes de rabanete.

Correa e colaboradores (2008) [142] observaram boas atividades fitotóxicas nos extratos etanólicos de folhas e raízes e aquosos das folhas das espécies *Psychotria leiocarpa*, *P. brachyceras* e *P. umbellata*. As atividades alelopáticas foram avaliadas através da germinação e desenvolvimento de sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Chorisia speciosa* (paineira) e *Mimosa bimucronata* (maricá), sendo que os extratos da espécie *P. leiocarpa* apresentaram melhores resultados com inibições entre 77 e 100 % na germinação. Para estas três espécies foi reportada a presença alcaloides do tipo monoterpene indólicos [27, 61, 79].

Frescura e colaboradores (2013) [143] observaram atividade alelopática significativa para os extratos aquosos das folhas de *Psychotria brachypoda* e *P. birotula* avaliadas através da germinação e desenvolvimento de sementes de *Eruca sativa* (rúcula).

5.1.3. Atividade inibitória da enzima Acetilcolinesterase

A Doença de Alzheimer é uma enfermidade mais comum entre idosos e se apresenta como demência, ou perda de funções cognitivas (memória, orientação, atenção e linguagem). É uma doença considerada, até o presente momento, como incurável que se agrava ao longo do tempo, mas pode e deve ser tratada. Quase todas as suas vítimas são pessoas idosas. Talvez, por isso, a doença tenha ficado erroneamente conhecida como “esclerose” ou “caduquice” [144].

Em 1906, um médico chamado Dr. Alzheimer examinou o tecido cerebral de uma mulher que havia morrido por conta de uma doença mental desconhecida à época. Ele observou muitos blocos anormais (placas amiloides) e emaranhado de feixes de fibras (emaranhados neurofibrilares). Atualmente já é sabido que a presença de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares são as duas principais causas dos sintomas observados na doença de Alzheimer, pois causam perda neuronal associada com outros eventos prejudiciais relacionados com a idade, tais como aumento do stress oxidativo, metabolismo de energia reduzida e inflamação. Como terceira causa dos sintomas da doença, estudos indicaram a deficiência de diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina [145, 146].

Atualmente, os principais medicamentos licenciados para o tratamento da doença de Alzheimer atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase, AchE, como os fármacos sintéticos tacrina

(Cognex[®]), donepezil (Aricept[®]) e riastigmina (Exelon[®]) e o alcaloide natural galantamina (Reminyl[®]). Apesar destes fármacos serem bastante eficazes em reduzir os sintomas da doença, ainda são muito caros e podem apresentar efeitos colaterais como náuseas, vômitos, anorexia, etc. [147]. Sendo assim há uma grande demanda na busca de novas substâncias candidatas inibidoras da enzima acetilcolinesterase com baixa toxicidade.

Em 1961, Ellman e colaboradores descreveram um método fotocolorimétrico para a determinação da atividade anticolinesterásica [128]. O método baseia-se na medição indireta da taxa de produção de tiocolina a medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase. A tiocolina formada pela hidrólise reage com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico), produzindo um ânion de forte coloração amarela, o ácido 5-tio-2-nitro-4-tiobenzóico, conforme mostrado na Figura 10. A taxa de produção do ânion ácido 5-tio-2-nitro-4-tiobenzóico é observada em um espectrofotômetro UV/VIS em 405 nm e é diretamente proporcional à atividade da enzima e inversamente proporcional à atividade inibitória da amostra.

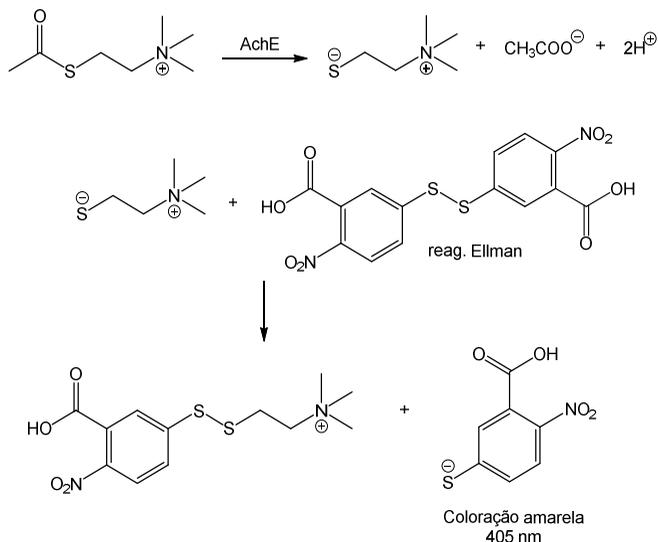


Figura 10. Sequência de reações envolvidas no método proposto por Ellman para detecção de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase por substâncias naturais

Os extratos brutos e as frações alcalóidicas das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram testados quanto a sua atividade inibitória

da enzima acetilcolinesterase. O teste foi feito em triplicata e as respectivas porcentagem de inibição enzimática são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos extratos brutos de *P. stenocalyx* e *P. suterella*

| Amostra | Inibição (%) |
|----------------------------|---------------------|
| <i>P. stenocalyx</i> – EB | 52,63 ± 5,0 |
| <i>P. stenocalyx</i> – FRA | 54,31 ± 6,3 |
| <i>P. suterella</i> – EB | 51,82 ± 5,0 |
| <i>P. suterella</i> – FRA | 63,58 ± 4,9 |
| galantamina | 74,44 ± 3,1 |

Na concentração de 1 mg.mL⁻¹ o extrato bruto de *Psychotria stenocalyx* apresentou uma inibição de 52,63% na atividade da enzima, um valor ligeiramente maior do que a inibição apresentada pelo extrato bruto de *Psychotria suterella*, que apresentou inibição de 51,82%. As frações alcaloídicas de ambas as espécies, na concentração de concentração de 1 mg.mL⁻¹, apresentaram inibições um pouco maiores que os extratos. A fração alcaloídica de *P. stenocalyx* inibiu a atividade da enzima em 54,31 % e a fração alcaloídica de *P. suterella* inibiu em 63,58 % a atividade da enzima, sendo esta última amostra a que apresentou maior inibição da enzima AchE. Como controle positivo foi utilizada uma solução preparada a partir do medicamento Reminyl® de maneira que a concentração do fármaco galantamina fosse de 0,1 mg.mL⁻¹. Esta solução controle apresentou inibição de 74,44% da enzima acetilcolinesterase.

Passos e colaboradores (2013) [45] reportaram as atividades inibitórias da enzima AchE para o extrato foliar e frações obtidas de cromatografia deste extrato para a espécie *Psychotria laciniata* assim como de treze alcaloides isolados de espécies do gênero *Psychotria* estudadas em seu grupo de pesquisas. O extrato e frações da espécie *P. laciniata* não foram considerados ativas na concentração avaliada de 40 µg.mL⁻¹. Dos alcaloides avaliados, pode-se os alcaloides monoterpeno

indólicos vallesiachotamina lactona (**11**), *E*-vallesiachotamina (**12**) e *Z*-vallesiachotamina (**13**) que inibiram a atividade da enzima AchE em 45,32 %, 47,03 % e 63 %, respectivamente. Estes alcaloides também foram identificados nas espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*, discutidas no presente trabalho.

A partir dos experimentos realizados pode-se observar que, apesar dos extratos brutos e frações alcaloídicas das espécies *Psychotria stenocalyx* e *Psychotria suterella* terem apresentado em geral uma inibição enzimática relevante, ainda é considerada uma atividade pouco promissora. Por outro lado, considerando que se tratam de extratos e frações devem ser desenvolvidos mais testes com os compostos isolados que podem apresentar potenciais inibitórios mais relevantes para esta enzima.

5.1.4. Atividade antimicrobiana

Várias espécies de bactérias já foram identificadas como causadoras de infecções, como hospitalares, o que faz com que elas sejam alvos de pesquisas de interesse na área médica. As bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* são exemplos de organismos amplamente estudados por sua patogenicidade, responsáveis por diversos tipos de infecções [148]. Os índices cada vez maiores de resistência destas bactérias frente às substâncias testadas, aumenta ainda mais a demanda de novas substâncias ativas e com baixa toxicidade.

Assim como as bactérias, os fungos também são de grande relevância no que tange às infecções hospitalares. Nos Estados Unidos, hospitais com sistema de vigilância operante notificaram espécies de *Candida* como sendo o 6º patógeno nosocomial (infecção hospitalar) e a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais. A alta incidência de infecções hospitalares causadas por fungos e bactérias resistentes justifica a preocupação na busca de substâncias que possam auxiliar no seu combate e/ou tratamento.

Atividade inibitória do crescimento bacteriano

O método utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de substrato capaz de inibir o crescimento bacteriano. Este ensaio utiliza a quantificação da atividade das enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração celular, ocorre a liberação de íons hidrogênio que reagem

com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazan [149, 150] evidenciando a presença de bactérias viáveis.

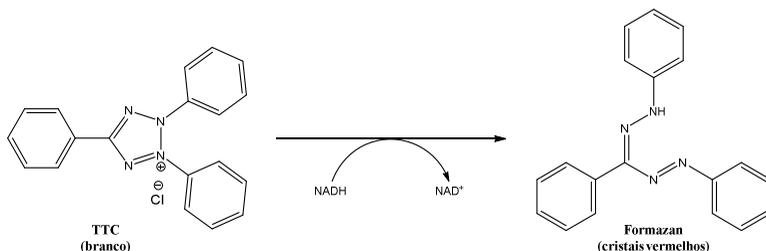


Figura 11. Esquema da reação do TTC (branco) produzindo o formazan (cristais vermelhos) em meio enzimático

Os extratos e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram usados para avaliar as atividades inibitórias do crescimento bacteriano e as concentrações inibitórias mínimas são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de CIM para extratos e frações das folhas de *P. stenocalyx* e *P. suterella* contra três bactérias

| Amostras / bactérias | | CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | | |
|-------------------------|-----|-------------------------------|-------------------------|----------------------|
| | | <i>S. aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| <i>P. stenocalyx</i> | EB | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| | INS | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| | FH | > 1000 | 1000 | > 1000 |
| | FAE | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| | FRA | > 1000 | > 1000 | 1000 |
| | FAq | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| <i>P. suterella</i> | EB | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| | INS | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| | FAE | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| | FRA | 1000 | > 1000 | 1000 |
| | FAq | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| Gentamicina | | 2,5 | - | 0,156 |

Para a classificação da atividade antibacteriana de extratos e frações vegetais é utilizado o critério proposto por Machado e colaboradores 2005 [151], onde as amostras que apresentam valores de

concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são classificados com atividade excelente, CIM entre 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com atividade boa, CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com atividade moderada, CIM entre 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com atividade fraca e CIM acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inativos.

Para a espécie *P. stenocalyx* apenas a fração hexano apresentou atividade contra a bactéria *E. coli* e a fração rica em alcaloides contra a bactéria *P. aeruginosa*, porém ambas consideradas atividades fracas de acordo com o critério supracitado. Para a espécie *P. suterella* apenas a fração rica em alcaloides apresentou atividade também considerada fraca contra as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*. Todas as demais amostras foram consideradas inativas contra todas as bactérias, pois apresentaram valores de CIM maiores do que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na literatura foi reportada atividade antibacteriana das frações polares do extrato da espécie *Psychotria reevesii* contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* atribuídas ao alto nível de taninos condensados, porém estas frações foram inativas contra a *E. coli* [75].

Liu e colaboradores (2016) [73] reportaram uma potente atividade inibitória do crescimento da bactéria *E. coli* para o alcaloide monoterpeneo indólico 16,17,19,20-tetrahidro-2,16-dehidro-18-deoxi-isoestriquinina (**63**), isolado da fração alcaloídica do extrato bruto das folhas de *Psychotria pilífera*, com CIM 0,781 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Atividade inibitória do crescimento fúngico

Os extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram avaliadas quanto as suas atividades antifúngicas pelo método colorimétrico do MTT. Neste método o MTT é metabolizado na mitocôndria do micro-organismo durante a respiração celular produzindo o formazan de que absorve em 530 nm sendo medido em espectrofotômetro (Figura 12).

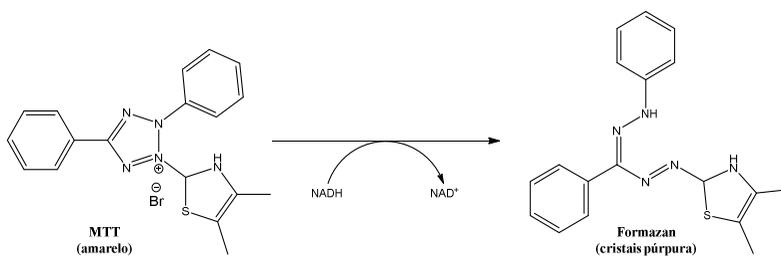


Figura 12. Esquema da reação do MTT (amarelo) produzindo o formazan (cristais púrpura) em meio enzimático

Os extratos brutos de *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram submetidos a uma triagem onde foram avaliadas as porcentagens de inibição do crescimento fúngicos na concentração 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, o extrato bruto da espécie *P. stenocalyx* apresentou inibição contra os micro-organismos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb 18*) nos valores de 8,7 %, 64,9 % e 100 %, respectivamente. Para o extrato da espécie *P. suterella* foi observada inibição contra os micro-organismos *C. krusei*, *C. tropicalis* e *PB 18* nos valores de 15,7 %, 56,8 % e 100 %. Para o restante dos micro-organismos não foi observada inibição, sendo os extratos considerados inativos.

Tabela 8. Porcentagens de inibição dos extratos brutos de *P. stenocalyx* e *P. suterella* contra leveduras patogênicas

| amostras | <i>P. stenocalyx</i> ^a | <i>P. suterella</i> ^a | Itraconazol ^b |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| <i>C. albicans</i> | 8,7 | 0,0 | 85,5 |
| <i>C. krusei</i> | 0,0 | 15,7 | 100 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 0,0 | 0,0 | 96,2 |
| <i>C. tropicalis</i> | 64,9 | 56,8 | 80 |
| <i>Cryp. neoformans</i> | 0,0 | 0,0 | 100 |
| <i>Cryp. Gattii</i> | 0,0 | 0,0 | 94,7 |
| <i>P. brasiliensis</i> | 100 | 100 | 100 |

^aAs amostras foram testadas na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. ^bFármaco de referência, utilizado na concentração de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ambos os extratos brutos foram considerados ativos contra o micro-organismo *P. brasiliensis*, pois apresentaram valor de inibição do crescimento microbiano maior que 70% e foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O extrato bruto de *P. stenocalyx* apresentou valor de CIM de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o extrato de *P. suterella* apresentou valor de CIM de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

De acordo com o critério proposto por Rios e Recio (2005) [152], extratos vegetais cujo valor de CIM for abaixo de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados ativos e abaixo de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados muito potentes. Desta forma os extratos brutos de *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram considerados ativos contra o micro-organismo *P. brasiliensis* e inativos contra os demais.

Giang e colaboradores (2007) [75] reportaram que o extrato bruto e frações polares de *Psychotria reevesii* foram considerados inativos contra os micro-organismos *Candida albicans* e *Candida stellatoidea*.

Foi reportada na literatura a atividade do extrato metanólico de *Psychotria spectabilis* contra os micro-organismos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* atribuídos à presença de cumarinas, diterpenos e flavonoides bioativos [77].

De uma maneira geral, os resultados demonstraram que os extratos de *P. stenocalyx* e *P. suterella* não são considerados ativos contra os micro-organismos de bactérias e fungos testados. As atividades reportadas na literatura para espécies do gênero foram atribuídas à presença de taninos condensados, diterpenos, cumarinas e flavonoides.

5.1.5. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é um evento defensivo complexo definido como a reação local que envolve o reconhecimento do agente ou do estímulo lesivo (físico, químico ou provocado por micro-organismos) para sua posterior destruição e recomposição dos tecidos e, às vezes, formação de um novo tecido. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis pela vasodilatação, extravasamento de líquido e migração de leucócitos [153]. O aspecto macroscópico do tecido inflamado é caracterizado por cinco sinais: calor, rubor, dor, edema e perda funcional.

Para enfrentar a invasão de um agente inflamatório o organismo pode recorrer a várias respostas de defesa e a organização destas constitui a reação inflamatória/imunológica. Um dos eventos iniciais da resposta imune inata consiste na atuação dos leucócitos (neutrófilos e monócitos)

no tecido inflamado, através da fagocitose do agente invasor. Este evento inicia-se com a aderência destes leucócitos ao endotélio vascular com posterior migração destes para o local onde se encontra o agente invasor, processo chamado de diapedese. Em seguida, os leucócitos o englobam formando uma “bolha” chamada fagossomo. Os neutrófilos possuem grânulos (organelas) chamados lisossomos que contêm, entre outras substâncias, a enzima mieloperoxidase, que catalisa reações para a formação de compostos bactericidas. Estes lisossomos fusionam-se ao fagossomo liberando seu conteúdo que inclui a enzima mieloperoxidase [153].

Foram testados os extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* nas doses de 100, 200 e 400 mg.kg⁻¹ de camundongos utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina. Através deste modelo foram feitas as quantificações de leucócitos totais e contagem diferencial entre polimorfonucleares e mononucleares nas amostras de lavado pleural.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13, para o extrato bruto de *P. stenocalyx*, e na Figura 14, para o extrato bruto de *P. suterella*. Nos gráficos, a barra em cinza-claro representa o grupo controle, animais pré-tratados com salina intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com salina (**S**); a barra em cinza-escuro representa o controle negativo, animais tratados com salina i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia com a carragenina (**Cg**); a barra com preenchimento pontilhado representa o grupo controle positivo, animais pré-tratados com dexametasona i.p. 0,5 mg.kg⁻¹ antes da indução da pleurisia com carragenina (**Dex**) e as barras brancas representam os grupos experimentais, animais pré-tratados com os extratos brutos das de *P. stenocalyx* e *P. suterella* i.p. nas doses de 100, 200 e 400 mg.kg⁻¹ antes da indução da pleurisia com a carragenina.

Em relação à migração celular, os extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* reduziram significativamente a migração total de leucócitos para a cavidade pleural dos animais testados com uma solução de carragenina a 1% em todas as doses testadas.

O extrato de *P. stenocalyx* apresentou melhor inibição na dose 200 mg.kg⁻¹ com redução de 57,1 % ± 5,2 (p < 0,001) na migração de leucócitos (Figura 13a). Esta redução foi devida à inibição de polimorfonucleares, cuja porcentagem foi de 57,3 % ± 5,1 (p < 0,01) na dose 200 mg.kg⁻¹ (Figura 13b). Como esperado, o grupo controle positivo, que foi pré-tratado com dexametasona 0,5 mg.kg⁻¹, também reduziu a migração de leucócitos em 62,1 % ± 2,7 (p < 0,001), devido à inibição de polimorfonucleares em 63,4 % ± 2,7 (p < 0,001) (Figura 13a).

O extrato de *P. suterella* apresentou melhor inibição na dose 400 mg.kg⁻¹ com redução na migração de leucócitos de 64,7 % ± 3,9 (p < 0,001) e, na dose de 200 mg.kg⁻¹, de 63,4 % ± 4,8 (p < 0,001) (Figura 14a). Esta redução foi devida a inibição polimorfonucleares em 56,9 % ± 6,9 e 64,8 % ± 4,8 (p < 0,01) nas doses 400 e 200 mg.kg⁻¹, respectivamente (Figura 14b). O grupo controle positivo, que foi pré-tratado com dexametasona 0,5 mg.kg⁻¹, também reduziu a migração de leucócitos em 62,1 % ± 2,7 (p < 0,001), devido à inibição de polimorfonucleares em 91,3 % ± 2,2 (p < 0,001) (Figura 14a).

A formação de exsudato foi significativamente reduzida pelo extrato bruto de *P. stenocalyx* apenas na dose de 400 mg.kg⁻¹, cuja inibição foi de 30,1 % ± 6,7 (p < 0,01) (Figura 13c). Como esperado, o grupo controle positivo pré-tratado com dexametasona 0,5 mg.kg⁻¹ também mostrou redução da formação de exsudato com inibição de 43,1 % ± 1,6 (p < 0,001) (Figura 13c).

A formação de exsudato não foi significativamente reduzida pelo extrato bruto de *P. suterella* (p > 0,05 em qualquer das doses testadas) (Figura 14c). Este resultado mostra que, nas doses testadas, este extrato não tem capacidade para inibir o extravazamento de fluido para a cavidade pleural dos camundongos testados com carragenina. Embora tenha sido relatado [32] que o extrato bruto de *P. suterella* pode ter atividade inibitória sobre a formação de óxido nítrico *in vitro* e este gás solúvel está intimamente relacionado com a formação de exsudato, outros mediadores inflamatórios, tais como prostanoídes, também podem desempenhar um papel central na formação de exsudato [154]. Como esperado, a dexametasona, na dose de 0,5 mg.kg⁻¹, inibiu a formação de exsudato na cavidade pleural de forma significativa com inibição de 43,1 % ± 1,6 (p < 0,01) (Figura 14a).

Moraes e colaboradores (2011) [32] estudaram os extratos brutos das folhas de dez espécies de *Psychotria* e demonstraram que o extrato de *P. suterella* foi o mais eficiente em inibir a produção de óxido nítrico em macrófagos obtendo um valor de CI₅₀ de 4,09 µg.mL⁻¹. Ao ser avaliada quanto à capacidade sequestrante de radicais livres, esta espécie não se mostrou muito eficaz sugerindo que a atividade inibitória de NO não está relacionada à eliminação de NO gerado, mas sim devido a uma inibição específica da atividade ou expressão da enzima óxido nítrico sintetase isoforma indutível, iNOS.

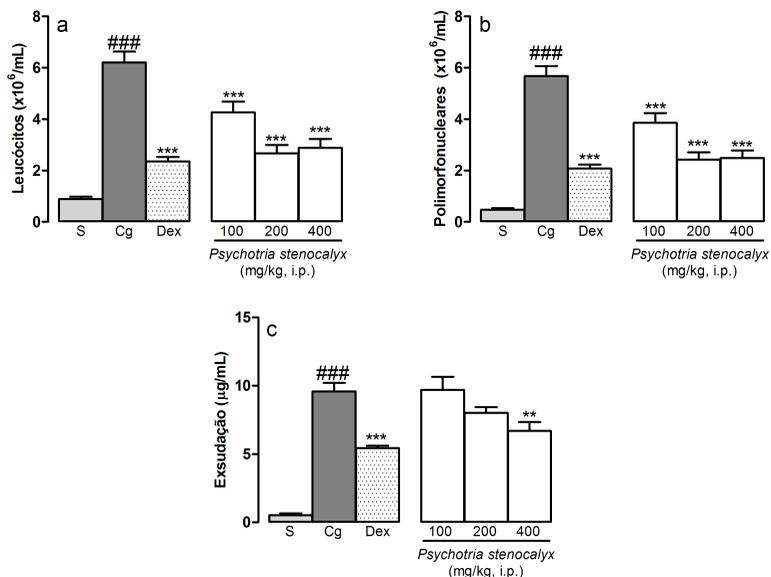


Figura 13. Efeito do extrato bruto das folhas de *Psychotria stenocalyx* (100-400 mg.kg⁻¹) quanto à (a) migração de leucócitos, (b) migração de polimorfonucleares e (c) concentração de exsudato quando administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina em camundongos.

S: grupo controle, animais pré-tratados com salina intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com salina; **Cg:** controle negativo, animais tratados com salina i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia com a carragenina; **Dex:** controle positivo, animais pré-tratados com dexametasona i.p. 0,5 mg.kg⁻¹ antes da indução da pleurisia com carragenina; ***Psychotria stenocalyx*:** grupos experimentais, animais pré-tratados com o extrato bruto de *P. stenocalyx* i.p. nas doses de 100 – 400 mg.kg⁻¹ antes da indução da pleurisia com carragenina. Os resultados são expressos em como as médias ± EPM. N = 6 animais/grupo.

** p < 0,01 em comparação com o grupo Cg

*** p < 0,001 em comparação com o grupo Cg

p < 0,001 em comparação com o grupo S

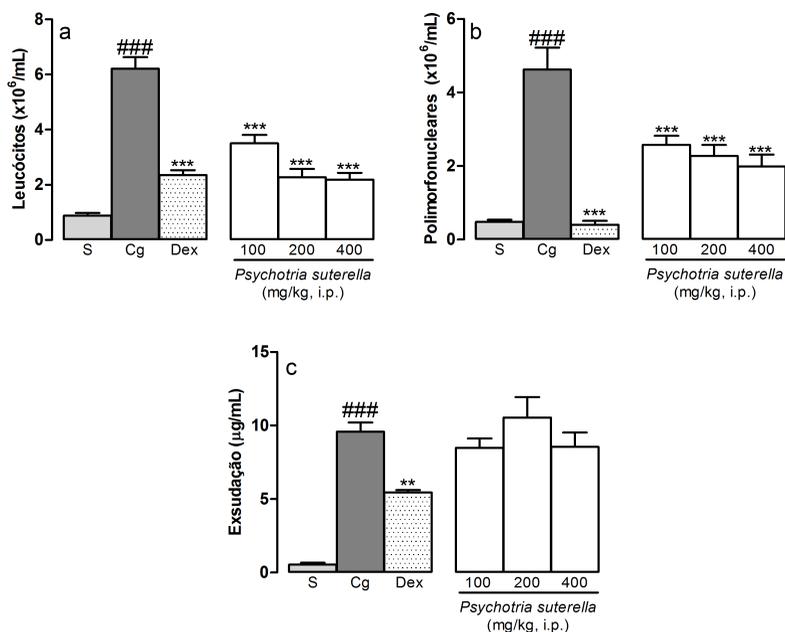


Figura 14. Efeito do extrato bruto das folhas de *Psychotria suterella* (100-400 mg.kg⁻¹) quanto à (a) migração de leucócitos, (b) migração de polimorfonucleares e (c) concentração de exsudato quando administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina em camundongos.

S: grupo controle, animais pré-tratados com salina intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com salina; **Cg:** controle negativo, animais tratados com salina i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia com a carragenina; **Dex:** controle positivo, animais pré-tratados com dexametasona i.p. 0,5 mg.kg⁻¹ antes da indução da pleurisia com carragenina; ***Psychotria suterella*:** grupos experimentais, animais pré-tratados com o extrato bruto de *P. suterella* i.p. nas doses de 100 – 400 mg.kg⁻¹ antes da indução da pleurisia com carragenina. Os resultados são expressos em como as médias ± EPM. N = 6 animais/grupo.

** p < 0,01 em comparação com o grupo Cg

*** p < 0,001 em comparação com o grupo Cg

p < 0,001 em comparação com o grupo S

Nascimento e colaboradores (2007) [25] e Gregianini e colaboradores (2003) [26] mencionaram que o alcaloide brachicerina (7), um alcaloide monoterpeneo indólico presente no extrato bruto das folhas de *Psychotria brachyceras*, mostrou atividade anti-inflamatória específica em testes de migração de leucócitos em ratos por meio de um ensaio de quimiotaxia (F. Farias & A. T. Henriques, dados não publicados). O alcaloide monoterpeneo indólico brachicerina (7) é bastante peculiar, pois é possivelmente derivado de 10-oxo-1-*epi*-loganina, diferentemente de todos os alcaloides monoterpeneo indólicos isolados das espécies estudadas no presente trabalho que são derivados da secologanina, para os quais não foram reportadas atividades anti-inflamatórias até o presente momento.

Iniyavan e colaboradores 2011 [28] reportaram uma redução de 73,54 % na inflamação induzida pela carragenina para o extrato dos frutos de *Psychotria nilgiriensis*. Porém, para esta espécie não foi reportada a presença de alcaloides.

Com base nos resultados obtidos, pode-se considerar que os extratos brutos de ambas as espécies se mostraram bons inibidores do processo inflamatório nos modelos estudados, sendo que a melhor dose para ambos foi de 400 mg.kg⁻¹, uma vez que esta dose foi capaz de inibir a migração celular e a formação de exsudato desencadeada pelo agente flogístico neste modelo de pleurisia. Por outro lado, considerando que testes com extratos brutos são de caráter preliminar, deve-se incentivar o desenvolvimento de ensaios mais detalhados envolvendo, especialmente, as frações acetato de etila e alcaloídica das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*, pois estas apresentaram melhores resultados nos testes antioxidantes.

5.2. Estudo fitoquímico das frações alcaloídicas utilizando técnicas hifenadas com HPLC

Esta etapa do trabalho foi executada com a aplicação da técnica HPLC-SPE-NMR, que apresenta uma unidade de extração em fase sólida automatizada (SPE) entre o equipamento de HPLC e o espectrômetro de NMR. Esta técnica apresenta a etapa de isolamento (*trapping*), onde são feitas sucessivas separações cromatográficas utilizando solventes não deuterados e os picos de interesse são capturados e concentrados nos respectivos cartuchos de SPE. Na etapa seguinte são executadas as eluições dos analitos dos cartuchos para os microtubos de NMR com solventes deuterados para serem adquiridos os espectros. A Figura 15 esquematiza as etapas de isolamento e eluição dos picos para os microtubos de NMR.

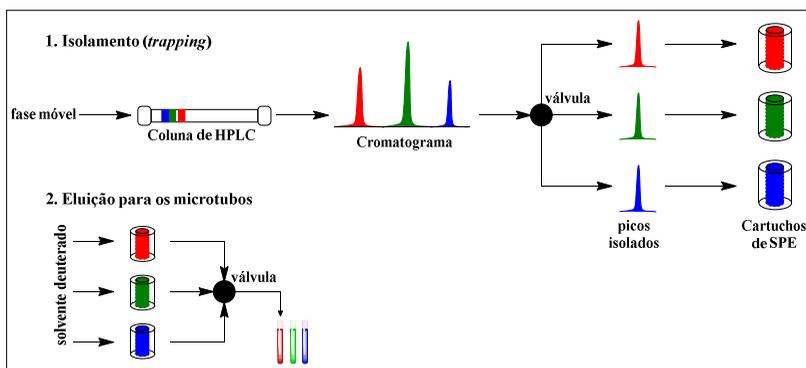


Figura 15. Esquema das etapas de (1) isolamento, *trapping*, e (2) transferência para os microtubos de NMR (imagem adaptada [107])

Para a elucidação estrutural dos alcaloides isolados foram utilizados espectros de massas de alta resolução, espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura através do *Scifinder*[®]. A seguir serão discutidas, de forma mais detalhada, as separações cromatográficas, os isolamentos e as elucidações estruturais dos alcaloides das espécies *P. rhytidocarpa* e *P. suterella*. Em seguida será feito um estudo fitoquímico comparativo por HPLC-HRMS envolvendo frações alcaloídicas das espécies *P. rhytidocarpa*, *P. suterella* e *P. stenocalyx*.

5.2.1. Isolamento e elucidação estrutural dos alcaloides da fração alcaloídica da espécie *Psychotria rhytidocarpa* através de HPLC-HRMS-SPE-ttNMR

A amostra foi preparada dissolvendo-se 71,0 mg da fração rica em alcaloides de *P. rhytidocarpa* em 1,0 mL de metanol e filtrada utilizando microfiltro de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro. Antes de iniciar o procedimento de isolamento foi feita a otimização do método de separação em equipamento HPLC Agilent serie 1200, utilizando uma coluna C₁₈ (Phenomenex, 150 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å) mantida a 40 °C. O solvente aquoso, A, consistiu de 95 % H₂O + 5 % MeCN e o solvente orgânico, B, de 5 % H₂O + 95 % MeCN, ambos acidificados com 0,1 % de ácido fórmico (v/v). O fluxo foi mantido em 0,5 mL.minuto⁻¹, volume de injeção de 15 µL. Inicialmente foi aplicado um método exploratório de 0-100 %B em 60 minutos. O método otimizado iniciou-se com 10 %B, aumentando em gradiente até 100 %B no minuto 35, mantendo-se por 5 minutos. No minuto 41 reduziu-se a 10 %B e manteve-se por 10 minutos para recondicionamento da coluna.

O método otimizado foi reproduzido no equipamento de HPLC-HRMS-SPE-ttNMR, utilizando método de ionização *electrospray* – ESI em modo positivo e em analisador de massas por tempo de vôo (*time of flight* – TOF), em uma análise *pre-trapping* para serem programados os picos a serem isolados através do método *threshold* aplicado aos cromatogramas a 254 nm ou 280 nm de acordo com a necessidade. O método *threshold* consiste em estabelecer limites de absorbâncias, em diferentes intervalos de tempo no cromatograma, onde são coletados os picos assim que ultrapassarem este limite. Em seguida, são executadas dez sucessivas separações nas quais os picos selecionados vão sendo coletados e concentrados nos respectivos cartuchos de SPE previamente condicionados com 500 µL de acetonitrila seguido de 500 µL de H₂O. A Figura 16 apresenta o cromatograma da separação extraído a 254nm identificando os picos isolados através de números.

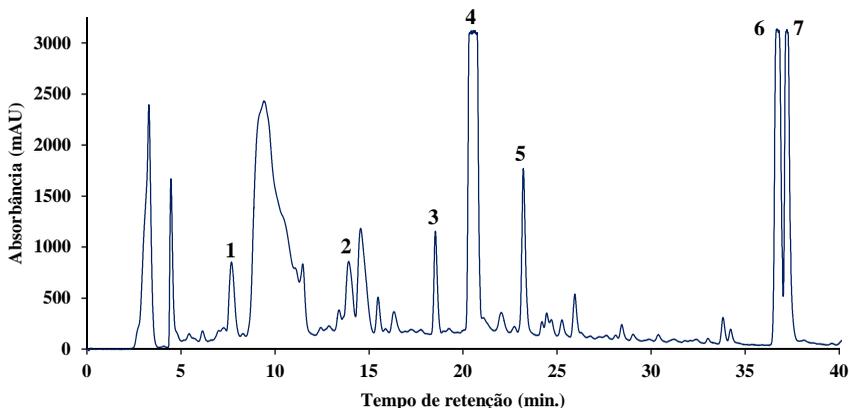


Figura 16. Cromatograma extraído a 254 nm da separação executada na fração rica em alcaloides do extrato bruto de *P. rhytidocarpa* através da técnica hifenada HPLC-HRMS-SPE- μ NMR

O cromatograma total (TIC – *total ion chromatogram* e UV/VIS) foi analisado através do software *ESI COMPASS – Data Analysis 4.2* da Bruker. De cada pico do cromatograma foi extraído o espectro de massas de alta resolução do qual foram obtidas as respectivas massas exatas. Foi obtido do próprio software as fórmulas moleculares com os respectivos erros entre massa calculada e obtida experimentalmente. Foram feitas buscas na literatura através do *Scifinder*[®] utilizando as fórmulas moleculares obtidas e refinando os resultados desta busca com fragmentos da molécula identificados pelos espectros de NMR.

Analisando a região de campo baixo dos espectros de NMR de ^1H dos compostos isolados foi possível observar, em todos eles, um padrão de dois dupletos seguidos de dois tripletos que são característicos dos hidrogênios aromáticos do anel benzênico do grupo indol presente nos alcaloides monoterpênicos indólicos, na porção do esqueleto proveniente da triptamina, conforme mostrado na Figura 17.

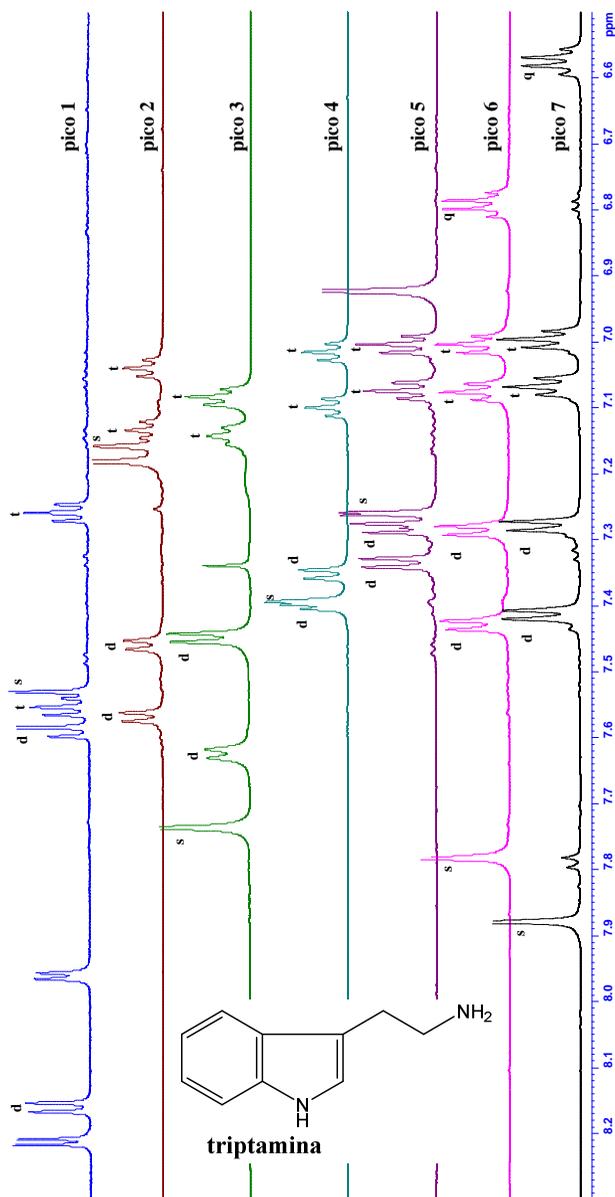


Figura 17. Sobreposição dos espectros de NMR ^1H dos picos isolados de *P. rhytidocarpa* por HPLC-SPE. (as letras indicadas próximas aos picos referem-se às multiplicidades dos sinais, sendo d=duplete, q=quarteto, s=simpleto e t=tripleto)

Também apresentaram sinais que indicam a presença da porção do iridoide secologanina, como um simpleto em campo baixo nos espectros de todos os picos, um duplo-triplete e dois dupletos nos picos de 1 a 5 ou um quarteto e um duplete nos picos 6 e 7, conforme será discutido a seguir, evidenciando que todos eles são alcaloides do tipo monoterpene indólicos. Os estudos de elucidação estrutural foram iniciados pelos compostos majoritários devido à qualidade superior dos espectros obtidos e para que seus espectros auxiliem na elucidação dos minoritários.

Elucidação estrutural do pico 4

O pico 4 foi coletado através do modo HPLC-SPE no intervalo de 20,3 a 21,0 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 499,2083 calculado para $[M+H]^+$ $C_{26}H_{31}N_2O_8^+$ (499,2075 com erro de 1,6 ppm). O espectro de UV apresentou três bandas com comprimentos de onda máximos em 224, 280 e 350 nm. Os espectros de UV e de massas de alta resolução são apresentados no Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente. Somente este pico foi coletado em quantidade suficiente para se obter um espectro de NMR de ^{13}C , no qual foi confirmado o número de carbonos na molécula devido à presença de 26 picos bem definidos (Apêndice 3). Dos carbonos hidrogenados, o espectro de correlação bidimensional HSQC mostrou a presença de 5 sinais de carbonos do tipo CH_2 e mais 15 sinais de carbonos hidrogenados do tipo CH (Apêndice 4).

No espectro de NMR de 1H , disponível no Apêndice 5, fica evidente o padrão de sistema de anel indólico com dois dupletos largos centrados em δ_{H9} 7,38 e δ_{H12} 7,33 ppm com constantes de acoplamentos de $J_{9-10} = 7,7$ e $J_{11-12} = 8,1$ Hz atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 e C12, respectivamente, apresentando constantes de acoplamento do tipo *orto* com os duplo-dupletos duplos centrados em δ_{H10} 7,00 e δ_{H11} 7,08 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 e C11 que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento do tipo *orto* $J_{10-11} = 7,0$ Hz e do tipo *meta* no valor de $J_{10-12} = 0,8$ Hz e $J_{9-11} = 1,0$ Hz. Esses acoplamentos foram atribuídos com base no espectro de correlação homonuclear bidimensional H-H, COSY, disponível no Apêndice 6. Através do espectro de correlação HSQC foi possível atribuir os sinais dos carbonos C9, C10, C11 e C12 como sendo δ_{C9} 118,8, δ_{C10} 120,3, δ_{C11} 122,6 e δ_{C12} 112,4 ppm, respectivamente.

No espectro HSQC foram observados dois sinais de carbonos metilênicos em δ_{C5} 44,89 e δ_{C6} 22,26 ppm atribuídos, respectivamente, aos C5 e C6 provenientes da porção triptamina da molécula, assim como

seus respectivos pares de hidrogênios. Analisando o HSQC foi identificado um duplo-dupletos duplo centrado em $\delta_{H_{5a}}$ 3,08 ppm e um duplo-dupletos duplo centrado em $\delta_{H_{5b}}$ 4,94 ppm, com acoplamento geminal de $J_{5a-5b} = 12,6$ Hz correlacionados ao sinal do C5. Para o sinal do C6 foi identificado um duplo-dupletos duplo centrado em $\delta_{H_{6a}}$ 2,67 ppm acoplado ao multipletos centrado em $\delta_{H_{6b}}$ 2,94 ppm com $J_{6a-6b} = 13,4$ Hz. Estes hidrogênios metilênicos apresentam acoplamentos vicinais $J_{5a-6a} = 4,6$ Hz, $J_{5a-6b} = 12,2$ Hz e $J_{5b-6b} = 5,7$ Hz confirmados no espectro COSY. Não foi observado acoplamento entre os hidrogênios H_{5b} e H_{6a} , o que pode indicar um ângulo muito próximo de 90° entre as ligações C– H_{5b} e C– H_{6a} , de acordo com o diagrama de Karplus [155]. Os sinais destes hidrogênios metilênicos apresentam um comportamento coincidente com um padrão de multiplicidades esperado para um sistema AA'BB' do tipo gauche estrelado. A proximidade com o nitrogênio N4 promove uma desblindagem pelo efeito indutivo no carbono C5 assim como nos hidrogênios H_{5a} e H_{5b} , porém a diferença de deslocamentos químicos entre estes hidrogênios pode ser explicada pelo efeito da anisotropia diamagnética da carbonila C22 [156] que causa uma desblindagem no hidrogênio H5b (Figura 18a), associado ao efeito da hiperconjugação, doação eletrônica do orbital sp^3 não ligante do nitrogênio N4 para o orbital antiligante (σ^* -LUMO) da ligação C– H_{5a} , estando estes em posição *anti* entre si, resultando em uma blindagem neste hidrogênio [157] (Figura 18b).

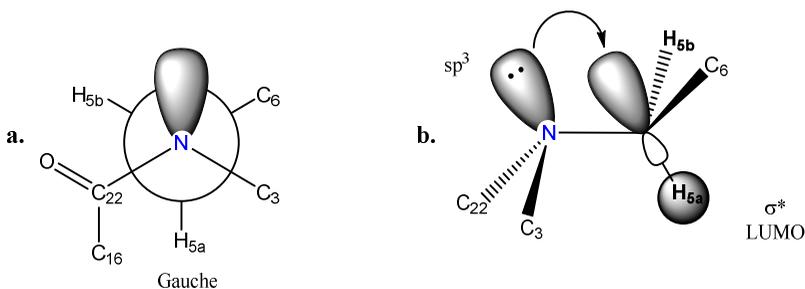


Figura 18. Esquema que mostra (a) a proximidade do H_{5a} com a carbonila C22 e (b) o efeito de doação eletrônica do par isolado do orbital sp^3 do nitrogênio N4 para o orbital molecular antiligante (LUMO – σ^*) da ligação C5– H_{5a}

O espectro bidimensional COSY mostrou uma correlação do hidrogênio H_{6b} com um multipletos centrado em δ_{H_3} 5,04 ppm, sinal de hidrogênio ligado ao carbono δ_{C_3} 55,24 ppm de acordo com o HSQC,

atribuído ao C3. Este hidrogênio H3 também apresentou correlação no COSY com o duplo-dupletto duplo centrado em $\delta_{H_{14a}}$ 2,03 ppm ($J_{3-14a} = 5,1$ Hz) e com o duplo-dupletto duplo $\delta_{H_{14b}}$ 2,45 ppm ($J_{3-14b} = 2,0$ Hz), ambos ligados ao metileno em $\delta_{C_{14}}$ 27,49 ppm no HSQC e apresentando acoplamento geminal $J_{14a-14b} = 14,0$ Hz.

Através das constantes de acoplamentos e com a ajuda de simulações utilizando o software FOMSC3 foi possível propor as multiplicidades para o H3 como sendo duplo-dupletto duplo e para o H6b como sendo duplo-duplo-dupletto duplo. A Figura 19a mostra os espectros simulados em comparação com as regiões ampliadas do espectro experimental para o multipletto atribuído ao H3 e a Figura 19b mostra a comparação para os multipletos sobrepostos H6b da porção triptamina e o H2' da glicose.

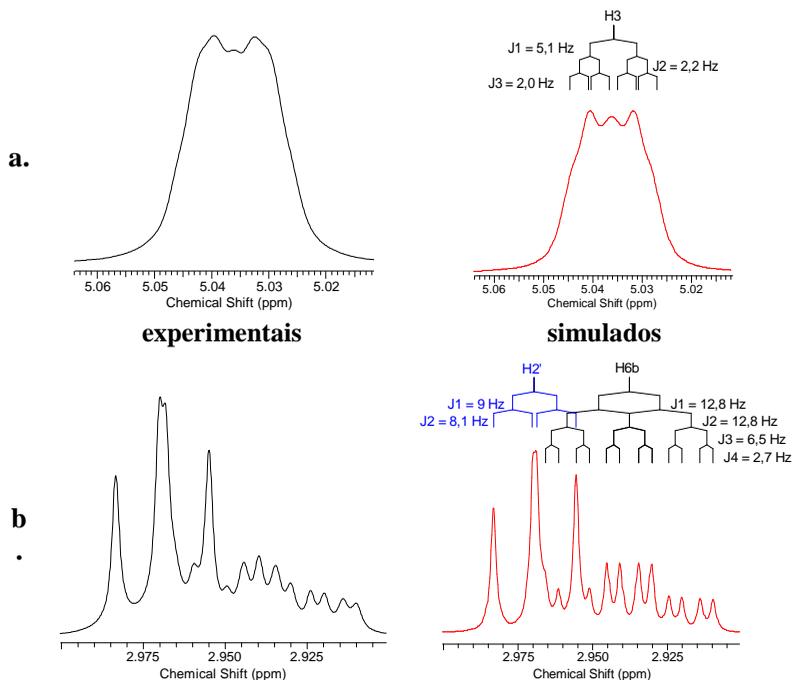


Figura 19. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente para o sinal do hidrogênio (a) H3 e os sinais hidrogênios sobrepostos (b) H2'/H6b e os simulados através do software FOMSC3 (pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*)

Na região de campo baixo do espectro de NMR de ^1H observa-se outro grupo de sinais que é característico da porção secologanina nos alcaloides monoterpene indólicos, que no espectro bidimensional HSQC correspondem aos sinais $\delta_{\text{C}17}$ 149,29 ppm, $\delta_{\text{C}18}$ 120,67 ppm e $\delta_{\text{C}19}$ 134,48 ppm, atribuídos aos carbonos C17, C18, C19. O hidrogênio H17 apresenta um duplete centrado em $\delta_{\text{H}17}$ 7,37 ppm ($J_{17-15} = 2,4$ Hz). Os hidrogênios do grupo alceno terminal H18a, H18b e H19 apresentam no espectro um grupo de sinais coincidente com o esperado para um padrão ABX. Para este grupo alceno são observados os duplo-dupletos centrados em $\delta_{\text{H}18\text{a}}$ 5,32 e $\delta_{\text{H}18\text{b}}$ 5,37 ppm, com acoplamento do tipo geminal de $J_{18\text{a}-18\text{b}} = 1,6$ Hz e acoplamentos do tipo vicinal *cis* com $J_{18\text{a}-19} = 10,1$ Hz e vicinal *trans* com $J_{18\text{b}-19} = 17,1$ Hz, e um duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}19}$ 5,65 ppm, apresentando acoplamento de $J_{19-20} = 10,0$ Hz com seu vizinho hidrogênio metínico H20.

O multiplete atribuído ao hidrogênio H20 apresenta-se no espectro sobreposto com o sinal do H6a e está centrado em $\delta_{\text{H}20}$ 2,69 ppm acoplando, além do H19, com o duplete centrado em $\delta_{\text{H}21}$ 5,40 ppm ($J_{20-21} = 1,7$ Hz) atribuído ao H21 e com o multiplete centrado em $\delta_{\text{H}15}$ 2,79 ppm ($J_{20-15} = 5,4$ Hz) atribuído ao H15. O espectro bidimensional COSY confirmou os acoplamentos supracitados sendo importante salientar que também confirmou o acoplamento de longa distância, com 4J , do hidrogênio alílico H15 com o olefínico H17 (duplete com $J_{15-17} = 2,4$ Hz).

Após a simulação através do FOMSC3 foi possível atribuir ao sinal do hidrogênio H15 a multiplicidade de duplo-duplo-duplete duplo com os acoplamentos $J_{15-17} = 2,4$ Hz, $J_{14\text{b}-15} = 4,6$ Hz, $J_{15-20} = 5,4$ Hz e $J_{14\text{a}-15} = 13,8$ Hz. De acordo com o diagrama de Karplus, um acoplamento vicinal próximo de 14 Hz sugere um ângulo diedro muito próximo de 180° entre os hidrogênios H15 e H14a. A Figura 20a mostra um comparativo dos espectros simulados, utilizando as constantes de acoplamento dos hidrogênios vizinhos, para os sinais dos hidrogênios H15 e a Figura 20b mostra esta comparação para o sinal do hidrogênio H20 sobreposto com o H6a em relação às respectivas regiões do espectro experimentais ampliados.

No espectro de NMR de ^1H foi observado um duplete centrado em $\delta_{\text{H}1'}$ 4,58 ppm com constante de acoplamento de $J_{1'-2'}$ = 8,0 Hz, no espectro bidimensional HSQC apresentou correlação com o sinal $\delta_{\text{C}1'}$ 100,65 ppm. Estes deslocamentos químicos são característicos de CH anomérico em açúcar e uma constante de acoplamento típica de β -glicosídeo, ou seja, apresenta acoplamento do tipo axial-axial entre H1'-H2'. Os espectros de correlação bidimensional indicam que este β -

glicosídeo está ligado ao alcaloide através do C21 (δ_{C21} 98,23 ppm) devido à correlação mútua C21–H1' e C1'–H21 no HMBC (Apêndice 7) e H21–H1' no NOESY (Apêndice 8). O H2' foi atribuído ao duplo-dupleto centrado em $\delta_{H2'}$ 2,97 ppm devido à correlação H1'–H2' encontrada nos espectros COSY, NOESY e C1'–H2' no HMBC.

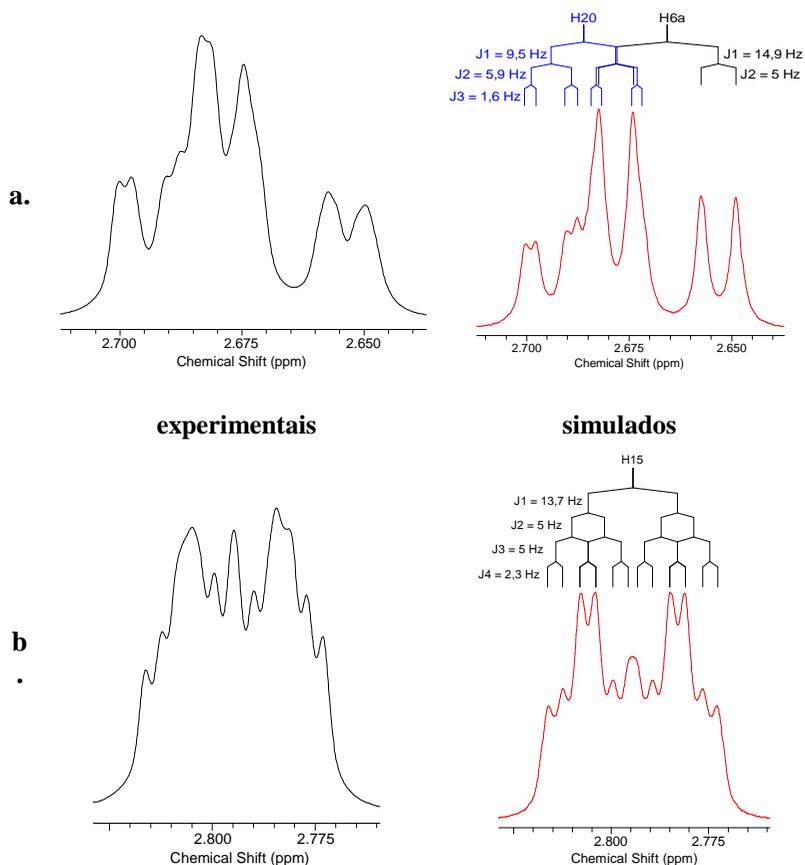


Figura 20. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente para os sinais de hidrogênios sobrepostos (a) H20/H6a e do sinal do (b) H15 e os simulados através do software FOMSC3 (pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*)

O sinal do H2' apresenta correlação no HMBC com um sinal de carbono próximo de δ_c 78 ppm. No espectro HSQC os sinais de carbonos

δ_C 78,35 e δ_C 78,09 ppm apresentam-se correlacionados a um multipletto centrado em δ_H 3,26 ppm com integral relativa a dois hidrogênios sobrepostos. Nos espectros bidimensionais COSY e NOESY foi observada correlação deste multipletto com os sinais dos hidrogênios hidroximetílicos presentes na glicose, o duplo-dupletto centrado em $\delta_{H6'a}$ 3,63 e $\delta_{H6'b}$ 3,86 com acoplamento geminal de $J_{6'a-6'b} = 11,9$ Hz. Estas informações indicam que o multipletto em questão é formado pela sobreposição dos sinais atribuídos aos hidrogênios H3' e H5' que devem apresentar multiplicidades duplo-dupletto e duplo-dupletto duplo, respectivamente. A Figura 21 mostra a comparação entre o espectro simulado usando o FOMSC3 e o experimental que confirmou as multiplicidades esperadas. A deformação no pico experimental em relação ao simulado é causada pelo chamado “efeito telhado”, do inglês *roof effect*, e pode ser explicada pela proximidade do sinal do H3' com os sinais dos hidrogênios que ele acopla, H2' e H4'.

Após a simulação ficou mais fácil identificar que o duplo-dupletto centrado em $\delta_{H3'}$ 3,26 ppm atribuído ao H3' apresenta um acoplamento de $J_{2'-3'} = 9,0$ Hz com o H2' e $J_{3'-4'} = 9,1$ Hz com o H4', um duplo-dupletto centrado $\delta_{H4'}$ 3,19 ppm. Para o duplo-dupletto duplo centrado em $\delta_{H5'}$ 3,27 ppm atribuído ao H5' foi atribuído o acoplamento $J_{4'-5'} = 9,4$ Hz com o H4' e os acoplamentos $J_{5'-6'a} = 5,7$ Hz e $J_{5'-6'b} = 2,2$ Hz com os hidrogênios H6'a e H6'b, respectivamente.

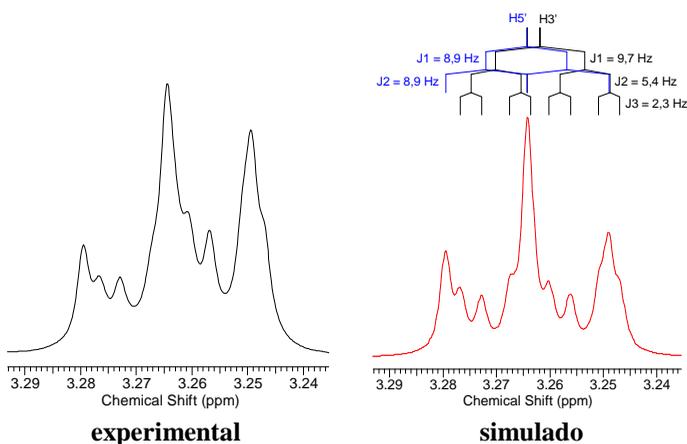


Figura 21. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente para os multipletos sobrepostos H3' e H5' e os simulados através do software FOMSC3 (pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*)

Os sinais dos carbonos não hidrogenados foram atribuídos através do espectro de correlação bidimensional HMBC (Apêndice 7) e comparação com dados na literatura [158]. O sinal de carbono em δ_{C8} 128,84 ppm foi atribuído ao C8 por apresentar correlação com os sinais dos hidrogênios H10 e H12 com 3J . O sinal em δ_{C13} 137,91 ppm foi atribuído ao carbono C13 devido às correlações com os sinais dos hidrogênios H9 e H11 com 3J . O sinal em δ_{C2} 134,90 ppm apresentou correlações com os sinais dos hidrogênios H6a e H14a com 3J , por isso foi atribuído ao C2. O sinal de carbono em δ_{C7} 110,46 ppm apresentou correlação apenas com o sinal do hidrogênio H6b com 2J e foi atribuído ao C7 completando a elucidação da porção triptamina do alcaloide. Os sinais restantes, que devem pertencer à porção secologanina do alcaloide, foram os sinais de carbono em δ_{C16} 109,39 ppm e δ_{C22} 167,23 ppm. O primeiro é atribuído ao carbono C16, apresentando apenas a correlação com o H17 com 2J , e o segundo é atribuído à carbonila C22 apresentando as correlações com os sinais dos hidrogênios H5a, H15 e H17 todos com 3J .

A Figura 22 e a Figura 23 mostram as representações das correlações homonucleares H-H observadas no espectro COSY com os respectivos valores de constante de acoplamento através de setas vermelhas assim como as correlações mútuas C21–H1' e C1'–H21 observadas no espectro HMBC, confirmando a posição na qual a glicose está ligada ao alcaloide.

Todas as informações espectrométricas acima discutidas e comparadas com dados da literatura [45, 158] não deixam dúvidas de que a estrutura do composto isolado como pico 4 se trata da strictosamida (32).

Este alcaloide já isolado anteriormente em espécies de *Psychotria*. Na literatura foram encontrados relatos da presença deste alcaloide, no gênero *Psychotria*, para as espécies *P. bahiensis* [59], *P. laciniata* [46], *P. nuda* [72], *P. pilifera* [73], *P. prunifolia* [74] e *P. suterella* [46, 103].

Todos os dados obtidos através da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR de 1H e ^{13}C com o auxílio das simulações em FOMSC3 supracitadas foram compilados e são mostrados na Tabela 9. Os dados da literatura utilizados na comparação estão disponíveis no Anexo 1 para NMR de ^{13}C e no Anexo 2 para NMR de 1H . No Anexo 5 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

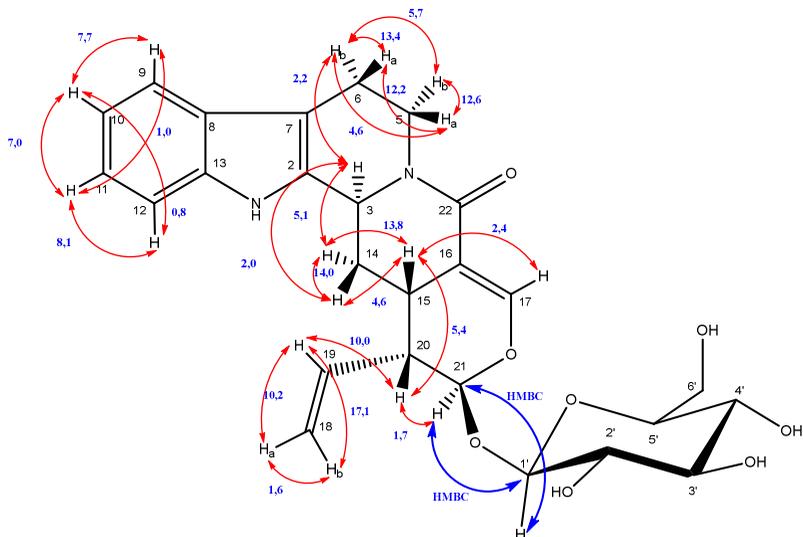


Figura 22. Representação, através de setas vermelhas, das correlações homonucleares H-H observadas no espectro COSY com os respectivos valores de constante de acoplamento e, através de setas azuis, das correlações mútuas C21-H1' e C1'-H21 observadas no espectro HMBC para a aglicona da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*

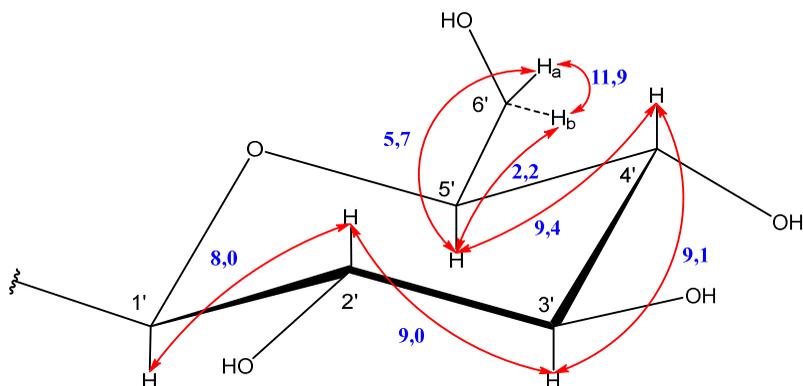


Figura 23. Representação, através de setas vermelhas, das correlações homonucleares H-H observadas no espectro COSY com os respectivos valores de constante de acoplamento para o β -glicosídeo da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*

Tabela 9. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³C* | ¹H | COSY | NOESY | HMBC ²J, ³J |
|-----------|------------------------|---|--------------------------------|------------------------|--|
| 2 | 134,90 | - | - | - | H6a, H14a |
| 3 | 55,24 | 5,04 (ddd; 5,1; 2,2; 2,0; 1H) | H6b, H14a, H14b | - | H14a, H5b |
| 5 | 44,89 | (a) 3,08 (ddd; 12,6; 12,2; 4,6; 1H) (b) 4,94 (dd; 12,6; 5,7; 1H) | H5b, H6a, H6b H5a, H6b | H5b H5a | H3, H6a, H6b |
| 6 | 22,26 | (a) 2,67 (dd; 13,4; 4,6; 1H) (b) 2,94 (dddd; 13,4; 12,2; 5,7; 2,2; 1H) | H5a, H6b H3, H5a, H5b, H6a | H5a H5b | H5a, H5b |
| 7 | 110,46 | - | - | - | H6a |
| 8 | 128,84 | - | - | - | H10, H12 |
| 9 | 118,82 | 7,38 (dl; 7,7; 1H) | H10, H11 | H10 | H11 |
| 10 | 120,29 | 7,00 (ddd; 7,7; 7,0; 0,8; 1H) | H9, H11, H12 | H9 | H12 |
| 11 | 122,63 | 7,08 (ddd; 8,1; 7,0; 1,0; 1H) | H9, H10, H12 | - | H9 |
| 12 | 112,41 | 7,33 (dl; 8,1; 1H) | H10, H11 | - | H9, H10, H11 |
| 13 | 137,91 | - | - | - | H9, H11 |
| 14 | 27,49 | (a) 2,03 (ddd; 14,0; 13,8; 5,1; 1H) (b) 2,45 (ddd; 14,0; 4,6; 2,0; 1H) | H3, H14b, H15 H3, H14a, H15 | H14b, H15 H14a, H15 | H3 |
| 15 | 25,09 | 2,79 (dddd; 13,8; 5,4; 4,6; 2,4; 1H) | H14a, H14b, H17, H20 | H14a, H14b, H17 | H3, H14a, H17, H21 |

| | | | | | | |
|-----------|--------|--|------------------------|--------------|--------------|------------------------------|
| 16 | 109,39 | - | - | - | - | H17 |
| 17 | 149,29 | 7,37 (d; 2,4; 1H) | H15 | H15 | H15 | H21 |
| 18 | 120,67 | (a) 5,32 (dd; 10,2; 1,6; 1H) (b) 5,37 (dd; 17,1; 1,6; 1H) | H19 H19 | - | - | H20 |
| 19 | 134,48 | 5,65 (ddd; 17,1; 10,2; 10,0; 1H) | H18a, H18b, H20 | - | - | H20 |
| 20 | 44,92 | 2,69 (ddd 10,0; 5,4; 1,7; 1H) | H15, H19, H21 | - | - | H15, H18a, H18b, H19, H21 |
| 21 | 98,23 | 5,40 (d; 1,7; 1H) | H20 | H1', H20 | H1', H20 | H17 |
| 22 | 167,23 | - | - | - | - | H3, H5a, H17 |
| 1' | 100,65 | 4,58 (d; 8,0; 1H) | H2' | H2', H21 | H2', H21 | H2', H21 |
| 2' | 74,46 | 2,97 (dd; 9,0; 8,0; 1H) | H1', H3' | - | - | H3' |
| 3' | 78,35 | 3,27 (d; 9,1; 9,0; 1H) | H2', H4' | - | - | H2', H4' |
| 4' | 71,50 | 3,19 (d; 9,4; 9,1; 1H) | H3', H5' | - | - | H3', H5' |
| 5' | 78,09 | 3,26 (ddd; 9,4; 5,7; 2,2; 1H) | H4', H6'a, H6'b | H6'a, H6'b | H6'a, H6'b | H1', H4' |
| 6' | 62,74 | (a) 3,63 (dd; 11,9; 5,7; 1H) (b) 3,86 (dd; 11,9; 2,2; 1H) | H5', H6'b H5', H6'a | H6'b H6'a | H6'b H6'a | H4', H5' |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*₄. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=duplete, dd=duplo-duplete, ddd=duplo-duplete duplo, dddd=duplo-duplo-duplete duplo, dl=duplete largo; acoplamento – *J* / Hz). *(300 MHz)

Elucidação estrutural do pico 1

O pico 1 foi coletado no intervalo de 7,7 a 7,8 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 527,2050 calculado para $[M+H]^+ C_{27}H_{31}N_2O_9^+$ (527,2024 com erro de 4,8 ppm). O espectro de UV apresentou três bandas com comprimentos de onda máximos em 247, 303 e 370 nm. Os espectros de UV e de massas de alta resolução são apresentados no Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente. Este pico, assim como os demais, não foi isolado em quantidade suficiente para se obter espectro de NMR de ^{13}C , portanto os valores de deslocamento químico serão obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC (Apêndice 9). Estes dados são coincidentes com os reportados [159] para o alcaloide lialosídeo (**54**) (Figura 24), já isolado de espécies de *Psychotria* [46].

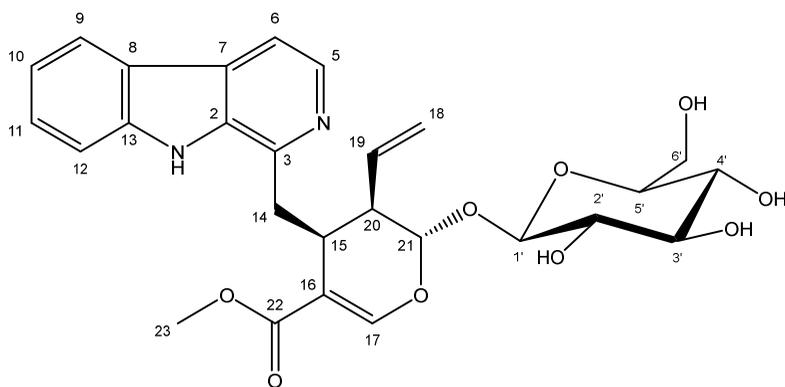


Figura 24. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico lialosídeo (**54**), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

O espectro de NMR de 1H do pico 1 apresenta o padrão de sistema de anel indólico com dois dupletos centrados em δ_{H9} 8,16 e δ_{H12} 7,59 ppm ($J_{9-10} = 7,8$ e $J_{11-12} = 7,9$ Hz), atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 e C12, respectivamente, e dois duplo-dupletos duplos centrados em δ_{H10} 7,26 e δ_{H11} 7,55 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 e C11 que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento do tipo *orto* $J_{11-12} = 7,51$ Hz e do tipo *meta* no valor de $J_{10-12} = J_{9-11} = 0,9$ Hz (Apêndice 10). Esses acoplamentos foram atribuídos com base no espectro de correlação homonuclear bidimensional H-H, COSY (Apêndice 11) e NOESY (Apêndice 12). Através do espectro de

correlação bidimensional HSQC foi possível atribuir os sinais dos carbonos hidrogenados C9 a C12 com os deslocamentos químicos δ_{C9} 121,2, δ_{C10} 119,3, δ_{C11} 128,4 e δ_{C12} 111,4 ppm, respectivamente.

Além do padrão de dois dupletos e dois duplo-dupletos, foram observados mais dois dupletos centrados em δ_{H5} 8,21 e δ_{H6} 7,96 ppm com acoplamento mútuo de $J_{5-6} = 5,3$ Hz, cujo valor da constante é coerente com a esperada para este tipo de acoplamento em um anel piridina [156], apresentando correlação bidimensional no HSQC com os sinais em δ_{C5} 136,2 e δ_{C6} 112,8 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C5 e C6, respectivamente. A oxidação do anel heterocíclico C₅N, na porção triptamina, estende a aromaticidade de dois para três anéis promovendo uma diminuição da blindagem eletrônica dos hidrogênios H9, H10, H11 e H12 do anel indólico em comparação com os dados de NMR da estrictosamida (**32**), pico 4.

Os sinais atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C17, C18 e C19 da porção secologanina são facilmente identificados no espectro de NMR de ¹H onde se observa um simpleto em δ_{H17} 7,53 ppm correlacionado ao carbono δ_{C17} 152,4 ppm no HSQC e um grupo de sinais coincidente com o esperado para um padrão ABX atribuído aos hidrogênios H18a, H18b e H19 do grupo alceno terminal. Para este grupo alceno são observados os dupletos centrados em δ_{H18a} 4,94 e δ_{H18b} 5,04 ppm, com acoplamento do tipo vicinal *cis* com $J_{18b-19} = 10,3$ Hz e vicinal *trans* com $J_{18a-19} = 17,4$ Hz, e um duplo-duplo duplo centrado em δ_{H19} 5,87 ppm. No espectro de correlação bidimensional HSQC estes sinais de hidrogênios estão correlacionados aos sinais de carbonos δ_{C18} 118,0 e δ_{C19} 133,9 ppm, respectivamente.

O espectro de correlação COSY mostra que o sinal do H19 apresenta acoplamento com o duplo-duplo duplo centrado em δ_{H20} 2,61 ppm com constante de $J_{19-20} = 8,5$ Hz atribuído ao hidrogênio metínico H20. O COSY também mostra acoplamento do H20 com o duplo centrado em δ_{H21} 5,73 ppm ($J_{20-21} = 6,4$ Hz), atribuído ao H21, e com o duplo-duplo centrado em δ_{H15} 3,61 ppm ($J_{20-15} = 6,1$ Hz), atribuído ao H15. Para atribuir os sinais dos hidrogênios ligados ao carbono metilênico C14 foram observadas, no COSY, duas bandas de correlação com o sinal do H15, um multipletto em δ_{H14a} 3,29 ppm ($J_{14a-14b} = 14,1$ Hz e $J_{14a-15} = 13,7$ Hz) sobreposto com o sinal do solvente, metanol-*d*₄, e o duplo-duplo centrado em δ_{H14b} 3,56 ppm ($J_{14b-15} = 6,8$ Hz). No HSQC foram observados os sinais de carbono δ_{C15} 32,9, δ_{C20} 44,2 e δ_{C21} 96,1 ppm atribuídos aos carbonos C15, C20 e C21, respectivamente. O sinal do carbono C14 não pode ser atribuído devido à baixa intensidade do espectro bidimensional HSQC.

No espectro bidimensional HMBC, disponível no Apêndice 13, é possível observar uma banda de correlação entre o sinal de carbono δ_{C22} 167,6 ppm e o simpleto δ_{H23} 3,36 ppm, com integral relativa a três hidrogênios no espectro de NMR de 1H , atribuídos ao carbono C22 e os hidrogênios ligados ao C23 do grupo éster metílico ligado ao carbono C16. O HSQC mostra que o sinal de hidrogênio H23 está correlacionado com o sinal de carbono δ_{C23} 50,3 ppm. Os deslocamentos químicos de δ_{C22} 167,6 e δ_{C23} 50,3 ppm estão coerentes para o esperado para um grupo éster metílico, uma vez que para um grupo acetil se esperaria os deslocamentos químicos $\delta_{C=O} \sim 195$ e $\delta_{CH_3} \sim 25$ ppm [156].

No espectro de NMR de 1H observa-se um duplete centrado $\delta_{H1'}$ 4,75 ppm com constante de acoplamento $J_{1'-2'} = 7,9$ Hz, correlacionado com o $\delta_{C1'}$ 98,8 ppm no HSQC e com o sinal do H21 no NOESY. Os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio são atribuídos a CH anomérico, cuja constante de acoplamento corresponde a ligação β -glicosídica e a correlação bidimensional mostra que esta glicose está ligada ao C21. Os demais sinais de hidrogênio e carbono referentes à beta-glicose foram obtidos do espectro de NMR de 1H e do espectro bidimensional HSQC, respectivamente, e atribuídos com base nos acoplamentos encontrados no COSY e por comparação com os dados de NMR da estrictosamida (**32**).

Devido à baixa intensidade dos sinais obtidos no espectro bidimensional HMBC não foi possível atribuir todos os sinais de carbonos não hidrogenados. Apesar disto, os dados de NMR foram suficientes para confirmar a estrutura do alcaloide monoterpene indólico lialosídeo (**54**) conforme dados da literatura [159].

Van de Santos e colaboradores (2001) já haviam reportado a presença deste alcaloide na espécie *P. suterella* [103] e, em 2013, Passos e colaboradores reportaram a presença deste alcaloide nas espécies *P. suterella* e *P. laciniata* [46].

Todos os dados de NMR foram compilados e são mostrados na Tabela 10. Os dados da literatura utilizados na comparação estão disponíveis no Anexo 1 para NMR de ^{13}C e no Anexo 2 para NMR de 1H . No Anexo 6 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

Tabela 10. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | NOESY | HMBC 3J |
|----|------------------|--|------------------------|---------|------------|
| 2 | ** | - | - | - | ** |
| 3 | ** | - | - | - | ** |
| 5 | 136,2 | 8,21 (d; 5,3; 1H) | H6 | H6 | ** |
| 6 | 112,8 | 7,96 (d; 5,3; 1H) | H5 | H5 | ** |
| 7 | ** | - | - | - | ** |
| 8 | ** | - | - | - | ** |
| 9 | 121,2 | 8,16 (d; 7,7; 1H) | H10 | H10 | ** |
| 10 | 119,3 | 7,26 (ddd; 7,7; 7,5; 0,9; 1H) | H9, H11 | H9, H11 | H12 |
| 11 | 128,4 | 7,55 (ddd; 7,9; 7,5; 0,9; 1H) | H10 | H10 | H9 |
| 12 | 111,4 | 7,59 (d; 7,9; 1H) | H11 | - | ** |
| 13 | ** | - | - | - | ** |
| 14 | ** | (a) 3,30 (m; 1H) (b) 3,56 (dd; 14,1; 6,8; 1H) | H14b, H15 H14a, H15 | - | ** |
| 15 | 32,9 | 3,61 (ddd; 13,7; 6,8; 6,1; 1H) | H14b, H20 | - | ** |
| 16 | ** | - | - | - | ** |

| | | | | | |
|-----------|-------|--|------------------------|--------------|-----|
| 17 | 152,4 | 7,53 (sl; 1H) | - | - | ** |
| 18 | 118,0 | (a) 4,94 (d; 17,4; 1H) (b) 5,04 (d; 10,3; 1H) | H19 H19 | - | ** |
| 19 | 133,9 | 5,87 (ddd; 17,4; 10,3; 8,5; 1H) | H18a, H18b, H20 | - | ** |
| 20 | 44,2 | 2,61 (dt; 8,5; 6,4; 6,1; 1H) | H15, H19, H21 | - | ** |
| 21 | 96,1 | 5,74 (d; 6,4; 1H) | H20 | H20, H1' | ** |
| 22 | 167,6 | - | - | - | H23 |
| 23 | 50,3 | 3,36 (s; 3H) | - | - | ** |
| 1' | 98,8 | 4,75 (d; 7,9; 1H) | H2' | H21 | ** |
| 2' | 73,3 | 3,23 (dd; 9,1; 7,9; 1H) | H1', H3' | - | ** |
| 3' | 76,9 | 3,39 (dd; 9,2; 9,1; 1H) | H2', H4' | - | ** |
| 4' | 70,3 | 3,28 (dd; 9,2; 6,1; 1H) | H3', H5' | - | ** |
| 5' | 77,1 | 3,35 (ddd; 6,5; 6,1; 2,1; 1H) | H4', H6'a, H6'b | - | ** |
| 6' | 61,6 | (a) 3,68 (dd; 12,0; 6,5; 1H) (b) 3,92 (dd; 12,0; 2,1; 1H) | H5', H6'b H5', H6'a | H6'b H6'a | ** |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*₄. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=duplete, dd=duplo-duplete, ddd=duplo-duplete duplo; acoplamento – *J* / Hz). *Obtidos do espectro bidimensional HSQC. **não atribuído devido à baixa intensidade dos sinais obtidos nos espectros bidimensionais HSQC e/ou HMBC.

Elucidação estrutural dos picos 6 e 7

O pico 6 foi coletado no intervalo de 36,6 a 37,0 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 351,1726 calculado para $[M+H]^+ C_{21}H_{23}N_2O_3^+$ (351,1703 com erro de 6,4 ppm). O pico 7 foi coletado no intervalo de 37,1 a 37,4 min e o espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 351,1716 calculado para $[M+H]^+ C_{21}H_{23}N_2O_3^+$ (351,1703 com erro de 6,4 ppm). O espectro de UV de ambos apresentou duas bandas com comprimentos de onda máximos em 225 e 290 nm. Os espectros de UV e de massas de alta resolução são apresentados no Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente. Estes dados são coincidentes com os já reportados na literatura para os alcaloides monoterpene indólicos isômeros *E*-vallesiachotamina (**12**) e *Z*-vallesiachotamina (**13**), respectivamente, já isolados de espécies de *Psychotria* [46] (Figura 25).

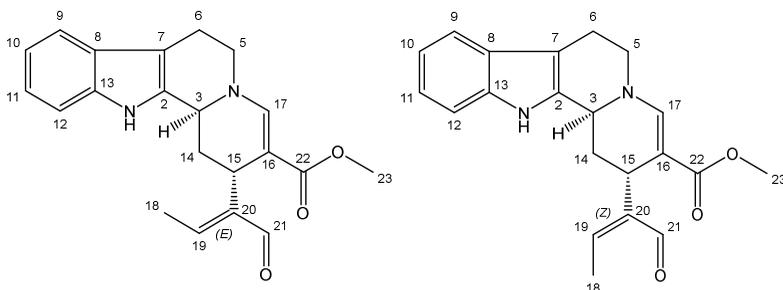


Figura 25. Estruturas dos alcaloides monoterpene indólicos isômeros *E*-vallesiachotamina (**12**) e *Z*-vallesiachotamina (**13**), picos 6 e 7 isolados da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

O padrão de sinais para um sistema de anel indólico, com dois dupletos e dois duplo-dupletos duplos, foi observado em ambos os espectros de NMR de 1H dos isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**). O espectro do NMR de 1H do isômero *E* apresentou os dupletos centrados em δ_{H9} 7,43 e δ_{H12} 7,29 ppm ($J_{9-10} = 7,8$ e $J_{11-12} = 8,0$ Hz – *orto*), atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 e C12, respectivamente, e os duplo-dupletos duplos centrados em δ_{H10} 7,01 e δ_{H11} 7,08 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 e C11 que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento mútuo do tipo *orto* $J_{11-12} = 7,0$ Hz e do tipo *meta* no valor de $J_{9-11} = 0,8$ e $J_{10-12} = 0,9$ Hz (Apêndice 14).

Para o isômero *Z* pôde-se observar apenas uma pequena diferença nos dados do espectro do NMR de ^1H em relação ao isômero *E*. O espectro mostrou os dupletos centrados em $\delta_{\text{H}9}$ 7,41 e $\delta_{\text{H}12}$ 7,28 ppm ($J_{9-10} = 7,9$ e $J_{11-12} = 8,0$ Hz – *orto*), atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 e C12, respectivamente, e os duplo-dupletos duplos centrados em $\delta_{\text{H}10}$ 7,00 e $\delta_{\text{H}11}$ 7,07 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 e C11 que apresentam acoplamento mútuo do tipo *orto* com constante $J_{11-12} = 7,1$ Hz e do tipo *meta* no valor de $J_{9-11} = J_{10-12} = 0,8$ Hz (Apêndice 15). Os acoplamentos supracitados foram confirmados através dos espectros de correlação homonuclear bidimensional H-H, COSY e NOESY disponíveis, respectivamente, no Apêndice 16 e Apêndice 18 para o isômero *E* e no Apêndice 17 e Apêndice 19 para o isômero *Z*.

Através dos espectros de correlação bidimensional HSQC de ambos os isômeros foi possível observar que os sinais dos carbonos hidrogenados C9 a C12 apresentaram os mesmos valores de deslocamentos químicos sendo $\delta_{\text{C}9}$ 117,1, $\delta_{\text{C}10}$ 118,4, $\delta_{\text{C}11}$ 120,9 e $\delta_{\text{C}12}$ 110,6 ppm para o para ambos os isômeros, respectivamente (Apêndice 20 e Apêndice 21).

No espectro HSQC de ambos os isômeros foram observados dois sinais de carbonos metilênicos em $\delta_{\text{C}5}$ 51,00 e $\delta_{\text{C}6}$ 21,80 ppm atribuídos, respectivamente, aos C5 e C6 provenientes da porção triptamina da molécula, assim como seus respectivos pares de hidrogênios. No espectro de NMR de ^1H do isômero *E* foi identificado um duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}5a}$ 3,73 ppm e um duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}5b}$ 3,89 ppm, com acoplamento geminal de $J_{5a-5b} = 12,5$ Hz atribuídos aos hidrogênios ligados ao C5. Os hidrogênios do metileno C6 do isômero *E* foram identificados como sendo um duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}6a}$ 2,82 ppm acoplado ao multiplete centrado em $\delta_{\text{H}6b}$ 2,93 ppm com $J_{6a-6b} = 14,9$ Hz. Estes hidrogênios metilênicos apresentam acoplamentos vicinais $J_{5a-6a} = 3,1$, Hz, $J_{5a-6b} = 12,0$ Hz, $J_{5b-6b} = 5,2$ Hz e $J_{5b-6a} = 1,3$ Hz confirmados no espectro COSY.

Para isômero *Z* foram observados, no espectro de NMR de ^1H , um duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}5a}$ 3,61 ppm e um duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}5b}$ 3,83 ppm, com acoplamento geminal de $J_{5a-5b} = 12,6$ Hz atribuídos aos hidrogênios ligados ao C5. Também foram identificados os sinais dos hidrogênios do metileno C6 atribuídos ao duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H}6a}$ 2,80 ppm acoplado ao multiplete centrado em $\delta_{\text{H}6b}$ 2,90 ppm com $J_{6a-6b} = 15,0$ Hz. Estes hidrogênios metilênicos apresentam acoplamentos vicinais $J_{5a-6a} = 3,2$, Hz, $J_{5a-6b} = 12,1$ Hz, $J_{5b-6b} = 5,1$ Hz e $J_{5b-6a} = 1,3$ Hz confirmados no espectro COSY.

Os sinais destes hidrogênios metilênicos apresentam um comportamento coincidente com um padrão de multiplicidades esperado para um sistema AA'BB' do tipo gauche estrelado, apresentando alguma semelhança com os valores de acoplamentos encontrados na estrictosamida (**32**), pico 4. Assim como observado no espectro do estrictosamida (**32**), o sinal atribuído ao H6b apresenta quatro constantes de acoplamento, podendo a quarta constante ser atribuída a um acoplamento entre o H3 e o H6b com valores de $J_{3-6b} = 2,0$ Hz, para o isômero *E*, e $J_{3-6b} = 2,1$ Hz, para o isômero *Z*. A Figura 26 compara o multipletto simulado através do FOMSC3 com o que foi obtido experimentalmente para o sinal atribuído ao H6b para se confirmar a multiplicidade duplo-duplo-dupletto duplo para o sinal do H6b da porção triptamina do alcaloide.

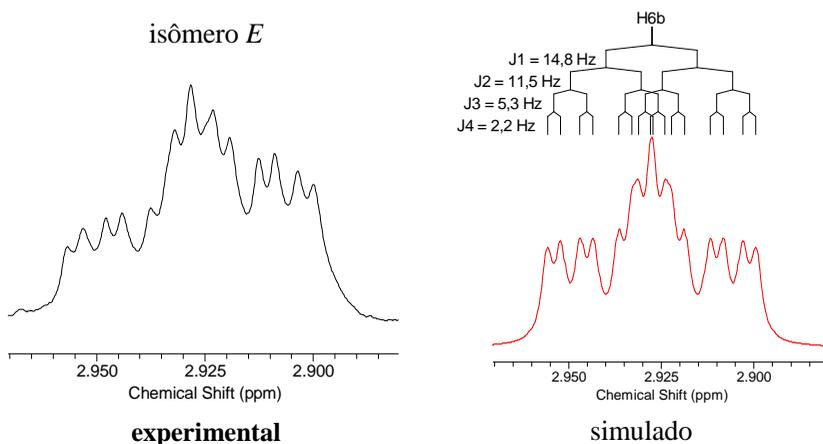


Figura 26. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente e o simulado através do software FOMSC3 para o hidrogênio H6b dos isômeros *E*-vallesiachotamina (**12**), pico 6 isolados da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

No espectro de NMR de ^1H do isômero *E*, o sinal do multipletto centrado em δ_{H_3} 4,48 ppm, correlacionado com o δ_{C_3} 49,4 ppm, apresenta multiplicidade como um dupletto bastante largo que, após análise das multiplicidades dos hidrogênios dos metilenos C14 ($\delta_{\text{C}_{14}}$ 33,8 ppm) e C6, pode-se chegar à sua real multiplicidade como sendo de um duplo-dupletto duplo com acoplamentos vicinais $J_{3-6b} = 2,0$ Hz, $J_{3-14a} = 11,6$ Hz e $J_{3-14b} = 3,1$ Hz. As demais constantes de acoplamento dos duplos-dupletos duplos centrados em $\delta_{\text{H}_{14a}}$ 1,83 e $\delta_{\text{H}_{14b}}$ 2,38 ppm, atribuídos aos

hidrogênios H14a e H14b, foram identificadas com acoplamento geminal de $J_{14a-14b} = 13,4$ Hz e vicinais nos valores de $J_{14a-15} = 1,6$ Hz e $J_{14b-15} = 6,0$ Hz. Estas constantes auxiliaram na atribuição da multiplicidade ao sinal centrado em $\delta_{H15} 4,00$ ppm, atribuído ao hidrogênio metínico ligado ao C15 ($\delta_{C15} 28,1$ ppm), como sendo um duplo-duplete.

O mesmo ocorre para o duplete largo centrado em $\delta_{H3} 4,48$ ppm atribuído ao H3 no espectro de NMR de 1H do isômero *Z*, correlacionado com o $\delta_{C3} 49,4$ ppm no HSQC, que apresenta como multiplicidade real a de um duplo-duplete duplo, cujos valores de constante de acoplamento vicinais são: $J_{3-6b} = 2,1$ Hz, $J_{3-14a} = 11,9$ Hz e $J_{3-14b} = 3,2$ Hz. Para o metileno C14 do isômero *Z* também foram observados, no HSQC, que o sinal de carbono $\delta_{C14} 32,6$ ppm estava correlacionado aos duplos-dupletos duplos centrados em $\delta_{H14a} 1,69$ e $\delta_{H14b} 2,37$ ppm, atribuídos aos hidrogênios H14a e H14b, respectivamente, apresentando constante de acoplamento geminal de $J_{14a-14b} = 13,4$ Hz e acoplamentos vicinais de $J_{14a-15} = 1,7$ Hz e $J_{14b-15} = 5,2$ Hz. Da mesma forma que no isômero *E*, estas constantes auxiliaram na atribuição da multiplicidade ao sinal centrado em $\delta_{H15} 3,98$ ppm, atribuído ao hidrogênio metínico ligado ao C15 ($\delta_{C15} 30,4$ ppm), como sendo um duplo-duplete.

Os isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**) são biossintetizados a partir da strictosidina (**17**) após a ciclização resultante da reação de substituição nucleofílica promovida pelo N4 no carbono C17. Neste caso, diferente dos alcaloides lialosídeo (**54**) e strictosamida (**32**), o carbono C17 ($\delta_{C17} 140,3$ ppm) encontra-se posicionado como vizinho do nitrogênio proveniente do grupamento amino da triptamina, confirmado pela correlação encontrada no espectro bidimensional NOESY entre sinal do hidrogênio H5b e sinal do H17, os simpletos $\delta_{H17} 7,78$ ppm, no espectro de NMR de 1H do isômero *E*, e $\delta_{H17} 7,88$ ppm, no espectro de NMR de 1H do isômero *Z*.

No espectro bidimensional NOESY de ambos os compostos foi observado correlação entre o sinal do H17 com o simpleto em $\delta_{H23} 3,63$ ppm com integral relativa a três hidrogênios, correlacionado ao $\delta_{C23} 49,8$ ppm no HSQC, atribuído ao carbono C23 do grupo éster metílico. Este sinal de hidrogênio do H23 apresentou correlação com o sinal da carbonila C22 no espectro HMBC, com sinal de carbono em $\delta_{C22} 169,0$ ppm para o isômero *E* (Apêndice 22) e $\delta_{C22} 168,5$ ppm para o isômero *Z* (Apêndice 23).

No espectro bidimensional HMBC do isômero *Z* foi observada uma correlação do sinal do H15 com o sinal de carbono $\delta_{C20} 142,5$ ppm, atribuído ao C20. O sinal do carbono C20, por sua vez, apresentou correlação no HMBC com o simpleto em $\delta_{H21} 10,31$ ppm, atribuído ao

hidrogênio ligado à carbonila do aldeído C21. O sinal de carbono em δ_{C21} 190,1 ppm foi atribuído à carbonila C21 devido à correlação, no HMBC, com o sinal do hidrogênio H19 (δ_{H19} 6,58 ppm). Devido à baixa intensidade dos sinais no espectro bidimensional HMBC do isômero *E* não foi possível observar estas correlações, porém foi possível atribuir o sinal do simpleto em δ_{H21} 9,37 ppm, presente no espectro de NMR de 1H , ao hidrogênio ligado à carbonila C21 pelo fato de ter apresentado correlação no espectro NOESY com o H19 (δ_{H19} 6,79 ppm).

Na região de campo baixo do espectro de NMR de 1H de ambos os isômeros é facilmente observável um quarteto atribuído ao hidrogênio olefínico β -carbonílico H19. Para a *E*-vallesiachotamina (**12**) este quarteto está centrado em δ_{H19} 6,79 ppm, correlacionado ao sinal de carbono δ_{C19} 152,8 ppm no HSQC, acoplado com $J_{18-19} = 7,3$ Hz ao duplete centrado em δ_{H18} 2,10 ppm, atribuído aos hidrogênios da metila C18 (δ_{C18} 13,8 ppm). Para a *Z*-vallesiachotamina (**13**), sinal do quarteto atribuído ao H19 (δ_{C19} 146,3 ppm) está centrado em δ_{H19} 6,58 ppm, acoplado ao duplete do H18 (δ_{C18} 11,6 ppm) centrado em δ_{H18} 2,21 ppm com valor de $J_{18-19} = 7,5$ Hz. Em ambos os casos, os acoplamentos entre os hidrogênios H18 e H19 são confirmados pelos respectivos espectros de correlação bidimensional COSY e NOESY.

Os valores de deslocamentos químico dos hidrogênios olefínico β -carbonílico H19 e metílico H18 são as principais diferenças observadas nos espectros de NMR de 1H dos alcaloides isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**). O efeito da anisotropia diamagnética da carbonila C21 promove uma desblindagem no hidrogênio olefínico H19 do isômero *E* da mesma forma que nos hidrogênios metílicos H18 do isômero *Z* [156, 160]. A Figura 27 mostra as regiões ampliadas dos espectros de NMR de 1H dos isômeros *E* e *Z*, onde se encontram o quarteto atribuído ao H19 e o duplete atribuído ao H18.

Os sinais dos carbonos não hidrogenados restantes foram atribuídos através do espectro de correlação bidimensional HMBC (Apêndice 20 para o isômero *E* e Apêndice 21 para o isômero *Z*) e comparação com dados na literatura [46, 160, 161]. No espectro da *Z*-vallesiachotamina (**13**), o sinal de carbono em δ_{C8} 126,3 ppm foi atribuído ao C8 por apresentar correlação com os sinais dos hidrogênios H10 e H12 com 3J , o sinal em δ_{C13} 135,7 ppm foi atribuído ao carbono C13 devido às correlações com os sinais dos hidrogênios H9 e H11 com 3J , o sinal em δ_{C7} 106,8 ppm foi atribuído ao C7, pois apresentou correlação com os sinais dos hidrogênios H9 e H5b com 3J e o sinal em δ_{C16} 92,5 ppm foi atribuído ao C16, pois apresentou correlação com os sinais dos hidrogênios H14b com 3J e H15 com 2J . Não foi possível atribuir sinal ao

C2 do isômero *Z* assim como da maioria dos carbonos não hidrogenados do isômero *E* devido à baixa intensidade dos sinais obtidos no espectro.

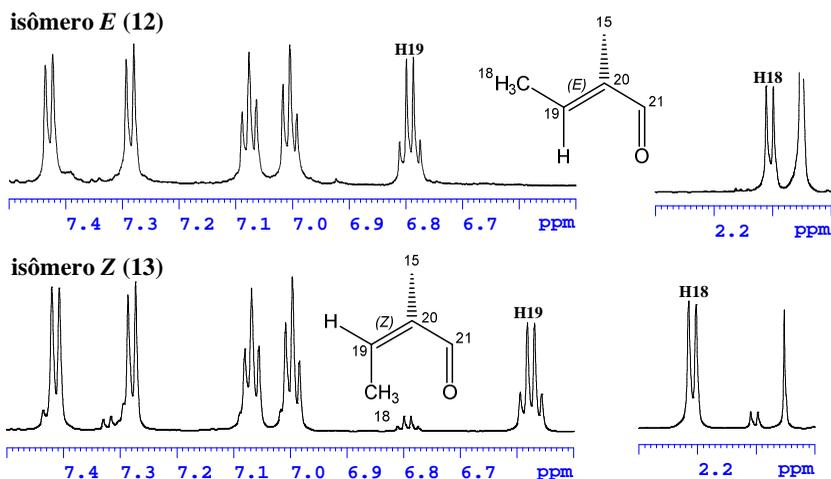


Figura 27. Comparação entre as regiões de campo baixo ampliadas dos espectros dos alcaloides isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (12 e 13), picos 6 e 7 isolados da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*, onde se encontram o quarteto atribuído ao H19 e o duplete atribuído ao H18

Os dados de NMR aqui apresentados para os picos 6 e 7 estão em concordância com os encontrados na literatura para *E*-vallesiachotamina (12) e *Z*-vallesiachotamina (13), respectivamente [46, 160, 161].

Na literatura foram encontrados relatos da presença deste alcaloide para as espécies *P. acuminata* [57], *P. bahiensis* [59], *P. laciniata* [46] e *P. suterella* [46].

Todos os dados de NMR uni e bidimensionais adquiridos para os alcaloides isômeros foram compilados e são mostrados na Tabela 11 e Tabela 12, respectivamente. Os dados da literatura utilizados na comparação estão disponíveis no Anexo 1 para NMR de ^{13}C e no Anexo 3 para NMR de ^1H . Também estão disponíveis na parte dos anexos os diagramas que esquematizam os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para os compostos *E*-vallesiachotamina (12) (Anexo 7) e *Z*-vallesiachotamina (13) (Anexo 8), respectivamente.

Tabela 11. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide *E-vallesiachotamina* (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | NOESY | HMBC ² J, ³ J |
|----|------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| 2 | ** | - | - | - | - |
| 3 | 49,4 | 4,48 (ddd; 11,6; 3,1; 2,0; 1H) | H14a, H14b | - | H17 |
| 5 | 51,0 | (a) 3,73 (ddd; 12,5; 12,0; 3,1; 1H) (b) 3,89 (ddd; 12,5; 5,2; 1,3; 1H) | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b, H17 | - |
| 6 | 21,8 | (a) 2,82 (ddd; 14,9; 3,1; 1,3; 1H) (b) 2,93 (dddd; 14,9; 12,0; 5,2; 2,0; 1H) | H5a, H5b, H6b H5a, H5b, H6a | H5a, H5b, H6b H5a, H5b, H6a | - |
| 7 | ** | - | - | - | - |
| 8 | ** | - | - | - | - |
| 9 | 117,1 | 7,43 (d; 7,8; 1H) | H10 | H6a, H10 | H11 |
| 10 | 118,4 | 7,01 (ddd; 7,8; 7,0; 0,8; 1H) | H9, H11 | H9, H11 | H12 |
| 11 | 120,9 | 7,08 (ddd; 8,0; 7,0; 0,9; 1H) | H10, H12 | H10, H12 | H9 |
| 12 | 110,6 | 7,29 (d; 8,0; 1H) | H11 | H11 | H10 |
| 13 | 136,0 | - | - | - | H9, H11 |
| 14 | 33,8 | (a) 1,83 (ddd; 13,4; 11,6; 6,0; 1H) (b) 2,38 (ddd; 13,4; 3,1; 1,6; 1H) | H3, H15, H14b H3, H15, H14a | H3, H15, H14b H3, H15, H14a | - |
| 15 | 28,1 | 4,00 (dd; 6,0; 1,6; 1H) | H14a, H14b | H14a, H14b | H17 |

| | | | | | |
|-----------|-------|-------------------|-----|----------|-----|
| 16 | ** | - | - | - | - |
| 17 | 148,3 | 7,78 (s; 1H) | - | - | - |
| 18 | 13,8 | 2,10 (d; 7,3; 3H) | H19 | H5b | - |
| 19 | 152,8 | 6,79 (q; 7,3; 1H) | H18 | H19, H23 | - |
| 20 | 146,4 | - | - | H18 | H18 |
| 21 | ** | 9,37 (s; 1H) | - | - | H18 |
| 22 | 169,0 | - | - | H19 | - |
| 23 | 49,8 | 3,63 (s; 3H) | - | - | H23 |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*4. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=dupleteo, dd=duplo-dupleteo, ddd=duplo-dupleteo duplo, dddd=duplo-duplo-dupleteo duplo, q=quarteto, s=simpleto, acoplamento – *J* / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC. **não atribuído devido à baixa intensidade dos sinais obtidos nos espectros bidimensionais HSQC ou HMBC.

Tabela 12. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide *Z-vallesiachotamina* (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | NOESY | HMBC ² J, ³ J |
|-----------|------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--|
| 2 | ** | - | - | - | - |
| 3 | 47,7 | 4,34 (ddd; 11,9; 3,2; 2,1; 1H) | H14a, H14b, H6b | H6a, H14b, H19 | H15 |
| 5 | 51,0 | (a) 3,61 (ddd; 12,6; 12,1; 3,2; 1H) (b) 3,83 (ddd; 12,6; 5,1; 1,3; 1H) | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b | H5b, H17 H5a, H6a, H6b, H17 | H17 |
| 6 | 21,8 | (a) 2,80 (ddd; 15,0; 3,2; 1,3; 1H) (b) 2,90 (dddd; 15,0; 12,1; 5,1; 2,1; 1H) | H5a, H5b H5a, H5b | H3, H6b, H9 H6a, H9 | - |
| 7 | 106,8 | - | - | - | H9, H5b |
| 8 | 126,3 | - | - | - | H10, H12 |
| 9 | 117,1 | 7,41 (d; 7,9; 1H) | H10 | H6a, H6b | H11 |
| 10 | 118,4 | 7,00 (ddd; 7,9; 7,1; 0,8; 1H) | H9, H11 | - | H12 |
| 11 | 120,9 | 7,07 (ddd; 8,0; 7,1; 0,8; 1H) | H10, H12 | - | H9 |
| 12 | 110,6 | 7,28 (d; 8,0; 1H) | H11 | - | H10 |
| 13 | 135,7 | - | - | - | H9, H11 |
| 14 | 32,6 | (a) 1,69 (ddd; 13,4; 11,9; 5,2; 1H) (b) 2,37 (ddd; 13,4; 3,2; 1,7; 1H) | H3, H14b, H15 H3, H14a, H15 | H14b H14a, H3 | - |
| 15 | 30,4 | 3,98 (dd; 5,2; 1,7; 1H) | H14a, H14b | H14a, H14b | H17, H19, H23 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|-------------------|-----|---|---------------|
| 142 | 16 | 92,5 | - | - | - | H14b, H15 |
| | 17 | 148,3 | 7,88 (s; 1H) | - | - | H5a, H5b |
| | 18 | 11,6 | 2,21 (d; 7,5; 3H) | H19 | - | H19, H23 |
| | 19 | 146,3 | 6,58 (q; 7,5; 1H) | H18 | - | H3, H18 |
| | 20 | 142,5 | - | - | - | H15, H18, H21 |
| | 21 | 190,1 | 10,31 (s; 1H) | - | - | H19 |
| | 22 | 168,5 | - | - | - | H17, H23 |
| | 23 | 49,8 | 3,63 (s; 3H) | - | - | - |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*4. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=duplete, dd=duplo-duplete, ddd=duplo-duplete duplo, dddd=duplo-duplo-duplete duplo, q=quarteto, s=simpleto, acoplamento – *J* / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC. **não atribuído devido à baixa intensidade dos sinais obtidos nos espectros bidimensionais HSQC ou HMBC.

Elucidação estrutural do pico 2

O pico 2 foi coletado no intervalo de 13,8 a 14,2 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 725,2921 calculado para $[M+H]^+ C_{37}H_{44}N_2O_{13}^+$ (725,2916 com erro de 0,7 ppm). O espectro de UV apresentou duas bandas com comprimentos de onda máximos em 223 e 280 nm. Os espectros de UV e de massas de alta resolução são apresentados no Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente. A busca na literatura através do scifinder® por alguma substância com a fórmula molecular $C_{37}H_{43}N_2O_{13}$ não encontrou resultados, indicando que esta substância pode ser inédita.

Analisando o espectro de NMR de 1H , disponível no Apêndice 24, observou-se o padrão de sinais para um sistema de anel indólico, com dois dupletos centrados em δ_{H9} 7,56 e δ_{H12} 7,45 ppm ($J_{9-10} = 8,1$ e $J_{11-12} = 7,8$ Hz – *orto*), atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 (δ_{C9} 111,1 ppm) e C12 (δ_{C12} 117,3 ppm), respectivamente, e dois duplo-dupletos duplos centrados em δ_{H10} 7,12 e δ_{H11} 7,03 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 (δ_{C10} 121,0 ppm) e C11 (δ_{C11} 118,5 ppm) que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento mútuo do tipo *orto* $J_{11-12} = 7,2$ Hz e do tipo *meta* no valor de $J_{9-11} = J_{10-12} = 0,8$ Hz. Os acoplamentos foram confirmados através dos espectros bidimensionais COSY (Apêndice 25) e NOESY (Apêndice 26) e os sinais de carbono foram atribuídos pelos espectros bidimensionais HSQC (Apêndice 27) e HMBC (Apêndice 28).

Através da análise do espectro HSQC e comparação dos dados de NMR do pico 2 com os dados da estrictosamida (**32**) foi possível atribuir os sinais dos multipletos centrados em δ_{H6a} 2,75 ppm, $\delta_{H6b} = \delta_{H5a} = 2,94$ ppm e δ_{H5b} 3,21 ppm aos hidrogênios ligados aos metilênos C6 (δ_{C6} 17,9 ppm) e C5 (δ_{C5} 47,0 ppm), respectivamente. Não foi possível identificar a multiplicidade dos sinais, porém foram observadas as correlações H5a-H5b e H6a-H6b no espectro COSY e NOESY e as intensidades negativas no HSQC confirmaram que estes hidrogênios eram do tipo CH_2 .

Observando o espectro bidimensional HMBC, o sinal de carbono em δ_{C8} 136,3 ppm foi atribuído ao C8 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H10 e H12, o sinal de carbono em δ_{C13} 126,4 ppm foi atribuído ao C13 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H9 e H11, já para os carbonos não hidrogenados C7 e C2, não foi possível atribuir deslocamento químico devido a baixa intensidade dos sinais.

No espectro HSQC foi observado um sinal de carbono em δ_{C3} 57,9 ppm ligado ao duplo-duplete centrado em δ_{H3} 3,86 ppm atribuído ao C3.

No espectro NOESY foi observada correlação entre os sinais do H3 e o H6b, da mesma forma que foi observado nos alcaloides strictosamida (**32**), *E*-vallesiachotamina (**12**) e *Z*-vallesiachotamina (**13**), picos 4, 6 e 7, respectivamente. Ainda no espectro NOESY, foi observada correlação do sinal do H3 com um simpleto com integração relativa a três hidrogênios em δ_{H} 2,57 ppm, correlacionado ao δ_{C} 40,9 ppm no HSQC, atribuído ao grupo metílico ligado ao nitrogênio N4 heterocíclico da porção triptamina. A posição desta metila ligada ao N4 é confirmada pela correlação de 3J de seus hidrogênios com os carbonos C3 e C5 observadas no HMBC.

O espectro COSY mostrou as correlações do H3 com dois duplo-dupletos duplos centrados em $\delta_{\text{H}14\text{a}}$ 1,73 ppm ($J_{3-14\text{a}} = 13,2$) e $\delta_{\text{H}14\text{b}}$ 2,43 ppm ($J_{3-14\text{b}} = 8,9$ Hz), hidrogênios metilênicos correlacionados com o sinal de carbono $\delta_{\text{C}14}$ 31,4 ppm no HSQC, atribuído ao C14. Também foram observadas no COSY as correlações destes hidrogênios com um multipletto centrado em $\delta_{\text{H}15}$ 2,94 ppm ($J_{14\text{a}-15} = 4,6$ e $J_{14\text{b}-15} = 2,8$ Hz), correlacionado ao sinal de carbono $\delta_{\text{C}15}$ 27,3 ppm no HSQC, atribuído ao C15.

Os espectros bidimensionais COSY e NOESY apresentaram correlação do H15 com um dupletto centrado em $\delta_{\text{H}17}$ 7,15 ppm ($J_{15-17} = 1,2$ Hz) que, por sua vez, apresentou correlação com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}17}$ 151,4 ppm no HSQC, atribuído ao C17. No espectro HMBC, o sinal do H17 apresentou correlação com os sinais de carbono $\delta_{\text{C}16}$ 109,0 ppm, atribuído ao carbono não hidrogenado C16, e $\delta_{\text{C}21}$ 95,7 ppm, atribuído ao carbono acetal C21. No espectro HSQC o sinal do C21 está correlacionado ao dupletto centrado em $\delta_{\text{H}21}$ 5,50 ppm ($J_{20-21} = 1,6$ Hz), cujo sinal apresenta correlação no COSY com o multipletto centrado em $\delta_{\text{H}20}$ 2,94 ppm ($\delta_{\text{C}20}$ 43,4 ppm). Como é possível observar, o multipletto em δ_{H} 2,94 ppm foi resultado da sobreposição dos sinais dos hidrogênios H5a, H6b, H15 e H20. Somente através da análise do espectro bidimensional HSQC foi possível distinguir os quatro sinais sobrepostos e através da análise dos espectros COSY, NOESY foi possível atribuir as constantes de acoplamento observadas no espectro de unidimensional de ^1H .

Na região de campo baixo do espectro de NMR de ^1H observou-se um padrão de sinais coincidente com o esperado para um padrão ABX característico da porção secologanina nos alcaloides monoterpeneo indólicos, atribuído aos hidrogênios do grupo alceno terminal H18a, H18b e H19. Para este grupo alceno foram observados, respectivamente, os duplo-dupletos centrados em $\delta_{\text{H}18\text{a}}$ 5,29 e $\delta_{\text{H}18\text{b}}$ 5,36 ppm, com acoplamento do tipo geminal de $J_{18\text{a}-18\text{b}} = 1,3$ Hz e acoplamentos do tipo

vicinal *cis* com $J_{18a-19} = 10,1$ Hz e vicinal *trans* com $J_{18b-19} = 16,7$ Hz, e um duplo-dupletto duplo centrado em $\delta_{H19} 5,61$ ppm, apresentando acoplamento de $J_{19-20} = 9,8$ Hz com o hidrogênio metínico H20. Através das correlações observadas no espectro HSQC foram atribuídos os sinais de carbono em $\delta_{C18} 119,7$ e $\delta_{C19} 133,4$ ppm aos carbonos C18 e C19, respectivamente.

No espectro de NMR de 1H foi observado um dupletto centrado em $\delta_{H1'}$ 5,01 ppm, correlacionado no HSQC ao sinal de carbono $\delta_{H1'}$ 95,7 ppm, atribuído ao CH anomérico do açúcar. Este dupletto apresentou uma constante de acoplamento de $J_{1'-2'} = 8,1$ Hz, um valor esperado para um β -glicosídeo. Pela biossíntese dos alcaloides monoterpene indólicos, o açúcar está sempre ligado ao carbono C21 [6] e as correlações mútuas C21-H1' e C1'-H21, observadas no HMBC, corroboram a posição do açúcar no alcaloide em questão. O espectro COSY mostrou correlação do H1' com um duplo-dupletto centrado em $\delta_{H2'}$ 5,09 ppm, atribuído ao C2' ($\delta_{C2'}$ 73,6 ppm) que, por sua vez, também está correlacionado ao sinal do duplo-dupletto centrado em $\delta_{H3'}$ 3,82 ppm com $J_{2'-3'} = 9,3$ Hz, atribuído ao C3' ($\delta_{C3'}$ 74,1 ppm). O sinal do H3' apresentou correlação no COSY com o multipletto centrado em δ_H 3,48 ppm, que no HSQC está correlacionado aos sinais de carbono $\delta_{C4'}$ 70,5 e $\delta_{C5'}$ 77,3 ppm, atribuídos por comparação com os dados da estrictosamida (**32**) aos carbonos C4' e C5' do açúcar.

No espectro de NMR de 1H , foram observados os sinais dos hidrogênios hidroximetílicos ligados ao C6' ($\delta_{C6'}$ 61,5 ppm) do açúcar como sendo um duplo-dupletto centrado em $\delta_{H6'a}$ 3,76 ppm apresentando acoplamento geminal de $J_{6'a-6'b} = 11,8$ Hz com o dupletto centrado em $\delta_{H6'b}$ 3,99 ppm, confirmadas pelo COSY. Ambos os sinais apresentaram correlação no COSY como H5'.

Comparando os deslocamentos químicos tanto de carbono quanto de hidrogênio apresentados pelo açúcar no pico 2 com os da estrictosamida (**32**) é possível perceber uma diferença significativa. Na Figura 28 é mostrada a sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC onde se encontram os sinais de açúcar do pico 2 e da estrictosamida (**32**). Todos os sinais do açúcar do pico 2 apresentam um deslocamento químico de hidrogênio maior que os da estrictosamida (**32**), com destaque para o sinal do H2' seguidos do H1' e H3'. Analisando o espectro HMBC foi observada uma correlação do sinal do H2' com um sinal de carbono em $\delta_{C=O}$ 166,1 ppm, um sinal típico de carbonila de éster [156] responsável por causar uma desblindagem, pelo efeito da anisotropia diamagnética da carbonila, mais pronunciada no hidrogênio H2' e mais suave nos hidrogênios H1' e H3'.

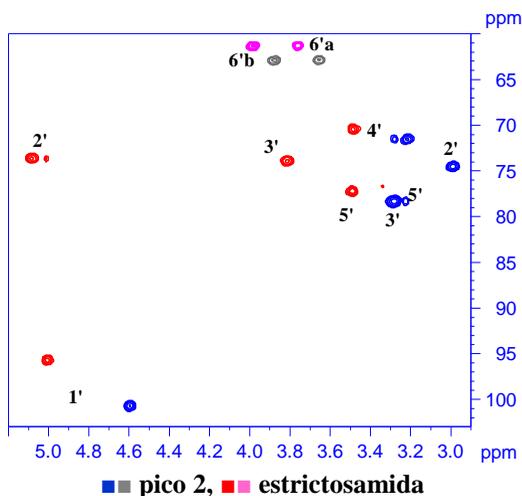


Figura 28. Sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC na região onde se encontram os sinais de açúcar do composto correspondente ao pico 2 e estrictosamida (32), pico 4 isolado da espécie *P. rhytidocarpa*

Para o sinal de carbono em $\delta_{C=O}$ 166,1 ppm foi observado, no espectro HMBC, uma correlação com um sinal na região de hidrogênio aromático, o simpleto em $\delta_{H2''/6''}$ 7,19 ppm ($\delta_{C2''/6''}$ 107,0 ppm) com integral relativa a dois hidrogênios. A ausência de acoplamento caracteriza que esta carbonila está ligada a um anel aromático do tipo 3,4,5-trissubstituído, sendo o sinal deste simpleto atribuído aos hidrogênios simétricos H2'' e H6''. Além disso, foi observado no espectro HMBC as correlações mútuas C2''-H6'' e C6''-H2'', corroborando esta atribuição.

No espectro NOESY foi observada correlação do sinal do H2''/6'' com um simpleto com integral relativa a seis hidrogênios em $\delta_{H3''/5''OMe}$ 3,58 ppm ($\delta_{C3''/5''OMe}$ 55,2 ppm), atribuído aos hidrogênios ligados aos substituintes metoxilas das posições 3'' e 5'' do anel. Também foi observado no NOESY a correlação do sinal em $\delta_{H3''/5''OMe}$ 3,58 ppm com um simpleto em $\delta_{H4''OMe}$ 3,29 ppm ($\delta_{C4''OMe}$ 50,0 ppm) atribuído à metoxila ligada na posição 4'' do anel.

No espectro HMBC foram observadas as correlações do sinal dos hidrogênios das metoxilas 3 e 5 com o sinal de carbono em $\delta_{C3''/5''}$ 146,7 ppm atribuído aos carbonos C3'' e C5'' do anel aromático. Por fim, foi observado a correlação do sinal do H2''/6'' com um sinal em $\delta_{C4''}$ 119,2

ppm, atribuído ao carbono C4'' do anel aromático. Sendo assim, o substituinte esterificado ao C2' do açúcar é o 3,4,5-trimetoxibenzoato (proveniente do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico).

No espectro de NMR de ^1H foi observado um sinal largo em $\delta_{\text{H}22}$ 9,56 ppm que foi atribuído ao sinal o hidrogênio do grupo ácido carboxílico ligada no carbono C16, estando em concordância com a massa encontrada no espectro de massas de alta resolução, apesar de não ter sido observadas correlações no HMBC com os hidrogênios vizinhos para atribuição do sinal de carbono. A presença do grupo ácido carboxílico também pode ser confirmada pela ausência dos sinais $\delta_{\text{H}} \approx 3,6$ ppm e $\delta_{\text{C(HSQC)}} \approx 52$ ppm referentes à metila grupo éster metílico proveniente da biossíntese da porção secologanina presente nos alcaloides monoterpene indólicos.

Todos os dados acima discutidos corroboraram para a proposição da estrutura do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (**143**), cuja estrutura química é mostrada na Figura 29, sendo este o primeiro relato desta substância na literatura. Todos os dados de NMR uni e bidimensionais adquiridos para este alcaloide inédito foram compilados e são mostrados na Tabela 13. No Anexo 9 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

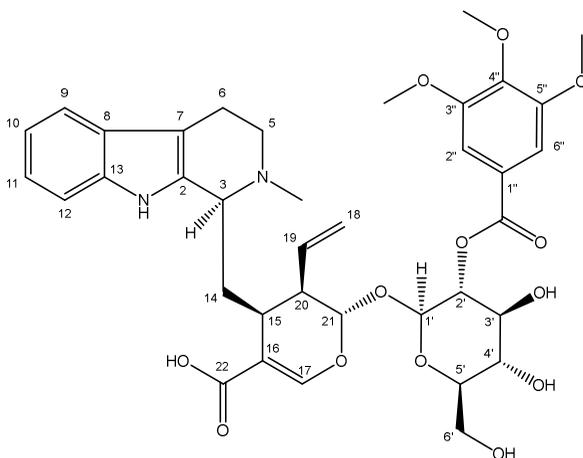


Figura 29. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico inédito ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (**143**), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

Tabela 13. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-estrictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcalóide de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | NOESY | HMBC ² J, ³ J |
|------------------|------------------|---|--------------------------------|-------------------|--|
| 2 | ** | - | - | - | - |
| 3 | 57,9 | 3,86 (dd; 13,2; 8,9; 1H) | H14a, H14b | H6b | NCH ₃ |
| NCH ₃ | 40,9 | 2,57 (s; 3H) | - | H3, H5b | - |
| 5 | 47,0 | (a) 2,94 (m; 1H) (b) 3,21 (m; 1H) | H5b H5a | H5b H5a | NCH ₃ |
| 6 | 17,9 | (a) 2,75 (m; 1H) (b) 2,94 (m; 1H) | H6b H6a | H6b H3, H6a | - |
| 7 | ** | - | - | - | - |
| 8 | 136,3 | - | - | - | H10, H12 |
| 9 | 111,1 | 7,56 (d; 8,1; 1H) | H10 | H10 | H12 |
| 10 | 121,0 | 7,12 (ddd; 8,1; 7,2; 0,8; 1H) | H9 | H9 | H11 |
| 11 | 118,5 | 7,03 (ddd; 7,81; 7,2; 0,8; 1H) | H12 | H12 | H9 |
| 12 | 117,3 | 7,45 (d; 7,8; 1H) | H11 | H11 | H10 |
| 13 | 126,4 | - | - | - | H9, H11 |
| 14 | 31,4 | (a) 1,73 (ddd; 13,1; 13,2; 4,6; 1H) (b) 2,43 (ddd; 13,1; 8,9; 2,8; 1H) | H3, H14b, H15 H3, H14a, H15 | H14b, H15 H14a | - |

| | | | | | |
|-----------|-------|--|------------------------|------------------------|------------|
| 15 | 27,3 | 2,94 (m; 1H) | H14a, H14b, H17 | H17 | - |
| 16 | 109,0 | - | - | - | H17 |
| 17 | 151,4 | 7,15 (d; 1,2; 1H) | H15 | H15 | H21 |
| 18 | 119,7 | (a) 5,29 (dd; 10,1; 1,3; 1H) (b) 5,36 (dd; 16,7; 1,3; 1H) | H19 H19 | H19, H20 H19, H20 | - |
| 19 | 133,4 | 5,61 (dt; 16,7; 10,1; 9,8; 1H) | H18a, H18b, H20 | H18a, H18b | - |
| 20 | 43,4 | 2,94 (m; 1H) | H19, H21 | H21, H18a, H18b | H18a, H18b |
| 21 | 95,7 | 5,50 (d; 1,6; 1H) | H20 | H20 | H17, H1' |
| 22 | ** | - | - | - | - |
| 1' | 95,7 | 5,01 (d; 8,1; 1H) | H2' | H3', H5' | H21 |
| 2' | 73,6 | 5,09 (dd; 9,3; 8,1; 1H) | H1', H3' | H3' | - |
| 3' | 74,1 | 3,82 (dd; 9,3; 8,2; 1H) | H2', H4' | H1', H5' | H4' |
| 4' | 70,5 | 3,48 (m; 1H) | H3' | - | - |
| 5' | 77,3 | 3,48 (m; 1H) | H6'a, H6'b | H1', H3' H6'a, H6'b | H4' |
| 6' | 61,5 | (a) 3,76 (dd; 11,8; 5,1; 1H) (b) 3,99 (d; 11,8; 1H) | H5', H6'b H5', H6'a | H5', H6'b H5', H6'a | - |

| | | | | |
|-------------------------|-------|--------------|---|--------------------|
| 1'' | 139,7 | - | - | H2'', H6'' |
| 2'', 6'' | 107,0 | 7,19 (s; 2H) | - | H3''OMe H5''OMe |
| 3'', 5'' | 146,7 | - | - | H3''OMe H5''OMe |
| 4'' | 119,2 | - | - | H2'', H6'' |
| 3'', 5'' OMe | 55,2 | 3,58 (s; 6H) | - | H3''OMe |
| 4'' OMe | 50,0 | 3,29 (s; 3H) | - | H3''OMe H5''OMe |
| C=O | 166,1 | - | - | H2'', H6'', H2' |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*4. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=duplete, dd=duplo-duplete, ddd=duplo-duplete duplo, m=multiplete, s=simpleto; acoplamento – *J* / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC. **não atribuído devido à baixa intensidade dos sinais obtidos no espectro bidimensional HMBC.

Elucidação estrutural do pico 5

O pico 5 foi coletado no intervalo de 23,2 a 23,5 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 679,2493 calculado para $[M+H]^+ C_{35}H_{39}N_2O_{12}^+$ (679,2498 com erro de 0,7 ppm). O espectro de UV apresentou três bandas com comprimentos de onda máximos em 224, 280 e 400 nm. Os espectros de UV e de massas de alta resolução são apresentados no Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente. A busca na literatura através do scifinder® por alguma substância com a fórmula molecular $C_{35}H_{38}N_2O_{12}$ não encontrou resultados, indicando que esta substância pode ser inédita.

Analisando o espectro de NMR de 1H , disponível no Apêndice 29, observou-se o padrão de sinais para um sistema de anel indólico, com dois dupletos centrados em δ_{H9} 7,32 e δ_{H12} 7,26 ppm ($J_{9-10} = 7,9$ e $J_{11-12} = 7,1$ Hz – *orto*), atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 (δ_{C9} 117,5 ppm) e C12 (δ_{C12} 110,6 ppm), respectivamente, e dois duplo-dupletos duplos centrados em δ_{H10} 6,99 e δ_{H11} 7,06 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 (δ_{C10} 118,4 ppm) e C11 (δ_{C11} 120,7 ppm) que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento mútuo do tipo *orto* $J_{11-12} = 8,0$ Hz e do tipo *meta* nos valores de $J_{9-11} = 0,9$ e $J_{10-12} = 0,8$ Hz. Os acoplamentos foram confirmados através dos espectros bidimensionais COSY (Apêndice 30) e NOESY (Apêndice 31) e os sinais de carbono foram atribuídos pelo espectro bidimensional HSQC (Apêndice 32) e HMBC (Apêndice 33).

No espectro HSQC foram observados os sinais dos carbonos metilênicos, δ_{C5} 42,9 e δ_{C6} 20,5 ppm atribuídos aos C5 e C6 assim como seus respectivos sinais de hidrogênios correlacionados. Os sinais destes hidrogênios metilênicos apresentaram um comportamento coincidente com um padrão de multiplicidades esperado para um sistema AA'BB' do tipo *gauche* estrelado.

Observando o espectro bidimensional HMBC, o sinal de carbono em δ_{C8} 126,8 ppm foi atribuído ao C8 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H10 e H12, o sinal de carbono em δ_{C13} 136,0 ppm foi atribuído ao C13 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H9 e H11, o sinal de em δ_{C7} 108,8 ppm foi atribuído ao C7 por apresentar correlação 3J com o sinal de hidrogênio H5b e o sinal em δ_{C2} 131,8 ppm foi atribuído ao C2 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H6a e H6b.

Os sinais dos hidrogênios metilênicos, observados no espectro de NMR de 1H , foram um duplo-dupletos duplo centrado em δ_{H5a} 2,88 ppm e

um duplo-dupletto centrado em δ_{H5b} 4,74 ppm, com acoplamento geminal de $J_{5a-5b} = 12,5$ Hz atribuídos aos hidrogênios H5a e H5b, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios H6a e H6b foram atribuídos, respectivamente, um duplo-duplo-dupletto duplo centrado em δ_{H6a} 2,39 ppm com acoplamento geminal com o duplo-dupletto duplo centrado em δ_{H6b} 2,44 ppm com $J_{6a-6b} = 15,2$ Hz. Estes hidrogênios metilênicos apresentam acoplamentos vicinais $J_{5a-6a} = 12,0$ Hz, $J_{5a-6b} = 5,1$ Hz, $J_{5b-6a} = 5,5$ Hz e $J_{5b-6b} = 1,0$ Hz confirmados no espectro COSY. No espectro de NMR de 1H , também foi observada a diferença de deslocamentos químicos entre os hidrogênios H5a e H5b, atribuído ao efeito de doação eletrônica do orbital sp^3 não ligante do nitrogênio N4 para o orbital antiligante (σ^* -LUMO) da ligação C5-H5a, que causa uma maior blindagem.

As multiplicidades dos sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos H5b, H6a e H6b foram obtidas com o auxílio de simulações no software FOMSC3 (Figura 30). O sinal do H5b apresentava-se sobreposto com um duplo-dupletto, ambos com integral reduzida devido à proximidade com o sinal do solvente que foi suprimido através de sequência de pulso com pré-saturação de sinal (Figura 30a). Os sinais dos hidrogênios H6a e H6b apresentavam alguma sobreposição e, devido à proximidade de deslocamentos químicos, apresentavam uma deformação causada pelo chamado “efeito de telhado”, *roof effect*, conforme indicado na Figura 30b com as linhas retas vermelhas.

O espectro bidimensional COSY mostrou uma correlação do sinal H6a com o multipletto centrado em δ_{H3} 4,89 ppm (δ_{C3} 53,4 ppm), com constante de acoplamento $J_{3-6a} = 2,4$ Hz, atribuído ao carbono C3 por comparação com os dados espectrais dos compostos anteriores. Este sinal também apresentou uma integral reduzida devido à proximidade com o sinal do solvente suprimido. A multiplicidade deste sinal foi atribuída como duplo-dupletto duplo através da obtenção das constantes de acoplamento dos sinais de hidrogênio metilênicos H6a, H14a e H14b, cujos sinais apresentaram correlações nos espectros COSY e NOESY.

As constantes de acoplamento observadas no espectro de NMR de 1H entre o sinal do H3 e os hidrogênios metilênicos ligados ao C14 (δ_{C14} 26,1 ppm) foram de $J_{3-14a} = 4,6$ Hz com o duplo-dupletto duplo centrado em δ_{H14a} 1,93 ppm e de $J_{3-14b} = 2,4$ Hz com o duplo-dupletto duplo centrado em δ_{H14b} 2,32 ppm. Para estes hidrogênios do metileno C14 foi observado acoplamento mútuo de $J_{14a-14b} = 14,1$ Hz além dos acoplamentos vicinais com o duplo-duplo-dupletto duplo centrado em δ_{H15} 2,58 ppm (δ_{C15} 23,3 ppm) nos valores de $J_{14a-15} = 13,5$ e $J_{14b-15} = 5,0$ Hz.

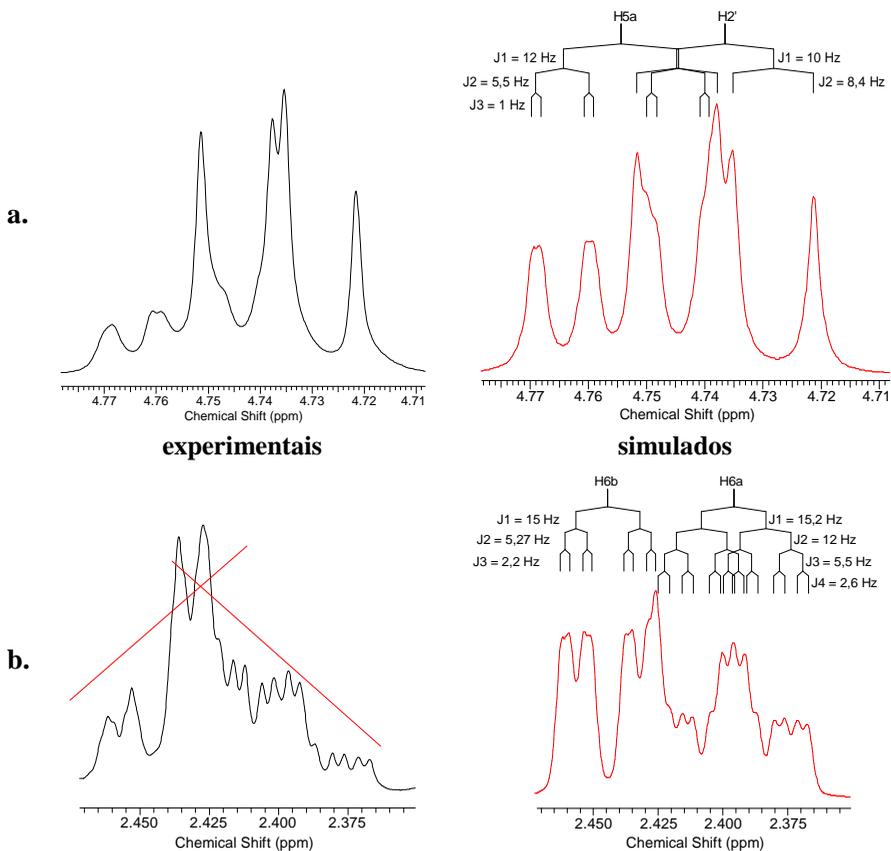


Figura 30. Comparação entre os multipletos os obtidos experimentalmente para os pares de sinais de hidrogênios sobrepostos (a) H5b/H2' e (b) H6a/H6b e os simulados através do software FOMSC3 (pico 5 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*)

O sinal de hidrogênio do H15 apresentou correlação no COSY com um duplete centrado δ_{H17} 7,24 ppm (δ_{C17} 146,5 ppm) com valor de constante de $J_{15-17} = 2,4$ Hz e com o sinal do duplo-duplete duplo centrado em δ_{H20} 2,63 ppm (δ_{C20} 42,9 ppm) com valor de constante de $J_{15-20} = 5,6$ Hz. O sinal de hidrogênio H20 apresentou acoplamento de $J_{20-19} = 9,7$ Hz com o duplo-duplo duplete centrado em δ_{H19} 5,63 ppm (δ_{C19} 132,8 ppm), que compõe um grupo de sinais coincidente com o esperado para um padrão ABX juntamente com os sinais de hidrogênio atribuídos aos H18a e H18b do alceno terminal proveniente da porção secologanina do

alcaloide. Neste grupo foram observadas no espectro COSY as correlações do sinal do H19 com os dupletos centrados em δ_{H18a} 5,30 e δ_{H18b} 5,35 ppm, com valores de constantes de acoplamento do tipo vicinal *cis* com $J_{18a-19} = 10,1$ Hz e vicinal *trans* com $J_{18b-19} = 17,0$ Hz. Estes hidrogênios H18a e H18b também apresentaram acoplamento do tipo geminal de $J_{18a-18b} = 1,6$ Hz e, no espectro HSQC, apresentaram correlação com o sinal de carbono δ_{C18} 119,3 ppm.

No espectro COSY também foi observada correlação do sinal do H20 com duplete centrado em δ_{H21} 5,45 ppm (δ_{C21} 95,5 ppm), atribuído ao hidrogênio ligado ao C21. No espectro NOESY foi observada uma correlação do sinal do H21 com um duplete centrado em $\delta_{\text{H1'}}$ 4,99 ppm ($\delta_{\text{C1'}}$ 95,6 ppm) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico da glicose evidenciando que este encontra-se ligado ao C21. No espectro HMBC foram observadas as correlações mútuas C21-H1' / C1'-H21, que corroboram para a posição da glicose.

O espectro COSY mostrou correlação do hidrogênio anomérico H1' com um duplo-duplete centrado em $\delta_{\text{H2'}}$ 4,74 ppm, atribuído ao C2' ($\delta_{\text{C2'}}$ 73,4 ppm) com uma constante de acoplamento de $J_{1'-2'} = 8,3$ Hz, característica de β -glicosídeo. Também foi observada, no COSY, uma correlação do H2' com o sinal do duplo-duplete centrado em $\delta_{\text{H3'}}$ 3,59 ppm com $J_{2'-3'} = 9,4$ Hz, atribuído ao C3' ($\delta_{\text{C3'}}$ 74,8 ppm). O sinal do H3' que apresentou acoplamento de $J_{3'-4'} = 9,0$ Hz com o duplo-duplete centrado em $\delta_{\text{H4'}}$ 3,35 ppm atribuído ao C4' ($\delta_{\text{C4'}}$ 70,5 ppm) que, por sua vez, apresentou acoplamento de $J_{4'-5'} = 9,8$ Hz com o duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{\text{H5'}}$ 3,40 ppm atribuído ao C5' ($\delta_{\text{C5'}}$ 77,2 ppm) do açúcar. O espectro NOESY mostrou correlação do sinal do H1' com os sinais dos hidrogênios H3' e H5', devido ao fato destes três hidrogênios estarem ligados na posição axial do açúcar em uma conformação de cadeira.

No espectro HSQC, foram observados os dois sinais dos hidrogênios hidroximetílicos ligados ao C6' ($\delta_{\text{C6'}}$ 61,5 ppm) do açúcar como sendo um duplo-duplete centrado em $\delta_{\text{H6'a}}$ 3,69 ppm apresentando acoplamento geminal de $J_{6'a-6'b} = 11,9$ Hz com o duplete centrado em $\delta_{\text{H6'b}}$ 3,91 ppm, confirmadas pelo COSY. Ambos os sinais apresentaram correlação no COSY como H5' com valores de constantes de acoplamento de $J_{5-6'a} = 5,74$ e $J_{5-6'b} = 2,0$ Hz, respectivamente.

Através da comparação dos dados de deslocamentos químicos de carbono e de hidrogênio da região do açúcar apresentados pelo pico 5 com os dados do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (**143**) e da strictosamida (**32**) foi possível perceber uma que maior semelhança com o alcaloide **143**. Na Figura 31 são mostradas as sobreposições das regiões ampliadas dos espectros de HSQC onde se

encontram os sinais de açúcar, em (a), para o pico 5 e alcaloide **143** e, em (b), para o pico 5 o alcaloide **32**. Assim como no alcaloide **143**, o sinal do H2' do pico 5 apresenta uma desblindagem pronunciada em comparação com o H2' da strictosamida (**32**), supondo a presença de um grupo retirador de elétrons forte. Analisando o espectro HMBC foi observada uma correlação do sinal do H2' com um sinal de carbono em $\delta_{C=O}$ 165,3 ppm, um sinal típico de carbonila de éster [156] que justifica tal desblindagem no sinal do H2'.

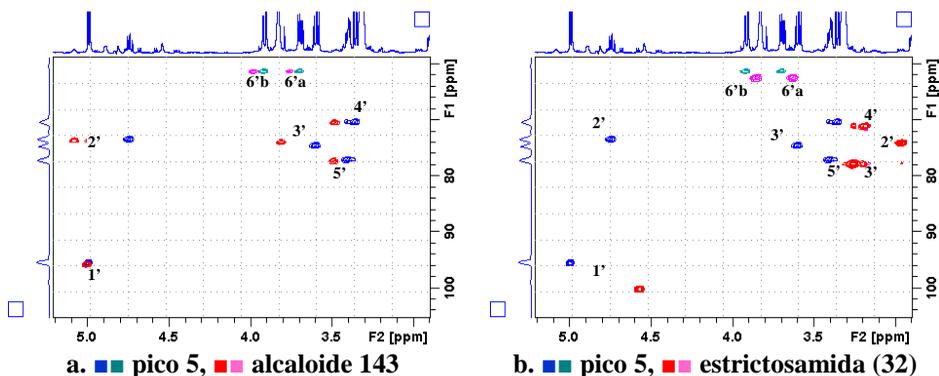


Figura 31. Sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC na região onde se encontram os sinais de açúcar dos picos 5 e alcaloide **143** (a) e do pico 5 e strictosamida (**32**) (b)

No espectro HSQC foi observado um sinal de carbono na região de aromático em $\delta_{C2''/6''}$ 106,5 ppm, correlacionado a um simpleto em $\delta_{H2''/6''}$ 6,90 ppm com integral relativa a dois hidrogênios no espectro de NMR de 1H , atribuído aos carbonos simétricos C2'' e C6''. O sinal dos hidrogênios H2''/6'' apresentaram correlações, no HMBC, com os carbonos não hidrogenados em $\delta_{C1''}$ 119,2 ppm, atribuído ao C1'', $\delta_{C4''}$ 140,0 ppm, atribuído ao C4'' e também com o sinal da carbonila de éster em $\delta_{C=O}$ 165,3 ppm. Para os sinais dos hidrogênios H2''/6'' foram observadas correlações, no espectro NOESY, com um simpleto em $\delta_{H3''/5''OMe}$ 3,83 ppm ($\delta_{C3''/5''OMe}$ 55,5 ppm) com integral relativa de seis hidrogênios, atribuídos às duas metoxilas simétricas substituintes nas posições 3'' e 5'' do anel aromático. No espectro HMBC foi observada uma correlação do sinal dos hidrogênios das metoxilas com o sinal de carbono em $\delta_{C3''/5''}$ 146,9 ppm atribuído aos carbonos simétricos não hidrogenados C3''/C5''. O valor de deslocamento químico de $\delta_{C4''}$ 140,0 ppm, atribuído ao sinal do carbono não hidrogenado C4'', sugere que este

apresente um grupo hidroxila como substituinte. Estas informações mostram que o substituinte esterificado ao C2' do açúcar se trata do 3,5-dimetoxibenzoato ou siringato, proveniente do ácido 3,5-dimetoxibenzoico ou ácido siríntrico.

Todos os dados acima discutidos corroboraram para a proposição da estrutura do alcaloide monoterpene indólico inédito 2'-siringil-strictosamida (**144**), cuja estrutura é mostrada na Figura 32, sendo este o primeiro relato desta substância na literatura. O alcaloide 2'-siringil-strictosamida (**144**) é um derivado da strictosamida (**32**), provavelmente formado a partir de uma reação de esterificação com o ácido siríntrico em meio enzimático.

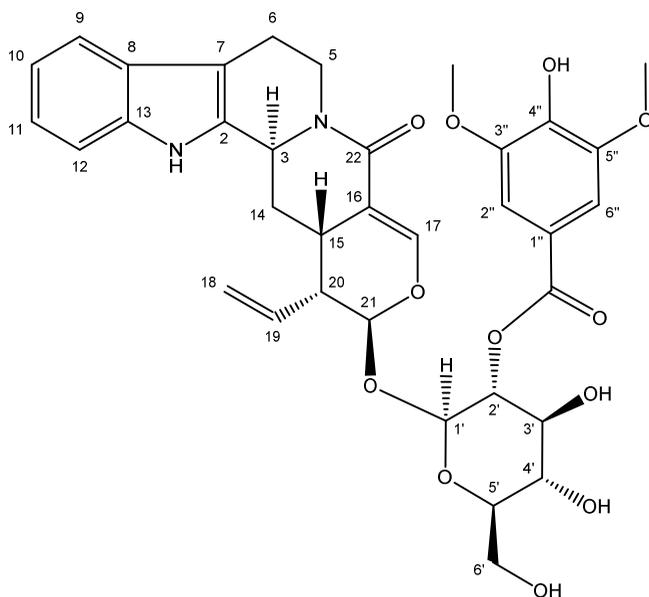


Figura 32. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico inédito 2'-siringil-strictosamida (**144**), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

Todos os dados de NMR uni e bidimensionais adquiridos para este alcaloide inédito foram compilados e são mostrados na Tabela 14. No Anexo 10 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

Tabela 14. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | NOESY | HMBC ² J, ³ J |
|----|------------------|---|------------------------------------|--------------------------------|--|
| 2 | 131,8 | - | - | - | H6a, H6b |
| 3 | 53,4 | 4,89 (ddd; 4,6; 2,4; 2,4; 1H) | H6b, H14a, H14b | H14a, H14b, H5a | - |
| 5 | 42,9 | (a) 2,88 (ddd; 12,5; 12,0; 5,1; 1H) (b) 4,75 (ddd; 12,5; 5,5; 1,0; 1H) | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b | - |
| 6 | 20,5 | (a) 2,39 (dddd; 15,2; 12,0; 5,5; 2,4; 1H) (b) 2,44 (ddd; 15,2; 5,1; 1,0; 1H) | H3, H5a, H5b, H6b H5a, H5b, H6a | H5a, H5b H5a, H5b, H9 | - |
| 7 | 108,8 | - | - | - | H5b |
| 8 | 126,8 | - | - | - | H10, H12 |
| 9 | 117,5 | 7,32 (d; 7,9; 1H) | H10 | H6b, H10 | H11 |
| 10 | 118,4 | 6,99 (ddd; 7,9; 7,01 0,8; 1H) | H9, H11 | H9 | H12 |
| 11 | 120,7 | 7,06 (ddd; 8,0; 7,1; 0,9; 1H) | H10, H12 | H12 | H9 |
| 12 | 110,6 | 7,26 (d; 8,0; 1H) | H11 | H11 | H10 |
| 13 | 136,0 | - | - | - | H9, H11 |
| 14 | 26,1 | (a) 1,93 (ddd; 14,1; 13,5; 4,6; 1H) (b) 2,32 (ddd; 14,2; 5,0; 2,4; 1H) | H3, H14b, H15 H3, H14a, H15 | H3, H14b H3, H14a | - |

| | | | | | |
|-----------|-------|---|---|---------------------------------|----------------------|
| 15 | 23,3 | 2,58 (dddd; 1,3,5; 5,6; 5,0; 2,4; 1H) | H14a, H14b H17, H20 | H18a, H18b | H21 H14a, H20 |
| 16 | 132,2 | - | - | - | H21 |
| 17 | 146,5 | 7,24 (d; 2,4; 1H) | H15 | - | H21 |
| 18 | 119,3 | (a) 5,30 (dd; 10,1; 1,6; 1H) (b) 5,35 (dd; 17,0; 1,6; 1H) | H18b, H19 H18a, H19 | H15 H15, H20 | H20 |
| 19 | 132,8 | 5,63 (ddd; 17,0; 10,1; 9,7; 1H) | H18a, H18b, H20 | H18a, H18b | - |
| 20 | 42,9 | 2,63 (ddd; 9,7; 5,6; 1,6; 1H) | H15, H19, H21 | H18b, H21 | H18a, H18b |
| 21 | 95,5 | 5,45 (d; 1,6; 1H) | H20 | H20, H1' | H17, H1' H19, H20 |
| 22 | 164,3 | - | - | - | H3, H17 |
| 1' | 95,6 | 4,99 (d; 8,3; 1H) | H2' | H3', H5', H21 | H21 |
| 2' | 73,4 | 4,74 (dd; 9,4; 8,3; 1H) | H1', H3' | H1' | H3' |
| 3' | 74,8 | 3,59 (dd; 9,4; 9,0; 1H) | H4', H2' | H1' | H2' |
| 4' | 70,4 | 3,35 (dd; 9,8; 9,0; 1H) | H5', H3' | - | H5' |
| 5' | 77,2 | 3,40 (ddd; 9,8; 5,7; 2,0; 1H) (a) 3,69 (dd; 11,9; 5,7; 1H) (b) 3,91 (dd; 11,9; 2,0; 1H) | H4', H6'a, H6'b H5', H6'b H5', H6'a | H1', H6'a, H6'b H6'b H6'a | H4' |
| 6' | 61,4 | - | - | - | - |

| | | | | | |
|------------------------|-------|--------------|---|------------------|------------------|
| 1'' | 119,2 | - | - | - | H2'', H6'' |
| 2''/6'' | 106,5 | 6,90 (s; 2H) | - | 5''OMe 3''OMe | - |
| 3''/5'' | 146,9 | - | - | - | 5''OMe 3''OMe |
| 4'' | 140,0 | - | - | - | H2'', H6'' |
| 3''/5'' OMe | 55,5 | 3,83 (s; 6H) | - | H2'', H6'' | - |
| C=O | 165,3 | - | - | - | H2'', H6'' |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*4. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=dupleteo, dd=duplo-dupleteo, ddd=duplo-dupleteo duplo, dddd=duplo-duplo-dupleteo duplo, s=simpleto; acoplamento – *J* / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC.

Elucidação estrutural do pico 3

O pico 3 foi coletado no intervalo de 18,5 a 18,8 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 677,2934 calculado para $[M+H]^+ C_{33}H_{45}N_2O_{13}^+$ (677,2916 com erro de 2,6 ppm). O espectro de UV apresentou duas bandas com comprimentos de onda máximos em 223 e 291 nm. Os espectros de UV e de massas de alta resolução são apresentados no Apêndice 1 e Apêndice 2, respectivamente. A busca na literatura através do scifinder® por alguma substância com a fórmula molecular $C_{33}H_{44}N_2O_{13}$ não encontrou resultados, indicando que esta substância seja inédita.

Através da análise do espectro de NMR de 1H , disponível no Apêndice 34, observou-se o padrão de sinais de hidrogênios aromáticos de um sistema de anel indólico, com dois dupletos centrados em δ_{H9} 7,62 e δ_{H12} 7,45 ppm ($J_{9-10} = 7,8$ e $J_{11-12} = 7,5$ Hz – *orto*), atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos C9 (δ_{C9} 115,8 ppm) e C12 (δ_{C12} 120,2 ppm), respectivamente, e dois duplo-dupletos centrados em δ_{H10} 7,14 e δ_{H11} 7,09 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 (δ_{C10} 124,1 ppm) e C11 (δ_{C11} 122,3 ppm) que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento mútuo do tipo *orto* $J_{10-11} = 7,3$ Hz. Os acoplamentos foram confirmados através dos espectros bidimensionais COSY (Apêndice 35) e NOESY (Apêndice 36) e os sinais de carbono foram atribuídos pelo espectro bidimensional HSQC (Apêndice 37) e HMBC (Apêndice 38).

No espectro HSQC foram observados os sinais dos carbonos metilênicos, δ_{C5} 54,0 e δ_{C6} 24,8 ppm atribuídos aos C5 e C6 assim como seus respectivos sinais de hidrogênios correlacionados. O sinal do C5 estava correlacionado com um multipletto centrado em δ_{H5a} 3,54 ppm e o duplo-dupletto centrado em δ_{H5b} 3,77 ppm, apresentando acoplamento geminal de $J_{5a-5b} = 12,0$ Hz, atribuídos aos hidrogênios H5a e H5b. No espectro HSQC, o sinal do C6 estava correlacionado com um multipletto centrado em $\delta_{H6a/b}$ 2,81 ppm, com integral relativa a dois hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios H6a e H6b. O espectro bidimensional COSY confirma a correlação mútua entre os sinais dos hidrogênios H5a e H5b, assim como de ambos com o sinal atribuído ao par H6a/H6b.

No espectro bidimensional HMBC o sinal de carbono não hidrogenado em δ_{C8} 138,0 ppm foi atribuído ao C8 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H10 e H12, o sinal de carbono em δ_{C13} 130,0 ppm foi atribuído ao C13 por apresentar correlação 3J com os hidrogênios H9 e H11, o sinal de em δ_{C7} 112,9 ppm foi atribuído ao C7

por apresentar correlação 3J com o sinal de hidrogênio H5b e correlação 2J com o sinal do par H6a/H6b. O sinal em δ_{C2} 137,1 ppm foi atribuído ao C2 por apresentar correlação 3J com o sinal do par H6a/H6b.

No espectro de NMR de 1H foi observado um par de sinais, correlacionados entre si no COSY, atribuído aos hidrogênios do metileno C14 (δ_{C14} 35,8 ppm), sendo um duplo-duplete duplo centrado em δ_{H14a} 1,40 ppm e um multiplete centrado em δ_{H14b} 3,21 ppm. No espectro COSY foram observadas correlações destes hidrogênios metilênicos com um sinal centrado em δ_{H3} 4,82 ppm, correlacionado com o sinal de carbono em δ_{C3} 50,9 ppm no espectro HSQC, atribuído ao H3. O sinal do H3 apresentou deslocamento químico coincidente com o sinal do solvente que foi eliminado por supressão durante a aquisição do NMR de 1H .

O espectro NOESY mostrou correlação dos hidrogênios metilênicos H14a/b com o multiplete centrado em δ_{H15} 3,04 ppm atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono metínico C15 (δ_{C15} 35,4 ppm) atribuído ao carbono C15. No espectro COSY foi observada correlação entre o H15 e o multiplete centrado em δ_{H20} 2,56 ppm ligado ao carbono alílico C20 (δ_{C20} 53,3 ppm).

No espectro COSY foi observado acoplamento do sinal de hidrogênio H20 com o duplo-duplete duplo centrado em δ_{H19} 5,90 ppm, com acoplamento de $J_{20-19} = 9,5$ Hz, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono vinílico C19 (δ_{C19} 141,9 ppm). No espectro COSY também foram observados acoplamentos do H19 com o duplo-duplete centrado em δ_{H18a} 5,05 ppm e o duplete largo centrado em δ_{H18b} 5,13 ppm, com valores de constantes de acoplamento do tipo vicinal *cis* com $J_{18a-19} = 9,9$ Hz e vicinal *trans* com $J_{18b-19} = 17,1$ Hz. Estes hidrogênios H18a e H18b também apresentaram acoplamento do tipo geminal de $J_{18a-18b} = 1,4$ Hz e, no espectro HSQC, apresentaram correlação com o sinal de carbono δ_{C18} 117,8 ppm. Estes hidrogênios H18a/b e H19 compõem o grupo vinil proveniente da porção secologanina do alcaloide.

No espectro de NMR de 1H foi observado o sinal característico do hidrogênio olefínico β -carbonila H17 como sendo um simpleto em δ_{H17} 7,74 ppm, correlacionado ao carbono δ_{C17} 150,0 ppm no HSQC. No espectro HMBC foi observada correlação do H17 com o sinal de carbono em δ_{C22} 173,0 ppm, atribuído à carbonila de éster C22. Também foi observado, no HMBC, correlação do sinal da carbonila C22 com um simpleto com integral relativa a três hidrogênios em δ_{H23} 3,67 ppm atribuído aos hidrogênios ligados à metila do éster C23 (δ_{C23} 52,3 ppm).

No espectro HSQC foi observada, na região de açúcar, uma quantidade maior de sinais sugerindo a presença de dois açúcares, porém a grande proximidade dos sinais de carbono e hidrogênio dificultou as

atribuições. Para facilitar as atribuições dos sinais, foram sobrepostos os espectros de HSQC adquiridos para o composto correspondente ao pico 3 e o adquirido para o lialosídeo (**54**), pico 1 isolado de *P. rhytidocarpa*, (Figura 33).

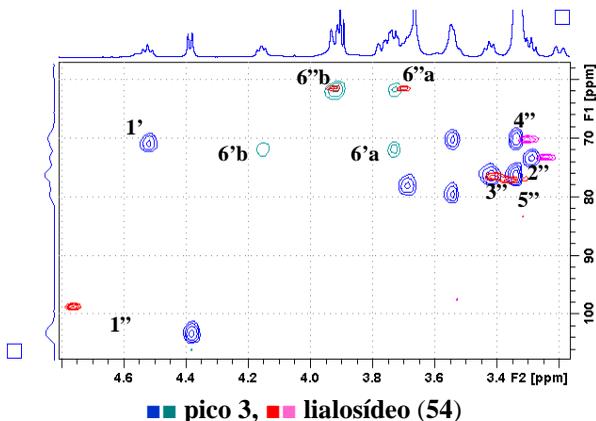


Figura 33. Sobreposição das regiões ampliadas dos espectros HSQC na região onde se encontram os sinais de açúcar coincidentes para o composto correspondente ao pico 3 e o lialosídeo (**54**), pico 1 isolado da espécie *P. rhytidocarpa*

Na Figura 33 observa-se que há um grupo de sinais com grande similaridade de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio entre os dois alcaloides comparados. No espectro de NMR de ¹H do composto correspondente ao pico 3 foi observado que o duplete centrado em $\delta_{H1''}$ 4,39 ppm, ligado ao carbono anomérico C1'' ($\delta_{C1''}$ 103,0 ppm), apresentou constante de acoplamento no valor de $J_{1''-2''} = 8,1$ Hz, um valor correspondente a um β -glicosídeo.

No espectro HMBC foram observadas as correlações do carbono anomérico C1'' com os sinais de hidrogênio em $\delta_{H6'a}$ 3,73 e $\delta_{H6'b}$ 4,16 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono C6', cujo deslocamento químico de carbono, $\delta_{C6'}$ 64,0 ppm, sugere que seja do tipo éter. No HMBC também foi observada a correlação do sinal do C6' com o H1''. Estas informações indicam que esta unidade glicosídica está ligada no carbono C6' de uma primeira unidade glicosídica através de uma ligação O-glicosídica. Isto explica a diferença de deslocamentos químicos entre o sinal do hidrogênio anomérico, H1'', do composto correspondente ao pico 3 é mais blindado que o sinal observado para o hidrogênio anomérico do alcaloide lialosídeo (**54**) observada na Figura 33.

No espectro COSY foi observada correlação do H1'' com o duplo-dupleto centrado em $\delta_{H2''}$ 3,29 ppm, ligado ao carbono C2'' ($\delta_{C2''}$ 73,5 ppm) do açúcar. No espectro de NMR de 1H , o duplo-dupleto centrado em $\delta_{H3''}$ 3,43 ppm, ligado ao carbono C3'' ($\delta_{C3''}$ 76,2 ppm) do açúcar, apresentou acoplamentos no valor de $J_{2''-3''} = 8,4$ Hz com o H2'' e no valor de $J_{3''-4''} = 8,3$ Hz com o H4''. Os hidrogênios H4'' e H5'' apresentaram-se como um multiplete centrado em $\delta_{H4''/5''}$ 3,34 ppm e correlacionados no HSQC com os sinais de carbono $\delta_{C4''}$ 70,1 e $\delta_{C5''}$ 76,5 ppm. No espectro de NMR de 1H , o multiplete centrado em $\delta_{H6''a}$ 3,73 ppm e o dupleto largo centrado em $\delta_{H6''b}$ 3,93 ppm, com acoplamento geminal no valor de $J_{6''a-6''b} = 12,0$ Hz, foram atribuídos aos hidrogênios do carbono hidroximetílico C6'' ($\delta_{C6''}$ 61,5 ppm).

Devido à grande proximidade entre os sinais de hidrogênio no espectro de NMR de 1H , as multiplicidades de alguns hidrogênios da primeira unidade glicosídica e seus deslocamentos químicos foram atribuídos com o auxílio de simulação feita através do software ChemDraw®. Os sinais dos hidrogênios H3' e H5' apresentaram-se sobrepostos entre si e foram atribuídos ao multiplete centrado em $\delta_{H3'/5'}$ 3,52 ppm. Os sinais dos hidrogênios H2' e H4' também se apresentaram sobrepostos entre si e foram atribuídos ao multiplete centrado em $\delta_{H2'/4'}$ 3,69 ppm. No espectro HSQC os sinais dos carbonos C3', C4' e C5' desta unidade glicosídica foram atribuídos, respectivamente, aos sinais em $\delta_{C3'}$ 70,4, $\delta_{C4'}$ 62,0 e $\delta_{C5'}$ 79,8 ppm.

No espectro de NMR de 1H foi observado um duplo-dupleto centrado em $\delta_{H1'}$ 4,52 ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C1' ($\delta_{C1'}$ 70,8 ppm) da primeira unidade glicosídica. No espectro COSY foi observada a correlação do H1' com o dupleto centrado em δ_{H21} 5,18 ppm, com $J_{21-1'} = 8,8$ Hz, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C21 (δ_{C21} 88,9 ppm). A atribuição do sinal do hidrogênio H21 foi confirmada pela correlação com o sinal do hidrogênio H14b, observada no espectro NOESY. A ausência de acoplamento entre os hidrogênios H20 e H21 pode ser explicado por um possível ângulo próximo de 90° entre as ligações H-C(20)-C(21)-H, de acordo com o diagrama de Karplus [155]. Estas informações corroboram para a presença de uma ligação do tipo C-glicosídica desta primeira unidade glicosídica no carbono C21 da porção secologanina do alcaloide. A Figura 34 sinaliza, através de setas coloridas, as correlações observadas nos espectros COSY, NOESY e HMBC.

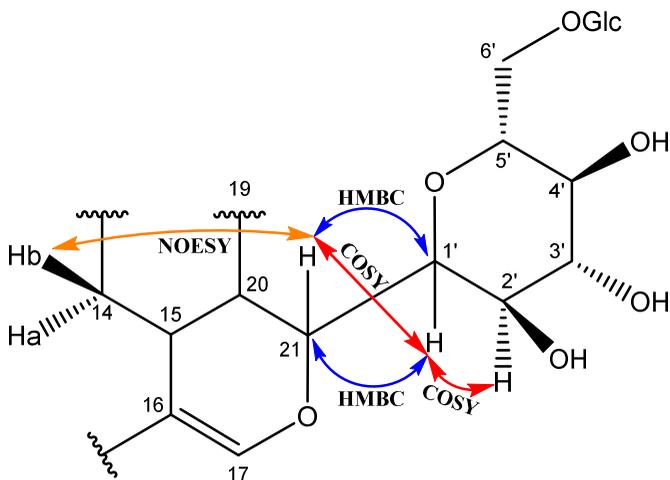


Figura 34. Demonstração das correlações observadas nos espectros COSY, em vermelho, HMBC, em azul, e NOESY, em laranja, para a porção da secologanina e da ligação C-glicosídica com a primeira unidade glicosídica do alcaloide correspondente ao pico 2 isolado da espécie *P. rhytidocarpa*

No espectro COSY o sinal do H1' apresentou correlação com o H2' com valor de constante de acoplamento de $J_{1'-2'} = 8,9$ Hz, valor este equivalente a uma ligação β -glicosídica. O sinal de carbono em $\delta_{C2'} 78,1$ ppm foi atribuído ao C2' devido à correlação de 2J observada no espectro HMBC com o sinal de hidrogênio H1'.

Todos os dados acima discutidos corroboraram para a proposição da estrutura do alcaloide monoterpene indólico (**145**), um derivado da estrictosidina (**17**) aglicona contendo um grupo 21-C-(β -D-glicopiranosil-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glicopiranosídeo) cuja estrutura numerada é mostrada na Figura 35. Os dados encontrados na literatura [162] para a estrictosidina (**17**) auxiliaram na elucidação da porção aglicona do alcaloide.

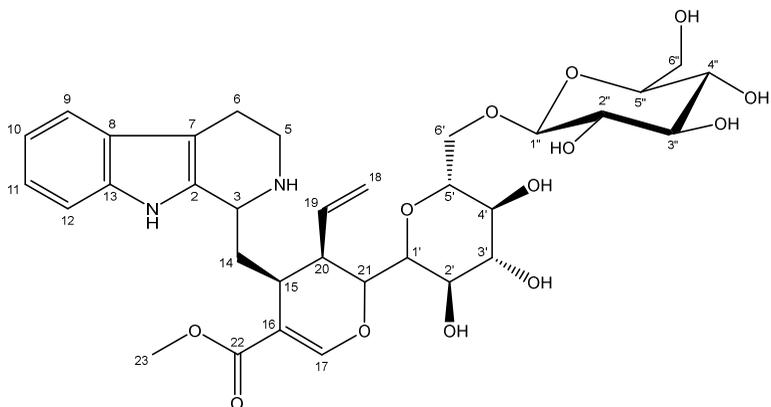


Figura 35. Proposta de estrutura para o alcaloide monoterpene indólico derivado da strictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *P. rhytidocarpa*

Apesar dos dados experimentais corroborarem para esta proposta, não foram encontrados na literatura relatos da ocorrência de ligação C-glicosídica em compostos derivados do grupo secologanina nem rotas biossintéticas que demonstrassem a formação desta ligação C-glicosídica. Todos os dados de NMR uni e bidimensionais adquiridos para este alcaloide inédito foram compilados e são mostrados na Tabela 15. No Anexo 13 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

Tabela 15. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide inédito derivado da *estricosidina (145)*, pico 3 isolado da fração alcalóidica de *P. rhytidocarpa*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | NOESY | HMBC ² J, ³ J, ⁴ J |
|----|------------------|--|--------------------------------|-----------------------------|--|
| 2 | 137,1 | - | - | - | H6a, H6b |
| 3 | 50,9** | 4,82 (m)** | H14a, H14b | - | H5b, H14a, H14b, H15 |
| 5 | 54,0 | (a) 3,50 - 3,58 (m; 1H) (b) 3,77 (dd; 12,0; 3,5; 1H) | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b | - | H6a, H6b |
| 6 | 24,8 | 2,76 - 2,87 (m; 2H) | H5a, H5b | - | H5a |
| 7 | 112,9 | - | - | - | H6a, H6b, H5b |
| 8 | 138,0 | - | - | - | H10, H12 |
| 9 | 115,8 | 7,62 (d; 7,8 1H) | H10 | H10 | H11 |
| 10 | 124,1 | 7,14 (dd; 7,8; 7,3; 1H) | H9 | H9 | H12 |
| 11 | 122,3 | 7,09 (dd; 7,5; 7,3; 1H) | H12 | H12 | H9 |
| 12 | 120,2 | 7,45 (d; 7,5; 1H) | H11 | H11 | H10 |
| 13 | 130,0 | - | - | - | H9, H11 |
| 14 | 35,8 | (a) 1,40 (ddd; 14,5; 11,9; 4,8; 1H) (b) 3,18 - 3,25 (m; 1H) | H3, H14b H3, H14a | H14b, H15 H14a, H15, H21 | H15 |
| 15 | 35,4 | 3,02-3,06 (m; 1H) | H20 | H14a, H14b | H14a, H14b, H17 |

| | | | | | | |
|-----------|-------|--|------------------------|-----------------|--------------|-------------------------------------|
| 16 | 98,0 | - | - | - | - | H14a, H14b, H17 |
| 17 | 150,0 | 7,74 (s; 1H) | - | - | H23 | H15 |
| 18 | 117,8 | (a) 5,05 (dd; 9,9; 1,4; 1H) (b) 5,13 (dl; 17,1; 1H) | H18b, H19 H18a, H19 | H19 H19 | H19 H19 | H20 |
| 19 | 141,9 | 5,90 (ddd; 17,1; 9,9; 9,5; 1H) | H18a, H18b, H20 | H18a, H18b, H20 | H19 | H18a, H18b, H20 |
| 20 | 53,3 | 2,52 - 2,60 (m; 1H) | H15, H19 | H19 | H19 | H14a, H14b, H17, H18a, H18b, H19 |
| 21 | 88,9 | 5,18 (d; 8,8; 1H) | H1' | H14b | H14b | H1', H2' |
| 22 | 173,0 | - | - | - | - | H17, H23 |
| 23 | 52,3 | 3,67 (s; 3H) | - | - | - | - |
| 1' | 70,8 | 4,52 (dd; 8,9; 8,8; 1H) | H21, H2' | - | - | H21 |
| 2' | 78,1 | 3,68 - 3,71 (m; 1H) | H1' | - | - | H1' |
| 3' | 70,4 | 3,51 - 3,53 (m; 1H) | - | - | - | H5' |
| 4' | 62,0 | 3,68 - 3,71 (m; 1H) | - | - | - | H5' |
| 5' | 79,8 | 3,51 - 3,53 (m; 1H) | - | - | - | H3', H4' |
| 6' | 64,0 | (a) 3,71 - 3,75 (m; 1H) (b) 4,16 (dd; 8,8; 7,1; 1H) | H6'b H6'a | H6'b H6'a | H6'b H6'a | H1'' |

| | | | | | |
|------------|-------|--|----------------|----------------|----------------------------|
| 1'' | 103,0 | 4,39 (d; 8,1; 1H) | H2'' | H6'a, H5'' | H2'', H3'', H6'a, H6''b |
| 2'' | 73,5 | 3,29 (dd; 8,4; 8,1 Hz; 1H) | H1'' | - | H3' |
| 3'' | 76,2 | 3,43 (dd; 8,4; 8,3; 1H) | H2'', H4'' | - | H4'' |
| 4'' | 70,1 | 3,34 - 3,35 (m; 1H) | - | - | H3'' |
| 5'' | 76,5 | 3,34 - 3,35 (m; 1H) | - | - | H6''a, H6''b |
| 6'' | 61,5 | (a) 3,71 - 3,75 (m; 1H) (b) 3,93 (dl; 12,0; 1H) | H6''b H6''a | H6''b H6''a | H4'', H5'' |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*₄. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=duplete, dd=duplo-duplete, ddd=duplo-duplete duplo, dl=duplete largo, m=multiplete, s=simpleto; acoplamento – J / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC. **sobreposto com o sinal residual do solvente.

5.2.2. *Isolamento e elucidação estrutural dos alcaloides da fração alcaloídica da espécie Psychotria suterella através de HPLC-SPE-NMR*

Foram utilizados 74,0 mg da fração rica em alcaloides do extrato bruto de *P. suterella*. A amostra foi dissolvida em 1,0 mL de metanol e filtrada utilizando microfiltro de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro. O método foi aplicado em equipamento HPLC Agilent serie 1200, utilizando uma coluna C₁₈ (Phenomenex, 150 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å) mantida a 40 °C. O solvente aquoso, A, consistiu de 95 % H₂O + 5 % MeCN e o solvente orgânico, B, de 5 % H₂O + 95 % MeCN, ambos acidificados com 0,1 % de ácido fórmico. O fluxo foi mantido em 0,5 mL.minuto⁻¹, volume de injeção de 15 µL. Inicialmente foi aplicado um método exploratório de 0-100 %B em 60 minutos. O método otimizado iniciou-se com 15 %B, gradiente de 15-30 %B de 0-35 min., gradiente de 30-65 %B de 35-60 min., gradiente de 65-100 %B de 60-65 min., mantendo-se por 5 minutos, reduzindo a 15 %B no minuto 66 e mantém-se por 10 minutos para recondicionamento da coluna.

O método otimizado foi reproduzido no equipamento de HPLC-SPE-NMR em uma análise *pre-trapping* para serem programados os picos a serem isolados através do método *threshold*, aplicado ao cromatograma a 254 nm ou 280 nm de acordo com a necessidade. Em seguida foram executadas vinte sucessivas separações sendo os picos concentrados nos respectivos cartuchos de SPE previamente condicionados com 500 µL de acetonitrila seguido de 500 µL de H₂O. A Figura 36 apresenta o cromatograma da separação extraído a 254nm identificando os picos isolados através de números.

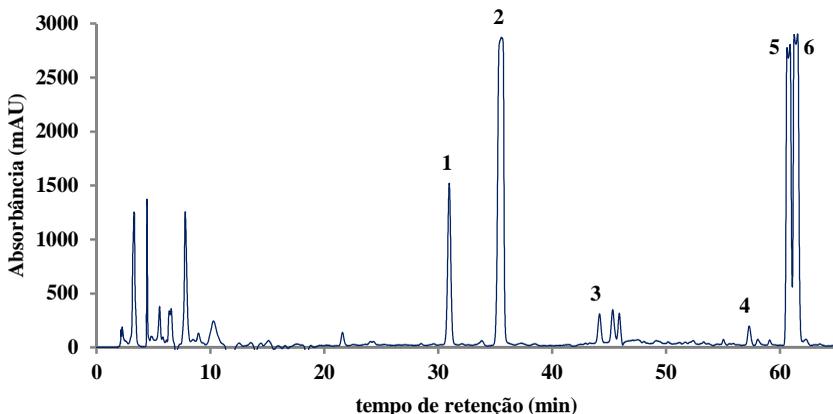


Figura 36. Cromatograma extraído a 280 nm da separação executada na fração rica em alcaloides do extrato bruto de *P. suterella* através da técnica hifenada HPLC-SPE-NMR

O pico 1 foi coletado em torno do tempo de retenção 30,9 min. O espectro de massas de alta resolução (Apêndice 39) apresentou um íon quasi-molecular em m/z 677,2917 calculado para $[M+H]^+ C_{33}H_{45}N_2O_{13}^+$ (677,2916 com erro 0,1 ppm). O espectro de UV (Apêndice 40) apresentou três bandas com comprimentos de onda máximos em 225 e 290 nm. O espectro MS/MS, disponível no Apêndice 41, apresentou um fragmento em m/z 515,5, proveniente da perda de uma unidade de glicose, em m/z 483,2 proveniente da perda da metoxila do grupo éster e em m/z 353,1 proveniente da fragmentação diferenciada para α -glicose com quebra das ligações C1'-C2' e O-C5' do açúcar. O espectro de NMR de 1H encontra-se disponível no Apêndice 42. Estes dados são coincidentes com os obtidos para o alcaloide monoterpene indólico inédito derivado da strictosidina (**145**), também isolado da espécie *P. rhytidocarpa* e sendo o primeiro relato deste composto na espécie *P. suterella*. Os espectros de massas de alta resolução, UV e MS/MS de todos os picos isolados da espécie *P. suterella* encontram-se no Apêndice 39, Apêndice 40 e Apêndice 41, respectivamente.

O pico 2 foi coletado em torno do tempo de retenção 35,5 min, o espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 499,2083 calculado para $[M+H]^+ C_{26}H_{31}N_2O_8^+$ (499,2075 com erro de 1,6 ppm). O espectro de UV apresentou três bandas com comprimentos de onda máximos em 224, 280 e 350 nm. O espectro

MS/MS apresentou os fragmentos em m/z 337,3, proveniente da perda da glicose e em m/z 266,8 pela perda do fragmento $C_{10}H_{16}O_6$ do íon precursor, conforme já reportado na literatura [163]. O espectro de NMR de 1H encontra-se disponível no Apêndice 43. Estes dados são coincidentes com os obtidos para o alcaloide strictosamida (**32**), também isolado da espécie *P. rhytidocarpa* e já reportado para a espécie *P. suterella* [46].

O pico 5 foi coletado em torno do tempo de retenção 60,7 min, o espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 351,1726 calculado para $[M+H]^+ C_{21}H_{23}N_2O_3^+$ (351,1703 com erro de 6,4 ppm). O pico 6 foi coletado em torno do tempo de retenção 61,4 min, o espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 351,1716 calculado para $[M+H]^+ C_{21}H_{23}N_2O_3^+$ (351,1703 com erro de 6,4 ppm). O espectro de UV de ambos apresentou duas bandas com comprimentos de onda máximos em 225, 290 nm. O espectro MS/MS apresentou os fragmentos principais em m/z 319,2, proveniente da perda da metoxila do grupo acetil, m/z 170,1, referente ao fragmento 5,6-dihidro- β -carbolina e em m/z 73,0, proveniente da perda de um grupo 2-butenal do íon precursor, conforme já reportado na literatura [164]. Os espectros de NMR de 1H encontram-se disponíveis no Apêndice 44 e Apêndice 45, respectivamente. Estes dados são coincidentes com os obtidos para os alcaloides isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**), também isolado da espécie *P. rhytidocarpa* e já reportados para a espécie *P. suterella* [46].

Elucidação estrutural do pico 3

O pico 3 foi coletado em torno do tempo de retenção de 44,2 min no HPLC. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 541,1853 calculado para $[M+H]^+ C_{27}H_{29}N_2O_{10}^+$ (541,1817 com erro de 6,8 ppm). O espectro de UV apresentou três bandas com comprimentos de onda máximos em 219, 286 e 385 nm. O espectro MS/MS apresentou os fragmentos em m/z 379,3, proveniente da perda da glicose. Estes dados são coincidentes com os reportados para o alcaloide pauridiantosídeo (**55**) (Figura 37), um derivado do alcaloide lialosídeo (**54**), que já foi reportado no gênero *Psychotria*, em *P. laciniata* [45]. Este é o primeiro relato desta substância na espécie *P. suterella*. Este alcaloide e seu epímero (C21 - isopauridiantoside) foram reportados pela primeira vez para a espécie *Pauridiantha lyalli* (Rubiaceae) [165, 166].

Na região de campo baixo do espectro de NMR de ^1H , disponível no Apêndice 46, observou-se o padrão de sinais para um sistema de anel indólico com dois dupletos e dois duplo-dupletos. Os dois dupletos foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios ligados aos carbonos C9 ($\delta_{\text{C}9}$ 124,1 ppm) e C12 ($\delta_{\text{C}12}$ 114,9 ppm) e apresentavam-se centrados em $\delta_{\text{H}9}$ 8,23 e $\delta_{\text{H}12}$ 7,69 ppm ($J_{9-10} = 7,92$ e $J_{11-12} = 8,2$ Hz – *orto*) e dois duplo-dupletos duplos centrados em $\delta_{\text{H}10}$ 7,32 e $\delta_{\text{H}11}$ 7,59 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos C10 ($\delta_{\text{C}10}$ 123,0 ppm) e C11 ($\delta_{\text{C}11}$ 131,7 ppm) que, por sua vez, apresentam constantes de acoplamento mútuo do tipo *orto* $J_{11-12} = 7,0$ Hz e do tipo *meta* nos valores de $J_{9-11} = 1,2$ e $J_{10-12} = 0,9$ Hz. Os acoplamentos foram confirmados através do espectro bidimensional COSY disponível no Apêndice 30 e os sinais de carbono foram atribuídos pelo espectro bidimensional HSQC disponível no Apêndice 47Apêndice 32.

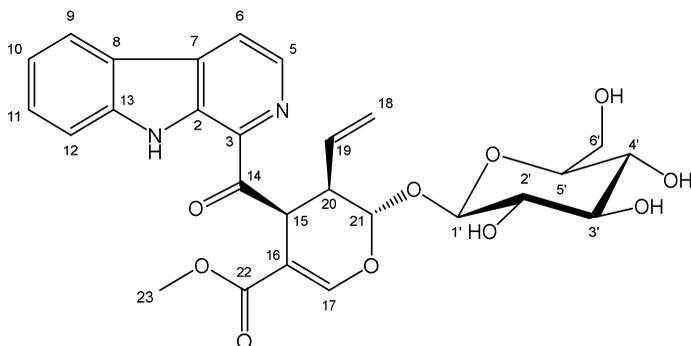


Figura 37. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico pauidiantosídeo (55), pico3 isolado da fração alcaloídica de *P. suterella*

No espectro de NMR de ^1H foram observados dois dupletos bastante desblindados apresentando “efeito de telhado”, sugerindo visualmente acoplamento mútuo. Estes dupletos estavam centrados em $\delta_{\text{H}5}$ 8,52 e $\delta_{\text{H}6}$ 8,32 ppm, apresentavam acoplamento de $J_{5-6} = 4,9$ Hz e foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C5 ($\delta_{\text{C}5}$ 140,1 ppm) e C6 ($\delta_{\text{C}6}$ 121,7 ppm) da porção triptamina. Estas atribuições foram confirmadas através do espectro bidimensional HMBC (Apêndice 48), no qual foi observada uma correlação do sinal do H5 com o sinal de carbono $\delta_{\text{C}7}$ 134,4 ppm, com 3J , atribuído ao C7. Para o sinal do H6 não foi observada correlação com o C7.

Comparando-se os espectros HSQC dos alcaloides pauridiantosídeo (**55**), pico 3 isolado da espécie *P. suterella*, e lialosídeo (**54**), pico 1 isolado da espécie *P. rhytidocarpa*, foi observada uma pequena diferença de deslocamento químico de carbono e hidrogênio para os sinais do núcleo indólico, carbonos C9 a C12 (Figura 38). Por outro lado, foi observada uma diferença bastante significativa para os deslocamentos de carbono e hidrogênio para C5 e C6. O grupo carbonila C14 (δ_{C14} 204,2 ppm) no alcaloide pauridiantosídeo (**55**) promove uma desblindagem acentuada na posição *para* do anel, onde se encontra o C6, explicada pelo efeito de ressonância retirador (Figura 38).

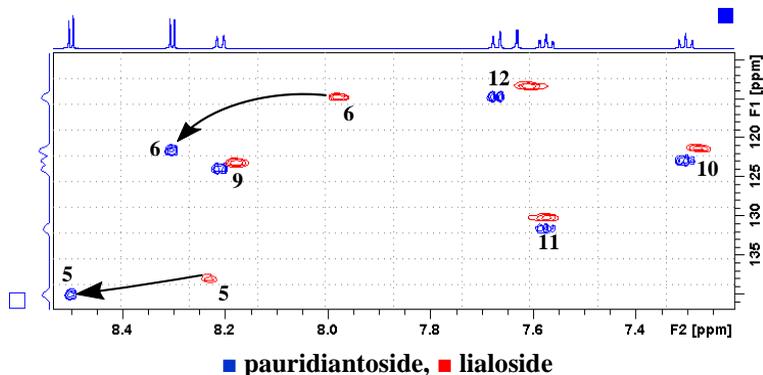


Figura 38. Sobreposição dos espectros HSQC dos alcaloides pauridiantosídeo (**55**), pico 3 isolado da espécie *P. suterella*, e lialosídeo (**54**), pico 1 isolado da espécie *P. rhytidocarpa*

No espectro HMBC foi observado que o sinal da carbonila C14 (δ_{C14} 204,2 ppm) apresentava correlação com um multipletto centrado em δ_H 5,67 ppm, cuja integral no espectro de NMR de 1H era relativa a dois hidrogênios. No espectro HSQC, este multipletto apresentava-se correlacionado aos sinais de carbono δ_{C15} 45,8 e δ_{C19} 136,2 ppm que foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C15 e C19 da porção secologanina do alcaloide. Através de simulação utilizando o FOMSC3, foi possível atribuir as multiplicidades aos sinais de hidrogênio sobrepostos como sendo duplo-dupletto para o H15 e duplo-dupletto duplo para o H19 (Figura 39).

No espectro COSY, disponível no Apêndice 49, foi observada uma correlação do sinal do hidrogênio H15 com um dupletto centrado em δ_{H17} 7,65 ppm, com constante de $J_{15-17} = 1,8$ Hz atribuída ao acoplamento entre o hidrogênio alílico H15 e o olefínico ligado ao C17 (δ_{C17} 155,0 ppm).

Também foram observadas, no espectro COSY, as correlações do sinal δ_{H19} 5,67 ppm com os sinais dos hidrogênios ligados ao C18 (δ_{C18} 120,9 ppm), um par de duplos-dupletos centrados em δ_{H18a} 4,78 e δ_{H18b} 4,90 ppm, com valores de constantes de acoplamento do tipo vicinal *cis* com $J_{18b-19} = 10,3$ Hz e vicinal *trans* com $J_{18a-19} = 17,3$ Hz. Os sinais dos hidrogênios H18a e H18b também apresentaram acoplamento mútuo do tipo geminal de $J_{18a-18b} = 1,5$ Hz compondo, juntamente com o sinal do H19, um grupo de sinais coincidente com o esperado para um padrão ABX.

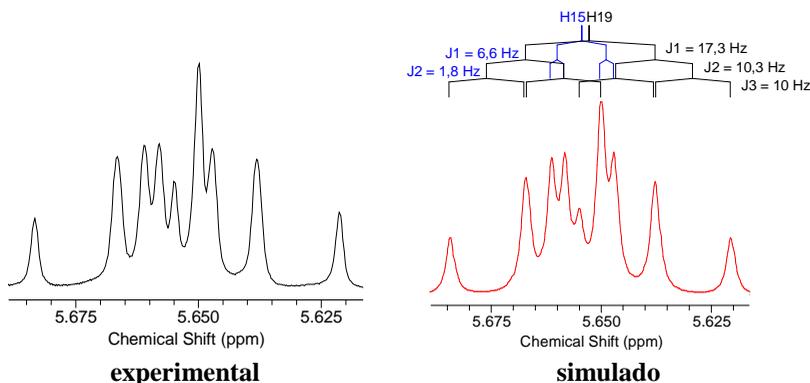


Figura 39. Comparação entre os multipletos sobrepostos H19/H15 obtidos experimentalmente para composto (55) e os simulados através do software FOMSC3 (pico 3 isolado da fração alcaloídica de *P. suterella*)

No espectro de NMR de ^1H , o sinal do multipletto centrado em δ_{H20} 3,37 ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao C20 (δ_{C20} 41,8 ppm) por apresentar correlações no espectro COSY com o sinal em δ_{H} 5,67 ppm dos hidrogênios H15, H19 e com um dupletto centrado δ_{H21} 5,58 ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono acetal C21 (δ_{C21} 99,0 ppm). A multiplicidade do H20 foi atribuída como sendo duplo-dupletto duplo de acordo com os valores de constantes de acoplamento dos hidrogênios vizinhos coletados no espectro de NMR de ^1H : $J_{19-20} = 10,0$, $J_{15-20} = 6,7$ e $J_{21-20} = 2,9$ Hz. A Figura 40 mostra a simulação feita no FOMSC3 para o sinal do H20, em vermelho, sobreposto ao sinal obtido experimentalmente.

Na Figura 40 também é mostrada, em azul, a simulação de um duplo-dupletto centrado em δ_{H2} 3,34 ppm sobreposto ao espectro obtido experimentalmente. Este sinal foi atribuído ao hidrogênio ligado ao

C2' ($\delta_{C2'}$ 76,1 ppm) do açúcar por apresentar uma correlação no espectro COSY com o sinal do hidrogênio ligado ao carbono anomérico C1' ($\delta_{C1'}$ 101,5 ppm), um dupletto centrado em $\delta_{H1'}$ 4,73 ppm. A simulação através do FOMSC3 auxiliou na obtenção das constantes de como sendo $J_{1'-2'}$ = 7,8 e $J_{2'-3'}$ = 9,0 Hz.

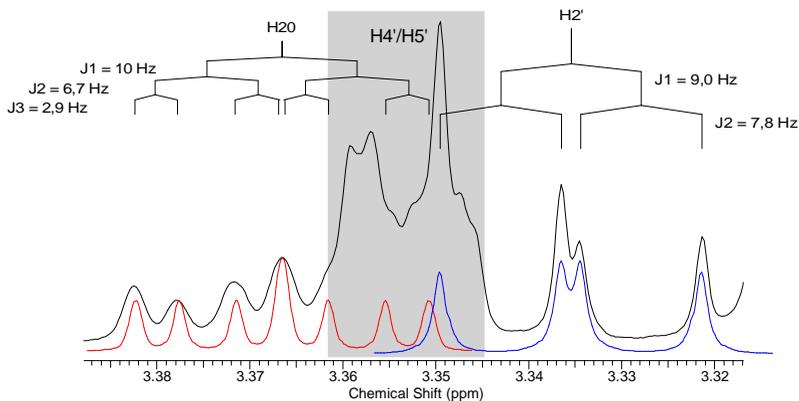


Figura 40. Região ampliada do espectro de NMR de ^1H do alcaloide pauidiantosídeo (55), onde se encontram os sinais sobrepostos para os hidrogênios H20, H2', H4' e H5'. Em vermelho e azul são apresentados os multipletos simulados através do FOMSC3 para H20 e H2' e a região em cinza é atribuída aos hidrogênios H4' e H5' (pico 3 isolado da fração alcaloídica de *P. suterella*)

Conforme observado na Figura 40, a região do espectro de NMR de ^1H , δ_{H} 3,34-3,36 ppm, destacada em cinza foi atribuída aos multipletos sobrepostos dos hidrogênios H4' e H5' ($\delta_{C4'}$ 79,5 e $\delta_{C5'}$ 79,9 ppm). Para os sinais dos carbonos C4' e C5' foram observadas, no espectro HMBC, as correlações com o par de duplos-dupletos centrados em $\delta_{H6'a}$ 3,72 e $\delta_{H6'b}$ 3,93 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono hidroximetílico C6' ($\delta_{C6'}$ 64,2 ppm) do açúcar. Da mesma maneira foram observadas, no HMBC, as correlações do carbono C6' com os hidrogênios H4' e H5'.

No espectro de NMR de ^1H , o duplo-dupletto centrado em $\delta_{H3'}$ 3,41 ppm, apresentando constantes de acoplamento $J_{2'-3'}$ = 9,0 e $J_{3'-4'}$ = 8,9 Hz, foi atribuído ao hidrogênio ligado ao C3' ($\delta_{C3'}$ 73,0 ppm), por seu sinal de hidrogênio apresentar correlação no espectro HMBC com os sinais do C2' e C4' e seu sinal de carbono apresentar correlação com os hidrogênios H4' e H5'.

No espectro bidimensional HMBC foram observadas as correlações do sinal de carbono da carbonila C22 em δ_{C22} 170,9 ppm com os sinais de hidrogênios do H15, H17 e com um simpleto em δ_{H23} 3,64 ppm, com integral relativa a três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios da metila C23 (δ_{C23} 53,3 ppm). Os carbonos C22 e C23 pertencem ao grupo éster metílico ligado ao carbono C16 (δ_{C16} 110,7 ppm). No espectro HMBC o C16 apresenta correlação com os hidrogênios H15, H17 e H20.

A comparação dos dados obtidos e discutidos acima com a literatura [45] corroboram a elucidação do alcaloide monoterpene indólico pauridiantosídeo (**55**). Todos os dados de NMR uni e bidimensionais adquiridos para este alcaloide foram compilados e são mostrados na Tabela 16. Os dados da literatura utilizados na comparação estão disponíveis no Anexo 1 para NMR de ^{13}C e no Anexo 4 para NMR de 1H . No Anexo 12 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

Tabela 16. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcoleide pauciantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *P. suterella*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | HMBC ² J, ³ J, ⁴ J |
|----|------------------|-------------------------------|--------------|--|
| 2 | 137,9 | - | - | H5, H6 |
| 3 | 135,1 | - | - | H5, H6 |
| 5 | 140,1 | 8,52 (d; 4,9; 1H) | H6 | H6 |
| 6 | 121,7 | 8,32 (d; 4,9; 1H) | H5 | H5 |
| 7 | 134,4 | - | - | H5, H9 |
| 8 | 133,1 | - | - | H9, H10 |
| 9 | 124,1 | 8,23 (dd; 7,9; 1,2 1H) | H10, H11 | H11 |
| 10 | 123,0 | 7,32 (ddd; 7,9; 7,0; 0,9; 1H) | H9, H11, H12 | H9, H12 |
| 11 | 131,7 | 7,59 (ddd; 8,2; 7,0; 1,2; 1H) | H9, H10, H12 | H9, H10 |
| 12 | 114,9 | 7,69 (dd; 8,2; 0,9; 1H) | H10, H11 | H11 |
| 13 | 144,6 | - | - | H9, H11, H12 |
| 14 | 204,2 | - | - | H15, H20 |
| 15 | 45,8 | 5,67 (dd; 6,7; 1,8; 1H) | H17, H20 | H17, H20 |
| 16 | 110,7 | - | - | H15, H17, H20 |
| 17 | 155,0 | 7,65 (d; 1,8; 1H) | H15 | H15, H21 |

| | | | | |
|-----------|-------|--|------------------------|---------------------------|
| 18 | 120,9 | (a) 4,78 (dd; 17,3; 1,5; 1H) (b) 4,90 (dd; 10,3; 1,5; 1H) | H18b, H19 H18a, H19 | H20 |
| 19 | 136,2 | 5,67 (ddd; 17,3; 10,3; 10,0; 1H) | H18a, H18b, H20 | H18a, H18b, H20 |
| 20 | 41,8 | 3,37 (ddd; 10,0; 6,7; 2,9; 1H) | H15, H19, H21 | H15, H18a, H18b, H19, H21 |
| 21 | 99,0 | 5,58 (d; 2,9; 1H) | H20 | H17, H20, H1' |
| 22 | 170,9 | - | - | H17, H23 |
| 23 | 53,3 | 3,64 (s; 3H) | - | - |
| 1' | 101,5 | 4,73 (d; 7,8; 1H) | H2' | H21, H2' |
| 2' | 76,1 | 3,34 (dd; 9,0; 7,8; 1H) | H1', H3' | H3' |
| 3' | 73,0 | 3,41 (dd; 9,0; 8,9; 1H) | H2', H4' | H2' |
| 4' | 79,5 | 3,34-3,36 (m; 1H) | H3' | H6'a, H6'b |
| 5' | 79,9 | 3,34-3,36 (m; 1H) | H6'a, H6'b | H6'a, H6'b |
| 6' | 64,2 | (a) 3,72 (dd; 12,0; 3,8; 1H) | H5', H6'b | H3', H5' |
| | | (b) 3,93 (dd; 12,0; 1,5; 1H) | H5', H6'a | |

NMR 600 MHz; Metanol-d4. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=duplete, dd=duplo-duplete, ddd=duplo-duplete duplo, m=multiplete, s=simpleto; acoplamento – J / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC.

Elucidação estrutural do pico 4

O pico 4 foi coletado em torno do tempo de retenção de 57,3 min. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon quasi-molecular em m/z 365,1497 calculado para $[M+H]^+$ $C_{21}H_{21}N_2O_4^+$ (365,1496 com erro de 0,3 ppm). O espectro de UV apresentou duas bandas com comprimentos de onda máximos em 219 e 290 nm. O espectro MS/MS apresentou os fragmentos principais em m/z 279,2, proveniente da perda da γ -lactona da molécula-pai e em m/z 170,1, referente ao fragmento 5,6-dihidro- β -carbolina. Uma busca na literatura através do scifinder[®] por alguma substância com a fórmula molecular $C_{21}H_{20}N_2O_4$ foram encontrados dados coincidentes com os reportados para o alcaloide vallesiachotamina lactona (**11**) (Figura 41), um derivado cíclico dos isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**) que já foi reportado nas espécie *P. suterella* e *P. laciniata* [46].

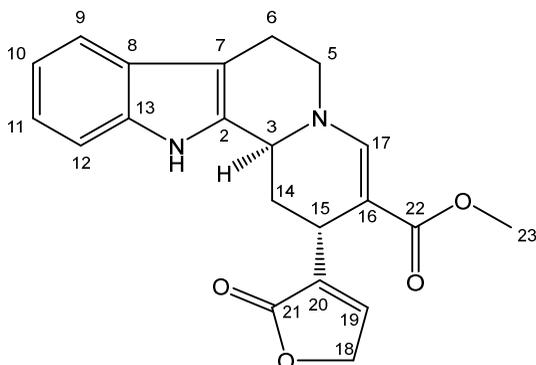


Figura 41. Estrutura do alcaloide monoterpene indólico vallesiachotamina lactona (**11**), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. suterella*

Na região de campo baixo do espectro de NMR de 1H , disponível no Apêndice 50, observou-se o padrão de sinais para um sistema de anel indólico com dois dupletos e dois duplo-dupletos duplos. Os dois dupletos foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios ligados aos carbonos C9 (δ_{C9} 124,0 ppm) e C12 (δ_{C12} 117,3 ppm) e apresentavam-se centrados em δ_{H9} 7,43 e δ_{H12} 7,29 ppm ($J_{9-10} = 7,9$ e $J_{11-12} = 8,1$ Hz – *orto*) e os dois duplo-dupletos duplos apresentavam-se centrados em δ_{H10} 7,01 e δ_{H11} 7,08 ppm e foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios ligados aos C10 (δ_{C10} 125,2 ppm) e C11 (δ_{C11} 127,8 ppm). Os hidrogênios H10 e H11 apresentaram constantes de acoplamento mútuo do tipo *orto* no valor

de $J_{11-12} = 7,0$ Hz e do tipo meta nos valores de $J_{9-11} = 1,2$ e $J_{10-12} = 1,0$ Hz. Os acoplamentos foram confirmados através do espectro bidimensional COSY disponível no Apêndice 51 e os sinais de carbono foram atribuídos pelo espectro bidimensional HSQC disponível no Apêndice 52.

No espectro HSQC foram observados dois sinais de carbonos metilênicos em $\delta_{C5} 57,5$ e $\delta_{C6} 28,3$ ppm atribuídos, respectivamente, aos C5 e C6 provenientes da porção triptamina do alcaloide, assim como seus respectivos pares de hidrogênios. No espectro de NMR de 1H , os hidrogênios ligados ao C5 apresentaram-se como dois duplo-dupletos duplos centrados em $\delta_{H5a} 3,63$ e $\delta_{H5b} 3,86$ ppm com acoplamento geminal de $J_{5a-5b} = 12,6$ Hz. Os sinais de hidrogênios ligados ao C6 apresentaram-se como um duplo-duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{H6a} 2,82$ ppm e o duplo-duplo-duplete duplo centrado em $\delta_{H6b} 2,93$ ppm, com acoplamento do tipo geminal no valor de $J_{6a-6b} = 15,0$ Hz. Estes hidrogênios metilênicos apresentam acoplamentos vicinais nos valores de $J_{5a-6a} = 4,0$ Hz, $J_{5a-6b} = 11,7$ Hz, $J_{5b-6a} = 1,5$ Hz e $J_{5b-6b} = 5,5$ Hz. Todos estes acoplamentos foram confirmados no espectro COSY. Os sinais destes hidrogênios metilênicos apresentam um comportamento coincidente com um padrão de multiplicidades esperado para um sistema AA'BB' do tipo gauche estrelado. As multiplicidades dos hidrogênios metilênicos H6a e H6b foram atribuídas com o auxílio de simulações feitas no software FOMSC3 as quais são apresentadas na Figura 42.

No espectro bidimensional HMBC, disponível no Apêndice 53, o sinal de carbono não hidrogenado em $\delta_{C8} 133,4$ ppm foi atribuído ao C8 por apresentar correlações de 3J com os hidrogênios H10 e H12, o sinal de carbono em $\delta_{C13} 143,3$ ppm foi atribuído ao C13 por apresentar correlações de 3J com os hidrogênios H9 e H11. O sinal de em $\delta_{C7} 114,0$ ppm foi atribuído ao C7 por apresentar correlações de 2J com os hidrogênios H6a e H6b e correlações de 3J com os hidrogênios H5a, H5b e H9. O sinal em $\delta_{C2} 154,8$ ppm foi atribuído ao C2 por apresentar correlações de 3J com os hidrogênios H6a e H6b.

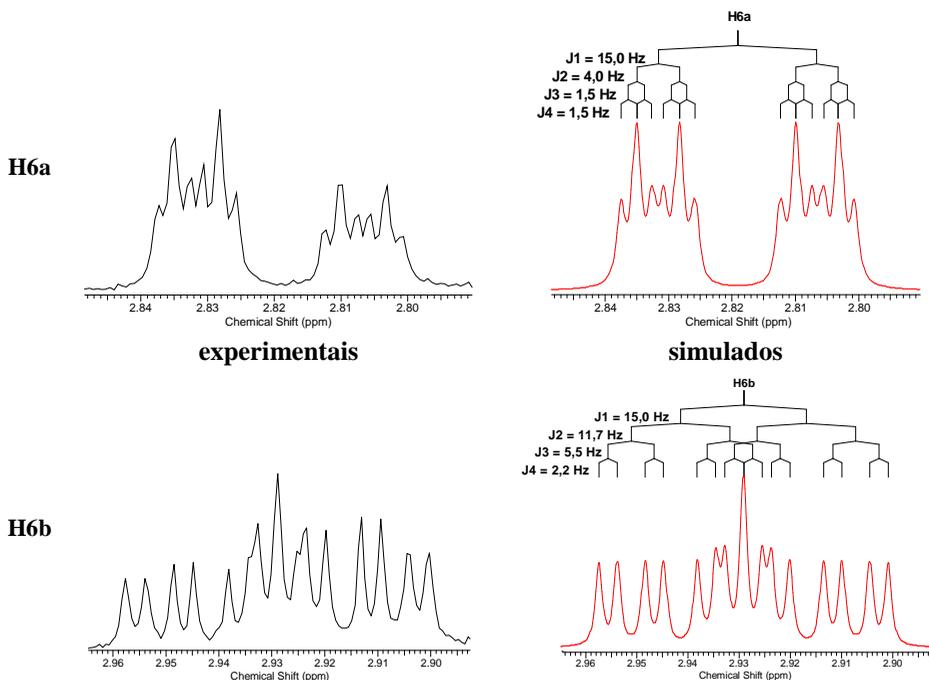


Figura 42. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente e os simulados através do software FOMSC3 para os hidrogênios metilênicos H6a e H6b do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da espécie *P. suterella*

No espectro de NMR de ^1H foi observado um multipletto centrado em $\delta_{\text{H}3}$ 4,40 ppm, correlacionado ao sinal de carbono em $\delta_{\text{C}3}$ 54,7 ppm no espectro HSQC. Este sinal apresentou correlação no espectro COSY com os hidrogênios metilênicos H6a ($J_{3-6a} = 1,5$ Hz) e H6b ($J_{3-6b} = 2,2$ Hz). Também foram observadas, no COSY, as correlações com dois duplo-dupletos duplos centrados em $\delta_{\text{H}14a}$ 1,79 ($J_{3-14a} = 11,6$ Hz) e $\delta_{\text{H}14b}$ 2,65 ppm ($J_{3-14b} = 3,3$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metilênicos ligados ao C14 ($\delta_{\text{C}14}$ 37,9 ppm). Sendo assim, o sinal deste multipletto foi atribuído ao hidrogênio ligado ao C3. A multiplicidade do sinal do H3 foi atribuída como sendo de duplo-duplo-dupletto duplo através de simulação feita no software FOMSC3 utilizando as constantes obtidas dos hidrogênios metilênicos vizinhos conforme mostrado na Figura 43.

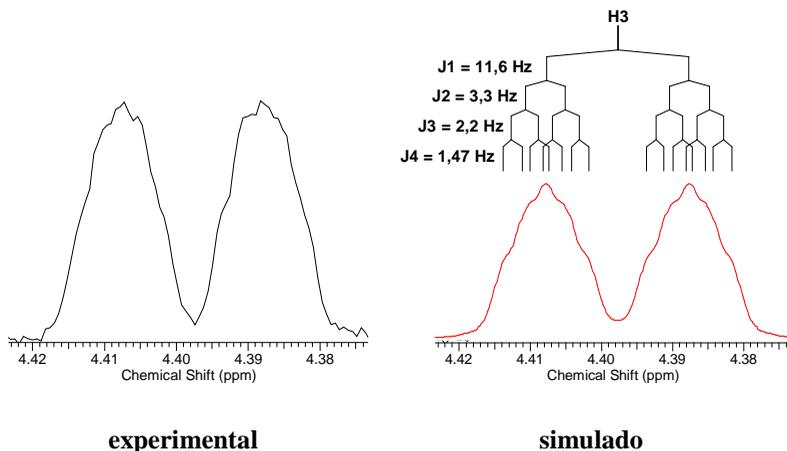


Figura 43. Comparação entre o multipeto obtido experimentalmente e o simulado através do software FOMSC3 para o hidrogênio H3 do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da espécie *P. suterella*

No espectro de NMR de ^1H foi observado que os hidrogênios metilênicos H14a e H14b apresentavam uma constante de acoplamento do tipo geminal no valor de $J_{14a-14b} = 13,5$ Hz, confirmado no espectro COSY. Também foram observadas correlações de ambos os sinais com um multipeto centrado em $\delta_{\text{H}15} 3,78$ ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao C15 ($\delta_{\text{C}15} 34,9$ ppm), com valores de constante de acoplamento de $J_{14a-15} = 5,4$ Hz e $J_{14b-15} = 1,8$ Hz. No espectro COSY foram observadas correlações do H15 com um duplo-duplo duplo centrado em $\delta_{\text{H}19} 7,25$ ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico β -carbonílico C19 ($\delta_{\text{C}19} 155,4$ ppm), apresentando acoplamento alílico no valor de $J_{15-19} = 1,8$ Hz. No espectro COSY também se observou que os hidrogênios H15 e H19 apresentavam correlação com um sinal de hidrogênio centrado em $\delta_{\text{H}18a/b} 4,86$ ppm, atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono metilênico γ -carbonila C18 ($\delta_{\text{C}18} 77,2$ ppm). No espectro de NMR de ^1H , os sinais dos hidrogênios H18a/b apresentaram-se sobrepostos com o sinal residual do solvente, o qual foi suprimido durante a aquisição do espectro.

Através da análise das constantes de acoplamento coletadas do espectro de NMR de ^1H para os sinais dos hidrogênios H15 e H19 foram feitas simulações utilizando o software FOMSC3 para atribuir as respectivas multiplicidades e os valores de constantes de acoplamento. Para o H15 foi atribuída a multiplicidade de duplo-duplo-duplo-duplo

duplo com acoplamentos, além do já citado, de $J_{15-18a} = J_{15-18b} = 1,7$ Hz. Para o sinal do H19 foi atribuída a multiplicidade de duplo-duplete duplo com acoplamentos, além do já citado, de $J_{18a-19} = J_{18b-19} = 1,8$ Hz. A Figura 44 mostra as regiões ampliadas do espectro de NMR de ^1H para os picos H15 e H19 em comparação com os espectros simulados através do FOMSC3 juntamente com seus respectivos diagramas de acoplamento.

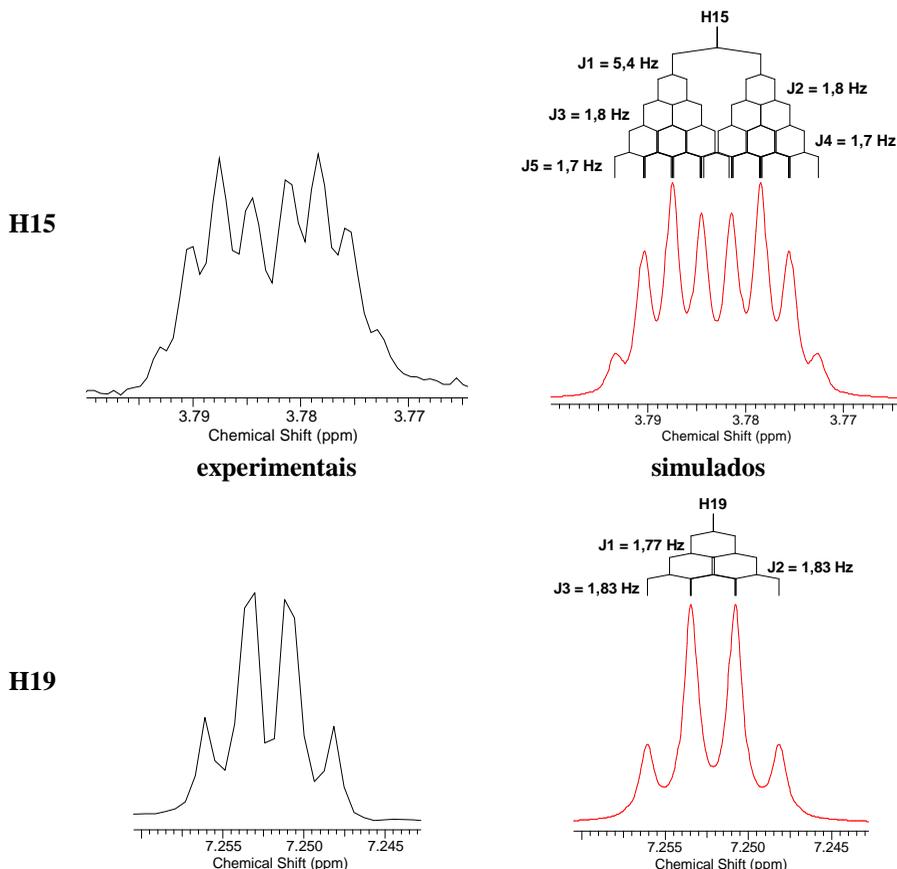


Figura 44. Comparação entre os multipletos obtidos experimentalmente e os simulados através do software FOMSC3 para os hidrogênios H15 e H19 do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da espécie *P. suterella*

No espectro bidimensional HMBC foram observadas as correlações dos sinais dos hidrogênios H18a/b e H19 com os sinais de

carbono em δ_{C20} 145,0 ppm, atribuído ao carbono olefínico α -carbonila C20, e δ_{C21} 180,8 ppm, atribuído à carbonila C21. Para o sinal do carbono C20 também foram observadas as correlações de 3J com os hidrogênios H14a e H14b e de 2J com o hidrogênio H15. Os carbonos C18, C19, C20 e C21 compõem o grupo γ -lactona α - β -insaturada, ligada ao restante da molécula através dos carbonos C15-C20.

No espectro HMBC foram observadas as correlações dos sinais dos hidrogênios H3 e H15 com o sinal de carbono em δ_{C17} 154,6 ppm, correlacionado no HSQC ao sinal de hidrogênio simpleto em δ_{H17} 7,87 ppm, atribuído ao carbono olefínico C17. Para o sinal do hidrogênio H17 foi observada, no HMBC, uma correlação de 2J com um sinal de carbono em δ_{C16} 99,5 ppm atribuído ao carbono C16 e uma correlação com o sinal de carbono em δ_{C22} 175,6 ppm, atribuído à carbonila C22. Também foi observada correlação entre o sinal de carbono C22, com 3J , a um simpleto em δ_{H23} 3,66 ppm, com integral relativa a três hidrogênios e atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono C23 (δ_{C23} 56,6 ppm). Os carbonos C22 e C23 compõem o grupo acetil ligados através do carbono C16.

A comparação dos dados obtidos e discutidos acima com a literatura [45] corroboram para a elucidação do alcaloide monoterpene indólico vallesiachotamina lactona (**11**). Todos os dados de NMR uni e bidimensionais adquiridos para este alcaloide foram compilados e são mostrados na Tabela 17. Os dados da literatura utilizados na comparação estão disponíveis no Anexo 1 para NMR de ^{13}C e no Anexo 4 para NMR de 1H . No Anexo 13 está disponível um diagrama que esquematiza os acoplamentos observados nos espectros de NMR bidimensionais através de setas para este composto.

Tabela 17. Dados compilados a partir da análise dos espectros uni e bidimensionais de NMR do alcaloide vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *P. suterella*

| N. | ¹³ C* | ¹ H | COSY | HMBC ² J, ³ J |
|----|------------------|---|--|--|
| 2 | 154,8 | - | - | H6a, H6b |
| 3 | 54,7 | 4,40 (dddd; 11,6; 3,3; 2,2; 1,5; 1H) | H14a, H14b, H6a, H6b | H6b, H17 |
| 5 | 57,5 | (a) 3,63 (ddd; 12,6; 11,7; 4,0; 1H) (b) 3,86 (ddd; 12,6; 5,5; 1,5; 1H) | H5b, H6a, H6b H5a, H6a, H6b | H17 |
| 6 | 28,3 | (a) 2,82 (dddd; 15,0; 4,0; 1,5; 1,5; 1H) (b) 2,93 (dddd; 15,0; 11,7; 5,5; 2,2; 1H) | H3, H5a, H5b, H6b H3, H5a, H5b, H6a | H5b |
| 7 | 114,0 | - | - | H6a, H6b, H5a, H5b, H9 |
| 8 | 133,4 | - | - | H10, H12 |
| 9 | 124,0 | 7,43 (dt; 7,9; 1,2; 1H) | H10 | H10 |
| 10 | 125,2 | 7,01 (ddd; 7,9; 7,0; 1,0; 1H) | H9 | H11, H12 |
| 11 | 127,8 | 7,08 (ddd; 8,1; 7,0; 1,2; 1H) | H12 | H9 |
| 12 | 117,3 | 7,29 (dt; 8,1; 1,0; 1H) | H11 | H10, H9 |
| 13 | 143,3 | - | - | H11, H9 |
| 14 | 37,9 | (a) 1,79 (ddd; 13,5; 11,6; 5,4; 1H) (b) 2,65 (ddd; 13,5; 3,3; 1,8; 1H) | H3, H14b, H15 H3, H14a, H15 | H15 |

| | | | | |
|-----------|-------|---|----------------------------|---------------------------------|
| 15 | 34,9 | 3,78 (dddd; 5,4; 1,8; 1,8; 1,7; 1,7; 1,7; 1H) | H14a, H14b, H18a/b, H19 | H14a, H14b, H17, H19 |
| 16 | 99,5 | - | - | H14b, H15, H17 |
| 17 | 154,6 | 7,87 (s; 1H) | - | H5a, H6a |
| 18 | 77,2 | (a/b) 4,86** | H15, H19 | H19 |
| 19 | 155,4 | 7,25 (ddd; 1,8; 1,8; 1,8; 1H) | H15, H18a/b | H15, H18a/b |
| 20 | 145,0 | - | - | H14a, H14b, H15, H18a/b, H19 |
| 21 | 180,8 | - | - | H18a/b, H19 |
| 22 | 175,6 | - | - | H17, H23 |
| 23 | 56,6 | 3,66 (s; 3H) | - | - |

NMR 600 MHz; Metanol-*d*₄. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade -ddd=duplo-duplo duplo, dddd=duplo-duplo duplo, dddd=duplo-duplo-duplo duplo, dt=duplo-triplete, s=simpleto; acoplamento -*J* / Hz). *Obtidos dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC. **sobreposto com o sinal residual do solvente.

5.2.3. Estudo fitoquímico comparativo entre as frações alcaloídicas das espécies *P. rhytidocarpa*, *P. suterella* e *P. stenocalyx* através de HPLC-ESI-TOF-MS

Neste trabalho foi feito o estudo fitoquímico aplicando a técnica hífenada de HPLC com espectrômetro de massas de alta resolução focado na identificação de alcaloides para as espécies *P. rhytidocarpa*, *P. suterella* e *P. stenocalyx*, porém, para esta última espécie, o estudo foi feito através de comparação dos dados de tempo de retenção no cromatograma, comprimentos de onda máximos no espectro de UV/VIS e do espectro de massas de alta resolução com os dados identificados para os alcaloides nas duas espécies utilizando as mesmas condições operacionais.

As amostras das frações alcaloídicas de *P. rhytidocarpa*, *P. suterella* e *P. stenocalyx* foram preparadas nas concentrações de 71 mg.mL⁻¹, 72 mg.mL⁻¹ e 110 mg.mL⁻¹, respectivamente, em metanol e filtradas utilizando microfiltro de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro. As análises foram executadas em equipamento HPLC Agilent serie 1200, utilizando uma coluna C₁₈ (Phenomenex, 150 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å) mantida a 40 °C. O solvente aquoso, A, consistiu de 95 % H₂O + 5 % MeCN e o solvente orgânico, B, de 5 % H₂O + 95 % MeCN, ambos acidificados com 0,1 % de ácido fórmico (v/v). O fluxo foi mantido em 0,5 mL.minuto⁻¹, volume de injeção de 5 µL. O método gradiente iniciou-se com 15 %B, aumentando para 30 %B no minuto 35, em seguida para 65 %B no minuto 60, alcançando 100 %B no minuto 65, mantendo-se por 10 minutos. As análises de massas em tempo real foram executadas através do detector de massas de alta resolução ESI-TOF-MS em modo positivo. A Figura 45 apresenta os cromatogramas da separação a 280 nm sobrepostos das três espécies estudadas. Os picos foram identificados com os números correspondentes aos alcaloides isolados ou identificados neste trabalho.

Conforme se pode observar na Figura 45, os alcaloides lialosídeo (**54**), (*E*)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**), derivado da strictosidina (**145**), strictosamida (**32**), vallesiachotamina lactona (**11**), *E*-vallesiachotamina (**12**) e *Z*-vallesiachotamina (**13**) encontram-se presentes nas três espécies.

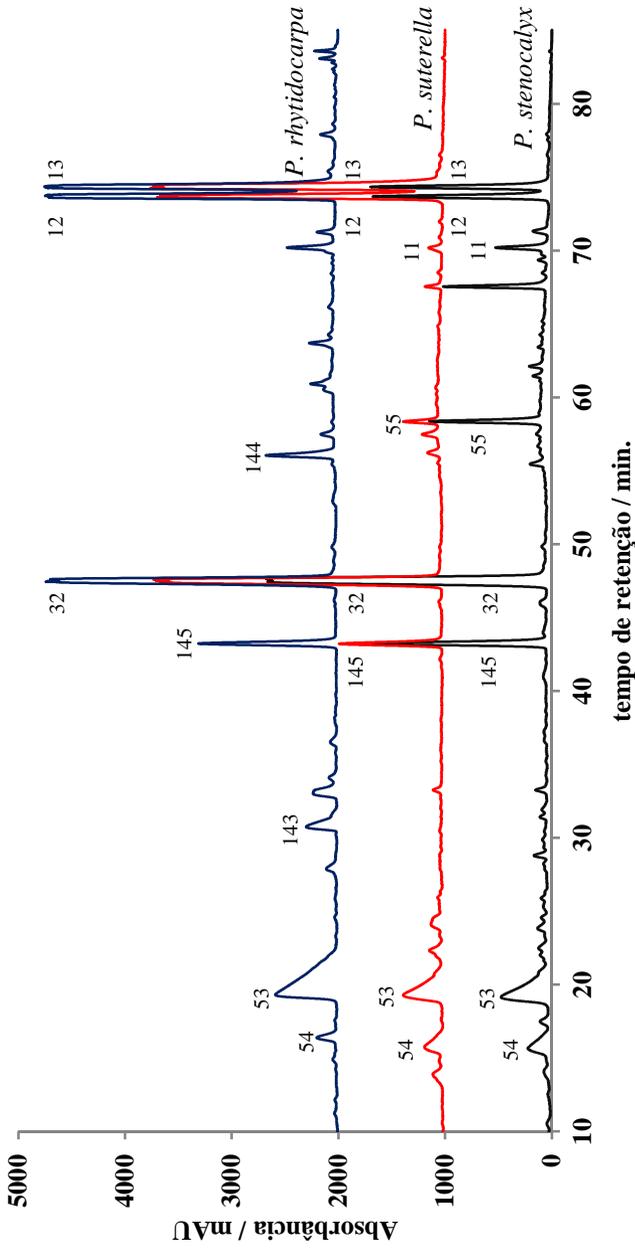


Figura 45. Cromatogramas extraídos a 280 nm sobrepostos para as espécies *P. rhytidocarpa*, *P. suterella* e *P. stenocalyx*. Acima dos picos encontram-se os números dos respectivos alcoídeos isolados ou identificados neste trabalho

Os alcaloides inéditos ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (**143**) e 2'-siringil-strictosamida (**144**) estão presentes apenas da espécie *P. rhytidocarpa*. O alcaloide pauidiantosídeo (**55**) foi identificado nas espécies *P. suterella* e *P. stenocalyx*.

Para a espécie *P. suterella*, já havia sido reportada a presença dos alcaloides (*E*)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**) [46] e naucletina (**142**) [103], cujas massas moleculares são 732,73 e 329,12, respectivamente. Não foi identificada a presença do alcaloide naucletina (**142**) em nenhuma das espécies estudadas através da pesquisa no cromatograma de íons totais. Conforme mostrado na Figura 45, foi identificada a presença do alcaloide (*E*)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**) nas três espécies. Foi executada a análise em espectrômetro de massas, cujo espectro apresentou os fragmentos principais em m/z 527,3 referente à molécula do lialosídeo após a perda do derivado (*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-cinamoil e em m/z 365,3 referente à perda da glicose pela porção lialosídeo do alcaloide, confirmado sua identidade através de comparação dos dados obtidos experimentalmente com os dados da literatura [159]. O espectro MS/MS do alcaloide (*E*)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**) é mostrado na Figura 46.

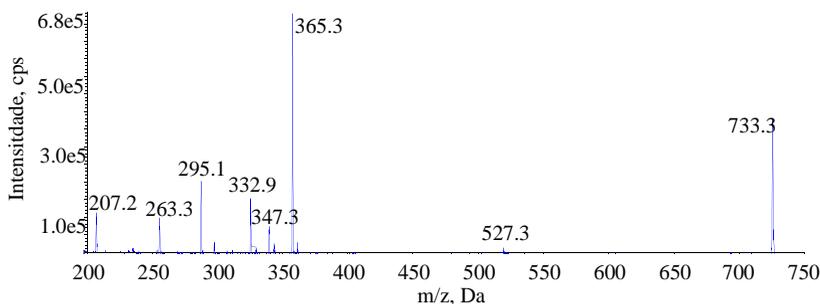


Figura 46. Espectro de massas MS/MS executado para a massa selecionada em m/z 733,3, referente ao alcaloide (*E*)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**)

A Tabela 18 mostra, de forma mais simplificada, quais alcaloides foram identificados em cada espécie após o estudo comparativo utilizando a técnica HPLC-HRMS. Na tabela são apresentados apenas os números dos compostos, os quais estão dispostos na mesma sequência da separação cromatográfica e as espécies na mesma sequência dos cromatogramas expostos na Figura 45.

Tabela 18. Relação dos compostos identificados através do estudo comparativo utilizando a técnica HPLC-HRMS para cada uma das três espécies de

| | <i>Psychotria</i> | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------|----|-----|-----|----|-----|----|----|----|----|
| | 54 | 53 | 143 | 145 | 32 | 144 | 55 | 11 | 12 | 13 |
| <i>P. rhytidocarpa</i> | x | x | x | x | x | x | | | x | x |
| <i>P. suterella</i> | x | x | | x | x | | x | x | x | x |
| <i>P. stenocalyx</i> | x | x | | x | x | | x | x | x | x |

5.3. Discussão da biogênese dos alcaloides monoterpene indólicos identificados nas espécies de *Psychotria* estudadas

Dentre todos os alcaloides de plantas, os alcaloides monoterpene indólicos representam o maior grupo já tendo sido identificados mais de 3000 diferentes estruturas ocorrendo, principalmente, nas famílias Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae [6, 167].

Os alcaloides monoterpene indólicos são biossintetizados através de uma reação de condensação estereoseletiva de Pictet-Spengler, semelhante à reação de Mannich, catalisada pela enzima strictosidina sintetase, formando a strictosidina (**17**), um sistema tetrahydro- β -carbólico apresentando configuração *S* no carbono quiral 3. De acordo com o rearranjo apresentado pela secologanina, podem ser identificados três tipos principais de esqueletos para estes alcaloides, o tipo corinanto, o tipo aspidosperma e o tipo Iboga [6, 105] (Figura 3, página 67).

A strictosidina (**17**) é precursora dos alcaloides do tipo corinanto, a qual pode ser submetida a diferentes reações de ciclização entre o nucleófilo N4 e um dos carbonos eletrofílicos, C17, C19, C21 e C22 dando origem aos subtipos vincosan lactama, ciclizado através da ligação N4-C22, e vallesiachotaman, ciclizado através da ligação N4-C17. A strictosidina (**17**) e seus derivados não ciclizados também são classificados como o subtipo vincosan [168, 169] (Figura 47).

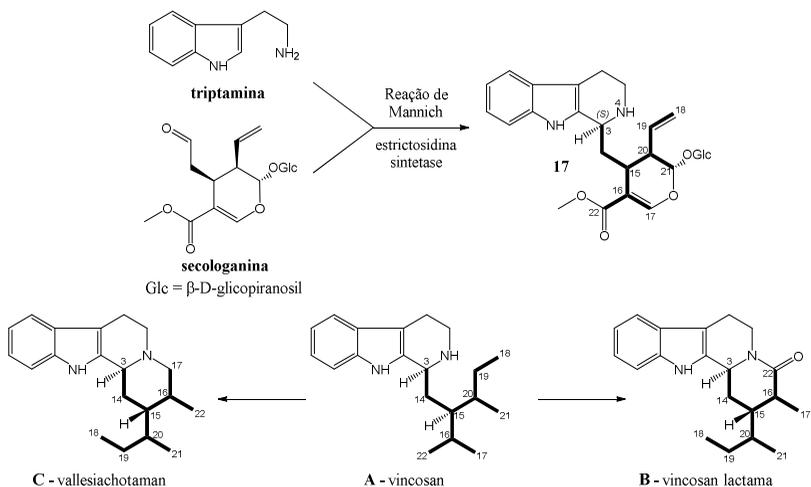


Figura 47. Esquema da biossíntese da strictosidina, o precursor do esqueleto tipo corinanto, e dos subtipos vincosan, vincosan lactama e vallesiachotaman

A porção secologanina da strictosidina (**17**) sofre uma rotação, posicionando a carbonila (C22) do seu grupo éster metílico próximo da amina secundária da porção triptamina (N4). O par de elétrons do N4 promove um ataque nucleofílico a esta carbonila formando a lactama do alcaloide strictosamida (**32**), um representante do subtipo vincosan lactama (Figura 48). Outros alcaloides podem ser originados a partir de derivatizações da strictosamida (**32**) como é o caso do alcaloide 2'-siringil-strictosamida (**144**), provavelmente formado a partir de uma reação de esterificação com o ácido síngico em meio enzimático (Figura 50).

A strictosidina (**17**) também pode sofrer reação de hidrólise catalisada pela enzima strictosidina glicosidase gerando sua aglicona, que apresenta um hemiacetal reativo. Este hemiacetal é hidrolisado formando um dialdeído intermediário a partir de um equilíbrio tautomérico aldo-enólico nos carbonos C17 e C21. Através do ataque nucleofílico do N4 ao C17, este dialdeído forma uma enamina que, após reações de isomerizações, resultam nos alcaloides isômeros *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**) ou vallesiachotamina lactona (**11**), todos representantes do subtipo vallesiachotaman [6, 105]. A Figura 48 sumariza as reações de biossíntese destes alcaloides.

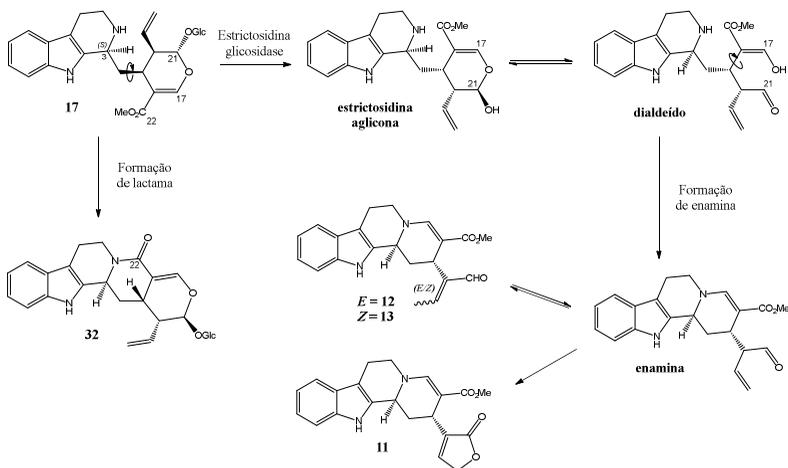


Figura 48. Biossíntese dos alcaloides strictosamida e vallesiachotamina a partir da reação da triptamina e secologanina tendo como intermediário a strictosidina (17)

A enamina, formada na etapa anterior, sofre uma reação de oxidação do grupo aldeído (C21) para formar o grupo ácido β -butenóico. O grupo ácido β -butenóico sofre uma ciclização após ataque nucleofílico promovido pelo oxigênio resultando no grupo γ -lactona α - β -insaturado do alcaloide vallesiachotamina lactona (**11**), conforme proposto na Figura 49.

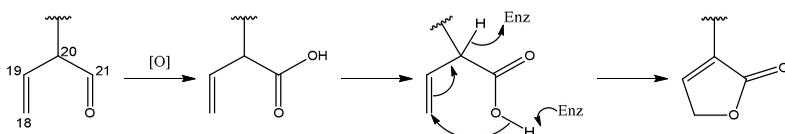


Figura 49. Sequência de reações ocorrentes no grupo β -butenaldeído da enamina proposta para a biossíntese do alcaloide vallesiachotamina lactona (11)

O ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato)-N4-metil-strictosidínico (**143**) é um derivado do ácido strictosidínico (**5**) que, por sua vez, é formado pela hidrólise do grupo éster metílico presente na strictosidina (**17**). É possível que este alcaloide inédito (**143**) tenha sido formado a partir de uma reação metabólica de transmetilação do ácido strictosidínico (**5**) na presença do cofator S-Adenosilmetionina (SAM) e

uma reação de esterificação com o ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico em meio enzimático (Figura 50).

O alcaloide lialosídeo (**54**), também representante do subtipo vincosan, foi biossintetizado a partir da oxidação do grupo tetrahydro- β -carbolina da strictosidina (**17**) tornando-o uma β -carbolina, cuja principal diferença é a aromatização do anel piperidínico. Os alcaloides (*E*)-O-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**) e pauridiantosídeo (**55**) são derivados do lialosídeo (**54**) sendo o primeiro sintetizado a partir da esterificação do grupo cinamoil à hidroxila ligada ao C2' da glicose e o segundo a partir da oxidação do grupo metileno C14 (Figura 50).

O alcaloide inédito derivado de strictosidina (**145**) pode ter sido biossintetizado após uma reação de C-glicosilação no carbono C21 da aglicona do alcaloide strictosidina (**17**).

A Figura 50 mostra uma proposta para a biogênese dos alcaloides identificados nas espécies de *Psychotria* estudadas neste trabalho, *P. rhytidocarpa*, *P. suterella* e *P. stenocalyx*.

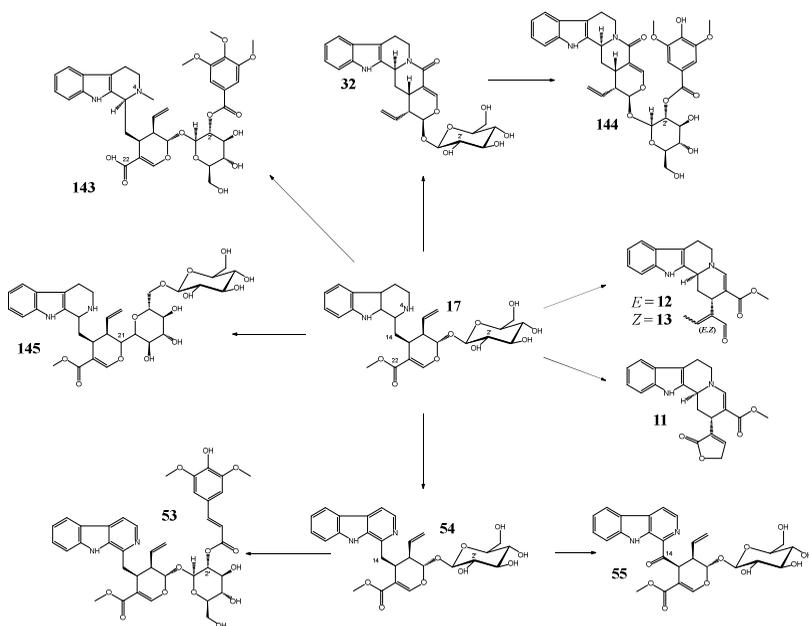


Figura 50. Biogênese proposta para os alcaloides isolados e/ou identificados nas espécies de *Psychotria* estudadas

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliadas algumas atividades biológicas dos extratos brutos das folhas e frações das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*, os quais foram submetidos aos ensaios antioxidantes, alelopático, antimicrobianos, acetilcolinesterásico e anti-inflamatório.

A fração acetato de etila de ambas as espécies apresentou maior teor de fenólicos que as demais, sendo importante destacar a fração acetato de etila de *P. stenocalyx* que apresentou conteúdo de fenólicos e flavonoides significativamente maior que as demais frações. As frações acetato de etila e alcaloídicas também apresentaram boas atividades no teste que avalia o poder redutor, com destaque para a fração rica em alcaloides de *P. stenocalyx* que apresentaram maior potencial redutor.

O teste alelopático mostrou que, de uma maneira geral, ambos os extratos são fitotóxicos para todas as sementes testadas, porém as sementes de alface são mais sensíveis aos aleloquímicos presentes nos extratos testados do que as sementes de rabanete e pepino.

Os extratos brutos e frações alcaloídicas das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* foram avaliados quanto inibição da enzima AchE na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Em relação às inibições apresentadas pelos extratos brutos, a espécie *P. stenocalyx* inibiu em 52,63% e a espécie *P. suterella* inibiu em 51,82% a atividade da enzima. Em relação às inibições apresentadas pelas frações alcaloídicas, a espécie *P. stenocalyx* inibiu em 54,31 % e a espécie *P. suterella* inibiu em 63,58 %, sendo esta última amostra a que apresentou maior inibição na atividade da enzima AchE.

Nos testes antimicrobianos, que avaliaram inibição nos crescimentos bacteriano e fúngico, ambos os extratos foram considerados inativos ou pouco ativos contra os micro-organismos testados.

Os extratos brutos das espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella* se mostraram bons inibidores do processo inflamatório nos modelos estudados. O extrato de *P. stenocalyx* apresentou melhor inibição na dose 200 mg.kg⁻¹ com redução de 57,1 % na migração de leucócitos. O extrato de *P. suterella* apresentou melhor inibição na dose 400 mg.kg⁻¹ com redução na migração de leucócitos de 64,7 %. A formação de exsudato foi significativamente reduzida pelo extrato de *P. stenocalyx* apenas na dose de 400 mg.kg⁻¹ com inibição foi de 30,1 %. O extrato de *P. suterella* não reduziu significativamente a formação de exsudato.

Foi desenvolvido um estudo fitoquímico envolvendo as frações ricas em alcaloides das espécies *Psychotria rhytidocarpa*, *Psychotria suterella* e *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae) das quais foram isolados e elucidados alguns alcaloides através da aplicação das técnicas hifenadas

de HPLC com espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS), extração em fase sólida (SPE) e ressonância magnética nuclear (NMR).

Através da técnica hifenada HPLC-HRMS-SPE-*tt*NMR na fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa* foram isolados e elucidados quatro alcaloides conhecidos: *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**), strictosamida (**32**), lialosídeo (**54**) e os três alcaloides inéditos: ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (**143**), 2'-siringil-strictosamida (**144**) e uma proposta de estrutura para o derivado de strictosidina (**145**).

Através da aplicação das técnicas hifenadas HPLC-SPE-NMR e HPLC-HRMS na fração alcaloídica de *Psychotria suterella* foram isolados e elucidados cinco alcaloides conhecidos: *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**), strictosamida (**32**), pauridiantosídeo (**55**) e vallesiachotamina lactona (**11**) e o alcaloide derivado de strictosidina (**145**). Este é o primeiro relato da presença do alcaloide pauridiantosídeo (**55**) na espécie *Psychotria suterella*.

Através da aplicação da técnica hifenada HPLC-HRMS foi efetuado um estudo fitoquímico comparativo envolvendo as frações alcaloídicas das espécies *P. stenocalyx*, *P. suterella* e *P. rhytidocarpa*. Para a espécie *P. stenocalyx* foram identificadas a presença dos alcaloides *E/Z*-vallesiachotamina (**12** e **13**), strictosamida (**32**), (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**), lialosídeo (**54**), pauridiantosídeo (**55**), vallesiachotamina lactona (**11**) e o derivado de strictosidina (**145**). Para a espécie *P. suterella* foram identificados os alcaloides (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4-hidroxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**), lialosídeo (**54**), vallesiachotamina lactona (**11**) e o alcaloide derivado de strictosidine (**145**), além dos alcaloides já mencionados. Finalmente, para a espécie *P. rhytidocarpa* foram identificados os alcaloides (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4-hidroxy-3,5-dimetoxi-lialosídeo (**53**) e vallesiachotamina lactona (**11**), além dos alcaloides já mencionados. Após o estudo comparativo foi possível identificar a presença de nove alcaloides na espécie *P. rhytidocarpa*, oito alcaloides nas espécies *P. stenocalyx* e *P. suterella*.

Através do estudo da biossíntese foi possível compreender que a strictosidina (**17**), precursora de todos os alcaloides monoterpênicos indólicos do tipo corinanto, apresenta configuração *S* no carbono quiral 3. Este alcaloide, por sua vez, é formado por uma reação de condensação estereoseletiva entre a triptamina e a secolonganina. Os corinantos podem ser submetidos a diferentes reações de ciclização dando origem aos subtipos vincosana lactama e vallesiachotamina, subtipos dos alcaloides identificados no presente estudo. Também foram discutidas propostas de

rotas biossintéticas para os alcaloides inéditos isolados no presente trabalho como a formação dos ésteres nos compostos ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (**143**) e 2'-siringil-strictosamida (**144**) e para a formação do grupo lactona do alcaloide vallesiachotamina lactona (**11**).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Henriques, A.T., *et al.*, *Alcaloides: Generalidades e Aspectos Básicos*, in *Farmacognosia : da planta ao medicamento*. 2010, Editora da UFSC ; Editora da UFRGS: Florianópolis, SC; Porto Alegre, RS. p. 765-817.
2. Viegas Jr, C., V.S. Bolzani, and E.J. Barreiro, *Os produtos naturais e a química medicinal moderna*. Quimica Nova, 2006. **29**: p. 326-337.
3. Barreiro, E.J. and C.A.M. Fraga, *Química medicinal as bases moleculares da ação dos fármacos*. 2008, Porto Alegre: Artmed.
4. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*. Journal of Natural Products, 2016. **79**(3): p. 629-661.
5. Aniszewski, T., *Alkaloids - secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. 2015, Amsterdam: Elsevier.
6. Dewick, P.M., *Alkaloids*, in *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. 2009, John Wiley & Sons Ltd: University of Nottingham, UK. p. 311-420.
7. Robbrecht, E., *et al.* *National Botanic Garden of Belgium Research*. Monographic and systematic studies in Rubiaceae [cited 2017 April 9]; Available from: <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.php>.
8. Eisenhut, M., A. Omari, and H.G. MacLehose, *Intrarectal quinine for treating Plasmodium falciparum malaria: a systematic review*. Malaria Journal, 2005. **4**.
9. Hasegawa, M., *et al.*, *Studies for the emetic mechanisms of ipecac syrup (TJN-119) and its active components in ferrets: Involvement of 5-hydroxytryptamine receptors*. Japanese Journal of Pharmacology, 2002. **89**(2): p. 113-119.
10. Barbosa, M.R., *et al.* *Rubiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. 2015 [cited 2017 April 9]; Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB210>.
11. Chao, P.D.L. and G.H. Svoboda, *2 New iridoids from Posoqueria latifolia*. Journal of Natural Products, 1980. **43**(5): p. 571-576.
12. Martins, D., *et al.*, *Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae)*. Biomed Research International, 2013.

13. Tan, S.N., *et al.*, *Determination of metabolites in Uncaria sinensis by HPLC and GC-MS after green solvent microwave-assisted extraction*. *Talanta*, 2011. **83**(3): p. 891-898.
14. Ferreira, J.C., R.P.L. Lemos, and L.M. Conserva, *Chemical constituents from Spermaceoce verticillata (Rubiaceae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012. **44**: p. 208-211.
15. Moreira, V.F., *et al.*, *New Chemical Constituents from Borreria verticillata (Rubiaceae)*. *Helvetica Chimica Acta*, 2010. **93**(9): p. 1751-1757.
16. Davis, A.P., *et al.*, *The typification and characterization of the genus Psychotria L. (Rubiaceae)*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2001. **135**(1): p. 35-42.
17. Nepokroeff, M., B. Bremer, and K.J. Sytsma, *Reorganization of the genus Psychotria and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data*. *Systematic Botany*, 1999. **24**(1): p. 5-27.
18. Roth, A., *et al.*, *Preliminary study of the alkaloids of Psychotria forsteriana*. *Planta Medica*, 1985. **51**(3): p. 289-289.
19. Frodin, D.G., *History and concepts of big plant genera*. *Taxon*, 2004. **53**(3): p. 753-776.
20. Chiapella, J. and F.O. Zuloaga, *A Revision of Deschampsia, Avenella, and Vahlodea (Poaceae, Poeae, Airinae) in South America*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2010. **97**(2): p. 141-162.
21. JBRJ. *Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. 2016 [cited 2017 April 9]; Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>.
22. Riba, J., *et al.*, *Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003. **306**(1): p. 73-83.
23. Sarris, J., E. McIntyre, and D.A. Camfield, *Plant-based medicines for anxiety disorders, part 2: a review of clinical studies with supporting preclinical evidence*. *CNS Drugs*, 2013. **27**(4): p. 301-19.
24. Rivier, L. and J.E. Lindgren, *Ayahuasca, south-american hallucinogenic drink - ethnobotanical and chemical investigation*. *Economic Botany*, 1972. **26**(2): p. 101-129.

25. Nascimento, N.C., *et al.*, *Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of Psychotria brachyceras*. Environ. Mol. Mutagen., 2007. **48**(9): p. 728-734.
26. Gregianini, T.S., *et al.*, *The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher*. Photochem. Photobiol., 2003. **78**(5): p. 470-474.
27. Matsuura, H.N. and A.G. Fett-Neto, *The major indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl vincosamide from leaves of Psychotria leiocarpa Cham. & Schlttdl. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity*. Nat. Prod. Res., 2013. **27**(4-5): p. 402-411.
28. Iniyavan, M., *et al.*, *Evaluation of antioxidant and pharmacological properties of Psychotria nilgiriensis Deb & gang*. Food Sci. Biotechnol., 2012. **21**(5): p. 1421-1431.
29. Formagio, A.S.N., *et al.*, *Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in Psychotria leaf extracts*. Antioxidants, 2014. **3**(4): p. 745-757, 13 pp.
30. Alves, G.R.M., *et al.*, *Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (Psychotria ipecacuanha)*. Biochem. Syst. Ecol., 2005. **33**(3): p. 233-243.
31. Camacho-Corona, M.d.R., *et al.*, *Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. J. Mex. Chem. Soc., 2009. **53**(2): p. 71-75.
32. Moraes, T.M.S., *et al.*, *Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of Psychotria species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic rainforest*. Planta Med., 2011. **77**(9): p. 964-970.
33. Takayama, H., *et al.*, *New Type of Trimeric and Pentameric Indole Alkaloids from Psychotria rostrata*. Org. Lett., 2004. **6**(17): p. 2945-2948.
34. Moeller, M. and M. Wink, *Characteristics of apoptosis induction by the alkaloid emetine in human tumour cell lines*. Planta Med., 2007. **73**(13): p. 1389-1396.
35. Moeller, M., *et al.*, *The alkaloid emetine as a promising agent for the induction and enhancement of drug-induced apoptosis in leukemia cells*. Oncol. Rep., 2007. **18**(3): p. 737-744.
36. Muhammad, I., *et al.*, *Antiparasitic Alkaloids from Psychotria klugii*. J. Nat. Prod., 2003. **66**(7): p. 962-967.

37. Kato, L., *et al.*, *Antiprotozoal alkaloids from Psychotria prunifolia (Kunth) steyererm.* J. Braz. Chem. Soc., 2012. **23**(2): p. 355-360.
38. Gerlach, S.L., *et al.*, *Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin O2 from Viola odorata and psyle cyclotides from Psychotria leptothyrsa.* Biopolymers, 2010. **94**(5): p. 617-625.
39. Simões-Pires, C.A., *et al.*, *Indole monoterpenes with antichemotactic activity from Psychotria myriantha: chemotaxonomic significance.* Nat. Prod. Commun., 2006. **1**(12): p. 1101-1106.
40. Farias, F.M., *et al.*, *Strictosidinic acid, isolated from Psychotria myriantha Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus.* Fitoterapia, 2012. **83**(6): p. 1138-1143.
41. Both, F.L., *et al.*, *Psychopharmacological Profile of the Alkaloid Psychollatine as a 5HT2A/C Serotonin Modulator.* J. Nat. Prod., 2005. **68**(3): p. 374-380.
42. Awad, R., *et al.*, *Ethnopharmacology of Q'eqchi' Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system.* J. Ethnopharmacol., 2009. **125**(2): p. 257-264.
43. Guerrero, E.I., *et al.*, *Vasoactive effects of different fractions from two Panamanians plants used in Amerindian traditional medicine.* J Ethnopharmacol, 2010. **131**(2): p. 497-501.
44. Currais, A., *et al.*, *Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tome e Principe.* J. Ethnopharmacol., 2014. **155**(1): p. 830-840.
45. Passos, C.S., *et al.*, *Indole alkaloids of Psychotria as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors.* Phytochemistry (Elsevier), 2013. **86**: p. 8-20.
46. Passos, C.S., *et al.*, *Monoamine oxidase inhibition by monoterpene indole alkaloids and fractions obtained from Psychotria suterella and Psychotria laciniata.* J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2013. **28**(3): p. 611-618.
47. Klein, L.C., *et al.*, *Indole Alkaloids and Semisynthetic Indole Derivatives as Multifunctional Scaffolds Aiming the Inhibition of Enzymes Related to Neurodegenerative Diseases - A Focus on Psychotria L. Genus.* Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014. **14**(8): p. 1056-1075.

48. Pimenta, A.A.T., *et al.*, *Unusual monoterpene indole alkaloids from Psychotria stachyoides Benth.* Biochem. Syst. Ecol., 2010. **38**(4): p. 846-849.
49. Pimenta, A.T.A., *et al.*, *Alkaloid and other chemical constituents from Psychotria stachyoides Benth.* J. Braz. Chem. Soc., 2011. **22**(11): p. 2216-2219.
50. Farias, F.M., *et al.*, *Monoamine levels in rat striatum after acute intraperitoneal injection of strictosidinic acid isolated from Psychotria myriantha Mull. Arg. (Rubiaceae).* Phytomedicine, 2010. **17**(3-4): p. 289-291.
51. Oliveira, A.M., L.R.P. Lyra, and L.M. Conserva, *β -Carboline alkaloids from Psychotria barbiflora DC. (Rubiaceae).* Biochem. Syst. Ecol., 2013. **50**: p. 339-341.
52. Henriques, A.T., *et al.*, *N,β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of Psychotria leiocarpa.* Phytochemistry (Elsevier), 2004. **65**(4): p. 449-454.
53. Li, X.-N., *et al.*, *Psychotripine: A New Trimeric Pyrroloindoline Derivative from Psychotria pilifera.* Org. Lett., 2011. **13**(21): p. 5896-5899.
54. Zhou, H., *et al.*, *A New Dimeric Alkaloid from the Leaf of Psychotria calocarpa.* Helv. Chim. Acta, 2010. **93**(8): p. 1650-1652.
55. Nomura, T. and T.M. Kutchan, *Is a metabolic enzyme complex involved in the efficient and accurate control of Ipecac alkaloid biosynthesis in Psychotria ipecacuanha?* Plant Signaling Behav., 2010. **5**(7): p. 875-877.
56. Nomura, T., A.L. Quesada, and T.M. Kutchan, *The new β -D-Glucosidase in terpenoid-isoquinoline alkaloid biosynthesis in Psychotria ipecacuanha.* J. Biol. Chem., 2008. **283**(50): p. 34650-34659.
57. Berger, A., *et al.*, *Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from Palicourea acuminata (=Psychotria acuminata, Rubiaceae).* Phytochem. Lett., 2012. **5**(3): p. 558-562.
58. Schinnerl, J., *et al.*, *Alstroines in Rubiaceae: Alstroisine A from Chassalia curviflora var. ophioxylodes and a novel derivative, rudgeifoline from Rudgea cornifolia.* Phytochem. Lett., 2012. **5**(3): p. 586-590.

59. Paul, J.H.A., A.R. Maxwell, and W.F. Reynolds, *Novel Bis(monoterpenoid) Indole Alkaloids from Psychotria bahiensis*. J. Nat. Prod., 2003. **66**(6): p. 752-754.
60. Bernhard, M., *et al.*, *Dopamine-iridoid alkaloids in Carapichea affinis (=Psychotria borucana) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac*. Biochem. Syst. Ecol., 2011. **39**(3): p. 232-235.
61. Kerber, V.A., *et al.*, *Brachycerine, a Novel Monoterpene Indole Alkaloid from Psychotria brachyceras*. J. Nat. Prod., 2003. **66**(7): p. 1038.
62. Gregianini, T.S., *et al.*, *Environmental and Ontogenetic Control of Accumulation of Brachycerine, a Bioactive Indole Alkaloid from Psychotria brachyceras*. J. Chem. Ecol., 2004. **30**(10): p. 2023-2036.
63. Limberger, R.P., *et al.*, *Bioconversion of (+)- and (-)- α -pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of Psychotria brachyceras and Rauvolfia sellowii*. Electron. J. Biotechnol., 2007. **10**(4): p. No pp. given.
64. Nascimento, N.C., *et al.*, *Accumulation of brachycerine, an antioxidant glucosidic indole alkaloid, is induced by abscisic acid, heavy metal, and osmotic stress in leaves of Psychotria brachyceras*. Plant Physiol Biochem, 2013. **73C**: p. 33-40.
65. Narine, L.L. and A.R. Maxwell, *Monoterpenoid indole alkaloid from Palicourea crocea*. Phytochem. Lett., 2009. **2**(1): p. 34-36.
66. Berger, A., *et al.*, *Iridoids as chemical markers of false ipecac (Ronabea emetica), a previously confused medicinal plant*. J. Ethnopharmacol., 2011. **138**(3): p. 756-761.
67. Tan, M.A., J.A. Eusebio, and G.J.D. Alejandro, *Chemotaxonomic implications of the absence of alkaloids in Psychotria gitingensis*. Biochem. Syst. Ecol., 2012. **45**: p. 20-22.
68. Li, H.-f., *et al.*, *Studies on chemical constituents from leaves of Psychotria hainanensis*. Zhongguo Shiyan Fangjixue Zazhi, 2011. **17**(19): p. 125-127.
69. Liu, Y., *et al.*, *Two novel dimeric indole alkaloids from the leaves and twigs of Psychotria henryi*. Fitoterapia, 2013. **86**: p. 178-182.
70. Liu, Y., *et al.*, *Absolute configuration study of a new dimeric indole alkaloid from the leaves and twigs of Psychotria henryi*. J. Asian Nat. Prod. Res., 2014. **16**(1): p. 29-33.

71. Farias, F.M., *Análise dos alcalóides de Psychotria myriantha Müell. Arg. e Psychotria nuda (Cham. et Schlttdl) Wawra (Rubiaceae)*. 2004, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre - RS.
72. Farias, F.M., *et al.*, *Strictosamide from Psychotria nuda (Cham. et Schlttdl) Wawra (Rubiaceae)*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2009. **36**(12): p. 919-920.
73. Liu, L., *et al.*, *A potent antibacterial indole alkaloid from Psychotria pilifera*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2016. **18**(8): p. 798-803.
74. Faria, E.O., *et al.*, *Quaternary β -carboline alkaloids from Psychotria prunifolia (Kunth) Steyerm.* *Phytochem. Lett.*, 2010. **3**(3): p. 113-116.
75. Phan, M.G., V.S. Ha, and T.S. Phan, *Study on the chemistry and antimicrobial activity of Psychotria reevesii Wall. (Rubiaceae)*. *Tap Chi Hoa Hoc*, 2007. **45**(5): p. 628-633.
76. Lu, H.-X., *et al.*, *A new iridoid glycoside from the root of Psychotria rubra*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2014. **57**: p. 133-136.
77. Benevides, P.J.C., M.C.M. Young, and V.S. Bolzani, *Biological activities of constituents from Psychotria spectabilis*. *Pharm. Biol. (Lisse, Neth.)*, 2004. **42**(8): p. 565-569.
78. Pimenta, A.A.T., *et al.*, *Structure elucidation and NMR assignments of two unusual monoterpene indole alkaloids from Psychotria stachyoides*. *Magn. Reson. Chem.*, 2010. **48**(9): p. 734-737.
79. Kerber, V.A., *et al.*, *Psychollatine, a Glucosidic Monoterpene Indole Alkaloid from Psychotria umbellata*. *J. Nat. Prod.*, 2008. **71**(4): p. 697-700.
80. Paranhos, J.T., *et al.*, *Organ-specific and environmental control of accumulation of psychollatine, a major indole alkaloid glucoside from Psychotria umbellata*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2009. **37**(6): p. 707-715.
81. Fragoso, V., *et al.*, *Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of Psychotria umbellata Vell.* *Toxicol. in Vitro*, 2008. **22**(3): p. 559-566.
82. Both, F.L., *et al.*, *Role of Glutamate and Dopamine Receptors in the Psychopharmacological Profile of the Indole Alkaloid Psychollatine*. *J. Nat. Prod.*, 2006. **69**(3): p. 342-345.

83. Kerber, V.A., *et al.*, *Three new monoterpene indole alkaloids from Psychotria umbellata Thonn.* Tetrahedron Lett., 2014. **55**(34): p. 4798-4800.
84. Riba, J., *et al.*, *Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca.* Drug Test. Anal., 2012. **4**(7-8): p. 610-616.
85. Souza, P.A.d., *Alkaloids and ayahuasca tea: a correlation of hallucinogen-induced "altered states of consciousness".* Rev. Bras. Plant. Med., 2011. **13**(3): p. 349-358.
86. Santos, R.G., *et al.*, *Autonomic, Neuroendocrine, and Immunological Effects of Ayahuasca: A Comparative Study With d-Amphetamine.* J. Clin. Psychopharmacol., 2011. **31**(6): p. 717-726.
87. Pires, A.P.S., *et al.*, *Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in ayahuasca, an amazonian psychoactive plant beverage.* Phytochem. Anal., 2009. **20**(2): p. 149-153.
88. Gambelungho, C., *et al.*, *Identification of N,N-dimethyltryptamine and β -carbolines in psychotropic ayahuasca beverage.* Biomed. Chromatogr., 2008. **22**(10): p. 1056-1059.
89. Huhn, C., *et al.*, *Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionization-mass spectrometry: A case study.* Electrophoresis, 2005. **26**(7-8): p. 1389-1397.
90. Blackledge, R.D. and C.M. Taylor, *Psychotria viridis - a botanical source of dimethyltryptamine (DMT).* Microgram J., 2003. **1**(1-2): p. 18-22.
91. Santos, R.G., *et al.*, *Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members.* J Ethnopharmacol, 2007. **112**(3): p. 507-13.
92. Callaway, J.C., *Various alkaloid profiles in decoctions of Banisteriopsis caapi.* J Psychoactive Drugs, 2005. **37**(2): p. 151-5.
93. Moreno, B.P., *et al.*, *Terpenoids and a coumarin from aerial parts of Psychotria vellosiana Benth. (Rubiaceae).* Biochem. Syst. Ecol., 2014. **56**: p. 80-82.
94. Zhang, C.-X., *et al.*, *Antiproliferative triterpenoid saponins from the stem of Psychotria sp.* Planta Med., 2013. **79**(11): p. 978-986.

95. Zhang, C.-X., *et al.*, *New sphingolipid psychotramide A-D from the stem of Psychotria sp.* Nat. Prod. Res., 2012. **26**(20): p. 1864-1868.
96. Zhang, C., *et al.*, *Chemical constituents of Psychotria sp. (I).* Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 2010. **49**(4): p. 147-149, 152.
97. Lu, Q., *et al.*, *A new acorane sesquiterpene from the aerial parts of Psychotria yunnanensis.* Nat. Prod. Res., 2014. **28**(20): p. 1659-1663.
98. Lu, Q., J. Wang, and L. Kong, *Chemical constituents from Psychotria yunnanensis and its chemotaxonomic study.* Biochem. Syst. Ecol., 2014. **52**: p. 20-22.
99. Dillenburg, C.R., *et al.*, *Rubiaceae : Tribo Psychotrieae.* 1985, Porto Alegre: Impr. Univ.
100. Taylor, C., M. Gomes, and D. Zappi. *Psychotria rhytidocarpa in Flora do Brasil 2020 em construção.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016 [cited 2017 April 9]; Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14211>.
101. Taylor, C., M. Gomes, and D. Zappi. *Psychotria stenocalyx in Flora do Brasil 2020 em construção.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016 [cited 2017 April 9]; Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14219>.
102. Taylor, C., M. Gomes, and D. Zappi. *Psychotria suterella in Flora do Brasil 2020 em construção.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016 [cited 2017 April 9]; Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14224>.
103. Van De Santos, L., *et al.*, *Indole monoterpene alkaloids from leaves of Psychotria suterella Mull. Arg. (Rubiaceae).* Biochemical Systematics and Ecology, 2001. **29**(11): p. 1185-1187.
104. Dewick, P.M., *The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids*, in *Medicinal natural products : a biosynthetic approach.* 2009, John Wiley & Sons Ltd: University of Nottingham, UK. p. 137-186.
105. O'Connor, S.E. and J.J. Maresh, *Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis.* Natural Product Reports, 2006. **23**(4): p. 532-547.
106. Dewick, P.M., *The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids*, in *Medicinal natural*

- products : a biosynthetic approach*. 2009, John Wiley & Sons Ltd: University of Nottingham, UK. p. 187-310.
107. Kesting, J.R., K.T. Johansen, and J.W. Jaroszewski, *Hyphenated NMR techniques*, in *Biomolecular NMR spectroscopy*, S.M.P. Andrew J Dingley, Editor. 2011, IOS Press: Amsterdam. p. 413-434.
 108. Watanabe, N. and E. Niki, *Direct-coupling of FT NMR to high performance liquid chromatography*. Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences, 1978. **54**(4): p. 194-199.
 109. Bayer, E., *et al.*, *On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance*. Journal of Chromatography A, 1979. **186**: p. 497-507.
 110. Bringmann, G., *et al.*, *HPLC-NMR on-line coupling including the ROESY technique: Direct characterization of naphthylisoquinoline alkaloids in crude plant extracts*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(14): p. 2805-2811.
 111. Elipe, M.V.S., *Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique*. Analytica Chimica Acta, 2003. **497**(1-2): p. 1-25.
 112. Bieri, S., *et al.*, *Identification of isomeric tropane alkaloids from Schizanthus grohamii by HPLC-NMR with loop storage and HPLC-UV-MS/SPE-NIVIR using a cryogenic flow probe*. Phytochemical Analysis, 2006. **17**(2): p. 78-86.
 113. Exarchou, V., *et al.*, *LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2005. **43**(9): p. 681-687.
 114. Kuhnle, M., K. Holtin, and K. Albert, *Capillary NMR detection in separation science*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(5-6): p. 719-726.
 115. Wubshet, S.G., *et al.*, *Magnetic Ligand Fishing as a Targeting Tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: alpha-Glucosidase Inhibitory Ligands and Alkylresorcinol Glycosides from Eugenia catharinae*. Journal of Natural Products, 2015. **78**(11): p. 2657-2665.
 116. Okutan, L., *et al.*, *High-Resolution alpha-Amylase Assay Combined with High-Performance Liquid Chromatography Solid-Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Expedited Identification of alpha-Amylase*

- Inhibitors: Proof of Concept and alpha-Amylase Inhibitor in Cinnamon*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(47): p. 11465-11471.
117. Schmidt, J.S., *et al.*, *Development of a bioassay-coupled HPLC-SPE-ttNMR platform for identification of alpha-glucosidase inhibitors in apple peel (Malus domestica Borkh.)*. Food Chemistry, 2012. **135**(3): p. 1692-1699.
 118. Stahl, E., *Thin-layer chromatography : a laboratory handbook*. 1969: Springer-Verlag.
 119. Matos, F.J.A., *Introdução à fitoquímica experimental*. 1997, Fortaleza: Edições UFC.
 120. Anagnostopoulou, M.A., *et al.*, *Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange-peel (Citrus sinensis)*. Food Chemistry, 2006. **94**(1): p. 19-25.
 121. Moresco, H.H., *et al.*, *Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of Averrhoa carambola leaves*. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2012. **22**(2): p. 319-324.
 122. Woisky, R.G. and A. Salatino, *Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control*. Journal of Apicultural Research, 1998. **37**(2): p. 99-105.
 123. Price, M.L. and L.G. Butler, *Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. **25**(6): p. 1268-1273.
 124. Waterman, P.G. and S. Mole, *Analysis of phenolic plant metabolites*. 1994, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
 125. Cavin, A., *et al.*, *Antioxidant and lipophilic constituents of Tinospora crispa*. Planta Medica, 1998. **64**(5): p. 393-396.
 126. Nishimura, H., T. Nakamura, and J. Mizutani, *Allelopathic effects of p-menthane-3,8-diols in Eucalyptus citriodora*. Phytochemistry, 1984. **23**(12): p. 2777-2779.
 127. Colla, G., *et al.*, *Antioxidant, Allelopathic and Toxic Activity of Ochra serrulata*. Latin American Journal of Pharmacy, 2011. **30**(4): p. 809-813.
 128. Ellman, G.L., *et al.*, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 1961. **7**(2): p. 88-&.

129. Magina, M.D.A., *et al.*, *Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of Eugenia brasiliensis*. *Química Nova*, 2012. **35**: p. 1184-1188.
130. Cockerill, F. and CLSI, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : twenty-second informational supplement*. 2012, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
131. Rex, J.H. and CLSI, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard*. 2008, Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute.
132. Cruz, R.C., *et al.*, *Influence of Different Media, Incubation Times, and Temperatures for Determining the MICs of Seven Antifungal Agents against Paracoccidioides brasiliensis by Microdilution*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013. **51**(2): p. 436-443.
133. Johann, S., *et al.*, *Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology*, 2010. **48**(4): p. 388-396.
134. Saleh, T.S.F., J.B. Calixto, and Y.S. Medeiros, *Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy*. *British Journal of Pharmacology*, 1996. **118**(3): p. 811-819.
135. Halliwell, B., *et al.*, *The characterization of antioxidants*. *Food and Chemical Toxicology*, 1995. **33**(7): p. 601-617.
136. Sousa, C.M.M., *et al.*, *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais*. *Química Nova*, 2007. **30**: p. 351-355.
137. Magina, M.A., *et al.*, *Antioxidant Activity of Three Species of Eugenia (Myrtaceae)*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2010. **29**(3): p. 376-382.
138. Gao, J., K. Igarashi, and M. Nukina, *Three new phenylethanoid glycosides from Caryopteris incana and their antioxidative activity*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2000. **48**(7): p. 1075-1078.
139. Ferreira, A.L.A. and L.S. Matsubara, *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 1997. **43**: p. 61-68.
140. Male, D.K., *Immunology*. 2006, [Edinburgh]: Mosby Elsevier.

141. Formagio, A., *et al.*, *Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts*. *Antioxidants*, 2014. **3**(4): p. 745.
142. Correa, L.R., G.L.G. Soares, and A.G. Fett-Neto, *Allelopathic potential of Psychotria leiocarpa, a dominant understorey species of subtropical forests*. *South African Journal of Botany*, 2008. **74**(4): p. 583-590.
143. Frescura, V.D., *et al.*, *Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species Psychotria brachypoda and Psychotria birotula (Rubiaceae) on the germination and cell division of Eruca sativa (Brassicaceae)*. *Caryologia*, 2013. **66**(2): p. 138-144.
144. ABRAZ. *O que é Alzheimer - Associação Brasileira de Alzheimer*. 2016 [cited 2017 April 9]; Available from: <http://abraz.org.br/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer>.
145. Gra Menéndez, S., N. Padrón Pérez, and J.d.J. Llibre Rodríguez, *Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 2002. **21**: p. 253-261.
146. Schubert, D. and P. Maher, *An alternative approach to drug discovery for Alzheimer's disease dementia*. *Future Medicinal Chemistry*, 2012. **4**(13): p. 1681-1688.
147. Sereniki, A. and M.A.B.F. Vital, *A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos*. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, 2008. **30**: p. 0-0.
148. Haida, K.S., *et al.*, *Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais* *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 2007. **11**(3): p. 185-192.
149. Johnson, T.L., *et al.*, *Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction*. *American Journal of Clinical Pathology*, 1985. **83**(3): p. 374-378.
150. Rahman, M., *et al.*, *Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. **70**(4): p. 2398-2403.
151. Machado, K.E., *et al.*, *Potent antibacterial activity of Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, 2005. **43**(7): p. 636-639.

152. Ríos, J.L. and M.C. Recio, *Medicinal plants and antimicrobial activity*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **100**(1-2): p. 80-84.
153. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-435.
154. Ogino, K., *et al.*, *Meloxicam Inhibits Prostaglandin E₂ Generation via Cyclooxygenase 2 in the Inflammatory Site but Not That via Cyclooxygenase 1 in the Stomach*. Pharmacology, 2000. **61**(4): p. 244-250.
155. Karplus, M., *Vicinal proton coupling in Nuclear Magnetic Resonance*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(18): p. 2870-2871.
156. Silverstein, R.M., *et al.*, *Identificação espectralométrica de compostos orgânicos*. 2007, Rio de Janeiro: LTC.
157. Weisman, G.R., V. Johnson, and R.E. Fiala, *Tricyclic orthoamides: Effects of lone-pair orientation upon NMR spectra*. Tetrahedron Letters, 1980. **21**(38): p. 3635-3638.
158. Zhang, Z.Z., *et al.*, *New indole alkaloids from the bark of Nauclea orientalis*. Journal of Natural Products, 2001. **64**(8): p. 1001-1005.
159. Valverde, J., G. Tamayo, and M. Hesse, *beta-carboline monoterpene glucosides from Palicourea adusta*. Phytochemistry, 1999. **52**(8): p. 1485-1489.
160. Waterman, P.G. and S. Zhong, *Vallesiachotamine and isovallesiachotamine from the seeds of Strychnos tricalysioides*. Planta Medica, 1982. **45**(1): p. 28-30.
161. Zhang, Z.Z., S.Y. Li, and S.M. Zhang, *Six new triterpenoid Saponins from the root and stem bark of Cephalanthus occidentalis*. Planta Medica, 2005. **71**(4): p. 355-361.
162. Patthy-Lukáts, Á., *et al.*, *First Direct and Detailed Stereochemical Analysis of Strictosidine*. Journal of Natural Products, 1997. **60**(2): p. 69-75.
163. Liang, Y., *et al.*, *Structural identification of the metabolites for strictosamide in rats bile by an ion trap-TOF mass spectrometer and mass defect filter technique*. Journal of Chromatography B, 2011. **879**(20): p. 1819-1822.
164. Akhgari, A., *et al.*, *Determination of terpenoid indole alkaloids in hairy roots of Rhazya stricta (Apocynaceae) by GC-MS*. Phytochemical Analysis, 2015. **26**(5): p. 331-338.

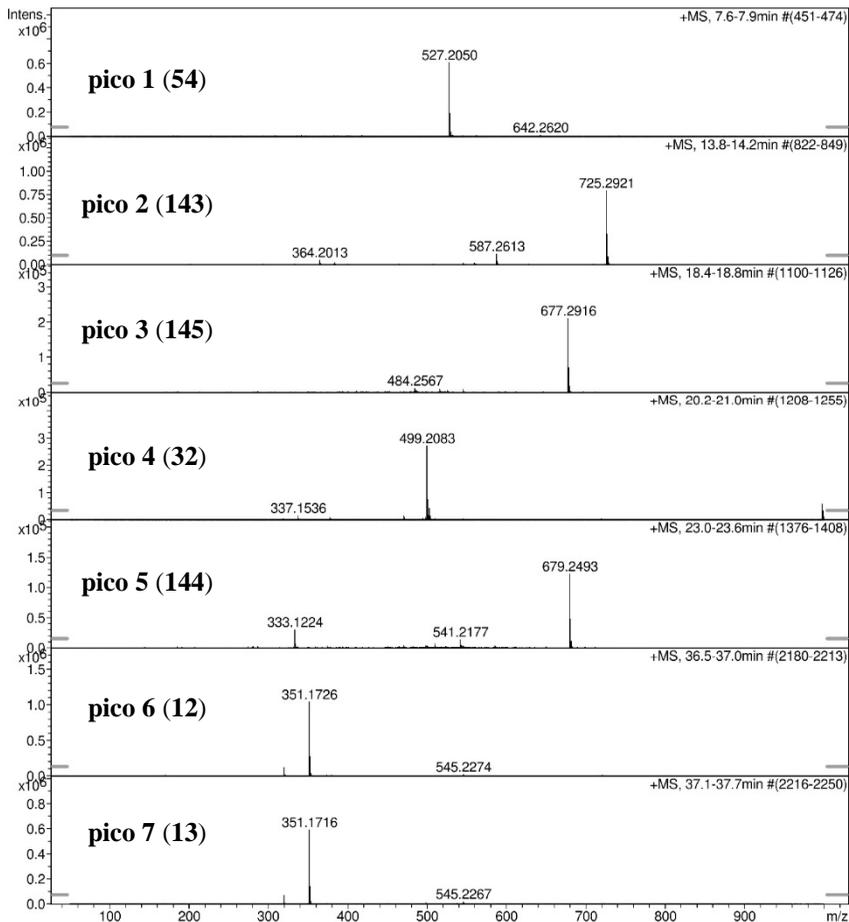
165. Levesque, J., R. Jacquesy, and C. Merienne, *A gluco-alkaloid from the isolated unusual configuration from Pauridiantha lyallii - isopauridianthoside*. Journal of Natural Products, 1983. **46**(5): p. 619-625.
166. Levesque, J., J.L. Pousset, and A. Cave, *Pauridianthoside, a new glucoalkaloid isolated from Pauridiantha lyalli*. Fitoterapia, 1977. **48**(1): p. 5-7.
167. Facchini, P.J. and V. De Luca, *Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants*. Plant Journal, 2008. **54**(4): p. 763-784.
168. Szabó, L.F., *Rigorous biogenetic network for a group of indole alkaloids derived from strictosidine*. Molecules, 2008. **13**(8): p. 1875-1896.
169. Szabó, L.F., *Molecular evolutionary lines in the formation of indole alkaloids derived from secologanin*. Arkivoc, 2008(3): p. 167-181.

8. APÊNCICES

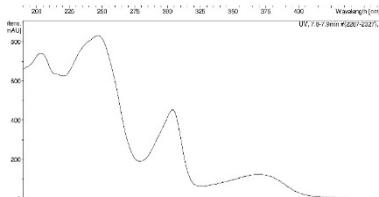
APÊNDICE 1. Espectros de massas de alta resolução obtidos em equipamento ESI-HRMS e extraídos do cromatograma de íons totais da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*

Acquisition Parameter

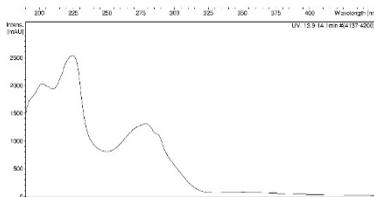
| | | | | | |
|-------------|------------|-----------------------|-----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 2.0 Bar |
| Focus | Not active | Set Capillary | 4100 V | Set Dry Heater | 200 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Dry Gas | 7.0 l/min |
| Scan End | 1000 m/z | Set Collision Cell RF | 110.0 Vpp | Set Divert Valve | Waste |



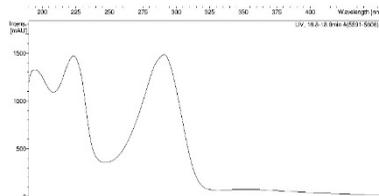
APÊNDICE 2. Espectros de ultravioleta obtidos em equipamento HPLC-DAD Agilent e extraídos do cromatograma da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



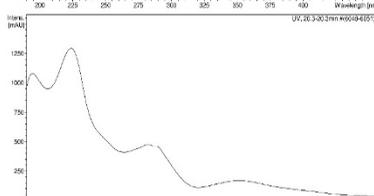
pico 1 (54)



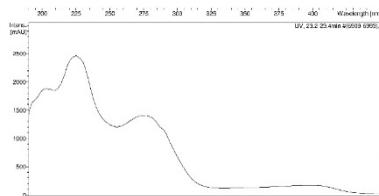
pico 2 (143)



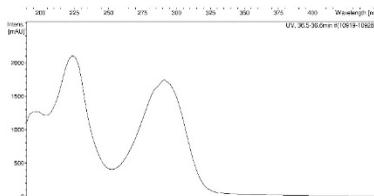
pico 3 (145)



pico 4 (32)

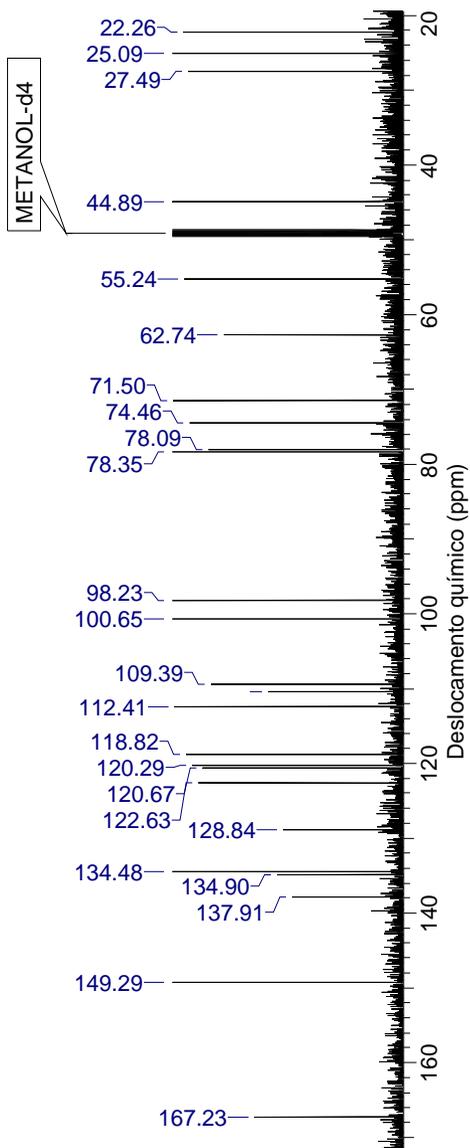


pico 5 (144)

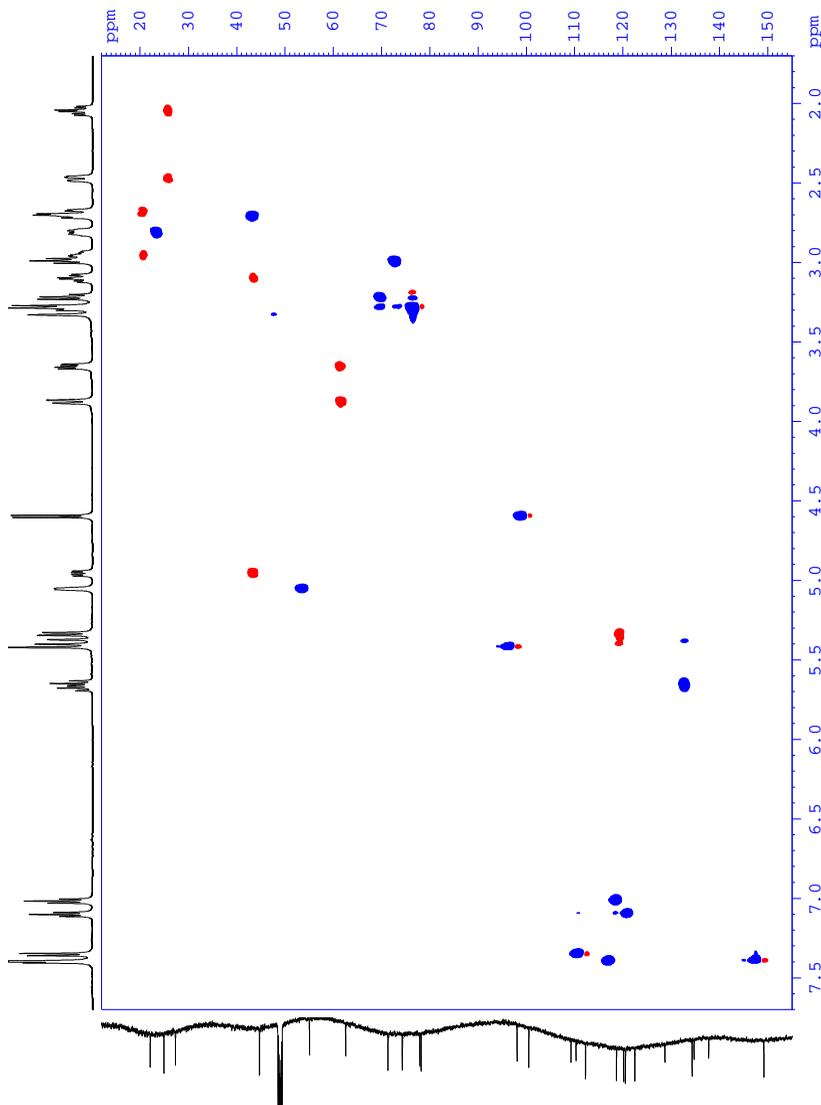


picos 6 (12) e 7 (13)

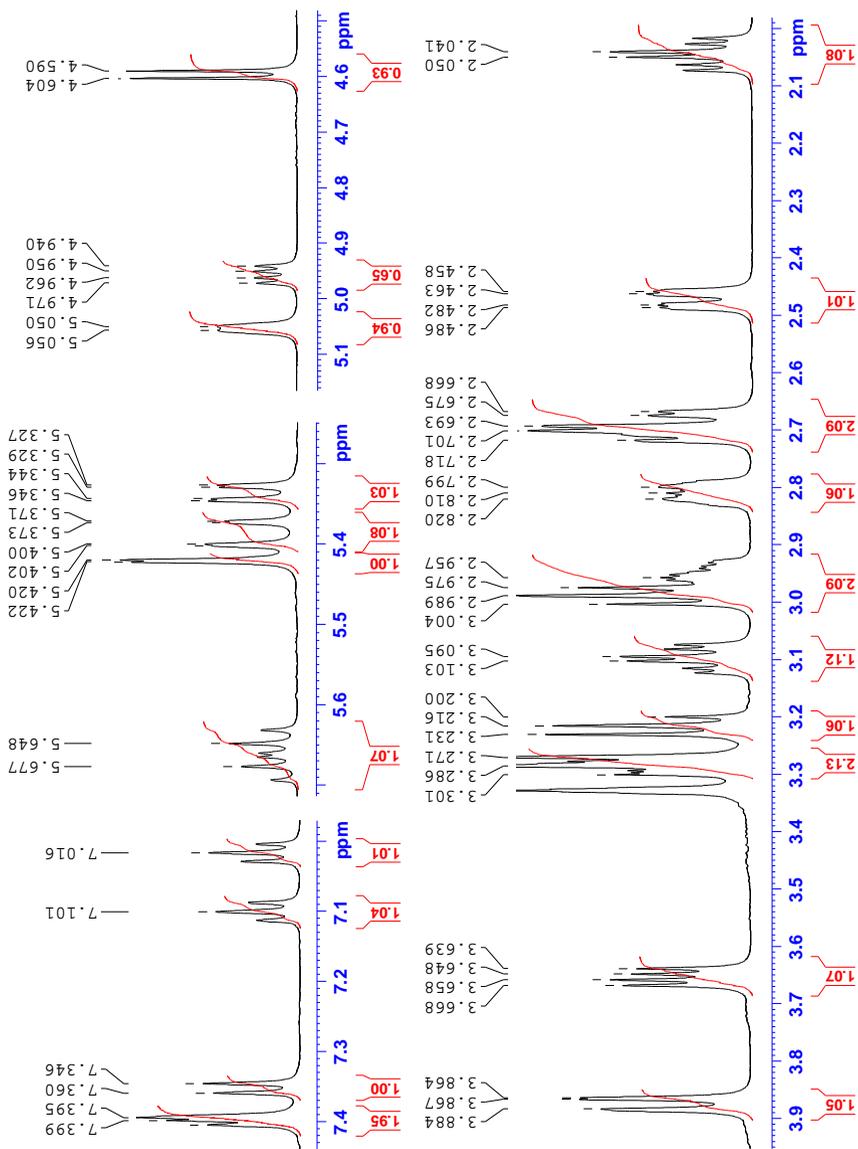
**APÊNDICE 3. Espectro de NMR de ^{13}C da estrictosamida (32),
pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa***



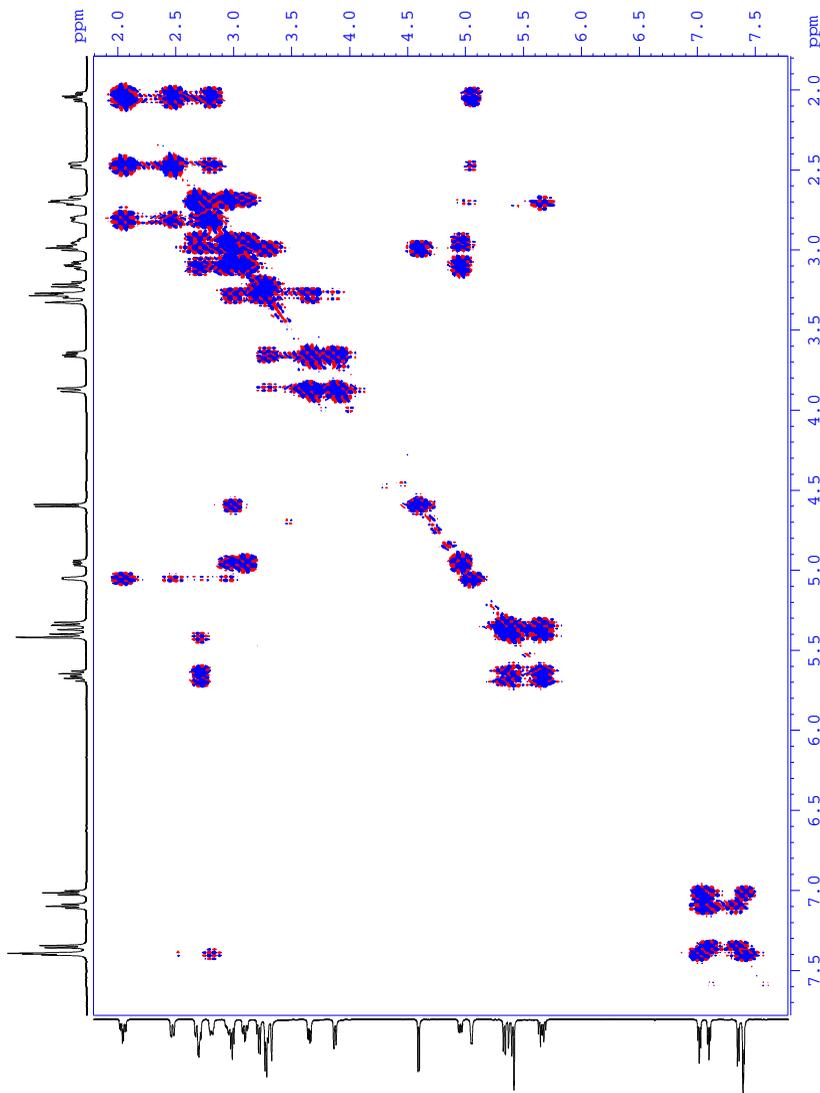
APÊNDICE 4. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



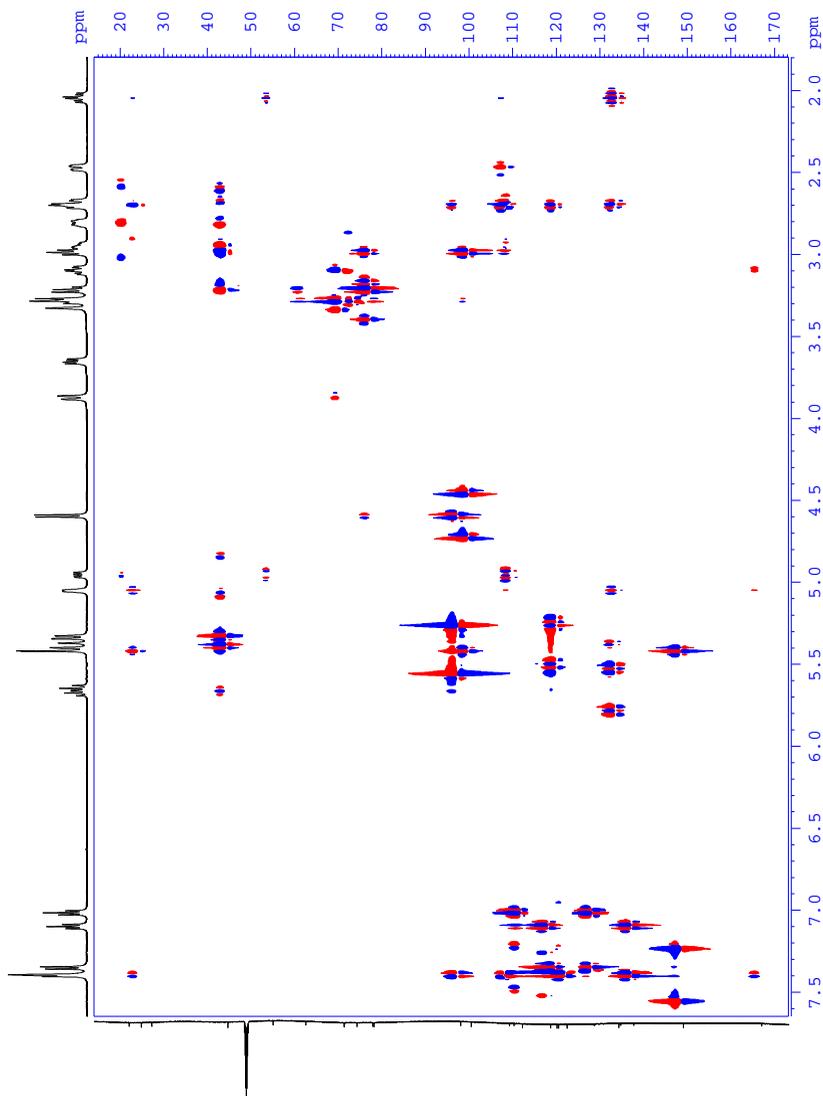
**APÊNDICE 5. Espectro de NMR de ^1H da estrictosamida (32),
pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa***



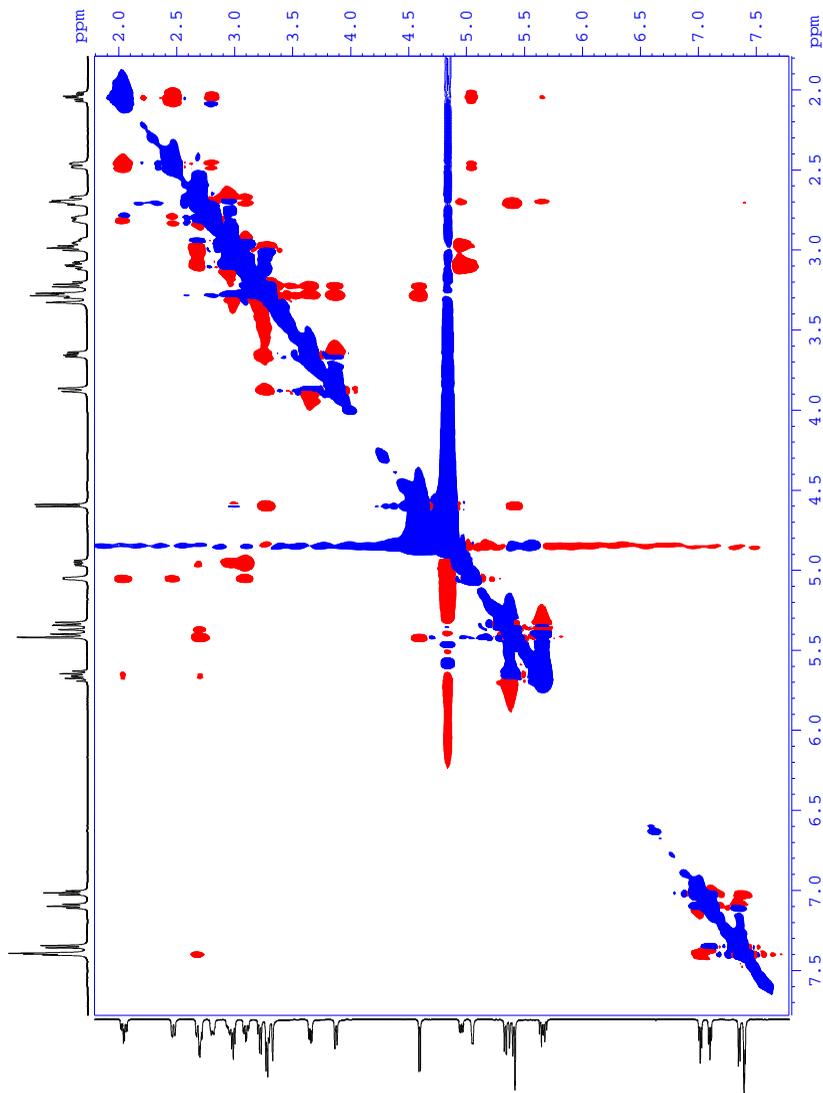
APÊNDICE 6. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



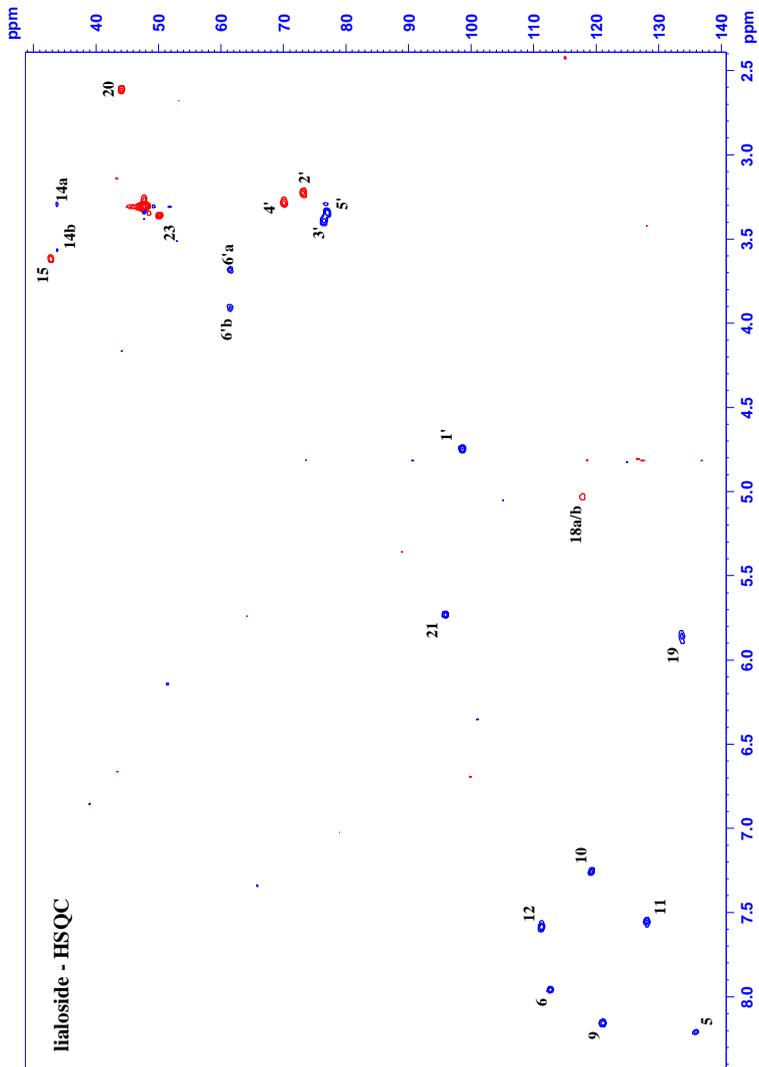
APÊNDICE 7. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



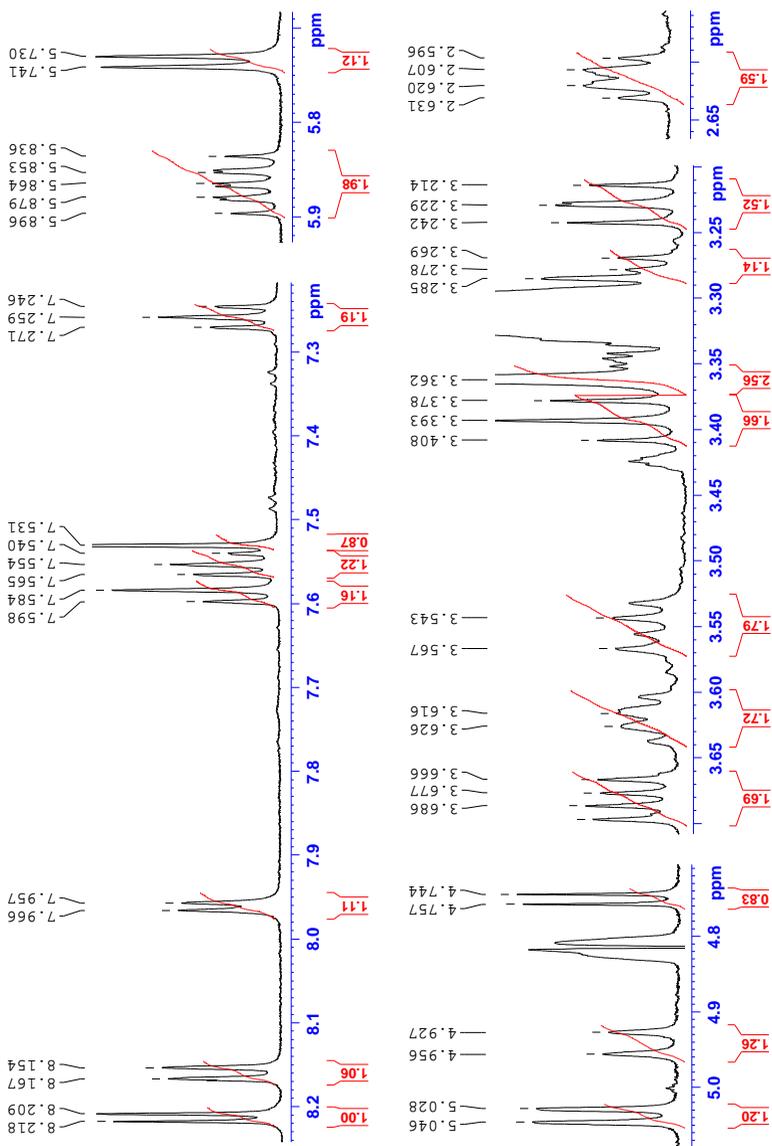
APÊNDICE 8. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY da estrictosamida (32), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



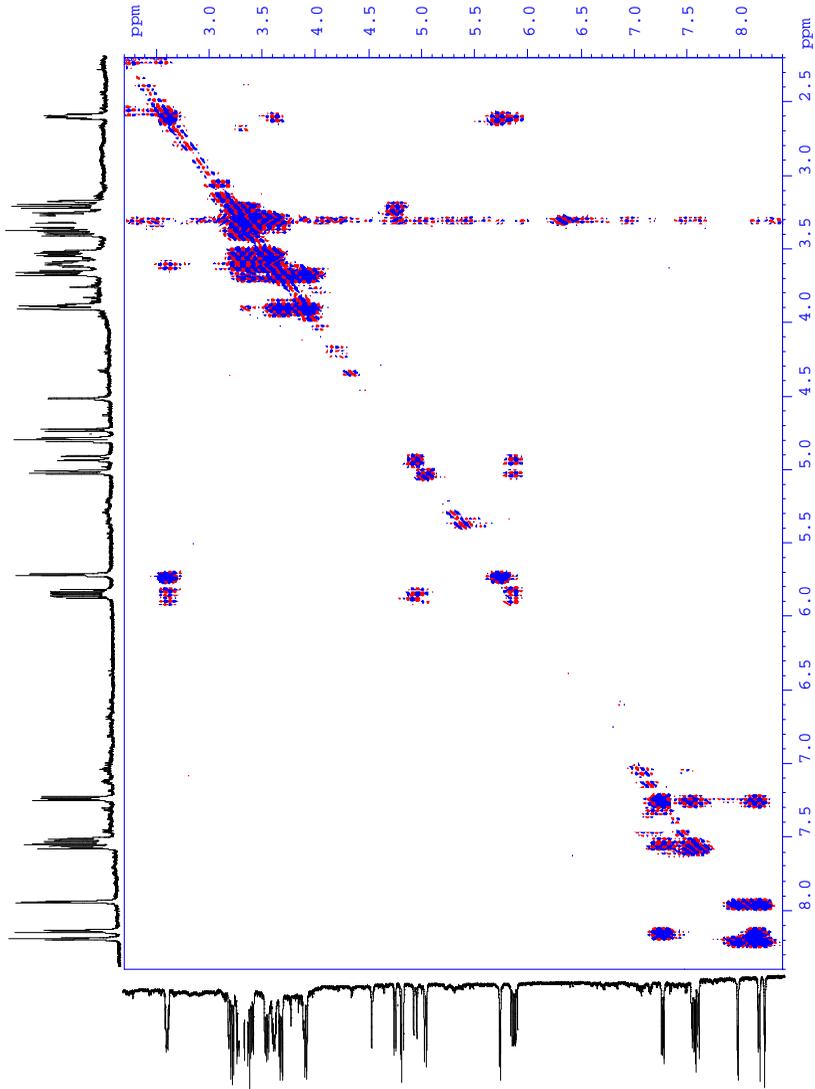
APÊNDICE 9. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



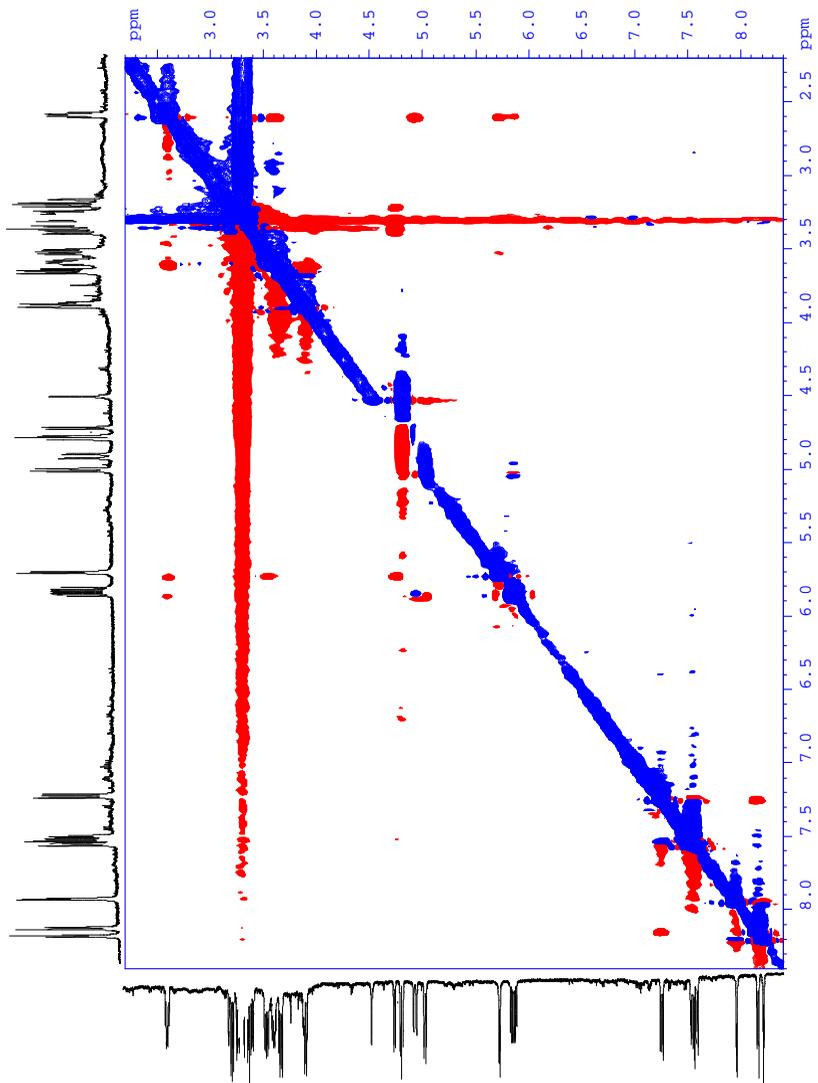
APÊNDICE 10. Espectro de NMR de ^1H do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



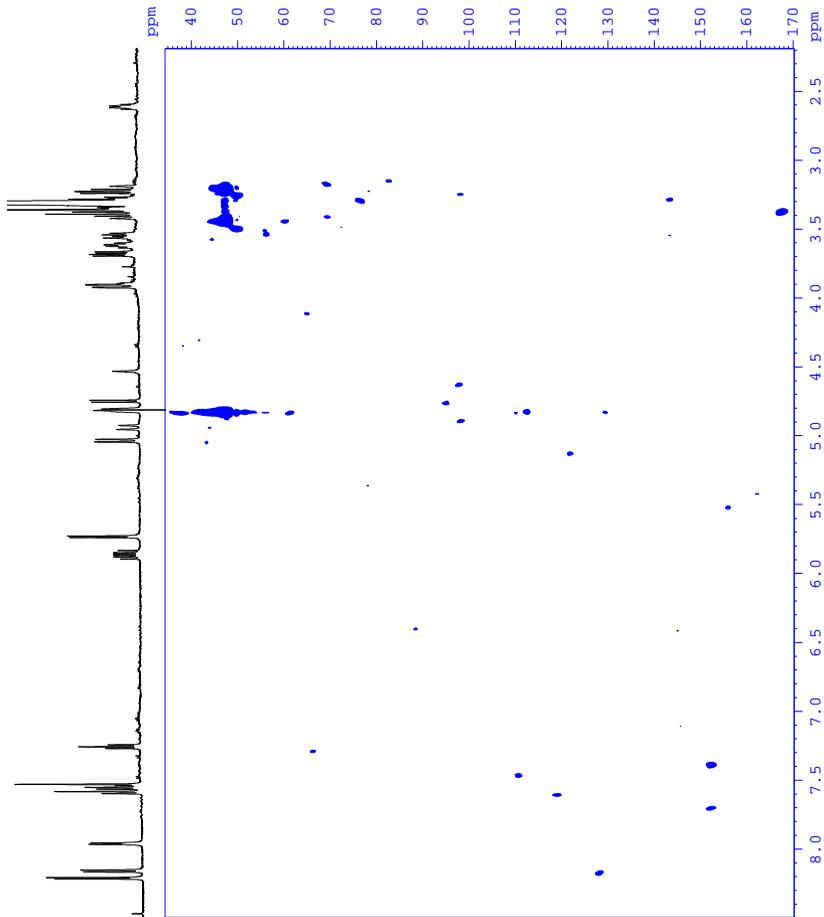
APÊNDICE 11. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



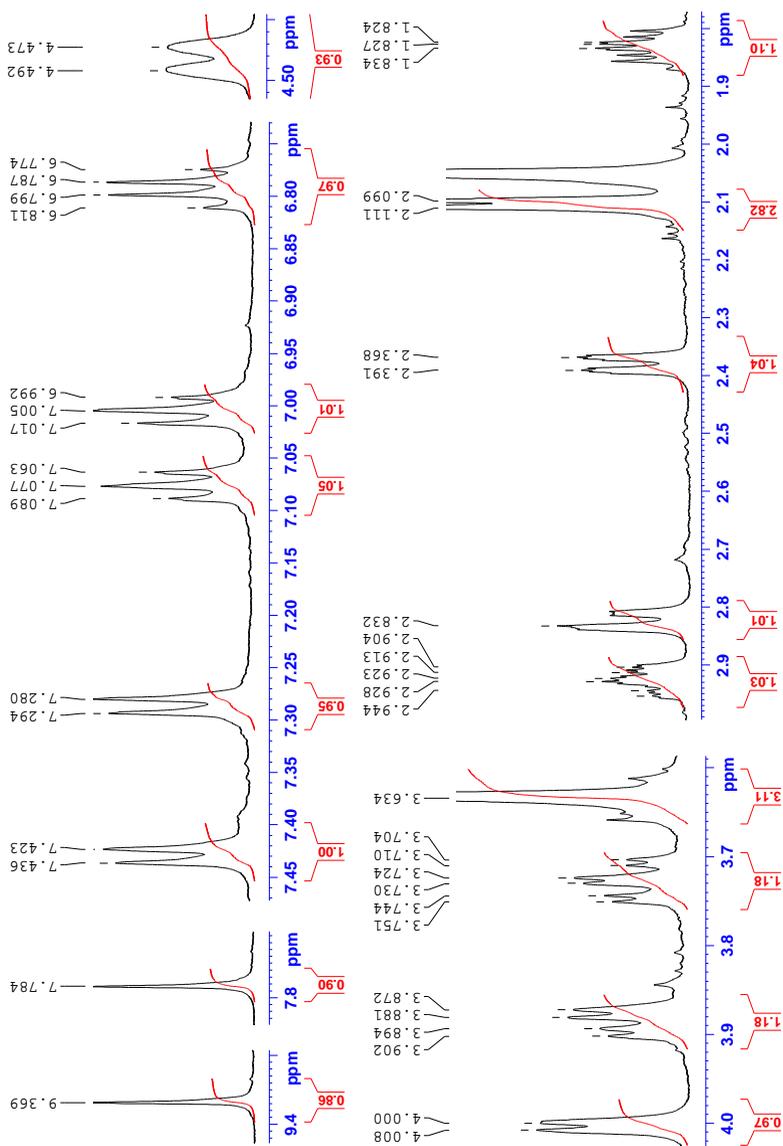
APÊNDICE 12. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



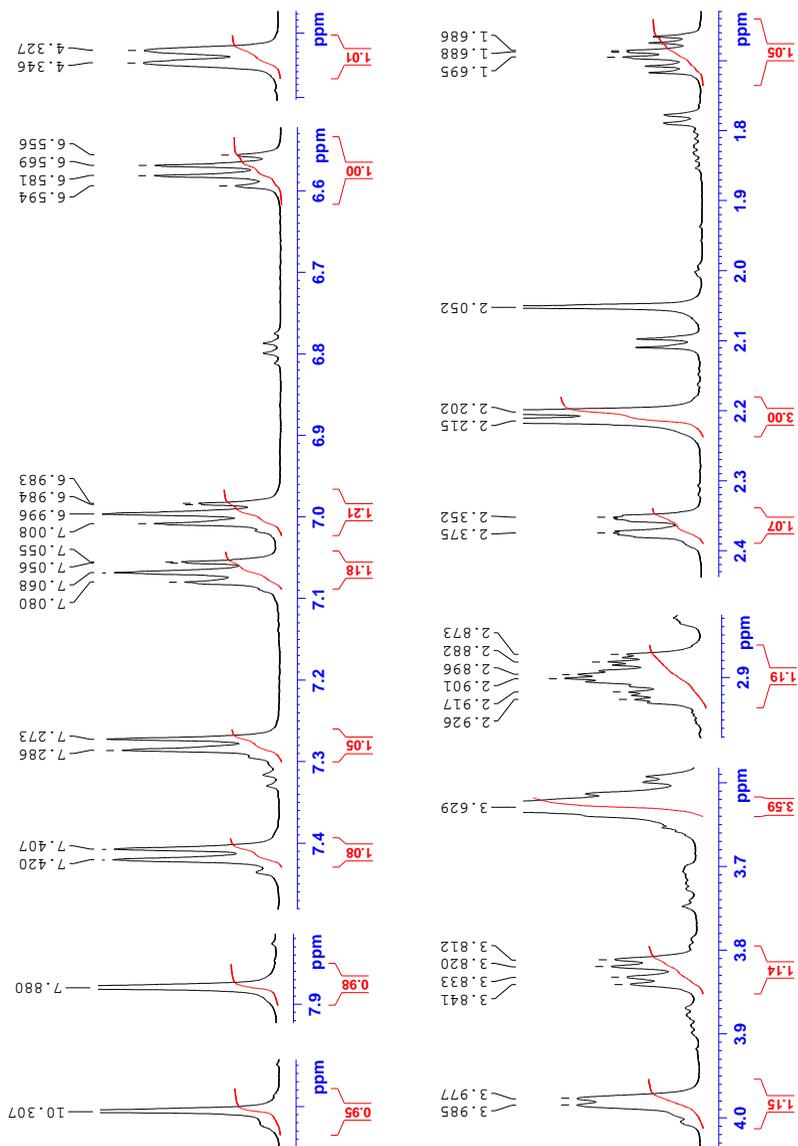
APÊNDICE 13. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do lialosídeo (54), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



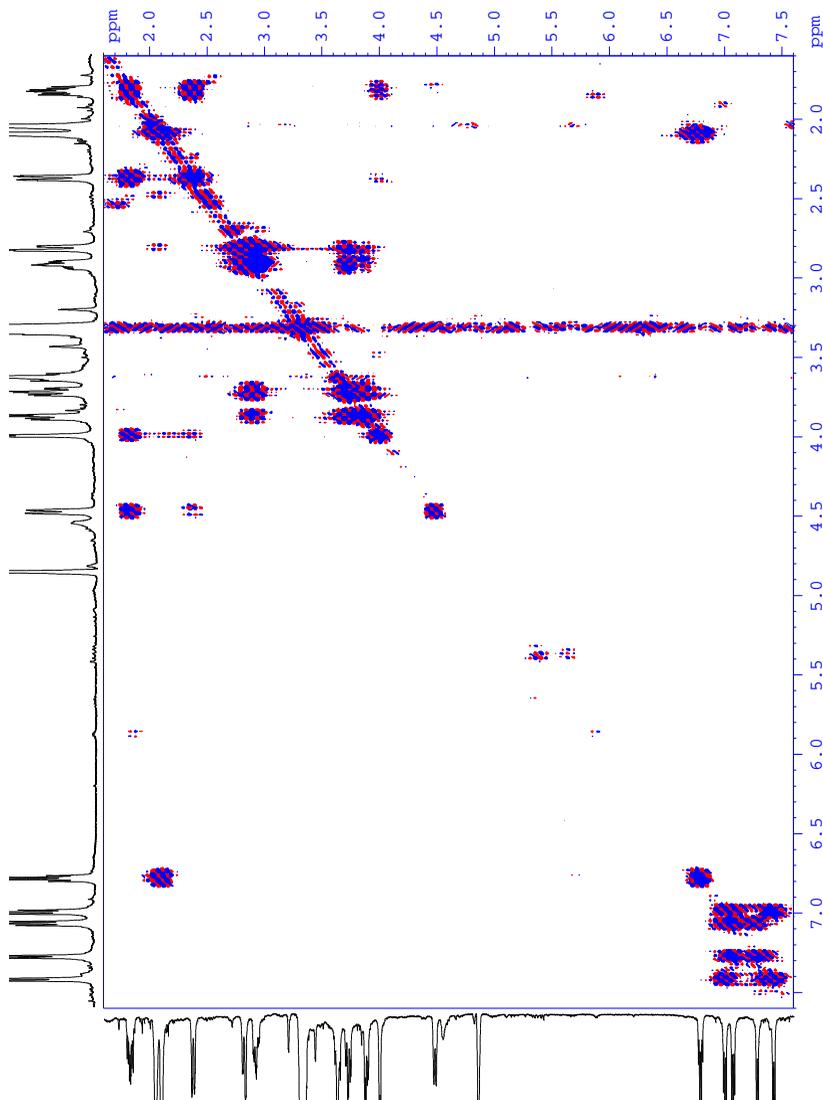
APÊNDICE 14. Espectros de NMR de ^1H da *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolados da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



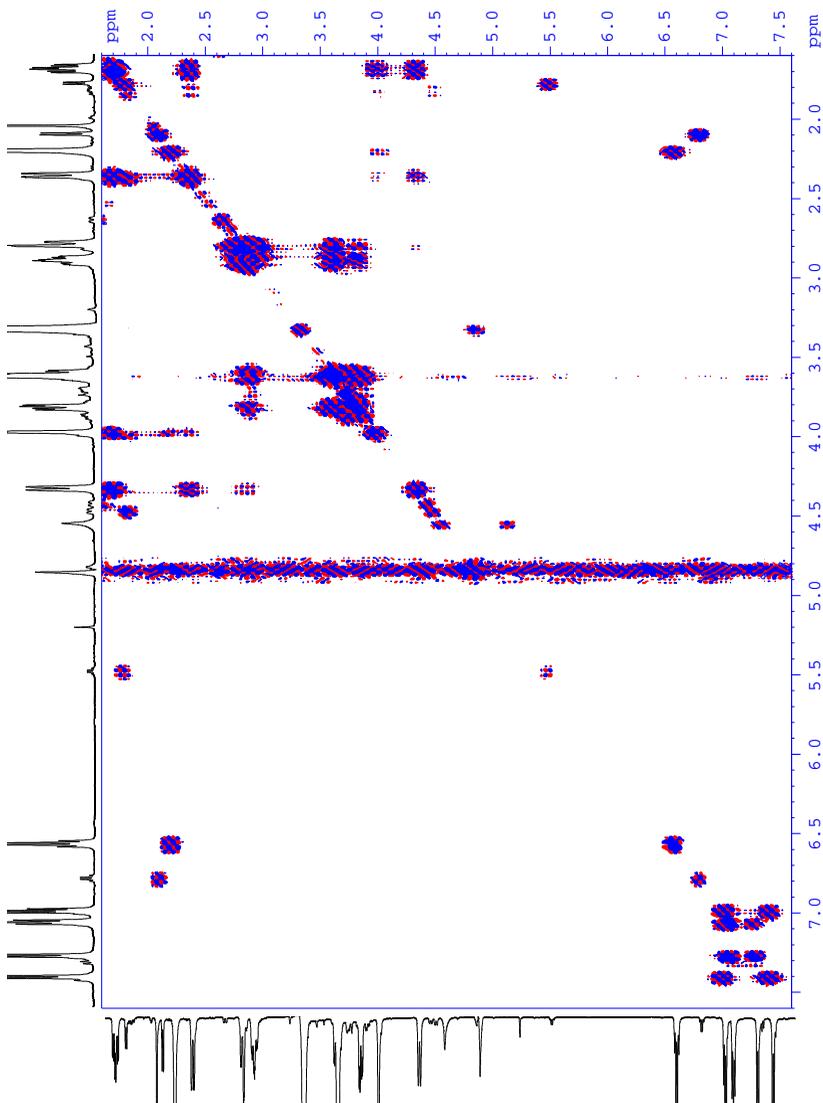
APÊNDICE 15. Espectros de NMR de ^1H da Z-vallesiachotamina (13), pico 7 isolados da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



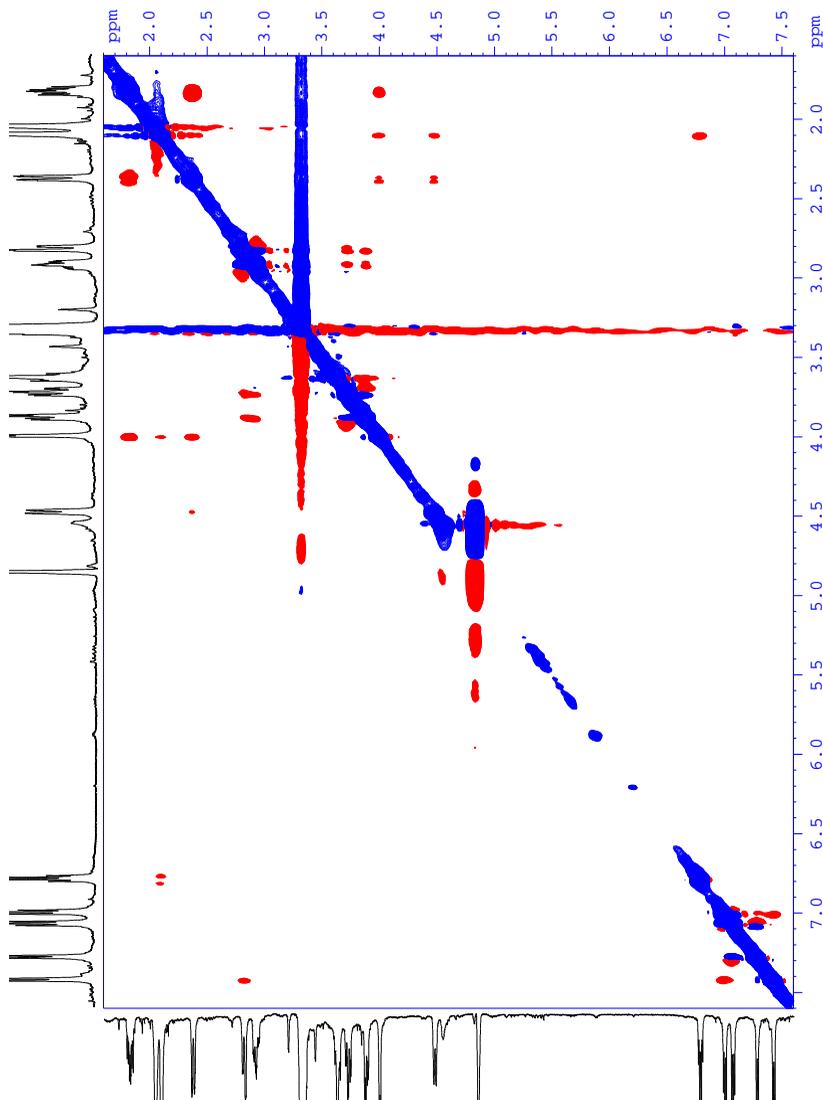
APÊNDICE 16. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



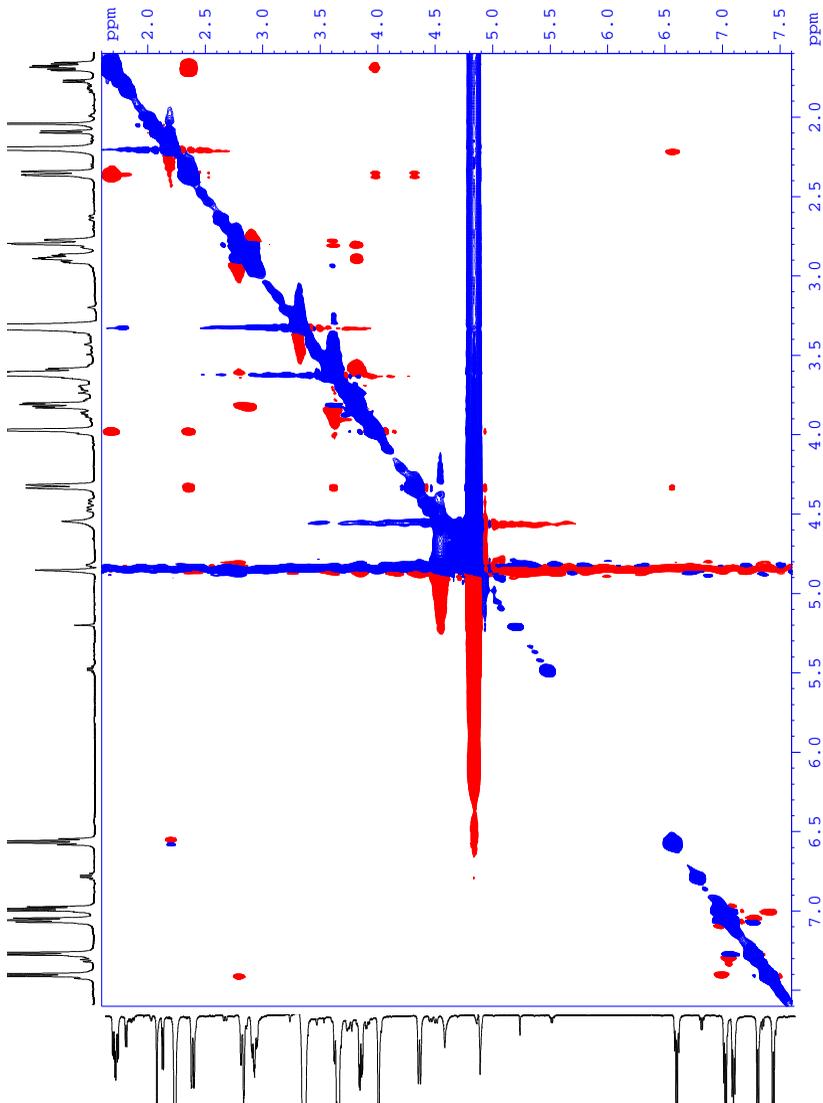
APÊNDICE 17. Espectros de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da Z-vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



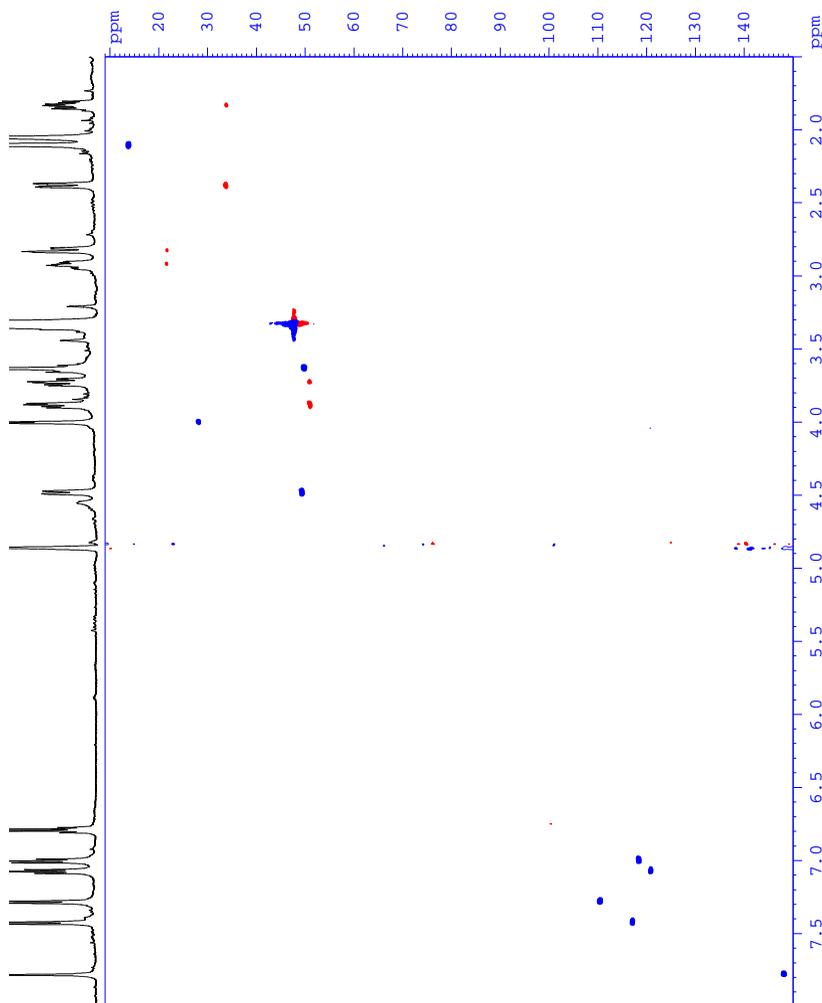
APÊNDICE 18. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY da *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



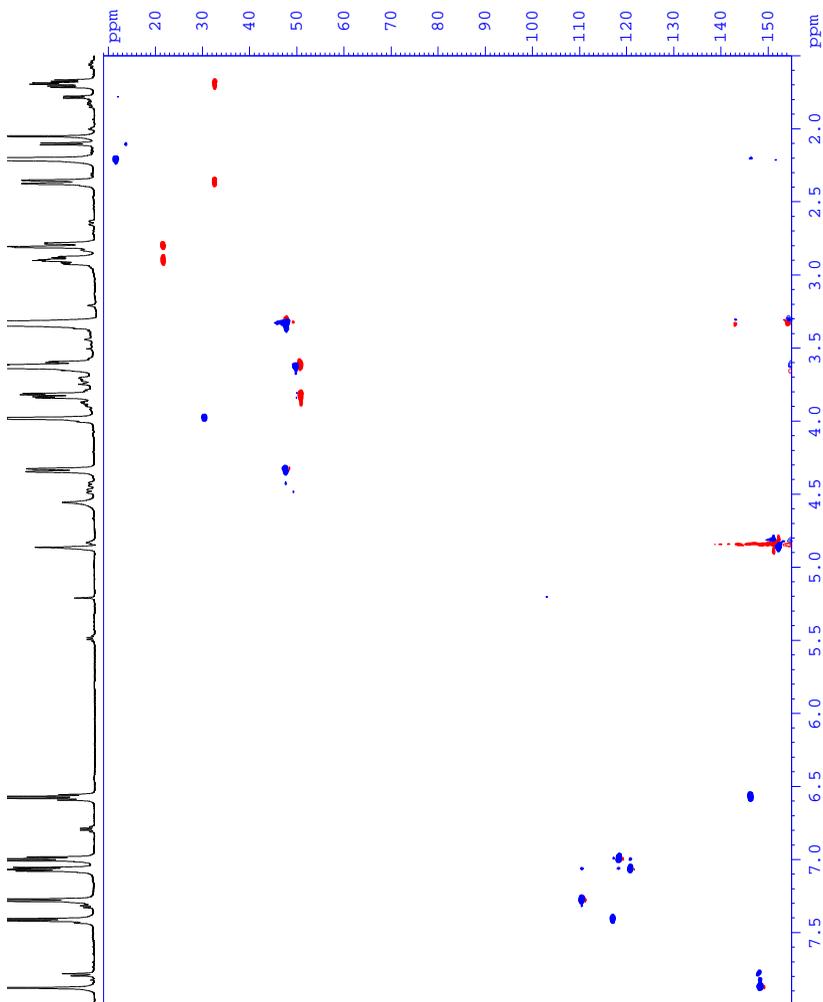
APÊNDICE 19. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY da Z-vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



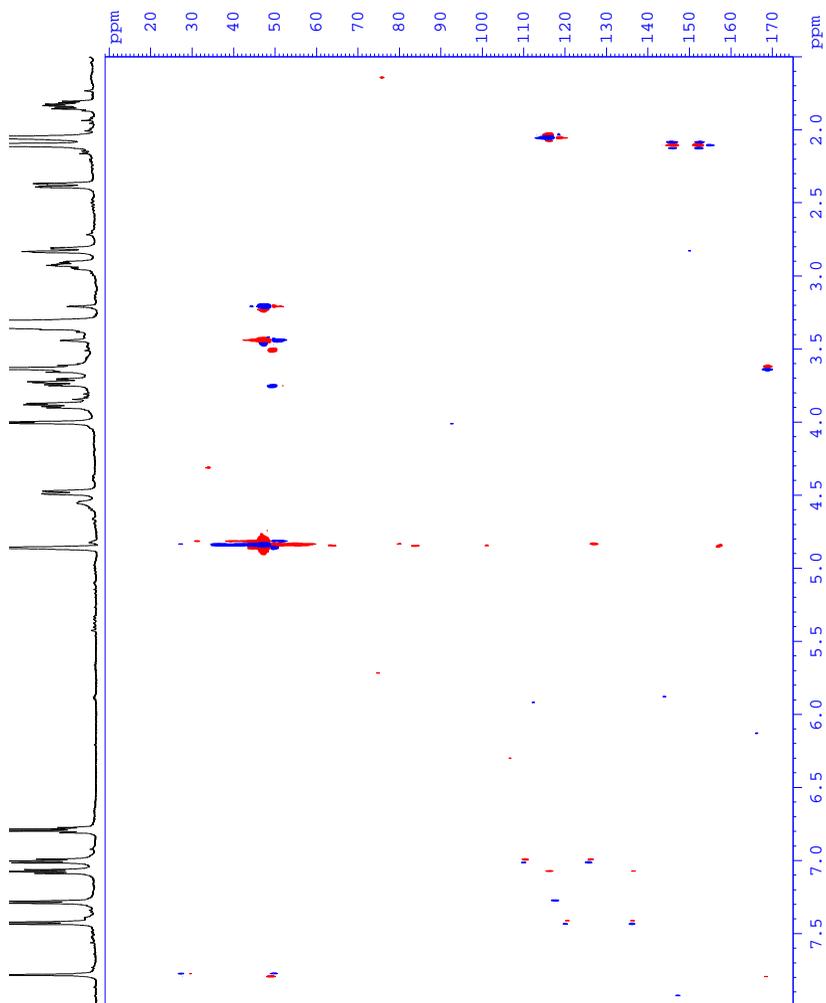
APÊNDICE 20. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



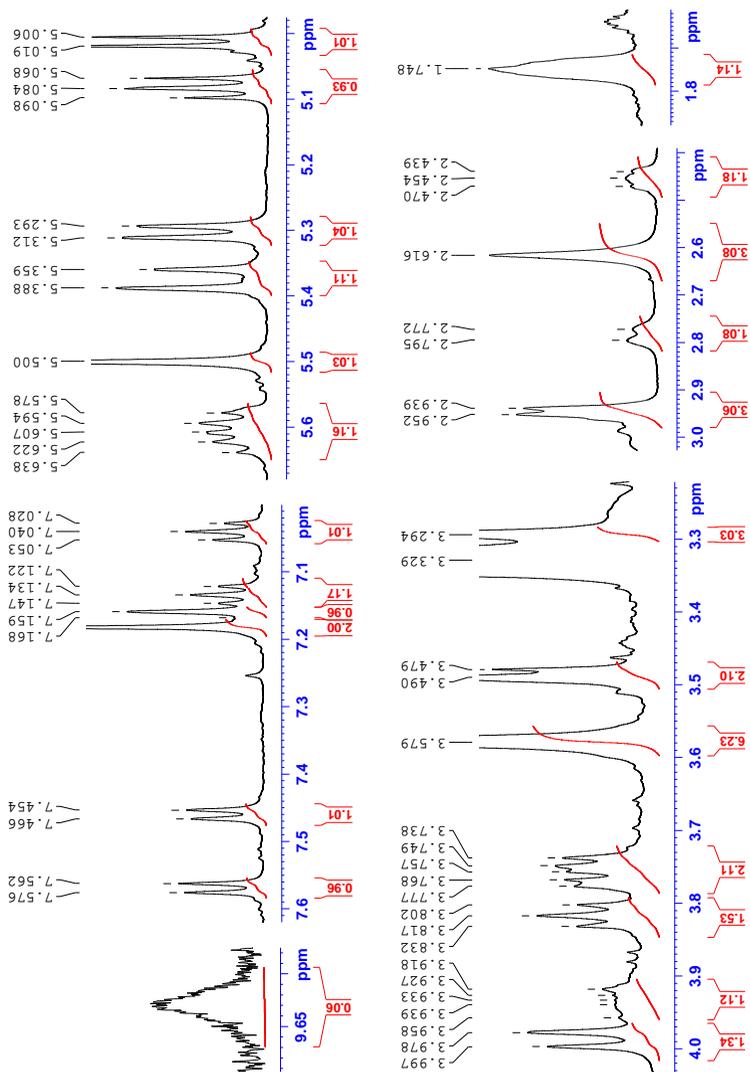
APÊNDICE 21. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da Z-vallesiachotamina (13), pico 7 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



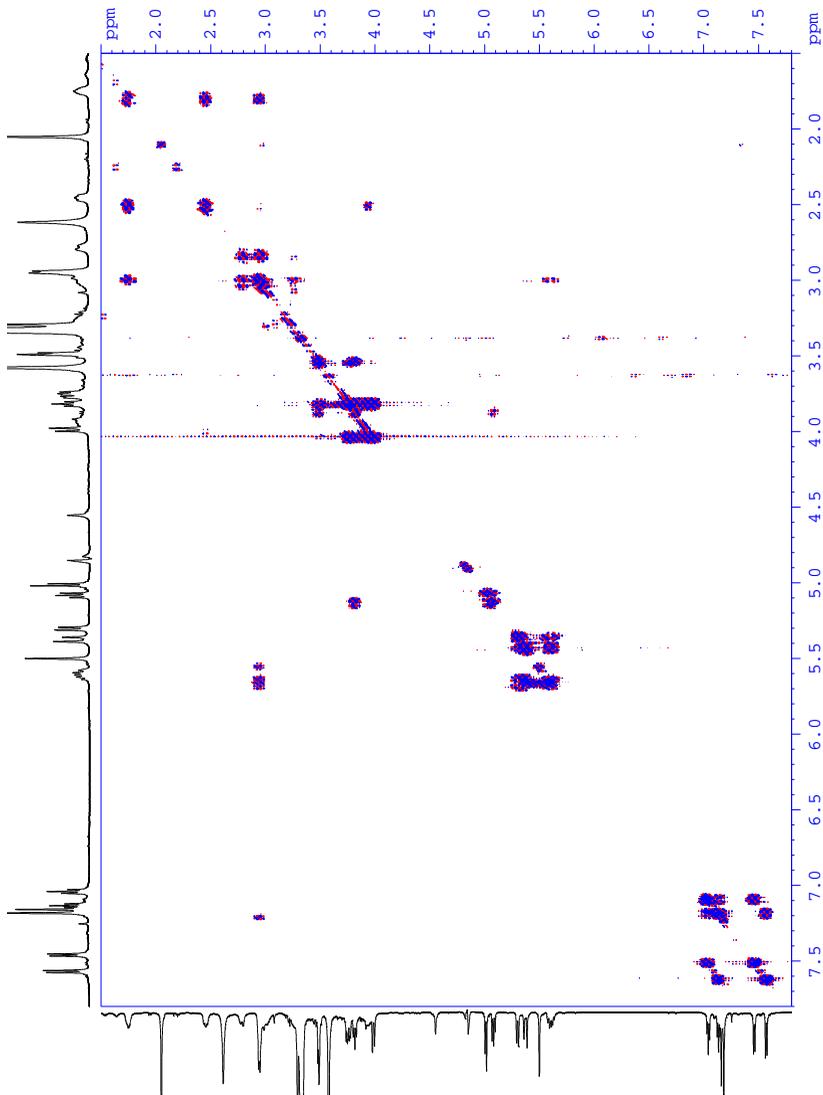
APÊNDICE 22. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC da *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



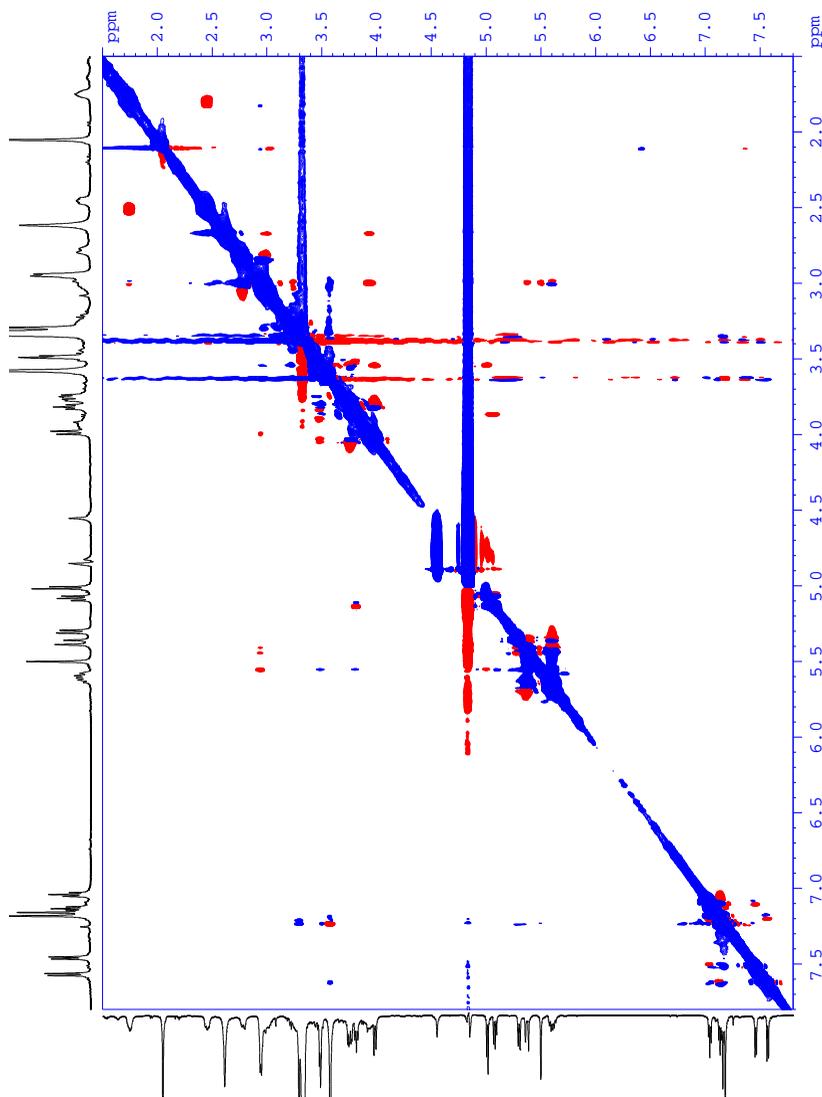
APÊNDICE 24. Espectro de NMR de ^1H do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



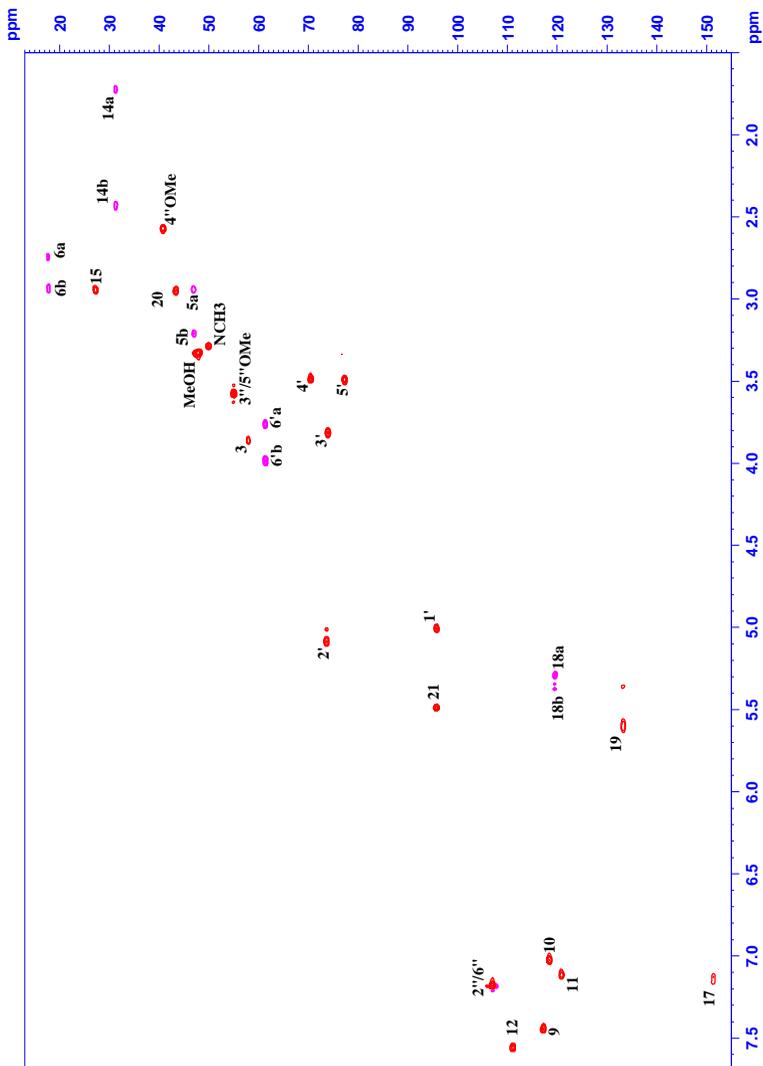
APÊNDICE 25. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-estrictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



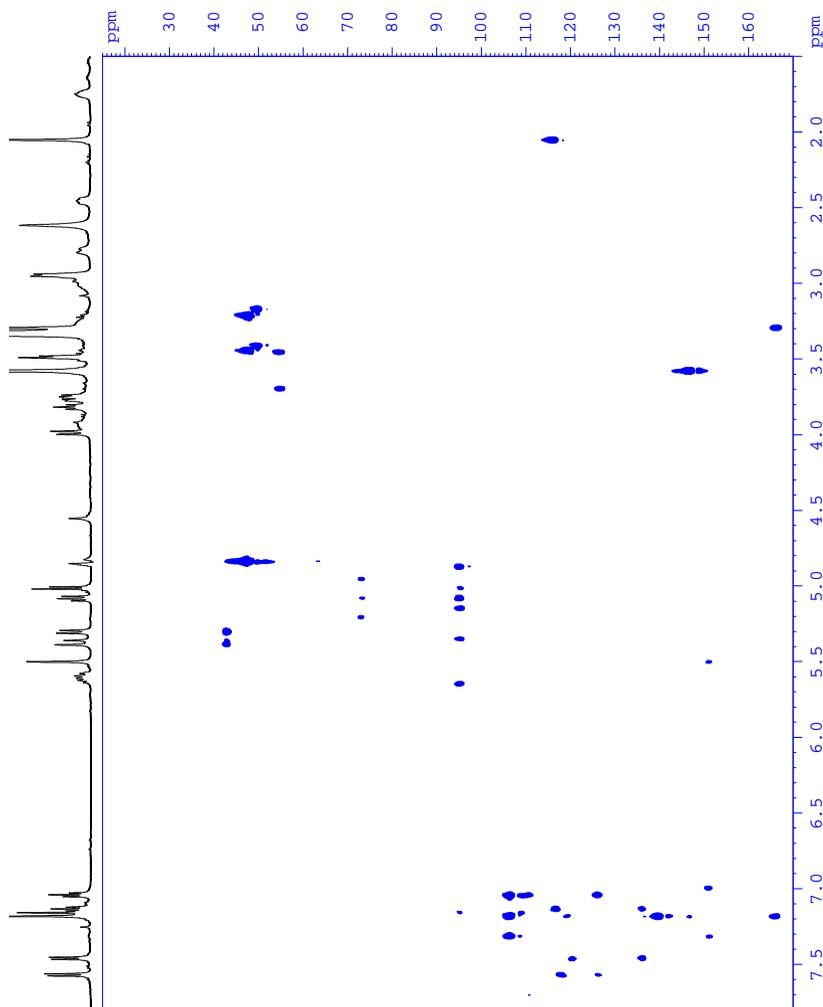
APÊNDICE 26. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoateo-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



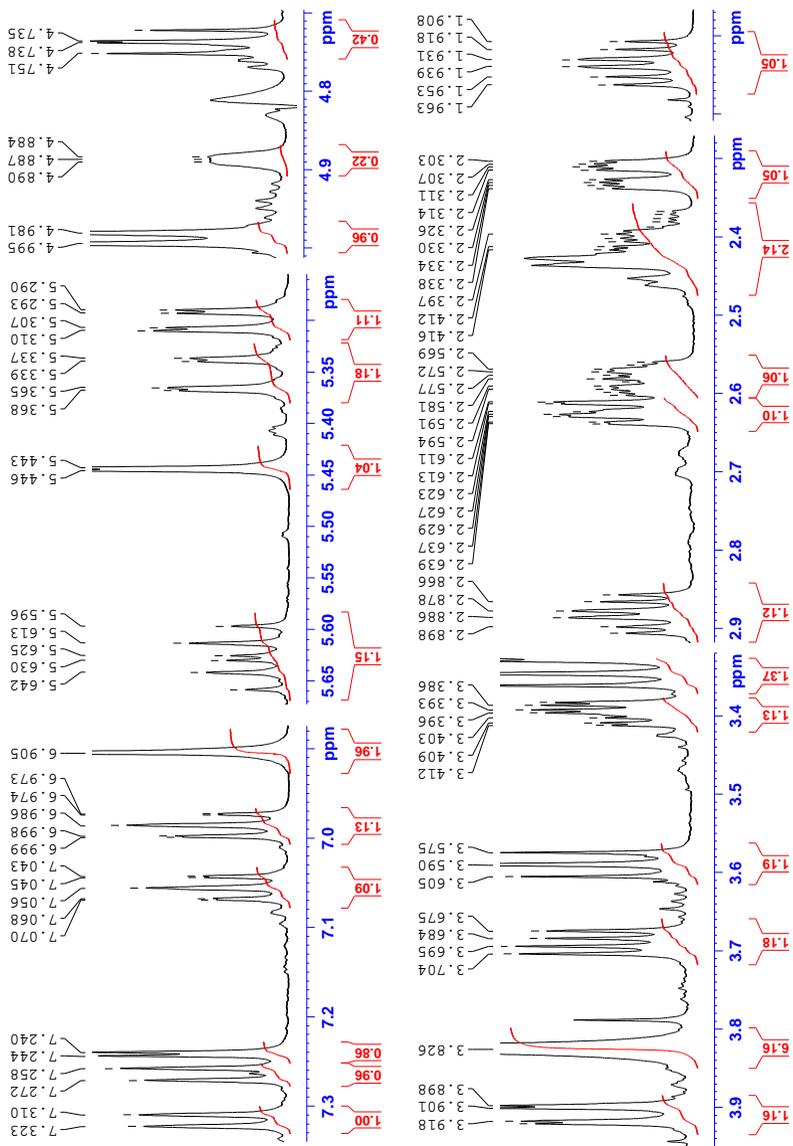
APÊNDICE 27. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoato-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



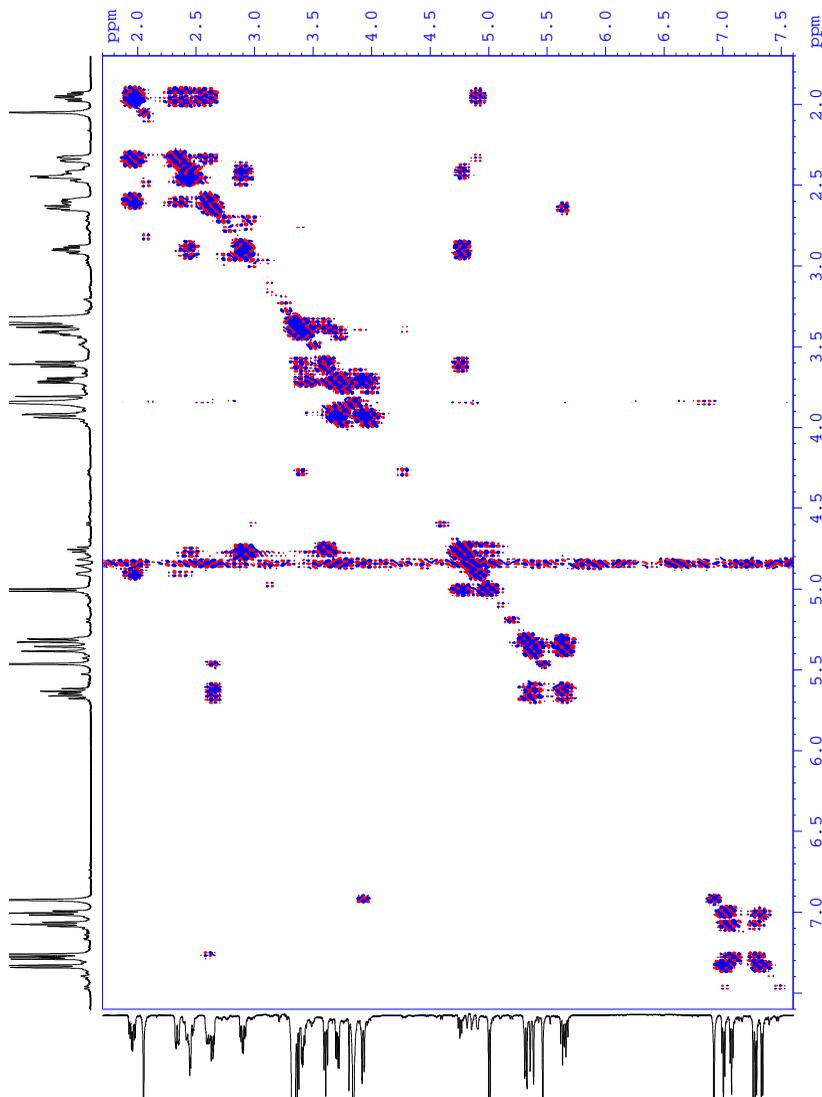
APÊNDICE 28. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do ácido 2'-(3,4,5-trimetoxibenzoateo-N4-metil-strictosidínico (143), pico 2 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



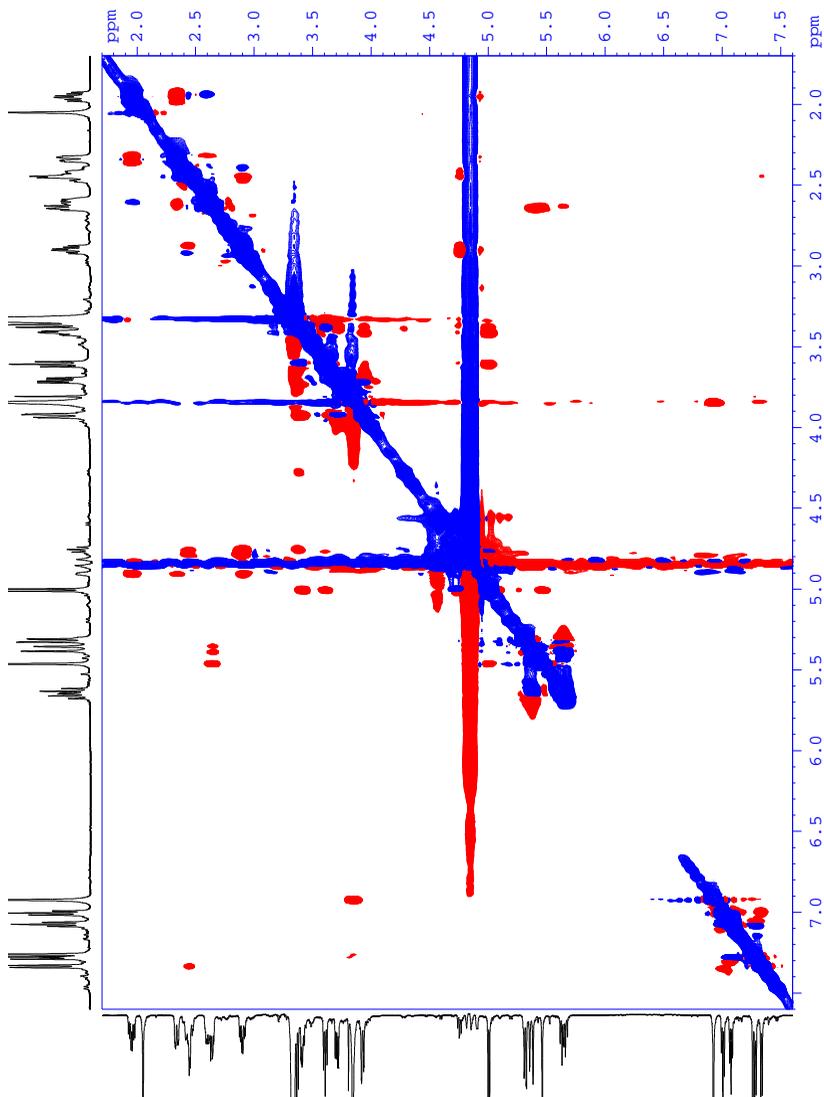
**APÊNDICE 29. Espectro de NMR de ^1H do 2'-siringil-
estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de
*Psychotria rhytidocarpa***



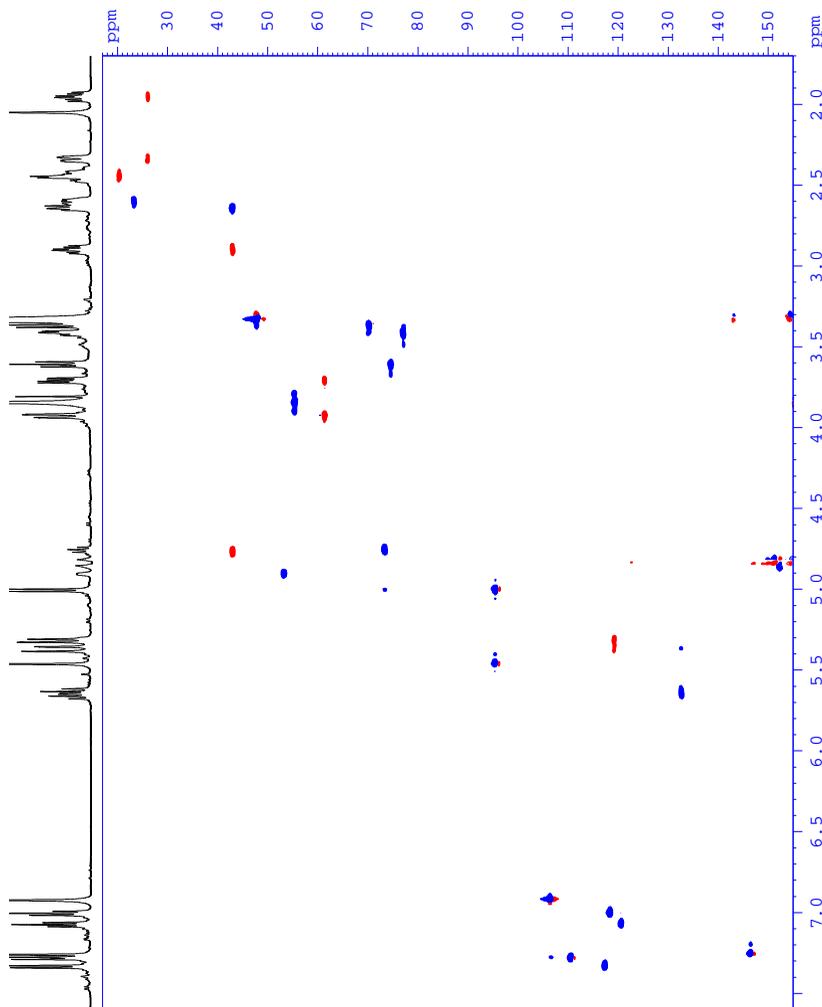
APÊNDICE 30. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



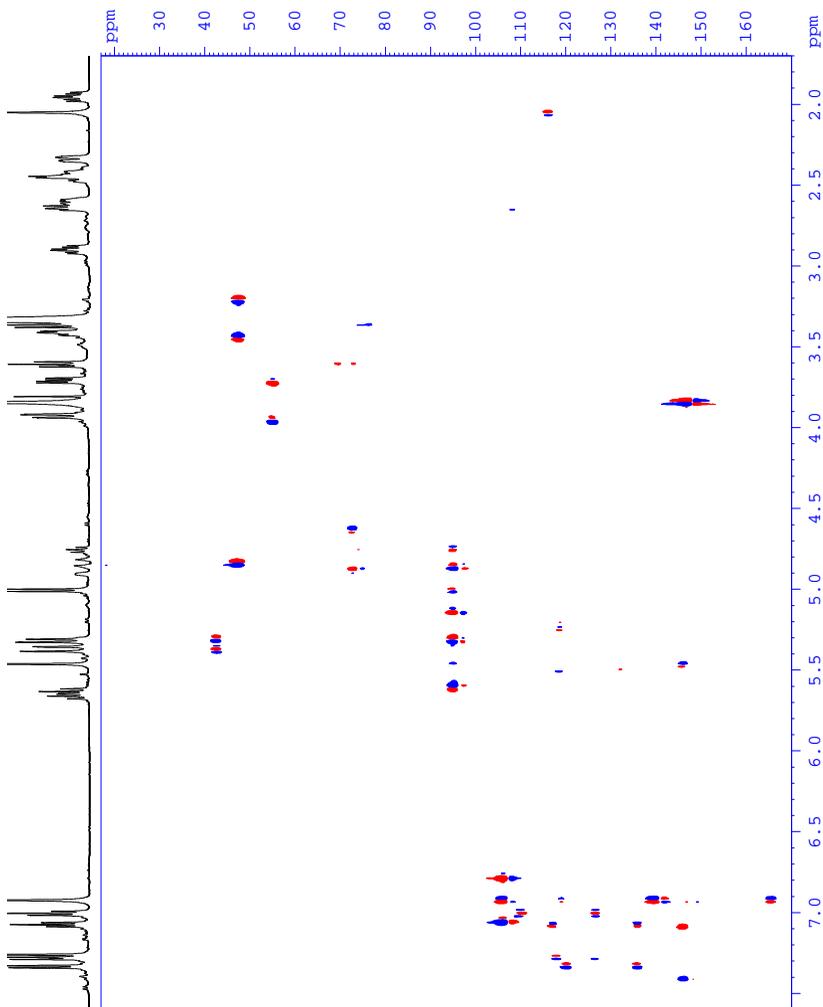
APÊNDICE 31. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do 2'-siringil-estricosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



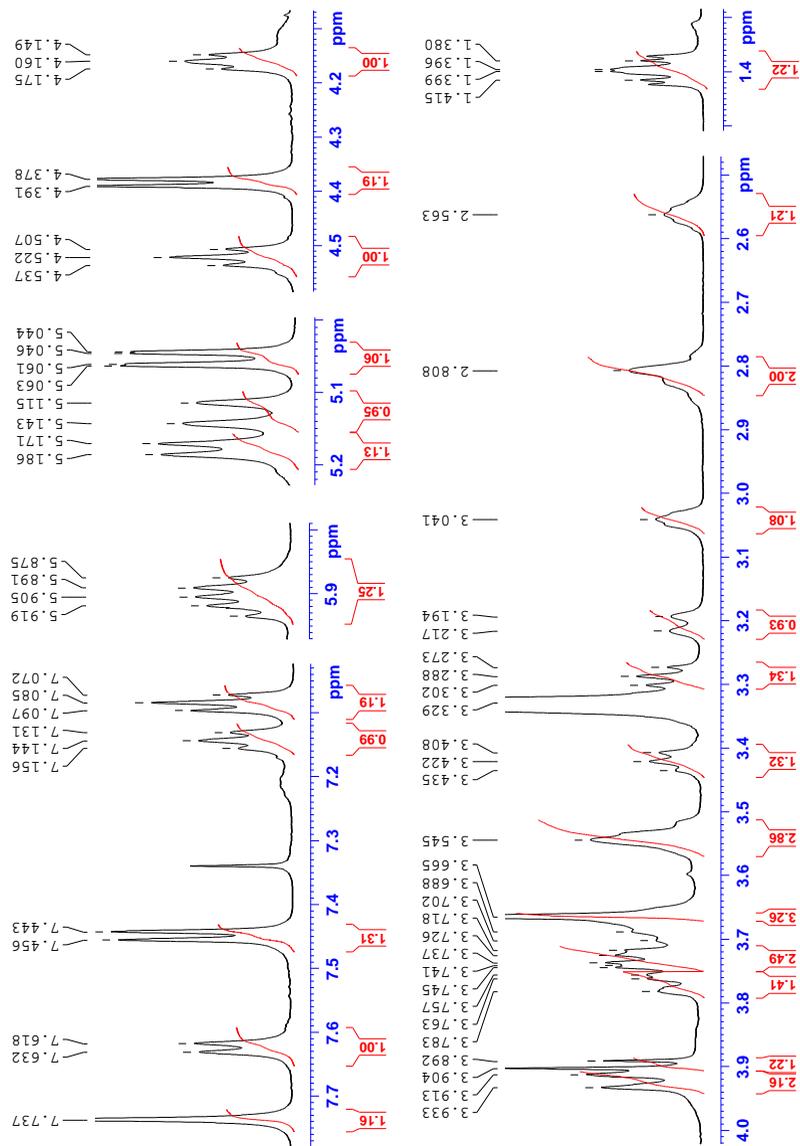
APÊNDICE 32. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



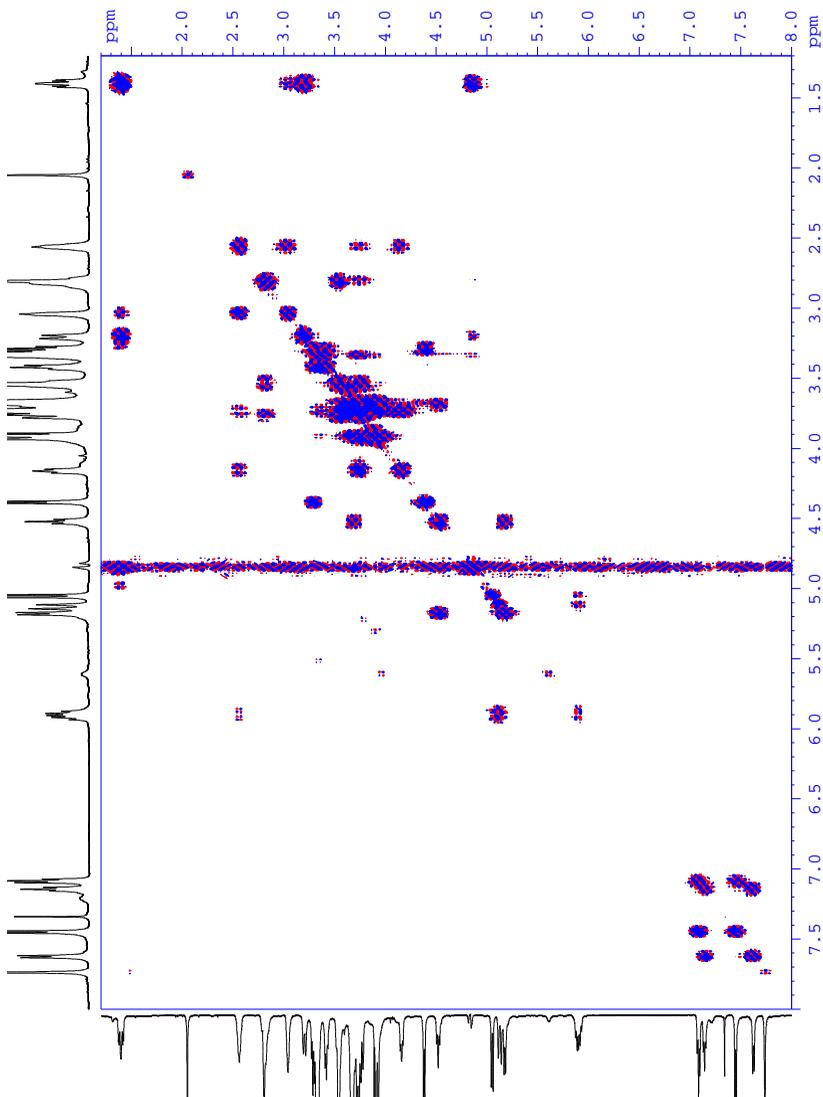
APÊNDICE 33. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do 2'-siringil-estrictosamida (144), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



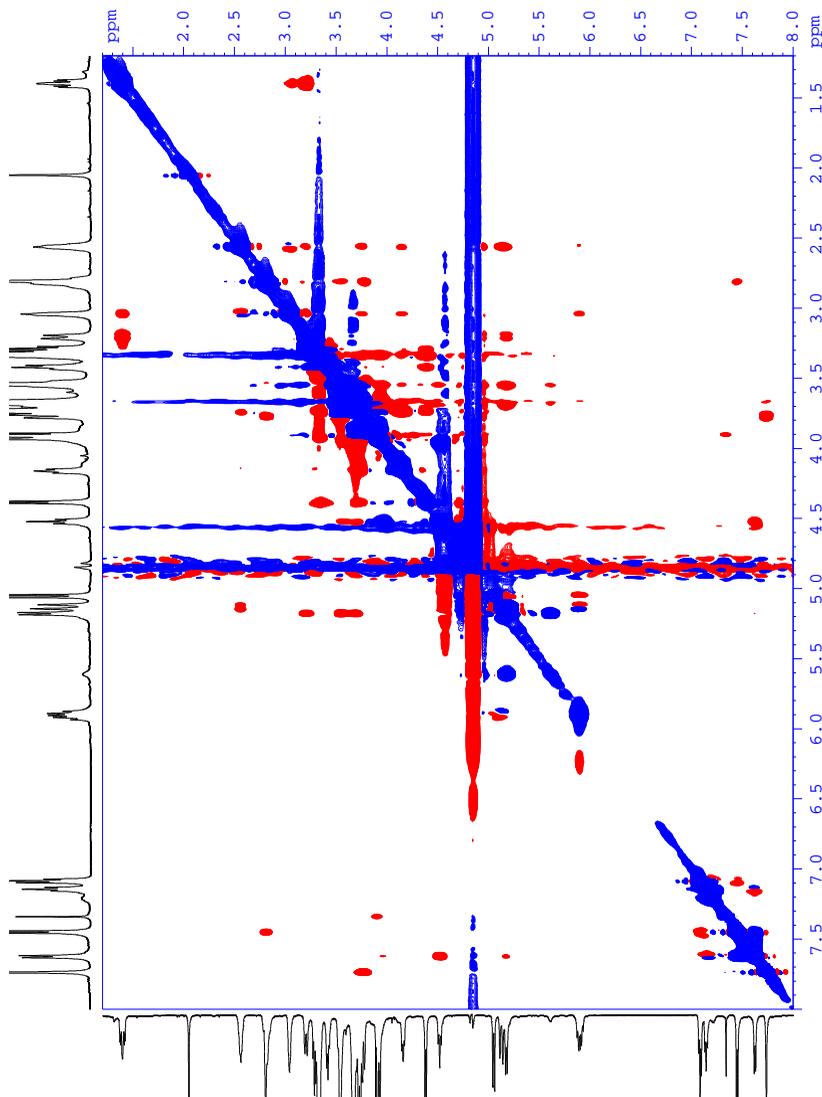
APÊNDICE 34. Espectro de NMR de ^1H do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



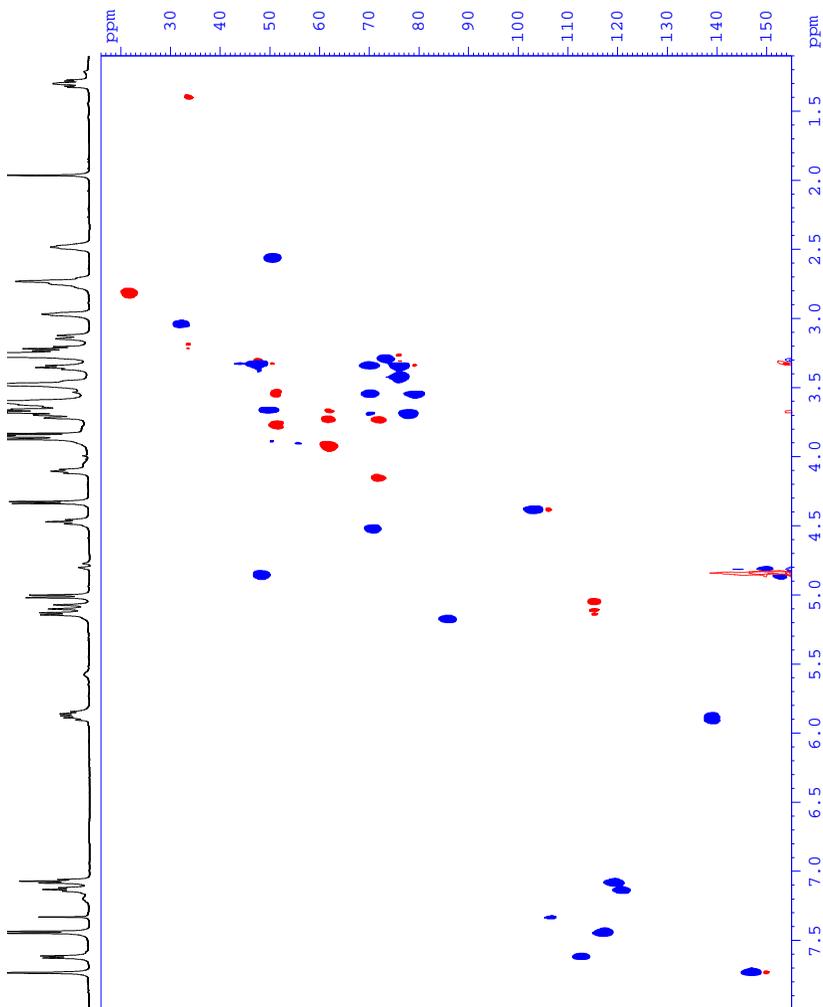
APÊNDICE 35. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do derivado de strictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



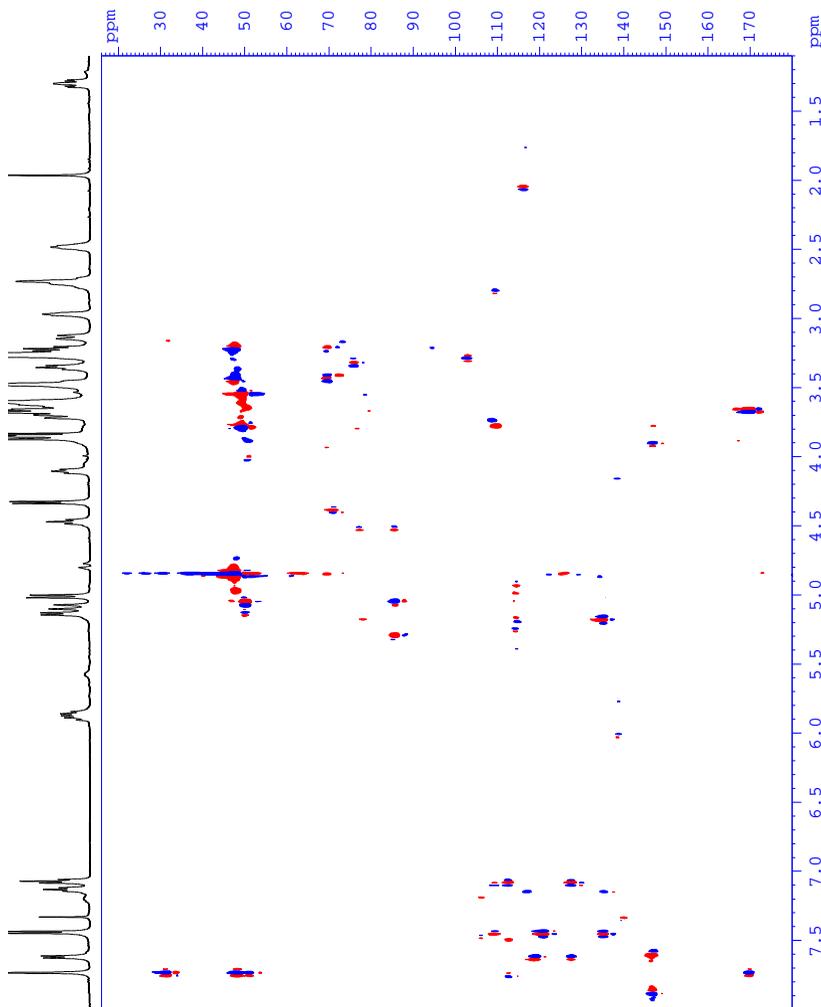
APÊNDICE 36. Espectro de NMR de correlação bidimensional H-H NOESY do derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



APÊNDICE 37. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do derivado de strictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



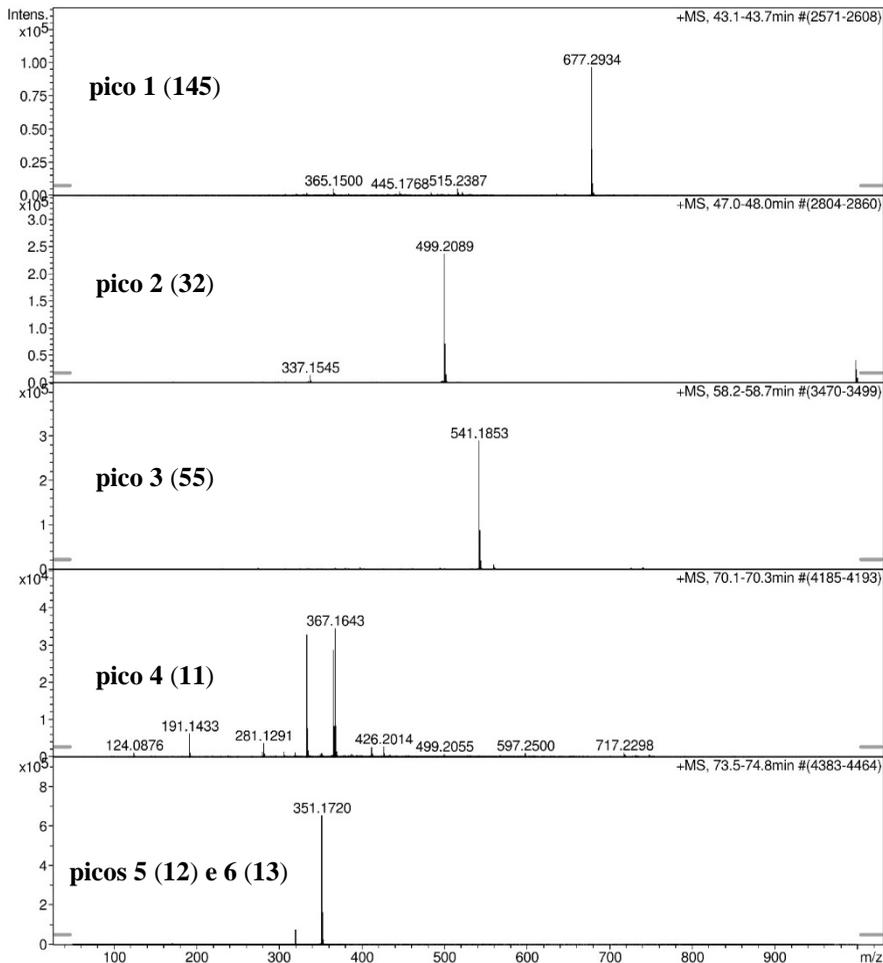
APÊNDICE 38. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do derivado de strictosidina (145), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria rhytidocarpa*



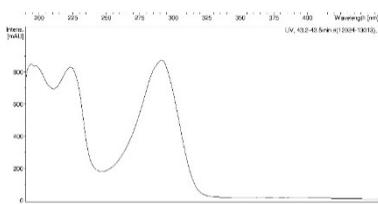
APÊNDICE 39. Espectros de massas de alta resolução obtidos em equipamento ESI-HRMS e extraídos do cromatograma de íons totais da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*

Acquisition Parameter

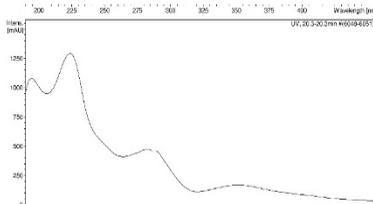
| | | | | | |
|-------------|------------|-----------------------|-----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 2.0 Bar |
| Focus | Not active | Set Capillary | 4100 V | Set Dry Heater | 200 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Dry Gas | 7.0 l/min |
| Scan End | 1000 m/z | Set Collision Cell RF | 110.0 Vpp | Set Divert Valve | Waste |



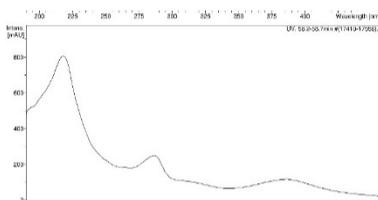
APÊNDICE 40. Espectros de ultravioleta obtidos em equipamento HPLC-DAD Agilent e extraídos do cromatograma da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



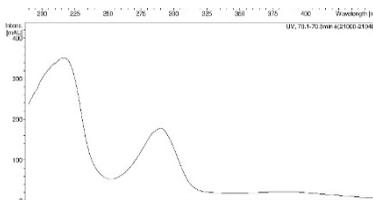
pico 1 (145)



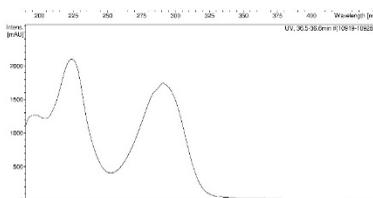
pico 2 (32)



pico 3 (55)

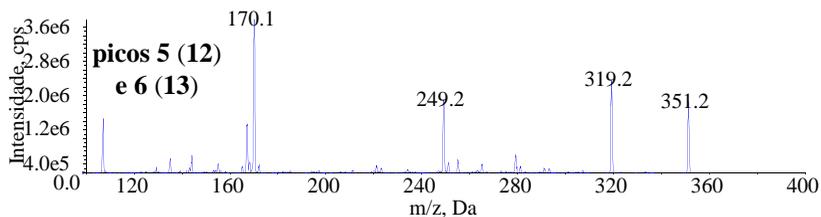
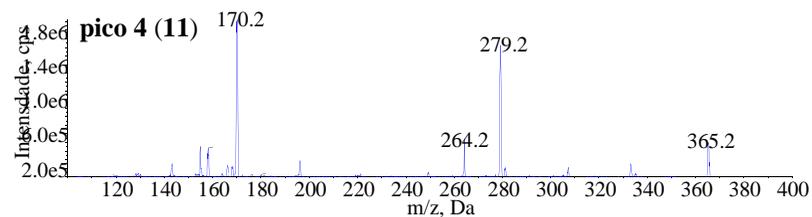
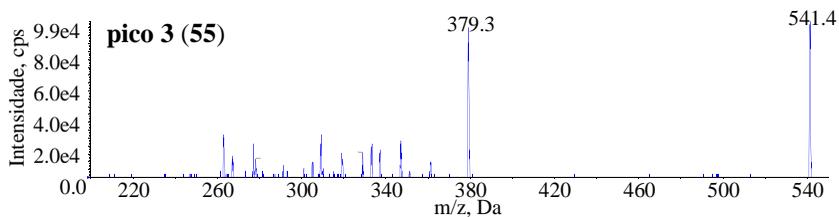
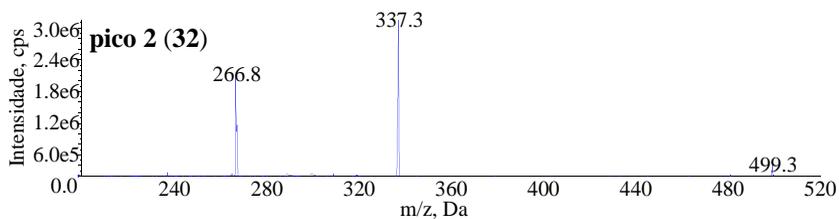
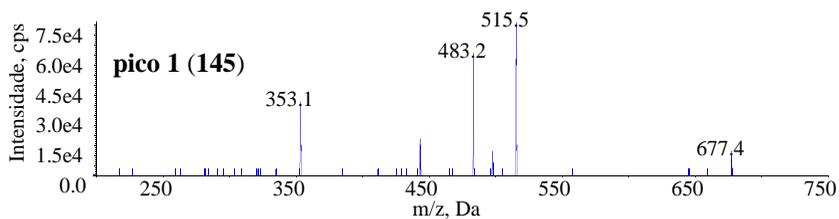


pico 4 (11)

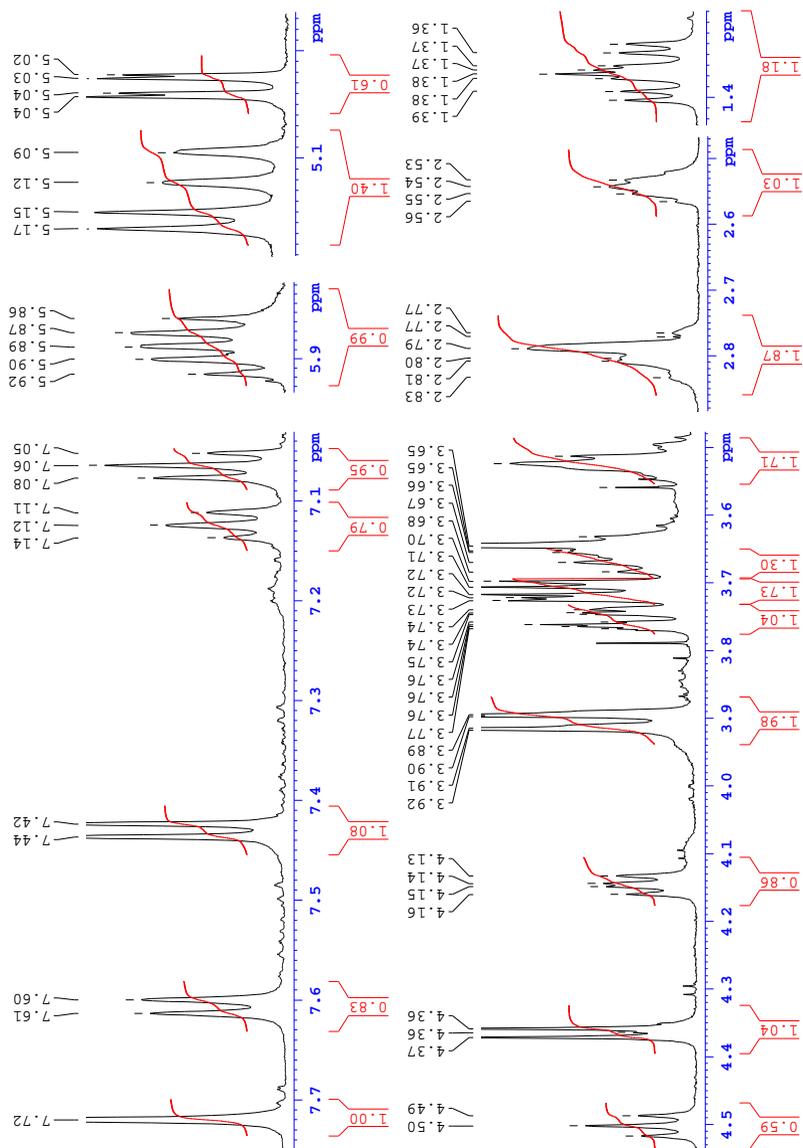


picos 5 (12) e 6 (13)

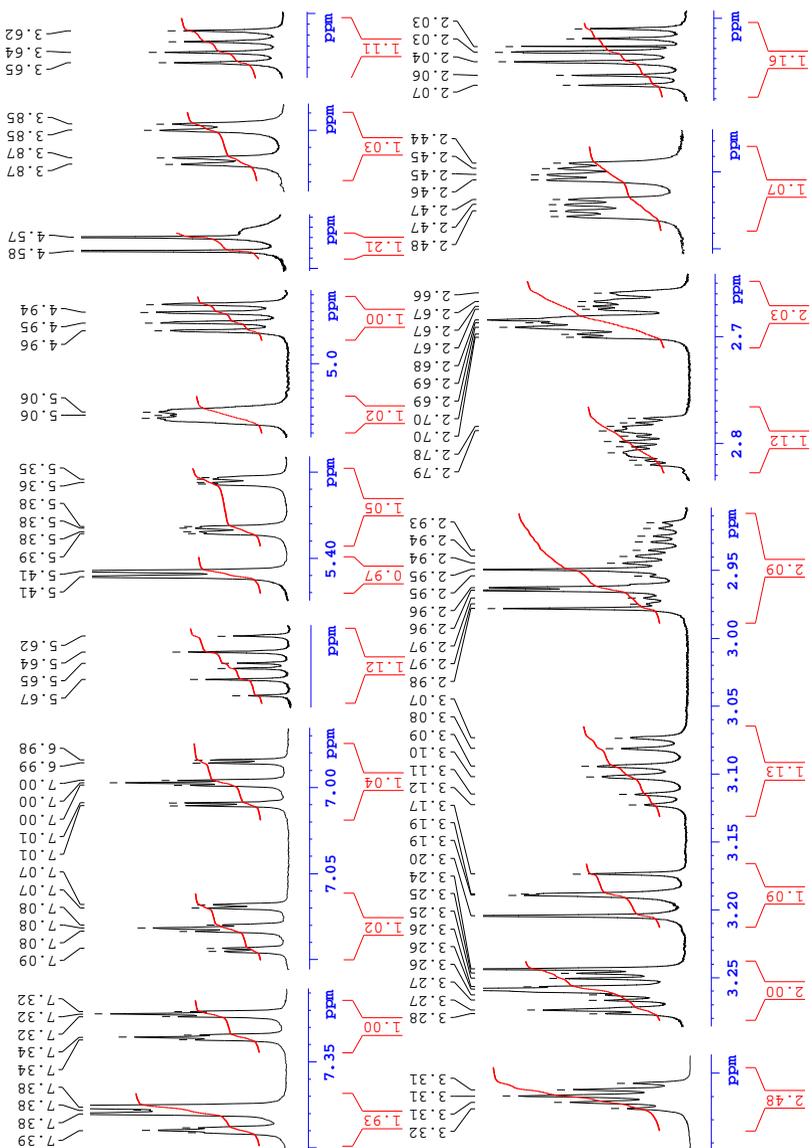
APÊNDICE 41. Espectros de massas obtidos em equipamento LC-MS/MS da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



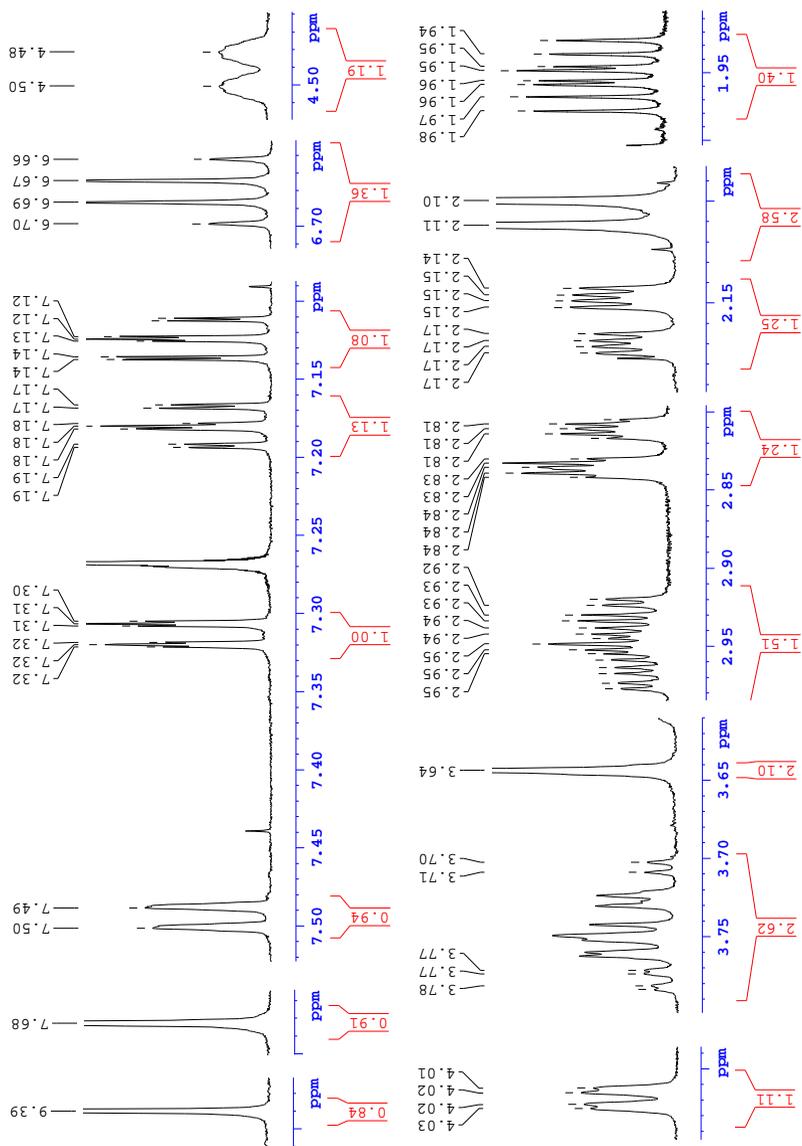
APÊNDICE 42. Espectro Espectro de NMR de ^1H do derivado de strictosidina (145), pico 1 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



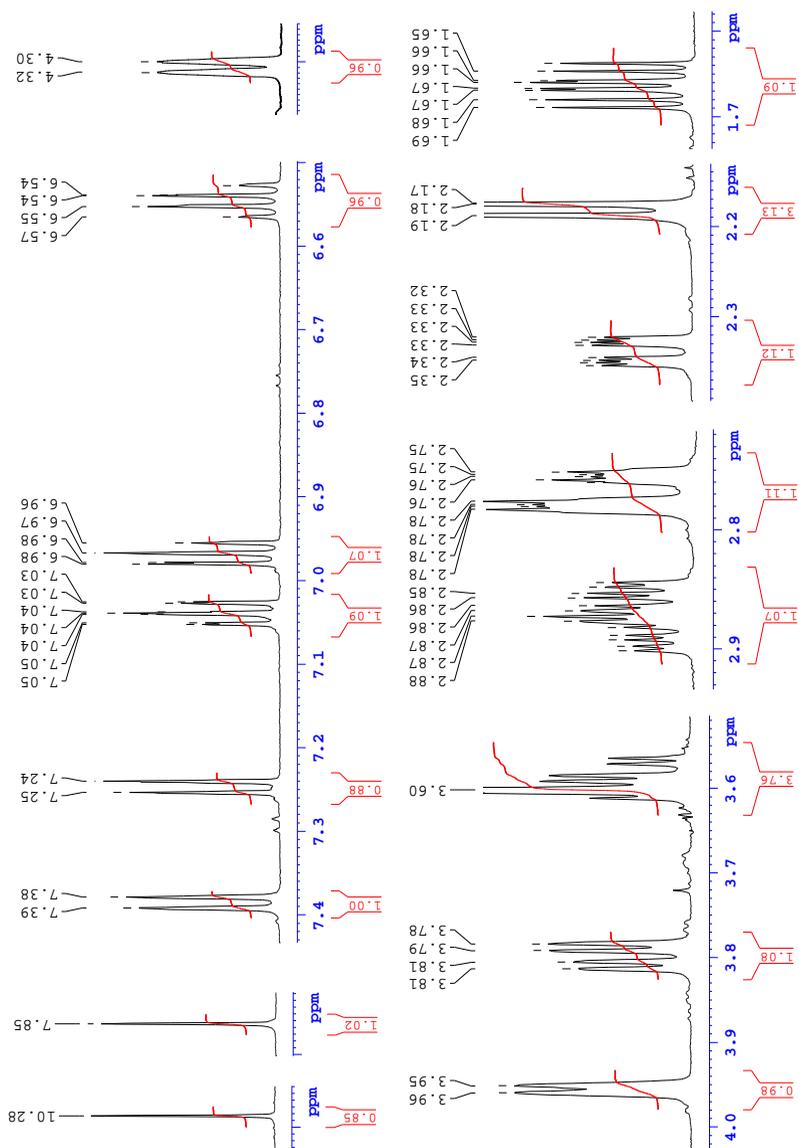
**APÊNDICE 43. Espectro de NMR de ^1H da estrictosamida (32),
pico 2 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella***



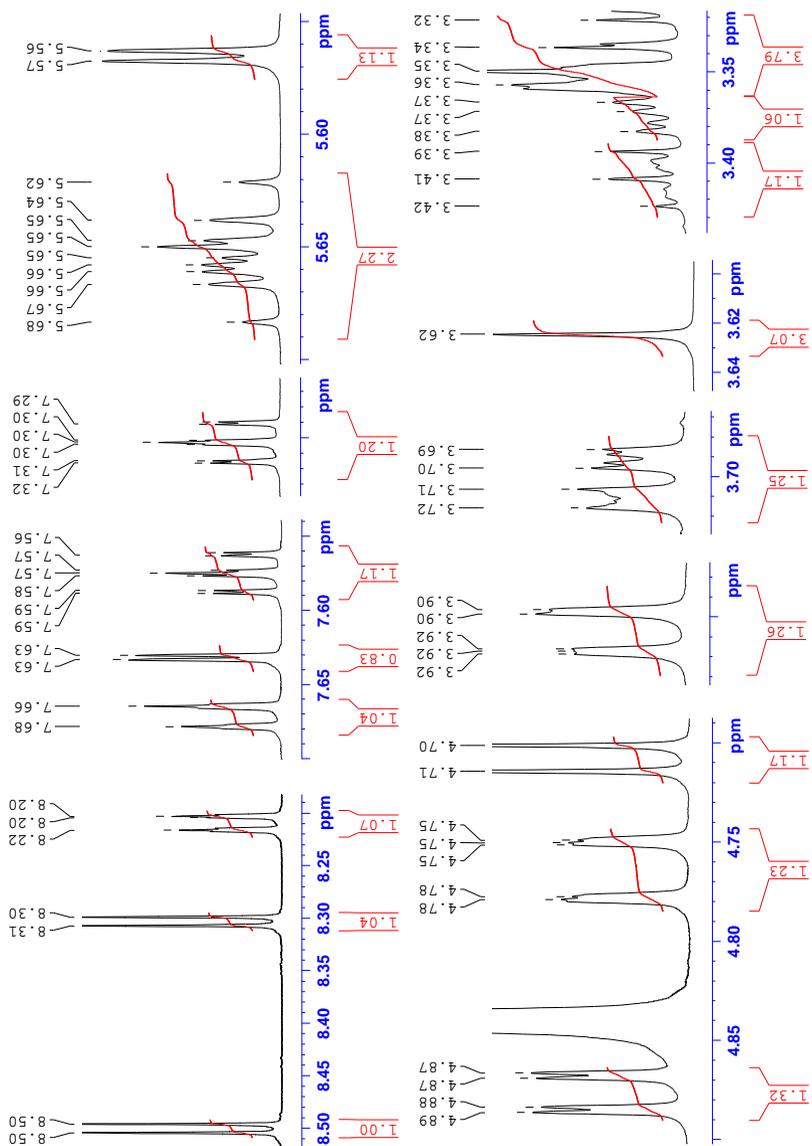
APÊNDICE 44. Espectro de NMR de ^1H da *E*-vallesiachotamina (12), pico 5 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



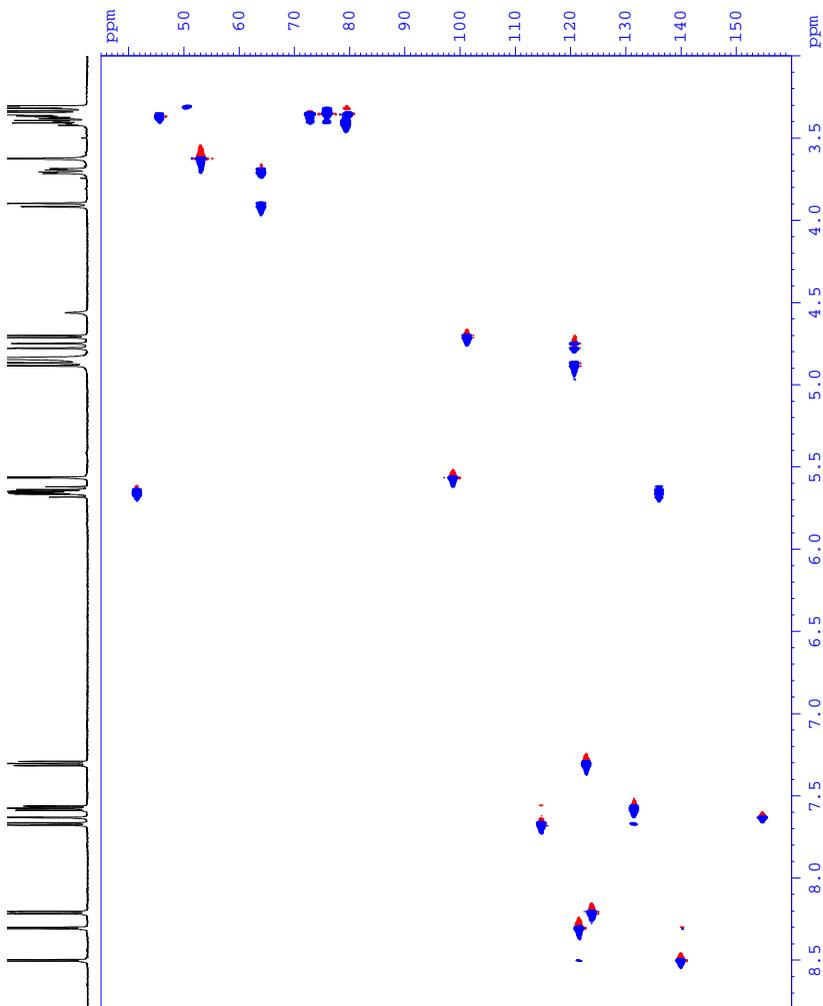
APÊNDICE 45. Espectro de NMR de ^1H da Z-vallesiachotamina (13), pico 6 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



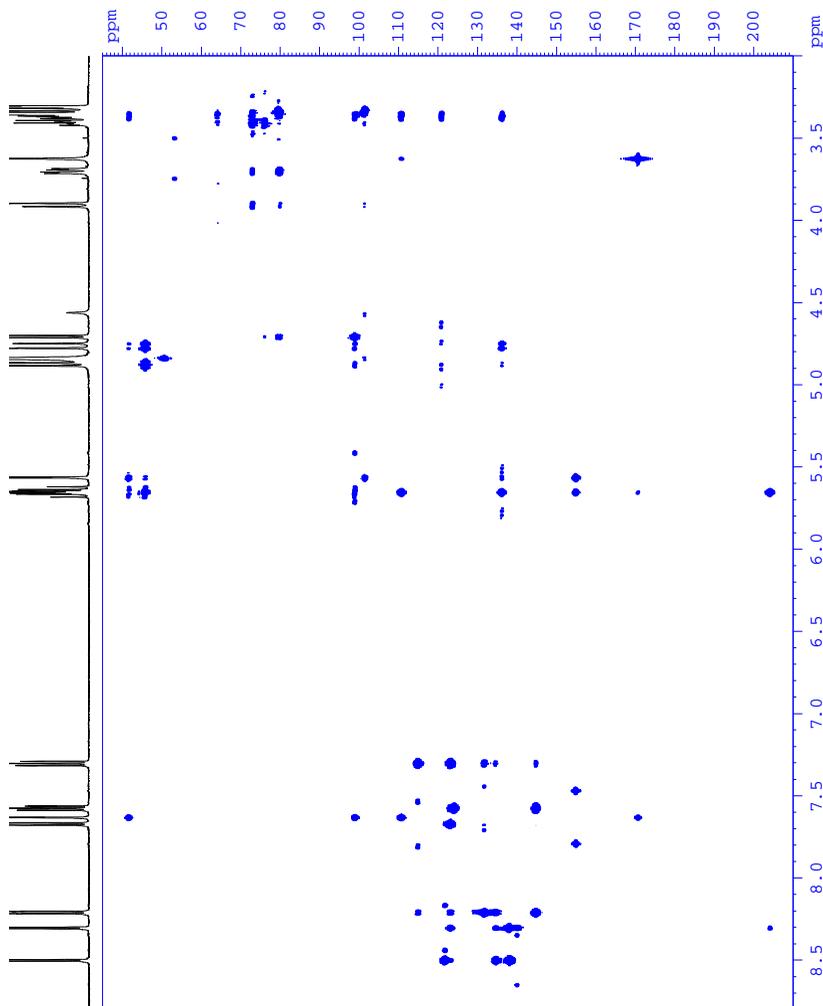
**APÊNDICE 46. Espectro de NMR de ^1H do pauridiantosídeo (55),
pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella***



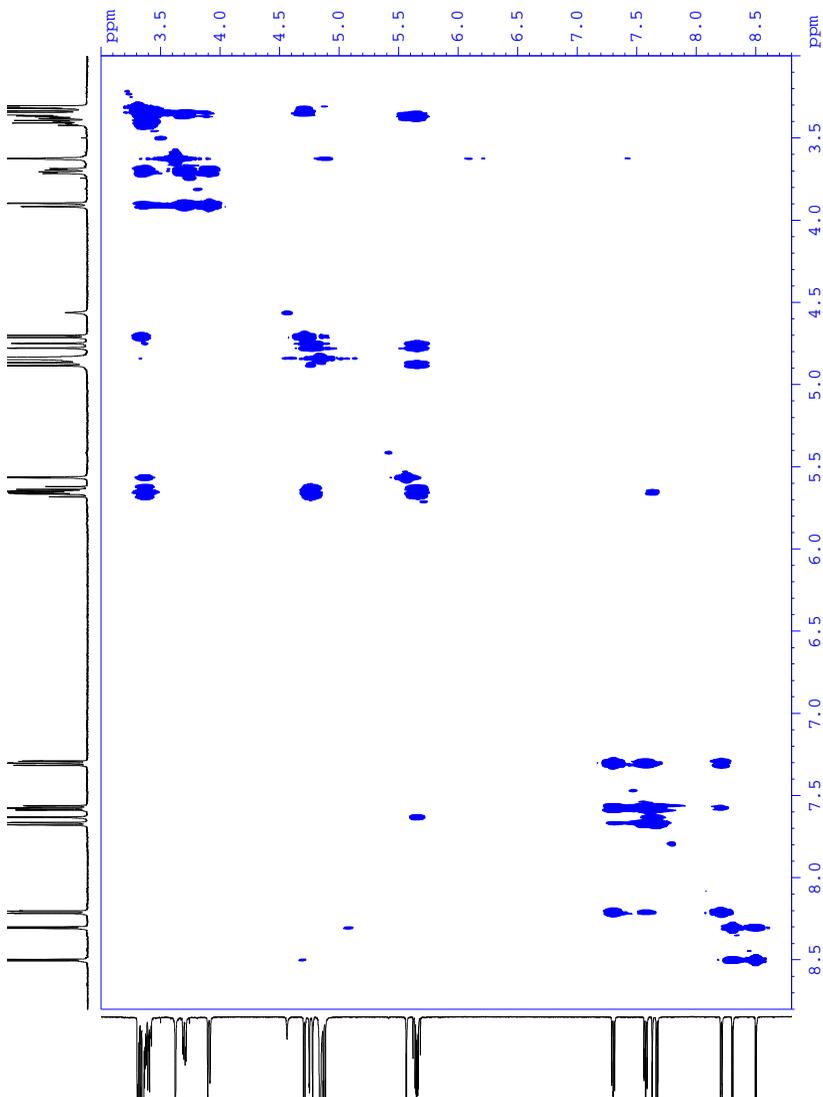
APÊNDICE 47. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC do pauidiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



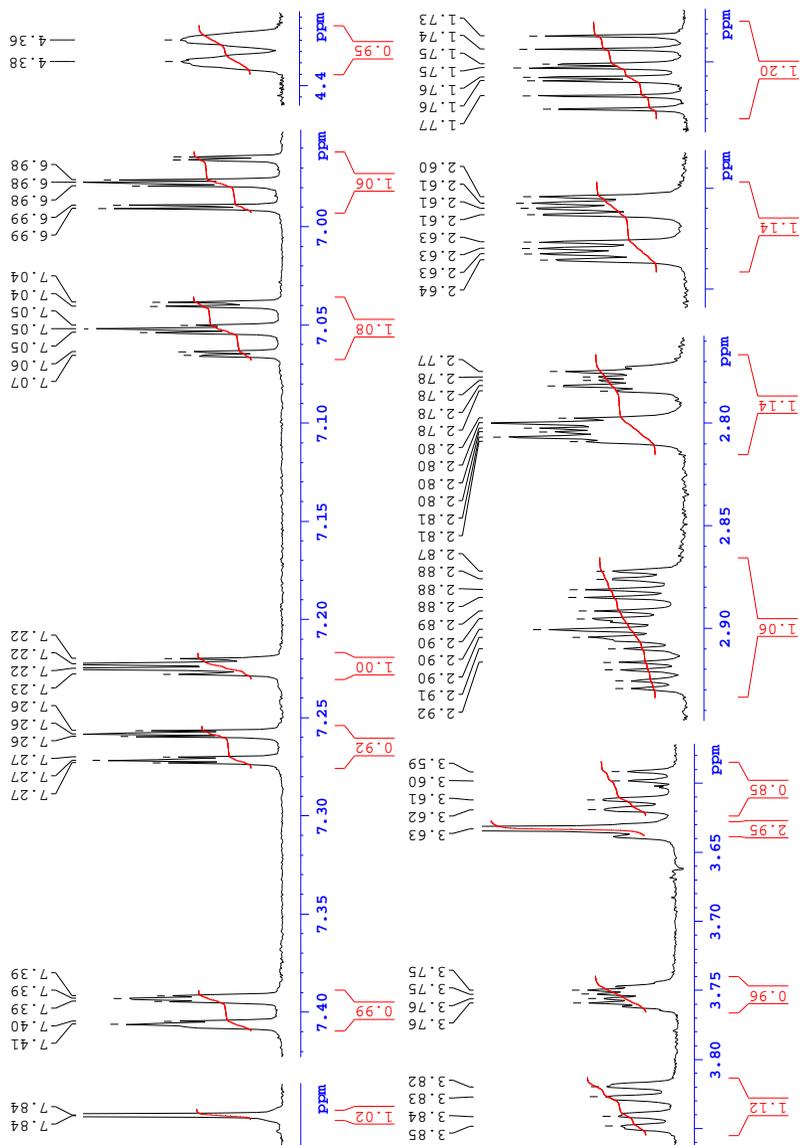
APÊNDICE 48. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HMBC do pauidiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



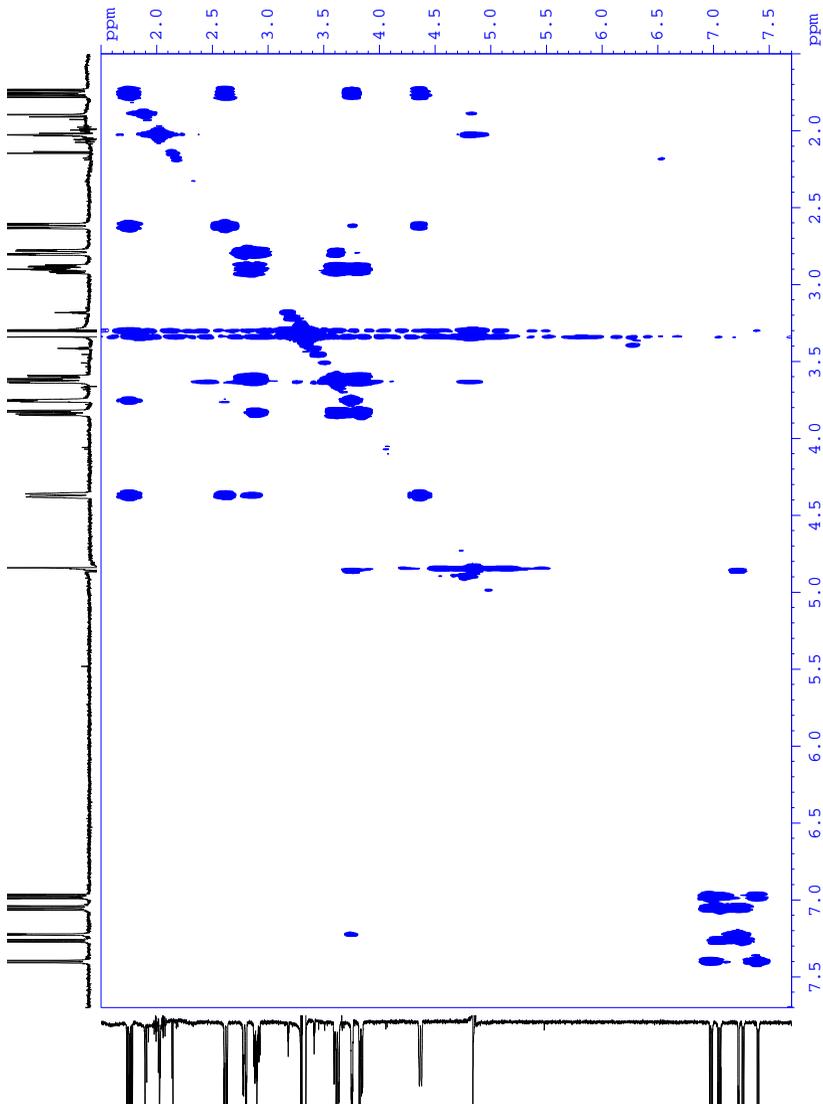
APÊNDICE 49. Espectros de NMR de correlação bidimensional H-H COSY do pauridiantosídeo (55), pico 3 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



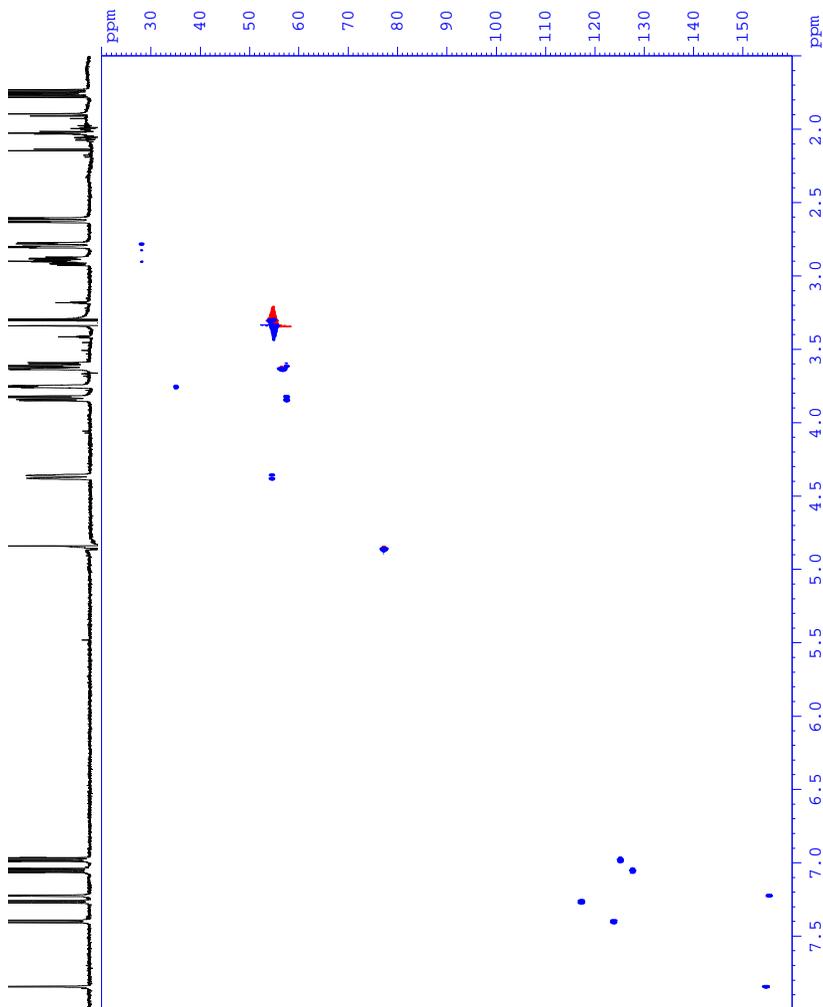
APÊNDICE 50. Espectro de NMR de ^1H da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



APÊNDICE 51. Espectros de NMR de correlação bidimensional H-H COSY da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



APÊNDICE 52. Espectro de NMR de correlação bidimensional C-H HSQC da vallesiachotamina lactona (11), pico 4 isolado da fração alcaloídica de *Psychotria suterella*



9. ANEXOS

ANEXO 1. Comparação entre os dados de NMR de ^{13}C para os alcalóides estrictosamida (32), lialosídeo (54), E/Z-vallesiachotamina (12 e 13), pauridiantosídeo (55) e vallesiachotamina lactona (11) com os dados disponíveis na literatura

| N. | estrictosamida (32) | | lialosídeo (54) | | E ⁻ -vallesiachotamina (12) | | Z ⁻ -vallesiachotamina (13) | | pauridiantosídeo (55), | | vallesiachotamina lactona (11) | |
|----|---------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | $^{13}\text{C}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ [158] | $^{13}\text{C}^c$ [159] | $^{13}\text{C}^d$ [46] | $^{13}\text{C}^e$ | $^{13}\text{C}^f$ [46] | $^{13}\text{C}^g$ | $^{13}\text{C}^h$ [46] | $^{13}\text{C}^i$ | $^{13}\text{C}^j$ [45] | $^{13}\text{C}^k$ | $^{13}\text{C}^l$ [46] |
| 2 | 134,90 | 134,9 | f | 133,2 | f | 133,06 | f | 133,60 | 137,9 | 134,22 | 154,8 | 131,87 |
| 3 | 55,24 | 55,2 | f | 143,6 | 49,4 | 48,65 | 47,7 | 47,94 | 135,1 | 135,02 | 54,7 | 46,96 |
| 5 | 44,89 | 44,9 | 136,2 | 134,5 | 51,0 | 49,77 | 51,0 | 50,68 | 140,1 | 137,44 | 57,5 | 49,76 |
| 6 | 22,26 | 22,2 | 112,8 | 112,5 | 21,8 | 21,33 | 21,8 | 22,24 | 121,7 | 119,63 | 28,3 | 21,20 |
| 7 | 110,46 | 110,4 | f | 126,0 | f | 106,61 | 106,8 | 107,44 | 134,4 | 131,11 | 114,0 | 106,59 |
| 8 | 128,84 | 128,8 | f | 120,9 | f | 126,25 | 126,3 | 127,01 | 133,1 | 119,78 | 133,4 | 117,34 |
| 9 | 118,82 | 118,8 | 121,2 | 121,6 | 117,1 | 117,45 | 117,1 | 118,37 | 124,1 | 121,77 | 124,0 | 125,77 |
| 10 | 120,29 | 120,3 | 119,3 | 119,0 | 118,4 | 118,26 | 118,4 | 119,22 | 123,0 | 120,21 | 125,2 | 118,17 |
| 11 | 122,63 | 122,6 | 128,4 | 127,7 | 120,9 | 120,66 | 120,9 | 121,58 | 131,7 | 128,93 | 127,8 | 120,53 |
| 12 | 112,41 | 112,4 | 111,4 | 111,8 | 110,6 | 110,78 | 110,6 | 111,79 | 114,9 | 112,99 | 117,3 | 110,75 |
| 13 | 137,91 | 137,8 | f | 140,2 | 136,0 | 136,07 | 135,7 | 136,83 | 144,6 | 200,46 | 143,3 | 135,74 |
| 14 | 27,49 | 27,4 | f | 32,5 | 33,8 | 32,98 | 32,6 | 32,88 | 204,2 | 38,29 | 37,9 | 30,50 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 15 | 25,09 | 25,0 | 32,9 | 30,1 | 28,1 | 27,44 | 30,4 | 30,56 | 45,8 | 107,42 | 34,9 | 27,58 |
| 16 | 109,39 | 109,3 | f | 109,8 | f | 93,23 | 92,5 | 93,40 | 110,7 | 141,79 | 99,5 | 92,08 |
| 17 | 149,29 | 149,3 | 152,4 | 151,7 | 148,3 | 147,16 | 148,3 | 148,48 | 155,0 | 151,67 | 154,6 | 69,97 |
| 18 | 120,67 | 120,8 | 118,0 | 118,7 | 13,8 | 14,34 | 11,6 | 13,34 | 120,9 | 118,95 | 77,2 | 147,15 |
| 19 | 134,48 | 134,4 | 133,9 | 134,0 | 152,8 | 152,00 | 146,3 | 146,35 | 136,2 | 133,38 | 155,4 | 148,30 |
| 20 | 44,92 | 44,8 | 44,2 | 42,9 | 146,4 | 146,11 | 142,5 | 143,95 | 41,8 | 42,31 | 145,0 | 135,97 |
| 21 | 98,23 | 98,2 | 96,1 | 95,8 | f | 195,48 | 190,1 | 191,53 | 99,0 | 95,32 | 180,8 | 172,57 |
| 22 | 167,23 | 167,2 | 167,6 | 166,6 | 169,0 | 166,97 | 168,5 | 167,56 | 170,9 | 166,45 | 175,6 | 166,36 |
| 23 | - | - | 50,3 | 50,8 | 49,8 | 49,74 | 49,8 | 50,84 | 53,3 | 50,93 | 56,6 | 49,81 |
| 1' | 100,65 | 100,6 | 98,8 | 98,7 | - | - | - | - | 101,5 | 98,58 | - | - |
| 2' | 74,46 | 74,3 | 73,3 | 73,0 | - | - | - | - | 76,1 | 72,93 | - | - |
| 3' | 78,35 | 78,2 | 76,9 | 77,3 | - | - | - | - | 73,0 | 76,75 | - | - |
| 4' | 71,50 | 71,4 | 70,3 | 70,0 | - | - | - | - | 79,5 | 69,90 | - | - |
| 5' | 78,09 | 78,0 | 77,1 | 76,8 | - | - | - | - | 79,9 | 77,31 | - | - |
| 6' | 62,74 | 62,7 | 61,6 | 61,0 | - | - | - | - | 64,2 | 60,91 | - | - |

NMR de ^{13}C : $^{\text{a}}$ 300 MHz; Metanol- d_4 . $^{\text{b}}$ 100 MHz in Metanol- d_4 . $^{\text{c}}$ 150 MHz; DMSO- d_6 . $^{\text{d}}$ 75 MHz; DMSO- d_6 . Dados: deslocamento químico / ppm. $^{\text{e}}$ Obtidos do espectro bidimensional HSQC. $^{\text{f}}$ não atribuído devido à baixa intensidade dos sinais obtidos nos espectros bidimensionais HSQC e/ou HMBC.

ANEXO 2. Comparação entre os dados de NMR de ^1H para os alcalóides estrictosamida (32) e lialosídeo (54) com os dados disponíveis na literatura

| N. | estrictosamida (32) | | lialosídeo (54) | |
|-----------|---|---|--|-------------------------------------|
| | $^1\text{H}^a$ | $^1\text{H}^b$ [45] | $^1\text{H}^a$ | $^1\text{H}^b$ [45] |
| 3 | 5,04 (dddd; 5,1; 2,2; 2,0) | 5,03 (d; 3,38) | - | - |
| 5 | (a) 3,08 (ddd; 12,6; 12,2; 4,6) (b) 4,94 (dd; 12,6; 5,7) | (a) 2,99 (m) (b) 4,79 (m) | 8,21 (d; 5,3) | 8,26 (d; 5,24) |
| 6 | (a) 2,67 (dd; 13,4; 4,6) (b) 2,94 (dddd; 13,4; 12,2; 5,7; 2,2) | (a) 2,61 (m) (b) 2,79 (m) | 7,96 (d; 5,3) | 7,91 (d; 5,24) |
| 9 | 7,38 (dl; 7,7) | 7,37 (d; 7,84) | 8,16 (d; 7,7) | 8,18 (d; 7,88) |
| 10 | 7,00 (ddd; 7,7; 7,0; 0,8) | 6,98 (t; 7,45) | 7,26 (ddd; 7,7; 7,5; 0,9) | 7,21 (t; 7,45) |
| 11 | 7,08 (ddd; 8,1; 7,0; 1,0) | 7,07 (t; 7,45) | 7,55 (ddd; 7,9; 7,5; 0,9) | 7,51 (t; 7,45) |
| 12 | 7,33 (dl; 8,1) | 7,34 (d; 8,08) | 7,59 (d; 7,9) | 7,56 (d; 8,15) |
| 14 | (a) 2,03 (ddd; 14,0; 13,8; 5,1) (b) 2,45 (ddd; 14,0; 4,6; 2,0) | (a) 1,90 (m) (b) 2,48 (m) | (a) 3,30 (m) (b) 3,56 (dd; 14,1; 6,8) | (a) 3,11 (m) (b) 3,70 (m) |
| 15 | 2,79 (dddd; 13,8; 5,4; 4,6; 2,4) | 2,62 (m) | 3,61 (ddd; 13,7; 6,8; 6,1) | 3,70 (m) |
| 17 | 7,37 (d; 2,4) | 7,24 (d; 2,03) | 7,53 (sl) | 7,47 (s) |
| 18 | (a) 5,32 (dd; 10,2; 1,6) (b) 5,37 (dd; 17,1; 1,6) | (a) 5,32 (m; 10,10; 1,82) (b) 5,36 (m) | (a) 4,94 (d; 17,4) (b) 5,04 (d; 10,3) | (a) 4,75 (d; 17,20) (b) 4,95 (m) |
| 19 | 5,65 (ddd; 17,1; 10,2; 10,0) | 5,60 (dt; 17,27; 9,79) | 5,87 (dddd; 17,4; 10,3; 8,5) | 5,66 (m) |

| | | | | | |
|-----------|--|------------------------------|--|--|------------------------------|
| 20 | 2,69 (ddd 10,0; 5,4; 1,7) | | | 2,61 (dt; 8,5; 6,4; 6,1) | 2,73 (dt; 9,62; 5,01) |
| 21 | 5,40 (d; 1,7) | 2,58 (m) | | 5,74 (d; 6,4) | 5,52 (d; 5,01) |
| 23 | - | - | | 3,36 (s; 3H) | 3,31 (s) |
| 1' | 4,58 (d; 8,0) | 4,44 (d; 8,08) | | 4,75 (d; 7,9) | 4,57 (d; 7,61) |
| 2' | 2,97 (dd; 9,0; 8,0) | 2,81 (td; 8,08; 4,74) | | 3,23 (dd; 9,1; 7,9) | 3,11 (m) |
| 3' | 3,27 (d; 9,1; 9,0) | 3,07 (td; 8,87; 4,74) | | 3,39 (dd; 9,2; 9,1) | 3,11 (m) |
| 4' | 3,19 (d; 9,4; 9,1) | 2,96 (m) | | 3,28 (dd; 9,2; 6,1) | 3,11 (m) |
| 5' | 3,26 (ddd; 9,4; 5,7; 2,2) | 3,12 (ddd; 9,78; 6,27; 2,11) | | 3,35 (ddd; 6,5; 6,1; 2,1) | 3,11 (m) |
| 6' | (a) 3,63 (dd; 11,9; 5,7) (b) 3,86 (dd; 11,9; 2,2) | (a) 3,41 (m) (b) 3,66 (m) | | (a) 3,68 (dd; 12,0; 6,5) (b) 3,92 (dd; 12,0; 2,1) | (a) 3,46 (m) (b) 3,56 (m) |

NMR ¹H ^a600 MHz; Metanol-d₄, ^b500 MHz; DMSO-d₆. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=dupleteo, dd=duplo-dupleteo, ddd=duplo-dupleteo duplo, dddd=duplo-duplo-dupleteo duplo, dt=duplo-tripleteo, m=multiploteo, s=simpleto, sl=simpleto largo, t=tripleteo, td=triplo-dupleteo; acoplamento – J / Hz).

ANEXO 3. Comparação entre os dados de NMR de ^1H para os alcalóides *E*-vallesiachotamina (12) e *Z*-vallesiachotamina (13) com os dados disponíveis na literatura

| N. | <i>E</i> -vallesiachotamina (12) | | <i>Z</i> -vallesiachotamina (13) | |
|----|--|---|--|---|
| | $^1\text{H}^a$ | $^1\text{H}^b$ [45] | $^1\text{H}^a$ | $^1\text{H}^b$ [45] |
| 3 | 4,48 (dddd; 11,6; 3,1; 2,0) (a) 3,73 (ddd; 12,5; 12,0; 3,1) (b) 3,89 (ddd; 12,5; 5,2; 1,3) | 4,34 (d; 11,28) (a) 3,57 (td; 12,60; 4,40) (b) 3,95 (dd; 12,60) | 4,34 (dddd; 11,9; 3,2; 2,1) (a) 3,61 (ddd; 12,6; 12,1; 3,2) (b) 3,83 (ddd; 12,6; 5,1; 1,3) (a) 2,80 (dddd; 15,0; 3,2; 1,3) (b) 2,90 (dddd; 15,0; 12,1; 5,1; 2,1) 7,41 (d; 7,80) | 4,23 (d; 12,01) (b) 3,49 (td; 12,55; 4,50) (a) 3,88 (dd; 12,55; 4,30) 2,73 (m) 7,39 (d; 7,83) |
| 5 | (a) 2,82 (ddd; 14,9; 3,1; 1,3) (b) 2,93 (dddd; 14,9; 12,0; 5,2; 2,0) | 2,77 (m) | | |
| 6 | 7,43 (d; 7,8) | 7,41 (d; 7,80) | | |
| 9 | 7,01 (ddd; 7,8; 7,0; 0,8) | 6,97 (ddd; 7,80; 7,20; 0,85) | 7,00 (ddd; 7,9; 7,1; 0,8) | 6,96 (ddd; 7,83; 7,00; 1,08) |
| 10 | 7,08 (ddd; 8,0; 7,0; 0,9) | 7,04 (ddd; 8,05; 7,20; 1,03) | 7,07 (ddd; 8,0; 7,1; 0,8) | 7,03 (ddd; 8,08; 7,00; 1,22) |
| 11 | 7,29 (d; 8,0) | 7,27 (d; 8,05) | 7,28 (d; 8,0) | 7,26 (d; 8,08) |
| 12 | (a) 1,83 (ddd; 13,4; 11,6; 6,0) (b) 2,38 (ddd; 13,4; 3,1; 1,6) | (a) 1,66 (td; 13,20; 5,41) (b) 2,33 (m) | (a) 1,69 (ddd; 13,4; 11,9; 5,2) (b) 2,37 (ddd; 13,4; 3,2; 1,7) 3,98 (dd; 5,2; 1,7) | (a) 1,52 (ddd; 13,20; 12,01; 5,32) (b) 2,28 (ddd; 13,20; 3,50; 1,80) 3,84 (d; 5,32) |
| 14 | 4,00 (dd; 6,0; 1,6) | 3,85 (d; 5,41) | | |
| 15 | 7,78 (s) | 7,70 (s) | 7,88 (s) | 7,80 (s) |
| 17 | 2,10 (d; 7,3) | 2,00 (d; 7,28) | 2,21 (d; 7,5) | 2,15 (dd; 7,57; 1,02) |
| 18 | 6,79 (q; 7,3) | 6,76 (q; 7,28) | 6,58 (q; 7,5) | 6,44 (q; 7,57) |
| 19 | | | | |

| | | | | |
|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
| 21 | 9,37 (s) | 9,36 (s) | 10,31 (s) | 10,27 (s) |
| 23 | 3,63 (s) | 3,51 (s) | 3,63 (s) | 3,51 (s) |

NMR ¹H ^a600 MHz; Metanol-d₄, ^b500 MHz; DMSO-d₆. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=dupleteo, dd=duplo-dupleteo duplo, dddd=duplo-duplo-dupleteo duplo, m=multipleteo, q=quarteto, s=simpleto, td=triplo-dupleteo; acoplamento – J / Hz).

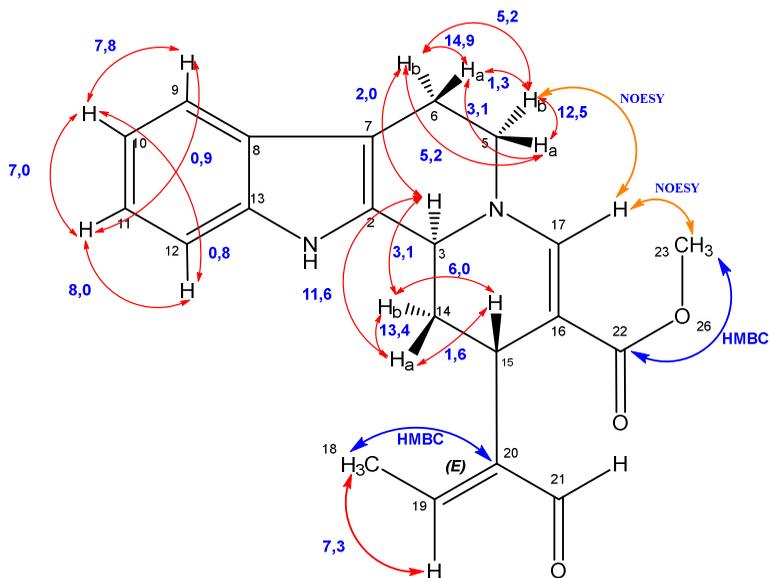
ANEXO 4. Comparação entre os dados de NMR de ^1H para os alcaloides pauidiantosídeo (55) e vallesiachotamina lactona (11) com os dados disponíveis na literatura

| N. | pauidiantosídeo (55) | | vallesiachotamina lactona (11) | |
|----|--|--|---|--|
| | $^1\text{H}^a$ | $^1\text{H}^b$ [45] | $^1\text{H}^a$ | $^1\text{H}^b$ [45] |
| 3 | - | - | 4,40 (dddd; 11,6; 3,3; 2,2; 1,5) | 4,29 (d; 11,22) |
| 5 | 8,52 (d; 4,9) | 8,56 (d; 4,92) | (a) 3,63 (ddd; 12,6; 11,7; 4,0) (b) 3,86 (ddd; 12,6; 5,5; 1,5) | (a) 3,49 (m) (b) 3,93 (dd; 12,80; 4,90) |
| 6 | 8,32 (d; 4,9) | 8,47 (d; 4,92) | (a) 2,82 (dddd; 15,0; 4,0; 1,5; 1,5) (b) 2,93 (dddd; 15,0; 11,7; 5,5; 2,2) | 2,75 (m) |
| 9 | 8,23 (dd; 7,9; 1,2) | 8,30 (d; 7,84) | 7,43 (dt; 7,9; 1,2) | 7,41 (d; 7,93) |
| 10 | 7,32 (ddd; 7,9; 7,0; 0,9) | 7,31 (t; 7,40) | 7,01 (ddd; 7,9; 7,0; 1,0) | 6,97 (ddd; 7,93; 7,00; 1,03) |
| 11 | 7,59 (ddd; 8,2; 7,0; 1,2) | 7,59 (ddd; 8,23; 7,40; 1,05) | 7,08 (ddd; 8,1; 7,0; 1,2) | 7,04 (ddd; 8,08; 7,00; 1,25) |
| 12 | 7,69 (dd; 8,2; 0,9) | 7,77 (d; 8,23) | 7,29 (dt; 8,1; 1,0) | 7,28 (dt; 8,08; 1,03) |
| 14 | - | - | (a) 1,79 (ddd; 13,5; 11,6; 5,4) (b) 2,65 (ddd; 13,5; 3,3; 1,8) | (a) 1,62 (td; 12,70; 4,41) (b) 2,53 (m) |
| 15 | 5,67 (dd; 6,7; 1,8) | 5,53 (dd; 6,53; 1,58) | 3,78 (dddd; 5,4; 1,8; 1,8; 1,7; 1,7) | 3,60 (t; 4,41) |
| 17 | 7,65 (d; 1,8) | 7,61 (d; 1,71) | 7,87 (s) | 7,78 (s) |
| 18 | (a) 4,78 (dd; 17,3; 1,5) (b) 4,90 (dd; 10,3; 1,5) | (a) 4,80 (d; 17,1) (b) 4,89 (dd; 10,19; 1,30) | (a/b) 4,86 ^c | (a) 4,84 (m) (b) 4,90 (dt; 18,30; 1,78) |
| 19 | 5,67 (ddd; 17,3; 10,3; 10,0) | 5,55 (dt; 17,18; 10,19) | 7,25 (ddd; 1,8; 1,8; 1,8) | 7,24 (q; 1,78) |

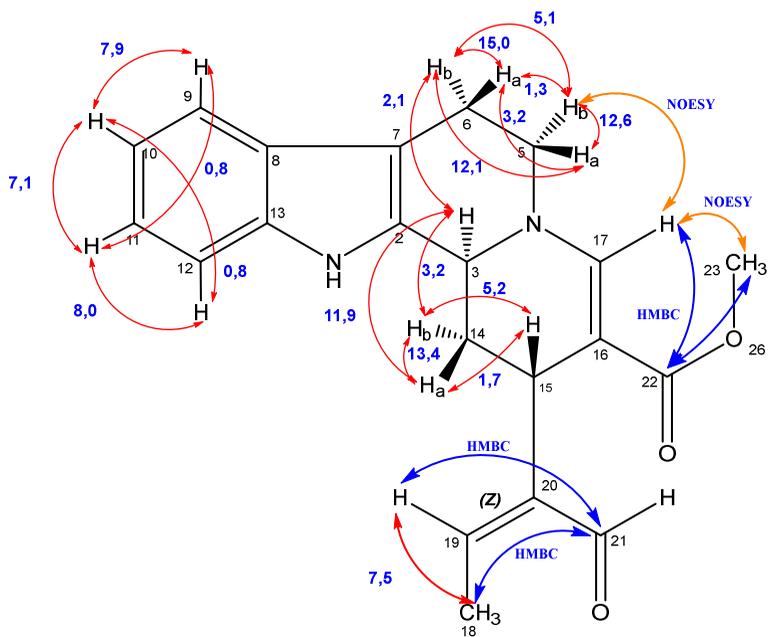
| | | | | |
|-----------|--|--|----------|----------|
| 20 | 3,37 (ddd; 10,0; 6,7; 2,9) | 3,29 (ddd; 9,43; 6,53; 2,55) | - | - |
| 21 | 5,58 (d; 2,9) | 5,46 (d; 2,55) | - | - |
| 23 | 3,64 (s) | 3,56 (s) | 3,66 (s) | 3,54 (s) |
| 1' | 4,73 (d; 7,8) | 4,55 (d; 7,84) | - | - |
| 2' | 3,34 (dd; 9,0; 7,8) | 3,09 (t; 9,36) | - | - |
| 3' | 3,41 (dd; 9,0; 8,9) | 3,19 (m) | - | - |
| 4' | 3,34-3,36 (m) | 3,11 (t; 9,36) | - | - |
| 5' | 3,34-3,36 (m) | 3,19 (m) | - | - |
| 6' | (a) 3,72 (dd; 12,0; 3,8) (b) 3,93 (dd; 12,0; 1,5) | (a) 3,47 (dd; 11,85; 6,00) (b) 3,70 (dd; 11,85; 1,40) | - | - |

NMR ^1H $^{\text{a}}$ 600 MHz; Metanol- d_4 , $^{\text{b}}$ 500 MHz; DMSO- d_6 . Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=dupleteo, dd=duplo-dupleteo, ddd=duplo-dupleteo duplo, dddd=duplo-duplo-dupleteo duplo, dt=duplo-tripleteo, m=multiploteo, s=simpleto, t=tripleteo; acoplamento – J / Hz). $^{\text{c}}$ sobreposto com o sinal residual do solvente.

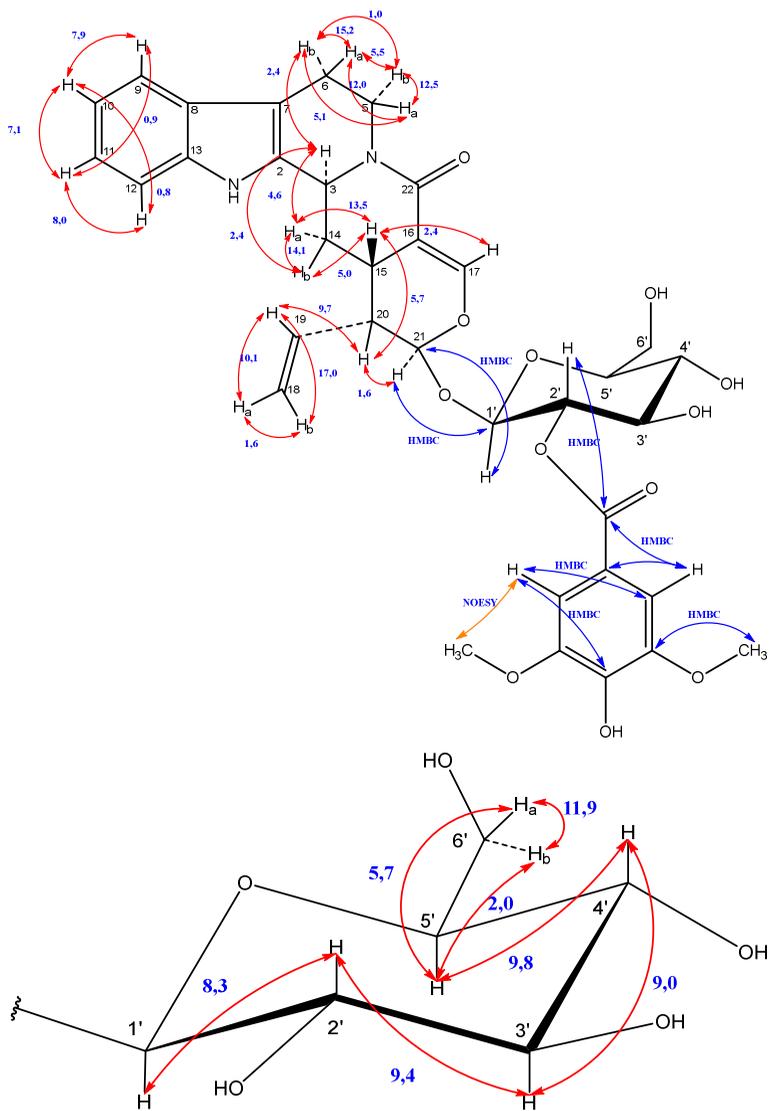
ANEXO 7. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide *E*-vallesiachotamina (12), pico 6 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*



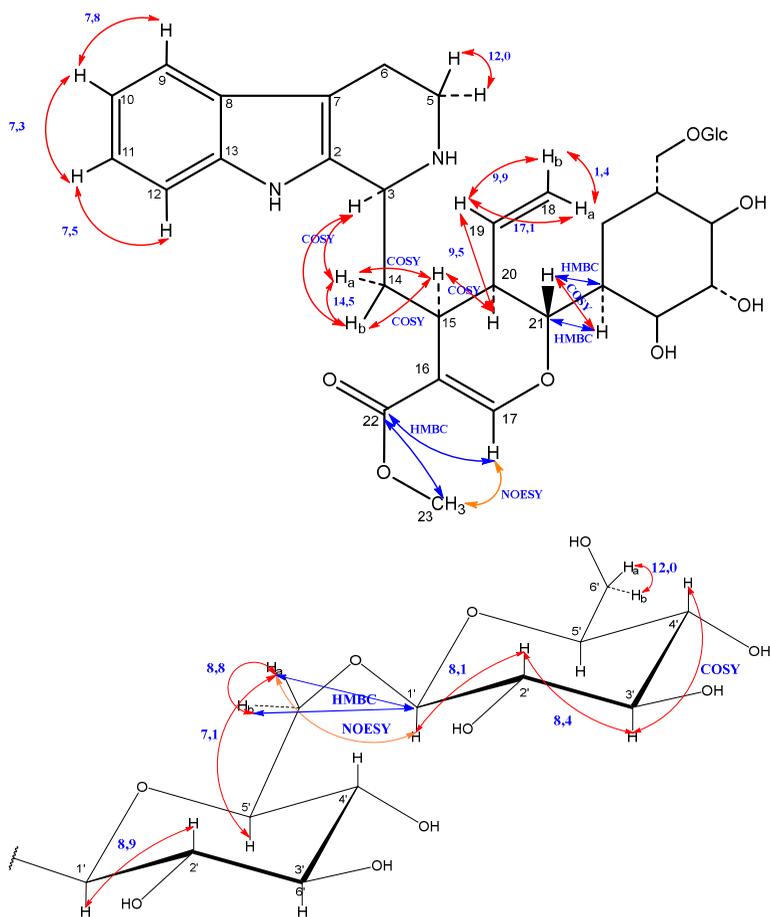
ANEXO 8. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide Z-vallesiachotamina (13), pico 7 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*



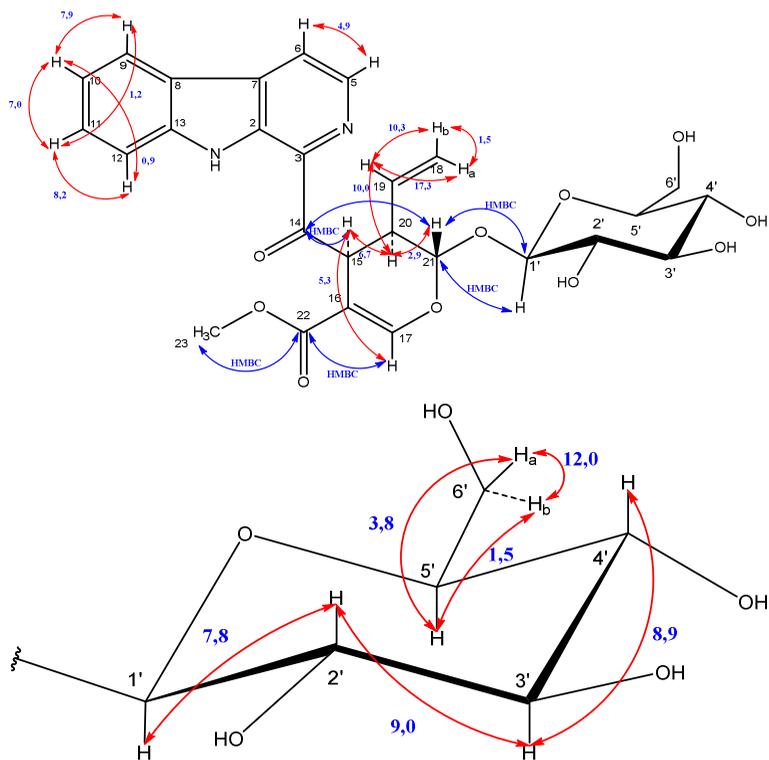
**ANEXO 10. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide 2'-siringil-
 strictosamida (144), pico 5 isolado de *Psychotria rhytidocarpa***



ANEXO 11. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide derivado de estrictosidina (145), pico 3 isolado de *Psychotria rhytidocarpa*



ANEXO 12. Diagrama de acoplamentos para o alcaloide paurdiantoside (55), pico 3 isolado de *Psychotria suterella*



ANEXO 14. Artigo intitulado “Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae)” aceito para publicação no periódico *Journal of Applied Pharmaceutical Science*

Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 7 (xx), pp. xxx-xxx, 2017

Available online at <http://www.japsonline.com>

DOI: 10.7324/JAPS.2017.XXXXX

ISSN 2231-3354 

Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae)

Gustavo Silva Queiroz¹, Ana Beatriz Gobbo Luz², Marcus Vinícius Pereira dos Santos Nascimento², Sergio Scherrer Thomasi³, Antonio Gilberto Ferreira⁴, Eduardo Monguilhott Dalmarco², Ines Maria Costa Brighente^{1*}

¹ Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil.

² Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil.

³ Department of Chemistry, Federal University of Lavras, Lavras – MG, Brazil.

⁴ Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos – SP, Brazil.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: XXXX/XXXX

Revised on: XXXX/XXXX

Accepted on: XXXX/XXXX

Available online:

XXXX/XXXX

Key words:

Psychotria stenocalyx, anti-inflammatory, monoterpene indole alkaloids, HPLC-DAD-SPE/NMR

ABSTRACT

In this study, an *in vivo* anti-inflammatory assay was conducted on *Psychotria stenocalyx* ethanol extract of leaves, evaluating this effect on cell migration and exudate formation in a murine carrageenan-induced model of pleurisy. The extract showed the optimum dose, at 400 mg/kg, inhibiting cellular and vascular parameters: total leucocytes due to polymorphonuclear migration and exudate formation ($p < 0.01$). A phytochemical study was conducted using the hyphenated techniques HPLC-DAD-SPE/NMR and HPLC-DAD-FSI-TOF-HRMS, in which seven monoterpene indole alkaloids were identified: lyaloside 1, (E)-O-(6'-cinnamoyl-4''-hydroxy-3'',5''-dimethoxy-lyaloside 2, strictosamide 3, pauidanthoside 4, vallesiachotamine lactone 5, E-vallesiachotamine 6 and Z-vallesiachotamine 7, in the alkaloid fraction, obtained by an acid-base extraction on *P. stenocalyx* crude extract. This is the first study developed with this species.

INTRODUCTION

Psychotria L. is the largest genus in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae) and is comprised of around 2000 species worldwide, distributed in tropical regions (Nepokroeff *et al.*, 1999).

Many biological and pharmacological investigations of the genus *Psychotria* have shown a significant number of activities, such as antioxidant (Formagio *et al.*, 2014), antibacterial (Moraes *et al.*, 2011), anti-parasitic (Kato *et al.*, 2012), antitumor (Gerlacher *et al.*, 2010), anti-inflammatory (Iniyan *et al.*, 2012), anxiolytic and anti-depressive (Farias *et al.*, 2012), and anti-epileptic (Awad *et al.*, 2009) activities. Studies have also reported the efficacy of *P. poeppigiana* against heart disease, cough, asthma and bronchitis (Guerrero *et al.*, 2010). Species of *Psychotria* was also evaluated for their ability

to protect against intracellular amyloid toxicity and induced cell differentiation (Currais *et al.*, 2014). Chemical studies on *Psychotria* species have reported the presence of alkaloids as the main secondary metabolites, particularly monoterpene indole alkaloids (Calixto *et al.*, 2016). The monoterpene indole alkaloids lyaloside 1, (E)-O-(6'-cinnamoyl-4''-hydroxy-3'',5''-dimethoxy-lyaloside 2, strictosamide 3, pauidanthoside 4, vallesiachotamine lactone 5, E-vallesiachotamine 6, and Z-vallesiachotamine 7 have previously been reported in *Psychotria* species (Berger *et al.*, 2015; Farias *et al.*, 2009; Passos *et al.*, 2013a-b; Paul *et al.*, 2003). The genus *Psychotria* can also be characterized as an abundant source of indoles (Gerlacher *et al.*, 2010), pyrrolidinoindeole (Henriques *et al.*, 2004), quinolin and isoquinolin (Bernhard *et al.*, 2011), and β -carboline (Muriello and Castro, 1998) alkaloids. Some of these alkaloids inhibited monoamine oxidase A and B (Passos *et al.*, 2013a), and exhibited potential inhibition of the enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (Passos *et al.*, 2013b).

* Corresponding Author
Ines Maria Costa Brighente
Email: ines.marica@ufsc.br

© 2017 Gustavo Silva Queiroz *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License -NonCommercial-ShareAlikeUnported License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).