



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de química de Araraquara - Departamento de química orgânica

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Marcos Marçal Ferreira Queiroz

**Identificação dos inibidores de acetilcolinesterase em
Tetrapteryx mucronata Cav. (Malpighiaceae) e comparação
quali e quantitativa dos derivados triptamínicos presentes na
espécie em estudo e Ayahuasca**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani

Coorientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara - SP

2013

Marcos Marçal Ferreira Queiroz

**Identificação dos inibidores de acetilcolinesterase em
Tetrapteryx mucronata Cav. (Malpighiaceae) e comparação
quali e quantitativa dos derivados triptamínicos presentes na
espécie em estudo e Ayahuasca**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
– UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani

Coorientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

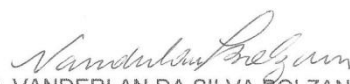
- Q3i Queiroz, Marcos Marçal Ferreira
 Identificação dos inibidores de acetilcolinesterase em
Tetrapteryx mucronata Cav. (Malpighiaceae) e comparação
quali e quantitativa dos derivados triptamínicos presentes na
espécie em estudo e Ayahuasca / Marcos Marçal Ferreira
Queiroz. – Araraquara : [s.n.], 2013
 179 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
 Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
 Coorientador: Ian Castro-Gamboa
1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Alcaloides.
 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

MARCOS MARÇAL FERREIRA QUEIROZ

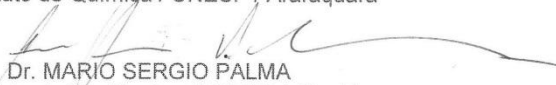
Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Química.

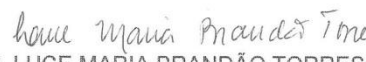
Araraquara, 23 de setembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA


Profª. Drª. VANDERLAN DA SILVA BOLZANI
Instituto de Química / UNESP / Araraquara


Profª. Drª. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara


Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA
Instituto de Biociências / UNESP / Rio Claro


Drª. LUCE MARIA BRANDÃO TORRES
Instituto de Botânica / IBT / São Paulo


Prof. Dr. NORBERTO PEPORINE LOPES
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto

Dados curriculares

Dados Pessoais:

Nome: Marcos Marçal Ferreira Queiroz.

Filiação: Marçal de Queiroz Paulo e Carmen Lúcia Ferreira Queiroz

Data e local de Nascimento: 14/05/1982, Campinas/SP – Brasil.

E-mail: marcosmfq@hotmail.com

Formação acadêmica:

2009 - atual

Doutorado em Química.

Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil

Título: Uso da espectrometria de massas e da ressonância magnética nuclear para avaliação metabólica & Identificação de protótipos inibidores de AChE em *Tetrapteryx mucronata* Cav. (Malpighiaceae)

Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

2007 - 2009

Mestrado em Química.

Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil

Título: Detecção e caracterização dos constituintes micromoleculares de *Ocotea paranapiacabensis* e *Aniba firmula* (Lauraceae) – Utilização de técnicas hifenadas e de desreplicação como ferramenta para identificação de substâncias bioativas.

Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES

2002 - 2006

Graduação em Bacharelado em Química

Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Título: Síntese e caracterização de pigmentos de cromatos e sua aplicação em estruturas cerâmicas

Orientador: Prof. Dr. João Bosco Lucena de Oliveira

Atuação acadêmica

- 05/2012-03/2013** Estágio de doutorado “sanduíche” na Universidade de Genebra - Suíça.
Supervisor: Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender.
Section des sciences pharmaceutiques, Laboratoire de Phytochimie et Produits Naturels Bioactifs, Genebra, Suíça
- 02/2011-06/2011** Bolsista didático da disciplina de química orgânica II - experimental. *Ministradas para os cursos de farmácia e química licenciatura.*
Carga horária: 8 h semanais
Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil
- 08/2010-12/2010** Estágio a docência na disciplina de química orgânica II, sob supervisão do Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa. *Ministradas para os alunos do curso de química de bacharelado e licenciatura.*
Carga horária: 4 h semanais
Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil
- 07/2009-10/2009** Estágio na Universidade de Santiago de Compostela-Espanha.
Determinação de configuração absoluta por RMN e DC.
Supervisor: Prof. Dr. Ricardo Rigueira/José M. Seco
Departamento de Química Orgânica, Faculdade de química, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

Produção bibliográfica

Artigos:

Queiroz M.M.F., Queiroz E.F., Marti G., Marcourt L., Bolzani V., Wolfender J.L. Alkaloid content of the stem bark of *Tetrapteryx mucronata* Cav, Malpighiaceae: A specie used in the ayahuasca preparation. J. Ethnopharmacol. 2013. submetido.

Queiroz M.M.F., Queiroz E.F., Zeraik M.L., Marcourt L., Cuendet M., Bolzani V.S., Wolfender J.L. Acetylcholinesterase inhibitors from stem bark of *Tetrapteryx mucronata* Cav. Malpighiaceae. 2013, *in preparation*.

Queiroz M.M.F., Queiroz E.F., Zeraik, ML, Marcourt L., Cuendet M., Bolzani V., Wolfender J.L. Antifungals and Acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). 2013, *in preparation*.

Coqueiro A., Regasini L.O., Skrzek S.C.G., Queiroz M.M.F., Silva, D.H.S., Bolzani V.S. Free Radical Scavenging Activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). *Molecules*, v. 18, pg. 2376-2385, 2013.

Apresentação de Trabalho:

Queiroz M.M.F., Queiroz E.F., Marti G., Marcourt L., Gamboa I.C., Bolzani V., Wolfender J.L. *Phytochemical investigations of the stem bark of Tetrapteryx mucronata* Cav, Malpighiaceae: A specie used in the ayahuasca preparation, 2013. Apresentação oral no 44th World Chemistry Congress-IUPAC: Istambul, Turquia.

Queiroz M.M.F., Gamboa I.C., Bolzani V.S. *Detection and characterization of micromolecular constituents from Banisteriopsis variabilis* - Malpighiaceae (B. Gates) using HPLC-DAD-HRMS combined with in silico techniques, 2012. Apresentação de pôster no VIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA: Ilhéus, Bahia, Brazil.

Queiroz M.M F., Bolzani V.S. *Direct flow injection electrospray tandem mass spectrometry for the characterization of polyphenolic compounds in Banisteriopsis variabilis* (Malpighyaceae) (B. Gates), 2011. Apresentação de poster no 3rd BCNP, *Brazilian Chemistry of Natural Products*: Outro Preto, Minas Gerais, Brazil

Queiroz M.M.F., Coqueiro A., Gamboa I.C., Young M.C.M., Torres L.M.B., Bolzani V.S. *Cyclobutane dimers from Aniba firmula* (Lauraceae) (Nees&Mart), 2009. Apresentação oral no 2nd BCNP, *Brazilian Chemistry of Natural Products*: Águas de São Pedro, São Paulo, Brazil.

Queiroz M.M.F., Matos A.T.S., Roperio D.R., Pauletti P., Bolzani V.S., Gamboa I.C. *Detection and characterization of major micromolecular constituents from species of cerrado and atlantic rainforest using HPLC/HRMS/DAD combined with in silico technique: the case of Strychnos*

brasiliensis, 2007. Apresentação de poster no 1st. BCNP, *Brazilian Chemistry of Natural Products*: Águas de São Pedro, São Paulo, Brazil.

**“Dedico esse trabalho a minha família,
sem ela nada disso seria possível”**

Agradecimentos

Em especial a professora Vanderlan da Silva Bolzani por ter me aceitado como aluno de pós-graduação, por sua orientação e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses 7 anos, que vão além da esfera acadêmica.

Ao professor Ian Castro-Gamboa, por sempre estar disposto a transmitir seus valiosos ensinamentos e, sobretudo, por sua valiosa e inestimável amizade.

Aos professores Jean Luc-Wolfender e Emerson F. Queiroz (Universidade de Genebra-Suíça), pela grandiosa experiência de passar 11 meses em seus laboratórios. Obrigado por todo companheirismo e ensinamentos transmitidos.

A Aline Coqueiro, que fez parte da minha vida durante os sete anos que passei em Araraquara. Obrigado pelos momentos de descontração, amizade, companheirismo e de discussão também.

Aos grandes amigos que fiz durante essa jornada e que vão ficar para toda vida: Marcos Pivatto, Amanda, Denise Roperio, José Rufino (“a lenda”) Zé Rena, Lima Netis, Daniel Rinaldo, João Marcos, Andreinha, Marília Valli, Maria Luiza Zeraique (Malú), Magela, Cristiano Funari, Luís Regasini, Glenda, Phanuel, Néia, Fernando Cotinguiba, Vaninha, Rose (*in memoriam*), Lidiane, Pilon, Rafael “Frera”, Piá, Rodrigo e Letícia Sequinel.

Ao botânico Rafael Almeida pela identificação da espécie.

“Pour tous mes amis de l'Université de Genève, merci pour tous camaraderie, essentielles lorsque vous êtes de l'autre côté de l'Atlantique”.

A FAPESP pelo apoio financeiro e a bolsa concedida.

Finalmente, a TODOS os amigos, funcionários do NuBBE e do Instituto de química – UNESP Araraquara, pela inestimável amizade e companheirismo,

que me proporcionaram um ambiente agradável durante a realização desse trabalho.

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo a busca de compostos, que inibem *in vitro* a enzima acetilcolinesterase (AChE), úteis para o tratamento de doenças neuro-degenerativas crônicas como o mal de Alzheimer. Neste contexto, a espécie *Tetrapteryx mucronata* Cav. (Malpighiaceae) foi selecionada no banco de extratos do NuBBE, devido ao resultado positivo para a inibição *in vitro* da AChE. Na literatura, esta espécie também é relatada como uma das espécies usadas em menor escala na preparação da bebida Ayahuasca. Dessa forma, foi realizada a análise fitoquímica dos extratos EtOH e aquoso de *T. mucronata*. Após obtenção do perfil químico dos referidos extratos através da técnica CLAE-DAD, observou-se a presença de taninos, substâncias que interferem nas análises cromatográficas de identificação e isolamento dos demais constituintes do extrato. Para remoção destes interferentes, foram utilizadas as técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase sólida (SPE) com poliamida como fase estacionária. A fração obtida livre de taninos (P6) foi analisada pelas técnicas CLAE-DAD-EM e UPLC-TOF-EM, a fim de identificar os constituintes químicos presentes nesta fração previamente descritos na literatura para a família Malpighiaceae. Esta metodologia permitiu a identificação do flavonol catequina. Como não foi possível identificar os demais constituintes da fração P6, esta foi submetida a purificação em larga escala, utilizando a técnica de MPLC-UV. As frações obtidas por este procedimento foram analisadas por técnicas espectrométricas e como resultado foi possível identificar e caracterizar 17 compostos destes, 5 novos produtos naturais: dois alcaloides, 5'-hidroxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1*H*-indol-3-il)1,2-propanodiol]triptamina (**6**) e 5'-hidroxi-3'-etil-*N,N*-dimetilamina-2'-[3-(3-(1*H*-indol-3-il)1,2-propanodiol]triptamina (**7**) e três derivados de fenantreno 2,6-diidroxí-9,10-diidrofenantreno (**13**), 2,6-diidroxifenantreno (**14**) e 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**). 12 compostos foram descritos pela primeira vez na família Malpighiaceae: três alcaloides triptamínicos: bufotenina (**1**), 5-metoxi-*N*-metiltriptamina (**2**) e 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**), um alcaloide β -carbolínico: 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**), quatro derivados de ácidos aromáticos: ácido vanílico (**5**), ácido-*trans*-metoxicinâmico (**8**), ácido-*cis*-metoxicinâmico (**9**) e ácido salicílico (**10**), uma lignana: lioresinol (**11**), três amidas: moupinamida (**12**), grossamida (**15**) e canabissina F (**16**). Os compostos isolados foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Os compostos que apresentaram maior atividade foram os alcaloides triptamínicos: **1**, **2**, **3**, **6** e **7**, com Cl_{50} em torno de 10 μ mol/L. Dentre os compostos isolados, dois alcaloides triptamínicos, bufotenina e 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina, são substâncias controladas pelos Estados Unidos e outros países, considerados compostos alucinógenos proibidos. Por esse motivo, foi desenvolvido um método utilizando a técnica CLAE-ESI-EM/EM para a quantificação dos alcaloides **1**, **2**, **3** e **4** no extrato aquoso do lenho de *T. mucronata*. Os resultados obtidos neste estudo explicam o uso desta espécie como ingrediente ativo (alucinógeno) utilizado na preparação do Ayahuasca.

Palavras-chave: Ayahuasca. *Tetrapteryx mucronata*. alcaloides. acetilcolinesterase. CLAE-ESI-EM/EM.

Abstract

The present work aims at seeking compounds that inhibit *in vitro* the enzyme acetylcholinesterase (AChE), and might be useful for the treatment of chronic neuro-degenerative diseases such as Alzheimer's. In this context the species *Tetrapteryx mucronata* Cav. (Malpighiaceae) was selected from NuBBE's bench of extract to be the focus of this work, due to the positive result for the *in vitro* inhibition of AChE conducted prior to this study. In the literature this species is also reported as a species used a lesser extent in the preparation of Ayahuasca. Thus, it was performed the phytochemical analysis of EtOH and aqueous extracts of *T. mucronata*. After analysis by HPLC-DAD of these extracts, was observed the presence of polymeric compounds (tannins). Liquid-Liquid Extraction (LLE) and Solid Phase Extraction (SPE) using polyamide as stationary phase were used to remove these interferents. The tanin free fraction (P6) was analyzed by HPLC-DAD-MS and UPLC-TOF-MS techniques in order to identified chemical constituents present in this fraction which had been previously described in other species of Malpighiaceae family. This methodology led to the identification of catechin. As almost all the compounds present in the fraction could not be identified by the hyphenated techniques mentioned above, the P6 fraction was subjected to large-scale purification steps using MPLC-UV. The fractions obtained by this procedure were analyzed and as results were thus identified 17 compounds, 5 of them new natural products: two alkaloids, 3-(3-(2-aminoethyl)-5-hydroxy-1*H*-indol-2-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)propane-1,2-diol (**6**) and 3-(3-(2-*N,N*-dimethyl-aminoethyl)-5-hydroxy-1*H*-indol-2-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)propane-1,2-diol (**7**); three phenanthrene derivatives 2,6-dihydroxy-9,10-dihydrophenanthrene (**13**), 2,6-dihydroxifenantrene (**14**) and 7-methyl-2,6-dihydroxifenantrene (**17**). 12 compounds were described for the first time in Malpighiaceae family: three tryptamine alkaloids: bufotenin (**1**), 5-methoxy-*N*-methyltryptamine (**2**) and 5-methoxy-bufotenin (**3**); one β -carboline alkaloid: 2-methyl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (**4**), four aromatic acids derivatives: vanillic acid (**5**) *trans*-methoxycinnamic acid (**8**) *cis*-methoxycinnamic acid (**9**), salicylic acid (**10**); one lignan: lioresinol (**11**); three amides: moupinamide (**12**) grossamide (**15**) and canabissine F (**16**). The isolated compounds were evaluated for their potential to inhibit of the enzyme acetylcholinesterase. The most active compounds were the tryptamine alkaloids: **1**, **2**, **3**, **6** and **7**, with IC₅₀ around 10 μ mol/L. Among the compounds isolated, two triptamine alkaloids described, bufotenine and 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine, are controlled substances by the United States and other countries, considered prohibited hallucinogenic compounds. Therefore a HPLC-ESI-MS/MS method was developed for quantification of the alkaloids **1**, **2**, **3** e **4** in the aqueous decoction extract of the *T. mucronata* wood. The results obtained in this study explain the use of *T. mucronata* as active ingredient (hallucinogen) used in the preparation of Ayhuasca.

Keywords Ayahuasca. *Tetrapteryx mucronata*. Alkaloids. Acetylcholinesterase. HPLC-ESI-MS/MS.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Aloysius (Alois) Alzheimer e Auguste Deter, primeira paciente em que foi diagnosticada a doença de Alzheimer.	29
Figura 2 – Ilustração do mestre Raimundo Irineu e da bebida Ayahuasca.	36
Figura 3 - Ilustração da espécie <i>Psychotria viridis</i> e dos alcaloides indólicos <i>N</i> -metiltriptamina e <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (DMT) presentes nas folhas desta espécie.	37
Figura 4 - Ilustrações da espécie <i>Banisteriopsis caapi</i> e dos alcaloides β -carbolíneos presentes no cipó desta espécie.	38
Figura 5 - Reações que se sucedem ao ensaio de iAChE em CCD.	44
Figura 6 - Perfis comatográficos dos extratos TML Et (A) e TML Dec (B) do lenho de <i>T. mucronata</i> obtidos através da técnica de CLAE-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254, 280 e 366 nm.	51
Figura 7 - Comparação dos extratos EtOH (A) e aquoso (B) do lenho de <i>T. mucronata</i> por CLAE-DAD. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.	52
Figura 8 - Procedimento experimental e rendimentos obtidos para remoção de polifenóis poliméricos (taninos) do extrato TML Et através da técnica de extração líquido-líquido.	53
Figura 9 - Perfis cromatográficos CLAE-DAD das frações hidroalcoólica (A) e DCM (B), obtidas através da técnica de extração líquido-líquido. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.	54
Figura 10 - Perfil cromatográficos da fração obtida através da filtração do extrato EtOH com poliamida P6 como FE e EtOH como eluente. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.	55
Figura 11 - Comparação dos perfis cromatográficos do extrato TML Et (A) e da fração obtida através da filtração com poliamida utilizando EtOH e MeOH como eluentes (B). Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.	55
Figura 12 - Resultados da análise por CCD dos extratos TML Et, TML Dec e da fração P6 para Dragendorff (A) iAChE (B).	58
Figura 13 - Ilustração do procedimento experimental realizado para obtenção das regiões do perfil cromatográfico da fração P6 que possuem atividades de iAChE e resultado positivo para Dragendorff.	59

Figura 14 - Análise da fração P6 através da técnica CLAE-DAD-ESI-EM. Perfil cromatográfico da fração P6, espectros de UV e valores de m/z dos constituintes químicos detectados. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.	60
Figura 15 - Ilustração dos resultados obtidos através da técnica UPLC-TOF-EM da fração P6 nos modos positivo (A) e negativo (B). Condição cromatográfica, ver Tabela 4. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (120 x 2,1 mm d.i., 1,7 μ m). Equipamento Acquity UPLC-TOF-EM (Waters), fluxo 0,6 mL/min.	63
Figura 16 - Ilustração da estrutura química da catequina, metabólito detectado na fração P6 do lenho de <i>T. mucronata</i> através da técnica UPLC-TOF-EM.	64
Figura 17 - Ilustração da transposição das análises de CLAE da fração P6 analítico (100 μ g) para MPLC preparativo (8 g).	65
Figura 18 - Espectro de massas de alta resolução (UPLC-TOF-EM) para o composto presente na fração 8, identificado como o alcaloide bufotenina (1).	67
Figura 19 - RMN ^1H (500 MHz, D_2O) do alcaloide bufotenina (1).	68
Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,80-7,50), da bufotenina (1).	68
Figura 21 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,80-3,65), da bufotenina (1).	69
Figura 22 - Ampliação do mapa de contorno $g\text{COSY}$ (δ_{H} 2,4-3,7) da bufotenina (1).	69
Figura 23 - Ampliação do mapa de contorno $g\text{COSY}$ (δ_{H} 6,75-7,50) da bufotenina (1).	70
Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) da bufotenina (1).	70
Figura 25 - Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (500 MHz, D_2O) da bufotenina (1).	71
Figura 26 - Ampliação do mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (δ_{C} 20-60), da bufotenina (1).	71
Figura 27 - Ampliação do mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (δ_{C} 104-130), da bufotenina (1).	72
Figura 28 - Ampliação do mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (δ_{C} 98-154), da bufotenina (1).	72
Figura 29 - Estrutura do alcaloide 5-hidroxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (bufotenina, 1).	73
Figura 30 - Comparação dos espectro de RMN ^1H (500 MHz) das frações 8 (em D_2O), 18 e 23 (em $\text{DMSO}-d_6$).	74

Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução (UPLC-TOF-EM) para o composto presente na fração 18, identificado como o alcaloide 5-metoxi- <i>N</i> -metiltriptamina (2).	75
Figura 32 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide 5-metoxi- <i>N</i> -dimetiltriptamina (2).	75
Figura 33 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,2-4,0), do alcaloide 5-metoxi- <i>N</i> -dimetiltriptamina (2).	76
Figura 34 - Mapa de contorno gHSQC (δ_{C} 20-60), do alcaloide 5-metoxi- <i>N</i> -dimetiltriptamina (2).	76
Figura 35 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_{C} 95-1170) do alcaloide 5-metoxi- <i>N</i> -dimetiltriptamina (2).	77
Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 23, identificado como o alcaloide 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (3) .	78
Figura 37 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (3).	78
Figura 38 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 2,5-3,9), do alcaloide 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (3) .	79
Figura 39 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_{C} 20-60) do alcaloide 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (3).	79
Figura 40 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_{C} 140-165) do alcaloide 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (3).	80
Figura 41 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_{C} 140-165) do alcaloide 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina (3).	80
Figura 42 - Estruturas dos alcaloides triptamínicos isolados do lenho de <i>T. mucronata</i> .	81
Figura 43 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 43, identificado como o alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (4).	83
Figura 44 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (4).	83
Figura 45 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 6,50-7,25), do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (4).	84
Figura 46 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 2,2-3,8) do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (4).	84
Figura 47 - Estrutura do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (4) isolado do extrato EtOH do lenho de <i>Tetrapteryx mucronata</i> .	85
Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução da lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (11).	87
Figura 49 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (11).	87

Figura 50 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 3,6-4,35) da lignana (+)-lioniresinol-8'- α -O- β -D-xilanopiranosídeo (11).	88
Figura 51 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 1,3-3,5) da lignana (+)-lioniresinol-8'- α -O- β -D-xilanopiranosídeo (11).	88
Figura 52 – Estrutura da lignana (+)-lioniresinol-8'- α -O- β -D-xilopiranosídeo (11), isolada do lenho de <i>T. mucronata</i> .	89
Figura 53 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 204, identificado como a amida, moupinamida (12).	92
Figura 54 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da amida <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida) (12).	93
Figura 55 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,4-8,0) da moupinamida (12).	93
Figura 56 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,4-3,9) da moupinamida (12).	94
Figura 57 – Estrutura da amida, <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (moupinamida).	94
Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 252, identificado como a amida, grossamida (15).	96
Figura 59 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da grossamida (15).	96
Figura 60 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,4-8,4) da grossamida (15).	97
Figura 61 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,4-6,0) da grossamida (15).	97
Figura 62 – Estrutura da grossamida (15), isolada a partir do extrato EtOH do lenho de <i>T. mucronata</i> .	98
Figura 63 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 264, identificado como novo derivado de fenantreno, 7-metil-2,6-fenantrenodiol (17).	101
Figura 64 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno, 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	101
Figura 65 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 2,18-2,62), do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	102
Figura 66 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 7,05-8,40), do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	102
Figura 67 - Mapa de contorno gCOSY (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	103
Figura 68 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	103
Figura 69 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (δ_{C} 102-156) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	104

Figura 70 - Mapa de contorno gHSQC (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	104
Figura 71 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_c 101-134) gHSQC, do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	105
Figura 72 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	105
Figura 73 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 11,5-21,5) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	106
Figura 74 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 110-137) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	106
Figura 75 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 120-162) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	107
Figura 76 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 150-162) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (17).	107
Figura 77 – Estrutura do novo produto natural, 7-metil-2,6-diidroxifenantreno isolado do lenho de <i>T. mucronata</i> .	108
Figura 78 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido vanílico (5).	111
Figura 79 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_H 6,75-7,45) do ácido vanílico (5).	111
Figura 80 - Estrutura do ácido vanilínico (5).	112
Figura 81 – Espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração H-2, identificado como o alcaloide-5'-metoxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (6).	113
Figura 82 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide 6 .	114
Figura 83 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_H 6,40-7,85) do alcaloide 6 .	114
Figura 84 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_H 3,85-4,85) do alcaloide 6 .	115
Figura 85 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_H 1,90-3,10) do alcaloide 6 .	115
Figura 86 – Mapa de contorno gCOSY do alcaloide 6 .	116
Figura 87 – Ampliação mapa de contorno gCOSY (δ_H 6,4-7,9) do alcaloide 6 .	116
Figura 88 – Ampliação do mapa de contorno gCOSY (δ_H 3,0-4,9) do alcaloide 6 .	117
Figura 89 - Mapa de contorno gHSQC do alcaloide 6 .	117
Figura 90 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_c 34-74) do alcaloide 6 .	118
Figura 91 - Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_c 99-127) do alcaloide 6 .	118

Figura 92 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC do alcaloide 6 .	119
Figura 93 - Ampliação do mapa de contorno <i>g</i> HMBC (δ_c 100-154) do alcaloide 6 .	119
Figura 94 - Ampliação do mapa de contorno <i>g</i> HMBC (δ_c 100-142) do alcaloide 6 .	120
Figura 95 - Ampliação do mapa de contorno <i>g</i> HMBC (δ_c 25-145) do alcaloide 6 .	120
Figura 96 – Estrutura do novo alcaloide 5'-metoxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol] triptamina (6), isolado do lenho de <i>T. mucronata</i> .	121
Figura 97 – Comparação dos espectros de RMN ^1H dos alcaloides 6 e 7 .	123
Figura 98 – Espectro de massas de alta resolução do alcaloide 7 .	124
Figura 99 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) d do alcaloide 7 .	124
Figura 100 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_H 6,40-7,80) do alcaloide 7 .	125
Figura 101 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_H 2,0-4,8) do alcaloide 7 .	125
Figura 102 - Mapa de contorno <i>g</i> COSY do alcaloide 7 .	126
Figura 103 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> COSY (δ_H 6,3-7,7) do alcaloide 7 .	126
Figura 104 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> COSY (δ_H 2,9-4,9) do alcaloide 7 .	127
Figura 105 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> COSY (δ_H 1,0-3,5) do alcaloide 7 .	127
Figura 106 - Mapa de contorno <i>g</i> HSQC do alcaloide 7 .	128
Figura 107 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> HSQC (δ_c 99-127) do alcaloide 7 .	128
Figura 108 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> HSQC (δ_c 35-75) do alcaloide 7 .	129
Figura 109 - Mapa de contorno <i>g</i> HMBC do alcaloide 7	129
Figura 110 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> HMBC (δ_c 70-140) do alcaloide 7 .	130
Figura 111 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> HMBC (δ_c 108-152) do alcaloide 7 .	130
Figura 112 - Ampliação mapa de contorno <i>g</i> HMBC (δ_c 106-139) do alcaloide 7 .	131
Figura 113 – Estrutura do alcaloide 5'-metoxi-3'-etil-N,N-dimetilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (7).	131
Figura 114 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido <i>cis</i> -3-metoxi-4,5-metilenodioxo-cinâmico (8).	133

Figura 115 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 3,7-7,2) do ácido <i>cis</i> -3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (8).	134
Figura 116 - Estrutura do <i>cis</i> -3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (8).	134
Figura 117 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido <i>trans</i> -3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (9).	136
Figura 118 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 5,8-7,4) do ácido <i>trans</i> -3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (9).	136
Figura 119 - Estrutura do ácido <i>trans</i> -3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (9).	137
Figura 120 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido salicílico (10).	138
Figura 121 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,6-8,3) do ácido salicílico (10).	139
Figura 122 - Estrutura do ácido 2-hidroxibenzóico (ácido salicílico) (10).	139
Figura 123 - Comparação dos espectros de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) dos compostos 13 , 14 e 17 .	141
Figura 124 - Ampliação dos espectros de RMN ^1H (δ_{H} 6,5-8,5) dos compostos 13 , 14 e 17 .	141
Figura 125 – Espectro de massas de alta resolução de 13 , caracterizado como o derivado de fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno.	143
Figura 126 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	143
Figura 127 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,4-7,6) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	144
Figura 128 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,30-3,00) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	144
Figura 129 – Mapa de contorno gHSQC (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	145
Figura 130 – Ampliação do espectro de gHSQC (δ_{C} 25-30) do fenantreno, 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	145
Figura 131 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_{C} 106-131) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	146
Figura 132 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	146
Figura 133 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_{C} 25-140) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	147
Figura 134 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_{C} 30-160) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	147
Figura 135 – Estrutura do novo derivado de fenantreno, 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (13).	148

Figura 136 – Espectro de massa de alta resolução de 14 , caracterizado como o derivado de fenantreno, 2,6-diidroxifenantreno.	149
Figura 137 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	149
Figura 138 – Ampliação RMN ^1H (δ_{H} 6,9-8,5) do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	150
Figura 139 – Mapa de contorno gCOSY (500 MHz, DMSO- d_6), do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	150
Figura 140 – Ampliação do mapa de contorno gCOSY (500 MHz, DMSO- d_6) do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	151
Figura 141 - Mapa de contorno gHSQC (500 MHz, DMSO- d_6), do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	151
Figura 142 - Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_{C} 103-131) do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	152
Figura 143 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, DMSO- d_6), do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	152
Figura 144 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_{C} 106-158) do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	153
Figura 145 – Estrutura do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (14).	153
Figura 146 – Espectro de massa de alta resolução lignanamida canabisina F (16).	155
Figura 147 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da lignamida, cannabisina F (16).	155
Figura 148 - Ampliação RMN ^1H (δ_{H} 2,4-4,2) da amida cannabisina F (16).	156
Figura 149 - Ampliação RMN ^1H (δ_{H} 6,4-8,1) da amida cannabisina F (16).	156
Figura 150 - Estrutura da cannabisina F (16), isolada do lenho de <i>T. mucronata</i> (Malpighiaceae).	157
Figura 151 - Compostos isolados a partir do extrato EtOH do lenho de <i>T. mucronata</i> : 1 - bufotenina; 2 - 5-metoxi- <i>N</i> -metiltriptamina; 3 - 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina; 4 - 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolínico; 5 - ácido vanílico; 6 - 5'-metoxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina; 7 - 5'-metoxi-3'-etil- <i>N,N</i> -dimetilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina; 8 - ácido 3-metoxi-4,5-metilenodioxo- <i>cis</i> -cinâmico; 9 - 3-metoxi-4,5-metilenodioxo- <i>trans</i> -cinâmico; 10 - ácido salicílico; 11 - lioniresinol; 12 - moupinamida; 13 - 2,6-diidroxí-9,10-diidrofenantreno; 14 - 2,6-diidroxifenantreno; 15 - grossamida; 16 - cannabisina F; 17 - 7-metil-2,6-diidroxifenantreno.	159
Figura 152 - Alcaloides isolados a partir da fração P6 e quantificados no extrato aquoso de <i>T. mucronata</i> .	161

Figura 153 - Cromatograma de íons totais otimizado obtido através da técnica de CLAE-ESI-EM/EM para mistura dos quatro alcaloides (bufotenina (**1**), 5-MeOH-*N*-metiltriptamina (**2**), 5-MeOH-DMT (**3**) e 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico) (**4**) presente no extrato aquoso de *T. mucronata* (**A**) e os padrões de fragmentação obtidos para cada analito analisado (**B**).

Lista de tabelas

Tabela 1* – Compostos isolados a partir de fontes vegetais com atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.	31
Tabela 2 - Condição cromatográfica aplicada para o microfracionamento da fração P6 através da técnica CLAE-UV.	48
Tabela 3 - Condição cromatográfica aplicada na análise da fração P6 através da técnica UPLC-TOF-EM.	48
Tabela 4 – Condições analíticas e preparativas para purificação da fração P6.	49
Tabela 5 - Condição cromatográfica aplicada para obtenção dos perfis cromatográficos de TML Et e TML Dec através da técnica de CLAE-DAD.	50
Tabela 6 – Dados obtidos na detecção do metabólito catequina presente na fração P6 do lenho de <i>T. mucronata</i> através da técnica UPLC-TOF-EM.	64
Tabela 7 - Dados de RMN (500 MHz, D ₂ O) mono e bi dimensionais do alcaloide 5-hidroxi- <i>N,N</i> -dimetiltryptamina (bufotenina, (1)).	73
Tabela 8 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) dos compostos 2 e 3 .	81
Tabela 9 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> 6) do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-β-carbolínico (4) e da literatura (CD ₃ OD).	85
Tabela 10 – Descrição das espécies que acumulam a lignana (+)-lioniresinol-8'α- <i>O</i> -β-D-xilopiranosídeo e suas respectivas atividades (quando relatadas).	86
Tabela 11 - Valores de RMN de ¹ H e ¹³ C da ligana (+)-lioniresinol-8'α- <i>O</i> -β-D-xilopiranosídeo (11 , em DMSO- <i>d</i> 6) e dos dados presentes na literatura (CD ₃ OD).	90
Tabela 12 - Descrição das espécies que acumulam moupinamida e suas respectivas atividades (quando relatadas).	92
Tabela 13 - Valores de RMN de ¹ H e ¹³ C da moupinamida (12 , em DMSO- <i>d</i> 6) e dos dados presentes na literatura (em CD ₃ OD).	95
Tabela 14 - Valores de RMN de ¹ H e ¹³ C da grossamida (15 , em DMSO- <i>d</i> 6) e dos dados presentes na literatura (acetona).	99
Tabela 15 - Dados de RMN mono e bidimensionais para o fenantreno, 7-metil-2,6-fenantrenodiol (17).	108
Tabela 16 - Agrupamento das frações oriundas do fracionamento de P6 conforme similaridade nos perfis CLAE-DAD e CCD.	109
Tabela 17 - Ilustração do processo de purificação das frações de P6 através da técnica de CLAE-UV-preparativo.	110

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido vanilínico (5).	112
Tabela 19 - Dados de RMN mono e bidimensionais do alcaloide 6 .	122
Tabela 20 - Dados de RMN mono e bidimensionais do alcaloide (7)	132
Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e ^{13}C (125 MHz) do ácido 3-metoxi-4,5-metilenodioxo- <i>cis</i> -cinâmico (8).	135
Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido 3-metoxi-4,5-metilenodioxo- <i>trans</i> -cinâmico (9) e os dados da literatura.	137
Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido salicílico (10).	140
Tabela 24 - Dados de RMN mono e bidimensionais para o fenantreno 2,6-diidroxi-diidrofenantreno (13).	148
Tabela 25 - Dados de RMN mono e bidimensionais para o fenantreno, 2,6-diidroxi-fenantreno (14).	154
Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e ^{13}C (125 MHz) para a canabisina F (16 , em DMSO- <i>d</i> 6) e da literatura.	158
Tabela 27 - Parâmetros otimizados na análise por CLAE-ESI-EM/EM para as transições monitoradas em modo MRM.	163
Tabela 28 – Dados de precisão e exatidão obtidos das curvas de calibração.	163
Tabela 29 - Quantidade dos alcaloides analisados no extrato aquoso do lenho de <i>T. mucronata</i> .	164
Tabela 30 - Valores de IC_{50} para os compostos isolados do lenho de <i>Tetrapteryx mucronata</i> .	165

Lista de abreviaturas e siglas

AChE	acetilcolinesterase
ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
AF	ácido fórmico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHCl ₃	clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	dublete
DCM	diclorometano
<i>dd</i>	duplodublete
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido
DMT	dimetiltryptamina
EM	Espectrometria de Massas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
<i>g</i> COSY	<i>gradient Correlation Spectroscopy</i>
<i>g</i> HMBC	<i>gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>g</i> HSQC	<i>gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
hex	hexano
iAChE	Inibição da enzima acetilcolinesterase
iBT/SP	Instituto de Botânica/São Paulo
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
IES–EM	Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i>
<i>J</i>	constante de acoplamento (em Hertz)
<i>m</i>	multiplete
MAO	Monoamina oxidase
MeOH	metanol
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>

NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
P6	Fração do extrato EtOH do lenho de <i>T. mucronata</i> obtida após filtração com gel de poliamida
PTFE	politetrafluoretileno
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
s	singleto
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
t	triplete
TML Dec	Extrato aquoso (obtido por decocção) do lenho de <i>T. mucronata</i>
TML Et	Extrato EtOH do lenho de <i>T. mucronata</i>
UDV	União do Vegetal
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
δ	deslocamento químico (expresso em ppm)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	O mal de Alzheimer e Inibidores de acetilcolinesterase	28
1.2	Descrição da espécie estudada	33
1.3	Ayahuasca	35
1.3	Composição, aspectos químicos e farmacológicos da ayahuasca	36
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Material vegetal	40
3.2	Solventes e reagentes	40
3.3	Fases estacionárias e suporte para cromatografia	41
3.4	Instrumentação	41
3.5	Reveladores para análise por CCD.	43
3.5.1	Reagente de Dragendorff.	43
3.5.2	Avaliação da atividade inibitória anticolinesterásica.	43
3.6	Extrações	46
3.7	Procedimentos cromatográficos gerais	46
3.7.1	Obtenção dos perfis cromatográficos através de CLAE-DAD	46
3.7.2	Filtração com poliamida P6	47
3.7.3	Microfracionamento por CLAE-UV	47
3.7.4	Análise por UPLC-TOF-MS	48
3.7.5	Condições cromatográficas empregadas na transferência das escalas analítica para preparativa	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Análise dos extratos TML Et e Dec por CLAE-DAD	50
4.2	Extração líquido-líquido	52
4.3	Filtração com poliamida P6	54
4.4	Análise por CCD	56
4.5	Microfracionamento da fração P6 por CLAE-UV	58
4.6	Análise por CLAE-DAD-ESI-EM	60
4.7	Análise da fração P6 através da técnica de UPLC-TOF-EM	61
4.8	Purificação da fração P6 através da técnica MPLC-UV	65
4.9	Elucidação estrutural dos compostos isolados da fração P6 diretamente do fracionamento por MPLC-UV	66
4.10	Análise das demais frações obtidas através do fracionamento de P6.	109
4.11	Quantificação dos alcaloides 1, 2, 3 e 4 no extrato aquoso do lenho de <i>T. mucronata</i> através da técnica CLAE-ESI-EM/EM.	161
4.12	Avaliação do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase dos compostos isolados do extrato EtOH do lenho de <i>T. mucronata</i> .	165
5	CONCLUSÃO	166
	REFERÊNCIAS	168

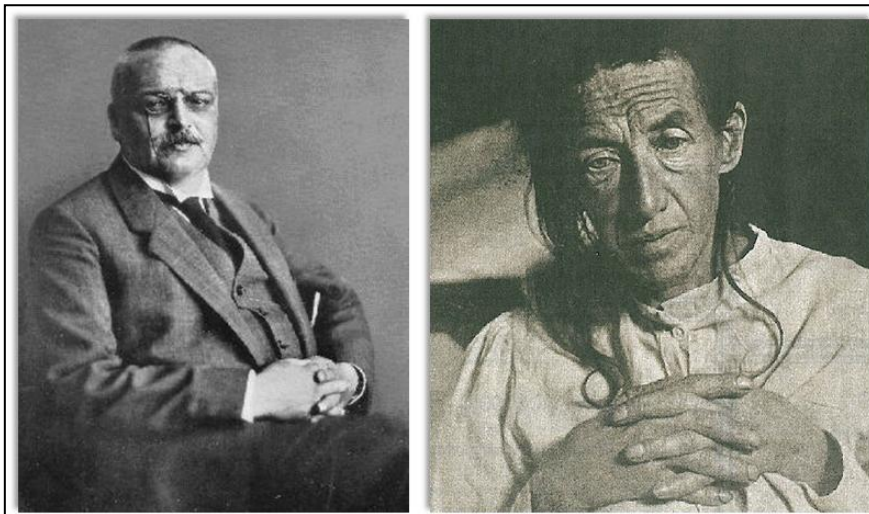
1. INTRODUÇÃO

O consumo de plantas alucinógenas pelos seres humanos é uma prática utilizada desde os primórdios de nossa civilização. Os motivos são os mais diversos, vão desde magia a práticas médicas e religiosas. Dentre os inúmeros exemplos citáveis, a utilização da bebida alucinógena Ayahuasca em rituais religiosos não-indígenas chama atenção pela sua globalização nos dias atuais. A natureza química dos constituintes ativos desta bebida e a forma de sua utilização têm impacto relevante em questões contemporâneas como: neurofarmacologia e psiquiatria. Nesse contexto a utilização de produtos de origem natural com atividade de inibição de enzimas que atuam no sistema nervoso central, como a enzima acetilcolinesterase, vem se mostrando uma ferramenta benéfica na busca por substâncias úteis para o tratamento de pacientes acometidos com doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer (MA) (LASNER; LEE, 1998; MARTINEZ; ALMEIDA, PINTO, 2009; McKENNA, 2004).

1.1 O mal de Alzheimer e os inibidores de acetilcolinesterase

O mal de Alzheimer foi anunciado pela primeira vez em 1907 quando o psiquiatra e neuropatologista alemão, Aloysius Alzheimer, diagnosticou a doença ao examinar uma paciente (~ 50 anos de idade) que apresentava graves transtornos cognitivos relacionados à memória, linguagem e interação social (Figura 1). Após a morte da paciente, Alzheimer realizou uma autópsia em seu cérebro, usando uma técnica de coloração que lhe permitiu visualizar a presença de neurônios com deformações incomuns, que foram posteriormente diagnosticados como placas senis e emaranhados neurofibrilantes. Alzheimer supôs que essas lesões podiam ser a causa ou o efeito da doença. Essa deformação ficou popularmente conhecida como mal de Alzheimer (MA) (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997).

Figura 1 - Aloysius (Alois) Alzheimer e Auguste Deter, primeira paciente em que foi diagnosticada a doença de Alzheimer.



Fonte: (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997)

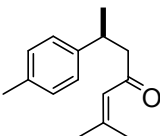
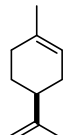
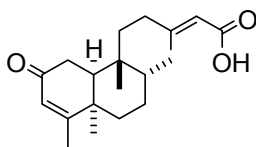
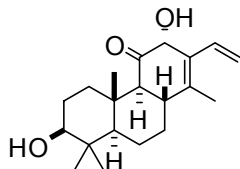
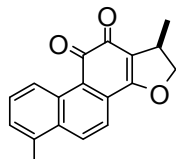
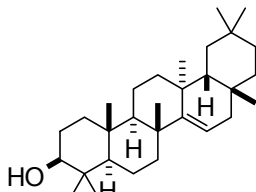
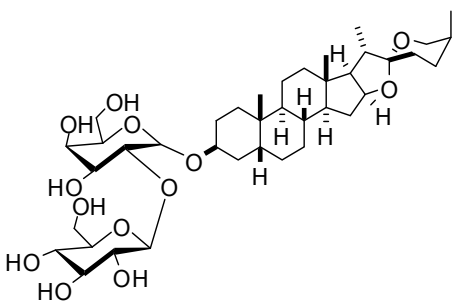
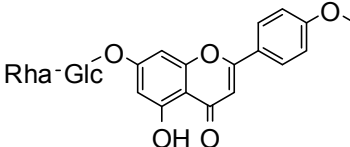
Mesmo após a descoberta de Alzheimer, a enfermidade não foi aceita imediatamente como "doença". Até meados do século passado, a senilidade e a demência ainda eram consideradas como parte do processo de envelhecimento. As investigações científicas sobre as causas da doença explodiram no final dos anos 70, com a criação da Associação de Alzheimer, em 1985 a doença foi progressivamente aceita como um distúrbio e não como uma função natural de envelhecimento (HOLSTEIN, 1996). Hoje o mal de Alzheimer (MA) é diagnosticado como uma doença neurodegenerativa grave e progressiva dado a longevidade e qualidade de vida humana alcançada no presente século. O MA vem causando sérios prejuízos sócio-econômicos devido ao aumento marcante de pessoas economicamente úteis que são acometidas por este mal. Países emergentes como o Brasil já apresentam dados estatísticos da doença bastante preocupantes, acredita-se que nos próximos 20 anos os idosos brasileiros serão 30 milhões e que o MA será o grande desafio da medicina deste século. Atualmente, é considerada a maior causa de demência na faixa de 65 anos, chegando atingir cerca de 50-60% da população de idosos. Em 2009 o número estimado de pessoas com o MA no mundo foi de 36 milhões e a previsão para 2050 não é nada animadora, 115

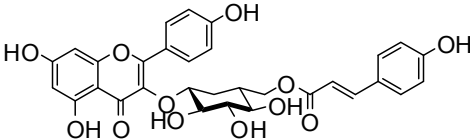
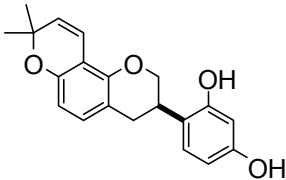
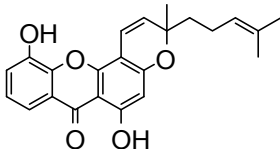
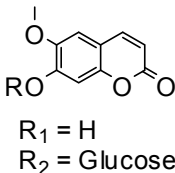
milhões. (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2009; LIMA-COSTA; VERAS, 2003).

Atualmente um dos métodos utilizados para o tratamento dos males causado por esta doença se dá através da inibição de enzimas que atuam no sistema nervoso central (SNC) catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) a colina. A hidrólise da ACh é um processo natural necessário para o retorno dos neurônios ativados colinergicamente a um estado de repouso, mas o seu déficit foi observado nos pacientes com o mal de Alzheimer. Estas observações conduziram à hipótese colinérgica, a teoria bioquímica mundialmente aceita para o tratamento (controle sintomático) de indivíduos acometidos por esta doença. Dentre os vários mecanismos propostos para aumentar a transmissão colinérgica, a inibição da enzima AChE é, atualmente, o método mais eficiente de melhorar o déficit colinérgico através do aumento dos níveis de ACh no sistema nervoso central (SNC) resultando numa melhora sintomática do paciente (BARTUS et al., 1982; LASNER; LEE, 1998).

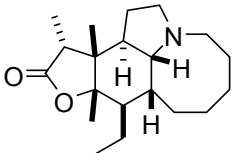
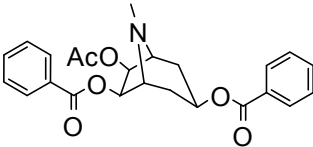
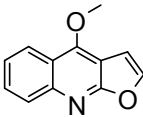
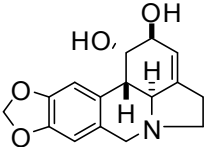
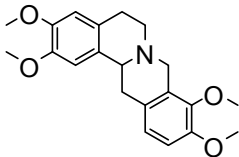
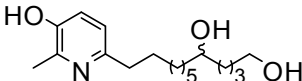
Vários métodos são utilizados por pesquisadores de todo o mundo na busca por inibidores de AChE a partir de fontes naturais, a maior parte destes são baseados na metodologia proposta por Ellman e colaboradores (1961) para detecção de inibidores de AChE através de método espectrofotométrico. Dentre os métodos atualmente utilizados os que fazem uso de cromatografia em camada delgada (MARTSON et al., 2002; RHEE et al., 2001) e ensaio em micro-placa (BRÜHLMANN et al., 2004; INKANINAN et al., 2001) têm sido considerados de grande utilidade. A aplicação destes métodos resultaram no isolamento de diversos compostos com atividade inibitória da AChE, como ilustrados na Tabela 1, ilustrada a seguir.

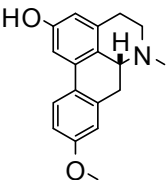
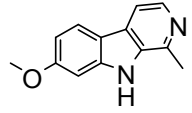
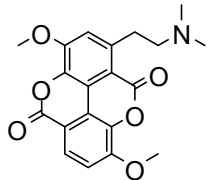
Tabela 1* – Exemplo de compostos isolados a partir de fontes vegetais com atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

Classe	Estrutura	Fonte natural	Referência
Terpenoides		<i>Peltophorum dasyrachis</i> (Fabaceae)	FUJIWARA; YAGI; MIYAZAWA, 2010.
		<i>Citrus sp.</i> (Rutaceae)	ZHOU; FUKUMOTO; YOKOGOSHI, 2009
		<i>Detarium microcarpum</i> (Leguminosae)	CAVIN et al., 2006
		<i>Acacia nilotica</i> subsp. <i>kraussiana</i> (Fabaceae)	ELDEEN; VAN HEERDEN; VAN STADEN, 2010.
		<i>Salvia miltiorhiza</i> (Lamiaceae)	REN et al., 2010.
		<i>Clitoria ternatea</i> L. (Leguminosae)	KUMAR et al., 2007.
		<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (Asparagaceae)	LEE; JUNG; KIM, 2009.
Polifenois		<i>Buddleja davidii</i> (Buddlejaceae)	OINONEN et al., 2006.

	<i>Agrimonia pilosa</i> (Rosaceae)	JUNG; PARK, 2007.
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Leguminosae)	CUI et al., 2008.
	<i>Garcinia livingstonei</i> (Clusiaceae)	BRÜHLMANN et al. 2004.
 R ₁ = H R ₂ = Glucose	<i>Vaccinium oldhami</i> (Ericaceae)	LEE et al., 2004.

Alcaloides

	<i>Stemona sessilifolia</i> (Stemonaceae)	DONG-HAI et al., 2013
	<i>Erythroxylum rimosum</i> (Erythroxylaceae)	RIBEIRO et al., 2013
	<i>Conchocarpus fontanesianus</i> (Rutaceae)	CABRAL et al., 2012
	<i>Galanthus rizehensis</i> (Amaryllidaceae)	SARIKAYA et al., 2012
	<i>Corydalis saxicola</i> (Fumariaceae)	HUANG et al., 2012
	<i>Senna multijuga</i> (Fabaceae)	FRANCISCO et al., 2012

	<i>Beilschmiedia alloiophylla</i> (Lauraceae)	MOLLATAGHI et al., 2012
	<i>Peganum nigellastrum</i> (Nitrariaceae)	ZHENG et al., 2009
	<i>Croton lechleri</i> (Euphorbiaceae)	MILANOWSKI et al., 2002

* As tabelas de 1 a 30 foram elaborados pelo autor.

Exaustivas pesquisas foram e vêm sendo realizadas para que fármacos obtidos a partir de fontes naturais ou semi-sintetizados cheguem ao mercado. Atualmente existem quatro fármacos licenciados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do mal de Alzheimer: Cognex[®] (tacrina), Aricept[®] (donepezil), Exelon[®] (rivastigmina), Ebixa[®] (memantina) e o alcaloide Reminyl[®] (galantamina). Este último alcaloide é descrito como um dos constituintes químicos de espécies da família Amaryllidaceae. (ANAND; SINGH, 2013; WILLIAMS; HOWES; SORRIBAS, 2011).

1.2 Descrição da espécie estudada

Malpighiaceae é uma família constituída por ervas, arbustos ou árvores distribuídas em cerca de 80 gêneros e aproximadamente 1300 espécies. Destas, cerca de 80% dos gêneros e 90% das espécies ocorrem no continente Americano. No Brasil, já foram descritos 38 gêneros e aproximadamente 300 espécies. O estudo fitoquímico das espécies desta família revelou que elas acumulam metabólitos secundários da classe dos flavonoides, taninos, alcaloides e terpenoides com potenciais atividades antioxidante, antiulcerogênica, antimicrobiana e inibidores de enzimas que atuam no sistema nervoso central (SNC) (ANDERSON; ANDERSON, 2010; SAMOYLENKO et

al., 2010; SANNOMIYA et al., 2005; SILVA et al., 2001; SOUZA e LORENZI, 2008). Dentre os gêneros desta família destacam-se por seu potencial terapêutico, *Banisteriopsis* e *Byrsonima*.

Banisteriopsis é um dos maiores gêneros da família Malpighiaceae, com 92 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru (MABBERLEY, 1999; SCHULTES, 1977). Do ponto de vista químico as espécies deste gênero acumulam metabólitos da classe dos alcaloides (β -carbolínicos, indólicos, pirrolidínicos e etc), terpenos, derivados fenólicos de várias classes, (flavonoides, flavonois e proantocianidinas) e sulfonoglicolipídeos (BEJAR et al., 1995; MENDES et al., 1999; RASTRELLI et al., 1997; WANG et al., 2010). A principal espécie deste gênero do ponto de vista químico e farmacológico é *B. caapi*, um dos componentes da bebida alucinógena Ayahuasca. (McKENNA, 2004).

Ott (1994) cita o uso em menor escala de outras espécies da família Malpighiaceae na preparação da Ayahuasca, em substituição a *B. caapi*: *Banisteriopsis longialata*, *Banisteriopsis lutea*, *Banisteriopsis martiniana* e *Tetrapteryx mucronata*, esta última, a espécie foco do presente estudo.

O gênero *Tetrapteryx*, também pertencente a família Malpighiaceae, possui cerca de 90 espécies distribuídas em regiões tropicais na América Central e do Sul. No território brasileiro as espécies deste gênero se distribuem por todas as regiões do país (CUATRECASAS; CROAT, 1980). Este gênero é ainda pouco estudado do ponto de vista químico e farmacológico, apenas um relato sobre o estudo da composição química de espécies deste gênero foi encontrado na literatura. Neste os autores descrevem o isolamento de metabólitos secundários da classe das coumarinas e antraquinonas provenientes da espécie *T. multiglandulosa* A. Juss. (MELO; BARROS, 1999). Em ensaio realizado anteriormente a esse trabalho, o extrato EtOH do lenho de *T. mucronata* apresentou resultado positivo para inibição da enzima acetilcolinesterase.

1.3 Ayahuasca

Ayahuasca é o nome dado à bebida alucinógena oriunda da floresta amazônica pela nação indígena quéchua do Peru. Ela também é conhecida pelos índios Tupis do Brasil como *Yage* e pelos caboclos e seringueiros do norte de nosso país com o nome de *Hoasca*. Em quéchua (língua indígena falada na América do Sul) a palavra *ayahuasca* tem o seguinte significado: prefixo *aya* seria alma ou espírito e o sufixo *huasca*, liana ou cipó, portanto Ayahuasca pode ser traduzida como “liana ou cipó das almas ou dos espíritos”, a “liana dos sonhos” (MCKENNA et al., 1998; SANGIRARD, 1989).

Esta bebida é utilizada por grupos indígenas associados ao xamanismo e por vegetarianos curandeiros tanto para medicina quanto para rituais religiosos. Essas características fizeram com que um grupo de cientistas propusesse o termo enteógeno, que quer dizer “Deus dentro” ou “o que gera experiência interna”. Este termo é utilizado em substituição a alucinógeno e psicodélico (LUNA, 1984; OTT, 1994).

O uso da Ayahuasca tem se expandido além da cultura indígena sendo utilizada em movimentos sincréticos religiosos, que buscam um meio de facilitação do autoconhecimento e introspecção (YRITIA et al., 2002; CARLINI, 2003). Essa expansão teve início no início do século XX quando o maranhense, Sr. Raimundo Irineu Serra, mudou-se para o Acre dentro do movimento migratório do “Ciclo da Borracha”. Trabalhando como seringueiro conheceu a Ayahuasca numa prática nativa, na fronteira entre o Brasil e o Peru, na década de 10. Ao longo de suas experiências iniciais com Ayahuasca ele obteve revelações espirituais que o levaram a constituir uma religião conhecida como Santo Daime, na cidade de Rio Branco – Acre (Figura 2) (GOULART, 2004). Com o passar dos anos, outras doutrinas foram criadas, dentre estas, destaca-se a União do Vegetal (UDV). Estas vertentes têm em comum o fato de pertencerem a uma mesma tradição de religiosidade não-indígena de consumo da Ayahuasca, porém cada uma delas possui diferenças significativas de contexto religioso e social (LABATE, 2004; TUPPER, 2008).

Figura 2 – Ilustração do mestre Raimundo Irineu e da bebida Ayahuasca.



Fonte: (MESTREIRINEU, 2013)

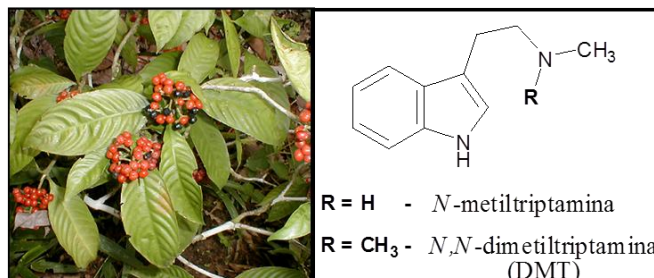
1.3 Composição, aspectos químicos e farmacológicos da Ayahuasca

A forma mais comumente relatada para o preparo da ayahuasca é através da decocção de duas espécies vegetais: o cipó de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) Morton e as folhas da *Psychotria viridis* (Rubiaceae) Ruiz & Pavón (FREEDLAND; MANSBACH, 1999).

A espécie *Psychotria viridis* foi descrita por Ruiz & Pavón em 1779 (Figura 3) (ARANHA; TRAVAINÉ; CORREA, 1991). *Psychotria* é um gênero de arbustos e pequenas árvores encontradas em regiões tropicais do planeta incluindo cerca de 1400 espécies. Muitas espécies deste gênero são morfologicamente semelhantes à *P. viridis* como a espécie *P. cartagenensis*. Desta forma algumas destas também são usadas no preparo da Ayahuasca (BLACKLEDGE; TAYLOR, 2003; McKENNA; CALLAWAY; GROB, 1998).

P. viridis possui em sua composição química alcaloides triptamínicos, dentre estes a *N*-metiltriptamina e *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (Figura 3) (CALLAWAY, 2005; TOWERS; ABBOTT, 1984). DMT é uma substância controlada tanto no Brasil através da PORTARIA de 1998 da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) e internacionalmente, sob a Convenção de 1971 das Nações Unidas sobre substâncias psicotrópicas (LABATE; ROSE; SANTOS, 2006; LABATE; MACRAE, 2010).

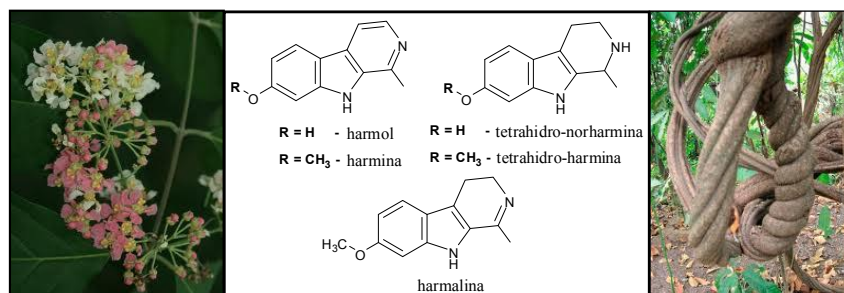
Figura 3 - Ilustração da espécie *Psychotria viridis* e dos alcaloides triptamínicos *N*-metiltriptamina e *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) presentes nas folhas desta espécie.



Fonte: (acervo <http://www.entheology.org>).

Banisteriopsis caapi descrita por Morton em 1931 (Figura 4), é conhecida popularmente como mariri ou jagube, um cipó pertencente à família Malpighiaceae, sendo nativa das zonas tropicais da América do Sul e Antilhas (ARANHA; TRAVAINÉ; CORREA, 1991). Esta espécie acumula, principalmente no seu cipó, alcaloides β -carbolíneos, como ilustrado na Figura 4 (SAMOYLENKO et al., 2010). Esta classe de alcaloides foi isolada inicialmente a partir das sementes da espécie vegetal *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae), por isso essa classe de alcaloides também é conhecida como alcaloides de harmala. Relatos da literatura indicam um amplo espectro de atividades terapêuticas para os extratos de espécies vegetais contendo essa classe de compostos: efeitos antinociceptivo e analgésico (FAROUK et al., 2008; MONSEF et al., 2004), anticâncer (JAHANIANI et al., 2005; SOBHANI; EBRAHIMI; MAHMOUDIAN, 2002), antiproliferativo (AYOUB; AL-ALLAF; RASHAN, 1994), vasorelaxante (ASTULLA et al., 2008; BERROUGUI et al., 2006), propriedades hipotérmicas (ABDEL-FATTAH et al., 1995; WINSTON, 2000) e atividade antimicrobiana (ARSHAD et al., 2008).

Figura 4 - Ilustrações da espécie *Banisteriopsis caapi* e dos alcaloides β -carbolínicos presentes no cipó desta espécie.



Fonte: (acervo davesgarden.com)

Os alcaloides β -carbolínicos também são inibidores das enzimas monoamina oxidase (MAO). A função da MAO é degradar as monoaminas evitando assim que se acumulem (no caso de monoaminas endógenas) ou que gerem efeitos indesejáveis (no caso de monoaminas exógenas). O processo pelo qual a MAO degrada monoaminas é conhecido por deaminação oxidativa. (McKENNA et al., 1984, 1998; WANG et al., 2010).

O sinergismo entre as substâncias psicoativas encontradas na bebida Ayahuasca, provenientes da decocção das espécies *B. caapi* e *P. viridis*, é uma notável interação farmacocinética. O cipó de *B. caapi* contém alcaloides de harmala (β -carbolíneo), como a harmina e tetrahydroharmina, que são inibidores da monoamina oxidase, enquanto a espécie *P. viridis* contém dimetiltriptamina (DMT), um alucinógeno potente que é ativo quando inalado ou por administração parenteral, mas não por via oral (FREEDLAND; MANSBACH, 1999; STAFFORD, 1977). Isto ocorre porque o trato gastrointestinal contém a enzima monoamina oxidase, que degrada a DMT ingerida oralmente antes que ela possa chegar ao sistema nervoso central (SNC). No entanto, quando a DMT é ingerida em conjunto com um inibidor de MAO - como é o caso na Ayahuasca - o seu metabolismo primário é retardado, permitindo que ela chegue ao SNC, fato que explica as propriedades psicoativas da bebida (RIBA et al., 2001; YRITIA et al., 2002).

2. OBJETIVOS

- Estudo fitoquímico da espécie *T. mucronata* (Malpighiaceae) no que diz respeito a busca de novas entidades químicas, que inibam *in vitro* a acetilcolinesterase, úteis para o tratamento de doenças crônico neuro-degenerativas como o mal de Alzheimer, utilizando técnicas modernas de triagem química e biológica;*
- Enriquecimento da base de dados de substâncias químicas do grupo de pesquisa, NuBBE.
- Compreensão da utilização da espécie *T. mucronata* em rituais religiosos que fazem uso da bebida alucinógena Ayahuasca, através dos dados gerados pela análise fitoquímica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Amostra do caule de *Tetrapterys mucronata* Cav. (Malpighiaceae) foi coletada na cidade de São Paulo, na reserva do Instituto de botânica-IBt-SP. O material botânico foi devidamente identificado pelo botânico M.Sc Rafael Felipe Almeida, Instituto de Botânica-São Paulo. *Voucher* Nº SP146620 foi depositado no "Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo" - Instituto Botânico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3.2 Solventes e reagentes

- Solventes grau técnico (p.a.), purificados em destilador semi-industrial: hexano, acetato de etila, etanol, metanol, acetona;
- Metanol e acetonitrila grau HPLC: Mallinckrodt, St. Louis, EUA;
- Acetonitrila, metanol, água e ácido fórmico utilizado para análises UPLC-TOF-EM grau UPLC (Biosolve, Valkenswaard, Holanda);
- Ácido fórmico 98% (Fluka Analytical, St. Louis, MO, EUA).
- Acetato de amônio (Biosolve, Valkenswaard, Holanda).
- Solventes deuterados, D₂O; CD₃OD; DMSO-*d*6; CDCl₃ (CIL - Cambridge Isotope Laboratories In., Andover, MA, EUA).
- Água ultrapura em aparelho Merck Millipore (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).
- Acetilcolinesterase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Sal de *Fast Blue B* (Fluka, Buchs, Switzerland);

3.3 Fases estacionárias e suporte para cromatografia

- Cromatografia em camada delgada (CCD): Sílica Gel 60 - F₂₅₄ em Alumínio w/UV, 11-14 µm, 60 Å, 20 × 20 cm (Sigma-Aldrich, EUA);
- Para o *Clean-up* das amostras analisadas através da técnica de CLAE-DAD foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida (SPE), Sílica gel C18 Finisterre®, 200 mg/3 mL, 60 Å e 50 µm (Teknokroma, Barcelona, Espanha);
- Análise por CLAE-DAD: coluna X-Bridge C18, 250 x 4,6 mm d.i., 5 µm. (Waters, Milford, MA, EUA);
- SPE com poliamida: Poliamida CC6, partícula < 0,07 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha);
- Microfracionamento CLAE-UV: Coluna X-Bridge (Waters) C18, 250 x 10 mm d.i., 5 µm (Waters, Milford, MA, EUA);
- Cromatografia líquida sob pressão reduzida (MPLC): Sílica gel C18 Zeoprep® 60 Å, 15-25 µm (Zeochem, Suíça);
- Purificação por CLAE-UV-preparativo: coluna X-Bridge C18, 100 x 19 mm d.i., 5 µm. (Waters, Milford, MA, EUA);
- Análise por UPLC-TOF-EM: Coluna C18 Waters Acquity UPLC BEH C18, 150 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm (Waters Acquity, Milford, MA, EUA);
- Para quantificação dos alcaloides através da técnica CLAE-ESI-EM/EM utilizou-se uma coluna Kinetex C18, 100 × 3 mm d.i., 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

3.4 Instrumentação

As análises cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas, foram realizadas utilizando-se os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência CLAE-DAD-ESI-EM Agilent série 1100, compostos pelos seguintes módulos da série 1100: injetor automático,

sistema de bombas, misturador de alta pressão e detector DAD. Os dados obtidos através da técnica de EM foram realizados em um equipamento Finnigan MAT LCQ *ion trap*, os parâmetros deste equipamento foram otimizados para máxima transmissão dos íons. Voltagem do capilar 30 V, temperatura do capilar de 200 °C, voltagem da fonte 4,5 kV, corrente na fonte 80 uA e modos de análise positivo e negativo;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência CLAE-UV Varian 9012 composto pelos sistemas de bombas Varian 9012, válvula de injeção Valco com *loop* de 200 uL e detector UV LKB-Bromma, acoplado a um coletor de frações Gilson FC 204;
- Cromatógrafo líquido a pressão reduzida, MPLC-UV, composto por um sistema de bombeamento Büchi 681 equipado com detector UV Knauer e coletor de frações Büchi 684;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência CLAE-UV-preparativo Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com um sistema de bombeamento LC-10AT, detector UV SPD-10A, injetor automático SIL-10A, degasser DGU-20A5 e controlador SCL-10A;
- *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) Waters Acquity acoplado ao espectrômetro de massas Waters Micromass-LCT Premier dotado de interface *electrospray* (ESI) e analisador por tempo de voo (Time Of Flight-TOF). As temperaturas do injetor automático de amostras e do forno de coluna foram fixadas em 10 e 60° C, respectivamente. As análises de massas foram realizadas em ambos os modos de ionização, positivo e negativo, dentro da faixa de 100-1000 Da, com tempos de aquisição de 0,25 s. As condições da interface *electrospray* (ESI) foram definidas como da seguinte forma: voltagem capilar de 2,8 kV, cone de tensão a 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvatação 250 °C, fluxo de gás de dessolvatação 600 L/h, O fluxo de solvente utilizado foi de 600 µL/min e volume de injeção de 1 µL.
- Os dados espectroscópicos de RMN foram obtidos através de um equipamento Varian Inova de 500 MHz, (Vernon Hills, Illinois, EUA),

operando em frequência de 500 MHz para o núcleo de hidrogênio e 125 MHz para o núcleo de carbono.

- Polarímetro da marca Perkin-Elmer, (Waltham, MA, EUA), modelo 241, lâmpada de Hg (589 nm).

3.5 Reveladores para análise por CCD.

3.5.1. Reagente de Dragendorff.

Preparo da solução:

Em banho de gelo foram dissolvidos 850 mg carbonato de bismuto em 10 mL de água, adicionando-se cuidadosamente 40 mL de ácido acético glacial. Posteriormente foram acrescentados gradativamente 8 g iodeto de potássio. Após a dissolução da solução, o volume total foi completado para 100 mL com água.

3.5.2 Avaliação da atividade inibitória anticolinesterásica.

3.5.2.1 Testes de bioautografia para detecção de inibidores da AChE por CCD.

Preparo das soluções:

Solução A: 1000 unidades (U) da enzima acetilcolinesterase (Merck, Alemanha) foram dissolvidos em 150 mL utilizando solução de 0,05 M do tampão com ácido *tris*-hidroclorídrico (totalizando 6,67 unidades de enzima por mL), em seguida adiciona-se 150 mg de albumina com a finalidade de

estabilizar a enzima durante a autobiografia. A solução estoque foi armazenada a 4 °C.

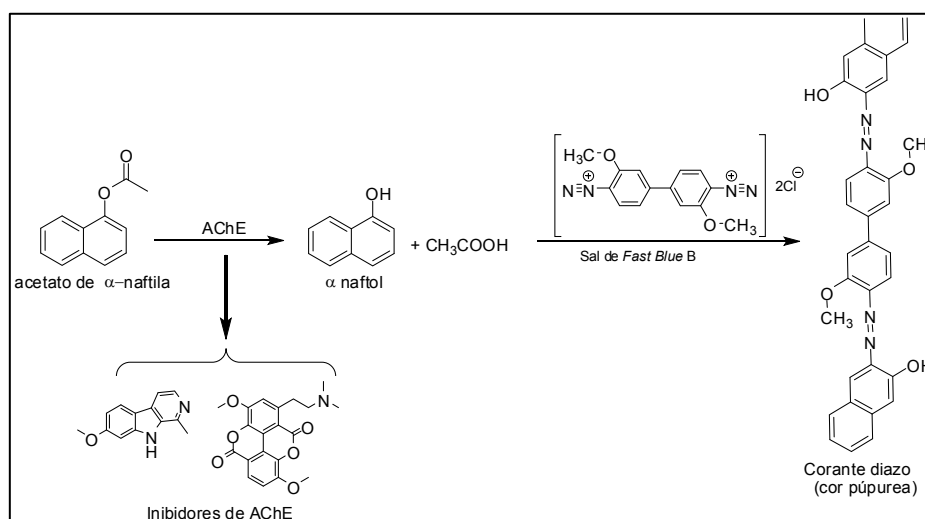
Solução B: 12,5 mg de acetato de 1-naftila em 5 mL de acetona.

Solução C: 50 mg do sal *Fast Blue B* em 20 mL de água destilada.

Aplicação:

Após desenvolvimento da cromatoplaça esta foi borrifada com a solução da enzima (Solução A) e incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos. Em seguida a placa foi borrifada com a solução do revelador (Solução B+C). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos após a aplicação. A Figura 5 abaixo ilustra um esquema das reações que se sucedem até o aparecimento da coloração purpúrea na cromatoplaça. O resultado positivo é observado quando a amostra analisada contém inibidor da enzima AChE. A enzima sendo inibida não catalisa a descarboxilação do acetato de α -naftila, resultando no surgimento de um alo branco sobre um fundo de cor púrpura (Figura 5) (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

Figura 5 - Reações que se sucedem ao ensaio de iAChE em CCD.



(Fonte: Figura retirada do artigo MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

3.5.2.2 Ensaio de inibição de AChE em microplaca.

O ensaio de inibição da AChE em microplaca foi realizado segundo método descrito por Brühlmann e colaboradores (2004).

Foram adicionados separadamente a uma placa de 96 poços, 14 µL dos compostos puros, (concentrações finais que variam de 40-1,25 mmol/L), 10 µL sub-estado da acetiltiocolina em água (concentração final de 0,44 mmol/L), e 106 µL do reagente de Ellman (0,15 mol/L concentração final em 0,1 mol/L de tampão fosfato de pH 7,4). A reação enzimática foi iniciada pela adição de 10 mL de solução de AChE *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA), 1 U/mL, em 0,1 mol/L de tampão fosfato (pH 7,4), contendo albumina de soro humano a 1 mg/mL. A absorbância do produto foi medida a 412 nm depois de 6 min, utilizando um leitor de microplacas (PowerWavex, BioTek Instrument, Winooski, Vermont, EUA). As soluções dos compostos testados e de referência (tacrina e galantamina) foram preparados em DMSO e diluídos em um tampão fosfato pH 7,4. A concentração de cada amostra foi analisada em triplicada. As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra), através da seguinte fórmula:

$$\%_{\text{inibição}} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Os ensaios de controle positivo foram realizados em condições idênticas, em presença de 1 % de DMSO (concentração final), mas na ausência dos compostos testados (valor considerado como 100%). A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) foi calculada graficamente a partir de uma curva de dose-resposta obtidas através da representação gráfica da percentagem de inibição versus concentração usando o software GraphPad

Prism 5.0 de GraphPad Software Inc. Os valores de IC_{50} foram avaliados em seis concentrações diferentes.

3.6 Extrações

As extrações dos constituintes químicos presentes no lenho de *T. mucronata* foram realizadas de duas formas, por maceração sob agitação com EtOH 96% e por decocção, assim como é preparado nos rituais que fazem uso da bebida Ayahuasca. Na extração por maceração o solvente foi colocado em contato com 500 g do material vegetal seco e triturado. A solução obtida foi colocada sob agitação constante, após 24 h foi filtrada e concentrada em rotaevaporador a 40 °C e 180 bar de pressão, resultando em 48 g do extrato TML Et (9,6 % de rendimento). Na extração por decocção o material vegetal seco e triturado (10 g) foi mantido em refluxo com água a 100 °C por 24 h. A solução aquosa obtida foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C e 72 bar de pressão, em seguida o material foi liofilizado, resultando em 1,12 g de extrato aquoso – TML Dec - (rendimento de 11,2 %).

3.7 Procedimentos cromatográficos gerais

3.7.1 Obtenção dos perfis cromatográficos através de CLAE-DAD

Foi utilizada a técnica de CLAE-DAD, com o intuito de obter os perfis cromatográficos dos extratos e frações de *T. mucronata*. As amostras a serem analisadas foram submetidas a um procedimento prévio de *Clean-up* através da técnica de extração em fase sólida-SPE. Neste procedimento o cartucho de SPE (Finisterra-C18) foi inicialmente eluído com MeOH, seguido de H₂O, e por fim condicionado com MeOH/H₂O na proporção de 85/15. O material seco da amostra a ser analisada foi suspenso em 0,5 mL de MeOH/H₂O (85/15 v/v). A solução obtida foi aplicada no cartucho de SPE. Em seguida o sistema foi

eluido com a fase móvel nas mesmas proporções. Os eluentes obtidos pelo método descrito foram filtrados em membranas de PTFE (0,20 μm) e analisados através da técnica de CLAE-DAD.

3.7.2 Filtração com poliamida P6

Durante o procedimento de filtração do extrato TML Et através da técnica de extração em fase sólida (SPE) com Poliamida P6 como fase estacionária, foi utilizado a mesma proporção de massa de extrato-fase estacionária descrito por Ioset e colaboradores (2011). Neste artigo os autores otimizaram as condições de análise fazendo uso de 0,5 g de poliamida para cada 0,65 mg de extrato. A fração obtida através deste procedimento foi denominada de P6.

3.7.3 Microfracionamento por CLAE-UV

O procedimento experimental utilizado para o microfracionamento da fração P6 em placa de 96 poços foi otimizado baseando-se nas análises realizadas previamente para obtenção do perfil cromatográfico da fração P6 através da técnica CLAE-DAD. Foi utilizado o sistema de solventes composto por água e ACN nas bombas A e B, respectivamente, mas sem a adição de ácido, pois este poderia interferir no ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase que foi realizado após o experimento de microfracionamento. O método empregado em modo gradiente foi otimizado para que os constituintes analisados eluíssem durante toda a análise, totalizando 96 minutos. O fluxo utilizado na análise foi de 2,0 mL/min. O coletor de frações foi programado para coletar um minuto por poço. Foram injetados 200 μL da solução de P6 com a concentração de 20 mg/mL, (totalizando 4000 μg por injeção). O resumo das condições empregadas pode ser observado na Tabela 2 abaixo. O experimento foi realizado em duplicata, para que os ensaios de iAChE (inibição da enzima acetilcolinesterase) e de Dragendorff pudessem ser realizados separadamente.

Tabela 2 - Condição cromatográfica aplicada para o microfracionamento da fração P6 através da técnica CLAE-UV.

Solvente A - H ₂ O Solvente B - ACN Fluxo = 2,0 mL/min V_{injeção} = 200 µL []_{amostra} = 20,0 mg/mL	Gradiente	
	Tempo (min)	% B
	0	5
	60	60
	86	100
	96	100

3.7.4 Análise por UPLC-ToF-MS

As análises dos extratos e frações provenientes de *T. mucronata* através da técnica UPLC-ToF-EM foram realizadas nas condições cromatográficas descritas na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3 - Condição cromatográfica aplicada na análise da fração P6 através da técnica UPLC-TOF-EM.

Solvente A - H ₂ O + 0,1% AF Solvente B - ACN + 0,1% AF Fluxo = 0,6 mL/min V_{injeção} = 1 µL []_{amostra} = 0,1 mg/mL	Gradiente	
	Tempo (min)	% B
	0	5
	30	95
	40	95
	40,2	5
	50	5

As temperaturas do injetor automático de amostras e no forno da coluna foram fixadas em 10 e 60 °C, respectivamente. Foram realizadas análises em ambos os modos de ionização positivo e negativo, na faixa de 100-1000 Da, com tempos de aquisição de 0,3 s. As condições da interface ESI foram definidas da seguinte forma: voltagem capilar de 2,800 V, cone de tensão a 40

V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvatação 330 °C, fluxo de gás do cone de 20 L/h, o fluxo de gás dessolvatação 600 L/h.

Os dados obtidos foram processados usando o software MassLynx, versão 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). As possíveis fórmulas moleculares foram extraídas utilizando os elementos C, H, N e O, através da ferramenta de composição elementar do MassLynx.

3.7.5 Condições cromatográficas empregadas na transferência das escalas analítica para preparativa, para análise por MPLC-UV

Para transferência das condições cromatográficas utilizadas em escala analítica para escala preparativa foi utilizado o software HPLC calculator 3.0. Para tal a análise em modo analítico fez-se uso de coluna com FE com as mesmas dimensões da fase preparativa, Sílica gel C18 Zeoprep® 60 Å, 15-25 µm (Zeochem, Suíça). As condições de análise analítica e preparativa estão descritas na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 – Condições analíticas e preparativas para purificação da fração P6.

	CLAE-DAD analítico		MPLC-UV preparativo	
Coluna:				
Altura	250		920	
Diâmetro	4,6		49,0	
Partícula	15		15	
Fluxo	1		5	
Dwell volume (mL)	0,95		13	
Método:	t (min)	% B	t (min)	% B
	0	5	0	5
	85	100	1500	100

4. Resultados e discussão

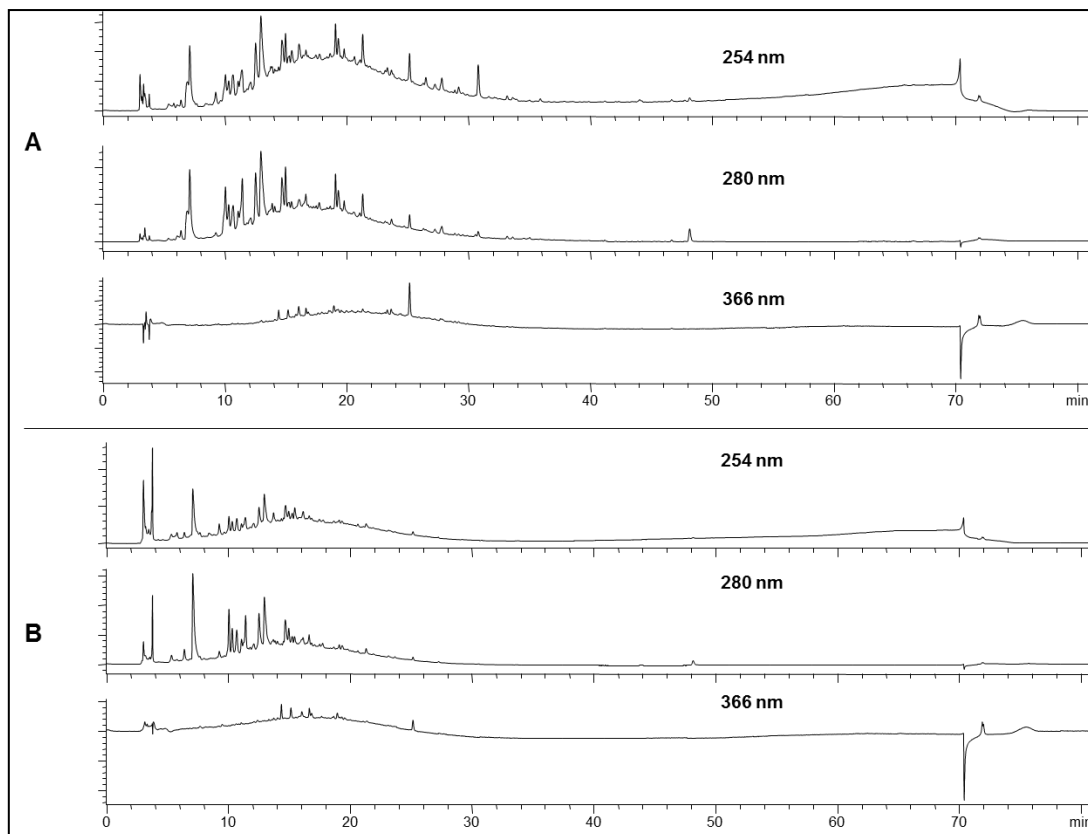
4.1 Análise dos extratos TML Et e Dec por CLAE-DAD

Os perfis cromatográficos dos extratos EtOH (TML Et) e aquoso (TML Dec) provenientes do lenho da espécie *T. mucronata* foram obtidos através da técnica CLAE-DAD. Foi empregado um método de eluição em modo gradiente com variação linear da porcentagem do solvente orgânico de 5% a 100% em 60 minutos (Tabela 5). Com a finalidade de obter uma melhor resolução cromatográfica entre as bandas presentes nos perfis cromatográficos, diferentes composições de solventes foram testadas nas bombas A e B, sendo estas: H₂O/MeOH; H₂O/ACN ambos sem a adição de modificadores, H₂O/MeOH e H₂O/ACN ambos contendo com 0,1% ácido fórmico (pH = 3,5) e por fim 20 mM trietilamina/ACN (pH = 8,0). Após análise comparativa dos cromatogramas obtidos optou-se por utilizar o sistema composto por H₂O/ACN ambos contendo 0,1% de ácido fórmico (AF), pois neste sistema observou-se uma melhor resolução entre as bandas num menor tempo de retenção. Os perfis cromatográficos obtidos através da metodologia descrita estão ilustrados a seguir nos comprimentos de onda de 254, 280 e 366 nm respectivamente (Figura 6).

Tabela 5 - Condição cromatográfica aplicada para obtenção dos perfis cromatográficos de TML Et e TML Dec através da técnica de CLAE-DAD.

	Gradiente	
	Tempo (min)	% B
Solvente A - H ₂ O + AF (0,1%)	0	5
Solvente B - ACN + AF (0,1%)	60	100
Fluxo = 1,0 mL/min	65	100
V _{injeção} = 20 uL	66	5
[] _{amostra} = 10 mg/mL	81	5

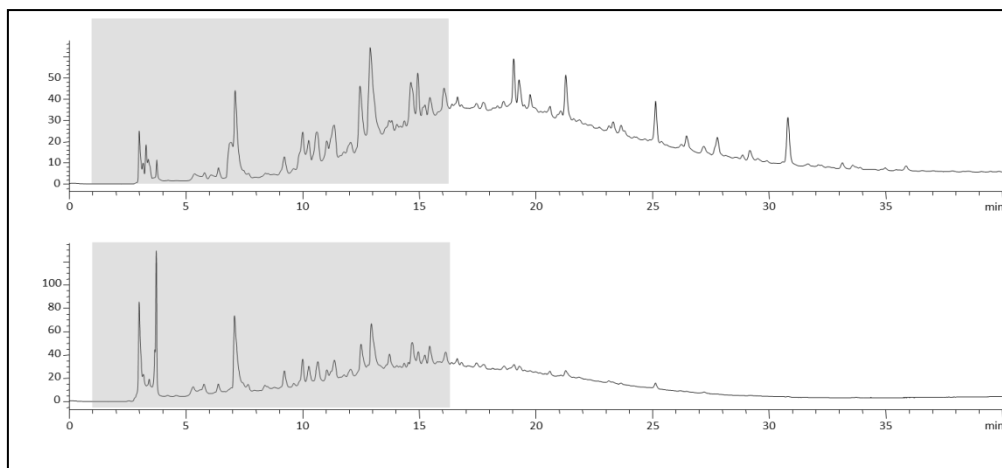
Figura 6 - Perfis cromatográficos dos extratos TML Et (A) e TML Dec (B) do lenho de *T. mucronata* obtidos através da técnica de CLAE-DAD. Coluna X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254, 280 e 366 nm.



A partir da análise dos perfis cromatográficos dos extratos TML Et e TML Dec obtidos nas mesmas condições cromatográficas pode-se observar a alta complexidade das amostras analisadas, as quais apresentaram inúmeras bandas em diferentes tempos de retenção. Pode-se observar nos perfis cromatográficos a 254 nm dos dois extratos analisados a presença de uma banda alargada na faixa de tempo de retenção de 12 a 26 min, esta é uma característica da presença de polifenóis poliméricos (taninos). A presença destes acarreta na instabilidade das soluções de extratos resultando na formação gradual de precipitados e o aparecimento de picos alargados no espectro de RMN ^1H , sobrepondo-se a outros sinais de interesse. Apesar de complexos os perfis cromatográficos de TML Et e TML Dec apresentam

similaridade no que diz respeito a faixa de tempo de retenção de 0-16 min como ilustrado na Figura 7 a seguir.

Figura 7 - Comparação dos extratos TML Et (**A**) e TML Dec (**B**) do lenho de *T. mucronata* por CLAE-DAD. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.



A partir do exposto houve a necessidade de remoção dos polifenóis poliméricos (taninos) a fim de obter uma melhor resolução cromatográfica entre as bandas presentes nas amostras analisadas. Como poderá ser observado na sequência dos resultados obtidos no presente trabalho, fez-se uso de diversas técnicas e metodologias cromatográficas com a finalidade de eliminar estes interferentes.

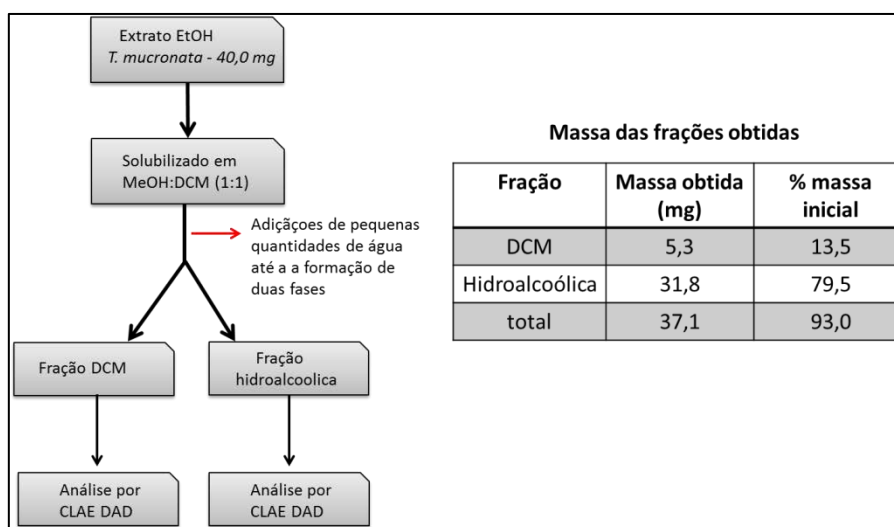
Devido ao fato dos perfis cromatográficos dos extratos analisados apresentarem similaridade no que diz respeito a uma análise qualitativa, decidiu-se dar continuidade as análises com o extrato EtOH, pois este possui uma maior diversidade química além daquela observada também no extrato aquoso (ver Figura 7).

4.2 Extração líquido-líquido

A primeira técnica utilizada com a finalidade de remoção dos taninos e obtenção de uma melhor resolução entre as bandas presentes no perfil

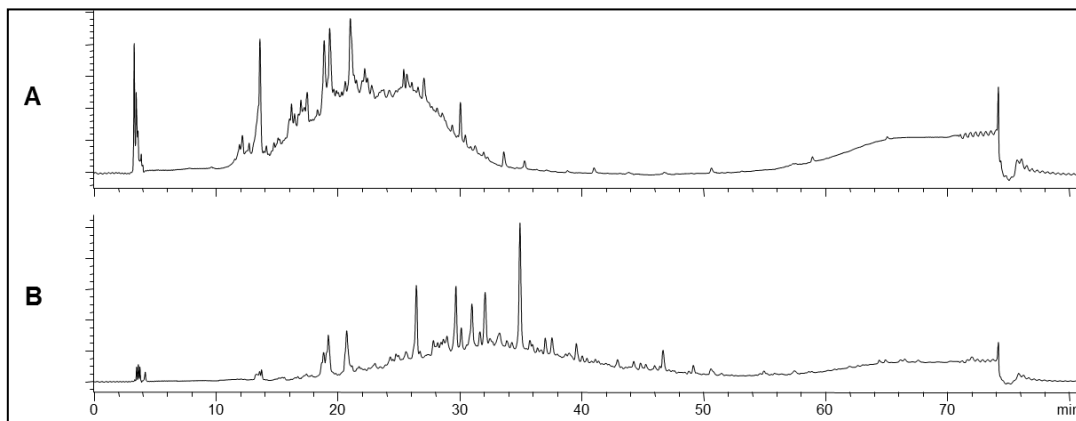
cromatográfico de TML Et foi a extração líquido-líquido. O extrato seco de TML Et (40,0 mg) foi suspenso em DCM (diclorometano):MeOH na proporção de 1:1, a solução obtida foi transferida para um funil de separação. Em seguida foi adicionado água até que fosse observada a separação entre as fases hidroalcoólica e DCM. O procedimento experimental e os rendimentos obtidos estão descritos na Figura 8 a seguir.

Figura 8 - Procedimento experimental e rendimentos obtidos para remoção de polifenóis poliméricos (taninos) do extrato TML Et através da técnica de extração líquido-líquido.



As frações obtidas através do procedimento experimental descrito acima foram analisadas pela técnica CLAE-DAD com finalidade de observar se houve separação do material polimérico, e se o perfil cromatográfico da fração DCM possuía alteração significativa do conteúdo dos demais constituintes no que diz respeito a uma análise qualitativa. O resultado desta análise está ilustrado na Figura 9, onde pode-se observar que a fração hidroalcoólica extraiu grande parte dos polifenóis poliméricos (taninos), e os constituintes de menor polaridade (maior tempo de retenção) foram extraídos pela fração DCM. No entanto pode-se observar também que houve alteração significativa do conteúdo dos demais constituintes quando comparamos os perfis cromatográficos da fração DCM e TML Et.

Figura 9 - Perfis cromatográficos CLAE-DAD das frações hidroalcoólica (**A**) e DCM (**B**), obtidas através da técnica de extração líquido-líquido. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.

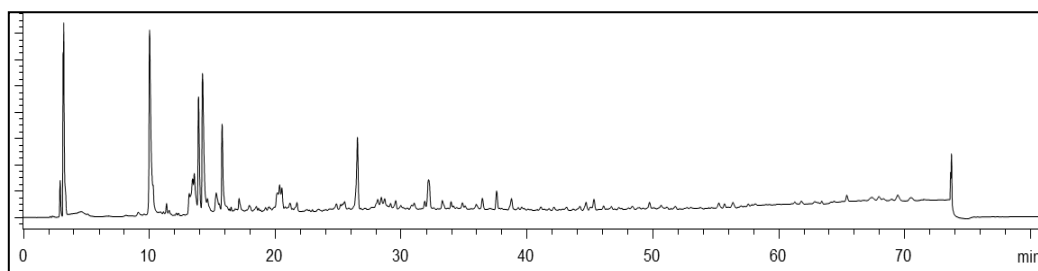


Pela análise dos resultados obtidos pode-se concluir que não houve separação satisfatória dos polifenóis poliméricos (taninos) através da técnica de extração líquido-líquido utilizando o sistema de solventes descrito. Sendo assim foi realizada busca na literatura por novos métodos de extração destes interferentes. As metodologias descritas por Collins e colaboradores (1998) e Ioset e colaboradores (2011) demonstraram bons resultados na remoção de taninos em matrizes vegetais através da técnica de extração em fase sólida (SPE) utilizando poliamida como fase estacionária. Tais procedimentos foram realizados e suas descrições encontram-se no tópico a seguir.

4.3 Filtração com poliamida P6

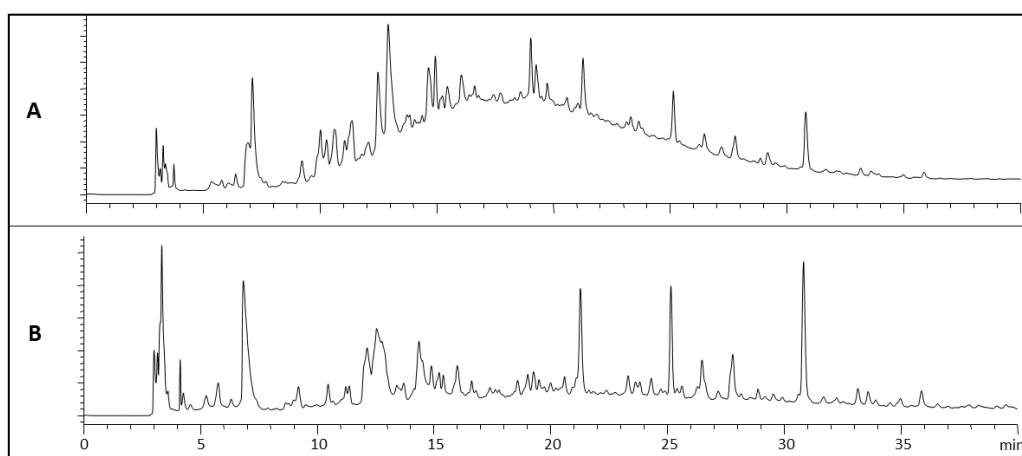
O extrato EtOH seco(TML Et) foi submetido ao processo de extração em fase sólida com poliamida P6 como fase estacionária (FE) fazendo uso de EtOH como eluente assim como descrito por Ioset e colaboradores (2011). O extrato seco TML Et foi suspenso numa quantidade mínima de EtOH a 96% e aplicado em um cartucho de SPE previamente empacotado com poliamida. Foi utilizado a proporção de 0,5 g de FE para cada 65 mg de extrato seco. O cartucho foi condicionado e eluído com 6 mL de EtOH 96%. A fração obtida foi seca e posteriormente analisada por CLAE-DAD, como ilustrado na Figura 10 a seguir.

Figura 10 - Perfil cromatográfico da fração obtida através da filtração do extrato EtOH com poliamida P6 como FE e EtOH como eluente. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.



Após a análise por CLAE-DAD da fração obtida através do procedimento descrito foi observado que os constituintes de maior polaridade não foram eluídos, como pode-se observar na Figura 10 acima, logo conclui-se que era necessário utilizar MeOH como eluente subsequente ao EtOH como forma de eluir os compostos de maior polaridade. Um segundo cartucho de SPE contendo poliamida foi preparado mantendo as proporções de extrato-FE da análise anterior. O sistema foi condicionado e eluído inicialmente com 6 mL EtOH, em seguida utilizou-se 2 mL de MeOH. A fração obtida a partir do procedimento descrito foi analisada por CLAE-DAD e os resultados ilustrados abaixo na Figura 11 abaixo.

Figura 11 - Comparação dos perfis cromatográficos do extrato TML Et (A) e da fração obtida através da filtração com poliamida utilizando EtOH e MeOH como eluentes (B). Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, λ = 254 nm.



Através da análise dos resultados obtidos pode-se observar que o uso de MeOH durante a eluição do extrato TML Et, complementa a extração dos demais constituintes, aumentando a resolução entre as bandas presentes no perfil cromatográfico e removendo quantitativamente os taninos sem alteração significativa do conteúdo dos demais constituintes. A partir dos resultados obtidos pode-se planejar a filtração com poliamida em larga escala com a finalidade de obter maior quantidade do material vegetal sem os referidos interferentes.

Para tal procedimento, mantiveram-se as proporções entre os valores de massa do extrato - fase estacionária (0,5 g de FE para 65 mg de extrato). Dessa forma foram utilizados 20 g de extrato e 153 g de FE. Foi utilizado o volume de 1,5 L de EtOH e 0,4 L de MeOH como eluentes. Este procedimento resultou na obtenção de 8,5 g de fração P6 livre de taninos.

4.4 Análise por CCD

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sílica como fase estacionária, foi aplicada com a finalidade de verificar a presença dos constituintes químicos presentes nos extratos TML Et, TML Dec e na fração P6 que apresentem atividade de inibição da enzima AChE, já que o extrato de *T. mucronata* apresentou esta atividade em ensaio realizado previamente a esse estudo. Este ensaio foi realizado no instituto de botânica de São Paulo (IBt-SP), núcleo de pesquisa em fisiologia e bioquímica, sob supervisão da Prof^a. Dr^a Maria Cláudia Marx Young, com quem o grupo de pesquisa NuBBE mantém parceria.

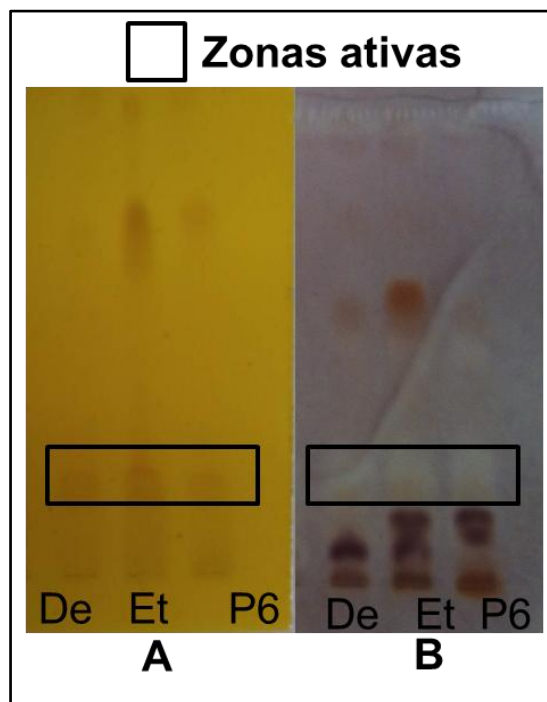
Na otimização do sistema para análise por cromatografia e camada delgada (CCD) foram testados diversos sistemas de solventes em diferentes proporções, dentre eles: AcOEt, Hex, MeOH, DCM e CHCl₃. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o sistema DCM:MeOH (8:2 v/v). A utilização de modificadores ácidos e básicos com a finalidade de melhorar a resolução entre a separação dos constituintes analisados não pode ser realizada, pois

estes poderiam resultar em resultados “falsos positivos” no ensaio de inibição de AChE, que foi realizado após esse procedimento.

Foi aplicado sobre a placa de CCD a quantidade de 50 µg de cada extrato e fração separadamente (TML Et, TML Dec e P6). A cromatoplaça foi desenvolvida utilizando o sistema de solventes otimizado. O próximo passo foi o emprego da metodologia desenvolvida por Martson e colaboradores (2002), de autobiografia em CCD para uma rápida detecção de inibidores de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em espécies vegetais. Nesta metodologia as substâncias que inibem a acetilcolinesterase surgem como manchas de coloração púrpura (ver seção 3.5.2, p. 42). O resultado desta análise para as amostras analisadas está ilustrado na Figura 12 abaixo. Estes resultados confirmam os ensaios realizados anteriormente, demonstrando que a espécie *T. mucronata* possui constituintes inibidores de acetilcolinesterase e que após o procedimento de remoção dos taninos por filtração com poliamida os constituintes ativos não ficaram retidos na fase estacionária.

Relatos bibliográficos citam a presença de compostos da classe dos alcaloides como responsáveis pela atividade de inibição das enzimas AChE, monoamina oxidase A e B e butirilcolinesterase (BuChE) em espécies da família Malpighiaceae (WANG et al., 2010; SAMOYLENKO et al., 2010). Desta forma foi realizado o teste de bioautografia com Dragendorff a fim de observar indícios da presença de alcaloides nos extratos analisados. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 12 a seguir.

Figura 12 - Resultados da análise por CCD dos extratos TML Et, TML Dec e da fração P6 para Dragendorff (A) iAChE (B).



Após análise dos resultados obtidos pode-se concluir com base na comparação dos fatores de retenção que os constituintes ativos presentes nos extratos analisados TML Et, TML Dec e na fração P6, apresentaram resultados positivos para o teste com Dragendorff sugerindo que estes pertencem a classe dos alcaloides. Estes resultados obtidos de forma rápida e objetiva estão de acordo com relatos da literatura que citam esta classe de metabólitos como responsável pela atividade de inibição da acetilcolinesterase em espécies da família Malpighiaceae (WANG et al., 2010; SAMOYLENKO et al., 2010).

4.5 Microfracionamento da fração P6 por CLAE-UV

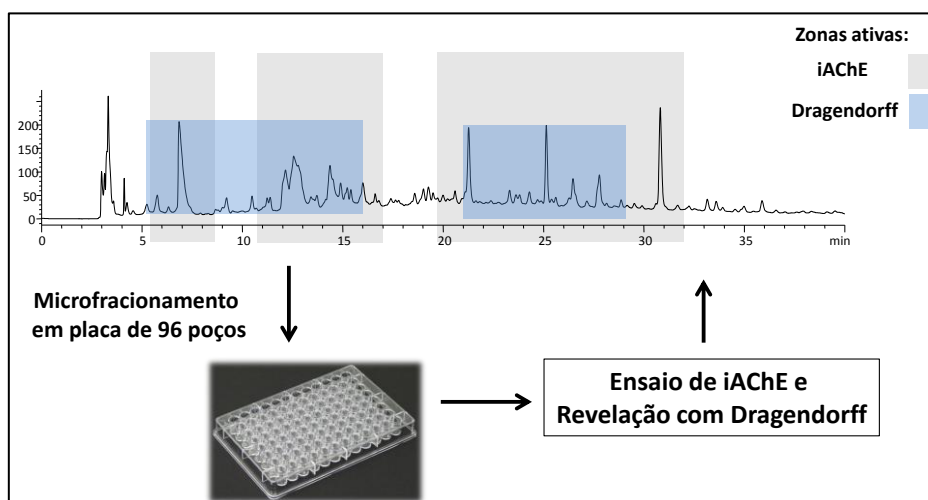
De acordo com os resultados obtidos até então com indicativos da presença de constituintes com atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase e Dragendorff positivo nos extratos TML Et, TML Dec e na

fração P6, foi planejado o experimento de microfracionamento da fração P6 utilizando a técnica CLAE-UV em placa de 96 poços, com o objetivo de localizar a(s) região(ões) do perfil cromatográfico responsáveis por tal atividade. Após realização do microfracionamento, as placas de 96 poços foram secas utilizando um aparelho de Speedvac. O passo seguinte foi a transferência das frações coletadas para uma placa de CCD com sílica como fase estacionária mantendo a mesma distribuição da placa de 96 poços. Em seguida foi realizado o ensaio de inibição de AChE descrito por Martson e colaboradores (2002).

A partir da metodologia descrita foi possível localizar no perfil cromatográfico da fração P6 as áreas com resultados positivos para o ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase e Dragendorff. O resultado desta análise está ilustrado na Figura 13 abaixo. Nesta ilustração pode-se observar que as áreas de inibição da enzima acetilcolinesterase e Dragendorff positivo são praticamente as mesmas, indicando que os compostos ativos têm nitrogênio em sua estrutura.

Os resultados obtidos até então são importantes no que diz respeito ao direcionamento das próximas análises para a identificação e/ou isolamento dos constituintes que possuem atividade de inibição de acetilcolinesterase.

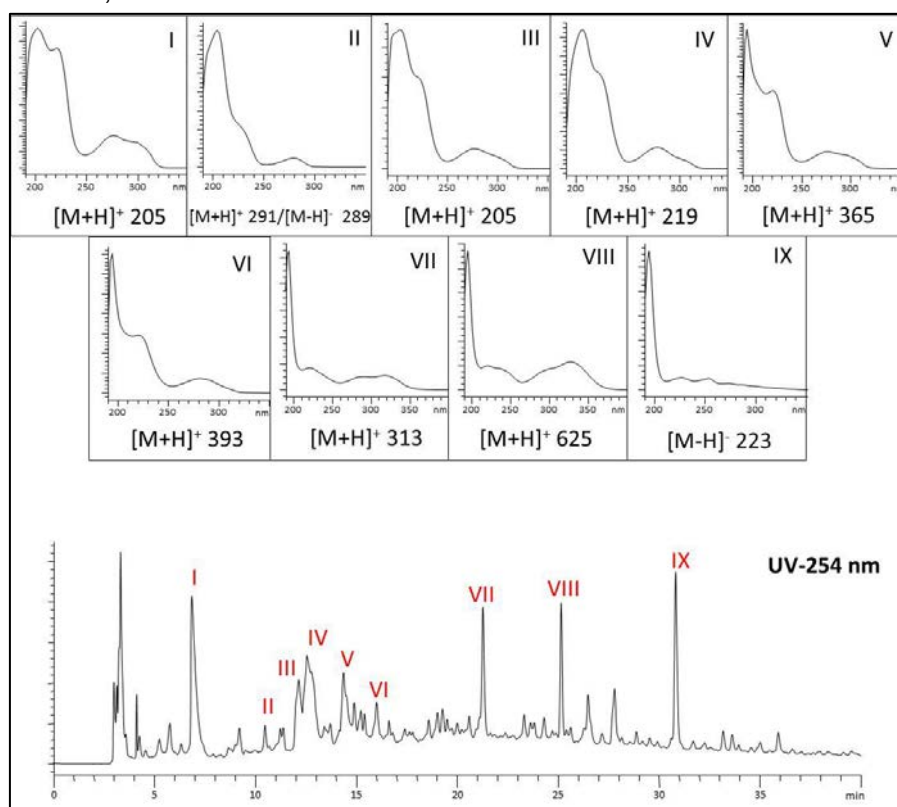
Figura 13 - Ilustração do procedimento experimental realizado para obtenção das regiões do perfil cromatográfico da fração P6 que possuem atividades de iAChE e resultado positivo para Dragendorff.



4.6 Análise por CLAE-DAD-ESI-EM

Com o intuito de identificar os constituintes químicos presentes na fração P6 previamente descritos na literatura para a família Malpighiaceae, foi realizada análise através da técnica hifenada CLAE-DAD-ESI-EM, esta última dotada de interface *electrospray* (ESI) como fonte ionizadora e analisador *ion-trap*. Foram realizados experimentos nos modos positivo e negativo. Os resultados desta análise estão ilustrados a seguir na Figura 14, onde pode-se observar o perfil cromatográfico da fração analisada, os espectros de UV e os valores de m/z dos constituintes químicos detectados.

Figura 14 - Análise da fração P6 através da técnica CLAE-DAD-ESI-EM. Perfil cromatográfico da fração P6, espectros de UV e valores de m/z dos constituintes químicos detectados. Coluna X-bridge (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), equipamento CLAE-DAD (Agilent), fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.



A análise dos resultados obtidos resultou na constatação da alta complexidade da amostra analisada, conclusão essa obtida pela observação

da diversidade de bandas de UV e m/z dos constituintes detectados. A partir dos dados gerados foi possível a comparação destes com aqueles presentes na literatura para a família Malpighiaceae, na tentativa de identificar os compostos presentes na fração P6 previamente isolados.

Pode-se observar que os compostos I, III, IV e V apresentam banda de UV com formato similar, mas com diferentes m/z . Pressupõe-se que a diferença de 14 Da entre os compostos I e III para o composto IV refere-se a presença de um grupo metilênico a mais na estrutura IV. Os dados obtidos foram insuficientes para identificação destes compostos.

O aduto II, com espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ em 278 nm e valores de m/z , 291 ($[M+H]^+$) e 289 ($[M-H]^-$) nos modos positivo e negativo respectivamente, dão indícios da presença do metabólito catequina. Este metabólito foi previamente isolado em espécies de Malpighiaceae (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; SAMOYLENKO et al., 2010; SANNOMIYA et al., 2005).

A fim de se obter dados mais precisos acerca dos adutos detectados, se fez necessário uma nova análise utilizando um equipamento de espectrometria de massas que gera dados em alta resolução. A partir desta análise foi possível gerar informações precisas das massas e fórmulas moleculares dos constituintes químicos presentes na fração P6.

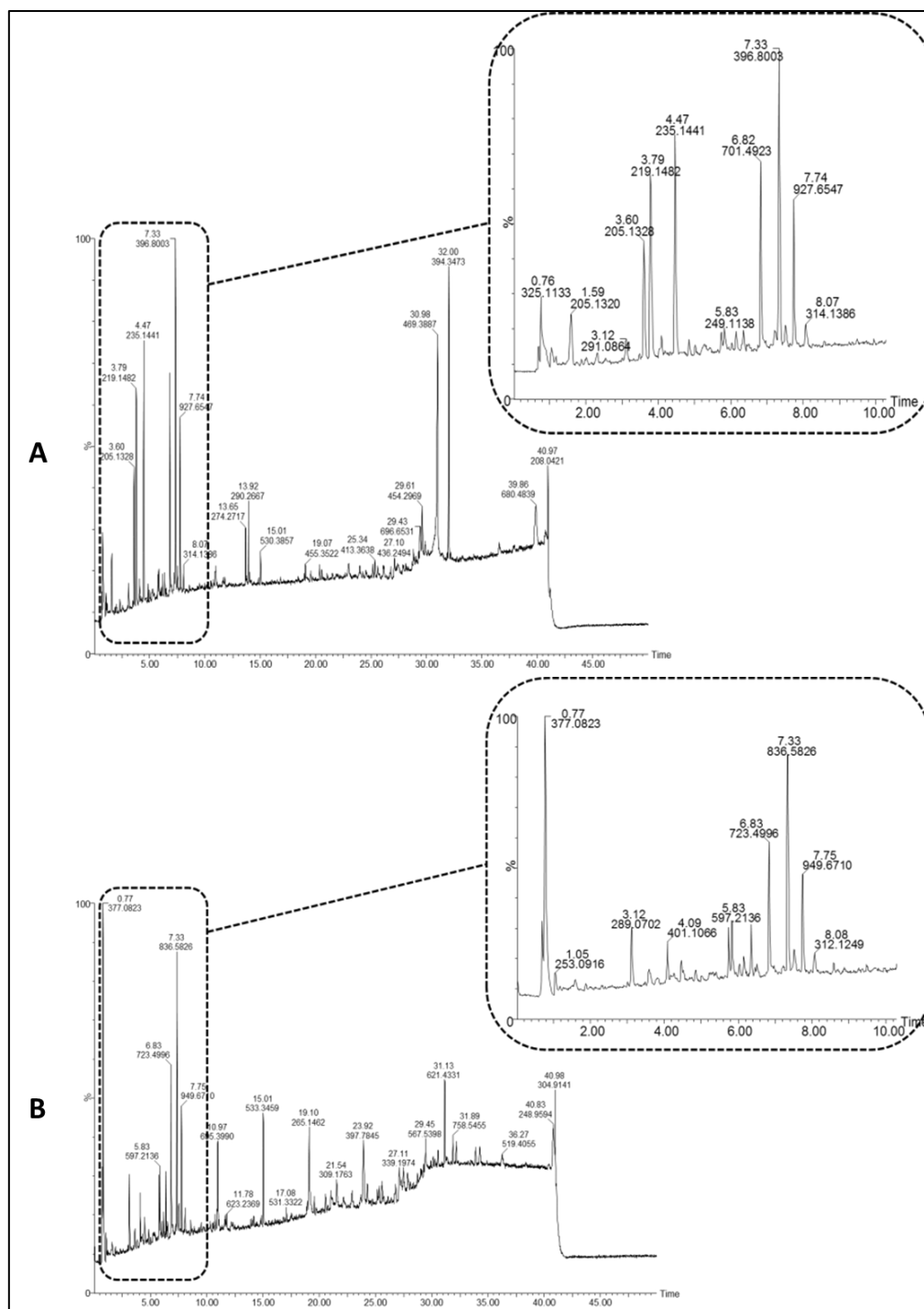
4.7 Análise da fração P6 através da técnica de UPLC-TOF-EM

Com a finalidade de obter informações mais precisas acerca da estrutura dos constituintes químicos presentes na fração P6, optou-se pela utilização da técnica de *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC), acoplada a espectrometria de massas, esta última dotada de interface *electrospray* (ESI) e analisador *Time of flight* (TOF). Este instrumento permite trabalhar com elevadas pressões, utilizando partículas de fase estacionárias $\leq 2,0 \mu\text{m}$, um menor tempo de análise e baixo consumo de solventes possibilitando obter uma melhor eficiência e resolução cromatográfica entre as bandas quando comparado com a técnica comumente utilizada, CLAE. Esta plataforma possibilita também a obtenção tanto do perfil metabólico de alta resolução

como um rápido *fingerprinting* de extratos vegetais (EUGSTER et al., 2011; GUILLAUME et al., 2009; WOLFENDER; GUILLAUME; QUEIROZ, 2010; ZHUA et al., 2010).

Para análise através desta plataforma, uma alíquota da fração P6 foi analisada pela técnica em questão. Os resultados da referida análise estão ilustrados na Figura 15 abaixo.

Figura 15 - Ilustração dos resultados obtidos através da técnica UPLC-TOF-EM da fração P6 nos modos positivo **(A)** e negativo **(B)**. Condição cromatográfica, ver Tabela 4. Coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (120 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). Equipamento Acquity UPLC-TOF-EM (Waters), fluxo 0,6 mL/min.



Os dados obtidos durante a análise da fração P6 pela técnica UPLC-TOF-EM foram contrastados com aqueles presentes na literatura para as substâncias já descritas na família Malpighiaceae. A partir de tal procedimento pode-se identificar a presença do aduto ionizado no tempo de retenção de 3,12 min nos modos de positivo ($[M+H]^+$, m/z 291,0864) e negativo ($[M-H]^-$, m/z 289,0712), como sendo o metabólito catequina. Este metabólito é descrito como um quimiomarcador em espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; MALDINI; MONTORO; PIZZA, 2011; RINALDO et al., 2010; SANNOMIYA et al., 2005). Os resultados obtidos para o composto detectado estão ilustrados na Figura 16 e Tabela 6, abaixo.

Figura 16 - Ilustração da estrutura química da catequina, metabólito detectado na fração P6 do lenho de *T. mucronata* através da técnica UPLC-OF-EM.

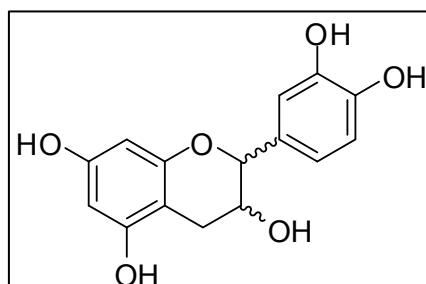


Tabela 6 – Dados obtidos na detecção do metabólito catequina presente na fração P6 do lenho de *T. mucronata* através da técnica UPLC-TOF-EM.

Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	Modo de ionização	m/z experimental	m/z teórico	Desvio (ppm)
3,12	$C_{15}H_{14}O_6$	ESI+ ($[M+H]^+$)	291,0864	291,0869	- 1,7
	$C_{15}H_{14}O_6$	ESI- ($[M-H]^-$)	289,0702	289,0712	- 3,4

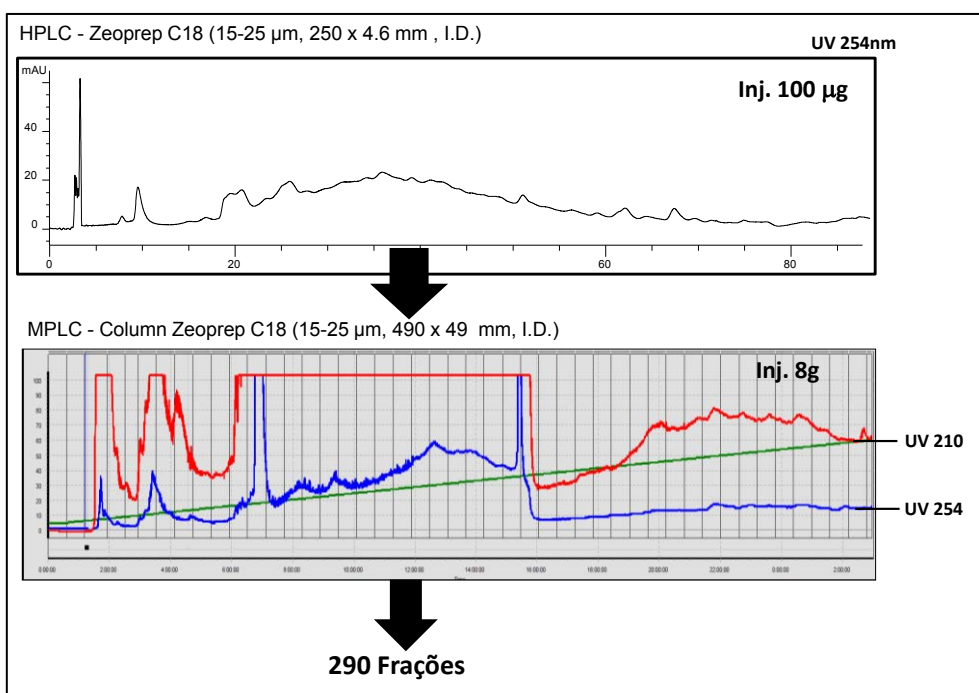
Através dos resultados obtidos não foi possível identificar os demais constituintes presentes na fração P6 do lenho de *T. mucronata*. Sendo assim foi planejado o isolamento destes através da técnica de cromatografia líquida

sob pressão reduzida (MPLC). A descrição da metodologia aplicada e os resultados obtidos estão detalhados no tópico a seguir.

4.8 Purificação da fração P6 através da técnica MPLC-UV

A fim de isolar os constituintes químicos não detectados presentes nas regiões do perfil cromatográfico onde há atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase e Dragendorff positivo, 8 g da fração P6 (obtidos após filtração do extrato EtOH de *T. mucronata* sobre gel de poliamida) foram submetidos a separação cromatográfica em larga escala através da técnica MPLC-UV. As condições de separação analítica obtidas através da técnica de CLAE-DAD foram transferidas para cromatografia preparativa MPLC-UV como ilustrado na Figura 17 a seguir (GUILLARME et al., 2007; GUILLARME et al., 2008). A separação foi realizada com a fase móvel composta por água e MeOH nas bombas A e B respectivamente, ambas contendo 0,1 % de ácido fórmico. Através deste procedimento foram obtidas 290 frações.

Figura 17 – Ilustração da transposição das análises de CLAE da fração P6 analítico (100 µg) para MPLC preparativo (8 g).



Para a determinação da composição química das frações obtidas, estas foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM. O resultado destas análises demonstrou que dentre estas, oito continham compostos puros. As frações **Fr 8** (80 mg), **Fr 18** (25,8 mg), **Fr 23** (66,5 mg), **Fr 43** (3 mg), **Fr 131** (23,7 mg), **Fr 204** (28,0 mg), **Fr 252** (21,2 mg) e a **Fr 264** (8 mg). Estas frações foram analisadas pelas técnicas de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais (RMN 1 e 2D), o que resultou na completa caracterização dos compostos presentes, como descrito no tópico a seguir.

4.9 Elucidação estrutural dos compostos isolados da fração P6 diretamente do fracionamento por MPLC-UV

Fração 8

O composto presente na fração 8 (80 mg), apresentou-se como um sólido, amorfo e solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF-EM no modo positivo ($[M+H]^+$) para esta fração apresentou valor de m/z de 205,1347, compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{16}N_2O$ (erro = 2,9 ppm) (Figura 18).

Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C desta fração apresentaram sinais referentes ao núcleo triptamínico, condizente com a fórmula molecular gerada pela análise por HRMS. Tal observação foi obtida com base nos espectros de RMN de ^{13}C , apresentando 12 sinais, e RMN 1H o qual apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos característico de um sistema ABX, δ_H (ppm) 7,08 (*d*; $J = 2,2$ Hz; H-4), δ_H 6,87 (*dd*, $J = 8,7$ e $2,3$ Hz, H-6) e δ_H 7,41 (*d*; $J = 8,7$ Hz; H-7) (Figuras 19 e 20). Tal afirmação foi confirmada através do experimento de *g*COSY (Figuras 23). O sinal em δ_C (ppm) 149,5 sugere a presença de uma hidroxila ligada ao carbono na posição 5. Esta afirmação foi constatada através de experimento de *g*HMBC, com o acoplamento deste com os hidrogênios nas posições 4 e 7 (Figura 28). O sinal em δ_H 7,29 referente ao hidrogênio do núcleo indólico foi correlacionado com o carbono C-2 (δ_C 125,9),

através do experimento de *g*HMBC (Figura 28). Dois tripletos em δ_H 3,16 (*t*; *J* = 7,4 Hz) e δ_H 3,44 (*t*; *J* = 7,4) foram relacionados aos hidrogênios metilênicos H-10 e H-11 respectivamente. Estas observações foram confirmadas após análise por *g*COSY e *g*HMBC (Figuras 22, 25 e 26). O sinal em δ_H 2,90 (*s*, 6H) foi atribuído aos grupamentos metílicos ligados ao nitrogênio amínico ($-N(CH_3)_2$). Esta observação foi constatada através do experimento de *g*HMBC com o acoplamento deste sinal com o carbono na posição C-11 (δ_C 58,14) (Figura 26). A comparação dos resultados obtidos com aqueles presentes na literatura levou a identificação do composto presente na fração 8 como o alcaloide triptamínico 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**1**) (bufotenina). Esta é a primeira vez que este alcaloide é descrito em espécies de *Malpighiaceae* (SOMEI et al., 2001) (Figura 29, Tabela 7).

Bufotenina é um dos constituintes das sementes de *Anadenanthera colubrina* e *A. peregrina* (Fabaceae). As sementes destas espécies têm sido utilizadas como ingrediente na preparação de chás alucinógenos por culturas indígenas da América do Sul, Caribe e Central (TORRES; REPKE, 2006). Dentre outras fontes, bufotenina também pode ser encontrada na secreção de alguns sapos do gênero *Bufo* sp., que têm sido usados por povos antigos em rituais mágicos e xamânicos (LYTTLE; GOLDSTEIN; GARTZ, 1996).

Figura 18 – Espectro de massas de alta resolução (UPLC-TOF-EM) para o composto presente na fração 8, identificado como o alcaloide bufotenina (**1**).

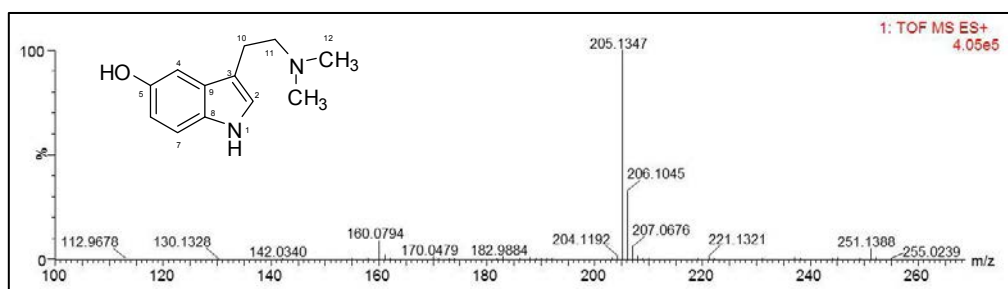


Figura 19 - RMN ^1H (500 MHz, D_2O) do alcaloide bufotenina (**1**).

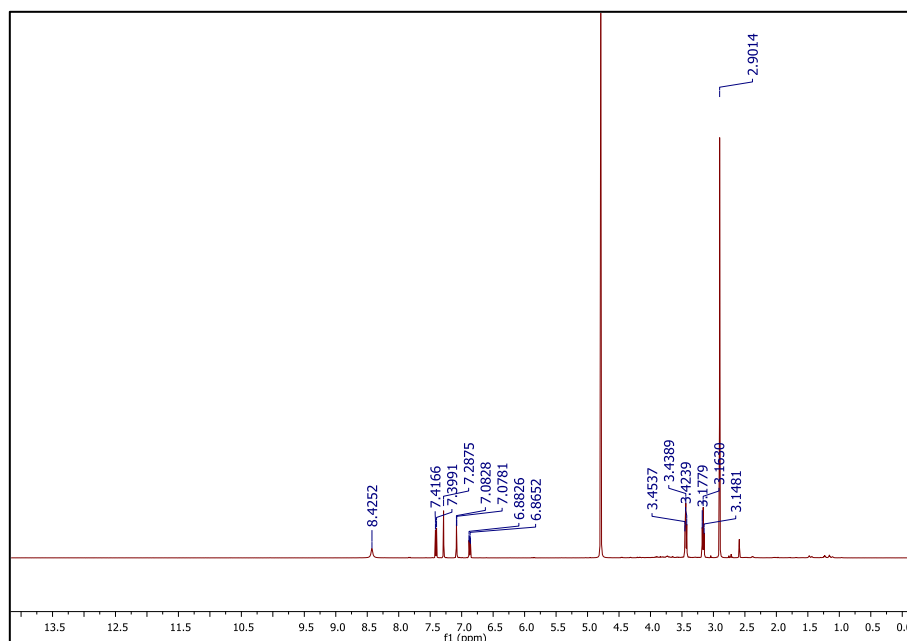


Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,80-7,50), da bufotenina (**1**).

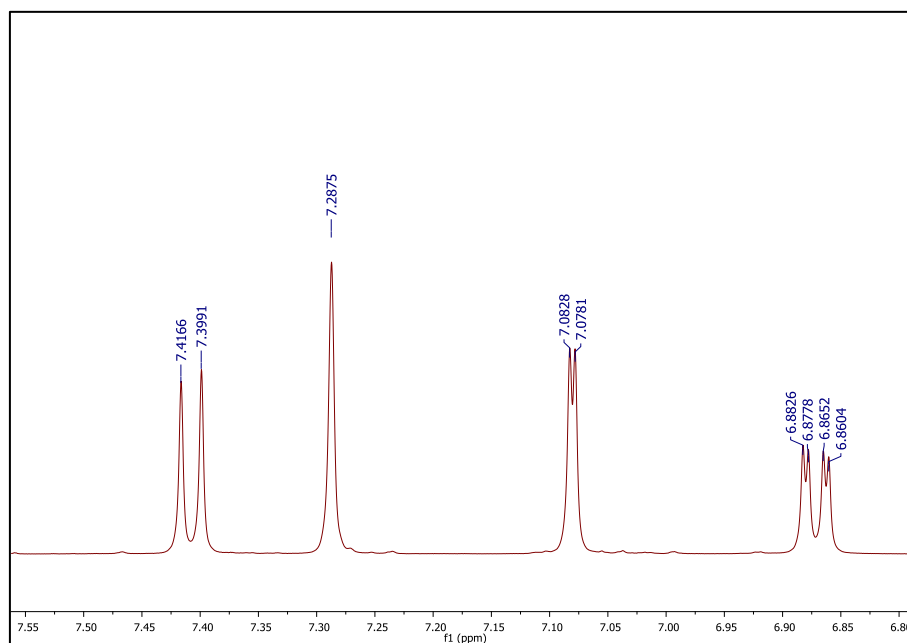


Figura 21 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,80-3,65), da bufotenina (**1**).

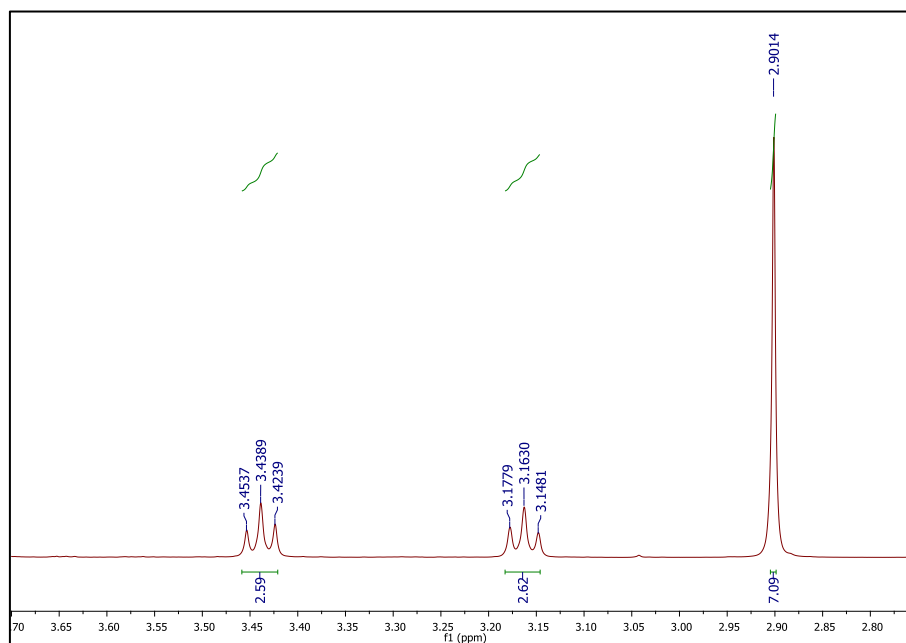


Figura 22 - Ampliação do mapa de contorno gCOSY (δ_{H} 2,4-3,7) da bufotenina (**1**).

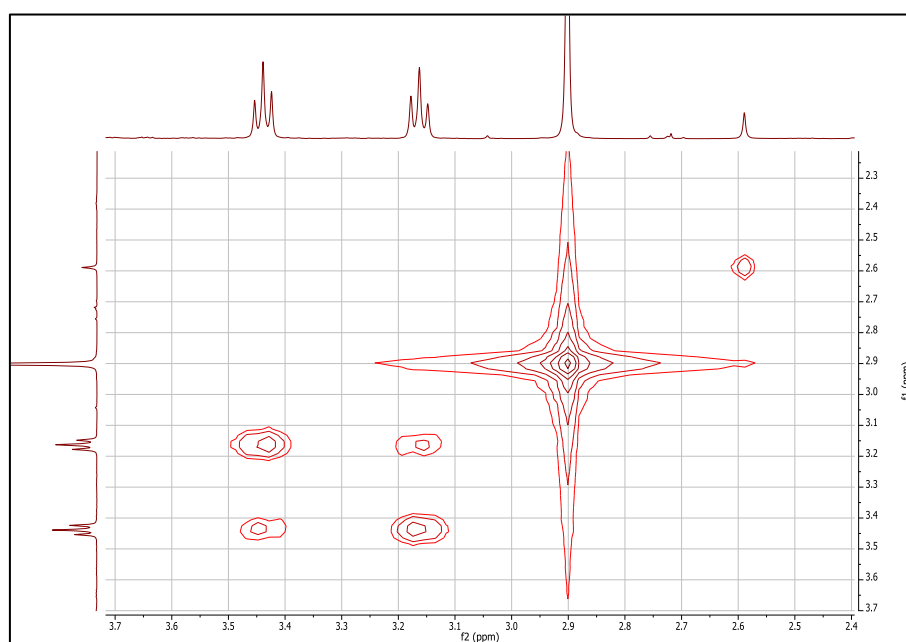


Figura 23 - Ampliação do mapa de contorno gCOSY (δ_{H} 6,75-7,50) da bufotenina (**1**).

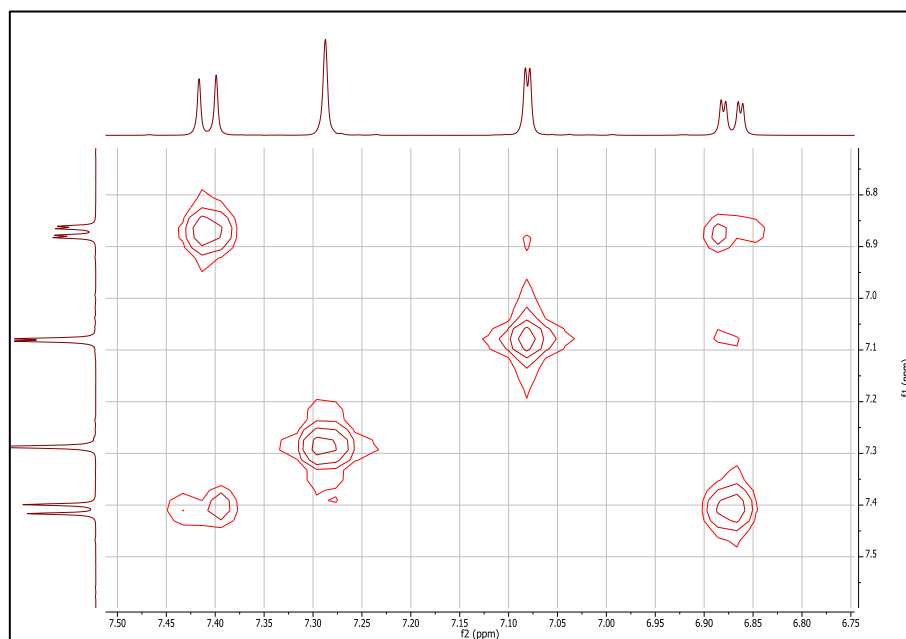


Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) da bufotenina (**1**).

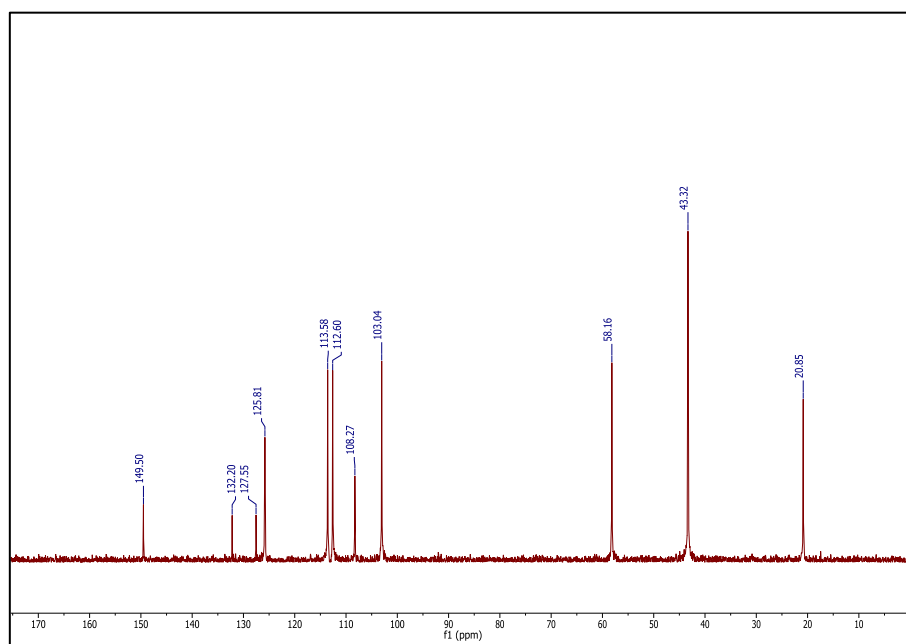


Figura 25 - Mapa de contorno gHSQC (500 MHz, D₂O) da bufotenina (1).

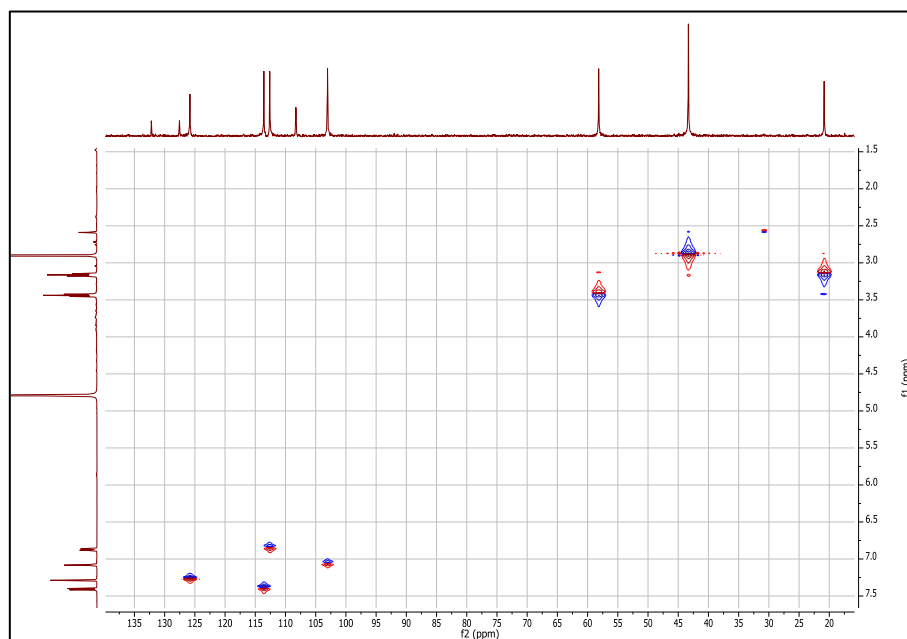


Figura 26 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 20-60), da bufotenina (1).

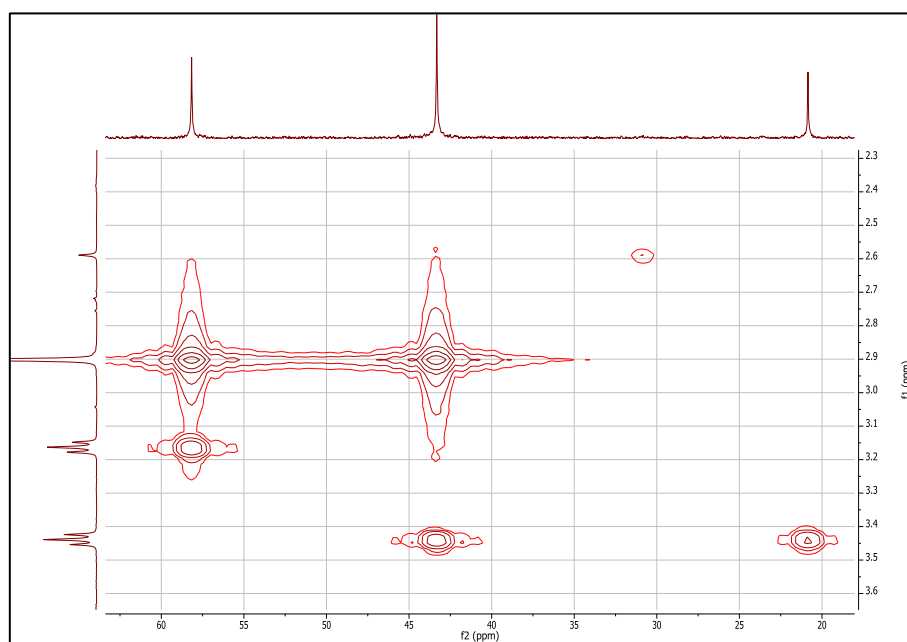


Figura 27 - Ampliação do mapa de contorno *g*HMBC (δ_c 104-130), da bufotenina (**1**).

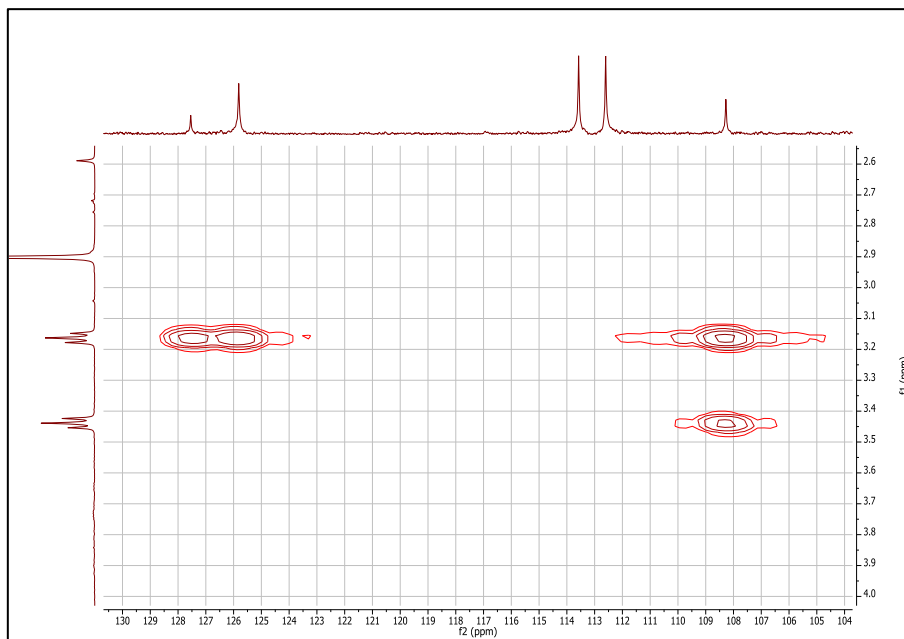


Figura 28 - Ampliação do mapa de contorno *g*HMBC (δ_c 98-154), da bufotenina (**1**).

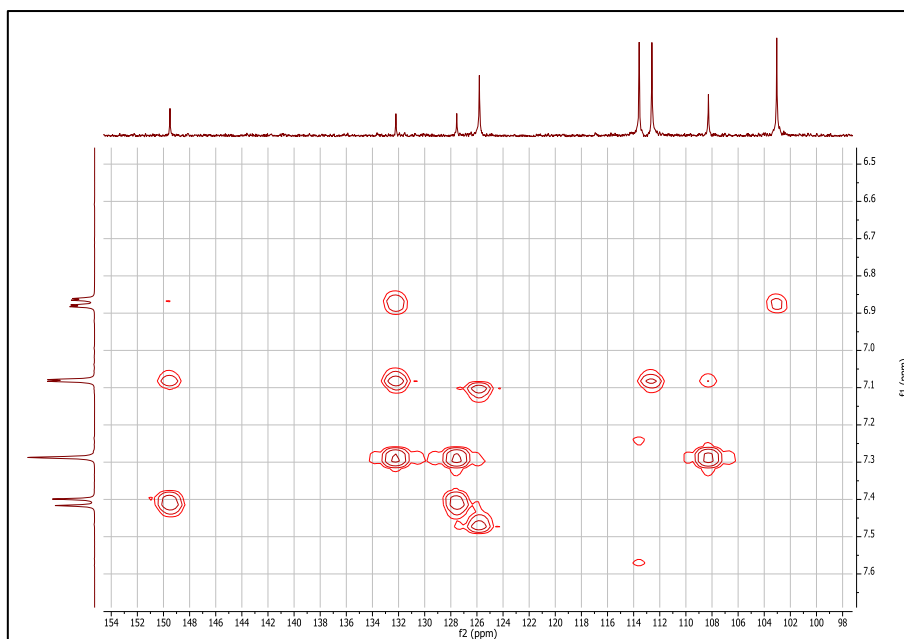


Figura 29 - Estrutura do alcaloide 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (bufotenina, **1**).

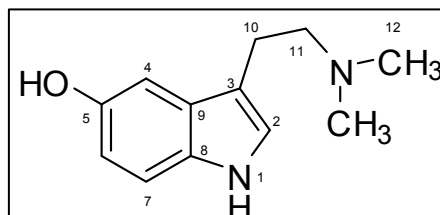


Tabela 7 - Dados de RMN (500 MHz, D₂O) mono e bi dimensionais do alcaloide 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (bufotenina, **1**).

Posição	δ_H^a (m ^b ; J)	δ_C (ppm)	<i>g</i> HMBC
2	7,29 (s)	125,8	127,5(9), 132,2(8), 108,3(3)
3		108,3	
4	7,08 (<i>d</i> ; 2,3)	103,0	132,2(8), 112,6(6), 149,5(5), 108,3(3)
5		149,5	
6	6,87 (<i>dd</i> ; 8,7 e 2,3)	112,6	103,0(4), 132,2(8)
7	7,41 (<i>d</i> ; 8,7)	113,6	127,5(9), 149,5(5)
8		132,2	
9		127,5	
10	3,16 (<i>t</i> ; 7,4)	20,8	127,5(9), 108,3(3), 125,8(2), 58,1(11)
11	3,44 (<i>t</i> ; 7,4)	58,1	108,3(3), 20,8(10), 43,3(13), 43,3(14)
N-CH₃	2,90 (s)	43,3	58,1(11), 43,3(13)

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

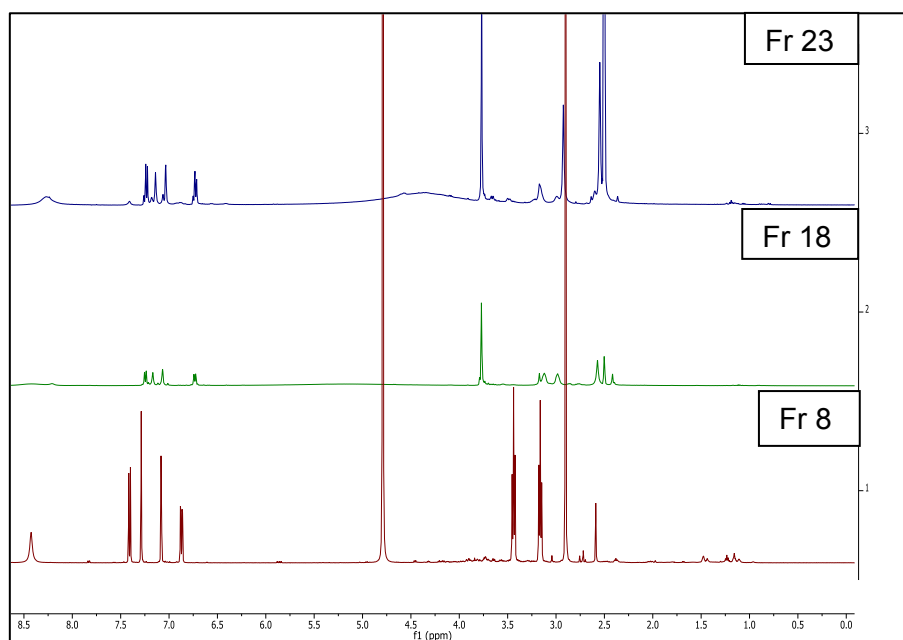
^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

Frações 18 e 23

Os compostos presentes nas frações 18 e 23 apresentaram espectros de RMN ¹H semelhantes ao do composto **1**, como pode ser observado na Figura 30, abaixo.

Figura 30 - Comparação dos espectro de RMN ^1H (500 MHz) das frações 8 (em D_2O), 18 e 23 (em $\text{DMSO}-d_6$).



A análise por UPLC-TOF-EM da fração 18 no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$) apresentou m/z 205,1346, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ (erro = 2,4 ppm). Estes dados juntamente com a observação feita acerca da similaridade entre os espectros de RMN ^1H levaram a crer que o composto presente na fração 18 é um isômero do alcaloide bufotenina (**1**).

O espectro de RMN ^1H desta fração, apresentou sinal referente a uma metoxila em δ_{H} (ppm) 3,77 (s, 3H), que foi correlacionado com C-5 (δ_{C} 153,1) através do espectro de gHMBC (Figura 35). Outro sinal diferente daquele observado no RMN de ^1H da bufotenina é a presença de apenas um grupamento metílico ligado ao nitrogênio amínico (Figura 33). A comparação dos resultados obtidos com aqueles presentes na literatura levou a identificação do composto presente na fração 18 como o alcaloide triptamínico 5-metoxi-*N*-metiltriptamina (**2**) (SOMEI et al., 2001). Esta é a primeira vez que este alcaloide é descrito em espécies de Malpighiaceae (Figura 42, Tabela 8).

5-metoxi-*N*-metiltriptamina foi descrito anteriormente em espécies da família (Poaceae), *Arundo donax*, *Phalaris arundinacea*, *P. tuberosa* ou *P.*

aquática (em inglês, *canary grass*). (CULVENOR; DAL BOM; SMITH, 1964; McKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984; GHOSAL et al., 1972; WILKINSON, 1958).

Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução (UPLC-TOF-EM) para o composto presente na fração 18, identificado como o alcaloide 5-metoxi-*N*-metiltriptamina (**2**).

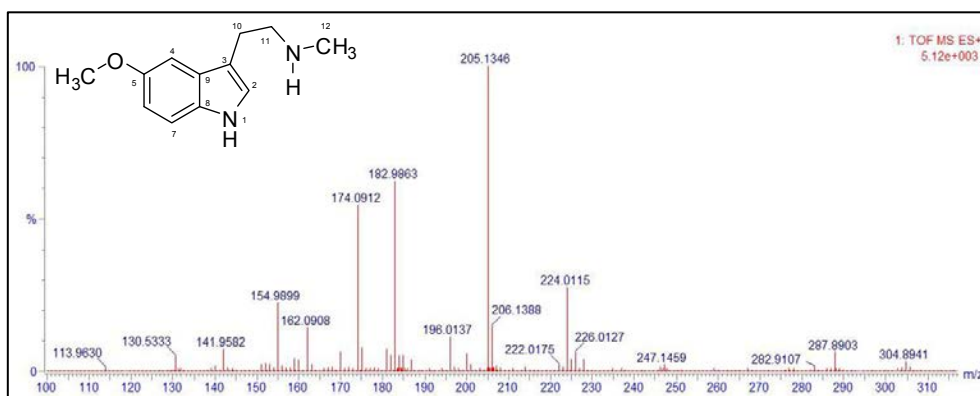


Figura 32 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do alcaloide 5-metoxi-*N*-dimetiltriptamina (**2**).

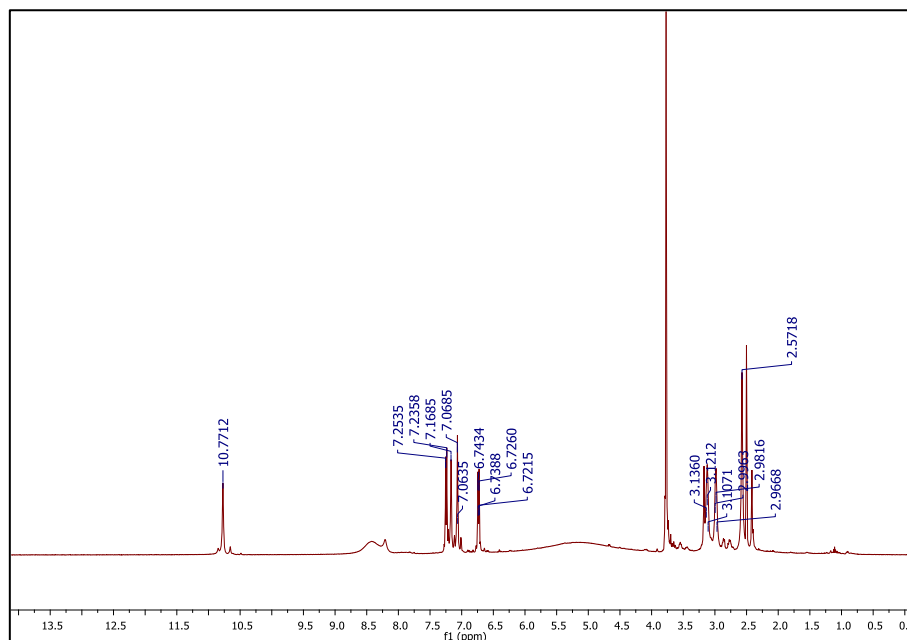


Figura 33 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,2-4,0), do alcaloide 5-metoxi-*N*-dimetiltriptamina (**2**).

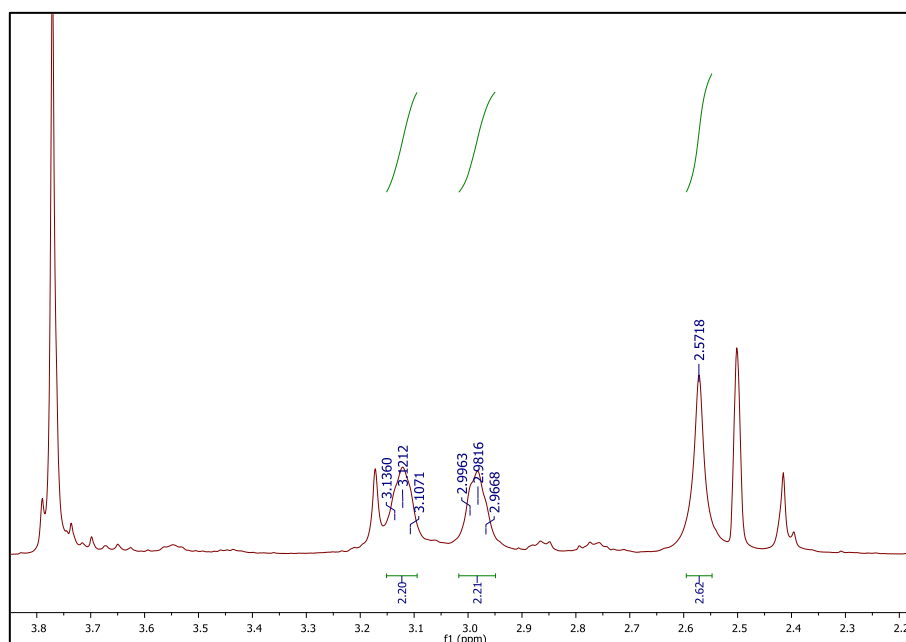


Figura 34 - Mapa de contorno gHSQC (δ_{C} 20-60), do alcaloide 5-metoxi-*N*-dimetiltriptamina (**2**).

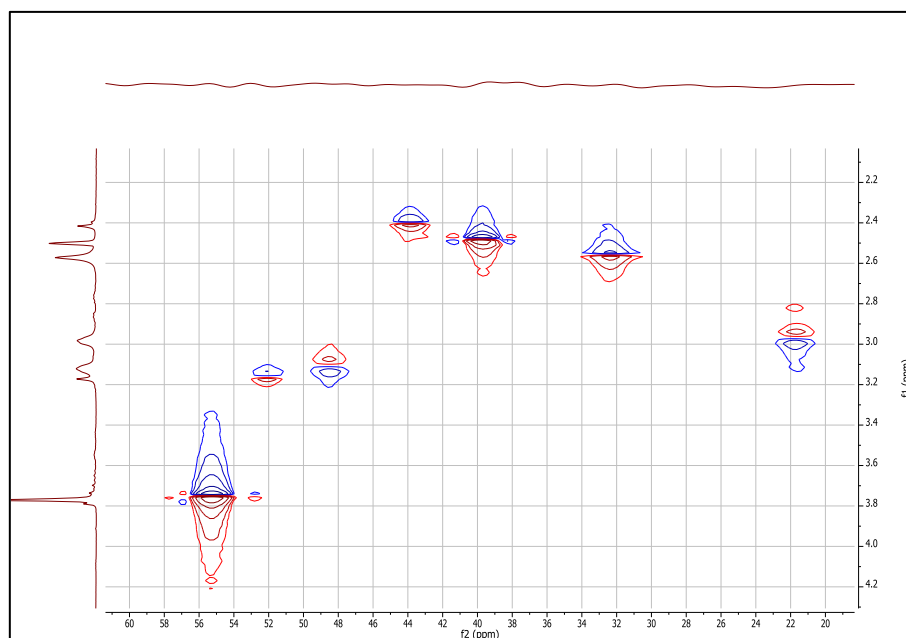
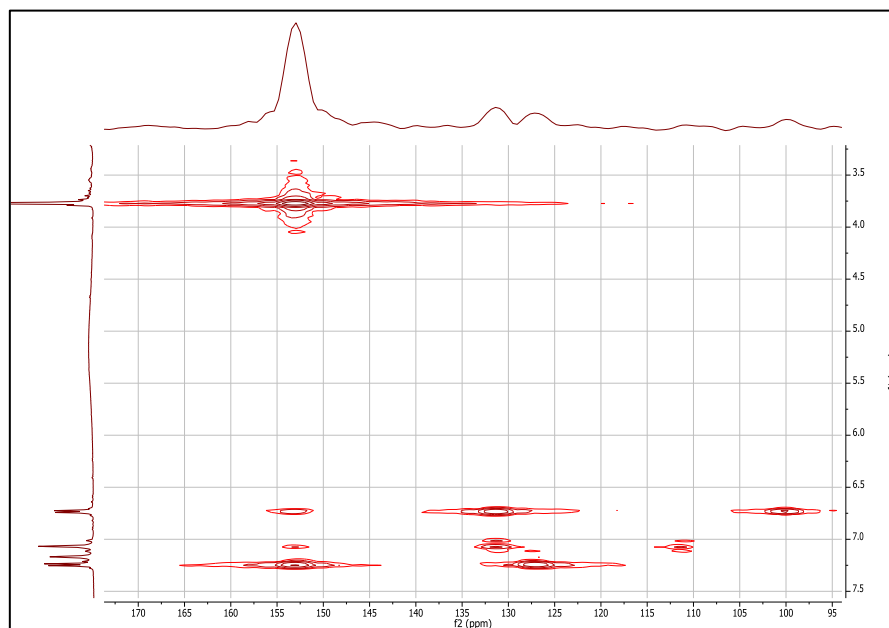


Figura 35 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 95-1170) do alcaloide 5-metoxi-*N*-dimetiltriptamina (**2**).



A análise por UPLC-TOF-EM do composto presente na fração 23, no modo positivo ($[M+H]^+$), apresentou m/z 219,1578, compatível com a fórmula $C_{13}H_{18}N_2O$ (erro = 0,5 ppm). Este resultado, juntamente com as observações feitas no espectro de RMN 1H , levou a hipótese de que a fração 23 contém alcaloide triptamínico análogo a bufotenina, mas com 14 Da adicionais, o que sugere a presença de uma metoxila ligado ao carbono 5. Esta hipótese foi confirmada através da observação do sinal no espectro de RMN 1H referente a uma metoxila em δ_H (ppm) 3,77 (s, 3H), que foi correlacionado com o carbono C-5 (δ_c 152,7) através de experimentos de gHMBC (Figura 40). Foi observado também que o sinal referente aos hidrogênios metilênicos nas posições C-10 e C-11 apareceram como um único multiplete em δ_H 2,92 (m; 4H) (Figura 38). Os dados obtidos para este composto foram comparados com os da literatura, levando a identificação do composto presente na fração 23 como o alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**) (5-MeO-bufotenina). Está é a primeira descrição desse alcaloide em espécies de Malpighiaceae (Figura 42, Tabela 8).

5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina foi descrita anteriormente como um dos constituintes da espécie vegetal *Virola calophylla* (Myristicaceae) (MILES et al., 1987). Assim como a bufotenina, 5-MeO-bufotenina é descrita em espécies

vegetais, que são utilizadas popularmente devido ao seu poder alucinógeno (LYTTLE; GOLDSTEIN; GARTZ, 1996; TORRES; REPKE, 2006).

Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 23, identificado como o alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**) .

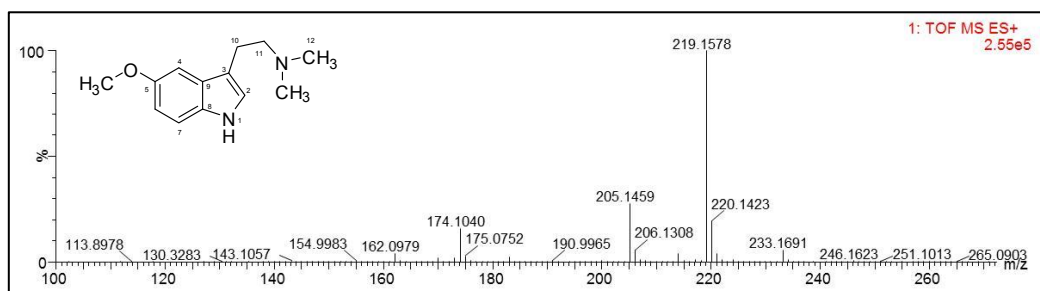


Figura 37 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**).

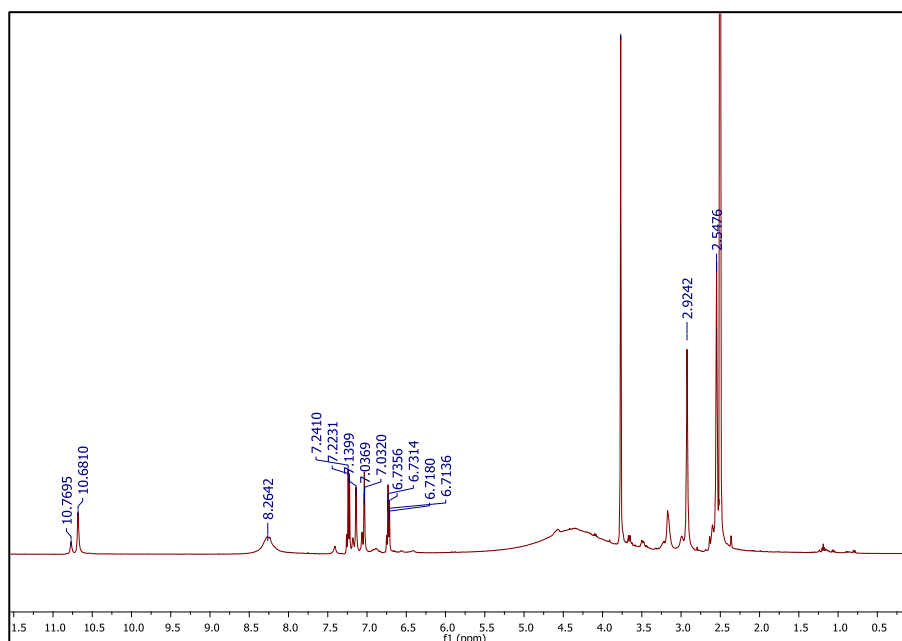


Figura 38 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 2,5-3,9), do alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**) .

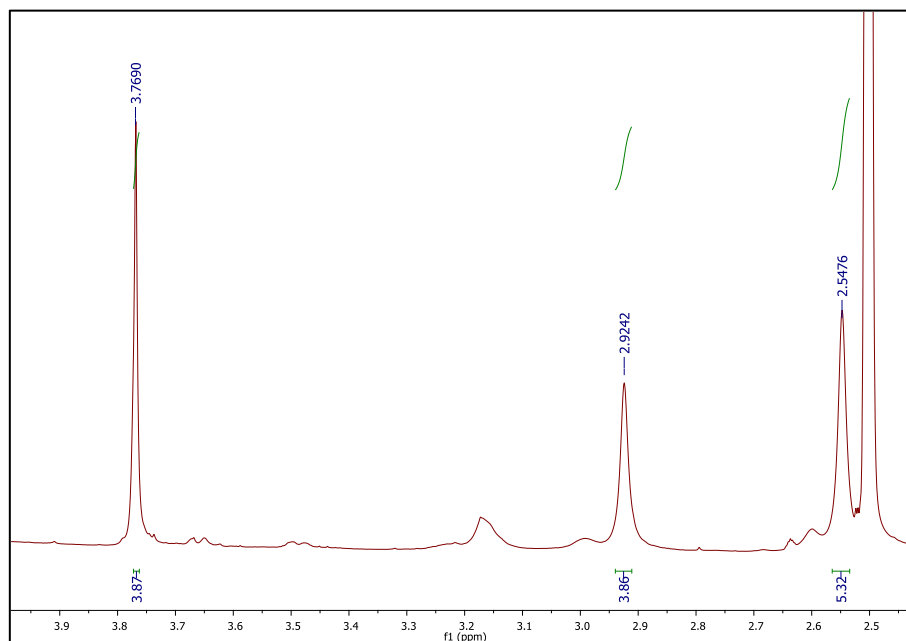


Figura 39 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_{C} 20-60) do alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**).

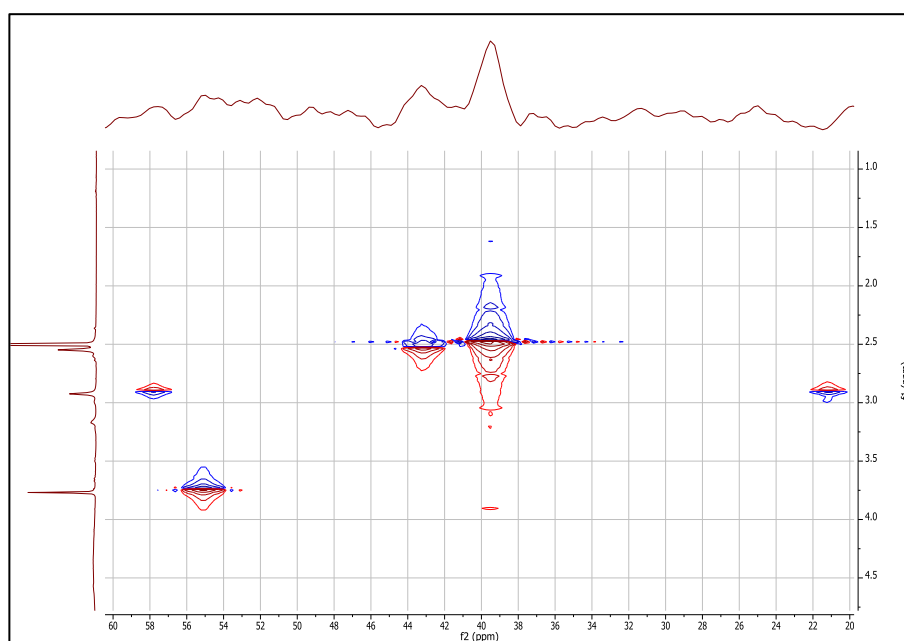


Figura 40 - Ampliação do mapa de contorno *g*HMBC (δ_c 140-165) do alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltryptamina (**3**).

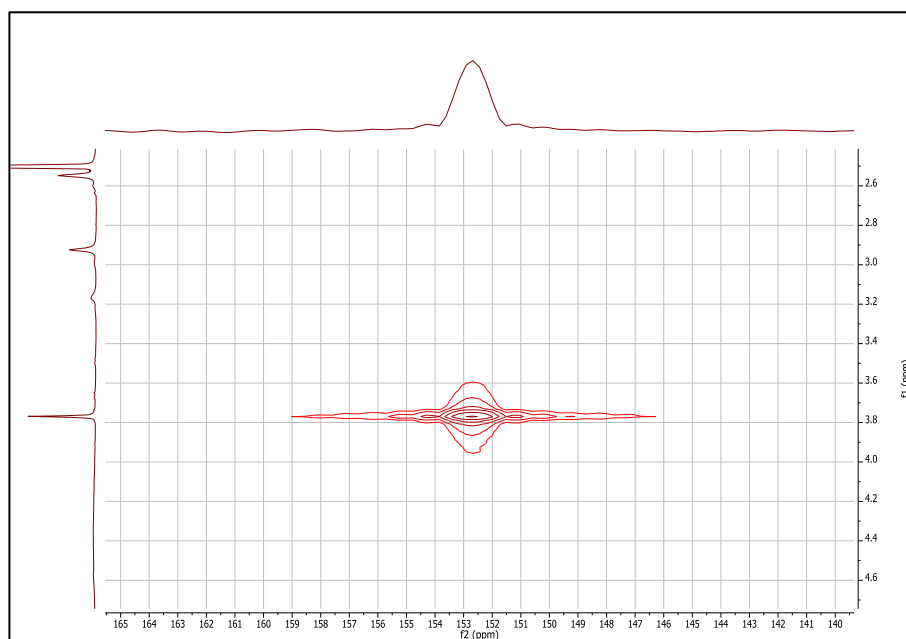


Figura 41 - Ampliação do mapa de contorno *g*HMBC (δ_c 140-165) do alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltryptamina (**3**).

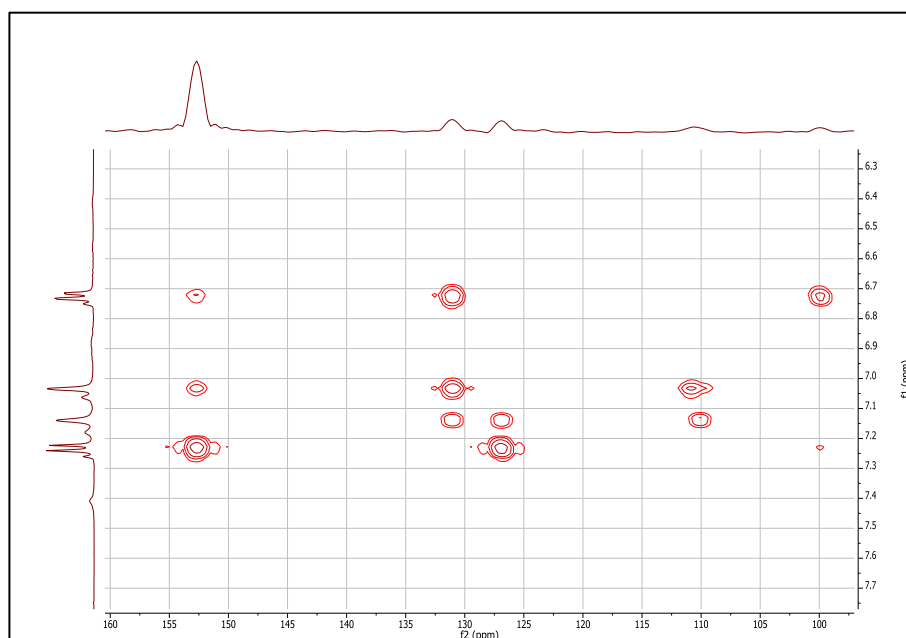


Figura 42 - Estruturas dos alcaloides triptamínicos isolados do lenho de *T. mucronata*.

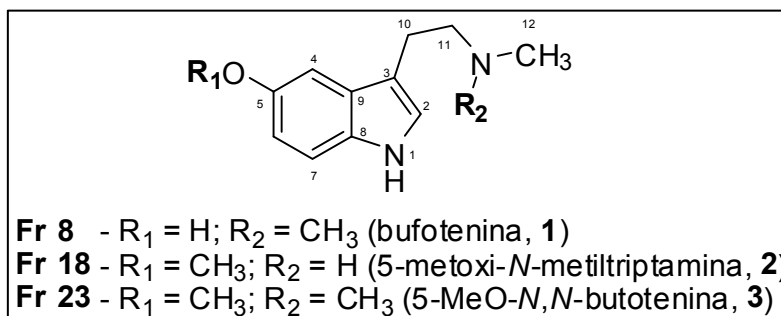


Tabela 8 - Dados de RMN de ¹H e ¹³C (500 MHz, DMSO-*d*₆) dos compostos **2** e **3**.

Posição	(2)		(3)	
	δ _c (ppm)	δ _H ^a (m ^b ; J ^c)	δ _c (ppm)	δ _H ^a (m ^b ; J ^c)
1		10,77 (s)		10,68 (s)
2	123,7	7,17 (s)	123,2	7,14 (s)
3	109,7		110,0	
4	100,0	7,06 (<i>d</i> ; 2,4)	99,9	7,03 (<i>d</i> ; 2,6)
5	153,1		152,7	
6	111,0	6,73 (<i>dd</i> ; 8,7 e 2,4)	110,8	6,72 (<i>dd</i> ; 8,7 e 2,2)
7		7,24 (<i>d</i> ; 8,8)	111,7	7,23 (<i>dd</i> ; 8,8)
8	131,4		131,0	
9	127,1		126,9	
10	21,6	2,98 (<i>t</i> ; 6,5)	21,2	2,92 (<i>m</i>)
11	48,4	3,12 (<i>t</i> ; 6,5)	57,8	2,92 (<i>m</i>)
12	32,3	2,57 (s)	43,1	2,55 (s)
R₁	55,2	3,77 (s)	55,1	3,77 (s)
R₂			43,1	2,55 (s)

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração 43

O composto presente na fração 43 (3 mg) foi obtido como um sólido amorfo, solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF-EM no modo

positivo ($[M+H]^+$) para esta fração apresentou valor de m/z de 217,1349, compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{16}N_2O$ (erro = 3,7 ppm) .

O espectro de RMN de 1H (Tabela 9) apresentou sinais na região de aromáticos referente a um sistema ABX, com sinais em δ_H (ppm) 6,85 (d ; 2 Hz), 6,63 (dd ; 8,7 e 2,4 Hz) e 7,14 (d ; 8,7 Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios nas posições H-5, H-7 e H-8, respectivamente. Assim como na determinação dos hidrogênios metilênicos do alcaloide 5-MeO-bufotenina (**4**), o sinal em δ_H 2,66 (m ; 4H) foi atribuído aos hidrogênio nas posições H-3 e H-4, respectivamente. Essa hipótese foi confirmada através do experimento de gHSQC com a correlação deste sinal com os δ_C 21,8 e 53,1, respectivamente. O sinal em δ_H 3,50 (s ; 2H) foi correlacionado com os hidrogênios metilênicos na posição C-1 (δ_C 52,6) através dos experimentos de gHSQC e gHMBC. Foram observados também dois singletos em δ_H 3,50 (s ; 2H) e 3,73 (s ; 3H), que foram correlacionados a metila ligada ao nitrogênio na posição 2 e a metoxila ligado ao carbono na posição C-5, respectivamente. Estas hipóteses foram confirmadas pelos experimentos de gHMB. Os dados obtidos foram contrastados com aqueles presentes na literatura (WENIGER et al., 1995; JOSSANG et al., 1991), levando a identificação do compostos presente na fração 43 como o alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**). Esta é a primeira descrição deste alcaloide em espécies da família Malpighiaceae.

2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico foi descrito anteriormente como um dos constituintes em espécies dos gêneros *Dutailleya* (Rutaceae), *Virola* (Myristicaceae), *Phalaris* (Poaceae). Estas espécies são descritas como alucinógenas e tóxicas. Há relatos de mortes de animais após a ingestão das folhas da espécie *Phalaris arundinacea* L. (AGURELL et al., 1969; BAUDOUIN et al., 1981; GANDER et al., 1976; KENNEDY et al., 1986).

Figura 43 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 43, identificado como o alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**).

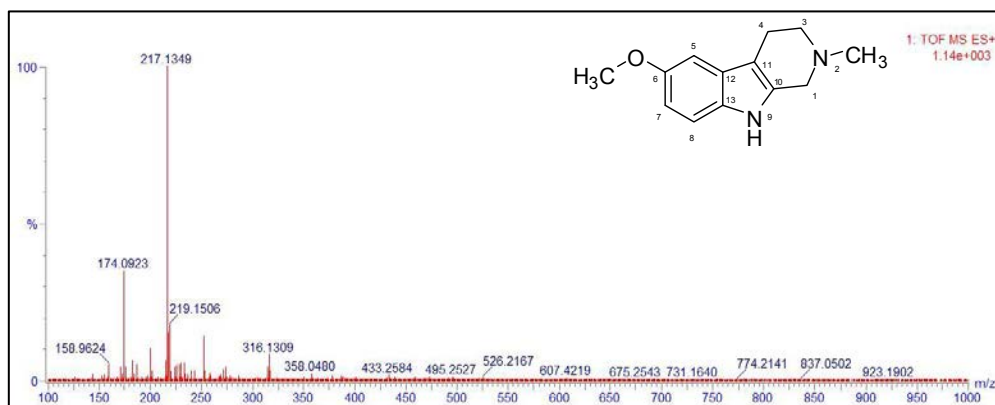


Figura 44 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**).

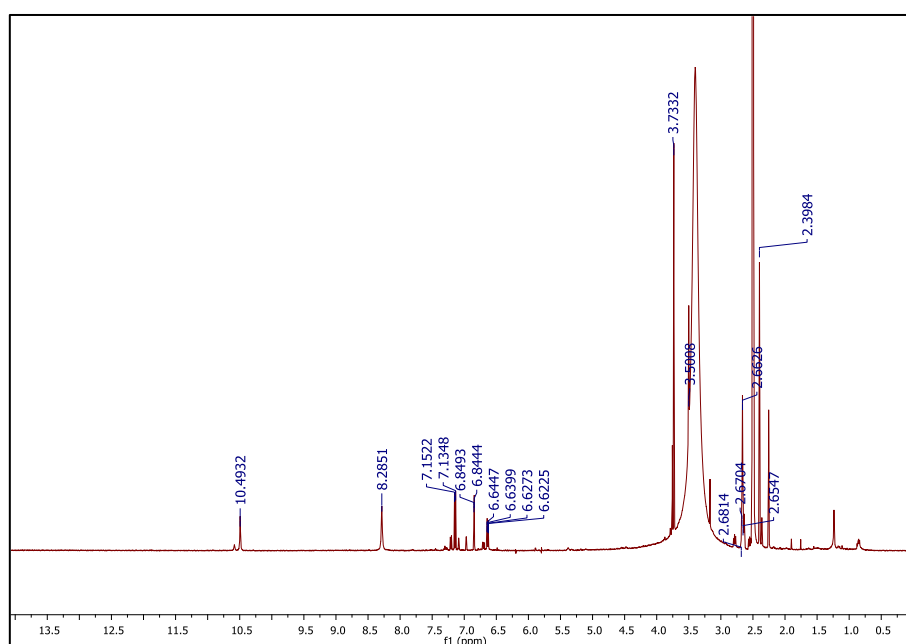


Figura 45 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 6,50-7,25), do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**).

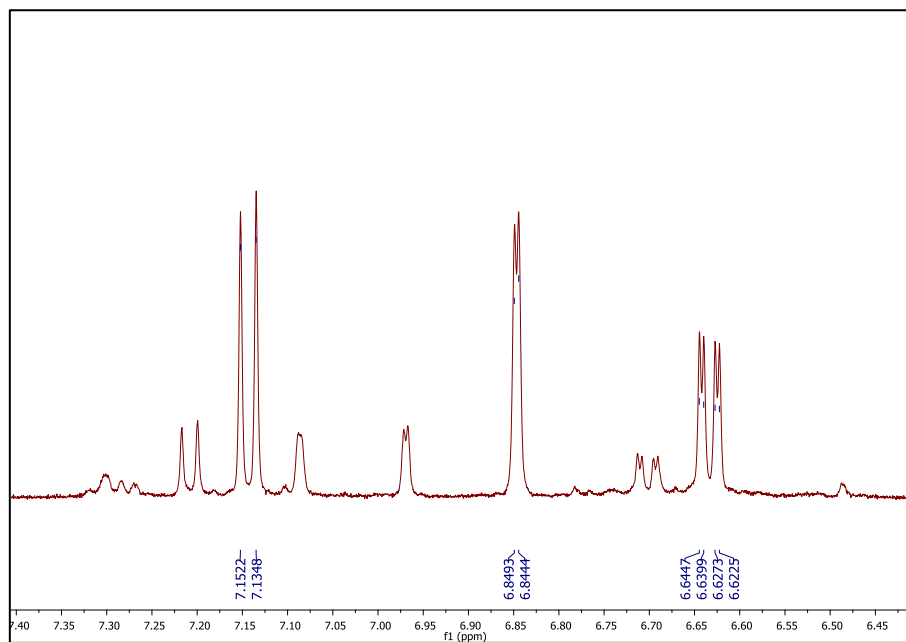


Figura 46 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 2,2-3,8) do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**).

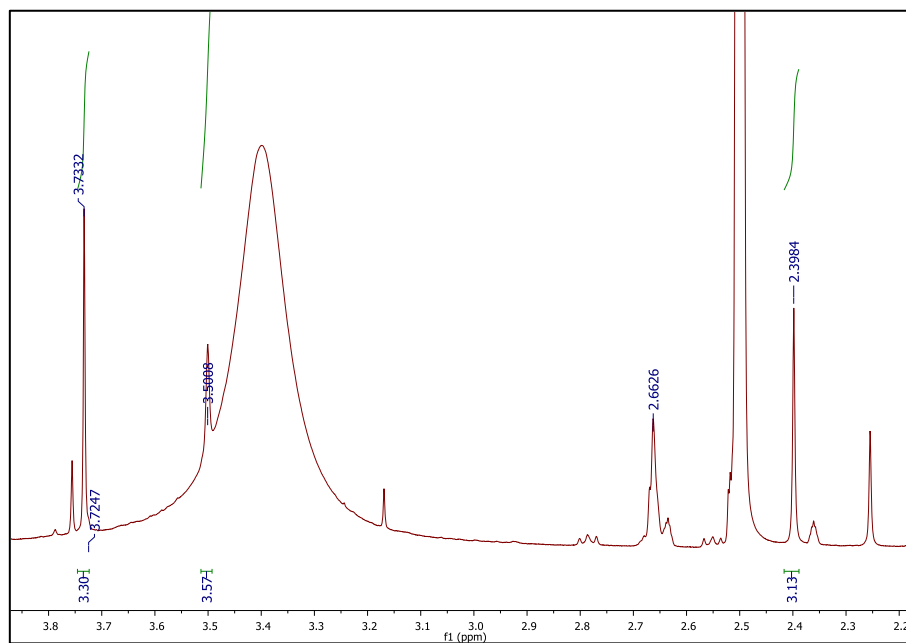


Figura 47 - Estrutura do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**) isolado do extrato EtOH do lenho de *Tetrapterys mucronata*.

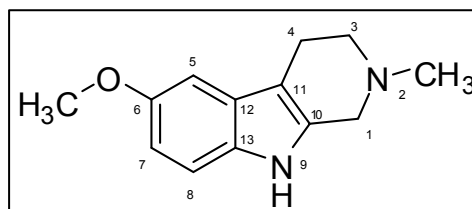


Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6) do alcaloide 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico (**4**) e da literatura (CD $_3$ OD).

Posição	(4)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1	3,50 (s)	52,6	3,65 (s)	53,2
3	2,66 (m)	53,10	2,84 (m)	54,1
4	2,66 (m)	21,80	2,84 (m)	22,1
5	6,85 (d; 2)	100,2	6,89 (d; 2,3)	101,0
6		153,4		155,0
7	6,63 (dd; 8,7 e 2,4)	110,3	6,69 (dd; 8,7 e 2,3)	111,7
8	7,14 (d; 8,7)	111,8	7,15 (d; 8,7)	112,4
9	10,49 (s)		2,52 (s)	
10		134,2		133,0
11		106,4		107,7
12		127,5		128,5
13		131,3		132,6
-NCH $_3$ (2)	2,40 (s)	45,9	2,52 (s)	45,5
6-OCH $_3$	3,74 (s)	55,8	3,79 (s)	56,3

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

*JOSSANG et al., 1991

Fração 131

O composto presente na Fração 131 (23,7 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópico (RMN) e espectrométrico (UPLC-TOF-EM). A Tabela 11 abaixo ilustra os resultados obtidos pela análise por RMN.

A análise por UPLC-TOF-EM no modo negativo apresentou valor de m/z de 551,2194 $[M-H]^-$, compatível com a fórmula $C_{27}H_{36}O_{12}$ (erro = 6,3 ppm), o que corrobora com a estrutura proposta (Figura 49). O alfa-D para esta fração apresentou valor de + 32 (c 1,0; MeOH). Através da comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura foi possível caracterizar o composto presente na fração 131 como a lignana: (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (**11**) (SADHU et al., 2007). Esta lignana é descrita como um dos constituintes químicos em espécies de diversas famílias, com distintas atividades, como ilustrado na Tabela 10, a seguir.

Tabela 10 – Descrição das espécies que acumulam a lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo e suas respectivas atividades (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
Caule de <i>Tilia amurensis</i> Rupr., Tiliaceae	Anticâncer e anti-inflamatória	KIM et al., 2012
Caule de <i>Ficus glumosa</i> Del., Moraceae	Citotoxicidade	NANA et al., 2012
Caule de <i>Betula pendula</i>, Betulaceae		LIIMATAINEN et al., 2012
Ramos de <i>Eucalyptus maiden</i>, Myrtaceae		TIAN et al., 2012
Raiz <i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>, Ulmaceae.	Anti-inflamatória	ZHENG et al., 2011
<i>Litsea glutinosa</i>, Lauraceae		PAN et al., 2010
<i>Casearia velutina</i> Bl., Flacourtiaceae		CHAI et al., 2010
<i>Iryanthera juruensis</i>, Myristicaceae	Leishmanicida (<i>Leishmania amazonenses</i>)	MORAIS et al., 2009
Caule, <i>Saraca asoca</i>, Fabaceae	Antioxidante	SADHU et al., 2007
Caule de <i>Betula pendula</i> Roth, Betulaceae.		HILTUNEN; PAKKANEN; ALVILA, 2006
Sementes de <i>Combretum quadrangulare</i>, Combretaceae	Hepatoprotetora	ADNYANA et al., 2000
Caule de <i>Trichilia stipulata</i>, Meliaceae		CORTEZ et al., 1998
<i>Quercus petraea</i>, Fagaceae		DADA; CORBANI, 1989

Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução da lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (**11**).

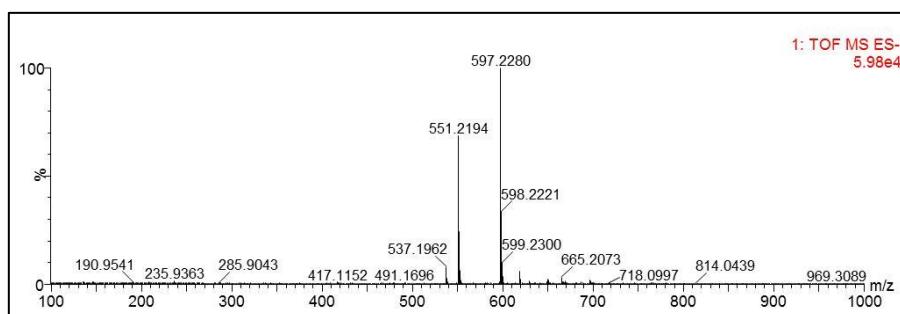


Figura 49 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (**11**).

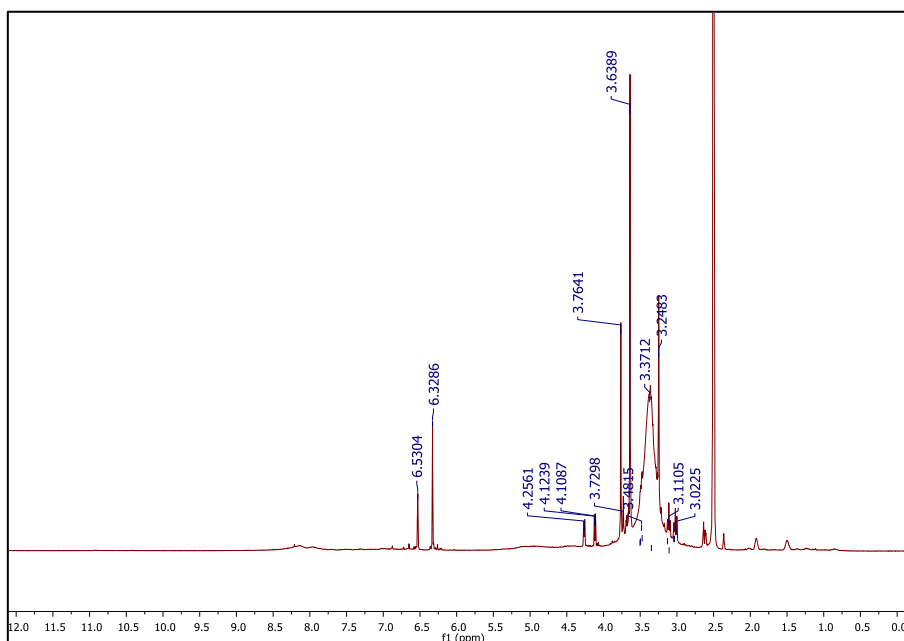


Figura 50 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 3,6-4,4) da lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (**11**).

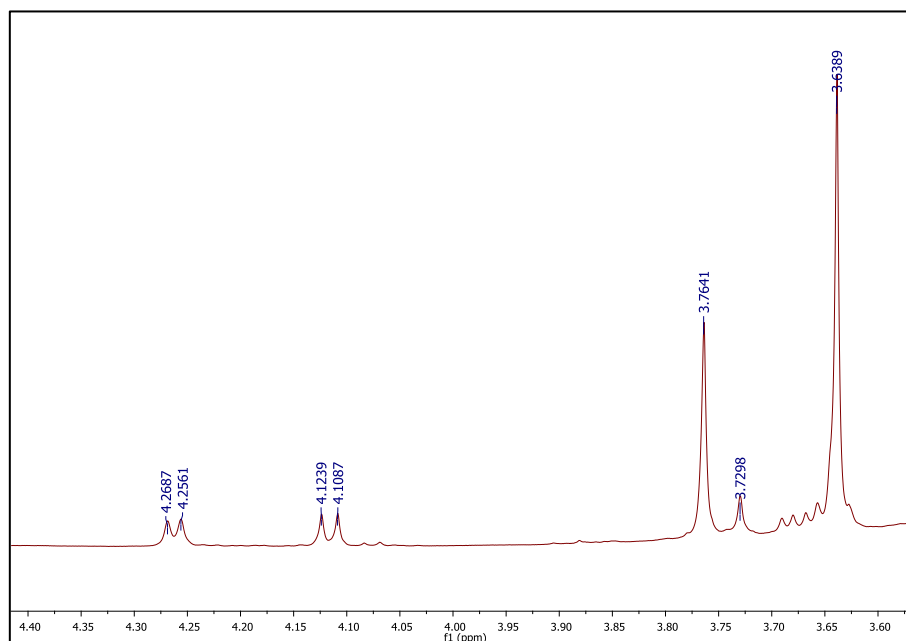


Figura 51 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 1,4-3,5) da lignana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilanopiranosídeo (**11**).

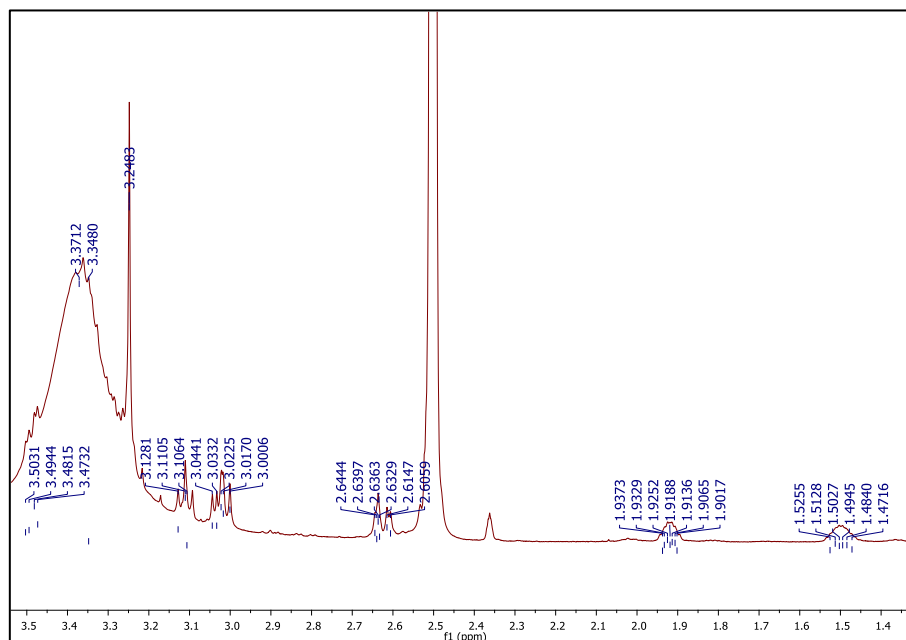


Figura 52 – Estrutura da lignana (+)-lioni-resinol-8'- α -O- β -D-xilopiranosídeo (**11**), isolada do lenho de *T. mucronata*.

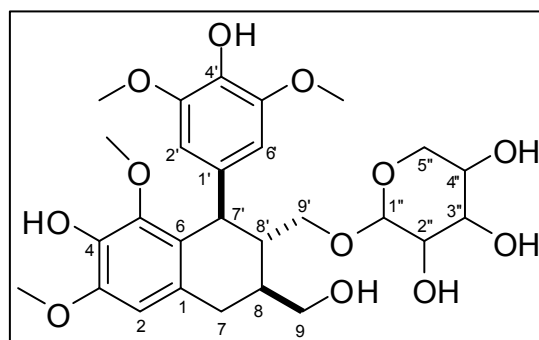


Tabela 11 - Valores de RMN de ^1H e ^{13}C da ligana (+)-lioniresinol-8' α -O- β -D-xilopiranosídeo (**11**, em DMSO- d_6) e dos dados presentes na literatura (CD $_3$ OD).

Posição	(11)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})*	δ_{C} (ppm)*
1		128,0		130,1
2	6,53 (s)	106,4	6,56 (s)	107,8
3		146,5		148,6
4		136,8		138,9
5		146,1		147,6
6		124,4		126,4
7a	2,62 (<i>dd</i> ; 15,0 e 4,2)	32,2	2,71 (<i>dd</i> ; 15,0 e 4,6)	33,9
7b	2,51 (<i>m</i>)		2,63 (<i>dd</i> ; 15,0 e 11,3)	
8	1,50 (<i>m</i>)	38,6	1,66 (<i>m</i>)	40,5
9a	3,49 (<i>dd</i> ; 10,7 e 4,3)	63,4	3,65 (<i>dd</i> ; 11,0 e 4,3)	66,0
9b	3,34 (<i>dd</i> ; 10,7 e 6,7)		3,55 (<i>dd</i> ; 11,0 e 6,7)	
3-OMe	3,76 (s)	55,3	3,84 (3H, s)	56,6
5-OMe	3,25 (s)	58,3	3,31 (3H, s)	60,0
1'		137,4		139,4
2'	6,33 (s)	105,7	6,42 (1H, s)	106,9
3'		147,1		149,0
4'		132,9		134,5
5'		147,1		149,0
6'	6,33 (s)	105,7	6,42 (s)	106,9
7'	4,26 (<i>d</i> ; 6,3)	40,6	4,37 (<i>d</i> ; 6,7)	43,0
8'	1,92 (<i>m</i>)	44,4	2,03 (<i>m</i>)	46,7
9'a	3,65 (<i>m</i>)	68,5	3,83 (<i>dd</i> ; 9,8 e 3,7)	71,0
9'b	3,24 (<i>m</i>)		3,41 (<i>dd</i> ; 9,8 e 3,7)	
3' e 5'-OMe	3,64 (s)	55,8	3,74 (s)	56,8
1''	4,12 (<i>d</i> ; 8,0)	103,6	4,21 (<i>d</i> ; 7,6)	105,5
2''	3,02 (<i>t</i> ; 8,0)	72,8	3,21 (<i>dd</i> ; 8,9 e 7,6)	75,0
3''	3,11 (<i>t</i> ; 8,0)	76,4	3,27 (1H, <i>m</i>)	78,0
4''	3,28 (<i>m</i>)	69,3	3,47 (<i>ddd</i> ; 10,4, 9 e 5,8)	71,3
5''a	3,67 (<i>dd</i> ; 11,3 e 5,4)	65,4	3,82 (1H, <i>dd</i> ; 11,6 e 5,8)	67,0
5''b	3,03 <i>m</i>		3,16 (1H, <i>dd</i> ; 11,6 e 5,8)	

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

* SADHU et al., 2007

Fração 204

O composto presente na Fração 204 (28,9 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH, esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (RMN) e espectrométricos (UPLC-TOF-EM). A Tabela 13 abaixo ilustra os resultados obtidos pela análise por RMN.

A análise por UPLC-TOF-EM no modo positivo apresentou valor de m/z de 314,1373 ($[M+H]^+$), compatível com a fórmula $C_{18}H_{19}NO_4$ (erro = 6,0), o que corrobora com a estrutura proposta como sendo a amida *N-trans-feruloiltiramina* (moupinamida, **12**) (Figura 53). Esta hipótese foi confirmada após comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura (AL-TAWEEL et al., 2012; KING; CALHOUN 2005; SECA et al., 2001). Esta é a primeira descrição deste metabólito em espécies de Malpighiaceae. A Tabela 12 a seguir, ilustra as espécies onde esta amida já foi descrita e as respectivas atividades relatadas.

Tabela 12 - Descrição das espécies que acumulam moupinamida e suas respectivas atividades (quando relatadas).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Neolitsea aciculata</i> (Blume) Koidz, Lauraceae.	Atividade inibidora da enzima tirosinase	KIM et al., 2013
Raízes de <i>Liriope platyphylla</i>, Asparagaceae.	Estrogênicas e antiagregante plaquetária	TSAI et al., 2013
Partes aéreas de <i>Piper</i> <i>flaviflorum</i>, Piperaceae.		WU et al., 2013
Raízes de <i>Acorus gramineus</i>, Acoraceae.	Anticâncer e Anti-inflamatória	KIM et al., 2012
Partes aéreas de <i>Polygonum</i> <i>hyrcanicum</i>, Polygonaceae.	Anti-Trypanosoma (<i>Trypanosoma brucei</i> <i>rhodesiense</i>)	MORADI- AFRAPOLI et al., 2012
<i>Celtis africana</i>, Cannabaceae	Citotoxicidade, Anti- inflamatória e iAChE	AL-TAWHEEL et al., 2012
<i>Pisonia umbellifera</i> Seem., Nyctaginaceae.	Antitubercular	KUO et al., 2011
<i>Colocasia antiquorum</i> var. <i>esculenta</i>, Araceae	Antimelanogenica	KIM et al., 2010
Raízes e caule de <i>Erycibe</i> <i>hainanesis</i>, Convolvulaceae	Hepatoprotetora	SONG et al., 2010
Ramos de <i>Piper umbellatum</i>, Piperaceae.	Antioxidante e antifúngica	TABOPDA et al., 2008
<i>Peperomia duclouxii</i>, Piperaceae	Citotoxicidade	LI et al., 2007

Figura 53 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 204, identificado como a amida, moupinamida (**12**).

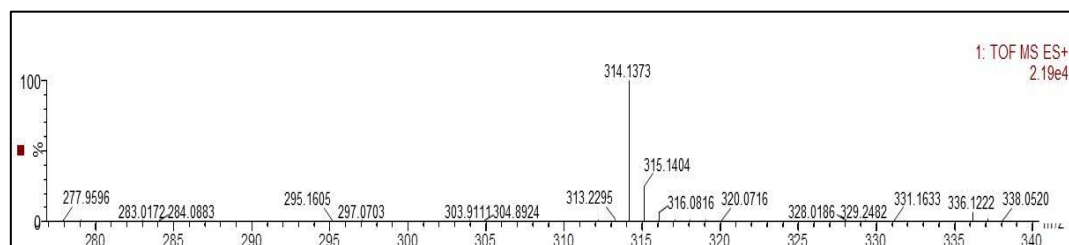


Figura 54 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da amida *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida) (**12**).

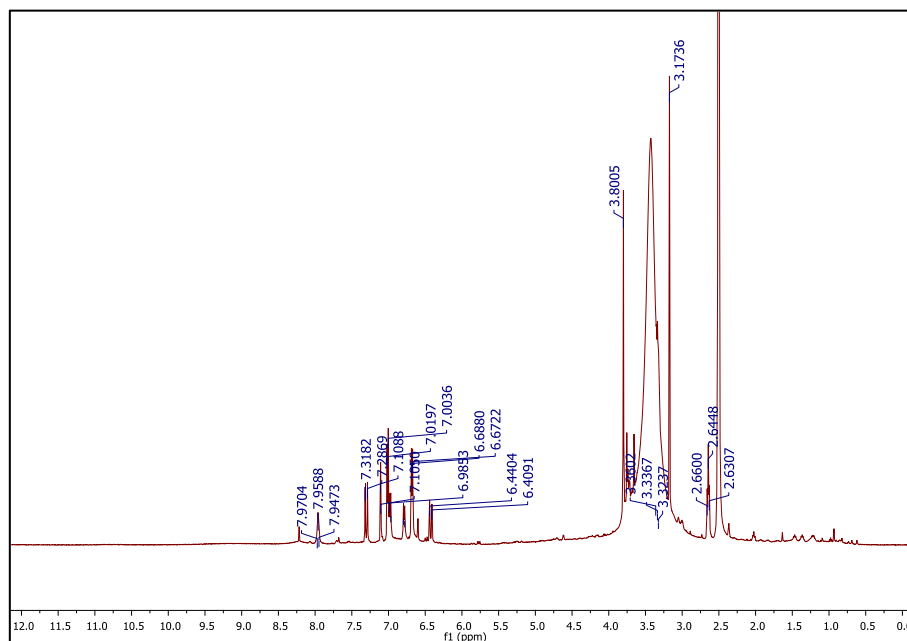


Figura 55 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,4-8,0) da moupinamida (**12**).

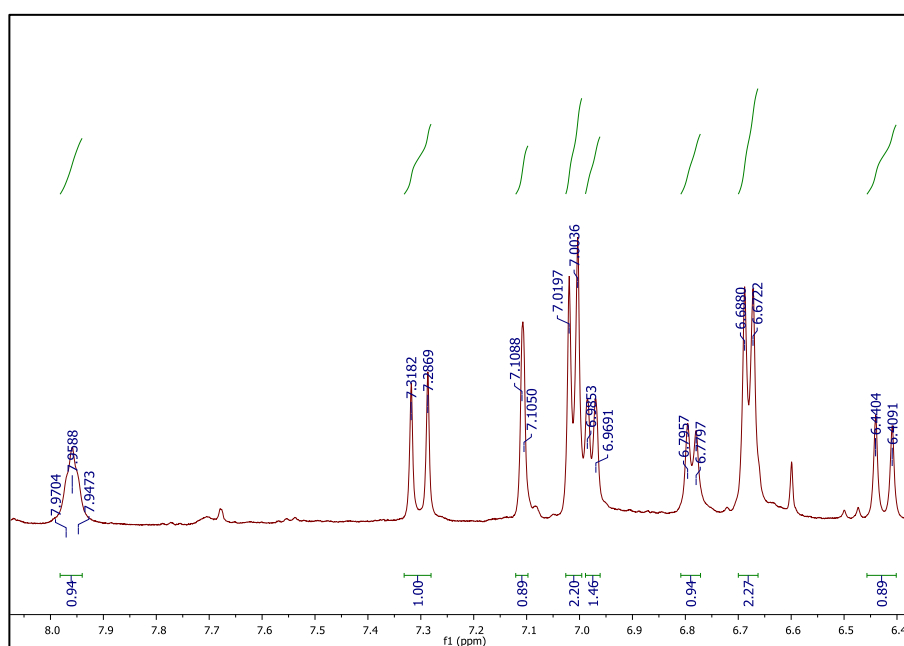


Figura 56 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,4-3,9) da moupinamida (**12**).

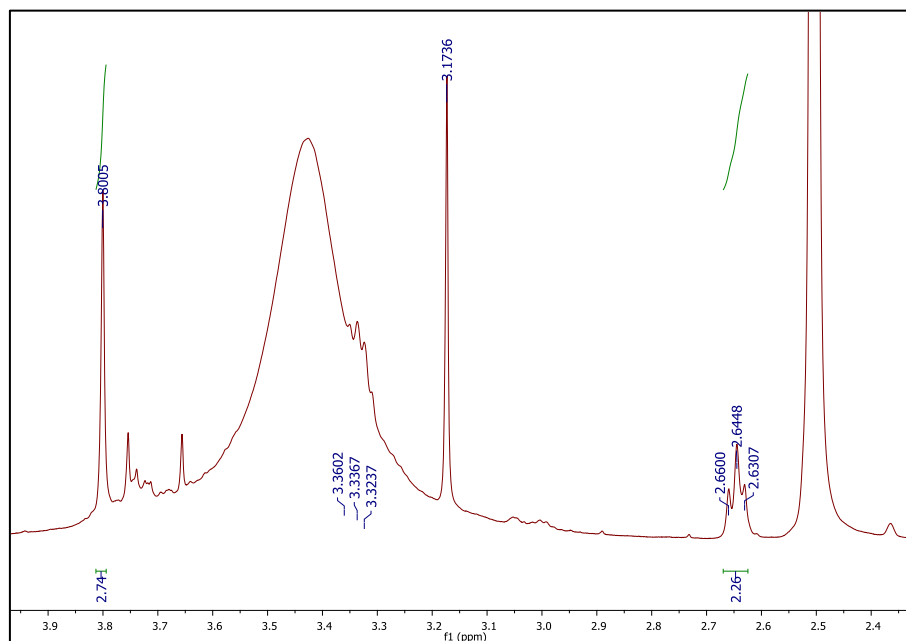


Figura 57 – Estrutura da amida, *N-trans*-feruloiltiramina (moupinamida).

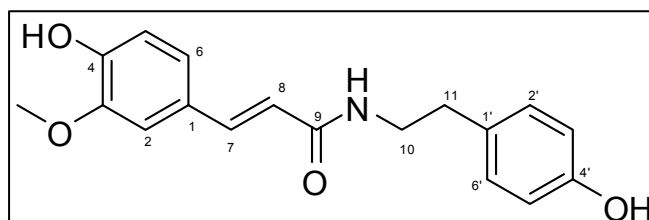


Tabela 13 - Valores de RMN de ^1H e ^{13}C da moupinamida (**12**, em DMSO- d_6) e dos dados presentes na literatura (em CD_3OD).

Posição	(12)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})*	δ_{C} (ppm)*
1		126,2		128,2
2	7,1 (<i>d</i> ; 1,9)	110,5	7,19 (<i>d</i> ; 2,0)	111,5
3		147,5		149,3
4		148,0		149,8
5	6,78 (<i>d</i> ; 8,0)	115,3	6,81 (<i>d</i> ; 8,5)	116,4
6	6,97 (<i>dd</i> ; 8,0 e 1,9)	121,2	7,05 (<i>dd</i> ; 8,5 e 2,0)	123,2
7	7,30 (<i>d</i> ; 15,7)	138,5	7,44 (<i>d</i> ; 15,5)	142,0
8	6,42 (<i>d</i> ; 15,7)	118,7	6,41 (<i>d</i> ; 15,5)	118,7
9		165,0		169,2
10	3,32 (<i>m</i>)	40,3	3,47 (<i>t</i> ; 7,5)	42,5
11	2,64 (<i>t</i> ; 7,3)	34,1	2,76 (<i>t</i> ; 7,5)	35,8
1'		129,4		131,3
2' e 6'	7,01 (<i>d</i> ; 7,9)	129,1	7,07 (<i>d</i> ; 2,0)	130,7
3' e 5'	6,68 (<i>d</i> ; 7,9)	114,8	6,73 (<i>d</i> ; 8,4)	116,2
4'		155,3		156,9
NH	7,95 (<i>t</i> ; 5,5)		8,01 (<i>s</i>)	
3-OMe	3,8 (<i>s</i>)	55,2	3,85 (<i>s</i>)	56,4

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (*m*).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

* Al-Taweel et al., 2012.

Fração 252

O composto presente na Fração 252 (21,2 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (RMN) e espectrométricos (UPLC-TOF-EM). A Tabela 14 abaixo ilustra os resultados obtidos na análise por RMN para esta fração.

A análise por UPLC-TOF-EM no modo positivo apresentou valor de m/z de 625,2530 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), compatível com a fórmula $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$ (erro = - 3,2 ppm), o que corrobora com a estrutura proposta como sendo a amida, (+)grossamida (**16**), sua estrutura está ilustrada na Figura 62 abaixo. A análise por alfa-D para esta fração apresentou valor de + 22. A configuração absoluta dos centros

assimétricos foi inferida comparando-se os dados obtidos, com aqueles presentes na literatura (KING; CALHOUN, 2005; SECA et al., 2001; YOSHIHARA, 1981 e 1983). Esta é a primeira descrição desta amida em espécie de Malpighiaceae. Grossamida foi descrita anteriormente em espécies de *Capsicum annuum* (Solanaceae), *Mitrephora thorelii* (Annonaceae), *Hibiscus cannabinus* (Malvaceae), *Annona crassiflora* (Annonaceae), *Cannabis sativa* (Cannabaceae) (GE et al., 2008; SAKAKIBARA et al., 1991; SANTOS et al., 1996; SECA et al., 2001; YOSHIHARA et al., 1981).

Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 252, identificado como a amida, grossamida (**15**).

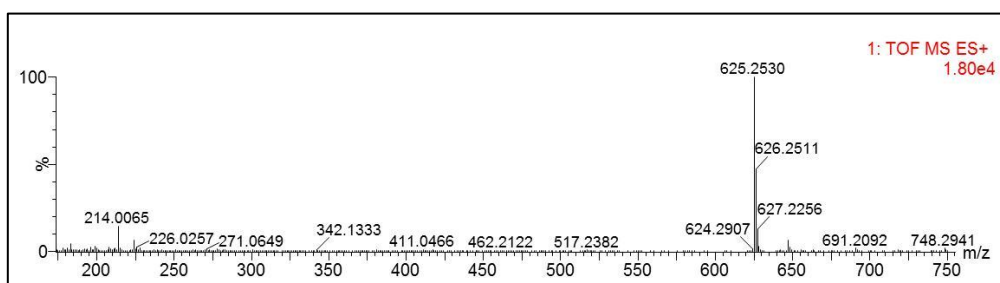


Figura 59 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da (+)grossamida (**15**).

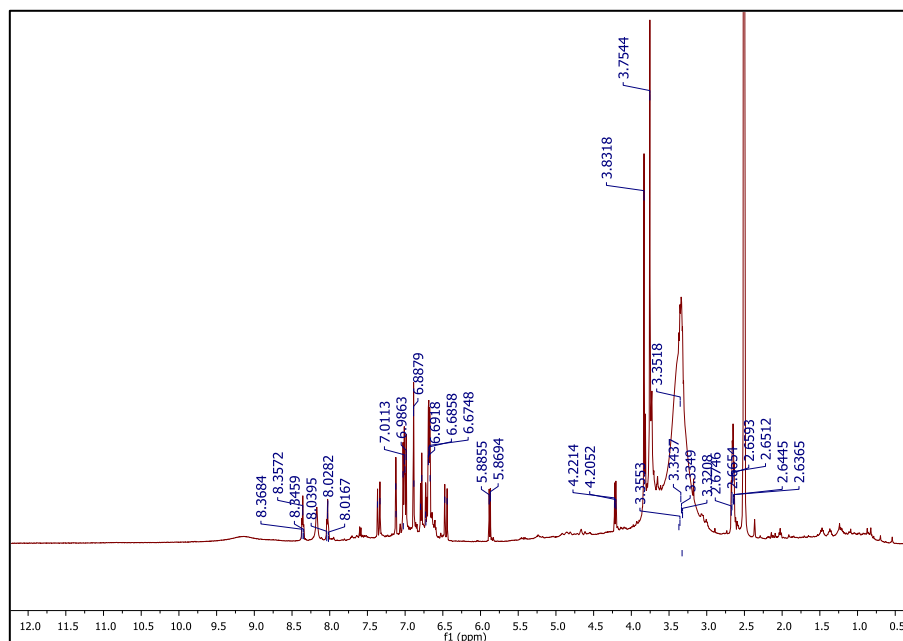


Figura 60 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,4-8,4) da (+)grossamida (**15**).

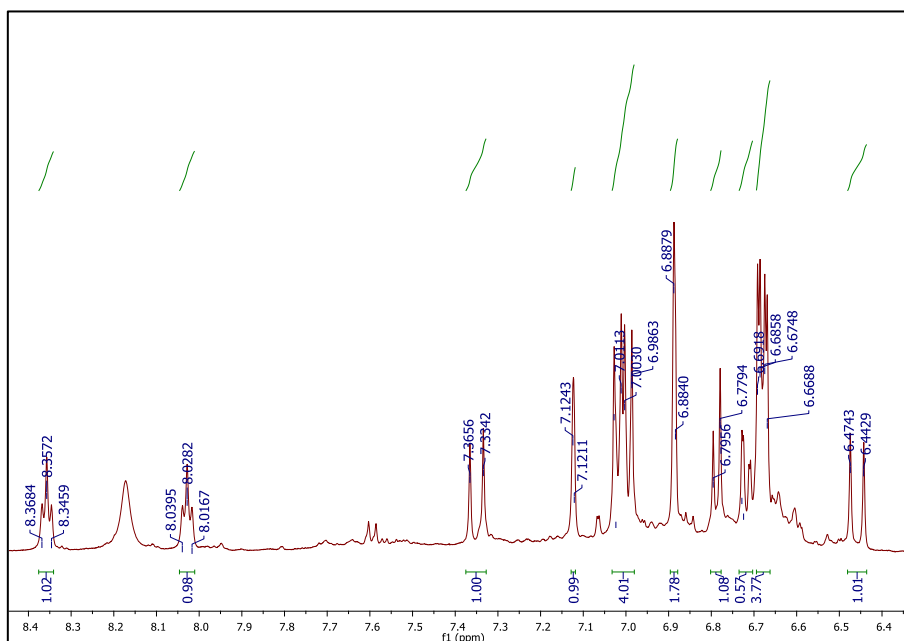


Figura 61 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,4-6,0) da (+)grossamida (**15**).

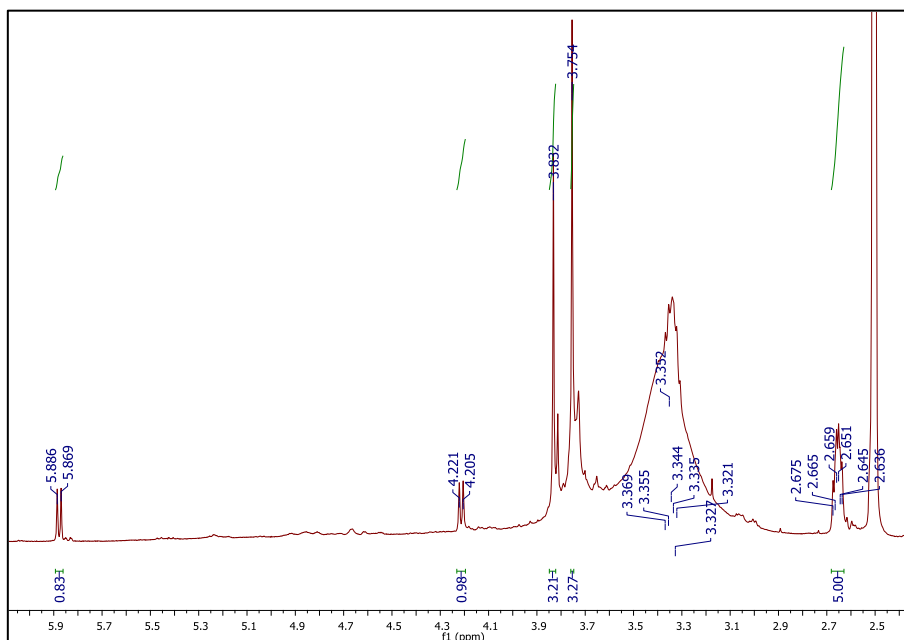


Figura 62 – Estrutura da (+)grossamida (**15**), isolada a partir do extrato EtOH do lenho de *T. mucronata*.

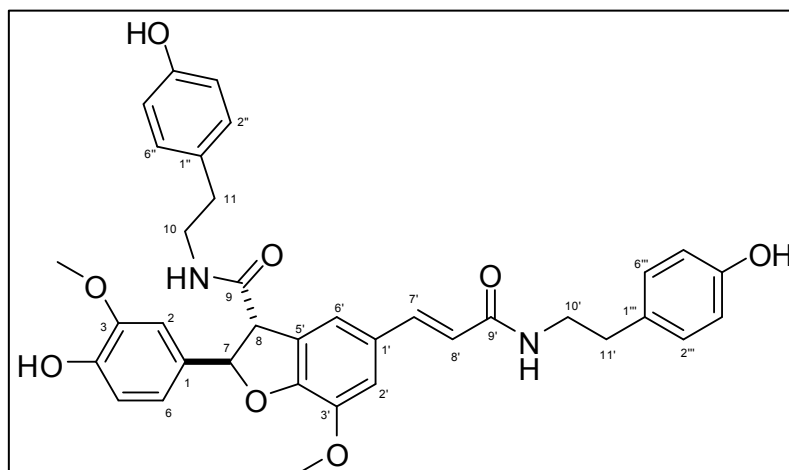


Tabela 14 - Valores de RMN de ^1H e ^{13}C da grossamida (**15**, em DMSO- d_6) e dos dados presentes na literatura (acetona).

Posição	(15)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1		130,6		132,3
2	6,88 (<i>d</i> ; 1,7)	110,4	6,96 (<i>s</i>)	110,4
3		147,7		148,3
4		146,9		147,5
5	6,78 (<i>d</i> ; 8,1)	115,5	6,81 (<i>s</i>)	115,7
6	6,71 (<i>dd</i> ; 8,1 e 1,7)	118,8	6,70 (<i>m</i>)	119,7
7	5,87 (<i>d</i> ; 8,1)	87,7	6,02 (<i>d</i> ; 8,6)	88,8
8	4,21 (<i>d</i> ; 8,1)	55,8	4,18 (<i>d</i> ; 8,6)	57,6
9		169,4		170,3
10	3,33 (<i>m</i>)	40,8	3,75 (<i>m</i>)	41,4
11	2,65 (<i>m</i>)	34,4	2,83 (<i>t</i> ; 6,0)	34,5
1'		128,6		129,4
2'	7,12 (<i>d</i> ; 1,7)	111,8	7,07 (<i>s</i>)	111,0
3'		144,0		145,4
4'		148,7		150,4
5'		128,5		129,0
6'	6,88 (<i>d</i> ; 1,7)	115,9	6,44 (<i>s</i>)	119,0
7'	7,35 (<i>d</i> ; 15,7)	138,7	7,41 (<i>d</i> ; 15,8)	141,2
8'	6,45 (<i>d</i> ; 15,7)	119,7	6,46 (<i>d</i> ; 15,8)	118,8
9'		165,2		167,4
10'	3,35 (<i>m</i>)	40,7	3,50 (<i>m</i>)	42,0
11'	2,65 (<i>m</i>)	34,2	2,77 (<i>t</i> ; 7,1)	35,4
1''		129,3		130,7
2'' e 6''	6,99 (<i>d</i> ; 8,4)	129,5	7,05 (<i>d</i> ; 8,3)	130,3
3'' e 5''	6,67 (<i>d</i> ; 8,4)	115,2	6,74 (<i>d</i> ; 8,3)	115,9
4''		155,6		156,7
1'''		129,3		130,4
2''' e 6'''	7,02 (<i>d</i> ; 8,5 Hz)	129,4	6,77 (<i>d</i> ; 6,9)	130,5
3''' e 5'''	6,68 (<i>d</i> ; 8,5)	115,1	6,80 (<i>d</i> ; 6,9)	116,7
4'''		155,6		156,5
3-OMe	3,75 (<i>s</i>)	55,7	3,80 (<i>s</i>)	56,2
3'-OMe	3,83 (<i>s</i>)	55,8	3,83 (<i>s</i>)	56,2
10-NH	8,35 (<i>t</i> ; 5,6)		7,50 (<i>t</i> ; 5,2)	
10'-NH	8,02 (<i>t</i> ; 5,7)		7,55 (<i>t</i> ; 5,7)	

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (*m*).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

* SECA et al., 2001

Fração 264

O composto presente na Fração 264 (8 mg) foi obtido como um sólido avermelhado amorfo, solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF-EM no modo negativo para esta fração apresentou valor de m/z de 223,0746 ($[M-H]^-$) compatível com a fórmula $C_{15}H_{12}O_2$ (erro = - 5,8 ppm) (Figura 63). O espectro de RMN 1H (Tabela 15) exibiu dois sinais em δ_H 7,54 e 7,38 como dubletos de constante de acoplamento de 8,8 Hz cada, indicando um acoplamento de hidrogênios aromáticos *orto*, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios nas posições H-9 e H-10, respectivamente. Os singletos em δ_H 7,58 e 7,85 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente. O espectro de RMN 1H também exibiu sinais em δ_H 7,13 e 8,26, que foram correlacionados com os hidrogênios aromáticos for H-1, H-3 e H-4, respectivamente. Estas observações foram confirmadas através das correlações de $gCOSY$ e $gHMBC$ (Figuras 66-74)

O sinal em δ_H 2,30 (s, 3H) foi correlacionado com o carbono C-7 (δ_C 124,6) através do espectro de $gHMBC$. A posição do grupo metílico em C-7 foi inferida através da correlação a longa distância 3J ($gHMBC$) com os prótons em C-8 (δ_C 129,8) e C-6 (δ_C 155,2). O Experimento de NOESY confirmou essa correlação entre os hidrogênios metílicos e H-8.

A presença de dois carbonos em δ_C 155,5 (C-6) and δ_C 155,7 (C-2) sugere a presença de duas hidroxilas livre. Baseado nestes resultados, o composto presente na fração 264 foi identificado como o novo produto natural derivado de fenantreno, 7-metil-2,6-fenantrenodiol (**17**) (Figura 77).

Figura 63 - Espectro de massas de alta resolução para o composto presente na fração 264, identificado como novo derivado de fenantreno, 7-metil-2,6-fenantrenodiol (**17**).

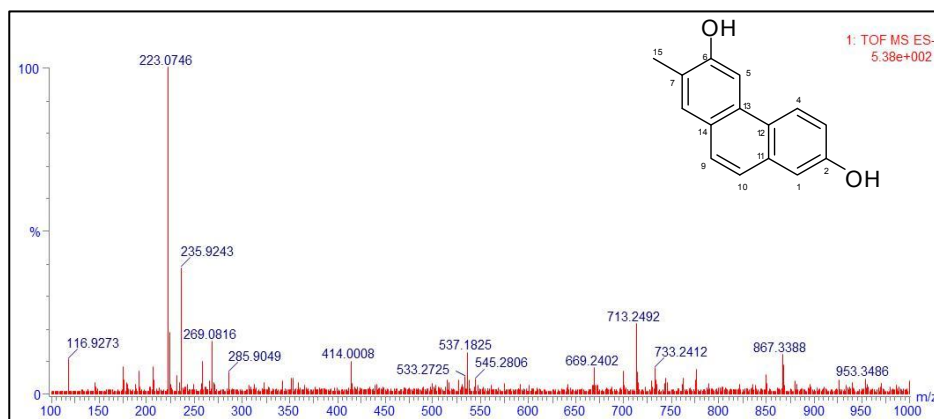


Figura 64 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do fenentreno, 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

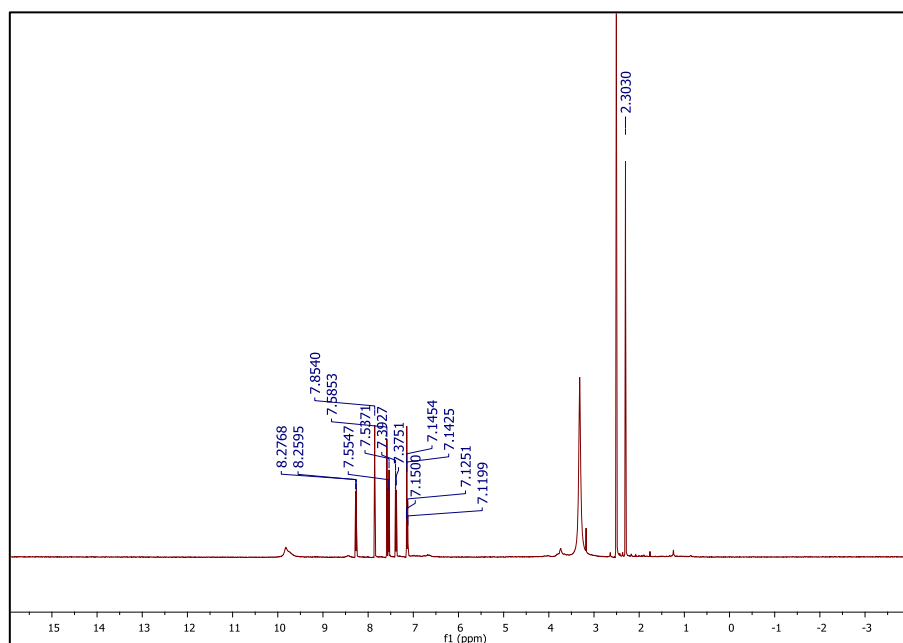


Figura 65 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 2,18-2,62), do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

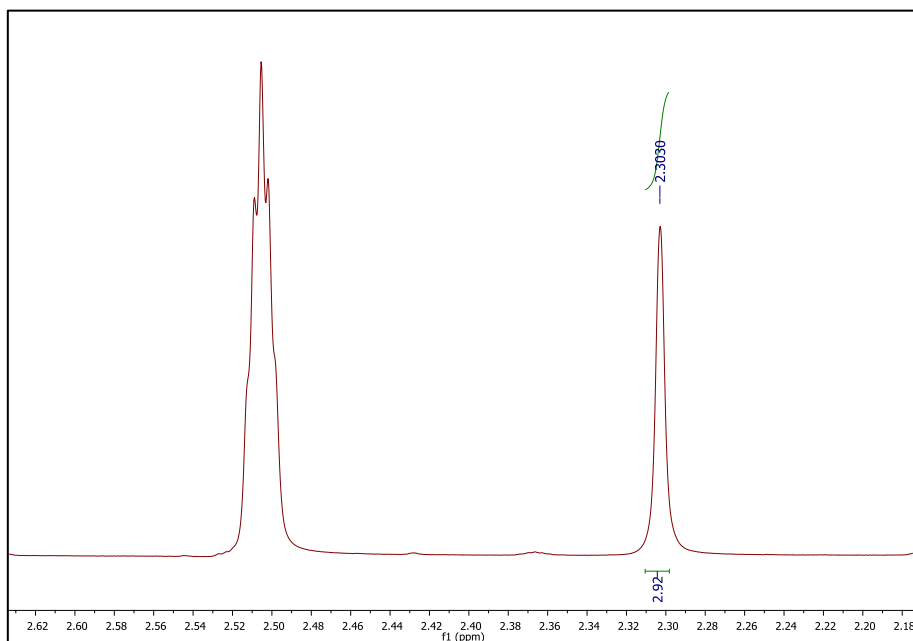


Figura 66 - Ampliação do RMN ^1H (δ_{H} 7,05-8,40), do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

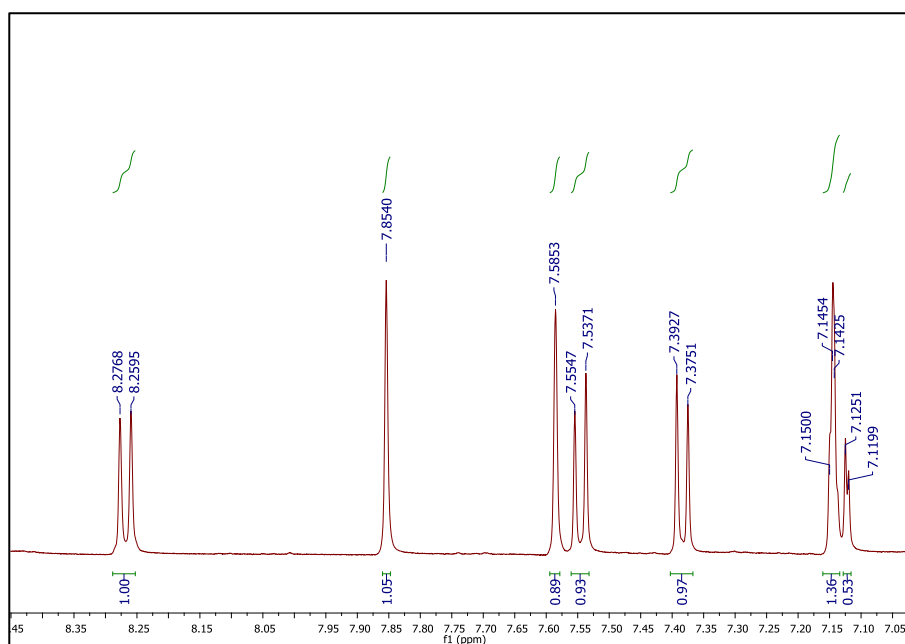


Figura 67 - Mapa de contorno gCOSY (500 MHz, DMSO-*d*₆) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

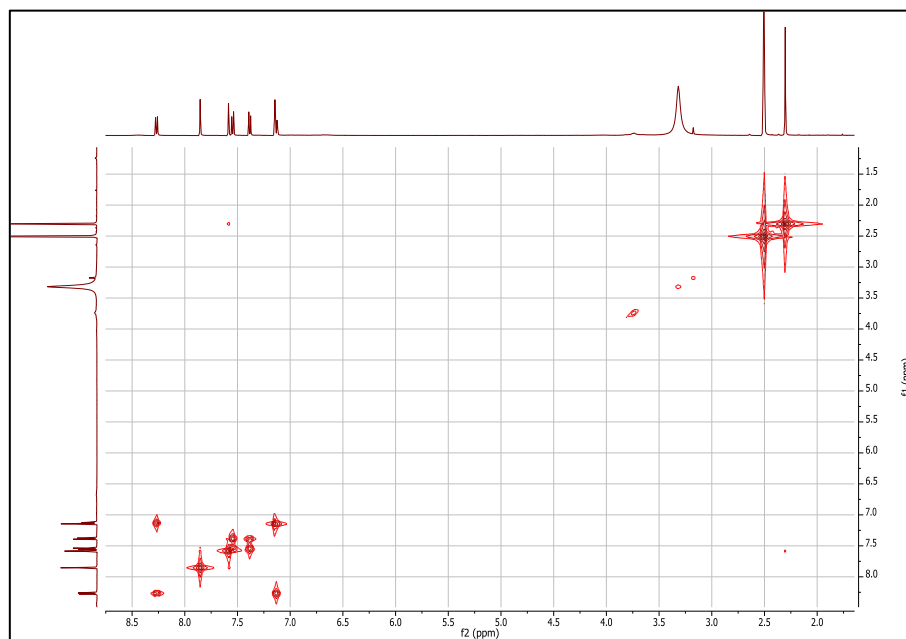


Figura 68 - Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

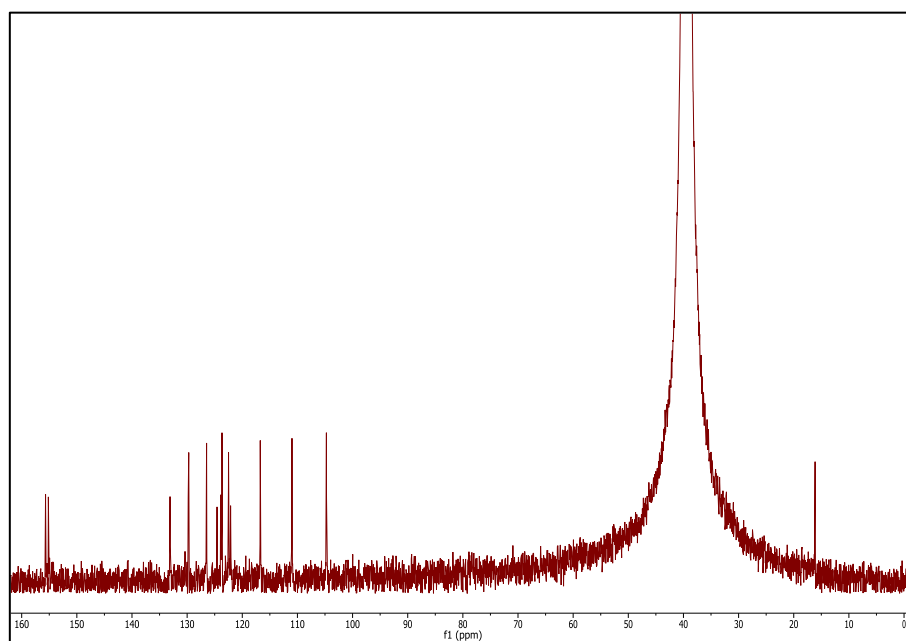


Figura 69 – Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (δ_c 102-156) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

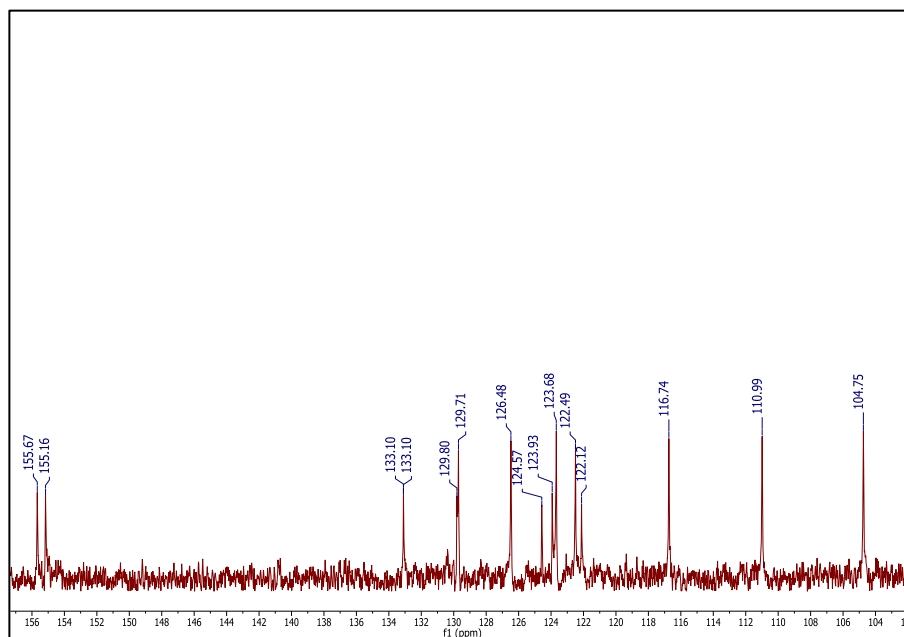


Figura 70 - Mapa de contorno gHSQC (500 MHz, DMSO- d_6) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

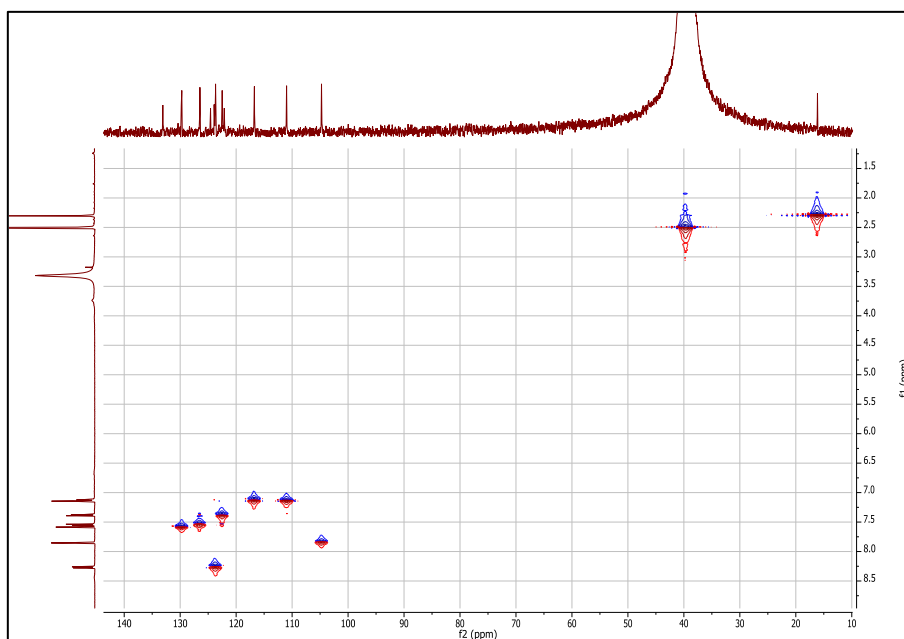


Figura 71 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_c 101-134) gHSQC, do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

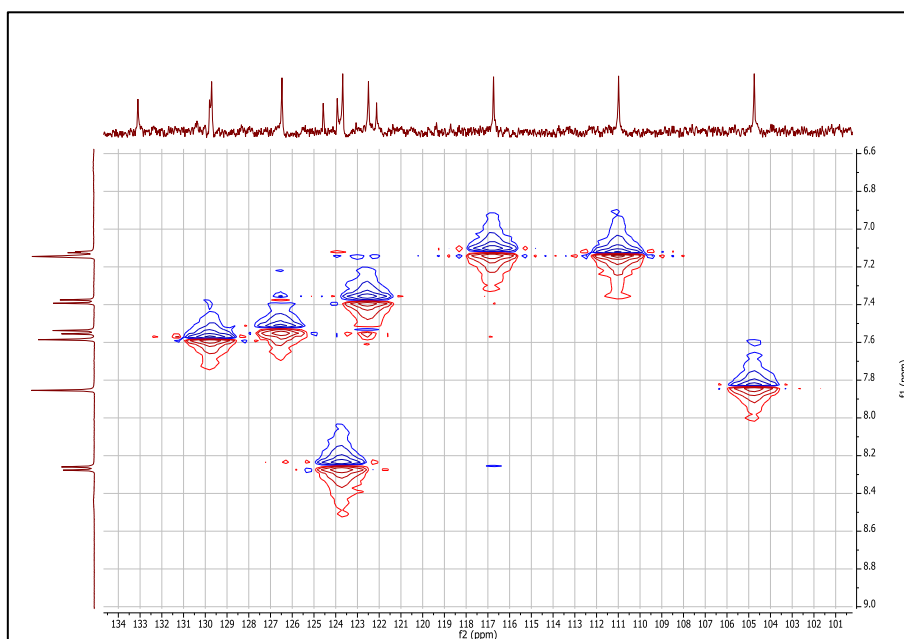


Figura 72 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, DMSO-*d*₆) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

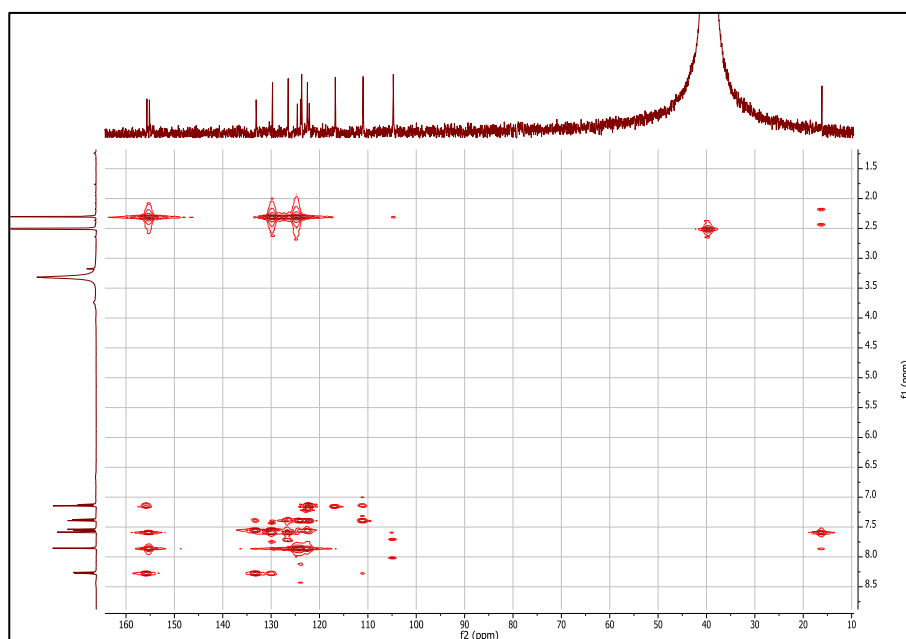


Figura 73 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 11,5-21,5) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

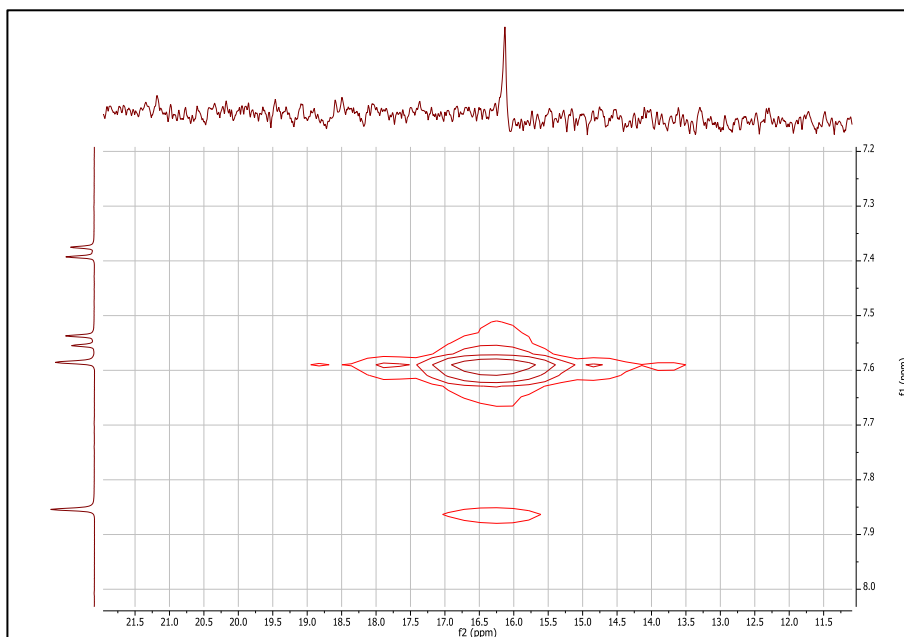


Figura 74 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 110-137) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

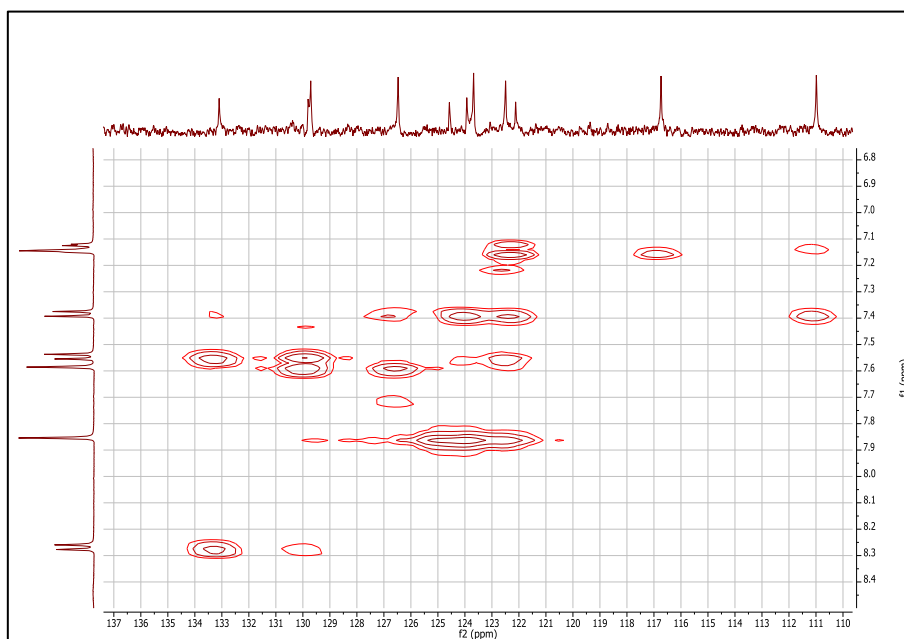


Figura 75 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 120-162) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

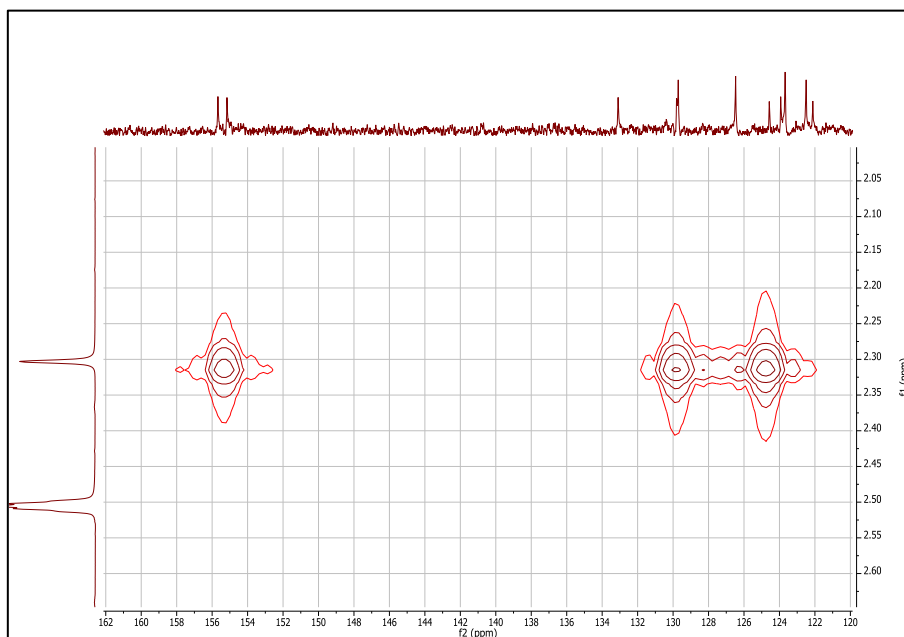


Figura 76 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 150-162) do fenantreno 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**).

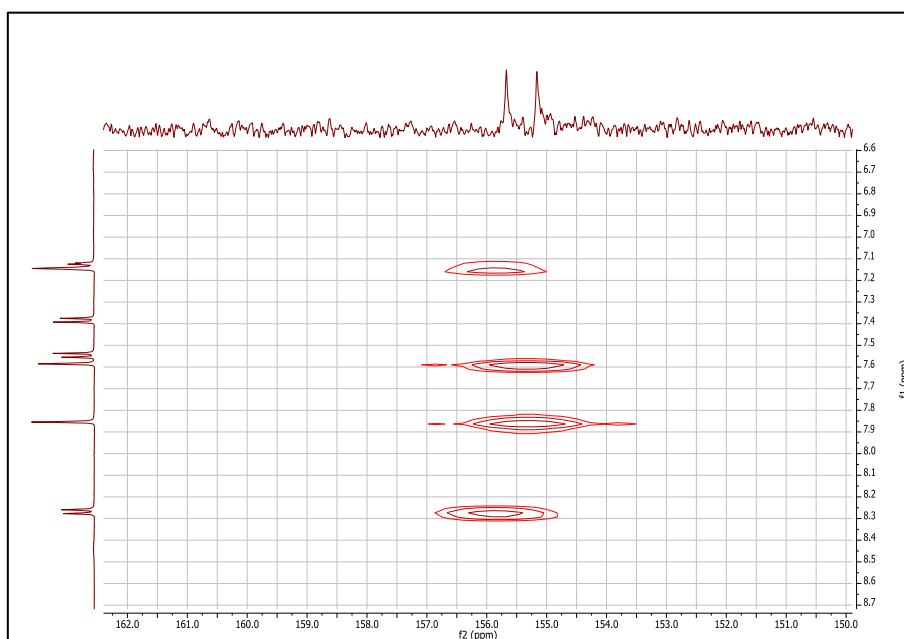


Figura 77 – Estrutura do novo produto natural, 7-metil-2,6-diidroxifenantreno isolado do lenho de *T. mucronata*.

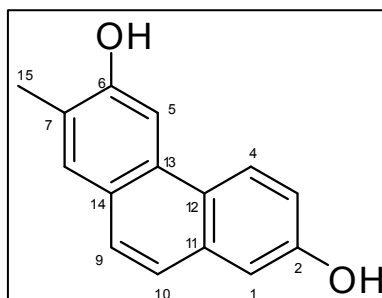


Tabela 15 - Dados de RMN mono e bidimensionais para o fenantreno, 7-metil-2,6-fenantrenodiol (**17**).

Posição	δ_H^a (m ^b ; J ^c)	δ_C	gHMBC
1	7,14 (d; 2,5)	111,0	116,8(3); 122,2(12); 155,7(2)
2		155,7	
3	7,13 (dd; 8,7 e 2,5)	116,8	111,0(1); 122,2(12); 155,7(2)
4	8,26 (d; 8,7)	123,7	129,8(8); 133,1(11); 155,7(2)
5	7,85 (s)	104,8	122,2(12); 123,9(14); 124,6(7); 155,2(6)
6		155,2	
7		124,6	
8	7,58 (s)	129,8	126,5(9); 129,9(13); 155,2(6)
9	7,54 (d; 8,8)	126,5	122,5(10); 129,9(13); 133,1(13)
10	7,38 (d; 8,8)	122,5	
11		133,1	
12		122,2	
13		129,9	
14		124,0	
-CH₃ (15)	2,30 (s)	16,2	124,6(7); 129,8(8); 155,2(6)

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

4.10 Análises das demais frações obtidas através do fracionamento de P6.

As demais frações obtidas através do fracionamento de P6 foram analisadas por CLAE-DAD e CCD. Aquelas que possuíam perfil cromatográfico semelhante foram agrupadas resultando em 22 novas frações (**A – V**) conforme ilustrado na Tabela 16 a seguir.

Tabela 16 - Agrupamento das frações oriundas do fracionamento de P6 conforme similaridade nos perfis CLAE-DAD e CCD.

Fração	Agrupam.*	Massa (mg)	Fração	Agrupam.*	Massa (mg)
A	1 + 5	1500	L	96 + 125	553
B	6 + 11	823	M	126 + 143	500
C	12 + 18	537	N	144 + 198	545
D	19 + 23	250	O	199 + 214	90
E	24 + 28	180	P	215 + 223	334
F	29 + 42	100	Q	224 + 229	55
G	43 + 50	62	R	230 + 236	66
H	51 + 57	116	S	237 + 250	432
I	58 + 61	160	T	251 + 261	287
J	62 + 76	290	U	262 + 270	57
K	77 + 95	142	V	271 + 290	658

* Grupo de frações reunidas.

Inicialmente foram selecionadas para o processo de purificação as frações localizadas nas áreas do perfil cromatográfico CLAE-DAD de P6 com atividade de inibição da acetilcolinesterase. A tabela 16 a seguir ilustra o processo de purificação destas frações, com suas respectivas massas, modos de eluição, vazão e número de frações enviadas para análise através da técnica de RMN mono e bidimensionais.

Tabela 17 - Ilustração do processo de purificação das frações de P6 através da técnica de CLAE-UV-preparativo.

Fração	Massa (mg)	Modo de eluição	Tempo (min.)	Vazão (mL/min)	Frações enviadas para RMN
H	116	Isocrático 14% B	70	10	H-1 H-2 H-3
K	142	Gradiente, 17 a 20% B	60	8	K-1 K-2 K-3
Q	55	Gradiente, 22 a 26% B	75	10	Q-1
R	66	Gradiente, 23 a 28% B	50	10	R-1
U	57	Gradiente, 30 a 35% B	60	10	U-1

A fim de obter informações acerca a composição química das frações obtidas, estas foram analisadas pelas técnicas de CCD, CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM. O resultado destas análises demonstrou que dentre estas 9 continham compostos puros. A descrição da caracterização destes compostos se encontra seguir.

Fr H-1

O composto presente na fração H-1 (12,0 mg) foi isolado como um sólido amorfo, solúvel em metanol. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópico (RMN) e espectrométrico (UPLC-TOF-EM). A Tabela 18 abaixo ilustra os resultados obtidos pela análise por RMN para esta fração. A partir da comparação dos resultados obtidos, com aqueles presentes na literatura foi possível caracterizar a fração como o ácido vanilínico (**5**) (Figura 80). O ácido vanilínico é descrito como um dos constituintes químicos das seguintes espécies: *Nauclea orientalis* (Rubiaceae), *Lithrea molleoides* (Anacardiaceae), *Chenopodium murale* (Chenopodiaceae), *Polygonum perfoliatum* (Polygonaceae), *Myriactis humilis* (Asteraceae) (CHANG; TSAI;

CHOU et al., 2008; CHEN; DUH; CHEN et al., 2005; GHAREIB; ABDELHAMED; IBRAHIM, 2010; MORUCCI et al., 2012; SICHAEM; WORAWALAI, TIP-PYANG, 2012).

Figura 78 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do ácido vanílico (**5**).

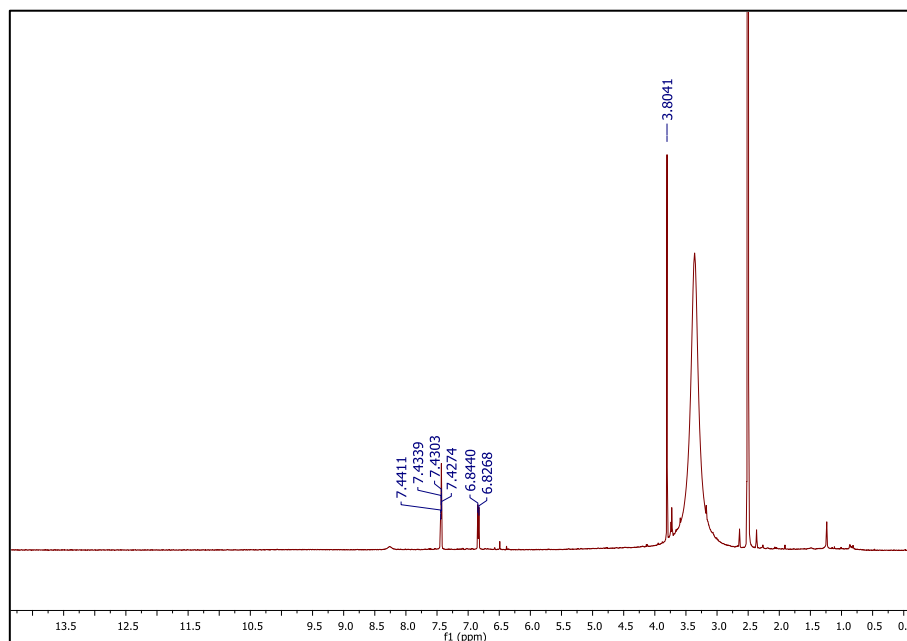


Figura 79 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,75-7,45) do ácido vanílico (**5**).

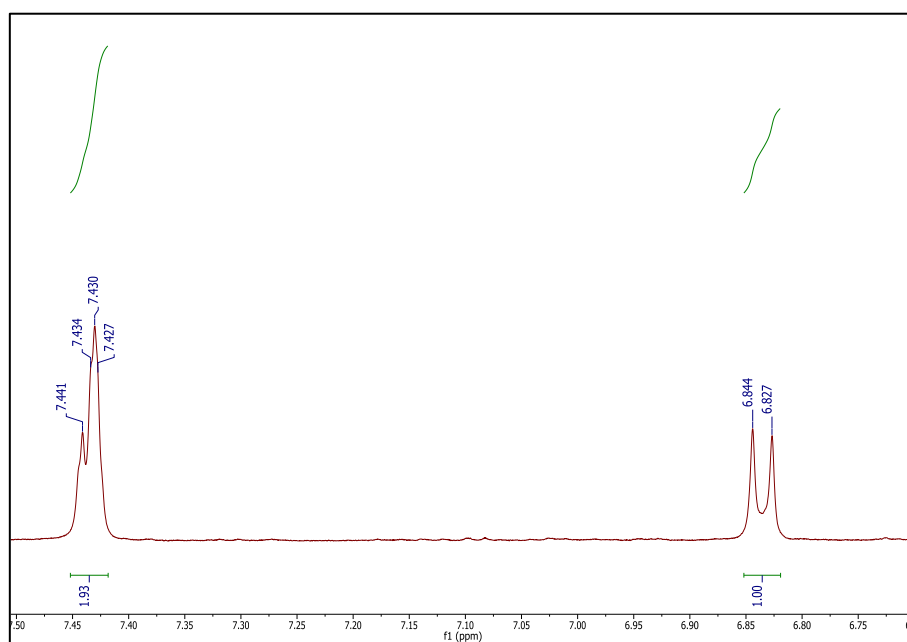
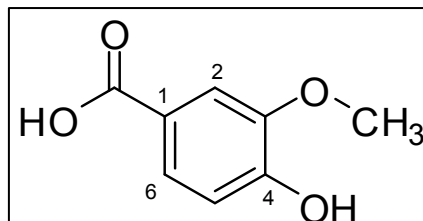


Figura 80 - Estrutura do ácido vanilínico (**5**).**Tabela 18** - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido vanilínico (**5**).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C}
1		121,7
2	7,43 (<i>m</i>)	112,7
3		147,2
4		150,9
5	6,84 (<i>d</i> ; 8,5)	114,8
6	7,43 (<i>m</i>)	123,3
3-OMe	3,80 (<i>s</i>)	55,4
COOH	(<i>s</i>)	167,2

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).^b multiplicidade (*m*).^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração H-2

O composto presente na Fração H-2 (3 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH. A análise por UPLC-TOF-EM no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$ para esta fração apresentou valor de m/z de 366,1780, compatível com a fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ (erro = - 6,0). A Tabela 19 abaixo ilustra os resultados obtidos pela análise por RMN mono e bidimensionais para esta fração.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 82-85) exibiu sinais referentes a um sistema aromático di-substituído, com sinais em δ_{H} 7,60 e 7,31 como dubletos

de constante de acoplamento de 8,0 Hz cada, indicando um acoplamento de hidrogênios aromáticos *orto*, estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios nas posições H-4 e H-7, respectivamente. Os tripletos em singletos em δ_H 6,95 e 7,03 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-6, respectivamente. O espectro de RMN 1H também exibiu sinais indicando a presença de um sistema do tipo ABX, δ_H 6,52 (*dd*, 8,5 e 2,0 Hz, 1H), 6,74 (*s*; 1H) e 7,11 (*d*; 8,5 Hz, 1H) 7,13 e 8,26, para os hidrogênios aromáticos for H-6', H-4' e H-7', respectivamente. Estas observações foram confirmadas através das correlações nos mapas de contorno gCOSY e gHMBC (Figuras 86-95).

O sinal em δ_H 4,56 (*d*; 7,0 Hz, 1H) foi correlacionado com o carbono C-10 (δ_C 34,9) através do mapa de contorno gHMBC. Através do mapa de contorno gCOSY pode-se observar a correlação deste sinal (H-10) com o hidrogênio na posição H-11 (*q*; 12 e 6,9 Hz, 1H). Através do valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios H-10 e H-11 (7,0 Hz), e a comparação deste valor com aquele presente na literatura para um sistema semelhante, pode-se concluir que os hidrogênios estão em posição *anti* (Figura 96). (referência)

O singlete em δ_H 10,27, foi correlacionado com os hidrogênio amínico H-1' do sistema indólicos, a confirmação desta hipótese fez-se através do experimento de gHMBC. A partir dos dados obtidos, o composto presente na fração H-2 foi caracterizado como um novo produto natural, alcaloide 5'-metoxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1*H*-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (**6**)

Figura 81 – Espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração H-2, identificado como o alcaloide-5'-metoxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1*H*-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (**6**).

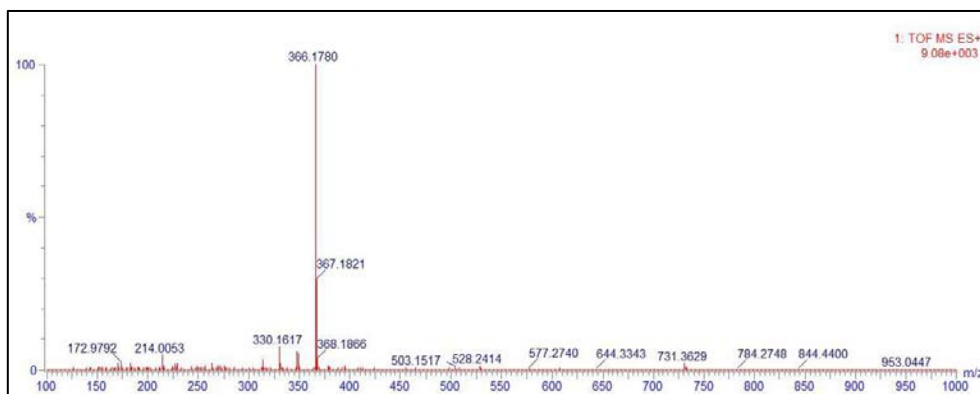


Figura 82 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do alcaloide **6**.

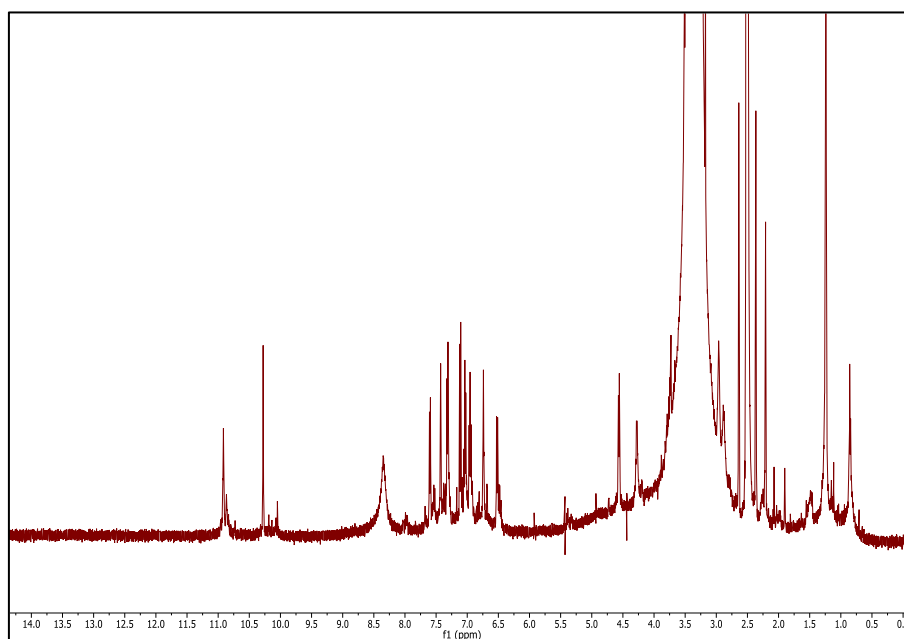


Figura 83 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,40-7,85) do alcaloide **6**.

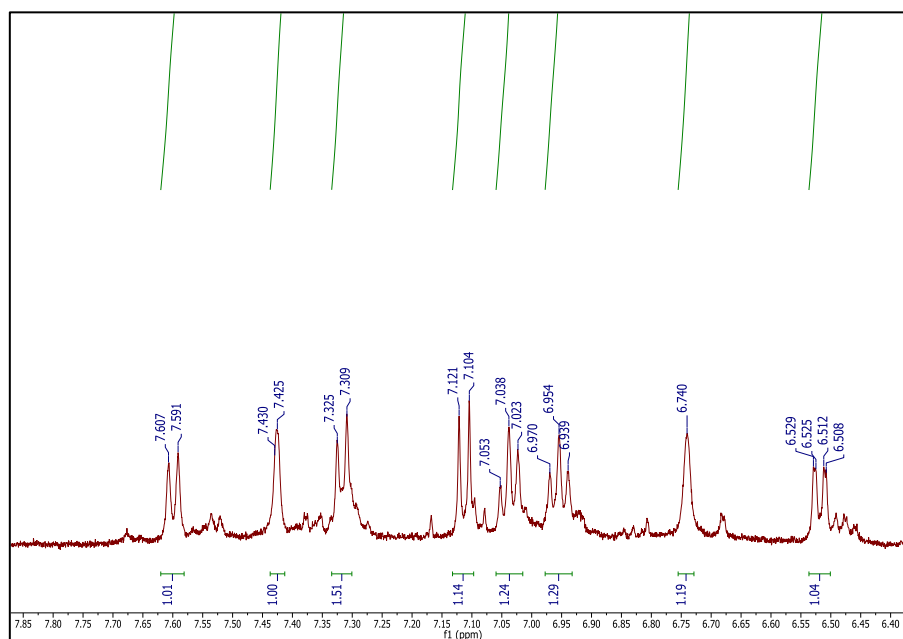


Figura 84 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 3,85-4,85) do alcaloide **6**.

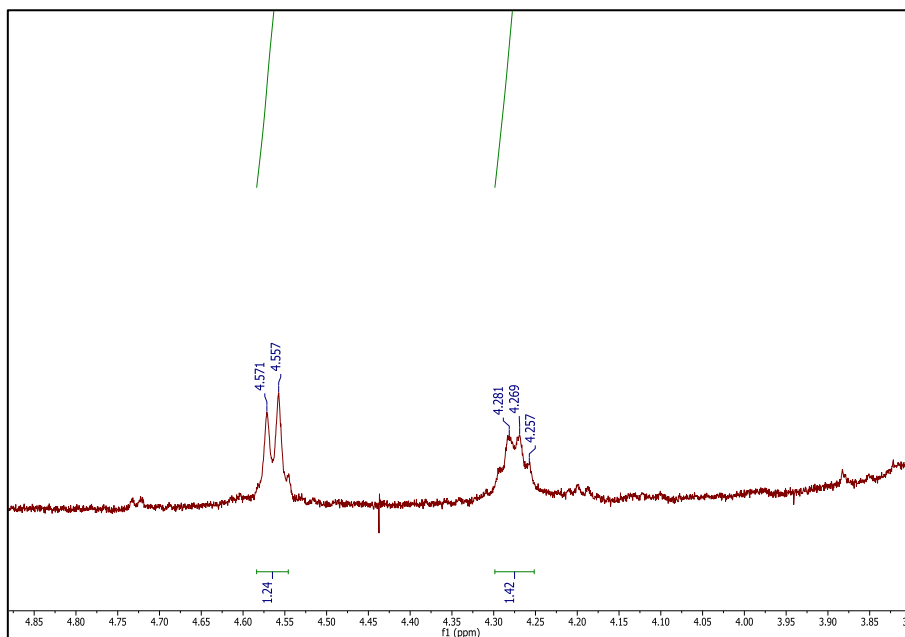


Figura 85 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 1,90-3,10) do alcaloide **6**.

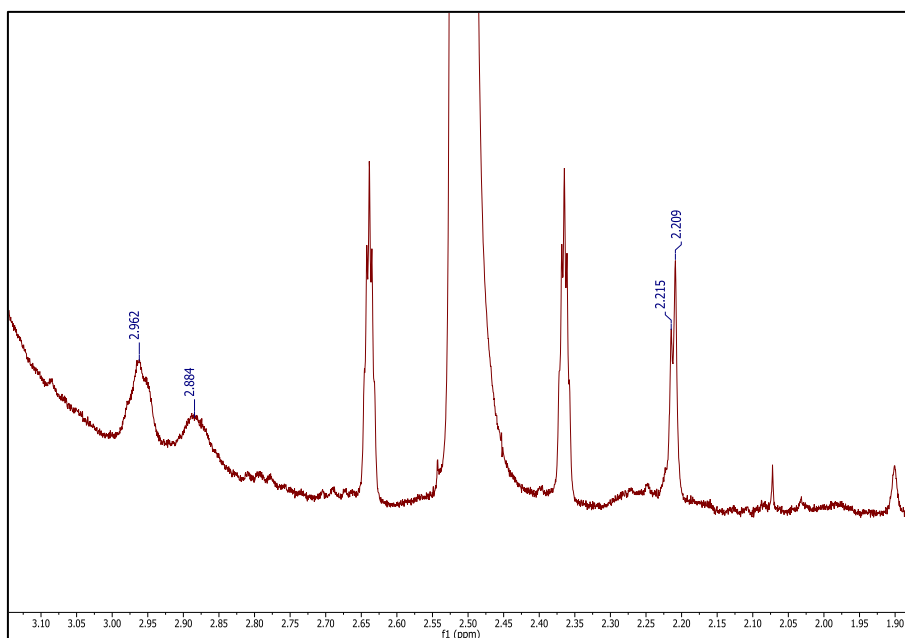


Figura 86 – Mapa de contorno gCOSY do alcaloide **6**.

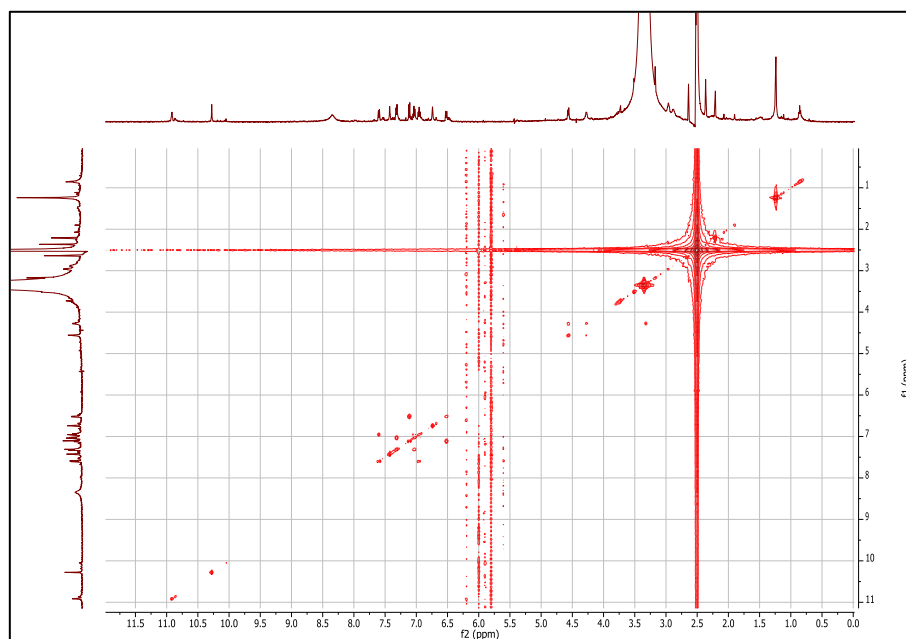


Figura 87 – Ampliação mapa de contorno gCOSY (δ_H 6,4-7,9) do alcaloide **6**.

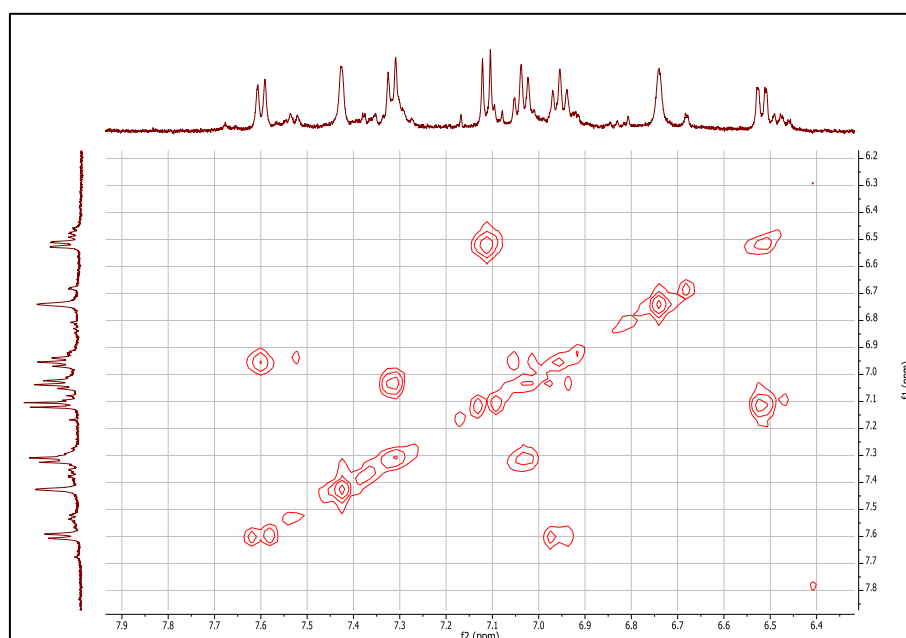


Figura 88 – Ampliação do mapa de contorno gCOSY (δ_H 3,0-4,9) do alcaloide **6**.

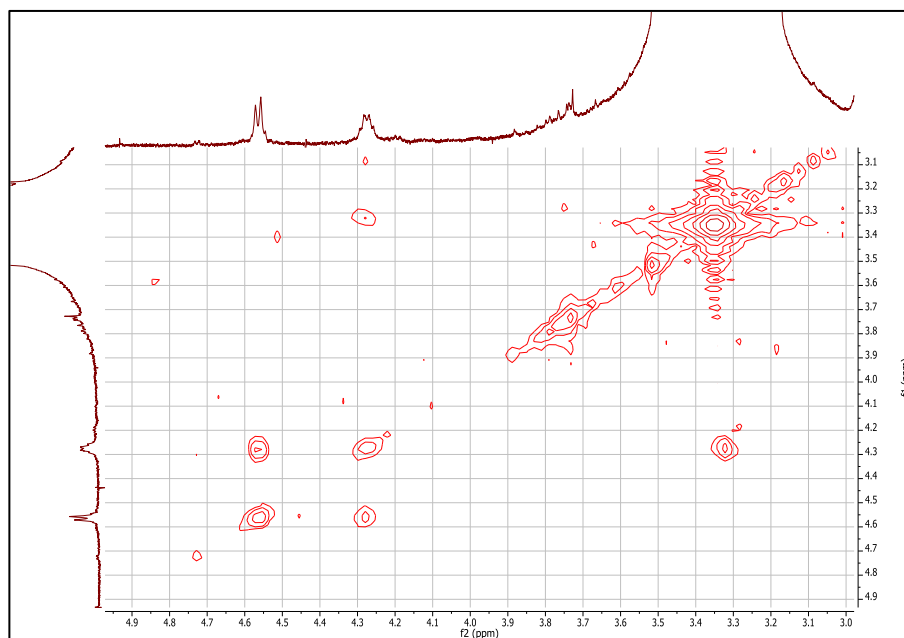


Figura 89 - Mapa de contorno gHSQC do alcaloide **6**.

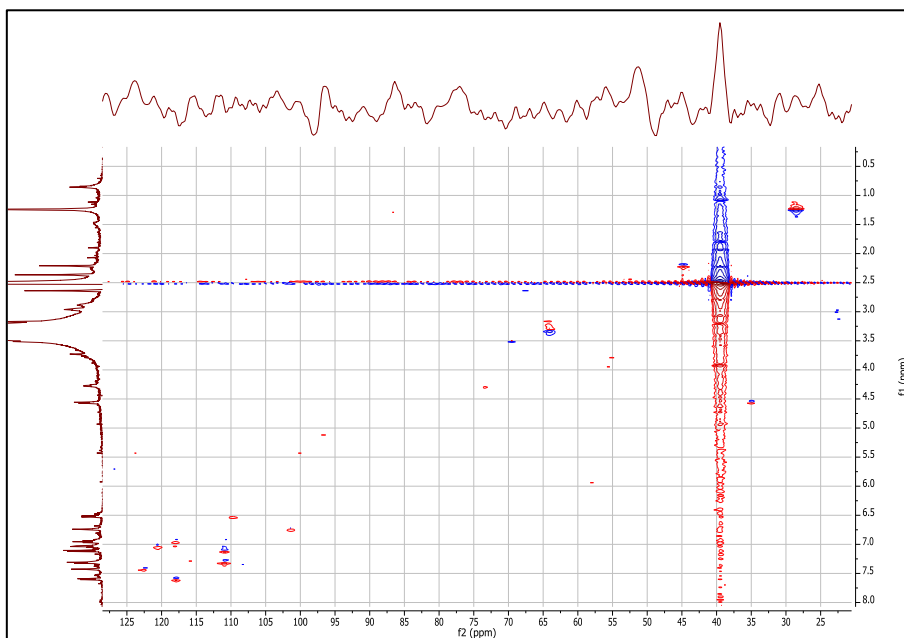


Figura 90 – Ampliação do mapa de contorno *g*HSQC (δ_c 34-74) do alcaloide **6**.

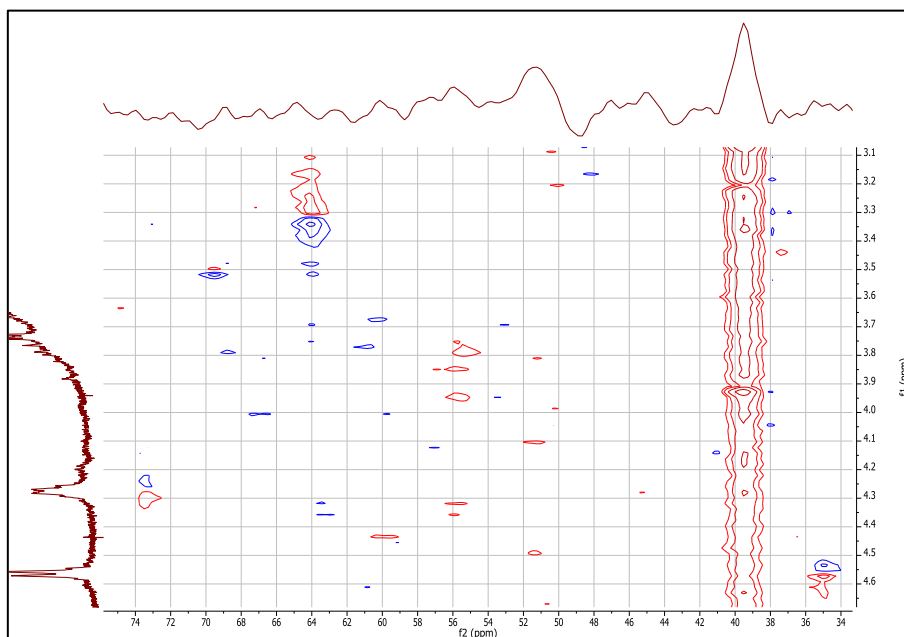


Figura 91 - Ampliação do mapa de contorno *g*HSQC (δ_c 99-127) do alcaloide **6**.

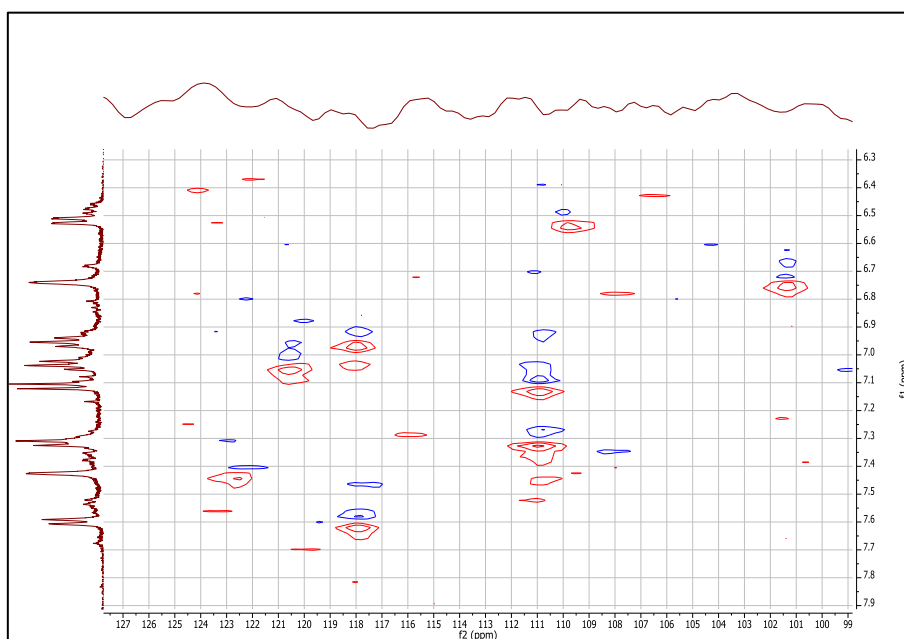


Figura 92 – Mapa de contorno gHMBC do alcaloide **6**.

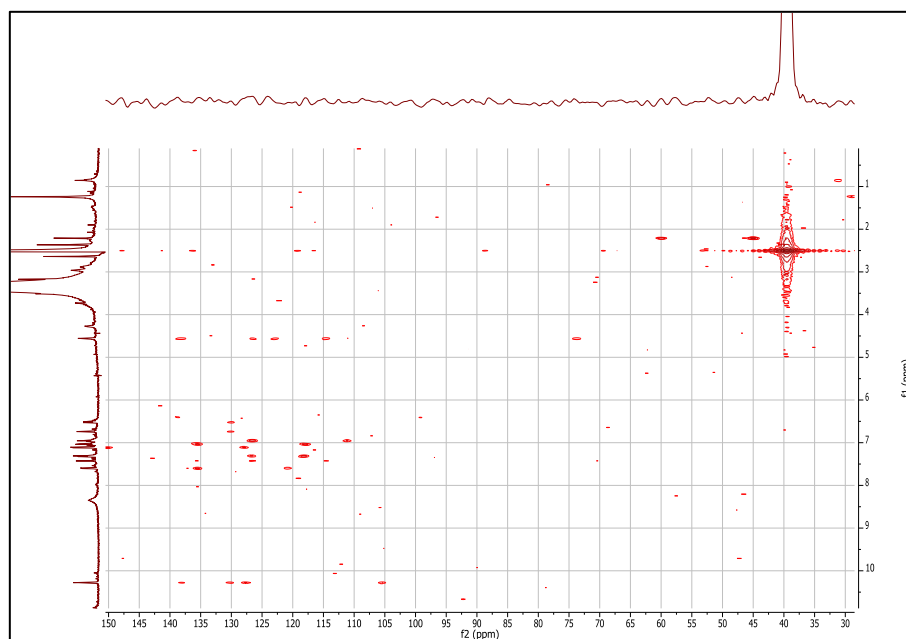


Figura 93 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 100-154) do alcaloide **6**.

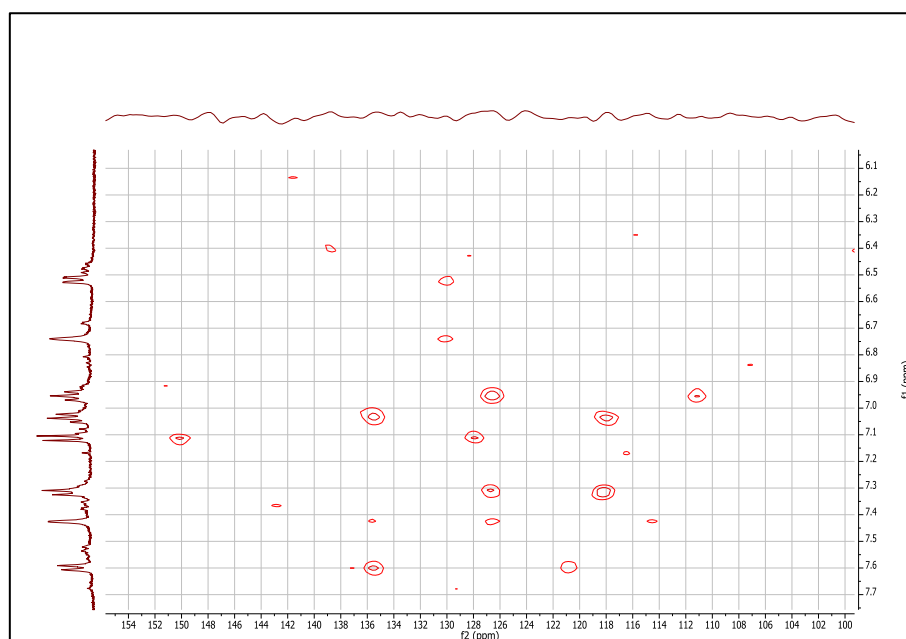


Figura 94 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 100-142) do alcaloide **6**.

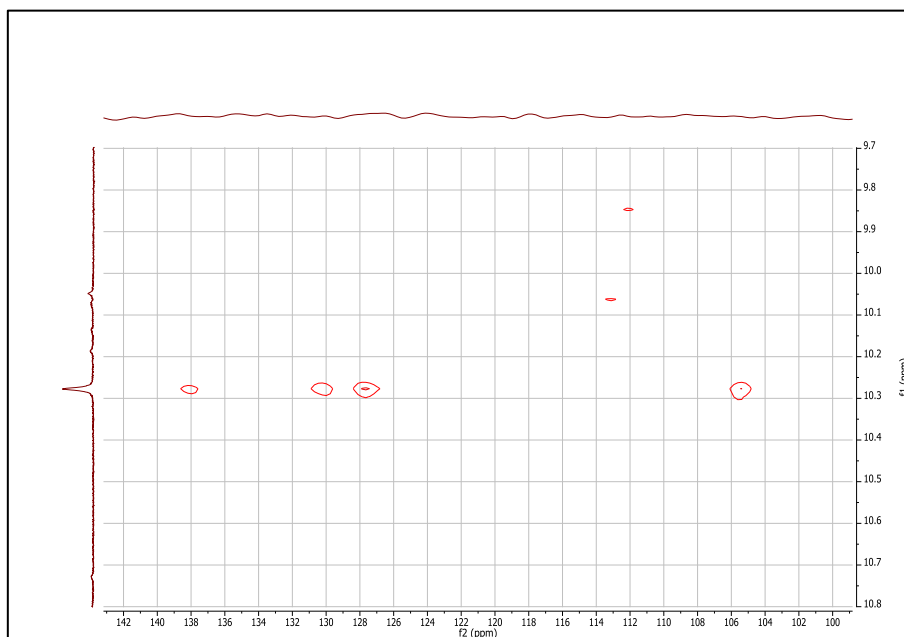


Figura 95 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 25-145) do alcaloide **6**.

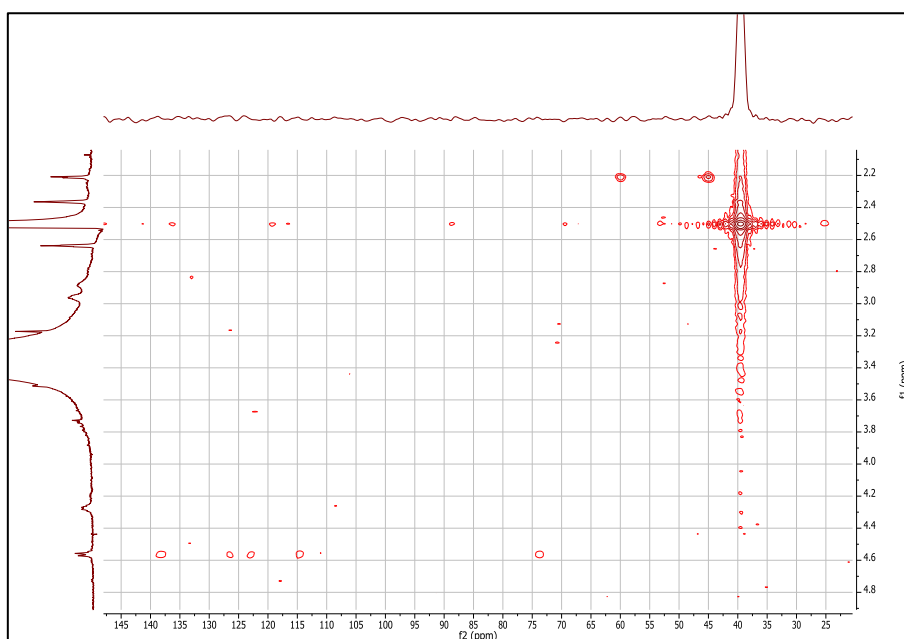


Figura 96 – Estrutura do novo alcaloide 5'-hidroxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol] triptamina (**6**), isolado do lenho de *T. mucronata*.

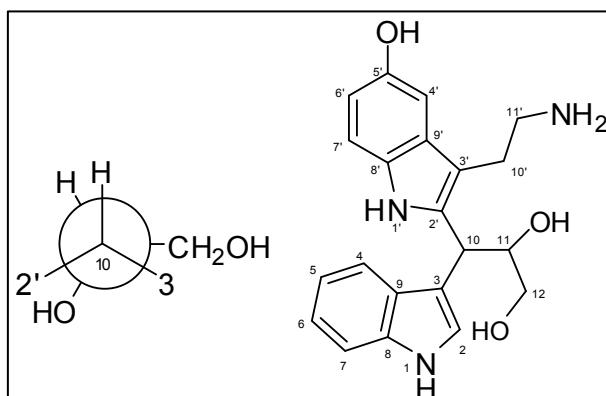


Tabela 19 - Dados de RMN mono e bidimensionais do alcaloide **6**.

Posição	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_C	$gHMBC$
2	7,42 (<i>d</i> ; 2,5)	122,7	135,5(8); 114,5(3)
3		114,5	
4	7,60 (<i>d</i> ; 8)	117,9	135,5(8); 120,6(6)
5	6,95 (<i>t</i> ; 8)	118,1	126,5(9); 110,8(7)
6	7,03 (<i>t</i> ; 7,5)	120,6	135,4(8); 117,9(4);
7	7,31 (<i>d</i> ; 8)	110,8	126,5(9); 118,1(5)
8		135,4	
9		126,5	
10	4,56 (<i>d</i> ; 7,0)	34,9	73,4(11); 114,5(3); 122,7(2); 126,5(9); 138,0(2')
11	4,27 (<i>dd</i> ; 12 e 6,9)	73,4	
12	3,31 (<i>m</i>)	64,4	
1'	10,27 (<i>s</i>)		138,0(2'); 130,1(8'); 127,9(9'); 105,4(3')
2'		138,0	
3'		105,4	130,1(8')
4'	6,74 (1H, <i>s</i>)	101,4	
5'		150,2	
6'	6,52 (<i>dd</i> ; 8,5, 2,0)	109,7	130,1(8')
7'	7,11 (<i>d</i> ; 8,5)	110,9	150,2(5'); 127,9(9')
8'		130,1	
9'		127,9	
10'	2,96 (<i>t</i>)	22,7	
11'	2,88 (<i>t</i>)	68,5	
12' (11'-NH)			

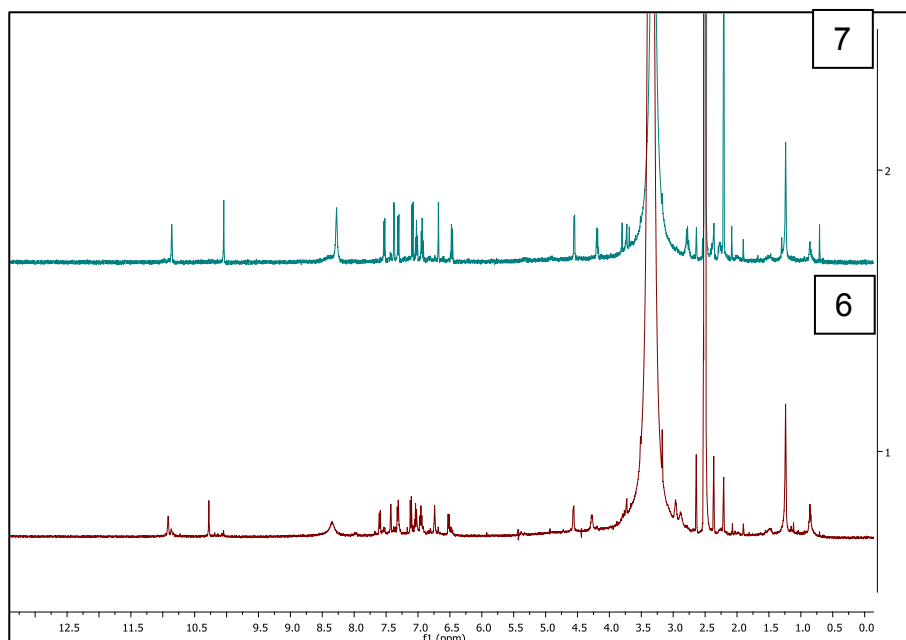
^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).^b multiplicidade (*m*).^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração H-3

O composto presente na Fração H-3 (2,0 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH. O espectro de RMN 1H para esta fração apresentou

sinais semelhantes aos do alcaloide **6**, como pode ser observado na Figura 97 a seguir.

Figura 97 – Comparação dos espectros de RMN ^1H dos alcaloides **6** e **7**.



A diferença espectral observada foi a presença de dois grupos metílicos ligados ao grupamento amínico $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$. O sinal referente a estes hidrogênios no espectro de RMN ^1H foram observados em δ_{H} 2,20 (s, 6H) (Figura 101). Esta afirmação pode ser confirmada através dos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC. Os dados de RMN mono e bidimensionais obtidos para este composto estão ilustrados na Tabela 20 a seguir.

A análise por UPLC-TOF-EM no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$) para esta fração apresentou valor de m/z de 394,2122, compatível com a fórmula $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3$ (erro = - 2,3) (Figura 97). Estes dados corroboram com a estrutura proposta como sendo um novo produto natural, o alcaloide 5'-metoxi-3'-etil-N,N-dimetilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (**7**) (Figura 113)

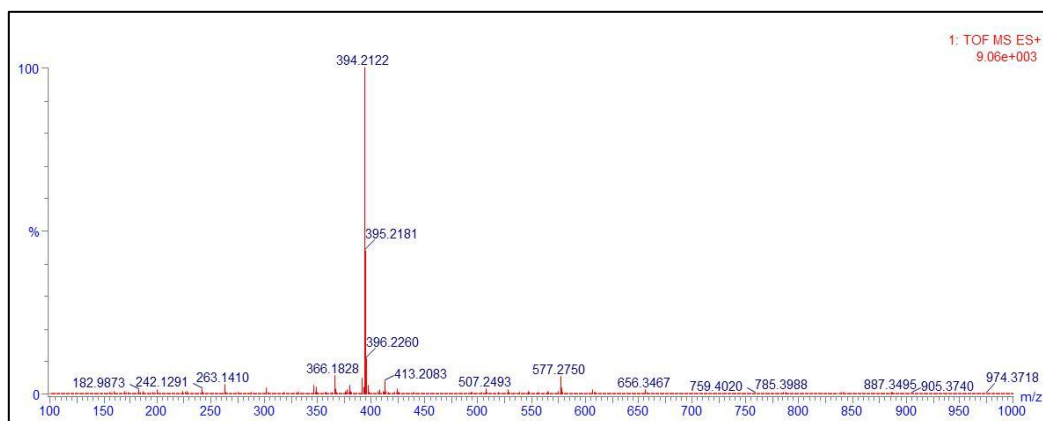
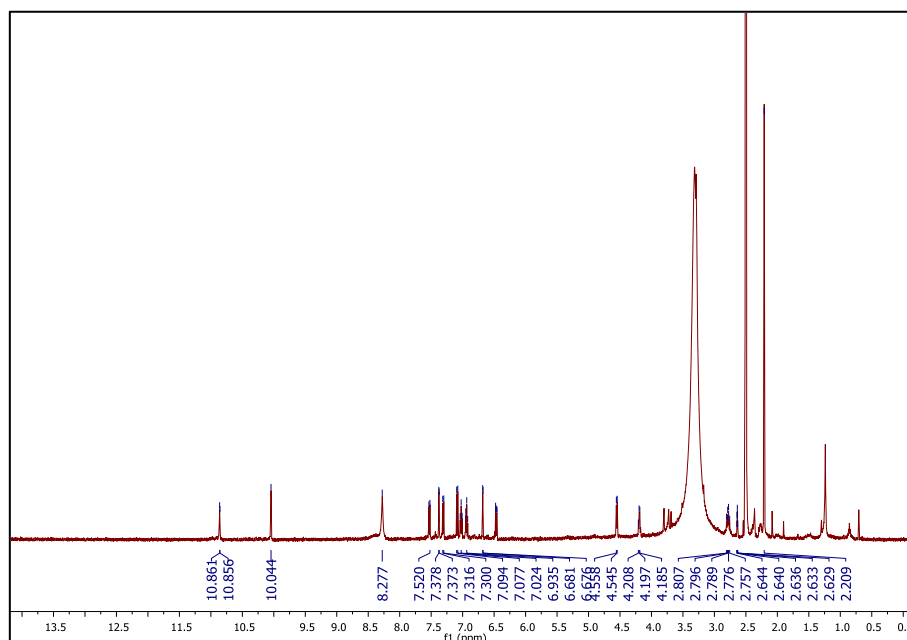
Figura 98 – Espectro de massas de alta resolução do alcaloide 7.**Figura 99** - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) d do alcaloide 7.

Figura 100 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,40-7,80) do alcaloide **7**.

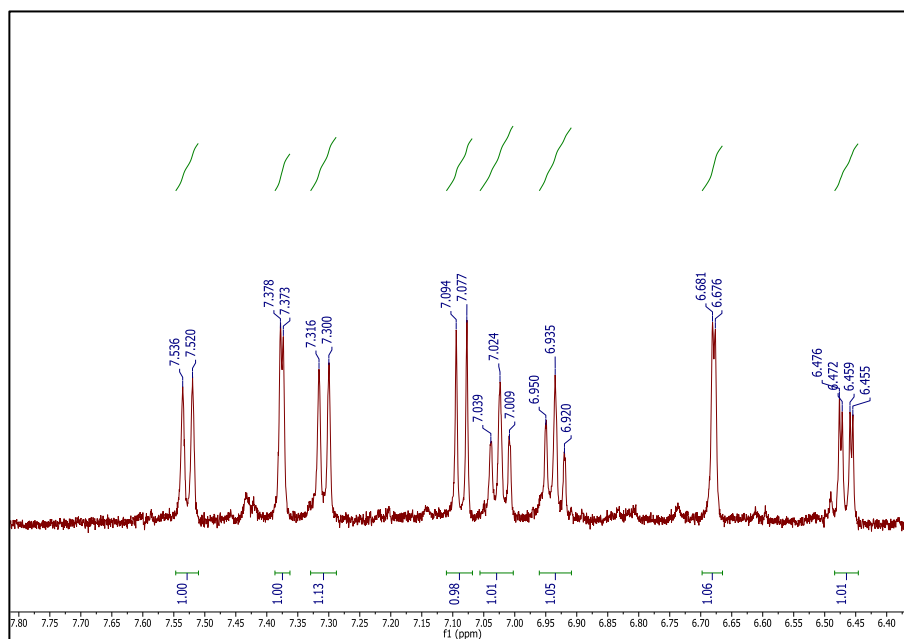


Figura 101 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,0-4,8) do alcaloide **7**.

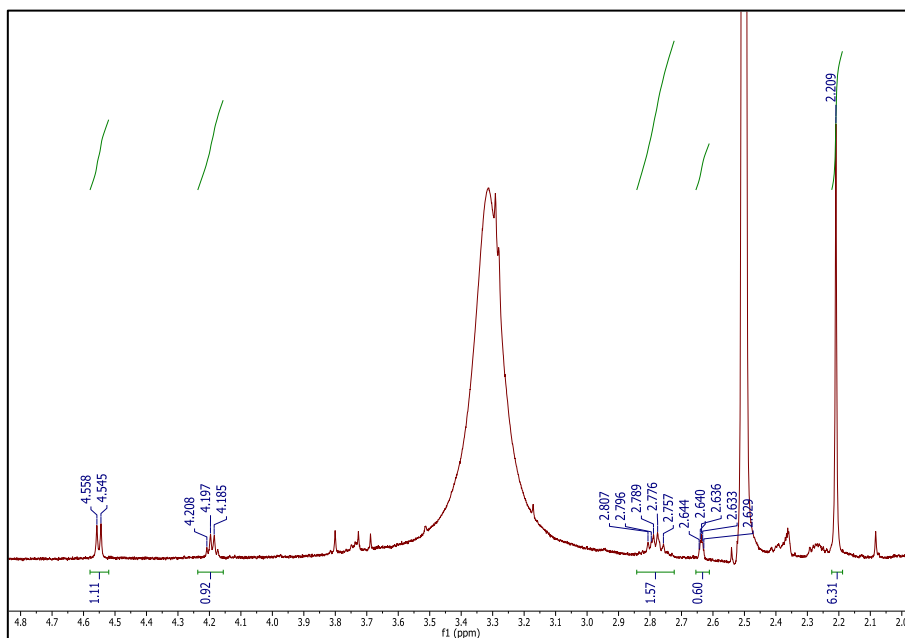


Figura 102 - Mapa de contorno gCOSY do alcaloide 7.

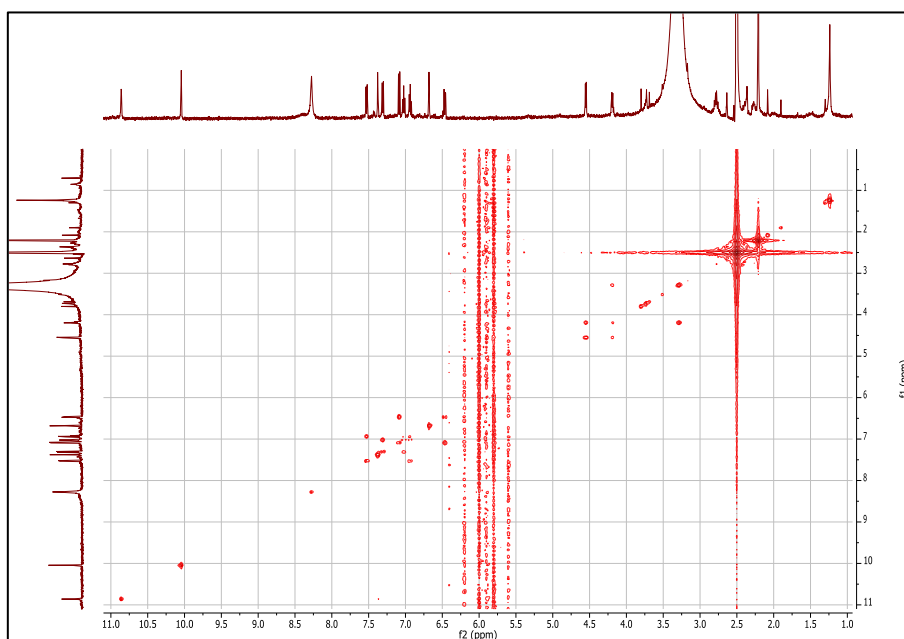


Figura 103 - Ampliação mapa de contorno gCOSY (δ_H 6,3-7,7) do alcaloide 7.

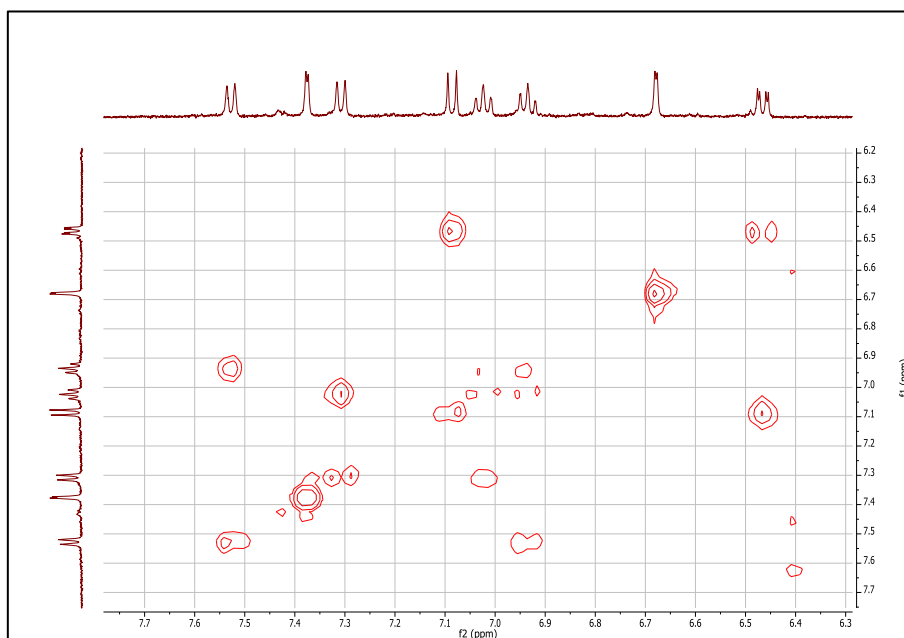


Figura 104 - Ampliação mapa de contorno gCOSY (δ_H 2,9-4,9) do alcaloide 7.

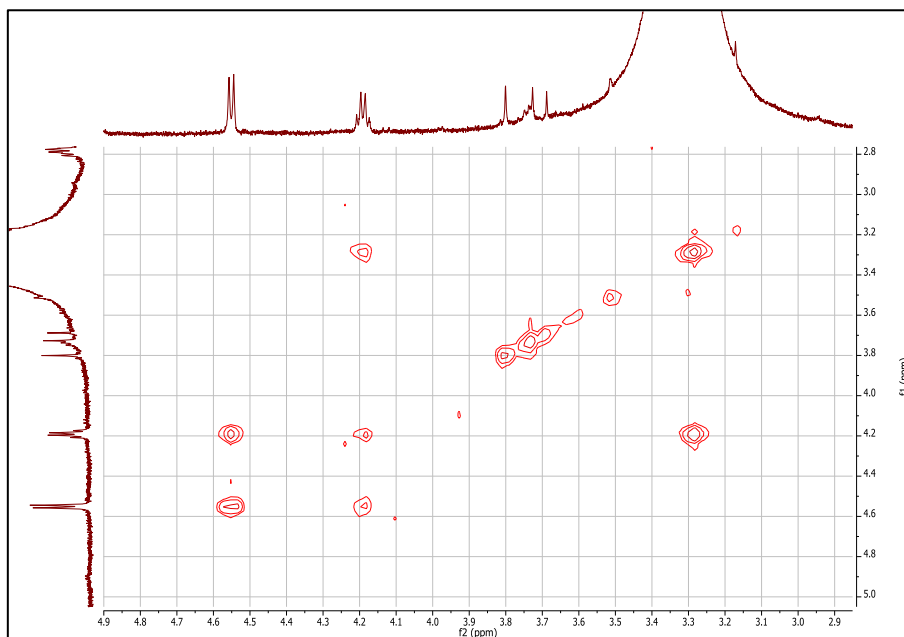


Figura 105 - Ampliação mapa de contorno gCOSY (δ_H 1,0-3,5) do alcaloide 7.

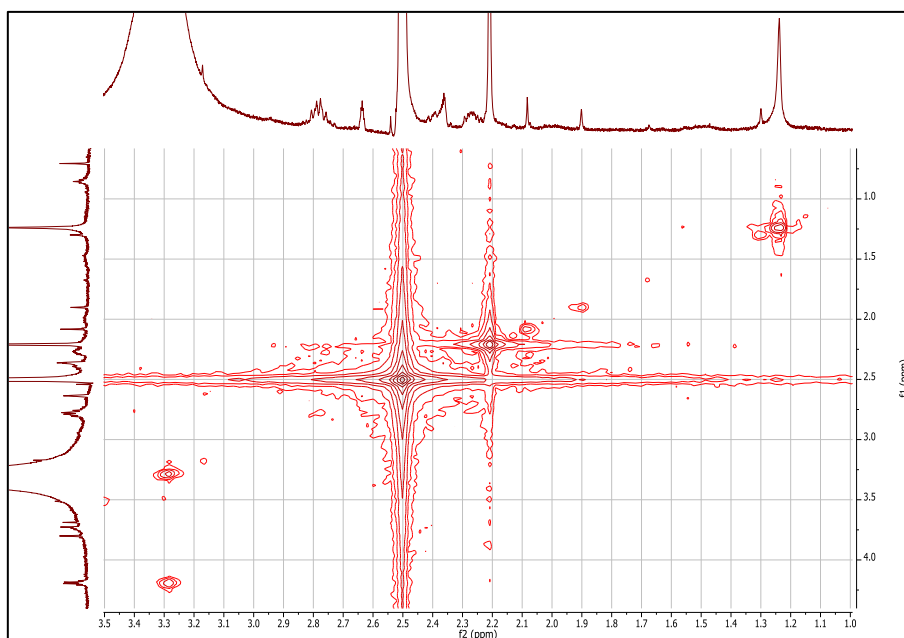


Figura 106 - Mapa de contorno gHSQC do alcaloide 7.

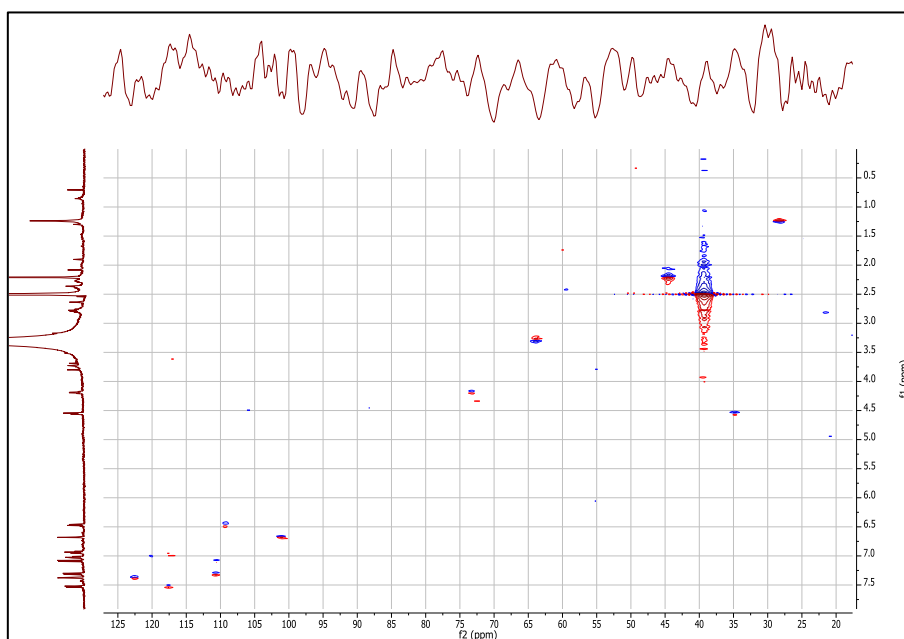


Figura 107 - Ampliação mapa de contorno gHSQC (δ_c 99-127) do alcaloide 7.

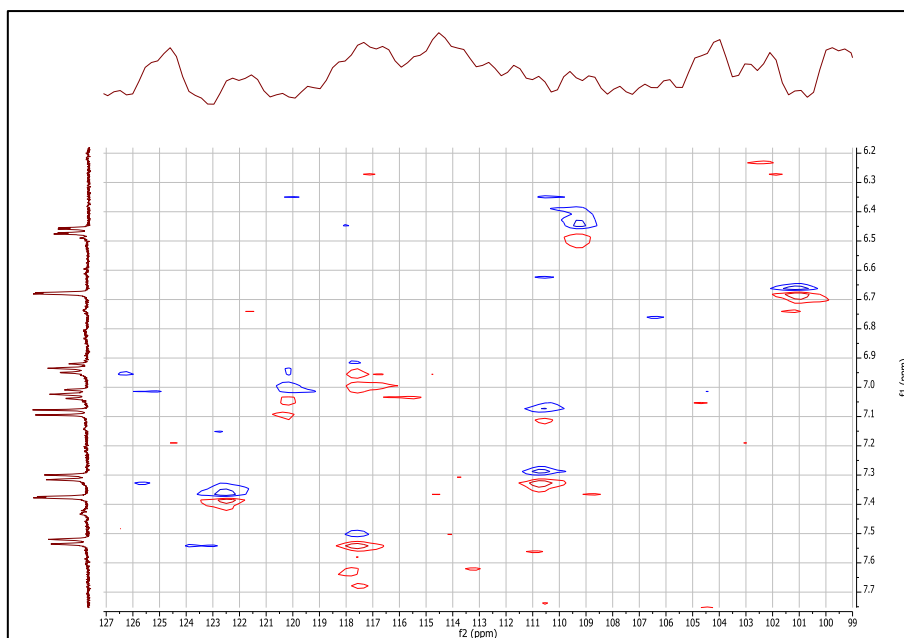


Figura 108 - Ampliação mapa de contorno gHSQC (δ_c 35-75) do alcaloide 7.

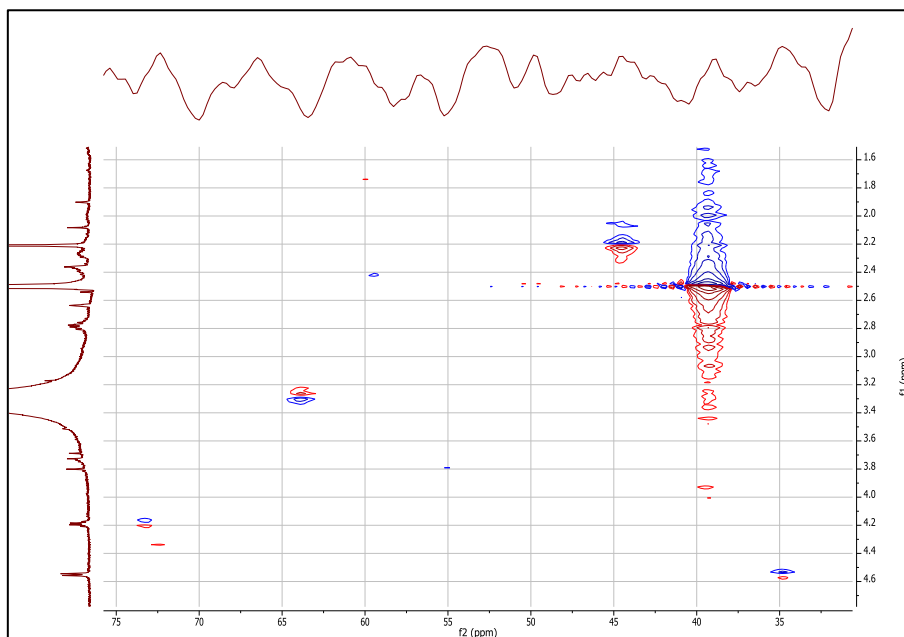


Figura 109 - Mapa de contorno gHMBC do alcaloide 7

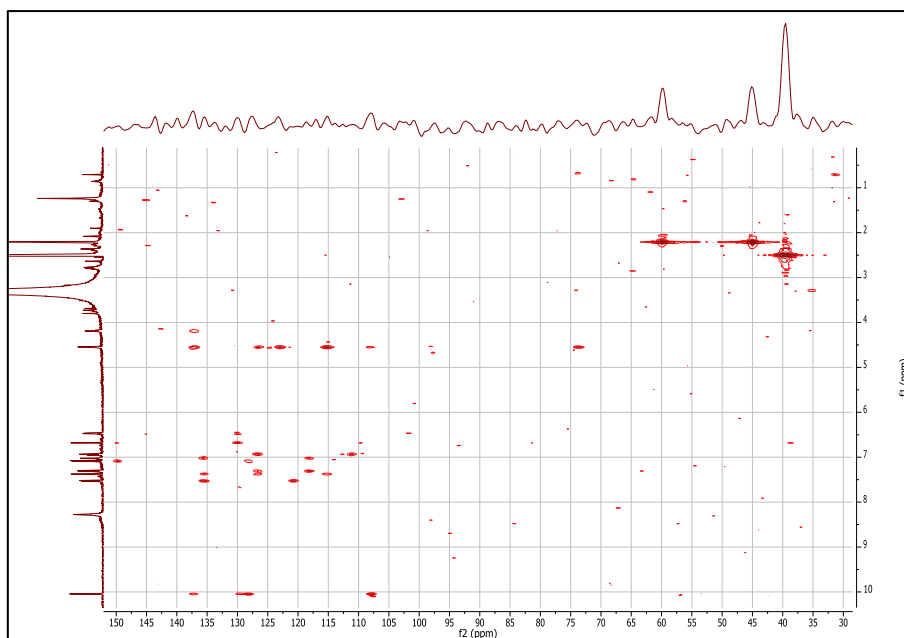


Figura 110 - Ampliação mapa de contorno gHMBC (δ_c 70-140) do alcaloide **7**.

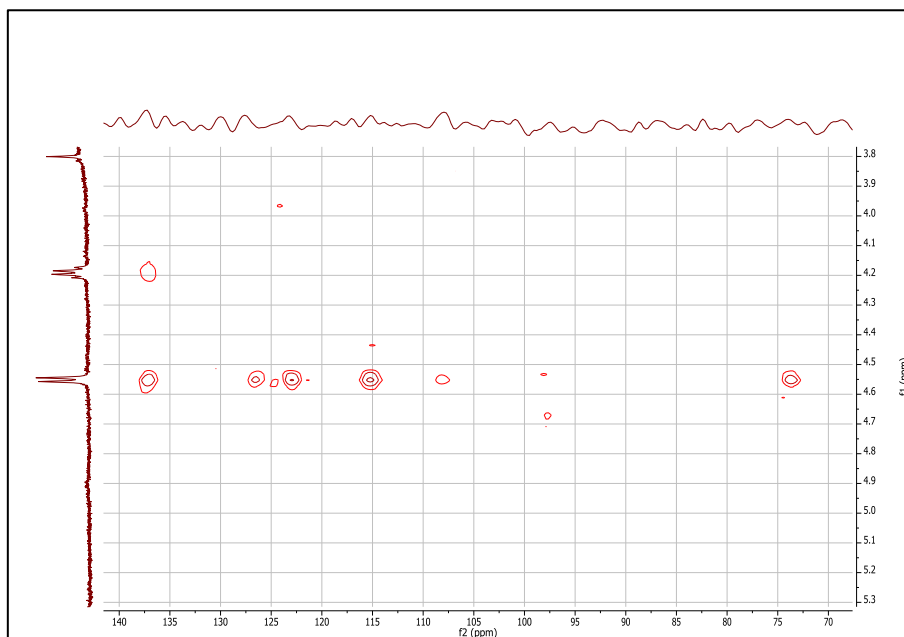


Figura 111 - Ampliação mapa de contorno gHMBC (δ_c 108-152) do alcaloide **7**.

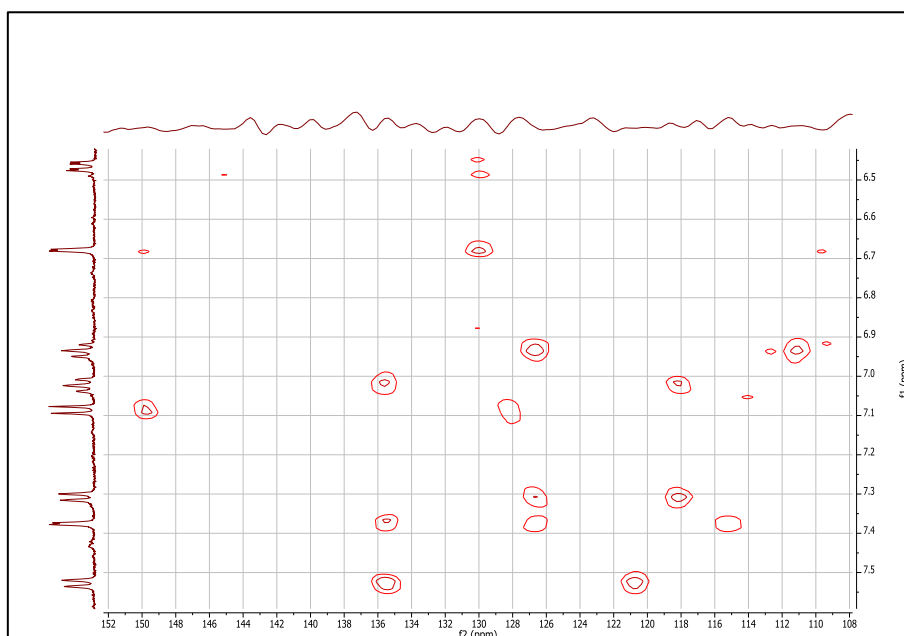


Figura 112 - Ampliação mapa de contorno gHMBC (δ_c 106-139) do alcaloide **7**.

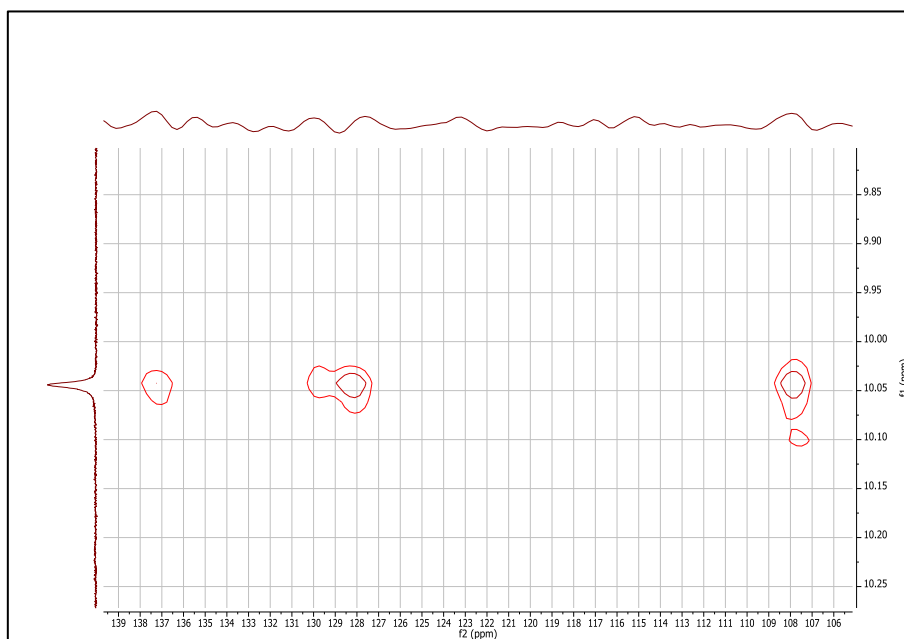


Figura 113 – Estrutura do alcaloide 5'-metoxi-3'-etil-N,N-dimetilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (**7**).

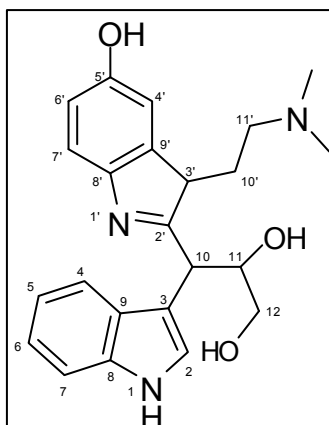


Tabela 20 - Dados de RMN mono e bidimensionais do alcaloide (7)

Posição	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_C	$gHMBC$
2	7,38 (<i>d</i> ; 2,5)	122,6	135,4(8); 126,7 (9); 115,2(3)
3		115,2	
4	7,53 (<i>d</i> ; 7,5)	117,8	135,4(8); 120,5(6);
5	6,94 (<i>t</i> ; 7,0)	117,9	126,7(9); 110,9(7)
6	7,04 (<i>t</i> ; 6,5)	120,5	135,4(8); 117,8(4)
7	7,32 (<i>d</i> ; 8,5)	110,9	126,7(9); 117,9(5)
8		135,4	
9		126,7	
10	4,56 (<i>d</i> ; 6,5)	34,9	137,4(2'); 126,7(9); 115,2(3); 108,0(3'); 73,5(11)
11	4,19 (<i>dd</i> ; 12 e 6,0)	73,5	137,4(2')
12	3,29 (<i>m</i>)	64,1	34,9(10)
1'	10,27 (<i>s</i>)		137,4(2'); 130,1(8'); 128,2(9'); 108,0(3')
2'		137,4	
3'		108,0	
4'	6,68 (<i>d</i> ; 2,5)	101,2	130,1(8'); 109,7(6')
5'		149,9	
6'	6,46 (<i>dd</i> ; 6,5 e 2,0)	109,7	130,1(8'); 101,2(4')
7'	7,09 (<i>d</i> ; 8,5)	110,1	149,9(5'); 128,2(9')
8'		130,1	
9'		128,2	
10'	2,79 (<i>m</i>)	21,7	
11'	2,79 (<i>m</i>)		
N-(CH₃)₂	2,20 (<i>s</i> ; 6H)	44,7	44,7

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).^b multiplicidade (*m*).^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração K-1

O composto presente na Fração K1 (11 mg) foi obtido como um sólido amorfo, solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos e espectrométricos. A Tabela 21 abaixo ilustra os resultados obtidos pela análise por RMN para esta fração. A partir dos dados obtidos, pode-se caracterizar o composto presente como o ácido *cis*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**8**).

Figura 114 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do ácido *cis*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**8**).

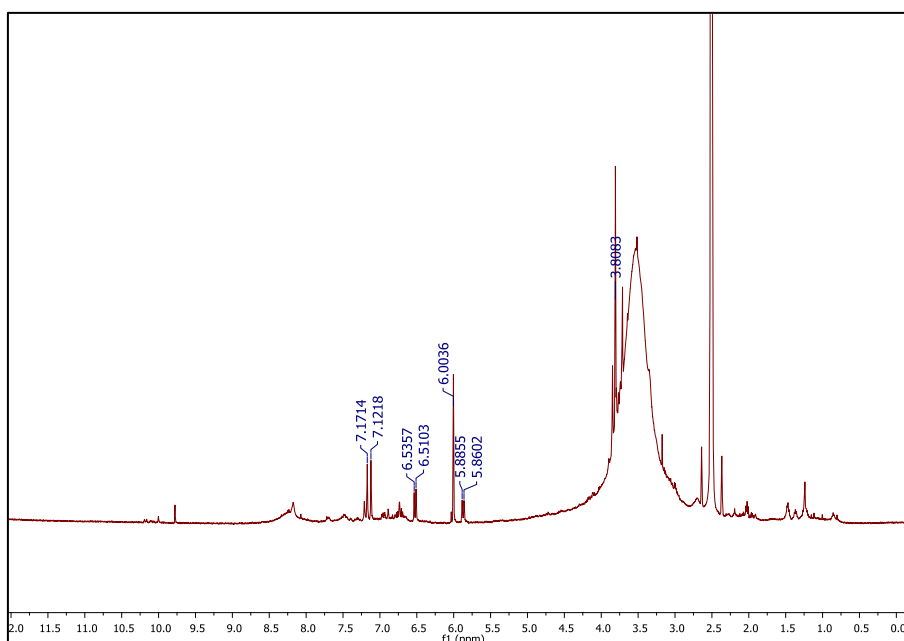


Figura 115 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 3,7-7,2) do ácido *cis*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**8**).

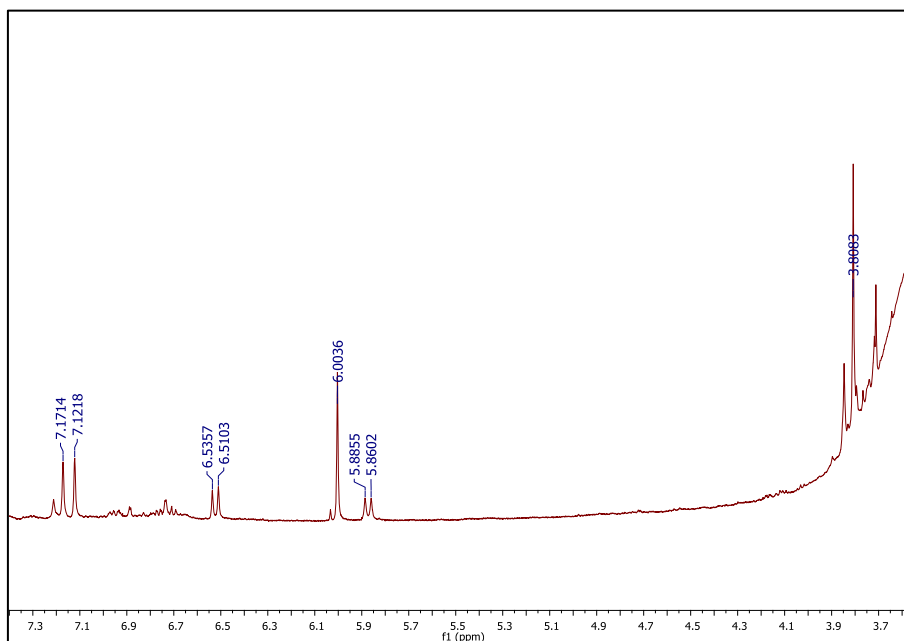


Figura 116 - Estrutura do ácido *cis*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**8**).

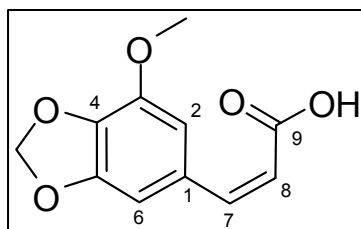


Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C (125 MHz) do ácido *cis*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**8**).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C}
1		129,8
2	7,17 (s)	103,7
3		148,2
4		147,9
5		
6	7,12 (s)	110,6
7	6,52 (d, 13)	135,9
8	5,87 (d, 13)	122,8
9		165,9
3-OMe	3,80 (s)	55,8
OCH ₂ O	6,00 (s)	100,9

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

Fração K-2

O composto presente na Fração K-2 (20 mg) foi obtido como um sólido amorfo, solúvel em MeOH. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos e espectrométricos. A Tabela 22 abaixo ilustra os resultados obtidos pela análise por RMN para esta fração. A partir da comparação dos dados de obtidos, com aqueles presentes na literatura (GIJILHON et al., 1994), pode-se caracterizar o composto presente como o ácido *trans*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**9**) (equisentan). Este metabólito foi descrito anteriormente nas espécies *Canella winterana* (Canellaceae), *Esenbeckia Almawillia* (Rutaceae). (EL-FERAL; HOFFSTETTER, 1980; GIJILHON et al., 1994).

Figura 117 - RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do ácido *trans*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**9**).

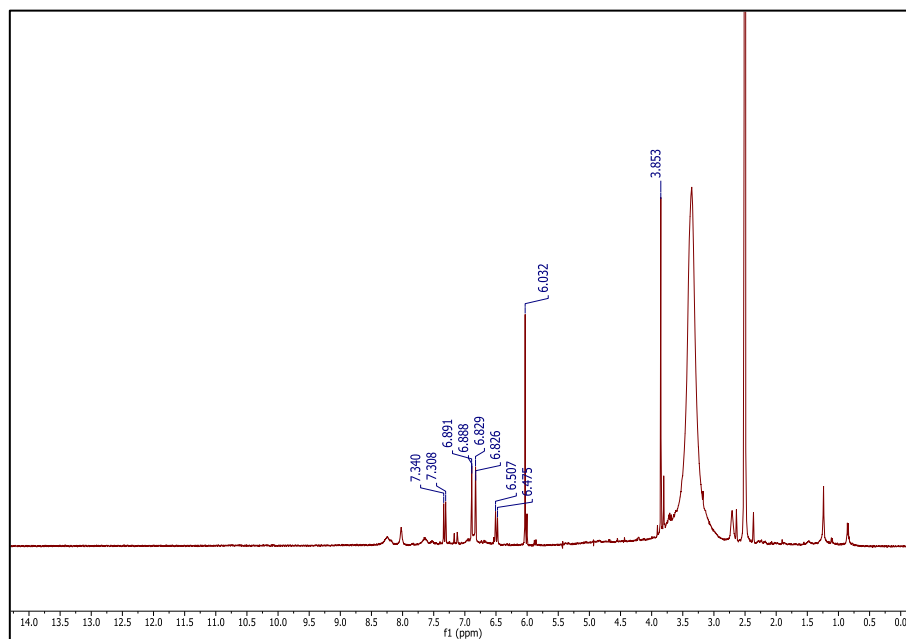
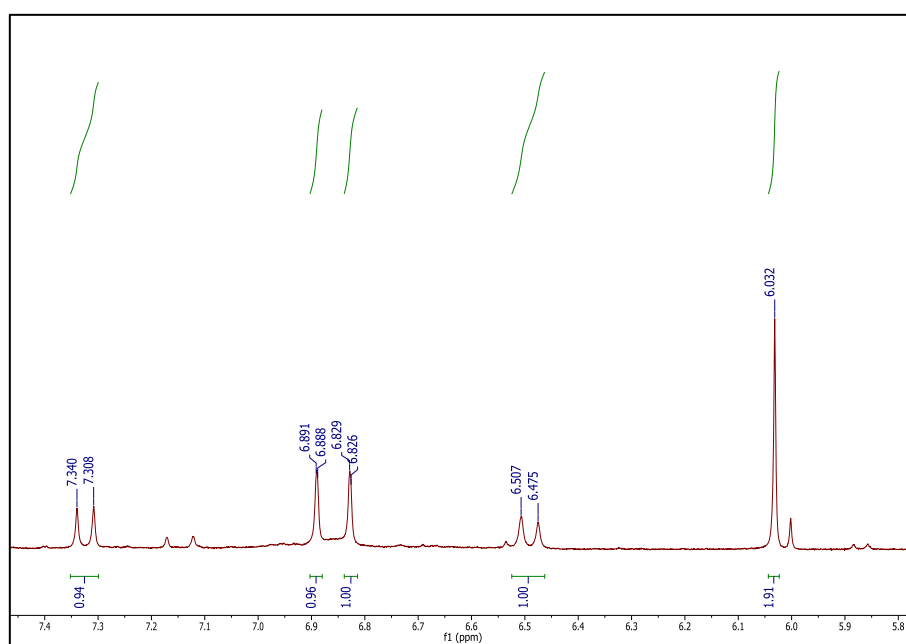


Figura 118 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 5,8-7,4) do *trans*-3-metoxi-4,5-metilenodioxi-cinâmico (**9**).



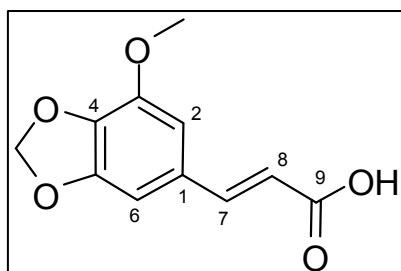


Figura 119 - Estrutura do *trans*-3-metoxi-4,5-metilenodioxo-cinâmico (**9**).

Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido *trans*-3-metoxi-4,5-metilenodioxo-cinâmico (**9**) e os dados da literatura.

Posição	(9)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1		129,7		129,2
2	6,90 (<i>d</i> ; 1,5)	108,3	6,67 (<i>br</i>)	101,3
3		143,2		149,3
4		135,9		137,3
5		148,9		143,7
6	6,83 (<i>d</i> ; 1,5)	100,4	6,72 (<i>br</i>)	109,1
7	7,33 (<i>d</i> , 16,0)	138,3	7,55 (<i>d</i> , 15,9)	144,7
8	6,49 (<i>d</i> , 16,0)	129,7	6,25 (<i>d</i> , 15,9)	116,2
9		164,9		167,5
3-OMe	3,85 (<i>s</i>)	56,0	3,90 (<i>s</i>)	56,6
OCH ₂ O	6,03 (<i>s</i>)	101,4	5,99 (<i>s</i>)	101,8

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (*m*).

^c Constante de acoplamento (*J*), expressa em Hz

* GIJILHON et al., 1994

Fração K-3

O composto presente na Fração K-3 (13 mg) foi isolado como um sólido amorfo, solúvel em MeOH. Os dados obtidos através da técnica de RMN para esta fração estão ilustrados na Tabela 23, abaixo. Através destes dados pode-se caracterizá-la como o ácido 2-hidroxibenzóico (**10**) (ácido salicílico).

O ácido salicílico é um dos principais metabólitos das folhas e cascas do caule de salgueiro (*Salix*- Salicaceae). É sabido que mascar as folhas ou casca desta espécie de salgueiro, pode aliviar a febre, dor e inflamação (MACLAGAN, 1876; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009). Nas plantas o AS tem diversas funções, dentre estas: regular o crescimento celular, a abertura dos estômatos, a respiração, germinação das sementes, desenvolvimento das mudas, termotolerância, produção de frutos, a nodulação em leguminosas e na expressão de genes relacionados com a senescência. O AS é conhecido também como uma molécula de sinalização na defesa das plantas contra fitopatógenos (BOATWRIGHT; PAJEROWSKA-MUKHTAR, 2013; RASKIN, 1992; SPOEL e DONG, 2012; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009).

Figura 120 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do ácido salicílico (**10**).

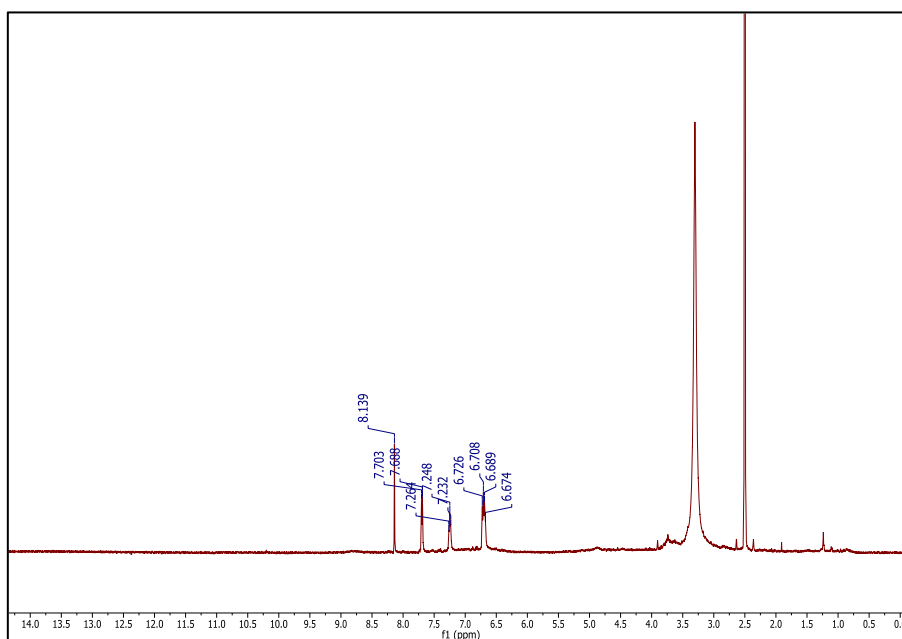


Figura 121 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,6-8,3) do ácido salicílico (**10**).

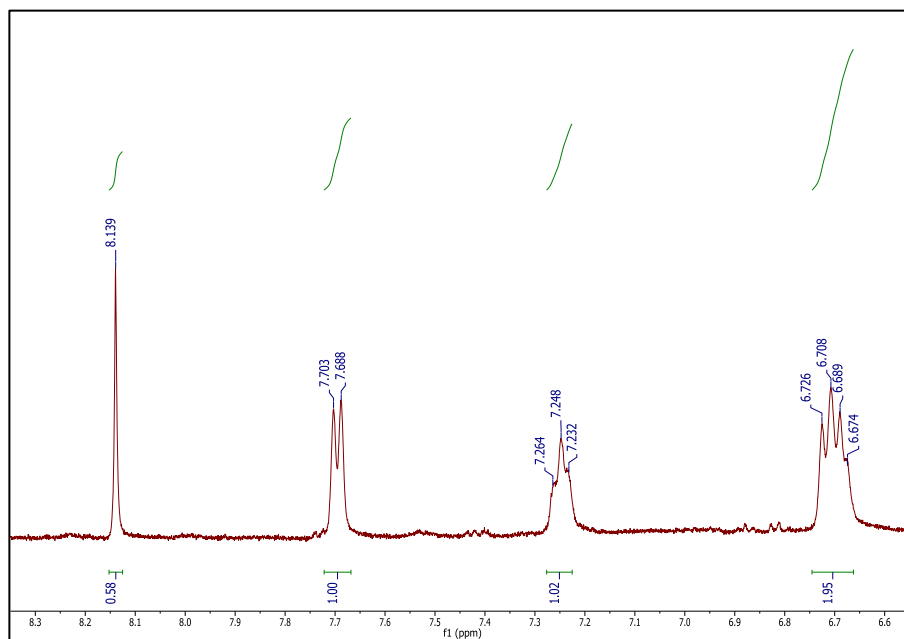


Figura 122 - Estrutura do ácido 2-hidroxibenzóico (ácido salicílico) (**10**).

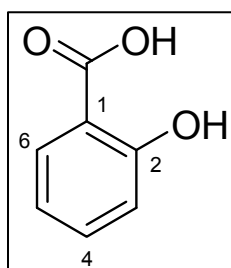


Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido salicílico (**10**).

(10)		
Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1		116,5
2		162,5
3	6,70 (<i>m</i>)	116,1
4	7,24 (<i>t</i> ; 8)	132,7
5	6,70 (<i>m</i>)	114,8
6	7,70 (<i>d</i> ; 7,5)	123,3
COOH		171,0

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (*m*).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

Frações Q-1 e R-1

Os compostos presentes nas Frações Q-1 (10 mg) e R-1 (6 mg) foram obtidos como sólidos amorfos solúveis em MeOH e ACN. Estes foram caracterizados por métodos espectroscópicos (RMN) e espectrométricos (UPLC-TOF-EM).

Os espectros de RMN de ^1H para estes compostos apresentaram semelhanças com o espectro do composto **17** (7-metil-2,6-diidroxifenantreno), como pode ser observado nas figuras 123 e 124, abaixo.

Figura 123 - Comparação dos espectros de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) dos compostos **13**, **14** e **17**.

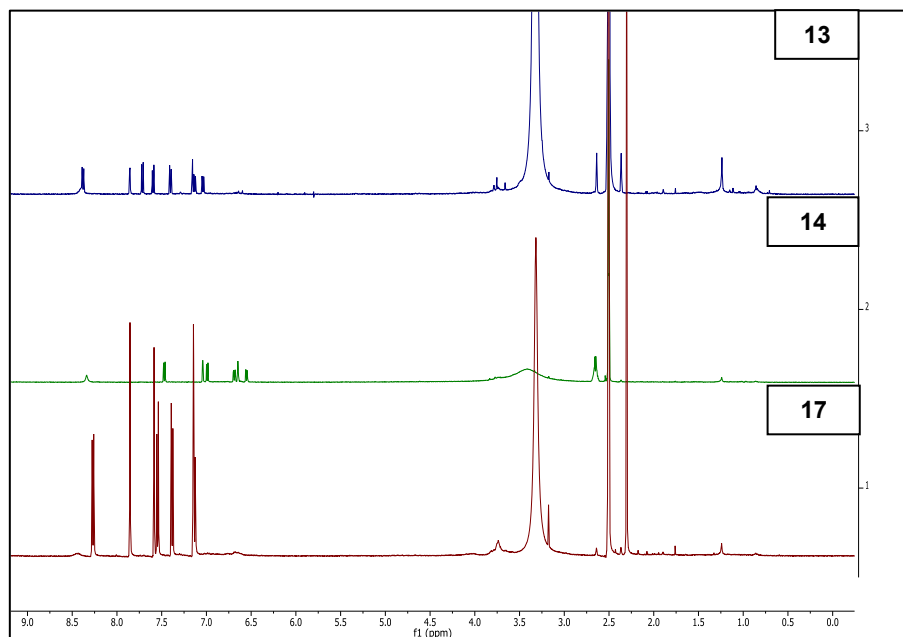
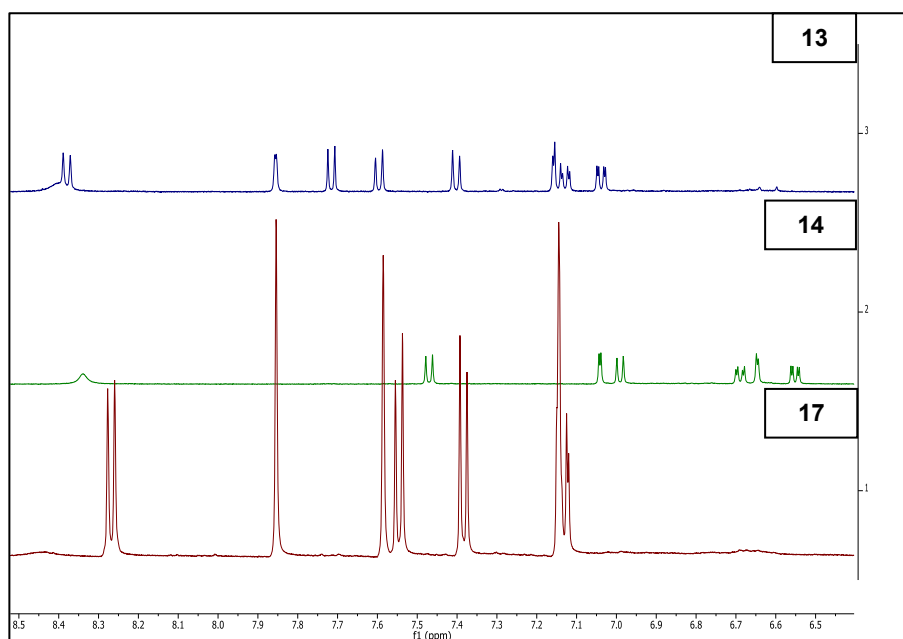


Figura 124 - Ampliação dos espectros de RMN ^1H (δ_{H} 6,5-8,5) dos compostos **13**, **14** e **17**.



A semelhança nos espectro de RMN ^1H destes compostos deve-se a presença de sistemas do tipo ABX. Os compostos **13** e **14** apresentam dois destes sistemas referentes aos hidrogênios H-1, H-3, H-4 e H-5, H-7, H-8. No composto **13** estes hidrogênios foram correlacionados aos sinais δ_{H} 6,65 (d ; 2,5 Hz, H-1), 6,69 (dd ; 8,5 e 2,5 Hz, H-3) e 7,47 (d ; 8,0 Hz, H-4); 7,04 (d ; 2,5 Hz, H-

5), 6,55 (*dd*; 7,8 e 2,5 Hz, H-7) e 6,99 (*d*; 8,0 Hz, H-8) (Figuras 127, 129, 131 e 134). No espectro de RMN ^1H de **14** estes sinais foram correlacionados aos sinais δ_{H} 7,16 (*d*; 9,0 Hz, H-1), 7,13 (*dd*; 9,0 e 2,5 Hz, H-3), e 8,38 (*d*; 9,0 Hz, H-4); 7,86 (*d*; 2,5 Hz, H-5), 7,04 (*dd*; 8,0 e 2,0 Hz, H-7) e 7,72 (*d*; 8,5 Hz, H-8). Esta hipótese foi confirmada através de experimentos de *g*COSY e *g*HMBC (Figuras 137, 139, 141 e 143).

A diferença observada entre os referidos espectros foi relacionada a presença de um multipeto na região de δ_{H} 2,64 (*m*; 4H) em **13**, que foi correlacionado com os hidrogênios metilênicos nas posições H-9 e H-10, e confirmada através dos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC (Figuras 127, 129, 132). No composto **14** estes hidrogênios foram observados como dubletos δ_{H} 7,40 e 7,60, com constantes de acoplamento de 8,5 Hz, indicando acoplamento de hidrogênios aromáticos *orto*. Estes dados foram confirmados por experimentos de *g*COSY e *g*HMBC (138, 140, 142 e 144).

A análise por UPLC-TOF-EM no modo negativo ($[\text{M-H}]^-$) para **13** apresentou valor de m/z 211,0755 compatível com a fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2$ (erro = - 1,9 ppm) (Figura 124). O que corrobora com a estrutura proposta do composto presente na fração Q-1 como o novo produto natural derivado do fenantreno, 2,6-diidrox-9,10-diidrofenantreno (**13**) (Figura 135).

A análise por UPLC-TOF-EM no modo negativo ($[\text{M-H}]^-$) para a fração **14** apresentou valor de m/z de 209,0596, compatível com a fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$. (erro = - 3,3 ppm) (Figura 136), o que corrobora com a estrutura proposta como a do novo produto natural do derivado de fenantreno, 2,6-diidroxifenantreno (**14**) (Figura 145).

Figura 125 – Espectro de massas de alta resolução de **13**, caracterizado como o derivado de fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno.

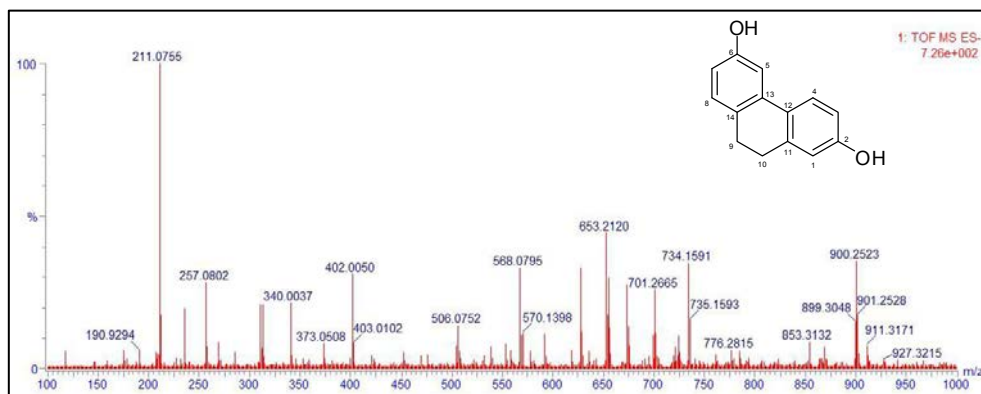


Figura 126 - RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

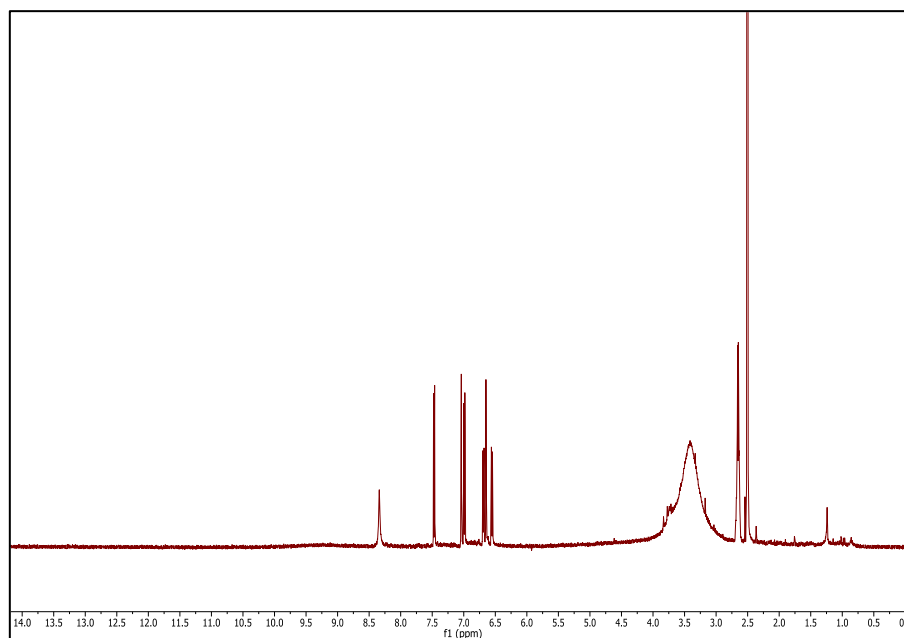


Figura 127 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 6,4-7,6) do fenantreno 2,6-diidroxí-9,10-diidrofenantreno (**13**).

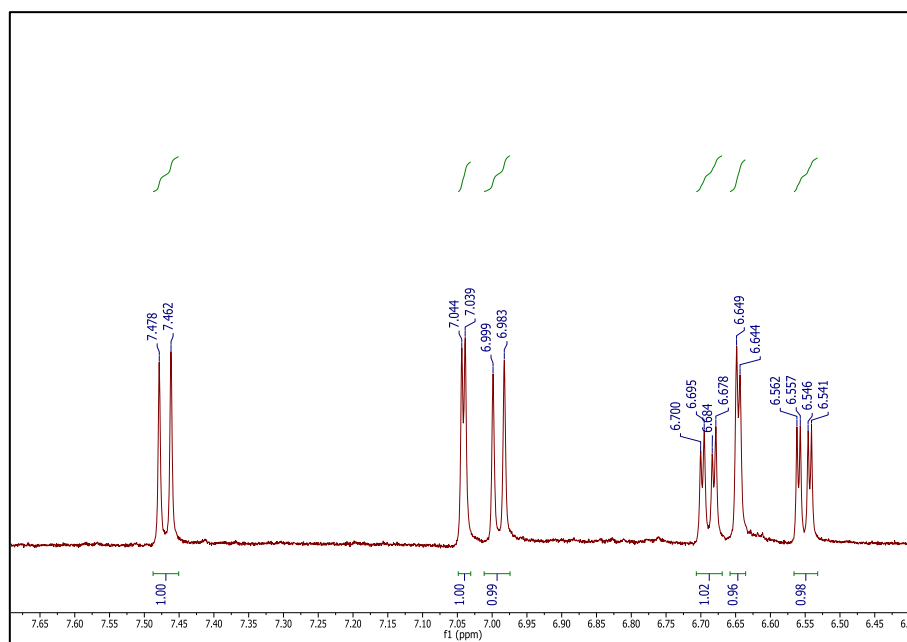


Figura 128 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ_{H} 2,30-3,00) do fenantreno 2,6-diidroxí-9,10-diidrofenantreno (**13**).

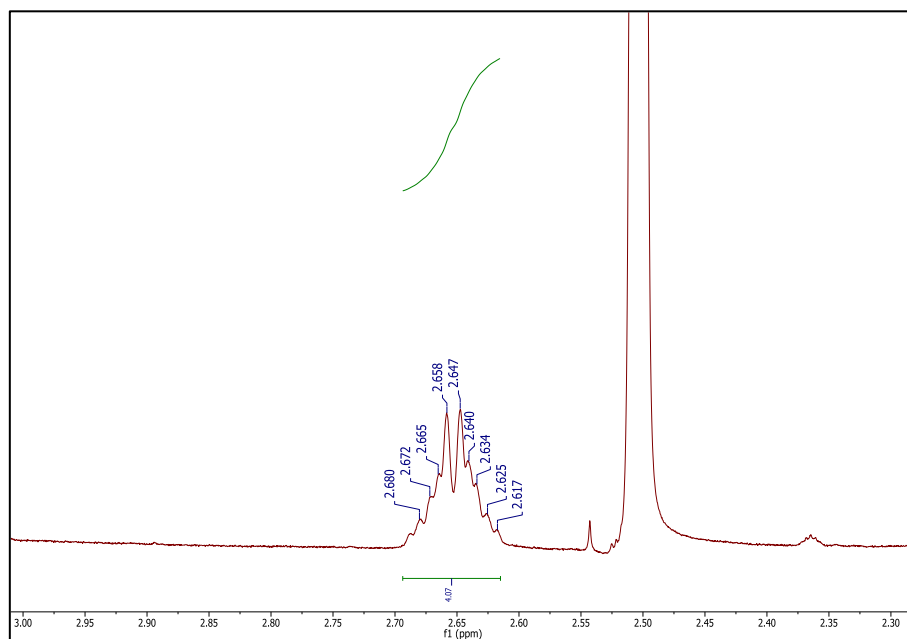


Figura 129 – Mapa de contorno gHSQC (500 MHz, DMSO-*d*₆) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

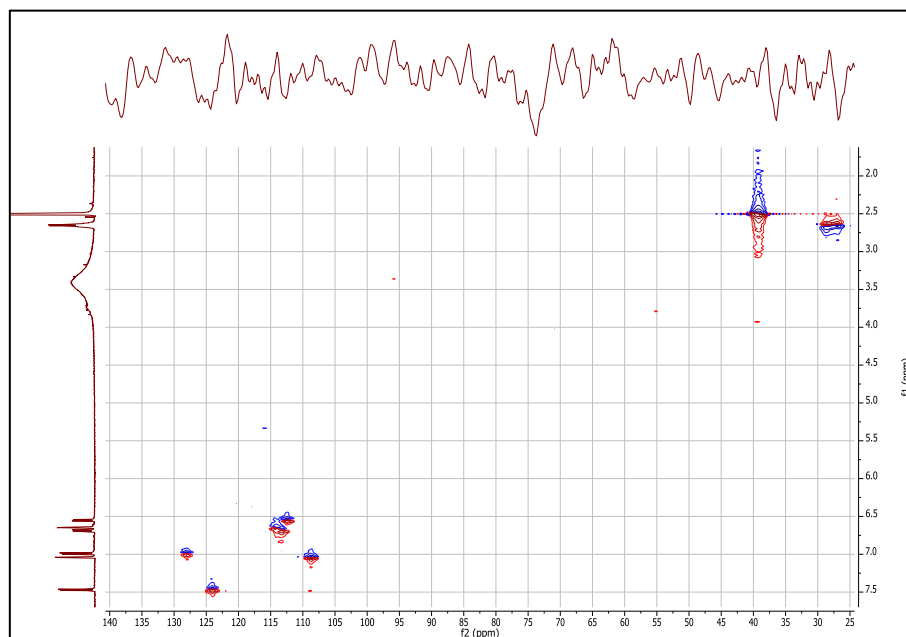


Figura 130 – Ampliação do espectro de gHSQC (δ_c 25-30) do fenantreno, 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

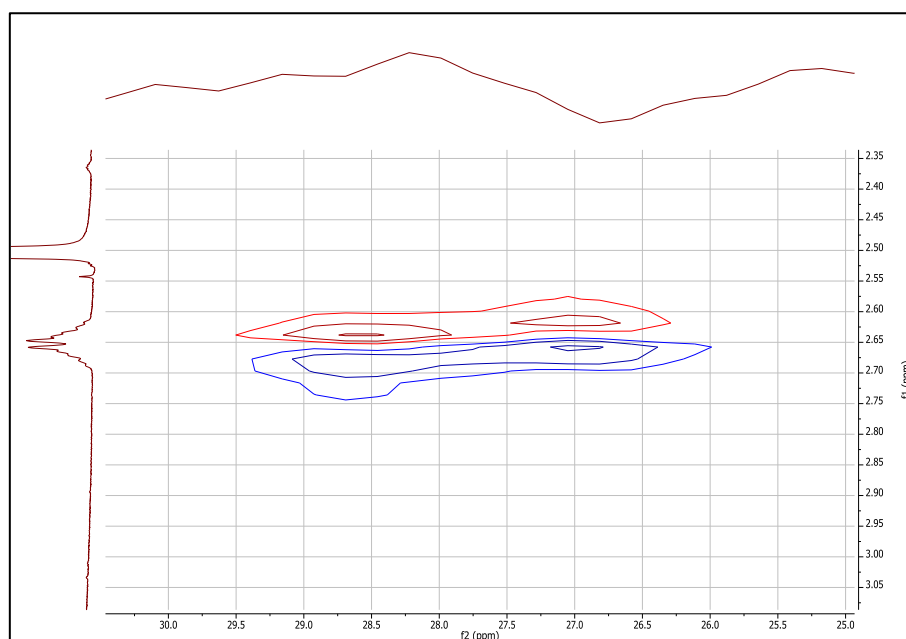


Figura 131 – Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_c 106-131) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

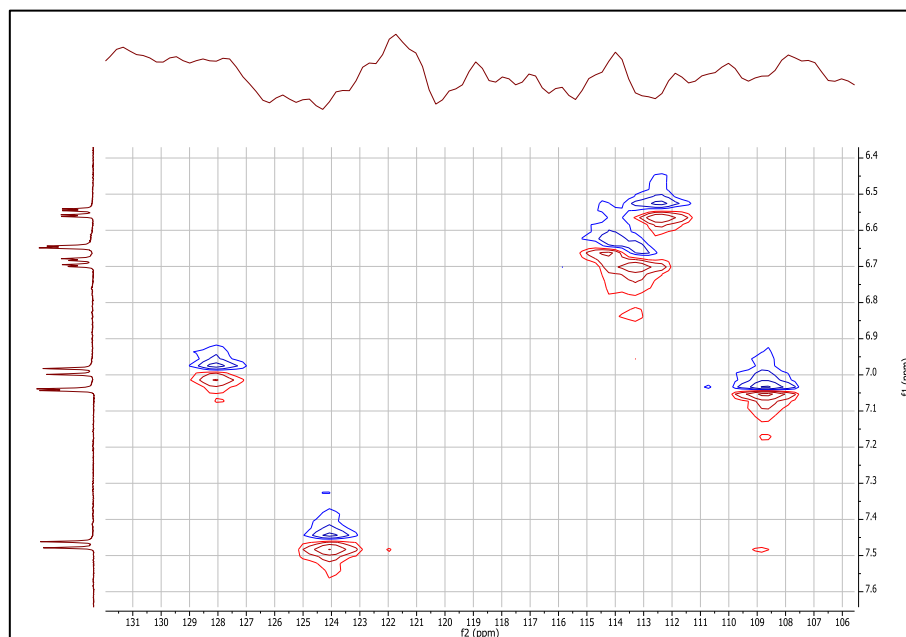


Figura 132 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, DMSO- d_6) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

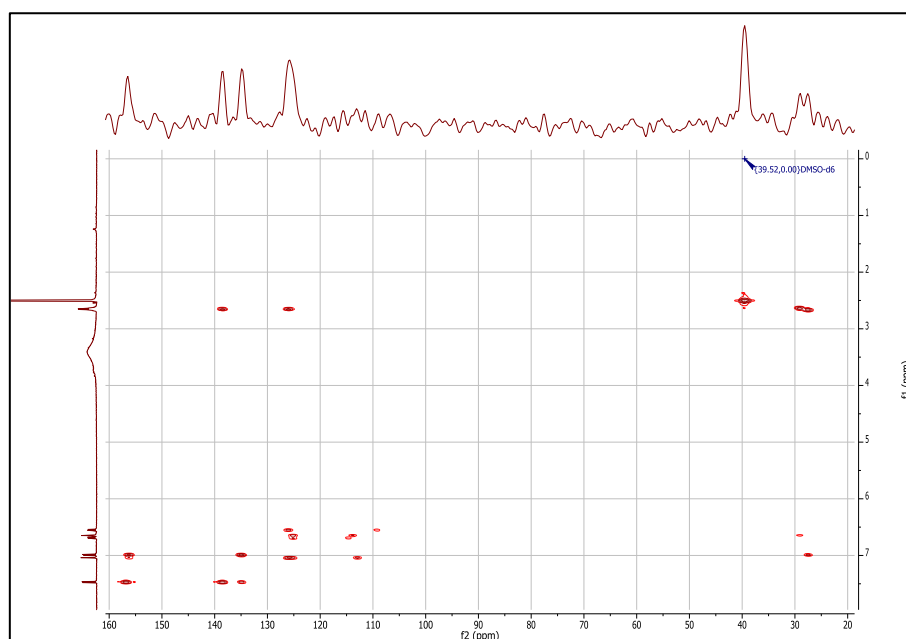


Figura 133 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 25-140) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

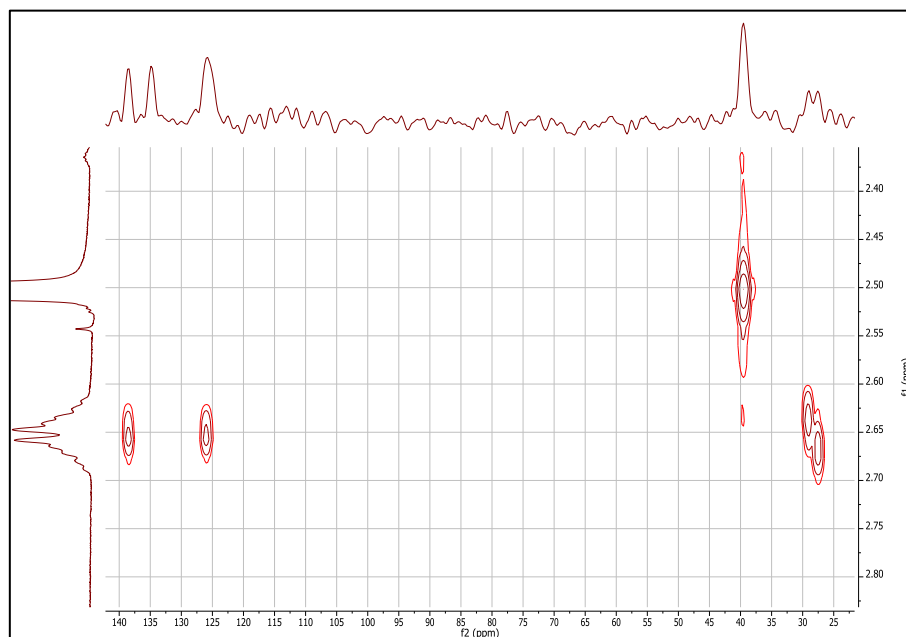


Figura 134 - Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ_c 30-160) do fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

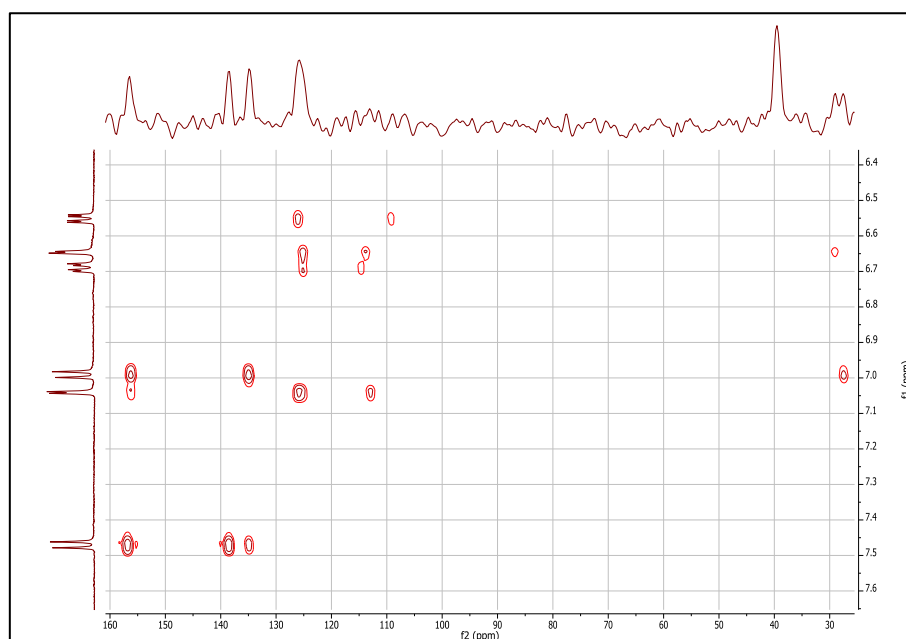


Figura 135 – Estrutura do novo derivado de fenantreno, 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**).

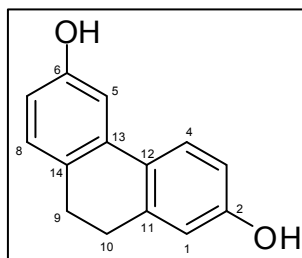


Tabela 24 - Dados de RMN mono e bidimensionais para o fenantreno 2,6-diidroxi-diidrofenantreno (**13**).

Posição	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_C	$gHMBC$
1	6,65 (<i>d</i> ; 2,5)	114,2	29,2(10); 113,1(3) 125,2(12); 156,6(2)
2		155,7	
3	6,69 (<i>dd</i> ; 8,5 e 2,5)	113,3	114,2(1); 125,2(12)
4	7,47 (<i>d</i> ; 8,0)	124,0	138,6(11); 134,9(13); 156,3(2)
5	7,85 (<i>d</i> ; 2,5)	108,8	113,6(7); 125,2(12); 126,1(14)
6		156,3	
7	6,55 (<i>dd</i> ; 7,8 e 2,5)	112,4	108,8(5); 126,1(14); 153,3(6)
8	6,99 (<i>d</i> ; 8,0)	128,0	135,0(13); 156,3(6)
9	2,64 (<i>m</i>)	27,4	
10	2,64 (<i>m</i>)	29,2	
11		138,6	
12		125,0	
13		135,0	
14		126,0	

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (*m*).

^c Constante de acoplamento (*J*), expressa em Hz.

Figura 136 – Espectro de massa de alta resolução de **14**, caracterizado como o derivado de fenantreno, 2,6-diidroxifenantreno.

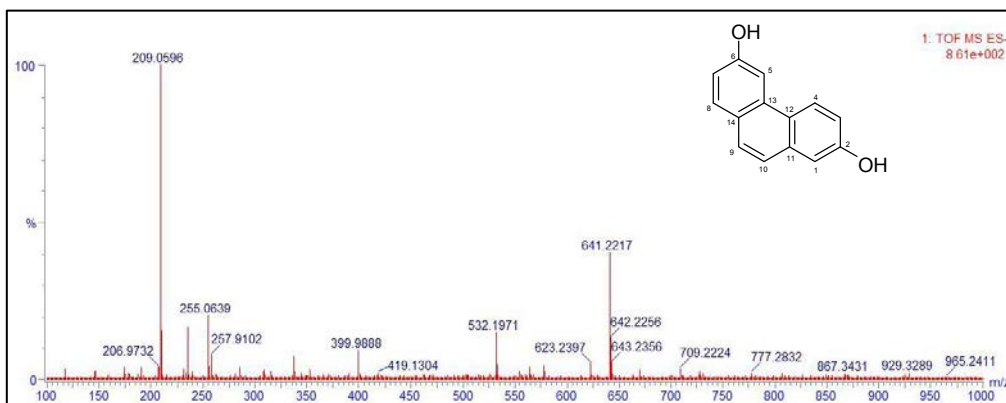


Figura 137 - RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

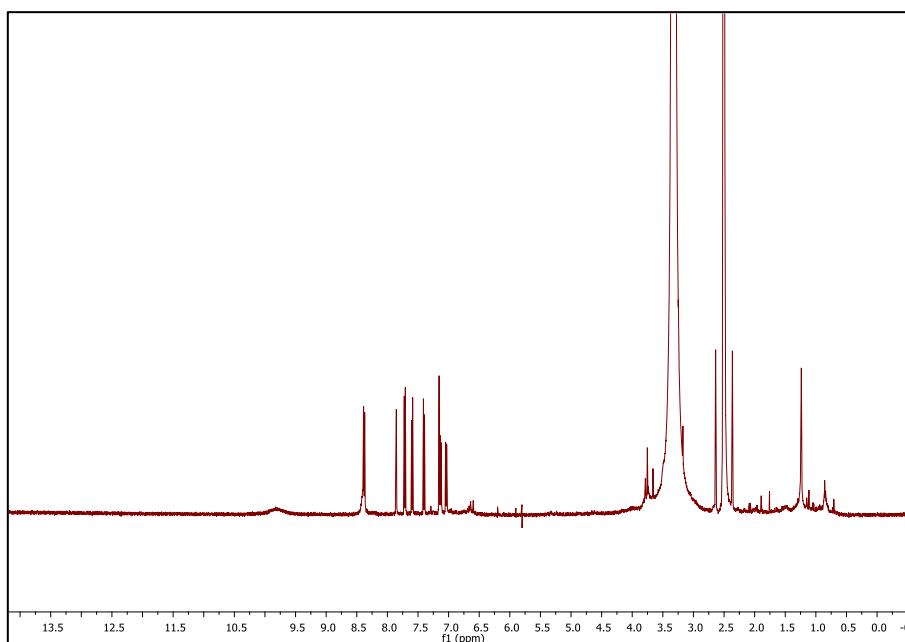


Figura 138 – Ampliação RMN ^1H (δ_{H} 6,9-8,5) do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

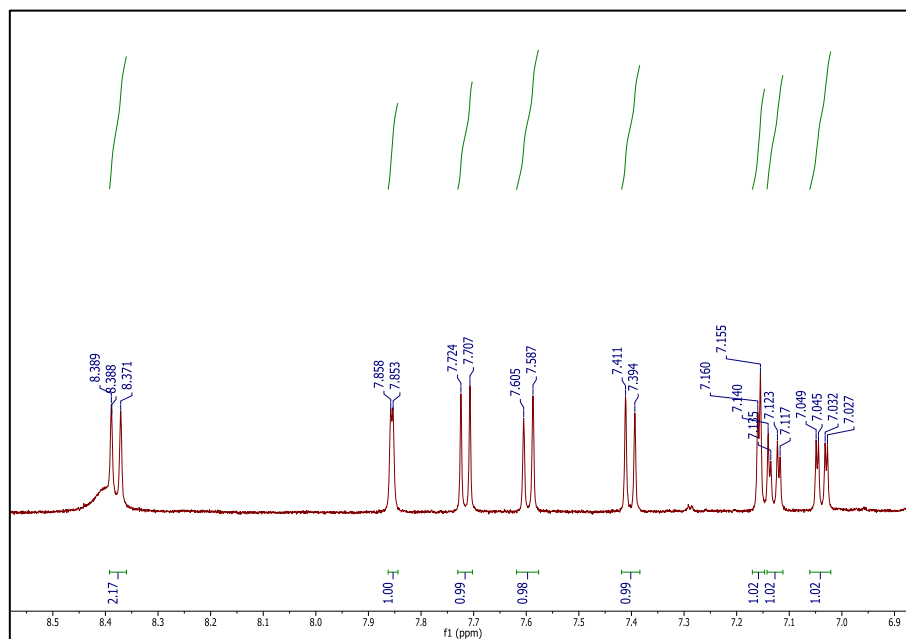


Figura 139 – Mapa de contorno gCOSY (500 MHz, DMSO-*d*₆), do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

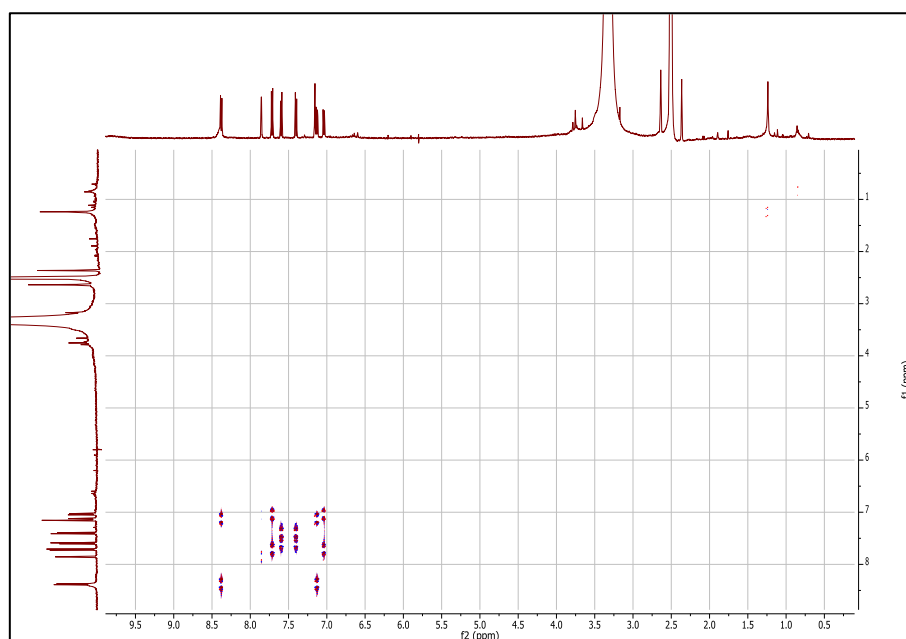


Figura 140 – Ampliação do mapa de contorno *g*COSY (500 MHz, DMSO-*d*6) do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

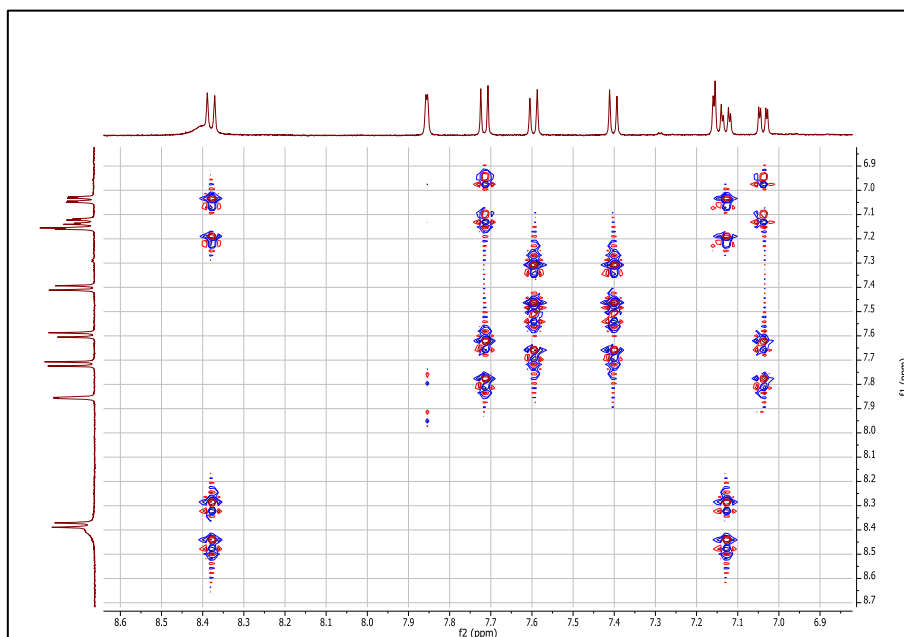


Figura 141 - Mapa de contorno *g*HSQC (500 MHz, DMSO-*d*6), do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

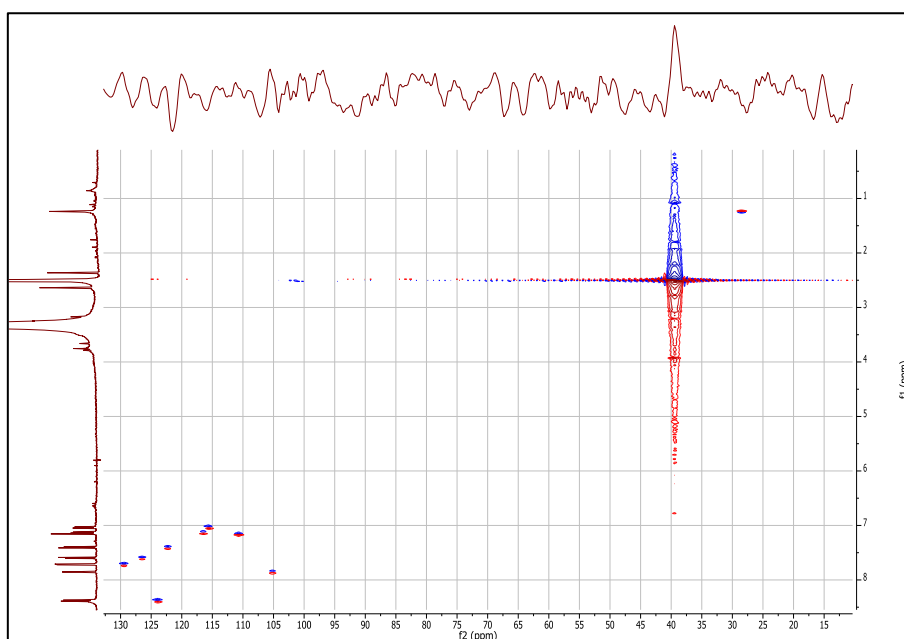


Figura 142 - Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ_c 103-131) do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

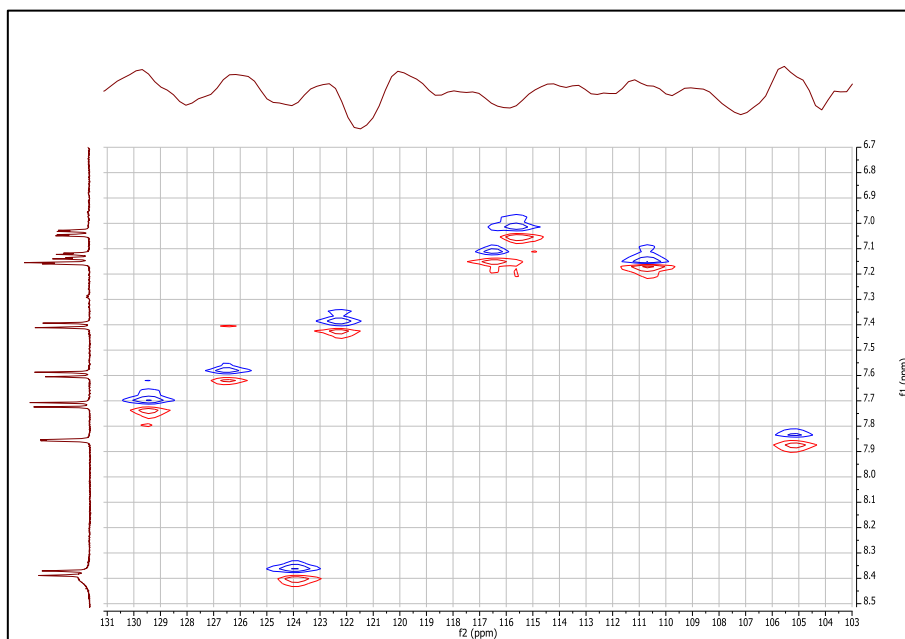


Figura 143 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, DMSO- d_6), do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

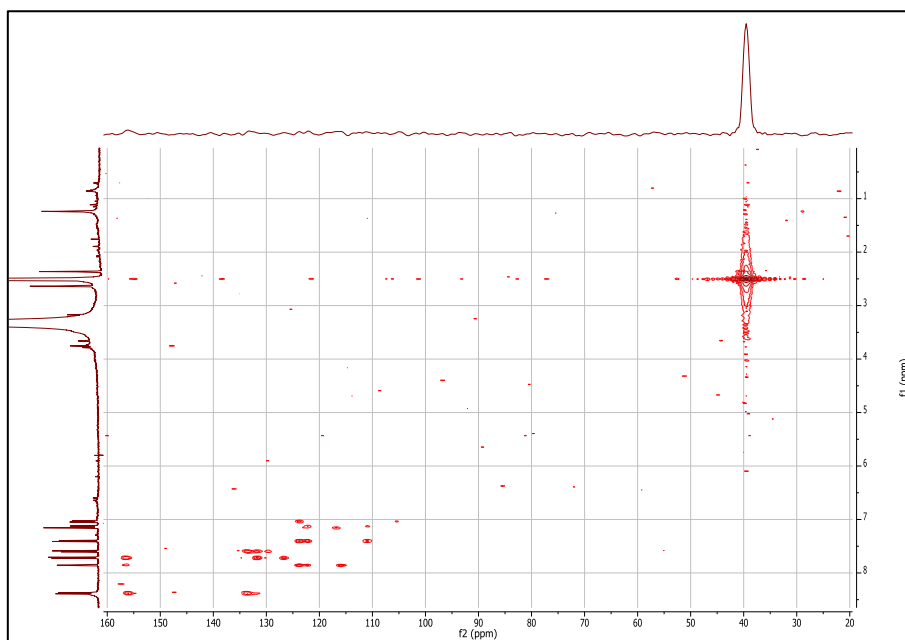


Figura 144 - Ampliação do mapa de contorno *g*HMBC (δ_c 106-158) do fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

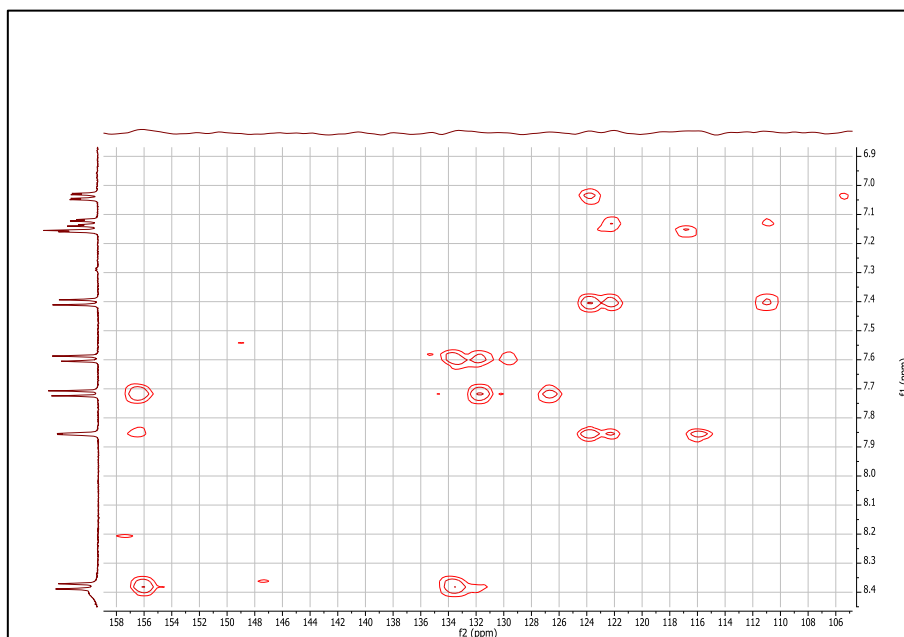


Figura 145 – Estrutura do novo derivado de fenantreno 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

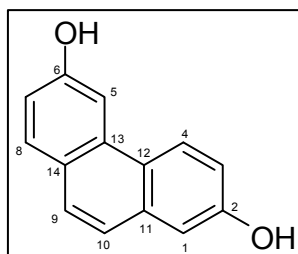


Tabela 25 - Dados de RMN mono e bidimensionais para o fenantreno, 2,6-diidroxifenantreno (**14**).

Posição	δ_H^a (m^b ; J^c)	δ_C	$gHMBC$
1	7,16 (<i>d</i> ; 2,5)	110,7	116,8(3); 122,2(10); 122,3(12)
2		156,1	
3	7,13 (<i>dd</i> ; 9,0 e 2,5)	116,5	110,8(1); 122,3(12)
4	8,38 (<i>d</i> ; 9,0)	123,9	133,5(13); 156,1(2)
5	7,86 (<i>d</i> ; 2,5)	105,2	115,6(7); 122,2(10); 123,7(14)
6		156,4	
7	7,04 (<i>dd</i> ; 8,0 e 2,0)	115,6	105,2(5); 123,7(14)
8	7,72 (<i>d</i> ; 8,5)	129,5	126,7(9); 131,8(13); 156,4(6)
9	7,60 (<i>d</i> ; 8,5)	126,9	129,5(8); 131,8(13); 133,5(11)
10	7,40 (<i>d</i> ; 8,5)	122,3	110,7(1); 122,3(12); 123,7(14)
11		133,5	
12		122,3	
13		131,8	
14		123,7	

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

Fração U-1

O composto presente na Fração U-1 (15 mg) foi obtido como um sólido amorfo solúvel em MeOH e ACN. Esta fração foi caracterizada por métodos espectroscópicos (RMN) e espectrométricos (UPLC-TOF-EM). A Tabela 26 ilustra os resultados através da técnica de RMN.

A análise por UPLC-TOF-EM no modo negativo ($[M-H]^-$) para esta fração apresentou valor de m/z de 623,2382, compatível com a fórmula $C_{36}H_{35}N_2O_8$. (erro = - 1,8 ppm) (Figura 146). O que corrobora com a estrutura proposta como sendo a amida canabisina F (**16**), sua estrutura está ilustrada

Figura 148 - Ampliação RMN ^1H (δ_{H} 2,4-4,2) da amida canabissina F (16).

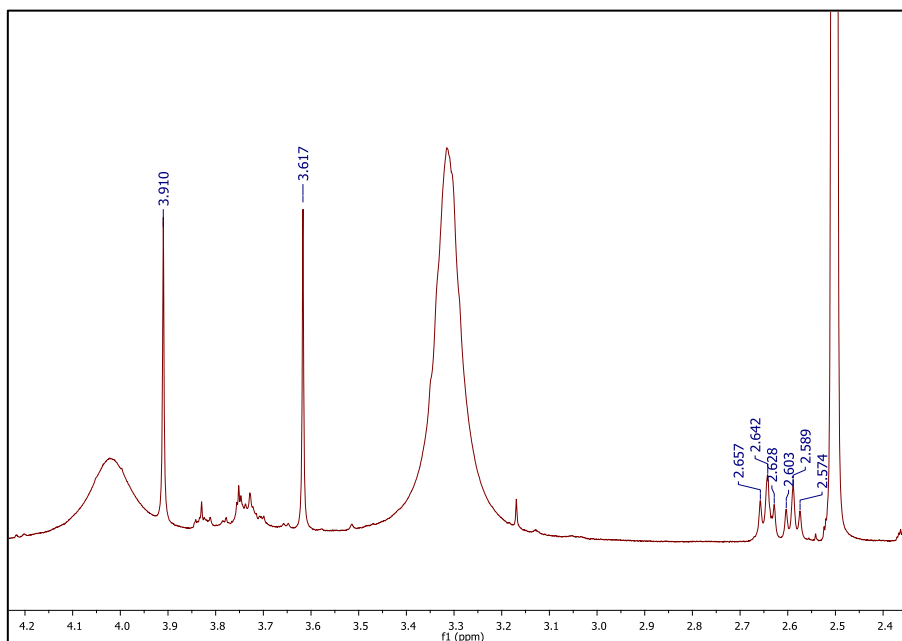


Figura 149- Ampliação RMN ^1H (δ_{H} 6,4-8,1) da amida canabissina F (16).

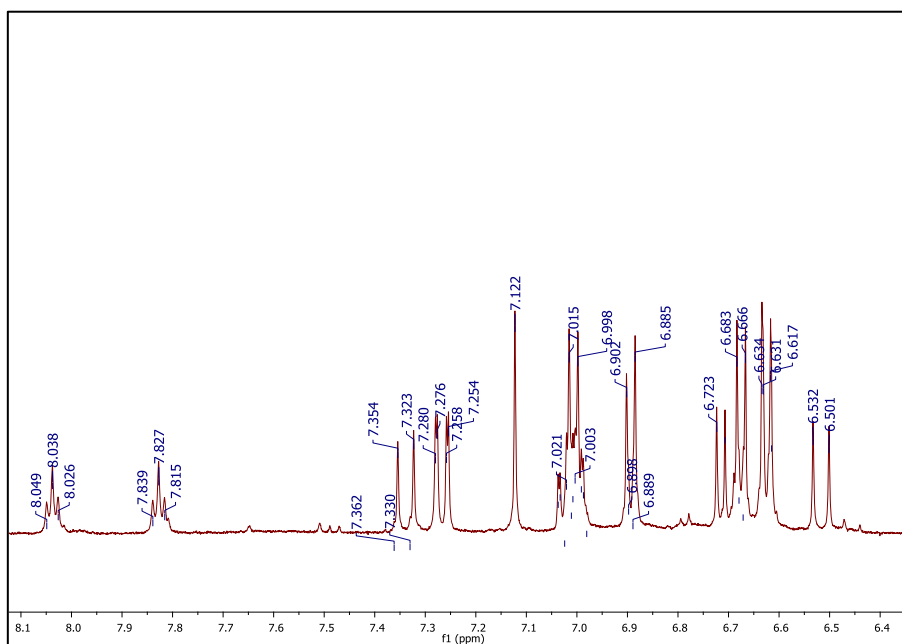


Figura 150 - Estrutura da cabisina F (**16**), isolada do lenho de *T. mucronata* (Malpighiaceae).

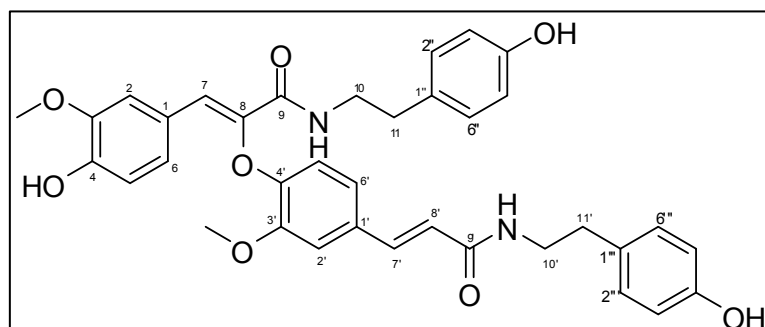


Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e ^{13}C (125 MHz) para a canabisina F (**16**, em DMSO- d_6) e da literatura.

Posição	(16)		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (ppm)
1		129,4		125,5
2	7,26 (<i>d</i> ; 2,0)	110,8	7,27 (<i>d</i> ; 2,0)	112,3
3		148,8		148,3
4		155,7		147,1
5	6,68 (<i>d</i> ; 8,0)	114,8	6,75 (<i>d</i> ; 8,4)	115,1
6	7,01 (<i>m</i>)	124,4	7,03 (<i>dd</i> ; 8,4 e 2,0)	121,5
7	7,12 (<i>s</i>)	121,8	7,27 (<i>s</i>)	123,7
8		140,8		142,3
9		162,2		166,1
10	3,31 (<i>m</i>)	40,1	3,46 (<i>dd</i> ; 13 e 6,0)	41,8
11	2,59 (<i>t</i> ; 7,5)	34,0	2,65 (<i>t</i> ; 7,1)	35,5
1'		129,8		131,7
2'	7,28 (<i>d</i> ; 2,0)	112,6	7,35 (<i>d</i> ; 2,0)	113,6
3'		147,5		150,2
4'		146,2		148,8
5'	6,72 (<i>d</i> ; 8,0)	115,0	6,78 (<i>d</i> ; 8,4)	115,9
6'		122,0	7,14 (<i>dd</i> ; 8,4 e 2,0)	125,5
7'	7,34 (<i>d</i> ; 15,5)	137,8	7,46 (<i>d</i> ; 15,7)	139,6
8'	6,52 (<i>d</i> ; 15,5)	120,6	6,57 (<i>d</i> ; 15,7)	122,0
9'		165,0		163,3
10'	3,35 (<i>m</i>)	40,1	3,49 (<i>dd</i> ; 13 e 6,0)	42,0
11'	2,64 (<i>t</i> ; 7,5)	34,2	2,75 (<i>t</i> ; 7,1)	35,7
1''		130,4		130,8
2'' e 6''	7,01 (<i>m</i>)	129,6	6,90 (<i>d</i> ; 8,6)	130,5
3'' e 5''	6,63 (<i>m</i>)	114,7	6,69 (<i>d</i> ; 8,6)	116,1
4''		155,6		156,7
1'''				131,1
2''' e 6'''	6,89 (<i>m</i>)	128,9	7,06 (<i>d</i> ; 8,6)	130,5
3''' e 5'''	6,63 (<i>m</i>)	114,7	6,75 (<i>d</i> ; 8,6)	116,1
4'''		155,5		156,7
3-OMe	3,91 (<i>s</i>)	55,4	3,94 (<i>s</i>)	56,2
3'-OMe	3,62 (<i>s</i>)	54,8	3,69 (<i>s</i>)	56,0
10-NH	7,83 (<i>t</i> ; 5,0)	162,3		
10'-NH	8,04 (<i>t</i> ; 5,0)	165,0		

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

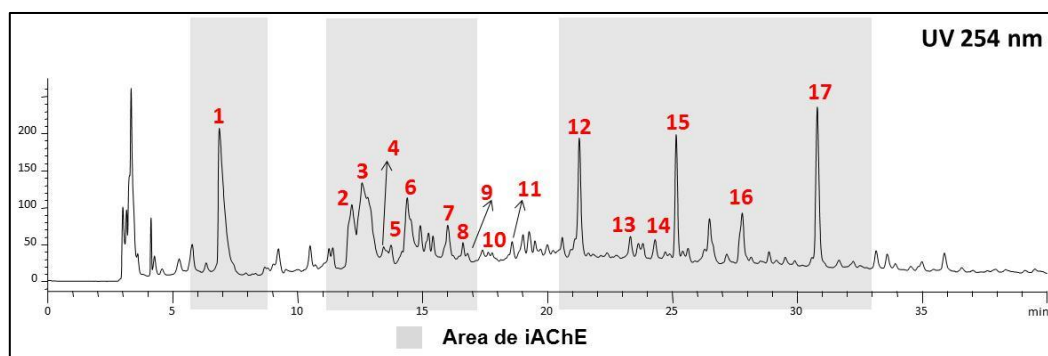
^b multiplicidade (*m*).

^c Constante de acoplamento (*J*), expressa em Hz

SAKAKIBARA et al., 1994.

O isolamento bioguiado pela atividade de inibição da acetilcolinesterase do extrato EtOH do lenho *T. mucronata* levou a identificação de 17 compostos, sendo destes 6 alcaloides: 3 derivados da triptamina (**1**, **2**, e **3**), um alcaloide β -carbolíneo (**4**) e 2 novos dímeros com núcleo triptamínico (**6** e **7**); uma lignana glicosilada (**11**); 3 amidas (**12**, **15** e **16**); 4 derivados de ácidos fenólicos (**5**, **8**, **9** e **10**); 3 novos derivados de fenantreno (**13**, **14** e **17**). (Figura 151)

Figura 151 - Compostos isolados a partir do extrato EtOH do lenho de *T. mucronata*: **1**- bufotenina; **2**- 5-metoxi-*N*-metiltriptamina; **3**- 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina; **4**- 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico; **5**- ácido vanílico; **6**- 5'-hidroxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol)triptamina; **7**- 5'-hidroxi-3'-etil-*N,N*-dimetilamina-2'-[3-(3-(1H-indol-3-il)propano-1,2-diol)triptamina; **8**- ácido *cis*-3-metoxi-4,5-metilenodioxo-cinâmico; **9**- *trans*-3-metoxi-4,5-metilenodioxo-cinâmico; **10**- ácido salicílico; **11**- lioniresinol; **12**- moupinamida; **13**- 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno; **14**- 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno; **15**- grossamida; **16**- canabisina F; **17**- 7-metil-2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno.



Após levantamento bibliográfico realizado sobre as substâncias isoladas pode-se constatar que os três alcaloides isolados derivados da triptamina (**1**, **2**, e **3**) são descritos em vários estudos como sendo poderosos compostos alucinógenos. Dentre estes compostos, destacamos a bufotenina (**1**) e o alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (**3**). A primeira foi descrita anteriormente no veneno de algumas espécies de sapo (*Bufo* spp), no látex da espécie *Brosimum acutifolium* (Moraceae), em espécies do gênero Leguminosae e Gramineae. (CALLAWAY et al., 1999; CARLINI, 2003; FORSSTRÖM et al., 2001; McBRIDE, 2000; McKENNA, 2004; MORETTI et al., 2006). A bufotenina possui uma potente atividade alucinógena comparada com a droga LSD (acrônimo de *Lysergsäurediethylamid*, palavra alemã para a dietilamida do ácido lisérgico) (FABING; HAWKINS, 1956). 5-metoxi-*N,N*-

dimetiltryptamina (ou 5-MeO-bufotenina), é descrita como um dos ingredientes psicoativos da sementes *Anadenanthera peregrina* (Fabaceae) conhecida popularmente com angico. Esta espécie é utilizada em rituais de cura por índios Ianomâmis. Os alcaloides bufotenina e 5-metoxi-bufotenina são substâncias controladas pelos governos dos Estados Unidos, Inglaterra, Austrália dentre outros. Elas estão incluídas no anexo I na acta de substâncias controladas pelo governo americano. (DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION, 2010; SHEN et al., 2010).

Em 2005, um homem de 25 anos de idade morreu após consumo da ayahuasca. A análise do sangue da vítima através da técnica de CLAE-EM identificou a presença de alcaloides β -carbolíneos e triptamínicos, dentre estes elevados níveis de 5-metoxi-*N,N*-dimetiltryptamina (SKLEROV et al., 2005). Após a publicação do referido estudo houve um questionamento quanto à origem da intoxicação do jovem, uma vez que as espécies comumente utilizadas no preparo da ayahuasca, *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*, não contêm o alcaloide 5-metoxi-*N,N*-dimetiltryptamina (CALLAWAY et al., 2006).

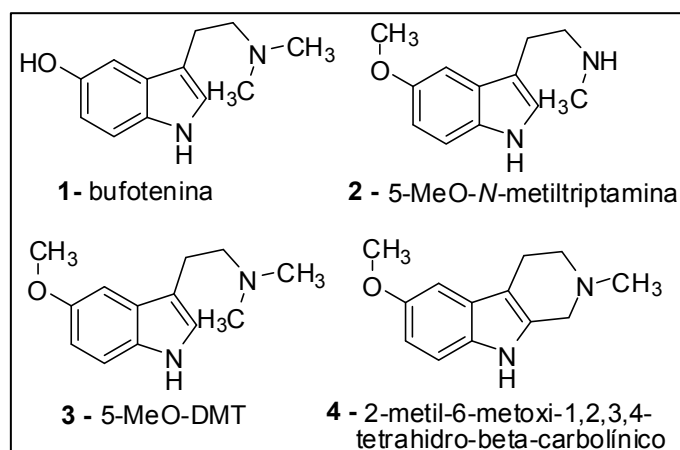
Após a obtenção dos resultados demonstrados na presente pesquisa, pode-se supor que se o ayahuasca consumido por este jovem foi preparado com a espécie *Tetrapterys mucronata*, que contém o referido composto, a origem da intoxicação fatal da vítima pode ser esclarecida.

Pelo exposto, a presença de constituintes com elevada toxicidade no lenho de *T. mucronata*, que é uma espécie utilizada na preparação da ayahuasca, traz perigo para os praticantes que ingerem esta bebida. Por esse motivo, foi desenvolvido um método através da técnica de CLAE-ESI-EM/EM para quantificação dos alcaloides **1**, **2**, **3** e **4** no extrato aquoso do lenho de *T. mucronata*.

4.11 Quantificação dos alcaloides 1, 2, 3 e 4 no extrato aquoso do lenho de *T. mucronata* através da técnica CLAE-ESI-EM/EM.

Foi realizada a quantificação dos alcaloides **1**, **2**, **3** e **4** (Figura 152) no extrato aquoso do lenho de *T. mucronata* através da técnica CLAE-ESI-EM/EM, este dotado de uma fonte geradora de íons *electrospray* (ESI) e analisador triplo quadrupolo (Quattro Micro-Waters, Manchester, UK).

Figura 152 - Alcaloides isolados a partir da fração P6 e quantificados no extrato aquoso de *T. mucronata*.

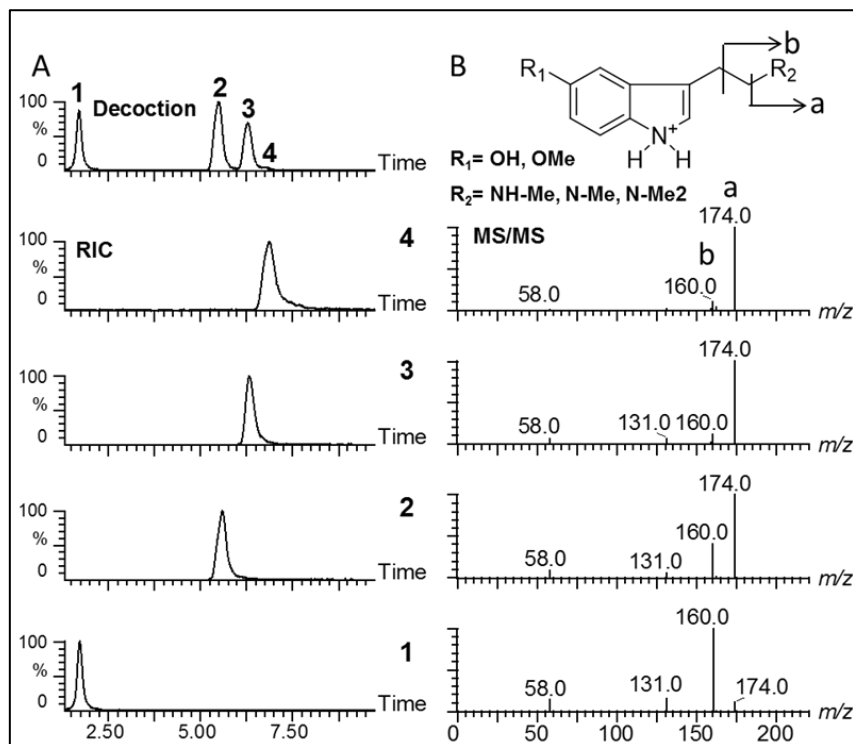


Foram testados diversos sistemas de solventes com diferentes pH para otimização da separação cromatográfica e detecção dos alcaloides analisados. Inicialmente metanol e acetonitrila foram testados como solventes na fase orgânica. Acetonitrila forneceu uma relação sinal-ruído 2 vezes maior em comparação com a utilização de metanol dentro de uma análise mais rápida. O próximo passo foi a otimização do pH da fase aquosa em meios ácido e básico, 3,5 (0,1% de ácido fórmico), 6,6 (acetato de amônio 20 mM), e 10,0 (acetato de amônio 20 mM ajustado para pH 10,0 com amônia), para avaliar tanto a separação de picos quanto a sensibilidade. A utilização da fase aquosa com pH básico forneceu uma melhor separação entre os picos, mas aumentou drasticamente o encaudamento destes, conseqüentemente, diminuindo a

sensibilidade. O melhor resultado foi obtido utilizando uma análise em modo isocrático com 7% de acetonitrila e o pH mantido em 3,5.

Na análise através do experimento *tandem* EM/EM, a detecção foi realizada em modo de monitoramento de reações múltiplas MRM (Multiple Reaction Monitoring) e a energia de colisão foi otimizada para cada analito separadamente, maximizando assim o sinal do pico base. Os quatro compostos monitorados exibiram o mesmo padrão de fragmentação envolvendo a protonação do nitrogênio da etilamina seguido de clivagem α - e β a cadeia lateral (Figura 153). Este padrão de fragmentação foi proposto com base no artigo publicado por McClean e colaboradores (2002).

Figura 153 - Cromatograma de íons totais otimizado obtido através da técnica de CLAE-ESI-EM/EM para mistura dos quatro alcaloides (bufotenina (1), 5-MeOH-*N*-metiltriptamina (2), 5-MeOH-DMT (3) e 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolínico) (4) presente no extrato aquoso de *T. mucronata* (A) e os padrões de fragmentação obtidos para cada analito analisado (B).



As curvas de calibração foram construídas utilizando-se cinco níveis de concentração cada composto. A relação linear apresentou coeficiente de

correlação (r^2) acima de 0,98 para todos os compostos monitorados (Tabela 27). A precisão e exatidão intra-dia e inter-dia estão dentro da faixa de $\pm 15\%$ (Tabela 28). O efeito de matriz também foi avaliado por comparação das áreas de quatro níveis de fortificação (spike): extrato, extrato + padrões dos alcaloides em duas concentrações e padrões dos alcaloides, preparados com acetonitrila/água (1/1) + 0,1% de ácido fórmico. Para todos os compostos monitorados, a recuperação foi superior a 95%.

Tabela 27 - Parâmetros otimizados na análise por CLAE-ESI-EM/EM para as transições monitoradas em modo MRM.

Alcaloide	Ion precursor	Transição (MRM)	E. colisão* (eV)	Voltagem do cone (V)	Tr (min)	r^2	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
1	205,05	205,04→159,91	15	16	1,76	0,991	0,01
2	205,05	205,07→174,01	11	16	5,77	0,992	0,01
3	219,04	219,04→174,01	15	18	6,62	0,994	0,02
4	217,04	217,04→174,01	13	18	7,29	0,983	0,05

*Energia de colisão.

Tabela 28 – Dados de precisão e exatidão obtidos das curvas de calibração.

Intra-dia (n = 3)					Inter-dia (n = 9)				
Alc	[C] ($\mu\text{g/mL}$)	[C] média	CV	Erro relat. (%)	Precisão (%) ^a	[C] média	CV	Erro relat. (%)	Precisão (%)
1	48,0	47,7	3,4	-0,7	7,1	47,3	0,4	-1,5	0,9
	12,0	12,3	1,2	2,3	9,9	12,2	0,9	1,6	7,1
	3,0	2,6	0,3	-8,0	10,0	2,5	0,2	-15,0	7,7
2	15,5	15,5	1,1	0,2	7,3	15,6	0,1	0,6	0,8
	3,9	3,8	0,4	-1,4	9,3	3,8	0,2	-2,5	5,2
	1,0	1,0	0,1	4,1	6,3	1,1	0,1	9,9	7,8
3	32,8	32,9	2,0	0,4	6,1	33,0	0,1	0,6	0,2
	8,2	8,0	0,4	-2,7	5,0	8,0	0,4	-2,0	5,2
	2,1	2,3	0,3	9,8	6,2	2,3	0,0	10,9	1,6
4	3,4	3,4	0,4	0,1	10,3	3,7	0,5	0,5	0,4
	0,9	0,9	0,1	-6,6	2,7	0,9	0,2	1,6	2,1
	0,2	0,2	0,0	2,3	15,0	0,2	0,0	10,2	6,2

Segundo os dados obtidos, foi possível avaliar a quantidade dos alcaloides bufotenina (1), 5-metoxi-*N*-metiltriptamina (2), 5-metoxi-bufotenina

(3) e 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolínico (4) presente no extrato aquoso de *T. mucronata*, como sendo 46,5; 9,9; 30,6 e 2,08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 29).

Tabela 29 - Quantidade dos alcaloides analisados no extrato aquoso do lenho de *T. mucronata*.

Alcaloide	Decocto ($\mu\text{g/mL}$)
1	46,5 $\pm$ 2,7
2	9,9 $\pm$ 0,8
3	30,6 $\pm$ 1,9
4	2,08 $\pm$ 0,1

Os alcaloides bufotenina e a 5-metoxi-bufotenina são conhecidos por serem poderosos compostos alucinógenos (SHEN et al., 2010). Após a ingestão por via oral, a 5-metoxi-bufotenina é desativada através de uma reação de desaminação via enzima monoamino oxidase (MAO). Os efeitos farmacológicos e toxicológicos de bufotenina e 5-metoxi-bufotenina geralmente são potencializados pela presença de inibidores de monoamino oxidase (MAO) tais como os alcaloides β -carbolínicos presentes em plantas usadas na preparação da ayahuasca (SHEN et al., 2010).

Os alcaloides que possuem o núcleo indólico, com os alcaloide triptamínicos, também são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (GELDENHUYS; VAN der SCHYF, 2009; WRIGHT; GEULA; MESULAM, 1993). Esta enzima atua no sistema nervoso central (SNC) catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A busca por inibidores de AChE é um dos métodos utilizados para diminuição do déficit colinérgico através do aumento dos níveis de ACh no sistema nervoso central (SNC), resultando na melhora sintomática de pacientes acometidos pelo Mal de Alzheimer. Por esse motivo todos os compostos isolados do lenho de *T. mucronata* tiveram seu potencial de inibição da acetilcolinesterase avaliados através do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase em microplaca, como descrito no tópico a seguir (BRÜHLMANN et al., 2004).

4.12 Avaliação do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase dos compostos isolados do extrato EtOH do lenho de *T. mucronata*.

Os metabólitos isolados do lenho de *T. mucronata* foram avaliados quando ao seu potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase através do método descrito por Brühlmann e colaboradores (2004). Este método é mais sensível para análise de compostos puros quando comparado com o método por CCD (DI GIOVANNI et al., 2008). Os resultados obtidos para esta análise estão ilustrados na Tabela 30 a seguir. Nela pode-se observar que os compostos mais ativos, com IC₅₀ próximo de 10 µmol/L, foram os alcaloides triptamínicos **1**, **2**, **3**, **6** e **7**. Estes valores indicam que estes compostos possuem atividade moderada para inibição da enzima acetilcolinesterase. Os demais compostos apresentaram IC₅₀ superior a 20, o que indica que estes são inibidores fracos da enzima AChE.

Tabela 30 - Valores de IC₅₀ para os compostos isolados do lenho de *Tetrapteryx mucronata*.

Compostos	IC ₅₀ (µmol/L)*
1	11,47 ± 0,26
2	12,55 ± 0,36
3	14,01 ± 0,22
4	> 20
5	> 20
6	11,70 ± 0,41
7	12,76 ± 0,32
8	> 20
9	> 20
10	> 20
11	> 20
12	> 20
13	> 20
14	> 20
15	> 20
16	> 20
17	> 20
tacrina	0,09 ± 0,02
galantamina	2,40 ± 0,25

5. Conclusão

O estudo fitoquímico do extrato EtOH do lenho da espécie *T. mucronata* permitiu a identificação de 17 compostos, dentre estes 5 novos produtos naturais, dois alcaloides: 5'-hidroxi-3'-etilamina-2'-[3-(3-(1*H*-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina e 5'-hidroxi-3'-etil-N,N-dimetilamina-2'-[3-(3-(1*H*-indol-3-il)propano-1,2-diol]triptamina (**6**, **7**) e três derivados de fenantreno 2,6-diidroxi-9,10-diidrofenantreno (**13**), 2,6-diidroxifenantreno (**14**) e 7-metil-2,6-diidroxifenantreno (**17**). Foram descritos pela primeira vez na família Malpighiaceae 12 compostos, três alcaloides triptamínicos: bufotenina (**1**), 5-metoxi-*N*-metiltriptamina (**2**) e 5-metoxi-bufotenina (**3**); um alcaloide beta-carbolíneo: 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolíneo (**4**); quatro derivados de ácidos aromáticos: ácido vanílico (**5**), ácido *cis*-metoxicinâmico (**8**), ácido *trans*-metoxicinâmico (**9**), ácido salicílico (**10**); uma lignana: lioresinol (**11**); três amidas: moupinamida (**12**), grossamida (**15**) e canabissina F (**16**). Através dos dados gerados através da técnica de UPLC-TOF-EM, pode-se identificar a presença do metabólito catequina, previamente descrito em espécies da família Malpighiaceae.

Os compostos isolados foram avaliados quanto ao potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Como resultado, aqueles que apresentaram maior atividade foram os alcaloides com núcleo triptamínico: **1**, **2**, **3**, **6** e **7**. Os valores obtidos indicam que estes compostos possuem atividade moderada para inibição da enzima acetilcolinesterase.

Dentre os compostos isolados foi possível evidenciar a presença de alcaloides derivados da triptamina, bufotenina (**1**) e a 5-metoxi-bufotenina (**3**) conhecidos por serem compostos alucinógenos poderosos. A presença destes compostos no extrato aquoso de *T. mucronata* explica o uso tradicional desta espécie na preparação da Ayahuasca.

Foi desenvolvido um método rápido e sensível através da técnica CLAE-ESI-EM/EM para detecção e quantificação dos alcaloides triptamínicos e β -

carbolíneos **1**, **2**, **3** e **4** em matrizes vegetais. Este protocolo pode ser utilizado para o controle de qualidade de amostras de Ayahuasca.

Por fim, os resultados obtidos no presente trabalho dão suporte científico para o perigo do uso da espécie *Tetrapterys mucronata* Cav. (Malpighiaceae) na preparação da Ayahuasca.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. F.; MATSUMOTO, K.; GAMMAZ, H. A.; WATANABE, H. Hypothermic effect of harmala alkaloid in rats: involvement of serotonergic mechanism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 421-426, 1995.
- ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. Hepatoprotective constituents of the seeds of *Combretum quadrangulare*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1328-1332, 2000.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 344, de 12 de dezembro de 1998**. Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/controlados/legais.html>. Acesso em: 30 set. 2012.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- AGURELL, S.; HOLMSTEDT, B.; LINDGREN, J. E.; SCHULTES, R. E. Alkaloids in certain species of *Virola* and other south American plants of ethnopharmacologic interest. **Acta Chemica Scandinavica (1947-1973)**, v. 23, p. 903-916, 1969.
- AL-TAWEEL, A. M.; PERVEEN, S.; EL-SHAFEE, A. M.; FAWZY, G. A.; MALIK, A.; AFZA, N.; IQBAL, L.; LATIF, M. Bioactive phenolic amides from *Celtis Africana*. **Molecules**, v. 17, p. 2675-2682, 2012.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **World Alzheimer report 2009**. Disponível em: <www.alz.co.uk/research/world-report>. Acesso em: 01 jun. 2013.
- ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 375-399, 2013.
- ARSHAD, N.; NEUBAUER, C.; HASNAIN, S.; HESS, M. *Peganum harmala* can minimize *Escherichia coli* infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. **Poultry Science**, v. 87, p. 240-249, 2008.
- ASTULLA, A.; ZAIMA, K.; MATSUNO, Y.; HIRASAWA, Y.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; ZAINI, N. C.; MORITA, H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 470-472, 2008.
- AYOUB, M. T.; AL-ALLAF, T. A. K.; RASHAN, L. J. Antiproliferative activity of harmol, a beta-carboline alkaloid. **Fitoterapia**, v. 65, p. 14-18, 1994.
- BARTUS, R. T.; DEAN, R. L.; BEER, B.; LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, p. 408-417, 1982.

BAUDOUIN, G.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M.; PUSSET, J.; SEVENET, T. Plantes de Nouvelle-Calédonie. LXXIII. Alcaloides de *Dutailleya oreophila* et de *Dutailleya drupacea*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 546-550, 1981.

BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHEC, C. T.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 33, p. 25-32, 1995.

BERROUGUI, H.; MARTÍN-CORDERO, C.; KHALIL, A.; HMAMOUCI, M.; ETTAIB, A.; MARHUENDA, E.; HERRERA, M. D. Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seeds in isolated rat aorta. **Pharmacological Research**, v. 54, p. 150-157, 2006.

BLACKLEDGE, R. D.; TAYLOR, C. M. *Psychotria Viridis* - a botanical source of Dimethyltryptamine (DMT). **Microgram Journal**, v. 1, p. 18-22, 2003.

BOATWRIGHT, J. L.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 623-634, 2013.

BRÜHLMANN, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, p. 819-829, 2004.

CABRAL, R. S.; SARTORI, M. C.; CORDEIRO, I.; QUEIROGA, C. L.; EBERLIN, M. N.; LAGO, J. H. G.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 374-380, 2012.

CALLAWAY, J. C. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, p. 151-155, 2005.

CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S.; McKENNA, D. J.; NICHOLS, D. E.; SHULGINS, A.; TUPPER, K. W. A demand for clarity regarding a case report on the ingestion of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) in an ayahuasca preparation. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, p. 406-407, 2006.

CALLAWAY, J. C.; McKENNA, D. J.; GROB, C. S.; BRITO, G. S.; RAYMON, L. P.; POLAND, R. E.; ANDRADE, E. N.; ANDRADE, E. O.; MASH, D. C. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 243-256, 1999.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CAVIN, A.; HAY, A.; MARSTON, A.; STOECKLI-EVANS, H.; SCOPELLITI, R.; DIALLO, D.; HOSTETTMANN, K. Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 768-773, 2006.

CHAI, X.; LI, F.; BAI, C.; XU, Z.; SHI, H.; TU, P. Three new acylated glycosides from the stems of *Casearia velutina* and their protective effect against H₂O₂-induced impairment in PC12 cells. **Planta Medica**, v. 76, p. 91-93, 2010.

CHANG, C.; TSAI, F.; CHOU, C. Natural products from *Polygonum perfoliatum* and their diverse biological activities. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 1385-1386, 2008.

CHEN, J.; DUH, C.; CHEN, I. Cytotoxic chromenes from *Myriactis humilis*. **Planta Medica**, v. 71, p. 370-372, 2005.

CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, J. B.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G.; PIRANI, J. R. Lignan glycosides from *Trichilia stipulata* bark. **Natural Product Letters**, v. 11, p. 255-262, 1998.

CUATRECASAS, J.; CROAT, T. B. Flora of Panama (Part VI. Family 93. Malpighiaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 67, p. 851-945, 1980.

CUI, Y.; AO, M.; LI, W.; YU, L. Effect of glabridin from *Glycyrrhiza glabra* on learning and memory in mice. **Planta Medica**, v. 74, p. 377-380, 2008.

CULVENOR, C. C. J.; DAL BON, R.; SMITH, L. W. The occurrence of indolealkylamine alkaloids in *Phalaris tuberosa* L. and *P. arundinacea* L. **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 1301-1304, 1964.

DADA, G.; CORBANI, A. Lignan glycosides from the heartwood of european oak *Quercus petraea*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1327-1330, 1989.

DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 109-119, 2008.

DONG-HAI, L.; ZHONG-DUO, Y.; WEI-WEI, X.; JIE, S.; YIN, S.; XIAO-JUN, Y. Isolation, characterization and acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids from roots of *Stemona sessilifolia*. **Fitoterapia**, v. 89, p. 257-264, 2013.

DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION. Departament of justice. Schedules of controlled substances: placement of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine into schedule I of the controlled substances act. final rule. **Federal Register**, v. 75, n. 243, p. 79296-79300. 2010.

ELDEEN, I.; VAN HEERDEN, F.; VAN STADEN, J. *In vitro* biological activities of niloticane, a new bioactive cassane diterpene from the bark of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 555-560, 2010.

EL-FERAL, F.; HOFFSTETTER, M. Isolation, characterization and synthesis of 3-methoxy-4,5-methylenedioxycinnamaldehyde: a novel constituent from *Canella winterana*. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 407-410, 1980.

EUGSTER, P. J.; GUILLAUME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L. Ultra high pressure liquid chromatography for crude plant extract profiling. **Journal of AOAC International**, v. 94, p. 51-70, 2011.

FABING, H. D.; HAWKINS, J. R. Intravenous bufotenine injection in the human being. **Science**, v. 123, p. 886-887, 1956.

FAROUK, L.; LAROUBI, A.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF, A.; CHAIT, A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 449-454, 2008.

FORSSTRÖM, T.; TUOMINEN, J.; KÄRKKÄINEN, J. Determination of potentially hallucinogenic *N*-dimethylated indoleamines in human urine by HPLC/ESI-MS-MS. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 61, p. 547-556, 2001.

FRANCISCO, W.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; BACCINI, L. R.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; BOLZANI, V. S. Pyridine Alkaloids from *Senna multijuga* as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 408-413, 2012.

FREEDLAND, C. S.; MANSBACH, R. S. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 54, p. 183-94, 1999.

FUJIWARA, M.; YAGI, N.; MIYAZAWA, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (Yellow Batai) and bisabolane-type sesquiterpenoids. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 58, p. 2824-2829, 2010.

GANDER, J. E.; MARUM, P.; MARTEN, G. C.; HOVIN, A. W. The occurrence of 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline and variation in alkaloids in *Phalaris arundinacea*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 737-738, 1976.

GE, F.; TANG, C.; YE, Y. Lignanamides and sesquiterpenoids from stems of *Mitrephora thorelii*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1023-1030, 2008.

GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHYF, C. J. The serotonin 5-HT 6 receptor: a viable drug target for treating cognitive deficits in Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 9, p. 1073-1085, 2009.

GHAREIB, H. R.; ABDELHAMED, M. S.; IBRAHIM, O. H. Antioxidative effects of the acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. **Weed Biology and Management**, v. 10, p. 64-72, 2010.

GHOSAL, S.; CHAUDHURI, R. K.; DUTTA, S. K.; BHATTACHARYA, S. K. Occurrence of curarimimetic indoles in the flowers of *Arundo donax*. **Planta Medica**, v. 21, p. 22-28, 1972.

GIJILHON, G. M. S. P.; BAETAS, A. C. S.; MAIA, J. G. S.; CONSERVA, L. M. 2-alkyl-4-quinolone alkaloids and cinnamic acid derivatives from *Esenbeckia alnawillia*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1193-1195, 1994.

GOULART, S. L. **O contexto de surgimento do culto do Santo Daime: formação da comunidade e do calendário ritual**. Campinas: Mercado de Letras, 2004. 301 p.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 475-482, 2007.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: gradient experiments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 430-440, 2008.

GUILLARME, D.; GRATA, E.; GLAUSER, G.; WOLFENDER, J. L.; VEUTHEY, J. L.; RUDAZ, S. Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic and gradient modes using small particles size and ultra-high pressure. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3232-3243, 2009.

HILTUNEN, E.; PAKKANEN, T. T.; ALVILA, L. Phenolic compounds in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. **Holzforschung**, v. 60, p. 519-527, 2006.

HOLSTEIN, M. Alzheimer's disease and senile dementia, 1885-1920: an interpretive history of disease negotiation. **Journal of Aging Studies**, v. 11, p. 1-13, 1996.

HOUGHTON, P. J.; RENA, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Report**, v. 23, p. 181-199, 2006.

HUANG, Q.; BI, J.; SUN, Q.; YANG, F.; WANG, Y.; TANG, G.; ZHAO, F.; WANG, H.; XU, J.; KENNELLY, E. J.; LONG, C.; YIN, G. Bioactive isoquinoline alkaloids from *Corydalis saxicola*. **Planta Medica**, v. 78, p. 65-70, 2012.

IOSET, K. N.; NYBERG, N. T.; VAN DIERMEN, D.; MALNOE, P.; HOSTETTMANN, K.; SHIKOV, A. N.; JAROSZEWSKI, J. W. Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by ¹H NMR spectroscopy. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 158-165, 2011.

JAHANIANI, F.; EBRAHIMI, S. A.; RAHBAR-ROSHANDEL, N.; MAHMOUDIAN, M. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1581-1592, 2005.

JOSSANG, A.; JOSSANG, P.; HADI, H. A.; BVENET, T. S.; BODO, B. Horsfiline, an oxindole alkaloid from *Horsfieldia superba*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 6527-6530, 1991.

JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. **Molecules**, v. 12, p. 2130-2139, 2007.

- KENNEDY, A. B. Ecce *Bufo*: the toad in nature and in olmec iconography. **Current Anthropology**, v. 23, p. 273-290, 1982.
- KENNEDY, D. J.; CREGAN, P. D.; GLASTONBURY, J. R. W.; GOLLAND, D. T.; DAY, D. G. Poisoning of cattle grazing a low-alkaloid cultivar of *Phalaris aquatica*, Sirolan. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 88-89, 1986.
- KIM, K. H.; MOON, E.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Lignans from the tuber-barks of *Colocasia antiquorum* var. *esculenta* and their antimelanogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4779-4785, 2010.
- KIM, K. H.; MOON, E.; KIM, S. Y.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Lignan constituents of *Tilia amurensis* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3680-3686, 2012.
- KIM, K. H.; MOON, E.; KIM, H. K.; OH, J. Y.; KIM, S. Y.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Phenolic constituents from the rhizomes of *Acorus gramineus* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6155-6159, 2012.
- KIM, S. S.; HYUN, C.; CHOI, Y. H.; LEE, N. H. Tyrosinase inhibitory activities of the compounds isolated from *Neolitsea aciculata* (Blume) Koidz. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 685-689, 2013.
- KING, R. R.; CALHOUN, L. A. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2468-2473, 2005.
- KUHN, M. A.; WINSTON, D. **Herbal therapy and supplements, a scientific and traditional approach**. New York: Lippincott, 2000. 350 p.
- KUMAR, V.; MUKHERJEE, B. C.; PAL, B. C.; HOUGHTON, P. J.; MUKHERJEE, P. K. Acetylcholinesterase inhibitor from *Clitoria ternatea*. **Planta Medica**, v. 73, p. 479, 2007.
- KUO, H.; PENG, C.; HUANG, H.; LIN, C.; CHEN, I.; TSAI, I. Chemical constituents and antitubercular activity of formosan *Pisonia umbellifera*. **Planta Medica**, v. 77, p. 736-741, 2011.
- LABATE, B. C. **A literatura brasileira sobre as religiões ayahuasqueiras**. Campinas: Mercado de Letras, 2004. 273 p.
- LABATE, B. C.; MacRAE, E. **Ayahuasca, ritual and religion in Brazil**. London: Equinox, 2010. 256 p.
- LABATE, B. C.; ROSE, I. S.; SANTOS, R. G. **Ayahuasca religions: a comprehensive bibliography and critical essays**. Santa Cruz: MAPS, 2009. 160 p.

- LASNER, C. J.; LEE, J. M. Pharmacological drug treatment of alzheimer disease: the cholinergic hypothesis revisited. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 57, p. 719-731, 1998.
- LEE, B.; JUNG, K.; KIM, D. Timosaponin AIII a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides* ameliorates learning and memory deficits in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 93, p. 121-127, 2009.
- LEE, J. H.; LEE, K. T.; YANG, J. H.; BAEK, N. L.; KIM, D. K. Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 53-56, 2004.
- LI, N.; WU, J.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; BAI, L.; WANG, L.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 544-548, 2007.
- LIIMATAINEN, J.; KARONEN, M.; SINKKONEN, J.; HELANDER, M.; SALMINEN, J. Characterization of phenolic compounds from inner bark of *Betula pendula*. **Holzforschung**, v. 66, p. 171-181, 2012.
- LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Saúde pública e envelhecimento. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 700-701, 2003.
- LYTTLE, T.; GOLDSTEIN, D.; GARTZ, J. *Bufo* toads and bufotenine: fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 28, p. 267-290, 1996.
- MABBERLEY, D. J. **The plant book. A portable dictionary of the higher plants**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858 p.
- MacLAGAN, T. The treatment of rheumatism by salicin and salicylic acid. **British Medical Journal**, v. 1, p. 627, 1876.
- MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 1-6, 2011.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemistry Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 2501-2507, 2009.
- MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 349, p. 1546-1549, 1997.
- McBRIDE, M. C. Bufotenine: toward an understanding of possible psychoactive mechanisms. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 32, p. 321-331, 2000.

McCLEAN, S.; ROBINSON, R. C.; SHAW, C.; SMYTH, W. F. Characterization and determination of indole alkaloids in frog-skin secretions by electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, p. 346-354, 2002.

McKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, p. 111-129, 2004.

McKENNA, D. J.; CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S. The scientific investigation of ayahuasca: a review of past and current research. **The Heffter Review of Psychodelic Research**, v. 1, p. 65-76, 1998.

McKENNA, D.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamino oxidase inhibitors in south american hallucinogenic plants: tryptamine and β -carboline constituents of ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 195-223, 1984.

MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Pharmacochemistry study of *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.12, p. 55-62, 1999.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Quimica Nova**, v. 22, p. 185-188, 1999.

MESTREIRINEU. **Mestre Imperador Raimundo Irineu Serra: Rei Juramidã**. Disponível em: <www.mestreirineu.org>. Acesso em: 20 jul. 2013.

MILANOWSKI, D. J.; WINTER, R. E. K.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 814-819, 2002.

MILES, D. H.; LY, A. M.; RANDLE, S. A.; HEDIN, P. A.; BURKS, M. L. Alkaloidal insect antifeedants from *Viola calophylla* Warb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 794-797, 1987.

MOLLATAGHI, A.; COUDIERE, E.; HADI, A. H. A.; MUKHTAR, M. R.; AWANG, K.; LITAUDON, M.; ATA, A. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. **Fitoterapia**, v. 83, p. 298-302, 2012.

MONSEF, H.; GHOBADI, A.; IRANSHAHI, M.; ABDOLLAHI, M. Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 65-69, 2004.

MORADI-AFRAPOLI, F.; YASSA, N.; ZIMMERMANN, S.; SAEIDNIA, S.; HADJIAKHOONDI, A.; EBRAHIMI, S. N.; HAMBURGER, M. Cinnamoylphenethyl amides from *Polygonum hyrcanicum* possess anti-trypanosomal activity. **Natural Product Communications**, v. 7, p. 753-755, 2012.

MORAIS, S. K. R.; TEIXEIRA, A. F.; TORRES, Z. E. S.; NUNOMURA, S. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; LINDOSO, J. A. L.; YOSHIDA, M. Biological activities of lignoids from amazon myristicaceae species: *Virola michellii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1110-1118, 2009.

MORETTI, C.; GAILLARD, Y.; GRENAND, P.; BÉVALOT, F.; PRÉVOSTO, J. M. Identification of 5-hydroxy-tryptamine (bufotenine) in takini (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C. C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 198-202, 2006.

MORUCCI, F.; LOPEZ, P.; MINO, J.; FERRARO, G.; GORZALCZANY, S. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of *Lithrea molleoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 401-406, 2012.

NANA, F.; SANDJO, L. P.; KEUMEDJIO, F.; AMBASSA, P.; MALIK, R.; KUETE, V.; RINCHEVAL, V.; CHOUDHARY, M. I.; NGADJUI, B. T. Ceramides and cytotoxic constituents from *Ficus glumosa* Del. (Moraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 482-487, 2012.

OINONEN, P. P.; JOKELA, J. K.; HATAKKA, A. I.; VUORELA, P. M. Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 429-434, 2006.

OTT, J. **Ayahuasca analogues**. Kennewick: Natural Products Communications, 1994. 128 p.

PAN, J.; ZHANG, S.; WU, J.; LI, Q.; XIAO, Z. Litseaglutinan a and lignans from *Litsea glutinosa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 951-957, 2010.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 439-463, 1992.

RASTRELLI, L.; DE TOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A.; SARAVIA, A.; DE SIMONE, F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 647-650, 1997.

REN, Y.; HOUGHTON, P. J.; HIDER, R. C.; HOWES, M. R. A novel diterpenoid AChE inhibitor from *Salvia miltiorhiza*. **Planta Medica**, v. 70, p. 201-204, 2004.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RIBA, J.; RODRÍGUEZ-FORNELLS, A.; URBANO, G.; MORTE, A.; ANTONIJOAN, R.; MONTERO, M.; CALLAWAY, J. C.; BARBANOJ, M. J. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 154, p. 85-95, 2001.

- RIBEIRO, E. M. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E.; LOPES, L. M. X.; DAVID, J. P. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 232-235, 2013.
- RINALDO, D.; BATISTA JUNIOR, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, p. 726-733, 2010.
- SADHU, S. K.; KHATUN, A.; PHATTANAWASIN, P.; OHTSUKI, T.; ISHIBASHI, M. Lignan glycosides and flavonoids from *Saraca asoca* with antioxidant activity. **Journal of Natural Medicine**, v. 61, p. 480-482, 2007.
- SAKAKIBARA, I.; IKEYA, Y.; HAYASHI, K.; OKADA, M.; MARUNO, M. Three acyclic bis-phenylpropane lignanamides from fruits of *Cannabis sativa*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1003-1007, 1995.
- SAKAKIBARA, I.; KATSUHARA, T.; IKEYA, Y.; HAYASHI, K.; MITSUHASHI, H. Cannabisin A, an aryl-naphthalene lignanamide from fruits of *Cannabis sativa*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3013-3016, 1991.
- SAMOYLENKO, V.; RAHMAN, M. M.; TEKWANI, B. L.; TRIPATHI, L. M.; WANG, Y. H.; KHAN, S. I.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S.; VAISHALI, C. J.; MUHAMMAD, I. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 357-369, 2010.
- SANGIRARD, J. **O índio e as plantas alucinógenas**. 2. ed. São Paulo: Tecnoprint, 1989. 200 p.
- SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2244-2250, 2005.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.
- SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B.; CASSADY, J. M. Grossamide and *N-trans*-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* seeds. **Planta Medica**, v. 62, p. 76, 1996.
- SARIKAYA, B. B.; KAYA, G. I.; ONUR, M. A.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; SOME, N. U. Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 367-370, 2012.
- SCHULTES, R. E. The botanical and chemical distribution of hallucinogens. **Journal of Psychedelic Drugs**, v. 9, p. 247-263, 1977.

SECA, A. M. L.; SILVA, A. M. S.; SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DOMINGUES, F. M. J.; PASCOAL NETO, C. Lignanamides and other phenolic constituents from the bark of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Phytochemistry**, v. 58, p. 1219-1223, 2001.

SHEN, H. W.; JIANG, X. L.; WINTER, J. C.; YU, A. M. Psychedelic 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine: metabolism, pharmacokinetics, drug interactions, and pharmacological actions. **Current Drug Metabolism**, v. 11, p. 659-666, 2010.

SICHAEM, J.; WORAWALAI, W.; TIP-PYANG, S. Chemical constituents from the roots of *Nauclea orientalis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, p. 827-830, 2012.

SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA, M. C.; MEDEIROS, M. B.; **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília, DF: WWF, 2001. 132 p.

SKLEROV, J.; TEVINE, B.; MOORE, K. A.; KING, T.; FOWLER, D. A fatal intoxication following the ingestion of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine in an ayahuasca preparation. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, p. 838-841, 2005.

SMITE, E.; PAN, H.; LUNDGREN, L. N. Lignan glycosides from inner bark of *Betula pendula*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 341-343, 1995.

SOBHANI, A. M.; EBRAHIMI, S. A.; MAHMOUDIAN, M. An *in vitro* evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its β -carboline alkaloids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 19-23, 2002.

SOMEI, M.; YAMADA, F.; KURAUCHI, T.; NAGAHAMA, Y.; HASEGAWA, M.; YAMADA, K.; TERANISHI, S.; SATO, H.; KANEKO, C. The chemistry of indoles. CIII.¹⁾ simple syntheses of serotonin, *N*-methylserotonin, bufotenine, 5-Methoxy-*N*-methyltryptamine, bufobutanoic acid, *N*-(Indol-3-yl) methyl-5-methoxy-*N*-methyltryptamine, and lespedamine based on 1-hydroxyindole chemistry. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 87-96, 2001.

SONG, S.; LI, Y.; FENG, Z.; JIANG, J.; ZHANG, P. Hepatoprotective constituents from the roots and stems of *Erycibe hainanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 177-184, 2010.

SOUZA, M. H.; LORENZI, H. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1120 p.

SPOEL, S. H.; MOU, Z.; TADA, Y.; SPIVEY, N. W.; GENSCHIK, P.; DONG, X. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell**, v. 137, p. 860-872, 2009.

STAFFORD, P. **Psychedelics encyclopedia**. Berkeley: And/Or Press. 1977. 511 p.

TABOPDA, T. K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.; TANOLI, S. A. K.; KHAN, S. N.; ALI, M. S.; NGADJUI, B. T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1726-1731, 2008.

TIAN, L.; XU, M.; LI, Y.; LI, X.; WANG, D.; ZHU, H.; YANG, C.; ZHANG, Y. Phenolic compounds from the branches of *Eucalyptus maiden*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 123-130, 2012.

TORRES, C. M.; REPKE, D. B. **Anadenanthera**: visionary plant of ancient South America. New York: Haworth Herbal Press, 2006. 340 p.

TSAI, Y.; CHIANG, S.; EL-SHAZLY, M.; WU, C.; BEERHUES, L.; LAI, W.; WU, S.; YEN, M.; WU, Y.; CHANG, F. The oestrogenic and anti-platelet activities of dihydrobenzofuroisocoumarins and homoisoflavonoids from *Liriope platyphylla* roots. **Food Chemistry**, v. 140, p. 305-314, 2013.

TUPPER, K. W. The globalization of ayahuasca: harm reduction or benefit maximization? **International Journal of Drug Policy**, v. 19, p. 297-303, 2008.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 177-206, 2009.

WANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANIA, B. L.; KHANA, I. A.; MILLERD, L. S.; CHAURASIYA, N. D.; RAHMANA, M. M.; TRIPATHIA, L. M.; KHANA, S. I.; JOSHI, V. C.; WIGGERA, F. T.; MUHAMMADA, I. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 662-671, 2010.

WENIGER, B.; RAFIK, W.; BASTIDA, J.; QUIRION, J.; ANTON, R. Indole Alkaloids from *Antirhea lucida*. **Planta Medica**, v. 61, p. 569-570, 1995.

WILKINSON, S. 5-methoxy-*N*-methyltryptamine: a new indole alkaloid from *Phalaris arundinacea* L. **Journal of the Chemical Society**, p. 2079-2081, 1958.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Natural Product Report**, v. 28, p. 48-77, 2011.

WOLFENDER, J. L.; GUILLAUME, M.; QUEIROZ, E. F. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p. 1808-1832, 2010.

WRIGHT, C. I.; GEULA, C.; MESULAM, M. M. Protease inhibitors and indolamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 695, p. 65-68, 1993.

WU, Y.; ZHENG, C.; DENG, X.; QIN, L. Two new bis-alkaloids from the aerial part of *Piper flaviflorum*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, p. 951-955, 2013.

YOSHIHARA, T.; YAMAGUCHI, K.; SAKAMURA, S. The relative configuration of grossamide and hordatines. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 217-220, 1983.

YOSHIHARA, T.; YAMAGUCHI, K.; TAKAMATSU, S.; SAKAMURA, S. A new lignan amide, grossamide, from bell pepper (*Capsicum annuum* var. grosswn). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 2593-2598, 1981.

YRITIA, M.; RIBA, J.; ORTUÑO, J.; RAMIREZ, A.; CASTILLO, A.; ALFARO, Y.; TORRE, R.; BARBANOJ, M. J. Determination of *N,N*-dimethyltripatamine and β -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **Journal of Chromatography B**, v. 779, p. 271-281, 2002.

YU, A. M.; IDLE, J. R.; BYRD, L. G.; KRAUSZ, K. W.; KUPFER, A.; GONZALEZ, F. J. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. **Pharmacogenetics**, v. 13, p. 173-181, 2003.

ZHENG, M. S.; LI, G.; LI, Y.; SEO, C.; LEE, Y.; JUNG, J.; SONG, D.; BAE, H.; KWAK, S.; CHANG, H. Protective constituents against sepsis in mice from the root barks of *Ulmus davidiana* var. japonica. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, p. 1443-1450, 2011.

ZHENG, X.; ZHANG, Z.; CHOU, G.; WU, T.; CHENG, X.; WANG, C.; WANG, Z. Acetylcholinesterase inhibitive activity-guided isolation of two new alkaloids from seeds of *Peganum nigellastrum* Bunge by an *in vitro* TLC- bioautographic assay. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, p. 1245-1251, 2009.

ZHOU, W.; FUKUMOTO, S.; YOKOGOSHI, H. Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. **Nutritional Neuroscience**, v. 12, p. 57-64, 2009.

ZHUA, J.; GUOA, X.; FUA, S.; ZHANG X.; LIANG, X. Characterization of steroidal saponins in crude extracts from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 462-474, 2010.