

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo Fitoquímico das Folhas da Espécie
***Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm**
(Rubiaceae)

EMIRET OTONI DE FARIA

ORIENTADORA: PROF. DR (A): LUCÍLIA KATO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GOIÂNIA- 2009

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Química

Estudo Fitoquímico das Folhas da Espécie
***Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm**
(Rubiaceae)

EMIRET OTONI DE FARIA

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química da
Universidade Federal de Goiás,
como exigência parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Química.

Orientadora: Dr. (a) Lucília Kato

Goiânia, 2009

Aos meus pais Claret e Emilio
pelo apoio incondicional, estímulo e
incentivo em meus estudos e em todas
as etapas da minha vida. Ao meu esposo
Paulo pelo companheirismo incrível,
compreensão e ajuda nos momentos
difíceis. Amo vocês.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

F224e Faria, Emiret Otoni.
Estudo Fitoquímico das folhas da Espécie *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyererm (Rubiaceae) [manuscrito] / Emiret Otoni de Faria. - 2009.
xv, 126 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucília Kato;
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Química, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

1. *Psychotria prunifolia* – Fitoquímica 2. Alcalóides. I. Título.

CDU: 582.936.1

AGRADECIMENTOS

Nós somos o conjunto de todas as pessoas que passaram por nossas vidas, que atuando de maneira positiva ou negativa, nos modificaram de algum modo, contribuindo para nosso crescimento e amadurecimento. Tudo isso aliado à nossa personalidade, faz de cada pessoa um ser único, muito especial e com potencialidades ilimitadas.

Desta maneira, agradeço:

A Deus, por me dar a vida, saúde e bençãos proporcionados ao longo desta caminhada.

À Profa. Dra. Lucília Kato, pela orientação, paciência e bom humor, confiando e incentivando a busca de novos conhecimentos, de modo a enriquecer esta dissertação.

À Profa. Dra. Cecília M. A. de Oliveira, pela constante disposição em colaborar neste trabalho.

À Profa. Dra. Olga do Rego Barros pelo Estágio de Docência.

À Profa. Dra. Gláucia Braz Alcântara pela disposição em esclarecer dúvidas de RMN e contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos aprendizes de cientistas do laboratório, Pollyanna, companheira de mestrado, Daniele, Laryssa, Deomar, presença constante no laboratório, e às alunas de IC, a todos pela amizade, momentos de descontrações e pela troca de experiências.

À Brenda pela paciência em me ensinar bioautografia. À Letícia e Laryssa pelo auxílio nas análises de atividade antioxidante.

À Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva e à Dra. Ivânia T. A. Schuquel da Universidade Estadual de Maringá pela ajuda na elucidação estrutural dos compostos isolados.

Aos professores e técnicos do Instituto de Química, pela disposição e colaboração constantes.

A todos os colegas de mestrado, que contribuíram com a boa convivência e momentos descontraídos em meio a tanto trabalho.

Aos meus amigos, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta realização.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A toda a sociedade brasileira, que com os impostos pagos financiou este trabalho, e que espero seja beneficiada com os resultados alcançados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	18
3 PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 Materiais e Métodos	21
3.2 Coleta	22
3.3 Extração dos Constituintes Químicos	23
3.3.1 Extrato Clorofórmico	24
3.3.2 Extrato Clorofórmico Ácido	30
3.3.3 Extrato Clorofórmico Neutro	32
3.3.4 Extrato Clorofórmico Básico	33
3.3.5 Extrato Acetato Etílico Básico	33
3.4 BIOENSAIOS	36
3.4.1 Bioautografia	36
3.4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante	36
3.4.3 Avaliação da Atividade frente a Dermatófitos	37
3.4.4 Avaliação da Atividade Citotóxica (<i>in vitro</i>)	37
4 DISCUSSÃO	41
4.1 Rendimento das Frações Isoladas	41
4.2 Análise Espectroscópica	42
4.2.1 Prunifolina	42
4.2.2 Prunifoliona	48

4.2.3 EPP 26.2	52
4.2.4 Estrictosamida	58
4.2.5 EPP 28.1	62
4.2.6 EPP 39-37	65
4.3 Bioensaios	69
4.3.1 Bioautografia	69
4.3.2 Antioxidante	70
4.3.3 Dermatófitos	70
4.3.4 Citotóxica	70
5 CONCLUSÃO	72
6 BIBLIOGRAFIA	74
ANEXO A	84
ANEXO B	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da estimativa de cobertura vegetal nativa do Cerrado	3
Figura 2	Algumas estruturas de alcalóides isolados de plantas de interesse da indústria farmacêutica.	5
Figura 3	Estruturas de alguns alcalóides indólicos (grupo indol em destaque).	6
Figura 4	Estruturas de alcalóide formados a partir da condensação do iridóide secologanina com a amina correspondente.	7
Figura 5	Rota biossintética que dá origem aos alcalóides indol-monoterpênicos (DEWICK, 1997).	8
Figura 6	Distribuição dos princípios metabólitos secundários nas três subfamílias da família Rubiaceae.	9
Figura 7	Estruturas da serotonina e N, N-dimetiltriptamina.	12
Figura 8	Estruturas de alcalóides e iridóides isolados de <i>Psychotria</i> .	13
Figura 9	Exemplar de <i>Psychotria prunifolia</i> (Kunth) Steyerm.	14
Figura 9.1	<i>Psychotria prunifolia</i> .	
Figura 10	Esquema do fracionamento com solventes orgânicos das folhas de <i>P. prunifolia</i> .	24
Figura 11	Esquema do fracionamento ácido-base do extrato bruto	29

das folhas de *P. prunifolia*

Figura 12	Esquema de purificação dos compostos EP20.2 e EPP20.3.	31
Figura 13	Esquema para purificação do extrato clorofórmico neutro.	33
Figura 14	Etapas de processos cromatográficos para a purificação de compostos do extrato acetato etílico básico.	35
Figura 15	Estrutura da unidade β -carbolina.	42
Figura 16	Deslocamento químico ($\delta^{13}\text{C}$), em ppm, dos carbonos do grupo vinílico.	43
Figura 17	Correlações observadas pelo experimento de COSY.	43
Figura 18	Correlações observadas no HMBC de prunifolina com destaque para as correlações da junção do anel secologanínico.	44
Figura 19	Correlações em NOESY de Prunifolina.	44
Figura 20	Correlações observadas com o experimento de NOESY, desdobramentos e constantes de acoplamento dos hidrogênios de prunifolina.	45
Figura 21	Estruturas de prunifolina e ofiorina B.	45
Figura 22	Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 75 MHz) de prunifoliona isolada das cascas de <i>P. prunifolia</i> .	49
Figura 23	Correlação em HMBC de prunifoliona.	49
Figura 24	Correlações em HMBC e COSY de prunifoliona.	50
Figura 25	Espectro de RMN de ^1H do alcalóide EPP 26.2 e ampliação dos sinais aromáticos.	52

Figura 26	Correlações em HMBC da unidade β -carbolina.	53
Figura 27	Espectro de RMN ^1H do alcalóide Epp26 e ampliação dos sinais vinílicos.	54
Figura 28	Conectividades entre os núcleos de hidrogênio obtidas por COSY ($\leftrightarrow$) e correlações em HMBC($\rightarrow$) da unidade monoterpênica do alcalóide EPP26.2.	54
Figura 29	Correlação observada pelo experimento de NOESY entre os núcleos H-15 e H-20 do alcalóide EPP26.2 e estrutura do alcalóide lialosídeo.	55
Figura 30	Constantes de acoplamento para os H-3, H-14 e H-15 da strictosamida.	59
Figura 31	Configuração relativa do alcalóide isolado strictosamida e do alcalóide N, β -D -glucopiranosil vincosamida.	59
Figura 32	Correlações observadas nos experimentos de COSY (a) e TOCSY (b).	63
Figura 33	Correlações em HMBC de EPP28.1.	63
Figura 34	Correlações em HMBC (a) e em COSY (b) do alcalóide 5.	66
Figura 35	Proposta de tautomerismo ceto-enólico sugerido para o composto EPP39-37.	66
Figura 36	Compostos isolados das folhas de <i>P. prunifolia</i> .	68
Figura 37	Viabilidade celular do extrato etanólico de <i>P. prunifolia</i> em diferentes concentrações.	71
Figura 38	Viabilidade celular do alcalóide prunifoliona em diferentes concentrações.	71

Figura 39	Espectro de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 300 MHz) de Prunifolina.	85
Figura 40	Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 75 MHz) de Prunifolina.	86
Figura 41	Experimento de Dept ($135^\circ/90^\circ$) de Prunifolina.	87
Figura 42	Experimento de COSY de Prunifolina	88
Figura 43	Experimento de HMQC de Prunifolina.	89
Figura 44	Experimento de HMBC de Prunifolina.	90
Figura 45	Experimento de NOESY de Prunifolina.	91
Figura 46	Espectro de RMN ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 300 MHz) de Prunifoliona	92
Figura 47	Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 75 MHz) de Prunifoliona.	93
Figura 48	Experimento de Dept ($135^\circ/90^\circ$) de Prunifoliona.	94
Figura 49	Experimento de COSY de Prunifoliona.	95
Figura 50	Experimento de HMQC de Prunifoliona.	96
Figura 51	Experimento de HMBC de Prunifoliona.	97
Figura 51.1	Experimento de NOESY de Prunifoliona.	98
Figura 52	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de EPP 26.2	99
Figura 53	Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de EPP 26.2	100
Figura 54	Experimento de Dept ($135^\circ/90^\circ$) de EPP 26.2	101
Figura 55	Experimento de COSY de EPP 26.2.	102

Figura 56	Experimento de HMQC de EPP 26.2.	103
Figura 57	Experimento de HMBC de EPP 26.2.	104
Figura 58	Experimento de NOESY de EPP 26.2.	105
Figura 59	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de Estrictosamida.	106
Figura 60	Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de Estrictosamida.	107
Figura 61	Experimento de Dept ($135^\circ/90^\circ$) de Estrictosamida.	108
Figura 62	Experimento de COSY de Estrictosamida.	109
Figura 63	Experimento de HMQC de Estrictosamida.	110
Figura 64	Experimento de NOESY de Estrictosamida.	111
Figura 65	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de EPP 28.	112
Figura 66	Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de EPP 28.	113
Figura 67	Experimento de Dept ($135^\circ/90^\circ$) de EPP 28.	114
Figura 68	Experimento de COSY de EPP 28.	115
Figura 69	Experimento de HMQC de EPP 28.	116
Figura 70	Experimento de HMBC de EPP 28.	117
Figura 71	Experimento de NOESY de EPP 28.	118
Figura 72	Experimento de TOCSY (CD_3OD , 500 MHz) de EPP 28	119
Figura 73	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de EPP 39-37.	120
Figura 74	Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de EPP 39-37.	121

Figura 75	Experimento de Dept (135°/90°) de EPP 39-37.	122
Figura 76	Experimento de COSY de EPP 39-37.	123
Figura 77	Experimento de HMQC de EPP 39-37.	124
Figura 78	Experimento de HMBC de EPP 39-37	125
Figura79	Espectro de absorção na região de infravermelho de Prunifolina.	127
Figura 80	Espectro de absorção na região de infravermelho de Prunifoliona.	127
Figura81	Espectro de absorção na região de infravermelho de EPP 26.2.	128
Figura 82	Espectro de absorção na região de infravermelho de Estrictosamida.	128
Figura 83	Espectro de absorção na região de infravermelho de EPP28.1.	129
Figura 84	Espectro de absorção na região de infravermelho de EPP39-37.	129
Figura 85	Espectro de massas de alta resolução do alcalóide 1	130
Figura 86	Espectro de massas de alta resolução do alcalóide 2	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frações da coluna cromatográfica do extrato clorofórmico.	25
Tabela 2	Frações reunidas por análise de CCD e respectivas massas.	26
Tabela 3	Extratos obtidos da planta através do fracionamento ácido base.	28
Tabela 4	Frações reunidas da coluna cromatográfica do extrato ácido clorofórmico.	30
Tabela 5	Frações reunidas por semelhanças do perfil cromatográfico	31
Tabela 6	Frações reunidas da coluna cromatográfica do extrato clorofórmico neutro.	32
Tabela 7	Frações resultantes da coluna cromatográfica do extrato acetato etílico básico.	34
Tabela 8	Rendimento dos alcalóides isolados das folhas de <i>Psychotria prunifolia</i> .	41
Tabela 9:	Dados de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY, HMBC e NOESY do alcalóide prunifolina (1).	46
Tabela 10	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de prunifolina e ofiorina B.	47
Tabela 11	Dados de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY, HMBC e NOESY do alcalóide prunifoliona (2).	51
Tabela 12	Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C , RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY, HMBC e NOESY do alcalóide EPP 26.2.	56
Tabela 13	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EPP 26.2 e lialosídeo.	57
Tabela 14	Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY e NOESY do alcalóide	60

	estrictosamida	
Tabela 15	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de estrictosamida e vincosamida.	61
Tabela 16	Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY e NOESY do alcalóide EPP28.1	64
Tabela 17	Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C do alcalóide EPP39-37.	67
Tabela 18	Atividade antibiótica dos extratos de <i>Psychotria prunifolia</i> .	69
Tabela 19	Resultados da avaliação da menor concentração inibitória (MIC), em ppm, extratos de <i>Psychotria prunifolia</i> .	69
Tabela 20	Avaliação de atividade antioxidante dos extratos de <i>P. prunifolia</i> expressa em CE_{50} .	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BHT	Hidroxitolueno butilado
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CHCl ₃	Clorofórmio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	¹ H- ¹ H correlation Spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dl	Dubleto largo
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
D ₂ O	Água Deuterada
DPPH	Radical 2,2-difenil-picrilidrazila
EtOH	Etanol
HMBC	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Bond correlation
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MTT	3-(4,5-Dimetiltiasol-2-il-2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio)
NCI	National Cancer Institute
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement Spectroscopy
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

s	Singleto
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
sl	Singleto largo
TOCSY	Total Correlation Spectros Copy

RESUMO

Psychotria prunifolia é uma planta da família Rubiaceae com ocorrência no cerrado goiano. O NCI (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos - EUA) apontou o gênero *Psychotria* como “hot” gênero referindo-se ao potencial citotóxico de seus extratos e frações. Em estudos químicos do gênero foram encontrados principalmente alcalóides indólicos responsáveis por diversas atividades biológicas.

O presente estudo tem por objetivo a investigação fitoquímica de *P. prunifolia*, a avaliação citotóxica, antibacteriana, antioxidante e antifúngica dos extratos brutos e frações das folhas. A partir do fracionamento ácido-base do extrato bruto das folhas foi possível o isolamento de quatro novos alcalóides indol-monoterpenos e a strictosamida, já isolada em outras espécies do gênero. Os alcalóides inéditos foram chamados de prunifolina, prunifoliona, EPP26.2 e EPP28.1. Os alcalóides indol-monoterpenos tem importância quimiotaxionômica na família Rubiaceae e podem auxiliar na melhor classificação das espécies do subgênero heteropsychotria.

Os testes *in vitro* com quatro tipos de cultura de células (S-180-sarcoma de camundongo, A549-carcinoma de pulmão humano, K562- leucemia mielóide crônica humana e HFF-1-células normais humanas-fibroblastos) mostraram promissora atividade citotóxica da espécie *P. prunifolia*. No teste de atividade antibacteriana, os extratos das folhas foram considerados pouco ativos. O extrato bruto das folhas mostrou-se pouco promissor quanto ao potencial antioxidante. A atividade antifúngica *in vitro* mostrou-se razoável.

ABSTRACT

Psychotria prunifolia is a Rubiaceae family specimen found in the Goiás “cerrado”, which is a huge ecosystem in the Brazilian Mid-West Mainland. The NCI (National Cancer Institute) highly referred to *Psychotria* as a “hot” genera with a cytotoxic potential from its extracts and fractions. Several related chemical studies have mostly indicated findings of indole alkaloid, which are “keys” to various biological activities.

Current ongoing studies are focusing on phytochemical investigation of *P. prunifolia*, and its cytotoxic, antibacterial, antioxidant, and antifungal findings from its leaves’ extracts and fractions. It was feasible to isolate four new indole-monoterpene alkaloids and estrictosamida upon fractioning the leaves’ gross extracts. Estrictosamida has been found in and isolated from other specimens from the same genera. Recently-found alkaloids have been named prunifolina, prunifoliona, EPP26.2 e EPP28.1. Indole-monoterpene alkaloid is of greater chemotaxonomic importance for the Rubiaceae family, and it may assist with better classifying heteropsychotria sub-genera specimens.

In vitro analysis of four cultures of cellular kinds, (S-180- Mice Sarcoma, A549- Human-Lung Carcinoma, K562 – Chronic Human Myeloid Leukemia e HFF-1-Regular Human Cells – fibroblasts), has demonstrated successful cytotoxic activity of the *P. prunifolia* specimen. As a result of the antibacterial analysis, the leaves’ extracts were deemed to be less active. Extracts of leaves have shown little efficacy with its antioxidant potential, and *in vitro* antifungal analysis has indicated mild or little response.

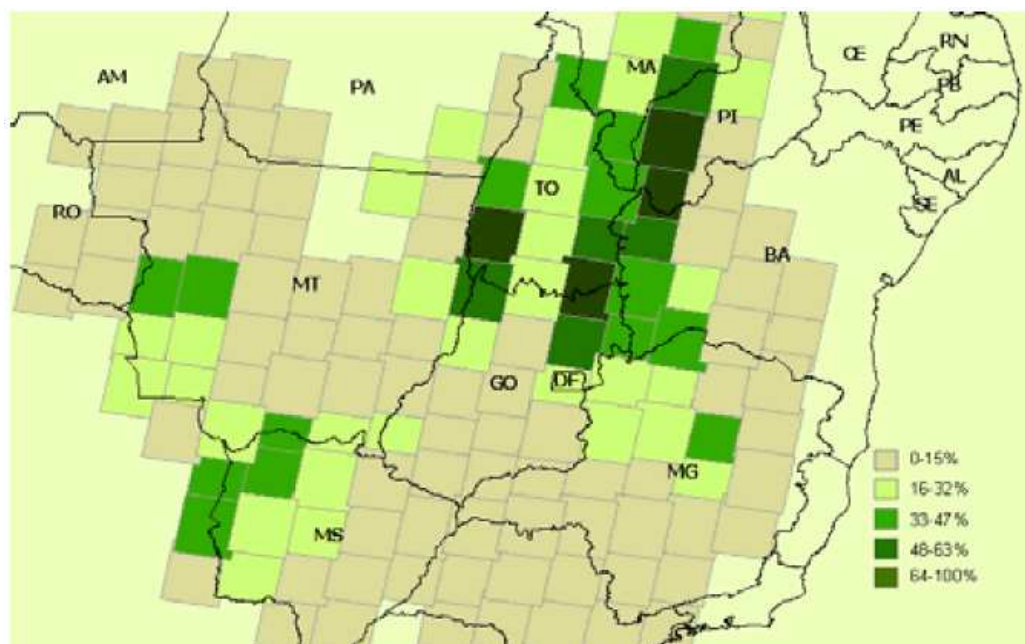
1. INTRODUÇÃO

1.1 CERRADO

O Cerrado constitui o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área de aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados, o que corresponde aproximadamente a 24% do território nacional (KLINK; MACHADO, 2005). Em português, Cerrado significa “fechado”, “denso” e, provavelmente, foi aplicada a essa região devido à dificuldade de atravessá-la a cavalo (OLIVEIRA; MARQUIS, 2002). É constituído por árvores relativamente baixas (até vinte metros), esparsas, disseminadas em meio a arbustos, subarbustos e uma vegetação baixa constituída, em geral, por gramíneas.

Considerado o “berço das águas”, por abrigar nascentes de importantes bacias da América do Sul e reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas, possui riquíssima flora, com mais de 10.000 espécies de plantas, com 4.400 endêmicas (exclusivas) dessa área (IBAMA, 2009). Há, também, 837 espécies de aves (3,4 % endêmicas); 161 de mamíferos (11% endêmicas); 120 de répteis (20% endêmicas); e 150 espécies de anfíbios (30% endêmicas). Porém, sua diversidade biológica é ainda pouco conhecida e estudada, principalmente quando comparada ao que se dispõe sobre a Amazônia e a Mata Atlântica (BRASIL, 1999; MAURY, 2002)

Apesar da riqueza, o bioma está sendo rapidamente convertido em pastagem e cultivo agrícola. Por isso, foi identificado como um dos mais ricos e ameaçados biomas mundiais. A excepcional concentração de espécies endêmicas está vivenciando grande perda de habitat, situação conhecida como *hotspots* (MYERS *et al*, 2000; RATTER *et al.*, 1997). A expansão agrícola tem por base desmatamentos, queimadas, uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que resulta em 67% de áreas do Cerrado “altamente modificadas”, com voçorocas, assoreamento e envenenamento dos ecossistemas, restando apenas 20% de área em estado conservado (IBAMA, 2009) (Fig. 1).



Fonte: MAURY, 2002

Figura 1: Representação da estimativa de cobertura vegetal nativa do Cerrado.

Entre 1970 e 1975, a velocidade média anual de desmatamento no Cerrado era de 40.600 km² por ano, cerca de 1,8 vezes mais do que o desflorestamento da Amazônia (OLIVEIRA; MARQUIS, 2002; SANO *et al.*, 2002).

Além de ser o “celeiro do mundo” ou “área de expansão da fronteira agrícola” (EMBRAPA CERRADOS, 1999), apenas 1,5% de seu território é protegido nas diversas categorias de unidade de conservação (BRASIL, 1999; MAURY, 2002).

A alta taxa de destruição do Cerrado, frente à sua grande diversidade de espécies vegetais (44% endêmicas), leva a uma urgente necessidade de estudos científicos para a valorização do bioma.

Muitas plantas do Cerrado são usadas por pessoas que vivem nessa área, para tratar diversas doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas, entre outras (DUARTE *et al.*, 2005).

A diversidade de substâncias encontradas nas plantas do cerrado pode estar relacionada à aridez e acidez do solo, além do clima seco e quente da região, uma vez que a tentativa de adaptação das plantas a um ecossistema de características tão peculiares resultaria numa maior variedade estrutural de seus constituintes químicos (GOODLAND e FERRI, 1979 *apud* OLIVEIRA, 2009).

O potencial do Cerrado Brasileiro, como fonte de substâncias, é interessante, sob o ponto de vista químico e farmacológico, o qual vem estimulando diversas pesquisas, visando a descoberta de princípios ativos e o desenvolvimento de novos fármacos (LEWIS, 2005), destacando-se, entre estes, os alcalóides que são um vasto grupo de metabólitos secundários, possuindo diferentes formas comparáveis às dos terpenóides. Representam cerca de 20% das substâncias naturais e são extremamente importantes nas áreas da indústria química e farmacêutica (BRUNETON, 1993).

1.2 ALCALÓIDES

Alcalóides ocorrem em muitas plantas e possuem uma longa e importante história na medicina tradicional (ROBERTS e STRACK, 1999). O uso de extratos de plantas contendo alcalóides como poções, remédios e venenos, acontece desde o início da civilização. Cerca de 13000 plantas são conhecidas por terem sido usadas como drogas e aproximadamente 25% dos remédios contemporâneos são derivados de metabólitos de diversas classes, isolados e purificados de plantas, tais como o alcalóide morfina, um analgésico narcótico, os agentes quimioterapêuticos vincristina e vimblastina, a quinina e o taxol (Fig.2) (KUTCHAN, 1995; BOLZANI, 2000).

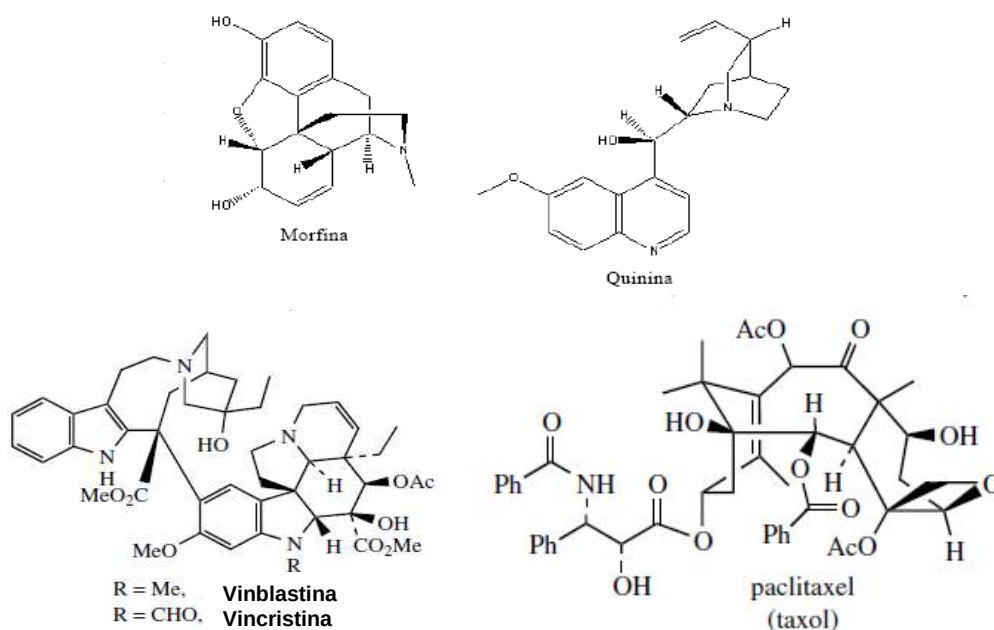


Figura 2: Algumas estruturas de alcalóides isolados de plantas de interesse da indústria farmacêutica.

O termo alcalóide é derivado da palavra árabe “al-qali”, denominação vulgar da planta da qual a soda (que tem propriedades alcalinas) foi originalmente obtida. Alcalóides possuem variadas definições e são majoritariamente compostos orgânicos nitrogenados, de baixo peso molecular, geralmente com estrutura heterocíclica (MEMELINK, *et al.*, 2001).

Embora sendo classificados como metabólitos secundários, eles apresentam papel relevante para a existência dos vegetais. Várias são as funções dos alcalóides nas plantas, principalmente na proteção contra estresses ambientais. Alguns alcalóides protegem a planta contra a radiação UV, devido ao fato de que, sua maior parte, ser composta com núcleos aromáticos altamente absorventes desta radiação (JANSEN *et al.*, 1998), e estão envolvidos nos mecanismos de defesa, podendo atuar em resposta a herbivoria e ataques patogênicos (WITTSTOCK e GERSHENZON, 2002).

Cerca de 2.000 alcalóides conhecidos são do tipo indólicos, ou seja, possuem um anel indólico em sua estrutura, uma versátil estrutura heterocíclica descoberta em 1866, e encontrada em um considerável número de produtos medicinais derivados de plantas (WILLIAMS, 2001).

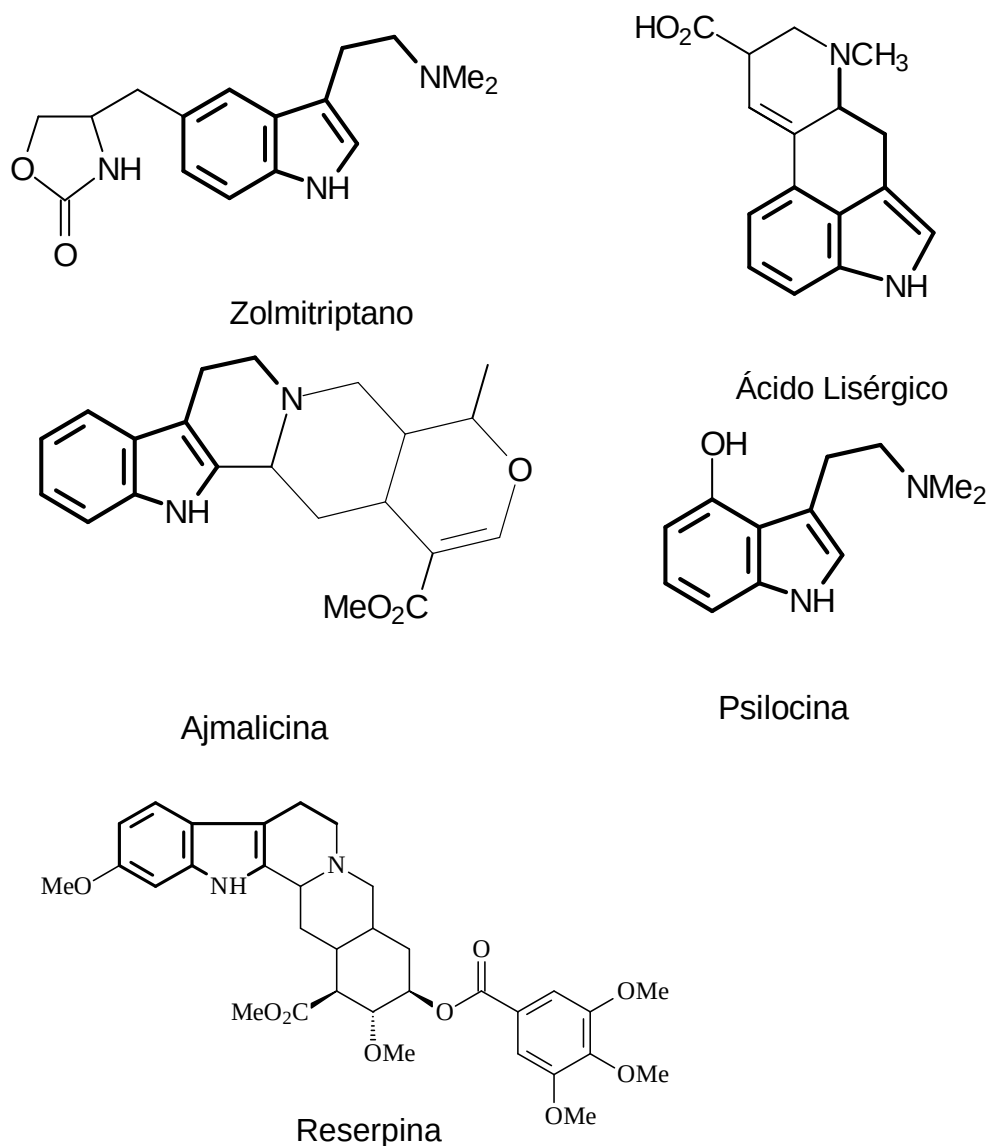


Figura 3: Estruturas de alguns alcalóides indólicos (grupo indol-C₂N em destaque).

Esta classe de compostos pode ser subdividida em dois grupos: um grupo maior conhecido como alcalóides indólicos monoterpênicos e outro com os demais alcalóides indólicos (SCHRIPSEMA *et al.*, 2001).

A condensação do iridóide secologanina (**a**) com um aminoácido, ou sua amina correspondente, gera uma variedade de alcalóides (Fig. 4). Na família Rubiaceae encontra-se alcalóides originados da condensação da secologanina com:

- tiramina (**b**) produzindo alcalóides isoquinolínicos do tipo emetina (**c**);

- L-triptofano (**d**), formando alcalóides indol-carboxílicos como a carboxi-corinantina (**e**);

- triptamina (Fig.5), formando alcalóides indol-monoterpênicos (BOTH, 2005).

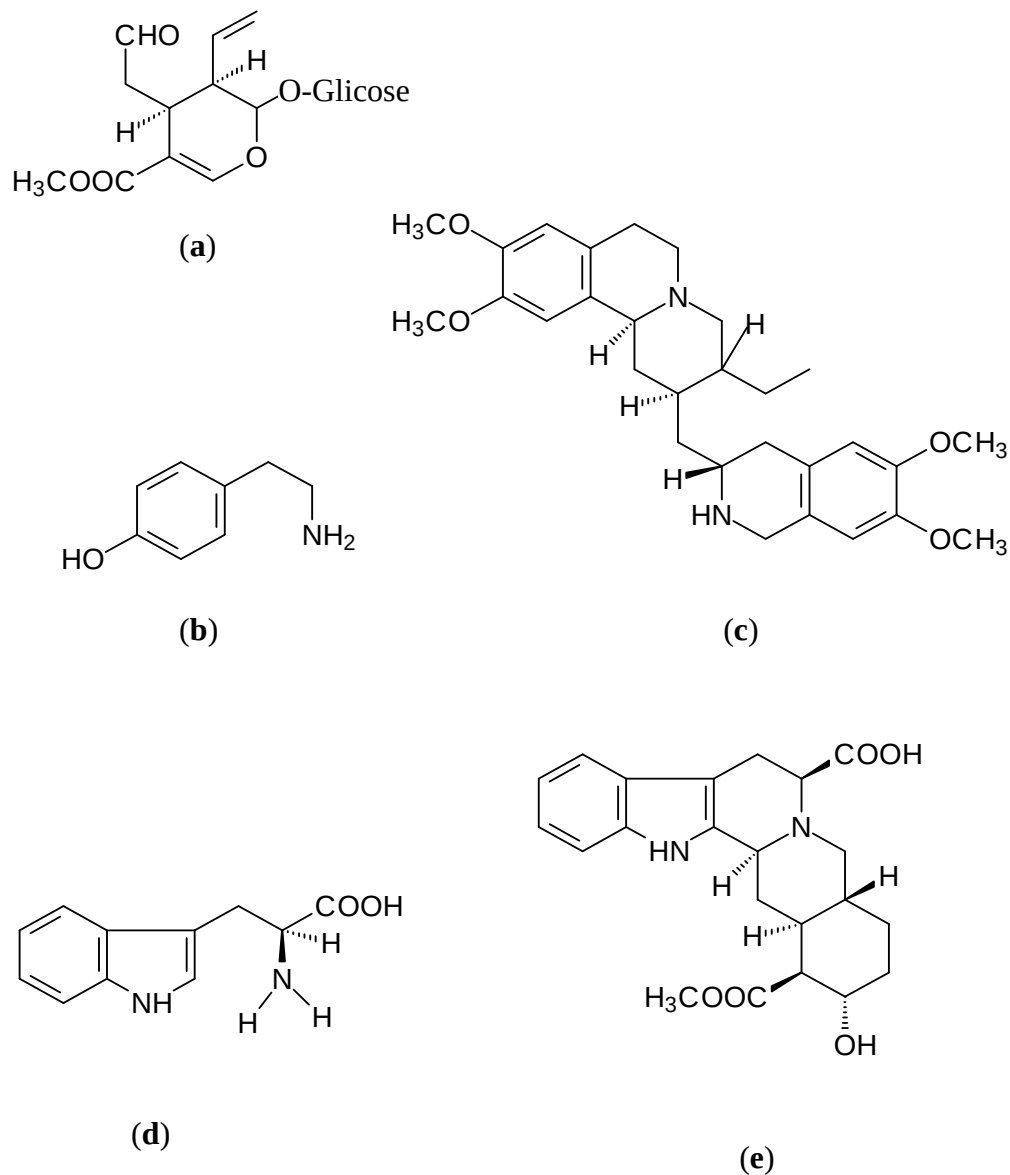


FIGURA 4: Estruturas de alcalóides formados a partir da condensação do iridóide secologanina com a amina correspondente.

A principal característica dos alcalóides indol-monoterpênicos é sua origem biossintética comum. Todos os compostos conhecidos provêm de um precursor único: a strictosidina produzida pela condensação de uma

molécula de triptamina (fig.5) com a secologanina, elaborada via geraniol, a partir das moléculas do ácido mevalônico (BRUNETON, 1991).

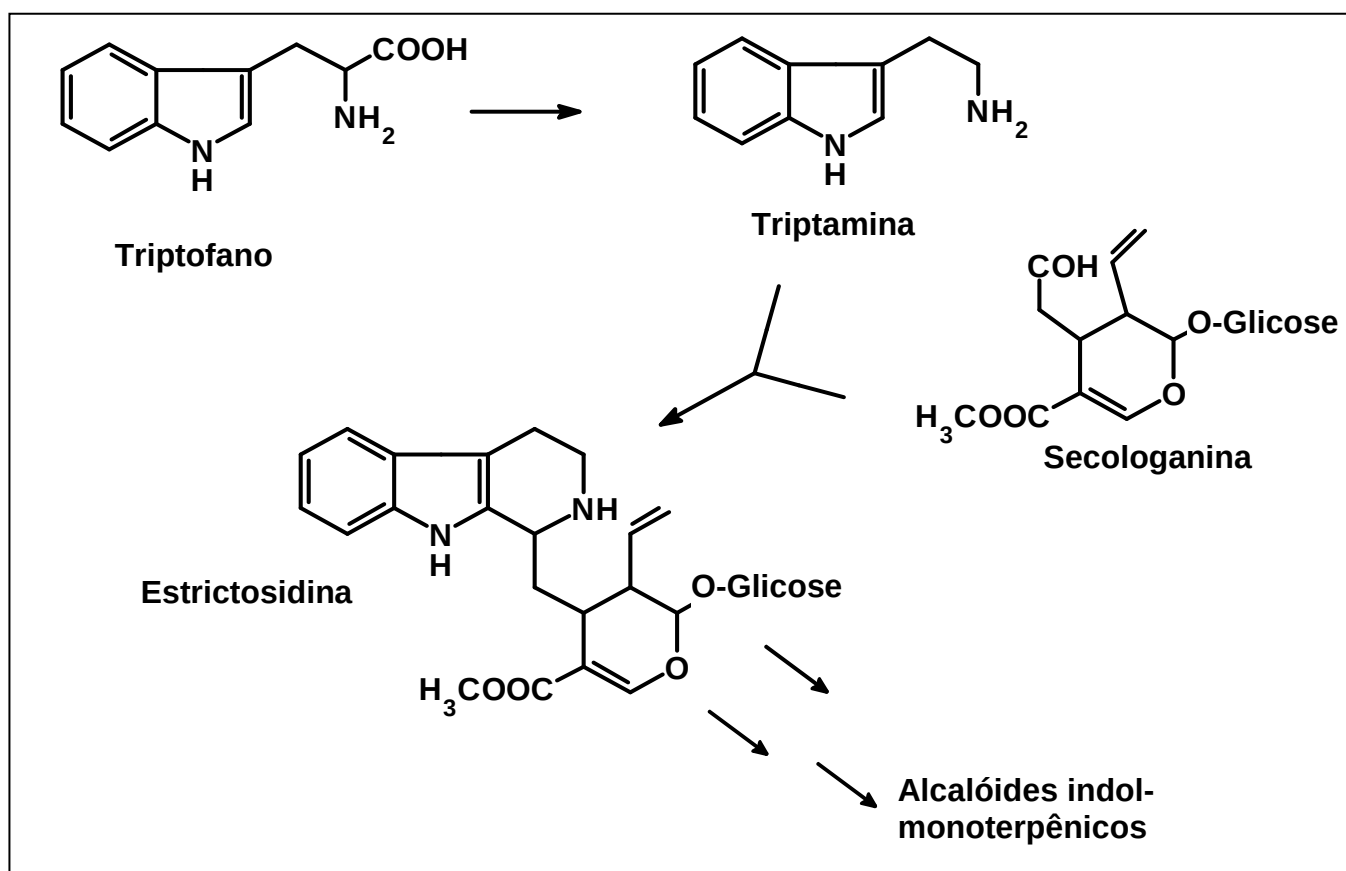


Figura 5: Rota biossintética que dá origem aos alcalóides indol-monoterpênicos (DEWICK, 1997).

O grupo de alcalóides derivados do triptofano começou a ser estudado, com mais atenção, a partir do isolamento da reserpina (Fig. 3), um composto anti-hipertensivo e tranquilizante, de *Rauwolfia serpentina* Benth. (Apocinaceae) e pelas propriedades antitumorais de alcalóides isolados de *C. roseus* (fig. 2) (BRUNETON, 1991).

1.3 FAMÍLIA RUBIACEAE

Dentre as Angiospermas, segundo Robbers *et al.* (1996) os táxons Apocynaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Berberidaceae são conhecidos pela presença de grande número de espécies produtoras de alcalóides.

A família Rubiaceae possui, aproximadamente, 650 gêneros e cerca de 13.000 espécies, sendo representada por árvores, arbustos e ervas, com distribuição geográfica concentrada em regiões mais quentes, principalmente nos trópicos. Na América do Sul, encontra-se 30% do total das espécies da família, o que supera em número de espécies todas as regiões da Terra, estando, em seguida, respectivamente à região sul da Ásia, o continente africano e o Pacífico. No Brasil, as rubiáceas são representadas por aproximadamente 2.000 espécies distribuídas em 110 gêneros (DELPRETE, 1998 e 2004).

A família subdivide-se em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae, correspondente a cerca de 50 tribos (BREMER *et al.*, 1995; ROVA *et al.*, 2002). Estudos de levantamento bibliográfico, quanto à distribuição de classes destes compostos em termos das subfamílias, mostram que a subfamília Rubioideae é caracterizada pela segunda maior concentração de alcalóides (fig.6) (DELPRETE, *et al.* 2006).

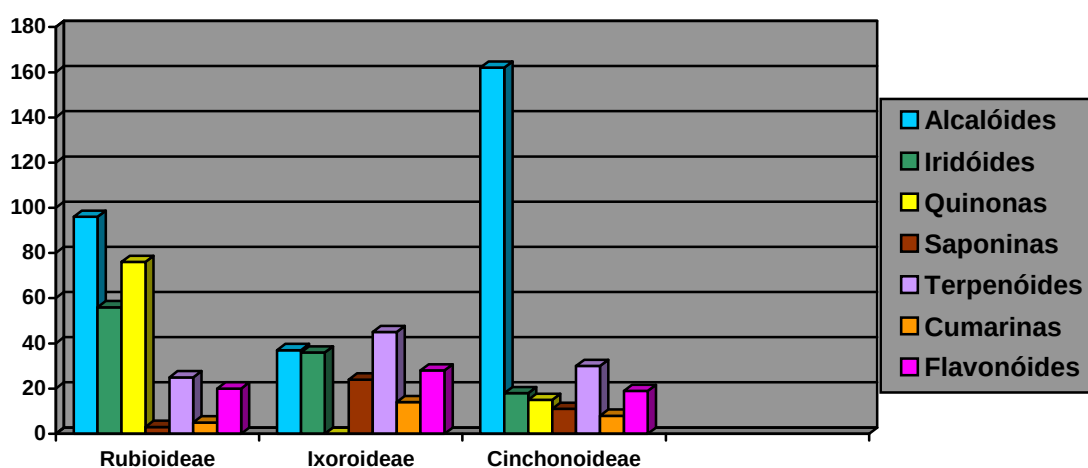


Figura 6: Distribuição dos principais metabólitos secundários nas três subfamílias da família Rubiaceae.

1.4 GÊNERO *PSYCHOTRIA*

A subfamília Rubioideae é distribuída em 15 tribos, sendo que a Psychotrieae é a maior delas, com aproximadamente 50 gêneros e ampla distribuição em toda a zona tropical (LIBOT *et al.*, 1987). Pertencente à tribo Psychotrieae, o gênero *Psychotria* engloba cerca de 1.650 espécies a maioria de hábito arbustivo, embora árvores, ervas, lianas e epífitas sejam também conhecidas (NEPOKROEFF *et al.*, 1999).

O gênero *Psychotria* possui complexa taxonomia devido às dificuldades de delimitações de suas fronteiras. A classificação do gênero é motivo de controvérsias entre autores por apresentar grandes similaridades com *Palicourea* e *Cephaelis*. Inúmeros estudos buscam características adequadas para auxiliar na separação entre as espécies incluídas nesses gêneros, já que são morfologicamente muito semelhantes (FARIAS, 2006). A quimiotaxonomia é uma área de estudo que auxilia na classificação tendo por base as classes dos constituintes químicos isolados. Com isso, o conhecimento das rotas metabólicas de marcadores quimiotaxonômicos torna-se ferramenta importante para a diferenciação das espécies.

O gênero *Cephaelis* produz alcalóides isoquinolínicos, especialmente os tetraidroisoquinolínicos-monoterpênicos, cujo aminoácido de origem é a tirosina (BOTH, 2005, FARIAS, 2006).

Já, em *Palicourea*, foi relatada a presença de alcalóides polindólicos, isolados em *P. fendleri* Standl., *P. domingensis* Jacq. (KERBER, 1999). Estudo químico realizado por nosso grupo de pesquisa de duas espécies *P. coriacea*, “douradinha”, e *P. rigida*, “douradão”, ambas encontradas no cerrado goiano, revelou a presença de alcalóides indól-monoterpênicos e quinolínicos (VENCATO, *et.al.*, 2004; LIÃO, *et.al.*, 2006). Alcalóides derivados da strictosidina também foram isolados em *Palicourea marcgravii* Muell. Arg. e *Palicourea alpina* Sw. (KERBER, 1999).

O gênero *Psychotria* também pode ser dividido em três subgêneros baseados em características morfológicas e distribuição geográfica: *Psychotria* (pantropical), *Heteropsychotria* (inclui as espécies de *Psychotria* neotropicais) e *Tetramerae* (inclui espécies da África e

Madagascar), os quais têm sido combinados, pois a diferenciação das numerosas espécies é complexa (BOTH, 2005; FARIAS, 2006).

Este gênero é caracterizado pela presença de alcalóides cujo aminoácido de origem é o triptofano, sendo estes, na maior parte, indol não iridídicos (monoterpênicos), com destaque para os polindólicos, os derivados triptamínicos e β -carbolínicos. No entanto, alcalóides indol-monoterpênicos foram isolados de espécies do subgênero *Heteropsychotria*. Os alcalóides indólicos-monoterpênicos isolados em espécies do gênero têm importância biogenética e taxonômica por serem úteis como marcadores quimiotaxonômicos (BOTH, 2005; KERBER, 2008).

A presença de alcalóides indol-monoterpênicos em espécies de *Psychotria* sugere que esta classe possa ser característica das espécies do sub-genêro *hetereopsychotria*, aproximando-se, ainda mais, ao gênero *Palicourea* (KERBER, 2008).

Espécies de *Psychotria* coletadas, no sul do Brasil, mostram a presença de alcalóides indol-monoterpênicos que possuem rota metabólica típica de *Psychotria* de regiões neotropicais, enquanto alcalóides polindólicos são encontrados em *Psychotria* de regiões pantropicais (KONRATH, 2009).

Estudos com o isolamento de alcalóides em outras espécies ajudarão a diferenciar e classificar, taxonomicamente, contribuindo na decisão de fusão ou separação destes gêneros.

As pesquisas etnofarmacológicas abrangem 10% das espécies de *Psychotria* conhecidas e foram realizadas com plantas de diferentes origens geográficas, mostrando que elas são utilizadas, na medicina tradicional, para uma grande variedade de indicações terapêuticas (ADJIBADÉ, 1989; LEAL; ELISABETSKY, 1996, LAGIS *et al.*, 1993; PERRY, 1980). Os mais frequentes usos internos referem-se a afecções do aparelho reprodutor feminino, além do emprego auxiliar no pré- e pós-parto, doenças dos brônquios e distúrbios gastrointestinais. Quanto ao uso externo, é relatada a utilização em afecções cutâneas, “tumores”, úlceras, distúrbios oculares, como cataplasmas e banhos no tratamento de febre e em casos de dores de cabeça e dores de ouvido.

Investigações fitoquímicas do gênero levaram à identificação de vários alcalóides com ampla variedade de atividades farmacológicas, tais como analgésicas, antidepressivas e antiinflamatórias (AMADOR *et al.*, 2001; LEAL e ELISABETSKY 1996).

No Brasil, a pesquisa desse gênero foi motivada principalmente pelo uso de duas espécies, *P. viridis* e *P. carthagenensis*, junto com o decocto de *Banisteriopsis caapi*, na preparação da “ayahuasca”, uma bebida alucinógena utilizada para fins religiosos e medicinais pelos caboclos da Amazônia (MCKENNA *et al.*, 1984; LIWSYZ *et al.*, 1992); De *P. viridis* isolou-se o alcalóide N,N-dimetiltriptamina (I) que possui semelhança estrutural com a serotonina (fig. 7), que o torna uma droga potente no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central (SÉRPICO e CAMURÇA, 2001).

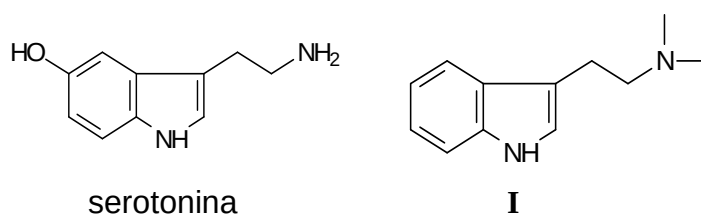


Figura 7: Estruturas da serotonina e N, N-dimetiltriptamina.

De *P. umbelata* isolou-se a umbelatina ou psicolatina (II) (fig. 8) que apresenta atividade ansiolítica e anticonvulsivante (BOTH, 2006). Dos estudos com *P. myriantha* Mull. Arg. foram isoladas as myrianthoisinas A (III) e B (IV) e o ácido strictosidínico (V).

Da espécie *P. brachyceras* isolou brachycerina (VI), e em *P. leiocarpa* foram encontrados o alcalóide N,β-d-Glucopiranosila vincosamida (VII) e os iridóides asperulosideo (VIII) e deacetilasperulosideo (IX). Lialosídeo (X) e strictosamida (XI) foram isolados de *P. suterella* (HENRIQUES, 2004; SANTOS, 2001; KERBER, 2001). A investigação fitoquímica de *P. nuda* resultou, também, no isolamento da strictosamida (KONRATH, 2009).

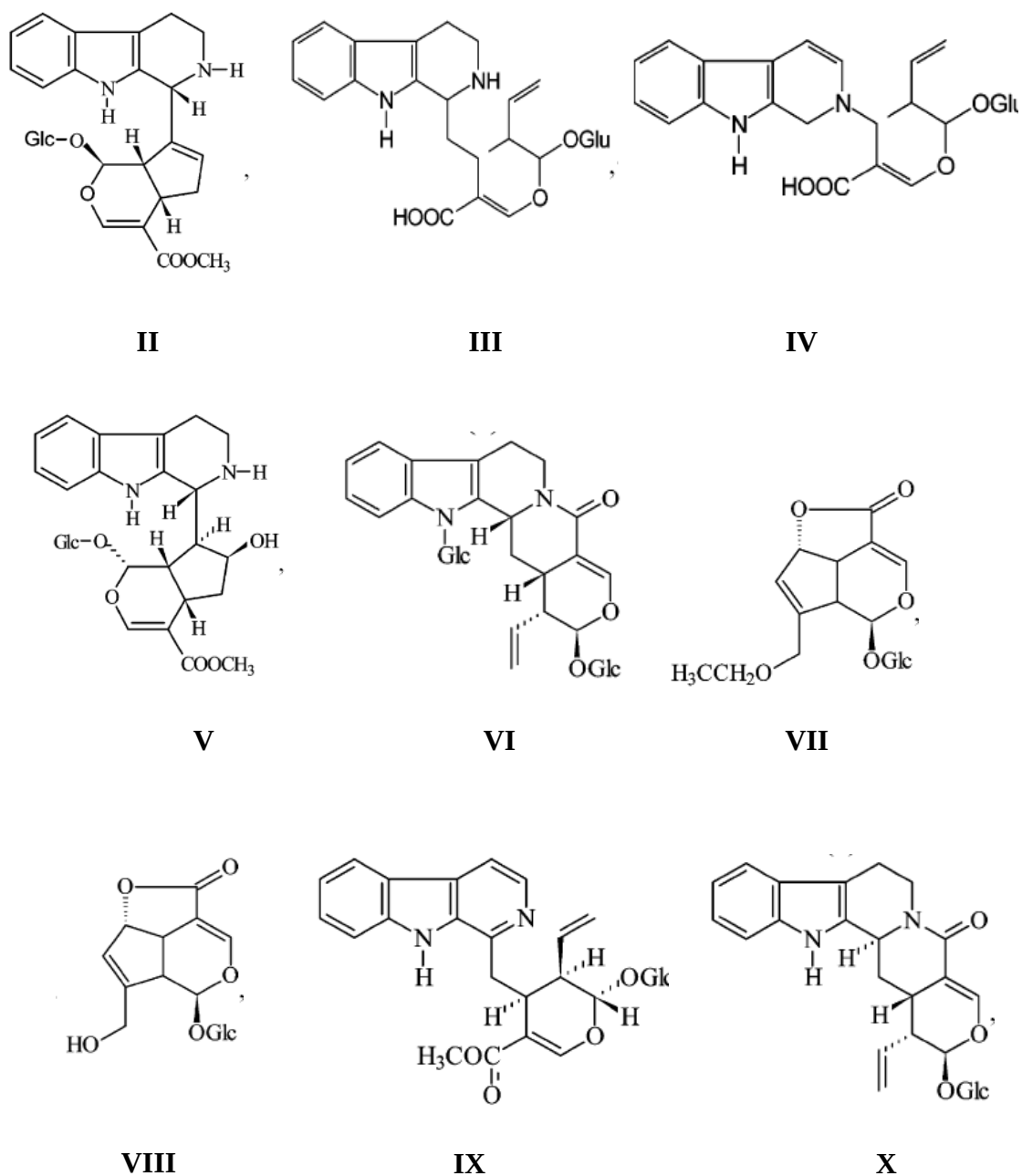


Figura 8: Estruturas de alcalóides e iridóides isolados de *Psychotria*.

Além da presença de alcalóides e outras substâncias bioativas no gênero *Psychotria* que despertam grande interesse, recentemente trabalho publicado por pesquisadores do NCI (CRAGG *et al.*, 2006) sobre ensaios com um número significativo de extratos de plantas apontou o gênero *Palicourea* e *Psychotria* como “hot” gênero, referindo-se ao potencial citotóxico de seus extratos e frações.

1.5 *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm

A espécie é representada por arbustos e é encontrada em estratos vegetais tipo cerrado, onde, geralmente, possui sombra e solo úmido.

A espécie é classificada da seguinte forma:

Taxonomia:

- Reino Plantae
 - Superdivisão Spermatophyta
 - Divisão Magnoliophyta
 - Classe Magnoliopsida
 - Subclasse Asteridae
 - Ordem Rubiales
 - Família Rubiaceae
 - Gênero *Psychotria*
 - Espécie *P. prunifolia*



Figura 9: Exemplar de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm.

Essa espécie ocorre nos estados de Goiás e Tocantins, e não possui estudos fitoquímicos descritos na literatura científica.

1.6 Atividade Biológica

Uma planta medicinal pode ser definida como qualquer vegetal produtor de drogas ou de substâncias biologicamente ativas utilizadas direta ou indiretamente como medicamento. Os compostos químicos ou grupos de compostos químicos que constituem os princípios biologicamente ativos das drogas são, em geral, produtos ou subprodutos do metabolismo secundário das plantas que os produzem e os constituem respostas dos mecanismos da interação planta ambiente (PIRES e GRIPP, 1988).

Um grande número de medicamentos atualmente comercializados teve origem no uso popular ou nas práticas tradicionais que tiveram atividade medicinal comprovada (UNANDER, *et al.* 1994).

Porém, ainda é grande o desconhecimento sob o ponto de vista científico das plantas existentes no planeta, onde de 250 a 500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas, fitoquimicamente, e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, são um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, por causa da presença de compostos de classes ou estruturas diferentes, contribuindo, assim, para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais, é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Por isso, os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (MACIEL, 2002).

Os bioensaios podem envolver organismos inferiores (microorganismos e microcrustáceos, entre outros), ensaios bioquímicos, visando pontos moleculares (enzimas e receptores) e cultura de células animais ou humanas. Contudo, o teste adequado dependerá da doença-alvo (MACIEL, 2002).

1.6.1 Bioensaios:

Bioautografia

É uma técnica usada para varredura de atividade antibacteriana. O método comum baseia-se na técnica por comparação ao diâmetro do halo inibitório do padrão clorofenicol, em placa de agar, frente ao microorganismo testado. Os resultados obtidos são qualitativos. Dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitofármacos, avaliada frente a microorganismos sensíveis e resistentes a antibióticos são relevantes, permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados. (CORDEIRO, *et. al.*, 2006; NASCIMENTO *et.al.*2000)

Atividade antioxidante

Antioxidantes são compostos que atuam inibindo e /ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos antioxidantes. São importantes, porque com o combate aos processos oxidativos, tem-se menores danos ao DNA e às macromoléculas, amenizando, assim, os danos cumulativos que podem desencadear doenças como o câncer, cardiopatias e cataratas (MAIA, 2007 *apud* SANTOS, 2008). Vários são os métodos usados para obter a diferenciação, seja de forma qualitativa ou quantitativa, da atividade antioxidante de compostos, o mais comum é o teste colorimétrico que mede a habilidade de compostos orgânicos em reduzir o radical livre de fenilpicrihidrazila (DPPH).

Atividade *in vitro* sobre dermatófitos

Dermatofitoses são infecções causadas por fungos denominados dermatófitos, que envolvem as camadas superficiais da pele, pelo e unhas. Os dermatófitos são capazes de utilizar a queratina existente nestes locais produzindo lesões que variam de brandas a graves. (FERNANDES *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002). Para o tratamento dessas infecções, podem ser

utilizados antifúngicos tópicos ou sistêmicos, sendo que os medicamentos de via oral a exemplo dos derivados azólicos: cetoconazol, econazol e miconazol são os mais eficazes. Tais fungicidas podem ser aplicados, diariamente, permanecendo por períodos prolongados na superfície da pele (WEINSTEIN e BERMAN, 2002). Esses fármacos, entretanto, podem apresentar efeitos adversos como alterações gastrintestinais e cefaléia. A busca de novas substâncias que possam atuar como antifúngico é de notável necessidade. Novas moléculas que apresentem bom poder fungicida e menos efeitos colaterais têm sido encontradas em vegetais. Estudos, com extratos de plantas, podem representar uma nova estratégia, para sair dos meios convencionais de tratamento (LUCENA, *et. al.*, 2007).

Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A neoplasia, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2006), é um conjunto com mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem órgãos e tecidos, podendo se espalhar por todo o corpo (metástase). A busca por soluções ou meios de converter os quadros de morbidade e mortalidade causados pelas neoplasias são de extrema importância. Dessa forma, estudos com esse enfoque baseiam-se em experimentos com novos compostos antineoplásicos de origem orgânica e inorgânica (PEREIRA, *et. al.*, 2006).

A atividade citotóxica das drogas pode ser estabelecida em cultura de células tumorais de várias linhagens através de métodos semelhantes a inibição do metabolismo celular, sendo comum o uso da técnica que se baseia na medida do dano induzido pela droga no metabolismo celular de glicídeos usualmente no decorrer da atividade de desidrogenases (método MTT) (MACIEL, *et.al.*, 2002).

Neste trabalho foi utilizado também o teste de exclusão com o azul de Trypan, que é um corante que só penetra nas células mortas, cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma onde percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (WALUM, 1990 *apud* FRÖHNER, 2003).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

O estudo de *Psychotria prunifolia* visa contribuir para o conhecimento químico e biológico dessa espécie presente no Cerrado goiano. Especificamente foram traçados os seguintes objetivos:

- Estudar quimicamente *Psychotria prunifolia* visando o isolamento, a elucidação estrutural e a identificação dos metabólitos especiais presentes nas suas folhas;
- Avaliar o potencial biológico da espécie através de bioensaios que julguem a atividade antibiótica, antioxidante, antifúngica e citotóxica dos extratos e frações obtidas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1-MATERIAL E MÉTODOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO FITOQUÍMICO.

O material coletado foi seco em estufa de ventilação forçada e moído em moinho de facas. Para eliminação dos solventes utilizou-se evaporador rotativo, modelo MA 120 da marca MARCONI.

As cromatografias em coluna(CC) foram feitas utilizando-se sílica gel 60 [0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM)] da Merck, e SEPHADEX LH-20, em colunas de vidro cujo diâmetro e altura variaram conforme a massa dos extratos. O acompanhamento das colunas foi feito através de cromatografia em camada delgada(CCD).

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) e camada delgada preparativa (CCDP) empregou-se placas de alumínio (sílica gel 60 F₂₅₄-Merck), ou placas de vidro. As placas de vidro para CCD e CCDP foram confeccionadas com camada de sílica gel 60 Pf₂₅₄₊₃₆₅- Merck de 0,25 mm e 1,00 mm de espessura respectivamente. As placas para CCD em suporte de vidro foram de dimensões de 3x10 e 5x10 cm, e para CCDP de 10x20 cm.

Os solventes utilizados na CC, CCDP, CCD e recristalizações apresentavam grau de pureza P.A.

As técnicas unidimensionais de RMN empregadas para elucidação estrutural das substâncias obtidas foram RMN ¹H, RMN ¹³C e DEPT e as técnicas bidimensionais utilizadas foram COSY, HMQC, HMBC e NOESY. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Varian, Gemini 2000 BB, 300 MHz (300,6 MHz para ¹H e 75,4 MHz para ¹³C). Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como padrão de referência interna o TMS (δ 0,0). Os solventes deuterados utilizados para diluição das amostras foram CDCl₃, CD₃OD.

Como agentes reveladores para CCD e CCDP foram empregados:

- Luz UV (254 e 365 nm);
- Reagente de Dragendorff: Reagente específico para alcalóides e compostos nitrogenados. Resposta positiva: Coloração alaranjada.

Preparo: 85g de subnitrato de bismuto, 10 mL de ácido acético glacial, 40 mL de água destilada (Solução A); 8,0 g de iodeto de potássio, 20 mL de água destilada (Solução B). As soluções A e B foram misturadas, sendo 20 mL desta solução diluídos com 60 mL de água destilada e 20 mL de ácido acético glacial (UGAZ, 1988)

Aplicação: pulverização.

- MeOH/H₂SO₄ (1:1 v/v), seguido de aquecimento até carbonização.
- Anisaldeído/H₂SO₄: Reagente específico para terpenóides e açúcares. Resposta positiva: coloração roxa e outras.

Preparo: Solução recém preparada de 0,5 mL de anisaldeído, 50 mL de CH₃CO₂H glacial, 1 mL de H₂SO_{4(conc)} (UGAZ, 1988).

Aplicação: pulverização seguida de aquecimento.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em equipamento FTIR BOMEM, modelo MB-100, em filme com acetona destilada, utilizando celas de NaCl.

A análise de rotação óptica foi realizada em polarímetro 343, Perkin Elmer com diâmetro da cubeta igual a 10 mm e temperatura de 20°C. O experimento foi realizado no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

3.2- COLETA.

O material vegetal foi coletado e identificado sob a supervisão do botânico Dr. Piero G. Delprete. Foram realizadas duas coletas, em novembro/2006 e setembro/2007, no bosque *St. Hilaire* da UFG, Goiânia/GO.



FIGURA 9.1: *Psychotria prunifolia*.

3.3- EXTRAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.

Material vegetal coletado em novembro de 2006:

As folhas (282,61 g) de *P. prunifolia* coletadas em novembro/2006 foram secas, moídas e submetidas à percolação com etanol à temperatura ambiente. A evaporação do solvente em evaporador rotativo resultou em 33,1g de extrato etanólico bruto que foi solubilizado em 250 mL de MeOH/H₂O (1:1). A solução hidrometanólica (EHM) foi particionada com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade (fig. 10). A fração hidrometanólica remanescente foi liofilizada e armazenada.

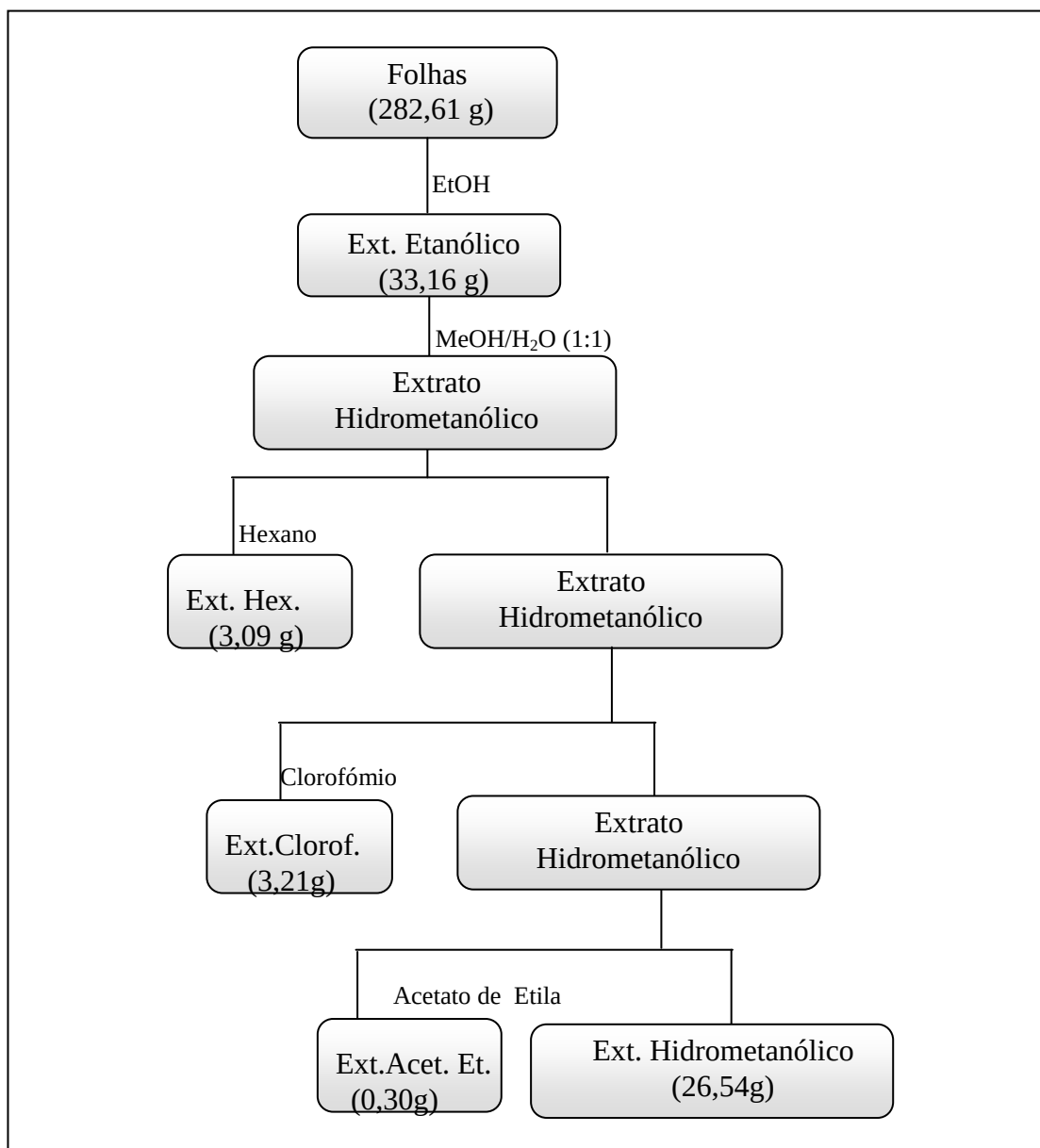


FIGURA 10: Esquema do fracionamento com solventes orgânicos das folhas de *P. prunifolia*.

Extrato Clorofórmico

O extrato clorofórmico (1g) foi submetido à CC em sílica gel 60 tendo como eluente misturas que variaram de CHCl₃ 100% à CHCl₃/MeOH/NH₄OH (20:75:5) fornecendo 515 frações (Tabela 1).

Tabela 1: Frações da coluna cromatográfica do extrato clorofórmico.

Frações	Eluente	Proporção
1-57	CHCl ₃	100
58-78	CHCl ₃ /MeOH	99:1
79-175	CHCl ₃ /MeOH	98:2
176-219	CHCl ₃ /MeOH	97:3
220-294	CHCl ₃ /MeOH	96:4
295-315	CHCl ₃ /MeOH	95:5
316-361	CHCl ₃ /MeOH	94:6
362-396	CHCl ₃ /MeOH	93:7
397-430	CHCl ₃ /MeOH	90:10
431-439	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	89:10:1
440-474	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	84:15:1
475-484	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	83,5:15:1,5
485-499	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	78,5:20:1,5
500-507	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	73,5:25:1,5
508-511	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	68,5:30:1,5
512-515	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH	63:35:2 a 20:75:5

Volume médio das frações: 10mL

Todas as frações foram analisadas por CCD e reunidas segundo as semelhanças do perfil cromatográfico (tabela 2).

Tabela 2: Frações reunidas por análise de CCD e respectivas massas.

Mistura	Fração	Massa(g)	Mistura	Fração	Massa(g)
1	1-3	0,0034	28	187-189	0,0031
2	4-10	0,0213	29	190-224	0,0175
3	11-13	0,0138	30	225-229	0,0163
4	14-17	0,0031	31	230-244	0,0083
5	18-21	0,0021	32	245-249	0,0046
6	22-24	0,0011	33	250-252	0,0080
7	25-28	0,0034	34	253-256	0,0133
8	29-31	0,0038	35	257-269	0,0269
9	32-42	0,0079	36	270-283	0,0471
10	43-57	0,0030	37	284-306	0,0546
11	58-63	0,0022	38	307-318	0,0200
12	64-69	0,0031	39	319-328	0,0181
13	70-78	0,0001	40	329-337	0,0242
14	79-88	0,0088	41	338-351	0,0126
15	89-92	0,0088	42	352-362	0,0279
16	93-98	0,0068	43	363-391	0,0064
17	99-102	0,0033	44	392-400	0,0385
18	103-106	0,0043	45	401-419	0,0086
19	107-112	0,0034	46	420-422	0,0051
20	113-124	0,0067	47	423-428	0,0411
21	125-132	0,0044	48	429-442	0,0330
22	133-147	0,0075	49	443-450	0,0257
23	148-152	0,0017	50	451-457	0,016
24	153-162	0,0024	51	458-463	0,0305
25	163-174	0,0040	52	464-487	0,0077
26	175-179	0,0018	53	488-494	0,0390
27	180-186	0,0039	54	495-507	0,0058
			55	508-515	0,0033

Massa total das frações: 0,6846 g

A mistura 37 (fração 284-306, 47,1 mg) foi purificada por CCD preparativa em sílica gel 60 resultando em sete outras frações, onde a terceira em ordem crescente de polaridade foi chamada de EPP7 (21,0 mg) e mostrando-se pura por CCD esta foi submetida à análise espectroscópica. As demais frações da coluna apresentaram complexa mistura de compostos.

Material vegetal coletado em setembro de 2007:

As folhas (543,32 g) de *P. prunifolia* coletadas em setembro de 2007 foram secas, moídas e submetidas à percolação a frio com etanol. A evaporação do solvente em evaporador rotativo resultou 55,32g de extrato etanólico bruto que foi submetido ao fracionamento ácido-base (fig.11), que é um procedimento padrão para o isolamento de alcalóides.

O extrato etanólico foi solubilizado em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v), e deixado sob agitação em banho de gelo por 24h. A solução formada foi filtrada em funil de Büchner para a separação dos resíduos formados, fornecendo a solução aquosa ácida 1.

A solução aquosa ácida 1 foi extraída com CHCl_3 fornecendo o extrato clorofórmico ácido.que em seguida foi lavado com solução aquosa de NaCl saturada e seco sob Na_2SO_4 . O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo

A solução aquosa ácida 2 foi neutralizada com NH_4OH e extraída com CHCl_3 , que em seguida foi lavada com solução aquosa de NaCl saturada, e seca sob Na_2SO_4 . O solvente orgânico foi eliminado, fornecendo o extrato clorofórmico neutro e solução aquosa neutra 2.

A solução aquosa neutra 2 teve o pH elevado pela adição de NH_4OH até pH= 8, sendo chamada de solução aquosa básica 1 e extraída com CHCl_3 , que após seco sob Na_2SO_4 e a evaporação do solvente forneceu o extrato clorofórmico básico e solução aquosa básica 2.

A solução aquosa básica 2 foi extraída com AcOEt , que após secagem com Na_2SO_4 e evaporado o solvente, em evaporador rotativo sob pressão reduzida, forneceu o extrato acetato etílico básico. A solução aquosa básica 2 foi liofilizada e armazenada. Os extratos assim obtidos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Extratos obtidos das folhas através do fracionamento ácido base.

Material	Massa(g)
Folhas secas	543,32
Extrato Etanólico	55,32
Resíduos	13,01
Extrato Clorofómico Ácido	0,809
Extrato Clorofómico Neutro	0,866
Extrato Clorofómico Básico	0,184
Extrato Acetato Etílico Básico	1,353

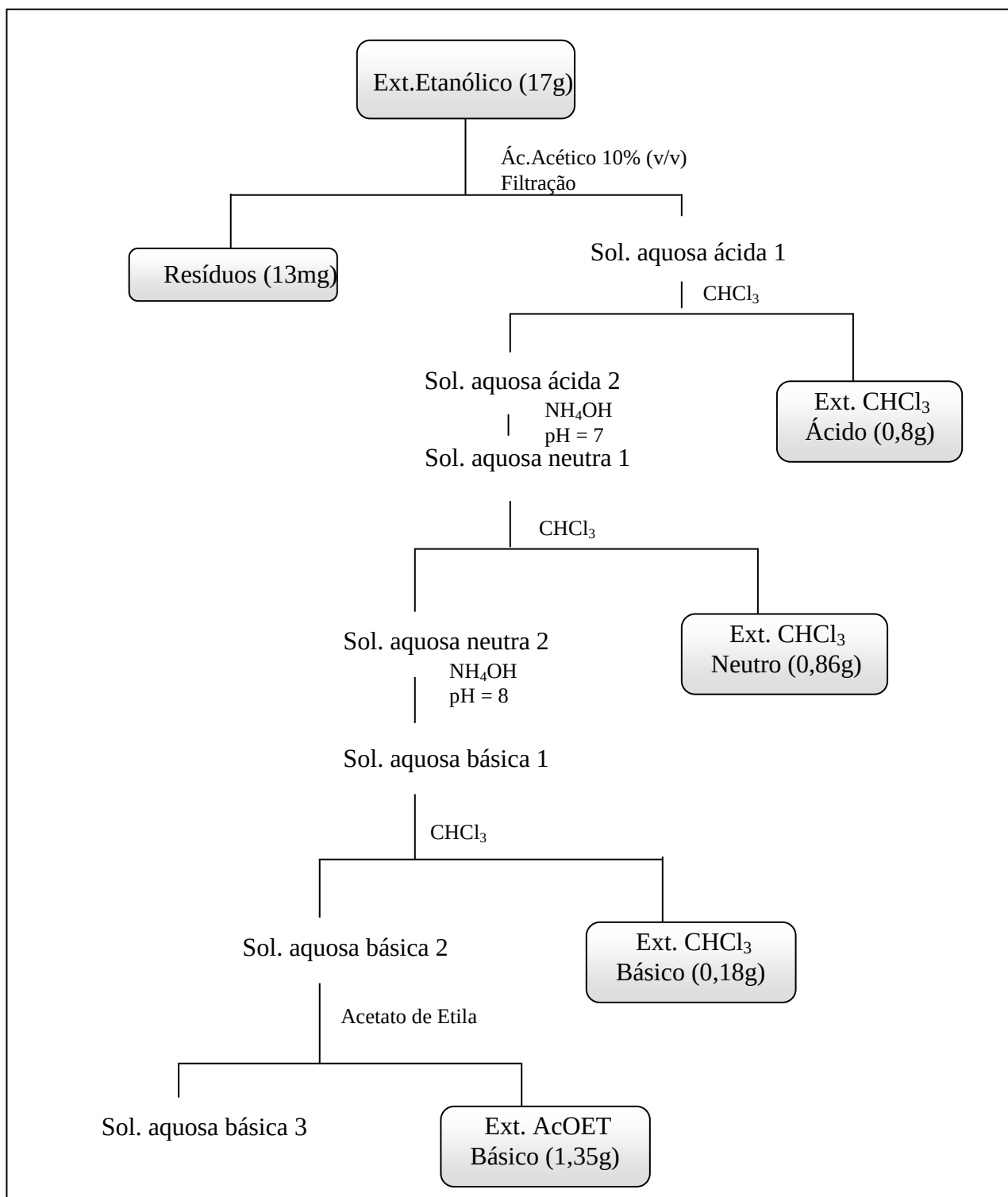


FIGURA 11: Esquema do fracionamento ácido-base do extrato bruto das folhas de *P. prunifolia*.

Extrato clorofórmico ácido:

O extrato clorofórmico ácido (0,5g) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 60, sendo eluído com misturas de diferentes proporções em ordem crescente de polaridade dos solventes: CHCl_3 / CH_3OH / NH_4OH , fornecendo 143 frações.

Tabela 4: Frações reunidas da coluna cromatográfica do extrato clorofórmico ácido.

Frações	Eluente	Proporção
1-7	CHCl_3	
8-11	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	99:1
12-19	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	98:2
20-24	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	96:4
25-31	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	94:6
32-43	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	90:10
44-47	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	88:12
48-69	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	85:15
70-81	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	83:17
82-91	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	79:20:1
92-103	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	67,5:30:2,5
104-108	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	62,5:35:2,5
109-110	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	57,5:40:2,5
111-115	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	52,5:45:2,5
116-119	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	47:50:3
120	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	36:60:4
121-138	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	26:70:4
139-142	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	25:70:5
143	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$	10:83:7

Volume médio das frações: 16mL

As frações foram analisadas por CCD e reunidas segundo as semelhanças do perfil cromatográfico (tabela 5).

Tabela 5: Frações reunidas por semelhanças do perfil cromatográfico.

Mistura	Frações	Massa (g)
1	1-15	0,0040
2	16-18	0,0452
3	19-22	0,0246
4	23-33	0,0824
5	35-38	0,0557
6	39-51	0,0545
7	52-72	0,0159
8	73-82	0,0140
9	83-92	0,0105
10	94-96	0,0072
11	97-99	0,0232
12	100-102	0,0082
13	103-115	0,0122
14	116-121	0,0048
15	122-126	0,0062
16	130-136	0,0150
17	140-143	0,0026

Massa total das frações= 0,3862 g

A mistura 6 (30,8 mg) foi purificada através de CCD preparativa (fig. 12) em sílica gel 60 resultando em mais 4 frações, onde duas dessas, EPP20.2 e EPP20.3, se mostraram puras por CCD sendo então submetidas à análise espectroscópica.

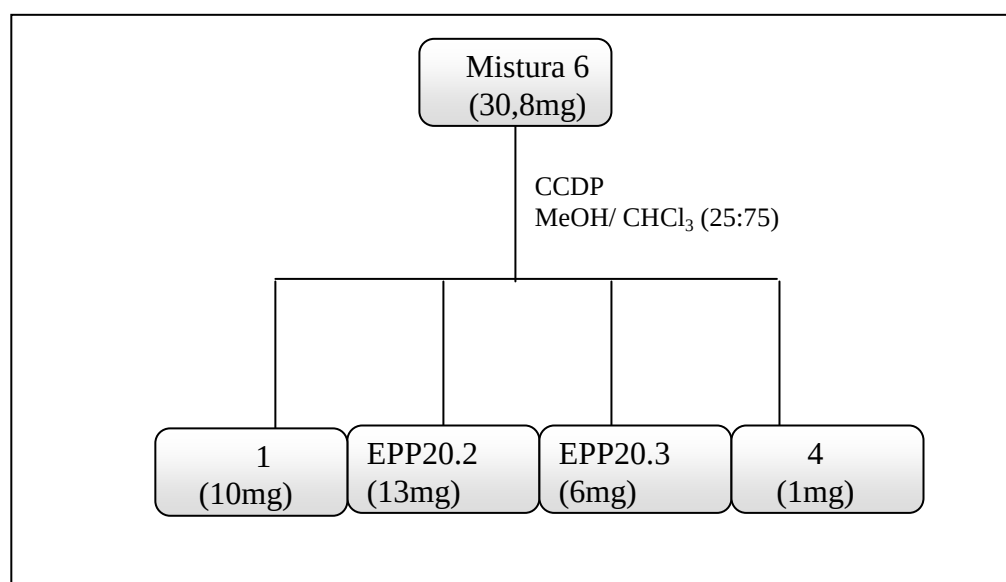


FIGURA 12: Esquema de purificação dos compostos EP20.2 e EPP20.3.

Extrato clorofórmico neutro.

O extrato clorofórmico neutro (0,97g) foi submetido à CC em sílica gel 60 (tabela 6) que resultou em 55 frações. Através de análises por CCD de todas as frações, verificou-se que a fração 37 encontrava-se pura e com resposta positiva para o reagente de Dragendorff, sendo então, encaminhada para análise por RMN. O composto recebeu o código EPP39-37. As demais frações fornecidas através da CC foram reunidas levando-se em consideração as semelhanças do perfil cromatográfico analisado por CCD (tabela 6).

Tabela 6: Frações reunidas da coluna cromatográfica do extrato clorofórmico neutro.

Mistura	Fração	Massa(g)	Eluente
1	1-3	0,0020	CHCl ₃
2	4-7	0,0030	CHCl ₃ /MeOH(95:5)
3	8-9	0,0150	CHCl ₃ /MeOH(1:1)
4	10	0,0230	CHCl ₃ /MeOH(1:1)
5	11	0,0189	CHCl ₃ /MeOH(1:1)
6	12-13	0,2054	CHCl ₃ /MeOH (1:1)
7	14-18	0,1163	CHCl ₃ /MeOH (45:55)
8	19-26	0,1205	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (40:55:5)
9	27-33	0,1177	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (23:70:7)
10	34-36	0,1125	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (23:70:7)
11	37	0,0172	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (23:70:7)
12	38-41	0,0089	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (23:70:7)
13	42-43	0,0036	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (23:70:7)
14	44-56	0,0025	CHCl ₃ /MeOH/NH ₄ OH (23:70:7)

Volume médio das frações: 20mL; Massa total das frações= 0,7665g

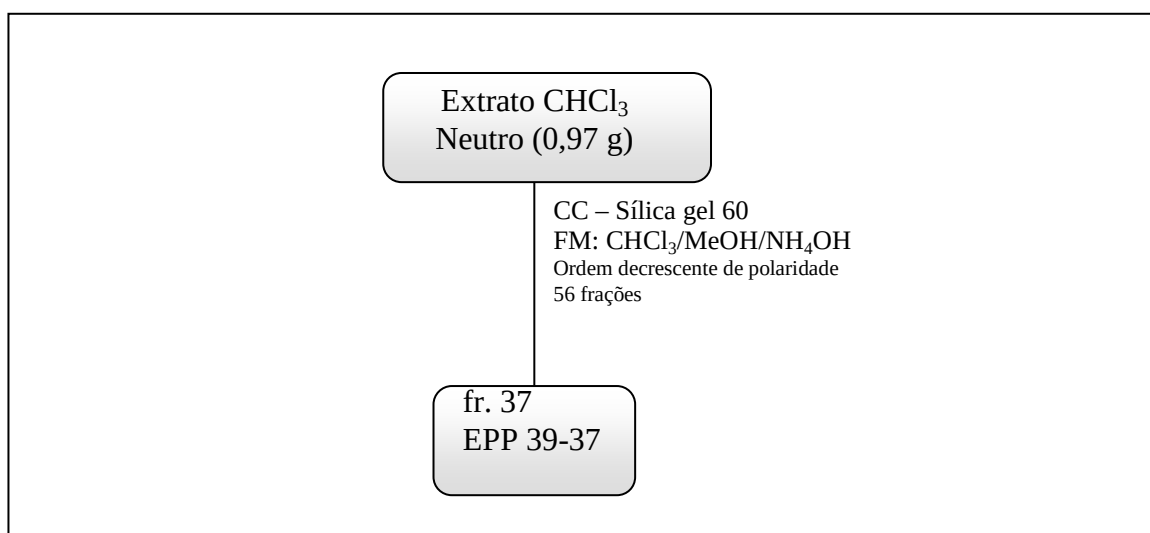


FIGURA 13: Esquema para purificação do extrato clorofórmico neutro.

Extrato clorofórmico básico

Em análise prévia por CCD deste extrato verificou-se a grande semelhança do perfil cromatográfico com o extrato clorofórmico neutro. Preferiu-se assim priorizar o trabalho com outros extratos.

Extrato acetato etílico básico

O extrato acetato etílico básico foi submetido à CC em sílica gel 60, na qual o eluente usado constituiu-se das misturas de CHCl_3 , MeOH e NH_4OH em ordem crescente de polaridade, fornecendo 143 frações (tabela 7).

Tabela 7: Frações resultantes da coluna cromatográfica do extrato acetato etílico básico.

Mistura	Fração	Massa (g)	Eluente
1	2-4	0,0126	Acet. Et/CH ₂ Cl ₂ (1:1) e (8:2)
2	5-8	0,0102	Acet. Etila
3	9-13	0,0014	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (96:4)
4	14-17	0,0058	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (93:7)
5	18-23	0,0167	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (93:7) e (88:12)
6	24-28	0,1887	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (88:12)
7	29-33	0,0543	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (88:12) e (85:15)
8	34-54	0,1206	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (85:15) e (74:25:1)
9	55	0,005	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (68:30:2)
10	56-60	0,0152	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (63:35:2)
11	61-65	0,2235	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (57:40:3)
12	66-72	0,0498	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (52:45:3)
13	73-76	0,0105	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (47:50:3)
14	77-80	0,0064	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (47:50:3)
15	81-87	0,0035	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (36,5:60:3,5)
16	88	0,0029	Acet. Etila/MeOH/NH ₄ OH (26:70:4)

Volume médio das frações: 20mL ; Massa total das frações= 0,7271 g

A mistura 6 (55,6mg) foi purificada por CCD preparativa em sílica gel 60, tendo como fase móvel a mistura AcOEt/MeOH/NH₄OH (77:20:3).

O procedimento forneceu a fração EPP 26.2 pura, que foi separada para análises espectroscópicas, e a fração 3 (26.3) que foi novamente purificada por CCD preparativa (fig. 14) fornecendo o composto EPP27.

A mistura 8 (70 mg) foi purificada por CCD preparativa em sílica gel 60 sendo usada como fase móvel a mistura AcOEt/MeOH/NH₄OH (77:20:3) fornecendo assim o composto EPP28.1 que mostrou-se puro em análises de CCD.

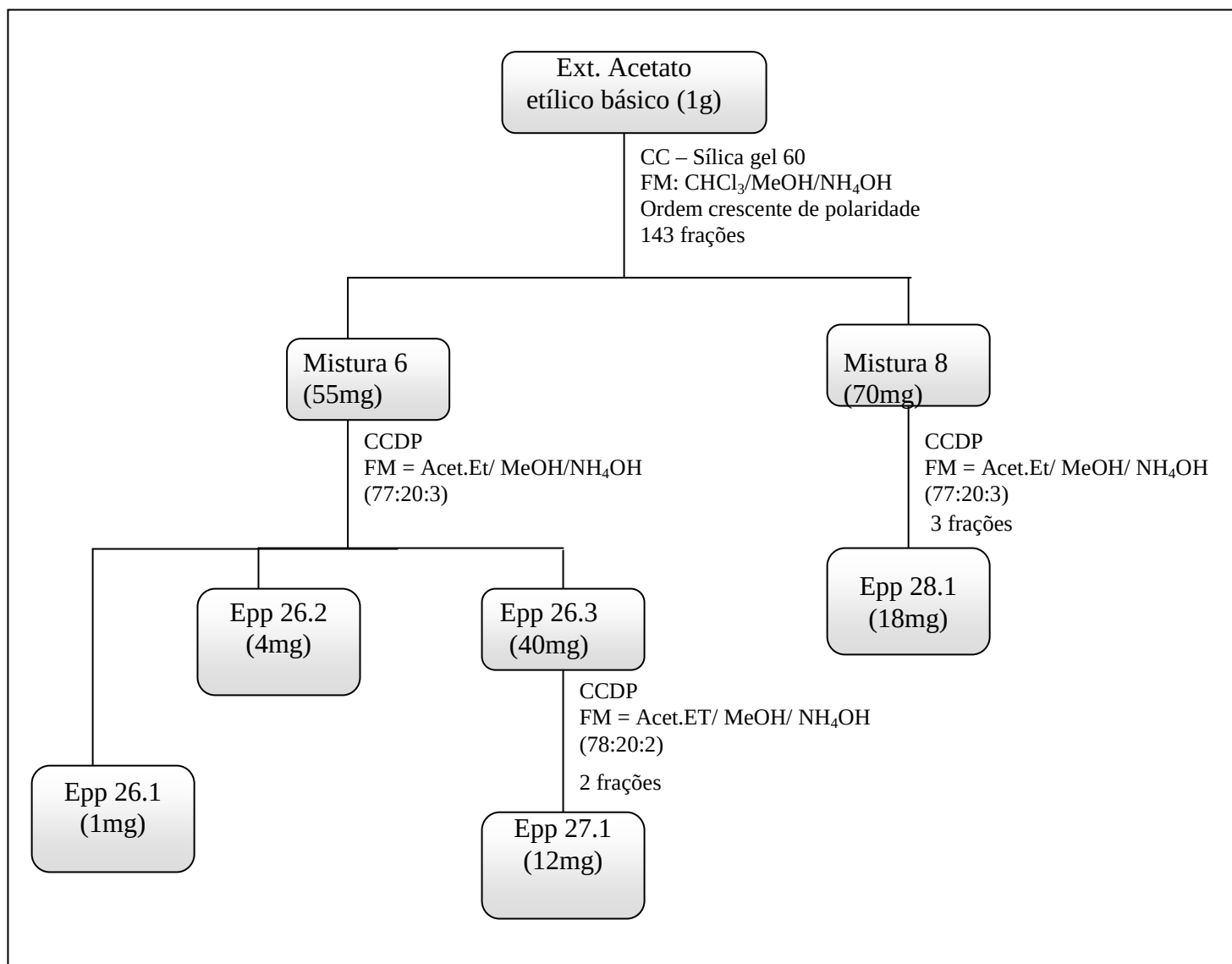


FIGURA 14: Etapas de processos cromatográficos para a purificação de compostos do extrato acetato etílico básico.

3.4 BIOENSAIOS

Bioautografia

O estudo da atividade antibacteriana de *P. prunifolia* foi realizado utilizando as técnicas de bioautografia e CIM dos extratos e frações resultantes da extração etanólica das folhas frente às bactérias *Escherichia coli*, *E. coli* resistente a sulfonamida, *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas) e *Staphylococcus aureus* (gram positiva), tendo como controle o antibiótico clorofenicol. O teste foi realizado para o extrato etanólico bruto das folhas e para os extratos resultantes da partição deste: extrato hexânico (EH), clorofórmico (EC) e acetato etílico (AE); e comparado ao resultado do extrato etanólico do caule (EEC). Os extratos nas concentrações de 1mg/μL, 1,5mg/μL e 3mg/μL e clorofenicol 50g/L (1 μL) foram aplicados em discos e imersos no meio de cultura pré-inoculado em placa Petri de vidro. Após 24hs de incubação em estufa bacteriológica foram verificados e medidos os halos de inibição (tabela 18, pág. 69). O teste foi realizado em triplicata.

Posteriormente, foi realizada a quantificação das atividades pelo método CIM (concentração inibitória mínima) em placa de 96 poços para os extratos hexânico, clorofórmico, que apresentaram maior halo de inibição, frente às bactérias *E. coli* (res.) e *P. aeruginosa* (tabela19).

Os bioensaios foram realizados no laboratório de produtos naturais do Instituto de Química/UFG e supervisionados pela Prof. Dra. Lucilia Kato.

Avaliação da atividade antioxidante.

O extrato etanólico das folhas foi submetido para a avaliação da capacidade antioxidante, ao teste colorimétrico que mede a habilidade de compostos orgânicos em reduzir o radical livre de fenilpicridihidrazila (DPPH). A reação provoca descoloramento da solução de DPPH, que inicialmente apresenta coloração violeta, torna-se amarela. O grau de descoloração indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre. Foram realizados também bioensaios com o extrato etanólico dos caules e raízes para comparação do potencial antioxidante de partes da planta.

Preparou-se uma solução de trabalho de DPPH 40 µg/mL em MeOH e fez-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda=515\text{nm}$). Foram realizadas diluições, misturando-se 2,7 mL de solução de DPPH com quantidades apropriadas dos extratos (concentrações variando entre 30-180 µg/mL). Após 30 min, a descoloração dos radicais de DPPH foi registrada em UV-Vis no comprimento de onda 515 nm. O teste foi realizado em triplicata. O BHT foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos através do valor da CE_{50} , que representa a concentração da amostra necessária para seqüestrar 50% dos radicais de DPPH (tabela 20).

Os bioensaios foram realizados no Instituto de Química/UFG.

Avaliação da atividade frente à dermatófitos.

Para avaliar a atividade fungicida do extrato bruto das folhas (etanólico) foram utilizados 30 isolados de dermatófitos, sendo 10 de *Trichophyton rubrum*, 10 de *Trichophyton mentogrophytes* e 10 de *Microsporum rubrum*. Foram utilizadas placas de microdiluição contendo 96 poços, nos quais os extratos de *Psychotria prunifolia* foram diluídos para uma concentração de 2048mg/mL. A cada poço, contendo 100µL do agente antifúngico, foram adicionadas alíquotas de 100µL do inóculo. As concentrações do extrato da planta variaram de 1024 a 1 mg/mL. Houve ainda um controle do agente antifúngico e do inóculo. As placas de microdiluição foram incubadas a 28°C durante quatro a cinco dias para a leitura da CIM. O procedimento segue a metodologia descrita por Lucena, *et.al.* (2007). Os bioensaios foram realizados no IPTSP/UFG (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública sob a coordenação da Prof. Dr.(a) Maria do Rosário Rodriguez (LUCENA, 2007).

Avaliação da atividade citotóxica (*in vitro*).

A avaliação citotóxica de *Psychotria prunifolia* foi realizada frente às células normais humanas HFF-1 (fibroblastos) e células tumorais K562 (leucemia mielóide crônica), S-180 (sarcoma de camundongo) e A549 (carcinoma de pulmão humano). A quantificação da inibição enzimática é realizada por medidas espectrofotométricas permitindo a obtenção dos

valores de IC₅₀ (concentração das drogas que inibem 50% da atividade enzimática).

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE COLORIMÉTRICO MTT:

Para realização do teste foi diluído em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino os extratos da *Psychotria prunifolia*. Em seguida as células foram tratadas com o extrato nas concentrações 1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,001 mg/mL, e incubadas por 24h em estufa a 37°C. Ao fim da incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10 µL de MTT na concentração de 5mg/mL. A placa foi novamente incubada e após 3 horas foram adicionados 50 µL SDS 10%/HCl 0,01 N. A quantificação da densidade óptica foi medida em espectrofotômetro após 24h do tratamento com SDS.

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRYPAN

Obteve-se uma suspensão de células contendo $2742,5 \times 10^4$ células para cada 1000µL através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Foi usado como controle positivo Paclitaxel. Definida a utilização de 10^4 células por poço, foi pipetado em cada poço 200µL de Meio DMEM, estéril, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Posteriormente, foram adicionados a cada poço 0,36µL de células. Após 24 h de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, foram adicionadas as diferentes concentrações de extrato da planta e diluídos em 3mL de Meio DMEM suplementado com 10% de SFB, por 40 minutos em ultra-som. O tapete celular foi dissociado por tripsinização. A tripsina foi, então, inativada através da adição 100µL de meio DMEM suplementado com 10% SFB. A suspensão celular foi recolhida e centrifugada a 4400rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e adicionado-se 200µL de Meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Para a quantificação das células, foi adicionado 40µL de Azul de Tripiano. As

contagens foram realizadas em câmara de Neubauer, estabelecendo-se os percentuais de células viáveis em relação aos controles celulares.

O extrato bruto das folhas de *P. prunifolia* foi avaliado frente às células S-180 (sarcoma de camundongo), o alcalóide (2) foi testado frente à linhagem de células A549 (carcinoma de pulmão humano) e o extrato bruto do caule frente às células normais humanas HFF-1 (fibroblastos), células tumorais K562 (leucemia mielóide crônica), S-180 (sarcoma de camundongo) e A549 (carcinoma de pulmão humano).

Os bioensaios foram realizados no ICB/UFG (Instituto de Ciências Biológicas) sob a coordenação da Prof. Dr.(a) Elisângela de Paula Silveira Lacerda.

4. DISCUSSÃO

4- Discussão

Visando-se a obtenção de diferentes classes de metabólitos foi realizada a extração por partição com solventes de diferentes polaridades. Paralelamente, adotou-se o fracionamento ácido-base do extrato etânico das folhas de *P. prunifolia*, direcionando o estudo fitoquímico para o isolamento de alcalóides, visto caráter básico destes compostos e seus diferentes pK_b s.

4.1 Rendimento das Frações Isoladas

O fracionamento ácido-base (fig.11) seguido de etapas de purificação por cromatografia levou a obtenção de cinco compostos isolados. O rendimento das frações isoladas foi calculado em relação às folhas secas (543,3 g) e é apresentado na tabela 8 .

Tabela 8: Rendimento dos alcalóides isolados das folhas de *Psychotria prunifolia*.

Frações	Alcalóide (Código)	Extrato de Origem	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	Alcalóide 1 (EPP 20.2)	Clorofórmico Ácido	13	0,002
2	Alcalóide 2 (EPP20.3)	Clorofórmico Ácido	6	0,001
3	EPP 26.2	Acet. Etílico Básico	4	0,0007
4	Estrictosamida (EPP 27)	Acet. Etílico Básico	12	0,002
5	EPP 28.1	Acet. Etílico Básico	18	0,003
6	EPP 39-37	Clorofórmico Neutro	17	0,003

4.2- ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA

4.2.1 Alcalóide 1

O alcalóide (**1**) foi isolada na forma de um óleo amarelado, com fluorescência azul sob luz ultravioleta ($\lambda = 360$ e 254 nm) e reação positiva frente ao reagente Dragendorff.

A proposta estrutural de (**1**) foi realizada a partir das análises de IV, RMN (1D e 2D), EMAR, assim como comparação com os dados da literatura de compostos da mesma classe (CARVALHO, *et.al* 2002) (tabela 10).

O espectro de massas de alta resolução (EMAR) (anexo B fig.85) mostra íon molecular $m/z = 291.1458$ concordante com a fórmula molecular $[C_{19}H_{17}N_2O]^+$ (massa calculada: $m/z = 291.1497$).

O espectro de infravermelho (IV) (fig. 79, página 127) apresenta bandas de absorção referentes: a deformação angular da ligação N-H em 1641cm^{-1} , estiramento da ligação C=C de aromáticos em 1476 e 1579cm^{-1} , deformação da ligação C-O de éter de cadeia cíclica 1079cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H mostra sinais de seis hidrogênios aromáticos em δ 8,33 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-5), δ 8,41 (1H; d; $6,6$ Hz; H-6) δ 8,28 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-9), δ 7,48 (1H, t, $J = 7,81$ Hz, H-10) e 1 multipeto em δ 7,76-7,91 com integração para dois hidrogênios (H-11 e H-12) correlacionados a carbonos sp^2 em: δ 132,5 (C-5), 132,4 (C-11), 122,8 (C-9), 122,4 (C-10), 116,0 (C-6), 113,3 (C-12) sugerindo a unidade β -carbolina não substituída (fig. 15).

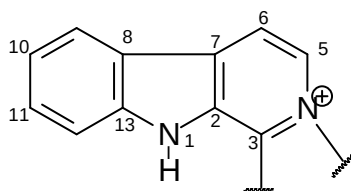


Figura 15: Estrutura da unidade β -carbolina.

Sinais de três hidrogênios em δ 5,79 (1H, ddd, $17,4$ Hz, $10,8$ Hz e $5,1$ Hz, H-19), δ 5,08 (1H, d, $17,4$ Hz, H-18a - *trans*) e δ 5,28 (1H, d, $10,8$ Hz, H-18b - *cis*) com correlações, observadas no experimento de HMQC, aos

carbonos δ 134,9 (CH, C-19) e δ 117,8 (CH₂, C-18) sugerem a presença de uma ligação dupla terminal (fig.16).

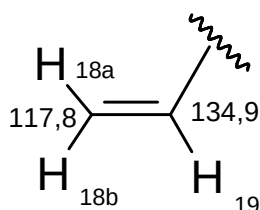


Figura 16: Deslocamento químico (δ ¹³C), em ppm, dos carbonos do grupo vinílico.

Além disso, no espectro ¹³C e DEPT são vistos sinais de cinco carbonos quaternários, dez metínicos e quatro metilênicos. O sinal em δ 86,7 (CH, C-17) diretamente correlacionado ao hidrogênio desblindado em δ 6,33(1H, sl) sugerem a presença de ligação nitrogênio-carbono-oxigênio.

O grupo metilênico em δ 29,7 (C-16) com sinais de hidrogênio em δ 2,51 (1H, d, 14,1, H-16a) e δ 2,62 (1H, d, 14,1, H16-b) apresenta correlações homonucleares H-H (COSY, fig.17) com H-17 e H-15, por sua vez H-15 apresenta correlações com H-14 e H-20 e este com H-21 e H-19.

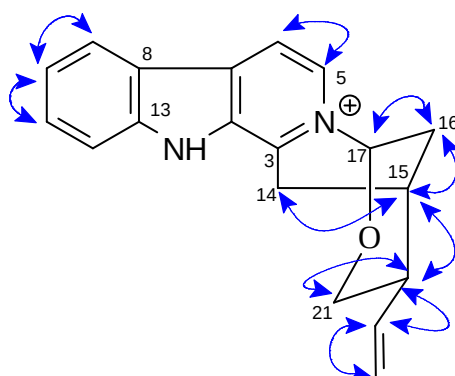


FIGURA 17: Correlações observadas pelo experimento de COSY.

Corroborando com o anel secologanínico observa-se a correlação de um carbono carbinólico em δ 61,9 (CH₂, C-21; δ 3,91 e δ 3,01) com o sinal de H-17 (δ 6,33;sl) no mapa de contornos do HMBC (fig. 18).

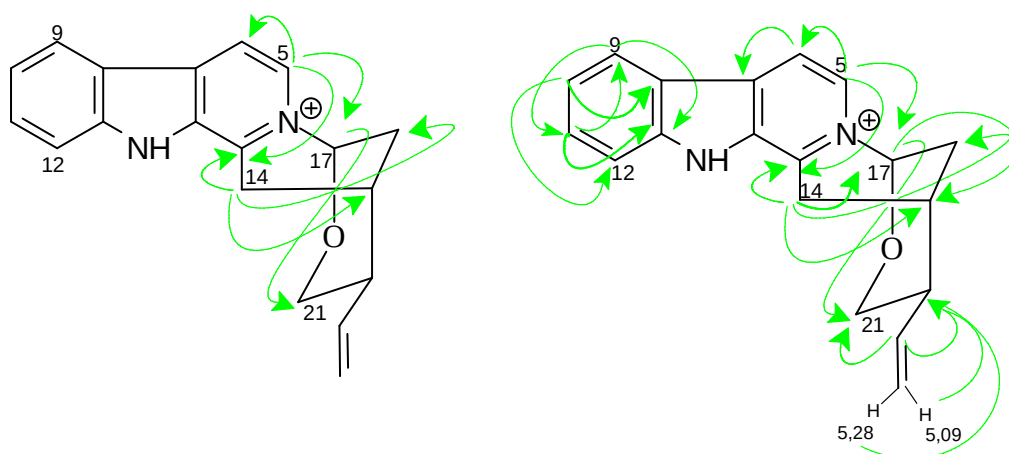


Figura 18: Correlações observadas no HMBC de (1) com destaque para as correlações da junção do anel secologanínico.

Correlações importantes para a proposta da segunda unidade foram observadas no HMBC para o hidrogênio δ 3,89 (H-14) com os carbonos δ 139,6 (C-3), δ 29,7 (C-16) e δ 25,6 (C-15), e correlação dos hidrogênios vinílicos com o carbono δ 41,2 (CH, C-20).

No experimento de NOESY observa-se, entre outras, a correlação do hidrogênio H-17 com δ 8,33 (H-5) (fig.19 e 20), H-18 e H10 e correlação de H-14 com H-15 e H-19

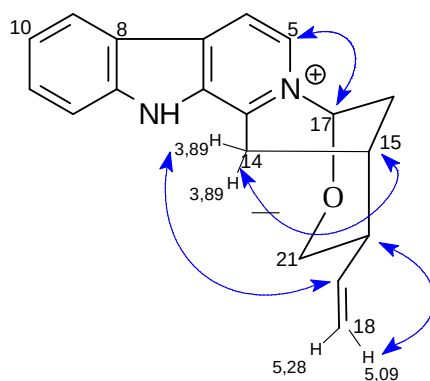


Figura 19: Correlações em NOESY do alcalóide (1).

H-15 = 2,82 (1H;m)

H-16 = 2,51(1H;d; 14,1)

2,62 (1H;d; 14,1)

H-17 = 6,33 (1H;sl)

H- 20= 2,97(1H;dl;12,3)

H-21a= 3,91(1H;dd;12,3;6,9)

H-21b= 3,01(1H;t;12,3)

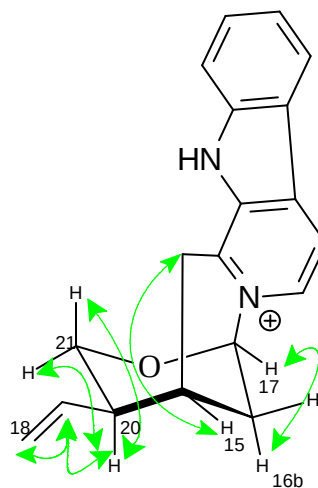


Figura 20: Correlações observadas com o experimento de NOESY, desdobramentos e constantes de acoplamento dos hidrogênios de **(1)**.

Os hidrogênios H-15, H-14 mostraram-se em forma de multipletos e H-17 em singlete largo não apresentando constantes de acoplamentos definidos, os prótons diasterotópicos H-16a e H-16b desdobraram em dubletos com $J = 14$ Hz (constante de acoplamento de H-H geminais).

O mapa de contornos de NOESY mostra correlações entre H-20 e os hidrogênios H-21a e H-21b, porém os deslocamentos químico de H-21b e H-20 são muito próximos dificultando a clareza dos dados não auxiliando na discriminação das disposições espaciais equatorial-axial destes, ou seja, não foi possível a determinação da configuração relativa deste alcalóide.

(1) é um alcalóide inédito, com esqueleto do tipo indol-monoterpênico, cujos dados espectroscópicos comparados à literatura sustentam a proposta da estrutura semelhante à da ofiorina (tabela 10).

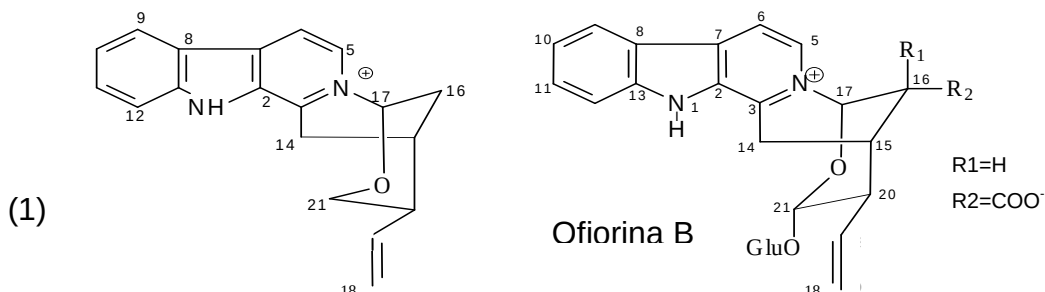


Figura 21: Estruturas do alcalóide **(1)** e ofiorina B.

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY, HMBC e NOESY do alcalóide (**1**).

Alcalóide (1)						
N	DEPT	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (J Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	C	132,2	-	-	-	-
3	C	139,5	-	-	-	-
5	CH	132,5	8,33(1H;d; 6,6)	H-6	C_3 ; C_{17} ; C_6	H-17
6	CH	116,0	8,41(1H;d; 6,6)	H-5	C_7	-
7	C	132,9	-	-	-	-
8	C	119,7	-	-	-	-
9	CH	122,8	8,28(1H;d; 8,1)	H-10	C_{13} ; C_{11}	H-10
10	C	122,4	7,48(1H; t; 7,81)	H-9; H-11 e 12	C_8 ; C_{12}	H-9, H-11, H-12
11	CH	132,4	7,76-7,91 (2H; m)	H-10	C_{13} ; C_9	H-10
12	CH	113,3	7,76-7,91 (2H; m)	H-10	C_{13} ; C_9	H-10
13	C	144,6	-	-	-	-
14	CH_2	24,8	3,93-3,80 (2H; m)	H-15	C_{17} ; C_3 ; C_{16} ; C_{15} ; C_{20}	H-15
15	CH	25,6	2,82(1H; m)	H-16a e b; H-20; H-14	-	H-14
16	CH_2	29,7	a 2,51(1H;d; 14,1) b 2,62(1H;d; 14,1)	H-16b; H-17; H-15	-	- H-17
17	CH	86,7	6,33(1H;sl)	H-16b	C_{15} ; C_{21}	H-5; H-16b
18	CH_2	117,8	a 5,08(1H;d; 17,4) b. 5,28(1H;d; 10,8)	H-19 H-19	C_{20} C_{20}	H-19; H-20, H-21
19	CH	134,9	5,79(1H;ddd;17,4;10,8;5,1)	H-18b e a; H-20	C_{20} ; C_{21}	H-18; H-20
20	CH	41,2	2,97(1H;dl;12,3)	H-19; H-15; H-21a	-	H-18,H 21; H-19
21	CH_2	61,9	a 3,91 (1H;;dd;12,3;6,9) b 3,01 (1H;t;12,3)	H-21 b e 20-	- C_{20}	H-20 H-18; H-20;H-19

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **(1)** e ofiorina B.

Ofiorina B (CARVALHO, <i>et.al.</i> , 2002) ^a			Alcalóide (1) ^b	
N	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (J Hz)	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (J Hz)
2	135,9	-	132,2	-
3	138,8	-	139,5	-
5	133,3	8,6 (d; 6,8)	132,5	8,33 (d; 6,6)
6	118,0	8,3 (d; 6,8)	116,0	8,41 (d; 6,6)
7	130,2	-	132,9	-
8	119,2	-	119,7	-
9	123,4	8,1 (d; 8,0)	122,8	8,28 (d; 8,1)
10	122,7	7,1 (t; 8,0)	122,4	7,48 (t; 7,81)
11	132,6	7,4 (t; 8,0)	132,4	7,76 -7,91 (m)
12	113,3	7,6 (d; 8,0)	113,3	7,76 -7,91 (m)
13	144,1	-	144,6	-
14	24,0	3,5	24,8	3,93-3,80 (m)
15	31,0	3,0 (m)	25,6	2,82 (m)
16	46,6	3,3	29,7	a 2,51 (d; 14,1) b 2,62 (d; 14,1)
17	89,0	6,6 (sl)	86,7	6,33 (sl)
18	120,9	5,2 (d; 10,8) 5,3 (d; 17,2)	117,8	a 5,08 (d; 17,4) b 5,28 (d; 10,8)
19	134,7	5,7(dd;17,4;10,8;6,4)	134,9	5,79 (ddd;17,4;10,8;5,1)
20	47,6	2,8 (m)	41,2	2,97(1H;dl;12,3)
21	94,2	4,6 (d; 9,6)	61,9	a 3,91 (1H;;dd;12,3;6,9) b 3,01 (1H;t;12,3)
22	175,6	-		
1'	99,7	4,4 (d; 8,8)		
2'	73,5	2,9 (t; 8,8)		
3'	76,6	3,1 (m)		
4'	69,8	3,0 (m)		
5'	77,0	2,8 (m)		
6'	60,6	3,5 (m) e 3,2 (m)		

^a RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O , 400 e 100 MHz)

^b RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300 e 75 MHz).

4.2.2 Alcalóide 2

O alcalóide (2) foi isolado como um sólido amorfo amarelo, não visível sob luz ultravioleta ($\lambda=254$ e 360 nm) e reação positiva frente ao reagente Dragendorff, com rotação óptica específica de $[\alpha]_D^{20} = -2,18$.

O espectro de massa de alta resolução (EMAR) (anexo B, fig.86) mostra íon molecular (m/z) = 305,1396 concordante com a fórmula molecular $[C_{19}H_{17}N_2O_2]^+$ (massa calculada m/z = 305,1290).

O espectro de infravermelho mostra bandas de absorção referentes à: estiramento da ligação C-H de alquenos em 2922 cm^{-1} , estiramento da ligação C=C de aromáticos em 1452 cm^{-1} , estiramento da ligação C-O de éter em 1103 cm^{-1} , deformação angular de N-H em 1627 cm^{-1} , deformação estiramento de ligação C-N em 1250 cm^{-1} , estiramento de C=O de cetona aril-alquila em 1695 cm^{-1} .

Com a análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (tabela 11) foram observadas semelhanças nos padrões dos deslocamentos químicos do grupo indólico do alcalóide (1). Observa-se a ausência do sinal do carbono metilênico em δ 24,8 e a presença do sinal de um carbono quaternário em δ 191,6 atribuído à carbonila de cetona α - β -insaturada que garante a diferenciação da estrutura do alcalóide (2).

A análise dos experimentos de HMBC permitiu identificar os carbonos quaternários δ C: 146,9 (C-13), 139,7 (C-3), 134,4 (C-2), 124,6 (C-7) da unidade aromática. Foi observada a sobreposição dos sinais de C8 e C18 com deslocamento químico em δ 118,9. No espectro de RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 75 MHz) deste mesmo composto quando isolado da casca de *P. prunifolia* (trabalho de PIBIC da aluna Brenda G. Carvalho ainda não publicado).mostra a sobreposição parcial destes dois carbonos evidenciando a grande proximidade dos deslocamentos químicos de C8 e C18 (fig. 22)

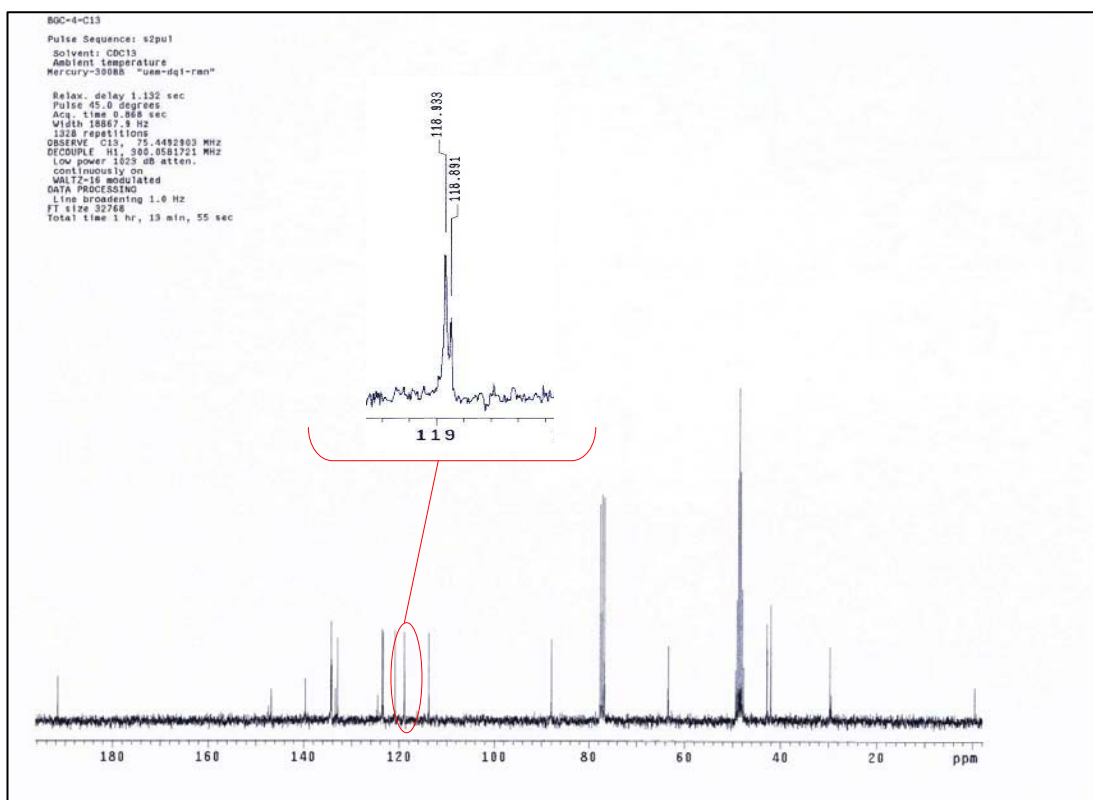


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 75 MHz) do alcalóide (2) isolado das cascas de *P. prunifolia*.

Além disso, a sobreposição dos sinais de C-18 e C-8 é evidenciada pela correlação de H-5 (8,89; 1H; d; 6) e com δ 118,9 observado no mapa de contornos de HMBC (fig. 23).

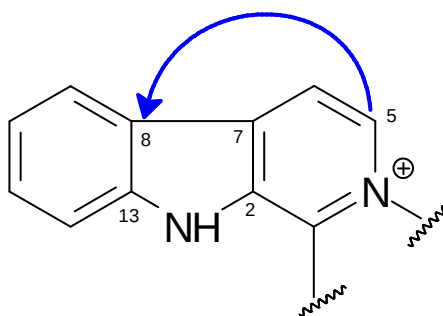


FIGURA 23: Correlação em HMBC do alcalóide (2).

Os sinais em δ 2,82 (1H; d, 14 Hz, H-16a) e 3,05 (1H; d, 14 Hz, H-16b) assim como os sinais em δ 3,22 (1H; d; 1,8 Hz, H-21a) e 4,01 (1H; d, 7,5 Hz, H-21b) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-16 e H-21. Através do experimento de HMQC foram observadas

correlações entre os hidrogênios H-16 e o carbono em δ 29,7 (C-16), vizinho ao carbono carbinólico ligado ao nitrogênio (O-C-N), e entre hidrogênios H-21 e o carbono em δ 63,4 (C-21).

Os deslocamentos referentes ao grupo vinílico foram observados em 5,22 (1H; d; 17 Hz, H-18a, *trans*), 5,25 (1H; d; 10 Hz, H-18b, *cis*) e 5,65 (1H; ddd; 6,6 Hz; 10 Hz; 17 Hz, H-19) com correlações em HMQC aos carbonos em δ 118,9 (C-18) e 132,8 (C-19).

A análise dos dados obtidos com os experimentos de HMQC, HMBC, Dept, COSY e NOESY confirmou as semelhanças estruturais e mostram a proximidade da carbonila à unidade secologanínica principalmente pela correlação de H-16 com C-14 (fig. 24).

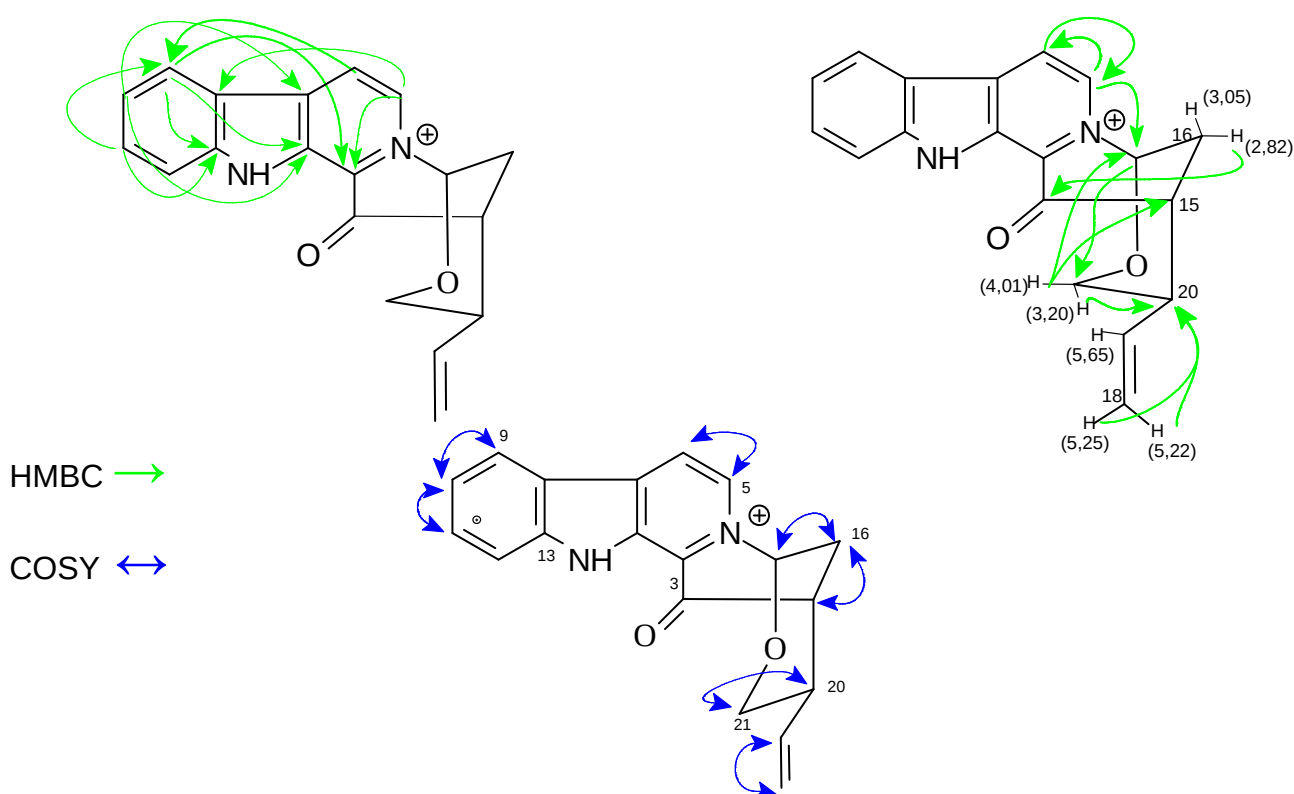


Figura 24: Correlações em HMBC e COSY do alcalóide (2).

A análise dos espectros de RMN de (2), comparação com o alcalóide (1) e buscas na literatura levaram à proposta estrutural para o alcalóide (2) também inédito .

Tabela 11: Dados de RMN ^1H (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY, HMBC e NOESY do alcalóide (2).

Alcalóide 2						
N	DEPT	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	C	134,4	-			
3	C	139,7	-			
5	CH	134,1	8,89 (1H; d; 6)	H ₆	C ₃ ; C ₆ ; C _{17;9 e 7}	
6	CH	120,9	8,92 (1H; d; 6)	H ₅	C ₅ ; C ₉	
7	C	124,6	-			
8	-	118,9	-			
9	CH	123,6	8,43 (1H; d; 8)	H ₁₀	C ₃ ; C ₁₃ ; C ₂	H ₁₀
10	CH	123,4	7,57 (1H; ddd; 3,6,8)	H _{11;9}	C ₂ ; C ₇	H ₉
11	CH	134,4	7,94-7,88 (2H; m)	H ₁₀	C ₁₃ ; C ₉	H ₁₀
12	CH	113,7	7,94-7,88 (2H; m)		C ₁₃ ; C ₉	H ₁₀
13	C	146,9	-			
14	C	191,6	-			
15	CH	42,8	3,36 (1H; sl)	H _{16b}		
16	CH ₂	29,7	a 2,82 (1H; d, 14)	H _{16b} ; H ₁₇	C ₁₄	H _{16b}
			b 3,05 (1H; d, 14)	H _{16a} ; 15		H _{16a}
17	CH	87,9	6,76 (1H; s)	H _{16a}	C ₂₁ ; C ₇	
18	CH ₂	118,9	a 5,22 (1H; d; 17)	H ₁₉	C ₂₀	H _{19;20}
			b 5,25(1H; d; 10)	H ₁₉		H _{18a} ; 20
19	CH	132,8	5,65(1H; ddd; 6.6; 10; 17)	H _{18a} ; 18b		H _{18a;b} H ₂₀
20	CH	42,03	3,20 (1H; d; 7.8)	H _{21b}		H _{18a;21a} ; 19
21	CH ₂	63,4	a 3,22(1H; d; 1.8)		C ₂₀	
			b 4,01 (1H; d,7.5)	H ₂₀	C ₁₇ ; C ₁₅	H ₂₀

4.2.3 EPP 26.2

O alcalóide EPP26.2 (3) foi isolado como um óleo amarelo, não visível em luz UV ($\lambda=365$ e 254 nm) e com reação positiva frente ao reagente de Dragendorff.

A proposta estrutural foi realizada a partir dos dados espectroscópicos de IV, RMN ^1H e ^{13}C e 2 D e comparação com os dados da literatura (CARVALHO, *et.al.*, 2002; VALVERDE, *et.al.*, 1999) (tabela 13).

O espectro de infravermelho mostra banda de absorção em, em 1060 cm^{-1} , deformação da ligação C-O de éter de cadeia fechada, em 902 e 820 cm^{-1} característica de deformação angular da ligação C-H de anel aromático 1,2,4 trissubstituído, 1580 cm^{-1} e 1475 cm^{-1} características de estiramento da ligação C=C de aromáticos, em 1657 cm^{-1} referente a estiramento da ligação C=C de alceno.

O espectro de RMN ^1H mostra sinais de três hidrogênios aromáticos em δ 7,51 (d, 2,4Hz, H-9), δ 7,44 (d, 9 Hz, H-12), δ 7,14 (dd, 9 Hz, 2,4 Hz, H-11), atribuídos ao anel aromático do grupo indólico, cujos desdobramentos (fig.25) caracterizam um anel trissubstituído.

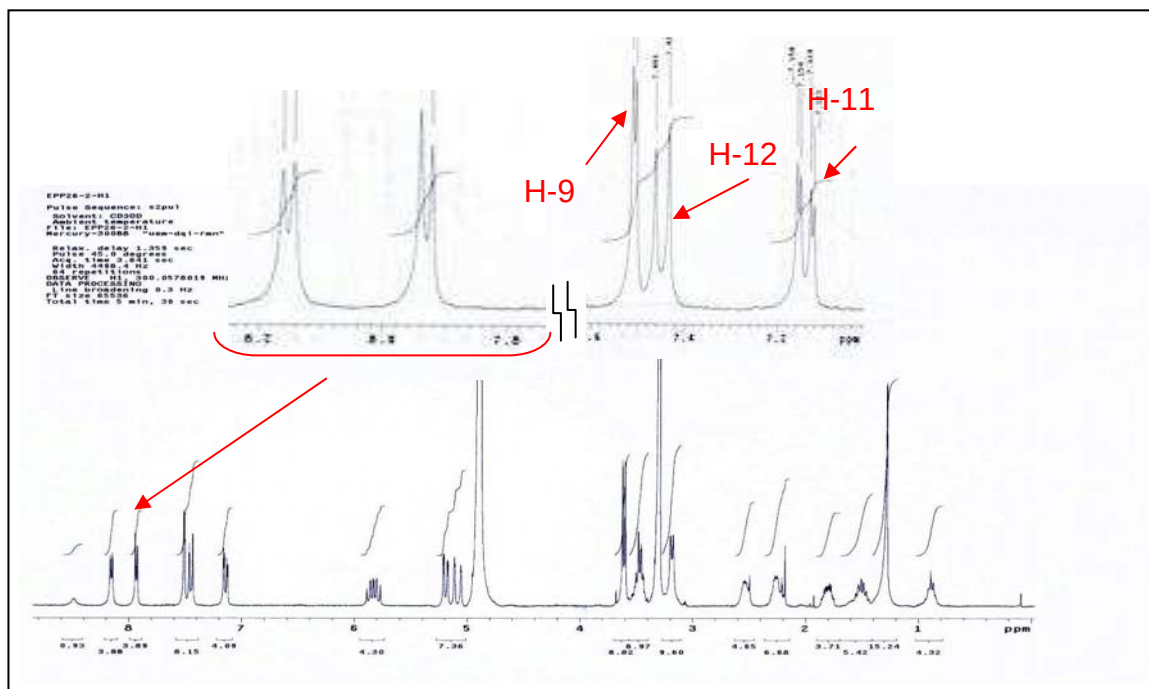


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H do alcalóide EPP 26.2 e ampliação dos sinais aromáticos.

Os sinais em δ 8,15 (d, 5,4 Hz, H-5) e δ 7,93 (d, 5,4 Hz, H-6) correlacionados em HMQC aos carbonos em δ 135,6 (C-5) e 114,6 (C-6) indicam a presença da insaturação do grupo indol caracterizando a estrutura β -carbolina deste alcalóide.

No espectro de RMN ^{13}C foram observados outros três sinais de carbonos sp^2 em δ_{CH} 120,6 (C-11), 113,6 (C-12), 106,6 (C-9), assim como cinco quaternários em δ 145,5 (C-3), 137,5 (C-7), 136,9 (C-13), 130,5 (C-2), 123,1 (C-8) atribuídos à unidade β -carbolina. O carbono com deslocamento químico (RMN ^{13}C) em δ 152,6 (C-10) correlacionado no mapa de contorno HMBC ao hidrogênio H-12 sugere a substituição de um hidrogênio aromático por um grupo hidroxila (fig.26).

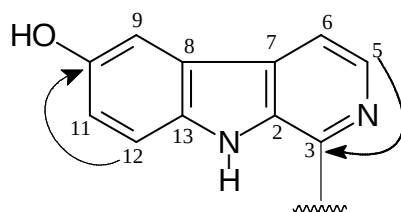


Figura 26: Correlações em HMBC da unidade β -carbolina.

O grupo vinílico foi novamente observado com sinais de hidrogênios em δ 5,10 (1H, dd, 10,2 Hz; 1,6 Hz; H-18a; *cis*) e 5,20 (1H, dd, 17,1 Hz; 1,6 Hz; H-18b; *trans*) correlacionados em HMBC com o carbono δ 118,6 (C-18) e o sinal em 5,83 (1H, ddd, 17,1 Hz; 10,2 Hz; 1,6 Hz; H-19) que se correlaciona com o carbono C-19 em δ 138,1 (fig. 27).

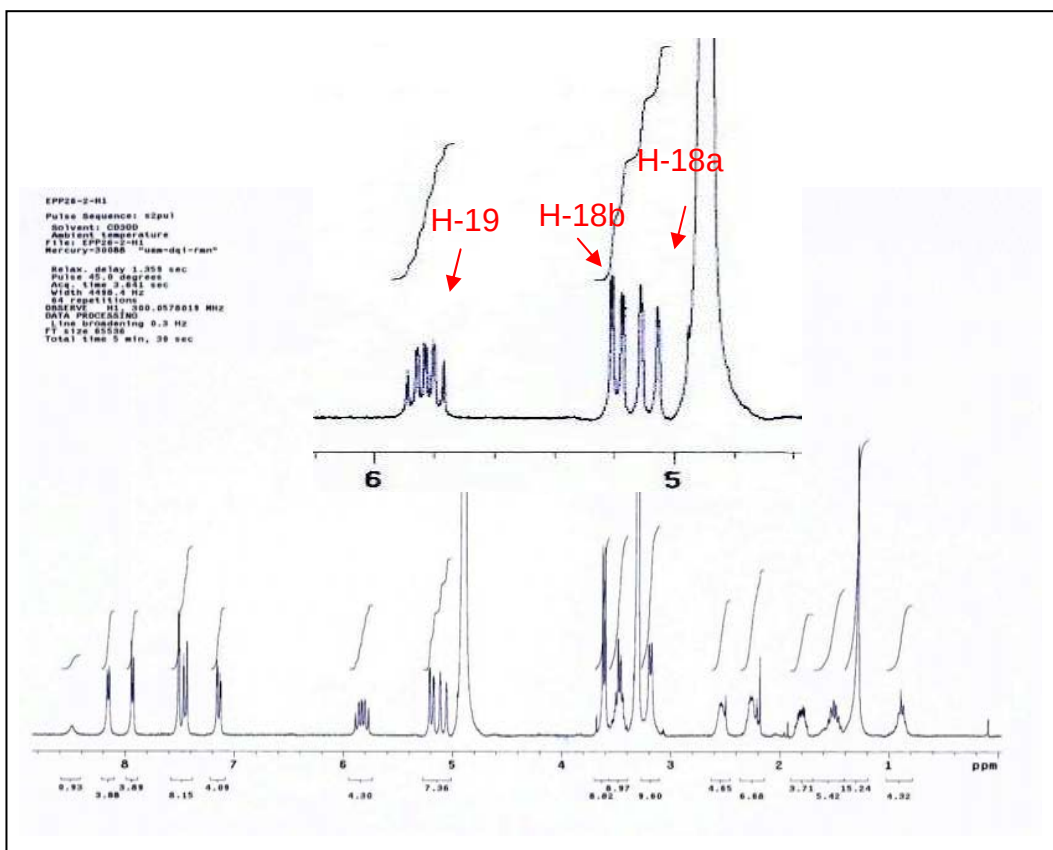


Figura 27: Espectro de RMN ^1H do alcalóide Epp26 e ampliação dos sinais vinílicos

A ausência do carbono em δ 80-87 e a observação de dois sinais de carbonos carbinólicos δ 64,3 (CH_2 , C-21) e δ 61,4 (CH_2 , C-17) mostram uma disposição do anel secologanínico diferenciada dos alcalóides (1) e (2).

Os dados do experimento de COSY permitiram a atribuição do sistema de spins H-14/H-15, H-15/H-16/H-17, H-15/H-20/H-21, H-18/H-19/H-20. As correlações observadas em HMBC entre H-5/C-3 e H-14/C-3 orientam quanto a posição da condensação da unidade β -carbolina ao anel monoterpênico saturado.

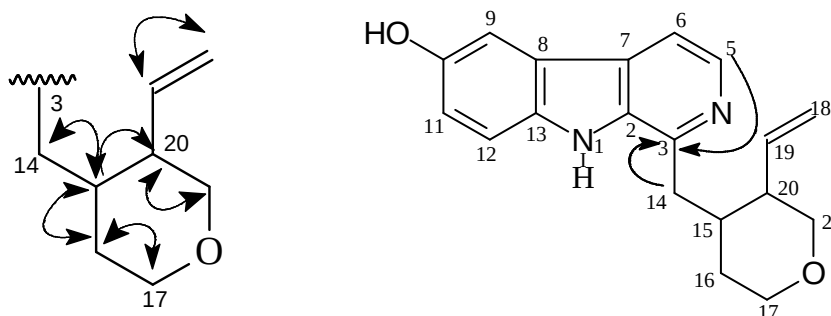


Figura 28: Conectividades entre os núcleos de hidrogênio obtidas por COSY ($\longleftrightarrow$) e correlações em HMBC ($\longrightarrow$) da unidade monoterpênica do alcalóide EPP26.2.

A configuração relativa do composto foi proposta com base na correlação observada no experimento de NOESY entre os hidrogênios H-15 e H-20 indicando a configuração '*cis*' entre eles.

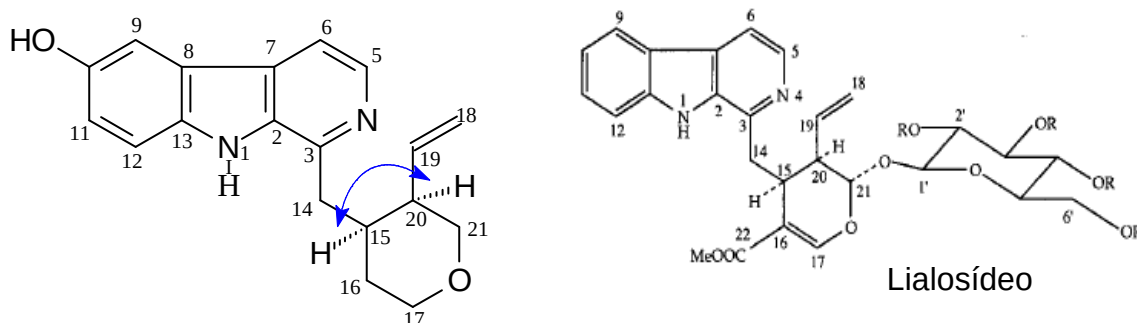


Figura 29: Correlação observada pelo experimento de NOESY entre os núcleos H-15 e H-20 do alcalóide EPP26.2 e estrutura do alcalóide lialosídeo.

A análise dos dados espectroscópicos, comparação e buscas na literatura levaram à proposta estrutural para o alcalóide indol-monotrepênico EPP26.2 também inédito.

Tabela 12: Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C , RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY, HMBC e NOESY do alcalóide EPP 26.2.

Epp26.2						
N	DEPT	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	C	130,6	-			
3	C	145,5	-			
5	CH	135,6	8,15(1H,d, 5,4)	H-6	$\text{C}_2, \text{C}_3, \text{C}_6$	H-6
6	CH	114,6	7,93(1H,d, 5,4)	H-5	$\text{C}_8, \text{C}_{13}, \text{C}_5$	H-5, H-9
7	C	137,5	-			
8	C	123,1	-			
9	CH	106,6	7,51(1H, d, 2,4)		$\text{C}_2, \text{C}_7, \text{C}_{11}$	H-6
10	C	152,6	-			
11	CH	120,3	7,14(1H, dd, 9; 2,4)	H-12	C_7, C_9	H-12
12	CH	113,6	7,44(1H, d, 9)	H-11	C_{10}	H-11
13	C	136,9	-			
14	CH_2	36,9	a 3,19(2H, d, 6,9)	H-15	$\text{C}_{20}, \text{C}_{15}$	
15	CH	36,4	b 2,5-2,4(1H, m)	H-14, H-16a, H-20		H-17, H-20, H-21
16	CH_2	33,9	a 1,5-1,4(1H, m)	H-17	C_{17}	H-17
			b 1,8-1,7(1H, m)	H-17	C_{17}	H-21
17	CH_2	61,4	3,5-3,4(2H, m)	H-16a,b		H-15, 16a
18	CH_2	118,6	a 5,10(1H, dd, 10,2; 1,6)	H-19		H-20, 19
			b 5,20(1H, dd, 17,1; 1,6)	H-19		H-19
19	CH	138,1	5,83(1H, ddd, 17,1; 10,2; 1,6)	H-20, H-18a,b		H-21, H-18a,b
20	CH	50,9	2,3-2,1 (1H, m)	H-15, H-19, H-21		H-15, H-18a, H-21
21	CH_2	64,4	3,60 (2H, d, 6,6)	H-20	$\text{C}_{19}, \text{C}_{15}, \text{C}_{20}$	H-20, H-15, H-19, 16b

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EPP 26.2 e lialosídeo.

Lialosídeo (VALVERDE, <i>et.al.</i> , 1999) ^a			Epp26.2 ^b	
N	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (J Hz)	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (J Hz)
2	133,2	-	130,6	-
3	143,6	-	145,5	-
5	134,5	8,26 (d; 5)	135,6	8,15(d, 5,4)
6	112,5	7,92 (d; 5)	114,6	7,93(d, 5,4)
7	126,0	-	137,5	-
8	120,6	-	123,1	-
9	121,6	8,17 (dl; 8)	106,6	7,51(d, 2,4)
10	119,0	7,21(tl; 8)	152,6	-
11	127,7	7,5 (tl; 8)	120,3	7,14(dd, 9; 2,4)
12	111,8	7,55 (dl; 8)	113,6	7,44(d, 9)
13	140,2	-	136,9	-
14	32,5	3,13 (m) e 3,55(m)	36,9	3,19(d, 6,9)
15	30,1	3,71 (m)	36,4	2,5-2,4(m)
16	109,8	-	33,9	1,5-1,4(m) e 1,8-1,7(m)
17	151,7	7,47(d;1,5)	61,4	3,5-3,4(m)
18	118,7	4,75(dl;17)	118,6	5,10(dd,10,2;1,6)
		4,94(m)		5,20(dd,17,1;1,6)
19	134,0	5,66(m)	138,1	5,83(ddd,17,1;10,2;1,6)
20	42,9	2,73 (m)	50,9	2,3-2,1 (m)
21	95,8	5,37(d; 5,0)	64,4	3,60 (d, 6,6)
22	175,6	-		
22-OMe	50,8	3,28(s)		
1'	98,7	4,56(d;8)		
2'	73,0	3,02(m)		
3'	77,3	3,18(m)		
4'	70,0	3,07(m)		
5'	76,8	3,18(m)		
6'	61,0	3,45(m) e 3,60(m)		

^a RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz)

^b RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz).

4.2.4 Estrictosamida

Estrictosamida (4) foi isolado como um óleo amarelo, com fluorescência azul sob luz UV ($\lambda=360$ nm) e com reação positiva frente ao reagente de Dragendorff. A proposta estrutural foi realizada a partir dos dados espectroscópicos de IV, e RMN ^1H , ^{13}C e 2 D e a comparação com os dados da literatura (HENRIQUES, 2003).

O espectro de infravermelho mostra bandas de absorção em, em 3005 cm^{-1} característico de deformação axial de ligação C-H, em 1650 cm^{-1} de deformação axial da ligação C=C de alceno, 1583 cm^{-1} e 1470 cm^{-1} referentes a deformação axial C=C de aromáticos, 1074 cm^{-1} característicos de deformação da ligação C-O de éter de cadeia cíclica.

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT apresentam sinais de dez carbonos metínicos, quatro metilênicos, seis quaternários e carbonos glicosídicos. Os deslocamentos químicos de oito carbonos sp^2 em δ 137,8 (C, C-13), δ 134,8 (C, C-2), 128,7 (CH, C-8), 122,5 (CH, C-11), 120,2 (CH, C-10), 112,3 (CH, C-12), 110,3 (C, C-7), de dois metilênicos em δ 44,8 (C-5) e δ 22,1 (C-6) e o metínico em δ 55,1 (C-3) caracterizam a unidade tetrahydro- β -carbolínica.

Sinais de carbonos vinílicos foram observados δ 120,5 (CH_2 , C-18) e 134,3 (CH, C-13) correlacionados (HMQC) aos hidrogênios δ 5,64 (1H, ddd, 17,7 Hz, 10,2 Hz, 10 Hz, H-19), 5,36 (1H, dd, 17,7 Hz, 1,8Hz, H-18b, *trans*), 5,31 (1H, dd, 10,2 Hz, 1,8Hz, H-18a, *cis*), sugerindo, como visto nos alcalóides discutidos anteriormente, a presença de um anel secologanínico.

A presença de um uma carbonila de amida δ 167,1 (C-22), de sinais de dois carbonos anoméricos, carbonos glicosídicos, a análise de experimentos de RMN 2D e comparação com a literatura permitiram a identificação deste alcalóide como sendo a conhecida strictosamida (tabela 14).

A configuração relativa do alcalóide (fig. 30) foi estabelecida a partir dos valores das constantes de acoplamento e análises dos mapas de contornos de COSY e NOESY (anexo A pág. 109 e 111).

$$J_{H3-H14b} = 4,5 \text{ Hz (ax-eq)}$$

$$J_{H15-H14a} = 13 \text{ Hz (ax-ax)}$$

$$J_{H15-H20} = 5,4 \text{ Hz (ax-eq)}$$

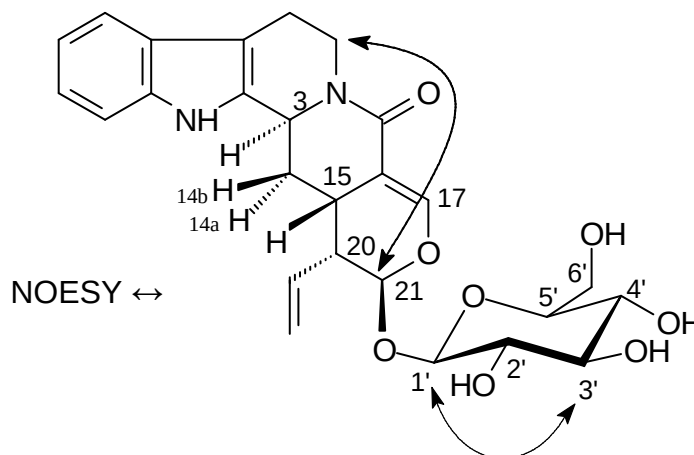


Figura 30: Constantes de acoplamento para os H-3, H-14 e H-15 da estrictosamida.

A comparação na literatura dos dados da estrictosamida e seu epímero, vincosamida, sustenta a configuração relativa na posição α de H-3 ligado ao carbono C-3 em δ 55,1. A correlação observada em NOESY entre H-1' e H-3' evidencia a configuração axial-axial destes hidrogênios o que confirma a ligação do tipo β -glicosídica do carbono C-1'.

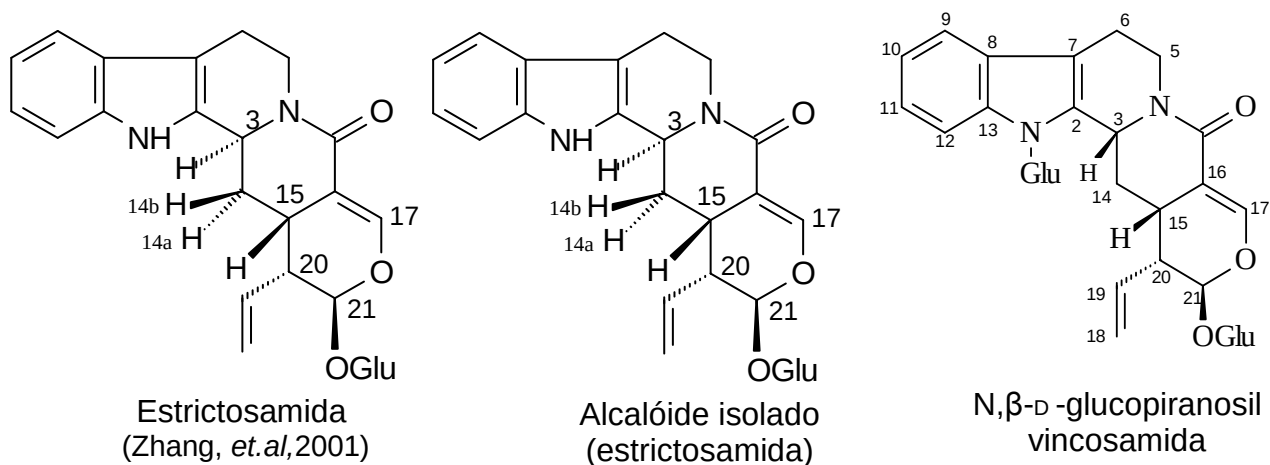


Figura 31: Configuração relativa do alcalóide isolado, estrictosamida e do alcalóide N,β-D-glucopiranosil vincosamida.

Tabela 14: Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY e NOESY do alcalóide estrictosamida.

Estrictosamida					
Nº	^{13}C	DEPT	HMQC H^1	COSY	NOESY
2	134,8	C			
3	55,1	CH	5,06 (1H; dl; 4,5)	H-14a	
5	44,8	CH_2	2,64 – 2,69 (2H; m) 3,10 (2H; m)		H-21,6b
6	22,1	CH_2	2,64 – 2,69 (2H; m) 2,88 – 2,96 (2H; m)		H-5 ^a
7	110,3	C			
8	128,7	C			
9	118,7	CH	7,38 (1H; d; 6,6)	H-10	H-10
10	120,2	CH	6,98 (1H; ddd; 7,8; 6,6; 1)	H-9	H-9,H-11
11	122,5	CH	7,07 (1H; ddd; 7,8; 7,2; 1)	H-12	H-12
12	112,3	CH	7,31 (1H; d; 7,2)	H-11	H-11
13	137,8	C			
14	27,3	CH_2	2,02 (1H; ddd; 13,5; 13,0; 5,6) 2,45 (1H; ddd; 13,5; 4,5; 1,8)	H-15; H-3 H-15	H-14b H-14a,15
15	24,9	CH	2,74 – 2,80 (1H; m)	H-14a; H-14b	H-14b
16	109,2	C			
17	149,2	CH	7,37 (1H; d; 2,4)		
18	120,5	CH_2	5,31 (1H; dd; 10,2; 1,8) 5,36 (1H; dd; 17,7; 1,8)	H-19 H-19	H-19 H-18a
19	109,2	CH	5,64 (1H; ddd; 17,7; 10,2; 10)	H-18 a,b ; H-21	
20	44,7	CH	4,9 (1H; dd; 11; 5,4)*		H-4'
21	98,1	CH	5,40 (1H; d; 1,8)	H-19	H-1',5a
22	167,1	C			
1'	100,5	CH	4,56 (1H; d; 8,1)	H-2'	H-21, 3'
2'	74,3	CH	2,88 - 2,96 (2H; m)	H-1'; H-5'	
3'	77,9	CH	3,24 - 3,17 (2H; m)		H-1'
4'	71,3	CH	3,10 (2H; m)		H-20
5'	78,2	CH	3,24 - 3,17 (2H; m)	H-2'	
6'	62,6	CH_2	3,60 (1H; dd; 9,1; 7,3) 3,84 (1H; dd; 11,7; 1,8)	H-6'b H-6'a	H-6'b H-6'a,5'

* Observado em RMN ^1H 500 MHz.

Tabela 15: Dados de ^a RMN de ¹H e ¹³C de estrictosamida e vincosamida.

Estrictosamida (Zhang, <i>et.al</i> , 2001)		Vincosamida (HENRIQUES, <i>et.al.</i> , 2004)		Estrictosamida isolada ^b	
N ^o	δ C	δ C	δ H (J Hz)	δ C	δ H (J Hz)
2	134,2	136,1	-	134,8	
3	55,2	54,4	5,12 (dl; 11)	55,1	5,06 (dl; 4,5)
5	42,5	41,63	2,84(ddd;12,4;11,8;3,3) 5,05 (ddd;12,4;4,5;1,5)	44,8	2,64 – 2,69 (m) 3,10 (m)
6	22,2	22,3	2,65(ddd;16;11,8;4,5) 2,78(ddd;16;3,3;1,5)	22,1	2,64 – 2,69 (m) 2,88 – 2,96 (m)
7	110,4	111,5	-	110,3	
8	128,8	129,6	-	128,7	
9	118,8	119,3	7,44 (d; 7,8)	118,7	7,38 (d; 6,6)
10	120,3	121,3	7,06(ddd;7,8;7,1;1,1)	120,2	6,98 (ddd; 7,8; 6,6; 1)
11	122,6	122,8	7,12(ddd; 8,2;7,1;1,1)	122,5	7,07 (ddd; 7,8; 7,2; 1)
12	112,4	114,7	7,63(d; 8,2)	112,3	7,31 (d; 7,8)
13	137,8	137,7	-	137,8	
14	27,4	35,5	1,38(dddd;13,5;13,5;11,3;2,5) 2,30(dl;13,5)	27,3	2,02 (ddd; 13,5; 13,0; 5,6) 2,45 (ddd; 13,5; 4,5; 1,8)
15	25,0	27,9	3,40(m)	24,9	2,74 – 2,80 (m)
16	109,3	109,1	-	109,2	
17	149,3	149,2	7,48(d;2,7)	149,2	7,37 (d; 2,4)
18	120,8	120,7	5,14(dd;10,2;2,0) 5,26(dd;17,2;2,0)	120,5	5,31 (dd; 10,2; 1,8) 5,36 (dd; 17,7; 1,8)
19	134,4	133,4	5,48(ddd;17,2;10,2;9,9)	134,7	5,64 (ddd; 17,7; 10,2; 9,9)
20	44,8	44,1	2,75(m)	44,7	4,9 (dd; 12,6; 5,4)*
21	98,2	97,5	5,51(d; 1,9)	98,1	5,40 (d; 1,8)
22	167,2	166,3	-	167,1	-
1'	100,6	99,6	4,71(d;8)	100,5	4,56 (d; 8,1)
2'	74,3	74,8	3,24(m)	74,3	2,88 – 2,96 (m)
3'	78,2	77,9	3,37(m)	77,9	3,24 - 3,17 (m)
4'	71,4	71,6	3,54(m)	71,3	3,10 (m)
5'	78,0	78,4	3,50(m)	78,2	3,24 – 3,17 (m)
6'	62,7	62,7	3,3,68(m) e 3,90(m)	62,6	3,60 (dd; 9,1;7,3)/3,84(dd; 11,7; 1,8)
1''		87,6	5,12 (dl; 8,9)		
2''		71,9	4,13 (dd; 8,9; 9,0)		
3''		79,1	3,54 (m)		
4''		71,6	3,63 (m)		
5''		81,24	3,54 (m)		
6''		62,9	3,79 (dd;12,1; 5,9) e 3,97 (dd;12,1; 2,0)		

^aRMN de ¹H e ¹³C (CD₃OD, 600 e 150MHz) ^bRMN de ¹H e ¹³C (CD₃OD, 300 e 75MHz).

4.2.5 – EPP28.1

O composto EPP28.1 (5) foi isolado como sólido amorfo amarelo, solúvel em metanol, com fluorescência sob luz ultravioleta ($\lambda=365$ nm) e com reação positiva frente ao reagente Dragendorff.

O espectro de absorção na região do IV para o composto EPP 28 mostrou bandas de absorção referentes á: defoemação axial de ligação C-H de alqueno em 2927 cm^{-1} , deformação axial de ligação C=C aromática em 1454 e 1593 cm^{-1} , deformação axial de ligação C-O-C em 1153 cm^{-1} , deformação axial de ligação C-N(amina aromática) em 1373 cm^{-1} , deformação axial de ligação C-N em 1207 cm^{-1} de amina alifática.

Pelo espectro de COSY aliado às informações dos experimentos de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) e TOCSY (CD_3OD , 500 MHz) pode-se observar as correlações dos hidrogênios diasterótópicos H-6 em δ 2,73 (dd;4,6;17) e 2,9-2,8(1H;m) com o hidrogênio em δ 3,31(dd;4,6;12; H-5a) e correlação do hidrogênio aromático em δ 6,58 (dd;8,7;2,4;H-11) com os hidrogênios em δ 6,70(d;2,4;H-9) e 7,07(d;8,7;H-12), que correspondem às conectividades da unidade tetrahidrocarbolina sugerido ao composto EPP28.1. Ainda pelo espectro de COSY, pode-se observar correlação entre os hidrogênios em δ 3,53 (2H;m;H-17) e os prótons em δ 2,19 (sl;H-16b) e 2,07 (s;H-16a) e correlações de hidrogênios metilênicos em δ 5,07 (d;10;H-18a) e δ 5,05 (d;17;H-18b; trans) com sinal em δ 5,57 (ddd;17;10;6,6;H-19) sugerem a presença de grupo vinílico.

Através do experimento de TOCSY (CD_3OD ; 500 MHz) do composto foram observadas correlações adicionais entre os hidrogênios H- 14b e H-15 e correlação entre os hidrogênios H-15 e H-17. O sinal de H-3 observado em δ 4,63 (1H;sl) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 300MHz) foi suprimido no experimento RMN ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) adquirido para a realização do TOCSY.

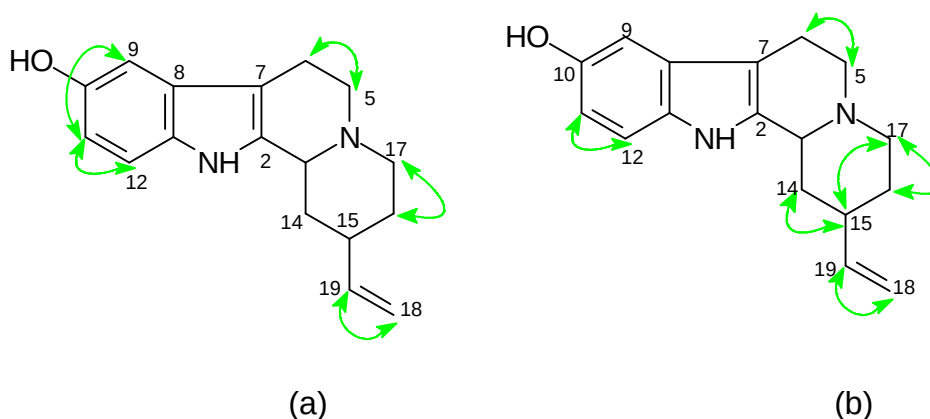


Figura 32: Correlações observadas nos experimentos de COSY (a) e TOCSY (b).

Com a análise do espectro de RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75 MHz, (pág. 113) foi possível observar quatro sinais referentes a carbonos aromáticos quaternários em δ 133,1 (C-2), 130,7 (C-13), 128,6 (C-8) e 105,8 (C-7), outros sinais de três carbonos sp^2 aromáticos em δ_{CH} 112,9 (C-11), 112,8 (C-12) e 103,2 (C-9), um sinal característico de carbono carbinólico aromático em δ 151,8 (C-10), dois sinais de carbonos vinílicos em δ 118,5 (CH_2 , C-18) e 138,7 (CH , C-19) e cinco carbonos metilênicos em δ_{sp^2} 64,0 (C-17), 52,4 (C-5), 31,6 (C-16), 27,2 (C-14), 18,1 (C-6).

Foram observadas correlações no experimento de HMBC entre o hidrogênio H-15 e C-3, H-17 e o carbono vinílico C-19, H-15 e C-14 entre outras (fig. 33).

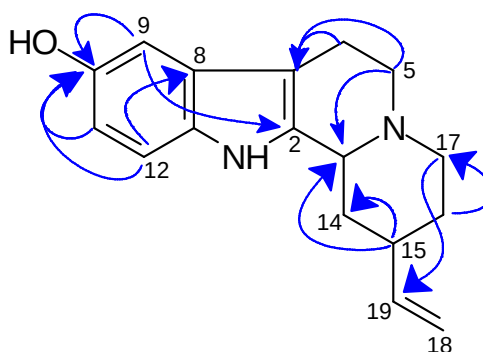


Figura 33: Correlações em HMBC de EPP28.1

Através da análise dos espectros de RMN ^{13}C , ^1H e experimentos bidimensionais de RMN chegou-se a proposta estrutural para o composto EPP 28.1 como o alcalóide indólico do tipo tetrahydro-β-carbolina inédito.

Tabela 16: Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C , e correlações de HMQC, COSY e NOESY do alcalóide EPP28.1

Epp28.1						
N	DEPT	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	C	133,1	-			
3	CH	57,0	4,63 (sl)			
5	CH ₂	52,4	a 3,31 (1H;dd;4,6;12) b 3,42 (1H;dd;12;5,8)	H-6a,H-6b	C ₇ ; C ₃	H-6
6	CH ₂	18,1	a 2,73 (1H;dd;4,6;17) b 2,9-2,8 (1H;m)	H-5a H-5a	C ₇	H-5,H-9
7	C	105,8	-			
8	C	128,6	-			
9	CH	103,2	6,70 (1H;d;2,4)	H-11	C ₁₀ ,C ₂	H-6
10	C	151,8	-			
11	CH	112,9	6,58 (1H;dd;8,7;2,4)	H-12, H-10	C ₁₀ ,C ₂	H-12
12	CH	112,8	7,07 (1H;d;8,7)	H-11	C ₁₀ ; C ₈	H-11
13	C	130,7	-			
14	CH ₂	27,2	a 1,74 (1H;d;12) b 1,50 (1H;sl)			
15	CH	47,1	3,03 (1H;sl)		C ₃ ; C ₁₄	
16	CH ₂	31,6	a 2,07 (1H;s) b 2,19 (1H;sl)	H-17 H-17, H-19	C ₁₇ C ₁₇	H-17 H-21
17	CH ₂	64,0	3,53 (2H;m)	H-16a,b	C ₁₉	H-15,16a
18	CH ₂	118,5	a 5,07 (1H;d;10) b 5,05 (1H;d;17)	H-19		H-19 H-19
19	CH	138,7	5,57 (1H;ddd;17;10;6,6)	H-18, H-16		H-18a,b

4.2.6. EPP39-37

O composto EPP39-37 foi isolado como um sólido amorfo vermelho.

O espectro de infravermelho (IV) apresenta bandas de absorção referente à deformação axial de C=C de aromáticos 1447 e 1500 cm^{-1} , característico de deformação axial de ligação C=C isolada em 1623 cm^{-1} , referente a deformação axial C-H de alqueno em 2918 cm^{-1} , característico de deformação axial de ligação C-O de éter de cadeia cíclica 1107 cm^{-1} .

Na análise do espectro de RMN de ^1H para o composto Epp39-37 observou-se o aparecimento de seis sinais na região dos aromáticos, sendo dois dubletos em δ_{H} : 8,8 ppm (1H; d; $J=6$ Hz) e δ_{H} : 8,6 ppm (1H; d; $J=6$ Hz) e quatro hidrogênios que se correlacionam (COSY) indicando a presença de um anel aromático dissustituído.

Os dados de RMN de ^1H revelam ainda, dois multipletos, em δ_{H} : 5,7-5,6 ppm (1H), e em δ_{H} : 5,2-5,1 (2H), que estão diretamente correlacionados (HMQC) aos carbonos em δ_{C} : 118,8 (CH_2) e 135,6 (CH) típicos de dupla terminal.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta um sinal típico de grupo carbonila de cetonas. A análise de RMN de ^{13}C apresenta também, sinais de carbonos quaternários em δ_{C} : 142,0; 138,4; 126,7; 121,2 e 121,7, sendo este último deslocado para a direita em relação a sinais típicos de carbonos β -carbólicos.

A análise dos dados de RMN mostra também o sinal do carbono carbinólico em δ_{C} : 89,3 diretamente correlacionado (HMQC) ao sinal em RMN ^1H δ_{H} : 6,6 (sl) e um CH_2 carbinólico em δ_{C} : 64,6 (δ_{H} : 3,9-3,2) que apresentam correlações a longa distância (HMBC) entre si, característicos do anel da ofiorina (CARVALHO, 2002) como na proposta estrutural do alcalóide **(1)** e **(2)**.

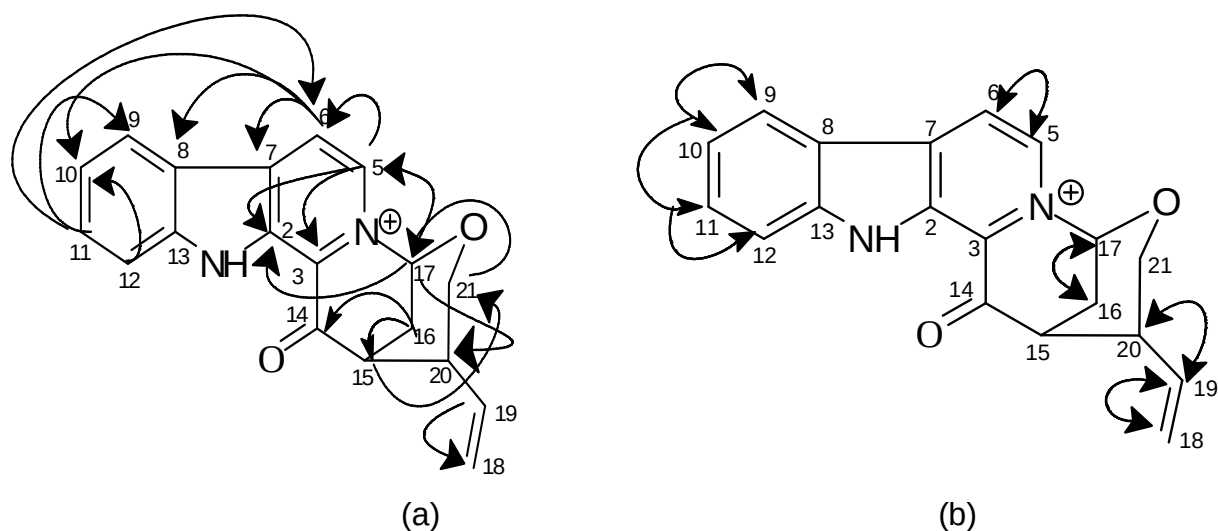


Figura 34: Correlações em HMBC (a) e em COSY (b) do alcalóide 5.

A análise destes dados contribuíram para a proposta estrutural semelhante ao alcalóide (2), porém com a diferenciação de um sinal de carbono em δ_C : 153.4 que se correlaciona com 3 prótons aromáticos (H_{9-10} , H_{12}). Sinais de carbonos ligeiramente deslocados em relação aos carbonos atribuídos na molécula e com o aparecimento de novos sinais mantendo-se a intensidade e a integração dos sinais primeiramente observados (e atribuídos) deste e outros compostos isolados de *P.prunifolia* quando submetidos à repetidas análises de RMN chamou a atenção para a possibilidade da observação de tautomerismo ocorrido quando a amostra encontrava-se em solução.

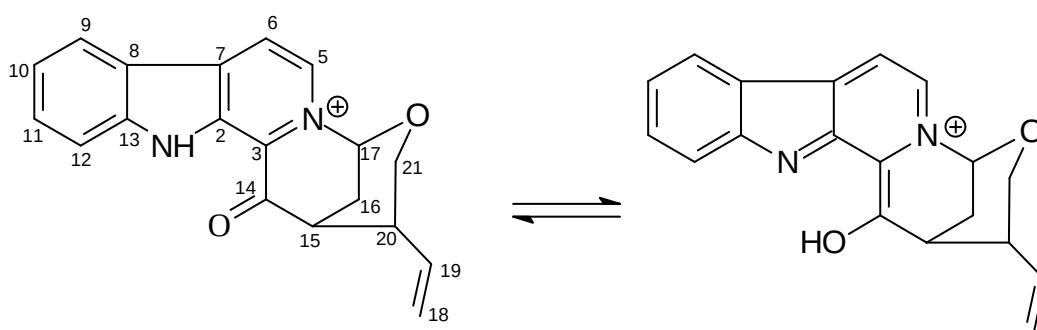
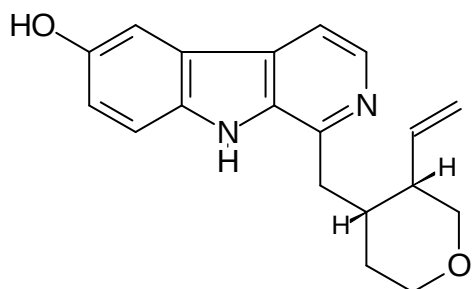
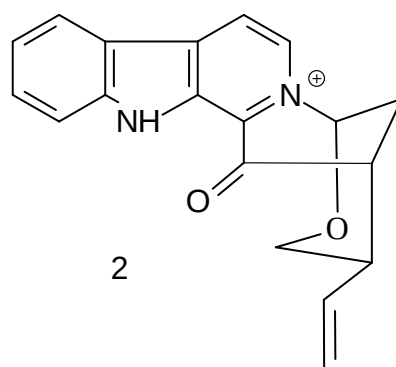
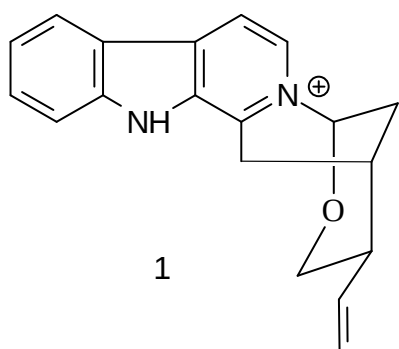


Figura 35: Proposta de tautomerismo ceto-enólico sugerido para o composto EPP39-37.

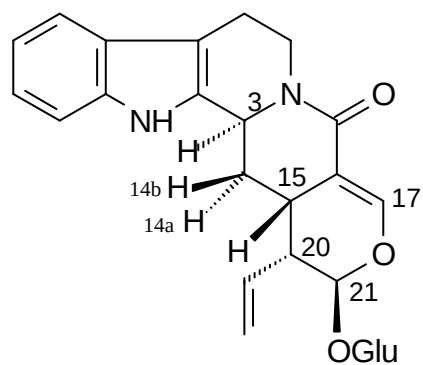
A estrutura de Epp39-37, igual à estrutura do alcalóide 3, em possível equilíbrio ceto-enólico ainda não é definitiva estudos mais detalhados estão sendo realizados pelo grupo de pesquisa para explicar o equilíbrio por dados de RMN.

Tabela 17: Dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C do alcalóide EPP39-37.

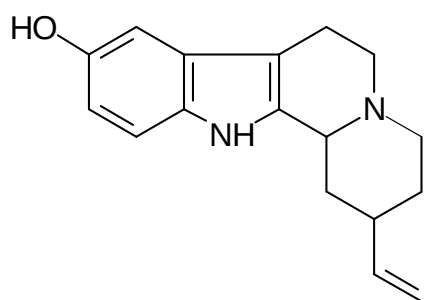
EPP39-37			
N	DEPT	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)
2	C	134,2	-
3	C	138,4	-
5	CH	132,8	8,59 (d, 6)
6	CH	120,8	8,81(d, 6)
7	C	121,7	-
8	C	121,2	-
9	CH	124,58	8,39 (d, 8,1)
10	CH	123,1	7,42 (td, 7,5; 0,9)
11	CH	126,7	7,7-7,8(m)
12	CH	116,6	7,7-7,8 (m)
13	C	142,1	-
14	C	192,7	-
15	CH	43,6	3,20-3,28 (m)
16	CH_2	31,1	2,7-2,6 (m) 2,9-3,0 (m)
17	CH	89,3	6,58 (s)
18	CH_2	118,8	5,211-5,23(m) 5,1(m)
19	CH	135,6	5,7-5,6 (m)
20	CH	44,9	3,20-3,28 (m)
21	CH_2	64,6	3,9-3,8(m)



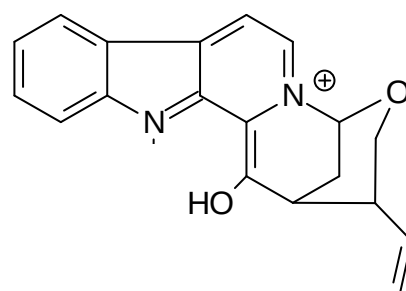
EPP 26.2



Estrictosamida



EPP 28.1



EPP39.37

Figura 36: Compostos isolados das folhas de *P. prunifolia*.

4.3 – Bioensaios

4.3.1 Bioautografia

Todas as frações e o extrato bruto das folhas apresentaram inibição frente às bactérias testadas. Comparado ao resultado dos testes para o extrato bruto do caule, as folhas mostram maior ação antibacteriana frente a todos os microorganismos testados.

Tabela 18: Atividade antibiótica dos extratos de *Psychotria prunifolia*.

Extratos	<i>E.coli</i>	<i>E.coli (res)</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
Etanólico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Hexânico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Clorofórmico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Acetato de Etila	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Etanólico do Caule	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

As frações que apresentaram maior halo de inibição foram selecionadas para o teste de determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Os resultados apresentados na tabela 19 mostram concentrações $\geq 500 \mu\text{g/mL}$, sendo considerado pouco ativo.

Tabela 19: Resultados da avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) em ppm, extratos de *Psychotria prunifolia*.

Extratos	<i>E.coli (res)</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EC	1000	500
EH	1000	1000

4.3.2 Antioxidante

Os resultados mostram que concentrações 162, 144, 231µg/mL dos extratos permitiram reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%. O extrato bruto das folhas mostrou-se menos promissor quanto ao potencial antioxidante comparado aos caules e raízes.

Tabela 20: Avaliação de atividade antioxidante dos extratos de *P. prunifolia* expressa em CE₅₀.

Extratos	CE ₅₀ (µg/mL)
Caule	162
Raiz	144
Folha	231

O BHT, usado como controle positivo, é um antioxidante comercial que apresenta CE₅₀ = 12µg/mL.

4.3.3 Dermatófitos

O extrato bruto das folhas foi capaz de inibir cerca de 50% dos isolados testados em concentrações ≤256mg/mL este valor segundo LUCENA, *et. al.* (2007) demonstra razoável atividade antifúngica *in vitro*.

4.3.4 Citotóxica

O extrato bruto das folhas de *P. prunifolia* foi testado frente a linhagem de células S-180 (sarcoma de camundongo). O valor de CE₅₀ encontrado foi 19,6 µg/ mL.

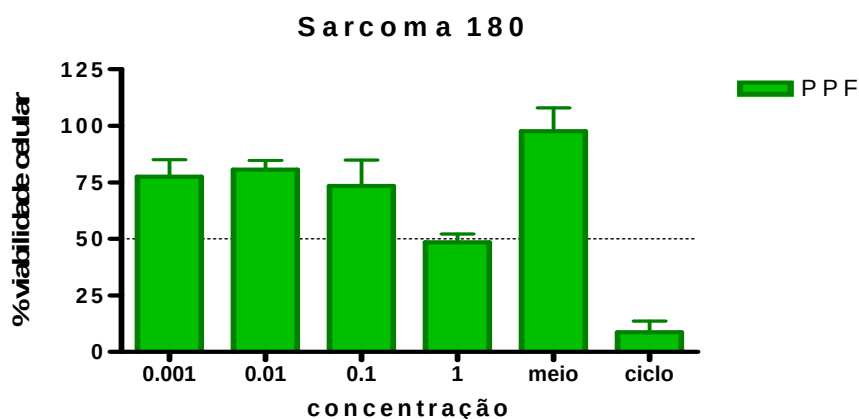


Figura 37: Viabilidade celular do extrato etanólico de *P. prunifolia* em diferentes concentrações.

O alcalóide (2) teve a atividade citotóxica avaliada frente a linhagem de células A 549 (carcinoma de pulmão humano) onde o CE_{50} calculado foi de 13,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$. As concentrações testados não abrangeram a concentração de CE_{50} , por este motivo o teste está sendo repetido.

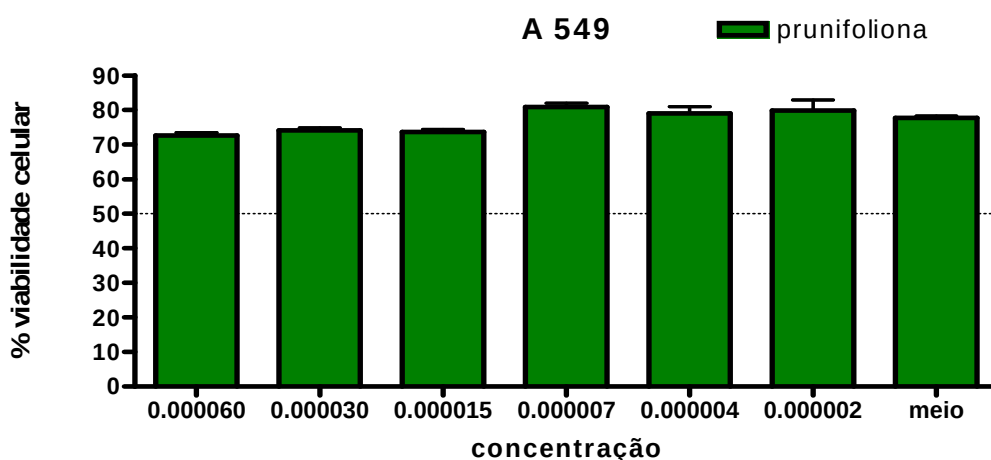


Figura 38: Viabilidade celular do alcalóide (2) em diferentes concentrações.

O extrato etanólico do caule mostrou resultados bons frente as quatro linhagens de células.

Os testes mostraram atividade citotóxica promissoras para extratos das folhas e caules de *P. prunifolia* e para o alcalóide (2) isolado. Novos estudos devem ser realizados a fim de analisar a ação das amostras.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, realizamos o estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm (Rubiaceae) onde apresentamos o isolamento, purificação e elucidação estrutural dos alcalóides **(1)**, **(2)**, EPP26.2 e EPP 28.1 e strictosamida, além de um estudo em andamento sobre tautomerismo de EPP39-37. Os alcalóides **(1)** e **(2)** EPP 28.1 e EPP26.2 são inéditos

O isolamento de alcalóides indol-monoterpenos em *Psychotria prunifolia* contribui para os estudos taxonômicos do gênero e reforçam a estreita semelhança dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria* de regiões pantropicais.

Os testes *in vitro* do extrato etanólico da planta com quatro tipos de cultura de células (S-180-sarcoma de camundongo, A549-carcinoma de pulmão humano, K562- leucemia mielóide crônica humana e HFF-1-células normais humanas –fibroblastos) mostraram promissora atividade citotóxica e antitumoral . Sendo necessários ensaios *in vivo* e com os compostos isolados para correlacionar a atividade com os alcalóides.

Os extratos das folhas apresentaram no teste de atividade antibacteriana Concentração Inibitória Mínima $\geq 500 \mu\text{g/ mL}$ frente a *E. coli* e *E. coli res.* sendo considerado pouco ativo. O extrato bruto das folhas mostrou-se pouco promissor quanto ao potencial antioxidante com CE_{50} de $231 \mu\text{g/mL}$. A atividade antifúngica *in vitro* mostrou-se razoável apresentando CE_{50} de $\leq 256\text{mg/mL}$, porém fica necessário mais estudos comprobatórios, provavelmente partindo de testes *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

ADJIBADÉ, Y. Pharmacognosie du *Psychotria forsteriana* A. Gray (Rubiaceae) – aspects botanique, chimique et essais pharmacologiques preliminaires. Paris, França. 1989, (These de Doctorat) - Université Louis Pasteur de Strasbourg I.

AMADOR, T.A. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of psychotridine . *Phytomedicine*, v.8, p.202-206, 2001.

BOLZANI, V. S.; MONTANARI, C. A; Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

BOTH, F. L.; MENEGUINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. *J. Nat. Prod.* v.69, p.342-345, 2006.

BOTH, Fernanda Lima. Avaliação do perfil farmacológico de psicolatina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae). 2005. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Brasília: 26p, 1999.

BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSSON, D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, v. 82, p. 383-397, 1995.

BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farnacognosia. 1 ed. Espanha: Editorial Acribia, S.A., p.467-517,1991.

BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y Farnacognosia. 1 ed. Paris: Editorial Acribia, S.A., 1993.

BURGER, W.C.; TAYLOR, C.M. Flora costaricensis. Fieldiana, v.33, p.1-333, 1993.

CARVALHO, M. G.; BASTOS, A. B. F. D.; VELANDIA, J. R. Constituintes químicos isolados de *Simira Glaziovii* (K.SCUM) STREYRM. e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do alcalóide ofiorina e seus derivados. Química Nova, v.25, p.241-245, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CHAVES, M. H.; SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.-Jr.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; LARA, E. H. G.; MORAES, H. P.; Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. Ver. Bras. Pl. Méd., Botucatu, v.8, n.4, p.173-182, 2006.

DELPRETE, P.G. Rubiaceae. In: SMITH, N.P. *et al.* Flowering Plant Families of the American Tropics. Ed. Princeton University Press, p. 328-333, 2004.

DELPRETE, P. G.; CHOZE, R.; DUFRAYER, C. F.; SILVA, R. A. Chemotaxonomy and macroclassification of Rubiaceae. In: THIRD INTERNATIONAL RUBIACEAE CONFERENCE RUBIACEAE, p.28, (18-21 September), Leuven, Belgium, 2006. Program and Abstracts. Leuven, 2006.

DEWICK, P. M.; Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester, Ed. John Wiley & Sons, v.2, p.351-359, 1997

DHOOGHE, L.; *et al.* Development and validation of an HPLC-method for the determination of alkaloids in the stem bark extract of NAUCLEA pobeguini. Talanta, v.76, p.462-468, 2008.

DUARTE, M. C. T., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A., REHDER, V. L. G., DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. J. Ethnopharmacol, v.97, p.305-311, 2005.

EMBRAPA CERRADOS. Embrapa cerrados: conhecimento, tecnologia e compromisso ambiental. Planaltina, 1999, p.34.

FARIAS, Fabiane Moreira. *Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica e sobre o sistema nervoso central. Porto Alegre, 2006, 217p. Tese (doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERNANDES, N. C.; AKITI, T.; BARREIROS, M. G. C. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. Rev Inst med Trop S. Paulo, v.43, p. 83-85, 2001.

HAMILTON, C. W. Variation on a distylous theme in mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). Memories of the New York Botanical Garden, v.55, p.62-75. 1990.

HENRIQUES, A.T.; LOPES, S.O; PARANHOS,TJ.T; GREGIANINI,T.S.; POSER,G.L.V; FETT-NETO, A.G.; SCHRPSMA J. N,β-D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. Phytochemistry, v.65, p.449-454, 2004.

HUGHES, E. W.; SHANKS, J. V. Metabolic engineering of plants for alkaloid production. Metab. Eng., v.4, p.41-48, 2002.

IBAMA, <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>, acessado em 01/02/2009.

JANSEN, M.; GABA, V.; GREENBERG, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.*, v.3, p.131-135, 1998.

KERBER, V. A.; PASSOS, C. S.; VERLI, H.; FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J. P.; HENRIQUES, A. T. Psychollatine, a glucosidic monoterpene indole alkaloid from *Psychotria umbellata*. *J. Nat. Prod.*, v.71, n.4, p.697-700, 2008.

KERBER, V. A. *et al.* Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J. Nat. Prod.*, v.64, p.677-679, 2001.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade*. v.1, p.147-155, 2005.

KUTCHAN, T. M.; Alkaloid biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, v.7, p.1059-1070, 1995.

LAGIS, N. H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R. F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*, *Planta Med.*, v.59, p.383-384, 1993.

LEAL, M.B.; ELISABETSKY, E. Oipoid-like activity of *P. brachypoda*. *Int. J Pharmacognosy*, v.34, n.4, p 267-272, 1996.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005, p.577.

LIÃO, L. M.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; NASCIMENTO, C. A.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A.; Alcalóides de *Palicourea coriacea*. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Águas de Lindóia, SP, 2006.

LIBOT, F. *et al.* Rubiacées D'Océanie: Alcalóides de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédone et de *Calycodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelles-Hébrides). J. Nat. Pro., v.50, n.3, p.468-473, 1987.

LIU, D.; PEARCE, L.; LILLEY, G.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDRESEN, J. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T soudanense* and *T gourvilli*. Journal of Medical Microbiology. v.51, p.117-122, 2002.

LIWSZYC, G. E. *et al.* Daime – a ritual herbal potion. J. Ethnopharmacol., v.36, p.91-92, 1992.

LOPES, S.; POSER, L. G.; KERBER, A. V.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). Biochemical Systematics and Ecology, v.32, p.1187-1195, 2004.

LUCENA, P. A.; SILVA, M. R. R.; SANTOS, D. R.; NEVES, F. A.; SOUZA, G. F.; KATO, L. Atividade in vitro de *Psychotria prunifolia* sobre dermatófitos. Científica Farmacêutica, v.4, n.2, p.107-109, 2007.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. Processamento de Sucos de Frutas Tropicais. Fortaleza, Edições UFC, 2007. p.320

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAURY, C. M. (Org). Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Distrito Federal, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA, 2002. p.404.

McKENNA, D. J.; TOWERS, G. N. T.; ABBOT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: triptamine and B-carboline constituents of Ayahuasca. *J. Ethnopharmacol*, v.10, p.195-223, 1984.

MEMELINK, J.; VERPOORTE, R.; KIJNE, J. W.; ORCANIZATION of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.*, v.6, p.212-219, 2001.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v.403, p.853-858, 2000.

NASCIMENTO, G. F. G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.,247-256, 2000.

OLIVEIRA, P. L. Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: Espécie *Amaioua guianensis* Aubl. Goiânia, 2009. Dissertação Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.

OLIVEIRA, P. S., MARQUIS, R. J. The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. Nova Iorque, Columbia University Press, 2002. p.398.

PELLETIER, S. W. Chemistry of the alkaloids. Nova Iorque, Van Nostrand Reinhold, 1970. p.795.

PERRY, L. M. Rubiaceae – dans *Medicinal Plants of East and Southeast Ásia*. MIT Press, 1980. p.347-360.

PIRES, M. J. P.; GRIPP, A. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em banco ativo de germoplasma. Manaus, *Acta Amazônica*, 1988. v.18, n.1/2, p.61-73.

RATTER, J. A., RIBEIRO, J. F., BRIDGEWATER, S. The brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.*, v.80, p.223-230, 1997.

ROBBERS, J. E.; SPEEDLE, M. K.; TYLER, V. E. *Pharmacognosy and pharmacobiothechnology*. Philadelphia, Willians e Wilkins, 1996.

ROBERTS, M. F.; STRACK, D. () Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains, In: WINK, M. *Biochemistry of plant secondary metabolism*. 1999. *Ann. Plant Rev.* 1999, v.1, p.17-18.

ROVA, J. H. E.; DELPRETE, P. G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V. A. A *trnL-F* cpDNA sequence study of the Condamineeae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. *American Journal of Botany*. v. 89, p. 145-159, 2002.

SANO, E. E.; BEZERRA, H. S.; BARCELLOS, A. O.; ROSA, R. *Metodologias para mapeamento de pastagens degradadas no cerrado*. Planaltina, DF, Embrapa cerrados, 2002.

SANTOS, L.V.; FETT-NETO, A. G.; KERBER, V. A.; ELISABETISKY, E.; QUIRION, J. C.; HENRIQUES, A. T. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Mull. Arg. (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.29, p.1185–1187, 2001.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; PRADO, G. M.; Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos latinoamericanos de nutricion*. v.58, n.4, p.187-192, 2008.

SCHRIPSEMA , J; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. p.689-716, 2001.

SÉRPICO, R. L.; CAMURÇA, D. M.; Ayahuasca: Revisões teóricas e considerações botânicas sobre as espécies *Banisteriopsis caapi* Morton, 1931 e *Psychotria viridis* Ruiz e Pavon, 1779. Guarulhos, 2006. Monografia - Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Universidade de Guarulhos.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V.; FILHO, R. B. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (Malvaceae) Química. Nova, v.29, n.6, p.1250-1254, 2006.

TAYLOR, C. M. Overview of Psychotrieae (Rubiaceae) in the Neotropics. Opera Botanical Belgica, v.7, p.261-270, 1996.

UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. Journal of Ethnopharmacology, v.45, n.1, p.1-18, 1995.

VENCATO, I.; SILVA, F. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; TANAKA, C. M. A.; SILVA, C. C.; SABINO, J. R. Acta Cryst. E62, p.429-431, 2004.

WEINSTEIN, A.; BERMAN, B. Tropical treatment of common superficial tinea infection. American Family Physician, v.65, p.2095-2102, 2002.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. Altern. Med. Rev., v.6, n.6, p.567-79, 2001.

WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. Curr. Opin. Plant Biol., v.5, p.1-8, 2002.

Zhang, Z., ElSohly, H.N., Jacob, M.R., Pascop, D.S., Walker, L.A., Clark, A.M. New Indole Alkaloids from the Bark of *Nauclea orientalis*. *Journal of Natural Products*. V 64, n 8, p.1001-1005, 2001.

ANEXO A

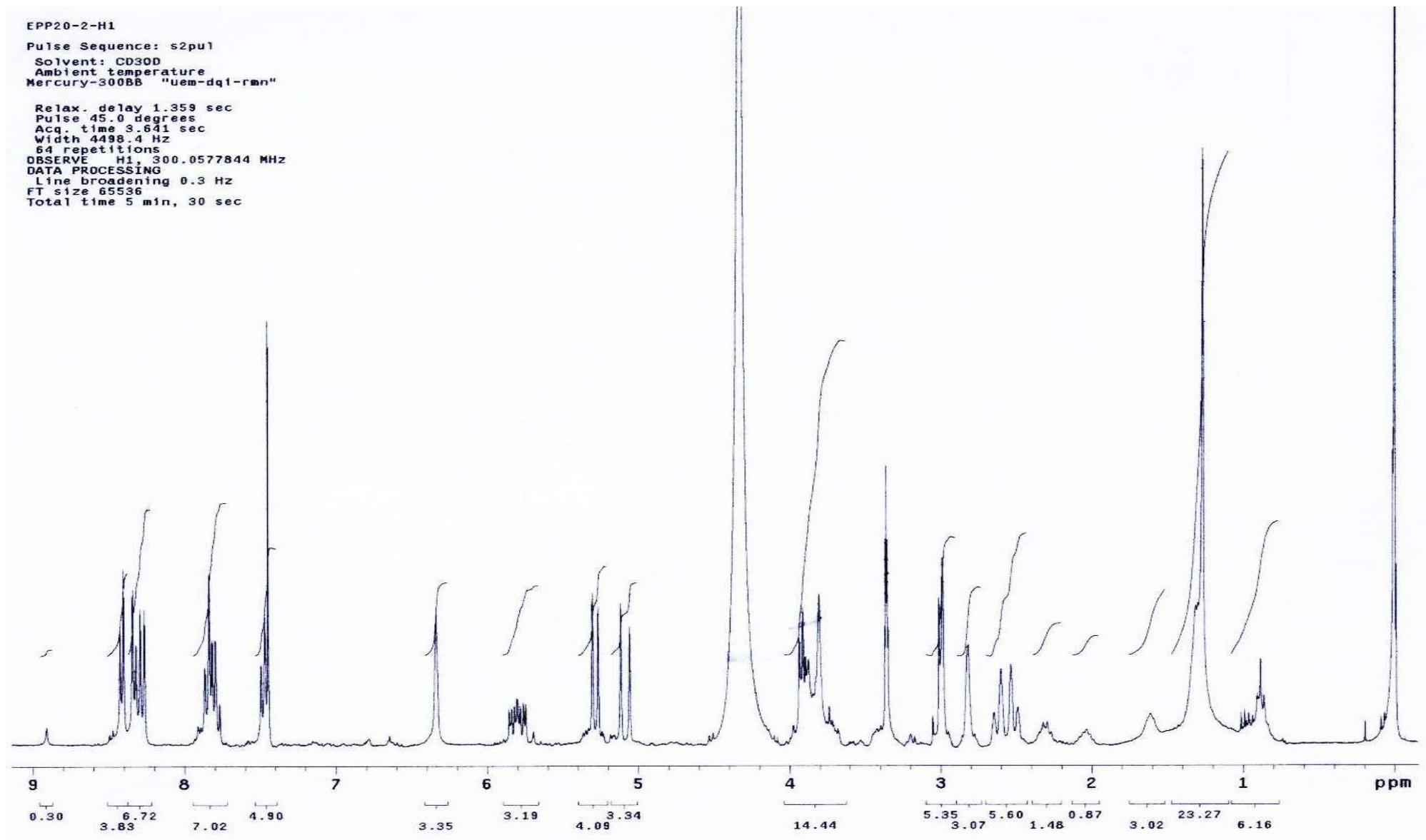


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 300 MHz) do alcalóide (1).

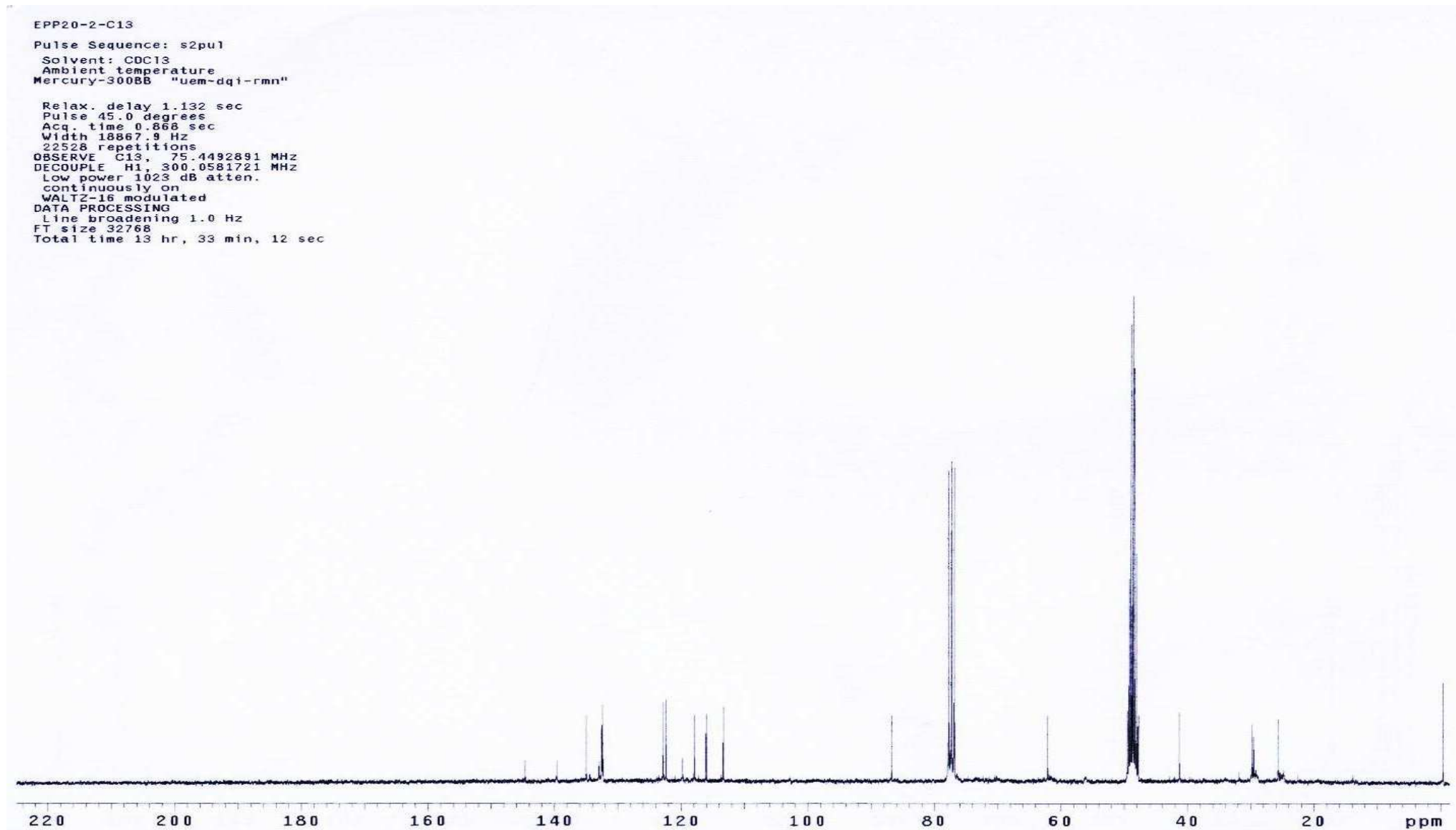


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 75 MHz) do alcalóide (1).

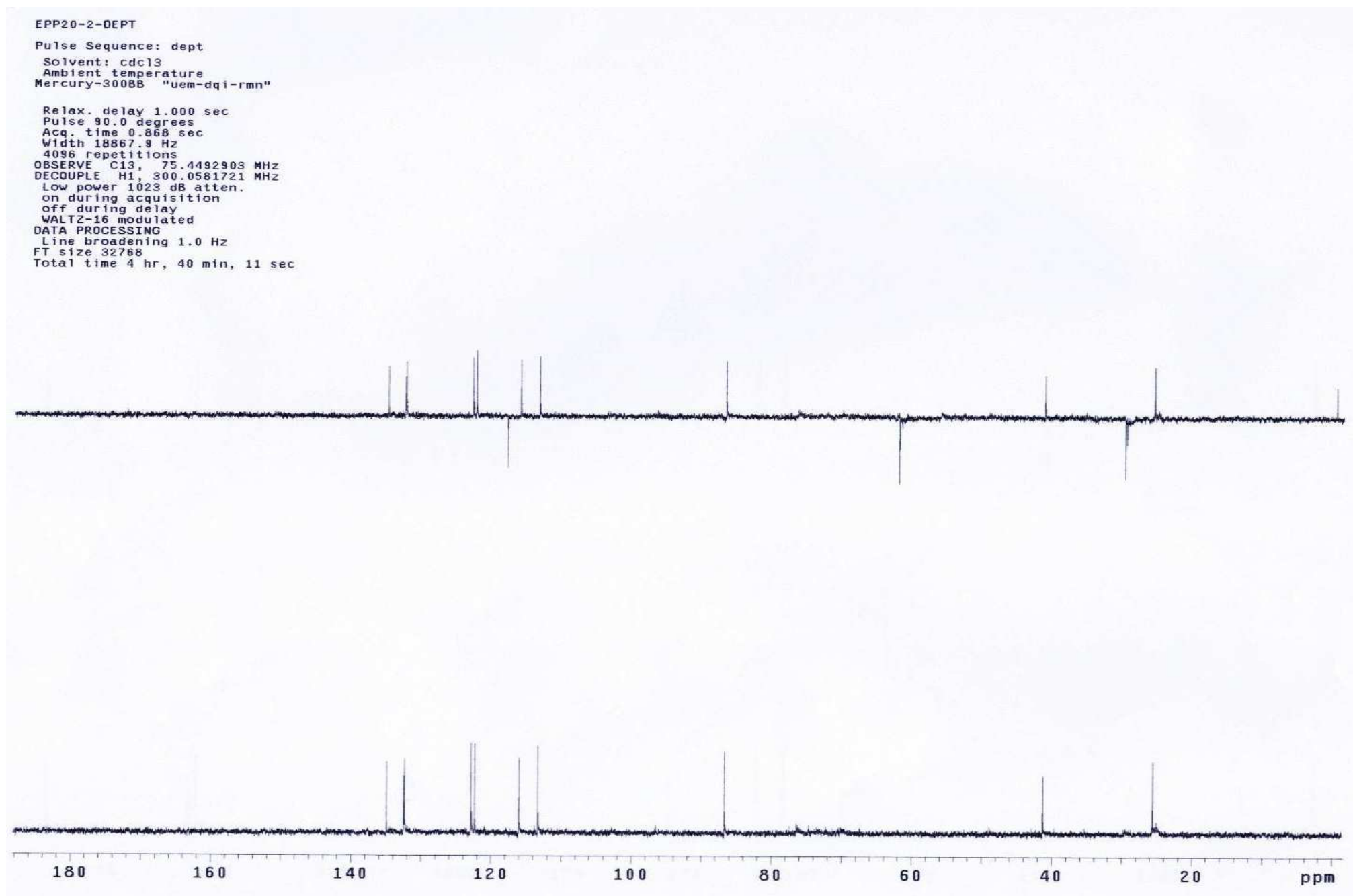


Figura 41: Experimento de DEPT ($135^\circ/90^\circ$) do alcalóide (1).

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Total time 11 min, 42 sec



EPP20-2-HMQC

Pulse Sequence: HMQC

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.153 sec

Width 3351.2 Hz

2D Width 12820.5 Hz

8 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 300.0565561 MHz

DECOUPLE C13, 75.4549374 MHz

Low power 1023 dB atten.

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.071 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.018 sec

FT size 1024 x 2048

Total time 55 min, 19 sec

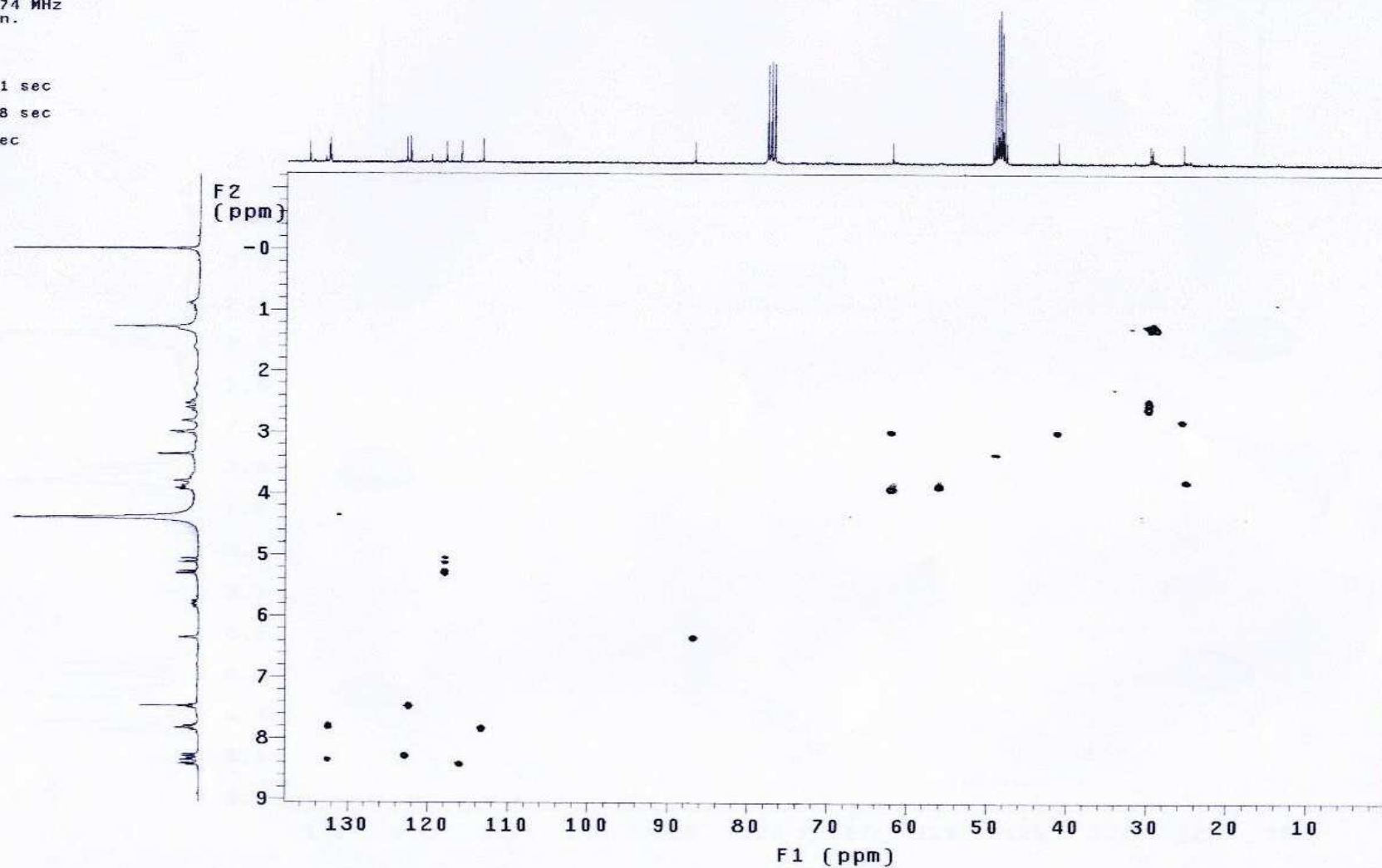


Figura 43: Experimento de HMQC do alcalóide (1).

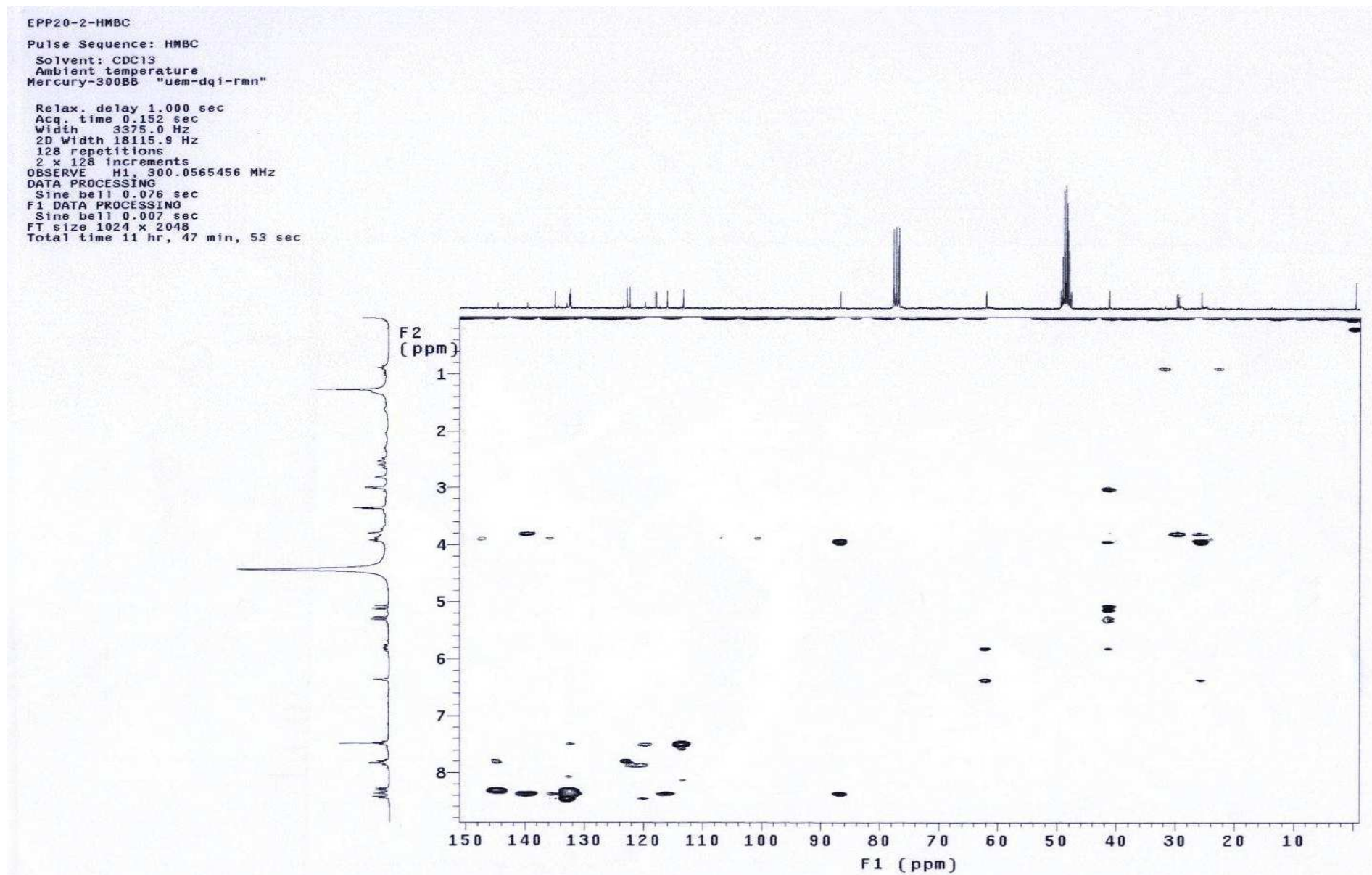


Figura 44: Experimento de HMBC do alcalóide (1).

EPP20-2-NOESY
Pulse Sequence: NOESY
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.500 sec
Mixing 1.000 sec
Acq. time 0.152 sec
Width 3375.0 Hz
2D Width 3375.0 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 300.0565523 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.070 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.055 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 35 min, 5 sec

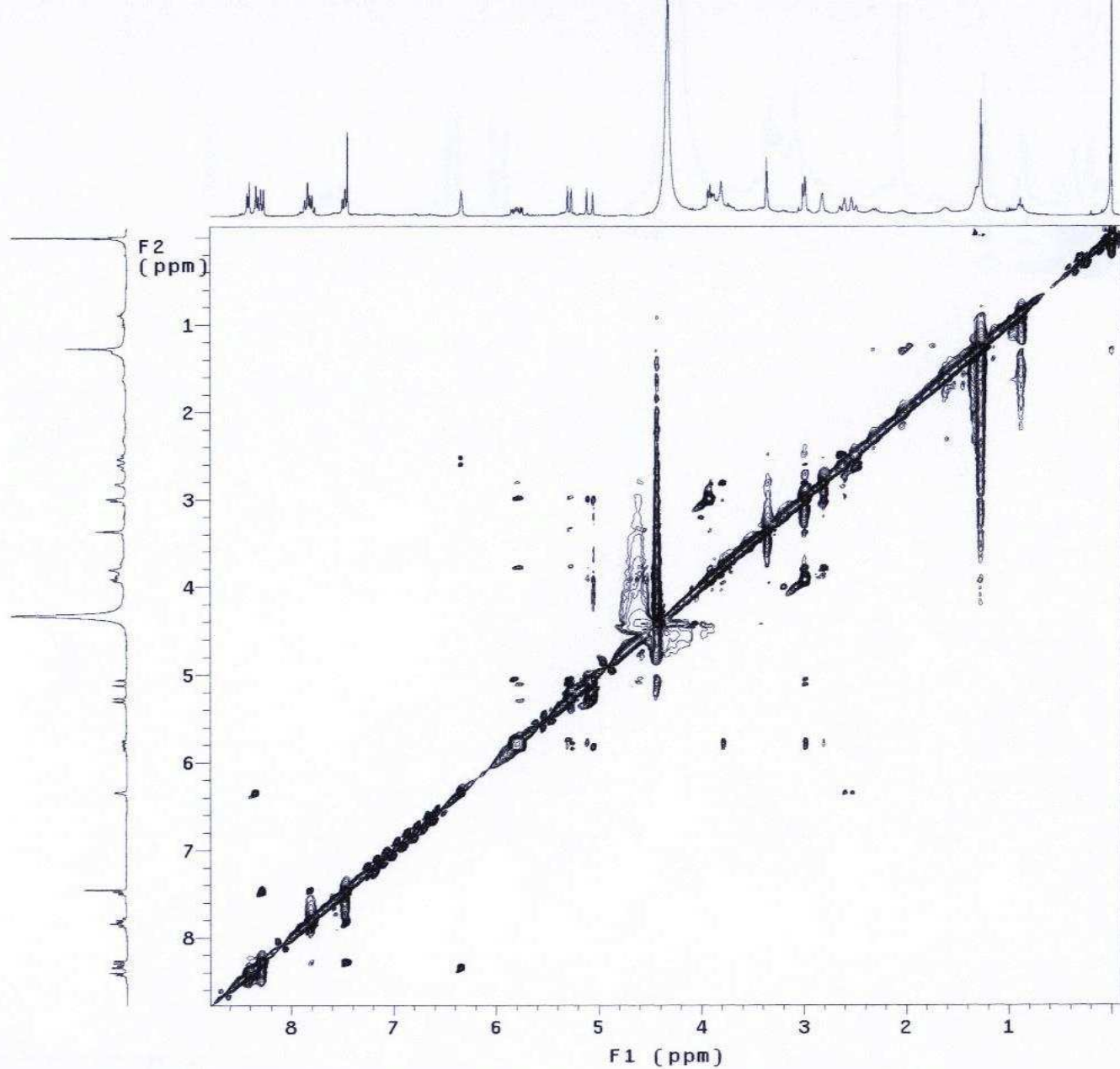


Figura 45: Experimento de NOESY do alcalóide (1).

EPP20-3-H1

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CD3OD

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.359 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 3.641 sec

Width 4498.4 Hz

64 repetitions

OBSERVE H1, 300.0577848 MHz

DATA PROCESSING

Line broadening 0.3 Hz

FT size 65536

Total time 5 min, 30 sec

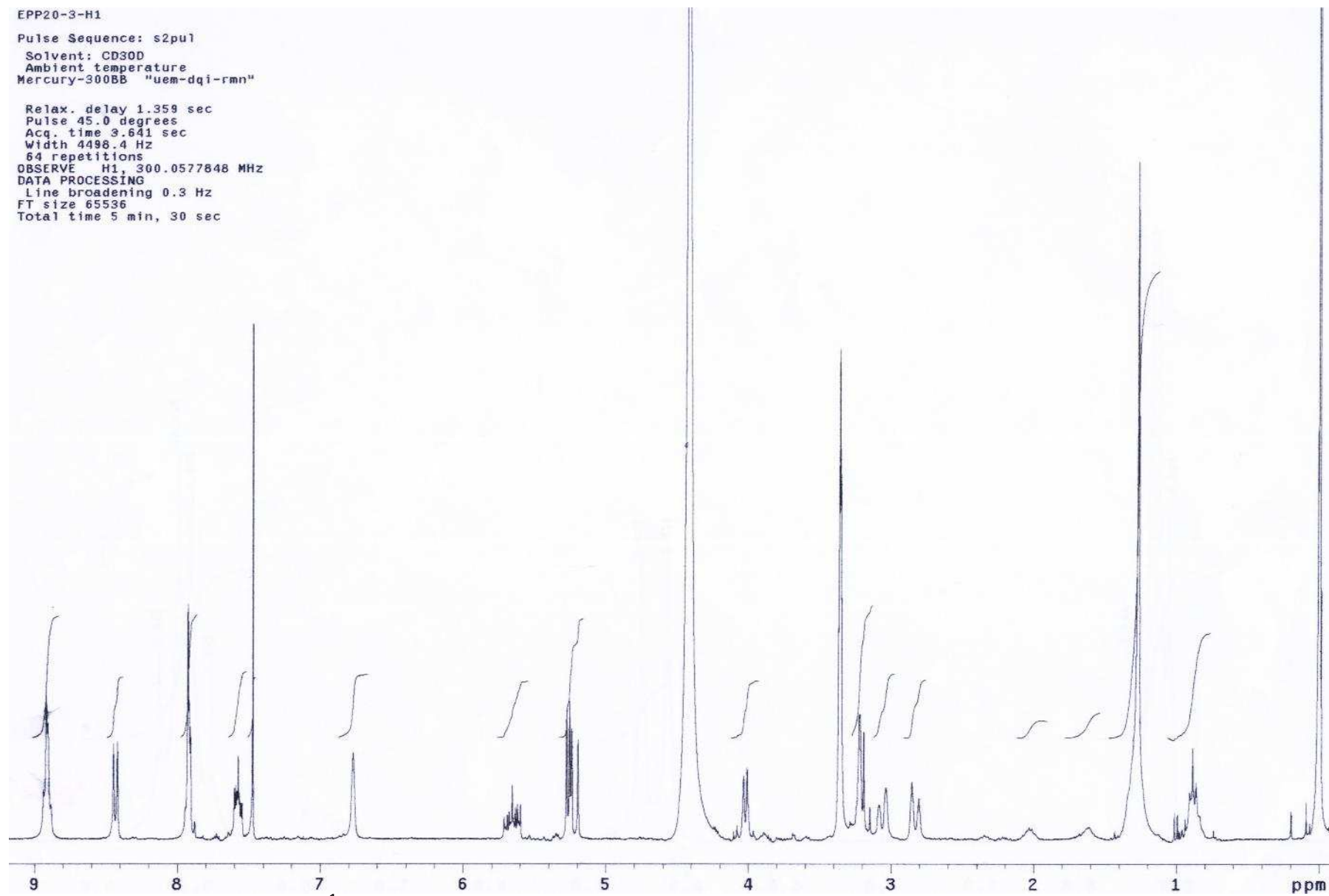


Figura 46: Espectro de RMN ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 300 MHz) do alcalóide (2)..

EPP20-3-C13

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.132 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.868 sec

Width 18867.9 Hz

15248 repetitions

OBSERVE C13, 75.4492891 MHz

DECOUPLE H1, 300.0581721 MHz

Low power 1023 dB atten.

continuously on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 12 hr, 19 min, 16 sec

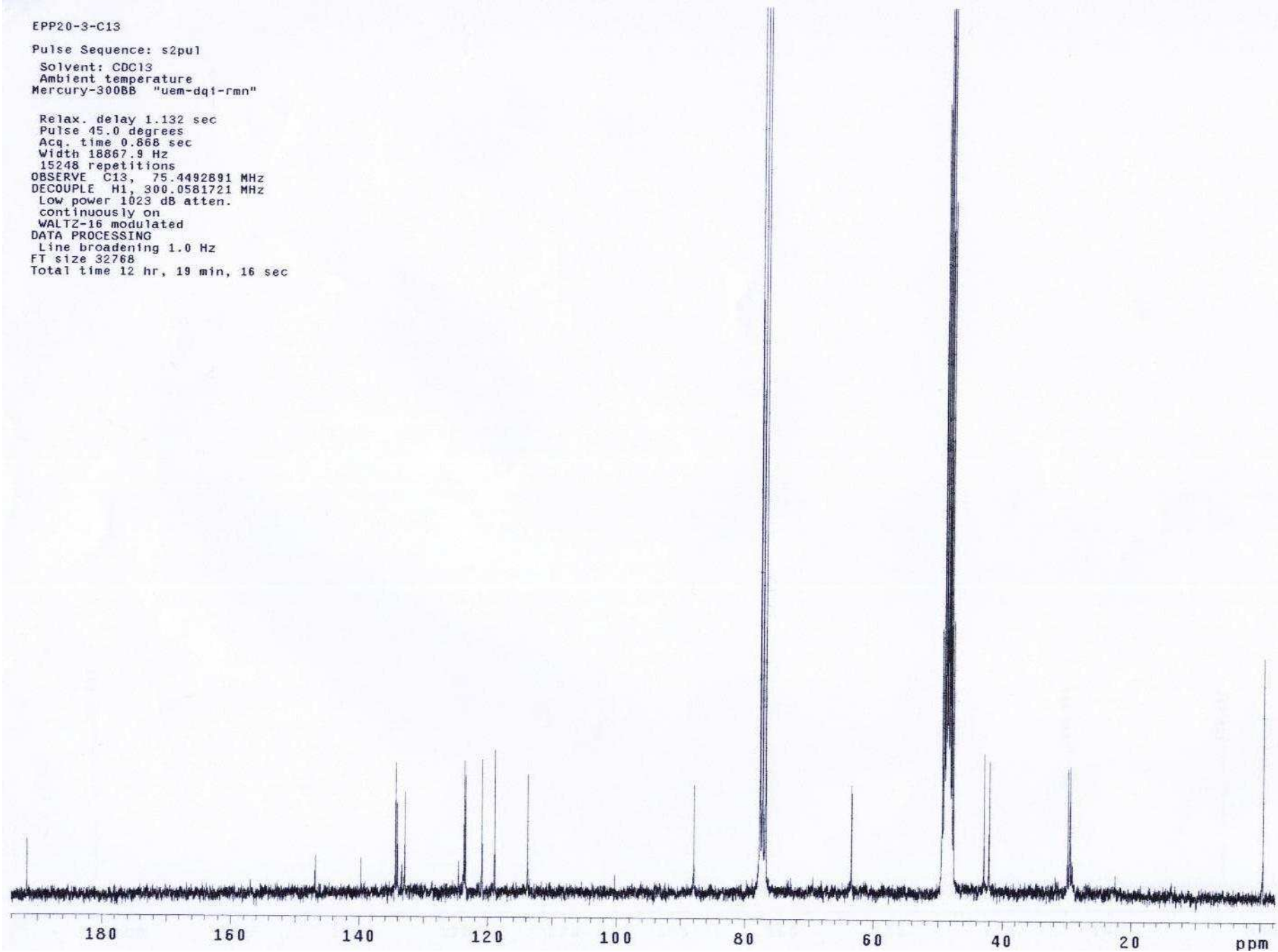


Figura 47: Espectro de RMN ¹³C (CD₃OD/ CDCl₃, 75 MHz) do alcalóide (2)

EPP20-3-DEPT
Pulse Sequence: dept
Solvent: cdc13
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 0.868 sec
Width 18867.9 Hz
4096 repetitions
OBSERVE C13, 75.4492891 MHz
DECOUPLE H1, 300.0581721 MHz
Low power 1023 dB atten.
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 4 hr, 40 min, 11 sec

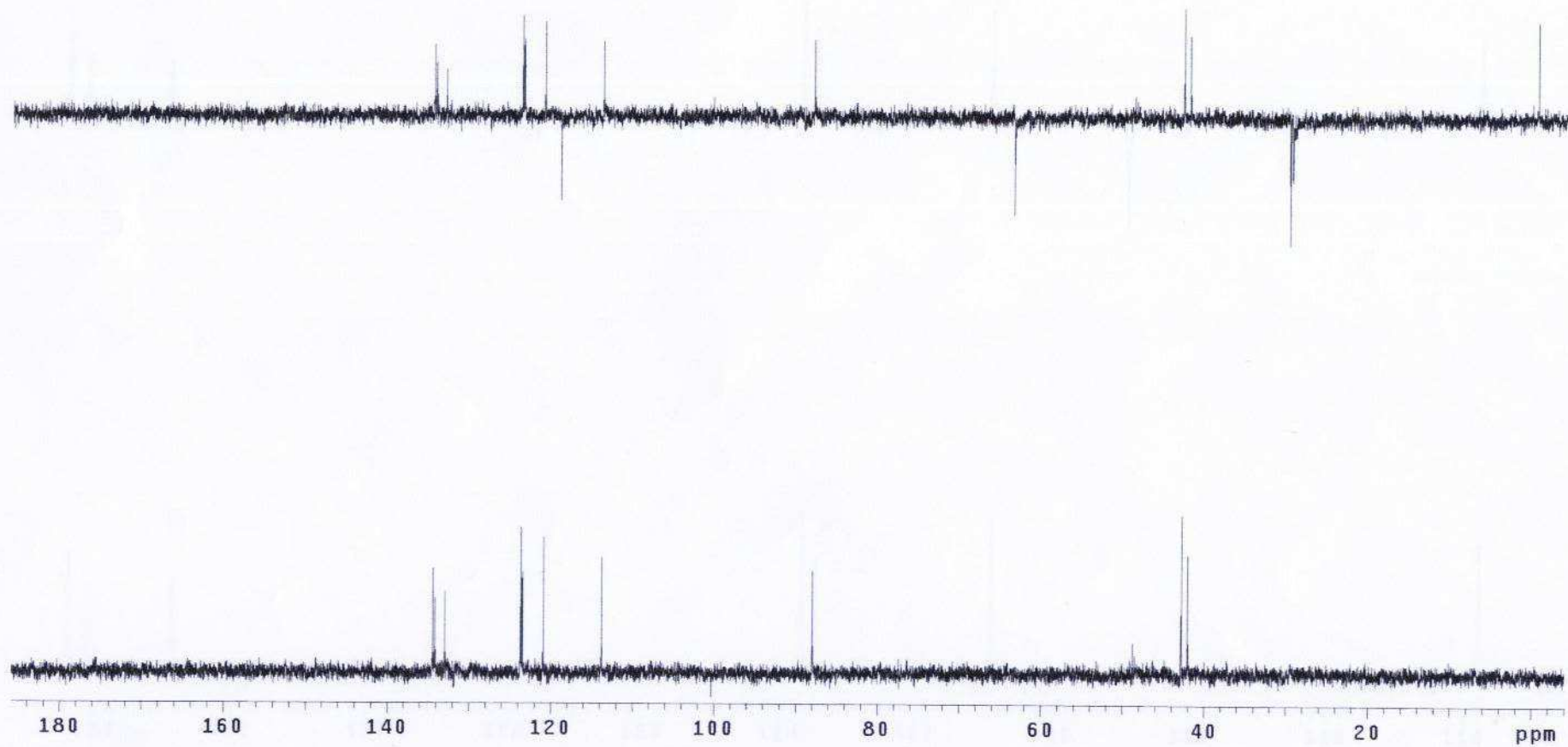


Figura 48: Experimento de DEPT (135°/90°). do alcalóide (2)

EPP20-3-COSY

Pulse Sequence: COSY

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.151 sec

Width 3380.7 Hz

2D Width 3380.7 Hz

8 repetitions

128 increments

OBSERVE H1, 300.0565466 MHz

DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.076 sec

F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.038 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 21 min, 56 sec

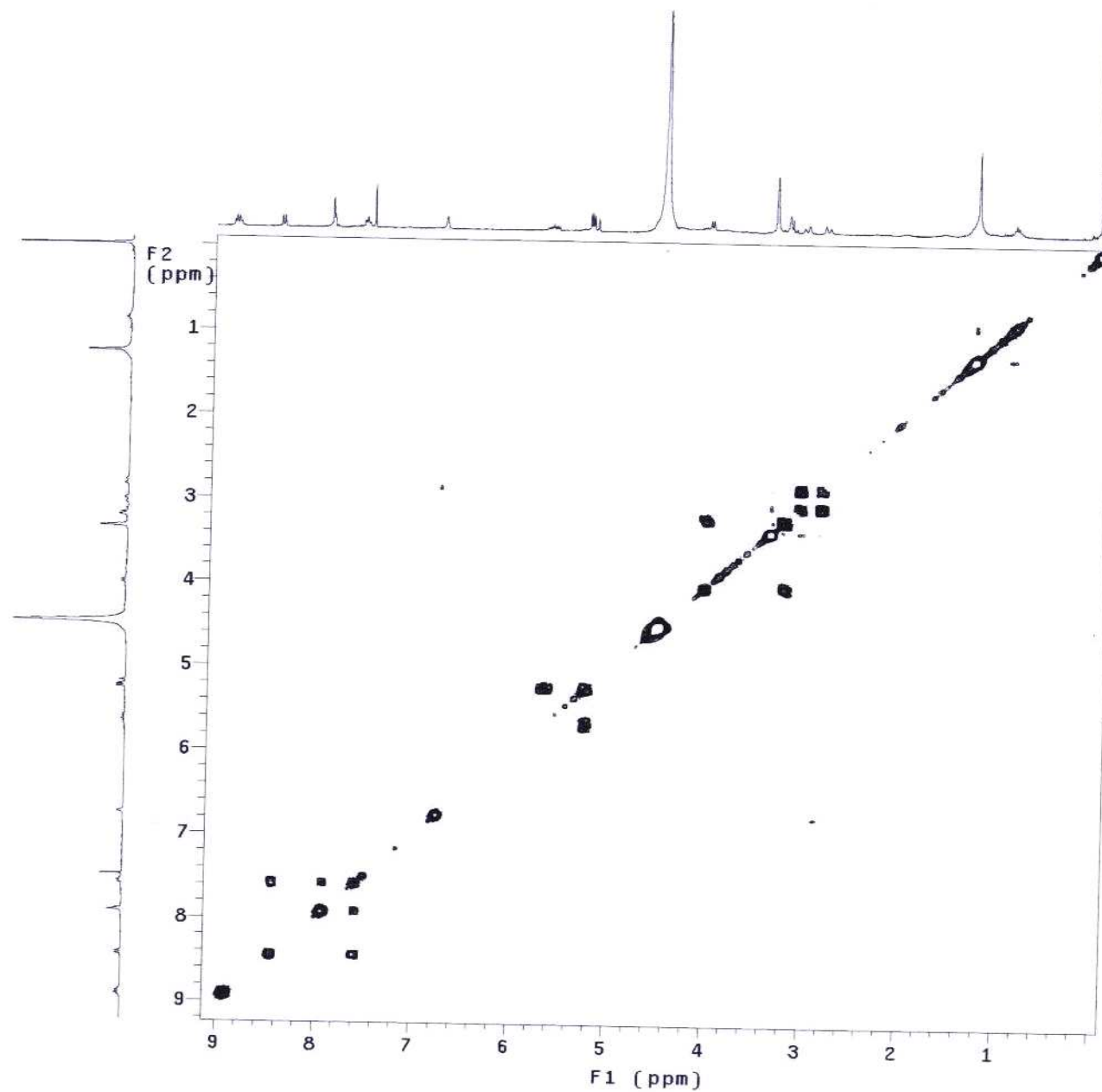


Figura 49: Experimento de COSY do alcalóide (2).

EPP20-3-HMQC
Pulse Sequence: HMQC
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.151 sec
Width 3380.7 Hz
2D Width 12820.5 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 300.0565466 MHz
DECOUPLE C13, 75.4549374 MHz
Low power 1023 dB atten.
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.070 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.018 sec
FT size 1024 x 2048
Total time 1 hr, 44 min, 50 sec

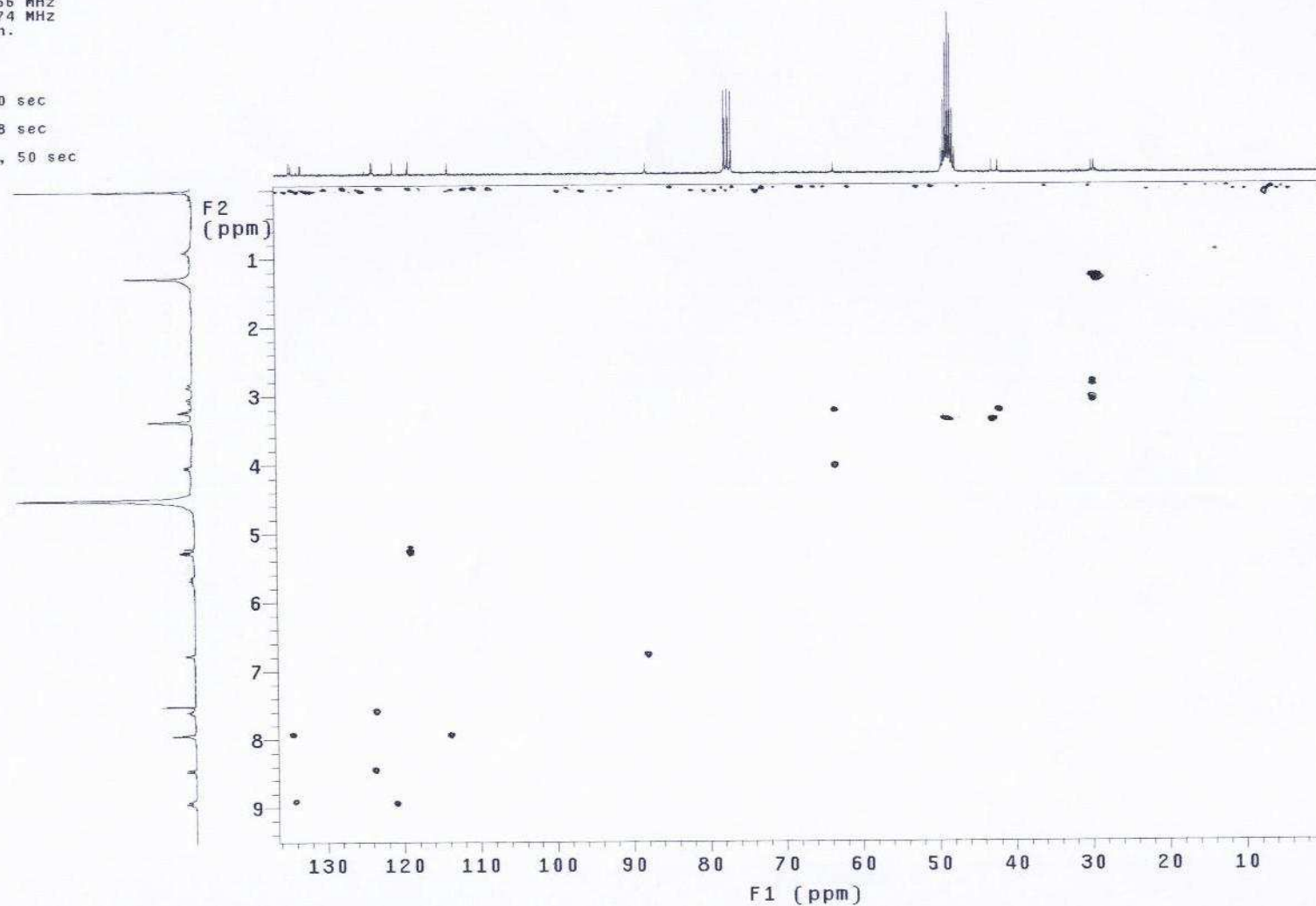


Figura 50: Experimento de HMQC do alcalóide (2)

EPP20-3-HMBC

Pulse Sequence: HMBC

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.149 sec

Width 3445.9 Hz

2D Width 18115.9 Hz

128 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 300.0565368 MHz

DATA PROCESSING

Sine bell 0.074 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.007 sec

FT size 1024 x 2048

Total time 11 hr, 46 min, 9 sec

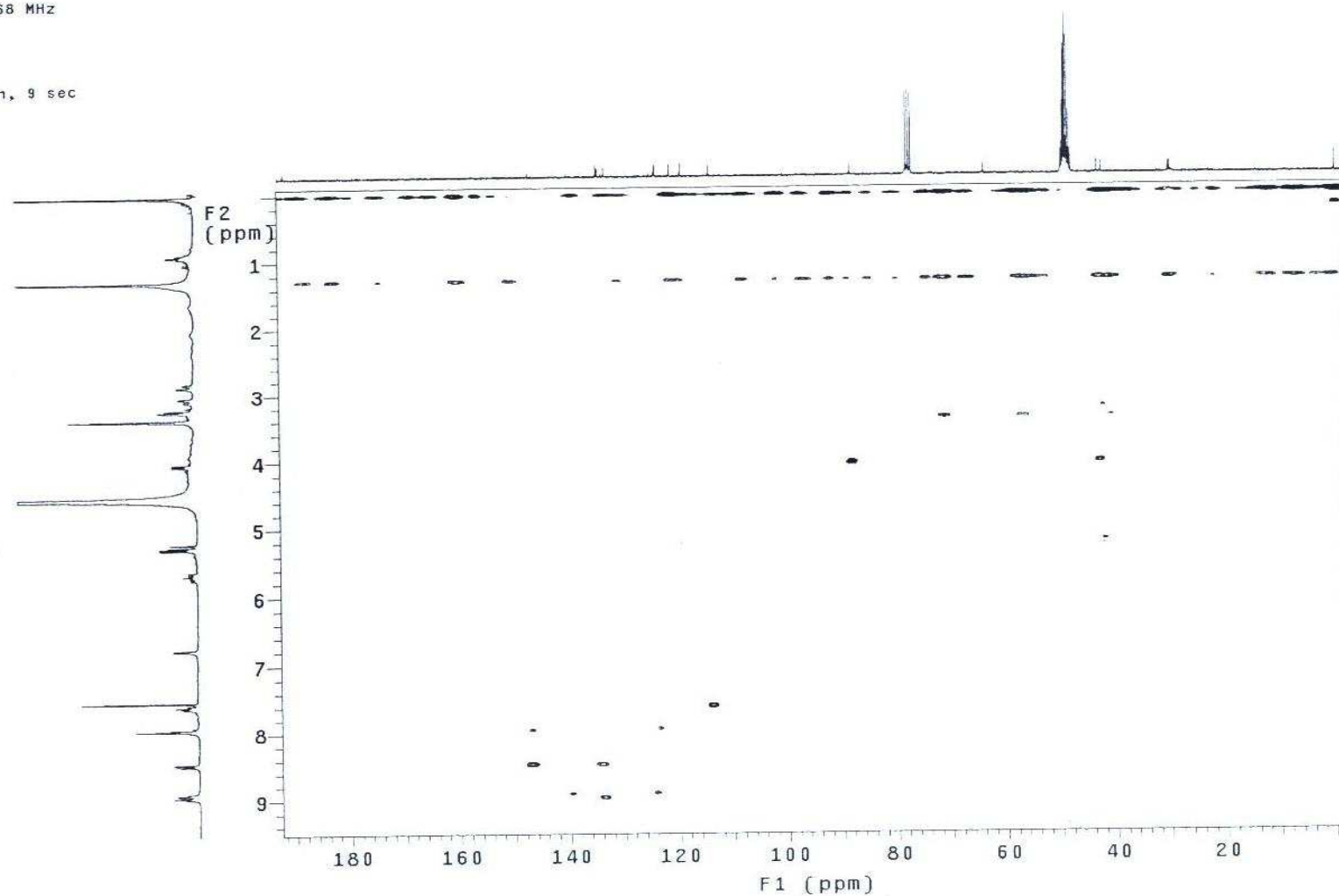


Figura 51: Experimento de HMBC do alcalóide (2)

FPP20-3-NOESY

Pulse Sequence: NOESY

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.500 sec

Mixing 1.000 sec

Acq. time 0.149 sec

Width 3445.9 Hz

2D Width 3445.9 Hz

16 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 300.0565431 MHz

DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.053 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 3 hr, 7 min, 5 sec

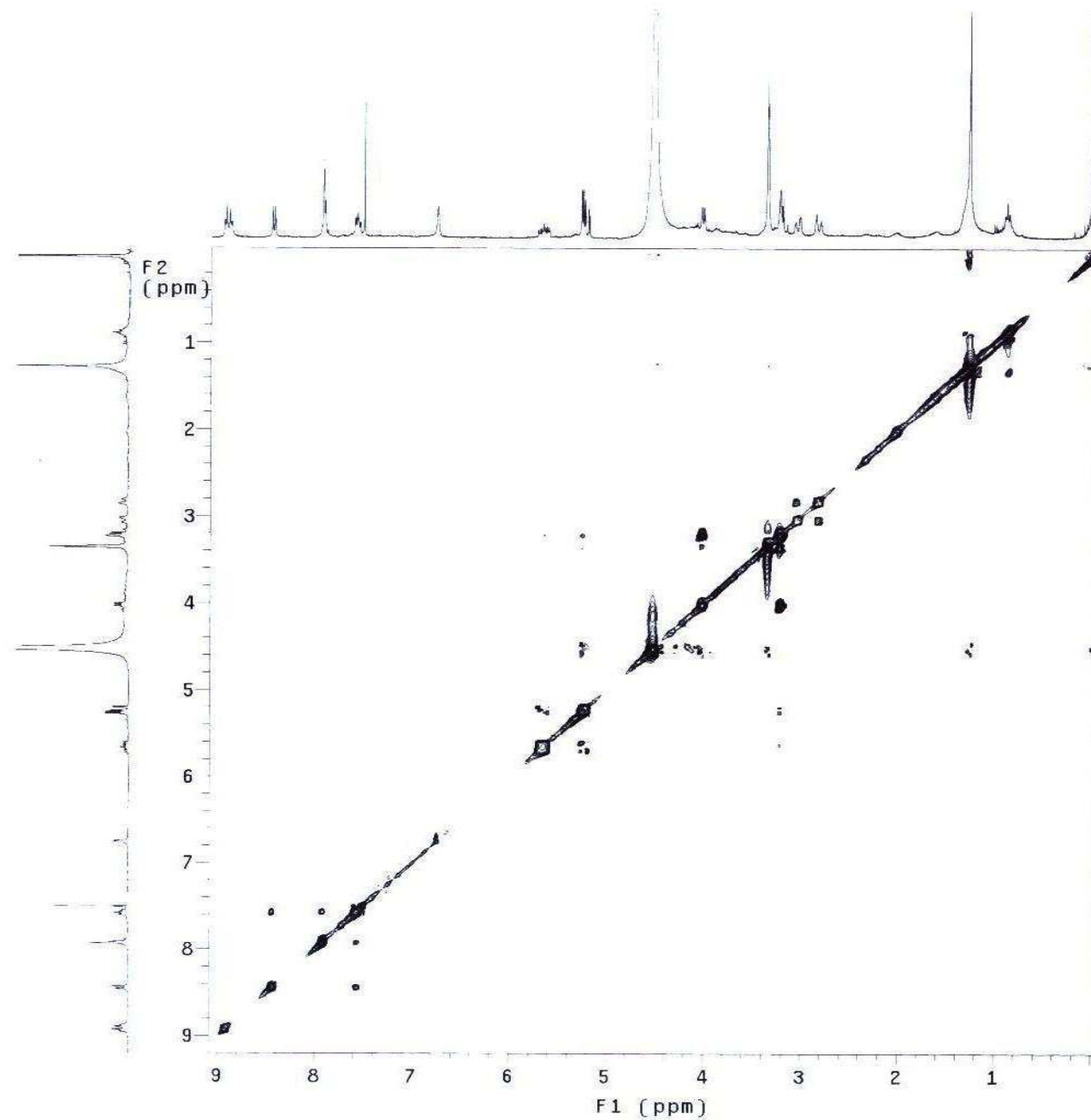


Figura 51.1: Experimento de NOESY do alcalóide (2)

EPP26-2-H1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
File: EPP26-2-H1
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4498.4 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1, 300.0578019 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 65536
Total time 5 min, 30 sec

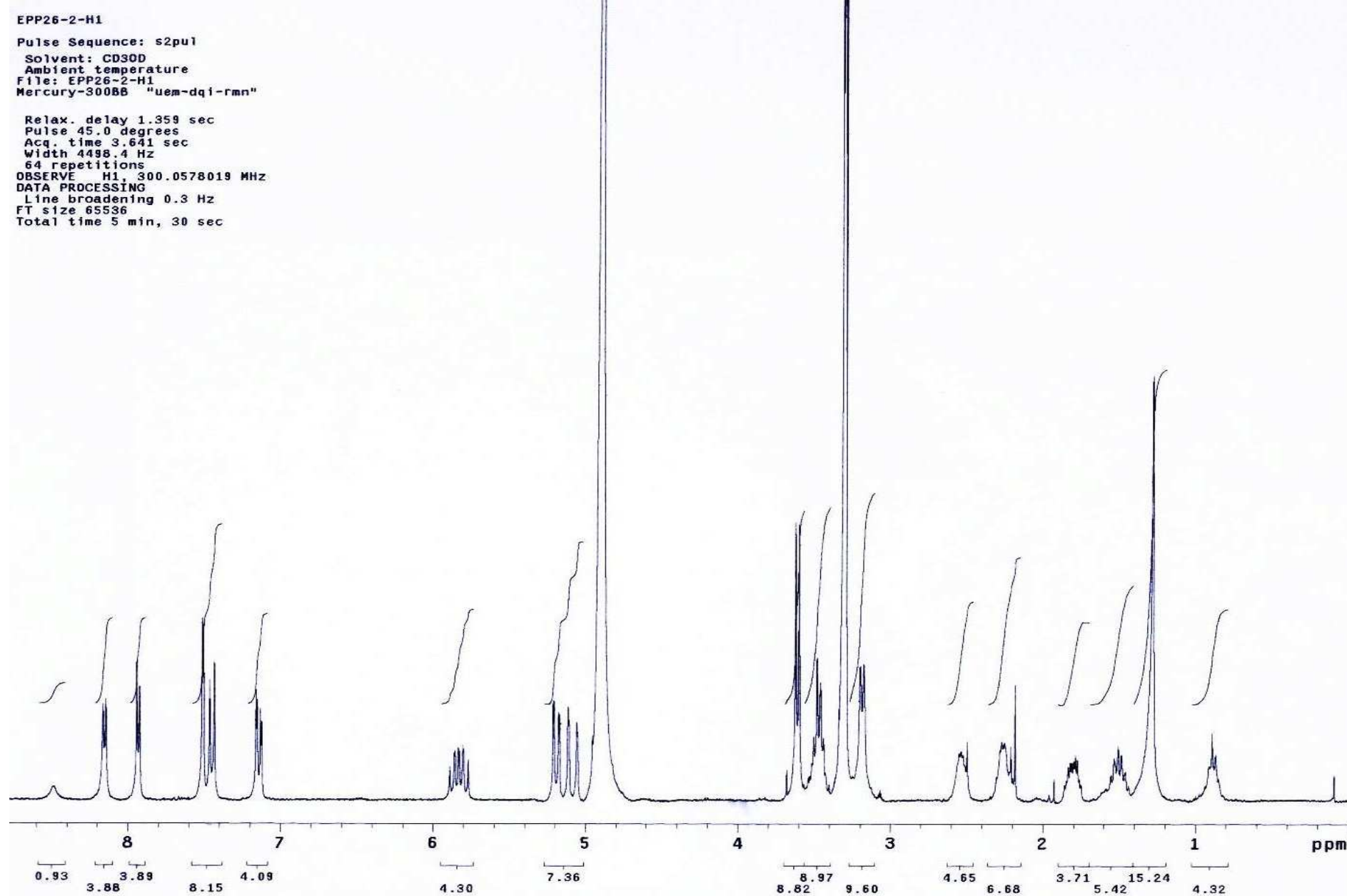


Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de EPP 26.2

EPP26-2-C13

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CD3OD

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.132 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.868 sec

Width 18867.9 Hz

18912 repetitions

OBSERVE C13, 75.4494856 MHz

DECOUPLE H1, 300.0593543 MHz

Low power 1023 dB atten.

continuously on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 13 hr, 33 min, 12 sec

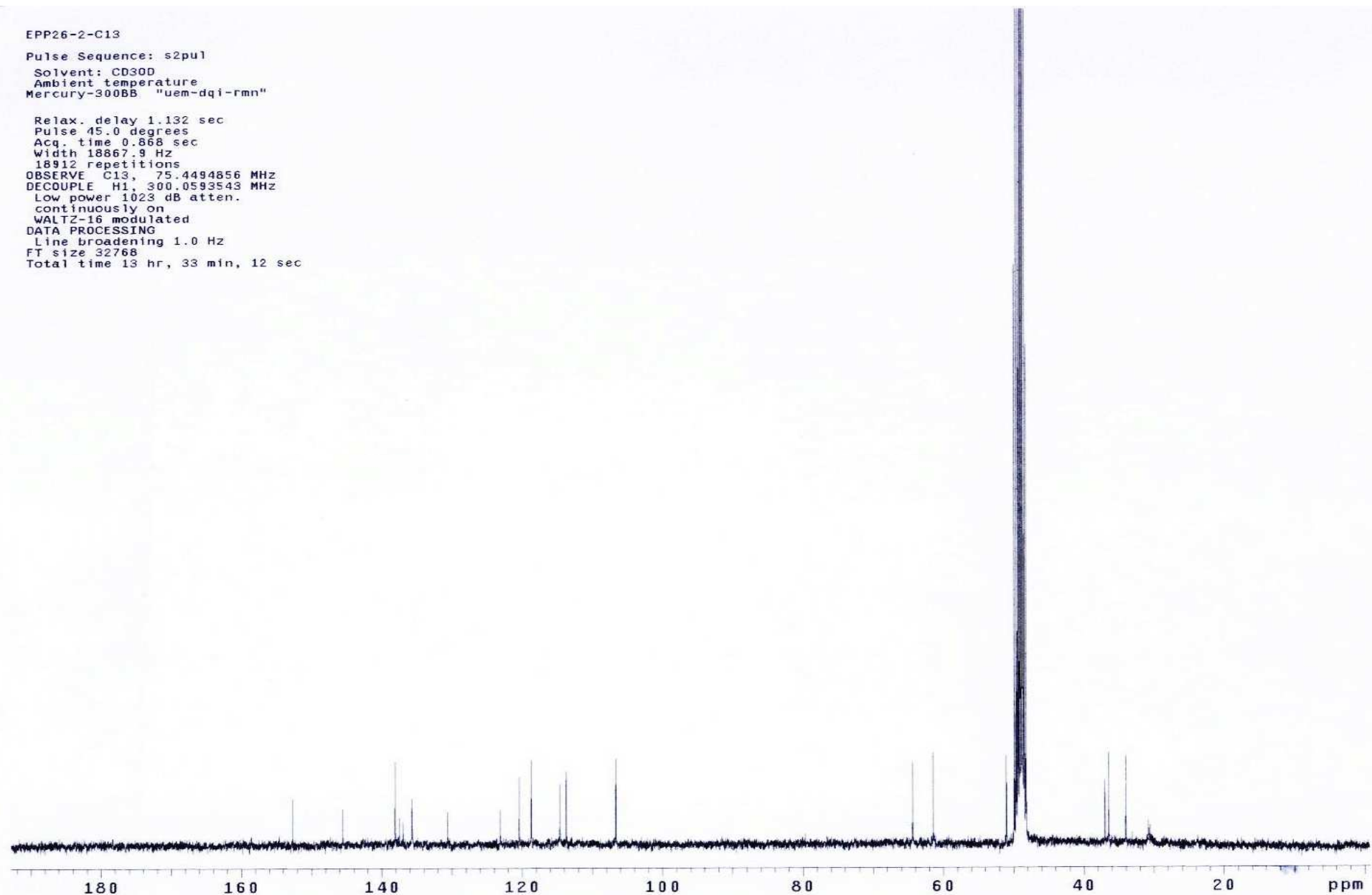


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de EPP 26.2

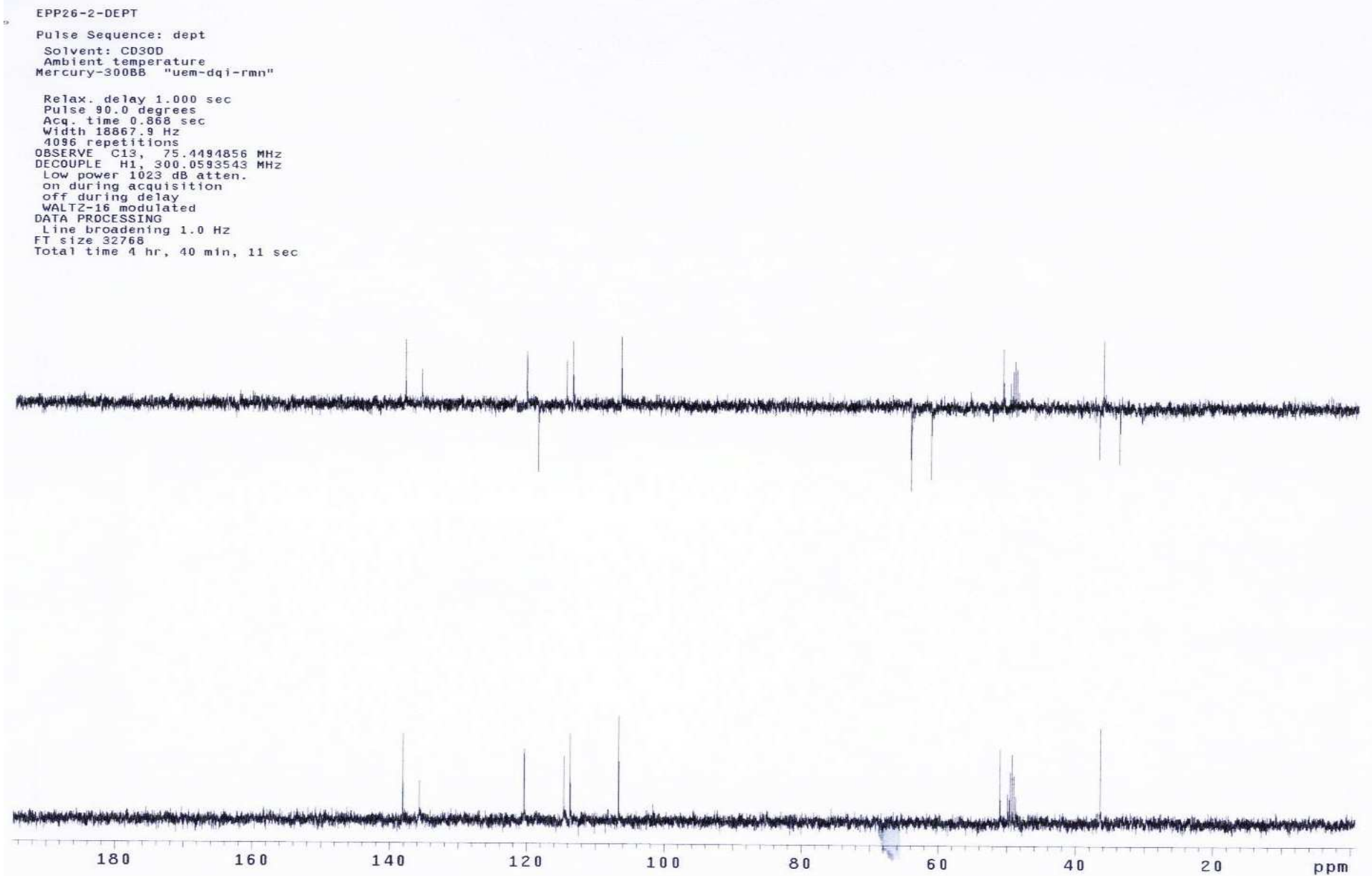


Figura 54: Experimento de DEPT ($135^\circ/90^\circ$) de EPP 26.2

EPP26-2-COSY
Pulse Sequence: COSY
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.173 sec
Width 2961.2 Hz
2D Width 2961.2 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE M1, 300.0578017 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.086 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.043 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 43 min, 17 sec

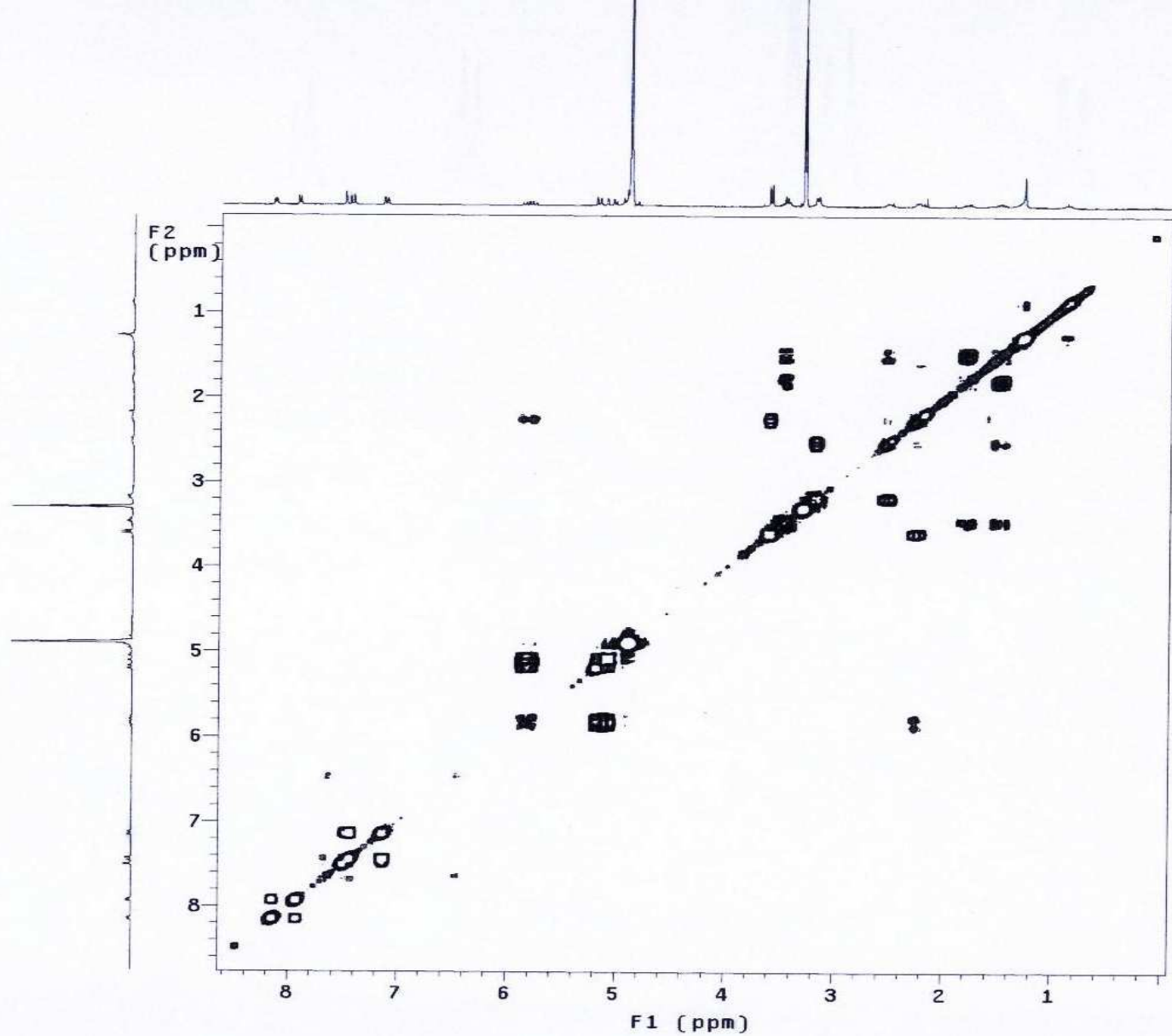


Figura 55: Experimento de COSY de EPP 26.2.

EPP26-2-HMQC
 Pulse Sequence: HMQC
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.173 sec
 Width 2961.2 Hz
 2D Width 12820.5 Hz
 32 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 300.0578017 MHz
 DECOUPLE C13, 75.4552347 MHz
 Low power 1023 dB atten.
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.080 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.018 sec
 FT size 1024 x 2048
 Total time 3 hr, 33 min, 2 sec

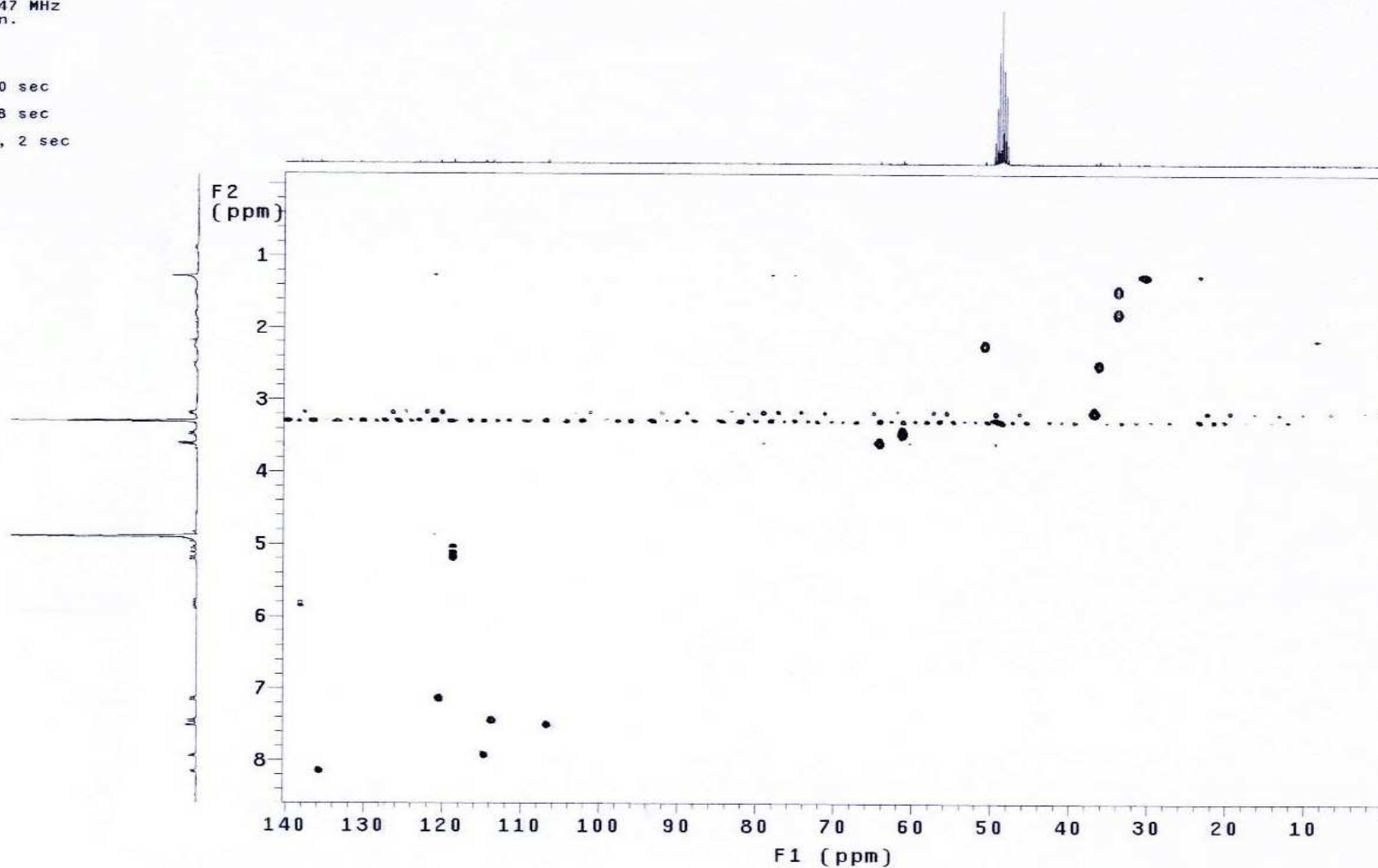


Figura 56: Experimento de HMQC de EPP 26.2.

EPP26-2-HMBC
Pulse Sequence: HMBC
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.173 sec
Width 2961.2 Hz
2D Width 18115.9 Hz
128 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1 300.0578017 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.086 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.007 sec
FT size 1024 x 2048
Total time 11 hr, 59 min, 38 sec

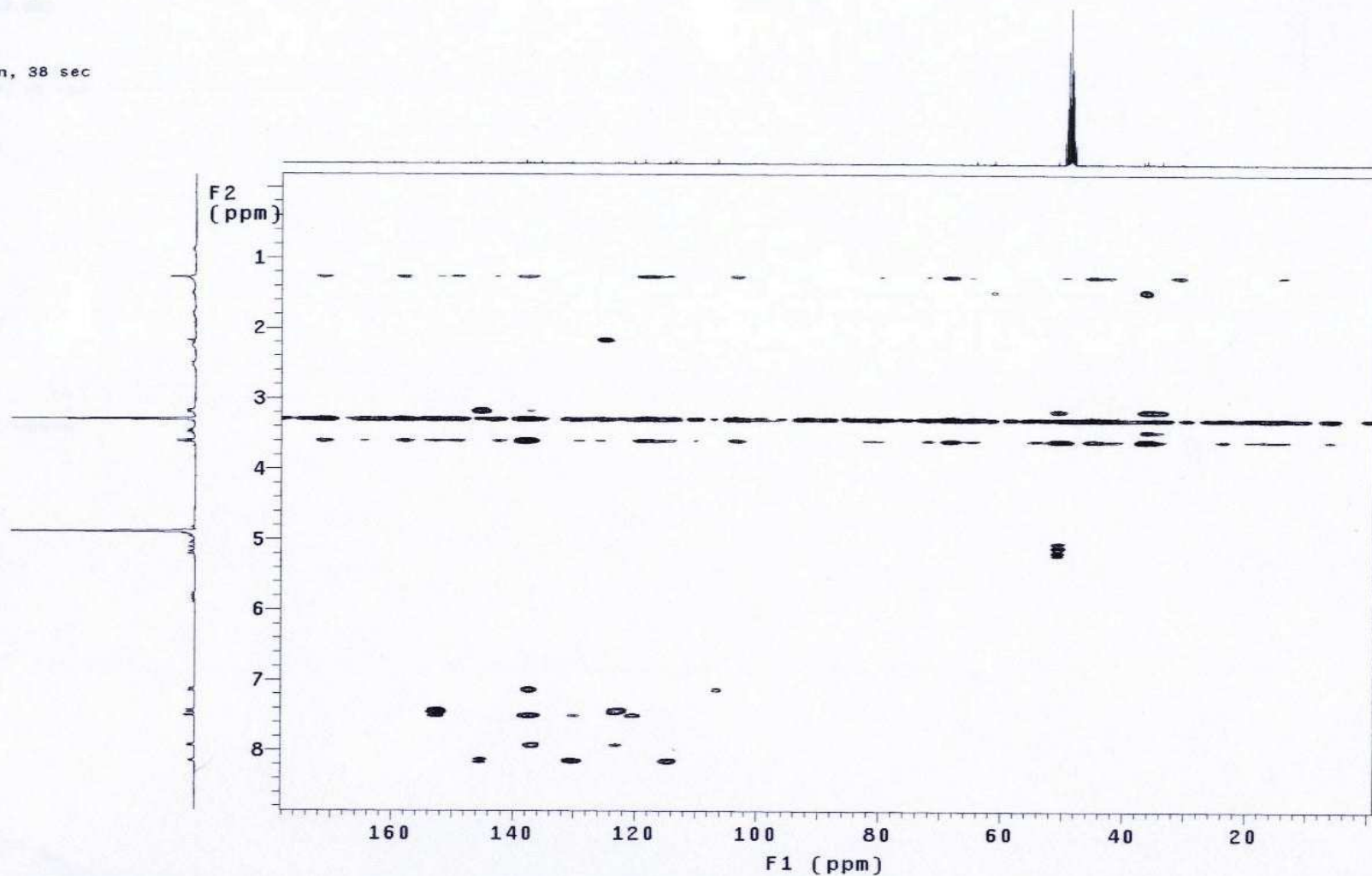


Figura 57: Experimento de HMBC de EPP 26.2.

EPP26-2-NOESY
Pulse Sequence: NOESY
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.500 sec
Mixing 1.000 sec
Acq. time 0.173 sec
Width 2961.2 Hz
2D Width 2961.2 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 300.0578017 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.080 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.062 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 3 hr, 8 min, 57 sec

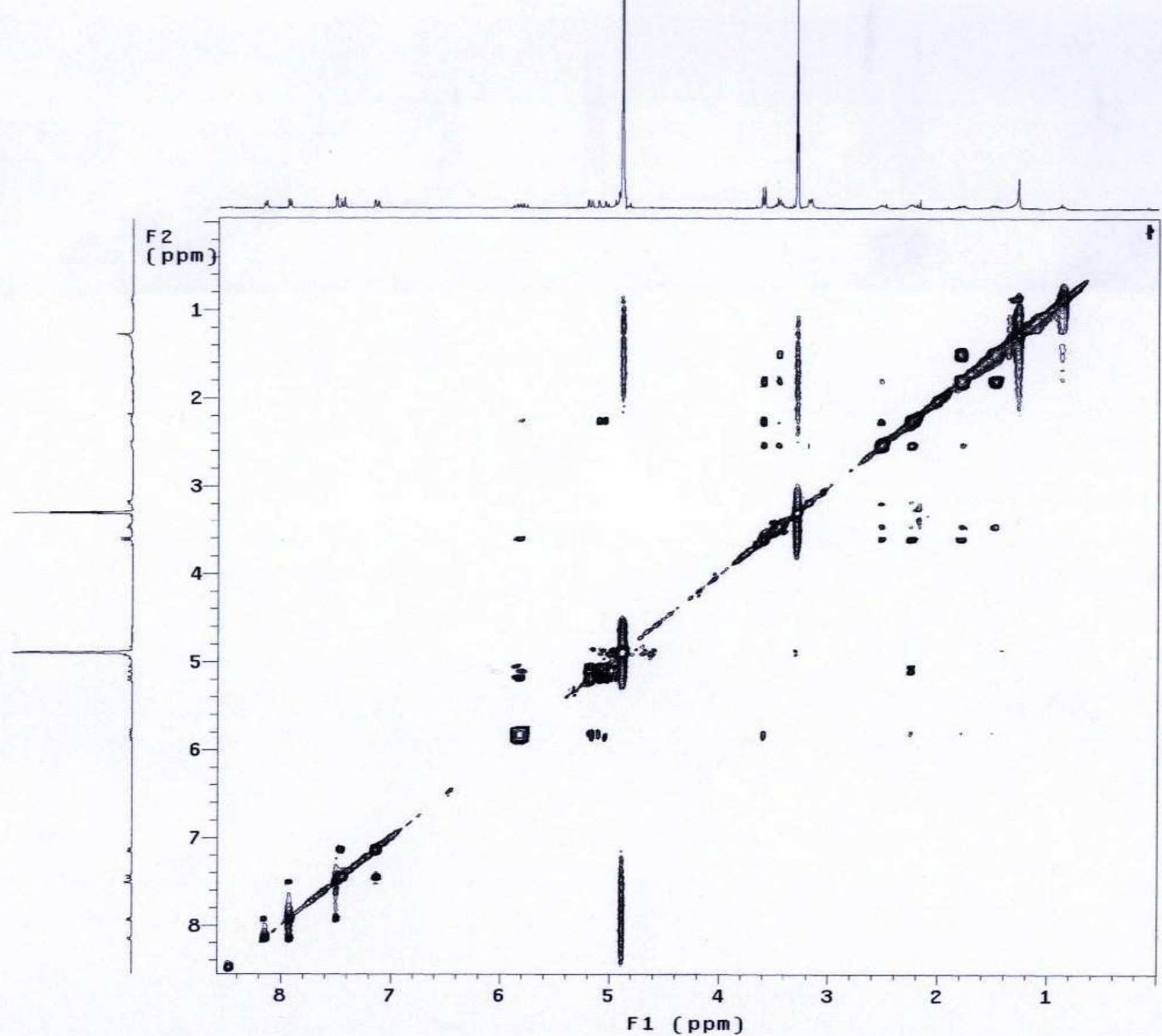


Figura 58: Experimento de NOESY de EPP 26.2.

EPP27-1-H1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
File: EPP27-1-H1
Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4498.4 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 300.0578019 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 65536
Total time 2 min, 45 sec

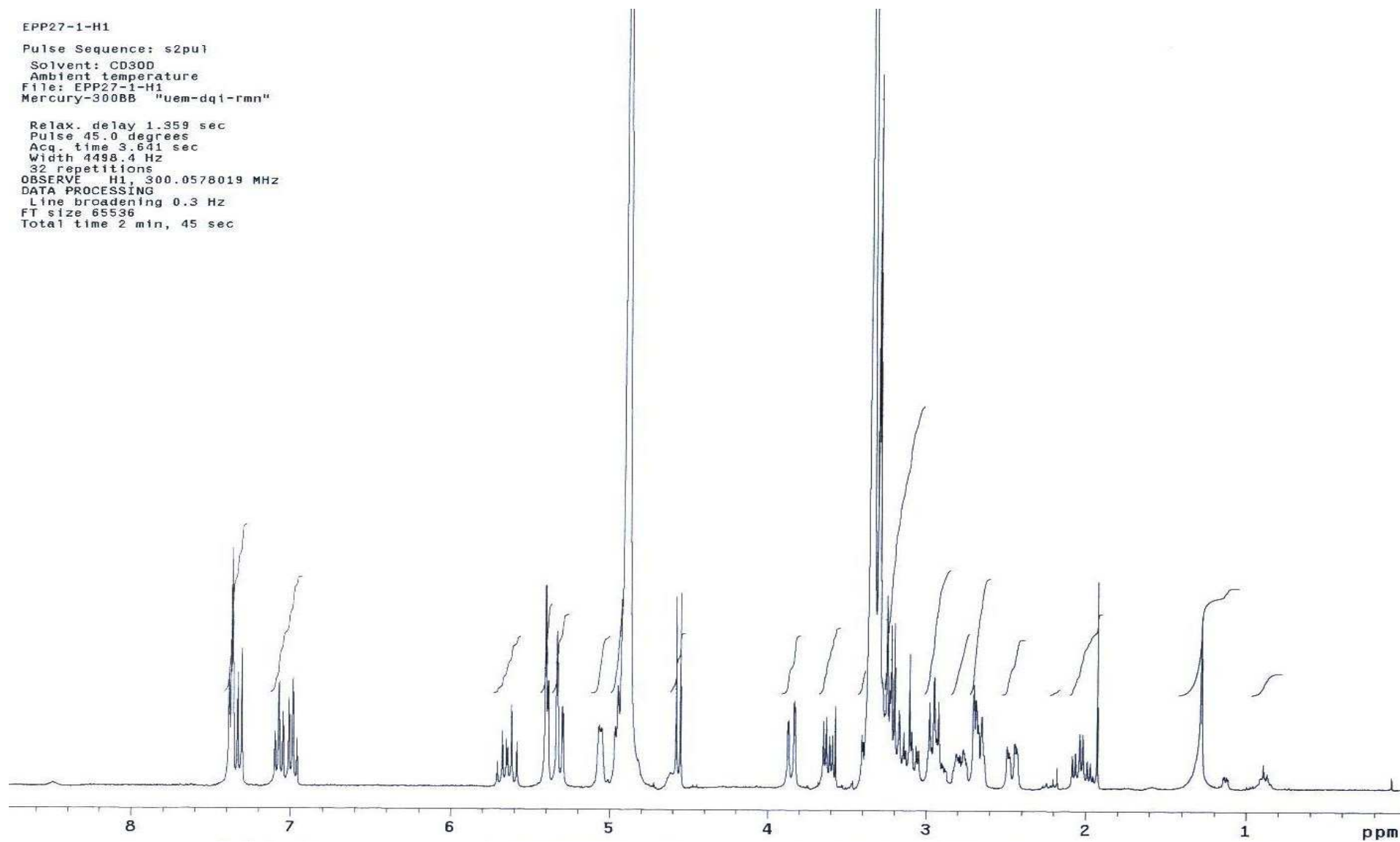


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de Estrictosamida.

EPP27-1-C13
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.132 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.868 sec
Width 18867.9 Hz
2656 repetitions
OBSERVE C13, 75.4494867 MHz
DECOUPLE H1, 300.0593543 MHz
Low power 1023 dB atten.
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 2 hr, 27 min, 51 sec

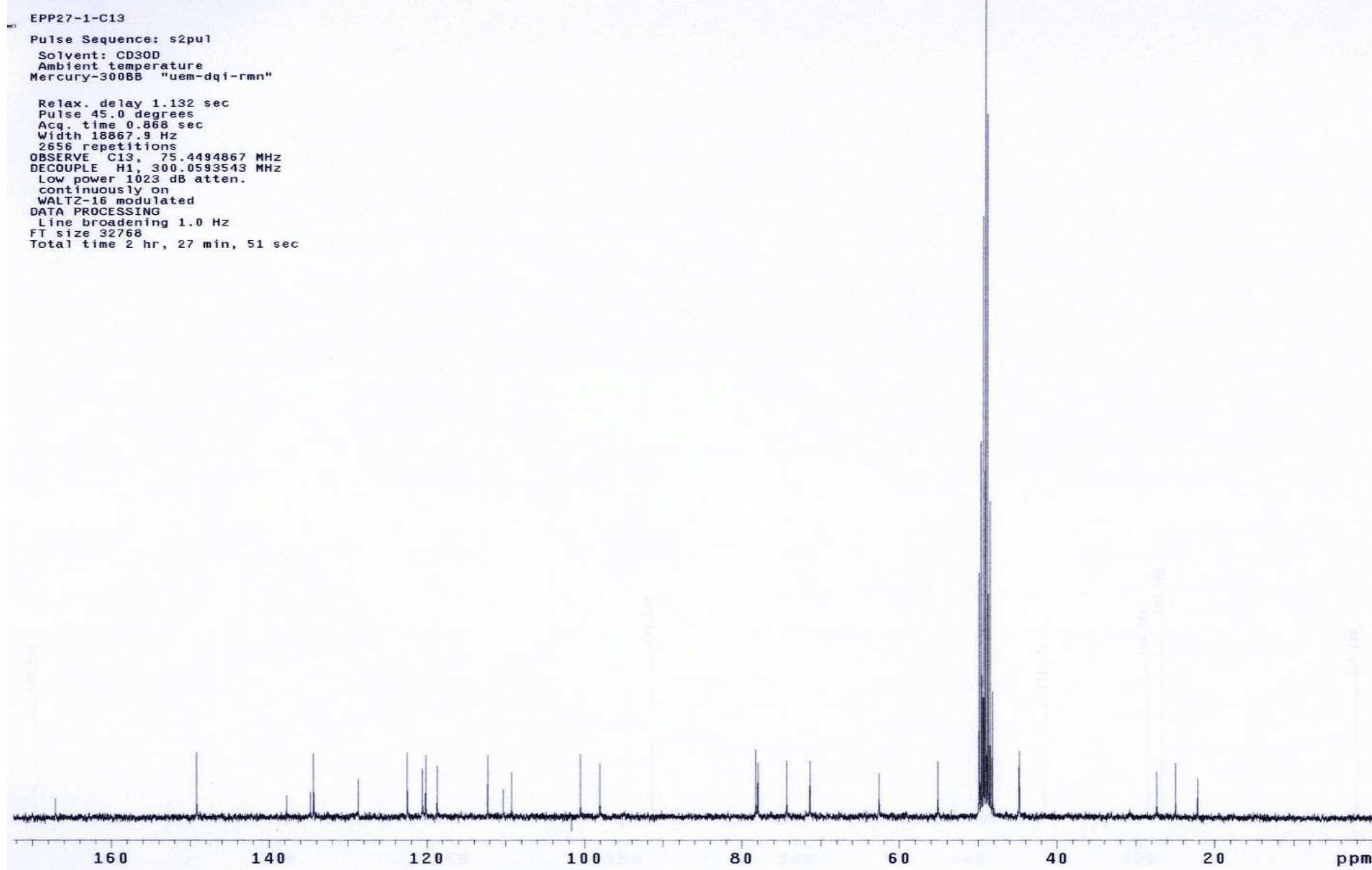


Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de Estrictosamida.

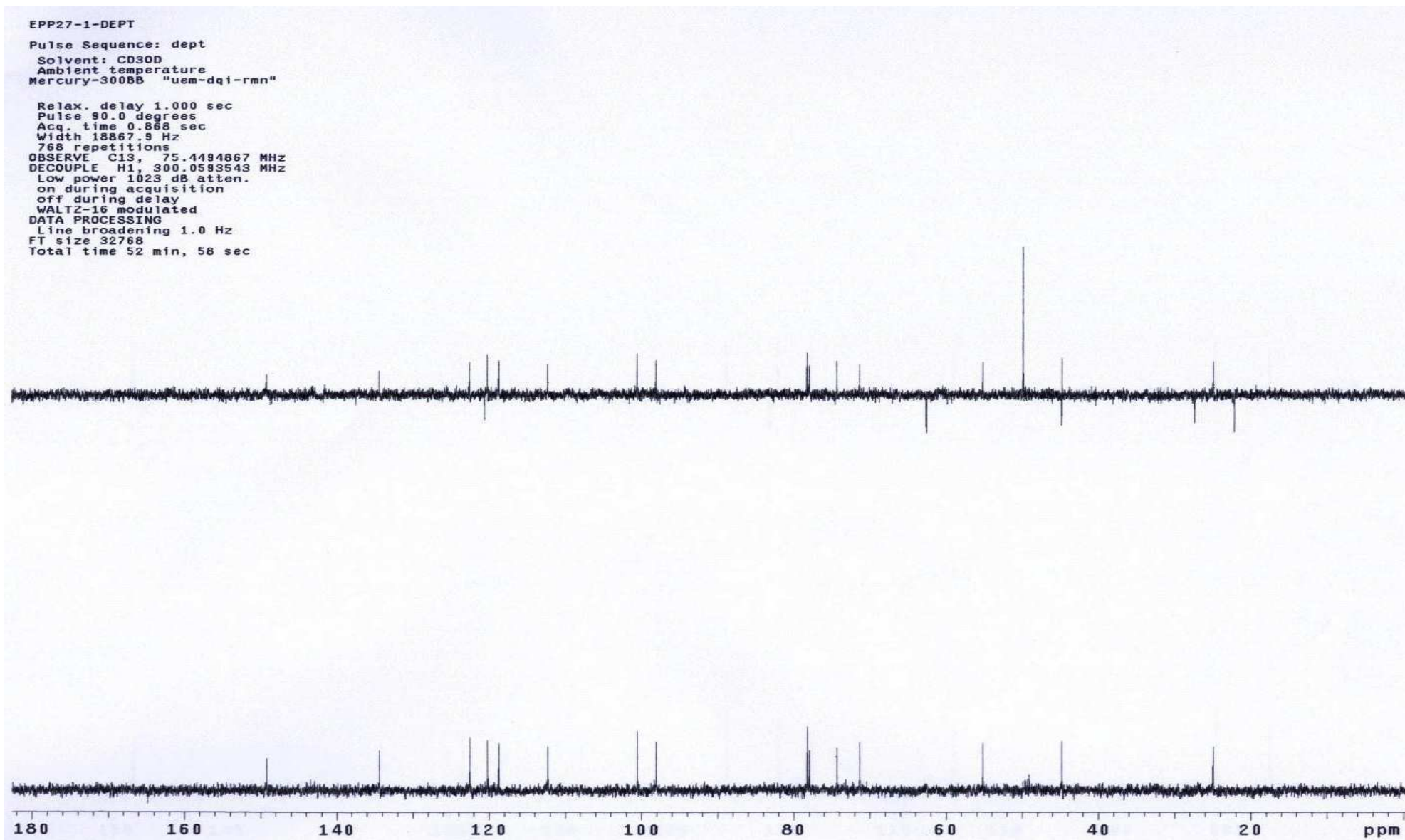


Figura 61: Experimento de DEPT ($135^\circ/90^\circ$) de Estrictosamida.

EPP27-1-COSY
Pulse Sequence: COSY
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 2653.9 Hz
2D Width 2653.9 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0578016 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.096 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.048 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 22 min, 45 sec

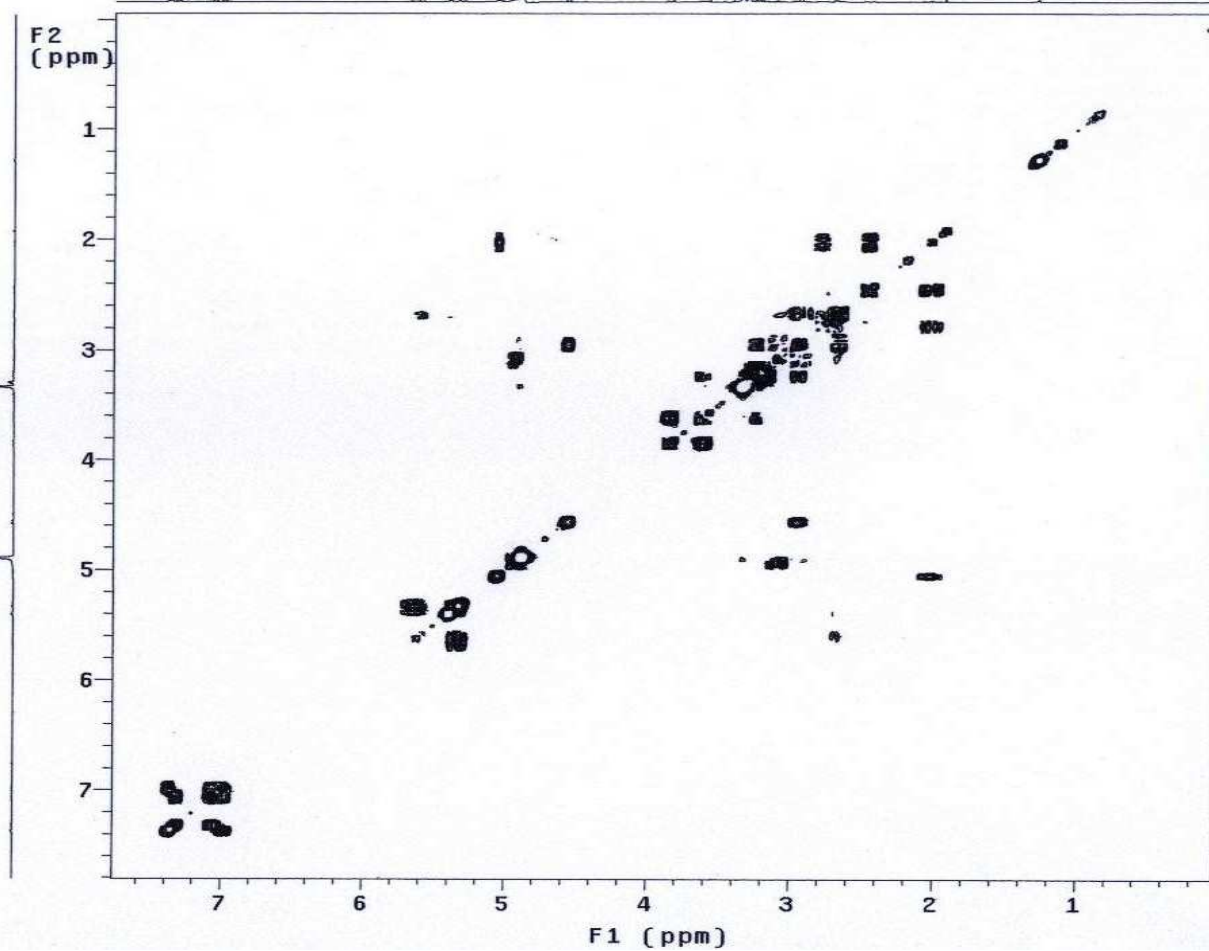


Figura 62: Experimento de COSY de Estrictosamida.

EPP27-1-HMQC
Pulse Sequence: HMQC
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 2653.9 Hz
2D Width 12820.5 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 300.0578016 MHz
DECOUPLE C13, 75.4552347 MHz
Low power 1023 dB atten.
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.089 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.018 sec
FT size 1024 x 2048
Total time 1 hr, 47 min, 41 sec

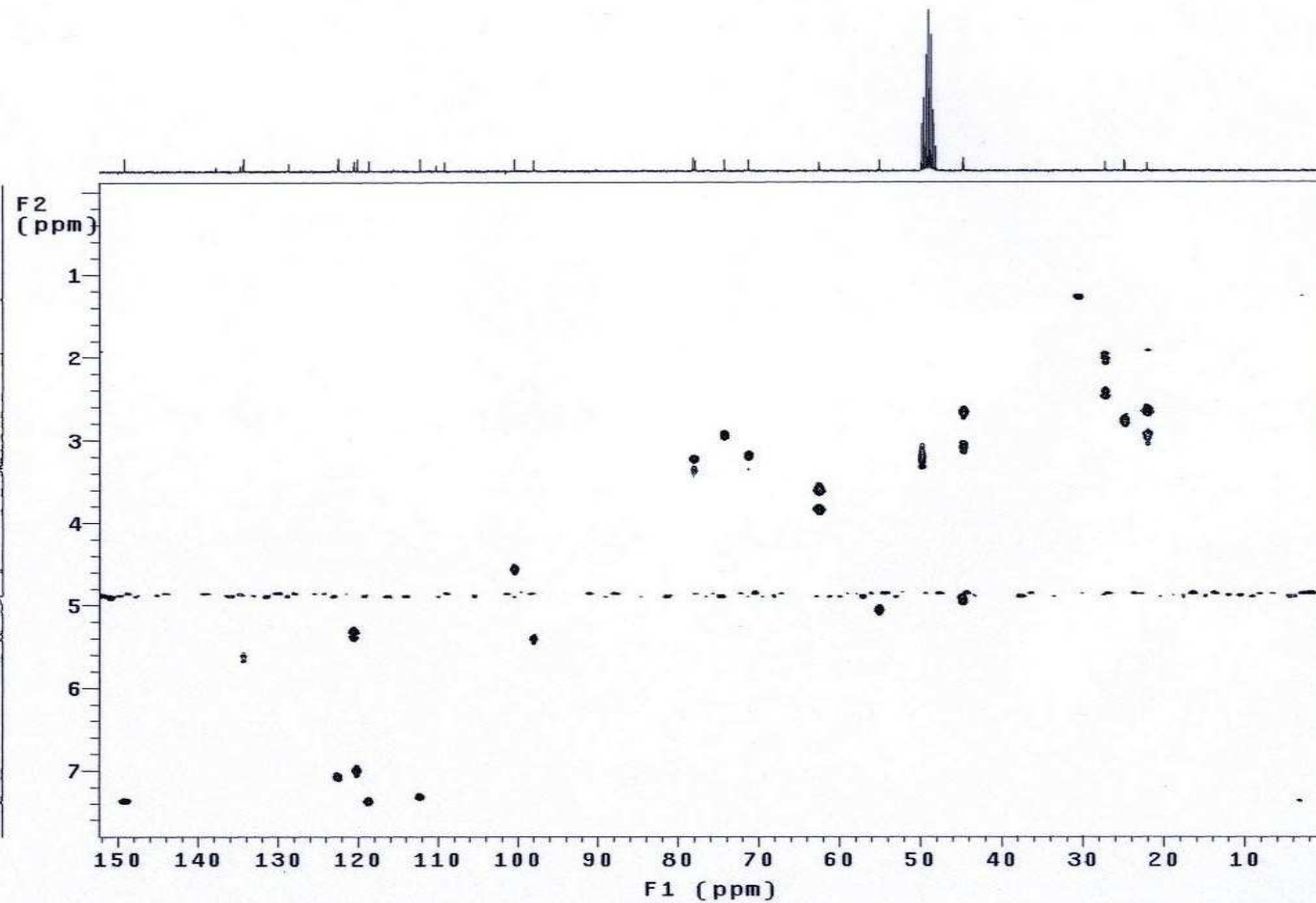


Figura 63: Experimento de HMQC de Estrictosamida.

EPP27-1-NOESY
 Pulse Sequence: NOESY
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

 Relax. delay 1.500 sec
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 0.193 sec
 Width 2653.9 Hz
 2D Width 2653.9 Hz
 16 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 300.0578016 MHz
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.089 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.069 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 3 hr, 10 min, 30 sec

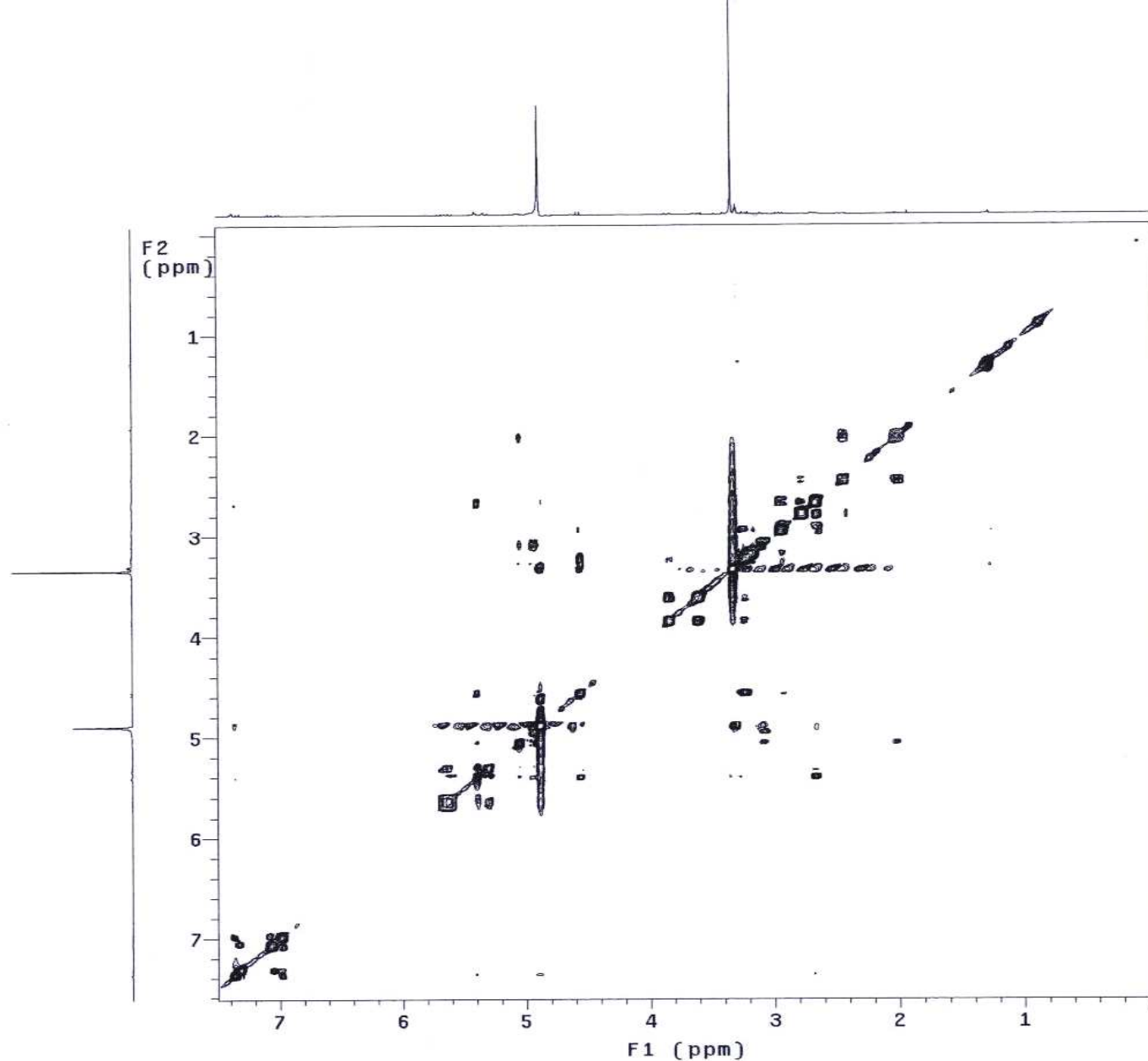


Figura 64: Experimento de NOESY de Estrictosamida.

EPP28-1-H1
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"
 Relax. delay 1.359 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 3.641 sec
 Width 4498.4 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0578295 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.3 Hz
 FT size 65536
 Total time 2 min, 45 sec

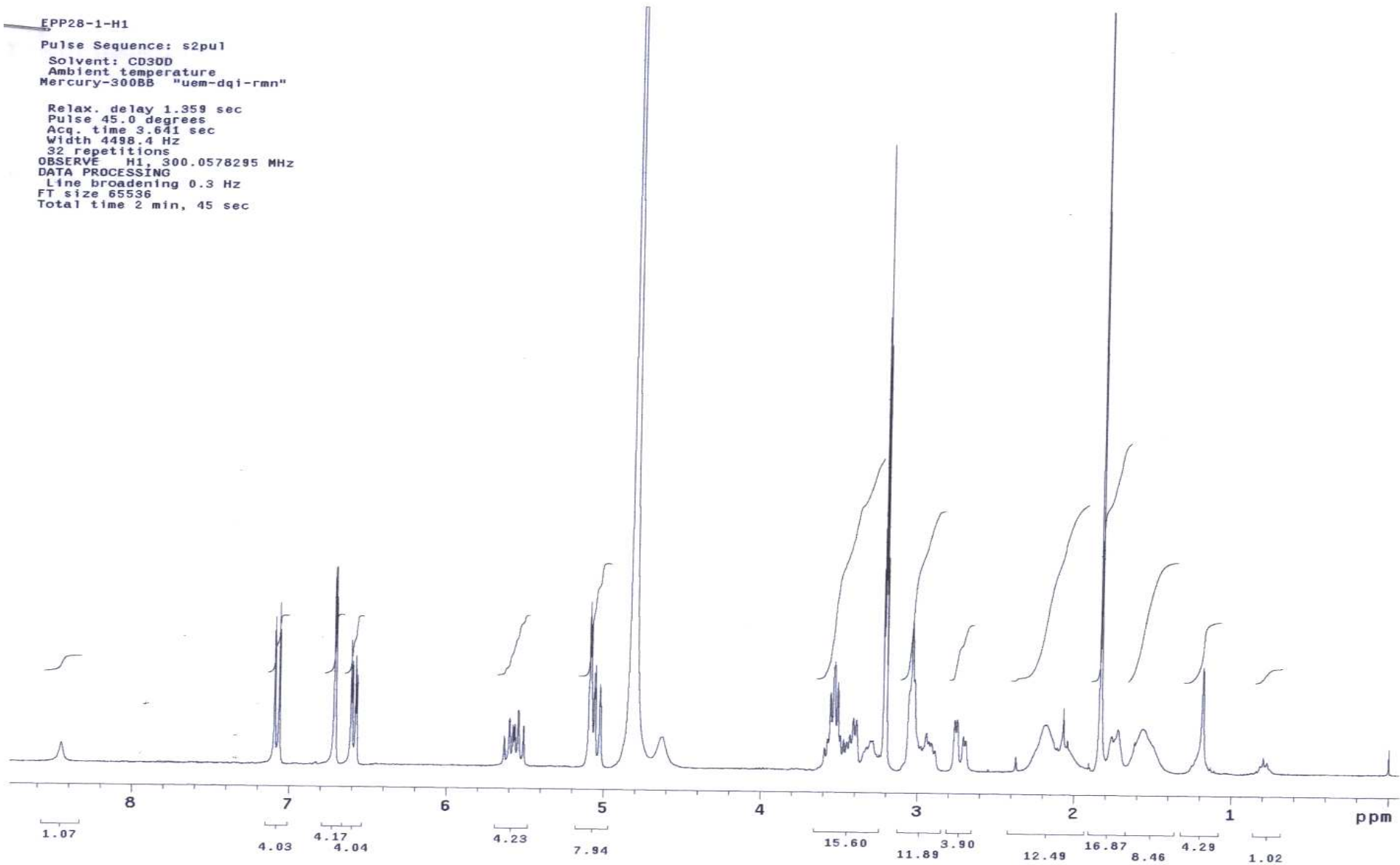


Figura 65: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de EPP 28.

EPP28-1-C13

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CD3OD

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

Relax. delay 1.132 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.868 sec

Width 18867.9 Hz

2912 repetitions

OBSERVE C13, 75.4494867 MHz

DECOUPLE H1, 300.0593543 MHz

Low power 1023 dB atten.

continuously on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 2 hr, 27 min, 51 sec

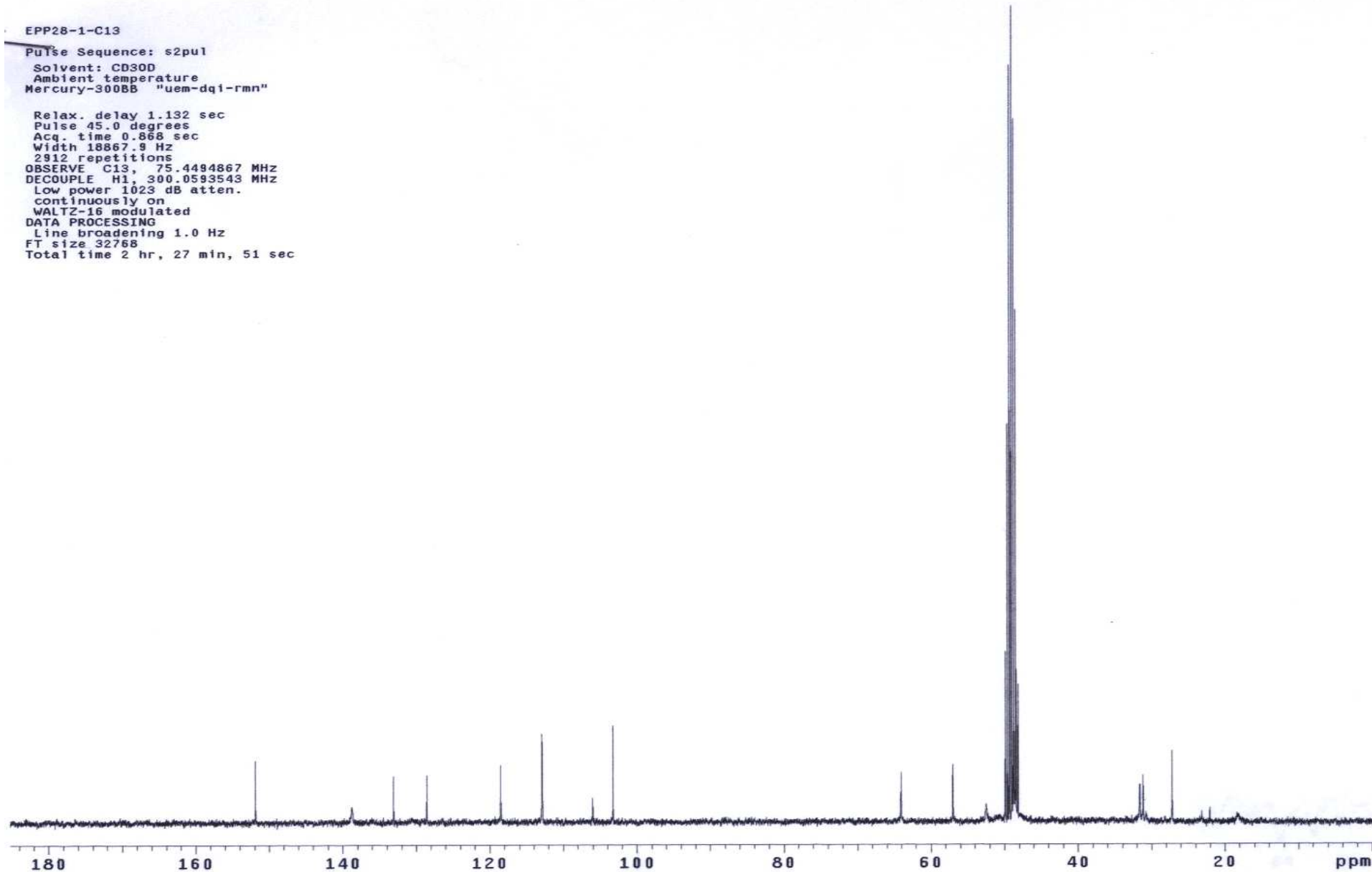


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de EPP 28.

EPP28-1-DEPT
Pulse Sequence: dept
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 0.868 sec
Width 18867.9 Hz
1280 repetitions
OBSERVE C13, 75.4494867 MHz
DECOUPLE H1, 300.0593543 MHz
Low power 1023 dB atten.
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 1 hr, 27 min, 55 sec

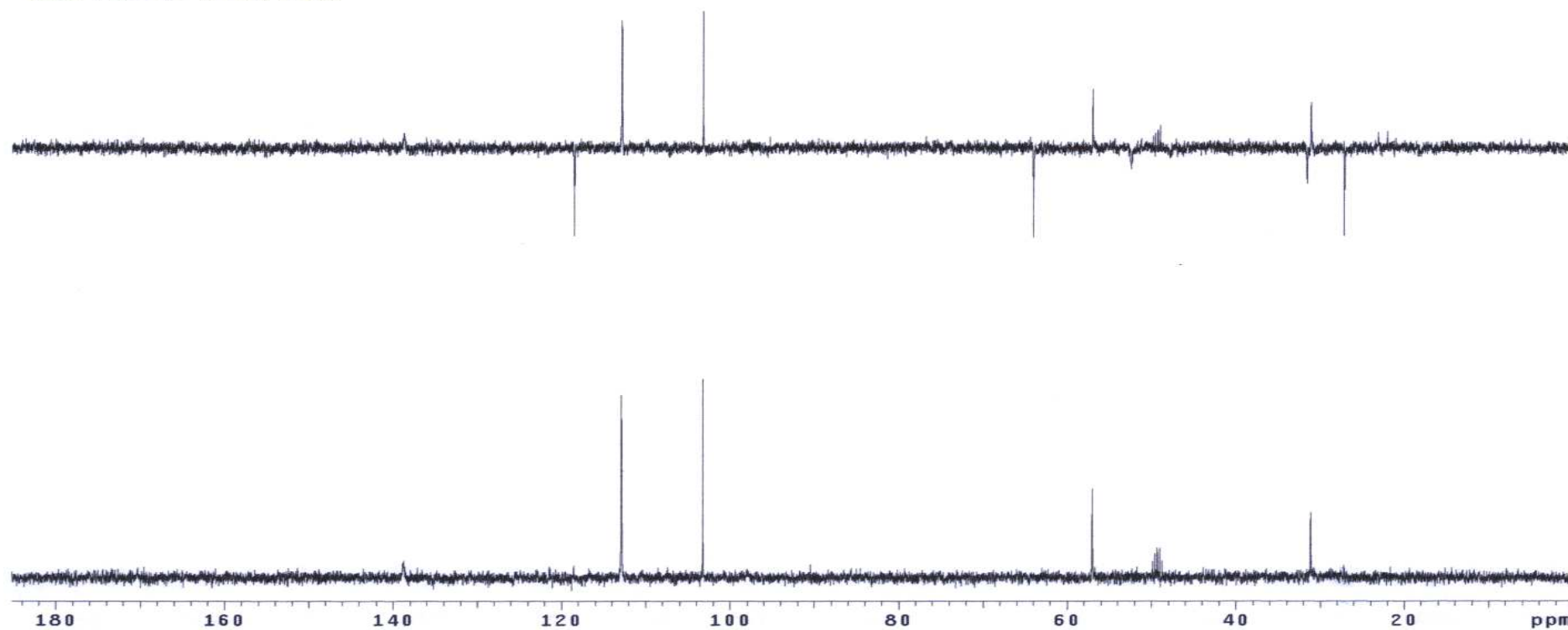


Figura 67: Experimento de DEPT (135/90) de EPP 28

EPP28-1-COSY
 Pulse Sequence: COSY
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.170 sec
 Width 3008.4 Hz
 2D Width 3008.4 Hz
 16 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1, 300.0578017 MHz
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.085 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.043 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 43 min, 10 sec

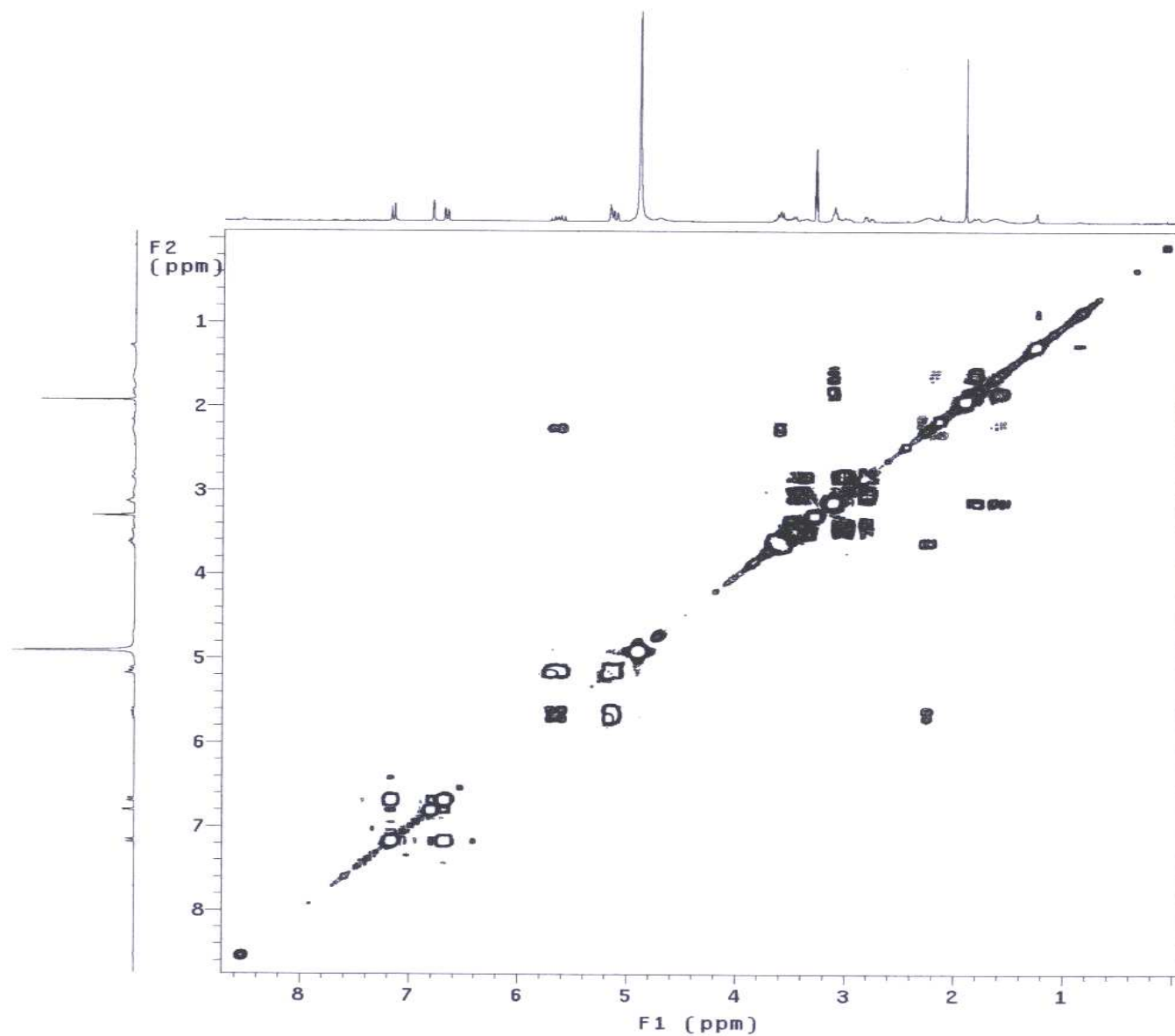


Figura 68: Experimento de COSY de EPP 28.

EPP28-1-HMQC
 Pulse Sequence: HMQC
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.170 sec
 Width 3008.4 Hz
 2D Width 12820.5 Hz
 16 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 300.0578017 MHz
 DECOUPLE C13, 75.4552347 MHz
 Low power 1023 dB atten.
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.079 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.018 sec
 FT size 1024 x 2048
 Total time 1 hr, 45 min, 26 sec

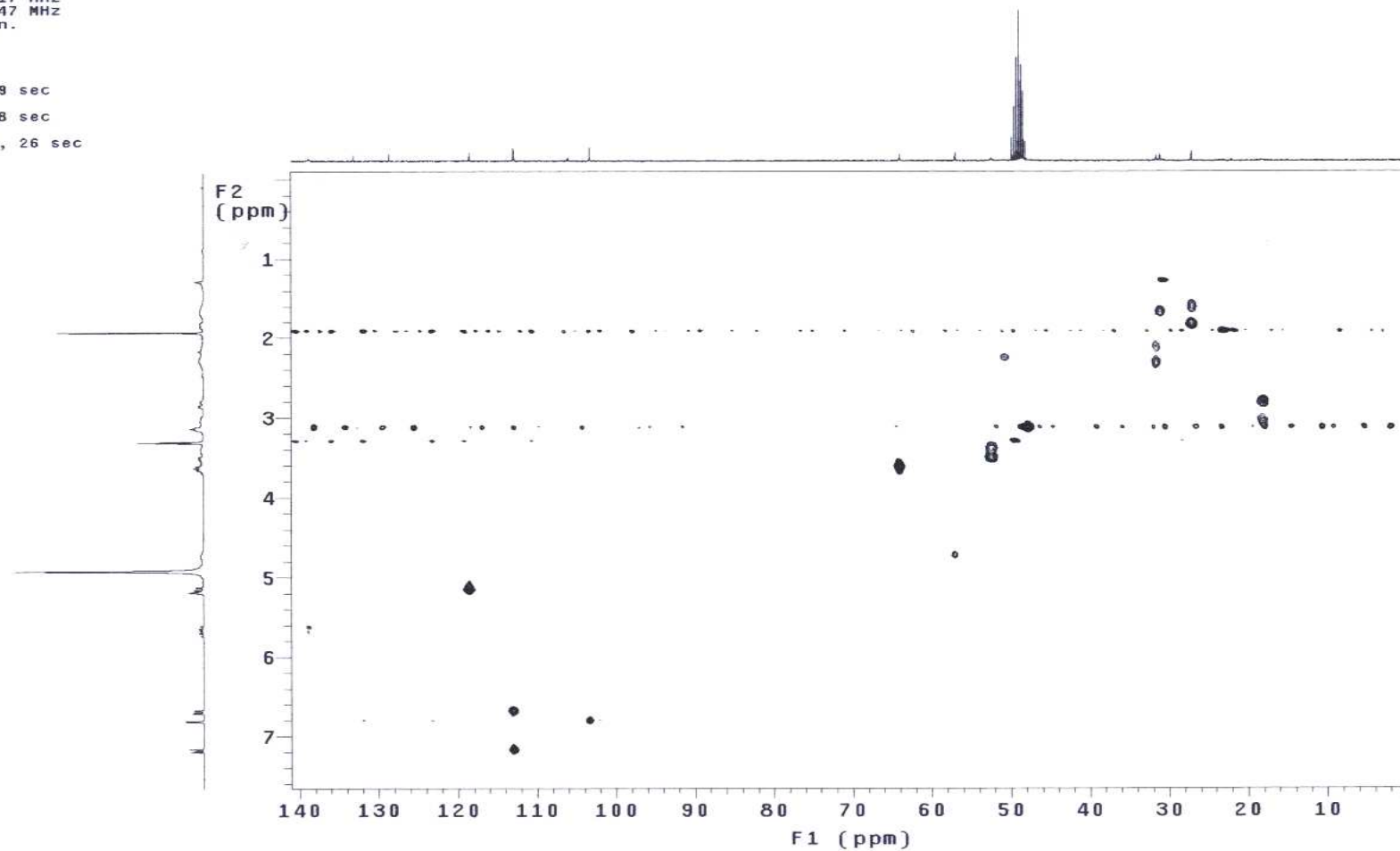


Figura 69: Experimento de HMQC de EPP 28.

EPP28-1-HMBC
Pulse Sequence: HMBC
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.170 sec
Width 3008.4 Hz
2D Width 18115.9 Hz
128 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 300.0578017 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.085 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.007 sec
FT size 1024 x 2048
Total time 11 hr, 58 min, 8 sec

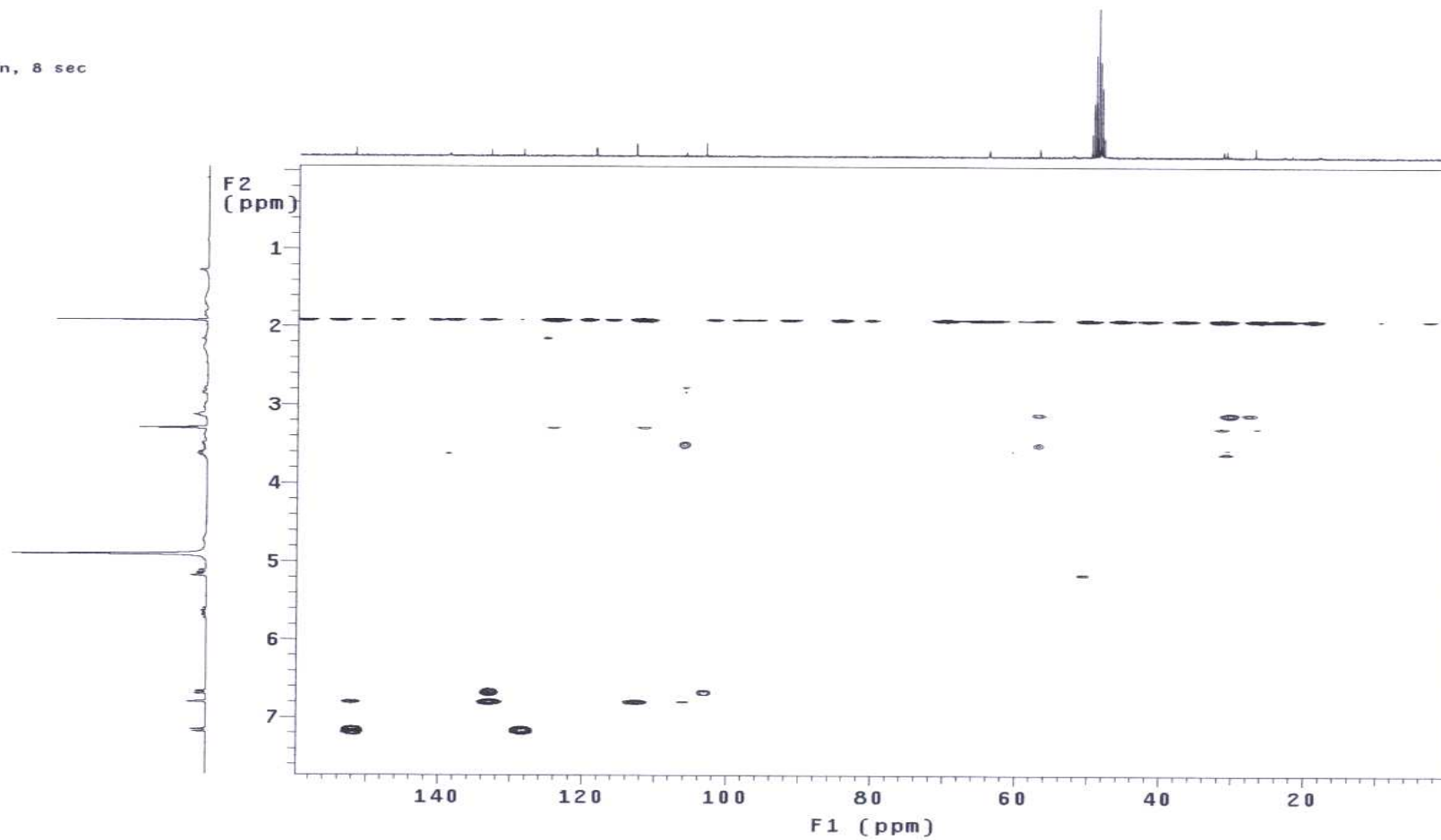


Figura 70: Experimento de HMBC de EPP 28.

EPP28-1-NOESY
Pulse Sequence: NOESY
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dq1-rmn"

Relax. delay 1.500 sec
Mixing 1.000 sec
Acq. time 0.170 sec
Width 3008.4 Hz
2D Width 3008.4 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 300.0578017 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.079 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.061 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 35 min, 49 sec

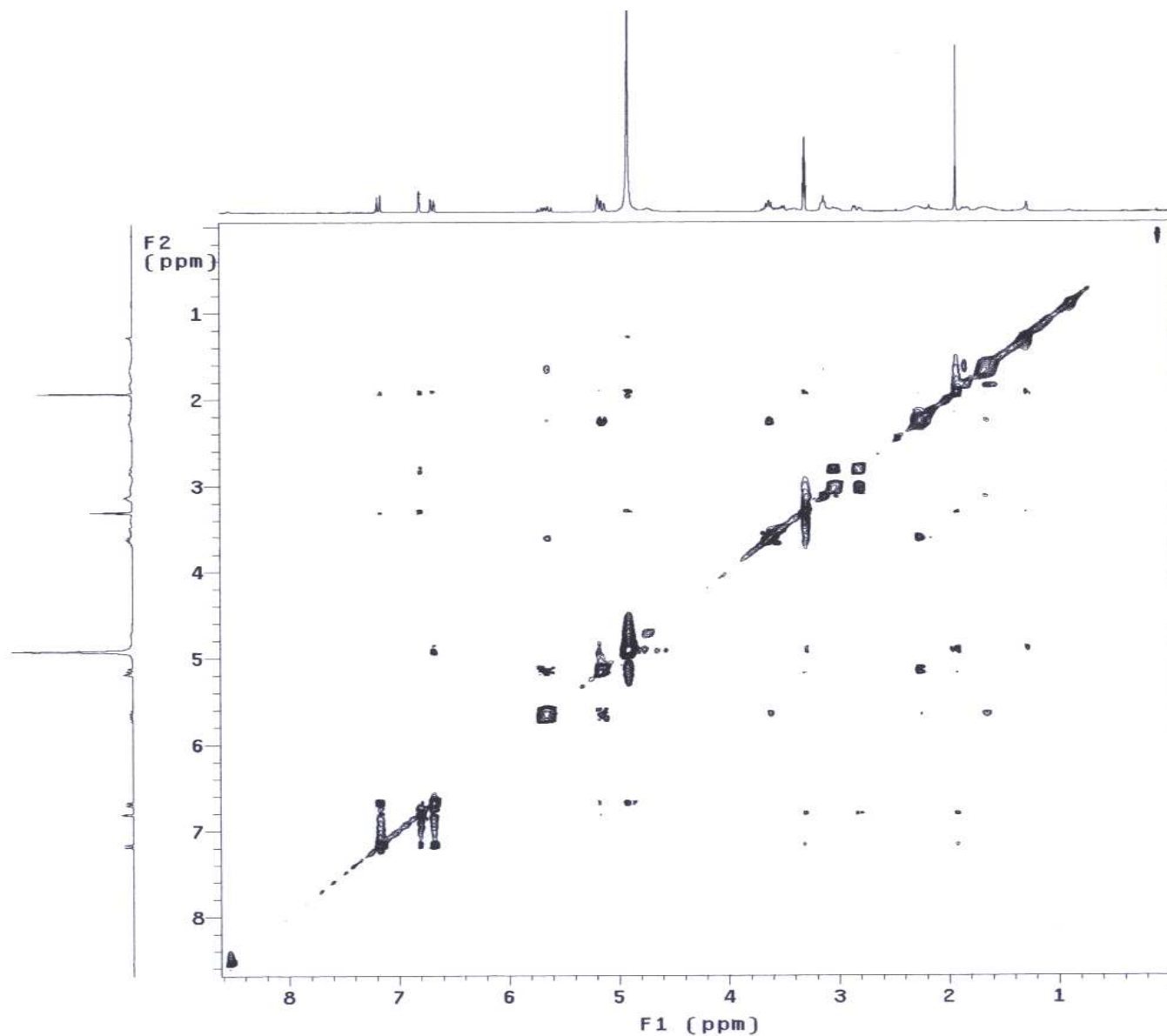


Figura 71: Experimento de NOESY de EPP 28.

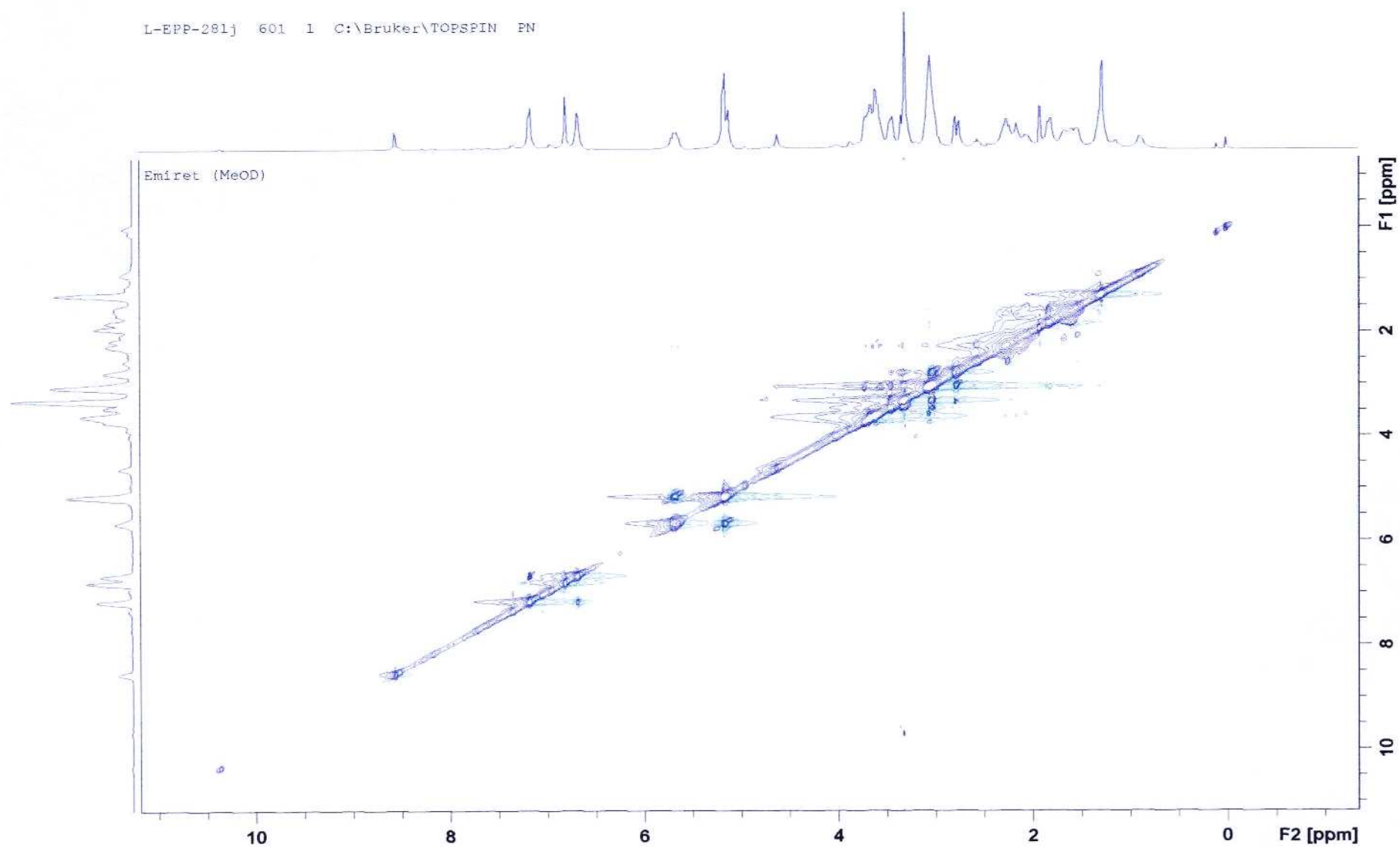


Figura 72: Experimento de TOCSY (CD_3OD , 500 MHz) de EPP 28.1.

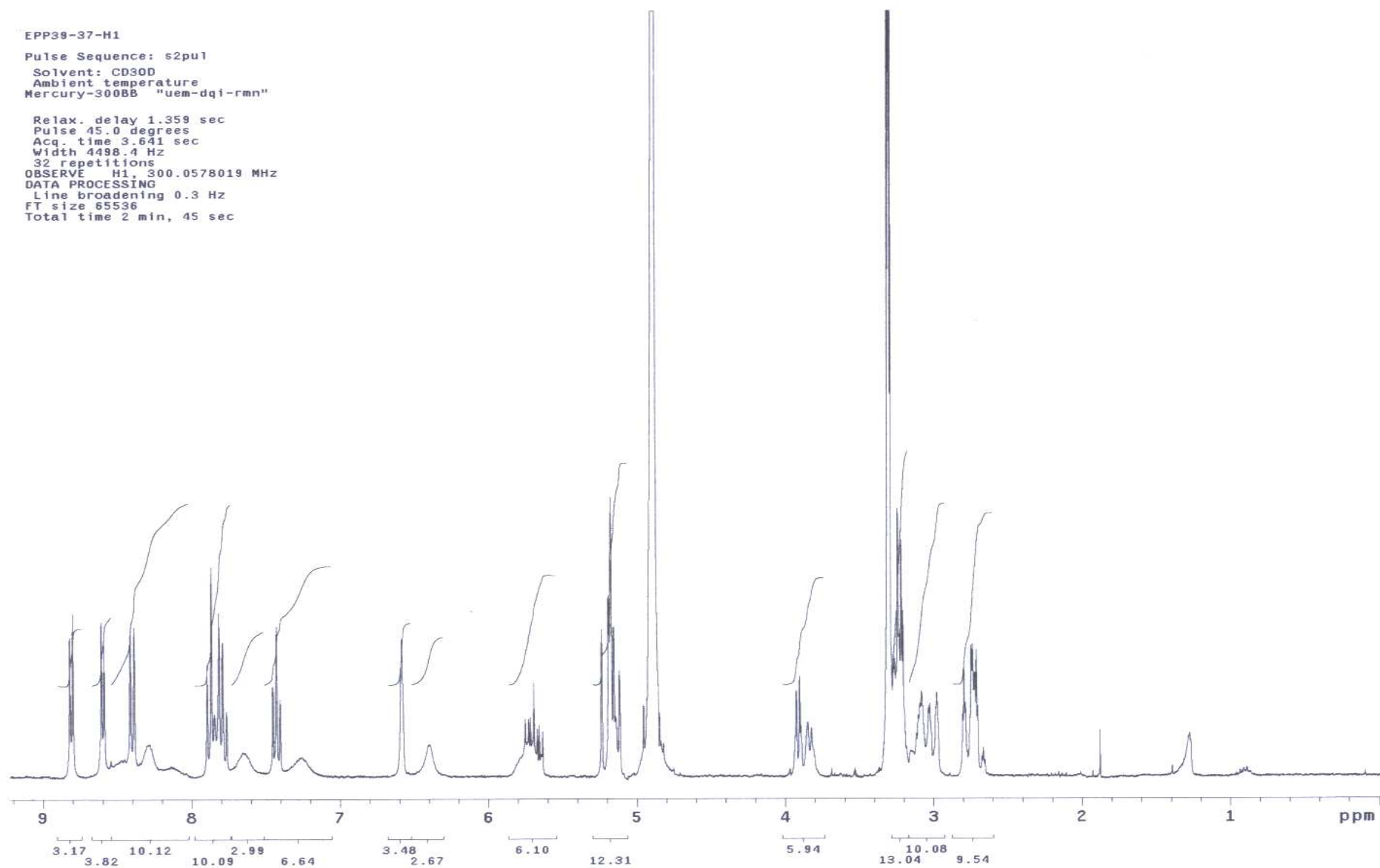


Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de EPP 39-37.

EPP39-37-C13

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CD3OD

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.132 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.868 sec

Width 18867.9 Hz

5120 repetitions

OBSERVE C13, 75.4495760 MHz

DECOUPLE H1, 300.0593543 MHz

Low power 1023 dB atten.

continuously on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 3 hr, 4 min, 49 sec

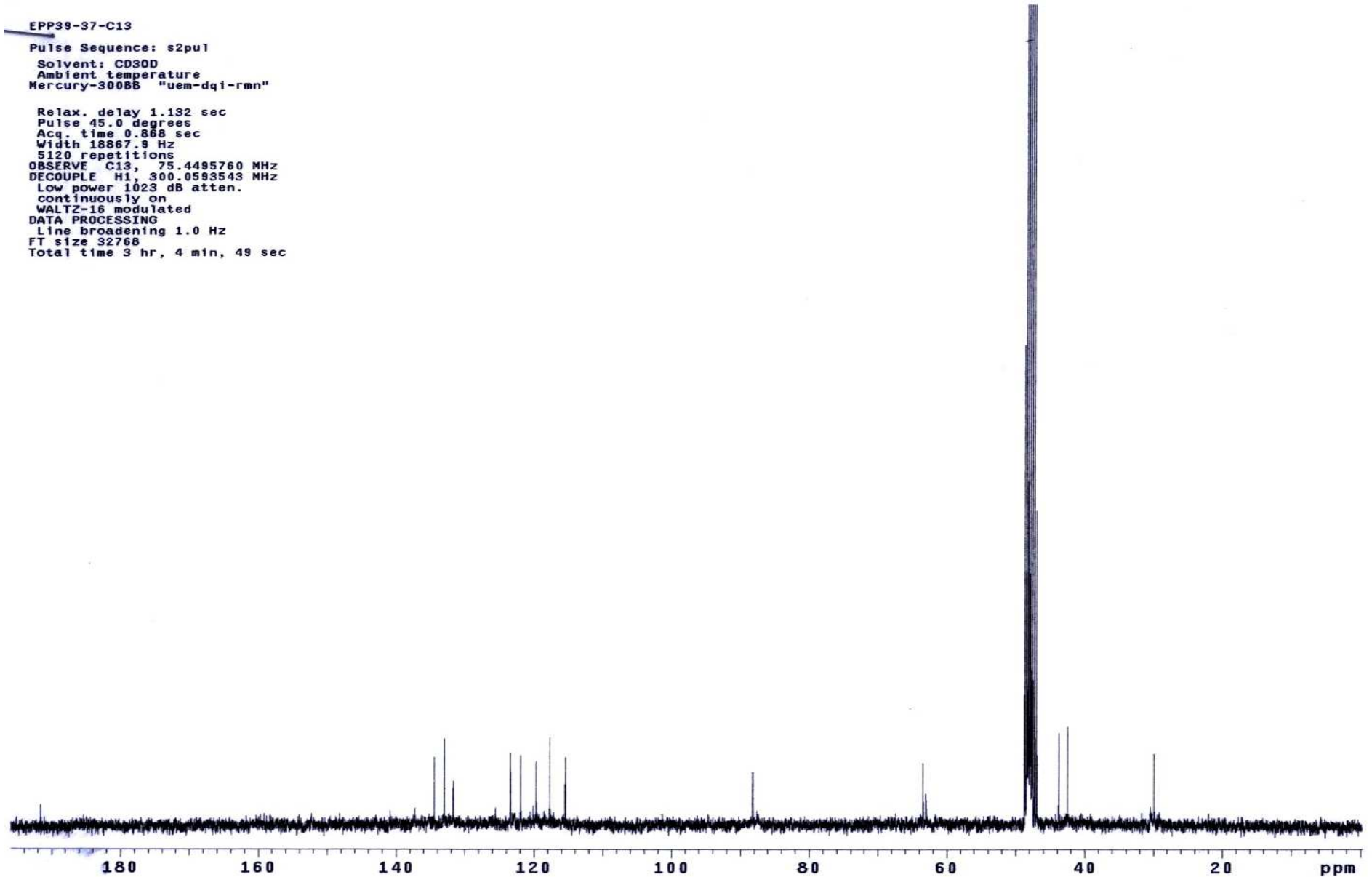


Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de EPP 39-37.

EPP39-37-DEPT
Pulse Sequence: dept
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 0.868 sec
Width 18867.9 Hz
2048 repetitions
OBSERVE C13, 75.4495074 MHz
DECOUPLE H1, 300.0593543 MHz
Low power 1023 dB atten.
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 2 hr, 20 min, 21 sec

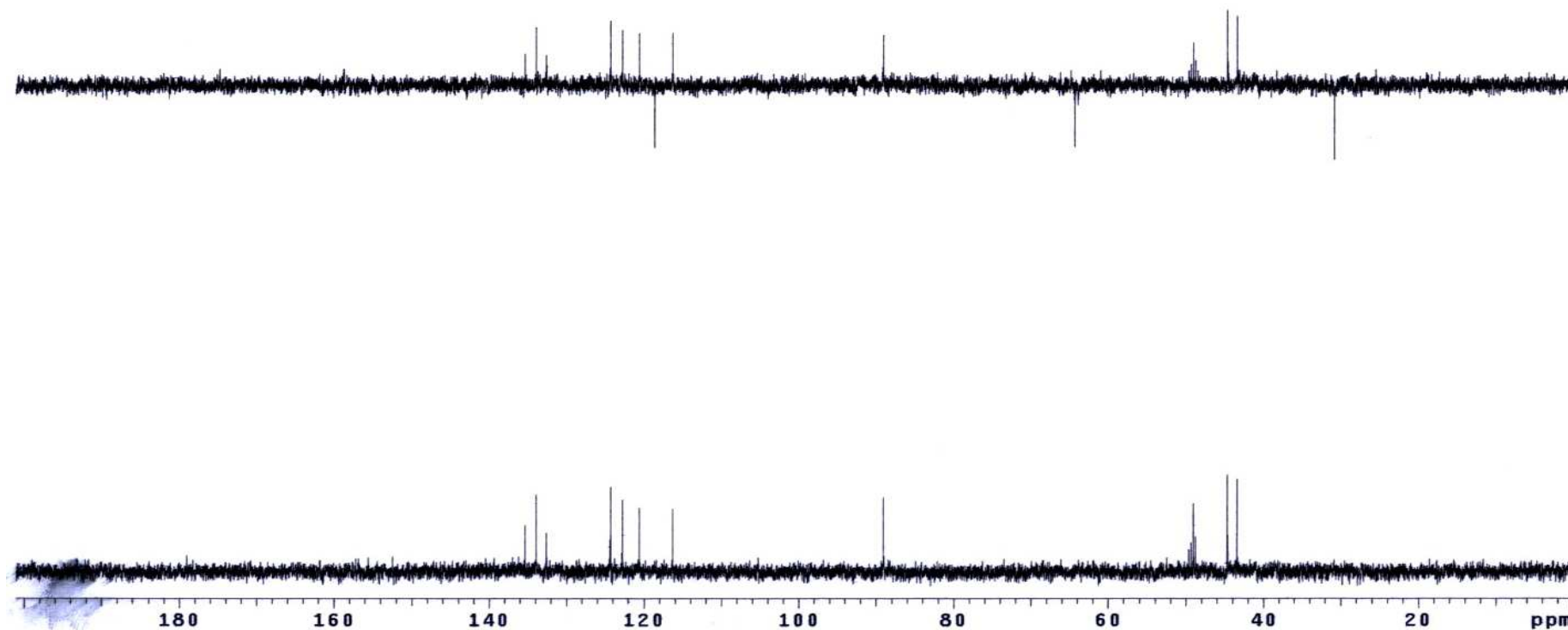


Figura 75: Experimento de DEPT ($135^\circ/90^\circ$) de EPP 39-37.

EPP39-37-COSY
Pulse Sequence: COSY
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.168 sec
Width 3054.4 Hz
2D Width 3054.4 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0578018 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.084 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.042 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 22 min, 15 sec

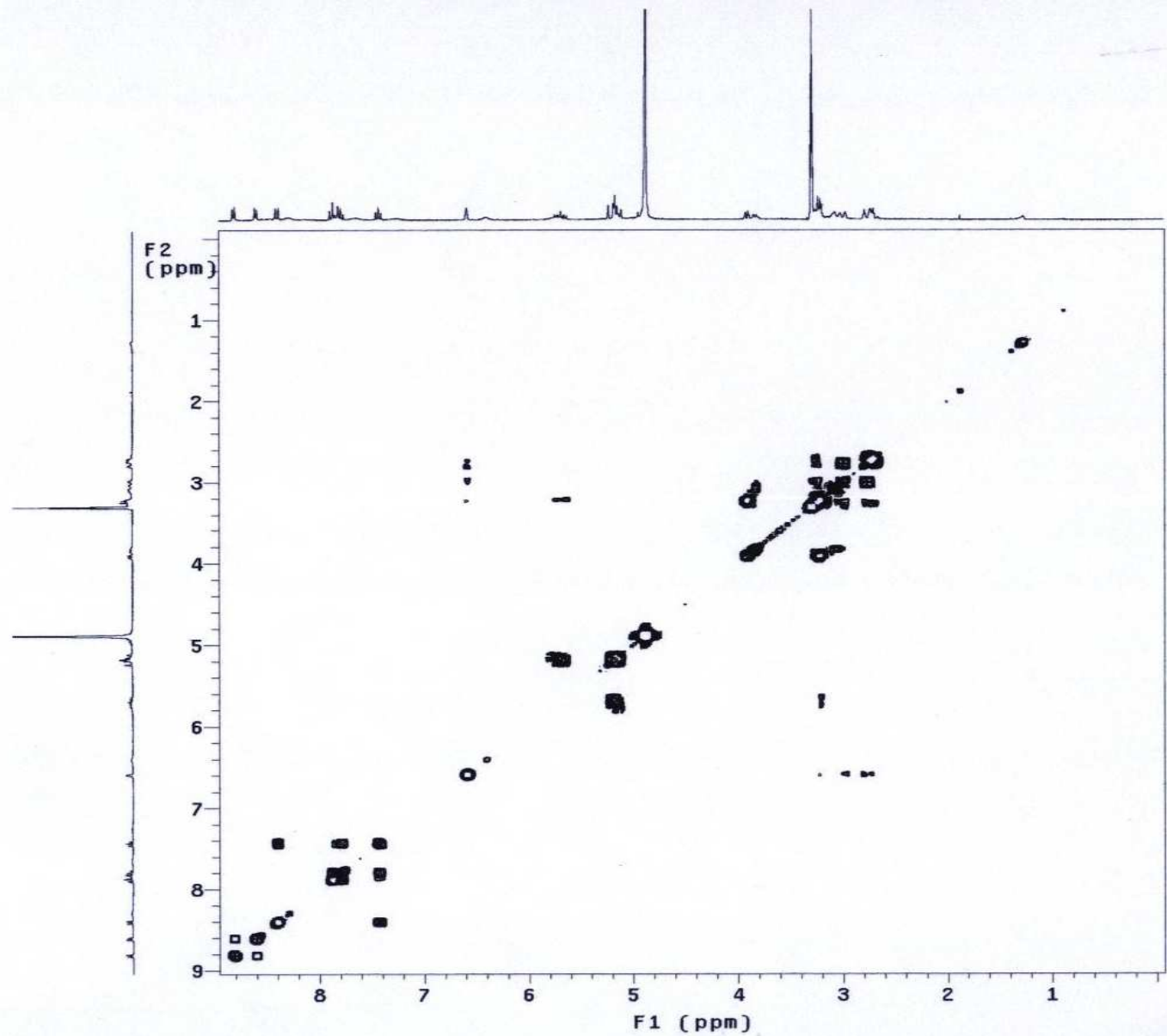


Figura 76: Experimento de COSY de EPP 39-37.

EPP39-37-HMQC

Pulse Sequence: HMQC

Solvent: CD3OD

Ambient temperature

Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.168 sec

Width 3054.4 Hz

2D Width 12820.5 Hz

8 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 300.6578018 MHz

DECOUPLE C13, 75.4552347 MHz

Low power 1023 dB atten.

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.084 sec

Shifted by -0.084 sec

F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.010 sec

Shifted by -0.010 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 56 min, 52 sec

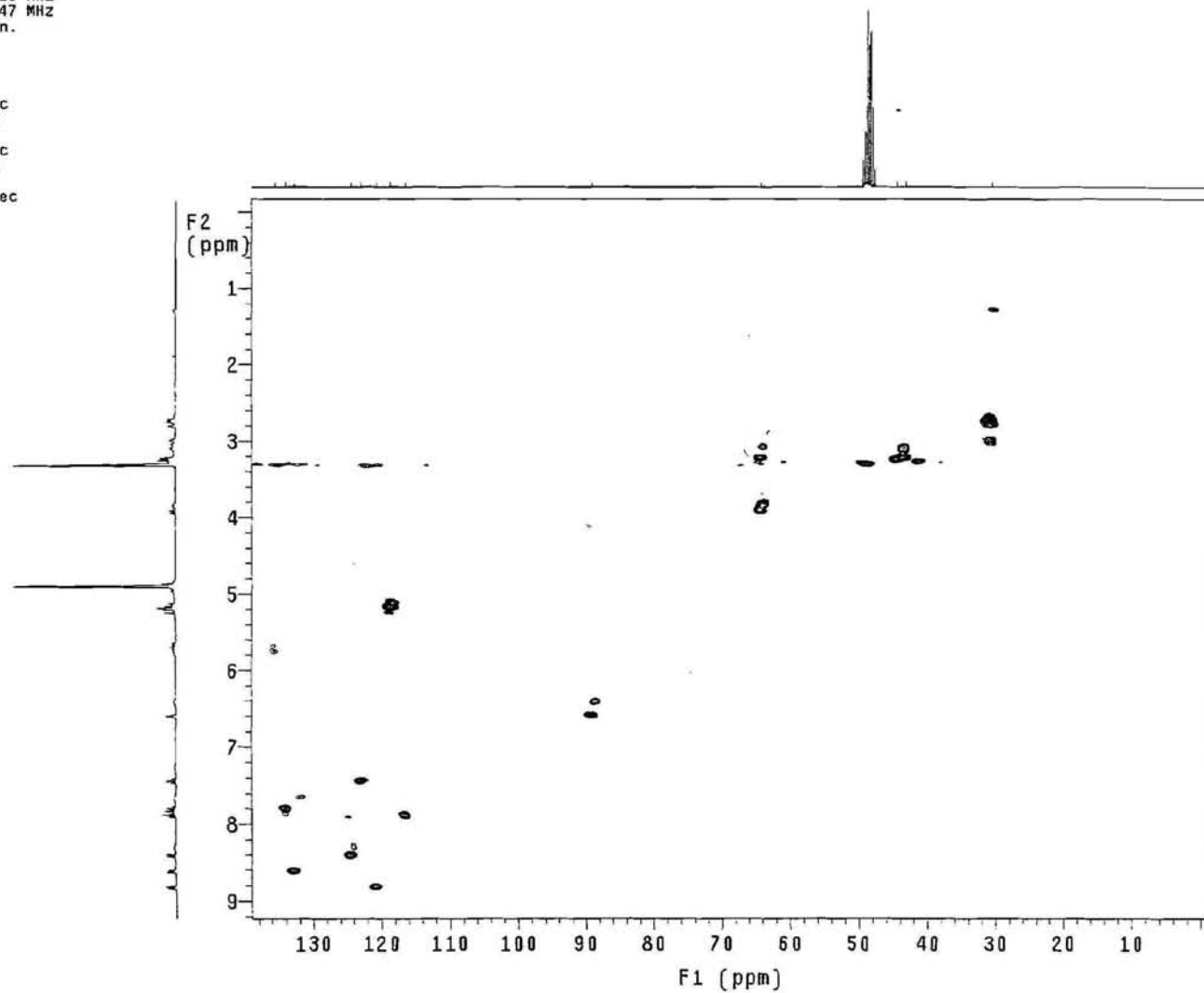


Figura 77: Experimento de HMQC de EPP 39-37.

EPP39-37-HMBC
 Pulse Sequence: HMBC
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.168 sec
 Width 3054.4 Hz
 2D Width 18115.9 Hz
 128 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 300.0578018 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.084 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.007 sec
 FT size 1024 x 2048
 Total time 11 hr, 56 min, 43 sec

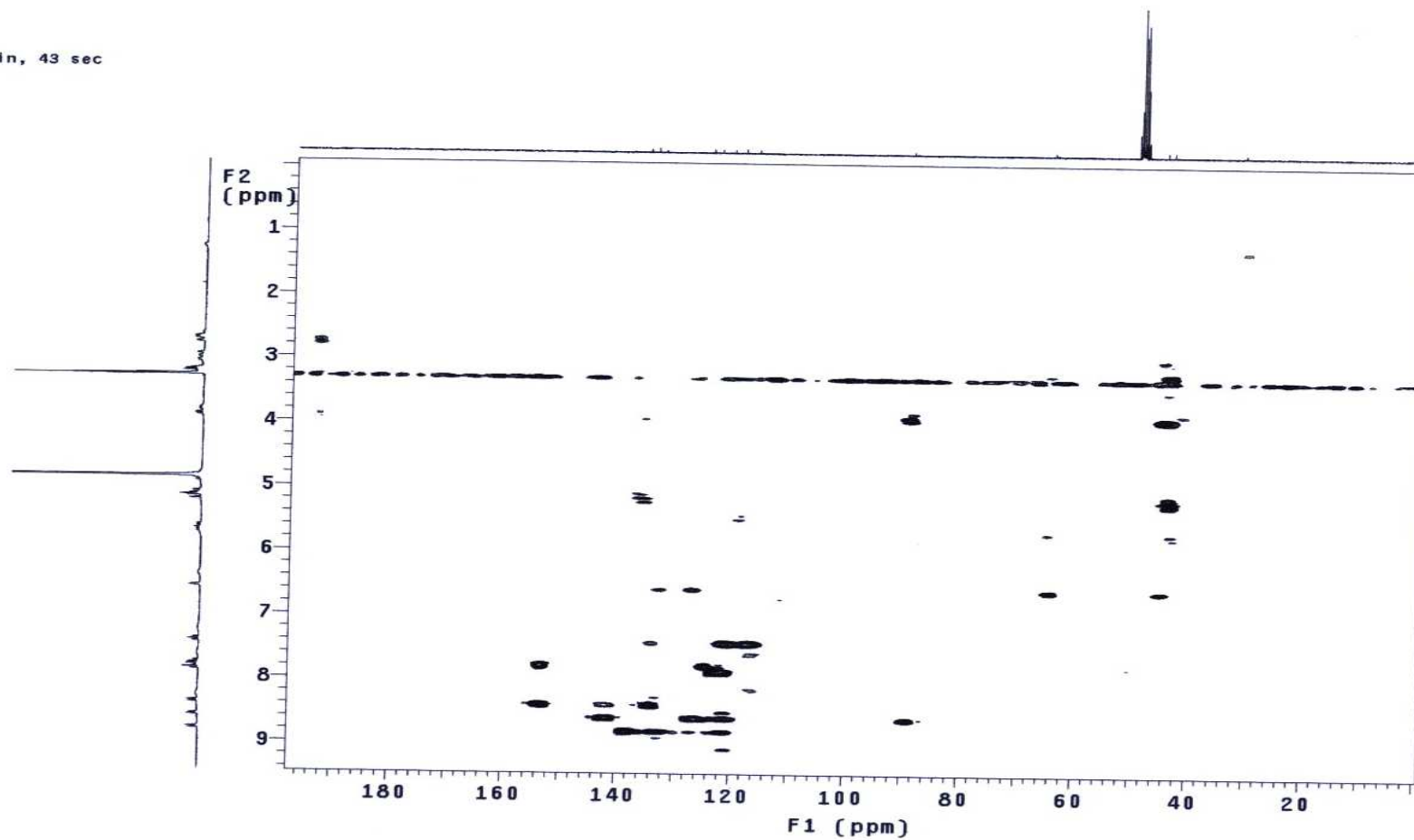


Figura 78: Experimento de HMBC de EPP 39-37.

ANEXO B

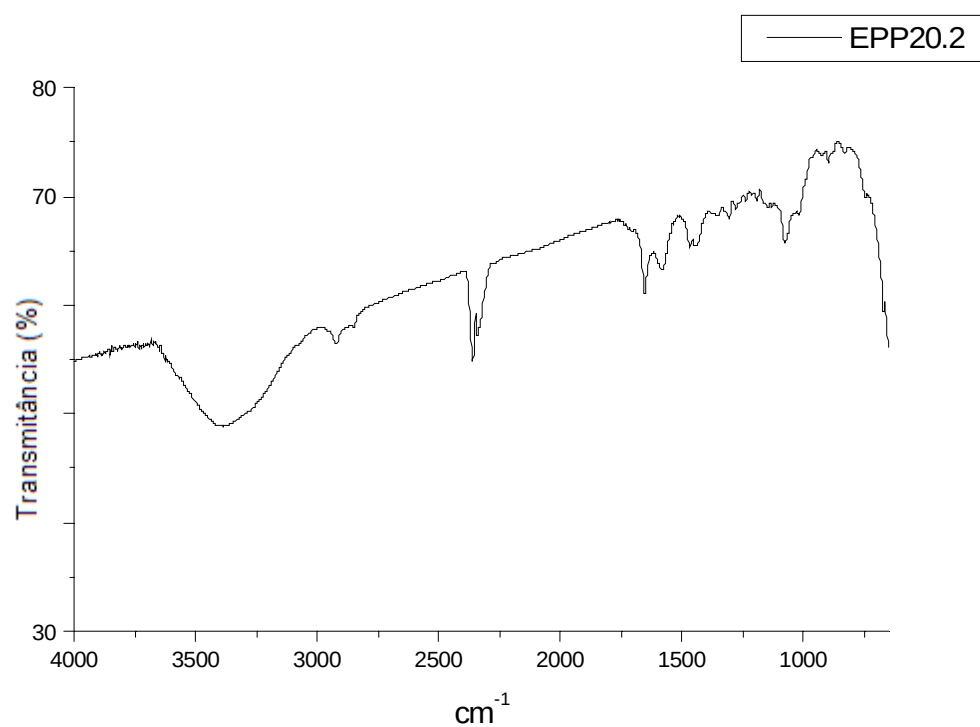


Figura 79: Espectro de absorção na região de infravermelho de (1).

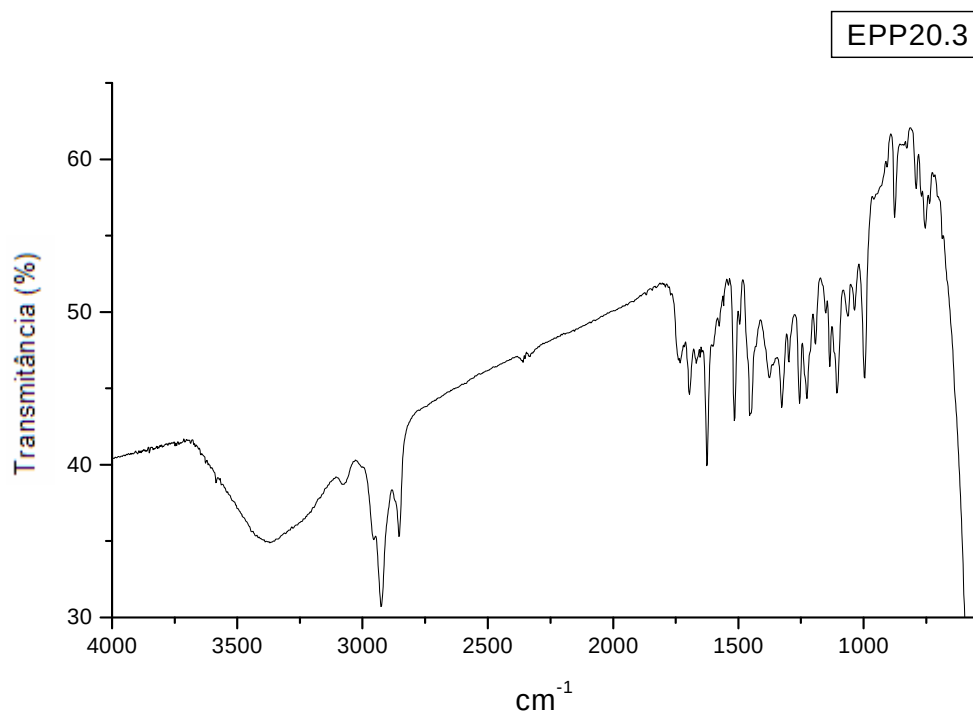


Figura 80: Espectro de absorção na região de infravermelho do alcalóide (2).

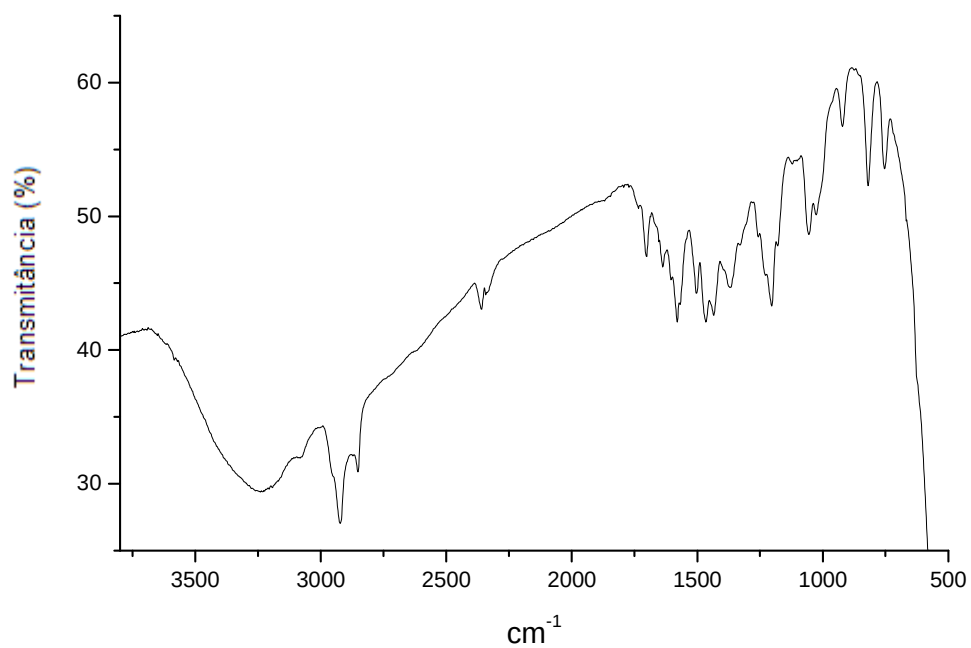


Figura 81: Espectro de absorção na região de infravermelho de EPP 26.2

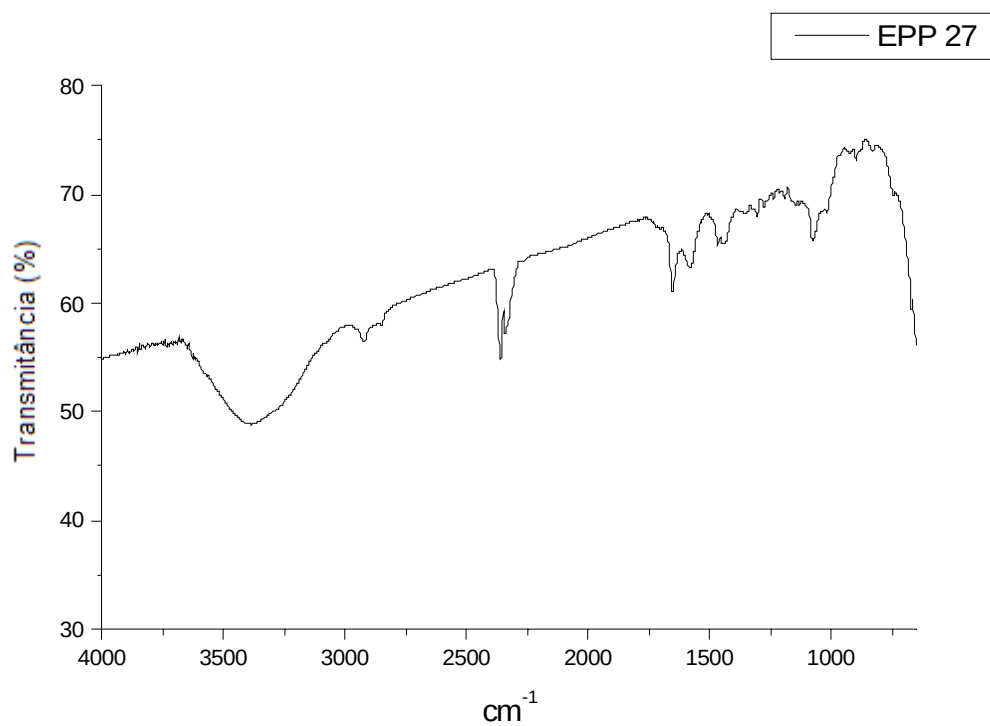


Figura 82: Espectro de absorção na região de infravermelho de Estrictosamida.

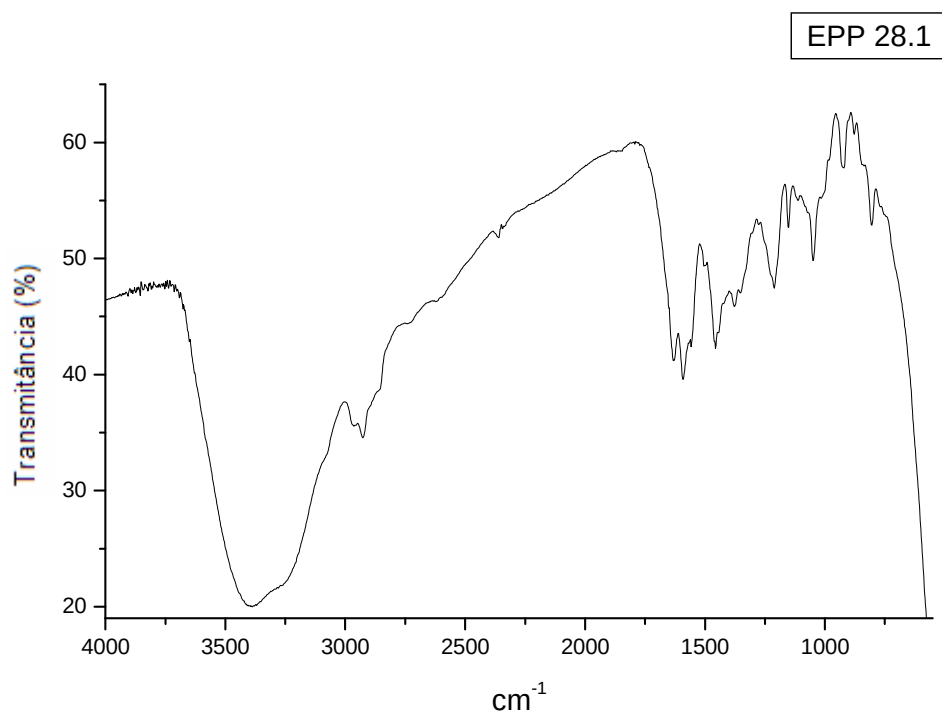


Figura 83: Espectro de absorção na região de infravermelho de EPP28.1.

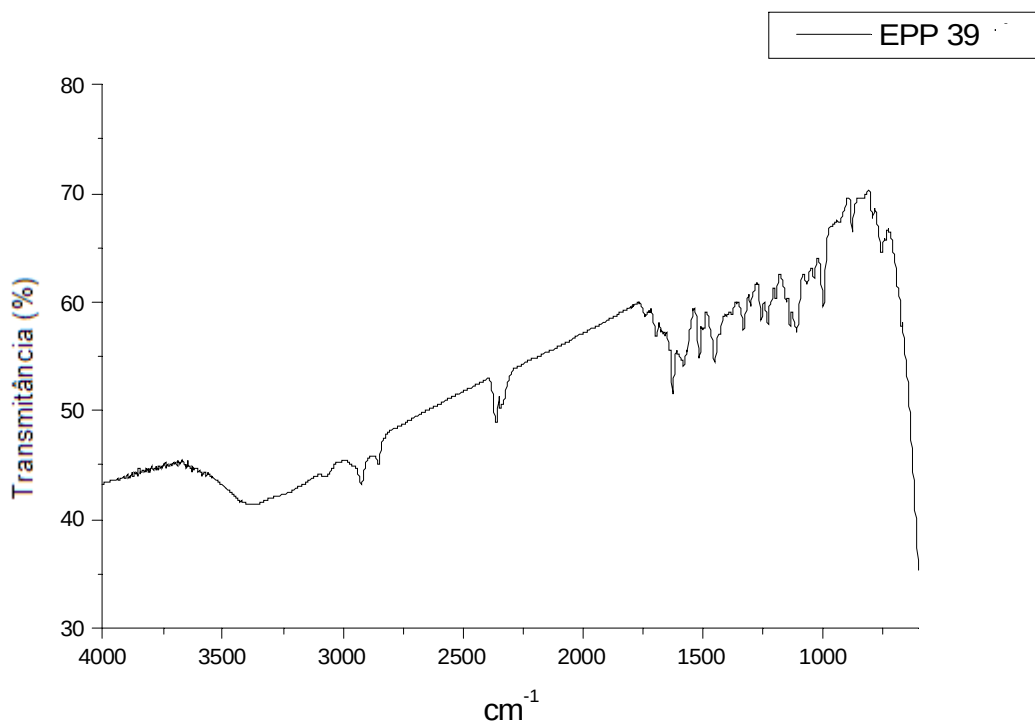


Figura 84: Espectro de absorção na região de infravermelho de EPP39-37.

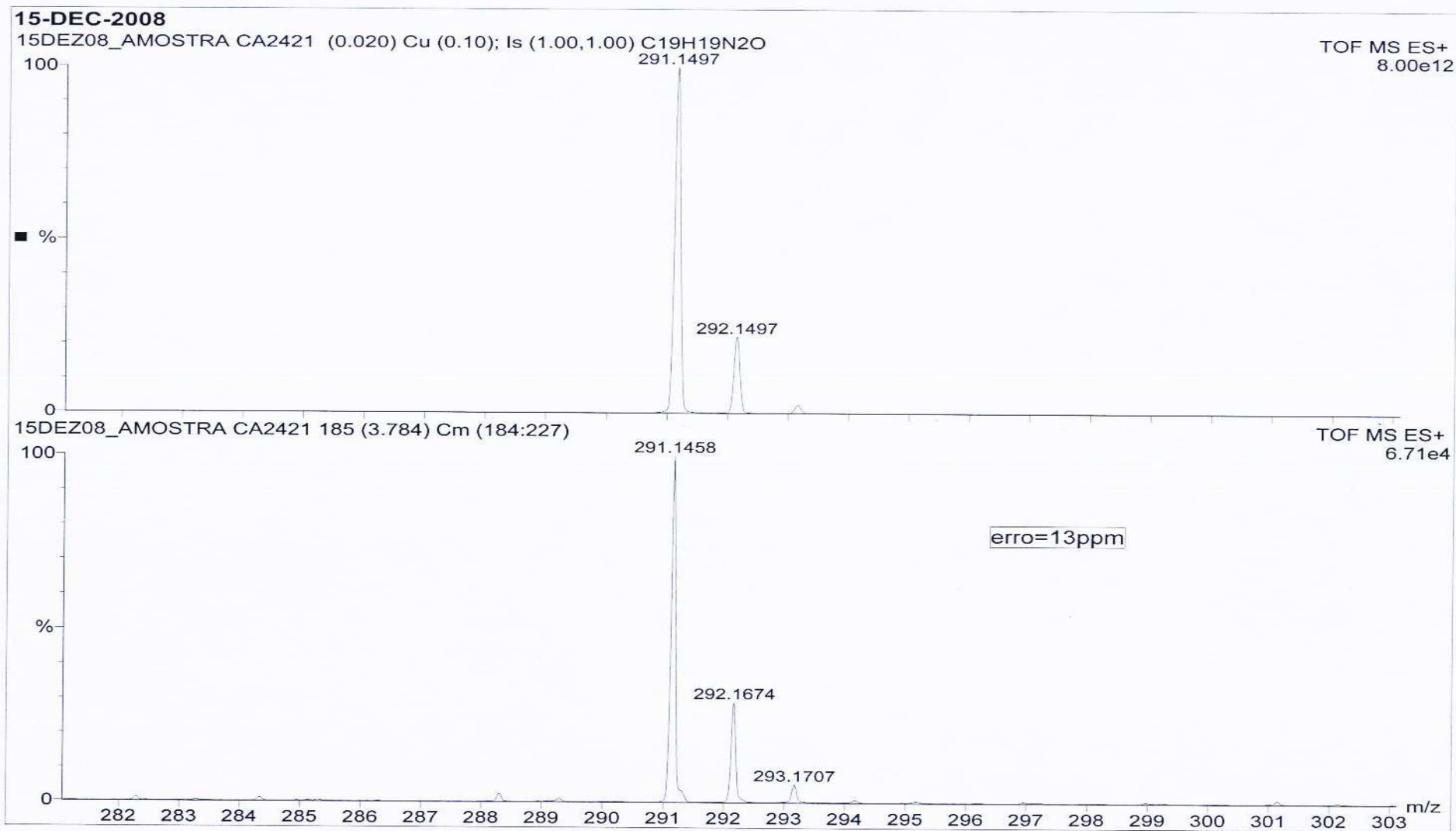


Figura 85: Espectro de massas de alta resolução do alcalóide 1

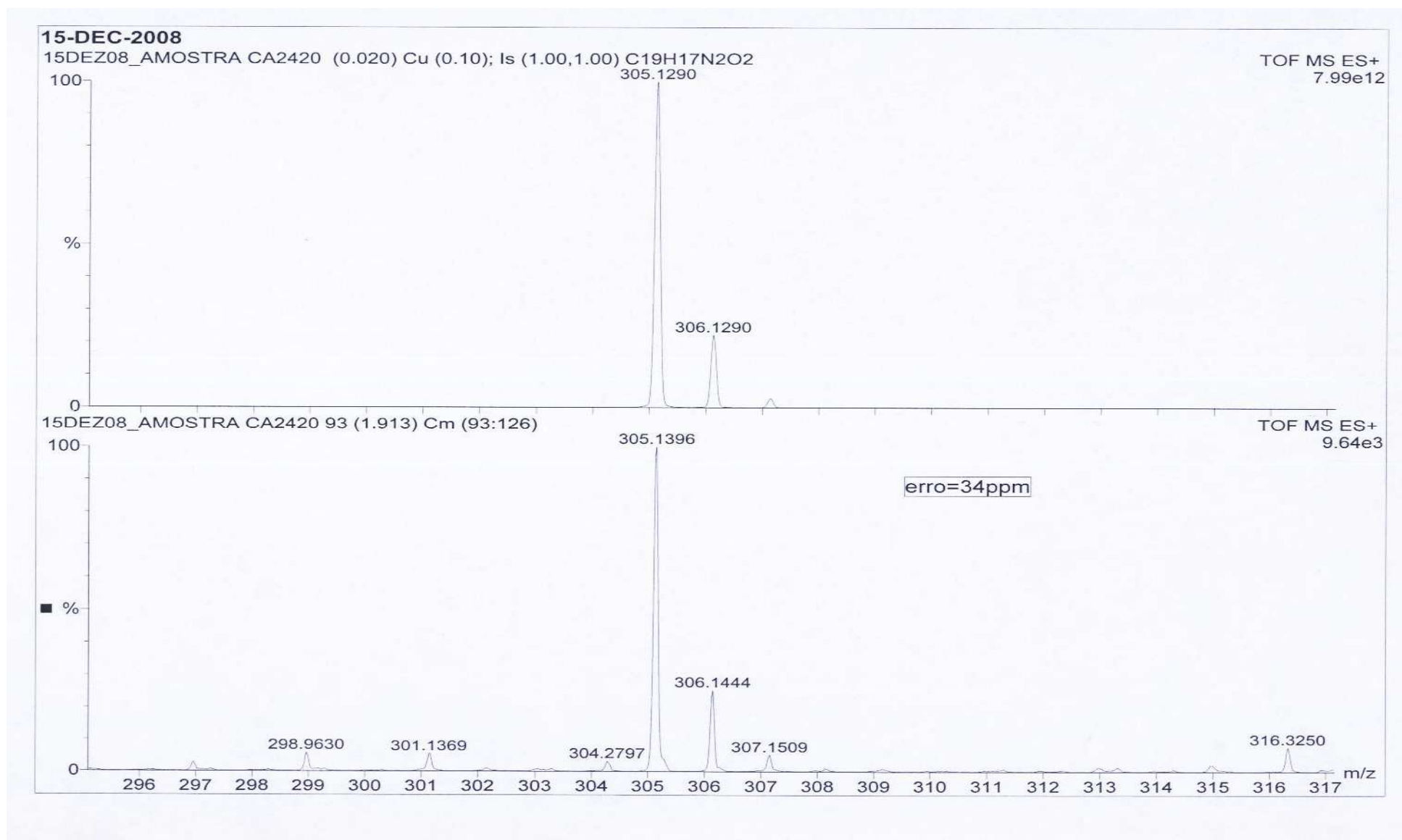


Figura 86: Espectro de massas de alta resolução do alcalóide 2