



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Simira grazielae*  
(RUBIACEAE)**

**MIRZA NALESSO GOMES SANCHES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Dr. Raimundo Braz-Filho**

*e Co-orientação do Professor*  
**Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ  
Julho de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S211e Sanches, Mirza Nalesso Gomes, 1988-  
Estudo Fitoquímico e Biológico de *Simira graziellae*  
(Rubiaceae) / Mirza Nalesso Gomes Sanches. -  
Seropédica, 2019.  
236 f.: il.

Orientador: Raimundo Braz Filho.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

1. Determinação Estrutural. 2. Alcaloides indólicos.  
3. Desreplicação. I. Braz Filho, Raimundo, 1935-,  
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MIRZA NALESSO GOMES SANCHES**

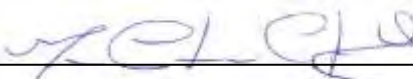
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 25/07/2019



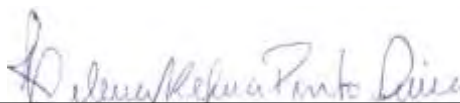
---

Raimundo Braz Filho (Dr.) UFRRJ/UENF  
(Orientador)



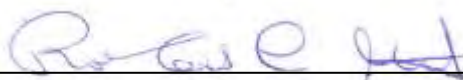
---

Márcia Cristina Campos de Oliveira (Dra.) UFRRJ



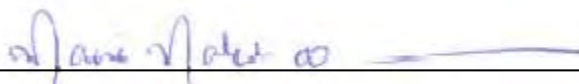
---

Helena Regina Pinto Lima (Dra.) UFRRJ



---

Roberto Carlos Campos Martins (Dr.) UFRJ



---

Marise Maleck de Oliveira (Dra.) USS

---

Bruno Guimarães Marinho (Dr.) UFRRJ

---

Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro (Dra.) UFMT

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência e por estar sempre me iluminando, proporcionando-me a oportunidade de fazer esse curso.

Toda minha família pelo apoio, amor, carinho, compreensão, orações e por entenderem minha ausência. Em especial aos meus pais Carlos André e Rita de Cácia, e minha irmã Lorraine Nalesso.

Ao meu esposo, que sempre está do meu lado dando suporte na vida pessoal e profissional. Por ter me acolhido nos momentos de aflição que só quem passa por uma pós-graduação entende. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho pela orientação e ensinamentos transmitidos sempre com muita ética e profissionalismo, sendo sem dúvidas um exemplo a seguir. Já são sete anos de convivência desde quando o senhor me apresentou a Química de Produtos Naturais. Aprendi muito! Obrigado pela amizade, paciência, apoio, estímulo e carinho.

Ao Prof. Dr. Douglas Chaves pela co-orientação, conhecimentos transmitidos, amizade, carinho, confiança e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e pessoa.

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo, pelas grandes contribuições dadas na execução deste trabalho, tanto no suporte financeiro como técnico, e pela amizade. Aos professores do Departamento de Química (DEQUIM) da UFRRJ, pela convivência e apoio incalculável, em especial a Profa. Rosane Nora e Prof. Luciano Suzart, que se tornaram grandes amigos.

Aos Professores Doutores Márcia Cristina, Bruno Marinho e Caio Monteiro (UFG), pelos suportes na execução desse trabalho envolvendo a investiação dos testes biológicos. Aos doutores Kirley Canudo e Paulo Riceli (EMBRAPA-Ceará), que disponibilizaram os equipamentos e seu tempo na execução dos experimentos de desreplicação.

Aos funcionários e técnicos do DEQUIM-UFRRJ, em especial os Técnicos Dra. Frances Regian, Maurício Matos e o secretário Paulo pelo apoio técnico-científico e pela amizade.

A todos os meus amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), cada um teve sua importância, seja nos momentos de estudos nos momentos de descontração. De um modo especial à Débora Ramos, Renata Duarte, Carolina Passos, Ilna Gomes e o Carlos Henrique.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.*

Cora Coralina

## RESUMO

SANCHES, Mirza Nalesso Gomes. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Simira grazielae* (Rubiaceae)**. 2019. 236p. Tese (Doutorado em Química, Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A espécie de estudo *Simira grazielae* Peixoto, é conhecida popularmente como arariba-vermelha e encontra distribuída no Brasil pelos estados da BA e do ES. O objetivo do presente estudo foi contribuir para o conhecimento da composição química da espécie *S. grazielae*, família Rubiaceae, através do estudo fitoquímico e bem como farmacológico (frente a Larvas de *Rhipicephalus microplus*, a enzima Tirosinase e anti-inflamatória e antinociceptiva) dos extratos e frações. O material vegetal da madeira e casca foi coletado na Reserva Florestal da Companhia Vale do Rio Doce - ES, posteriormente seco em temperatura ambiente, triturado e submetido ao processo de maceração exaustiva com metanol, sem aquecimento. O extrato metanólico da madeira foi submetido à partição líquido/líquido com *n*-hexano, Diclorometano, Acetato de etila e *n*-butanol, e uma quantidade pequena dessas partições, juntamente com o extrato foi submetida à prospecção química. As frações foram cromatografadas em colunas clássicas de sílica gel por exclusão (Sephadex LH-20) e analisadas através de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, CG-EM e CL-EM-IES. Além do fracionamento, os extratos e as frações particionadas foram submetidos à análise por desreplicação no sistema CLUE-IES-QTOF-EM/EM no modo positivo, uma análise rápida e precisa para caracterização dos perfis químicos. Os testes de prospecção química apresentaram resultados positivos para os metabólitos: saponinas, esteroides, triterpenóides, purinas, derivados da cumarina, alcaloides, açúcares redutores, sacarídeos e aminoácidos não proteicos. Foram isoladas e identificadas da madeira de *S. grazielae* dezoito (18) substâncias: *N*-acetilserotonina, Maxonina, Harmana, *cis*- *N*-*p*-coumaroil Serotonina, *trans*-*N*-*p*-coumaroil serotonina, *N*-isoferuloil serotonina, *N*-feruloil serotonina (Moschamine), *cis*-moschamine, *N*-cafeiloil serotonina, Higarine, Ofiorina B, Ofiorina A, Ácido Estrictosidínico, Estrictosidina, mistura de Triacilglicerídeos, 5-hidroxiendole-3-aldeído, 6'-*O*-vanilloilbarbutina e Ácido desmetilisopauridiantosideo, sendo esse último inédito na literatura. A técnica de desreplicação e as propostas de fragmentações permitiram postular a presença de 57 metabólitos, sendo quase na totalidade alcaloides indólicos, dos quais 20 estão sendo propostos como inéditos na literatura. Os testes realizados da espécie *S. grazielae* frente à atividade acaricida sobre as larvas do *R. microplus* nas frações SGD, SGAc SGB, SGR, e sobre a ação na enzima tirosinase [Ofiorina B e as partições (SGAc e SGB)], não apresentaram resultados significativos. Já o teste anti-inflamatório e antinociceptivo realizado nas frações da madeira de *S. grazielae* mostraram ter ação nesses sistemas e esse efeito pode ser atrelado à presença dos alcaloides derivados da serotonina. Assim, neste trabalho registra-se a identificação de 18 substâncias isoladas da madeira de *S. grazielae* e propõe-se a presença adicional de 57 metabólitos através da técnica de desreplicação envolvendo majoritariamente alcaloides, além de revelar a presença de frações da espécie com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

**Palavras-chave:** Determinação Estrutural, Alcaloides indólicos, Desreplicação.

## ABSTRACT

SANCHES, Mirza Nalesso Gomes. **Phytochemical and Biological Study of *Simira grazielae* (Rubiaceae)**. 2019. 236p. Thesis (Doctorate Chemistry, Chemistry). Instituto Chemistry, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The study species *Simira grazielae* Peixoto is popularly known as red macaw and is found in Brazil by the states of BA and ES. The aim of the present study was to contribute to the knowledge of the chemical composition of the species *S. grazielae*, family Rubiaceae, through the phytochemical and pharmacological study (against *Rhipicephalus microplus* larvae, the tyrosinase and antiinflammatory and antinociceptive enzyme) extracts and fractions. The wood material and bark was collected in the Forest Reserve of Vale do Rio Doce Company - ES, then dried at room temperature, crushed and subjected to exhaustive maceration process with methanol, without heating. The methanolic extract of the wood was subjected to liquid/liquid partition with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol, and a small amount of these partitions along with the extract were subjected to chemical prospecting. The fractions were chromatographed on standard exclusion silica gel columns (Sephadex LH-20) and analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, GC-MS and LC-MS-IES. In addition to fractionation, extracts and partitioned fractions were subjected to dereplication analysis in the CLUE-IES-QTOF-EM/MS system in positive mode, a fast and accurate analysis for characterization of chemical profiles. The chemical prospecting tests showed positive results for the metabolites: saponins, steroids, triterpenoids, purines, coumarin derivatives, alkaloids, reducing sugars, saccharides and non-protein amino acids. Eighteen (18) substances were isolated and identified from *S. grazielae* wood: *N*-acetyl serotonin, Maxonin, Harmana, *cis-N*-*p*-coumaroyl serotonin, *trans-N*-*p*-coumaroyl serotonin, *N*-isoferuloil serotonin, *N*-feruloil serotonin (Moschamine), *cis*-moschamine, *N*-cafeloyl serotonin, Higarine, Ofiorina B, Ofiorina A, Strictosidinic Acid, Strictosidine, Mixed of Triacylglycerides, 5-Hydroxyendole-3-aldehyde, 6'-*O*-Vanilloylbarbutine and Desmethylisopauridiantidoil acid unpublished in the literature. The technique of dereplication and the proposed fragmentation allowed to postulate the presence of 57 metabolites, almost all of them being indole alkaloids, of which 20 are being proposed as unpublished in the literature. The tests carried out of the species *S. grazielae* against the acaricidal activity on the *R. microplus* larvae in the fractions SGD, SGAc, SGB, SGR and on the action on the tyrosinase enzyme [Ofiorina B and the partitions (SGAc and SGB)] did not show significant results. The antiinflammatory and antinociceptive test performed on the fractions of *S. grazielae* wood showed to have action in these systems and this effect can be linked to the presence of serotonin-derived alkaloids. Thus, in this work we identify 18 substances isolated from *S. grazielae* wood and propose the additional presence of 57 metabolites through the dereplication technique involving mostly alkaloids, besides revealing the presence of fractions of the species with antiinflammatory and antinociceptive.

**Key words:** Structural determination, Indolic alkaloids, Dereplication.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Agentes terapêuticos aprovados 1981-2014 N = 1562 (número total). ....	7
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de medicamentos aprovados de: N-Produto natural inalterado; NB-drogas botânicas-misturas definidas; ND-derivados de P.N-semissintética; S*-fármaco sintético (farmacóforo P.N.) registradas no ano de 1981-2014. ....	8
<b>Figura 3.</b> Diversidade química e distribuição de metabólitos secundários nas subfamílias de Rubiaceae. IXO: Ixoroideae, CIN: Cinchonoideae e RUB: Rubioideae. Adaptado de Martins e Nunez, 2015. ....	11
<b>Figura 4.</b> Alguns metabólitos especiais isolados de Rubiaceae (continua). ....	12
<b>Figura 5.</b> Estrutura química dos compostos isolados do gênero <i>Simira</i> (Continua). ....	17
<b>Figura 6.</b> Imagem de espécie de <i>Simira grazielae</i> . ....	19
<b>Figura 7.</b> Constituintes químicos isolados da madeira de <i>S. grazielae</i> . (SANCHES, 2017) ..	20
<b>Figura 8.</b> Reação genérica de detecção de alcaloides com reagente de Dragendorff. ....	26
<b>Figura 9.</b> Reação de Liebermann-Burchard, detecção de esteroides. Fonte: QUEIROZ, 2009. ....	26
<b>Figura 10.</b> Reação genérica de Shinoda, detecção de derivados flavônicos. ....	27
<b>Figura 11.</b> Reação de alfa-aminoácidos com a ninidrina. Fonte: PEREIRA, 2010. ....	27
<b>Figura 12.</b> Reação de oxirredução do reagente de Fehling A e B com a glicose. ....	28
<b>Figura 13.</b> Reação positiva para cumarinas em meio básico. Fonte: SBFGNOSIA, 2017. ....	28
<b>Figura 14.</b> Sistemas de cromatografia em coluna gravitacional (A) e cromatografia em camada delgada analítica (B) empregados no estudo fitoquímico de <i>S. grazielae</i> . ..	30
<b>Figura 15.</b> Separação por solubilização em água de SGB e posterior liofilização. ....	31
<b>Figura 16.</b> Constituintes químicos isolados da madeira de <i>Simira grazielae</i> (continua). ....	34
<b>Figura 17.</b> Rota sintética da maxonina descrita na literatura por Kelly e colaboradores (1993). ....	47
<b>Figura 19.</b> Trechos do artigo da Maxonina por KELLY et al., 1993 (A) HASBUN e colaboradores 1989 (B). ....	48
<b>Figura 18.</b> Estrutura da maxonina sintetizada proposta por KELLY et al., 1993 (A), estrutura da maxonina isolada de <i>S. maxonii</i> por HASBUN e colaboradores 1989 (B). ....	48
<b>Figura 20.</b> Estruturas do alcaloide Maxonina propostas por Kelly e colaboradores (1993) (A) e a postulada por Hasbun e colaboradores (1989) (B). ....	49
<b>Figura 21.</b> Cromatograma do CG de SGD-2. ....	53
<b>Figura 22.</b> Cromatograma da CLUE de SGAc-1. ....	61
<b>Figura 23.</b> Estruturas dos alcaloides propostos como componentes na mistura de SGAc-4. ..	72
<b>Figura 24.</b> Cromatograma por CLUE da mistura de SGAc-4. ....	74
<b>Figura 25.</b> Efeito $\gamma$ no carbono CH-15 pelo átomo de oxigênio da unidade glicose em Pauridiantosideo. ....	89
<b>Figura 26.</b> Interação espacial (dipolar) dos hidrogênios H-21 com ambos H-15 e H-1' revelada pelo espectro 2D no NOESY. ....	89
<b>Figura 27.</b> Cromatograma por CLUE de SGAc-6. ....	95
<b>Figura 28.</b> Estrutura da Ofiorina A e B. ....	101
<b>Figura 29.</b> Configuração relativa de SGB-3. ....	108
<b>Figura 30.</b> Cromatograma por CLUE de SGB-3. ....	112



## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Estruturas das primeiras moléculas identificadas por desreplicação. ....	132
<b>Figura 2.</b> Análise de LC-EM/EM empregada na desreplicação de compostos presentes em .....	134
<b>Figura 3.</b> Novas substâncias bioativas naturais isoladas por desreplicação com CL-EM. ....	134
<b>Figura 4.</b> Formação do anel indol do Triptofano (adaptação McMURRY e BEGLEY, 2005). .....	136
<b>Figura 5.</b> Esquematização da rota biossintética dos alcaloides indólicos monoterpênicos....	137
<b>Figura 6.</b> Biossíntese da secolganina pela adaptação de FERREIRA, 2016; O'CONNOR e MARESH (2006). .....	138
<b>Figura 7.</b> Estrutura da Ioimbina com o sistema de numeração para alcaloides indólicos monoterpênicos. ....	138
<b>Figura 8.</b> Estruturas das substâncias propostas através de EM da madeira e casca de <i>S. grazielae</i> no modo positivo. ....	145
<b>Figura 9.</b> Cromatograma por CLUE de SGAc. ....	147
<b>Figura 10.</b> Esqueleto básico os alcaloides indólicos $\beta$ -carbolina (A), tetrahydro- $\beta$ -carbolina (B) e dihydro- $\beta$ -carbolina (C). ....	149
<b>Figura 11.</b> Cromatograma por CLUE de SGD. ....	177
<b>Figura 12.</b> Cromatograma por CLUE de SGB. ....	185
<b>Figura 13.</b> Cromatograma por CLUE de SGR. ....	191
<b>Figura 14.</b> Cromatograma por CLUE de SGC. ....	194

## CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Fonte de substâncias aprovadas como fármacos, de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 (n=1073). (adaptado de NEWMAN, CRAGG, 2012). ....	217
<b>Figura 2.</b> Teste acaricida com as larvas de <i>R. microplus</i> . ....	222
<b>Figura 3.</b> Teste de enzima tirosinase. ....	222
<b>Figura 4.</b> Teste de contrações abominais por ácido acético do extrato/partições de <i>S. grazielae</i> . ....	223
<b>Figura 5.</b> Esquema do teste de contrações abominais por ácido acético de SGAc nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg de <i>S. grazielae</i> . ....	224
<b>Figura 6.</b> Esquema avaliação da dor inflamatória e não inflamatória por formalina da partição SGAc. ....	224
<b>Figura 7.</b> Efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominal (A) do extrato metanólico de <i>S. grazielae</i> e suas partições (B) partição de acetato de etila com doses crescentes. ....	225
<b>Figura 8.</b> Efeito antinociceptivo do extrato metanólico e das partições de <i>S. grazielae</i> no modelo de formalina na primeira e segunda fase. (morfina (5,01 mg/kg), Ácido Acetilsalicílico (ASA - 100 mg/kg). ....	226
<b>Figura 9.</b> Efeito antinociceptivo da partição em acetato de etila de <i>S. grazielae</i> no modelo de formalina na primeira e segunda fase nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg. ....	226

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Cinco maiores famílias Angiospermas com número aproximado de espécies no mundo, (GOVAERTS et al., 2011; LPWG, 2017; SOUZA e LOEUILLE; 2018)....9
- Tabela 2.** Distribuição de espécies de Rubiaceae pelos domínios fitogeográficos no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2018)..... 10
- Tabela 3.** Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Simira*. .... 15
- Tabela 4.** Frações obtidas por fracionamento do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* (SGM) usando Hexano (SGH), Diclorometano (SGD), Acetato de etila (SGAc) e Butanol (SGB), sendo o resíduo denominado SGR..... 24
- Tabela 5.** Resultados da prospecção fitoquímica da madeira de *S. grazielae*. (+) presença e (-) ausência da classe metabólica no material analisado. SGM - extrato metanólico, SGH - partição Hexânica, SGD - partição de diclorometano, SGAc - Acetato de etila e SGB- partição Butanólica e SGR - resíduo da partição. .... 33
- Tabela 6.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGD-1A, comparados com valores da literatura de *N*-acetilserotonina (GUERREIRO et al., 1999). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 37
- Tabela 7.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGD-1B, comparados com valores da literatura de 6'-*O*-vanilloilarbutina (WU; LI; SHI, 2006). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 39
- Tabela 8.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGD-3, comparados com Maxonina (HASBUN et al., 1989). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm)..... 50
- Tabela 9.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em CDCl<sub>3</sub>) de SGD-3, comparados com valores da literatura GUNSTONE et al., 1985.(Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm) ..... 55
- Tabela 10.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-1, comparados com valores da literatura do 5-hidroindol-3-aldeído (KOBAYASHI et al., 1990). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 58
- Tabela 11.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-2A, comparados com valores da literatura da *N*-*p*-coumaroil serotonina (TAKAHASHI e MIYAZAWA 2011). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 63
- Tabela 12.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-2B, comparados com valores da literatura da *N*-feruloil serotonina (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2011). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult.,*J*(Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 64
- Tabela 13.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) da mistura de SGAc-3, e valores da literatura da *N*-cafeoil serotonina (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2012). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 69
- Tabela 14.** Comparação dos dados espectrais de RMN das substâncias naturais das misturas SGAc-3 e SGAc-2. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).. 70
- Tabela 15.** Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (400 e 100 MHz em MeOD) da SGAc-4B<sub>Z,E</sub> e SGAc-2B. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm). .... 73

<b>Tabela 16.</b> Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (400 e 100 MHz em MeOD) da mistura de SGAc-4 <sub>Z,E</sub> e SGAc-2A = SGAc-3A. Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm). .....	76
<b>Tabela 17.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (400 e 120 MHz em MeOD) de SGAc-5, comparados com valores da literatura da harmana (BASTOS et al., 2002). Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm). .....	85
<b>Tabela 18.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-6, comparados com valores da literatura do Pauridiantosideo e Isopauridiantosideo (LEVESQUE e JACQUESY, 1983). Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm). .....	90
<b>Tabela 19.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGB-1, comparados com valores da literatura da ofiorina B (BASTOS et al., 2002). Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm), nd= não identificado. ....	97
<b>Tabela 20.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGB-2, comparados com valores da literatura para as Ofiorinas A e B (Bastos et al., 2002) Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm) .....	101
<b>Tabela 21.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ (400) e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz) em MeOD de SGB-3, comparados com valores da literatura para os Ácido Estrictosidínico e <i>epi</i> -Estrictosidínico (NASCIMENTO et al., 2008 <sup>[1]</sup> ; BERGER et al., 2015 <sup>[2]</sup> ; NASCIMENTO et al., 2006 <sup>[3]</sup> ). Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm). .....	109
<b>Tabela 22.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (400 e 100 MHz em DMSO- <i>d</i> 6) de SGB-4, comparados com valores da literatura (PATTHY-LUKÁTS, et al., 1997) da Estrictosidina. Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ [mult., $J$ (Hz)] e $\delta_{\text{C}}$ , ppm). ...	114

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Quantidade de metabólitos identificados em cada fração de <i>S. grazielae</i> . .....	142
<b>Tabela 2.</b> Substâncias propostas através do EM obtidos da madeira e casa de <i>S. grazielae</i> no modo positivo. ....	143
<b>Tabela 3.</b> Substâncias propostas através de EM da fração SGAc no modo positivo. ....	148
<b>Tabela 4.</b> Substâncias propostas através dos espectros de EM da fração SGD no modo positivo. ....	177
<b>Tabela 5.</b> Substâncias propostas através dos espectros de EM da fração SGB no modo positivo. ....	186
<b>Tabela 6.</b> Substâncias propostas através dos espectros de EM da fração SGR no modo positivo. ....	192
<b>Tabela 7.</b> Substâncias propostas dos espectros de EM de SGC no modo positivo. ....	194

## LISTA DE FLUXOGRAMA

### CAPÍTULO I

<b>Fluxograma 1.</b> Obtenção e extração do material vegetal de <i>S. grazielae</i> . .....	23
<b>Fluxograma 2.</b> Partição do extrato metanólico da madeira de <i>S. grazielae</i> . .....	24
<b>Fluxograma 3.</b> Fracionamento do extrato metanólico da casca de <i>S. grazielae</i> . .....	25
<b>Fluxograma 4.</b> Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano do extrato metanólico de <i>S. grazielae</i> . .....	30
<b>Fluxograma 5.</b> Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato metanólico de <i>S. grazielae</i> . .....	31
<b>Fluxograma 6.</b> Fracionamento cromatográfico da fase butanólica do extrato metanólico de <i>S. grazielae</i> . .....	32

## LISTA DE ESPECTROS

### CAPÍTULO I

<b>Espectro 1.</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) de SGD-1.....	40
<b>Espectro 2.</b> Expansão do RMN $^1\text{H}$ de SGD-1.....	40
<b>Espectro 3.</b> Expansão do RMN $^1\text{H}$ de SGD-1.....	40
<b>Espectro 4.</b> RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGD-1.....	41
<b>Espectro 5.</b> Expansão do RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT-Q de SGD-1.....	41
<b>Espectro 6.</b> Expansão do RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT-Q de SGD-1.....	41
<b>Espectro 7.</b> RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY e expansão (500 MHz, MeOD) de SGD-1.....	42
<b>Espectro 8.</b> RMN HSQC e expansão (MeOD) de SGD-1.....	42
<b>Espectro 9.</b> Expansão do HSQC de SGD-1.....	43
<b>Espectro 10.</b> RMN HMBC de SGD-1.....	43
<b>Espectro 11.</b> Expansão do HMBC de SGD-1.....	44
<b>Espectro 12.</b> Cromatograma do CG de SGD-1.....	44
<b>Espectro 13.</b> EM de baixa resolução no Tr. 22.4 de SGD-1A.....	44
<b>Espectro 14.</b> IES-EM de SGD-1.....	45
<b>Espectro 15.</b> RMN $^1\text{H}$ e expansão de (500 MHz, MeOD) de SGD-2.....	50
<b>Espectro 16.</b> RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGD-2.....	51
<b>Espectro 17.</b> RMN e expansão de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY de SGD-2.....	51
<b>Espectro 18.</b> RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (MeOD) de SGD-2.....	52
<b>Espectro 19.</b> RMN e expansão de HSQC (MeOD) de SGD-2.....	52
<b>Espectro 20.</b> EM de baixa resolução no Tr.28.06 de SGD-2.....	53
<b>Espectro 21.</b> EM-IES $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de SGD-2.....	53
<b>Espectro 22.</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.....	56
<b>Espectro 23.</b> RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.....	56
<b>Espectro 24.</b> RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.....	57
<b>Espectro 25.</b> RMN HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.....	57
<b>Espectro 26.</b> RMN $^1\text{H}$ de (500 MHz, MeOD) SGAc-1.....	59
<b>Espectro 27.</b> RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGAc-1.....	59
<b>Espectro 28.</b> RMN e expansão do $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY de SGAc-1.....	59
<b>Espectro 29.</b> RMN de HSQC (MeOD) de SGAc-1.....	60
<b>Espectro 30.</b> RMN de HMBC de SGAc-1.....	60
<b>Espectro 31.</b> EM-IES $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}+\text{H}]^-$ de SGAc-1.....	61
<b>Espectro 32.</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-2.....	64
<b>Espectro 33.</b> Expansão do RMN $^1\text{H}$ da mistura de SGAc-2.....	65
<b>Espectro 34.</b> RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-2.....	65
<b>Espectro 35.</b> Expansão do RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ da mistura de SGAc-2.....	65
<b>Espectro 36.</b> RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) da mistura de SGAc-2.....	66
<b>Espectro 38.</b> RMN- HMBC da mistura de SGAc-2.....	66
<b>Espectro 37.</b> RMN e expansão de HSQC da mistura de SGAc-2.....	66
<b>Espectro 39.</b> Expansão de RMN- HMBC da mistura de SGAc-3.....	67
<b>Espectro 40.</b> IES-EM $[\text{M}+\text{Na}]^+$ da mistura de SGAc-2.....	67
<b>Espectro 41.</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-3.....	70
<b>Espectro 42.</b> Expansão de RMN $^1\text{H}$ da mistura de SGAc-3.....	71
<b>Espectro 43.</b> RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) da mistura de SGAc-3.....	71
<b>Espectro 44.</b> RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-3.....	71
<b>Espectro 45.</b> EM-IES $[\text{M}+\text{H}]^+$ de SGAc-4B <sub>Z</sub> ou E Tr 5.46 min.....	74
<b>Espectro 46.</b> EM-IES $[\text{M}+\text{H}]^+$ de SGAc-4B <sub>Z</sub> ou E Tr 5.48 min.....	74
<b>Espectro 47.</b> EM-IES $[\text{M}+\text{H}]^+$ de SGAc-4A <sub>Z</sub> ou E no Tr. 5.08 min.....	76

<b>Espectro 48.</b> EM-IES [M+H] <sup>+</sup> de SGAc-4Az <sub>ou E</sub> Tr 5.30 min.....	76
<b>Espectro 49.</b> EM-IES [M+H] <sup>+</sup> de SGAc-4C e SGAc-4D no Tr. 5.27 min.....	78
<b>Espectro 50.</b> RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOD) de SGAc-4.....	79
<b>Espectro 51.</b> Expansão do RMN <sup>1</sup> H de SGAc-4.....	79
<b>Espectro 52.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT-Q (125 MHz, MeOD) de SGAc-4.....	79
<b>Espectro 53.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT-Q e expansão (125 MHz, MeOD) de SGAc-4.....	80
<b>Espectro 54.</b> Expansão do RMN <sup>13</sup> C-DEPT-Q de SGAc-4.....	80
<b>Espectro 55.</b> Expansão do RMN <sup>13</sup> C-DEPT-Q de SGAc-4.....	80
<b>Espectro 56.</b> RMN- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (MeOD) de SGAc-4.....	81
<b>Espectro 57.</b> RMN e expansão <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY de SGAc-4.....	81
<b>Espectro 58.</b> RMN de HSQC (MeOD) de SGAc-4.....	82
<b>Espectro 59.</b> RMN de HMBC de SGAc-4.....	82
<b>Espectro 60.</b> Expansão de HMBC de SGAc-4.....	83
<b>Espectro 61.</b> RMN- <sup>1</sup> H e expansão (400 MHz, MeOD) de SGAc-5.....	85
<b>Espectro 62.</b> RMN- <sup>13</sup> C-DEPTQ (100 MHz, MeOD) de SGAc-5.....	86
<b>Espectro 63.</b> RMN de HSQC (A) e <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY(B) (MeOD) de SGAc-5.....	86
<b>Espectro 64.</b> RMN e expansão de HMBC (MeOD) de SGAc-5.....	86
<b>Espectro 65.</b> RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) de SGAc-6.....	90
<b>Espectro 66.</b> Expansão do RMN <sup>1</sup> H de SGAc-6.....	91
<b>Espectro 67.</b> Expansão do RMN <sup>1</sup> H de SGAc-6.....	91
<b>Espectro 68.</b> Expansão do RMN <sup>1</sup> H de SGAc-6.....	91
<b>Espectro 69.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGAc-6.....	91
<b>Espectro 70.</b> RMN e expansão do <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (MeOD) de SGAc-6.....	92
<b>Espectro 71.</b> RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY (MeOD) de SGAc-6.....	92
<b>Espectro 72.</b> RMN de HSQC (MeOD) de SGAc-6.....	93
<b>Espectro 73.</b> RMN de HMBC de SGAc-6.....	93
<b>Espectro 74.</b> Expansão do HMBC de SGAc-6.....	94
<b>Espectro 75.</b> Expansão do HMBC de SGAc-6.....	94
<b>Espectro 76.</b> EM-IES [M+H] <sup>+</sup> de SGAc-6.....	95
<b>Espectro 77.</b> RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) de SGB-1.....	97
<b>Espectro 78.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGB-1.....	98
<b>Espectro 79.</b> RMN de HSQC (MeOD) de SGB-1.....	98
<b>Espectro 80.</b> IES -EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB-1.....	98
<b>Espectro 81.</b> Expansão do RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) de SGB-2.....	102
<b>Espectro 82.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGB-2.....	102
<b>Espectro 83.</b> Expansão de RMN <sup>13</sup> C-DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGB-2.....	102
<b>Espectro 84.</b> Expansão do RMN <sup>13</sup> C-DEPT-Q de SGB-2.....	103
<b>Espectro 85.</b> RMN- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (MeOD) de SGB-2.....	103
<b>Espectro 86.</b> RMN e expansão de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY (MeOD) de SGB-2.....	104
<b>Espectro 87.</b> RMN de HSQC (MeOD) de SGB-2.....	104
<b>Espectro 88.</b> Expansão do HSQC de SGB-2.....	105
<b>Espectro 89.</b> RMN de HMBC e expansão (MeOD) de SGB-2.....	105
<b>Espectro 90.</b> RMN de HMBC e expansão (MeOD) de SGB-2.....	106
<b>Espectro 91.</b> RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOD) de SGB-3.....	110
<b>Espectro 92.</b> RMN- <sup>13</sup> C-DEPTQ (100 MHz, MeOD) de SGB-3.....	110
<b>Espectro 93.</b> RMN- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (MeOD) de SGB-3.....	110
<b>Espectro 94.</b> RMN de HSQC (MeOD) de SGB-3.....	111
<b>Espectro 95.</b> RMN de HMBC (MeOD) de SGB-3.....	111
<b>Espectro 96.</b> RMN de NOESY (MeOD) de SGB-3.....	111
<b>Espectro 97.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB-3.....	112

<b>Espectro 98.</b> Expansão do RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de SGB-4.....	115
<b>Espectro 99.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPTQ (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de SGB-4. ....	116
<b>Espectro 100.</b> RMN- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de SGB-4. ....	116
<b>Espectro 101.</b> Expansão do RMN- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de SGB-4. ....	116
<b>Espectro 102.</b> RMN de HSQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de SGB-4.....	117
<b>Espectro 103.</b> RMN de HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de SGB-4.....	117
<b>Espectro 104.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> , [M+Na] <sup>+</sup> e [M+CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> de SGB-4.....	118

## CAPÍTULO II

<b>Espectro 1.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 2.80 de hidroxi-harmana (1). ....	150
<b>Espectro 2.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.74 da Harmana (4). ....	151
<b>Espectro 3.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.76 da Harmana A (5). ....	151
<b>Espectro 4.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.81 da Harmana B (6). ....	152
<b>Espectro 5.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.84 da Harmana C (7). ....	152
<b>Espectro 6.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.87 da Harmana D (8). ....	152
<b>Espectro 7.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 2.97 da Ofiorina A (3). ....	153
<b>Espectro 8.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.28 da Ofiorina B (2). ....	153
<b>Espectro 9.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 3.95, do Ácido lialosídico (9).....	155
<b>Espectro 10.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.55, Lialosídeo (10). ....	156
<b>Espectro 11.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.26, Ácido Estrictosidínico (11). ....	157
<b>Espectro 12.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.41, Estrictosidina (13). ....	158
<b>Espectro 13.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.70, de Antirrina (18) e <i>N</i> -metil antirrhine (25). ....	159
<b>Espectro 14.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 5.01, do epímero Antirrina (19). ....	160
<b>Espectro 15.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.8, das substâncias 20, 26 e 27. ....	161
<b>Espectro 16.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.22, da Antirrina glicosilada (27). ....	162
<b>Espectro 17.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 4.29, das substâncias 12, 17 e 24. ....	163
<b>Espectro 18.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 5.35 da <i>N</i> - <i>p</i> -coumaroil serotonina (32). ....	164
<b>Espectro 19.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 5.35 das substâncias 21, 33 e 34. ....	165
<b>Espectro 20.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 5.55, <i>N</i> - <i>p</i> -feruloil serotonina (36). ....	166

<b>Espectro 21.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 6.30, <i>N</i> -desmetil-correantosida (15). .....	167
<b>Espectro 22.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 6.98, Estrictosamida (16). .....	168
<b>Espectro 23.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 6.48, Ácido desmetilisopauridiantosídico (14). .....	169
<b>Espectro 24.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 7.05, da substância 44. ....	170
<b>Espectro 25.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 7.18, da substância 45. ....	171
<b>Espectro 26.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 7.29, da substância 46. ....	172
<b>Espectro 27.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 7.60, da substância 47. ....	172
<b>Espectro 28.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 7.89, da substância 48. ....	172
<b>Espectro 29.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 7.39, da substância 43. ....	174
<b>Espectro 30.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 15.37, substância 37. ....	175
<b>Espectro 31.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGAc no Tr 15.62, substância 53. ....	176
<b>Espectro 32.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.23, das substâncias 11, 24, 32 e 35. ...	178
<b>Espectro 33.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 5.26 da substância 28. ....	179
<b>Espectro 34.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 6.51 da substância 31. ....	180
<b>Espectro 35.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 2.97, Ofiorina A (3). ....	181
<b>Espectro 36.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 3.28, Ofiorina B (2). ....	181
<b>Espectro 37.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 3.77, Harmana (4). ....	181
<b>Espectro 38.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 3.82, isômero da Harmana A(5). ....	182
<b>Espectro 39.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 3.85, isômero da Harmana B (6). ....	182
<b>Espectro 40.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 3.95, Ác. Lialosídico (9). ....	182
<b>Espectro 41.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.26, Ácido 3- <i>epi</i> -Estrictosidínico (12). ....	182
<b>Espectro 42.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.29, isômero da Antirrina glicosilada (23) e descarboxi-lialosídico (55) .....	183
<b>Espectro 43.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.41, Estrictosidina (13). ....	183
<b>Espectro 44.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.55, Ácido desmetilisopauridiantosídico (14). ....	183
<b>Espectro 45.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.69, Antirrina (18) e <i>N</i> <sub>6</sub> -metilantirrina (25). ....	184
<b>Espectro 46.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.79, Epímero da Antirrina (19) e 3,5,6,14-tetradehidro Antirrina (26). ....	184
<b>Espectro 47.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 4.81 Epímero da Antirrina (20) e Matadina (50). ....	184
<b>Espectro 48.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 5.01, Epímero da Antirrina (21). ....	184
<b>Espectro 49.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 5.43, Epímero da Antirrina (22) e <i>N</i> - <i>p</i> -metoxi cinamoil serotonina (34). ....	185
<b>Espectro 50.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGD no Tr 6.30, <i>N</i> -desmetil-correantosida (15). ....	185
<b>Espectro 51.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 2.78, do Descarboxi-estrictosidínico (29). ....	187
<b>Espectro 52.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 3.55, Lialosídeo (10) e 3,4-didehidro estrictosidina (30). ....	188
<b>Espectro 53.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 2.93, Ofiorina A (3). ....	189



<b>Espectro 54.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 3.27, Ofiorina B (2).....	189
<b>Espectro 55.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 3.91, Ácido Lialosídico (9).....	189
<b>Espectro 56.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 4.18, Antirrina glicosilada (23).....	190
<b>Espectro 57.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 4.22, Ác. Strictosidínico (11).....	190
<b>Espectro 58.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 4.29, isômero do Ác. 3- <i>epi</i> -Strictosidínico (12) e Epímero da Antirrina glicosilada (24).....	190
<b>Espectro 59.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 4.37, Strictosidina (13).....	190
<b>Espectro 60.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 4.54, Ác. desmetilisopauridiantosídico (14).....	191
<b>Espectro 61.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGB no Tr 4.78, Antirrina insaturada (26).....	191
<b>Espectro 62.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGR no Tr 2.77, Descarboxi-Estrictosidínico (29).....	192
<b>Espectro 63.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGR no Tr 2.95, Ofiorina A (2).....	192
<b>Espectro 64.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGR no Tr 3.27, Ofiorina B (3).....	192
<b>Espectro 65.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGR no Tr 3.94, Ácido lialosídico (9).....	193
<b>Espectro 66.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGR no Tr 4.19, Antirrina glicosilada (23).....	193
<b>Espectro 67.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> no Tr 4.25, Ácido Strictosidínico (24).....	193
<b>Espectro 68.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> no Tr 4.40, Strictosidina (13).....	193
<b>Espectro 69.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 3.81, substância 37.....	195
<b>Espectro 70.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.05, substância 38.....	196
<b>Espectro 71.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.10, substância Ácido 3,4-dideidro Strictosidínico (39).....	197
<b>Espectro 72.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.21, Antirrina glicosilada (23), 5,6-dideidro Antirrina glicosilada (40) e <i>N<sub>b</sub></i> -metil Antirrina glicosilada (41).....	198
<b>Espectro 73.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.42, Hirsutasida D (42).....	198
<b>Espectro 74.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.72, <i>N<sub>b</sub></i> -metilAntirrina (25).....	199
<b>Espectro 75.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.53 <i>N</i> -metilAntirrina (56) e derivado insaturado <i>N</i> -metilAntirrina (49).....	200
<b>Espectro 76.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC Tr 4.84 de 18, 50 e 57.....	201
<b>Espectro 77.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 5.05, substância 51.....	202
<b>Espectro 78.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 5.13, substância 52.....	203
<b>Espectro 79.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 2.77, Descarboxi-Estrictosidínico (29).....	204
<b>Espectro 80.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 2.96, Ofiorina A (3).....	204
<b>Espectro 81.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 3.28, Ofiorina B (2).....	204
<b>Espectro 82.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 3.87, Harmana (4).....	204
<b>Espectro 83.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 3.96, Ácido Lialosídico (9).....	205
<b>Espectro 84.</b> IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.26, Ácido Strictosidínico (11).....	205
<b>Espectro 85.</b> IES-EM [M+H] <sup>+</sup> e IES-EM/EM [M+H] <sup>+</sup> de SGC no Tr 4.79, Matadina (50).....	205

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$\delta_H$	Deslocamento químico de hidrogênio
$\delta_c$	Deslocamento químico de carbono
$\lambda$	Comprimento de onda
%	Porcentagem
$\nu$	Estiramento
H <sub>2</sub> O	gua
ACD/Labs	Advanced Chemistry Development
AcOEt	Acetato de etila
<i>Br</i>	Broad = largo
°C	Graus Celsius
<i>calc.</i>	Calculada
CL	Cromatografia Líquida
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas
CL-UV/DAD	Cromatografia Líquida acoplada a detecção por Ultravioleta em Detector de Arranjo de Diodos
CL-RMN	Cromatografia Líquida acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
cm	Centímetro
cm <sup>-1</sup>	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
COSY	Correlated Spectroscopy
CVRD	Companhia Vale do Rio Doce
D <sub>3</sub> CCOCD <sub>3</sub>	Acetona deuterado
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DEPTQ	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Quantum
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
eV	Elétron Volt
EM	Espectrometria de Massas
EMBR	Espectro de Massas de Baixa Resolução
EMAR	Espectro de Massas de Alta Resolução
ESI-MS	ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
PDA	Arranjo fotodiodo
g	Gramas
IES	Ionização por Eletrospray
<i>J</i>	Constante de acoplamento
HCl	cido clorídrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation ( <sup>2</sup> J <sub>CH</sub> e <sup>3</sup> J <sub>CH</sub> principalmente)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz

I.E.	Impacto de Elétrons
L	Litro
Kg	Quilograma
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligrama
min	Minutos
mm	Milímetro
mult	Multiplicidade
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
m	Metro
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
N	Normalidade
<i>n</i> -ButOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> <sup>o</sup>	Número
<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	<i>n</i> -hexano
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
p.	Página
P.A.	Pro analyse
ppm	Parte por milhão
QTOF	Quadrupole Time-of-Flight
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear Dimensional
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
SGC	<i>Simira grazielae</i> casca extrato metanólico
SGC <sub>aq</sub>	<i>Simira grazielae</i> casca extrato metanólico fração aquosa
SGC <sub>naq</sub>	<i>Simira grazielae</i> casca extrato metanólico fração não aquosa
SGM	<i>Simira grazielae</i> madeira extrato metanólico
SGH	<i>Simira grazielae</i> madeira extrato metanólico partição hexano
SGD	<i>Simira grazielae</i> madeira extrato metanólico partição diclorometano
SGAc	<i>Simira grazielae</i> madeira extrato metanólico partição acetato de etila
SGB	<i>Simira grazielae</i> madeira extrato metanólico partição <i>n</i> -butanol
SGR	<i>Simira grazielae</i> madeira extrato metanólico partição resíduo
T	Tesla
SPE	Solid phase extraction
<i>t</i>	Triplete
<i>td</i>	Tripló duplete
TMS	Tetrametilsilano
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UV- Vis	Ultravioleta no visível
VAC	Voltage Current Alternated

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 Geral .....	3
2.2 Específicos .....	3
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>4</b>
<b>ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE <i>Simira grazielae</i></b>	
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
1.1 Produtos Naturais.....	7
1.2 Prospecção Fitoquímica.....	9
1.3 Família Rubiaceae .....	9
1.4 Gênero <i>Simira</i> .....	14
1.5 <i>Simira grazielae</i> Peixoto.....	19
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 Reagentes e Equipamentos .....	22
2.2 Coleta e Extração dos Materiais Vegetais .....	23
2.3 Fracionamento do Extrato Bruto da Madeira de <i>Simira grazielae</i> .....	23
2.4 Fracionamento do Extrato Bruto da Casca de <i>Simira grazielae</i> .....	25
2.5 Prospecção fitoquímica da madeira de <i>Simira grazielae</i> .....	25
2.5.1 Prospecção para saponinas .....	25
2.5.2 Prospecção para alcaloides .....	25
2.5.3 Prospecção para esteroides e triterpenoides.....	26
2.5.4 Prospecção para flavonoides.....	26
2.5.5 Prospecção para aminoácidos .....	27
2.5.6 Prospecção para açúcares redutores.....	27
2.5.7 Prospecção para derivados da cumarina .....	28
2.5.8 Prospecção para sacarídeos.....	29
2.5.9 Prospecção para purinas .....	29
2.5.10 Prospecção para ácidos orgânicos .....	29
2.6 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos da Madeira .....	29
2.6.1 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de SGD.....	30
2.6.2 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de SGAc.....	31
2.2.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de SGB.....	31
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
3.1 Prospecção Fitoquímica.....	33
3.2 Determinação Estrutural das Substâncias .....	33
3.2.1 Determinação estrutural dos componentes da mistura SGD-1 .....	36
3.2.2 Determinação estrutural da substância SGD-2 .....	46
3.2.3 Determinação estrutural de SGD-3.....	54
3.2.4 Determinação estrutural de SGAc-1 .....	57
3.2.5 Determinação estrutural da mistura de SGAc-2 .....	62
3.2.6 Determinação estrutural da mistura SGAc-3 .....	68
3.2.8 Determinação estrutural da SGAc-5 .....	84
3.2.9 Determinação estrutural da substância SGAc-6 .....	87
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>119</b>

<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>120</b>
--	------------

**CAPÍTULO II .....129**

**DESREPLICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE *S. grazielae***

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>132</b>
1.1 Visão geral da desreplicação .....	132
1.2 Técnicas utilizadas nas análises de desreplicação .....	133
1.3 Identificação por desreplicação - EM/EM .....	134
1.4 Os alcaloides .....	135
1.4.1 Definição e Histórico .....	135
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>140</b>
2.1 Reagentes e Equipamentos .....	140
2.2 Preparação do material vegetal .....	140
2.3 Levantamento Bibliográfico .....	140
2.4 Análise dos extratos e partições por CL-EM .....	140
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>142</b>
3.1 Estudo de desreplicação da madeira e casca de <i>S. grazielae</i> por IES-EM/EM .....	142
3.2 Estudo da desreplicação de SGAc de <i>S. grazielae</i> por EM/EM-IES .....	147
3.3 Estudo da desreplicação de SGD de <i>S. grazielae</i> por EM/EM-IES .....	177
3.4 Estudo da desreplicação de SGB de <i>S. grazielae</i> por EM/EM-IES .....	185
3.5 Estudo da desreplicação de SGR de <i>S. grazielae</i> por EM/EM-IES .....	191
3.6 Estudo da desreplicação de SGC de <i>S. grazielae</i> por EM/EM-IES .....	194
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>206</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>208</b>

**CAPÍTULO III .....214**

**TESTES BIOLÓGICOS DA MADEIRA DE *Simira grazielae***

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>217</b>
1.1 Atividade biológica de produtos naturais .....	217
1.2 Atividade Acaricida .....	218
1.3 Atividade frente à enzima tirosinase.....	218
1.4 Atividade inflamatória, anti-inflamatória e antinociceptiva .....	219
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>221</b>
2.1 Local de realização dos testes .....	221
2.2 Obtenção dos materiais vegetais.....	221
2.3 Atividade acariciada .....	221
2.3.1 Diluição do material .....	221
2.3.2 Obtenção dos carrapatos .....	221
2.3.3 Teste de Pacote de larvas .....	221
2.4 Atividade da enzima tirosinase .....	222
2.4.1 Preparação do material .....	222
2.4.2 Análise no UV-Vis .....	222
2.5 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória .....	223
2.5.1 Animais.....	223
2.5.2 Preparação do material .....	223
2.5.3 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	223
2.5.4 Modelo da formalina.....	224

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>225</b>
3.1	Atividade acariciada em Larvas de <i>R. microplus</i> .....	225
3.2	Atividade da enzima tirosinase .....	225
3.3	Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória .....	225
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>228</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>229</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>234</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA GERAL .....</b>	<b>236</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas superiores constituem uma das fontes naturais mais importantes de alimentos, fibras, madeira e também de diversos produtos químicos como óleos, essências, corantes, cosméticos, inseticida, defensivos agrícolas além de diversas substâncias de importância farmacêutica. Dessa forma, desde os primórdios das civilizações elas têm contribuído significativamente para o fornecimento de substâncias úteis aos seres humanos (CALIXTO, 2005; PALMA e PALMA, 2012).

O profundo conhecimento popular do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas (VIEGAS JR et al., 2006).

Os produtos naturais assumiram a liderança como fonte mais consistente e bem sucedida no fornecimento e na geração e de novos fármacos (GAUDENCIO e PEREIRA, 2015), sendo também a mais importante fornecedora de diversidade química para a descoberta de novos *leads* (candidatos a fármacos) para o tratamento terapêutico de diversas doenças (CRAGG e NEWMAN, 2013), além da utilização em outros setores comerciais.

A fitoterapia tem ressurgido como uma opção medicamentosa bem aceita e acessível em diferentes países, e, no caso do Brasil, é adequada para as necessidades locais de centenas de municípios brasileiros no atendimento primário à saúde (ELDIN e DUNFORD, 2001).

No nosso planeta existe cerca de 400.000 espécies de plantas, onde 60.000 dessas estão catalogadas no território brasileiro (GUERRA et al., 2001). O Brasil detém uma das maiores biodiversidades do mundo, uma variedade de biomas que reflete a riqueza da flora e fauna (EVELYN et al., 2012), porém, estima-se que somente 8% dessas espécies foram estudadas quanto a sua composição química, e que apenas 1.100 espécies foram avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas nas últimas décadas (GUERRA et al., 2001). Devido a isso, se fazem necessários a intensificação de estudos fitoquímicos e farmacológicos dos produtos naturais.

A fim de acelerar e descobrir esses novos compostos bioativos de plantas, os extratos vegetais brutos são submetidos à triagem química ou perfil metabólico pela técnica de desrepliação, visando distinguir entre os compostos já conhecidos e novas moléculas. Assim, o isolamento de compostos conhecidos, o consumo de tempo e gastos podem ser evitados e o isolamento de constituintes novos ou incomuns pode ser realizado (NG et al., 2009).

O procedimento geral da desrepliação envolve a análise dos componentes das matrizes complexas através de métodos cromatográficos, da coleta de dados espectroscópicos pelo acoplamento (hifenação) de diferentes detectores e pela comparação das informações obtidas com as bases de dados, proporcionando dessa maneira a detecção e proposta de elucidação estrutural.

O uso do método CL-EM/EM (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa sequencial), um dos mais utilizado, fornece massas moleculares de alta resolução, fórmulas moleculares, entre outras informações também importante, sem a necessidade do isolamento dos metabólitos (LANG et al., 2008). Assim, através dos espectros de massas e propostas de mecanismos de fragmentação para justificar a presença de picos essenciais pode-se contribuir significativamente para a identificação dos compostos.

Deste modo, a fim de contribuir para o conhecimento químico do gênero *Simira*, assumiu-se uma proposta para realização do estudo fitoquímico da planta da Amazônia brasileira *Simira grazielae* Peixoto (Rubiaceae), visando o isolamento e caracterização dos

seus metabólitos secundários e avaliar algumas atividades farmacológicas, uma vez que há apenas um estudo envolvendo esta espécie.

A fim de evitar consumo de tempo e gasto com análises convencionais, bem como isolamento de compostos já isolados de outras espécies de *Simira*, foi também realizado estudo direcionado de *S. grazielae* através de desreplicação por CL-EM usando extratos brutos e com frações obtidas por partições.

Este trabalho foi organizado como estabelecido pela guia de normalização da UFRRJ e encontra-se descrito em três capítulos: Isolamento e Determinação Estrutural dos Metabólitos de *Simira grazielae* (Capítulo I), Desreplicação por Espectrometria de massa de *Simira grazielae* *Simira* (Capítulo II) e Testes Biológicos de *Simira grazielae* (Capítulo III). As referências utilizadas estão nos respectivos capítulos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo a investigação fitoquímica e testes biológicos da madeira e da casca de *Simira grazielae*, ampliando o conhecimento fitoquímico da espécie e da família.

### 2.2 Específicos

- Isolar e purificar os constituintes químicos da madeira e casca e *S. grazielae*.
- Determinar estruturalmente as substâncias isoladas pelas técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e EM.
- Identificar metabólitos de *S. grazielae* através da técnica de Desreplicação com CLUE-EM/EM.
- Avaliar os efeitos dos testes antinociceptiva, anti-inflamatória, eficácia carrapaticida e a ação sobre a enzima tirosinase do extrato, das frações de *S. grazielae*.

## **CAPÍTULO I**

### **ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE *Simira grazielae***

## RESUMO

Este capítulo tem como objetivo principal a descrição do isolamento e a determinação estrutural de metabólitos especiais da madeira de *Simira grazielae* Peixoto, Rubiaceae. O material para o estudo foi coletado na Reserva Florestal do Vale do Rio Doce, Linhares-ES. Os metabólitos da madeira foram isolados através de partição do extrato metanólico usando os solventes orgânicos *n*-hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Butanol. No isolamento foram usadas técnicas cromatográficas clássicas com adsorventes em fase normal (gel de sílica), fase reversa (RP-2) e por exclusão (Sephadex LH-20), utilizando-se eluentes em gradiente de polaridade. Para a determinação estrutural utilizou-se técnicas de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C (1D e 2D), CL-EM/EM e CG-EM. O fracionamento cromatográfico e análise das frações conduziram ao isolamento e identificação de dezoito (18) substâncias, sendo a maioria alcaloides: *N*-acetil-serotonina (SGD-1A), 6'-*O*-vanilloilbarbutina (SGD-1B), Maxonina (SGD-2), triacilglicerídeo (SGD-3), 5-hidroxiendole-3-aldeído (SGAc-1), *trans-N-p*-coumaroil serotonina (SGAc-2A=SGAc-3A=SGAc-4A<sub>E</sub>), *N*-feruloil serotonina (Moschamine)(SGAc-2B=SGAc-4B<sub>E</sub>), *N*-cafeloil serotonina (SGAc-3B), *cis-N-p*-coumaroil serotonina (SGAc-4A<sub>Z</sub>), *cis*-Moschamine (SGAc-4B<sub>Z</sub>), Higarine (SGAc-4C), *N*-isoferuloil serotonina (SGAc-4D), Harmana (SGAc-5), Ofiorina B (SGB-1), Ofiorina A (SGB-2A), Ácido Estrictosidínico (SGB-3) e a Estrictosidina (SGB-4). Além do o alcaloide o Ácido desmetilisopauriantosídico (SGAc-6), que está sendo descrito como inédito na literatura. Com exceção dos alcaloides *N*-acetil-serotonina, Harmana e Ofiorina B, todos os demais estão sendo isolados e identificados pela primeira vez na espécie, no entanto a Harmana e a Ofiorina B estão sendo isolados em partições diferentes das já relatadas na Literatura.

**Palavras-chave:** RMN, Alcaloides, Dados espectrais.

## ABSTRACT

This chapter aims to describe the isolation and determine the special structural metabolites of wood from *Simira Grazielae* Peixoto, Rubiaceae. The material for the study was collected at the Rio Doce Valley Forest Reserve, Linhares-ES. Wood metabolites were exposed to methanolic extraction partitions using *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol organic solvents. No isolation was used for classical chromatographic techniques with normal phase (silica gel), reverse phase (RP-2) and exclusion (Sephadex LH-20) adsorbents using polarity gradient eluents. For structural determination we used <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR (1D and 2D), LC-MS/MS and GC-MS techniques. Chromatographic fractionation and analysis of fractions led to the isolation and identification of eighteen (18) substances, the majority being alkaloids: *N*-acetyl serotonin (SGD-1A), 6'-*O*-vanilloylbarbutine (SGD-1B), Maxonin (SGD), Triacylglyceride (SGD-3), 5-hydroxyendol-3-aldehyde (SGAc-1), *trans-N*-*p*-coumaroyl serotonin (SGAc-2A=SGAc-3A=SGAc-4AE), *N*-feruloyl serotonin (Moschamine)(SGAc-2B=SGAc-4BE), *N*-cafeloyl serotonin (SGAc-3B), *cis-N*-*p*-coumaroyl serotonin (SGAc-4Az), *cis*-Moschamine (SGAc-4BZ), Higarin (SGAc-4C), *N*-isoferuloyl serotonin (SGAc-4D), Harmana (SGAc-5), Ofiorina B (SGB-1), Ofiorina A (SGB-2A), Strictosidinic Acid (SGB-3) and Strictosidine (SGB-4). In addition to alkaloid or demethylisopurianostatic acid (SGAc-6), which is being described as published in the literature. With the exception of *N*-acetyl serotonin, Harmana and Ofiorina B alkaloids, all others are being used and used for the first time in the species, however Harmana and Ofiorina B are being used in different parts those already listed in the literature.

**Key words:** NMR, Alkaloids, Spectral data.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos Naturais

Os primeiros registros de plantas na medicina tradicional foram datadas cerca de 2600 a.C., com uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas, incluindo os óleos de espécies de *Cedrus* (cedro), *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula). Algumas destas plantas são utilizadas até os dias de hoje para o tratamento de doenças que vão desde tosses e resfriados a infecções parasitárias e inflamação (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Os recursos naturais sempre foram imprescindíveis para o desenvolvimento e manutenção da qualidade de vida. A diversidade de produtos obtidos dessa fonte incluem principalmente os alimentos, óleos, carboidratos, proteínas, fibras e os biocombustíveis (LUBBE e VERPOORTE, 2011).

Apesar da grande importância dos metabólitos primários como matéria-prima para inúmeros processos, plantas, fungos, bactérias e animais são cultivados e/ou extraídos de seu habitat em busca de substâncias especiais, os chamados metabólitos secundários. Essa química fina serve de base na indústria agroquímica para a produção de pesticidas, herbicidas, fabricação de produtos cosméticos, perfumes, corantes e principalmente no desenvolvimento de fármacos (BARREIRO e BOLZANI, 2009; LUBBE e VERPOORTE, 2011).

O florescimento da Química de Produtos Naturais como ciência de fronteira quimiofarmacêutica ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial. A demanda por antibióticos impulsionou os programas de pesquisa dentro das companhias farmacêuticas por novas metodologias de triagem metabólica. A chamada Golden era (1940-1980) ofereceu novas possibilidades no campo da medicina através da descoberta e produção de um arsenal terapêutico nunca visto antes. Pode-se observar isso, pela expectativa de vida que era 44 anos no início do século XX e saltou para os 77 anos nos meados da década de 1990 (LI e VEDERAS, 2009)

A química de produtos naturais sempre teve papel relevante para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, fragrâncias, e outros bioprodutos, dado a diversidade estrutural e grupos funcionais presentes em milhares de substâncias que compõem a biodiversidade terrestre (BOLZANI, 2016). Decorrente a variedade de metabólitos secundários oriundos dos produtos naturais, esses são uma excelente fonte para geração de novos fármacos e para terapia de diversas doenças (GAUDENCIO e PEREIRA, 2015).

Em uma revisão publicada por Newman e colaboradores (2016), foi realizado o levantamento da quantidade de agentes terapêuticos aprovados durante 34 anos, de janeiro de 1981 a dezembro de 2014 (Figura 1). Dos 1562 novos agentes terapêuticos confirmados, 36% foram de produtos naturais ou derivados deles, e 26% sintetizados com base nos produtos naturais.

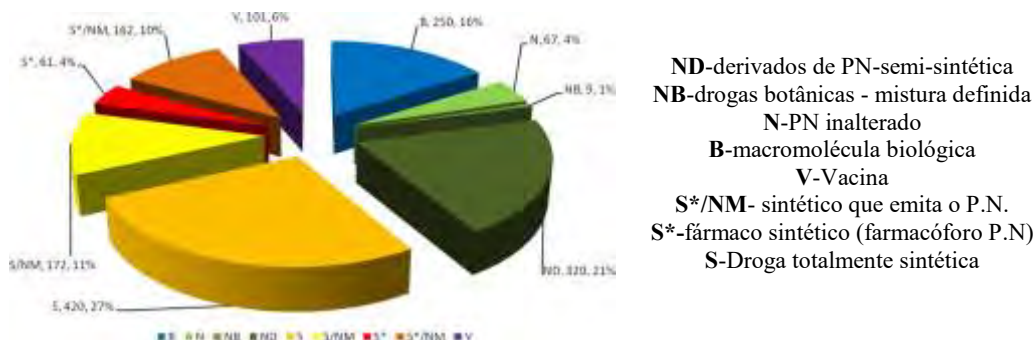


Figura 1. Agentes terapêuticos aprovados 1981-2014 N = 1562 (número total).

Fonte: NEWMAN e CRAGG, 2016.

A Figura 2 exibe a porcentagem de moléculas de medicamentos por ano oriundo de produto natural, de compostos baseados ou de seus derivados. No ano de 2014, dos 40 medicamentos aprovados 10 foram de moléculas naturais e seus derivados, representando 25%. Os dados apresentados na Figura 1 e 2 destacam o papel contínuo e importante que os produtos naturais e seus derivados vêm desempenhando no desenvolvimento terapêutico, mesmo com o reduzido nível de programas de descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais nas indústrias farmacêuticas (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Newman e Cragg publicaram três trabalhos (2007, 2012) nos quais mostram que aproximadamente 50% dos fármacos de uso clínico presentes no mercado farmacêutico são de origem natural. De modo geral, esses compostos são encontrados como purificados, derivados, análogos ou então obtidos através de processos de semi-síntese. No caso dos medicamentos usados no tratamento do câncer ou doenças infecciosas esse percentual é ainda maior, cerca de dois terços desses agentes são de origem natural (NEWMAN e CRAGG 2007; 2012).



**Figura 2.** Porcentagem de medicamentos aprovados de: N-Produto natural inalterado; NB-drogas botânicas-misturas definidas; ND-derivados de P.N-semi-sintética; S\*-fármaco sintético (farmacóforo P.N.) registradas no ano de 1981-2014.

Fonte: NEWMAN e CRAGG, 2016.

Em um amplo levantamento de dados realizado por 575 botânicos brasileiros e 14 estrangeiros mostrou-se a grande diversidade de 46.097 espécies entre plantas, algas e fungos encontrados no Brasil. Quase metade desse número (43%) é exclusiva (endêmica) do território nacional (FIORAVANTI, 2016).

Mesmo a que a biodiversidade brasileira esteja incluída entre as maiores do planeta é ainda pouco explorada. Estima-se que apenas 8% dessas espécies foram estudadas quanto a sua composição química, tendo 1.100 espécies avaliadas farmacologicamente (GUERRA e NODARI, 2001), sendo que os bioprodutos de grande impacto, capazes de gerar riqueza e contribuir para a balança econômica nacional ainda estão no plano dos desejos (BOLZANI, 2016).

O avanço da pesquisa de produtos naturais no Brasil se revela promissor, cresceu e se diversificou de maneira notável no século XXI (BERLINCKY et al., 2017), mas ainda é perceptível o atraso nas inovações a partir de produtos naturais e derivados. Isso se deve aos entraves burocráticos, referente ao acesso ao patrimônio genético e aos saberes tradicionais, tanto quanto, ao escasso financiamento dos projetos de pesquisas. Além do fato que, o processo é complexo e demorado, sendo uma tarefa árdua de pesquisa e garimpo visando à viabilização de produtos (BOLZANI, 2016).

Mesmo diante desse cenário é preciso incentivar os setores acadêmicos, governamentais e empresariais, na busca pela inovação industrial baseada em produtos naturais e seus derivados aproveitando ao máximo, com consciência, nossa vasta biodiversidade (BOLZANI, 2016).

## 1.2 Prospecção Fitoquímica

Em decorrência das diversas substâncias químicas presente nos materiais vegetais é relevante fazer uma análise fitoquímica preliminar, prospecção fitoquímica, com objetivo de caracterizar os componentes químicos presentes nas plantas. Esses metabólitos poderão vir a serem marcadores químicos da espécie, ou até mesmo da região que são encontradas (BESSA et al., 2013).

Com a informação a cerca da composição química do vegetal, obtido da prospecção química, pode-se delinear os melhores métodos para a extração dos metabólitos de anseio no estudo (CARVALHO et al., 2014; LUZ et al., 2014).

Os métodos e técnicas empregados na prospecção fitoquímica variam de acordo com a tecnologia disponível. Existem métodos rápidos e de baixo custo e métodos que exigem equipamentos nem sempre existentes ou disponíveis nos laboratórios. Geralmente são empregados testes por reações químicas de coloração e precipitação em tubos de ensaios e placas de toques. Também podem ser feitas detecções e fracionamentos cromatográficos com reagentes distintos, acompanhados de testes farmacológicos simples (CUNHA, 2014).

Apesar das informações relevantes geradas pela triagem preliminar, procedimentos fitoquímicos mais específicos são importantes para que as substâncias de interesse sejam elucidadas e submetidas a análises de cunho farmacológico (ARAUJO, FARIA e SAFARI, 2014).

## 1.3 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae é conhecida pela sua diversidade e é classificada como a quarta maior família em número de espécies das Angiospermas (Tabela 1), ficando atrás apenas de Orchidaceae, Asteraceae e Leguminosae. Delprete (2004) estimava que a família fosse composta de cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies no mundo; estes números foram posteriormente analisados por Govaerts e colaboradores (2011) e em sua lista de verificação apresentou cerca de 13.443 espécies em 598 gêneros. A diferença no número de gêneros entre essas duas contas é em parte devido ao advento de filogenias moleculares (estudo da relação evolutiva entre grupos de organismos, por meio de sequenciamento de dados moleculares) e comparações morfológicas recentes que resultaram na redução de sinonímia de muitos gêneros.

**Tabela 1.** Cinco maiores famílias Angiospermas com número aproximado de espécies no mundo, (GOVAERTS et al., 2011; LPWG, 2017; SOUZA e LOEUILLÉ; 2018).

Famílias	Número de Espécies
Asteraceae	24.000
Orchidaceae	22.500
Leguminosae	19.500
Rubiaceae	13.443
Poaceae	10.550

No Brasil existe cerca de 126 gêneros e 1415 espécies de Rubiaceae, dos quais 16 gêneros e 733 espécies (51,8 %) são endêmicos do país. Dentre a distribuição dessa família nos domínios fitogeográficos tem-se destaque de sua presença na Amazônia e na Mata Atlântica com 750 e 585 espécies respectivamente (Tabela 2) (FLORA DO BRASIL, 2018).

**Tabela 2.** Distribuição de espécies de Rubiaceae pelos domínios fitogeográficos no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2018).

Domínios Fitogeográficos	Espécies de Rubiaceae
Amazônia	750
Caatinga	175
Cerrado	404
Mata Atlântica	584
Pampa	46
Pantanal	34

Podem existir até 2.000 espécies desta família no Brasil, incluindo as que ainda não foram relatadas; devido às vastas áreas desconhecidas presentes no país, especialmente Região Amazônica e Mata Atlântica. Isso, porém, é apenas uma projeção hipotética com base em fatores de probabilidade relacionados com as vastas áreas sem estudos botânicos no país (DELPRETE, 1998; BREME e ERIKSSON, 2009).

A distribuição de Rubiaceae ocorre por todo o mundo, em sua maior parte, é própria das regiões mais quentes, principalmente nos trópicos, diminuindo em direção ao norte e ao sul, sendo a América do Sul a região do mundo com maior número de espécies (CHIQUIERI, Di MAIO e PEIXOTO, 2004). Essa família está presente em quase todas as formações naturais: cerrados, caatingas, banco de areia, campo de altitude, prateleiras, dunas, campos restingas e florestas (PINA et al., 2012). Está representada em todas as camadas de vegetação tropical, em vários habitat: ervas, arbustos, cipós e árvores de pequeno a grande porte, com uma diversidade de dimensões (DELPRETE, 1998; DELPRETE e JARDIM, 2012).

Muitos esforços foram dedicados a estudos filogenéticos para classificação interna da família, subfamílias, tribos ou grupos ainda menores, a fim de ter uma visão geral da estrutura familiar (ROVA et al., 2002). Assim, a divisão mais adequada de Rubiaceae são três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae (BREMER e ERIKSSON, 2009).

As maiores atenções para a família Rubiaceae concentram-se no interesse econômico representado principalmente pela espécie *Coffea arabica* (café). O café vem sendo usado há séculos como estimulante, assim como a quinina e ipeca (BORHIDI e DIEGO-PÉREZ, 2002). Possui a cafeína como um dos principais componentes químicos. Esta substância atua como estimulante do sistema nervoso central, bem como vasoconstritora, broncodilatadora e diurética, além de ser um dos componentes de enxaquecas (HEITZMM et al., 2005). É um representante expressivo na economia, estando descrito como umas das bebidas mais apreciadas e consumidas no mundo, produzidas a partir de seus frutos, empregando mais de 25 milhões de pessoas em mais de 60 países, desde a produção ao seu processamento (O'BRIEN e KINNAIRD, 2003).

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é outra espécie da família que apresenta grandes possibilidades de exploração econômica, por meio do consumo do fruto ao natural, na produção de doces, compotas e licores, bem como na extração de corantes dos frutos imaturos (NASCIMENTO e DAMIÃO-FILHO, 1998). Apresenta atividade antiangiogênica, anti-inflamatória e antioxidante (KOO et al., 2004; KIM et al., 2005). É um dos gêneros de importância do qual a genipina foi isolada, um iridoide incolor, usado por indígenas para tatuar pele, pois produz uma coloração negra quando reage com proteínas da pele.

Plantas do gênero *Diodia* são empregados na medicina popular e tradicional como agentes antirreumático, antidiarreico, antiofídico, laxativo e emético, no tratamento de úlceras gástricas, urticárias, dores de ouvido, dores abdominais, (MOURA et al., 2006) e também antipirético (BHATTACHARYYA e ALMEIDA, 1985; FERRARI et al., 1986) e em correções de irregularidades menstruais (BAHIA, 1979).



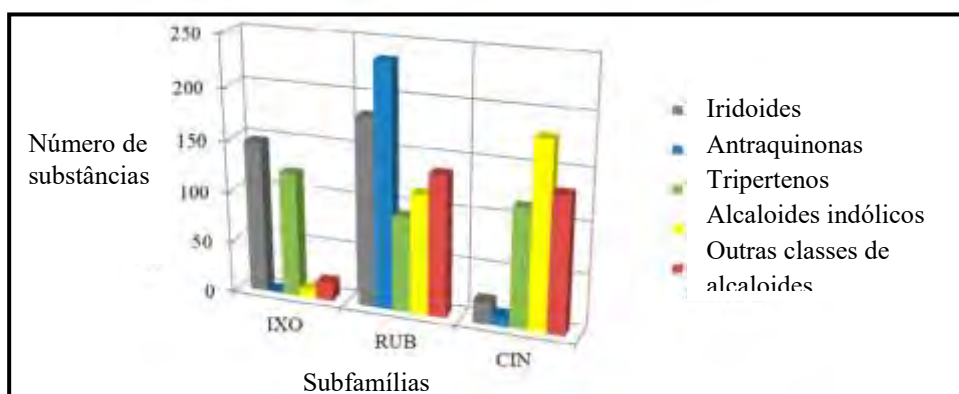
A espécie *Uncaria quianensis* (unha de gato) é uma planta usada pelos indígenas peruanos e brasileiros há centenas de anos e os rumores de suas curas milagrosas despertaram nas últimas décadas, o interesse científico e medicinal. Esse interesse é decorrente da indicação popular como imunestimulante e anti-inflamatório. A espécie vem sendo submetida à extração indiscriminada e intensiva, o que poderá levá-la à diminuição da variabilidade genética ou até mesmo à sua extinção (PEREIRA et al., 2006).

Espécies dessa família apresentam uma variada atividade biológica, podendo-se destacar: antimicrobiana (JAYASINGHE et al., 2002), antioxidante (FRAGOSO et al., 2008), inibidora do crescimento em linhas de células tumorais (MACHADO et al., 2008), propriedades analgésicas e anti-inflamatórias usadas comumente no tratamento de feridas e reumatismo (BERTUCCI et al., 2008). Apresentam ainda, atividade antinociceptiva e antitussígena (GAZDA, 2004), hipoglicemiante (GUERRERO-ANALCO et al., 2007), fototóxica (CASTANEDA et al., 1991), antimalárica (SUN et al., 2008), antiviral, efeitos em doenças vasculares (HEITZMM et al., 2005), e atuação no sistema nervoso central (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2006).

Espécies de Rubiaceae podem ser utilizadas em análises ecológicas, juntamente com a família Melastomataceae por fornecem muitas frutas comestíveis, dos quais pássaros tropicais se alimentam, apresentando-se dessa forma um indicador para estudos ecológicos e da situação da conservação da vegetação tropical (BREMER e ERIKSSON, 1992).

A composição química dessa família é pouco variável, destacando-se os flavonoides e outros derivados fenólicos, terpenoides (diterpenos) (BOLZANI et al., 2001), triterpenos, iridoides, antraquinonas e alcaloides indólicos. Os três últimos são considerados marcadores quimiotaxonômico de Rubiaceae, e se apresentam sob um perfil químico diferente e típico para cada subfamília (GAZDA, 2004; CARDOSO et al., 2008).

Os iridoides são descritos como marcadores quimiotaxonômico exclusivos na subfamília Ixoroideae, os alcaloides indólicos em Cinchonoideae e as antraquinomas na Rubioideae (Figura 3). Alguns compostos isolados selecionados de espécies de Rubiaceae estão mostrados na Figura 4 (MARTINS e NUNEZ, 2015).



**Figura 3.** Diversidade química e distribuição de metabólitos secundários nas subfamílias de Rubiaceae. IXO: Ixoroideae, CIN: Cinchonoideae e RUB: Rubioideae. Adaptado de Martins e Nunez, 2015.

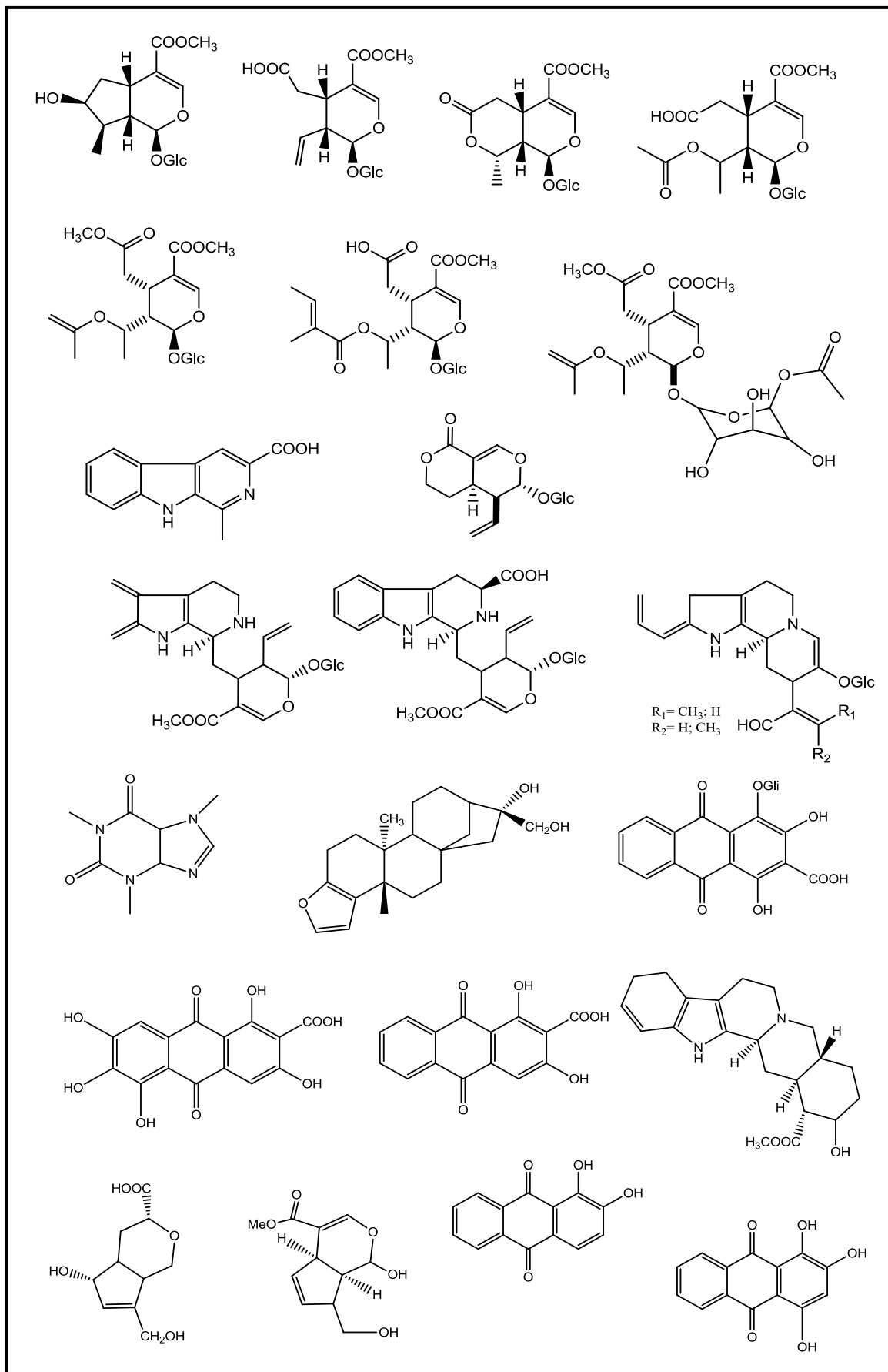


Figura 4. Alguns metabólitos especiais isolados de Rubiaceae (continua).

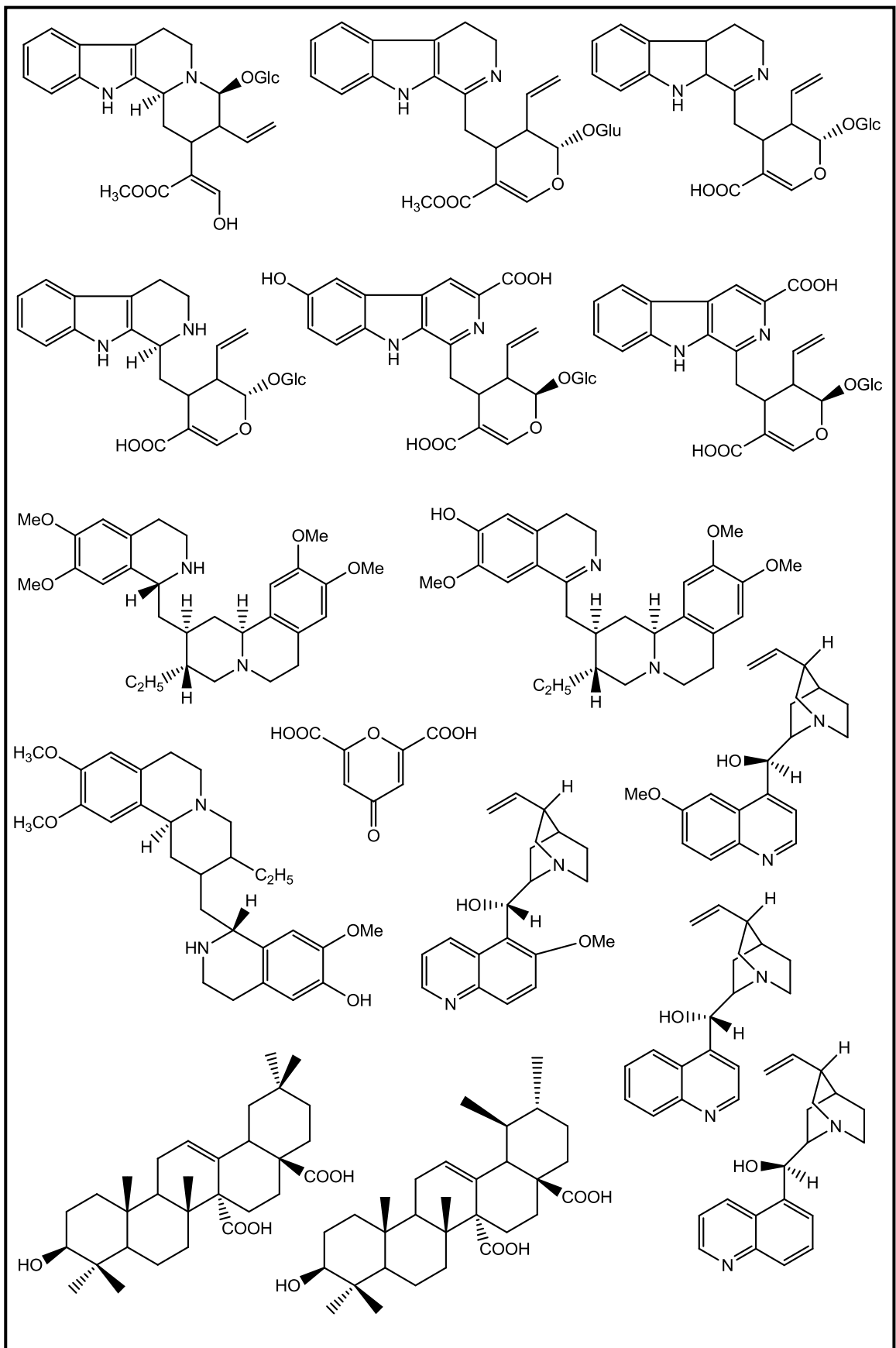
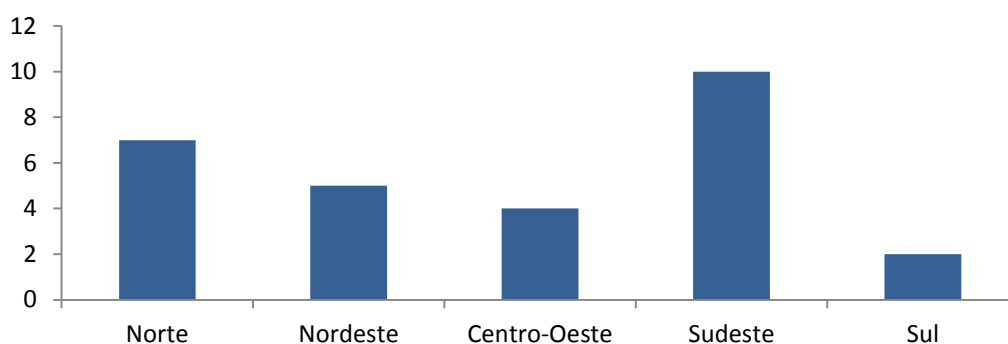


Figura 4. Continuação.

#### 1.4 Gênero *Simira*

*Simira* é um dos principais gêneros pertencentes à família Rubiaceae, compreendendo em 45 espécies distribuídas pela região neotropical. No Brasil há ocorrência de 19 espécies distribuídas nas regiões: norte (Acre, Amazonas, Amapá, Rondônia, Pará e Tocantins), nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Piauí), centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e no Sul (Paraná e Santa Catarina) (Gráfico 1) (FLORA DO BRASIL, 2018).



**Gráfico 1.** Número de espécies de *Simira* distribuídas por região brasileira.

Com base em dados morfológicos o gênero *Simira* foi classificado na subfamília Cinchonoideae e na tribo Rondeletieae (MORAES et al., 2009). A madeira desse gênero possui como característica um cerne marrom ou acinzentado, albúrneo amarelado ou acinzentado quando fresco, e geralmente adquire coloração vermelha, rósea ou violácea quando exposto ao ar (MAINIERI e CHIMELO, 1989) e desaparecem alguns meses após a coleta (CALLADO e NETO, 2003). É a única dentre as Rubiáceas que apresentam essa mudança de cor quando cortadas e expostas a luz. Apresenta ainda, um brilho médio ou reduzido, inodoro e com sabor levemente amargo (MARGALHO et al., 2017).

No Brasil, espécies de *Simira* são conhecidas como araribá, araribá-vermelha, araribá-rosa, araribá-branca, quina-rosa, canela-samambaia, maiate e marfim. São encontradas como árvores de pequeno a grande porte (PEIXOTO, 1982) e possui densidade variável, textura fina e uniforme (RECORD e HESS, 1972).

Um aspecto que deve ser considerado é a associação que muitas vezes são feitas das propriedades assinaladas pela etnofarmacologia ao nome popular. Plantas com propriedades amargas de uma casca sugerem, de modo geral, ao homem leigo, supostas qualidades febrífugas e antimaláricas (RIZZINI e MORS, 1995). Decorrentes a isso, muitos vegetais amargos recebem o nome de quina, mesmo não tendo tais ações farmacológicas. Devido ao sabor amargo das espécies brasileiras do gênero *Simira* levou Hoehne (1920) a tratá-las como pseudo-quinas, relatando ainda propriedades tônicas (fortificantes) e antifebris das mesmas.

Um estudo realizado sobre a medicina popular em mercados no estado do Rio de Janeiro identificou como nome popular de quina-rosa a espécie *Simira glaziovii*. As cascas dessa espécie são utilizadas como chás, com intuito de tratarem principalmente problemas relacionados ao sangue como o “combate a anemia”, “limpar o sangue” e também para “queda de cabelo”. São consumidas ainda em casos de inflamações em geral, impotência, e problemas circulatórios (SILVA et al., 2001).

O interesse sobre o estudo químico de espécies de *Simira* é baseado nessa utilização por comunidades locais, além dos aspectos quimiotaxonômico e atividades farmacológicas registradas (ALVES et al., 2001). Trabalhos verificaram atividades de capacidade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

(ARAÚJO et al., 2009; SANCHES, 2017) e toxidez frente a larvas de *Artemia salina* de extratos e frações de espécies de *Simira* (ARAÚJO et al., 2009).

A literatura relata ainda as propriedades farmacológicas dos compostos isolados de espécies do gênero, principalmente dos alcaloides. Castaneda e colaboradores (1991) testaram o alcaloide harmana oriundo de *S. mexicana* com metodologias *in vitro*, tendo apresentado toxicidade no ensaio de *Artemia salina* e moderada atividade contra *Plasmodium falciparum*. O mesmo alcaloide foi isolado de *S. salvadorensis* e apresentou fototoxicidade, inibindo o crescimento de *Sacharomyces cereviceae*. Substâncias procedidas de *Simira* apresentam ainda, atuação do sistema nervoso central e contribuem para o mecanismo de defesa da planta e causam fotodermatites em humanos e animais (ARNASON et al., 1983).

Além do uso farmacológico, as espécies desse gênero também são empregadas no fornecimento de madeira, em artesanato, paisagismo urbano e tinturaria (CORRÊA, 1978). As espécies do sudeste do Brasil são utilizadas em construção interior, como tabuados e tacos (SALDANHA DA GAMA, 1872). *S. tinctoria* da Amazônica é usada na confecção de colheres e gamelas. A espécie *S. salvadorensis* é utilizada em construções e o corante vermelho dessa espécie é empregado no tingimento de redes de dormir e outros artigos regionais (RECORD e HESS, 1972).

A literatura registra estudos químicos das espécies *S. maxonii* (HASBUN et al., 1989; CASTRO e LÓPEZ, 1986), *S. mexicana* (CASTANEDA et al., 1991), *S. salvadorensis* (ARNASON et al., 1983), *S. rubra* (ARNASON et al., 1983), *S. glaziovii* (BASTOS et al., 2002; ALVES et al., 2001; ARAÚJO, 2011), *S. eliezeriana* (ARAÚJO, 2011), *S. sampaioana* (MOREIRA et al., 2017), *S. gardneriana* (FERRAZ, 2017) e *S. grazielae* (SANCHES, 2017).

Dentre as classes metabólicas identificadas podem-se destacar os alcaloides, triterpenos e os esteroides. Os alcaloides harmana, maxonina, ofiorinas aparecem como os mais comuns neste gênero. (BASTOS et al., 2002). Na Tabela 3 e Figura 5 estão descritas e representadas, respectivamente, as substâncias isoladas de espécies desse gênero.

**Tabela 3.** Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Simira*.

Substâncias	Espécies	Referências
<b>Alcaloides</b>		
Harmana (1)	<i>S. mexicana</i> , <i>S. glaziovii</i> , <i>S. rubra</i> , <i>S. salvadorensis</i> , <i>S. eliezeriana</i> , <i>S. grazielae</i> , <i>S. sampaioana</i> , <i>S. gardneriana</i>	Arnason et al., 1983 Araujo et al., 2011; 2012 Castaneda et al., 1991 Sanches, 2017 Moreira et. al., 2017 Ferraz, 2017
Ofiorina A (2)	<i>S. glaziovii</i> , <i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i> ,	Aquino et al., 1994 Bastos et al., 2002
Ofiorina B (3)	<i>S. glaziovii</i> , <i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i> , <i>S. grazielae</i>	Aquino et al., 1994 Bastos et al., 2002 Sanches, 2017
Sickingina (4)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
5 $\alpha$ -carboxi-strictosidina (5)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
Ácido lialosídico (6)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
Maxonina (7)	<i>S. maxonii</i> <i>S. sampaioana</i>	Castro e Lopes, 1986 Hasbun et al., 1989 Kelly et al., 1993 Moreira et. al., 2017
Harmina (8)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Bastos et al., 2002
Strictosamida (9)	<i>S. mexicana</i>	Castaneda et al., 1991

<i>N</i> -acetil-serotonina (10)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
Isomalindina (11)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Malindina (12)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
<b>Cumarinas</b>		
Escopoletina (13)	<i>S. glaziovii, S. tinctoria, S. williamsii, S. grazielae</i>	Aquino et al., 1994 Araujo et al., 2012 Sanches, 2017
Umbeliferona (14)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
Isofraxidina (15)	<i>S. glaziovii, S. grazielae</i>	Araujo et al., 2012 Sanches, 2017
7-hidroxi-8-metoxicumarina (16)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
5,7 – dimetoxicumarina (17)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
<b>Terpenoides</b>		
Simirana A (18)	<i>S. eliezeriana</i>	Araujo et al., 2011
Simirana B (19)	<i>S. glaziovii, S. eliezeriana</i>	Araujo et al., 2011 Araujo et al., 2012
	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Angelocunhol (20)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Lupeol (21)	<i>S. glaziovii</i>	Araujo et al., 2012
Lupenona (22)	<i>S. glaziovii</i>	Araujo et al., 2012
1 $\beta$ ,3 $\beta$ -diidroxiolean-12-eno (23)	<i>S. glaziovii</i>	Bastos et al., 2002
Acido oleanoico (24)	<i>S. tinctoria, S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
Eufol (25)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
Butirospermol (26)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
<b>Esteroides</b>		
$\beta$ -sitosterol (27)	<i>S. glaziovii, S. eliezeriana, S. grazielae, S. sampaioana</i>	Alves et al., 2001
		Araujo et al., 2011 Araujo et al., 2012 Bastos et al., 2002 Sanches, 2017 Moreira et. al., 2017
Estigmasterol (28)	<i>S. glaziovii, S. eliezeriana, S. grazielae, S. sampaioana</i>	Araujo et al., 2011 Araujo et al., 2012 Bastos et al., 2002 Sanches, 2017 Moreira et. al., 2017
Campesterol (29)	<i>S. glaziovii, S. eliezeriana</i>	Araujo et al., 2011 Araujo et al., 2012
3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol(30)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
$\beta$ -sitostenona (31)	<i>S. glaziovii</i>	Araujo et al., 2012
Estigmastenona (32)	<i>S. glaziovii</i>	Araujo et al., 2012
3- <i>O</i> -glicopiranosil-(6,1)-acil-sitosterol (33)	<i>S. glaziovii</i>	Araujo et al., 2012
Sitost-4-en-6-ol-3-ona (34)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Estigmast-4,22- dien-6-ol-3-ona(35)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Campest-4-en-6-ol-3-ona (36)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Sitost- 4-en-3-ona (37)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Estigmast-4,22-dien-3-ona (38)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Campest- 4-en-3-ona (39)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
Estigmast-4,22-dien-3-ol (40)	<i>S. sampaioana</i>	Moreira et. al., 2017
<b>Iridoides</b>		

Loganina (41)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
Serosídeo (42)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
Secoxiloganina (43)	<i>S. tinctoria</i> , <i>S. williamsii</i>	Aquino et al., 1994
<b>Lignanas</b>		
Pinoresinol (44)	<i>S. eliezeriana</i>	Araujo et al., 2011
Pinocebrina (45)	<i>S. glaziovii</i>	Araujo et al., 2012
Siringaresinol (46)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
<b>Outras substâncias</b>		
Metil-hexadecanoato (47)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
Ácido hexadecanoico (48)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
Ácido octadecanoico (49)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
Ácido eicosanoico (50)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
inositol (51)	<i>S. glaziovii</i>	Alves et al., 2001
Metil- <i>trans</i> -4-hidroxi-3-methoxicinamato (52)	<i>S. glaziovii</i>	Bastos et al., 2002
Coniferil (53)	<i>S. eliezeriana</i>	Araujo et al., 2011
Siringaldeído (54)	<i>S. eliezeriana</i> , <i>S. grazielae</i>	Araujo et al., 2011 Sanches, 2017
3,4,5-trimetoxifenol (55)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
6'- <i>O</i> -vaniloilchiosídeo (56)	<i>S. grazielae</i>	Sanches, 2017
Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactosídeo (57)	<i>S. gardneriana</i>	Menezes, 2014.
Octacosanol (58)	<i>S. gardneriana</i>	Menezes, 2014.
Heptacosano (59)	<i>S. gardneriana</i>	Menezes, 2014.

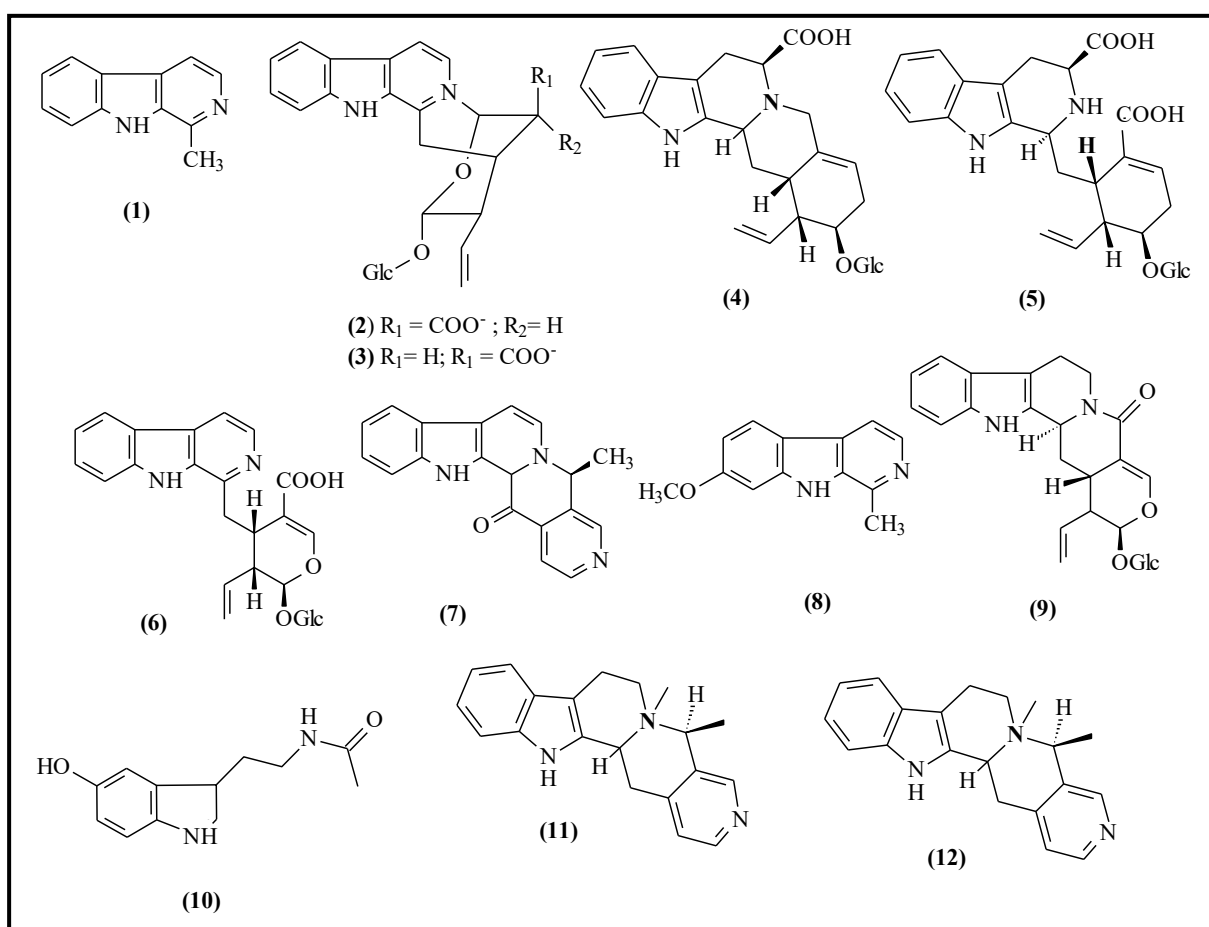
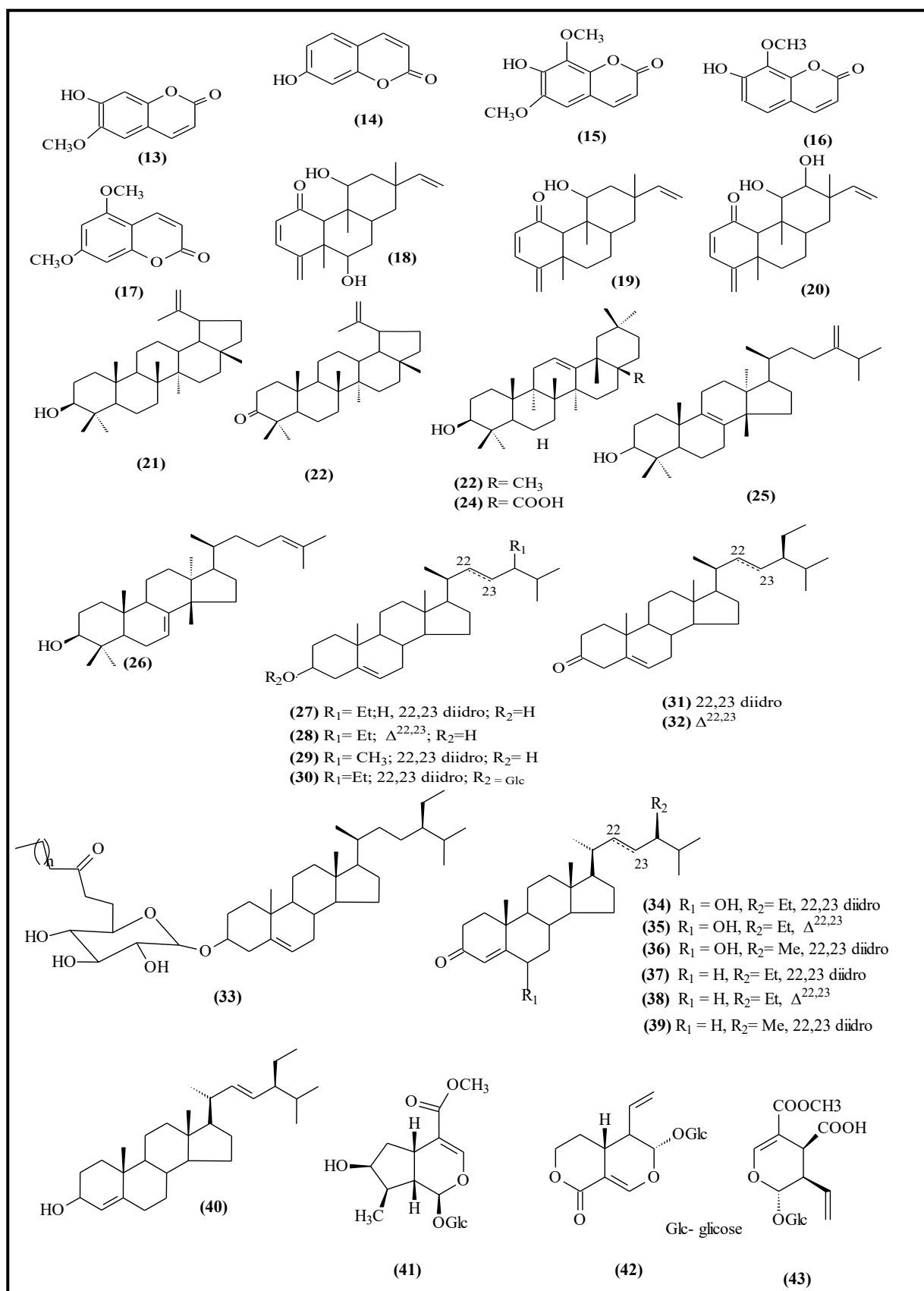
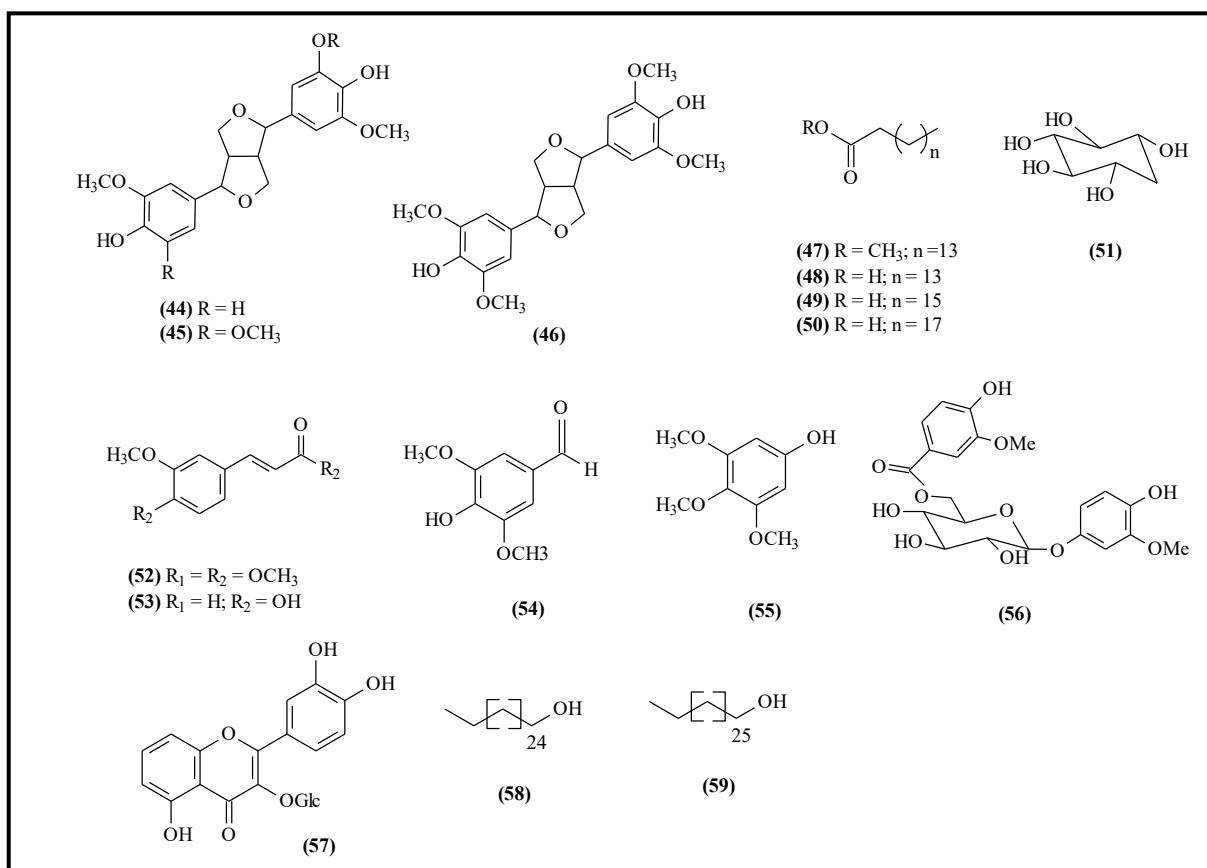


Figura 5. Estrutura química dos compostos isolados do gênero *Simira* (Continua).



**Figura 5.** Continuação.





**Figura 5.** Continuação.

### 1.5 *Simira grazielae* Peixoto

A planta *Simira grazielae* Peixoto, (Figura 6) é umas das 25 espécies que receberam o nome “grazielae” em homenagem à botânica brasileira Graziela Maciel Barroso (PEIXOTO, 1982), conhecida como a primeira dama da botânica no Brasil e maior catalogadora de plantas do país (CNPq, 2016).

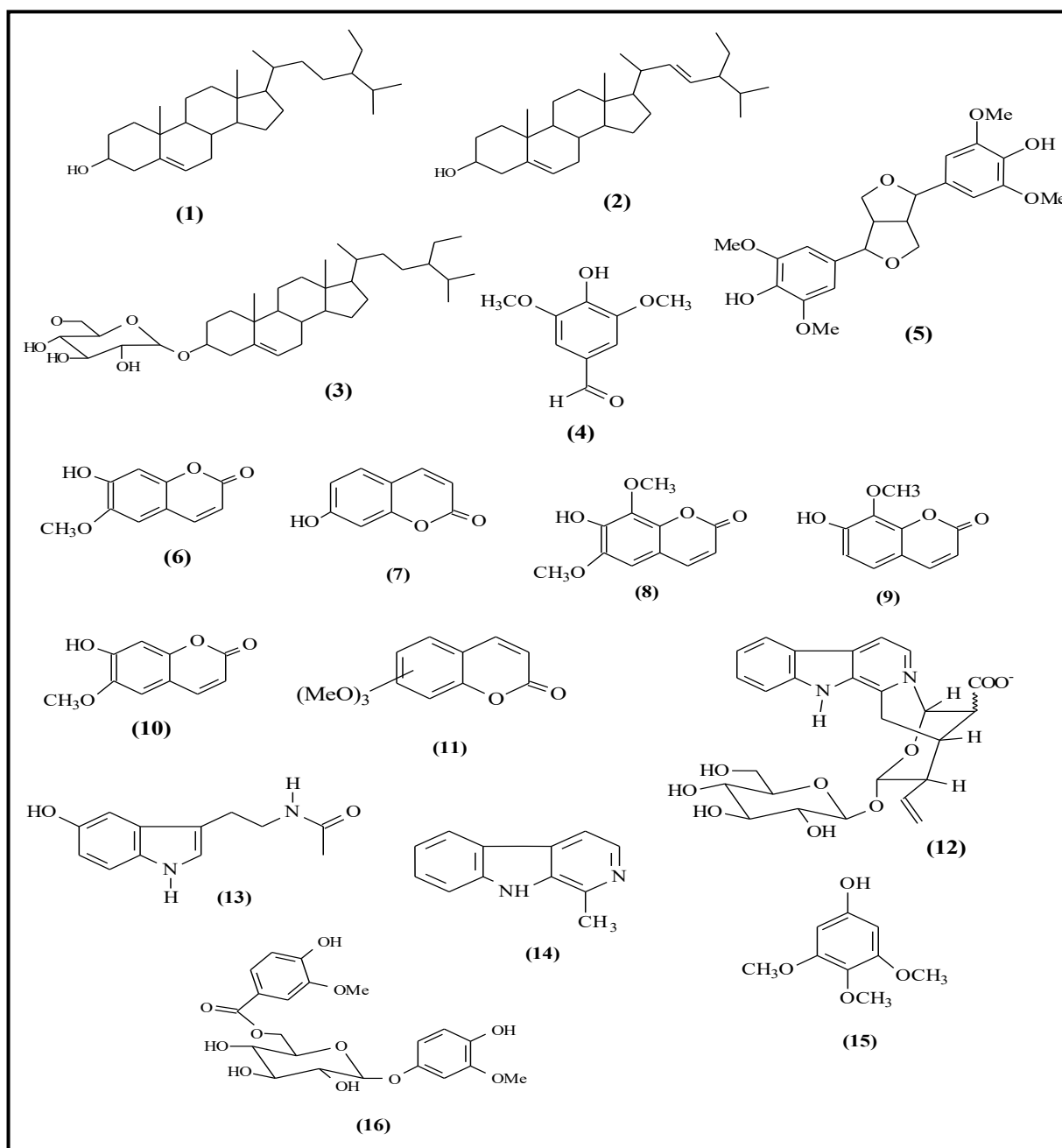


**Figura 6.** Imagem de espécie de *Simira grazielae*  
Fonte: ZipcodeZoo.com, 2012.

Descrita em 1981 é considerada uma planta rara do Brasil. Essa espécie endêmica do Brasil é encontrada em Floresta Pluvial Atlântica nos Estados da Bahia e do Espírito Santo, aparecendo como árvores em floresta estacional semidecidual (CNCFLORA, 2012).

Conhecida popularmente como arariba-vermelha, é uma espécie arbórea de grande porte com árvores de até 30 m de altura, com período de floração anual em novembro e dezembro, e frutificação em janeiro (CABRAL et al., 2009); apresenta flores hermafroditas (SILVA NETO, 2000).

Estudo realizado por Sanches e colaboradores (2017) relatou a presença de 16 substâncias na espécie: os esteroides  $\beta$ -sitosterol (1), Estigmasterol (2) e o 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosilsterol (3); aldeído Siringaldeído (4); lignana Siringaresinol (5); as cumarinas Escopoletina (6), Umbeliferona (7), Isofraxidina (8), 7-hidroxi-8-metoxicumarina (9), 5,7-dimetoxicumarina (10); Trimetoxicumarina (11) e os alcaloides Ofiorina B (12), *N*-acetilserotonina (13) e Harmana (14); e os compostos fenólicos o 3,4,5-trimetoxifenol (15) e 6'-*O*-vaniloiltachioside (16) (Figura 7).



**Figura 7.** Constituintes químicos isolados da madeira de *S. grazielae*. (SANCHES, 2017).

Estudo envolvendo avaliação de extrato e partições de *S. grazielae* revelou em teste preliminar atividade antinociceptiva e anti-inflamatória e capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (SANCHES, 2013).

O interesse no estudo fitoquímico adicional de *S. grazielae* baseou-se nos resultados promissores de atividades biológicas preliminares já relatadas da espécie e nos estímulos adicionais promovidos pela utilização de outras espécies do gênero por comunidades locais (MOREIRA et al., 2014).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e Equipamentos

No processo de extração, fracionamento, purificação, prospecção química e identificação foram utilizados os seguintes materiais:

Na etapa de extração bem como no fracionamento e purificação:

- Solventes grau P.A. das marcas Isotar e Vetec.
- Nas cromatografias as fases adsorventes utilizadas foram a de gel de sílica 70-230 mesh (Vetec e Silicycle), Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) e fase reversa RP2 - sílica gel 60 silanized 0.0063-0,200 mm (Merck KGaA).
- A evaporação por pressão reduzida dos solventes em evaporadores rotatórios Büchi B-480 e Fisatom 802.
- O liofilizador utilizado foi da marca Liotop modelo 105, a - 91 °C.
- Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com 60 F<sub>254</sub> Merck e 60 F<sub>254</sub> Marcherey-Nagel. Como método de revelação não destrutivo foi utilizada irradiação na região do ultravioleta ( $\lambda_{\text{max}}$  254 e 356 nm) e revelação destrutivo e semidestruutivo os reagentes cromogênicos: solução de vanilina sulfúrica [1g de vanilina em solução com 45 mL de água, 45 mL de etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) e 10 mL ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)] (MATOS, 1997) e vapores de iodo.

Reagentes utilizados na prospecção química (BARBOSA FILHO, 2001):

- Dragendorff: Solução A [8 g de subnitrito de bismuto (BiONO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O), 20 mL de ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH) e Solução B 27,2 g de iodeto de potássio (KI) e 50 mL de água destilada].
- Fehling: Solução A (34,65 g de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) e 500 mL de água destilada) e Solução B (173g de tartarato de sódio e potássio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O), 125 g de hidróxido de potássio (KOH) e 500 mL de água destilada).
- Reativo de Pascová: Solução A (0,075 g de verde de bromocresol, 0,025 g de azul de bromo fenol e 100 mL de etanol) e Solução B (0,25 g de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>), 0,25 g de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e 100 mL de água destilada).

Na etapa de identificação:

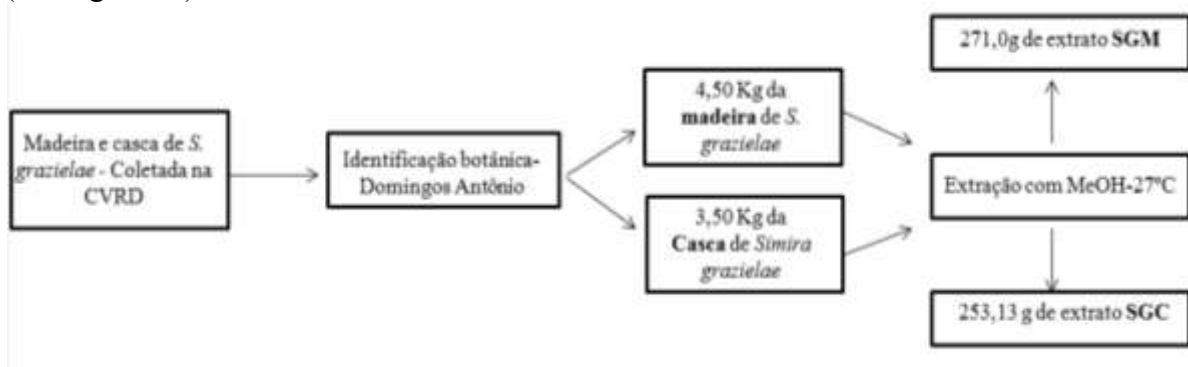
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de Carbono (RMN <sup>13</sup>C), incluindo experimentos em 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, HSQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY-<sup>n</sup>J<sub>CH</sub>, n=1) e HMBC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY-<sup>n</sup>J<sub>CH</sub>, n=2 e 3)], foram obtidos em espectrômetros Bruker Advance II 9,4 T (400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C), 11,5 T (500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C), na UFRRJ. A escolha dos solventes deuterados baseou-se na solubilidade das amostras: MeOD (Metanol deuterado), D<sub>2</sub>O (Água deuterada), DMSO-*d*<sub>6</sub> (Dimetilsulfóxido deuterado) e CDCl<sub>3</sub> (Clorofórmio deuterado). O TSM (Tetrametilsilano) foi usado como referência interna. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Todos experimentos foram realizados na UFRRJ.
- O programa ACD/Labs (versão 12.0) foi utilizado para processamento dos espectros obtidos nos experimentos de RMN.
- As estruturas foram desenhadas nos programas ChemWindow e ChemDraw Ultra 12.0.

- Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em equipamento de cromatografia a gás que possuem como detector espectrômetro de massas com analisador de íons quadrupolo e com modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), temperatura da coluna 100 °C, temperatura de injeção 250°C no aparelho Shimadzu QP2010 Plus. Foram realizados na UFRRJ.
- Os espectros de massas de baixa resolução foram processados no programa GCMS Postrun Analysis (Shimadzu).
- Espectros de massas de alta resolução foram obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta resolução (CLUE/EM-EM), no sistema UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), coluna Waters Acquity UPLC BEH C 18 (150 mm x 2,1cm, 1,7 µm), temperatura de 40 °C e fases móveis de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, realizada na Embrapa Agroindústria Tropical, *Campus* do Pici - Fortaleza – CE. Os espectros de massas também foram obtidos por injeção direta no espectrômetro de massas Q-TOF (Synapt HDMS, Waters) com ionização por eletrospray (IES) na Embrapa Agroindústria de Alimentos em Guaratiba – RJ.

## 2.2 Coleta e Extração dos Materiais Vegetais

Para a realização desse estudo foram coletados 4,5 kg da madeira e 3,5 kg da casca de *S. grazielae* na reserva florestal da Companhia Vale do Rio Doce (CVRD), em Linhares-ES, situada entre os paralelos 19° 06' e 19° 18' de latitude Sul e os meridianos 39° 45' e 40° 19' de longitude Oeste. A identificação botânica foi realizada por comparação das amostras coletadas com um código de registro nº 357 depositada no herbário da companhia (Herbário CVRD), com a colaboração do identificador botânico Domingos Antônio Folli, funcionário da companhia.

Os materiais coletados foram secos em temperatura ambiente e triturados em liquidificador. Em seguida foram submetidas ao processo de extração separadamente, por maceração exaustiva com metanol (MeOH) em temperatura ambiente (~27°C), tendo por finalidade uma máxima extração de constituintes químicos. A solução extrativa resultante foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório a uma temperatura média de 40°C, sob pressão reduzida, obtendo-se 271,63 g de extrato metanólico da madeira (SGM - *Simira grazielae* madeira extrato metanólico) e 253,13 g (SGC- *Simira grazielae* casca extrato metanólico), (Fluxograma1).



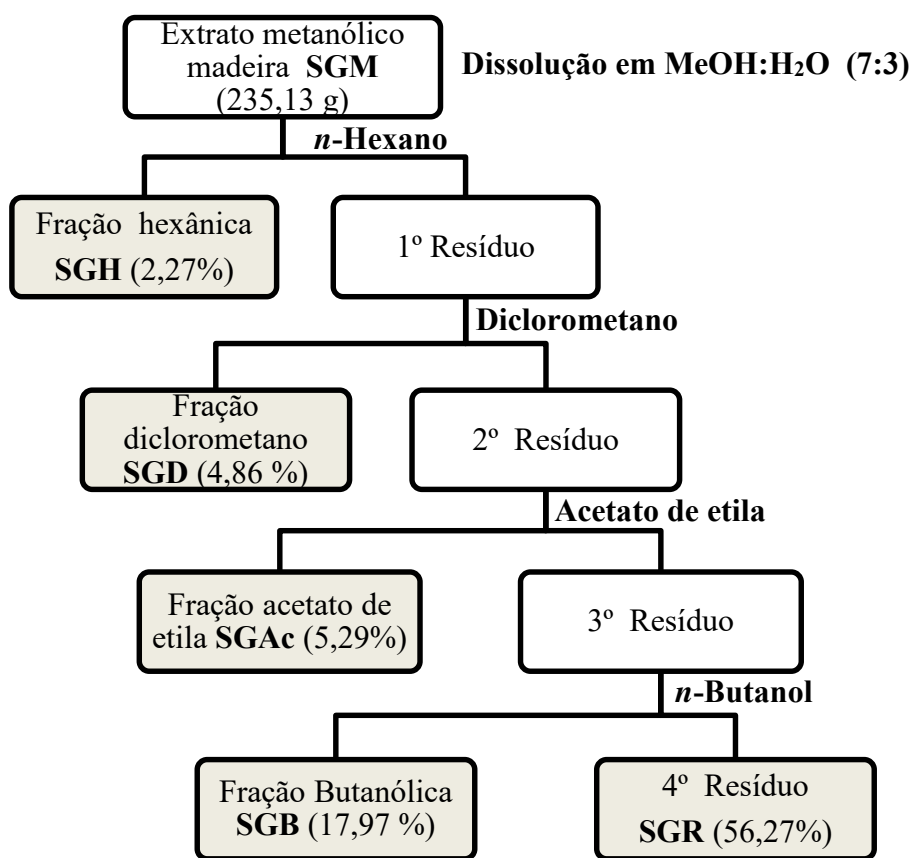
**Fluxograma 1.** Obtenção e extração do material vegetal de *S. grazielae*.

## 2.3 Fracionamento do Extrato Bruto da Madeira de *Simira grazielae*

Após obtenção do extrato bruto metanólico da madeira, SGM, aproximadamente 235,13 g foram solubilizados em MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3) e a solução submetida a extrações sucessivas em

funil de decantação com os solventes  $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$  ( $n$ -hexano),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Diclorometano),  $\text{AcOEt}$  (Acetato de etila) e  $n\text{-BuOH}$  ( $n$ -butanol). As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo à temperatura média de  $40\text{ }^\circ\text{C}$  e, assim, as partições do extrato metanólico da madeira forneceram quatro frações denominadas **SGH**, **SGD**, **SGAc** e **SGB** [**SG** de *Simira grazielae* seguida da primeira letra do solvente usado na partição (**H** de Hexano, **D** de Diclorometano, **Ac** de Acetato de etila e **B** de Butanol)] e **SGR** correspondente ao resíduo (**R**). As massas e os rendimentos correspondentes foram descritos no Fluxograma 2 e na Tabela 4.

As frações obtidas foram analisadas por CCDA para identificar as partições com maior diversidade de substâncias e, em seguida, as selecionadas **SGD**, **SGAc** e **SGB** foram submetidas a procedimentos cromatográficos.



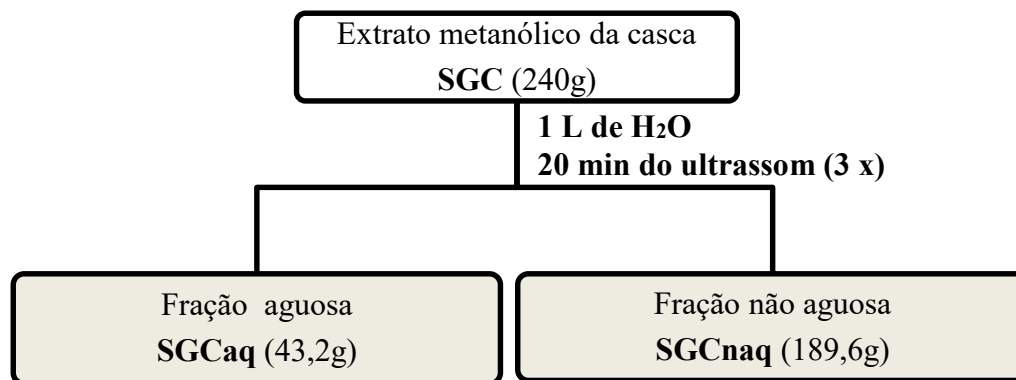
**Fluxograma 2.** Partição do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae*.

**Tabela 4.** Frações obtidas por fracionamento do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* (**SGM**) usando Hexano (**SGH**), Diclorometano (**SGD**), Acetato de etila (**SGAc**) e Butanol (**SGB**), sendo o resíduo denominado **SGR**.

Material	Frações	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
Madeira	$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$	SGH	5,34	2,27
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	SGD	11,44	4,86
	$\text{AcOEt}$	SGAc	12,44	5,29
	$n\text{-BuOH}$	SGB	47,25	17,97
	Resíduo metanólico	SGR	132,32	56,27

## 2.4 Fracionamento do Extrato Bruto da Casca de *Simira grazielae*

Do extrato metanólico da casca (SGC) 240 g foram suspensos em 1L de H<sub>2</sub>O destilada e colocados em ultrassom por 20 minutos (min). O material que ficou na fase aquosa (SGC<sub>aq</sub>) foi separado da fase não aquosa (SGC<sub>naq</sub>) pelo processo de decantação. Esse procedimento foi repetido 3 vezes e no final as 2 fases obtidas foram congeladas separadamente e posteriormente liofilizadas (Fluxograma 3).



**Fluxograma 3.** Fracionamento do extrato metanólico da casca de *S. grazielae*.

## 2.5 Prospecção fitoquímica da madeira de *Simira grazielae*

O extrato metanólico bruto da madeira, SGM, e as partições obtidas, SGD, SGAc, SGB e SGR, foram submetidos a análise de prospecção química para avaliação das principais classes de metabólitos presentes. Essa avaliação foi realizada através de reações químicas responsáveis pelo fornecimento de coloração e/ou formação de precipitado compatível com cada classe de substância.

As classes de metabólitos avaliadas na prospecção química foram: saponinas, alcaloides, esteroides e triterpenoides, flavonoides, derivados de cumarinas, açúcares redutores, sacarídeos, ácidos orgânicos, purinas e aminoácidos. Os procedimentos para a caracterização destas classes de metabólitos aparecem descritos nos subitens.

### 2.5.1 Prospecção para saponinas

Na detecção de saponinas, cerca de 5 mg do extrato e das partições foram dissolvidos, separadamente, em 3 mL de água destilada, onde foi agitado vigorosamente em tubo de ensaio por 30 segundos. A formação de espuma permanente por pelo menos 15 min indica a presença de saponinas (BARBOSA FILHO, 2001). Essa espuma persistente e abundante decorre do fato das saponinas apresentarem em sua estrutura uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina (triterpeno ou esteroide) e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (SCHENKEL et al., 2001).

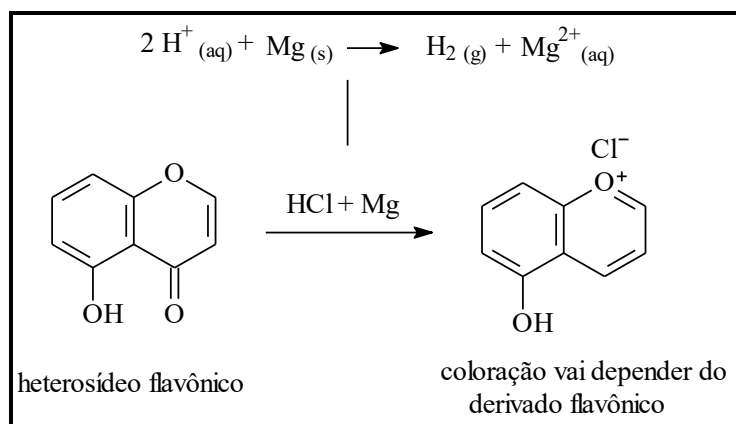
### 2.5.2 Prospecção para alcaloides

Para análise da presença de alcaloides foram dissolvidos 5 mg do extrato e das partições, separadamente em 2 mL de ácido clorídrico a 1% em um tubo de ensaio. Nele foram adicionadas gotas do reagente de Dragendorff; a ocorrência do precipitado vermelho tijolo indica reação positiva (WALL et al., 1954). Em condições ácidas, os alcaloides ficam no seu estado protonado e a adição do reagente leva à formação de um complexo com o átomo de bismuto. O complexo obtido gera um cromóforo de coloração do amarelo ao laranja avermelhada (castanho). A precipitação confirma a presença de alcaloides (Figura 8).





avermelhada indicaria a presença de flavonóis; violeta indicaria a presença de flavanonas e laranja indicaria a presença de flavonas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004) (Figura 10).

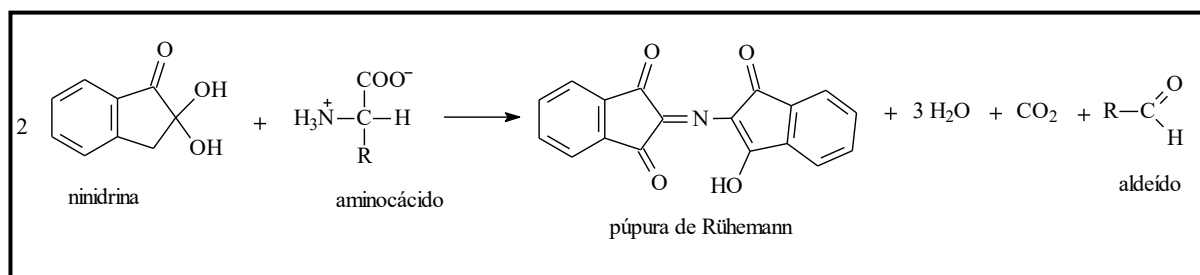


**Figura 10.** Reação genérica de Shinoda, detecção de derivados flavônicos.

### 2.5.5 Prospecção para aminoácidos

Para detecção de aminoácidos foram utilizados aproximadamente 5 mg do extrato e das partições, separadamente, que foram dissolvidos em água destilada, e aplicada em papel de filtro, formando um halo de 1 cm de diâmetro. Sobre a mancha foram adicionadas 2 gotas do reativo ninidrina (hidrato de tricetoidrindeno) a 1% e aquecidas a 100°C por 3 min. O aparecimento e persistência da coloração violeta-azulado indica reação positiva (MATOS, 1997).

O princípio da reação da ninidrina pelo aquecimento se dá pela reação do grupo alfa-amino de um aminoácido com duas moléculas de ninidrina, produzindo um complexo de cor azul, denominado “Púrpura de Ruhemann”. A cor azul é obtida na reação da ninidrina para todos os aminoácidos que apresentam um grupo alfa-amino livre, enquanto que a prolina e a hidroxiprolina, em que o grupo alfa-amino está substituído, produzem derivados com uma cor amarela característica (Figura 11) (PEREIRA, 2010).



**Figura 11.** Reação de alfa-aminoácidos com a ninidrina. Fonte: PEREIRA, 2010.

### 2.5.6 Prospecção para açúcares redutores

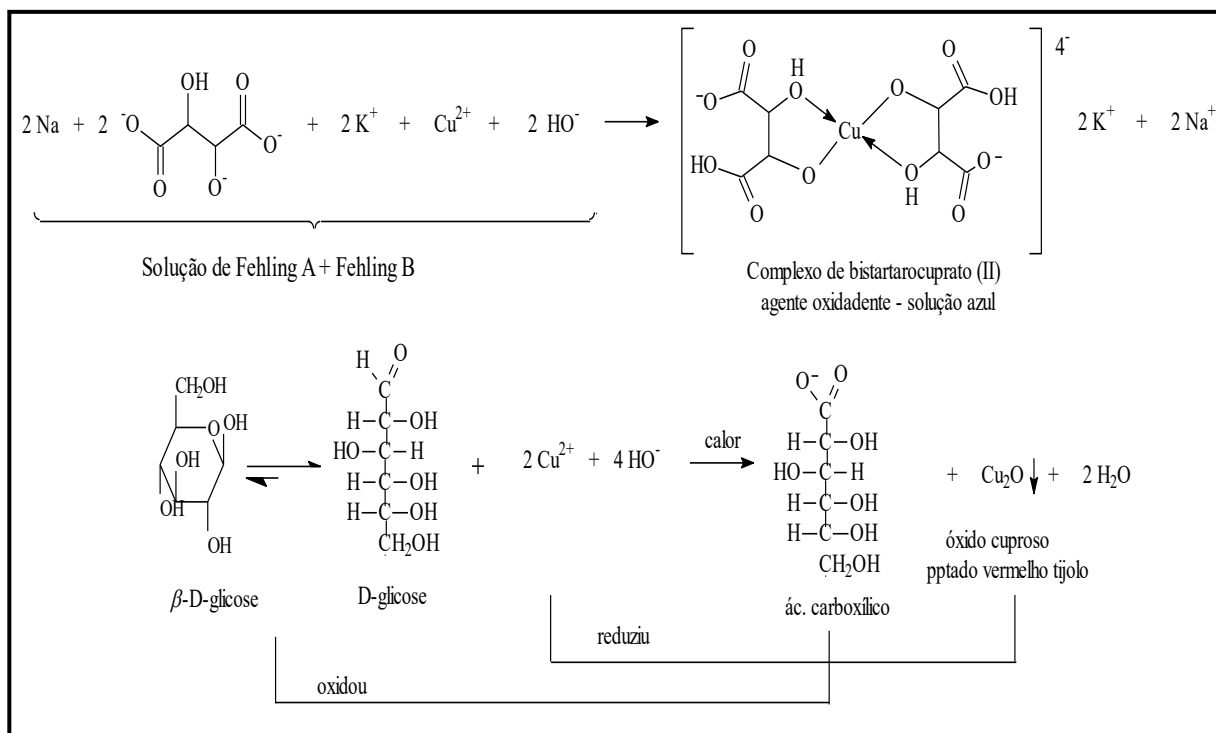
Na detecção da presença de açúcares redutores, 4 mg do extrato e das partições foram dissolvidos em 3 mL de água destilada, separadamente. Adicionou-se em seguida 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL de reativo Fehling B e foi levado a banho-maria até ebulição por 5 min (COSTA, 1972).

Essas soluções promovem a oxidação seletiva dos açúcares redutores. Quando o reagente de Fehling entra em contato com essa classe ocorre à oxidação do grupo carbonila em carboxila, reduzindo seu complexo azul de  $\text{Cu}^{2+}$  a íon cuproso ( $\text{Cu}^+$ ).

Os glicídios que contenham um grupo aldeído ou cetona potencialmente livre existem em solução aquosa em equilíbrio com uma forma enodiol, que é um agente redutor ativo. Em meio ligeiramente alcalino esta forma é favorecida e a sua presença assegura a redução de

íons cobre (II) a cobre (I) com a formação de hidróxido cuproso que, por aquecimento, se converte em óxido cuproso  $\text{Cu}_2\text{O}$ , um composto insolúvel de cor vermelho tijolo que precipita.

Para manter os íons cobre (II) em solução em meio alcalino o reagente de Fehling contém um agente complexante, o íon tartarato. A formação do precipitado vermelho-tijolo indica reação positiva para açúcares redutores (Figura 12) (PEREIRA, 2010).

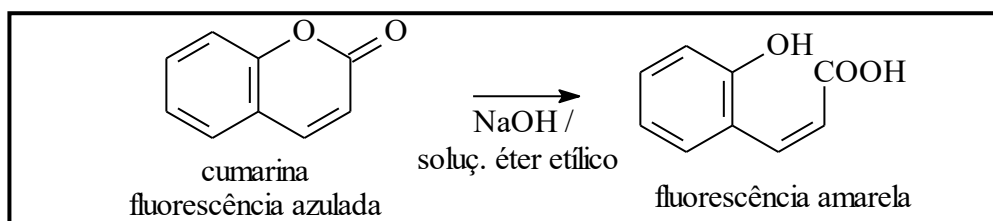


**Figura 12.** Reação de oxirredução do reagente de Fehling A e B com a glicose.

### 2.5.7 Prospecção para derivados da cumarina

Para caracterização dessa classe de metabólitos secundários, 5 mL das soluções em éter etílico do extrato e das partições, separadamente, foram concentrados em banho-maria até adquirir o volume de 0,5 mL. Em seguida foram aplicadas gotas da fase etérea sobre duas regiões de um papel de filtro de modo a formar manchas de 1 cm de diâmetro cada. Em uma das manchas formadas adicionou-se 1 gota de NaOH 1N. O papel foi observado sob a luz ultravioleta 365nm (COSTA, 1972).

Segundo Simões e colaboradores (2004), as cumarinas desenvolvem fluorescência azul-brilhante ou verde quando observadas sob a luz ultravioleta 365 nm, e em solução alcalina sofrem rompimento do anel lactônico, desenvolvendo cor amarelada. Essa reação é revertida pela adição de uma solução ácida (Figura 13). Assim, a existência dessas fluorescências indica a reação positiva.



**Figura 13.** Reação positiva para cumarinas em meio básico. Fonte: SBFGNOSIA, 2017.

### 2.5.8 Prospecção para sacarídeos

Para avaliação da presença de sacarídeos em um tubo de ensaio foram adicionadas duas gotas de solução de bórax 1% e duas gotas de solução de fenolftaleína, tornando-a rosa. Em seguida foram adicionados 5 mg do extrato e das partições, separadamente, sobre esta solução. Se ocorrer o desaparecimento da coloração rosa e reaparecer ao se aquecer, e sumir novamente ao resfriar, indica a reação positiva para essa classe de metabólito (BARBOSA FILHO, 2001).

### 2.5.9 Prospecção para purinas

Para análise da presença de purinas em uma cápsula de porcelana juntou-se 5 mg de extrato e das partições separadamente, com ácido clorídrico 6 N e duas gotas de peróxido de hidrogênio concentrado. Em seguida foram evaporados em banho-maria obtendo um resíduo vermelho. Nesse resíduo foram adicionados três gotas de hidróxido de amônia 6 N, a obtenção de uma coloração violeta indica reação positiva (COSTA, 1972).

### 2.5.10 Prospecção para ácidos orgânicos

Na avaliação da presença de ácidos orgânicos, o extrato e as partições separadamente, foram colocadas em 3 mL de água destilada e gotejados o reativo de Pascová. A descoloração desta reação acusa reação positiva (MERCK, 1980).

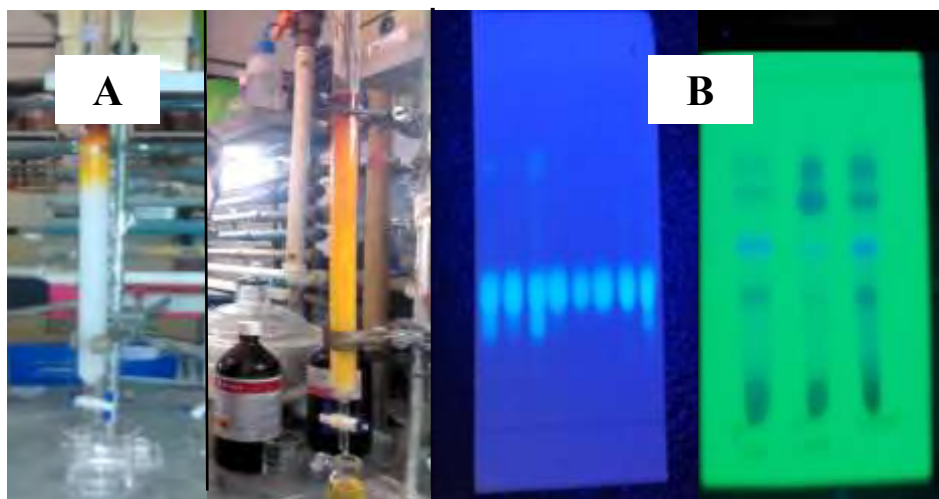
## 2.6 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos da Madeira

Os isolamentos e as purificações dos constituintes químicos da madeira de *S. grazielae* foram realizados através dos métodos de cromatografia em coluna gravitacional (CC) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

Nas cromatografias de adsorção em coluna foram utilizadas sílica gel como fase normal e na fase reversa (RP-2) sílica gel 60 silanized. Na cromatografia por exclusão foi utilizada Sephadex® LH-20. Tiveram como suporte colunas de vidros cilíndricos cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada (Figura 14 A).

Após o empacotamento das colunas por via úmida, as amostras foram aplicadas sobre o topo da coluna, procedendo-se então a eluição na cromatografia de fase normal com os solventes comerciais *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade, e na fase reversa com H<sub>2</sub>O + MeOH em ordem decrescente de polaridade e na cromatografia por exclusão com MeOH. Na cromatografia em fase reversa as frações aquosas coletadas foram secas no liofilizador.

As análises das frações oriundas de CC de fase normal e reversa foram realizadas por meio do monitoramento em placas de CCDA em suporte de alumínio. As revelações das cromatofolhas foram feitas pela exposição à lâmpada de radiação UV em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e, quando necessário utilizou-se também reveladores químicos, a vanilina sulfúrica e vapor de iodo (Figura 14 B).

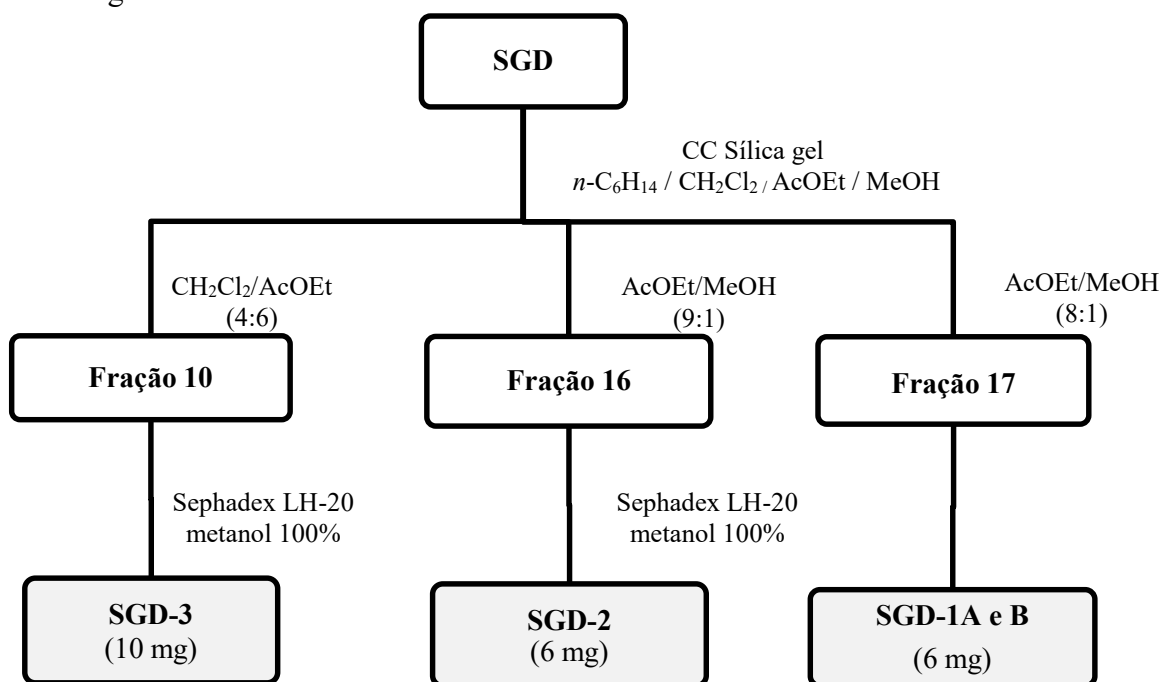


**Figura 14.** Sistemas de cromatografia em coluna gravitacional (A) e cromatografia em camada delgada analítica (B) empregados no estudo fitoquímico de *S. grazielae*.

### 2.6.1 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de SGD

A fração **SGD**, obtida do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* através de partição com Diclorometano, foi submetida à coluna cromatográfica clássica usando gel de sílica e eluída com gradiente de polaridade com os solventes: *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH. Esse fracionamento resultou em 110 frações de 50 mL. Os solventes dessas frações foram eliminados por evaporação à pressão reduzida e as soluções concentradas foram analisadas por meio da CCDA. Assim, a comparação dos perfis cromatográficos permitiu a reunião das frações em 27 grupos.

Posteriormente, as frações numeradas 10 e 16 foram purificadas em coluna com Sephadex LH-20, fornecendo as substâncias **SGD-3** e **SGD-2**, respectivamente. A fração 17 forneceu mistura de **SGD-1A** e **SGD-1B**. O estudo cromatográfico dessas frações foi reunido no Fluxograma 4.

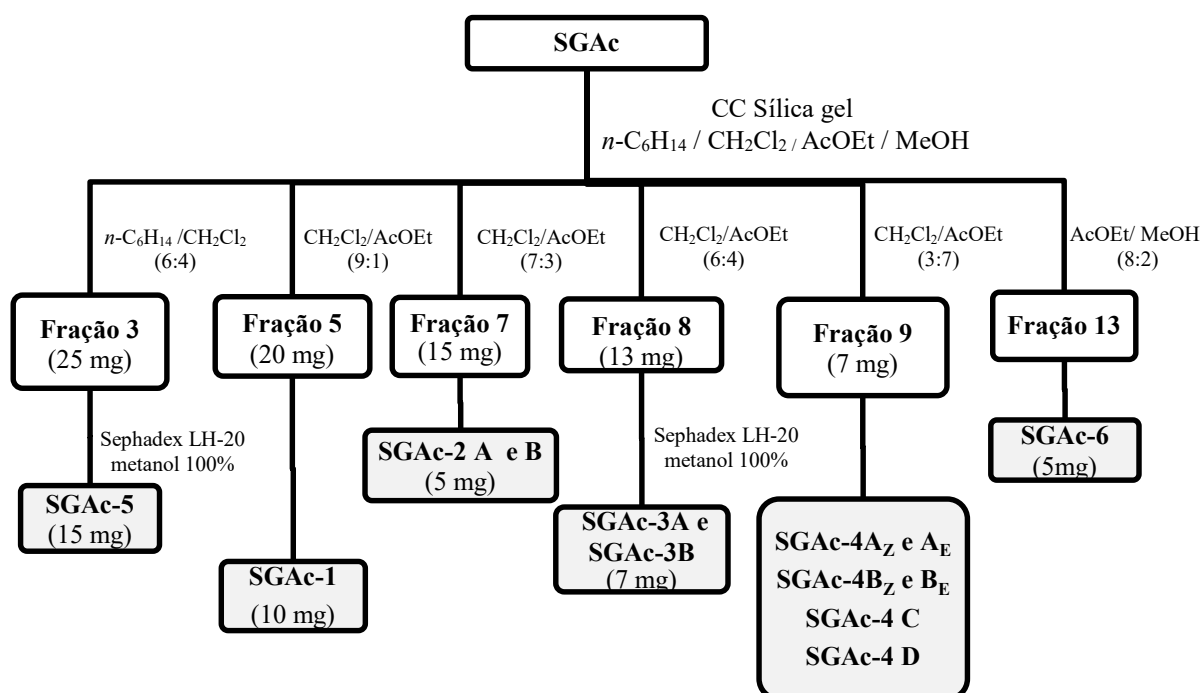


**Fluxograma 4.** Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano do extrato metanólico de *S. grazielae*.

## 2.6.2 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de SGAc

A fração **SGAc**, obtida do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* através de partição com Acetato de etila, foi submetida a coluna cromatográfica clássica usando gel de sílica e eluída com gradiente de polaridade *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH. Foram coletadas 45 frações de 50 mL cada e os solventes eliminados por evaporador rotatório a pressão reduzida e reunidas de acordo com perfil de semelhanças revelado por CCDA, obtendo-se 21 frações.

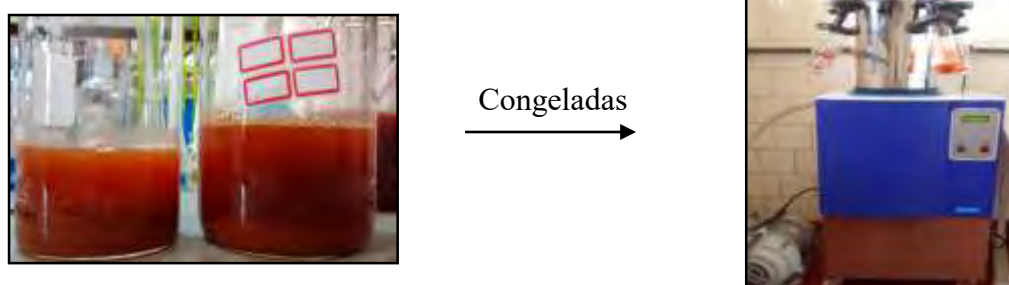
As frações 3 e 8 foram purificadas em coluna com Sephadex LH-20 e forneceram as substâncias **SGAc-5** e uma mistura de **SGAc-3A** e **SGAc-3B**. A **SGAc-1** foi obtida da fração 5 e uma mistura de **SGAc-2A** e **SGAc-2B** foi fornecida da fração 7. Esse fracionamento permitiu também o isolamento das misturas dos isômeros **SGAc-4Az**, **SGAc-4A<sub>E</sub>**, **SGAc-4Bz**, **SGAc-4B<sub>E</sub>**, **SGAc-4C** e **SGAc-4D** da fração 9 e a **SGAc-6** oriunda da fração 13. O detalhamento do estudo cromatográfico dessas frações foi resumido no Fluxograma 4.



**Fluxograma 5.** Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila do extrato metanólico de *S. grazielae*.

## 2.6.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de SGB

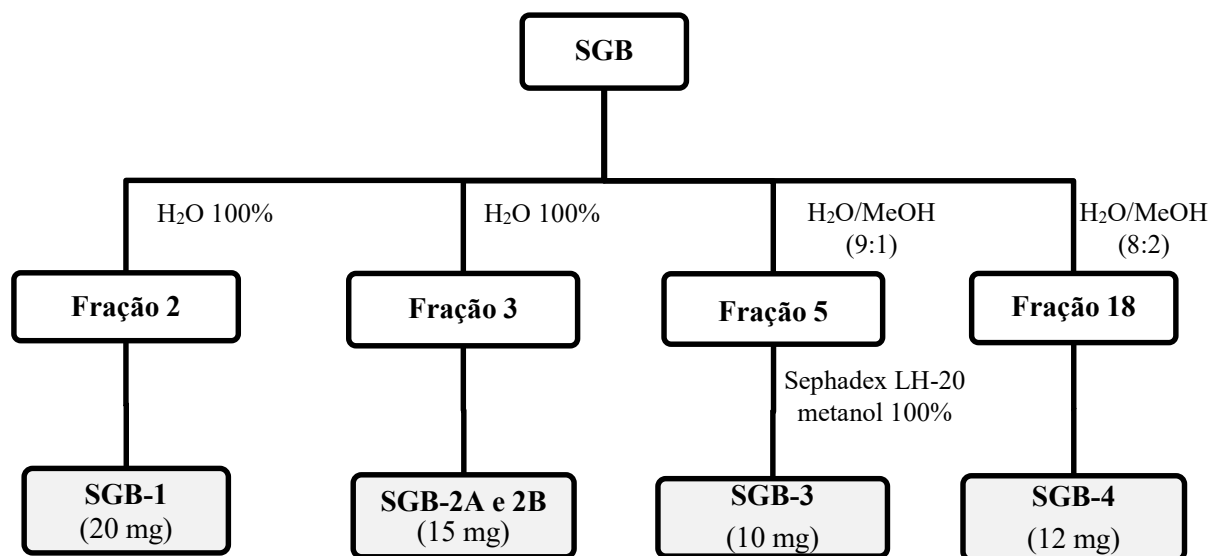
Trinta e sete gramas da fração **SGB**, obtida do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* através de partição com Butanol, foram colocados em 1,5 L de água destilada para separação por decantação e filtração das substâncias solúveis (**SGBaq**) e insolúveis em água (**SGBnaq**), que foram posteriormente submetidas a congelamento e liofilização as quais forneceram 19,5g e 17g, respectivamente (Figura 15).



**Figura 15.** Separação por solubilização em água de **SGB** e posterior liofilização

Cerca de 3,26 g da fração de **SGBaq** foram cromatografadas em coluna empacotada com sílica de fase reversa eluída com misturas H<sub>2</sub>O + MeOH em gradiente decrescente de polaridade. Foram obtidas 150 frações de 40 mL cada, sendo as que continham água foram liofilizadas e as soluções com solvente orgânico foram destiladas sob pressão reduzida em rota evaporador. Obteve-se 25 grupos de frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico apresentado pela CCDA (Fluxograma 6).

A eluição com 100% de água gerou as frações 2 e 3, que forneceram respectivamente as substâncias **SGB-1** e a mistura **SGB-2A** e **SGB-2B**. A fração 5 foi purificada em coluna com Sephadex LH-20 e forneceu o **SGB-3**. A **SGB-4** foi obtida da fração 18.



**Fluxograma 6.** Fracionamento cromatográfico da fase butanólica do extrato metanólico de *S. grazielae*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Prospecção Fitoquímica

A avaliação fitoquímica preliminar foi realizada para obtenção de informações sinalizadora sobre algumas classes específicas de metabólitos presentes nos extratos e frações de *S. grazielae*. Tal análise simples, qualitativa e rápida, foi realizada através de reagentes responsáveis por coloração ou precipitação.

O teste apresentou resultado positivo para a presença dos seguintes metabólitos secundários: saponinas, esteroides, triterpenos, purinas, derivados de cumarinas e alcaloides. Para os metabólitos primários, foram detectadas a presença de aminoácidos, sacarídeos e açúcares redutores. As cinco últimas classes descritas apareceram positivamente em todas as frações das partições ao extrato bruto de *S. grazielae*. Já as ocorrências de flavonoides e ácidos orgânicos não foram observadas em nenhuma das amostras. Os resultados estão descritos na Tabela 5.

Comparação dos dados obtidos nos testes realizados e as análises fitoquímicas registradas na literatura para o mesmo gênero *Simira* observaram-se semelhanças entre os resultados, divergindo apenas para na presença de flavonoides (BARBIERI et al., 2015; CASTANEDA et al., 1991).

Assim, os resultados da prospecção foram compatíveis e corroboram com o perfil quimiotaxonômico do gênero *Simira* e permitiram, preliminarmente, fazer uma abordagem do comportamento fitoquímico que se deve obter nas análises de isolamento e identificação dessa espécie.

**Tabela 5.** Resultados da prospecção fitoquímica da madeira de *S. grazielae*. (+) presença e (-) ausência da classe metabólica no material analisado. SGM - extrato metanólico, SGH - partição Hexânica, SGD - partição de diclorometano, SGAc - Acetato de etila e SGB- partição Butanólica e SGR - resíduo da partição.

Classe dos Metabólitos	SGM	SGD	SGAc	SGB	SGR
Alcaloides	+	+	+	+	+
Saponinas	+	-	+	+	-
Esteroides e triterpenoides	+	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-	-
Açúcares redutores	+	+	+	+	+
Sacarídeos	+	+	+	+	+
Purinas	-	-	-	+	+
Ácidos orgânicos	-	-	-	-	-
Aminoácidos	+	+	+	+	+
Derivados da cumarina	+	+	+	+	+

#### 3.2 Determinação Estrutural das Substâncias

Para determinação estrutural, as amostras obtidas foram solubilizadas em solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$ , MeOD e  $\text{DMSO-}d_6$ ), conforme as características de solubilidade de cada um, e submetidos a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni- (1D) e bidimensional (2D). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: *s* (singlete), *sl* (singlete largo), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto), *q* (quarteto) ou *m* (multiplete). As constantes de acoplamento (*J*) foram calculadas com base nos deslocamentos químicos de cada sinal e na frequência do aparelho, sendo registradas em Hertz (Hz).

Para auxiliar na elucidação estrutural, a maioria das amostras foram submetidas à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) com ionização por elétron spray (EMAR-IES) - no modo positivo ou Espectrômetro de Massas de Baixa Resolução (EMBR)

com ionização por impacto eletrônico (70 eV) de acordo com as características de cada amostra.

O estudo fitoquímico do extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* por meio dos fracionamentos, resultou no isolamento e a caracterização de 18 substâncias que estão representadas na Figura 16.

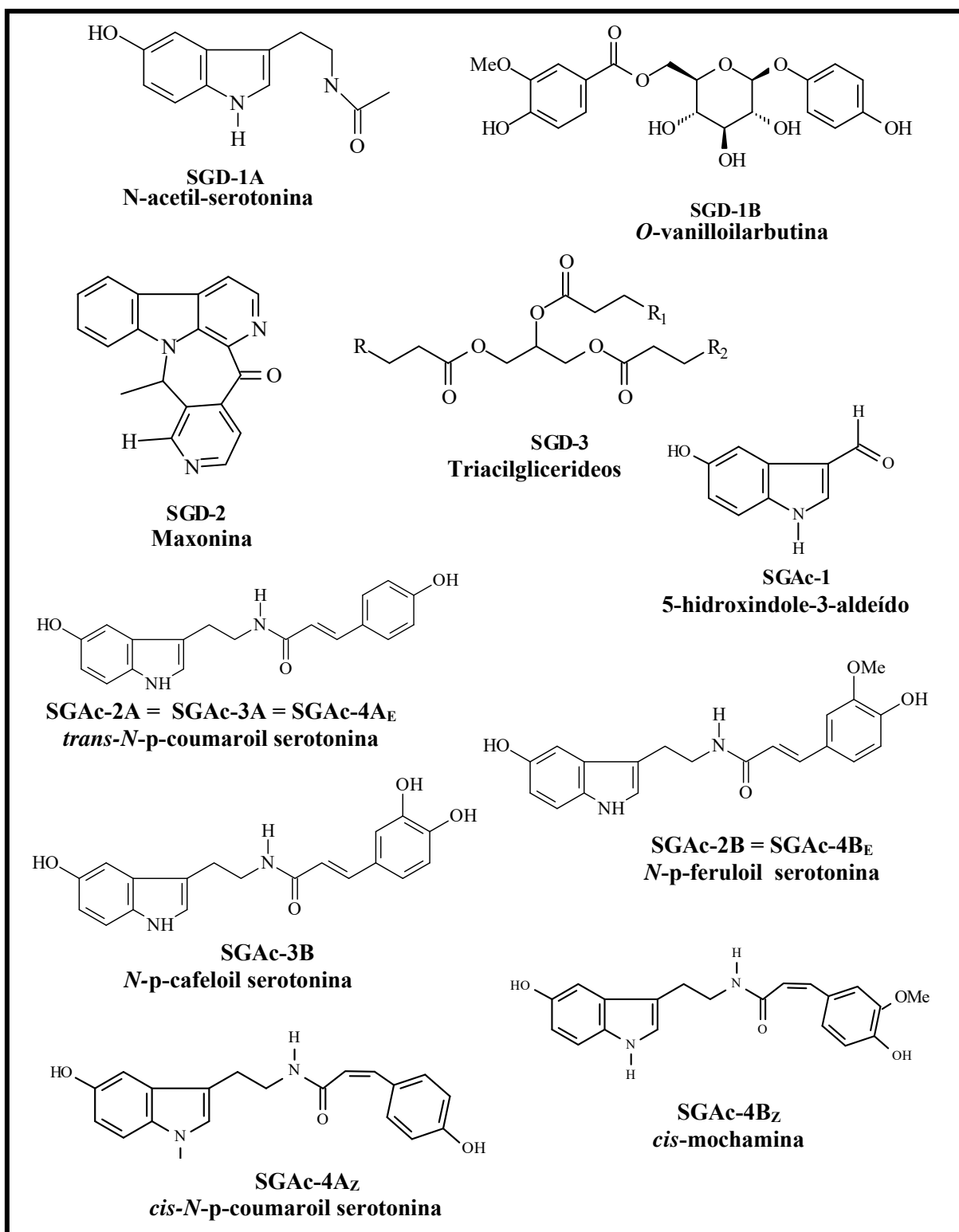


Figura 16. Constituintes químicos isolados da madeira de *Simira grazielae* (continua).



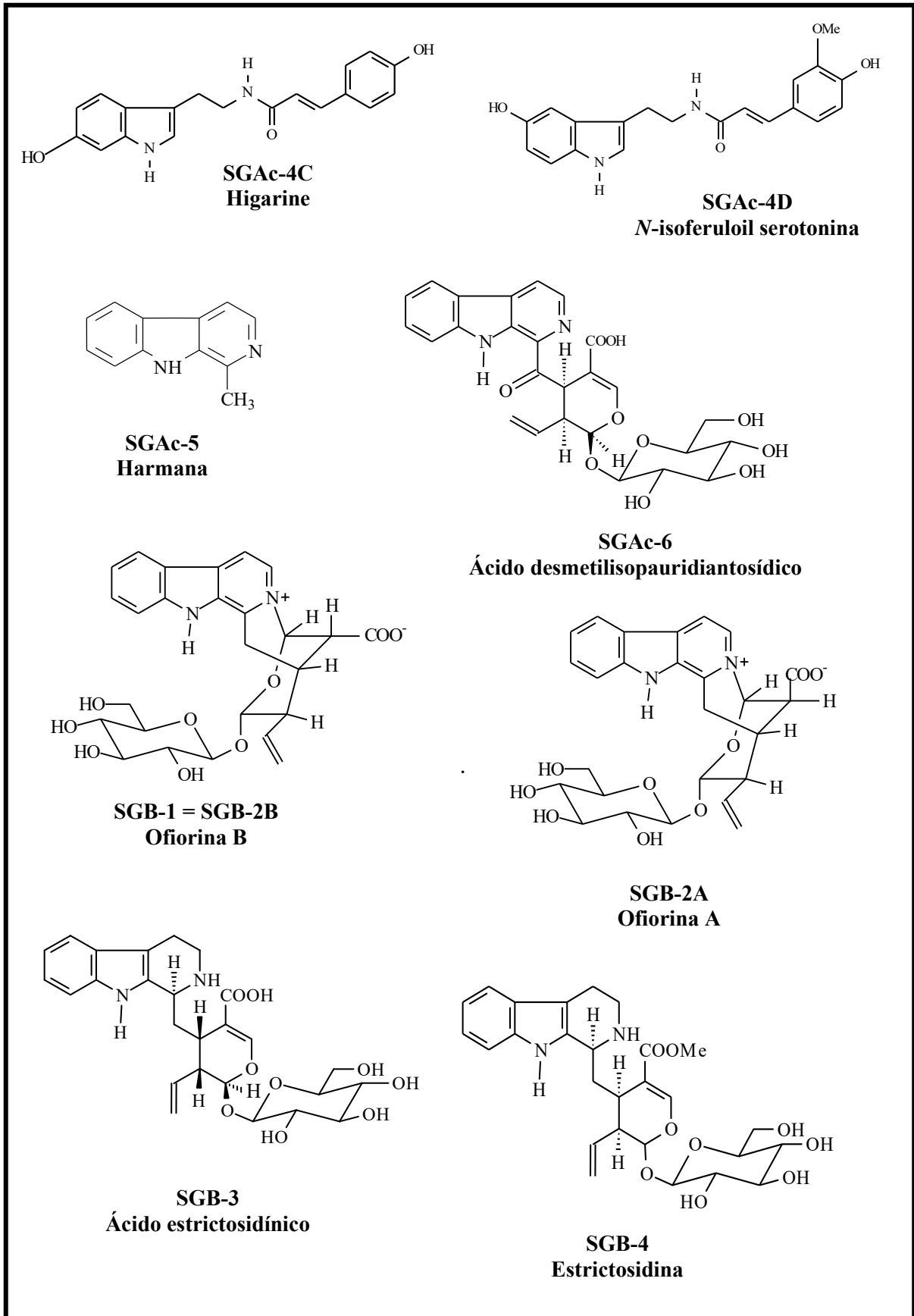
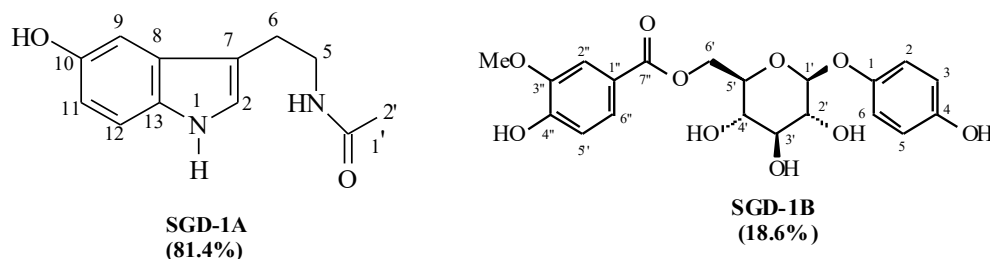


Figura 16. Continuação.

### 3.2.1 Determinação estrutural dos componentes da mistura SGD-1

As análises dos espectros 1D e 2D de RMN (Espectros 1-11) e EM (Espectros 12 e 13) da mistura **SGD-1** permitiram identificar as substâncias: *N*-acetil-serotonina (**SGD-1A**) e 6'-*O*-vanilloilributina (**SGD-1B**). Com base na integração de sinais de hidrogênio selecionados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  como representantes dos componentes foi possível determinar as porcentagens aproximadas de 81,4% e 18,6%, respectivamente.



O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Espectros 4-6) revelou-se também claramente em acordo com a mistura.

As letras **A** (SGD-1A) e **B** (SGD-1B) foram acrescentadas nas atribuições dos sinais dos espectros de RMN para facilitar a identificação das substâncias com seus respectivos sinais.

#### SGD-1A

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros 1-3) mostrou sinais de hidrogênios na região de aromáticos constituindo um sistema ABC referente à unidade  $\beta$ -carbolínica, com a presença de um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (*d*,  $J=2.0$  Hz, H-9), um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (*dd*,  $J=8.8$  e 2.0 Hz, H-11) e duplete em  $\delta_{\text{H}}$  7.14 (*dd*,  $J=8.8$  Hz, H-12), sendo estas interações confirmadas pelos acoplamentos homonucleares reveladas pelo espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 7).

O singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7.00 foi atribuído ao H-2 e correlacionado com o sinal de carbono metínico em  $\delta_{\text{C}}$  123.99 (CH-2) através do espectro 2D de correlação heteronuclear HSQC (Espectros 8 e 9 e Tabela 6), onde se observou também as correlações correspondentes aos demais carbonos metínicos CH-9 ( $\delta_{\text{C}}$  103.26/ $\delta_{\text{H}}$  6.91), CH-11 ( $\delta_{\text{C}}$  112.15/ $\delta_{\text{H}}$  6.66) e CH-12 ( $\delta_{\text{C}}$  112.44/ $\delta_{\text{H}}$  7.14), aos metilênicos  $\text{CH}_2$ -5 ( $\delta_{\text{C}}$  41.26/ $\delta_{\text{H}}$  3.42, *t*) e  $\text{CH}_2$ -6 ( $\delta_{\text{C}}$  26.06/ $\delta_{\text{H}}$  2.83, *t*) e ao metílico  $\text{CH}_3$ -2' ( $\delta_{\text{C}}$  22.39/ $\delta_{\text{H}}$  1.91, *s*).

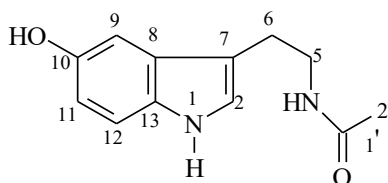
A ligação entre os carbonos metilênicos  $\text{CH}_2$ -6 e  $\text{CH}_2$ -5 foi revelada pelo mesmo valor constante de acoplamento ( $J=7.2$  Hz) deduzido dos sinais de átomos de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  2.83 (2H-6) e 3.42 (2H-5, mais desprotegido pelo efeito indutivo pela ligação ao átomo de nitrogênio) e confirmada através do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 7). Suas posições foram também definidas através da interpretação das correlações heteronucleares a longa distância ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) reveladas pelo espectro 2D HMBC (Espectros 10 e 11, Tabela 6), observando-se as correlações do sinal de C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  112.30) com os sinais dos átomos de hidrogênio 2H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2.83,  $^2J_{\text{CH}}$ ), 2H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  3.42,  $^3J_{\text{CH}}$ ) e H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  7.00,  $^2J_{\text{CH}}$ ). Outros resultados revelados pelo espectro 2D HMBC e também usados para dedução estrutural encontram-se descritos na Tabela 6.

O grupamento amida de **SGD-1A** foi reconhecida pela presença do sinal de hidrogênio como singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1.91 (3H-2'), correlacionado no HSQC com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  22.39 ( $\text{CH}_3$ -2') e no HMBC com sinal  $\delta_{\text{C}}$  173.08 ( $^2J_{\text{CH}}$ ), referente ao carbono carbonílico (C-1'). Picos transversais correspondência às interações heteronucleares de átomos de carbono e

hidrogênio observados nos 2D HSQC e HMBC permitiram assinalar inequivocamente a completa atribuição dos sinais dos átomos de hidrogênio e carbono carbonos, que envolveu também comparação com dados descritos na literatura por Guerreiro et al, 1999 (Tabela 6).

O cromatograma (Espectro 12) da análise de CG-EM da **SGD-1** revelou pico com tempo de retenção 22.448 min e área de 55.71% correspondente a **SGD-1A**. O espectro de massas (Espectro 13) gerado desse tempo de retenção forneceu os picos em  $m/z$  218, correspondente ao íon molecular ( $[M]^+$ ), e os picos 146 e 159, como representantes de fragmentos produzidos através de reações de fragmentação. A estrutura foi proposta e justificada pelas fragmentações dos picos resumidos no Esquema 1. Porém, como cromatograma (Espectro 12) não apresentou uma boa resolução e o espectro de massas apresentou uma intensidade baixa para o íon molecular a amostra foi submetida à análise por EMAR-IES.

O espectro de alta resolução (Espectro 14) confirmou os dados já obtidos, permitindo deduzir o íon molecular  $m/z$  218.1055 ( $[M]^+$ ) e a fórmula molecular  $C_{12}H_{14}N_2O_2$  através do pico  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  241.0972 ( $C_{12}H_{14}N_2NaO_2$ , valor calc.  $m/z$  241.0953). Proposta de fragmentação para a formação do fragmento correspondente ao pico de  $m/z$  168.0650 (Esquema 2) contribuiu para caracterizar a presença do grupo acetila no átomo de nitrogênio (grupo- $NCOCH_3$ ). Assim, pode-se confirmar a estrutura da **SGD-1A** como *N*-acetilserotonina, componente predominante na mistura.



SGD-1A

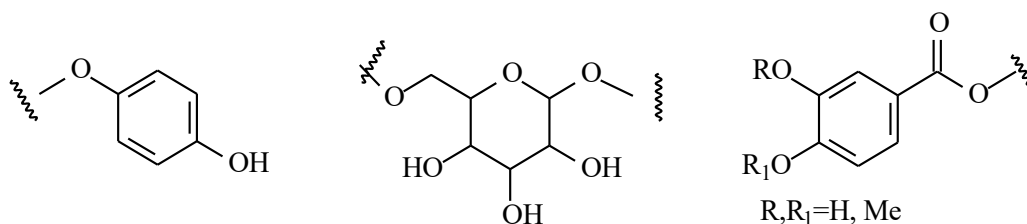
**Tabela 6.** Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGD-1A, comparados com valores da literatura de *N*-acetilserotonina (GUERREIRO et al., 1999). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

	SGD-1A				<i>N</i> -acetil serotonina	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>C</b>						
7	112.30	-	H-2; 2H-6	2H-5	114.06	-
8	129.27	-		H-2; H-12	131.03	-
10	150.92	-	H-112	H-12	152.69	-
13	132.97	-		H-2; H-9; H-11	134.90	-
1'	173.08	-	3H-2'	2H-5	174.82	-
<b>CH</b>						
2	123.99	7.00 (s)		2H-6	125.74	7.01 (s)
9	103.26	6.91 (d, 2.0)		H-11	105.02	6.91 (dd, 2.4 e 0.6)
11	112.15	6.66 (dd, 8.8, 2.0)		H-9	113.90	6.65 (dd, 8.7 e 2.4)
12	112.44	7.14 (d, 8.8)			114.19	7.15 (dd, 8.7 e 0.6)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
5	41.26	3.42 (t, 7.2)	2H-6		43.02	3.43 (t, 7.5)
6	26.06	2.83 (t, 7.2)	2H-5		27.80	2.85 (t, 7.5)
<b>CH<sub>3</sub></b>						
2'	22.39	1.91 (s)			24.15	1.92 (s)
<b>HN-4</b>	-	8.00 (s)				

## SGD-1 B

A fórmula molecular  $C_{20}H_{22}O_{10}$  ( $m/z$  422.1212,  $[M]^+$ ) da substância **SGD-1B**, componente presente em menor quantidade na mistura, foi deduzida através EMAR-IES (Espectro 14) pelo do pico em  $m/z$  457.2672 ( $C_{20}H_{22}ClO_{10}$ , calc.  $m/z$  457.0901  $[M-Cl]^+$  (Esquema 3), visto que no CG-EM ela não foi detectada devido sua polaridade, e nos sinais de menor intensidade apresentados nos espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$ , levando ao propor a presença de composto glicosídeo fenólico.

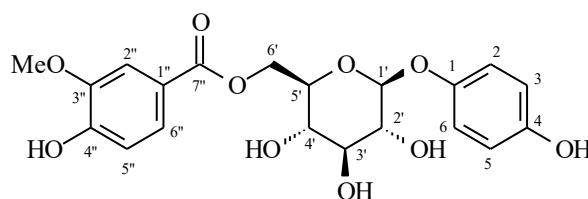
Análise adicional dos experimentos 1D (RMN $^1H$ , RMN $^{13}C$ -DEPTQ) e 2D ( $^1H$ - $^1H$ -COSY, HSQC e HMBC) de RMN permitiu reconhecer a presença de sinais de uma metoxila em  $\delta_C$  56.27 (MeO-3), um metileno oxigenado (OCH $_2$ -6',  $\delta_C$  64.97/ $\delta_H$  4.68, 4.34), doze carbonos metínicos [(CH) $_{10}$ , incluindo um dioxigenado  $\delta_C$  103.45/ $\delta_H$  4.70 (CH-1', anomérico), quatro monooxigenados em  $\delta_C$  74.76/ $\delta_H$  3.44 (CH-2'), 75.35/ $\delta_H$  3.70 (CH-3'), 71.89/ $\delta_H$  3.40 (CH-4') e 77.73/ $\delta_H$  3.50 (CH-5') e cinco  $sp^2$  representando sete carbonos aromáticos em  $\delta_C$  116.35/ $\delta_H$  6.58 (CH-2'/CH-6), 119.30/ $\delta_H$  6.93 (CH-3'/CH-5), 113.50/ $\delta_H$  7.56 (CH-2''), 115.80/ $\delta_H$  6.87 (CH-5'') e 125.04/ $\delta_H$  7.59 (CH-6'')] e seis carbonos quaternários [(C) $_6$ , todos  $sp^2$ , incluindo uma carbonila conjugada de éster em  $\delta_C$  167.69 (C-7''), quatro oxigenados em 152.93 (C-1), 153.70 (C-4), 152.45 (C-4'') e 148.60 (C-3'') e um não oxigenado em 122.26 (C-1'')]. Assim, foi possível deduzir a fórmula (MeO)(CH $_2$ O)(HC-O) $_4$ (O-HC-O)(COO)(CH) $_7$ (C-O) $_4$ (C) =  $C_{20}H_{17}O_{11}+5H$  (considerando a presença de cinco OH) - 1° (considerando a possibilidade de um dos oxigênios do éster representar um dos quatro HC-O =  $C_{20}H_{22}O_{10}$  (10 graus de insuficiência,  $C_{20}H_{42}O_{10} - C_{20}H_{22}O_{10} = 10$ , atribuídos a dois anéis benzênicos, uma unidade glicosídica e uma carbonila) e caracterizando-se as unidades estruturais com



Com base nos espectros de RMN  $^1H$  (Espectros 1-3) e RMN  $^{13}C$  (Espectros 4-6), que indicaram a presença de sinais de uma unidade benzênica *p*-dissubstituída, com os átomos de hidrogênio H-2/H-6 ( $\delta_H$  6.58; *d*,  $J = 8.8$  Hz/ $\delta_C$  116.35) e H-3/H-5 ( $\delta_H$  6.91/ $\delta_C$  119.30) constituindo um sistema  $A_2B_2$ , de uma unidade  $\beta$ -piranoglicosídica e um adicional anel aromático 1,3,4-trissubstituído sustentando os grupos MeO ( $\delta_H$  3.84, *s* / $\delta_C$  56.27), OH e COO conjugada ( $\delta_C$  167.69) e compatível com a presença de uma unidade 4-hidroxi-3-metoxibenzenoica constituindo um sistema 1'',3'',4'' através dos com deslocamentos químicos em  $\delta_H$  7.56 (H-2''), 7.58 (*dd*, 8.2 e 1.9, H-6'') e 6.87, correlacionados no HSQC com os sinais átomos de carbono metínicos em 113.50, 125.04 e 115.80, respectivamente. As localizações dos grupos hidroxílico e metoxílico desta unidade foram definidas pelo espectro HMBC (Espectros 10 e 11), já que carbono com menor deslocamento químico (C-3'', não conjugado com carbonila) revelou interação heteronuclear com os átomos de hidrogênio da MeO (Tabela 7), definindo-se esta unidade 4''-hidroxi-3''-metoxi. Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono ( $\delta_C$  64.97) e hidrogênio ( $\delta_H$  4.68 e 4.34) do grupo metilênico H $_2$ CO-6' da unidade  $\beta$ -piranoglicosídica indicaram a esterificação deste grupamento, permitindo a localização da unidade benzoica neste grupo metilênico, que responde pela prevista desproteção por efeito indutivo. Assim, restou à benzênica dissubstituída para ligação

no CH-1' da unidade  $\beta$ -piranoglicosil, permitindo postular estrutura para **SGD-1B** como do tipo 6'-*O*-vanilloilarbutina.

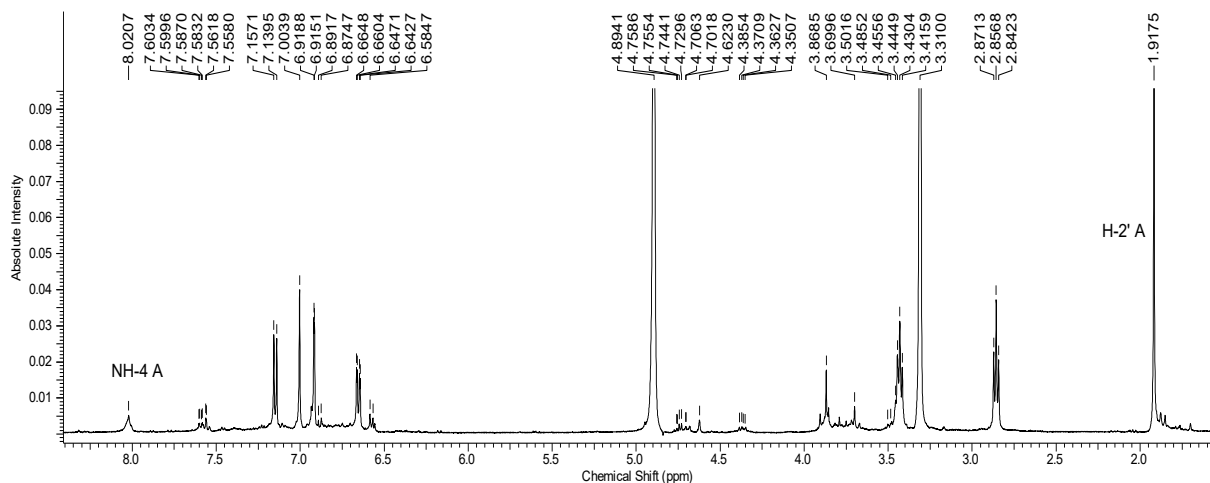
De fato, todos os dados espectrais fornecidos pelos espectros 1D (RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C e RMN<sup>13</sup>C-DEPTQ) e 2D (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, HSQC e HMBC) de RMN e de massas (EMAR-IES) da **SGD-1B** comparados com dados da literatura (Tabela 7) permitiram a caracterização como 6'-*O*-vanilloilarbutina.



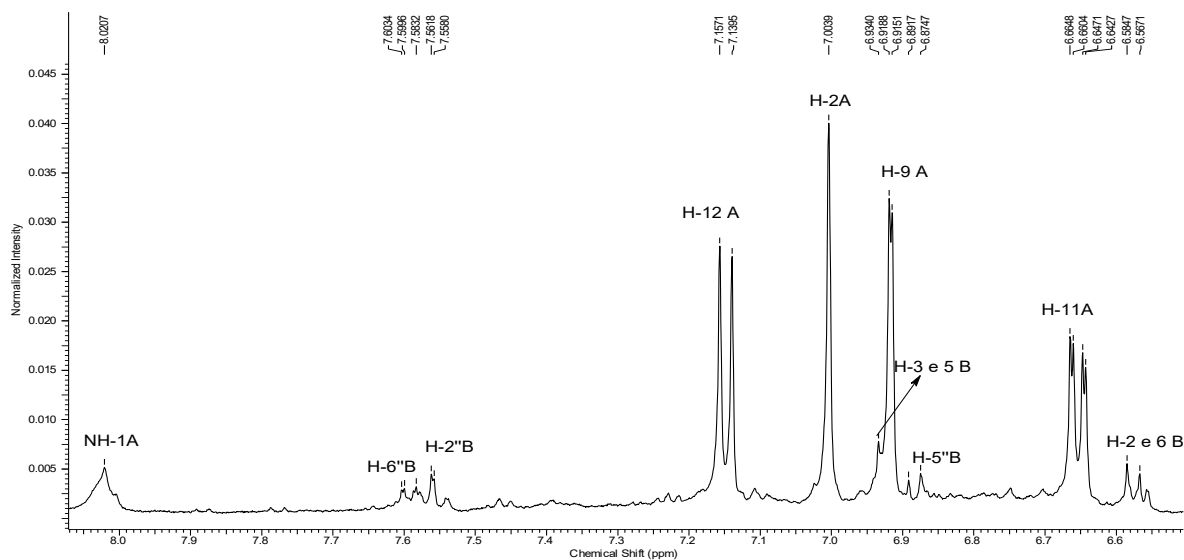
**SGD-1B**

**Tabela 7.** Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGD-1B, comparados com valores da literatura de 6'-*O*-vanilloilarbutina (WU; LI; SHI, 2006). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

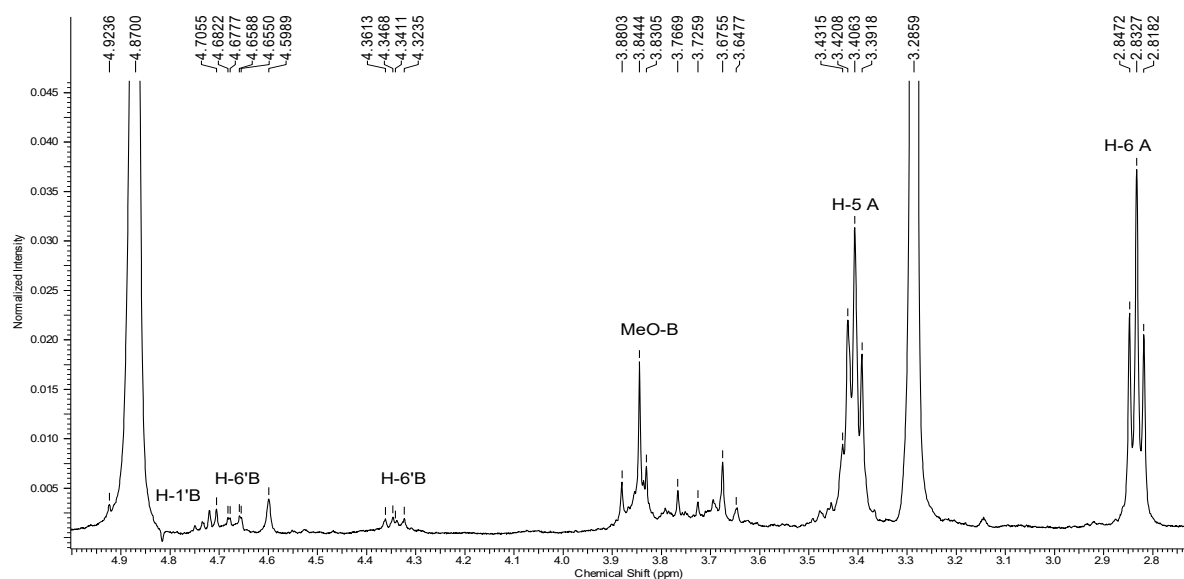
<b>SGD-1B</b>					<b>6'-<i>O</i>-vanilloilarbutina</b>	
<b>C</b>	$\delta_C$	$\delta_H$	<sup>2</sup> <i>J</i> <sub>CH</sub>	<sup>3</sup> <i>J</i> <sub>CH</sub>	$\delta_C$	$\delta_H$
1	152.93	-	H-2/6	H-3/H-5	152.1	-
4	153.70	-		H-2/H-6	153.6	-
1''	122.26	-		H-5''	122.3	-
3''	148.60	-		H-5''; MeO-3''	148.6	-
4''	152.45	-		H-2''; H-6''	152.7	-
7''	167.69	-			167.8	-
<b>CH</b>						
2 e 6	116.35	6.58 ( <i>d</i> , 8.8)			116.5	6.58 ( <i>d</i> , 8.4)
3 e 5	119.30	6.93			119.4	6.91 ( <i>d</i> , 8.4)
2''	113.50	7.56			113.6	7.51 ( <i>s</i> )
5''	115.80	6.87			115.9	6.84 ( <i>d</i> , 8.8)
6''	125.04	7.59 ( <i>dd</i> , 8.2, 1.9)			125.7	7.56 ( <i>d</i> , 8.8)
<b>Glic</b>						
1'	103.45	4.70			103.4	4.76 ( <i>d</i> , 7.6)
2'	74.76	3.44			77.8	3.48 ( <i>m</i> )
3'	75.35	3.70			74.9	3.48 ( <i>m</i> )
4'	71.89	3.40			72.0	3.48 ( <i>m</i> )
5'	77.73	3.50			75.3	3.74 ( <i>ddd</i> , 8.0, 8.8)
6'	64.97	4.68( <i>dd</i> , 10.1, 2.2) 4.34( <i>dd</i> , 10.1, 7.2)			65.1	4.69 ( <i>d</i> , 11.2) 4.36 ( <i>dd</i> , 11.2, 7.6)
<b>MeO-3</b>	56.27	3.84 ( <i>s</i> )			56.4	3.85 ( <i>s</i> )



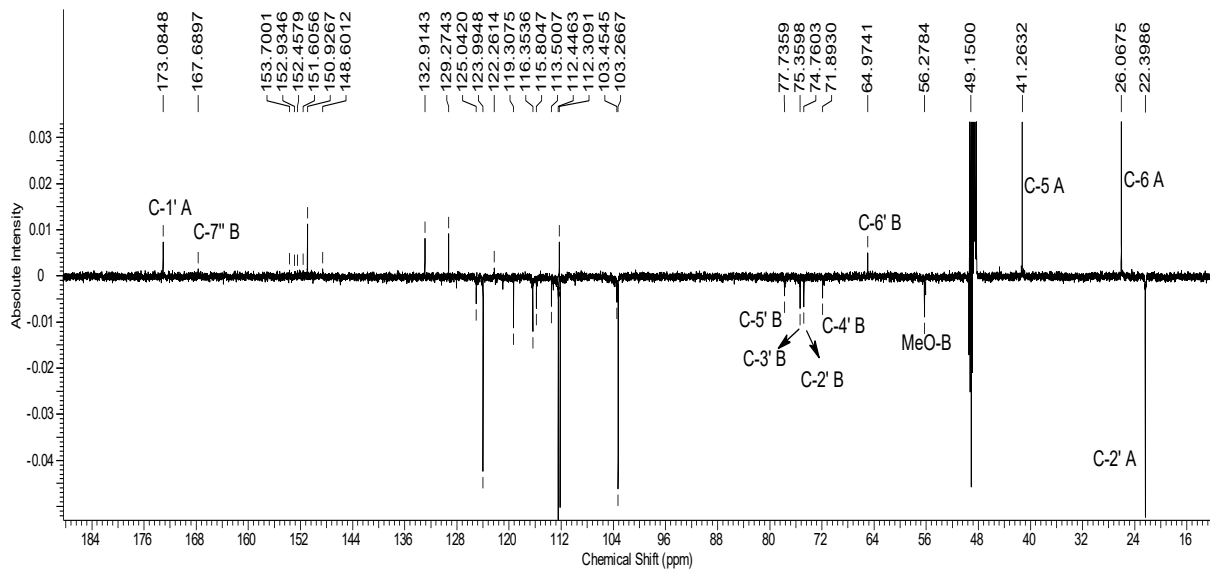
**Espectro 1.** RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de SGD-1.



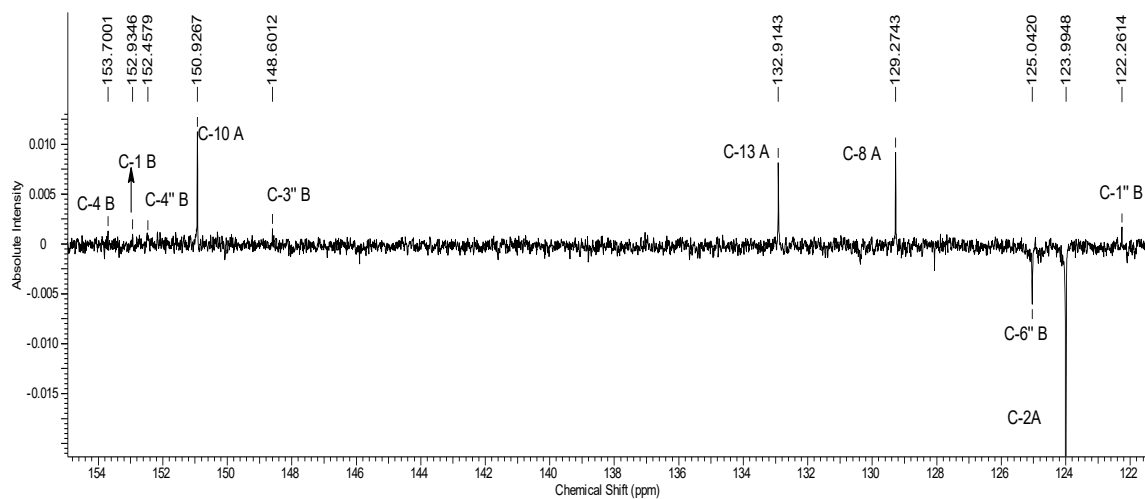
**Espectro 2.** Expansão do RMN  $^1\text{H}$  de SGD-1.



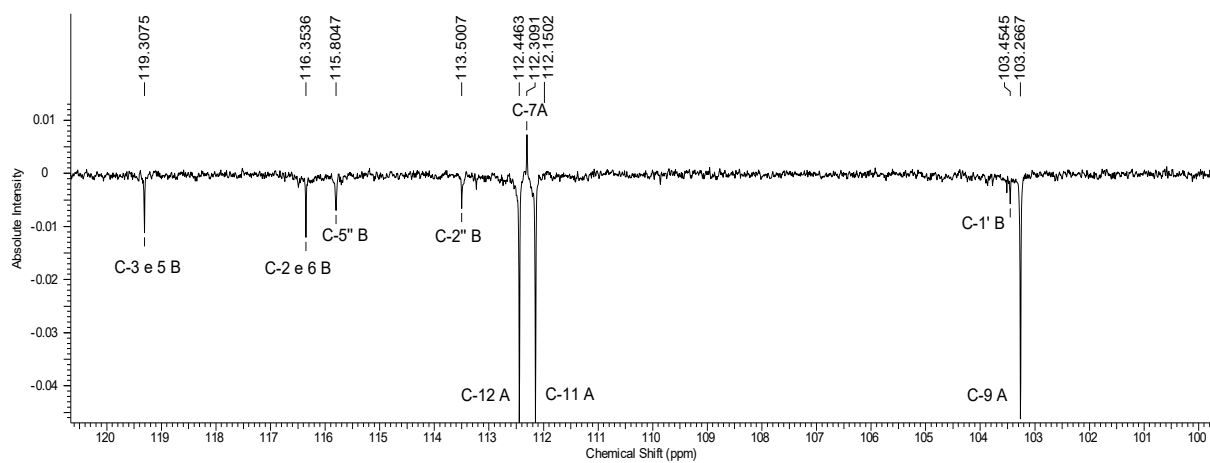
**Espectro 3.** Expansão do RMN  $^1\text{H}$  de SGD-1.



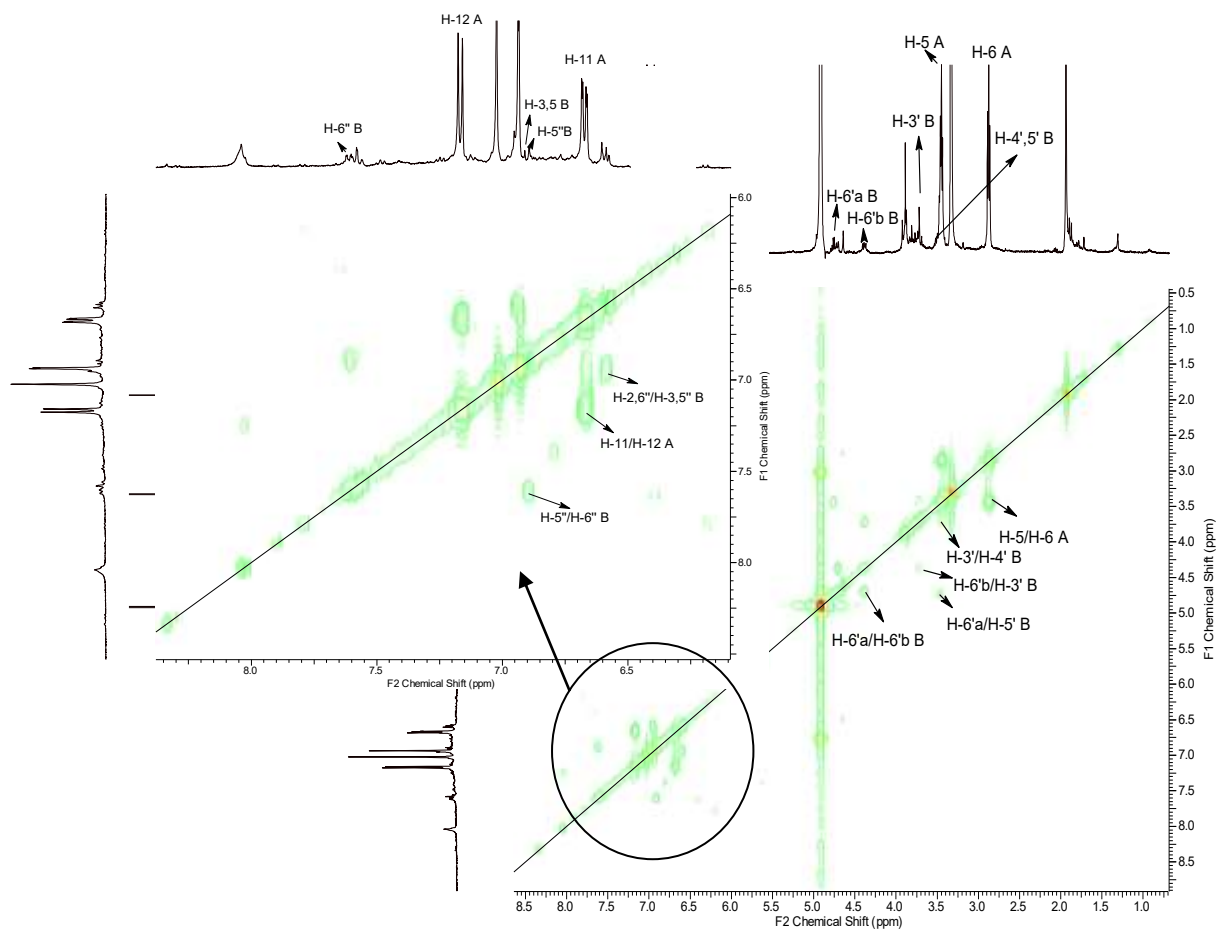
**Espectro 4.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGD-1.



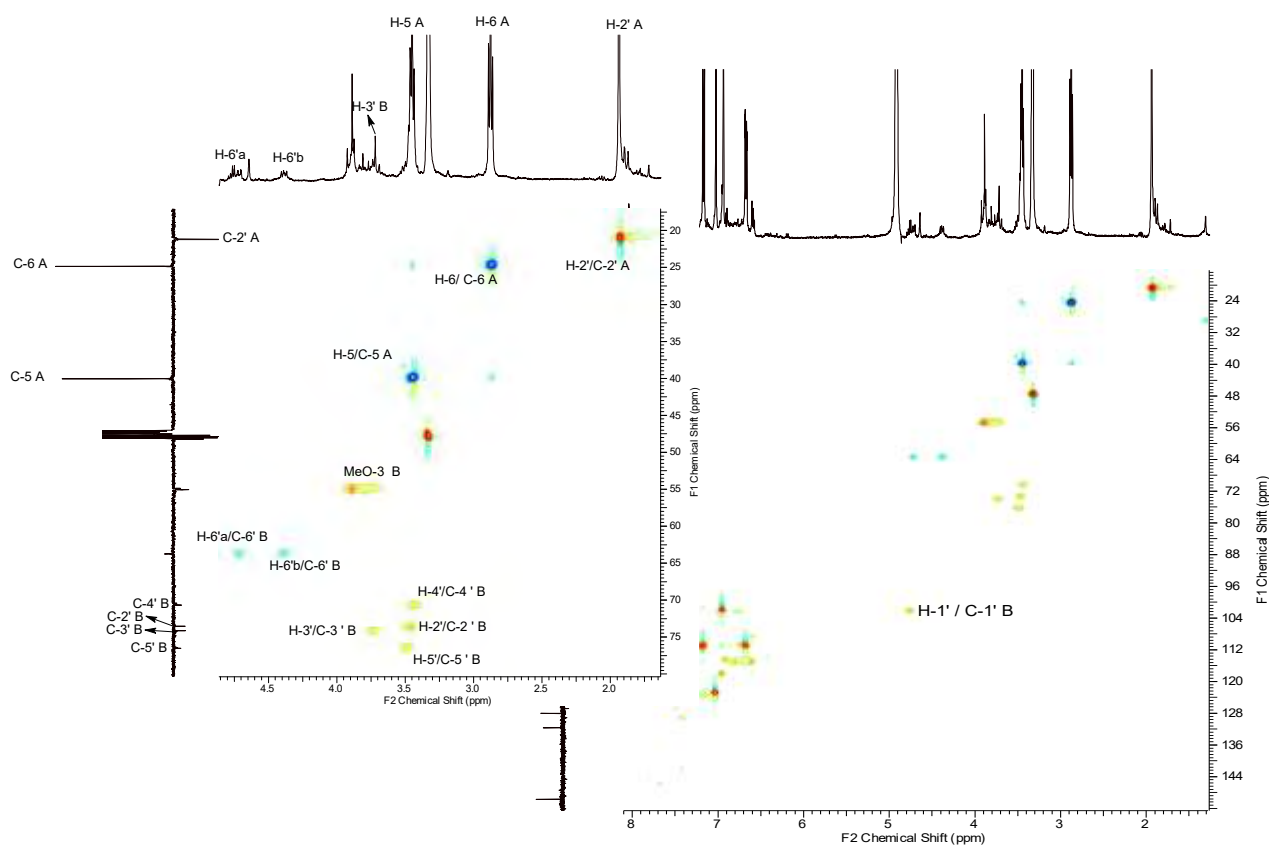
**Espectro 5.** Expansão do RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT-Q de SGD-1.



**Espectro 6.** Expansão do RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT-Q de SGD-1.

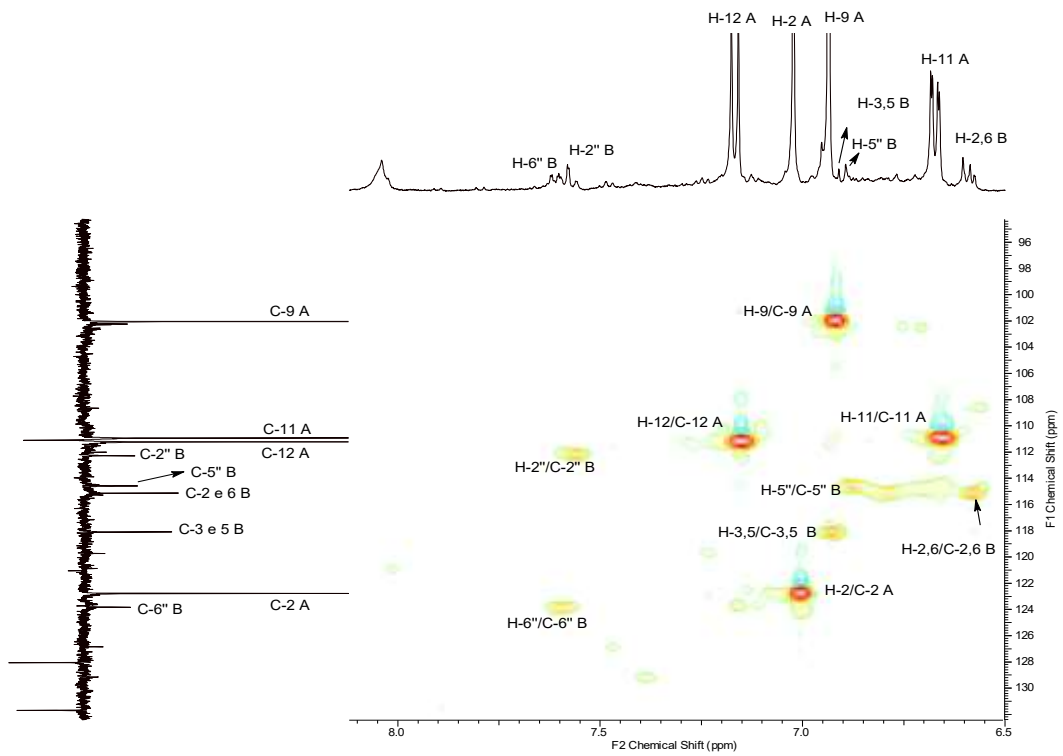


**Espectro 7.** RMN-<sup>1</sup>H-H-COSY e expansão (500 MHz, MeOD) de SGD-1.

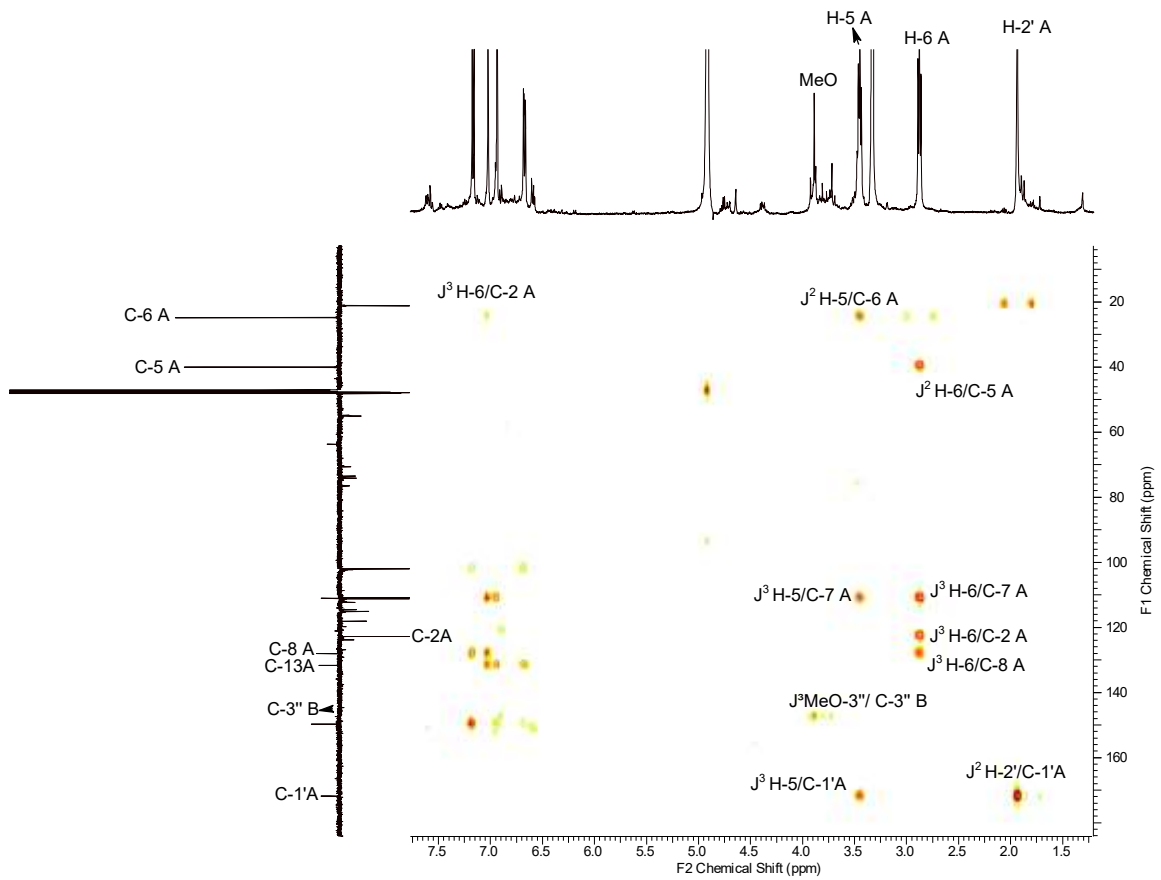


**Espectro 8.** RMN HSQC e expansão (MeOD) de SGD-1.

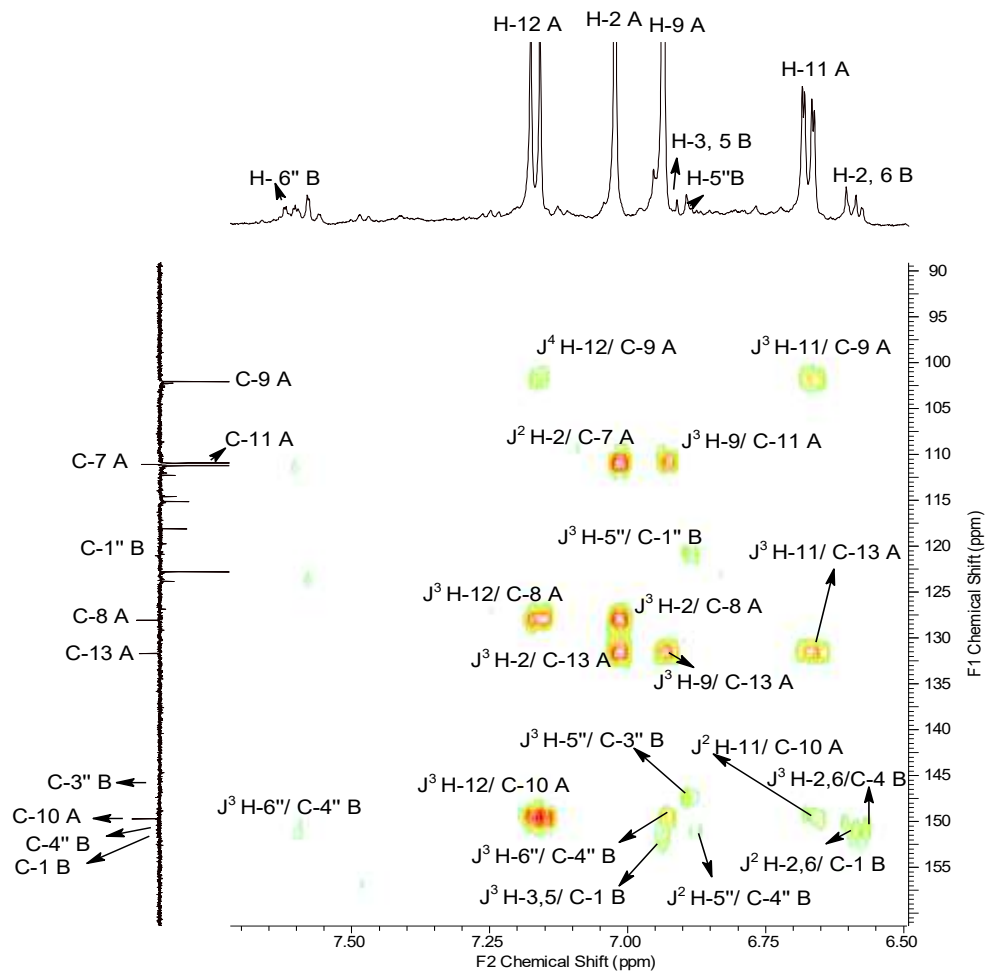




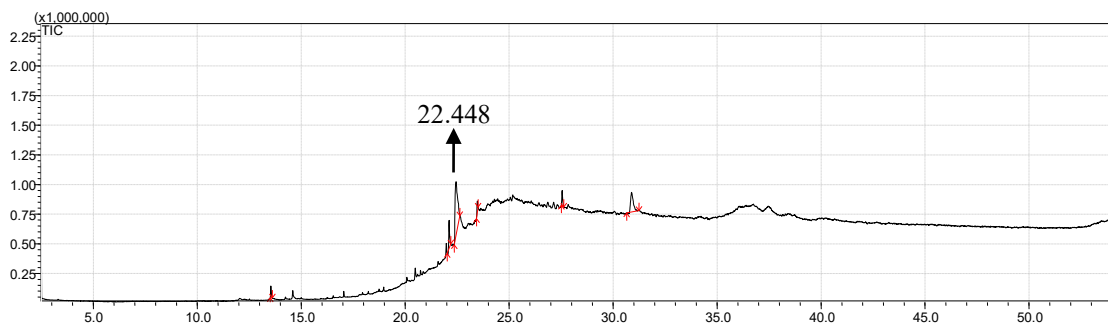
**Espectro 9.** Expansão do HSQC de SGD-1.



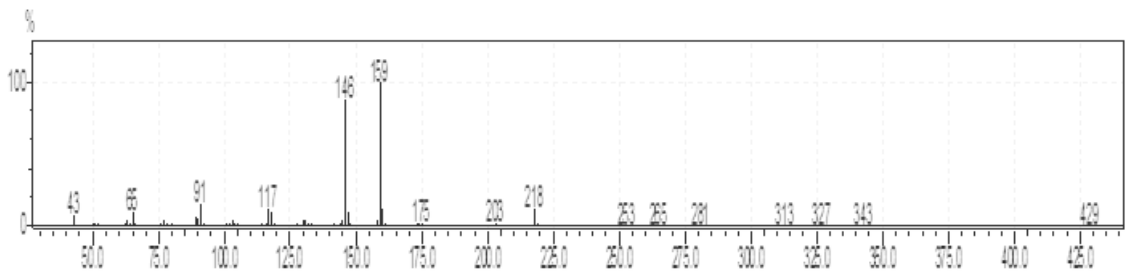
**Espectro 10.** RMN HMBC de SGD-1.



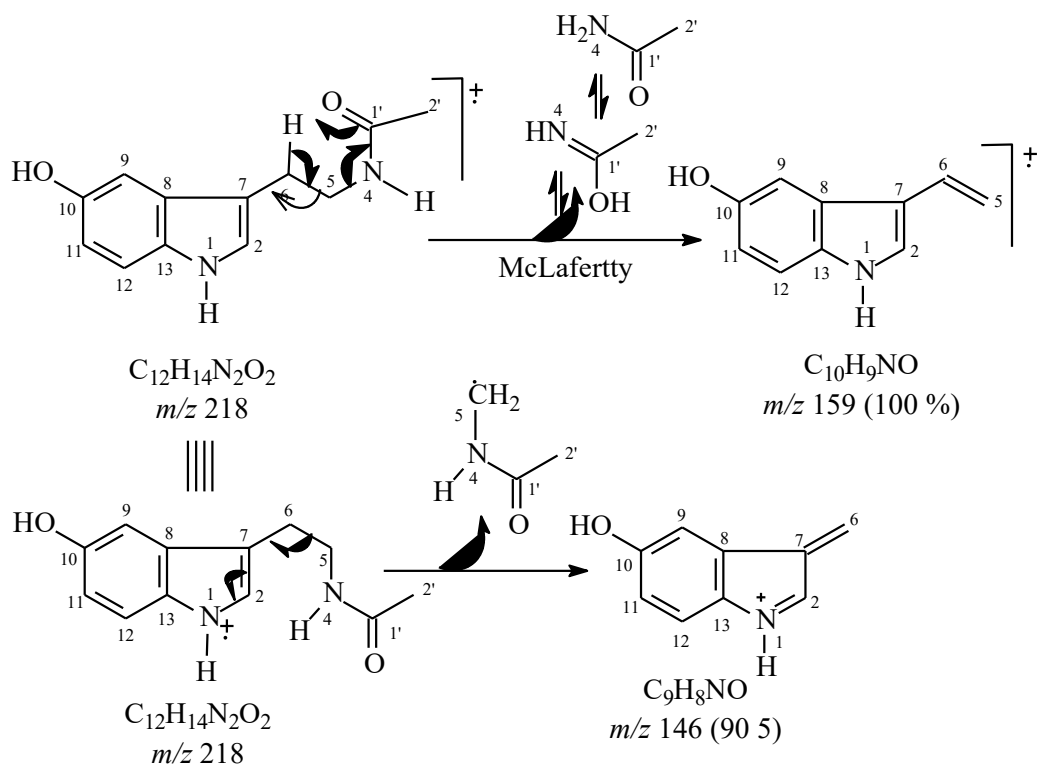
**Espectro11.** Expansão do HMBC de SGD-1.



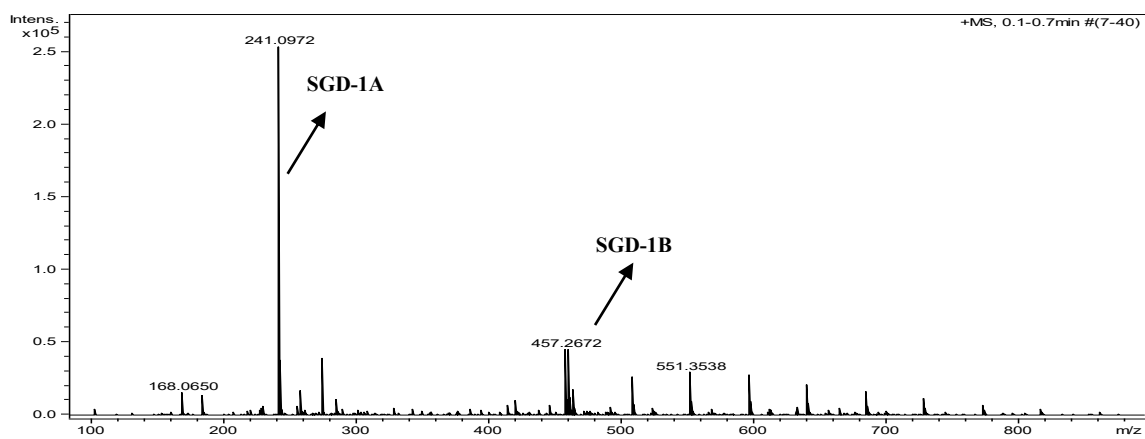
**Espectro12.** Cromatograma do CG de SGD-1.



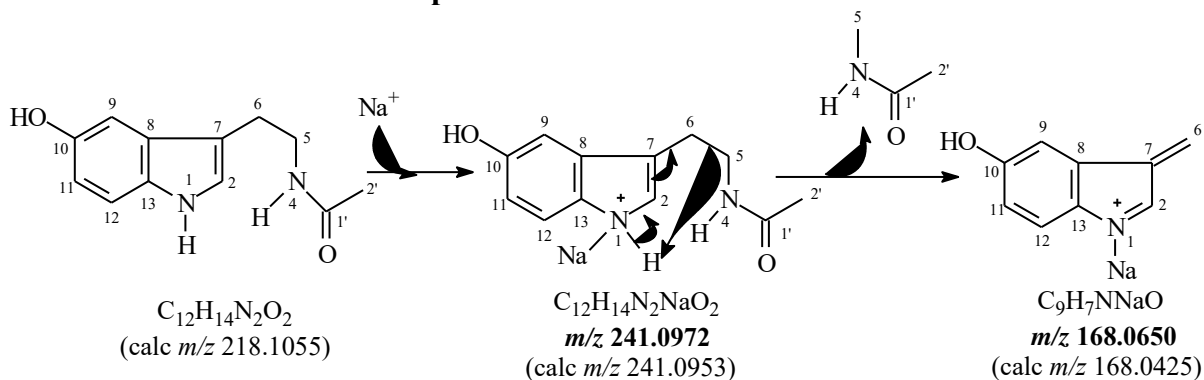
**Espectro13.** EM de baixa resolução no Tr. 22.4 de SGD-1A.



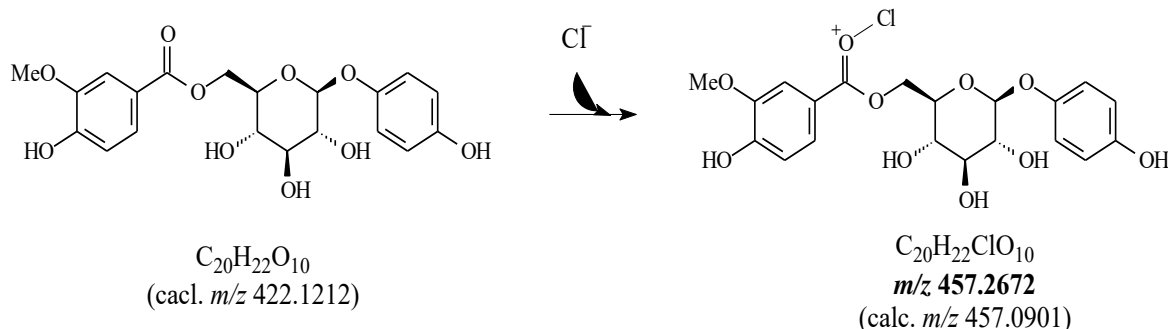
**Esquema 1.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do EM de baixa resolução no Tr. 22.4 (55.74%) de SGD-1.



**Espectro 14.** IES-EM de SGD-1.



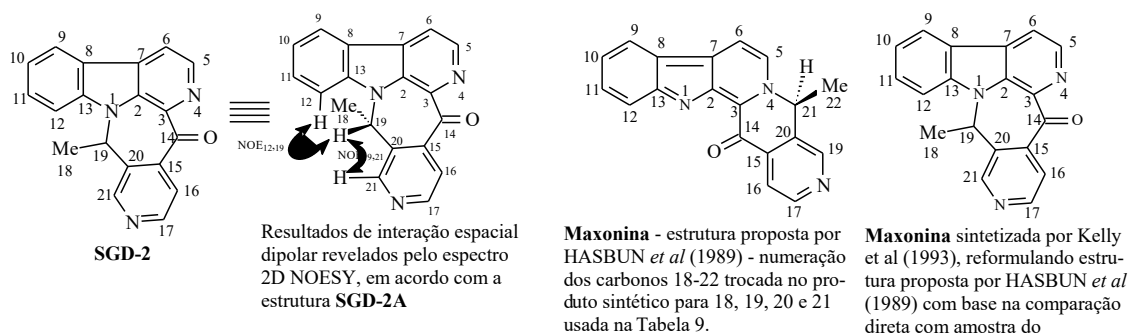
**Esquema 2.** Estruturas para os picos apresentados no IES-EM,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de SGD-1A.



**Esquema 3.** Estruturas para os picos apresentados no IES-EM de SGD-1B.

### 3.2.2 Determinação estrutural da substância SGD-2

Através da análise dos espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  (1D e 2D) e EM-IES e comparação com dados da literatura a estrutura **SGD-2** (6 mg, isolados do extrato Diclorometano) foi proposta, podendo ser caracterizada como idêntica a Maxonina, isolada de *Simira maxonii* (HASBUN et al., 1989), após reformulação da estrutura publicada inicialmente através de processo sintético desenvolvido por Kelly e colaboradores (1993)



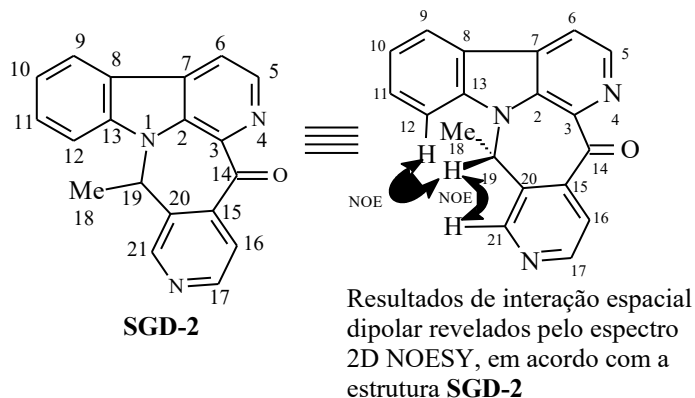
Os sinais do espectro de RMN  $^1H$  da **SGD-2** (Espectro 15) entre  $\delta_H$  8.79-7.46 revelaram-se compatíveis com a presença de hidrogênios (H-5, H-6, H-9, H-10, H-11 e H-12) na região de aromáticos de unidade  $\beta$ -carbolínica, além dos sinais dos hidrogênios do anel piridínico com descolamentos químicos em  $\delta_H$  8.66 (*d*,  $J=4.3$  Hz, H-17), 8.46 (*d*,  $J=4.3$  Hz, H-16) e 9.05 (*s*, H-21).

Os sinais de hidrogênio foram atribuídos com auxílio do espectro de RMN 2D ( $^1H$ - $^1H$ -COSY, Espectro 17), que permitiu identificar as interações de acoplamento entre o H-10 ( $\delta_H$  7.46), apresentando-se como um tripleto se as duas interações do tipo *orto* com H-9 e H-11 fossem iguais (o que não é verdade), com H-11 ( $\delta_H$  7.81), apresentando-se também como um tripleto em situação análoga como H-10 devido as duas interações do tipo *orto* com H-10 e H-9 ( $\delta_H$  8.34, *d*,  $J=7.5$  Hz), H-12,  $J=7.9$  Hz pela interação com H-11, que deve revelar igual valor de acoplamento. Esses experimentos revelaram também a presença de uma metila (CH<sub>3</sub>-18, *d*,  $J=6.6$  Hz,  $\delta_H$  1.57) com interação com o hidrogênio metínico (H-19, *q*,  $\delta_H$  6.41) e a relação vicinal entre os hidrogênios metínicos H-5 ( $\delta_H$  8.79, *d*,  $J=4.7$  Hz) com H-6 ( $\delta_H$  7.88, *d*,  $J=4.7$  Hz) e do hidrogênio H-16 ( $\delta_H$  8.46, *d*,  $J=4.3$  Hz) com H-17 ( $\delta_H$  8.66, *d*,  $J=4.3$  Hz).

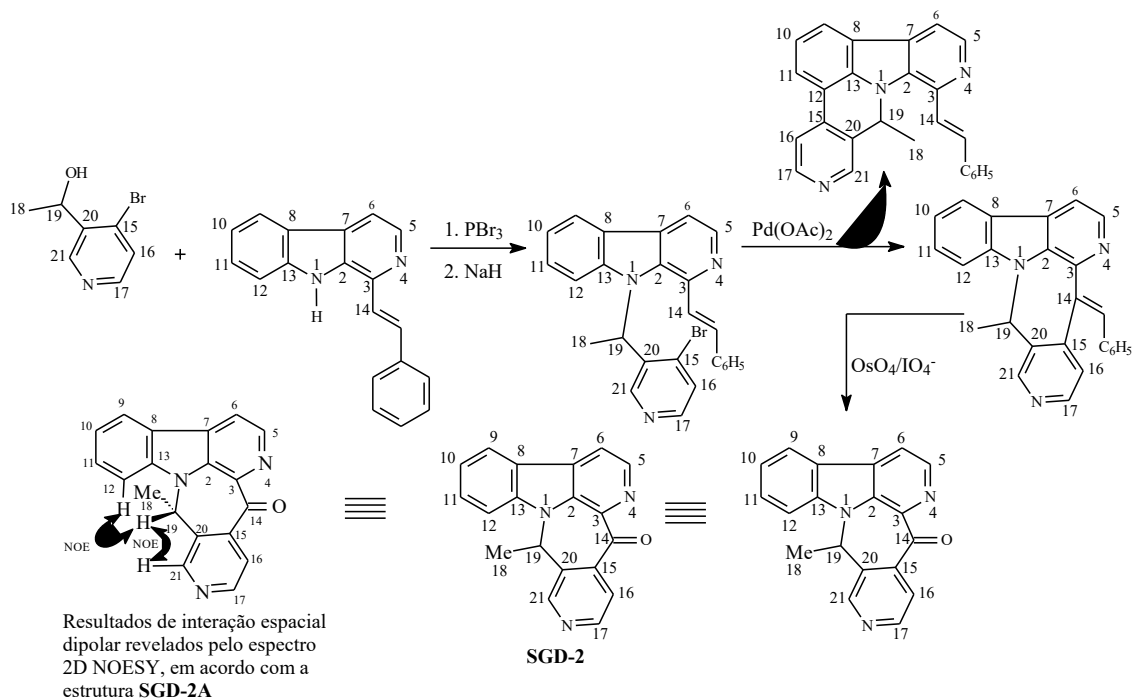
O espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ (Espectro 16) apresentou nove sinais na região de  $\delta_C$  111.67-151.81 atribuídos aos carbonos  $sp^2$  metínicos, sendo os sinais em  $\delta_C$  151.81, 124.00, 120.80, 141.43 e 150.56 correspondentes aos carbonos dos anéis piridínicos CH-5, CH-6, CH-6, CH-17 e CH-21, respectivamente. Os demais sinais de carbonos  $sp^2$  metínicos foram assinalados para os carbonos do anel aromático dissubstituído da unidade indólica. A metila

(CH<sub>3</sub>-18) conectada ao CH-19 (confirmada pelo acoplamento à longa distância - <sup>2</sup>J) exibiu sinal em δ<sub>C</sub> 21.2. A presença da carbonila de lactona foi assinalada pelo sinal típico em δ<sub>C</sub> 191.37.

O experimento 2D de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-NOESY (Espectro 18), que fornece informações sobre a proximidade espacial de átomos de hidrogênio, foi de grande importância para afastar a alternativa estrutural e confirmar a proposta **SCD-2** através dos efeitos NOE entre os átomos de hidrogênio de H-19 (δ<sub>H</sub> 6.41) com ambos H-12 (δ<sub>H</sub> 8.07) e H-21 (δ<sub>H</sub> 9.05) revelados pelo espectro NOESY e afastar a estrutura inicial proposta por Hasbun e colaboradores (1989) para a **Maxonina**, que utilizou, inclusive, experiências 2D de correlação heteronuclear de átomos de hidrogênio e carbono através de uma ligação (<sup>1</sup>J<sub>CH</sub>) e de longo acoplamento (<sup>2</sup>J<sub>CH</sub> e <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>).



A rota sintética utilizada por Kelly e colaboradores (1993) (Figura 17) envolveu a sequência reacional resumida abaixo. Esse artigo registrou que a confirmação da identidade do produto sintético e a substância natural isolada por Hasbun *et al* (1989) de *Simira maxonii* envolvendo comparação direta com amostra autêntica exigia reformulação estrutural da Maxonina.

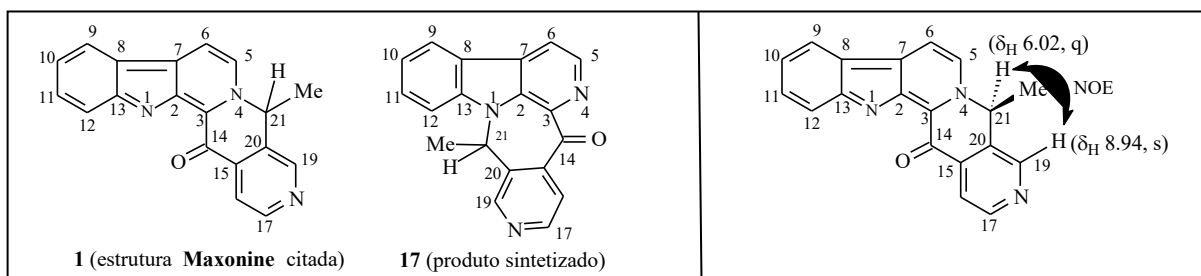


**Figura 17.** Rota sintética da maxonina descrita na literatura por Kelly e colaboradores (1993).

A comparação dos dados espectrais de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 8) da **SGD-2** com valores publicados por Hasbun e colaboradores (1989), registrados em solvente diferentes (**SGD-2** em MeOH-*d*<sub>4</sub> e **Maxonina** em CDCl<sub>3</sub>), revelou diferenças significativas nos deslocamentos químicos dos CH-5 [ $\delta_C$  151.81/ $\delta_H$  8.79 (**SGD-2**) e  $\delta_C$  140.63/ $\delta_H$  8.83 (**Maxonina**), diferença de 11.18 ppm nos sinais de carbono], CH-17 [ $\delta_C$  141.43/ $\delta_H$  8.66 (**SGD-2**) e  $\delta_C$  150.74/ $\delta_H$  8.82 (**Maxonina**), tendo uma diferença de 9.4 ppm nos sinais de carbono], podendo-se classificar tais diferenças expressivas mesmo considerando-se os solventes diferentes utilizados nos registros dos espectros. A troca das atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos carbonos metínicos CH-5 ( $\delta_C$  140.63/ $\delta_H$  8.83,  $J=5.0$  Hz) e CH-17 ( $\delta_C$  150.74/ $\delta_H$  8.82,  $J=5.0$  Hz) descritos por Hasbun e colaboradores (1989) para a Maxonina (Tabela 8) para CH-5 ( $\delta_C$  150.74/ $\delta_H$  8.82) e CH-17 ( $\delta_C$  140.63/ $\delta_H$  8.83,  $J=5.0$  Hz) atenua significativamente tal situação conflitante.

Para uma atribuição inequívoca dos sinais de hidrogênio e carbono obteve-se as correlações diretas ( $J^1$ ) pelos espectros 2D HSQC (Espectro 19) e a longa distância ( $J^2$  e  $J^3$ ) HMBC.

Assim, alguns sinais de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 8) não revelaram a esperada semelhança resultante da comparação com os dados da literatura para uma mesma substâncias através do uso de solventes diferentes (CDCl<sub>3</sub> e MeOH-*d*<sub>4</sub>) e aparelhos que operaram com diferentes frequências [400 (<sup>1</sup>H) e 100 (<sup>13</sup>C) MHz para a **Maxonina** e 500 para (<sup>1</sup>H) e 125 (<sup>13</sup>C) MHz para **SGD-2**]. Os autores do trabalho sintético (KELLY et al., 1993) não descreveram os dados espectrais de RMN correspondentes de hidrogênio e carbono, declarando somente na parte experimental referente a “Mp and <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz).**17** (número atribuído no artigo à **Maxonina**): identical to authentic maxonine.”; além disto aparece nesse artigo um parágrafo demonstrando insegurança na identidade estrutural do produto sintético **17** (KELLY et al., 1993) e a estrutura molecular **1** proposta por Hasbun e colaboradores (1989) substância natural isolada de *Simira maxonii* Figura 18.



**Figura 18.** Estrutura da maxonina sintetizada proposta por KELLY et al., 1993 (A), estrutura da maxonina isolada de *S. maxonii* por HASBUN e colaboradores 1989 (B).

The lowest field proton at  $\delta$  8.94 is long-range coupled with the carbons C-18, C-17 and C-20. Anisotropic anisotropy was found between H-18 and C-18, thus suggesting the presence of a 3,4-disubstituted pyridine nucleus. The signals at  $\delta$  149.35 and 131.74 were now assigned to the bridged carbons C-18 and C-20, respectively. The connection of B and E rings was established by a concerted use of 1D- and 2D-NMR and NOE difference experiments. The protons H-16 and H-19 displayed long-range correlation peaks with the carbons C-14 and C-21 of the C ring. Selective irradiation of the signal at  $\delta$  8.94 (H-18) caused considerable NOE enhancement of the resonance at  $\delta$  6.02 (H-21). These data require that these protons remain in the same plane with the methyl group oriented out of the plane. Finally, on the basis of long-range correlations with protons H-5 and H-21, the carbon resonance at  $\delta$  135.13 was assigned to C-3, the common carbon between the C and E rings. The assignment of the two remaining C ring quaternary carbons (C-2 and C-7) was based on their long-range correlation with protons H-3 and H-4. Data for the attachment of rings A and B is modified (table 1a) and is given as follows. The most characteristic high field resonance at  $\delta$  139.51, was attributed to C-13 in ring A while the signals of the carbon atoms and protons attached thereto were assigned by proton-proton decoupling and heteronuclear correlation experiments.

Although the reported spectral data did not allow a clear distinction between **1** and **17** as the structure for maxonine, two NMR experiments on the synthetic sample already in hand were decisive. Della Montanone et al. had shown that irradiation of H-19 caused considerable NOE enhancement of H-21, consistent with both structures **1** and **17**. We found that irradiation of H-19 gave NOE enhancement of H-19 and the methyl resonance, as expected for both **1** and **17**. In addition, NOE enhancement was also seen for H-12, but not H-5, which is consistent with structure **17** but not **1**. Moreover, long range HMQC measurements - which indicated three bond coupling of C-2 with H-5 and H-21, and of C-3 with H-5 (but not H-21) - supported the retention of maxonine's structure from **1** to **17**.

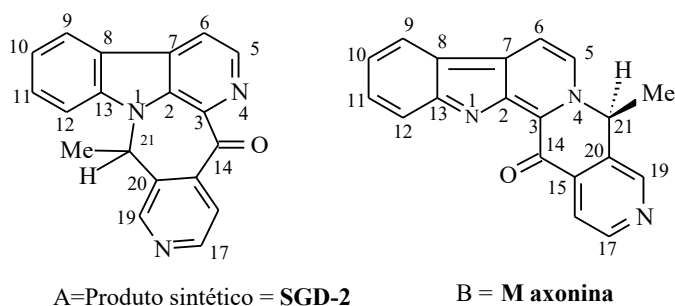
**Figura 19.** Trechos do artigo da Maxonina por KELLY et al., 1993 (A) HASBUN e colaboradores 1989 (B).

As descrições contidas nos dois trechos dos dois artigos acima citados revelando imprecisões e equívocos [como exemplo: “long range HMQC (HMBC e não HMQC) measurements – which indicated three bond coupling of C-2 with H-6 and H-21, and of C-3 with H-5 (but not H-21) – reinforced the revision of maxonine’s structure from **1** to **17**”] e a comparação dos dados espectrais da **SGD-2** e da **Maxonina** descritos por Hasbun e colaboradores (1989, Tabela 8) permitiram defender essa estrutura como correta, sendo a do produto sintético idêntica à da substância agora isolado de *S. grazielae*.

O alcaloide **SGD-2** foi também analisado por CG-EM e forneceu cromatograma (Figura 21) contendo pico com tempo de retenção  $T_r = 28.067$  min e área de 65.95% (**SGD-2**). O espectro de massas (70 eV, Espectro 20) deste componente principal revelou o pico do íon molecular em  $m/z$  299 ( $[M]^+$ ) compatível com a fórmula molecular  $C_{19}H_{13}N_3O$ . Como o cromatograma não se mostrou muito bem definido, obteve-se também o espectro alta resolução, EMAR-IES, no modo positivo (Espectro 21), que confirmou a fórmula molecular  $C_{19}H_{13}N_3O$  através do pico  $[M-H]^+$  em  $m/z$  300.1126 ( $C_{19}H_{14}N_3O$ , calc.  $m/z$  300.1137) e  $[M-Na]^+$  em  $m/z$  322.1013 ( $C_{19}H_{13}N_3NaO$ , calc  $m/z$  322.0956). A representação estrutural e as reações de fragmentação do **SGD-2** para justificar os principais observados no EMAR-IES foram descritos no Esquema 6 e dos principais picos do EM de baixa resolução no Esquema 5.

Assim, a proposta estrutural lançada no presente trabalho para a **SGD-2** está condizente com a publicação realizado por Kelly e colaboradores (1993) (Figura A), que desenvolveram trabalho de síntese e contestaram a estrutura proposta por Hasbun e colaboradores (1989). Nesta nossa avaliação os dados espectrais 1D e 2 D de RMN da **SGD-2** comparados com os da **Maxonina** publicados por Hasbun e colaboradores não permitiram afastar definitivamente a estrutura B, sendo o produto sintético idêntico ao isolado de *S. grazielae*. Os autores do trabalho sintético não conseguiram sintetizar esta estrutura B após várias tentativas (KELLY et al., 1993)

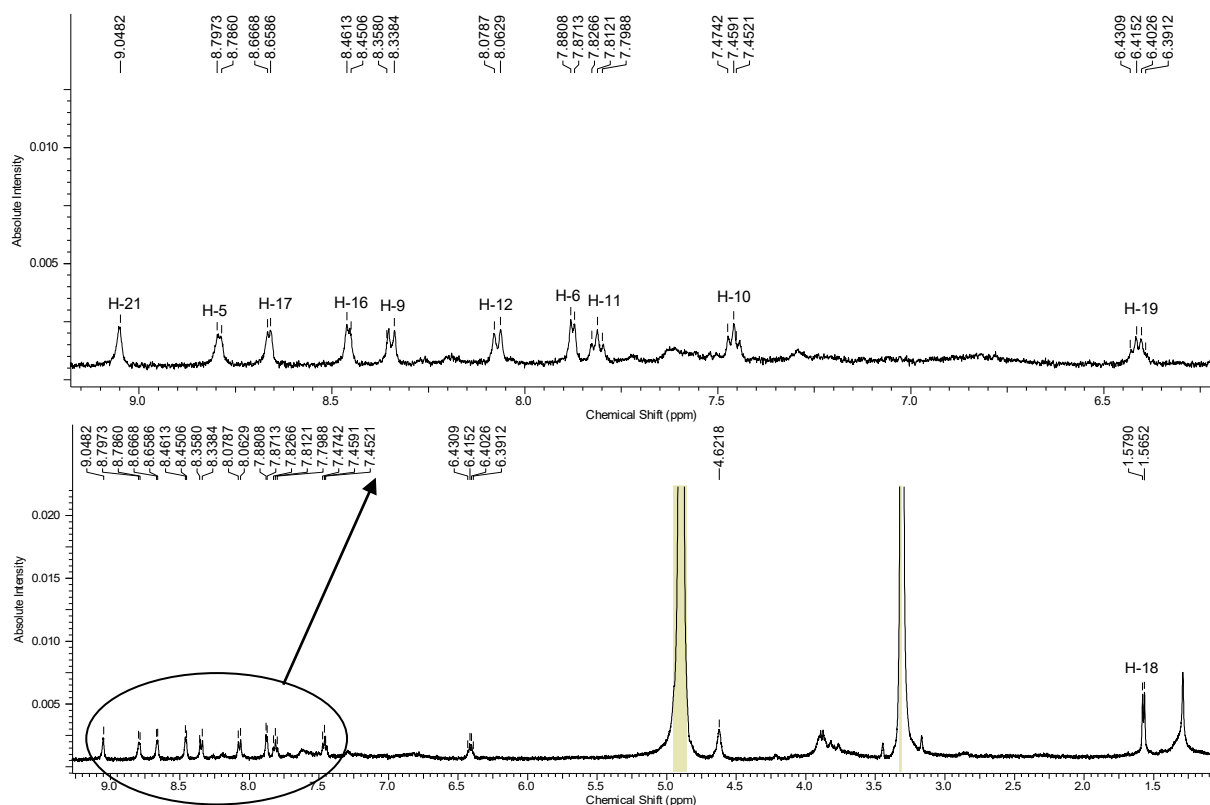
Aliás, as diferenças espectrais reveladas pela comparação dos dados duas substâncias podem ser justificadas pelas diferenças estruturais.



**Figura 20.** Estruturas do alcaloide **Maxonina** propostas por Kelly e colaboradores (1993) (A) e a postulada por Hasbun e colaboradores (1989) (B).

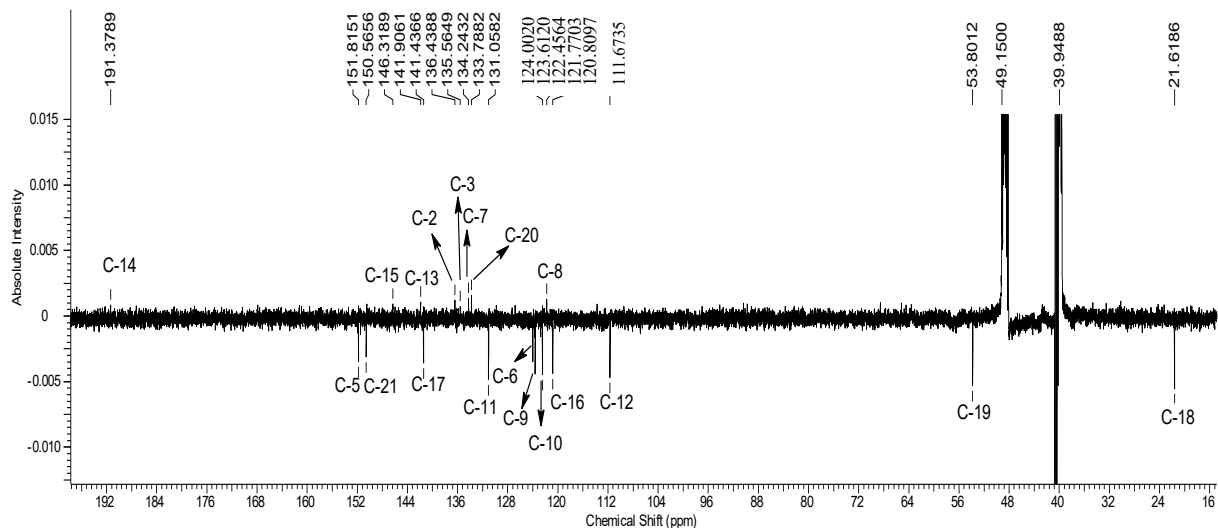
**Tabela 8.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGD-3, comparados com Maxonina (HASBUN et al., 1989). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

SGD-2				Maxonina		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	136.43	-			135.02	-
3	135.56	-			135.13	-
7	134.21	-			133.46	-
8	121.77	-		H-10	121.16	-
13	141.90	-			140.84	-
14	191.31	-			190.64	-
15	146.31	-			145.25	-
20	133.78	-		3H-18	132.78	-
<b>CH</b>						
5	151.81	8.79 ( <i>d</i> , 4.7)			140.63	8.83 ( <i>d</i> , 5.0)
6	124.00	7.88 ( <i>d</i> , 4.7)			119.23	8.26 ( <i>d</i> , 5.0)
9	123.61	8.35 ( <i>d</i> , 7.5)			122.50	8.23 ( <i>d</i> , 8.0)
10	122.45	7.46 ( <i>t</i> )			121.57	7.44( <i>m</i> ,8.0;5.5;2.5)
11	131.05	7.81 ( <i>t</i> )			130.15	7.78
12	111.67	8.07 ( <i>d</i> , 8.0)			109.51	7.78
16	120.80	8.46 ( <i>d</i> , 4.3)			123.84	7.87 ( <i>d</i> , 5.0)
17	141.43	8.66 ( <i>d</i> , 4.3)	H-16		150.74	8.82 ( <i>d</i> , 5.0)
19	53.80	6.41 ( <i>q</i> , 6.3)	3H-18		54.09	6.02 ( <i>q</i> , 6.8)
21	150.56	9.05 ( <i>s</i> )			148.73	8.94 ( <i>s</i> )
<b>CH<sub>3</sub></b>						
18	21.61	1.57 ( <i>d</i> , 6.6)	H-19		21.29	1.65 ( <i>d</i> , 6.8)

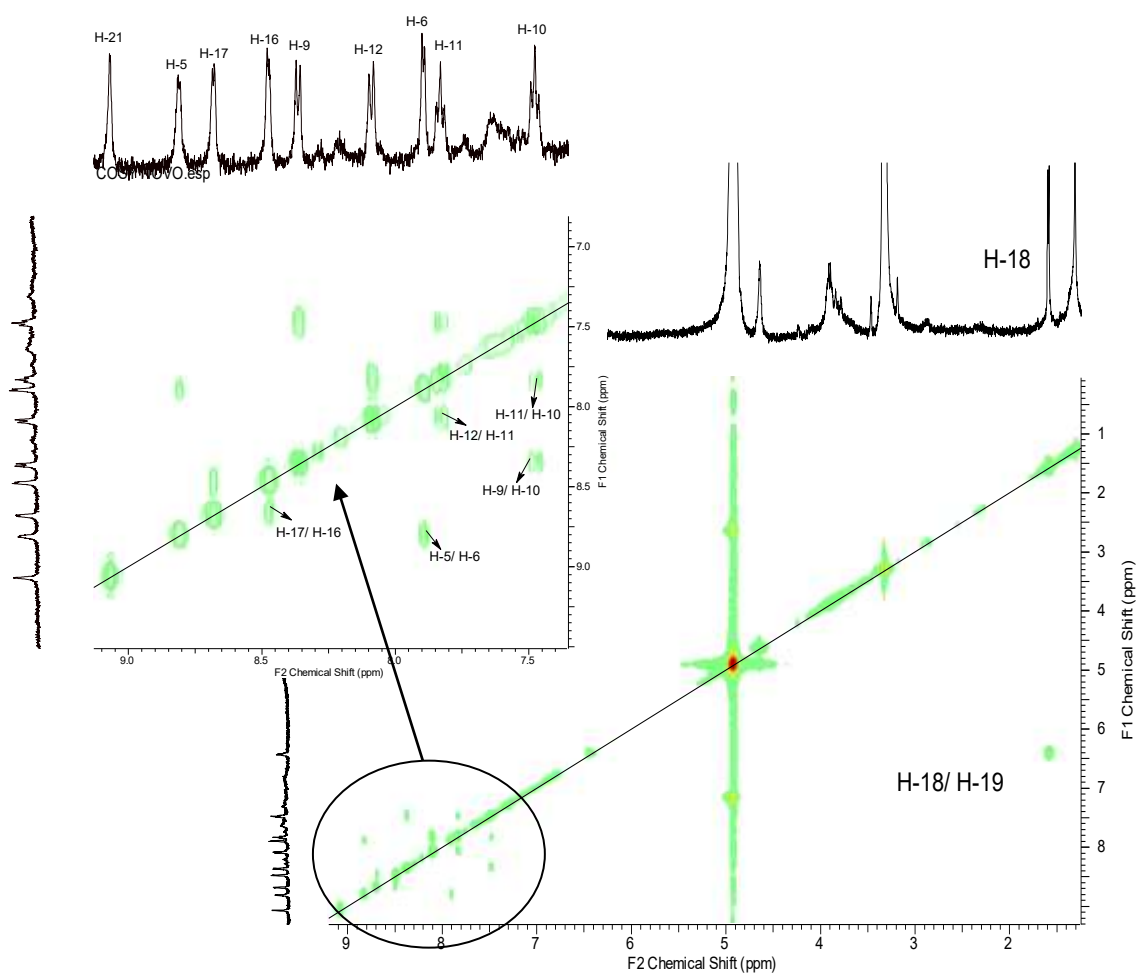


**Espectro 15.** RMN  $^1\text{H}$  e expansão de (500 MHz, MeOD) de SGD-2.

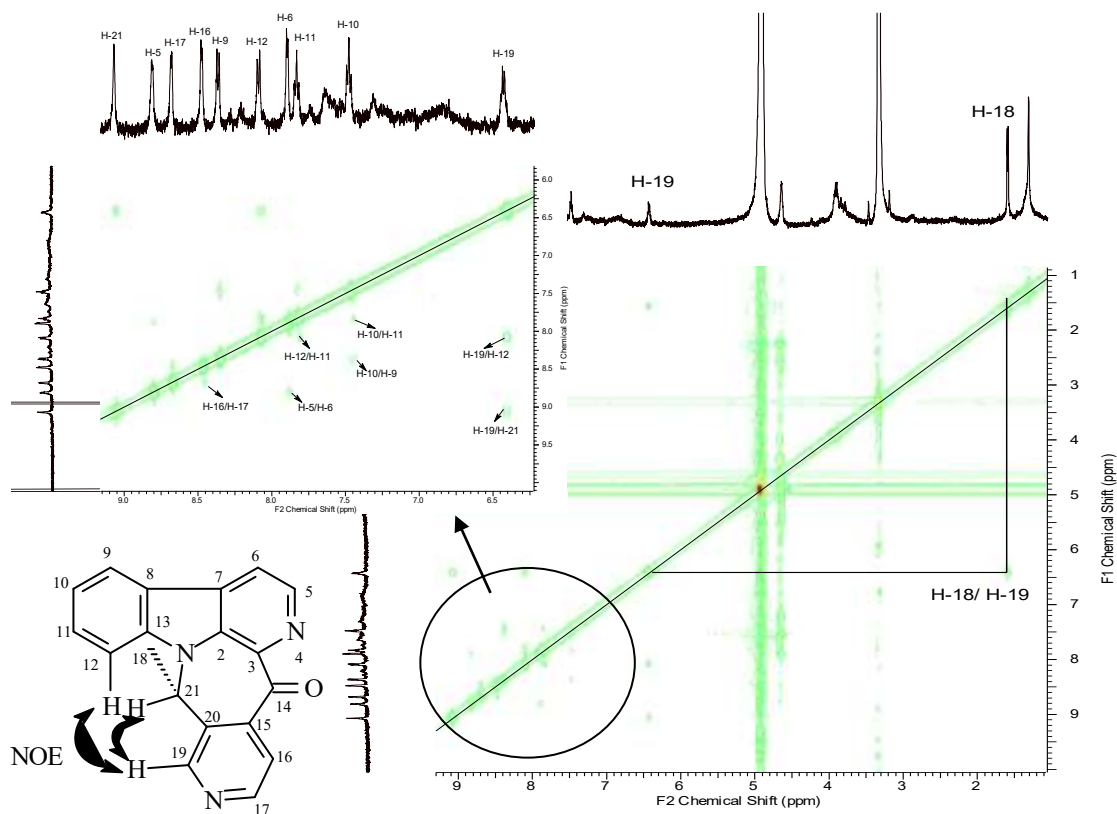




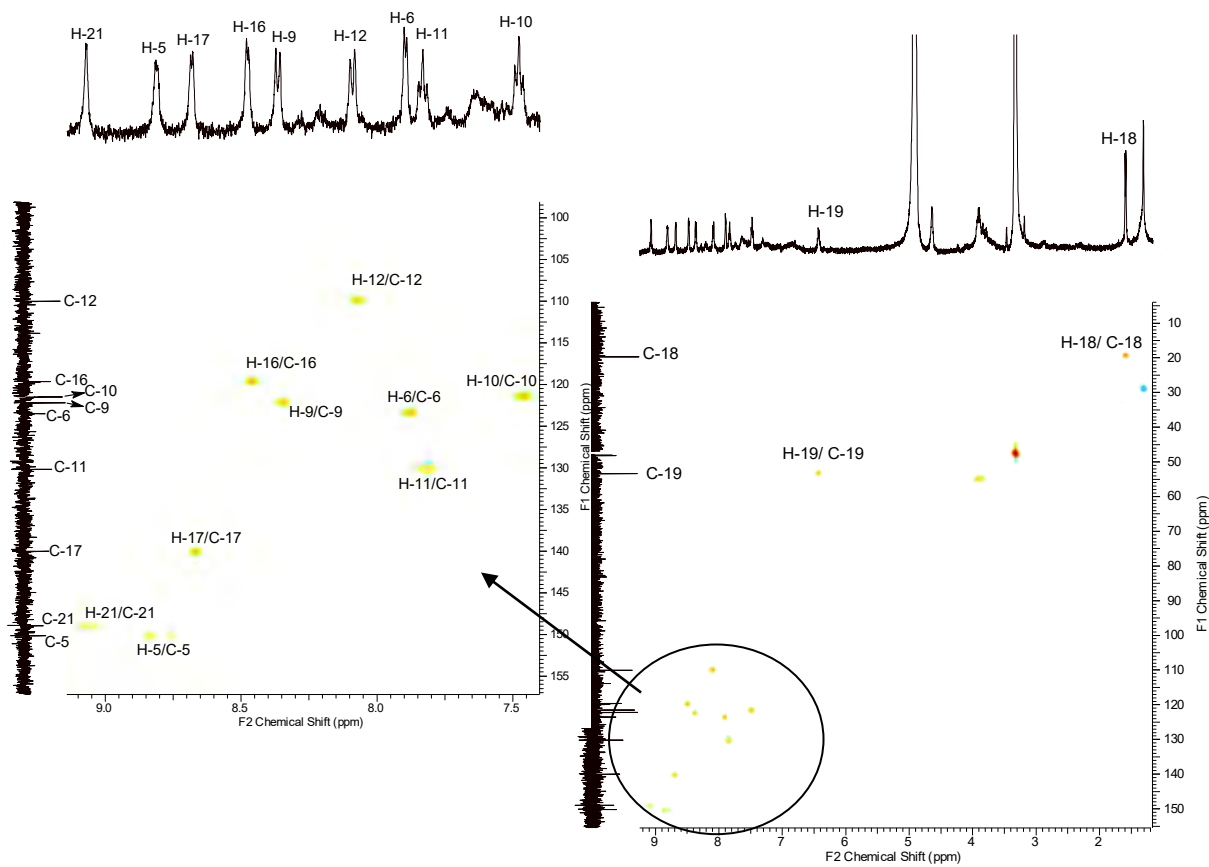
**Espectro 16.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGD-2.



**Espectro 17.** RMN e expansão de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY de SGD-2.



**Espectro 18.** RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (MeOD) de SGD-2.



**Espectro 19.** RMN e expansão de HSQC (MeOD) de SGD-2.

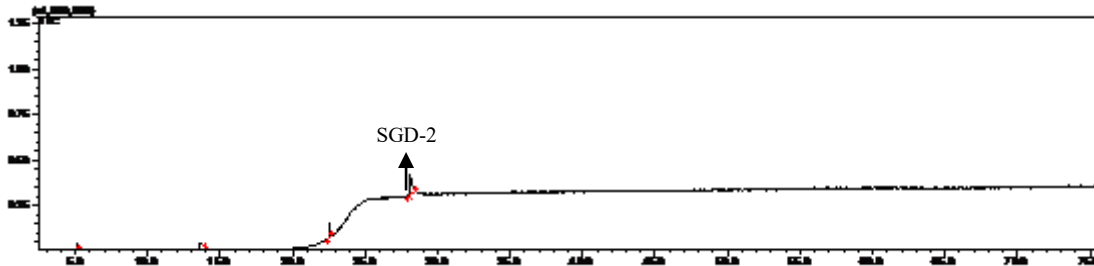
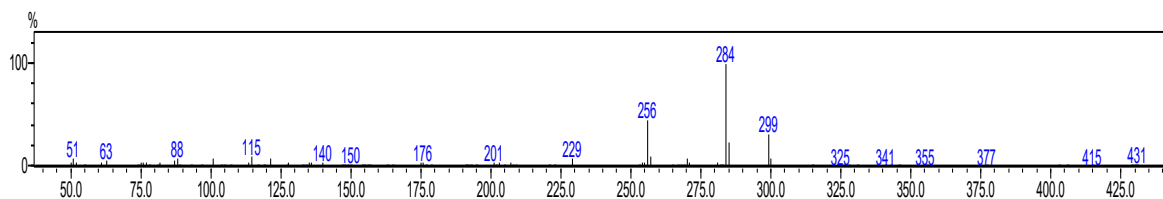
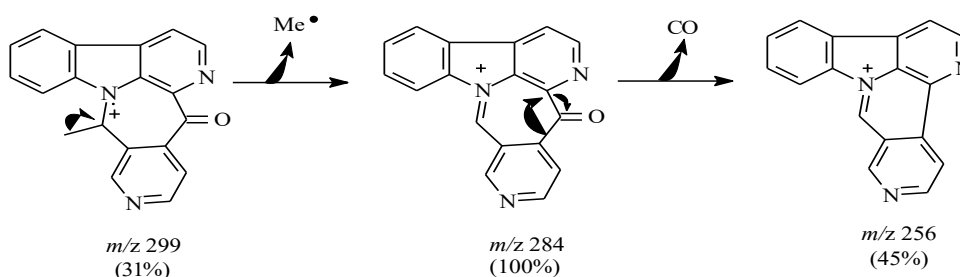


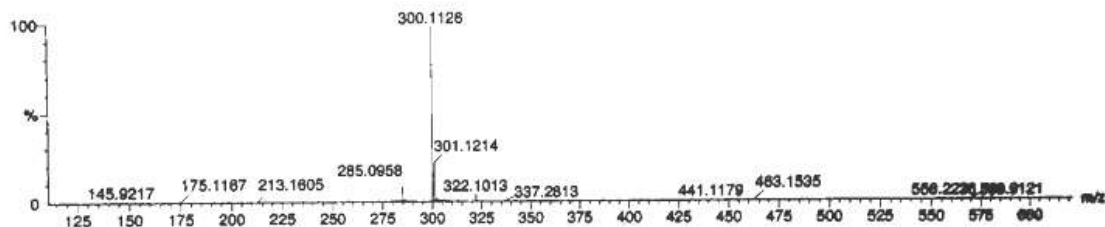
Figura 21. Cromatograma do CG de SGD-2.



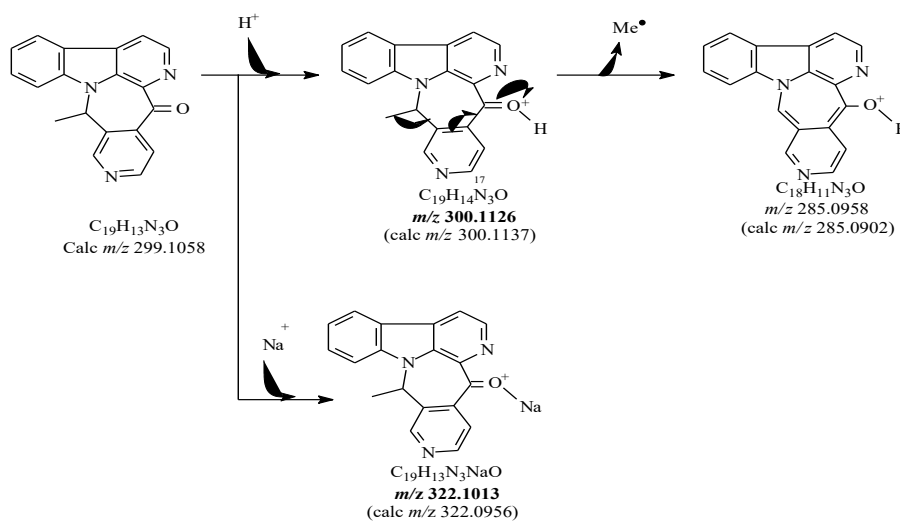
Espectro 20. EM de baixa resolução no Tr. 28.06 de SGD-2.



Esquema 4. Proposta de fragmentação do EM de baixa resolução no Tr. 28.06 de SGD-2.



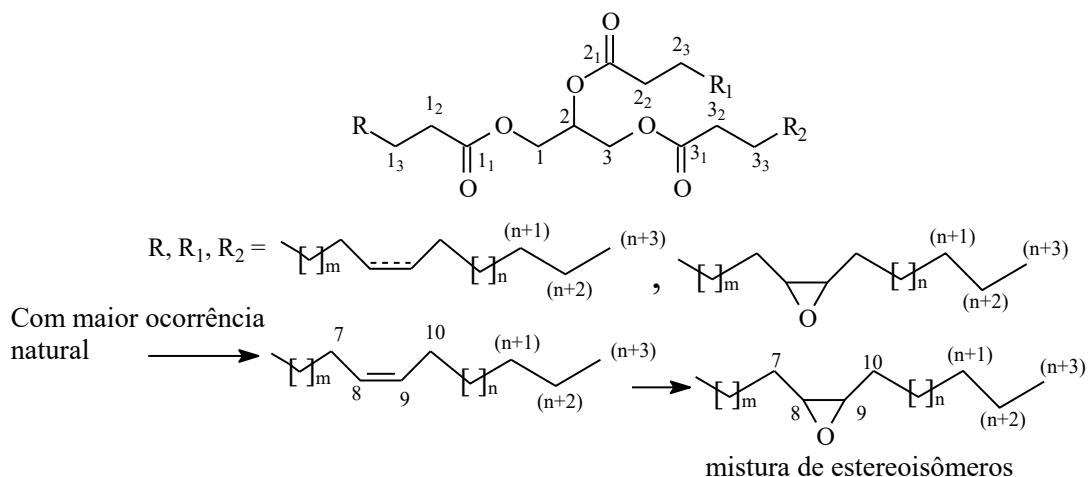
Espectro 21. EM-IES  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  de SGD-2.



Esquema 5. Estruturas dos picos do IES-EM  $[M+H]^+$  e de  $[M+Na]^+$  de SGD-2.

### 3.2.3 Determinação estrutural de SGD-3

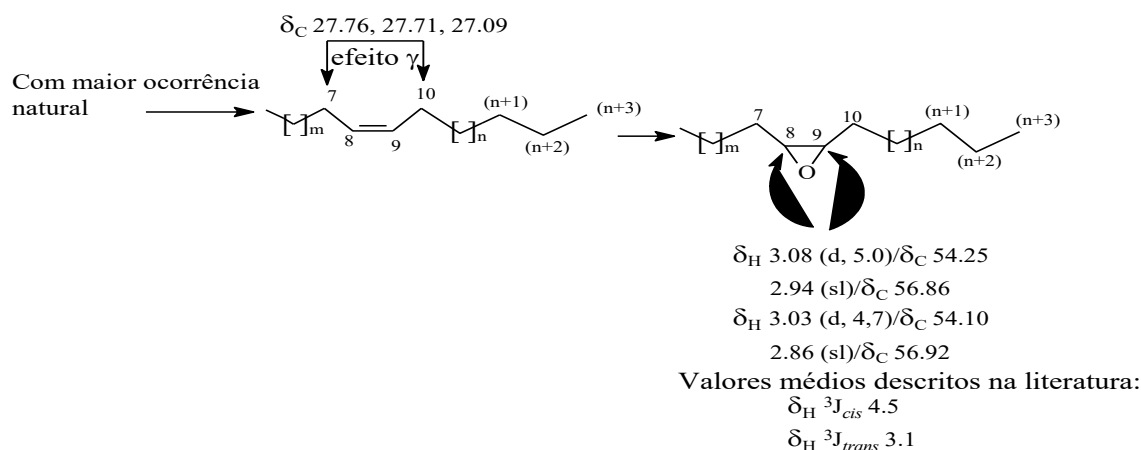
A amostra **SGD-3** (15 mg) foi caracterizada como uma mistura de triacilglicerídeos sustentando unidades acílicas insaturada e epoxidada através da análise dos espectros 1D de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ e 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY e HSQC.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 22) apresentou sinais de hidrogênios compatíveis com estrutura de triglicerídeo insaturado ( $\delta_{\text{H}}$  5.29, singlete largo = *sl*, correlacionado no HSQC (Espectro 25) com sinais de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  129.78/129.75) e epoxidado ( $\delta_{\text{H}}$  3.10 – 2.85, correlacionados no HSQC com sinais de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  57.98 – 54.10), observando-se também em regiões diferentes do espectro sinais distintos e característicos para grupos alquílicos ( $\delta_{\text{H}}$  1.45 – 0.82/ $\delta_{\text{C}}$  29.56 – 13.8) e para os hidrogênios glicéricos metilênicos  $\text{CH}_2\text{-1}/\text{CH}_2\text{-3}$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.25, *dd*,  $J=11.6$  e 3.8 Hz e 4.10, *dd*,  $J=11.6$  e 5.6 Hz, correlacionado no HSQC com sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  61.97) e metínico  $\text{CH-2}$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.22, correlacionado no HSQC com sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  68.78) com as interações spin-spin entre eles confirmadas pelo espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 23).

O experimento COSY (Espectro 23) revelou claramente as interações dos hidrogênios olefinicos com os metilênicos alílicos vizinhos, dos metilênicos  $\text{CH}_2\text{-1}/\text{CH}_2\text{-3}$  e metínico  $\text{CH-2}$  da unidade glicerolila (interação geminada e vicinal), dos metilênicos ligados aos carbonos do epóxido e dos metilênicos  $\alpha$  ( $\text{CH}_2\text{-1}_2/\text{CH}_2\text{-2}_2/\text{CH}_2\text{-2}_2$ ,  $\delta_{\text{H}}$  2.27, *sl*, correlacionado no HSQC com sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  33.85) e  $\beta$  ( $\text{CH}_2\text{-1}_3/\text{CH}_2\text{-2}_3/\text{CH}_2\text{-2}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$  1.57, *sl*, correlacionado no HSQC com sinais de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  24.69 e 24.66, revelando o efeito  $\gamma$  (gama) protetor do oxigênio carbonílico.

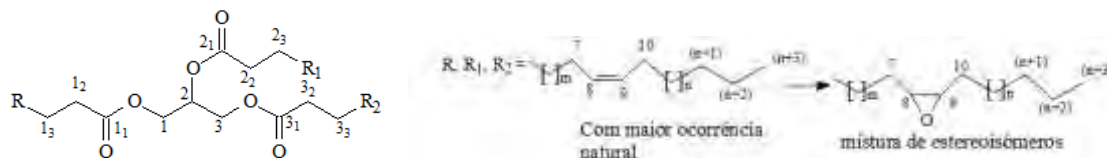
Os sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  0.85-0.82, correlacionados no HSQC com  $^{13}\text{C}$  sinais em  $\delta_{\text{C}}$  14.02/13.89 (Espectro 24), foram atribuídos aos hidrogênios das metilas [ $\text{CH}_3\text{-(n+3)}$ ] das três unidades alifáticas, revelando acoplamento no espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 23) com os hidrogênios metilenos dos três carbonos  $\text{CH}_2\text{-(n+2)}$  em  $\delta_{\text{H}}$  1.28. Os deslocamentos químicos dos metilênicos alílicos ( $\delta_{\text{C}}$  27.76/27.71/27.09, revelando mútuo efeito  $\gamma$  protetor) permitiram postular a configuração *cis* (=Z) para ligação dupla das cadeias acílicas, sendo os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  31.56 [ $\text{CH}_2\text{-(n+1)}$ ], 22.46 [ $\text{CH}_2\text{-(n+2)}$ ] e 14.02/13.89 [ $\text{CH}_3\text{-(n+3)}$ ] atribuídos ao propila terminal das unidades.



O espectro de RMN  $^{13}C$  (Espectro 24) permitiu também confirmar a presença das carbonilas de éster (C-1<sub>1</sub>/ C-2<sub>1</sub>/ C-3<sub>1</sub>) pelos sinais em  $\delta_C$  173.20 e 173,12 e 172,71.

Não foi possível determinar com exatidão o tamanho da cadeia alifática. Trata-se de amostra relativamente complexa, sendo necessárias informações adicionais através de CG-EM e/ou CL-EM.

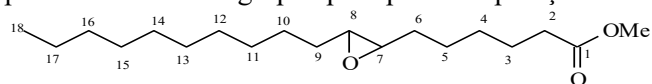
A Tabela 9 resume os dados espectrais de RMN ( $^1H$  e  $^{13}C$ ) comparados com valores descritos na literatura por Colzato e colaboradores (2008) e de Barisson (2005).



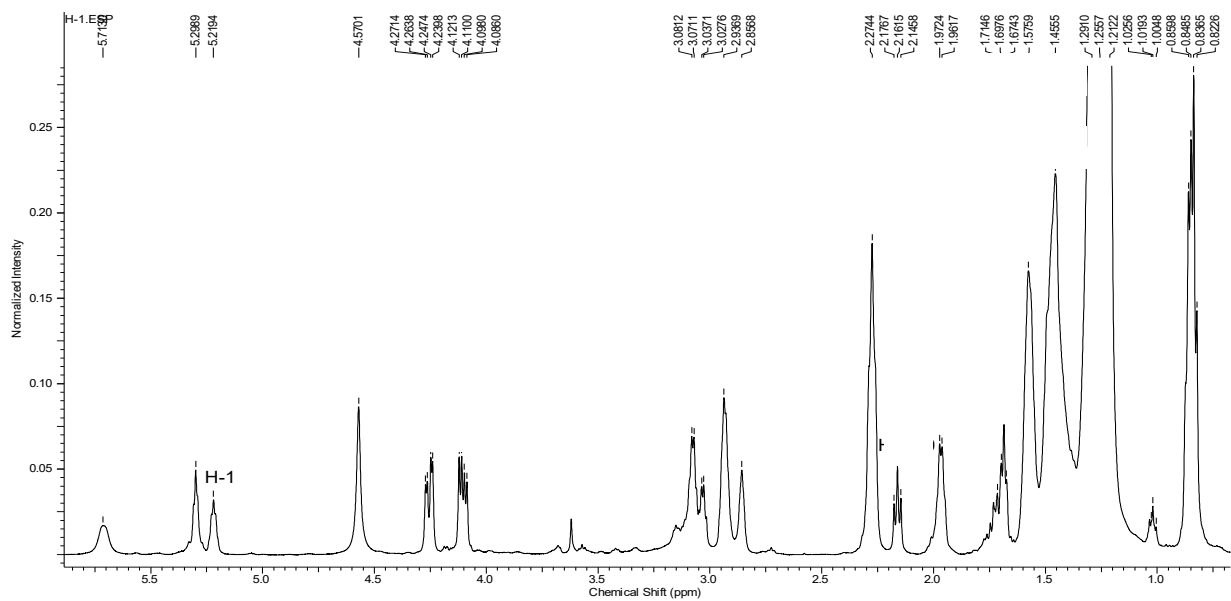
**Tabela 9.** Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em  $CDCl_3$ ) de SGD-3, comparados com valores da literatura GUNSTONE et al., 1985.(Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., J (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm)

SGD-3			$\Delta^7$		Literatura Epoxi	
C	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$ - Cis	$\delta_C$ - Cis
1 <sub>1</sub> , 2 <sub>1</sub> , 3 <sub>1</sub>	173.21, 173.12, 172,71	-	172.5	-		
<b>CH</b>						
2	68.78	5.21	68.8	5.22	-	
HC=CH	129.75	5.29	130.4	5.30		
$\begin{matrix} O \\ \diagup \\ HC-CH \end{matrix}$	57.14, 56.92, 56.86, 56.64, 54.25, 54.10	3.08 – 2.86	-	-	56.62 (CH-7)	58.32 (CH-7)
					56.75 (CH-8)	58.46 (CH-8)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1/3	61.79	4.15	62.0	4.20	27.38 (CH <sub>2</sub> -6)	31.66 (CH <sub>2</sub> -6)
1 <sub>2</sub> , 2 <sub>2</sub> , 3 <sub>2</sub>	33.85	2.27	34.0	2.30	27.55 (CH <sub>2</sub> -9)	31.85 (CH <sub>2</sub> -9)
1 <sub>3</sub> , 2 <sub>3</sub> , 3 <sub>3</sub>	24.69, 24.66	1.57				
7,10	27.76, 27.71, 27.09	1.97/1.96	29.9	2.10		
epoxi	29-59-2908	1.71-1.67, 1.45				
m,n	29.59-29.08					
(n+1)	31.56				31.69 (CH <sub>2</sub> -16)	31.66 (CH <sub>2</sub> -16)
(n+)	22.46				22.34 (CH <sub>2</sub> -17)	22.40 (CH <sub>2</sub> -17)
<b>CH<sub>3</sub></b>						
13.79(n+3)	14.02, 13.89	0.89	14.1	0.90	13.74 (CH <sub>3</sub> -18)	13.79 (CH <sub>3</sub> -18)

Dados da literatura para modelo com o grupo epóxi para comparação. Por exemplo:

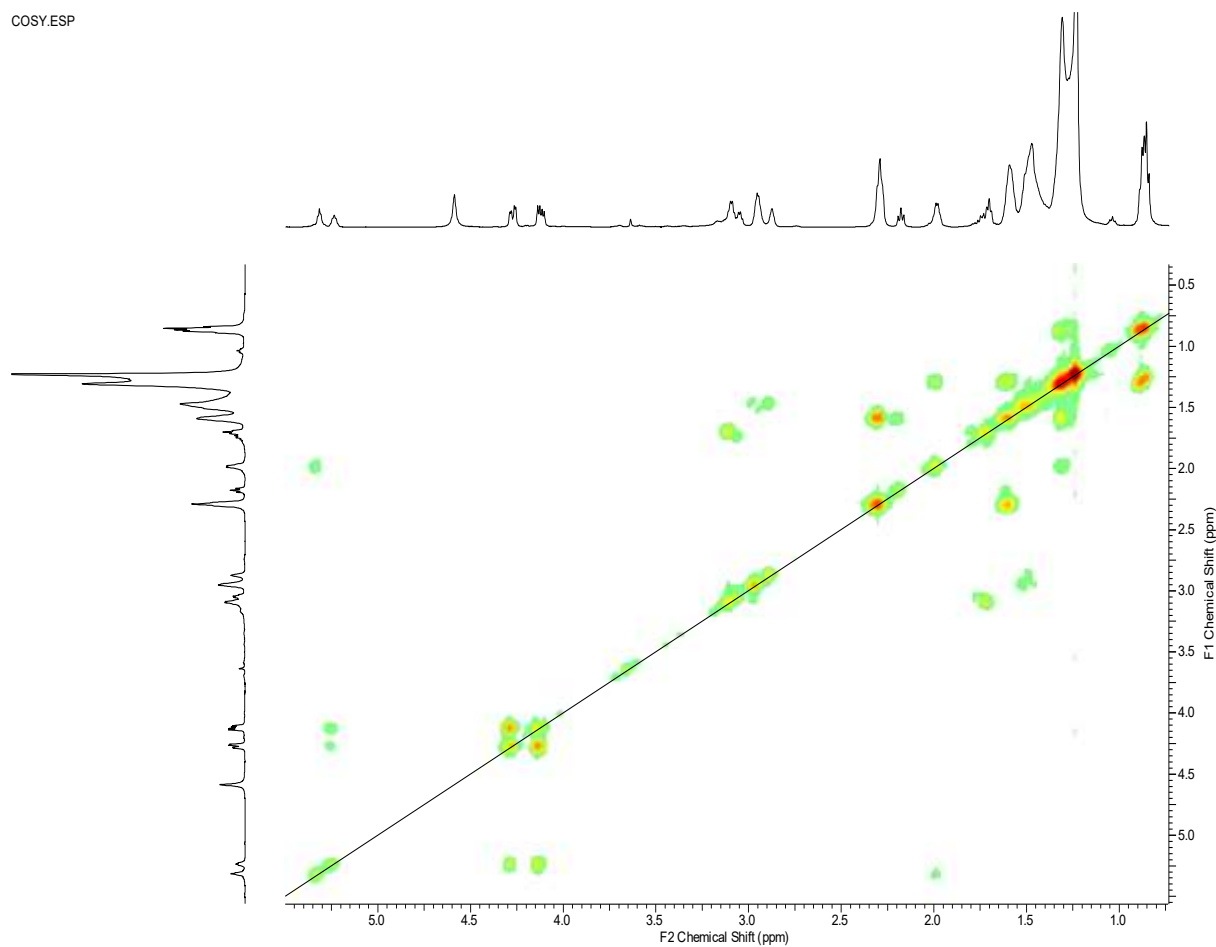


cis e trans-epóxido

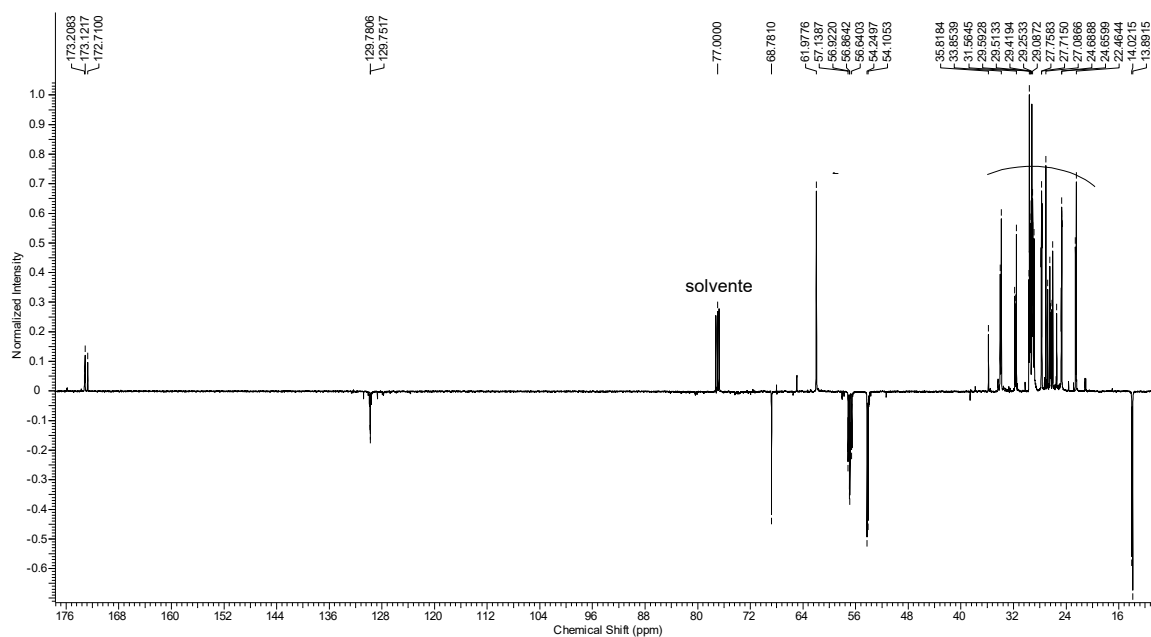


**Espectro 22.** RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.

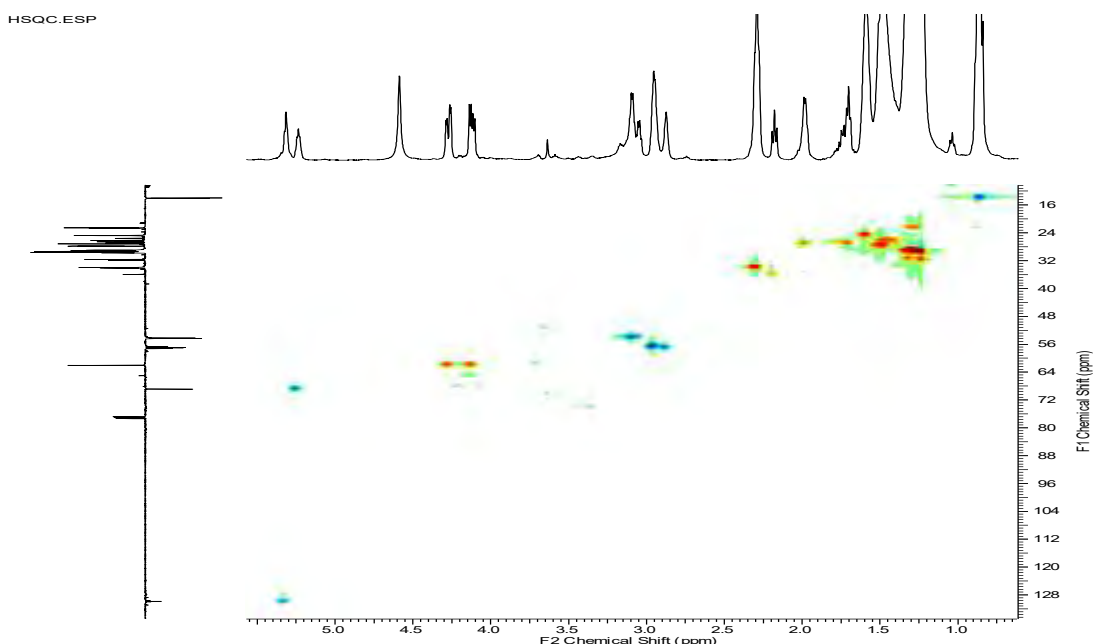
COSY.ESP



**Espectro 23.** RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY ( $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.



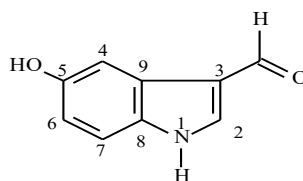
**Espectro 24.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.



**Espectro 25.** RMN HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) de SGD-3.

### 3.2.4 Determinação estrutural de SGAc-1

A substância **SGAc-1** (5 mg) foi obtida como um sólido amorfo marrom, solúvel em metanol, e contendo impurezas. Esse metabólito secundário foi identificado através da análise dos espectros 1D de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ) e 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC- $^1J_{\text{CH}}$  e HMBC- $^nJ_{\text{CH}}$ ,  $n=2$  e 3) e CLUE-EM-IES como 5-hidroxiindole-3-aldeído.



**SGAc-1**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 26) mostrou sinais com deslocamentos químicos 8.00 (H-2, *s*), 7.56 (H-4, *d*, 2.2), 7.29 (H-7, *d*, 8.6) e 6.81 (H-6, *dd*, 8.6, 2.2) característicos de um sistema indol 3,5-dissubstituído. Esses sinais foram correlacionados com os sinais de átomos de carbono (Espectro 27) através do espectro 2D de HSQC (Espectro 29) em  $\delta_{\text{C}}$  139.45, 106.57, 113.29 e 114.27, respectivamente. O espectro de COSY (Espectro 28) mostrou a interação dos hidrogênios metínicos H-6 e H-7, auxiliando na confirmação da substituição dos anéis.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e DEPTQ mostraram também sinais  $\delta_{\text{H}}$  9.80 (*s*) e  $\delta_{\text{C}}$  186.78 compatíveis com a presença do grupo aldeídico CHO-10, correlacionados através do HSQC (Espectro 29). Sua posição foi confirmada com base no experimento HMBC (Espectro 30), observando-se as correlações a longa distância deste H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  9.80) com os átomos de carbono quaternários C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  119.30,  $^2J_{\text{CH}}$ ) e C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  126.20) e H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  8.00) com ambos CH-10 ( $\delta_{\text{C}}$  186.78,  $^3J_{\text{CH}}$ ) e C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  132.40,  $^3J_{\text{CH}}$ ). O C-8 revelou interações adicionais através de três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  7.56) e H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.81), em acordo com localização do grupo hidroxílico no carbono C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  153.03). Outras interações reveladas pelo HMBC (Espectro 38) encontram-se descritas na Tabela 10.

A amostra contendo a substância **SGAc-1** foi submetida a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplada ao espectrômetro de massa em série de alta resolução (EM). O cromatograma (Figura 22) gerado com o tempo de análise de 18 min. mostrou o pico com tempo de retenção de 3.29 min para o alcaloide em questão. Devido à sensibilidade do equipamento, outros picos foram detectados na identificação.

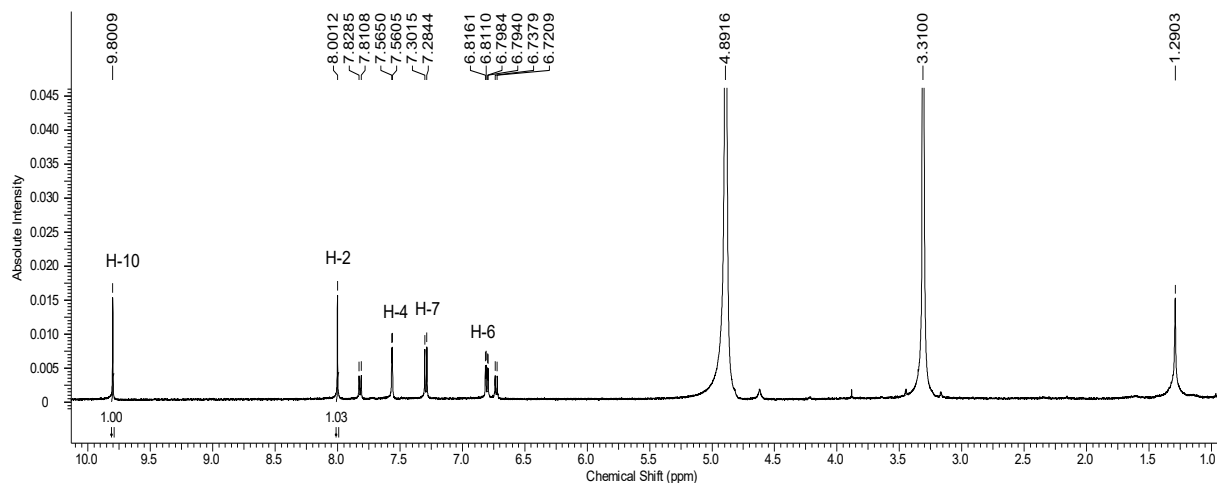
A fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2$  ( $m/z$  161.0476,  $[\text{M}]^+$ ) foi deduzida com base nos dados fornecidos pelo espectro de massas de alta resolução (Espectro 31) através do pico em  $m/z$  162.0550 ( $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}_2$ , calc.  $m/z$  162.0555) no modo positivo ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). As propostas de fragmentações para justificar os picos principais observados no espectro de massas da **SGAc-1** encontram-se resumidas no Esquema 6.

Assim, com base em todas as informações espectrais e com comparação com os dados relatados na literatura (KOBAYASHI et al., 1990), a **SGAc-1** foi identificada como 5-hidroindole-3-aldeído. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6.73 (*d*,  $J=8.5$  Hz) e 7.82 (*d*,  $J=8.5$  Hz), correlacionados no HSQC com os sinais de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  114.91 e 131.99, respectivamente, revelaram-se compatíveis com a presença de substância adicional (cerca de 25 %) contendo sistema aromático 1,4-disubstituído, formando um sistema AA'BB'.

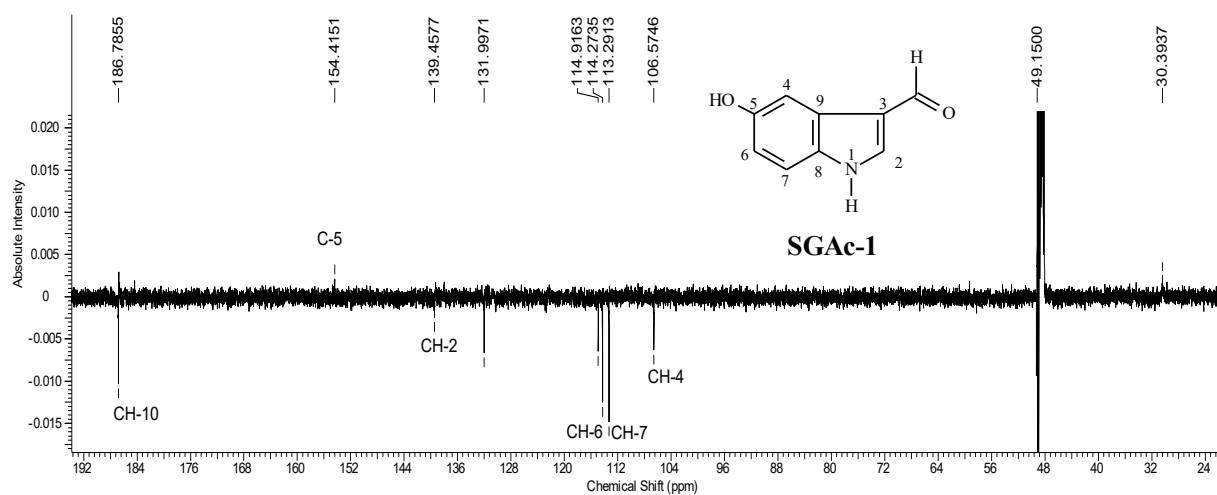
**Tabela 10.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-1, comparados com valores da literatura do 5-hidroindol-3-aldeído (KOBAYASHI et al., 1990). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

		SGAc-1			5-hidroindol-3-aldeído	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
3	119.30	-	H-2; H-10		119.7	-
5	153.03	-		H-7	154.8	-
8	132.40	-		H-2; H-4; H-6	133.3	-
9	126.20	-		H-2; H-10; H-7	126.9	-
<b>CH</b>						
2	139.45	8.00 ( <i>s</i> )			139.8	7.99 ( <i>s</i> )
4	106.57	7.56 ( <i>d</i> , 2.2)			107.0	7.56 ( <i>d</i> , 2.4)
6	114.27	6.81 ( <i>dd</i> , 8.6, 2.2)			114.7	6.80 ( <i>dd</i> , 8.8, 2.4)
7	113.29	7.29 ( <i>d</i> , 8.6)			113.7	7.28 ( <i>d</i> , 8.8)
10	186.78	9.80 ( <i>s</i> )		H-2	187.1	9.80 ( <i>s</i> )

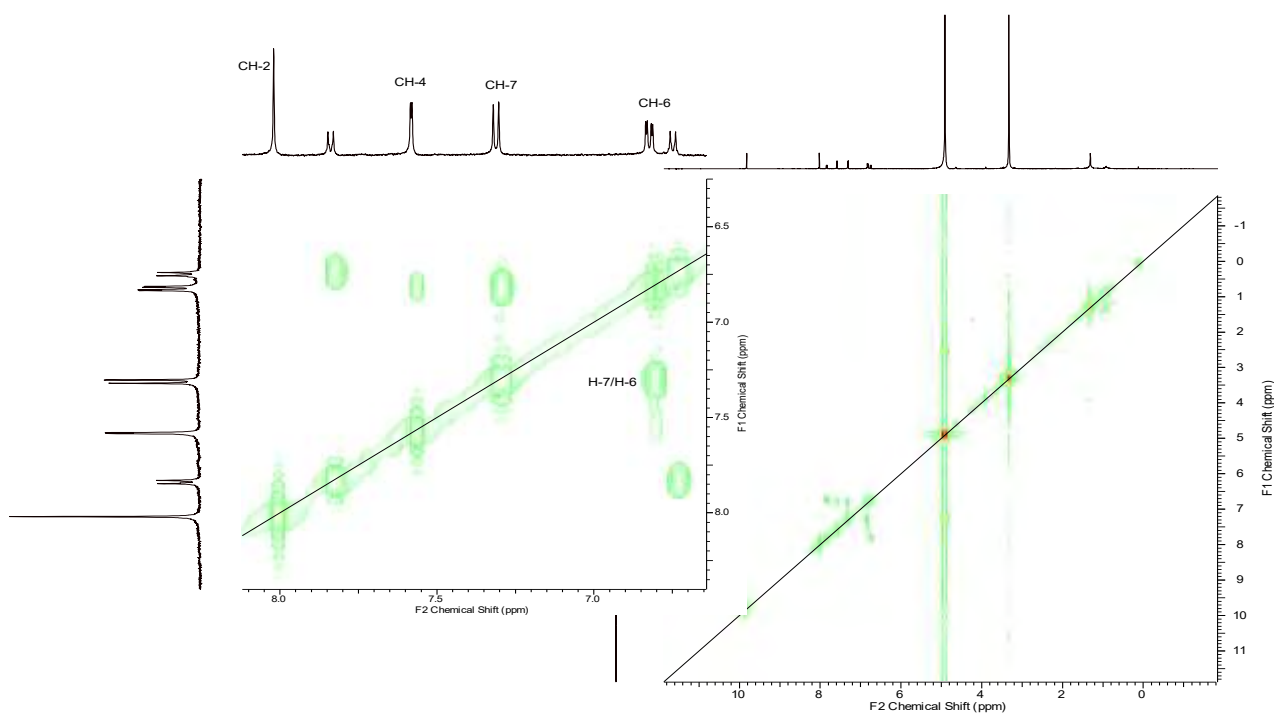




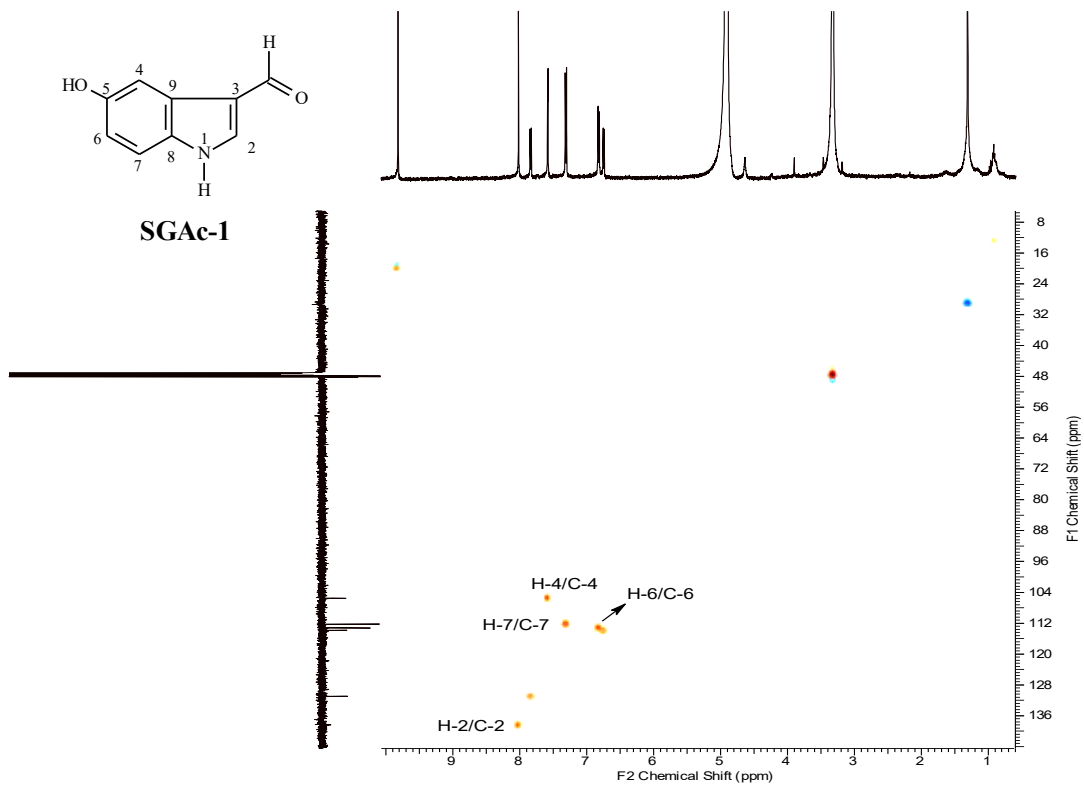
**Espectro 26.** RMN  $^1\text{H}$  de (500 MHz, MeOD) SGAc-1.



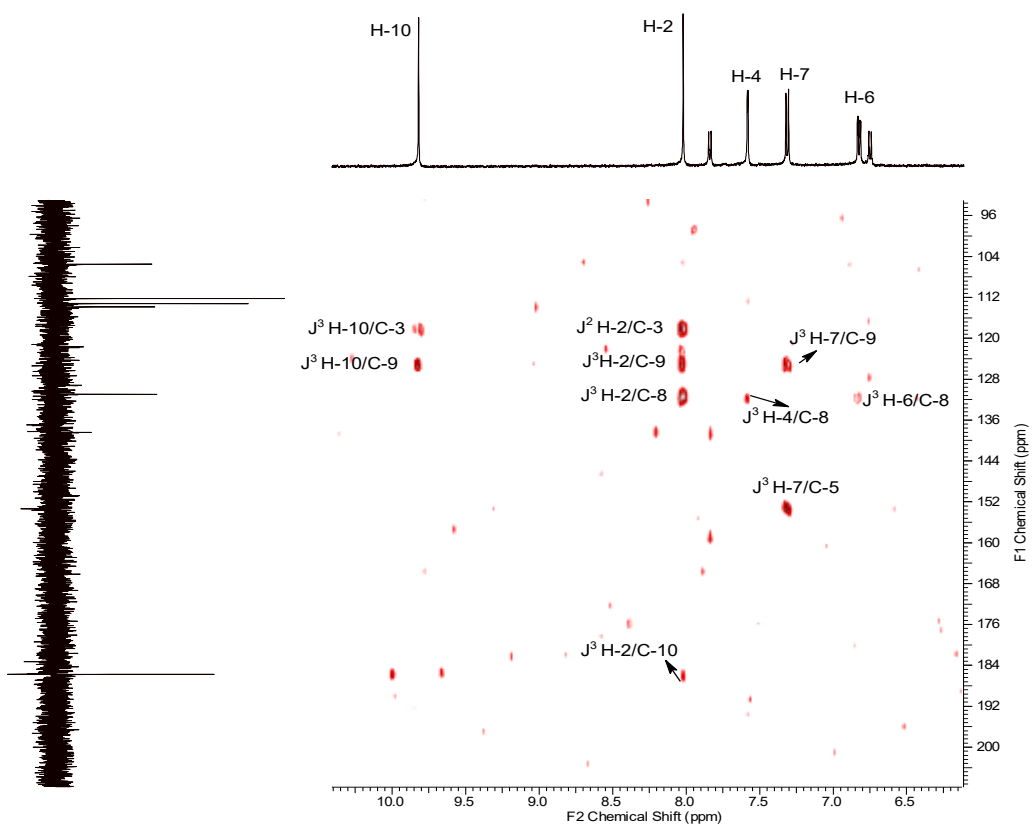
**Espectro 27.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGAc-1.



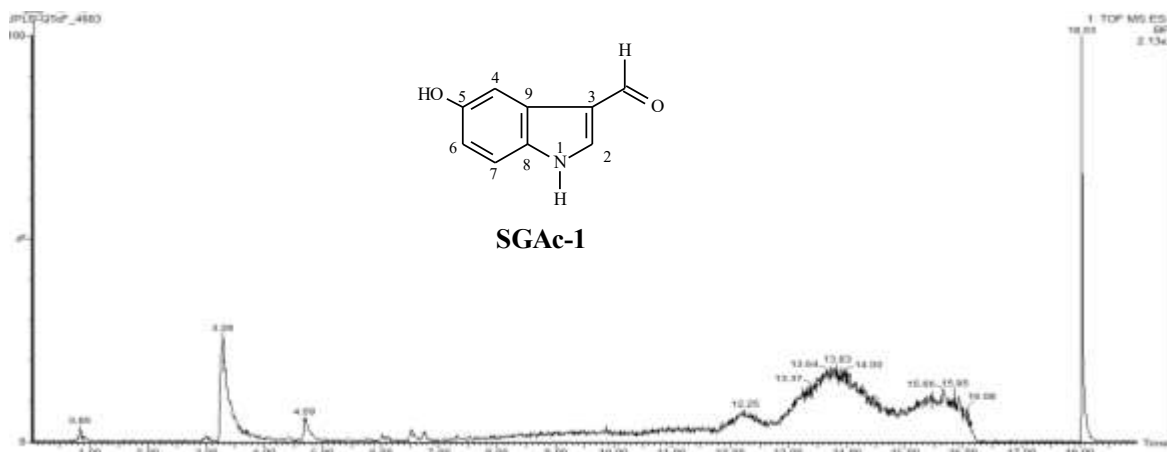
**Espectro 28.** RMN e expansão do  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY de SGAc-1.



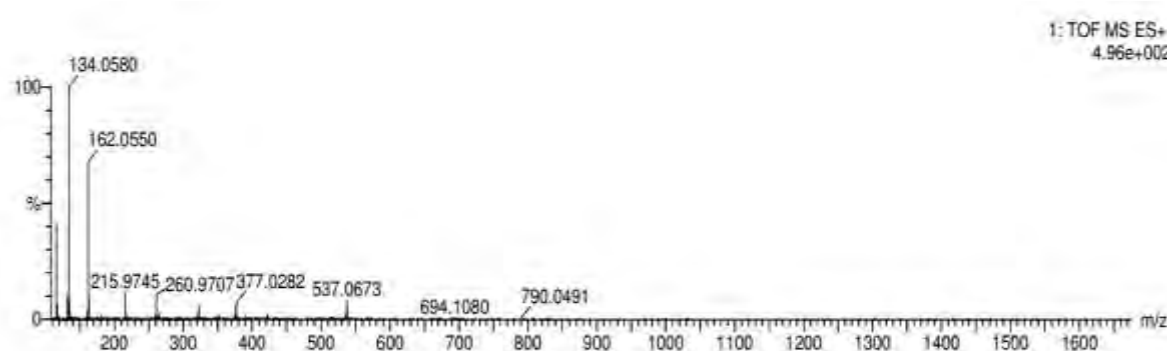
**Espectro 29.** RMN de HSQC (MeOD) de SGAc-1.



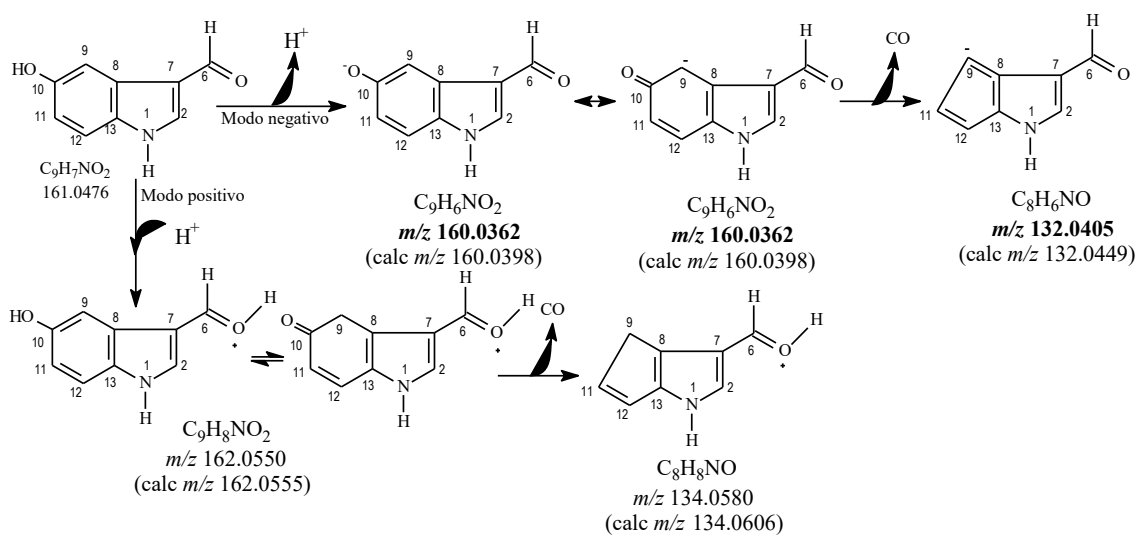
**Espectro30.** RMN de HMBC de SGAc-1.



**Figura 22.** Cromatograma da CLUE de SGAc-1.



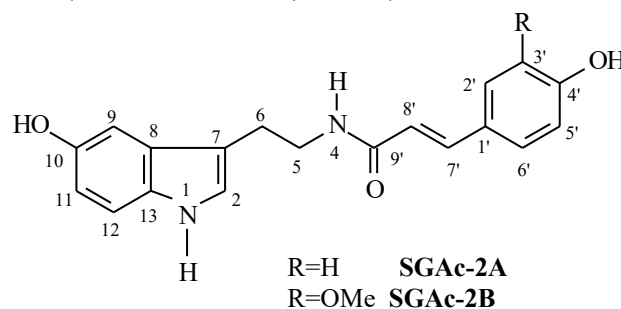
**Espectro31.** EM-IES  $[M+H]^+$  e  $[M+H]^-$  de SGAc-1.



**Esquema 6.** Proposta de fragmentação dos picos apresentados no IES-EM  $[M+H]^+$  e  $[M+H]^-$  de SGAc-1.

### 3.2.5 Determinação estrutural da mistura de SGAc-2

A mistura de **SGAc-2** (**SGAc-2A** e **SGAc-2B**) (5 mg) solúvel em metanol e de aspecto caramelo foi elucidada como *N*-*p*-coumaroil serotonina (**SGAc-2A**) e *N*-feruloil serotonina (**SGAc-2B**), na proporção de 48,85 % e 51,15 % deduzidas da integração de sinais de hidrogênios do espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectros 32 e 33), respectivamente, através da análise dos espectros de RMN 1D (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-DEPTQ) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) e EMAR IES.



Os espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 32 e 33) e <sup>13</sup>C-DEPTQ (Espectro 34-35) apresentaram diversos sinais duplicados e relacionados com a parte estrutural semelhante nas duas estruturas.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura (Espectros 32 e 33) apresentou três sinais de hidrogênios aromáticos mutuamente acoplados com as intensidades duplicadas referentes com deslocamentos de  $\delta_H$  6.95 (1H, *d*), 6.65 (1H, *dd*, 8.6, 2.0 Hz) e 7.16 (1H, *d*, 8.6 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-9, H-11 e H-12 do esqueleto de indol, respectivamente. O sinal em  $\delta_H$  7.02 (1H, *s*) foi também atribuído ao H-2 da unidade indol, que teve a confirmação da sua posição pela interação <sup>3</sup>*J* com CH<sub>2</sub>-6 ( $\delta_C$  25.04, correlacionado no HSQC o sinal de hidrogênios em  $\delta_H$  2.93).

Dois sinais de hidrogênios metilênicos duplicados em  $\delta_H$  3.58 (2H, *m*) e 2.95 (2H, *t*, 7.2 Hz) revelaram-se correlacionados com os sinais de carbono em  $\delta_C$  40.09 (CH<sub>2</sub>-5, deslocamento químico compatível com a ligação em átomo de nitrogênio) e 25.05 (CH<sub>2</sub>-6), respectivamente, na experiência HSQC (Espectro 37). O espectro de HMBC mostrou os hidrogênios metilênicos 2H-6 acoplado através de duas ligações (<sup>2</sup>*J*<sub>CH</sub>) com o carbono quaternário C-7 ( $\delta_C$  111.11) do sistema indólico, confirmando a conexão dessa parte da estrutura, permitindo postular a presença da mesma unidade indólica nos alcaloides (Tabelas 11 e 12).

O espectro HMBC (Espectro 38 e 39) apresentou também correlações heteronucleares adicionais através de três ligações (<sup>3</sup>*J*<sub>CH</sub>) entre H-5/C-9', H-7'/C-9' e H-8'/C-1', confirmando a conexão determinada para as três unidades estruturais acima mencionadas. Sinais de hidrogênios *trans*-olefínicos com intensidades duplicados apareceram em  $\delta_H$  7.47 (1H, *d*, 15.8 Hz) para CH-7' e 6.41 (1H, *d*, 15.8 Hz) para CH-8'. O espectro de 2D (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, Espectro 36), confirmou também as interações de acoplamento entre esses hidrogênios olefínicos com valor *J*=15.8 Hz indicativo da configuração *trans*.

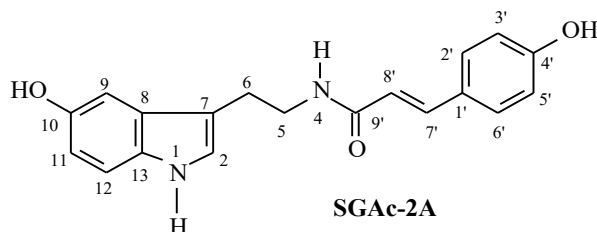
O espectro de RMN <sup>13</sup>C permitiu também verificar a presença de uma carbonila de amida ligada na unidade do derivado do ácido cumárico, com deslocamento químico em  $\delta_C$  167.93, além de outros sinais que estão atribuídos nas Tabelas 11 e 12, contando-se também com o auxílio do espectro de HSQC.

Os dados espectrais adicionais RMN <sup>1</sup>H da **SGAc-2A** na região aromática indicaram a presença de um anel de benzeno 1,4-dissubstituído através dos sinais em  $\delta_H$  7.42 (2H, *d*, 8.0 Hz) e 6.78 (2H, *d*, 8.0 Hz) referentes aos hidrogênios H-2'/H-6' e os H-3'/H-5', respectivamente (Tabela 11), confirmados pelo acoplamento entre si desses hidrogênios no espectro de COSY (Espectro 36) e correlacionados respectivamente no HSQC com os sinais

de carbonos metínicos em  $\delta_C$  129.21 e 115.33 (Espectro 37). O espectro IES-EM (Espectro 40) permitiu deduzir o íon molecular  $m/z$  322.1317 ( $[M]^+$ ) e a fórmula molecular  $C_{19}H_{18}O_3N_3$  através dos picos  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  345.1489 ( $C_{19}H_{18}NaN_3O_3$ , calc.  $m/z$  345.1215) (Esquema 7). Portanto, os dados combinados permitiram identificar **SGAc-2A** como do *N*-p-coumaroil serotonina.

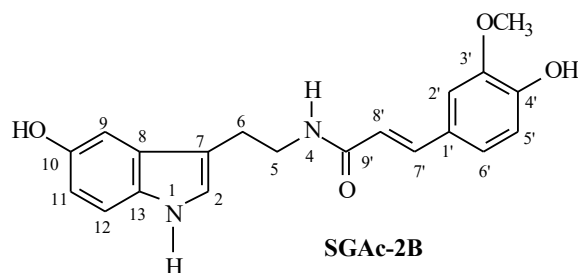
Os sinais de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  relacionados à **SGAc-2B** (Tabela 12) permitiram reconhecer a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, com deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios metínicos em  $\delta_C$  110.14/ $\delta_H$  7.12 (1H, *d*) para CH-2',  $\delta_C$  115.05/ $\delta_H$  6.80 (1H, *d*, 8.6 Hz) para CH-5' e 121.84  $\delta_H$  7.04 (1H, *dd*) para CH-6'. O espectro EMAR-IES (Espectro 40, modo positivo) permitiu deduzir o íon molecular  $m/z$  352.1423 ( $[M]^+$ ) e a fórmula molecular  $C_{20}H_{20}N_2O_4$  através dos picos  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  375.1625 ( $C_{19}H_{18}N_3NaO_3$ , calc.  $m/z$  375.1320) e  $[M+K]^+$  em  $m/z$  391.1171 ( $C_{19}H_{18}N_3KO_3$ , calc.  $m/z$  391.1060) (Esquema 8). De acordo estes dados a substância **SGAc-2B** foi caracterizada como *N*-feruloil serotonina. O EMAR-IES revelou também picos correspondentes a três adutos envolvendo os dois componentes da mistura (Esquema 9).

Assim, os dados obtidos e comparação com a literatura, pode-se determinar a misturas dos alcaloides *N*-p-coumaroil serotonina (**SGAc-2A**) e *N*-feruloil serotonina (**SGAc-2B**).



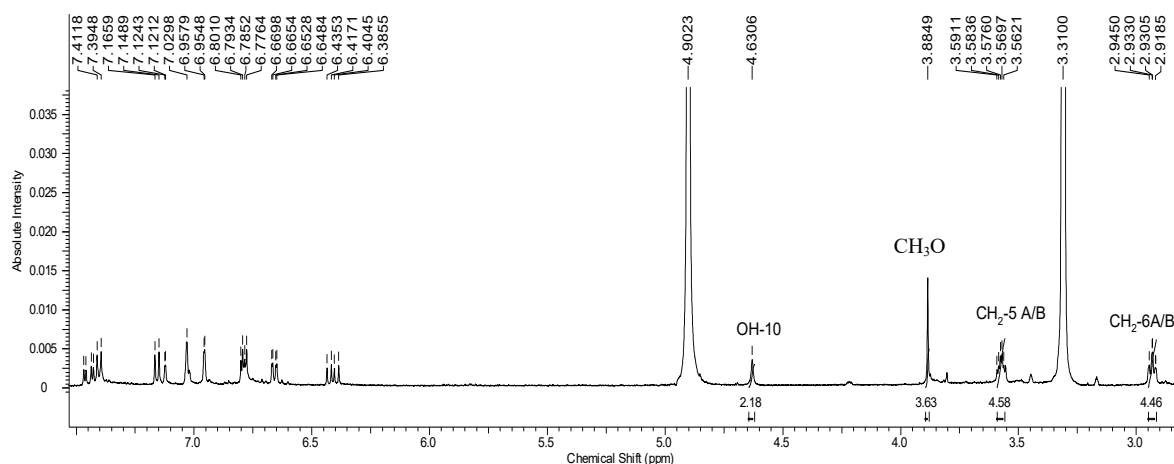
**Tabela 11.** Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-2A, comparados com valores da literatura da *N*-p-coumaroil serotonina (TAKAHASHI e MIYAZAWA 2011). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

SGAc-2A				<i>N</i> -p-coumaroil serotonina		
C	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^2J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
7	111.11	-	H-2; 2H-6	H-5; H-6; H-9	111.0	-
8	128.03	-		H-2; H-12; H-6	128.1	-
10	149.67		H-9	H-12	150.4	-
13	131.72	-		H-2; H-9; H-11	131.0	-
1'	126.93	-		H-3'/H-5'; H-8'	126.2	-
4'	159.02		H-3'/H-5'	H-2'/H-6'	159.0	-
9'	167.88		H-8'	H-7'; H-5	165.5	-
<b>CH</b>						-
2	122.94	7.02 ( <i>s</i> )		2H-6	123.3	7.05 ( <i>d</i> , 2.3)
9	102.08	6.95 ( <i>d</i> , 2.0)		H-11	102.4	6.85 ( <i>d</i> , 2.3)
11	111.00	6.65 ( <i>dd</i> , 8.6, 2.0)		H-9	111.5	6.59 ( <i>dd</i> , 8.6, 2.3)
12	111.25	7.16 ( <i>d</i> , 8.6)			111.8	7.12 ( <i>d</i> , 8.6)
2'/6'	129.21	7.42 ( <i>d</i> , 8.0)		H-7'	129.4	7.38 ( <i>d</i> , 8.6)
3'/5'	115.33	6.78 ( <i>d</i> , 8.0)			115.9	6.79 ( <i>d</i> , 8.6)
7'	140.37	7.47 ( <i>d</i> , 15.8)		H-2'/H-6'	138.7	7.33 ( <i>d</i> , 16.0)
8'	117.16	6.41 ( <i>d</i> , 15.8)			119.1	6.41 ( <i>d</i> , 16.0)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
5	40.09	3.58 ( <i>m</i> )	2H-6		40.0	3.42 ( <i>dt</i> , 5.6, 7.8)
6	25.04	2.94 ( <i>t</i> , 7.2)	2H-5		25.6	2.78 ( <i>t</i> , 7.8)

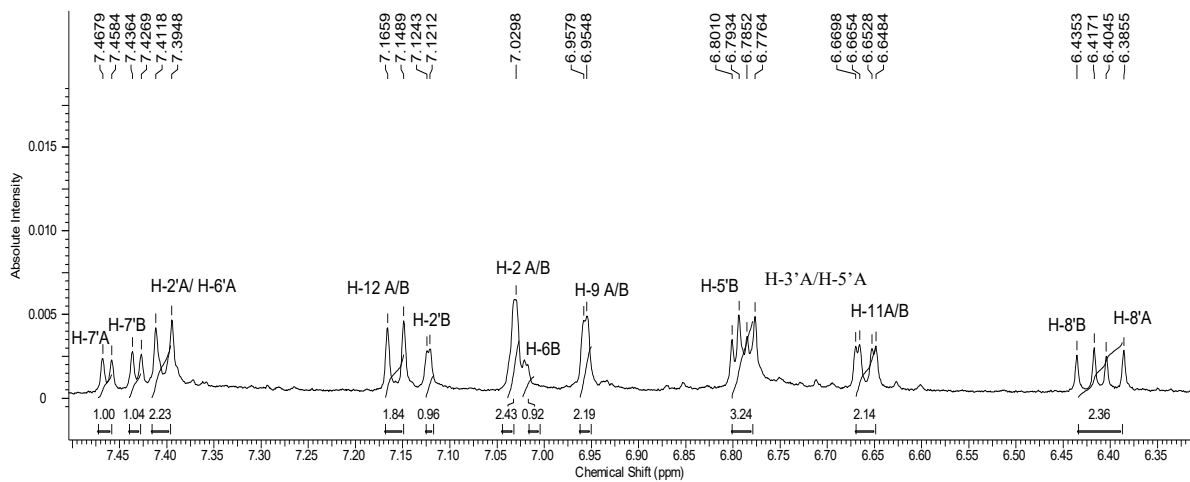


**Tabela 12.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-2B, comparados com valores da literatura da *N*-feruloil serotonina (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2011). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$ (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

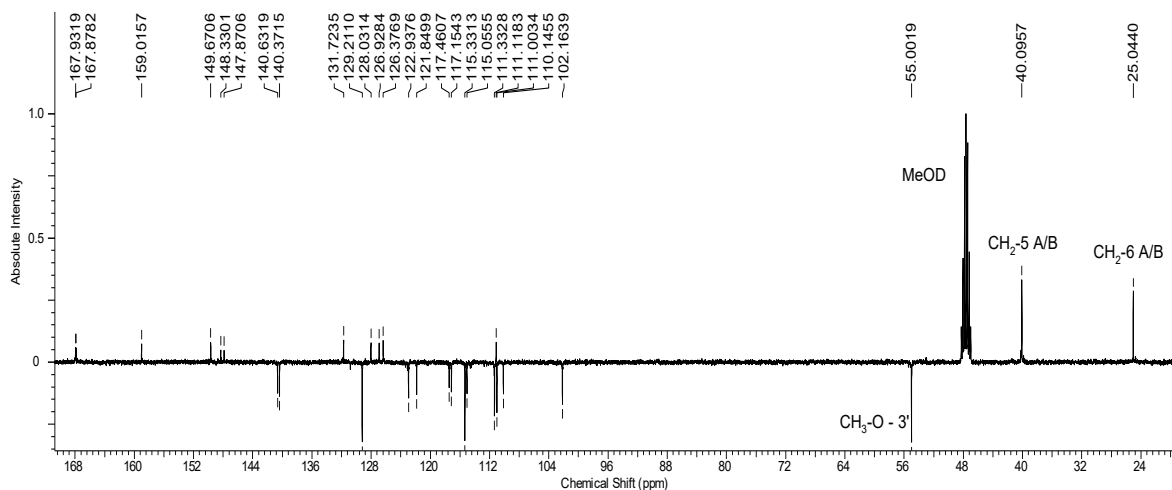
SGAc-2B				<i>N</i> -feruloil serotonina		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
7	111.11	-	H-2; 2H-6	2H-5; H-9	111.0	-
8	128.03	-		H-2; H-12; 2H-6	128.1	-
10	149.67	-	H-9	H-12	150.4	-
13	131.72	-		H-2; H-9; H-11	131.0	-
1'	126.33	-	H-8'		126.7	-
3'	147.87	-		H-5'; MeO-3'	148.0	-
4'	148.33	-		H-2; H-6'	148.4	-
9'	167.93	-	H-8'	H-7'; H-5	165.5	-
<b>CH</b>						
2	122.94	7.02 (s)		2H-6	123.3	7.06 (d, 2.0)
9	102.08	6.95 (d, 2.0)		H-11	102.4	6.86 (d, 2.3)
11	111.00	6.65 (dd, 8.6, 2.0)		H-9	111.5	6.60 (dd, 8.6, 2.3)
12	111.25	7.16 (d, 8.6)			111.9	7.13 (d, 8.6)
2'	110.14	7.12 (d)			110.9	7.12 (d, 2.0)
5'	115.05	6.80 (d, 8.6)			115.8	6.79 (d, 8.1)
6'	121.88	7.04 (dd)		H-2'	121.7	6.99 (dd, 8.1, 2.0)
7'	140.63	7.46 (d, 15.6)		H-2'	139.0	7.34 (d, 15.6)
8'	117.46	6.41 (d, 15.6)			119.4	6.46 (d, 15.6)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
5	40.09	3.58 (m)	2H-6		39.6	3.43 (dt, 5.8, 7.5)
6	25.04	2.93 (t, 7.2)	2H-5		25.6	2.78 (t, 7.5)
<b>MeO</b>						
3'	55.00	3.88 (s)			55.7	3.81 (s)



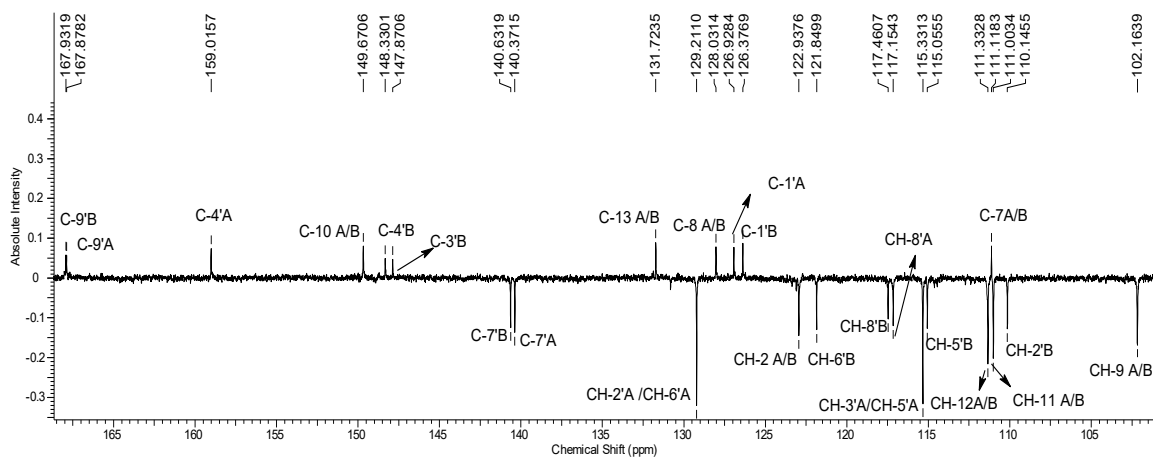
**Espectro 32.** RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-2.



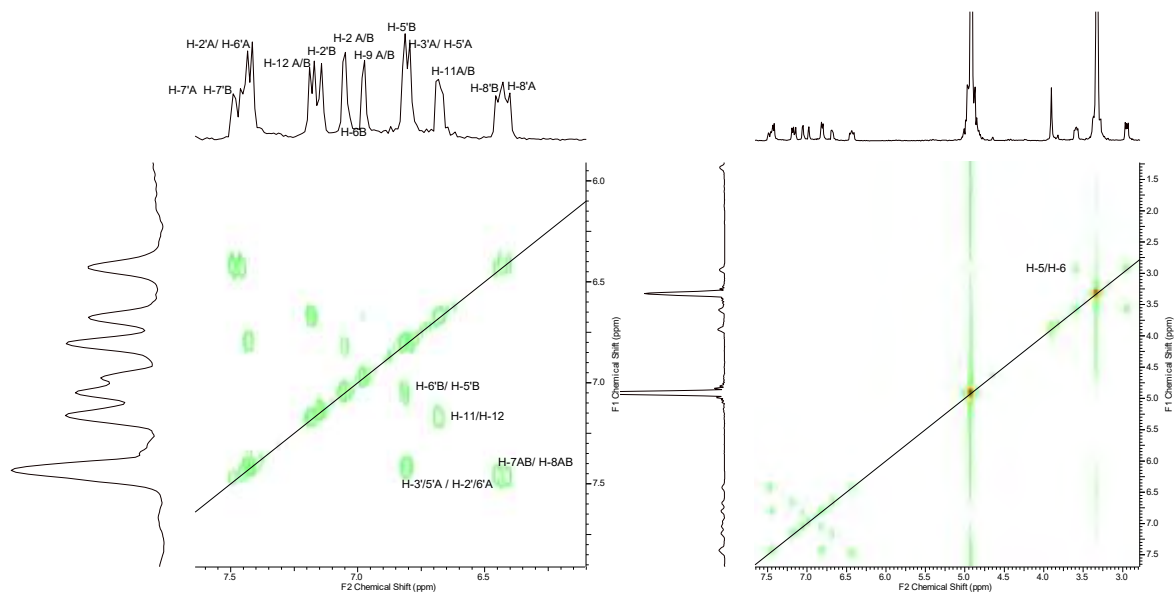
**Espectro 33.** Expansão do RMN  $^1\text{H}$  da mistura de SGAc-2.



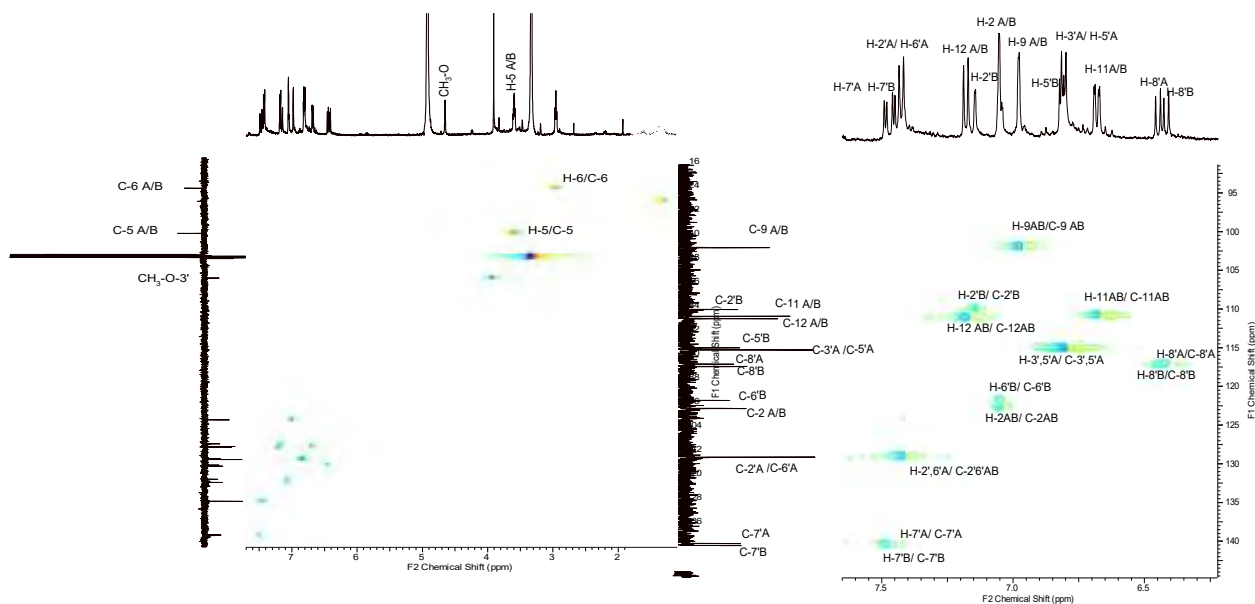
**Espectro 34.** RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-2.



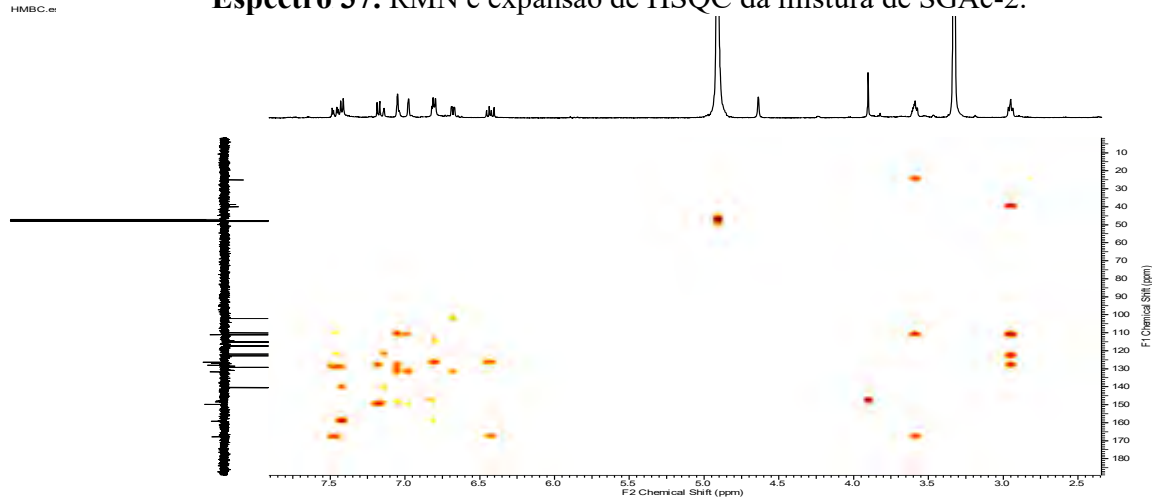
**Espectro 35.** Expansão do RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ da mistura de SGAc-2.



**Espectro 36.** RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) da mistura de SGAc-2.



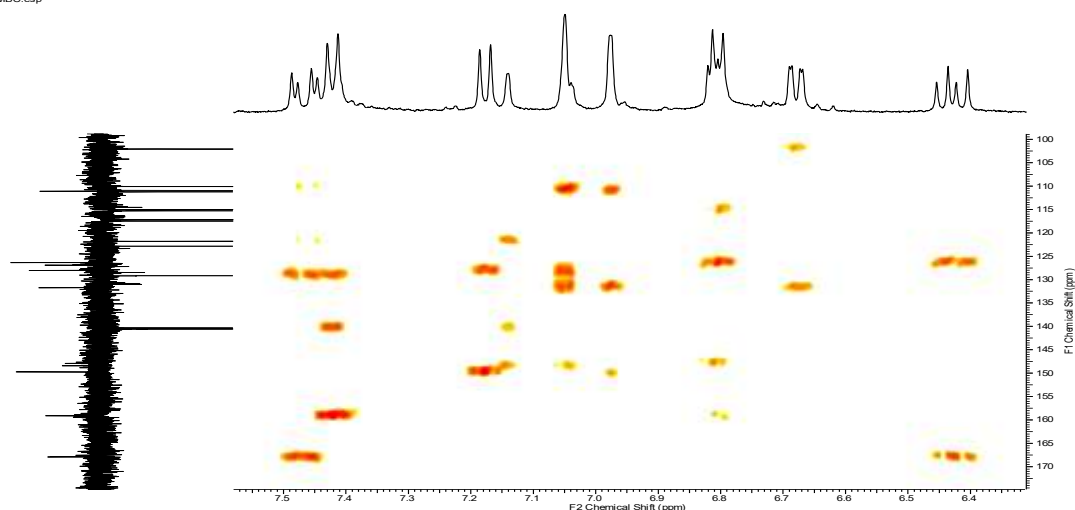
**Espectro 37.** RMN e expansão de HSQC da mistura de SGAc-2.



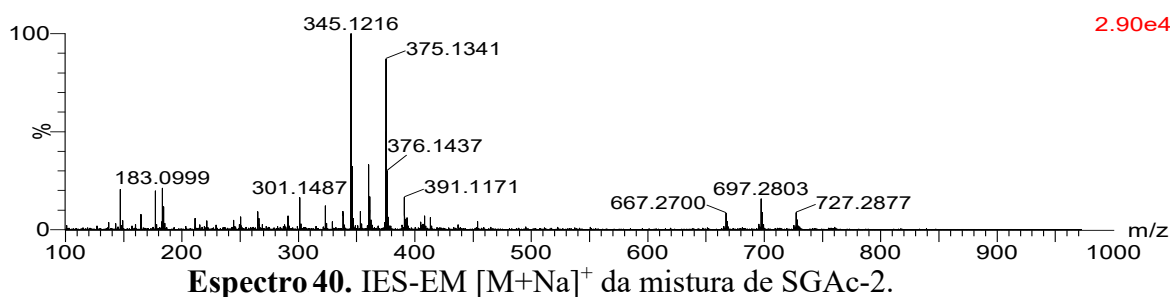
**Espectro 38.** RMN- HMBC da mistura de SGAc-2.



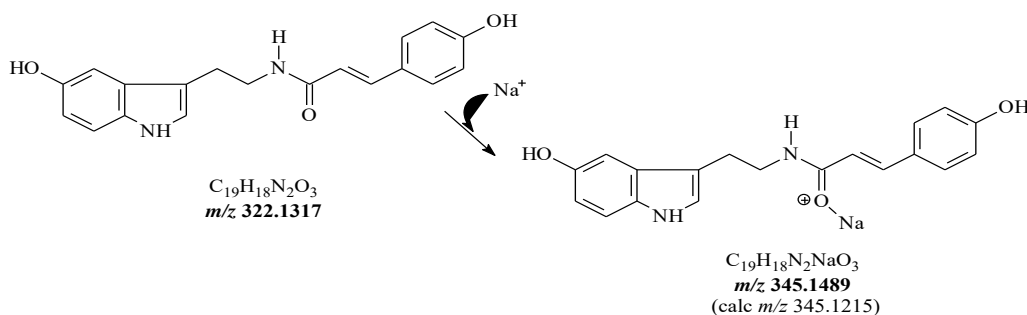
HMBC.esp



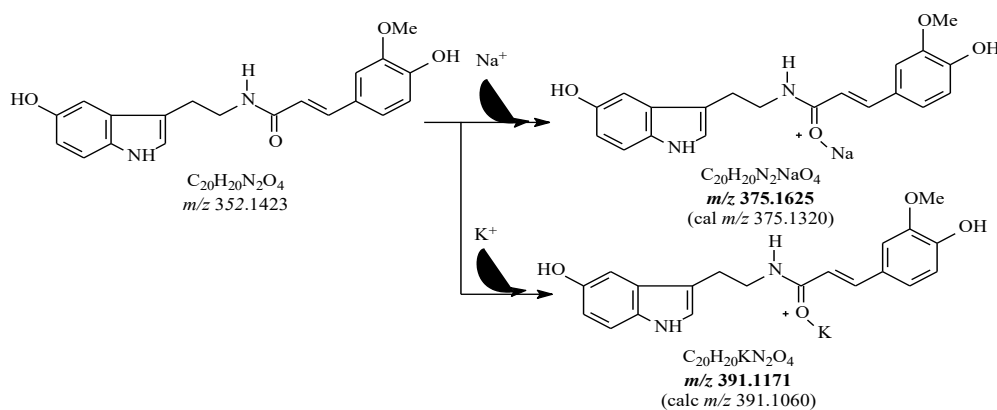
**Espectro 39.** Expansão de RMN- HMBC da mistura de SGAc-3.



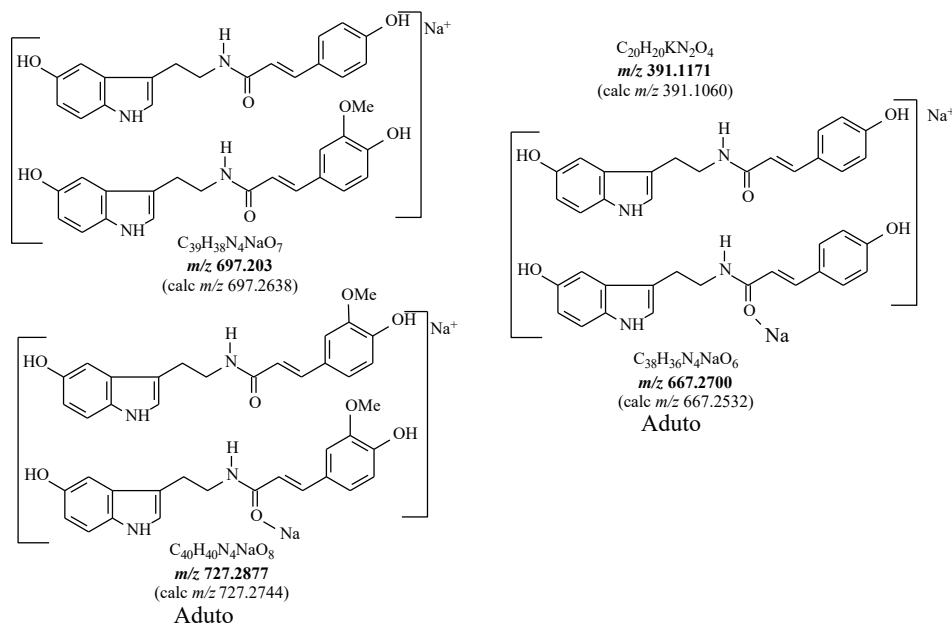
**Espectro 40.** IES-EM  $[M+Na]^+$  da mistura de SGAc-2.



**Esquema 7.** Estruturas para os picos apresentados no EMAR-IES ( $[M+Na]^+$ ) da substância SGAc-2A.



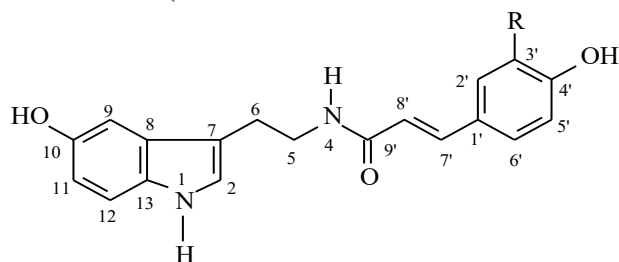
**Esquema 8.** Estruturas para os picos revelados pelo EMAR- IES ( $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ ) da substância SGAc-2B.



**Esquema 9.** Estruturas de **adutos** envolvendo as substâncias SGAc-2A e SGAc-2B. e representados por picos revelados pelo EMAR- IES registrado no modo positivo.

### 3.2.6 Determinação estrutural da mistura SGAc-3

As estruturas dos componentes mistura **SGAc-3** (**SGAc-3A** e **SGAc-3B**, 5 mg foram isolados), solúvel em metanol e de cor amarela, foram caracterizadas como *N-p*-coumaroil serotonina (**SGAc-3A**) e *N*-cafeoil serotonina (**SGAc-3B**), presentes na proporção de 61,12% e 38,88% respectivamente, através da análise dos espectros de RMN 1D ( $^1H$ , e  $^{13}C$ -DEPTQ) e 2D homonuclear  $^1H$ - $^1H$ -COSY envolvendo comparação dos destes com os correspondentes obtidos da **SGAc-2** (mistura de **SGAc-2A** = **SGAc-3A** e **SGAc-3B**).



R=H      **SGAc-3A** = **SGAc-2A** = *N-p*-coumaroil serotonina  
 R=OH     **SGAc-3B** (R=OMe = **SGAc-2B** = *N*-feruloil serotonina)

A comparação dos dados espectrais obtidos dos espectros de RMN  $^1H$  (Espectros 41 e 42), COSY (Espectro 43) e  $^{13}C$ -DEPTQ (Espectro 44) da mistura **SGAc-3** e os fornecidos por tais espectros pela **SGAc-2** (mistura das **SGAc-2A**, (Tabela 11) e **SGAc-2B**, (Tabela 12) revelou como diferença significativa somente a ausência de sinais correspondentes ao grupo metoxila ( $\delta_C$  55.00/ $\delta_H$  3.91, Tabela 12) presente na **SGAc-2B**. Assim, foi possível propor a **SGAc-3A** como idêntica a **SGAc-2A** e **SGAc-3B** como **SGAc-2B** desmetilada no grupo metoxila localizado no C-3'. A substituição da metoxila por hidroxila no C-3' permitiu a permanência da mesma feição espectral, confirmada pelo espectro  $^1H$ - $^1H$ -COSY (Espectro 43), pela presença de sinais de H-2' ( $\delta_H$  7.12, *sl*), H-5' ( $\delta_H$  6.79,  $J=8.2$  Hz) e H-6' ( $\delta_H$  7.03, parcialmente superposto com o sinal de H-2 das duas substâncias).

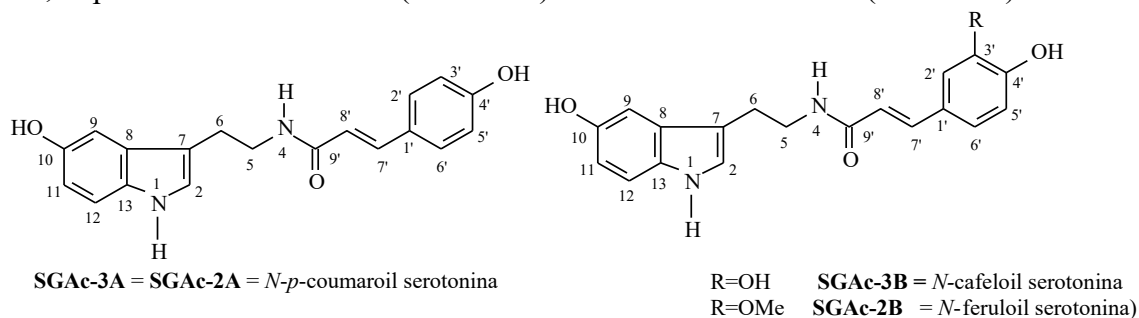
O espectro de RMN $^1H$  (Espectro 41 e 42) apresentou também sinais de hidrogênios metínicos aromáticos duplicados, com integração de 2H para cada sinal, em  $\delta_H$  6.95 (*sl*, H-9,

A/B), 6.65 (*d*, 8.5 Hz, H-11, A/B) e em  $\delta_H$  7.15 (*d*, 8.5 Hz, H-12A/B), atribuídos a um anel aromático monossustituído de uma unidade indólica, sendo os acoplamentos entre eles confirmados pelo espectro 2D de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 43). Essa unidade indólica foi corroborada pela análise do espectro de RMN $^{13}\text{C}$  DEPTQ (Espectro 44), apresentando os sinais de carbono metínico em  $\delta_C$  102.65 (CH-9), 111.52 (CH-11) e 111.81 (CH-12), sendo o sinal de carbono em  $\delta_C$  123.41 atribuído ao CH-2 ( $\delta_H$  7.03, *s*).

A cadeia lateral da unidade indólica, formada também pelos carbonos metilênicos CH $_2$ -5 e CH $_2$ -6, foi representada pelos sinais duplicados, com integração de 4H em cada sinal, de hidrogênio em  $\delta_H$  3.58 (2H, *t*, 7.3 Hz, 2H-5) e 2.93 (2H, *t*, 7.3 Hz, 2H-6) e de carbono em  $\delta_C$  40.63 e 25.63, respectivamente, sendo o acoplamento entre eles confirmado no COSY.

A análise do espectro de RMN $^1\text{H}$  e do espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY indicou ainda a presença de um segundo anel aromático 1,4-dissustituído (presente em maior percentagem) através dos sinais de H-2'/H-6' ( $\delta_H$  7.40, 2H, *d*,  $J=8.5$  Hz) e H-3'/H-5' ( $\delta_H$  6.78, 2H, *d*,  $J=8.5$  Hz) atribuídos ao **SGAc-3A**, sendo assim caracterizada como o alcaloide *N*-*p*-coumaroil serotonina. Os sinais do segundo anel aromático trissustituído, reconhecido pela presença de sinais de H-2' ( $\delta_H$  7.12, *s*), H-5' ( $\delta_H$  6.79,  $J=8.2$  Hz) e H-6' ( $\delta_H$  7.03, parcialmente superposto com o sinal de H-2 das duas substâncias), completaram a caracterização da **SGAc-3B** como *N*-cafeoil serotonina.

As demais atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono da **SGAc-3A** e **SGAc-3B** encontram-se descritos nas Tabela 13 e Tabela 14. Assim, o conjunto destes dados deduzidos aliados à comparação com valores da literatura permitiram identificar a mistura de **SGAc-3** como sendo constituída pelo alcaloide derivado da serotonina, *N*-*p*-coumaroil serotonina (**SGAc-3A**) e *N*-cafeoil serotonina (**SGAc-3B**).



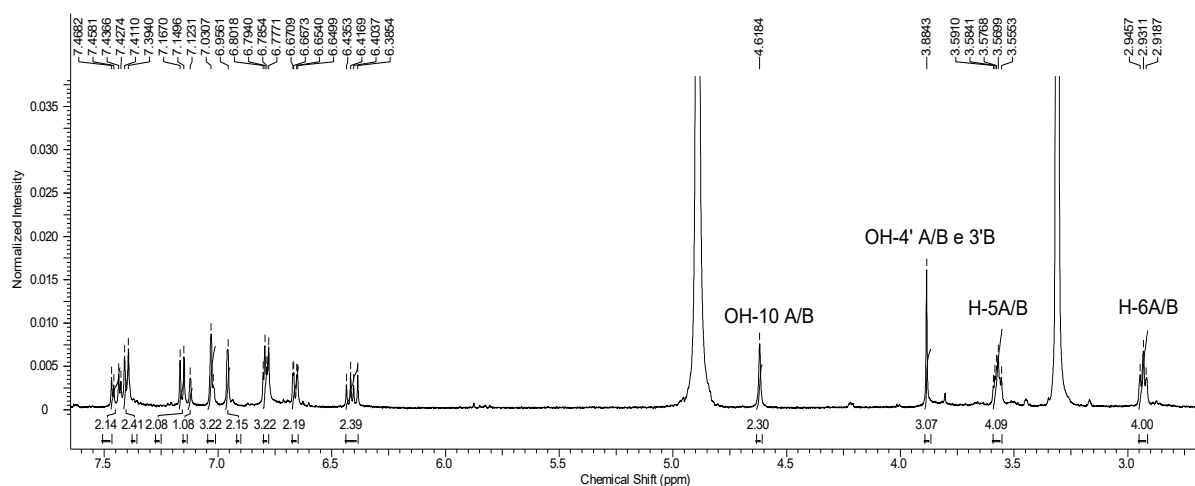
**Tabela 13.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) da mistura de **SGAc-3**, e valores da literatura da *N*-cafeoil serotonina (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2012). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

C	SGAc-3A		SGAc-3B		<i>N</i> -cafeoil serotonina	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
7	111.66	-	111.66	-	110.9	-
8	128.59	-	128.58	-	130.8	-
10	150.29	-	150.29	-	150.2	-
13	132.29	-	132.29	-	130.8	-
1'	127.47	-	126.91	-	126.5	-
3'	-	-	148.43	-	147.3	-
4'	159.65	-	148.96	-	148.6	-
9'	168.43	-	168.38	-	165.4	-
<b>CH</b>						
2	123.41	7.03 ( <i>s</i> )	123.41	7.03 ( <i>s</i> )	123.1	7.07 ( <i>s</i> )
9	102.65	6.95 ( <i>s</i> )	102.65	6.95 ( <i>s</i> )	102.3	6.87
11	111.52	6.65 ( <i>d</i> , 8.5)	111.52	6.65 ( <i>d</i> , 8.5)	111.3	6.61

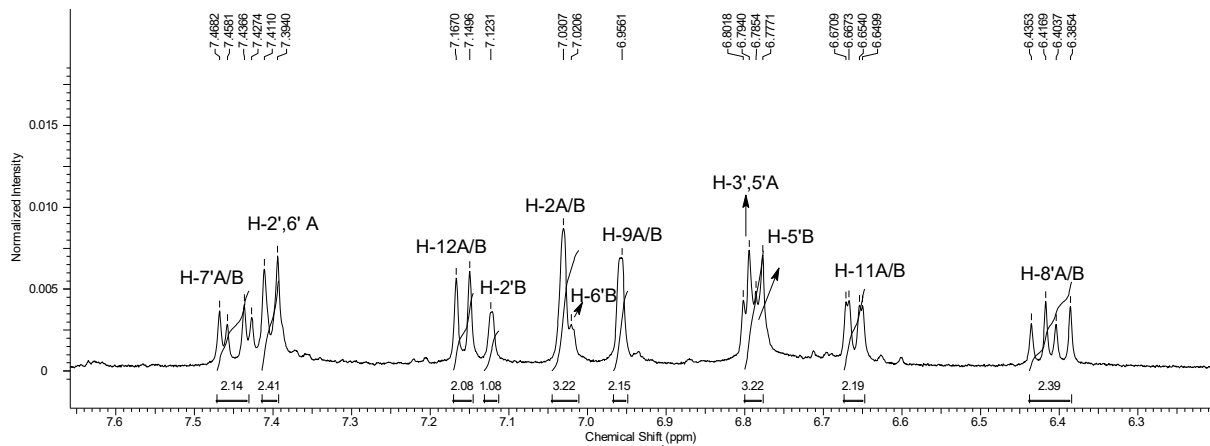
12	111.81	7.15 ( <i>d</i> , 8.5)	111.81	7.15 ( <i>d</i> , 8.5)	111.7	7.14 ( <i>d</i> , 8.0)
2'	129.71	7.40 ( <i>d</i> , 8.5)	110.66	7.12 ( <i>s</i> )	113.9	6.98
3'	115.84	6.78 ( <i>d</i> , 8.5)	-	-	-	-
5'	115.84	6.78 ( <i>d</i> , 8.5)	115.59	6.79 ( <i>d</i> , 8.2)	115.8	6.77 ( <i>d</i> , 8.0)
6'	129.71	7.40 ( <i>d</i> , 8.5)	122.36	7.03 ( <i>s</i> )	120.4	6.85
7'	140.86	7.45 ( <i>d</i> , 15.8)	141.11	7.43 ( <i>d</i> , 15.8)	139.0	7.27 ( <i>d</i> , 15.6)
8'	117.71	6.40 ( <i>d</i> , 15.8)	118.03	6.43 ( <i>d</i> , 15.8)	118.8	6.37 ( <i>d</i> , 15.6)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
5	40.63	3.58 ( <i>t</i> , 7.3)	39.33	3.58 ( <i>t</i> , 7.3)	39.5	3.43 ( <i>dt</i> , 5.2, 7.6)
6	25.63	2.93 ( <i>t</i> , 7.3)	25.63	2.93 ( <i>t</i> , 7.3)	35.5	2.79 ( <i>t</i> , 7.6)

**Tabela 14.** Comparação dos dados espectrais de RMN das substâncias naturais das misturas SGAc-3 e SGAc-2. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult., *J* (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

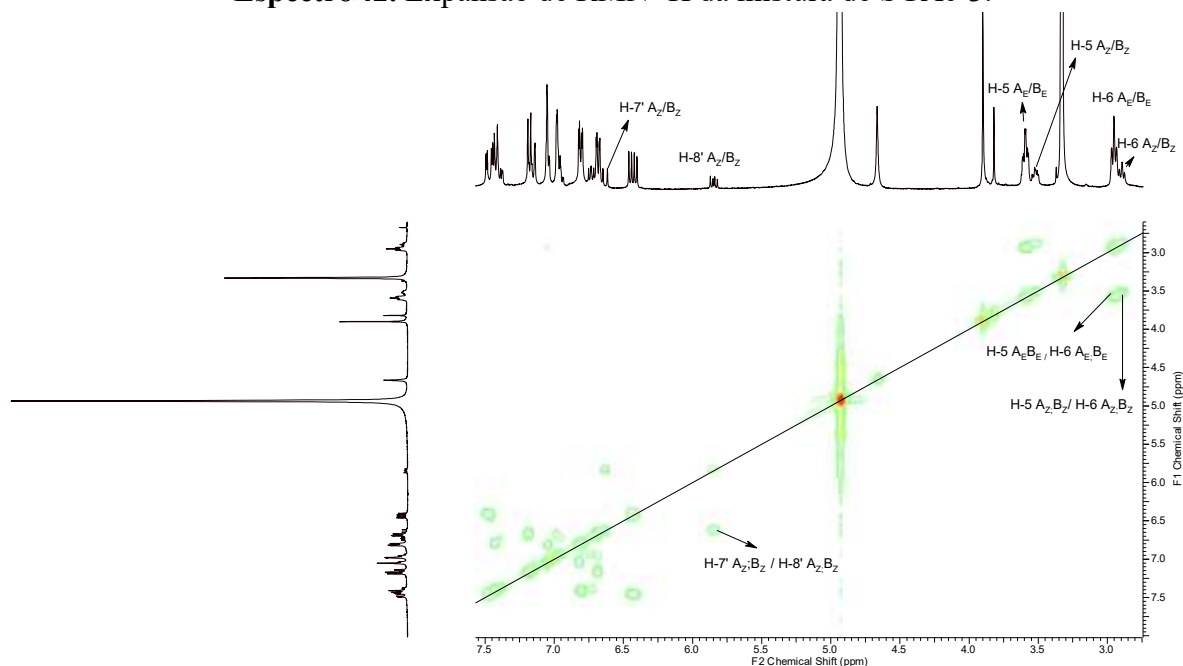
	SGAc-3A		SGAc-2A		SGAc-3B		SGAc-2B	
C	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
7	111.66	-	111.12	-	111.66	-	111.11	-
8	128.58	-	128.03	-	128.58	-	128.03	-
10	150.29	-	149.67	-	150.29	-	149.67	-
13	132.29	-	131.72	-	132.29	-	131.72	-
1'	127.47	-	126.93	-	126.91	-	126.33	-
3'	-	-	-	-	148.43	-	147.87	-
4'	159.65	-	159.02	-	148.96	-	148.33	-
9'	168.43	-	167.88	-	168.38	-	167.93	-
<b>CH</b>								
2	123.41	7.03 ( <i>s</i> )	122.94	7.05 ( <i>s</i> )	123.41	7.03 ( <i>s</i> )	122.94	7.02 ( <i>s</i> )
9	102.65	6.95 ( <i>s</i> )	102.08	6.98 ( <i>s</i> )	102.65	6.95 ( <i>s</i> )	102.08	6.95 ( <i>s</i> )
11	111.52	6.65 ( <i>d</i> , 8.5)	111.00	6.68 ( <i>dd</i> , 8.6, 2.0)	111.52	6.65 ( <i>d</i> , 8.5)	111.00	6.65 ( <i>dd</i> , 8.6, 2.0)
12	111.81	7.15 ( <i>d</i> , 8.5)	111.25	7.18 ( <i>d</i> , 8.6)	111.81	7.15 ( <i>d</i> , 8.5)	111.25	7.16 ( <i>d</i> , 8.6)
2'	129.71	7.40 ( <i>d</i> , 8.5)	129.21	7.42 ( <i>d</i> , 8.0)	110.66	7.12 ( <i>s</i> )	110.14	7.12 ( <i>d</i> )
3'	115.84	6.78 ( <i>d</i> , 8.5)	115.33	6.78 ( <i>d</i> , 8.0)	-	-	-	-
5'	115.84	6.78 ( <i>d</i> , 8.5)	115.33	6.80 ( <i>d</i> , 8.0)	115.59	6.79 ( <i>d</i> , 8.2)	115.05	6.80 ( <i>d</i> , 8.6)
6'	129.71	7.40 ( <i>d</i> , 8.5)	129.21	7.42 ( <i>d</i> , 8.0)	122.36	7.03 ( <i>s</i> )	121.88	7.04 ( <i>dd</i> )
7'	140.86	7.45 ( <i>d</i> , 15.8)	140.37	7.47 ( <i>d</i> , 15.8)	141.11	7.43 ( <i>d</i> , 15.8)	140.63	7.46 ( <i>d</i> , 15.6)
8'	117.71	6.40 ( <i>d</i> , 15.8)	117.16	6.46 ( <i>d</i> , 15.8)	118.03	6.43 ( <i>d</i> , 15.8)	117.46	6.41 ( <i>d</i> , 15.6)
<b>CH<sub>2</sub></b>								
5	40.63	3.58 ( <i>t</i> , 7.3)	40.09	3.58 ( <i>m</i> )	39.33	3.58 ( <i>t</i> , 7.3)	40.09	3.58 ( <i>m</i> )
6	25.63	2.93 ( <i>t</i> , 7.3)	25.05	2.93 ( <i>t</i> , 7.2)	25.63	2.95 ( <i>t</i> , 7.3)	25.04	2.93 ( <i>t</i> , 7.2)
<b>MeO</b>								
3'	-	-	-	-	-	-	55.00	3.91 ( <i>s</i> )



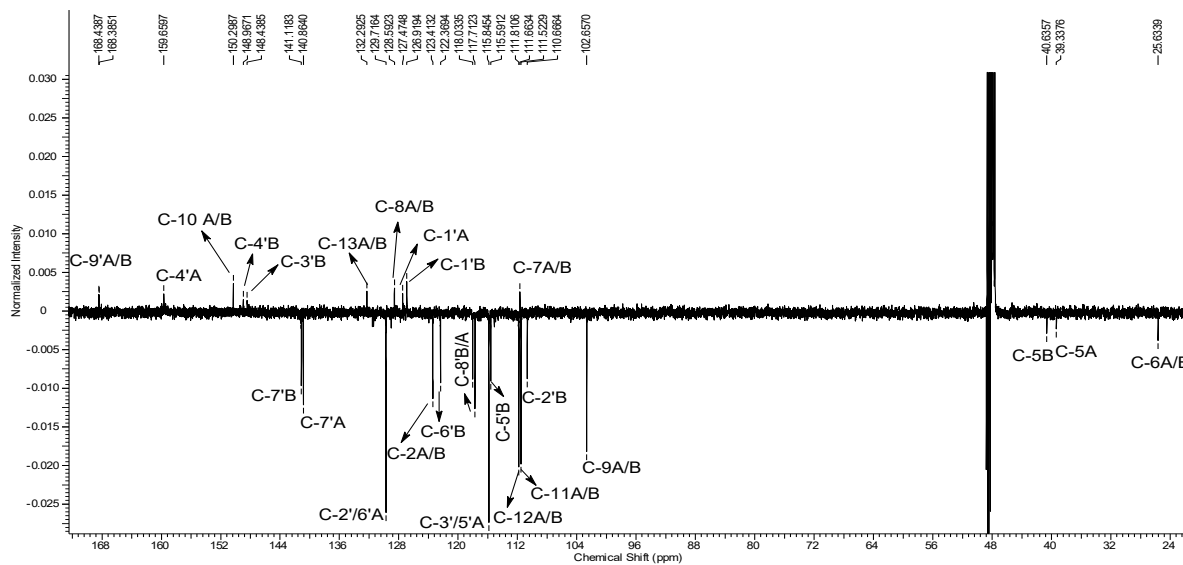
**Espectro 41.** RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-3.



**Espectro42.** Expansão de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de SGAc-3.



**Espectro43.** RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) da mistura de SGAc-3.

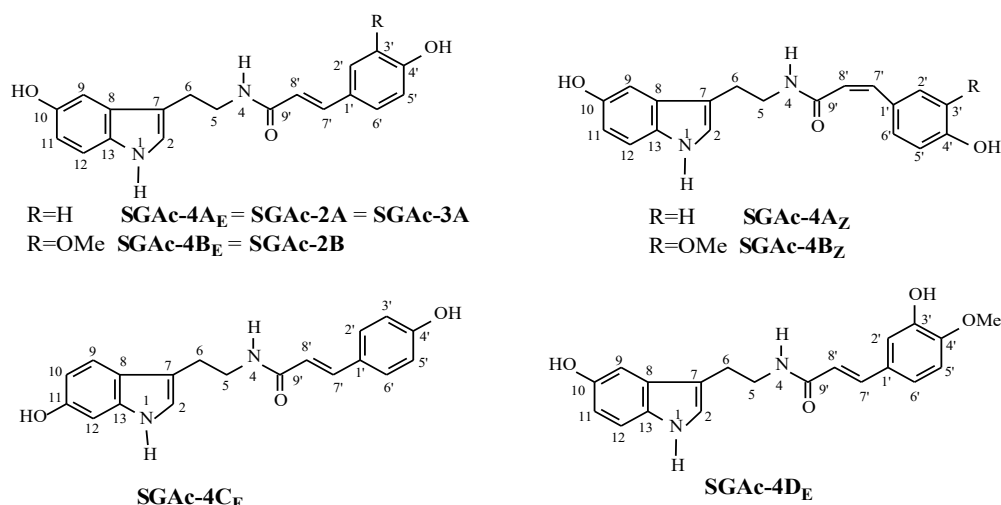


**Espectro 44.** RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) da mistura de SGAc-3.

### 3.2.7 Determinação estrutural da mistura de SGAc-4

A mistura **SGAc-4** (7 mg), solúvel em metanol e de aspecto caramelado de coloração azulada, apresentou sinais referentes a seis componentes (Figura 23), com deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ revelando similaridade com mistura **SGAc-2** pela presença de sinais correspondentes aos alcaloides *N*-*p*-coumaroil serotonina (**SGAc-2A** = **SGAc-3A**) e *N*-feruloil serotonina (**SGAc-2B**), agora nas duas isomerias *cis* (*Z*) e *trans* (*E*) como previstas, além de sinais adicionais atribuídos aos isômeros de posição dos substituintes dos anéis aromáticos, como *N*-isoferuloil serotonina e higarine. A presença destas substâncias recebeu informações adicionais importantes através de análise por CL-EM, contribuindo para atenuar a superposição de sinais reveladas pelos espectros de RMN.

As letras *Z* (= *cis*) e *E* (= *trans*) foram acrescentadas aos códigos das amostras para facilitar a identificação e a compreensão de semelhança.



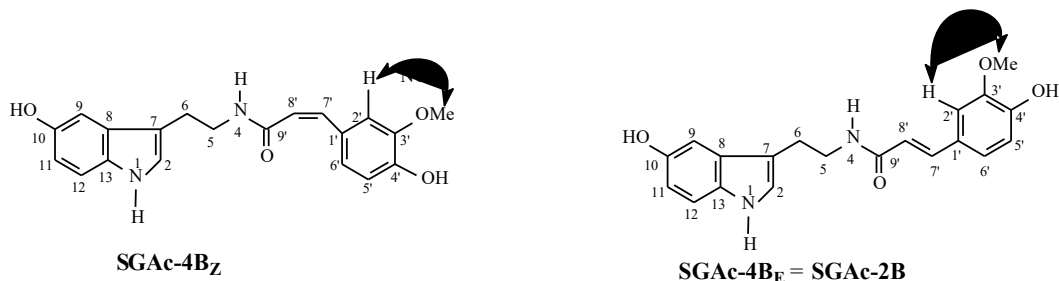
**Figura 23.** Estruturas dos alcaloides propostos como componentes na mistura de SGAc-4.

#### **SGAc-4B<sub>Z</sub>** e **SGAc-4B<sub>E</sub>**

As substâncias **SGAc-4B<sub>Z</sub>** e **SGAc-4B<sub>E</sub>** foram identificados como um par de isômeros *cis* e *trans* com base essencialmente nas diferenças espectrais envolvendo principalmente os deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos carbonos metínicos CH-7' ( $\delta_{\text{C}}$  141.65/  $\delta_{\text{H}}$  7.46, *d*,  $J=15.8$  Hz) e CH-8' ( $\delta_{\text{C}}$  118.47/6.42, *d*,  $J=15.8$  Hz) de *E* (*trans*,  $J=15.8$  Hz) comparados com CH-7 ( $\delta_{\text{C}}$  137.82/  $\delta_{\text{H}}$  6.60, *d*,  $J=12.6$  Hz, *Z*) e CH-8' ( $\delta_{\text{C}}$  121.66/5.83 (*d*,  $J=12.6$  Hz) de *Z* (*cis*,  $J=12.6$  Hz) e valores das constantes de acoplamento típicos entre os átomos de hidrogênio H-7' e H-8' de  $J=15.8$  Hz (configuração *trans*) e  $J=12.6$  Hz (configuração *cis*), confirmados através do espectro de correlação homonuclear 2D COSY (Espectro 56) e a localização da metoxila no carbono 3' (3'-OMe) pela interação dipolar observada no espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (Espectro 57). Os valores espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  revelaram-se também semelhantes entre si e aos observados nos componentes **SGAc-2B** = **SGAc-3B** das misturas **SGAc-2** e **SGAc-3** (Tabela 14).

Assim, os conjuntos de dados de RMN permitiram caracterizar a presença do esqueleto da serotonina (5-hidroxitriptamina) e da porção referente a 3-metoxi-4-hidroxicinamoíla, para ambos isômeros. Atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio desses isômeros foram confirmados pelo HSQC (Espectro 58). No experimento HMBC (Espectro 59 e 60), os isômeros da unidade cinamoíla revelaram amida com carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  169.22 para a substância *cis* e 169.17 para *trans*

indicadas pelas correlações  $^3J_{CH}$  e  $^2J_{CH}$  dos hidrogênios metínicos H-7' e H-8'. Esse espectro permitiu também confirmar a presença da metoxila ( $\delta_C$  56.29 e  $\delta_H$  3.83) ligada ao carbono quaternário C-3'. A Tabela 15 contém também para comparação os dados da **SGAc-2B**.



**Tabela 15.** Comparação dos dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -DEPTQ (400 e 100 MHz em MeOD) da SGAc-4B<sub>Z,E</sub> e SGAc-2B. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

SGAc-4B <sub>Z,E</sub>			SGAc-2B	
C	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
7	112.42	-	111.12	-
8	129.36	-	128.03	-
10	151.06	-	149.67	-
13	133.06	-	131.72	-
1'	127.68	-	126.33	-
3'	149.21	-	147.87	-
4'	149.73	-	148.33	-
9'	169.22 ( <i>cis</i> )	-	167.93	-
	169.17 ( <i>trans</i> )			
<b>CH</b>				
2	124.22	7.03 ( <i>s</i> )	122.94	7.05 ( <i>s</i> )
9	103.41	6.95	102.08	6.98 ( <i>d</i> , )
11	112.29	6.67 ( <i>d</i> , 8.5)	111.00	6.68 ( <i>dd</i> , 8.5, 2.0)
12	112.65	7.16 ( <i>d</i> , 8.5)	111.25	7.18 ( <i>d</i> , 8.5)
2'	111.42	7.12 ( <i>d</i> , 1.76)	110.14	7.14 ( <i>d</i> )
5'	116.37	6.77 ( <i>d</i> , 8.3)	115.06	6.81 ( <i>d</i> , 8.6)
6'	123.16 ( <i>trans</i> )	7.01	121.81	7.04 ( <i>dd</i> )
	124.73 ( <i>cis</i> )			
7'	141.65	7.46 ( <i>d</i> , 15.5, <i>trans</i> )	140.63	7.46 ( <i>d</i> , 15.6)
	137.82	6.60 ( <i>d</i> , 12.6, <i>cis</i> )		
8'	118.78	6.40 ( <i>d</i> , 15.8, <i>trans</i> )	117.46	6.46 ( <i>d</i> , 15.6)
	121.66	5.83 ( <i>d</i> , 12.5, <i>cis</i> )		
<b>CH<sub>2</sub></b>				
5	41.42	3.56 ( <i>t</i> , <i>trans</i> )	40.09	3.58 ( <i>m</i> )
	41.21	3.55 ( <i>t</i> , <i>cis</i> )		
6	26.40	2.93 ( <i>t</i> , <i>trans</i> )	25.05	2.95 ( <i>t</i> , 7.2)
	26.06	2.89 ( <i>t</i> , <i>cis</i> )		
<b>CH<sub>3</sub></b>				
3'-OCH <sub>3</sub>	56.29	3.87 ( <i>s</i> )	55.00	3.91 ( <i>s</i> )

Os espectros EMAR-IES (Espectro 45 e 46) referentes aos Tr. 5.46 e 5.48 (min) registrados no cromatograma (Figura 24) permitiram deduzir os íons moleculares dos isômeros *cis* e *trans*, com  $m/z$  352 ( $[M]^+$ ) e as fórmulas moleculares de C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, através dos picos  $[M+H]^+$  em  $m/z$  353.1504 (Tr 5.46 min) e  $m/z$  353.1490 (Tr 5.48 min) (C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, calc.  $m/z$  353.1501). Nos dois espectros observou-se a presença dos mesmos picos principais com intensidades diferentes, indicando as mesmas reações de fragmentação nos dois isômeros

(Esquema 10). Assim esses dados comparados com literatura (SARKER et al., 1997) indicaram a presença dos alcaloides Moschamina, também conhecido como *N*-feruloil serotonina (SGAc-4B<sub>E</sub>), e o do alcaloide *cis*-Moschamina (SGAc-4B<sub>Z</sub>).

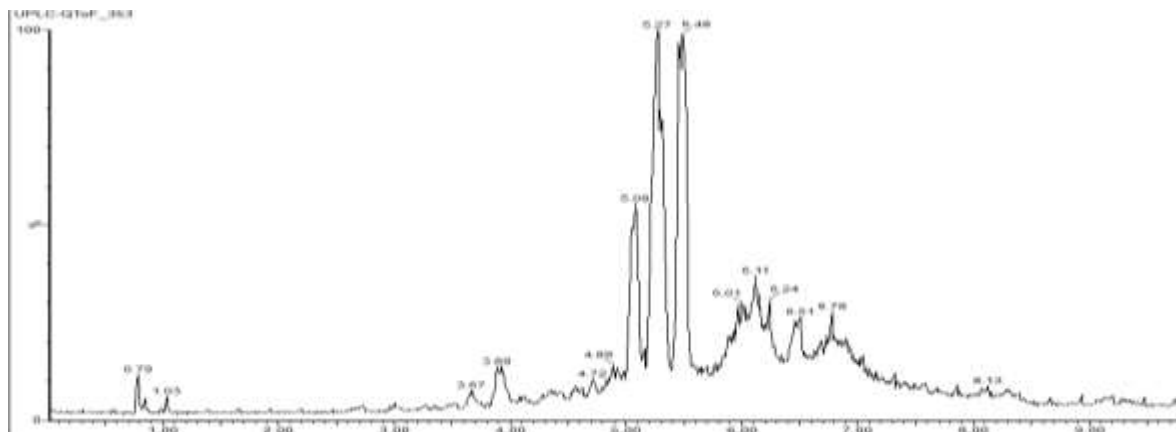
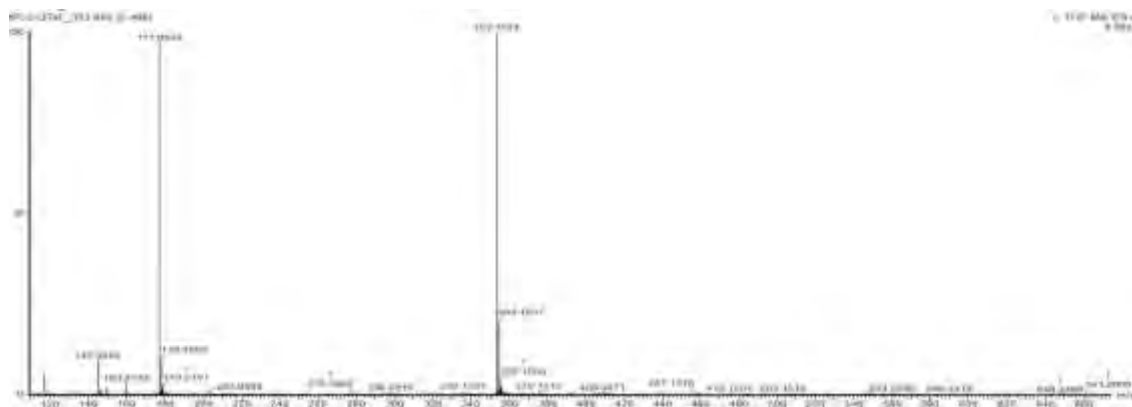
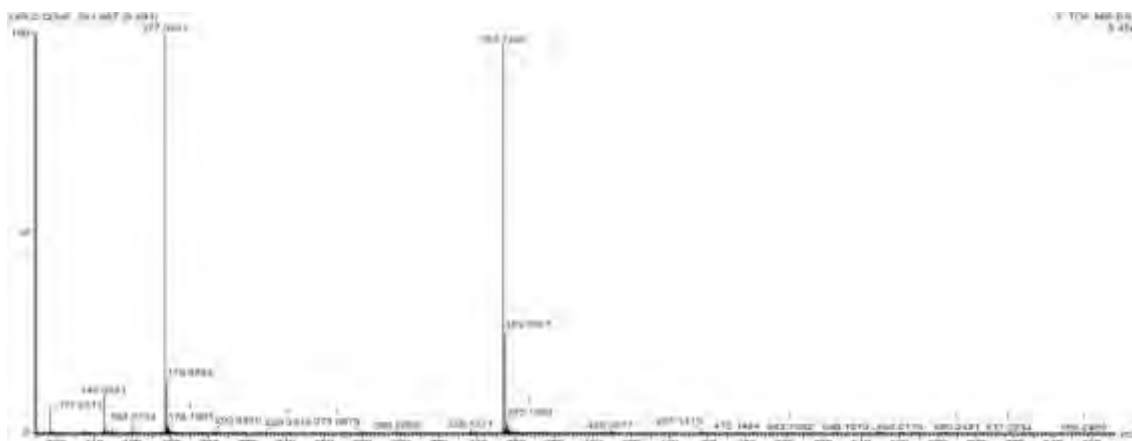


Figura 24. Cromatograma por CLUE da mistura de SGAc-4.

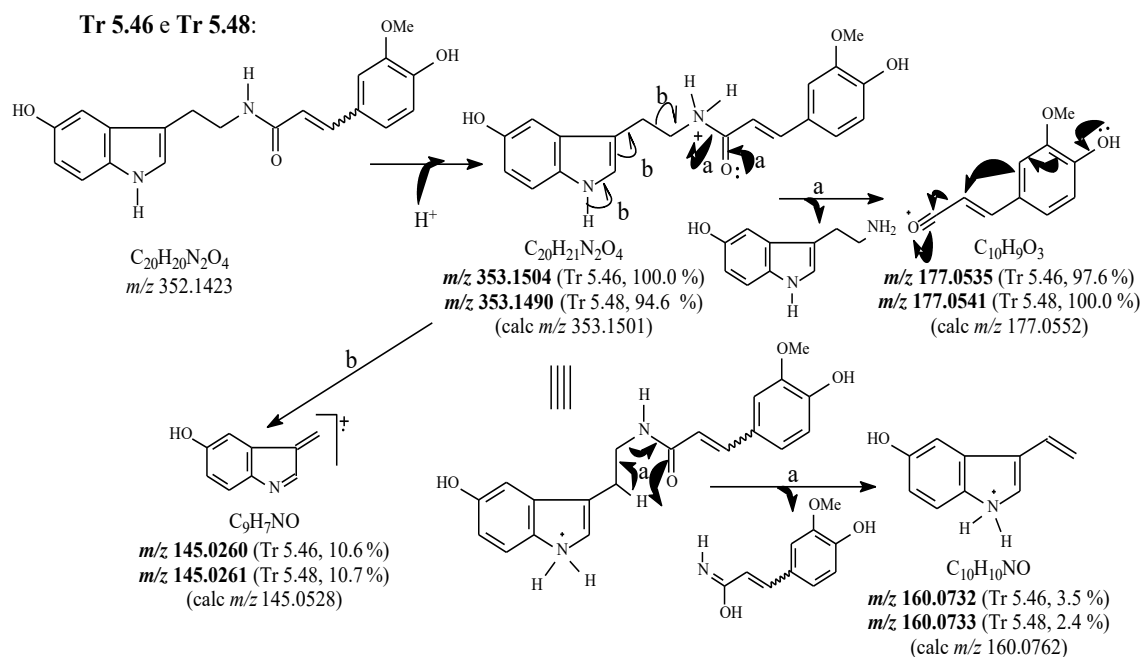


Espectro 45. EM-IES  $[M+H]^+$  de SGAc-4B<sub>Z</sub> ou E Tr 5.46 min.



Espectro 46. EM-IES  $[M+H]^+$  de SGAc-4B<sub>Z</sub> ou E Tr 5.48 min.





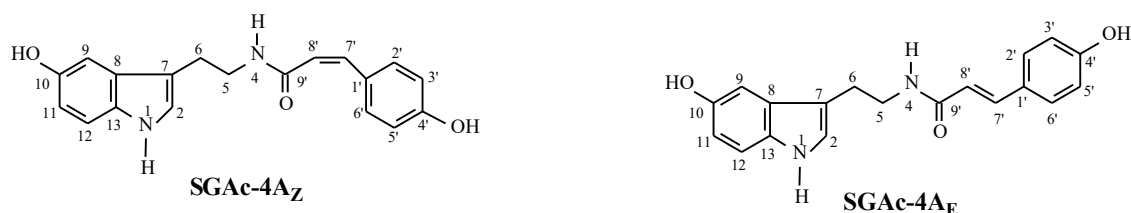
**Esquema 10.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos revelados pelos MAR-IES SGAc-4B<sub>Z</sub> e SGAc-4B<sub>E</sub>.

#### SGAc-4A<sub>Z</sub> e SGAc-4A<sub>E</sub>

O mesmo procedimento utilizado para propor as estruturas postuladas como SGAc-4B<sub>Z</sub> e SGAc-4B<sub>E</sub> foi adotado para a proposição estrutural das SGAc-A<sub>Z</sub> e SGAc-4A<sub>E</sub>, incluindo-se também contribuição comparativa envolvendo os dados espectrais 1D e 2D de RMN com a SGAc-2A da SGAc-2A<sub>E</sub> (Tabela 16).

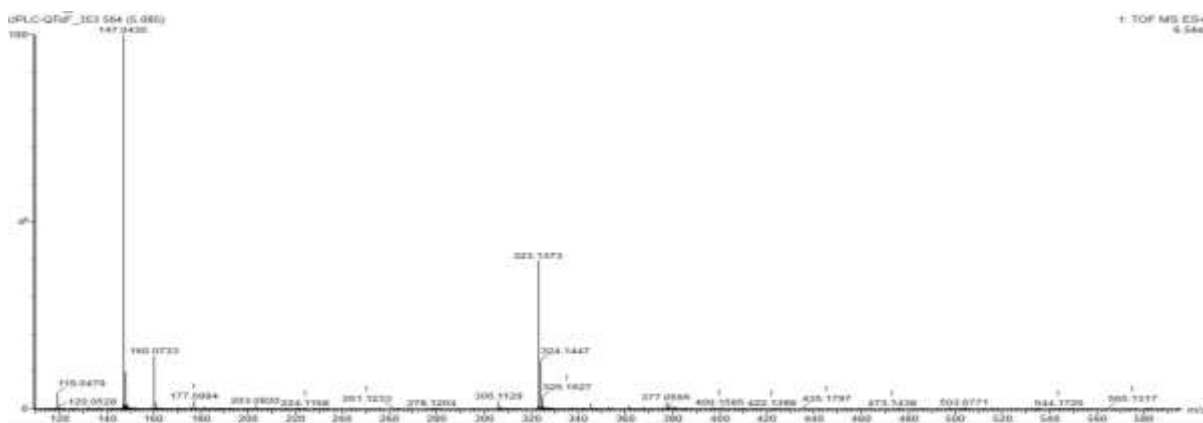
Os espectros EMAR-IES (Espectro 47 e 48) referentes aos Tr. 5.08 e 5.30 (min) registrados no cromatograma (Figura 24) permitiu deduzir os íons moleculares dos isômeros *cis* e *trans* em  $m/z$  322. ( $[M]^+$ ) com a mesma fórmula molecular de  $C_{19}H_{18}N_2O_3$ , através dos picos  $[M+H]^+$  em  $m/z$  323.1373 e  $m/z$  323.1415 ( $C_{19}H_{19}N_2O_3$ , calc.  $m/z$  323.1396).

Com estes dados em conjunto foi possível identificar os alcaloides *cis*-*N*-*p*-coumaroil serotonina e *trans*-*N*-*p*-coumaroil serotonina. Como a única diferença entres os isômeros restringe-se à disposição espacial dos hidrogênios metínicos H-7' e H-8, não foi possível assegurar a correlação de cada isômero com o respectivo espectro. Com isso apenas um isômero está com a estrutura e as fragmentações representadas no Esquema 11.

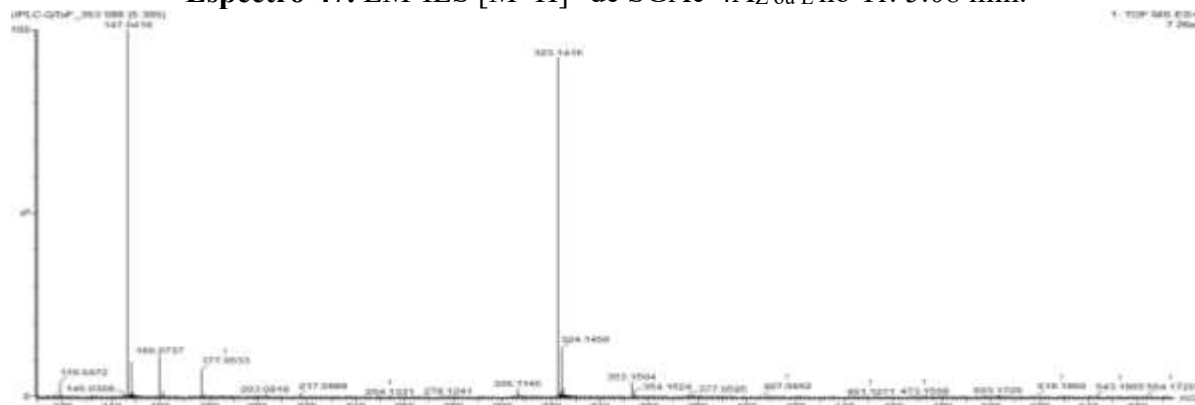


**Tabela 16.** Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (400 e 100 MHz em MeOD) da mistura de SGAc-4 $_{Z,E}$  e SGAc-2A = SGAc-3A. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

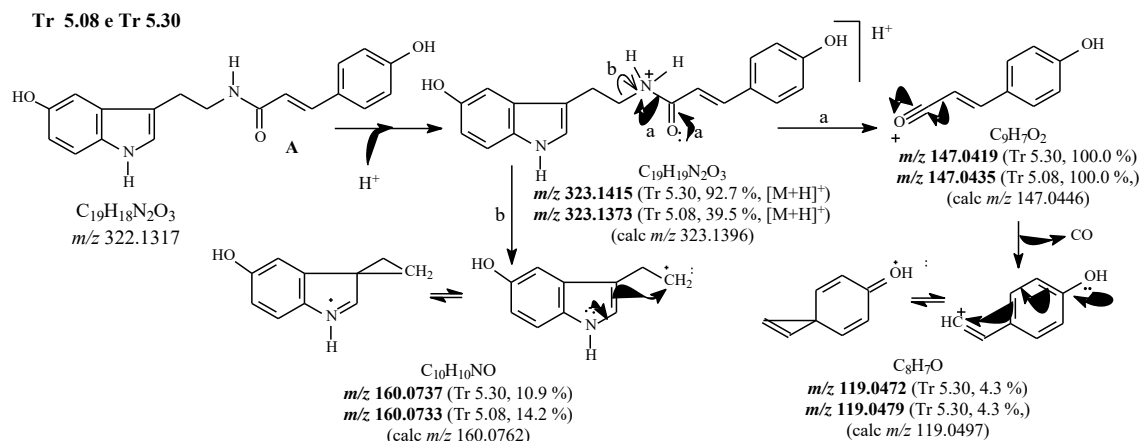
SGAc-4A $_{Z,E}$			SGAc-2A $_E$	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
7	112.42	-	111.12	-
8	129.36	-	128.03	-
10	151.06	-	149.67	-
13	133.06	-	131.72	-
1'	128.24	-	126.93	-
4'	160.43	-	159.02	-
9'	169.22 (cis) 169.17 (trans)	-	167.88	-
<b>CH</b>				
2	124.09	7.03 (s)	122.94	7.05 (s)
9	103.41	6.95 (s)	102.08	6.98 (d)
11	112.29	6.65 (d, 8.5)	111.00	6.68 (dd, 8.6, 2.0)
12	112.65	7.16 (d, 8.5)	111.25	7.18 (d, 8.6)
2'/6'	130.50	7.40 (d, 8.8)	129.61	7.42 (d, 8.0)
3'/5'	116.63	6.79 (d, 8.5)	115.28	6.80 (d, 8.0)
7'	141.91	7.46 (d, 15.8, trans)	140.37	7.47 (d, 15.8)
	138.11	6.60 (d, 12.6, cis)		
8'	118.47	6.43 (d, 15.8, trans)	117.16	6.46 (d, 15.8)
	121.57	5.82 (d, 12.6, cis)		
<b>CH<sub>2</sub></b>				
5	41.42	3.56 (t, trans)	40.09	3.58 (m)
	41.21	3.55 (t, cis)		
6	26.40	2.93 (t, trans)	25.05	2.95 (t, 7.2)
	26.06	2.89 (t, cis)		



**Espectro 47.** EM-IES  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de SGAc-4A $_{Z}$  ou E no Tr. 5.08 min.



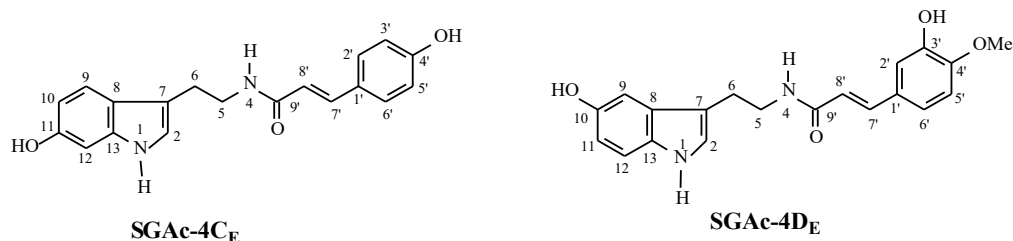
**Espectro 48.** EM-IES  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de SGAc-4A $_{Z}$  ou E Tr 5.30 min.



**Esquema 11.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos revelados pelos EMAR-IES SGAc-4A<sub>z</sub> e SGAc-4A<sub>E</sub>.

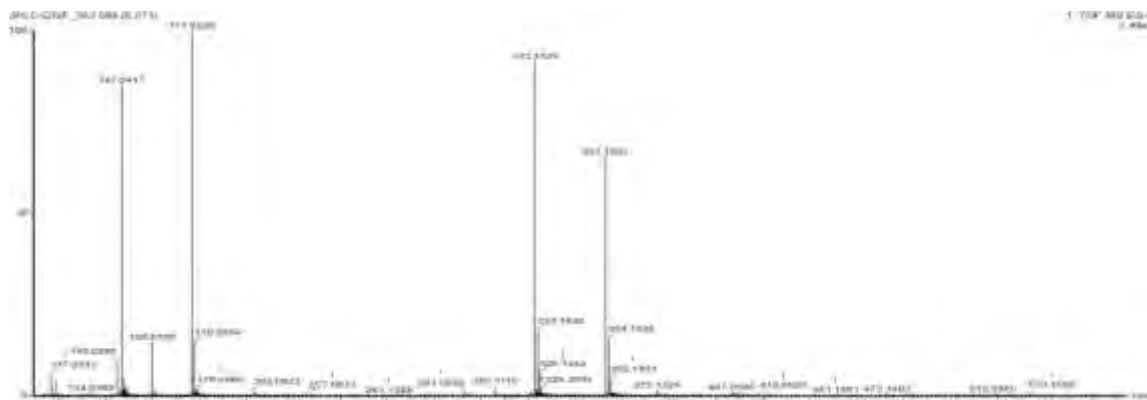
### SGAc-4C e SGAc-4D

Os espectros de RMN não permitiram atribuir de forma precisa os sinais referentes aos isômeros **SGAc-4C** e **SGAc-4D**, pois seus sinais apareceram predominantemente superpostos com os dos outros isômeros derivados da serotonina que se encontram majoritariamente. Assim, através dos espectros de massa de alta resolução foi possível propor a presença destes componentes na mistura.

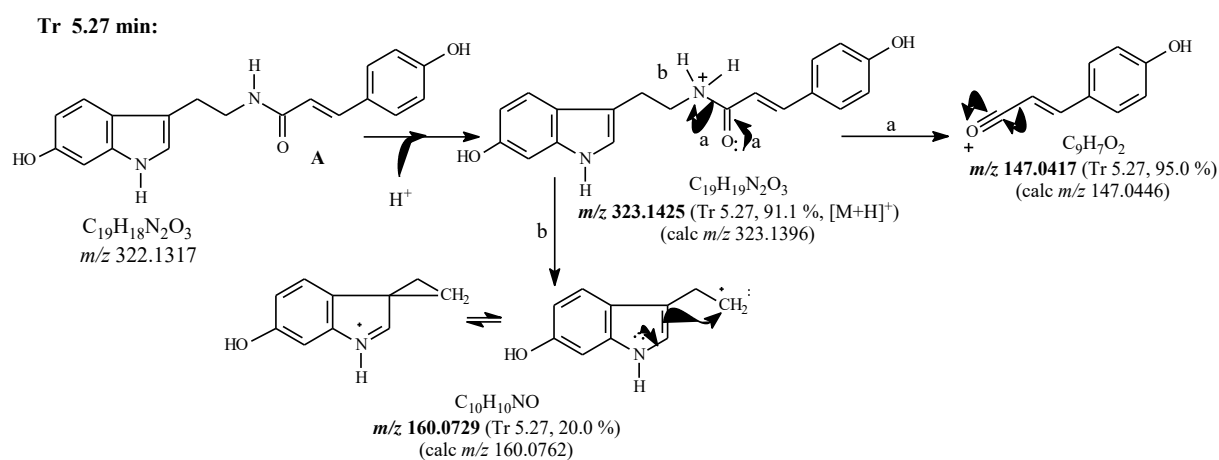


O espectro EMAR-ES (Espectro 49) referente ao pico do cromatograma com Tr. 5.27 min permitiu deduzir o íon molecular em  $m/z$  322 ( $[M]^+$ ) de F.M de  $C_{19}H_{18}N_2O_3$ , através dos picos  $[M+H]^+$  em  $m/z$  323.1425 ( $C_{19}H_{18}N_2O_3$ , calc.  $m/z$  323.11396) (Esquema 12) para o **SGAc-4C**, que possui semelhança estrutural com o *N*-coumaroil serotonina, como a modificação apenas na posição da hidroxila do esqueleto indol, que ao invés de estar localizado no carbono C-10 liga-se ao carbono C-11. Assim, foi possível propor a presença do Higarine.

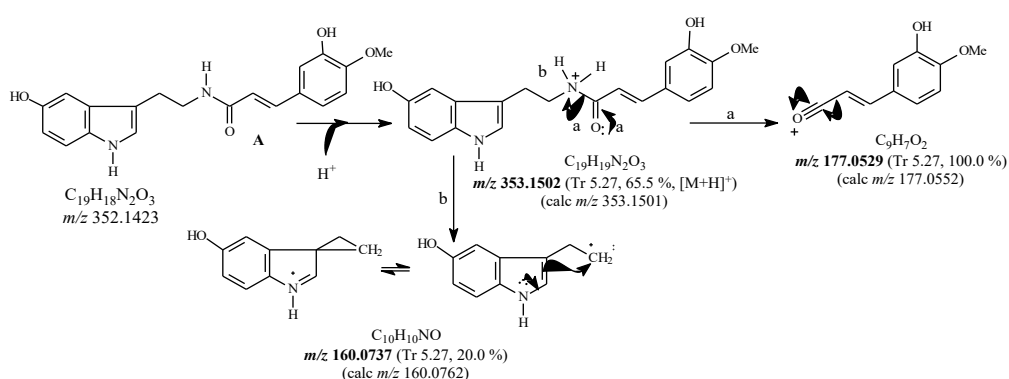
Esse espectro permitiu propor outro isômero da serotonina o **SGAc-4D**, com íon molecular em  $m/z$  353 ( $[M]^+$ ) de F.M. de  $C_{20}H_{20}N_2O_4$ , através dos picos  $[M+H]^+$  em  $m/z$  353.1502 ( $C_{20}H_{21}N_2O_4$ , calc.  $m/z$  353.1501). Esse isômero é semelhante ao *N*-feruloil serotonina (Mochanine) com inversão da localização do grupo metoxila e hidroxila. O espectro de RMN apresentou sinais referentes ao OCH<sub>3</sub> com deslocamento químico em  $\delta_H$  3.79 e  $\delta_C$  56.25, e o espectro de 2 D HMBC (Espectro 59 e 60) permitiu confirmar a ligação da metoxila ao carbono quaternário C-4' ( $\delta_C$  148.44) através do interação em  $^3J$  do carbono. Com essas informações foi proposta a presença do alcaloide *N*-isoferuloil serotonina (Esquema 13).



**Espectro 49.** EM-IES  $[M+H]^+$  de SGAc-4C e SGAc-4D no Tr. 5.27 min.

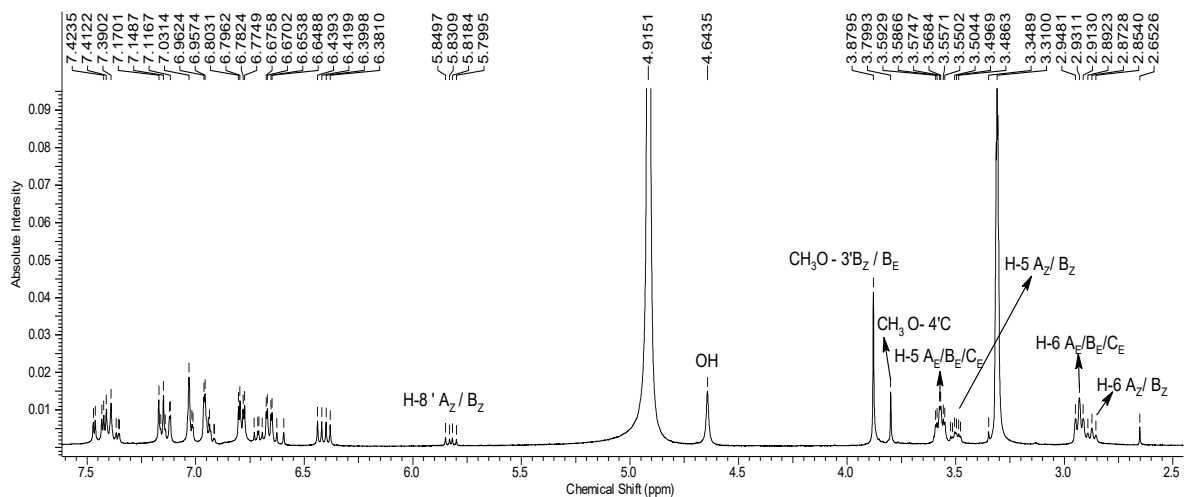


**Esquema 12.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos revelados pelos EMAR-IES SGAc-4C.

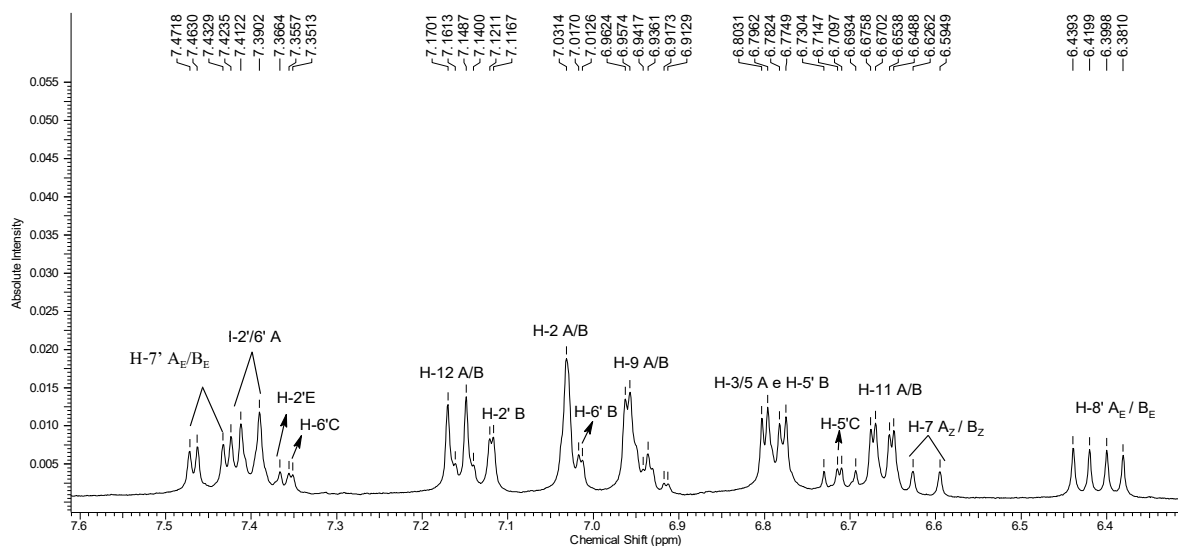


**Esquema 13.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos revelados pelos EMAR-IES SGAc-4D.

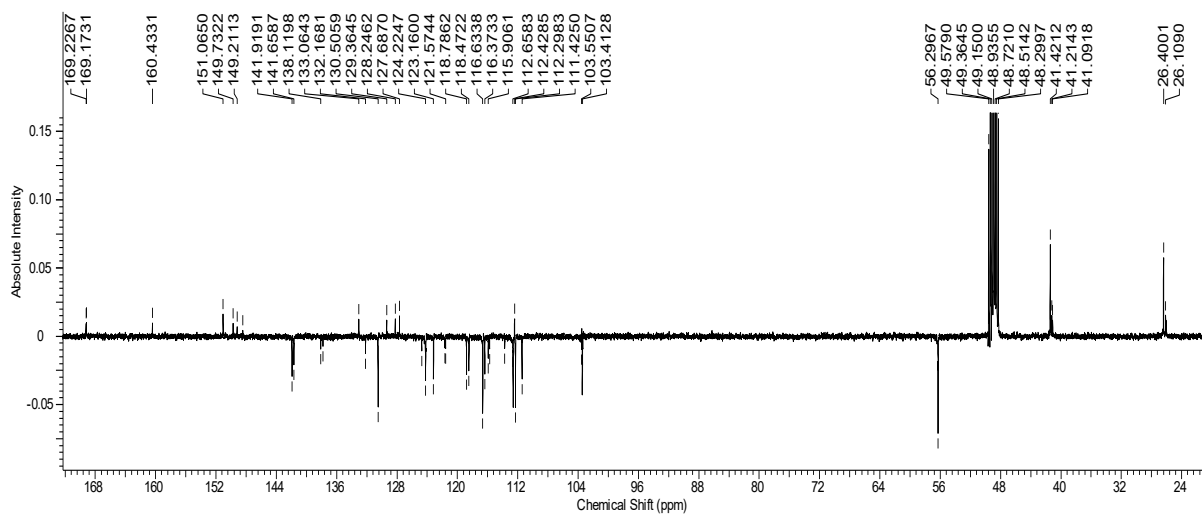
Portanto, a mistura de SGAc-4 permitiu à identificação os isômeros: *Cis-N-p-coumaroil serotonina (SGAc-4Az)*, *trans-N-p-coumaroil serotonina (SGAc-4AE)*, Moschamine ou *N-p-feruloil serotonina (SGAc-4BE)*, *cis-Moschamine (SGAc-4Bz)*, Higarine (SGAc-4C) e *N-p-isoferuloil serotonina (SGAc-4D)*.



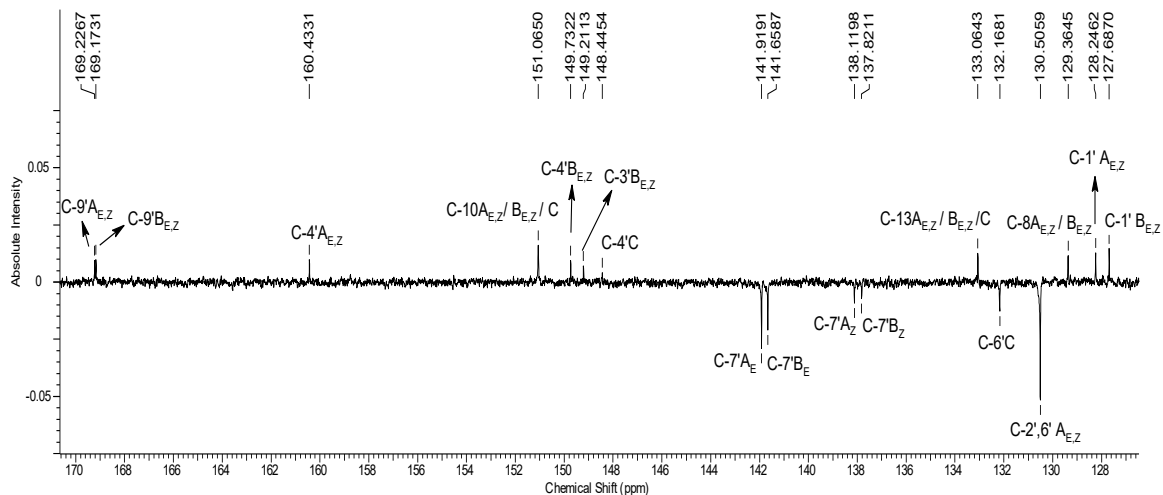
**Espectro 50.** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) de SGAc-4.



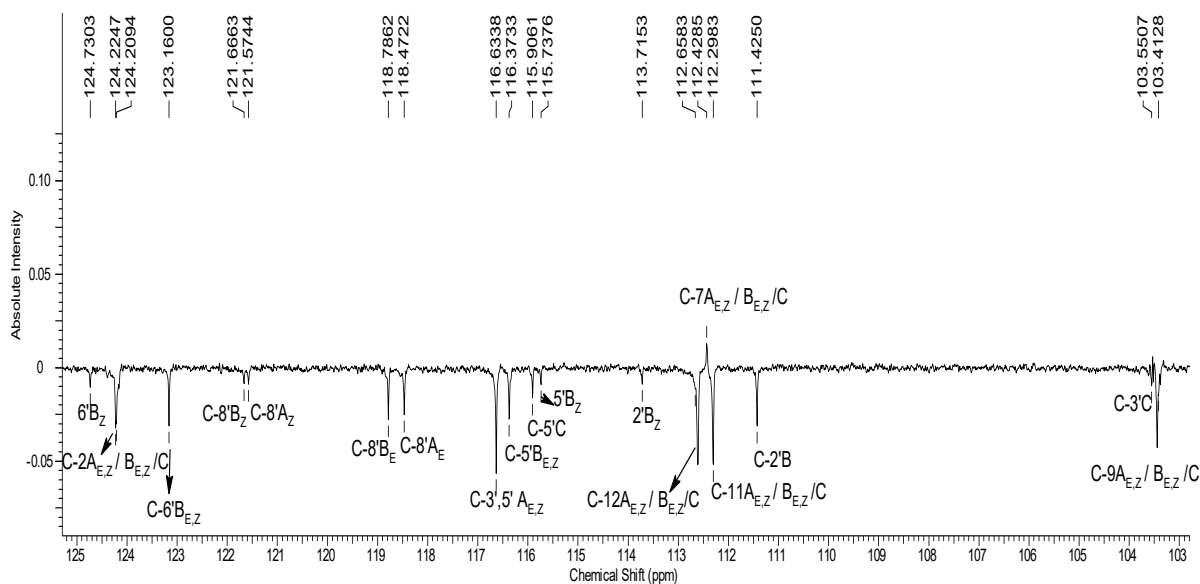
**Espectro 51.** Expansão do RMN <sup>1</sup>H de SGAc-4.



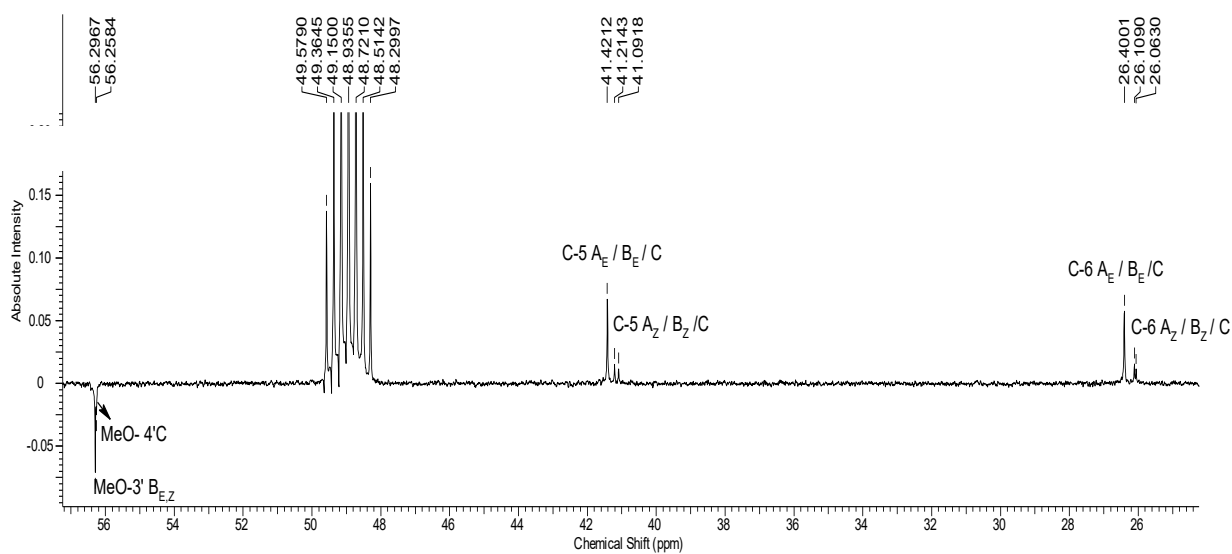
**Espectro 52.** RMN <sup>13</sup>C-DEPT-Q (125 MHz, MeOD) de SGAc-4.



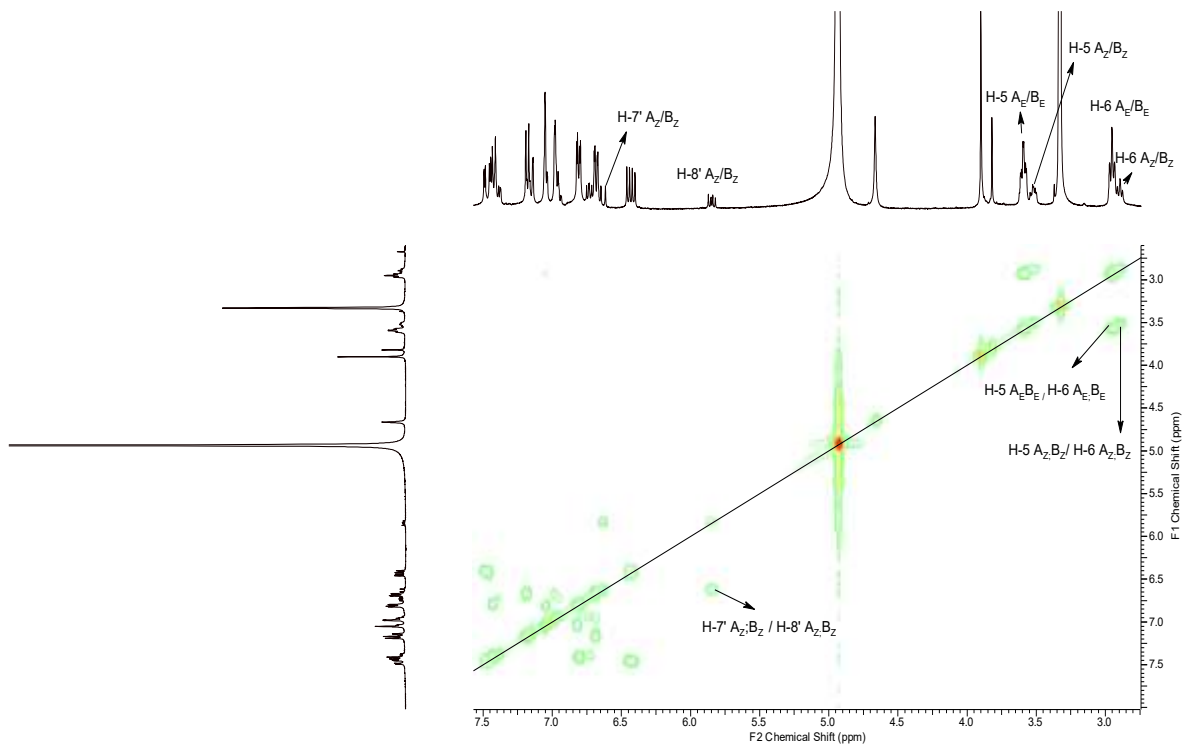
**Espectro 53.** RMN <sup>13</sup>C-DEPT-Q e expansão (125 MHz, MeOD) de SGAc-4.



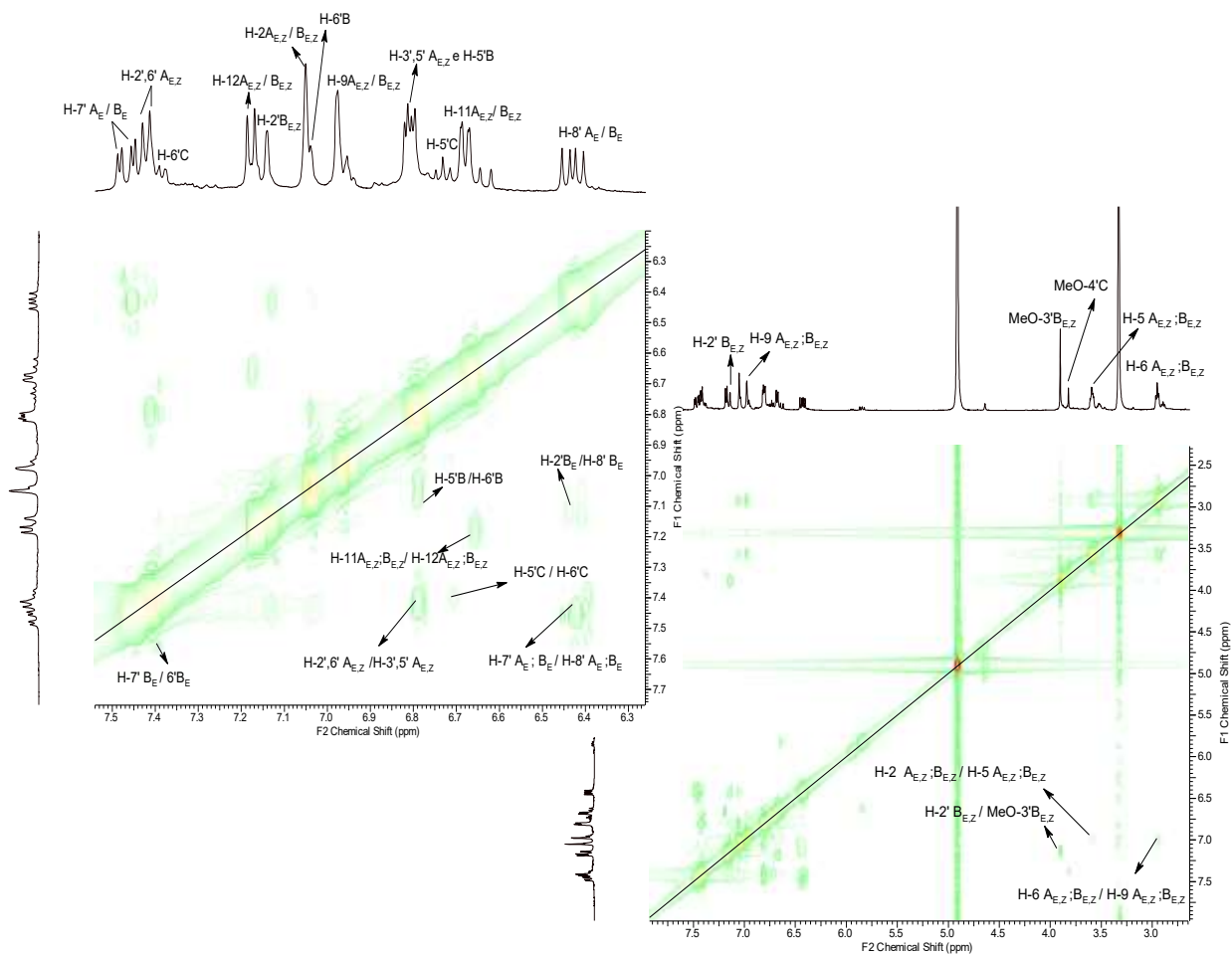
**Espectro 54.** Expansão do RMN <sup>13</sup>C-DEPT-Q de SGAc-4.



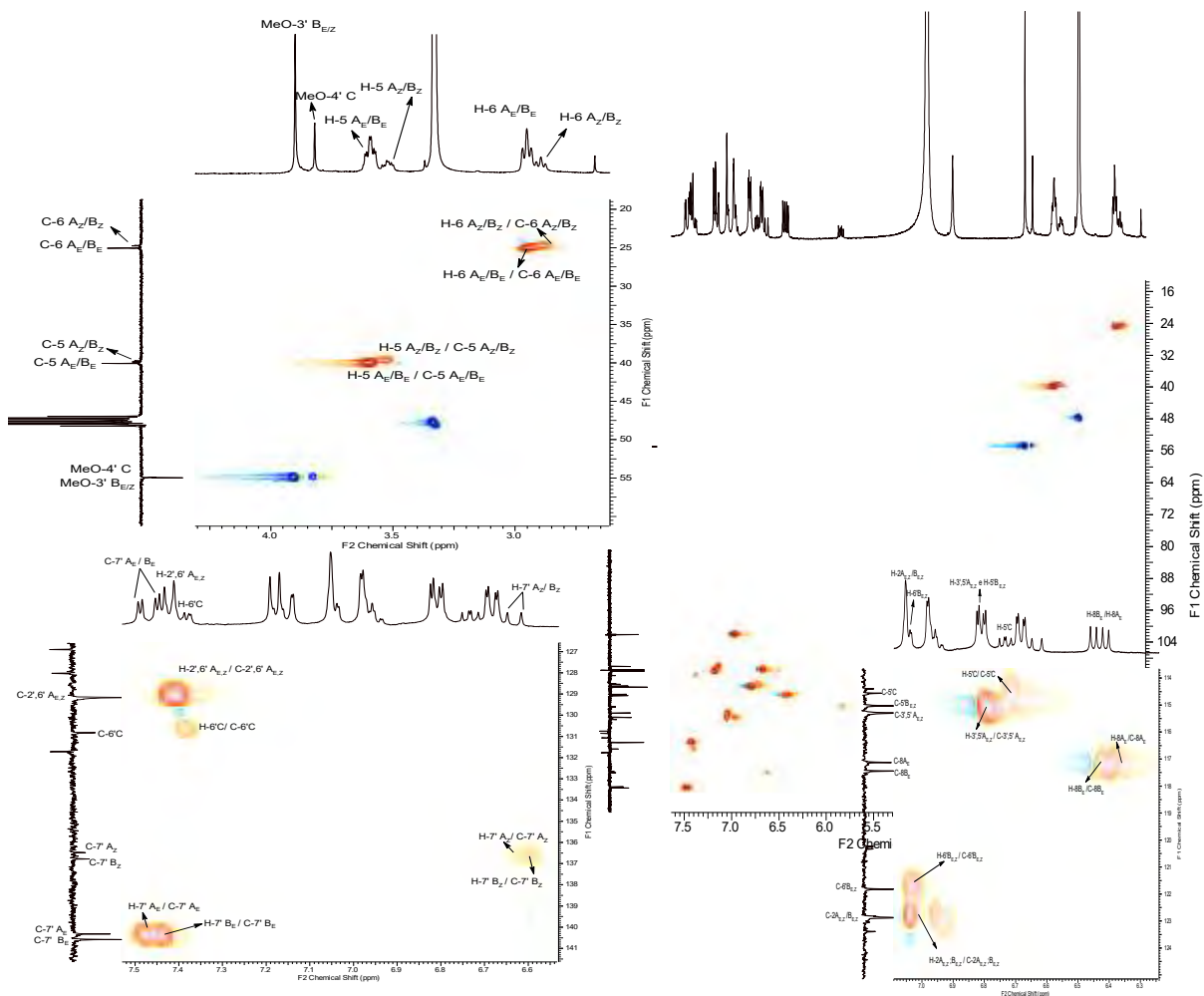
**Espectro 55.** Expansão do RMN <sup>13</sup>C-DEPT-Q de SGAc-4.



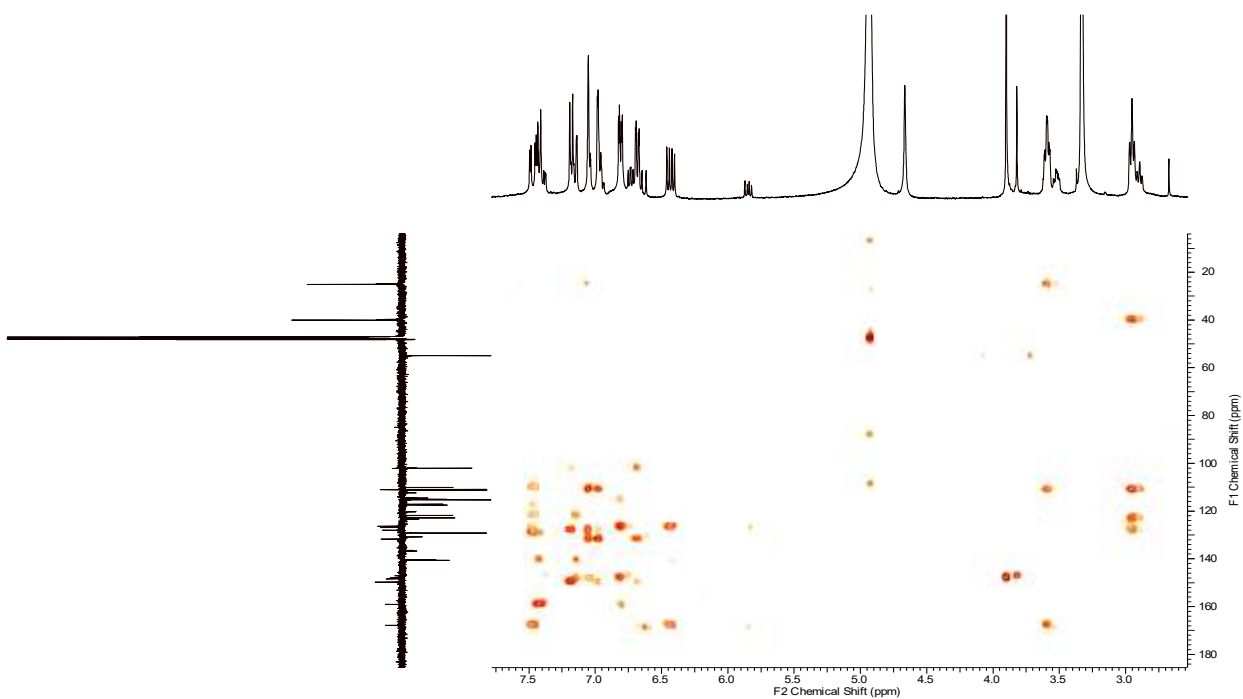
**Espectro 56.** RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) de SGAc-4.



**Espectro 57.** RMN e expansão  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY de SGAc-4.

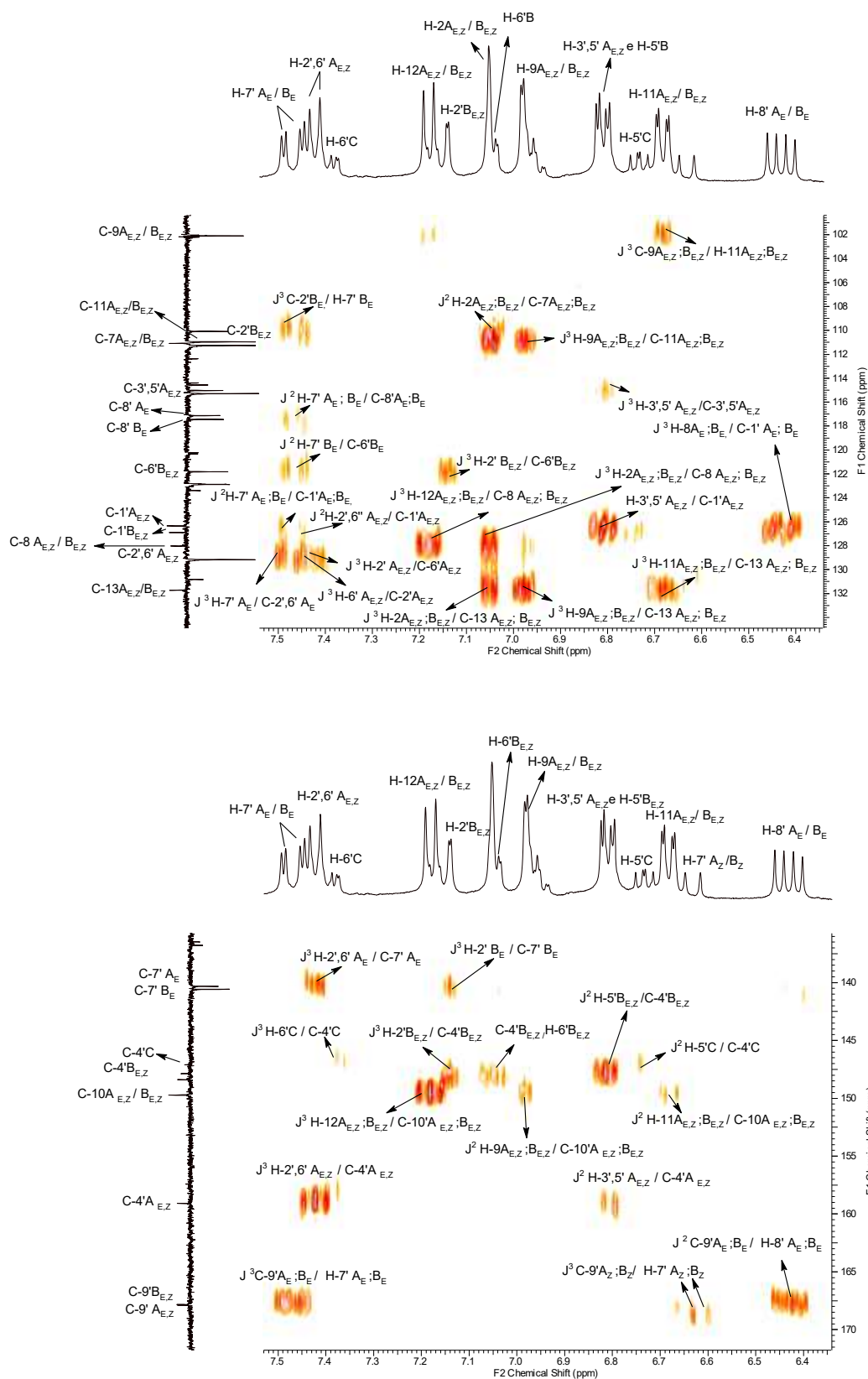


Espectro 58. RMN de HSQC (MeOD) de SGAc-4.



Espectro 59. RMN de HMBC de SGAc-4.

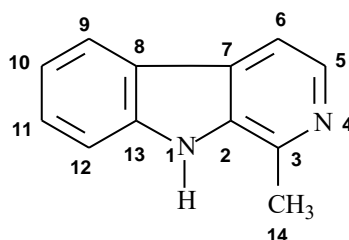




**Espectro 60.** Expansão de HMBC de SGAc-4.

### 3.2.8 Determinação estrutural da SGAc-5

O composto **SGAc-5** foi isolado na forma de um sólido amarelo, solúvel em metanol e determinado pelas técnicas 1D de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ) e 2D COSY, HSQC e HMBC) como o alcaloide Harmana.



**SGAc-5** = Harmana

Através dos dados do espectro de RMN $^1\text{H}$  (Espectro 61) observou-se sinais característicos de um anel aromático *orto*-dissubstituído em  $\delta_{\text{H}}$  8.02 (*d*,  $J=7.8$  Hz, H-9),  $\delta_{\text{H}}$  7.22 (*t*,  $J=7.8$  Hz, H-10),  $\delta_{\text{H}}$  7.51 (*t*,  $J=7.8$  Hz, H-11) e  $\delta_{\text{H}}$  7.55 (*d*,  $J=7.8$  Hz, H-12), correlacionados através de uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ ) no espectro 2D HSQC (Espectro 63) com os sinais de átomos de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  123.23,  $\delta_{\text{C}}$  121.35,  $\delta_{\text{C}}$  130.02 e  $\delta_{\text{C}}$  113.43, respectivamente. O RMN 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, Espectro 63) permitiu identificar claramente as interações de acoplamento dos hidrogênios metínicos H-9 (*d*) com H-10, H-10 (*t*) com H-9 (*d*) e H-11 (*t*) e H-11 (*t*) com H-10 (*t*) e H-12 (*d*) e H-12 (*d*) com H-11 (*t*).

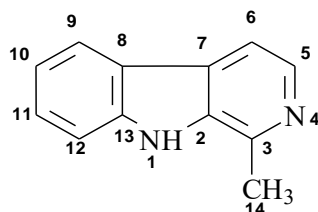
O espectro de RMN $^1\text{H}$  (Espectro 61) revelou também dois dupletos ( $J=5.2$  Hz) em  $\delta_{\text{H}}$  8.12 e 7.87 atribuídos respectivamente aos H-5 e H-6, sendo esta constante de acoplamento plenamente compatível com interação vicinal entre os hidrogênios H-5 e H-6 da unidade piridínica, os quais apareceram correlacionados no HSQC com deslocamentos químicos dos sinais dos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  138.05 (CH-5) e  $\delta_{\text{C}}$  114.68 (CH-6). Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2.77 no espectro de RMN $^1\text{H}$  e  $\delta_{\text{C}}$  20.14 no de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ foram atribuídos grupo metila Me-14, obtendo-se confirmação pela correspondente correlação revelada pelo espectro HSQC.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Espectro 62) apresentou sinais de carbonos não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  143.12, 143.42, 136.73, 130.36 e 123.12, que foram atribuídos átomos de carbono C-13, C-3, C-2, C-7 e C-8, respectivamente, pela análise do 2D HMBC (Tabela 17). Outras correlações heteronucleares a longa distância reveladas pelo espectro HMBC encontram-se descritas na Tabela 17.

A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio e carbono foi realizada contando com contribuição especial dos espectros bidimensionais homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY) e heteronucleares envolvendo uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ , HSQC, Espectro 64) e a longa distância ( $^nJ_{\text{CH}}$ ,  $n=2$  e 3 principalmente, HMBC, Espectro 64).

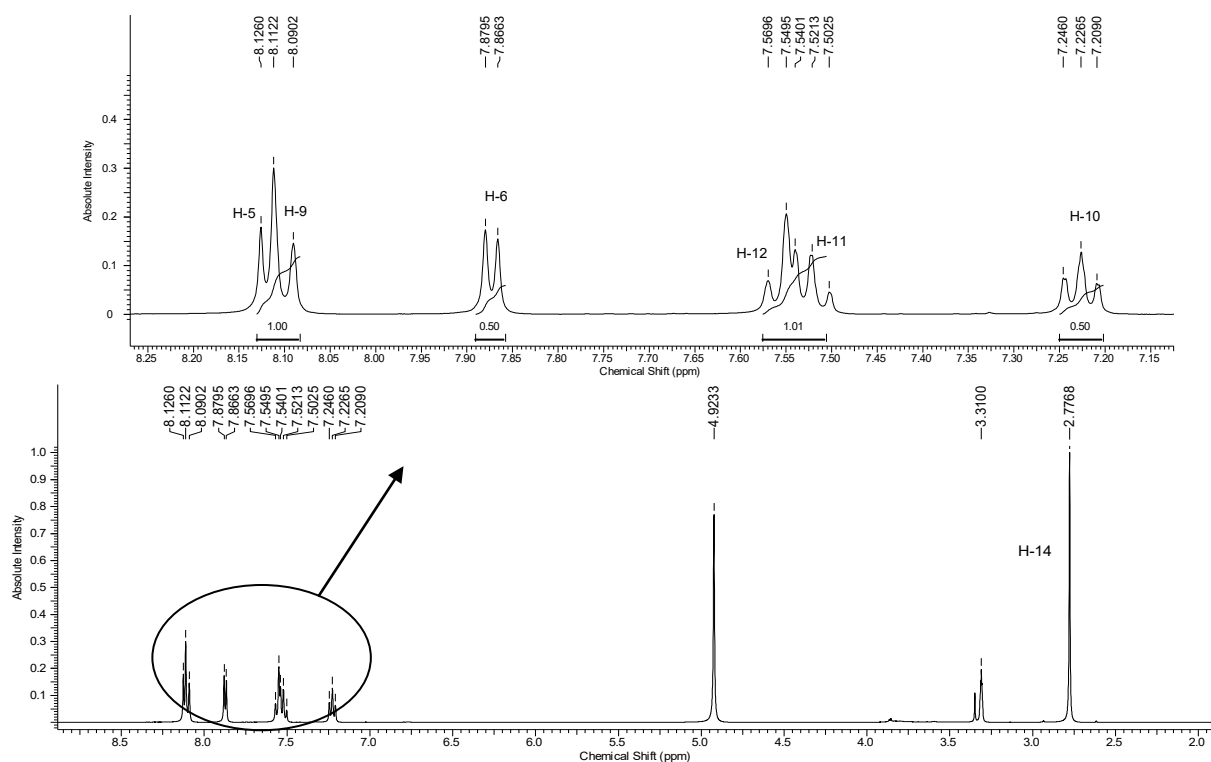
No espectro HMBC (Espectro 64) foram observadas as correlações dos sinais de hidrogênios aromáticos H-10, H-6 e H-12 com o carbono quaternário do anel indólico C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  123.12,  $^3J_{\text{CH}}$ ), H-5 com os carbonos C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  143.42,  $^3J_{\text{CH}}$ ), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  130.36,  $^3J_{\text{CH}}$ ) e CH-6 ( $\delta_{\text{C}}$  114.68,  $^2J_{\text{CH}}$ ), em acordo com a presença de um anel piridínico. Além disso, H-6 correlaciona-se com os carbonos quaternários C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  136.73) e C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  123.12), confirmando-se a ligação do anel piridínico aos carbonos quaternários, C-7 e C-2, do anel indólico. E por fim, ainda observa-se a correlação dos hidrogênios da metila com os carbonos quaternários C-2 e C-3, sugerindo a ligação da metila ao anel piridínico em C-3.

A análise do conjunto destes dados e a comparação com informações da literatura das espécies de *Simira* (ARNASON et al., 1983; ARAUJO et al., 2011 e 2012; CASTANEDA et al., 1991; MOREIRA et al., 2017; FERRAZ, 2017) conduziu à identificação da substância **SGAc-5** como alcaloide Harmana, sendo este o marcador quimiotaxonômico do gênero (BASTOS et al., 2002).

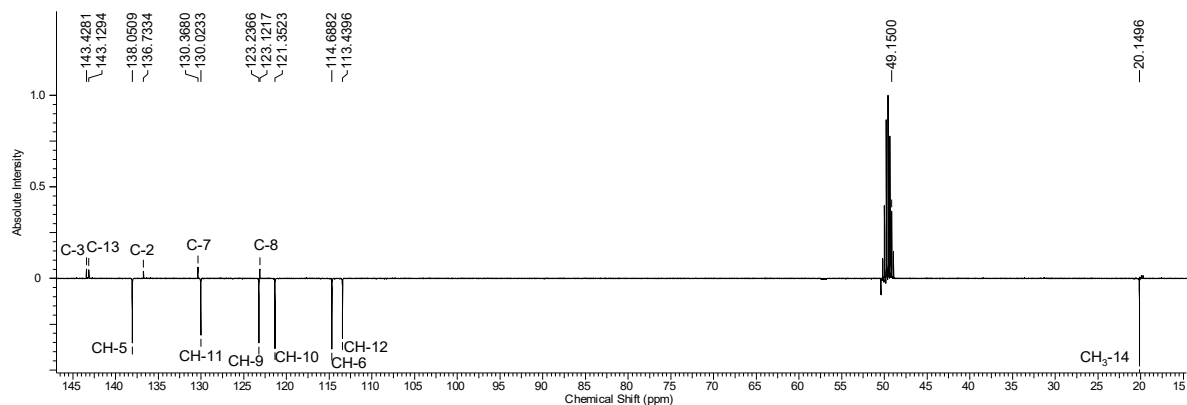


**Tabela 17.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (400 e 120 MHz em MeOD) de SGAc-5, comparados com valores da literatura da harmana (BASTOS et al., 2002). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

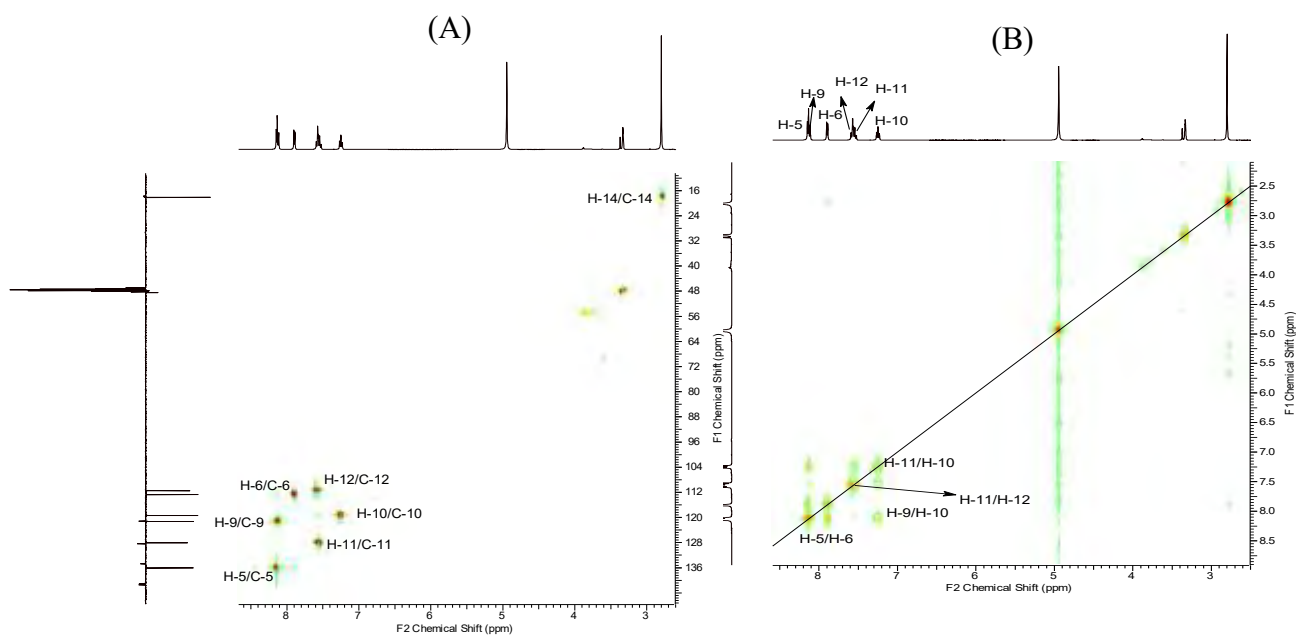
SGAc-5				Harmana		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	136.73	-		H-6; H-14	134.7	-
3	143.42	-	H-5; H-14		141.4	-
7	130.36	-		H-5	128.3	-
8	123.12	-		H-6; H-10; H-12	121.8	-
13	143.12	-	H-12	H-9; H-11	140.8	-
<b>CH</b>						
5	138.05	8.12 ( <i>d</i> , 5.2)			138.3	8.25 ( <i>d</i> , 5.2)
6	114.68	7.87 ( <i>d</i> , 5.2)	H-5		113.4	7.85 ( <i>d</i> , 5.2)
9	123.23	8.02 ( <i>d</i> , 7.8)	H-11		121.8	8.20 ( <i>d</i> )
10	121.35	7.22 ( <i>t</i> , 7.8)	H-11	H-12	120.0	7.20 ( <i>t</i> )
11	130.02	7.51 ( <i>t</i> , 7.8)	H-10	H-9	128.2	7.51 ( <i>t</i> )
12	113.43	7.55 ( <i>d</i> , 7.8)		H-10	111.6	7.59 ( <i>d</i> )
<b>CH<sub>3</sub></b>						
14	20.14	2.77 ( <i>s</i> )			20.3	2.77 ( <i>s</i> )
<b>NH</b>						
	n.d					10.65



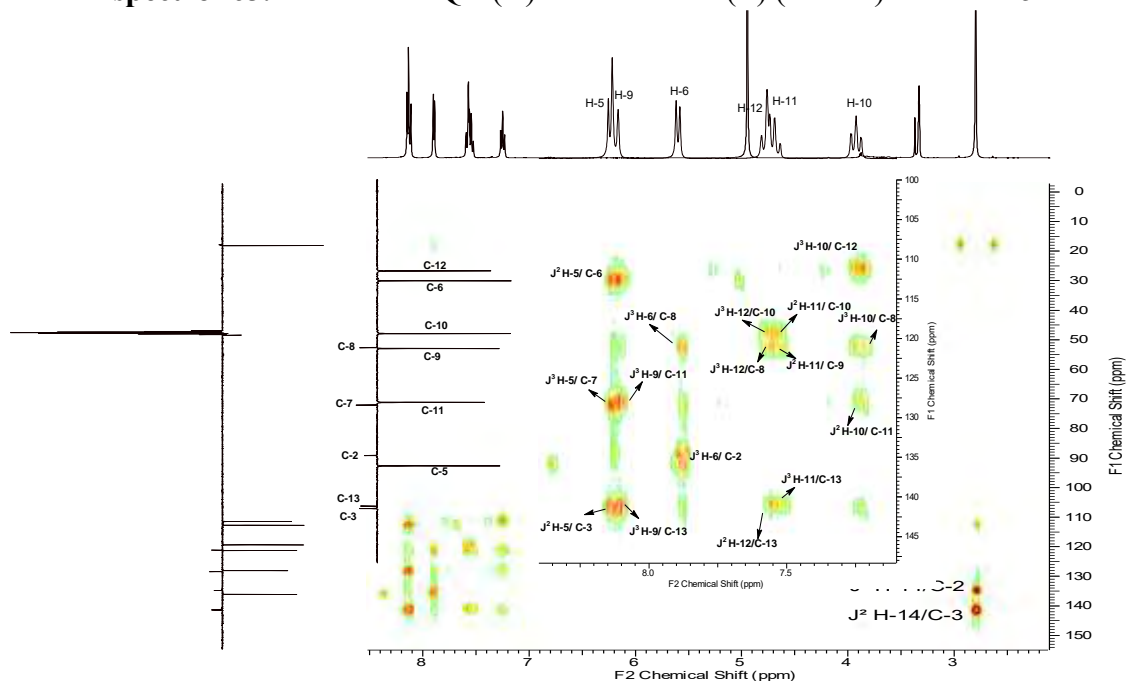
**Espectro 61.** RMN- $^1\text{H}$  e expansão (400 MHz, MeOD) de SGAc-5.



**Espectro 62.** RMN-<sup>13</sup>C-DEPTQ (100 MHz, MeOD) de SGAc-5.



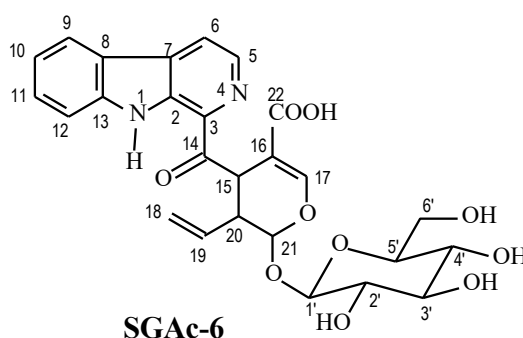
**Espectro 63.** RMN de HSQC (A) e <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY(B) (MeOD) de SGAc-5.



**Espectro 64.** RMN e expansão de HMBC (MeOD) de SGAc-5.

### 3.2.9 Determinação estrutural da substância SGAc-6

A substância **SGAc-6** (5 mg), solúvel em metanol, apresentou-se como sólido amarelo e pelo melhor do nosso conhecimento está sendo descrita agora pela primeira vez na literatura como Ácido desmetilisopauridiantosídico. A estrutura deste metabólito foi caracterizada através da análise dos espectros 1D de RMN ( $^1\text{H}$ , RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ) e 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY, HSQC ( $^1J_{\text{CH}}$ ) e HMBC ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ , principalmente)] e EMAR-IES, envolvendo comparação com dados descritos na literatura para substâncias com estruturas análogas.

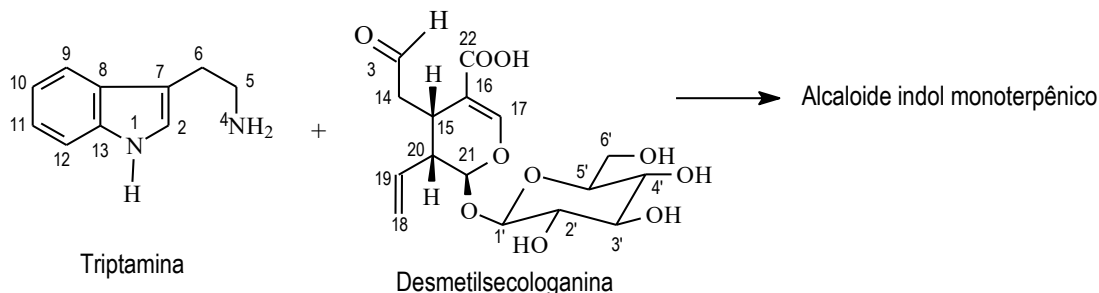


Os espectros de RMH  $^1\text{H}$  (Espectro 65-68) e RMH  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Espectro 69) mostraram sinais (Tabela 18) referentes a um alcaloide  $\beta$ -carbólico glicosilado contendo grupo vinila, tendo o esqueleto estrutural básico semelhante aos alcaloides que estão relatados nessa tese, porém com a aromatização do tetrahidropiridínico e a presença adicional de uma carbonila cetônica (C-14,  $\delta_{\text{C}}$  203.42).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou sinais devido à presença do anel benzeno do sistema indol, com quatro hidrogênios aromáticos: dois dupletos (H-9 e H-12) e dois tripletos (H-10 e H-11) com os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  8.20 (*d*,  $J=7.5$  Hz, H-9), 7.30 (*t*,  $J=7.5$  Hz, H-10), 7.59 (*dd*,  $J=7.5$  e 8.1 Hz, H-11) e 7.70 (*d*,  $J=8.1$  Hz, H-12), correlacionados no espectro 2D HSQC (Espectro 72) com os sinais dos respectivos carbonos  $\text{sp}^2$  metínicos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  121.08 (CH-9), 120.04 (CH-10), 128.64 (CH-11) e 112.16 (CH-12). Os sinais dupletos com  $J=4.7$  Hz em  $\delta_{\text{H}}$  8.50 e 8.26 referentes aos hidrogênios metínicos do anel piridínico H-5 e H-6 apareceram correlacionados no HSQC com os sinais correspondentes em  $\delta_{\text{C}}$  137.14 (CH-5) e 118.49 (CH-6). As interações previstas entre todos estes hidrogênios foram confirmadas no espectro 2D COSY (Espectro 70).

A presença do grupamento vinila terminal foi deduzida pelos sinais atribuídos ao sistema ABX representado pelos hidrogênios H18a, H-18b e H-19 em  $\delta_{\text{H}}$  5.46 (*d*, 17.1 Hz), 5.23 (*d*, 10.6 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5.95 respectivamente. Esses estão correlacionados no espectro HSQC com os sinais de átomos de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  116.15 e 135.69, respectivamente. Os acoplamentos ( $J=17.1$  Hz indicando H-18 interagindo *trans* com H-19 e  $J=10.6$  Hz a *cis*) destes hidrogênios vicinais foram confirmados no  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 70), onde se observou também a interação de H-19 com H-20 ( $\delta_{\text{H}}$  3.56).

O singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7.55 (H-17) e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5.42 (H-21) interagindo no espectro COSY com o em  $\delta_{\text{H}}$  3.56 (H-20), correlacionados no espectro HSQC com os sinais de átomos de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  148.19 (CH-17), 94.25 (CH-21) e 42.90 (CH-20), sinalizaram para a presença da unidade desmetilsecologanina. A presença de sinais referentes ao núcleo indólico e da desmetilsecologanina sugeriram se tratar de alcaloide indol monoterpênico.

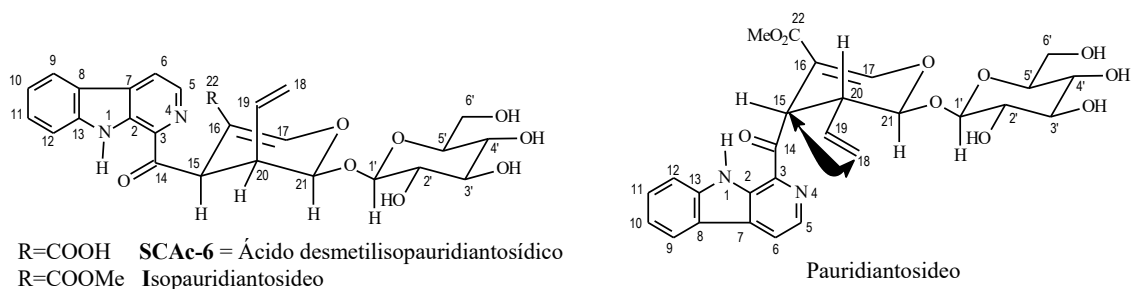


A presença da unidade glicosídica da desmetilsecologanina foi confirmada pelos sinais de CH-1' anomérico ( $\delta_{\text{H}}$  4.65/ $\delta_{\text{C}}$  96.82) e dos carbonos também  $\text{sp}^3$  monooxigenados metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  2.96/ $\delta_{\text{C}}$  73.36 (CH-2'),  $\delta_{\text{H}}$  3.41/ $\delta_{\text{C}}$  75.65 (CH-3'),  $\delta_{\text{H}}$  3.11/ $\delta_{\text{C}}$  69.78 (CH-4') e  $\delta_{\text{H}}$  3.24/ $\delta_{\text{C}}$  76.82 (CH-5') e metilênico em  $\delta_{\text{H}}$  3.74, 3.52/ $\delta_{\text{C}}$  61.00 (CH<sub>2</sub>-6') (Tabela 18). O sinal do hidrogênio anomérico H-1' como um duplete com a constante de acoplamento  $J \approx 8.0$  Hz revelou-se coerente com  $\beta$ -glicose. O espectro 2D de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (Espectro 73-75) revelou interações entre CH-21 ( $\delta_{\text{C}}$  96.25) com H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  4.67,  $^3J_{\text{CH}}$ ) e CH-1' ( $\delta_{\text{C}}$  96.82) com H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  5.42,  $^3J_{\text{CH}}$ ), confirmando a ligação da unidade glicosídeo no carbono cetál CH-21 (Tabela 18). Outras correlações a longa distância adicionais foram descritas na Tabela 18, inclusive as que permitiram a localização carbonila cetônica no carbono 14 através das interações do sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  203.42 (C-14) com os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5.06 (H-15,  $^2J_{\text{CH}}$ ) e 3.50 (H-20,  $^3J_{\text{CH}}$ ).

Os dados espectrais da **SGAc-6** foram comparados com os dos derivados metilados dos isômeros Pauridiantosideo e Isopauridiantosideo (LEVESQUE e JACQUESY, 1983). A comparação dos deslocamentos químicos do carbono  $\text{sp}^2$  quaternário C-22, grupos carboxílico na unidade desmetilsecologanina da **SGAc-6** e carbometoxílico na secologanina presente no dois isômeros usados nesta comparação, revelou a diferença esperada com base nos valores descritos na literatura,  $\delta_{\text{C}}$  173.33 para **SGAc-6** e em torno de  $\delta_{\text{C}}$  167 para os dois isômeros (Tabela 18).

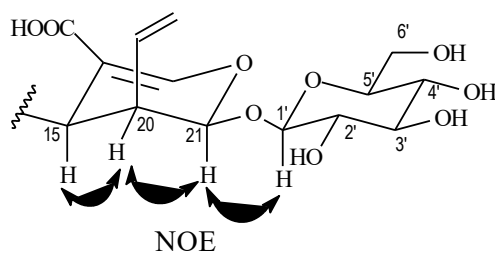
Na determinação da configuração relativa da **SGAc-6** usou-se inicialmente a comparação dos valores dos deslocamentos químicos do CH-15 (Tabela 18) das unidades terpênicas desmetilsecologanina/secologanina:  $\delta_{\text{C}}$  42.94 (**SGAc-6**), 41.64 (Isopauridiantosideo) e 38.99 (Pauridiantosideo). O menor valor observado no deslocamento químico do CH-15 ( $\delta_{\text{C}}$  38.99) da Pauridiantosideo pode ser justificado através do efeito  $\gamma$  (gama) de proteção exercido pelo átomo de carbono do grupo vinila ligado ao CH-20 (Figura 25).

Os sinais dos átomos de hidrogênio H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  5.06) e H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  5.42) foram observados como singletos no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , permitindo, assim, afastar a possibilidade de interação axial-axial destes hidrogênios com H-20, restando como alternativa final a localização de H-20 em posição equatorial, conseqüentemente, o grupo vinila em posição axial. O mesmo não foi observado nos dados dos sinais dos átomos de hidrogênio H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  5.43,  $d$ ,  $J=3.0$  Hz), H-20 ( $\delta_{\text{H}}$  3.53,  $d_{20-21}$ ,  $J=6.5$  Hz) e H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  5.48,  $d_{20-21}$ ,  $J=6.5$  Hz) descritos na literatura para a Pauridiantosideo (LEVESQUE e JACQUESY, 1983), revelando constante de acoplamento ( $J=6.5$  Hz) compatível com a interação axial-axial entre o H-20 e H-21 (Figura 25), sendo  $J=1.8$  Hz interação destes átomos de hidrogênio na Isopauridiantosideo em acordo com interação axial-equatorial (Figura 25).



**Figura 25.** Efeito  $\gamma$  no carbono CH-15 pelo átomo de oxigênio da unidade glicose em Pauridiantosideo.

Além disso, o espectro 2D NOESY da **SGAc-6** (Espectro 71) mostrou as interações espaciais (Figura 26) do hidrogênio H-21 ( $\delta_H$  5.42, *s*) com ambos H-1' ( $\delta_H$  4.65, *d*,  $J=7.6$  Hz devido interação axial-axial com H-2') e H-15 ( $\delta_H$  5.06, *s*), concordando plenamente com tais hidrogênios ocupando posições axiais.



**Figura 26.** Interação espacial (dipolar) dos hidrogênios H-21 com ambos H-15 e H-1' revelada pelo espectro 2D no NOESY.

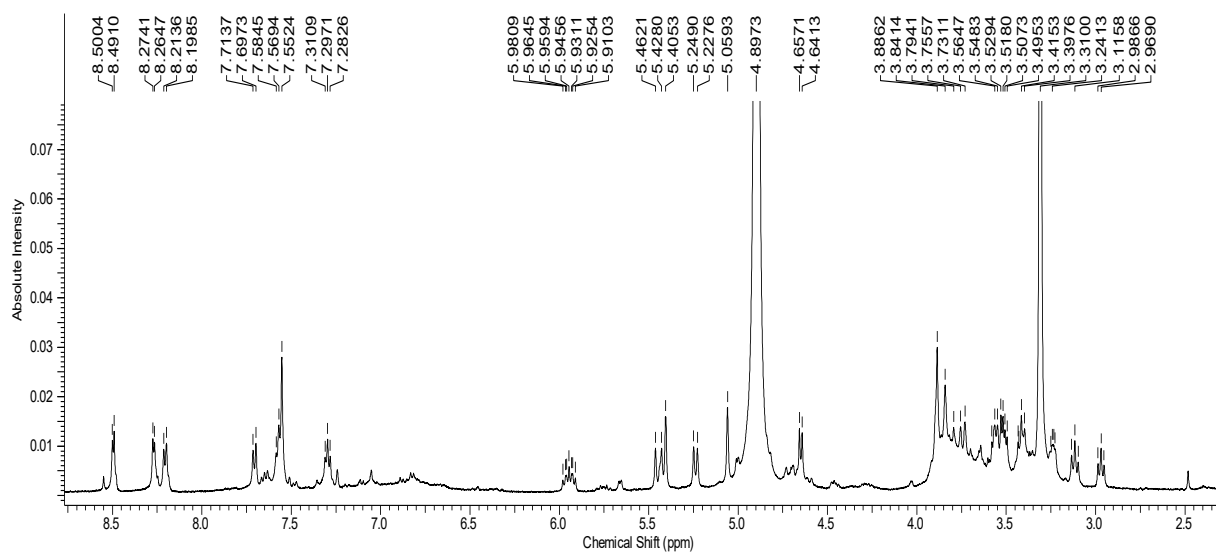
Os sinais dos carbonos não quaternários e quaternários foram atribuídos de forma inequívoca pela correlação entre os espectros de hidrogênio e de carbono pelo HSQC e do HMBC (Espectro 73-75), respectivamente, permitindo assim afirmar que a literatura fez atribuição invertida dos carbonos C-7 e C-13.

Todos os dados espectrais da **SGAc-6**, envolvendo comparação com informações da literatura (LEVESQUE e JACQUESY, 1983), permitiram deduzir a proposta estrutural e a caracterização como Ácido desmetilisopauridiantosídico.

A CLUE-EM da **SGAc-6** forneceu cromatograma (Figura 27) com predominância do componente com tempo de retenção de 6.78 min, que forneceu o espectro de massas EMAR-IES (Espectro 76) compatível com a possibilidade estrutural do ácido desmetilisopauridiantosídico. Este espectro permitiu deduzir o íon molecular  $m/z$  526.1587 ( $[M]^+$ ) e a fórmula molecular  $C_{26}H_{26}N_2O_{10}$  através do pico quase molecular em  $m/z$  527.1686 ( $[M+H]^+$ ) dos picos registrados no modo positivo em  $m/z$  ( $C_{26}H_{27}N_2O_{10}$ , calc.  $m/z$  527.1666). As propostas de fragmentação para justificar os principais os picos do espectro de massas **SGAc-6** foram resumidas no Esquema 14.

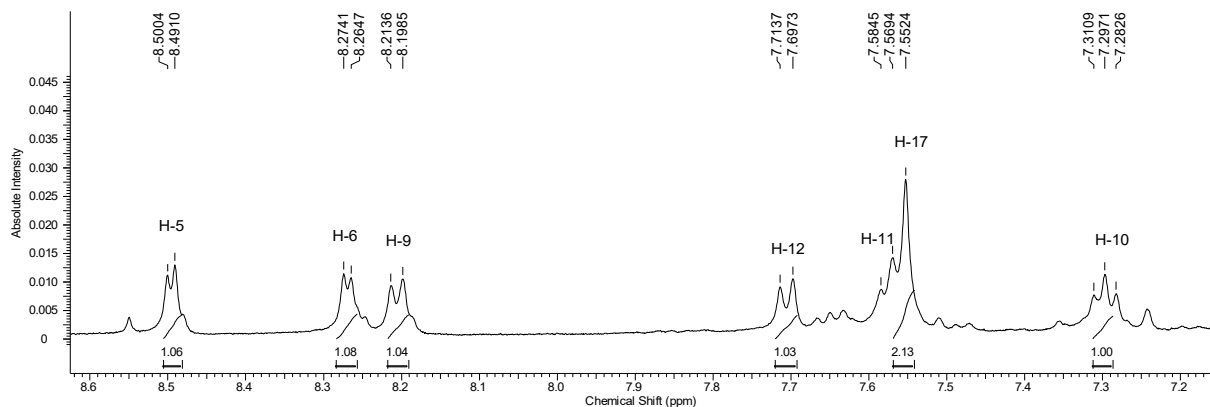
**Tabela 18.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGAc-6, comparados com valores da literatura do Pauridiantosideo e Isopauridiantosideo (LEVESQUE e JACQUESY, 1983). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult., J (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

SGAc-6				Pauridiantosideo		Isopauridiantosideo		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	135.39	-		H-6	135.36	-	135.36	-
3	133.15	-		H-5	141.09	-	141.71	-
7	131.74	-		H-5;H-9	120.52	-	120.62	-
8	120.40	-		H-6; H-9; H-12	131.32	-	131.67	-
13	141.84	-		H-9; H-11	135.02	-	134.79	-
14	203.42	-	H-15	H-20	201.78	-	199.45	-
16	110.89	-	H-15;17	H-20	108.96	-	106.51	-
<b>22</b>	<b>173.33</b>	-		H-17; H-15	<b>167.00</b>	-	<b>167.29</b>	-
<b>CH</b>								
5	137.14	8.50 ( <i>d</i> , 4.7)	H-6		138.21	8.54 (5.0)	137.52	8.46 (5.0)
6	118.49	8.26 ( <i>d</i> , 4.7)	H-5		116.04	8.12 (5.0)	121.71	8.11 (5.0)
9	121.08	8.20 ( <i>d</i> , 7.5)		H-11	119.03	8.12 (8.0)	118.79	8.13 (8.0)
10	120.04	7.30( <i>t</i> , 7.5)	H-9	H-12	120.52	7.24 (8.0)	120.41	7.30 (8.0)
11	128.64	7.59 ( <i>dd</i> , 7.5, 8.1)		H-9	129.05	7.52 (8.0)	129.12	7.60 (8.0)
12	112.16	7.70 ( <i>d</i> , 8.1)		H-10	112.12	7.52 (8.0)	112.59	7.70
<b>15</b>	<b>42.94</b>	5.06 ( <i>s</i> )	H-20	H-17; H-19	<b>38.99</b>	5.44 (3.0)	<b>41.64</b>	4.90 (1.0)
17	148.19	7.55 ( <i>s</i> )		H-21	150.89	7.58 (3.0)	151.21	7.68
19	135.69	5.95 ( <i>m</i> )	H-18;H20	H-15; H-21	132.53	5.56 (9.5)	134.79	5.86 (7.5)
20	42.90	3.56	H-19;H15	H-18	42.42	3.53 (6.5)	41.39	3.61 (7.5)
21	94.25	5.42 ( <i>s</i> )		H-1'; H-17; 19;15	95.82	5.48 (6.5)	95.04	5.28 (1.8)
<b>CH<sub>2</sub></b>								
18	116.15	5.46 ( <i>d</i> , 17.1) 5.23 ( <i>d</i> , 10.6)			119.55	4.96 (17.5) 4.63 (10.0)	118.13	5.45 (17.5) 5.28 (10.5)
<b>CH<sub>3</sub></b>								
23	55.04	3.86			51.40	3.68	51.64	3.69
<b>Açúcar</b>								
1'	96.82	4.65 ( <i>d</i> , 7.6)	H-2'	H-21	95.94	4.96 (7.0)	95.28	4.86 (8.0)
2'	73.36	2.96 ( <i>dd</i> , 7.6 8.9)	H-1'		70.69	5.08	70.52	4.70 (8.0)
3'	75.65	3.41 ( <i>t</i> , 8.9)	H-2';H-4'	H-1'	72.61		73.47	5.10 (9.3)
4'	69.78	3.11 ( <i>t</i> , 8.9)	H-3'		68.18	5.34	67.73	4.90 (9.4)
5'	76.82	3.24 ( <i>m</i> )	H-4'	H-1'	72.28	3.76 (4.0)	72.28	3.60 (9.7)
6'	61.00	3.74( <i>dl</i> ,12.3) 3.52( <i>dd</i> ,12.3,5.0)		H-4'	61.71	4.34 (12.0) 1.92 (1.0)	61.69	4.34 (12.5) 3.97 (2,3)

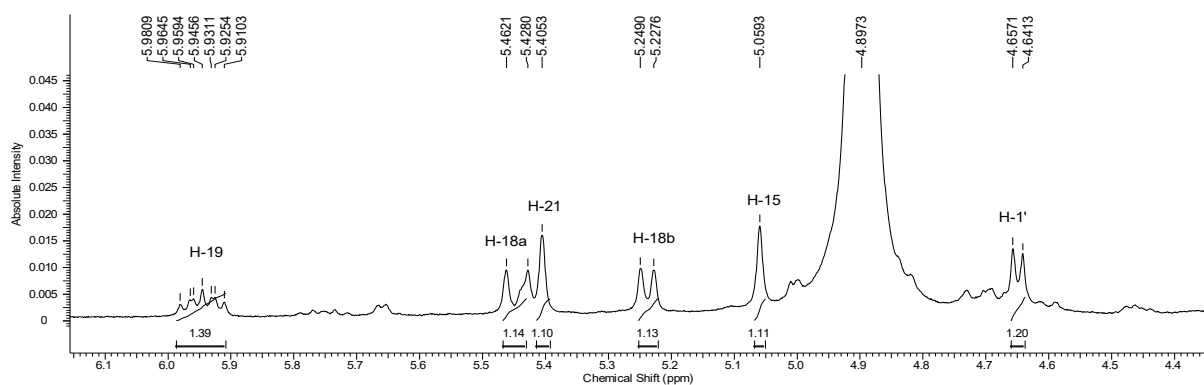


**Espectro 65.** RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de SGAc-6.

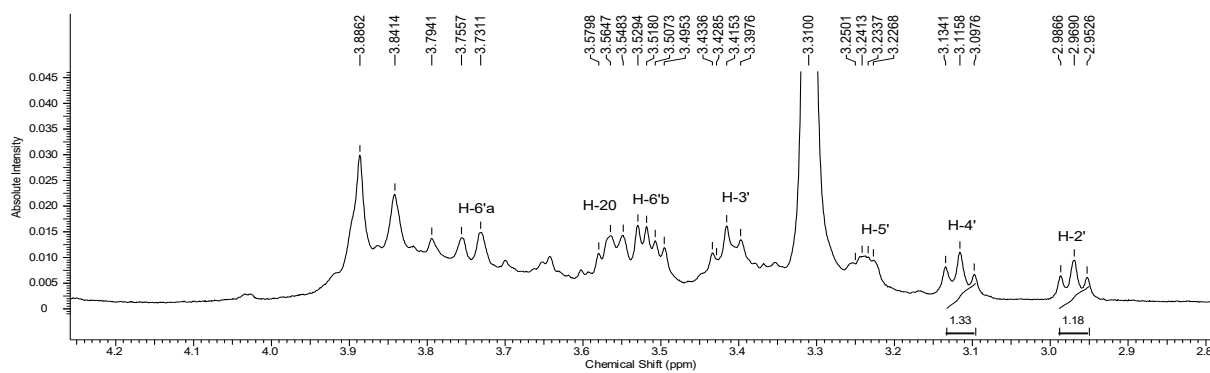




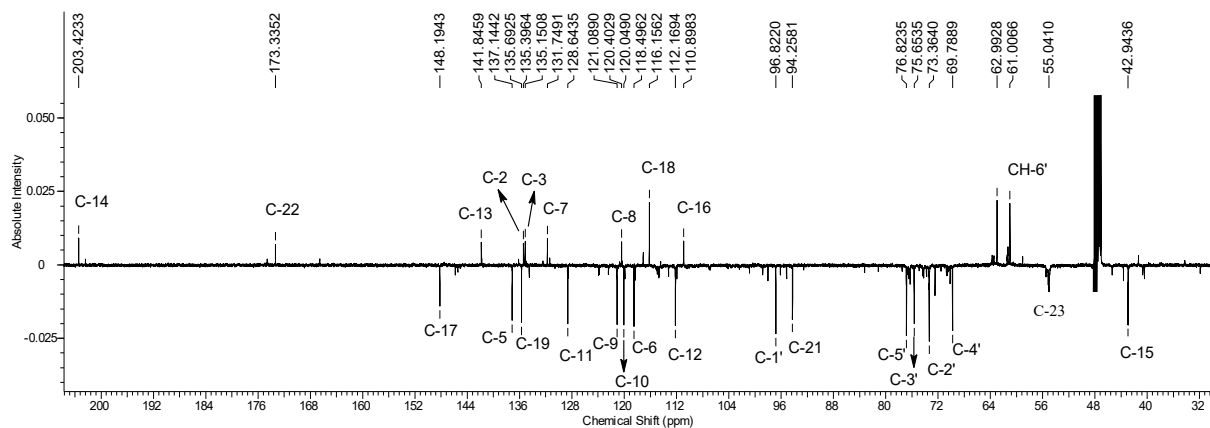
**Spectro 66.** Expansão do RMN  $^1\text{H}$  de SGAc-6.



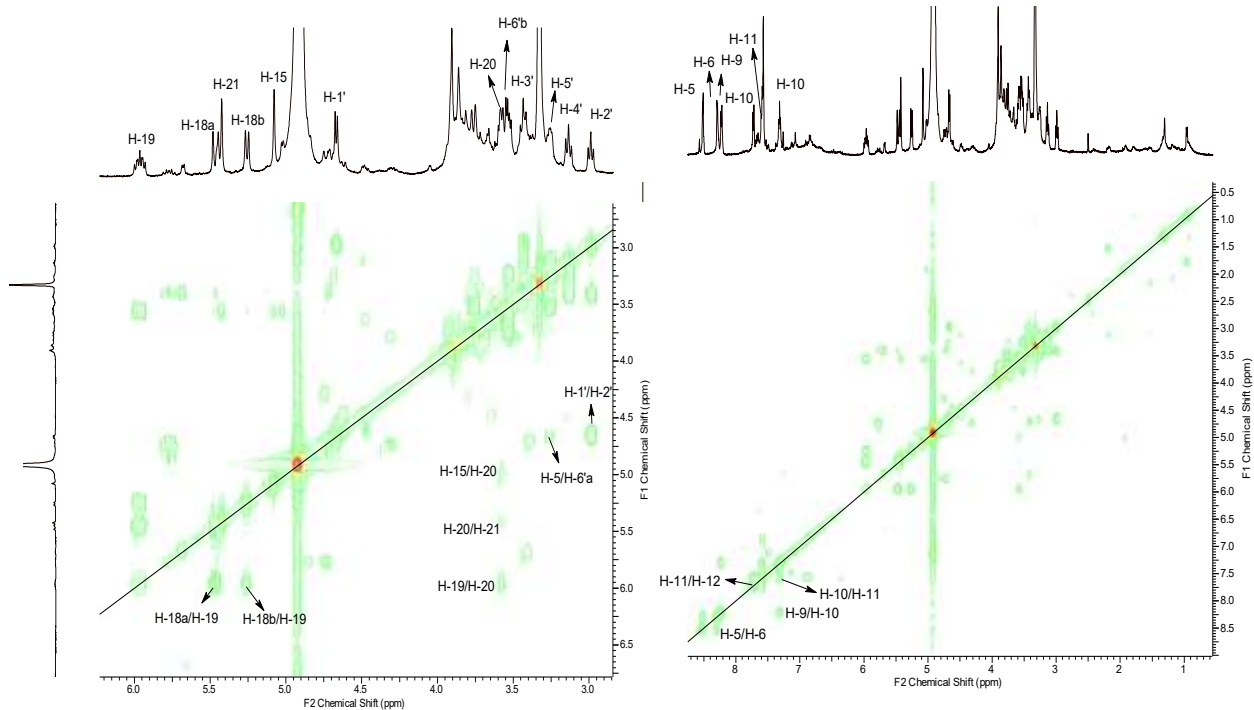
**Spectro 67.** Expansão do RMN  $^1\text{H}$  de SGAc-6.



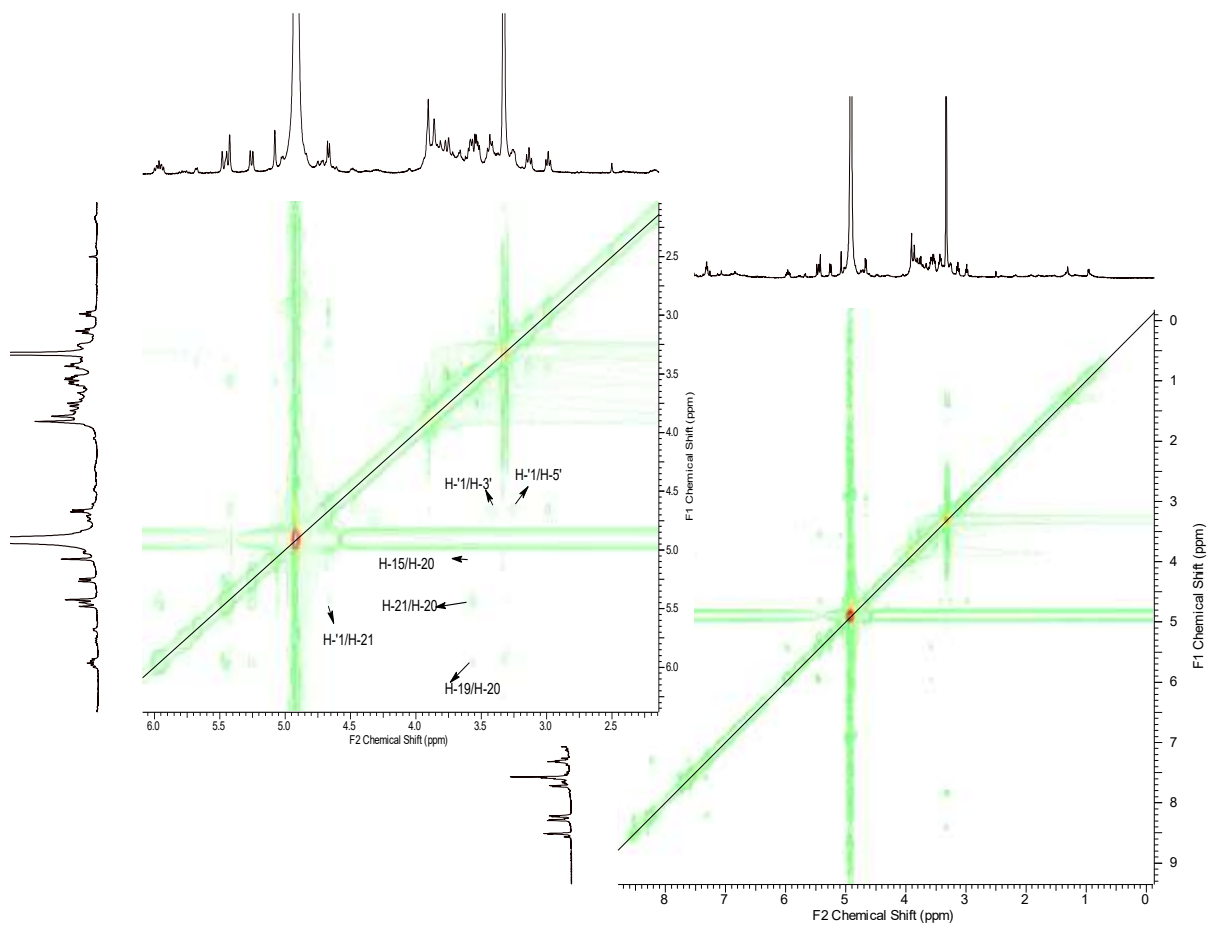
**Spectro 68.** Expansão do RMN  $^1\text{H}$  de SGAc-6.



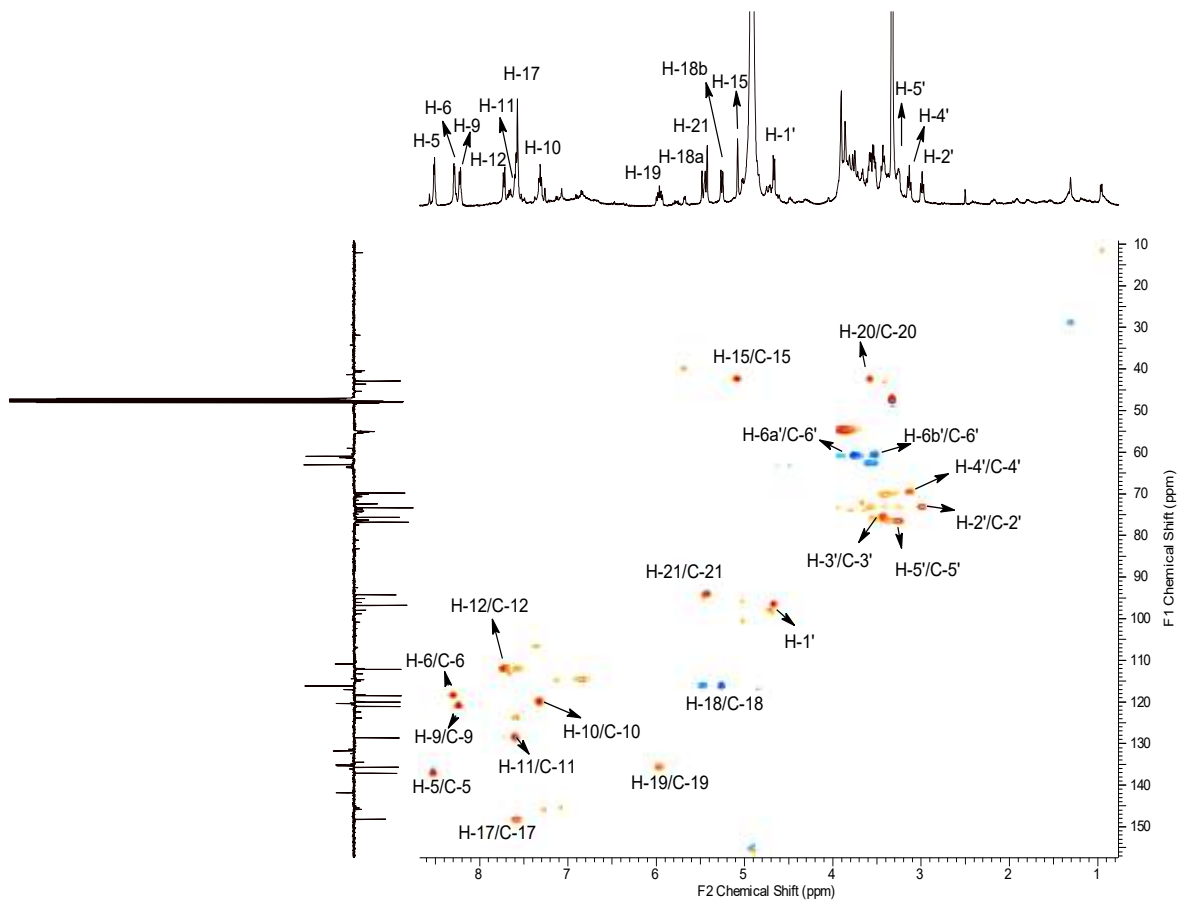
**Spectro 69.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGAc-6.



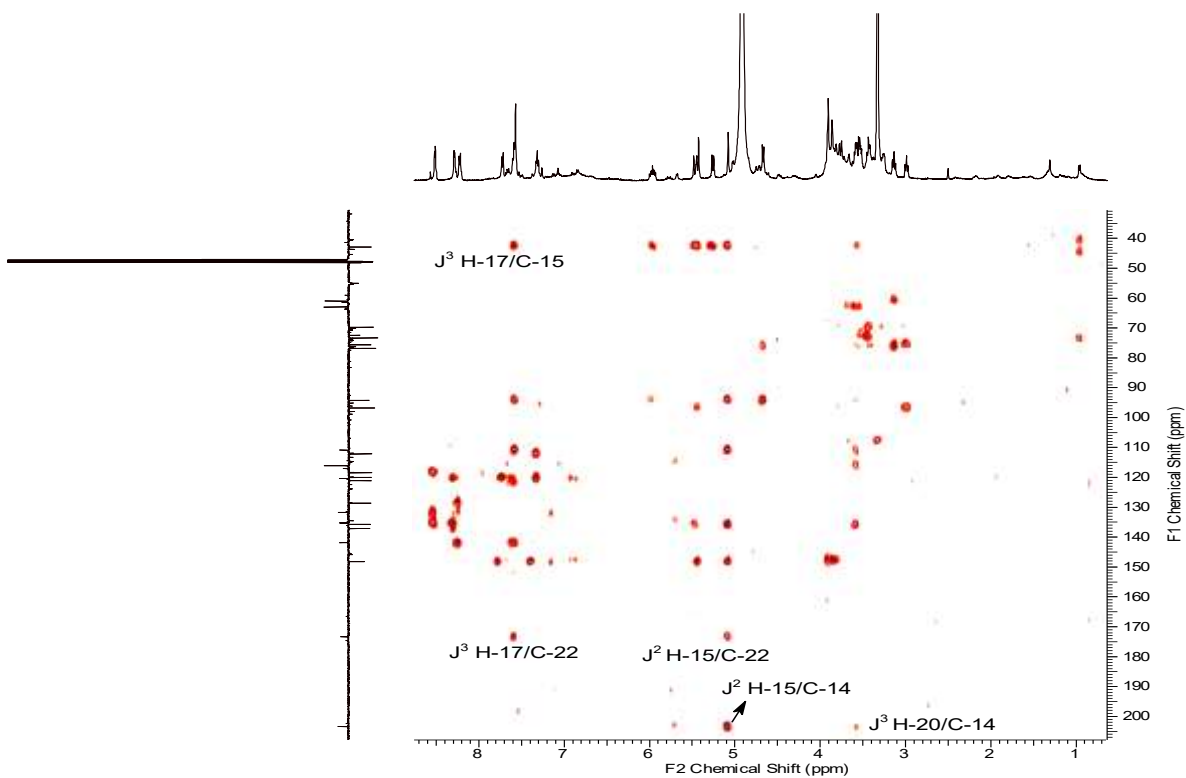
**Espectro 70.** RMN e expansão do  $^{-1}\text{H-}^1\text{H-COSY}$  (MeOD) de SGAc-6.



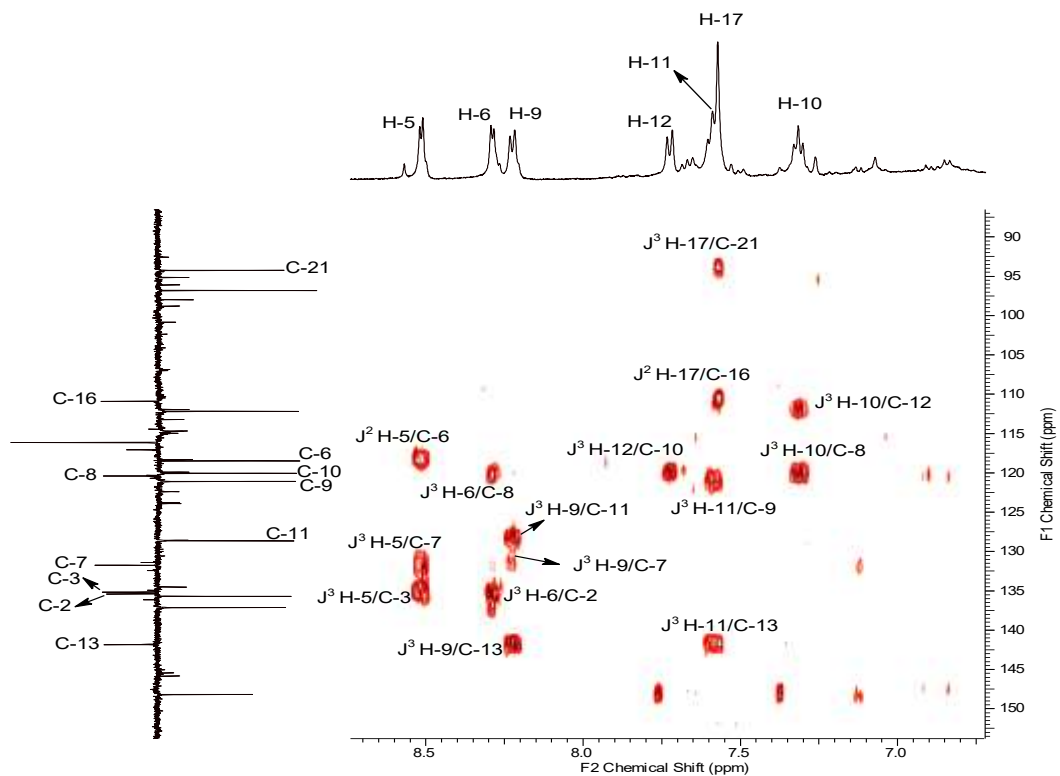
**Espectro 71.** RMN  $^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$  (MeOD) de SGAc-6.



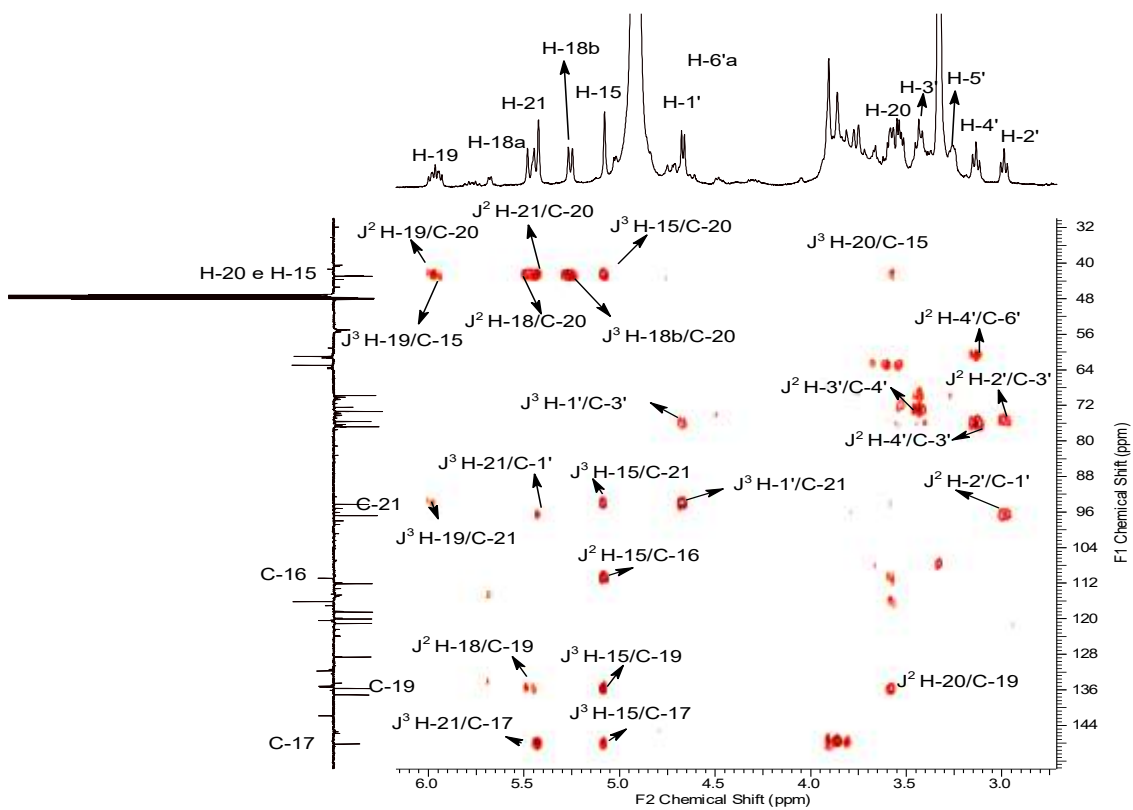
**Espectro 72.** RMN de HSQC (MeOD) de SGAc-6.



**Espectro 73.** RMN de HMBC de SGAc-6.



**Spectro 74.** Expansão do HMBC de SGAc-6.



**Spectro 75.** Expansão do HMBC de SGAc-6.

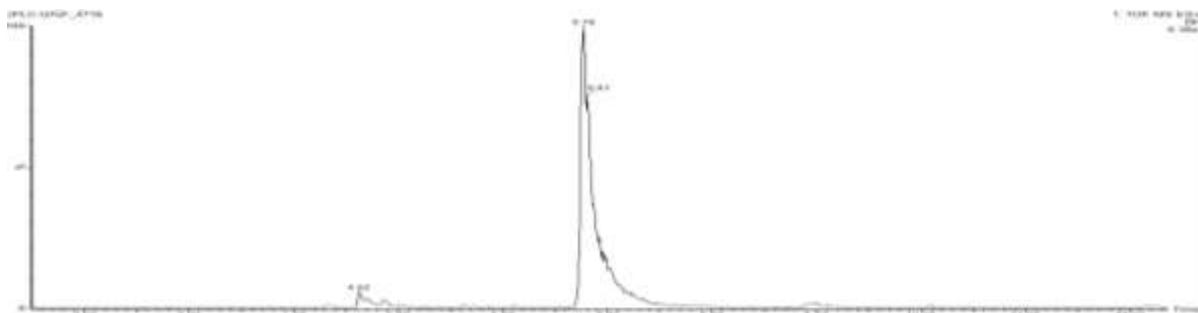
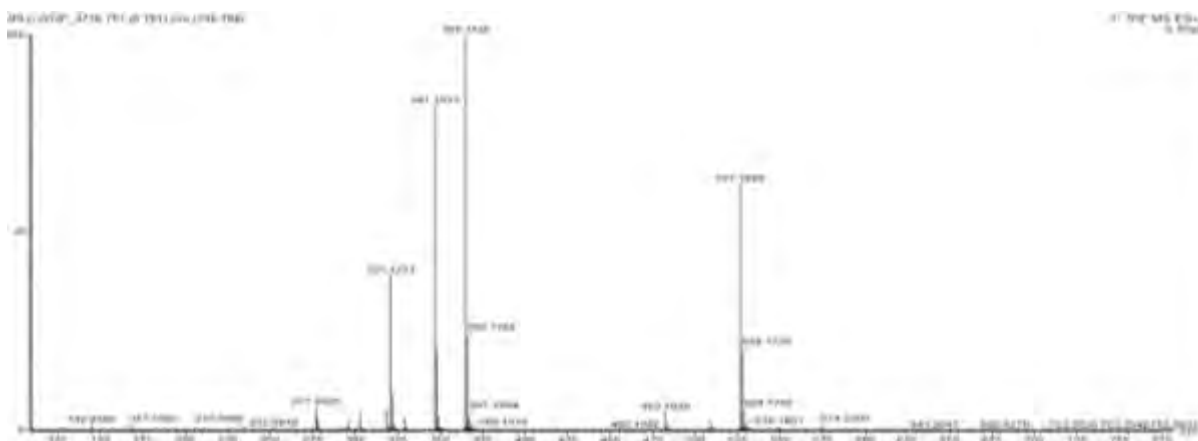
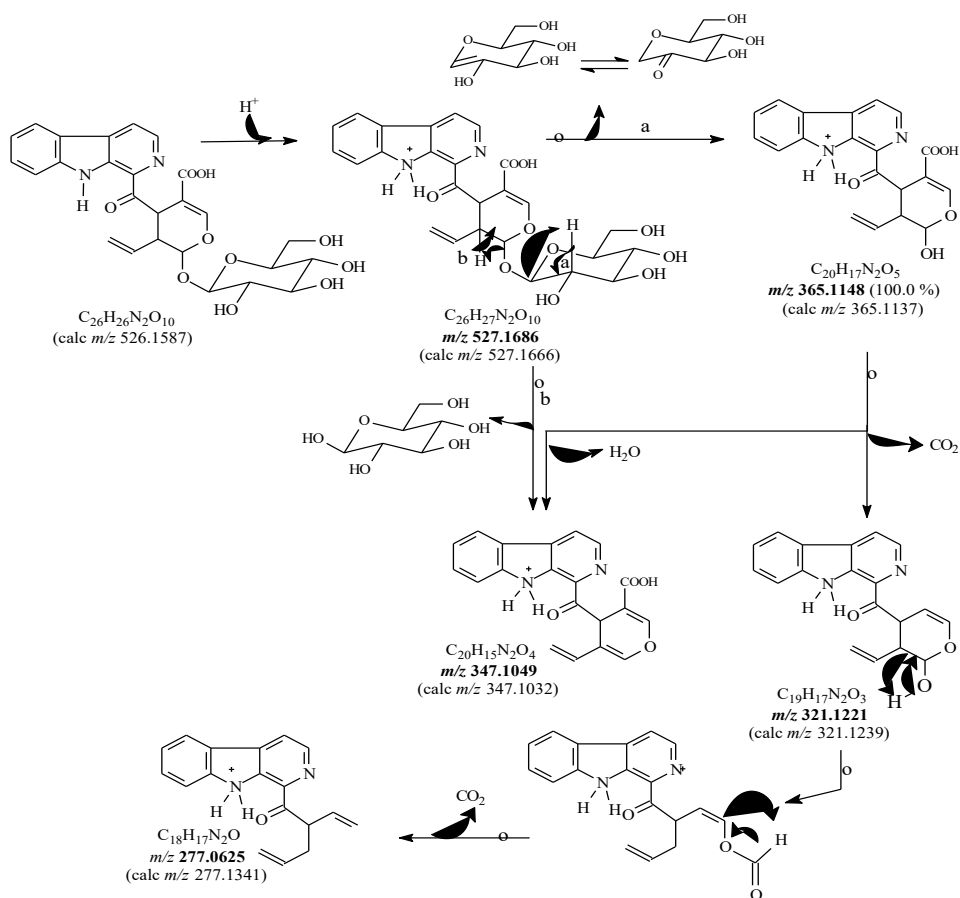


Figura 27. Cromatograma por CLUE de SGAc-6.



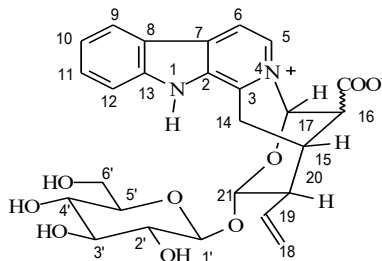
Espectro 76. EM-IES  $[M+H]^+$  de SGAc-6.



Esquema 14. Estruturas dos picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de SGAc-6.

### 3.2.10 Determinação estrutural da substância SGB-1

A substância **SGB-1** (30 mg) apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol. Esse metabólito foi identificado através da análise dos espectros 1D de RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ) e 2D (HSQC) e EMAR-IES como o alcaloide Ofiorina B.



**SGB-1**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 77) mostrou sinais de seis hidrogênios na região de aromáticos referente à unidade  $\beta$ -carbólica do alcaloide indólico. A análise desse espectro juntamente com de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 78) conduziu também ao grupo vinila, reconhecido pelos sinais dos carbonos  $\text{sp}^2$  metilênico  $\text{CH}_2$ -18 ( $\delta_{\text{C}}$  119.95/  $\delta_{\text{H}}$  5.45 e 5.40) e metínico CH-19 ( $\delta_{\text{C}}$  136.23/ $\delta_{\text{H}}$  6.00).

A unidade de glicose foi proposta através dos sinais dos átomos de carbono  $\text{sp}^3$  oxigenados metínicos CH-1'-anômérico [ $\delta_{\text{C}}$  100.78/ $\delta_{\text{H}}$  4.47 (*d*, 8.0 Hz, H-1' em posição axial)], CH-2' ( $\delta_{\text{C}}$  75.04/ $\delta_{\text{H}}$  3.11), CH-3' ( $\delta_{\text{C}}$  78.32/ $\delta_{\text{H}}$  3.15), CH-4' [ $\delta_{\text{C}}$  72.07/ $\delta_{\text{H}}$  3.09] e CH-5' ( $\delta_{\text{C}}$  78.63/ $\delta_{\text{H}}$  3.02) e o metilênico  $\text{CH}_2$ -6' [ $\delta_{\text{C}}$  63.06/ $\delta_{\text{H}}$  3.63 e  $\delta_{\text{H}}$  3.17].

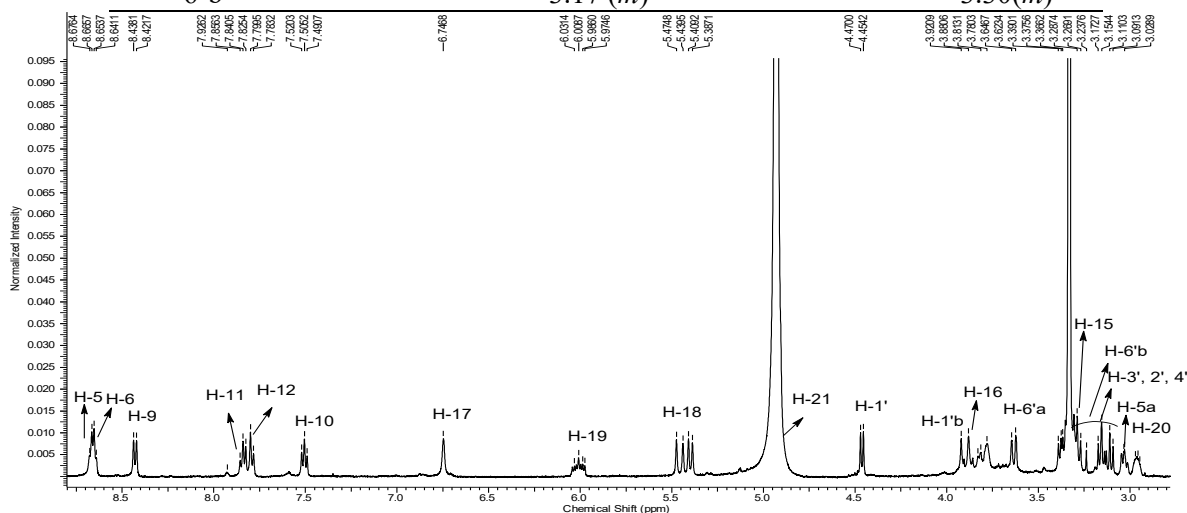
A comparação destes dados com valores registrados na literatura (BASTOS et al., 2002) para alcaloides  $\beta$ -carbólicos glicosilados contendo grupo vinila, permitiu reconhecer a presença de sinais adicionais nos dados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , que foram confirmados através de acoplamento heteronuclear via uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ ) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  revelados pelo espectro 2D HSQC (Espectro 79). Os sinais referentes aos carbonos CH-20, CH-16 e CH-15 foram observados em  $\delta_{\text{C}}$  48.94/ $\delta_{\text{H}}$  2.97,  $\delta_{\text{C}}$  46.92/ $\delta_{\text{H}}$  3.78 e  $\delta_{\text{C}}$  31.55/ $\delta_{\text{H}}$  3.23, respectivamente. Os sinais dos átomos de hidrogênio e carbono CH-21 ligado a dois átomos de oxigênio ( $\delta_{\text{C}}$  96.43/ $\delta_{\text{H}}$  4.82) e CH-17 ligado a oxigênio e nitrogênio ( $\delta_{\text{C}}$  89.40/ $\delta_{\text{H}}$  6.74) revelaram os deslocamentos químicos como previstos. Todos estes dados espectrais de RMN revelaram-se compatíveis com os descritos na literatura para o alcaloide Ofiorina B (Tabela 19).

O espectro EMAR-IES (Espectro 80) revelou pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  513.1906 ( $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_9$ , calc.  $m/z$  513.1873). Os principais picos adicionais observados no espectro em  $m/z$  469.2016, 351.1363, 333.1278, 307.1427, 263.0854 e 182.0864, entre outros, foram justificados através de reações de fragmentação postuladas resumidamente no Esquema 15, confirmando a presença do grupo  $\text{COO}^-$ , as unidades glicosídica e  $\beta$ -carbólica indólica revelando-se, assim, em pleno acordo com estrutura da Ofiorina B.

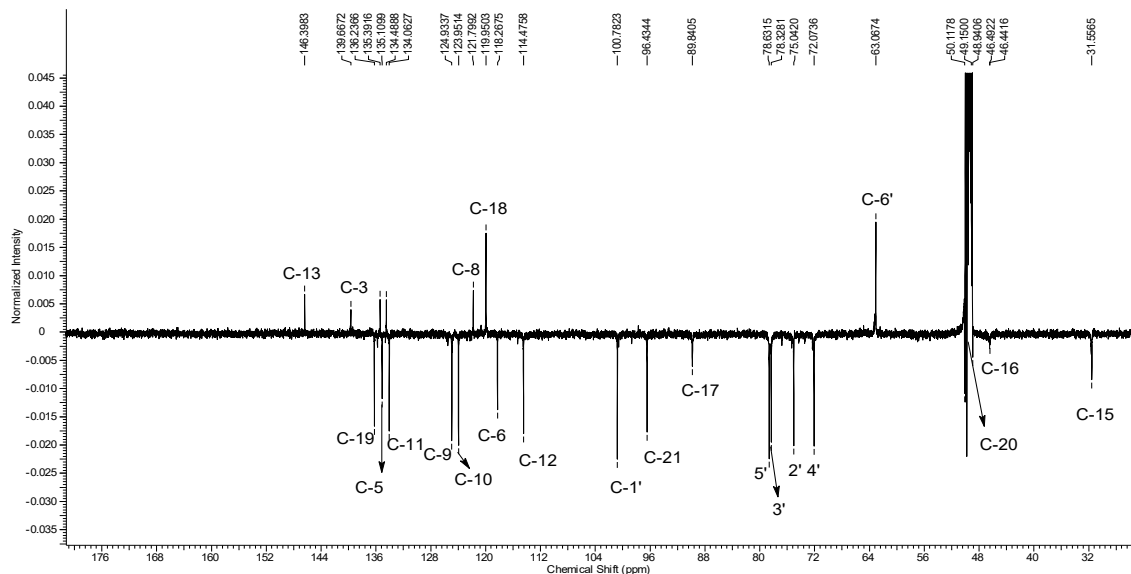
Esse alcaloide já foi identificado nas espécies de *Simira glaziovvi*, *Simira tinctoria* e *Simira williamssi*. (AQUINO et al., 1994 ; BASTOS et al., 2002).

**Tabela 19.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGB-1, comparados com valores da literatura da ofiorina B (BASTOS et al., 2002). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm), nd= não identificado.

SGB-1			Ofiorina B	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	135.39	-	135.9	-
3	139.66	-	138.8	-
7	134.48	-	130.2	-
8	121.79	-	119.2	-
13	146.39	-	144.1	-
22	n.d	-	175.6	-
<b>CH</b>		-		
5	135.10	8.67 ( <i>d</i> , 6.3)	133.3	8.60 ( <i>d</i> , 6.8)
6	118.26	8.65 ( <i>d</i> , 6.3)	118.0	8.30 ( <i>d</i> , 6.8)
9	124.93	8.43 ( <i>d</i> , 8,2)	123.4	8.10 ( <i>d</i> , 8.0)
10	123.95	7.50 ( <i>t</i> , 7.5)	122.7	7.10 ( <i>t</i> , 8.0)
11	134.06	7.70 ( <i>t</i> , 7.5)	132.6	7.40 ( <i>t</i> , 8.0)
12	114.47	7.79 ( <i>d</i> , 8.2)	113.3	7.60 ( <i>d</i> , 8.0)
15	31.55	3.23 ( <i>m</i> )	31.0	3.0 ( <i>m</i> )
16	46.92	3.78	46.6	3.30
17	89.40	6.74 ( <i>sl</i> )	89.0	6.60 ( <i>sl</i> )
19	136.23	6.00 ( <i>m</i> )	134.7	5.70 ( <i>dd</i> )
20	48.94	2.97 ( <i>m</i> )	47.6	2.80 ( <i>m</i> )
21	96.43	4.82	94.2	4.60 ( <i>d</i> , 9.6)
<b>CH<sub>2</sub></b>				
14	n.d	n.d	24.0	3.50
18	119.95	5.45 ( <i>d</i> , 17.2)	120.9	5.30 ( <i>d</i> , 17.2)
		5.40 ( <i>d</i> , 11.0)		5.20 ( <i>d</i> , 10.8)
<b>Açúcar</b>				
1'	100.78	4.47 ( <i>d</i> , 8.0)	99.7	4.4 ( <i>d</i> , 8.8)
2'	75.04	3.11	73.5	2.9 ( <i>t</i> , 8.8)
3'	78.32	3.15	76.6	3.10 ( <i>m</i> )
4'	72.07	3.09	69.8	3.00 ( <i>m</i> )
5'	78.63	3.02 ( <i>m</i> )	77.0	2.80( <i>m</i> )
6'a	63.06	3.63 ( <i>m</i> )	60.6	3.50( <i>m</i> )
6'b		3.17 ( <i>m</i> )		3.30( <i>m</i> )

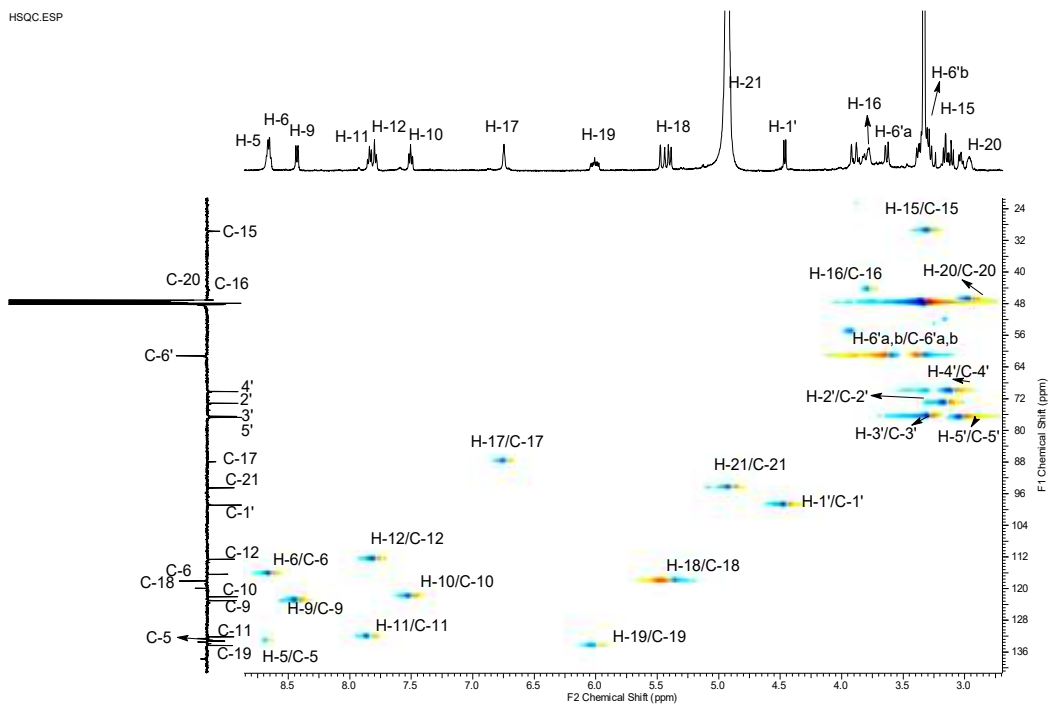


**Espectro 77.** RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) de SGB-1.

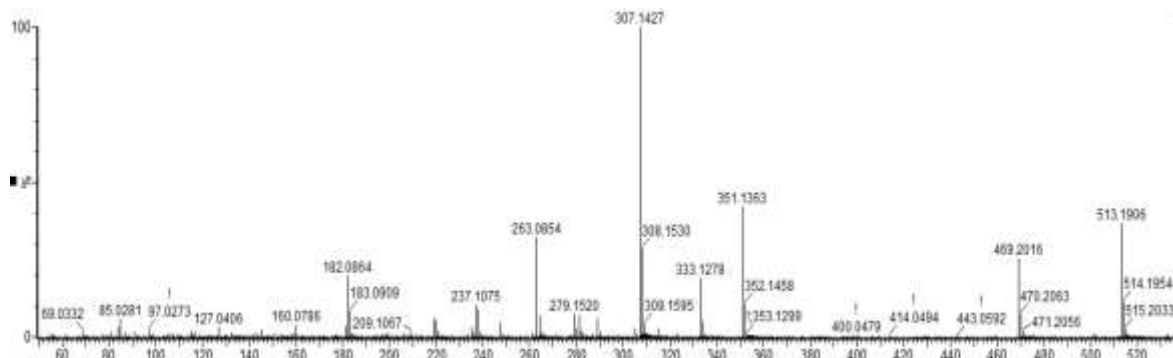


**Espectro 78.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGB-1.

HSQC.ESP

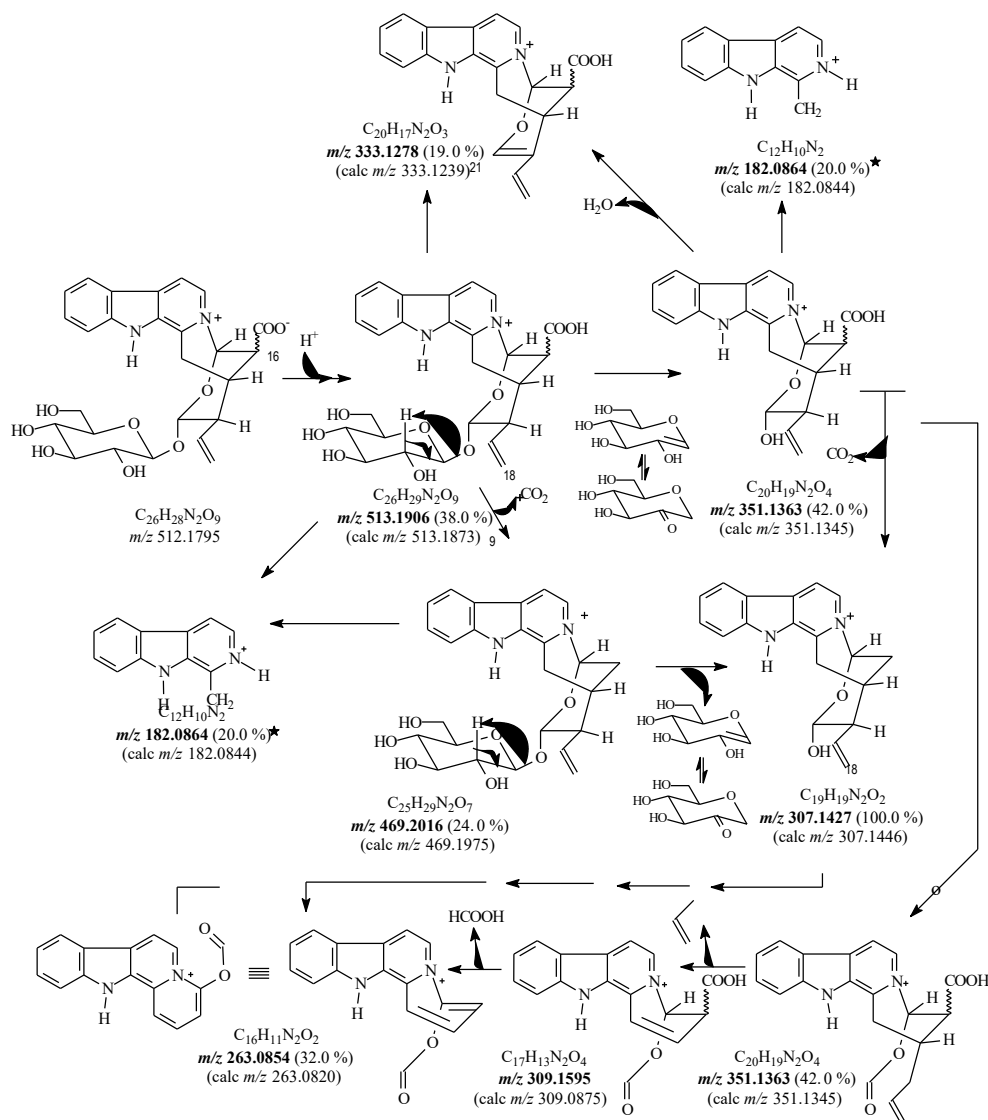


**Espectro 79.** RMN de HSQC (MeOD) de SGB-1.



**Espectro 80.** IES -EM/EM  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de SGB-1.

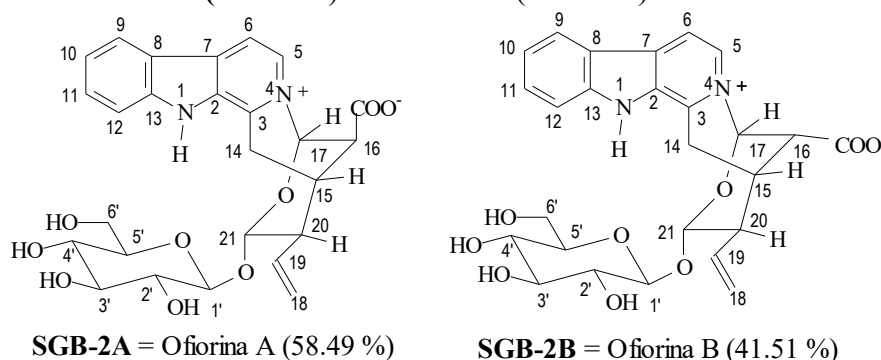




**Esquema 15.** Proposta de fragmentação dos principais picos apresentados no IES-EM/EM, de SGB-1  $[M+H]^+$  em  $m/z$  513.1906.

### 3.2.11 Determinação estrutural dos componentes da mistura de SGB-2

A mistura **SGB-2A** e **SGB-2B** (9 mg), solúvel em metanol, apresentou-se como sólido amarelo e seus dados espectrais foram semelhantes ao **SGB-1**. A identificação dos componentes foi realizada através da análise dos espectros 1D de RMN ( $^1H$  e RMN $^{13}C$ -DEPTQ) e 2D (COSY, NOESY, HSQC e HMBC), EMAR- IES e comparação com dados da literatura como Ofiorina A (**SGB-2A**) e Ofiorina B (**SGB-2B**).



Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 81) e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Espectros 82-84) apresentaram sinais duplicados com pequenas diferenças nos valores de deslocamentos químicos, o que sugeriu estarem relacionados com estruturas semelhantes (**SGB-2A** e **SGB-2B**) envolvendo diferenciação espacial.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou quadro hidrogênios metínicos atribuído à presença de dois anéis C da  $\beta$ -carbolina com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  8.60 e 8.64 (H-5A/H-5B) e 8.57 e 8.61 (H-6A/H-6B), com acoplamentos entre si está confirmado no espectro do COSY (Espectro 85). O espectro de hidrogênio apresentou também quatro sinais duplicados dos hidrogênios aromáticos no anel A com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  8.39/8.42 (H-9A/H-9B), 7.48/7.50 (H-10A/H-10B), 7.81/7.83 (H-11A/H-11B) e 7.75/7.78 (H-12A e H-12B).

Os hidrogênios de grupo vinil (2H-18A/2H-18B e H-19A/H-19B) presente nas duas substâncias foram deduzidos pelos sinais observados entre os valores de 5.98/6.00 e 5.31/5.40 ppm. Os sinais dos hidrogênios anomérico H-1'A e H-1'B foram observados como dupletos ( $J=7.8$  Hz) em  $\delta_{\text{H}}$  4.44 e  $\delta_{\text{H}}$  4.36, respectivamente, sendo o valor da constante de acoplamento compatível com a configuração  $\beta$  da ligação glicosídica. Os demais sinais da unidade da glicose encontram-se descritos na Tabela 20.

Os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  4.82 (H-21A) e 4.76 (H-21B) dos hidrogênios cetais (CH-21) apresentaram respectivamente as constantes de acoplamento  $J=9.8$  Hz e  $J=10.0$  Hz compatíveis com a configuração diaxial entre H-21 e H-20. Os isômeros **SGB-2A** e **SGB-2B** apresentaram singletos largos em  $\delta_{\text{H}}$  6.63 e  $\delta_{\text{H}}$  6.70, respectivamente. Este sinal foi atribuído ao H-17, o hidrogênio de um carbono (CH-17) ligado ao átomo de nitrogênio carregado positivamente; esta ligação foi confirmada pela interação heteronuclear a longa distância ( $^3J_{\text{CH}}$ ) revelada pelos picos transversais correspondentes aos acoplamentos dos CH-17 ( $\delta_{\text{C}}$  90.94 e 90.97 A/B) e H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  8.60/A e 8.64/B) observados no espectro 2D HMBC (Espectros 89 e 90, Tabela 20)

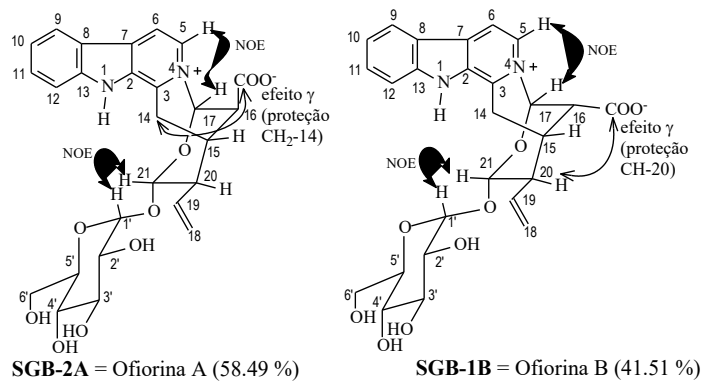
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , o sinal do CH-20 de **SGB-2A** foi observado em  $\delta_{\text{C}}$  47.79 e o do **SGB-2B** em  $\delta_{\text{C}}$  44.62. Esta diferença entre tais deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  47.79 -  $\delta_{\text{C}}$  44.62 = 3.17 ppm pode ser atribuída ao efeito  $\gamma$  protetor do carbono do grupo carboxila em posição alfa no CH-20, resultando numa situação de relacionamento do grupo carboxila ( $\delta_{\text{C}}$  174.23) do **SGB-2B** ocupando uma posição 1,3-diaxial em relação ao hidrogênio C-20. Análogo efeito  $\gamma$  protetor ( $\Delta_{\text{C}} = 2.59$  ppm) do átomo de carbono do ânion carboxi sobre o carbono metilênico CH<sub>2</sub>-14 de **SGB-2A** foi deduzido através da comparação dos deslocamentos químicos dos correspondentes sinais:  $\delta_{\text{C}}$  26.43 - 23.84 = 2.59 ppm (Tabela 20) Portanto, a configuração do CH-16 da **SGB-2A** e **SGB-2B** foi feita como mostrado na Figura 28.

Outra confirmação para esta atribuição estereoquímica foi evidenciada adicionalmente pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Enquanto todos os outros sinais revelaram deslocamentos químicos muito semelhantes, uma diferença característica entre (**A**) e (**B**) foi observada no sinal do hidrogênio H-16. O deslocamento para o campo baixo de H-16 em (**A**) pode ser explicado em termos do efeito anisotrópico causado pelo anel aromático, no plano do qual este hidrogênio se encontra.

O espectro de carbono juntamente com o HSQC (Espectros 87 e 88) permitiu atribuir os sinais aos respectivos carbonos a cada estrutura. O HMBC mostrou a interação de  $J^2$  e  $J^3$  do C-22 com H-16 e H-17, confirmando a localização do ácido. Apresentou também a acoplamento em  $^3J$  do carbono quaternário C-3 com hidrogênio metilênico do CH<sub>2</sub>-14, confirmando a ligação da secologanina com a porção  $\beta$ -carbolínicos. Outras interações identificadas encontram-se descritas na Tabela 20.

O espectro 2D NOESY (Espectros 86) revelou interações dipolares importantes, destacando-se as envolvendo os hidrogênios H-5 e H-17 e H-1' e H-21 confirmando as ligações do CH-17

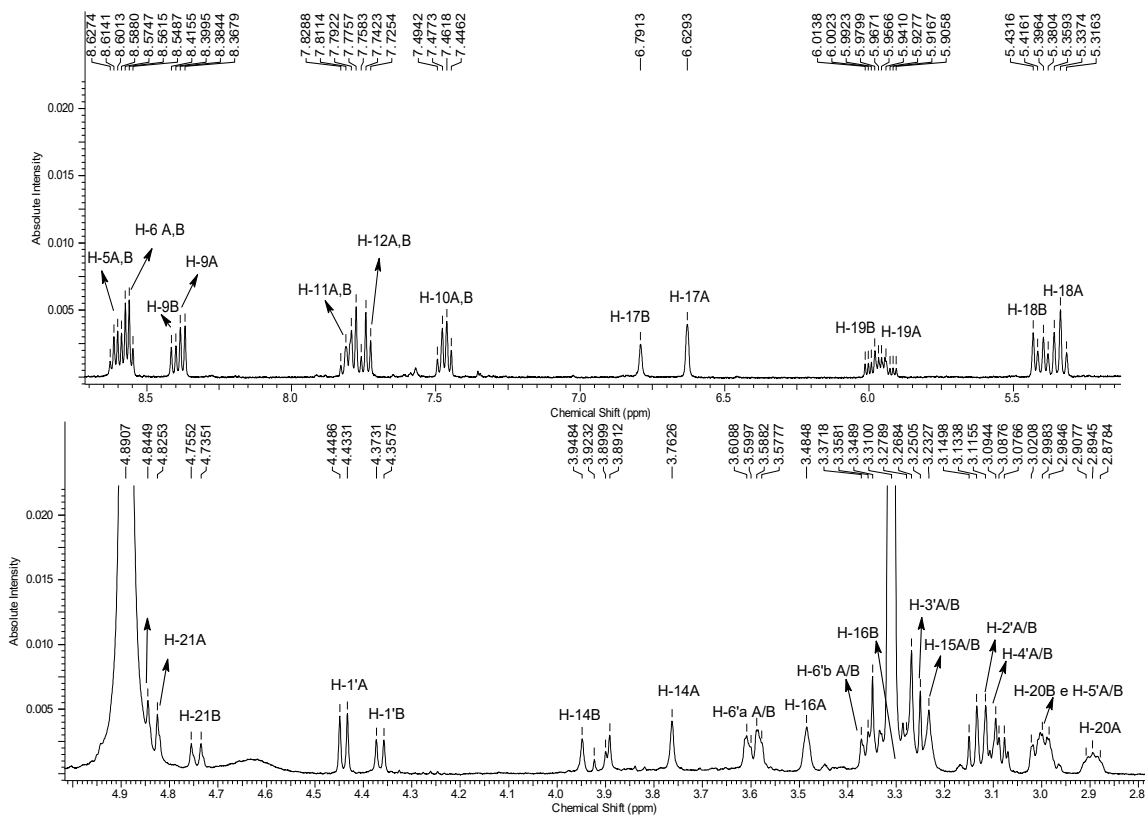
com o átomo de nitrogênio e da unidade glicosídica com o átomo de carbono CH-21. Outras interações podem ser encontradas nos assinalamentos inseridos no espectro. Esse alcaloide já foi identificado nas espécies de *Simira glaziovvi*, *Simira tinctoria* e *Simira williamssi*. (AQUINO et al., 1994; BASTOS et al., 2002).



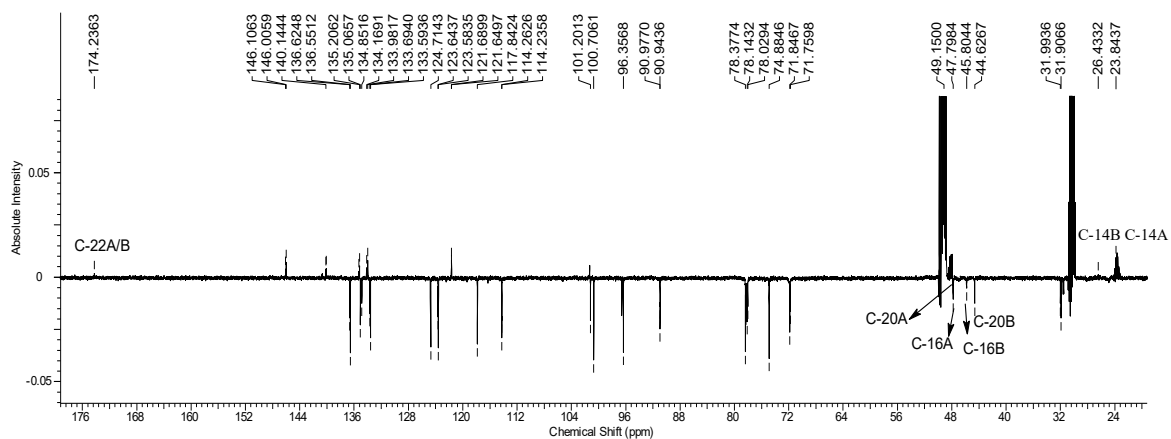
**Figura 28.** Estrutura da Ofiorina A e B.

**Tabela 20.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (500 e 125 MHz em MeOD) de SGB-2, comparados com valores da literatura para as Ofiorinas A e B (Bastos et al., 2002) Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm)

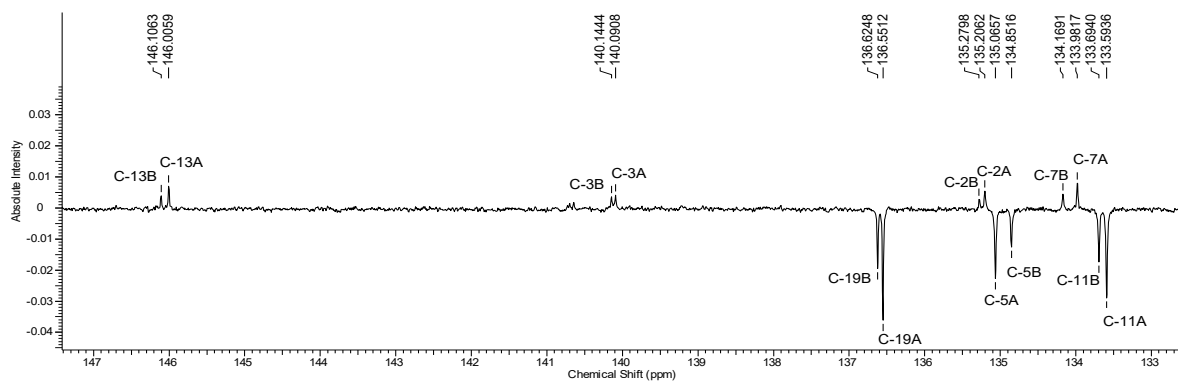
C	SGB- 2A (58.49 %)			SGB- 2B (41.51 %)			OfiorinaA	Ofiorina B		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}/\beta J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}/\beta J_{\text{CH}}$	134.8	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
2	135.20	-	H-6	135.27	-	H-6	146.6	135.9	-	
3	140.09	-	H-5; 17	140.14	-	H-5; 17	140.2	138.8	-	
7	133.98	-	H-6; H-5	134.16	-	H-6; 5	122.1	130.2	-	
8	121.68	-	H-9; H-12	121.68	-	H-9; 10	135.8	119.2	-	
13	146.00	-	H-9; 11	146.10	-	H-9; 11	176.9	144.1	-	
22	174.23	-	H-16	174.23	-	H-16	134.8	175.6	-	
<b>CH</b>										
5	135.06	8.60 ( <i>d</i> , 6.5)	H-6; H-17	134.85	8.64 ( <i>d</i> , 6.6)	H-17	136.9	133.3	8.60	
6	117.84	8.57 ( <i>d</i> , 6.5)	H-5	117.84	8.61 ( <i>d</i> , 6.6)	H-5	135.9	118.0	8.30	
9	124.71	8.39 ( <i>d</i> , 8.1)	H-11	124.76	8.42 ( <i>d</i> , 8.1)	H-11	124.6	123.4	8.10	
10	123.58	7.48 ( <i>t</i> , 8.1)	H-9; H-12	123.64	7.50 ( <i>t</i> , 8.1)	H-9;12	119.2	122.7	7.10	
11	133.59	7.81 ( <i>t</i> , 8.1)	H-9	133.69	7.83 ( <i>t</i> , 8.1)	H-9	125.5	132.6	7.40	
12	114.23	7.75 ( <i>d</i> , 8.1)	H-10	114.26	7.78 ( <i>d</i> , 8.1)	H-10	115.4	113.3	7.60	
15	31.99	3.23	H-19;21	31.90	3.23	H-19;21	33.0	31.0	3.00	
16	47.79	3.48		45.80	3.35		49.8	46.6	3.30	
17	90.94	6.63 ( <i>s</i> )	H-5	90.97	6.79 ( <i>s</i> )	H-5	91.7	89.0	6.60	
19	136.55	5.94 ( <i>m</i> )	2H-18	136.62	6.00 ( <i>m</i> )	2H-18	134.8	134.7	5.70	
20	47.79	2.89 ( <i>m</i> )	H-19;21;18	44.62	3.03 ( <i>m</i> )	2H-18	48.8	47.6	2.80	
21	96.35	4.82 ( <i>d</i> , 9.8)	H-1';17;19	96.45	4.76 ( <i>d</i> , 10.0)	H-1'; 17;19	98.2	94.2	4.60	
<b>CH<sub>2</sub></b>										
14	23.84	3.76 ( <i>sl</i> )		26.43	3.94 ( <i>sl</i> )		26.0	24.0	3.50	
18	121.64	5.43( <i>d</i> ,17.6) 5.31( <i>d</i> ,10.9)		121.68	5.42( <i>d</i> ,17.7) 5.40( <i>d</i> ,10.6)		121.9	120.9	5.30 5.20	
<b>Gli</b>										
1'	100.70	4.44 ( <i>d</i> ,7.8)	H-2'; H-21	100.20	4.46 ( <i>d</i> ,7.8)	H-2/ H-21	101.8	99.7	4.40	
2'	74.88	3.11( <i>dd</i> ,7.8, 9.0)	H-3'	74.88	3.11 ( <i>dd</i> , 7.8, 9.0)	H-3'	75.4	73.5	2.90	
3'	78.14	3.23 ( <i>t</i> , 9.0)	H-2'	78.02	3.23 ( <i>t</i> , 9.0)		78.8	76.6	3.1	
4'	71.84	3.07 ( <i>t</i> , 9.0)		71.75	3.07 ( <i>t</i> , 9.0)		72.2	69.8	3.0	
5'	78.37	2.99 ( <i>m</i> )		78.31	2.99 ( <i>m</i> )		78.4	77.0	2.80	
6'	61.19	3.60 3.37	H-5'	61.19	3.60 3.37	H-5'	63.3	60.6	3.5 3.2	



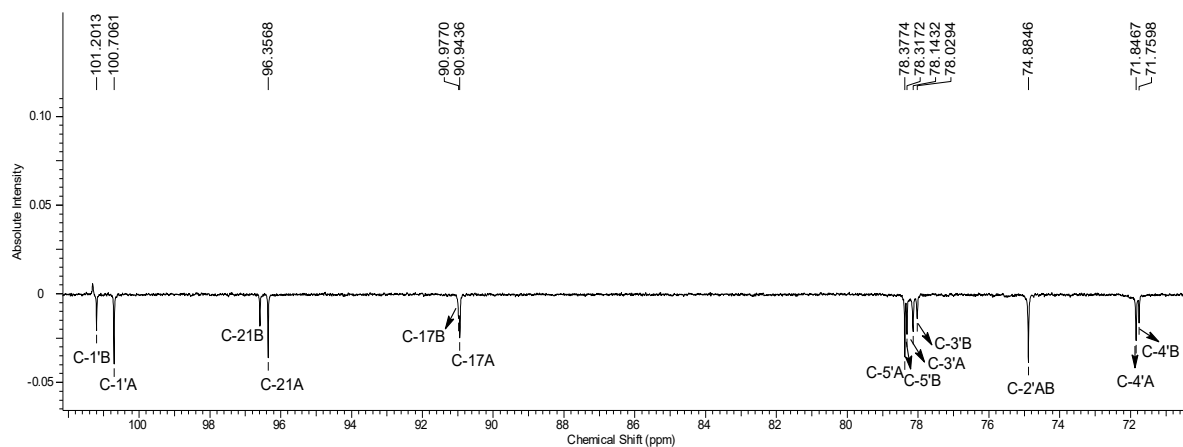
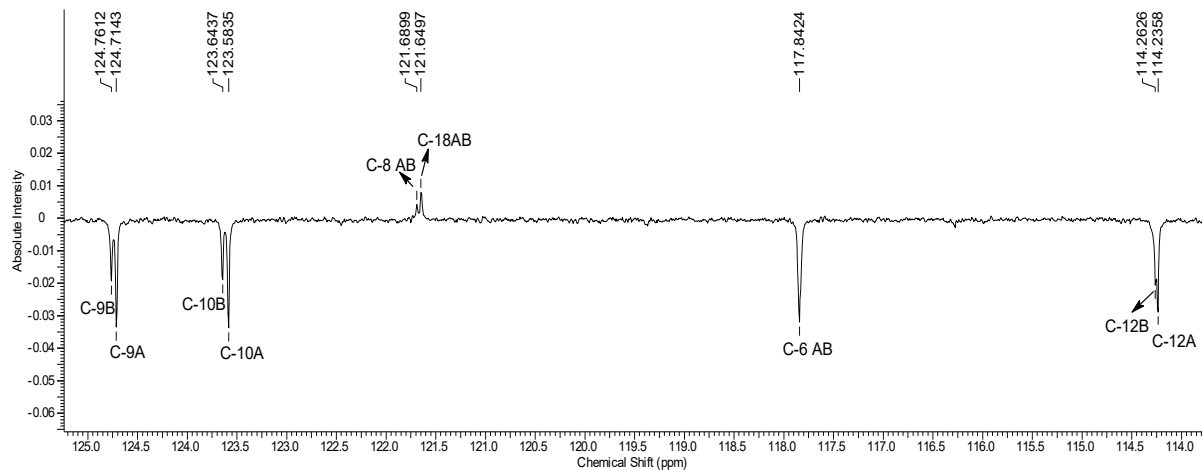
**Espectro 81.** Expansão do RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) de SGB-2.



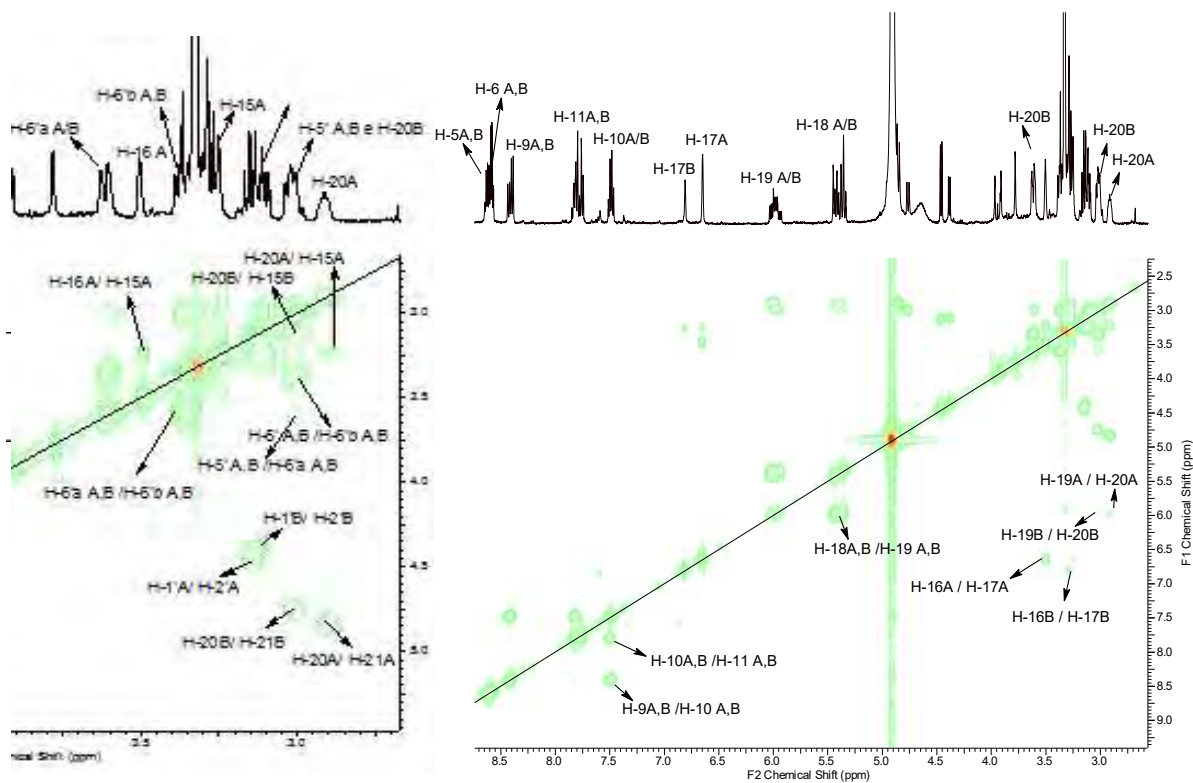
**Espectro 82.** RMN <sup>13</sup>C-DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGB-2.



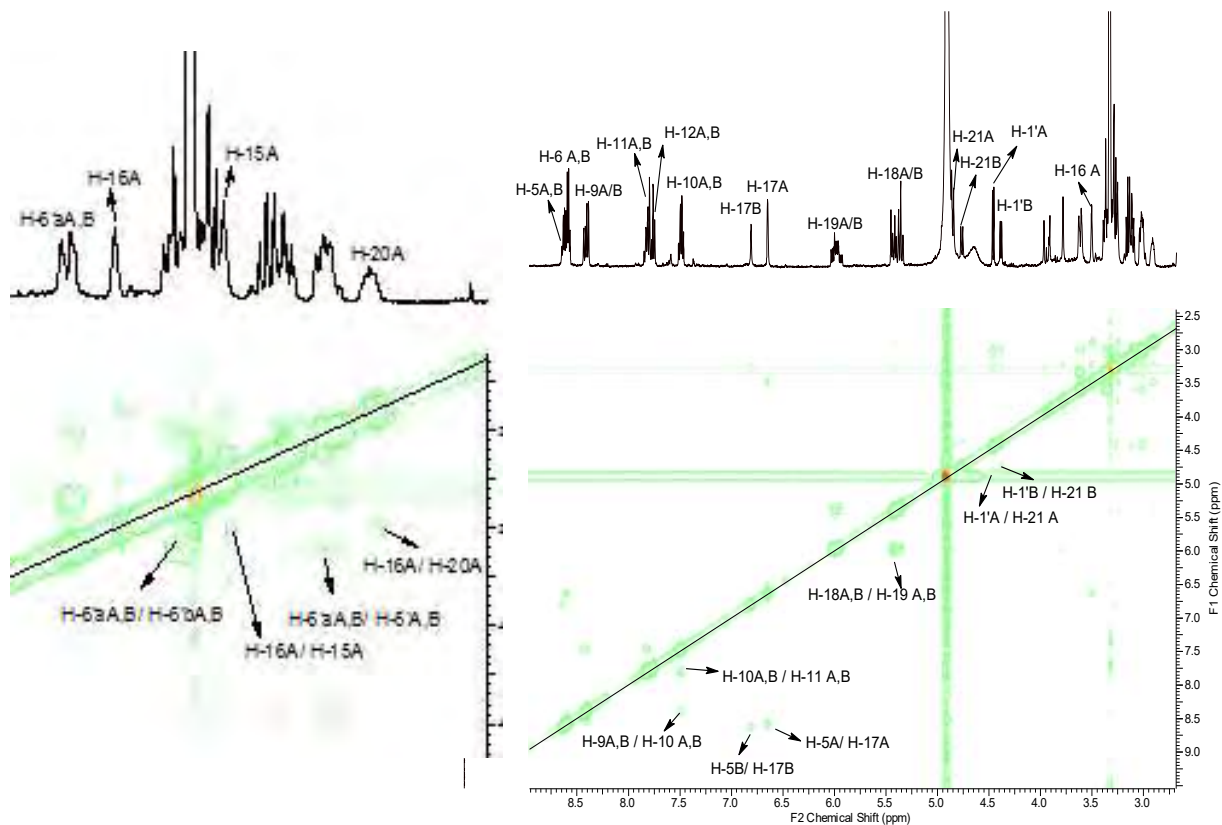
**Espectro 83.** Expansão de RMN <sup>13</sup>C-DEPTQ (125 MHz, MeOD) de SGB-2.



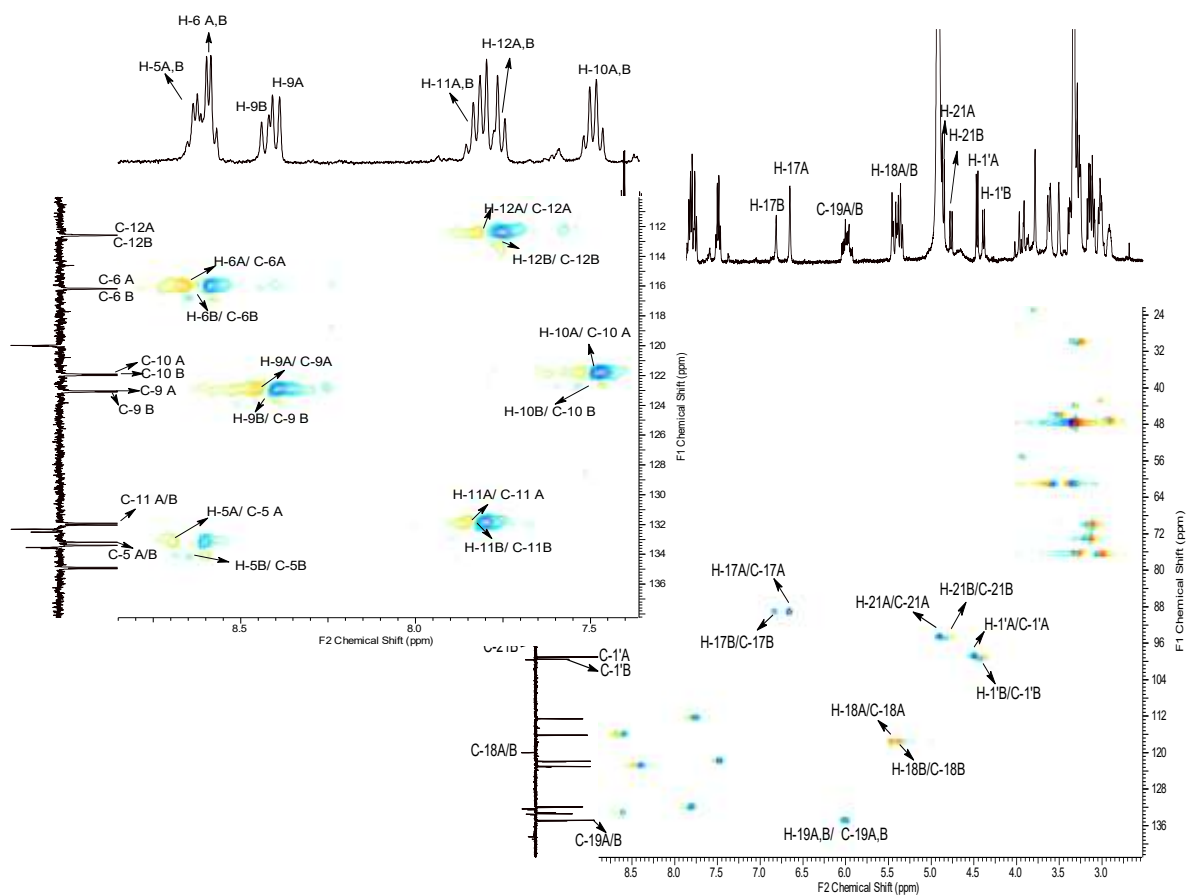
**Espectro 84.** Expansão do RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT-Q de SGB-2.



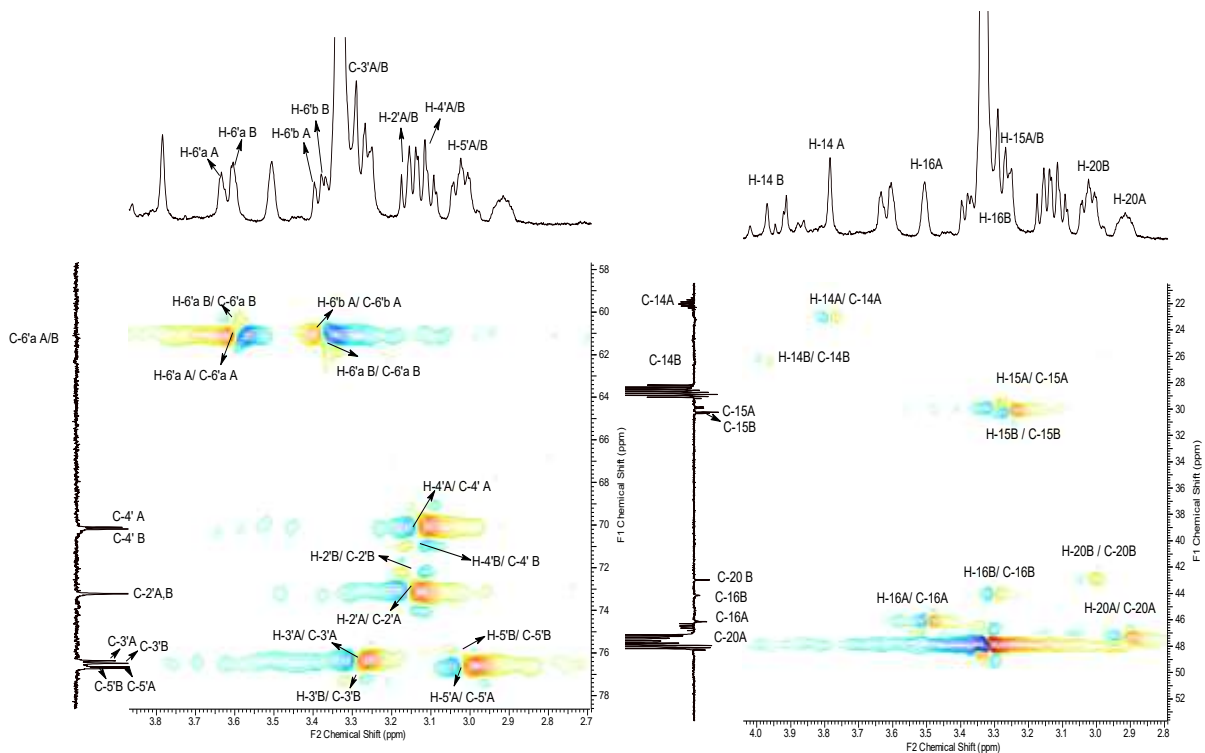
**Espectro 85.** RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) de SGB-2.



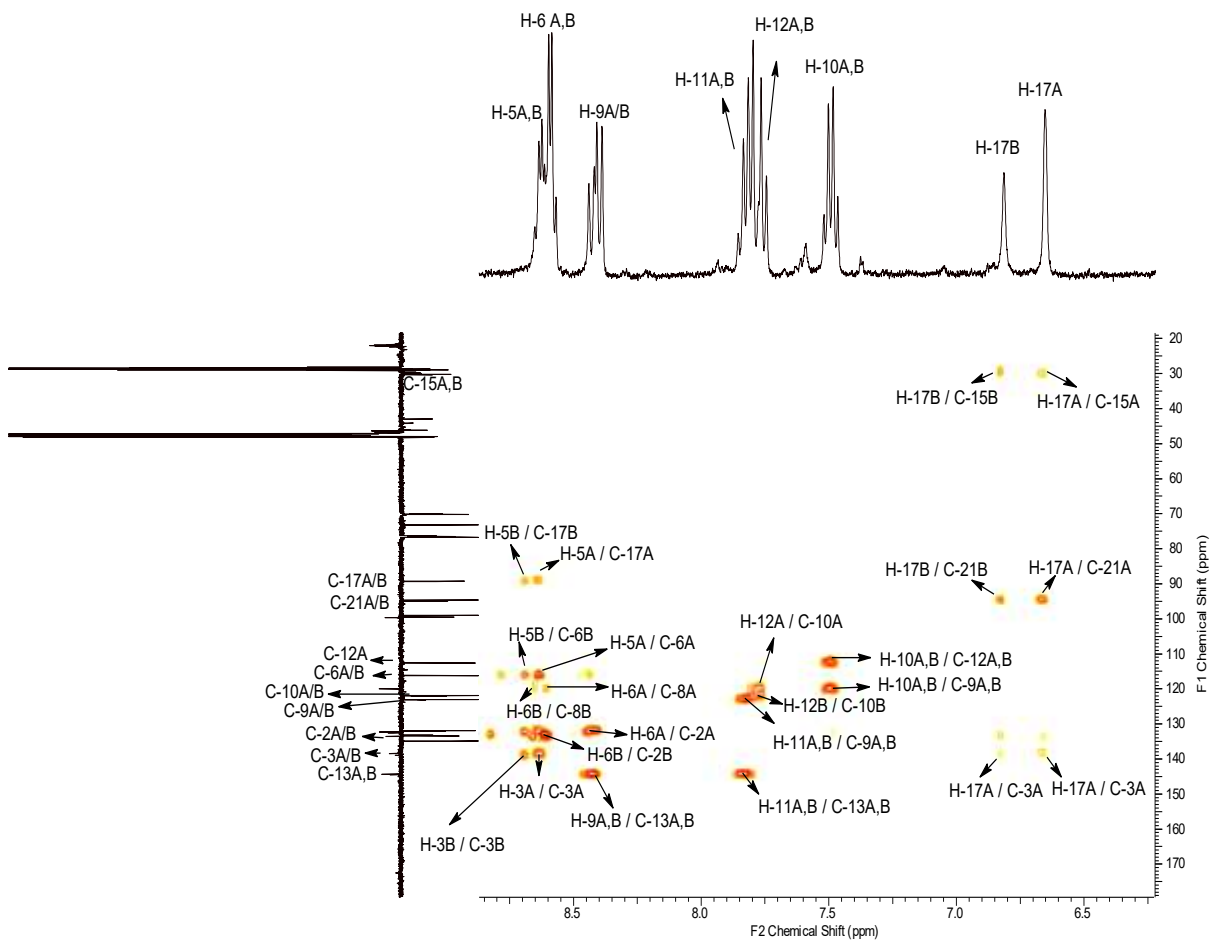
**Espectro 86.** RMN e expansão de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (MeOD) de SGB-2.



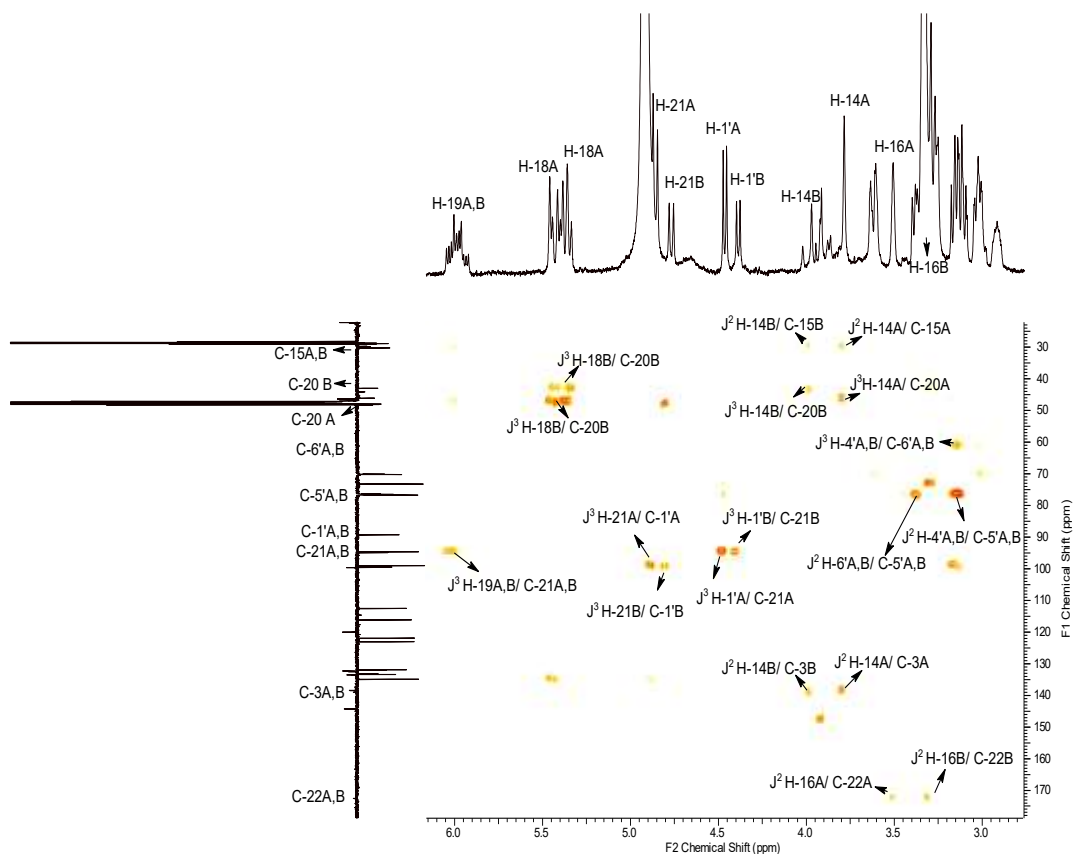
**Espectro 87.** RMN de HSQC (MeOD) de SGB-2.



**Espectro 88.** Expansão do HSQC de SGB-2.



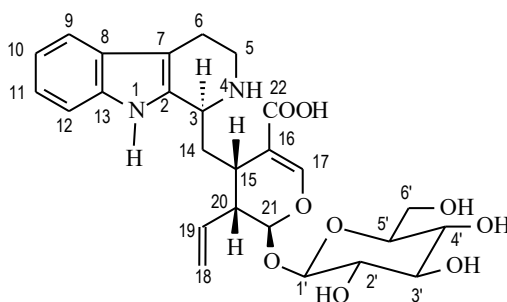
**Espectro 89.** RMN de HMBC e expansão (MeOD) de SGB-2.



**Espectro90.** RMN de HMBC e expansão (MeOD) de SGB-2.

### 3.2.12 Determinação estrutural de SGB-3

A substância **SGB-3** (8 mg), solúvel em metanol e de aspecto caramelo, foi elucidada como Ácido Estrictosidínico, através da análise dos espectros de RMN 1D ( $^1\text{H}$ , RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ) e 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY, HSQC e HMBC), EMAR-IES e comparação com dados da literatura. Os deslocamentos químicos foram descritos na Tabela 21.



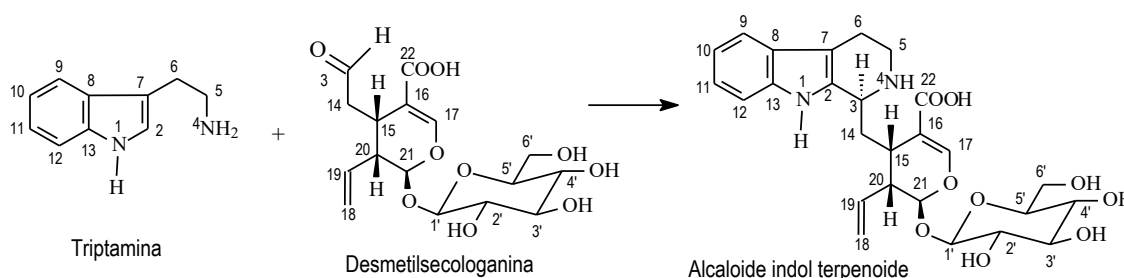
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 91) da **SGB-3** foram observados quatro sinais atribuídos a hidrogênios aromáticos em:  $\delta_{\text{H}}$  7.45 (*d*,  $J=7.8$  Hz, H-9), 7.03 (*t*,  $J=7.8$ , H-10), 7.13 (*t*,  $J=7.6$  Hz, H-11) e 7.31 (*d*,  $J=8.2$  Hz, H-12), característicos de um anel aromático *orto*-dissubstituído de um anel indólico. Além disso, observou-se também sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos correspondentes aos  $\text{CH}_2$ -5 ( $\delta_{\text{H}}$  3.70 e 3.23) e  $\text{CH}_2$ -6 ( $\delta_{\text{H}}$  3.10-2.98), correlacionados no mapa de correlação heteronuclear 2D HSQC (Espectro 94) com os sinais de átomos carbonos em:  $\delta_{\text{C}}$  42.97 e  $\delta_{\text{C}}$  19.54, respectivamente (Espectro 92). Observou-se também a presença de um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  4.45 ( $J=11.0$  Hz) do H-3



correlacionando com o sinal de carbono em  $\delta_c$  52.23, identificando-se conseqüentemente a presença de um anel piperidínico.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou um singlete na região de hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  7.56 (H-17, *s*), correlacionado no mapa do HSQC (Espectro 94) com o sinal de carbono em  $\delta_c$  153.27 (CH-17) e no espectro HMBC (Espectro 95) interagindo através de 3 ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os sinais de átomos de carbono em  $\delta_c$  175.91 (carbonílico de ácido, C-22), 34.03 (CH-15) e 96.49 (CH-21) e através de 2 ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com  $\delta_c$  113.44 (C-16). Tais dados permitiram caracterização de uma unidade desmetilsecologanina, que foi confirmada pelas interações observadas no espectro COSY (Figura 93) dos hidrogênios metilênico CH<sub>2</sub>-18 [H-18a ( $\delta_H$  5.27, *d*,  $J=17.3$  Hz, *trans*) e H-18b ( $\delta_H$  5.20, *d*,  $J=10.5$  Hz, *cis*)] e metínico CH-19 ( $\delta_H$  5.88, *m*) do grupo vinílico terminal, correlacionados no HSQC com os sinais de átomos de carbono em  $\delta_c$  118.84 e 136.22, respectivamente (Tabela 21).

O espectro COSY confirmou também as interações dos hidrogênios H-19 com H-20 ( $\delta_H$  2.71), H-20 com ambos H-15 ( $\delta_H$  3.02) e H-21 ( $\delta_H$  5.83), H-15 com 2H-14 ( $\delta_H$  2.36, H-14a, e  $\delta_H$  2.13, H-14b) e 2H-14 com H-3 ( $\delta_H$  4.45). Esta confirmação da interação spin-spin vicinal dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos 2H-14 com o hidrogênio do carbono metínico CH-3 praticamente definiu a união das unidades estruturais desmetilsecologanina e triptamina (tetrahydro- $\beta$ -carbolina) através do CH-3.

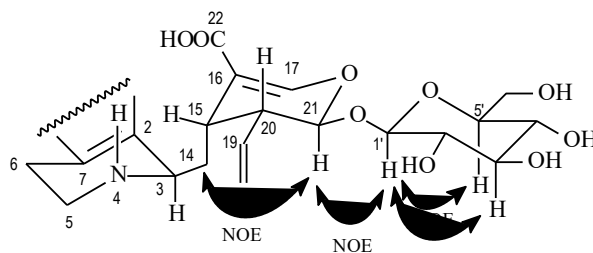


No RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Espectro 92) observou-se um sinal de carbono anomérico (CH-1') com deslocamento químico em  $\delta_c$  100.28, compatível com CH-1 característico de uma unidade de açúcar, que revelou no HMBC (Espectro 95) correlação heteronuclear a longa distância através de três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  5.83 [H-21, correlacionado no HSQC (Espectro 94) com o sinal em  $\delta_c$  96.49 (CH-21)] da unidade desmetilsecologanina, confirmando a posição da unidade glicosídica. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 91) e RMN $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Espectro 92) permitiram observar ainda: sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos CH<sub>2</sub>-6' ( $\delta_H$  4.03 e 3.70/ $\delta_c$  63.05) e quatro sinais dos hidrogênios metínicos CH-2' ( $\delta_H$  3.22/ $\delta_c$  74.67), CH-3' ( $\delta_H$  3.42/ $\delta_c$  77.91), CH-4' ( $\delta_H$  3.20/ $\delta_c$  71.73) e CH-5' ( $\delta_H$  3.40/ $\delta_c$  78.69), que foram correlacionados como indicado pelo HSQC (Espectro 94) e foram usados para reconhecer a presença de uma unidade de glicose. As interações espaciais dos hidrogênios do carbono anomérico (CH-1') com os hidrogênios metínicos de H-3' e H-5' no espectro de NOESY (Espectro 96) e a constante de acoplamento de  $J=7.8$  Hz observada no sinal do H-1' ( $\delta_H$  4.82) devido a interação axial-axial com H-2' ( $\delta_H$  3.22) evidenciaram as configurações destes hidrogênios, confirmando a presença de uma unidade  $\beta$ -glicosídica ligada ao anel desmetilsecologanina.

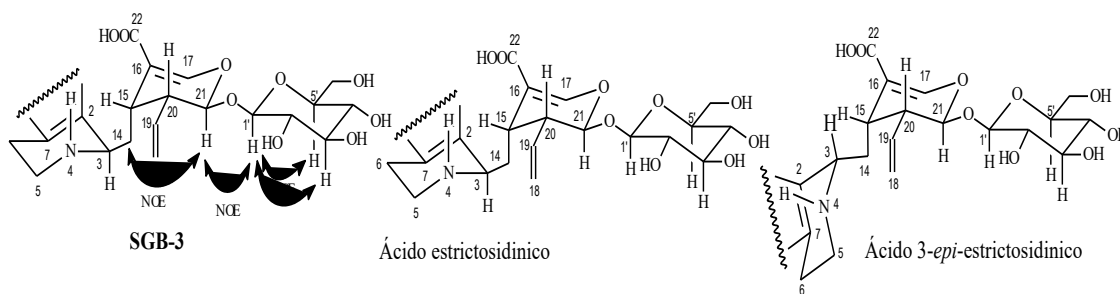
Os dois ácidos (Ácido Strictosidínico e Ácido 3-*epi*-Strictosidínico) utilizados na comparação dos dados espectrais exibiram uma série de semelhanças de sinais, tendo basicamente mudanças nos deslocamentos químicos dos carbonos CH-3, CH<sub>2</sub>-5 e CH<sub>2</sub>-14. Estes dados, principalmente do CH-3, foram responsáveis pela distinção entre os dois ácidos.

A comparação dos dados espectrais da **SGB-3** (Tabela 21) e do Ácido Estrictosidínico permitiu reconhecer a estreita semelhança estrutural dos dois alcaloides indólicos.

O espectro 2D NOESY (Figura 96) mostrou a interação espacial do hidrogênio H-14a ( $\delta_H$  2.36) do carbono metilênico CH<sub>2</sub>-14 com o metínico H-21 ( $\delta_H$  5.83, d,  $J=9.5$  Hz) e o valor da constante acoplamento ( $J=9.5$  Hz) observado no sinal do H-21 ( $\delta_H$  5.83) indicando interação axial-axial com o H-20 permitiram postular a configuração relativa do átomo de CH-15 localizando o CH<sub>2</sub>-14 o em posição axial para possibilitar a sua interação espacial (dipolar-dipolar) com o H-21, como demonstrado na Figura 29. Estes dados permitiram postular a mesma configuração relativa para **SGB-3** e a descrita na literatura para o Ácido Estrictosidínico (NASCIMENTO et al., 2008 e BERGER et al., 2015), diferente do seu epímero Ácido 3-*epi*-Estrictosidínico (NASCIMENTO et al., 2006).



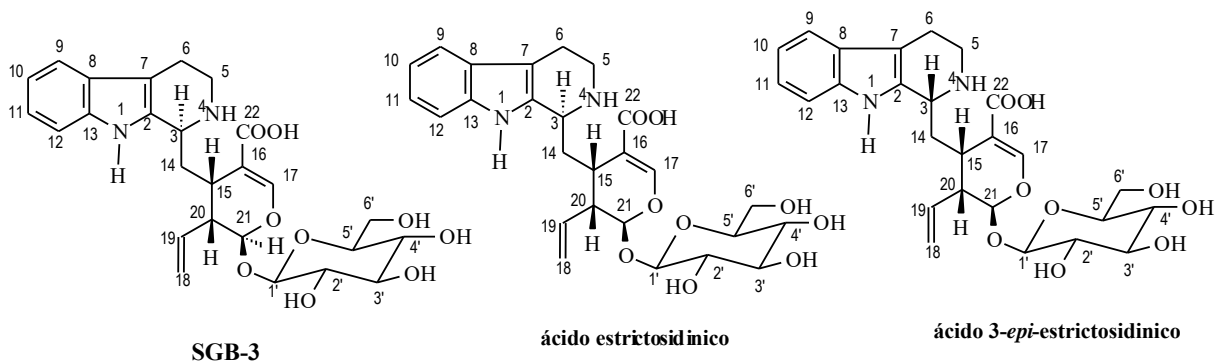
**Figura 29.** Configuração relativa de SGB-3.



A única diferença significativa revelada pela comparação dos dados de RMN da **SGB-3** e o Ácido Estrictosidínico restringe-se ao deslocamento químico do C-16:  $\delta_C$  113.44 (confirmado pela interação com o H-17 no HMBC) e 107.3. Aliás, os espectros 1D e 2D de RMN da **SGB-3** possibilitaram as atribuições inequívocas dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 21).

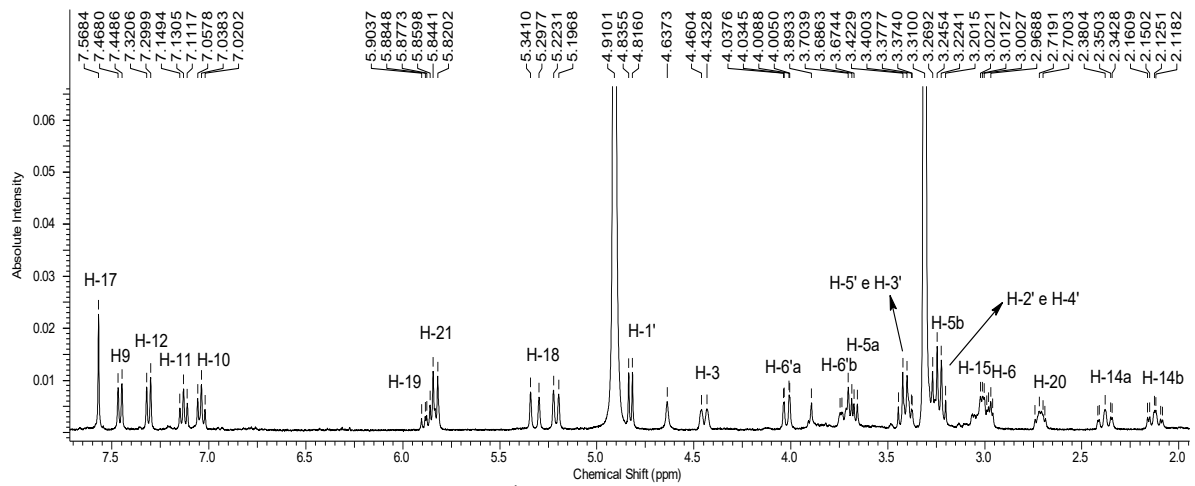
A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CL-EM) gerou o cromatograma (Figura 30) revelando alto grau de pureza da amostra e um pico com o tempo de retenção em 4.20 min. O espectro de massas de alta resolução com IES, modo positivo (Espectro 97), apresentou o pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  517.2184 ( $C_{26}H_{33}N_2O_9$ , calc.  $m/z$  517.2186), permitindo deduzir o íon molecular  $m/z$  516.2108 ( $[M]^+$ ) de fórmula molecular  $C_{26}H_{32}N_2O_9$ .

O espectro de EMAR/EM-IES revelou picos compatíveis com perdas de unidades estruturais características corroborando para a proposição do alcaloide ácido estrictosidínico. No Esquema 16 apresenta-se proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas em  $m/z$  500.1916, 338.1365, 320.1220, 269.0974 e 144.0734, através de reações de eliminação dos fragmentos  $NH_3$ ,  $C_6H_{10}O_5$  (glicose),  $H_2O$ ,  $C_{10}H_{16}N_2O_7$  e  $C_{10}H_8N_2$ , respectivamente, envolvendo inclusive em certos casos migração de hidrogênio.

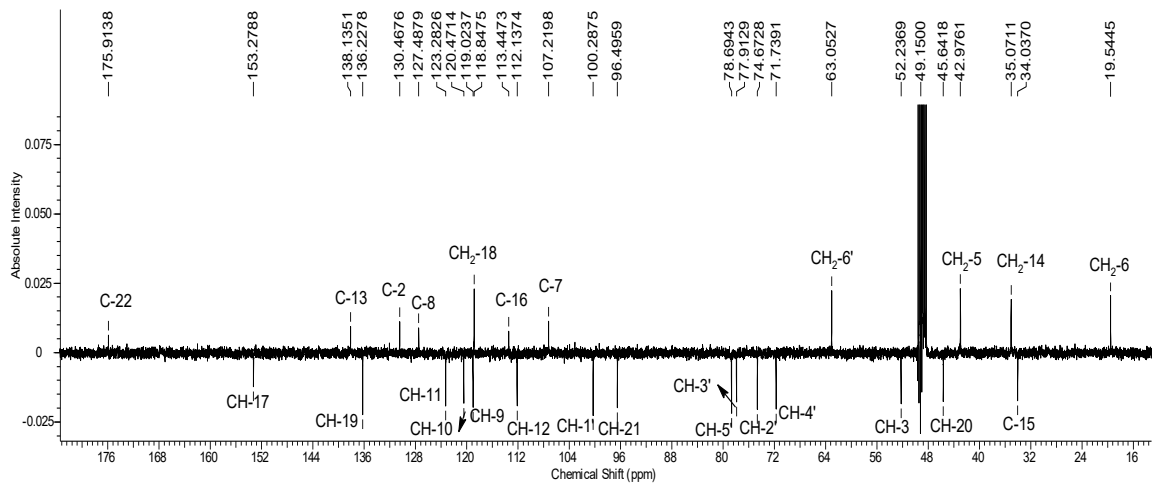


**Tabela 21.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400) e  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz) em MeOD de SGB-3, comparados com valores da literatura para os Ácido Estrictosidínico e *epi*-Estrictosidínico (NASCIMENTO et al., 2008 <sup>[1]</sup>; BERGER et al., 2015<sup>[2]</sup>; NASCIMENTO et al., 2006<sup>[3]</sup>). Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_{\text{C}}$ , ppm).

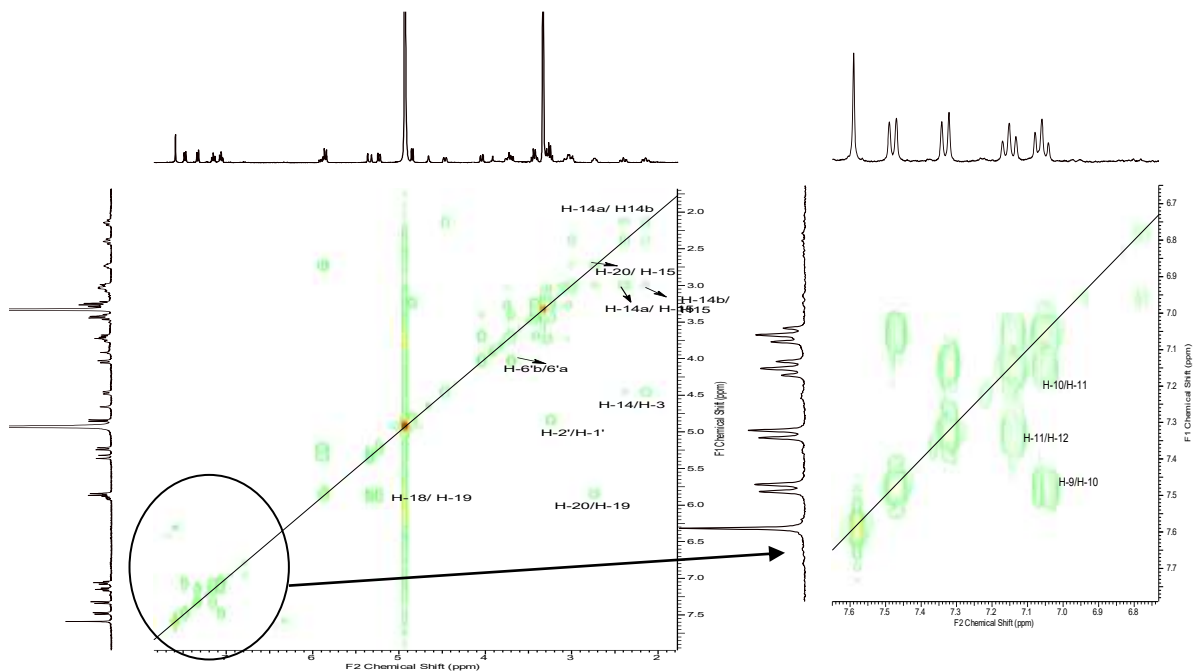
SGB-3				Ácido Estrictosidínico <sup>[1,2]</sup>		Ác. <i>epi</i> -Estrictosidínico <sup>[3]</sup>		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$J^2$	$J^3$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	130.46	-	N-H		130.0	-	129.5	-
7	107.21	-		N-H	105.3	-	106.0	-
8	127.48	-		N-H; H-12; 10	127.5	-	127.5	-
13	138.13	-	N-H	H-9; H-11	138.2	-	138.3	-
16	113.44	-	H-17		107.3	-	114.5	-
22	175.91	-		H-17	175.4	-	175.0	-
<b>CH</b>								
3	<b>52.23</b>	4.45 ( <i>d</i> , 11.0)			<b>52.5</b>	4.43	<b>59.5</b>	4.54
9	119.02	7.45 ( <i>d</i> , 7.8)		H-11	119.1	7.44	119.0	7.46
10	120.47	7.03 ( <i>t</i> , 7.8)	H-11	H-12	120.6	7.03	120.0	7.05
11	123.28	7.13 ( <i>t</i> , 7.6)		H-9	123.4	7.12	123.3	7.12
12	112.13	7.31 ( <i>d</i> , 8.2)		H-10	112.3	7.30	112.3	7.32
15	34.03	3.02 ( <i>m</i> )		H-17	33.8	3.00	33.6	2.94
17	153.27	7.56 ( <i>s</i> )			154.2	7.56	152.4	7.48
19	136.22	5.88 ( <i>m</i> )			136.2	5.86	136.5	5.87
20	45.64	2.71 ( <i>m</i> )		H-18 <i>cis</i>	45.6	2.70	45.8	2.68
21	96.49	5.83 ( <i>d</i> , 9.5)		H-17; H-1'	96.7	5.82	96.8	5.72
<b>CH<sub>2</sub></b>								
5	<b>42.97</b>	3.70			<b>43.0</b>	3.70	<b>51.0</b>	3.40
		3.23				3.20		3.60
6	19.54	3.00			19.8	3.02	17.3	3.02
14	<b>35.07</b>	2.36 ( <i>m</i> )			<b>35.1</b>	2.37	<b>33.0</b>	2.25
		2.13 ( <i>m</i> )				2.11		
18	118.84	5.27 ( <i>d</i> , 17.3)			119.1	5.31	119.0	5.22
		5.20 ( <i>d</i> , 10.5)				5.20		5.30
<b>Açúcar</b>								
1'	100.28	4.82 ( <i>d</i> , 7.8)		H-21	100.3		100.3	4.76
2'	74.67	3.22 ( <i>m</i> )	H-3'		74.6		74.7	3.20
3'	77.91	3.42 ( <i>t</i> , 9.1)			77.9		77.9	3.40
4'	71.73	3.20 ( <i>m</i> )	H-5'	H-3'	72.0		71.8	3.24
5'	78.69	3.40 ( <i>m</i> )			78.1		78.6	3.36
6'	63.05	4.03 ( <i>dd</i> , 11.8; 1.6)			63.1		63.1	3.66
		3.70 ( <i>dd</i> , 11.8; 7.0)						3.96



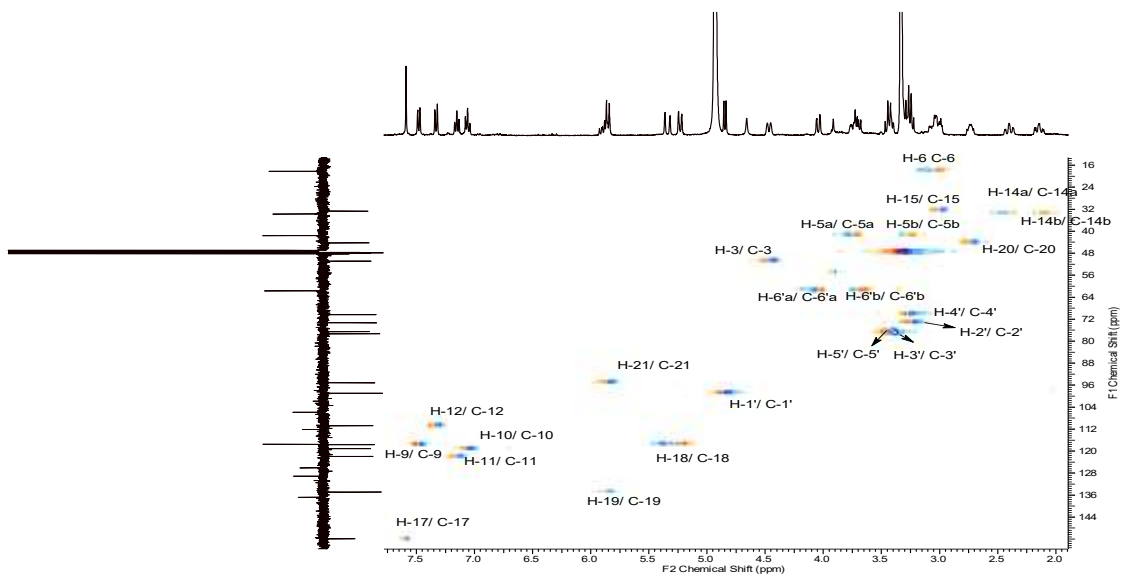
**Espectro 91.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) de SGB-3.



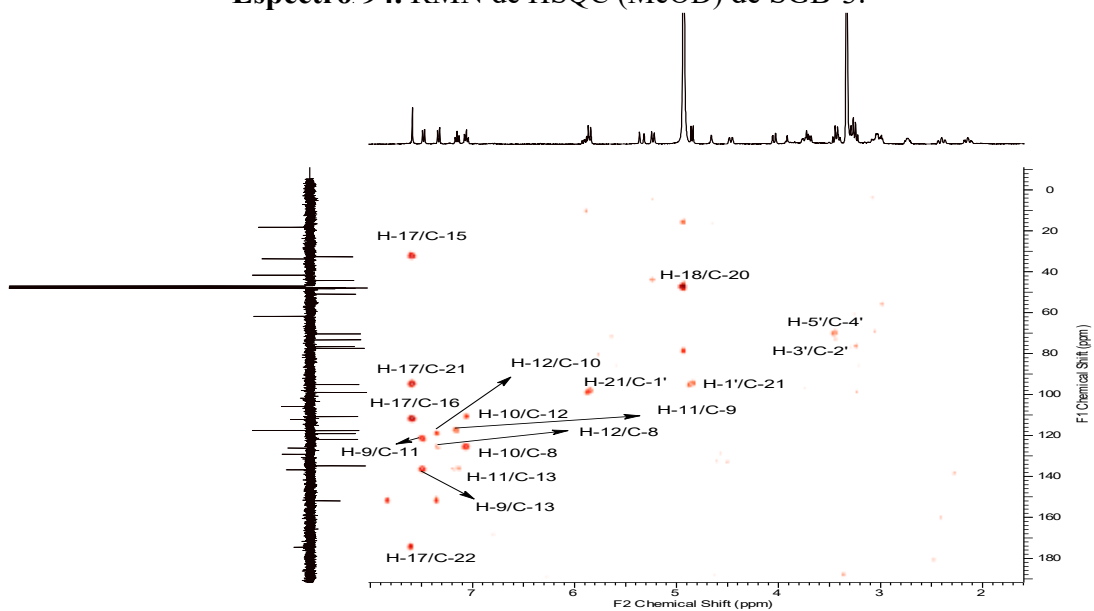
**Espectro 92.** RMN- $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz, MeOD) de SGB-3.



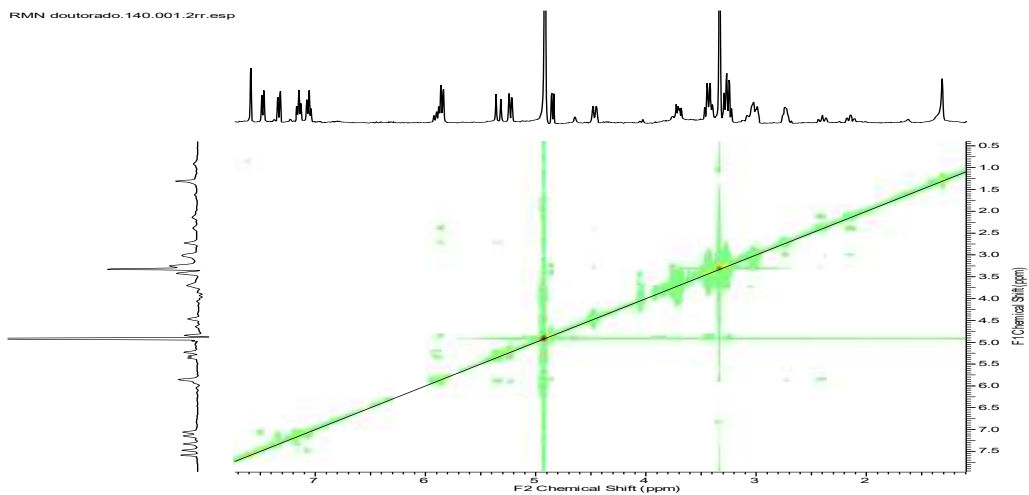
**Espectro 93.** RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (MeOD) de SGB-3.



**Espectro 94.** RMN de HSQC (MeOD) de SGB-3.



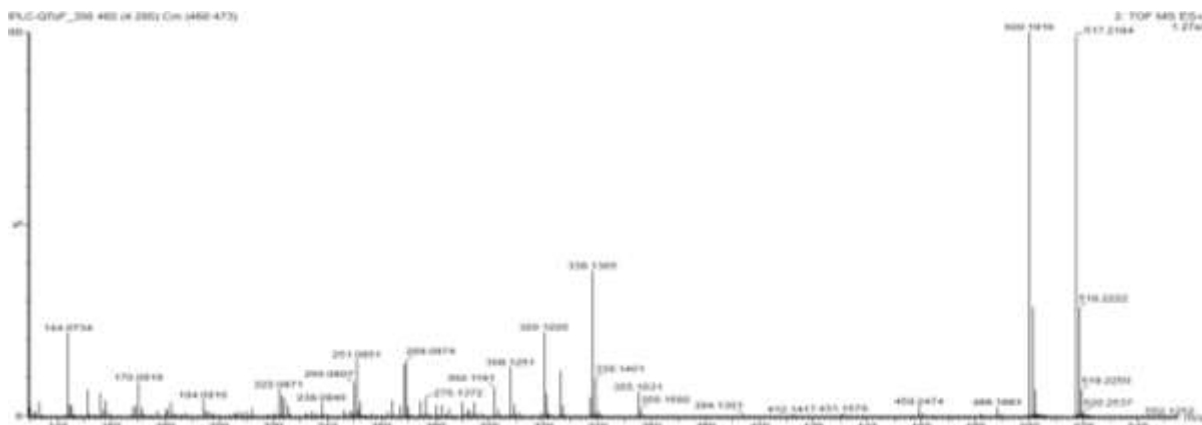
**Espectro 95.** RMN de HMBC (MeOD) de SGB-3.



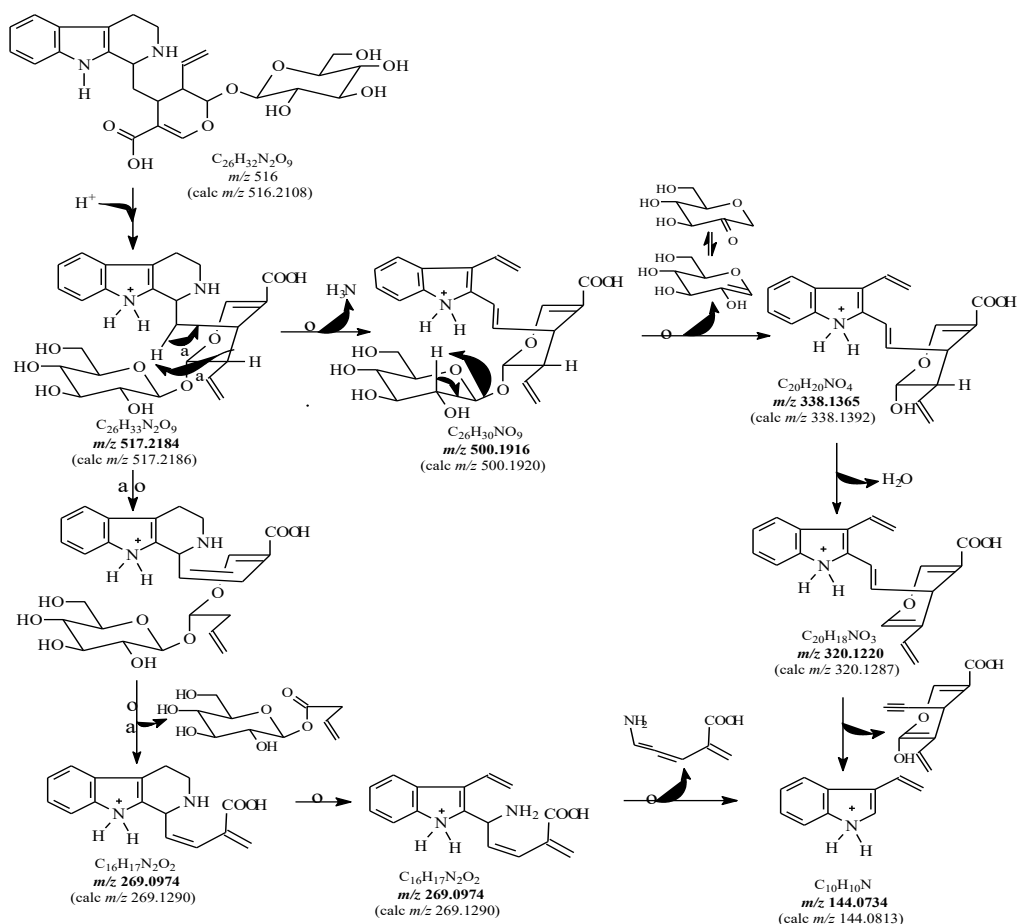
**Espectro 96.** RMN de NOESY (MeOD) de SGB-3.



Figura 30. Cromatograma por CLUE de SGB-3.



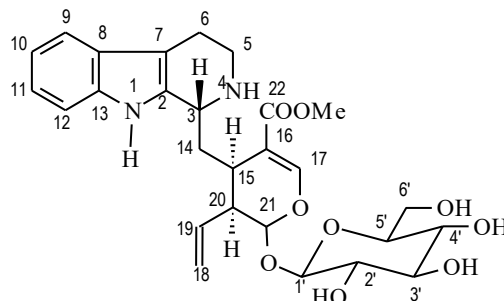
Espectro 97. IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB-3.



Esquema 16. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos de SGB-3.

### 3.2.13 Determinação estrutural de SGB-4

A substância de **SGB-4** (7 mg) solúvel em metanol e DMSO, de coloração amarela, foi elucidada como Estrictosidina através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  (1 e 2 D) e IES-EM.



**SGB-4**

Os dados dos espectros de RMN foram semelhantes aos atribuídos à substância **SGB-3** (Ácido Estrictosidínico), tendo diferenciação estrutural no carbono quaternário C-22, onde no **SGB-3** trata-se de carboxila de ácido ( $\delta_{\text{C}}$  175.91), enquanto em **SGB-4** tem a presença de sinais relativos a C=O de éster (C-22,  $\delta_{\text{C}}$  169.65) (Tabela 22).

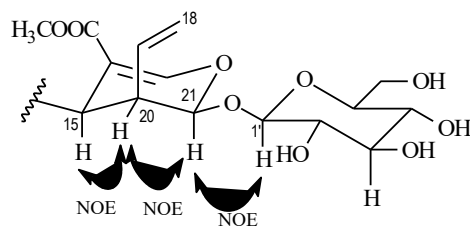
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 98) foi observado a presença dos sinais do anel indólico, na região aromática, na faixa em torno de  $\delta_{\text{H}}$  6.92 -7.35 ppm, referente aos H-9, H-10, H-11 e H-12, que pelo acoplamento de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Espectro 101 e 102) estão acoplado entre si. Nos descolamentos em  $\delta_{\text{H}}$  5.27 (CH<sub>2</sub>-18a, *d*, 17.6, *trans*) e 5.20 (CH<sub>2</sub>-18b, *d*, 10.6, *cis*) e 5.76 ppm (CH-19, *m*) encontram-se sinais que caracterizam a presença de um grupamento vinila terminal na estrutura. O sinal referente à metoxila (CH<sub>3</sub>O-22) foi assinalado ao valor de  $\delta_{\text{H}}$  3.12, com carbono em  $\delta_{\text{C}}$  49.07, típico dessa função orgânica.

Os sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  70.04 e 99.23 ppm do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 99) e os deslocamentos entre  $\delta_{\text{H}}$  2.96 e 4.56 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  são típicos de unidade glicosídica, que através do sinal  $\delta_{\text{H}}$  4.56 ( $J = 7.8$  Hz) do carbono anomérico (CH-1') correspondem a uma molécula de  $\beta$ -glicose, indicando tratar-se de um alcaloide indol monoterpênico glicosilado. A presença do singleto em  $\delta_{\text{H}}$  7.50 (H-17), juntamente com o duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5.49 (H-21,  $J = 8.8$  Hz), confirmam a presença da secologanina na proposta da estrutura.

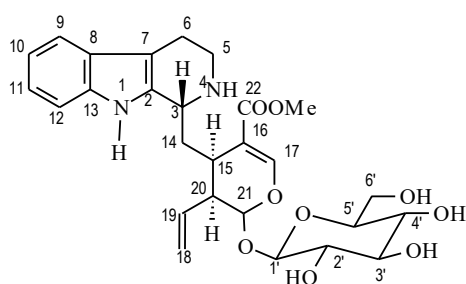
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais dos carbonos metilênicos CH<sub>2</sub>-5 ( $\delta_{\text{C}}$  46.67) e CH<sub>2</sub>-6 ( $\delta_{\text{C}}$  16.41), e no HSQC (Espectro 102) fazem correlação com os deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  3.03 e  $\delta_{\text{H}}$  2.48 e 2.78, respectivamente. O carbono metínico CH-3 teve os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  56.80 e  $\delta_{\text{H}}$  3.80 e seu hidrogênio está acoplado com o hidrogênio metilênico (H-14,  $\delta_{\text{H}}$  1.65 e 1.91), confirmando a conexão da secologanina com o anel.

Através do HSQC foi possível estabelecer a ligação entre os hidrogênios e carbonos presentes na molécula (Espectro 102). No espectro de HMBC (Espectro 103), que fornece a relação entre hidrogênios e carbonos distantes por até três ligações, as correlações  $J^{\beta}$  entre  $\delta_{\text{H}}$  4.56 (CH-1') e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  96.20 (CH-21) indicam que o carbono cetálico C-21 é o carbono de ligação com a unidade de açúcar. Também foi confirmada a posição do carbonila do éster (C-22) que interage em  $^3J$  com o hidrogênio metínico H-17.

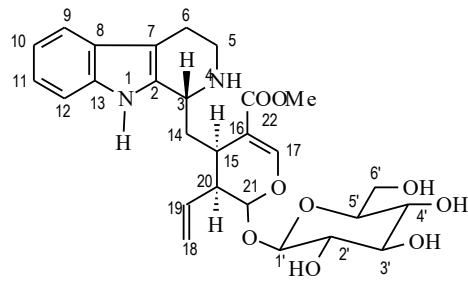
O experimento de NOESY mostrou a interação espacial do H-15 com H-20, H-20 com H-21 e H-21 com H-1', permitindo propor a configuração absoluta dos referidos hidrogênios (*S, R, R*).



O espectro de IES-EM no modo positivo (Espectro 104), apresentou o pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  531.2314 ( $C_{27}H_{35}N_2O_9$ , calc.  $m/z$  531.2342), o pico  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  553.2133 ( $C_{27}H_{34}N_2NaO_9$ , calc.  $m/z$  553.2162) e o pico com a presença do aduto  $[M+CO_2]^+$  em  $m/z$  575.1951 ( $C_{28}H_{35}N_2O_{11}$ , calc.  $m/z$  575.2241), permitindo deduzir o íon molecular  $m/z$  530.2264 ( $[M]^+$ ) de fórmula molecular  $C_{27}H_{34}N_2O_9$ . A representação dos íons e fragmentação do pico  $m/z$  488.1899 está no Esquema 17. Os resultados obtidos nos espectros de **SGB-4**, comparados com dados da literatura confirmou a presença da Estrictosidina (PATTHY-LUKÁTS, et al., 1997).



**SGB-14**



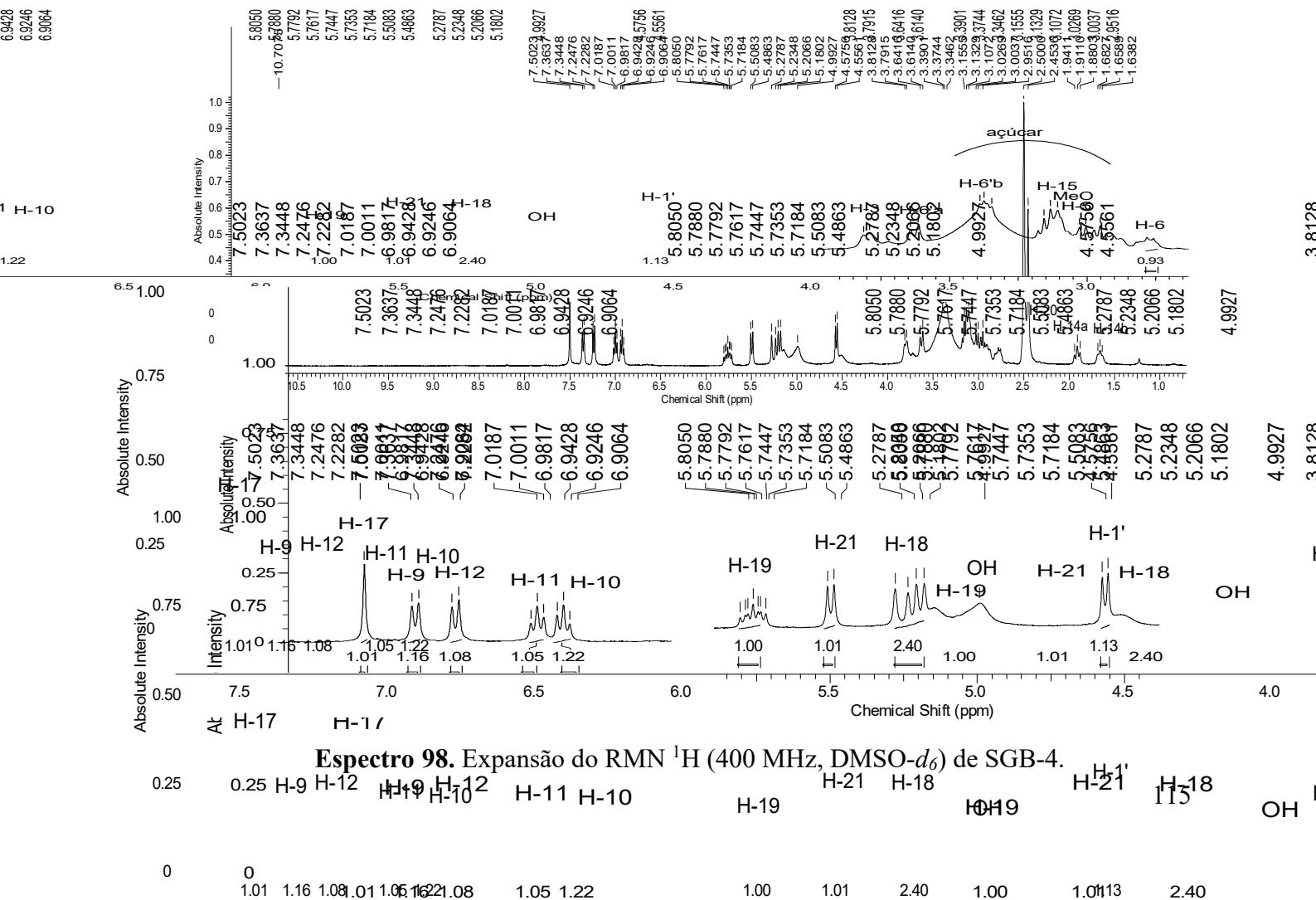
**Estrictosidine**

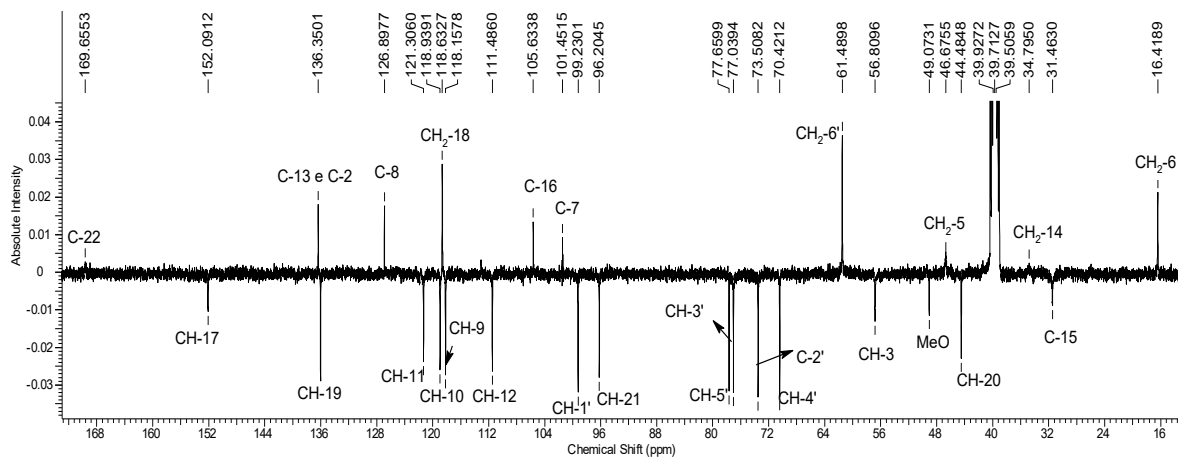
**Tabela 22.** Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -DEPTQ (400 e 100 MHz em  $DMSO-d_6$ ) de SGB-4, comparados com valores da literatura (PATTHY-LUKÁTS, et al., 1997) da Estrictosidina. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_H$  [mult.,  $J$  (Hz)] e  $\delta_C$ , ppm).

C	<b>SGB-4</b>				<b>Estrictosidina</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$J^2$	$J^3$	$\delta_C$	$\delta_H$
2	136.35	-	N-H		133.2	-
7	101.45	-		N-H	107.7	-
8	126.89	-		N-H; H-12;10	127.9	-
13	136.35	-	N-H	H-9; H-11	137.9	-
16	105.63	-			109.9	-
22	169.65	-		H-17	170.8	-
<b>CH</b>						
3	56.80	3.80			52.4	4.30
9	118.15	7.35 ( <i>d</i> , 7.5)			118.8	7.40
10	118.93	6.92 ( <i>t</i> , 7.2)	H-11	H-12	120.1	6.98
11	121.30	7.00 ( <i>t</i> , 7.0)		H-9	122.7	7.07
12	111.48	7.23 ( <i>d</i> , 7.7)		H-10	112.0	7.29
15	31.46	3.10		H-17	32.5	3.06

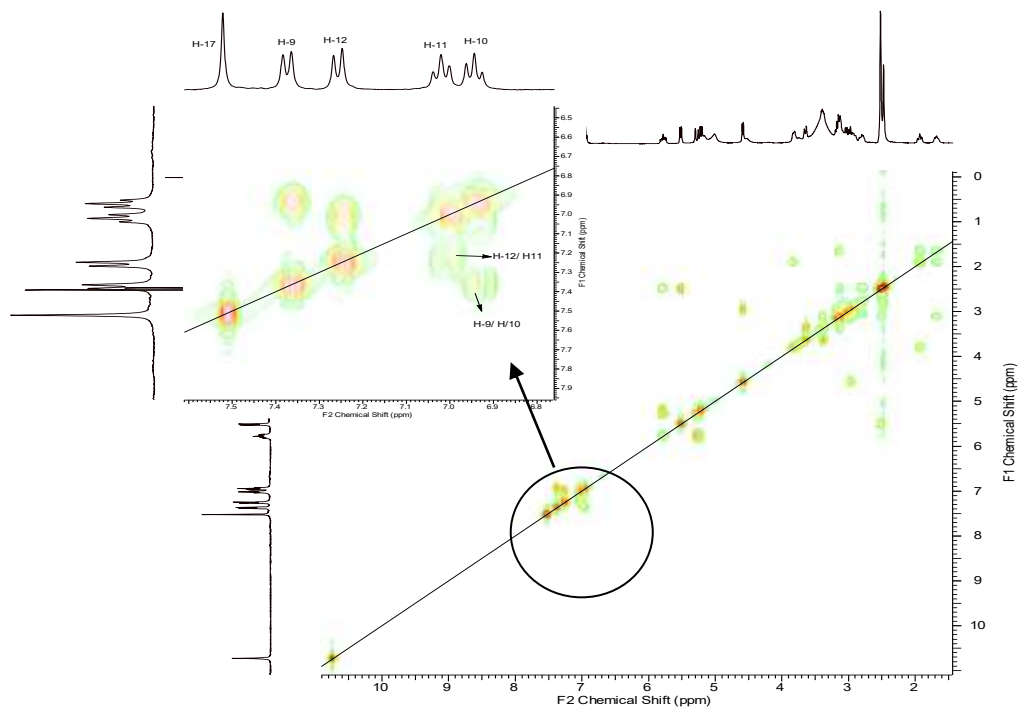


17	152.09	7.50 (s)		156.1	7.74
19	135.01	5.76 (m)		135.7	5.85
20	44.48	2.50 (s)	H-18	45.6	2.70
21	96.20	5.49 (d, 8.8)	H-17; H-1'	97.5	5.85
<b>CH<sub>2</sub></b>					
5	46.67	3.03		42.9	3.50, 3.17
6	16.41	2.48 2.78		21.0	2.95, 2.85
14	34.79	1.65 (t, 8.2) 1.91 (t, 12.0)		35.9	2.21 2.09
18	118.63	5.27 (d, 17.6) 5.24 (d, 10.6)		119.5	5.33 (Z) 5.24 (E)
MeO-22	49.07	3.12		52.4	3.77
<b>Açúcar</b>					
1'	99.23	4.56 (d, 7.8)	H-21		
2'	73.50	2.96 (dd, 7.8, 9.1)		100.3	4.80
3'	77.04	3.41 (t, 9.1)		78.6	3.45-3.20
4'	70.42	3.10 (t, 9.1)	H-3	78.0	3.45-3.20
5'	77.65	3.24 (m)		74.6	3.45-3.20
6'a		3.63 (m)		71.7	3.45-3.20
6'b	61.49	3.38 (m)			
NH-1		10.70 (s)			

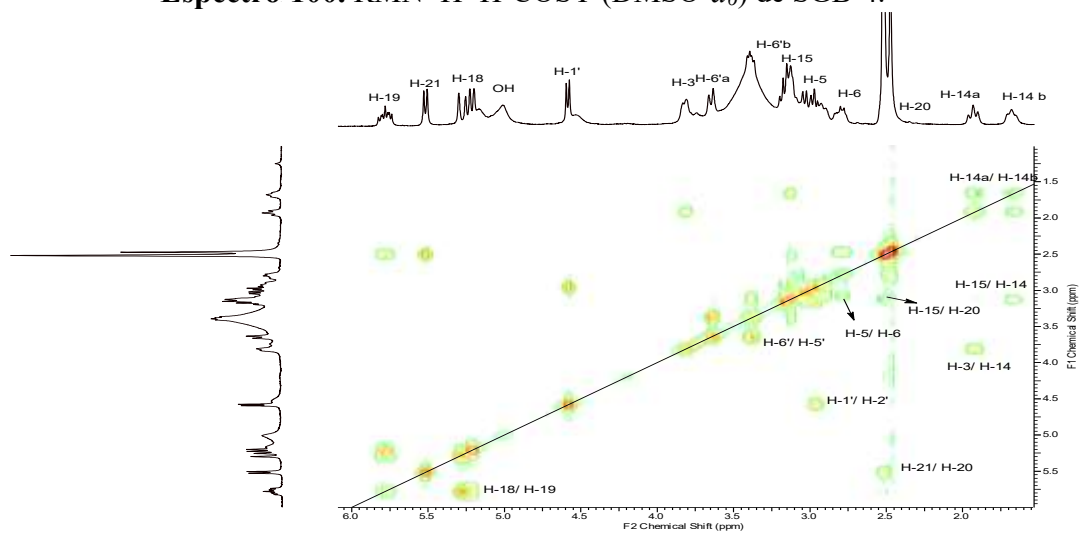




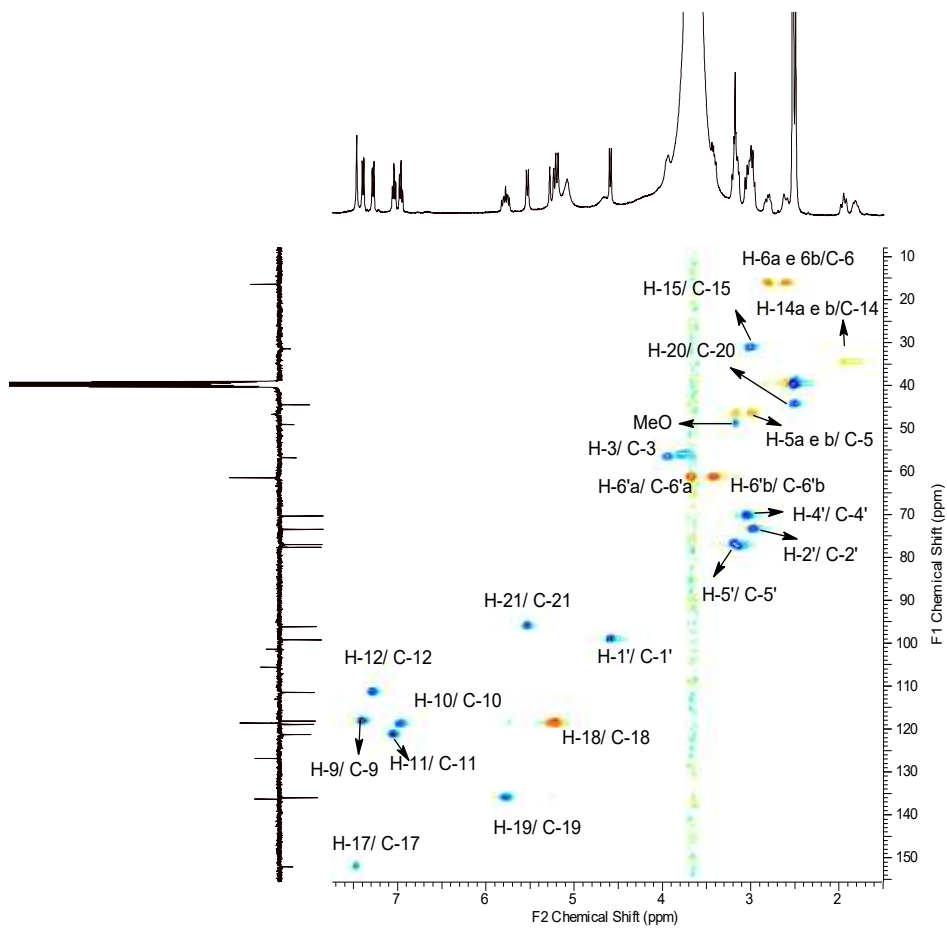
**Espectro 99.** RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de SGB-4.



**Espectro 100.** RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) de SGB-4.

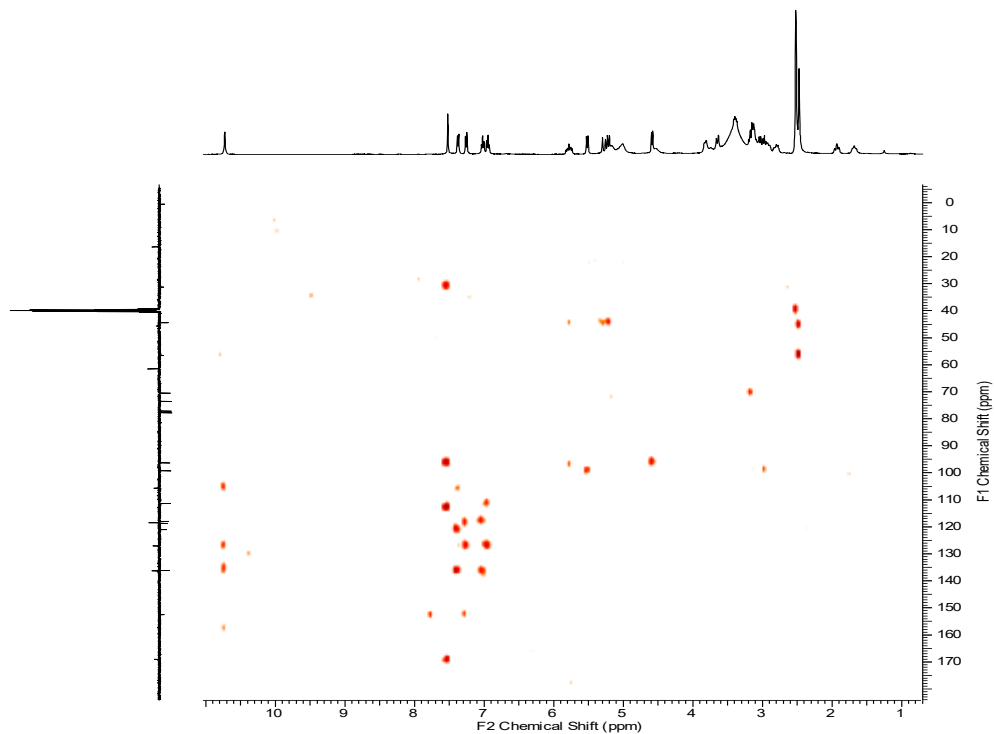


**Espectro 101.** Expansão do RMN- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) de SGB-4.

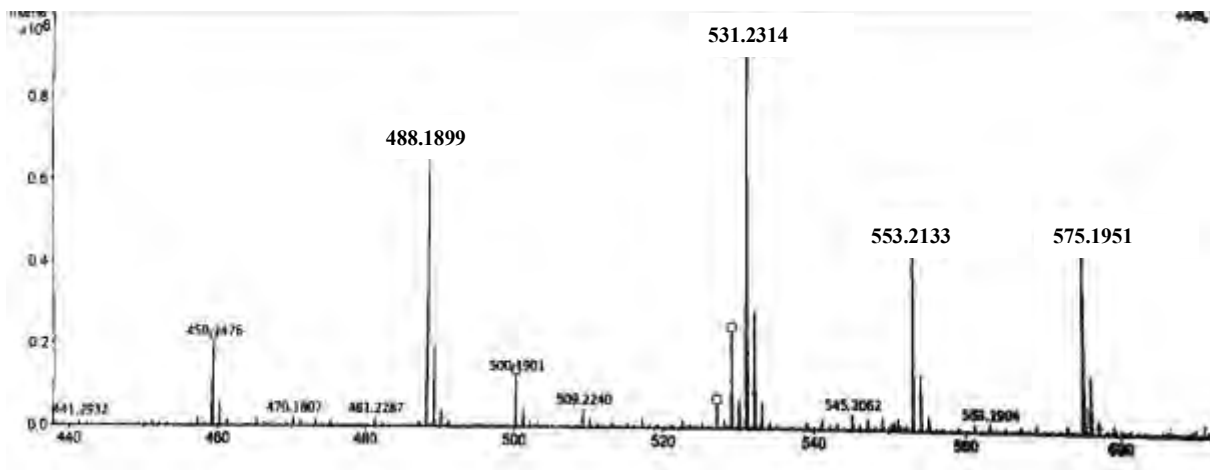


**Espectro 102.** RMN de HSQC (DMSO- $d_6$ ) de SGB-4.

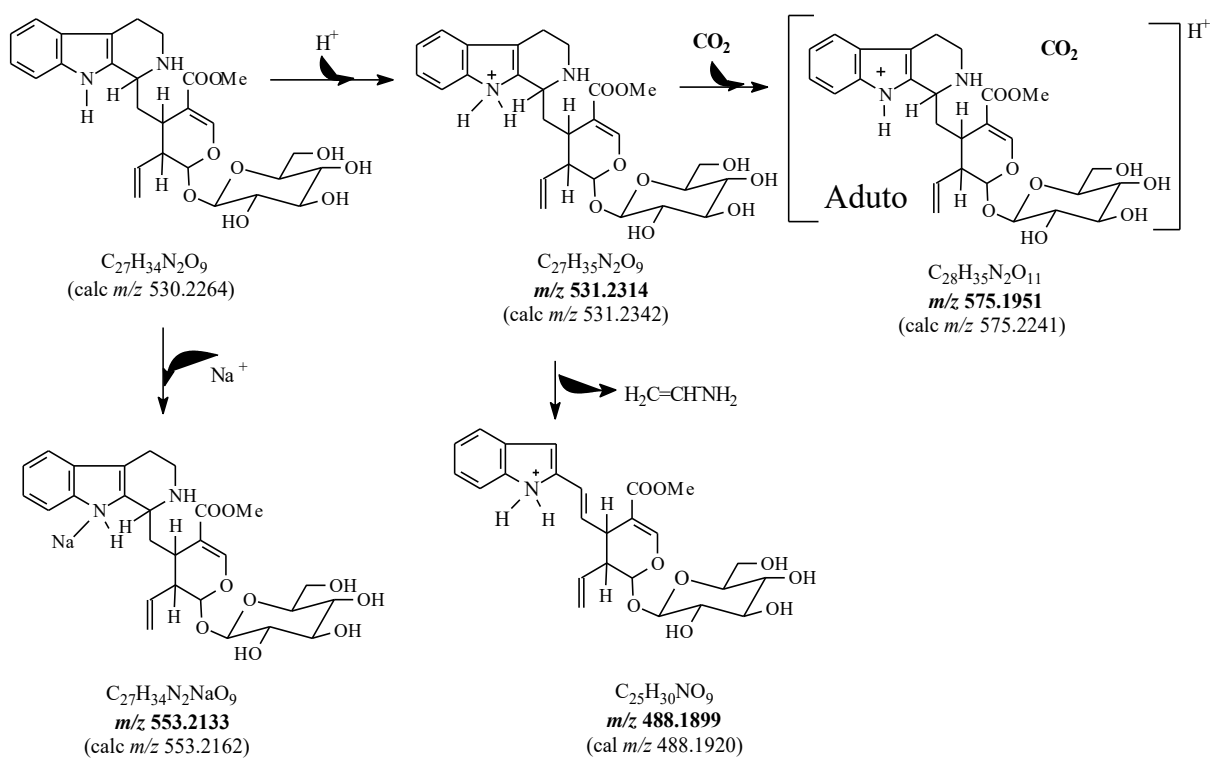
HMBC.ESP



**Espectro 103.** RMN de HMBC (DMSO- $d_6$ ) de SGB-4.



**Espectro104.** IES-EM  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+CO_2]^+$  de SGB-4.



**Esquema 17.** Propostas dos picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e do aduto  $CO_2$  de SGB-4.

#### 4. CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica do extrato metanólico da madeira de *Simira grazielae*, através dos testes de prospecção química da madeira mostrou a presença dos metabólitos saponinas, esteroide, triterpenoide, purinas, derivados da cumarina, alcaloides, sacarídeos, aminoácidos não proteico e açúcares redutores.

O fracionamento cromatográfico da madeira de *S. grazielae* permitiu o isolamento e identificação de dezoito (18) substâncias oriundos das partições do extrato metanólico. Da fração de diclorometano foram isolados quatro (4) metabólitos: o *N*-acetil-serotonina (SGD-1A), 6'-*O*-vanilloilbarbutina (SGD-1B), Maxonina (SGD-2) e uma fração rica em lipídios e/ou hidrocarbonetos (SGD-3).

Os alcaloides *trans-N-p*-coumaroil serotonina (SGAc-2A=SGAc-3A=SGAc-4A<sub>E</sub>), *N*-feruloil serotonina (moschamine)(SGAc-2B=SGAc4B<sub>E</sub>), *N*-cafeloil serotonina (SGAc-3B), *cis-N-p*-coumaroil serotonina (SGAc-4A<sub>Z</sub>), *cis*-moschamine (SGAc-4B<sub>Z</sub>), Higarine (SGAc-4C), *N*-isoferuloil serotonina (SGAc-4D), Harmana (SGAc-5), Ácido desmetilisopauridiantosídico (SGAc-6) e o Aldeído 5-hidroxiendole-3-aldeído (SGAc-1) foram provenientes a fração de acetato de etila, totalizando dessa fração dez (10) substâncias.

Da fração butanólica foram isolados quatro (4) alcaloides: Ofiorina B (SGB-1=SGB-2A), Ofiorina A (SGB-2A), Ácido Estrictosidínico (SGB-3) e o Estrictosidina (SGB-4). A Ofiorina foi isolada em diversas frações butanólica e em quantidade satisfatória quando comparados a isolamentos fitoquímicos tradicionais.

O alcaloide Ácido desmetilisopauridiantosídico (SGAc-6) está sendo identificado pela primeira vez na literatura, uma vez que só há relato desse alcaloide com o éster ligado no carbono C-16, enquanto nesse trabalho está sendo relatada a presença no grupo carboxílico ligado a esse carbono.

Com exceção dos alcaloides *N*-acetil-serotonina, Harmana e Ofiorina B, todos os demais estão sendo isolados e identificados pela primeira vez na espécie, no entanto a Harmana e a Ofiorina B estão sendo isolados em partições diferentes das já relatadas na Literatura (SANCHES et al., 2017). Este estudo fitoquímico contribuiu significativamente para o conhecimento e confirmação dos metabólitos especiais do gênero, assinalando a presença dos alcaloides indólicos e  $\beta$ -carbolínicos do gênero *Simira* e da família Rubiaceae.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. C. F.; CRANCHI, D. C.; CARVALHO, M. G.; SILVA, S. J. Triterpenes, Glucosyl Steroid and Alkaloid Isolated from *Simira glaziovii*. **Floresta e Ambient.**, v. 8, n. 1, p. 174-179. 2001.
- AQUINO, R.; GAROFALO, L.; TOMMASI, N.; UGAZ, O. L.; PIZZA, C. **Phytochemistry**, v. 37, v. 5, p. 1471-1475, 1994.
- ARAÚJO, L. L. N.; FARIA, M. J. M.; SAFADI, G. M. V. V. Prospecção fitoquímica da espécie *Justicia pectoralis* JACQ. VAR. *Stenophylla* Leonard pertencente à família acanthaceae. **Rev. Fasem Ciênc.** v. 6, n. 2, 2014.
- ARAÚJO, M. F.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G.; VIEIRA, I. J. C. Other compounds isolated from *Simira glaziovii* and the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shift assignments of new 1-*epi*-castanopsol. **Quím. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2202-2204, 2012.
- ARAUJO, M.F.; MOTTA, O.V.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M.G. Avaliação da Atividade Biológica de Três Espécies de *Simira* (Rubiaceae): Um Estudo Preliminar. 32nd Annual Meeting of the Brazilian Chemical Society, 2009.
- ARAÚJO, M. F.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G. Simiranes A and B: erythroxylanes diterpenes and other compounds from *Simira eliezeriana* (Rubiaceae). **Nat. Prod. Res.**, v. 25, n. 18, p. 1713-1719, 2011.
- ARNASON, T.; MORAND, P.; SALVADOR, J.; REYES, I.; LAMBERT, J.; TOWERS, N. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 594-595, 1983.
- BARBIERI, P. H. M.; ARAÚJO, M. F.; ROMANOS, M. T. V.; CAVALCANTE, J. F. Prospecção Fitoquímica e Atividade Antiviral de Frações das Raízes de *Simira Eliezeriana* (Rubiaceae). In: Anais do II Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão – CONEPE. **Anais...**, Instituto Federal Fluminense *Campus Guarus*, 2015.
- BAHIA. Governo do Estado. Seplantec - Subsecretaria de Ciência e Tecnologia. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979.
- BARBOSA FILHO, J. M. **Triagem fitoquímica**. UFPB: Departamento de Ciências Farmacêuticas, 2001. 10 p.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova**, n.3, v.32, 2009.
- BASTOS, A. B. F. D. O.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos isolados de *Simira glaziovii* (K. schum) steyerem. e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do alcaloide ofiorina e seus derivados. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 241-245, 2002.
- BERGER, A.; KOSTYAN, K. M.; KLOSE, S. I.; GASTEGGER, M.; LORBEER, E.; BRECKER, L.; SCHINNERL, J. Loganin and secologanin derived tryptamine-iridoid

alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 116, p. 162-169, 2015.

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Quím. Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BERTUCCI, A.; HARETCHE, F.; OLIVARO, C.; VÁZQUEZ, A. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 21-25, 2008.

BESSA, N. G. F. D.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospeção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15 n. 4, p. 692-707, 2013.

BHATTACHARYYA, J.; ALMEIDA, M. Z. Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda*. **J. Nat. Prod.**, v. 48, p. 148-149, 1985.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospeção e inovação no Brasil. **Cienc. Cult.**, v. 68, n. 1, 2016.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. R.; ARAÚJO, A. R.; DILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent Res. Dev. Phytochem.**, v. 5, p. 19-31, 2001.

BORHIDI, A.; DIEGO-PÉREZ, N. Introducción a la taxonomía de la familia Rubiaceae en la flora de México. **Acta Bot. Hung.**, v. 44, n. 3-4, p. 237-280, 2002.

BREMER, B.; ERIKSSON, O. Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 47, n. 1, p. 79-95. 1992.

BREMER, B. & ERIKSSON, O. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. **Int. J. Plant Sci.**, v. 170 p. 766-793, 2009.

CABRAL, E. L.; MACIAS, L.; DI MAIO, F. R.; PEREIRA, M. do S.; SALAS, R.; BARBOSA, M. R. de V.; PEIXOTO, A. L.; NETO, S. J. da S.; SOUZA, E. B.; FILHO, P. G. Rubiaceae. In: GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P. de; SILVA, J. M. C. da. **Planta Raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. p. 351-357

CALLADO, C. H.; NETO, S. J. S. Anatomia do lenho de três espécies do gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae) da Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 54, n. 83, 2003.

CARVALHO, C. A.; SANTANA, G. S.; AMARO, M. O. F.; LIMA, L. M.; PIRES, F. B.; PRÁ, V. D.; CARDOSO, S. A.; ROSA, M. B.; OLIVEIRA, L. L. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* (Fabaceae). **Ciênc. Nat.**, v. 36, n. 2, p. 732-744, 2014.

CASTANEDA, P.; ALBOR, C.; MATAR, R.; BYE, R.; LINARES, E. Alkaloids from *Simira mexicana*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 4, p. 366, 1991.

CASTRO, O.; LÓPEZ, J. V. Harman, alcaloide mayoritario de la raíz de *Simira maxonii* Standley (Rubiaceae). **Ing. Cien. Quim.**, v. 10, n. 3-4, p. 56-57, 1986.

CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 26-29, 2008.

CHIQUIERI, A.; Di MAIO, F. R.; PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora brasiliensis de Martius. **Rodriguésia**. v. 55, n. 84, p. 47-57. 2004.

CNCFlora. *Simira grazielae* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Simira grazielae](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Simira%20grazielae)>. Acesso em: 7 outubro 2016.

CNPq. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Pioneiras da Ciência no Brasil**. Disponível em: <<http://cnpq.br/pioneiras-da-ciencia-do-brasil>>. Acessado em: 18 de abr. 2017.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v. 3, 1978. p. 646

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. V. II e III.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3v. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. "Natural products: A continuing source of novel drug leads". **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 3670, 2013.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2014. 674p.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; GUERRERO-ANALCO, J. A.; QUIJANO, L.; MATA, R. Antinociceptive activity of 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 83, n. 2, p. 342–348, 2006.

DELPRETE, P. G. Notes on calycophyllous Rubiaceae. Part III. Systematic position of the monotypic Mexican genus *Cosmocalyx* and notes on the calycophyll development. **Brittonia**, v. 50, p. 309-317, 1998.

DELPRETE, P. G. **Rubiaceae**. In: Smith, N.P. *et al.* (eds.). Flowering plant families of the American tropics. Princeton University Press, New York Botanical Garden Press. 2004. p. 328-333.



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, 2012.

FERRARI, F.; MESANA, I.; BOTTA, B.; MELLO, J. F. Constituents of *Guettarda platypoda*. **J. Nat. Prod.**, v. 49, p. 1150-1151, 1986.

FERRAZ, C. A. A. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica de *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto**. 197p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2017.

FIORAVANTI, C. Maior diversidade de plantas do mundo. **Pesquisa Fapesp**. Ed. 241, p. 43-47, 2016.

FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2017.

Flora do Brasil 2020. Rubiaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14287>>. Acesso em: 16 Outubro de 2018

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. **Toxicol. in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 559-566, 2008.

GAUDENCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, p. 779, 2015.

GAZDA, V. E. **Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiocca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RUHSAM, M.; BRIDSON, D. M.; DAVIS, A. P. **World checklist & bibliography of Rubiaceae**. The Trustees of the Royal Botanic Gardens: Kew. 2007.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: Simões M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed., 2001.

GUERRERO-ANALCO, J.; MEDINA-CAMPOS, O.; BRINDIS, F.; BYE, R.; CHAVERRI-PEDREZA, J.; NAVARRET, A.; MATA, R. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2087-2095, 2007.

GUERRIERO, A.; D'AMBROSIO, M.; PIETRA, F.; Peridines, sterols, and indole derivatives from the lithistid sponge *Corallistes undulates* of the Coral Sea. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n.11, p.1962-1970, 1993.

HASBUN, C. P.; CALDERON, M.; CASTRO, O.; GÁCS-BAITZ, E.; MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D. Maxonine, A novel alkaloid from *Simira maxonii*. **Tetrahedron Lett.**, v. 30, n. 45, p. 6199-6202, 1989.

HEITZMM, M. E; NETO, C. C; WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 5-29, 2005.

HOEHNE, F. C. **O que vendem os hervanários da cidade de São Paulo**. Serviço Sanitário do estado de São Paulo, São Paulo, 247, 1920.

JAYASINGHE, U. L. B.; JAYASOORIYA, C. P.; BANDARA, B. M. R.; EKANAYAKE, S. P.; MERLINI, L.; ASSANTE, G. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 424-427, 2002.

KELLY, T. R.; XU, W.; SUNDARESAN, J. Maxonine - Structure Correction and Synthesis. **Tetrahedron Lett.**, v. 34, n. 39, p. 6173-6176, 1993.

KIM, B. C.; KIM, H. G.; LEE, S. A.; LIM, S.; PARK, E. H.; KIM, S. J.; LIM, C. J. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH 2-terminal kinasedependent activation of mitochondrial pathway. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, p. 1398-1407, 2005.

KOBAYASHI, J.; MURAYAMA, T.; ISHIBASHI, M.; KOSUGE, S.; TAKAMATSU, M.; OHIZUMI, Y.; KOBAYASHI, H.; OHTA, T.; NOZOE, S.; SASAKI, T. Hyrtiosins A and B, new indole alkaloids from the Okinawan marine sponge *Hyrtios erecta*. **Tetrahedron**, v. 46, n. 23, p. 7699-1102, 1990.

KOO, H. J.; SONG, Y. S.; KIM, H. J.; LEE, Y. H.; HONG, S. M.; KIM, S. J.; KIM, B. C.; JIN, C.; LIM, C. J.; PARK, E. H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 495, p. 201-208, 2004.

LEVESQUER, J.; ACQUESY, O. Un gluco-alcaloide de configuration inhabituelle isole de *Pauridzantha lyallii*: l'isopauridianthoside. **J. Nat. Prod.**, v. 4, n. 5, p. 619-625, 1983.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier. **Science**, v. 325, p.161-165, 2009.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Nd. Crop. Prod.**, n.1, v.34, p.785-801, 2011.

LPWG [Legume Phylogeny Working Group]. Phylogeny and classification of the Leguminosae. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.

LUZ, H. S.; SANTOS, A. C. G.; LIMA, F. C.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, p. 657-662, 2014.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Bol. Cent. Biol. Reprod. Reprod.**, v. 27, p. 33-39, 2008.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Ficha de Característica das Madeiras Brasileiras**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas. 1989, 420 p.

MARGALHO, L. F.; SIQUEIRA, G. de S.; DELPRETE, P. G.; GROppo, M. *Simira robusta* (Rubiaceae, Condamineae), a new species from the Atlantic Rainforest of south-eastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 299, n. 1, p. 118-124, 2017.

MARTINS, D.; NUNEZ, C.V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, v. 20, p. 13422-13495, 2015.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MENEZES, I. M. G. B. **Estudo químico e biológico das partes aéreas de *Simira gardneriana* M. R. Barbosa & A. L. Peixoto (Rubiaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2014.

MERCK, E. **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel**. Alemanha: Darmstaadt. 1980, 76p.

MORAES, T. M. S.; BARROS, C. F.; SILVA-NETO, S. J. da; GOMES, V. M.; CUNHA, M. da. Leaf blade anatomy and ultrastructure of six *Simira* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rain Forest, Brazil. **Biocell**, v. 33, n. 3, p. 155-165, 2009.

MOREIRA, V. F.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes Químicos e Atividades Biológicas do Gênero *Simira*: Uma Contribuição para a Quimiotaxonomia da Família Rubiaceae. **J. Nat Prod.**, v.4, n. 4, p.290-298, 2014.

MOREIRA, V. F.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R. Angelocunhol: New Erythroxyllane Diterpene and Other Compounds from *Simira sampaioana* (Rubiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 28, n. 1, p.152-157, 2017.

MOURA, M. de M.; SANTOS, D. P. dos; SANTIN, S. M. de O. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 452-455, 2006.

NASCIMENTO, W. M. O. do; DAMIÃO-FILHO, C. P. Caracterização morfológica de sementes e plântulas de jenipapeiro (*Genipa americana* L.-Rubiaceae). **Rev. Bras. Sementes**, v. 20, n. 1, p. 143-147, 1998.

NASCIMENTO, C. A.; GOMES, M. S.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Z. Naturforschp.**, v. 61b, p. 1443-1446, 2006.

NASCIMENTO, C. A.; LIÃO, L. M.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A.; SCHUQUEL, I. T. A.; OLIVEIRA, C. M. A. A tetrahydro  $\beta$ -carboline trisaccharide from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 1104-1107, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.461–477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**,v.75, p.311–335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, M. G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v.79, p. 629–661, 2016.

O'BRIEN T. G.; KINNAIRD, M. F. Caffeine and conservation. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 587, 2003.

PATTHY-LUKÁTS, A.; KÁROLYHÁZY, L.; SZABÓ, L. F.; PODÁNYI, B. First Direct and Detailed Stereochemical Analysis of Strictosidine. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 69-75, 1997.

PEIXOTO, A. L. The species of *Simira* (Rubiaceae, Rondeletieae) of northern Espírito Santo State, Brazil. **Arq. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. v. 5, n. 2, p. 115-128, 1982.

PEREIRA, F. S. G. **Bioquímica numa abordagem química**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Recife, 2010.

PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M. de; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento in vitro de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha de gato). **Cienc. Agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.

PINA, E. M. L.; ARAÚJO, F. W. C.; SOUZA, I. A.; BASTOS, I. V. G. A.; SILVA, T. G.; NASCIMENTO, S. C.; MILITÃO, G. C. G.; SOARES, L. A. L.; XAVIER, H. S.; MELO, S. J. Triagem farmacológica e toxicidade aguda de raízes casca de *Guettarda platypoda*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 6, 2012.

QUEIROZ, G. S. **Análise de esteroides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora***. Estágio Supervisionado II. Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química. Florianópolis, 2009.

RECORD, S. J.; HESS, R. W. 1972. **Rubiaceae**. In: *Timbers of the New World*, 2 ed., New York: Arno Press. p. 475-477

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995.

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

SALDANHA DA GAMA, J. **Configuração e estudo botânico dos vegetais seculares III**: 1-127. Typogr. Univ. Laemmert, Rio de Janeiro, 1872.

SANCHES, M. N. G.; CHAVES, D. S. A.; CARVALHO, M. G.; ARAUJO, M. F.; VIEIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical Compounds Isolated from *Simira grazielae*. **Chem. Nat. Compd.**, v. 53, n. 3, p. 543-544, 2017.

SANCHES, M. N. G. **Metabólitos especiais isolados de madeira de *Simira grazielae* (Rubiaceae) e atividades biológicas**. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2013.

SARKER, S.D.; SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SIK, V.; DINAN, L.N. Moschamine, cis-moschamine, moschamine, moschamindole and moschamindolol: four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. **Nat. Prod. Lett.**, v.9, p.189-199, 1997.

SBFGNOSIA. **Cumarinas**. Apostila de Aula Prática de Farmacognosia UEM e UEL. Disponível em: <<http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/cumarinas.html>>. Acesso em: 27 de agosto de 2017.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. **Saponinas**. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC, 2001. p. 597-619.

SILVA NETO, S. J. **O gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae, Rondeletieae) no Brasil extra-amazônico**. 80 f. Dissertação Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFRJ, 2000.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M. V. M. **Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Quito: TRAFFIC/IBAMA, 2001. p. 52.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. Petrovick. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC, 2004.

SOUZA, F. G. L. S.; LOEUILLE, B. F. P.; Levantamento de espécies de Asteraceae na Chapada do Araripe (Ceará, Pernambuco e Piauí). **Rev. Bras. Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 112, 2018.

SUN, J.; LOU, H.; DAI, S.; XU, H.; ZHAO, F.; LIU, K. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1405–1410, 2008.

TAKAHASHI, T.; MIYAZAWA, M. Serotonin derivatives as inhibitors of -secretase (BACE 1). **Pharmazie**, v. 66, p. 301-305, 2011.

WALL, M. E.; GARVIN, J. W. WILLAMAN, J. J.; SCHUBERT, B. G. Steroides saponins VII- Survery of plants for steroidal sapogenins and another constituents. **J. Amer. Pharm. Ass.**, v. 43, 1954.

WU, Q. X.; LI, Y.; SHI, Y. P. Antioxidant phenolic glucosides from *Gentiana piasezkii*. **J Asian Nat Prod Res.**, v. 8, n. 5, p. 391-396, 2006.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. **Lipids**, v. 42, p. 87-96, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. Petrovick. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC. p. 577-614. 2004.

**CAPÍTULO II**  
**DESREPLICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE *S.***  
***grazielae***

## RESUMO

Plantas superiores biossintetizam uma diversidade química de metabólitos, que podem ser utilizados para descoberta de novos fármacos e de matéria-prima para a produção de novas substâncias para terapias diversas. A identificação das substâncias já conhecidas em misturas complexas através da aplicação da técnica desrepliação tornou-se importante agilizando a descoberta de novas substâncias. O objetivo desse capítulo foi estudar a constituição química de *S. grazielae* P. através da técnica de desrepliação com CLUE-EM/EM. Foram analisados os extratos metanólicos SGM (*Simira grazielae* madeira) e SGC (*Simira grazielae* casca) e as frações hexânicas (SGH), diclorometano (SGD), acetato de etila (SGAc), butanólica (SGB) e residual (SGR). O sistema foi o UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), com coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1cm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C. Com eluição: água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos na fonte de ionização por eletrospray no modo positivo (ESI<sup>+</sup>) e analisados pelo software MassLynx. Após a aquisição dos íons moleculares e das possíveis fórmulas moleculares, juntamente com bancos de dados e das plataformas de pesquisa (Dictionary of Natural Products, Scifinder, ChEBI, ChemSpider e PubChem), os constituintes químicos foram identificados e justificados através das propostas mecanísticas de fragmentações. A desrepliação no modo positivo, juntamente com as propostas de fragmentação, permitiu postular a presença de 27 substâncias na fração SGD, 38 na fração SGAc, 13 na fração SGB e 7 na fração SGR e 22 substâncias no extrato SGC. Sendo que alguns desses metabólitos identificados estavam presentes em várias frações, totalizando assim, 57 substâncias identificadas de *S. grazielae* dentre os isômeros. Dessa quantia 20 substâncias estão sendo propostas como inéditas na literatura. Quase a totalidade das substâncias identificadas foram alcaloides indólicos monoterpênicos glicosilados, tendo destaque os metabólitos secundários: Ofiorina A, Ofiorina B, Ácido Lialosídico, Ácido Estrictosidínico, Lialosídeo, Ácido 3-*epi*-Estrictosidínico, Estrictosidina e Harmana. A partir desses resultados pode-se afirmar que essa pesquisa contribuiu para o conhecimento das substâncias químicas do gênero *Simira*, e para futuras descobertas de novas substâncias bioativas.

**Palavras-chaves:** Desrepliação, Espectro de massas, Alcaloides.



## ABSTRACT

Higher plants can be metabolized into metabolic, which can be used for the discovery of new drugs and primary substances for the production of new substances for various therapies. Identification of the substances is already used in complex applications through the application of the technique of de-duplication to a large extent, speeding up an adventure of new substances. The graph was developed for the chemistry of *S. grazielae* P. through the technique of dereplication with UPLC-ESI-MS/MS. Methane extracts SGM (*Simira grazielae* wood) and SGC (*Simira grazielae* bark) and hexane fractions of wood (SGH), dichloromethane (SGD), ethyl acetate (SGAc), butanolic (SGB) and residual SGR were obtained by UPLC/MS-MS. The system was UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), based on Heated Waters UPLC BEH C18 (150 mm x 2.1 cm, 1.7  $\mu$ m), fixed temperature of 40 ° C. Elution: Water with 0.1% ferric acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B), variable gradient 0-15 min (2-95%) of B, flow 0.4 ml / min injection volume of 5  $\mu$ l. High resolution mass spectra were taken at electrospray ionization source in positive (ESI<sup>+</sup>) and MassLynx software. After purchasing the data and lists of molecular tools, databases and research platforms (natural products dictionary, Scifinder, ChEBI, ChemSpider and PubChem). The positive mode, with fragmentation specifications, is applied in the presence of 27 samples in the SGD, 38 in the SGAc fraction, 13 in the SGB fraction and 7 in the SGR fraction, and 22 extract SGC. Some of the metabolites are present in several fractions, thus totaling 54 of the occurrences of *S. grazielae* among isomers. Of this amount 20 substances are being applied as unpublished in the literature. Almost the sum of the substances were glycosylated monoterpene indole alkaloids, and the secondary metabolites could be highlighted: Ofiorin A, Ofiorin B, Lysoside Acid, Strictosidic Acid, Lysoside, 3-epi-Strictosidic Acid and Harman. From the results it can be done that this research contributes to the knowledge of the chemical substances of the genus *Simira*, and for future discoveries of new bioactive substances

**Key words:** Dereplication, Mass spectrum, Alkaloids.

## 1. INTRODUÇÃO

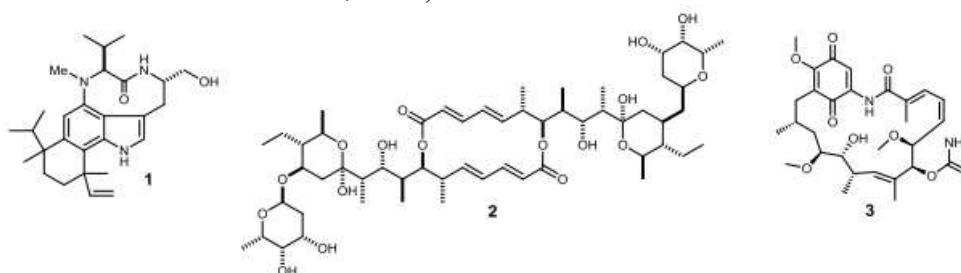
### 1.1 Visão geral da desrepliação

Os produtos naturais são conhecidos fontes de produção de metabólitos químicos com características únicas, estruturas e propriedades para a saúde humana, exibindo uma ampla variedade de aplicações que inspiram vários setores industriais. Assim, não há dúvidas de que os produtos naturais são a fonte mais consistente e bem sucedida na geração de novos fármacos (GAUDENCIO e PEREIRA GAUDENCIO, 2015).

A rápida identificação de compostos conhecidos em misturas complexas, uma etapa crucial na busca de novas substâncias bioativas, é um exercício rotineiro nos laboratórios de pesquisas avançadas, bem como nas companhias farmacêuticas e é conhecida como desrepliação (BOBZIN et al., 2000; FREDENHAGEN et al., 2005).

O termo “desrepliação” (do inglês, dereplication) popularizou-se na literatura acadêmica a partir dos anos de 1990 como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos, objetivando a identificação de compostos bioativos conhecidos de maneira a se evitar o re-isolamento e determinação estrutural de uma substância que não seja inédita (NG et al., 2009).

O processo de desrepliação foi inicialmente utilizado para a busca de substâncias específicas em meios de crescimento de diferentes linhagens de microrganismos, tais como a teleocidina (1), a elaiofilina (2), e a geldanamicina (3) (Figura 1) (SEDLACK et al., 1992 e ALVI, PETERSON e HOFMANN, 1995).



**Figura 1.** Estruturas das primeiras moléculas identificadas por desrepliação.

Além de impedir a replicação de trabalhos, esta abordagem minimiza o consumo de amostra e solvente, além de acelerar o estágio de descoberta de novas substâncias com atividade biológica (LANG et al., 2008).

O procedimento geral da desrepliação envolve a identificação/separação dos componentes de matrizes complexas através de métodos cromatográficos de acoplamentos (hifenação) a diferentes detectores e/ou coletores de frações, e em seguida pela coleta de dados espectroscópicos que são comparados as informações obtidas nas bases de dados, chegando assim, a detecção e a uma proposta de elucidação estrutural (LANG et al., 2008).

Vários métodos analíticos de desrepliação foram desenvolvidos para a detecção de moléculas acumuladas em plantas com propriedades adoçantes (CHUNG et al., 1997), extratos de origem natural com atividade anti-HIV (CARDELLINA et al., 1999), extratos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (RHEE et al., 2001), extratos com atividade inibidora de ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases (JIA, 2003), substâncias de plantas com atividade citotóxica (KINGHORN et al., 2003), substâncias com atividade antituberculose (STAVRI et al., 2004) e antifúngico (MASOKO e ELOFF, 2005).

Técnicas de desrepliação também foram utilizadas para detectar classes específicas de produtos naturais, como flavonoides glicosilados (WARIDEL et al., 2001), polipeptídeos (CLAESON et al., 1998), limonoides (CUI et al., 1998), derivados do ácido cafeico (PAULI et al., 1999), depsipeptídeos cíclicos (POTTERAT et al., 2000), flavonoides e derivados de

flavonoides (WOLFENDER et al., 2000), derivados de taxoides (STEFANOWICZ et al., 2001), vitanolídeos citotóxicos (MINGUZZI et al., 2002), sesterterpenos de esponjas marinhas (STESSMAN et al., 2002), micotoxinas de fungos (NIELSEN e SMEDSGAARD, 2003), fitoestrogênios (VAN ELSWIJK et al., 2004), terpenos glicosilados (WARIDEL et al., 2004), isoflavanoides (LAMBERT et al., 2005) e triterpenos pentacíclicos (GU et al., 2006).

Nielsen e Smedsgaard (2003) desenvolveram um método em micro escala para a detecção e desreplicação de metabólitos de fungos utilizando CL-DAD-EM. Esta metodologia permitiu aos autores a elaboração de um banco de dados com 474 metabólitos sem a necessidade da utilização de padrões, utilizando-se somente a análise de padrões de fragmentação por eletrospray. Além disso, os autores indicam as melhores condições de análise em função dos possíveis metabólitos presentes, incluindo a obtenção de dados para compostos estruturalmente inéditos.

As técnicas de desreplicação estão continuamente em desenvolvimento no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido à sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas (SHEO e BARRETT, 2006).

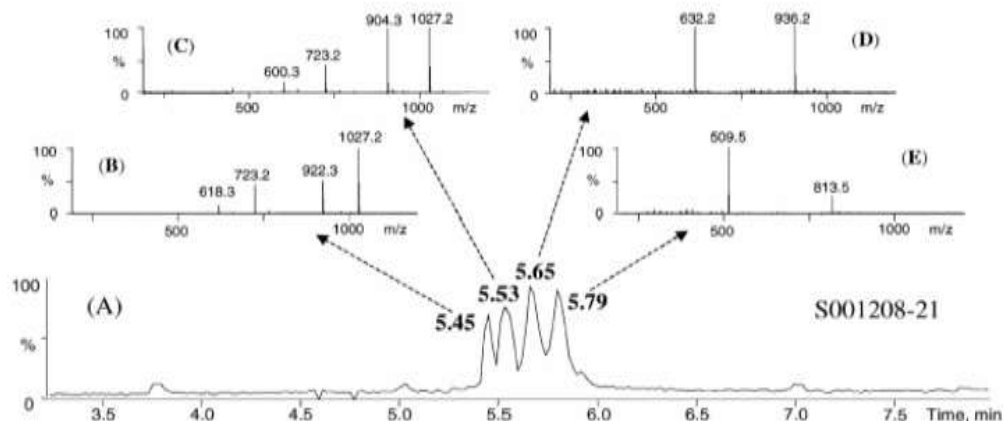
## 1.2 Técnicas utilizadas nas análises de desreplicação

Diversas são as técnicas de hifenações utilizadas na desreplicação, cada uma com vantagens com relação à sensibilidade e a resolução. As mais comuns envolvem os acoplamentos CL-UV/DAD (Cromatografia Líquida acoplada à detecção por Ultravioleta em detector de arranjo de diodos), CL-EM (Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas), CL-EMn (Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de Massas sequencial) e CL-RMN (Cromatografia Líquida acoplada Ressonância Magnética Nuclear).

O uso de CL-UV/DAD é amplamente conhecido na química de produtos naturais devido ao menor custo do equipamento e das análises, e tem sido utilizada na desreplicação através da comparação dos dados espectroscópicos de UV, obtidos diretamente após a separação dos constituintes em um sistema denominado *online*, com as absorções características do composto conhecido. Porém, seu uso é limitado apenas para compostos que apresentam cromóforos, como os polifenóis, e a mudança nas condições cromatográficas podem influir negativamente na detecção, principalmente em menores comprimentos de onda (WOLFENDER et al., 2009).

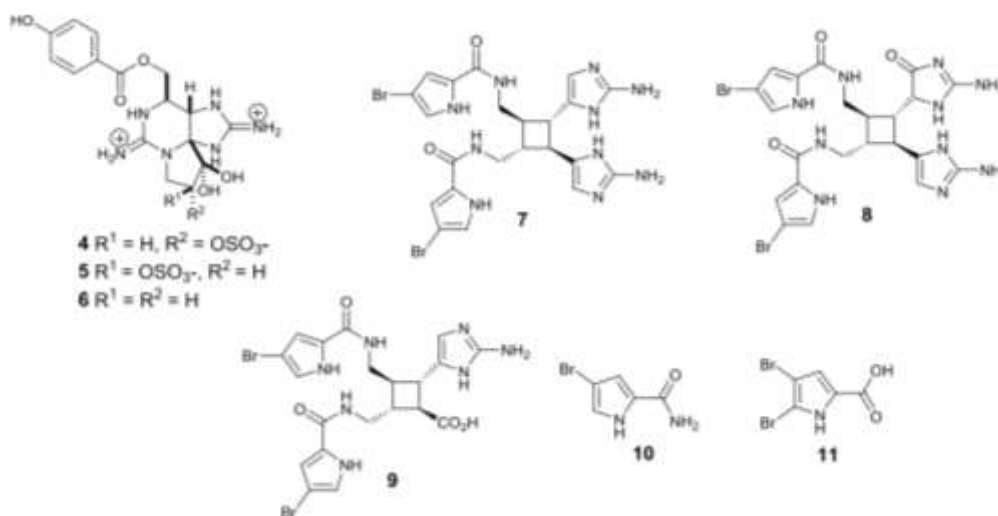
O uso da espectroscopia de RMN como ferramenta na desreplicação tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido a sua robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos ativos orgânicos mais populosos:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Seu uso pode ser feito a partir de hifenação com CL em fluxo contínuo para determinação dos constituintes majoritários, ou por coleta em extração de fase sólida permitindo a realização de espectros 2D e a detecção dos compostos minoritários. Além disto, por meio do uso de sequências de pulso, é possível a detecção *in situ* de compostos conhecidos através da obtenção de espectros de RMN de moléculas individuais em mistura sem haver a necessidade de separação (VERPOORTE et al., 2007; KIM et al., 2010).

A espectrometria de massas (EM) tem sido a mais utilizada na desreplicação de matrizes naturais devido à sua versatilidade, rapidez e elevada sensibilidade, possibilitando o uso de pequenas quantidades de amostra. A partir dos dados obtidos (a massa molecular de baixa ou alta resolução e as fragmentações) realiza-se a determinação estrutural através da busca da fórmula molecular em bases de dados como *AntiBase*, *Dictionary of Natural Products*, *MarinLit* e mesmo o *SciFinder Scholar* ou *STN International* (CAPlus), e justifica-se a detecção por propostas mecanísticas de fragmentação (LANG et al., 2008; WOLFENDER et al., 2009) (Figura 2).



**Figura 2.** Análise de LC-EM/EM empregada na desrepliação de compostos presentes em extratos de plantas. Fonte: Nielsen e Smedsgaard, 2003.

Higgs e colaboradores (2001) desenvolveram um método rápido (1 minuto) para detectar a presença de metabólitos secundários em extratos de 43 linhagens de actinomicetos (bactérias Gram positivas filamentosas) utilizando CL-EM, método que também pode ser posteriormente utilizado para otimizar as condições de crescimento e produção de metabólitos por microrganismos. Três novos derivados da saxitoxina, (4-6), contendo um grupo hidroxibenzoato foram isolados por esse monitoramento (Figura 3).



**Figura 3.** Novas substâncias bioativas naturais isoladas por desrepliação com CL-EM.

Nielsen e Smedsgaard (2003) utilizaram desrepliação por CL-PDA-EM para a análise de metabólitos de fungos, onde os dados permitiram a elaboração de um banco de dados com 474 metabólitos, incluindo compostos estruturalmente inéditos, sem a necessidade da utilização de padrões empregando somente a análise de padrões de fragmentação.

### 1.3 Identificação por desrepliação - EM/EM

A aplicação da espectrometria de massas (EM) e o seu acoplamento com técnicas de separação, especialmente a cromatografia líquida (CL-EM), tem sido reconhecida como a técnica de separação direta mais eficiente em análises e caracterização de produtos naturais. A espectrometria de massas, especialmente quando é possível a realização da fragmentação dos

compostos (EM/EM), pode ser usada para detectar analitos com maior sensibilidade e seletividade, através da análise da razão massa-carga ( $m/z$ ) (CHENG et al., 2008).

A identificação de metabólitos via massas é usualmente realizada segundo as combinações das informações, exatidão de massas, distribuição isotópica e padrões de fragmentação.

O padrão de fragmentação de um dado íon fornece informações estruturais daquele composto. O conhecimento das vias de fragmentação assim como o entendimento de quebras homolíticas ou heterolíticas tem permitido a elucidação de compostos via EM. Um exemplo típico são os flavonoides *O*-glicosilados. Ligações lábeis como, por exemplo, entre a aglicona e o glicosídeo são facilmente rompidas através de perdas neutras. Assim, com baixa energia de colisão (como na fonte de ionização) é possível distinguir diferentes classes de açúcar como hexoses, deoxihexose, pentoses e outros.

Para maiores energias de colisão são notadas quebras relativas ao esqueleto molecular como reações de retro-Diels-Alder (RDA), saídas de monóxido de carbono, quebras radiculares e perdas neutras de água. Com este arsenal de informações é possível reconstruir a molécula estudada permitindo, em alguns casos, determinar o padrão de substituição e a conectividade dos seus elementos (CLAEYS et al., 1996; CROTTI et al., 2006; CUYCKENS et al., 2000 e 2005; MARCH et al., 2006; PETERSON et al., 2014; WARIDEL et al., 2001).

## 1.4 Os alcaloides

### 1.4.1 Definição e Histórico

Meissener, em 1819 foi o primeiro a usar a palavra alcaloide para designar algumas substâncias ativas que se encontravam em vegetais e que possuíam caráter básico. Em 1983 Pelletier, citado por Henriques e colaboradores (2003), designa os alcaloides como substâncias nitrogenadas que geralmente contêm nitrogênio em um anel de estrutura variável, em um estado de oxidação negativo. No ano de 1910, Winterstein e Trier definiram alcaloides em um sentido mais amplo, como substâncias básicas nitrogenadas de origem vegetal ou animal (ACCAME, 2001).

O nome alcaloide vem do fato de essas substâncias serem álcalis, uma vez que possuem um grupo amina que lhes confere um caráter básico. Os alcaloides que contêm um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados alcaloides verdadeiros, os que não possuem nitrogênio em um sistema de anel heterocíclico são denominadas de protoalcaloides. As substâncias com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados pseudoalcaloides (HENRIQUES et al., 2003).

O uso de extratos vegetais contendo alcaloides como medicamentos, venenos e em poções mágicas pode ser traçado desde os primórdios da civilização. Por exemplo, Reginald Campbell Thompson em 1924, do Museu Britânico, identificou 250 vegetais, minerais e substâncias diversas utilizadas por médicos babilônicos em virtude de suas propriedades terapêuticas. Pode-se destacar dentre esses vegetais a beladona, conhecida como uma espécie altamente tóxica, empregada como veneno desde a época do Império Romano nos banquetes o com o propósito de assassinar os inimigos. Suas folhas contêm cerca de 0,3 a 0,5% de alcaloides, sendo o principal a hiosciamina, administrada contra espasmos, tosse e asma [Lewis, (1977), apud por Bacchi (2003)].

Os índios da Bacia Amazônica utilizavam o extrato seco da planta conhecida como curare, contendo o alcaloide tubucurarina, para preparar dardos e flechas envenenados para serem utilizados nas caçadas e nas guerras. O extrato preparado à base de cicuta, contendo o alcaloide coníina, foi utilizado na execução do filósofo Sócrates.

Ao longo dos séculos vários alcaloides foram sendo descobertos: a morfina, estricnina, quinina, coníina, narcotina, codeína, cafeína e atropina. Muitos outros alcaloides continuam sendo descritos, e seu uso introduzido na terapêutica (ACCAME, 2001).

Os alcaloides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (HENRIQUES et al., 2003); e usualmente, são detectados por meio dos reativos gerais de alcaloides (RGA), com os quais formam turvação a precipitação em meio ácido: Dragendorff (iodo bismutato de potássio), Mayer (cloro-iodo mercurato de potássio), entre outros.

De uma maneira geral, a nomenclatura dos alcaloides não segue nenhuma regra sistemática, seus nomes podem refletir a origem botânica da substância, como por exemplo: estricnina, que foi isolada da planta *Strychnos*, ou ainda estar ligado a algum tipo de homenagem, como a nicotina, que vem de Nicot, embaixador francês que enviou sementes de tabaco para a França.

Os alcaloides são classificados de acordo com a natureza do átomo de nitrogênio presente na estrutura, ou ainda dos precursores biogenéticos, os quais conferem suas características estruturais próprias. O número de subdivisões dá-se de acordo com a complexidade estrutural da substância, e na Família Rubiaceae e no gênero *Simira*, os alcaloides classificados com indólicos são encontrados em grande quantidade.

#### 1.4.1.1 Alcaloides indólicos

A maioria dos alcaloides é derivada do metabolismo dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) e dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano).

Alcaloides indólicos são os metabólitos que possuem o triptofano como precursor biogenético. O triptofano é um aminoácido aromático que tem origem na rota do ácido chiquímico via ácido antranílico, que contém em sua estrutura um sistema de anel indólico.

O ácido chiquímico, na forma de ânion chiquimato, não é o precursor somente do aminoácido aromático triptofano, mas também da fenilalanina e da tirosina. Os animais são incapazes de levar a cabo a biossíntese destes aminoácidos utilizando a via do chiquimato, ao contrário das plantas e dos micro-organismos, e estão totalmente dependentes da dieta para obtê-los.

Na biossíntese do triptofano o primeiro passo é a fosforilação do chiquimato na posição 3. Em seguida reage com o carbono 2 do fosfoenol piruvato dando origem a um intermediário tetraédrico. A perda do grupo fosfato por ação da enzima corismato sintase dá origem ao corismato. O corismato é transformado em triptofano por adição de amônia e de ribose, passando pela formação do ácido antranílico. O processo é complexo e está resumidamente descrito na Figura 4.

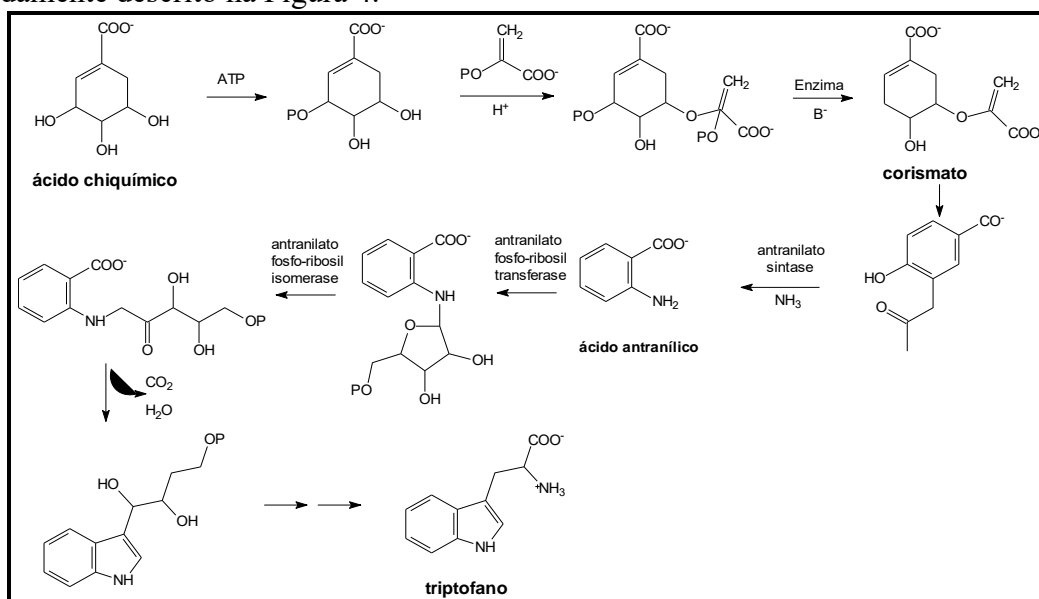
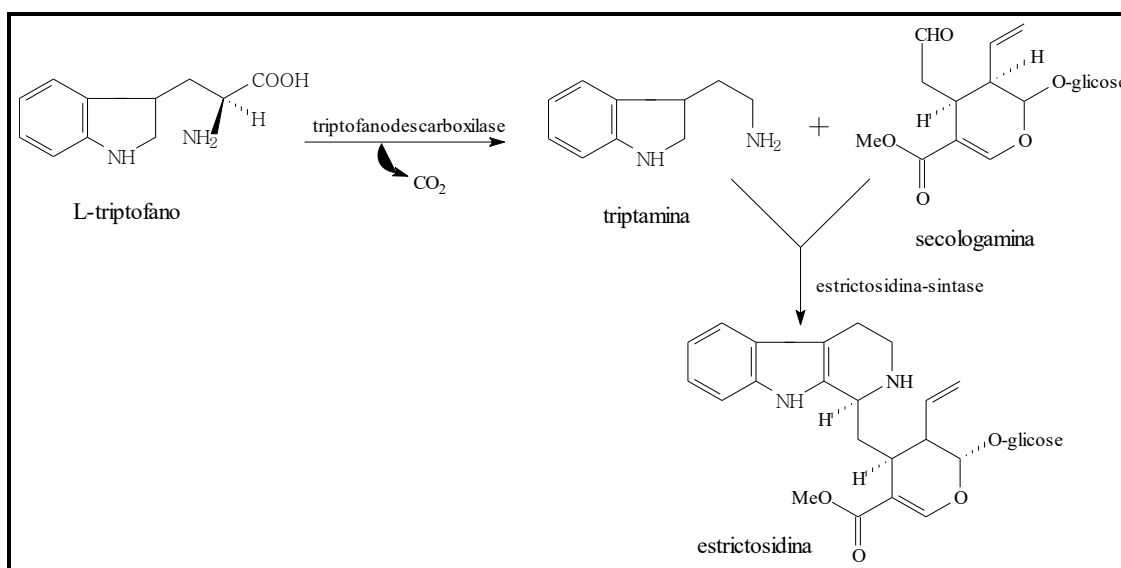


Figura 4. Formação do anel indol do Triptofano (adaptação McMURRY e BEGLEY, 2005).

O triptofano atua tanto como precursor dos alcaloides indólicos como também pode sofrer reações de rearranjo promovendo a conversão do sistema de anel indólico em anel quinolínic. A classe dos alcaloides indólicos pode ser dividida em dois grupos: alcaloides indólicos monoterpênicos e os demais alcaloides indólicos. Os alcaloides indólicos simples são formados por modificações simples do *L*-triptofano, como descarboxilações, hidroxilações e metilações.

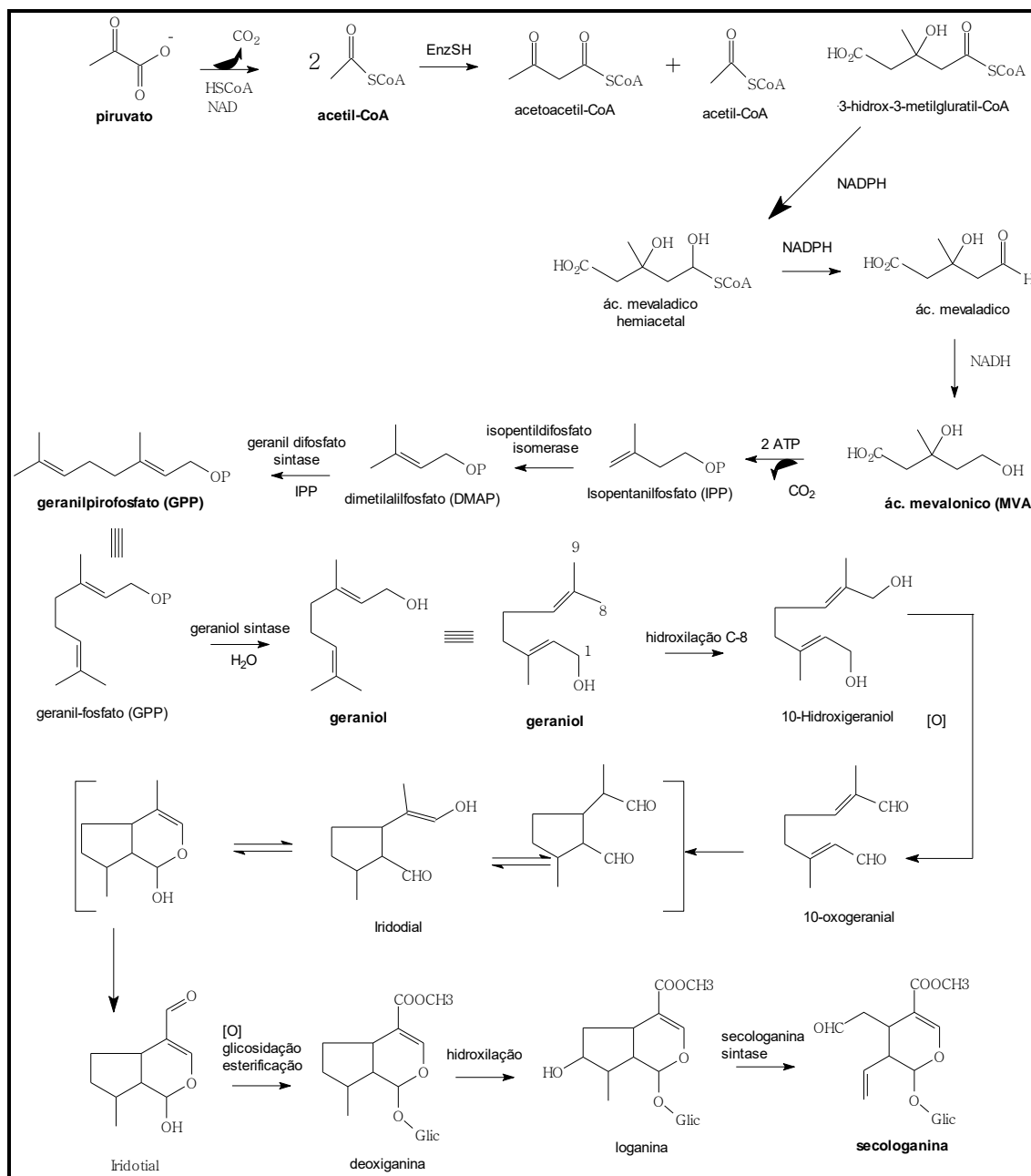
Os alcaloides indólicos monoterpênicos característicos da família Rubiaceae, contêm dois elementos estruturais: um anel indólico e uma unidade C9 ou C10 derivada da unidade secologanina (MARINHO, 2001).

Esses alcaloides são derivados da strictosidina, que é um intermediário comum formado pela condensação da triptamina com a secologanina, um iridoide glicosídico, catalisada pela enzima strictosidina sintase (YAMAZAKI et al., 2004) (Figura 5). A formação da Triptamina ocorre através da descarboxilação do triptofano catalisado pela enzima triptofano descarboxilase (TDC) (DE LUCA et al., 1989).



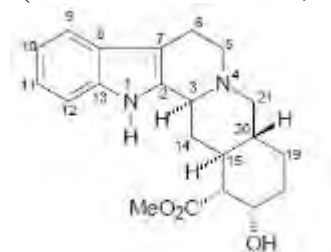
**Figura 5.** Esquemática da rota biossintética dos alcaloides indólicos monoterpênicos.

O outro precursor da strictosidina, a secologanina, é biossintetizado a partir da loganina (Figura 6) (YAMAMOTO et al., 2000). A biossíntese se inicia com o piruvato sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Três moléculas de acetil-CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota para formar o ácido mevalônico (AMV). Esse ácido é transformado na unidade de isopreno ou isopentenilpirofosfato (IPP) numa série de reações, começando com a fosforilação do álcool primário, adição de 2 ATP e descarboxilação-desidratação, o qual originará terpenos maiores. A junção de duas unidades de isopreno forma o geranylpirofosfato (GPP), o qual é precursor dos monoterpênicos. O geraniol, derivado do IPP, é hidroxilado pela enzima geraniol-10-hidroxilase, gerando o 10-hidroxi-geraniol. Depois se tem como intermediários o iridodial e iridotrial, que em seguida sofre oxidação do aldeído a ácido carboxílico, esterificação e em seguida a glicosilação, produzindo o deoxiloganina; hidroxilação subsequente de deoxiloganina produz a loganina. A secologanina é então gerada por clivagem oxidativa da loganina pela enzima secologanina sintase (O'CONNOR e MARESH, 2006).



**Figura 6.** Biossíntese da secologanina pela adaptação de FERREIRA, 2016; O'CONNOR e MARESH (2006).

O sistema de numeração aceito atualmente para os alcaloides indólicos monoterpênicos foi proposto através do relacionado com sua biogênese, no qual, tem-se como base a Ioimbina, conforme ilustra a Figura 7 (SCHRIPEMA et al., 2003).



**Figura 7.** Estrutura da Ioimbina com o sistema de numeração para alcaloides indólicos monoterpênicos.



A subclasse denominada alcaloides indólicos pode ser encontrada em plantas das famílias Apocynaceae, Rubiaceae e Loganiaceae.

Apesar da grande variedade estrutural dos alcaloides indólicos monoterpênicos, todos apresentam a origem comum que têm como precursor a strictosidina (Bruneton, 1995). Após a biossíntese do strictosidina diversas reações podem ocorrer nesse alcaloide para produzir os diferentes alcaloides indólicos monoterpênicos (HUTCHINSON et al., 1979).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e Equipamentos

Na análise por desreplicação foram utilizados os seguintes materiais:

- Solventes grau UPLC: o ácido fórmico e acetonitrila.
- H<sub>2</sub>O deionizada (Milli-Q, Millipore).
- Os cromatogramas e os espectros de massa de alta resolução foram obtidos pela Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta resolução (CLUE/EM-EM), no sistema UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), coluna Waters Acquity UPLC BEH C 18 (150 mm x 2,1cm, 1,7 µm), na temperatura de 40 °C.

Na etapa de identificação:

- O software MassLynx foi utilizado no processamento dos espectros de massa e dos cromatogramas.
- As estruturas e as propostas mecanísticas foram desenhadas no programa ChemWindow.

O experimento foram realizados na Embrapa Agroindústria Tropical, *Campus* do Pici – Fortaleza.

### 2.2 Preparação do material vegetal

A madeira e casca de *S. grazielae* foram coletadas Reserva Florestal da Companhia Vale do Rio Doce - ES e a partir desse material foram obtidos os extratos metanólicos **SGM** (madeira) e **SGC** (casca) e as frações do extrato metanólico da madeira: **SGD** (diclorometano), **SGAc** (acetato de etila), **SGB** (butanólica) e **SGR** (Residual), conforme a metodologia descrita no Capítulo I em Material e métodos.

Dos extratos e frações foram pesados 1mg de cada, que foi dissolvido em H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (0,5 mL -1:1, v/v) para posterior injeção no Cromatógrafo Líquido acoplado ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução.

### 2.3 Levantamento Bibliográfico

Os estudos de desreplicação se fundamentam na comparação de informações experimentais com bases de dados, incluindo informações espectroscópicas, espectrométricas e desenhos. Deste modo, foi necessário o levantamento de dados de massas de moléculas já reportadas para o gênero *Simira* e da Família Rubiaceae.

O levantamento bibliográfico foi feito nas principais fontes de pesquisa: Scifinder, Dictionary of Natural Products, ChEBI, ChemSpider, PubChem, ScienceDirect, além de análise de trabalhos científicos envolvendo, livros, artigos, teses e revisões em busca de substâncias presentes no gênero. Foram pesquisadas diversas classes de metabólitos, mas a busca pelos alcaloides indólicos monoterpenos foi o principal alvo. As informações levantadas estavam relacionadas: ao desenho estrutural, massa monoisotópica, massa monoisotópica protonada e a fórmula molecular.

### 2.4 Análise dos extratos e partições por CL-EM

Os extratos **SGM** e **SGC** e as partições **SGD**, **SGAc**, **SGB**, e **SGC** de *S. grazielae* foram submetidos a técnica de desreplicação por CL-IES-EM/EM. Na análise desses materiais foi utilizado o sistema UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), com coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1cm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C. A eluição foi realizada no sistema de: água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com o gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B, com fluxo de

0,4 mL/min e volume de injeção de 5  $\mu$ L. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos na fonte de ionização por eletrospray no modo positivo (IES<sup>+</sup>) e analisados pelo software MassLynx.

A caracterização dos metabólitos identificados foi realizada por meio dos dados, em termos de suas massas moleculares e o agrupamento de amostras que contêm perfis químicos semelhantes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estudo de desreplicação da madeira e casca de *S. grazielae* por IES-EM/EM

Através da técnica de desreplicação com sistema (CL-EM/EM) no modo positivo  $[M+H]^+$ , foram detectadas 57 substâncias da madeira e da casca de *S. grazielae* (Rubiaceae), das quais a maioria é da classe dos alcaloides indólicos monoterpênicos. A quantidade de metabólitos identificados em cada fração está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1.** Quantidade de metabólitos identificados em cada fração de *S. grazielae*.

Tipo de amostra	Quantidade de metabólitos identificados
SGD	27
SGAc	38
SGB	13
SGR	7
SGC	22

O levantamento de dados com informações acerca de alcaloides já isolados das espécies de *Simira* e da Família Rubiaceae assumiu grande relevância na identificação das substâncias através dos espectros de massas.

Os picos observados nos espectros de massas foram usados para identificá-los através da avaliação comparativa com os das moléculas de componentes já descritas na literatura para a família Rubiaceae, utilizando-se também propostas mecanísticas de fragmentação com significativo número de originalidade. Assim, foram avaliados nos espectros EM os valores de razão massa-carga de alta resolução (molécula protonada  $[M+H]^+$ ) e os picos gerados através de EM/EM.

A espectrometria de massas de alta resolução forneceu massas moleculares e fórmulas moleculares (estas últimas obtidas pelo software MassLynx) utilizadas na comparação com informações disponibilizadas na literatura. As massas dos picos observados nos espectros das amostras analisadas foram também comparadas com as massas teóricas estruturais fornecidas pelo programa ChemWindow contribuindo como auxiliar na confirmação da presença dos componentes de *S. grazielae*. Os resultados descritos no Capítulo I também foram utilizados na comparação analítica dos espectros de massas obtidos.

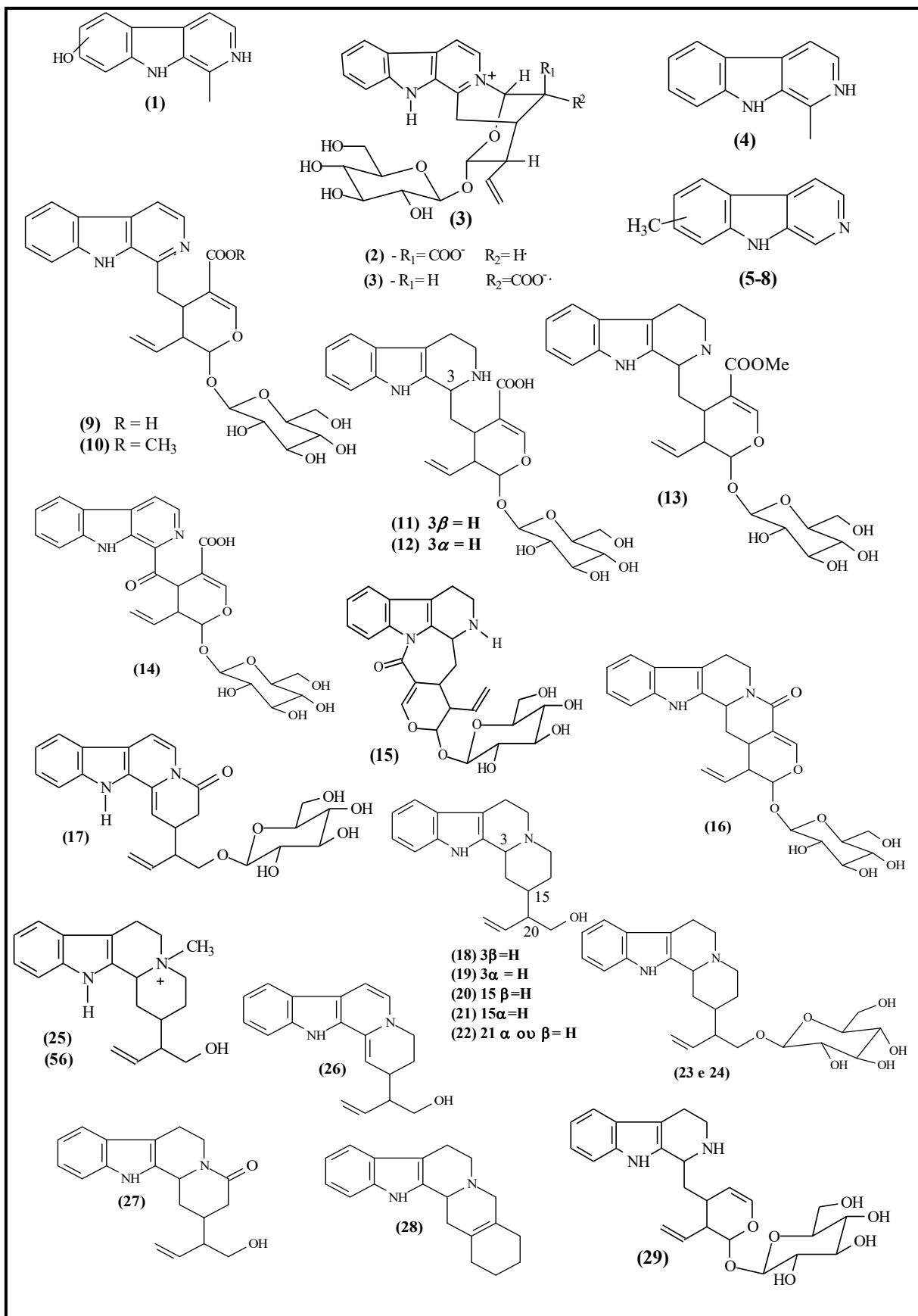
Após as análises dos extratos e frações foram construídas tabelas contendo todos os componentes identificados (Tabela 2-8), além das massas de alta resolução dos íons moleculares protonados ( $[M+H]^+$ ) para cada componente, registrou-se também os principais picos representantes de reações de fragmentação ( $EM^2$ ), os tempos de retenção registrados no cromatograma e as fórmulas moleculares, incluindo-se também quando disponível os nomes das substâncias identificadas. As confirmações das propostas estruturais foram feitas após análises comparativas de massas teóricas e observadas e pelas propostas de fragmentações.

Os resultados de todos os processos de detecção com dados de íons moleculares protonados ( $[M+H]^+$ ) e as fórmulas moleculares foram resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Substâncias propostas através do EM obtidos da madeira e casa de *S. grazielae* no modo positivo.

Numeração das substâncias	Substâncias	Fórmula Molecular	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup>
1	Hidroxi-harmana	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	199.0786
2	Ofiorina B	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1882
3	Ofiorina A	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1906
4	Harmana	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0931
5	Harmana A	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0900
6	Harmana B	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0913
7	Harmana C	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0627
8	Harmana D	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0724
9	Ácido Lialosídico	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1914
10	Lialosídeo	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	527.2034
11	Ácido Estrictosidínico	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2154
12	Ác. 3- <i>epi</i> -Estrictosidínico	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2225
13	Estrictosidina	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	531.2348
14	Ácido desmetilisopauridiantosídico	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	527.1629
15	<i>N</i> -desmetil-correantosida	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	499.1993
16	Estrictosamida	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	499.2085
17	Derivado lactâmico da Antirrina glicosilada	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	469.1973
18	Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1968
19	Epímero Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1971
20	Epímero de Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	297.1988
21	Epímero de Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	297.1983
22	Epímero de Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	297.1983
23	Antirrina glicosilada	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2495
24	Isômero Antirrina glicosilada	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2484
25	<i>N<sub>b</sub></i> -metilantirrina	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.1776
26	3,5,6,14 Tetradehidro Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1675
27	2-(1-hidroximetil-2propenil)-1,2,3,4,6,7,12b-octahidro-4-oxoindole-[2,3- $\alpha$ ]-quinolizine	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.1768
28	15,20-didehidro Ioimbana	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub>	279.1862

29	Estrictosidínico descarboxilado	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	475.2447
30	3,4-didehidro estRICTOSIDINA	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	529.2839
31	Camptotecina-5-glicopiranosídeo	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	527.1684
32	<i>N</i> - <i>p</i> -coumaroil serotonina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	323.1400
33	Isômero <i>N</i> - <i>p</i> -coumaroil serotonina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	323.1410
34	<i>N</i> - <i>p</i> -metoxi cinamoil serotonina	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	337.1562
35	<i>N</i> - <i>p</i> - cafeloil serotonina	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	339.1377
36	<i>N</i> - <i>p</i> -feruloil serotonina	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	353.1494
37	Derivado do Hirsutasida D	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	871.3147
38	epímero derivado do Hirsutasida D	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	871.3264
39	Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	515.2018
40	5,6-didehidro Antirrina glicosilado	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	457.2390
41	<i>N</i> <sub>b</sub> -metil Antirrina glicosilada	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	473.2673
42	Hirsutasida D	C <sub>43</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	885.3348
43	Derivado Ioimbana triglicosilada	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4274
44	Derivado Ioimbana triglicosilada	C <sub>38</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4204
45	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada	C <sub>38</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4243
46	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada	C <sub>38</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4219
47	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4263
48	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4245
49	<i>N</i> <sub>b</sub> -metil-5,6-didehidro Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	309.1615
50	Matadina	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1697
51	Derivado Hirsutasida D	C <sub>50</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O <sub>20</sub>	1011.3917
52	Ác.lialosídico-estRICTOSIDÍNICO desglicosilado	C <sub>40</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	689.2371
53	Diocadecilamina	C <sub>36</sub> H <sub>75</sub> N	522.5974
54	Dinonadecilamina	C <sub>38</sub> H <sub>79</sub> N	550.6304
55	Descarboxi-lialosídico	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	469.1960
56	Epímero <i>N</i> <sub>b</sub> -metil Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.2088
57	5,6-didehidro Antirrina	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O	295.1849



**Figura 8.** Estruturas das substâncias propostas através de EM da madeira e casca de *S. grazielae* no modo positivo.

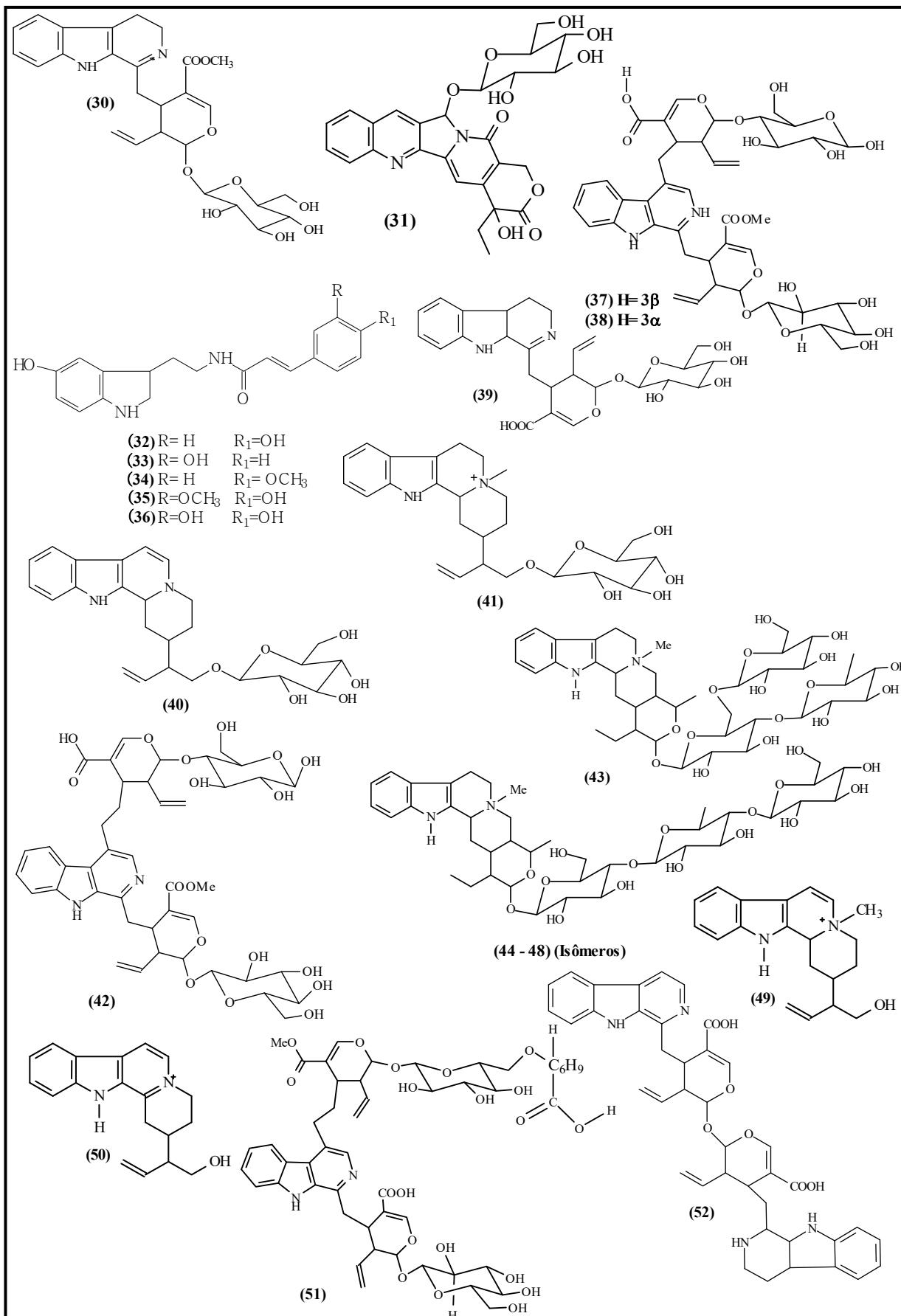


Figura 7. Continuação.



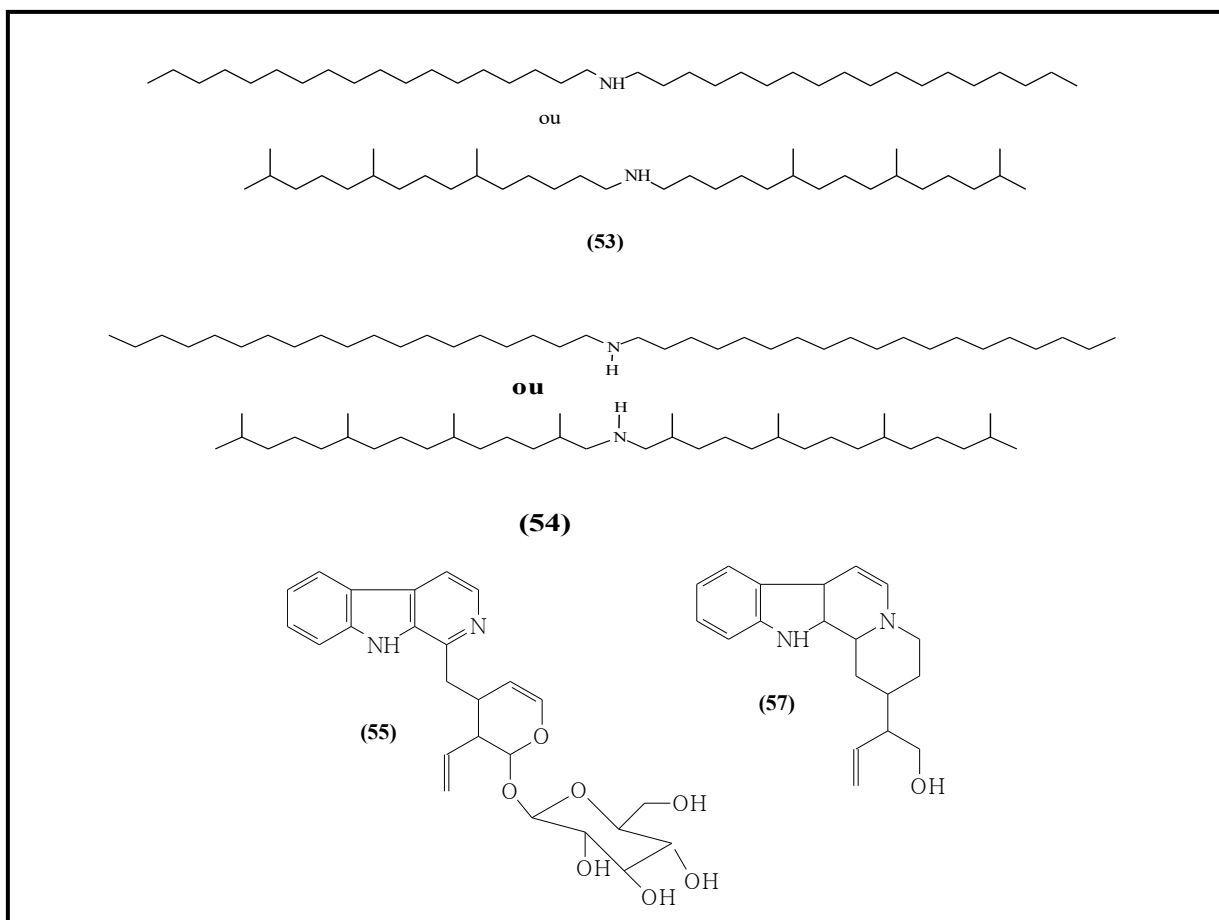


Figura 7. Continuação.

### 3.2 Estudo da desreplicação de SGAc de *S. grazielae* por EM/EM-IES

O cromatograma por CLUE da fração acetato de etila (SGAc) da madeira de *S. grazielae*, (Figura 8) apresentou picos com tempo de retenção de 2.80 a 15 min. Estes picos forneceram espectros EM-IES (Espectros 1-31) no modo positivo com picos de íons moleculares protonados ( $[M+H]^+$ ) entre  $m/z$  160 e 825.

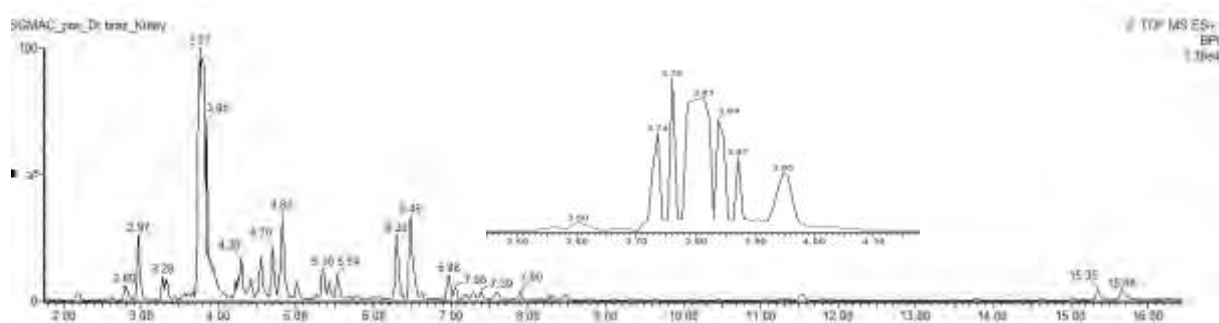


Figura 9. Cromatograma por CLUE de SGAc.

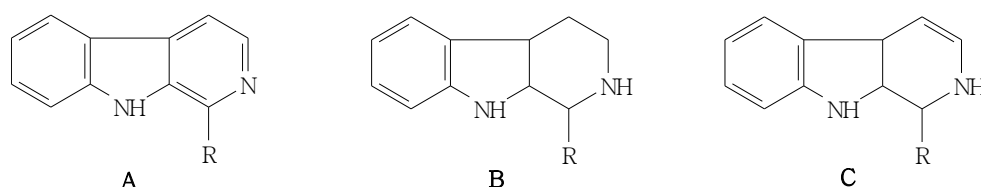
A comparação de resultados de massas calculados com os dados obtidos dos espectros e da literatura, incluindo-se as fragmentações propostas, permitiu postular a presença de 38 alcaloides indólicos nessa fração, sendo a maioria da subclasse dos indólicos monoterpênicos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Substâncias propostas através de EM da fração SGAc no modo positivo.

Tr	Substâncias	Fórmula Molecular	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup>	EM/EM
2.80	Hidroxi-harmana (1)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	199.0786	184, 171, 131,103
2.97	Ofiorina A (3)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1882	469, 351, 307
3.28	Ofiorina B (2)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1906	469, 351, 307, 267, 182
3.74	Harmana (4)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0931	168, 167, 142, 115
3.76	Harmana A (5)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0900	168, 167, 142, 115
3.81	Harmana B (6)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0913	168, 167, 142, 115
3.84	Harmana C (7)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0627	168, 167, 142, 115
3.87	Harmana D (8)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0724	168, 167, 142, 115
3.95	Ácido Lialosídico (9)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1914	469, 351, 183
4.22	Antirrina glicosilada (23)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2484	297,182, 144
4.26	Ácido Estrictosidínico (11)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2154	500, 338, 320, 269, 144
4.29	Ác. 3- <i>epi</i> -Estrictosidínico (12)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2225	500, 338
4.29	Derivado lactâmico da Antirrina glicosilada (17)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	469.1973	307, 182
4.29	Isômero Antirrina glicosilada (24)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2495	297, 144
4.41	Estrictosidina (13)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	531.2348	500, 488, 369, 326, 308, 183,181, 144
4.55	Lialosídeo (10)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	527.2034	365, 333, 295, 263, 235, 183
4.70	Antirrina (18)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1968	225, 154, 144, 117
4.70	<i>N</i> <sub>6</sub> -metil-antirrina (25)	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.1776	
4.81	Epímero da Antirrina (19)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1971	154, 144, 117
4.81	3,5,6,14 tetraedro Antirrina (26)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1675	275, 247, 221, 183,182, 181
4.81	2-(1-hidroximetil-2-propenil)-1,2,3,4,6,7,12b-octahidro-4-oxoindole-[2,3- $\alpha$ ]-quinolizina (27)	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.1768	
5.01	Epímero de Antirrina (20)	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	297.1988	144
5.35	<i>N</i> -p-coumaroil serotonina (32)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	323.1400	305, 160, 147, 119, 91
5.43	<i>N</i> -p-metoxi cinamoil serotonina (34)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	337.1562	279
5.43	Isômero <i>N</i> -p-coumaroil serotonina(33)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	323.1410	147, 119, 91
5.43	Epímero de Antirrina (21)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	297.1983	279, 144
5.55	<i>N</i> -p-feruloil serotonina (36)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	353.1494	321, 177, 145, 117, 89
6.30	<i>N</i> -desmetil-correantosida (15)	C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	499.1998	337, 300, 267, 171, 144
6.48	Ác. desmetilisopauridiantosídico (14)	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	527.1629	365, 347, 321, 319, 278,

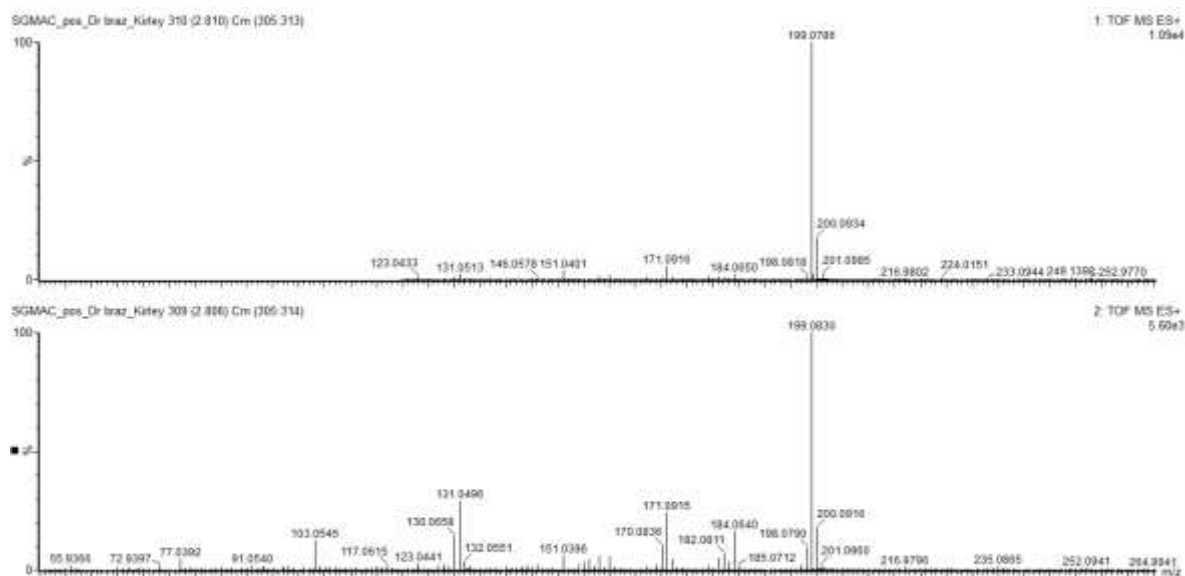
6.97	Estrictosamida ( <b>16</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	499.2085	337, 267, 171, 144
7.05	Derivado Ioimbana triglicosilada ( <b>44</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4204	807, 663, 645, 513, 351, 333
7.18	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada ( <b>45</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4243	807, 663, 645, 513, 351, 333
7.29	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada ( <b>46</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4219	807, 663, 645, 513, 351, 333
7.39	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada ( <b>43</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4274	661, 513, 337, 267, 171, 144
7.60	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada ( <b>47</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4263	807, 663, 645, 513, 351, 333
7.89	Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada ( <b>48</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	825.4245	807, 663, 645, 513, 351, 333
15.37	Dioctadecilamina ( <b>53</b> )	C <sub>36</sub> H <sub>75</sub> N	522.5974	284
15.70	Dinonadecilamina ( <b>54</b> )	C <sub>38</sub> H <sub>79</sub> N	550.6304	

Alguns picos dos espectros de massas foram utilizados como parâmetro na caracterização do esqueleto básico das estruturas. A presença dos picos  $m/z$  182 e 183 nos espectros foram utilizados para propor estruturas de metabólitos contendo esqueleto básico a  $\beta$ -carbolina, enquanto a presença do pico  $m/z$  144 conduziu à consideração da possibilidade da presença de esqueleto básico de alcaloides indólicos tetrahydro- $\beta$ -carbolina ou dihydro- $\beta$ -carbolina (Figura 10). Algumas substâncias propostas nessa fração não possuem registros na literatura e por isso foram nomeadas de forma genérica, segundo a base das estruturas existentes.

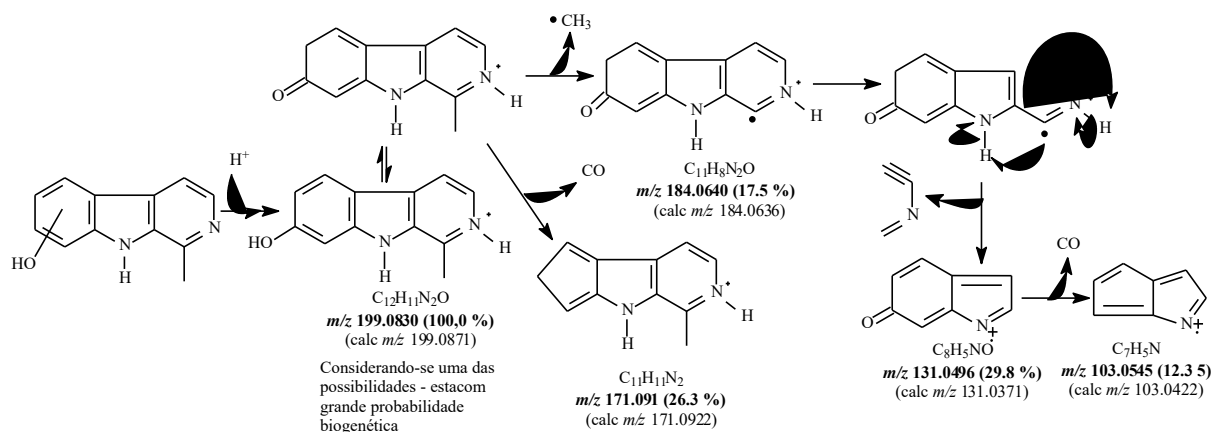


**Figura 10.** Esqueleto básico os alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolina (A), tetrahydro- $\beta$ -carbolina (B) e dihydro-  $\beta$ -carbolina (C).

Nos espectros de EM e EM/EM (Espectro 1) da substância **1** observou-se o pico do íon molecular em  $m/z$  199.0786 ( $[M]^+$ ) e no EM<sup>2</sup> os picos justificados pela saída de CO e C<sub>2</sub>HN<sub>2</sub> através de rearranjos (Esquema 1), sendo possível postular a estrutura de um alcaloide  $\beta$ -carbolina sustentando um grupo hidroxila (**1**). Os picos de massas não foram usados determinar a posição da hidroxila fenólica no anel aromático, já que em qualquer das posições tornou-se possível admitir padrão de fragmentação análogo. Na literatura a presença da hidroxila aparece nas diferentes posições, sendo assim possível proposto de forma geral tratar-se de uma hidroxi-harmana, mas sem definição de sua posição.

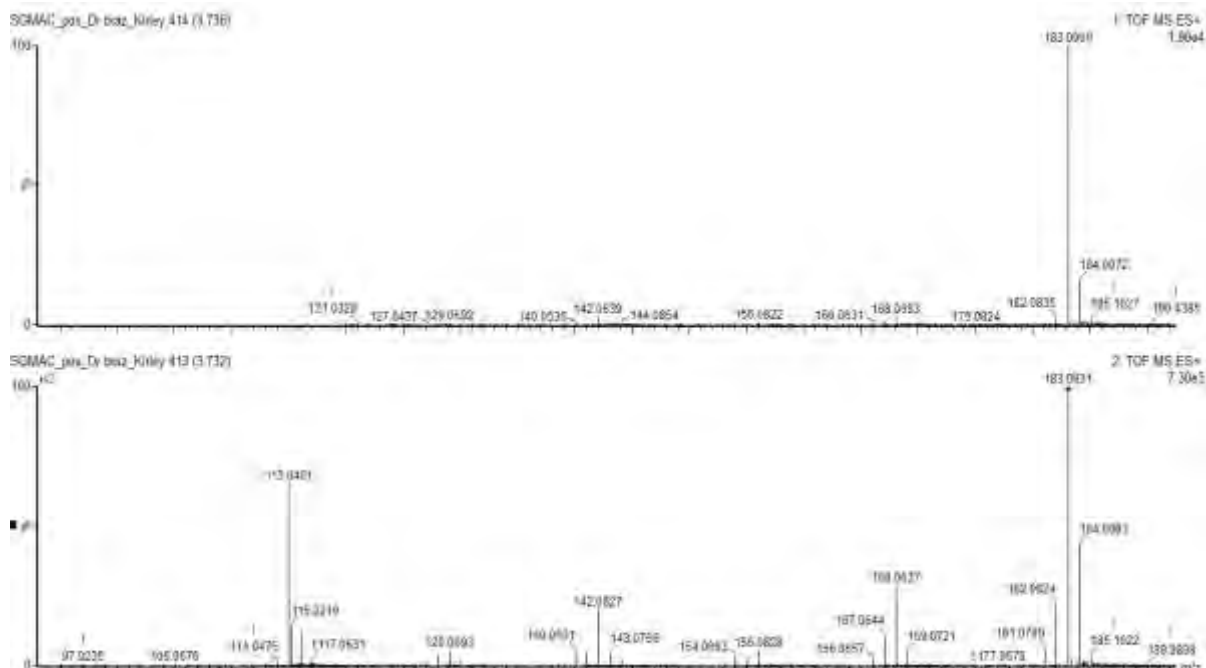


**Espectro 1.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 2.80 de hidroxiharmana (1).

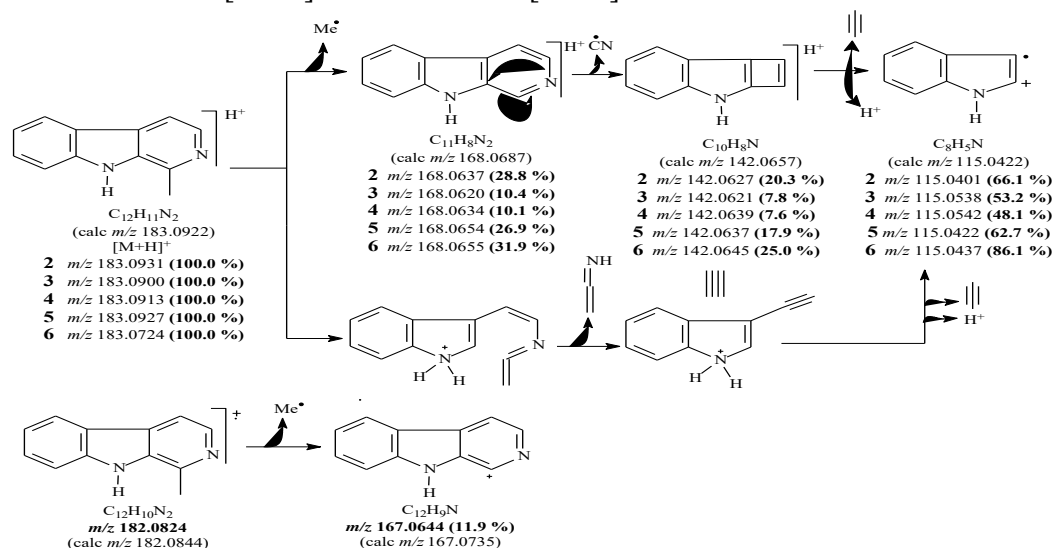


**Esquema 1.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 199 hidroxiharmana (1). (Não foi determinada a posição do OH).

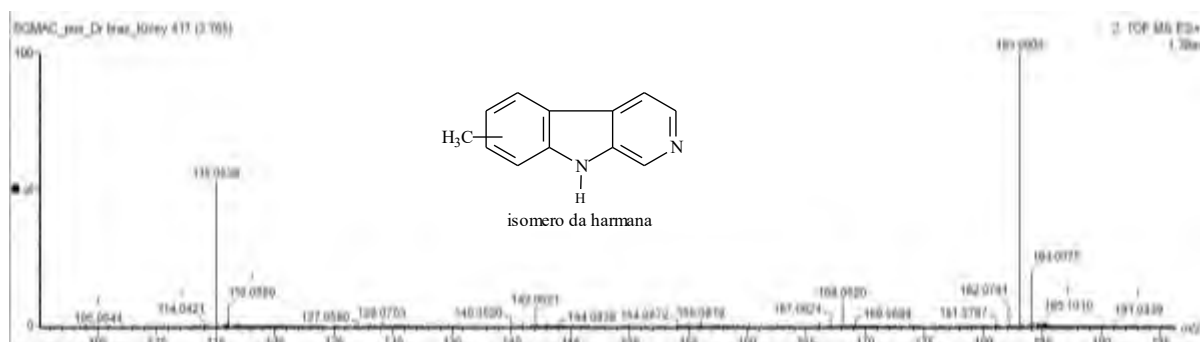
Os cinco picos de maior intensidade do cromatograma da SGAc (Figura 9), com Tr. de 3.74, 3.76, 3.81, 3.84 e 3.85, forneceram espectros de EM (Espectros 2-6), que permitiram deduzir através picos dos íons moleculares protonados em  $m/z$  183 ( $[M+H]^+$ ) a mesma fórmula molecular  $C_{12}H_{10}N_2$  e postular o mesmo padrão de fragmentação nos EM/EM considerando-se a possibilidade de isômeros. Através das propostas de fragmentação (Esquema 2) para justificar os principais picos do EM<sup>2</sup> em  $m/z$  168, 167, 142 e 115 foi postulado tratar-se da  $\beta$ -carbolina Harmana (4) e alguns de seus possíveis isômeros (5-8). A diferenciação postulada entre os isômeros restringe-se à posição do grupo metila, podendo-se propor os isômeros: 6-metil-norharmana, 12-metil-norharmana, 9-metil-norharmana e a 10-metil-harmana (Esquema 3). Os alcaloides da  $\beta$ -carbolina são amplamente distribuídos na natureza (LI et al., 2017), sendo a Harmana considerada marcador quimiotaxonômico do gênero *Simira*, o que se revela consistente com a presença desta substância em maior percentagem nessa fração.



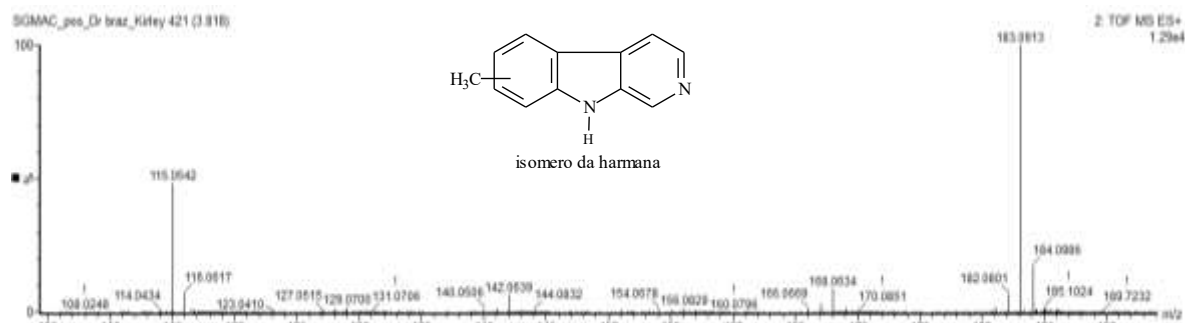
**Espectro 2.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.74 da Harmana (4).



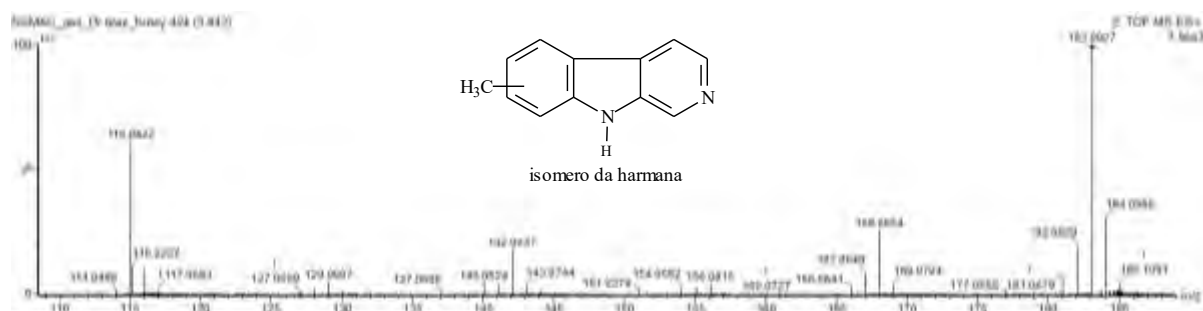
**Esquema 2.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos IES-EM e IES-EM/EM da Harmana (2, Espectro 2) incluindo-se os isômeros Harmanas A-D (5 a 8, Espectros 3 a 6),  $[M+H]^+$  em  $m/z$  183.



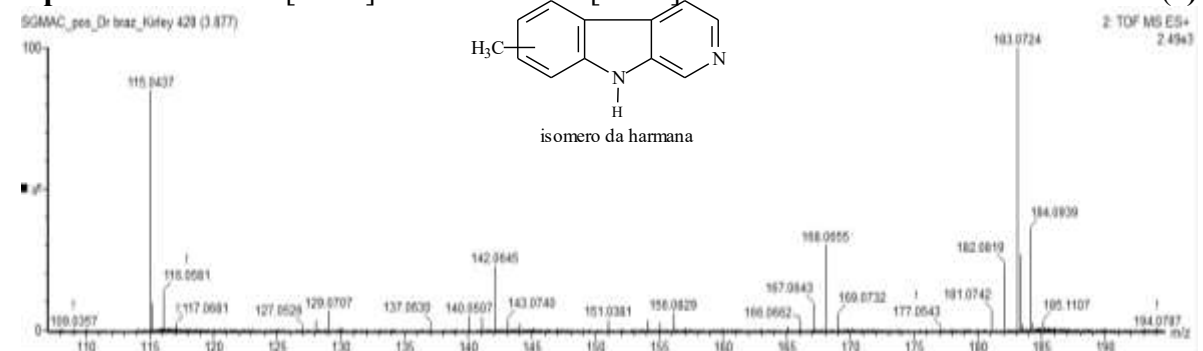
**Espectro 3.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.76 da Harmana A (5).



**Espectro 4.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.81 da Harmana B (6).

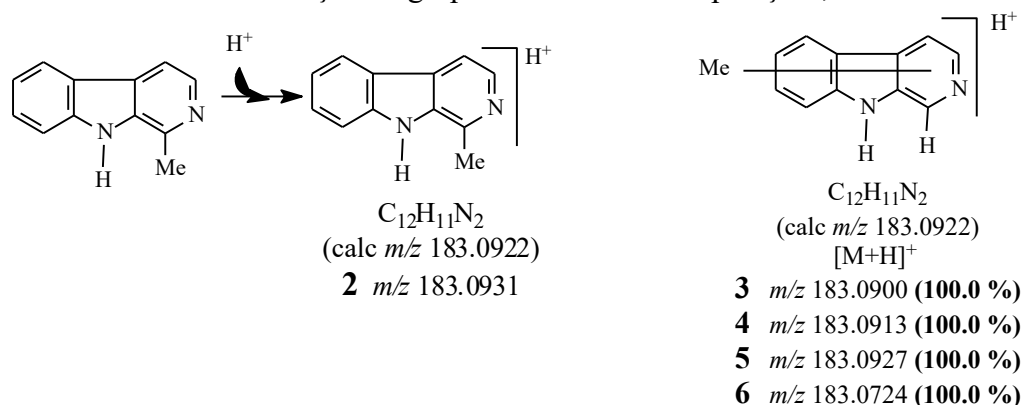


**Espectro 5.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.84 da Harmana C (7).



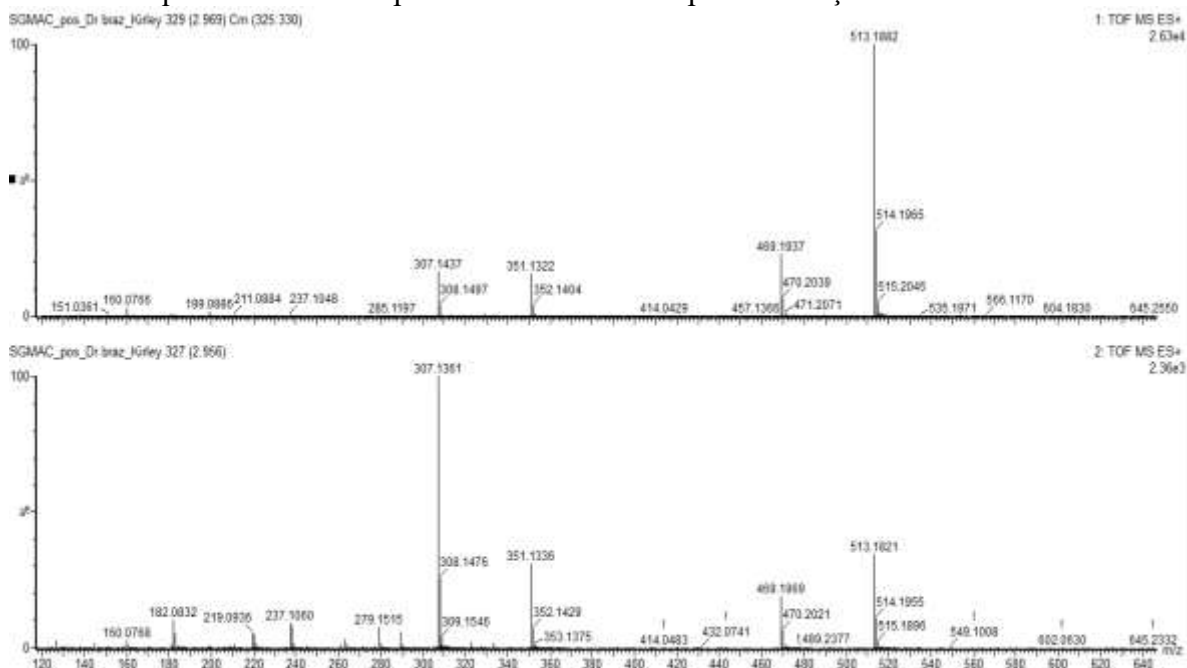
**Espectro 6.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.87 da Harmana D (8).

Pode-se cogitar das possibilidades isoméricas Harmanas A a D (5 a 8) da Harmana (4) envolvendo somente a localização do grupo metila em outras posições, como sumarizado no

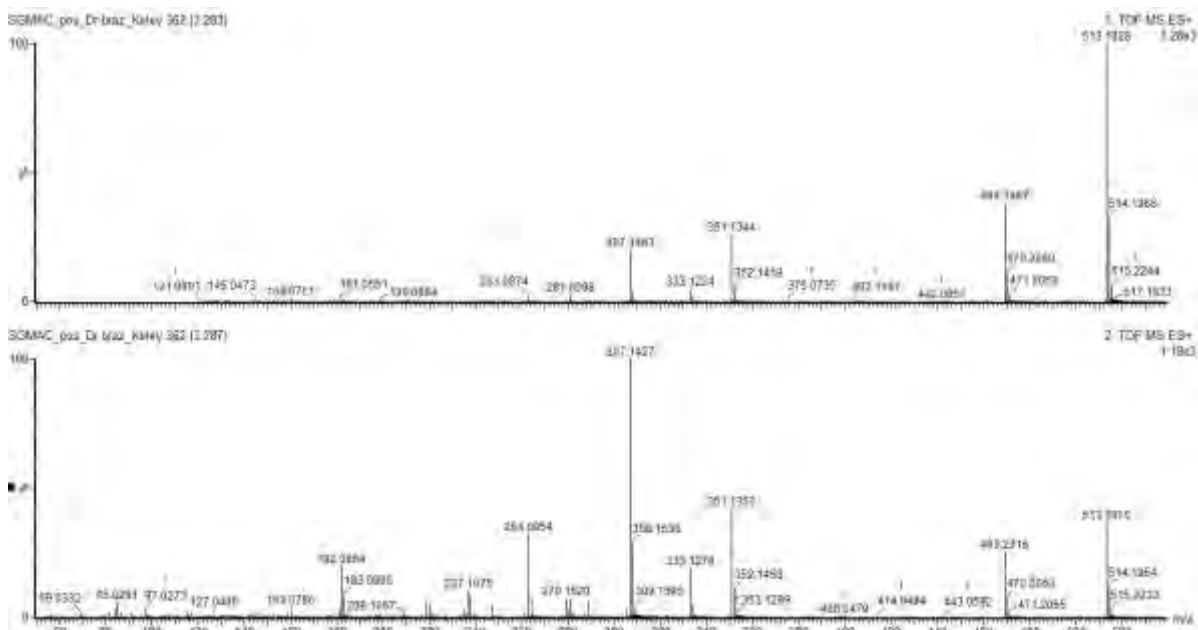


**Esquema 3.** Os picos dos íons moleculares ( $[M+H]^+$ ) revelados pelas possibilidades isoméricas (5 a 8) da harmana (4): 4-metil-norharmana, 5-metil-norharmana, 6-metil-norharmana, 7-metil-norharmana e 8-metil-norharmana.

Os Espectros 7 e 8 com tempos de retenção (Tr) 2.97 e 3.38 geraram espectros muito semelhantes, apresentando os picos dos íons moleculares protonados em  $[M+H]^+$  513.1882 e 513.1906, respectivamente, que permitiu propor a fórmula molecular  $C_{26}H_{29}N_2O_9$ . O EM/EM forneceu os picos de fragmentação  $m/z$  469, 351, 307 e 267 e 182 padrão esperado para o alcaloide indólicos  $\beta$ -carbonílicos com o grupo secologanina. Esses picos são justificados pela saída da unidade de glicose ( $C_6H_{11}O_5$ , saída de fragmento de  $m/z$  162 Daltons) e do dióxido de carbono (saída de  $CO_2$  de  $m/z$  44) (Esquema 4) envolvendo rearranjo de hidrogênio. Assim, foi proposta a presença dos isômeros Ofiorina B (**2**) e Ofiorina A (**3**) (BASTOS et al., 2002), visto que pelo padrão de fragmentação não seria possível inicialmente distinguir com a requerida e necessária confiança esses isômeros, sendo essa distinção realizada através dos dados de RMN discutidos no isolamento da mistura SGB-2 apresentado no Capítulo I, quando verificou-se que a molécula **3** apresentou o menor tempo de retenção.



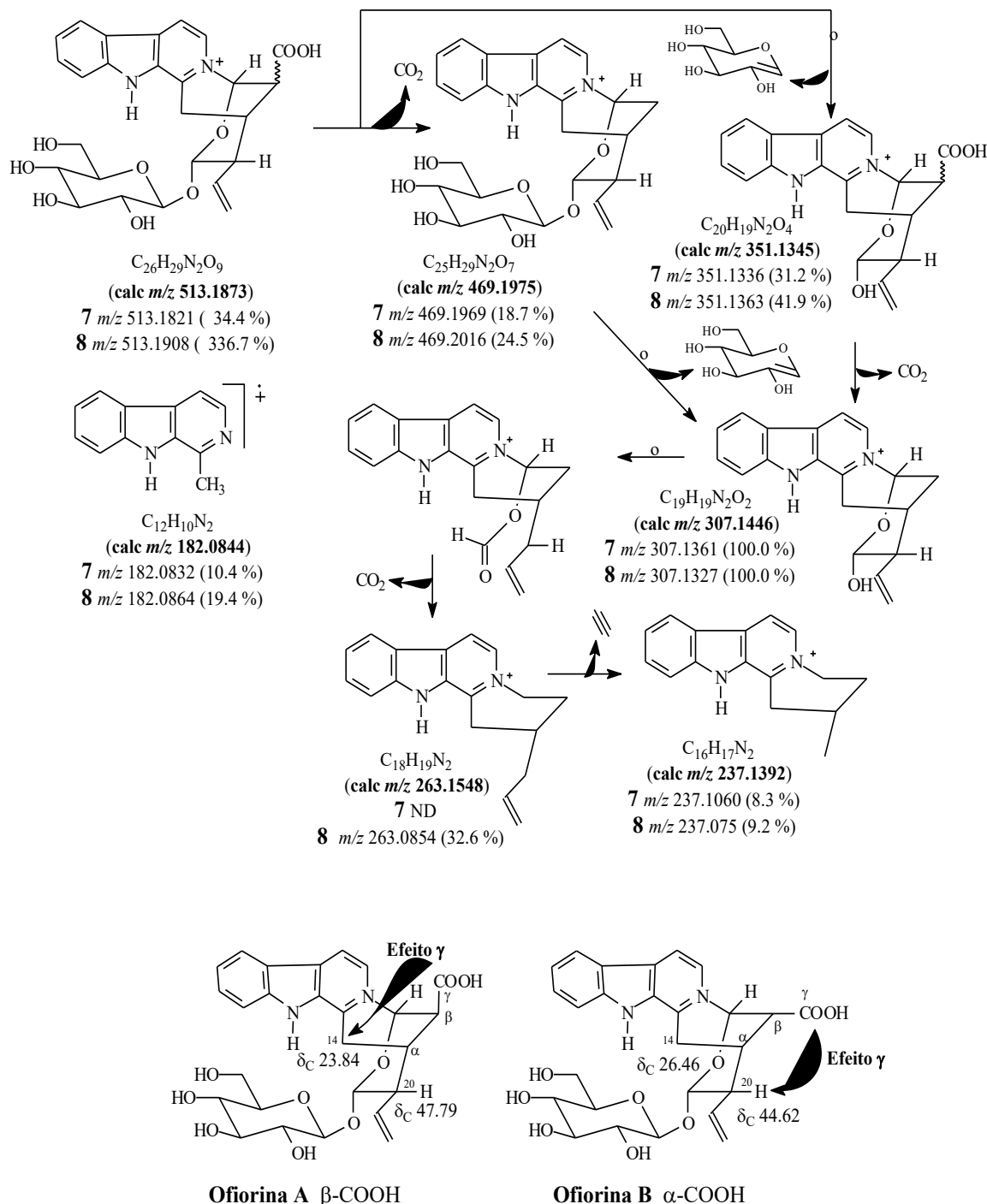
**Espectro 7.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 2.97 da Ofiorina A (**3**).



**Espectro 8.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.28 da Ofiorina B (**2**).

**Oforina A**  $\beta$ -COOH

**Oforina B**  $\alpha$ -COOH

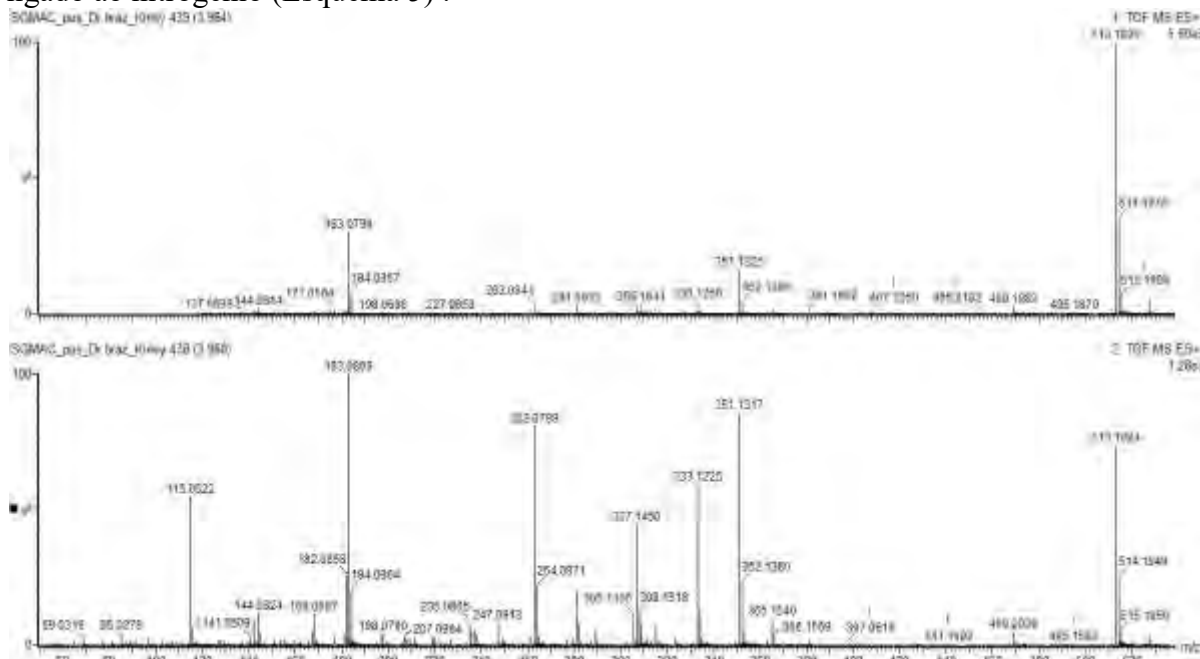


**Esquema 4.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados nos IES-EM/EM com Tr 3.97 (3, Espectro 7) e 328 (2, Espectro 8) da SGAc, modo positivo.

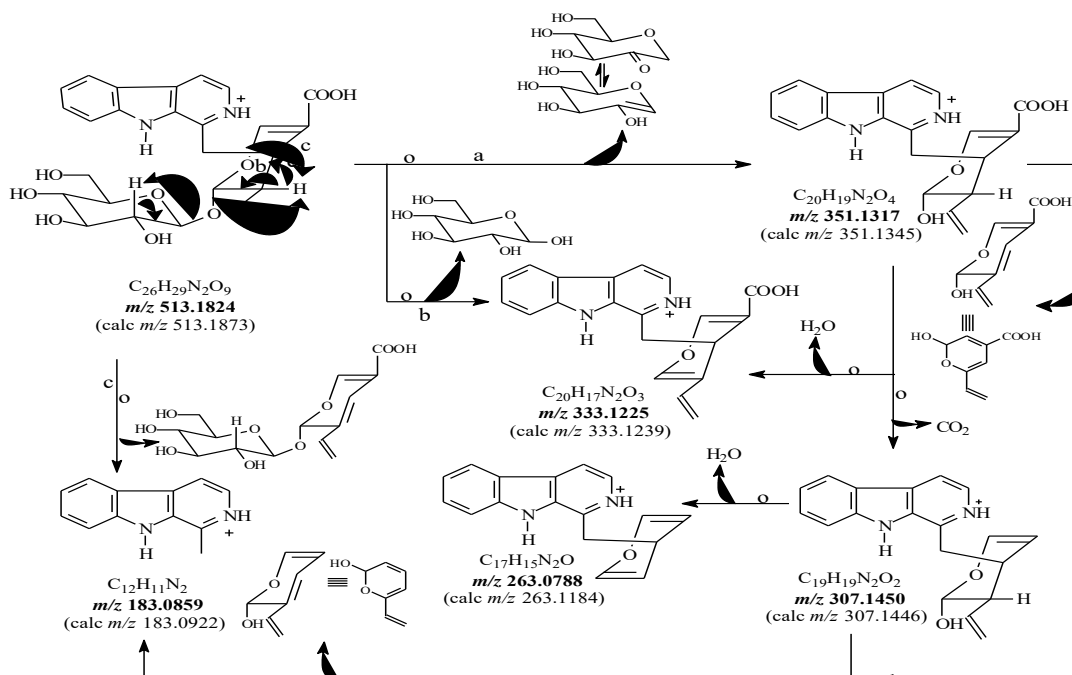
O espectro de massas do pico no cromatograma com Tr.3.95 (Espectro 9), referente à substância **9**, forneceu pico da molecular protonada ( $[M+H]^+$ ) em  $m/z$  513.1890, valor semelhante aos revelados pelos isômeros **2** e **3** (Ofiorina A e B), além da semelhança no perfil de fragmentação no EM/EM com as intensidades diferentes. O pico em  $m/z$  307 ( $C_{19}H_{19}N_2O_2$ ), que pode ser justificado pela eliminação de  $CO_2$  ( $m/z$  44), apareceu com



intensidade de 45% no espectro de **9** e nos isômeros **2** e **3** com 100%, indicando maior facilidade de eliminação e permitindo sugerir uma diferenciação estrutural na parte que sustenta o grupo carboxílico. Também se verificou diferenciação na intensidade do pico em  $m/z$  183 (100%), apontando para a fragmentação envolvendo eliminação da porção secologanina e ficando apenas o esqueleto  $\beta$ -carbonílico ( $C_{12}H_{11}N_2$ ). Isso levou a propor que **9** trata-se do Ácido Lialosídico ( $C_{26}H_{28}N_2O_9$ ) (AQUINO et al., 1994), que não possui C-17 ligado ao nitrogênio (Esquema 5).

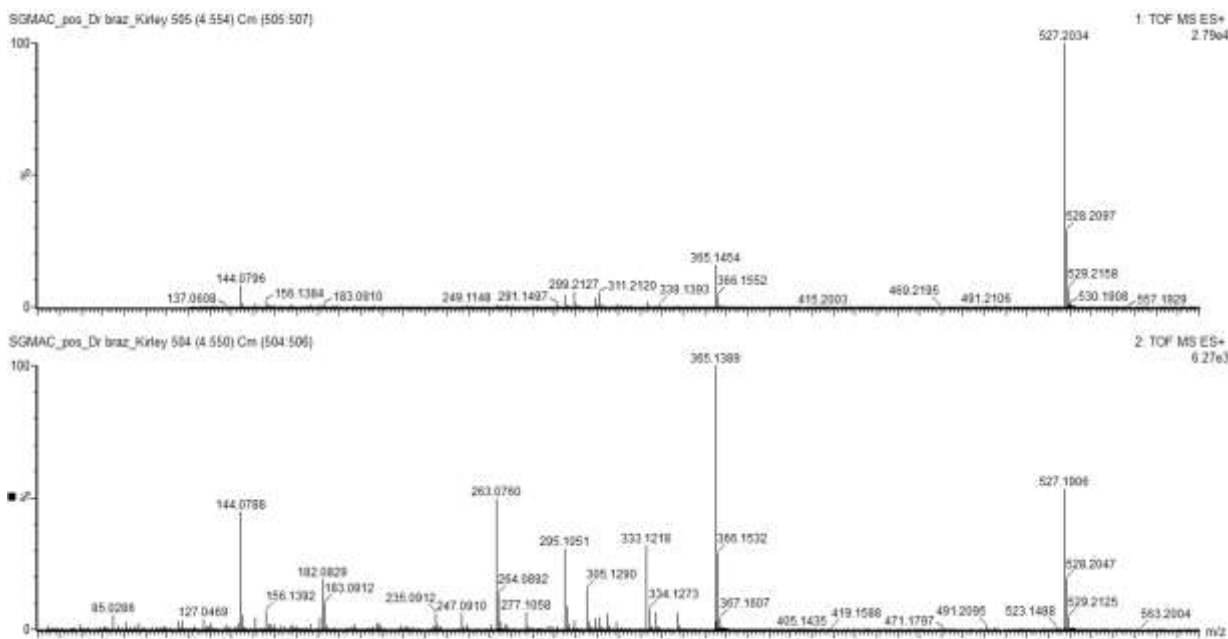


**Espectro 9.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 3.95, do Ácido lialosídico (**9**).

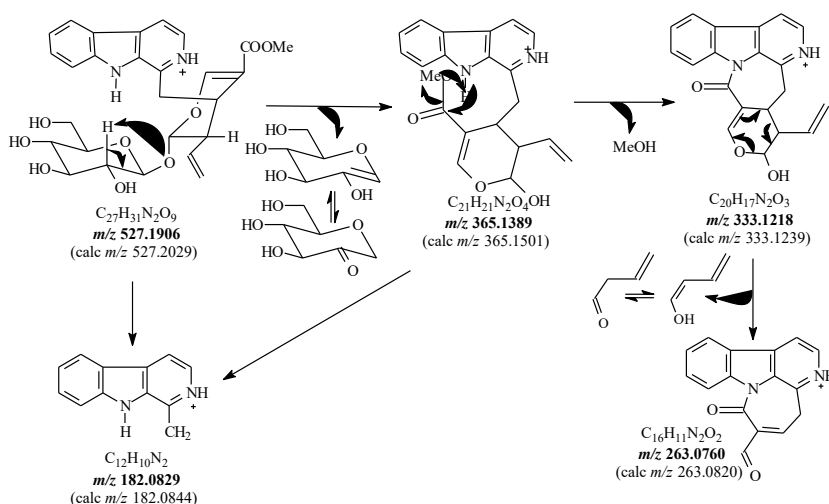


**Esquema 5.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 513, do Ácido lialosídico (**9**).

No Tr. 4.55 o Espectro 10  $[M+H]^+$  gerado, forneceu o pico  $m/z$  527.2034 e um padrão de fragmentação parecido com a substância **9** (Ácido Lialosídico), mas com diferença de 14 unidades de massa, o que sugeriu uma estrutura que possui a função éster no lugar do ácido carboxílico. As estruturas da fragmentação (Esquema 6) justificaram os picos 365 e 333 referentes à saída da unidade de açúcar ( $C_6H_{11}O_5$ ) e eliminação do metanol ( $CH_3OH$ ) através de um rearranjo com a ciclização com formação da lactama, respectivamente, além dos picos  $m/z$  263 referente à  $C_{16}H_{11}N_2O_2$  e o  $m/z$  182 coerente com a  $\beta$ -carbolina ( $C_{12}H_{10}N_2$ ). Assim a substância **10** foi proposta como o Lialosídeo (VALVERDE et al., 1999).



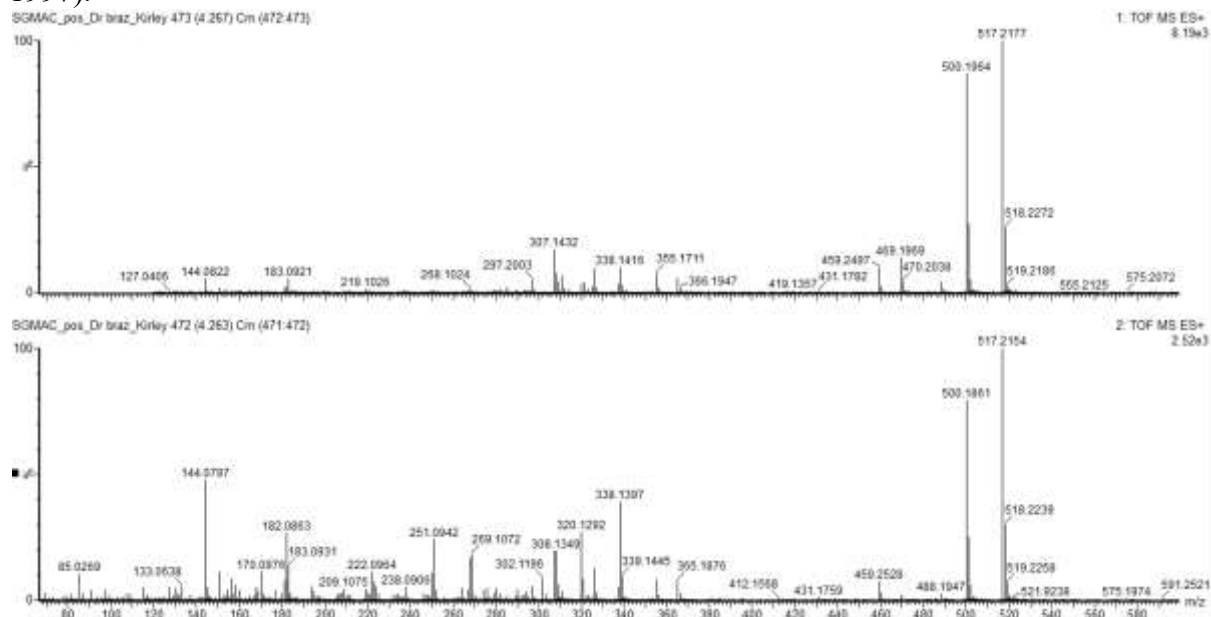
**Espectro 10.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.55, Lialosídeo (**10**).



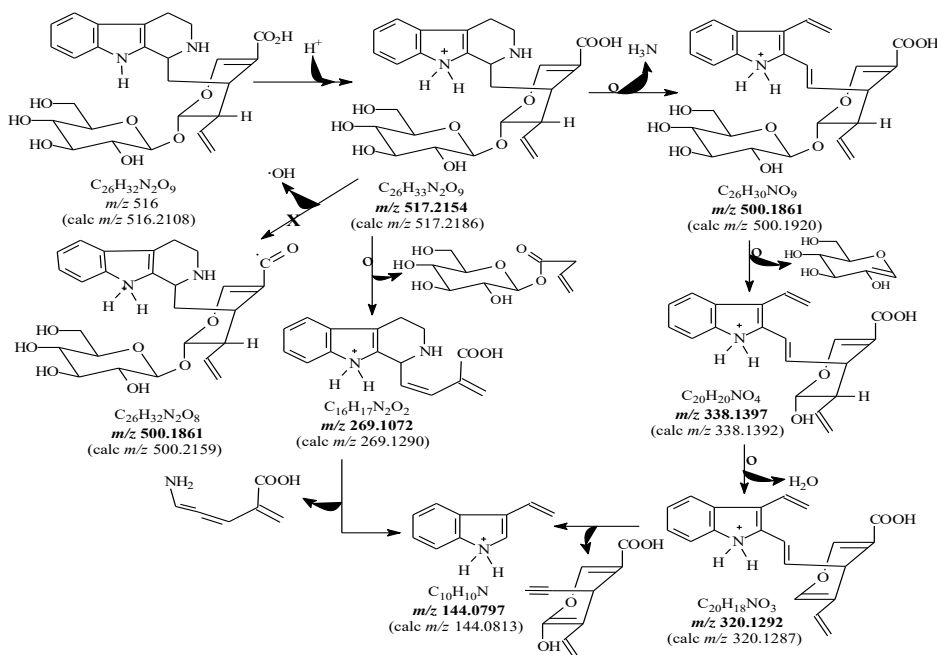
**Esquema 6.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 527, do Lialosídeo (**10**).

Os Espectros 11 e 17 (T 4.26 e 4.29) apresentaram picos  $m/z$  144, que foi relacionado ao esqueleto tetrahydro- $\beta$ -carbolina. O pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  517.2154 ( $C_{26}H_{33}N_2O_9$ , calc.  $m/z$  517.2186) do Espectro 11 apresentou picos de fragmentação coerentes com a presença do Ácido Estrictosidínico (**11**) (BEGER et al., 2017). No espectro de EM/EM o pico  $m/z$  500 (com 80% de intensidade) justificou a saída do  $NH_3$  que é fragmentado com facilidade por

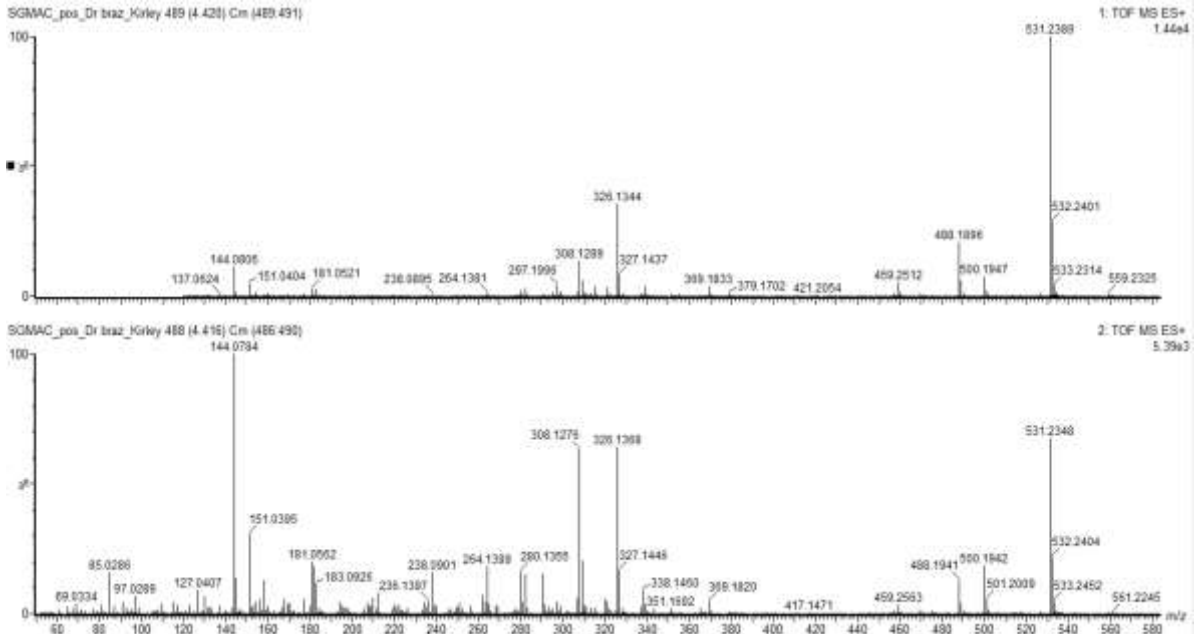
dois rearranjos de hidrogênio na porção tetrahydro e a presença da unidade de glicose ( $C_6H_{11}O_5$ ) foi justificada pelo pico  $m/z$  338 (40%) (Esquema 7). O isômero desse alcaloide, Ácido 3-*epi*-Estrictosidínico (**12**) (BEGER et al., 2017), foi identificado no Espectro 12 com o mesmo padrão de fragmentação. O Espectro 12 (Tr.4.41) apresentou um padrão semelhante com esses isômeros descritos, porém com a diferença de massa de 14 unidades, o que foi sugerido que a substância **13** teria a função éster no lugar do ácido carboxílico (Esquema 8). A massa experimental teve o pico  $[M+H]^+$   $m/z$  531.2348 muito próxima a calculada ( $m/z$  531.2342), sendo assim, descrito como a Estrictosidina (**13**) (PATTHY e LUKATS et al., 1997).



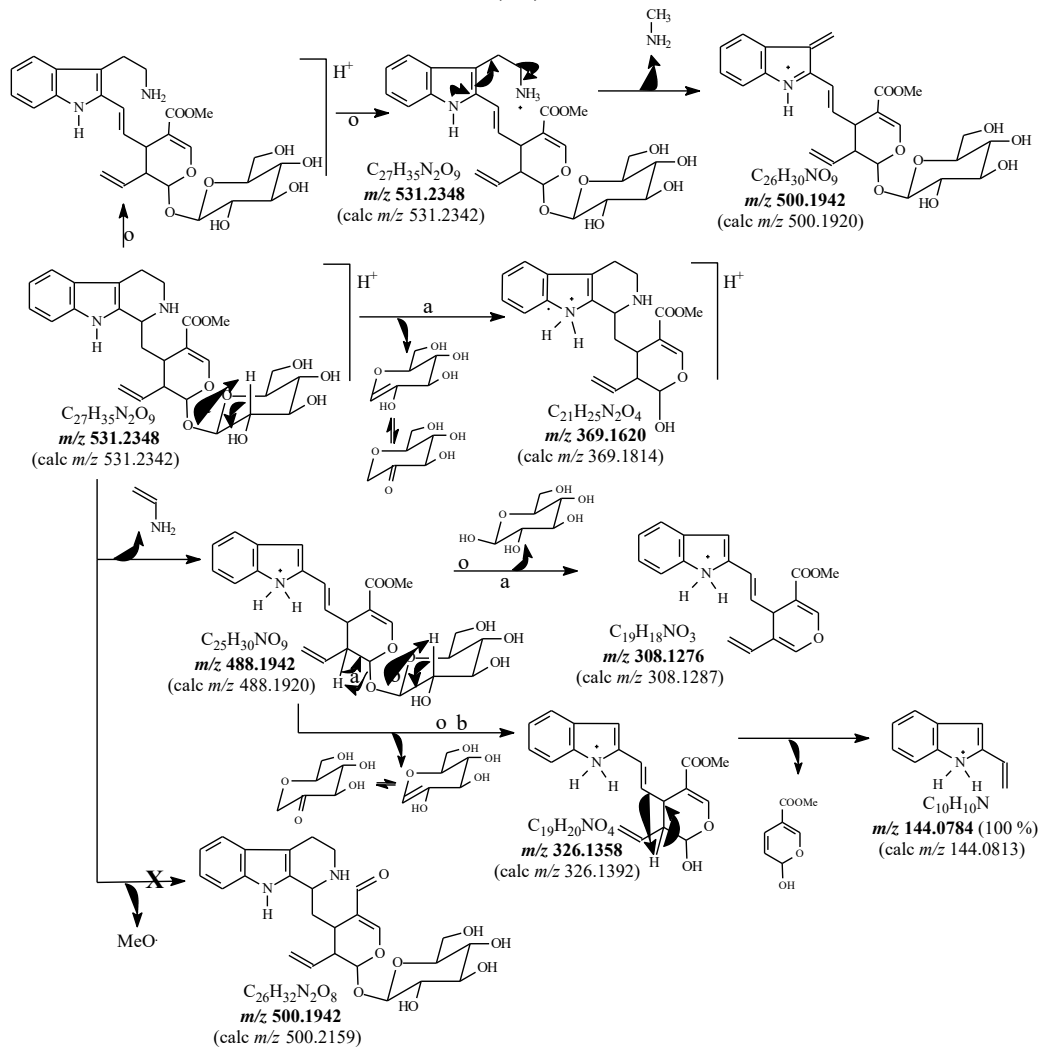
**Espectro 11.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.26, Ácido Estrictosidínico (11).



**Esquema 7.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 517, do Ácido estrictosidínico (11) e Ác. 3-*epi*-Estrictosidínico (12).

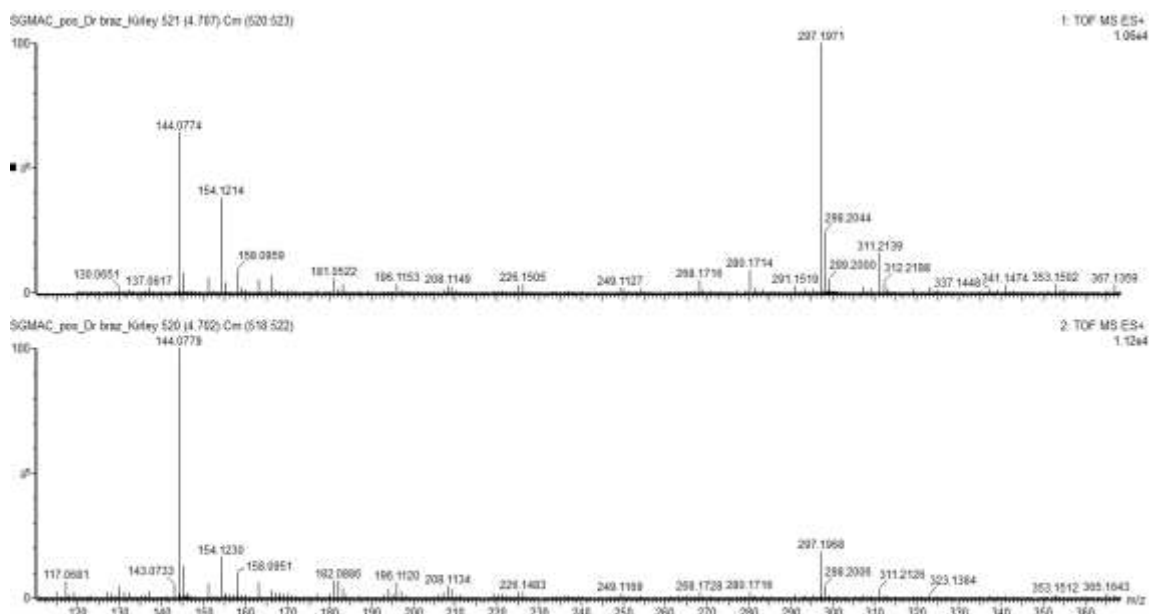
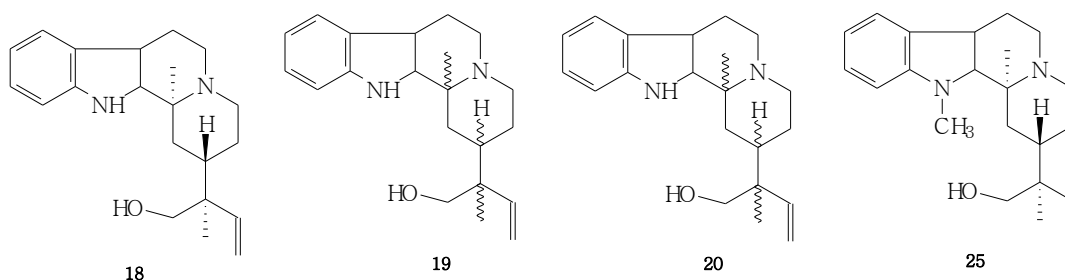


**Espectro 12.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.41, Estrictosidina (13).

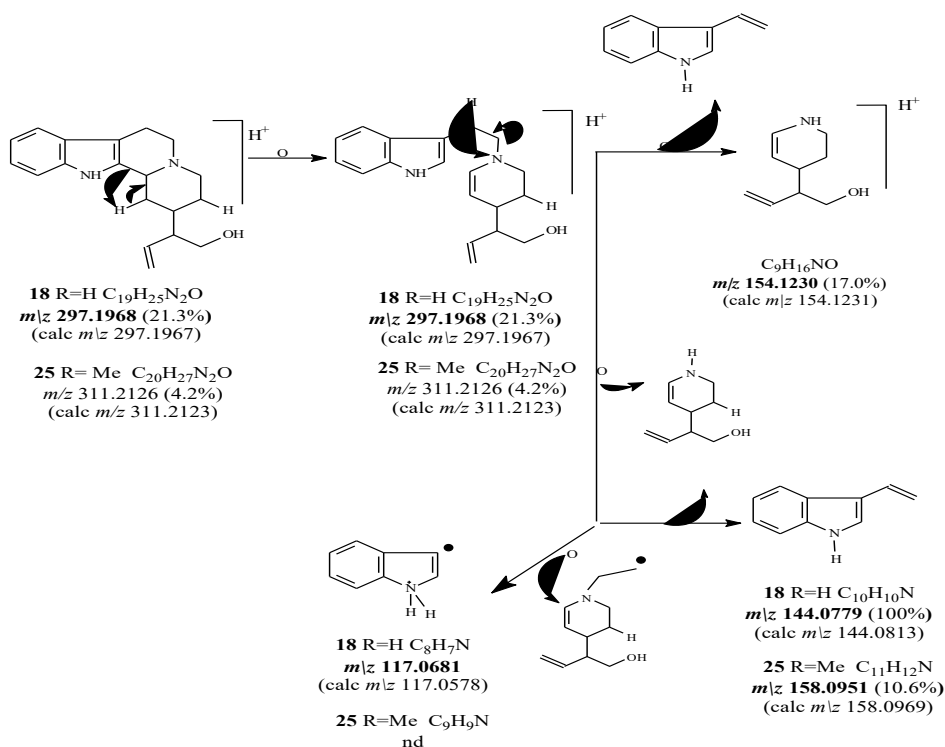


**Esquema 8.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 531, de Estrictosidina (13).

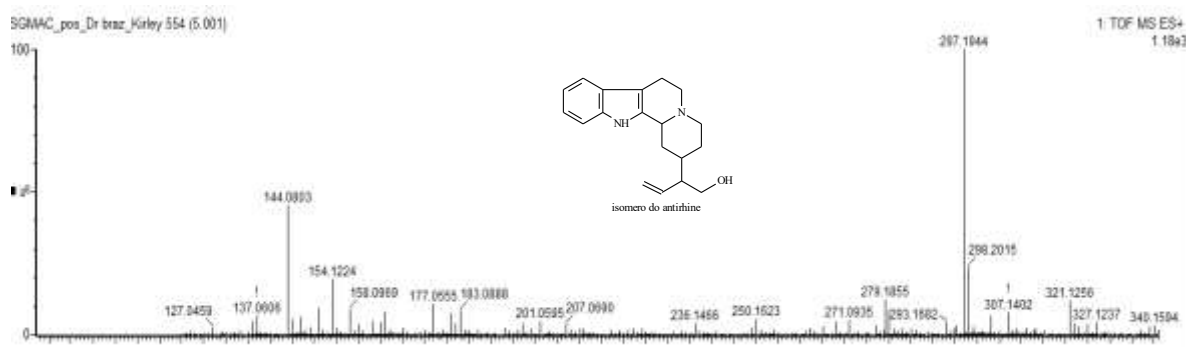
O alcaloide Antirrina (**18**) e seu epímero (3-*epi*-Antirrina ou 20-*epi*-Antirrina) (**19**) (WENIGER e ANTON, 1994; AHMED et al., 2018) foram identificados nos Espectros 13 (Tr. 4.70) e 14 (Tr. 5.01) através do pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  297.1968 ( $C_{19}H_{25}N_2O$ , calc.  $m/z$  297.1967), permitindo deduzir a fórmula molecular  $C_{19}H_{24}N_2O$ . Nessa determinação foi proposta o esqueleto tetrahydro- $\beta$ -carbolina devido à presença do pico padrão em  $m/z$  144 (100%,  $C_{10}H_{10}N$ ) referente à eliminação da porção  $C_9H_{16}NO$  através dos rearranjos de hidrogênios (Esquema 10). O Esquema 9 contempla também fragmentos adicionais atribuídos ao picos considerados importantes no espectro, tais como em  $m/z$  154.1230 e 117.0681 confirmando a estrutura. Pelos espectros de massas não foi possível determinar em quais tempos de retenção cada epímero estava presente. No Espectro 13 (Tr. 4.70) foi proposta ainda a presença do *N*-metil antirrhine (**25**) através do pico  $m/z$  311.2126 (calc.  $m/z$  311.2128, valor experimental muito próximo ao Teórico), no qual apresentou uma diferença de  $m/z$  14 unidades correspondentes a grupo metila. Assim, foi proposta a estrutura **25** (*N*-metil Antirrina) com base na presença do pico em  $m/z$  158.0951 (Abundância relativa 10.6%, Espectro 13 e Esquema 9). Considerando-se a mesma estabilidade para os íons moleculares protonados  $[M+H]^+$  de **18** ( $m/z$  297.1968, abundância relativa 21.3%) e **25** ( $m/z$  311.2126, abundância relativa 4.2%) pode-se calcular as porcentagens aproximadas destes componentes na mistura como 80% de **18** e 20 % de **25**. As porcentagens das abundâncias relativas dos picos em  $m/z$  144.0779 (100%) de **18** e  $m/z$  158.0951 (10.6%) de **25** (Espectro 13 e Esquema 9) revelaram-se em acordo satisfatório (77.5% e 22.5%) com as porcentagens dos dois componentes na mistura (80% de **18** e 20 % de **25**).



**Espectro 13.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.70, de Antirrina (**18**) e *N*-metil antirrhine (**25**).

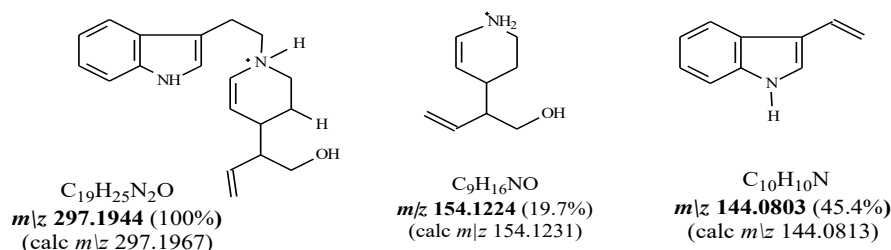


**Esquema 9.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 311 e 297, Antirrina (18) e *N*-metil antirrhine (25).



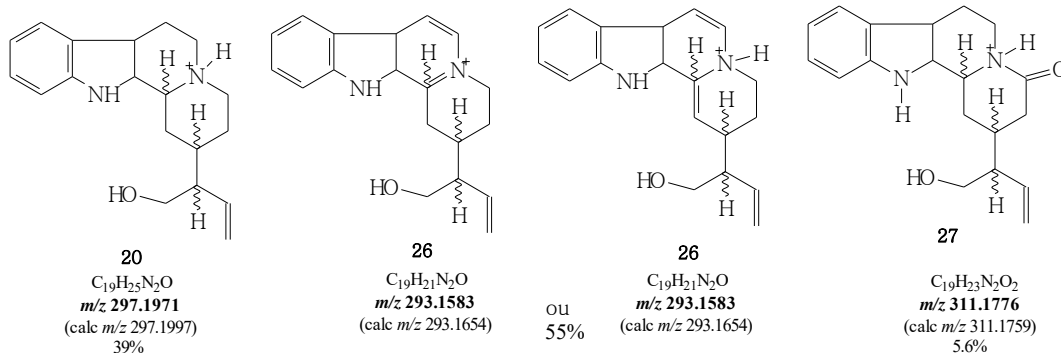
**Espectro 14.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 5.01, do epímero Antirrina (19).

O Esquema 9 pode ser utilizado para justificar os principais picos observados no Espectro 14 obtido do pico com Tr 5.01 min (contendo mais de dois componentes) do Cromatograma de SGAc (Figura 9), obviamente respeitando-se as abundâncias relativas dos picos correspondentes (Esquema 10), para o epímero da epímero Antirrina (19).



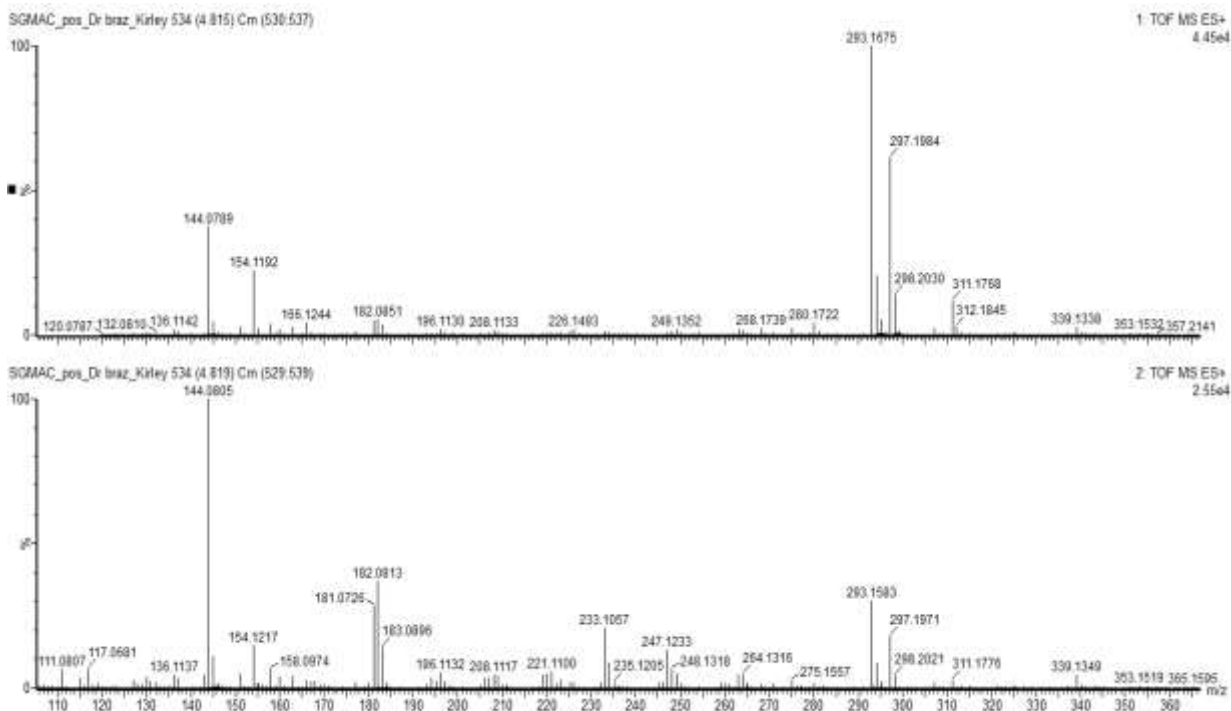
**Esquema 10.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 297, Antirrina (19).

No tempo de retenção 4.81 (Espectro 15), além da presença de outro epímero da Antirrina (**20**) com 39%, foram observados mais dois picos de íons moleculares protonados,  $[M+H]^+$  em  $m/z$  293.1675 ( $C_{19}H_{21}N_2O$ , calc.  $m/z$  293.1654) com uma porcentagem de 55.5% (**26**) e o pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  311.1768 ( $C_{19}H_{23}N_2O_2$ , calc.  $m/z$  311.1759) com 5.6% (**27**).

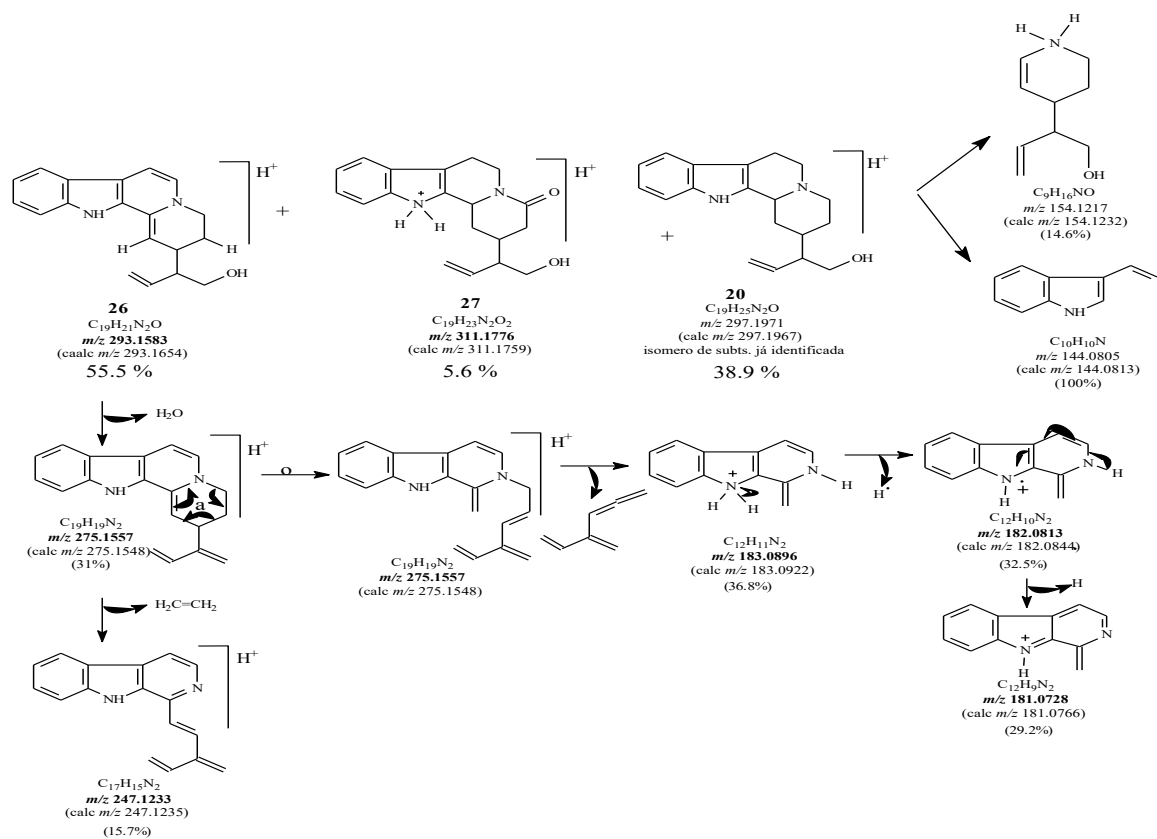


O valor da massa referente a **26** apresentou uma diferença de  $m/z$  4 em relação à Antirrina, o que estimulou a proposta de estrutura com insaturação de quatro carbonos a esse esqueleto, considerando-se também as propostas de fragmentação (Esquema 11) para justificar os picos  $m/z$  275, 247, 221, 183, 182 e 181 e a presença dos picos 183 e 182 sendo favoráveis a insaturação no anel piridínico. Assim **26** foi nomeado como 3,5,6,14 tetraedro Antirrina, e está sendo proposta pela primeira vez na literatura.

A relativamente baixa proporção da substância **27** (5.6%) pode ser considerada como responsável pela ausência de picos referentes à sua fragmentação nas condições operacionais usadas para obtenção do Espectro 15. A diferença entre essa (**27**) e a Antirrina foi de  $m/z$  14, que através do cálculo de massas foi proposta a presença de uma carbonila na estrutura, sendo a substância denominada em: 2-(1-hidroxi metil-2-propenil)-1,2,3,4,6,7,12b-octahidro-4-oxoindole-[2,3- $\alpha$ ]-quinolizina.

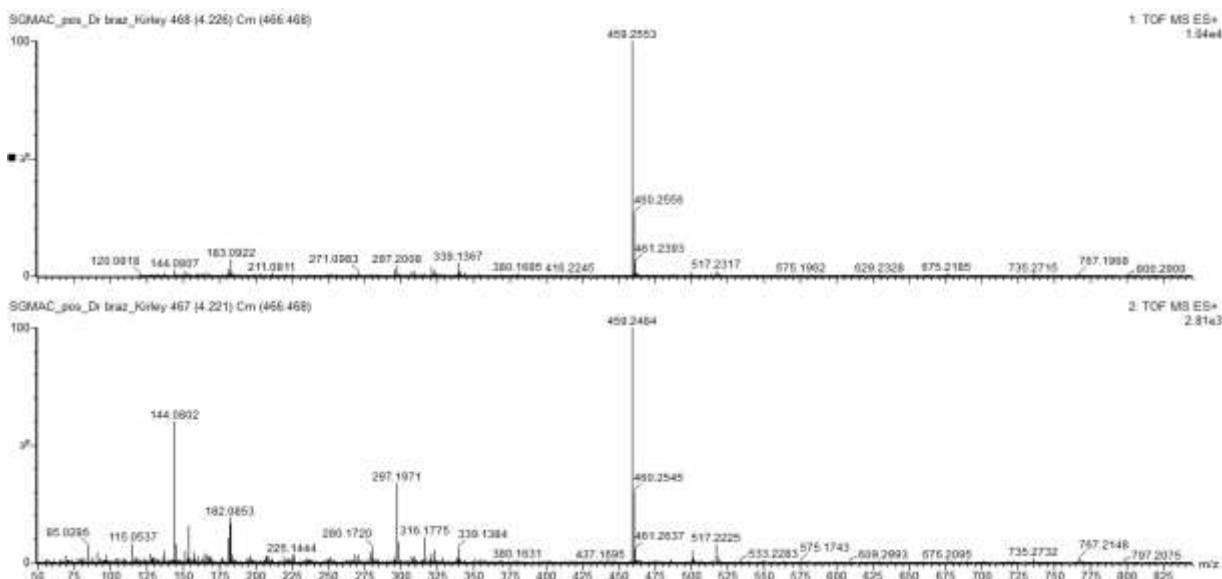


**Espectro 15.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.8, das substâncias **20**, **26** e **27**.



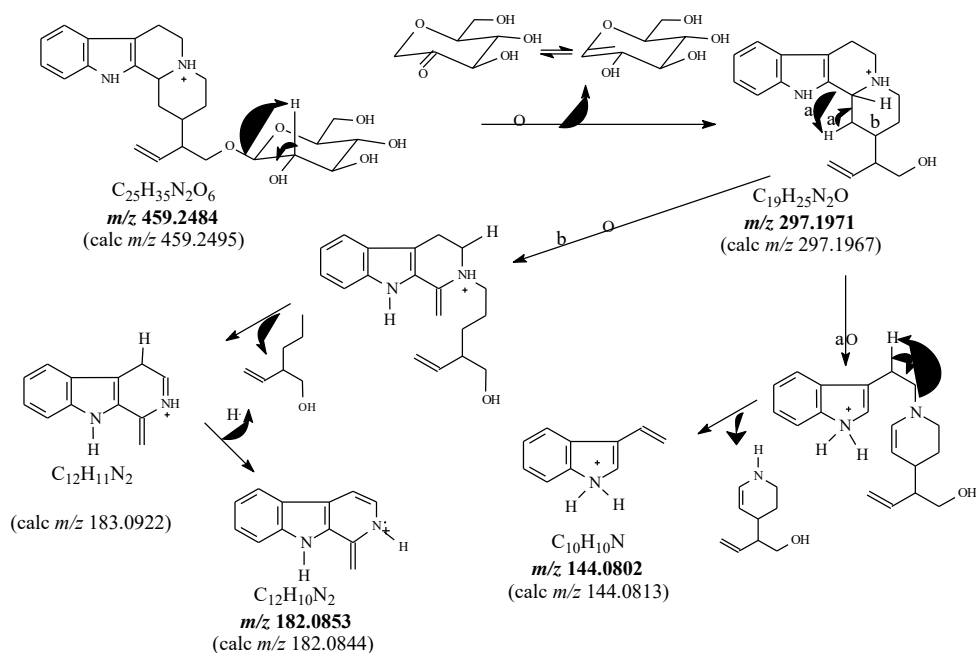
**Esquema 11.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 293, das substâncias 20, 26 e 27.

O Espectro 16 (Tr. 4.22) teve o pico  $[M+H]^+$  em  $m/z$  459.2484 ( $C_{25}H_{35}N_2O_6$ ), uma diferença de  $m/z$  162 em relação a Antirrina (**18**), característico de uma unidade de glicose. O EM/EM apresentou os principais íons em  $m/z$  297.1971 e 144.0802 onde foram feitas propostas de fragmentação (Esquema 12), confirmando que a substância **23** proposta, se trata da Antirrina glicosilada. Na literatura ainda não há relatos sobre essa estrutura, sendo proposta pela primeira vez nesse trabalho.



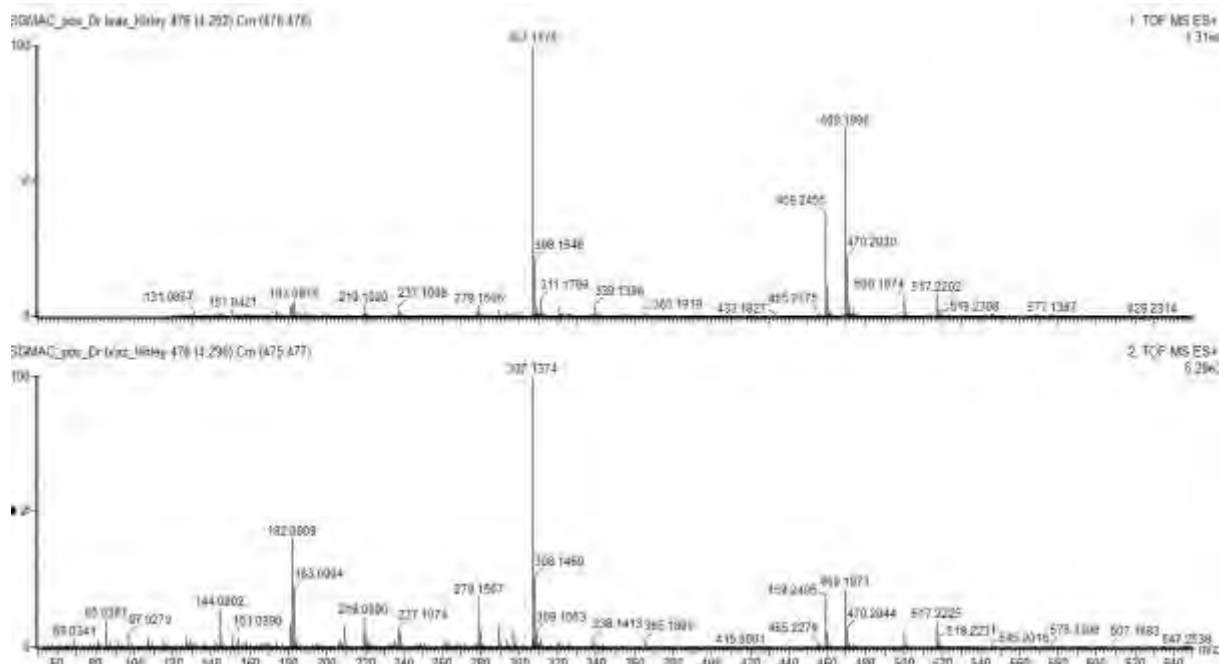
**Espectro 16.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.22, da Antirrina glicosilada (**27**).



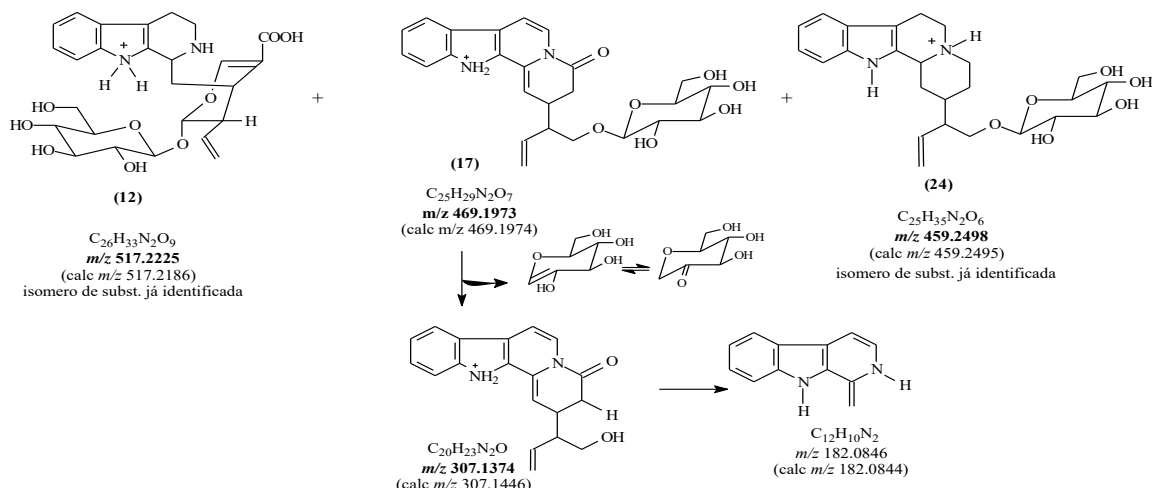


**Esquema 12.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 459, da Antirrina glicosilada (27).

Uma mistura de três substâncias foram propostas para o Espectro 17 (Tr.4.29). Duas estão sendo identificadas como isômeras já identificadas nos espectros anteriores, o Ác. 3-*epi*-Estrictosidínico (**12**) com  $[M+H]^+$  em  $m/z$  517.2225 ( $C_{26}H_{33}N_2O_9$ ) e o isômero da Antirrina glicosilada (**24**) (epímero no H-3 ou H-20)  $[M+H]^+$  em  $m/z$  459.2495 ( $C_{25}H_{34}N_2O_6$ ). Além desses alcaloides, o espectro de massas forneceu picos dos quais foram possíveis propor a presença do alcaloide **17**, com  $[M+H]^+$  em  $m/z$  469.1973 ( $C_{25}H_{29}N_2O_7$ , calc.  $m/z$  469.1974) que através da fragmentação (Esquema 13) com picos  $m/z$  307.1374 e 182.0846 foi proposta a estrutura de um derivado lactâmico da Antirrina glicosilada.

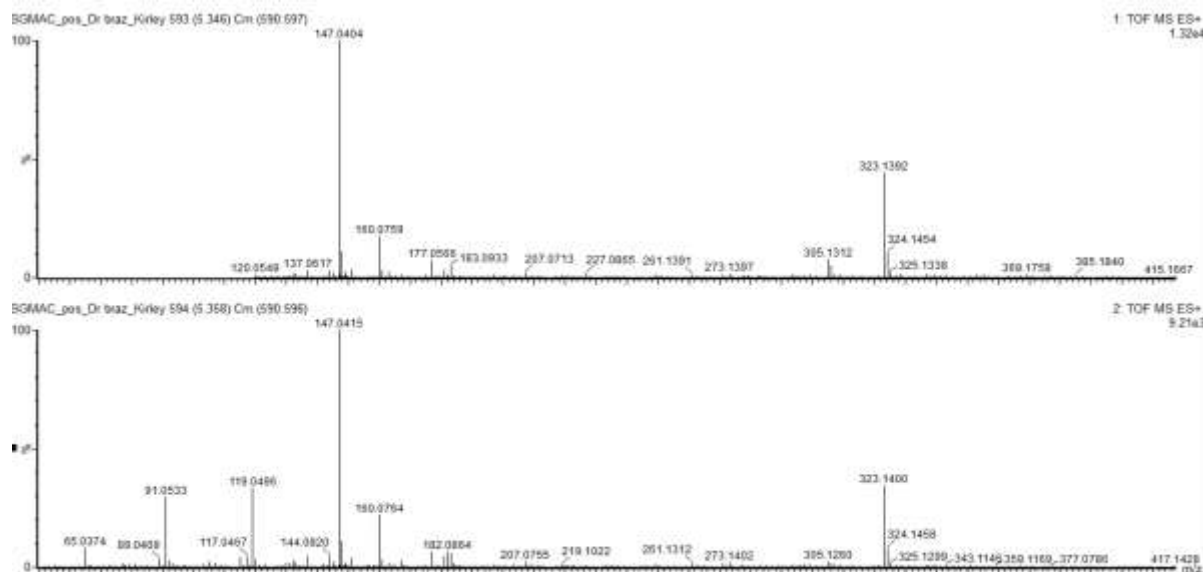


**Espectro 17.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 4.29, das substâncias 12, 17 e 24.

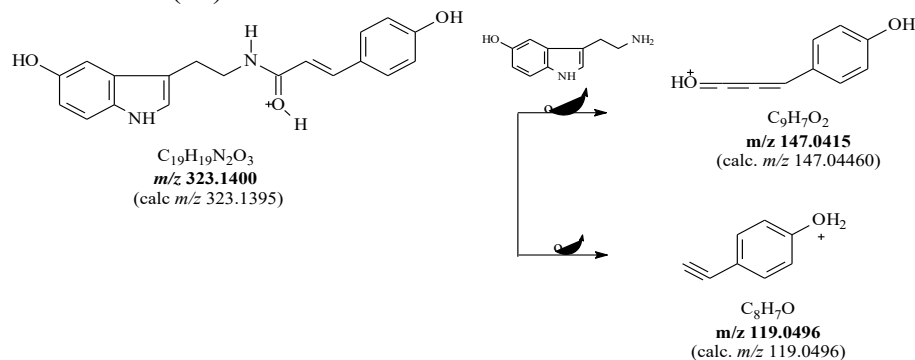


**Esquema 13.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 469, das substâncias 12, 21 e 24.

O alcaloide derivado da serotonina, *N*-*p*-coumaroil serotonina (**32**) (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2011), foi identificado no Espectro 18, com íon protonado em  $[M+H]^+$   $m/z$  323.1400 ( $C_{19}H_{19}N_2O_3$ ). O espectro de EM<sup>2</sup> apresentou os picos de fragmentação 147 e 119 que estão sendo representados no Esquema 14.

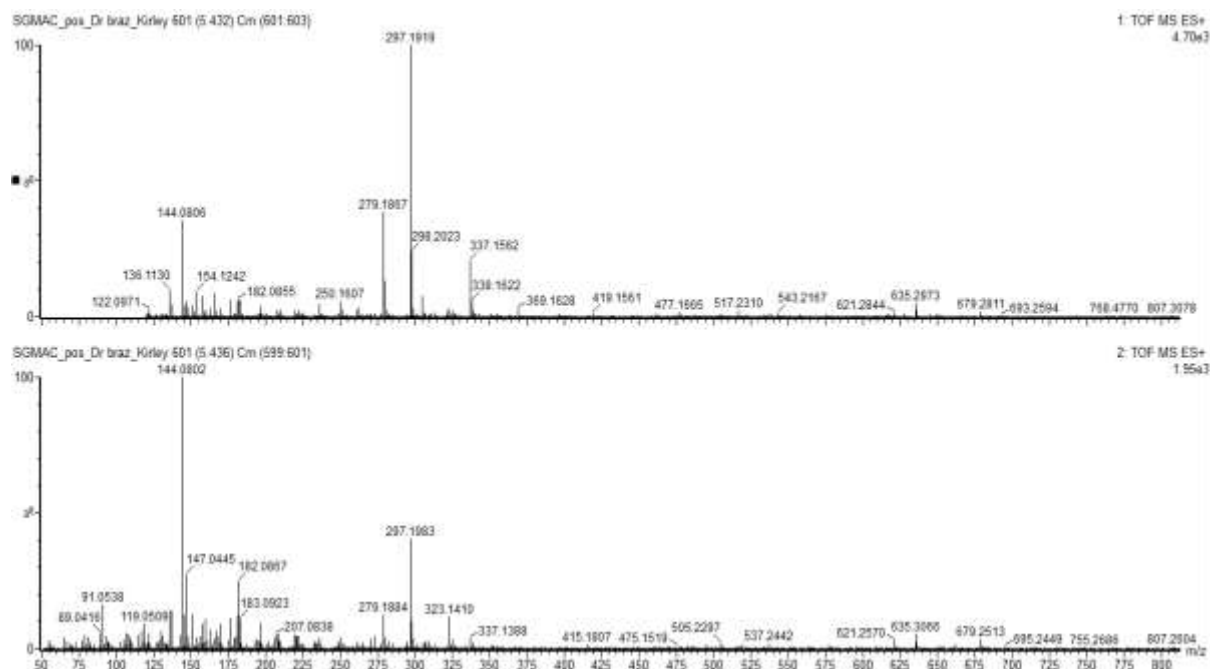


**Espectro 18.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 5.35 da *N*-*p*-coumaroil serotonina (**32**).

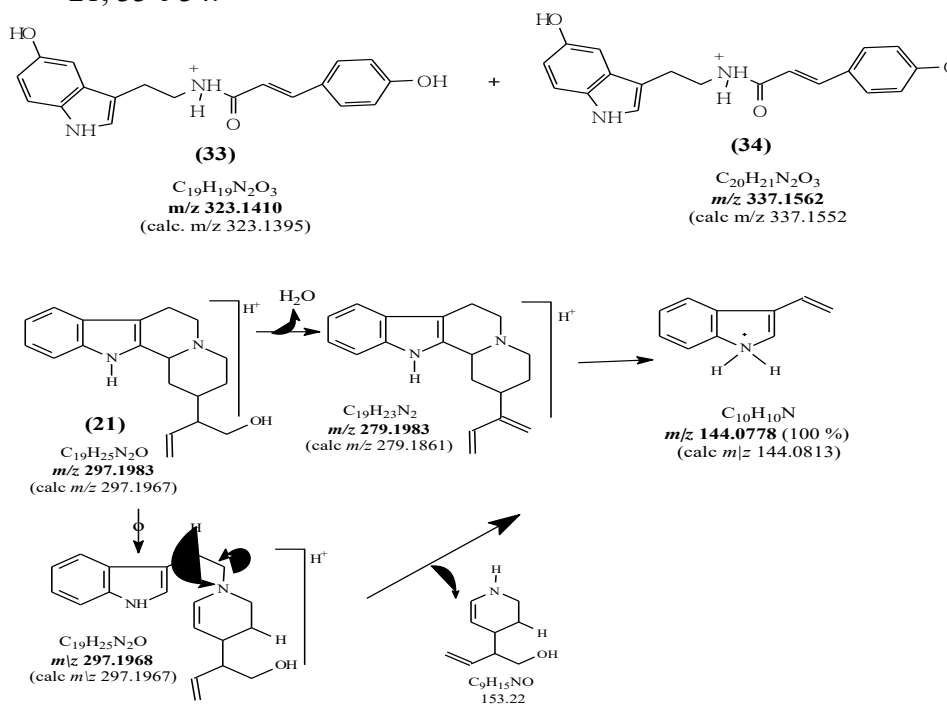


**Esquema 14.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 323 da *N*-*p*-coumaroil serotonina (**32**).

O Espectro 19 gerado do pico do cromatograma no Tempo de retenção em 5.43 forneceu uma mistura de três alcaloides. O isômero (*cis-trans*) *N*-*p*-coumaroil serotonina (**33**) e o epímero da Antirrina (**21**), com os  $[M+H]^+$   $m/z$  323.1410 ( $C_{19}H_{19}N_2O_3$ ) e 297.1983 ( $C_{19}H_{19}N_2O$ ) respectivamente. A terceira substância, em menor quantidade, foi denominada *N*-*p*-metoxicinamoil serotonina (**34**) (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2011) com a fórmula molecular  $C_{20}H_{21}N_2O_3$  com íon molecular ( $[M]^+$ ) 337.1552 gerado do pico  $m/z$  337.1562, no qual apresentou uma diferença de 14  $m/z$ , o que levou a propor a presença de uma metila no lugar da hidroxila quando comparada com a *N*-*p*-coumaroil serotonina (Esquema 15).

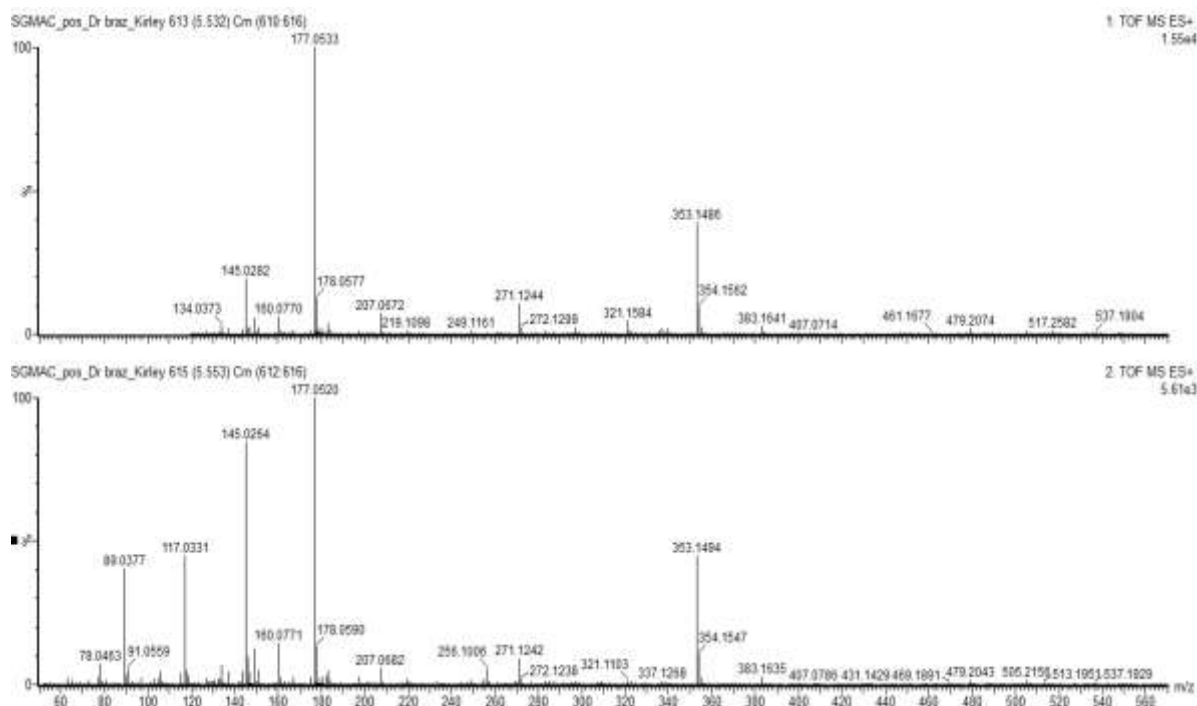


**Espectro 19.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 5.35 das substâncias 21, 33 e 34.

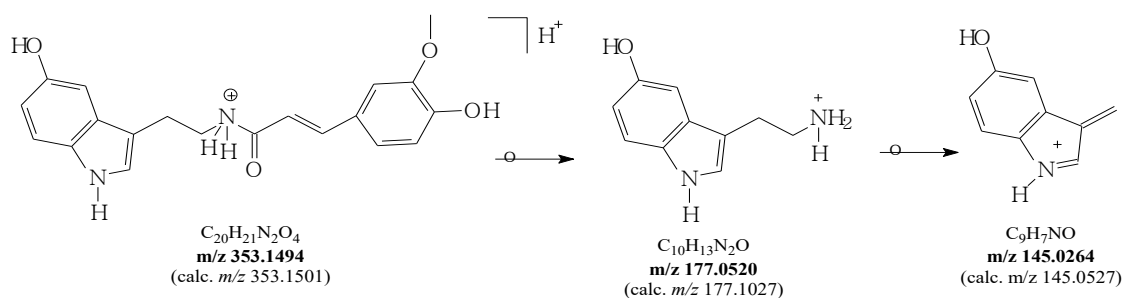


**Esquema 15.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM  $[M+H]^+$ , das substâncias 21, 33 e 34.

A presença do *N*-*p*-feruloil serotonina (36) (TAKAHASHI e MIYAZAWA, 2011) no Espectro 20, foi identificada pelo íon protonado  $[M+H]^+$   $m/z$  353.1494 e com os picos de fragmentação do EM<sup>2</sup> em  $m/z$  177.0520, 145.0264, 117.0331 e 89.0377 (Esquema 16).

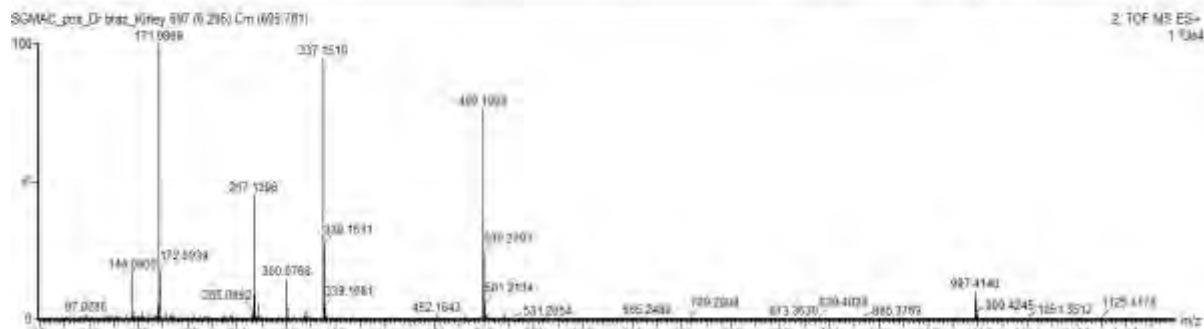
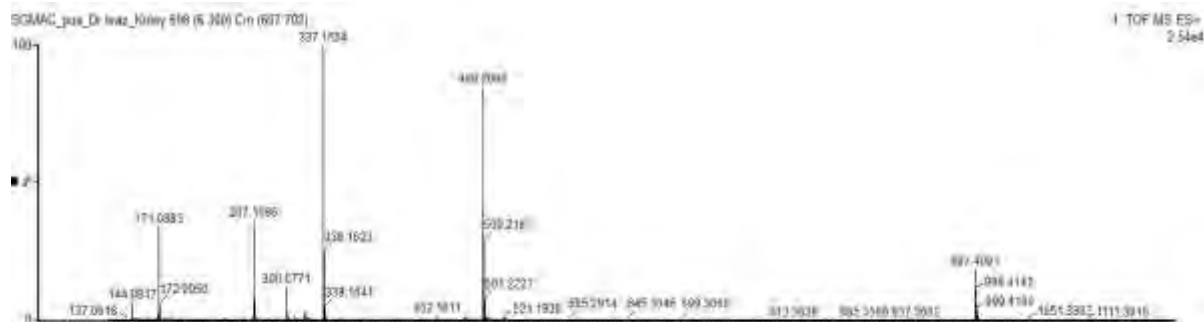


**Espectro 20.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 5.55, *N*-*p*-feruloil serotonina (36).

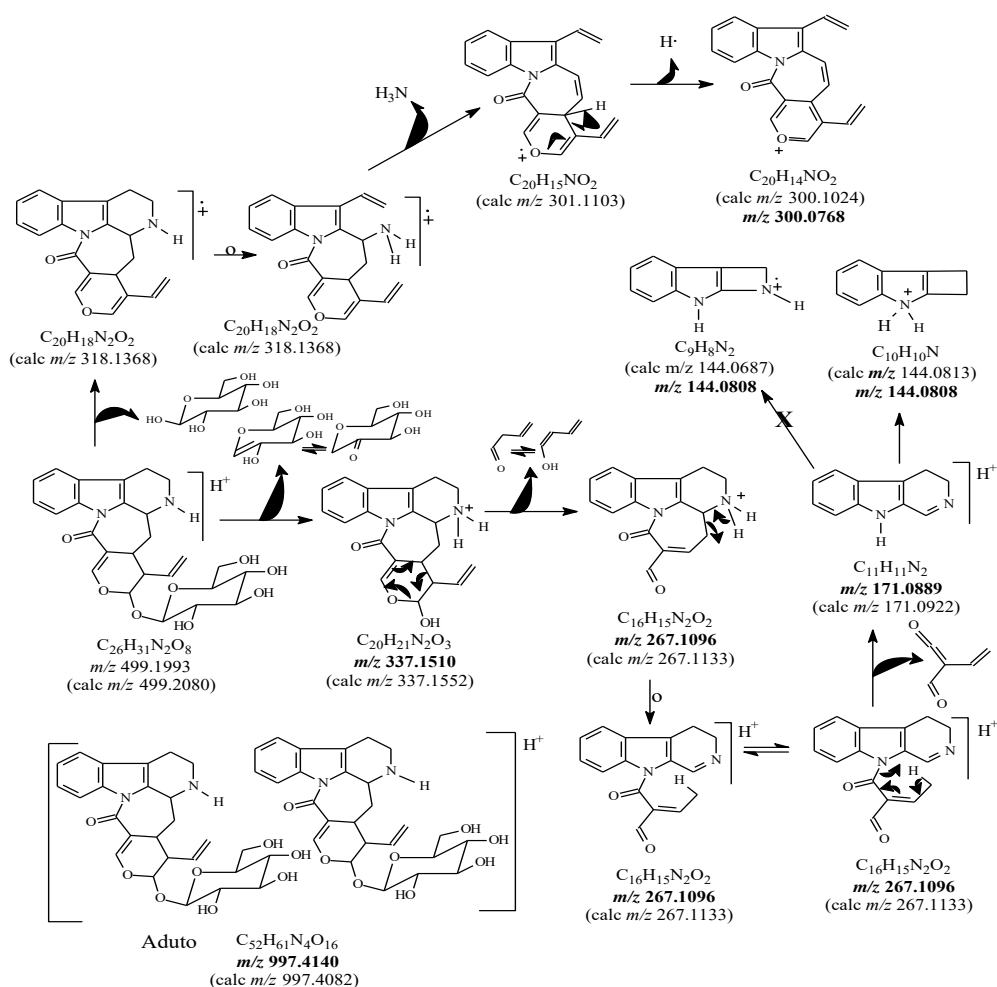


**Esquema 16.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 353 do *N*-*p*-feruloil serotonina (36).

O Espectro 21 apresentou um pico em  $m/z$  997.4091 referente ao aduto de duas moléculas do *N*-desmetil-correantossida (15) (PIMENTA et al., 2011), com o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  499.2086 ( $C_{26}H_{31}N_2O_8$ , calc.  $m/z$  499.2080). A presença desse alcaloide foi confirmada pelas fragmentações (Esquema 17) dos picos do EM<sup>2</sup>, principalmente dos  $m/z$  337.1510 referente à saída da unidade de glicose e  $m/z$  171.0889 ( $C_{11}H_{11}N_2$ ) onde ocorreram sucessivos rearranjos com a perda de toda porção da secologonina, ficando apenas o esqueleto diidro- $\beta$ -carbolina.

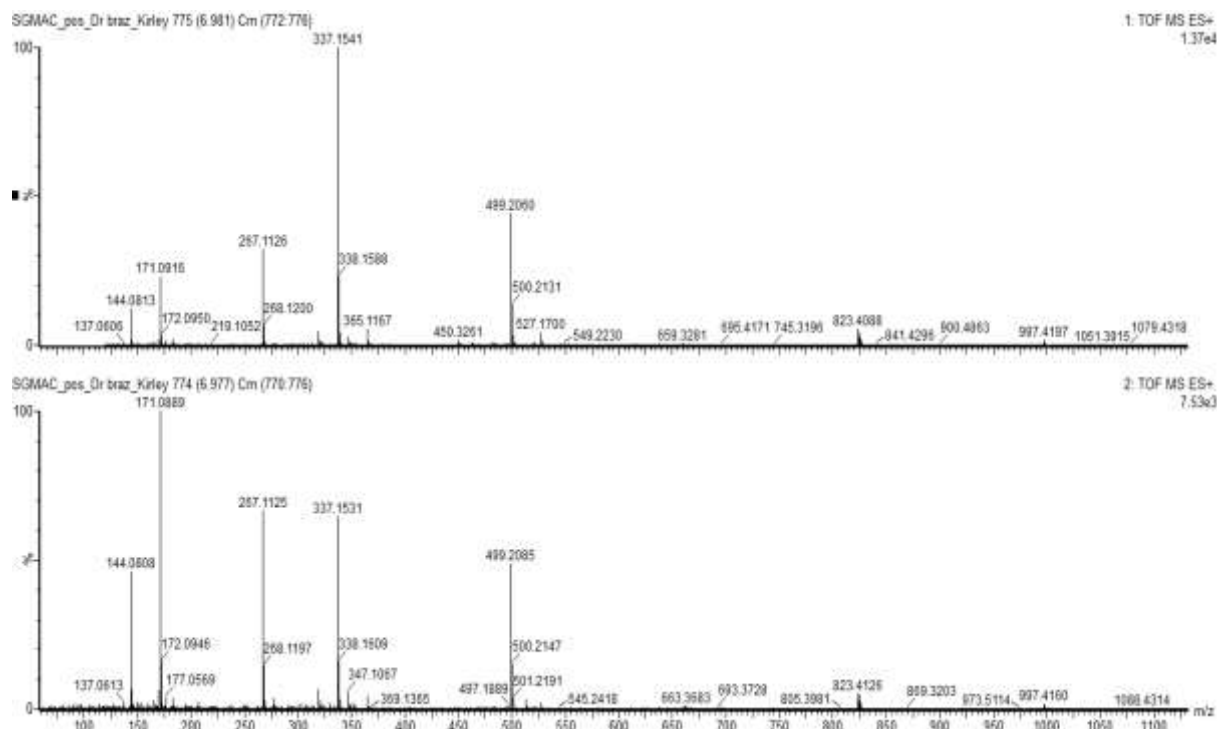


**Espectro 21.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 6.30, *N*-desmetil-correantosida (15).

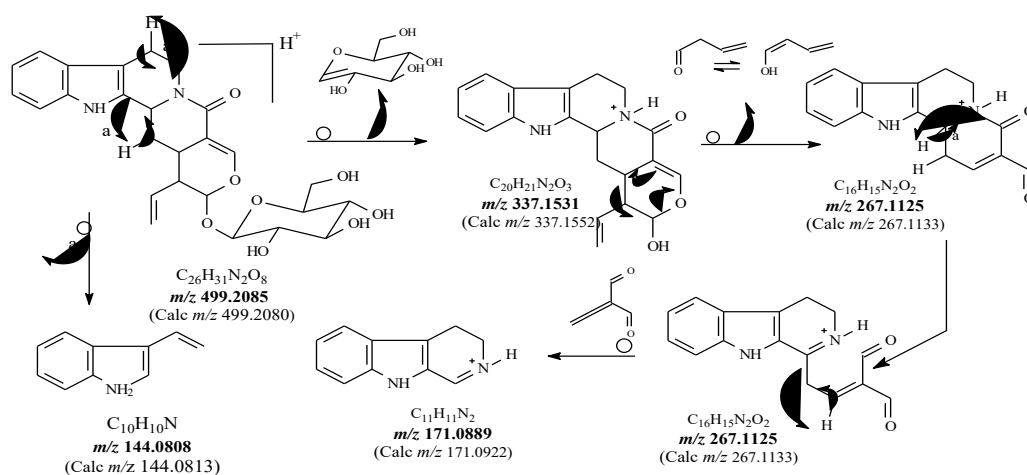


**Esquema 17.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 499, *N*-desmetil-correantosida (15).

O Espectro 22 gerou o pico molecular protonado  $[M+H]^+$   $m/z$  499.2085 ( $C_{26}H_{31}N_2O_8$ , calc.  $m/z$  499.2080) e os picos da fragmentação do EM/EM em  $m/z$  337.1531, 267.1125, 171.0889 e 144.0808. Esse padrão foi semelhante ao *N*-desmetil-correantosida (**15**) identificado, porém a porcentagem de fragmentação do pico  $m/z$  144 nesse espectro obteve uma maior intensidade, em torno de 50%, o que se pode concluir que a formação do  $C_{10}H_{10}N$  ocorre mais facilmente. Isso levou a propor que a substância **16** trata-se do alcaloide com semelhança a **15**, porém com a carbonila virada para o lado do tetrahydro  $\beta$ -carbolina, o que facilita a formação de  $m/z$  144, sendo assim foi proposto à estrutura da Estrictosamida (**16**) (CASTANEDA et al., 1991). As propostas de fragmentação estão no Esquema 18.

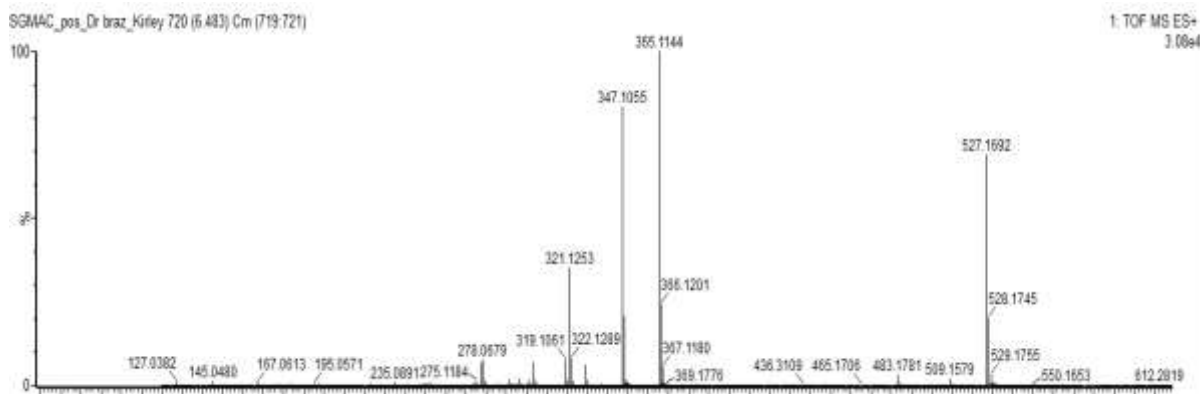


Espectro 22. IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 6.98, Estrictosamida (**16**).

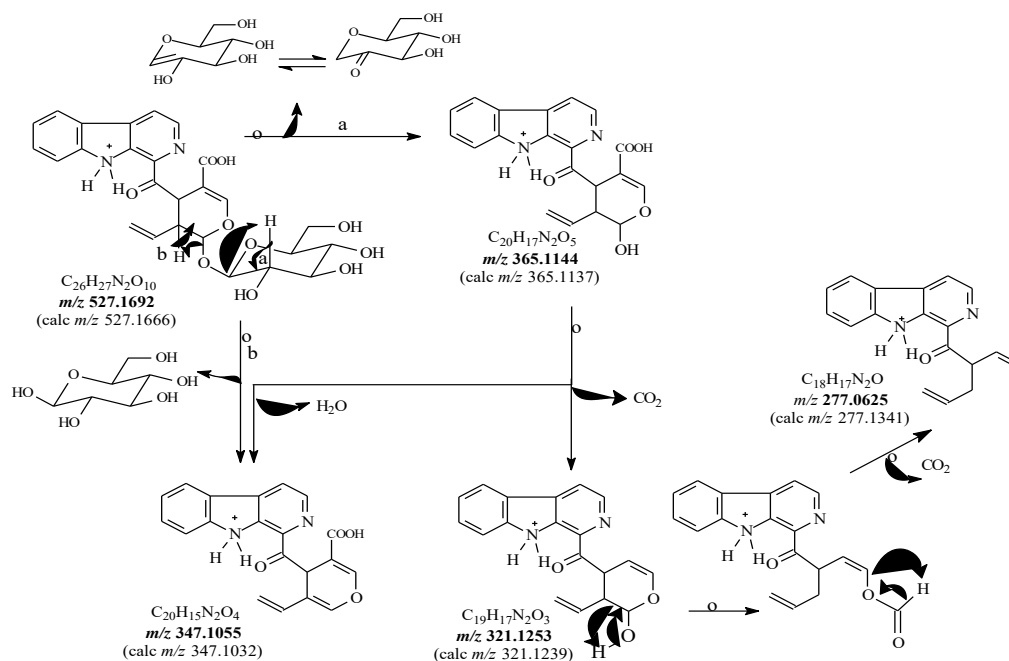


Esquema 18. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 499, Estrictosamida (**16**).

O espectro de massas (Espectro 23) gerado a partir do pico de tempo de retenção 6.48 min, permitiu determinar a substância **14** como Ácido desmetilisopauridiantosídico. O espectro registrou o íon no modo positivo  $[M+H]^+$  em  $m/z$  ( $C_{26}H_{27}N_2O_{10}$ , calc.  $m/z$  527.1692 e com os picos de fragmentações  $m/z$  365.1144, 347.1055 e 321.1253 que justificam a saída da unidade da glicose,  $H_2O$  e  $CO_2$  nesse alcaloide. A representação das propostas de fragmentações estão no Esquema 19.



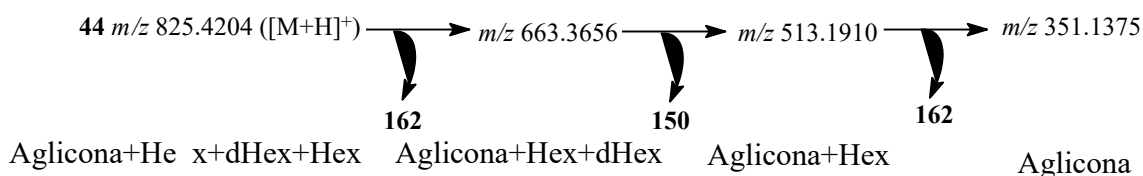
**Espectro 23.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 6.48, Ácido desmetilisopauridiantosídico (**14**).



**Esquema 19.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 527, Ácido desmetilisopauridiantosídico (**14**).

Os Espectros 24, 25, 26, 27 e 28 apresentaram estreito perfil de semelhança, o que levou a propor serem isômeros estereoquímicos (**44**, **45**, **46**, **47** e **48**) envolvendo os átomos de hidrogênio H-3, H-15 e H-20, sem ignorar as possibilidades alternativas das ligações envolvendo o encadeamento das unidades glicose e ramnose, que ocorrem com maior frequência na natureza, além outros carboidratos. O Espectro 24, utilizado para descrição de molécula, apresentou o íon molecular protonado  $m/z$  825.4175 (100%) de fórmula de molecular  $C_{38}H_{34}N_2O_{18}$ . O EM/EM obteve como principais picos  $m/z$  807, 663, 513, 513, 351 e 333, onde justificou a eliminação de uma molécula de  $H_2O$ , a perda de uma unidade de açúcar, eliminação da segunda unidade de açúcar juntamente com a molécula de gás  $H_2$ ,

eliminação da terceira unidade de açúcar e da metila ligada ao nitrogênio, respectivamente (Esquema 20 e 21). Assim foi proposto o alcaloide indólico com a secologanina e com três unidades de açúcar. Na literatura essa estrutura ainda não tinha sido relatada, mas de acordo com os alcaloides isolados de Rubiaceae e de *Simira* e juntamente com as fragmentações permitiram propor esse alcaloide derivado da Ioimbana triglicosilada, propostas inéditas na literatura. Análise aritmética pode permitir postulação das possibilidades das unidades carboidráticas:



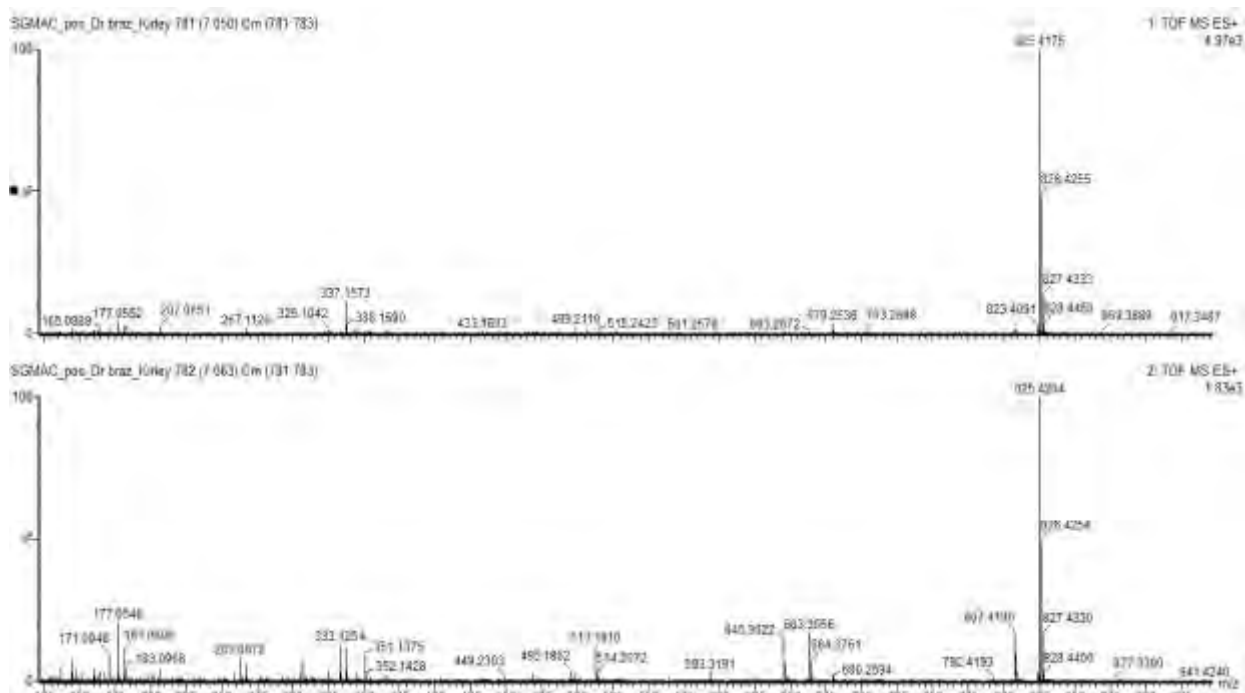
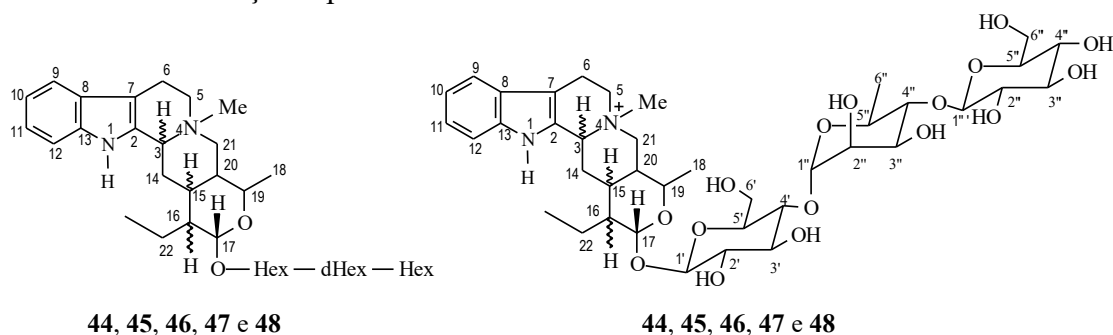
HexA = Ácidos glucurônico e Galacturônico mais comuns

Pent = Arabinose e Xilose pentoses mais comuns

Hex = Glucose e Galactose hexoses mais comuns

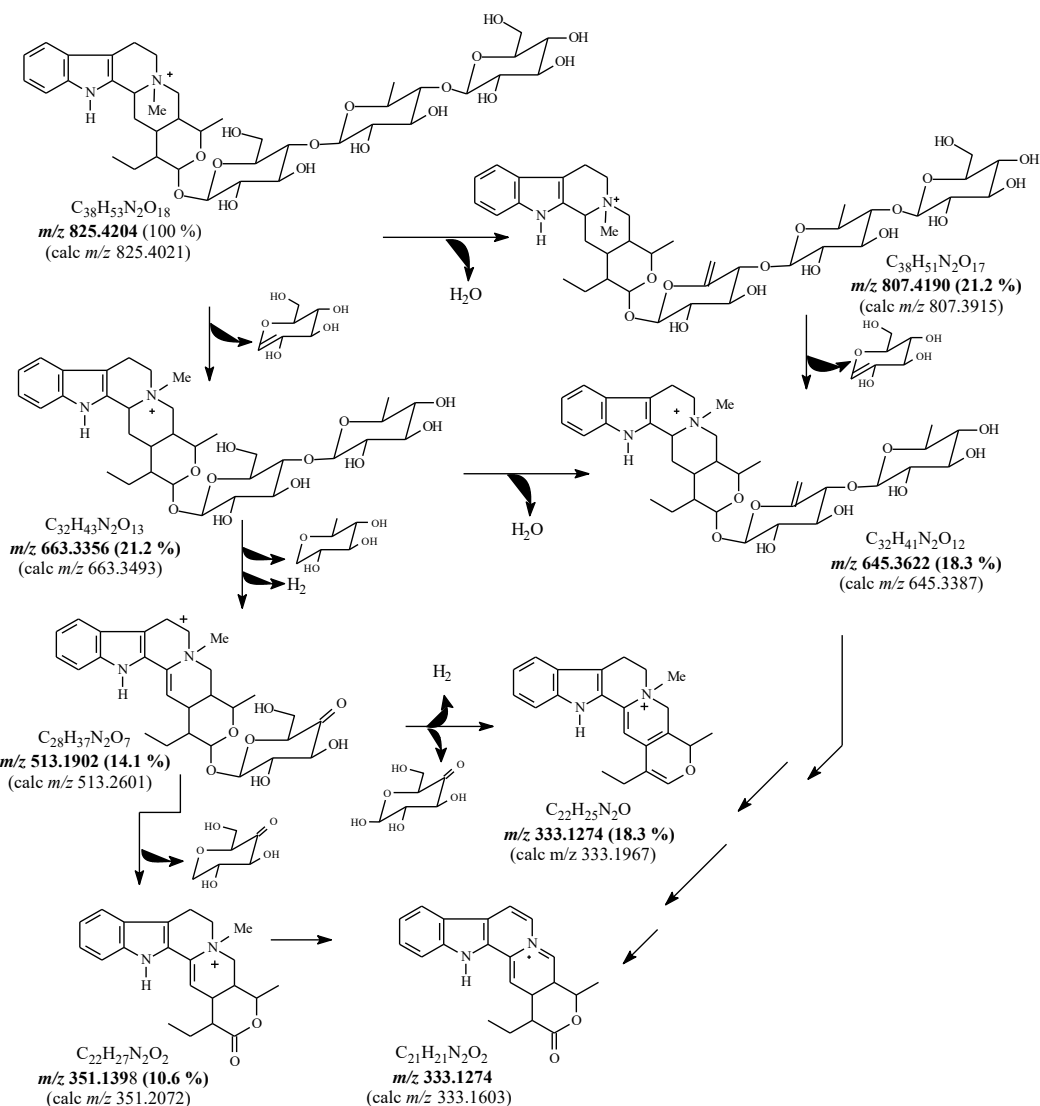
dHex = Rarnose e Fucose desoxihexoses mais comuns

Tentativa de identificação especulativa das substâncias **44-48**:

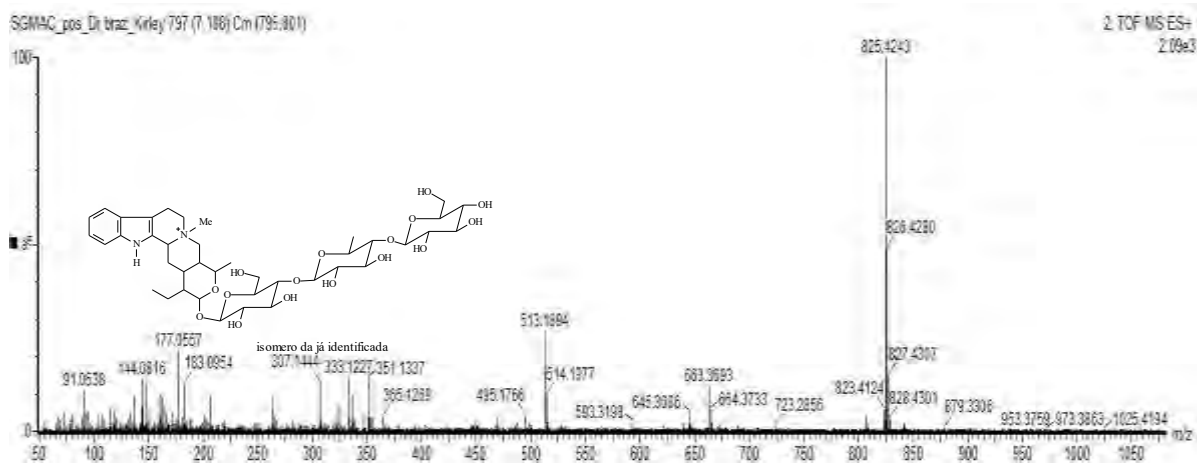


**Espectro 24.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 7.05, da substância 44.

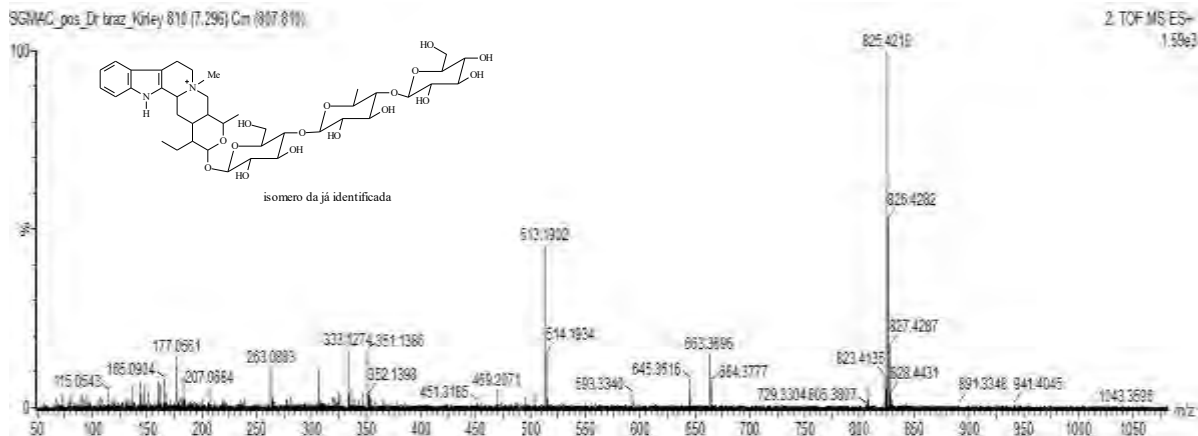




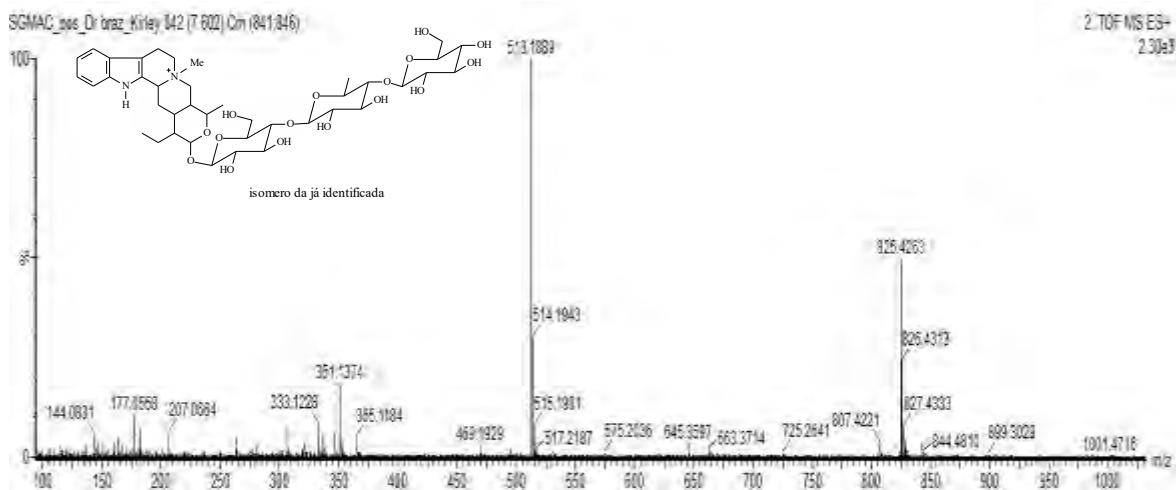
**Esquema 20.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 825, da substância 44.



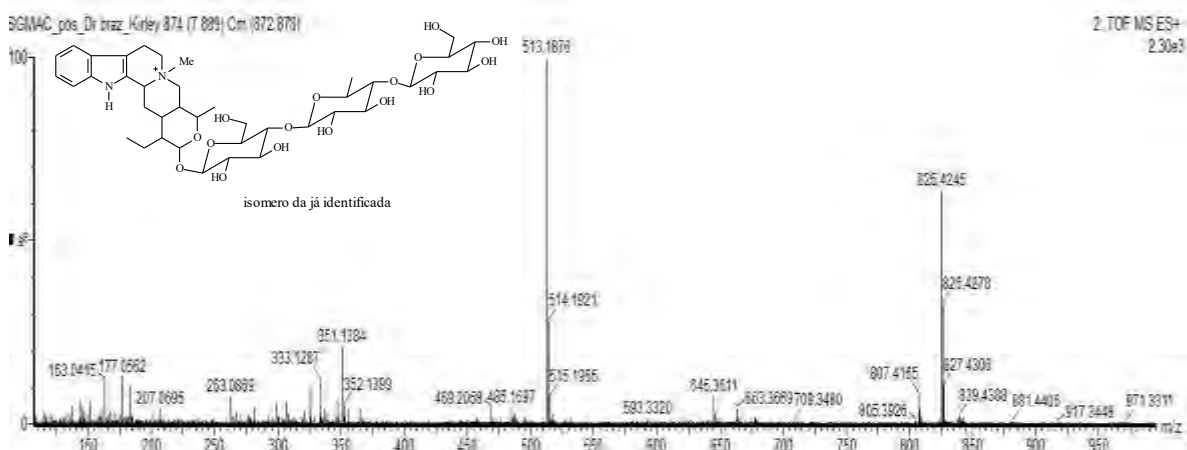
**Espectro 25.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 7.18, da substância 45.



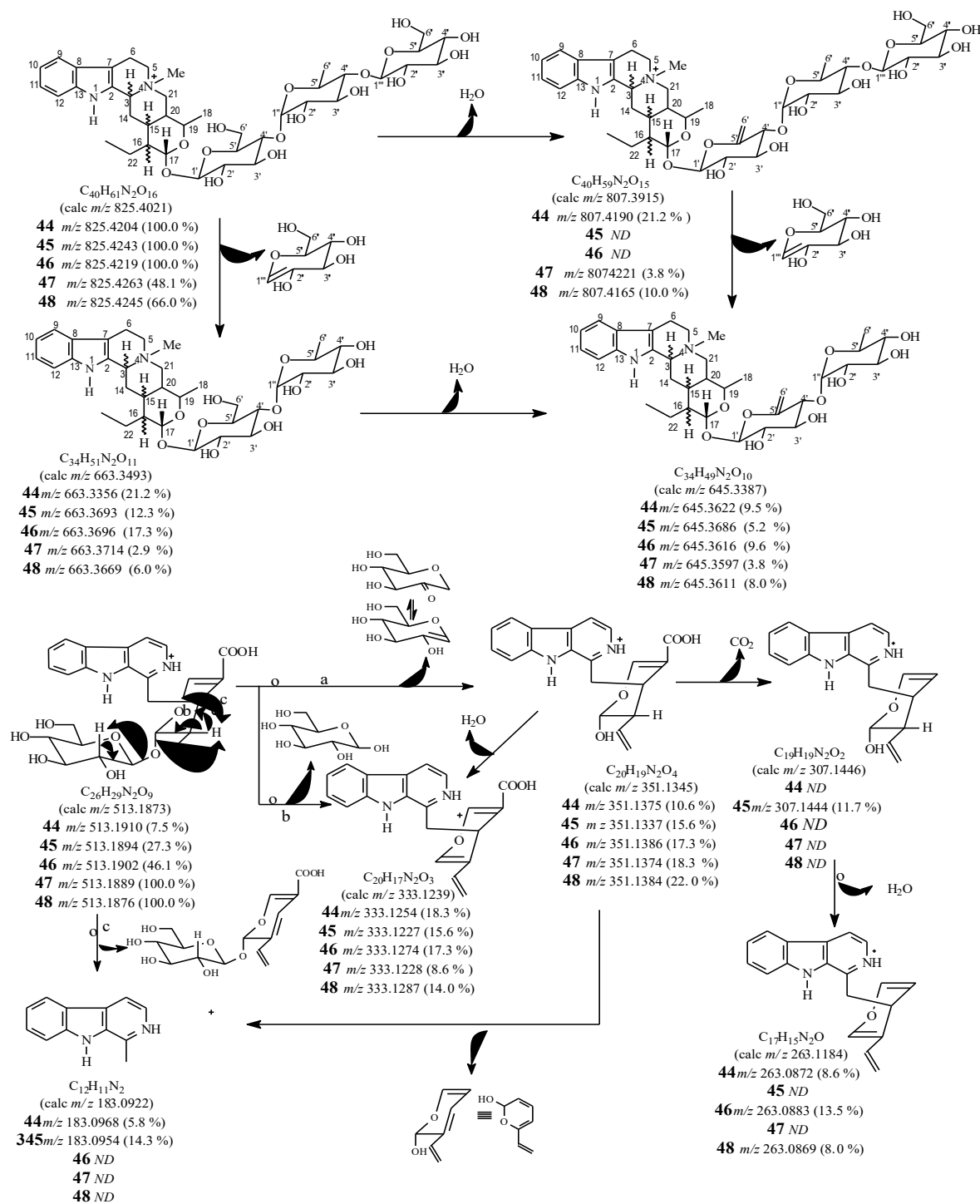
**Espectro 26.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 7.29, da substância 46.



**Espectro 27.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 7.60, da substância 47.

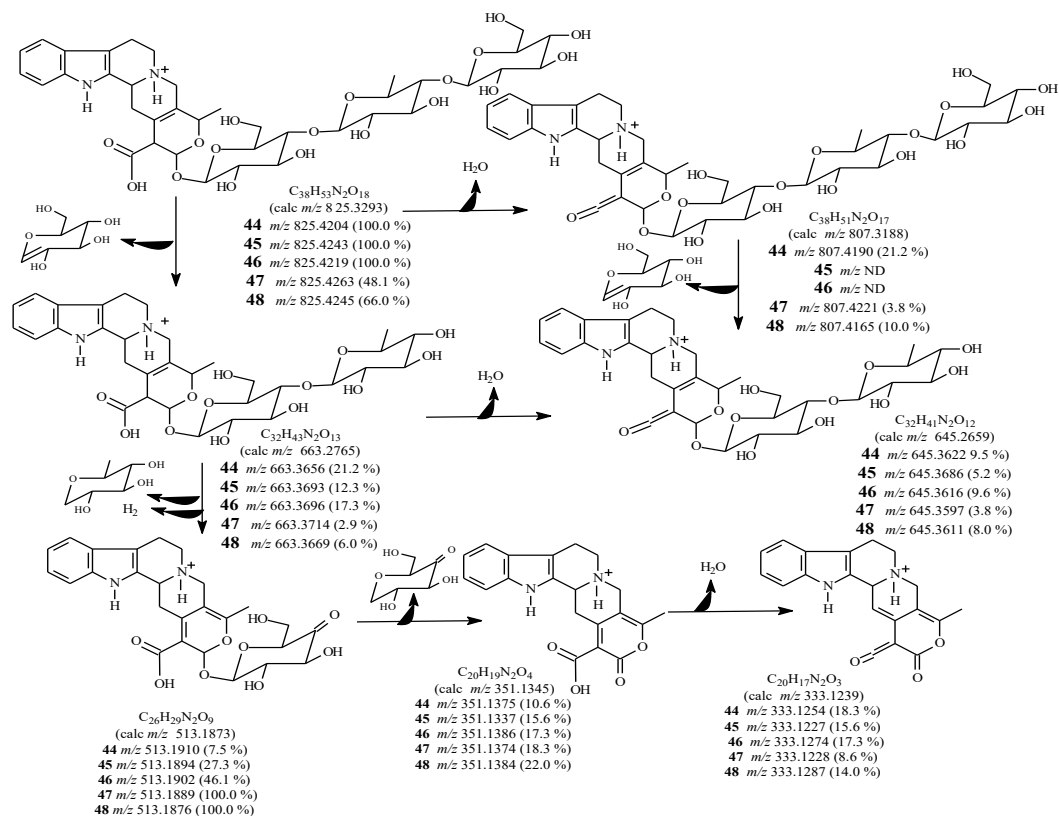


**Espectro 28.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 7.89, da substância 48.



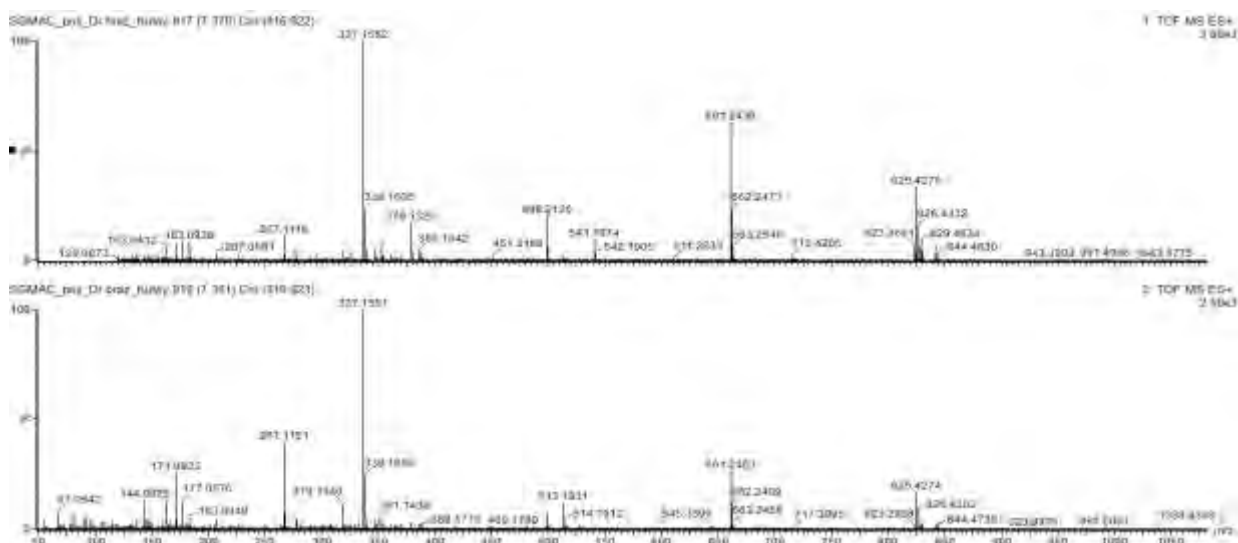
**Esquema 21.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 825, da substância 44-48.

A partir dos dados espectrais foi proposta uma segunda estrutura para as substâncias 44-48 (Esquema 22), com a presença do grupamento carboxílico, mas esse apresentou uma diferença maior no cálculo da massa teórica com a experimental, o que sugere a proposta anterior mais adequada.

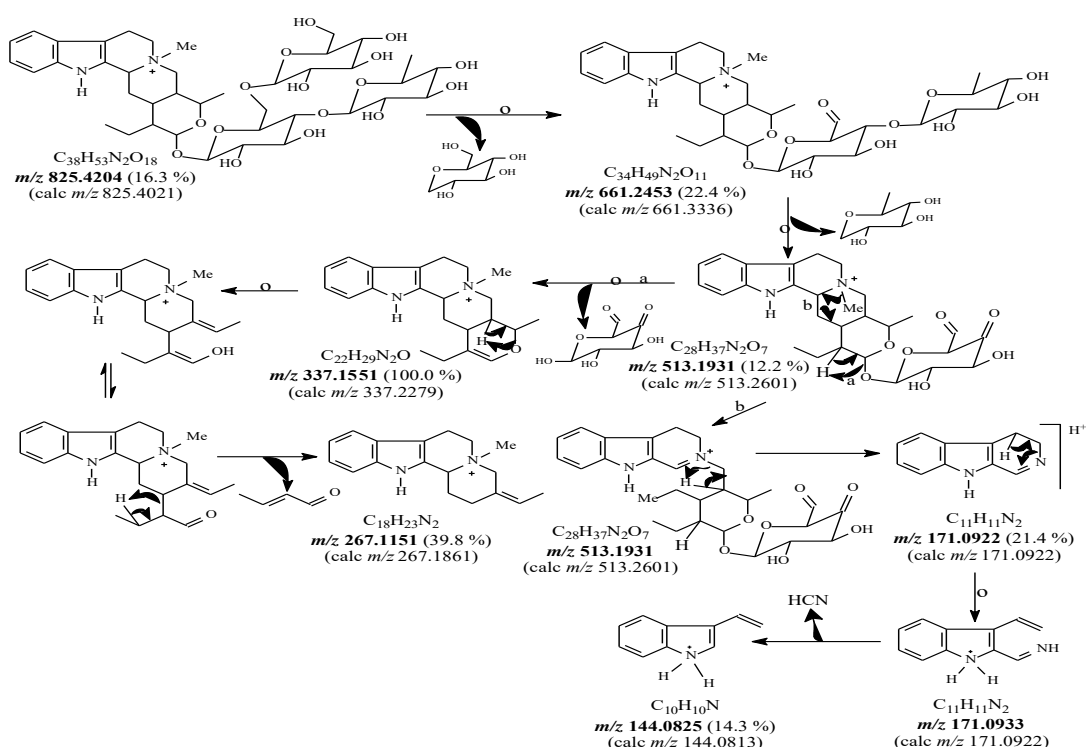


**Esquema 22.** Segunda proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 825, da substância 44-48.

A substância **43** obtida através dos dados do Espectro 29 no Tr. do cromatograma em 7.39 apresentou o íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  825.4276. Esse possui semelhança com o alcaloide proposto anteriormente (**44**), tendo a diferenciação apenas na posição da terceira unidade de glicose, que ao invés de estar conectada a segunda unidade de açúcar ele está ligado ao oxigênio do carbono metilênico do primeiro açúcar. Isso foi proposto, pois o EM<sup>2</sup> apresentou o pico diferente da estrutura **44** em  $m/z$  661 que justifica a posição diferente do terceiro açúcar. Esse e os demais picos estão sendo justificados no Esquema 23. Essa estrutura (**43**), também não tem relatos na literatura.

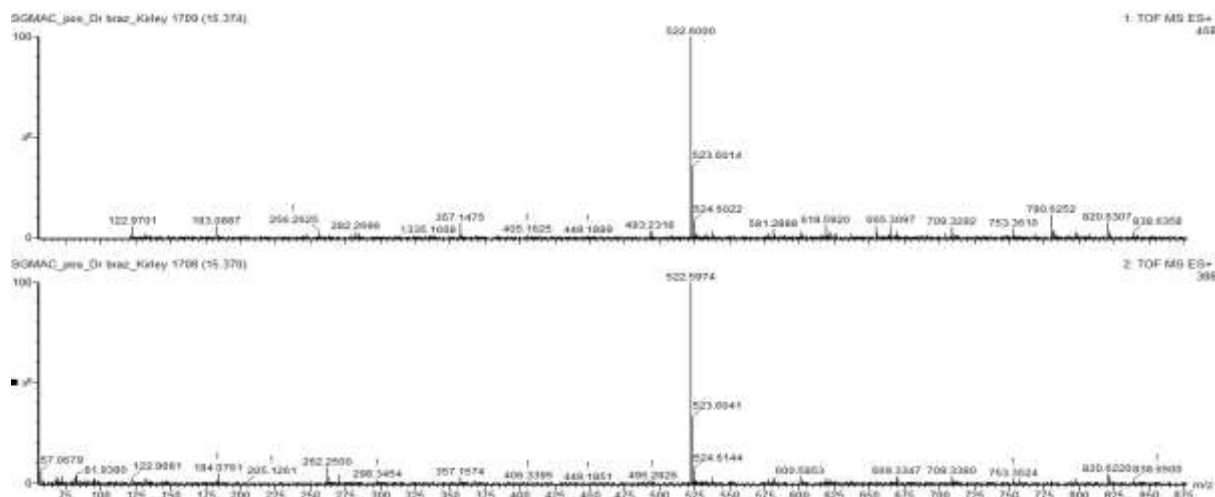


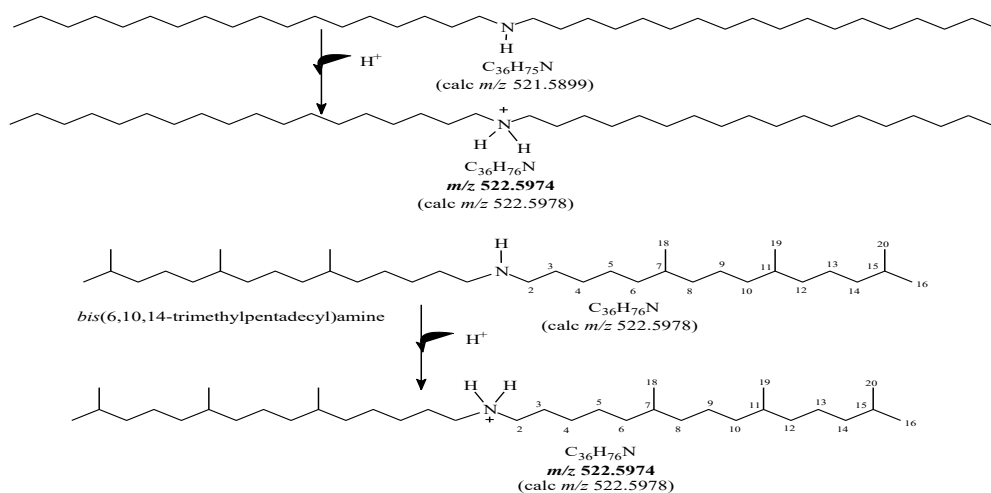
**Espectro 29.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 7.39, da substância 43.



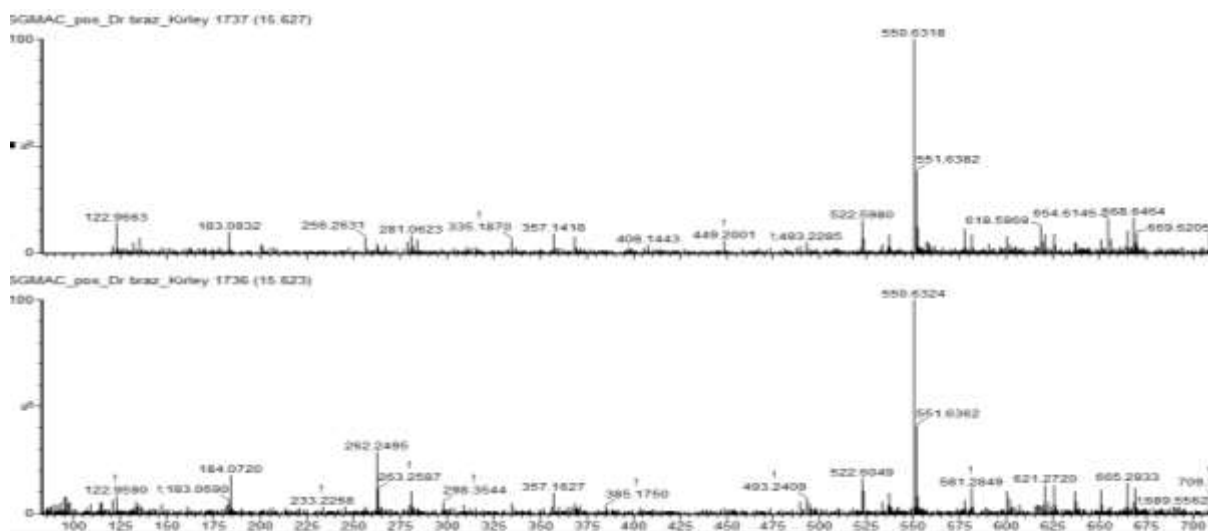
**Esquema 23.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 825, da substância 43.

Nos Espectros 30 e 31 foram propostas a presença de aminas alifáticas, porém não foi possível afirmar se são de cadeias do tipo normal ou ramificadas. Isso porque no cálculo das massas teóricas os dois tipos tiveram o mesmo valor, sendo esses muito próximos ao valor experimental, além dos picos do EM/EM estarem muito baixo, não permitindo propor as fragmentações. No Espectro 30 o pico  $[M+H]^+$   $m/z$  522.5974 ( $C_{36}H_{76}N$ , calc.  $m/z$  522.5978) gerou a proposta da amina de cadeia normal a Dioctadecilamina ou a ramificada *bis* (7, 11, 15-trimetilpentadecil) amina (**53**) (Esquema 24). No Tr.15.62 que gerou o Espectro 31 foram propostas as aminas Dinonadecilamina, para cadeia normal, e a *bis* (3, 7, 11, 15-trimetilpentadecil) amina se for a ramificada (**54**), a partir do o pico  $[M+H]^+$   $m/z$  550.6317 ( $C_{38}H_{80}N$ , calc.  $m/z$  550.6291) (Esquema 25).

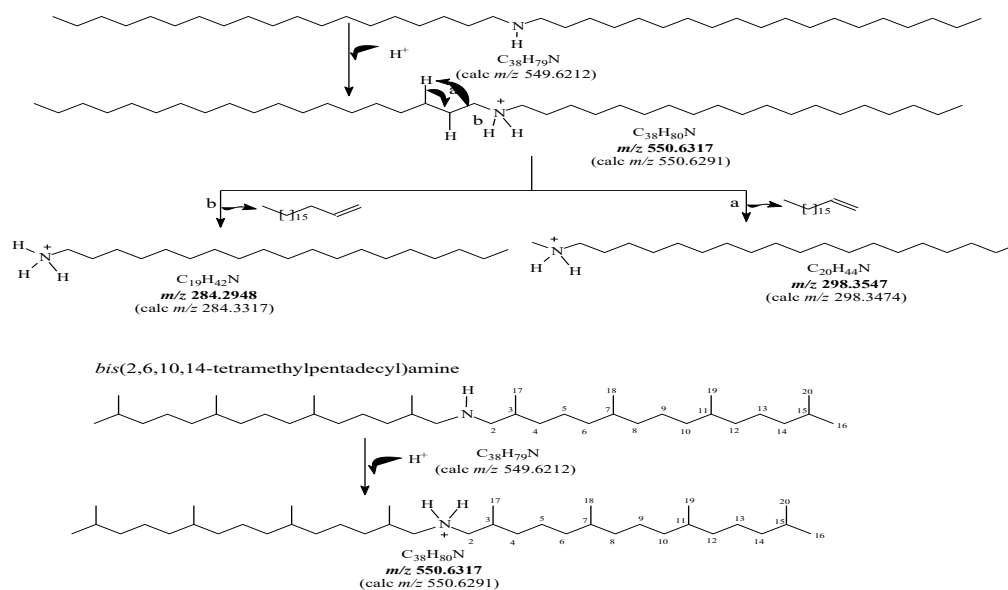




Esquema 24. Proposta para justificar o 522 no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$ , da substância 53.



Espectro 31. IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGAc no Tr 15.62, substância 53.



Esquema 25. Proposta para justificar o 550 no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$ , da substância 54.

### 3.3 Estudo da desreplicação de SGD de *S. grazielae* por EM/EM-IES

O cromatograma por CLUE da fração diclorometano da madeira de *S. grazielae*, SGD (Figura 11), apresentou picos com tempo de retenção de 2.97 a 11.54. Desses picos foram gerados os espectros EM-IES (Espectro 32-50) no modo positivo, com picos de íon molecular protonados entre  $m/z$  183-531.

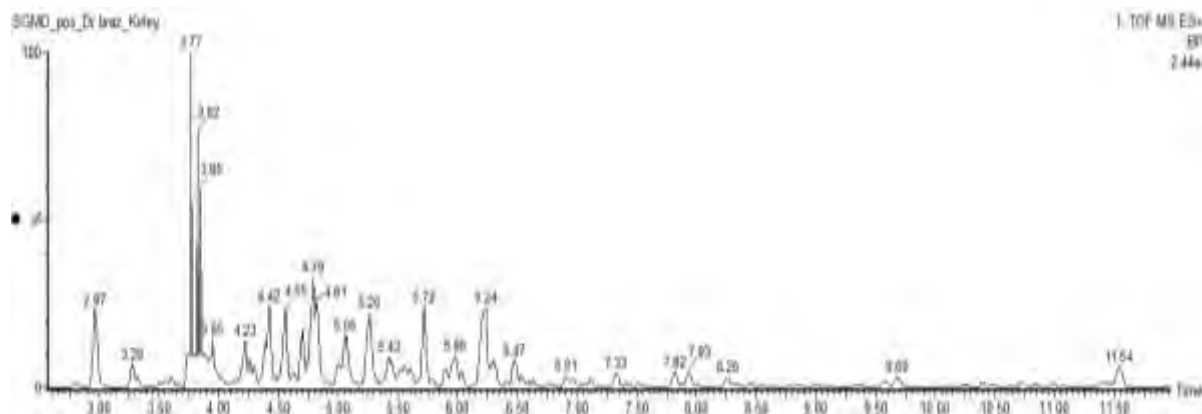


Figura 11. Cromatograma por CLUE de SGD.

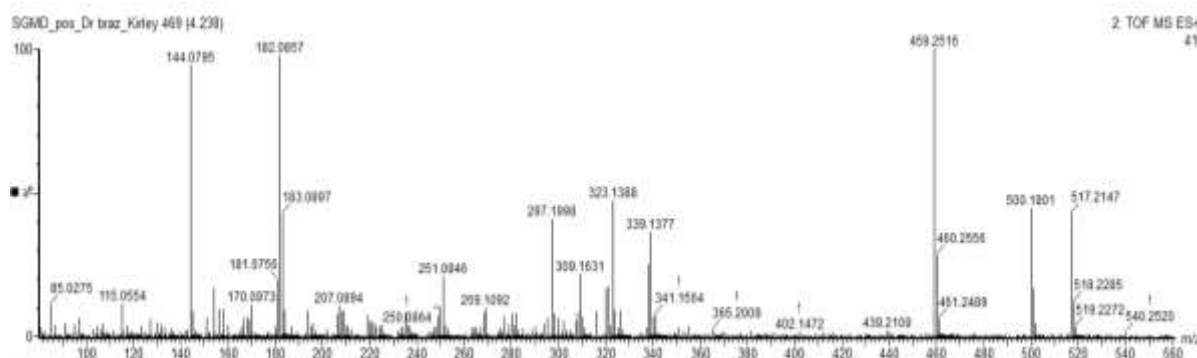
A comparação das medidas de massas calculadas com os dados obtidos dos espectros, juntamente com a comparação da literatura e com as fragmentações foi possível indicar a presença nessa fração de 27 substâncias dentre isômeros (Tabela 4). Muitas moléculas propostas nessa fração foram relatadas na desreplicação da fração de acetato de etila, então essas serão apenas citadas nos seus respectivos espectros de massas sem justificativas por esquemas de fragmentações. Além disso, em alguns espectros gerados de SGD não foi possível propor a estrutura.

Tabela 4. Substâncias propostas através dos espectros de EM da fração SGD no modo positivo.

TR	Substâncias	Fórmula Molecular	$m/z$ $+[H+]$	MS/MS
4.23	Isômero Antirrina glicosilada ( <b>24</b> )	$C_{25}H_{34}N_2O_6$	459.2451	
4.23	Ácido Estrictosidínico ( <b>11</b> )	$C_{26}H_{32}N_2O_9$	517.2147	500, 338, 320,309, 269, 251, 144
4.23	<i>N</i> -p-coumaroil serotonina ( <b>32</b> )	$C_{26}H_{18}N_2O_3$	323.1388	
4.23	<i>N</i> -p-cafeloil serotonina ( <b>35</b> )	$C_{19}H_{17}N_2O_4$	339.1377	
5.26	15,20-dideidro Ioimbana ( <b>28</b> )	$C_{19}H_{23}N_2$	279.1862	249, 144, 136
6.51	Camptotecina-5-glicopiranosídeo ( <b>31</b> )	$C_{26}H_{26}N_2O_{10}$	527.1684	365, 347, 337, 321, 160
2.96	Ofiorina A ( <b>3</b> )	$C_{26}H_{28}N_2O_9$	513.1823	469, 351, 307, 183
3.28	Ofiorina B ( <b>2</b> )	$C_{26}H_{28}N_2O_9$	513.1866	469, 351, 333, 307, 263
3.77	Harmana ( <b>4</b> )	$C_{12}H_{10}N_2$	183.0930	168, 142, 115
3.82	Harmana A ( <b>5</b> )	$C_{12}H_{10}N_2$	183.0926	168, 142, 115

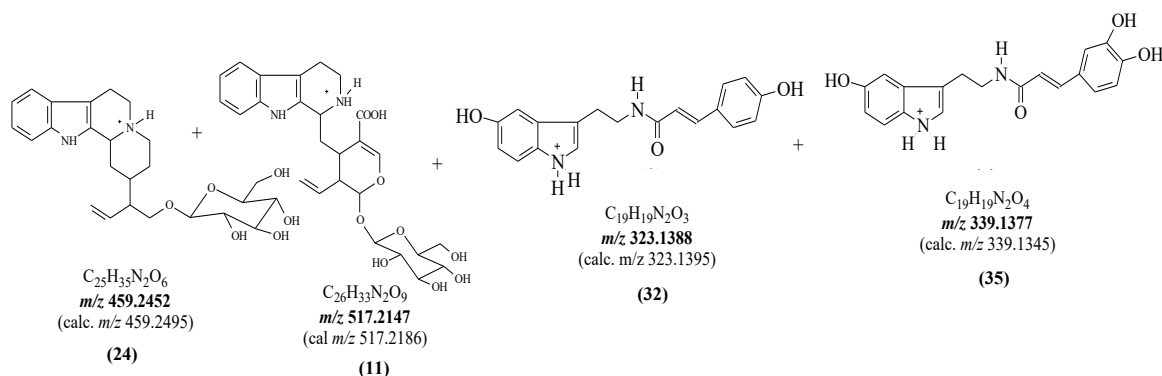
3.85	Harmana B (6)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0723	168, 142, 115
3.95	Ácido Lialosídico (9)	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1860	469,351, 333, 263, 183
4.26	Acido 3- <i>epi</i> - Estrictosidínico (12)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2154	500, 338, 320,309, 269, 251, 144
4.29	Descarboxi-lialosídico (55)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	469.1960	307, 182
4.29	Antirrina glicosilada (23)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2491	297, 144
4.41	Estrictosidina (13)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	531.2333	500, 488, 369, 326, 308, 183,181, 144
4.55	Ácido desmetilisopauridiantosídico (14)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	527.2012	365, 333, 295, 263, 235, 183
4.69	Antirrina (18)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1957	154, 144
4.69	<i>N<sub>b</sub></i> -metilantirrina (25)	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.2118	154
4.79	Epímero do Antirrina (19)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1949	
4.79	3,5,6,14-tetradehidro Antirrina (26)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1556	
4.81	Epímero do Antirrina (20)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1945	
4.81	Matadina (50)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1623	
5.01	Epímero do Antirrina (21)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1931	154, 144
5.43	<i>N</i> - <i>p</i> -metoxi cinamoil serotonina (34)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	337.1560	305, 279,182
5.43	Epímero do Antirrina (22)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1913	279, 261, 144
6.30	<i>N</i> -desmetilcorreantosida (15)	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	499.2033	337, 300, 267, 171, 144

No Espectro 32 foi proposta a mistura da Antirrina glicosilada (24), Ácido Estrictosidínico (11), *N*-*p*- coumaroil serotonina (32), que tinham sido identificados em SGAc, e o alcaloide *N*-*p*-cafeoil serotonina (35) com íon molecular protonado [M+H]<sup>+</sup> em *m/z* 339.1377 (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), e o cálculo teórico de *m/z* foi de 339.1345, valor muito próximo (Esquema 26).



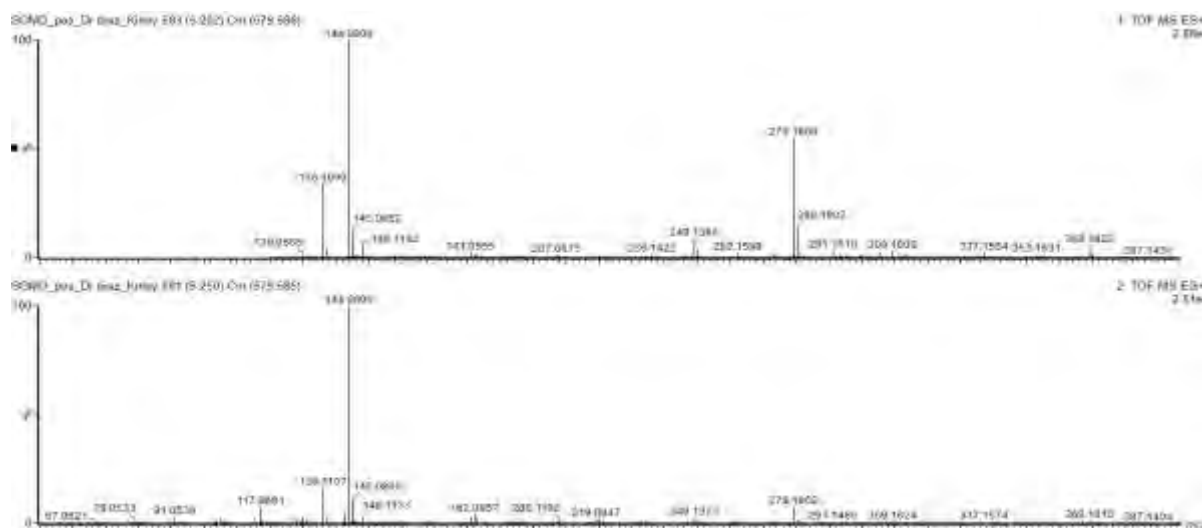
**Espectro 32.** IES-EM/EM [M+H]<sup>+</sup> de SGD no Tr 4.23, das substâncias 11, 24, 32 e 35.



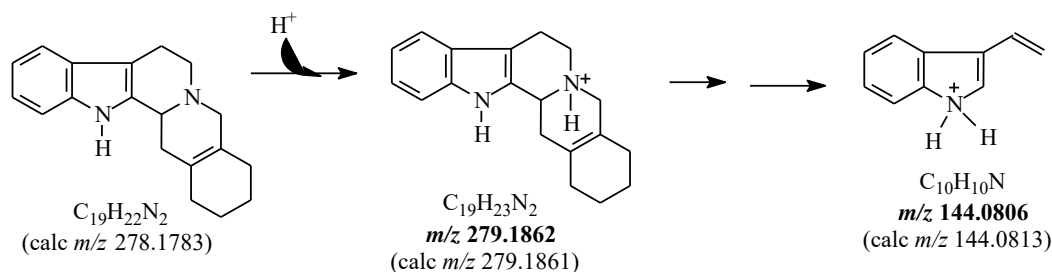


**Esquema 26.** Proposta para justificar os picos no IES-EM/EM  $[M+H]^+$ , das substâncias 11, 24, 32 e 35.

O Espectro 33 apresentou como íon molecular  $[M+H]^+$   $m/z$  279.1862 e possuiu como pico de fragmentação  $m/z$  em 144, o que é esperado para o esqueleto base dos alcaloides  $\beta$ -tetrahydro- $\beta$ -carbolina. Com essa informações e juntamente com o cálculo de massa teórica  $[M+H]^+$   $m/z$  279.1861, valor praticamente idêntico ao real, foi proposto o 15,20-dideidro Ioimaba (28) (SCHUMANN e SCHMID, 1963)(Esquema 27).



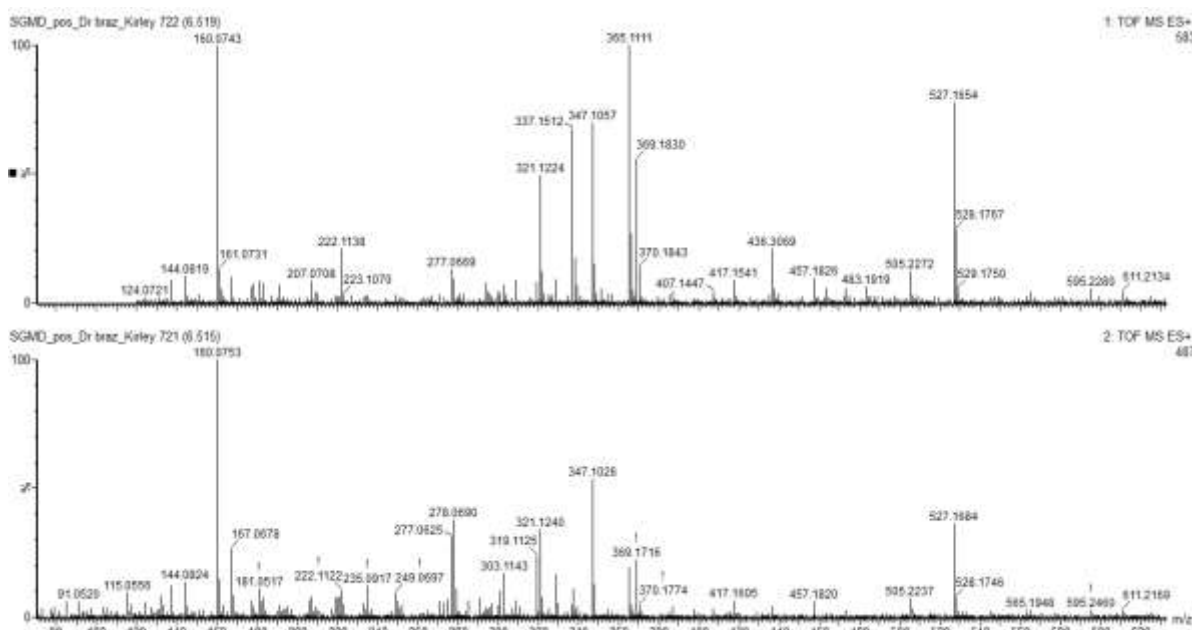
**Espectro 33.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 5.26 da substância 28.



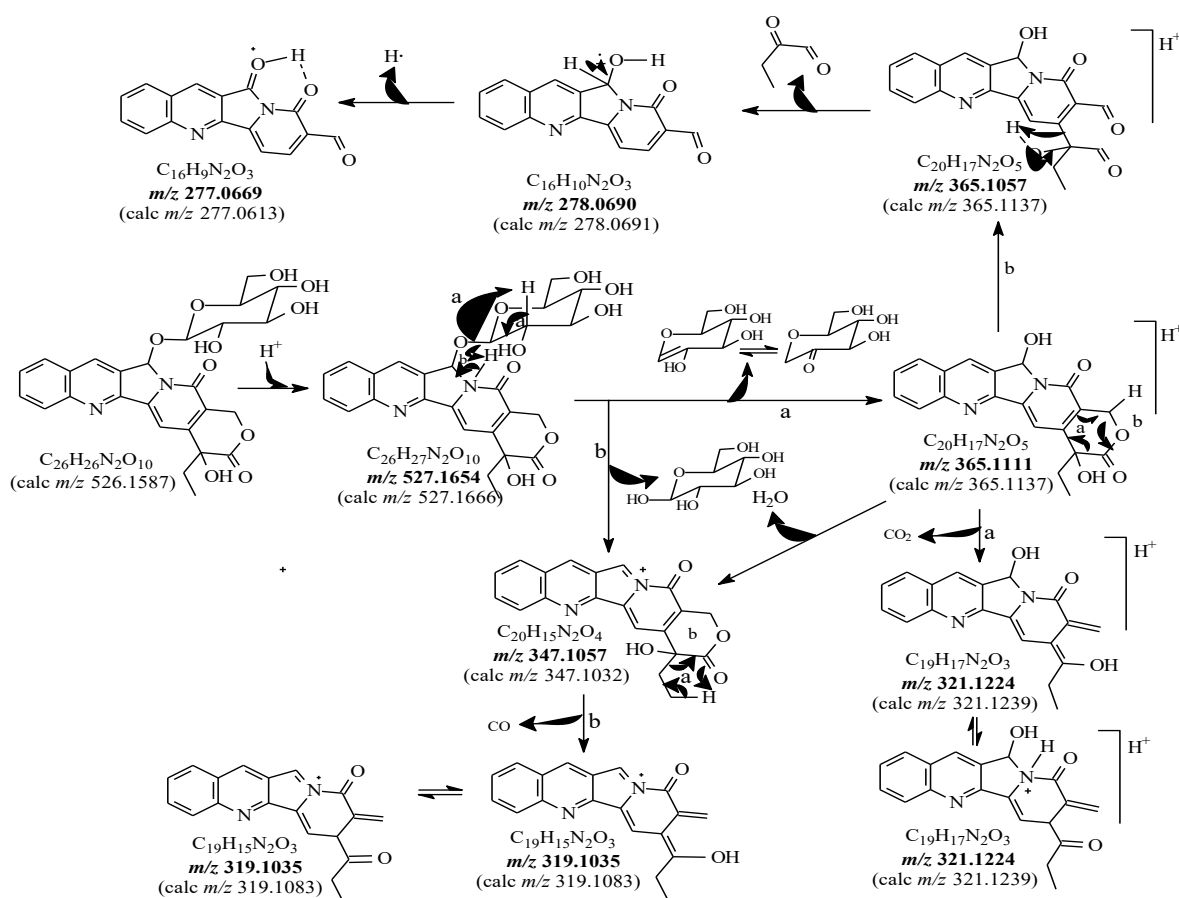
**Esquema 27.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 279 da substância 28.

O Espectro 34 gerado do tempo de retenção 6.51 min apresentou o íon molecular  $[M+H]^+$  em 527.1654, valor parecido com Lialosídeo, porém com padrão de fragmentação diferente. Isso levou propor a presença de outra substância denominada como Camptotecina-5-glicopiranosídeo (31)(WANG et al., 2015) de fórmula molecular  $C_{26}H_{26}N_2O_{10}$ . Tanto as

fragmentações (Esquema 28) como o íon molecular protonado tiveram valores experimentais de massa muito parecidos com o teórico, o que auxiliou ainda mais na confirmação desse alcaloide.

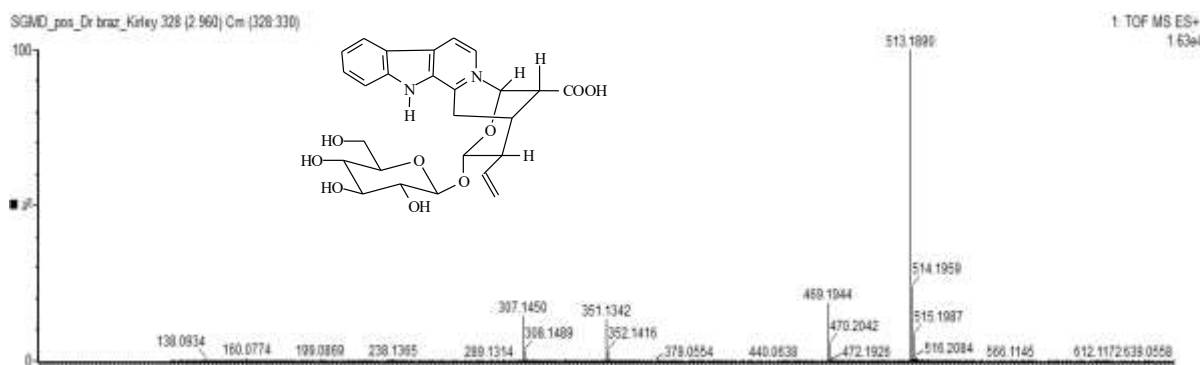


**Espectro 34.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 6.51 da substância 31.

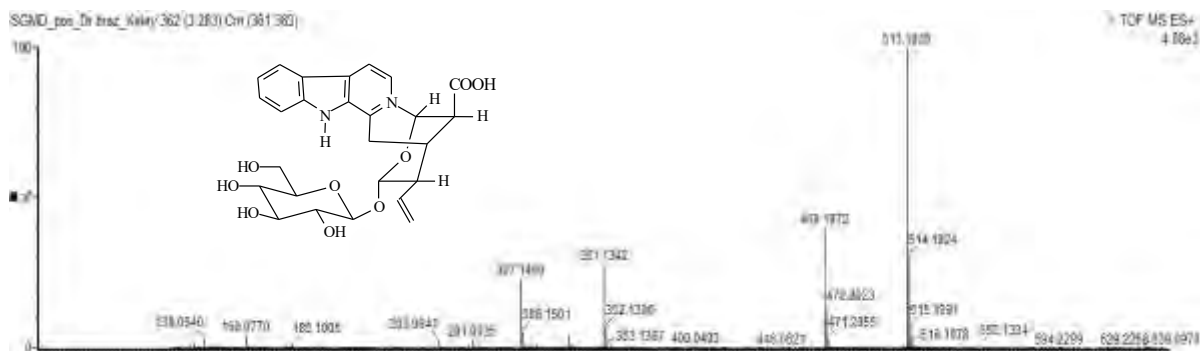


**Esquema 28.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 527 da substância 31.

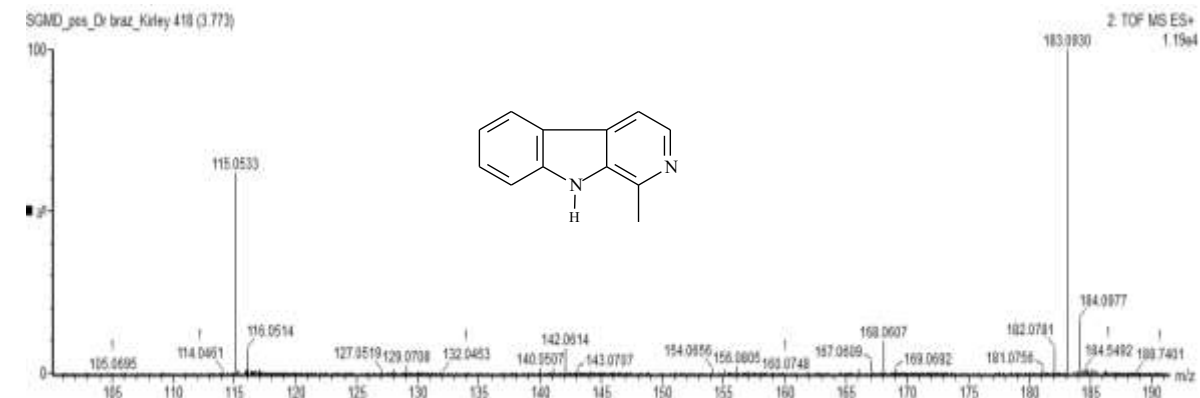
Na análise dos Espectros de 35-50 foi utilizada o método comparativo com os espectros gerados da fração SGAc, e esses apresentaram semelhanças tanto nos valores dos íons moleculares protonados como no padrão de fragmentação para cada substância o que conclui serem as mesmas substâncias identificadas. Assim foi proposta para os Espectros de 35-51 a presença dos metabólitos: Ofiorina A (3), Ofiorina B (2), Harmana (4), 2 Isômeros da Harmana (5 e 6), Ácido Lialosídico (9), Antirrina glicosilada (23), Ácido 3-*epi*-Estrictosidínico (12), descarboxi-lialosídico (55), Estrictosidina (13), Ácido desmetilisopauridiantosídico (14) Antirrina (18), *N*-metilantirrina (25), quatro isômeros da Antirrina (19, 20, 21 e 22), 3,5,6,14-tetradehidro antirrina (26), Matadina (50), *N*-*p*-metoxi cinamoil serotonina (34) e *N*-desmetil-correantosida (15).



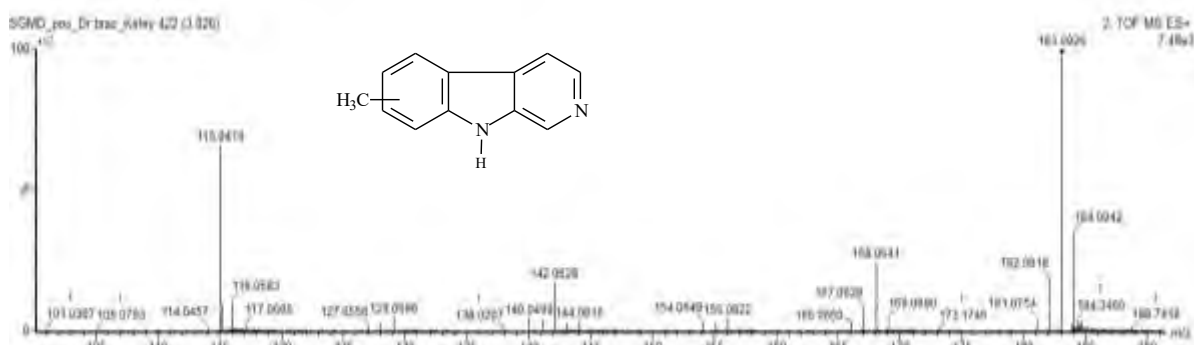
**Espectro 35.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 2.97, Ofiorina A (3).



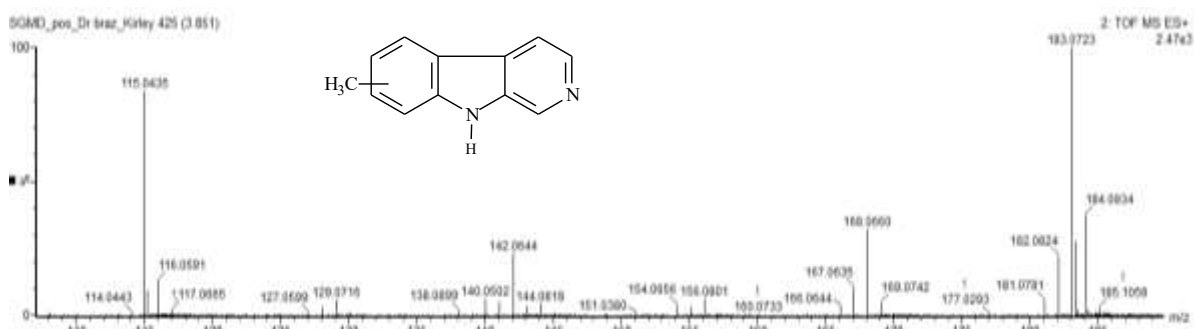
**Espectro 36.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 3.28, Ofiorina B (2).



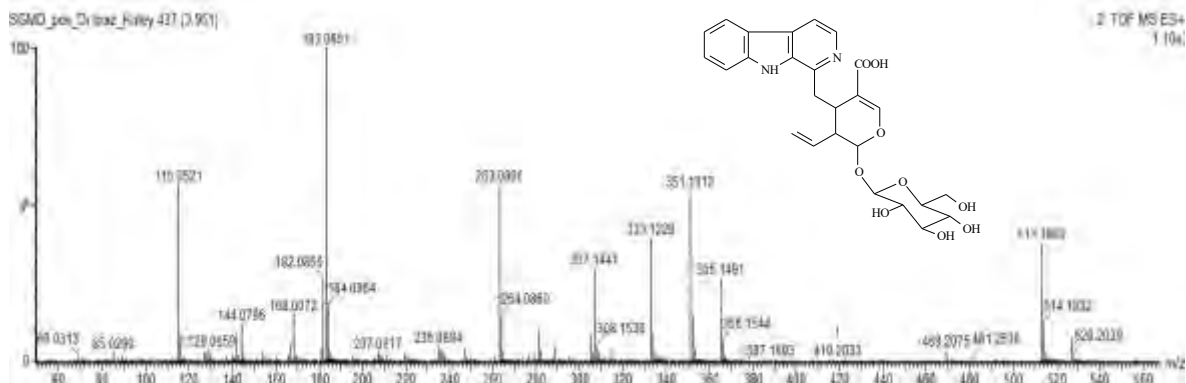
**Espectro 37.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 3.77, Harmana (4).



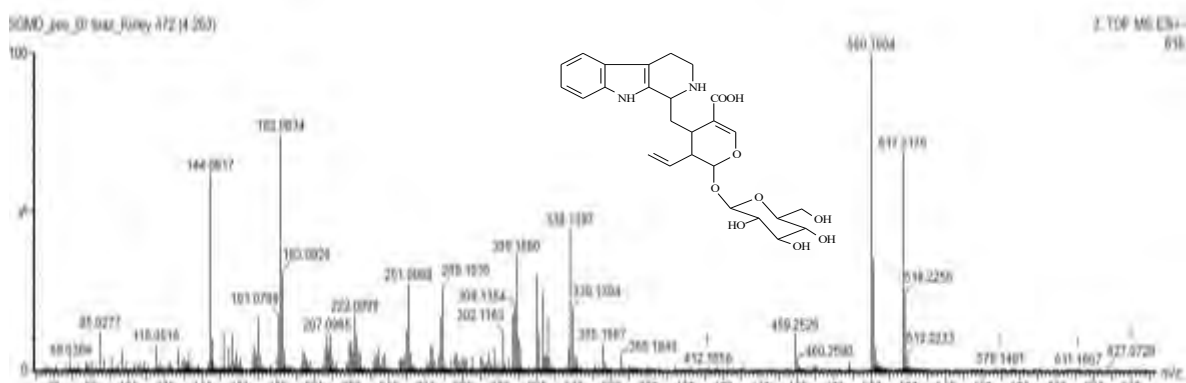
**Espectro 38.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 3.82, isômero da Harmana A (5).



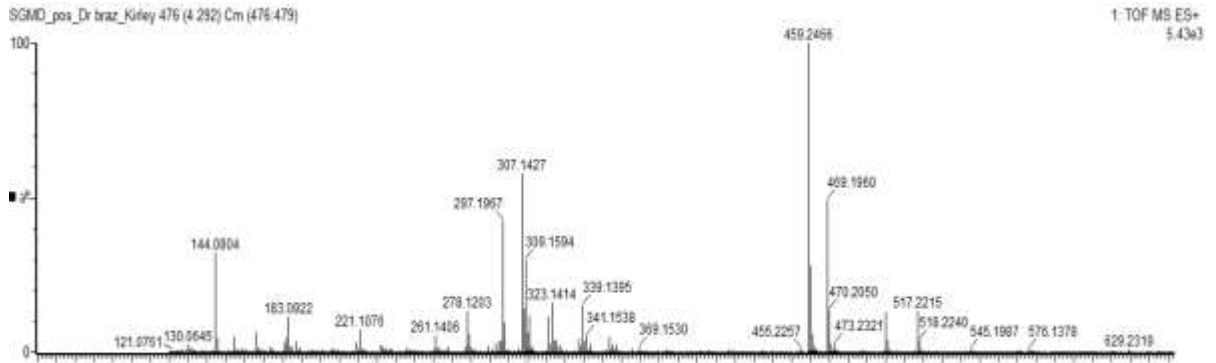
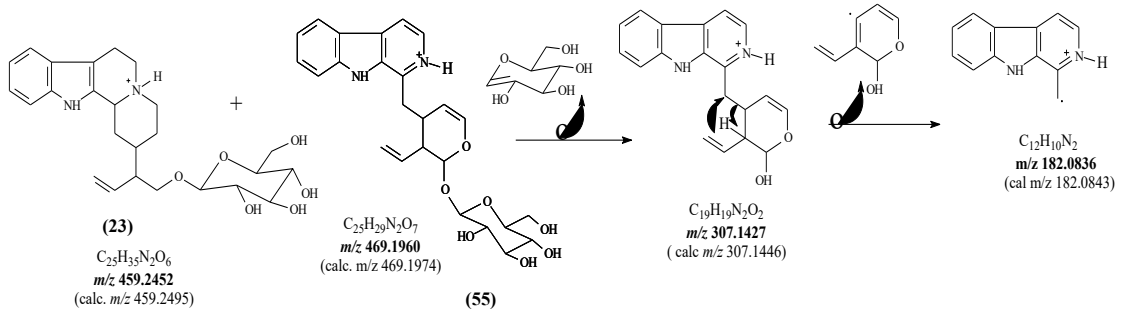
**Espectro 39.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 3.85, isômero da Harmana B (6).



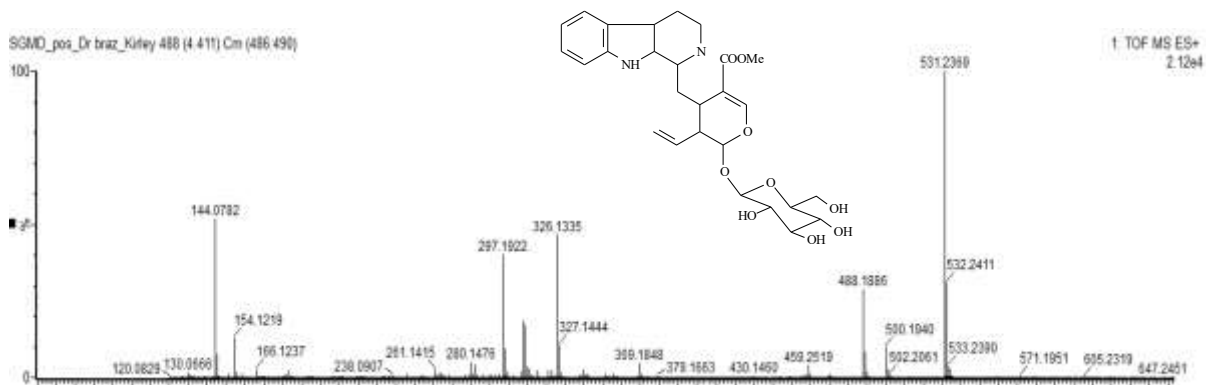
**Espectro 40.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 3.95, Ác. Lialosídico (9).



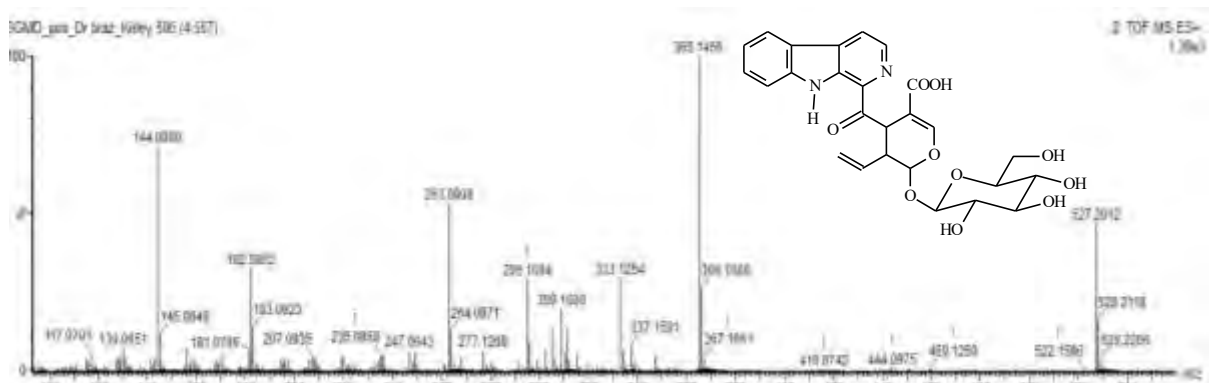
**Espectro 41.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.26, Acido 3-*epi*-Strictosidínico (12).



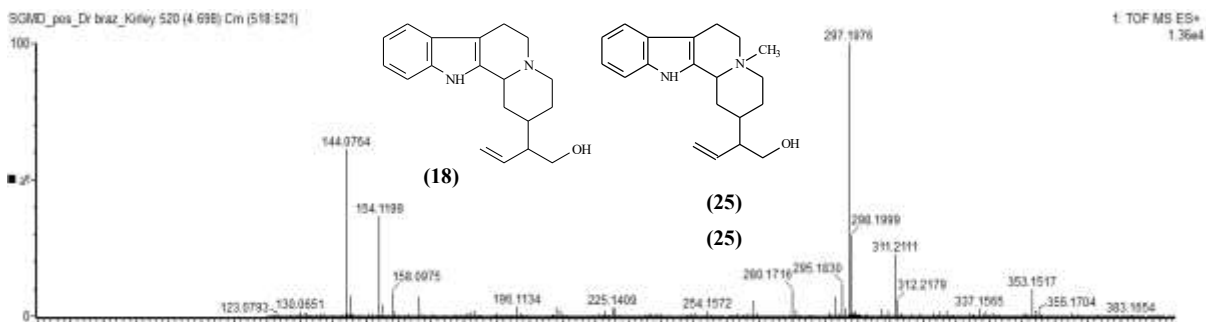
**Espectro 42.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.29, isômero da Antirrina glicosilada (23) e descarboxi-lialosídico (55).



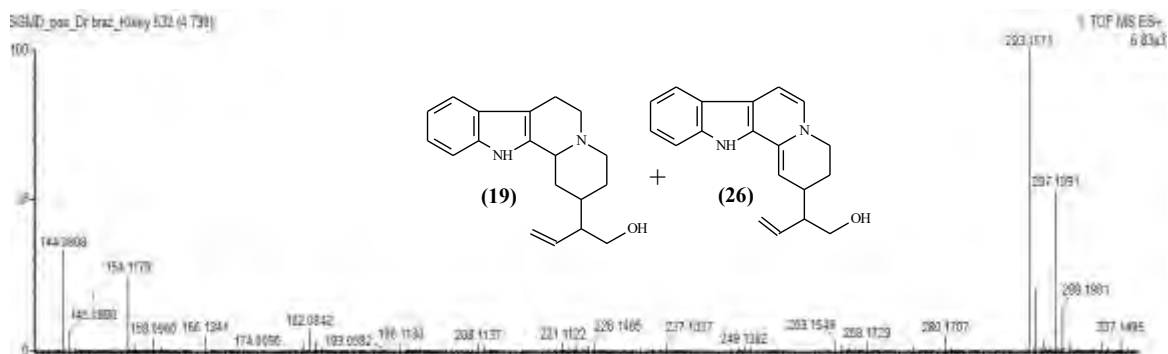
**Espectro 43.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.41, Estrictosidina (13).



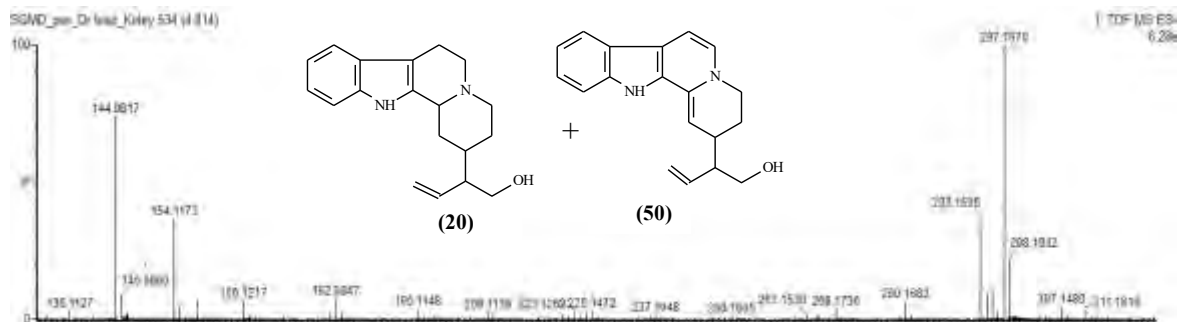
**Espectro 44.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.55, Ácido desmetilisopauridiantosídico (14).



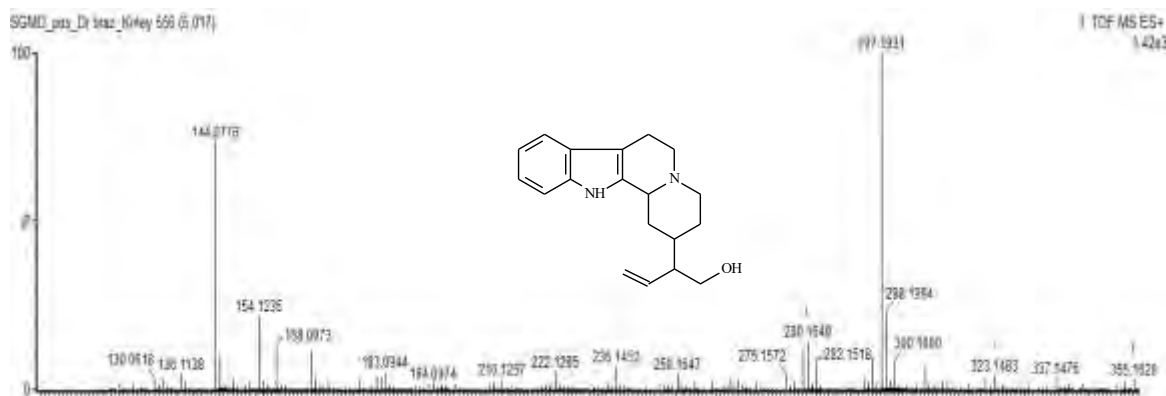
**Espectro 45.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.69, Antirrina (18) e  $N_6$ -metilantirrina (25).



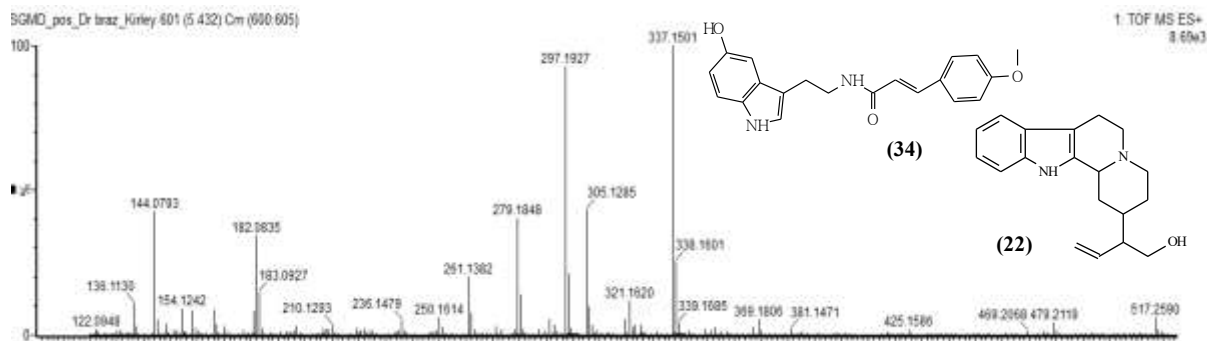
**Espectro 46.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.79, Epímero da Antirrina (19) e 3,5,6,14-tetrahidro Antirrina (26).



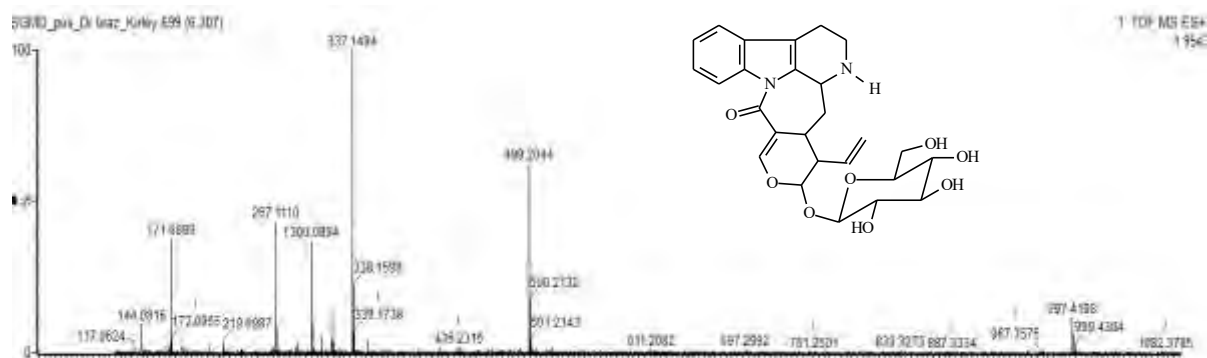
**Espectro 47.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 4.81 Epímero da Antirrina (20) e Matadina (50).



**Espectro 48.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 5.01, Epímero da Antirrina (21).



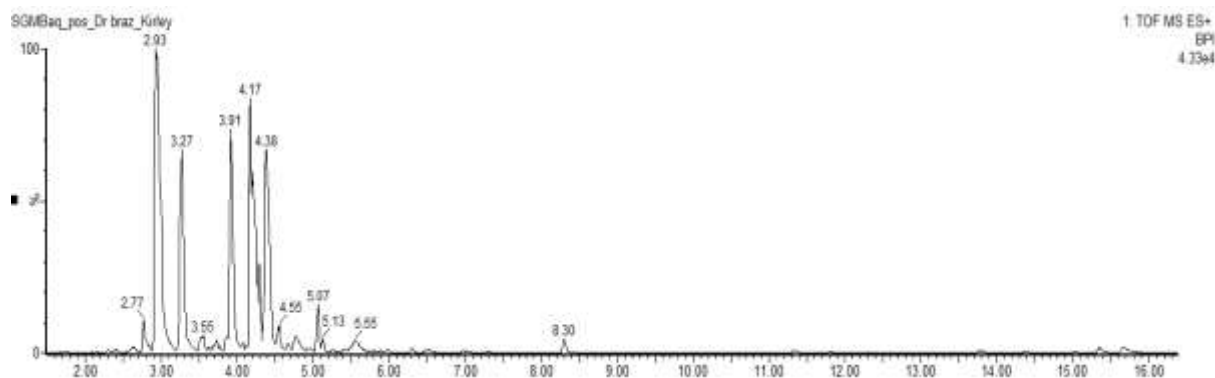
**Espectro 49.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 5.43, Epímero da Antirrina (22) e *N*-*p*-metoxi cinamoil serotonina (34).



**Espectro 50.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGD no Tr 6.30, *N*-desmetil-correantósida (15).

### 3.4 Estudo da desreplicação de SGB de *S. grazielae* por EM/EM-IES

O cromatograma por CLUE da fração butanólica da madeira de *S. grazielae*, SGB (Figura 12), apresentou poucos picos (Tr. 2.77 a 8.30), mostrando que essa fração de polaridade alta possui poucos metabólitos. Dos picos foram gerados os espectros EM-IES (Espectro 53-61) no modo positivo, com picos de íon molecular protonados entre  $m/z$  459-531.



**Figura 12.** Cromatograma por CLUE de SGB.

O perfil dos metabólitos identificados nessa partição foi compatível com as isoladas no Capítulo I, tendo como esqueleto base dos alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolina, tetrahydro- $\beta$ -carbolinas e dos dihidro- $\beta$ -carbolinas.

Foram propostas nessa fração treze alcaloides, sendo um relatado pela primeira nesse trabalho, o Estrictosidínico descarboxilado (29) e o 3,4-didehidro estrictosidina (30), e onze

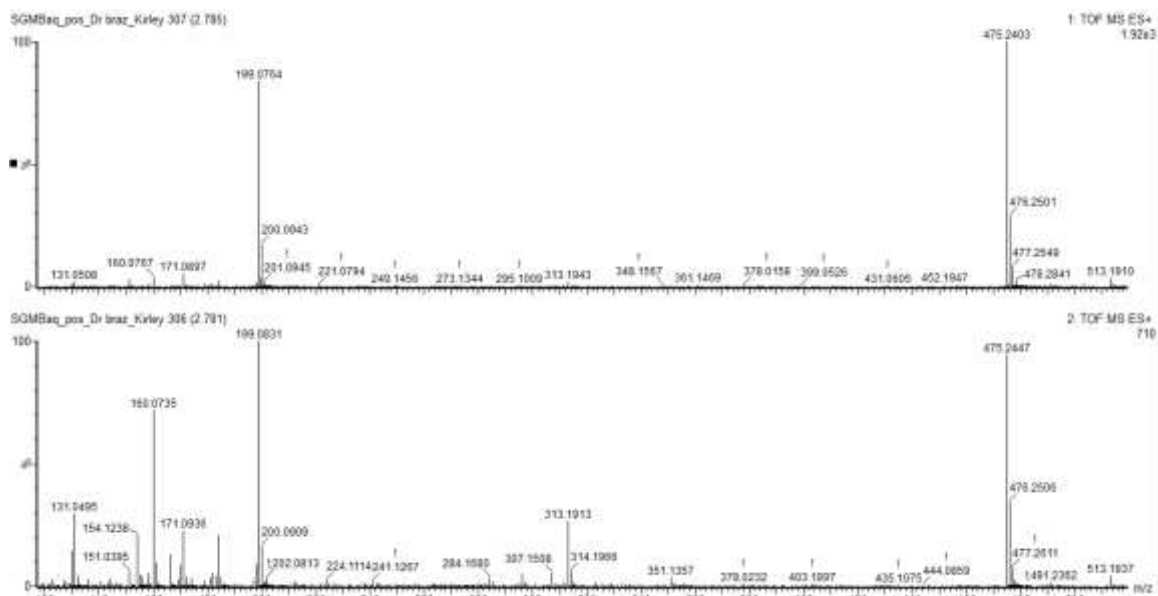
que já foram identificados nas frações anteriores (SGD e SGAc): Lialosídeo (**10**), Ofiorina A (**3**), Ofiorina B (**2**), Ácido Lialosídico (**9**), Antirrina glicosilada (**23**), Ácido Estrictosidínico (**11**), Ácido 3-*epi*-Estrictosidínico (**12**), Epímero Antirrina glicosilada (**24**), Estrictosidina (**13**), Ácido desmetilisopauridiantosídico (**14**) 3,5,6,14-tetradehidro Antirrina (**26**) (Tabela 5). Assim, apenas os alcaloides **29** e **30** serão descritos dessa fração.

**Tabela 5.** Substâncias propostas através dos espectros de EM da fração SGB no modo positivo.

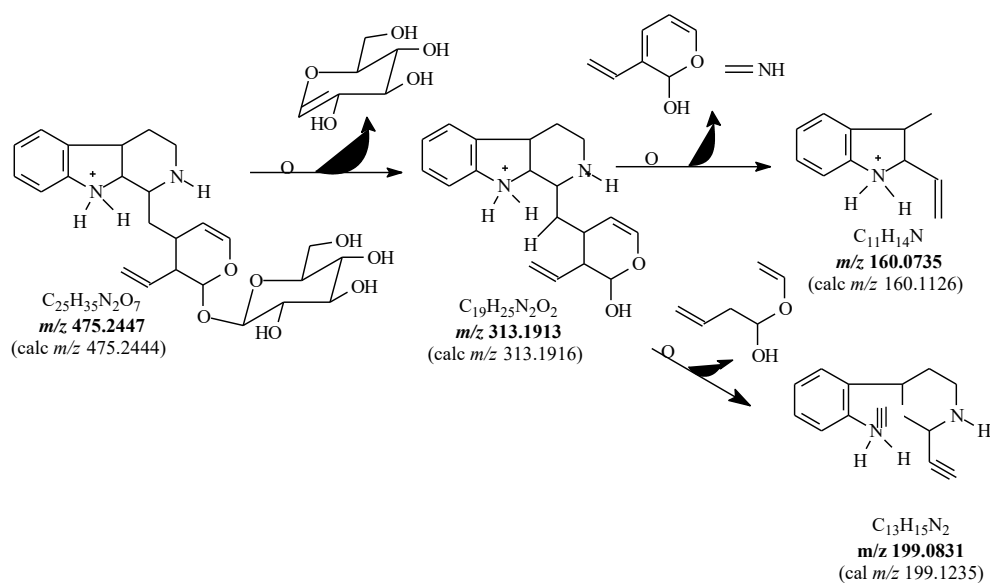
Tr.	Substâncias	Fórmula Molecular	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	EM/EM
2.77	Descarboxi-strictosidínico ( <b>29</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	475.2447	313, 199, 160
3.55	Lialosídeo ( <b>10</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	527.2091	365, 333, 263, 235, 183
3.55	3,4-dideidro estrictosidina ( <b>30</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	529.2839	367, 349, 279
2.93	Ofiorina A ( <b>3</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1883	469, 351, 307, 183
3.27	Ofiorina B ( <b>2</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1831	469, 351, 307, 183
3.91	Ácido lialosídico ( <b>9</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1718	351, 333, 307, 263, 183
4.17	Antirrina glicosilada ( <b>23</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2545	339, 297, 144
4.22	Ácido Estrictosidínico ( <b>11</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2266	338, 320, 269, 251, 144
4.29	Ácido 3- <i>epi</i> -Estrictosidínico ( <b>12</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2304	338, 320, 269, 251, 144
4.29	Epímero Antirrina glicosilada ( <b>24</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2545	339, 297, 144
4.37	Estrictosidina ( <b>13</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	531.2357	500, 488, 369, 326, 308, 144
4.54	Ác.desmetilisopauridiantosídico( <b>14</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	527.2026	365, 333, 263, 235, 182
4.78	3,5,6,14-tetradehidro Antirrina ( <b>26</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1629	263, 247, 221

Do Espectro 51 gerado do Tr. 2.78 foi proposto o alcaloide indólico com a estrutura semelhante ao Ácido Estrictosidínico, porém sem o grupo carboxílico. A substância **29** teve como íon molecular [M+H]<sup>+</sup> em  $m/z$  475.2447 compatível com a FM protonada C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e com valor muito próximo ao teórico (calc. 475.2444). O EM/EM apresentou picos de fragmentação ( $m/z$  313, 199 e 160) que justificam a estrutura proposta que estão descritos no Esquema 29. Assim, essa substância está sendo descrita como Descarboxi-strictosidínico (**29**), e está sendo proposta inédita na literatura.



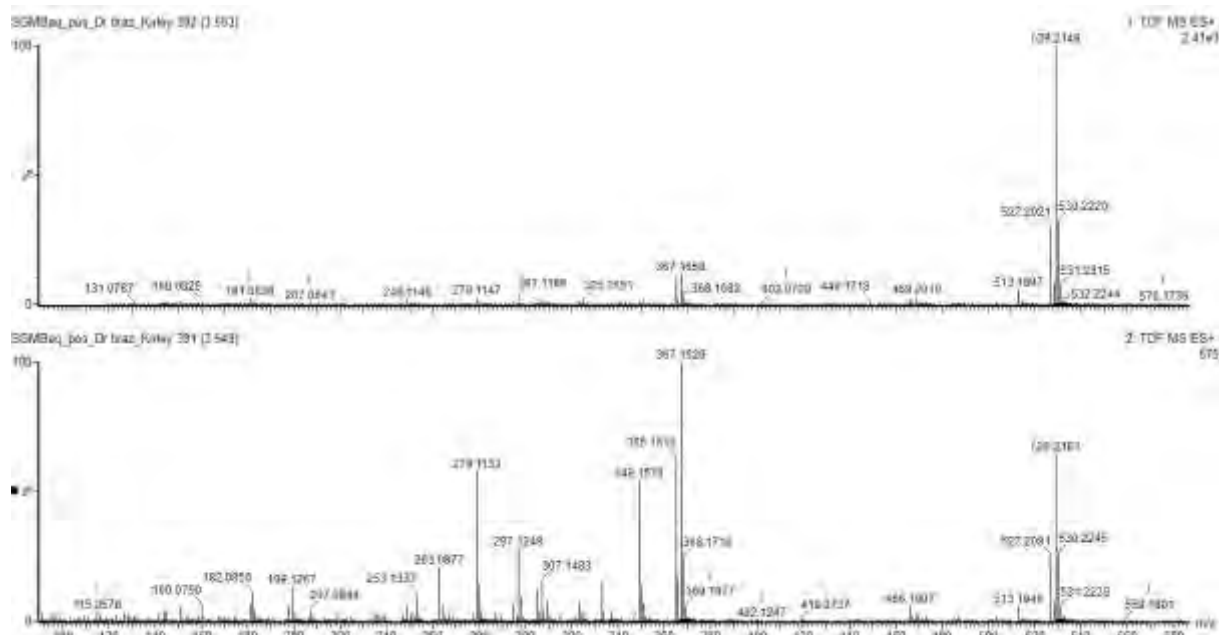


**Espectro 51.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 2.78, do Descarboxi-estrictosidínico (29).

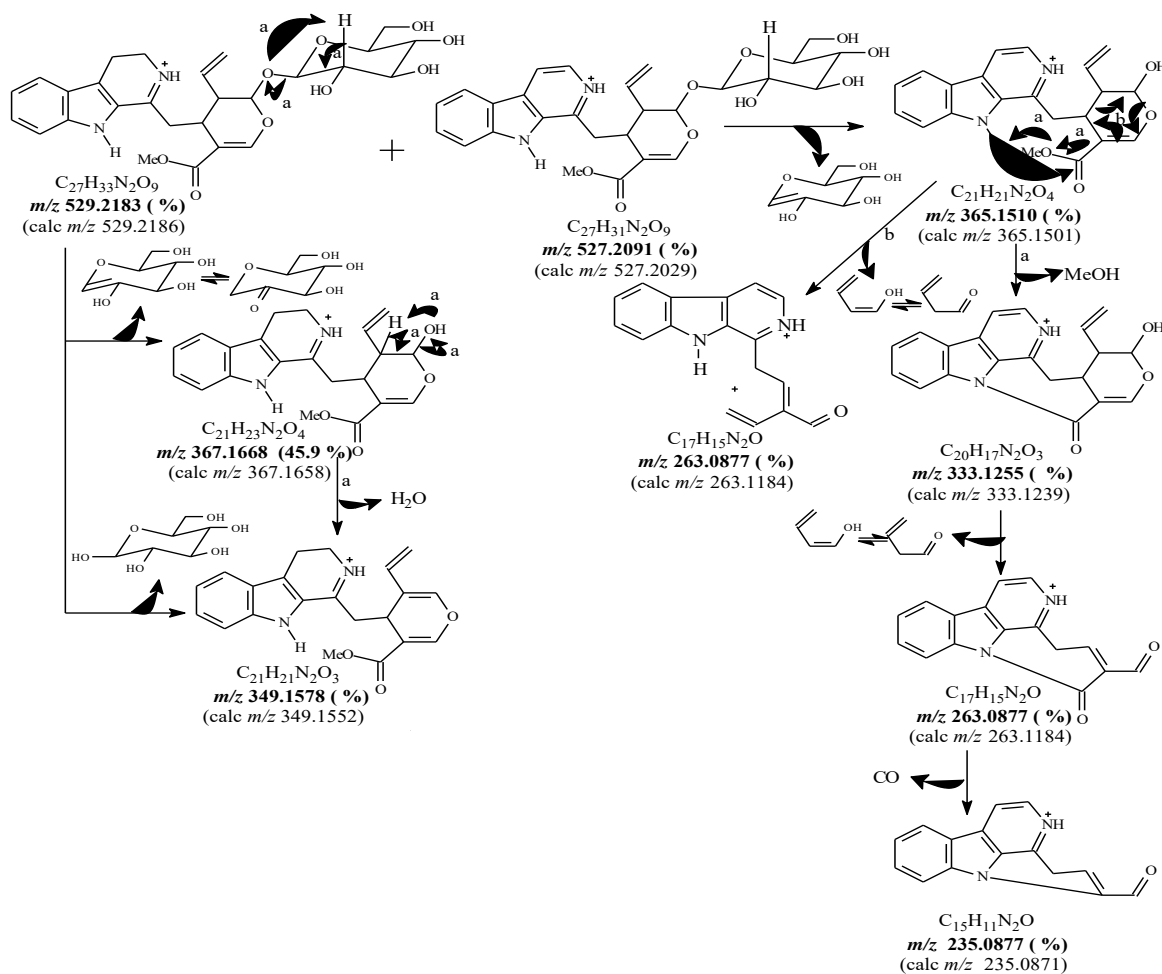


**Esquema 29.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 475, do Descarboxi-estrictosidínico (29).

Do Espectro 52 pode ser extraído dois íons moleculares,  $[M+H]^+$  em  $m/z$  527.2091 (10) e 529.2183 (30) uma diferença de duas unidades. Essa diferença de massa também foi observado nos picos de fragmentação, o que levou a sugerir serem estruturas com a diferenciação apenas em uma insaturação. A substância 10 já foi identificada em frações anteriores como o Lialosídeo ( $\beta$ -carbolínico), e com base nessa estrutura, a substância 30 ( $C_{27}H_{29}N_2O_9$ ) está sendo proposta com os carbonos 5 e 6 do anel piridínico saturados, compatível com a estrutura registrada na literatura como 3,4-dideidro estrictosidina (CARDOSO et al., 2004). As propostas de fragmentação estão descritas no Esquema 30.

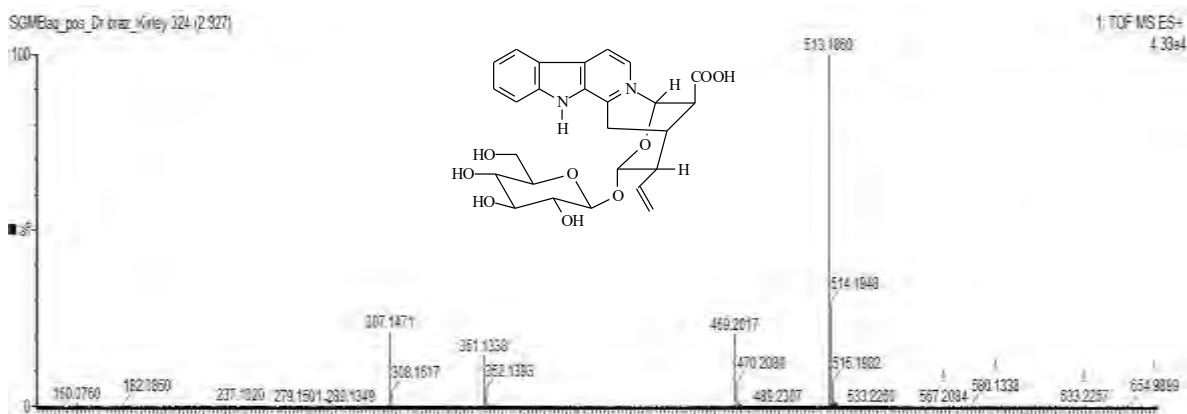


**Espectro 52.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 3.55, Lialosídeo (10) e 3,4-dideidro estrictosidina (30).

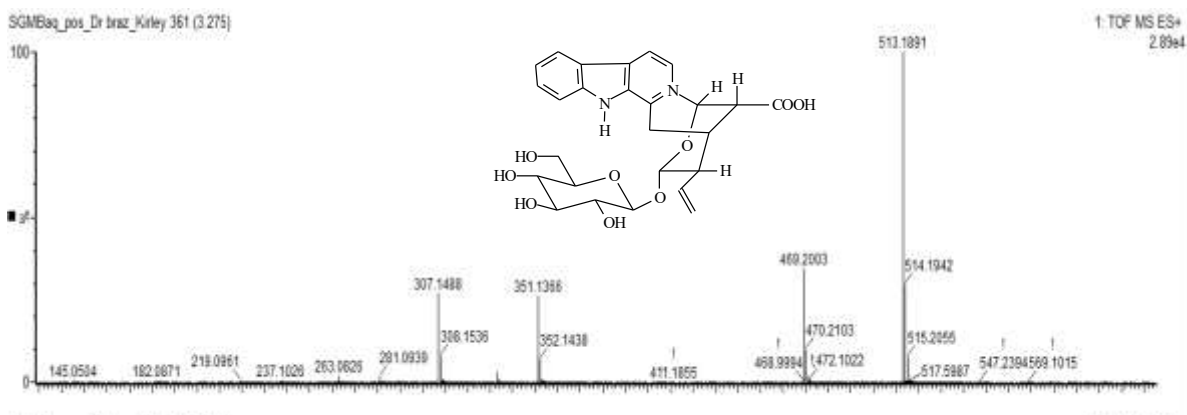


**Esquema 30.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM/EM,  $[M+H]^+$  de 529 e 527 do Lialosídico (10) e 3,4-dideidro estrictosidina (30).

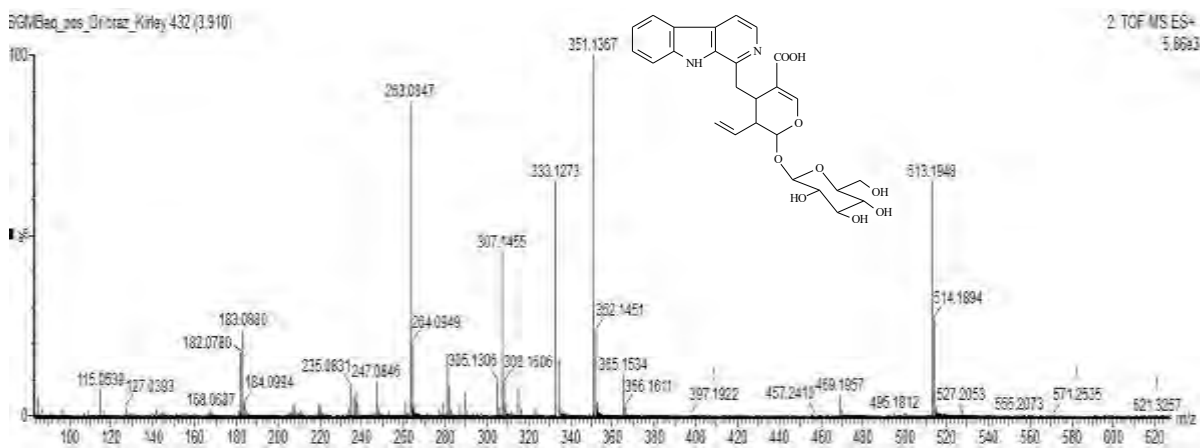
Os Espectros de 53 a 61 foram comparados com os espectros das frações anteriores e apresentaram perfis semelhantes a das substâncias: Ofiorina A (3), Ofiorina B (2), Ácido Lialosídico (9). Antirrina glicosilada (23), Ácido Strictosidínico (11), Ácido 3-*epi*-Strictosidínico (12), Epímero Antirrina glicosilada (24), Strictosidina (13) e Ácido desmetilisopauridiantosídico (14), metabólitos esses que já foram propostos nas frações anteriores, sendo assim essas substâncias estão apenas citados nos seus respectivos espectros.



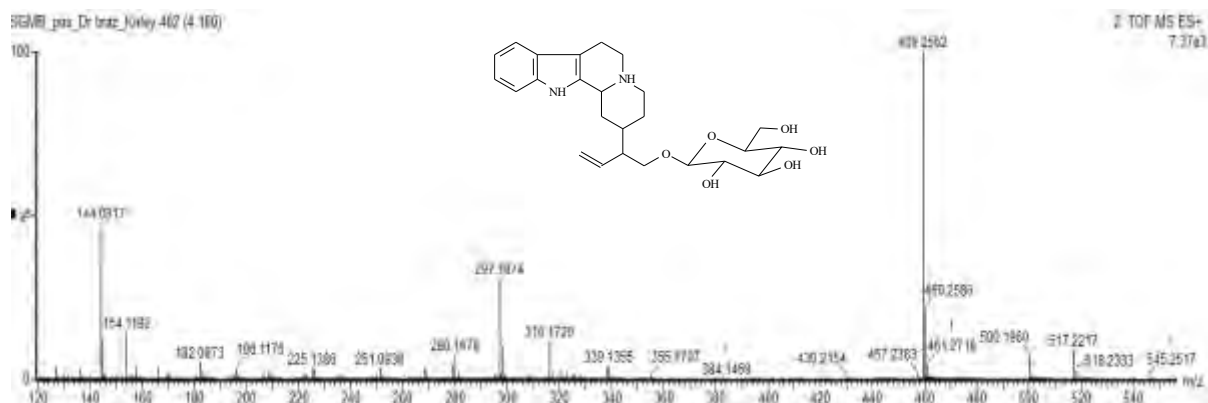
**Espectro 53.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 2.93, Ofiorina A (3).



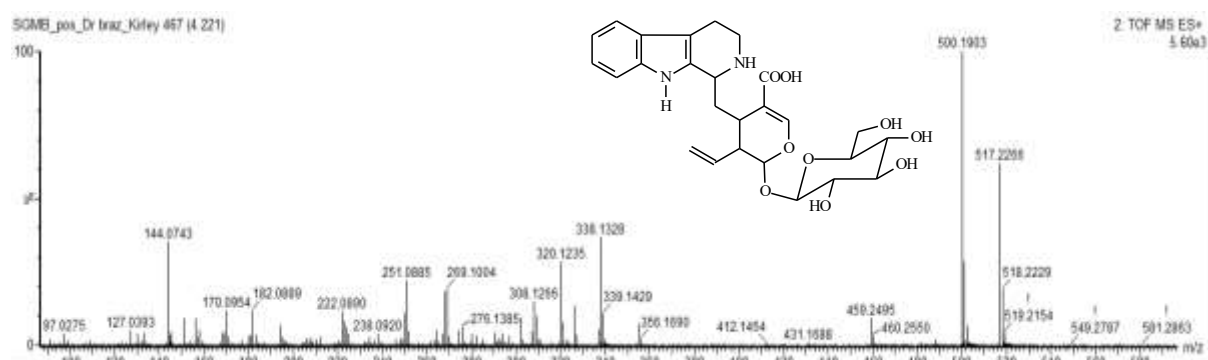
**Espectro 54.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 3.27, Ofiorina B (2).



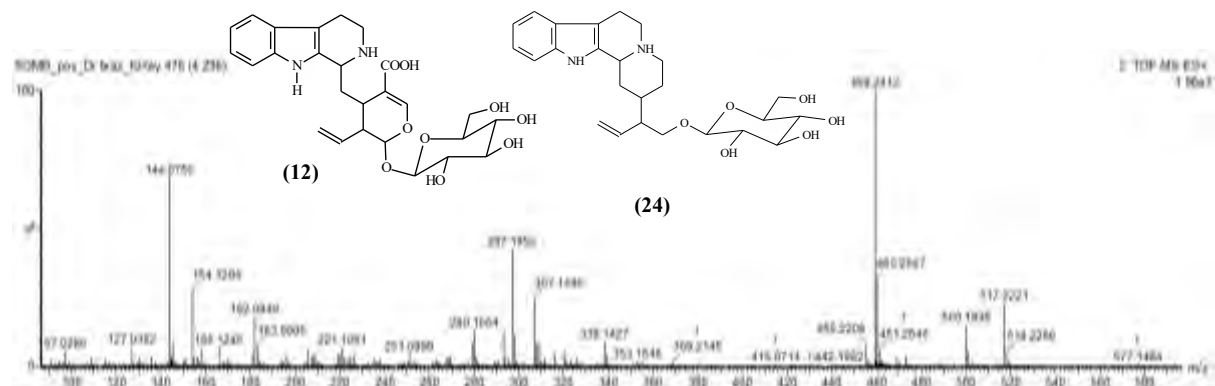
**Espectro 55.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 3.91, Ácido Lialosídico (9).



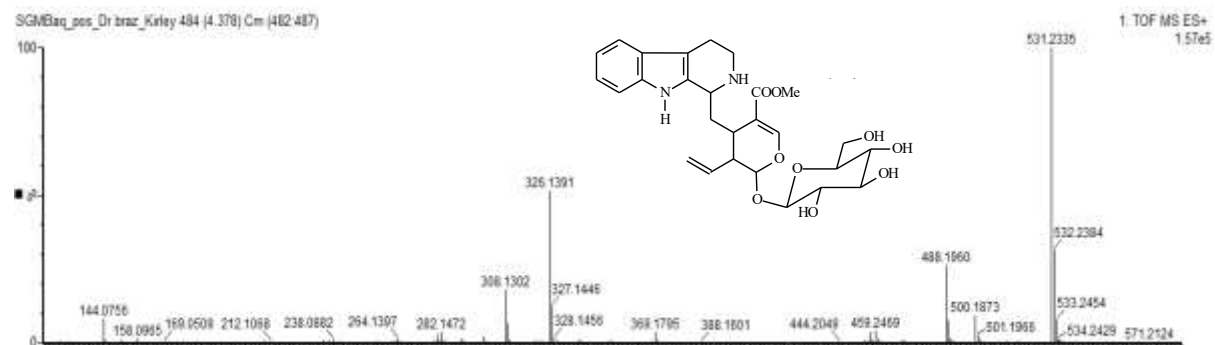
**Espectro 56.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 4.18, Antirrina glicosilada (23).



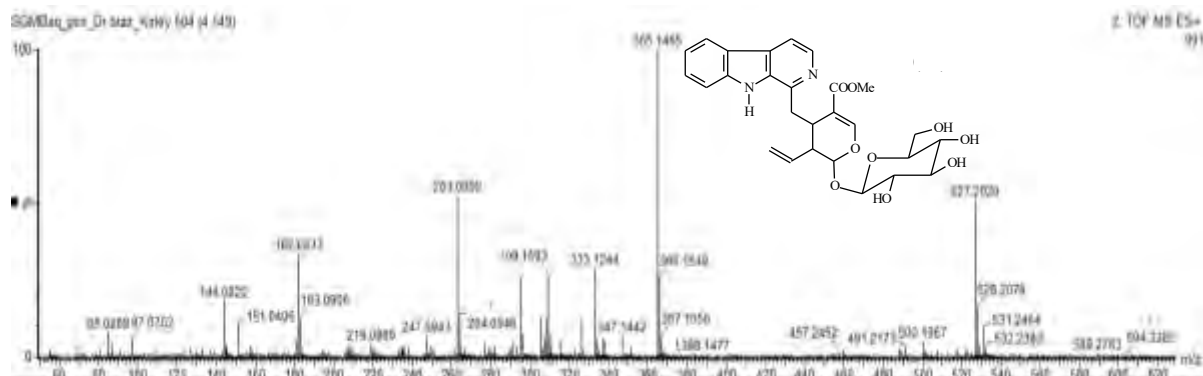
**Espectro 57.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 4.22, Ac. Estrictosidínico (11).



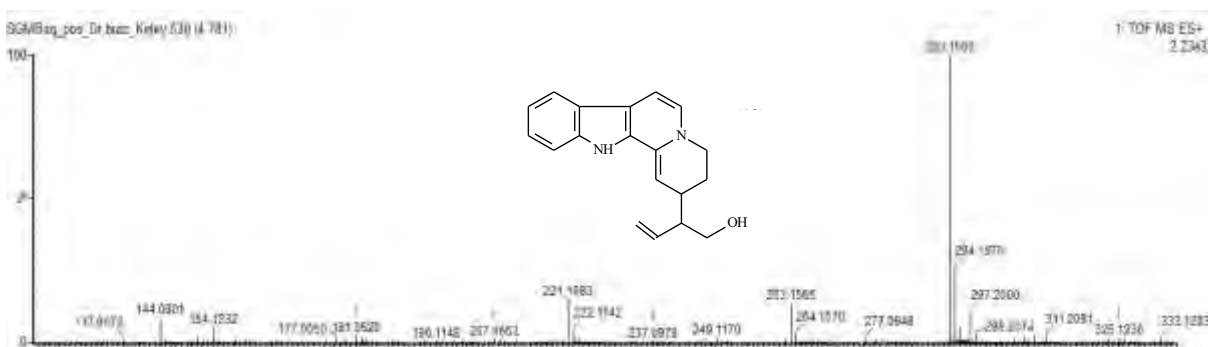
**Espectro 58.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 4.29, isômero do Ac. 3-epi-Estrictosidínico (12) e Epímero da Antirrina glicosilada (24).



**Espectro 59.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 4.37, Estrictosidina (13).



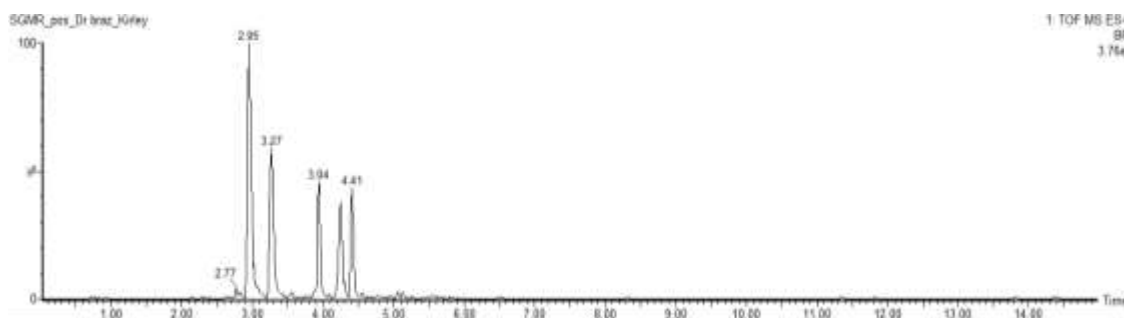
**Espectro 60.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 4.54, Ac. desmetilopauridiantosídico (14).



**Espectro 61.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGB no Tr 4.78, Antirrina insaturada (26).

### 3.5 Estudo da desreplicação de SGR de *S. grazielae* por EM/EM-IES

O cromatograma por CLUE da fração residual da madeira de *S. grazielae*, **SGR** (Figura 13), apresentou seis picos (Tr. 2.77, 2.95, 3.27, 3.94, 4.19 e 4.40), mostrando que essa fração de polaridade alta possuiu uma pequena variação de metabólitos. Os picos do cromatograma geram os Espectros EM-IES de 62-78 no modo positivo, com picos de íons moleculares protonados entre  $m/z$  459-531.



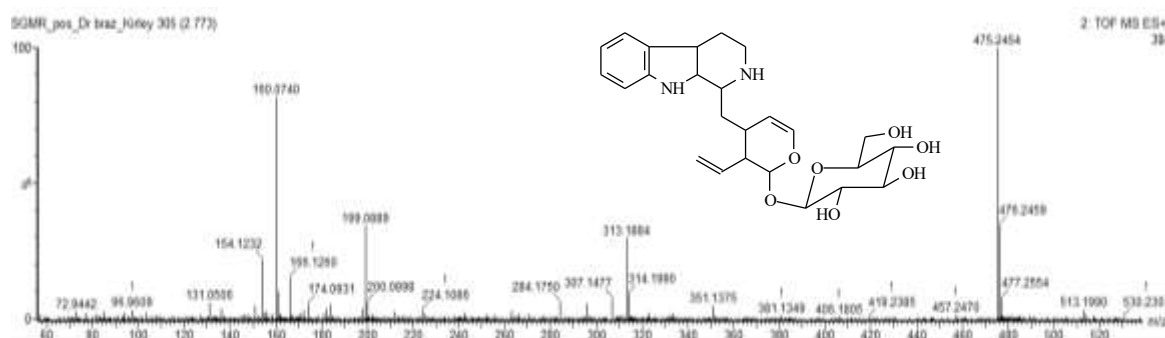
**Figura 13.** Cromatograma por CLUE de SGR.

Nessa fração foram identificados sete alcaloides, que foram propostos em comparação com os espectros das substâncias isoladas nas frações anteriores e apresentou perfis semelhantes o que levou a propor serem substâncias semelhantes. Para **SGR** foram propostos à presença dos metabólitos: o Descarboxi-estrictosidínico (**29**), Ofiorina A (**2**), Ofiorina B (**3**), Ácido Lialosídico (**9**), Antirrina glicosilada (**23**), Ácido Estrictosidínico (**11**) e a Estrictosidina (**13**), (Tabela 6).

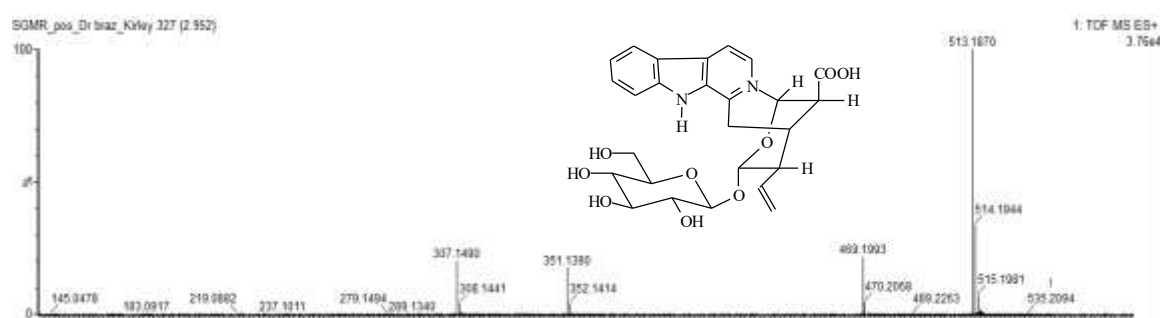
**Tabela 6.** Substâncias propostas através dos espectros de EM da fração SGR no modo positivo.

Tr.	Substâncias	Fórmula Molecular	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	EM/EM
2.77	Descarboxi-Estrictosidínico ( <b>29</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	475.2454	313, 199, 160
2.97	Ofiorina B ( <b>2</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1889	469, 351, 307
3.27	Ofiorina A ( <b>3</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1754	469, 351,307, 263
3.94	Ácido lialosídico ( <b>9</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1743	365, 351, 333, 307, 263, 183
4.19	Antirrina glicosilada ( <b>23</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2479	339, 297, 144
4.25	Ácido Estrictosidínico ( <b>11</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2114	338, 320, 269, 251, 144
4.40	Estrictosidina ( <b>13</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	531.2285	500, 488, 369, 326, 308, 144

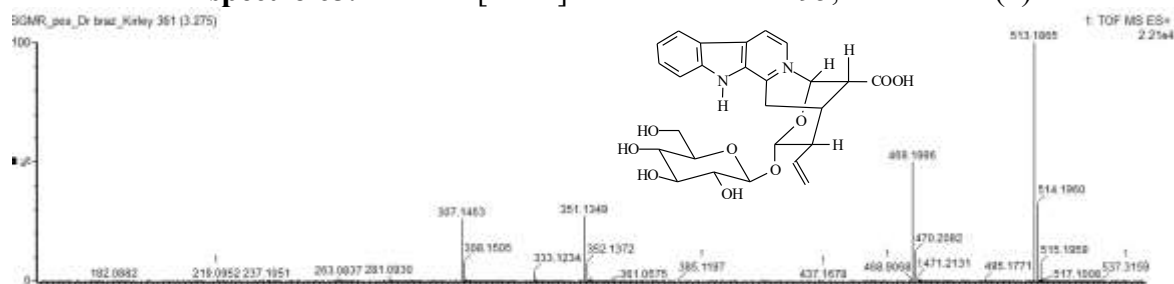
Os espectros de massas gerados de cada pico do cromatograma estão relacionados a seguir, juntamente com as estruturas propostas.



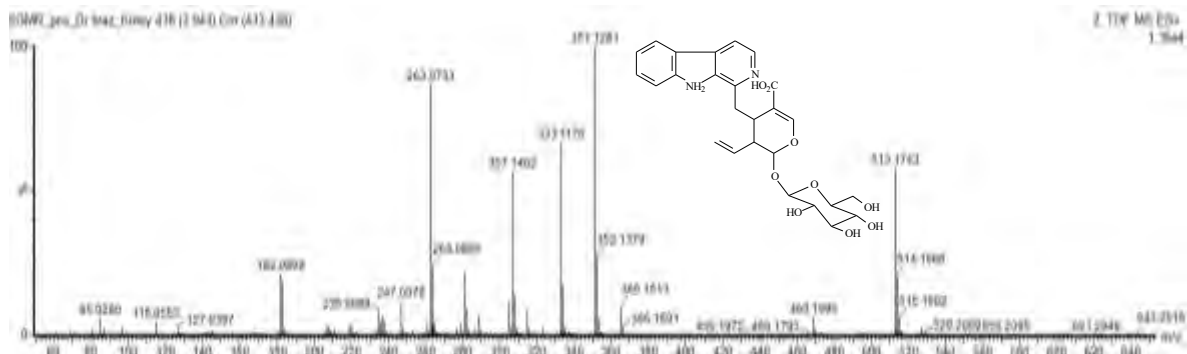
**Espectro 62.** IES-EM/EM [M+H]<sup>+</sup> de SGR no Tr 2.77, Descarboxi-Estrictosidínico (29).



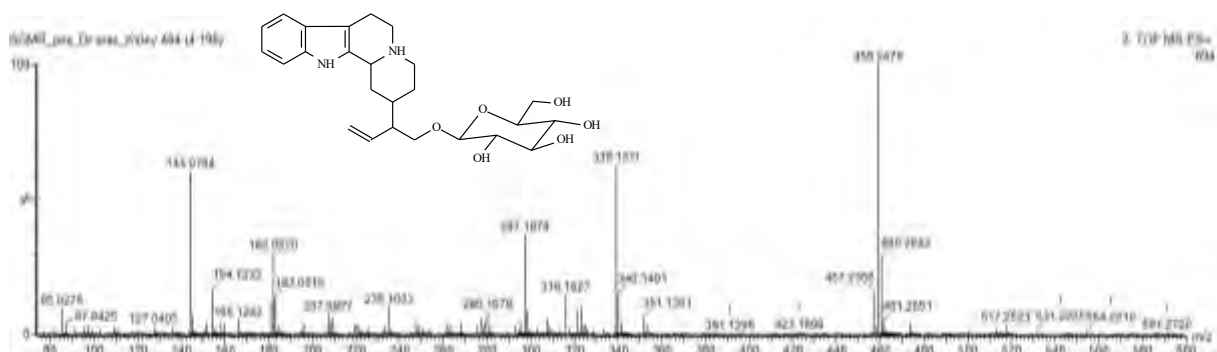
**Espectro 63.** IES-EM [M+H]<sup>+</sup> de SGR no Tr 2.95, Ofiorina A (2).



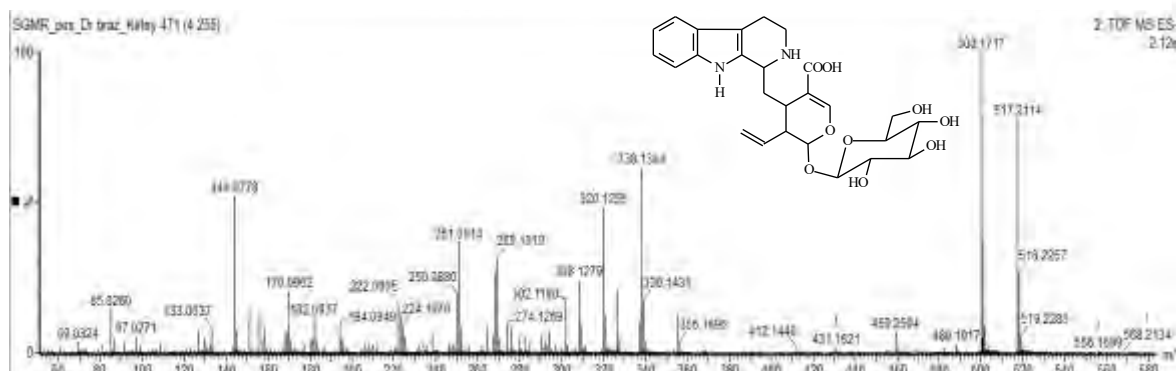
**Espectro 64.** IES-EM [M+H]<sup>+</sup> de SGR no Tr 3.27, Ofiorina B (3).



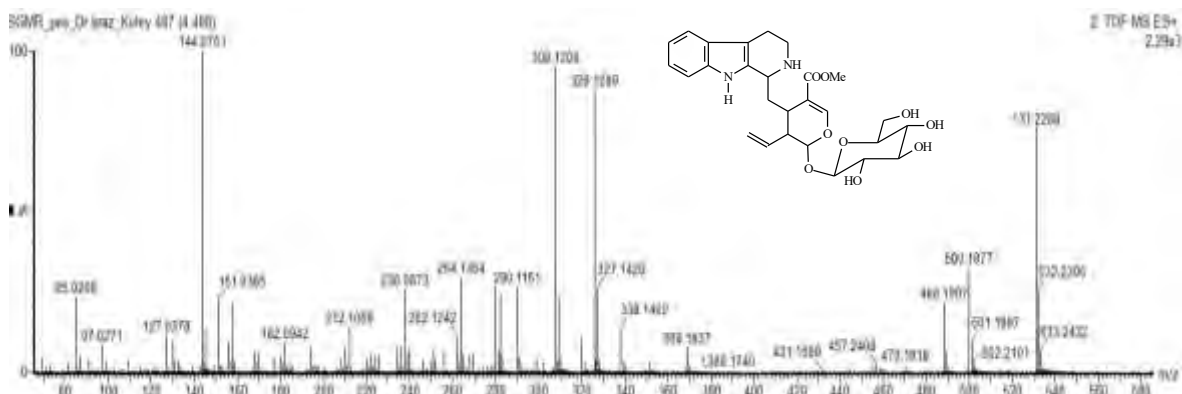
**Espectro 65.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGR no Tr 3.94, Acido lialosídico (9).



**Espectro 66.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGR no Tr 4.19, Antirrina glicosilada (23).



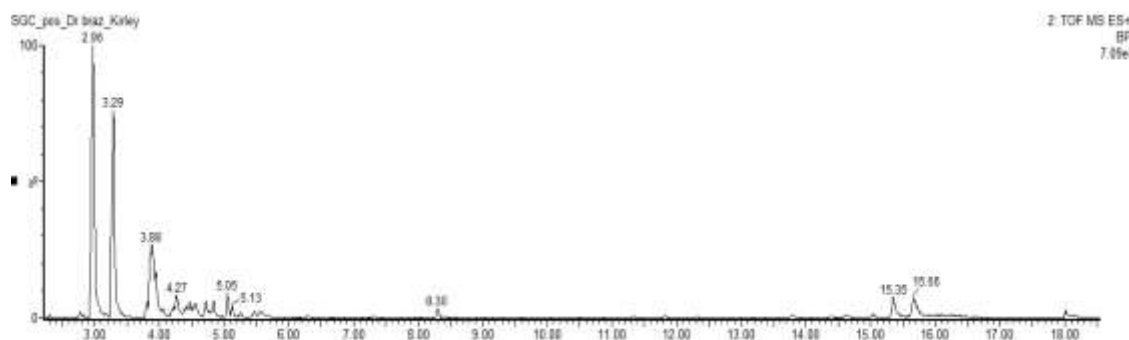
**Espectro 67.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  no Tr 4.25, Ácido Estrictosidínico (24).



**Espectro 68.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  no Tr 4.40, Estrictosidina (13).

### 3.6 Estudo da desreplicação de SGC de *S. grazielae* por EM/EM-IES

O cromatograma por CLUE do extrato metanólico da casca de *S. grazielae*, SGC (Figura 14), apresentou poucos picos (Tr. 2.77 a 8.30), pois o material tinha um aspecto arenoso e com isso não apresentou uma boa solubilidade, o que influenciou na análise. Dos picos foram gerados os espectros EM-IES (Espectro 69-85) no modo positivo, com os íons moleculares protonados entre  $m/z$  183-1011.



**Figura 14.** Cromatograma por CLUE de SGC.

Os espectros desse extrato proporcionaram a proposta de vinte e dois alcaloides, dos quais dez já foram propostos nas frações do extrato da madeira de *S. grazielae*, anteriormente relatadas. Os metabólitos identificados no extrato da casca (SGC) foram: Derivado da Hirsutasida D (**37**), Epímero do Derivado da Hirsutasida D (**38**), Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico (**39**), Antirrina glicosilada (**23**), 5,6-didehidro Antirrina glicosilada (**40**), *N*-metil Antirrina glicosilada (**41**), Hirsutasida D (**42**), *N*-metilAntirrina (**25**), Epímero *N*-metil Antirrina (**56**), *N<sub>b</sub>*-metil-5,6-didehidro Antirrina (**49**), Antirrina (**18**), 5,6-didehidro antirrina (**57**), 3,5,6,14-tetradehidro Antirrina (**26**), Derivado Hirsutasida D (**51**), Ác.lialosídico-strictosidínico desglicosilado (**52**), Descarboxi-Estrictosidínico (**29**), Ofiorina A (**3**), Ofiorina B (**12**), Harmana (**4**) Ácido Lialosídico (**9**), Ácido Estrictosidínico (**11**) e Matadina (**50**), estão descritas na Tabela 7.

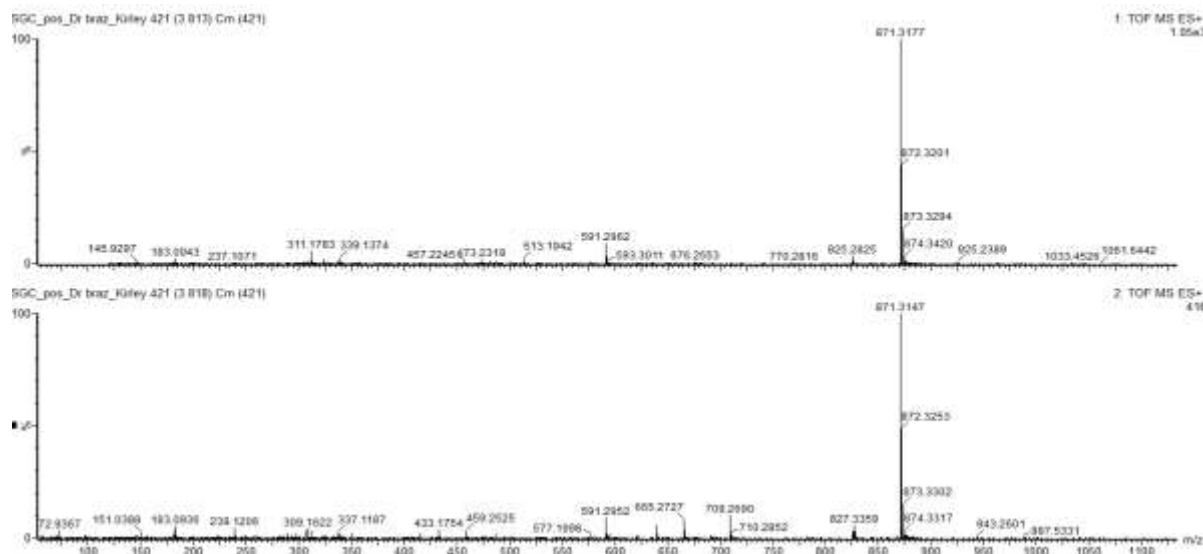
**Tabela 7.** Substâncias propostas dos espectros de EM de SGC no modo positivo.

Tr.	Substâncias	Fórmula Molecular	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	EM/EM
3.81	Derivado da Hirsutasida D ( <b>37</b> )	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	871.3147	827, 709, 665
4.05	Epímero Derivado da Hirsutasida D ( <b>38</b> )	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	871.3264	827, 709, 665, 307, 183, 115
4.10	Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico ( <b>39</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	515.2018	353, 309, 337, 307, 265, 182
4.21	Antirrina glicosilada ( <b>23</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	459.2498	339, 297, 144
4.21	5,6-didehidro Antirrina glicosilada ( <b>40</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	457.2390	182
4.21	<i>N<sub>b</sub></i> -metil Antirrina glicosilada ( <b>41</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	473.2673	
4.42	Hirsutasida D ( <b>42</b> )	C <sub>43</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	885.3348	527, 457, 309, 182
4.71	<i>N</i> -metilAntirrina ( <b>25</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.2100	295, 280, 239, 144
4.53	Epímero <i>N</i> -metilAntirrina ( <b>56</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.2125	144

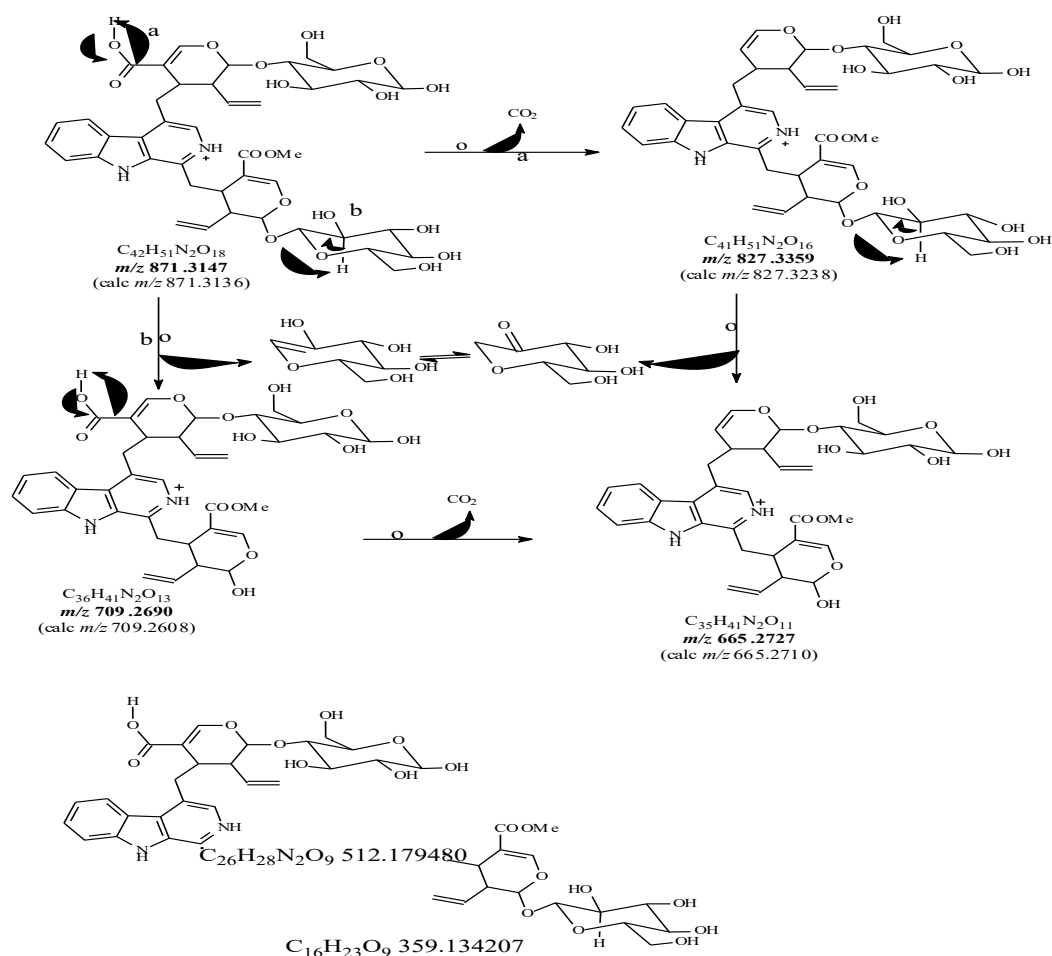


4.53	<i>N</i> -metil- 5,6-dideidro Antirrina ( <b>49</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	309.1615	182
4.84	Antirrina ( <b>18</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	297.1996	154, 144
4.84	5,6-dideidro antirrina ( <b>57</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	295.1849	223, 154, 144
4.84	3,5,6,14-tetradehidro Antirrina ( <b>26</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1697	263, 223, 221
5.05	Derivado Hirsutasida D ( <b>51</b> )	C <sub>50</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O <sub>20</sub>	1011.3917	967, 885, 805, 719, 675, 351, 307, 279, 207
5.13	Ác.lialosídico-strictosidínico desglicosilado ( <b>52</b> )	C <sub>40</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	689.2371	645, 351, 307, 177
2.97	Descarboxi-Estrictosidínico ( <b>29</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> O <sub>7</sub>	475.2438	313, 160
2.96	Ofiorina A ( <b>3</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1781	469, 351, 307, 183
3.28	Ofiorina B ( <b>2</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1762	469, 351, 326, 307,263 183
3.87	Harmana ( <b>4</b> )	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	183.0764	168,167 142, 115
3.96	Ácido lialosídico ( <b>9</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	513.1880	351, 333, 307, 263, 183
4.26	Ác. Estrictosidinico ( <b>11</b> )	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	517.2205	459, 338, 320, 309, 269, 251, 144
4.79	Matadina ( <b>50</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	293.1668	263, 221, 182

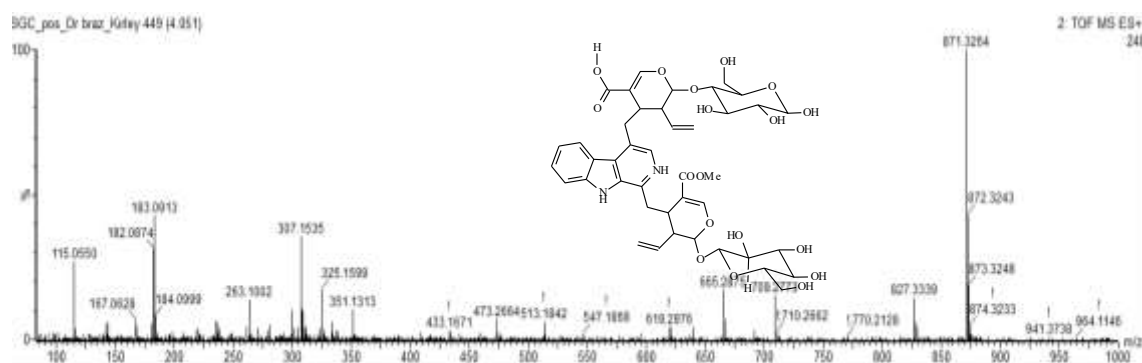
Os picos do cromatograma no Tr. 3.81 e 4.05 geraram espectros de massas (Espectros 69 e 70) com íons moleculares protonados  $[M+H]^+$  em  $m/z$  871.3247 e 871.3264, respectivamente, o que foi proposto serem isômeros, de fórmula molecular protonada C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>. O EM/EM gerou as fragmentações em  $m/z$  827, 709 e 665 (Esquema 31), que juntamente com o cálculo de massas foi proposto um alcaloide Derivado da Hirsutaside D (**37**), com a estrutura base do Lialosídeo com uma unidade a mais da secologonina com o ácido carboxílico, e o seu epímero (**38**), sendo propostos como inéditos.



**Espectro 69.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 3.81, substância 37.

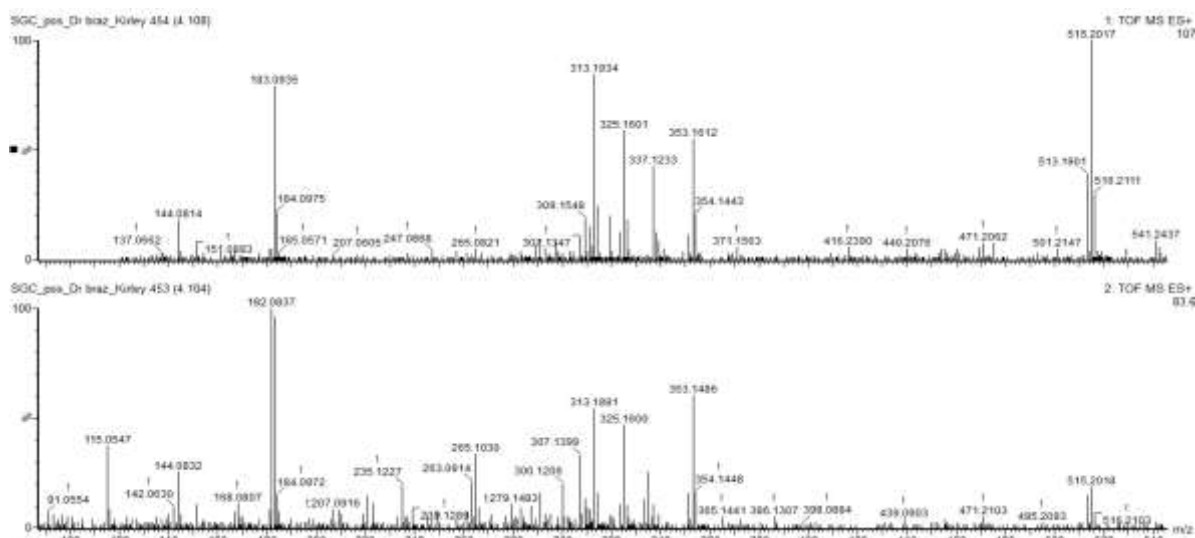


**Esquema 31.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  de 871, substância 37.

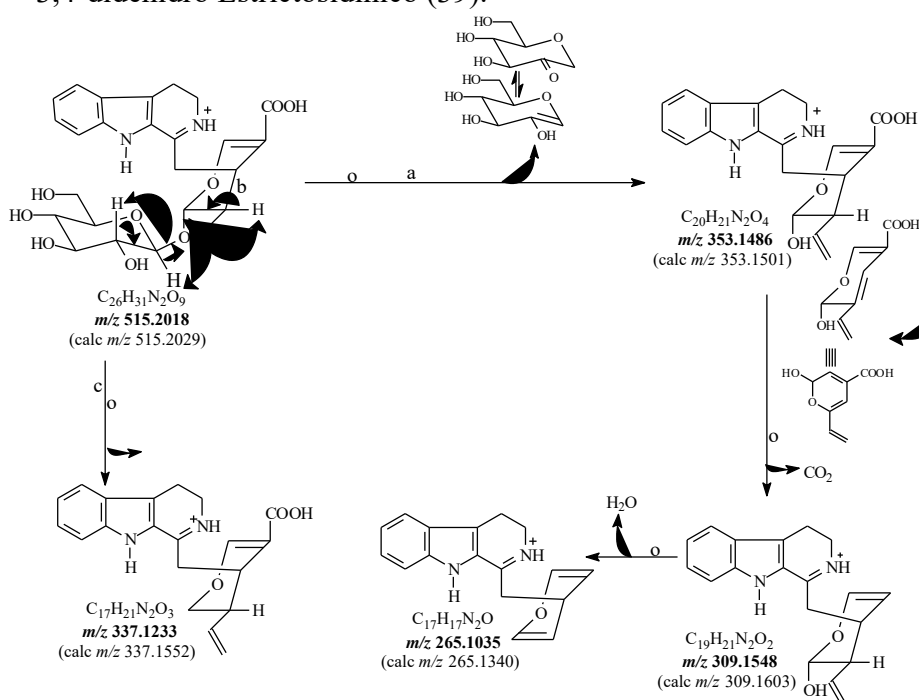


**Espectro 70.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.05, substância 38.

O Espectro 71 de massas forneceu um padrão de picos parecidos com o Ácido Lialosídico, mas com duas unidades a mais de massa, tendo como íon molecular protonado  $[M+H]^+$   $m/z$  515.2018 e os picos de fragmentação em 353, 309, 337, 307, 265 182. Assim pode-se propor a fórmula molecular  $C_{26}H_{30}N_2O_9$ , referente à estrutura do Ácido Lialosídico com saturação nos carbonos 5 e 6 do anel piridínico. Assim a substância **39** está de acordo com o Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico registrado na literatura (CARDOSO et al., 2004 (Esquema 32).

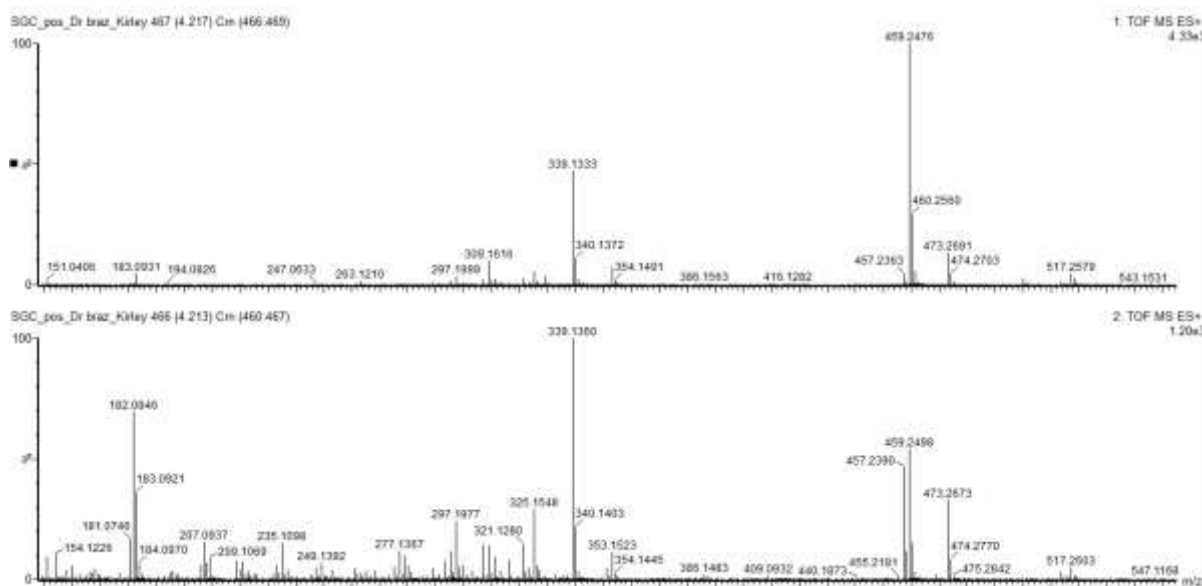


**Espectro 71.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.10, substância Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico (39).

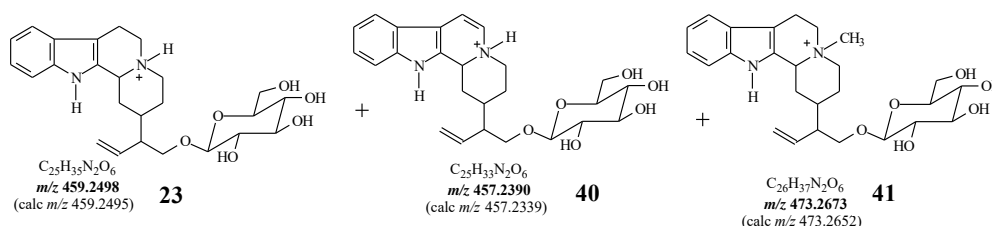


**Esquema 32.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  de 515, Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico (39).

No Tr. 4.21 o Espectro 72 de massas gerado, forneceu três picos com íons moleculares  $[M+H]^+$   $m/z$  em 457.2390 (**23**), 459.2498 (**40**) e 473.2673 (**41**). A substância **23** foi proposta como a Antirrina glicosilada ( $C_{25}H_{33}N_2O_6$ ), já identificadas nas frações anteriores. As outras duas são variações estruturais de **23**, onde a substância **40** está com uma diferença de duas unidades a menos de massas, o que foi proposta uma insaturação no terceiro anel, gerando a fórmula molecular ( $C_{25}H_{31}N_2O_6$ ), sendo nomeado como 5,6-didehidro Antirrina glicosilada. A substância **41** possuiu uma diferença de  $m/z$  14 unidades de massas em relação a **23**, referente à presença de uma metila, ( $C_{26}H_{37}N_2O_6$ ), sendo assim proposta como  $N_b$ -metil Antirrina glicosilada (**41**). A substância **40** e **41** estão sendo propostas pela primeira vez na literatura (Esquema 33).

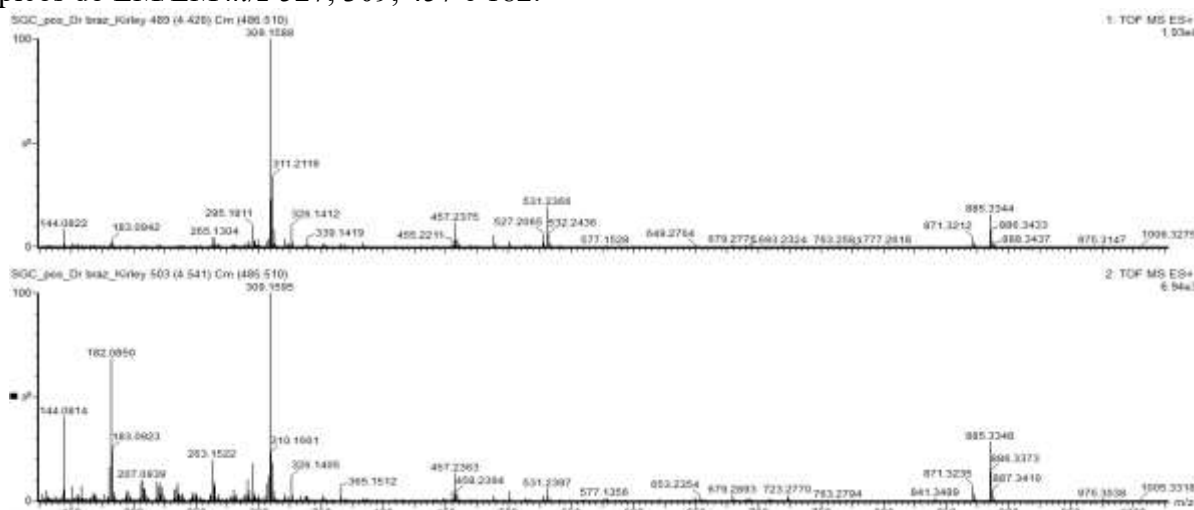


**Espectro 72.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.21, Antirrina glicosilada (23), 5,6-dideidro Antirrina glicosilada (40) e  $N_b$ -metil Antirrina glicosilada (41).

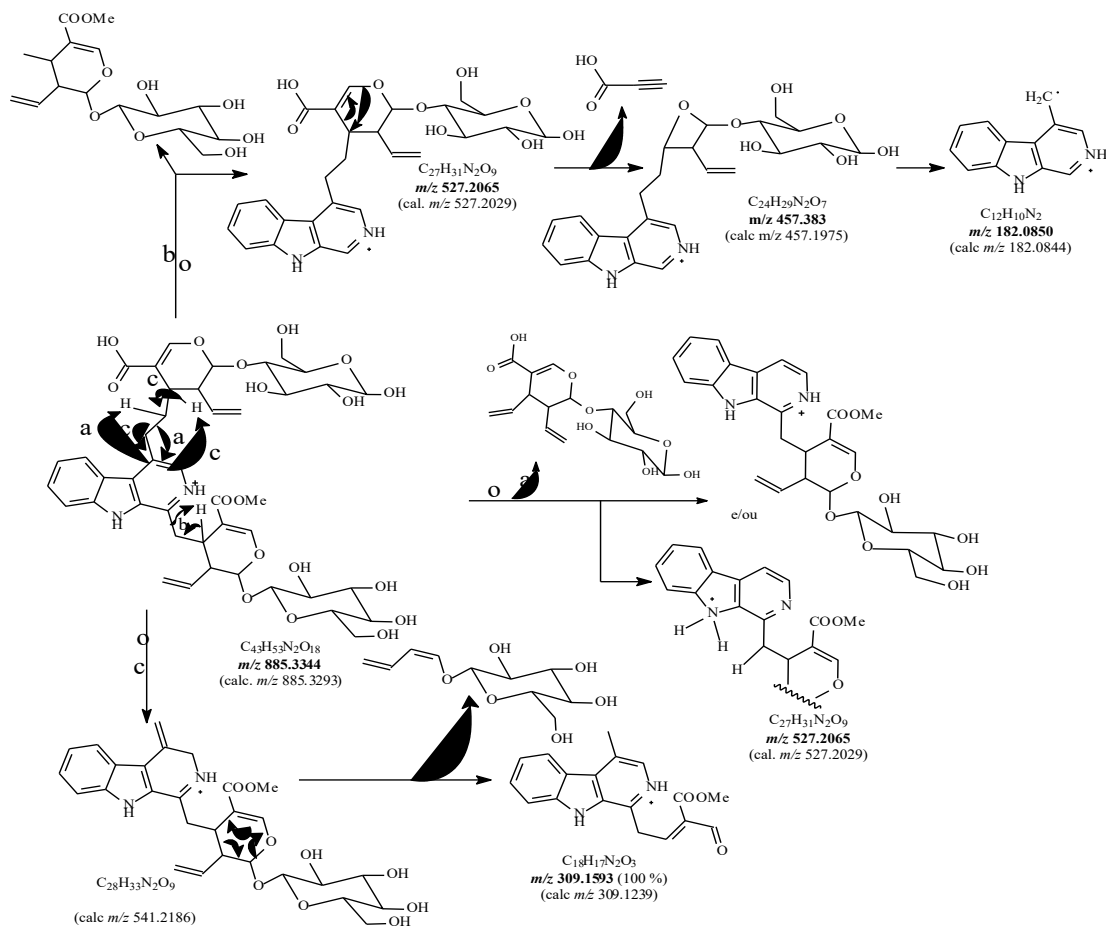


**Esquema 33.** Proposta de 23, 40 e 41 apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  em Tr.4.21.

O alcaloide indólico glicosídico *bis*-monoterpenoico, Hirsutasida D (42) (XIN et al., 2011) isolado da *Uncaria hirsuta* Haviland (família Rubiaceae) foi proposto nessa fração devido a presença da íon molecular protonado  $[M+H]^+$   $m/z$  885.3344 no Espectro 73. Essa proposta foi confirmada pelos mecanismos de fragmentação (Esquema 34) dos principais picos do EM/EM  $m/z$  527, 309, 457 e 182.

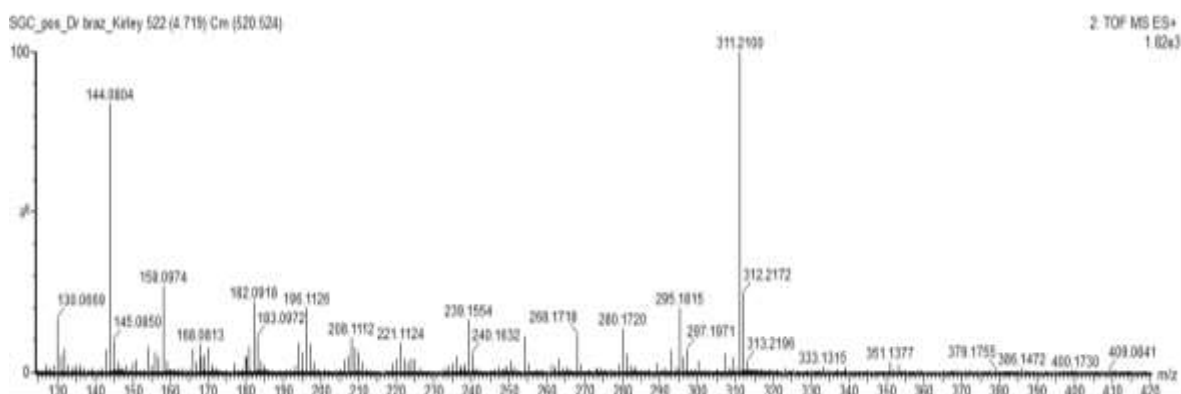


**Espectro 73.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.42, Hirsutasida D (42).

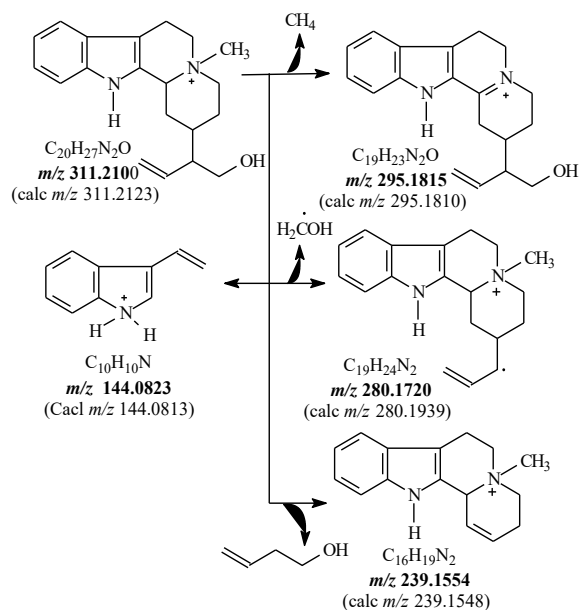


**Esquema 34.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM, [M+H]<sup>+</sup> de 885, Hirsutasida D (42).

No Tr. 4.72 foi gerado o Espectro 74, com o íon [M+H]<sup>+</sup> m/z 311.2100, no qual foi proposta a presença da *N<sub>b</sub>*-metil Antirrina (**25**). (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (CAPRASSE et al., 1984). Os picos gerados do EM<sup>2</sup> foram estão no Esquema 35. O pico m/z 295 justificou a saída do metano, através do rearranjo de hidrogênio com metila existente na estrutura, confirmando a presença da metila ligada à estrutura da Antirrina.

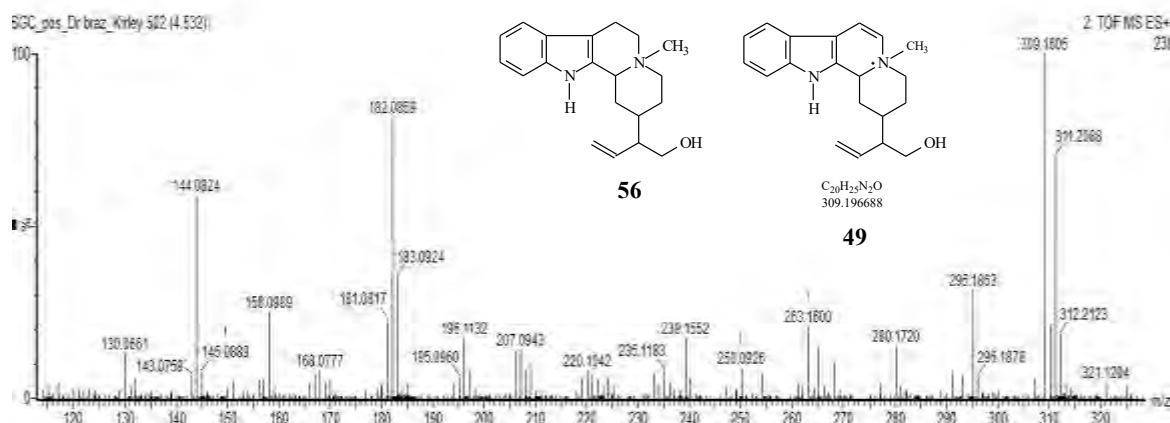


**Espectro 74.** IES-EM/EM [M+H]<sup>+</sup> de SCG no Tr 4.72, *N<sub>b</sub>*-metilAntirrina (**25**).



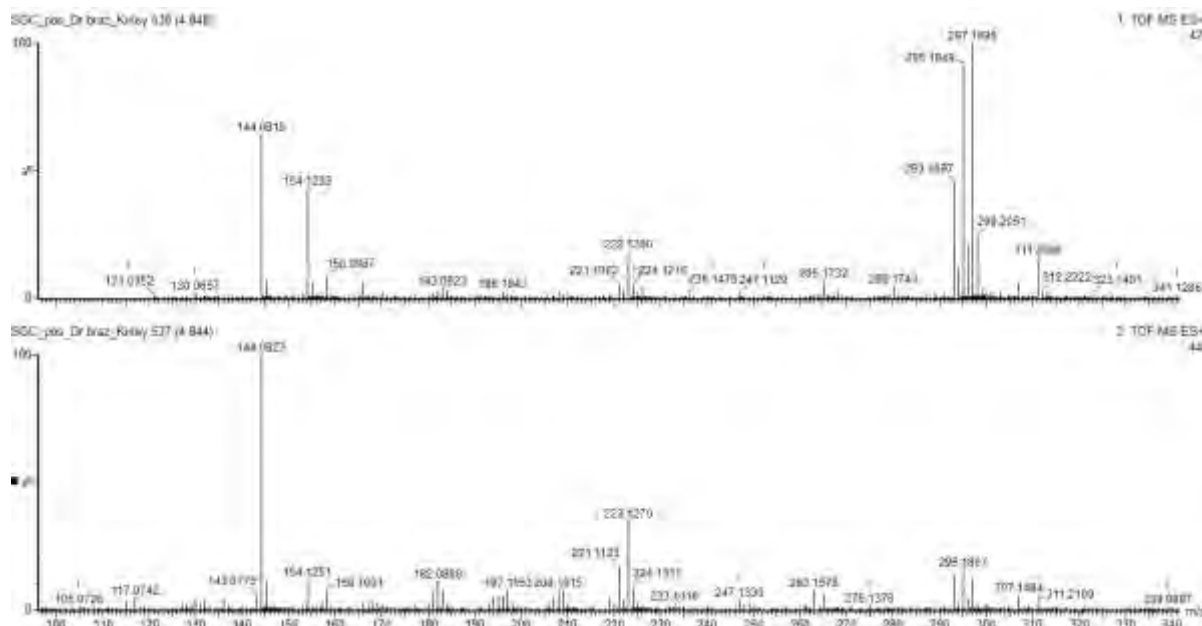
**Esquema 35.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  de 311 *N<sub>b</sub>*-metil Antirrina (25).

O Espectro 75 forneceu dois íons moleculares protonados  $[M+H]^+$  com  $m/z$  311.2088 e 309.1605 com uma diferença de duas unidades. Essa característica, juntamente com os sinais de fragmentação levou a propor a presença de um epímero da *N<sub>b</sub>*-metil Antirrina ( $C_{19}H_{21}N_2O_2$ ) (56) e um segundo componente de estrutura semelhante a essa, porém com carbono 5 e 6 insaturados (49) ( $C_{19}H_{19}N_2O_2$ ), sendo denominado como *N<sub>b</sub>*-metil-5,6-dideidro Antirrina, sendo proposta pela primeira vez na literatura.

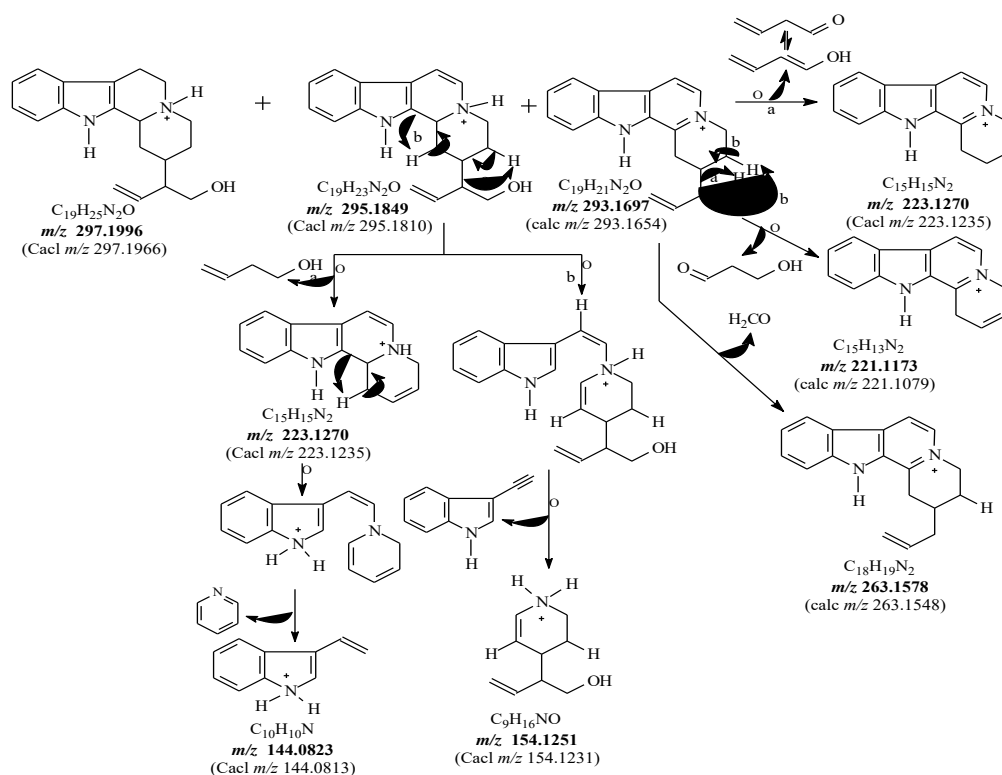


**Espectro 75.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.53 *N*-metilAntirrina (56) e derivado insaturado *N*-metilAntirrina (49).

O Espectro 76 apresentou três picos intensos referentes a 3 alcaloides com estruturas parecidas, com diferenciação no grau de insaturação do terceiro anel (Piridínico). No íon molecular  $[M+H]^+$   $m/z$  297.1996 foi proposto a Antirrina (18) e  $[M+H]^+$   $m/z$  293.1697 proposto a Matadina (QUETEN-LECLERCQ et al., 1991) (50), em quanto o pico  $[M+H]^+$   $m/z$  295.1849 ( $C_{19}H_{23}N_2O$ ) apresentou o esqueleto estrutural da Antirrina mas com 1 insaturação, sendo nomeada como 5,6-dideidro antirrina (57). As propostas de fragmentação que auxiliam na confirmação das propostas estão descritas no Esquema 36.

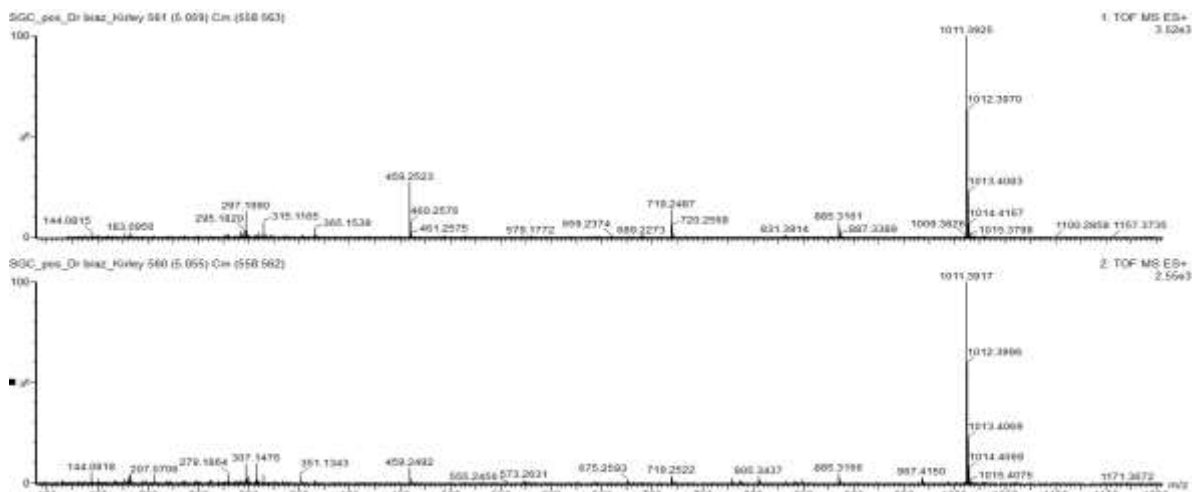


**Espectro 76.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC Tr 4.84 de 18, 50 e 57.

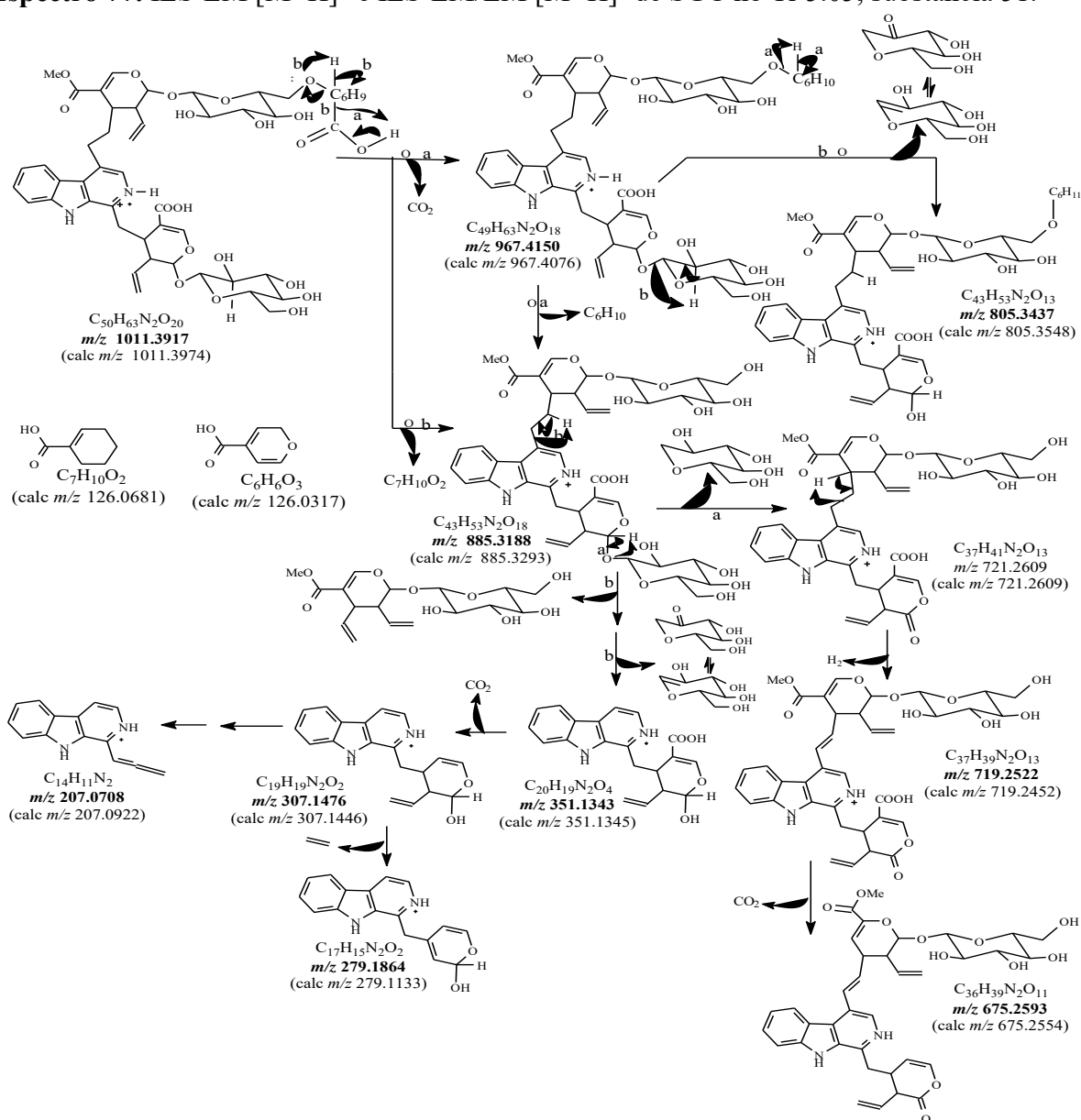


**Esquema 36.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  de 295 e 293, substâncias 18, 50 e 57.

Na proposta da substância **51**, gerada a partir do Espectro 77, os dados foram comparados com a substância derivada do Hirsutasida (**37**). A partir da análise pode-se propor a presença do alcaloide com íon molecular de  $[M+H]^+$   $m/z$  1011.3917 ( $C_{50}H_{52}N_2O_{20}$ ), com estrutura semelhante a substância **37**, mas com adição de uma unidade de açúcar. (Esquema 37).



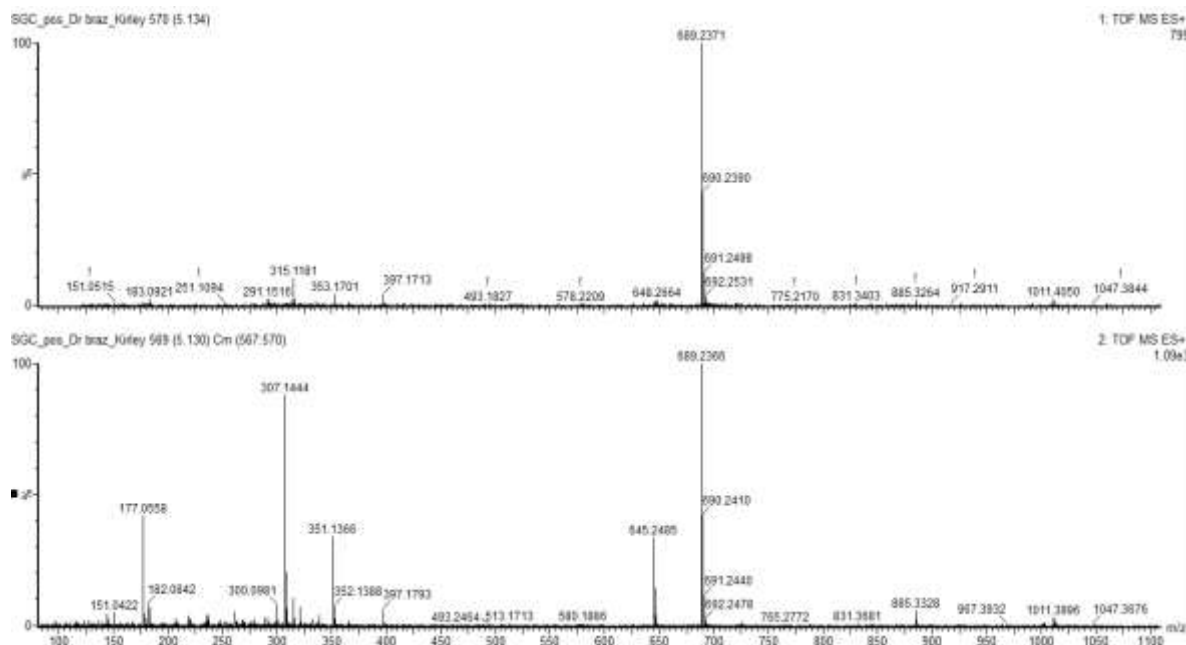
**Espectro 77.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 5.05, substância 51.



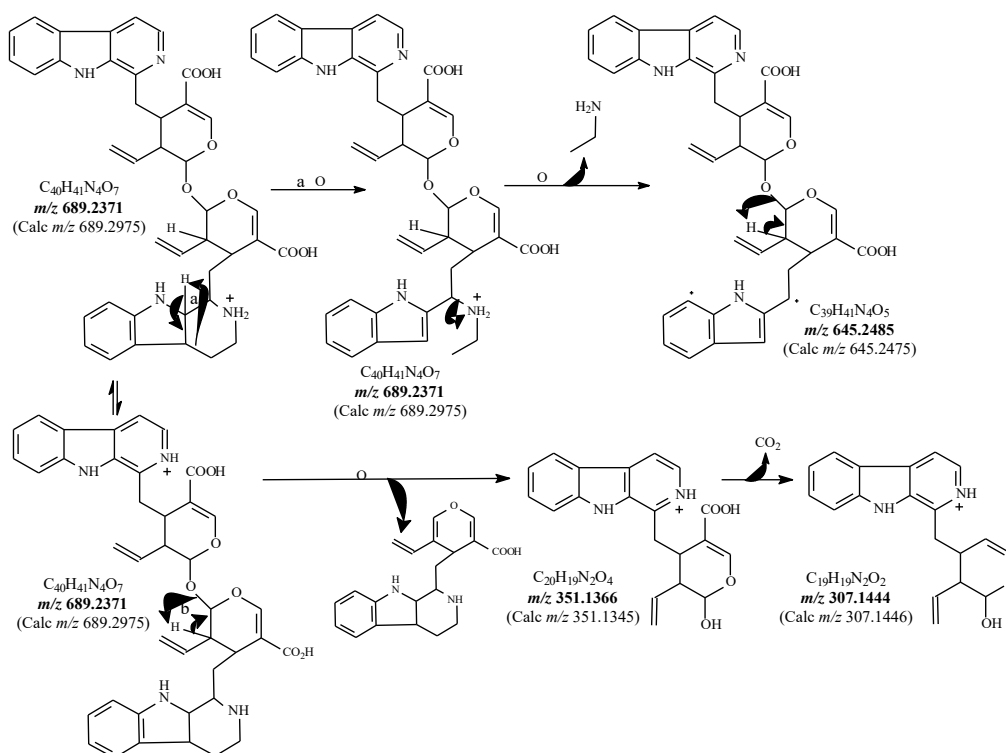
**Esquema 37.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  de 1011, substância 51.



O Espectro 78 gerou o íon molecular  $[M+H]^+$   $m/z$  689.2371 que gerou a FM  $C_{40}H_{40}N_2O_7$ , no qual foi proposta a estrutura com a união dos alcaloides Ácido Lialosídico e Ácido Strictosidínico sem as unidades de açúcar (**52**). As principais fragmentações ( $m/z$  645, 351 e 307) geradas no espectro estão representadas do Esquema 38. Dentro os picos representados o  $m/z$  351 justifica a fragmentação dos dois ácidos e em seguida sofre a descarboxilação da porção do ácido Lialosídico com  $m/z$  307.

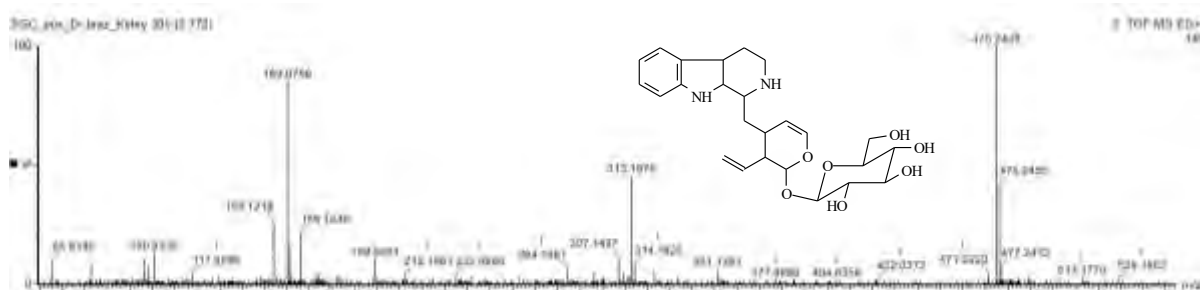


**Espectro 78.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 5.13, substância 52.

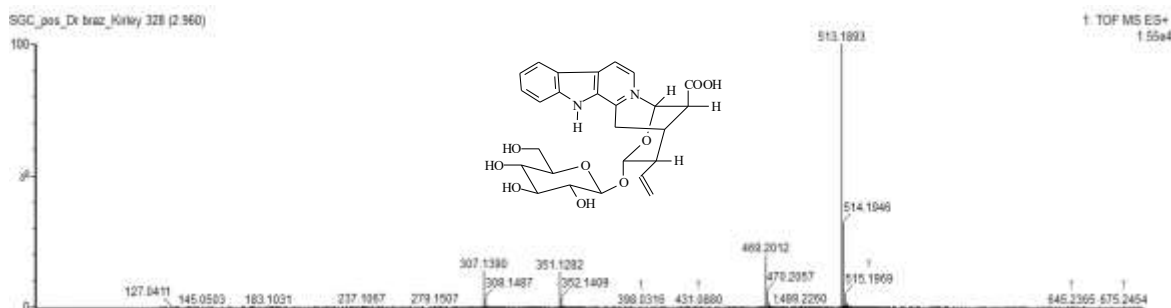


**Esquema 38.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no IES-EM,  $[M+H]^+$  de 689, substância 52.

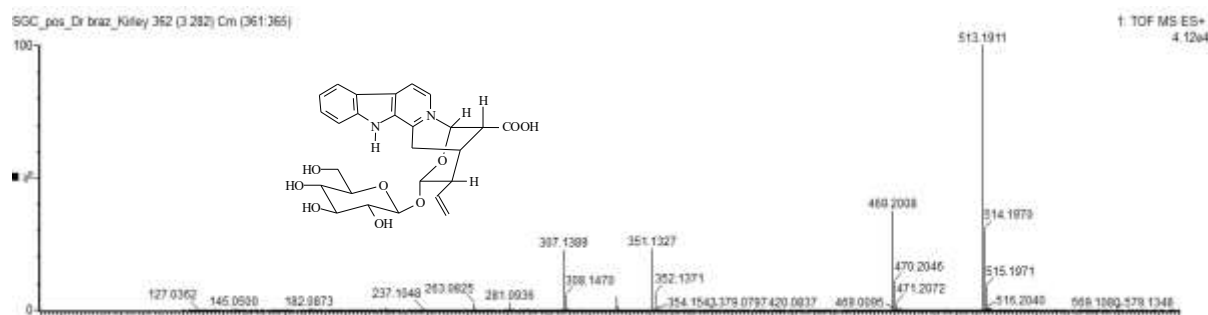
Os Espectros de 79 a 85 geraram as substâncias que foram comparadas com frações anteriores e apresentaram semelhança nos perfis e por isso estão sendo apresentados somente os espectros e as estruturas. Com os dados fornecidos por esses espectros foram propostos à presença dos metabólitos: Descarboxi-Estrictosidínico (29), Ofiorina A (3), Ofiorina B (2), Harmana (4), Ácido Lialosídico (9), Ácido Estrictosidínico (11) e Matadina (50).



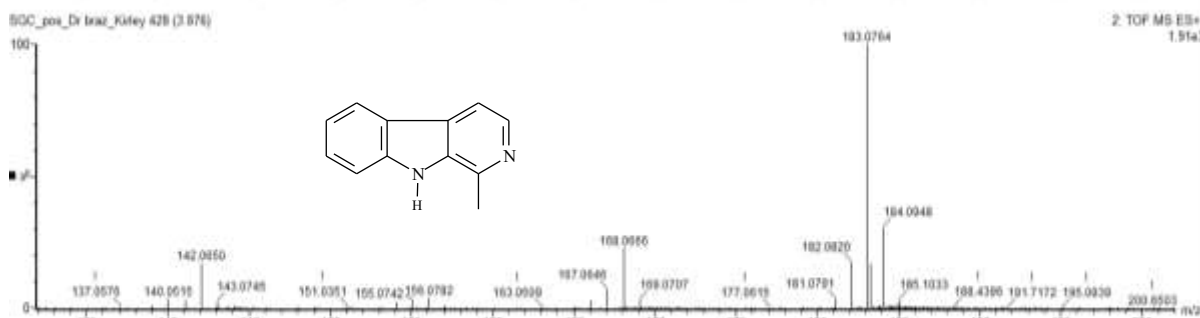
**Espectro 79.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 2.77, Descarboxi-Estrictosidínico (29).



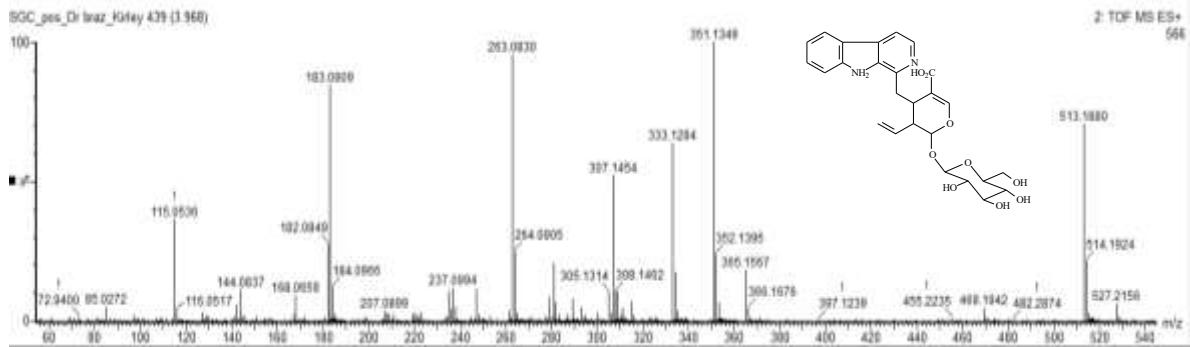
**Espectro 80.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 2.96, Ofiorina A (3).



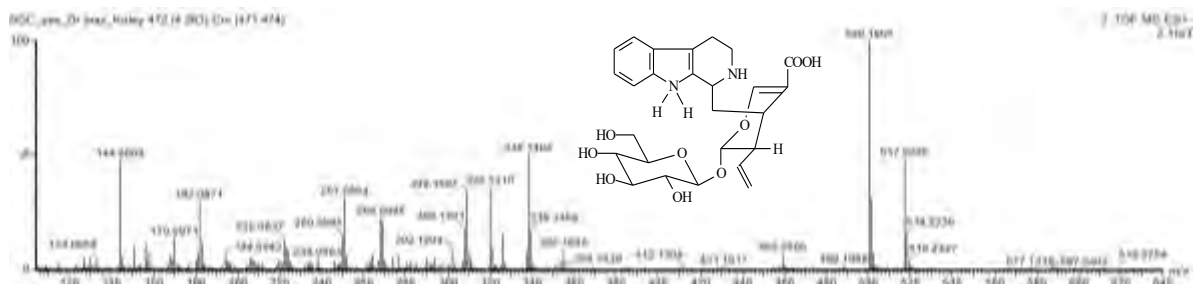
**Espectro 81.** IES-EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 3.28, Ofiorina B (2).



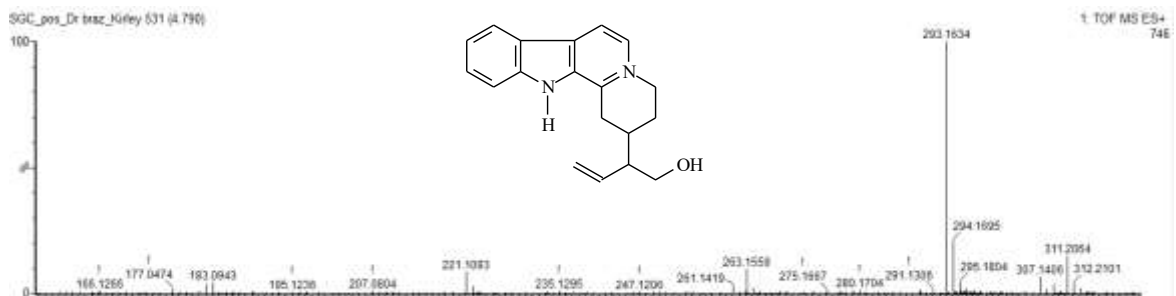
**Espectro 82.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 3.87, Harmana (4).



**Espectro 83.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 3.96, Ácido Lialosídico (9).



**Espectro 84.** IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.26, Ácido Estrictosidínico (11).



**Espectro 85.** IES-EM  $[M+H]^+$  e IES-EM/EM  $[M+H]^+$  de SGC no Tr 4.79, Matadina (50).

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização da técnica de desreplicação na identificação das substâncias mostrou-se muito importante, onde se economizou tempo e custos financeiros no trabalho laboratorial. Contudo, demandou mais tempo na elucidação das estruturas a partir dos dados espectrais gerados em com a comparação com as informações da literatura.

A desreplicação de *S. grazielae* permitiu propor a presença de 55 alcaloides indólicos e 2 hidrocarbonetos, sendo a quantidade de 27, 38, 13, 7, respectivamente, nas frações diclorometano (SGD), acetato de etila (SGAc), butanólica (SGB), residual (SGR) presentes da madeira e 22 alcaloides do extrato metanólico da casaca (SGC). Esses dados são sustentáveis uma vez que essa classe metabólica é registrada no gênero e Família de estudo, além de estar coerente com as substâncias isoladas no Capítulo I desse Trabalho.

As 57 substâncias propostas pela técnica de desreplicação foram: Hidroxi-harmana (1), Ofiorina B (2), Ofiorina A (3), Harmana (4), isômeros da Harmana A (5-8), Ácido Lialosídico (9), Lialosídeo (10), Ácido Strictosidínico (11), Ác. 3-*epi*-Strictosidínico (12), Strictosidina (13), Ácido desmetilisopauridiantosídico (14), *N*-desmetil-correantosida (15), Strictosamida (16) Derivado lactâmico da Antirrina glicosilada (17), Antirrina (18), Epímeros Antirrina (19-22), Antirrina glicosilada (23), Epímero Antirrina glicosilada (24), *N<sub>b</sub>*-metilantirrina (25 e 56), 3,5,6,14 Tetradehidro Antirrina (26), 2-(1-hidroximetil-2propenil)-1,2,3,4,6,7,12b-octahidro-4-oxoindole-[2,3- $\alpha$ ]-quinolizine (27), 15,20-dideidro Ioimbana (28), Strictosidínico descarboxilado (29), 3,4-dideidro strictosidina (30), Camptotecina-5-glicopiranosídeo (31), *N*-p-coumaroil serotonina (32), Isômero *N*-p-coumaroil serotonina (33), *N*-p-metoxi cinamoil serotonina (34), *N*-p- cafeloil serotonina (35), *N*-p-feruloil serotonina (36), Derivado do Hirsutasida D (37 e 51), Epímero derivado do Hirsutasida D (38), Ácido 3,4-dideidro Strictosidínico (39), 5,6-dideidro Antirrina glicosilado (40), *N<sub>b</sub>*-metil Antirrina glicosilada (41), Hirsutasida D (42), Derivado Ioimbana triglicosilada (43 e 44), Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada (45-48), *N<sub>b</sub>*-metil-5,6-dideidro Antirrina (49), Matadina (50), Ác.lialosídico-strictosidínico desglicosilado (52), Dioctadecilamina (53), Dinonadecilamina (54), 5,6-dideidro Antirrina (57).

Das 57 substâncias propostas nesse capítulo, 20 estão sendo descritas como inéditas na literatura, e 5 já tinham sido relatadas no gênero *Simira*.

O estudo de fragmentação realizado com os alcaloides indólicos através da espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (IES-EM/EM) mostrou que o processo de fragmentação desses compostos envolve principalmente a eliminação de unidade de glicose ( $C_6H_{11}O_5$ ,  $m/z$  162) para os alcaloides glicosilados e de dióxido de carbono ( $CO_2$ ,  $m/z$  44) para as estruturas que possuíam a função de ácido carboxílico. A presença ou ausência dos picos  $m/z$  182 ou 183 e  $m/z$  144 nos espectros de massas foram utilizados como parâmetro na caracterização do esqueleto básico das estruturas. Isso porque a presença dos picos  $m/z$  182 e 183 propõem metabólitos que possuíam como esqueleto base a  $\beta$ -carbolina, e a presença do pico  $m/z$  144 conduziu como esqueleto básico os alcaloides indólicos tetrahydro- $\beta$ -carbolina ou o esqueleto de dihydro- $\beta$ -carbolina.

Dentre as substâncias propostas tiveram muitos epímeros, visto que a classe de alcaloides indólicos possui essa característica, podendo apresentar os epímeros ( $\alpha$  e  $\beta$ ) nos hidrogênios os H-3, H-15, H-16, H-20 e H-21. Através apenas do espectro de massas não foi possível determinar qual epímero saiu em cada tempo de retenção (gerado a partir do cromatograma).

Para a determinação fitoquímica das espécies via desreplicação por EM/EM é importante ter um vasto levantamento bibliográfico a cerca da família, do gênero e se possível da espécie estudada. Isso facilita e agiliza na proposição das estruturas, visto que muitos metabólitos estão sendo reportados como inéditos e com base na rota biossintética e dos

metabólitos já isolados ficam consistente as estruturas propostas. Mesmo com levantamento e análise dos espectros de massas, não foi possível propor a estrutura de todos os íons gerados nos espectros das frações, precisando assim, de se realizar o isolamento para a identificação por RMN, assim como para identificação precisa dos epímeros.

Essa técnica de detecção sensível e de alta resolução foi muito importante, apontando a “localização”, através do tempo de retenção, das substâncias inéditas ou de interesse para futuros isolamentos e com posteriores técnicas de Ressonância Magnética Nuclear, e para futuros ensaios biológicos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, U.; KOCH, C.; SPEITLING, M.; HANSSKE, F. G. Modern methods to produce natural-product libraries. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, p. 453-458, 2002.
- ACCAME, M. A. C. Alcaloides: aspectos generales (I). **Panorama Actual Med.**, v. 25, p. 222-227, 2001.
- AHMED, A.; LI, W.; CHEN, F.F.; ZHANG, J.S.; TANG, Y.Q.; CHEN, L.; TANG, G.H.; YIN, S. Monoterpene indole alkaloids from *Rhazya stricta*. **Fitoterapia**, v. 128, p. 1-6, 2018.
- ALVI, K. A.; PETERSON, J.; HOFMANN, B. Rapid identification of elaiophylin and geldanamycin in streptomyces fermentation broths using CPC coupled with a photodiodearray detector and LC-MS methodologies. **J. Ind. Microbiol.**, v. 15, n. 2, p. 80-84, 1995.
- AQUINO, R.; GAROFALO, L.; TOMMASI, N.; UGAZ, O. L.; PIZZA, C. **Phytochem.**, v. 37, v. 5, p. 1471-1475, 1994.
- BACCHI, E. M. **Alcalóides tropânicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELL, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 793-817.
- BASTOS, A. B. F. D. O.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos isolados de *Simira glaziovii* (K. schum) steyererm. e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do alcaloide ofiorina e seus derivados. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 241-245, 2002.
- BERGER, A.; TANUHADI, E.; BRECKER, L.; SCHINNERL, J.; VETSCHERA, K. Chemodiversity of tryptamine-derived alkaloids in six Costa Rican *Palicourea* species (Rubiaceae–Palicoureeae). **Phytochem.**, v. 143, p.124-131, 2017.
- BOBZIN, S. C.; YANG, S.; KASTEN, T. P. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, v. 25, p. 342, 2000.
- CAPRASSE, M.; TAVERNIER, D.; ANTEUNIS, M. J. O.; ANGENOT, LUC. The isolation of Nb-methyl-Antirrina, malindine and isomalindine from *Strychnos. Usambarensis*. **Plant Med.** n.1, v.50, p.27-30, 1984.
- CARDELLINA, J. H.; FULLER, R. W.; GAMBLE, W. R.; WESTERGAARD, C.; BOSWELL, J.; MUNRO, M. H. G.; CURRENS, M.; BOYD, M. R. Evolving strategies for the selection, dereplication and prioritization of antitumor and HIV-inhibitory natural products extracts. **Pr. Phyt. Soc.**, v. 43, p. 25-35, 1999.
- CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 26-29, 2008.
- CASTANEDA, P.; ALBOR, C.; MATAR, R.; BYE, R.; LINARES, E. Alkaloids from *Simira mexicana*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 4, p. 366, 1991.

CHENG KA-WING; CHEN, F.; WANG, M.; COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**, 2 ed. CRC Press, 2008. p. 245-266

CHUNG, M-S.; KIM, N-C.; LONG, L.; SHAMON, L.; AHMAD, W-Y.; SAGRERO-NIEVES, L.; KARDONO, L. B. S.; KENNELLY, E. J.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: isolation of the sesquiterpene glycoside mukurozioside IIb as a sweet principle of *Sapindus rarak*. **Phytochem. Analysis**, v. 8, p. 49-54, 1997.

CLAESON, P.; GOERANSSON, U.; JOHANSSON, S.; LUIJENDIJK, T.; BOHLIN, L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 77-81, 1998.

CLAEYS, M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CHEN, S.; DERRICK, P. J.; MELLON, F., A.; PRICE, K. R. Comparison of high- and low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry in the analysis of glycoalkaloids and their aglycons. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 7, p. 173-181, 1996.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CUI, B.; CHAI, H.; CONSTANT, H. L.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V.; BEECHER, C. W. W.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Limonoids from *Azadirachta excelsa*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1283-1287, 1998.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, n. 3, p. 364-372, 2005.

CUYCKENS, F.; MA, Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAEYS, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analisis**, v. 28, n. 10, p. 888-895, 2000.

DE LUCA, V.; MARINEAU, C.; BRISSON, N. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2582-2586, 1989.

FERREIRA, M. J. P. **Metabólitos Vegetais: Origem, Diversidade e Aplicações**. Apostila. São Paulo: USP, 2016.

FREDENHAGEN, A.; DERRIEN, C.; GASSMANN, E. An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for  $[M + H]^+$  and  $[M + Na]^+$  ions. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 385-391, 2005.

FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P-A.; WOLFENDER, J-L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-offlight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian Lippia species. **J. Chromatogr. A**, v. 1259, 167-178, 2012.

GAUDENCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, p. 779-810, 2015.

GU, J-Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. **Phytochem. Analysis**, v. 17, p. 102-106, 2006.

HENRIQUES A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELL, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 765-791.

HIGGS, R. E.; ZAHN, J. A.; GYGI, J. D.; HILTON, M. D. Rapid Method To Estimate the Presence of Secondary Metabolites in Microbial Extracts. **Appl. Environ. Microb.**, v. 67, p. 371-376, 2001.

HUTCHINSON, C. R.; HECKENDORF, A. H.; STRAUGHN, J. L.; DADDONA, P. E.; CANE, D. E. Biosynthesis of camptothecin. 3. Definition of strictosamide as the penultimate biosynthetic precursor assisted by <sup>13</sup>C and deuterium NMR spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 101, p. 3358-3369, 1979.

JIA, Q. Generating and screening a natural product library for Cyclooxygenase and Lipoxygenase dual inhibitors. **St. Nat. Prod. Chem.**, v. 29, p. 643-718, 2003.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nat. Protoc.**, v. 5, p. 536-549, 2010.

KINGHORN, D.; FARNSWORTH, N.; SOEJARTO, D.; CORDELL, G.; SWANSON, S.; PEZZUTO, J.; WANI, M.; WALL, M.; OBERLIES, N.; KROLL, D.; KRAMER, R.; ROSE, W.; VITE, G.; FAIRCHILD, C.; PETERSON, R.; WILD, R. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **Pharm. Biol.**, v. 41, p. 53-67, 2003.

LAMBERT, M.; STRK, D.; HANSEN, S. H.; SAIRAFIANPOUR, M.; JAROSZEWSKI, J. W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 1500-1509, 2005.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY C. J.; MIAO X.-S.; ZHAO, X.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry International. **J. Mass Spec.**, v. 248, p. 61-85, 2006.

MARINHO, S. R. M. **Função dos Alcaloides indólicos monoterpênicos de Catharanthus roseus (L.) G. Don**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 2001.



MASOKO, P.; ELOFF, J. N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, p. 1425-1431, 2005.

McMURRY, J.; BEGLEY, T. **The organic chemistry of biological pathways**. Englewood: Roberts and Company, 2005. 490 p.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; SHIN, Y. G.; JONAS, P. F.; CHAI, H-B.; PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 635-641, 2002.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W-T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and *de novo* sequencing of nonribosomal peptides. **Nat. Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **J. Chromatogr. A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

O'CONNOR, S. E.; MARESH, J. J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 532-547, 2006.

PATTHY-LUKÁTS, A.; KÁROLYHÁZY, L.; SZABÓ, L. F.; PODÁNYI, B. First Direct and Detailed Stereochemical Analysis of Strictosidine. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 69-75, 1997.

PAULI, G. F.; KUCZKOWIAK, U.; NAHRSTEDT, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. **Magn. Reson. Chem.**, v. 37, p. 827-836, 1999.

PETERSON, A. C.; BALLOON, A. J.; WESTPHALL, M. S.; COON, J. J. Development of a CG/quadrupole-orbitrap mass spectrometer, part II: new approaches for discovery metabolomics. **Anal. Chem.**, v. 86, p. 10044-10051, 2014.

PIMENTA, A. T. A.; UCHÔA, D. E. A.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. Alkaloid and other chemical constituents from *Psychotria stachyoides* Benth. **J. Braz. Chem. Soc.**, n.11, v.22, p. 2011.

POTTERAT, O.; KLAUS, W.; HAAG, H. Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus *Metarrhizium anisopliae*. **J. Chromatogr. A**, v. 872, p. 85-90, 2000.

QUETIN-LECLERCQ, J.; COUCKE, P.; DELAUDE, C.; WARIN, R.; BASSLEER, R.; ANGENOT, L. Matadine, a cytotoxic alkaloid from *Strychnos gossweileri* Quick View Other Sources. **Phytochem.**, n.30, v.5, p.1697-700, 1991.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J. Chromatogr. A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

SANCHES, M. N. G.; CHAVES, D. S. A.; CARVALHO, M. G.; ARAUJO, M. F.; VIEIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical Compounds Isolated from *Simira graziela*. **Chem. Nat. Compd**, v. 53, n. 3, p. 543-544, 2017.

SCHUMANN, D.; SCHMID, H. Chemische korrelation von condylocarpin mit akuammicin **Helv. Chim. Acta.**, n.6, v.46, 1963.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. **Alcalóides indólicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELL, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 819-846

SEDLOCK, D. M.; SUN, H. H.; SMITH, W. F.; KAWAOKA, K.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Rapid identification of teleocidins in fermentation broth using HPLC photodiode array and LC-MS methodology. **J. Ind. Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 45-52, 1992.

SHEO, B. S.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery-Foundation in natural products. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 1006-1015, 2006.

STAVRI, M.; SCHNEIDER, R.; O'DONNELL, G.; LECHNER, D.; BUCAR, F.; GIBBONS, S. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. **Phytother. Res.**, v. 18, p. 774-776, 2004.

STEFANOWICZ, P.; PRASAIN, J. K.; YEBOAH, K. F.; KONISHI, Y. Detection and partial structure elucidation of basic taxoids from *Taxus wallichiana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 3583-3589, 2001.

STESSMAN, C. C.; EBEL, R.; CORVINO, A. J.; CREWS, P. Employing dereplication and gradient 1D NMR methods to rapidly characterize sponge-derived sesterterpenes. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 1183-1186, 2002.

TAKAHASHI, T.; MIYAZAWA, M. Serotonin derivatives as inhibitors of -secretase (BACE 1). **Pharmazie**, v. 66, p. 301-305, 2011.

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M.  $\beta$ -Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochem.** v.52, p.1485-1489, 1999.

VAN ELSWIJK, D. A.; SCHOBEL, U. P.; LANSKY, E. P.; IRTH, H.; VAN DER GREEF, J. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 65, p. 233-241, 2004.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochem.**, v. 6, p. 3-14, 2007.

XIN, W.B.; CHOU, G.X.; WANG, Z.T. Bis(monoterpene) indole alkaloid glucosides from *Uncaria hirsute*. **Phytochem.**, n. 3, v.4, p.380-382, 2011.

WANG, P.; LUO, J.; WANG, X. B.; FAN, B.Y.; YIKONG, L.. New indole glucosides as biosynthetic intermediates of camptothecin from the fruits of *Camptotheca acuminata* Fitoterapia. v. 103,p. 1-8, 2015.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; LACHAVANNE, J-B.; HOSTETTMANN, K. Identification of the polar constituents of *Potamogeton* species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSn and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2401-2410, 2004.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight *tandem* mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **J. Chromatogr. A**, v. 926, p. 29-41, 2001.

WOLFENDER, J-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Plant Med.**, v. 75, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER, J-L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-ToF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analysis**, v. 28, p. 895-906, 2000.

YAMAMOTO, H.; KATANO, N.; OOI, A.; INOUE, K. Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. **Phytochem.**, v. 53, p. 7-12, 2000.

YAMAZAKI, Y.; KITAJIMA, M.; ARITA, M.; TAKAYAMA, H.; SUDO, H.; YAMAZAKI, M.; AIMI, N.; SAITO, K. Biosynthesis of camptothecin. In silico and in vivo tracer study from [1-13C]glucose. **Plant Physiol.**, v. 134, p. 161-170, 2004.

### **CAPÍTULO III**

#### **TESTES BIOLÓGICOS DA MADEIRA DE *Simira grazielae***

## RESUMO

Esse estudo descreve testes biológicos do extrato metanólico (SGM) e das partições diclorometano (SGD), acetato de etila (SGAc), butanólica (SGB) e o residual (SGR) da madeira de *S. grazielae*, Rubiaceae. O extrato e as partições foram testados frente às larvas do carrapato *R. microplus*, onde estas larvas foram colocadas no centro de um papel de filtro e em seguida foram umedecidos com 90  $\mu$ l das soluções testadas nas concentrações: 12,5, 25, 50, 75 e 100 mg/mL e para cada tratamento foram feitas 10 repetições. Na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória foram utilizadas técnicas farmacológicas em camundongos, através dos modelos de dor (testes de contorções abdominais) induzidas por ácido acético, onde foram administrados o extrato e as partições por via oral em doses 100 mg/kg e analisadas as contrações da parede abdominal seguidas de extensão dos membros posteriores. Foi realizada também teste de formalina que mediu o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, após a injeção na superfície plantar de uma das patas de 0,02 mL de uma solução de formalina à 2,5%. Na análise da atividade sobre a enzima tirosinase, foram utilizadas as frações SGAc, SGB e o alcaloide Ofiorina B, que foram diluídas em DMSO e adicionadas ao meio de reação contendo a enzima tirosinase (50-100 unidades), EDTA (0,022 mmol.L<sup>-1</sup>), L-DOPA (0,17 mmol.L<sup>-1</sup>) em PBS (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0) em temperatura ambiente e após 30 min foram realizadas as leituras de reação no espectrofotômetro de UV-Vis a 475 nm. As frações SGAc, SGB e a ofiorina B não tiveram capacidade de atuar na atividade oxidante da enzima tirosinase para L-DOPA. Essas frações bem como as demais também não apresentaram efeito acaricida frente às larvas do *R. microplus*. Todavia o extrato metanólico da madeira de *S. grazielae* e suas partições mostraram propriedades antinociceptivas em modelos de dor aguda, bem como em modelos de inflamação. Assim, dos testes biológicos realizados do extrato e partições da madeira de *S. grazielae* os testes antinociceptivo e anti-inflamatório apresentaram atividade, podendo essas ações estar correlacionadas à presença de alcaloides indólicos existentes na planta.

**Palavra-Chave:** Acaricida, Anti-inflamatória, Enzima Tirosinase.

## ABSTRACT

This study describes biological tests of methanolic extraction (SGM) and dichloromethane (SGD), ethyl acetate (SGAc), butanolic (SGB) and residual (SGR) partitions of *S. grazielae*, Rubiaceae wood. The extractor and as parts were tested against *R. microplus* tick larvae, where these larvae were placed in the center of a filter paper and then moistened with 90  $\mu$ l of the tested solutions in the following: 12.5, 25, 50, 75 and 100 mg / mL and for each treatment 10 repetitions were made. In antinociceptive and anti-inflammatory activity, pharmacological techniques were used in mice, through acetic acid-induced pain models (abdominal contour tests), where they were administered or extracted, and as oral partitions at doses of 100 mg / kg and analyzed as contractions of the abdominal wall followed by extension of the hind limbs. A formality test was also performed which measured the time the animal spent licking a paw following an injection into the plantar surface of one 0.02 mL paw of a 2.5% formalin solution. In the activity analysis on tyrosinase enzymes, used as SGAc, SGB and alkaloid Ofiorin B fractions, which were diluted in DMSO and added to tyrosinase enzymatic filter reaction medium (50-100 units), EDTA (0.022 mmol.L<sup>-1</sup>). , L-DOPA (0.17 mmol.L<sup>-1</sup>) in PBS (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8.0) at room temperature and after 30 min were stored as reaction readings on the UV-Vis spectrophotometer at 475 nm. SGAc, SGB and ofiorin B fractions were not able to perform oxidative activity of tyrosinase enzyme for L-DOPA. These fractions, as well as the other fractions, also did not have an acaric effect against *R. microplus* larvae. However, the methanolic extract of *S. grazielae* wood and its parts affect antinociceptive properties in acute pain models as well as in inflammation models. Thus, the biological tests performed by extraction and partitions of *S. grazielae* wood and the antinociceptive and anti-inflammatory tests of sexual activity, allow these actions to be correlated with the presence of currently induced alkaloids in the plant.

**Key words:** Acaricide, Anti-inflammatory, Tyrosinase enzyme.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Atividade biológica de produtos naturais

A grande diversidade química dos metabólitos secundários isolados da família Rubiaceae e do gênero *Simira* tem motivado a realização de estudos sistemáticos visando à investigação do potencial biológico de suas espécies. Esses estudos fazem parte das estratégias de pesquisa no desenvolvimento de novos medicamentos, através da exploração racional e orientada de recursos provenientes da fauna e da flora, a fim de identificar e avaliar princípios ativos para a obtenção de novos produtos e processos possíveis de serem introduzidos no mercado e, enfim, comercializados (BARRETT e LYBBERT, 2000).

Uma das principais ferramentas sistemáticas que vem sendo utilizada nesse contexto são os estudos fitoquímicos auxiliados pela investigação da atividade farmacológica (PASQUET et al., 2011; UJANG et al., 2013).

O uso de substâncias orgânicas para fins de atividades biológicas é altamente viável, uma vez que eles tem tido resultados significativos para as mais diferentes atividades biológicas, sendo promissoras no fornecimento de princípios ativos para produção de fármacos (TSALA et al., 2013).

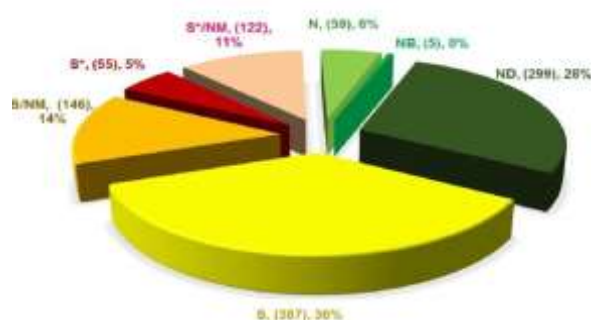
A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc., tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais.

As plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte de obter-se uma variedade de fármaco, pois o sistema público de saúde no Brasil não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população, sobretudo no Nordeste brasileiro (LOBO et al., 2011).

O interesse por fitoterápicos e produtos naturais vem crescendo cada vez mais no Brasil e no mundo. Em países desenvolvidos como Canadá, França, Alemanha e na Itália, o uso de produtos da medicina tradicional é praticado por 70 a 90% da população, tendo o mesmo peso do sistema alopático (WHO, 2011).

A relevância dos metabólitos de origem natural na área farmacêutica pode ser comprovada pela grande participação de produtos naturais e derivados (~64%, Figura 1), no número de substâncias (de baixo peso molecular) aprovadas como fármacos, no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 (NEWMAN e CRAGG, 2012). Além disso, produtos naturais têm sido apontados como fundamentais para a identificação e caracterização de novos alvos celulares, bem como para a compreensão do mecanismo de ação destas interações moleculares (BOTTCHEER et al., 2010; SCHMITT et al., 2011).

Estima-se que em 2011 aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo a maioria oriunda das plantas (WHO, 2011).



N – Produtos naturais, NB – Produtos naturais em misturas padronizadas, ND – Derivados de produtos naturais (modificações semissintéticas), S – sintéticos, S/NM Sintético inspirado a partir de produtos naturais, S\* Sintético contendo grupo farmacofórico de produtos naturais, S\*/NM Sintético contendo grupo farmacofórico

**Figura 1.** Fonte de substâncias aprovadas como fármacos, de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 (n=1073). (adaptado de NEWMAN, CRAGG, 2012).

A biodiversidade dos países tropicais, um recurso valioso, com grande variedade de espécies de plantas está sendo pouco explorada. Informações obtidas na medicina tradicional (etnofarmacologia) vêm contribuindo para a seleção de plantas a serem estudadas, na busca de extratos e metabólitos especiais com potencial promissor para atuarem como fitoterápicos ou fitofármacos.

Diante desta situação, fitoquímicos trabalham em conjunto com outros pesquisadores de diversas áreas da saúde, visando aplicabilidade dos metabólitos isolados e extratos, buscando de forma incessante substâncias que possam atuar de forma ativa à atividade farmacológica. O extrato, as partições, o alcaloide Ofiorina B de *S. grazielae* foram submetidos a ensaios biológicos, em parceria com outros grupos de pesquisa da UFRRJ e UFJF.

## 1.2 Atividade Acaricida

O carrapato *Rhipicephalus microplus* família Ixodidae, tem os bovinos como hospedeiros preferenciais, constituindo-se em um grande entrave para pecuária bovina (PEREIRA, 2008; MATIAS et al., 2013). No Brasil estima-se que esse carrapato é responsável por danos econômicos de 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014).

Esses prejuízos decorrem da perda de sangue do animal, diminuição da produtividade, depreciação do couro, estresse dos animais e gastos com aquisição de equipamentos, medicamentos e mão de obra especializada para o tratamento dos animais (FURLONG et al., 2004; FURLONG et al., 2007; AMARAL et al., 2011a,b). Durante a hematofagia, os carrapatos inoculam toxinas que promovem alterações fisiológicas nos animais infectados, podendo transmitir agentes infecciosos, principalmente *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp., responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (CAMPOS et al., 2012).

O uso de carrapaticidas ainda é o método predominante no controle *R. microplus*, no entanto, o uso excessivo e sem critério dos carrapaticidas disponíveis no mercado levou à seleção de populações resistentes as bases químicas utilizadas para seu controle (FURLONG et al., 2007; KLAFKE, 2008). Esse quadro é agravado pelas poucas bases químicas disponíveis no combate deste artrópode, além das indústrias destinarem poucos esforços para o lançamento de novas bases carrapaticidas, devido a altos custos na produção de novas moléculas e validade comercial do produto no mercado (KISS et al., 2012).

Decorrente a essas dificuldades, metabólitos secundários oriundos de plantas como pesticidas ou modelos para pesticidas sintéticos vêm sendo utilizados, tais como o toxafeno, as piretrinas, a nicotina e a rotenona (DUKE et al., 1998).

Diante dessa possibilidade iminente de resistência devido ao uso descontrolado de carrapaticidas sintéticos, além da preocupação com as questões ambientais, medidas alternativas de controle têm ganhado espaço nos dias atuais. No que se refere ao combate a carrapatos através do contato, substâncias de origem vegetal têm se mostrado promissoras (BORGES et al., 2011; GOMES et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012;).

## 1.3 Atividade frente à enzima tirosinase

A tirosinase também conhecida como polifenol oxidase (PPO) é uma enzima que contém cobre e é amplamente presente em mamíferos, plantas e fungos, utilizando muitos compostos fenólicos como substrato. Nos mamíferos, ela está envolvida na transformação da L-tirosina, para dopaquinona, que ocorre através de duas etapas: hidroxilação da L-tirosina, para L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), seguido da oxidação deste último para ortoquinona (dopaquinona). A dopaquinona será transformada posteriormente através de várias reações para produzir a melanina (marrom ou preta), que é responsável pela cor da pele de mamíferos (OKOMBI et al., 2006).

A melanina desempenha um papel importante na proteção da pele humana dos efeitos nocivos da radiação UV do sol. Ainda que a melanina tenha principalmente função de



fotoproteção na pele humana, o acúmulo de uma quantidade anormal de melanina em diferentes partes específicas da pele pode ocorrer, resultando em manchas mais pigmentadas, podendo se tornar um problema estético (CHANG, 2009).

Muitos compostos inibidores e ativadores da tirosinase têm se tornado cada vez mais importante em produtos medicinais e cosméticos. Por exemplo, os inibidores da tirosinase são usados em medicamentos e cosméticos clareadores, ao passo que os compostos que tendem a aumentar a melanogênese, como ativadores de tirosinase podem proteger a pele humana contra o dano da radiação UV solar (OKOMBI et al, 2006).

A tirosinase catalisa a oxidação de monofenóis, odifenóis e o-quinonas (KARIOTI et al., 2007) e é responsável pela melanização nos animais e escurecimento de plantas. Além disso, ela é responsável por reações escurecimento enzimático em frutas e hortaliças danificadas durante o manuseio e processamento pós-colheita. Assim, conhecer mecanismos que possam controlar o escurecimento enzimático é de grande importância na fabricação de polpa de fruta e derivados (SEO et al., 2003; KHAN et al., 2006).

A melanina possui muitas e interessantes propriedades que são benéficas ao organismo. Elas incluem a absorção da radiação solar proporcionando proteção contra os efeitos deletérios da luz ultravioleta e a supressão de radicais livres gerados no interior da célula (MANI et al., 2001).

Muitos dos distúrbios da pigmentação humana envolvem de certa forma a enzima tirosinase. O aumento da produção e acumulação de melanina pode levar a formação do melasma (MIOT, 2009). O albinismo, por exemplo, resulta de mutações no gene da tirosinase. No soro de pacientes portadores de vitiligo, doença que se caracteriza pela presença de manchas brancas na pele, foram encontrados anticorpos anti-tirosinase, demonstrando erros no processamento e endereçamento dessa proteína (KEMP et al., 1997). Produtos químicos, alimentos e extratos de plantas têm demonstrado efeito inibitório sobre a melanogênese, através da inibição da atividade da enzima tirosinase (MACRINI et al., 2009) e cada vez mais se busca novos produtos naturais que atuem sobre essa enzima.

#### **1.4 Atividade inflamatória, anti-inflamatória e antinociceptiva**

A inflamação é parte de uma resposta imune biológica complexa que ocorre em tecidos vasculares, devido aos estímulos nocivos, tais como, agentes patogênicos, danos celulares e irritantes (FERRERO-MILIANI et al., 2007). As respostas inflamatórias induzem a ativação de células do sistema imunológico, tais como os macrófagos, os quais desempenham papel na regulação e segregam mediadores inflamatórios (WADLEIGH et al., 2000).

Inflamação é a resposta de um tecido vivo e vascularizado a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Esta resposta se manifesta pela presença de rubor (eritema), dor e perda de função do tecido ou órgão afetado (LAPA et al., 2007).

Entre os modelos de nocicepção utilizados, o teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é bastante utilizado e descrito como um modelo inespecífico, mas com boa sensibilidade de origem inflamatória (COLLIER et al., 1967). Este modelo é uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos agentes, detectando drogas de ação de central e periférica (IKEDA et al., 2001).

Neste modelo, a administração de um agente irritante para membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados em camundongos e ratos, que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral (LE BARS et al., 2001).

O teste da formalina é um modelo de nocicepção bastante utilizado para determinar a atividade analgésica e avaliar a dor inflamatória e não inflamatória (HUNSKAAR e HOLE, 1987) das substâncias em teste, por apresentar um estímulo e resposta nociceptiva persistente ao invés de transitório (DUBUISSON e DENNIS, 1977). Esse modelo é realizado em duas fases distintas que podem indicar diferentes tipos de dor.

A fase inicial (nociceptiva) de origem neurogênica é um resultado direto da estimulação das fibras nociceptores e reflete a dor mediada no sistema nervoso central. A dor de origem neurogênica é causada pela estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C. A segunda fase (dor inflamatória) a inflamação local é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgesia mediada pelo sistema nervoso periférico, o que faz o método útil não só para avaliar o efeito analgésico, mas também para elucidar o mecanismo de dor e analgesia (TJOLSEN et al., 1992).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de realização dos testes

Os testes biológicos foram realizados em parceria com grupos de pesquisa da UFRRJ e UFJF:

- A atividade acaricida foi realizada pelo grupo de pesquisa da UFJF sob supervisão do professor Dr. Caio Monteiro.
- A execução do teste com a enzima tirosinase foi realizada pela professora Dra. Márcia Cristina C. de Oliveira no Laboratório de Produtos Naturais da UFRRJ.
- A atividade inflamatória, não inflamatória e antinociceptiva foi realizado no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, sob orientação do professor Dr. Bruno Guimarães Marinho.

### 2.2 Obtenção dos materiais vegetais

A madeira e casca de *Simira grazielae* foram coletadas Reserva Florestal da Companhia Vale do Rio Doce - ES CR e a partir delas foram obtidos os extratos metanólicos **SGM** (madeira) e as frações **SGD** (diclorometano), **SGAc** (acetato de etila), **SGB** (butanólica) e **SGR** (Residual), conforme a metodologia descrita no Capítulo I em Material e Métodos.

A substância pura utilizada no teste de na enzima tirosinase, Ofiorina B, foi obtida através do fracionamento cromatográfico da fração **SGB**, conforme descrito no Capítulo I.

### 2.3 Atividade acariciada

Esse teste teve como objetivo avaliar o efeito do extrato metanólico da madeira e as frações diclorometano, acetato de etila, butanólica e o residual sobre as larvas do carrapato *R. microplus*.

#### 2.3.1 Diluição do material

O extrato **SGM** e as partições **SGD**, **SGAc**, **SGB** e **SGR** utilizados no teste de larvas *R. microplus* foram solubilizadas em metanol com auxílio de uma lavadora ultrassônica (UNIQUE – USC 1400) e em seguida diluídas nas seguintes concentrações: 12,5, 25, 50, 75 e 100 mg/mL.

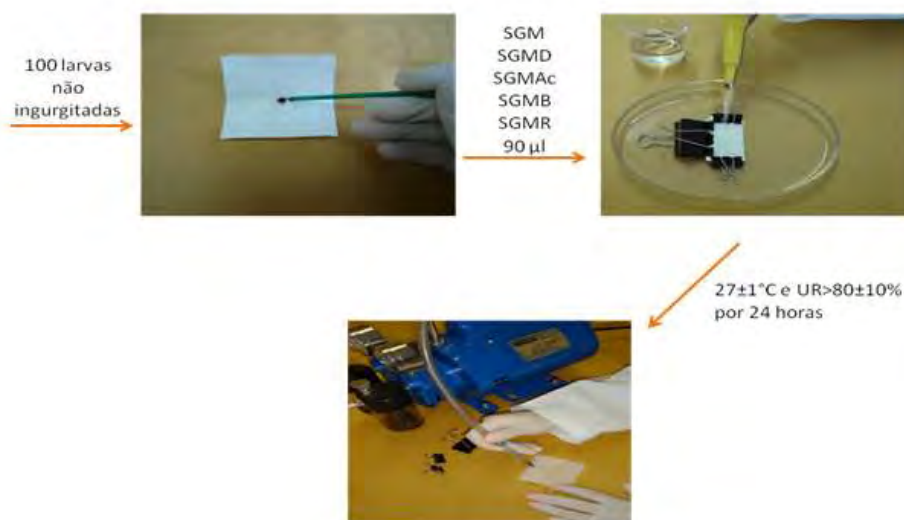
#### 2.3.2 Obtenção dos carrapatos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas larvas de *R. microplus* proveniente da cepa sensível Porto Alegre (POA), uma cepa de referência, sensível a carrapaticidas, mantida através de infestações artificiais em bezerros alocados em baias da Fazenda José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais (Procedimento registrado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa CEUA 11/2013). Foram utilizadas larvas com idades entre 15 a 21 dias após eclosão.

#### 2.3.3 Teste de Pacote de larvas

Para a realização dessa etapa foi utilizado o teste de pacote de larvas proposto por Stone e Haydoc (1962) e adaptado por Monteiro e colaboradores (2012). Nesse método, para cada partição foram colocados aproximadamente 100 larvas não ingurgitadas no centro de papel de filtro com dimensões 6 cm x 6 cm, e em seguida, foi dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques binder. Em seguida, cada lado do papel filtro foi umedecido com 90  $\mu$ L das soluções testadas (concentrações: 12,5, 25, 50, 75 e 100 mg/mL). Também foi formado um grupo controle (metanol 100%) e para cada tratamento foram feitas 10 repetições (Figura 2).

Após essa etapa, os envelopes contendo os carrapatos foram acondicionados em câmara climatizada a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $\text{UR}>80\pm 10\%$  por 24 horas. Passado este período, os envelopes foram abertos para a contagem do número de carrapatos vivos e mortos.



**Figura 2.** Teste acaricida com as larvas de *R. microplus*.

## 2.4 Atividade da enzima tirosinase

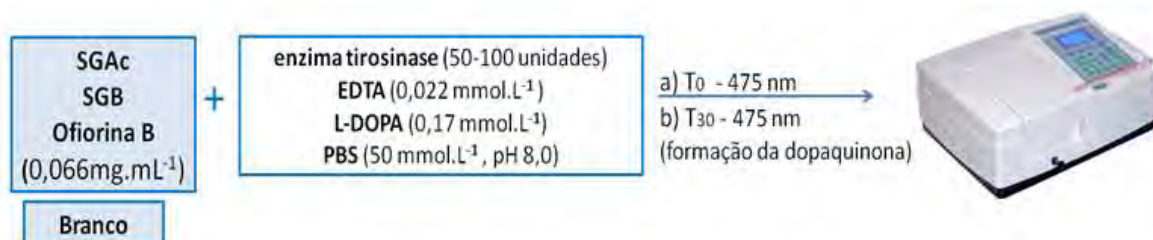
Esse teste teve como objetivo avaliar o efeito da fração acetato de etila, butanólica parte aquosa e a Ofiorina B sobre a enzima tirosinase.

### 2.4.1 Preparação do material

As partições de acetato de etila (**SGAc**), butanólica (**SGB**) e a substância isolada, ofiorina B, foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg/mL, e diferentes alíquotas da solução foram adicionadas ao meio de reação contendo a enzima tirosinase (50-100 unidades), EDTA ( $0,022 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), L-DOPA ( $0,17 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em PBS ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0) em temperatura ambiente. Os reagentes utilizados foram da Sigma Aldrich.

### 2.4.2 Análise no UV-Vis

A inibição da tirosinase foi medida com UV-Vis (Shimadzu, modelo Mini-1240, Japão a 475 nm) de acordo com o método de Patil e Zucker (1965) com modificações. As modificações consistiram na utilização de concentração diferente de EDTA. Após a adição das frações e da substância ao meio reacional foi feita a primeira leitura no tempo 0, e depois de 30 min, tempo para fenolase oxidar a LDOPA, foram realizadas novas leituras no espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata (Figura 3).



**Figura 3.** Teste de enzima tirosinase.

## 2.5 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

Foram realizados nessa tese alguns testes com objetivo avaliar o efeito do extrato metanólico (SGM), fração diclorometano (SGD), acetato de etila (SGAc), butanólica (SGB) e residual (SGR) de *S. grazielae* frente à atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Outros mecanismos mais aprofundados dessa investigação foram realizados e estão descritos na publicação do Pharmacognosy Research, SANTOS et al., 2019 .

### 2.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos, com peso de 20-25g, obtidos no Biotério da UFRRJ. Os protocolos experimentais de utilização de animais de laboratório foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFRRJ (COMEP-UFRRJ), sob o número 22678.003457 / 2012-32.

Os animais foram mantidos numa sala com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e um ciclo luz/escuro de 12 h de luz, com acesso livre a comida e água. Oito horas antes de cada experiência, os animais receberam apenas água para evitar uma possível interferência dos alimentos na absorção do fármaco.

### 2.5.2 Preparação do material

O extrato metanólico (SGM) as partições (SGD, SGAc, SGB e SGR) foram inicialmente administradas oralmente a uma dose de 100 mg/kg em testes de contorção abdominais induzida por ácido acético e formalina. A fração SGAc foi administrada por via oral nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético e formalina.

Morfina, ácido acetilsalicílico e dexametasona foram usadas como controles positivos. A dose de morfina (5,01 e 8,15 mg/kg - droga analgésica opióide), dexametasona (2,25 mg/kg - via subcutânea, antiinflamatória esteróide) e ácido acetilsalicílico (100 mg/kg) foi segundo Santos e colaboradores (2015). Dimetilsulfóxido solubilizado em água destilada (2,5%) foi utilizado como veículo para a dissolução do extrato e partições. O grupo controle foi constituído por camundongos que receberam água destilada.

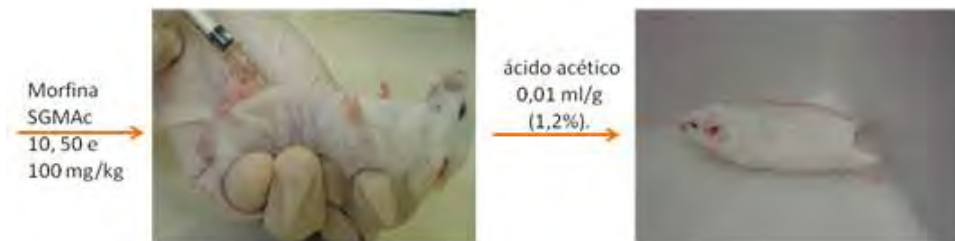
### 2.5.3 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Para avaliar a atividade antinociceptiva, os camundongos foram tratados oralmente com veículo, morfina, SGM, SGD, SGB, SGR e SGAc, 60 minutos antes administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de ácido acético (1,2%).

As contagens de contrações da parede abdominal seguidas de extensão dos membros posteriores (KOSTER et al., 1959), foram iniciadas imediatamente após a injeção e permaneceu por um período de 30 minutos. O padrão de contorção abdominal estabelecido para contagem foi o aparecimento de fortes contrações abdominais, alongamento de todo o corpo do animal, seguido pelo alongamento dos membros posteriores e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontra. Teste mais detalhado foi realizado com a partição de SGAc nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg, utilizando a metodologia descrita anteriormente (Figura 4 e 5).



**Figura 4.** Teste de contrações abdominais por ácido acético do extrato/partições de *S. grazielae*.



**Figura 5.** Esquema do teste de contrações abominais por ácido acético de SGAc nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg de *S. grazielae*.

#### 2.5.4 Modelo da formalina

Este modelo foi utilizado para avaliação da dor inflamatória e não inflamatória (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Injetou-se sob a pele da superfície plantar de uma das patas traseiras 0,02 mL de uma solução de formalina a 2,5%. A morfina, o veículo (solução de DMSO a 5%) e a amostra SGAc nas concentrações 10, 50 e 100 mg/kg, foram administrados por via oral 1 hora antes da injeção da solução de formalina. Posteriormente, mediu-se o tempo (em segundos) que o animal permaneceu lambendo a pata em que foi administrada a solução. A medida do tempo foi realizada em duas fases: a primeira neurogênica, entre 0 e 5 minutos após a injeção da formalina e a segunda fase inflamatória, entre 15 e 30 minutos após a injeção. A primeira fase ocorre devido ao efeito direto da formalina e de mediadores inflamatórios pré-formados sobre o nociceptor, já a segunda fase é decorrente da liberação de mediadores inflamatórios pós-formados, que irão atuar nas terminações nervosas livres (Figura 6).



**Figura6.** Esquema avaliação da dor inflamatória e não inflamatória por formalina da partição SGAc.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade acariciada em Larvas de *R. microplus*

O teste realizado do extrato metanólico (SGM) e as frações diclorometano (SGD), acetato de etila (SGAc), butanólico (SGB) e residual (SGR) não apresentaram mortalidade frente as larvas no carrapato *R. microplus*, uma vez comparado o resultado do número de larvas mortas com as do controle não apresentou diferença.

Não há descrição na literatura de teste carrapaticidas do gênero *Simira*, mas Chungsamarnyart e Jansawan (1993) constataram que o extrato aquoso da espécie vegetal de *Acmella oleracea* não apresentou atividade sobre larvas de *R. microplus*, em quanto Castro e colaboradores (2014) atribuíram uma maior atividade do extrato hexânico a espécie estudada, quando comparado aos extratos aquoso e etanólicos (CHUNGSAMARNYART et al., 1991; CHUNGSAMARNYART e JANSAWAN, 1993). Assim pode-se propor que substâncias apolares, extraídas da fração hexânica, apresentam uma maior atividade frente às larvas do carrapato *R. microplus*.

Frente a isso, a ausência de atividade acariciada das frações testadas de *S. grazielae* pode ser justificada pela média a alta polaridade das amostras testadas.

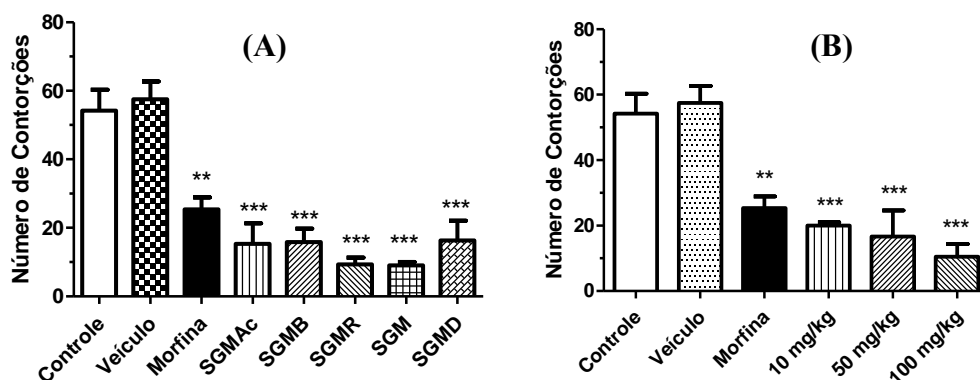
#### 3.2 Atividade da enzima tirosinase

Os testes realizados das frações acetato de etila (SGAc), butanólica (SGB) e do alcaloide indólico monoterpênico glicosilado (Ofiorina B) de *S. grazielae*, mostraram que esses não foram capazes de ativar ou inativar a ação oxidante da enzima tirosinase na L-DOPA, ou seja, não apresentaram atividade frente a essa enzima.

A ausência dessa atividade biológica pode ser justificada pela inexistência de metabólitos capazes de atuar nessa enzima ou o sinergismo entre elas, no caso das partições, pode ter anulado um possível efeito.

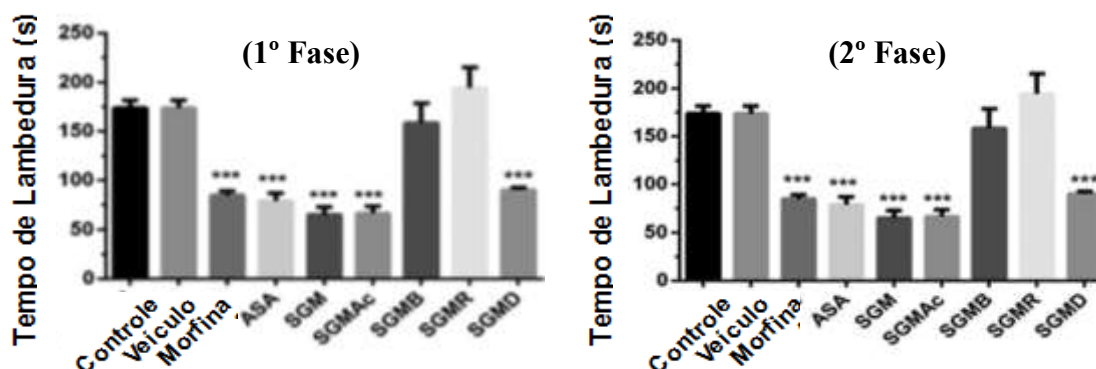
#### 3.3 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

No teste de contorção induzida pelo ácido acético, o camundongo controle produziu 54,2 ( $\pm 6,1$ ) contorções em um período de 30 minutos. O extrato metanólico e as partições de *S. grazielae* inibiram as contorções aproximadamente em: 83% (SGM, 9,0  $\pm 2,0$  contorções), 72% (SGAc, 15,3  $\pm 6,0$  contorções), 71% (SGB, 15,8  $\pm 3,2$ ), 83% (SGR, 9,3  $\pm 1,4$ ) e 70% SGD-16,3  $\pm 2,3$ ) (Figura 7A). Doses aplicadas de 10, 50 e 100 mg / kg de SGAc reduziram a contorção em aproximadamente 63% (20,0  $\pm 1,4$  contorções), 69% (16,6  $\pm 3,6$  contorções) e 81% (10,5  $\pm 3,3$  contorções), respectivamente (Figura 7B).



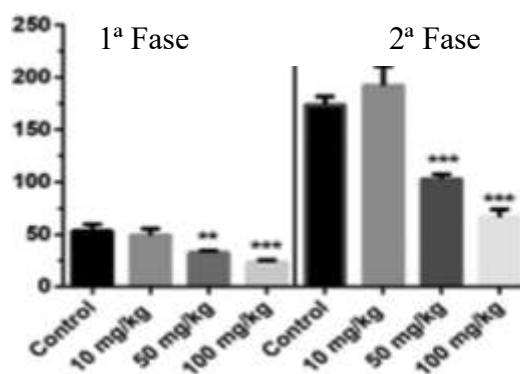
**Figura 7.** Efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominal (A) do extrato metanólico de *S. grazielae* e suas partições (B) partição de acetato de etila com doses crescentes.

No teste de formalina a injeção intraperitoneal de 2,5% formalina produziu no tempo em segundos de lambertura dos camundongos de  $53,2 \pm 6,3s$  (primeira fase) e  $173,9 \pm 7,8s$  (segunda fase). O pré-tratamento com o **SGM** e **SGAc** reduziu o tempo de lambertura nas duas fases, enquanto o **SGD** apenas inibiu a segunda fase. A **SGM** apresentou inibição de 68% ( $17,2 \pm 2,2s$ ) e **SGAc** 56% ( $23,5 \pm 1,9s$ ) no tempo de lambida na primeira fase, e na segunda fase, **SGM** apresentou 63% ( $65,0 \pm 8,2s$ ), **SGAc** 62% ( $66,6 \pm 7,9 s$ ) e **SGD** 48% de inibição ( $90,3 \pm 2,3 s$ ) na dose de 100 mg / kg (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito antinociceptivo do extrato metanólico e das partições de *S. grazielae* no modelo de formalina na primeira e segunda fase. (morfina (5,01 mg/kg), Ácido Acetilsalicílico (ASA - 100 mg/kg).

No tratamento em concentrações diferentes de **SGAc**, o efeito inibitório foi observado na primeira e segunda fases, apenas nas doses de 50 e 100 mg/kg (Figura 9). Na primeira fase, a **SGAc** induziu 39% ( $32,5 \pm 2,1s$ ) e 56% ( $23,5 \pm 1,9s$ ) de inibição nas doses de 50 e 100mg/kg, respectivamente. Na segunda fase, a **SGAc** induziu inibição de 41% ( $102,8 \pm 4,6 s$ ) e 62% ( $66,6 \pm 7,9 s$ ) nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. A morfina (5,01 mg/kg) inibiu o número de lambidelas em ambas as fases (1ª Fase -  $33,5 \pm 4,6$  e 2ª Fase -  $84,8 \pm 4,2 s$ ). O ácido acetilsalicílico (100 mg/kg) reduziu o número de lambidas somente na segunda fase ( $79,0 \pm 8,0s$ ).



**Figura 9.** Efeito antinociceptivo da partição em acetato de etila de *S. grazielae* no modelo de formalina na primeira e segunda fase nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg.

O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético é utilizado na avaliação dos efeitos antinociceptivos. O ácido acético induz inflamação na cavidade abdominal, com ativação de nociceptores (SANCHEZ-MATEO et al., 2006). A administração de ácido acético estimula a liberação de mediadores como substância P, bradicinina, prostaglandinas e citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), ativando nociceptores e neurônios periféricos (BUKHARI et al., 2013). O extrato metanólico de *S. grazielae* e suas partições, e diferentes



doses de partição de acetato de etila inibiram o número de contorções, mostrando que elas apresentavam uma atividade antinociceptiva.

Os resultados do teste da formalina mostraram que **SGM** e **SGAc** (100 mg/kg), inibiram as duas fases do teste, demonstrando uma possível atividade antinociceptiva central. Enquanto o **SGD** apresentou efeito apenas na segunda fase, sugerindo efeito antinociceptivo periférico, possivelmente devido à sua atividade anti-inflamatória.

Estudos fitoquímicos do gênero *Simira* (BOLZANI et al., 2001) e da espécie (apresentados no Capítulo I) mostram presença de alcaloides e cumarinas, compostos que podem justificam os resultados positivos frente as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em todas as partições testadas.

#### 4. CONCLUSÃO

Os ensaios biológicos mostraram resultados significativos que assinalaram as frações mais promissoras para estudos futuros. Os resultados obtidos na avaliação antinociceptiva e anti-inflamatória podem ser atribuídos aos alcaloides, principalmente os derivados da serotonina presentes na espécie de *S. grazielae*, que segundo a literatura possuem efeitos nesse tipo de sistema. O teste acaricida e da enzima tirosinase não apresentaram atividade, isso pode ser atribuído à ausência de metabólitos responsáveis por tais atividades ou até mesmo a pela aplicação das técnicas metodológicas inadequadas para o tipo de material, como a polaridade das frações e as concentrações.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M. A. Z.; ROCHA, C. M. B. M.; FACCINI, J. L. H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, p. 194-201, 2011a.
- AMARAL, M. A. Z.; ROCHA, C. M. B. M.; FACCINI, J. L. H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, p. 148-154, 2011b.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos **BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq, 2007.
- BARRETT, C. B.; LYBBERT, T. J. Is bioprospecting a viable strategy for conserving tropical ecosystems? **Ecol. Econ.**, v. 34, p. 293-300, 2000.
- BOLZANI, V. S.; JOVEM, M. C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAUJO, R. A.; SILVA, D. H. Metabólitos secundários de espécies de plantas brasileiras de *Rubiaceae*: significância quimiotaxonômica e biológica. **Res. Recente Dev. Phytochem.**, v. 5, p. 19-31, 2001.
- BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D. de; BARBOSA, C. da S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.
- BOTTCHER, T.; PITSCHIEDER, M.; SIEBER, S. A. Natural products and their biological targets: proteomic and metabolomic labeling strategies. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 49, n. 15, p. 2680-2698, 2010.
- BUKHARI, I. A.; PIVAC, N.; ALHUMAYYD, M. S.; MAHESAR, A. L.; GILANI, A. H. O efeito analgésico e anticonvulsivante da piperina em camundongos. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 64, p. 789-794, 2013.
- CAMPOS, R. N. S.; BACCI, L.; ARAÚJO, A. P. A.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, G. R. A.; RONEI, M. N. B. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. **Arch. Zootec.**, v. 61, p. 67-78, 2012.
- CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitol. Res.**, v. 113, p. 3697-3701, 2014.
- CHANG, TE-SHENG. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

CHUNGSAMARNYART, N.; JANSAWAN, W. Acaricidal effect of practical crude-extracts of plants against tropical cattle tick (*Boophilus microplus*). **Kasetsart J.**, v. 27, p. 57-64, 1993.

CHUNGSAMARNYART, N.; JIWAJINDA, S.; JANSAWAN, W. Acaricidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*Boophilus microplus*). **Kasetsart J.**, v. 25, p. 90-100, 1991.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Brit. J. Pharmacol.** v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morfíne, merepidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** v. 4, p.161-174, 1977.

DUKE, S. O.; PAUL, R. N.; LEE, S. M. Biologically active natural products – Potencial use in agriculture. In: PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against catle-tick (*Boophilus microplus*). **J. Brazil. Chem. Soc.**, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. A inflamação crônica: Importância da NOD2 e NALP3 na geração de interleucina-1 $\beta$ . **Clin. Exp. Immunol.** v. 147, p. 227-235, 2007.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **HV**, v. 27, p. 1-7, 2007.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **HV**, v. 23, p. 53-56, 2004.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S., GOIS; R. W., DA S.; DAEMON, E.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from on larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitol. Res.**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, 2012.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; CANCEADO, P. H. D. Reassessment of economic impact by cattle parasites in Brazil. **Rev. Brasil. Parasitol. Vet.**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p.103-114, 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI. Involvement of vaniloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, v. 69, p. 2911- 2919, 2001.

KARIOTI, A.; PROTOPAPPA, A.; MEGOULAS, N.; SKALTSA, H. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 15, p. 2708-2714, 2007.

KEMP, E. H.; GAWKRODGER, D. J.; WATSON, P. F.; WEETMAN, A. P. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein- 2 (TRP-2). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 109, p. 495-500, 1997

KHAN, K. M.; MUGHAL, U. R.; KHAN, M. T. H.; ULLAH, Z.; PERVEENB, S.; CHOUDHARY, M. I. Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure–activity relationships. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 14, p. 6027-6033, 2006.

KISS, T.; CADAR, D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Vet. Parasitol.**, v. 187, p. 357-366, 2012.

KLAFKE, G. M. **Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas**. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABO, M. P. J.; KLAFKE, G. M. (Eds.). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET. 2008. p. 81-105.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412, 1959.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo. UNIFESP/EPM, 2007. 144p.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animals models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LOBO, P. L. D.; FONTELES, C. S. R.; CARVALHO, C. B. M.; NASCIMENTO, D. F.; FONSECA, S. G. C.; JAMACARU, F. V. F.; MORAES, M. E. A. Dose-response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 551-556, 2011.

MACRINI, D. J.; SUFFREDINI I. B.; VARELLA A. D., YOUNES, R. N.; OHARA, M. T. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 2, 2009.

MANI, I.; SHARMA, V.; TAMBOLI, I.; RAMAN, G. Interaction of melanin with proteins - The importance of an acidic intramelanosomal pH. **Pigm. Cell. Res.**, v. 14, p. 170-179, 2001.

MATIAS, J.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. **Classificação, distribuição geográfica, ciclo biológico e importância econômica das principais espécies de carapatos no Brasil**. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas. Campo Grande: Embrapa. 2013. p. 1-13.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. da; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. **Na. Bras. Dermatol.**, v. 84, p. 623-635, 2009.

MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JR, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. O. S.; FAZZA, A. P.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitol. Res.**, v. 111, p. 1295-1300, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OKOMBI S.; RIVAL D.; BONNET S.; MARIOTTE A. M.; PERRIERB E.; BOUMENDJEL A. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, n. 8, p. 2252-2255, 2006.

PASQUET, V.; MORISSET, P.; IHAMMOUINE, S.; CHEPIED, A.; AUMAILLEY, L.; BERARD, J. B., SERIVE, B.; KAAS, R.; LANNELUC, I.; THIERY, V. et al. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 819-831, 2011.

PATIL, S. S.; ZUCKER, M. Potato phenolases. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 3938-3943, 1965.

PEREIRA, M. C. Introdução. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. (eds) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. São Paulo: MEDVET. 2008. p.1-5.

SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; BONKANKA, C. X.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; RABANAL, R. M. Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios analgésicos e tópicos do *Hypericum reflexum* L. fil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, p. 1-6, 2006.

SANTOS, C. M.; SANCHES, M. N. G.; S. A. C. D.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; MARINHO, B. G. Participation of cytokines, opioid, and serotonergic systems on antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Simira grazielae* peixoto (Rubiaceae). **Pharmacogn. Res.** v. 11, p. 51-59, 2019.

SANTOS, G.C; FERNANDES, R.D; BARROS, T.R; ABREU HDOS S.; SUZART, L.R.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; MARINHO, B.G. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the methanolic extract from the stem bark of *Lophanthera lactescens*. **Planta Med.** v.81, p.1688-96, 2015.

SCHMITT EK, MOORE CM, KRASTEL P, PETERSEN F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 15, n. 4, p. 497-504, 2011.

SEO, S. Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tytosinase: recent prospects. **J. Agr. Food Chem.**, v. 51, p. 2837-2853, 2003.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). **B. Entomol. Res.**, v. 53, p. 563-578, 1962.

TJOLSEN, A.; O. G. BERGE; S. HUNSKAAR; J. H. ROSLAND; K. HOLE. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** v. 51, p. 5-17, 1992.

TSALA, D. E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAN, S. Natural wound healing and bioactive natural products. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 532-560, 2013.

UJANG, Z. B.; SUBRAMANIAM, T.; DIAH, M. M.; WAHID, H. B.; ABDULLAH, B. B.; RASHID, A. H. B. A.; APPLETON, D. Bioguided Fractionation and Purification of Natural Bioactives Obtained from *Alpinia conchigera* Water Extract with Melanin Inhibition Activity. **J. Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, p. 265-272, 2013.

WADLEIGH, D. J.; REDDY, S. T.; KOPP, E.; GHOSH, S.; HERSCHMAN, H. R. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 6259-6266, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

O estudo fitoquímico da espécie *S. grazielae* permitiu o isolamento e a identificação de dezoito (18) substâncias, sendo o Ácido desmetilisopauridiantoside (SGAc-6), inédita na literatura, e as substâncias 6'-*O*-vanilloilbarbutina (SGD-1B), Maxonina (SGD-2), mistura de triacilglicerídeos (SGD-3), 5-hidroxiendole-3-aldeído (SGAc-1), *trans-N-p*-coumaroil serotonina (SGAc-2A), *N*-feruloil serotonina (Moschamine)(SGAc-2B), *N*-cafeloil serotonina (SGAc-3B), *cis-N-p*-coumaroil serotonina (SGAc-4A<sub>z</sub>), *cis*-Moschamine (SGAc-4B<sub>z</sub>), Higarine (SGAc-4C), *N*-isoferuloil serotonina (SGAc-4D), Ofiorina A (SGB-2A), Ácido Estrictosidínico, (SGB-3) e o Estrictosidina (SGB-4), relatadas pela primeira vez no gênero. Foram isoladas e identificados ainda os alcaloides *N*-acetil-serotonina (SGD-1A), Ofiorina B (SGB-1) e a Harmana (SGAc-5) que embora já relatados na espécie em trabalhos anteriores, estão sendo isolados no presente estudo em frações diferentes das já registradas.

Através da utilização da técnica de desreplcação por espectrometria de massas (EM/EM-ESI) foi possível propor a presença cinquenta e sete (57) metabólitos: Hidroxi-harmana (1), Ofiorina B (2), Ofiorina A (3), Harmana (4), isômeros da Harmana A (5-8), Ácido Lialosídico (9), Lialosídeo (10), Ácido Estrictosidínico (11), Ác. 3-*epi*-Estrictosidínico (12), Estrictosidina (13), Ácido desmetilisopauridiantosídico (14), *N*-desmetil-correantósida (15), Estrictosamida (16) Derivado lactâmico da Antirrina glicosilada (17), Antirrina (18), Epímeros Antirrina (19-22), Antirrina glicosilada (23), Epímero Antirrina glicosilada (24), *N<sub>b</sub>*-metilantirrina (25 e 56), 3,5,6,14 Tetradehidro Antirrina (26), 2-(1-hidroximetil-2propenil)-1,2,3,4,6,7,12b-octahidro-4-oxoindole-[2,3- $\alpha$ ]-quinolizine (27), 15,20-didehidro Ioimbana (28), Estrictosidínico descarboxilado (29), 3,4-didehidro estrictosidina (30), Camptotecina-5-glicopiranosídeo (31), *N-p*-coumaroil serotonina (32), Isômero *N-p*-coumaroil serotonina (33), *N-p*-metoxi cinamoil serotonina (34), *N-p*- cafeloil serotonina (35), *N-p*-feruloil serotonina (36), Derivado do Hirsutasida D (37 e 51), Epímero derivado do Hirsutasida D (38), Ácido 3,4-didehidro Estrictosidínico (39), 5,6-didehidro Antirrina glicosilado (40), *N<sub>b</sub>*-metil Antirrina glicosilada (41), Hirsutasida D (42), Derivado Ioimbana triglicosilada (43 e 44), Isômero Derivado Ioimbana triglicosilada (45-48), *N<sub>b</sub>*-metil-5,6-didehidro Antirrina (49), Matadina (50), Ác.lialosídico-strictosidínico desglicosilado (52), Dioctadecilamina (53), Dinonadecilamina (54), 5,6-didehidro Antirrina (57).

A desreplcação permitiu um estudo de maneira mais rápida, sensível, com o mínimo de preparo de amostras e o mínimo consumo de solvente. Os metabólitos propostos foram quase na totalidade de alcaloides indólicos, dos quais 20 estão sendo relatados pela primeira vez na literatura e 5 já tinham sido relatadas no gênero *Simira*. A classe metabólita está coerente com as substâncias relatadas nas outras espécies do gênero *Simira* e na família Rubiaceae.

As espécies de *Simira* estudadas até o momento, sob o ponto de vista fitoquímico, relataram a presença da Harmana um alcaloide indólico  $\beta$ -carbolínico. Soma-se a estes resultados, o fato de ter sido isolado e identificado este alcaloide na espécie *S. grazielae* no presente trabalho. Esses resultados corroboram para a afirmação deste alcaloide como marcador taxonômico do gênero

Os alcaloides Ofiorina B e Harmana foram isolados em grande quantidade e em diversas frações, bem como se encontraram majoritários nos picos dos cromatogramas (CL-EM) das frações analisadas na desreplcação, podendo se propor serem metabólitos predominantes dessa espécie.

Apesar de trabalhos já publicados relatarem potenciais atividades farmacológicas do gênero *Simira*, os testes realizados da espécie *S. grazielae* frente à atividade acaricida sobre as larvas do *R. microplus* nas frações SGD, SGAc SGB, SGR, e sobre a ação na enzima tirosinase [Ofiorina B e as partições (SGAc e SGB)], não apresentaram resultados significativos. Já o teste anti-inflamatório e antinociceptivo realizado nas frações da madeira



de *S. grazielae* mostraram ter ação nesses sistemas e esse efeito pode ser atrelado à presença dos alcaloides derivados da serotonina e das cumarinas relatadas.

## 7. BIBLIOGRAFIA GERAL

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p.131-134, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. "Natural products: A continuing source of novel drug leads". **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 3670, 2013.

GAUDENCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, p. 779, 2015.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed., 2001. p. 13-26.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W-T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nat. Meth.**, v. 6, p. 596-599, 2009.

PALMA, C. M.; PALMA, M. S. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. **Cienc. Cult.**, v. 64, p.22, 2012.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.