

UFG

IQ

A
L
I
N
E

P
E
R
E
I
R
A

M
O
R
A
E
S

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e
distribuição espacial dos metabólitos
secundários das folhas de espécies de
Psychotria e *Palicourea* por DESI-MS direto e
indireto

ALINE PEREIRA MORAES

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CECÍLIA MARIA ALVES DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. BONIEK GONTIJO VAZ

TESE DE DOUTORADO

GOIÂNIA - 2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

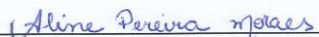
Nome completo do autor: Aline Pereira Moraes

Título do trabalho: Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e distribuição espacial dos metabólitos secundários das folhas de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por DESI-MS direto e indireto

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 19 / 07 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e
distribuição espacial dos metabólitos secundários das
folhas de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por
DESI-MS direto e indireto

Aline Pereira Moraes

Tese apresentada ao Instituto
de Química da Universidade
Federal de Goiás como
exigência parcial, para
obtenção do título de Doutora
em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia, 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moraes, Aline Pereira

Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e distribuição espacial
dos metabólitos secundários das folhas de espécies de *Psychotria* e
Palicourea por DESI-MS direto e indireto [manuscrito] / Aline Pereira
Moraes. - 2017.

xvii, 213 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira; co
orientador Dr. Boniek Gontijo Vaz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Palicourea officinalis*. 2. imagem por DESI-MS direto e indireto.
3. Rubiaceae. 4. alcaloides. 5. *Psychotria*. I. Oliveira, Cecília Maria
Alves de, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Tese de Doutorado de Aline Pereira Moraes, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutora em Química.

Aos dias 07 (sete) de abril do ano de 2017 (dois mil e dezessete), com início às 14:30 hs (catorze e trinta horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Prof. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira (UFG), Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG), Prof. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (UFG), Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia (UNB), Prof. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (UFG) e Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG), sob a presidência da primeira, para julgar a tese de Aline Pereira Moraes intitulada: "Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e distribuição espacial dos metabólitos secundários das folhas de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por DESI-MS direto e indireto". A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira: aprovada

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz: APROVADA

Prof. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira: APROVADA

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia: APROVADO

Prof. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto: APROVADA

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves: aprovada

A seguir, na presença do público e da candidata, a presidente da Banca Examinadora declarou que Aline Pereira Moraes, candidata ao título de doutora em Química foi: Aprovada(☒); Reprovada (), conforme justificativa em documento anexo a esta ata. Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 07 de abril de 2017.

Prof. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira (UFG)

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)

Prof. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (UFG)

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia (UNB)

Prof. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto (UFG)

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)

Aos meus pais Luiz e Maria
Terezinha e ao Jorge.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado perseverança e saúde para superar as dificuldades.

À Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Química, pela oportunidade de realizar esse trabalho. A todos os docentes de forma geral, que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida no início do doutorado e no doutorado-sanduíche.

Agradeço, em especial, à minha orientadora Cecília e ao meu co-orientador Boniek, que acreditaram na minha capacidade de realizar um doutorado-sanduíche na Dinamarca, desafio que eu inicialmente não acreditava conseguir realizar. Foi uma experiência enriquecedora e inesquecível.

Em especial, dedico este trabalho à minha orientadora Cecília, que muito contribuiu para a minha formação acadêmica. É uma imensa honra e orgulho tê-la como orientadora por todos esses anos.

À professora Lucília, pelo apoio e constante disposição para contribuir com o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pelos momentos especiais que vivemos na Dinamarca, onde foi realizado parte desse trabalho.

Ao professor Boniek, pela co-orientação e pela oportunidade de realizar os experimentos de espectrometria de massas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM), da Universidade Federal de Goiás.

A todos os amigos do laboratório, pelos momentos de descontração e amizade durante esses dez anos de UFG. Um agradecimento especial à Pollyanna, Geralda, Vinicius e Monique.

Agradeço aos meus pais, que com muito sacrifício e amor, não mediram esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Agradeço também ao meu grande amor, Jorge, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. A importância dos produtos naturais na descoberta de fármacos ...	2
1.2. Família Rubiaceae	4
1.3. Tribo Palicoureeae	6
1.3.1. <i>Palicourea officinalis</i>	17
1.4. Tribo Psychotrieae	17
1.5. Espectrometria de massas no estudo de produtos naturais	19
1.5.1. A ionização por electrospray (ESI)	20
1.5.2. A ionização de dessorção por eletrospray (DESI)	21
1.5.2. Imagem química por DESI-MS (DESI-MSI)	23
2. OBJETIVOS GERAIS	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Estudo fitoquímico de <i>Palicourea officinalis</i>	31
3.1.1. Instrumentação e procedimentos gerais	31

3.1.2. Preparação dos extratos e frações das partes aéreas de <i>P. officinalis</i>	32
3.1.3. Caracterização do perfil metabólico dos extratos e frações das folhas e galhos de <i>P. officinalis</i> por espectrometria de massas	36
3.1.4. Estudo fitoquímico das folhas de <i>P. officinalis</i>	37
3.1.5. Estudo fitoquímico dos galhos.....	42
3.2. Imagem química de espécies de <i>Psychotria</i> e <i>Palicourea</i> por DESI-MS	43
3.2.1. Procedimentos gerais	43
3.2.2. Material vegetal	43
3.2.3. Instrumentação e parâmetros de análise de DESI-MSI.....	44
3.2.4. Método indireto de análise (<i>imprint</i>)	45
3.2.5. Método direto de análise	47
3.2.6. Parâmetros experimentais de DESI-MS.....	47
3.2.7. Identificação dos metabólitos por espectrometria de massas .	47
3.3. Análises de quantificação em LC-MS	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Metabólitos de <i>Palicourea officinalis</i>	50
4.1.1. Caracterização do perfil metabólico dos extratos e frações polares das partes aéreas de <i>Palicourea officinalis</i> por espectrometria de massas	50
4.1.2. Estudo fitoquímico das folhas e galhos de <i>Palicourea officinalis</i>	54
4.1.3. Caracterização dos compostos isolados por RMN e MS.....	57
4.2. Imagem química das folhas de <i>Psychotria prunifolia</i> , <i>Palicourea coriacea</i> , <i>P. rigida</i> e <i>P. officinalis</i> por DESI-MS.....	123
4.2.1. Método de análise direto	124
4.2.2. Método de análise indireto (<i>imprint</i>)	126
4.2.3. Quantificação relativa por LC-MS.....	140
5. CONCLUSÃO	144
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	146
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de importantes produtos naturais usados no tratamento de doenças.....	3
Figura 2. Número aproximado de espécies e gêneros das cinco maiores famílias de angiospermas (DAVIS <i>et al.</i> , 2009).....	5
Figura 3. Números de artigos publicados até outubro de 2016 sobre <i>Palicourea</i> , conforme busca em banco de dados SciFinder (https://scifinder.cas.org/scifinder).....	7
Figura 4. Estruturas químicas de alcaloides isolados de espécies de <i>Palicourea</i> no período de 1975-2016.	11
Figura 5. Estruturas químicas de compostos de outras classes de metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Palicourea</i> no período de 1975-2016.....	13
Figura 6. Classes de metabólitos secundários isolados de <i>Palicourea</i> , no período de 1975-2016.....	14
Figura 7. Rota biossintética geral dos alcaloides indólicos monoterpênicos.	15
Figura 8. Biossíntese da secologanina a partir do geranil-difosfato. Enzimas E ₁ : geraniol sintase; E ₂ : geraniol 10-hidroxilase; E ₃ : 10-hidroxigeraniol óxido-redutase; E ₄ : monoterpene ciclase; E ₅ : 7-desoxiloganina 7-hidroxilase; E ₆ : ácido logânico metiltransferase; E ₇ : secologanina sintase.....	15
Figura 9. <i>Palicourea officinalis</i> Mart.: fotografia e classificação botânica da espécie (DELPRETE, 2010).....	17

Figura 10. Alcaloides indólicos isolados de <i>Psychotria prunifolia</i>	19
Figura 11. Mecanismos de ionização propostos para a fonte de ionização de eletrospray (ESI). Figura adaptada de Awad e colaboradores (2015).	21
Figura 12. Esquema geral de DESI-MS. Adaptado de Takáts e colaboradores (2004).	22
Figura 13. Estratégia de imageamento por espectrometria de massas aplicada a folha de <i>Hypericum perforatum</i> . Adaptado de Wolfender e colaboradores (2015).	24
Figura 14. Extração ácido-base da fração hidrometanólica das folhas de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	35
Figura 15. Extração ácido-base da fração hidrometanólica dos galhos de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	36
Figura 16. Esquema de fracionamento da fração CH ₂ Cl ₂ das folhas de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	38
Figura 17. Esquema de fracionamento da fração aquosa das folhas de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	39
Figura 18. Esquema de isolamento da cumarina escopoletina (35) de <i>P. officinalis</i> a partir da fração clorofórmica ácida. SF: subfração.	39
Figura 19. Esquema de fracionamento da fração butanólica básica das folhas de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	41
Figura 20. Esquema de fracionamento da fração hidrometanólica básica das folhas de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	42
Figura 21. Esquema de fracionamento da fração clorofórmica ácida dos galhos de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	42
Figura 22. Esquema de fracionamento da fração clorofórmica básica dos galhos de <i>P. officinalis</i> . SF: subfração.	43
Figura 23. a) <i>Palicourea coriacea</i> ; b) <i>Palicourea rigida</i> ; c) <i>Psychotria prunifolia</i> ; d) <i>Palicourea officinalis</i> . Fotos obtidas no dia da coleta.	44
Figura 24. Espectrômetro de massas Thermo Fisher Scientific LTQ XL íon trap linear equipado com uma fonte de ionização DESI utilizado nos experimentos de imagem.	45
Figura 25. Exemplo de processo de impressão da folha em superfície de PTFE (folha de cevada). a) A folha é colocada sobre uma superfície limpa de	

PTFE e coberta com papel toalha e uma peça de borracha; b) O “sanduíche” é colocado em uma morsa por cerca de 3 min; c) o “sanduíche” é aberto; d) o imprint está pronto para análise. Figura extraída com permissão de Janfelt (2015).....	46
Figura 26. Estruturas químicas dos compostos isolados e identificados das folhas e galhos de <i>Palicourea officinalis</i>	55
Figura 27. Espectro de HR-ESI-(+)-MS do composto 49	58
Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 49 ; a) na região de aromáticos, mostrando um perfil de sinais característicos das unidades β -carbolínica e loganínica; b) região de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos; c) região de hidrogênios saturados.....	59
Figura 29. Principais correlações observadas no mapa de contorno do composto 49	60
Figura 30. Espectro de HR-ESI-(+)-MS/MS do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 547,2288.	61
Figura 31. Proposta de mecanismo de fragmentação do alcaloide braquicerina. i: clivagem induzida.	62
Figura 32. Comparação de espectro de RMN de ^1H do composto 49 para o sinal de hidrogênio a) H-20 com b) sua simulação de espectro.....	63
Figura 33. Comparação de a) espectro de RMN de ^1H do composto 49 para o sinal de hidrogênio H-18 com b) simulações de espectro baseado na literatura (KERBER <i>et al.</i> , 2001) e c) nova proposta.....	64
Figura 34. Comparação de a) espectro de RMN de ^1H do composto 49 para o sinal de hidrogênio H-19 com b) simulações de espectro baseado na literatura (KERBER <i>et al.</i> , 2001) e c) nova proposta.....	64
Figura 35. Estruturas do alcaloide braquicerina e do composto 49	65
Figura 36. Espectro de HR-ESI-(+)-MS/MS do íon aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 527,2462.	67
Figura 37. Sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H (este último, entre parênteses) do composto 50 e correlações de HMBC característicos da unidade megastimano.....	68
Figura 38. Expansão do espectro de RMN de ^1H , mostrando a região de hidrogênios ligados a oxigênio.	69

Figura 39. Sinais de RMN de ^{13}C e ^1H (entre parentêses) e correlação de HMBC entre as duas unidades de açúcar.....	70
Figura 40. Principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto 50	70
Figura 41. Expansão do espectro de RMN de ^1H evidenciando a presença do derivado olefínico em C-7 e C-8 do norisoprenoide guettardionosídeo. .	73
Figura 42. Estrutura química do norisoprenoide 3-oxo- α -ionol 9-apiofuranosil-(1''=> 6')-glicopiranosídeo, identificado em mistura com guettardionosídeo.	74
Figura 43. Espectro de HR-ESI(-)-MS da mistura de derivados de α -ionol.	75
Figura 44. Expansão de espectro de RMN de ^1H de mistura de derivados de α -ionol.	76
Figura 45. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto 55	82
Figura 46. Expansão de espectro de RMN de ^1H do composto 55	82
Figura 47. Possíveis estereoquímicas do anel tipo 3,7-dioxabicyclo[3.3.0] octano de lignanas.	83
Figura 48. Principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto 55	85
Figura 49. Expansão do mapa de HMBC (CD_3OD) do composto 55 evidenciando as correlações principais.....	85
Figura 50. a) Espectro de massas HR-ESI(+)-MS e b) HR-ESI(+)-MS/MS da mistura de compostos 56 e 57	88
Figura 51. Expansão do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) mostrando os sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos da mistura de pirazinas.....	89
Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) mostrando os sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-1''.....	89
Figura 53. a) Espectro de massas HR-ESI(+)-MS da mistura de pirazinas 56 , 57 e 58	92
Figura 54. Expansão do espectro de RMN de ^1H da mistura de pirazinas..	93
Figura 55. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto 39	96

Figura 56. Expansão do mapa de HMBC evidenciando correlações que indicam ligação entre a aglicona e as unidades de açúcar.	97
Figura 57. Principais correlações de HMBC observadas para o composto 39	97
Figura 58. Espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS do composto 59	100
Figura 59. Correlações observadas no mapa de HMBC para o sinal em δ_H 5,45 (H-1''), indicando ligação da parte glicosídica com a aglicona pelo carbono C-3 (δ_C 135,4), e de δ_H 4,77 (H-1''') com o carbono em δ_C 82,7 (C-2''), indicando uma ligação interglicosídica via C-2''.	101
Figura 60. Principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto 59	101
Figura 61. Espectro de massas HR-ESI(-)-MS do composto 60	103
Figura 62. Expansão do espectro de RMN de ^1H (CD ₃ OD, 500 MHz) evidenciando os sinais atribuídos à unidade cafeoíla.	104
Figura 63. Expansão do espectro de RMN de ^1H (CD ₃ OD, 500 MHz) evidenciando os sinais atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-5 da unidade de ácido quínico.	105
Figura 64. Esquema de atribuição de constantes de acoplamento para os hidrogênios H-3, 4 e 5 e proposta de estereoquímica relativa para a unidade de ácido quínico, destacando as constantes de acoplamento em a) H-3 e em b) H-5 com os respectivos hidrogênios vicinais.	106
Figura 65. Espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS da mistura de compostos 3-ACQ e 4-ACQ.	109
Figura 66. Espectros de ESI(-)-MS/MS dos isômeros de ácido cafeoil-quínico. Figura adaptada de Clifford e colaboradores (2003) com permissão.	109
Figura 67. Mecanismo de fragmentação proposto por Clifford e colaboradores (2003) explicando porque a formação do fragmento de m/z 173 é favorecida para o composto a) 4-ACQ, e não para b) 3-ACQ. Figura adaptada com permissão.....	110
Figura 68. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 3-ACQ, em a) e c) , e da mistura de compostos 3-ACQ e 4-ACQ, em b) e d) , evidenciando a presença de duas unidades de ácido quínico e cafeoílas.	111

Figura 69. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto 62	113
Figura 70. Principais correlações de HMBC observadas para o composto 62	114
Figura 71. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto 63	115
Figura 72. Principais correlações observadas no mapa de HMBC para o composto 63	116
Figura 73. a) Espectro de massas HR-ESI(+)-MS e b) HR-ESI(+)-MS/MS do composto 35	117
Figura 74. Principais correlações de HMBC observadas para o composto 35	118
Figura 75. Espectro de HR-ESI(+)-MS do extrato etanólico da folha de a) <i>Psychotria prunifolia</i> ; b) <i>Palicourea coriacea</i> ; c) <i>Palicourea rigida</i>	123
Figura 76. Seção da folha adulta de <i>P. coriacea</i> analisada por imageamento direto por DESI-MS (26x4 mm). a) Foto. b) Ampliação da foto evidenciando a retirada da cutícula foliar na metade esquerda da folha. c) Imagem obtida para o íon m/z 347 (calicantina). d) Espectro de um ponto da folha representativo da presença da calicantina. O tamanho do pixel é de 150 μm e o tempo de aquisição da imagem, 1h e 2 min.....	126
Figura 77. Espectro de DESI(+)-MS da folha de <i>P. prunifolia</i> pelo método indireto no modo positivo obtido no imageamento, mostrando a presença majoritária do alcaloide prunifoleína (m/z 291, 44), além dos alcaloides 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, 47) e 10-hidroxiantirrina (m/z 313, 48)....	127
Figura 78. Espectros de DESI(+)-MS/MS dos íons a) prunifoleína (44 , m/z 291); b) 10-hidroxiantirrina (48 , m/z 313); c) 10-hidroxiisodeppeaninol (47 , m/z 327), com a proposta estrutural dos fragmentos.	128
Figura 79. Propostas de mecanismos de fragmentação dos alcaloides a) prunifoleína, m/z 291, b) 10-hidroxiantirrina, m/z 313 e c) 10-hidroxiisodeppeaninol, m/z 327, de <i>P. prunifolia</i>	130
Figura 80. Folha adulta de <i>P. prunifolia</i> analisada por imageamento indireto por DESI-MS (49 x 27 mm). a) Foto da folha após <i>imprint</i> ; b) Foto do <i>imprint</i> em PTFE; c) imagem de prunifoleína (m/z 291, 44); d) imagem de 10-	

hidroxiantirrina(m/z 313, 48), e) imagem de 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, 47); f) imagem de m/z 381 (aduto [sacarose+K] ⁺). O tamanho do pixel é de 300 μm e o tempo de aquisição da imagem, 2h e 52 min. As cores diferentes atribuídas a imagem de cada composto não indicam diferença na intensidade do sinal. A escala de cores varia de preto a branco, sendo a cor preta a ausência do composto analisado, e a cor branca intensidade máxima no respectivo ponto.....	131
Figura 81. Alcaloides isolados de <i>Palicourea coriacea</i>	132
Figura 82. Espectro de DESI-(+)-MS da folha de <i>P. coriacea</i> pelo método indireto obtido no imageamento, mostrando a presença majoritária do alcaloide calicantina (m/z 347). O alcaloide noreleagnina (m/z 173) foi identificado pela primeira vez nessa espécie.....	132
Figura 83. Espectro de DESI-(+)-MS/MS do íon m/z 347 (calicantina, 11).	133
Figura 84. Biossíntese da calicantina proposta por Robinson (1954) e Woodward (1960). Adaptada de Poupon e Nay (2011).	134
Figura 85. Espectro de DESI(+)-MS/MS do m/z 517 (ácido strictosídico (13) ou 3- <i>epi</i> -strictosidínico (14)).....	134
Figura 86. Espectro de DESI-(-)-MS/MS do m/z 191 ([ácido quínico-H] ⁻). 135	
Figura 87. Seção da folha adulta de <i>P. coriacea</i> analisada por imageamento indireto por DESI-MS (28 x 24 mm). a) Foto. b) Foto do <i>imprint</i> em PTFE. Imagens obtidas para os íons: c) m/z 173 ([noreleagnina+H] ⁺); d) m/z 347 (calicantina) e e) m/z 381 (aduto [sacarose+K] ⁺). O tamanho do pixel é de 275 μm e o tempo de aquisição da imagem, 1h e 54 min.....	135
Figura 88. Folha jovem de <i>P. coriacea</i> analisada por imageamento indireto por DESI-(+)-MS (24 x 17 mm). a) Foto; b) Foto do <i>imprint</i> em PTFE; c) e e) imagens de compostos não-identificados; d) e f) imagem dos compostos de m/z 290 e 316; g) imagem do composto calicantina (m/z 347). O tamanho do pixel é de 250 μm e o tempo de aquisição da imagem, 1h e 21 min.	136
Figura 89. a) Espectro de DESI-MS da folha de <i>P. rigida</i> pelo método indireto no modo positivo, mostrando a presença majoritária do alcaloide strictosidina (m/z 531); b) Espectro de massas de ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 531.	137

Figura 90. Proposta de mecanismo de fragmentação do íon m/z 531 (strictosidina). Figura extraída de Costa e colaboradores (2016), com permissão.....	138
Figura 91. Resultados da análise por LC-MS dos extratos das folhas das espécies <i>P. prunifolia</i> em a) e b) e <i>P. officinalis</i> em c) e d) ., sendo que em a) e c) os resultados estão expressos em intensidade absoluta e b) e d) em porcentagem. As barras de erros em a) e c) são referentes ao desvio padrão ($n = 3$). Os asteriscos indicam que as diferenças entre a concentração dos compostos encontrada nas folhas e na nervura central são significativamente maiores que zero a nível de 95% (*), 99% (**) pelo teste t de Student unicaudal. ns: diferença não significativa.	141
Figura 92. Espectro a) na região de infravermelho (KBr) e b) ultravioleta (MeOH) do composto 18- <i>epi</i> -braquicerina (49).....	164
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto 18- <i>epi</i> -braquicerina (49).....	165
Figura 94. Mapa de correlação de COSY (CD_3OD) do composto 18- <i>epi</i> -braquicerina (49).....	166
Figura 95. Mapa de correlação de HSQC (CD_3OD) do composto 18- <i>epi</i> -braquicerina (49).....	167
Figura 96. Mapa de correlação de HMBC (CD_3OD) do composto 18- <i>epi</i> -braquicerina (49).....	168
Figura 97. Espectro na região de infravermelho (KBr) do composto guettardionosídeo (50).....	169
Figura 98. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto guettardionosídeo (50).....	170
Figura 99. Mapa de correlação de HSQC (CD_3OD) do composto guettardionosídeo (50).....	171
Figura 100. Mapa de correlação de HMBC (CD_3OD) do composto guettardionosídeo (50).....	172
Figura 101. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da mistura de derivados de α -ionol (52 , 53 e 54).	173
Figura 102. Mapa de correlação de HSQC (CD_3OD) da mistura de derivados de α -ionol (52 , 53 e 54).....	174

Figura 103. Mapa de correlação de HMBC (CD ₃ OD) da mistura de derivados de α -ionol (52 , 53 e 54).....	175
Figura 104. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) do composto siringaresinol 4- β -D-glicosídeo (55).	176
Figura 105. Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) do composto siringaresinol 4- β -D-glicosídeo (55).	177
Figura 106. Mapa de correlação de HSQC (CD ₃ OD) do composto siringaresinol 4- β -D-glicosídeo (55).	178
Figura 107. Mapa de correlação de HMBC (CD ₃ OD) do composto siringaresinol 4- β -D-glicosídeo (55).	179
Figura 108. Espectro na região de infravermelho (KBr) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56) e 2,6-desoxifructosazina (57).....	180
Figura 109. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56) e 2,6-desoxifructosazina (57).....	181
Figura 110. Mapa de correlação de HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56) e 2,6-desoxifructosazina (57).....	182
Figura 111. Mapa de correlação de HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56) e 2,6-desoxifructosazina (57).....	183
Figura 112. Espectro de RMN de ¹ H (D ₂ O, 500 MHz) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56), 2,6-desoxifructosazina (57) e fructosazina (58).	184
Figura 113. Mapa de correlação de HSQC (D ₂ O) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56), 2,6-desoxifructosazina (57) e fructosazina (58).	185
Figura 114. Mapa de correlação de HMBC (D ₂ O) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (56), 2,6-desoxifructosazina (57) e fructosazina (58).	186
Figura 115. Espectro a) na região do infravermelho (KBr) e b) do ultravioleta do composto quercetina 3-O-soforosídeo (39).....	187
Figura 116. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) do composto quercetina 3-O-soforosídeo (39).	188
Figura 117. Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) do composto quercetina 3-O-soforosídeo (39).	189

Figura 118. Mapa de correlação de HSQC (CD ₃ OD) do composto quercetina 3-O-soforosídeo (39).....	190
Figura 119. Mapa de correlação de HMBC (CD ₃ OD) do composto quercetina 3-O-soforosídeo (39).....	191
Figura 120. Espectro na região de infravermelho (KBr) do composto canferol 3-O-soforosídeo (59).....	192
Figura 121. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) do composto canferol 3-O-soforosídeo (59).....	193
Figura 122. Mapa de correlação de HSQC (CD ₃ OD) do composto canferol 3-O-soforosídeo (59).....	194
Figura 123. Mapa de correlação de HMBC (CD ₃ OD) do composto canferol 3-O-soforosídeo (59).....	195
Figura 124. Espectro na região de infravermelho (KBr) do composto ácido 3-cafeoil-quínico (60).....	196
Figura 125. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) do composto ácido 3-cafeoil-quínico (60).	197
Figura 126. Mapa de correlação HSQC do composto do ácido 3-cafeoil-quínico (60).....	198
Figura 127. Mapa de correlação HMBC do composto do ácido 3-cafeoil-quínico (60).....	199
Figura 128. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) da mistura de ácidos 3-cafeoil-quínico (3-ACQ, 60) e 4- cafeoil-quínico (4-ACQ, 61).....	200
Figura 129. Mapa de correlação HSQC (CD ₃ OD) da mistura de ácidos 3-cafeoil-quínico (60) e 4- cafeoil-quínico (61).	201
Figura 130. Mapa de correlação HMBC (CD ₃ OD) da mistura de ácidos 3-cafeoil-quínico (60) e 4- cafeoil-quínico (61).	202
Figura 131. Espectro na região do infravermelho do ácido salicílico (62).	203
Figura 132. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) do composto ácido salicílico (62).	204
Figura 133. Mapa de correlação HSQC (CD ₃ OD) do composto ácido salicílico (62).	205
Figura 134. Mapa de correlação HMBC (CD ₃ OD) do composto ácido salicílico (62).	206

Figura 135. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do ácido 9,12,13-trihidróxi-10(<i>E</i>)-octadecenoico (63).....	207
Figura 136. Mapa de correlação HSQC (CD_3OD) do ácido 9,12,13-trihidróxi-10(<i>E</i>)-octadecenoico (63).....	208
Figura 137. Mapa de correlação HMBC (CD_3OD) do ácido 9,12,13-trihidróxi-10(<i>E</i>)-octadecenoico (63).....	209
Figura 138. Espectro na região do ultravioleta do composto escopoletina (35).....	210
Figura 139. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto escopoletina (35).....	211
Figura 140. Mapa de correlação HSQC (CDCl_3) do composto escopoletina (35).....	212
Figura 141. Mapa de correlação HMBC (CDCl_3) do composto escopoletina (35).....	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Novas entidades químicas classificadas por origem, aprovadas pelo U.S. FDA no período de 1981-2014. Dados extraídos de Newman e Cragg, 2016.	4
Tabela 2. Compostos isolados e identificados em espécies de <i>Palicourea</i> no período de 1975-2016.	8
Tabela 3. Rendimento das extrações por maceração das partes aéreas de <i>Palicourea officinalis</i>	33
Tabela 4. Partição líquido-líquido dos extratos brutos metanólicos das folhas e galhos de <i>P. officinalis</i>	33
Tabela 5. Metabólitos identificados nas partes aéreas de <i>P. officinalis</i>	51
Tabela 6. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto 49 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	66
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto 50 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	72
Tabela 8. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto 52 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	78

Tabela 9. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto 53 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	79
Tabela 10. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto 54 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	80
Tabela 11. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 55 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	86
Tabela 12. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 56 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz e 125 MHz, ppm).	90
Tabela 13. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 57 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	91
Tabela 14. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 58 (D_2O , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	94
Tabela 15. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 39 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	98
Tabela 16. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 59 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.	102
Tabela 17. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 60 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm).	107
Tabela 18. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 61 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm).	112
Tabela 19. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 62 (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm).	114
Tabela 20. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 35 (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz, ppm).	118
Tabela 21. Alcaloides de <i>Psychotria prunifolia</i> , <i>Palicourea coriacea</i> e <i>Palicourea rigida</i> detectados e identificados por espectrometria de massas (HR-ESI-MS).	124
Tabela 22. Íons analisados em experimento de quantificação relativa por LC-MS/MS dos extratos de <i>Palicourea coriacea</i> e <i>Psychotria prunifolia</i>	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ACQ	Ácido cafeoil-quínico
AF	Ácido fórmico
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CL ₅₀	Concentração letal mediana
<i>ddd</i>	duplo duplo duplete
DESI	<i>Desorption ElectroSpray Ionization</i> - ionização de dessorção por eletrospray
DMSO	Dimetilssulfóxido
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i> (concentração do fármaco que induz 50% do efeito máximo)
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> - Ionização por eletrospray
EtOH	Etanol
ϕ	Diâmetro da coluna cromatográfica
Glc	Glicose
h	Altura da fase estacionária na coluna cromatográfica
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HR	<i>High resolution</i> - Alta resolução
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> (concentração necessária

	para inibir 50% da atividade de um processo biológico)
MeOH	Metanol
MRM-MS	Monitoramento de reação múltipla em espectrometria de massas
MS	<i>Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de Massas
NCI	<i>National Cancer Institute</i> – Instituto Nacional do Câncer dos EUA
PTFE	Politetraflouretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SF	Subfração
TFA	Ácido trifluoracético
t _r	Tempo de retenção
U. S. FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV	Ultravioleta

RESUMO

Palicourea e *Psychotria* (Rubiaceae) são gêneros conhecidos pela presença de compostos com potencial atividade biológica, tais como os alcaloides indólicos, flavonoides e norisoprenoides. Com o objetivo de ampliar o conhecimento químico de espécies de *Palicourea*, foi realizado pela primeira vez o estudo fitoquímico das partes aéreas de *P. officinalis*, através do isolamento por cromatografia e elucidação estrutural dos compostos por RMN e espectrometria de massas. Os seguintes metabólitos secundários foram isolados e identificados: o alcaloide inédito 18-*epi*-braquicerina; os norisoprenoides: guettardionosídeo e 3-oxo- α -ionol 9-O- β -D-apiofuranosil(1 $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo e a mistura vomifoliol 9-glicopiranosídeo, vomifoliol 9-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-apiofuranosídeo e 7,8-diidro-vomifoliol 9-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-apiofuranosídeo; a lignana siringaresinol-4'- β -D-glicosídeo; a mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina, 2,6-desoxifructosazina e fructosazina; os flavonoides quercetina 3-O-soforosídeo e canferol 3-O-soforosídeo; os ácidos clorogênicos 3-cafeoil e 4-cafeoil-quínicos; uma mistura de ácidos feruloil-quínicos; ácido salicílico; a cumarina escopoletina; além das misturas dos triterpenos ácidos ursólico e oleanólico e dos esteroides sitosterol e estigmasterol glicosilados. Além disso, pela primeira vez, as técnicas de produção de imagem química por DESI-MS direto e indireto foram aplicadas no estudo da distribuição espacial dos alcaloides nas folhas de *Palicourea coriacea* e *Psychotria prunifolia*. O método indireto apresentou melhores resultados, com distintos padrões de distribuição dos alcaloides detectados. Os dados da imagem foram confirmados por LC-MS.

ABSTRACT

Palicourea and *Psychotria* (Rubiaceae) are known for the presence of compounds with potential biological activity, such as the indole alkaloids, flavonoids and norisoprenoids. In order to increase the chemical knowledge of *Palicourea* species, the phytochemical study of the aerial parts of *Palicourea officinalis* was carried out for the first time, through the isolation by chromatography and structural elucidation of the compounds by NMR and mass spectrometry. The following secondary metabolites were identified: the novel alkaloid 18-*epi*-brachycerine; the norisoprenoids: guettardionoside, 3-oxo- α -ionol 9-*O*- β -*D*-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranoside, vomifoliol 9-*O*- β -*D*-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranoside and 7,8-dihydro-vomifolol 9-*O*- β -*D*-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranoside; the lignan syringaresinol- β -*D*-glucoside; the pyrazines 2,5-deoxyfructosazine, 2,6-deoxyfructosazine and fructosazine; the flavonoids quercetin 3-*O*-sophoroside and kampferol 3-*O*-sophoroside; 3-caffeoyl and 4-caffeoylquinic acids; feruloylquinic acids; salicylic acid; coumarin scopoletin; besides ursolic and oleanolic triterpenes acids and glycosylated sitosterol and stigmasterol steroids. In addition, for the first time, the indirect and direct DESI-MSI techniques were applied in the study of the spatial distribution of alkaloids in the leaves of *Palicourea coriacea* and *Psychotria prunifolia*. The indirect approach was applied successfully and showed distinct distribution patterns of the alkaloids detected. The image data were confirmed by LC-MS.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância dos produtos naturais na descoberta de fármacos

Desde a antiguidade, as plantas têm sido uma importante fonte de produtos naturais usados como medicamentos no tratamento de diversas doenças. A complexidade, a diversidade química e as propriedades biológicas dessas substâncias sempre fascinaram os pesquisadores, e durante os últimos 200 anos, o estudo de produtos naturais resultou na descoberta de importantes medicamentos, dentre os quais se destacam: a) a artemisinina **(1)** (KLAYMAN, 1985), usada no tratamento da malária; b) o diterpenoide paclitaxel **(2)** (CORREA, 1995), isolado de *Taxus brevifolia*, que é hoje um medicamento utilizado para o tratamento de tumores sólidos (Taxol®); e c) a camptotecina **(3)** (WALL *et al.*, 1966), alcaloide que inspirou inúmeros derivados que ingressaram no mercado dos fármacos oncológicos (Figura 1).

A importância dos produtos naturais na descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas bioativas é um tema extensivamente documentado (NEWMAN *et al.*, 2000; BUTLER, 2004; PATRIDGE *et al.*, 2016) e teve reconhecimento recente com a concessão do prêmio Nobel de 2015 aos pesquisadores William C. Campbell, Satoshi Omura e Tu Youyou.

Eles foram pioneiros na descoberta de fármacos usados para o tratamento de doenças parasitárias, especialmente a ivermectina B_{1a}/B_{1b}, isolada de culturas de *Streptomyces* e utilizada no tratamento de filariose, e a artemisinina (**1**), isolada de *Artemisia annua* L., utilizada no tratamento da malária (MCKERROW, 2015).

Na Tabela 1, é apresentado o número de fármacos aprovados entre 1981 e 2014 classificados de acordo com a origem. Os fármacos classificados dentro das categorias N, NB, ND, S/NM, S* e S*/NM, que são aqueles derivados ou inspirados em produtos naturais, representam 51% dos novos medicamentos aprovados no período de 1981-2014 pelo *United States Food and Drug Administration* (U.S. FDA) (NEWMAN e CRAGG, 2016), o que corrobora a importância dos produtos naturais para a produção de novos fármacos.

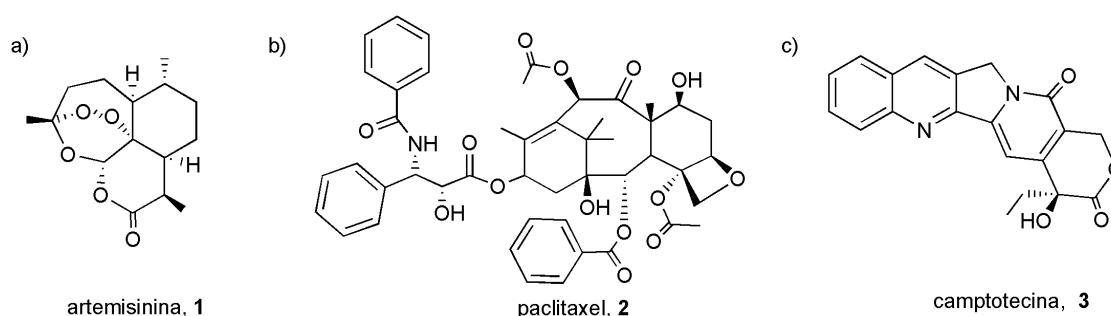


Figura 1. Exemplos de importantes produtos naturais usados no tratamento de doenças.

A investigação química e biológica de plantas medicinais constitui a primeira etapa no processo multidisciplinar de desenvolvimento de novos fármacos. O Brasil é reconhecido por sua rica diversidade vegetal, em especial dos domínios Cerrado e Mata Atlântica. Segundo o 5º Relatório Nacional do Brasil para a Convenção sobre Diversidade Biológica (2014), esses dois domínios estão entre os mais devastados do Brasil, contendo uma cobertura vegetal remanescente de 51,2 e 21,9%, respectivamente. Assim, torna-se cada vez mais importante o estudo de espécies desses domínios, dentre as quais se destacam as já utilizadas popularmente, a fim de ampliar o conhecimento científico de compostos bioativos produzidos por elas.

Tabela 1. Novas entidades químicas classificadas por origem, aprovadas pelo U.S. FDA no período de 1981-2014. Dados extraídos de Newman e Cragg, 2016.

Fonte	Sigla	Número	%
Biológica (proteína ou peptídeo)	B	189	14,2
Produto natural sem alteração	N	54	4,1
Fitoterápico	NB	4	0,3
Semissintético	ND	268	20,2
Sintético	S	359	27,0
Sintético, inspirado em produto natural	S/NM, S* e S*/NM	360	27,1
Vacinas	V	94	7,1
Total	-	1328	100

1.2. Família Rubiaceae

Com ampla distribuição no mundo, mas predominância nas áreas tropicais, especialmente florestas úmidas de baixa e média altitude, Rubiaceae é a quarta maior família das angiospermas, depois de Orchidaceae, Asteraceae e Leguminosae (Figura 2) (DAVIS *et al.*, 2009), com 611 gêneros e 13.143 espécies. No Brasil, há cerca de 120 gêneros e 1.400 espécies, representando uma das famílias mais importantes da flora brasileira do ponto de vista econômico, ornamental e medicinal (MARTINS e NUNEZ, 2015).

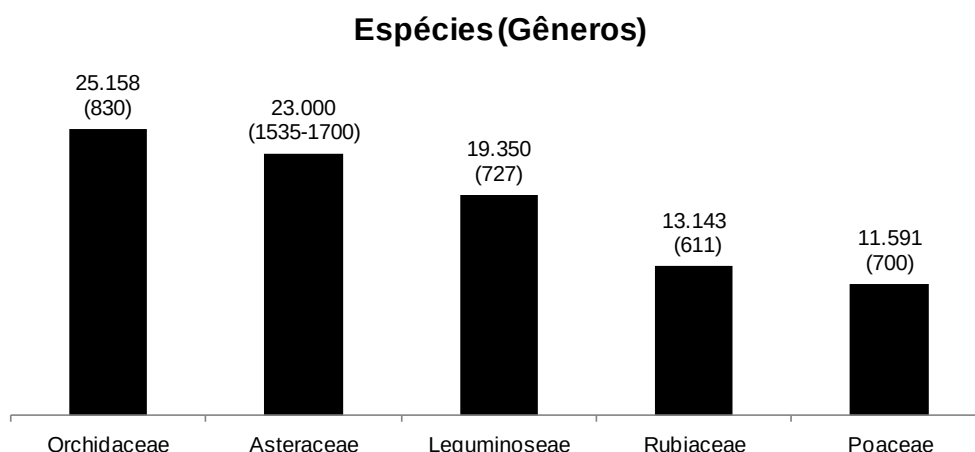


Figura 2. Número aproximado de espécies e gêneros das cinco maiores famílias de angiospermas (DAVIS *et al.*, 2009).

Como exemplo de espécies de Rubiaceae com grande importância econômica alimentícia, destacam-se o café (*Coffea* L.) e o jenipapo (*Genipa americana* L.); com importância ornamental, tem-se *Ixora* spp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* spp.; e na indústria farmacêutica, podem ser citadas a quina (*Cinchona pubescens* Vahl.), produtora de quinina, empregada no tratamento da malária (FLETCHER, 1926; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2012), e *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis* (nome comercial: unha-de-gato), fitoterápico utilizado no tratamento de processos degenerativos e inflamatórios (VALENTE, 2013).

Segundo Robbrecht (1988), Rubiaceae é dividida em quatro subfamílias baseado nas características morfológicas: Antirheoideae, Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae. No entanto, estudos mais recentes indicam que existem apenas as três últimas subfamílias listadas, uma vez que Antirheoideae mostrou ser polifilética (sem um ancestral comum) e não ter um marcador químico padronizado (BREMER, 2009).

Dentro da subfamília Rubioideae, destaca-se a Psychotrieae alliance (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2008), complexo grupo com mais de 3400 espécies (BERGER *et al.*, 2016) e que possui duas tribos principais: Palicoureeae and Psychotrieae, que incluem cerca de 91% das espécies pertencentes a esse grupo e 24% das espécies de Rubiaceae como um todo. Esse grupo é conhecido pela produção de metabólitos com potencial

importância farmacológica, tais como alcaloides indólicos, que apresentam atividade antifúngica (SILVA NETO *et al.*, 2012) e são inibidores de enzimas relacionadas a doenças neurodegenerativas (PASSOS *et al.*, 2013).

1.3. Tribo Palicoureeae

A tribo Palicoureeae é composta, entre outros gêneros, pelo gênero *Palicourea* Aubl., que compreende tradicionalmente cerca de 250 espécies de arbustos e árvores pequenas distribuídas desde o sul do México, passando pela América Central até América do Sul (TAYLOR, 1989). Estudos morfológicos (TAYLOR, 1996) e de sequenciamento genético (ANDERSSON e ROVA, 1999; NEPOKROEFF *et al.*, 1999; ROBBRECHT e MANEN, 2006; RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2008; 2014) mostraram que espécies neotropicais anteriormente classificadas como pertencentes ao gênero *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* pertencem a único grupo evolucionário, que inclui também espécies de *Palicourea*. Por isso, muitas espécies, inicialmente classificadas como *Psychotria*, estão sendo pouco a pouco transferidas para *Palicourea* (BORHIDI, 2011; TAYLOR, 2010; 2015a; 2015b; DELPRETE e KIRKBRIDE, 2016). Estima-se que *Palicourea* e *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* formem um clado (*i.e.*, um grupo de organismos originados de um único ancestral comum) de cerca de 600 espécies (TAYLOR, 2015a).

O Cerrado possui aproximadamente 14 espécies de *Palicourea* distribuídas em suas variadas fitofisionomias (MENDONÇA *et al.*, 2008) e, por essa razão, a região do Planalto Central é um dos centros de riqueza do gênero *Palicourea*.

De acordo com pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), *Palicourea* é considerado um gênero “hot”, devido ao grande potencial citotóxico de seus extratos e frações (CRAGG *et al.*, 2006).

Um crescimento no número de estudos sobre espécies de *Palicourea* pode ser observado no banco de dados *SciFinder* (<https://scifinder.cas.org/scifinder>), em especial nos últimos 20 anos, conforme levantamento bibliográfico realizado em outubro de 2016 com a

palavra-chave “palicourea”, presente no título, abstract e/ou palavras-chave da publicação (Figura 3).

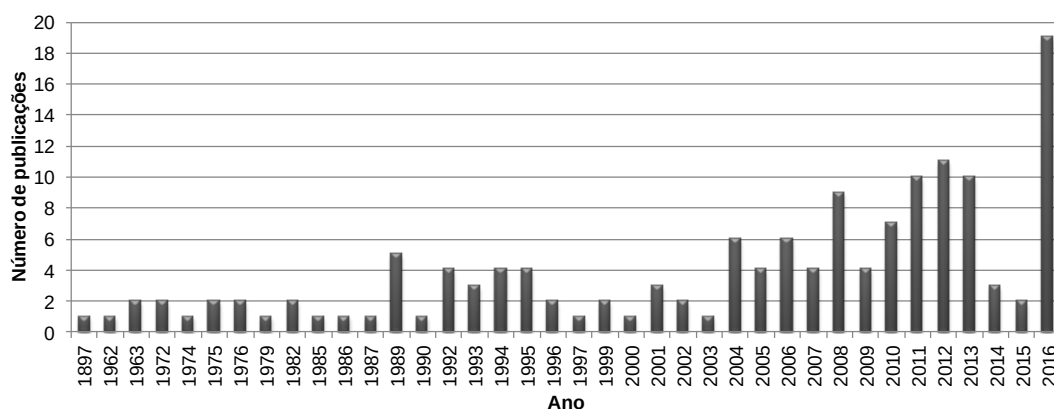


Figura 3. Números de artigos publicados até outubro de 2016 sobre *Palicourea*, conforme busca em banco de dados SciFinder (<https://scifinder.cas.org/scifinder>).

O aumento significativo de estudos de *Palicourea* nos últimos dez anos é motivado especialmente pelo uso etnofarmacológico de espécies desse gênero e pela presença de metabólitos secundários de diversas classes com potencial atividade biológica (Tabela 2), tais como alcaloides (Figura 4), iridoides, cumarinas, flavonoides e ácidos benzoicos (Figura 5).

Tabela 2. Compostos isolados e identificados em espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016.

Espécie	Composto	Referência
<i>P. acuminata</i>	Alcaloides: bahienosida B (4); desoxicordifolina (5); 5 α -carboxi-strictosidina (6); lagambosídeo (7)	BERGER <i>et al.</i> , 2012.
<i>P. adusta</i>	Alcaloides: lialosídeo (8); (<i>E</i>)- <i>O</i> -(6')-cinamoil-4"-hidroxi-3"-metoxi-lialosídeo (9); (<i>E</i>)- <i>O</i> -(6')-cinamoil-4"-hidroxi-3",5"-dimetoxi-lialosídeo (10)	VALVERDE <i>et al.</i> , 1999.
	Alcaloide: calicantina (11)	WOO-MING e STUART <i>et al.</i> , 1975.
<i>P. alpina</i>	Noirisoprenoide: vomifoliol (29)	STUART e WOO-MING <i>et al.</i> , 1975.
	Alcaloide: palinina (estereoquímica indefinida)(12)	STUART e WOO-MING <i>et al.</i> , 1974.
<i>P. condensata</i>	Ciclotídeo: palicoureína (30)	BOKESCH <i>et al.</i> , 2001.
	Alcaloides: calicantina (11); ácido strictosidínico (13); ácido <i>epi</i> -strictosidínico (14); cetona strictosidínica (15)	do NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006.
	Alcaloide: ácido strictosidínico trissacarídeo (16)	do NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008.
<i>P. coriacea</i>	Ésters aromáticos: Ésteres (<i>E</i>)-metil-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato; (<i>E</i>)-metil-4-hidroxi-3-metoxicinamato; (<i>E</i>)-metil-4-hidroxicinamato; (<i>Z</i>)-metil-4-hidroxicinamato; Alcaloide: calicantina (11); Triterpeno: ácido ursólico (31); Antraquinona: 2-hidroxi-3-metilantraquinona (32); Ácidos aromáticos: ácido 4-metoxibenzoico; ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, éster metil 4-hidroxibenzoato; Hidantoína: alantoína (33)	da SILVA <i>et al.</i> , 2008.

Tabela 2. Compostos isolados e identificados em espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016 (cont.).

Espécie	Composto	Referência
<i>P. crocea</i>	Alcaloides: croceaínas A (17) e B (18)	DÜSMAN <i>et al.</i> , 2004.
	Alcaloides: braquicerina (19); palicroceaína (20); ácido estrictosidínico (13)	BERGER <i>et al.</i> , 2015.
	Alcaloides: croceaína A (17); psicolatina (21); <i>N</i> -óxido, 3,4-dihidro-1-(1-β-D-glicopiranosiloxi-1,4a,5,7a-tetrahidro-4-metoxicarbonilciclopenta[c]piran-7-il)-β-carbolina- <i>N</i> ² -óxido (22)	NARINE <i>et al.</i> , 2009.
<i>P. demissa</i>	Ésteres metílicos de ácidos graxos; Esteroides: sitosterol; estigmasterol; Triterpeno: 3-friedelanona (34); Cumarinas: escopoletina (35); isoescopoletina (36); umbeliferona (37); Ácidos aromáticos: ácido protocatecuico, ácido vanílico e isovanílico.	EL-SEEDI, 1999.
<i>P. domingensis</i>	Alcaloide: quimonantina (23)	RIPPERGER, 1982.
<i>P. fendleri</i>	Alcaloides: calicantina (11) e quimonantina (23)	NAKANO e MARTÍN, 1976.
<i>P. longiflora</i>	Ácido monofluoracético; salicilato de metila; oxalato de cálcio	COELHO <i>et al.</i> , 2007.
<i>P. marcgravii</i>	Fluoroacetato, <i>N</i> -metiltiramina (24); Alcaloide: 2-metiltetrahidro-β-carbolina (25)	KEMMERLING, 1996.
	Alcaloide: palicosídeo (26)	MORITA <i>et al.</i> , 1989.
	Alcaloide: cafeína	GÓRNIK <i>et al.</i> , 1986.
<i>P. ovalis</i>	Alcaloide: calicantina (11)	de GARCIA <i>et al.</i> , 1997.
<i>P. padifolia</i>	Alcaloides: estrictosidina (27); lialosídeo (8); (<i>E</i>)- <i>O</i> -(6')-(4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi)-cinamoil-lialosídeo (10)	BERGER <i>et al.</i> , 2015.

Tabela 2. Compostos isolados e identificados em espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016 (cont.).

Espécie	Composto	Referência
<i>P. rigida</i>	Ciclotídeo: parigidinbr1	PINTO <i>et al.</i> , 2012.
	Alcaloide: <i>E</i> -valesiachotamina (28)	SOARES <i>et al.</i> , 2012.
	Flavonoides: quercetina 3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo (38); quercetina 3- <i>O</i> -soforosídeo (39); isoramnetina 3- glicosídeo (40)	ROSA <i>et al.</i> , 2010.
	Triterpenos: 3-friedelanona (34); 3 β -hidroxifriedelana (41); 30-hidroxifriedelan-3-ona (42)	BOLZANI <i>et al.</i> , 1992.
	Iridoide: 1- <i>epi</i> -loganina (43)	MOREL <i>et al.</i> , 2011; LOPES <i>et al.</i> , 2004.

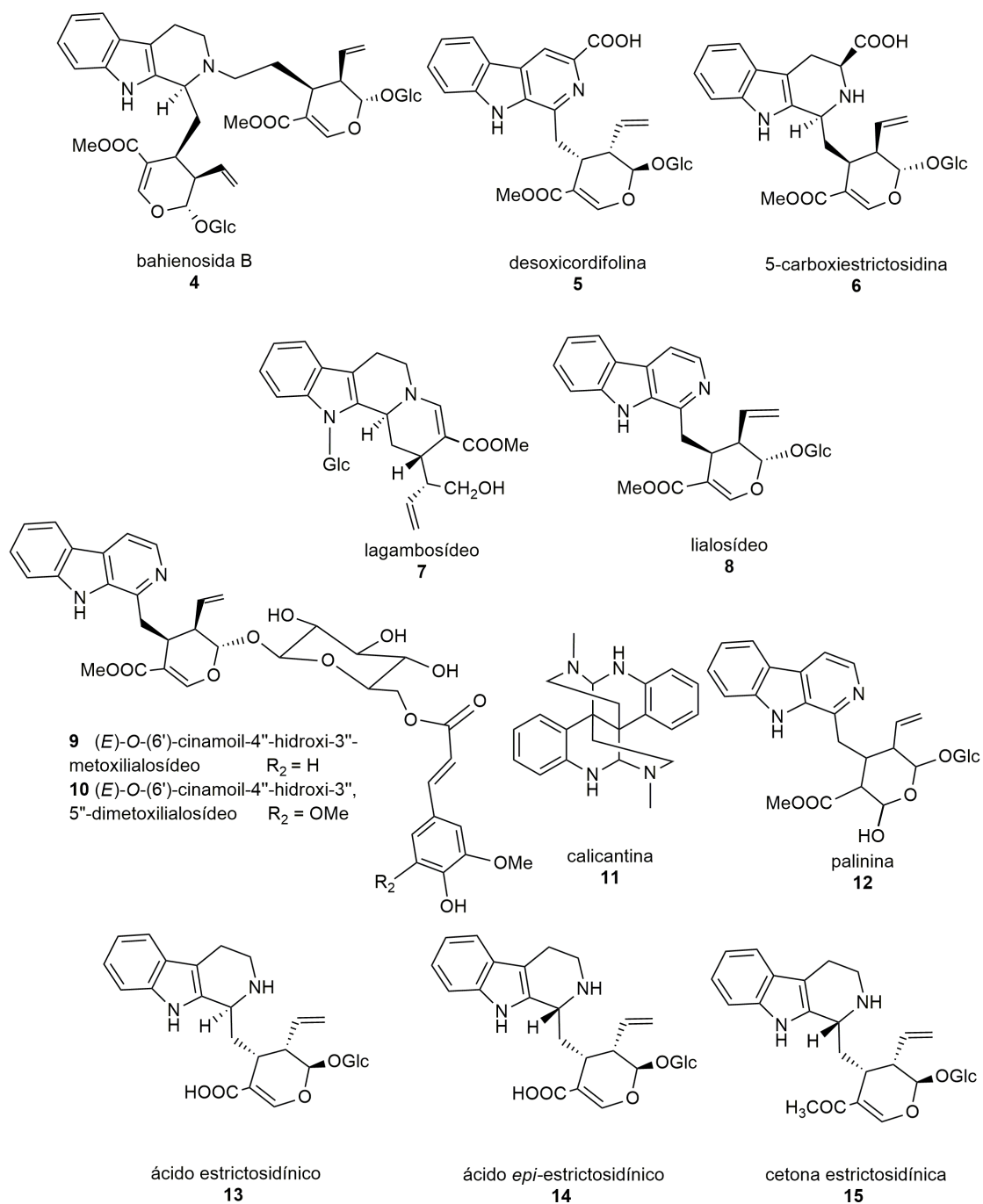


Figura 4. Estruturas químicas de alcaloides isolados de espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016.

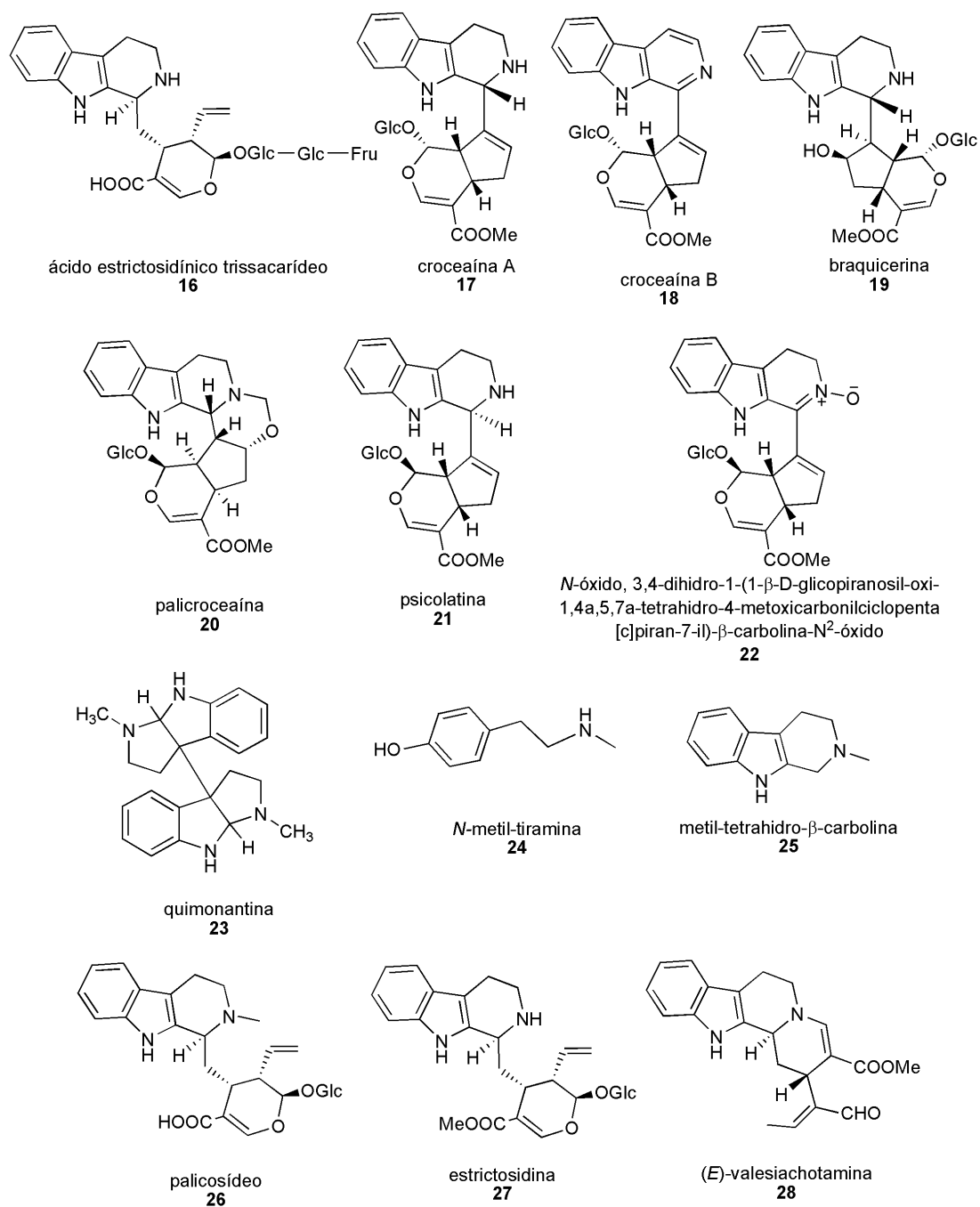


Figura 4. Estruturas químicas de alcaloides isolados de espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016 (cont.).

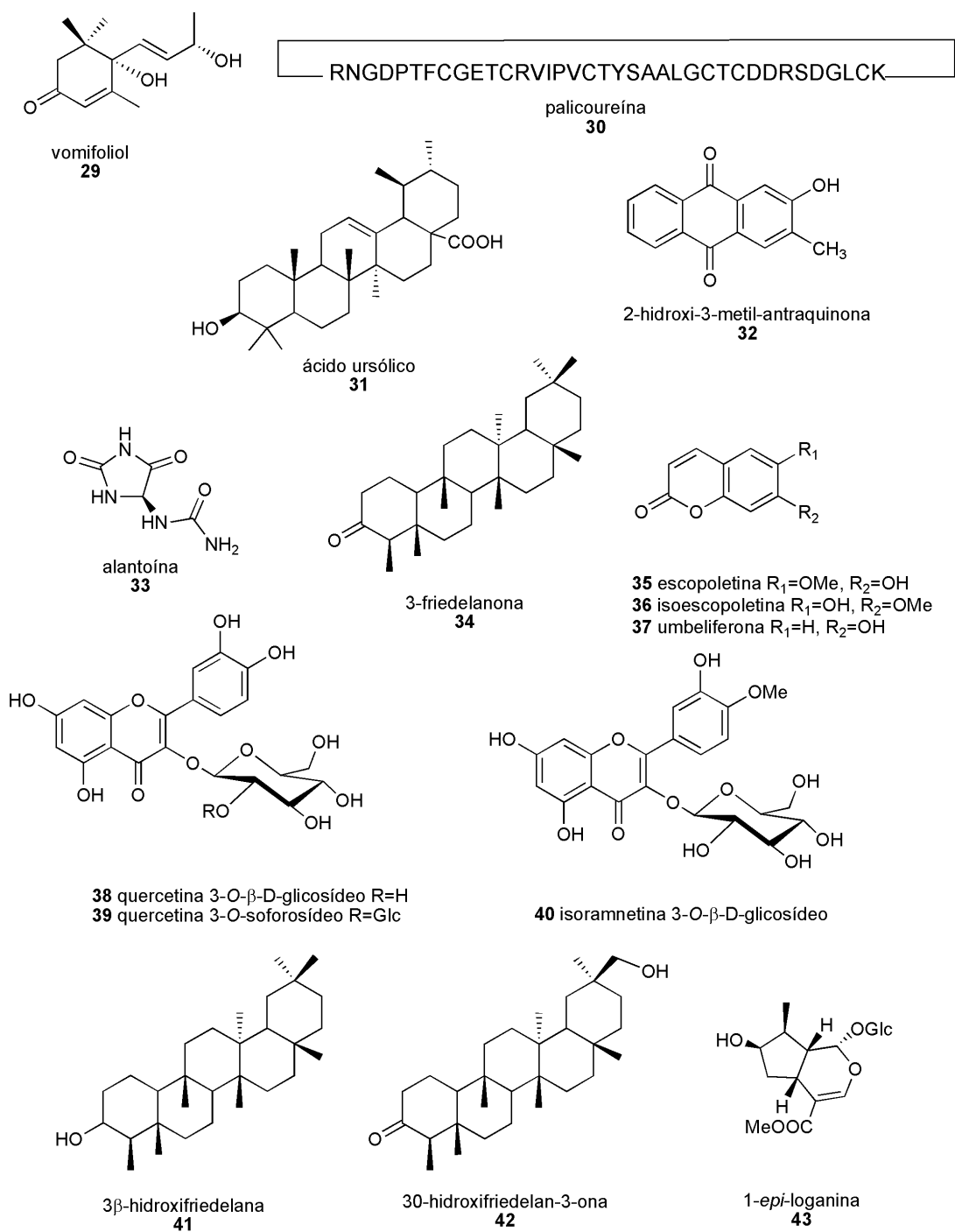


Figura 5. Estruturas químicas de compostos de outras classes de metabólitos secundários isolados de espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016.

Majoritariamente, *Palicourea* é uma fonte de alcaloides (37%) do tipo indólicos monoterpênicos e pirroloindólicos, seguida de ésteres aromáticos (11%) e terpenos (9%), conforme Figura 6. Dentre os alcaloides, destacam-se os pertencentes à classe dos alcaloides indólicos monoterpênicos, que representam 33% do total de compostos isolados. A presença de alcaloides em *Palicourea* foi sugerida desde o primeiro estudo desse gênero, realizado em 1897 (SANTESSON, 1897), no qual foi isolada uma substância alcaloídica de *P. rigida*, caracterizada por sua basicidade, solubilidade em etanol e precipitação com sais de sulfato e nitrato.

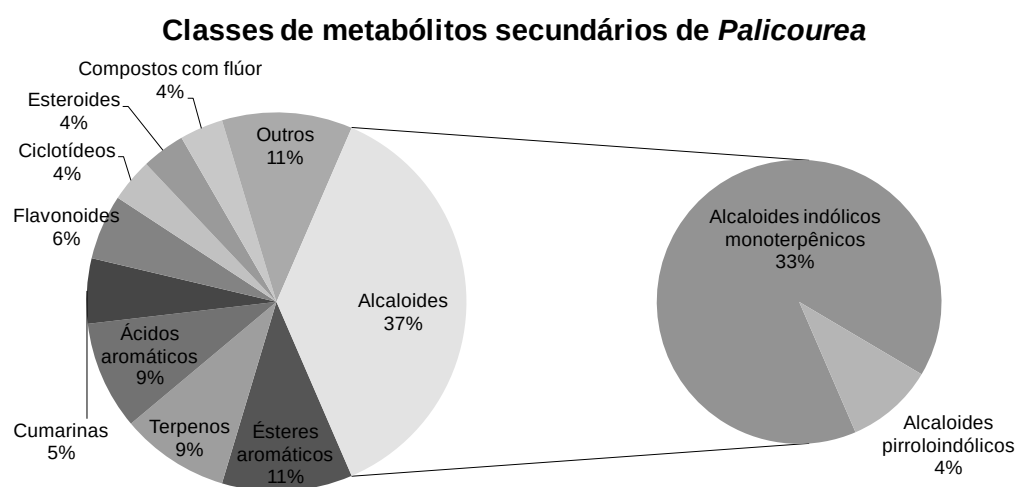


Figura 6. Classes de metabólitos secundários isolados de *Palicourea*, no período de 1975-2016.

Os alcaloides indólicos monoterpênicos possuem como principal característica a origem biossintética comum. A maioria dos compostos conhecidos provém de um precursor único: a strictosidina, produzida pela condensação da triptamina com a secologanina (Figura 7) (DEWICK, 2009), esta última elaborada via geraniol a partir do ácido mevalônico (DEWICK, 2009) (Figura 8).

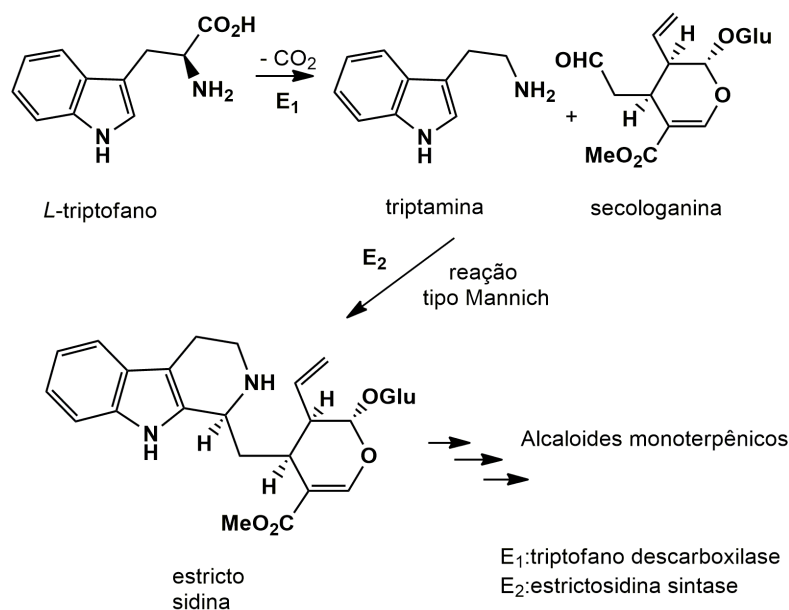


Figura 7. Rota biossintética geral dos alcaloides indólicos monoterpênicos.

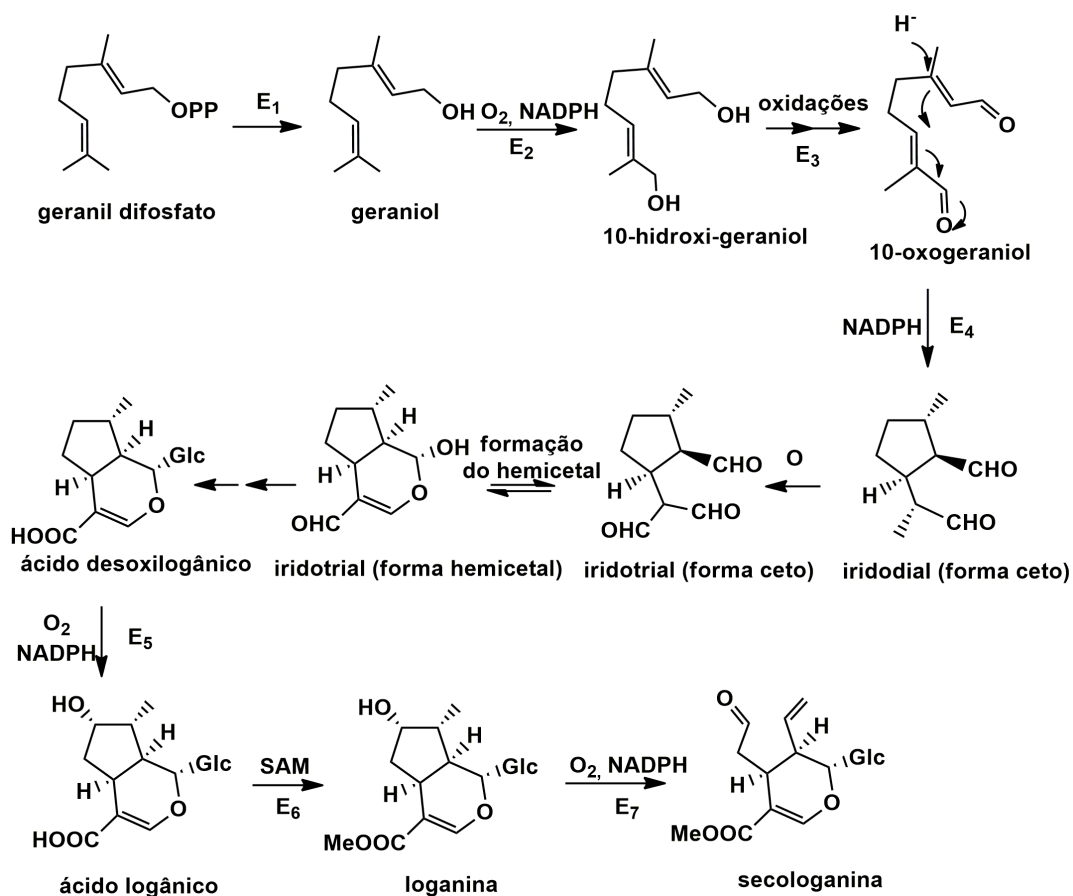


Figura 8. Biossíntese da secologanina a partir do geranil-difosfato. Enzimas E₁: geraniol sintase; E₂: geraniol 10-hidroxilase; E₃: 10-hidroxigeraniol óxido-redutase; E₄: monoterpeno ciclase; E₅: 7-desoxiloganina 7-hidroxilase; E₆: ácido logânico metiltransferase; E₇: secologanina sintase.

Com relação às atividades biológicas de espécies de *Palicourea*, Freitas e colaboradores (2011) confirmaram o uso etnofarmacológico de *P. coriacea* como diurético, cuja ação é atribuída ao triterpenoide ácido ursólico (**31**, Fig. 5) (SOMOVA *et al.*, 2003a, b). Além disso, o extrato bruto de *P. coriacea* demonstrou não apresentar atividade citotóxica e genotóxica nas concentrações de 5, 10 ou 15 mg de extrato *per* mL (PASSOS *et al.*, 2010). A fração hexânica das folhas de *P. rigida* demonstrou atividade antiedematogênica, atribuída à presença de fitóis, conhecidos por sua atividade anti-inflamatória (ALVES *et al.*, 2016). As folhas de *P. marcgravii* demonstraram atividades inseticida contra indivíduos adultos de cigarrinha das frutíferas *Aetalion* sp. e pulgões *Toxoptera citricida* (GONZAGA *et al.*, 2008) e acaricida contra o carrapato-de-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A atividade acaricida foi atribuída à presença do ácido monofluoracético (SILVA *et al.*, 2011). Em trabalho recente, Carvalho e colaboradores (2016) avaliaram a toxicidade das folhas de algumas espécies de *Palicourea* administradas a coelhos. *P. longiflora* e *P. barraensis*, que contém derivados de ácido monofluoracético, causaram morte súbita nos coelhos, ao passo que *P. croceoides* and *P. nitidella*, que não possuem esses compostos, não levaram a morte dos coelhos.

Dentre os compostos que tiveram sua atividade biológica avaliada isoladamente, pode-se destacar o alcaloide valesiachotamina (**27**, Fig. 4), isolado de *P. rigida*, que apresentou ação antiproliferativa contra células de melanoma com valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da atividade proliferativa) próximos de 15 µM (SOARES *et al.*, 2012). Outro exemplo é o ciclotídeo palicoureína (**29**, Fig. 4), isolado de *P. condensata*, que inibiu os efeitos citopáticos do vírus HIV com um EC₅₀ (concentração necessária que induz 50% da atividade biológica máxima) = 0,10 µM e IC₅₀ = 1,5 µM (BOKESCH *et al.*, 2001).

Conforme apresentado na Tabela 2, apenas 14 das 250 espécies desse gênero têm estudo químico reportado na literatura (5,6% do total de espécies). Com o intuito de ampliar o conhecimento da composição química e a presença de metabólitos potencialmente ativos em espécies de

Palicourea, este trabalho visa o primeiro estudo químico e biológico de *P. officinalis*.

1.3.1. *Palicourea officinalis*

P. officinalis, conhecida como “roxinha-escurinha” e “douradinha-do-campo”, é um pequeno arbusto endêmico do centro do Brasil, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Tocantins e no Distrito Federal. Sua classificação botânica está apresentada na Figura 9. Na medicina popular, o chá da raiz é usado para tratamento de problemas cardíacos (DELPRETE, 2004). O ensaio de toxicidade dos extratos etanólicos das folhas de *P. officinalis* sobre o microcrustáceo *Artemia salina* mostraram que essa espécie vegetal apresenta baixa toxicidade ($CL_{50} = 429,13 \pm 2,26 \mu\text{g mL}^{-1}$) (da SILVA *et al.*, 2012). Não há relatos de estudos fitoquímicos dos constituintes micromoleculares dessa espécie na literatura.



Figura 9. *Palicourea officinalis* Mart.: fotografia e classificação botânica da espécie (DELPRETE, 2010).

1.4. Tribo Psychotrieae

A tribo Psychotrieae inclui, entre espécies de outros gêneros, as espécies pantropicais de *Psychotria* subg. *Psychotria*. *Psychotria* L. é

considerado um gênero complexo e as espécies neotropicais geralmente classificadas como *Psychotria* formam um grupo heterogêneo de acordo com estudos morfológicos e moleculares. Por isso, algumas espécies de *Psychotria* estão sendo reclassificadas para outros gêneros, dentre eles o *Palicourea* (DELPRETE e KIRKBRIDE, 2016).

Estudos fitoquímicos de espécies de *Psychotria* reportados da literatura tem mostrado que as classes de alcaloides são características de certos subgêneros, tais como os alcaloides poli-indólicos, que são isolados de espécies do subgênero *Psychotria*, e os alcaloides indólicos monoterpênicos, isolados principalmente do subgênero *Heteropsychotria*.

Assim como *Palicourea*, *Psychotria* é também considerado gênero “hot”, de acordo com pesquisadores do NCI (CRAGG *et al.*, 2006). Estudos realizados com espécies de *Psychotria* resultaram no isolamento de vários alcaloides indólicos monoterpênicos, dentre os quais se destacam **44** e **45** (Figura 10), isolados de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyererm (FARIA *et al.*, 2010; KATO *et al.*, 2012), por apresentarem efeito inibitório das enzimas acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e monoamina oxidases A e B, relacionadas a doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson (PASSOS *et al.*, 2013; KLEIN JÚNIOR *et al.*, 2014). Os alcaloides 14-oxoprunicoleína (**45**) e estrictosamida (**46**) (Figura 10) inibiram as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, com valores de IC₅₀ de 16,0 e 40,7 µg per mL, respectivamente (KATO *et al.*, 2012).

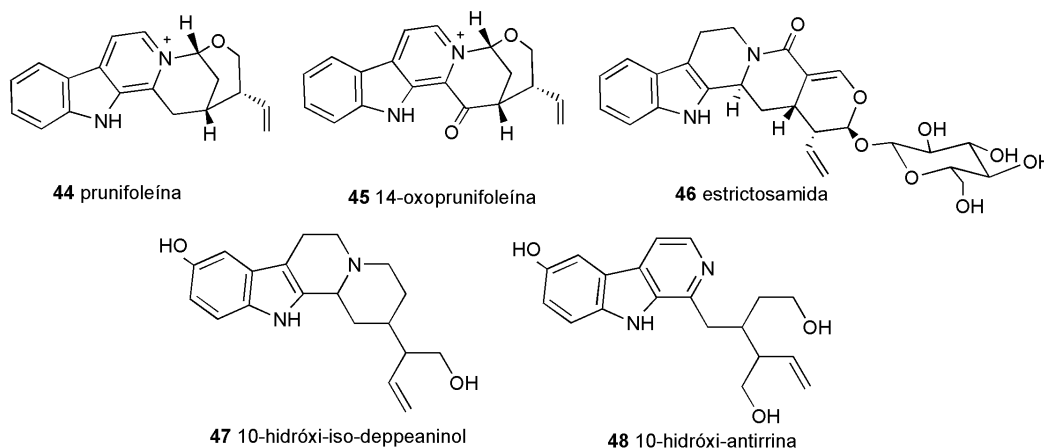


Figura 10. Alcaloides indólicos isolados de *Psychotria prunifolia*.

Um aumento no número de estudos fitoquímicos de espécies de *Palicourea* e *Psychotria* tem contribuído com a pesquisa nas áreas da etnobotânica, farmacológica e quimiotaxonômica (YANG *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016). Entretanto, a distribuição espacial de alcaloides nesse gênero é um tema ainda não reportado na literatura.

1.5. Espectrometria de massas no estudo de produtos naturais

A espectrometria de massas é uma técnica rápida e seletiva de análise para detecção, diferenciação e elucidação estrutural de produtos naturais em diferentes partes da planta, tais como folhas, flores (THUNIG *et al.*, 2011) e sementes (IFA *et al.*, 2011), bem como de fungos (JAEGER *et al.*, 2013), atendendo requisitos de sensibilidade e especificidade. A análise direta por espectrometria de massas tem se tornado uma ferramenta simples e rápida na identificação de novos metabólitos ou na detecção de metabólitos já conhecidos, mas que possuam grande interesse biológico ou mesmo para semissíntese.

Com a introdução de uma nova família de técnicas de ionização/dessorção, conhecidas como técnicas de ionização ambiente (ALBERICI *et al.*, 2010), sua aplicação tornou-se ainda mais abrangente. Comparadas com os métodos analíticos tradicionais que envolvem etapas laboriosas de preparo de amostra por meio de extração e separação cromatográfica, estas técnicas surgiram como uma alternativa simplificada e

rápida para detecção, identificação e quantificação de analitos diretamente dos seus ambientes naturais ou quando colocadas em superfícies auxiliares, com uma mínima ou nenhuma preparação de amostra (HARRIS *et al.*, 2011; TAKÁTS *et al.*, 2006).

1.5.1. A ionização por electrospray (ESI)

A ionização por electrospray (ESI) foi a primeira fonte de ionização a produzir os íons fora do espectrômetro de massas, diretamente de moléculas pré-ionizadas em solução. O desenvolvimento da fonte de ionização por eletrospray iniciou-se na década de 1960, com o trabalho de Dole e colaboradores (1968), que introduziram um polímero de estireno na forma de gás dentro do espectrômetro de massas.

Esse método de ionização utiliza um eletrospray produzido pela aplicação de forte campo elétrico, em atmosfera ambiente, em um capilar pelo qual passa o solvente em baixo fluxo ($1-10 \mu\text{L min}^{-1}$) e um gás nebulizador. Esse campo elétrico é obtido pela aplicação de uma diferença de potencial de 3-6 kV entre o capilar e a entrada do espectrômetro de massas, separados por uma distância de 0,3-2 cm, produzindo campos elétricos da ordem de 10^6 V m^{-1} . Esse campo induz o acúmulo de carga na superfície do líquido localizado na ponta do capilar, que leva à formação de gotículas altamente carregadas (YAMASHITA *et al.*, 1984).

Dois mecanismos diferentes são propostos para geração de íons em ESI, conforme ilustrado na Figura 11 (AWAD *et al.*, 2015; KEBARLE e VERKERK, 2009). Pelo mecanismo de evaporação de íons, os íons em fase gasosa são liberados/dessorvidos diretamente da superfície das pequenas gotas quando a repulsão entre as cargas na superfície da gota supera a força coesiva da tensão superficial. Já no modelo de carga residual, as gotículas de eletrospray passam por ciclos de evaporação e fissão, levando eventualmente a gotículas que contêm em média um íon. Os íons em fase gasosa formam-se após a evaporação das últimas moléculas de solvente, deixando o analito com as cargas que a gota carregava. Um trabalho de Smith e colaboradores (WINGER *et al.*, 1993) mostrou que esse mecanismo é o mais provável na ionização de grandes moléculas, como proteínas.

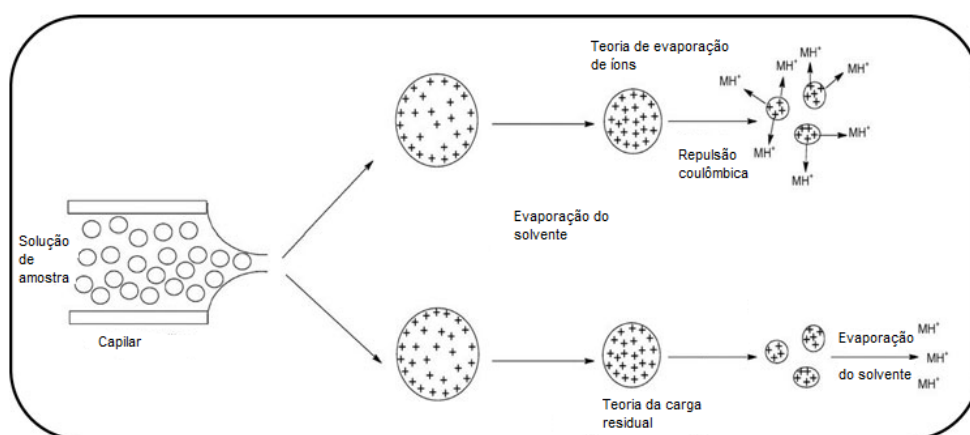


Figura 11. Mecanismos de ionização propostos para a fonte de ionização de eletrospray (ESI). Figura adaptada de Awad e colaboradores (2015).

A técnica de ESI-MS, atualmente, possui uma aplicação muito abrangente em estudos qualitativos e quantitativos de moléculas que desde analitos simples de baixa massa molecular até compostos complexos, como proteínas.

1.5.2. A ionização de dessorção por eletrospray (DESI)

A ionização de dessorção por eletrospray (*DESI-Desorption Electrospray Ionization*) foi a técnica precursora das técnicas ambiente na espectrometria de massas, introduzida por Cooks e colaboradores em 2004 (TAKÁTS *et al.*, 2004). A vantagem dessa técnica é a análise em atmosfera aberta do laboratório ou diretamente dos seus ambientes naturais, o que simplifica as aplicações analíticas e bioanalíticas de espectrometria de massas, eliminando o tempo de preparo de amostras e a formação de metabólitos e artefatos.

Esse método de ionização utiliza um eletrospray gerado por um baixo fluxo de solvente ($0,5-10 \mu\text{L min}^{-1}$) e aplicação de um gás nebulizador e uma alta voltagem (4-5 kV), resultando em um feixe de microgotas carregadas. Quando o spray é dirigido para a amostra, a superfície é molhada e ocorre um processo simultâneo de extração, dessorção e ionização dos analitos (Figura 12). Uma diferença de potencial no capilar direciona os íons formados para dentro do espectrômetro de massas.

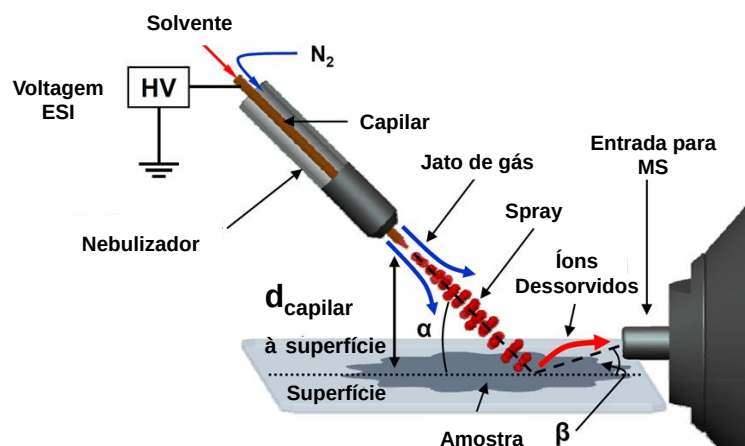


Figura 12. Esquema geral de DESI-MS. Adaptado de Takáts e colaboradores (2004).

As primeiras proposições para o mecanismo de ionização de DESI-MS foram baseadas em um processo conhecido por *single stage droplet pick-up*, segundo o qual o impacto de íons de solvente com a superfície levaria a dessorção do analito, com a subsequente evaporação das gotas dessorvidas através de processos de ionização semelhantes aos que ocorrem com ESI-MS. Uma investigação detalhada do mecanismo do espalhamento de gotículas em uma superfície (COSTA e COOKS, 2008) mostrou evidências de um processo baseado em uma transferência de momento em etapas consecutivas, indicando que a primeira proposição de mecanismo em etapa única não estava correta. Nesse estudo, Costa e Cooks realizaram uma série de experimentos e simulações para elucidar como as gotas são formadas pela fonte de DESI-MS e transportadas para o espectrômetro de massas. Esse estudo mostrou que a aplicação do spray sobre a superfície da amostra leva a formação de um fino filme de solvente, que realiza a extração dos analitos. O tamanho e a velocidade das gotas do spray indicam que o mecanismo provavelmente não depende do impacto do spray na superfície, mas sim da dessorção do analito e sua transferência para a camada de solvente. O impacto subsequente de gotas juntamente com o gás nebulizador dão energia necessária para a formação de novas gotas contendo a amostra, que são então transportadas para o espectrômetro de massas.

Em geral, a performance de DESI-MS é altamente influenciada pelos parâmetros experimentais listados a seguir (ALBERICI *et al.*, 2010):

a) parâmetros geométricos, tais como o ângulo de incidência (α), o ângulo (β) e a distância formada entre o capilar de entrada do espectrômetro de massas e a superfície da amostra, além da distância (d) entre a fonte de ionização e a superfície (Figura 12);

b) características do spray, tais como taxa de fluxo de gás, temperatura e voltagem de ESI;

c) tipo de solvente e aditivo adicionado para auxiliar a ionização por ESI;

d) tipo de superfície (vidro, plástico ou papel, por exemplo).

Desde sua introdução em 2004, DESI-MS tem sido aplicada com sucesso em diferentes áreas científicas, tais como química forense (D'AGOSTINO *et al.*, 2007), análise de explosivos (JUSTES *et al.*, 2007), drogas e produtos farmacêuticos (WILLIAMS *et al.*, 2005), lipídios, proteínas e peptídeos (LIU *et al.*, 2012), patologias (WISEMAN *et al.*, 2005; DILL *et al.*, 2009), meio-ambiente, combustíveis, óleos vegetais e minerais, polímeros, perfumes, imageamento de tecidos, monitoramento de reações e metabolômica (MIURA *et al.*, 2012). Na área de produtos naturais, destaca-se o trabalho de Cooks e colaboradores, no qual foi realizada a detecção *in situ* de alcaloides nas espécies vegetais *Conium maculatum* (cicuta), *Datura stramonium* (estramônio) e *Atropa beladonna* (beladona) com o objetivo de desreplicação de seus alcaloides (TALATY *et al.*, 2005).

1.5.2. Imagem química por DESI-MS (DESI-MSI)

A produção de imagem química por ionização de dessorção por eletrospray (DESI-MSI) é uma técnica ambiente em espectrometria de massas que, além de permitir a análise direta em tecidos biológicos e em outras superfícies, possui vantagens no que diz respeito à mínima ou nenhuma preparação de amostras, análise simplificada e ionização branda de moléculas presentes na superfície (WISEMAN *et al.*, 2006; IFA *et al.*, 2007). Por meio do uso da fonte de DESI-MS, é possível obter espectros de massas diretamente da amostra e monitorá-los em diferentes localizações

na superfície da amostra. A fonte DESI na área de imageamento tem sido cada vez mais utilizada na análise da distribuição de lipídios, drogas, agentes de defesa biológica, pigmentos e proteínas em tecido animal e vegetal nas mais variadas matrizes, sem a necessidade de métodos histoquímicos.

Nos experimentos de imagem por DESI-MS, a amostra é colocada em uma plataforma móvel nos eixos x e y , e cada ponto é analisado pela fonte de ionização com uma resolução lateral (que em geral variam de 100 a 300 μm) e dimensões definidas pelo analista. Então, a partir do armazenamento do espectro de massas de cada posição, uma imagem bidimensional do perfil metabólico da amostra pode ser obtida (ABDELNUR, 2010; WOLFENDER *et al.*, 2015). Como exemplo, a Figura 13 apresenta a análise da folha de *Hypericum perforatum* (LI *et al.*, 2013), em que um espectro de massas é gerado para cada ponto da folha. As imagens dos íons selecionados revelam a localização de hipericina, hiperforina e rutina nas folhas.

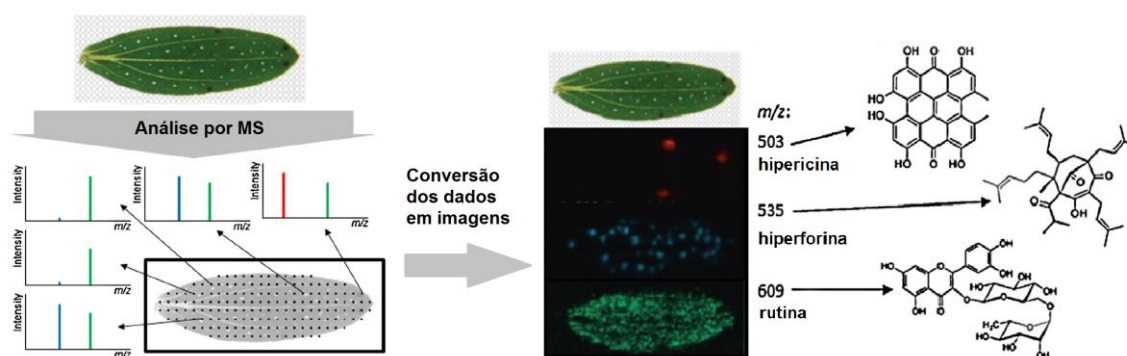


Figura 13. Estratégia de imageamento por espectrometria de massas aplicada a folha de *Hypericum perforatum*. Adaptado de Wolfender e colaboradores (2015).

Ou seja, o DESI-MSI é a somatória de várias aquisições pontuais geradas pela fonte de ionização e processadas por um *software* dedicado (STOECKLI *et al.*, 1999; BURREL *et al.*, 2007), que relaciona a intensidade de cada íon m/z com a coordenada de posição, fornecendo uma imagem química da superfície total analisada.

O preparo da amostra deve ser cuidadosamente otimizado de acordo com o tipo de amostra e os analitos de interesse para manter a localização

original e evitar degradação dos analitos. Nos experimentos de imagem química de tecidos vegetais, o preparo da amostra é mais desafiador do que o de tecidos animais. Na área vegetal, há dois desafios principais: 1) a cutícula em plantas superiores que dificulta a penetração do spray e a consequente ionização dos metabólitos secundários por fontes de ionização ambiente como DESI-MS; 2) a grande quantidade de água presente nos tecidos vegetais que, sob o processo de desidratação, pode levar ao encolhimento do tecido ou deixá-lo quebradiço, e assim a superfície perde a uniformidade necessária para o imageamento. Nesse sentido, o preparo da amostra é uma etapa crucial do processo para o sucesso da análise (DONG *et al.*, 2016).

No estudo de tecidos vegetais, o preparo da amostra para o imageamento por DESI-MS têm sido realizado por dois métodos: o direto e o indireto. O método direto de análise no tecido vegetal em geral é precedido pela etapa de tratamento da folha com solvente de média polaridade (CHCl_3) (BUSCHHAUS e JETTER, 2012; LI *et al.*, 2013) para remoção da cutícula epidérmica e subsequente análise da superfície foliar.

Já o método indireto, chamado de *imprint*, é baseado na pressão do material vegetal em uma superfície porosa de politetrafluoretileno (PTFE), e tem sido mais utilizado que o método direto, por ser mais robusto e reproduzível (THUNIG *et al.*, 2011), permitindo a detecção de sinais intensos e estáveis, uma vez que a presença da cutícula foliar é eliminada. A superfície porosa do Teflon possui características ideais para análise de DESI-MS (IFA *et al.*, 2008), combinando a superfície não aderente, que permite que os compostos sejam facilmente desorvidos, com uma porosidade que garante que a amostra não seja imediatamente dispersada pelo spray de DESI. Durante o processo de *imprint*, os analitos presentes no material vegetal, que deve ser fresco, são transferidos para a superfície do Teflon mantendo sua distribuição em duas dimensões.

A produção de imagem química por espectrometria de massas é uma ferramenta potencial na desreplicação de produtos naturais na busca por compostos bioativos. Esse método pode ser utilizado como um experimento de *screening* inicial para estudo do perfil químico e distribuição de

metabólitos secundários em tecidos vegetais, fornecendo um bom ponto de partida para subseqüentes análises quantitativas com extração e LC-MS (THUNIG *et al.*, 2011).

Para matrizes complexas, o uso do imageamento no estudo de desreplicação de produtos naturais, sem o auxílio de uma técnica cromatográfica como LC-MS, apresenta uma limitada detecção e complexa identificação de metabólitos, devido a efeitos de supressão iônica. Além disso, em relação a outras técnicas de imageamento, tais como MALDI-MS, a fonte de DESI-MS possui como desvantagem a limitada resolução espacial, em torno de 200 μm , que não atinge o nível celular (cerca de 10 μm) (BOGGIO *et al.*, 2011).

Mesmo com essas limitações, a determinação da distribuição espacial de constituintes químicos em tecidos vegetais é uma das grandes novidades da espectrometria de massas e tem se desenvolvido rapidamente na última década. Li e colaboradores (2011) descreveram o perfil químico para as folhas de *Hordeum vulgare* (cevada) demonstrando o desenvolvimento da metodologia de imageamento de glicosídeos hidroxinitrilados por DESI por via direta e indireta. O imageamento por via indireta (*imprint* em PTFE) permitiu o conhecimento dos diferentes grupos de glicosídeos hidroxinitrilados em folhas de diferentes cultivares de *Hordeum vulgare*. Outro exemplo de aplicação de DESI-MSI é o estudo do padrão de distribuição espacial e temporal do alcaloide rohitukina em sementes de *Dysoxylum binectariferum* por Kumara e colaboradores (KUMARA *et al.*, 2015). Recentemente, DESI-IMS foi utilizado no estudo de visualização dos hormônios vegetais ácido abscísico e um derivado de ácido jasmônico (ácido oxo-fitodienoico) e suas funções biológicas em tecidos jovens de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) (ENOMOTO *et al.*, 2017).

Outras aplicações da imagem química de tecidos vegetais são o estudo do mecanismo biossintético (IFA *et al.*, 2011) e das funções dos metabólitos secundários em uma planta; a relação da produção de metabólitos na interação ecológica com o ambiente, incluindo a resposta da planta frente aos raios UV (BECKER *et al.*, 2014) e de agentes patógenos para proteção da planta (TATA *et al.*, 2015). Essa técnica apresenta como

vantagem ainda a possibilidade de detecção de uma molécula confinada em uma pequena área em relação à análise de um extrato por LC-MS ou GC-MS, que não seria detectada devido à sua diluição. Isso reforça o potencial do uso dessa técnica na descoberta de novos metabólitos ou biomarcadores.

Neste trabalho, a técnica de DESI-MSI foi utilizada pela primeira vez no estudo da localização espacial de alcaloides em espécies de *Psychotria* e *Palicourea* com o intuito de desenvolvimento/aplicação de metodologia de Janfelt (2015) em espécies do Cerrado já estudadas fitoquimicamente por nosso grupo de pesquisa. Além disso, neste trabalho foi realizada a caracterização do extrato metanólico e frações de *Palicourea officinallis* por espectrometria de massas de alta resolução via infusão direta, seguido de isolamento por cromatografia e identificação inequívoca dos compostos por RMN, HR-MS e HR-MS/MS.

Objetivos



2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico das partes aéreas de *P. officinalis* (Rubiaceae) e desenvolver metodologia de imageamento por DESI-MS para a identificação e mapeamento de metabólitos secundários diretamente em matrizes vegetais, com ênfase nos alcaloides de espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil químico dos extratos e frações das partes aéreas de *P. officinalis* por espectrometria de massas de alta resolução com infusão direta;
- Realizar o isolamento e a identificação dos metabólitos secundários das folhas e dos galhos de *P. officinalis* por cromatografia líquida, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.
- Aplicar e otimizar metodologia de imageamento por DESI-MS utilizando espécies já estudadas fitoquimicamente, tais como *P. rigida*, *P. coriacea* e *Psychotria prunifolia*.
- Aplicar e otimizar metodologia de imageamento por DESI-MS em *P. officinalis*.

Materiais e métodos



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis*

3.1.1. Instrumentação e procedimentos gerais

O material vegetal coletado foi pulverizado em moinho de facas Marconi. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório modelo MA 120 da marca MARCONI®. O extrato aquoso das folhas e galhos foi liofilizado em liofilizador Edwards (Edwards vaccum, Brasil).

Os solventes utilizados neste estudo foram das marcas Synth, Fluka, Aldrich, Vetec, Acros Organic e Merck, destilados quando necessário. A técnica de cromatografia em coluna (CC) foi realizada em coluna de vidro com uma das seguintes fases estacionárias: sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm, 70-230 mesh ASTM, Merck), Sephadex LH-20 (Pharmacia) e Diaion HP-20 (Fluka). O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a massa das amostras. As análises de cromatografia de camada delgada (CCD) foram feitas em placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ suportada em placa de alumínio. Os agentes reveladores empregados na detecção das amostras em CCD foram luz UV (254 e 365 nm), reagente de Dragendorff (para detecção de compostos nitrogenados), anisaldeído e solução de ácido sulfúrico (MeOH/H₂SO₄ 1:1 v/v, seguido de aquecimento) (ambos usados na detecção de diversas classes de metabólitos secundários, dentre elas terpenoides, esteroides e saponinas). Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência no modo analítico foi utilizado o cromatógrafo Dionex® ICS 5000 DC, acoplado a detector de arranjos de diodos (DAD) Ultimat 3000, coluna analítica Acclaim®120 C18, 5 µm (4,6 x 100 mm), do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas ICB 1 (UFG). No modo preparativo foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu®, modelo LC8A, equipado com detector UV-Vis (SPD-M20A) e coluna Shim-pack PRESP-ODS (H) C18, 5 µm, 250 x 20 mm, da Central Analítica do Instituto de Química (UFG). Ambos apresentam injeção manual da amostra, sendo 20 µL no modo analítico e 2 mL, no preparativo.

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do IQ/UFG. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente deuterado. Os solventes utilizados para solubilização das amostras foram CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$ e D_2O (Cambridge Laboratories Isotopes). Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofômetro PerkinElmer, modelo Spectrum 400, na região de 4000 a 400 cm^{-1} em pastilhas de KBr e, os espectros na região do ultravioleta, no espectrofotômetro Lambda 45 da PerkinElmer entre 200-500 nm. Ambos os equipamentos são pertencentes à Central Analítica do Instituto de Química (UFG).

Os experimentos de caracterização dos extratos por espectrometria de massas foi realizado por injeção direta em espectrômetro de massas Thermo Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific), no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) da Universidade Federal de Goiás.

3.1.2. Preparação dos extratos e frações das partes aéreas de *P. officinalis*

As partes aéreas de *P. officinalis* foram coletadas em fevereiro de 2013, em Catalão-GO e identificadas pelo Prof. Dr. Piero Giuseppe Delprete, atualmente do *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD), da Guiana Francesa. A exsicata está depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, sob número de coleta #9185 (Delprete). O material vegetal foi seco ao ar livre, separado em folhas e galhos, moídos em moinho de facas e submetidos à extração a frio com metanol por maceração por uma semana. A evaporação do solvente em evaporador rotativo resultou no extrato bruto etanólico. A Tabela 3 mostra o rendimento percentual de extração do material vegetal.

Tabela 3. Rendimento das extrações por maceração das partes aéreas de *Palicourea officinalis*.

	Material vegetal seco (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas	685,6	39,1	5,7
Galhos	558,2	23,9	4,2

Na partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das partes aéreas, cada extrato foi solubilizado em uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (1:1). Essa mistura de solventes foi utilizada com o intuito de aumentar a solubilidade do extrato. Os detalhes de quantidade de massa utilizada na partição de cada extrato estão apresentados na Tabela 4.

Em seguida, a suspensão foi filtrada e a solução foi transferida para um funil de separação e adicionada H₂O até formação de fase. As fases diclorometano e hidrometanólica foram coletadas. A fração diclorometano foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotativo. A fração hidrometanólica foi liofilizada com prévia eliminação de metanol em evaporador rotativo. A Tabela 4 apresenta o valor das massas das frações obtidas na partição dos extratos.

Tabela 4. Partição líquido-líquido dos extratos brutos metanólicos das folhas e galhos de *P. officinalis*.

Frações	Folhas	Galhos
	Massa (g)	Massa (g)
Extrato metanólico inicial	39,1	23,9
Diclorometano	14,3	8,5
Hidrometanol	20,3	12,8
Total	34,6	21,3

3.1.2.1. Extração ácido-base da fração hidrometanólica de *P. officinalis*

Com o objetivo de isolar alcaloides e outros compostos nitrogenados, foi realizada a extração ácido-base de parte da fração hidrometanólica das folhas e dos galhos.

A fração hidrometanólica das folhas (8,1 g) foi suspensa em 200 mL de ácido acético 10% (v/v), mantida em agitação por 4 horas e filtrada em funil de Buchner. Conforme apresentado no fluxograma da Figura 14, na partição ácido-base das folhas, a fração hidrometanólica foi submetida à partição líquido-líquido com o solvente clorofórmio em um volume total de 150 mL divididos em três etapas de 50 mL. Para favorecer a separação da fase orgânica da aquosa, foi adicionada solução saturada de cloreto de sódio. Após a separação das fases, a fase orgânica foi coletada e seca com Na_2SO_4 anidro, obtendo-se a fração clorofórmica ácida. Na sequência, foi adicionado NH_4OH até $\text{pH}=8$, controlado por papel indicador de pH . Após esse ajuste do pH , a fase hidrometanólica foi ressubmetida a partição líquido-líquido pelos solventes clorofórmio, acetato de etila e butanol, nessa sequência, seguindo o mesmo procedimento usado para o clorofórmio inicialmente. as frações orgânicas básicas foram secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas em evaporador rotativo, enquanto que a fração hidrometanólica básica foi liofilizada com prévia eliminação de metanol em evaporador rotativo.

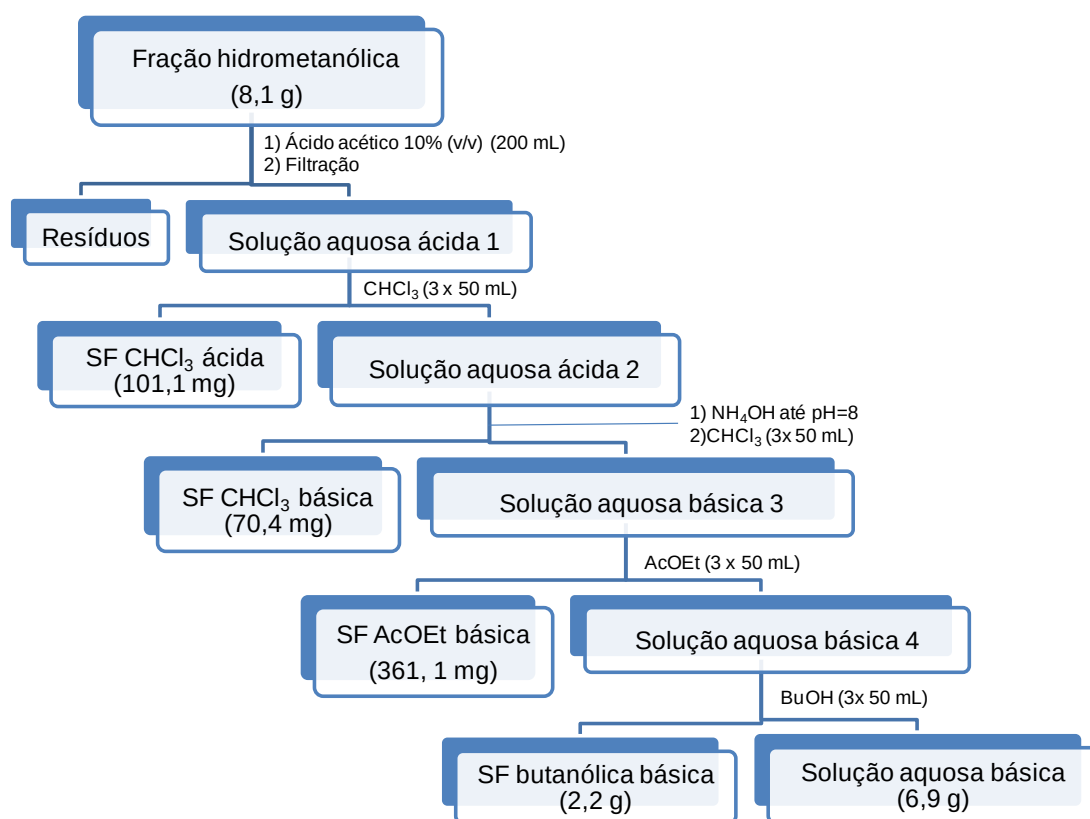


Figura 14. Extração ácido-base da fração hidrometanólica das folhas de *P. officinalis*. SF: subfração.

A fração hidrometanólica dos galhos (5,5 g) foi suspensa em 100 mL de ácido acético 10% (v/v), mantida em agitação por 4 horas e filtrada em funil de Buchner. O procedimento realizado foi o mesmo do utilizado para folhas e seguiu o fluxograma apresentado na Figura 15.

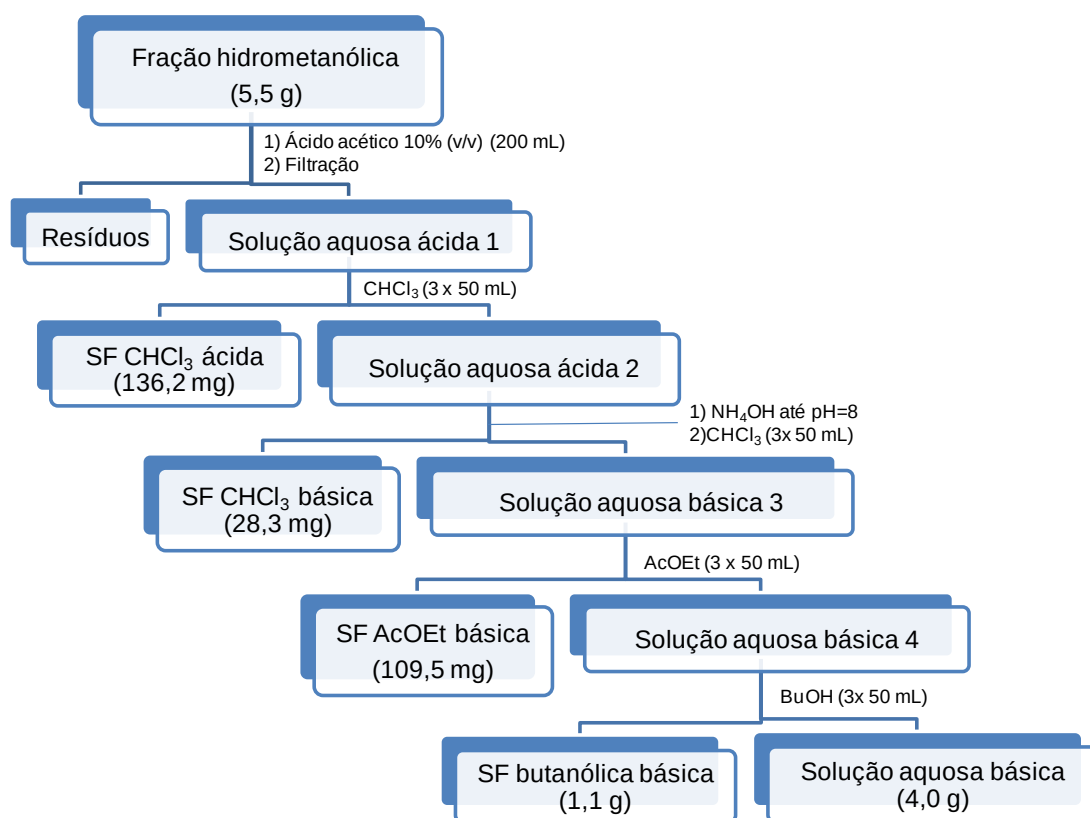


Figura 15. Extração ácido-base da fração hidrometanólica dos galhos de *P. officinalis*. SF: subfração.

3.1.3. Caracterização do perfil metabólico dos extratos e frações das folhas e galhos de *P. officinalis* por espectrometria de massas

As frações hidrometanól, obtidas das partições líquido-líquido das folhas e galhos, seguidas das suas subfrações obtidas no fracionamento ácido-base foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução e espectrometria de massas *tandem* por infusão direta, nos modos positivo e negativo. O preparo das amostras consistiu em solubilizar 1 mg de amostra em 1 mL de metanol (grau de pureza HPLC). Em seguida, 100 µL dessa solução foi transferida para um vial contendo 1mL de metanol.

As amostras foram filtradas (quando necessário) e injetadas diretamente na fonte de ESI do espectrômetro de massas Thermo Q-Exactive Orbitrap. O equipamento foi operado com uma temperatura capilar de 350 °C, voltagem de 3,5 kV e resolução de 140000. As razões

massa/carga foram obtidas com uma exatidão ≤ 3 ppm. Os espectros foram processados no *software* Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48.

3.1.4. Estudo fitoquímico das folhas de *P. officinalis*

3.1.4.1. Fração diclorometano

A fração diclorometano (13 g), obtida da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas, foi submetida à cromatografia líquida sob vácuo (C1, Ø = 8,5 cm e h = 4,5 cm) usando como fase estacionária sílica gel 60 para CCD (80 g) e eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se cinco subfrações (SF1-SF5). A subfração SF4-C1 foi lavada com etanol obtendo-se um sólido branco insolúvel (53 mg) identificado como **ácido ursólico (31)**. A subfração SF5-C1 (1,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (C2, Ø = 4,5 cm e h = 9,0 cm) e eluída com hexano, diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 238 subfrações, reunidas em 30 subfrações, de acordo com perfil cromatográfico apresentado. A subfração SF 112-120-C2 foi lavada com etanol e obteve-se um sólido branco insolúvel (11 mg) identificado como **sitosterol (67)** e **estigmasterol glicosilados (68)**. A subfração SF 84-91-C2 foi submetida a uma nova cromatografia em coluna de sílica gel 60 (C3, Ø = 1,5 cm e h = 13,0 cm) e eluída com CH₂Cl₂ e gradiente de CH₂Cl₂/metanol (3,5,6,10,15,33 e 50%). A subfração SF 4-13-C3 (10 mg) foi identificada como uma mistura dos triterpenoides **ácido ursólico (31)** e **oleanólico (64)**. O esquema de fracionamento da fração diclorometano está apresentado na Figura 16.

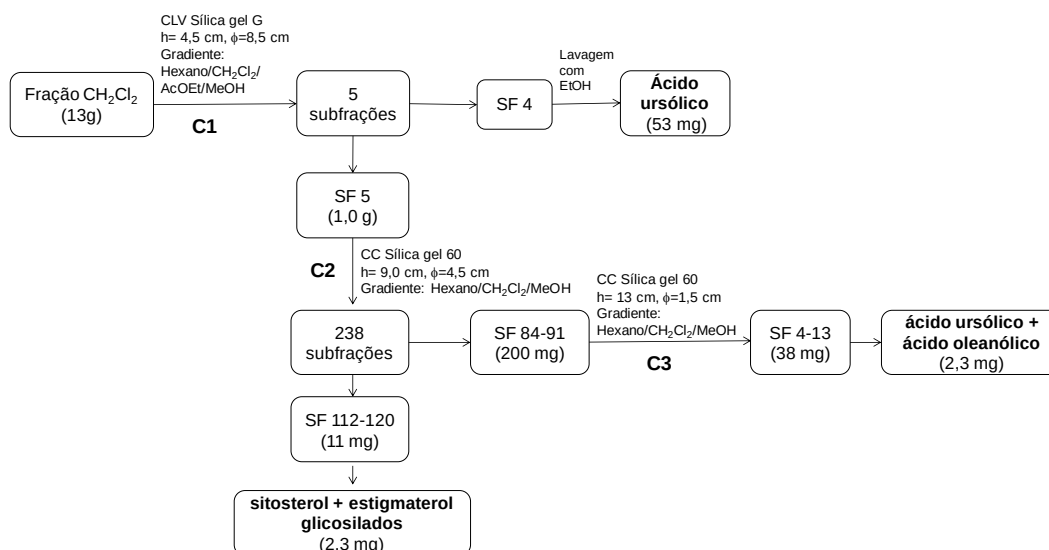


Figura 16. Esquema de fracionamento da fração CH_2Cl_2 das folhas de *P. officinalis*. SF: subfração.

3.1.4.2. Fração aquosa

A fração aquosa, obtida da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas, foi submetida à cromatografia em coluna de Diaion HP-20 (C4, $\varnothing = 4,5$ cm e $h = 26$ cm) e eluída com água 100%, metanol/água 50% e metanol 100%, consecutivamente, obtendo-se 8 subfrações.

A subfração SF 2-C4 (400 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (C5, $\varnothing = 3,5$ cm e $h = 34$ cm) e eluída em diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 58 subfrações. A subfração SF 22-23-C5 (7,8 mg) foi identificada como a mistura de **ácidos 3-cafeoil-quínico (60)** e **4-cafeoil-quínico (61)**. A subfração SF 24-33-C5 (10 mg) foi identificada como **ácido 3-cafeoil-quínico (60)**. A subfração SF 5-7-C5 foi submetida a uma coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (C6, $\varnothing = 3,5$ cm e $h = 34$ cm) e eluída em diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 8 subfrações, das quais a subfração SF2-C6 foi identificada como uma **mistura de derivados de α -ionol (52, 53 e 54)**.

A subfração SF3-C4 (33,7 mg) foi purificada por HPLC-UV preparativo isocrático, utilizando ACN:H₂O 70% como fase móvel, fluxo de 8 mL min^{-1} e coluna C18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$). O pico eluído em 9 min de análise (7,2 mg) foi identificado como o flavonoide **quercetina 3-O-soforosídeo**

(39). O esquema de fracionamento da fração aquosa está apresentado na Figura 17.

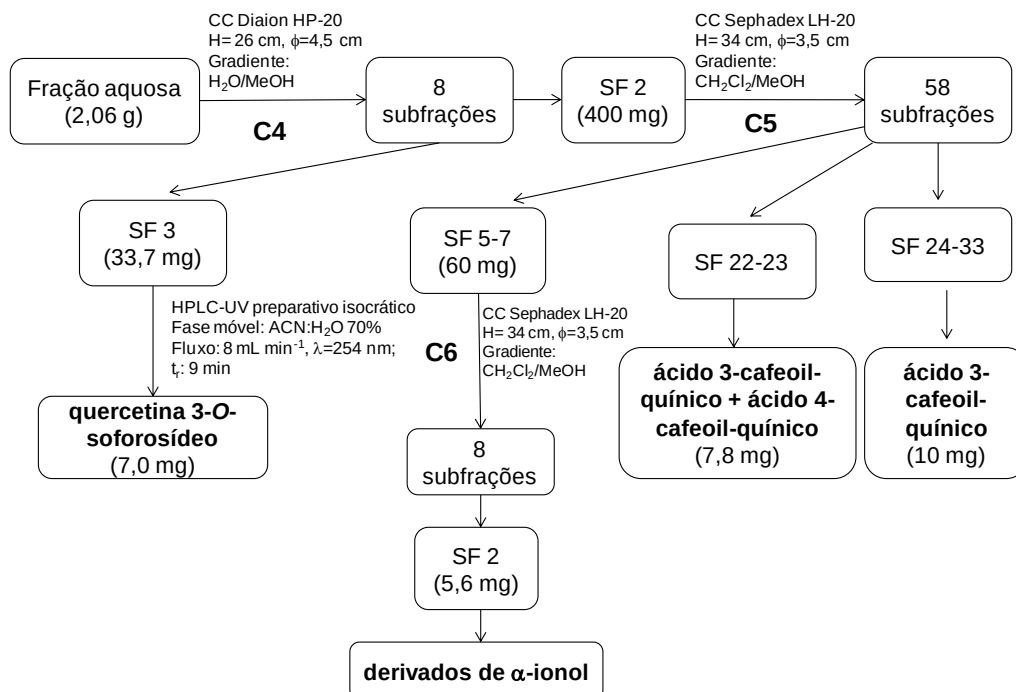


Figura 17. Esquema de fracionamento da fração aquosa das folhas de *P. officinalis*. SF: subfração.

3.1.4.3. Estudo das frações da partição ácido-base

A subfração clorofórmica ácida foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (C7, Ø = 1,5 cm e h = 12,5 cm) e eluída com hexano, diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 51 subfrações, reunidas em 7 subfrações, de acordo com perfil cromatográfico apresentado. A subfração 7-11-C7 (1,3 mg) foi identificada como **escopoletina (35)**. O esquema de isolamento do composto escopoletina está apresentado na Figura 18.

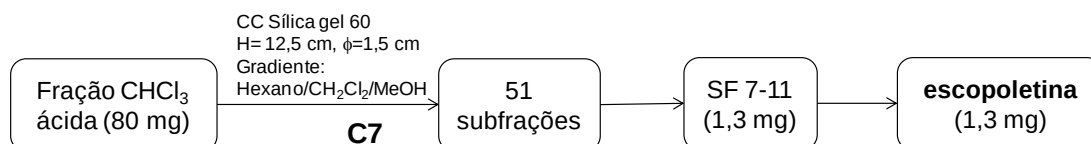


Figura 18. Esquema de isolamento da cumarina escopoletina (35) de *P. officinalis* a partir da fração clorofórmica ácida. SF: subfração.

A subfração butanólica básica (1,6 g) foi submetida a uma coluna

cromatográfica de Sephadex LH-20 (C8, Ø = 3,5 cm e h = 34 cm) e eluída em diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 122 subfrações. A subfração SF 54-C8 (13 mg) foi identificada como o alcaloide **18-*epi*-braquicerina (49)**; a subfração SF 90-91-C8 (10 mg), como o flavonoide **canferol 3-O-soforosídeo (59)** e a subfração SF 94-95-C8, como a mistura de flavonoides **quercetina 3-O-soforosídeo (39) + canferol 3-O-soforosídeo (59)**.

A subfração 57-62-C8 (124 mg) foi submetida a uma nova purificação em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (C9, Ø = 2 cm e h = 20 cm) e eluída em diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 28 subfrações. A subfração SF 11-13-C9 (61,5 mg) foi purificada por HPLC-UV preparativo isocrático, utilizando ACN:H₂O 18% como fase móvel, fluxo de 8 mL min⁻¹ e coluna C18 (5 µm, 250 mm X 20 mm). O pico eluído em 43 min de análise (2,3 mg) foi identificado como o norisoprenoide **guettardionosídeo (50)**.

O esquema de fracionamento da fração butanólica básica está apresentado na Figura 19.

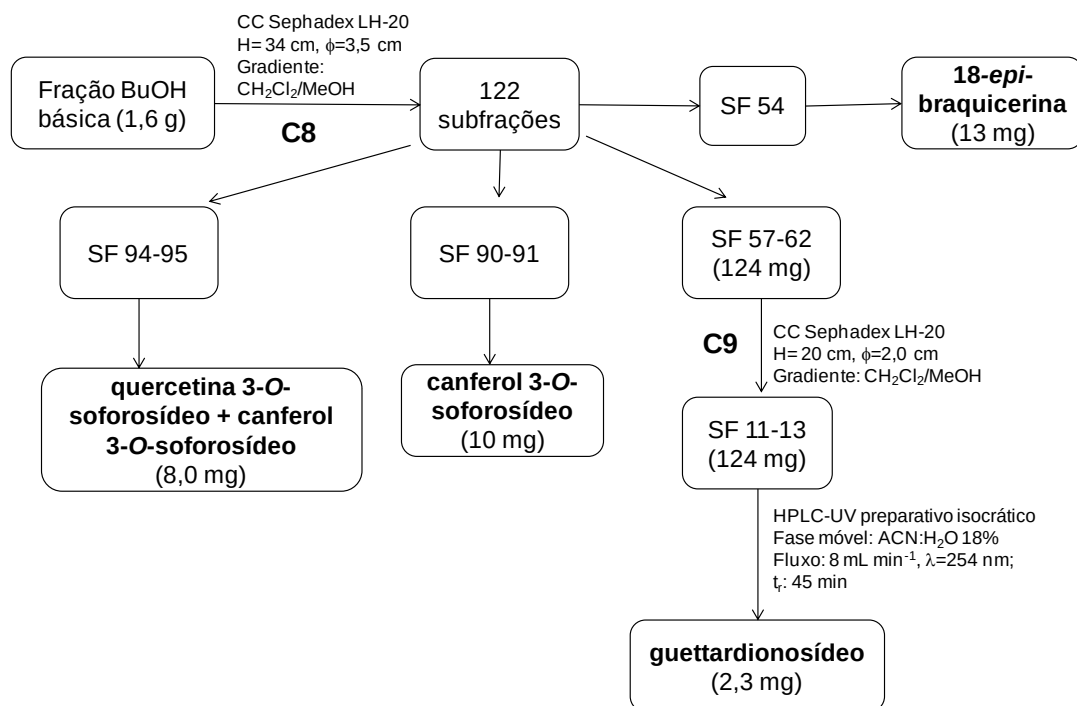


Figura 19. Esquema de fracionamento da fração butanólica básica das folhas de *P. officinalis*. SF: subfração.

A subfração hidrometanólica básica (1,7 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (C10, Ø = 3,5 cm e h = 27 cm) e eluída em metanol e água, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 61 subfrações. A subfração 7-11-C10 (538,9 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 (C11, Ø = 3,5 cm e h = 27 cm), obtendo-se 70 subfrações. A subfração 13-14-C11 (12,1 mg) foi identificada como a mistura de pirazinas **2,5-desoxifructosazina (56)**, **2,6-desoxifructosazina (57)** e **fructosazina (58)**.

O esquema de fracionamento da fração hidrometanólica básica está apresentado na Figura 20.

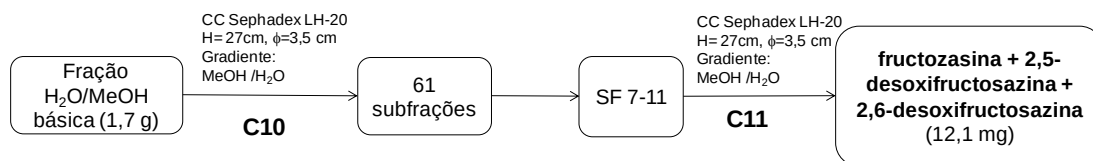


Figura 20. Esquema de fracionamento da fração hidrometanólica básica das folhas de *P. officinalis*. SF: subfração.

3.1.5. Estudo fitoquímico dos galhos

3.1.5.1. Estudo das frações da partição ácido-base

A subfração clorofórmica ácida foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel 60 (C12, Ø = 1,5 cm e h = 13,0 cm) e eluída com gradientes de clorofórmio e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 39 frações. A fração 9-10-C12 (2,0 mg) foi identificada como a cumarina **escopoletina (35)**, e a fração 23-24-C12 (6,9 mg) como **ácido salicílico (62)**. O esquema de fracionamento da fração clorofórmica ácida está apresentado na Figura 21.

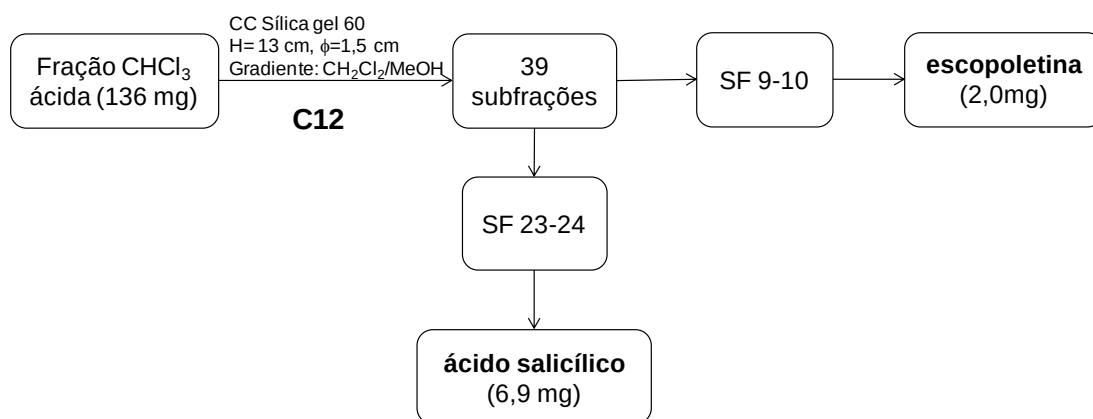


Figura 21. Esquema de fracionamento da fração clorofórmica ácida dos galhos de *P. officinalis*. SF: subfração.

A subfração clorofórmica básica foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel 60 (C13, Ø = 1,0 cm e h = 7,0 cm) e eluída com gradientes de hexano, clorofórmio e metanol, em ordem crescente de polaridade. A fração 3-4-C13 (1,7 mg) foi identificada como a mistura de esteroides **β-sitosterol (65)** e **estigmasterol (66)**; a fração 8-9-C13 (1,3 mg) como a mistura de triterpenoides **ácidos ursólico (31)** e **oleanólico (64)**; e,

por fim, a fração 15-C13 (4,4 mg) como a lignana **siringaresinol-4'-β-D-glicosídeo (55)**. O esquema de fracionamento da fração clorofórmica básica está apresentado na Figura 22.

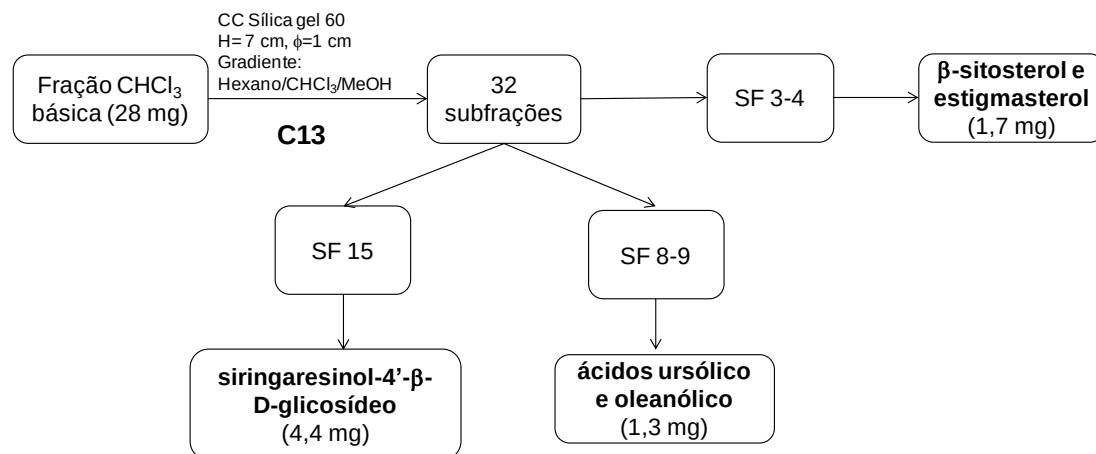


Figura 22. Esquema de fracionamento da fração clorofórmica básica dos galhos de *P. officinalis*. SF: subfração.

A fração hidrometanólica básica, sem passar por fracionamento, foi analisada por RMN uni e bidimensionais, e mostrou a presença majoritária das pirazinas **2,5-desoxifruktosazina (56)** e **2,6-desoxifruktosazina (57)**.

3.2. Imagem química de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por DESI-MS

3.2.1. Procedimentos gerais

A água foi purificada em Millipore Direct-Q3 UV (Billerica, MA, USA). O ácido fórmico e o metanol utilizados foram das marcas Sigma-Aldrich e VWR International (Herlev, Dinamarca), respectivamente. O PTFE poroso (1,5 mm de espessura, 7 μm de tamanho médio e 36% de volume de poro) é da marca Berghof (Eningen, Germany).

3.2.2. Material vegetal

As folhas de *Palicourea coriacea* e *P. rigida* foram coletadas no setor Itanhangá (Goiânia-GO) e as folhas de *Psychotria prunifolia* (Figura 23) foram coletadas no Bosque A. Saint-Hilaire da Universidade Federal de Goiás no dia 04 de junho de 2014, e armazenadas em tubo Falcon contendo

algodão umedecido a fim de evitar a perda de umidade das folhas no transporte. A exsicata das espécies está depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, sob número de coleta #4327 (H. D. Ferreira), #4325 (H. D. Ferreira) e #10323 (Delprete), respectivamente. As folhas de *P. officinalis* foram coletadas na Reserva ecológica do IBGE pelo Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (UFG-Regional Catalão) em dezembro de 2014. O transporte de amostra de componente do patrimônio genético foi legalmente realizado com autorização de remessa emitida pelo CNPq, sob nº 010742/2014-0.

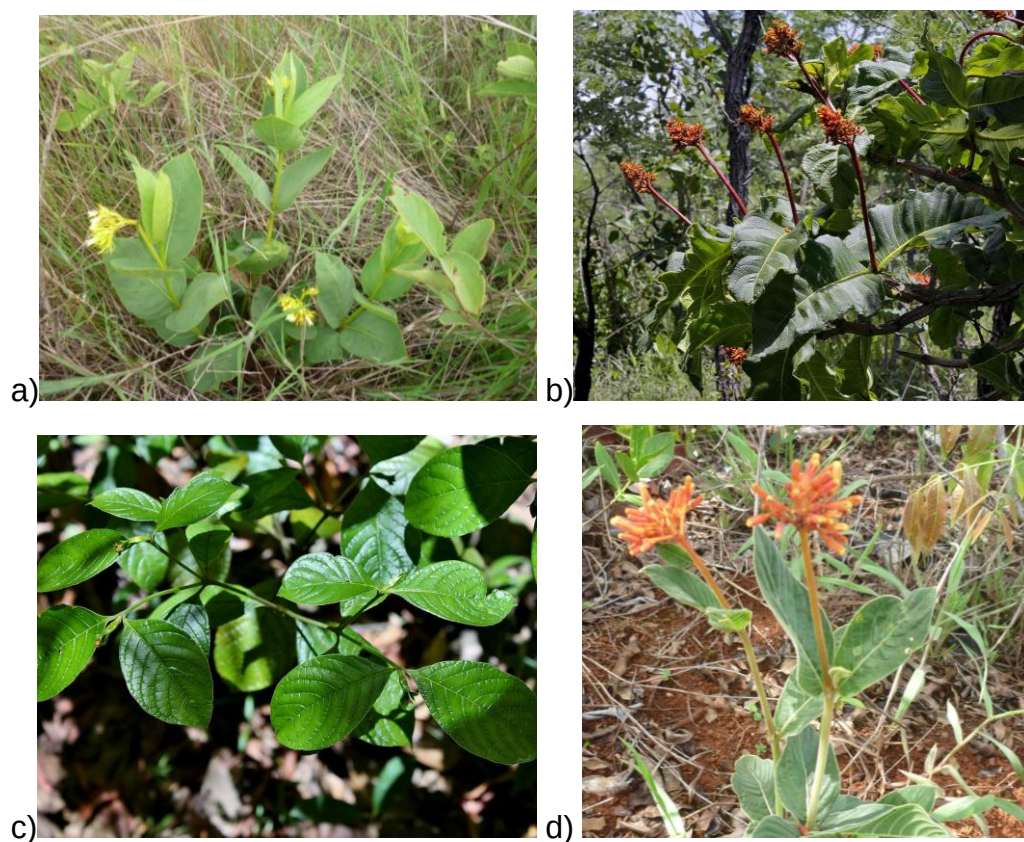


Figura 23. a) *Palicourea coriacea*; b) *Palicourea rigida*; c) *Psychotria prunifolia*; d) *Palicourea officinalis*. Fotos obtidas no dia da coleta.

3.2.3. Instrumentação e parâmetros de análise de DESI-MSI

A etapa de imageamento das folhas de *Palicourea coriacea*, *P. rigida*, *P. officinalis* e *Psychotria prunifolia* foi desenvolvida sob supervisão do Prof. Dr. Christian Janfelt, no Departamento de Farmácia da Universidade de Copenhagen, Dinamarca. Os experimentos de imageamento foram

realizados em um espectrômetro de massas Thermo Fisher Scientific LTQ XL *ion trap* linear equipado com uma fonte de ionização DESI de imageamento e plataforma de microscópio Märzhäuser-Wetzlar controlado por *software*, ambos construídos no próprio laboratório (Figura 24) (THUNIG *et al.*, 2011).



Figura 24. Espectrômetro de massas Thermo Fisher Scientific LTQ XL íon trap linear equipado com uma fonte de ionização DESI utilizado nos experimentos de imagem.

Os espectros de massas foram coletados e convertidos em arquivos imzML e as imagens foram criadas no *software* gratuito Data Cube Explorer (AMOLF, Amsterdam, Holanda) (KLINKERT *et al.*, 2014).

3.2.4. Método indireto de análise (*imprint*)

O preparo das amostras para análise por método indireto foi realizado seguindo metodologia desenvolvida por Janfelt (2015) (Figura 25), a qual é baseada na transferência do material vegetal para uma superfície de PTFE por prensagem. A extração dos analitos a partir do material vegetal fresco para uma superfície porosa de PTFE (1,5 mm de espessura, o tamanho de poro médio de 16 μm , volume de poro de 47%) ocorreu por pressão em um torno de bancada (morsa). Nenhuma preparação da amostra foi necessária antes da prensagem. Uma peça de PTFE porosa foi cortada em formato retangular (cerca de 5x3 cm^2) lavada com MeOH e seca em dessecador.

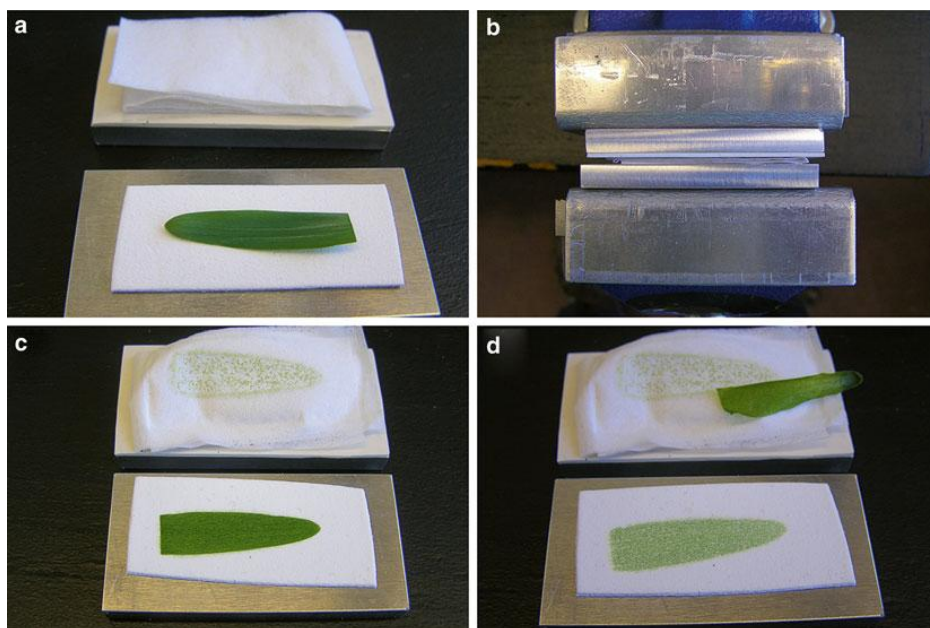


Figura 25. Exemplo de processo de impressão da folha em superfície de PTFE (folha de cevada). a) A folha é colocada sobre uma superfície limpa de PTFE e coberta com papel toalha e uma peça de borracha; b) O “sanduíche” é colocado em uma morsa por cerca de 3 min; c) o “sanduíche” é aberto; d) o imprint está pronto para análise. Figura extraída com permissão de Janfelt (2015).

A folha foi colocada sobre a peça de PTFE e coberta com algumas camadas de papel de seda (Figura 25a), a fim de absorver o suco excedente da folha lançado durante a prensagem e, assim, evitar que ele se espalhasse por toda a superfície do PTFE. Uma peça de 1 mm de espessura de borracha de silicone foi adicionada no topo, a fim de uniformizar a pressão aplicada em toda a superfície, uma vez que as folhas apresentam uma superfície irregular devido à presença das nervuras e veias. Finalmente, o “sanduíche” de PTFE, folha, lenço de papel e borracha foi colocado entre duas placas de alumínio 5mm de espessura e inserido em um torno de bancada sob forte pressão por aproximadamente 3 minutos. Em seguida, a superfície de PTFE foi submetida à análise de imageamento por DESI-MS.

As análises de imagem pelo método indireto foram realizadas em 15 seções semelhantes de folhas, garantindo a reprodutibilidade dos resultados apresentados.

3.2.5. Método direto de análise

A folha a ser analisada, após ser retirada do freezer -80 °C, foi seca com papel toalha para retirada da umidade superficial. O tratamento para retirada da cera epicuticular da folha foi realizado com imersão total da folha em clorofórmio (BUSCHHAUS e JETTER, 2012; LI *et al.*, 2013) por seis vezes consecutivas de dois minutos cada e seca ao ar. Em seguida, a face adaxial (superior) da folha foi colada em lâmina de vidro com fita adesiva de dupla face para subsequente imageamento.

3.2.6. Parâmetros experimentais de DESI-MS

Os parâmetros otimizados para análise de *P. coriacea* pelo método *imprint* foram: fluxo de MeOH:H₂O (70:30) de 3 µL/min, 5,5 bar de pressão de gás nebulizador (N₂), 5 microscans e 100 ms de tempo de injeção. A voltagem do spray foi 5 kV no modo positivo e -5 kV no modo negativo. Já pelo método direto de análise, os parâmetros otimizados foram: solvente MeOH/H₂O/HCOOH 70:30:1, fluxo de 7 µL/min e 5,5 bar de pressão de gás nebulizador (N₂). Para a espécie *P. prunifolia*, os parâmetros otimizados para o método *imprint* foram: fluxo de MeOH:H₂O 70:30 de 3 µL/min, 5 bar de pressão de gás nebulizador (N₂), 5 microscans e 100 ms de tempo de injeção. Já para o método direto de análise, os parâmetros otimizados foram: fluxo de MeOH:H₂O (60:40) de 7 uL/min, 7 bar de pressão de gás nebulizador (N₂), 5 microscans e 100 ms de tempo de injeção. Os parâmetros geométricos otimizados de DESI foram: distância sprayer-superfície da amostra de 1-2 mm, distância sprayer-inlet do equipamento de 4-5 mm, com ângulo de incidência (α , Figura 12) de 50-60° e ângulo de coleta (β , Figura 12) de 10°.

3.2.7. Identificação dos metabólitos por espectrometria de massas

Para a preparação dos extratos das folhas, a metade de uma folha de cada espécie foi cortada em pequenos pedaços e extraída com cerca de 2 mL de metanol a frio sob agitação por aproximadamente 5 minutos. Em

seguida, o extrato foi filtrado e injetado diretamente na fonte de ESI do espectrômetro de massas Thermo Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific), no Departamento de Farmácia da Universidade de Copenhague, Dinamarca. O equipamento foi operado com uma temperatura capilar de 350 °C, voltagem de 3,3 kV e resolução de 140000. As razões massa/carga foram obtidas com uma exatidão ≤ 3 ppm. Os experimentos de espectrometria de massas *tandem* foram realizados em um espectrômetro de massas LTQ XL ion trap linear (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com uma fonte de ionização DESI de imageamento, com os mesmos parâmetros otimizados. Os espectros foram processados no *software* Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48.

3.3. Análises de quantificação em LC-MS

As folhas foram separadas em lâmina e nervural central, moídas em almofariz com N₂ líquido, liofilizadas por 24 h e em seguida, pesadas três replicatas de cada espécie. O material foi extraído com MeOH:H₂O 15% (2 mL) por 3 min em bloco digestor e uma alíquota de 500 µL dessa solução foi centrifugada por 5 min. Uma alíquota de 100 µL de cada extrato foi diluída em 900 µL de MeOH e acondicionada em frasco ambar no freezer até análise. Um volume de 20 µL desse material foi injetado em LC TSQ Quantum, com coluna Phenomenex C18 (100 mm x 4.6 mm), no modo analítico (injeção de 20 µL), fluxo de 200 µL min⁻¹, utilizando como fase móvel gradiente de (A) H₂O 0,1%TFA e (B) MeOH 0,1% TFA, com a seguinte programação: 4 min de 30% B, 3 min de 70% B e finalmente, 80% B.

Resultados e discussão

.....

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metabólitos de *Palicourea officinalis*

4.1.1. Caracterização do perfil metabólico dos extratos e frações polares das partes aéreas de *Palicourea officinalis* por espectrometria de massas

Os extratos e frações polares de *P. officinalis* foram analisados por espectrometria de massas de alta resolução e espectrometria de massas *tandem* por infusão direta, nos modos positivo e negativo, para caracterização do perfil metabólico. Os metabólitos, apresentados na Tabela 5, foram identificados por comparação da massa exata (com erro <5 ppm) com banco de dados METLIN (SMITH *et al.*, 2005) e com dados de fragmentação com a literatura ou interpretação do perfil de fragmentação do íon precursor, cujo espectro ESI-MS/MS não é descrito na literatura. Apenas o íon mais intenso dos compostos detectados na forma de diferentes adutos foi analisado por espectrometria de massas *tandem*.

Tabela 5. Metabólitos identificados nas partes aéreas de *P. officinalis*.

Palicourea officinalis - folhas – (+)								
Fração	m/z	Massa molecular	m/z esperada	Erro (ppm)	Tipo de íon	MS/MS	Estrutura	Fonte bibliográfica
AcOEt e Aquosa básicas	547,2281	546,2213	547,2286	+0,91	[M+H] ⁺	530, 500, 385, 368, 338	braquicerina (49) ou isômero	KERBER <i>et al.</i> , 2001
BuOH básica	527,2462	504,2571	527,2463	-0,19	[M+Na] ⁺	395	guettardionosídeo (50) ou isômero	CAI <i>et al.</i> , 2011; MATSUNAMI <i>et al.</i> , 2010
Aquosa	305,1337327,1156	304,1271	305,1343327,1163	+1,96+2,14	[M+H]⁺[M+Na]⁺	287, 269, 251,227, 209, 191, 149	2,6-desoxifructosazina (57) ou 2,5-desoxifructosazina (56)	WANG <i>et al.</i> , 2015
Palicourea officinalis - folhas – (-)								
Fração	m/z	Massa molecular	m/z esperada	Erro (ppm)	Tipo de íon	MS/MS	Estrutura	Fonte bibliográfica
AcOEt básica	625,1412	626,1438	625,1416	+0,6	[M-H] ⁻	300	quercetina 3-O-soforosídeo ou isômero (39)	ROSA <i>et al.</i> , 2010
	661,1186		661,1177	-1,06	[M+Cl] ⁻	-		
BuOH básica	353,0879	354,0951	353,0878	-0,2	[M-H] ⁻	191, 179	Ácido 3-cafeoil-quínico (60)	CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003

Fração	<i>m/z</i>	Massa molecular	<i>m/z</i> esperada	Erro (ppm)	Tipo de íon	MS/MS	Estrutura	Fonte bibliográfica
BuOH básica	353,0879	354,0951	353,0878	-0,2	[M-H] ⁻	179, 173	Ácido 4-cafeoil-quínico (61)	CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003
	367,1035	368,1107	367,1035	<0,1	[M-H] ⁻	193 (88), 191 (100), 173 (88)	misturas de ácido feruloil-quínico	CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003
	421,1631	386,1941	421,1635	+0,9	[M+Cl] ⁻	-	vomifoliol 9-glicopiranosídeo (52) ou isômero	SPÍNOLA <i>et al.</i> , 2015
	431,1924		431,1923	-0,2	[M+HCOOH-H] ⁻	385, 179		
BuOH e aquosa básicas	503,2502	504,2571	503,2498	-0,7	[M-H] ⁻	371, 161	guettardionosídeo (50) ou isômero	CAI <i>et al.</i> , 2011; MATSUNAMI <i>et al.</i> , 2010
	539,2268		539,2259	-1,7	[M+Cl] ⁻	-		
	549,2558		549,2253	-0,9	[M+HCOOH-H] ⁻	-		
	517,2293	518,2363	517,2291	-0,4	[M-H] ⁻	385, 223	vomifoliol 9-O-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (53) ou isômero	de TOMMASI <i>et al.</i> , 1996
	553,2050		553,2057	+1,6	[M+Cl] ⁻	-		
	563,2350		563,2345	-0,8	[M+HCOOH-H] ⁻	-		
	565,2506	520,2520	565,2502	-0,7	[M+HCOOH-H] ⁻	519	7,8-diidrovoimifoliol 9-O-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (54) ou isômero	de TOMMASI <i>et al.</i> , 1996
	593,2822		593,2815	-1,2	[M+CH ₃ COO] ⁻	-		
Aquosa básica	609,1465	610,1534	609,1461	-0,6	[M-H] ⁻	284	canferol 3-O-soforosídeo (59) ou isômero	KIM <i>et al.</i> , 2012

Palicourea officinalis - galhos – (+)								
Fração	m/z	Massa molecular	m/z esperada	Erro (ppm)	Tipo de íon	MS/MS	Estrutura	Fonte bibliográfica
Aquosa básica	305,1339	304,1271	305,1343	+1,96	[M+H] ⁺	287, 269, 251, 227, 209, 191, 149	2,6-desoxifructosazina (57) ou 2,5-desoxifructosazina (56)	WANG <i>et al.</i> , 2015
	327,1157		327,1163	+2,14	[M+Na] ⁺	-		
Palicourea officinalis - galhos – (-)								
Fração	m/z	Massa molecular	m/z esperada	Erro (ppm)	Tipo de íon	MS/MS	Estrutura	Fonte bibliográfica
Extrato bruto	303,1202	304,1271	303,1198	-1,32	[M-H] ⁻	213	2,6-desoxifructosazina (57) ou 2,5-desoxifructosazina (56)	-
	339,0965		339,0965	<0,1	[M+Cl] ⁻	-		
	349,1253		349,1252	<0,1	[M+HCOOH-H] ⁻	-		
BuOH básica	579,2089	580,2156	579,2083	-1,03	[M-H] ⁻	417	siringaresinol 4'-β-D-glucosídeo (55) ou isômero	SHAHAT <i>et al.</i> , 2004

4.1.2. Estudo fitoquímico das folhas e galhos de *Palicourea officinalis*

Com o intuito de completar a elucidação estrutural dos compostos observados por espectrometria de massas e possivelmente isolar outros metabólitos secundários, foi realizado o isolamento dos metabólitos por cromatografia e análise por ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional e espectrometria de massas. A caracterização dos compostos pelas técnicas de espectrometria de massas, inclusive com os espectros de fragmentação, e ressonância magnética nuclear está detalhada no item 4.1.3.

O estudo fitoquímico das folhas e galhos de *Palicourea officinalis* resultou no isolamento e identificação dos seguintes metabólitos secundários: o alcaloide 18-*epi*-braquicerina (**49**), os norisoprenoides guettardionosídeo (**50**) e 3-oxo- α -ionol 9-*O*- β -D-apiofuranosil(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**51**) e a mistura vomifoliol 9-glicopiranosídeo (**52**), vomifoliol 9-*O*- β -D-apiofuranosil(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**53**) e 7,8-diidro-vomifoliol 9-*O*- β -D-apiofuranosil(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**54**), a lignana siringaresinol-4'- β -D-glicosídeo (**55**), a mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (**56**), 2,6-desoxifructosazina (**57**) e fructosazina (**58**), os flavonoides quercetina 3-*O*-soforosídeo (**39**) e canferol 3-*O*-soforosídeo (**59**), os ácidos clorogênicos 3-cafeoil e 4-cafeoil-quínicos (**60**, **61**), mistura de ácidos feruloil-quínicos, o ácido salicílico (**62**), o ácido 9,12,13-trihidroxioctadecenoico (**63**), a cumarina escopoletina (**35**), a mistura dos triterpenoides ácidos ursólico (**31**) e oleanólico (**64**), além dos esteroides sitosterol e estigmasterol (**65** e **66**) e seus derivados glicosilados (**67** e **68**). As estruturas desses compostos estão apresentadas na Figura 26.

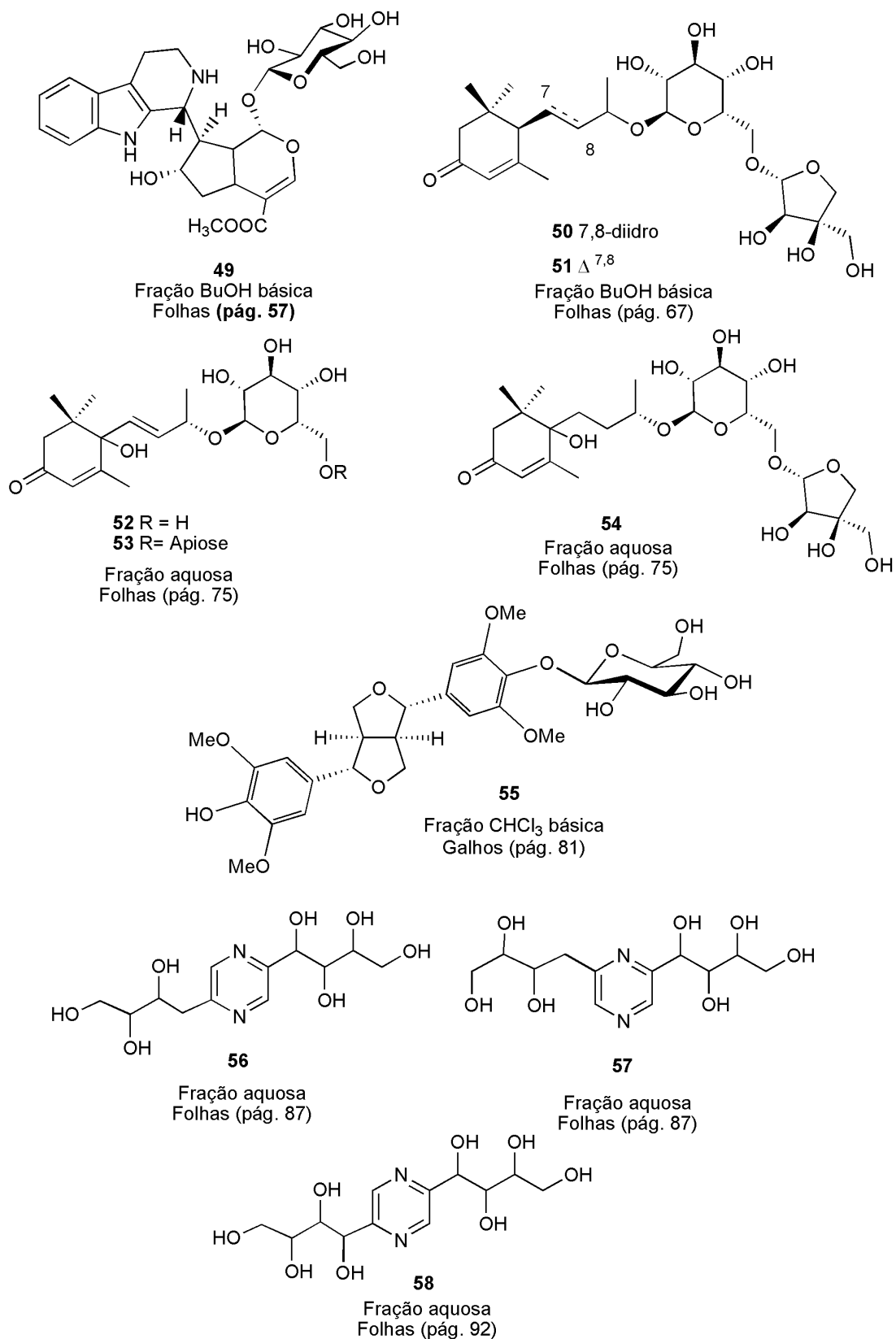


Figura 26. Estruturas químicas dos compostos isolados e identificados das folhas e galhos de *Palicourea officinalis*.

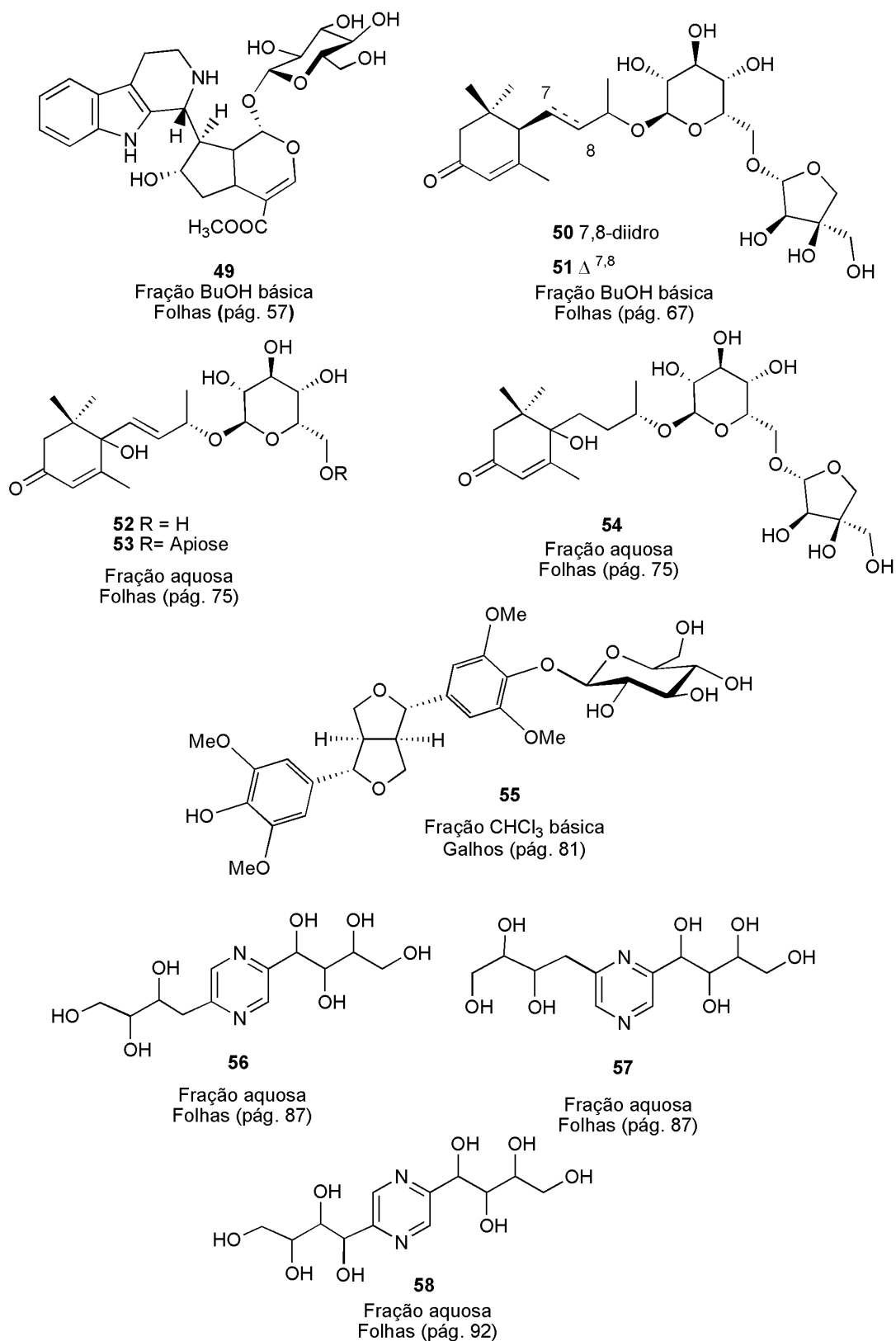
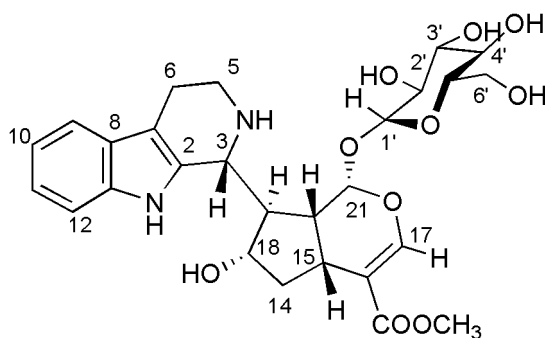


Figura 26. Estruturas químicas dos compostos isolados e identificados das folhas e galhos de *Palicourea officinalis* (cont.).

4.1.3. Caracterização dos compostos isolados por RMN e MS

Os espectros de RMN uni e bidimensionais dos compostos isolados estão apresentados no Anexo, a partir da página 164.

4.1.2.1. 18-*epi*-braquicerina (49)



O composto **49** (13 mg, p. f.: 167-169°C), inédito na literatura, foi isolado na forma de um sólido marrom a partir da fração butanólica das folhas de *P. officinalis*, apresentando-se solúvel em metanol, com coloração escura sob luz UV (254 nm) e reação positiva frente ao reagente de Dragendorff. No espectro de ultravioleta, foram observadas bandas de absorção em 230 e 280 nm, típicos de unidade indólica (PAUL *et al.*, 2003). No espectro de infravermelho destacaram-se as bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H e N-H (3388 cm^{-1}), de deformação axial de ligação C-H ($2949, 2898\text{ cm}^{-1}$) e de estiramento de ligação C=O (1698 cm^{-1}) e de C-O (1075 cm^{-1}).

O espectro de massas HR-ESI-(+)-MS do composto **49** apresentou um sinal em m/z 547,2288 $[M+H]^+$ (Figura 27) consistente com a fórmula molecular $C_{27}H_{34}N_2O_{10}$ (erro de 0,37 ppm).

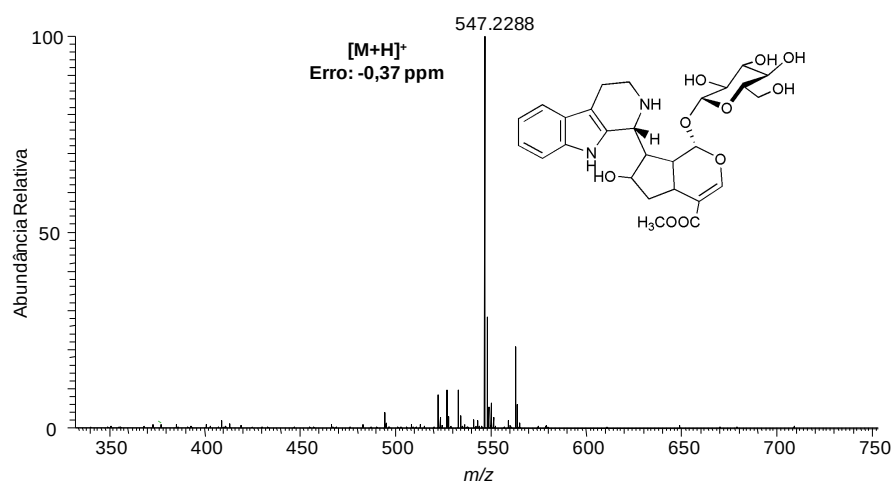


Figura 27. Espectro de HR-ESI-(+)-MS do composto **49**.

A análise dos mapas de correlação de HSQC e HMBC permitiu a identificação de 27 átomos de carbonos, os quais foram atribuídos a seis carbonos não hidrogenados, incluindo um carbono carbonílico com sinal em δ_c 168,0, quatro carbonos de anéis aromáticos com sinais em δ_c 129,4, 106,9, 126,1, 136,0 e um carbono olefínico em δ_c 110,0; 17 carbonos metínicos, incluindo um carbono olefínico em δ_c 152,2 e cinco oximetínicos atribuídos a uma unidade glicosídica; além de quatro carbonos metilênicos saturados em δ_c 60,9, 42,1, 40,4 e 19,4.

No espectro de RMN de ^1H , foram observados sinais característicos de unidade tetrahydro- β -carboline não substituída em δ_H 7,47 (*ddd*, $J=7,7$, 1,1, 0,8 Hz, 1H, H-9), 7,04 (*ddd*, $J=7,7$, 7,0, 0,8 Hz, 1H, H-10), 7,14 (*ddd*, $J=8,1$, 7,0, 1,1 Hz, 1H, H-11) e 7,38 (*ddd*, $J=8,1$, 0,9, 0,8 Hz, 1H, H-12) (Figura 28a), além dos sinais de grupos metilênicos em δ 3,68 e δ 3,40 (H-5) e em δ 2,44 (H-6) (Figura 28b e c) correlacionados pelo mapa de HSQC aos carbonos em δ_c 40,4 e δ_c 19,4, respectivamente. A presença da unidade loganínica foi indicada pelo sinal de H-17 em δ_H 7,55 (*d*, $J=1,1$ Hz, 1H), juntamente com o par de sinais de hidrogênios metilênicos H-14 em δ_H 2,46 e 1,52 e H-18, em δ_H 4,38.

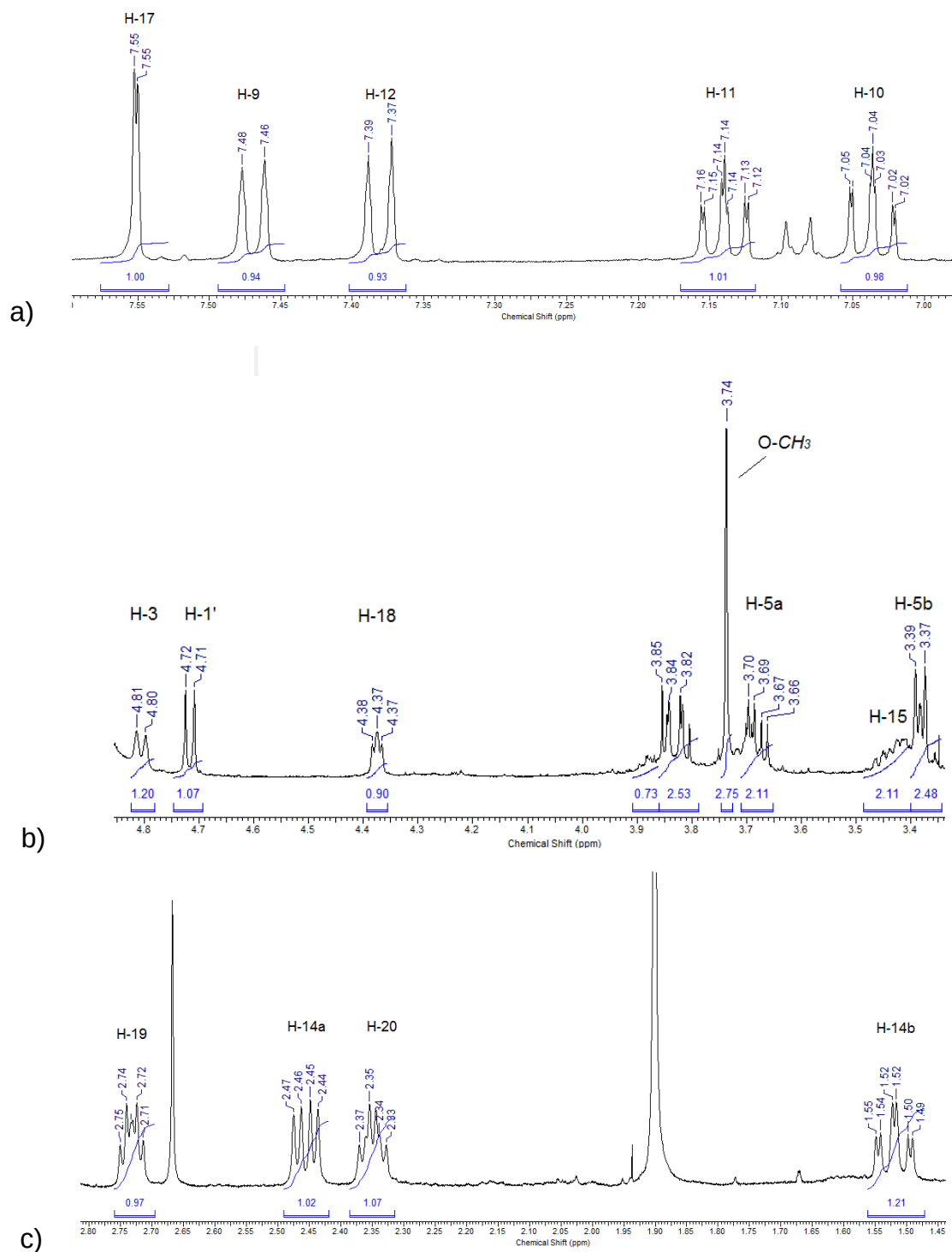


Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto **49**; a) na região de aromáticos, mostrando um perfil de sinais característicos das unidades β -carbolínica e loganínica; b) região de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos; c) região de hidrogênios saturados.

A posição da unidade loganínica foi atribuída pela análise do mapa de correlação de HMBC, que apresentou uma correlação entre C-3 (δ_c 53,2) e H-19 (δ_H 2,73) (Figura 29).

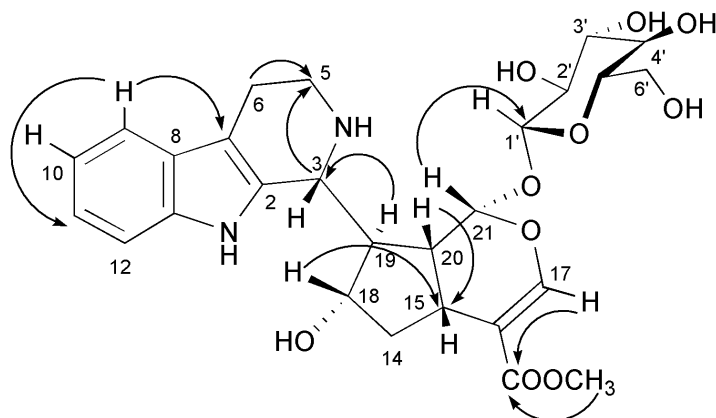


Figura 29. Principais correlações observadas no mapa de contorno do composto **49**.

O sinal de hidrogênio anomérico em δ_H 4,72 (*d*, $J = 8,1$ Hz, H-1') indicou a presença de uma unidade glicosídica e o valor da constante de acoplamento ($J = 8,1$ Hz) é indicativo da configuração β para o açúcar. A posição da unidade glicosídica na molécula foi determinada pelo mapa de HMBC, que apresentou a correlação entre o carbono anomérico C-1' (99,5) e o hidrogênio em δ_H 4,90 (H-21) (Figura 29).

A análise do perfil de fragmentação do composto **49** confirmou a estrutura do alcaloide, no qual foram observados como fragmentos principais do íon precursor m/z 547,2288, os íons m/z 530,2023, 385,1758 e 368,1492, atribuídos às perdas de NH_3 , glicose e glicose + NH_3 , respectivamente. As propostas estruturais dos fragmentos estão apresentadas na Figura 30 e foram geradas no programa High Chem Mass Frontier® (MISTRICK *et al.*, 2011). A proposta de mecanismo de fragmentação está apresentada na Figura 31.

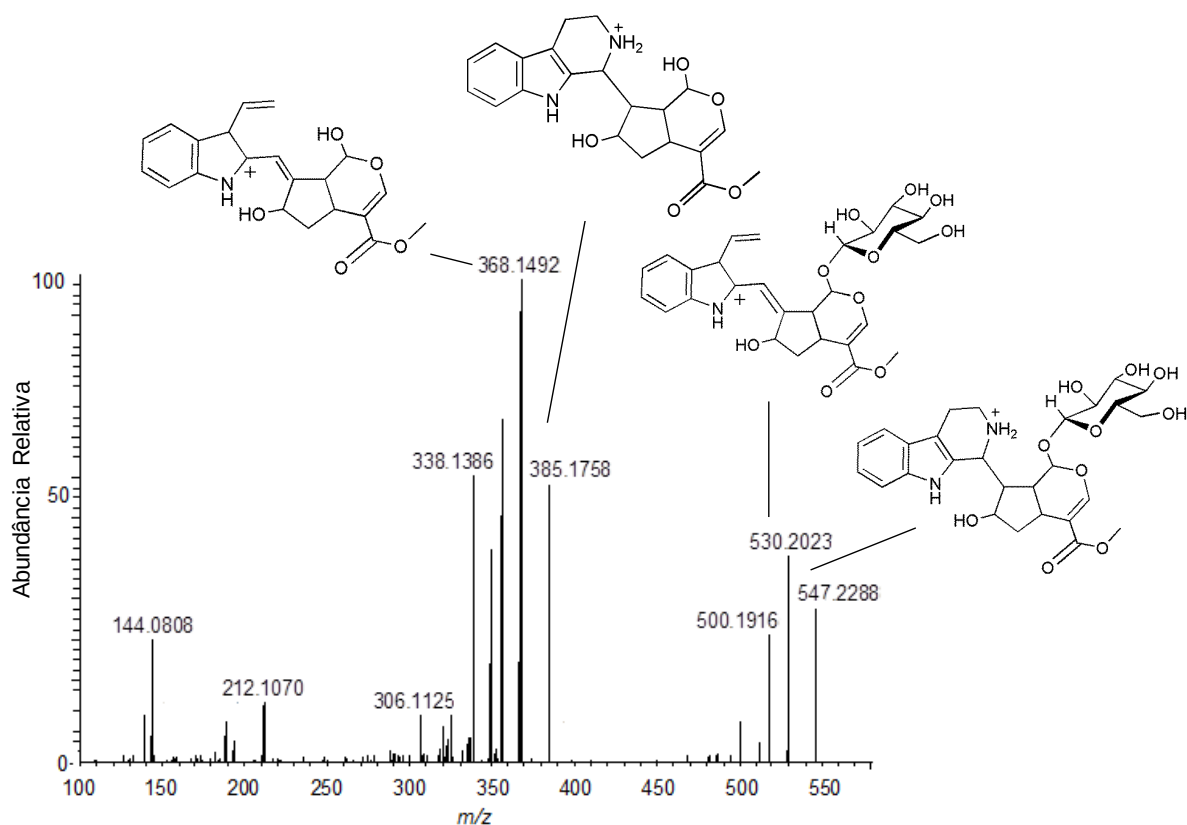


Figura 30. Espectro de HR-ESI-(+)-MS/MS do íon molecular protonado $[M+H]^+$ m/z 547,2288.

Como apresentado na Figura 31, a fragmentação provavelmente ocorre por meio de dois mecanismos principais: A e B. Segundo o mecanismo A, o íon molecular protonado $[M+H]^+$ m/z 547 inicialmente sofre uma clivagem induzida de uma das ligações de nitrogênio com carbono do anel β -carbólico não aromático, levando à formação de um carbocátion secundário. Na sequência, o ataque nucleofílico do nitrogênio da amina primária ao hidrogênio do carbono adjacente leva a formação de uma ligação dupla, seguida da perda neutra de amônia, gerando o fragmento de m/z 530. Em seguida, por meio de um rearranjo de hidrogênio glicosídico seguida da quebra heterolítica da ligação C21-O-C1', ocorre a perda da unidade glicosídica e formação do fragmento de m/z 368. Segundo o mecanismo B, ocorre a perda da unidade glicosídica diretamente do íon molecular protonado $[M+H]^+$ m/z 547 em um mecanismo semelhante à segunda etapa do A, levando à formação do fragmento de m/z 385.

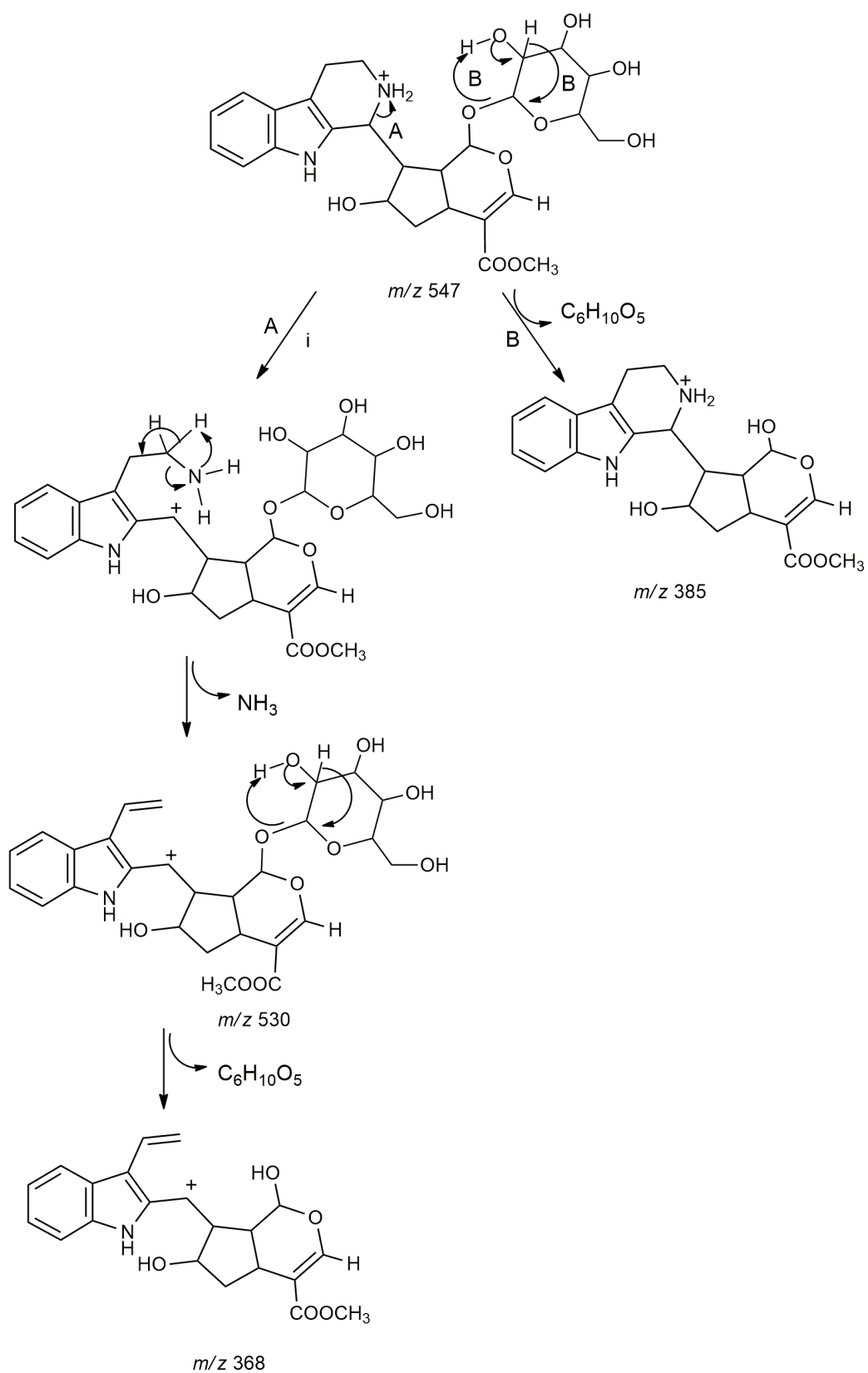


Figura 31. Proposta de mecanismo de fragmentação do alcaloide braquicerina. i: clivagem induzida.

O estudo da configuração relativa dos hidrogênios do anel loganínico foi realizado por análise das constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (KERBER *et al.*, 2001). A atribuição inequívoca dos valores das constantes de acoplamento dos sinais de H-18, H-19 e H-20 foi realizada por meio de simulações de espectros de RMN de ^1H utilizando o programa WinDNMR (REICH, 1995), que mostra a multiplicidade do sinal, dependendo do tipo de acoplamento, do valor da constante e do número de núcleos acoplados no sistema. Como pode ser observado na Figura 32, a simulação dos valores de constantes de acoplamento relatados em literatura para o sinal do hidrogênio H-20 (KERBER *et al.*, 2001), considerando um padrão de acoplamento de primeira ordem, resultou em padrão de multiplicidade igual ao observado no espectro de RMN de ^1H do composto **49**. Assim, as constantes do sinal de duplo duplo duplete de H-20 foram atribuídas como $J = 8,4, 8,2$ e $5,1$ Hz (Figura 32).

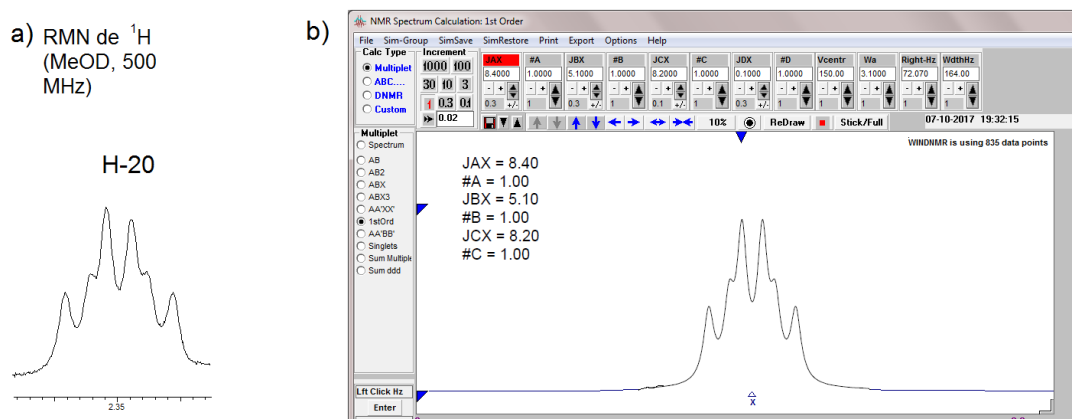


Figura 32. Comparação de espectro de RMN de ^1H do composto **49** para o sinal de hidrogênio a) H-20 com b) sua simulação de espectro.

Igualmente ao relatado em literatura (KERBER *et al.*, 2001), a atribuição da estereoquímica relativa dos carbonos C-3 e C-19 foi estabelecida como *trans*, com base na constante de acoplamento $J = 8,4$ Hz, que indica um ângulo de diedro próximo de 180° .

Já no caso da constante de acoplamento de H-18 e H-19, foi observado um padrão de acoplamento diferente do relatado em literatura (KERBER *et al.*, 2001), conforme pode ser observado na Figura 33 e 34, que mostram os sinais

no espectro de RMN de ^1H do composto **49** para H-18 e H-19 em 33a e 34a, respectivamente, e a simulação utilizando os valores de constantes de acoplamento atribuídos pela literatura em 33b e 34b (KERBER *et al.*, 2001) para braquicerina.

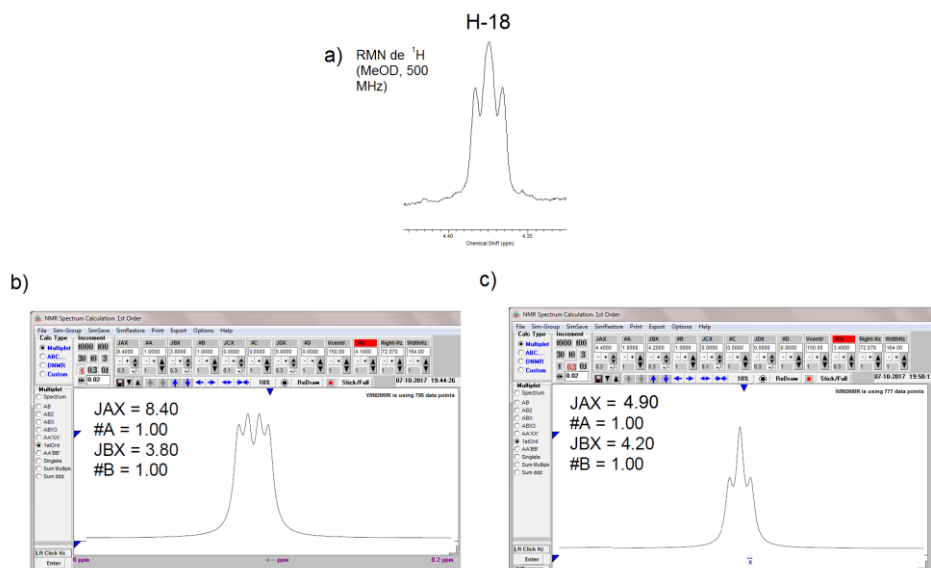


Figura 33. Comparação de a) espectro de RMN de ^1H do composto **49** para o sinal de hidrogênio H-18 com b) simulações de espectro baseado na literatura (KERBER *et al.*, 2001) e c) nova proposta.

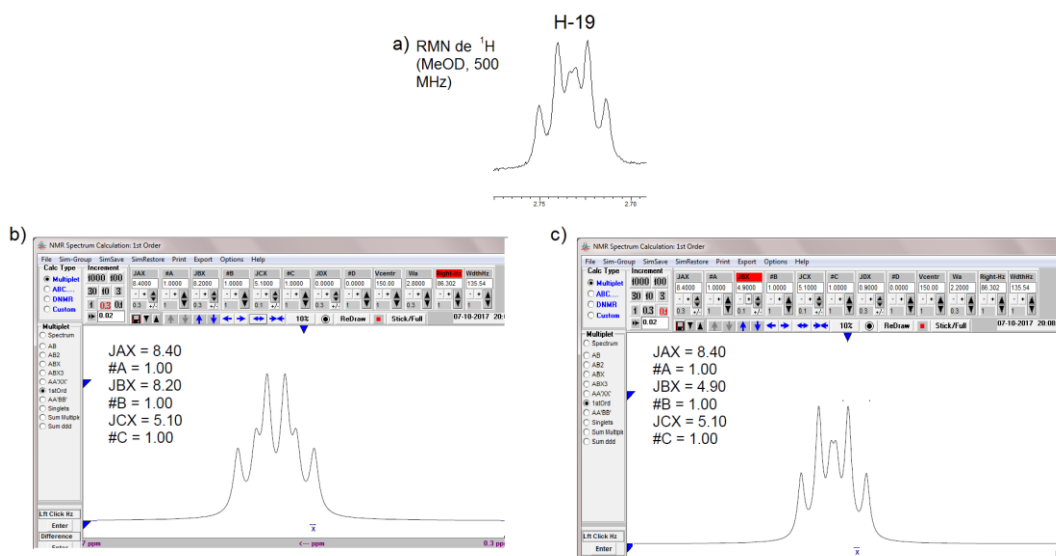


Figura 34. Comparação de a) espectro de RMN de ^1H do composto **49** para o sinal de hidrogênio H-19 com b) simulações de espectro baseado na literatura (KERBER *et al.*, 2001) e c) nova proposta.

Para a correta atribuição dos valores de constante de acoplamento,

foram feitas então simulações no programa Windnmr mudando esses valores até obter um padrão de acoplamento o mais semelhante possível com o observado experimentalmente. Os valores encontrados foram $J = 4,9$ e $4,2$ Hz para H-18 e $J = 8,4$, $5,1$ e $4,9$ Hz para H-19. Ao se comparar os sinais da literatura com os obtidos por simulação, observa-se uma mudança no valor da constante de $8,2$ para $4,2$ Hz, referente ao acoplamento entre H-18 e H-19, indicando uma estereoquímica *trans* de H-18 e H-19 para o composto **49** ao invés de *cis*, como na braquicerina. Portanto, o composto **49** foi identificado pela primeira vez como um epímero em C-18 do alcaloide braquicerina (Figura 35).

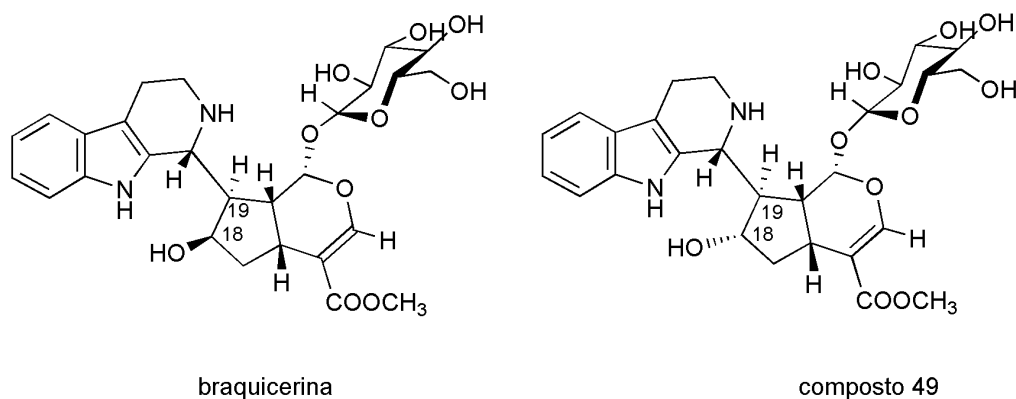


Figura 35. Estruturas do alcaloide braquicerina e do composto **49**.

Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com a literatura (KERBER *et al.*, 2001), o composto **49** foi identificado como 18-*epi*-braquicerina, inédito na literatura.

Os dados de RMN do composto **49** estão apresentados na Tabela 6.

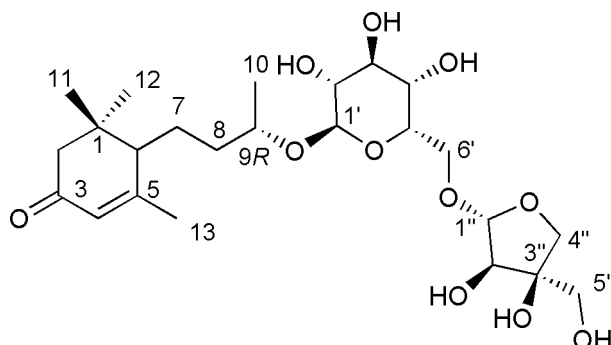
Estudos sobre a atividade biológica do alcaloide braquicerina indicam que ele possui atividade antimutagênica, antioxidante e de proteção da planta à radiação UV (do NASCIMENTO *et al.*, 2007; GREGIANINI *et al.*, 2003).

Tabela 6. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto **49** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 49			Braquicerina (KERBER <i>et al.</i> , 2001) ^a	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	129,4	-	130,7	-
3	53,2	4,81 (<i>d</i> , $J=8,4$ Hz, 1H)	54,7	4,78 (<i>d</i> , $J=8,2$ Hz, 1H)
5	40,4	3,68-3,73 (<i>m</i> , 1H) 3,40-3,48 (<i>m</i> , 1H)	41,8	3,69 (<i>d</i> , $J=5,8$ Hz, 1H) 3,40 (<i>m</i> , 1H)
6	19,4	2,96-3,04 (<i>m</i> , 1H)	24,4	2,98 (<i>m</i> , 1H)
7	106,9	-	108,3	-
8	126,1	-	127,7	-
9	118,2	7,47 (<i>ddd</i> , $J=7,7, 1,1, 0,8$ Hz, 1H)	118,9	7,45(<i>dd</i> , $J=7,7, 1,0$ Hz, 1H)
10	119,5	7,04 (<i>ddd</i> , $J=7,7, 7,0, 0,8$ Hz, 1H)	120,2	7,00 (<i>ddd</i> , $J=7,7, 7,4, 0,9$ Hz, 1H)
11	122,1	7,14 (<i>ddd</i> , $J=8,1, 7,0, 1,1$ Hz, 1H)	123,2	7,13 (<i>ddd</i> , $J=8,1, 7,4, 1,1$ Hz, 1H)
12	111,0	7,38 (<i>ddd</i> , $J=8,1, 0,8, 0,8$ Hz, 1H)	112,3	7,37 (<i>dd</i> , $J=8,1, 1,0$ Hz, 1H)
13	136,0	-	137,4	-
14	42,1	2,46 (<i>dd</i> , $J=13,2, 5,9$ Hz, 1H) 1,52 (<i>ddd</i> , $J=13,2, 13,2, 4,4$ Hz, 1H)	43,5	2,44 (<i>dd</i> , $J=13,2, 6,0$ Hz, 1H) 1,50 (<i>ddd</i> , $J=13,2, 12,7, 3,8$ Hz, 1H)
15	33,8	3,44 (<i>m</i> , 1H)	35,5	3,42 (<i>m</i> , 1H)
16	110,0	-	111,8	-
17	152,2	7,55 (<i>d</i> , $J=1,1$ Hz, 1H)	153,5	7,53 (<i>d</i> , $J=1,0$ Hz, 1H)
18	72,6	4,38 (<i>dd</i> , $J=4,9, 4,2$ Hz, 1H)	74,3	4,36 (<i>dd</i> , $J=8,2, 3,8$ Hz, 1H)
19	48,0	2,73 (<i>ddd</i> , $J=8,4, 5,1, 4,9$ Hz, 1H)	49,0	2,71 (<i>ddd</i> , $J=8,2, 8,2, 5,0$ Hz, 1H)
20	40,5	2,35 (<i>ddd</i> , $J=8,4, 8,2, 5,1$ Hz, 1H)	41,9	2,33 (<i>ddd</i> , $J=8,4, 8,2, 5,0$ Hz, 1H)
21	97,2	4,90 *	99,0	4,89 (<i>d</i> , $J=8,4$ Hz, 1H)
22	168,0	-	169,1	-
23	50,3	3,74 (<i>s</i> , 3H)	51,8	3,72 (<i>s</i> , 3H)
1'	99,5	4,72 (<i>d</i> , $J=8,1$ Hz, 1H)	100,6	4,70 (<i>d</i> , $J=8$ Hz, 1H)
2'	73,4	3,13-3,19 (<i>m</i>)	74,0	3,18 (<i>m</i>)
3'	70,0	3,36-3,40 (<i>m</i>)	71,1	3,38 (<i>m</i>)
4'	77,3	3,25-3,29 (<i>m</i>)	78,3	3,24 (<i>m</i>)
5'	76,7	3,36-3,40 (<i>m</i>)	77,7	3,36 (<i>m</i>)
6'	60,9	3,68-3,73 (<i>m</i>) 3,80-3,86 (<i>m</i>)	62,1	3,65 (<i>dd</i> , $J=12, 5,3$ Hz, 1H) 3,82 (<i>dd</i> , $J=12, 2,4$ Hz, 1H)

^a CD_3OD , 300 e 75 MHz. *sobrepuesto com sinal de solvente.

4.1.2.2. Bizantionosídeo C 9-O- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosídeo (guettardionosídeo) (50)



O composto **50** foi isolado na forma de um sólido incolor da fração butanólica das folhas, solúvel em metanol. A análise do espectro do composto **50** na região de infravermelho apresentou bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H (3422 cm^{-1}), de deformação axial de ligação C-H ($2923, 2853\text{ cm}^{-1}$), de estiramento de ligação C=O α,β -insaturada (1639 cm^{-1}) e de deformação angular de ligação C-O (1085 cm^{-1}). O espectro de massas HR-ESI-(+)-MS do composto **50** apresentou o íon aduto $[M+Na]^+$ em m/z 527,2462 com erro de -0,19 ppm, consistente com a fórmula molecular $C_{24}H_{40}O_{11}$. Seu espectro de massas ESI-(+)-MS/MS apresentou um fragmento de m/z 395,2039 $[M+Na-132]^+$ (erro de -0,25 ppm), correspondente a perda de uma pentose (Figura 36).

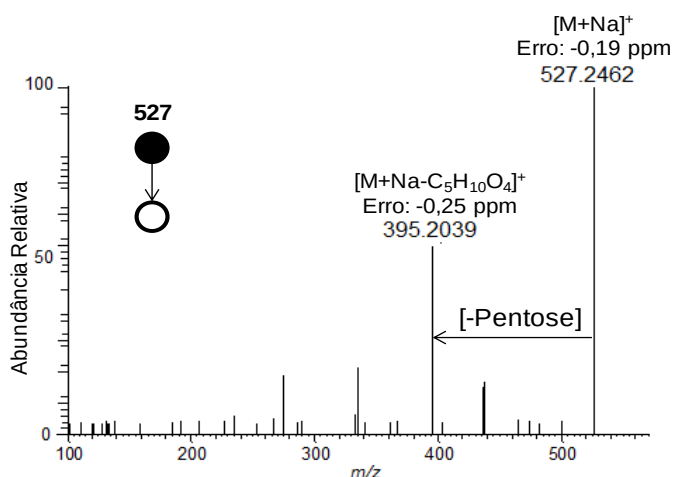


Figura 36. Espectro de HR-ESI-(+)-MS/MS do íon aduto $[M+Na]^+$ m/z 527,2462.

No espectro de RMN de ^1H do composto **50** foi observado um simpleto em δ_{H} 2,06 (3H, H-13), correlacionado a dois carbonos em δ_{C} 124,8 (C-4) e δ_{C} 170,0 (C-5) pelo mapa de HMBC, indicando a presença de uma ligação dupla substituída por uma metila. Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C , foi observada a presença de um sistema carbonílico α,β -insaturado em δ_{C} 202,1 (C-3), δ_{C} 124,8 (C-4) e δ_{C} 170,0 (C-5) e de quatro carbonos metílicos (δ_{C} 19,8, 28,7, 27,4 e 24,8). Pela multiplicidade dos sinais dos hidrogênios metílicos observados no espectro de RMN de ^1H e correlação no mapa de HMBC, foi atribuída a ligação de duas metilas a carbono quaternário, em δ_{C} 36,8 (C-1). No espectro de RMN de ^1H , também foi possível observar a presença de um quarteto de tripletos, em δ_{H} 3,83 ($J=6,1$, 6,1 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio oximetínico (H-9) (Figura 37), além de um sistema AB de metileno isolado em δ_{H} 1,97 (d , $J=17,3$ Hz, 1H) e δ_{H} 2,48 (d , $J=17,3$ Hz, 1H). Esse conjunto de sinais observados nos espectros de RMN é característico de um núcleo derivado de norisoprenoide, conhecido como megastimano (Figura 37).

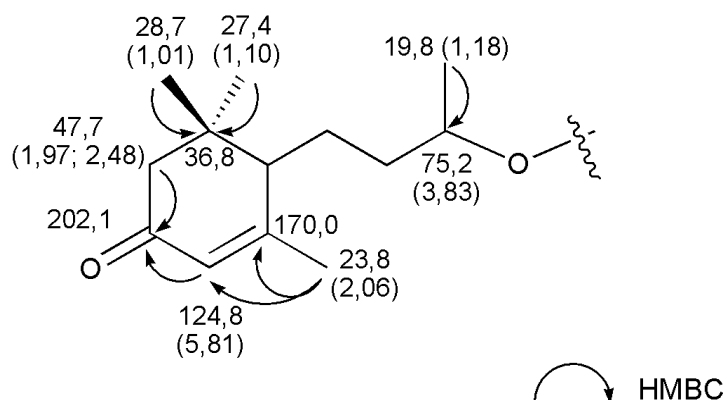


Figura 37. Sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H (este último, entre parênteses) do composto **50** e correlações de HMBC característicos da unidade megastimano.

Além disso, no espectro de RMN de ^1H , foram verificados dois dupletos em δ_{H} 4,30 ($J=7,6$ Hz, 1H, H-1') e 5,02 (d , $J=2,5$ Hz, 1H, H-1''), correlacionados aos carbonos anoméricos em δ_{C} 101,8 (C-1') e 110,5 (C-1'') pelo mapa de HSQC, respectivamente, indicando a presença de duas unidades de açúcar na estrutura. A análise dos acoplamentos *spin-spin* e deslocamentos químicos e pela comparação com os dados da literatura (CAI *et al.*, 2011) permitiram a identificação de uma unidade de glicose e de uma apiose terminal.

A presença da apiose é evidenciada pelo sinal de carbono anomérico (C-1'') com deslocamento químico relativamente mais alto que a da glicose (em torno de δ_C 110 ppm), juntamente com os sinais de hidrogênios diastereotópicos (H-4''), em δ_H 3,75 (*d*, $J= 11,2$ Hz, 1H) e 3,94 (*d*, $J= 11,2$ Hz, 1H) (Figura 38) e um simpleto em δ_H 3,56 (H-5). Os valores da constante de acoplamento do sinal de H-1' ($J= 7,6$ Hz) e de H-1'' ($J= 2,5$ Hz) são indicativos da configuração β para as unidades de açúcar. A ligação entre elas foi estabelecida como sendo apiofuranosil-(1'' $\rightarrow$ 6')-glicopiranosídeo devido à desblindagem de cerca de 6 ppm do carbono C-6' da glicose (δ_C 68,3), comparado ao da glicose livre (em torno de 60-62 ppm). Essa evidência foi confirmada pela análise do mapa de HMBC, que mostrou correlação entre os hidrogênios metilênicos H-6' da glicose com carbono anomérico C-1'' da apiose (δ_C 110,5) (Figura 39).

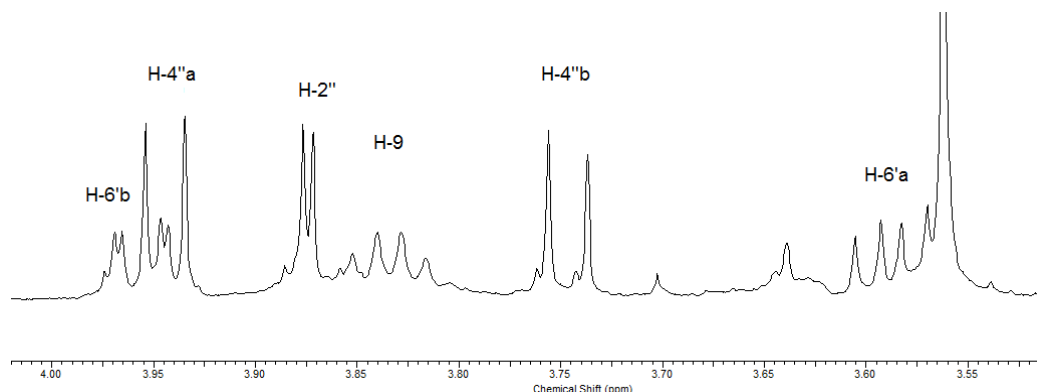


Figura 38. Expansão do espectro de RMN de ^1H , mostrando a região de hidrogênios ligados a oxigênio.

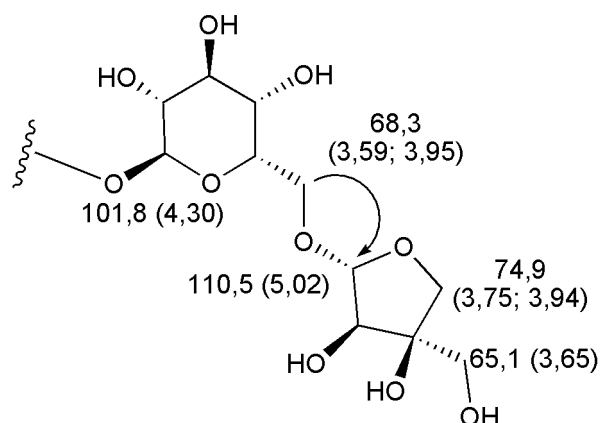


Figura 39. Sinais de RMN de ^{13}C e ^1H (entre parentêses) e correlação de HMBC entre as duas unidades de açúcar.

Por fim, a ligação da unidade glicosídica ao carbono C-9 da aglicona A foi atribuída com base na correlação do sinal de hidrogênio anomérico (H-1'), em δ_{H} 4,30, com o carbono em δ_{C} 75,2 (C-9).

As principais correlações observadas no mapa de HMBC de modo geral estão apresentadas na Figura 40.

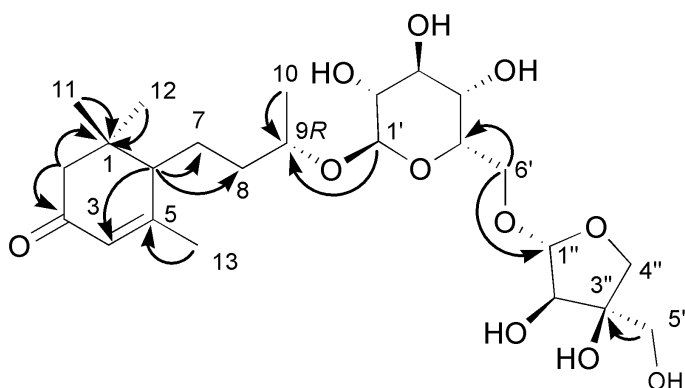


Figura 40. Principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto **50**.

A estereoquímica absoluta do carbono C-9 foi sugerida como 9R com base no seu deslocamento químico e de seus carbonos adjacentes (C-10 e C-1'), conforme regra empírica observada em revisão de Matsunami e colaboradores (2010). Segundo esse estudo, utilizando método de Mosher modificado, os compostos de configuração absoluta 9R apresentaram os deslocamentos químicos dos carbonos C-9, C-10 e C-1' em δ_{C} 75, 19 e 102 ppm, respectivamente, assim como observado para o composto **50**, enquanto

os de configuração 9S, em δ_c 77, 22 e 104 ppm, respectivamente.

Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com a literatura (CAI *et al.*, 2011; MATSUNAMI *et al.*, 2010), o composto **50** foi identificado como guettardionosídeo (bizantionosídeo B 9-O- β -D-apiofuranosil(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo ou (9*R*)-9-hidroximegastigman-4-en-3-ona 9-O- β -D-apiofuranosil(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo).

Os dados de RMN do composto **50** estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto **50** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 50			Guettardionosídeo ^a (CAI, <i>et al.</i> 2011)	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	36,8	-	37,4	-
2	47,7	1,97 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H) 2,48 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H)	48,2	1,97 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H) 2,47 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H)
3	202,1	-	202,6	-
4	124,8	5,81 (<i>sl</i> , 1H)	125,5	5,80 (<i>sl</i> , 1H)
5	170,0	-	170,3	-
6	52,0	1,98 – 2,01 (<i>m</i> , 1H)	52,5	1,99 (<i>m</i> , 1H)
7	26,8	1,59 – 1,66 (<i>m</i> , 2H) 2,00 – 2,05 (<i>m</i> , 1H)	26,9	1,51 (<i>m</i> , 1H) 2,00 (<i>m</i> , 1H)
8	37,5	1,59 – 1,66 (<i>m</i> , 2H)	37,8	1,62 (<i>m</i> , 2H)
9	75,2	3,83 (<i>qt</i> , $J=6,1, 6,1, 1\text{H}$)	75,9	3,87 (<i>qdd</i> , $J=6, 6, 6$ Hz, 1H)
10	19,8	1,18 (<i>d</i> , $J=6,1$ Hz, 3H)	20,2	1,18 (<i>d</i> , $J=6$ Hz, 3H)
11	28,7	1,01 (<i>s</i> , 3H)	29,1	1,01 (<i>s</i> , 3H)
12	27,4	1,10 (<i>s</i> , 3H)	27,6	1,09 (<i>s</i> , 3H)
13	24,8	2,06 (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz, 3H)	25,1	2,05 (<i>d</i> , $J=1$ Hz, 3H)
Glicose				
1'	101,8	4,30 (<i>d</i> , $J=7,6$ Hz, 1H)	102,4	4,29 (<i>d</i> , $J=8$ Hz, 1H)
2'	74,9	3,13 (<i>dd</i> , $J=9,3, 7,8$ Hz, 1H)	75,2	3,14 (<i>dd</i> , $J=9, 8$ Hz, 1H)
3'	77,6	3,35 – 3,40 (<i>m</i> , 1H)	78,2	3,34 (<i>dd</i> , $J=9, 9$ Hz, 1H)
4'	71,5	3,24 (<i>dd</i> , $J=9,7, 9,1$ Hz, 1H)	71,9	3,24 (<i>dd</i> , $J=10, 9$ Hz, 1H)
5'	76,7	3,37 (<i>ddd</i> , $J=9,7, 6,3, 1,7$ Hz, 1H)	77,1	3,38 (<i>ddd</i> , $J=10; 6; 2$ Hz, 1H)
6'	68,3	3,59 (<i>dd</i> , $J=13,1, 7,4$ Hz, 1H) 3,95 (<i>dd</i> , $J=13,1, 2,1$ Hz, 1H)	68,8	3,59 (<i>dd</i> , $J=12, 6$ Hz, 1H) 3,95 (<i>dd</i> , $J=12, 2$ Hz, 1H)
Apiose				
1''	110,5	5,02 (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz, 1H)	111,0	5,01 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)
2''	77,6	3,87 (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz, 1H)	78,1	3,90 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)
3''	80,2	-	80,5	-
4''	74,6	3,75 (<i>d</i> , $J=11,2$ Hz, 1H) 3,94 (<i>d</i> , $J=11,2$ Hz, 1H)	75,0	3,74 (<i>d</i> , $J=10$ Hz, 1H) 3,94 (<i>d</i> , $J=10$ Hz, 1H)
5''	65,1	3,56 (<i>s</i> , 2H)	65,6	3,56 (<i>s</i> , 2H)

^a CD_3OD , 400 e 100 MHz.

Além disso, foi observada a presença minoritária do derivado olefínico em C-7, o composto 3-oxo- α -ionol 9-O- β -D-apiofuranosil(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo ou isômero, evidenciada no espectro de HR-ESI(-)-MS pelos íons aduto $[M+Cl]^-$ em m/z 537,2112 (erro = -0,7 ppm) e $[M+HCOOH-H]^-$ em m/z 547,2399 (erro = -0,5 ppm), indicativos da fórmula molecular $C_{24}H_{38}O_{11}$. No espectro de RMN de ^1H , foram observados os sinais dos hidrogênios olefínicos H-7 e H-8, em δ 5,76 (dd, $J=15,4, 6,5$ Hz) e δ 5,64 (dd, $J=15,4, 8,4$ Hz) (Figura 41), respectivamente. O valor de constante de acoplamento entre H-7 e H-8 ($J=15,4$ Hz) é indicativo de uma ligação dupla do tipo *E*. Devido à baixa concentração desse composto na amostra, não foi possível observar as correlações de HMBC para atribuição inequívoca das unidades glicosídicas e suas posições.

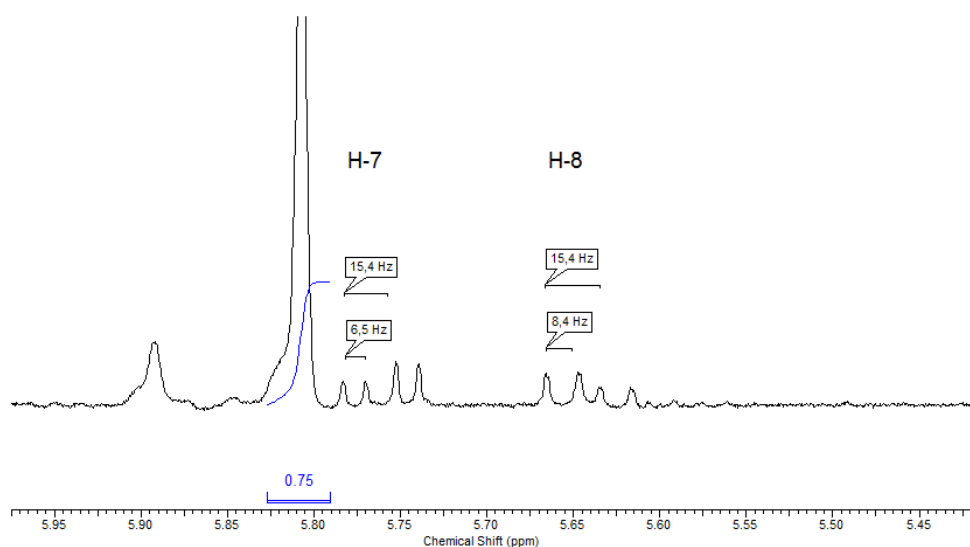


Figura 41. Expansão do espectro de RMN de ^1H evidenciando a presença do derivado olefínico em C-7 e C-8 do norisoprenoide guettardionosídeo.

Assim, com base na análise dos dados de RMN de ^1H e espectrometria de massas e comparação com a literatura (de TOMMASI *et al.*, 1996), o composto **51** (Figura 42) foi identificado como 3-oxo- α -ionol apiofuranosil-glicopiranosídeo.

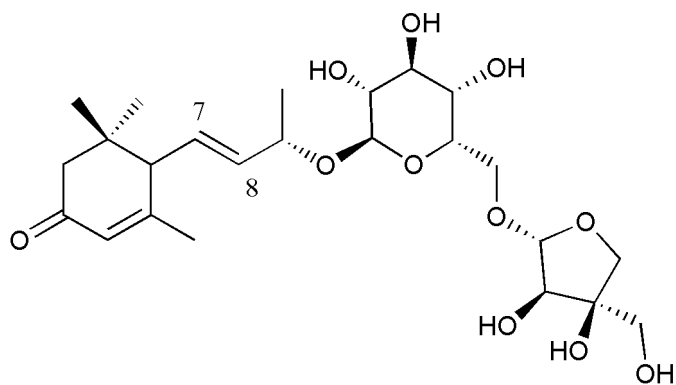
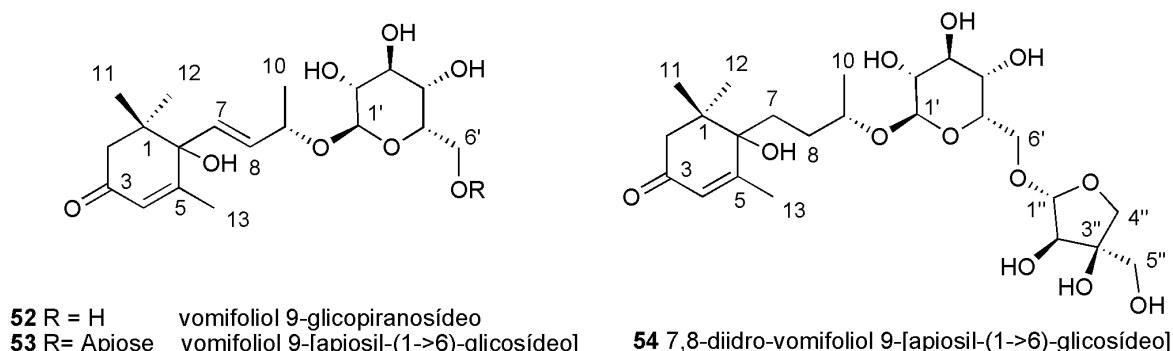


Figura 42. Estrutura química do norisoprenoide 3-oxo-a-ionol 9-apiofuranosil-(1'=> 6')-glicopiranosídeo, identificado em mistura com guettardionosídeo.

4.1.2.3. Derivados de α -ionol



A mistura de compostos **52-54**, solúvel em metanol, foi isolada na forma de um sólido amarelo da fração aquosa das folhas. O espectro de massas HR-ESI(-)-MS (Figura 43) apresentou os íons adutos $[M+Cl]^-$ em m/z 421,1631 (erro: +0,9 ppm) e $[M+HCOOH-H]^-$ em m/z 431,1924 (erro: -0,2 ppm), ambos consistentes com a fórmula molecular $C_{19}H_{30}O_8$. Já os íons adutos $[M+Cl]^-$ em m/z 553,2050 (erro: +1,6 ppm) e $[M+HCOOH-H]^-$ em m/z 563,2350 (erro: -0,8 ppm) são ambos consistentes com a fórmula molecular $C_{24}H_{38}O_{12}$. Por fim, o íon aduto $[M+HCOOH-H]^-$ em m/z 565,2506 (erro: -0,7 ppm) é consistente com a fórmula molecular $C_{24}H_{40}O_{12}$.

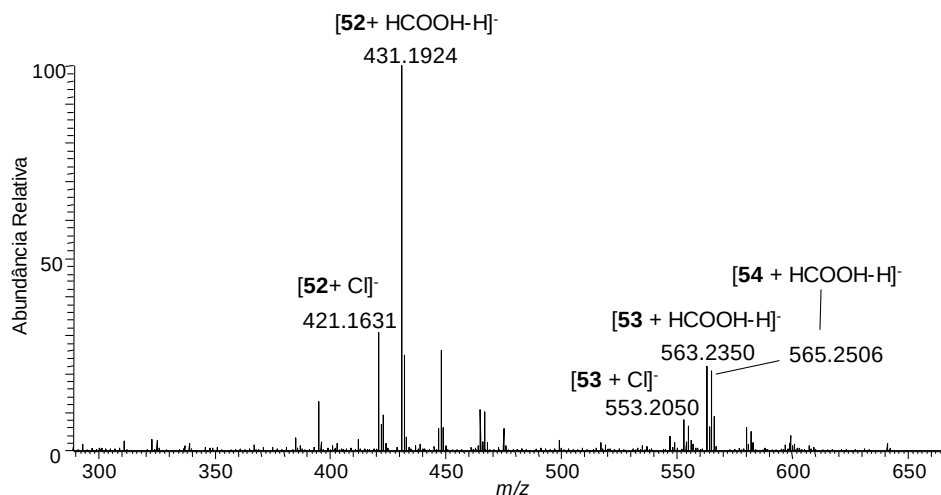


Figura 43. Espectro de HR-ESI(-)-MS da mistura de derivados de α -ionol.

Os espectros de massas ESI(-)-MS/MS dos íons m/z 431,1924 e m/z 565,2506 apresentaram fragmentos atribuídos a perda de ácido fórmico do aduto $[M-H-HCOOH]^-$, em m/z 385,1862 (erro= + 1,6 ppm) e em m/z 519, 2428

(erro= + 3,6 ppm), respectivamente. O espectro de massas ESI(-)-MS/MS do íon m/z 517,2293 apresentou fragmentos de m/z 385,1862 [M-Api-H]⁻ (erro= + 1,6 ppm), correspondente a perda de uma pentose, e de m/z 223,1332 [M-Api-Glu-H]⁻ (erro: + 3,6 ppm), correspondente a perda de uma pentose e de uma hexose.

No espectro de RMN de ^1H , foi observado o mesmo perfil de sinais do composto guettardionosídeo, exceto pelos sinais adicionais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,86-5,88 (m), atribuídos a H-7 e H-8 (Figura 44), correlacionados com sinais de carbono em δ_{C} 130,2 e δ_{C} 133,5, indicando a presença de uma dupla ligação adicional nas estruturas. Além disso, no espectro de RMN de ^{13}C , foi observado um sinal de carbono não hydrogenado ligado a oxigênio em δ_{C} 77,8, indicando a presença de uma hidroxila ligada ao carbono 6 da unidade megastimano (de TOMMASI *et al.*, 1996). Vale ressaltar que o deslocamento químico atribuído para esse carbono no trabalho de Tommasi (1996) de δ_{C} 50,4 não é compatível com a ligação de um heteroátomo nesse carbono.

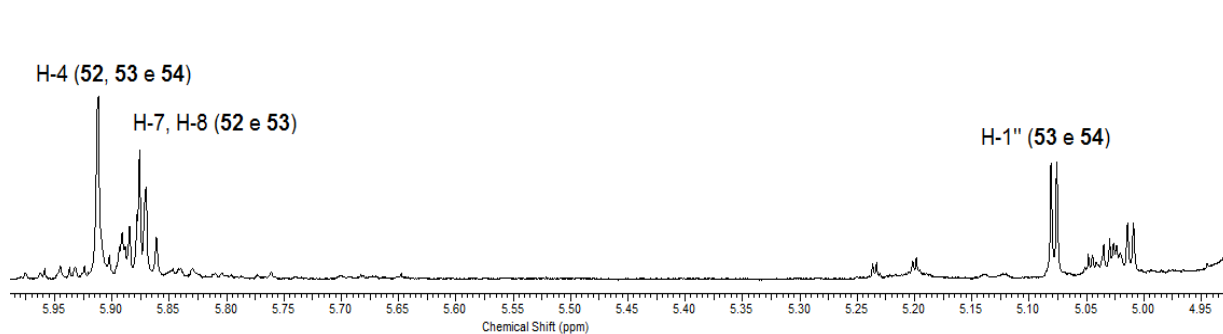


Figura 44. Expansão de espectro de RMN de ^1H de mistura de derivados de α -ionol.

Devido à sobreposição de sinais no espectro de RMN de ^1H , a determinação do número de compostos presentes na mistura foi realizada com base no espectro de massas que mostrou a presença de três fórmulas moleculares diferentes: $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_8$, $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$ e $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_{12}$. Essas fórmulas foram atribuídas aos compostos vomifoliol 9-O- β -D-glicopiranosídeo (**52**), vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**53**) e 7,8-diidro-vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**54**),

respectivamente, por busca de massa exata no banco de dados METLIN e análise dos sinais de RMN uni e bidimensionais.

A ligação entre as unidades foi proposta com base na análise do mapa de HMBC. Para o composto vomifoliol 9- O- β -D-glicopiranosídeo (**52**), a ligação da unidade glicosídica ao carbono C-9 da aglicona foi atribuída com base na correlação do sinal de hidrogênio anomérico (H-1'), em δ_H 4,34, com o carbono em δ_C 76,7 (C-9). Além disso, o valor da constante de acoplamento do sinal de H-1' ($J = 7,6$ Hz) é indicativo da configuração β para a unidade de glicose.

Para os compostos vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**53**) e 7,8-diidro-vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo (**54**), a ligação da unidade glicosídica ao carbono C-9 da aglicona foi atribuída com base na correlação do sinal de hidrogênio anomérico (H-1'), em δ_H 4,32, com o carbono em δ_C 74,4 (C-9). A ligação entre unidades glicosídicas foi estabelecida como sendo apiofuranosil-(1'' $\rightarrow$ 6')-glicopiranosídeo devido à desblindagem de cerca de 6 ppm do carbono C-6' da glicose (δ_C 68,4), comparado ao da glicose livre (em torno de 60-62 ppm), o que foi confirmado pela análise do mapa de HMBC, que mostrou correlação entre o hidrogênio H-1'' [δ 5,08 (d , $J = 2,35$ Hz)] da apiose com carbono metilênico C-6' (δ_C 68,4) da glicose. Os valores da constante de acoplamento do sinal de H-1' ($J = 7,6$ Hz) e de H-1'' ($J = 2,5$ Hz) são indicativos da configuração β para as duas unidades de açúcar.

Assim, baseado na análise dos dados de espectrometria de massas, de RMN uni e bidimensionais, e comparação com a literatura (de TOMMASI *et al.*, 1996), os derivados de α -ionol foram identificados como vomifoliol 9-O- β -D-glicopiranosídeo (**52**), vomifoliol 9-[apiofuranosil-(1,6)-glicosídeo] (**53**) e 7,8-diidro-vomifoliol 9-[apiofuranosil-(1,6)-glicosídeo] (**54**). Os dados de RMN estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 8. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto **52** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 52			Vomifoliol 9-glicopiranosídeo ^a (de TOMMASI <i>et al.</i> , 1996)	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	42,6	-	43,0	-
2	50,0	2,59 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H) 2,15 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H)	50,4	2,55 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H) 2,20 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H)
3	199,8	-	201,1	-
4	126,5	5,91 (<i>sl</i> , 1H)	126,9	5,90 (<i>sl</i> , 1H)
5	167,5	-	168,0	-
6	77,8	-	50,4	-
7	131,2	5,88 (<i>m</i> , 1H)	131,2	5,92 (<i>m</i> , 1H)
8	134,6	5,88 (<i>m</i> , 1H)	135,0	5,95 (<i>m</i> , 2H)
9	76,7	4,42 (<i>q</i> , $J=6,4$ Hz, 1H)	77,0	4,45 (<i>q</i> , $J=6, 6, 6$ Hz, 1H)
10	20,3	1,30 (<i>d</i> , $J=6,4$ Hz, 3H)	20,9	1,32 (<i>d</i> , $J=6$ Hz, 3H)
11	22,5	1,04 (<i>s</i> , 3H)	19,3	1,05 (<i>s</i> , 3H)
12	23,4	1,03 (<i>s</i> , 3H)	24,4	1,05 (<i>s</i> , 3H)
13	19,3	1,95 (<i>d</i> , $J=1,3$ Hz, 3H)	23,2	1,95 (<i>d</i> , $J=1,5$ Hz, 3H)
Glicose				
1'	102,5	4,34 (<i>d</i> , $J=7,9$ Hz, 1H)	102,7	4,52 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz, 1H)
2'	74,7	3,12-3,18 (<i>m</i> , 1H)	75,3	3,31 (<i>dd</i> , $J=7,5, 9,5$ Hz, 1H)
3'	77,6	3,32 – 3,42 (<i>m</i> , 1H)	78,3	3,42 (<i>dd</i> , $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H)
4'	71,3	3,20 – 3,30 (<i>m</i> , 1H)	71,9	3,34 (<i>dd</i> , $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H)
5'	77,6	3,20 – 3,30 (<i>m</i> , 1H))	78,8	3,28 (<i>m</i> , 1H)
6'	62,5	3,60 - 3,90 (<i>m</i> , 1H)	62,6	3,60 (<i>dd</i> , $J=12, 5$ Hz, 1H) 3,80 (<i>dd</i> , $J=12, 3,5$ Hz, 1H)

^a CD_3OD , 500 e 125 MHz.

Tabela 9. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto **53** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 53			Vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil-(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo ^a (de TOMMASI <i>et al.</i> , 1996)	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	42,6	-	43,0	-
2	50,0	2,59 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H) 2,15 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H)	50,4	2,55 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H) 2,20 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H)
3	199,8	-	201,1	-
4	126,5	5,91 (<i>sl</i> , 1H)	126,9	5,90 (<i>sl</i> , 1H)
5	167,5	-	168,0	-
6	77,8	-	50,4	-
7	131,2	5,88 (<i>m</i> , 1H)	131,2	5,92 (<i>m</i> , 1H)
8	134,6	5,88 (<i>m</i> , 1H)	135,0	5,95 (<i>m</i> , 2H)
9	76,7	4,42 (<i>q</i> , $J=6,4$ Hz, 1H)	77,0	4,45 (<i>q</i> , $J=6, 6, 6$ Hz, 1H)
10	20,3	1,30 (<i>d</i> , $J=6,4$ Hz, 3H)	20,9	1,32 (<i>d</i> , $J=6$ Hz, 3H)
11	22,5	1,04 (<i>s</i> , 3H)	19,3	1,05 (<i>s</i> , 3H)
12	23,4	1,03 (<i>s</i> , 3H)	24,4	1,05 (<i>s</i> , 3H)
13	19,3	1,95 (<i>d</i> , $J=1,3$ Hz, 3H)	23,2	1,95 (<i>d</i> , $J=1,5$ Hz, 3H)
Glicose				
1'	102,5	4,34 (<i>d</i> , $J=7,9$ Hz, 1H)	102,7	4,53 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz, 1H)
2'	74,7	3,12-3,18 (<i>m</i> , 1H)	75,4	3,31 (<i>dd</i> , $J=7,5, 9,5$ Hz, 1H)
3'	77,6	3,32 – 3,42 (<i>m</i> , 1H)	78,2	3,42 (<i>dd</i> , $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H)
4'	71,3	3,20 – 3,30 (<i>m</i> , 1H)	71,9	3,34 (<i>dd</i> , $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H)
5'	77,6	3,20 – 3,30 (<i>m</i> , 1H))	78,3	3,28 (<i>m</i> , 1H)
6'	68,4	3,58 - 3,62 (<i>m</i> , 1H) 3,92 – 4,00 (<i>m</i> , 1H)	68,7	3,60 (<i>dd</i> , $J=12,0, 3,0$ Hz, 1H) 4,00 (<i>dd</i> , $J=12,0, 5,0$ Hz, 1H)
Apiose				
1''	110,5	5,08 (<i>d</i> , $J=2,35$ Hz, 1H)	110,5	5,01 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)
2''	77,1	3,87 (<i>d</i> , $J=2,35$ Hz, 1H)	77,1	3,91 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)
3''	79,0	-	80,6	-
4''	74,9	3,76 (<i>d</i> , $J=9,6$ Hz, 1H) 3,95 (<i>d</i> , $J=9,6$ Hz, 1H)	75,2	3,74 (<i>d</i> , $J=10$ Hz, 1H) 4,02 (<i>d</i> , $J=10$ Hz, 1H)
5''	65,1	3,57 (<i>s</i> , 2H)	65,9	3,58 (<i>s</i> , 2H)

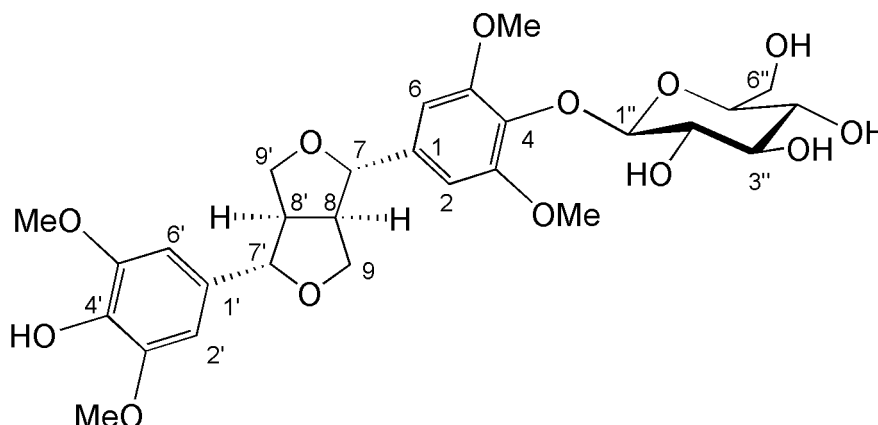
^a CD_3OD , 500 e 125 MHz.

Tabela 10. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C (via HSQC) e HMBC do composto **54** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 54			7,8-Diidro-vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil-(1'' $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo ^a (de TOMMASI <i>et al.</i> , 1996)	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	43,0	-	43,1	-
2	50,0	2,59 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H) 2,15 (<i>d</i> , $J=17,3$ Hz, 1H)	50,4	2,90 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H) 2,20 (<i>d</i> , $J=17$ Hz, 1H)
3	199,8	-	201,1	-
4	126,5	5,91 (<i>sl</i> , 1H)	126,6	5,87 (<i>sl</i> , 1H)
5	167,5	-	168,1	-
6	78,3	-	79,2	-
7	37,3	1,74 (<i>m</i> , 1H)	38,1	1,50 (<i>ddd</i> , $J=12,0, 4,5, 3,0$ Hz, 1H) 1,95 (<i>ddd</i> , $J=12,0, 6,0, 5,0$ Hz, 1H)
8	26,2	2,17-2,19 (<i>m</i> , 2H)	26,5	1,60 (<i>m</i> , 1H) 1,85 (<i>m</i> , 1H)
9	74,4	4,11 (<i>m</i> , 1H)	78,3	4,15 (<i>m</i> , 1H)
10	20,6	1,25 (<i>d</i> , $J=6,2$ Hz, 3H)	21,2	1,35 (<i>d</i> , $J=7$ Hz, 3H)
11	21,8	1,05 (<i>s</i> , 3H)	19,3	1,08 (<i>s</i> , 3H)
12	20,9	1,10 (<i>s</i> , 3H)	24,5	1,10 (<i>s</i> , 3H)
13	19,3	1,95 (<i>d</i> , $J=1,3$ Hz, 3H)	23,2	1,90 (<i>d</i> , $J=1,5$ Hz, 3H)
Glicose				
1'	102,5	4,34 (<i>d</i> , $J=7,9$ Hz, 1H)	104,5	4,52 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz, 1H)
2'	74,7	3,12-3,18 (<i>m</i> , 1H)	75,1	3,48 (<i>dd</i> , $J=7,5, 9,5$ Hz, 1H)
3'	77,6	3,32 – 3,42 (<i>m</i> , 1H)	78,3	3,40 (<i>dd</i> , $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H)
4'	71,3	3,20 – 3,30 (<i>m</i> , 1H)	71,9	3,34 (<i>dd</i> , $J=9,5, 9,5$ Hz, 1H)
5'	77,6	3,20 – 3,30 (<i>m</i> , 1H))	78,3	3,28 (<i>m</i> , 1H)
6'	68,4	3,58 - 3,62 (<i>m</i> , 1H) 3,92 – 4,00 (<i>m</i> , 1H)	68,6	3,63 (<i>dd</i> , $J=12,0, 3,0$ Hz, 1H) 4,01 (<i>dd</i> , $J=12,0, 5,0$ Hz, 1H)
Apiose				
1''	110,5	5,08 (<i>d</i> , $J=2,35$ Hz, 1H)	110,5	5,01 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)
2''	77,1	3,87 (<i>d</i> , $J=2,35$ Hz, 1H)	77,1	3,92 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)
3''	79,0	-	80,5	-
4''	74,9	3,76 (<i>d</i> , $J=9,6$ Hz, 1H) 3,95 (<i>d</i> , $J=9,6$ Hz, 1H)	75,2	3,74 (<i>d</i> , $J=10$ Hz, 1H) 4,02 (<i>d</i> , $J=10$ Hz, 1H)
5''	65,1	3,57 (<i>s</i> , 2H)	65,9	3,58 (<i>s</i> , 2H)

^a CD_3OD , 500 e 125 MHz.

4.1.2.4. Siringaresinol 4-β-D-glicosídeo (55)



O composto **55**, solúvel em metanol, foi isolado da fração clorofórmica básica dos galhos na forma de um sólido amorfo incolor e apresentou fluorescência azul sob luz UV (365 nm). O espectro de massas HR-ESI(-)-MS do composto **55** (Figura 45a) apresentou um sinal de m/z 579,2089 $[M-H]^-$, consistente com a fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_{13}$ (erro: -1,03 ppm). Os adutos $[M+Cl]^-$ e $[M+HCOOH-H]^-$ de m/z 615,1857 (erro: -1,11 ppm) e 625,2147 (erro: -1,44 ppm), respectivamente, também foram observados (Figura 45a). Seu espectro de massas ESI(-)-MS/MS apresentou um fragmento de m/z 417,1557 (erro de +1,7 ppm), indicando a perda de uma unidade glicosídica (Figura 45b).

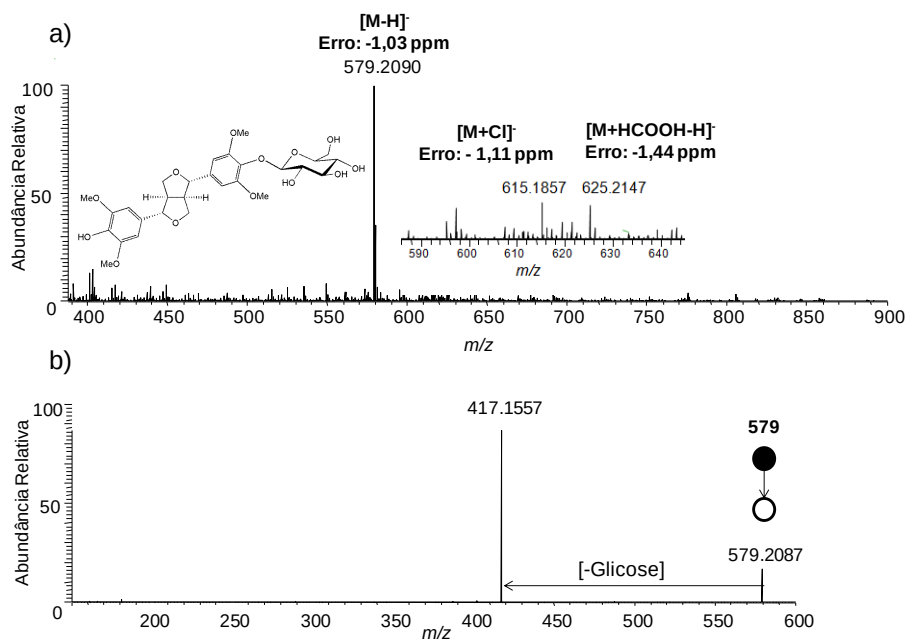


Figura 45. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto **55**.

No espectro de RMN de ^1H do composto **55**, foram observados quatro sinais de simpletos (Figura 46): dois em δ_{H} 6,72 (2H) e 6,64 (2H), pertencentes a anel aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído; e dois em δ_{H} 3,76 (6H) e 3,78 (6H), indicando a presença de quatro metoxilas; além de um sinal de hidrogênio anomérico (H-1'') em δ_{H} 4,82, característico de uma unidade de açúcar.

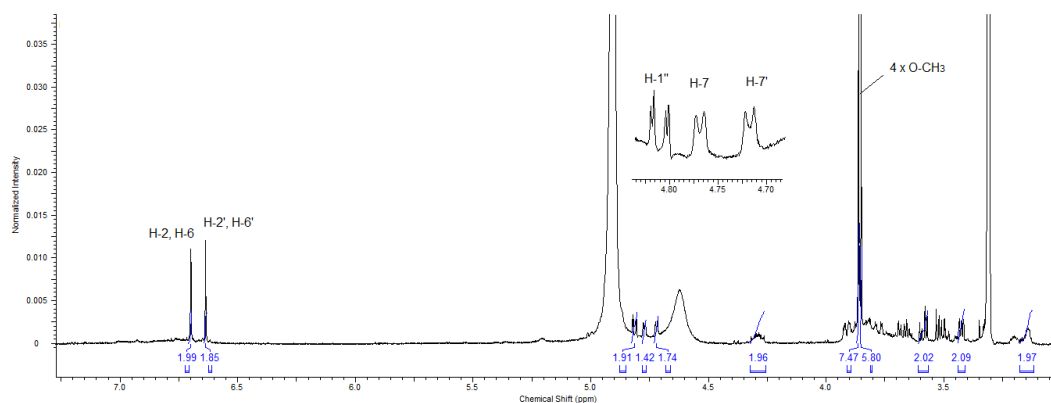


Figura 46. Expansão de espectro de RMN de ^1H do composto **55**.

No espectro de RMN ^{13}C foram observados sinais referentes a dois carbonos oximetilênicos em δ_{C} 72,9 e 73,0, 2 oximetínicos em δ_{C} 87,2 e 87,6 e dois metínicos em δ_{C} 55,5 e 55,7, característico de anel bis-tetrahydrofurano. As correlações observadas no mapa de HMBC entre os sinais de H-7 (δ_{H} 4,77) e

C-1 (δ_C 139,5) e entre H-7' (δ_H 4,72) e C-1' (δ_C 132,9) indicaram a ligação dos anéis aromáticos nos carbonos C-7 e C-7' do anel bis-tetrahidrofurano.

A análise combinada do espectro de ^{13}C e dos mapas HSQC e HMBC indicou a presença de uma unidade de glicose, cuja posição foi atribuída com base na correlação observada entre H-1'' (δ_H 4,81) e C-4 (δ_C 135,7), indicando a ligação da glicose em C-4. A configuração da glicose foi atribuída como β , com base no valor da constante de acoplamento de H-1'' ($J=7,8$ Hz).

A atribuição da estereoquímica relativa do anel central da lignana foi realizada a partir da análise dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios do anel e comparação com a literatura. Para os anéis 3,7-dioxobiciclo[3.3.0] octano com substituintes em C-7 e C-7', há três possibilidades de formas estereoquímicas apresentadas na Figura 47 (AGRAWAL e THAKUR, 2005).

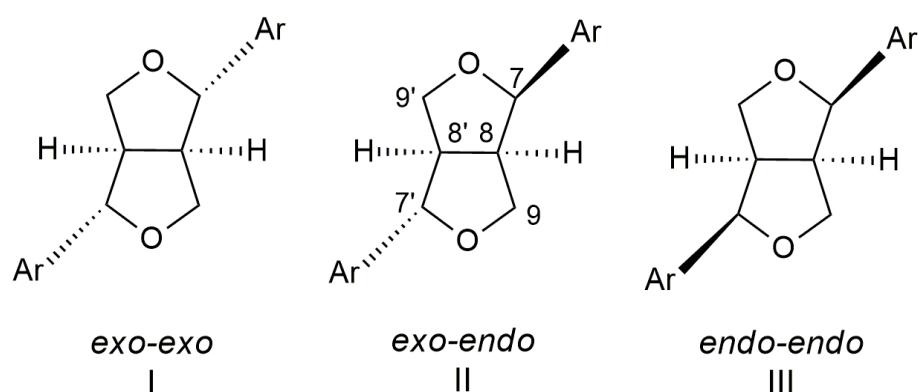


Figura 47. Possíveis estereoquímicas do anel tipo 3,7-dioxabicyclo[3.3.0] octano de lignanas.

De acordo com Tabela 11, os sinais de RMN de ^1H de H-8 e H-8' apresentaram mesmo deslocamento químico (δ_H 3,12-3,18), indicando tratar-se de um composto simétrico tais como as configurações (I) ou (III). No caso da configuração II, seria observada uma diferenciação entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-8 e H-8', assim como dos hidrogênios H-7 e H-7', devido a assimetria gerada pelo posicionamento dos anéis aromáticos em faces opostas do biciclo, resultando em uma diferença de campo magnético induzido sentido pelos hidrogênios por anisotropia diamagnética. Dessa forma, a opção II como configuração para o composto **55** foi excluída. Por fim, a

estereoquímica do composto **55** foi estabelecida como sendo do tipo *exo-exo* (diequatorial) (I) com base nos deslocamentos dos carbonos C-7/C-7', C-8/C-8' e C-9/C-9' que foram observados em δ_C 87,6/87,2, 55,7/55,5 e 73,0/72,9 ppm, característicos desse tipo de configuração (AGRAWAL e THAKUR, 2005). Para a configuração *endo-endo* (diaxial) há apenas um relato na literatura e foi verificada uma diminuição de cerca de 5 ppm para os deslocamentos dos carbonos C-7/C-7', C-8/C-8' e C-9/C-9', observados em δ_C 83,9, 49,5 e 68,7 ppm, respectivamente (RAO, 1978 *in* AGRAWAL e THAKUR, 2005).

As principais correlações observadas no mapa de HMBC para o composto estão apresentadas nas Figuras 48 e 49.

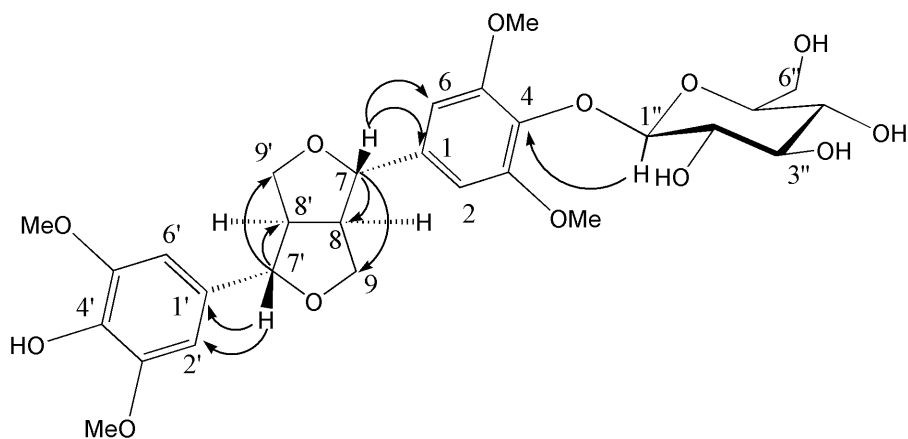


Figura 48. Principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto **55**.

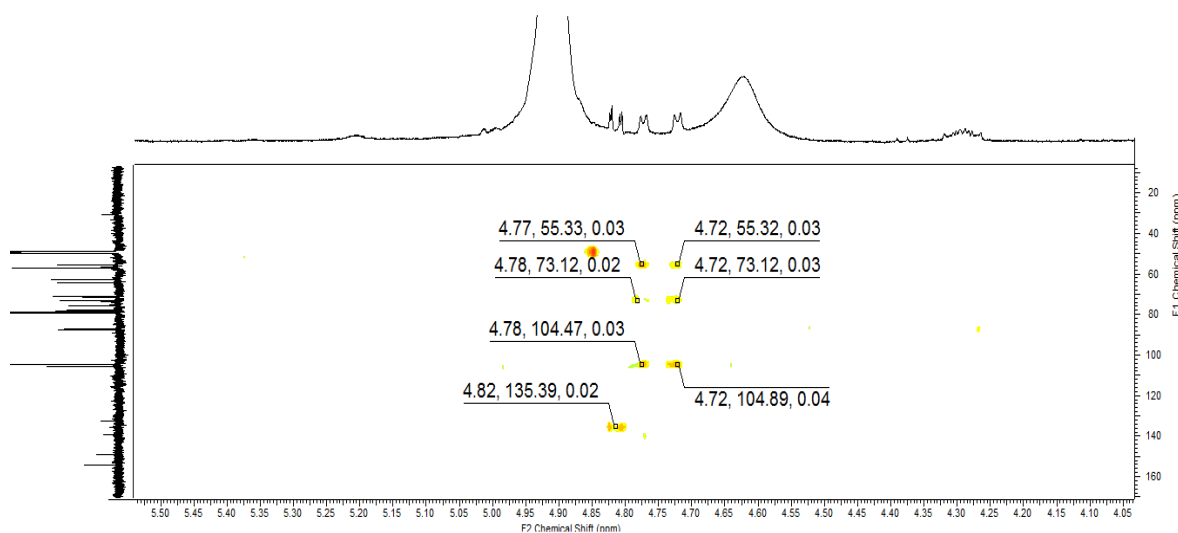


Figura 49. Expansão do mapa de HMBC (CD_3OD) do composto **55** evidenciando as correlações principais.

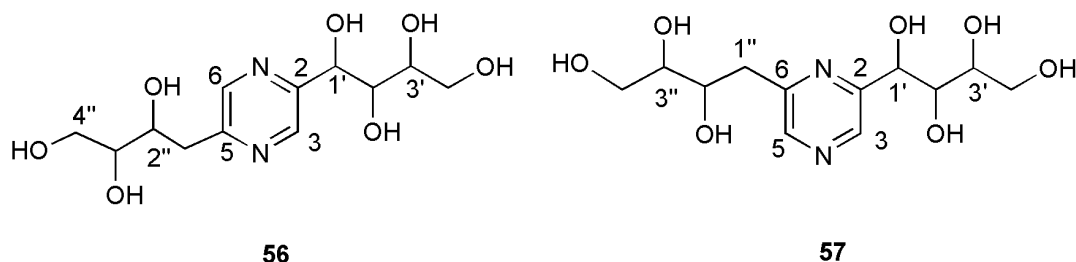
Desta forma, o composto **55** foi identificado por meio da análise dos dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura (SHAHAT *et al.*, 2004) como sendo o siringaresinol-4- β -D-glicosídeo.

Tabela 11. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **55** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 55				Siringaresinol -4'- β -D- glicosídeo ^a (SHAHAT <i>et al.</i> , 2004) $\delta^{13}\text{C}$
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	
1	139,5	-		139,62
2	104,8	6,72 (s, 2H)	C-3; C-1; C-4; C-7	104,96
3	154,4	-		154,49
4	135,7	-		135,72
5	154,4	-		154,49
6	104,8	6,72 (s, 2H)	C-3; C-1; C-4; C-7	104,96
7	87,6	4,77 (d, $J=4,2$ Hz, 1H)	C-6; C-1; C-9; C-8	87,26
8	55,5	3,12-3,18 (m)		55,57
9	72,9	3,89-3,93 (m)		72,93
		4,26-4,32 (m)		
1'	132,9	-		133,17
2'	104,5	6,64 (s, 2H)	C-3'; C-1'; C-4'; C-7'	104,66
3'	149,4	-		149,44
4'	135,7	-		136,35
5'	149,4	-		149,44
6'	104,5	6,64 (s, 2H)	C-3'; C-1'; C-4'; C-7'	104,66
7'	87,2	4,72 (d, $J=4,6$ Hz, 1H)	C-2'; C-9'; C-8'	87,65
8'	55,7	3,12-3,18 (m)		55,78
9'	73,0	3,89-3,93 (m)		72,99
		4,26-4,32 (m)		
O-	57,0	3,78 (s, 6H)		56,90
CH3	57,2	3,76 (s, 6H)		57,16
Glicose				
1"	105,6	4,81 (dd, $J=7,8, 1,6$ Hz, 1H)	C-4	105,43
2"	75,7	3,51 (m)		75,78
3"	77,8	3,45 (m)		77,90
4"	71,3	3,45 (m)		71,43
5"	78,3	3,22 (m)		78,40
6"	62,6	3,67 (dd, $J=12,2, 5,0$ Hz, 1H)		62,67
		3,80 (dd, $J=12,2, 2,3$ Hz, 1H)		

^a CD_3OD , 100 MHz.

4.1.2.5. 2,5-Desoxifructosazina (56) e 2,6-desoxifructosazina (57)



A mistura de compostos **56** e **57**, solúvel em DMSO, foi obtida da fração aquosa dos galhos. A análise do espectro na região de infravermelho apresentou bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H (3372 cm^{-1}), de estiramento de ligação C=C de anel aromático (1600 e 1396 cm^{-1}) e de deformação angular de ligação C-O (1078 cm^{-1}). O espectro de massas HR-ESI-(+)-MS da amostra (Figura 50a) apresentou um pico $[M+H]^+$ de m/z 305,1339, consistente com a fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_2O_7$ (erro: +1,31 ppm). O aduto $[M+Na]^+$ de m/z 327,1158 (erro: +1,22 ppm) também foi observado (Figura 50a). Seu espectro de massas ESI-(+)-MS/MS apresentou fragmentos resultantes de sucessivas perdas de água (Figura 50b). A comparação do espectro de massas com a literatura (WANG *et al.*, 2015) permitiu a identificação do composto como pertencente à classe das pirazinas e duas estruturas (**56** e **57**) são consistentes com a fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_2O_7$. Assim, para identificar a correta estrutura do composto foi realizada também a análise de ressonância magnética nuclear.

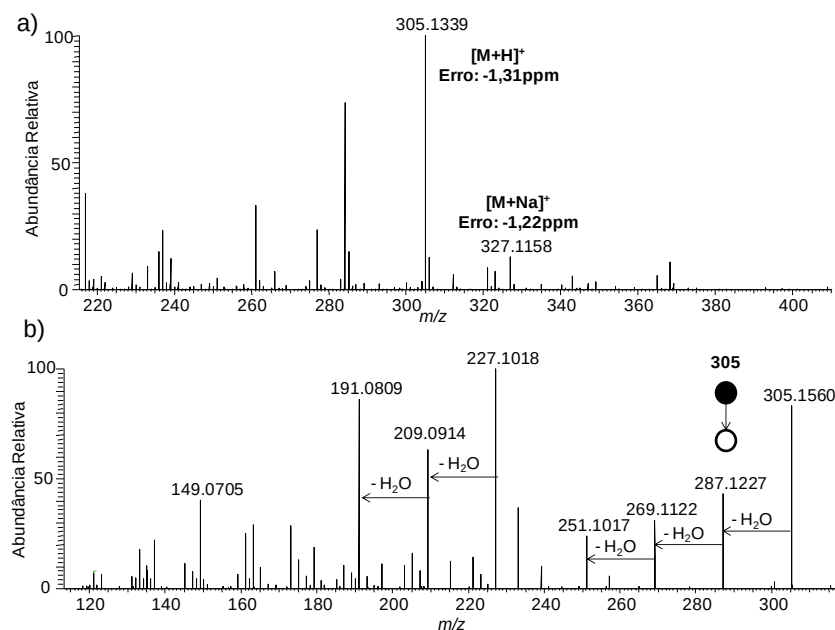


Figura 50. a) Espectro de massas HR-ESI-(+)-MS e b) HR-ESI-(+)-MS/MS da mistura de compostos **56** e **57**.

No espectro de RMN de ^1H , foram observados dois pares de sinais característicos de hidrogênios de anéis aromáticos *para*-substituídos em δ_{H} 8,53 (s, 1H, H) e 8,32 (s, 1H); e *meta*-substituídos em δ_{H} 8,62 (*d*, $J=1,1$ Hz, 1H) e 8,39 (*d*, $J=1,1$ Hz, 1H) (Figura 51). Esses sinais apresentaram correlação no mapa de HSQC com os sinais de carbonos em δ_{C} 140,6, 142,9, 142,4 e 143,4, respectivamente, e no mapa de HMBC com os carbonos em δ_{C} 157,9, 154,0, 155,9, 153,3. Esse conjunto de sinais é característico de anel heterocíclico de pirazina. A presença dos dois padrões de acoplamento no espectro de RMN de ^1H (hidrogênios *meta* e *para*) é indicativa da presença de ambas as estruturas propostas: 2,5-desofructosazina e 2,6-desofructosazina.

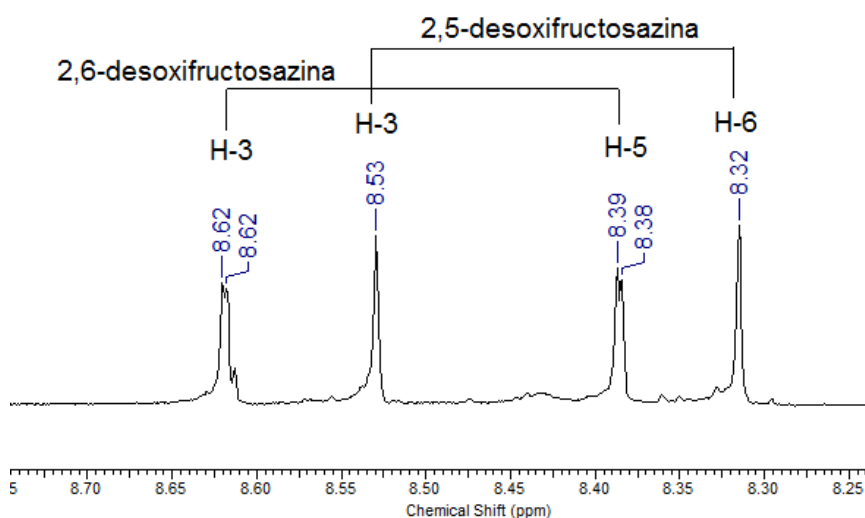


Figura 51. Expansão do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) mostrando os sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos da mistura de pirazinas.

Além disso, no espectro de RMN de ^1H , destacam-se os sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,05 (*dd*, $J= 14,0$ e $2,5$ Hz, 2H, H-1'') e δ_{H} 2,72 (*dd*, $J= 14,0$ e $9,5$ Hz, 2H, H-1'') (Figura 52) e do sinal de hidrogênio oximetínico em δ_{H} 4,94 (*sl*, 2H, H-1'). Também foi observado um envelope de sinais sobrepostos na região entre δ_{H} 3,33-3,78, atribuídos aos sinais de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos da cadeia lateral.

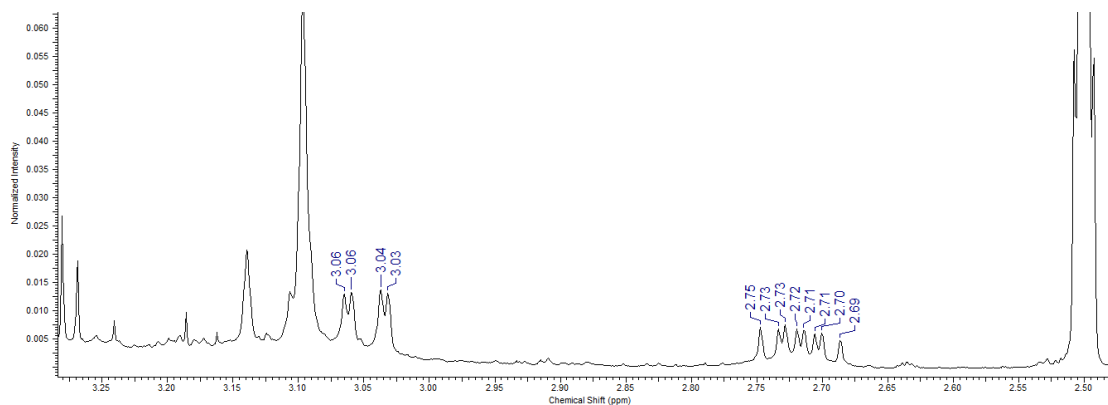


Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) mostrando os sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-1'.

Os dados de RMN estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Assim, por comparação dos dados espectrais de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas com dados da literatura (LONG *et*

al., 2011; WANG *et al.*, 2015), a mistura de compostos **56** e **57** foi identificada como 2,5-desofructosazina e 2,6-desofructosazina.

Tabela 12. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **56** (DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz, ppm).

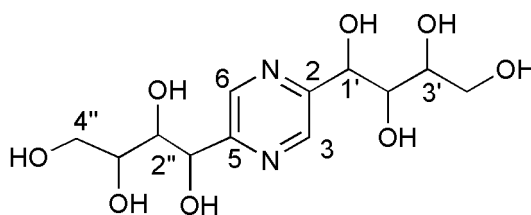
Composto 56			
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
2	157,9	-	
3	140,6	8,53 (s, 1H)	C-6, C-2
5	154,0	-	
6	142,9	8,32 (s, 1H)	C-3, C-5
1'	71,4	4,94 (sl, 1H)	C-6, C-2
2'	73,9	3,54-3,62 (m)	
3'	71,3	3,54-3,62 (m)	C-4'
4'	63,8	3,54-3,62 (m)	C-3', C-2'
		3,33-3,44 (m)	
1''	38,5	3,05 (dd, $J=14,0$ e $2,5$ Hz, 1H)	C-5, C-2''
		2,72 (dd, $J=14,0$ e $9,5$ Hz, 1H)	
2''	71,4	3,73-3,78 (m)	C-6
3''	75,1	3,33-3,36 (m)	
4''	63,3	3,54-3,62 (m)	
		3,33-3,44 (m)	

Tabela 13. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **57** (DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 57				2,6-desoxifructosazina (LONG <i>et al.</i> , 2011) ^a	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	155,9	-		156,6	-
3	142,4	8,62 (<i>d</i> , $J=1,1$ Hz, 1H)	C-5, C-2	141,4	8,50 (<i>s</i>)
5	143,4	8,39 (<i>d</i> , $J=1,1$ Hz, 1H)	C-5, C-2	142,9	8,35 (<i>s</i>)
6	153,3	-		155,4	-
1'	71,4	4,94 (<i>sl</i> , 1H)	C-6, C-2	74,5	5,03 (<i>d</i>)
2'	73,9	3,54-3,62 (<i>m</i>)		80,6	3,80 (<i>m</i>)
3'	71,3	3,54-3,62 (<i>m</i>)		73,5	3,72 (<i>m</i>)
4'	63,8	3,54-3,62 (<i>m</i>) 3,33-3,44 (<i>m</i>)		64,7	3,65-3,80 (<i>m</i>)
1''	38,8	3,05 (<i>dd</i> , $J=14,0$ e 2,5 Hz, 1H) 2,72 (<i>dd</i> , $J=14,0$ e 9,5 Hz, 1H)	C-6, C-5, C-2''	37,5	2,86 (<i>m</i> , 2H)
2''	71,4	3,73-3,78 (<i>m</i>)	C-6	75,3	4,05 (<i>m</i>)
3''	75,0	3,33-3,36 (<i>m</i>)		79,7	3,60 (<i>m</i>)
4''	63,3	3,54-3,62 (<i>m</i>) 3,33-3,44 (<i>m</i>)		64,4	3,65-3,80 (<i>m</i>)

^aD₂O, 400 e 100 MHz.

4.1.2.6. Fructosazina (58)



58

O composto **58**, solúvel em DMSO, foi identificado juntamente com a mistura de compostos **56** e **57**, já descritos, e obtido da fração aquosa das folhas. O espectro de massas HR-ESI-(+)-MS (Figura 53) apresentou um pico $[M+H]^+$ de m/z 305,1339, consistente com a fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_2O_7$ (erro: +1,31 ppm), e o aduto $[M+Na]^+$ de m/z 327,1158 (erro: +1,22 ppm), ambos atribuídos aos isômeros 2,5-desoxifructosazina e 2,6-desoxifructosazina. Um sinal adicional foi observado no espectro de massas em m/z 343,1112 $[M+Na]^+$, consistente com a fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_2O_8$, sugerindo a presença de uma hidroxila adicional na estrutura.

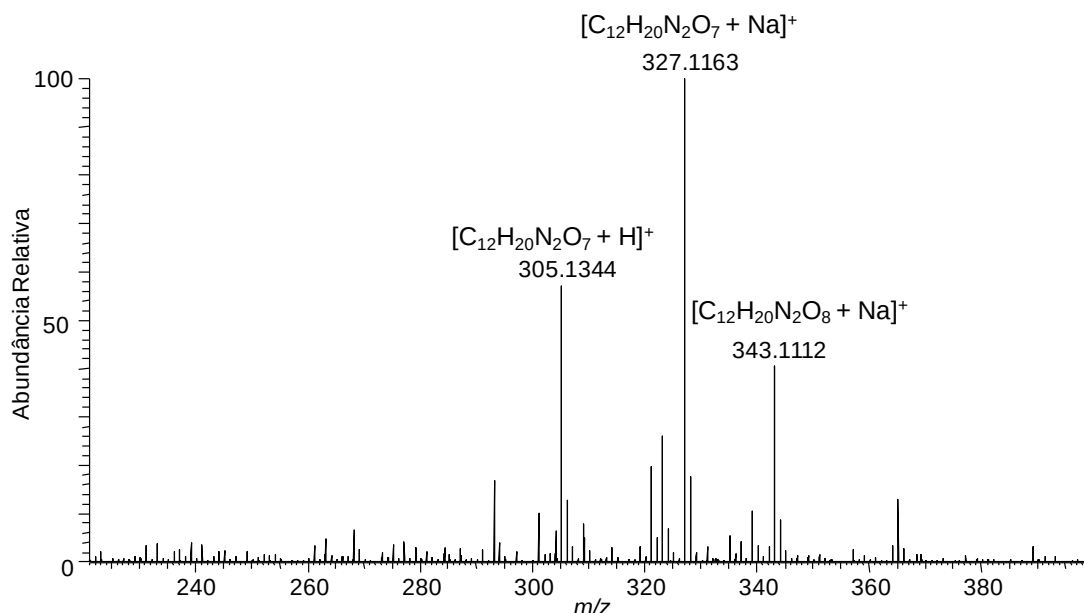


Figura 53. a) Espectro de massas HR-ESI-(+)-MS da mistura de pirazinas **56**, **57** e **58**.

No espectro de RMN de ^1H , além dos sinais atribuídos aos isômeros 2,5-desoxifructosazina (**56**) e 2,6-desoxifructosazina (**57**) em δ_H 8,66 (s, 1H, H-3) e

8,51 (s, 1H, H-6) e em δ_H 8,74 (s, 1H, H-3) e 8,56 (s, 1H, H-5), respectivamente, também foi observado um sinal de hidrogênio aromático em δ_H 8,78 (s, 2H, H-3 e H-6), conforme Figura 54. Esse sinal apresentou correlação no mapa de HSQC com o carbono em δ_C 142,2, e no mapa de HMBC com o carbono em δ_C 155,1, confirmando a presença de um terceiro anel heterocíclico de pirazina. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão de acordo com literatura (JIA *et al.*, 2014; SUMOTO *et al.*, 1991), conforme pode ser observado na Tabela 14.

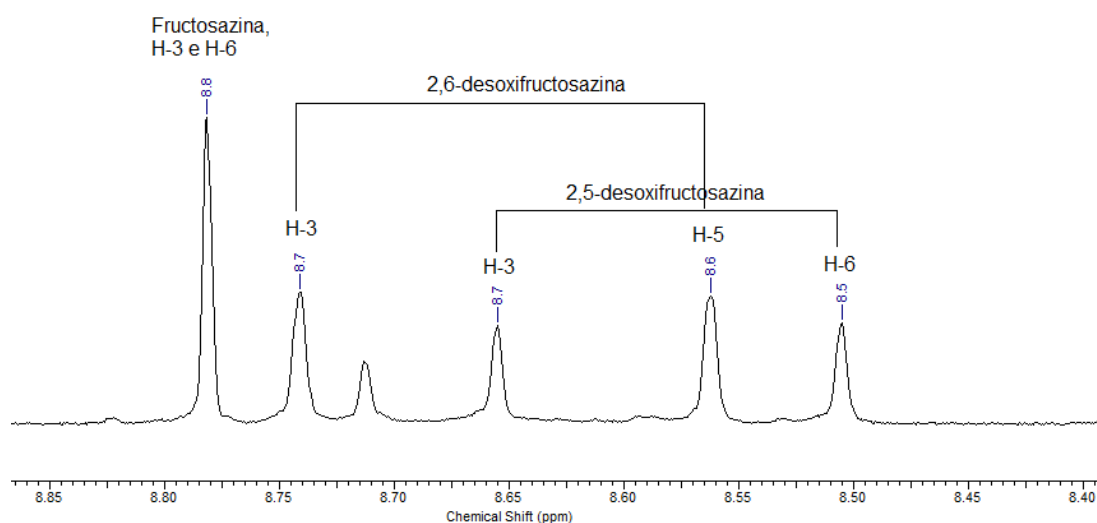


Figura 54. Expansão do espectro de RMN de ^1H da mistura de pirazinas.

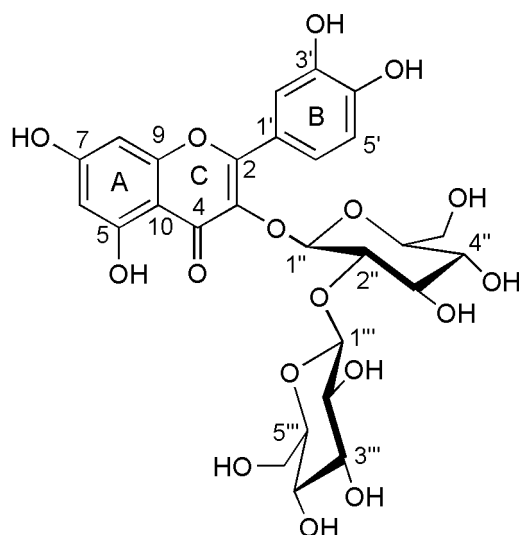
Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com dados da literatura (JIA *et al.*, 2014; SUMOTO *et al.*, 1991), o composto **58** foi identificado como fructosazina.

Tabela 14. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **58** (D_2O , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 58				Fructosazina (SUMOTO <i>et al.</i> , 1991) ^a	
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	155,1	-		157,90	-
3	142,1	8,78 (s, 1H)	C-5, C-2	144,82	8,76 (s)
5	155,1	-		157,90	-
6	142,1	8,78 (s, 1H)	C-5, C-2	144,82	8,76 (s)
1'	71,5	5,22 (d, $J=2,14$ Hz, 1H)	C-5, C-2	74,32	5,19 (d, $J=2,44$ Hz)
2'	75,6	3,21-3,97 (m)		76,33	3,84-3,92 (m)
3'	71,6	3,21-3,97 (m)		73,98	3,84-3,92 (m)
4'	61,9	3,40-3,94 (m)		65,84	3,67-3,92 (m)
1''	71,5	5,22 (d, $J=2,14$ Hz, 1H)	C-5, C-2	74,32	5,19 (d, $J=2,44$ Hz)
2''	75,6	3,21-3,97 (m)		76,33	3,84-3,92 (m)
3''	71,6	3,21-3,97 (m)		73,98	3,84-3,92 (m)
4''	61,9	3,40-3,94 (m)		65,84	3,67-3,92 (m)

^a D_2O , 400 e 100 MHz.

4.1.2.7. Quercetina 3-O-soforosídeo (39)



O composto **39**, solúvel em metanol, foi isolado como um sólido amorfo amarelo da fração aquosa das folhas. O espectro de ultravioleta apresentou dois grupos de bandas de absorção característicos de flavona: em 255 e 266 nm, atribuídos ao grupo cinamoil do anel B, e em 337 nm, ao grupo benzoil do anel A (MABRY *et al.*, 1970). O espectro de infravermelho apresentou bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H (3398 cm^{-1}), de estiramento de ligação C=C de anel aromático (1608 cm^{-1}) e de deformação angular de ligação C-O (1074 cm^{-1}). O espectro de massas HR-ESI(-)-MS do composto **39** (Figura 55a) apresentou um pico $[M-H]^-$ de m/z 625,1416, consistente com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{17}$ (erro: -0,96 ppm). O aduto $[M+Cl]^-$ de m/z 661,1186 (erro: -1,36 ppm) também foi observado (Figura 55a). Seu espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS apresentou um fragmento de m/z 300,0275 (erro de -0,33 ppm), indicando a perda de duas unidades de hexose (Figura 55b).

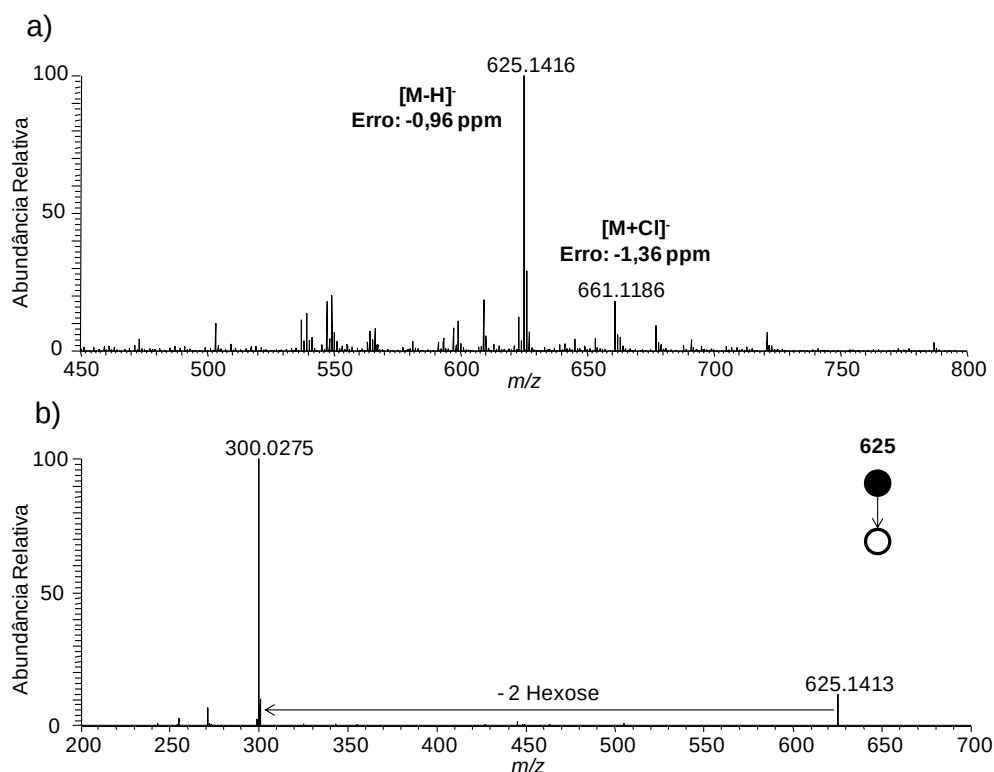


Figura 55. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto **39**.

O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais característicos de flavonoide tais como um sistema de spin do tipo AX em δ 6,21 (d , $J = 2,1$ Hz) e 6,39 (d , $J = 2,1$ Hz) atribuído ao anel A 5,7-dissubstituído, e um sistema de spin do tipo AMX em δ 6,89 (d , $J = 8,5$ Hz), 7,67 (d , $J = 2,1$ Hz) e 7,54 (dd , $J = 8,5, 2,1$ Hz), que foi atribuído ao anel C 4',5'-dissubstituído de núcleo flavona. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou os sinais em δ_{C} 179,9, 156,8 e 135,3, atribuídos aos carbonos C-4, C-2 e C-3, respectivamente, evidenciando a subclasse dos flavonóis. Com base na análise desses sinais e dos espectros de HSQC e HMBC, a aglicona foi identificada como o flavonoide quercetina.

Adicionalmente, a presença dos sinais de RMN de ^{13}C compreendidos entre δ_{C} 62,5 e δ_{C} 83,1 juntamente com os sinais de RMN de ^1H em δ_{H} 5,36 (d , $J = 7,6$ Hz, 1H) e δ_{H} 4,76 (d , $J = 7,1$ Hz, 1H), correspondentes a dois hidrogênios anoméricos, indicaram duas unidades de glicose e, com base no valor da constante de acoplamento ($J = 7,6$ e 7,1 Hz) para estes dois dupletos, a configuração das duas unidades foi atribuída como β -glicose. A correlação observada no mapa de correlação de HMBC entre o hidrogênio em δ_{H} 5,36 e o

carbono em δ_C 135,3 indica a ligação de uma unidade de açúcar ao carbono C-3; assim como a correlação observada entre em δ_H 4,76 (H-1'') e o carbono em δ_C 83,1 indica a ligação interglicosídica via C-2'', sugerindo a presença da unidade soforosídeo (MARKHAM *et al.*, 1978). Essas correlações estão apresentadas na Figura 56.

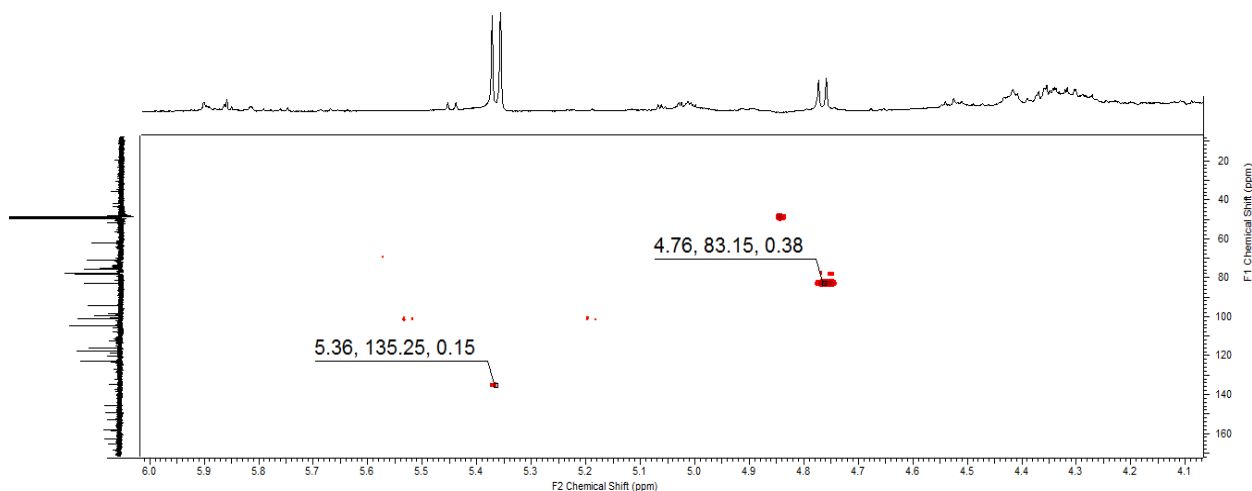


Figura 56. Expansão do mapa de HMBC evidenciando correlações que indicam ligação entre a aglicona e as unidades de açúcar.

As principais correlações observadas no mapa de HMBC estão apresentadas na Figura 57. Os dados de RMN estão apresentados na Tabela 15.

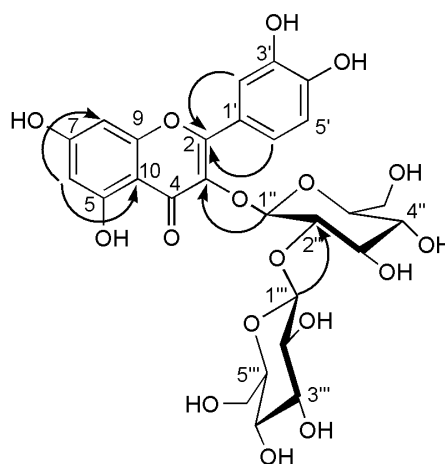


Figura 57. Principais correlações de HMBC observadas para o composto **39**.

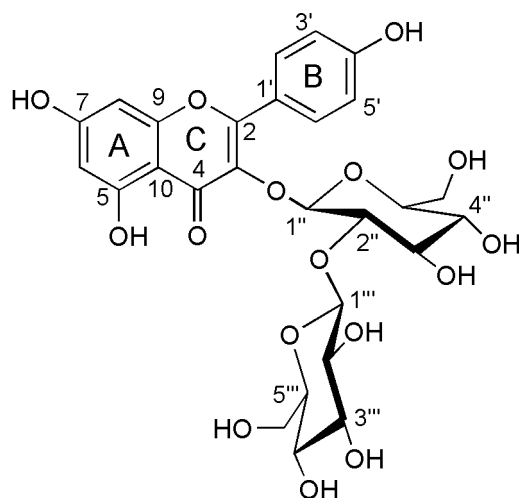
Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com a literatura (ROSA *et al.*, 2010), o composto **39** foi identificado como a quercetina 3-O-soforosídeo.

Tabela 15. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **39** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 39				Quercetina 3-O-soforosídeo ^a (ROSA <i>et al.</i> , 2010)
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
2	156,8	-		158,5
3	135,3	-		135,1
4	179,9	-		179,8
5	163,3	-		163,1
6	100,0	6,21 (<i>d</i> , $J=2,1\text{Hz}$, 1H)	C-7; C-8; C-10; C-5	99,8
7	166,0	-		165,9
8	94,8	6,39 (<i>d</i> , $J=2,1\text{Hz}$, 1H)	C-7; C-6; C-10; C-9	94,6
9	158,6	-		158,9
10	105,9	-		105,8
1'	123,2	-		123,0
2'	117,9	7,67 (<i>d</i> , $J=2,1\text{Hz}$, 1H)	C-6'; C-3'; C-4'; C-1'; C-2	117,7
3'	146,1	-		145,9
4'	149,9	-		149,8
5'	116,3	6,89 (<i>d</i> , $J=8,5\text{Hz}$, 1H)	C-1'; C-6'; C-3'; C-4'	116,1
6'	123,2	7,54 (<i>dd</i> , $J=8,5$, 2,1 Hz, 1H)	C-2'; C-4'; C-2	123,0
Glicose-1				
1"	101,3	5,36 (<i>d</i> , $J=7,6\text{ Hz}$, 1H)	C-3	101,2
2"	83,1	3,77-3,81 (m)		82,9
3"	78,2	3,35-3,62 (m)		78,1
4"	71,2	3,38-3,45 (m)		71,0
5"	78,4	3,35-3,62 (m)		78,3
6"	62,5	3,68-3,76 (m)		62,3
		3,79-3,88 (m)		
Glicose-2				
1'''	105,1	4,76 (<i>d</i> , $J=7,1\text{ Hz}$, 1H)	C-2''	105,0
2'''	75,7	3,35-3,44 (m)		75,6
3'''	78,1	3,35-3,62 (m)		77,8
4'''	71,1	3,38-3,45 (m)		70,9
5'''	78,1	3,35-3,62 (m)		77,9
6'''	62,6	3,68-3,76 (m)		62,4
		3,79-3,88 (m)		

^a CD_3OD ; 75 MHz.

4.1.2.8. Canferol 3-O-soforosídeo (59)



O composto **59**, solúvel em metanol, foi isolado como um sólido amorfo amarelo da fração aquosa das folhas. O espectro de infravermelho do composto **59** apresentou bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H (3376 cm^{-1}), de estiramento de ligação C=C de anel aromático (1607 cm^{-1}) e de deformação angular de ligação C-O (1082 cm^{-1}). O espectro de massas HR-ESI(-)-MS do composto **59** apresentou um pico $[M-H]^-$ de m/z 609,1462, consistente com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$ (erro: - 0,16 ppm). Seu espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS apresentou um fragmento de m/z 284,0327 $[M-C_{12}H_{21}O_{10}-H]^-$ (erro de -0,35 ppm), indicando a perda de duas unidades de hexose (Figura 58).

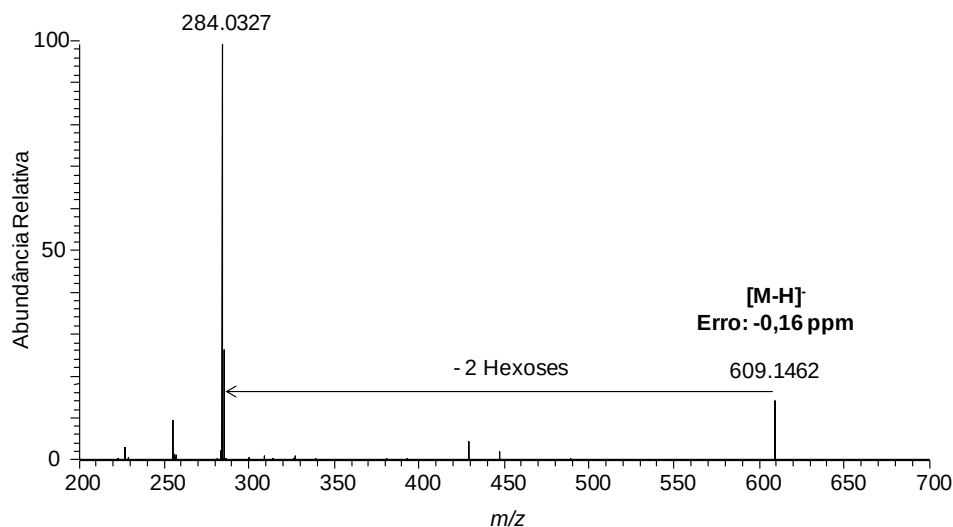


Figura 58. Espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS do composto **59**.

O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais característicos de flavonoide muito semelhantes ao do composto **39**, exceto pela presença de dois grupos de hidrogênios *orto* em δ_{H} 8,05 (*d*, $J=9,1\text{Hz}$, 2H, H-2', 6') e δ_{H} 6,91 (*d*, $J=9,1\text{Hz}$, 2H, H-3', 5'), característicos de anel B 1',4'-dissubstituído de flavona. Esses sinais juntamente com análise dos mapas de HSQC e HMBC permitiu a identificação da aglicona como canferol.

Além disso, a análise dos sinais de RMN de ^{13}C , observados nos mapas de HSQC e HMBC, compreendidos entre δ_{C} 62,5 e δ_{C} 83,1 correlacionados com os sinais de RMN de ^1H em δ_{H} 5,45 (*d*, $J=7,8\text{ Hz}$, 1H, H-1'') e δ_{H} 4,77 (*d*, $J=7,8\text{ Hz}$, 1H, H-1''') correspondentes a dois hidrogênios anoméricos indicaram duas unidades de glicose e, com base no valor da constante de acoplamento ($J= 7,8\text{ Hz}$) para estes dois dupletos, a configuração das duas unidades foi atribuída como β -glicose. A posição das unidades glicosídicas foi atribuída com base na análise do mapa de HMBC, que mostrou uma correlação entre δ_{H} 5,45 e δ_{C} 135,4 (Figura 59), que sugere a ligação da unidade glicosídica intermediária com o carbono C-3, e entre δ_{H} 4,77 (H-1''') e δ_{C} 82,7, indicando uma ligação interglicosídica via C-2'' e sugerindo a presença da unidade soforosídeo. O alto valor de deslocamento químico de C-2'' (δ_{C} 82,7) é outro indício de que esse carbono participa de uma ligação interglicosídica.

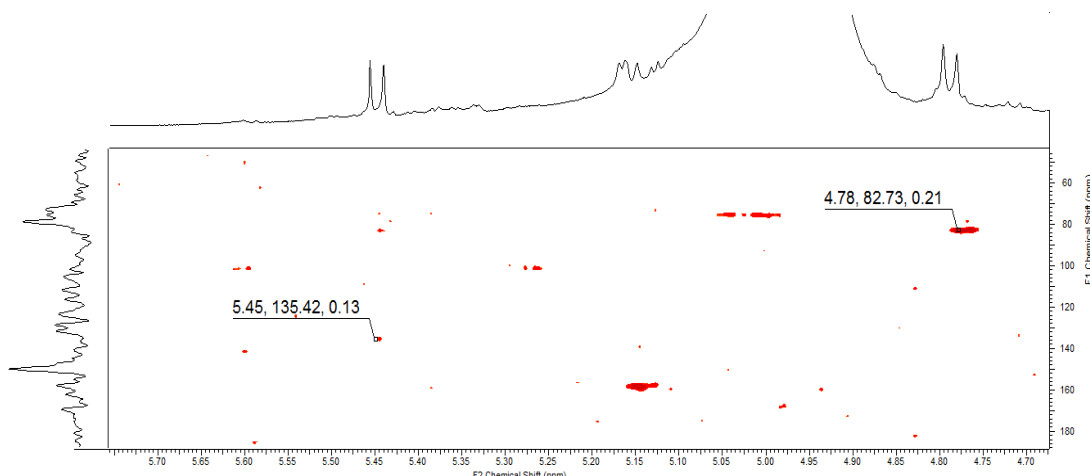


Figura 59. Correlações observadas no mapa de HMBC para o sinal em δ_H 5,45 (H-1''), indicando ligação da parte glicosídica com a aglicona pelo carbono C-3 (δ_C 135,4), e de δ_H 4,77 (H-1''') com o carbono em δ_C 82,7 (C-2''), indicando uma ligação interglicosídica via C-2''.

Os dados de RMN estão apresentados na Tabela 16.

As principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto **59** estão apresentadas na Figura 60.

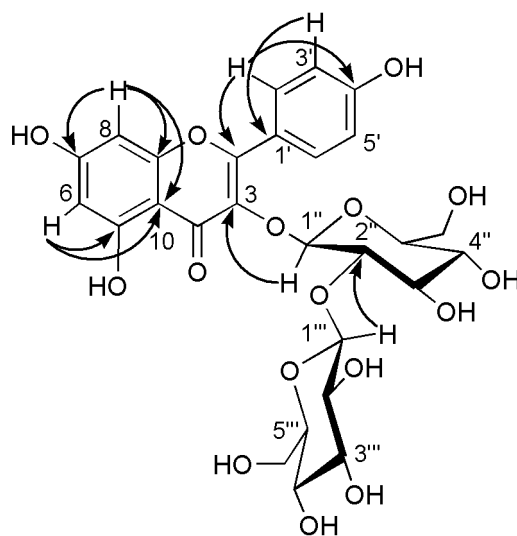


Figura 60. Principais correlações observadas no mapa de HMBC do composto **59**.

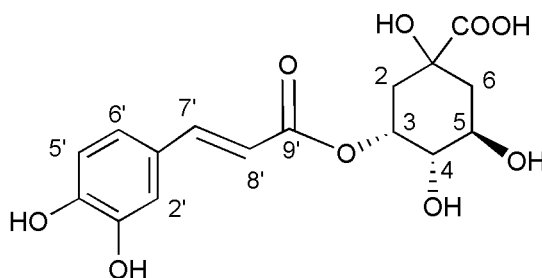
Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com a literatura (KIM *et al.*, 2012; MARKHAM *et al.*, 1978), o composto **59** foi identificado como o canferol 3-O-sulfosídeo.

Tabela 16. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **59** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm) e comparação com literatura.

Composto 59				Canferol 3-O-soforosídeo ^a (KIM <i>et al.</i> , 2012)
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
2	157,5	-		158,6
3	135,4	-		135,1
4	n.o.	-		180,0
5	164,8	-		163,3
6	100,1	6,20 (<i>d</i> , $J=2,0\text{Hz}$, 1H)	C-5; C-10	100,0
7	166,7	-		166,1
8	94,9	6,40 (<i>d</i> , $J=2,0\text{ Hz}$, 1H)	C-7; C-10; C-9	94,9
9	158,6	-		159,0
10	104,0	-		105,9
1'	123,3	-		122,8
2'/6'	132,6	8,05 (<i>d</i> , $J=9,1\text{Hz}$, 2H)	C-4'; C-2	132,6
3'/5'	116,6	6,91 (<i>d</i> , $J=9,1\text{Hz}$, 2H)	C-1'	116,4
4'	161,5	-		161,7
Glicose-1				
1"	101,4	5,45 (<i>d</i> , $J=7,8\text{ Hz}$, 1H)	C-3, C-2"	101,6
2"	82,7	3,77-3,81 (m)		84,6
3"	78,2	3,35-3,62 (m)		77,4
4"	71,2	3,38-3,45 (m)		70,0
5"	78,4	3,35-3,62 (m)		77,9
6"	62,5	3,68-3,76 (m) 3,79-3,88 (m)		68,4
Glicose-2				
1'''	105,1	4,77 (<i>d</i> , $J=7,8\text{ Hz}$, 1H)	C-2"	104,9
2'''	75,7	3,35-3,44 (m)		74,7
3'''	78,1	3,35-3,62 (m)		75,0
4'''	71,1	3,38-3,45 (m)		71,2
5'''	78,1	3,35-3,62 (m)		76,5
6'''	62,6	3,68-3,76 (m) 3,79-3,88 (m)		62,4

^a CD_3OD ; 125 MHz. n.o. sinal não observado.

4.1.2.9. Ácido 3-O-cafeoil-quínico (3-ACQ) (**60**)



O composto **60**, solúvel em metanol, foi isolado na forma de um sólido amorfo amarelo da fração aquosa das folhas e apresenta fluorescência azul sob luz UV (365 nm) e coloração amarela quando revelado com reagente anisaldeído. O espectro de infravermelho do composto **60** apresentou bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H (3398 cm^{-1}), de estiramento de ligação C=C de anel aromático (1608 , 1400 e 1280 cm^{-1}). O espectro de massas HR-ESI(-)-MS (Figura 61) apresentou um pico $[M-H]^-$ de m/z 353,0879, consistente com a fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ (erro: - 0,28 ppm).

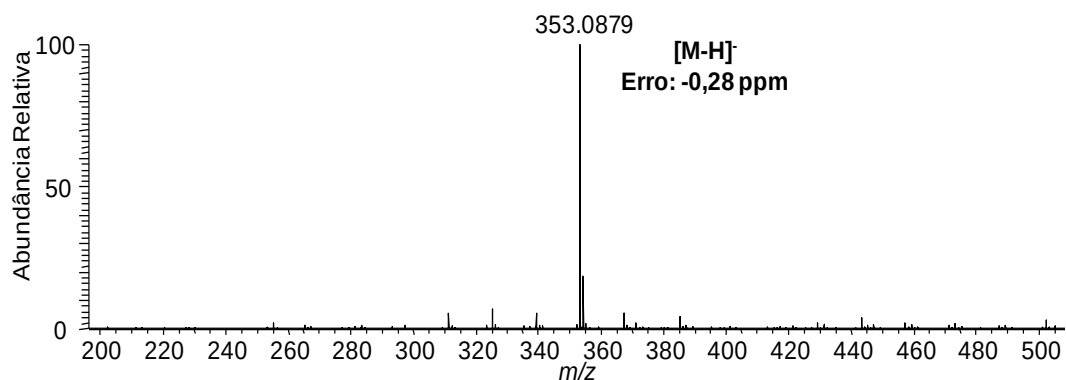


Figura 61. Espectro de massas HR-ESI(-)-MS do composto **60**.

O espectro de RMN de ^1H evidenciou sinais de um sistema de acoplamento ABX característico de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, em δ_{H} 6,80 (*d*, $J= 8,2$ Hz, 1H, H-5'), δ_{H} 6,96 (*dd*, $J= 8,2$ e $2,0$ Hz, 1H, H-6') e δ_{H} 7,08 (*d*, $J= 2,0$ Hz, 1H, H-2'), além de sinais de uma ligação dupla em δ_{H} 7,60 (*d*, $J= 15,6$ Hz, 1H, H-7') e δ_{H} 6,33 (*d*, $J=15,6$ Hz, 1H, H-8'), cuja constante de acoplamento indica configuração *trans* da ligação olefínica. Esse conjunto de sinais é característico de uma unidade cafeoíla (Figura 62).

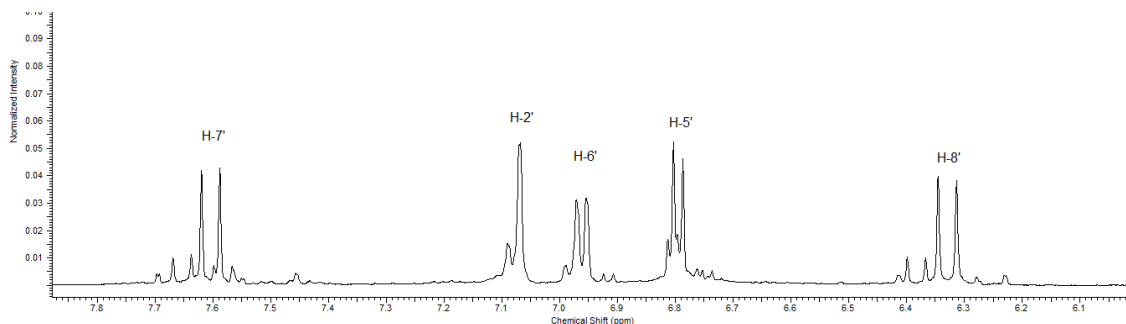


Figura 62. Expansão do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) evidenciando os sinais atribuídos à unidade cafeoíla.

Além disso, também foram observados sinais atribuídos ao ácido quínico, caracterizado por três sinais de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 5,37 (*ddd*, $J= 3,0$, $3,0$ e $4,0$ Hz, 1H, H-3), 3,69 (*m*, 1H, H-4) e 4,10 (*ddd*, $J= 7,4$, $7,4$ e $3,4$ Hz, 1H, H-5) e por dois sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,13-2,20 (*m*, H-2 e H-6_{eq}) e 1,95 (*dd*, $J= 13,5$ e $9,0$ Hz, H-6_{ax}) (Figura 63).

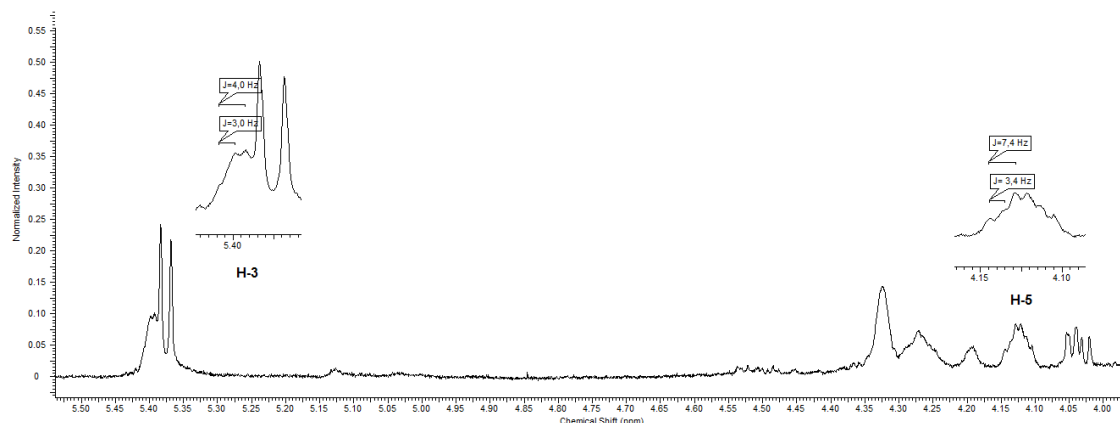
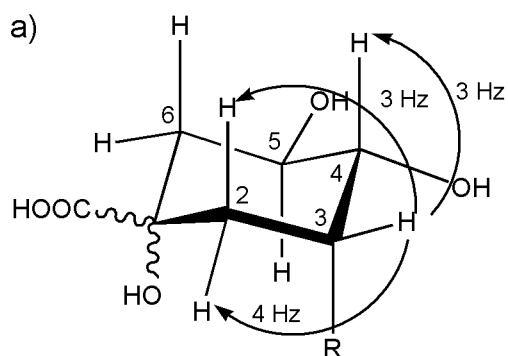


Figura 63. Expansão do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) evidenciando os sinais atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-5 da unidade de ácido quínico.

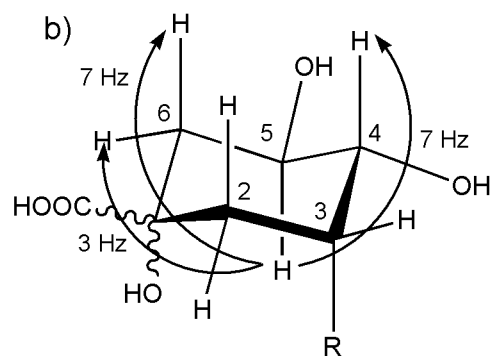
O efeito de desblindagem observado para o sinal de H-3 em relação aos sinais de H-4 e H-5 indica a esterificação da hidroxila de C-3 pela unidade cafeoila. No mapa de correlação de HSQC, destacam-se os sinais da carbonila α,β -insaturada em δ_{C} 146,2 (C-7'), 115,1 (C-8') e 167,7, além dos sinais de carbonos oximetínicos em δ_{C} 72,7 (C-3), 74,0 (C-4) e 68,8 (C-5) e dos carbonos metilênicos em δ_{C} 37,1 (C-2) e 40,5 (C-6). Os sinais de carbonos não-hidrogenados C-1 e C-7, cujos deslocamentos químicos esperados seriam em torno de δ_{C} 75 e 178, respectivamente, não foram observados provavelmente devido ao maior tempo de relaxação desses átomos, e por consequência, o tempo entre um scan e outro não foi suficiente para aquisição dos sinais desses carbonos.

A configuração relativa dos carbonos C-3, C-4 e C-5 da unidade de ácido quínico foi deduzida com base nas constantes de acoplamento vicinais. As constantes observadas para o H-3 ($J_{4,3} = 3,0$ Hz, $J_{2\text{ax},3} = 3,0$ Hz e $J_{2\text{eq},3} = 4,0$ Hz) são características de acoplamento equatorial-axial e equatorial-equatorial, o que indica que esse hidrogênio está na posição equatorial. Já as constantes observadas para H-5 ($J_{4,5} = 7,4$ Hz, $J_{6\text{ax},5} = 7,4$ Hz e $J_{6\text{eq},5} = 3,4$ Hz) são características de acoplamento axial-axial com H-4 e $\text{H}_{6\text{ax}}$ e equatorial-axial com $\text{H}_{6\text{eq}}$ e compatíveis com as posições axial para H-5 e H-4. A Figura 64 mostra o composto **60** em conformação cadeira, evidenciando esses acoplamentos.

Os dados de RMN estão apresentados na Tabela 17.



R= cafeoíla



R= cafeoíla

Figura 64. Esquema de atribuição de constantes de acoplamento para os hidrogênios H-3, 4 e 5 e proposta de estereoquímica relativa para a unidade de ácido quínico, destacando as constantes de acoplamento em a) H-3 e em b) H-5 com os respectivos hidrogênios vicinais.

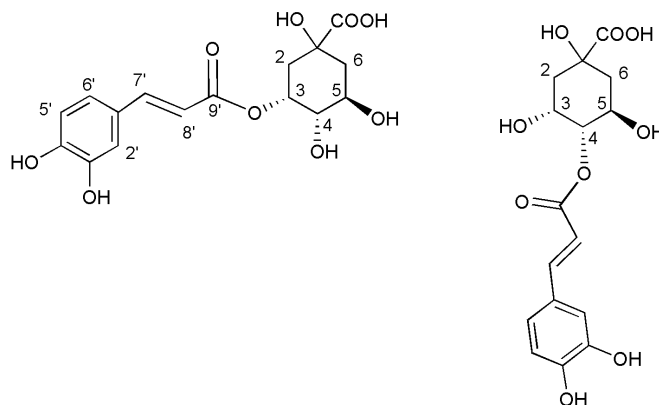
Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com a literatura (NAKATANI *et al.*, 2000), o composto **60** foi identificado como ácido 3-O-cafeoil-quínico (3-ACQ).

Tabela 17. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **60** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm).

Composto 60				Ácido 3-O-cafeoil-quínico ^a (NAKATANI <i>et al.</i> , 2000) $\delta^{13}\text{C}$
Nº	$\delta^{13}\text{C}$ (via HSQC)	$\delta^1\text{H}$	HMBC	
1	n.o.	-		75,1
2	37,1	2,13-2,20 (<i>m</i>)		36,7
3	72,7	5,37 (<i>ddd</i> , $J= 3,0, 3,0$ e $4,0$ Hz, 1H)		73,0
4	74,0	3,69 (<i>m</i> , 1H)		74,8
5	68,8	4,10 (<i>ddd</i> , $J= 7,4, 7,4$ e $3,4$ Hz, 1H)		68,3
6	40,5	1,95 (<i>dd</i> , $J=13,5$ e $9,0$ Hz, H_{ax}) 2,13-2,20 (<i>m</i> , H_{eq})		41,4
7	n.o.	-		178,3
1'	127,0	-		127,9
2'	114,9	7,08 (<i>d</i> , $J= 2,0$ Hz, 1H)	C-6', C-3', C-4'	115,1
3'	145,5	-		146,8
4'	148,4	-		149,4
5'	116,1	6,80 (<i>d</i> , $J=8,2$ Hz, 1H)	C-1', C-3'	116,4
6'	122,6	6,96 (<i>dd</i> , $J=8,2$ e $2,0$ Hz, 1H)	C-4'	122,9
7'	146,2	7,60 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	C-8', C-6', C-9'	146,8
8'	115,1	6,33 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	C-1'	115,8
9'	167,7	-		169,0

^a CD_3OD , 125 MHz. n.o.: não observado

4.1.2.10. Ácido 3-O-cafeoil-quínico (3-ACQ) (60) + ácido 4-O-cafeoil-quínico (4-ACQ) (61)



A mistura de compostos **60** e **61**, solúvel em metanol, foi isolada na forma de um sólido amorfo amarelo da fração aquosa das folhas e apresenta fluorescência azul sob luz UV (365 nm) e coloração amarela quando revelado com reagente anisaldeído.

O espectro de massas HR-ESI(-)-MS apresentou um pico $[M - H]^-$ de m/z 353,0877, consistente com a fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ (erro: -0,28 ppm). A análise do espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS (Figura 65) dessa amostra indicou a presença da mistura dos isômeros ácido 3-O-cafeoil-quínico (3-ACQ) e ácido 4-O-cafeoil-quínico (4-ACQ), que apresentou os fragmentos de m/z 191, 179, 173 e 135. Por comparação do espectro de massas de fragmentação com dados da literatura (CLIFFORD *et al.*, 2003) (Figura 66), é possível observar que o espectro de massas dessa amostra apresenta os fragmentos característicos dos compostos 3-ACQ, que são os m/z 191 e 179 e de 4-ACQ, em m/z 179 e 173. A Figura 65 mostra as prováveis estruturas dos fragmentos.

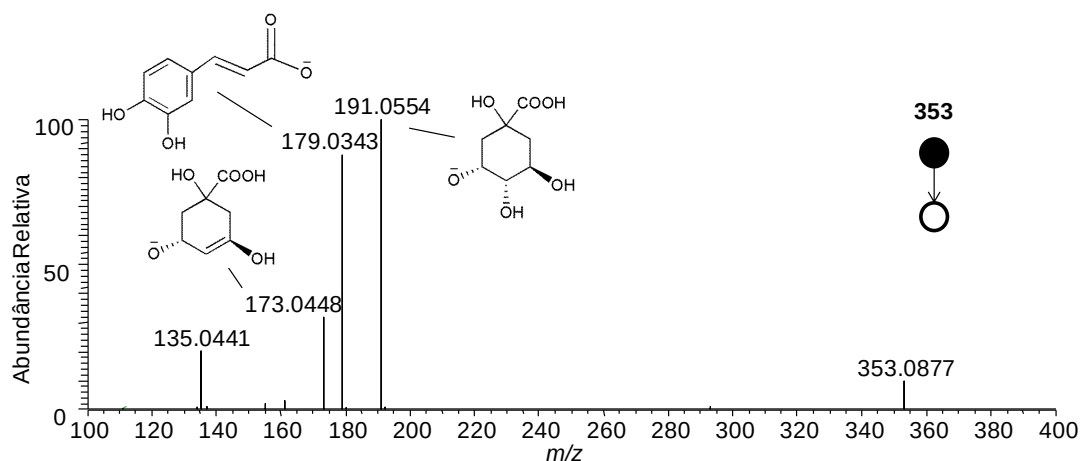


Figura 65. Espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS da mistura de compostos 3-ACQ e 4-ACQ.

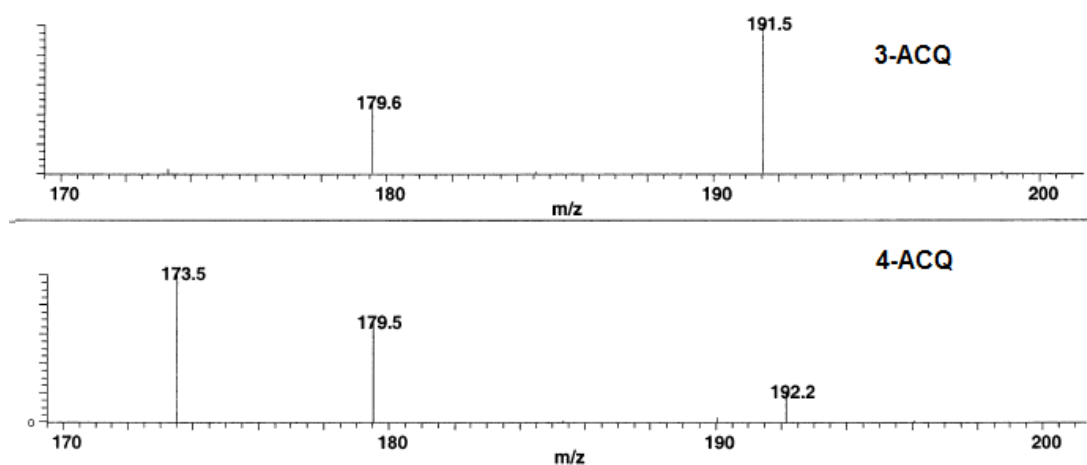


Figura 66. Espectros de ESI(-)-MS/MS dos isômeros de ácido cafeoil-quínico. Figura adaptada de Clifford e colaboradores (2003) com permissão.

O fragmento m/z 173, característico do espectro de massas de fragmentação do isômero 4-ACQ, é originado a partir de perda de água seguido de uma unidade cafeoil, conforme mecanismo apresentado na Figura 67 (CLIFFORD *et al.*, 2003). Segundo essa proposta de mecanismo, o fragmento m/z 173 é favorecido no composto 4-ACQ pela participação do grupo 1,2-acil *trans* vicinal na formação do ânion radical oxônio C, o qual é originado a partir da conformação **A**. Isso facilita a perda de OH de C5, e na sequência da unidade cafeoil de C4. Uma vez que 3-ACQ não possui o grupo acil *trans* ao grupo hidroxila de C5, não é possível a participação do 1,2-acil e a formação do fragmento m/z 173 não é favorecida.

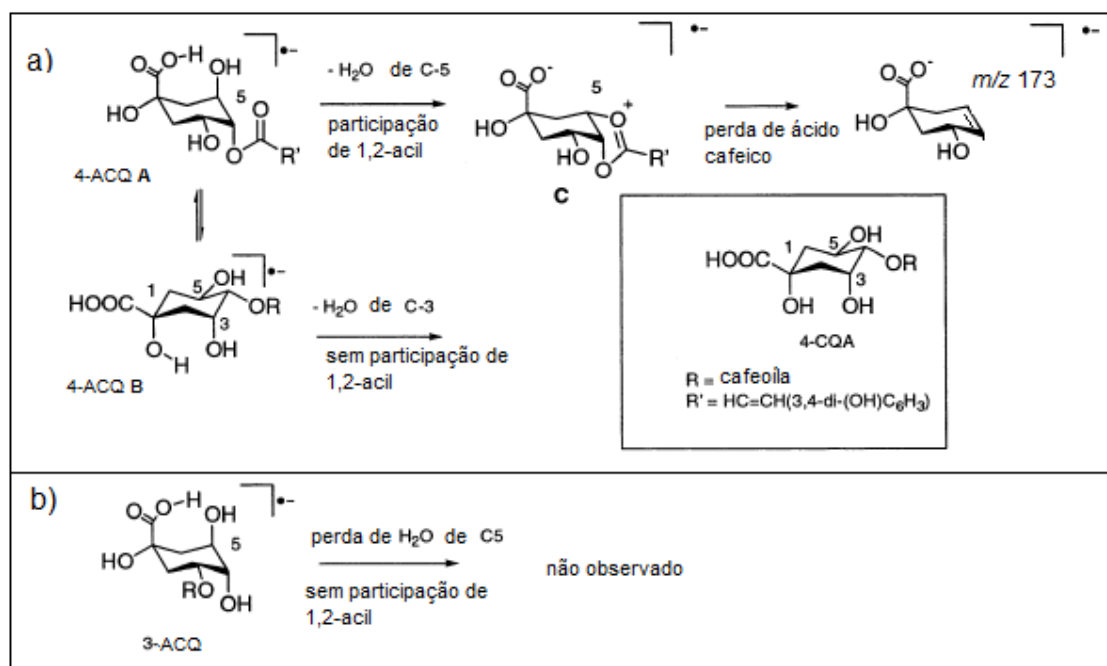


Figura 67. Mecanismo de fragmentação proposto por Clifford e colaboradores (2003) explicando porque a formação do fragmento de m/z 173 é favorecida para o composto a) 4-ACQ, e não para b) 3-ACQ. Figura adaptada com permissão.

A análise dos dados de RMN confirmaram a presença da mistura de ácidos quínicos. O espectro de RMN de ^1H mostrou, além dos sinais observados para o composto 3-ACQ, um perfil de sinais muito semelhantes, indicando a presença de um outro isômero de cafeoil-ácido quínico na mistura, conforme pode ser observado na Figura 68 pela presença dos sinais em pares.

A análise dos valores de constante de acoplamento dos hidrogênios H-3, H-4 e H-5 de 4-ACQ indicaram a mesma configuração relativa atribuída para 3-ACQ.

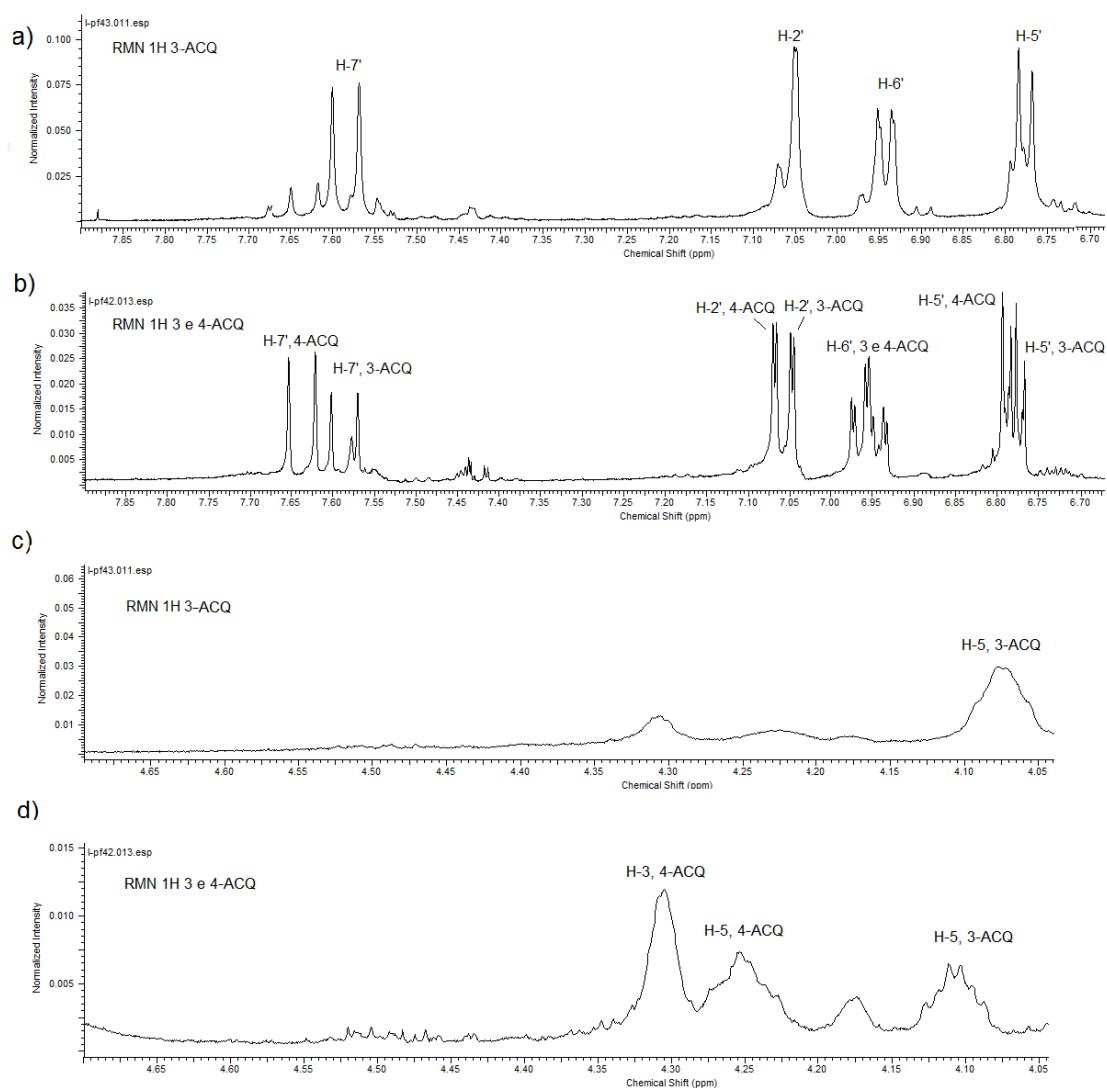


Figura 68. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 3-ACQ, em **a)** e **c)**, e da mistura de compostos 3-ACQ e 4-ACQ, em **b)** e **d)**, evidenciando a presença de duas unidades de ácido quínico e cafeóilas.

A Tabela 18 apresenta os dados de RMN atribuídos ao composto ácido 4-*O*-cafeoil-quínico (4-ACQ).

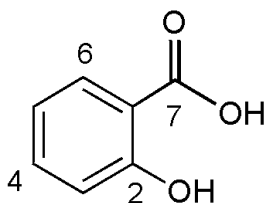
Assim, com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com a literatura (NAKATANI *et al.*, 2000), o composto **61** foi identificado como ácido 4-*O*-cafeoil-quínico (4-ACQ).

Tabela 18. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **61** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm).

Composto 61				Ácido 4-O- cafeoil- quínico ^a (NAKATANI <i>et al.</i> , 2000)
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
1	n.o.	-		76,6
2	38,6	2,07 (m) / 2,15 (m)		38,4
3	69,5	4,30 (m)		69,6
4	79,0	4,85*		79,3
5	65,8	4,24 (ddd, J= 7,4, 7,4 e 3,0 Hz, 1H)		65,5
6	42,0	2,02 (m) 2,13-2,20 (m)		42,7
7	n.o.	-		177,3
1'	127,0	-		127,8
2'	114,9	7,09 (d, J= 2,0 Hz, 1H)	C-6'	115,1
3'	145,5	-		146,8
4'	148,4	-		149,6
5'	116,1	6,79 (d, J=8,2 Hz, 1H)	C-1', C-3'	116,5
6'	122,6	6,98 (dd, J=8,2 e 2,0 Hz, 1H)	C-4'	123,0
7'	146,2	7,66 (d, J=15,6 Hz, 1H)	C-8', C-6', C-9'	147,1
8'	115,1	6,39 (d, J=15,6 Hz, 1H)	C-1'	115,4
9'	167,7	-		169,0

^a CD_3OD , 125MHz. n.o.: não observado * sobreposto com sinal do solvente.

4.1.2.11. Ácido salicílico (62)



O composto **62**, solúvel em metanol, foi isolado como um sólido amarelo da fração clorofórmica ácida dos galhos e apresenta fluorescência azul sob luz UV (365 nm). No espectro de infravermelho destacaram-se as bandas de absorção típicas de deformação axial de ligação O-H (3410 cm^{-1}), de deformação axial de ligação C-H ($2949, 2898\text{ cm}^{-1}$) e de estiramento de ligação C=C ($1596, 1460, 1384\text{ cm}^{-1}$) e de C-O (1121 cm^{-1}).

O espectro de massas HR-ESI(-)-MS apresentou um sinal de m/z 137,0232 $[M-H]^-$, consistente com a fórmula molecular $C_7H_6O_3$ (Figura 69a). Seu espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS apresentou um fragmento de m/z 93,0330 resultante da perda de CO_2 , característico de ácido hidróxi-benzoico (Figura 69b) (LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2015a).

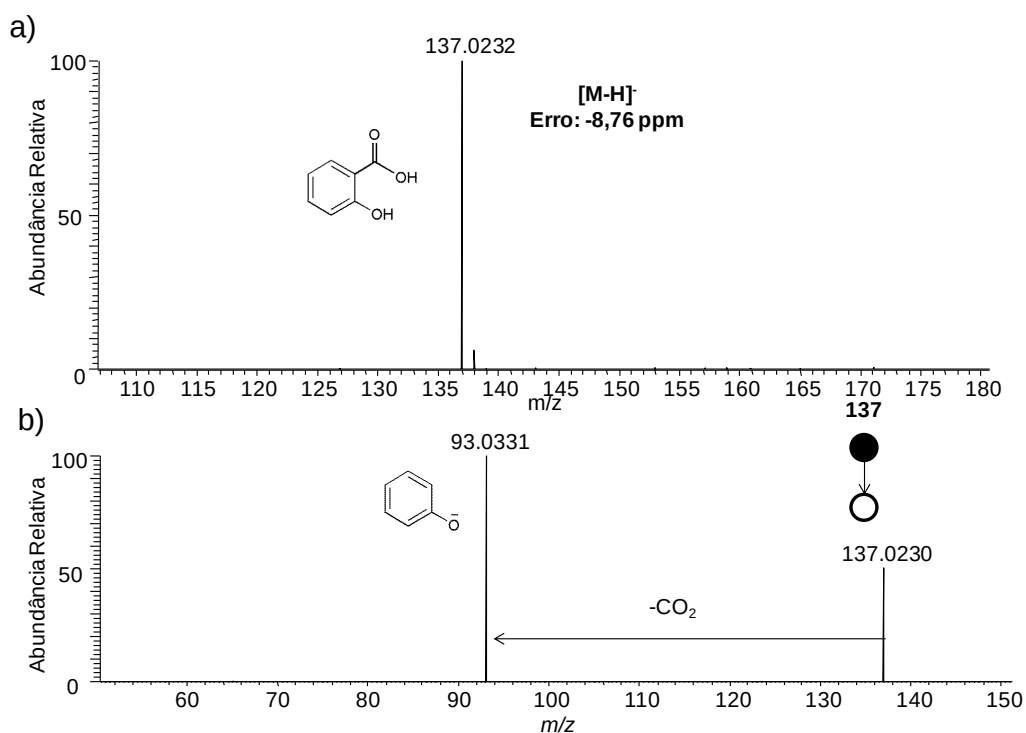


Figura 69. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto **62**.

No espectro de RMN de ^1H , foi observado um padrão de sinais de hidrogênios de anel aromático 1,2-dissubstituído em δ_{H} 6,82 (*dd*, $J=7,8$ e $1,4$ Hz, 1H, H-3), 7,32 (*ddd*, $J=7,8$, $7,1$ e $1,4$ Hz, 1H, H-4), 6,81 (*ddd*, $J=7,8$, $7,1$ e $1,4$ Hz, 1H, H-5) e 7,85 (*dd*, $J=7,8$ e $1,4$ Hz, 1H, H-6). No mapa de correlação de HMBC, foram observados sinais de carbono carboxílico em δ_{C} 176,5 e de um carbono aromático ligado a oxigênio em δ_{C} 162,6 (Figura 70).

Os dados de RMN estão apresentados na Tabela 19.

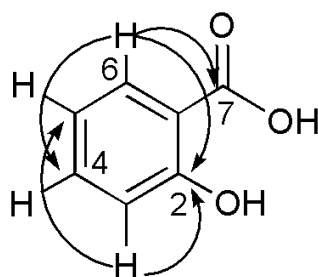


Figura 70. Principais correlações de HMBC observadas para o composto **62**.

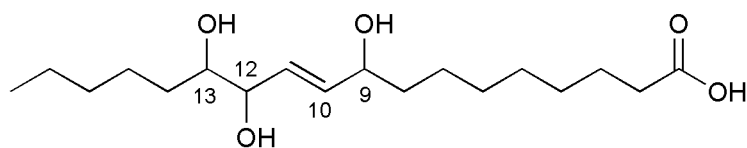
Assim, com base na análise dos dados de espectrometria de massas, RMN uni e bidimensionais e comparação com a literatura (TOMAZ *et al.*, 2008; LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2015a), o composto **62** foi identificado como ácido o-hidróxi-benzoico ou ácido salicílico.

Tabela 19. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **62** (CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz, ppm).

Composto 62				Ácido salicílico ^a (TOMAZ <i>et al.</i> , 2008)
Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
1	110,8	-		111,14
2	162,6	-		162,14
3	117,6	6,82 (<i>dd</i> , $J=7,8$ e $1,4$ Hz, 1H)	C-5, C-2	117,73
4	134,8	7,32 (<i>ddd</i> , $J=7,8$, $7,1$ e $1,4$ Hz, 1H)	C-2, C-6	136,75
5	119,5	6,81 (<i>ddd</i> , $J=7,8$, $7,1$ e $1,4$ Hz, 1H)	C-3, C-2, C-4, C-6	119,49
6	131,9	7,85 (<i>dd</i> , $J=7,8$ e $1,4$ Hz, 1H)	C-4, C-2, C-7	130,85
7	176,5	-		174,29

^a CDCl_3 , 50 MHz.

4.1.2.12. Ácido 9,12,13-trihidroxi-10(*E*)-octadecenoico (63)



O composto **63**, solúvel em metanol, foi isolado da fração clorofórmica ácida dos galhos e apresentou fluorescência azul sob luz UV (365 nm).

O espectro de massas HR-ESI(-)-MS (Figura 71a) apresentou um sinal de m/z 329,2330 $[M-H]^-$, consistente com a fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_5$. No seu espectro de massas HR-ESI(-)-MS/MS foram observados fragmentos de m/z 229 e 171, cujas propostas estruturais estão apresentadas na Figura 71b. Esses picos são característicos de quebra de ligação α à hidroxila (HOU, 1996), posicionando as três hidroxilas nos carbonos C-9, C-12 e C-13.

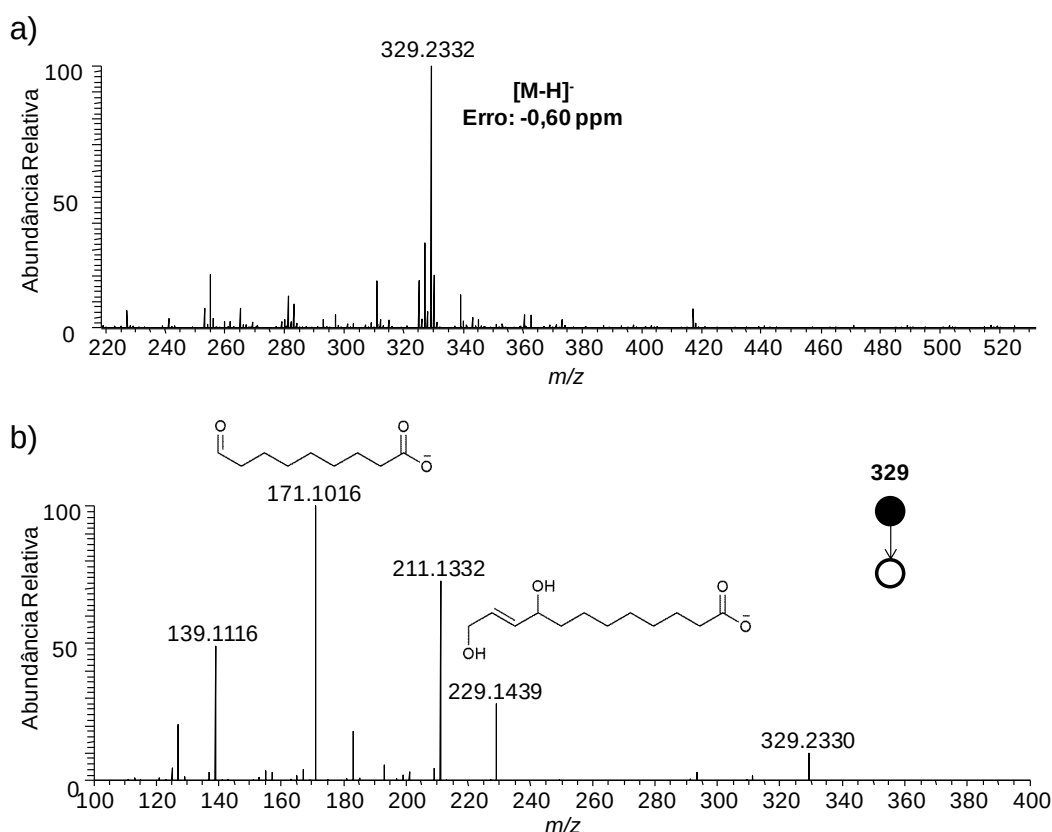


Figura 71. a) Espectro de massas HR-ESI(-)-MS e b) HR-ESI(-)-MS/MS do composto **63**.

No espectro de RMN de ^1H , foram observados sinais de hidrogênios olefínicos em δ_H 5,62 (*dd*, J = 16,0 e 6,1, 1H, H-11) e 5,57 (*dd*, J = 16,0 e 6,1,

1H, H-10), correlacionados pelo mapa de HSQC aos carbonos δ_C 136,6 e 130,8, respectivamente. O valor da constante $J_{10-11}=16,0$ Hz é indicativo da configuração *trans* para a ligação dupla. Além disso, foram observados no mapa de HSQC três carbonos oximetínicos, em δ_C 76,1, 75,5 e 73,4, atribuídos aos carbonos C-9, C-12 e C-13, respectivamente, além de 11 sinais de carbonos metilênicos entre δ_C 26,4-56,5 e de um carbono metílico em δ_C 14,2. No mapa de HMBC, foi observada a presença de um carbono carboxílico em δ_C 179,4 (C-1). A posição da ligação dupla foi atribuída com base nas correlações observadas no mapa de HMBC, apresentadas na Figura 72.

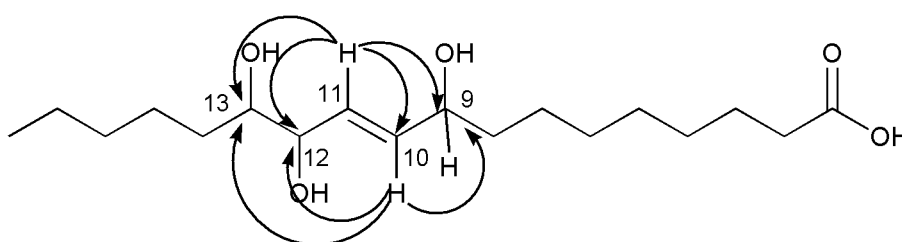
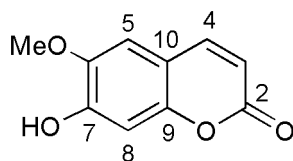


Figura 72. Principais correlações observadas no mapa de HMBC para o composto **63**.

Assim, a partir da análise dos dados de espectrometria de massas e RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura (VAN HOYWEGHEN *et al.*, 2014), o composto **63** foi identificado como o ácido 9,12,13-trihidróxi-10(*E*)-octadecenoico.

4.1.2.13. Escopoletina (35)



O composto **35**, sólido em clorofórmio, isolado na forma de um sólido incolor, da fração clorofórmica ácida das folhas e dos galhos e apresentou intensa fluorescência azul sob luz UV (365 nm). O espectro de ultravioleta do composto **35** apresentou bandas de absorção em 228, 288 e 346 nm.

Seu espectro de massas HR-ESI-(+)-MS apresentou um sinal de m/z 193,0493 $[M+H]^+$, consistente com a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$. O aduto $[M+Na]^+$ de m/z 215,0311 (erro: -1,86 ppm) também foi observado (Figura 73a). Seu espectro de massas ESI-(+)-MS/MS apresentou um fragmento de m/z 178,0258 resultante da perda de uma metila, bem como dos íons m/z 150,0310 e 133,0283, resultantes da perda consecutiva de CO e OH, respectivamente (Figura 73b).

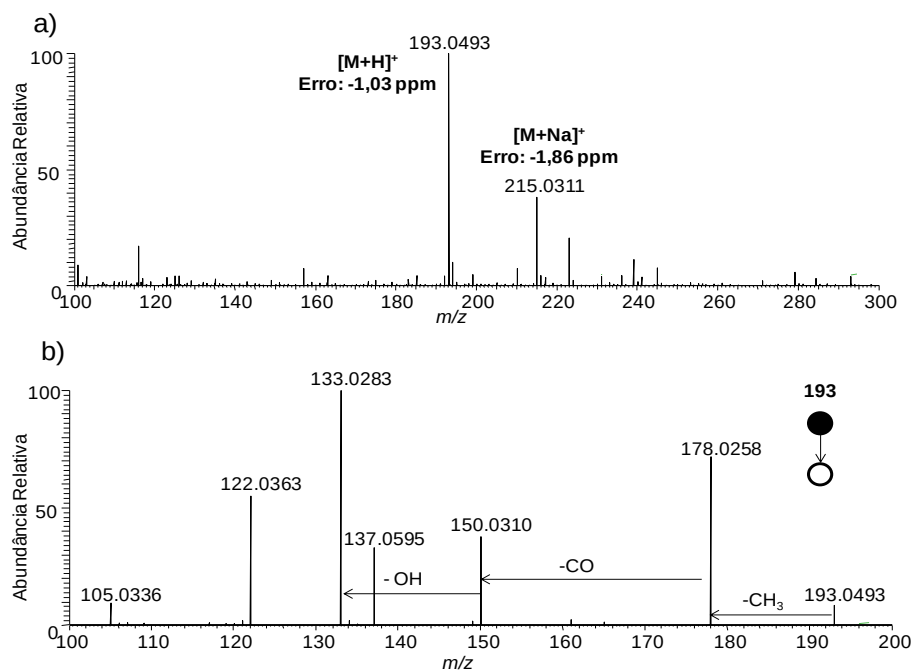


Figura 73. a) Espectro de massas HR-ESI-(+)-MS e b) HR-ESI-(+)-MS/MS do composto **35**.

A posição da metoxila em C-6 foi atribuída com base na correlação observada no mapa de HMBC entre os sinais em δ_H 3,97 (O-Me) e δ_C 144,1 (C-6).

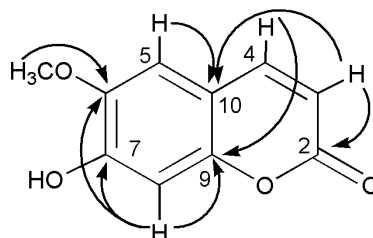


Figura 74. Principais correlações de HMBC observadas para o composto **35**.

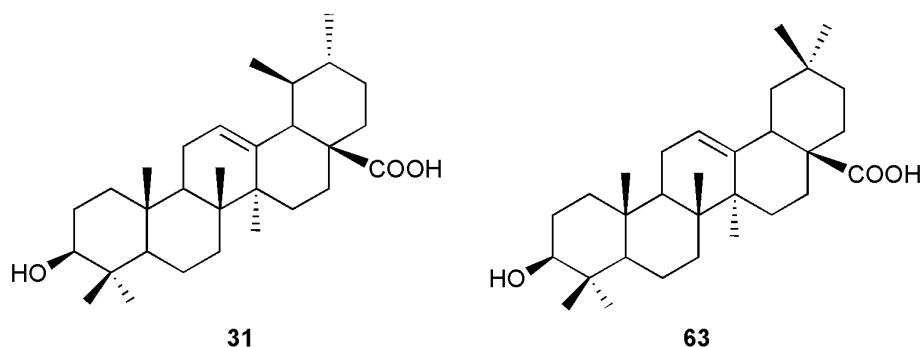
Baseado na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais (Tabela 20), espectrometria de massas e comparação com a literatura (WANG *et al.*, 2007; MIN, 2006), o composto **35** foi identificado como escopoletina.

Tabela 20. Dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto **35** ($CDCl_3$, 500 MHz e 125 MHz, ppm).

Composto 35			Escopoletina (JEREZANO <i>et al.</i> , 2011) ^a
Nº	$\delta^{13}C$ (via HSQC e HMBC)	δ^1H	$\delta^{13}C$
2	161,3	-	161,5
3	113,3	6,28 (<i>d</i> , $J=9,5$ Hz, 1H)	112,2
4	143,8	7,61 (<i>dd</i> , $J=9,5$ e 0,6 Hz, 1H)	143,5
5	103,5	6,93 (<i>d</i> , $J= 0,6$ Hz, 1H)	103,2
6	144,1	-	145,0
7	149,2	-	150,7
8	106,7	6,86 (<i>s</i> , 1H)	108,0
9	150,6	-	149,9
10	111,5	-	110,8
OCH ₃	56,0	3,97 (<i>s</i> , 3H)	59,1

^a $CDCl_3$ / $DMSO-d_6$ (99:1), 125 MHz.

4.1.2.14. Triterpenos ácido ursólico (31) e oleanólico (64)

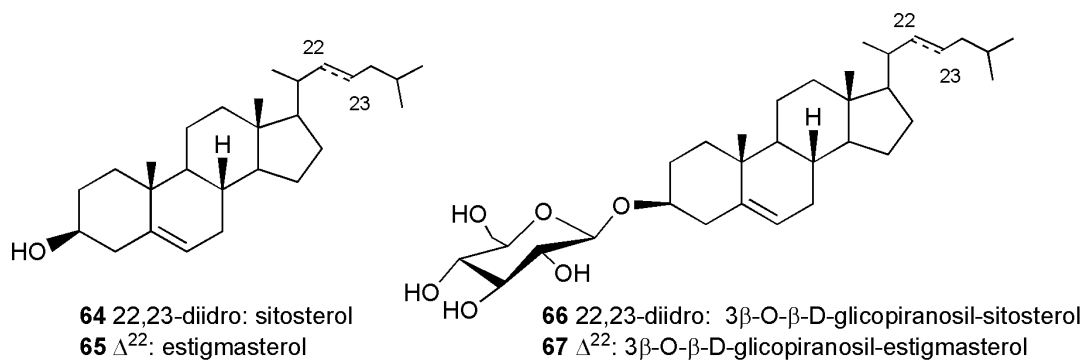


Os compostos **31** e **64** foram obtidos da fração clorofórmica como um sólido incolor amorfo solúvel em diclorometano/metanol. A mistura foi identificada com base nos dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC. O espectro de infravermelho (IV) apresentou uma banda larga de absorção em 3431 cm^{-1} , referente ao estiramento O-H em ligações hidrogênio intermoleculares e uma intensa banda em 1692 cm^{-1} , característica de carbonila. O espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 500 MHz) evidenciou a mistura de dois triterpenos pela presença de dois tripletos referentes ao hidrogênio vinílico H-12 em δ 5.24 ($J=3.6\text{ Hz}$, **31**) e δ 5.27 ($J=3.6\text{ Hz}$, **64**). No espectro de RMN de ^1H , observa-se também um sinal de hidrogênio carbinólico em δ 3,20 (dd , $J=10.3$ e 6.0 , H-3, **31** e **64**) correlacionado ao carbono δ 79,2 pelo espectro de HSQC, além de sinais de hidrogênios metílicos em δ 0,98 (s, H-23, **31** e **64**), δ 0,77 (s, H-24, **31** e **64**; H-26, **31**), δ 0,96 (s, H-25, **31** e **64**), δ 0,87 (s, H-26, **64**), δ 1,09 (s, H-27, **31**), δ 1,14 (s, H-27, **64**). O espectro de RMN ^{13}C (via HSQC e HMBC) apresentou sinais de carbonos olefínicos em δ 138,8 (C-13, **31**), δ 126,4 (C-12, **31**), além de um sinal de carbono alílico em δ 53,7 (C-18, **31**), característico de triterpeno da série ursano (OLIVEIRA *et al*, 2008). Os sinais de carbonos olefínicos em δ 144,3 (C-13, **64**) e δ 123,0 (C-12, **64**), além do sinal de carbono alílico em δ 41,8 (C-18, **64**) são característicos da série oleanano. No espectro de RMN ^{13}C , observam-se ainda sinal de carbono carbinólico em δ 79,2 (C-3, **31** e **64**) e de carbono carbonílico de grupo ácido em δ 181,5 (C-28, **31** e **64**). Os dupletos atribuídos aos hidrogênios metílicos em δ 0,99 ($J=6.0\text{ Hz}$, H-29, **31**) e δ 0,94 ($J=6.1\text{ Hz}$, H-30, **31**), característicos do acoplamento das metilas H-29 e H-30 com H-19 e H-20, respectivamente, e um duplete em δ 2,19 ($J=$

11,6 Hz, H-18, **31**) são sinais típicos de esqueleto ursânico (OLIVEIRA *et al.*, 2008), e confirmam a presença do ácido ursólico. Simpletos em δ 0,92 (H-29, **64**) e δ 0,96 (H-30, **64**) e um duplo duplete em δ 2,83 (J = 4,6, 14,9 Hz, H-18, **64**) são sinais característicos de triterpenos da série oleanano e caracterizam o ácido oleanólico. A configuração β da hidroxila ligada ao C-3 (**31** e **64**) foi estabelecida através da constante de acoplamento axial-axial (J = 10,3 Hz) observada entre H-3 e H-2 (LIMA *et al.*, 2009).

Por comparação dos dados espectrais de RMN uni e bidimensionais com dados da literatura (TAKETA *et al.*, 2004; JUNGES *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005; BAYKAL *et al.*, 1998; MAHATO e KUNDU, 1994) e perfil cromatográfico em CCD com padrão de referência (fase móvel: CH₂Cl₂/MeOH 10%), a mistura de compostos **31** e **64** foi identificada como ácido 3 β -hidroxiurs-12-en-28-óico (ácido ursólico) e ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-óico (ácido oleanólico).

4.1.2.15. Esteroides sitosterol e estigmasterol (65 e 66) e seus derivados glicosilados (67 e 68)



Os compostos **65** e **66** foram identificados como uma mistura na forma de cristais incolores, cujo ponto de fusão, 139-141°C, está de acordo com a literatura (JUNGES *et al.*, 2000). O espectro de infravermelho (IV) apresentou bandas de absorção em 2943 e 2861 cm⁻¹, referentes à deformação axial de *sp*³ C-H e uma banda em 1665 cm⁻¹, referente ao estiramento C=C. O espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 125MHz) apresentou sinais característicos de esqueletos esteroidais, tais como dois carbonos olefínicos em δ 140,97 (C-5) e δ 121,95 (C-6) e um carbono carbinólico em δ 72,03 (C-3). Os outros sinais de carbono

que confirmaram essa identificação apresentaram deslocamento químico entre δ 11 e 57 atribuídos à cadeia alquílica lateral do sistema de quatro anéis, característica de esteróides. O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500MHz) apresentou sinais como um dubleto de próton vinílico em δ 5,36 ($J= 5,1$, H-6), um hidrogênio hidroximetínico (H-3) em δ 3,53 (m , H-3), dois simpletos metílicos em δ 1,00 (H-19) e 0,68 (H-18), além de envelope de sinais em δ 0,68-1,00 referente aos prótons metílicos H-21, 26, 27 e 29. A presença de dois duplos dubletos em δ 5,15 ($J = 15,3$, 8,7 Hz) e δ 5,02 ($J = 15,3$, 8,7 Hz), atribuídos aos prótons vinílicos H-22 e H-23, respectivamente, permitiram identificar a presença de estigmasterol, cuja ligação dupla da cadeia alquílica possui isomeria *trans* pela constante de acoplamento de $J=15,3$ Hz. Assim, os esteróides **65** e **66** foram identificados com base nos dados espectrais e comparação com os dados de RMN já descritos na literatura (SUBHADHIRASAKUL *et al*, 2005; CORREIA *et al*, 2003) como β -sitosterol e estigmasterol, respectivamente.

A mistura de compostos **67** e **68**, isolada da fração diclorometânica das folhas, apresentou-se como um sólido incolor amorfo solúvel em diclorometano/metanol. O espectro de infravermelho exibiu uma banda larga de absorção em 3417 cm^{-1} , característica de estiramento O-H, e em 2958, 2928, 2846 cm^{-1} , características de deformação axial de C-H. O estiramento relativo à ligação C=C é responsável pela banda de absorção em 1645 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 500MHz) apresentou sinais característicos de esqueleto esteroidal em δ 5,38 (d , $J= 5,2$ Hz, H-6) de hidrogênio olefínico, um hidrogênio hidroximetínico (H-3) em δ 3,53 (m , H-3) e de grupos metílicos em δ 0,61-1,10. A presença da unidade glicosídica foi evidenciada pelos sinais em δ 4,41 (d , $J=7.8$ Hz, H-1') do hidrogênio anomérico da glicose e em δ 3,00-4,00 (m), referentes aos hidrogênios da glicose e do hidrogênio carbinólico (H-3). A configuração β de H-1' da porção glicosídica foi estabelecida através da constante de acoplamento diaxial ($J= 7,8$ Hz) observada entre H-1' e H-2', de acordo com a literatura (CORREIA *et al.*, 2003). A presença de dois duplos dubletos em δ 5,15 ($J = 15,3$, 8,7 Hz) e δ 5,02 ($J = 15,3$, 8,7 Hz), atribuídos aos hidrogênios vinílicos H-22 e H-23, respectivamente, permitiram identificar a

presença de estigmasterol, cuja ligação dupla da cadeia alquílica possui isomeria *trans* pelas constantes de acoplamento de $J = 15,3$ Hz. Por comparação dos dados espectrais de IV e de RMN uni e bidimensionais com dados da literatura (SUBHADHIRASAKUL *et al.*, 2005; FALCÃO, 2003; PAULO *et al.*, 2000; CORREIA *et al.*, 2003) e perfil cromatográfico em CCD com padrão de referência, a mistura de compostos **66** e **67** foi identificada como 3 β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol e 3 β -O- β -D-glicopiranosil-estigmasterol, respectivamente.

4.2. Imagem química das folhas de *Psychotria prunifolia*, *Palicourea coriacea*, *P. rigida* e *P. officinalis* por DESI-MS

Inicialmente, um experimento de HR-ESI-MS dos extratos etanólicos das folhas estudadas foi realizado a fim de se verificar o perfil químico de cada espécie e comparação com dados dos compostos reportados na literatura (FARIA *et al.*, 2010; KATO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2016). Com o objetivo de detecção dos alcaloides indólicos anteriormente isolados dessas espécies, foi utilizada uma faixa de m/z de 100-600 Da. Os espectros estão apresentados na Figura 75 e os resultados de massa exata e MS/MS estão apresentados na Tabela 21.

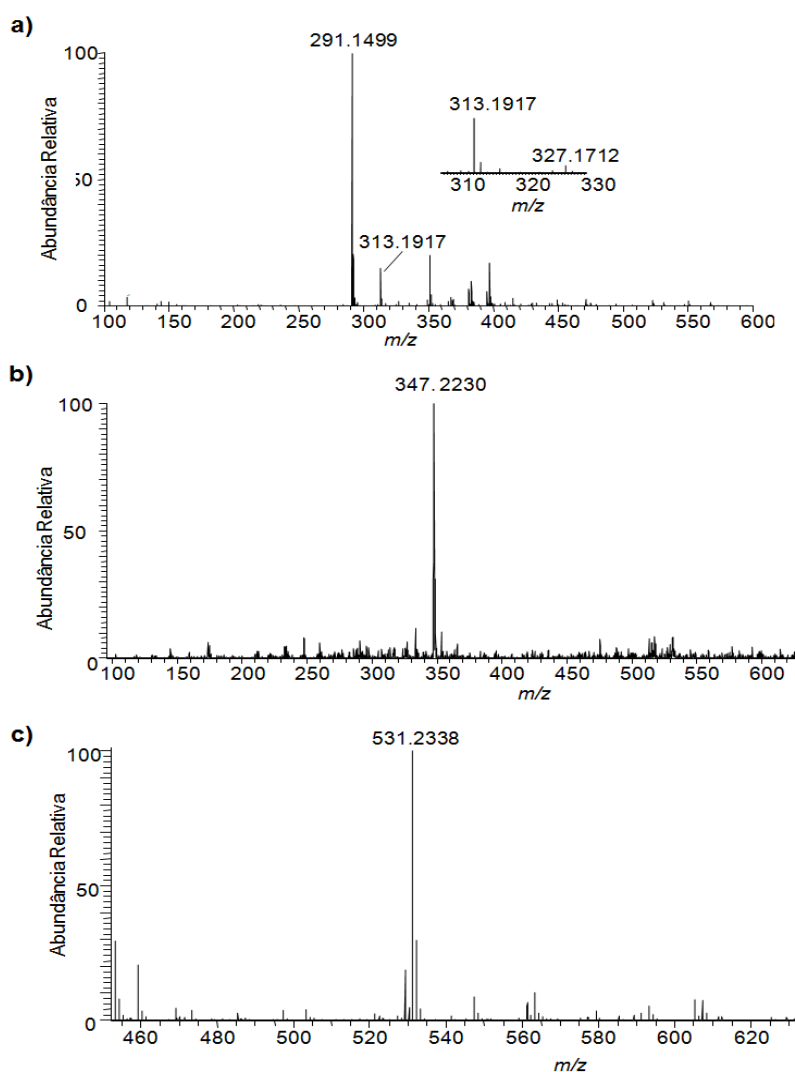


Figura 75. Espectro de HR-ESI-(+)-MS do extrato etanólico da folha de a) *Psychotria prunifolia*; b) *Palicourea coriacea*; c) *Palicourea rigida*.

Tabela 21. Alcaloides de *Psychotria prunifolia*, *Palicourea coriacea* e *Palicourea rigida* detectados e identificados por espectrometria de massas (HR-ESI-MS).

Alcaloide	Espécie	Fórmula molecular	Tipo de íon	<i>m/z</i> (observ.)	<i>m/z</i> (calculado)	Erro (ppm)	MS/MS (<i>m/z</i>)	Ref.
prunifoleína (44)	<i>P. prunifolia</i>	C ₁₉ H ₁₉ N ₂ O ⁺	[M] ⁺	291,1491	291,1492	-0.3	261,1387, 237,1023, 219,0918, 182,0840	(FARIA <i>et al.</i> , 2010) ¹
10-hidroxi-antirrina (48)	<i>P. prunifolia</i>	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	313,1908	313,1910	-0.6	296,1644, 160,0756, 154,1226	(KATO <i>et al.</i> , 2012) ¹
10-hidroxiisodepneanol (47)	<i>P. prunifolia</i>	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	327,1703	327,1703	< 0.1	309, 295	(KATO <i>et al.</i> , 2012) ¹
calicantina (11)	<i>P. coriacea</i>	C ₂₂ H ₂₆ N ₄	[M+H] ⁺	347,2230	347,2230	< 0.1	316, 290, 285, 173	(ZHANG <i>et al.</i> , 2009)
estrictosidina (27)	<i>P. rigida</i>	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₉	[M+H] ⁺	531,2338	531,2337	+0,2	514, 369, 352, 340	(COSTA <i>et al.</i> , 2016)

¹ Referência de dados de RMN e massa exata.

Em seguida, a eficiência de ionização dos compostos pelo método direto e indireto (*imprint* em PTFE) de DESI-MS foi avaliada. A performance de DESI é altamente influenciada pelos parâmetros operacionais, tais como composição do solvente, velocidade de fluxo e voltagem aplicada no solvente, ângulo de incidência do spray à superfície e à entrada do equipamento, distância da ponta do spray à superfície, entre outros. Assim, nessa primeira etapa foi realizada uma otimização desses parâmetros (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2014) a fim de se detectar e identificar os compostos de média e alta polaridade presentes nas folhas, com enfoque nos compostos previamente isolados, até obtenção de sinal intenso para imageamento.

4.2.1. Método de análise direto

Inicialmente, foi realizada a análise direta das folhas sem um pré-

tratamento com solvente orgânico e não foi detectado nenhum sinal estável dos compostos previamente isolados das espécies estudadas. Esse comportamento confirmou uma dificuldade do método direto de imageamento por DESI de tecidos vegetais, que é a obtenção de sinais estáveis de compostos que estão abaixo da camada de cutícula foliar. Os compostos de interesse em geral são apenas detectados quando o spray de fonte de ionização DESI permanece na mesma posição por alguns segundos, o que aumenta a eficiência de extração do solvente (LI *et al.*, 2011). No entanto, a permanência muito longa do spray de DESI em uma mesma posição pode encharcar a superfície de análise e diminuir a resolução espacial da imagem (MONGE *et al.*, 2013). Assim, a fim de remover a camada de cutícula foliar, foi feita a imersão da folha em solvente orgânico (CHCl_3) antes da análise por alguns minutos, como sugerido em trabalhos anteriores (LI *et al.*, 2011; CHA *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2011). Esse procedimento permitiu a detecção dos sinais previamente observados por ESI-MS.

Na Figura 76, estão apresentados exemplos de imagens obtidas pelo método direto para as folhas de *Palicourea coriacea*. Devido à baixa eficiência de ionização, não foi possível obter imagens de qualidade pelo método direto para as outras espécies. A baixa ionização pode ser confirmada pelo valor de NL (*normalized intensity level*), apresentado na figura 76d, na qual se observa ser da ordem de 10^1 , enquanto que nas imagens pelo método indireto o NL foi da ordem de 10^5 - 10^6 (dados de NL para o método indireto não mostrados).

Uma das poucas imagens pelo modo direto de razoável qualidade está apresentada na Figura 76c. Neste experimento, foi verificado a possibilidade de o alcaloide calicantina ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 347), majoritário na folha de *P. coriacea*, estar presente apenas na cutícula foliar e não internamente, comparando uma parte da folha com e sem cutícula. Pela imagem obtida para esse teste, foi observado que a calicantina está presente tanto na cutícula como abaixo dela, com uma distribuição homogênea na cutícula. Na metade esquerda da folha, os veios aparecem com uma maior concentração de calicantina do que a lâmina (espaço entre

os veios). Não foi possível garantir que isso representa a realidade ou se é consequência do fato da superfície da folha não ser lisa, pois os veios da folha estão numa altura superior ao da lâmina. Assim, uma vez que os veios da folha estão mais próximos da fonte de DESI-MS do que a lâmina, a ionização e entrada no espectrômetro de massas são mais eficientes para o analito presente nos veios.

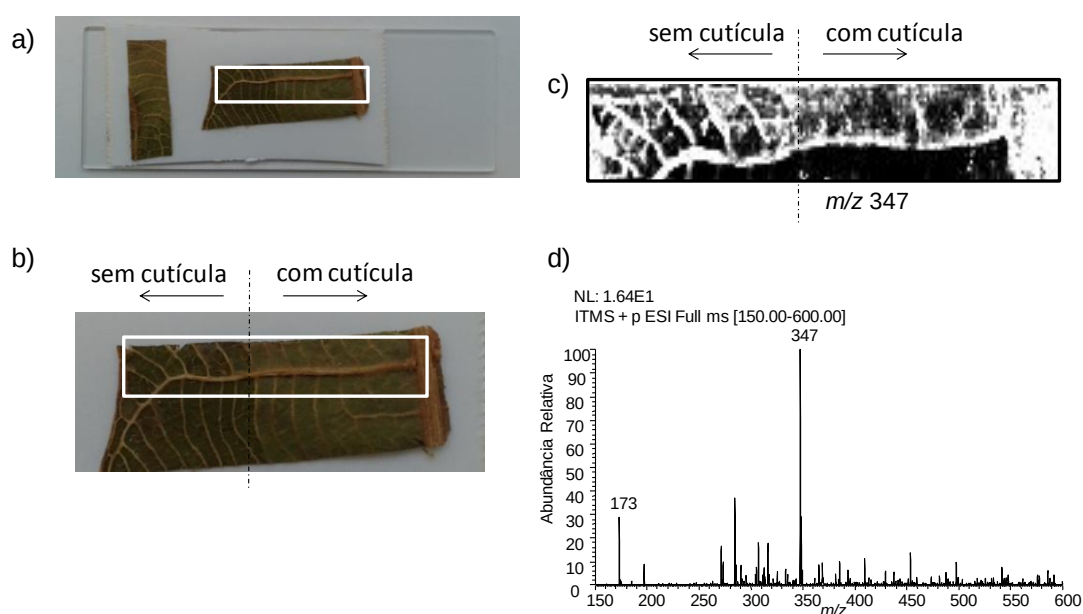


Figura 76. Seção da folha adulta de *P. coriacea* analisada por imageamento direto por DESI-MS (26x4 mm). a) Foto. b) Ampliação da foto evidenciando a retirada da cutícula foliar na metade esquerda da folha. c) Imagem obtida para o íon m/z 347 (calicantina). d) Espectro de um ponto da folha representativo da presença da calicantina. O tamanho do pixel é de 150 μm e o tempo de aquisição da imagem, 1h e 2 min.

4.2.2. Método de análise indireto (*imprint*)

4.2.2.1. *Psychotria prunifolia*

Psychotria prunifolia é conhecida pela presença de alcaloides β -carbolínicos (KATO *et al.*, 2012; FARIA *et al.*, 2010) apresentados na Figura 10 (pág. 19). Dentre os alcaloides reportados na literatura para essa espécie, foi observada a presença majoritária de prunifoleína (m/z 291, **44**), além dos alcaloides 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, **47**) e 10-hidroxiantirrina (m/z 313, **48**) no espectro de DESI-(+)-MS das folhas (Figura

77).

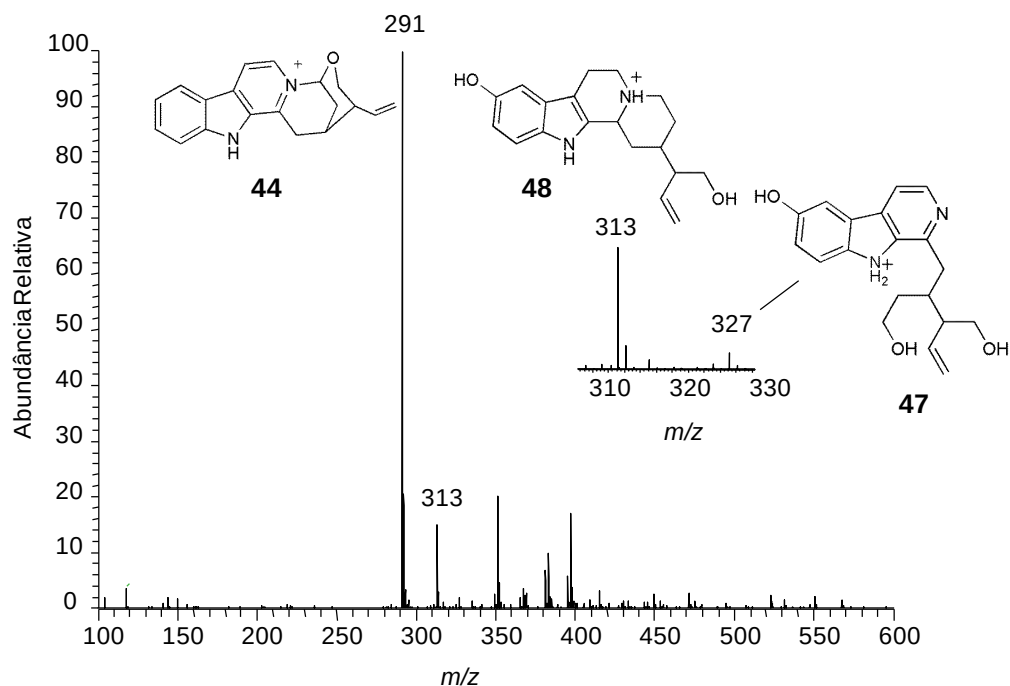


Figura 77. Espectro de DESI-(+)-MS da folha de *P. prunifolia* pelo método indireto no modo positivo obtido no imageamento, mostrando a presença majoritária do alcaloide prunifoleína (m/z 291, **44**), além dos alcaloides 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, **47**) e 10-hidroxiyantirrina (m/z 313, **48**).

A Figura 78 apresenta os espectros de fragmentação desses íons com a proposta de estrutura dos fragmentos.

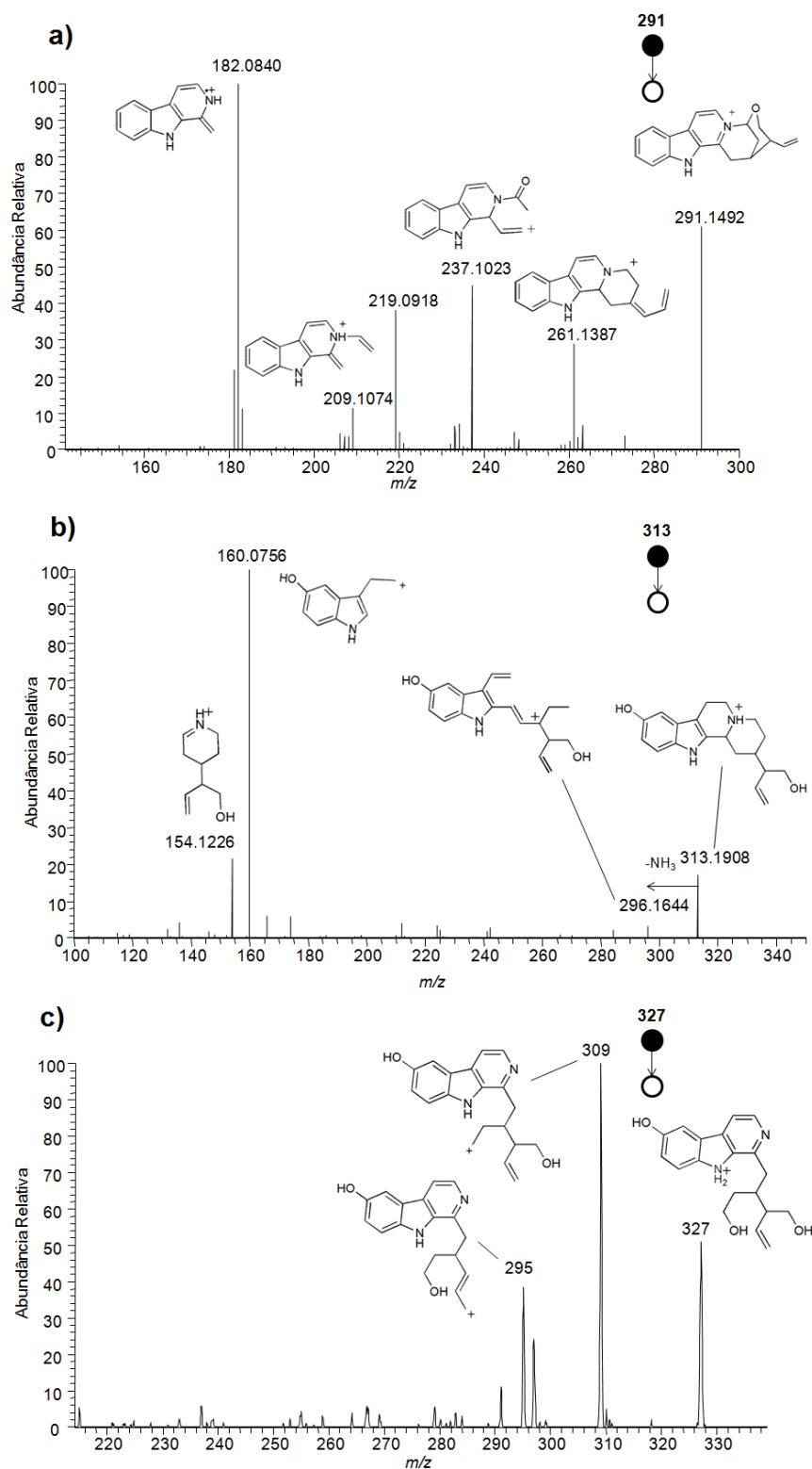


Figura 78. Espectros de DESI-(+)-MS/MS dos íons a) prunifoleína (**44**, m/z 291); b) 10-hidroxiántirrina (**48**, m/z 313); c) 10-hidroxiisodeppeanol (**47**, m/z 327), com a proposta estrutural dos fragmentos.

Como pode ser observado na Figura 78a, o espectro HR-ESI-(+)-

MS/MS do íon molecular m/z 291 contém fragmentos de m/z 261,1387 $[M-CH_2O]^+$ e m/z 237,1023 $[M-C_4H_6]^+$. O espectro HR-ESI-(+)-MS/MS da molécula protonada da 10-hidroxiantirrina (m/z 313, Figura 78b) contém fragmentos de m/z 296,1644, resultante da perda de NH_3 e de m/z 160,0756, originado após a perda de $C_9H_{15}NO$.

Devido à baixa intensidade do íon m/z 327 no experimento de infusão direta do extrato em Orbitrap, não foi possível obter o espectro de HR-ESI-(+)-MS/MS para o íon m/z 327, como realizado para os outros dois íons. Assim, o espectro de ESI-(+)-MS/MS da molécula protonada da 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, Figura 78c) foi obtido por DESI-MS antes de iniciar o experimento de imagem. O espectro de ESI-(+)-MS/MS apresentou fragmentos de m/z 309 e m/z 295, resultantes da perda de H_2O e CH_3OH , respectivamente.

A proposta de mecanismo de fragmentação está apresentada na Figura 79, a seguir.

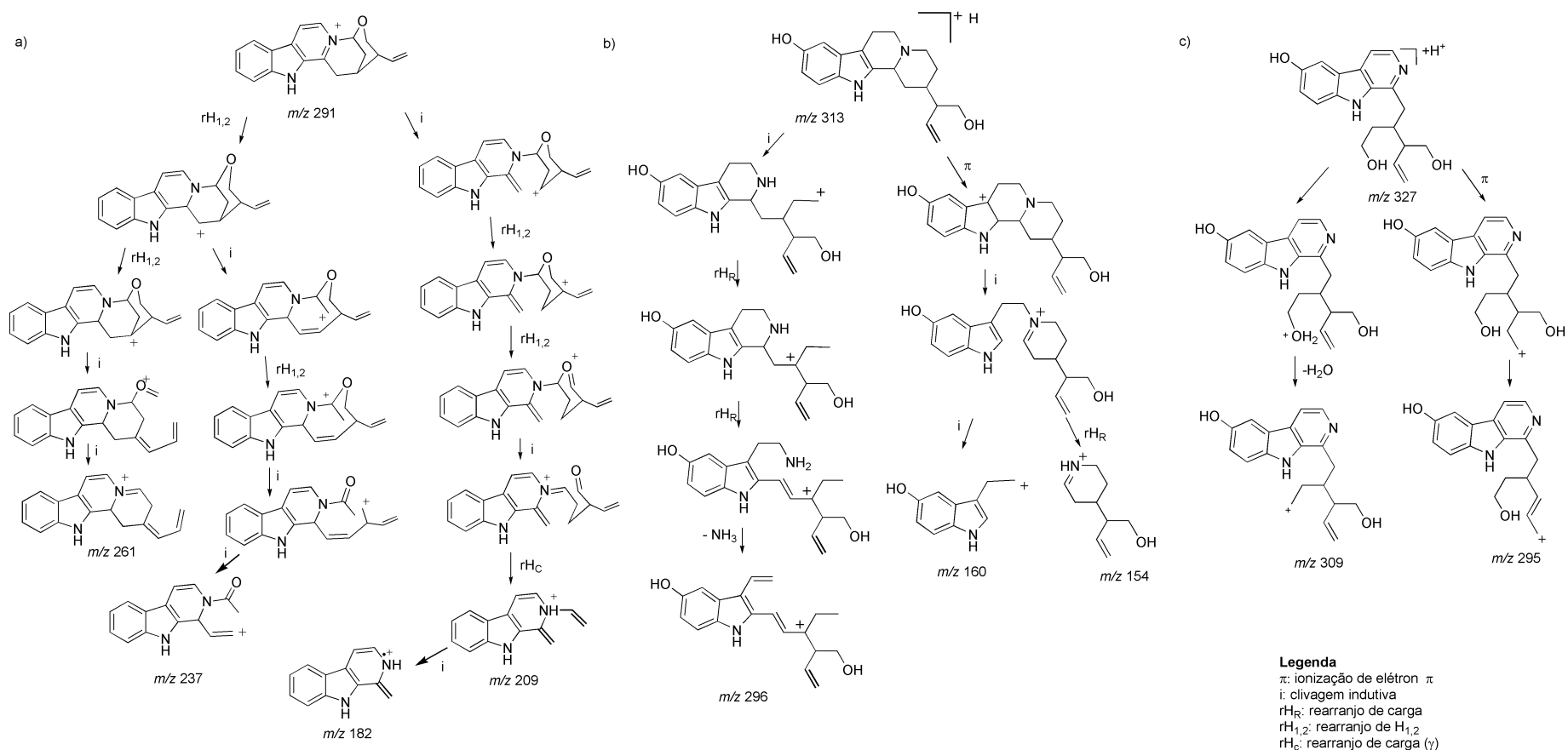


Figura 79. Propostas de mecanismos de fragmentação dos alcaloides a) prunifoleína, m/z 291, b) 10-hidroxiantirrina, m/z 313 e c) 10-hidroxiisodeppeaninol, m/z 327, de *P. prunifolia*.

No imageamento por DESI-MS da folha de *P. prunifolia*, observou-se uma distribuição homogênea por toda a folha dos alcaloides prunifoleína (m/z 291, Figura 80c) e 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, Figura 80e), com maior intensidade do sinal na nervura central, indicando um acúmulo desse composto nessa região em relação ao restante da folha. Para o alcaloide 10-hidroxiantirrina (m/z 313), observou-se uma distribuição homogênea por toda a folha.

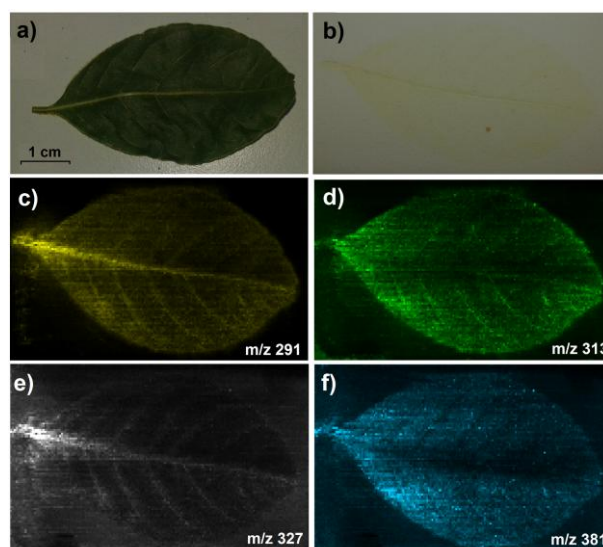


Figura 80. Folha adulta de *P. prunifolia* analisada por imageamento indireto por DESI-MS (49 x 27 mm). a) Foto da folha após *imprint*; b) Foto do *imprint* em PTFE; c) imagem de prunifoleína (m/z 291, **44**); d) imagem de 10-hidroxiantirrina (m/z 313, **48**), e) imagem de 10-hidroxiisodeppeaninol (m/z 327, **47**); f) imagem de m/z 381 (aduto [sacarose+K]⁺). O tamanho do pixel é de 300 μ m e o tempo de aquisição da imagem, 2h e 52 min. As cores diferentes atribuídas a imagem de cada composto não indicam diferença na intensidade do sinal. A escala de cores varia de preto a branco, sendo a cor preta a ausência do composto analisado, e a cor branca intensidade máxima no respectivo ponto.

4.2.2.2. *Palicourea coriacea*

P. coriacea é conhecida pela presença do alcaloide pirroloindólico calicantina (**11**) e dos alcaloides indólicos monoterpênicos **13-16**, apresentados na Figura 81 (do NASCIMENTO *et al.*, 2006).

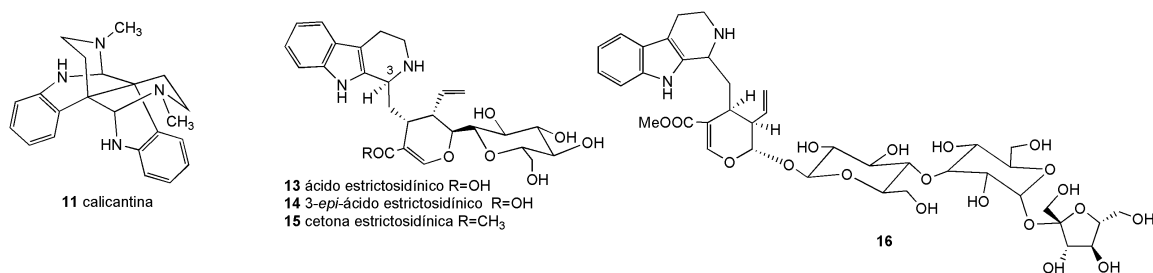


Figura 81. Alcaloides isolados de *Palicourea coriacea*.

No espectro de DESI-MS da folha (Figura 82), foi observada a presença majoritária da calicantina (**11**) detectado como $[M+H]^+$ de m/z 347. Em espectro HR-ESI-(+)-MS do extrato da folha, foi observado um íon de m/z 347,2230 (erro: 0,17 ppm), que sugere a fórmula molecular C₂₂H₂₆N₄. O espectro de ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 347 (Figura 83) apresentou um perfil de fragmentação consistente com dados descritos em literatura para o composto **11** (ZHANG *et al.*, 2009). O íon de m/z 173 foi identificado como o alcaloide noreleagnina, intermediário de formação dos alcaloides indólicos monoterpênicos, cuja análise de espectro HR-ESI-(+)-MS sugere a fórmula $[C_{11}H_{12}N_2+H]^+$ para o íon de m/z 173,1074 (erro: 0,58 ppm).

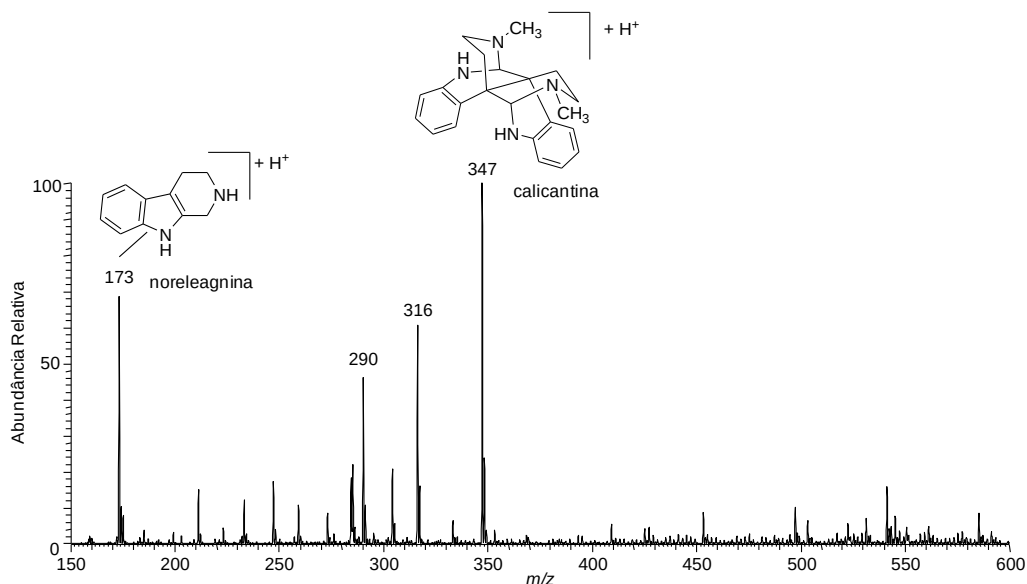


Figura 82. Espectro de DESI-(+)-MS da folha de *P. coriacea* pelo método indireto obtido no imageamento, mostrando a presença majoritária do alcaloide calicantina (m/z 347). O alcaloide noreleagnina (m/z 173) foi identificado pela primeira vez nessa espécie.

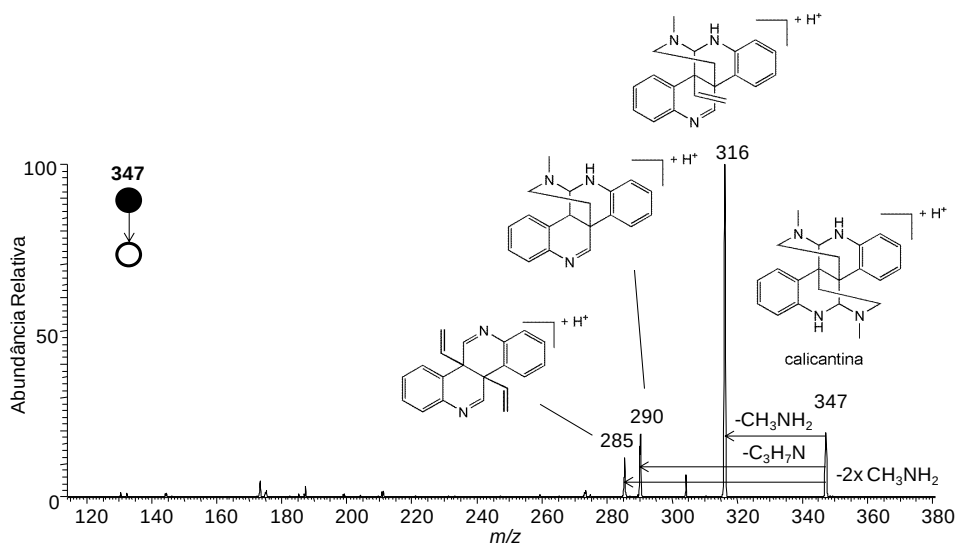


Figura 83. Espectro de DESI-(+)-MS/MS do íon m/z 347 (calicantina, **11**).

Outros íons observados no espectro da folha, tais como m/z 316 e 290, foram identificados como alcaloides intermediários biossintéticos da calicantina, cujas propostas estruturais estão apresentadas na Figura 83. O íon de m/z 316,1808 é compatível com a fórmula molecular C₂₁H₂₁N (erro < 0,1 ppm), observado em espectro HR-ESI-(+)-MS. Essas estruturas foram propostas baseadas na biossíntese da calicantina (ROBINSON e TEUBER, 1954; WOODWARD *et al.*, 1960 *apud* in POUPON e NAY, 2011), que está apresentada na Figura 84. A *N*-metiltriptamina (**68**), na presença de uma dimerase, forma os dímeros *d* e *l* (**69**) e o composto *meso* (**70**). Uma etapa intermediária de reação entre esses compostos e a quimonantina (**23**) envolvendo o fechamento de apenas um dos anéis levaria à formação dos intermediários m/z 316 e m/z 290.

Outra hipótese é que os íons m/z 316 e 290 sejam artefatos originados por fragmentação na fonte.

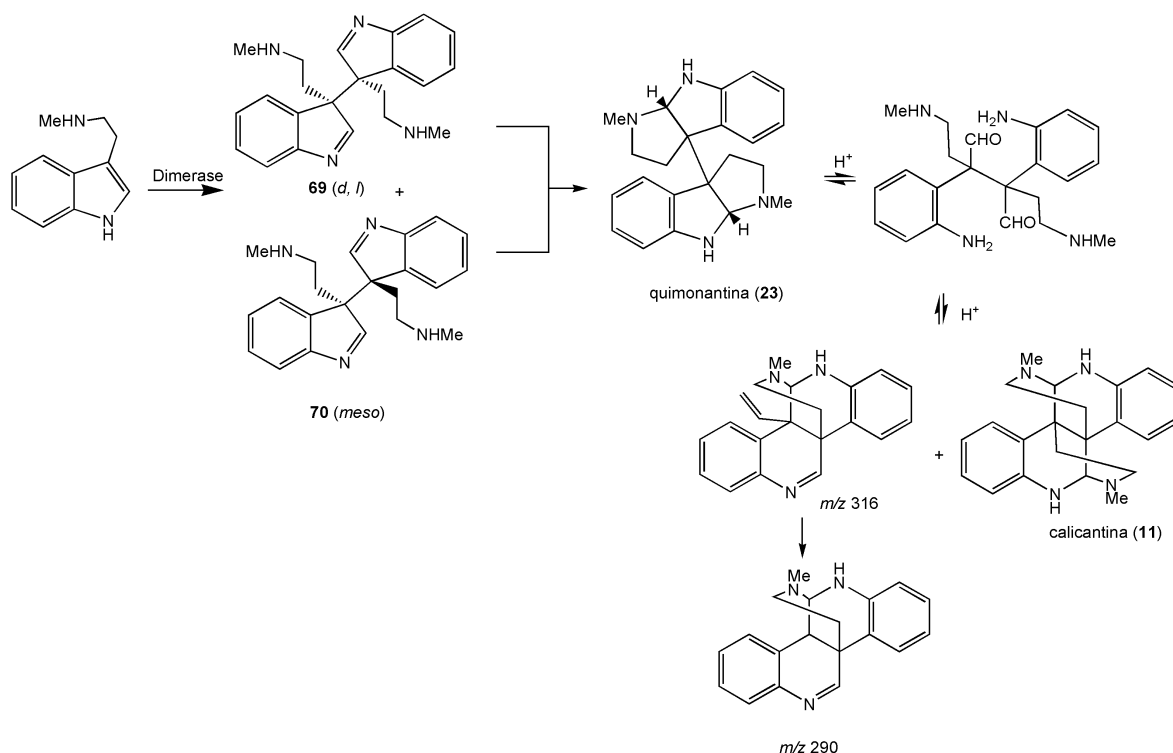


Figura 84. Biossíntese da calicantina proposta por Robinson (1954) e Woodward (1960). Adaptada de Poupon e Nay (2011).

Outro alcaloide observado em espectro de DESI-(+)-MS foi o íon m/z 517, identificado como ácido estrictosídico (**13**) ou 3-*epi*-strictosidínico (**14**) por espectrometria de massas *tandem* (Figura 85).

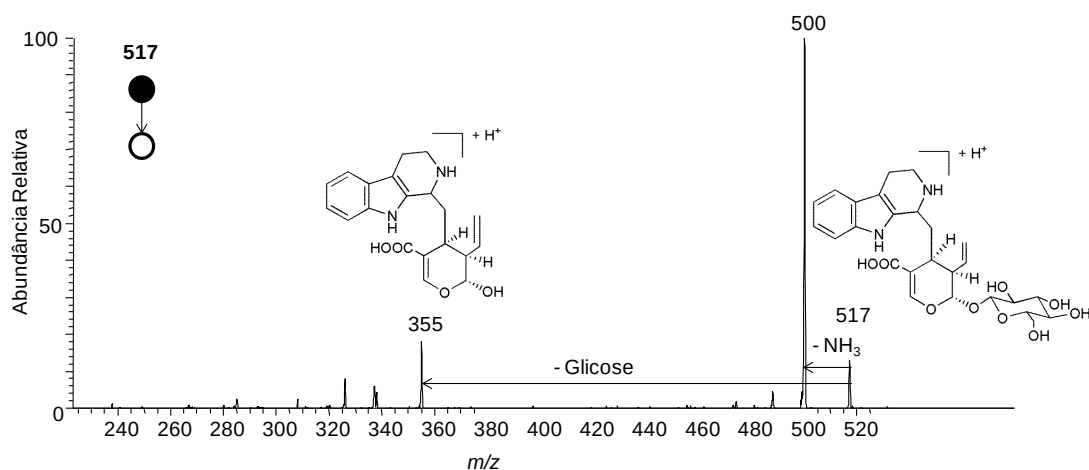


Figura 85. Espectro de DESI(+)-MS/MS do m/z 517 (ácido estrictosídico (**13**) ou 3-*epi*-strictosidínico (**14**)).

A análise no modo negativo mostrou a presença majoritária de um pico m/z 191, identificado como ácido quínico na forma $[M-H]^-$, por

comparação de seus dados de fragmentação com a literatura (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2015b). O espectro de massas de DESI-(-)-MS/MS desse íon é apresentado na Figura 86.

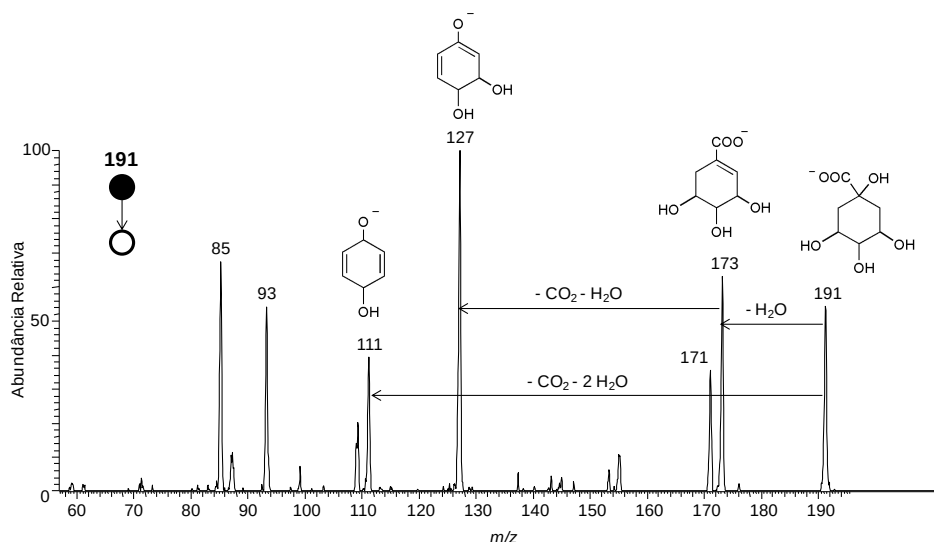


Figura 86. Espectro de DESI-(-)-MS/MS do m/z 191 ([ácido quínico- H] $^-$).

No imageamento por DESI-MS da folha no modo positivo, foi observado que o pico majoritário (m/z 347), identificado como calicantina, apresentou uma distribuição praticamente homogênea pela superfície foliar (Figura 87d). A Figura 87a mostra a foto de uma seção da folha de *P. coriacea* e a Figura 87b, a foto de seu *imprint* em PTFE.

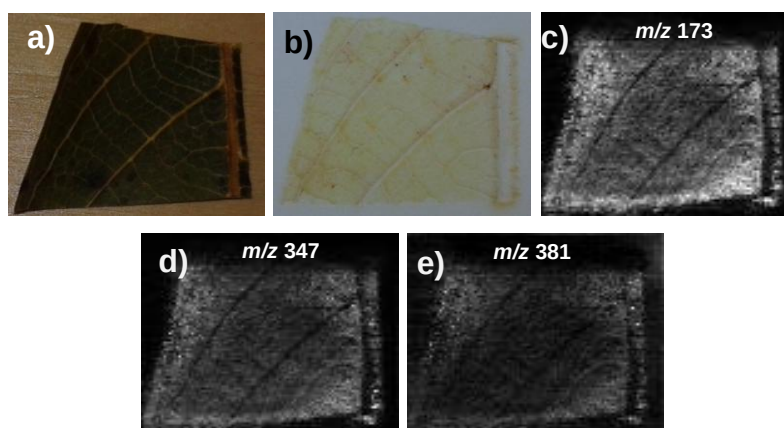


Figura 87. Seção da folha adulta de *P. coriacea* analisada por imageamento indireto por DESI-MS (28 x 24 mm). a) Foto. b) Foto do *imprint* em PTFE. Imagens obtidas para os íons: c) m/z 173 ([noreleagnina+ H] $^+$); d) m/z 347 (calicantina) e e) m/z 381 (aduto [sacarose+ K] $^+$). O tamanho do pixel é de 275 μ m e o tempo de aquisição da imagem, 1h e 54 min.

A fim de se verificar a distribuição dos metabólitos secundários na folha

inteira, foi analisada a folha jovem, cujo tamanho é de cerca de 2 cm, menor que uma folha adulta.

A análise da imagem do composto majoritário calicantina (m/z 347) na Figura 88g revelou que o composto apresenta uma distribuição homogênea em praticamente toda a folha, exceto na nervura central, o que sugere que esse composto seja produzido na própria folha. Outros compostos não identificados, tais como m/z 295 e 275, apresentaram diferentes padrões de distribuição, como mostra a Figura 88c e 88e.

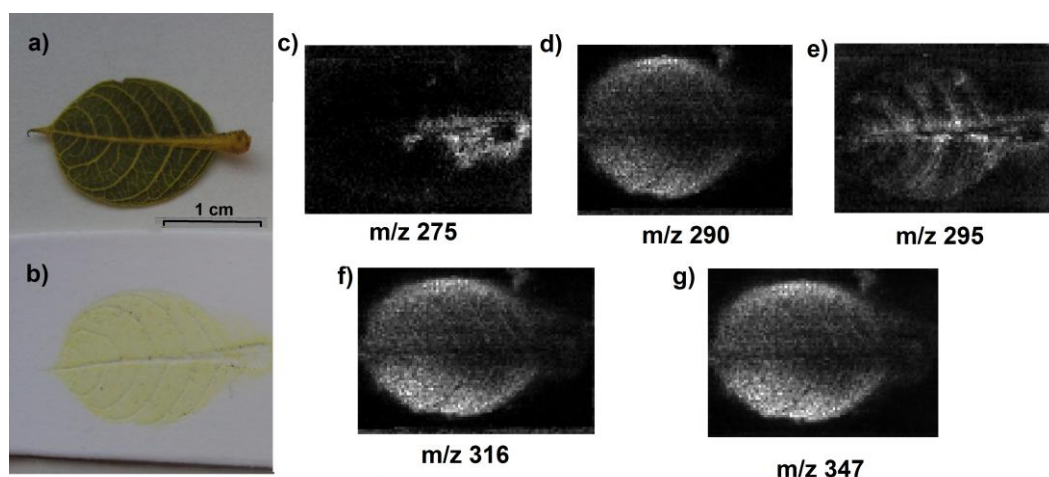


Figura 88. Folha jovem de *P. coriacea* analisada por imageamento indireto por DESI-(+)-MS (24 x 17 mm). a) Foto; b) Foto do *imprint* em PTFE; c) e e) imagens de compostos não-identificados; d) e f) imagem dos compostos de m/z 290 e 316; g) imagem do composto calicantina (m/z 347). O tamanho do pixel é de 250 μm e o tempo de aquisição da imagem, 1h e 21 min.

As diferentes proporções de MeOH:H₂O, variando entre 5% e 40% H₂O, foram testadas como solvente de DESI com o intuito de verificar a detecção dos outros metabólitos secundários já isolados dessa espécie, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e outros alcaloides indólicos (da SILVA *et al.*, 2008; do NASCIMENTO *et al.*, 2006), pela mudança na polaridade do solvente. No entanto, a mudança de solvente apenas alterou a relação sinal-ruído e a estabilidade dos sinais, não sendo observado nenhum sinal estável adicional na amostra.

4.2.2.3. *Palicourea rigida*

A Figura 89a apresenta um espectro de DESI-MS obtido pelo método

indireto da folha de *P. rigida*, no qual foi possível identificar pela primeira vez nessa espécie a presença do alcaloide strictosidina (m/z 531), identificado no espectro de HR-ESI-MS como pico $[M+H]^+$ de m/z 531,2339, com erro de 0,38 ppm. O espectro de ESI-MS/MS (Figura 89b) apresentou um perfil de fragmentação consistente com dados descritos na literatura (YAMAZAKI *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2016), no qual o pico de m/z 514 foi identificado como $[M+H-NH_3]^+$ e o pico de m/z 369, como $[M+H-Glc]^+$.

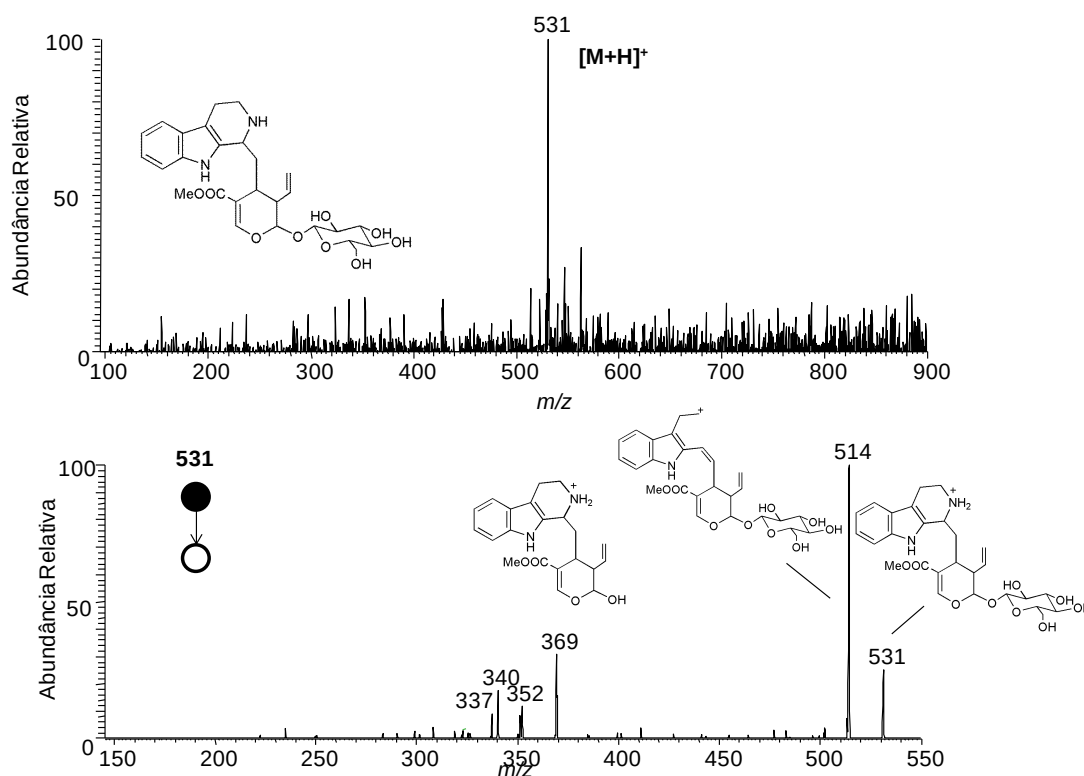


Figura 89. a) Espectro de DESI-MS da folha de *P. rigida* pelo método indireto no modo positivo, mostrando a presença majoritária do alcaloide strictosidina (m/z 531); b) Espectro de massas de ESI-(+)-MS/MS do íon de m/z 531.

Um mecanismo de fragmentação do íon m/z 531 foi proposto por Costa e colaboradores (2016) e está apresentado na Figura 90. Segundo esse mecanismo, o íon m/z 514 $[M+H-17\text{ Da}]$ é originado pela perda de NH_3 de acordo com a rota A, e o íon m/z 352 $[M+H-179\text{ Da}]$ é originado a partir do rearranjo de hidrogênio seguido da clivagem heterolítica da ligação C21-O-C1' (rota C). O fragmento m/z 369 $[M+H-162\text{ Da}]$ é provavelmente

gerado a partir da clivagem heterolítica direta da ligação C21-O-C1' (rota C).

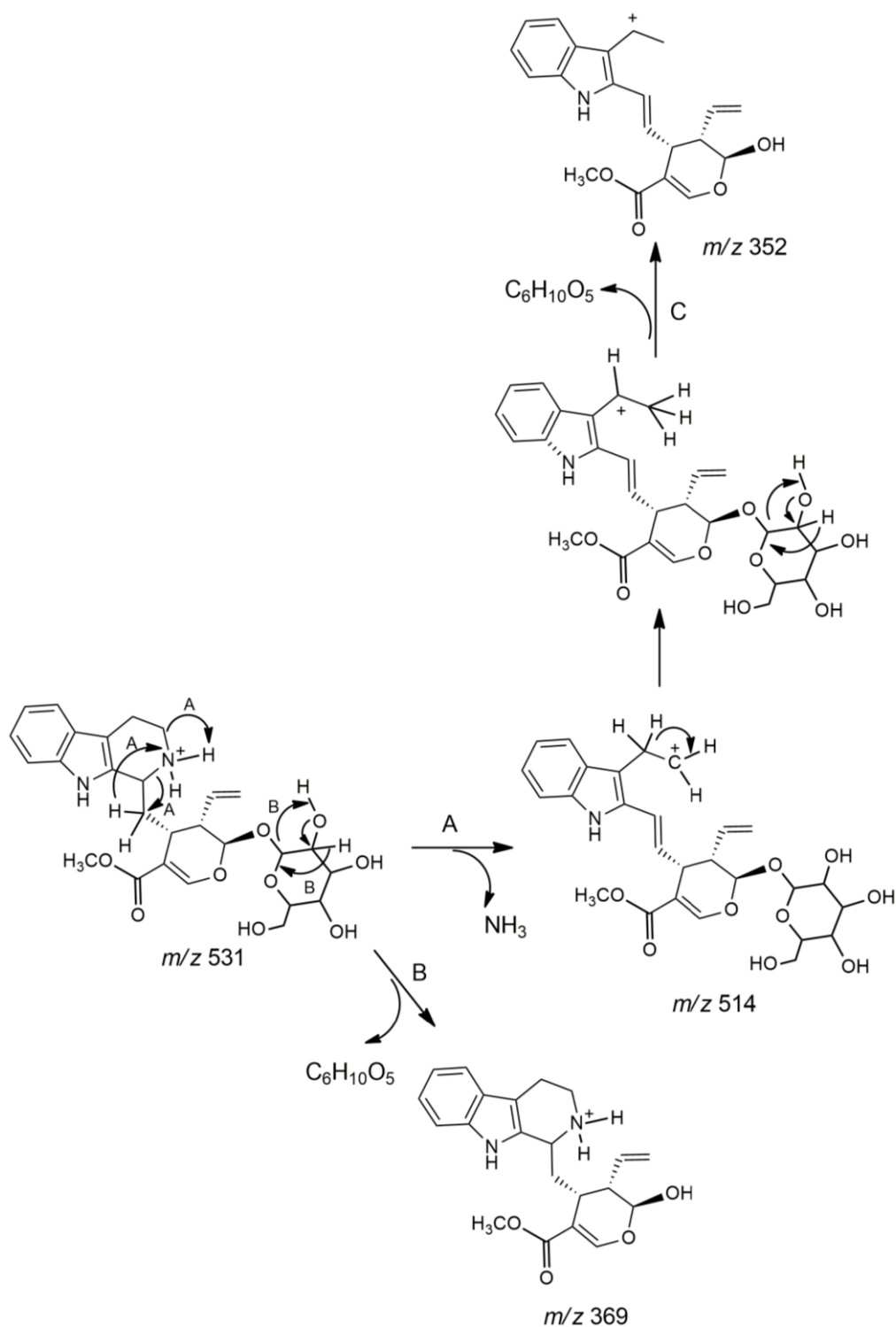


Figura 90. Proposta de mecanismo de fragmentação do íon m/z 531 (strictosidina). Figura extraída de Costa e colaboradores (2016), com permissão.

Apesar de várias tentativas de imageamento variando diferentes

condições experimentais, tais como solvente e parâmetros geométricos, não foi possível detectar nenhum sinal estável e, por conseguinte, uma imagem de boa qualidade das folhas dessa espécie. Isso provavelmente foi causado pela característica de dureza e grossa camada de cutícula das folhas, que dificulta a transferência dos analitos para a superfície do PTFE.

4.2.2.4. *Palicourea officinalis*

A análise de DESI-MS das folhas de *P. officinalis* foi realizada com o objetivo de se verificar o perfil metabólico e comparar com os compostos identificados e descritos no item 4.1. No entanto, os espectros apresentaram um perfil de sinais totalmente diferentes dos compostos esperados, e por isso a etapa seguinte, que seria a produção das imagens químicas das folhas, não foi realizada. Provavelmente, a diferença no perfil metabólico ocorreu em razão dos diferentes locais de coleta da espécie para o estudo fitoquímico e para o imageamento (Catalão e Brasília, respectivamente).

4.2.3. Quantificação relativa por LC-MS

Imagens químicas obtidas por espectrometria de massas são consideradas semiquantitativas quando não utilizadas condições experimentais que garantam quantificação, tais como o uso de padrões internos isotopicamente marcados (GARCÍA-REYES *et al.*, 2008; KÄLLBACK *et al.*, 2012) ou não marcados (KOENIGER *et al.*, 2011). A característica de quantificação relativa é inerente do processo de dessorção e ionização, cuja eficiência pode ser afetada pelas características da superfície a ser analisada e pelo efeito de supressão iônica. Assim, a fim de verificar a distribuição observada na imagem química, a técnica de LC-MS/MS foi utilizada na quantificação dos compostos majoritários detectados no imageamento das folhas. Para isso, foi realizada a comparação das concentrações dos alcaloides presentes na nervura central e lâmina, por experimentos de monitoramento de reação múltipla em espectrometria de massas (MRM-MS), dadas pela área do pico cromatográfico de cada composto. O íon fragmento de cada analito escolhido para o experimento de MRM-MS está apresentado na Tabela 22.

Tabela 22. Íons analisados em experimento de quantificação relativa por LC-MS/MS dos extratos de *Palicourea coriacea* e *Psychotria prunifolia*.

Espécie	MS ²		Composto
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	
<i>Palicourea coriacea</i>	347	285	calicantina (11)
	291	237	prunifoleína (44)
<i>Psychotria prunifolia</i>	313	160	10-hidroxiantirrina(48)
	327	297	10-hidroxiisodeppeaninol (47)

Os resultados da análise dos extratos das folhas das espécies estudadas por LC-MS (Figura 91) confirmaram os dados obtidos por DESI-MSI. Para a espécie *P. coriacea*, observou-se uma maior concentração do composto calicantina (**11**, *m/z* 347) distribuída na folha (lâmina) e menor na nervura central (Figura 88g), a um nível de confiança de 99,5% pelo teste *t*

de Student. Já para a espécie *P. prunifolia*, a distribuição na folha foi inversa para os compostos prunifoleína (**44**, m/z 291) e 10-hidroxiisodeppeaninol (**47**, m/z 327), que apresentaram uma concentração significativamente maior desses compostos na nervura central (Figura 80c e 80e, respectivamente), a um nível de confiança de 95%, quando comparada com o restante da folha, indicando o provável transporte desse alcaloide por toda a planta. Já para o composto de 10-hidroxiantirrina (**48**, m/z 313) não houve diferença significativa de distribuição entre lâmina e nervura central, assim como sugere a imagem obtida por DESI-MS (Figura 80d).

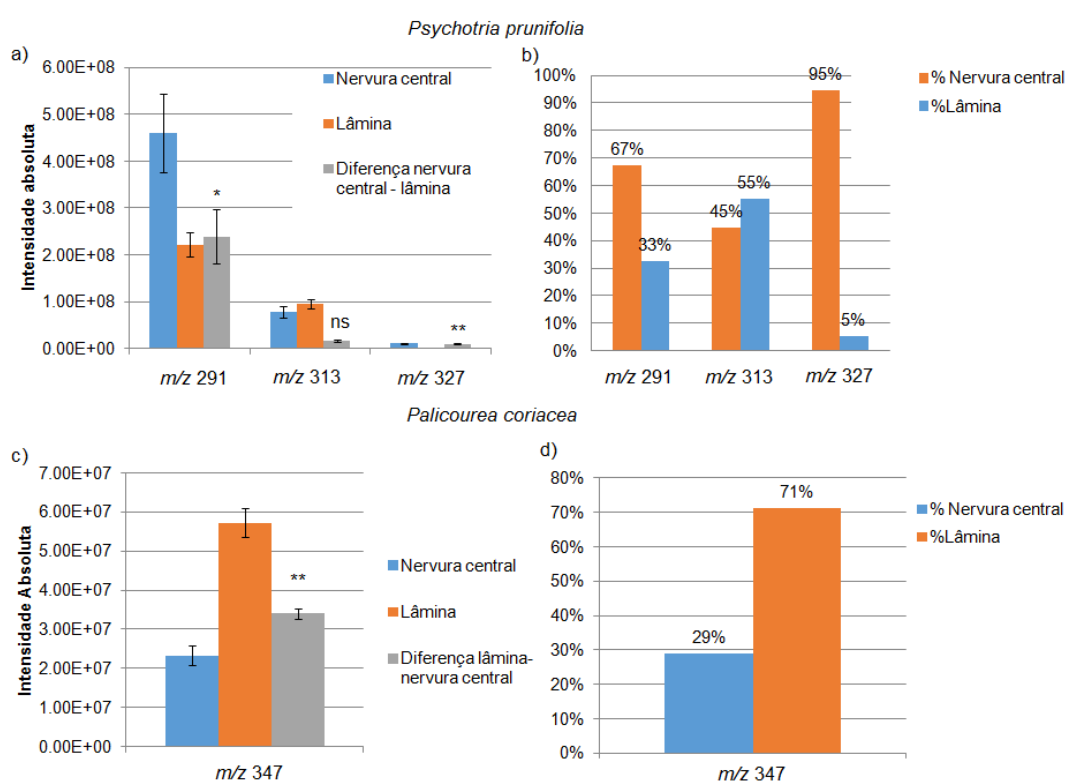


Figura 91. Resultados da análise por LC-MS dos extratos das folhas das espécies *P. prunifolia* em **a)** e **b)** e *P. officinalis* em **c)** e **d)**., sendo que em **a)** e **c)** os resultados estão expressos em intensidade absoluta e **b)** e **d)** em porcentagem. As barras de erros em **a)** e **c)** são referentes ao desvio padrão ($n = 3$). Os asteriscos indicam que as diferenças entre a concentração dos compostos encontrada nas folhas e na nervura central são significativamente maiores que zero a nível de 95% (*), 99% (**) pelo teste t de Student unicaudal. ns: diferença não significativa.

A técnica de DESI-MSI demonstrou ser uma ferramenta importante para fornecer informações de localização espacial de metabólitos em tecidos

vegetais e foi utilizada pela primeira vez em diferentes espécies de *Palicourea* e *Psychotria* para fornecer informações sobre a distribuição dos alcaloides indólicos nas folhas. Devido à ausência de separação antes da detecção por MS, experimentos de MSI são suscetíveis ao efeito de supressão iônica, podendo levar a resultados enganosos em relação à concentração dos compostos. Assim, a técnica de LC-MS foi utilizada para verificar os resultados obtidos por DESI-MSI e os mesmos foram confirmados.

Conclusão



5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Palicourea officinalis*, por meio do isolamento por cromatografia e elucidação estrutural por RMN e espectrometria de massas levou à identificação do alcaloide inédito 18-*epi*-braquicerina e dos seguintes metabólitos secundários conhecidos: os norisoprenoides guettardionosídeo e 3-oxo- α -ionol 9-O- β -D-apiofuranosil(1"→6')- β -D-glicopiranosídeo e a mistura vomifoliol 9-glicopiranosídeo, vomifoliol 9-O- β -D-apiofuranosil(1"→6')- β -D-glicopiranosídeo e 9-O- β -D-apiofuranosil(1"→6')- β -D-glicopiranosídeo, a lignana siringaresinol-4'- β -D-glicosídeo, a mistura de pirazinas 2,5-desoxifruktosazina, 2,6-desoxifruktosazina e fruktosazina, os flavonoides quercetina 3-O-soforosídeo e canferol 3-O-soforosídeo, os ácidos clorogênicos 3-cafeoil e 4-cafeoilquínicos, a mistura de ácidos feruloilquínicos, o ácido salicílico, a cumarina escopoletina, além das misturas dos triterpenoides ácidos ursólico e oleanólico e dos esteroides sitosterol e estigmasterol glicosilados.

A identificação do alcaloide 18-*epi*-braquicerina e sua diferenciação em relação à estereoquímica relativa de C-18 contou com o auxílio do *software* Windnmr, que permite a comparação dos perfis dos espectros simulados e experimentais. Assim, foi possível observar que os dados de constantes de acoplamento de H-18 e H-19 reportados na literatura apresentam perfis diferentes dos obtidos experimentalmente. Por tentativa e erro, foram simulados novos valores de constantes de acoplamento que resultassem em perfis semelhantes aos experimentais, mostrando que a estereoquímica relativa entre H-18 e H-19 era *trans* e não *cis*.

Os resultados de identificação de novos compostos contribuem para ampliação do conhecimento químico de espécies do gênero *Palicourea*, em especial para a espécie medicinal *P. officinalis*.

Além disso, nesse trabalho foi realizado o desenvolvimento/aplicação da técnica de DESI-MS direto e indireto na obtenção da imagem química dos alcaloides presentes nas folhas de *Palicourea coriacea*, *P. rigida*, *P.*

officinalis e *Psychotria prunifolia*, as quais são espécies que foram previamente estudadas em nosso grupo de pesquisa e que possuem uma composição química conhecida. A aplicação do método direto confirmou sua dificuldade na obtenção de boas imagens em folhas devido à baixa ionização dos analitos pela presença da cutícula foliar. Já o método indireto a partir do *imprint* em PTFE mostrou-se ser robusto e reprodutível, permitindo a caracterização das folhas das espécies *Palicourea coriacea* e *Psychotria prunifolia*. Para *P. coriacea*, foi detectado apenas um alcaloide identificado como calicantina, que apresentou uma distribuição homogênea sobre a folha, com menor concentração nos veios. Já para *P. prunifolia*, foram detectados três alcaloides: a presença majoritária de prunifoleína (**44**), além dos alcaloides 10-hidroxiisodeppeanol (**47**) e 10-hidroxiantirrina (**48**), os quais apresentaram diferentes perfis de localização na folha.

Este trabalho é pioneiro na aplicação com sucesso da técnica de imageamento de tecidos vegetais em plantas do Cerrado e representa um avanço no uso de novas abordagens no estudo de produtos naturais em plantas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliação biológica dos compostos isolados, tais como a potencial ação inibitória das enzimas monoaminaoxidasas, relacionadas à doença de Alzheimer, pelo alcaloide 18-*epi*-brauicerina;
- Refazer a coleta das folhas de *Palicourea officinalis* no mesmo local da coleta do material utilizado no estudo fitoquímico, em Catalão, para realização dos experimentos de imagem química das folhas.
- Comparar os perfis químicos das folhas de *Palicourea officinalis* em diferentes locais de coleta e confirmar se há diferenciação dos metabólitos secundários produzidos.
- Aplicar a técnica de imageamento para caracterização de outras espécies da família Rubiaceae, cujo perfil químico ainda não é conhecido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNUR, P. V. A espectrometria de massas e as bio-moléculas: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

AGRAWAL, P. K. e THAKUR, R. S. ^{13}C NMR Spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 23, 389–418, 1985.

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 265-294, 2010.

ALVES, V. G.; DA ROSA, E. A.; de ARRUDA, L. L.; ROCHA, B. A.; AMADO, C. A. B.; SANTIN, S. M.; POMINI, A. M.; SILVA, C. C. Acute toxicity, antiedematogenic activity, and chemical constituents of *Palicourea rigida* Kunth. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(3-4), 39-43, 2016.

ANDERSSON, L.; ROVA, J. H. E. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubiaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 214, 161–186, 1999.

AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization, *Applied Spectroscopy Reviews*, 50 (2), 158-175, 2015.

BAYKAL, T.; PANAYIR, T.; TASDEMIR, D.; STICHER, O.; ÇALIS, I. Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. *Phytochemistry*, 48 (5), 867- 873, 1998.

BECKER, L.; CARRÉ, V.; POUTARAUD, A.; MERDINOGLU, D.; CHAIMBAULT, P. MALDI mass spectrometry imaging for the simultaneous location of resveratrol, pterostilbene and viniferins on grapevine leaves. *Molecules*, 19, 10587–10600, 2014.

BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER, H. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (= *Psychotria acuminata*, Rubiaceae). *Phytochemistry Letters*, 5(3), 558-562, 2012.

BERGER, A.; KOSTYAN, M. K.; KLOSE, S. I.; GASTEGGER, M.; LORBEER, E.; BRECKER, L.; SCHINNERL, J. Loganin and secologanin derived tryptamine–iridoid alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 116, 162-169, 2015.

- BERGER, A.; PREINFALK, A.; ROBIEN, W.; BRECKER, L.; VALANT-VETSCHERA, K.; SCHINNERL, J. New reports on flavonoids, benzoic-and chlorogenic acids as rare features in the *Psychotria* alliance (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 145-153, 2016.
- BODZON-KULAKOWSKA, A.; DRABIK, A.; NER, J.; KOTLINSKA, J. H.; SUDER, P. Desorption electrospray ionisation (DESI) for beginners – how to adjust settings for tissue imaging. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28, 1–9, 2014.
- BOGGIO, K. J., OBASUYI, E., SUGINO, K., NELSON, S. B., AGAR, N. Y., & AGAR, J. N. Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact. *Expert Review of Proteomics*, 8(5), 591-604, 2011.
- BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K.; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C.; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. A Novel Anti-HIV Macrocyclic Peptide from *Palicourea condensata*. *Journal of Natural Products*, 64(2), 249-250, 2001.
- BOLZANI, V. da S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. Triterpenes of *Palicourea rigida* H.B.K. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 23(1), 20-1, 1992.
- BORHIDI, A. Transfer of the Mexican species of *Psychotria* subgen. *Heteropsychotria* to *Palicourea* based on morphological and molecular evidences. *Acta Botanica Hungarica*, 53(3-4), 241-250, 2011.
- BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96, 4–26, 2009.
- BURREL, M. M.; EARNSHAW, C. J.; CLENCH, M. R. Imaging Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. *Journal of Experimental Botany*, 58 (4), 757-763, 2007.
- BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: β -amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. *Plant Physiology*, 160(2), 1120-1129, 2012.
- BUTLER, M. S. J. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. 67, 2141–2153, 2004.
- CAI, W. H.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; SHINZATO, T.; TAKEDA, Y. A glycerol α -D-glucuronide and a megastigmane glycoside from the leaves of *Guettarda speciosa* L. *Journal of Natural Medicines*, 65(2), 364-369, 2011.
- CALIXTO, N. O.; PINTO, M. E. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER, M. C. M.; BOBEY, A. F.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; PINTO, A. C. The genus *Psychotria*: phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 27(8), 1355-

1378, 2016.

CARVALHO, K. D. L. F.; COOK, D.; LEE, S. T.; TAYLOR, C. M.; OLIVEIRA, J. B. S.; RIET-CORREA, F. Determination of toxicity in rabbits and corresponding detection of monofluoroacetate in four *Palicourea* (Rubiaceae) species from the Amazonas state, Brazil. *Toxicon*, 109, 42-44, 2016.

CHA, S.; ZHANG, H.; ILARSLAN, H. I.; WURTELE, E. S.; BRACHOVA, L.; NIKOLAU, B. J.; YEUNG, E. S. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *The Plant Journal*, 55(2), 348-360, 2008.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2900-2911, 2003.

COELHO, E. G.; AMARAL, A. C. F.; FERREIRA, J. L. P.; dos SANTOS, A. G.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. D. A. Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora*, an endemic species in the Amazonas state. *Toxicon*, 49(3), 407-409, 2007.

CORREA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, 18, 460, 1995.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). *Química Nova*, 26, 36-38, 2003.

COSTA, A. B.; COOKS, R. G. Simulated splashes: elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chemical Physics Letters*, 464(1), 1-8, 2008.

COSTA, R. A.; PINHEIRO, M. L. B.; de OLIVEIRA, K. M. T.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; IANK, J. R.; da SILVA, N. G.; CABRAL, T. S.; COSTA E. V. Structural, vibrational, and electronic properties of the glucoalkaloid strictosidine: a combined experimental and theoretical study. *Journal of Chemistry*, 2016, Article ID 1752429, 16 páginas, 2016.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. *Journal of Natural Products*, 69 (3), 488 -498, 2006.

D'AGOSTINO, P. A.; CHENIER, C. L.; HANCOCK, J. R.; LEPAGE, C. R. J. Desorption electrospray ionisation mass spectrometric analysis of chemical warfare agents from solid-phase microextraction fibers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (4), 543-549, 2007.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; RUHSAM, M.; MOAT, J.; BRUMMITT, N. A. A global assessment of distribution, diversity, endemism,

and taxonomic effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 68-78, 2009.

DELPRETE, P.G. RUBIACEAE. IN: SMITH, N.P. *et al.* Ed. Princeton University Press/ New York Botanical Garden Press, p. 328-333, 2004.

DELPRETE, P.G. Flora dos Estados de Goiás e Tocantins: Rubiaceae. Coordenador: José Angelo Rizzo. Goiânia: PRRPG/UFG e IRD, p. 783-788, 2010.

DELPRETE, P. G.; KIRKBRIDE JR, J. H. New combinations and new names in *Palicourea* (Rubiaceae) for species of *Psychotria* subgenus *Heteropsychotria* occurring in the Guianas. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 10(2), 2016.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3ª ed. Reino Unido, John Wiley & Sons, 2009.

DILL, A. L.; IFA, D. R.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*, 877(26), 2883-2889, 2009.

DOLE, M.; MACH, L.; HINES, R.L.; MOBLEY, R.C.; FERGUSON, L.D.; ALICE, M.B. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49, 2240–2247, 1968.

DONG, Y.; LI, B.; MALITSKY, S.; ROGACHEV, I.; AHARONI, A.; KAFTAN, F.; SVATOŠ, A.; FRANCESCHI, P. Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: a review. *Frontiers in plant science*, 7, 2016.

DÜSMAN, L. T.; MARINHO JORGE, T. C.; SOUZA, M. C. D.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C.; BOCCA, C. C.; BASSO, E. A.; SARRAGIOTTO, M. H. Monoterpene indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1886-1888, 2004.

EL-SEEDI, H. R. Coumarins, benzoic acids and terpenoids from *Palicourea demissa*. *Revista Latinoamericana de Química*, 27(1), 13-16, 1999.

ENOMOTO, H.; SENSU, T.; SATO, K.; SATO, F.; PAXTON, T.; YUMOTO, E.; MIYAMOTO, K.; ASAHINA, M.; YOKOTA, T.; YAMANE, H. Visualisation of abscisic acid and 12-oxo-phytodienoic acid in immature *Phaseolus vulgaris* L. seeds using desorption electrospray ionisation-imaging mass spectrometry. *Scientific Reports*, 7, 2017.

FALCÃO, D. Q. Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro, 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FARIA, E. O.; KATO, L.; de OLIVEIRA, C. M.; CARVALHO, B. G.; SILVA, C. C.; SALES, L. S.; Schuquel, I. T. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; DELPRETE, P. G. Quaternary β -carboline alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyer. *Phytochemistry Letters*, 3(3), 113-116, 2010.

FERREIRA JÚNIOR, W. S.; CRUZ, M. P.; DOS SANTOS, L. L.; MEDEIROS, M. F. T. Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): plants for medicinal use from the 16th century to the present. *Journal of Herbal Medicine*, 2(4), 103-112, 2012.

FLETCHER, W. The products of *Cinchona* in the treatment of malaria. *The British Medical Journal*, 1, 154, 1926.

FREITAS, P. C. M.; PUCCI, L. L.; VIEIRA, M. S.; LINO, R. S.; OLIVEIRA, C. M. A.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Diuretic activity and acute oral toxicity of *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum. *Journal of ethnopharmacology*, 134(2), 501-503, 2011.

de GARCIA, L. A.; TOBON, C. F.; MORA, C. E. Cytotoxicity of the constituents of *Palicourea ovalis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26, 55–57, 1997.

GARCÍA-REYES, J. F., JACKSON, A. U., MOLINA-DÍAZ, A., & COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for trace analysis of agrochemicals in food. *Analytical chemistry*, 81(2), 820-829, 2008.

GONZAGA, A. D.; GARCIA, M. V. B.; de SOUSA, S. G. A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R. D. S.; RIBEIRO, J. D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea margravii* St Hil) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). *Acta Amazonica*, 38, 101–106, 2008.

GÓRNIK S.L.; SOUZA-SPINOSA H.; PALERMO-NETO J.; FERRO V.O.; OLIVEIRA, F. Chromatographic isolation of caffeine from *Palicourea marcgravii*. *Veterinary and Human Toxicology*, 28(6), 542, 1986.

GREGIANINI, T. S.; SILVEIRA, V. C.; PORTO, D. D.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; FETT-NETO, A. G. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochemistry and Photobiology*, 78(5), 470-474, 2003.

HARRIS, G. A.; GALHENA, A. S.; FERNÁNDEZ, F. M. Ambient sampling/ionization mass spectrometry: applications and current trends. *Analytical Chemistry*, 83, 4508-4538, 2011.

HOU, C. T. A novel compound, 12, 13, 17-trihydroxy-9 (Z)-Octadecenoic acid, from linoleic acid by a new microbial isolate *Clavibacter* sp. ALA2. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(11), 1359-1362, 1996.

IFA, D. R.; WISEMAN, J. M.; SONG, Q.; COOKS, R. G. Development of

capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *International Journal of Mass Spectrometry*, 259, 1-3, 8 -15, 2007.

IFA, D. R.; MANICKE, N. E.; RUSINE, A. L.; COOKS, R. G. Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 22, 503–510, 2008.

IFA, D. R.; SRIMANY, A.; EBERLIN, L. S.; NAIK, H. R.; BHAT, V.; COOKS, R. G.; PRADEEP, T. Tissue *imprint* imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods*, 3(8), 1910-1912, 2011.

JAEGER, R. J.; LAMSHOFT, M.; GOTTFRIED, S.; SPITELLER, M.; SPITELLER, P. HR-MALDI-MS imaging assisted screening of β -carboline alkaloids discovered from *Mycena metata*. *Journal of Natural Products*, 76(2), 127-134, 2013.

JANFELT, C. Imaging of plant materials using indirect desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 1203, 91–97, 2015.

JEREZANO, A.; JIMÉNEZ, F.; DEL CARMEN CRUZ, M.; MONTIEL, L. E.; DELGADO, F.; TAMARIZ, J. New approach for the construction of the coumarin frame and application in the total synthesis of natural products. *Helvetica Chimica Acta*, 94(2), 185-198, 2011.

JIA, L.; WANG, Y.; QIAO, Y.; QI, Y.; HOU, X. Efficient one-pot synthesis of deoxyfructosazine and fructosazine from d-glucosamine hydrochloride using a basic ionic liquid as a dual solvent-catalyst. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4(83), 44253-44260, 2014.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, M. F. G. S.; FILHO, E. R.; FRUHAUF, M.; BARAÑANO, A. G. Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia Florida* DC. *Revista de Pesquisa e Pós-Graduação*, Erechim, RS, Brasil, 01, 13-30, 2000.

JUSTES, D. R.; TALATY, N.; COTTE-RODRIGUEZ, I.; COOKS, R. G. Detection of explosives on skin using ambient ionization mass spectrometry. *Chemical Communications*, 21, 2142, 2007.

KÄLLBACK, P., SHARIATGORJI, M., NILSSON, A., & ANDRÉN, P. E. Novel mass spectrometry imaging *software* assisting labeled normalization and quantitation of drugs and neuropeptides directly in tissue sections. *Journal of Proteomics*, 75(16), 4941-4951, 2012.

KATO, L.; de OLIVEIRA, C. M. A.; de FARIA, E. O.; RIBEIRO, L. C.; CARVALHO, B. G.; da SILVA, C. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. O.; NAKAMURA, C. V.; BRITA, E.; MIRANDA, N.; IGLESIAS, A.; DELPRETE, P.

G. Antiprotozoal alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 355-360, 2012.

KEBARLE, P. AND VERKERK, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. Mass Spectrometry Reviews, 28, 898–917, 2009.

KEMMERLING, W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro-beta-carboline. Zeitschrift für Naturforschung C, 51(1-2), 59-64, 1996.

KERBER, V. A.; GREGIANINI, T. S.; PARANHOS, J. T.; SCHWAMBACH, J.; FARIAS, F.; FETT, J. P.; ZUANAZZI, J. A. S.; QUIRION, J.-C.; ELIZABETSKY, E.; HENRIQUES, A. T. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. Journal of Natural Products, 64(5), 677-679, 2001.

KIM, T. H.; KU, S. K.; LEE, I. C.; BAE, J. S. Anti-inflammatory effects of kaempferol-3-O-sophoroside in human endothelial cells. Inflammation Research, 61(3), 217-224, 2012.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science, 228(4703), 1049-1055, 1985.

KLEIN JUNIOR, L.; SANTOS PASSOS, C.; MORAES, A. P.; WAKUI, V.; KONRATH, E.; NURISSO, A.; CARRUPT, P.-A.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; HENRIQUES, A. T. Indole alkaloids and semisynthetic indole derivatives as multifunctional scaffolds aiming the inhibition of enzymes related to neurodegenerative diseases - a focus on *Psychotria* L. genus. Current Topics in Medicinal Chemistry, 14, 1056-1075, 2014.

KLINKERT, I.; CHUGHTAI, K.; ELLIS, S.R.; HEEREN, R.M.A. Methods for full resolution data exploration and visualization for large 2D and 3D mass spectrometry imaging datasets. International Journal of Mass Spectrometry, 362, 40-47, 2014.

KOENIGER, S. L.; TALATY, N.; LUO, Y.; READY, D.; VOORBACH, M.; SEIFERT, T.; CEPA, S.; FAGERLAND, J. A.; BOUSKA, J.; BUCK, W.; JOHNSON, R. W.; JOHNSON, R. W. A quantitation method for mass spectrometry imaging. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 25(4), 503-510, 2011.

KUMARA, P. M.; SRIMANY, A.; RAVIKANTH, G.; SHAANKER, R. U.; PRADEEP, T. Ambient ionization mass spectrometry imaging of rohitukine, a chromone anti-cancer alkaloid, during seed development in *Dysoxylum binectariferum* Hook.f (Meliaceae). Phytochemistry, 116, 104-110, 2015.

LI, B.; BJARNHOLT, N.; HANSEN, S. H; JANFELT, C. Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization

imaging mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46 (12), 1241-1246, 2011.

LI, B.; HANSEN, S. H.; JANFELT, C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petal by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal Mass Spectrometry*, 348, 15-22, 2013.

LIMA, G.S.; MOURA, F.S.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M. R. V. Barbosa (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 19, n.1B, p. 284-289, 2009.

LIU, Y.; MIAO, Z.; LAKSHMANAN, R.; LOO, R.R.O.; LOO, J.A.; CHEN, H. Signal and charge enhancement for protein analysis by liquid chromatography-mass spectrometry with desorption electrospray ionization. *International Journal Mass Spectrometry*, 325-327, 161-166, 2012.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; SPÍNOLA, V.; GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. HPLC-ESI-MSⁿ characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Industrial Crops and Products*, 69, 80-90, 2015a.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilva forest species. *Industrial Crops and Products*, 64, 135-151, 2015b.

LONG, S.; CAO, Z.; LI, Y. L.; YANG, H. W.; LI, J. S.; XIANG, J. N. Synthesis of 2, 6-deoxyfructosazine and its decomposition of incense flavor in tobacco smoke. *Advanced Materials Research*, 233, 78-81, 2011.

LOPES, S.; von POSER, G. L.; KERBER, V. A.; 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*, 32, 1187-1195, 2004.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In *The systematic identification of flavonoids* (pp. 41-164). Springer Berlin Heidelberg, 1970.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C spectra of pentacyclic triterpenoids- a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37, 1517-1575, 1994.

MARKHAM K. R.; TERNAL B.; STANLEY R.; GEIGER H.; MABRY T. J. Carbon-13 NMR of flavonoids-III, naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, 34, 1389–1397, 1978.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7), 13422-13495, 2015.

MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Structural revisions of blumenol C glucoside and byzantionoside B. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58(3), 438-441, 2010.

MCKERROW, J. H. Recognition of the role of natural products as drugs to treat neglected tropical diseases by the 2015 Nobel prize in physiology or medicine. *Natural Products Reports*, 32 (12), 1610-1611, 2015.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA-JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; FAGG, C.W. 2008. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. *In* Cerrado: ecologia e flora. (S.M. Sano, S.D.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados/Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, v.2, p.421-1279.

MIN, B-S. Coumarins and a polyacetylene from the roots of *Angelica purpuraefolia*. *Natural Products Sciences*, 12 (3), 129-133, 2006.

MISTRIK, R.; LUTISAN, J.; SUCHY, M. Fragmentation Library by BEKESOVA, S.; BELICOVA, A.; FUX, I.; PITTENAUER, E. Mass Frontier Version 7.0.3.9 by HighChem, Ltd., 2011.

MIURA, D.; FUJIMURA, Y.; WARIISHI, H. *In situ* metabolomic mass spectrometry imaging: recent advances and difficulties. *Journal of Proteomics*, 75, 5052-60, 2012.

MONGE, M. E.; HARRIS, G. A.; DWIVEDI P.; FERNÁNDEZ, F. M. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. *Chemical Reviews*, 113 (4), 2269–2308, 2013.

MOREL, L. J. F.; BARATTO, D. M.; PEREIRA, P. S.; CONTINI, S. H. T.; MOMM, H. G.; BERTONI, B. W.; FRANCO, S. de C; PEREIRA, A. M. S. Loganin production in *Palicourea rigida* HBK (Rubiaceae) from populations native to Brazilian Cerrado. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2559-2565, 2011.

MORITA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; ITOKAWA, H.; MOTIDOME, M.. A new indole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*. *Planta medica*, 55(03), 288-289, 1989.

MÜLLER, T.; ORADU, S.; IFA, D.R.; COOKS, R.G.; KRAEUTLER, B. Direct plant tissue analysis and *imprint* imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83, 5754–5761, 2011.

NAKANO, T.; MARTÍN, A. Studies on the alkaloids of *Palicourea fendleri*. *Planta medica*, 30(06), 186-188, 1976.

NAKATANI, N.; KAYANO, S. I.; KIKUZAKI, H.; SUMINO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5512-5516, 2000.

NARINE, L. L.; MAXWELL, A. R. Monoterpenoid indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *Phytochemistry Letters*, 2(1), 34-36, 2009.

do NASCIMENTO, C. A.; GOMES, M. S.; LIAO, L. M.; de OLIVEIRA, C. M.; KATO, L.; da SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 61(11), 1443, 2006.

do NASCIMENTO, N. C.; FRAGOSO, V.; MOURA, D. J.; FETT-NETO, A. G.; SAFFI, J. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 48(9), 728-734, 2007.

do NASCIMENTO, C. A., LIAO, L. M., KATO, L., DA SILVA, C. C., TANAKA, C. M., SCHUQUEL, I. T., & DE OLIVEIRA, C. M. A tetrahydro β -carboline trisaccharide from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Carbohydrate research*, 343(6), 1104-1107, 2008.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. Reorganization of the genus *Psychotria* and the Tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. *Systematic Botany*, 24, 5–27, 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17, 215–234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661, 2016.

OLIVEIRA, S. M. de; SILVA, J. B. P. da; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. DO C. A. de; GALDINO, S. L.; PITTA, I. da R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. *Química Nova*, 31 (3), 614-622, 2008.

PASSOS, D. C.; FERREIRA, H. D.; VIEIRA, I. L. F. B.; NUNES, W. B.; FELÍCIO, L. P.; SILVA, E. M.; VALE, C.R.; DUARTE, S. R.; SILVA, E. S.; CARVALHO, S. Modulatory effect of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research*, 9, 1153-1162, 2010.

PASSOS, C. S.; SIMÕES-PIRES, C. A.; NURISSO, A.; SOLDI, T. C.; KATO, L.; de OLIVEIRA, C. M. A; de FARIA, E. O.; MARCOURT, L.; GOTTFRIED, C.; CARRUPT, P.-A.; HENRIQUES, A. T. Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. *Phytochemistry*, 86, 8-20, 2013.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, 21(2), 204-207, 2016.

PAUL, J. H. A.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Novel

bis(monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. Journal of Natural Products, 66, 752-754, 2003.

PAULO, A.; JIMENOB, M. L.; GOMES, E. T.; HOUGHTONC, P. J. Steroidal alkaloids from *Cryptolepis obtusa*. Phytochemistry, 53, 417–422, 2000.

PINTO, M. F.; FENSTERSEIFER, I. C.; MIGLIOLO, L.; SOUSA, D. A.; de CAPDVILLE, G.; ARBOLEDA-VALENCIA, J. W.; COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J.; MAGALHÃES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. Journal of Biological Chemistry, 287(1), 134-147, 2012.

POUPON, E.; NAY, B. Biomimetic Organic Synthesis. Weinheim:Wiley-VCH, 2011. vol.1. p.21.

RAO, C. B. S. The Chemistry of Lignans, pp. 254-259. Andhra University Press, Andhra, India (1978).

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; RYDIN, C.; BREMER, B. Evolution and trends in the Psychotrieae alliance (Rubiaceae) - A rarely reported evolutionary change of many-seeded carpels from one-seeded carpels. Molecular Phylogenetics and Evolution, 48, 207-223, 2008.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; TAYLOR, C. M.; WIKSTRÖM, N.; PAILLER, T.; KHODABANDEH, A.; BREMER, B. Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureeae (Rubiaceae): Evolution of schizocarps in *Psychotria* and origins of bacterial leaf nodules of the Malagasy species. American Journal of Botany, 101(7), 1102-1126, 2014.

REICH, H. J. WinDNMR: dynamic NMR spectra for Windows. Journal of Chemical Education, 72 (12), 1086, 1995.

RIPPERGER, H. Chimonanthine from *Palicourea domingensis*. Pharmazie, 37(12), 867, 1982.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. Opera Botanica Belgica, 1, 1-272, 1988.

ROBBRECHT, E.; MANEN J.-F. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF*, and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. Systematics and Geography of Plants, 76, 85-146, 2006.

ROBINSON, R.; TEUBER, H. J. Chemistry and Industry, 783, 1954.

ROSA, E. A.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C.

Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, 20(4), 484-488, 2010.

SANTESSON, K.G. Douradinha, or leaves of *Palicourea rigida*. Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany), 235, 143-150, 1897.

SANTOS, R. P. D.; LEMOS, T. L.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO, E.; VIANA, F. A.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Cordia piauhiensis*-Boraginaceae. Journal of the Brazilian Chemical Society, 16, 3B, 662-665, 2005.

SHAHAT, A. A.; ABDEL-AZIM, N. S.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Isolation and NMR spectra of syringaresinol- β -D-glucoside from *Cressa cretica*. Fitoterapia, 75(7), 771-773, 2004.

SILVA NETO, B. R.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, R. A.; SILVA, J. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SOARES, C. M. A.; PEREIRA, M. Indol alkaloids with potential inhibitory effect of the enzyme Malate Synthase of *Paracoccidioides lutzii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 58. Foz do Iguaçu. Resumos. Paraná, Sociedade Brasileira de Genética, 2012, p.44.

da SILVA, L. F.; DA CUNHA, L. C.; DE PAULA, J. R.; DELPRETE, P. G. Avaliação toxicológica comparativa entre *Palicourea marcgravii* St. Hil e *P. officinalis* Mart. (RUBIACEAE) em *Artemia salina* Leach. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, 8 (15), 353-364, 2012.

da SILVA, V. C.; de CARVALHO, M. G.; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). Journal of Natural Medicines, 62(3), 356-357, 2008.

SILVA, W. C.; MARTINS, J. R. S.; CESIO, M. V.; AZEVEDO, J. L.; HEINZEN, H.; de BARROS, N. M. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Veterinary parasitology, 179(1), 189-194, 2011.

SMITH, C. A.; O'MAILLE, G.; WANT, E. J.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; BRANDON, T. R.; THEODORE, R.; CUSTODIO, D. E.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. METLIN: a metabolite mass spectral database. Therapeutic drug monitoring, 27(6), 747-751, 2005.

SOARES, P. R. O.; OLIVEIRA, P. L.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; GUILLO, L. A. In vitro antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. Archives of Pharmacal Research, 35(3), 565-571, 2012.

SOMOVA, L.I.; SHODE, F.O.; RAMNANAN, P.; NADAR, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africana leaves. Journal of Ethnopharmacology

84,299–305, 2003a.

SOMOVA, L.O; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 10, 115–121, 2003b.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food chemistry*, 173, 14-30, 2015.

STOECKLI, M.; FARMER, T. B.; CAPRIOLI, R. M. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10, 67–71, 1999.

STUART, K. L., & WOO-MING, R. B. Palicourea alkaloids: The structure of palinine. *Tetrahedron letters*, 15(44), 3853-3856, 1974.

STUART, K. L.; WOO-MING, R. B. Vomifoliol in *Croton* and *Palicourea* species. *Phytochemistry*, 14(2), 594-595, 1975.

SUBHADHIRASAKUL, S.; PECHPONGS, P. A terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27, 2, 555-561, 2005.

SUMOTO, K.; IRIE, M.; MIBU, N.; MIYANO, S.; NAKASHIMA, Y.; WATANABE, K.; YAMAGUCHI T. Formation of pyrazine derivatives from D-glucosamine and their deoxyribonucleic acid (DNA) strand breakage activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(3), 792-794, 1991.

TALATY, N.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G. Rapid *in situ* detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst*, 130 (12), 1624-1633, 2005.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 306, 471–473, 2004.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 1261–1275, 2006.

TAKETA, A. T.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(2), 205-211, 2004.

TATA, A.; PEREZ, C. J.; HAMID, T. S.; BAYFIELD, M. A.; IFA, D. R. Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS.

Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 26(4), 641-648, 2015.

TAYLOR, C.M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. Systematic Botany Monographs, 26, 1-102, 1989.

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

TAYLOR, C. M.; LORENCE, D. H.; GEREAU, R. E. Rubiacearum Magna Hama. Pars XXV: The nocturnally flowering *Psychotria domingensis-Coussarea hondensis* group plus three other Mesoamerican *Psychotria* transfer to *Palicourea*. Novon, 20(4), 481–492, 2010.

TAYLOR, C. M. Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XXX: More new species of *Palicourea* (Palicoureeae) from Western South America. Novon, 24(3), 296-318, 2015a.

TAYLOR, C. M. Rubiacearum Americanarum Magna Hama XXXIII: The new group *Palicourea* sect. *Didymocarpae* with four new species and two new subspecies (Palicoureeae). Novon, 23(4), 452-478, 2015b.

THUNIG, J.; HANSEN, S. H.; JANFELT, J. Analysis of secondary plant metabolites by indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. Analytical Chemistry, 83, 3256-3259, 2011.

TOMAZ, A. C. D. A.; NOGUEIRA, R. B. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. D. F.; SOUZA, M. D. F. V. D.; da-CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(1), 47-52, 2008.

de TOMMASI, N.; PIACENTE, S.; de SIMONE, F.; PIZZA, C. Constituents of *Cydonia vulgaris*: Isolation and structure elucidation of four new flavonol glycosides and nine new α -ionol-derived glycosides. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 44, 1676-1681, 1996.

VALENTE, L. M. M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. Revista Fitos Eletrônica, 2(1), 48-58, 2013.

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. β -Carboline monoterpenoid glucosides from *Palicourea adusta*. Phytochemistry, 52(8), 1485-1489, 1999.

VAN HOYWEGHEN, L.; DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; DEFORCE, D.; HEYERICK, A. *In vitro* inhibition of the transcription factor NF- κ B and cyclooxygenase by bamboo extracts. Phytotherapy Research, 28(2), 224-230, 2014.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents I. The isolation and structure of

camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. Journal of the American Chemical Society, 88, 3880-3890, 1966.

WANG, X.; LV, H.; SUN, H.; LIU, L.; SUN, W.; CAO, H. Development of a rapid and validated method for investigating the metabolism of scoparone in rat using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21(23), 3883-3890, 2007.

WANG, H. Y.; ZHANG, J. T.; SUN, S. H.; ZHANG, S. S.; ZHANG, F.; ZHU, H.; GUO, Y. L. Study on the accelerated Gutknecht self-cyclocondensation of amino-sugars under atmospheric pressure chemical ionization conditions. Royal Society of Chemistry Advances, 5(127), 105079-105083, 2015.

WILLIAMS, J. P.; SCRIVENS, J. H. Rapid accurate mass desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry of pharmaceutical samples. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19, 3643-3650, 2005.

WINGER, B. A.; LIGHT-WAHL, K. J.; OGORZALEK LOO, R. R.; UDSETH, H. R.; SMITH, R.D. Observations and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry. Journal of American Society of Mass Spectrometry, 4, 536-545, 1993.

WISEMAN, J. M.; PUOLITAIVAL, S. M.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G.; CAPRIOLI, R. M. Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization. Angewandte Chemie, 117(43), 7256-7259, 2005.

WISEMAN, J. M.; IFA, D. R.; SONG, Q. Y.; COOKS, R. G. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. Angewandte Chemie International Edition, 45, 7188–7192, 2006.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. Journal of Chromatography A, 1382, 136–164, 2015.

WOODWARD, R.B.; YAND, N.; KATZ, T. J. Proceedings of the Chemical Society, 76-78, 1960.

WOO-MING, R. B.; STUART, K. L. Calycanthine from *Palicourea alpina*. Phytochemistry, 14(11), 2529, 1975.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. The Journal of Physical Chemistry, 88(20), 4451-4459, 1984.

YAMAZAKI, Y.; URANO, A.; SUDO, H.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.;

YAMAZAKI, M.; AIMI, N.; SAITO, K. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. *Phytochemistry*, 62(3), 461-470, 2003.

YANG, H.; ZHANG, H.; YANG, C.; CHEN, Y. Chemical constituents of plants from the genus *Psychotria*. *Chemistry and Biodiversity*, 13, 807–820, 2016.

ZHANG, J. W.; GAO, J. M.; XU, T.; ZHANG, X. C.; MA, Y. T.; JARUSSOPHON, S.; KONISHI, Y. Antifungal activity of alkaloids from the seeds of *Chimonanthus praecox*. *Chemistry and Biodiversity*, 6(6), 838-845, 2009.

Anexos



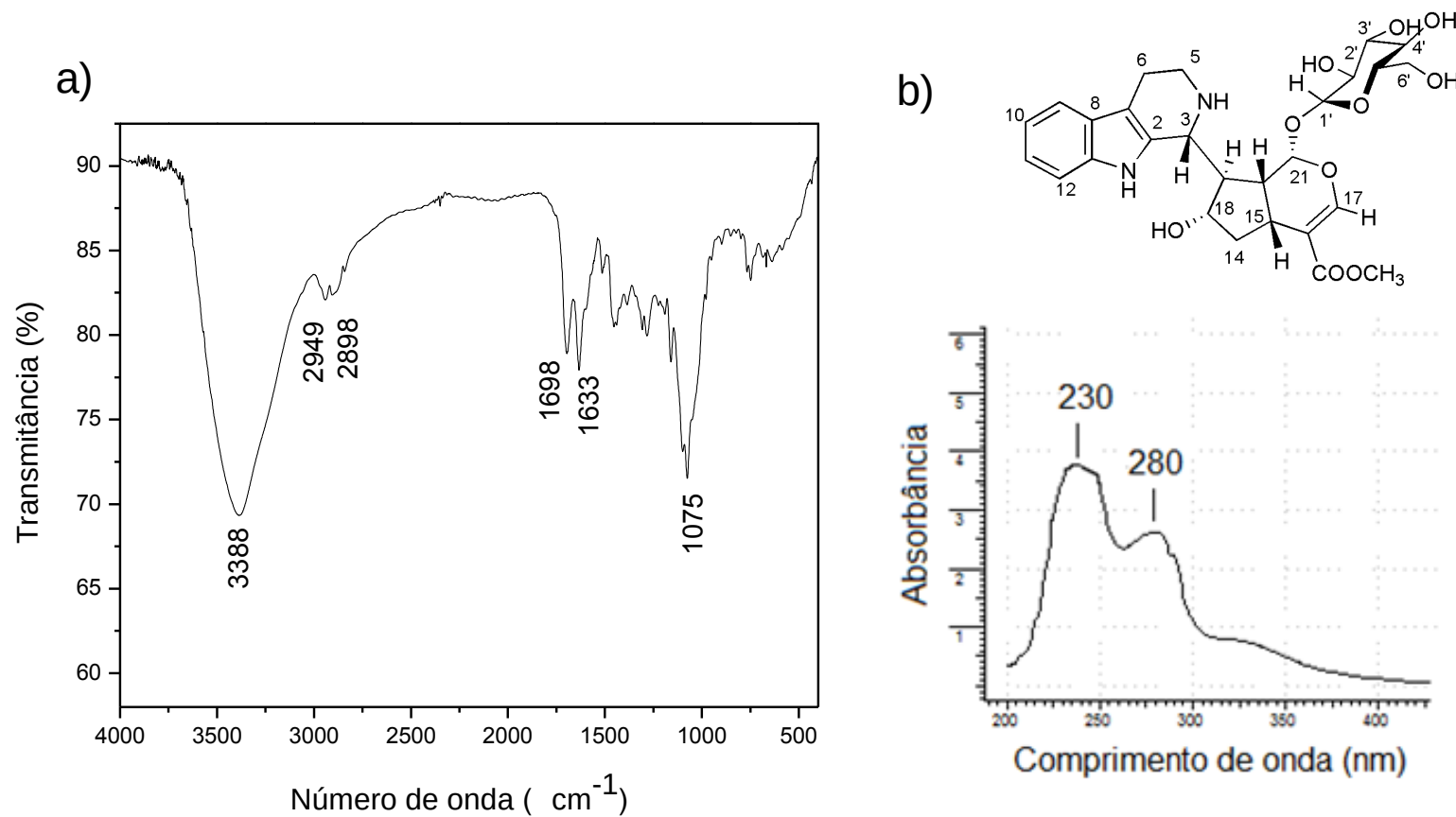
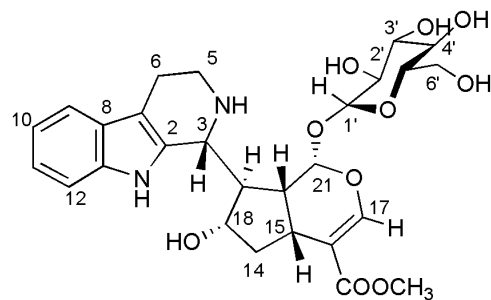


Figura 92. Espectro a) na região de infravermelho (KBr) e b) ultravioleta (MeOH) do composto 18-*epi*-braquicerina (**49**).



Acquisition Time (sec) 5.4526
 Comment l-pf10 MeOD 13mg Aline
 Frequency (MHz) 500.13
 Nucleus ^1H
 Number of Transients 16
 Origin spect
 Original Points Count 32768
 Owner nmrsu
 Points Count 32768

Pulse Sequence zg30
 Receiver Gain 114.00
 SW(cyclical) (Hz) 6009.62
 Solvent METHANOL-d4
 Spectrum Offset (Hz) 2452.6208
 Spectrum Type STANDARD
 Sweep Width (Hz) 6009.43
 Temperature (degree C) 25.060

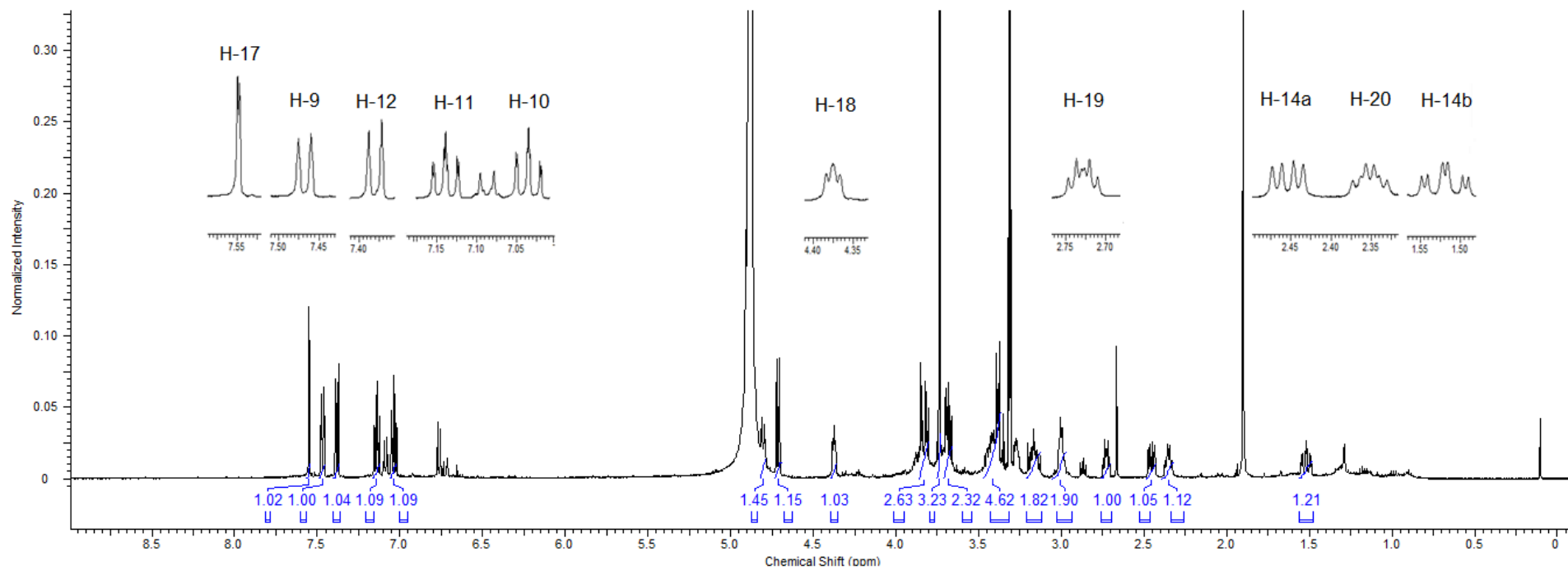


Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto 18-*epi*-braquicerina (49).

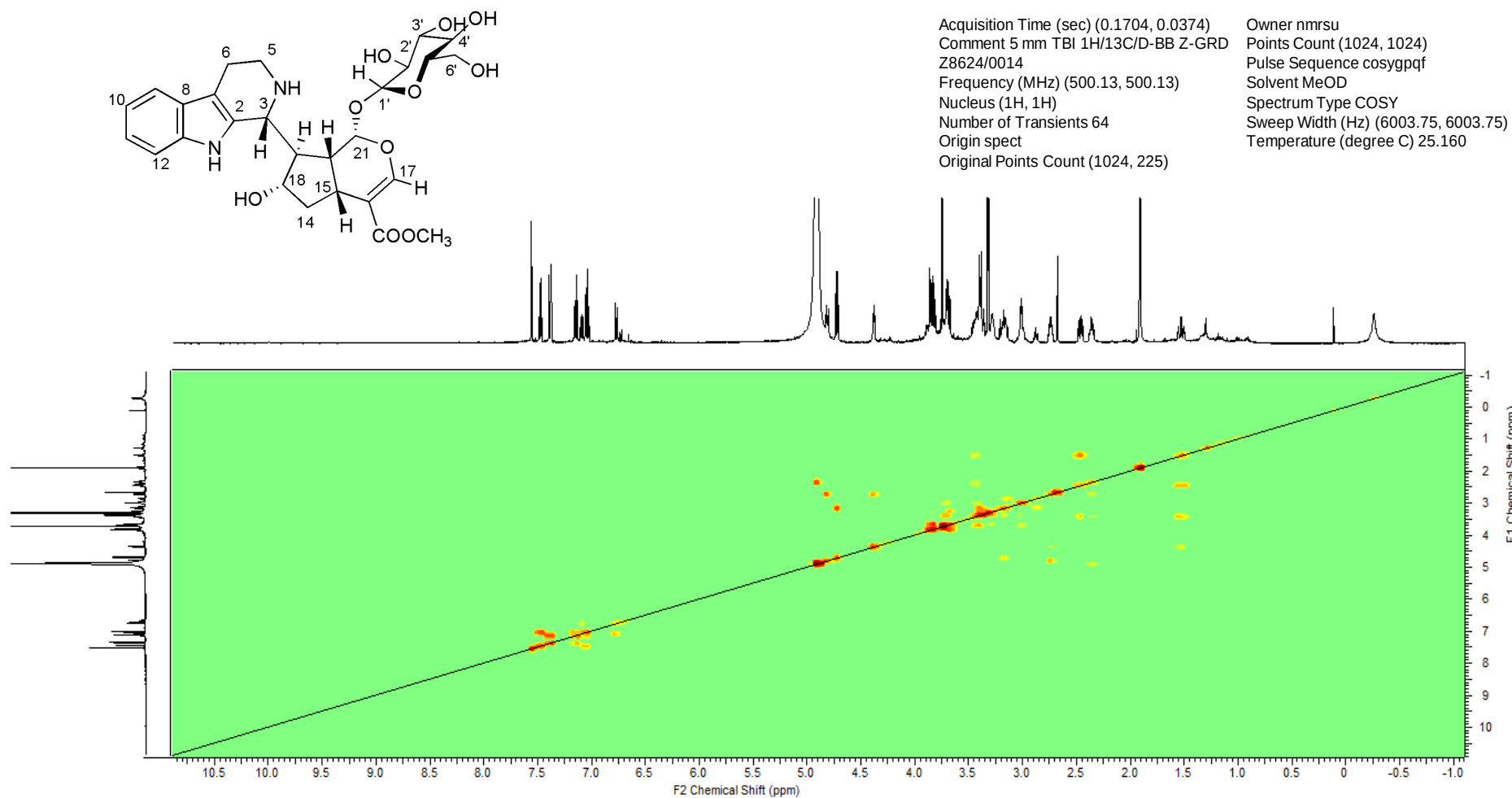


Figura 94. Mapa de correlação de COSY (CD₃OD) do composto 18-*epi*-braquicerina (49).

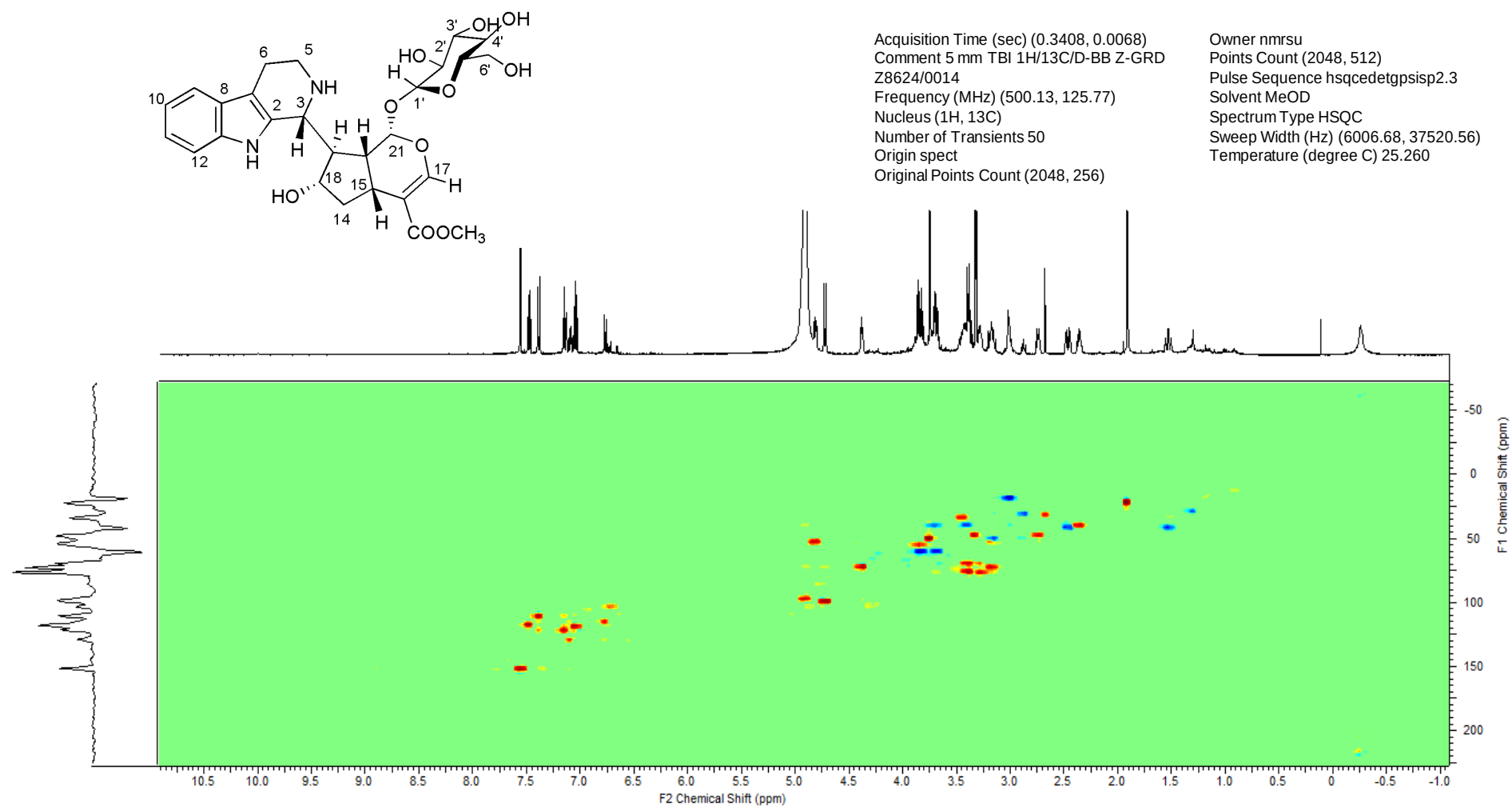


Figura 95. Mapa de correlação de HSQC (CD₃OD) do composto 18-*epi*-braquicerina (49).

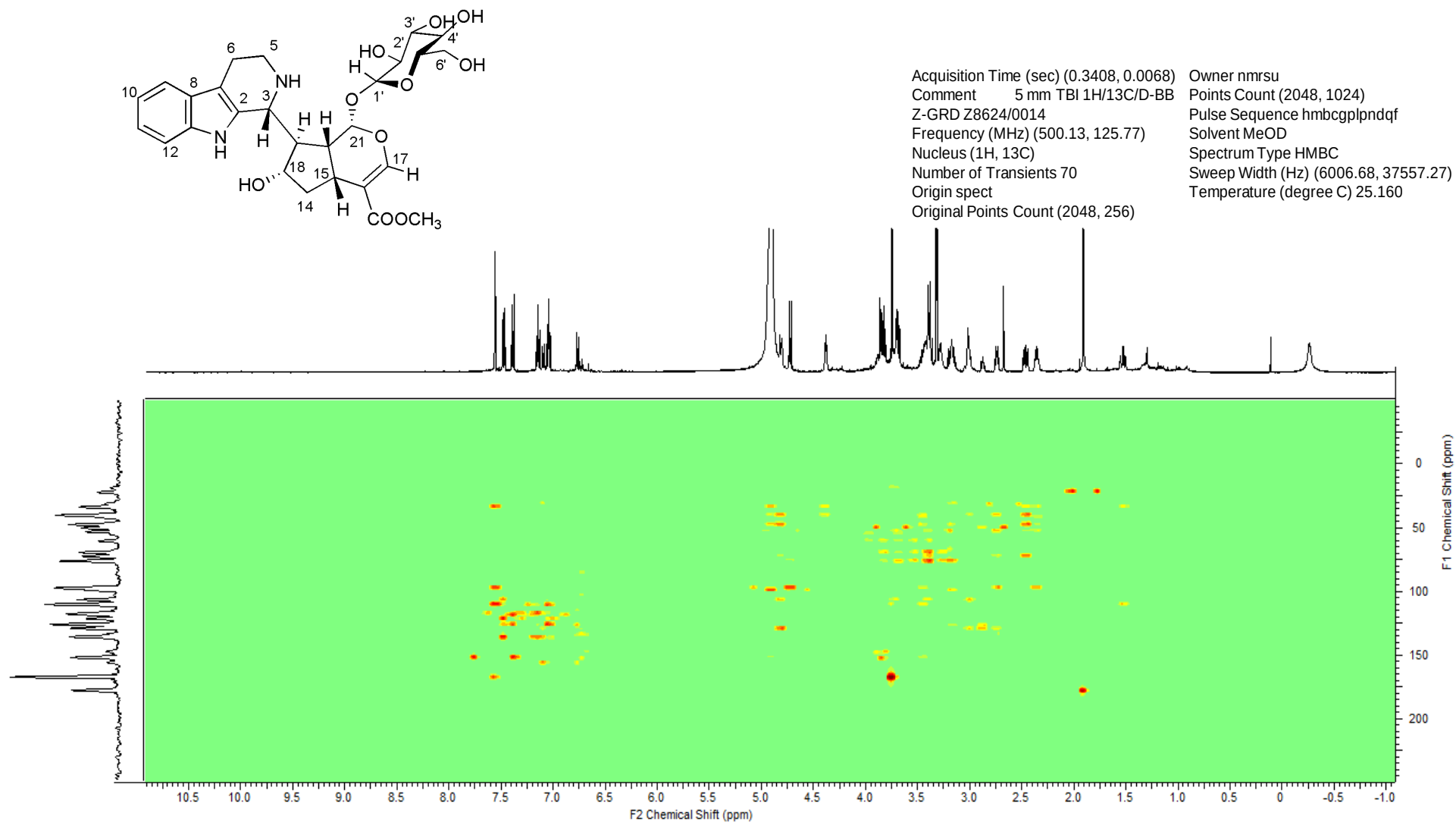


Figura 96. Mapa de correlação de HMBC (CD₃OD) do composto 18-*epi*-braquicerina (49).

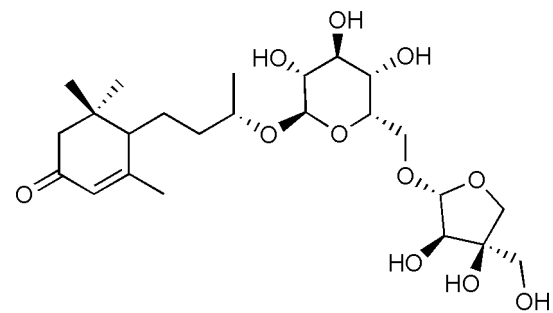
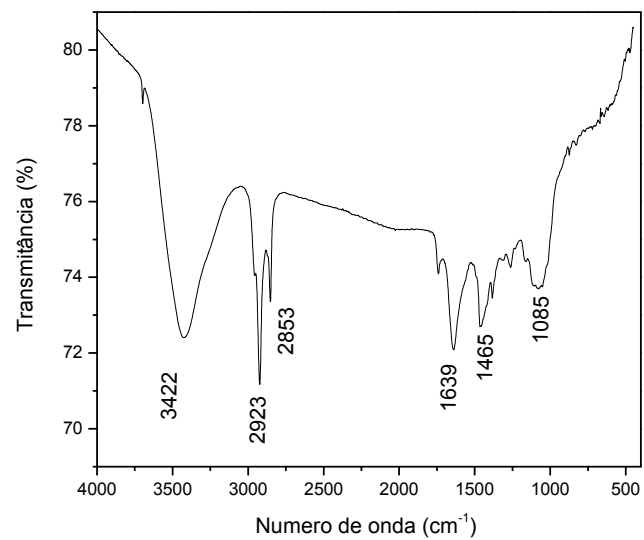
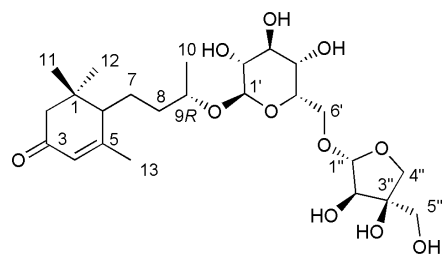


Figura 97. Espectro na região de infravermelho (KBr) do composto guettardionosídeo (**50**).



Acquisition Time (sec) 4.7317
 Frequency (MHz) 500.13
 Nucleus ^1H
 Number of Transients 16
 Origin spect
 Original Points Count 32768
 Owner nmrsu
 Points Count 32768

Pulse Sequence zgpcpr
 Receiver Gain 228.00
 SW(cyclical) (Hz) 6925.21
 Solvent METHANOL- d_4
 Spectrum Offset (Hz) 2436.6509
 Spectrum Type STANDARD
 Sweep Width (Hz) 6925.00
 Temperature (degree C) 25.160

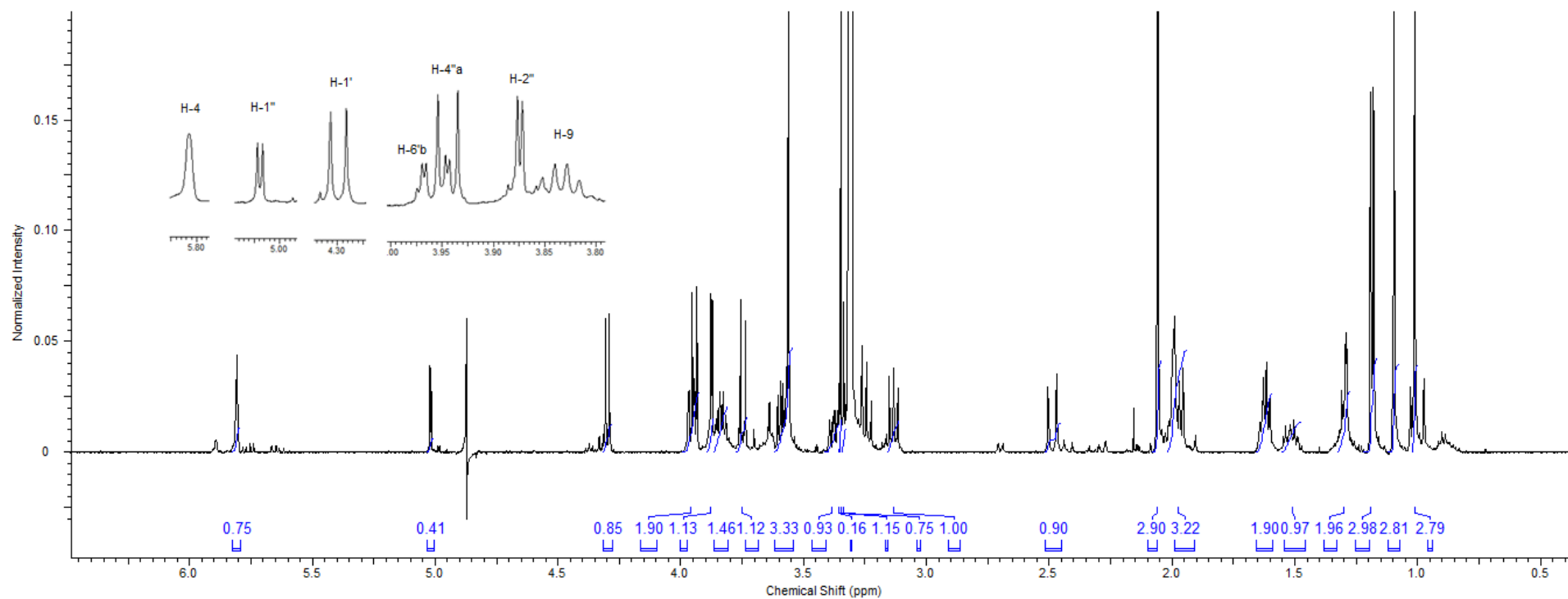


Figura 98. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto guettardionosídeo (**50**).

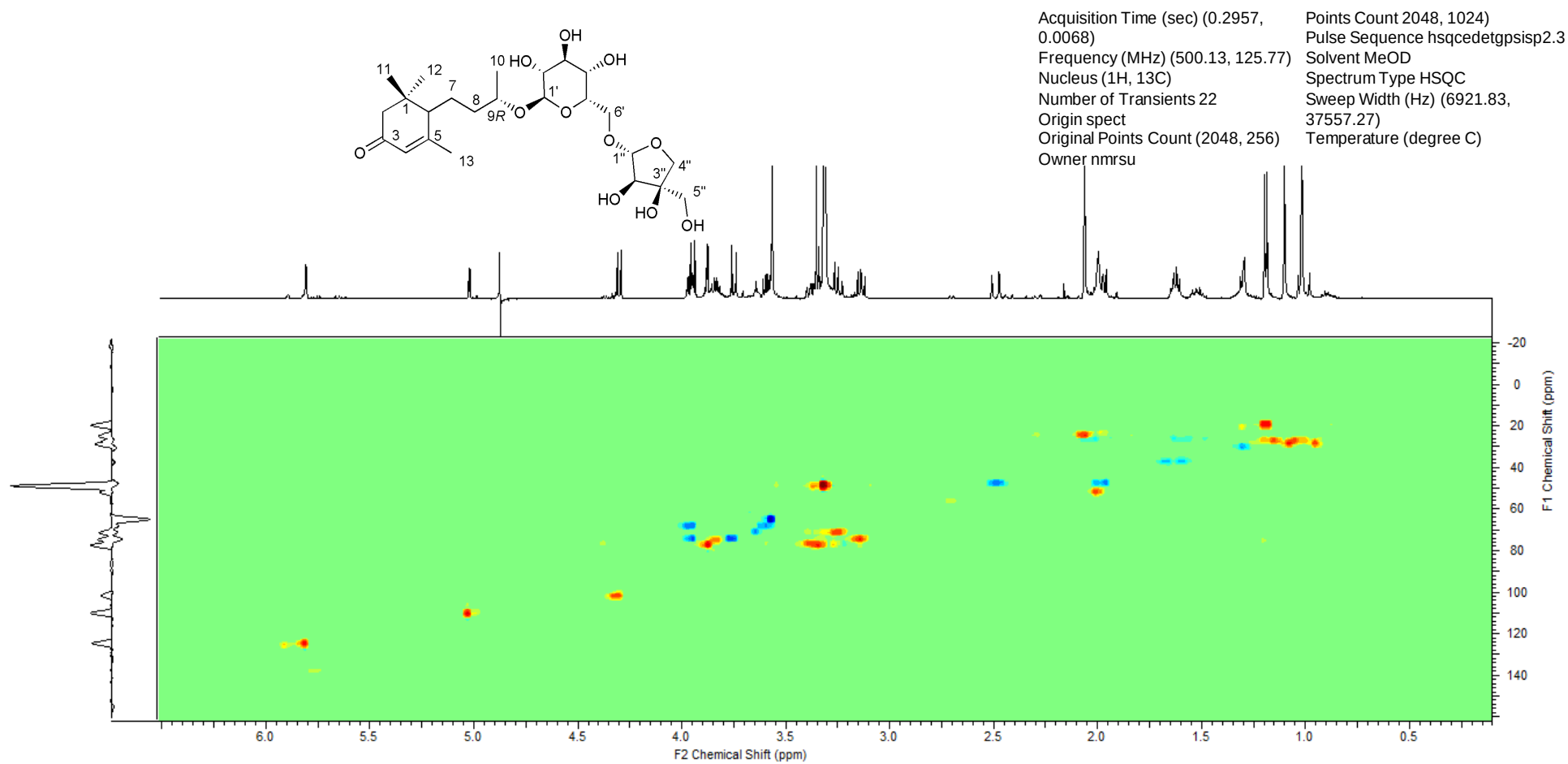


Figura 99. Mapa de correlação de HSQC (CD_3OD) do composto guettardionosídeo (50).

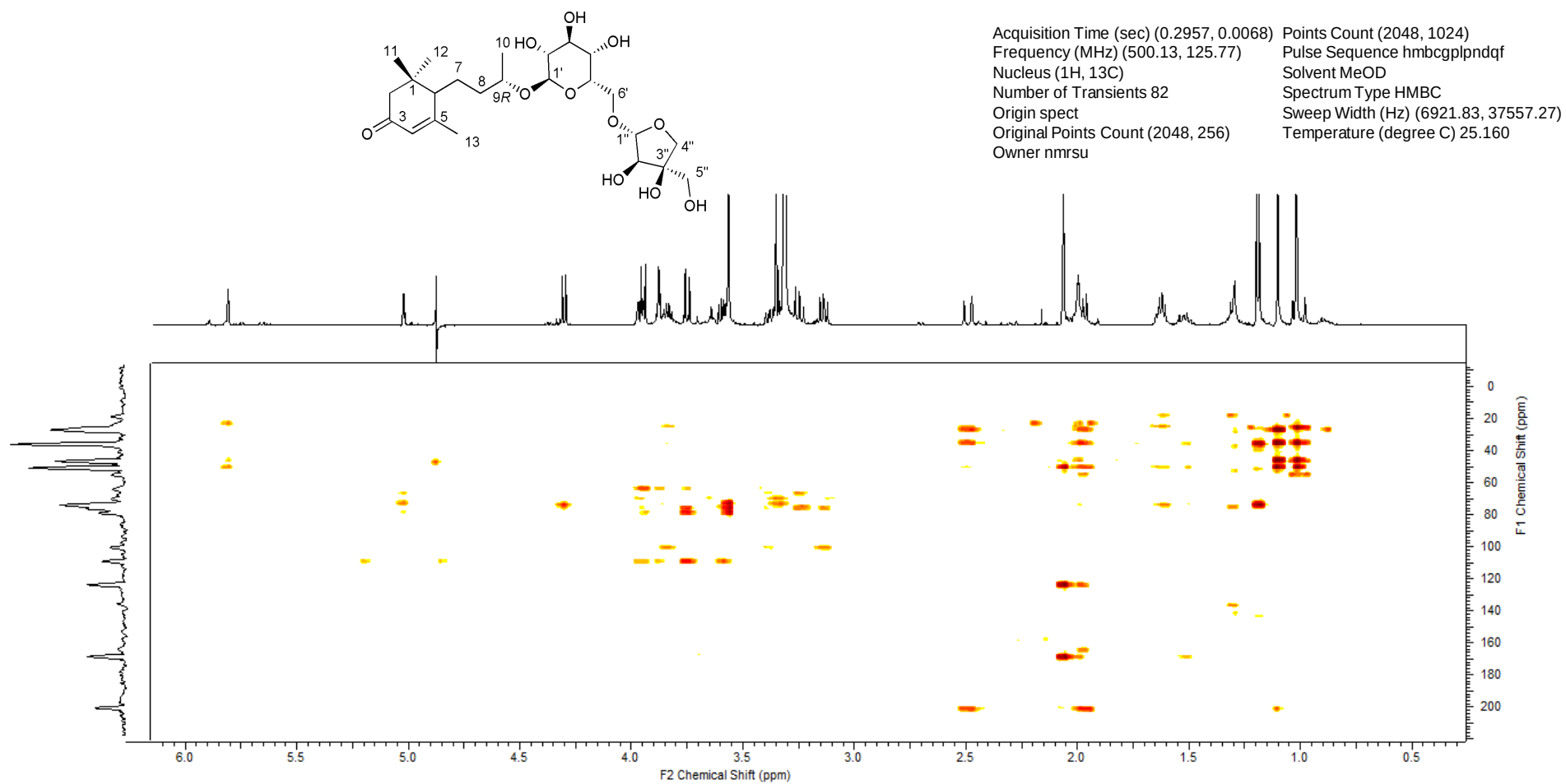


Figura 100. Mapa de correlação de HMBC (CD_3OD) do composto guettardionosídeo (**50**).

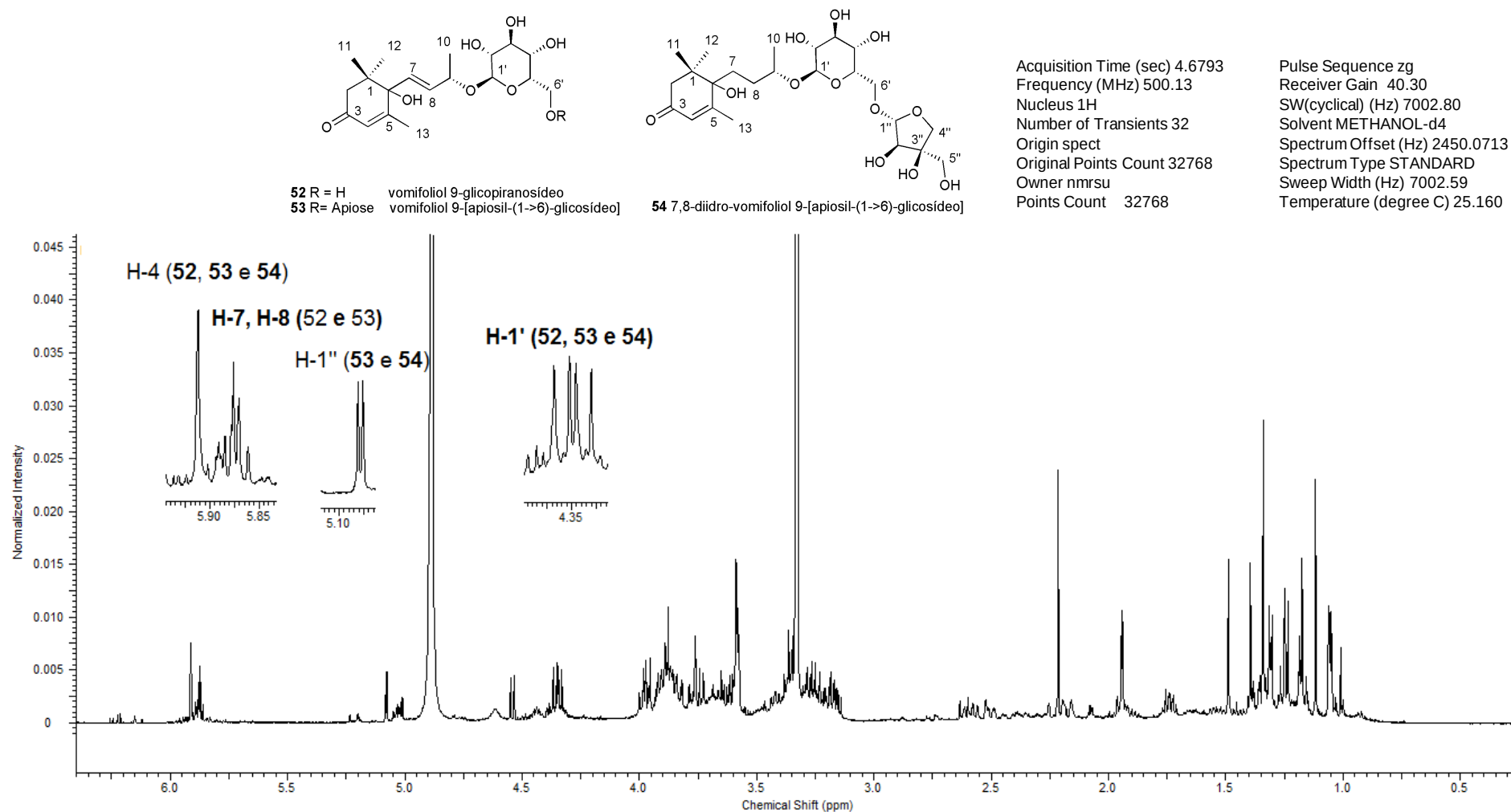


Figura 101. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da mistura de derivados de α -ionol (**52**, **53** e **54**).

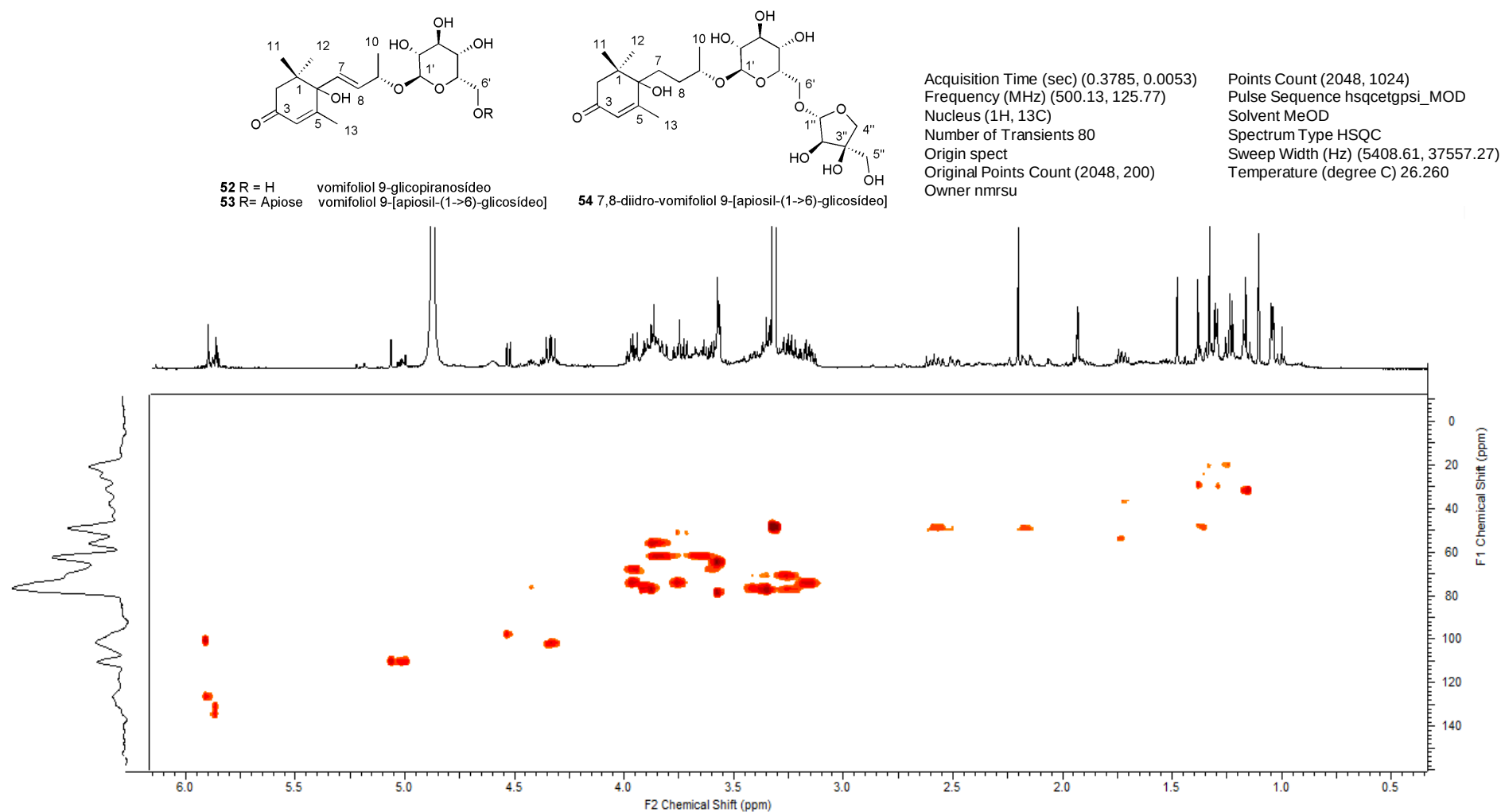


Figura 102. Mapa de correlação de HSQC (CD₃OD) da mistura de derivados de α -ionol (**52**, **53** e **54**).

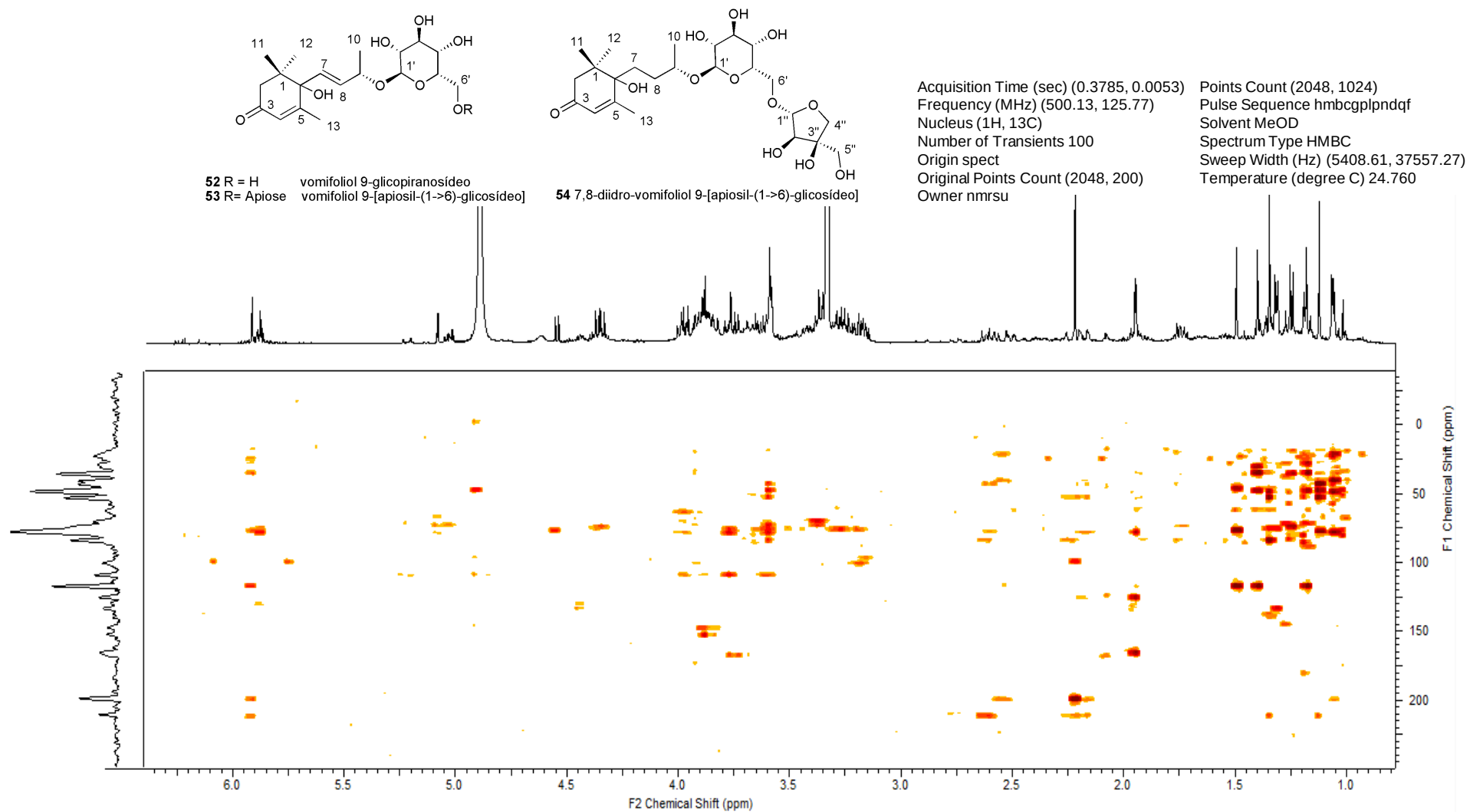
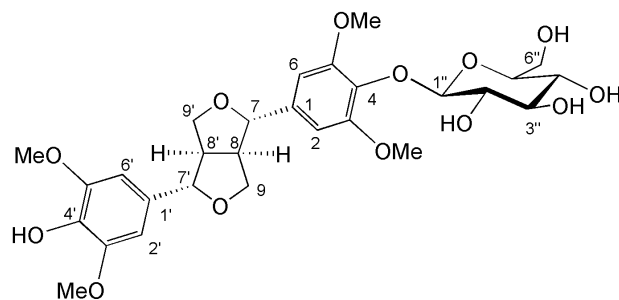


Figura 103. Mapa de correlação de HMBC (CD₃OD) da mistura de derivados de α -ionol (52, 53 e 54).



Acquisition Time (sec) 2.8180
 Frequency (MHz) 500.13
 Nucleus 1H
 Number of Transients 1
 Origin spect
 Original Points Count 40960
 Owner nmrsu
 Points Count 65536

Pulse Sequence zg
 Receiver Gain 64.00
 SW(cyclical) (Hz) 14534.88
 Solvent METHANOL-d4
 Spectrum Offset (Hz) 3327.1328
 Spectrum Type STANDARD
 Sweep Width (Hz) 14534.66
 Temperature (degree C) 19.760

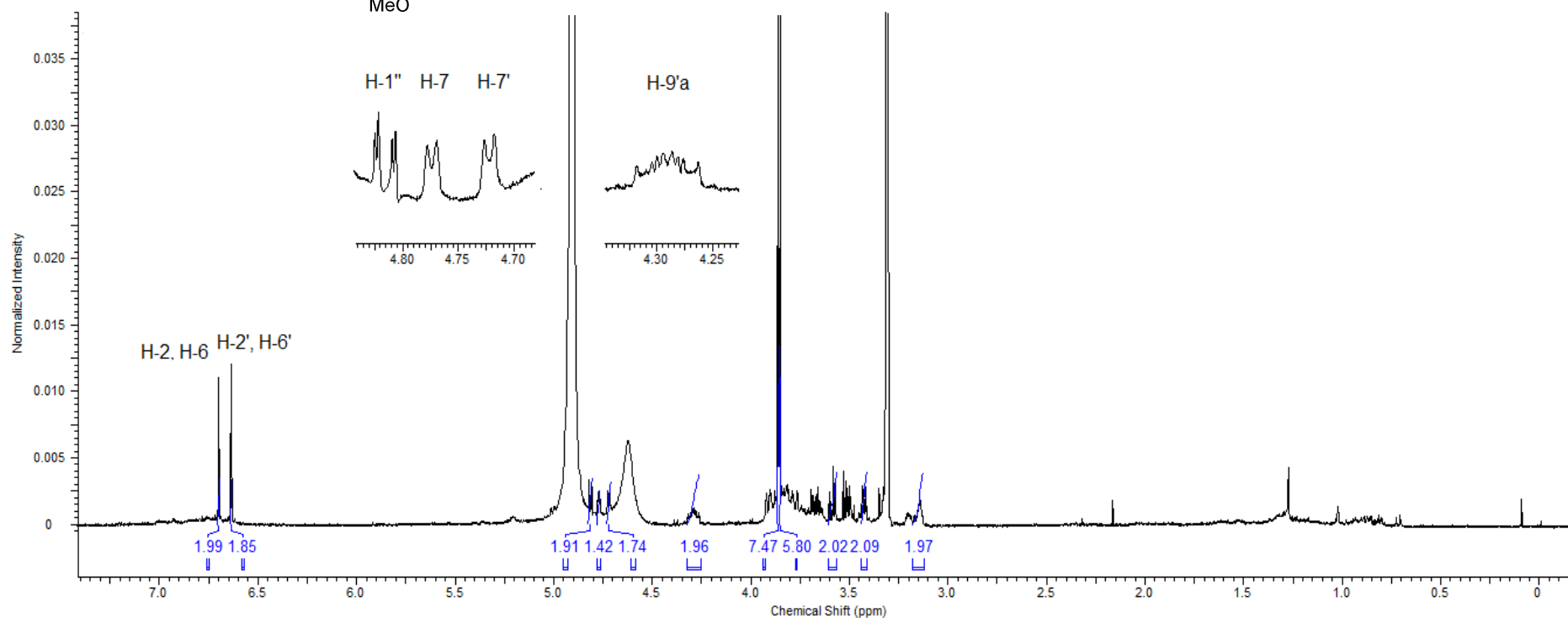


Figura 104. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto siringaresinol 4- β -D-glicosídeo (**55**).

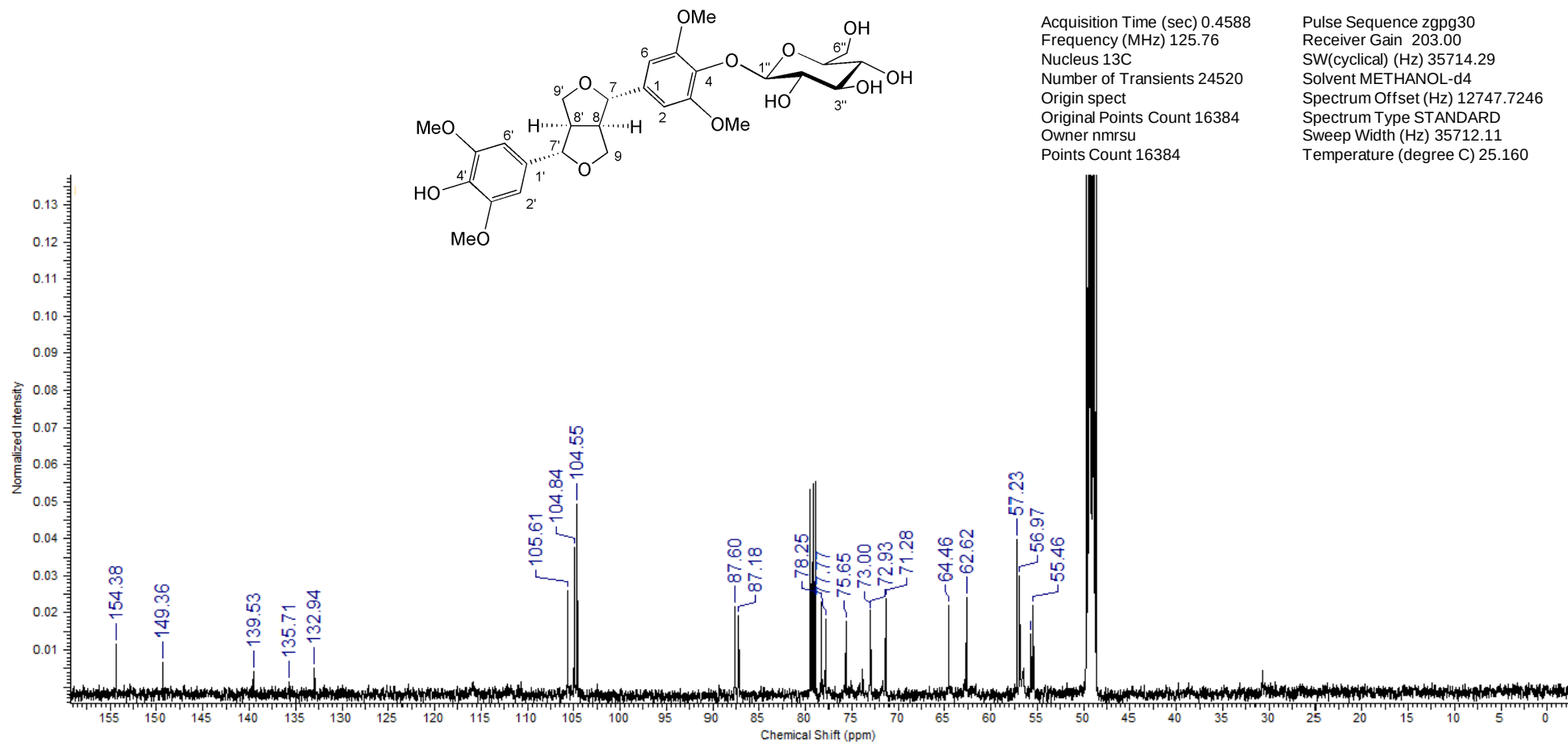


Figura 105. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) do composto siringaresinol 4-β-D-glucosídeo (55).

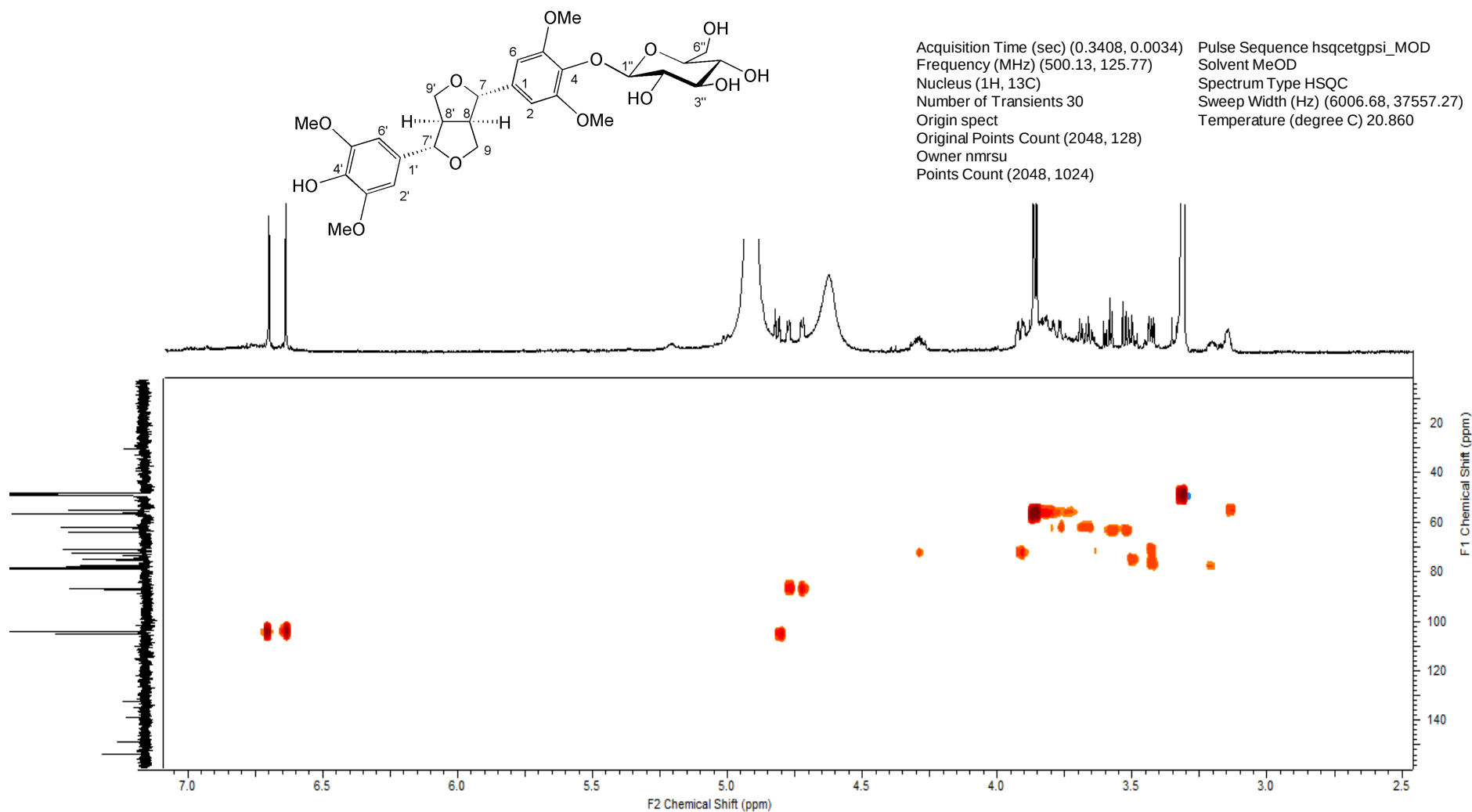


Figura 106. Mapa de correlação de HSQC (CD₃OD) do composto siringaresinol 4-β-D-glicosídeo (**55**).

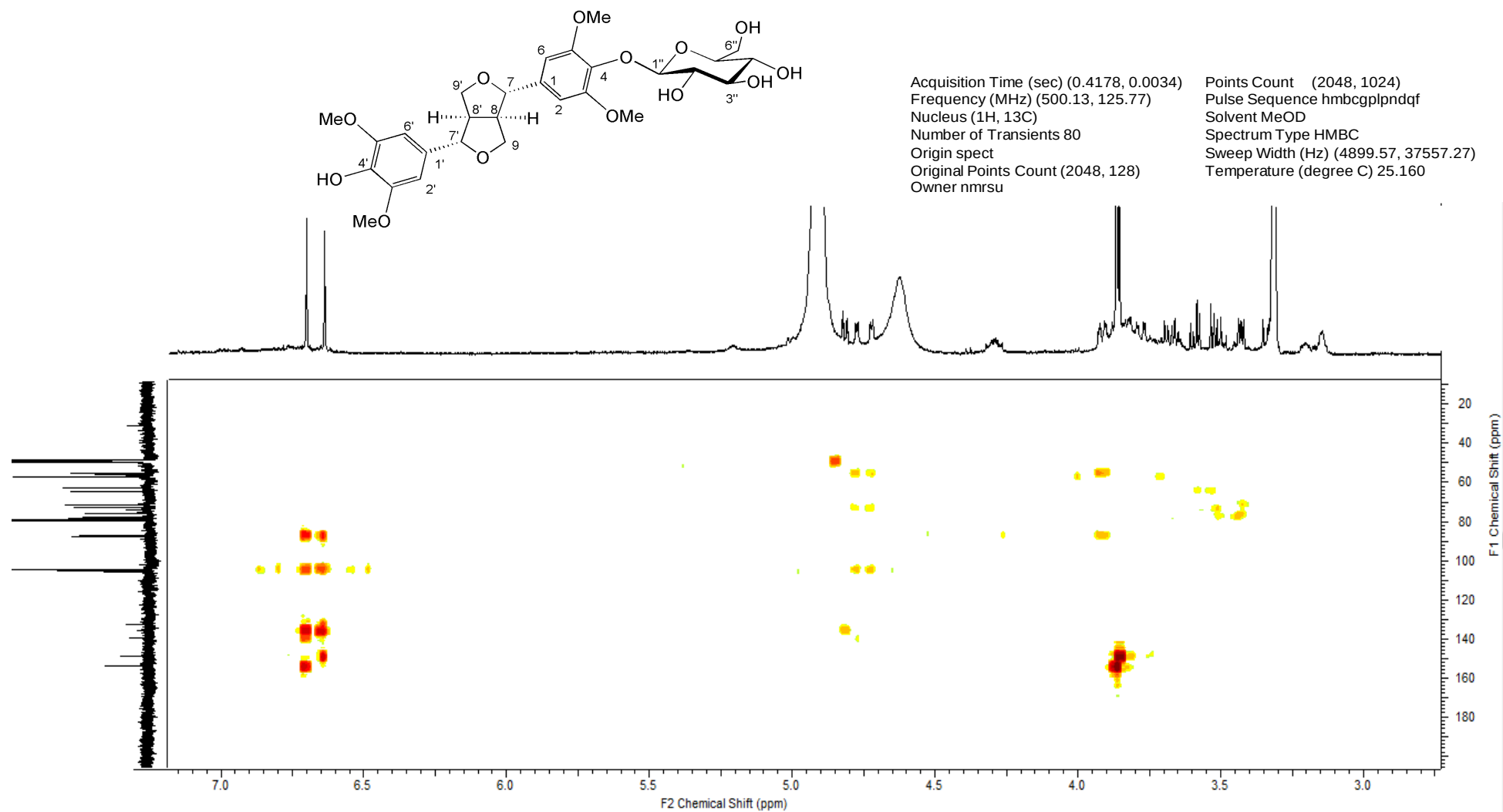


Figura 107. Mapa de correlação de HMBC (CD₃OD) do composto siringaresinol 4-β-D-glicosídeo (55).

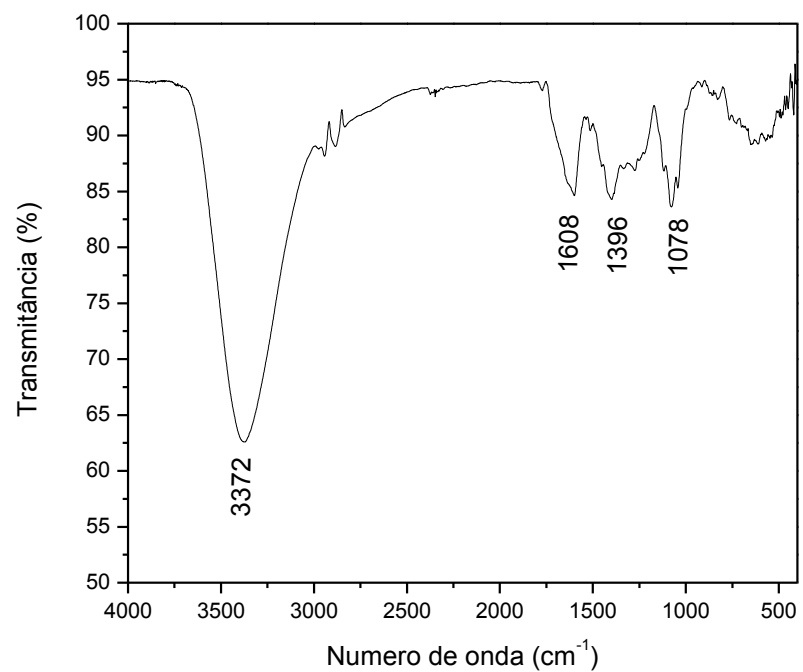
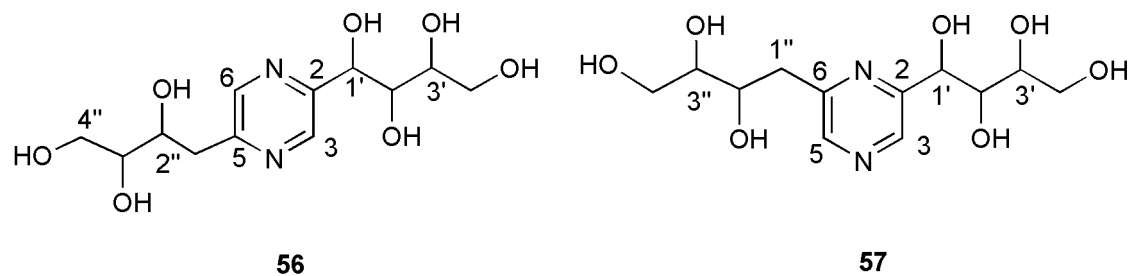
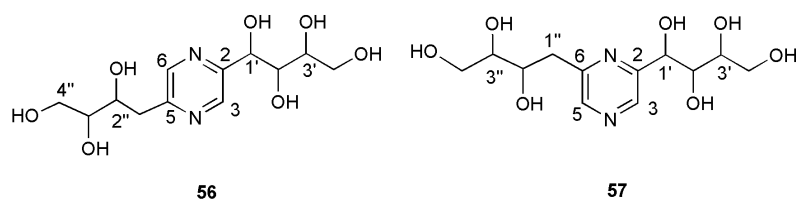


Figura 108. Espectro na região de infravermelho (KBr) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (**56**) e 2,6-desoxifructosazina (**57**).



Acquisition Time (sec) 2.7263
 Frequency (MHz) 500.13
 Nucleus 1H
 Number of Transients 32
 Origin spect
 Original Points Count 32768
 Owner Administrador
 Points Count 32768

Pulse Sequence zg
 Receiver Gain 64.00
 SW(cyclical) (Hz) 12019.23
 Solvent DMSO-d6
 Spectrum Offset (Hz) 2034.3553
 Spectrum Type STANDARD
 Sweep Width (Hz) 12018.86
 Temperature (degree C) 25.160

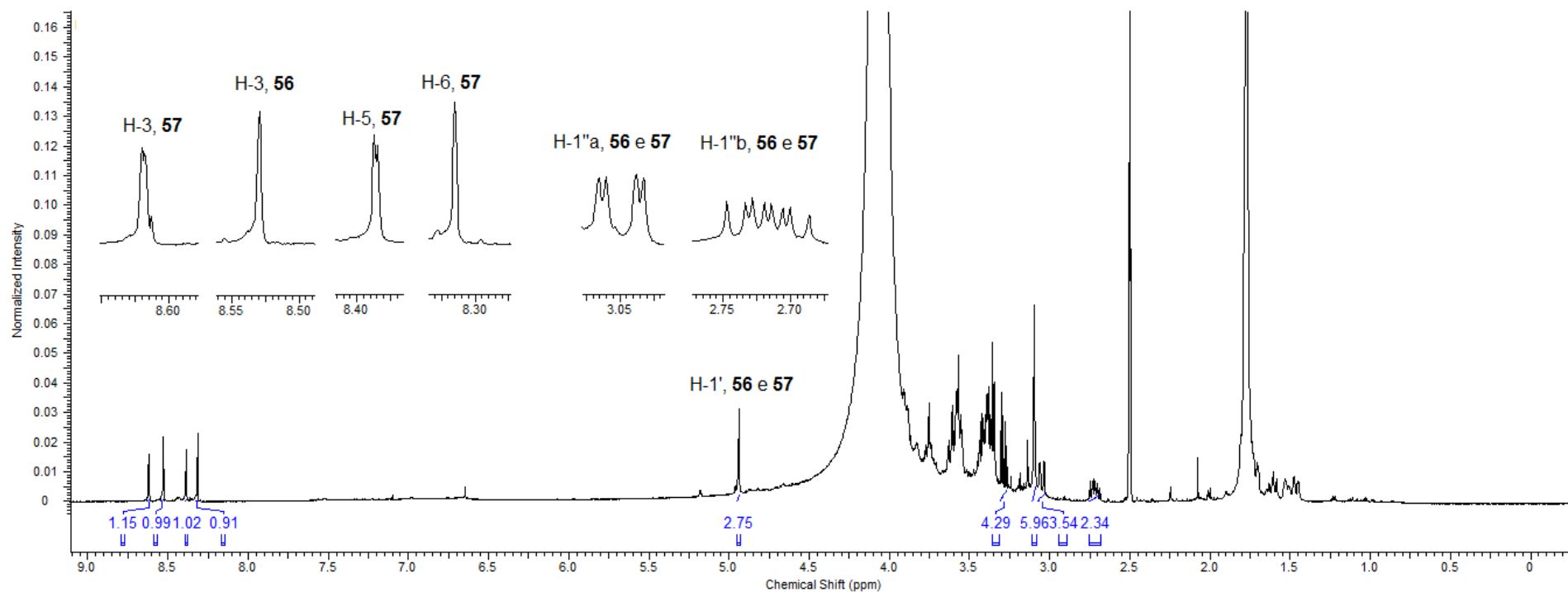


Figura 109. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifruktosazina (**56**) e 2,6-desoxifruktosazina (**57**).

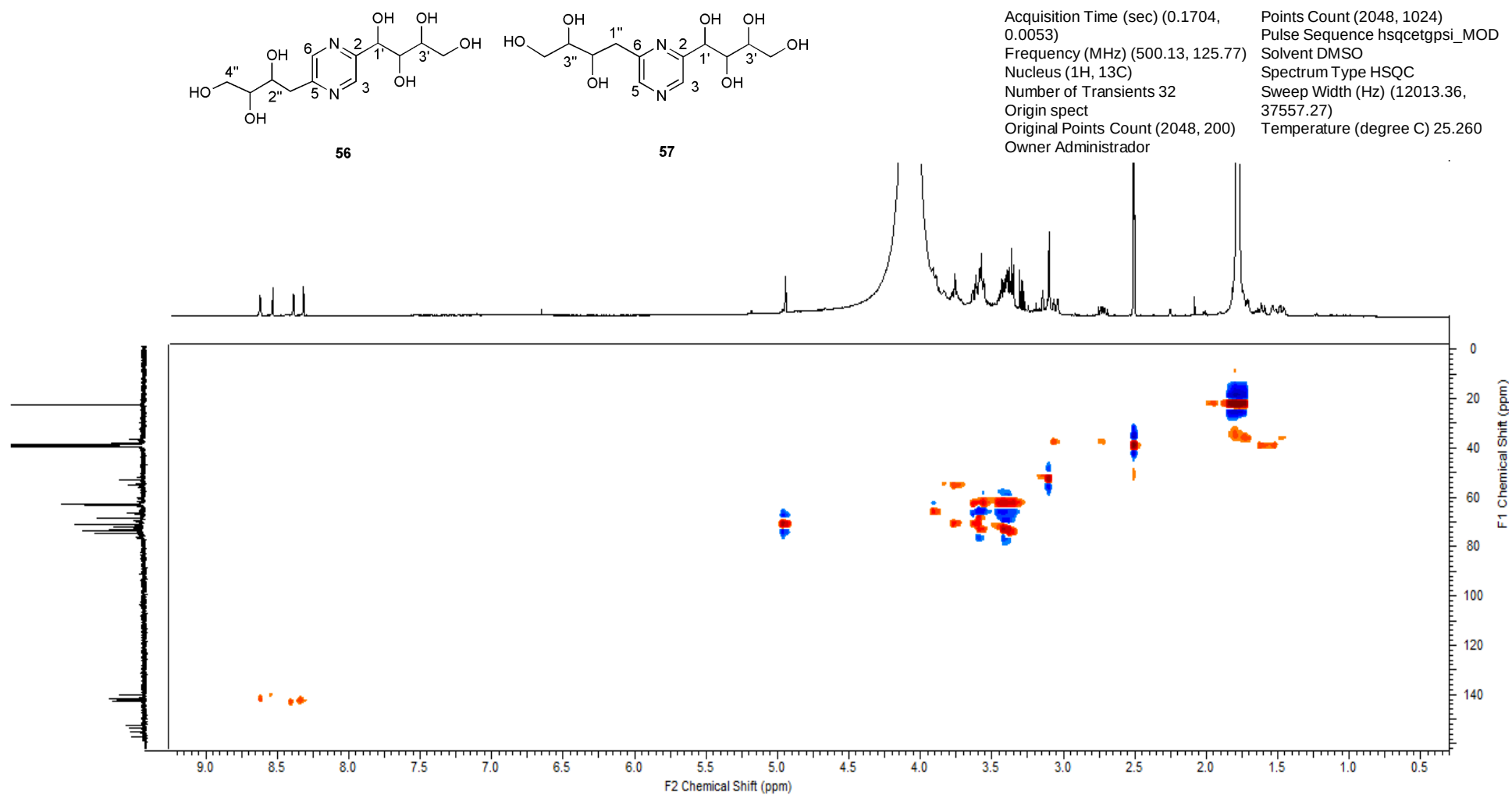


Figura 110. Mapa de correlação de HSQC (DMSO- d_6) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (**56**) e 2,6-desoxifructosazina (**57**).

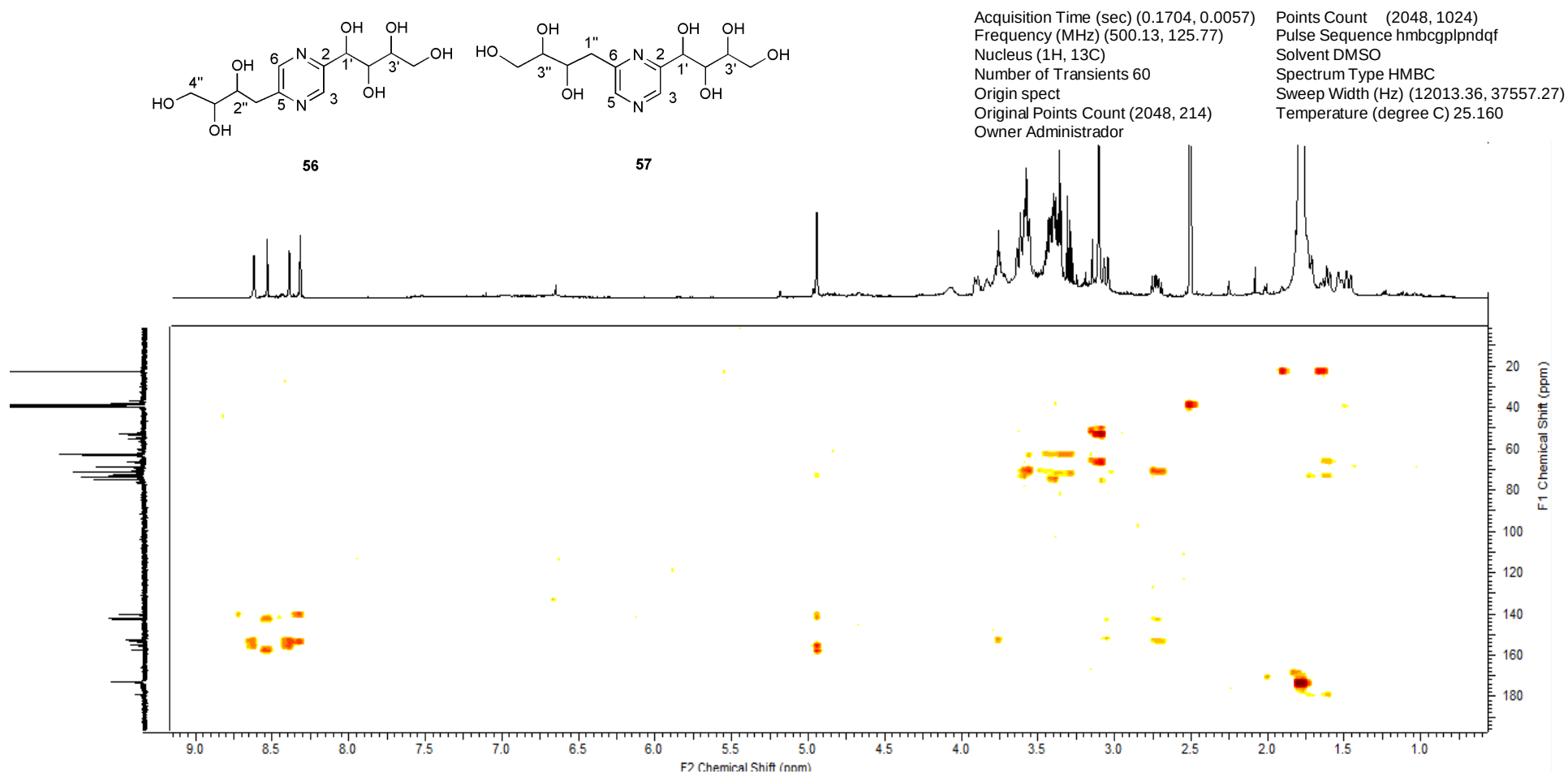
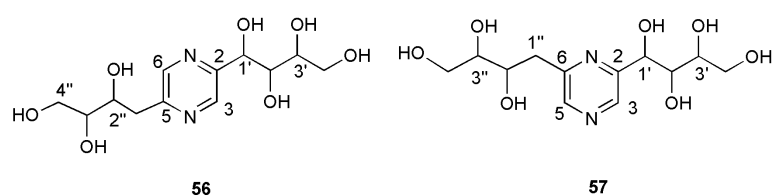


Figura 111. Mapa de correlação de HMBC (DMSO-*d*₆) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (**56**) e 2,6-desoxifructosazina (**57**).



Acquisition Time (sec) 3.2768
 Frequency (MHz) 500.13
 Nucleus 1H
 Number of Transients 128
 Origin spect
 Original Points Count 32768
 Owner nmrsu
 Points Count 32768

Pulse Sequence zgpr
 Receiver Gain 203.00
 SW(cyclical) (Hz) 10000.00
 Solvent DEUTERIUM OXIDE
 Spectrum Offset (Hz) 2393.4709
 Spectrum Type STANDARD
 Sweep Width (Hz) 9999.70
 Temperature (degree C) 25.160

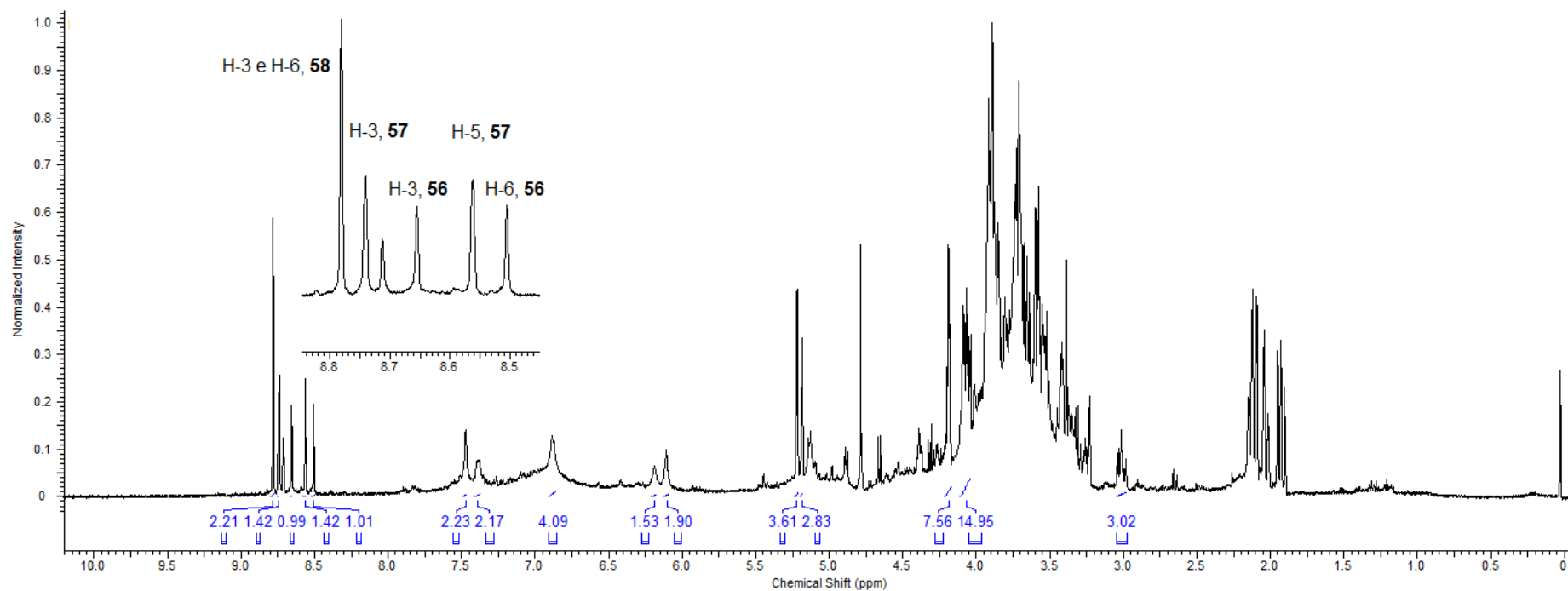


Figura 112. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifructosazina (**56**), 2,6-desoxifructosazina (**57**) e fructosazina (**58**).

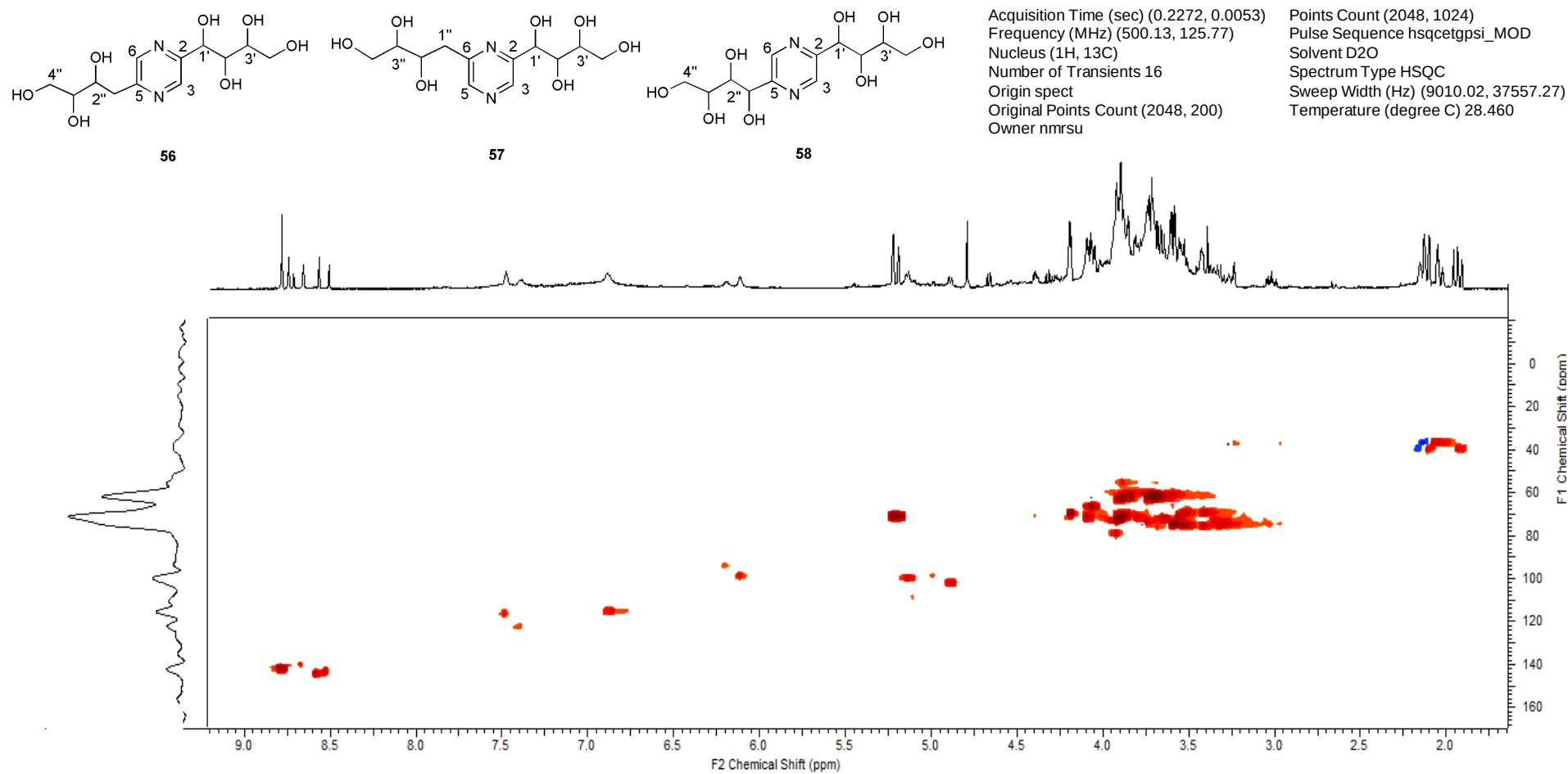


Figura 113. Mapa de correlação de HSQC (D₂O) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifruktosazina (**56**), 2,6-desoxifruktosazina (**57**) e fruktosazina (**58**).

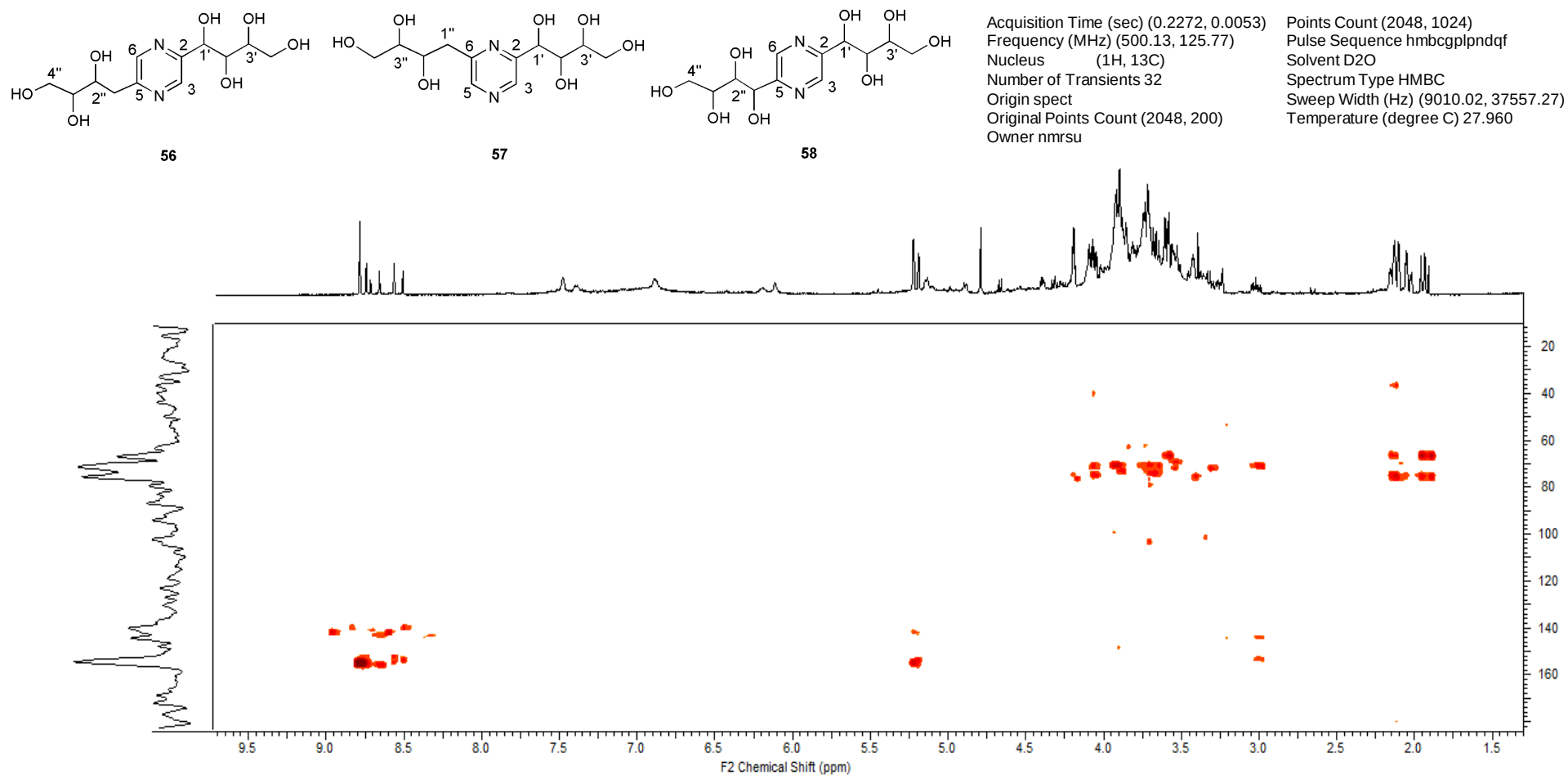


Figura 114. Mapa de correlação de HMBC (D₂O) da mistura de pirazinas 2,5-desoxifruktosazina (**56**), 2,6-desoxifruktosazina (**57**) e fruktosazina (**58**).

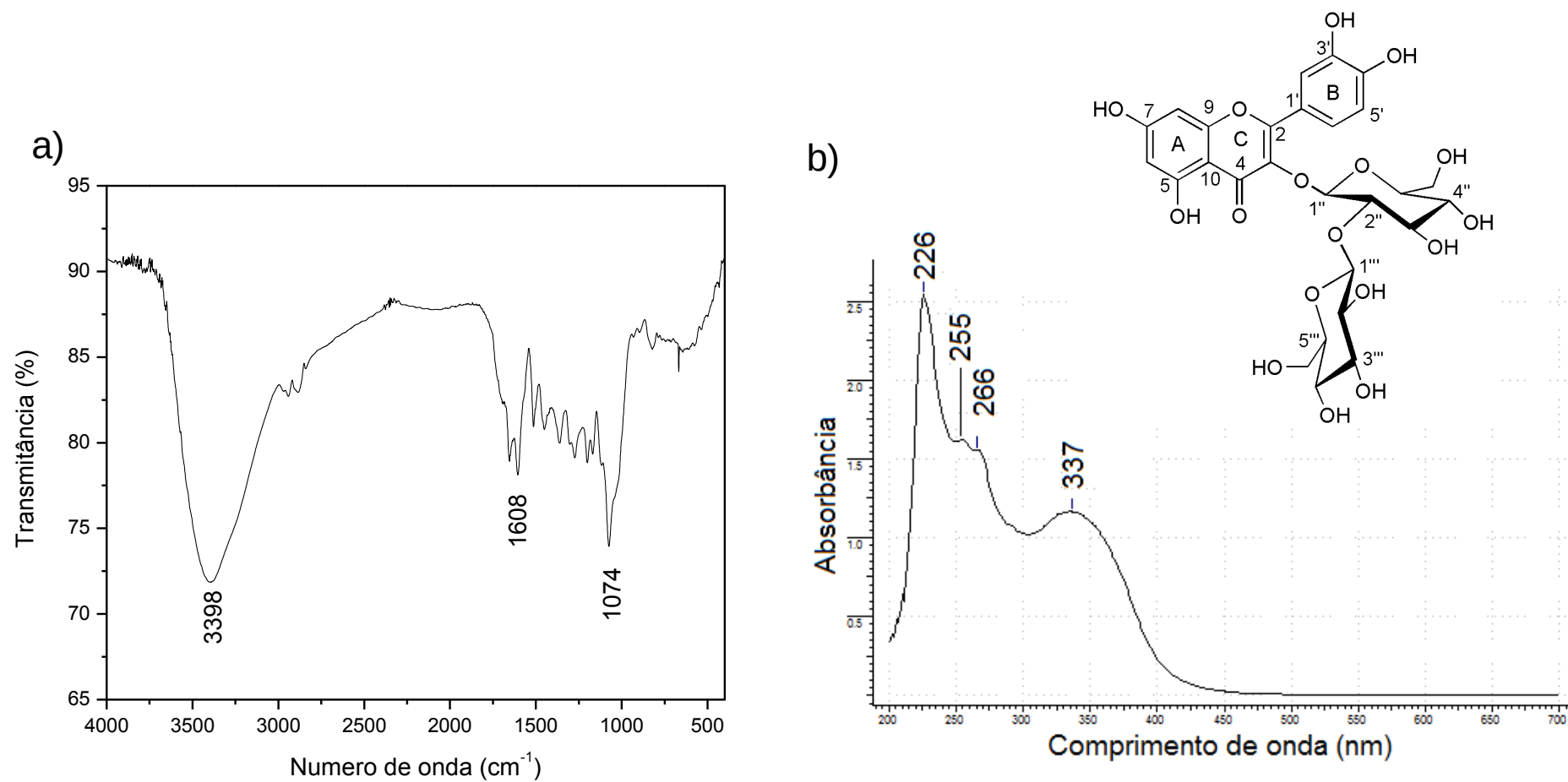


Figura 115. Espectro a) na região do infravermelho (KBr) e b) do ultravioleta do composto quercetina 3-O-soforosídeo (**39**).

Acquisition Time (sec) 2.6214
 Frequency (MHz) 500.13
 Nucleus 1H
 Number of Transients 1
 Origin spect
 Original Points Count 32768
 Owner Administrador
 Points Count 32768

Pulse Sequence zg
 Receiver Gain 90.50
 SW(cyclical) (Hz) 12500.00
 Solvent METHANOL-d4
 Spectrum Offset (Hz) 2442.7092
 Spectrum Type STANDARD
 Sweep Width (Hz) 12499.62
 Temperature (degree C) 24.760

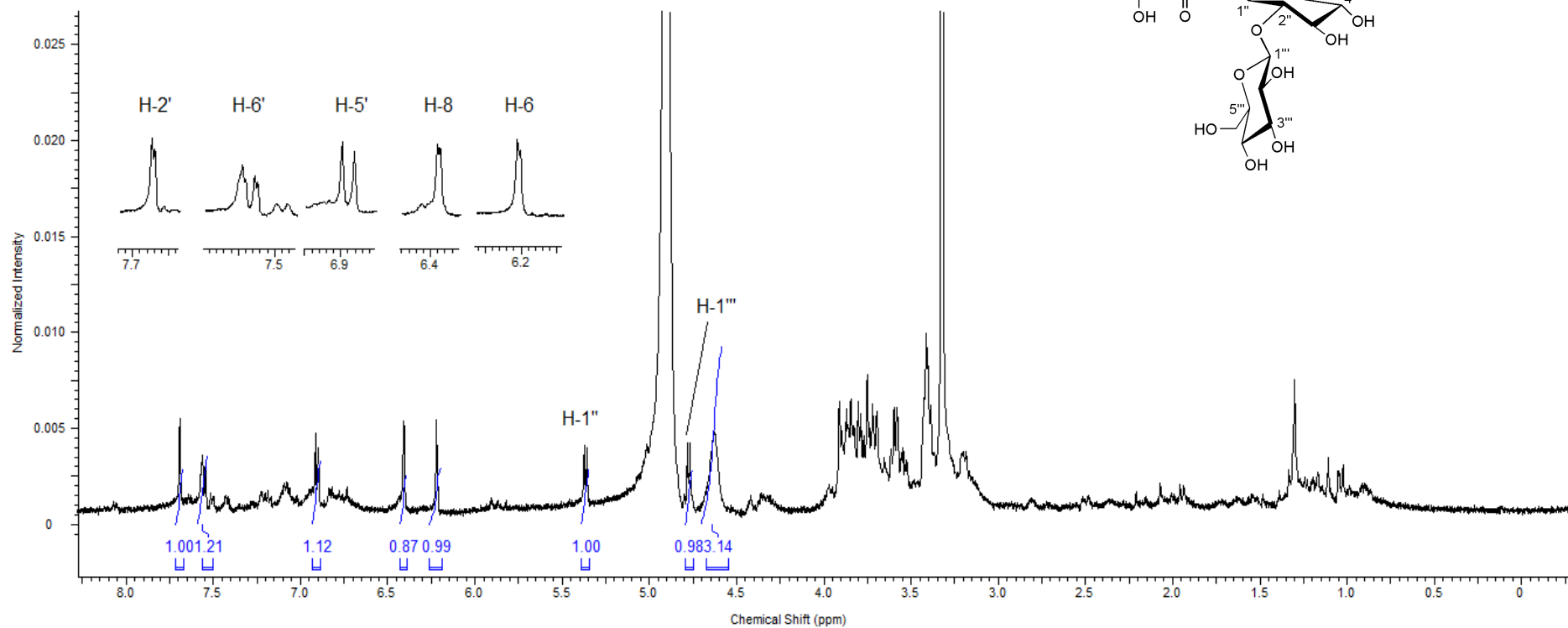
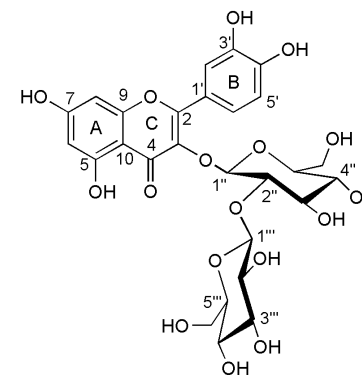


Figura 116. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto quercetina 3-O-soforosídeo (**39**).

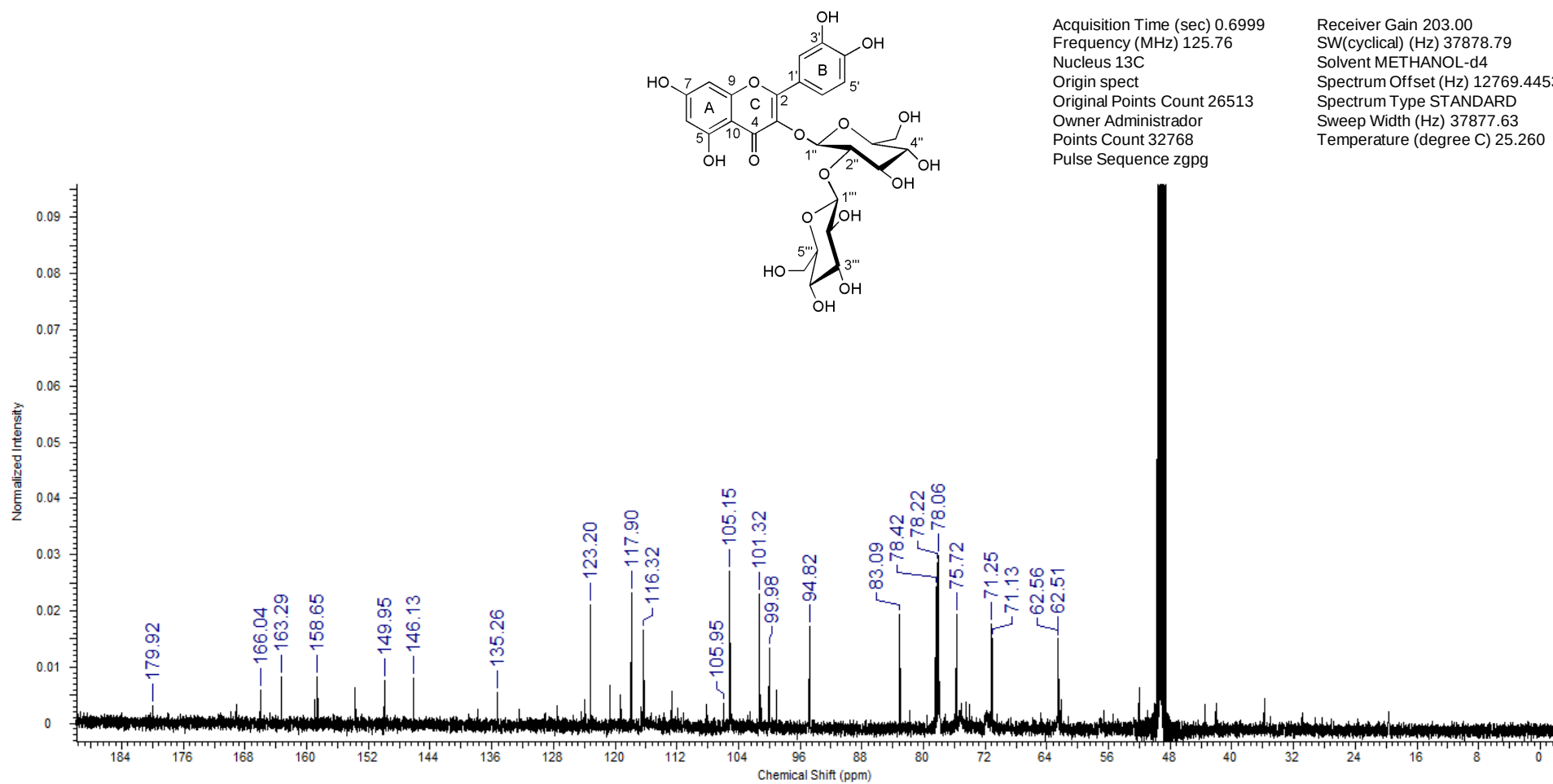


Figura 117. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) do composto quercetina 3-O-sorósídeo (39).

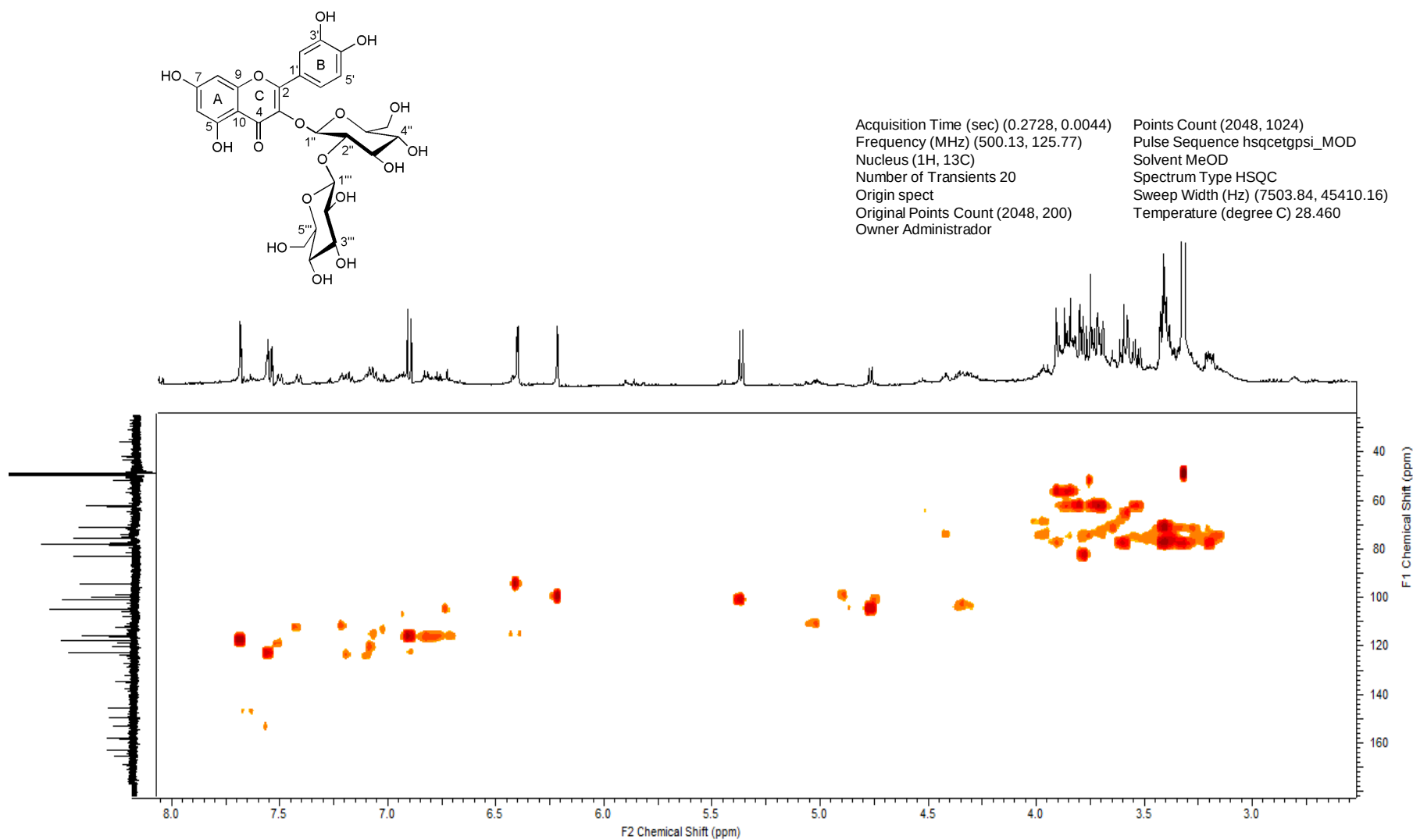


Figura 118. Mapa de correlação de HSQC (CD₃OD) do composto quercetina 3-O-sororosídeo (**39**).

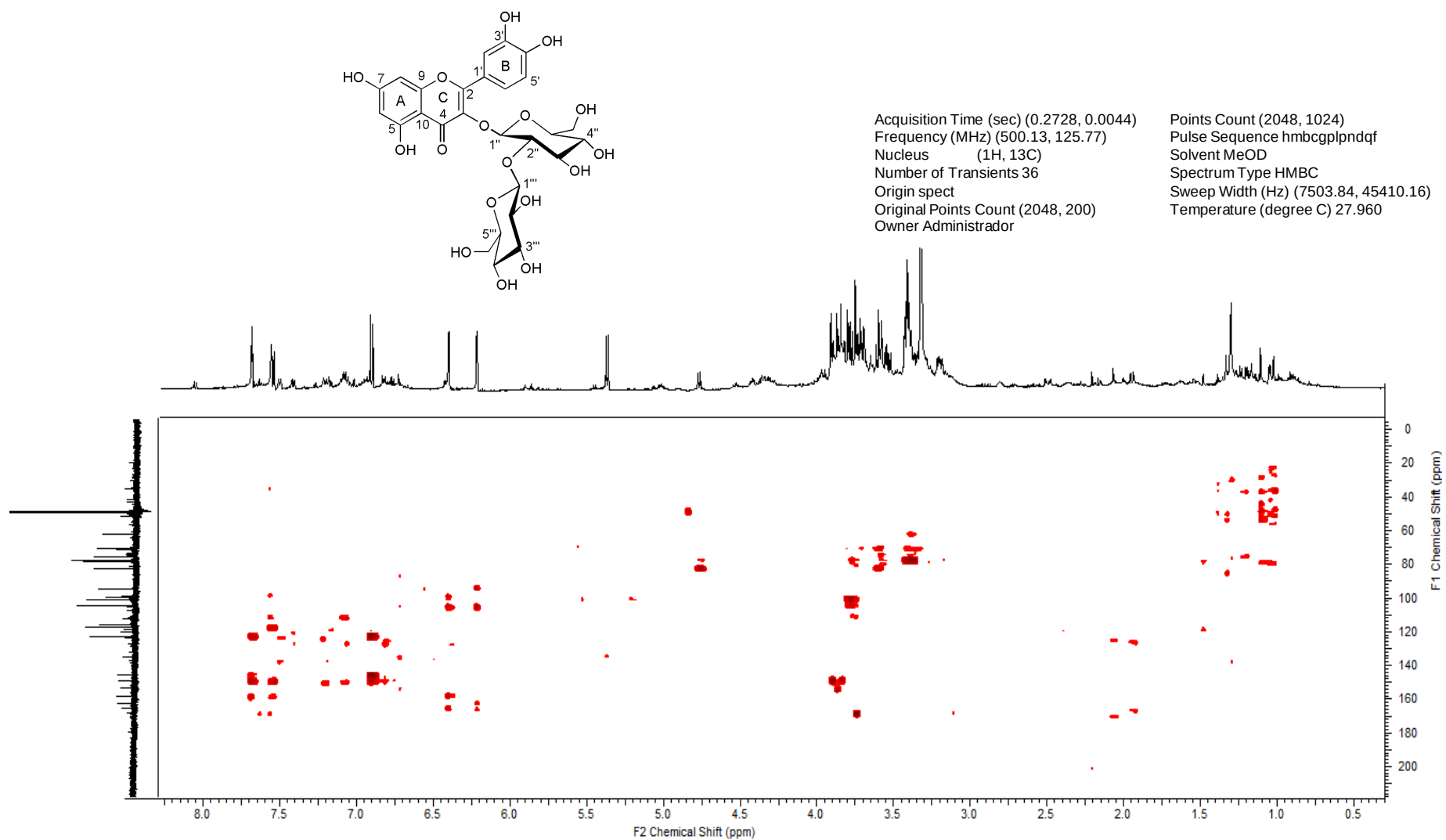


Figura 119. Mapa de correlação de HMBC (CD₃OD) do composto quercetina 3-O-soforosídeo (**39**).

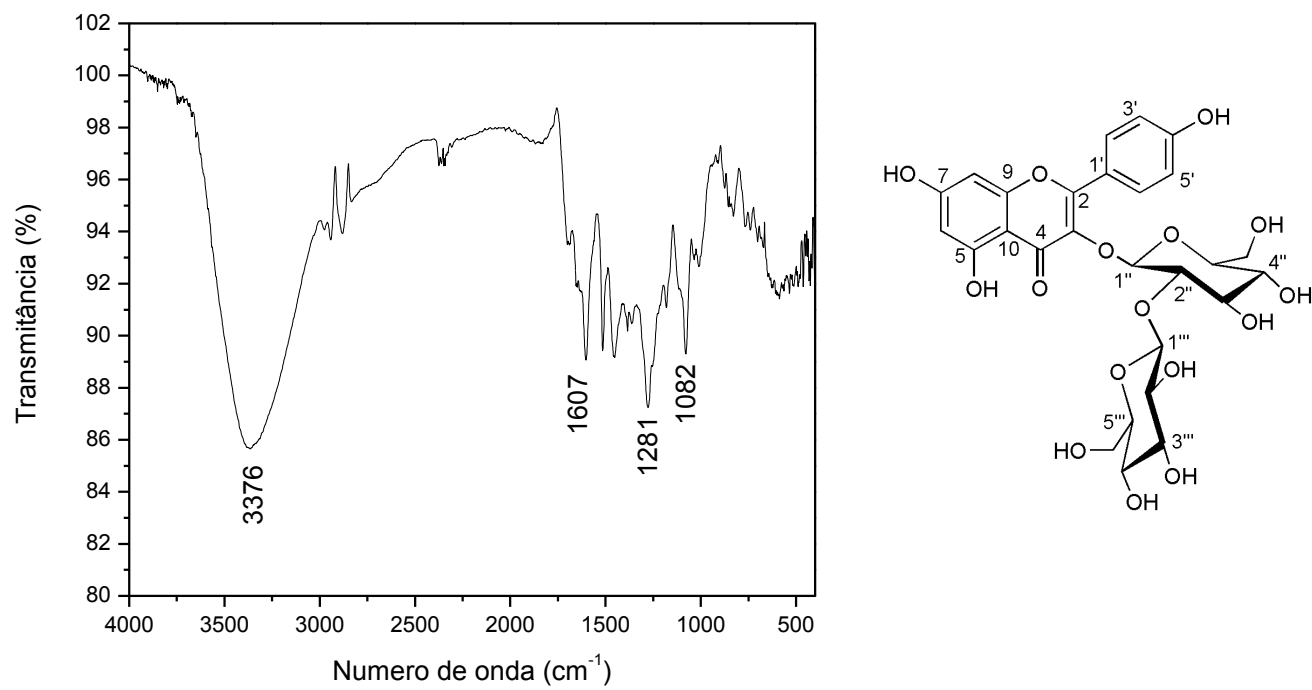


Figura 120. Espectro na região de infravermelho (KBr) do composto canferol 3-O-soforosídeo (**59**).

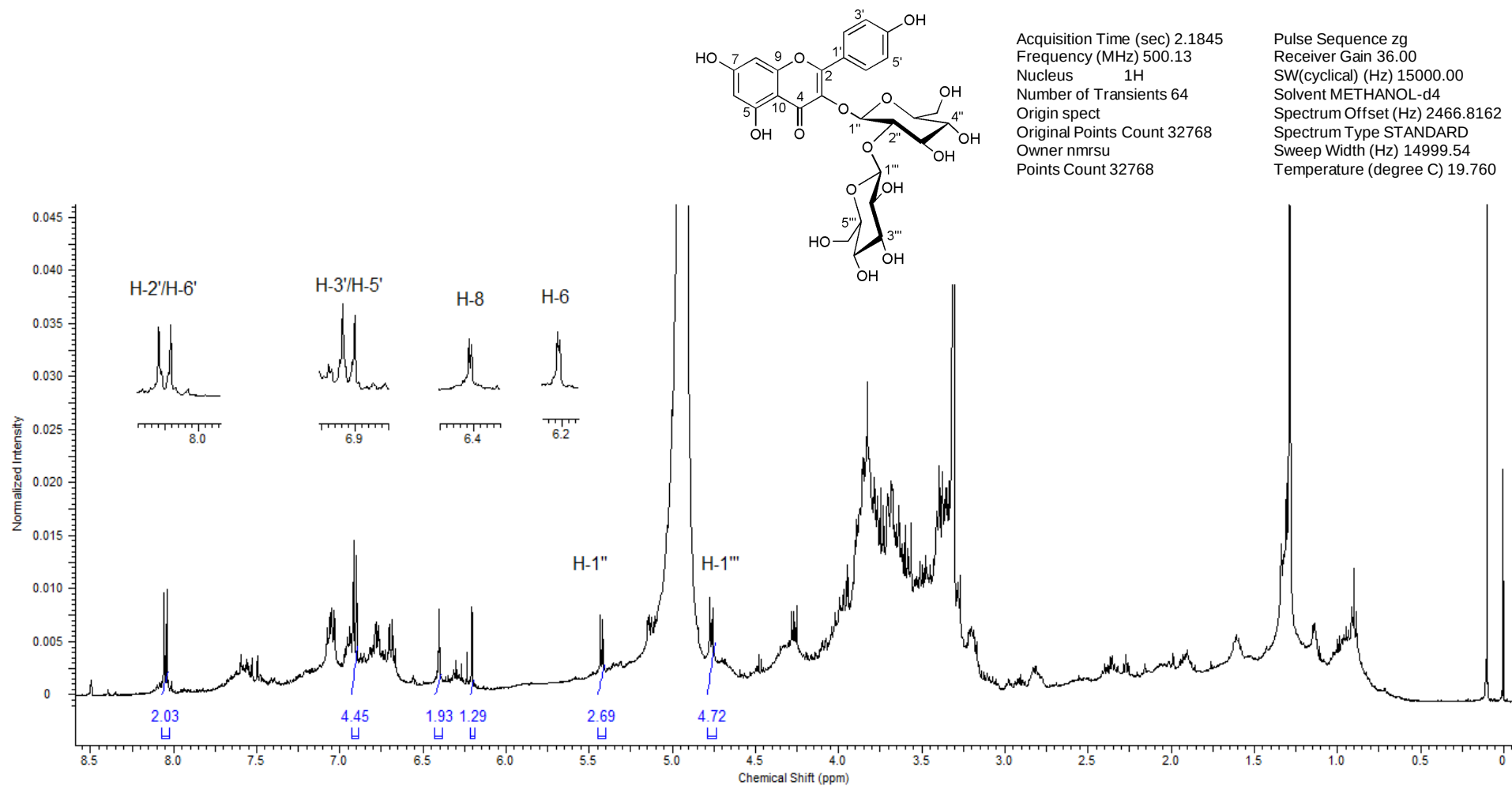


Figura 121. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto canferol 3-O-soforosídeo (**59**).

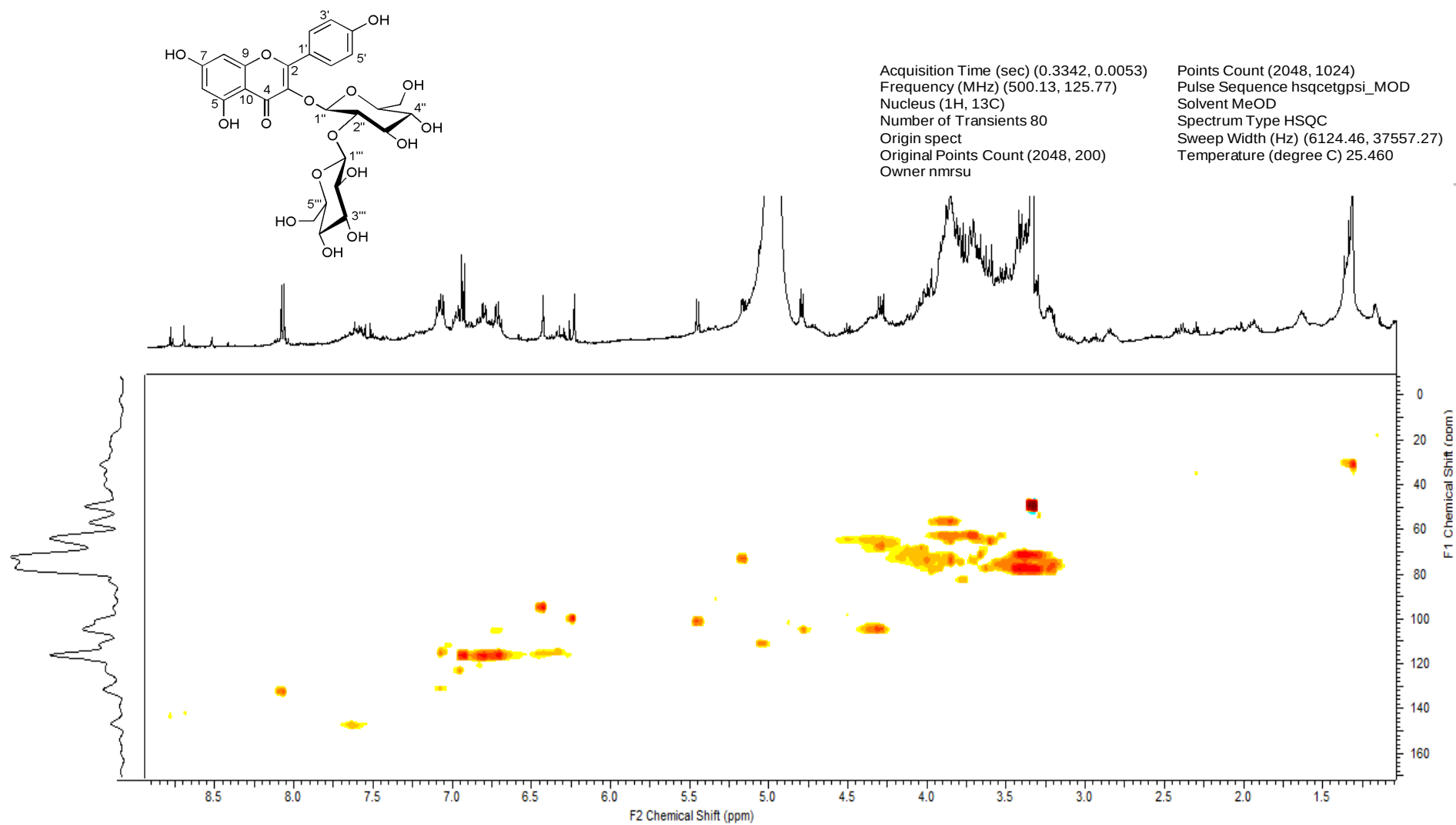


Figura 122. Mapa de correlação de HSQC (CD_3OD) do composto canferol 3-O-soforosídeo (**59**).

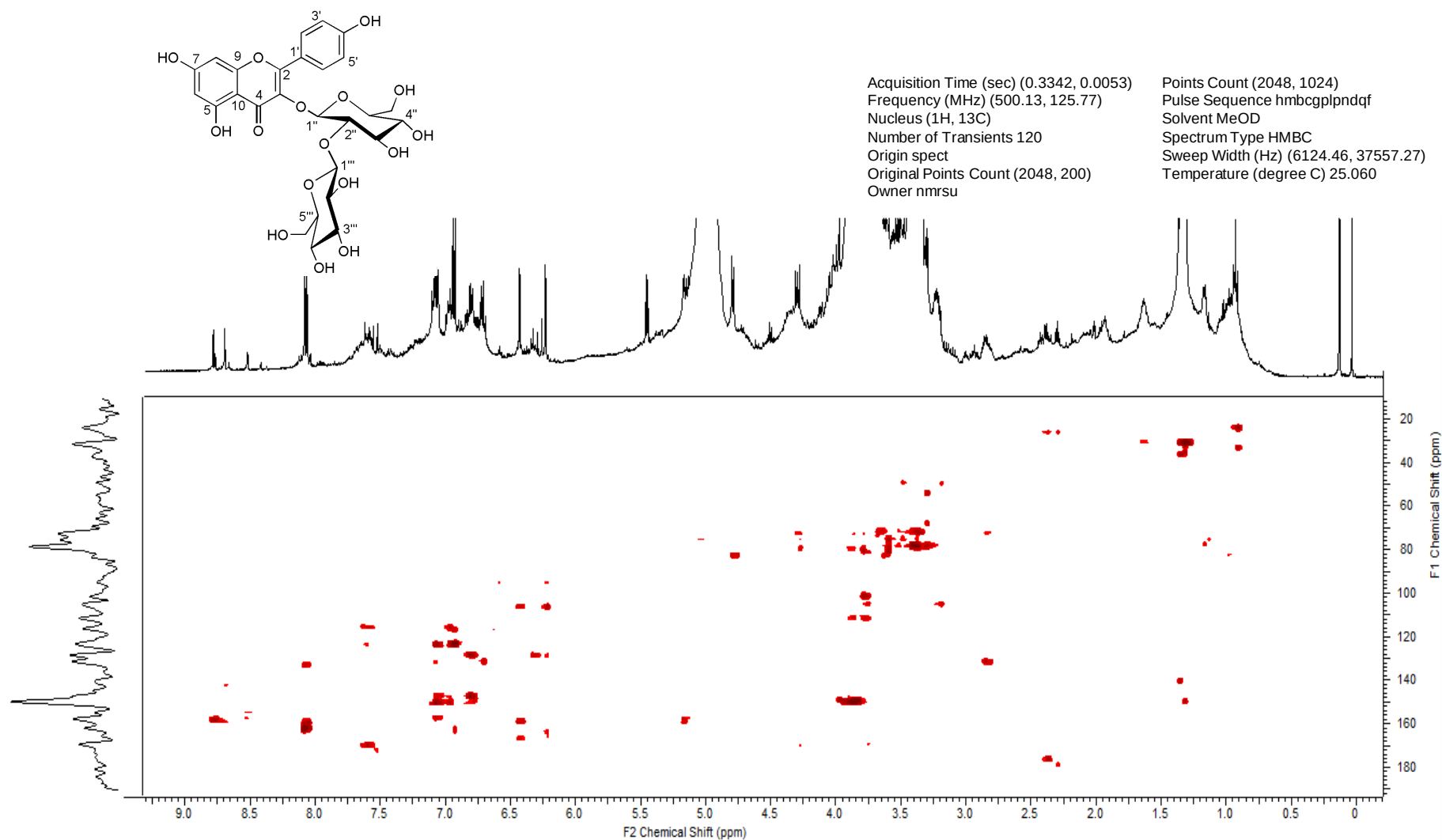


Figura 123. Mapa de correlação de HMBC (CD_3OD) do composto canferol 3-O-soforosídeo (**59**).

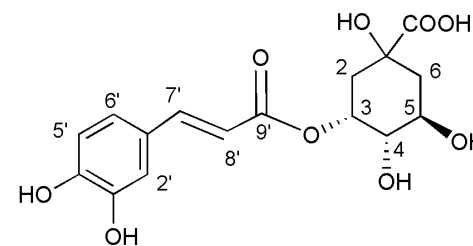
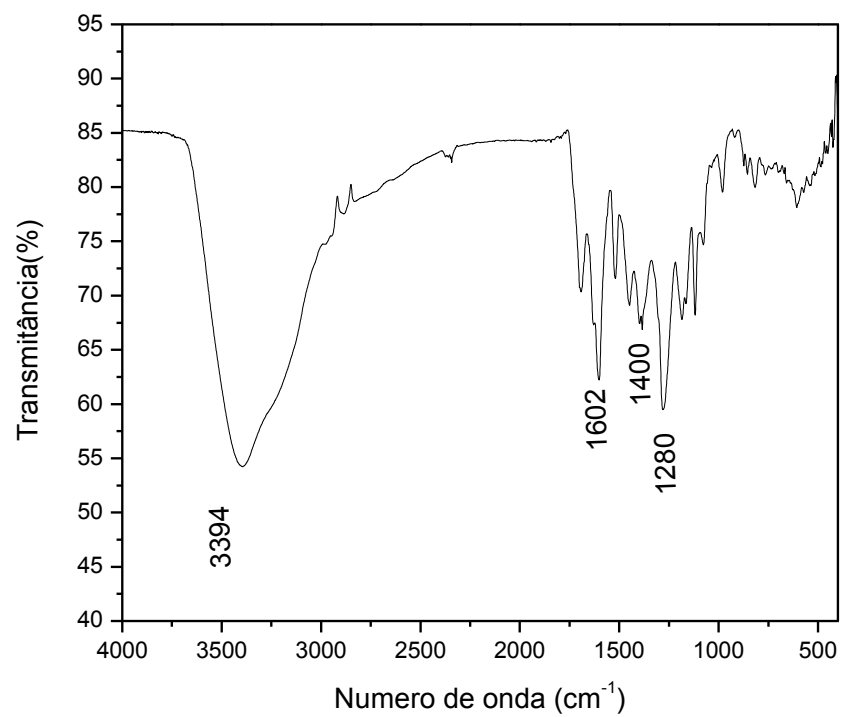


Figura 124. Espectro na região de infravermelho (KBr) do composto ácido 3-cafeoil-quínico (**60**).

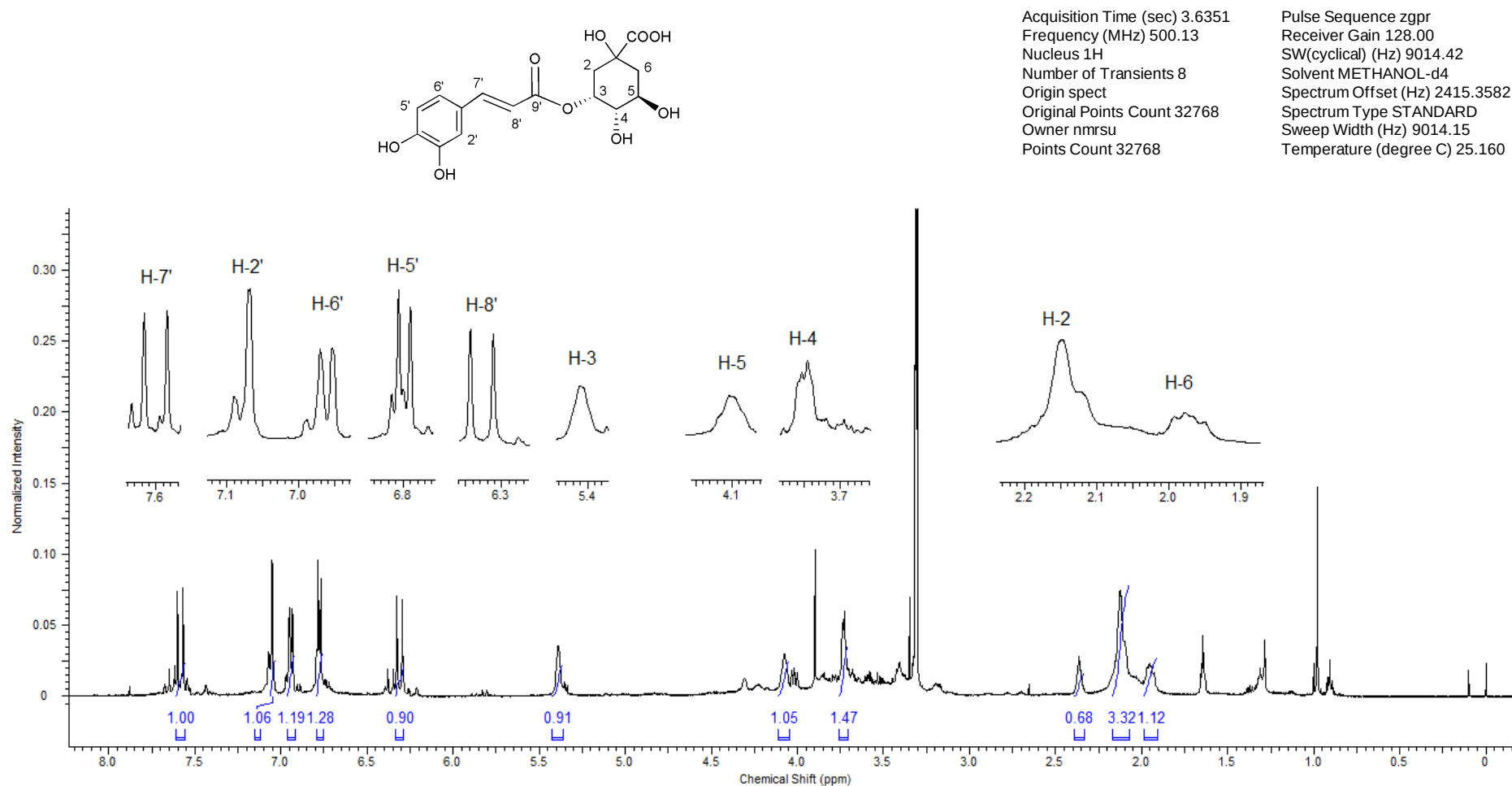


Figura 125. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto ácido 3-cafeoil-quínico (**60**).

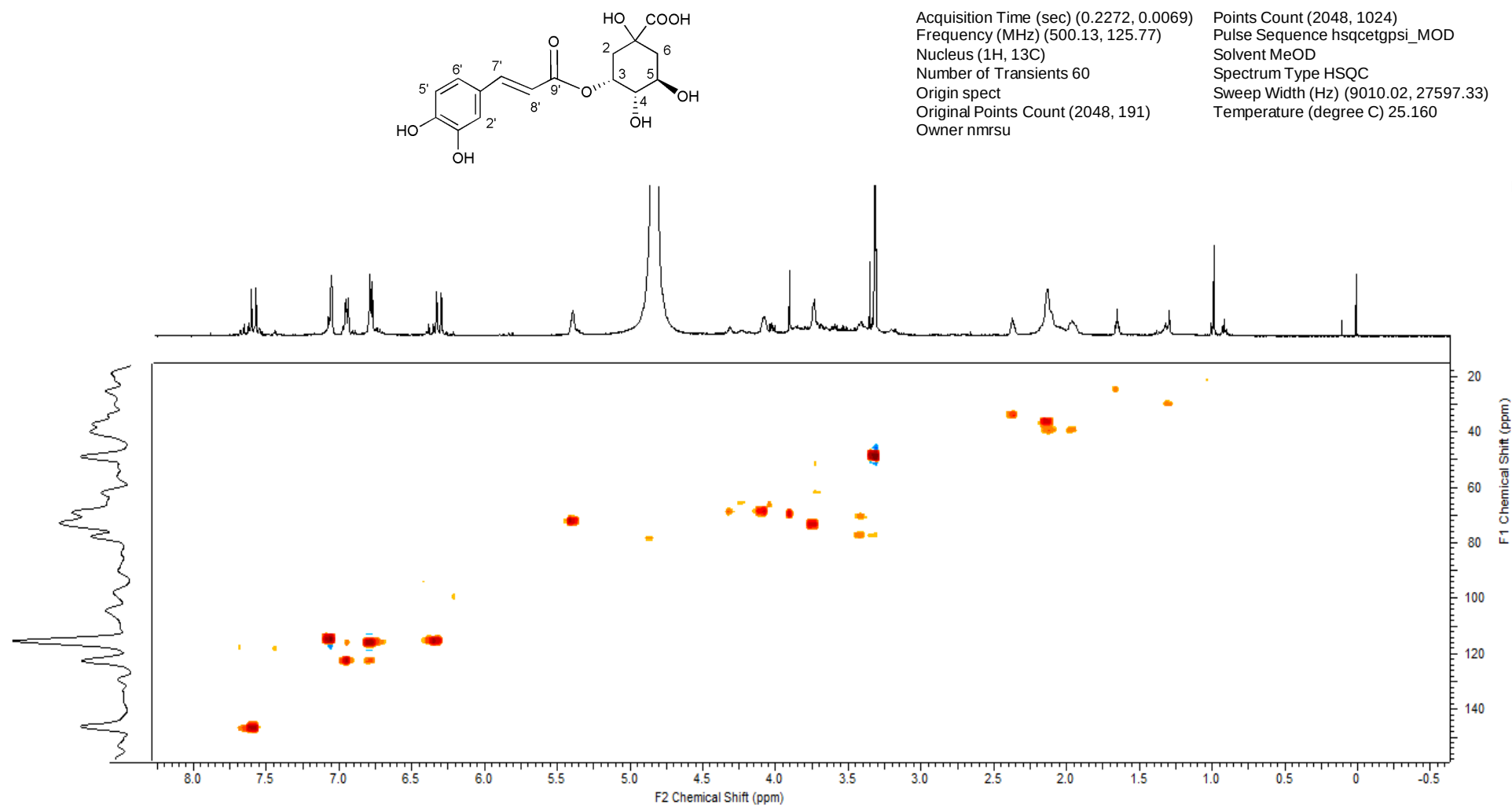


Figura 126. Mapa de correlação HSQC do composto do ácido 3-cafeoil-quínico (60).

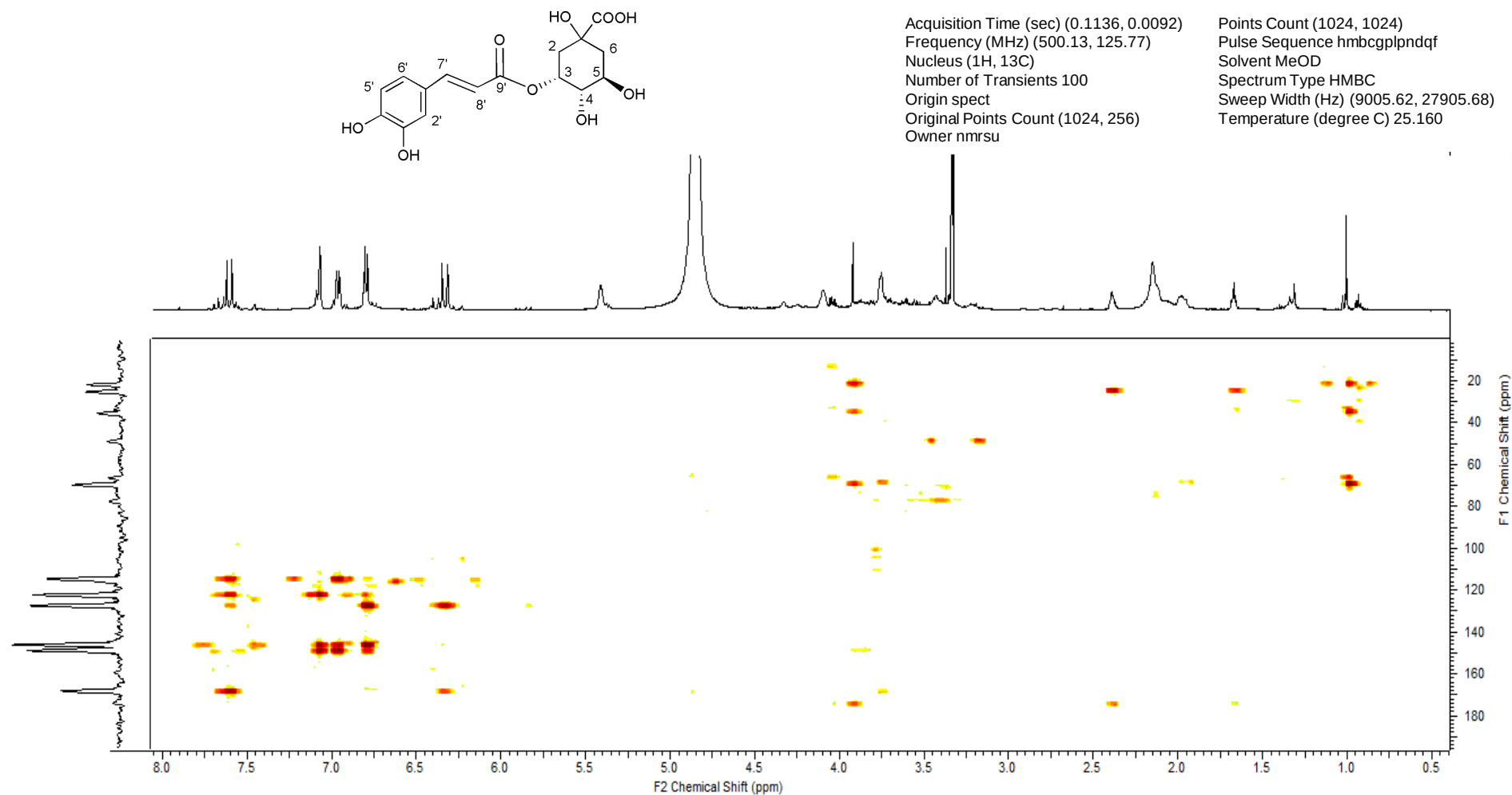


Figura 127. Mapa de correlação HMBC do composto do ácido 3-cafeoil-quínico (**60**).

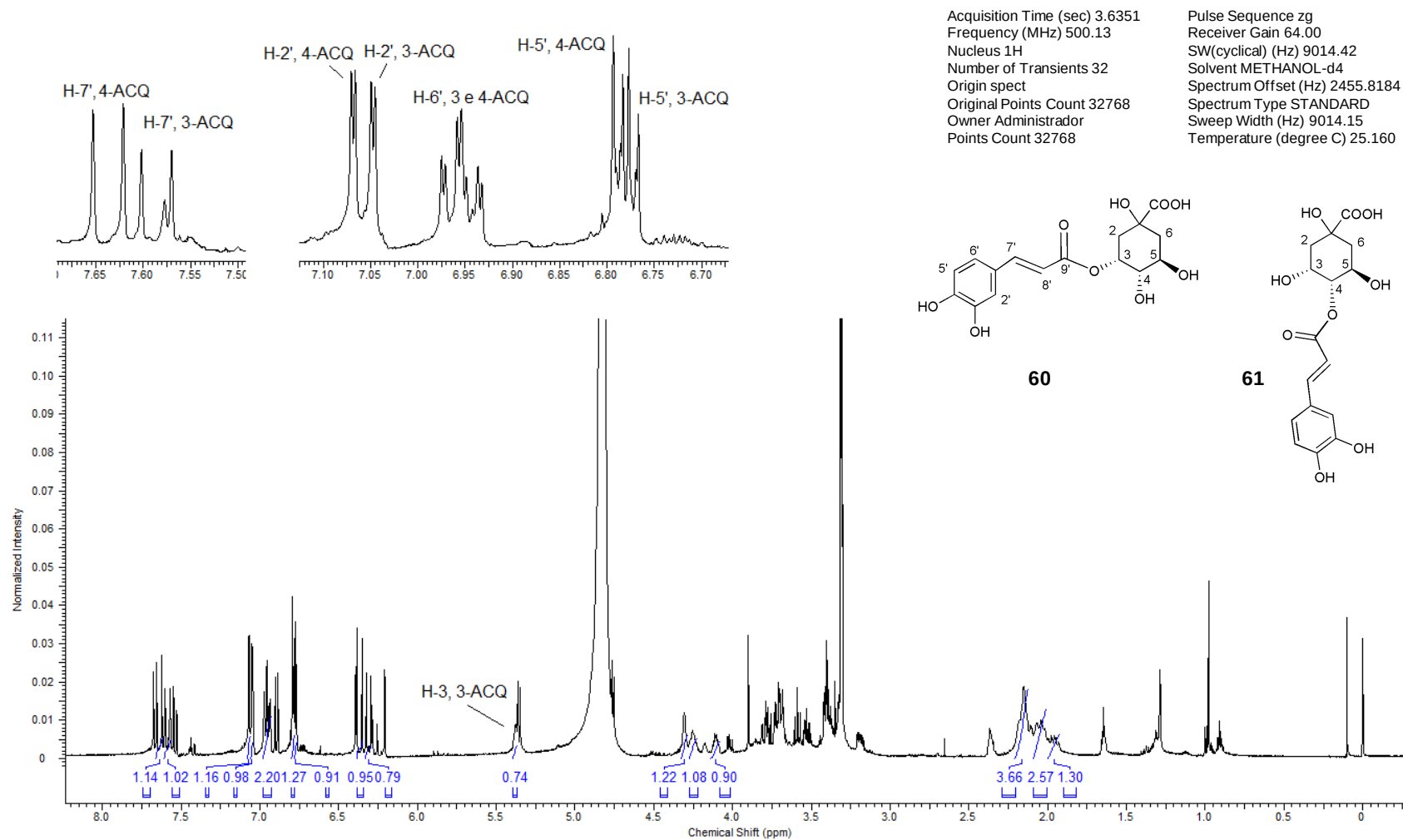


Figura 128. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da mistura de ácidos 3-cafeoil-quínico (3-ACQ, **60**) e 4-cafeoil-quínico (4-ACQ, **61**).

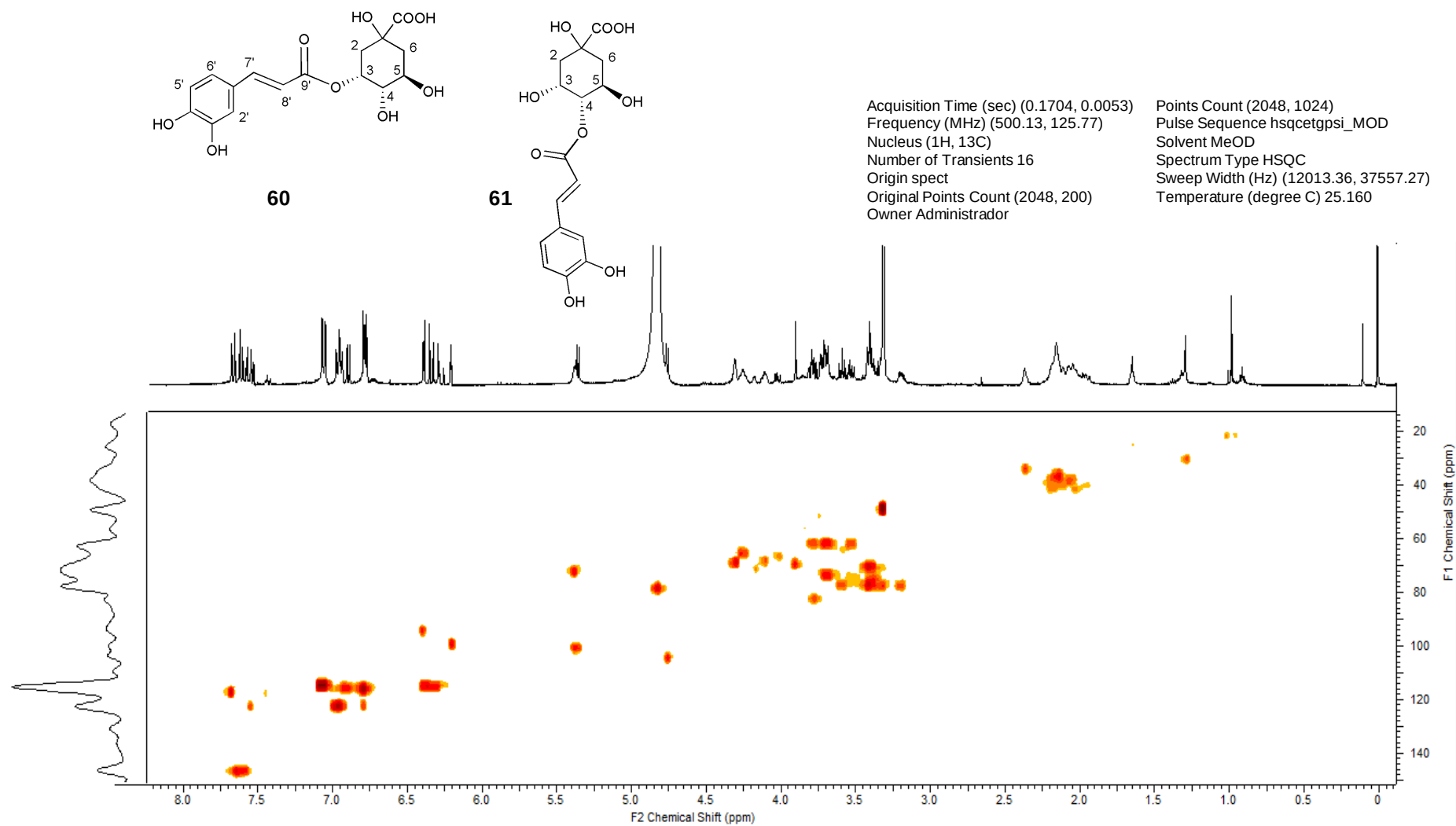


Figura 129. Mapa de correlação HSQC (CD₃OD) da mistura de ácidos 3-cafeoil-quínicico (**60**) e 4-cafeoil-quínicico (**61**).

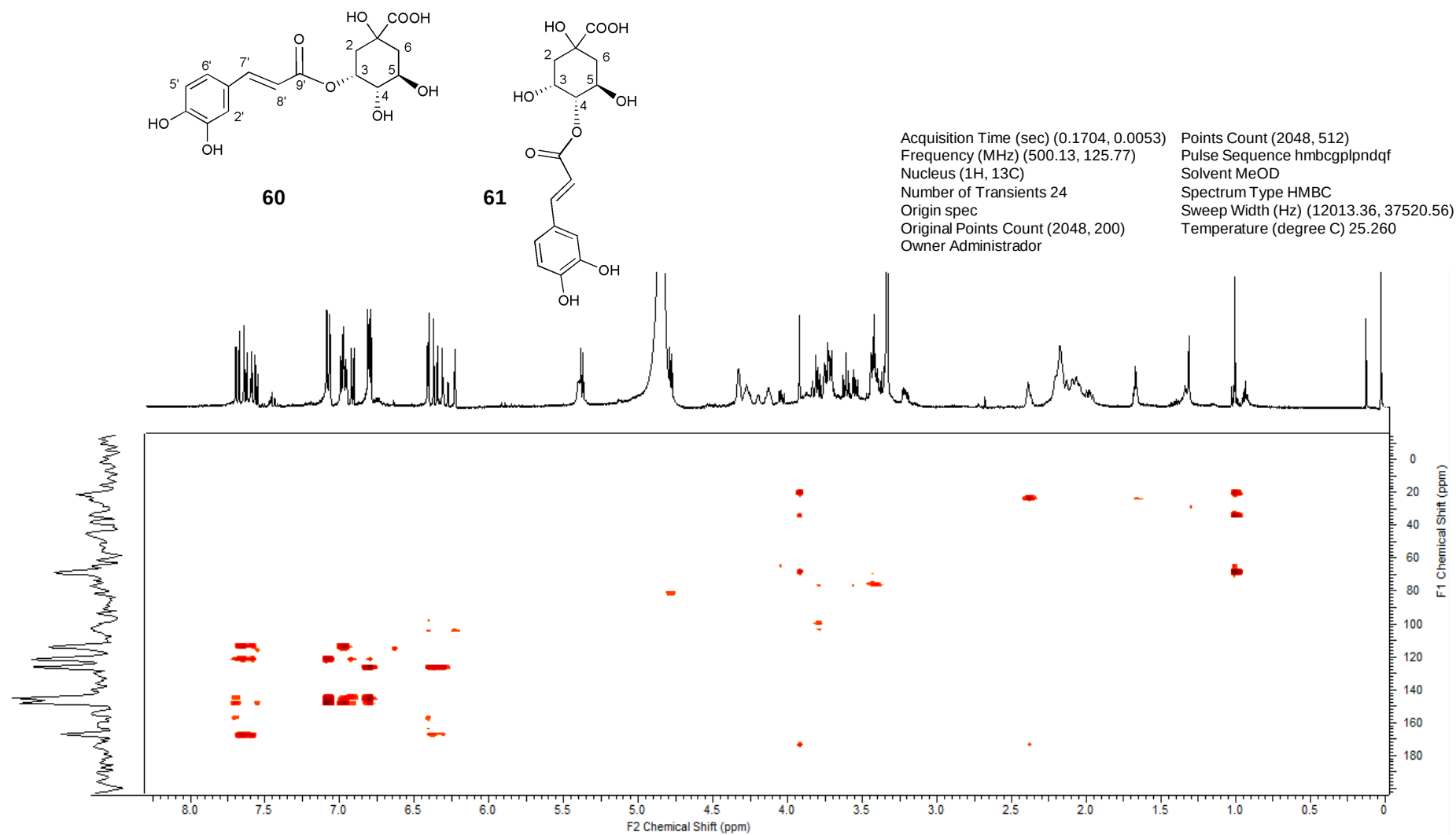


Figura 130. Mapa de correlação HMBC (CD₃OD) da mistura de ácidos 3-cafeoil-quínicos (**60**) e 4-cafeoil-quínicos (**61**).

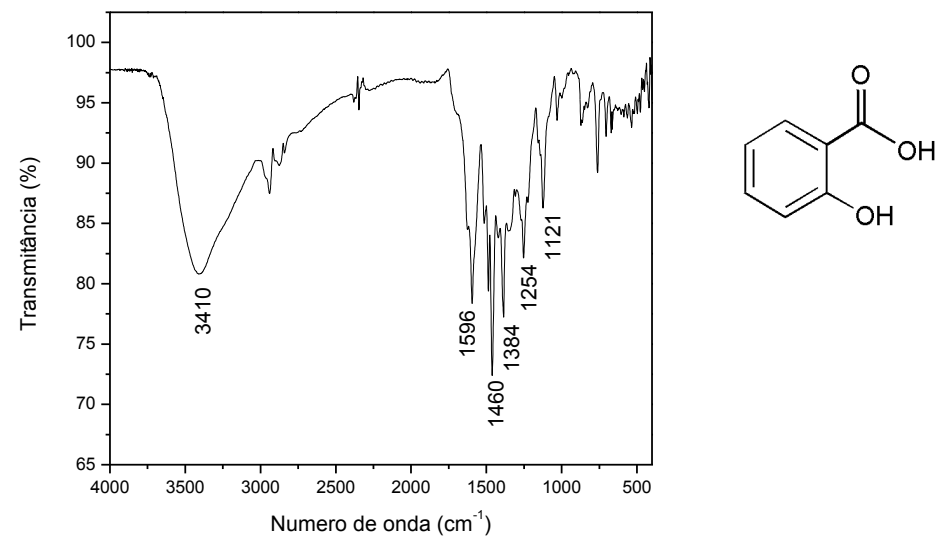


Figura 131. Espectro na região do infravermelho do ácido salicílico (**62**).

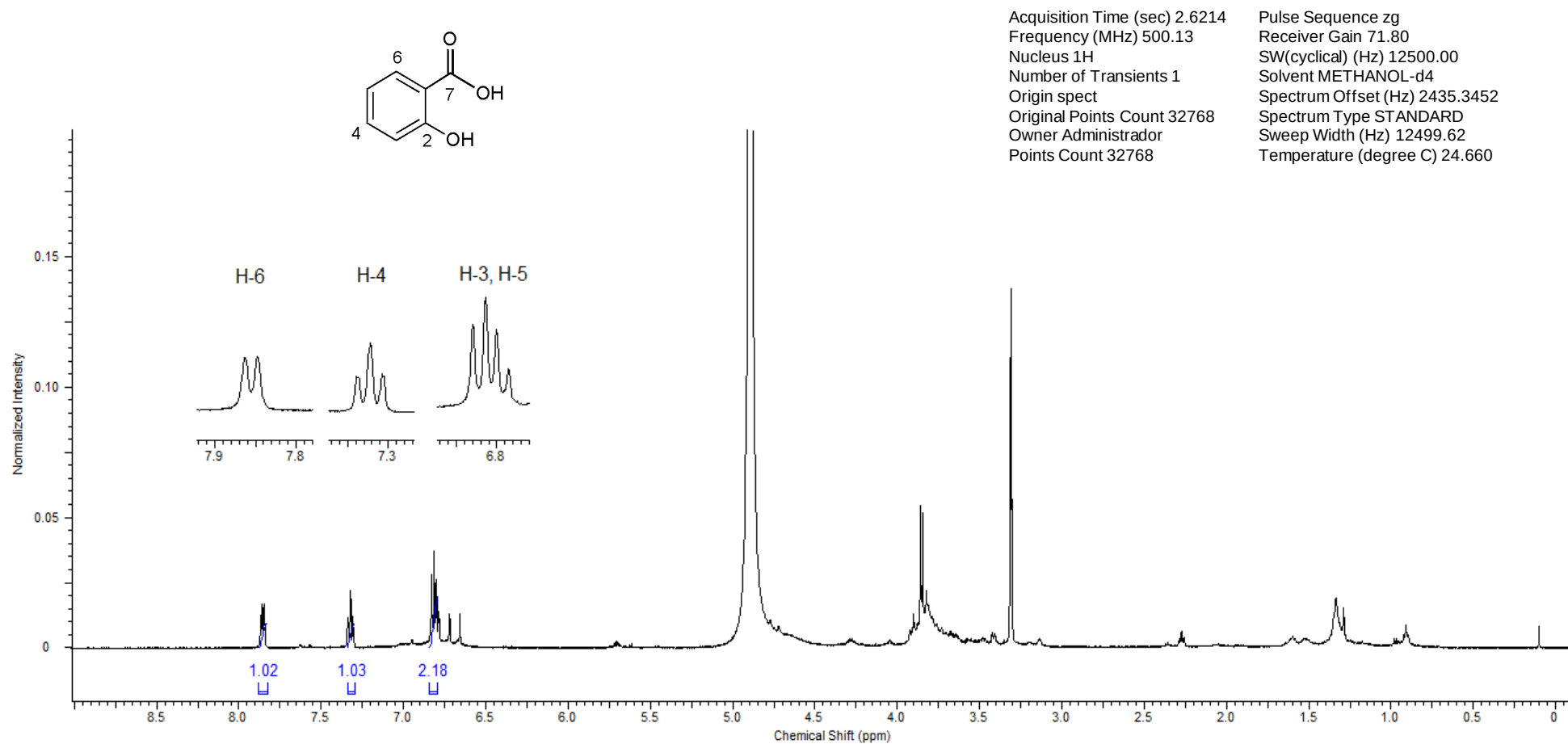
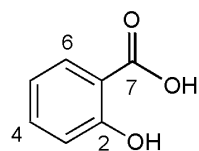


Figura 132. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto ácido salicílico (62).



Acquisition Time (sec) (0.2728, 0.0056) Points Count (2048, 1024)
 Frequency (MHz) (500.13, 125.77) Pulse Sequence hsqcetgpsi_MOD
 Nucleus (1H, 13C) Solvent MeOD
 Number of Transients 8 Spectrum Type HSQC
 Origin spect Sweep Width (Hz) (7503.84, 45410.16)
 Original Points Count (2048, 256) Temperature (degree C) 28.460
 Owner Administrador

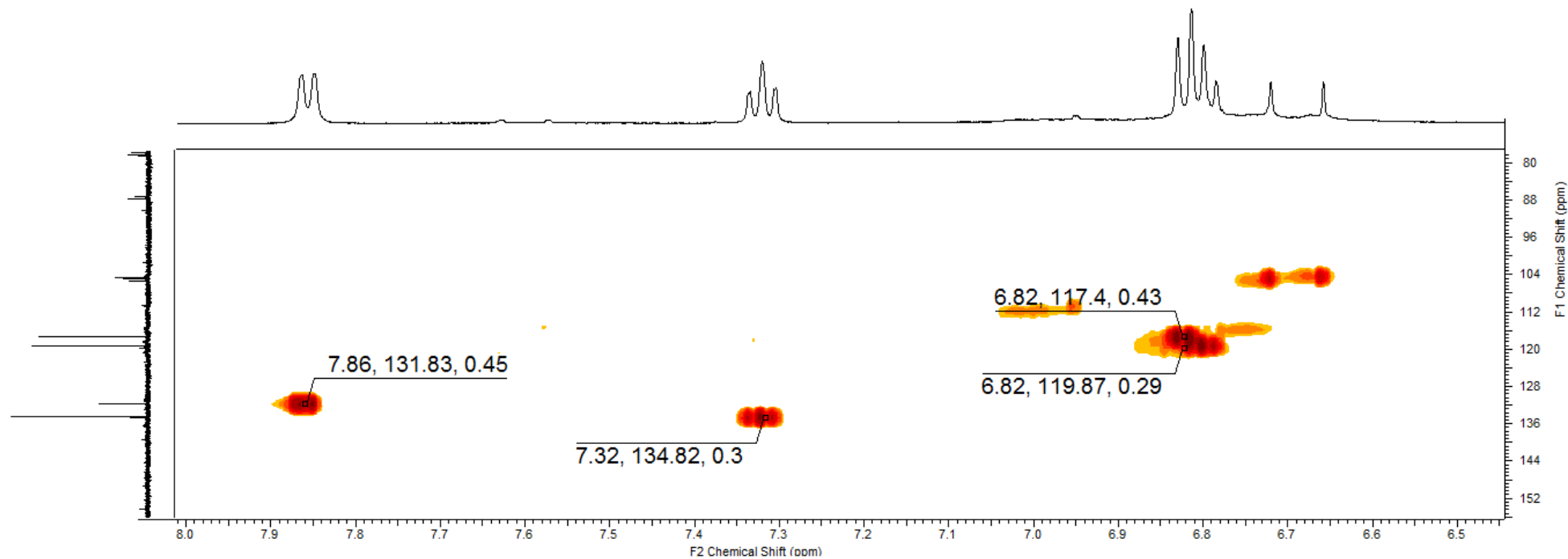
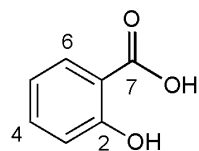


Figura 133. Mapa de correlação HSQC (CD₃OD) do composto ácido salicílico (**62**).



Acquisition Time (sec) (0.2728, 0.0056) Points Count (2048, 1024)
 Frequency (MHz) (500.13, 125.77) Pulse Sequence hmbcgp1pndqf
 Nucleus (1H, 13C) Solvent MeOD
 Number of Transients 16 Spectrum Type HMBC
 Origin spect Sweep Width (Hz) (7503.84, 45410.16)
 Original Points Count (2048, 256) Temperature (degree C) 28.160
 Owner Administrador

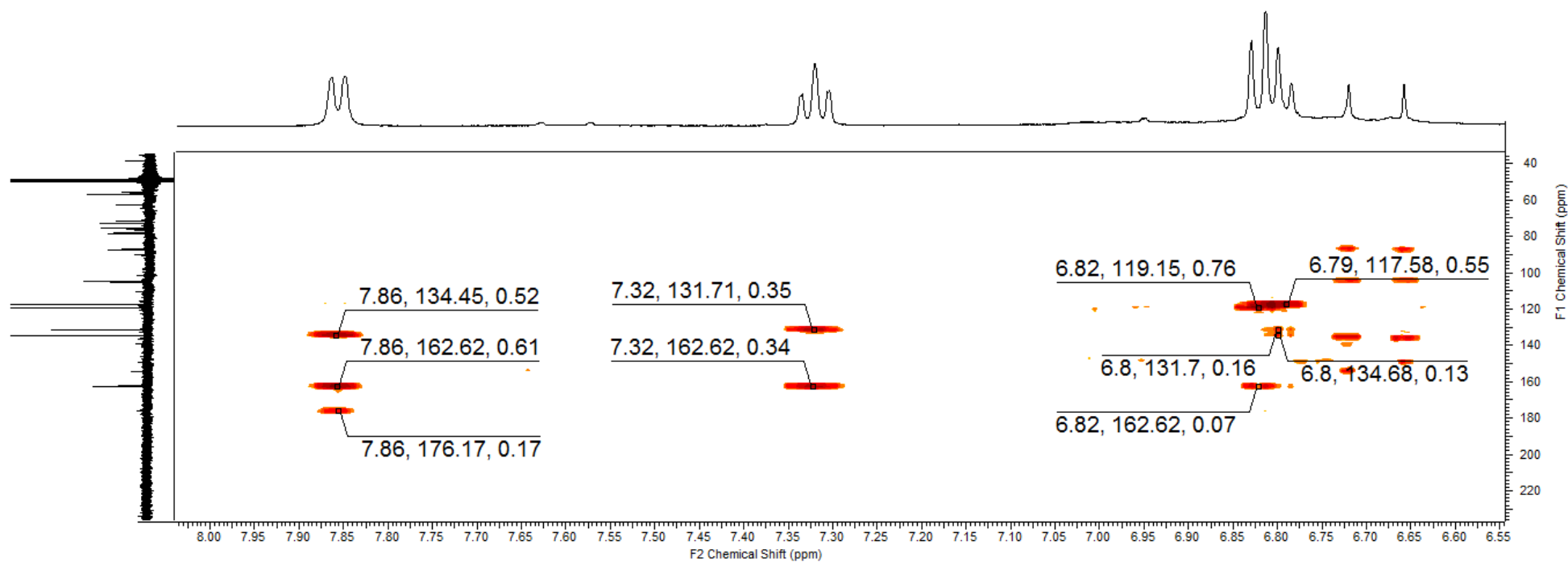


Figura 134. Mapa de correlação HMBC (CD₃OD) do composto ácido salicílico (**62**).

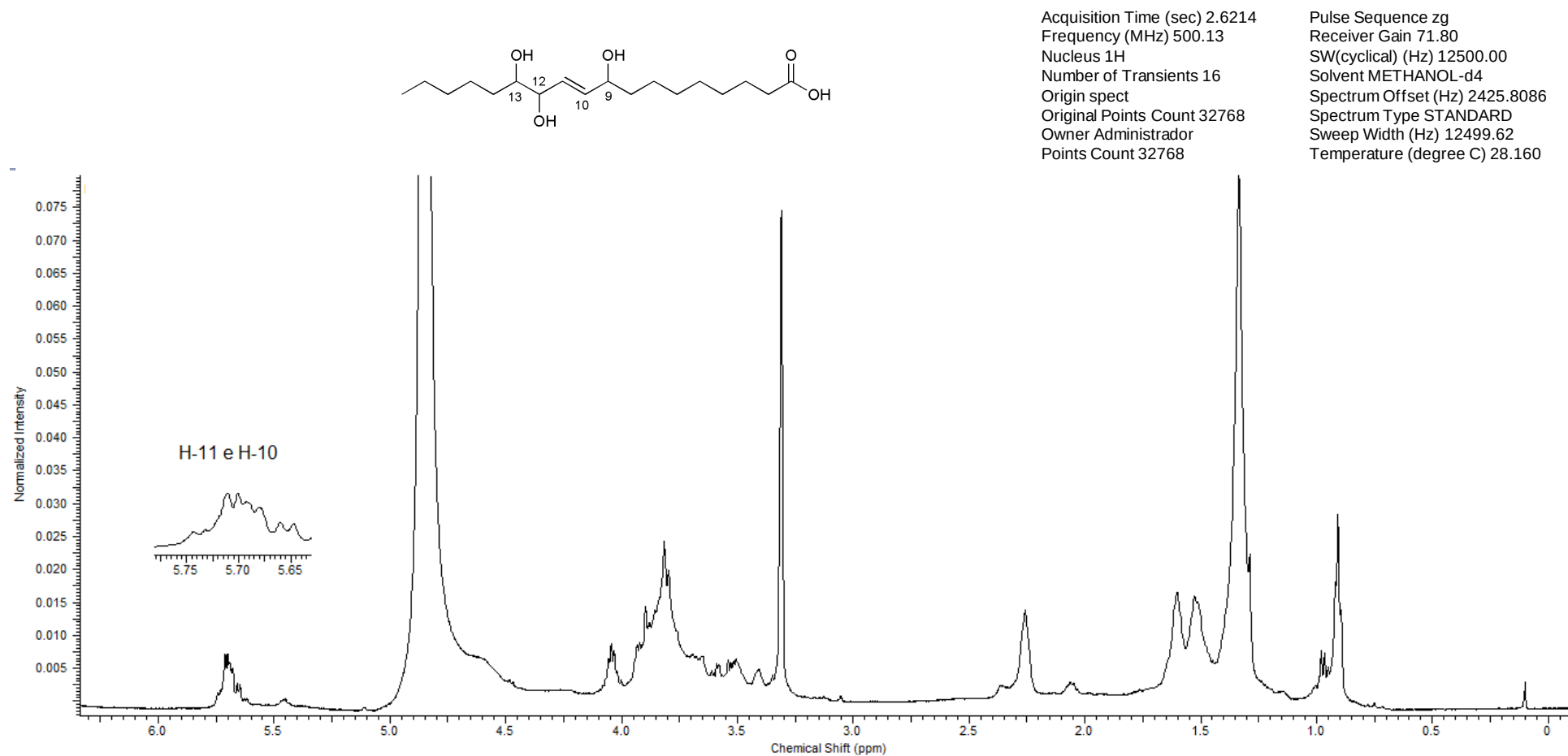
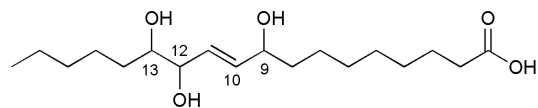


Figura 135. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do ácido 9,12,13-trihidróxi-10(*E*)-octadecenoico (**63**).



Acquisition Time (sec) (0.3727, 0.0053)
 Frequency (MHz) (500.13, 125.77)
 Nucleus (1H, 13C)
 Number of Transients 60
 Origin spect
 Original Points Count (2048, 200)
 Owner Administrador

Points Count (2048, 512)
 Pulse Sequence hsqcedetgpsisp2.3
 Solvent MeOD
 Spectrum Type HSQC
 Sweep Width (Hz) (5491.82, 37520.56)
 Temperature (degree C) 25.260

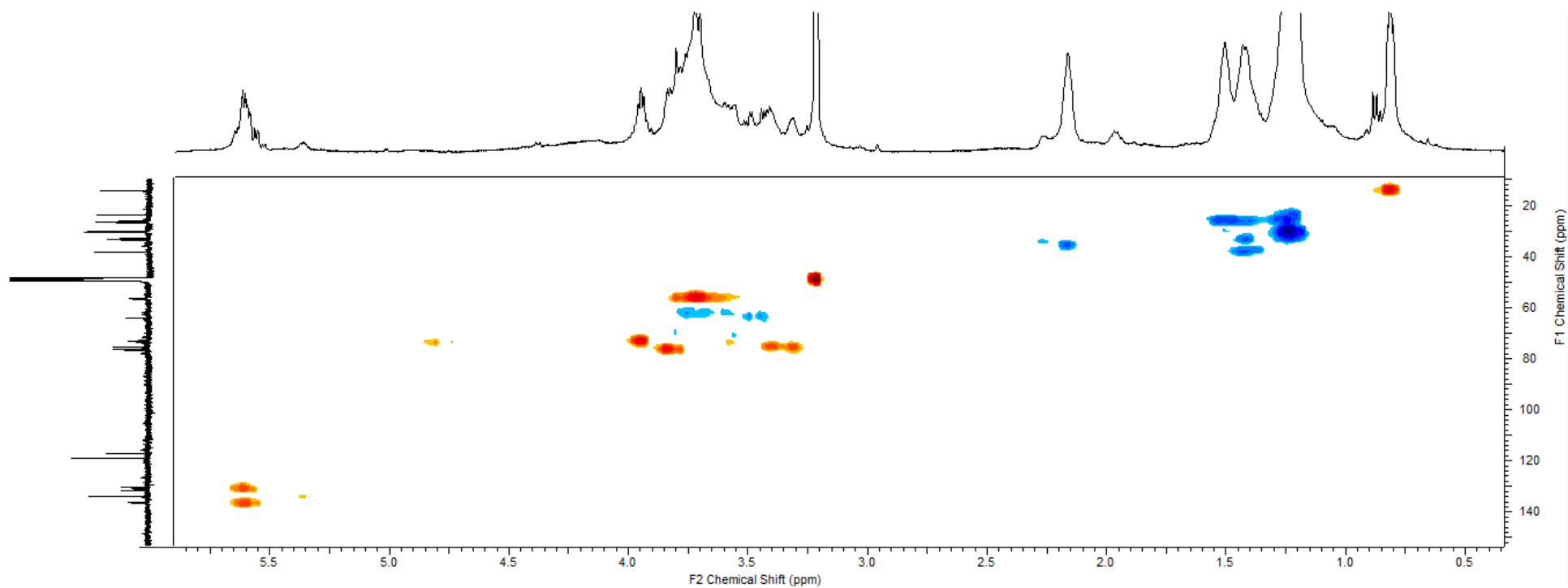
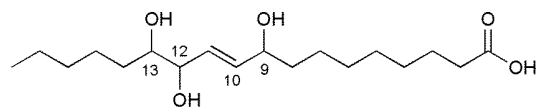


Figura 136. Mapa de correlação HSQC (CD₃OD) do ácido 9,12,13-trihidróxi-10(*E*)-octadecenoico (**63**).



Acquisition Time (sec) (0.3727, 0.0053)
 Frequency (MHz) (500.13, 125.77)
 Nucleus (1H, 13C)
 Number of Transients 70
 Origin spect
 Original Points Count (2048, 200)
 Owner Administrador

Points Count (2048, 512)
 Pulse Sequence hmbcgpplndqf
 Solvent MeOD
 Spectrum Type HMBC
 Sweep Width (Hz) (5491.82, 37520.56)
 Temperature (degree C) 25.160

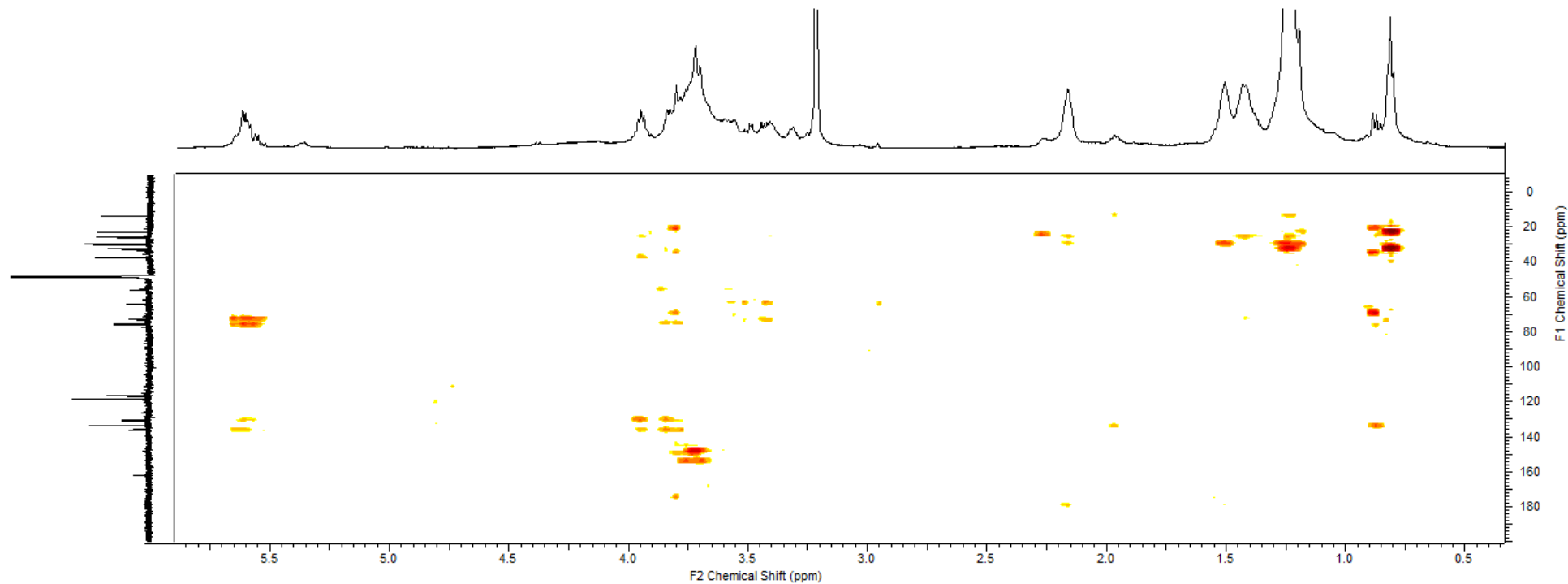


Figura 137. Mapa de correlação HMBC (CD_3OD) do ácido 9,12,13-trihidróxi-10(*E*)-octadecenoico (**63**).

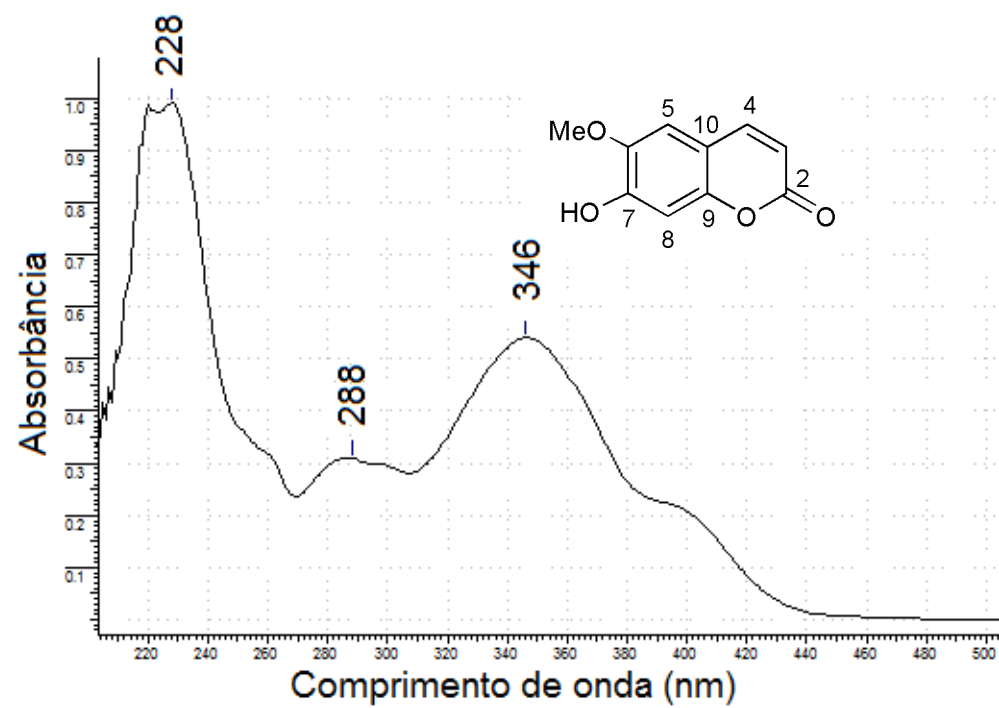


Figura 138. Espectro na região do ultravioleta do composto escopoletina (35).

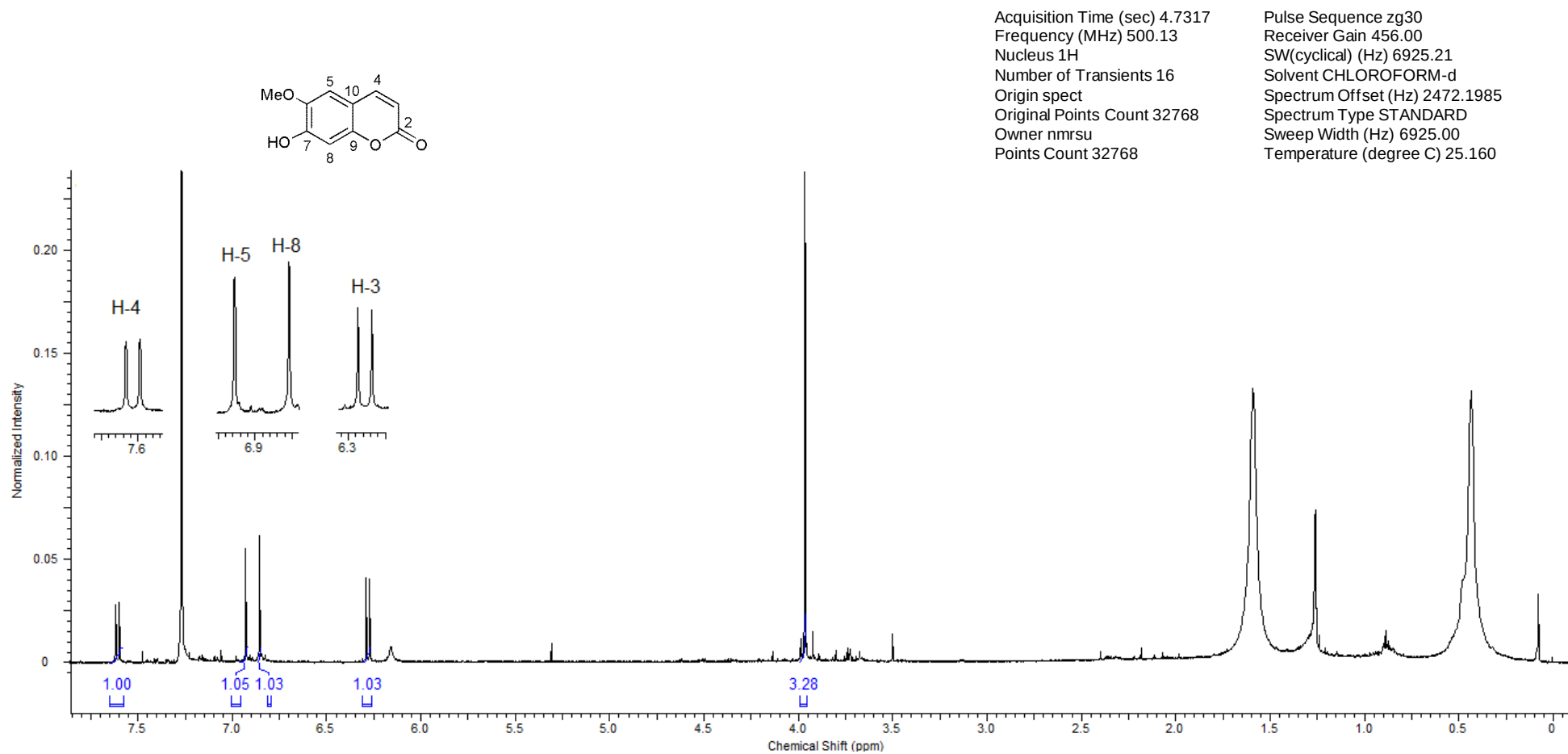


Figura 139. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto escopoletina (35).

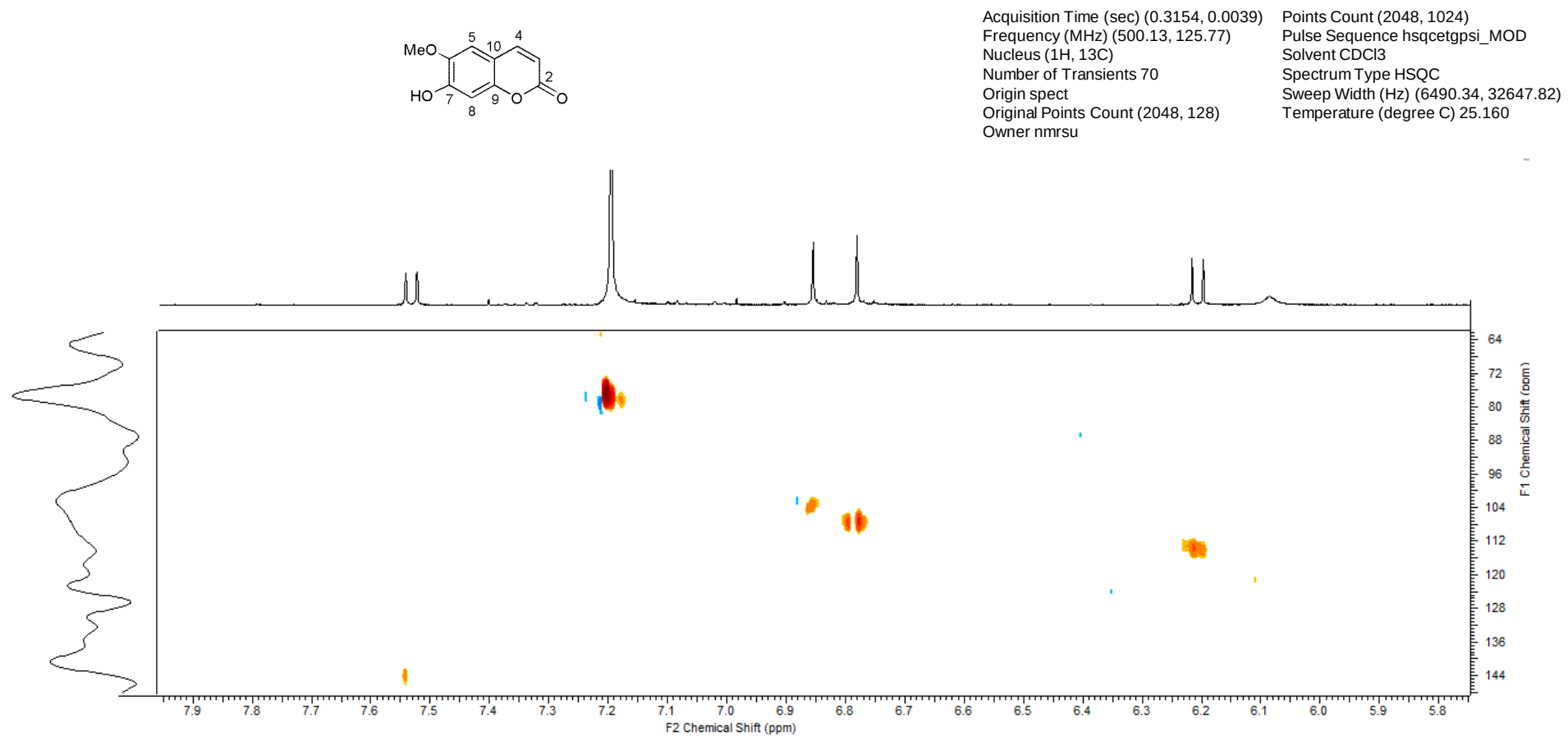


Figura 140. Mapa de correlação HSQC (CDCl₃) do composto escopoletina (35).

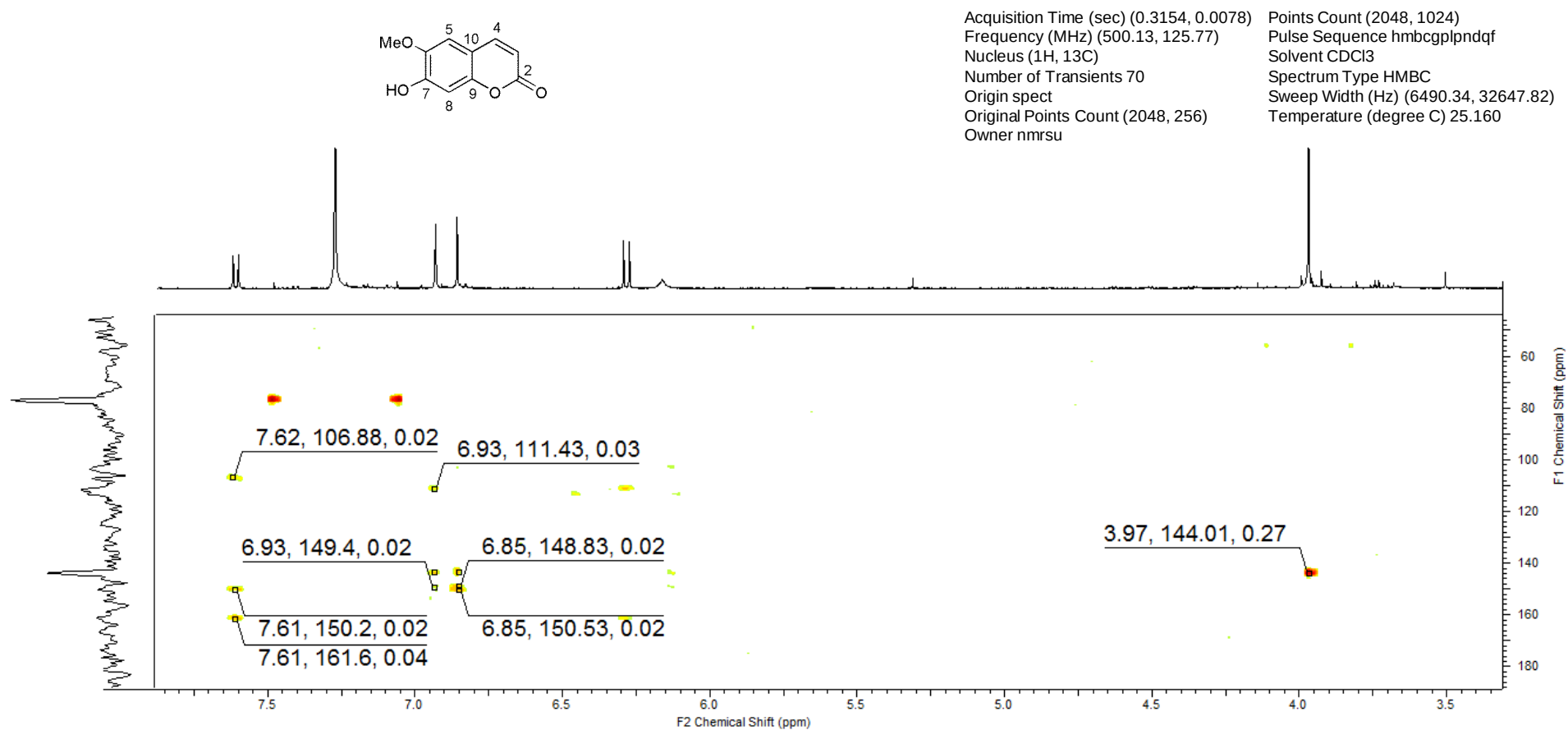


Figura 141. Mapa de correlação HMBC (CDCl₃) do composto escopoletina (**35**).