UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

IVAN MARTINS BARRETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PSYCHOTRIA* (RUBIACEAE): ESTUDO QUÍMICO DE *PSYCHOTRIA CARTHAGENENSIS* JACQ.

Jequié – Bahia
Julho – 2020

IVAN MARTINS BARRETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PSYCHOTRIA* (RUBIACEAE): ESTUDO QUÍMICO DE *PSYCHOTRIA CARTHAGENENSIS* JACQ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Dra. Betania Barros Cota.
Coorientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira.

Jequié – Bahia
Julho – 2020

B273a Barreto, Ivan Martins.

Avaliação da atividade antileishmania de espécies do gênero Psychotria (Rubiaceae): estudo químico de Psychotria carthagenensis Jacq. / Ivan Martins Barreto.- Jequié, 2020.

1317f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Betania Barros Cota e coorientação do Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira)

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

IVAN MARTINS BARRETO

Avaliação da atividade antileishmania de espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae): estudo químico de *Psychotria carthagenensis* Jacq.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Betânia Barros Cota (Orientadora)
(CPQRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte - MG, 2007)

Prof. Dr. Dialma Menezes de Oliveira (Coorientador)
(UFMG, Belo Horizonte - MG, 2012)

Prof. Dr. Ezequias Pessoa de Siqueira Filho
(UNICAMP, Campinas - SP, 2002)

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar
(UFBA, Salvador - BA, 2008)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 30 / 07 / 2020

A minha querida mãe Maria Gildete pelo estímulo,
compreensão, paciência e acima de tudo pelo amor.
E aos meus queridos irmãos Josevan, Ivana e Giovanna.

COLABORADORES

Profa. Dra. Guadalupe Edilma Licona de Macedo, curadora do Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB, campus Jequié.

Dra. Tania Maria de Almeida Alves do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos do Instituto René Rachou – FIOCRUZ Minas.

Plataforma de Métodos Analíticos - Ressonância Magnética Nuclear [RPT13A] do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ Rio.

AGRADECIMENTOS

Sou infinitamente grato a todos que estiveram presente, de diversas formas, nesta jornada.

Gratidão a Deus, sempre presente através das inúmeras e magníficas manifestações da natureza.

Aos meus pais, em especial a minha mãe por sempre ser meu porto seguro. Aos meus irmãos Josevan, Ivana e Giovanna pela compreensão de minhas ausências. A toda minha família, pelo carinho e apoio, muito obrigado.

À Dra. Betania Barros Cota pela orientação, que ao longo desse período me proporcionou inúmeros momentos de aprendizagem e que mesmo distante se tornou presente.

Ao Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira pela orientação, possibilitando muito aprendizado e muitas experiências adquiridas, além das divertidas viagens de coleta realizadas.

À Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Óleos Essenciais - LABOE.

A todos do Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB, em especial a Profa. Dra. Guadalupe Edilma Licona de Macedo, curadora do HUESB, pela cooperação nos trabalhos de coleta e identificação das espécies trabalhadas, a Rogersia Moreira Santos pelo auxílio nos processo de identificação e a Gerivaldo Souza Silva (Neném) pela prazerosa tarefa de guia em meio a mata, durante as coletas das espécies.

A todos do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos do Instituto René Rachou – FIOCRUZ Minas, em especial a Daniela Nabak Bueno Maia e Markus Kohlhoff, que ao longo desse período favoreceu aprendizagem e

amadurecimento como profissional e como ser humano, além da maravilhosa convivência com todos.

À Profa. Dra. Fátima Mendes Paixão e à Profa. Dra. Heiddy Márquez Álvarez pelos inúmeros incentivos e pela amizade, gratidão.

A todos os meus professores muitíssimo obrigado, pois com dedicação e afinco, me fizeram chegar até a concretização dessa jornada.

Aos meus amigos pela compreensão de minhas ausências, pelos encorajamentos e pelo apoio incondicional em todo o tempo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química – PGQui e a todo o corpo docente pela oportunidade de formação acadêmica, pelo apoio e incentivo ao desenvolvimento deste trabalho e conclusão de mais uma etapa.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, por ter sido minha segunda casa ao longo desse período e ter sido o divisor de águas em minha vida profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo provimento da bolsa.

A todos, muitíssimo obrigado!

Zu allem, vielen Dank!

“Para voar alto e ir longe
é preciso perder o medo de altura...”
“Um hoch zu fliegen und weit zu gehen,
muss man die Höhenangst verlieren...”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* sp. 31
Figura 2. Principais aminoácidos precursores de alcaloides. 39
Figura 3. Núcleos heterocíclico básico comum dos alcaloides. 40
Figura 4. Núcleo β-carbolínico dos alcaloides indólicos monoterpênicos. 41
Figura 5. *Psychotria carthagenensis*, coletada em Brejo Novo, Jequié – Bahia. 44
Figura 6. CCD das frações obtidas da partição líquido-líquido das folhas de *P. carthagenensis*. Mancha de cor alaranjada de Rf 0,80 após revelação com reagente de Dragendorff. 64
Figura 7. Fracionamento realizado através da cromatografia em coluna de média pressão utilizando gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica de *P. carthagenensis*. 65
Figura 8. Frações obtidas do fracionamento realizado através do gel de Sephadex LH-20 por CCMP. 65
Figura 9. CCD das 120 frações provenientes da filtração em gel da fração hidrometanólica de *P. carthagenensis*..... 66
Figura 10. Grupos obtidos (C-F) do fracionamento da fração hidrometanólica de EEF de *P. carthagenensis*, através do gel de Sephadex LH-20..... 66
Figura 11. Perfil cromatográfico do grupo C, obtido por CLAE-FR em escala analítica. Condições cromatográficas: conforme parte experimental (item 4.4.4.1). 68
Figura 12. Perfil cromatográfico do grupo D, obtido no CLAE-FR em escala analítica. Condições cromatográficas: conforme parte experimental (item 4.4.4.1). 69
Figura 13. Fluxograma de obtenção das substâncias **I** e **II** provenientes das folhas de *P. carthagenensis*. 70
Figura 14. CCD obtido das substancias **I** e **II**. 71
Figura 15. Perfil cromatográfico, obtido por CLAE-FR em escala analítica da fração hidrometanólica do extrato bruto dos caules de *P. carthagenensis*. Condições cromatográficas: conforme parte experimental (item 4.4.4.2)..... 72

Figura 16. Cromatograma da fração hidrometanólica proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de *P. carthagenensis* em escala semipreparativa. 73
Figura 17. Perfil cromatográfico do grupo 34, obtido no CLAE-FR em escala semipreparativa. 74
Figura 18. Perfil cromatográfico do grupo 32, obtido no CLAE-FR em escala semipreparativa. 75
Figura 19. Fluxograma de obtenção das substâncias **II** e **III**, provenientes dos caules de *P. carthagenensis*. 76
Figura 20. Proposta da estrutura da substância **I** - cartagenina. 77
Figura 21. Proposta de fragmentação, obtido através EMAR-IES, da substância **I** - cartagenina. 78
Figura 22. Estrutura da porção secologanina de alcaloides indólicos-terpenicos isolados de *Psychotria*..... 80
Figura 23. Estrutura da loganina. 81
Figura 24. Proposta da estrutura da substância **II** - ácido lialosídico..... 84
Figura 25. Proposta da estrutura da substância **III** - ácido estrictosidínico..... 88
Figura 26. Expansão no espectro de RMN 2D – HMBC da substância **III** - ácido estrictosidínico..... 89
Figura 27. Fluxograma da triagem da atividade antileishmania realizada com espécies de *Psychotria*..... 93
Figura 28. Fluxograma da atividade antileishmania realizada com a *P. carthagenensis*, em paralelo ao estudo fitoquímico. 97
Figura 29. Estrutura dos alcaloides isolados da *Psychotria kluggi*. 99
Figura 30. Estrutura dos alcaloides 14-oxoprunifoleína e estrictosamida isolados da *Psychotria prunifolia*. 100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Quantitativo de casos de leishmaniose cutânea e mucosa na América Latina, de 2001–2017..... 32
Gráfico 2. Casos de leishmaniose visceral registrados em países americanos com maior incidência no período de 2001–2017..... 33
Gráfico 3. Taxa de letalidade de leishmaniose visceral nas Américas, no período de 2012–2017. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das espécies do gênero *Leishmania*..... 29
Tabela 2. Os principais fármacos leishmanicidas e suas fórmulas estruturais. 36
Tabela 3. Atividades biológicas de espécies do gênero *Psychotria*..... 42
Tabela 4. Dados de coleta (nome da espécie vegetal, latitude, longitude e registro HUESB) das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria*..... 48
Tabela 5. Rendimento dos extratos brutos, em gramas e em percentual, das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria*..... 49
Tabela 6. Rendimento da partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas, em gramas e em percentual, de *P. carthagenensis*. 49
Tabela 7. Rendimento dos grupos oriundos da filtração em gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica proveniente do EEF de *P. carthagenensis*. 51
Tabela 8. Condições de eluição por CLAE-FR semipreparativo e rendimento das substâncias isoladas do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis*. 53
Tabela 9. Sistema de solventes, testados por CLAE-FR em escala analítica para a otimização do fracionamento da fração hidrometanólica do extrato dos caules (HM-C) de *P. carthagenensis*. 53
Tabela 10. Sistema de solvente utilizado na CLAE-FR em escala semipreparativa da fração hidrometanólica do extrato dos caules (HM-C) de *P. carthagenensis*. 54
Tabela 11. Rendimento das frações provenientes do fracionamento por CLAE-FR da fração hidrometanólica do extrato em etanol do caule de *P. carthagenensis*. 55
Tabela 12. Condições de eluição por CLAE-FR escala semipreparativa e rendimento das substâncias isoladas dos grupos 32 e 34 oriundos do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis*. 57
Tabela 13. Gradiente de eluição empregado nas análises por CLUAE-EMAR-IES..... 58
Tabela 14. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para substância **I** - cartagenina..... 82
Tabela 15. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para substância **II** - ácido lialosídico. 86

Tabela 16. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para substância **III** - ácido estrictosidínico..... 90
Tabela 17. Atividade antileishmania dos extratos brutos das espécies coletadas de *Psychotria* contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. 92
Tabela 18. Atividade antileishmania das frações obtidas após a partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas de *P. carthagenensis* contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*..... 94
Tabela 19. Avaliação da atividade antileishmania realizada com os 80 grupos provenientes do fracionamento do extrato em etanol dos caules de *P. carthagenensis*. 95
Tabela 20. Atividade antileishmania das substâncias isoladas das folhas e caules de *P. carthagenensis* contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*..... 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
[α]	Rotação ótica específica
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ACN	Acetonitrila
ATF	Ácido trifluoroacético
c	Concentração
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCMP	Cromatografia em coluna de média pressão
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI_{50}	Concentração inibitória do crescimento de 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
CLUAE	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
COSY	Espectroscopia de Correlação ^{1}H-^{1}H (COSY, do inglês: "*1H-1H Correlation Spectroscopy"*)
DEPT	Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT, do inglês: "*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*")
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EMAR-IES	Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por "*electrospray*"
FCR	Força Centrífuga Relativa
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
Glic	Glicose
h	Hora
HMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (HMBC, do inglês: "*Heteronuclear Multiple Bond Correlation"*)
HSQC	Correlação Heteronuclear Quântica Simples (HSQC, do inglês: "*Heteronuclear Single Quantum Correlation*")

HUESB	Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
IES	Ionização por "*electrospray*"
IRR	Instituto René Rachou
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês: *"International Union of Pure and Applied Chemistry*")
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde–Base de dados
m/z	Relação carga/massa
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
NOESY	Espectroscopia do Efeito Nuclear de Overhouse (NOESY, do Inglês: "*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*")
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ºC	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
PN	Produto natural
PubMed	Base de dados do Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica (do inglês: MEDLINE®-*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*)
Rf	fator de retenção (Rf, do inglês: "*retention factor*")
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta

Avaliação da atividade antileishmania de espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae): estudo químico de *Psychotria carthagenensis* Jacq.

Autor: Ivan Martins Barreto.
Orientador: Dra. Betania Barros Cota.
Coorientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira.

RESUMO: As doenças tropicais negligenciadas (DTN's) causam a morte de milhares de pessoas em todo o mundo e as drogas de primeira escolha utilizadas nos tratamentos são, em sua maioria, substâncias desenvolvidas há décadas, de baixa eficácia e altamente tóxicas para seus usuários. As leishmanioses estão entre as DTN's mais comuns no Brasil, responsáveis por mais de 90% dos casos notificados na América Latina. A família Rubiaceae possui cerca de 660 gêneros e 13.100 espécies de plantas. Diversas espécies utilizadas na ornamentação, na alimentação e na medicina popular. O gênero *Psychotria* destaca-se nesta família pelo uso medicinal em comunidades tradicionais da Floresta Amazônica e pelos relatos científicos da ação de algumas espécies contra diversas doenças e infecções, inclusive parasitas. Este trabalho avalia a atividade biológica dos extratos brutos das espécies de *Psychotria* (Bahia), bem como, o isolamento de seus constituintes químicos, visando a obtenção de substâncias leishmanicidas. Folhas e caules de *Psychotria carthagenensis* Jacq. e *Psychotria hoffmannseggiana* Willd. Ex. Schult. foram coletadas e as exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-HUESB. Alíquotas de extratos etanólicos brutos de folhas (EEF) e caules (EEC) a 200 µg/mL foram avaliadas contra formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Os resultados mostraram atividade antileishmania de 49% e 33% para EEF e EEC de *P. hoffmannseggiana* e 22% e 46% para *P. carthagenensis*, respectivamente. Considerando os escassos dados científicos sobre a espécie *P. carthagenensis*, este trabalho se concentrou em seu estudo. A partição do extrato EEF de *P. carthagenensis* forneceu a fração hidrometanólica (HM-F), a qual apresentou atividade antileishmania superior (52%) à encontrada para o extrato bruto. Os fracionamentos de HM-F e EEC de *P. carthagenensis* foram feitos por filtração em gel Sephadex LH-20 e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) com escala semipreparativa. As frações CLAE-FR permitiram o isolamento de três alcaloides glicosídicos de *P. carthagenensis*: um não relatado, denominado cartagenina (substância **I**, das folhas), ácido lialosídico (substância **II**, folhas e caules) e ácido estrictosidínico (substância **III**, caules). Os alcaloides isolados inibiram o crescimento de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 74% (cartagenina), 39% (ácido estrictosidínico) e 36% (ácido lialosídico), respectivamente. A cartagenina testada contra *L. (Viannia) braziliensis* demonstrou um CI_{50} de 41 µg/mL (80,0 µM), e um índice de seletividade maior que 2,5 em relação à linhagem celular de leucemia monocítica aguda (CI_{50}> 100 µg/mL). Em conclusão, este estudo relata o isolamento de três alcaloides indólicos monoterpênicos de *P. carthagenensis*, e cartagenina, um novo alcaloide ativo contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis e L. (V.) braziliensis.*

Palavras-chave: Rubiaceae**,** *Psychotria carthagenensis*, alcaloide, *Leishmania*.

Evaluation for antileishmanial activity of species of the genus *Psychotria* (Rubiaceae): chemical study of *Psychotria carthagenensis* Jacq.

Author: Ivan Martins Barreto.
Advisor: Dra. Betania Barros Cota.
Co-advisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira.

ABSTRACT: Neglected tropical diseases (NTD's) cause the death of thousands of people around the world and the drugs of the first choice used in treatments are, in the majority, substances developed decades ago, of low efficacy and highly toxic to its users. Leishmaniases are among the most common NTD's in Brazil, which account for more than 90% of reported cases in Latin America. The Rubiaceae family has about 660 genus and 13,100 plant species. Several species used in ornamentation, as food and in folk medicine. The genus *Psychotria* stands out in this family for its medicinal use in traditional communities from Amazon Forest and due scientific reports of the action of some species against various diseases and infections, including parasites. This work evaluates the biological activity of the crude extracts from *Psychotria* species (Bahia), as well, isolation of its chemical constituents, aiming to achieve leishmanicidal substances. Leaves and stems of *Psychotria carthagenensis* Jacq. and *Psychotria hoffmannseggiana* Willd. ex Schult species were collected, and voucher each one has placed at the Herbarium of the State University of Southwest Bahia-HUESB. Aliquots of crude ethanol extracts of leaves (EEF) and stems (EEC) at 200 µg/mL evaluated against amastigote-*like* forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The results showed antileishmanial activity of 49% and 33% for EEF and EEC of *P. hoffmannseggiana* and 22% and 46% for *P. carthagenensis*, respectively. Considering the scarce scientific data about the *P. carthagenensis* specie, this work focused on its study. Partition of EEF extract of the *P. carthagenensis* gave the hydromethanolic fraction (HM-F), which showed antileishmanial activity superior (52%) to that found for the crude extract. Fractionations of HM-F and EEC of *P. carthagenensis* were performed by filtration on Sephadex LH-20 gel and (or) High-Performance Liquid Chromatography on Reverse-Phase (HPLC-RP) with semi-preparative scale. The HPLC-RP fractions allowed the isolation of three glycosyl-alkaloids of *P. carthagenensis*: an unreported one called carthagenine (substance **I**, from leaves), lialosidic acid (substance **II**, leaves and stems) and strictosidinic acid (substance **III**, stems). The isolated alkaloids inhibited the growth of amastigote-*like* forms of *L.* (*L.*) *amazonensis* by 74% (carthagenine), 39% (strictosidinic acid) and 36% (lialosidic acid), respectively. Carthagenine tested against *L. (Viannia) braziliensis* demonstrated an IC_{50} of 41 µg/mL (80.0 µM), and a selectivity index greater than 2.5 about the acute monocytic leukaemia cell line (IC_{50} > 100 µg/mL). In conclusion, this study reports the isolation of three indolic-monoterpene alkaloids from *P. carthagenensis*, and carthagenine, a novel alkaloid active against amastigote forms of *L. (L.) amazonensis and L. (V.) braziliensis*.

Keywords: Rubiaceae, *Psychotria carthagenensis*, alkaloid, *Leishmania*.

SUMÁRIO

1 Introdução 24
2 Revisão Bibliográfica 27
2.1 Doenças negligenciadas 27
2.2 Os protozoários do gênero *Leishmania* 28
2.2.1 As Leishmanioses segundo a Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS 31
2.2.2 Tratamento das leishmanioses 34
2.3 A família Rubiaceae 36
2.3.1 O gênero *Psychotria* 37
2.3.2 Os alcaloides do gênero *Psychotria* 39
2.3.3 Atividades biológicas de espécies do gênero *Psychotria* 41
2.3.4 Atividade antileishmania do gênero *Psychotria* 43
2.3.5 *Psychotria carthagenensis* 44
3 Objetivos 47
3.1 Geral 47
3.2 Específicos 47
4 Material e Métodos 48
4.1 Coleta e identificação do material vegetal 48
4.2 Obtenção dos extratos brutos das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria* 48
4.3 Obtenção de frações enriquecidas brutas a partir do extrato das folhas de *Psychotria carthagenensis* 49
4.4 Métodos cromatográficos 49
4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) 49
4.4.2 Reveladores para cromatografia em camada delgada 50
4.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa – CLAE-FR 50
4.4.4 Estudo fitoquímico do extrato etanólico de folhas de *Psychotria carthagenensis* - Fracionamento por CCMP em gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica 51
4.4.4.1 Purificação dos grupos C e D, por CLAE-FR em escala semipreparativa 52

4.4.4.2 Estudo do extrato bruto dos caules de *Psychotria carthagenensis*- Otimização das condições de análise por CLAE-FR 53
4.4.4.3 Fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis* 54
4.4.4.4 Purificação por CLAE-FR em escala semipreparativa dos grupos 32 e 34 oriundos do fracionamento do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis* 56
4.5 Métodos físicos 57
4.5.1 Rotações óticas 57
4.5.2 Análises por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por "*electrospray*" – CLUAE-EMAR-IES 58
4.5.3 Espectros de ressonância magnética nuclear – RMN 59
4.6 Atividade biológica 59
4.6.1 Ensaio de atividade antileishmania com amastigotas-*like* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* 59
4.6.2 Ensaio de atividade antileishmania com células THP-1 infectadas com amastigotas *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* 60
4.6.3 Ensaios de avaliação da atividade citotóxica sobre células THP-1 60
5 Resultados e Discussão 62
5.1 Obtenção dos extratos brutos das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria* 62
5.2 Estudo fitoquímico do extrato etanólico de folhas de *Psychotria carthagenensis* 63
5.2.1 Fracionamento preliminar por partição líquido-líquido do extrato em etanol das folhas de *Psychotria carthagenensis* 63
5.2.2 Filtração em gel de Sephadex LH-20, através da CCMP, da fração hidrometanólica proveniente do extrato etanólico de folhas de *Psychotria carthagenensis* 64
5.2.3 Otimização das condições cromatográficas por CLAE-FR, em escala analítica dos grupos C e D, provenientes da fração hidrometanólica do extrato etanólico bruto das folhas de *Psychotria carthagenensis*..... 67

5.2.4 Purificação dos grupos C e D por CLAE-FR em escala semipreparativa 69
5.3 Estudo fitoquímico do extrato em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis* 72
5.3.1 Otimização das condições cromatográficas por CLAE-FR em escala analítica.....72
5.3.2 Fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*..... 73
5.3.3 Purificação por CLAE-FR em escala semipreparativa dos grupos 32 e 34, oriundos do fracionamento do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis* 74
5.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas dos extratos etanólicos das folhas e dos caules de *Psychotria carthagenensis* 77
5.4.1 Substância I 77
5.4.2 Substância II 84
5.4.3 Substância III 88
5.5 Avaliação da atividade antileishmania dos extratos etanólicos brutos de folhas e caules de espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae) 91
5.5.1 Atividade antileishmania das frações brutas provenientes do extrato em etanol das folhas de *Psychotria carthagenensis* 93
5.5.2 Atividade antileishmania dos grupos provenientes do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*..... 94
6 Conclusão 101
7 Perspectivas futuras 102
8 Referências..... 103
9 Apêndices 114
9.1 Apêndice A – Dados estruturais da substância I - cartagenina 114
9.1.1 A1 – Espectro de absorção no ultravioleta da substância I – cartagenina.....114
9.1.2 A2– Espectro de massas da substância I - cartagenina 114
9.1.3 A3 – Espectro de RMN ^{1}H obtido em MeOD a 400 MHz da substância I - cartagenina 115
9.1.4 A4 – Espectro de RMN ^{13}C obtido em MeOD a 100 MHz da substância I - cartagenina 118

9.1.5 A5 – Espectro de Carbono – DEPT 135 da substância I - cartagenina 118
9.1.6 A6 – Espectro de RMN 2D - HSQC da substância I - cartagenina 119
9.1.7 A7 – Espectro de RMN 2D - HMBC da substância I - cartagenina 119
9.1.8 A8 – Espectro de RMN 2D - COSY da substância I - cartagenina 120
9.1.9 A9 – Espectro de RMN 2D - NOESY da substância I - cartagenina 120
9.2 Apêndice B – Dados estruturais da substância II – ácido lialosídico. 121
9.2.1 B1 – Espectro de absorção no ultravioleta da sustância II - ácido lialosídico.....121
9.2.2 B2 – Espectro de massas da sustância II - ácido lialosídico..... 122
9.2.3 B3 – Espectro de RMN ^{1}H obtido em MeOD a 400 MHz da sustância II - ácido lialosídico 123
9.2.4 B4 – Espectro de RMN ^{13}C obtido em MeOD a 100 MHz da sustância II - ácido lialosídico 124
9.2.5 B5 - Espectro de Carbono – DEPT 135 da sustância II - ácido lialosídico.....125
9.2.6 B6 – Espectro de RMN 2D - HSQC da sustância II - ácido lialosídico 125
9.3 Apêndice C – Dados estruturais da substância III – ácido estrictosidínico 126
9.3.1 C1 – Espectro de absorção no ultravioleta da sustância III - ácido estrictosidínico..... 126
9.3.2 C2 – Espectro de massas da sustância III - ácido estrictosidínico 126
9.3.3 C3 – Espectro de RMN ^{1}H obtido em MeOD a 400 MHz da sustância III - ácido estrictosidínico 127
9.3.4 C4 – Espectro de RMN ^{13}C obtido em MeOD a 100 MHz da sustância III - ácido estrictosidínico 128
9.3.5 C5 – Espectro de Carbono – DEPT 135 da sustância III - ácido estrictosidínico..... 129

9.3.6 C6 – Espectro de RMN 2D - HSQC da sustância III - ácido estrictosidínico..... 129
10 ANEXOS..... 130
10.1 Resumo publicado no VIII Encontro de Química da Bahia – VIII EQBA 130
10.2 Resumo publicado no 7th Brazilian Conference on Natural Products – 7th BCNP.....131

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN's) causam, anualmente, a morte de milhares de pessoas em todo o mundo. Contudo, as pesquisas voltadas para as descobertas e o desenvolvimento de novas substâncias ativas frente aos agentes causadores dessas doenças recebem pouco financiamento governamental e não governamental, portanto utiliza-se o termo "negligenciada". Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem 17 doenças classificadas como tropicais negligenciadas, dentre as quais podemos destacar as leishmanioses (Dias et. al., 2013).

As leishmanioses são doenças causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e fazem parte do grupo de doenças classificadas como doenças tropicais negligenciadas (DTN's). Acometem a população pobre e com pouco acesso ao saneamento básico de países tropicais da África, Ásia e América Latina. As pesquisas e inovações destinadas às DTN's ocorrem de forma lenta, principalmente pela escassez de recursos financeiros. Os tratamentos de primeira escolha para a maioria das DTN's são realizados há décadas com os mesmos fármacos. Em geral, esses medicamentos apresentam baixa eficácia, são invasivos e podem desencadear inúmeros efeitos adversos em pacientes submetidos a tratamento clínico (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019).

As pesquisas em química de produtos naturais surgem como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos usados para o tratamento das DTN's, em especial as leishmanioses (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019). O reino vegetal tem sido utilizado como uma importante fonte de fármacos devido à presença de metabólitos secundários que também são chamados de produtos naturais (PNs). Os PNs podem expressar diversas atividades biológicas e estão presentes em todas as partes das plantas. O uso popular de espécies vegetais no tratamento de inúmeras doenças, inclusive as leishmanioses, tem sido vastamente relatado. Preparações farmacêuticas à base de espécies vegetais, administradas por via oral ou por aplicação tópica sobre lesões cutâneas, têm sido descritas na literatura como agentes com atividade antileishmania. Essas preparações contêm PNs pertencentes às classes de alcaloides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonoides e lactonas

sesquiterpênicas provenientes de espécies de diversas famílias como Annonaceae, Asteraceae, Fabaceae, Piperaceae, Rubiaceae, entre outras (Rocha et. al., 2005; Bezerra et. al., 2006; Brockson et. al., 2017).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2013), cuja revisão se baseou no PubMed e LILACS, a descoberta de novas substâncias com atividade biológica para o tratamento das leishmanioses é, em grande parte, oriunda de fontes naturais provenientes de plantas. A descoberta de PNs com atividades biológicas é bastante promissora ao considerarmos o crescimento anual de fitoterápicos em torno de 15% frente a 4% dos medicamentos sintéticos comercializados anualmente (Oliveira et. al., 2013).

O gênero *Psychotria* está entre os mais estudados da família Rubiaceae. São plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades tais como: infecções intestinais, tosse, distúrbios respiratórios e estomacais e, para o tratamento, por via oral ou aplicação tópica, de lesões cutâneas e úlceras. Estudos químicos e biológicos com espécies desta família são promissores, visto que seus integrantes apresentam grande diversidade de substâncias resultantes do metabolismo secundário, muitas das quais podem ser inéditas e com potencial bioativo ainda não avaliado (Benevides et. al., 2004; Souza, Mendonça e Silva, 2013; Soares, 2015).

Existem relatos na literatura científica de espécies do gênero *Psychotria* com atividades analgésica (Both et. al., 2002; Amador, et. al., 2000), antioxidante (Matsuura e Fett-Neto, 2013), citotóxica (Mahmud et. al., 1993; Adjibade et. al.,1989) e antiparasitária (Muhammad et. al., 2003). Folhas de *Psychotria rostrata* têm uso na medicina popular da Malásia, através da decocção, para o tratamento da constipação (Takayama et. al., 2004). O extrato etanólico dos caules da espécie *Psychotria klugii* possui atividade antileishmania e forneceu os alcaloides cefaelina, klugina e isocefaelina que demonstraram ser substâncias ativas contra *Leishmania donovani* (CI_{50} 0,03-0,45 μg/mL) e mais potentes do que a pentamidina (CI_{50} 0,7 μg/mL) e a anfotericina B (CI_{50} 0,17 μg/mL), fármacos amplamente utilizados no tratamento das leishmanioses (Muhammad et. al., 2003).

Esses resultados nos motivaram a propor o presente estudo que visa à avaliação da atividade antileishmania de extratos etanólicos e de constituintes

isolados de espécies do gênero *Psychotria* (*P. carthagenensis* e *P. hoffmannseggiana),* ocorrentes no sudoeste da Bahia, visando à descoberta de substâncias com atividade antileishmania.

A identificação de novas atividades biológicas de extratos de espécies vegetais visa contribuir com o potencial terapêutico dos extratos selecionados para estudo neste trabalho. Espera-se descobrir espécies vegetais que sejam fontes de substâncias úteis para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas, visando à melhoria na qualidade de vida de milhões de pessoas acometidas pelas Leishmanioses no Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças negligenciadas

O uso do termo “doenças negligenciadas” tem sido utilizado para o grupo de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários (vírus, bactérias, protozoários e helmintos). São doenças endêmicas em populações de baixa renda em países da África, Ásia e nas Américas, ou seja, predominantes em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. Esse termo foi proposto inicialmente pela Fundação Rockefeller, através do programa “The Great Neglected Diseases” em 1970. O termo “negligenciada” teve como base o fato de haver pouco financiamento para pesquisas por parte das agências de fomento e a falta de interesse das grandes empresas farmacêuticas multinacionais em desenvolver medicamentos para tratar essas doenças. Por afetarem pacientes de baixo poder aquisitivo e sem influência política, fármacos que tratam as doenças negligenciadas não conseguem gerar o retorno financeiro exigido pela maior parte das empresas voltadas ao lucro e, portanto, o financiamento para pesquisas e produção de medicamentos são reduzidos (Souza, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem dezessete doenças classificadas como DTN’s: dengue, raiva, tracoma, úlcera de Buruli (infecção por *Mycobacterium ulcerans*), treponematoses endêmicas (bouba, bejel e pinta), hanseníase (doença de Hansen), doença de Chagas (Tripanossomíase americana), doença do sono (Tripanossomíase africana), leishmanioses, cisticercose, dracunculíase (infecção pelo verme da guiné), equinococose, infecções por trematódeos (causadas por alimentos), filariose linfática, oncocercose (cegueira dos rios), esquistossomose (bilharziose) e helmintíases transmitidas pelo solo (Dias et. al., 2013).

A manutenção das DTN’s como doenças endêmicas, tanto no Brasil como em toda a América Latina, ainda está ligada a métodos de diagnósticos insuficientes, ausência de vacinas, falta de arsenal terapêutico, ações de cuidado frágeis na atenção básica e dificuldade de acesso aos medicamentos já existentes (Silva-Pires et. al., 2017).

O Brasil tem se destacado internacionalmente por possuir a maioria dos casos das doenças negligenciadas da região latino-americana e caribenha para

o período de 2008–2014. O Brasil possui 40% dos casos de dengue, 25% dos casos de doença de Chagas, 96% dos casos de esquistossomose, 86% dos casos de hanseníase, 24% dos casos de helmintoses intestinais, 39% dos casos de leishmaniose cutânea, 93% dos casos de leishmaniose visceral, 92% dos casos de leptospirose e 36% dos casos de malária. A partir de 2016, destacaram-se, também, no Brasil, duas doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*: a Chikungunya e a Zika. Foram registrados, no período de janeiro a maio de 2016, 122.762 casos de Chikungunya e 161.241 casos de Zika, dos quais 13.538 foram casos de Zika em gestantes (Silva-Pires et. al., 2017).

As leishmanioses, a tuberculose, a dengue e a hanseníase são DNT's que ocorrem em praticamente todas as regiões do Brasil. Infelizmente, a concentração dessas doenças ocorre majoritariamente nos estados do norte e nordeste do país, como consequência dos altos índices de pobreza e exclusão social e, estão relacionadas aos menores Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) (Inácio e Invernizzi, 2019).

O Brasil possui uma população acima dos 200 milhões de pessoas, o que corresponde a 34% da população da América Latina e do Caribe. O país possui 32 milhões de pessoas em extrema pobreza, dentre as quais 20 milhões vivem com menos de U$$ 2 por dia e em torno de 12 milhões sobrevivem abaixo da linha da pobreza, com U$$ 1,25 por dia. Deste modo, são necessárias medidas que visem aumentar o IDH das regiões brasileiras mais afetadas com as doenças negligenciadas, tais como ações socioeducativas de promoção à saúde e ainda investimentos em pesquisas interdisciplinares relacionadas a estas doenças por parte das agências de fomentos nacionais e internacionais. Todas estas medidas devem ter como objetivo principal não apenas o controle e tratamento eficaz, como também a erradicação completa dessas doenças (Hotez e Fujiwara, 2014).

2.2 Os protozoários do gênero *Leishmania*

Os protozoários são organismos protistas, unicelulares e eucariontes. Existem cerca de sessenta mil espécies de protozoários vivos, destas, dez mil espécies interagem com animais vertebrados e invertebrados. A interação protozoário–animal pode ser do tipo simbiótica, comensal ou parasitária. Em

relação aos protozoários parasitas, temos menos de cem espécies que parasitam os seres humanos (Neves et. al., 2016).

As leishmanioses são causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* que pertencem ao reino Protista e sub-reino *Protozoa,* filo *Sarcomastigophora*, do qual é caracterizado pela presença de flagelos, pseudópodos ou ambos, subfilo *Mastigophora*, marcado pela presença de flagelos, classe *Zoomastigophorea*, ordem *Kinetoplastida*, subordem *Trypanosomatina* e família *Trypanosomatidae*. Os hospedeiros vertebrados mais comuns das espécies de *Leishmania* são os roedores, canídeos e primatas, entre eles o homem (Neves et. al., 2016).

Diversos estudos sobre o gênero *Leishmania* levaram ao isolamento de grande quantidade de protozoários do homem e de animais domésticos e silvestres e, resultou na divisão do gênero em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Esta divisão ocorre conforme o tipo de desenvolvimento dos flagelos em espécies de *Leishmania* no sistema digestório do organismo vetor: o subgênero *Leishmania* se desenvolve no intestino médio e posterior e, o subgênero *Viannia* se desenvolve no intestino posterior. As espécies do gênero *Leishmania* são listadas na Tabela 1, de acordo com essa subdivisão (Menezes, 2014).

Tabela 1. Classificação das espécies do gênero *Leishmania*.

Gênero Leishmania	
Subgênero *Leishmania*	**Subgênero *Viannia***
L. (Leishmania) donovani	*L. (Viannia) braziliensis*
L. (L.) infantum infantum	*L. (V.) guyanensis*
L. (L.) infantum chagasi	*L. (V.) panamensis*
L. (L.) killicki	*L. (V.) peruviana*
L. (L.) tropica	*L. (V.) lainsoni*
L. (L.) aethiopica	*L. (V.) naiffi*
L. (L.) major	*L. (V.) shawi*
L. (L.) gerbilli	*L. (V.) colombiensis*
L. (L.) mexicana	*L. (V.) lindenbergi*
L. (L.) amazonensis	*L. (V.) equatoriensis*
L. (L.) venezuelensis	*L. (V.) utingensis*
L. (L.) enrietti	
L. (L.) aristidesi	
L. (L.) pifanoi	
L. (L.) gamhami	
L. (L.) hertigi	
L. (L.) forattinii	
L. (L.) deanei	

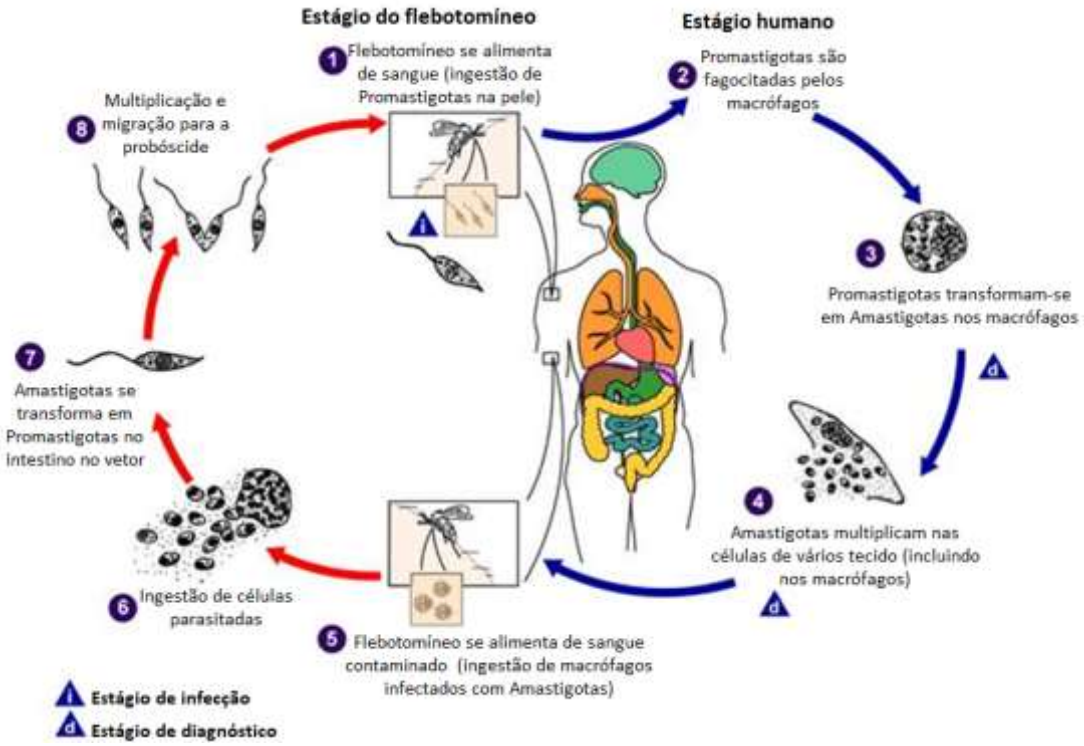
Fonte: Adaptado de Neves et. al. (2016).

As espécies do gênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida alternado entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores e são chamados de ciclo de vida digenético ou ainda heteroxênico. Esses parasitas assumem duas formas distintas bioquímica e morfologicamente; a chamada forma flagelada promastigota, que habita a luz do trato digestivo dos flebotomíneos (inseto vetor) e é inoculada durante a picada do inseto na pele dos mamíferos e, a forma amastigota, que é arredondada e imóvel e que se multiplica obrigatoriamente no interior das células do sistema fagocitário do hospedeiro mamífero (Neves et. al., 2016).

As fêmeas infectadas dos insetos vetores são as responsáveis pela transmissão de todas as espécies do gênero *Leishmania* de um mamífero a outro. Os flebotomíneos são dípteros da sub-família *Phlebotominae*, dentre os quais os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* são responsáveis pela transmissão dos protozoários *Leishmania* nas Américas e, Ásia e África, respectivamente (Neves et. al., 2016).

Podemos observar o ciclo do parasito *Leishmania* sp., na Figura 1, que é subdividido em estágio de infestação e estágio de diagnóstico. No primeiro, ocorre a transmissão do vetor para o hospedeiro ou do hospedeiro para o vetor. No segundo estágio, as formas promastigotas se transformam nas formas amastigotas dentro dos macrófagos do hospedeiro. Quando o inseto vetor não infectado pica um vertebrado contaminado, a forma amastigota no interior do sistema digestivo se transforma na forma promastigota e então, o ciclo continua (Neves et. al., 2016; Gontijo e Carvalho, 2003).

Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* sp.



Fonte: https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/v1015907_pt, com modificações, acessado em 11/09/2019.

2.2.1 As Leishmanioses segundo a Organização Pan-Americana da Saúde-OPAS

As leishmanioses são doenças que podem se manifestar no hospedeiro humano de três formas distintas: forma cutânea e mucocutânea (tegumentar) e forma visceral (Kala-azar, ou calazar) (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019).

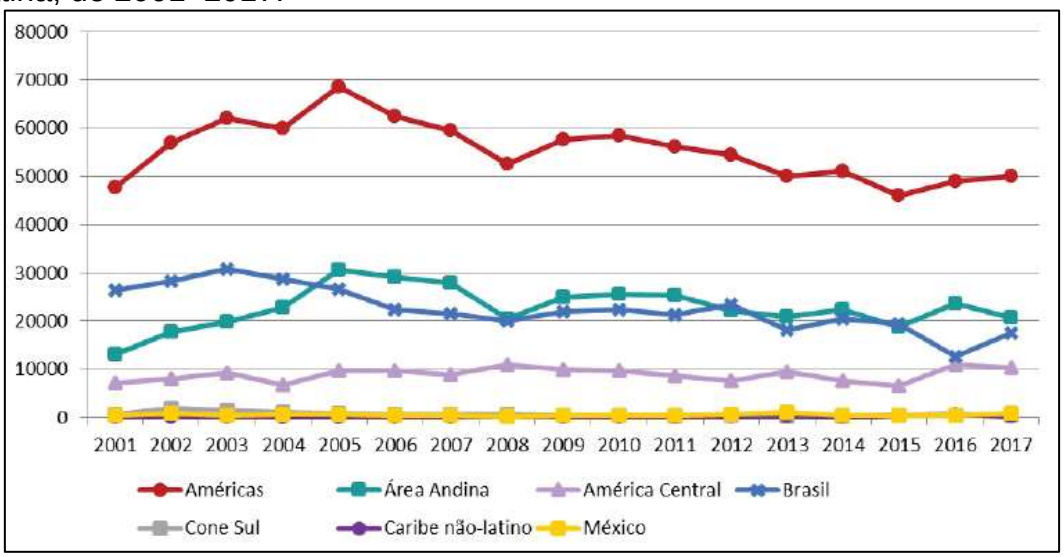
No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pelas espécies *Leishmania* (*L.*) *chagasi* e *Leishmania* (*L.*) *infantum* e a leishmaniose tegumentar é causada pelas espécies *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* e *L.* (*V.*) *braziliensis, L.* (*V.*) *guyanensis, L.* (*V.*) *lainsoni, L.* (*V.*) *naiffi* e *L.* (*V.*) *shawi* (Neves et. al., 2016).

Segundo a OPAS (2019) foram notificados 940.396 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 17 dos 18 países endêmicos das Américas no período de 2001-2017, o que corresponde a uma média anual de 55.317 casos. O Brasil (35,1%), a Colômbia (15,5%), o Peru (13,3%) e a Nicarágua

(8,7%) contribuíram com 72,6% do total dos casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 2017 (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019).

O Gráfico 1 abaixo representa o número de casos por região da América Latina acometida com a leishmaniose cutânea, no período de 2001 até 2017. Note que o Brasil (linha azul) apresenta uma das mais elevadas incidências em relação às outras regiões da América Latina, e que houve um aumento no número de registros de 2016 a 2017 (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019).

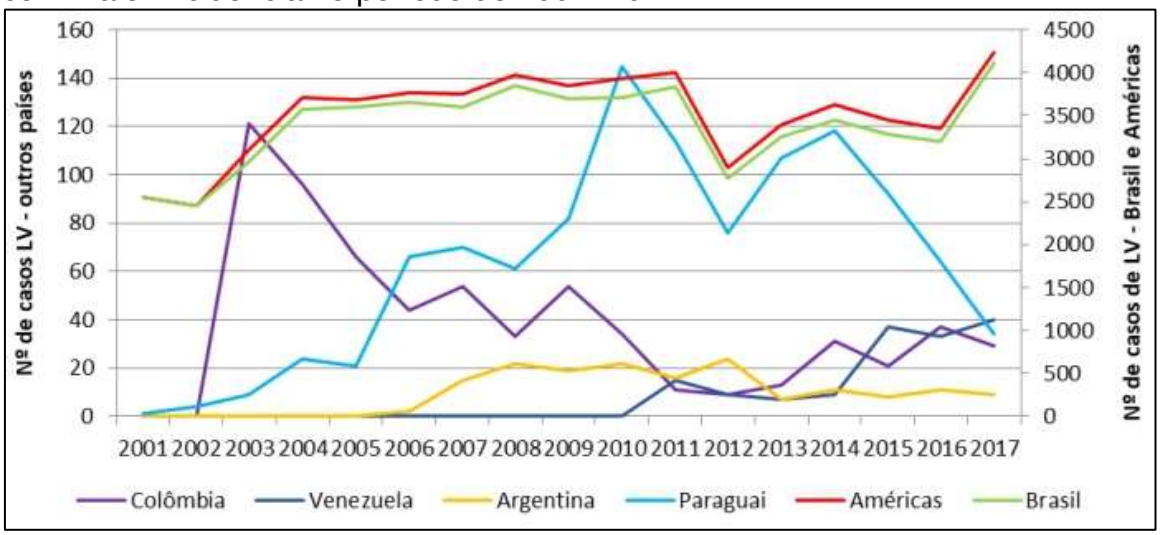
Gráfico 1. Quantitativo de casos de leishmaniose cutânea e mucosa na América Latina, de 2001–2017.



Fonte: Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas, 2019.

O Gráfico 2 representa o quantitativo de casos registrados de leishmaniose visceral de 2001 a 2017 em países das Américas. Vale salientar que o Brasil (linha verde) é o líder em número de casos na maior parte desse período e registrou mais de 4000 casos em 2017.

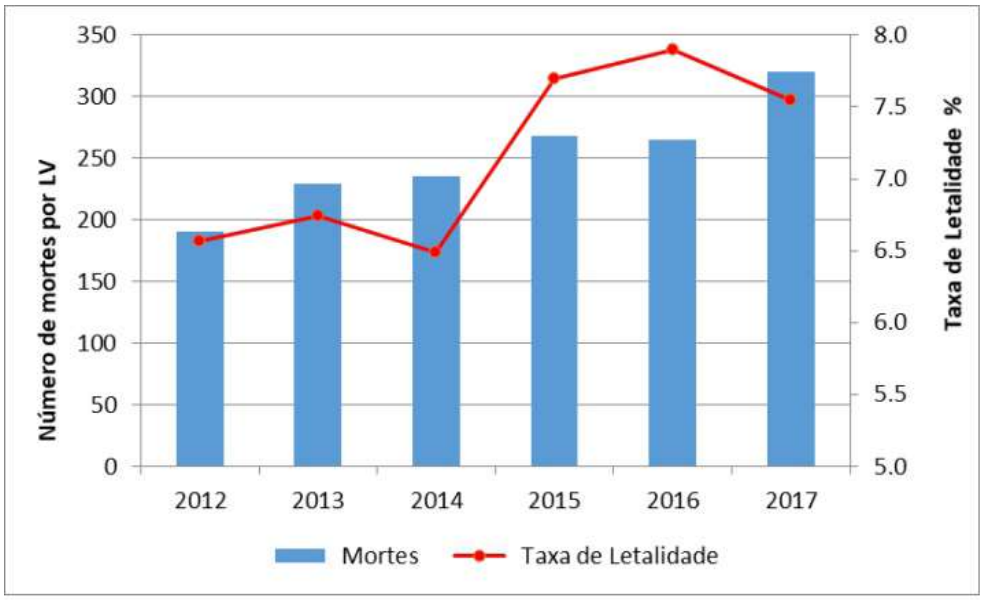
Gráfico 2. Casos de leishmaniose visceral registrados em países americanos com maior incidência no período de 2001–2017.



Fonte: Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas, 2019.

Em 2017, houve melhoria em 23,5% dos casos registrados das leishmanioses, dentre os quais, 49,1% (24529) dos casos progrediram para a cura e 0,03% (16) dos casos terminaram em morte. Os óbitos ocorreram, na grande maioria, em pessoas com idade superior a 50 anos de idade. Acredita-se que efeitos colaterais tais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade dos medicamentos utilizados durante o tratamento, sejam as causas dessas mortes (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019).

Gráfico 3. Taxa de letalidade de leishmaniose visceral nas Américas, no período de 2012–2017.



Fonte: Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas, 2019.

2.2.2 Tratamento das leishmanioses

As leishmanioses são doenças endêmicas tratadas com medicamentos desenvolvidos há décadas, que apresentam baixa eficácia, elevada toxidade e são responsáveis por desencadear inúmeros efeitos adversos. Formas de tratamentos menos agressivas e que melhorem a qualidade de vida das pessoas acometidas por essas doenças ainda são necessárias (Oliveira et. al., 2013; Dias et. al., 2013).

A Organização das Nações Unidas declara que medidas de combate às DTN's devem ser adotadas para o cumprimento dos objetivos de desenvolvimento para o milênio em 2000, pois estas doenças correspondem aproximadamente 12% das doenças existentes no mundo. As ações de combate e erradicação das DNT's permanecem na Agenda do Desenvolvimento pós-2015 e continuam sendo um dos objetivos de Desenvolvimento Sustentável, cuja principal meta é a erradicação de todas as DNT's até 2030 (Inácio e Invernizzi, 2019).

Estudos de revisão sobre o desenvolvimento de novas drogas para tratamento das DTNs, realizados nos períodos de 1975 e 2004 e de 2000 a 2011, têm demonstrado que poucos fármacos foram lançados no mercado para o tratamento das DTN's (Oliveira et. al., 2013; Dias et. al., 2013).

Newman e Cragg (2016) relatam que do total de 1328 novas drogas introduzidas no mercado no período de 1981 a 2014, apenas 16 eram drogas antiparasitárias, dentre as quais, 2 eram PNs inalterados, 5 eram derivados de PNs, 5 eram de origem sintética, 3 eram substâncias sintéticas com farmacóforos de PNs e 1 era vacina. Essas drogas foram destinadas para o tratamento da malária, tuberculose, verminoses, toxoplasmose, enquanto que a vacina foi desenvolvida contra a tricomoníase. O número de novas drogas antiparasitárias lançadas no mercado nesse período foi muito baixo se comparado a outros grupos de destino, tais como anticâncer (174 novas drogas), antibacteriano (140 novas drogas) e antiviral (139 novas drogas) (Newman e Cragg, 2016).

Avanços científicos e tecnológicos têm proporcionado o desenvolvimento de inúmeros tratamentos para várias enfermidades e aumentado a qualidade e a expectativa de vida em todo o mundo. Contudo, as DTN's continuam a ser fatais, pois pouca ou nenhuma inovação é direcionada para o tratamento dessas

enfermidades que ainda acometem grande parte da população mais pobre e mais vulnerável dos países tropicais (Dias et. al., 2013; Inácio e Invernizzi, 2019).

O antimoniato de N-metil glucamina ou Glucantime® tem sido o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, contudo seus efeitos adversos englobam mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos devido à sua elevada toxicidade. Existem medicamentos alternativos ao tratamento das leishmanioses chamados de segunda geração ou de segunda linha, tais como a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e a paromomicina ou aminosidina. Porém, o uso desses medicamentos pode resultar em elevada toxidade e desencadear em seus usuários efeitos adversos que incluem hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e óbito repentino (pentamidina). Podemos visualizar, na Tabela 2, a estrutura dos principais fármacos leishmanicidas usados na clínica (Pelissari et. al., 2011; Rath et. al., 2003).

Tabela 2. Os principais fármacos leishmanicidas e suas fórmulas estruturais.

Nome químico	Nome comercial	Fórmula estrutural proposta
Miltefosina	Miltefosina	
Anfotericina B	Anfotericina B®, Fungizon® Abelcet®, Ambisome®, Funtex B® e Unianf®	
Antimoniato de N-metilglucamina	Glucantime®; Antimoniato de meglumina	
Isetionato de pentamidina	Lomidina®	
Paromomicina	Humatin® e aminosidina	

Fonte: Rath et. al., 2003 (modificado).

2.3 A família Rubiaceae

A família Rubiaceae Juss. possui cerca de 660 gêneros que podem ser encontrados em vários lugares do globo, porém espécies dessa família são mais frequentes nos trópicos. É a quarta maior família de angiospermas existente no planeta com 13100 espécies, seguida das famílias Leguminosae (19500 espécies), Orchidaceae (22500 espécies) e Asteraceae (23600 espécies). De

acordo com a filogenia e as principais características morfológicas, essa família foi dividida em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae (Delprete e Jardim, 2012).

No Brasil, são encontrados 118 gêneros, pertencentes à família Rubiaceae, que se encontram distribuídos por todos os biomas, desde a Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Cerrado e Caatinga. Compreendem plantas desde a forma de árvores a subarbustos (Barbosa, 2014; Delprete e Jardim, 2012).

Espécies da família Rubiaceae são utilizadas no Brasil e no mundo como alimentos, ornamentos e na indústria farmacêuticapara o tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, inclusive como agentes leishmanicidas. Espécies dessa família também são utilizadas devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antirreumáticas, antitérmicas, antioxidantes, antivirais, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais. Esta família expõe grande importância medicinal em comunidades tradicionais da região da Floresta Amazônica e extenso potencial farmacológico com diversas atividades biológicas descritas pela literatura cientifica, pois apresentam em sua composição inúmeras substâncias de grupos químicos distintos, como os alcaloides, antraquinonas, taninos, terpenos, iridoides, saponinas, esteroides e flavonoides (Soares, 2015; Souza, Mendonça e Silva, 2013).

2.3.1 O gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria* L. pertence à subfamília Rubiodeae, tribo *Psychotrieae* e é o maior gênero da família Rubiaceae, com cerca de 1650 espécies (Hamilton, 1989; Naves 2014). Está subdividido em três subgêneros: 1-*Psychotria*; presente na região pantropical; 2-*Heteropsychotria* Steyerm. ou *Psychotria* neotropical; comum na região neotropical e 3-*Tetramerae* (Hiern) E. Petit; encontrado na África. Esse gênero possui taxonomia complexa que agrega características morfológicas e distribuição geográfica, pois reúne um grande número de espécies (Pimenta et. al., 2010).

As espécies deste gênero, como a *P. ipecacuanha*, *P. emetica*, *P. psychotriifolia*, *P. colorata*, *P. nudiflora*, *P. nilgiriensis* e *P. subobliqua*, têm sido largamente estudadas cientificamente, entretanto, os estudos

etnofarmacológicos abrangem somente 10% das espécies conhecidas. As espécies do gênero *Psychotria* têm indicação popular de uso interno para o tratamento de infecções do aparelho reprodutor feminino, doenças dos brônquios, distúrbios gastrointestinais e para o tratamento de sintomas do pré- e pós-parto. As indicações de uso popular de espécies desse gênero para o uso externo incluem o tratamento de infecções cutâneas, úlceras, distúrbios oculares, febre, dores de cabeça e de ouvido (Faria, 2009; Formagio et. al., 2014; Soares, 2015).

Nos países da América do Sul, como no Brasil, Peru e Equador, algumas espécies do gênero *Psychotria*, como a *Psychotria viridis*, são amplamente utilizadas pelos povos indígenas da Amazônia como um componente da bebida alucinógena "ayahuasca", que significa "vinho da alma". A "ayahuasca" é utilizada em cerimônias religiosas, no qual foi constatado a presença do alcaloide N,N-dimetiltriptamina, um agonista não seletivo de serotonina, o 5-HT. Os agonistas são moléculas que podem se ligar, via receptor celular, para induzir uma reação biológica, enquanto que os antagonistas possuem ação contrária, ou seja, são bloqueadores dos agonistas (Calixto et. al., 2016).

Já a espécie *Psychotria ipecacuanha* é utilizada como expectorante, amebicida e emética, ou seja, capaz de provocar dor de vômito (Garcia et. al., 2005).

As espécies *Psychotria emetica* e *Psychotria psychotriifolia* têm os seus galhos e raízes utilizados na forma de infusão para o tratamento de doenças por comunidades tradicionais do Panamá; a primeira para o tratamento da catapora e ambas para o tratamento da febre (Gupta et. al., 2005).

Na região Amazônica do Brasil, a espécie *Psychotria colorata*, conhecida como perpétua-do-mato ou repolho pelos caboclos de comunidades tradicionais, é utilizada como agente analgésico para o tratamento de dores abdominais e de ouvido (Moura e Maruo, 2014).

Folhas e flores de *Psychotria nudiflora* e os frutos de *Psychotria nilgiriensis* são utilizados por grupos tribais de Tamil Nadu, na Índia, para o tratamento de reumatismo (Sutha et. al., 2010).

Já as folhas e caules de *Psychotria subobliqua* são utilizados popularmente em São Tomé e Príncipe, na África, para o tratamento de doenças mentais por apresentarem efeitos no sistema nervoso central e, para o

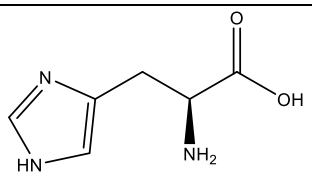
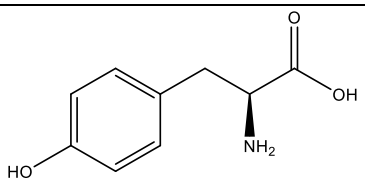
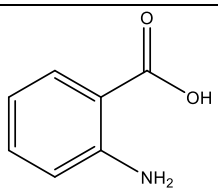
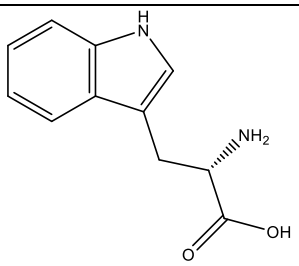
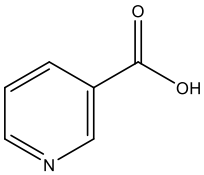
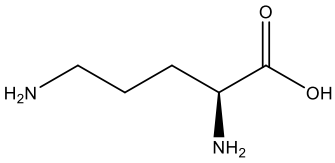
tratamento de dor de dente e inflamações na boca devido às suas propriedades anti-inflamatórias (Currais et. al., 2014).

2.3.2 Os alcaloides do gênero *Psychotria*

Os alcaloides são formados, em sua grande maioria, por compostos heterocíclicos nitrogenados, com o nitrogênio oriundo de aminoácidos. Apresentam caráter básico e ação farmacológica diversificada. Os vegetais são sua principal fonte, porém, podem ser encontrados em microrganismos e animais. O uso dessa terminologia surgiu em 1819 com o farmacêutico W. Meissner em Halle, na Alemanha, após estudos das características alcalinas de alguns representantes dessa classe de compostos (Aniszewski, 2007; Isidório, 2015; Mohiuddin, 2019). Desta forma, podemos definir os alcaloides como compostos básicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio fazendo parte de um sistema cíclico, com origem principal no metabolismo secundário e com diversos representantes da classe com estrutura molecular complexa e fisiologicamente ativos (Kar, 2007).

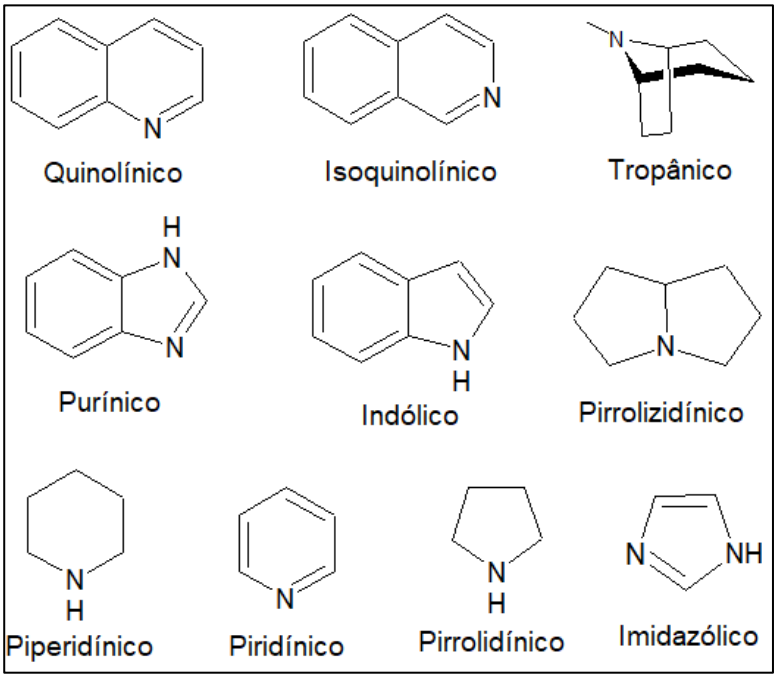
Os alcaloides podem ser classificados a partir da origem biossintética, como proposto por Aniszewski (2007), no qual os principais aminoácidos precursores podem ser a histidina, triptofano, tirosina, ornitina e, o ácido nicotínico e ácido antranílico, conforme a Figura 2 (Aniszewski, 2007; Kar, 2007).

Figura 2. Principais aminoácidos precursores de alcaloides.

		
Histidina	Tirosina	Ácido antranílico
		
Triptofano	Ácido nicotínico	Ornitina

Outro método de classificação dos alcaloides, que é o mais utilizado e mais aceito, é a presença ou ausência de um núcleo heterocíclico básico na estrutura da substância (Figura 3) (Kar, 2007).

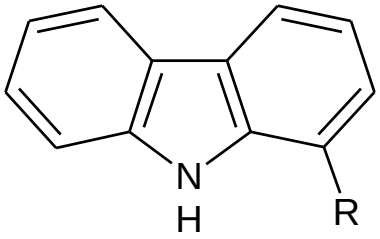
Figura 3. Núcleos heterocíclico básico comum dos alcaloides.



Uma recente revisão, realizada de 1962 até 2015 para as espécies do gênero *Psychotria,* revelou que os alcaloides indólicos é classe de produtos naturais mais descritas na literatura científica, seguida dos peptídeos cíclicos, conhecidos como ciclotídeos (Calixto et. al., 2016). Carvalho Junior e colaboradores (2017) catalogaram em uma revisão os dados de ressonância magnética nuclear (RMN) de 70 alcaloides isolados no período de 1974 a 2015. O esqueleto estrutural mais comum identificado foi do tipo indólico monoterpênico com 38 alcaloides (54,2 %) – Figura 4, seguido dos alcaloides pirrolidinoindolínicos com 27 alcaloides (38,7 %) e benzoquinolizidínicos com 5 alcaloides (7,1 %) (Carvalho Junior et. al., 2017).

Os alcaloides indólicos monoterpênicos têm origem biossintética a partir do aminoácido triptofano. Uma parte significativa são indol não-iridoides (não-monoterpênicos), destacando-se os grupos dos triptamínicos (N, N-dimetiltriptamina, N-metiltriptamina), polindólicos ou derivados metiltriptamínicos (Ribeiro, 2010).

Figura 4. Núcleo β-carbolínico dos alcaloides indólicos monoterpênicos.



2.3.3 Atividades biológicas de espécies do gênero *Psychotria*

Psychotria é o gênero da família Rubiaceae com mais estudos fitoquímicos, etnobotânicos, farmacológicos e quimiotaxonômicos. Diversas atividades biológicas já foram descritas para espécies desse gênero, como antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antiprotozoária, citotóxica, antiviral, bactericida, antifúngica e antidepressiva, conforme explícito na Tabela 3. Este gênero também possui espécies que demonstraram propriedades inibitórias das enzimas acetilcolinesterase e monoamina oxidase, que são alvos enzimáticos relacionados às doenças neurodegenerativas (Calixto et. al., 2016).

Tabela 3. Atividades biológicas de espécies do gênero *Psychotria*.

Espécies de *Psychotria*	Atividade Biológica	Referência
P. brachybotrya	Atividade antiturbeculose	Araújo et. al., 2014
P. brachyceras	Atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica, inseticida e de proteção contra UV	Nascimento et. al., 2007; Matsuura et. al., 2016; Magedans et. al., 2017
P. bridsoniae	Atividade antibacteriana	Razafintsalama et. al., 2017
P. colorata	Atividade analgésica	Amador et. al., 2000
P. dalzellii	Atividades antioxidante e antidiabética	Abhishek et. al., 2019
P. deflexa	Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase	Bertelli et. al., 2017
P. elata	Efeito antialucinógeno	Caballero-George et. al., 2001
P. hawaiiensis	Atividade antiviral	Locher et. al., 1995
P. henryi	Atividade citotóxica	Liu et. al., 2013
P. insularum	Inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1)	Dunstan et. al., 1997
P. leiocarpa	Atividades analgésica, inseticida, antioxidante, anti-inflamatória e anticolinérgica	Fragoso, 2007; Matsuura et. at., 2016; Formagio et. al., 2019
P. microlabastra	Atividade antibacteriana	Khan et. al., 2001
P. myriantha	Atividade analgésica	Farias, 2006
P. nemorosa	Atividades antiviral e analgésica	Costa, 2016; Calixto et. al., 2017
P. nuda	Atividade antimicobacteriana	Carvalho Junior et. al., 2019
P. oreotrephes	Atividade antibacteriana	Razafintsalama et. al., 2017
P. poeppigiana	Atividade anti-inflamatória e efeitos antialucinógeno e citotóxico	Caballero-George et. al., 2001 Villasmil et. al., 2006
P. prainii	Atividade anti-inflamatória	Tran et. al., 2017
P. serpens	Atividade anticâncer	Wang et. al., 2020
P. stenocalyx	Atividade anti-inflamatória	Queiroz et. al., 2017
P. suterella	Atividades antiparasitária e antiplasmodial	Santos et. al., 2001; Carvalho, 2015; Gontijo et. al., 2019

P. umbellata	Atividades analgésica, antidepressiva, antioxidante e antimutagênica	Both et. al., 2005; Fragoso et. al., 2008
P. viridis	Ação alucinógena e atividades antioxidante, antibacteriana e de inibição da colinesterase	De Souza, 2011; Soares, 2015; Soares et. al., 2017

2.3.4 Atividade antileishmania do gênero *Psychotria*

Folhas, cascas, raízes e rizomas de inúmeras espécies do gênero *Psychotria* são amplamente utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, inclusive doenças parasitárias, com destaque para as leishmanioses (Souza, Mendonça e Silva, 2013; Calixto et. al., 2016).

Estudos científicos têm demonstrado atividade antileishmania de metabólitos secundários de algumas espécies de gênero *Psychotria*. Muhammad e colaboradores (2003) identificaram os alcaloides klugina, cefaelina, isocefaelina e emetina com atividades antileishmania contra formas promastigotas de *L. donovani* (CI_{50s} de 0,03 a 0,45 μg/mL) e antimalárica contra *P. falciparum* (CI_{50} de 27,7 a 46,3 ng/mL) da espécie *Psychotria klugii*. Esses constituintes de *P. klugii* foram mais ativos do que a pentamidina (CI_{50} 0,7 μg/mL) e a anfotericina B (CI_{50} 0,17 μg/mL), fármacos amplamente utilizados para o tratamento das leishmanioses (Muhammad et. al., 2003).

Da *Psychotria prunifolia* foram isolados os alcaloides 14-oxoprunifoleína e estrictosamida que inibiram o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e apresentaram valores de CI_{50} de 16,0 e 40,7 μg/mL, respectivamente (Kato et. al., 2012).

O extrato em acetato de etila das folhas de *Psychotria suterella* também demonstrou atividade contra *L. amazonensis* com CI_{50} de 10,62 μg/mL (Carvalho, 2015).

O levantamento bibliográfico realizado demonstra que o gênero *Psychotria* é uma fonte alternativa de substâncias bioativas com atividade antileishmania e que podem servir de modelo para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxicos.

2.3.5 *Psychotria carthagenensis*

A espécie *Psychotria carthagenensis* Jacq., Figura 5, é encontrada na forma de arbusto que pode atingir até 3 m de altura. É encontrada em todas as regiões do Brasil e nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Lima, 2011; *Psychotria in* Flora do Brasil, 2020).

Figura 5. *Psychotria carthagenensis*, coletada em Brejo Novo, Jequié – Bahia.

Fonte: própria do autor.

Psychotria carthagenensis Jacq. é classificada da seguinte forma:

- Reino *Plantae*
  - Superdivisão *Spermatophyta*
    - Divisão *Magnoliophyta*
      - Classe *Magnoliopsida*
        - Subclasse *Asteridae*
          - Ordem *Rubiales*
            - Família *Rubiaceae*
              - Subfamília *Rubioideae*
                - Tribo *Psychotrieae*
                - Gênero *Psychotria*
                - Espécie *P. carthagenensis* Jacq.

Existem relatos de aplicação da *Psychotria carthagenensis* por indivíduos de comunidades tradicionais da Amazônia peruana como tônico da saúde (Sanz-Biset e Cañigueral, 2011; Matsuura et. al., 2013). Essa espécie também é utilizada para substituir *P. viridis* na composição da "ayahuasca", bebida alucinógena usada em rituais ou com fins terapêuticos por comunidades tradicionais da região da Amazônia (Santos et. al., 2017; Ramachandran et. al., 2018).

Lima e colaboradores (2010, 2011) demonstraram que a fração solúvel em hexano, oriunda da partição do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis,* apresentou atividade antioxidante pelo método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil e atividade antiacetilcolinesterásica pelo método Ellman. A análise realizada através da espectroscopia por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^{1}H), dessa fração revelou a presença de substâncias aromáticas e com insaturações. Neste mesmo estudo foi confirmada a presença de alcaloides nos extratos etanólicos bruto das folhas e dos caules, após realizar-se a extração ácido-base, e análises por CCD da amostra enriquecida com alcaloides e revelação com iodo platinado (Lima et. al., 2010; Lima, 2011).

A atividade antioxidante do extrato metanólico de folhas da espécie *P. carthagenensis* foi também demonstrada por Formagio e colaboradores em 2014 com diferentes metodologias: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, β-caroteno, ácido linoleico e ácido etilbenzotiazolina-6-sulfônico. Dentre as quatro espécies do gênero *Psychotria* avaliadas (*P. carthagenensis*, *P. leiocarpa*, *P. capillacea* e *P. deflexa*), a *P. carthagenensis* apresentou a maior concentração de flavonoides (182,07 ± 2,78 mg de equivalentes de quercetina-EQ/g de extrato), uma das maiores concentrações de flavonois (241,19 ± 9,48 mg EQ/g de extrato), além de altos níveis de taninos condensados (632,39 ± 5,63 mg equivalentes de catequina-EC/g de extrato) no extrato metanólico (Formagio et. al., 2014).

Musteata e colaboradores (2016) constataram que *P. carthagenensis* apresenta similaridade química com *Psychotria cincta* após Análises de Componentes Principais de dados obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM) de amostras provenientes da extração líquida usual e da microextração em fase sólida (MEFS) de seus extratos etanólicos (Musteata et. al., 2016).

Posteriormente, Vicentini (2017) avaliou 25 espécies da família Rubiaceae, dentre os quais 10 eram pertencentes ao gênero *Psychotria*, contra a enzima acetilcolinesterase. O extrato proveniente da percolação em metanol de partes não especificadas de *P. carthagenensis* foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase, com valor de CI_{50} 309,17 µg/mL. Nesse mesmo estudo, foi confirmada a natureza alcaloídica do extrato em metanol de *P. carthagenensis* através de CCD, utilizando o revelador específico de alcaloides, o reagente de Dragendorff (Vicentini, 2017).

Não foram encontrados, até o momento, relatos na literatura científica sobre o isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários provenientes da espécie vegetal *P. carthagenensis*, além da avaliação de seus extratos, frações e substâncias purificadas frente a testes biológicos que utilizam agentes causadores de doenças tropicais negligenciadas, em especial contra espécies de *Leishmania*. Portanto, a proposta de ser realizar a investigação fitoquímica do extrato bruto de *P. carthagenensis* e biológica frente à *Leishmania* sp. pode ser promissora, ao revelar uma nova aplicabilidade farmacológica para esta espécie.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antileishmania de extratos etanólicos, e de constituintes isolados de espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae), ocorrentes no sudoeste da Bahia, visando à descoberta de produtos naturais uteis para o tratamento das leishmanioses.

3.2 Específicos

• Coletar e identificar espécies do gênero *Psychotria* de ocorrência em Jequié/Bahia;
• Preparar extratos por maceração em etanol de espécies do gênero *Psychotria* (*P. carthagenensis* e *P. hoffmannseggiana*) de ocorrência em Jequié/Bahia;
• Avaliar os extratos brutos das folhas e caules de *P. carthagenensis* e *P. hoffmannseggiana* nos ensaios de atividade antileishmania contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*;
• Realizar o fracionamento cromatográfico dos extratos brutos das folhas e caules de *P. carthagenensis*, visando o isolamento de substâncias;
• Avaliar as frações e substâncias isoladas dos extratos brutos das folhas e caules de *P. carthagenensis* nos ensaios de atividade antileishmania contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*;
• Obter os dados espectrais das substâncias isoladas;
• Elucidar as estruturas das substâncias isoladas;
• Obter valores CI_{50} da(s) substância(s) ativa(s) nos ensaios de atividade antileishmania com células THP-1 infectadas com amastigotas *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal, folhas e caules, de exemplares do gênero *Psychotria*, (Rubiaceae) foram coletados na localidade rural de Brejo Novo, no município de Jequié, Bahia, em colaboração com a Profa Dra. Guadalupe Edilma Licona de Macedo, curadora do Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - HUESB e responsável pela identificação das espécies coletadas. Os dados obtidos de coleta estão descritos na Tabela 4. Uma exsicata de cada espécie foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia–HUESB. A *P. carthagenensis* foi a espécie utilizada para a continuidade dos estudos e foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número (SisGen-A4A3C62).

Tabela 4. Dados de coleta (nome da espécie vegetal, latitude, longitude e registro HUESB) das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria*.

Espécie	Latitude (S)	Longitude (W)	Registro HUESB
P. hoffmannseggiana	13º 57’ 00”	40º 06’ 48”	12112
P. carthagenensis	13º 57’ 00”	40º 06’ 48”	12351

4.2 Obtenção dos extratos brutos das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria*

O material vegetal de cada espécie coletada (Tabela 4) foi reservado em um local apropriado e seco à temperatura ambiente. Após a secagem, com o auxílio de um moinho de facas, modelo SL-32, série 14-008 - Solab® foi feita a cominuição das folhas e caules, a fim de se aumentar a superfície de contato e a eficiência da extração.

Os extratos brutos do material vegetal (folhas e caules) das espécies de *Psychotria* foram obtidos por maceração exaustiva com etanol, previamente destilado como solvente extrator, durante 4 semanas. As soluções obtidas pela extração foram reunidas e o solvente eliminado em evaporador rotatório por 4

vezes (1 vez por semana) e, posteriormente, em centrífuga a vácuo a 45°C (Muhammad et. al., 2003).

Tabela 5. Rendimento dos extratos brutos, em gramas e em percentual, das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria*.

Amostra	Massa partida (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%, p/p)
P. carthagenensis (folhas)	201,5	52,1	25,8
P. carthagenensis (caules)	288,4	16,9	5,8
P. hoffmannseggiana (folhas)	138,0	14,7	10,7
P. hoffmannseggiana (caules)	54,1	11,4	21,0

4.3 Obtenção de frações enriquecidas brutas a partir do extrato das folhas de *Psychotria carthagenensis*

O extrato bruto em etanol das folhas (EEF) de *P. carthagenensis* foi submetido à partição líquido-líquido. O extrato (10,3 g) foi dissolvido, com auxílio de um banho de ultrassom, em mistura de metanol:água (8:2, v/v) e particionado, sucessivamente, com hexano, diclorometano e acetato de etila (3 vezes para cada solvente), conforme proposto por Lima (2011), com modificações.

Tabela 6. Rendimento da partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas, em gramas e em percentual, de *P. carthagenensis*.

Fração	Massa obtida (g)	Rendimento (%, p/p)
Hexano	2,0	19,4
Diclorometano	0,8	8,7
Acetato de etila	0,06	0,6
Hidrometanólica	5,9	57,3

4.4 Métodos cromatográficos

4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para cromatografia em camada delgada - CCD foram utilizadas placas de sílica gel 60/F254 sobre folha de alumínio 0,25 mm (Merck®), cinchonina (Roth®) e cloreto de berberina (Sigma®) como padrões de alcaloides.

4.4.2 Reveladores para cromatografia em camada delgada

As cromatoplacas foram reveladas em câmara UV, com emissão de radiação em ultravioleta (λ 254 e 366 nm), possibilitando a visualização do perfil cromatográfico de cada amostra. Subsequente à revelação com luz UV, as cromatoplacas foram reveladas com as seguintes soluções (Wagner e Bladt, 1996):

- Reagente de vanilina e ácido sulfúrico:

Este reagente foi preparado misturando-se a solução em etanol de vanilina 1% m/v à solução em etanol de ácido sulfúrico a 10% v/v na proporção de 1:1. As placas foram então aquecidas a 100°C por 5-10 min.

- Reagente de Dragendorff:

As placas foram borrifadas com solução do reagente de Dragendorff (Sigma®) e observadas à existência de manchas alaranjadas.

4.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa – CLAE-FR

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) foi utilizada para análises em escala analítica e em escala semipreparativa para as purificações de amostras do presente trabalho.

As análises em escala analítica foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, constituído de injetor manual, detector no UV ajustado para os comprimentos de onda em 210 e 254 nm, modelo SPD M-10A VP e bomba modelo LC-10AD. Todas as análises foram realizadas utilizando-se um fluxo de 1 mL/min e coluna de fase reversa constituída de octadecilsilano (Shim-pack, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm, d.i.) (Cota et. al., 2018).

As separações em escala semipreparativa foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, constituído de injetor manual, detector no UV ajustado para os comprimentos de onda em 210 e 254 nm, modelo SPD-10A-UV, duas bombas modelo LC-6AD, e coluna de fase reversa constituída de octadecilsilano (Shim-pack®, C18, 5 µm, 20 x 250 mm) com fluxo

de 7,0 mL/min ou Supelco® (C8, 5 µm, 10 x 250 mm) com fluxo de 4,7 mL/min (Cota et. al., 2018).

4.4.4 Estudo fitoquímico do extrato etanólico de folhas de *Psychotria carthagenensis* - Fracionamento por CCMP em gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica

Uma porção da fração hidrometanólica (4,9 g), oriunda da partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto das folhas (EEF) de *P. carthagenensis*, foi solubilizada em uma mistura de etanol:metanol:água (4:4:2) v/v com o auxílio de ultrassom, totalizando o volume final de 10 mL.

A fração hidrometanólica foi fracionada em 3 colunas de vidros (1 coluna Büchi® n° 19676, 25,0 x 5,0 cm, d.i.; e 2 colunas Büchi® n° 17980, 48,0 x 5,0 cm, d.i.) acopladas em série e preenchidas com gel de Sephadex LH-20 (GE Healthcare®). A amostra foi eluída com etanol absoluto (PA) e fluxo de 2 mL/min.

A coleta das frações foi realizada com auxílio de um coletor automático modelo SF-2120 (Advantec®). Foram obtidas 120 frações de 20 mL que foram reunidas em 6 grupos (A-F), após análises por CCD, conforme a Tabela 7. Foram realizadas cromatoplacas em duplicata que foram eluídas com mistura de $CHCl_3$:MeOH:H_2O (6,5:3,5:0,25) e reveladas com o reagente de Dragendorff e vanilina 1% em ácido sulfúrico (1:1).

Tabela 7. Rendimento dos grupos oriundos da filtração em gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica proveniente do EEF de *P. carthagenensis*.

Grupo	Frações	Massa (mg)	Rendimento (%, p/p)
A	1-45	135,2	2,7
B	46-54	227,3	4,6
C	55-60	153,0	3,1
D	61-78	1100	22,4
E	79-89	737,1	15,0
F	90-120	2200	44,9

4.4.4.1 Purificação dos grupos C e D, por CLAE-FR em escala semipreparativa

Os grupos C e D, provenientes da filtração em gel de Sephadex LH-20, foram fracionados através do CLAE-FR em escala semipreparativa.

Previamente, as amostras C e D foram analisadas por CLAE-FR em escala analítica, a fim de se encontrar o melhor sistema para o fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa (item 4.4.4). As amostras C e D foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em mistura de MeOH:H_2O (1:1) v/v, grau CLAE e após realizar-se a centrifugação, o sobrenadante foi analisado por CLAE-FR em escala analítica. Foram testados quatro sistemas de eluição: ACN:H_2O, MeOH:H_2O, ACN:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v e MeOH:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v. O sistema ACN:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v, foi utilizado para a purificação do grupo C e o sistema MeOH:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v para o grupo D.

As amostras C e D foram previamente solubilizadas em mistura de MeOH:H_2O (8:2, v/v) grau CLAE, nas concentrações de 153 mg/mL e 150 mg/mL, respectivamente com posterior centrifugação. Alíquotas de 1 mL das amostras C e D foram fracionadas CLAE-FR em escala semipreparativa, conforme os parâmetros apresentados na Tabela 8. A purificação de ambas amostras foi realizada com gradiente linear de 10% a 70% em 40 min, 70% a 10% em 1 min, seguida de eluição isocrática com 10% em 14 min e adição ATF 0,05% v/v (Tabela 8). O grupo C foi fracionado com mistura contendo ACN:H_2O, enquanto que o grupo D foi fracionado com mistura com MeOH:H_2O, ambos acidificado com ATF 0,05% v/v. As coletas foram manuais e forneceram 51 frações a partir do grupo C e 40 frações do grupo D.

As frações obtidas foram analisadas por CCD de sílica gel, utilizando-se mistura de $CHCl_3$:MeOH:H_2O (6,0:5,0:1,0) e cinchonina como padrão externo de alcaloide e reveladas com o reagente de Dragendorff.

A partir das análises por CCD das frações obtidas, confirmou-se a pureza da substância **I** (18,7 mg) obtida do grupo C e da substância **II** (29,6 mg) obtida do grupo D.

Tabela 8. Condições de eluição por CLAE-FR semipreparativo e rendimento das substâncias isoladas do extrato etanólico bruto das folhas de *P. carthagenensis*.

Amostra original	CLAE-FR semiprep		Substâncias isoladas
	Solvente	Gradiente	
C (153,0 mg)	ACN:H_2O + ATF 0,05% v/v	10%→70% em 40 min; 70%→10% em 1 min; 10% em 14 min	Substância **I** (18,7 mg)
D (300,0 mg)	MeOH:H_2O + ATF 0,05% v/v	10%→70% em 40 min; 70%→10% em 1 min; 10% em 14 min	Substância **II** (29,6 mg)

4.4.4.2 Estudo do extrato bruto dos caules de *Psychotria carthagenensis*- Otimização das condições de análise por CLAE-FR

Uma alíquota de 300 mg do extrato etanólico bruto dos caules (EEC) de *P. carthagenensis* foi dissolvido em mistura de MeOH:H_2O (7:3) v/v e centrifugado durante 10 minutos. O sobrenadante da amostra (Fr HM C) foi analisado por CLAE-FR em escala analítica, na concentração de 10 mg/mL em mistura de MeOH:H_2O (1:1) v/v, grau CLAE. A otimização das condições cromatográficas baseou-se na testagem de dois sistemas de eluição: MeOH:H_2O e ACN:H_2O (Tabela 9). O sistema de eluição com mistura de MeOH:H_2O foi o que apresentou melhor resultado e foi selecionado para o fracionamento do extrato dos caules por CLAE-FR em escala semipreparativa.

Tabela 9. Sistema de solventes, testados por CLAE-FR em escala analítica para a otimização do fracionamento da fração hidrometanólica do extrato dos caules (HM-C) de *P. carthagenensis*.

Amostra	CLAE-FR analítico	
	Solvente	Gradiente
Fr HM-C (10 mg/mL)	MeOH:H_2O	10%→100% em 25 min; 100% em 15 min; 100%→10% em 1 min; 10% em 14 min
Fr HM-C (10 mg/mL)	ACN:H_2O	

4.4.4.3 Fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*

O extrato bruto em etanol dos caules de *P. carthagenensis* (2,6 g) foi dissolvido em um volume total de 5 mL da mistura de MeOH:H_2O (7:3) e centrifugado por 5 minutos à 6400 rpm, o que deu origem à fração hidrometanólica do extrato dos caules (HM-C) de *P. carthagenensis*.

Três alíquotas de 1 mL (300 mg/mL) de HM-C foram fracionadas por CLAE-FR em escala semipreparativa, utilizando-se um gradiente linear de MeOH em H_2O, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Sistema de solvente utilizado na CLAE-FR em escala semipreparativa da fração hidrometanólica do extrato dos caules (HM-C) de *P. carthagenensis*.

Amostra	CLAE-FR semiprep	
	Solvente	**Gradiente**
Fr HM-C (900 mg)	MeOH:H_2O	10%→100% em 50 min; 100% em 30 min; 100%→10% em 1 min; 10% em 14 min

Após se realizar os três fracionamentos sequenciais, foram obtidos 80 grupos de frações (Tabela 11). As frações foram agrupadas a partir dos seus tempos de retenção (Trs) e da similaridade dos seus Rf por CCD, após revelação química, conforme item 4.4.2. Os grupos 34 e 32 foram submetidos à purificação através de CLAE-FR, pois foram as frações que apresentaram as maiores intensidades no UV, e coincidentemente também apresentaram massa suficientes para a purificação. A fração do grupo 33 foi reservada, pois se tratava de uma fração entre as frações dos picos majoritários, em um tempo de recolhimento pequeno.

Tabela 11. Rendimento das frações provenientes do fracionamento por CLAE-FR da fração hidrometanólica do extrato em etanol do caule de *P. carthagenensis*.

Frações	Massa (mg)	Rendimento (%, p/p)
1 – 7	-	-
8	32,0	3,5
9	271,6	30,2
10	147,8	16,4
11	45,7	5,1
12	27,8	3,1
13	6,8	0,7
14	5,6	0,6
15	3,1	0,3
16	3,5	0,4
17	5,1	0,6
18	4,7	0,5
19	3,4	0,4
20	3,1	0,3
21	3,1	0,3
22	3,3	0,4
23	6,8	0,7
24	5,1	0,6
25	7,6	0,8
26	10,1	1,1
27	7,8	0,9
28	15,4	1,7
29	7,8	0,9
30	7,8	0,9
31	9,4	1,0
32	**33,6**	**3,7**
33	34,1	3,8
34	**32,0**	**3,5**
35	8,2	0,9
36	6,6	0,7
37	5,4	0,6
38	4,3	0,5
39	3,4	0,4
40	3,0	0,3
41	3,3	0,4
42	3,2	0,3
43	3,6	0,4
44	3,0	0,3
45	1,7	0,2
46	0,8	0,09
47	0,7	0,08
48	0,9	0,1
49	0,9	0,1
50	0,9	0,1

51	0,5	0,05
52	0,2	0,02
53	0,4	0,04
54	0,9	0,1
55	0,3	0,03
56	0,3	0,03
57	0,4	0,04
58	0,5	0,05
59	0,6	0,06
60	0,8	0,09
61	0,4	0,04
62	0,5	0,05
63	0,5	0,05
64	0,4	0,04
65	0,4	0,04
66	0,3	0,03
67	0,4	0,04
68	0,5	0,05
69	0,2	0,02
70	0,3	0,03
71	0,5	0,05
72	0,5	0,05
73	0,5	0,05
74	0,3	0,03
75	0,5	0,05
76	0,4	0,04
77	0,4	0,04
78	0,2	0,02
79	0,4	0,04
80	0,2	0,02

4.4.4.4 Purificação por CLAE-FR em escala semipreparativa dos grupos 32 e 34 oriundos do fracionamento do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*

Os grupos 32 e 34 foram analisados por CLAE-FR em escala analítica, a fim de se encontrar o melhor sistema para a purificação em CLAE-FR em escala semipreparativa (condições otimizadas em 4.4.4.2). As amostras dos grupos 32 e 34 foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em mistura de MeOH:H_2O (1:1) v/v, grau CLAE e após realizar-se a centrifugação, o sobrenadante foi analisado por CLAE-FR em escala analítica. Foram testados quatro sistemas de eluição: ACN:H_2O, MeOH:H_2O, ACN:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v e

MeOH:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v. O sistema ACN:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v, foi o que apresentou o melhor resultado e foi utilizado para a purificação dos grupos 32 e 34.

Os grupos 32 e 34 foram previamente solubilizadas em mistura de MeOH:H_2O (8:2, v/v) grau CLAE e centrifugadas. Alíquotas de 0,6 mL das amostras 32 e 34 foram purificadas em CLAE-FR em escala semipreparativa Supelco® C8, 250 x 10 e fluxo de 4,7 mL/min. A purificação de ambas amostras foi realizada com gradiente linear de 10% a 70% em 40 min, 70% a 10% em 1 min, seguida de eluição isocrática com 10% em 14 min de ACN:H_2O acidificado com ATF 0,05% v/v (Tabela 12).

As frações obtidas foram analisadas por CCD de sílica gel, utilizando-se mistura de $CHCl_3$:MeOH:H_2O (6,0:5,0:1,0) e cinchonina como padrão externo de alcaloide e reveladas com o reagente de Dragendorff.

A partir das análises por CCD e CLUAE-EMAR-IES (item 4.5.2) das frações obtidas, confirmou-se a pureza da substância II (6,5 mg) obtida do grupo 34 e da substância III (8,0 mg), obtida do grupo 32.

Tabela 12. Condições de eluição por CLAE-FR escala semipreparativa e rendimento das substâncias isoladas dos grupos 32 e 34 oriundos do extrato etanólico bruto dos caules de *P. carthagenensis*.

Amostra original	**CLAE-FR semiprep**		**Substâncias isoladas**
	Solvente	**Gradiente**	
32 (32 mg)	ACN:H_2O + ATF 0,05% v/v	10%→70% em 40 min; 70%→10% em 1 min 10% em 14 min	Substância **III** (8,0 mg)
34 (13 mg)		10%→70% em 40 min; 70%→10% em 1 min 10% em 14 min	Substância **II** (6,5 mg)

4.5 Métodos físicos

4.5.1 Rotações óticas

As atividades óticas foram medidas em polarímetro da marca Anton Paar modelo MCP-300 do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas. As amostras foram analisadas a 25 °C, após serem dissolvidas em MeOH ou mistura de MeOH:H_2O (9:1).

4.5.2 Análises por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por "*electrospray*" – CLUAE-EMAR-IES

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (CLUAE, Shimadzu® Nexera), equipado com um detector de matriz de diodos (190-450 nm) e acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por "*electrospray*"–quadrupolo-TOF (EMAR, Bruker® maXis-ETD, ESI-QTOF) e controlado pelo software Compass 1.5 (Bruker®).

As amostras foram preparadas nas concentrações de 1-10 μg/mL, em metanol grau CLAE e analisadas em coluna de fase reversa (Shim-pack XR-ODSIII, C18, 2,2 μm, 80A, dimensões internas de 2,0 x 150 mm), em temperatura controlada de 40 ºC, com fluxo de 400 µL/min e gradiente linear binário de água Milli Q (componente A) em acetonitrila grau CLAE (componente B) com adição de ácido fórmico 0,1 % v/v (Tabela 13).

Tabela 13. Gradiente de eluição empregado nas análises por CLUAE-EMAR-IES.

Tempo (minutos)	Acetonitrila (componente B) (%)
0,5	5
10,5	100
12,0	100
12,5	5
15,0	5

Os cromatogramas no UV foram adquiridos em comprimentos de ondas na faixa entre 190 a 450 nm. Os espectros de massas foram obtidos utilizando-se ionização por "*electrospray*" (IES) no modo positivo. As seguintes condições foram empregadas: *end plate offset*= −500 V, tensão do capilar= 4500 V, pressão do gás nebulizador= 3,0 bar, fluxo do gás secante (nitrogênio)= 8,0 L/min, temperatura da fonte= 200 ºC. A fragmentação dependente foi feita com energias de colisão entre 15 a 60 eV. Os parâmetros do íon cooler foram otimizados para a faixa *m/z* 100-1500, utilizando-se uma solução de 1 mM de formato de sódio em 2-propanol como calibrante. A calibração de massas foi feita pela infusão de 20 µl de calibrante na fonte de íons no início da aquisição dos espectros.

4.5.3 Espectros de ressonância magnética nuclear – RMN

Os espectros de RMN de 1D e 2D foram obtidos em aparelho Brucker® DRX-400 MHz, da Subunidade de Métodos Analíticos – RPT13A do Sistema da Rede de Plataformas Tecnológicas (PDTIS), FIOCRUZ. Metanol deuterado (MeOD) foi utilizado para obtenção dos espectros de RMN a 25 ºC e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna, cujo deslocamento químico é δ 0,00, em relação aos deslocamentos químicos dos núcleos de ^{1}H e ^{13}C adquiridos a 400 e 100 MHz, respectivamente e as constantes de acoplamento (*J*) dos espectros obtidos foram apresentadas em Hertz (Hz).

4.6 Atividade biológica

4.6.1 Ensaio de atividade antileishmania com amastigotas-*like* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

Os ensaios com amastigotas-*like* foram realizados por colaboradores do IRR-FIOCRUZ Minas. Formas promastigotas extracelulares de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8), obtidas de lesões de “hamsters”, foram cultivadas em meio Schneider's, pH 7,2, à temperatura de 26 ºC. Após 7 dias de cultivo, quando o crescimento das formas promastigotas atingem a fase estacionária, a cultura foi centrifugada por 10 min a 1200 FCR (RCF, do inglês: “relative centrifugal force”), ressuspendida em meio Schneider's, pH 6,0 e, incubada a 32 ºC, o que permitiu a obtenção das formas amastigotas. Uma alíquota de 90 μL de um inóculo contendo 1 x 10^{8} parasitas/mL e 10 μL das amostras a 200 μg/mL foram adicionadas a cada poço. As microplacas foram incubadas a 32 ºC por 72 h e a viabilidade celular foi determinada colorimetricamente usando 10 μL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a 5 mg/mL em 570 nm.

Anfotericina B a 0,2 μg/mL foi utilizada como droga com atividade antileishmania padrão. Os extratos das espécies vegetais de *Psychotria* foram testados na concentração de 200,0 µg/mL. Todas outras amostras-testes foram avaliadas a 20 µg/mL e os resultados expressos como porcentagem da inibição

do crescimento do parasito em relação ao controle sem amostra, conforme a equação 1.

Equação 1. $[1-(Abs_{exp}/Abs_{contr})] \times 100)]$

4.6.2 Ensaio de atividade antileishmania com células THP-1 infectadas com amastigotas *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

Os ensaios com formas amastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* foram realizados por colaboradores do Laboratório de Parasitologia Molecular e Celular do IRR-FIOCRUZ Minas. Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (cepa MHOM/BR/1994/H3227), que expressam a luciferase como gene repórter (Roy et. al., 2000).

A linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana, THP-1 (ATCC® TIB-202™) foi diferenciada na presença de miristato de forbol a 20 ng/mL, por 72 horas a 37 °C. As células foram infectadas com *L.* (*Viannia*) *brasilienses* na proporção de 10:1 de parasito/macrófago por 3 horas. Os parasitos não internalizados foram removidos após realizar-se cinco lavagens das células infectadas com tampão HEPES/NaCl. As células infectadas foram então tratadas com 20 µg/mL da amostra-teste e 2 µg/mL de anfotericina B (controle positivo). Após 72 horas, a atividade da luciferase foi avaliada ao se adicionar 20 µL de One-Glo™ e detecção da luminescência a 1000 nm, utilizando-se 1 segundo de integração por poço em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices CA, USA).

Células THP-1, infectadas e tratadas com 0,5% v/v de DMSO em água, foram utilizadas como controle para comparação de crescimento. Os resultados foram expressos como porcentagem da inibição do crescimento do parasito em relação ao controle tratado com DMSO. Os valores de CI_{50} foram determinados com base nas curvas de dose-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA).

4.6.3 Ensaios de avaliação da atividade citotóxica sobre células THP-1

Células THP-1 ($1x10^6$/mL) foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas com acetato de miristato de forbol a 20 ng/mL, por 72 horas à 37 °C

e em atmosfera com 5% de CO_2. As células foram então tratadas com as amostras-teste nas concentrações de 1,5-200,0 µg/mL e anfotericina B (controle positivo) na concentração de 2 µg/mL.

A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas, utilizando-se o ensaio com MTT. Vinte microlitros de uma solução contendo 10 µM de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio foi adicionado a cada poço. Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi removido, os cristais de formazana foram dissolvidos pela adição de 100 µL de DMSO e a absorbância foi medida em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices CA, USA) em 570 nm.

Os resultados foram calculados a partir das medidas de absorbância utilizando-se a porcentagem de morte celular em relação ao controle de células não tratadas (Garcia et. al., 2013). Os valores de CI_{50} foram determinados com base nas curvas de dose-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos extratos brutos das espécies vegetais coletadas do gênero *Psychotria*

A extração em etanol do material vegetal de *P. carthagenensis,* coletada em Jequié, forneceu 52,1 g (25,8 % p/p) do extrato das folhas e 16,9 g (5,8 % p/p) do extrato dos caules de *P. carthagenensis*. Os rendimentos desses extratos foram semelhantes ao rendimento do extrato polar encontrado por Vicentini (2017), no qual o material vegetal (2,35 g) de partes não especificadas de *P. carthagenensis,* extraído sequencialmente com hexano e metanol, forneceu rendimentos de 0,72 e 27,49% p/p, respectivamente (Vicentini, 2017).

Ainda nesse mesmo estudo relatado por Vicentini (2017), foi realizada uma análise por CCD dos extratos brutos metanólicos de 10 espécies do gênero *Psychotria*, incluindo a *P. carthagenensis*, o que revelou a presença predominante de manchas referentes a alcaloides. Foram observadas manchas de coloração azul, quando as cromatoplacas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico e, manchas na coloração castanho-alaranjada, quando as cromatoplacas foram reveladas com o reagente de Dragendorff (Vicentini, 2017).

Para *Psychotria hoffmannseggiana,* foram obtidos extratos em etanol com rendimento em massa (e percentual) de 14,7 g (10,7 % p/p) para as folhas e de 11,4 g (21,0 % p/p) para os caules. Em um trabalho similar, folhas e caules de *P. hoffmannseggiana* foram submetidos à extração em etanol, cujo rendimento ao final do processo foi de 21,2 g (8,7 % p/p) para as folhas e 19,8 g (5,1 % p/p) para os caules (Oliveira et. al., 2013). Em outro trabalho mais recente, foi confirmada a presença de alcaloides nas folhas e nos caules desta espécie, conforme metodologia de Matos (2009). Contudo os rendimentos das extrações em etanol realizadas com as folhas e com caules da *P. hoffmannseggiana* não foram mencionados (Mendonça et. al., 2015).

5.2 Estudo fitoquímico do extrato etanólico de folhas de *Psychotria carthagenensis*

5.2.1 Fracionamento preliminar por partição líquido-líquido do extrato em etanol das folhas de *Psychotria carthagenensis*

O fracionamento preliminar do EEF de *P. carthagenensis* foi realizado por partição líquido-líquido. Uma alíquota do EEF foi dissolvida em mistura de metanol:água (8:2) v/v e particionada com hexano, diclorometano e acetato de etila, conforme descrito na seção 4.3. A fração hidrometanólica foi a que apresentou o maior rendimento: 5,9 g, correspondendo ao rendimento em percentual de 57,3% p/p, seguida da fração hexano, cuja massa obtida foi de 2,0 g, o que equivale ao rendimento de 19,4% p/p. As frações solúveis em diclorometano e em acetato de etila foram as que apresentaram os menores rendimentos, com 0,8 g (8,7% p/p) e 0,06 g (0,6% p/p), respectivamente.

A fração hidrometanólica foi selecionada para isolamento por apresentar manchas de cor alaranjada, indicativo da presença de alcaloides, após avaliações por CCD com revelador específico para alcaloides, o reagente de Dragendorff (Figura 6). Note que uma mancha de cor alaranjada de fator de retenção (Rf, do inglês: "*retention factor*") de 0,80, aparece nas frações hidrometanólica, em diclorometano e em acetato de etila, porém foi purificada apenas a fração que apresentou o maior rendimento em massa, ou seja, a fração hidrometanólica.

Figura 6. CCD das frações obtidas da partição líquido-líquido das folhas de *P. carthagenensis*. Mancha de cor alaranjada de Rf 0,80 após revelação com reagente de Dragendorff.

Legenda: Eluente: $CHCl_3$:MeOH:H_2O (6,5:3,5:0,25) v/v.
Fase estacionária: cromatoplaca de sílica gel 60/F254 em folha de alumínio 0,25 mm (Merck®).
H: fr. hexano; D: fr. diclorometano; Ac: fr. acetato de etila e M: fr. hidrometanólica.
Revelador: Reagente de Dragendorff.
Fonte: própria do autor.

5.2.2 Filtração em gel de Sephadex LH-20, através da CCMP, da fração hidrometanólica proveniente do extrato etanólico de folhas de *Psychotria carthagenensis*

Uma alíquota da fração hidrometanólica, proveniente da partição líquido-líquido do EEF de *P. carthagenensis,* foi fracionada por cromatografia em coluna de média pressão - CCMP com colunas preenchidas com gel de Sephadex LH-20, Figura 7. A amostra foi eluída com etanol absoluto e obteve-se 120 frações, Figura 8.

Figura 7. Fracionamento realizado através da cromatografia em coluna de média pressão utilizando gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica de *P. carthagenensis*.

Fonte: própria do autor.

Figura 8. Frações obtidas do fracionamento realizado através do gel de Sephadex LH-20 por CCMP.

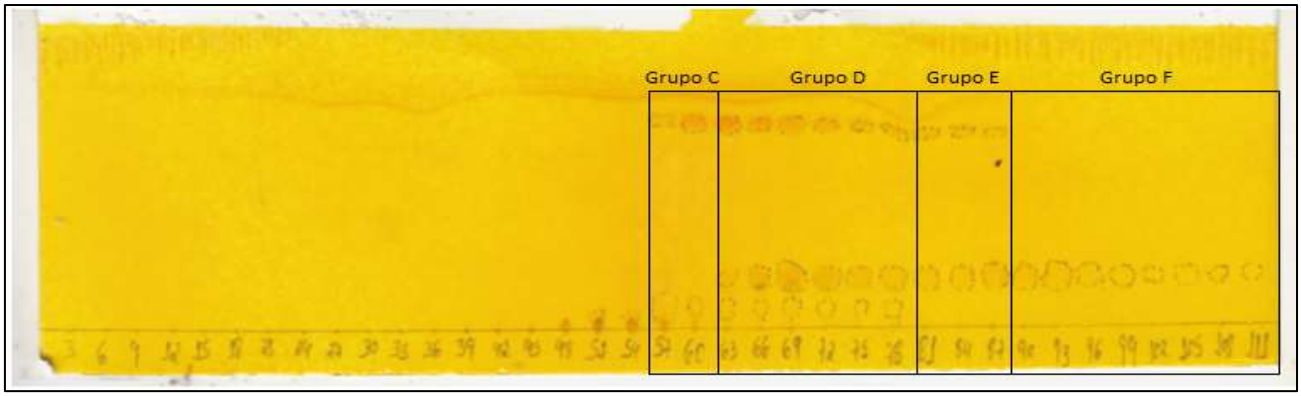
Fonte: própria do autor.

O perfil cromatográfico das frações foi obtido através da CCD de sílica gel, Figura 9, e revelação com o reagente de Dragendorff. Baseado na similaridade dos perfis cromatográficos das frações coletadas foram obtidos 6 grupos (A-F).

Foi possível observar manchas alaranjadas a partir do grupo C em análises por CCD, como pode ser observado na Figura 9 a seguir.

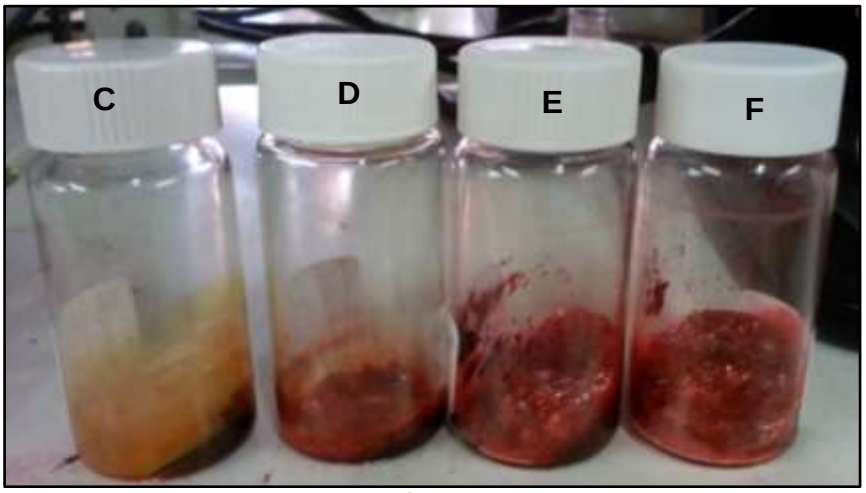
Os grupos C-F, de coloração alaranjada, são apresentados na Figura 10. Os maiores rendimentos obtidos foram dos grupos F com 2,2 g, correspondendo a 44,9% p/p e, do grupo D com 1,1 g, equivalendo a 22,4% p/p. E os menores rendimentos foram das frações A com 135,2 mg, correspondendo a 2,7% p/p e do grupo C, com 153,0 mg, equivalendo a 3,1% p/p.

Figura 9. CCD das 120 frações provenientes da filtração em gel da fração hidrometanólica de *P. carthagenensis*.



Legenda: Eluente: $CHCl_3$:MeOH:H_2O (6,5:3,5:0,25) v/v.
Fase estacionária: cromatoplaca de sílica gel 60/F254 em folha de alumínio 0,25 mm (Merck®).
Revelador: Reagente de Dragendorff.
Fonte: própria do autor.

Figura 10. Grupos obtidos (C-F) do fracionamento da fração hidrometanólica de EEF de *P. carthagenensis*, através do gel de Sephadex LH-20.



Fonte: própria do autor.

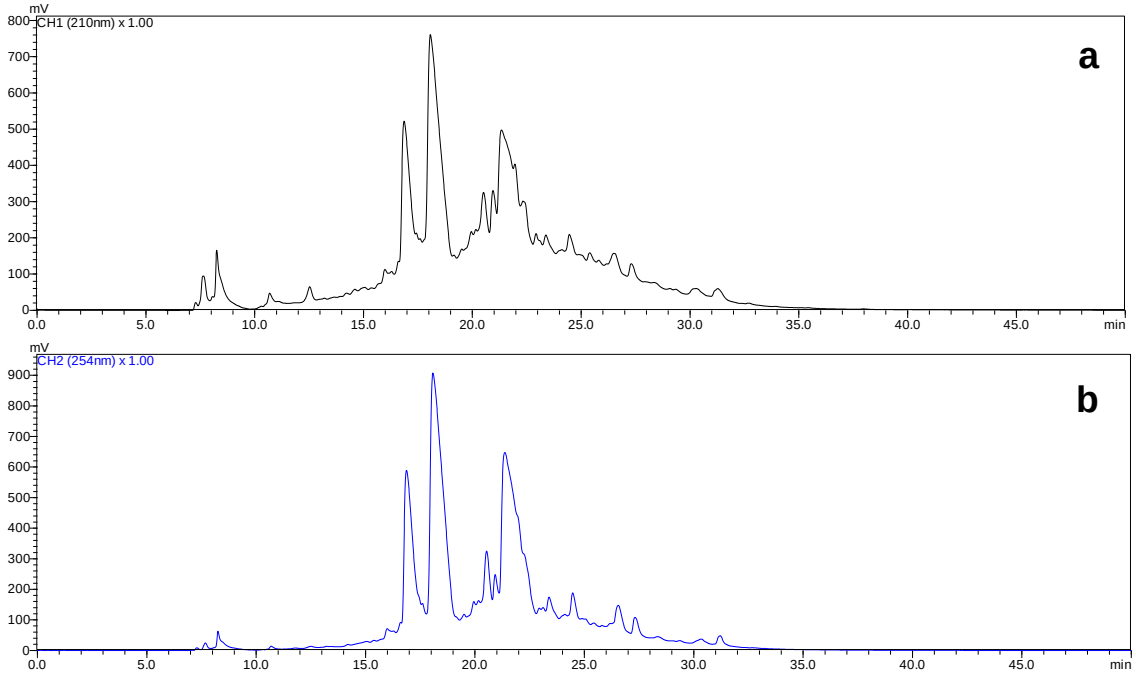
Lima (2011) realizou a triagem da presença de alcaloides nos extratos em etanol de folhas, caules e sementes de *P. carthagenensis*. Apesar de todos os extratos terem apresentado resultado positivo para a presença de alcaloides, quando revelados com cloro iodoplatinato, não houve o isolamento, de metabólitos secundários, em especial alcaloides, nesse trabalho (Lima, 2011).

5.2.3 Otimização das condições cromatográficas por CLAE-FR, em escala analítica dos grupos C e D, provenientes da fração hidrometanólica do extrato etanólico bruto das folhas de *Psychotria carthagenensis*.

Os grupos C e D, oriundos do fracionamento por CCMP com gel de Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica do EEF de *P. carthagenensis,* foram analisados por CLAE-FR em escala analítica para a otimização do fracionamento em escala semipreparativa. Foram testados os quatro sistemas de eluição, conforme descrito no item 4.4.4.1.

A fração C, cujo cromatograma obtido por CLAE-FR em escala analítica, é apresentado na Figura 11 e apresentou 3 picos majoritários que foram parcialmente resolvidos quando eluídos com mistura de H_2O em gradiente de ACN, acidificada com ATF 0,05% v/v. Esta mistura de solventes foi utilizada para a purificação da fração C por CLAE-FR em escala semipreparativa.

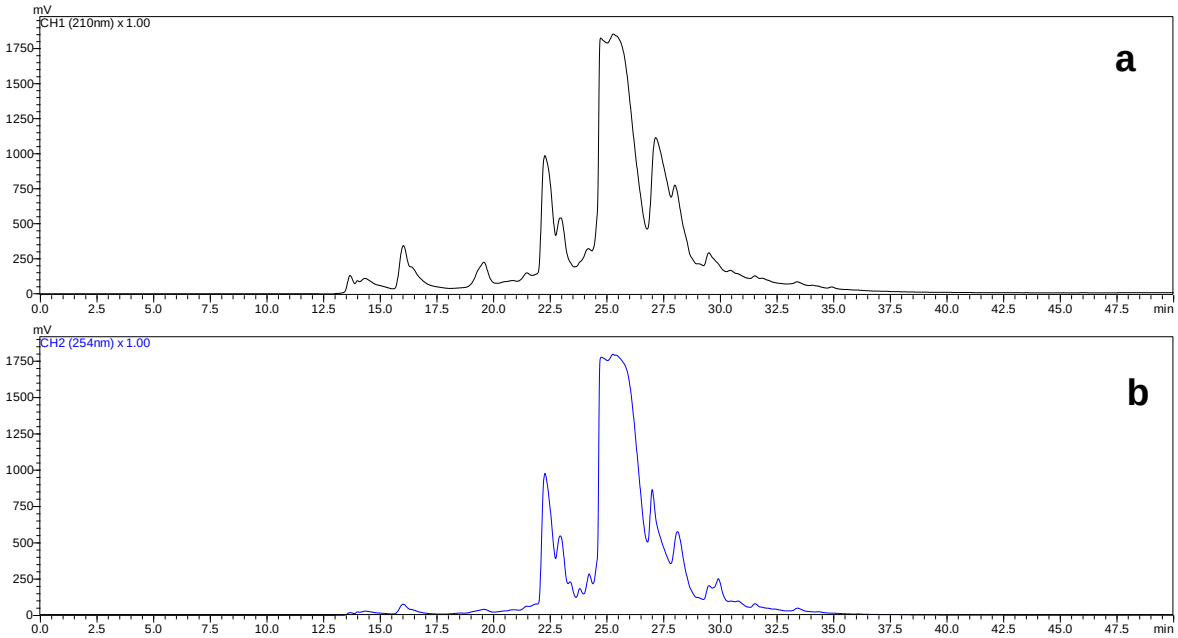
Figura 11. Perfil cromatográfico do grupo C, obtido por CLAE-FR em escala analítica. Condições cromatográficas: conforme parte experimental (item 4.4.4.1).



Legenda: Sistema de eluição: ACN:H_2O + ATF 0,05% v/v;
detecção no UV, a) λ 210 nm e b) λ 254 nm;
Coluna Shim-pack, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm;
Fluxo = 1,0 mL/min.

O cromatograma da fração D, obtido por CLAE-FR em escala analítica, Figura 12, apresentou 3 picos majoritários que foram resolvidos parcialmente com mistura de MeOH:H_2O, acidificada com ATF 0,05% v/v, sistema que apresentou o melhor resultado e que foi selecionado para o fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa.

Figura 12. Perfil cromatográfico do grupo D, obtido no CLAE-FR em escala analítica. Condições cromatográficas: conforme parte experimental (item 4.4.4.1).

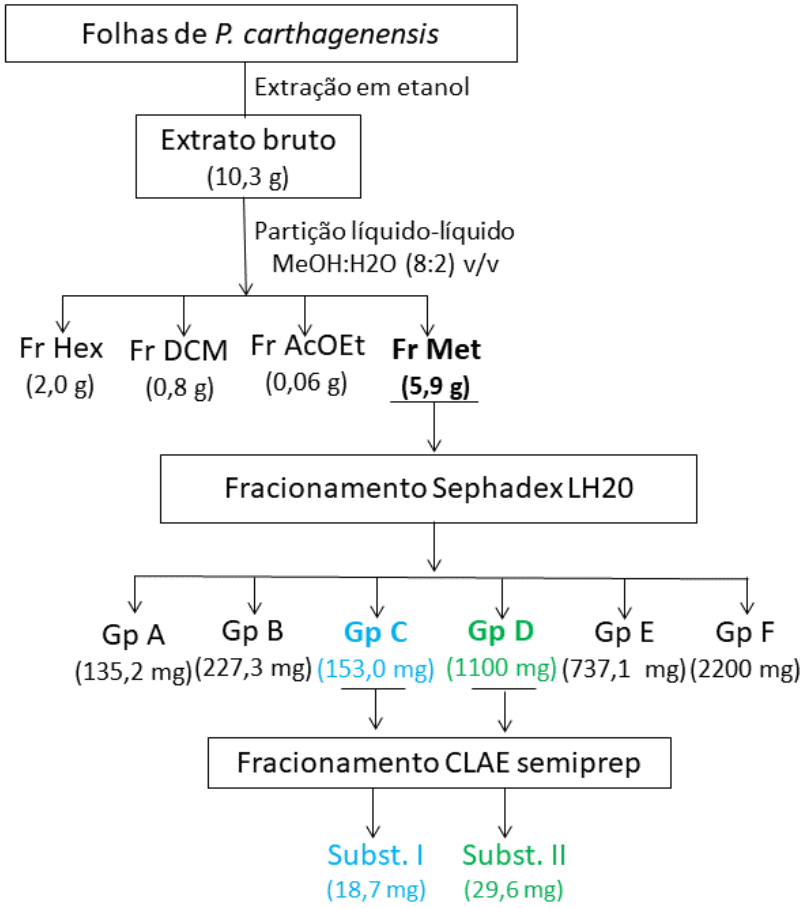


Legenda: Sistema de eluição: MeOH:H_2O + ATF 0,05% v/v e detecção no UV, a) λ 210 nm e b) λ 254 nm
Coluna Shim-pack, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm;
Fluxo = 1,0 mL/min.

5.2.4 Purificação dos grupos C e D por CLAE-FR em escala semipreparativa

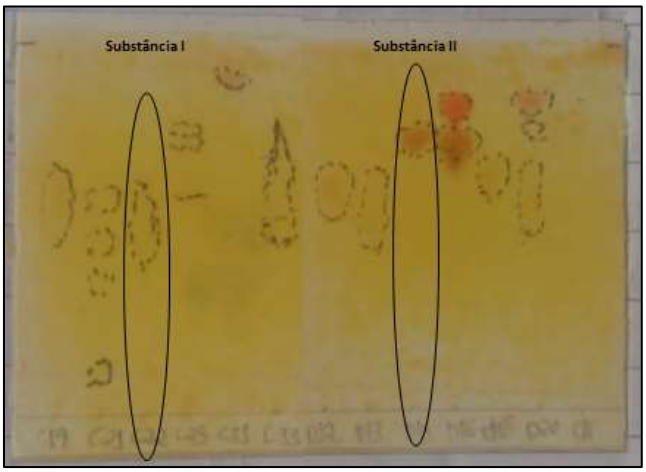
Após a avaliação em escala analítica dos grupos C e D, provenientes da fração hidrometanólica das folhas de *P. carthagenensis*, foi realizado o fracionamento de cada grupo por CLAE-FR em escala semipreparativa, conforme citado na Tabela 8 da seção 4.4.4.1. O processo de obtenção das substâncias **I** e **II** pode ser observado de forma sintetizada no fluxograma abaixo, Figura 13.

Figura 13. Fluxograma de obtenção das substâncias **I** e **II** provenientes das folhas de *P. carthagenensis*.



A purificação do grupo C foi realizada com gradiente linear com mistura de ACN e água e forneceu a substância **I** (18,7 mg), recolhida no tempo de coleta de 17,85 min, através do CLAE-FR em escala semipreparativa, segundo o item 4.4.3 presente na metodologia. A purificação do grupo D foi realizada com mistura de MeOH e água e forneceu a substância **II** (29,6 mg), recolhida no tempo de coleta de 24:50 min, através do CLAE-FR em escala semipreparativa, segundo o item 4.4.3 da metodologia. As amostras foram consideradas puras após avaliação por CCD, Figura 14 e a natureza alcaloídica das mesmas foi evidenciada através do reagente de Dragendorff.

Figura 14. CCD obtido das substancias **I** e **II**.



Legenda: Eluente: $CHCl_3$:MeOH:H_2O (6:5:1) v/v.
Fase estacionária: cromatoplaca de sílica gel 60/F254 em folha de alumínio 0,25 mm (Merck®).
Revelador: Reagente de Dragendorff.
Fonte: própria do autor.

A partir desta etapa, foram obtidos os valores de atividade ótica, os espectros por CLUAE-EMAR-IES, bem como os dados de RMN 1 e 2D das substâncias **I** e **II**.

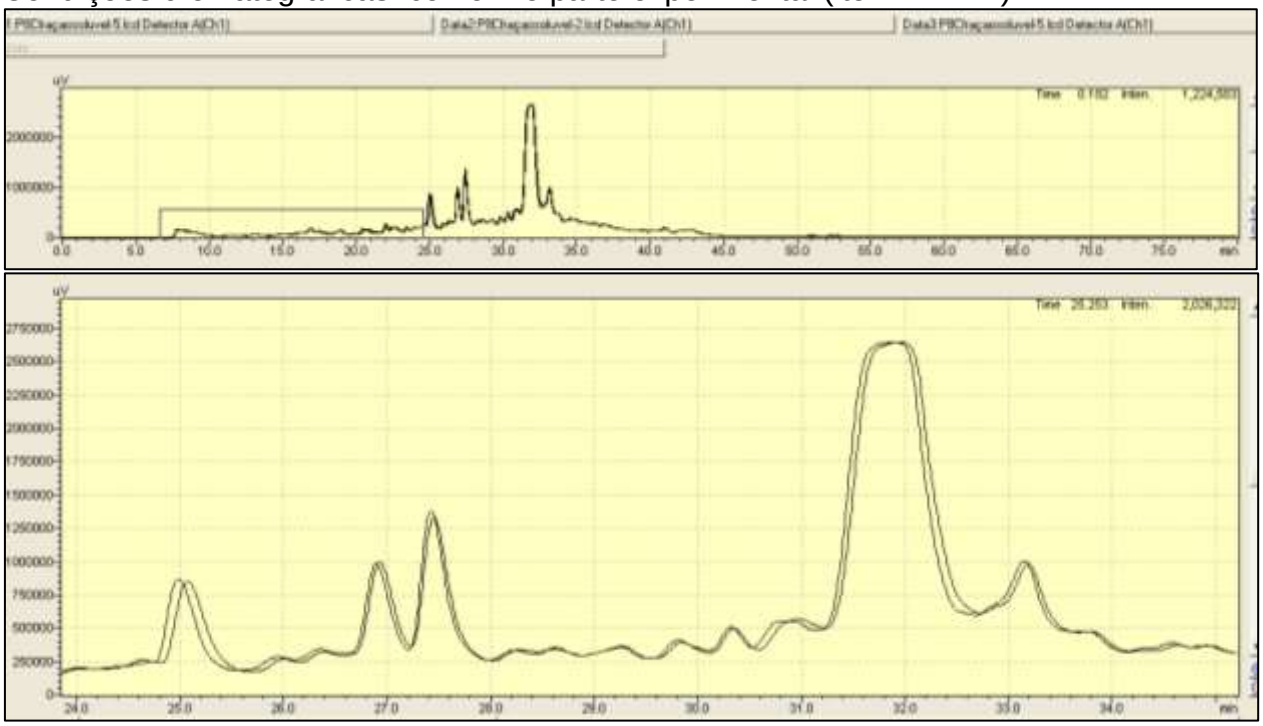
As frações E e F foram também purificadas de forma semelhante às frações C e D, porém, não houve isolamento de substâncias diferentes (dados não apresentados).

5.3 Estudo fitoquímico do extrato em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*

5.3.1 Otimização das condições cromatográficas por CLAE-FR em escala analítica

O perfil cromatográfico da fração hidrometanólica do extrato em etanol dos caules de *P. carthagenensis,* obtido por CLAE-FR em escala analítica com mistura de MeOH e H_2O (Figura 15), demonstrou ser pouco complexo e com um pico majoritário. Esse extrato foi submetido ao fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa devido à disponibilidade de massa e por apresentar perfil cromatográfico relativamente simples.

Figura 15. Perfil cromatográfico, obtido por CLAE-FR em escala analítica da fração hidrometanólica do extrato bruto dos caules de *P. carthagenensis*. Condições cromatográficas: conforme parte experimental (item 4.4.4.2).



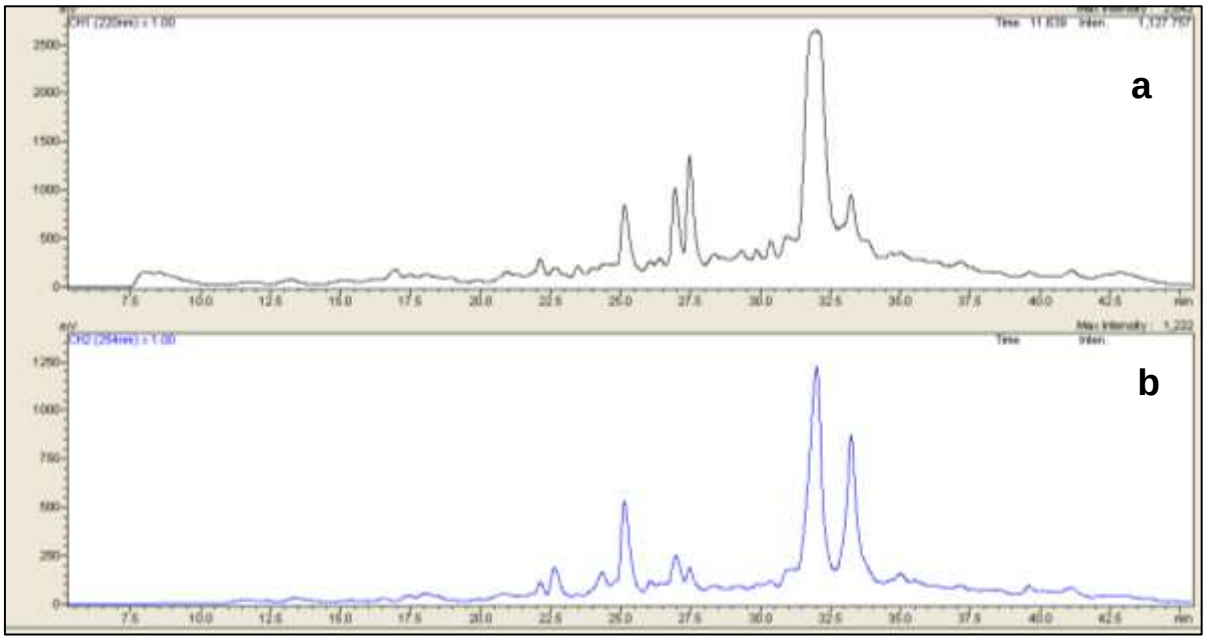
Legenda: Sistema de eluição: MeOH:H_2O;
detecção no UV: λ 210 e 254 nm;
Coluna Shim-pack, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm;
Fluxo = 1,0 mL/min.
Pico majoritário = 31,8 min.

5.3.2 Fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*

O fracionamento por CLAE-FR em escala semipreparativa da fração hidrometanólica do extrato bruto em etanol dos caules de *P. carthagenensis* (Figura 16) forneceu 80 frações que foram avaliadas por CCD com revelação com reagente de Dragendorff.

Os grupos 32 e 34 demonstraram ter natureza alcaloídica devido à presença de manchas de coloração alaranjada. A partir desta avaliação, estes grupos foram selecionados para as etapas de purificação e avaliação da atividade antileishmania.

Figura 16. Cromatograma da fração hidrometanólica proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de *P. carthagenensis* em escala semipreparativa.



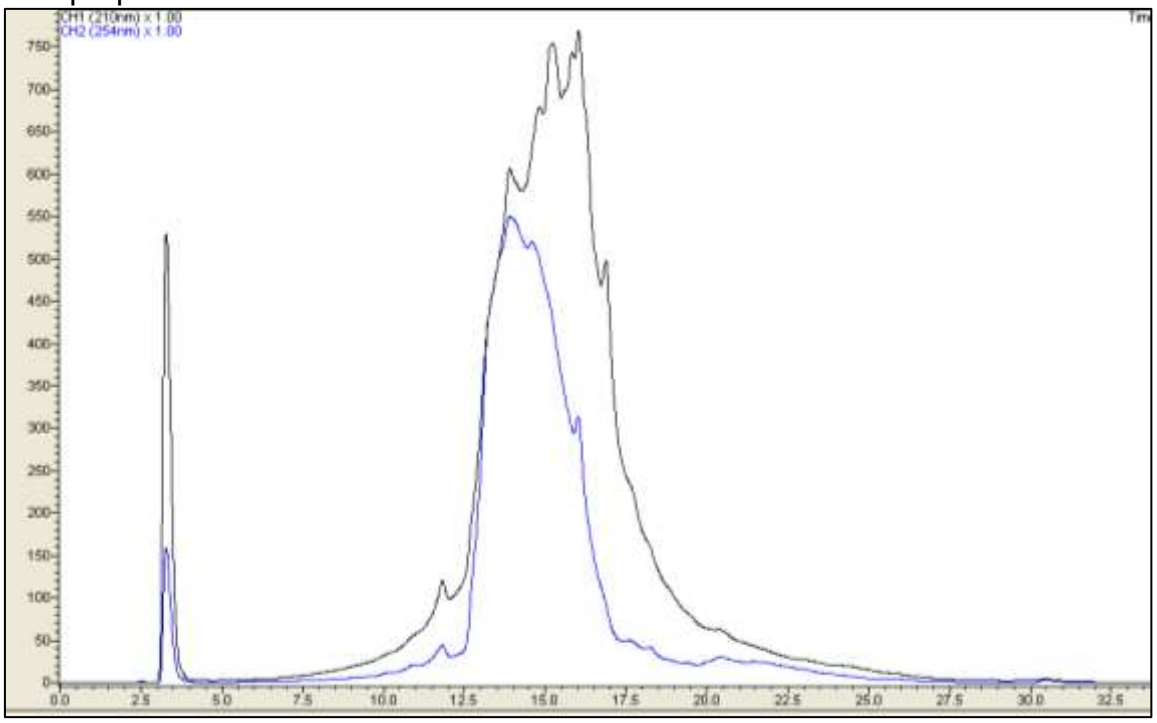
Legenda: Sistema de eluição: MeOH:H_2O;
detecção no UV, a) λ 210 nm e b) λ 254 nm;
Coluna Shim-pack, C18, 5 µm, 20 x 250 mm;
Fluxo = 7,0 mL/min.

5.3.3 Purificação por CLAE-FR em escala semipreparativa dos grupos 32 e 34, oriundos do fracionamento do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*

A purificação por CLAE-FR em escala semipreparativa dos grupos 32 e 34 forneceu as substâncias **II** e **III**, que após avaliação por CCD com revelação com reagente de Dragendorff, demonstraram ter natureza alcaloídica, pois apresentaram manchas alaranjadas, conforme as seções 4.4.1 e 4.4.2 dos materiais e métodos.

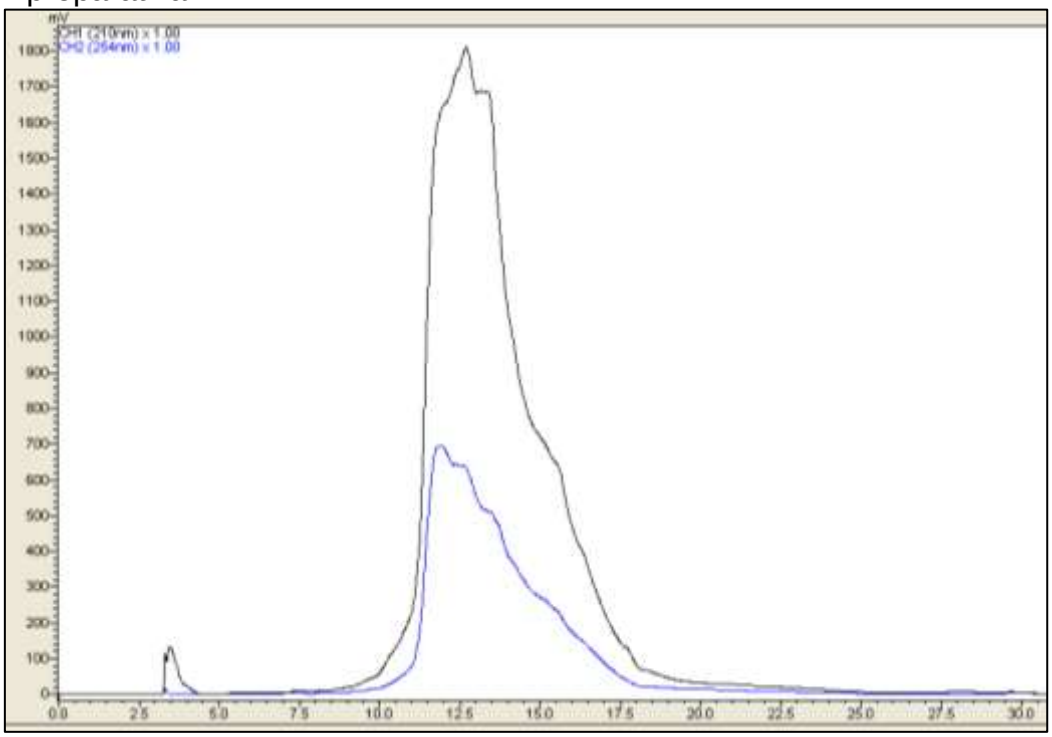
A partir das análises por CCD e CLUAE-EMAR-IES (item 4.5.2) das frações obtidas, confirmou-se a pureza da substância **II** (6,5 mg) obtida do grupo 34 e recolhida no tempo de coleta de 13:50 min e da substância **III** (8,0 mg), obtida do grupo 32 e recolhida no tempo de coleta de 11:50 min, conforme apresentado nos espectro apresentados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Figura 17. Perfil cromatográfico do grupo 34, obtido no CLAE-FR em escala semipreparativa.



Detecção por UV-Vis: λ 210 nm e λ 254 nm;
Coluna Supelco, C8, 5 µm, 10 x 250 mm;
Fluxo = 4,7 mL/min.

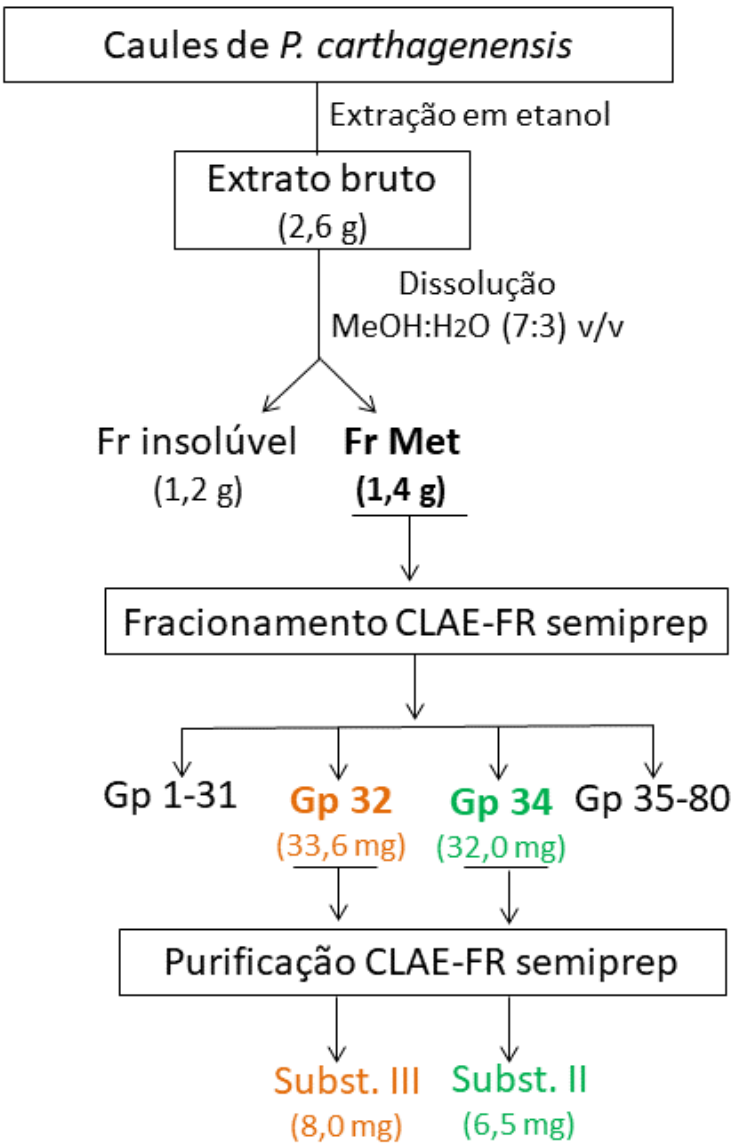
Figura 18. Perfil cromatográfico do grupo 32, obtido no CLAE-FR em escala semipreparativa.



Detecção por UV-Vis: λ 210 nm e λ 254 nm
Coluna Supelco, C8, 5 µm, 10 x 250 mm;
Fluxo = 4,7 mL/min.

O processo de obtenção das substâncias **II** e **III** pode ser observado de forma sintetizada no fluxograma abaixo, Figura 19.

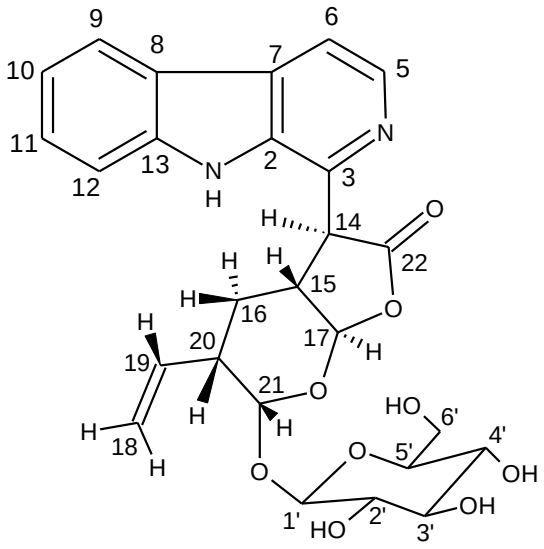
Figura 19. Fluxograma de obtenção das substâncias **II** e **III**, provenientes dos caules de *P. carthagenensis*.



5.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas dos extratos etanólicos das folhas e dos caules de *Psychotria carthagenensis*

5.4.1 Substância I

Figura 20. Proposta da estrutura da substância **I** - cartagenina.



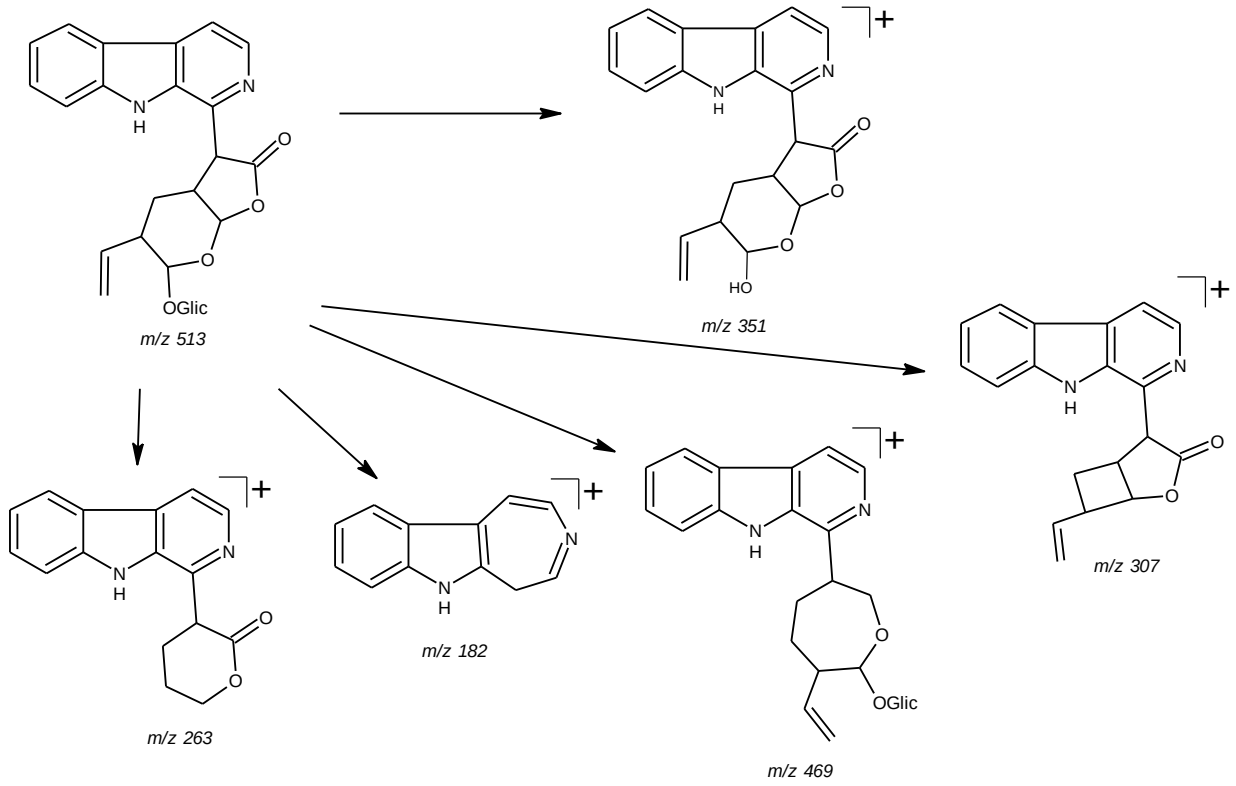
A substância **I** (18,7 mg) foi isolada, como um sólido amarelo, da fração hidrometanólica do extrato em etanol das folhas de *P. carthagenensis* e apresentou valor de atividade ótica de $[\alpha]^{25}_{D}$ 5,5 (*c* 0,728 g/100 mL; MeOH:H_2O, 9:1).

A substância **I** apresentou banda de absorção no UV-Vis com pico máximo em 212 nm; espectro obtido na célula do detector por arranjo de diodos (PDA, 190–450 nm) em análise por CLUAE com eluente de ACN em H_2O no modo analítico (Apêndice A1).

A varredura no espectrômetro de massas, obtido por CLUAE-EMAR-IES, apêndice A2, no modo positivo, registrou uma molécula catiônica $[M+H]^+$ em *m/z* 513,1876 (100,0%), sugerindo a fórmula molecular $C_{26}H_{28}N_2O_9$ (massa molecular = 512,50852 g/mol) para a substância **I**. A partir do espectro de massas obtido para a substância **I** foi possível propor as clivagens sofridas, Figura 21, tanto da ruptura da ligação glicosídica e formação do íon molecular em *m/z* 351, quanto da quebra da ligação do núcleo *β*-carbolínico com a perda de uma unidade glicosilada da molécula e formação do íon molecular em *m/z*

180. Também foi possível identificar a perda do glicosídeo associado ao CO_2 com geração do íon molecular em *m/z* 307.

Figura 21. Proposta de fragmentação, obtido através EMAR-IES, da substância **I** - cartagenina.



O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) da substância **I** (Apêndice A4) apresentou sinais correspondentes a 26 átomos de carbono. A partir da análise do espectro DEPT-135 (Apêndice A5) foi possível determinar a natureza dos carbonos, confirmando o que foi proposto no parágrafo anterior. Foram identificados seis carbonos metínicos aromáticos, sete carbonos metínicos alifáticos e três carbonos metínicos hidroxilados presentes na unidade glicosilada, dois carbonos metilênicos e seis carbonos desprotonados. Alguns carbonos apresentaram deslocamentos químicos característicos de carbonos de ligação dupla (δ_C 119,3 e δ_C 135,9), carbono de carbonila (δ_C 171,2), carbono metilênico (δ_C 27,8), carbono metilênico hidroxilado (δ_C 62,6), carbonos metínicos hidroxilados (δ_C 71,5, δ_C 74,5 e δ_C 77,8) e de um carbono anomérico (δ_C 100,5) (Tabela 14) (Silverstein, 2007).

O espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOD) da substância **I** (Apêndice A3) apresentou sinais de multipletos referentes à prótons aromáticos entre δ_H 8,65 a δ_H 7,49. Conforme observado para a substância **I**, o espectro de ^{1}H NMR mostrou a presença de quatro sinais em δ_H 7,78 (H-12, dd, *J*= 8,0; 1,5 Hz), δ_H 7,49 (H-10, ddd, *J*= 8,0; 7,0; 1,5 Hz), δ_H 8,42 (H-9, td, *J*= 8,0; 1,5 Hz) e δ_H 7,81 (H-11, dtd, *J*= 8,0; 7,0; 7,0; 1,5 Hz), que foram atribuídos aos prótons aromáticos do núcleo β-carbolínico. A presença de dois dubletos em δ_H 8,62 (H-6, d, *J*= 6,5 Hz) e em δ_H 8,65 (H-5, d, *J*= 6,5 Hz) indicou a presença de uma ligação dupla entre os carbonos H-6 e H-5, característicos da porção aromática, cujos 3 anéis aromáticos formam um esqueleto β-carbolínico (Simões-Pires et. al., 2006).

A análise do espectro de RMN de ^{1}H também indicou a presença de um anel tetraidropirano pelos sinais em δ_H 3,30 (H-15, m), em δ_H 3,89 (H-16a, dd, *J* = 20,0 e 7,0 Hz) e δ_H 4,01 (H-16b, d, *J* = 20,0 Hz), em δ_H 6,88 (H-17, dd, *J* = 1,8 Hz), em δ_H 2,97 (H-20, dd, *J* = 7,0 e 2,0 Hz) e em δ_H 4,79 (H-21, d, *J* = 10,0 Hz). O espectro de HMBC demonstrou a conectividade entre o sinal em δ_C 44,5 (C-20) com os sinais referentes aos prótons H-21, H-19 e H-16a e, do sinal em δ_C 96,0 (C-21) com os sinais referentes aos prótons H-20, H-19 e H-17, o que confirmou a atribuição do anel tetraidropirano, que tem estrutura semelhante a um iridoide.

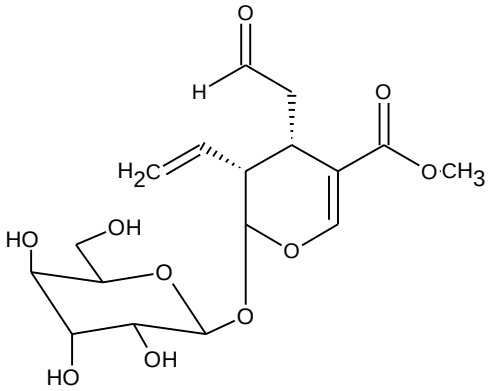
A presença de multipletos em δ_H 5,35 (H-18a, ddd, *J*= 11,0; 2,0; 1,5 Hz) e em δ_H 5,39 (H-18b, ddd, *J*= 17,5; 2,0; 1,5 Hz), que foram atribuídos aos prótons olefínicos geminais e do multipleto em δ_H 5,95 (H-19, dddd, *J*= 17,5; 11,0; 7,0; 1,5 Hz), que foi atribuído à um hidrogênio olefínico vicinal (Simões-Pires et. al., 2006; Silverstein, 2007), demonstrou a presença um grupo vinílico na substância **I**. Esse grupo vinílico foi localizado no anel tetraidropirano pelos sinais de correlação entre H-20 (δ_H 2,97) e os prótons H-19, H-18a, H-18b, após análise do espectro HMBC (Tabela 14).

Uma análise cuidadosa dos espectros de 1D e 2D de RMN revelou a presença de uma lactona de cinco membros pela existência de um sinal carbono de carbonila C-22 (δ_C 171,2), que apresentou correlação no HMBC com o multipleto referente ao H-14 (δ_H 3,56) e o singleto referente ao H-17 (δ_H 6,88). O sinal referente ao carbono C-15 (δ_C 30,9) confirmou a presença do anel lactona

de cinco membros ligado diretamente ao anel tetraidropirano pelas correlações no HMBC com os sinais referentes aos prótons H-14 (δ_H 3,56, m), H-16a (δ_H 3,89, dd, *J*= 20,0; 7,0 Hz), H-16b (δ_H 4,01, br d, *J*= 20,0 Hz) e, com o próton H-17 (δ_H 6,88, s, *J*= 1,8 Hz).

A presença da quebra da ligação glicosídica e formação do íon molecular em *m/z* 351, a partir do íon *quasi*-molecular em *m/z* 513 e de um carbono com deslocamento químico de anomérico (δ_C 100,5), nos levou a investigar a presença de um açúcar na substância **I**. Os sinais no espectro de ^{1}H entre δ_H 4,39 a δ_H 2,98, de três carbonos metínicos hidroxilados (δ_C 71,5, δ_C 74,5 e δ_C 77,8), de um carbono metilênico hidroxilado (δ_C 62,6) e de um carbono anomérico (δ_C 100,5) no espectro de ^{13}C confirmou a presença de uma unidade glicosídica. Foi possível determinar a localização do açúcar no C-21 (δ_C 96,0) do anel tetraidropirano devido à sua correlação com o sinal do próton anomérico H-1' (δ_H 4,39, d, *J*= 7,8 Hz) no espectro de HMBC. A parte da substância **I** que envolve o anel tetraidropirano ligado aos grupos vinílico e à glicose, é similar à molécula denominada secologanina (Figura 22), após reações de acoplamento e lactonação, que está presente em muitos alcaloides isolados de espécies de *Psychotria* tais como estrictosidina (Patthy-Lukáts et. al., 1997), palicosida (Morita et. al., 1989) e estrictosamida (Faria et. al., 2010).

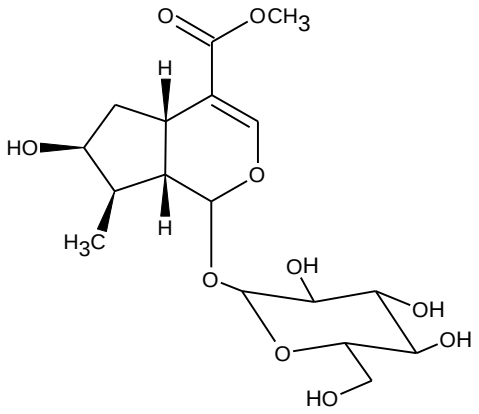
Figura 22. Estrutura da porção secologanina de alcaloides indólicos-terpenicos isolados de *Psychotria*.



Outra variação estrutural da secologanina pode ser observada na fusão entre o anel tetraidropirano e a lactona de cinco membros, a qual foi definida

como sendo *cis* através da correlação NOESY entre o próton H-17 (δ_H 6,88) do anel lactônico com o próton aromático do grupo β-carbolínico H-5 (δ_H 8,65). Essa estereoquímica está de acordo as configurações de alguns iridóides previamente isolados de *P. leiocarpa* (asperulosídeo) e de *P. rígida* (loganina, Figura 23) (Lopes et. al., 2004).

Figura 23. Estrutura da loganina.



A substância **I** foi identificada como sendo 1-5-etenil-6-{[3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi}tetraidro-4H-furo[2,3-b]piran-2(3H)-one-9*H*-pirido[3,4-b]indol, e nomeada como cartagenina.

De acordo com uma busca realizada na base de dados do Dicionário de Produtos Naturais, do inglês: Dictionary of Natural Products 28.2 (http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml) e no banco de dados Scifinder®, a substância **I** ainda não foi descrita na literatura em nenhum produto natural ou sintético.

Tabela 14. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para substância **I** - cartagenina.

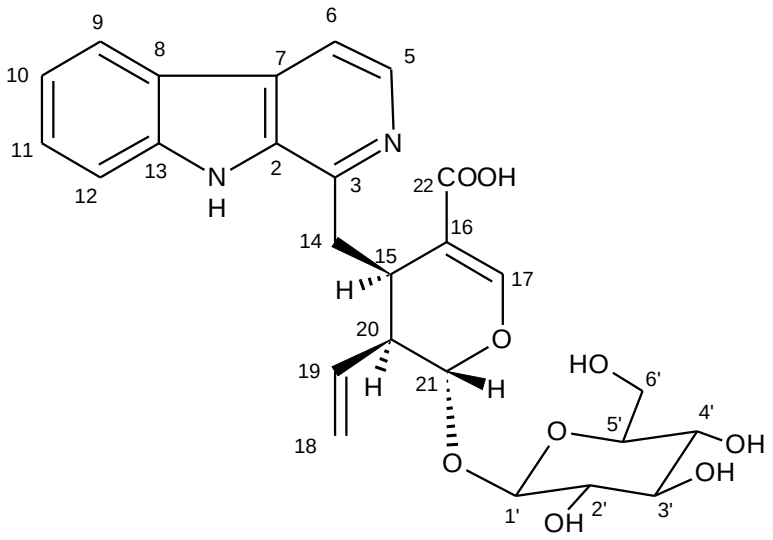
No.	δ_C (Hz) (100 MHz, MeOD)	δ_H (*J*, Hz) (400 MHz, MeOD)	Mult.	HMBC	COSY	NOESY
2	135,0	-	C ar	H16b	-	-
3	140,0	-	C ar	H5, H6, H16a, H16b, H17	-	-
5	134,5	8,65 (br,d, 6,5)	CH ar	H17	H6, H17	H6, H17
6	117,6	8,62 (br,d, 6,5)	CH ar	H5, H9	H5, H9	H5, H9
7	134,3	-	C ar	H5, H6	-	-
8	121,4	-	C ar	H6, H9, H10, H11	-	-
9	124,5	8,42 (dt, 8,0, 1,5)	CH ar	H11, H12	H6, H10, H11	H6, H10
10	123,4	7,49 (ddd, 8,0, 7,0, 1,5)	CH ar	H11, H12	H9, H11	H9, H11
11	133,6	7,81 (dtd, 8,0, 7,0, 7,0, 1,5)	CH ar	H9, H10	H9, H10, H12	H10, H12
12	113,9	7,78 (dd, 8,0, 1,5)	CH ar	H9, H10	H11	H11
13	146,1	-	C ar	H9, H11	-	-
14	44,1	3,56 (m)	CH	H16b	H15, H17, H20	-
15	30,9	3,30 (m)	CH	H14, H16a, H16b, H17, H19	H14, H16a	-
16a	27,8	*a*: 3,89 (dd, 20,0, 7,0)	CH_2	-	H15, H16b	H16b
16b	27,8	*b*: 4,01 (br, d, 20,0)	CH_2	-	H16a	H16a
17	89,4	6,88 (s, 1,8)	CH	H5, H14	H5, H14, H15	H5
18a	119,3	Ha: 5,35 (ddd, 11,0, 2,0, 1,5)	CH_2	-	H18b, H19, H20	H18b, H19

18b	119,3	Hb: 5,39 (ddd, 17,5, 2,0, 1,5)	CH_2	-	H18a, H20	H18a, H19
19	135,9	5,95 (dddd, 17,5, 11,0, 7,0, 1,5)	CH	H18a, H18b, H21	H18a, H20	H18a, H18b
20	44,5	2,97 (dd, 7,0, 2,0)	CH	H14, H16a, H18a, H18b, H19, H21	H14, H15, H18b, H19	H21
21	96,0	4,79 (d, 10,0)	CH	H1', H17, H19, H20	H20	H20
22	171,2	-	C=O	H14, H17, H16b	-	-
1'	100,5	4,39 (d, 7,8)	CH anomérico	H2', H3', H5', H21	H2'	H2'
2'	74,5	3,12 (d, 7,8)	CH	H3'	H1', H3'	H1'
3'	77,8	3,25 (dd, 9,0, 9,0)	CH	H1', H2', H5'	H2', H4'	-
4'	71,5	3,08 (dd, 10,0, 9,0)	CH	H2', H3', H5', H6'a, H6'b	H3', H5'	-
5'	78,2	2,98 (m, 9,5, 7,0)	CH	H1', H6'b	H4', H6'b	H6'b
6'a	62,6	3,58 (dd, 9,5, 2,5)	CH_2	H4', H5'		H6'b
6'b	62,6	3,33 (dd, 11,8, 7,0)	CH_2	-	H5'	H6'a

Legenda: Mult. = multiplicidade; ar= aromático; m= multipleto; s = singleto;
d = dubleto; dd= duplo dubleto; ddd= duplo dubleto duplo; dtd= duplo tripleto duplo; dddd= duplo duplo dubleto duplo.

5.4.2 Substância II

Figura 24. Proposta da estrutura da substância **II** - ácido lialosídico.



A substância **II** foi isolada, como um sólido amarelo, da fração hidrometanólica do extrato em etanol das folhas e do extrato em etanol dos caules de *P. carthagenensis* e apresentou $[\alpha]^{25}_{D}$ –203,3 (*c* 1,46 g/100 mL; MeOH:H_2O, 9:1). A substância **II** demonstrou máximo de absorção no ultravioleta em 210 nm, obtido em detector por arranjos de diodos (PDA, 190-450 nm) em análise por CLUAE-EMAR-IES em eluição com gradiente de ACN em H_2O, ambos acidificados com ácido fórmico 0,1% v/v (Apêndice B1).

O espectro de massas da substância **II** (Apêndice B2), obtido por ionização por "*electrospray*" (IES), forneceu o pico do íon molecular em *m/z* 513,1871, consistente com a fórmula $C_{26}H_{28}N_2O_9$ (massa molecular = 512,17777 g/mol).

O espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOD) da substância **II** (Apêndice B3) apresentou seis sinais na região de aromáticos, entre δ 7,44 e δ 8,47, que foram atribuídos aos prótons ligados aos carbonos aromáticos do núcleo *β*-carbolínico (H-5, H-6, H-9, H-10, H-11 e H-12) (Tabela 15).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) da substância **I** (Apêndice B4) apresentou sinais correspondentes a 26 átomos de carbono. A partir da análise do espectro DEPT-135 (Apêndice B5) foi possível determinar a natureza dos carbonos, o que confirmou a presença seis carbonos metínicos aromáticos,

oito carbonos metínicos alifáticos, sendo cinco deles pertencentes a unidade glicosídica, dois carbonos metilênicos, sete carbonos desprotonados, quatro carbonos olefínicos e ausência de carbonos metílicos. Alguns carbonos apresentaram deslocamentos químicos característicos de carbonos de ligação dupla (δ_C 109,5; δ_C 120,3; δ_C 134,6 e δ_C 155,4), carbono de carbonila (δ_C 170,2), carbonos hidroxilados relativo a porção do glicosilada (δ_C 63,0, δ_C 71,7, δ_C 74,7, δ_C 78,5 e δ_C 78,7) e um carbono anomérico (δ_C 100,4) (Tabela 15) (Silverstein, 2007).

Apesar da substância **II** ter apresentado a mesma massa molecular que a substância **I**, sua principal diferença foi em relação à porção monoterpênica da molécula. A análise do espectro de HSQC da substância **II** (Tabela 15) permitiu a observação das correlações diretas C-H: (δ_H 3,55-3,59/δ_C 33,4, H-14a/C-14; δ_H 3,52-3,55/δ_C 35,8, H-15/C-15; δ_H 7,63/δ_C 155,4, C-17; δ_H 5,20/δ_C 120,3, H-18b/C-18; δ_H 5,93/δ_C 135,0, H-19/C-19, δ_H 2,73/δ_C 45,5, H-20/C-20 e δ_H 5,87/δ_C 97,1, H-21/C-21) que revelaram a presença de uma porção seco-iridoide, além da confirmação da unidade glicosídica pela observação das correlações dos sinais de hidrogênio δ_H 3,23 a δ_H 4,83 com os cinco carbonos metínicos e um metilênico entre δ_C 100,4 e δ_C 63,0. Todos esses sinais caracterizaram a presença de um derivado da secologanina (Figura 22). A diferença dessa parte da estrutura da substância **II** em relação à secologanina é a presença de um sinal de carbono em δ_C 170,2 (C-22) de um grupo carboxila ao invés de um carbono de um grupo éster (na secologanina).

O posicionamento da unidade glicosídica na estrutura derivada do seco-iridoide foi possível através da análise das correlações do espectro de HMBC. Tal análise permitiu a observação da correlação do sinal do H-1' (δ_H 4,83, d, *J*=7,8 Hz) com o sinal do C-21 (δ_C 97,1/δ_H 5,87).

Assim, a substância **II** foi identificada por meio das análises obtidas a partir dos espectros de RMN 1 e 2D (Tabela 12), espectrometria de massas e dados da literatura (Nonato et. al., 1995) como sendo o ácido lialosídico, cujo isolamento e caracterização no gênero *Psychotria* ainda não foi reportado, sendo esta a primeira vez em que a substância **II** foi isolada neste gênero, em especial na *P. carthagenensis*.

Em 1994, o ácido lialosídico (substância **II**) foi isolado do extrato metanólico das cascas do caule de *Sickingia tinctoria* e *Sickingia williamsii* utilizando Sephadex LH-20 e CLAE-FR e caracterizado por RMN ^{1}H e ^{13}C, espectrometria de massas e dados físicos (Aquino et. al., 1994).

O ácido lialosídico foi também isolado após partição ácido-base, seguida de cromatografia de troca iônica, cromatografia em permeação em gel e CLAE-FR, do extrato em etanol de folhas de *Ophiorrhiza acuminata* (Rubiaceae) (Nonato et al. 1995).

A substância **II** foi novamente isolada do extrato metanólico da planta inteira da espécie *Ophiorrhiza liukiuensis* e dos caules de *Simira grazielae* (Rubiaceae), através da partição líquido-líquido, seguida de técnicas cromatográficas (Kitajima et. al., 2005; Sanches et. al., 2015).

Tabela 15. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para substância **II** - ácido lialosídico.

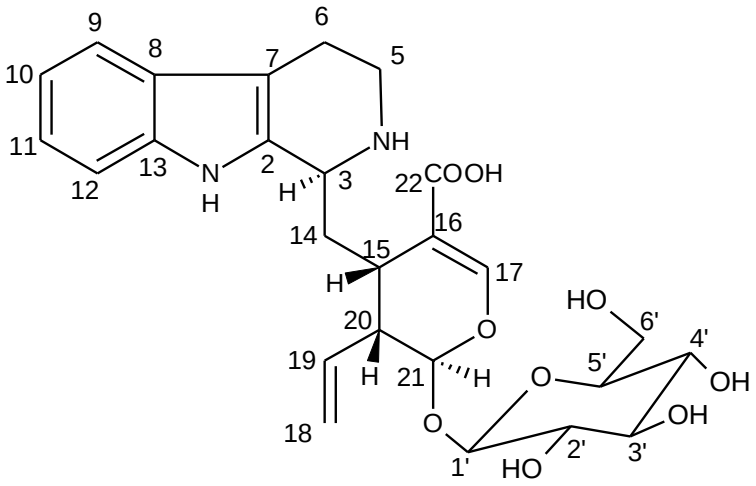
No.	δ_C (Hz) (100 MHz, MeOD)	δ_H (*J*, Hz) (400 MHz, MeOD)	Mult.	HMBC Correlações $^{(2-3)}J_{C-H}$	Dados da literatura	
					δ_C (100 MHz, MeOD)	δ_H (*J*, Hz) (400 MHz, MeOD)
2	136,0	-	C ar	H5, H14a, H14b	136,8	-
3	141,7	-	C ar	H5, H6, H14a, H14b, H15	146,6	-
5	130,1	8,30 (d, 6,0)	CH ar	H6	137,1	8,18 (d)
6	116,5	8,47 (d, 6,0)	CH ar	H5	114,1	8,01 (d, 5,2)
7	134,6	-	C ar	H5	131,2	-
8	121,5	-	C ar	H6, H9, H10, H11, H12	123,1	-
9	124,1	8,36 (d, 8,0)	CH ar	H12	123,5	8,19 (d)
10	122,9	7,44 (ddd, 8,0, 6,5, 2,0)	CH ar	H11, H12	121,6	7,29 (t, 7,6)
11	132,9	7,74 (dd, 8,0, 2,0)	CH ar	H9, H10	130,6	7,59 (t, 7,4)
12	113,8	7,78 (ddd, 8,5, 7,0, 2,0)	CH ar	H9, H10	114,1	7,74 (d, 8,2)
13	145,1	-	C ar	H9, H10, H11, H12	143,6	-
14a	33,4	3,55 - 3,59 (m)	CH_2	H15, H17, H20	36,6	3,39 (t, 8,0)
14b	33,4	3,62 (dd, 12,0, 7,0)	CH_2	-	36,6	3,71 (m)
15	35,8	3,52 - 3,55 (m)	CH	H14b, H17, H20, H21	37,8	3,57 (m)
16	109,5	-	=C	H14a, H14b, H15, H17, H20	115,4	-

17	155,4	7,63 (s)	=CH	H14a, H15, H21	151,4	7,41 (s)
18a	120,3	5,21 (dd, 18,0, 2,0)	$=CH_2$	-	119,4	4,91 $_{trans}$ (d, 17,0)
18b	120,3	5,20 (dd, 10,5, 2,0)	$=CH_2$	H20	119,4	4,83 $_{cis}$ (d, 10,0)
19	135,0	5,93 (ddd, 17,0, 10,5, 8,0)	=CH	H15, $H18_{trans}$, H20, H21	137,2	5,92 (ddd, 17,0, 10,0, 8,5)
20	45,5	2,73 (td, 8,0, 5,0)	CH	H15, H17, $H18_{trans}$, $H18_{cis}$, H19	47,2	2,64 (m)
21	97,1	5,87 (d, 8,0)	CH	H1', H15, H17, $H18_{trans}$, H19, H20	97,9	5,65 (d, 7,0)
22	170,2	-	COOH	H15, H17	170,0	-
1’	100,4	4,83 (d, 7,8)	CH $_{anomérico}$	H2', H3', H5', H21	101,1	4,77 (d, 7,8)
2’	74,7	3,23 (dd, 9,5, 8,0)	CH	H1', H3', H4'	75,4	3,20 (t, 8,0)
3’	78,5	3,42 (t, 9,0)	CH	H1', H2'	78,7	3,30 (qt, 9,0)
4’	71,7	3,27 (dd, 10,0, 8,5)	CH	H2', H3', H6'a, H6'b	72,4	3,23 (t, 9,0)
5’	78,7	3,39 (dd, 10,0, 2,0)	CH	H4', H6'b	79,2	3,41 (q, 9,0)
6’a	63,0	3,98 (dd, 12,0, 2,0)	CH_2	H3', H4', H5'	63,7	3,74 (m)
6’b	63,0	3,68 (dd, 12,0, 6,5)	CH_2	-	63,7	3,95 (dd, 12,0, 1,2)

Legenda: Mult.= multiplicidade; ar= aromático; m= multipleto; s= singleto;d= dubleto; dd= duplo dubleto; ddd= duplo dubleto duplo, q= quinteto; tq= tripo quinteto.
Dados da literatura: Nonato et. al., 1995.

5.4.3 Substância III

Figura 25. Proposta da estrutura da substância **III** - ácido estrictosidínico.



A substância **III** foi isolada, do extrato em etanol dos caules de *P. carthagenensis*, como um sólido que apresentou $[\alpha]^{25}_{D}$ –132,4 (*c* 0,64 g/100 mL; MeOH) e máximo de absorção no ultravioleta em 215 nm, obtido em detector de arranjo de diodos (PDA, 190 – 450 nm) após análise por CLUAE-EMAR-IES e eluição com gradiente de ACN em H_2O, ambos solventes acidificados com ácido fórmico 0,1% v/v (Apêndice C1).

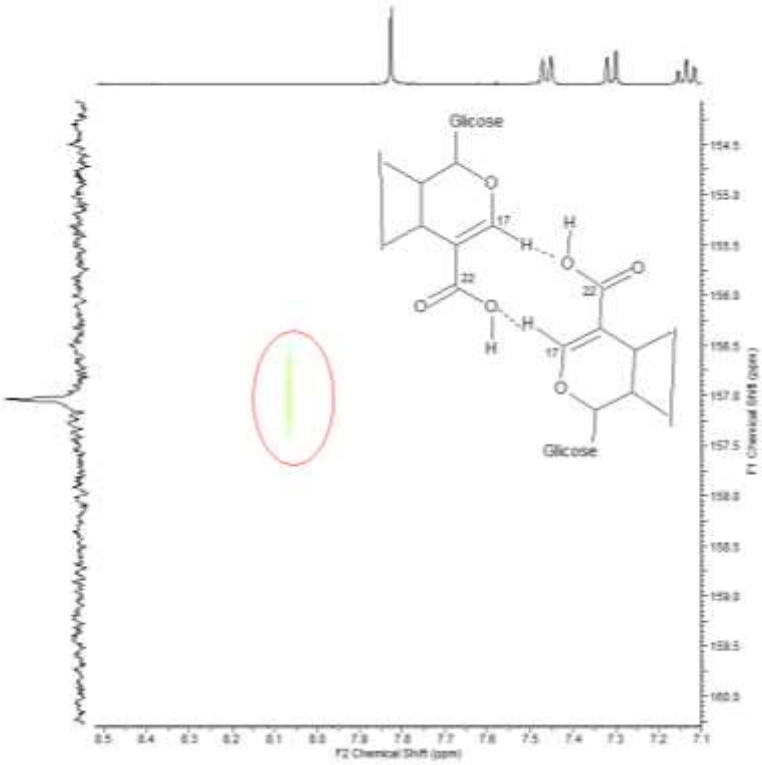
O espectro de massas (Apêndice C2), obtido por ionização por "*electrospray*" (IES) da substância **III**, forneceu o pico do íon molecular em *m/z* 517,2177 $[M+H]^+$, consistente com a fórmula $C_{26}H_{32}N_2O_9$ (massa molecular = 516,21137 g/mol).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) da substância **III** (Apêndice C4) apresentou 26 átomos de carbono, o mesmo número de carbonos das substâncias **I** e **II**. Porém, através de sua fórmula molecular, foi constatado que a substância **III** possui quatro átomos de hidrogênio a mais do que a substância **II**. A partir da análise comparada do espectro DEPT-135 (Apêndice C5), foi possível determinar a natureza dos carbonos, o que confirmou a presença de dois carbonos metilênicos, com deslocamentos químicos característicos de carbonos alifáticos em δ_C 42,8 e δ_C 19,6 (C-5 e C-6) (Tabela 16) (Silverstein, 2007) e a presença de cinco prótons entre δ_H 3,02 e δ_H 4,62 (H-3, H-5a, H-5b, H-6a e H-6b), além da presença de um carbono metínico em δ_C 53,0 (C-3) em

relação à substância **II.** Portanto, a principal diferença estrutural foi a presença de um núcleo tetraidro-β-carbolina na substância **III.**

A maior diferença entre os valores de deslocamento (δ_C) do composto isolado e os valores encontrados na literatura ocorreu com os valores do carbono da carbonila (C-22) e com os valores dos carbonos da ligação dupla vizinha a carbonila (C-16 e C-17). Isto pode ocorrer devido à ionização ou quelação, através de ligação de hidrogênio, da carbonila e pela possibilidade de formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o oxigênio do ácido e o hidrogênio da dupla ligação vizinha (H-17). Em uma expansão no espectro de RMN 2D – HMBC, Figura 26, foi verificado um vestígio de correlação entre C-17 (δ_C 157,0) e um sinal de próton em δ_H 8,07, que pode ser o sinal de um próton ácido ligado ao C-17 de outra molécula, através de uma interação intermolecular.

Figura 26. Expansão no espectro de RMN 2D – HMBC da substância III - ácido estrictosidínico.



Deste modo, a substância **III** foi identificada como sendo o ácido estrictosidínico, um alcaloide indólico monoterpênico glicosilado (Farias, 2006).

A substância **III** apresentou valor de atividade ótica de $[\alpha]^{25}_{D}$ –132 (*c* 0,64 g/100 mL; MeOH), que está em concordância com os dados da literatura que

foram de $[\alpha]^{20,9}_{D}$ –136,23º (*c* 0,1; metanol) (Naves, 2014) e de $[\alpha]^{25}_{D}$ –143,14º (*c* 0,1; metanol) (Farias, 2006).

O ácido estrictosidínico foi isolado, pela primeira vez no gênero *Psychotria,* das partes aéreas da *Psychotria myriantha* (Farias, 2006). Posteriormente, o ácido estrictosidínico também foi isolado do extrato metanólico das folhas de *Psychotria acuminata*, (Berger et. al., 2012) e do extrato em etanol das folhas de *Psychotria hoffmannseggiana* (Naves, 2014).

Tabela 16. Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para substância **III** - ácido estrictosidínico.

No.	δ_C (Hz) (100 MHz, MeOD)	δ_H (J, Hz) (400 MHz, MeOD)	Mult.	HMBC Correlações (2-3) J_{C-H}	Dados da literatura	
					δ_C (100 MHz, MeOD)	δ_H (*J*, Hz) (100 MHz, MeOD)
2	130,2	-	C ar	H3, H14a, H14b, H15	130,5	-
3	53,0	4,62 (ddd, 11,5, 3,0)	CH	H5a, H5b, H14a, H14b, H15	52,2	4,45 (d, 11,0)
5a	42,8	3,41 (m)	CH_2	-	43,0	3,23
5b	42,8	3,75 (dt, 12,4, 5,0)	CH_2	H6a, H6b	43,0	3,70
6a	19,6	3,06 (m)	CH_2	H5a, H5b	19,5	3,00
6b	19,6	3,02 (m)	CH_2	-	19,5	3,00
7	107,2	-	C ar	H5a, H5b, H6a, H-9	107,2	-
8	127,5	-	C ar	H9, H10, H11, H12	127,5	-
9	119,2	7,46 (ddd, 7,8, 1,0)	C ar	H10, H11, H12,	119,0	7,45 (d, 7,8)
10	120,7	7,04 (ddd, 7,8, 7,2, 1,0)	CH ar	H11, H12	120,5	7,03 (t, 7,8)
11	123,6	7,14 (ddd, 8,0, 7,2, 1,0)	CH ar	H9, H10, H12	123,3	7,13 (t, 7,6)
12	112,3	7,31 (ddd, 8,0, 1,0, 1,0)	CH ar	H9, H10	112,1	7,31 (d, 8,2)
13	138,3	-	CH ar	H9, H10, H11	138,1	-
14a	34,9	2,36 (ddd, 15,0, 12,0, 3,0)	CH_2	H6b, H15, H17, H20	35,1	2,13 (m)
14b	34,9	2,21 (ddd, 15,0, 12,0, 3,0)	CH_2		35,1	3,36 (m)
15	32,7	3,03 (m, 4,5)	CH	H14a, H14b, H17, $H18_{cis}$, H20, H21	34,0	3,02 (m)
16	109,1	-	CH	H15, H17	113,4	-
17	157,0	7,83 (br, s)	=CH	H15, H21	153,3	7,56 (s)
18a	119,7	*trans*: 5,35 (ddd, 17,5, 1,3)	$=CH_2$	H20	118,8	5,27 (d, 17,3)
18b	119,7	*cis*: 5,26 (ddd, 10,5, 1,3)	$=CH_2$	-	118,8	5,20 (d, 10,5)

19	135,6	5,85 (m, 17,5, 10,5, 7,5)	CH_2	$H18_{trans}$, H20, H21	136,2	5,88 (m)
20	45,4	2,75 (ddd, 9,0, 7,5, 5,0)	=CH	H14a, H14b, H15, H17, $H18_{cis}$, $H18_{trans}$, H19, H21	45,6	2,71 (m)
21	97,2	5,86 (d, 9,0)	CH	H1', H17, H19, H20	96,5	5,83 (d, 9,5)
22	172,9	-	COOH	H15, H17	175,9	-
1’	100,5	4,81 (d, 7,9)	CH anomérico	H2', H3', H5', H21	100,3	4,82 (d, 7,8)
2’	74,7	3,22 (dd, 9,0, 2,4)	CH	H2', H3',	74,7	3,22 (m)
3’	78,0	3,42(m)	CH	H2', H4'	77,9	3,42 (t, 9,1)
4’	71,9	3,24 (m)	CH	H2', H3', H5', H6'a, H6'b	71,7	3,20 (m)
5’	78,9	3,37 (dd, 7,0, 2,3)	CH	H2', H4'	78,7	3,40 (m)
6’a	63,1	3,65 (dd, 11,8, 7,0)	CH_2	-	63,1	3,70 (dd, 11,8, 7,0)
6’b	63,1	3,99 (dd, 11,8, 2,3)	CH_2	H4', H5'	63,1	4,03 (dd, 11,8, 1,6)

Legenda: Mult.= multiplicidade; ar= aromático; m= multipleto; s= singleto; d= dubleto; dd= duplo dubleto; td= triplo dubleto.
Dados da literatura: Sanches, 2019.

5.5 Avaliação da atividade antileishmania dos extratos etanólicos brutos de folhas e caules de espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae)

O gênero *Psychotria* é amplamente estudado em relação à sua fitoquímica, etnobotânica, farmacologia e quimiotaxonomia e, demonstra diversas atividades biológicas, dentre as quais podemos destacar a atividade antileishmania. Espécies pertencentes a este gênero são usadas pelos povos tradicionais para tratar diversos males. Esse gênero se destaca pela presença de alcaloides, uma classe de metabólitos secundários que possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura científica (Souza, Mendonça e Silva, 2013; Calixto et. al., 2016).

Foram produzidos extratos em etanol das folhas e caules de *P. carthagenensis* e de *P. hoffmannseggiana*, por ser um solvente menos tóxico e possuir a capacidade de extrais substâncias de diversas polaridades.

Uma triagem inicial com os extratos brutos de *P. carthagenensis* e de *P. hoffmannseggiana*, na concentração de 20,0 µg/mL, foi realizada contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

(IFLA/BR/67/PH-8). Entretanto, nenhum extrato foi considerado ativo (dados não mostrados). Em estudos de triagem realizados no LQPNB, extratos são considerados ativos, quando ao serem testados a 20 µg/mL, apresentam atividade antileishmania superior a 70%. Os extratos foram retestados na concentração de 200,0 µg/mL e também foram considerados inativos. Os extratos que apresentaram melhor atividade a 200,0 µg/mL foram das folhas de *P. hoffmannseggiana* (49 ± 2 %) e dos caules de *P. carthagenensis* (46 ± 0 %) (Tabela 17).

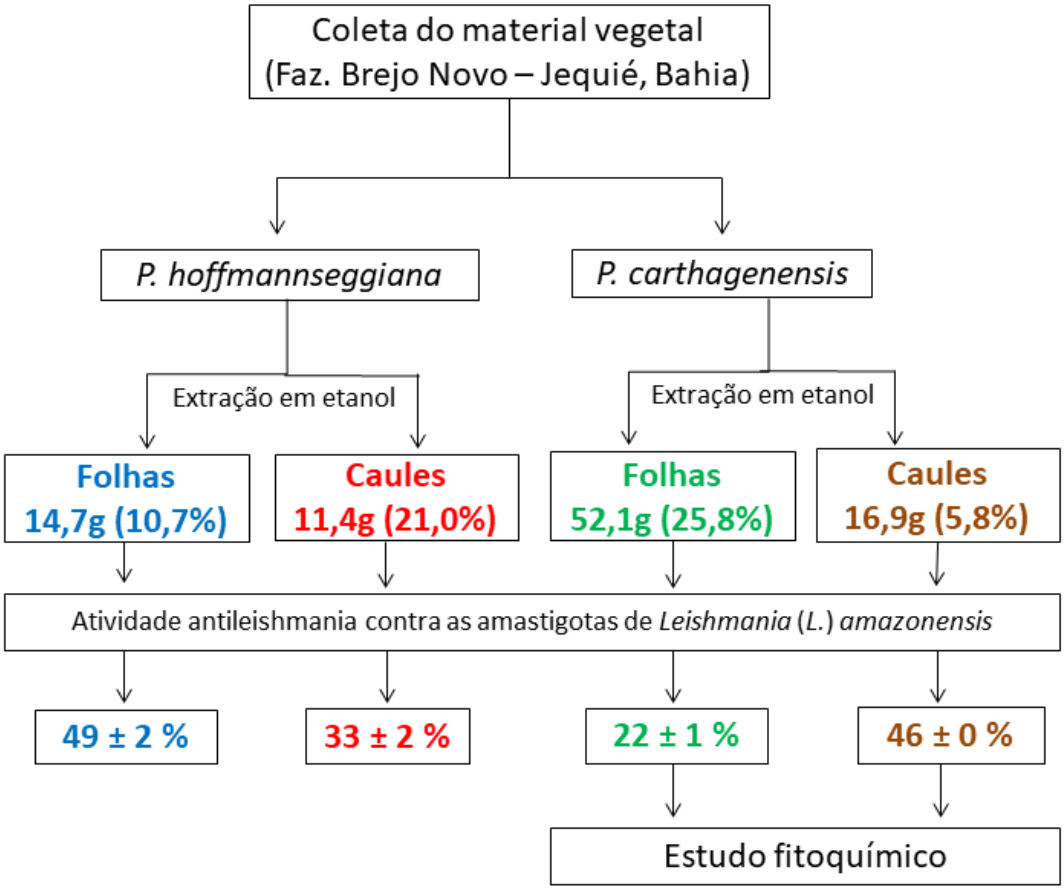
Tabela 17. Atividade antileishmania dos extratos brutos das espécies coletadas de *Psychotria* contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*.

Amostra	Atividade antileishmania (%)
P. carthagenensis (folhas)	22 ± 1
P. carthagenensis (caules)	46 ± 0
P. hoffmannseggiana (folhas)	49 ± 2
P. hoffmannseggiana (caules)	33 ± 2
Anfotericina B	85 ± 3
Dimetilsulfóxido	3 ± 10

Dados: *c* = 200,0 µg/mL da amostra utilizada no ensaio biológico.

A seguir, na Figura 27, pode ser observado o fluxograma da triagem da atividade antileishmania realizada com espécies de *Psychotria* (*P. carthagenensis* e *P. hoffmannseggiana*) que foram coletadas na região de Jequié, no sudoeste da Bahia.

Figura 27. Fluxograma da triagem da atividade antileishmania realizada com espécies de *Psychotria*.



A revisão bibliográfica realizada para essas duas espécies (*P. carthagenensis* e *P. hoffmannseggiana*) demonstrou que não existem estudos sobre isolamento e caracterização de metabólitos secundários, bem como avaliação de atividade antiprotozoária, em especial da atividade antileishmania para a espécie *P. carthagenensis.* Estes fatores influenciaram na escolha dessa espécie para o prosseguimento da investigação química.

5.5.1 Atividade antileishmania das frações brutas provenientes do extrato em etanol das folhas de *Psychotria carthagenensis*

A partição líquido-líquido foi realizada com o extrato bruto em etanol das folhas de *P. carthagenensis*, a fim de obter frações com diferentes polaridades, as quais foram destinadas, mais uma vez, para a avaliação biológica, contra a formas amastigotas-*like* de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8),

cujo resultado é exposto na Tabela 18. Nesse ensaio, as frações obtidas em hexano, diclorometano acetato de etila e hidrometanólica foram testadas na concentração de 200,0 µg/mL.

A fração hidrometanólica do extrato das folhas de *P. carthagenensis* foi a escolhida para continuidade dos estudos fitoquímicos e biológicos por apresentar um aumento da atividade antileishmania em relação ao seu extrato original (de 22% para 52%), devido à disponibilidade de massa e por apresentar resultado positivo para a presença de alcaloides através de sua análise por CCD com o revelador específico de alcaloides, o reagente de Dragendorff, segundo o item 4.4.1 e 4.4.2.

Tabela 18. Atividade antileishmania das frações obtidas após a partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas de *P. carthagenensis* contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*.

Fração	Atividade antileishmania (%)
Hexano	51 ± 1
Diclorometano	48 ± 1
Acetato de etila	47 ± 0
Hidrometanólica	52 ± 1
Anfotericina B	86 ± 6
Dimetilsulfóxido	10 ± 4

Dados: *c* = 20,0 µg/mL, da fração utilizada no ensaio biológico.

Foram utilizadas técnicas de isolamento e purificação – CCMP e CLAE-FR semipreparativo, e obteve-se 2 substâncias isoladas do extrato em etanol das folhas de *P. carthagenensis* – cartagenina (substâncias **I**) e o ácido lialosídico (substâncias **II**) (Figura 13).

5.5.2 Atividade antileishmania dos grupos provenientes do extrato bruto em etanol dos caules de *Psychotria carthagenensis*

Foi realizada a avalição da atividade antileishmania a 20 µg/mL, contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8), utilizando-se os 80 grupos provenientes do fracionamento do extrato em etanol

dos caules de *P. carthagenensis* por CLAE-FR em escala semipreparativa (Tabela 19).

Tabela 19. Avaliação da atividade antileishmania realizada com os 80 grupos provenientes do fracionamento do extrato em etanol dos caules de *P. carthagenensis*.

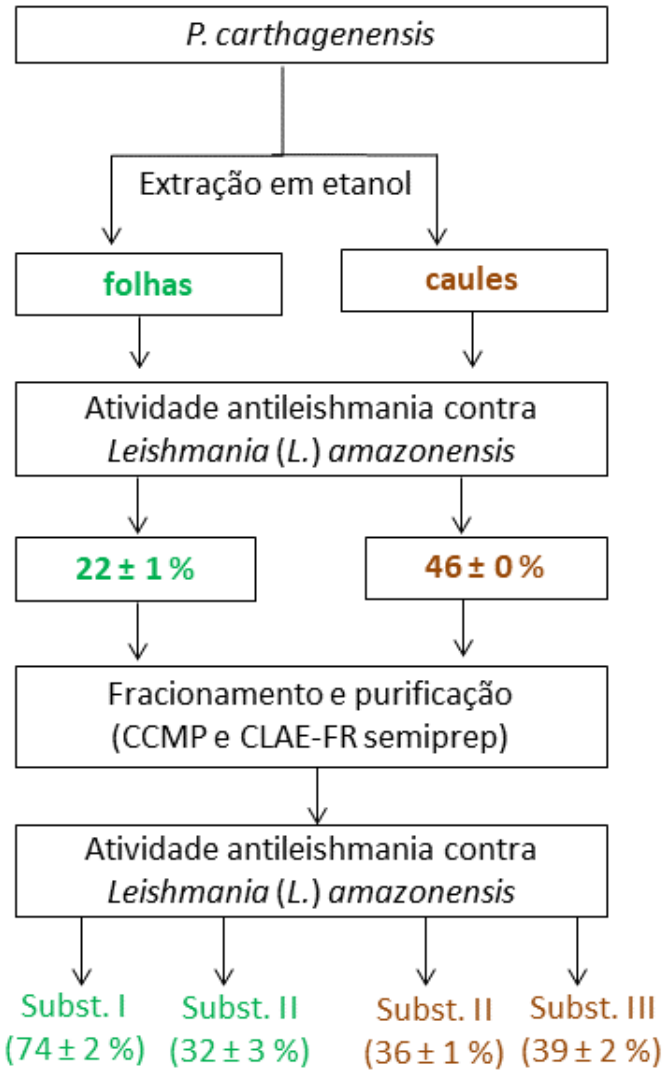
Grupo	Resultado (%)		Grupo	Resultado (%)
1-7	-		45	28 ± 1
8	33 ± 1		46	34 ± 1
9	45 ± 3		47	33 ± 1
10	34 ±1		48	42 ± 3
11	31 ± 1		49	45 ± 2
12	36 ± 1		50	33 ± 1
13	27 ± 0		51	33 ± 1
14	41 ± 1		52	35 ± 1
15	7 ± 0		53	31 ± 1
16	38 ± 2		54	58 ± 5
17	47 ± 2		55	34 ± 0
18	42 ± 2		56	42 ± 2
19	37 ± 1		57	46 ± 4
20	34 ± 1		58	48 ± 1
21	39 ± 1		59	45 ± 2
22	41 ± 0		60	43 ± 1
23	39 ± 3		61	43 ± 1
24	39 ± 3		62	38 ± 1
25	43 ± 0		63	35 ± 1
26	34 ± 1		64	43 ± 4
27	35 ± 1		65	46 ± 2
28	30 ± 2		66	40 ± 2
29	33 ± 2		67	44 ± 2
30	40 ± 3		68	34 ± 1

31	15 ± 0		69	38 ± 1
32	39 ± 2		70	43 ± 2
33	43 ± 2		71	36 ± 2
34	36 ± 1		72	40 ± 3
35	34 ± 2		73	42 ± 4
36	35 ± 2		74	43 ± 4
37	37 ± 1		75	40 ± 2
38	41 ± 1		76	42 ± 2
39	25 ± 0		77	35 ± 2
40	35 ± 2		78	36 ± 1
41	34 ± 3		79	37 ± 2
42	29 ± 1		80	19 ± 2
43	30 ± 1		Anfotericina B	79 ± 0
44	29 ± 1		Dimetilsulfóxido	6 ± 10

Dados: *c* = 20,0 µg/mL, de cada fração utilizada no ensaio biológico.

Apesar de nenhum grupo ter apresentado atividade superior a 70% (Tabela 19), os grupos 32 e 34 foram purificados (justificativas no item 5.3.3) e obtiveram-se os ácidos lialosídico (substância **II**) e estrictosidínico (substância **III**) (Figura 28).

Figura 28. Fluxograma da atividade antileishmania realizada com a *P. carthagenensis*, em paralelo ao estudo fitoquímico.



Todas as substâncias isoladas foram avaliadas a 20 µg/mL contra as formas amastigotas-like de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (Tabela 20). A cartagenina (substância **I**) e os ácidos estrictosidínico (substância **III**) e lialosídico (substância **II**) apresentaram atividade antileishmania de 74, 39 e 36%, respectivamente.

Tabela 20. Atividade antileishmania das substâncias isoladas das folhas e caules de *P. carthagenensis* contra as formas amastigotas-*like* de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*.

Substância	Origem	Atividade antileishmania (%)
Cartagenina (subst. **I**)	folhas	74 ± 2
Ácido lialosídico (subst. **II**)		32 ± 3
Ácido estrictosidínico (subst. **III**)	caules	39 ± 2
Ácido lialosídico (subst. **II**)		36 ± 1
Anfotericina B	-	82 ± 10
Dimetilsulfóxido	-	10 ± 6

Dados: *c* = 20,0 µg/mL, da substância utilizada no ensaio biológico.

Por ter apresentado atividade superior a 70% no ensaio de triagem, a cartagenina (substância **I**) foi testada contra formas amastigotas de *L. (Viannia) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1994/H3227) e demonstrou CI_{50} de 41 µg/mL (80,0 µM) e índice de seletividade superior a 2,5 em relação à linhagem celular de leucemia monocítica aguda ($CI_{50} > 100$ µg/mL).

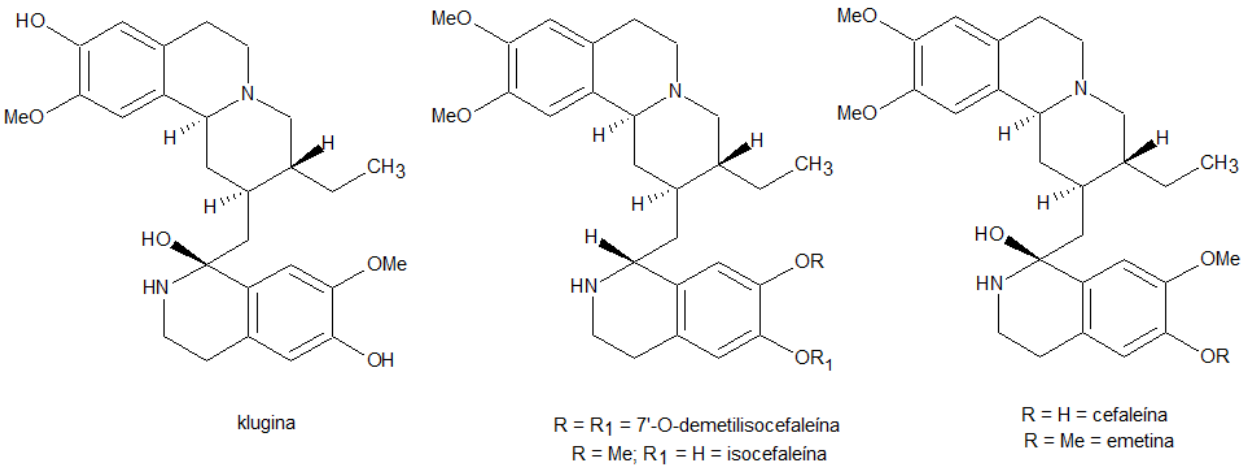
A substância cartagenina (substância **I**) apresenta similaridade com os ácidos lialosídico (substância **II**) e estrictosidínico (substância **III**) quanto à presença do esqueleto principal β-carbolínico e por ser um composto glicosilado. A cartagenina, difere desses dois ácidos por possuir ligada à posição 3 do núcleo β-carbolínico uma lactona cíclica com 5 membros em junção a um anel tetraidropirano. A cartagenina, um alcaloide de estrutura inédita e, os ácidos lialosídico e estrictosidínico foram isolados pela primeira vez como constituintes da *P. carthagenensis.* A presença da lactona na cartagenina pode ser um dos fatores responsáveis pela atividade dessa molécula. Porém, outros estudos seriam necessários para se confirmar essa diferença de atividade, visto que a porção da lactona de inúmeros PN's apresentam atividades biológicas e farmacológicas comprovadas, como citotoxidade, atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiprotozoária (Aliyu et. al., 2020; Elso et. al., 2020).

Outras espécies de *Psychotria* tiveram a atividade antileishmania de seus extratos brutos, frações ou substâncias isoladas avaliadas anteriormente, dentre

as quais podemos citar a *Psychotria kluggi*, a *Psychotria prunifolia* e a *Psychotria suterella* (Muhammad et. al., 2003; Kato et. al., 2012; Carvalho, 2015).

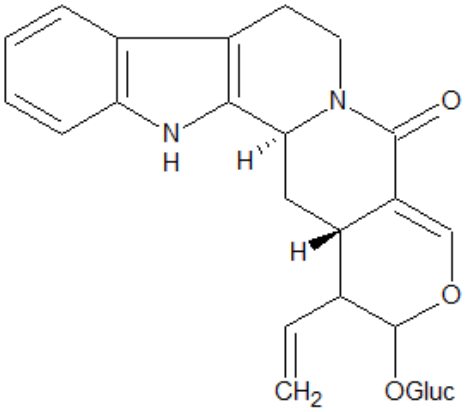
O extrato em etanol do caule da espécie *P. klugii* apresentou atividade antileishmania (CI_{50} 3,3 ± 0,8 μg/mL) contra formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Os cinco alcaloides isolados da fração alcaloídica (Figura 29), obtida por partição ácido-base do extrato bruto, demonstraram ser substâncias ativas contra *Leishmania donovani* (CI_{50} 0,03-0,45 μg/mL) e algumas mais potentes do que a pentamidina (CI_{50} 0,7 μg/mL) e a anfotericina B (CI_{50} 0,17 μg/mL), fármacos amplamente utilizados no tratamento das leishmanioses (Muhammad et. al., 2003).

Figura 29. Estrutura dos alcaloides isolados da *Psychotria kluggi.*

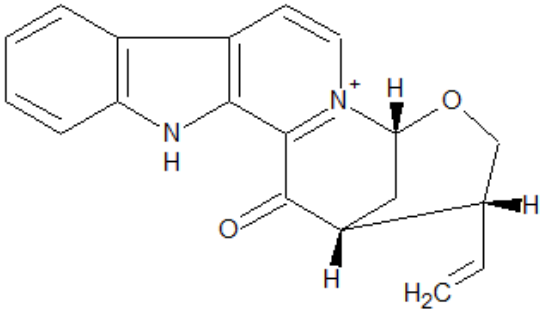


O extrato em etanol dos galhos de *P. prunifolia* foi submetido à partição ácido-base e dois compostos foram isolados e caracterizados. Os alcaloides 14-oxoprunifoleína, isolado da fração em clorofórmio acidificada e, estrictosamida, isolada da fração em acetato de etila basificada, Figura 30, apresentaram atividade biológica frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* com valores de CI_{50} de 16,0 ± 5,12 e 40,7 ± 6,08 μg/mL, respectivamente (Kato et. al., 2012).

Figura 30. Estrutura dos alcaloides 14-oxoprunifoleína e estrictosamida isolados da Psychotria prunifolia.



estrictosamida



14-oxoprunifoleína

Posteriormente, em um estudo desenvolvido por Carvalho (2015) demonstrou que o extrato em acetato de etila das folhas de *P. suterella* foi ativo contra a forma promastigota da *L. amazonensis* e apresentou CI_{50} de 10,62 μg/mL. Contudo, o isolamento dos constituintes ativos desse extrato não foi possível devido ao fato de ser uma espécie que se encontra em extinção e é de difícil aquisição pois não é comercializada (Carvalho, 2015).

Portanto, no presente trabalho com *Psychotria carthagenensis* foi possível realizar o isolamento e a elucidação de alcaloides presentes nas frações polares dos extratos brutos das folhas e dos caules dessa espécie, confirmando trabalhos prévios sobre a presença dessa classe de metabólitos secundários neste gênero. Outro ponto a se destacar foi o isolamento de um alcaloide ativo e de estrutura inédita.

6 CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos de caules e folhas de *P. carthagenensis* e de *P. hoffmannseggiana* demonstraram inibir em grau moderado, formas amastigotas-*like* de *Leishmania (L.) amazonensis,* quando testados na concentração de 200 μg/mL.

A revisão bibliográfica realizada sobre a espécie *P. carthagenensis* demonstrou ser uma espécie com escassa informação na literatura científica e ausência de relatos sobre a sua constituição química relativa a metabólitos secundários, em especial alcaloides.

Os estudos desenvolvidos confirmou a presença de alcaloides nos extratos brutos das folhas e caules de *P. carthagenensis*, espécie ocorrente no Sudoeste da Bahia, na qual foi possível o isolamento e caracterização de três alcaloides glicosídicos do grupo indólico monoterpênico: a cartagenina, um alcalóide inédito, e os conhecidos ácidos estrictosidínico e lialosídico, sendo este último isolado e identificado pela primeira vez no gênero *Psychotria*, em especial na *P. carthagenensis*.

A atividade antileishmania da cartagenina (substância **I**), comparável estatisticamente com a substância controle (anfotericina B) foi determinada em ensaios contra formas amastigotas-*like* de *L.* (*L.*) *amazonensis* e confirmada em ensaios contra formas amastigotas de *L.* (*V.*) *braziliensis*. Assim, é possível inferir que a cartagenina é um potencial agente leishmanicida, devendo ter a sua ação biológica confirmada em estudos *in vivo*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Determinar se o alcaloide cartagenina está presente no extrato etanólico dos caules;

- Determinar se há variação de atividade biológica e do teor de cartagenina em indivíduos de *P. carthagenensis,* ocorrentes em Jequié e coletados em diferentes épocas do ano;

- Avaliar a composição química dos extratos de *P. carthagenensis* utilizando ferramentas quimiométricas;

- Testar o alcaloide cartagenina frente a outros agentes causadores de DTN's, tais como a malária e doença de Chagas.

- Testar a susceptibilidade de outras espécies de leishmania na presença do alcaloide carthagenina;

- Elucidar o mecanismo de ação do alcaloide cartagenina contra formas amastigotas de *L. (Viannia) braziliensis;*

- Isolar o alcaloide cartagenina em quantidade suficiente para realizar testes *in vivo* em camundongos infectados com *Leishmania* sp.

8 REFERÊNCIAS

ABHISHEK, M.; SOMASHEKARAIAH, B. V.; DHARMESH, S. M. **In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Psychotria dalzellii* in streptozotocin-induced diabetic rats.** South African Journal of Botany. 121, 494–499. 2019. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.006

ADJIBADE, Y.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; JUNG, M. L.; BECK, J. P.; ANTON, R. **Cytotoxicity on human leukemic and rat hepatoma cell lines of alkaloid extracts of *Psychotria forsteriana*.** Planta Med. 55, 567–568, 1989.

ALIYU, A. B.; KOORBANALLY, N. A.; MOODLEY, B.; CHENIA, H. Y. **Sesquiterpene lactones from *Polydora serratuloides* and their quorum sensing inhibitory activity.** Natural Product Research, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2020.1739037

AMADOR, T. A.; VEROTTA, L.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. **Antinociceptive profile of hodgkinsine.** Planta Med. 66, 770–772, 2000. DOI:10.1055/s-2000-9604

ANISZEWSKI, T. P. **Alkaloids – secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role.** Elsevier, p. 2, 2007.

AQUINO, R.; GARAFALO, L.; TOMMASI, N.; UGAZ, O. L.; PIZZA, C. **Glucoindole alkaloids from bark of two *Sickingza* species.** Phytochemistry, Vol 37. No 5. pp. 1471-1475. 1994. DOI: 0031-9422(94)00501-X

ARAÚJO, R. C. P.; NEVES, F. A. R.; FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; STEFANELLO, M. E. A.; SOUZA, V. V.; PAVAN, F. R.; CRODA, J. **Evaluation of the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and *in vivo* acute toxicity of *Annona sylvatic*.** BMC Complement Altern. Med. 14, 209, 2014. http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-209

BARBOSA, M. R. **Simira in list of species of flora of Brazil.** Botanical Garden of Rio de Janeiro. Accessed 30 March 2014. http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14287

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. **Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*.** Pharmaceutical Biology. Vol. 42, No. 8, pp. 565–569, 2004. DOI: 10.1080/13880200490901780

BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER, H. **Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminate* (=*Psychotria acuminata*, Rubiaceae).** Phytochemistry Letters 5 (2012) 558–562. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2012.05.013

BERTELLI, P. R.; BIEGELMEYER, R.; RICO, E. P.; KLEIN-JUNIOR, L. C.; TOSON, N. S. B.; MINETTO, L.; BORDIGNON, S. A. L.; GASPER, A. L.; MOURA, S.; DE OLIVEIRA, D. L.; HENRIQUES, A. T. **Toxicological profile and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Palicourea deflexa*, a source of**

β-carboline alkaloids. Comp. Biochem. Physiol. 201, 44-50, 2017. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.09.003

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C. CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 16(Supl.): 631-637. 2006.

BOTH, F. L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. **Analgesic properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata.*** Pharmaceutical Biology. Vol. 40, No. 5, pp. 336–341, 2002. DOI: 10.1076/phbi.40.5.336.8453

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. **Psychopharmacological profile of the alkaloid Psychollatine as a 5HT2A/C serotonin modulator.** Journal of Natural Products, v.68, p. 374-380, 2005. DOI: 1020.11/np049695y

BROCKSON, T. J.; OLIVEIRA, K. T.; DESIDERÁ, A. L. **The chemistry of the sesquiterpene alkaloids.** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 28, No. 6, 933-942, 2017. http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170049

CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P. M. L.; SOLIS, P. N.; PIETERS, L.; SHAHAT, A. A.; GUPTA, M. P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. **Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques.** Phytomedicine. 8, 59-70, 2001. https://doi.org/10.1078/0944-7113-00011

CALIXTO, N. O.; CORDEIRO, M. S.; GIORNO, T. B. S.; OLIVEIRA, G. G.; LOPES, N. P.; FERNANDES, P. D.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. **Chemical constituents of *Psychotria nemorosa* Gardner and antinociceptive activity.** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 28, No. 5, 707-723, 2017. http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160219

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.** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 27, No. 8, 1355-1378, 2016. http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160149

CARVALHO JUNIOR, A. R.; BOENO, S. I. S.; PASSOS, M. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. **Identification of monoterpene indole alkaloids from *Psychotria nuda* leaves by UPLC-ESI-QTOF-MS/MS.** Anais 6th Brazilian Conference on Natural Products – BNCP, Vitória – ES. 2017. ISSN: 2594-7346.

CARVALHO JUNIOR, A. R.; FERREIRA, R. O.; PASSOS, M. S.; BOENO, S. I. S.; VIRGENS, L. L. G.; VENTURA, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; LASSOUNSKAIA, E.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C.

Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of triterpenes and alkaloids from *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra. Molecules. 24, 1026, 2019. doi:10.3390/molecules24061026

CARVALHO JUNIOR, A. R.; VIEIRA, I. J. C.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; LIMA, M. A. S.; FERREIRA, R. O.; MARIA, E. J.; OLIVEIRA, D. B. **13C-NMR spectral data of alkaloids isolated from *Psychotria* species (Rubiaceae) – review.** Molecules. 22, 103, 2017. doi:10.3390/molecules22010103

CARVALHO, P. S. L. **Avaliação de compostos derivados de plantas brasileiras na busca de protótipos a fármacos com atividade antileishmanial.** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2015.

COSTA, J. O. **Isolamento dos alcaloides presentes no extrato metanólico das folhas de *Psychotria nemorosa* Gardner (Rubiaceae) por extração em fase sólida.** Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2016.

COTA, B. B.; TUNES, L. G.; MAIA, D. N. B.; RAMOS, J. P.; OLIVEIRA, D. M.; KOHLHOFF, M.; ALVES, T. M. A.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CAMPOS, F. F.; ZANI, C. L. **Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotrichia*, an endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 113, p. 102-110, 2018.

CURRAIS, A.; CHIRUTA, C.; GOUJON-SVRZIC, M.; COSTA, G.; SANTOS, T.; BATISTA, M. T.; PAIVA, J.; MADUREIRA, M. C.; MAHER, P. **Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé e Príncipe.** J. Ethnopharmacol. 155, 830, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.046

DE SOUZA, P. A. **Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos "estados alterados da consciência" induzido por alucinógenos.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.13, n.3, p. 349-358, 2011.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. **Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges.** Rodriguésia, v. 63, n.1, p. 101-128, 2012.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. **Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades.** Rev. Quim. Nova, Vol. 36, No. 10, 1552-1556, 2013.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P. A.; PERERA, P.; BOHLIN, L. **Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assay.** Journal of Ethnopharmacology. 57, 35-56, 1997. DOI:10.1016/s0378-8741(97)00043-3

ELSO, O. G.; BIVONA, A. E.; ALBERTI, A. S.; CERNY, N.; FABIAN, L.; MORALES, C.; CATALÁN, C. A. N.; MALCHIODI, E. L.; CAZORLA, S. I.; SÜLSEN, V. P. **Trypanocidal activity of four sesquiterpene lactones isolated from *Asteraceae* species.** Molecules. 25, 2020. doi:10.3390/molecules25092014

FARIA, E. O. **Estudo fitoquímico das folhas da espécie *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm (Rubiaceae).** Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás. Goiania, 2009.

FARIA, E. O.; KATO, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; 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) Steyerm.** Phytochem. Lett. 2010, 3, 113–116. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.02.008

FARIAS, F. M. ***Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades antiquimiotáxica e sobre o sistema nervoso central.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FARIAS, F. M.; PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; BARROS, D. M.; GOTTFRIED, C.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. **Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus.** Fitoterapia. 83, 1138–1143. 2012. doi:10.1016/j.fitote.2012.04.013

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; PEREIRA, Z. V.; BAGATIN, M. C.; GAUZE, G. F. ***Psychotria leiocarpa* extract and vincosamide reduce chemically-induced inflammation in mice and inhibit the acetylcholinesterase activity.** Inflammation. 2019. DOI: 10.1007/s10753-019-01018-w

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; PEREIRA, Z. V. **Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* Leaf extracts.** Antioxidants, *3*, 745. 2014. doi:10.3390/antiox3040745

FRAGOSO, V. **Alcaloides de *Psychotria*: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R.; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. **Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell.** Toxicology. In Vitro. 22, 559, 2008. doi.org/10.1016/j.tiv.2007.11.010

GARCIA, I.; POUZET, C.; BRULAS, M.; BAUZA, E.; BOTTO, J. M.; DOMLOGE, N. **Evaluation of THP-1 cell line as an in vitro model for long-**

term safety assessment of new molecules. International Journal of Cosmetic. Science 35(6):568-574, 2013.

GARCIA, R. M. A.; OLIVEIRA, L. O.; MOREIRA, M. A.; BARROS, W. S. **Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*).** Biochemical systematics and ecology. v. 33, p. 233-243, 2005. doi.org/10.1016/j.bse.2004.08.005

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. **Leishmaniose tegumentar americana.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

GONTIJO, D. C.; LEITE, J. P. V.; NASCIMENTO, M. F. A.; BRANDRÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B. **Bioprospection for antiplasmodial activity, and identification of bioactive metabolites of native plants species from the Mata Atlântica biome, Brazil.** Natural Product Research, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1633645

GUPTA, M. P.; SOLÍS, P. N.; CALDERÓN, A. L.; GUIONNEAU-SINCLAIR, F.; CORREA, M.; GALDAMES, C.; GUERRA, C.; ESPINOSA, A.; ALVENDA, G. I.; ROBLES, G.; OCAMPO, R. **Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama.** J. Ethnopharmacol*.* 2005, *96*, 389. DOI:10.1016/j.jep.2004.08.032

HAMILTON, C. W.; Ann. Mo. Bot. Gard. 1989, 76, 67

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. **Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card.** Microbes and Infection, 16,601-606. 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.006

INÁCIO, M.; INVERNIZZI, N. **Nanotecnologias para doenças negligenciadas no Brasil: trajetórias de pesquisa, incentivos e perspectivas.** Acta Scientiarum. Human and Social Sciences, v. 41, e45769, 2019. ISSN on-line: 1807-8656. DOI: 10.4025/actascihumansoc.v41i1.45769

ISIDÓRIO, R. G. **Abordagens sintéticas para a obtenção dos alcaloides tetra-hidroquinolínicos cuspareina e galipinina e avaliação antibacteriana de alguns intermediários frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015.

KAR, A. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.** New age international publishers, New Dellhi, 2ed. 2007. ISBN (13): 978-81-224-2915-2

KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; FARIA, E. O.; RIBEIRO, L. C.; CARVALHO, B. G.; SILVA, C. C.; SHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; NAKAMURA, C. V.; BRITTA, E. A.; MIRANDA, N.; IGLESIAS, A. H.; DELPRETE, P. G. **Antiprotozoal alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm.** *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 23, No. 2, 355-360, 2012.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. **Antimicrobial activity of *Psychotria microlabastra*.** Fitoterapia. 72, 818-821, 2001.

KITAJIMA, M.; FUJII, N.; YOSHINO, F.; SUDO, H.; SAITO, K.; AIMI, N.; TAKAYAMA, H. **Camptothecins and two new monoterpene glucosides from Ophiorrhiza liukiuensis.** CHEM. PHARM. BULL. 53 (10) P. 1355—1358, 2005. DOI: 10.1248/CPB.53.1355

LIMA, L. B. **Triagem da atividade antioxidante e antiacetilcolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis*.** Dissertação de mestrado. USP, Ribeirão Preto - SP, 2011.

LIMA, L. B.; SILVA, J. F.; POTT, A.; CARDOSO, C. L. **Avaliação antioxidante e antiacetilcolinesterase das folhas e caules de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae).** Anais da 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo, 2010.

LIU, Y.; WANG, J. S.; WANG, X. B.; KONG, L. Y. **Two novel dimeric indole alkaloids from the leaves and twigs of *Psychotria henryi*.** Fitoterapia. 86, 178, 2013. DOI:10.1016/j.fitote.2013.03.013

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J.; **Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology. 49, 23-32, 1995. DOI:10.1016/0378-8741(95)01299-0

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

MAGEDANS, Y. V. S.; MATSUURAA, H. N.; TASCA, R. A. J. C.; WAIRICH, A.; JUNKES, C. F. O.; COSTA, F.; FETT-NETO, A. G. **Accumulation of the antioxidant alkaloid brachycerine from *Psychotria brachyceras* Müll. Arg. is increased by heat and contributes to oxidative stress mitigation.** Environmental and Experimental Botany 143 (2017) 185–193. http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.09.008

MAHMUD, Z.; MUSA, M.; ISMAIL, N.; LAJIS, N. H. **Cytotoxic and bacteriocidal activities of *Psychotria rostrata*.** Int. J. Pharmacogn. 31, 142–146, 1993.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 3ª ed. Fortaleza, Edições UFC, 2009.

MATSUURA, H. N.; FETT-NETO, A. G. **The major indole alkaloid N,b-D-glucopyranosyl vincosamide from leaves of *Psychotria leiocarpa* Cham.**

& Schltdl. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity. Natural Product Research. Vol. 27, Nos. 4–5, 402–411, 2013. http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.715293

MATSUURA, H. N.; FRAGOSO, V.; PARANHOS, J. T.; RAU, M. R.; FETT-NETO, A. G. **The bioactive monoterpene indole alkaloid N,β-D-glucopyranosylvincosamide is regulated by irradiance quality and development in *Psychotria leiocarpa*.** Industrial Crops and Products 86, 210–218, 2016. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.050

MATSUURA, H. N.; PORTO, D. D.; FETT-NETO, A. G. **Bioactive alkaloids from South American *Psychotria* and related Rubiaceae.** Natural Products, 2013. DOI 10.1007/978-3-642-22144-6_101

MATSUURA, H. N.; POTH, A. G.; YENDO, A. C. A.; FETT-NETO, A. G.; CRAIK, D. J. **Isolation and characterization of cyclotides from Brazilian *Psychotria*: significance in plant defense and co-occurrence with antioxidant alkaloids.** J. Nat. Prod. 79, 12, 3006-3013, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00492

MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P.; ANDRADE, A. O.; ALENCAR, S. R.; MACHADO, M. E. **Prospecção fitoquímica de *Psychotria colorata* (Willd. Ex. R. & S.) Müll. Arg. e *P. hoffmannseggiana* (R. & S.) Müll. Arg.** Caderno de Cultura e Ciência, Ano IX, v.13, n.2, Mar, 2015. ISSN 1980-5861

MENEZES, J. A. **Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga.** Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2014.

MOHIUDDIN, A. K. **Chemistry of secondary metabolites.** Annals of Clinical Toxicology. 2(1): 1014, 2019.

MORITA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; ITOKAWA, H.; MOTIDOME, M. A. **New indole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*.** Planta Med. 1989, 55, 288–289. DOI: 10.1055/s-2006-962007

MOURA, L. T. S.; MARUO, V. M. **Aspectos farmacológicos e toxicológicos de *Psychotria colorata* – revisão.** Rev. Cient. Eletr. Med. Vet. 23, 1, 2014.

MUHAMMAD, I.; DUNDAR, D. C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; BEDIR, E.; TAKAMATSU, S.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A. **Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*.** Journal of Natural Products. 66(7), 962-967, 2003. DOI: 10.1021/np030086k

MUSTEATA, F. M.; SANDOVAL, M.; RUIZ-MACEDO, J. C.; HARRISON, K.; MCKENNA, D.; MILLINGTON, W. **Evaluation of in vivo solid phase microextraction for minimally invasive analysis of nonvolatile**

phytochemicals in Amazonian plants. Analytica Chimica Acta. 933, 124-133, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.053

NASCIMENTO, N.; FRAGOSO, V.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R.; 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, v.48, p. 728-734, 2007. doi.org/10.1002/em.20349

NAVES, R. F. **Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria hoffmannseggiana* Roem. & Schult (Rubiaceae).** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana.** São Paulo. Editora Atheneu, 13 ed. 2016. 494 p. ISBN 978-85-388-0715-5

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.** J. Nat. Prod. 2016, 79, 629−661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055

NONATO, M. G.; TRUSCOTT, R. J.; CARVER, J. A.; HEMLING, M. E.; GARSON, M. J. **Glucoindole alkaloids from *Ophiorrhiza acuminata***. Planta Med. 61(3):278-80. 1995. DOI: 10.1055/s-2006-958074

OLIVEIRA, A. M.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. **β-carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae).** Biochemical Systematics and Ecology. 50, 339–341, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.04.015

OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; VILLAS BÔAS, G. K. **Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos.** Revista Fitos, Rio de Janeiro, Vol. 8(1): 1-72, Jan-Mar 2013.

Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas**. Nº 7 - Março, 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

PATTHY-LUKÁTS, A.; KÁROLYHÁZY, L.; SZABÓ, L.F.; PODÁNYI, B. **First direct and detailed stereochemical analysis of strictosidine.** J. Nat. Prod. 1997, 60, 69–75. https://doi.org/10.1021/np960324u

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; GOMES, M. L. S.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. **Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil.** Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 20(1):107-110, jan-mar 2011. doi: 10.5123/S1679-49742011000100012

PIMENTA, A. A. T.; BRAZ-FILHO, R.; DELPRETE, P. G.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. **Unusual monoterpene indole alkaloids from**

***Psychotria stachyoides* Benth.** Biochemical Systematics and Ecology, v. 38, p. 846-849, 2010. doi:10.1016/j.bse.2010.07.013

Psychotria in **Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14167>. Acesso em: 29 Jan. 2020

QUEIROZ, G. S.; LUZ, A. B. G.; NASCIMENTO, M. V. P. S.; THOMASI, S. S.; FERREIRA, A. G.; DALMARCO, E. M.; BRIGHENTE, I. M. C. **Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae).** Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 7 (04), pp. 168-173, April, 2017. DOI: 10.7324/JAPS.2017.70425

RAMACHANDRAN, P.; ZHANG, N.; MCLAUGHLIN, W. B.; LUO, Y.; HANDY, S.; DUKE, J. A.; VASQUEZ, R.; OTTESEN, A. **Sequencing the vine of the soul: full chloroplast genome sequence of *Banisteriopsis caapi*.** Genome Announc 6:e00203-18. 2018. https://doi.org/10.1128/genomeA.00203-18.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte.** Quim. Nova, Vol. 26, No. 4, 550-555, 2003.

RAZAFINTSALAMA, V. E.; RASOARIVELO, S. T. R.; RANDRIAMIALINORO, F.; RANARIVELO, L.; RAKOTONANDRASANA, S. R.; PETIT, T.; SARTER, S. **Antibacterial activities of fourteen medicinal plants from the endemic plant diversity of Madagascar.** South African Journal of Botany 112 (2017) 303–306. http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.06.006

RIBEIRO, L. C. **Metabólitos secundários obtidos através do estudo das raízes de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm (Rubiaceae), transformações e ensaios biológicos de seu extrato.** Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBORA-FILHO, J. M. **A review of natural products with antileishmanial activity.** Phytomedicine, 12. 514–535, 2005. doi:10.1016/j.phymed.2003.10.006

ROY, G.; DUMAS, C.; SERENO, D.; WU, Y.; SINGH, A. K.; TREMBLAY, M. J.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. **Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models.** Molecular Biochemical Parasitology 110(2):195-206, 2000. DOI: 10.1016/s0166-6851(00)00270-x

SANCHES, M. N. G. **Estudo fitoquímico e biológico de *Simira grazielae* (Rubiaceae).** Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2019.

SANCHES, M. N. G.; CHAVES, D. S. A.; CARVALHO, M. G.; ARAÚJO, M. F.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ FILHO, R. **Three glucosyl alkaloids from *Simira Grazielae* P. Rubiaceae.** Anais 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP. Atibaia - SP, 2015. ISBN: 978-85-66836-10-3.

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

SANTOS, R. G.; BOUSO, J. C.; HALLAK, J. E. C. **Ayahuasca, dimethyltryptamine, and psychosis: a systematic review of human studies.** Therapeutic Advances in Psychopharmacology, Vol. 7(4) 141–157, 2017. DOI: 10.1177/ 2045125316689030

SANZ-BISET, J; CAÑIGUERAL, S. **Plant use in the medicinal practices known as "strict diets" in Chazuta valley (Peruvian Amazon).** Journal of Ethnopharmacology. v. 137, p. 271–288, 2011. doi:10.1016/j.jep.2011.05.021

SILVA-PIRES, F. E. S.; BONATTO, M. P. O.; MELLO, M. L. B. C.; TRAJANO, V. S.; ARAÚJO-JORGE, T. C. **As doenças negligenciadas e os determinantes sociais da saúde no contexto da investigação em ensino.** Revista de Educação, Ciência e Cultura, v. 22, n. 1, p. 51-59, 2017. ISSN 22236-6377. http://dx.doi.org/10.18316/recc.v22i1.3344

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007. 387 p. ISBN 85-216-1221-3

SIMÕES-PIRES, C. A.; FARIAS, F. M.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN. **Indole monoterpenes with antichemotactic activity from *Psychotria myriantha*: chemotaxonomic significance.** Natural Product Communications Vol. 1 (12) 2006

SOARES, D. B. S. **Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais. 2015. UFMG/ICEx/DQ.1.078 D. 591

SOARES, D. B. S.; DUARTE, L. P.; CAVALCANTI, A. D.; SILVA, F. C.; BRAGA, A. D.; LOPES, M. T. P.; TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA-FILHO, S. A. ***Psychotria viridis*: chemical constituents from leaves and biological properties.** Anais da Academia Brasileira de Ciências (2017) 89(2): 927-938. dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160411

SOUZA, R. K. D. S.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. **Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil.** Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 18, n.1, p. 140-156, 2013.

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas.** Academia Brasileira de Ciências Rio de Janeiro. 2010. ISBN: 978-85-85761-30-1

SUTHA, S.; MOHAN, V. R.; KUMARESAN, S.; MURUGAN, C.; ATHIPERUMALSAMI, T. **Ethnomedicinal plants used by the tribals of Kalakad-Mundanthurai Tiger Reserve (KMTR), Western Ghats, Tamil Nadu for the treatment of rheumatism.** Indian J. Tradit. Know. 2010, 9, 502.

TAKAYAMA, H.; MORI, I.; KITAJIMA, M.; AIMI, N.; LAJIS, N. H. **New type of trimeric and pentameric indole alkaloids from *Psychotria Rostrata.*** Org. Lett., Vol. 6, No. 17, 2004. DOI: 10.1021/ol048971x

TRAN, P. H.; LE, V. D.; DO, T. H.; NGUYEN, T. L.; NGUYEN, P.T.; NGUYEN, T. T.; NGUYEN, T. D. **Anti-inflammatory constituents from *Psychotria prainii* H. Lév.** Natural Product Research, 2017. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1408095

VICENTINI, A. R. **Prospecção de inibidores da acetilcolinesterase em plantas da família Rubiaceae na Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), UFES, Alegre - ES, 2017.

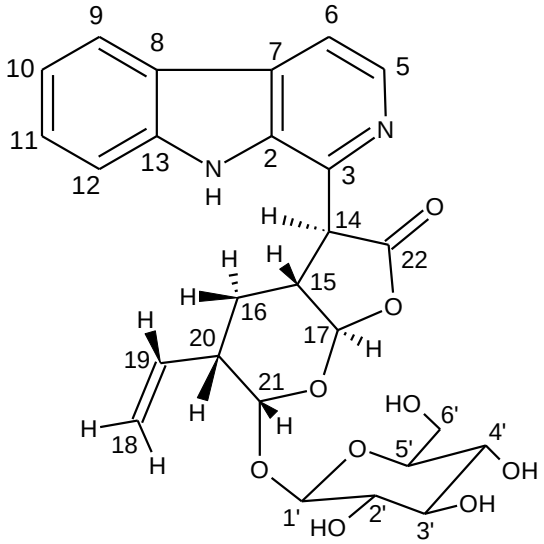
VILLASMIL, J.; ABAD, M. J.; ARSENAK, M.; FERNANDEZ, A.; RUIZ, M. C.; WILLIAMS, B.; MICHELANGELI, F.; HERRERA, F.; TAYLOR, P. **Citotoxic and antitumor activities of Venezuelan plant extracts *in vitro* and *in vivo*.** Pharmacologyonline. *3*, 808-816, 2006.

WAGNER, H.; BLADT. S. **Plant drug analysis.** 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

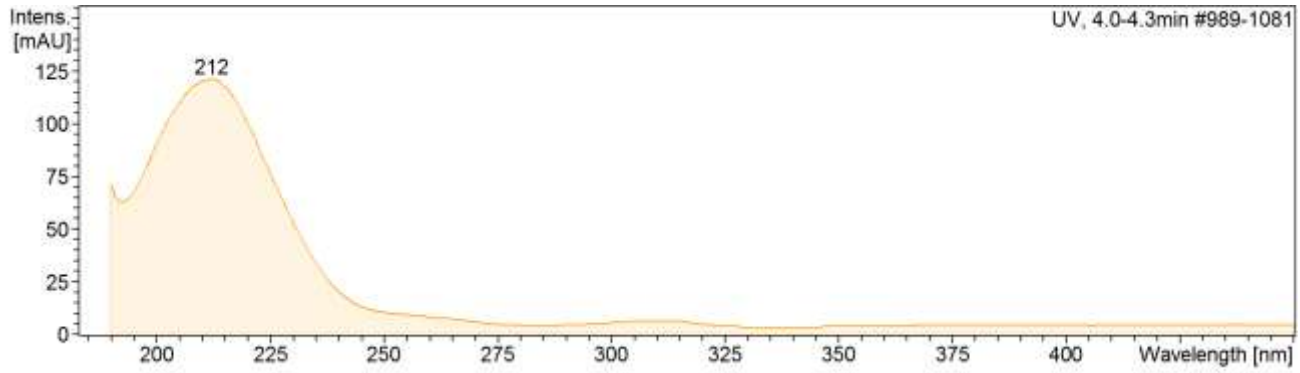
WANG, Y. M.; WU, A. Z.; ZHONG, Y.; PENG, G. T.; FAN, Q.; ZHU, C. C.; ZHANG, C. X. **New glycosylsphingolipids from *Psychotria serpens* L.** Natural Product Research. Vol. 34, n. 14, 2095–2100, 2020. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1574789

9 APÊNDICES

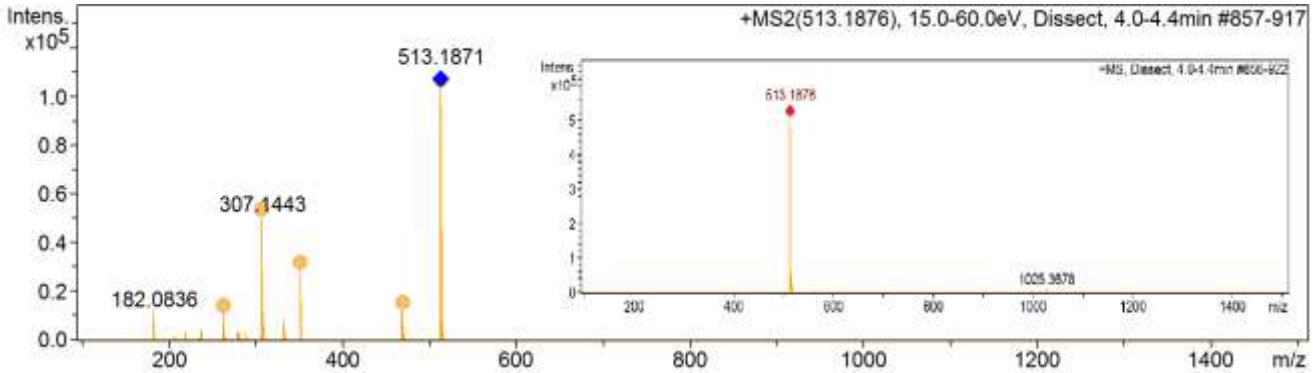
9.1 Apêndice A – Dados estruturais da substância I - cartagenina



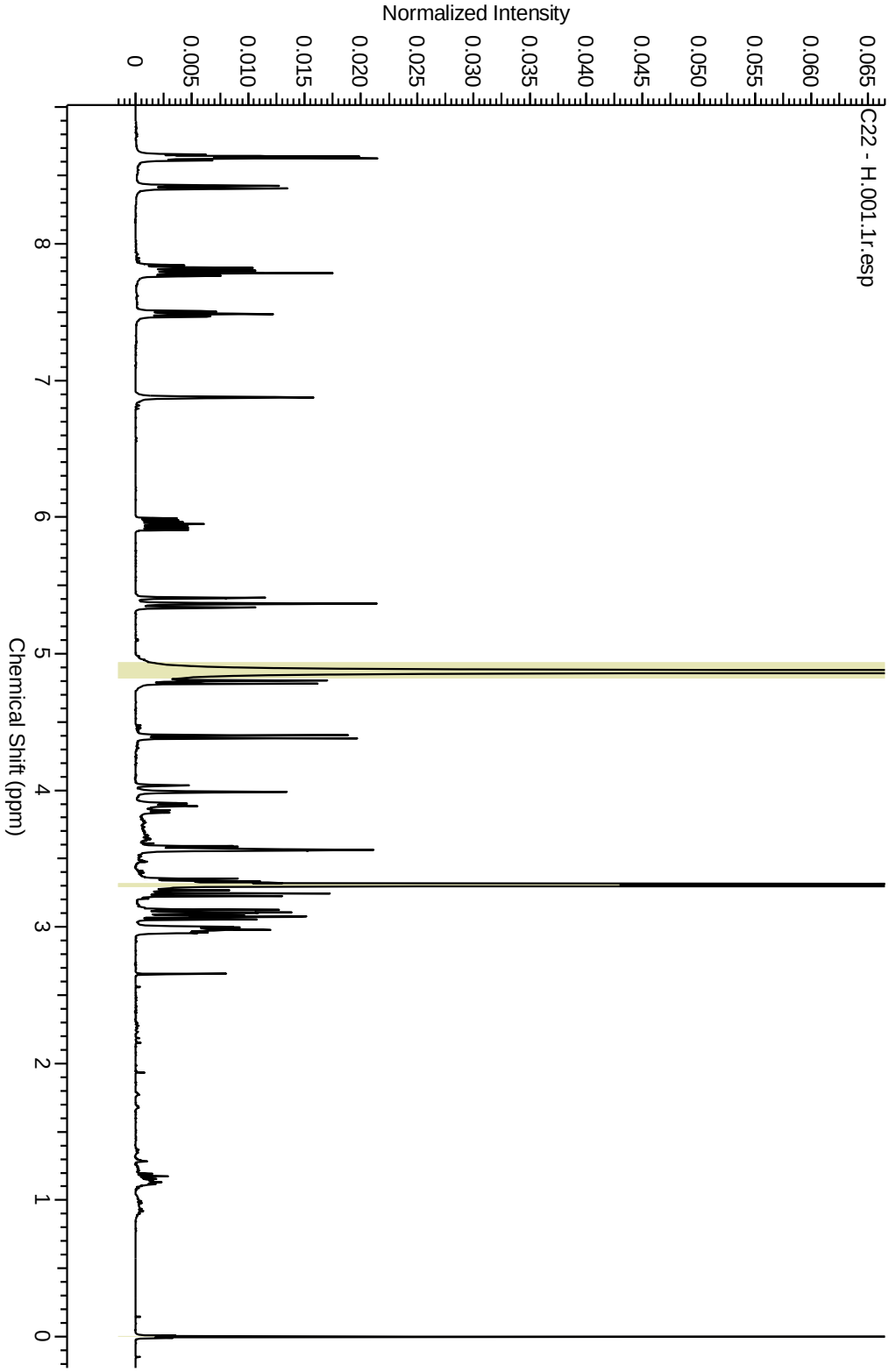
9.1.1 A1 – Espectro de absorção no ultravioleta da substância I - cartagenina

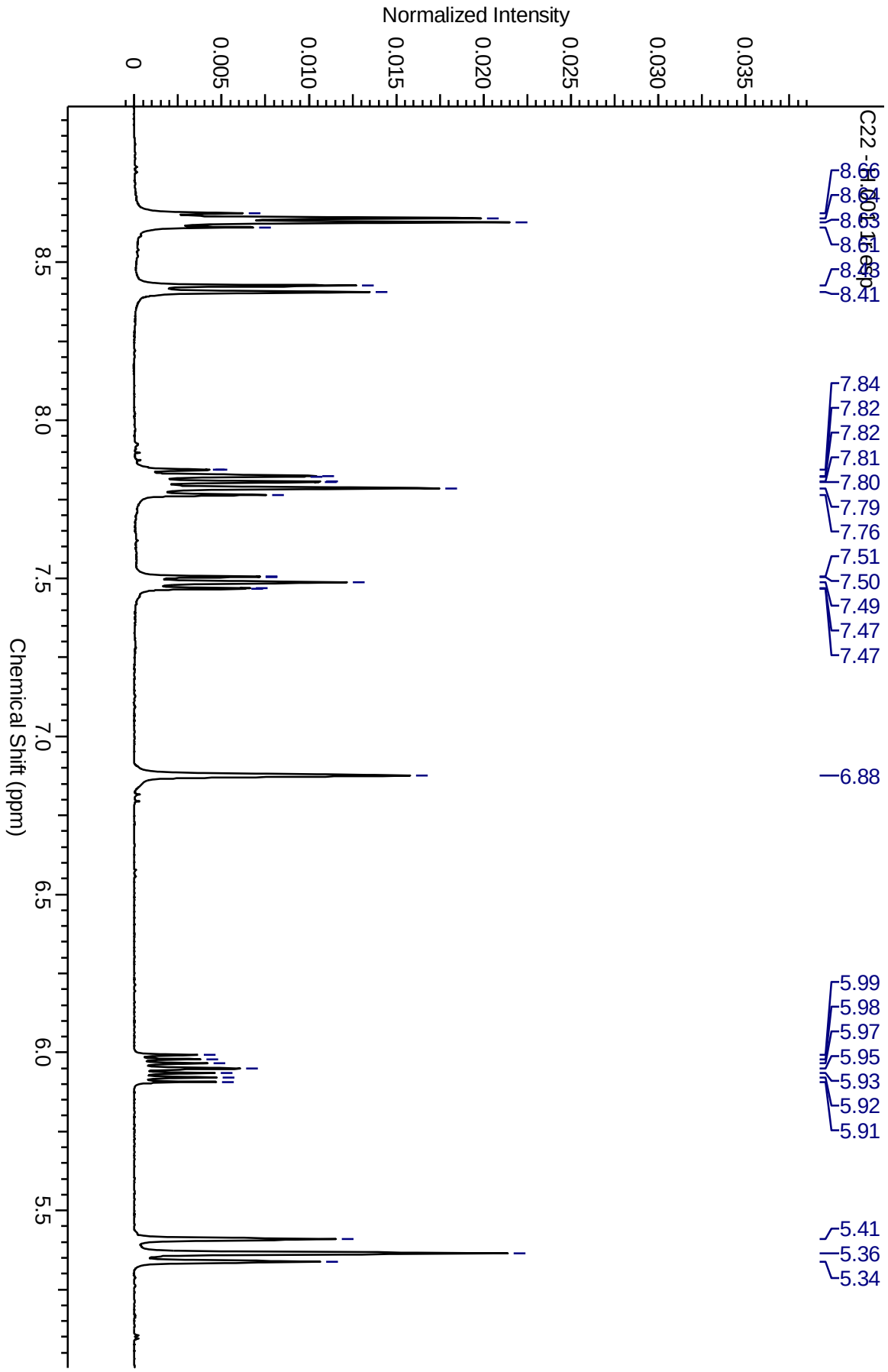


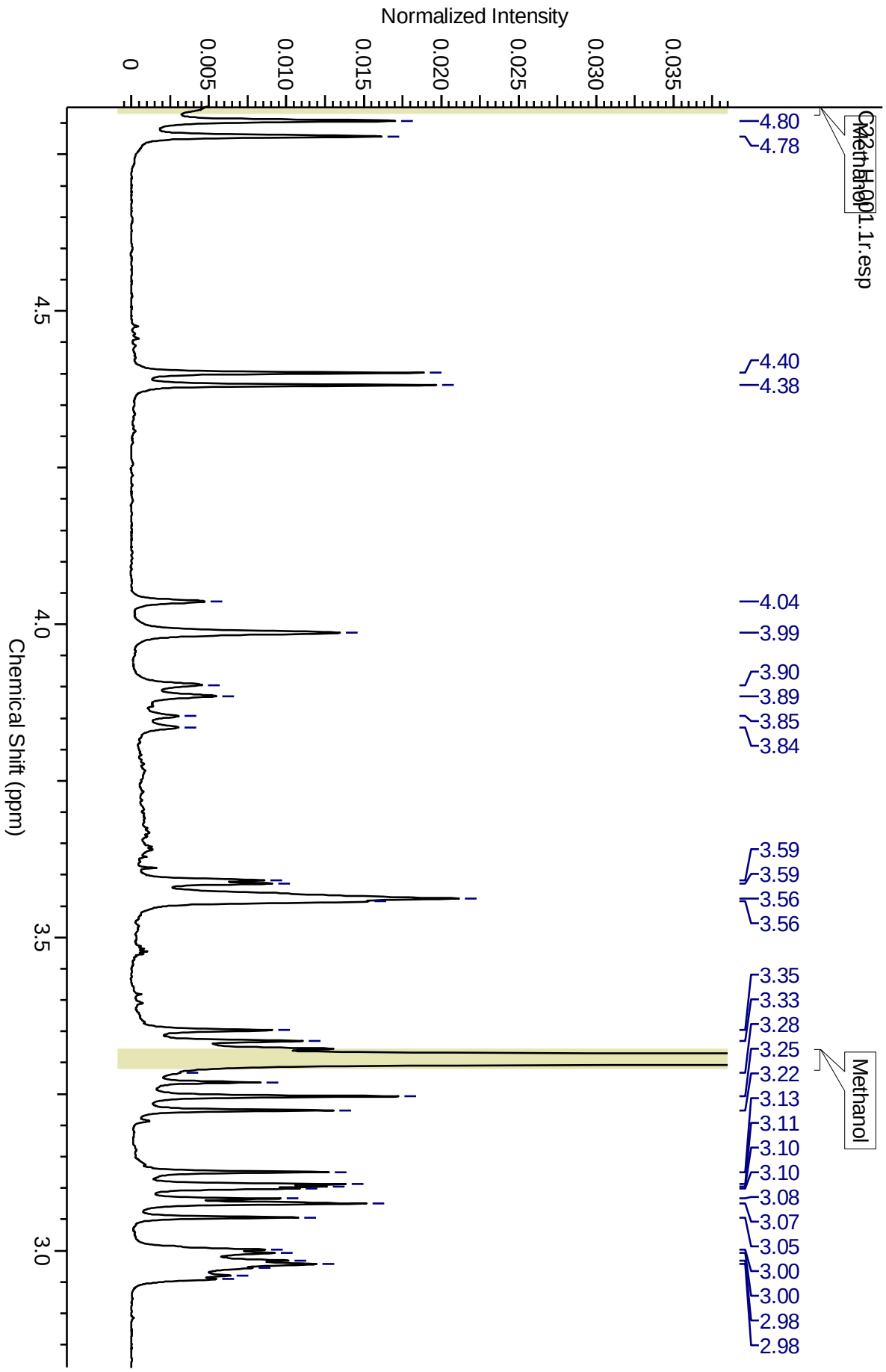
9.1.2 A2– Espectro de massas da substância I - cartagenina



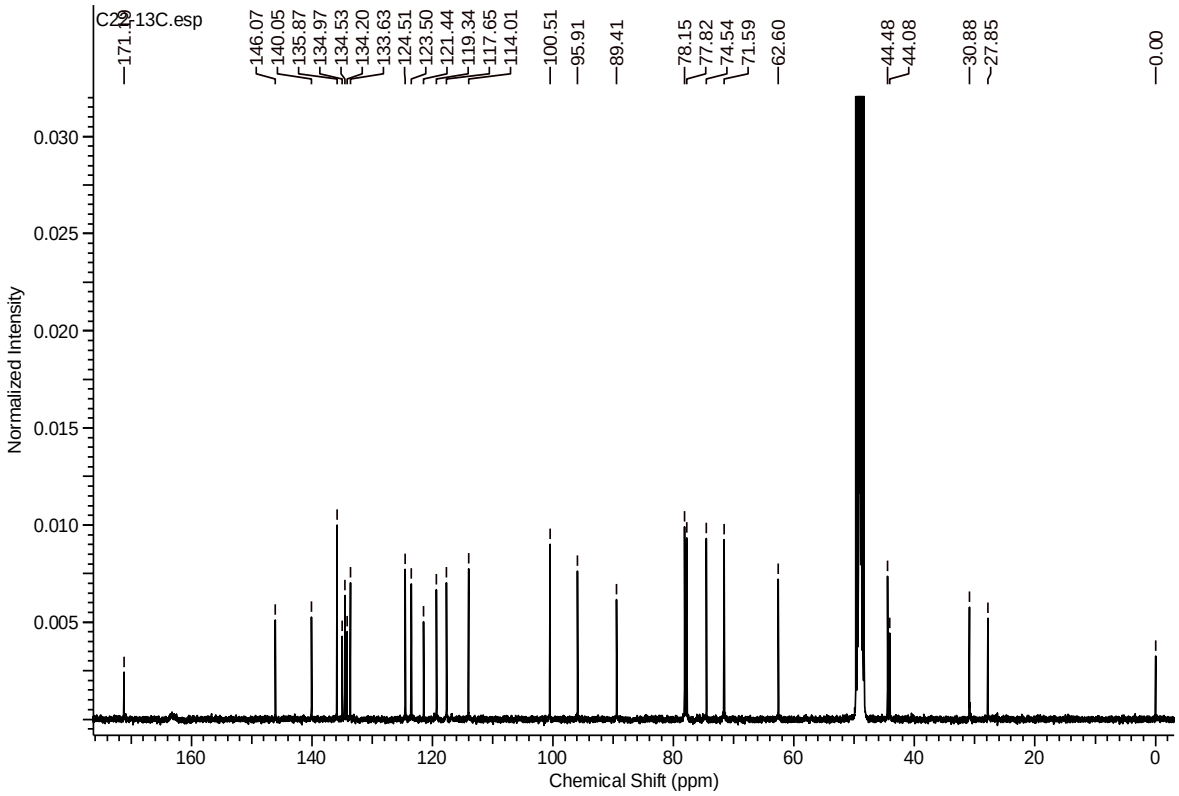
9.1.3 A3 – Espectro de RMN ^{1}H obtido em MeOD a 400 MHz da substância I - cartagenina



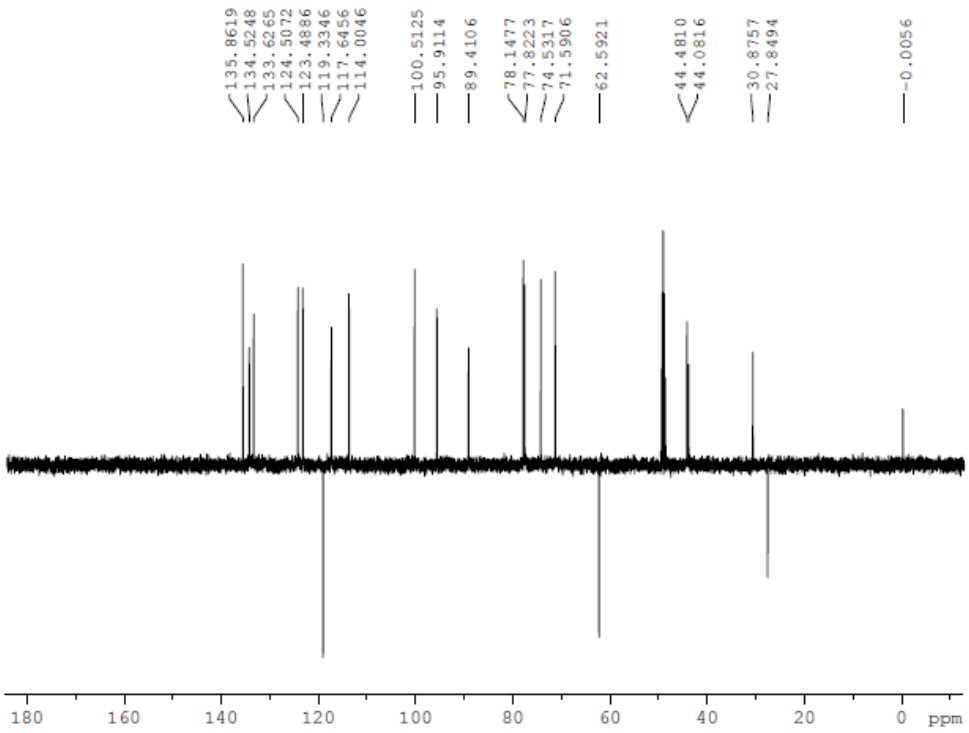

C22 - 6b
Normalized Intensity
0
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
0.030
0.035
8.66
8.64
8.63
8.61
8.43
8.41
7.84
7.82
7.82
7.81
7.80
7.79
7.76
7.51
7.50
7.49
7.47
7.47
6.88
5.99
5.98
5.97
5.95
5.93
5.92
5.91
5.41
5.36
5.34
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
Chemical Shift (ppm)


Methanol
C32
Methanol001.1r.esp
Normalized Intensity
0
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
0.030
0.035
4.80
4.78
4.40
4.38
4.04
3.99
3.90
3.89
3.85
3.84
3.59
3.59
3.56
3.56
3.35
3.33
3.28
3.25
3.22
3.13
3.11
3.10
3.10
3.08
3.07
3.05
3.00
3.00
2.98
2.98
Methanol
4.5
4.0
3.5
3.0
Chemical Shift (ppm)

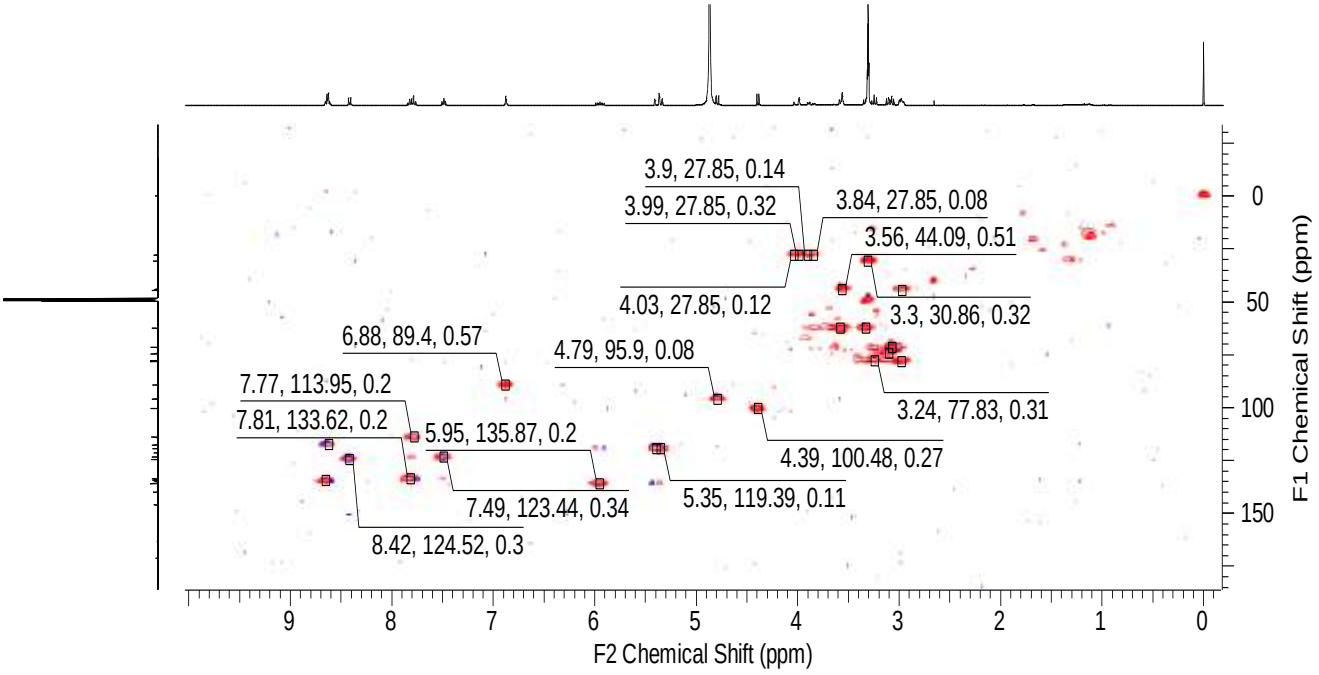
9.1.4 A4 – Espectro de RMN ^{13}C obtido em MeOD a 100 MHz da substância I - cartagenina



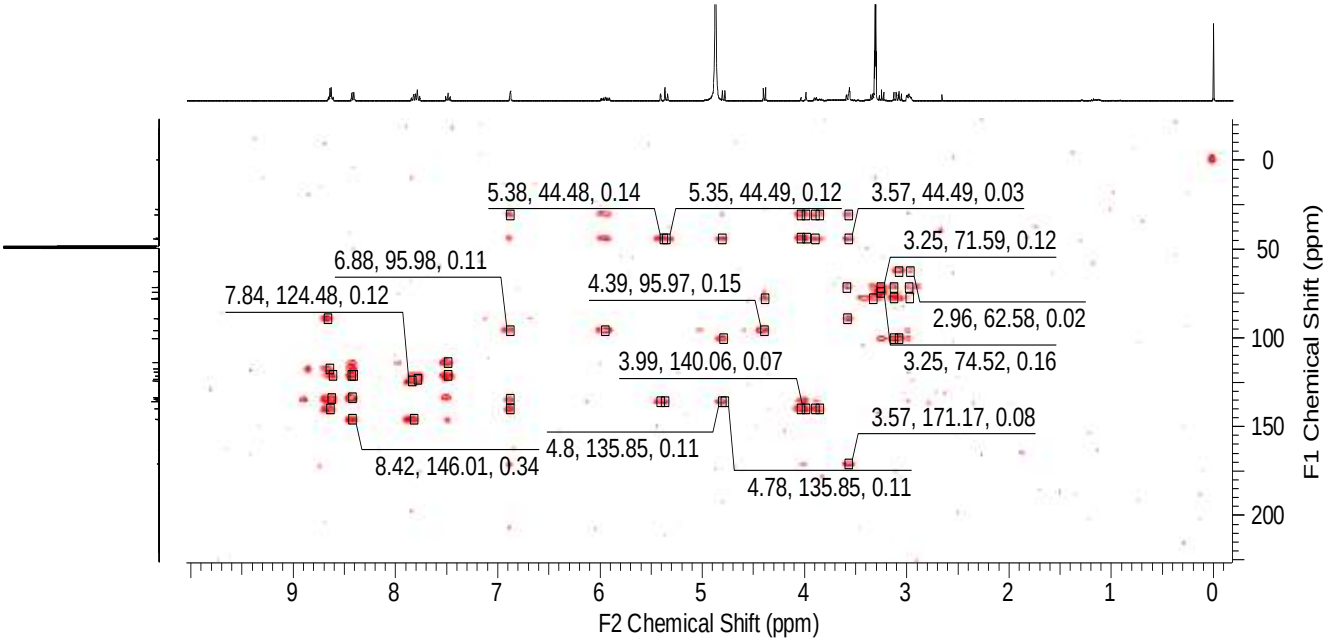
9.1.5 A5 – Espectro de Carbono – DEPT 135 da substância I - cartagenina



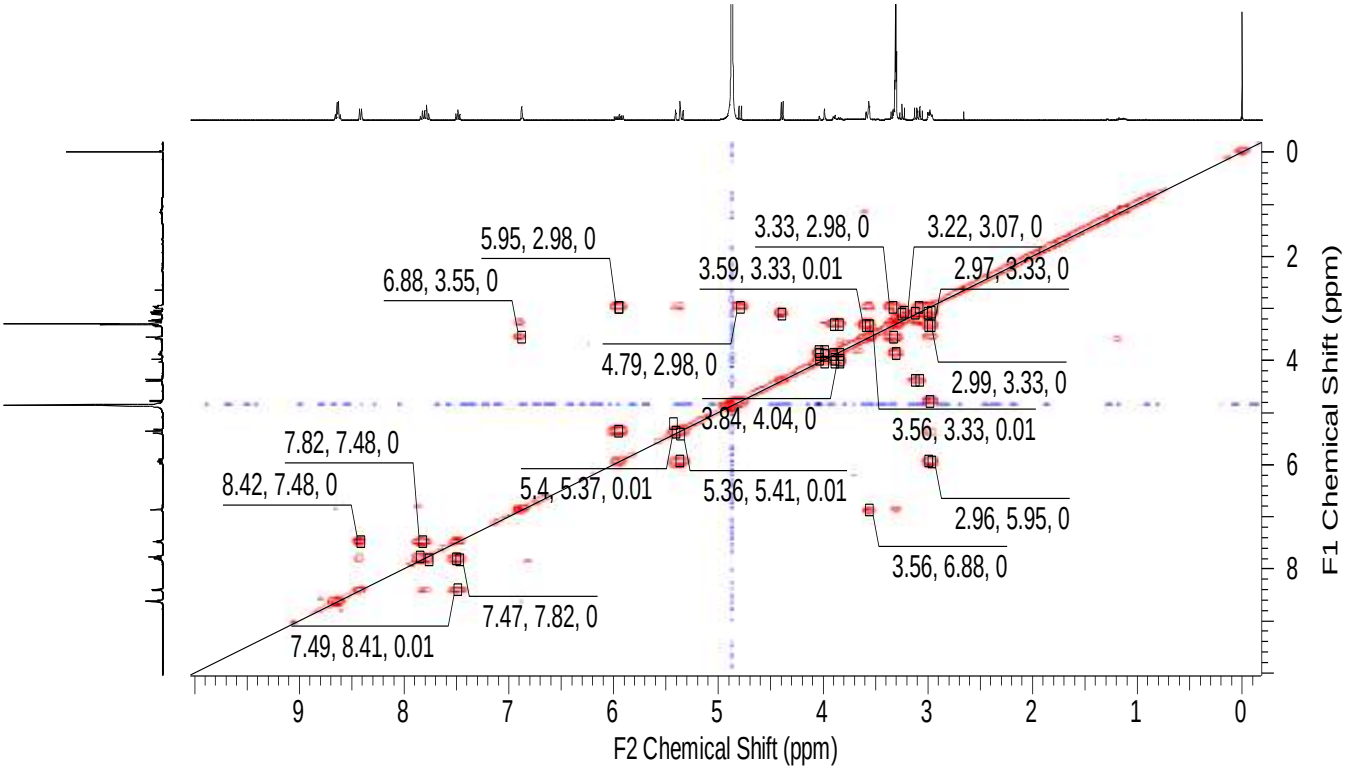
9.1.6 A6 – Espectro de RMN 2D - HSQC da substância I - cartagenina



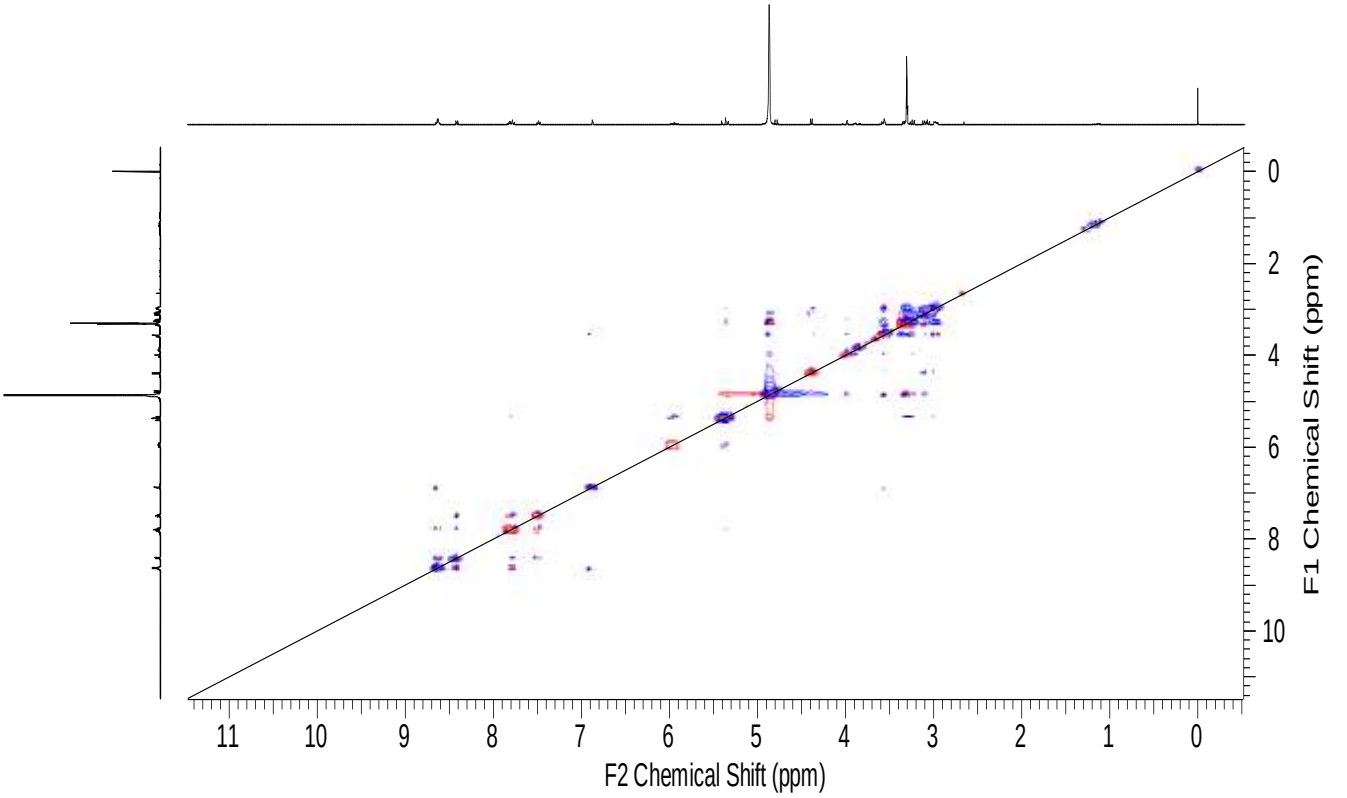
9.1.7 A7 – Espectro de RMN 2D - HMBC da substância I - cartagenina



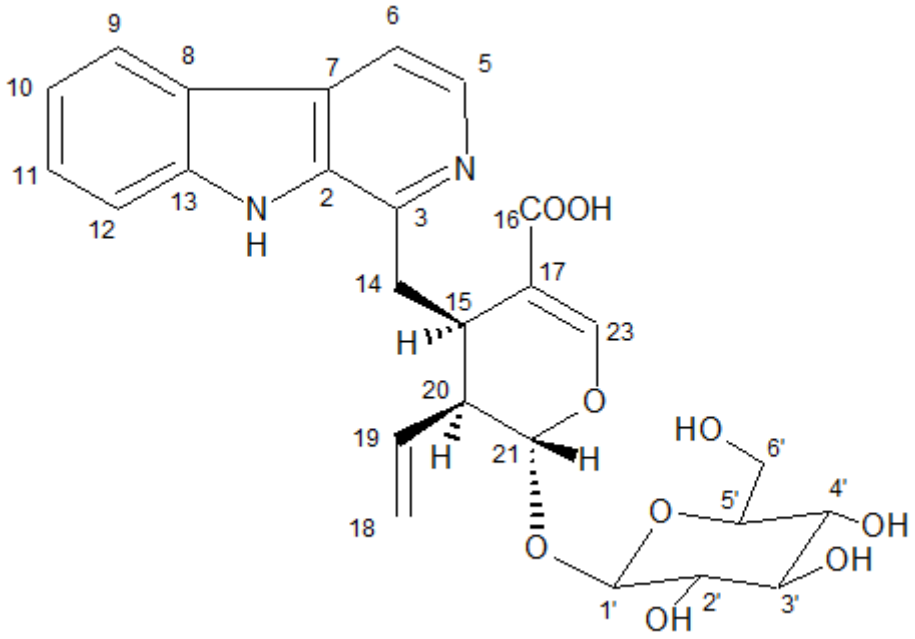
9.1.8 A8 – Espectro de RMN 2D - COSY da substância I - cartagenina



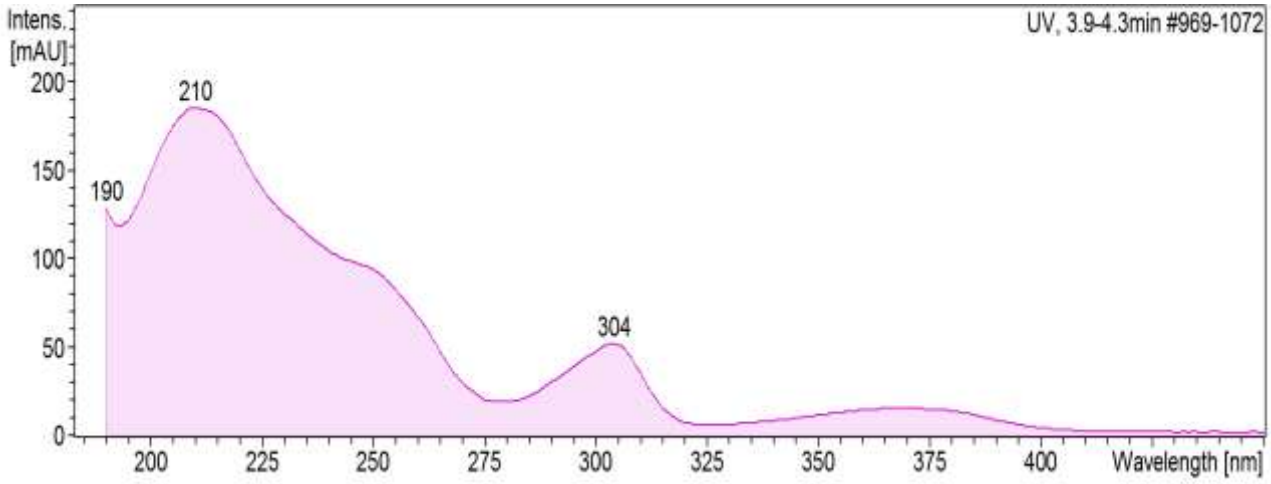
9.1.9 A9 – Espectro de RMN 2D - NOESY da substância I - cartagenina



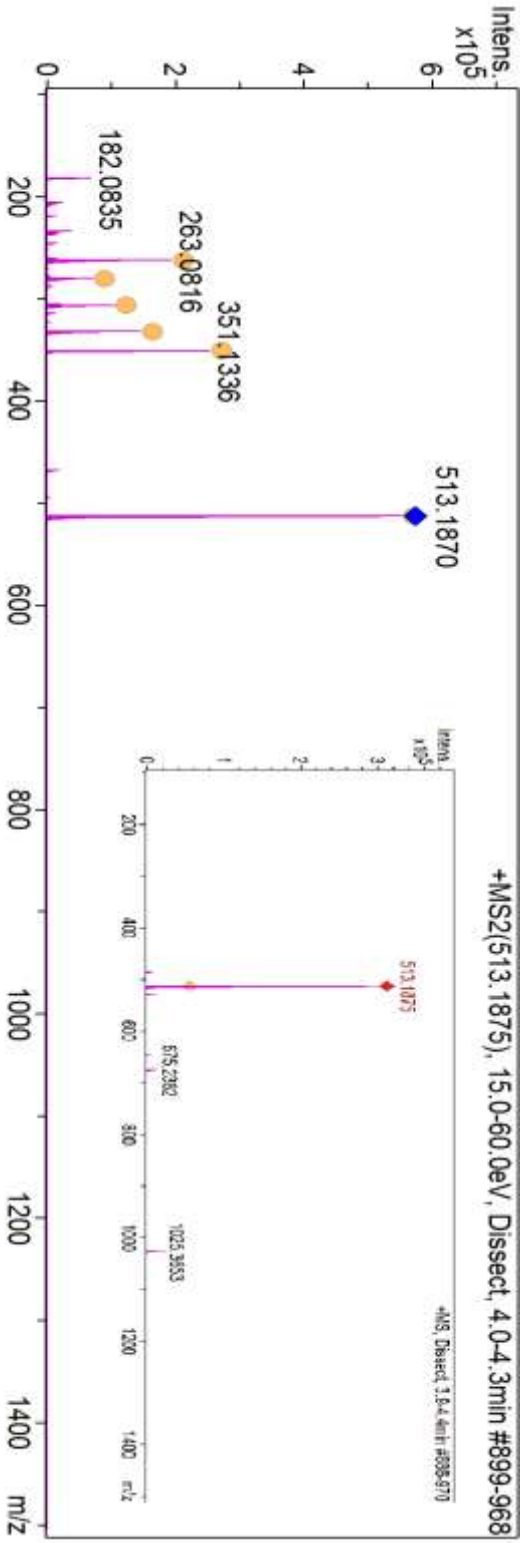
9.2 Apêndice B – Dados estruturais da substância II – ácido lialosídico



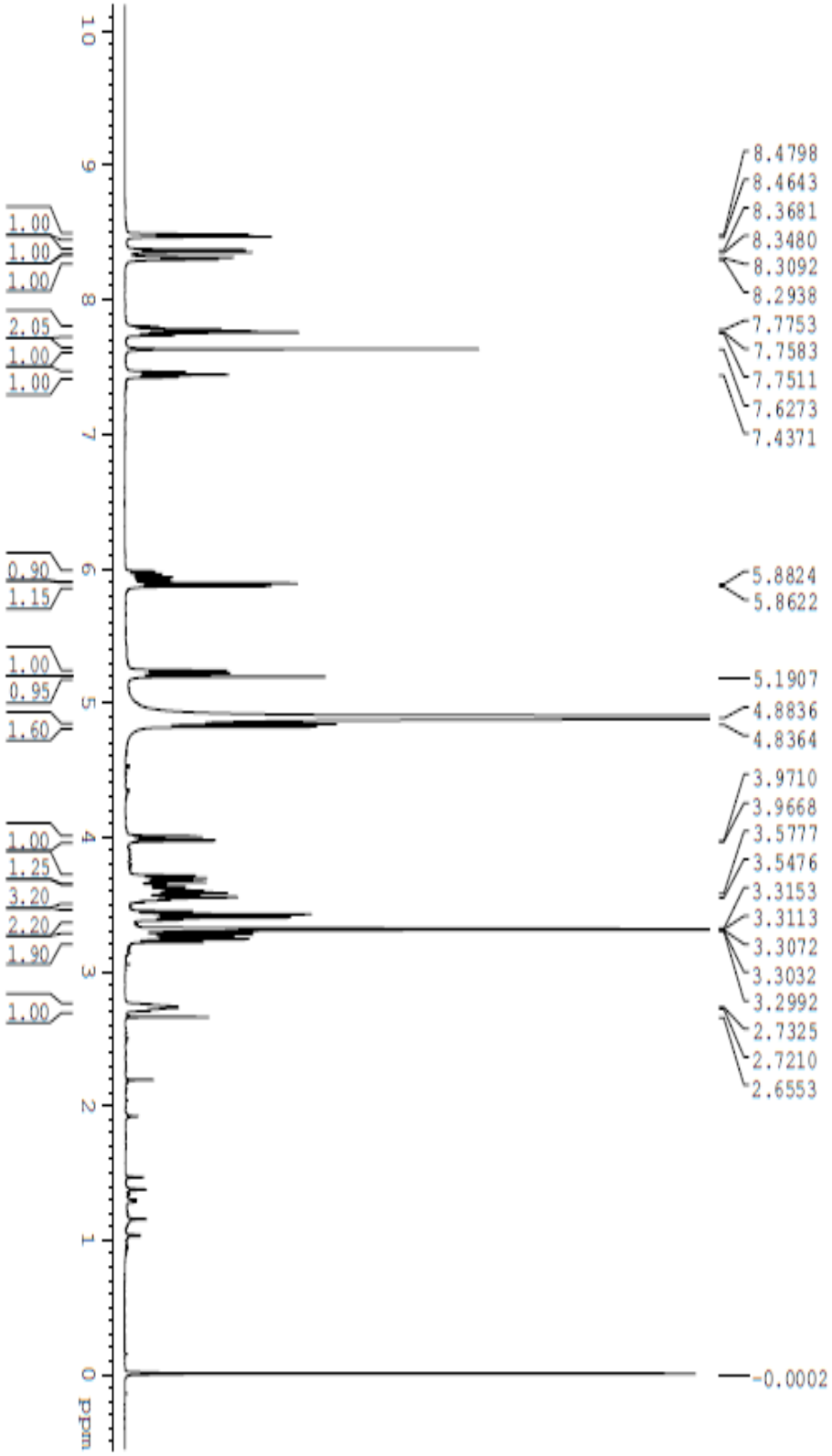
9.2.1 B1 – Espectro de absorção no ultravioleta da sustância II - ácido lialosídico



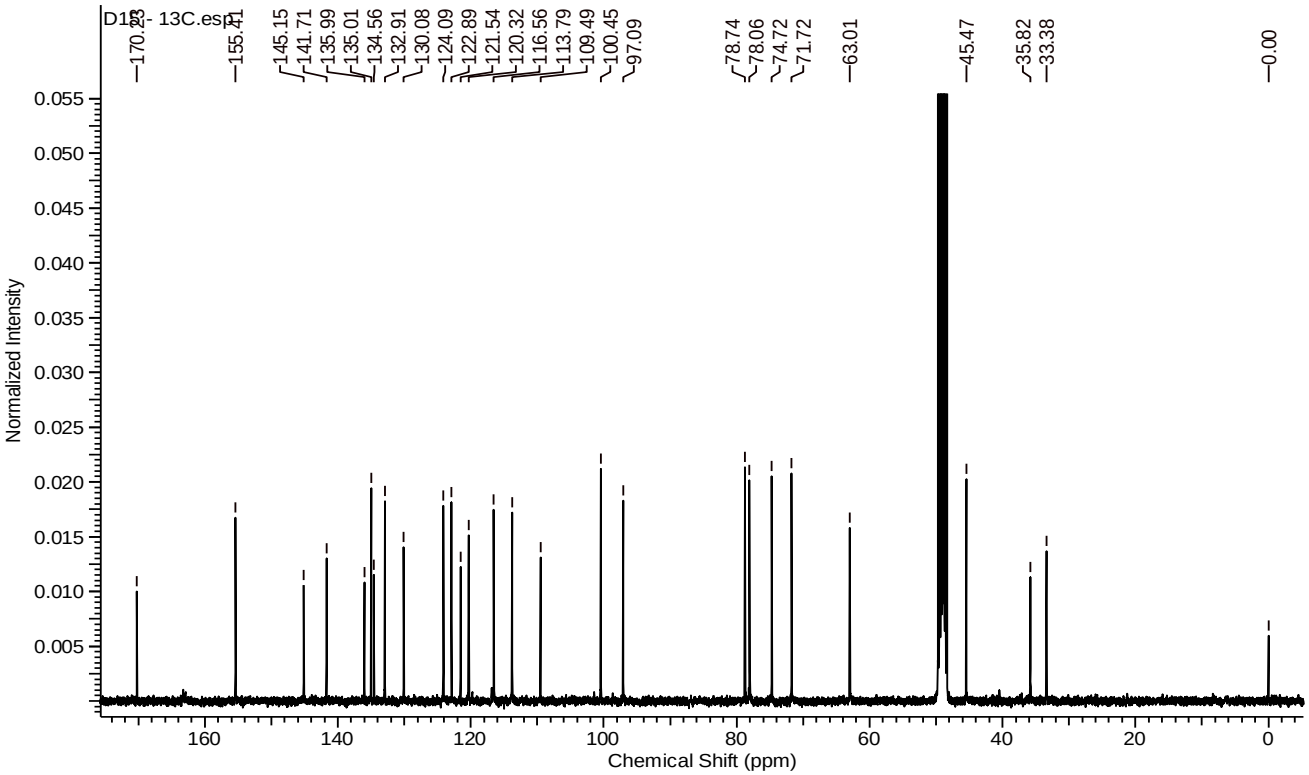
9.2.2 B2 – Espectro de massas da sustância II - ácido lialosídico



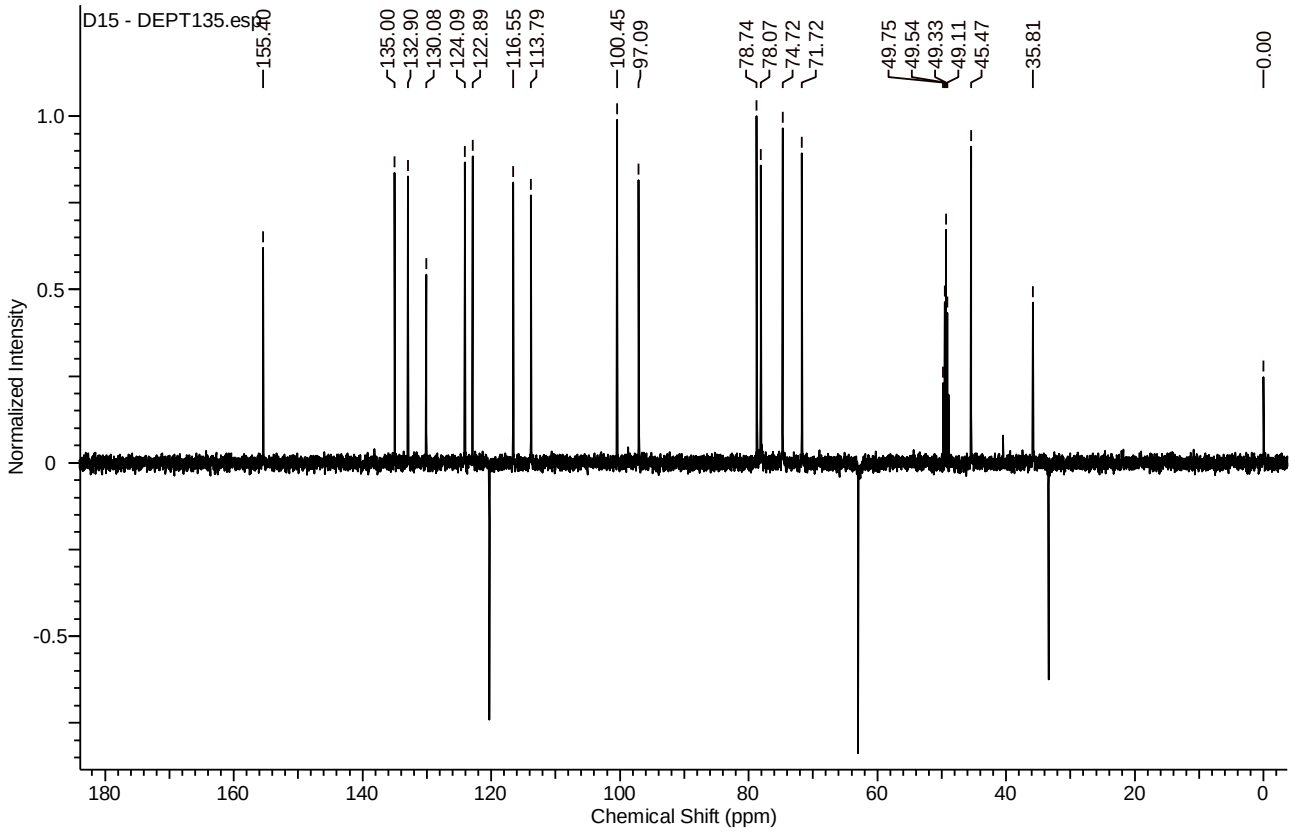
9.2.3 B3 – Espectro de RMN ^{1}H obtido em MeOD a 400 MHz da sustância II - ácido lialosídico



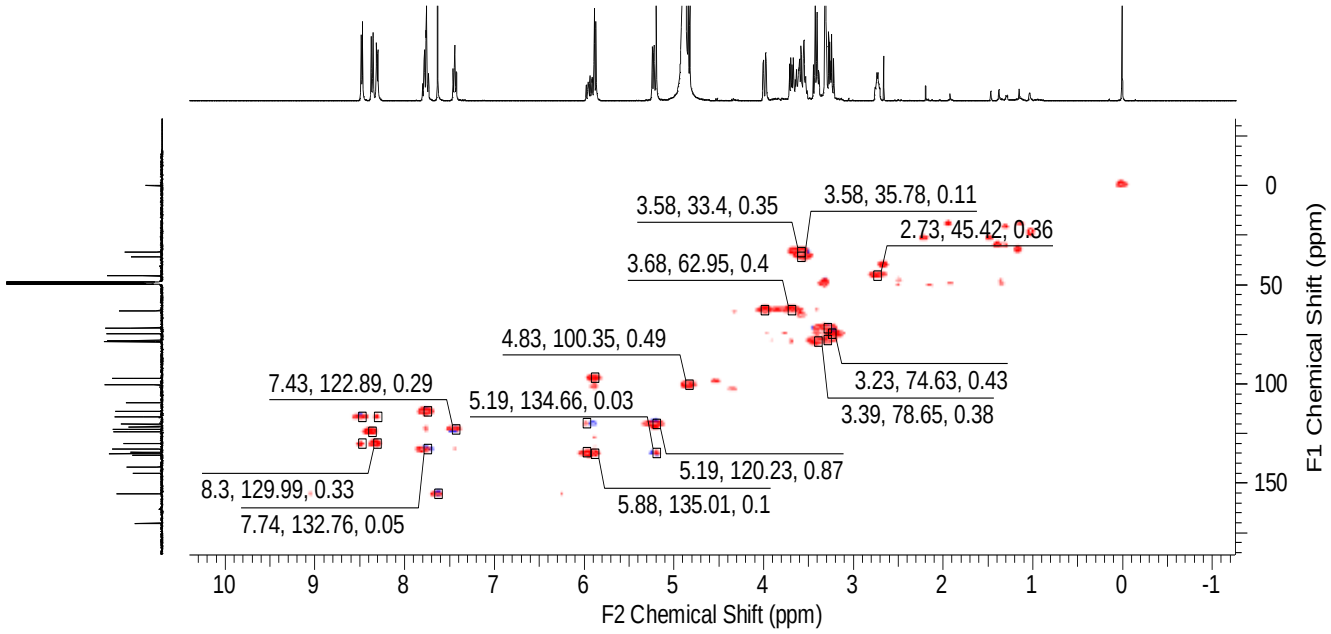
9.2.4 B4 – Espectro de RMN ^{13}C obtido em MeOD a 100 MHz da sustância II - ácido lialosídico



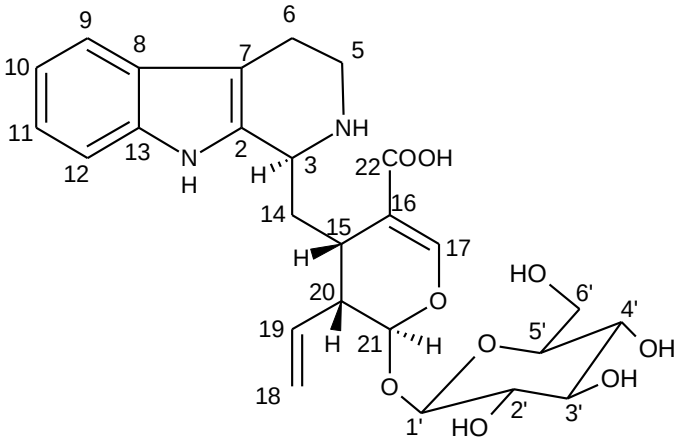
9.2.5 B5 - Espectro de Carbono – DEPT 135 da sustância II - ácido lialosídico



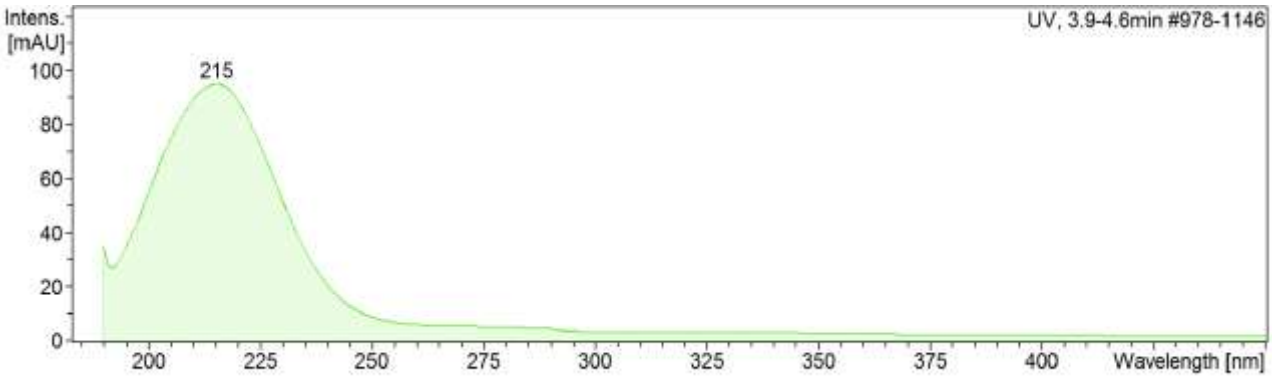
9.2.6 B6 – Espectro de RMN 2D - HSQC da sustância II - ácido lialosídico



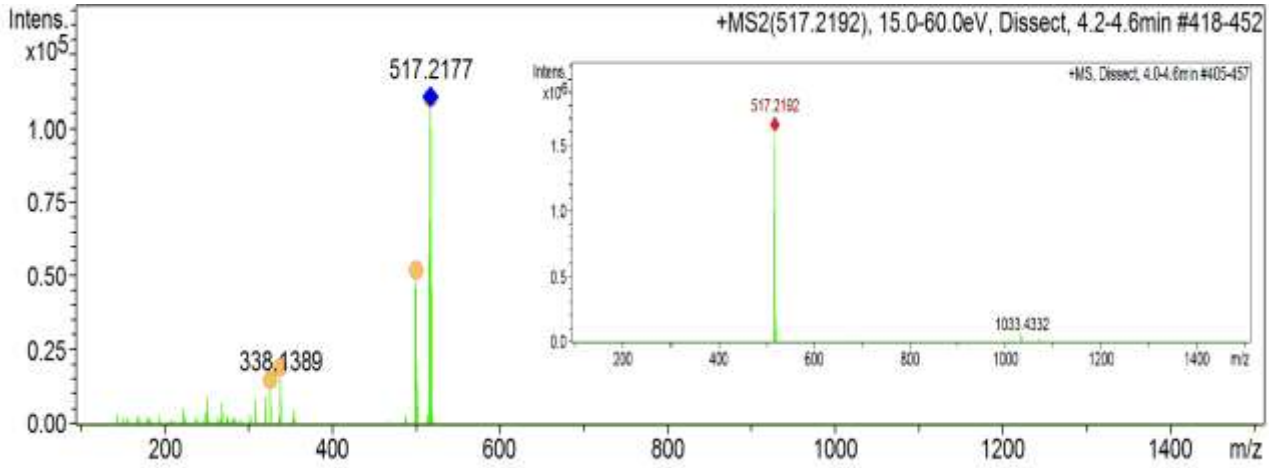
9.3 Apêndice C – Dados estruturais da substância III – ácido estrictosidínico



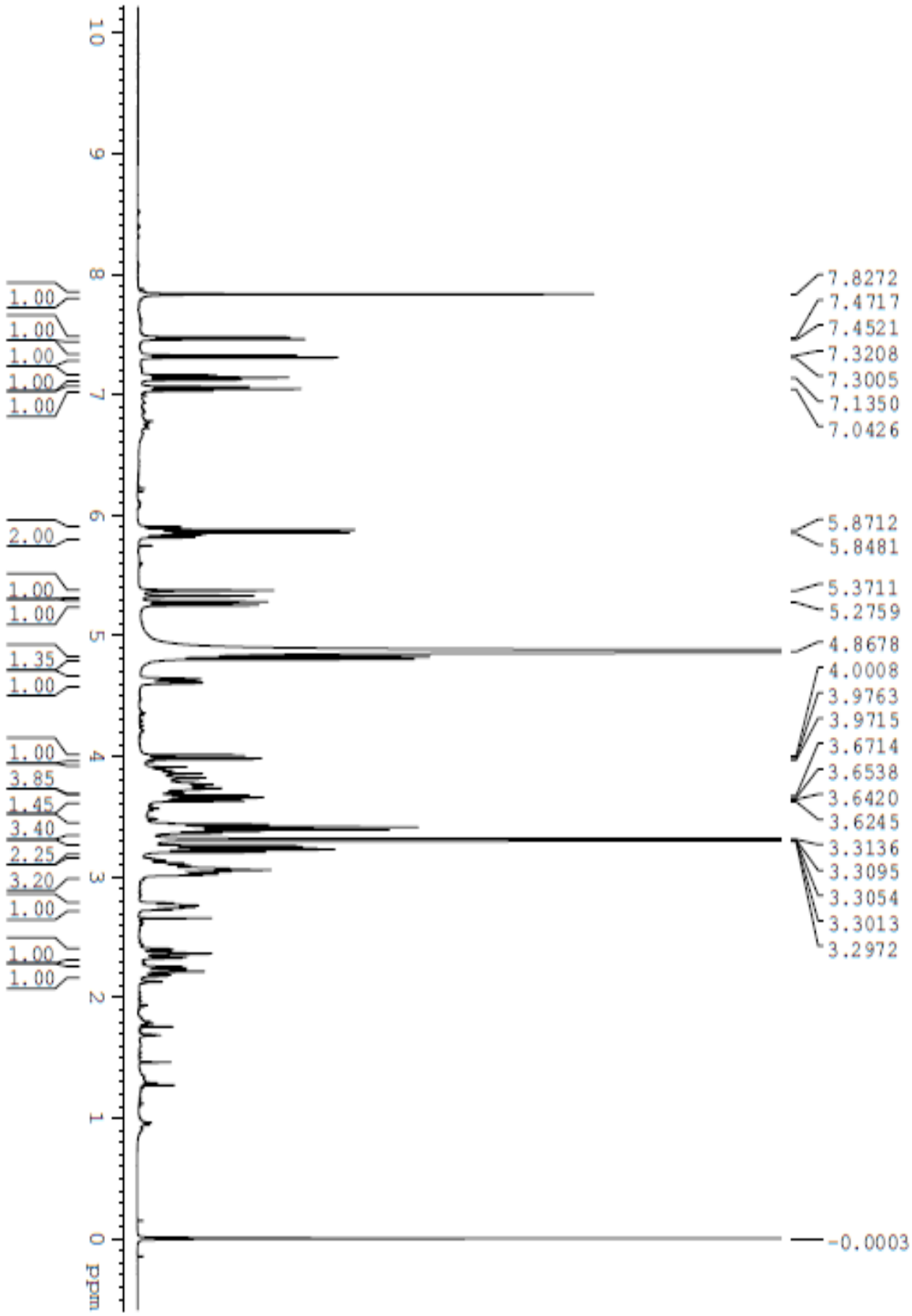
9.3.1 C1 – Espectro de absorção no ultravioleta da sustância III - ácido estrictosidínico



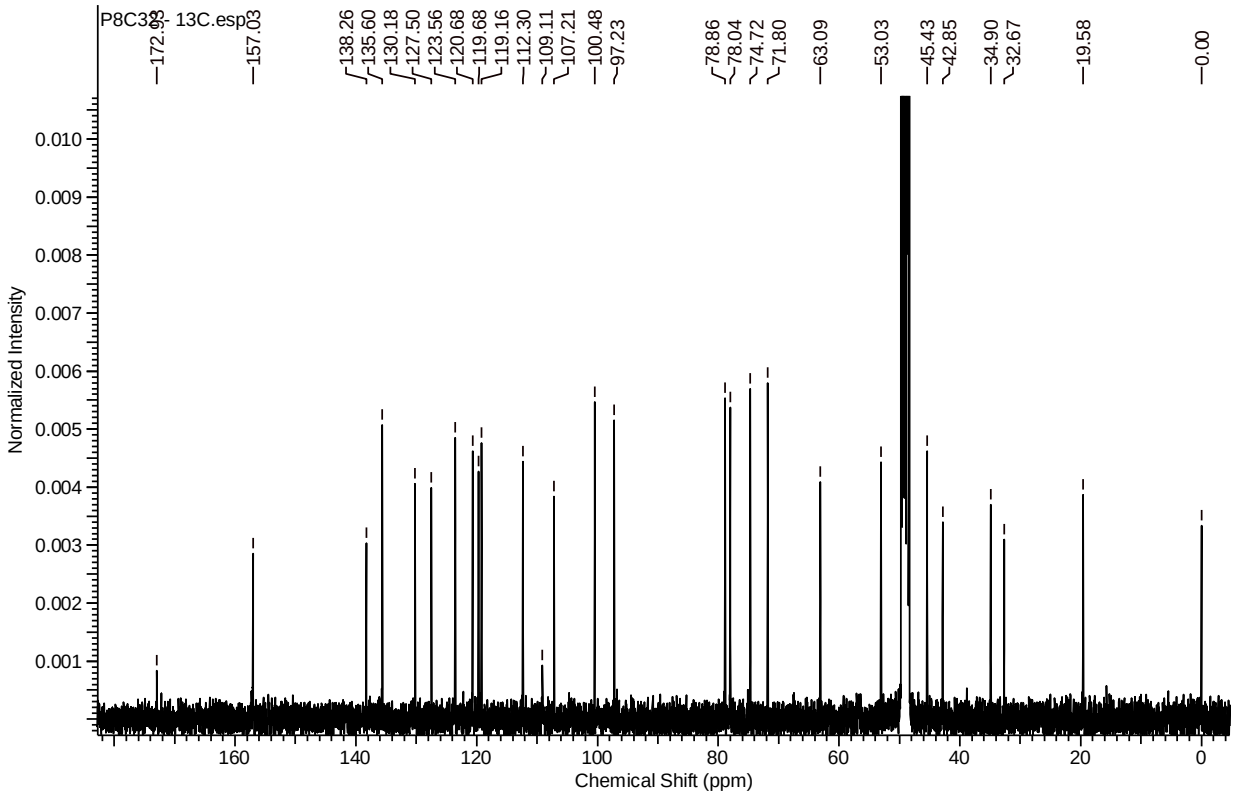
9.3.2 C2 – Espectro de massas da sustância III - ácido estrictosidínico



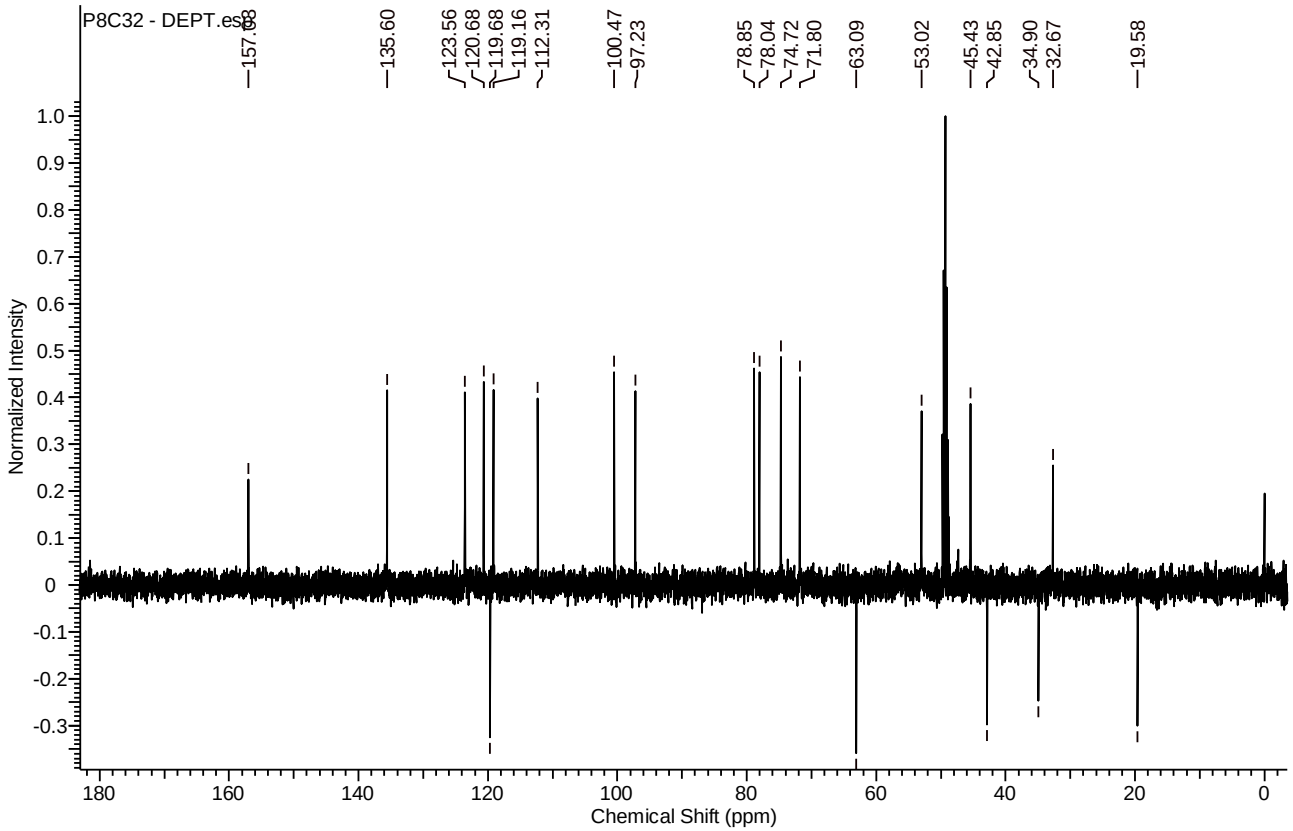
9.3.3 C3 – Espectro de RMN ^{1}H obtido em MeOD a 400 MHz da sustância III - ácido estrictosidínico



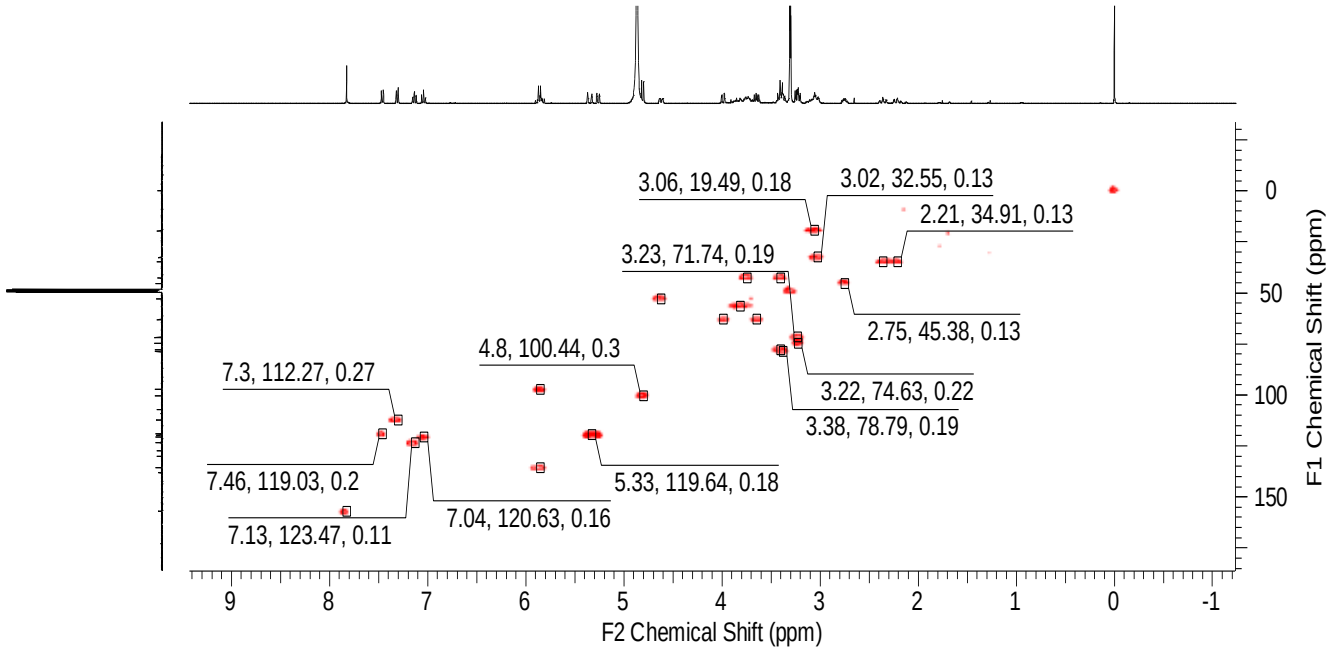
9.3.4 C4 – Espectro de RMN ^{13}C obtido em MeOD a 100 MHz da sustância III - ácido estrictosidínico



9.3.5 C5 – Espectro de Carbono – DEPT 135 da sustância III - ácido estrictosidínico



9.3.6 C6 – Espectro de RMN 2D - HSQC da sustância III - ácido estrictosidínico



10 ANEXOS

10.1 Resumo publicado no VIII Encontro de Química da Bahia – VIII EQBA

Eixo Temático: Produtos Naturais - PN

Uma revisão do gênero *Psychotria*, uma possível alternativa ao tratamento convencional das leishmanioses.

Ivan Martins Barreto*[1] (PG), Djalma Menezes de Oliveira[2] (PQ), Betânia Barros Cota[3] (PQ).

[1] *Programa de Pós-Graduação em Química – PGQui. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Campus Jequié, Bahia, Brasil.*
[2] *Departamento de Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Campus Jequié, Bahia, Brasil.*
[3] *Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Minas Gerais, Brasil.*
* *ivanmartfins@yahoo.com.br*

Palavras Chave: *produtos naturais, Psychotria, atividade anti-Leishmania*

Introdução

O termo "doenças emergentes" tem sido utilizado de forma mais adequada para as doenças negligenciadas, dentre as quais podemos destacar: as leishmanioses, malária, doença de Chagas, doença do sono, filariose linfática, dengue e esquistossomose. As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies do protozoário do gênero *Leishmania* e se manisfesta na forma visceral (calazar), atacando órgãos internos e que pode ser fatal se não tratada e, nas formas cutâneas, ao afetar a pele e mucosas, o que pode levar a grandes deformações. O tratamento das leishmanioses é feito com antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina, que podem ser tóxicos aos pacientes, de custo elevado e difícil administração e, podem ser alvos de resistência do parasita[1,2]. O objetivo deste trabalho é realizar o estudo de possíveis alternativas ao tratamento das leishmanioses a partir de produtos naturais (PNS) obtidos da flora tropical.

Resultados e Discussões

A literatura científica demonstra o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses, por via oral ou aplicação tópica sobre as lesões cutâneas com resultados eficazes, pois na composição dos vegetais encontramos substâncias com atividade anti-*Leishmania*[2]. Pertencente à família Rubiaceae, o gênero *Psychotria* tem sido largamente estudado, pelo fato de ser usado para o tratamento de inúmeras infecções tais como: do aparelho reprodutor feminino, de febre, dores de cabeça e de ouvido, doenças dos brônquios, distúrbios gastrointestinais, infecções cutâneas, úlceras, distúrbios oculares e no tratamento de sintomas do pré- e pós-parto[4]. Um recente estudo confirmou que os alcaloides indólicos, seguido dos peptídeos cíclicos, são os PNS mais descritos para as espécies do gênero *Psychotria*. Espécies desse gênero são também fontes de alcaloides do tipo quinolina e isoquinolina, flavonoides, cumarinas, terpenóides, PNS responsáveis por diversas atividades benéficas em sistemas biológicos, como efeitos analgésico, antiviral, antifúngico e leishmanicida[3]. Alcaloides isolados de *Psychotria klugii*: A = klugina, B = cefaelina, C = isocefaelina e D = emetina (figura 1), demonstraram ser substâncias ativas contra *Leishmania donovani* (IC_{50} 0,03-0,45 µg/mL). Alguns desses PNS foram até mais potentes do que a pentamidina (IC_{50} 0,7 µg/mL) e anfotericina B (IC_{50} 0,17 µg/mL), fármacos amplamente utilizados contra as leishmanioses[5].

Figura 1. Estrutura dos alcaloides leishmanicidas de *Psychotria klugii*.

Conclusões

Diversos PNS isolados de espécies do gênero *Psychotria* apresentaram atividade anti-*Leishmania*, superior ao de fármacos utilizados na clínica. O gênero abordado constitui uma alternativa a fontes de compostos bioativos com atividade leishmanicida, além de poderem servir de modelos estruturais para o desenvolvimento de fármacos novos e mais potentes.

Agradecimentos

Ao PGQui, UESB, FIOCRUZ e a CAPES pela concessão da bolsa.

1. SOUZA, W. et. al. Doenças negligenciadas. Ac. Bras. Ciências Rio de Janeiro. 2010. ISBN: 978-85-85761-30-1
2. BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C. CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacognosia. 16(Supl.), 2006.
3. BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Biological Activities of Constituents from *Psychotria spectabilis*. Pharm. Biol. v. 42, nº 8. 2004.
4. FARIA, E. O. Estudo Fitoquímico das folhas da espécie *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm (Rubiaceae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. 2009.
5. MUHAMMAD, I.; DUNDAR, D. C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; BEDIR, E.; TAKAMATSU, S.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. J. Natural Products, n. 66, 2003.

10.2 Resumo publicado no 7th Brazilian Conference on Natural Products – 7th BCNP

7TH BCNP
Brazilian Conference On Natural Products
XXXIII RESEM

Insituto Militar de Engenharia (IME)
Rio de Janeiro/RJ – Brazil
November 10-13/2019

Phytochemical profile of *Psychotria carthagenensis* obtained by analysis using UHPLC-MS and GC-MS.

Ivan Martins Barreto*[1] (PG), Djalma Menezes de Oliveira[1] (PQ), Markus Kohlhoff[2] (PQ), Betania Barros Cota[2] (PQ).
[1] *Postgraduate Chemistry Collegiate at the University of Southwest State of Bahia. Jequié Campus, Bahia, Brazil.*
[2] *Chemistry Laboratory of Bioactive Natural Products, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.*
** ivanmarttins@yahoo.com.br*

Keywords: Phytochemical profile, *Psychotria carthagenensis,* UHPLC.

There are about 1600 species of the genus *Psychotria* (Rubiaceae), which occur in many regions of the planet. The species *Psychotria carthagenensis* is used commonly for vomiting, fever, diarrhea, and spasms; also as an analgesic, sedative and a tonic[1]. Species of this genus present several alkaloids as metabolites, mainly quinolinic, indoles and poly-indoles derivates and monoterpene indoles[2]. Samples of stems of *P. carthagenensis,* collected at the locality of Brejo Novo, Jequié – Bahia, were used for botanical identification (HUESB 12351) and extracted by maceration with ethanol. The crude ethanol extract was subjected to acid-base partition[3], producing one extract soluble in hydromethanolic solution (HMC) and another in hexane (EHC). The analysis by thin layer chromatography of HMC extract indicated the presence of alkaloids by the production of orange spots after being stained with Dragendorff's reagent. Therefore, the HMC extract was submitted to analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (UHPLC-MS) using ionization source per electrospray in positive mode. The analysis of HMC by UHPLC-MS allowed to identify, through fragmentation patterns from different data bases (UNPD-ISDB, MassBank and in house library), the constituents: bisphenol A (TR 1.0 min.), agarobiose (TR 2.0 min.), pyrimethamine (TR 4.7 min.), safranin (TR 11.3 min.) and the alkaloids chanoclavine-I (TR 9.1 min.), glomerulatine B (TR 11.9 min.) and ircinal B (TR 13.0 min). The glomerulatine B was previously isolated from *Psychotria glomerulata*[4] and there is no other studies about the occurrence of the other alkaloid identified here in other species of *Psychotria*. The EHC extract was fractionated by liquid chromatography on a normal phase column and, fractions F-13 and F-20 (yellowish and oily) were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The GC-MS analysis of EHC F-13 and F-20 allowed the identification, through NIST Mass Spectral Library (NIST 11), of three phytosterols, six fatty esters, and α-tocopherol. Although there are reports of alkaloid detection by CG-MS such as of the N,N-dimethyltryptamine, N-momethyltryptamine and methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline[5] and the determination of concentration of phenolic, flavonoid, condensed tannin and flavonol in this species[2], we could not find reports about the occurrence of other compounds. The identification of *P. carthagenensis* substances by GC-MS and UHPLC-MS help to characterize the chemical profile of the species and the isolation of HMC alkaloids is still in progress.

References:

1. Matsuura, H. N.; Porto, D. D.; Fett-Neto, A. G. **Bioactive alkaloids from South American *Psychotria* and related Rubiaceae.** Natural Products, 2013. Doi:10.1007/978-3-642-22144-6_101
2. Formagio, A. S. N.; Volobuff, C. R. F.; Santiago, M.; Cardoso, C. A. L.; Vieira, M. C.; Pereira, Z. V. **Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts.** Antioxidants, 3, 745-757, 2014. doi:10.3390/antiox3040745
3. Lima, L. B. **Triagem da atividade antioxidante e antiacetilcolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis*.** Masters dissertation. USP, Ribeirão Preto - SP, 2011.
4. Solís, P. N.; Ravelo, A. G.; Palenzuela, J. A.; Gupta, M. P.; González, A.; Phillipson, J. D. **Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*.** Phytochemistry, v. 44, 5, 963-969, 1997.
5. Holmstedt, B.; Lindgren, J. E.; Rivier, L.; Do Valle, J. R. **Ayahuasca, caapi or yage - hallucinogenic drink of Amazonian Basin Indians [Brazil].** Ciência e Cultura, 31(10), 1120-4, 1979.