



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIPLASMÓDICA DE *PALICOUREA*
HOFFMANNSEGGIANA (SCHUT.) BORHIDI (RUBIACEAE)
DA PRAIA DO CRISPIM, MUNICÍPIO DE MARAPANIM,
ESTADO DO PARÁ**

Leticia Hiromi Ohashi

BELÉM – PA
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIPLASMÓDICA DE *PALICOUREA*
HOFFMANNSEGGIANA (SCHUT.) BORHIDI (RUBIACEAE)
DA PRAIA DO CRISPIM, MUNICÍPIO DE MARAPANIM,
ESTADO DO PARÁ**

Autor: Leticia Hiromi Ohashi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alaíde Braga de Oliveira

Co-orientador: Dr. Douglas da Costa Gontijo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Baetas Gonçalves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho parcialmente realizado no Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, durante estágio sanduiche.

BELÉM – PA
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O36c Ohashi, Leticia Hiromi

Caracterização fitoquímica e atividade antiplasmódica de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schut.) Borhidi (Rubiaceae) da Praia do Crispim, município de Marapanim, estado do Pará / Leticia Hiromi Ohashi. — 2020.

147 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Alaíde Braga de Oliveira
Coorientador(a): Prof. Dr. Douglas da Costa Gontijo
Coorientador(a): Prof^a. Dra. Ana Cristina Baetas Gonçalves
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. Fitoquímica. 2. Atividade antiplasmódica. 3. *Palicourea hoffmannseggiana*. 4. Alcaloides. 5. CLUE- DAD-ESI-EM\EM. I. Título.

CDD 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leticia Hiromi Ohashi

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE
PALICOUREA HOFFMANNSEGGIANA (SCHUT.) BORHIDI (RUBIACEAE) DA
PRAIA DO CRISPIM, MUNICÍPIO DE MARAPANIM, ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: 14 de agosto de 2020

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira (Orientadora)

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPA

Ass: Alaide Braga de Oliveira

Dr. Douglas da Costa Gontijo (Coorientador)

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFMG

Ass: Douglas da Costa Gontijo

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPA

Ass: José Guilherme Soares Maia

Profa. Dra. Joyce Kelly do Rosário da Silva

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPA

Ass: Joyce Kelly do Rosário da Silva

BELEM - PA

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene Shimada Ohashi e Pedro Keissaku Ohashi, pelo incentivo e por toda força dada no período do mestrado. Sem eles, este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação da UFMG.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Alaíde Braga de Oliveira, pela orientação indispensável para a realização deste projeto.

Ao meu co-orientador, Dr. Douglas da Costa Gontijo, pela ajuda nos experimentos e pela valerosa contribuição nas análises dos espectros de massa para a identificação das substâncias presentes nas amostras.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Ana Cristina Baetas, pela co-orientação e pela disponibilização do laboratório para a realização do projeto.

Ao Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão (UFOP), pela realização das análises por CLUE-DAD-ESI-EMEM.

À Dr. Maria Fernanda Alves do Nascimento, pela realização dos testes *in vitro* de atividade antiplasmódica e pela amizade, companhia e apoio durante a realização do projeto na UFMG.

Ao Prof. Dr. Wagner L. R. Barbosa, pela disponibilização do laboratório de fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFPA.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela contribuição para minha formação.

Ao Prof. Dr. Fernão Castro Braga, pela disponibilização do Laboratório de Fitoquímica da UFMG.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua (UFMG) e Prof^a Dr^a Priscilla Rodrigues Valadares Campana (UFMG) pelo apoio durante a realização do projeto no Laboratório de Fitoquímica (UFMG).

À Gabriela Samulski (IC/UFMG) e à Maria Beatriz Viana dos Santos (UFOPA), pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica (UFMG) pela amizade, Rosângela, Wellerson, Luciana, Nayara, Isabela, Marina, Lyandra, Alisson, Raquel, André, Juliana, Juliana Amorin, José Hugo, Renata, Diego e aos colegas do Laboratório de Farmacognosia UFMG, pelo apoio e companhia durante a realização do projeto.

À FUMP, pela disponibilização da moradia universitária durante o período realização do projeto na UFMG.

Ao técnico em Botânica, Luiz Carlos Batista, Museu Paraense Emílio Goeldi, e e ao Dr. Luciano Ferreira Margalho, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará- IFPA, pela coleta e identificação da planta.

Aos meus pais, Pedro Ohashi, Marlene Ohashi; minhas irmãs, Aline Ohashi e Alessandra Ohashi; meus avós, Chiyoko Ohashi, Tamico Shimada, Mario Shimada, meus tios; a todos da minha família.

Aos meus amigos. Em especial, à Amanda Roberta Silva, uma amizade da graduação para a vida. À Harisson Mesquita, por ser meu grande amigo, pela força e por nunca me deixar desanimar. À Jhon Reis, pela ótima amizade de anos, pela ótima companhia e pela força. Ao André Fernandes e ao Salomão Salim, por toda a ajuda. Aos amigos conhecidos na época da graduação, que levo para a vida, Juliana Corrêa, Érica, Milena, Luiz, Valdicley, Lara, Luiz, Jhessica, entre outros.

Aos colegas do PPGCF/UFPA, Ana Laura, Ana Beatriz, Amanda, Carolina, Daniele, Felipe, Gisele, Jhessica, Luís e Uebem.

Aos colegas do laboratório de Bromatologia UFPA, Laisy Trindade e Carolina Alves. Aos demais colegas da Universidade Federal do Pará. Às secretárias do PPGCF/UFPA, Dona Brasília e Cliciane, e ao secretário do PPGCF/UFMG, Marton Alves.

RESUMO

OHASHI, L. H. **Caracterização fitoquímica e atividade antiplasmódica de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schut.) Borhidi (Rubiaceae) da Praia do Crispim, município de Marapanim, estado do Pará.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

O presente trabalho descreve a análise farmacognóstica, fitoquímica e a avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* em cultivo de *Plasmodium falciparum* (W2) de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi (Rubiaceae) coletada na praia do Crispim, município de Marapanim, Pará. Extratos etanólicos, hidroetanólicos e aquosos das folhas e caules foram preparados por maceração descontínua, sonicação e decocção. A extração de alcaloides foi realizada por métodos de separação ácido-base e o extrato etanólico de folhas foi submetido a partição líquido. A prospecção fitoquímica dos extratos foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada de sílica gel (CCD), com resultados positivos para cumarinas, saponinas, alcaloides, polifenóis, taninos para todos os extratos, e esteroides e triterpenos, apenas nos extratos etanólicos. Os perfis cromatográficos dos extratos e frações obtidos foram registrados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a dispositivo de diodo (CLUE-DAD), e Espectrometria de Massas no modo sequencial (CLUE-DAD-ESI-EM/EM), e foram avaliados para atividade antiplasmódica em culturas de *P. falciparum* resistente a cloroquina (clone W2) pelo método PfLDH. Análises por CLUE-DAD demonstraram alta semelhança de perfis cromatográficos dos diferentes extratos brutos. Análises por CLUE-DAD-ESI-EM/EM revelaram a presença majoritária de ácidos clorogênicos, estrictosidínico e lialosídico nos diferentes extratos brutos, bem como permitiu a caracterização de um possível novo alcaloide para o qual foi proposta a estrutura de um sinapoil derivado do ácido lialosídico. Além disso, alcaloides β -carbolínicos, como harmano e 4-metil- β -carbolina, juntamente com a *N*-metiltriptamina, foram identificados nas frações mais ativas. Em relação à atividade antiplasmódica, as frações diclorometânica e clorofórmica das extrações de alcaloides e clorofórmica a partir da partição líquido-líquido apresentaram atividade antiplasmódica de moderada a elevada, com porcentagem de redução do crescimento do parasito entre $65,5 \pm 10,6\%$ e $96,5 \pm 4,9\%$, enquanto os extratos etanólicos, hidroetanólicos e aquosos mostraram-se inativos ou pouco ativos. Em conclusão, os fracionamentos por extrações ácido-base e partição líquido-líquido foram efetivos, levando a frações altamente ativas nas quais foram identificados alcaloides β -carbolínicos, possivelmente responsáveis pela atividade desta espécie, descrita neste trabalho pela primeira vez.

Palavras-chave: Alcaloides; Atividade antiplasmódica; CLUE-DAD-ESI-EM/EM; Fitoquímica; *Palicourea hoffmannseggiana*; Rubiaceae.

ABSTRACT

OHASHI, L. H. **Phytochemical characterization and antiplasmodial activity of *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi (Rubiaceae) from Crispim beach, municipality of Marapanim, state of Pará.** Master Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, UFPA, 2020.

The present master thesis describes the pharmacognostic, phytochemical analysis and the evaluation of the antiplasmodial activity of *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi (Rubiaceae), against *Plasmodium falciparum* (W2). Ethanol, hydroethanol and aqueous extracts from leaves and stems were prepared by batch maceration, sonication and decoction, the separation of alkaloids was carried out by acid-base extraction methods. Phytochemical prospecting of the extracts was performed by silica gel Thin Layer Chromatography (TLC) that showed positive results for coumarins, saponins, alkaloids, polyphenols, tannins for all the extracts. Steroids and triterpenes were detected only in the ethanol extracts. The chromatographic profiles of the obtained extracts and fractions were registered by Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector (UPLC-DAD), and mass analyses were determined by Ultra-High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (UPLC-DAD-ESI-MS\MS). Evaluation of the antiplasmodial activity against chloroquine resistant. *P. falciparum* cultures (clone W2) was performed by the lactatedehydrogenase method (*Pf*LDH). Analyses by UPLC-DAD corroborate the results of the TLC prospecting, besides demonstrating high similarity of chromatographic profiles of the crude extracts. Analyses by UPLC-DAD-ESI-MS\MS revealed the presence of chlorogenic acids, strictosidinic acid and lialosidic acid in different extracts, as well as allowed the characterization of a possible new alkaloid, a sinapoyl derivative of lialosidic acid. In addition, β -carboline alkaloids, such as harmano and 4-methyl- β -carboline, together with N-methyltryptamine, have been identified in the most active fractions. Regarding the antiplasmodial activity, the dichloromethane and chloroform fractions of the extractions of alkaloids and the chloroform fraction from liquid-liquid partitions showed high activity, with a percentage of reduction of the parasite growth between $65.5 \pm 10.6\%$ and $96.5 \pm 4.9\%$, while the crude extracts were inactive or showed low activity. In conclusion, the fractionations by acid-base extractions and liquid-liquid partitions were effective, leading to highly active fractions in which β -carboline alkaloids were identified as possibly responsible for the activity of this species that is described in this work for the first time.

Keywords: Alkaloids; Antiplasmodial activity; UPLC-DAD-ESI-MS\MS; Phytochemistry; *Palicourea hoffmannseggiana*; Rubiaceae.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------|---|
| % Red | Porcentagem de redução |
| Abs | Absorção |
| ACN | Acetonitrila |
| AcOEt | Acetato de etila |
| ACT | Terapia Combinada à base de Artemisinina |
| AMI | Alcaloide monoterpeneo indólico |
| APAD | 3-Acetilpiridina adenina dinucleotídio |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| Cl ₅₀ | Concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos |
| CLUE - DAD | Cromatografia líquida de ultra eficiência - Detector de Arranjos de Diodos |
| CLUE-DAD-ESI-EM | Cromatografia líquida de ultra eficiência - Detector de Arranjos de Diodos - Ionização por spray de elétrons - Espectrometria de Massas |
| DC | Dicroísmo circular |
| DCM | Diclorometano |
| DMT | <i>N,N</i> -Dimetiltriptamina |
| EACPH | Extrato aquoso dos caules de <i>P. hoffmannseggiana</i> |
| EAFPH | Extrato aquoso das folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> |
| EECPH | Extrato etanólico de caules de <i>P. hoffmannseggiana</i> |
| EEFPH | Extrato etanólico de folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> |
| EEFPH-2 | Extrato etanólico de folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> , 2 ^o coleta |
| EHEC1:1 | Extratos hidroetanólicos de caule de <i>P. hoffmannseggiana</i> , na proporção 1:1 |
| EHEC7:3 | Extratos hidroetanólicos de caules de <i>P. hoffmannseggiana</i> , na proporção 7:3 |
| EHEF1:1 | Extratos hidroetanólicos de folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> , na proporção 1:1 |
| EHEF7:3 | Extratos hidroetanólicos de folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> , na proporção 7:3 |
| EtOH 96° GL | Álcool etílico 96° |
| EtOH:H ₂ O 1:1 | Álcool etílico: água, na proporção 1:1 |
| EtOH:H ₂ O 7:3 | Álcool etílico: água, na proporção 7:3 |
| FCPLL | Fração clorofórmica, obtida por meio de partição líquido-líquido |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FHMPLL | Fração hidrometanólica, obtida por meio de partição líquido-líquido |
| FrAcOetMetB | Fração de acetato de etila básica de folhas, obtida pelo método B |
| FrBCMetA | Fração alcaloídica butanólica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 |
| FrBCMetB | Fração n-butanólica básica de folhas, obtida pelo método B |
| FrBFMetA | Fração alcaloídica butanólica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 |
| FrCAcMetB | Fração clorofórmica ácida de folhas, obtida pelo método B |

| | |
|-----------------|---|
| FrCBMetB | Fração clorofórmica básica de folhas, obtida pelo método B |
| FrCNMetB | Fração clorofórmica neutra de folhas obtida pelo método B |
| FrDCMetA | Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 |
| FrDFMetA | Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 - 10 |
| FrHCMetA | Fração hexânica do caule, obtida pelo método A |
| FrHFMetA | Fração hexânica de folhas, obtida pelo método A |
| HRF | Heterocycle ring fission, fissão do anel heterocíclico |
| INPM | Instituto Nacional de Pesos e Medidas |
| LDH | Lactato Desidrogenase |
| <i>m/z</i> | Razão massa (<i>m</i>) carga (<i>z</i>) |
| MAO | Monoamina oxidase |
| MeOH | Álcool metílico |
| MIA | Monoterpene Indole Alkaloids, alcaloide indólico monoterpênico |
| MTT | Brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio |
| N | Normalidade |
| NBT | Nitro Blue Tetrazolium salt |
| <i>n</i> -BuOH | Álcool butílico |
| OCDE | Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico |
| OMS/WHO | Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization |
| P. A. | Para Análise |
| P.A. – A. C. S. | Para Análise - AMERICAN CHEMICAL SOCIETY |
| PES | Étosulfato de fenazina |
| <i>Pf</i> LDH | Lactato desidrogenase do <i>Plasmodium falciparum</i> |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| RDA | Clivagem retro-Diels-Alder |
| R _f | Fator de Retenção – Retention factor |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| rpm | Rotações por minuto |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| Tr | Tempo de Retenção |
| UV | Ultravioleta |
| <i>v</i> | Volume |
| <i>v/v</i> | Volume/volume |
| Vis | Visível |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | | |
|------------------|---|---|----|
| Figura 01 | – | <i>Psychotria hoffmannseggiana</i> (Willd. ex Schult.) Müll.Arg..... | 25 |
| Figura 02 | – | Estruturas químicas de alcaloides isolados de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> e sinónímias..... | 27 |
| Figura 03 | – | Estruturas químicas de metabólitos não alcaloides isolados de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> e sinónímias..... | 28 |
| Figura 04 | – | Principais etapas do ciclo biológico de protozoários <i>Plasmodium</i> sp..... | 31 |
| Figura 05 | – | Estruturas químicas dos principais fármacos antimaláricos..... | 32 |
| Figura 06 | – | Exsicata de <i>Psychotria hoffmannseggiana</i> (Schult.) Mull. Arg. depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, número de registro MG 226057..... | 44 |
| Figura 07 | – | Fluxograma da obtenção dos extratos etanólicos e hidroetanólicos de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> , a partir do material vegetal da 1ª coleta..... | 49 |
| Figura 08 | – | Fluxograma da extração de alcaloides a partir de pó de caules e folhas da primeira coleta de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> , com HCl 1N (Verma e colaboradores (2007))..... | 51 |
| Figura 09 | – | Fluxograma da extração de alcaloides a partir do extrato etanólico das folhas da primeira coleta de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> , pelo método B (Naves, 2014, com modificações)..... | 53 |
| Figura 10 | – | Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico (EEFPH-2) de folhas por partição líquido-líquido..... | 54 |
| Figura 11 | – | Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> | 72 |
| Figura 12 | – | Prospecção fitoquímica dos extratos hidroetanólicos (7:3) de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> | 73 |
| Figura 13 | – | Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico (1:1) de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> | 74 |
| Figura 14 | – | Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> | 75 |
| Figura 15 | – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos etanólico e hidroetanólico (7:3) de caules de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> . Detecção em 280 nm..... | 77 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 16 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos hidroetanólico (1:1) e aquoso de caules de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> . Detecção em 280 nm..... | 78 |
| Figura 17 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos etanólico, hidroetanólico (7:3) de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> . Detecção em 280 nm..... | 79 |
| Figura 18 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos hidroetanólico (1:1) e aquoso de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> . Detecção em 280 nm..... | 80 |
| Figura 19 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das frações diclorometânicas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> obtidas por extrações ácido-base pelo método A. Detecção em 280 nm..... | 82 |
| Figura 20 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das frações butanólicas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> obtidas por extrações ácido-base pelo método A. Detecção em 280 nm..... | 83 |
| Figura 21 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das amostras obtidas a partir de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> por extrações ácido-base pelo método B. Detecção em 280nm..... | 85 |
| Figura 22 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das amostras obtidas a partir de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> por extrações ácido-base pelo método B. Continuação. Detecção em 280nm..... | 86 |
| Figura 23 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) da fração n-butanólica básica de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> , obtida pelo método B (FrBMetB)..... | 87 |
| Figura 24 – | Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das frações obtidas a partir de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> por partições líquido-líquido (método C). Detecção em 280nm..... | 88 |
| Figura 25 – | Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos dos caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> , destacando-se os picos presentes em todos os cromatogramas. Detecção em 220 nm..... | 91 |
| Figura 26 – | Cromatogramas por CLUE-DAD, registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM, dos extratos etanólicos de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> e das frações obtidas pelo método A de extração de alcaloides. Detecção em 220 nm..... | 94 |
| Figura 27 – | Expansão dos cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos e frações de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> , obtidas pelo método A de extração de | |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| | alcaloides (Tr 0 – 5 min). Detecção em 220 nm..... | 95 |
| Figura 28 – | Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM do extrato etanólico de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> e das frações obtidas pelo método B de extração de alcaloides. Detecção em 220 nm..... | 98 |
| Figura 29 – | Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM do extrato etanólico de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> (coletas 1 e 2) e das frações obtidas por partição líquido-líquido. Detecção em 220 nm..... | 100 |
| Figura 30 – | Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos etanólicos de caules e folhas e frações ativas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> frente ao <i>Plasmodium falciparum</i> (TR 0 –13 min). Detecção em 220 nm..... | 105 |
| Figura 31 – | Cromatogramas por CLUE-DAD expandidos e registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos etanólicos de caules e folhas e frações ativas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> frente ao <i>Plasmodium falciparum</i> (TR 0 –8 min). Detecção em 220 nm..... | 106 |
| Figura 32 – | CLUE-ESI-MS expandido (TIC Scan Positivo) de Extrato Etanólico, Extratos hidroetanólicos e extratos aquosos de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> caules e folhas (Grupo 1)..... | 108 |
| Figura 33 – | CLUE-ESI-MS expandido (TIC Scan Negativo) de Extrato Etanólico, Extratos hidroetanólicos e extratos aquosos de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> caules e folhas (Grupo 1)..... | 109 |
| Figura 34 – | Cromatograma CLUE-DAD do extrato etanólico das folhas (EEFPH-1) e dados de UV dos picos nos Trs 1,45, 1,82 e 1,95 min..... | 110 |
| Figura 35 – | Espectro no UV (A), Espectro de massas ESI ⁺ (B) do ácido lialosídico, identificado nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> | 112 |
| Figura 36 – | Espectro no UV (A), Espectro de massas ESI ⁺ (B) do ácido strictosidinico, identificado nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> | 114 |
| Figura 37 - | Espectro no UV (A), Espectro de massas ESI ⁺ (B) do ácido (E)-O-6'-sinapoil-lialosídico identificado nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> | 116 |
| Figura 38 - | Estruturas dos principais compostos identificados do extrato etanólicos(Grupo 1, Tabela 9) das folhas de <i>P. hoffmannseggiana</i> por CLUE-DAD-ESI-MS ² | 117 |

- Figura 39 -** Cromatograma CLUE-DAD do extrato etanólico dos caules e das folhas e frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH. Detecção em 220 nm.....120
- Figura 40 -** Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização positivo (ESI⁺), Varredura 0 a 1550 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.....121
- Figura 41 -** Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização positivo (ESI⁺), Varredura 0 a 720 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.....122
- Figura 42 -** Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização negativo (ESI⁻), varredura 0 a 1550 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.....123
- Figura 43 -** Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização negativo (ESI⁻), varredura 0 a 900 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.....124
- Figura 44 -** Estruturas químicas das substâncias identificadas nas frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* por extrações de alcaloides.....127
- Figura 45 -** Cromatogramas UPLC-DAD expandidos dos extratos etanólicos, coleta 1 (EEFPH-1) e coleta 2 (EEFPH-2) e das frações obtidas por partição do EEFPH-2 de *Palicourea hoffmannseggiana* (Grupo 4, tabela 09), a 220 nm.....130

LISTA DE QUADROS

- Quadro 01** - Classificação taxonômica da *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi.....25
- Quadro 02** - Condições utilizadas na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada – CCD.....56
- Quadro 03** - Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos de cascas e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta por cromatografia em camada delgada (CCD).....71

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabela 01 | - Condições cromatográficas utilizadas nas análises por CLUE-DAD..... | 59 |
| Tabela 02 | - Condições cromatográficas utilizadas nas análises por CLUE-DAD-ESI-EM/EM..... | 60 |
| Tabela 03 | - Rendimentos dos extratos etanólicos, hidroetanólicos e aquosos de folhas e caules de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da primeira coleta do material vegetal..... | 64 |
| Tabela 04 | - Rendimentos das extrações de alcalóides de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da primeira coleta do material vegetal pelo método A (Figura 08)..... | 64 |
| Tabela 05 | - Rendimentos das extrações de alcalóides a partir do extrato etanólico de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da primeira coleta pelo método B (Figura 09)..... | 65 |
| Tabela 06 | - Rendimentos das frações obtidas na partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico de folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da segunda coleta..... | 65 |
| Tabela 07 | - Resultados das análises granulométricas do pó de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da primeira coleta..... | 66 |
| Tabela 08 | - Dados farmacognósticos dos pós de cascas e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da primeira coleta..... | 68 |
| Tabela 09 | - Porcentagem de inibição do crescimento do <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) frente a extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> avaliados pelo método da Lactato Desidrogenase do parasito (PfLDH) e dados estatísticos para atividade antiplasmódica..... | 89 |
| Tabela 10 | - Porcentagem de inibição do crescimento do <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) do extrato etanólico de folhas da coleta 1 e das frações ativas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> avaliados pelo método da Lactato Desidrogenase do parasito (PfLDH) e dados estatísticos..... | 102 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 A família Rubiaceae | 22 |
| 2.1.1 O GÊNERO <i>PALICOUREA</i> | 23 |
| 2.1.2 <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> (Schult.) Borhidi | 24 |
| 2.2 A Malária | 29 |
| 2.2.1 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA | 32 |
| 2.3 Desreplicação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Dispositivo de Diodos e Espectrometria de Massas - CLUE-DAD-ESI-EM | 35 |
| 3 OBJETIVOS | 37 |
| 3.1. Objetivo geral | 37 |
| 3.2. Objetivos específicos | 37 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 Materiais e vidrarias | 38 |
| 4.2 Equipamentos | 38 |
| 4.3 Solventes e reagentes químicos | 39 |
| 4.3.1 SOLVENTES GRAU PA | 39 |
| 4.3.2 SOLVENTES GRAU HPLC | 39 |
| 4.3.3 REAGENTES QUÍMICOS..... | 39 |
| 4.4 Fases estacionárias | 40 |
| 4.5 Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) | 40 |
| 4.6 Cultivo do <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) | 41 |
| 4.6.1 MEIO DE CULTIVO | 42 |
| 4.6.2 REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA..... | 42 |
| 4.7 Coleta do material vegetal de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> (Schult.) Borhidi..... | 43 |
| 4.8 Métodos | 44 |
| 4.8.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL | 44 |
| 4.8.2 TESTES FARMACOGNÓSTICOS..... | 45 |
| 4.8.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNSEGGIANA</i> (SCHULT.) BORHIDI | 47 |
| 4.8.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNSEGGIANA</i> (SCHULT.) BORHIDI (2° COLETA) | 49 |
| 4.8.5 SEPARAÇÃO DE ALCALOIDES POR EXTRAÇÕES ÁCIDO-BASE | 50 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.8.6 | FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>PALICOUREA HOFFMANNGESIANA</i> POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (Método C) | 54 |
| 4.8.7 | PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) | 54 |
| 4.8.8 | PERFÍS CROMATOGRÁFICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJOS DE DIODO (CLUE-DAD) E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-ESI-EM/EM) | 58 |
| 4.8.9 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA <i>IN VITRO</i> | 60 |
| 4.9 | Análises estatísticas..... | 61 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 62 |
| 5.1. | Preparação do material vegetal e extrações | 62 |
| 5.2. | Análises farmacognósticas..... | 66 |
| 5.3 | Prospecção fitoquímica por CCD | 68 |
| 5.4 | Perfis cromatográficos dos extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> da primeira coleta por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos - CLUE-DAD | 76 |
| 5.4.1. | PERFÍS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS - CLUE-DAD DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÕES ÁCIDO-BASE A PARTIR DE CAULES E FOLHAS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNGESIANA</i> (Métodos A e B) | 81 |
| 5.4.2 | PERFÍS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS - CLUE-DAD DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNGESIANA</i> | 87 |
| 5.5 | Atividade antiplasmódica de extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> | 88 |
| 5.5.1 | ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE CAULES E FOLHAS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNGESIANA</i> E DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS OBTIDAS PELO MÉTODO A, DADOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES POR CLUE-DAD (Grupo 2 Tabela 09)..... | 92 |
| 5.5.2 | ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE FOLHAS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNGESIANA</i> OBTIDOS PELO MÉTODO B, DADOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES POR CLUE-DAD | 96 |
| 5.5.3 | ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA PELO MÉTODO PLDH DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>PALICOUREA HOFFMANNGESIANA</i> , DADOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES POR CLUE-DAD | 99 |
| 5.6 | Comparação dos perfis cromatográficos por CLUE-DAD dos extratos etanólicos de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> e das frações com atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> | 102 |

| | |
|---|-----|
| 5.7 Caracterização e identificação por CLUE-DAD-ESI-EM\EM de constituintes dos extratos de caules e folhas de <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> - Grupo 1 (Tabela 09)..... | 107 |
| 5.7.1 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR CLUE-DAD-ESI-EM\EM DE CONSTITUINTES POTENCIALMENTE ATIVOS PRESENTES NAS FRAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA..... | 118 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 132 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 133 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos problemas relacionado ao tratamento da malária, é a resistência do parasito aos fármacos disponíveis. A resistência pode ocorrer como consequência de diversos fatores, entre eles, a falta de adesão do paciente ao regime prescrito de antimaláricos, administração de uma dose incorreta de fármaco, e o uso de monoterapias orais à base de artemisinina e medicamentos abaixo do padrão. O aumento da resistência aos antimaláricos impulsionou as pesquisas por novas substâncias químicas efetivas e seguras para o tratamento da malária (KFFURI, 2014; DUARTE, 2019). Nesse contexto, a busca por novas alternativas de tratamento e novas moléculas antimaláricas se torna urgente.

Os produtos naturais constituem ricas fontes de fármacos e a investigação de plantas medicinais de uso popular ou tradicional representa uma estratégia válida na pesquisa de substâncias bioativas, potenciais fármacos (fitofármacos). Aproximadamente, 25% dos fármacos utilizados nos países industrializados foram obtidos de forma direta ou indiretamente de plantas medicinais (BRASIL, 2016; CARVALHO & SILVEIRA, 2010). Entre os anos de 1940 e o final de 2014, 85 (49%) moléculas aprovadas pelo FDA para o tratamento do câncer foram oriundas ou derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2016). Em relação aos medicamentos antiparasitários, 7 de um total de 20 moléculas aprovadas, no período de janeiro de 1981 a setembro de 2019, foram obtidos de plantas, correspondendo a 35% (NEWMAN & CRAGG, 2020).

O uso de plantas para o tratamento de doenças data de milhares de anos, contudo não existe um consenso sobre a época exata em que teve início (FIRMO et al., 2011). Somente a partir do século XIX iniciou-se a pesquisa científica de substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas, tais como o isolamento da morfina, de codeína, papaverina, atropina, cafeína, tubocurarina, camptotecina, forskolina, vincristina e vimblastina, e o taxol, entre outras (CALIXTO & SIQUEIRA, 2008; GRANADA et al., 2007; CIOTONEA & CERNATESCU, 2010; MELEGARI, 2014; WANG et al., 2018).

Dentre as famílias botânicas utilizadas na medicina tradicional pode-se citar a família Rubiaceae, que inclui 620 gêneros e 13.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo também encontradas nas regiões temperadas

e frias da Europa e no norte do Canadá (CRUZ et al., 2020; LY et al., 2020). De *Cinchona calisaya* Wedd. e *C. succirubra* Pav. ex Klotzsch, pertencentes a esta família botânica, Pierre Joseph Pelletier e Jean Bienaime Caventou isolaram a quinina, em 1820, o primeiro fármaco utilizado no tratamento da malária (OLIVEIRA & SZCZERBOWSKI, 2009).

Nesse contexto, os gêneros *Palicourea* e *Psychotria*, pertencentes à família Rubiaceae, destacam-se pelo seu uso na medicina tradicional e suas propriedades farmacológicas, além de serem caracterizados pela presença de alcaloides, assim como flavonoides, cumarinas, terpenoides e peptídios cíclicos, que podem ser responsáveis por uma ampla variedade de atividades biológicas (CALIXTO et al., 2016; DUSMAN et al., 2004; VENCATO et al., 2006; VALVERDE et al., 1999). O gênero *Palicourea* compreende cerca de 230 espécies sendo seus representantes encontrados nas regiões tropicais da América Central e América do Sul (TAYLOR, 1989; ROSA et al., 2010). Já a espécie *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi, possui como sinonímia botânica os nomes *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. Ex Schult.) Müll. Arg., *Psychotria barbiflora* DC., entre outros. É um arbusto de pequeno porte, com altura entre de 0,5 a 2,0 m, amplamente distribuída no Brasil (DELPRETE & KIRKBRIDE, 2016; TEIXEIRA & MACHADO, 2004; DELPRETE, 2010).

A diversidade de alcaloides bioativos presentes no gênero *Palicourea* (PORTO et al., 2009), e a ausência de estudos sobre a atividade antiplasmódica da espécie, motivaram o projeto desta dissertação que teve como objetivo a realização de estudos farmacognósticos do material vegetal, além da avaliação da atividade antiplasmódica de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi e a caracterização fitoquímica dos extratos e das frações ativas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Rubiaceae

A família Rubiaceae é a mais representativa da ordem Gentianales e uma das maiores dentre as Angiospermae, com aproximadamente 13.000 espécies, correspondendo por volta de 66% do total das Gentianales, classificados em cerca de 620 gêneros. Estudos recentes de taxonomia botânica subdividiram esta família em três subfamílias, Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae, e 65 tribos (DELPRETE & JARDIM, 2012; XU & CHANG, 2017; WIKSTRÖM et al., 2020; CRUZ et al., 2020; LY et al., 2020). As espécies desta família estão presentes em todos os continentes, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, porém também ocorrem nas regiões temperadas e frias do planeta (BREMER & ERIKSSON, 2009; DAVIS et al., 2009; JUNG-MENDAÇOLLI, 2007; SOUZA et al., 2013). Espécies pertencentes à família Rubiaceae são encontradas nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia (749 espécies), Caatinga (172 espécies), Cerrado (401 espécies), Mata Atlântica (575 espécies), Pampa (47 espécies), Pantanal (35 espécies) (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB210>).

A família Rubiaceae é conhecida por reunir espécies com importância econômica, seja medicinal, alimentícia, madeireira ou na produção de corantes. Demonstrou-se que diversas espécies desta família apresentam atividades biológicas, experimentalmente comprovadas, como antimalárica, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antidiabética, atividade antioxidante, anti-inflamatória e ação no sistema nervoso, como ansiolítica, antidepressiva (KALA, 2015; FARIAS, 2006; BOTH, 2005). Alcaloides bioativos são descritos entre os constituintes micromoleculares de espécies desta família, como *Coffea arabica* L., o popular café, bebida estimulante e tonificante que contém a cafeína como substância farmacologicamente ativa, com ação estimulante do sistema nervoso central (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; MENDOZA et al, 2004; CAZARIM & UETA, 2014; SANTOS et al., 2015). De uso medicinal, destacam-se espécies de *Cinchona* L., conhecidas como quinas, ricas em alcaloides quinolínicos, como a quinina, o primeiro fármaco utilizado em tratamento da malária (PORTO et al., 2009; MELÉNDEZ-GÓMEZ & KOUZNETSOV, 2005). O extrato de *Uncaria tomentosa* é

conhecido por apresentar atividade antioxidante e citostática que são devidas, em parte, à presença de alcaloides isolados dos extratos desta planta (PORTO et al., 2009).

Estudos fitoquímicos de espécies desta família revelaram uma grande variedade de classes de metabólitos secundários, como iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas, terpenos (diterpenos e triterpenos), flavonoides e outros fenólicos, muitos destes com alto potencial biológico. O grande número de substâncias descritas na literatura e as atividades farmacológicas relatadas para diversas espécies desta família demonstram que Rubiaceae é uma fonte promissora de substâncias bioativas, potenciais fármacos ou protótipos de novos fármacos (MARTINS & NUNEZ, 2015; OLIVEIRA, 2009).

A família Rubiaceae é conhecida por produzir alcaloides pertencentes a diversas classes, destacando-se a dos alcaloides isoquilínicos, quinolínicos e indólicos. Os iridóides são considerados marcadores da subfamília Ixoroideae, enquanto os alcaloides indolicos são considerados marcadores da subfamília Cinchonoideae e antraquinonas da subfamília Rubioideae (MENDONÇA et al., 2015).

2.1.1 O GÊNERO *PALICOUREA*

O gênero *Palicourea*, compreende mais de 230 espécies (NASCIMENTO et al., 2005; BERGER et al., 2012; MORAES, 2017; BERGER et al., 2015). Estudos taxonômicos realizados por Schumann, em 1891, caracterizaram o gênero *Psychotria*, separando-o do gênero *Palicourea*, após um estudo sistemático da família Rubiaceae (STANDLEY, 1936; STEYERMARK, 1972; TAYLOR, 1989, 1997).

Entre os séculos 20 e início do século 21, *Palicourea* Aubl. e *Psychotria* L. eram considerados como diferentes gêneros da tribo Psychotrieae, apesar de suas semelhanças morfológicas. A separação desses gêneros ocorria a partir da diferenciação das corolas. Espécies do gênero *Palicourea* apresentam corolas relativamente grandes, com bases largas, de coloração amarela, laranja, vermelha, rosa ou lilás, raramente brancas, e são polinizadas por beija-flores e borboletas. O gênero *Psychotria* apresenta corolas glabras internamente, abaixo do estame, e não possui base larga, as colorações das corolas podem ser brancas, amarelas claras,

verdes claras ou beges, e são polinizados por abelhas e outros insetos pequenos (DELPRETE & KIRKBRIDE, 2016; TAYLOR, 1989, TAYLOR et al., 2007).

O gênero *Psychotria* era dividido em dois subgêneros: *Psychotria* e *Heteropsychotria* Steyern. Entretanto, recentemente, Delprete e Kirkbride (2016) demonstraram, por meio de estudos de filogenia molecular, que a tribo Psychotrieae é composta por apenas dois grupos monofiléticos, um deles formado pelo subgênero *Psychotria* e outro grupo incluindo o gênero *Palicourea* e o subgênero *Heteropsychotria*, transferindo diversas espécies deste subgênero para o gênero *Palicourea* (DELPRETE & KIRKBRIDE, 2016). Entre essas espécies encontra-se a *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi, anteriormente denominada *Psychotria hoffmannseggiana* (Schult.) Müll. Arg.

O gênero *Palicourea* pertence à subfamília Rubioideae, que possui as antraquinonas como marcadores fitoquímico, entretanto estudos sobre a distribuição de metabólitos secundários em subfamílias da família Rubiaceae apontaram que a Rubioideae possui uma alta concentração de alcaloides, destacando-se por produzir alcaloides indólicos monoterpênicos, porém em concentração inferior a subfamília Cinchonoideae (PEREIRA & BARBOSA, 2006; MENDONÇA et al., 2015).

2.1.2 *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi

Palicourea hoffmannseggiana (Schult.) Borhidi é uma denominação recente (GARGOMINY, 2020) desta espécie para a qual são registradas 22 sinonímias, entre as quais *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. ex Schult.) Müll. Arg.; *Carapichea patrisii* DC, *Cephaelis hoffmannseggiana* Schult., *Cephaelis patrisii* (DC.) D. Dietr., *Cephaelis rubra* Willd. ex Roem. & Schult., *Psychotria bahiensis* Müll. Arg., *Psychotria barbiflora* DC., *Psychotria flavicans* Müll. Arg., *Psychotria furcata* DC., *Psychotria heterocephala* Müll. Arg., *Psychotria hoffmannseggiana* (Schult.) Müll. Arg., *Psychotria hoffmannseggiana* fo. *Pubescens* Steyerm., *Psychotria rubra* (Willd. Ex Roem. & Schult.) Müll. Arg. e *Uragoga carapichea* Kuntze (DELPRETE & KIRKBRIDE, 2016; www.tropicos.org/name/100408987; TAYLOR et al., 2014). Atualmente, esta espécie tem a classificação taxonômica mostrada no Quadro 1.

Quadro 01 - Classificação taxonômica de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi.

| | |
|-------------------|--|
| Classe | Equisetopsida C. Agardh |
| Subclasse | Magnoliidae Novák ex Takht. |
| Superordem | Asteranae Takht. |
| Ordem | Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl |
| Família | Rubiaceae Juss. |
| Gênero | <i>Palicourea</i> Aubl. |
| Espécie | <i>Palicourea hoffmannseggiana</i> (Schult.) Borhidi |

Fonte: www.tropicos.org/name/100408987

Palicourea hoffmannseggiana (Schult.) Borhidi está presente em países das Américas Central e do Sul, como, por exemplo, Brasil, México, Equador, Colômbia e Venezuela. No Brasil, ocorre em Estados de todas as regiões, até Santa Catarina (<https://www.tropicos.org/name/100408987>). Segundo Delprete (2010), esta espécie é amplamente distribuída e bastante comum, estando fora de perigo ecológico eminente. No entanto, não localizamos imagens com esta denominação e imagens de espécime identificado como *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. ex Schult.) Müll.Arg, que é uma das sinônimas (DELPRETE & KIRKBRIDE, 2016; www.tropicos.org/name/100408987) são mostradas na Figura 01. OK



Figura 01 - *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. ex Schult.) Müll.Arg
Legenda: a. Ramos com inflorescências; b. Ramo com inflorescência.
 Fonte: FERREIRA JUNIOR & VIEIRA, 2015.

Psychotria hoffmannseggiana (Willd. ex Schult.) é, também, considerado um nome aceito *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi e *Psychotria barbiflora*

DC é uma das diversas sinonímias. Trata-se de um arbusto, com altura variando entre 0,5 – 1 m (DELPRETE, 2010; TEIXEIRA & MACHADO, 2004).

Em alguns herbários encontra-se identificada com o nome *Psychotria barbiflora* DC., atualmente relacionado entre os seus sinônimos (DELPRETE, 2010). Para um espécimen com esta nomenclatura foi relatado o isolamento de dois alcaloides, o harmano (Figura 02. a) e o ácido strictosídínico (Figura 02. b) (OLIVEIRA et al., 2013). Estudos realizados por Naves (2014) com *Psychotria hoffmannseggiana*, sinonímia de *Palicourea hoffmannseggiana*, levaram ao isolamento de sinapato de metila (Figura 03. a), um éster metílico do ácido sinápico; uma cumarina, a 6-hidroxi-7-metoxicumarina, conhecida como isoescopoletina (Figura 03. b); cinco alcaloides, sendo três indólicos, harmano, *N*-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina (Figura 02. c), *N,N*-dimetiltriptamina (Figura 02. d), um alcalóide polindólico, a (+) - quimonantina (Figura 02. e) e um alcaloide indólico monoterpênico, o ácido strictosidínico (Figura 02. b); além de um derivado da glicose, a β -etilglicose (Figura 03. c).

Sob a nomenclatura de *Psychotria rubra*, Hayashi e colaboradores (1987) isolaram duas substâncias, uma quinona chamada psychorubrina (Figura 03. d) e um terpeno, helenalina (Figura 03. e). Foi relatado o isolamento dos flavonoides, 6-hidroxi-luteolina-7-*O*-rutenosídeo (Figura 03. f) e luteolina-7-*O*-rutenosídeo (Figura 03. g), os terpenos, 6 α -hidroxigeniposídeo (Figura 03. h) e psyrubrina A (Figura 03. i) (LU et al., 2014). De *Psychotria bahiensis* DC., Paul e colaboradores (2003), isolaram os seguintes alcaloides: 5 α -carboxiestrictosidina (Figura 02. f), (*E*)/(*Z*)-vallesiachotamina (Figura 02. g), angustina (Figura 02. h), bahienosida A (Figura 02. i), bahienosida B (Figura 02. j), strictosamida (Figura 02. k).



Figura 02 - Estruturas químicas de alcaloides isolados de *Palicourea hoffmannseggiana* e *sinonímias*.

Legenda: a – harmano ; b - ácido estrictosidínico; c - *N*-metil-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina; d – *N,N*-dimetiltriptamina; e -(-+)-quimonantina; f - 5α-carboxiestricosidina; g - (*E*)/(*Z*)-vallesiachotamina; h - angustina; i – bahienosida A; j – bahienosida B; k - estrictosamida.

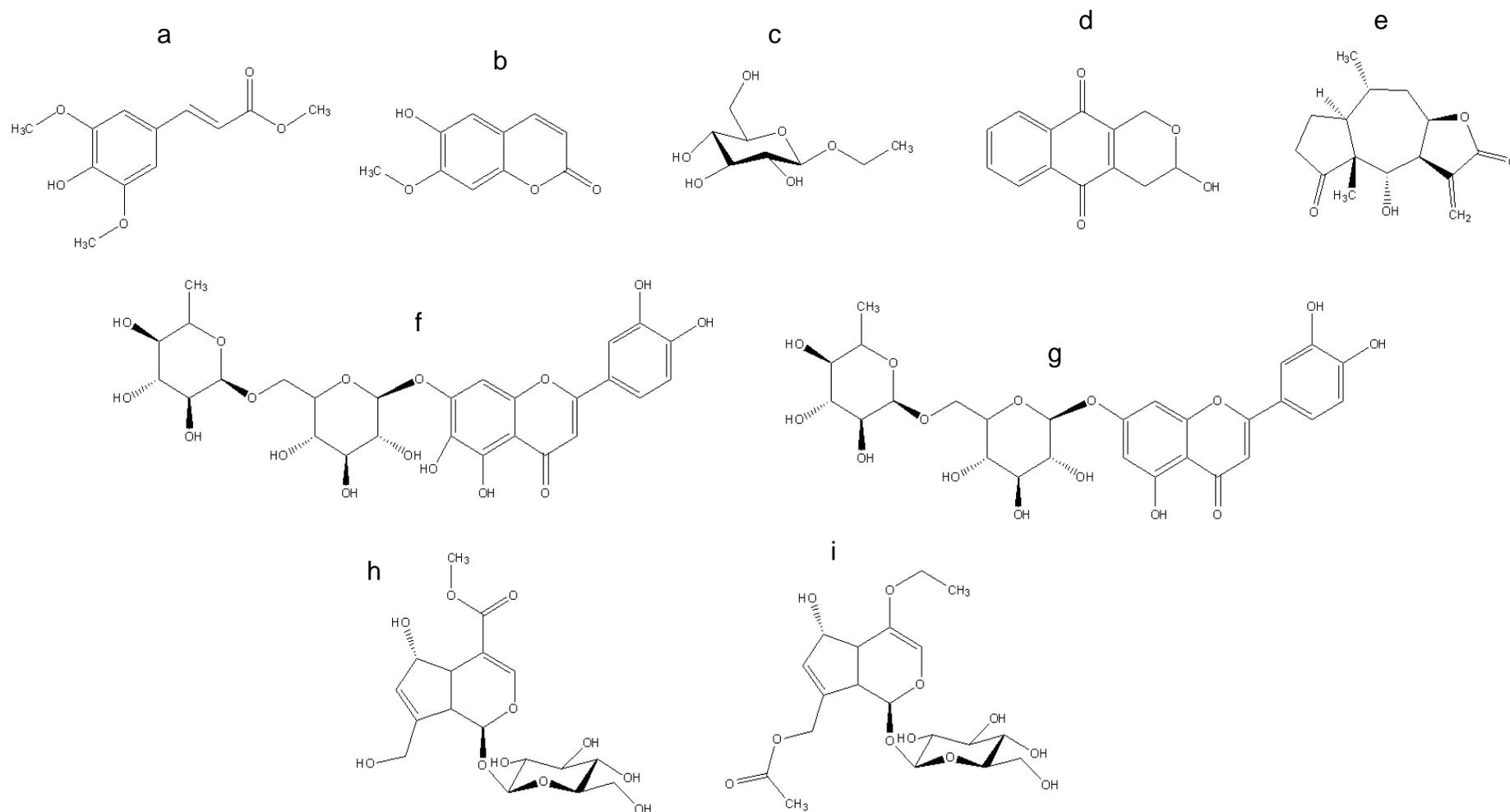


Figura 03 - Estruturas químicas de metabólitos não alcalóides isolados de *Palicourea hoffmannseggiana* e *sinonímias*.

Legenda: a – sinapato de metila; b - isoescopoletina; c - β -etilglicose; d – psychorubrina; e - helenalina; f – 6-hidroxi-luteolina-7-O-rutenosídeo; g - luteolina-7-O-rutenosídeo; h - 6 α -hidroxygeniposídeo; i – psyrrubrina A.

2.2 A Malária

A malária é uma parasitose humana grave. Esta doença também é conhecida como paludismo, impaludismo, febre palustre, o termo malária surgiu apenas no século XIX, visto se acreditar que esta doença era causada por vapores dos pântanos, justificando-se o nome “*Mal aire*”, em italiano. Apenas em 1880, foi descoberto pelo médico Charles Louis Alphonse Laveran que a malária era uma hemoparasitose, descoberta que foi posteriormente confirmada por Gerhardt (NEVES et al., 2004).

Trata-se de uma doença infecciosa, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium* sendo que cinco espécies são responsáveis pela malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. cynomolgi*. A infecção pelo *P. falciparum* é considerada a mais grave por ser este causador da malária cerebral, que leva o paciente à morte, na maioria dos casos. A transmissão do parasito ocorre através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Anopheles* (BENNET & WARREN, 1965; COX-SINGH et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; HELLEMOND et al., 2009).

Esta patologia está presente em regiões tropicais e subtropicais, tendo sido erradicada de países temperados nos últimos 100 anos. A incidência da doença depende de questões ambientais adequadas para vetores, em relação a altitude, clima, vegetação e a não implementação de medidas de controle e, portanto, estando relacionado com a pobreza e desastres naturais (ASHLEY et al., 2018).

No ano de 2018 ocorreram cerca de 228 milhões de casos de malária no mundo, e cerca de 405 000 mortes causadas por esta doença. O maior número de casos de malária registrados em 2018 ocorreu na África. Nesta região prevalece a infecção por *P. falciparum*, responsável por cerca de 99,7% dos casos, em 2018. No entanto, nas Américas prevalece a infecção pelo *P. vivax*, representando 75% dos casos de malária nesta região (WHO, 2019).

Globalmente, observou-se uma redução na incidência da malária no mundo que passou de 71 casos por 1.000 habitantes em risco no ano de 2010, para 57 casos em 1.000 no ano de 2018. No entanto, nas Américas, houve um aumento moderado na incidência neste período, devido ao aumento dos casos na Venezuela. Em relação às mortes causadas pela malária houve um declínio entre os anos de 2010 a 2018, com exceção das Américas, em que ocorreu um aumento devido às

mortes na Venezuela, e do Mediterrâneo oriental devido ao aumento de mortes na Somália, Sudão e Iêmen (WHO, 2019).

O ciclo biológico do *Plasmodium* (Figura 04) no hospedeiro humano se inicia com a transmissão do parasito, que ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas. Neste processo, os esporozoítos, formas infectantes do parasito, são inoculadas na derme do hospedeiro com a saliva infectada do mosquito. Os esporozoítos ganham os capilares sanguíneos e alcançam o fígado. Nesse órgão, penetram nos hepatócitos, onde formam o vacúolo parasitóforo e inicia o chamado ciclo hepático ou extra-eritrocítico da malária, com intensa multiplicação no interior dos hepatócitos, por esquizogonia, gerando os merozoítos envoltos por uma vesícula chamada merossoma. Alguns esporozoítos das espécies de parasita, *P. vivax* e *P. ovale*, podem permanecer em estado latente ou de dormência durante meses ou anos após alojarem-se nos hepatócitos, sendo denominados de hipnozoítos e são essas formas as responsáveis pelas ocorrências de episódios tardios ou recaídas da malária. Após aproximadamente uma semana de intensa multiplicação, ocorre o rompimento dos hepatócitos infectados e a liberação dos merozoítos na circulação sanguínea, sendo denominados exoeritrocíticos. Essas formas são liberadas do interior do merossoma e invadem os eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico da malária, nesta fase do ciclo, os parasitas intraeritrocíticos são sujeitos à ação de anticorpos, macrófagos e citocinas malária (GREENWOOD et al., 2008).

No decorrer da internalização do parasito ocorre a formação do vacúolo parasitóforo que envolve o parasita até o momento da ruptura do eritrócito, quando ocorre a liberação de novos merozoítos. A partir desse momento ocorre uma série de modificações morfológicas e estruturais no parasito, passando pelos estágios iniciais de trofozoíto jovem (ou anel) e trofozoíto maduro. Este originará um esquizonte multinucleado, através de um novo processo de esquizogonia, e a novos merozoítos que irão invadirão novos eritrócitos. Os merozoítos sanguíneos se diferenciam em gametócitos masculino e feminino, formas sexuadas do parasita, formas infectantes para o hospedeiro invertebrado. Estes gametócitos permanecem na circulação sanguínea até que ocorra o repasto sanguíneo por uma fêmea de anofelino e a ingestão destas formas malária (Figura 04; GREENWOOD et al., 2008).

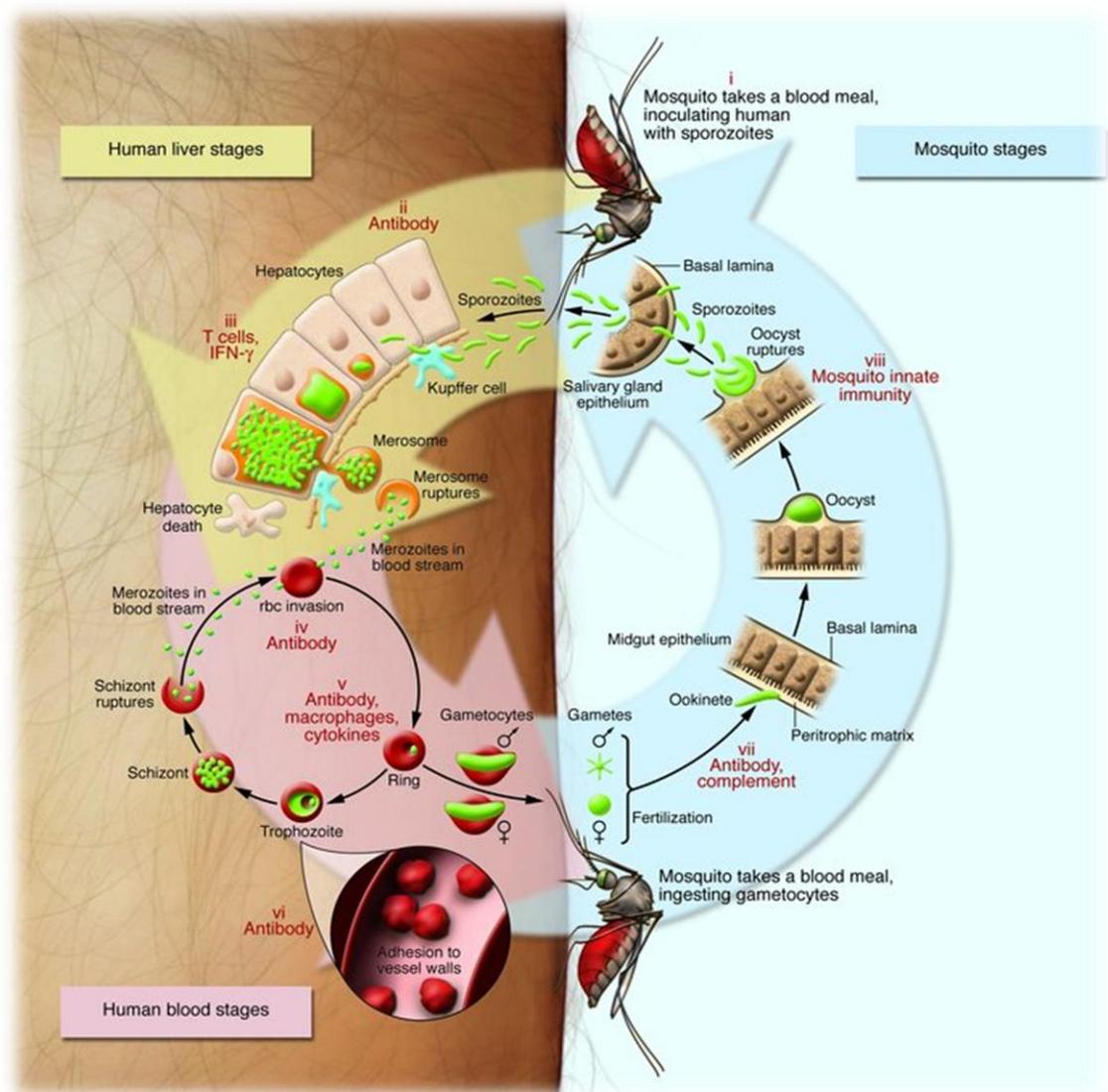


Figura 04 – Principais etapas do ciclo biológico de protozoários *Plasmodium* sp.
 Fonte: GREENWOOD et al., 2008

No interior do mosquito ocorre a fertilização e os gametócitos originam novas formas de desenvolvimento do parasito, chamadas de oocineto, oocisto e os esporozoítos. No momento que a fêmea do mosquito *Anopheles*, contendo milhares de esporozoítos infectantes, em suas glândulas salivares, realiza o repasto sanguíneo, inocula os esporozoítos na pele de um novo hospedeiro vertebrado, iniciando um novo ciclo da malária (Figura 04; GREENWOOD et al., 2008).

As manifestações clínicas da doença ocorrem durante o ciclo eritrocitário assexuado do parasita. Devido a destruição dos eritrócitos e liberação dos parasitas, juntamente, com seus metabolitos, acarretando em uma resposta do organismo do hospedeiro (NEVES et al., 2004). Assim, manifestações clínicas como febre alta

intermitente, que pode atingir 39 – 40 °C e durar de 3 a 4 horas, além de mal-estar geral, com náuseas, sudação profunda, mialgia e artralgia, anemia, icterícia, inchaço no fígado e no baço são recorrentes. Na forma grave da doença pode ocorrer malária cerebral, anemia grave, dificuldades respiratórias, insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada, acidose láctica e hipoglicemia (FRANÇA et al., 2008; ROSAS, 2003).

2.2.1 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA

A quimioterapia antimalárica é o principal fator para a redução da morbidade e mortalidade desta doença. A escolha do tratamento adequado de um paciente com malária deve ser precedida de informações sobre a gravidade da doença, espécie do *Plasmodium*, idade do paciente, histórico de exposição anterior à infecção e a suscetibilidade dos parasitas aos antimaláricos convencionais. Atualmente, ainda não foi estabelecido tratamento único efetivo igualmente contra ambas as espécies de *Plasmodium* prevalentes no Brasil (*P. vivax* e *P. falciparum*). Para cada espécie, vem sendo utilizado um medicamento ou associações de medicamentos específicos, em dosagens adequadas à situação de cada paciente (PIMENTEL et al., 2007).

Entre os principais fármacos antimaláricos, destacam-se quinina, cloroquina, primaquina, mefloquina e artemisinina e seus derivados (Figura 05). A quinina foi isolada em 1820 de cascas da *Chichona officinalis* (Rubiaceae), planta nativa da América do Sul, e é ativa contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax* (MÜLLER & HYDE, 2010). O alcaloide quinina continuou sendo usada como principal tratamento da malária até a década de 1920, quando se tornaram disponíveis fármacos sintéticos entre os estão a primaquina, descoberta durante a segunda guerra mundial, e a cloroquina, sintetizada em 1934, por químicos alemães e passou a ser amplamente usada a partir de 1946. Após alguns anos, outra quinolina antimalárica desenvolvida por pesquisadores norte-americanos surgiu no mercado, a primaquina. Atualmente a quinina é usada no tratamento de malária não complicada, ou seja, infecções que não apresentam complicações em diversos órgãos, como insuficiência renal aguda, malária cerebral, entre outros sinais e sintomas clínicos (KFFURI, 2014; MELÉNDEZ-GÓMEZ & KOUZNETSOV, 2005; BRUNTON et al., 2012; MÜLLER & HYDE, 2010).

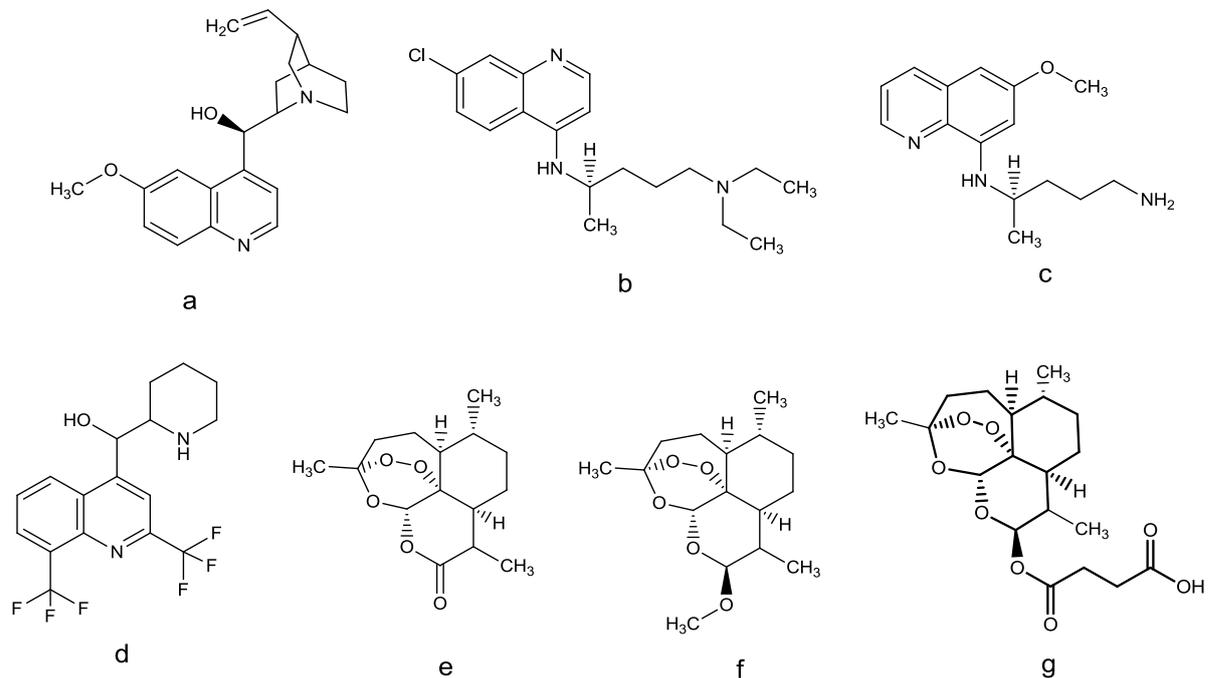


Figura 05 – Estruturas químicas dos principais fármacos antimaláricos.

Legenda: a - quinina; b – cloroquina; c – primaquina; d – mefloquina; e – artemisinina; f – artemeter; g – artesunato.

Fonte: Ferreira, 2015; Rang & Dale, 2012.

A cloroquina foi amplamente utilizada na quimioterapia antimalárica por ser de baixo custo e altamente eficiente contra as formas sanguíneas de várias espécies de *Plasmodium*, humanos e não humanos. No entanto, seu uso durante décadas, como monoterapia, no tratamento e na profilaxia da malária, selecionou mutantes resistentes ao fármaco, tanto em *P. falciparum* quanto em *P. vivax*, esse último em menor escala (VENANZI & LÓPEZ-VÉLEZ, 2016; BURGESS et al., 2010). A partir da década de 1960 começaram a surgir relatos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (KFFURI, 2014). Neste sentido, a cloroquina, possui mecanismo de ação como esquizonticida, induzindo a destruição ou inibição das formas assexuadas de plasmódios nos eritrócitos, sendo utilizada para tratar a forma aguda da doença. A primaquina, outro derivado de quinolina, sintetizada em 1946, é ativa contra gametócitos de todas as espécies de malária humana e contra hipnozoítos do *P. vivax*. Já a mefloquina, também quinolina-derivado, é um potente esquizonticida sanguíneo, de ação prolongada contra o *P. falciparum* cloroquina resistente (BRUNTON et al., 2012; RANG & DALE, 2012).

Outro antimalárico importante é a artemisinina (Figura 05. e), uma lactona sesquiterpênica contendo um grupo endoperóxido, isolada de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), uma planta nativa medicinal na China. Da artemisinina foram obtidos derivados semissintéticos, como artéter, arteméter, artesunato e di-hidroartemisinina, sendo o arteméter e o artesunato utilizados atualmente na terapia combinada baseada em artemisinina – ACT, do inglês Artemisinin-based Combination Therapy (WHO, 2019; BRASIL, 2020). A utilização crescente da artemisinina no tratamento da malária deu-se a partir da década de 90 do século XX, passando a ser a primeira linha terapêutica frente à malária não complicada. Neste sentido, recentemente a pesquisadora Youyou Tu, responsável pelo projeto chinês que levou ao desenvolvimento da artemisinina, recebeu o Nobel de Medicina, em reconhecimento pela importância mundial deste fitofármaco no tratamento da malária (GESSNER, 2015; LIU & LIU, 2016). A artemisinina e os seus derivados mais recentes (artesunato, artemeter, artemotil, di-hidroartemisinina) produzem uma rápida resolução da parasitemia, causando uma redução no número de parasitas no sangue maior do que qualquer outro antimalárico conhecido. Por possuir um curto tempo de meia-vida e um rápido início de ação as artemisininas devem ser sempre combinadas, no tratamento da malária, com um fármaco de longa semi-vida que remova os parasitas restantes, tal como mefloquina, lumefantrina, amodiaquina (VILAÇA, 2010). A artemisinina e derivados são esquizontocidas sanguíneos potentes e de ação rápida, provocando a eliminação do parasito e melhora dos sintomas em menos tempo que a cloroquina ou a quinina (FERREIRA, 2015). Por outro lado, as falhas na terapêutica da malária são devidas a diversos fatores (ASHLEY et al., 2018). Entre estes, destaca-se a difícil adesão do paciente ao tratamento, visto que os esquemas de tratamento da malária são complexos e, geralmente, consistem em dois ou mais medicamentos, além de possuir eventos adversos como pruridos, náuseas, vômitos, dores abdominais e cólicas. Outro fator é o baixo índice terapêutico dos antimaláricos e algumas interações medicamentosas, que em alguns casos restringem a aplicação, comprometendo a eficácia do tratamento. Adicionalmente, falhas técnicas e operacionais na execução de campanhas de combate à doença, aliadas à redução de recursos financeiros governamentais destinados as campanhas e ao tratamento, à resistência do vetor aos inseticidas utilizados, à resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos e às condições socioeconômicas das populações atingidas, agravam as dificuldades para

a erradicação da doença no mundo (FERREIRA et al., 2014; MEDA, 2017; GOMES et al., 2018). Contudo, a resistência do *Plasmodium* aos fármacos antimaláricos é o maior problema no controle da malária. *P. falciparum*, a espécie mais virulenta, desenvolveu resistência à cloroquina há mais de 50 anos. Atualmente, a resistência desta espécie se estende a muitos fármacos, incluindo a sulfadoxina associada à pirimetamina, atovaquona associada ao proguanil, à mefloquina e à artemisinina, determinando o aparecimento de locais no qual a multirresistência a fármacos é predominante (VENANZI & LOPÉZ-VÉLEZ, 2016, WHO, 2019). O desenvolvimento de multirresistência aos antimaláricos determina a urgência de novas terapêuticas para a malária, buscando controlar a propagação da doença.

Neste contexto, dado a origem de vários medicamentos antimaláricos e a necessidade de novas agentes terapêuticos, a busca de produtos naturais com ação antiplasmódica e/ou antimalárica se apresenta de forma destacada no âmbito de PD&I (Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação), devido a sua diversidade estrutural e química e as suas propriedades farmacológicas (RODRIGUES, 2018; SILVA, 2014). Neste sentido, o fracionamento bioguiado e a utilização de técnicas analíticas, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometrias no UV (CLUE-DAD) e de massas (CLUE-DAD-ESI-EM), constitui uma estratégia útil upara a identificação de substâncias bioativas.

2.3 Desrepliação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Dispositivo de Diodos e Espectrometria de Massas - CLUE-DAD-ESI-EM

Extratos de plantas possuem composição química bastante complexa, contendo diversas classes de metabólitos secundários. Portanto, técnicas analíticas que permitam a identificação da composição química são ferramentas úteis para o estudo da composição fitoquímica das plantas. Entre os métodos mais usuais estão a cromatografia líquida e a espectrometria de massas (ERNST et al., 2014). A cromatografia líquida é uma ótima técnica de separação e análises qualitativas de amostras e o acoplamento desta técnica ao espectrômetro de massas originou uma potente ferramenta para análises qualitativas e quantitativas, a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLUE-ESI-EM) (LANÇAS, 2009). A CLUE-ESI-EM permite a identificação substâncias presentes em misturas complexas, com as vantagens de

simplicidade no preparo das amostras, rapidez na obtenção dos resultados, além de uma alta seletividade e sensibilidade (RODRIGUES et al., 2006; SOUZA, 2008; SPRENGER, 2011; GAUDÊNCIO & PEREIRA, 2015).

A espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI) tem sido bastante utilizada nas mais diversas áreas das ciências, com aplicações que variam desde uma simples determinação do peso molecular ou quantificação até a determinação estrutural de uma substância (CROTTI et al., 2006; GOBBO-NETO, 2007; ROCHA, 2017).

Utilizando um procedimento conhecido como desreplicação é possível identificar compostos presentes em uma mistura complexa, como um extrato, simplificando-se o processo analítico por meio do uso de técnicas analíticas acopladas a espectrometrias no UV e de massas (CLUE-DAD-ESI-EM). Esta técnica vem sendo utilizada nos estudos de produtos naturais como uma ferramenta de triagem molecular, permitindo identificar moléculas bioativas, sem a necessidade de isolamento (SOUZA et al., 2011; FELÍCIO et al., 2012; PILON, 2015).

Neste contexto, o grupo de pesquisa liderado pela professora Alaíde Braga de Oliveira vem trabalhando, com sucesso, nesta linha de desreplicação de extratos/frações bioativos frente ao *P. falciparum*. Estudos realizados pelo grupo já levaram à identificação de flavonoides, alcaloides, terpenos e acetogeninas de extratos e frações de diferentes espécies também avaliadas quanto à atividade antiplasmódica em ensaios *in vitro* (NASCIMENTO et al., 2018; GONTIJO et al., 2019a; GONTIJO et al., 2019b). Desta maneira, foi observada a atividade antiplasmódica do extrato etanólico das folhas de *Psychotria suterella*, oriunda do bioma Mata Atlântica, Parque Estadual Serra do Brigadeiro, no sudeste de Minas Gerais, no qual foram identificados por CLUE-ESI-EM (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas) 7 diferentes alcaloides indólicos monoterpênicos ainda não avaliados quanto à atividade antiplasmódica/antimalárica (GONTIJO et al., 2019; GONTIJO, 2016). Este fato torna de interesse a investigação de espécies dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria* como potenciais fontes de alcaloides antimaláricos.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e farmacognóstico de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi e avaliar a atividade antiplasmódica de extratos e frações em cepa de *Plasmodium falciparum* (W2), resistente a cloroquina.

3.2. Objetivos específicos

- Coletar e identificar taxonomicamente a espécie vegetal;
- Separar caules e folhas, secar e pulverizar o material vegetal;
- Caracterizar farmacognosticamente o material vegetal pulverizado dos caules e das folhas;
- Realizar prospecção fitoquímica dos extratos;
- Comparar a eficiência dos solventes etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos dos caules e folhas da planta na atividade antiplasmódica;
- Obter frações enriquecidas em alcaloides por extrações ácido-base;
- Efetuar a desreplicação por CLUE–DAD e CLUE–DAD-ESI-EM/EM de extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de *P. hoffmannseggiana*;
- Avaliar a atividade antiplasmódica de extratos e frações de *P. hoffmannseggiana* por testes *in vitro* em cultivos de *Plasmodium falciparum* (W2), resistente a cloroquina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais e vidrarias

Balão de fundo redondo (250 mL, 500 mL e 1000 mL);
Bastão de vidro;
Béquer de vidro (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL e 1000 mL);
Cadinho de porcelana;
Cuba cromatográfica;
Dessecador de vidro;
Enlermeyer (100 mL, 125 mL, 250 mL e 500 mL);
Tubos Eppendorf de 2 mL (Sigma Chemical Company);
Espátulas de metal;
Fita de pH (Macherey-Nagel –MN);
Filtro de seringa de teflon hidrofóbico (0,22 µm);
Frascos vials para CLUE (Analítica);
Funil de Buchner;
Funil de decantação (125 mL, 250 mL, 500 mL e 1000 mL);
Funil de vidro;
Papel alumínio comercial;
Papel de filtro;
Pesa-filtro;
Pipeta graduada (1 mL, 5 mL e 10 mL);
Pipeta Pasteur;
Placas cromatográficas de vidro (10 x 5);
Placas com 96 poços;
Ponteiras (10 a 1000 µL e 20 a 200 µL);
Proveta (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL e 1000 mL);
Seringa de 1mL (SR);
Seringa de 3mL (Embramac);
Tubo tipo capilar;
Tubo Falcon (15, 50 mL)

4.2 Equipamentos

Autoclave (Phoenix);
Capela de exaustão (Quimis);
Centrífuga (Quimis);
Balança analítica, modelo AB204 (Mettler Toledo);
Balança de alta precisão (Denver Instrument);
Balança semi-analítica (Núcleo);
Banho ultrassom (Unique);
Bomba a vácuo V700 (Buchi);
Câmara de ultravioleta de 254 e 365 nm (Warning);
Concentrador rotatório – Centrivap Concentrator e Centrivap cold trap (Labconco);

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência acoplado a Dispositivo de Diodos – UPLC-DAD, com injetor automático, detector 2996 Photodiode Array Detector – PDA (Waters);
Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a dispositivo de Diodos - Ionização por spray de eletrons e acoplado à espectrometria de massas (Waters)
Evaporador rotativo – Rotavapor R-114 (Büchi), com banho Maria modelo 480;
Estufa com ventilação de ar forçado (Fanem);
Moinho de facas, modelo MA048 (Marconi);
Lâmpada de ultravioleta (Boitton);
Leitora de microplaca, modelo 2100 (ELISA Stat Fax®)
Liofilizador, modelo L101 (Liotop);
Recirculador de água com controle de temperatura (Servylab);
Sistema de purificação de água Milipore (Milli-Q plus)
Geladeira (Cônsul);
Freezer – 80 °C (LioBras);
Destilador de água;
Geladeira (Consul);
Micropipeta, volume ajustável de 10 – 1000 µL (Ependorff);
Micropipeta, volume ajustável de 20 – 200 µL (Ependorff);
Estufa (Biomatic).

4.3 Solventes e reagentes químicos

4.3.1 SOLVENTES GRAU PA

Acetato de etila (CRQ);
Álcool etílico 96 °GL (Santa Cruz);
Álcool metílico (Neon);
Álcool *n*-butílico (Vetec);
Clorofórmio (Neon);
Hexano P.A. (Neon);
Diclorometano (CRQ);
Tolueno (Vetec);
Éter dietílico (Vetec).

4.3.2 SOLVENTES GRAU HPLC

Acetonitrila – HPLC (LS Chemicals);
Álcool metílico – HPLC (Lichrosolv).

4.3.3 REAGENTES QUÍMICOS

Ácido clorídrico P.A. A.C.S. (Alphatec);
Anisaldeído (Merk);
Ácido Acético Glacial 99,8% P.A (Neon);

Ácido sulfúrico (Isofar);
Hidróxido de amônio (FMaia);
Sulfato de sódio anidro (Merck; Dinâmica);
Cloreto de alumínio (Dinâmica);
Ferricianeto de potássio (Synth);
Cloreto férrico (Synth);
Hidróxido de potássio (Dinâmica);
Subnitrato de bismuto (Synth);
Iodeto de potássio (Synth);
Anidrido acético (Dinâmica);
Ácido 3,4-dinitrobenzoico (Vertec);
Hidróxido de sódio (Synth);
Dimetil-sulfóxido - DMSO (Aldrich).

4.4 Fases estacionárias

Coluna cromatográfica de fase reversa Acquity UPLC, BEH C18, 1,7 μm , 2,1 mm X 100 mm (Waters);
Coluna cromatográfica de fase reversa, Acquity UPLC, BEH C18, 1,7 μm , 2,1 mm x 50 mm, (Waters);
Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada (CCD) (Machery Nagel – MN);
Placas cromatográficas de alumínio contendo sílica gel 60 (Merck).

4.5 Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)

- Anisaldeído sulfúrico (Saponinas)

Misturou-se 0,5 mL de anilsadeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico, seguindo esta ordem. O reagente foi guardado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

- Cloreto de alumínio a 2% (Heterosídeos Flavônicos e Geninas Flavônicas)

Dissoveu-se 1 g de cloreto de alumínio em 50 mL de metanol. O reagente foi guardado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

- Ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2% (Polifenóis e taninos)

Solubilizou-se 0,25g de ferricianeto de potássio em 25 mL de água destilada, obtendo-se a solução A. A solução B foi obtida solubilizando-se 1 g de cloreto férrico em 25 mL de água destilada. As duas soluções foram borrifadas na CCD no momento da revelação. O reagente foi mantido em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

- Hidróxido de potássio a 5% (Heterosídeos Antracênicos, Geninas Antracênicas, Naftoquinônicas e cumarinas)

Solubilizou-se 0,5 g de hidróxido de potássio em 50 mL de metanol. O reagente foi guardado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

- Reagente de Dragendorff (Alcalóides)

Misturou-se 0,850 g de subnitrato de bismuto, 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água destilada, obtendo-se a solução A. A solução B foi preparada solubilizando 8,0 g de iodeto de potássio em 20 mL de água destilada. As soluções A e B foram combinadas na proporção 1:1, obtendo-se a solução estoque. O reagente foi guardado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração. No momento da pulverização do reagente na placa cromatográfica, diluiu-se 2 mL da solução estoque com 4 mL de ácido acético glacial e 20 mL de água destilada (WAGNER et al., 1984).

- Reagente de Liebermann – Burchard (Triterpenos e Esteróides)

5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado são, cuidadosamente, adicionados a 50 mL de etanol absoluto, mantidos em banho de gelo. O reagente deve ser recentemente preparado e conservado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração. Após pulverização do reagente, a placa deve ser aquecida a 100° C por 5 - 10 min e depois observada ao UV 365nm (WAGNER et al., 1984).

- Reagente de Kedde (Heterosídeos Cardiotônicos)

Misturou-se 0,5 g de ácido 3,4-dinitrobenzoico em 25 mL de metanol, obtendo a solução A e misturou-se 2 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 25 mL de água destilada, em banho de gelo, obtendo-se a solução B. No momento da aplicação nas placas cromatográficas as soluções foram combinadas na proporção 1:1. O reagente foi guardado em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

4.6 Cultivo do *Plasmodium falciparum* (W2)

4.6.1 MEIO DE CULTIVO

4.6.1.1 Preparo do meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

O meio incompleto ou solução estoque foi preparado solubilizando 50 mg de hipoxantina em 400 mL de água destilada, em aquecimento a 40 °C. Após solubilização completa, adicionou-se, em temperatura ambiente e agitação constante, 40 mg de gentamicina, 300 mg de glutamina, 2 g de bicarbonato de sódio, 2 g de D-glicose (dextrose), 5,98 g do tampão HEPES e 10,4 g do RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina). Em seguida, completou-se o volume até 1000 mL com água deionizada, ajustou-se o pH para 7 e filtrou-se, no fluxo laminar, em sistema de filtração a vácuo, utilizando membrana de 0,22 ou 0,44 µm. O meio RPMI incompleto foi estocado sob refrigeração a 4 °C.

4.6.1.2 Preparo do meio completo

O meio completo utilizado no cultivo do parasita foi preparado suplementando o meio RPMI estoque com 10% de plasma humano inativado. Para o descongelamento do parasita o meio incompleto foi suplementado com 20% de plasma.

4.6.2 REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

4.6.2.1 Reagente MALSTAT

O reagente foi preparado solubilizando-se 400 mL de Triton X-100; 4 g de L-lactato de sódio; 1,32 g de Tris e 22 mg de 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD) em 200 mL de água destilada. Os reagentes foram adquiridos de Sigma-Aldrich Inc.

4.6.2.2 Reagente NBT/PES

O reagente foi preparado solubilizando-se 160 mg de Nitro Blue Tetrazolium Salt (NBT) e 8 mg de etosulfato de fenazina (PES) em água destilada. Os reagentes foram adquiridos de Sigma-Aldrich Inc.

4.7 Coleta do material vegetal de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi

O material vegetal foi coletado durante o período da manhã, na praia do Crispim, no município de Marapanim, no estado do Pará, nas coordenadas S 0° 35' 35.23" W 47° 39' 28.92", em área de vegetação de restinga marinha. Foram realizadas duas coletas no mesmo local, no período da manhã, em diferentes dias, a primeira coleta foi realizada no dia 14 de abril de 2018 e a segunda no dia 16 de maio de 2019. A coleta foi realizada pelo técnico em botânica Luiz Carlos Batista Lobato, da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, e para a identificação taxonômica contou-se, também, com a colaboração do Prof. Dr. Luciano Ferreira Margalho, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará- IFPA, Ananindeua PA. A identificação da espécie foi realizada por comparação com a exsicata mostrada na Figura 06, a qual se encontra depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, com o número de registro MG 226057, referente à espécie *Psychotria hoffmannseggiana* (Schult.) Mull. Arg., sinonímia de *Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi, que é o nome mais recentemente aceito (GARGOMINY, 2020)

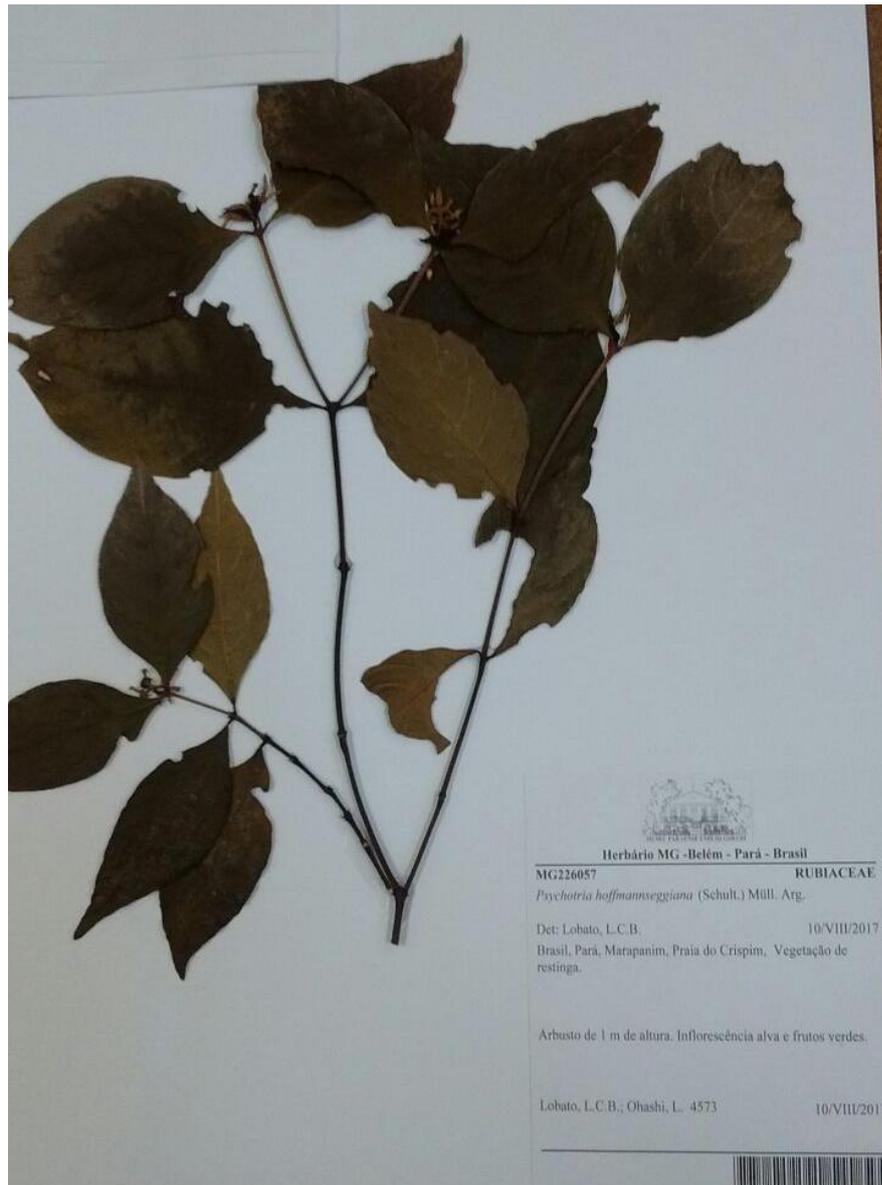


Figura 06 - Exsicata de *Psychotria hoffmannseggiana* (Schult.) Mull. Arg. depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, número de registro MG 226057.

4.8 Métodos

4.8.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Após coleta e identificação, o material vegetal da primeira coleta foi lavado com água corrente, para a remoção de algumas impurezas, posteriormente, foram separados os caules das folhas que foram secos em estufa com ventilação de ar forçado e, estes foram triturados em moinho de facas, obtendo-se o pó das folhas e o pó do caule de *P. hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi. Este mesmo procedimento foi realizado com o material vegetal da segunda coleta.

4.8.2 TESTES FARMACOGNÓSTICOS

Após pulverização, o material vegetal dos caules e das Folhas, da primeira coleta, foram utilizados na realização dos testes farmacognósticos. Foram efetuados a determinação da granulometria dos pulverizados da planta, a determinação do pH, a perda por dessecação, o teor de cinzas e o índice de espuma.

4.8.2.1 Determinação da granulometria dos pulverizados da planta

As determinações da granulometria dos pulverizados dos caules e das folhas da primeira coleta, foram realizadas, separadamente, de acordo com a metodologia da Farmacopeia Brasileira (5ª edição), com modificações. A granulometria foi determinada em referência a abertura nominal da malha do tamis utilizado. Os tamises de diferentes aberturas foram colocados em um dispositivo mecânico, o qual realiza movimentos horizontais e verticais de forma uniforme. Neste aparelho foram colocados 6 tamises de aberturas nominais de malha de 125 µm, 180 µm, 355 µm, 710 µm e 1,7 mm, com o tamis de maior abertura sobre o de menor abertura e o coletor abaixo. Pesou-se 5 g do material vegetal e transferiu-se para o tamis superior, distribuindo de maneira uniforme, tampou-se o conjunto e acionou-se o dispositivo por 15 minutos, com vibração adequada. Após o término deste período foi removida a amostra retida em cada malha e pesou-se. O cálculo do percentual retido em cada tamis foi realizado com a seguinte equação:

$$\% \text{ retirada pelo tamis} = \frac{P1}{P2} \times 100$$

Onde:

P1 = Peso da amostra retirada em cada tamis (em gramas)

P2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas)

100 = Fator de porcentagem

Após o cálculo da porcentagem retirada pelo tamis o material foi classificado como pó grosso, pó moderadamente grosso, pó semifino, pó fino e pó finíssimo, de acordo com a farmacopeia brasileira (5^a edição).

4.8.2.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi também realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5^a edição), com modificações. Pesou-se 3 g do material vegetal dos caules e das folhas da primeira coleta, separadamente, e adicionou-se água destilada, até obtenção de uma solução a 1%, que foi aquecida em chapa elétrica por 5 minutos. Após este período a solução foi filtrada em algodão e levada ao potenciômetro, previamente calibrado. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados obtidos pela média das aferições.

4.8.2.3 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação tem como objetivo determinar a quantidade de substância volátil, como a água, presente na amostra, avaliando assim o teor de umidade. A metodologia utilizada para esta determinação foi segundo a Farmacopeia Brasileira (5^a edição). Pesou-se 2 g do material vegetal dos caules e das folhas da primeira coleta, separadamente, e transferiu-se para um pesa-filtro, previamente dessecado, em seguida, levou-se à estufa à 100 °C por 5 horas. Após este período o pesa-filtro contendo a amostra foi resfriado em dessecador, pesado novamente e calculada a diferença entre os pesos iniciais e finais. Cada procedimento foi realizado em triplicata.

4.8.2.4 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação de cinzas totais for realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5^a edição). Pesou-se 3 g do material vegetal pulverizado de caules e de folhas da primeira coleta e transferiu-se, separadamente, para um cadinho, previamente tarado. Espalhou-se a amostra no cadinho e incinerou-se, em forno mufla, com aumento gradativo de temperatura, até alcançar no máximo 600 ± 25 °C. Resfriou-se o cadinho em dessecador, pesou-se e calculou-se a porcentagem de

cinzas em relação à droga seca ao ar. O teste foi realizado em triplicata e o resultado foi obtido pela média.

4.8.2.5 Determinação do índice de espuma

A determinação do índice de espuma foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5ª edição). Neste teste 1 g do material vegetal, da primeira coleta, de caules e de folhas foram transferidos, separadamente, para um erlenmeyer com 50 mL de água destilada fervente que foi mantido a fervura moderada durante 30 minutos. Após este período a solução foi resfriada, filtrada e transferida para um balão volumétrico, onde se completou o volume até 100 mL. Este decocto foi distribuído de maneira seriada (10 mL; 9 mL; 8 mL até 1mL) em 10 tubos de ensaio com tampas e os volumes ajustados para 10 mL com água. Os tubos foram tampados e agitados por 15 segundos, seguindo-se e repouso por 15 minutos, após este período a altura da espuma foi medida e o cálculo do índice de espuma foi feito com a seguinte equação: $1000/A$, onde o A consiste no volume do decocto usado no preparo da diluição no tubo onde a altura da espuma alcançou 1 cm.

4.8.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *PALICOUREA HOFFMANNSEGGIANA* (SCHULT.) BÖRHIDI

Inicialmente, foram obtidos quatro extratos diferentes dos caules e das folhas. Uma extração foi realizada com álcool etílico comercial 96°GL (92,8 INPM), duas extrações foram obtidas com solução hidroetanólica, nas proporções 7:3 e 1:1, e uma extração foi realizada com água destilada (Figura 07).

4.8.3.1 Obtenção dos extratos etanólicos de folhas e caules de *Palicourea hoffmannseggiana* - Maceração

Os extratos etanólicos de folhas e caules da primeira coleta foram obtidos por maceração descontínua, a frio, utilizando-se álcool etílico comercial 96°GL (92,8 INPM) da marca Santa Cruz® como líquido extrator. Assim, 200 g de pó das folhas e 500 g de pó dos caules foram colocados em contato com o líquido extrator por 24 h, sendo o solvente coletado após este período. Este processo foi repetido durante 6

dias consecutivos, utilizando-se, ao total, aproximadamente, 10 L de etanol. O solvente foi removido, sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato etanólico das folhas (EEFPH) e o extrato etanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana* (EECPH) (Figura 07).

4.8.3.2 Obtenção dos extratos hidroetanólicos de folhas e caules de *Palicourea hoffmannseggiana* - Sonicação

A obtenção dos extratos hidroetanólicos de folhas e caules da primeira coleta foi realizada com duas proporções de etanol-água: 7:3 e 1:1. Em cada caso, 10 g dos pós de folhas e caules da primeira coleta foram colocados em contato com 40 mL do líquido extrator, em recipientes distintos. Os recipientes contendo os pós de folhas e caules e o líquido extrator foram colocados no banho de ultrassom por 30 minutos e, após este período o material foi filtrado para a separação solução extrativa. Este processo foi realizado a frio e repetido 5 vezes, obtendo-se 150 mL de cada extrato. O solvente foi removido em evaporador rotativo e liofilizador, obtendo-se os extratos hidroetanólicos de folhas 7:3 (EHEF7:3); de caule 7:3 (EHEC7:3); de folhas 1:1 (EHEF1:1) e de caules 1:1 (EHEH1:1) (Figura 07).

4.8.3.3 Obtenção dos extratos aquosos de folhas e caules de *Palicourea hoffmannseggiana* - Decocção

Os extratos aquosos de folhas e caules da primeira coleta de *P. hoffmannseggiana* foram obtidos a partir de 10 g de folhas e caules, separadamente, por decocção, a quente, empregando-se, água destilada fervente. Após o esfriamento, filtrou-se a mistura para separação da solução aquosa, seguindo-se liofilização. Ao final do processo, foram obtidos o extrato aquoso das folhas de *P. hoffmannseggiana* (EAFPH) e o extrato aquoso dos caules de *P. hoffmannseggiana* (EACPH) (Figura 07).

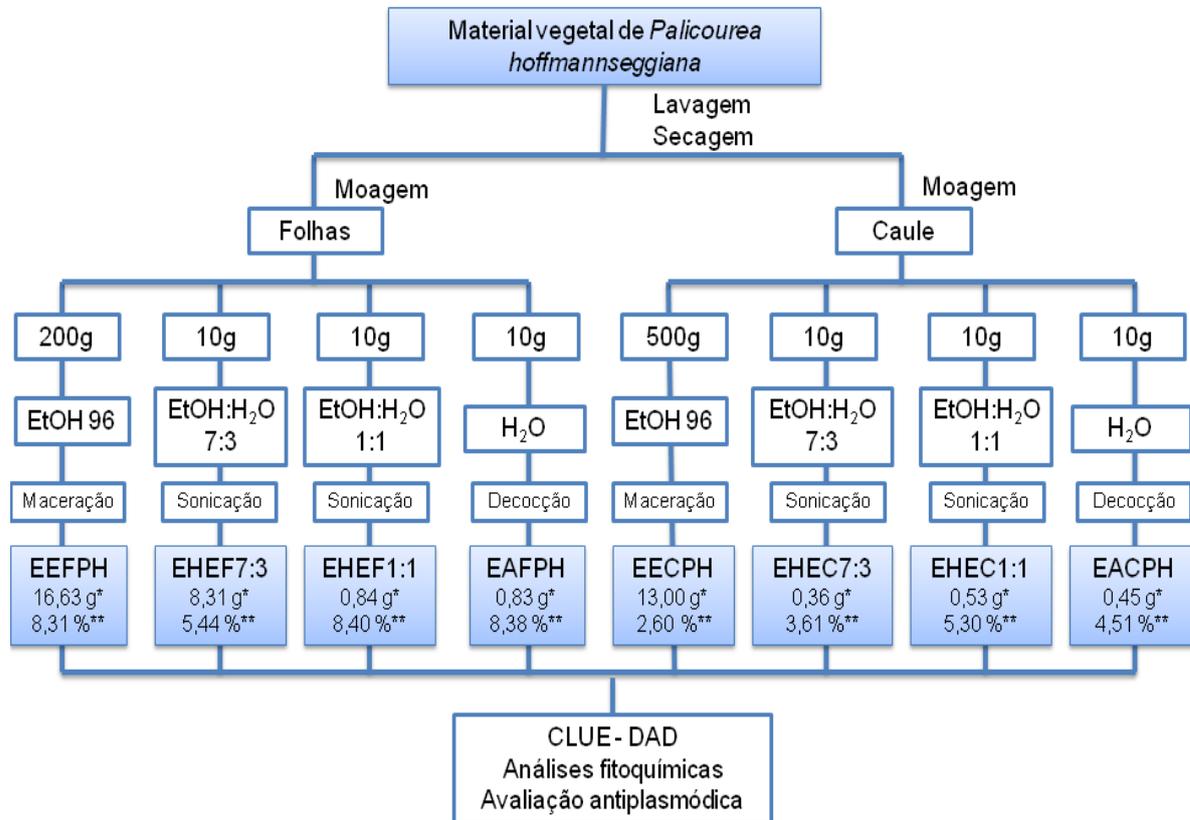


Figura 07. Fluxograma da obtenção dos extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Palicourea hoffmannseggiana*, a partir do material vegetal da 1ª coleta.

Legenda: EtOH 96 = álcool etílico 96 °GL; EtOH:H₂O 7:3 = álcool etílico: água, na proporção 7:3; EtOH:H₂O 1:1 = álcool etílico: água, na proporção 1:1; H₂O = água; EEFPH = Extrato etanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana*; EECPH = Extrato etanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana*; EHEF7:3 = Extratos hidroetanólicos de folhas 7:3; EHEC7:3 = Extratos hidroetanólicos de caule 7:3; EHEF1:1 = Extratos hidroetanólicos de folhas 1:1; EHEC1:1 = Extratos hidroetanólicos de caule 1:1; EAFPH = Extrato aquoso das folhas de *P. hoffmannseggiana*; EACPH = Extrato aquoso dos caules de *P. hoffmannseggiana*. * Quantidade de extrato obtido; ** Rendimento da extração.

4.8.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *PALICOUREA HOFFMANNSEGGIANA* (SCHULT.) BORHIDI (2ª COLETA)

Partindo-se do material vegetal da segunda coleta da planta foi obtido um extrato etanólico de folhas por maceração descontínua, utilizando-se álcool etílico comercial 96 °GL (92,8 INPM) da marca Santa Cruz® como líquido extrator. Assim, 200 g de pó das folhas foram colocados em contato com o líquido extrator por 24 h, sendo o solvente coletado após este período, repetindo este processo por 6 dias, utilizando-se, ao total, aproximadamente, 3 L de etanol comercial. O solvente foi removido em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico das folhas *P. hoffmannseggiana*, segunda coleta (EEFPH-2). Este extrato foi utilizado para a realização do fracionamento por partição líquido-líquido.

4.8.5 SEPARAÇÃO DE ALCALOIDES POR EXTRAÇÕES ÁCIDO-BASE

Visando a separação de alcaloides relatados anteriormente na espécie (PAUL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013; NAVES, 2014) foram realizadas extrações ácido-base por duas diferentes metodologias: por extração direta do material vegetal de caules e folhas com HCl 1N (método A) e a partir do extrato etanólico das folhas por extração com ácido acético aquoso (método B).

4.8.5.1 Separação de alcaloides por extração direta do material vegetal com HCl 1N - Método A (VERMA et al. 2007, com modificações)

Um total de 10 g dos pós de caules e folhas de *P. hoffmannseggiana* da primeira coleta foram, separadamente, submetidos a percolação com uma solução de HCl 1N (50 mL) sendo a solução ácida recolhida após 1 hora de maceração. Este processo foi repetido 3 vezes (3 x 50 mL), os extratos foram reunidos, seguindo-se filtração, obtendo-se a solução aquosa ácida. Inicialmente essa camada foi particionada em funil de decantação com *n*-hexano (2 x 100 mL), para a remoção de clorofila e compostos lipofílicos, obtendo-se a fração *n*-hexânica pelo método A (FrHMetA). Após esse processo, a camada aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 9 – 10 e, em seguida fez-se extração com diclorometano (2 x 100 mL). Essa camada foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄ anidro), filtrada em papel de filtro e o solvente foi removido em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, obtendo-se a fração diclorometânica de alcaloides (FrDMetA). A camada aquosa alcalina foi extraída com *n*-butanol (2 x 100 mL). A solução em *n*-butanol foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄ anidro), filtrada em papel de filtro e o solvente foi removido em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, obtendo-se a fração *n*-butanólica de alcaloides de caule (FrBMetA) (Figura 08).

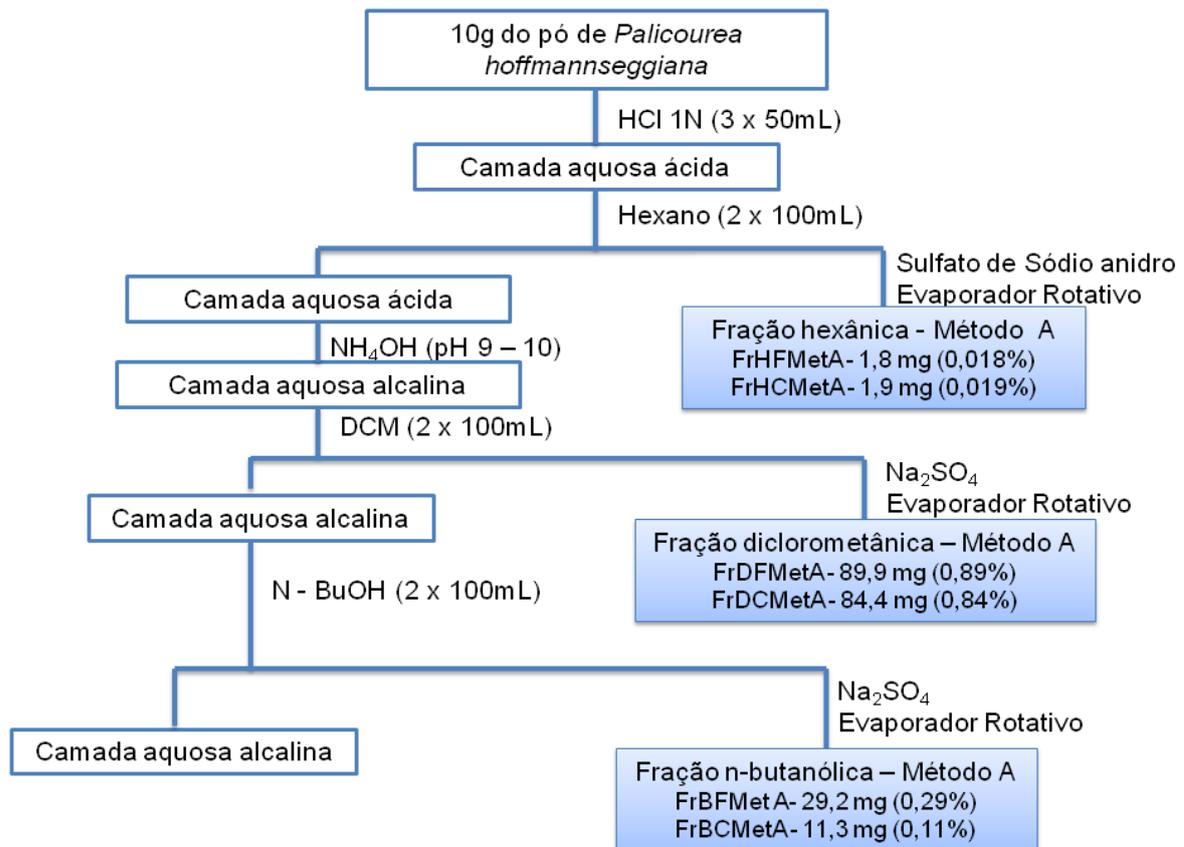


Figura 08. Fluxograma da extração de alcaloides a partir de pó de caules e folhas da primeira coleta de *Palicourea hoffmannseggiana*, com HCl 1N (Verma e colaboradores (2007)).

Legenda: FrHFMetA = Fração hexânica de folhas, obtida pelo método A; FrHCMetA = Fração hexânica do caule, obtida pelo método A; FrDFMetA = Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A a pH 9 – 10; FrDCMetA = Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10; FrBFMetA = Fração alcaloídica butanólica de folhas, obtida pelo método A a pH 9 – 10; FrBCMetA = Fração alcaloídica butanólica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10.

4.8.5.2 Separação de alcaloides a partir do extrato etanólico de folhas da primeira coleta de *Palicourea hoffmannseggiana* por extração com ácido acético diluído - Método B (NAVES, 2014, com modificações).

O extrato etanólico de folhas de *P. hoffmannseggiana* da primeira coleta (EEFPH-1) foi submetido a extrações ácido-base para separação de alcaloides. A 10 g do EEFPH-1 adicionou-se 100 mL de solução aquosa a 10 % de ácido acético (v/v) e colocou-se a mistura no banho de ultrassom por 40 minutos. A solução foi filtrada em funil de Büchner para a separação de resíduo, fornecendo uma solução aquosa ácida. Esta foi transferida para um funil de decantação e foi extraída sucessivas vezes com clorofórmio (4 x 50 mL), sendo as soluções extrativas reunidas. Esta solução clorofórmica foi tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o

solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo, obtendo-se a fração clorofórmica ácida de folhas (FrCAcMetB). A camada aquosa ácida foi neutralizada com hidróxido de amônio, até pH 7, e em seguida, extraída com clorofórmio (4 x 50mL). A fase clorofórmica foi seca sob Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo, obtendo-se a fração clorofórmica neutra de folhas (FrCNMetB). A camada aquosa neutra foi basificada com hidróxido de amônio, até o pH entre 9-10, sendo denominado camada aquosa básica, a qual foi extraída, sucessivamente, com clorofórmio (4 x 50 mL), acetato de etila (4 x 50 mL) e *n*-butanol (4 x 50 mL). As fases orgânicas foram secas sob Na₂SO₄ anidro, filtradas e os solventes orgânicos eliminados em evaporador rotativo, obtendo-se as frações clorofórmica básica de folhas (FrCMetB), fração básica de acetato de etila (FrAcOetMetB) e fração básica *n*-butanólica (FrBMetB), respectivamente.

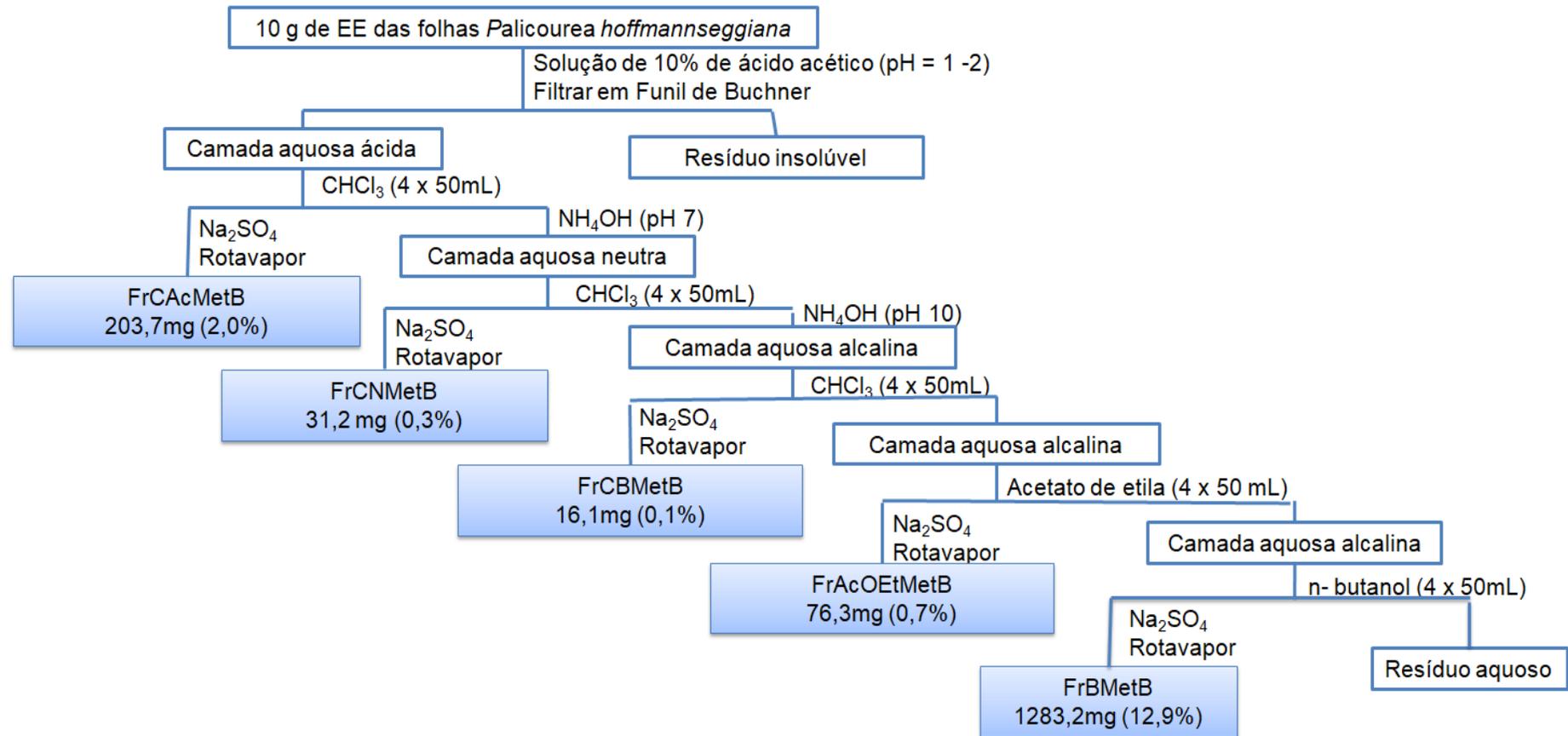


Figura 09. Fluxograma da extração de alcaloides a partir do extrato etanólico de folhas da primeira coleta de *Palicourea hoffmannseggiana*, pelo método B (Naves, 2014, com modificações).

Legenda: FrCAcMetB - Fração clorofórmica ácida de folhas, obtida pelo método B; FrCNMetB - Fração clorofórmica neutra de folhas obtida pelo método B; FrCBMetB - Fração clorofórmica básica de folhas, obtida pelo método B; FrAcOEtMetB - Fração de acetato de etila básica de folhas, obtida pelo método B; FrBMetB - Fração n-butanólica básica de folhas, obtida pelo método B.

4.8.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PALICOUREA HOFFMANNGESIANA* POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (Método C)

O extrato etanólico de folhas de *P. hoffmannseggiana* (EEFPH-2), obtido a partir do material vegetal da segunda coleta, foi submetido a partição líquido-líquido, para separação de uma fração alta polaridade e uma fração de polaridade média. Uma alíquota do EEFPH-2 (3 g) foi solubilizada em 50 mL de solução hidrometanólica (MeOH:H₂O 6:4) e, posteriormente, filtrada, para remoção de compostos insolúveis na solução, logo após esta solução foi submetida a extração com clorofórmio, obtendo-se a fração clorofórmica, obtida por partição líquido-líquido (FrCPLLF) e a fração hidrometanólica, obtida por partição líquido-líquido (FrHMPLLF).

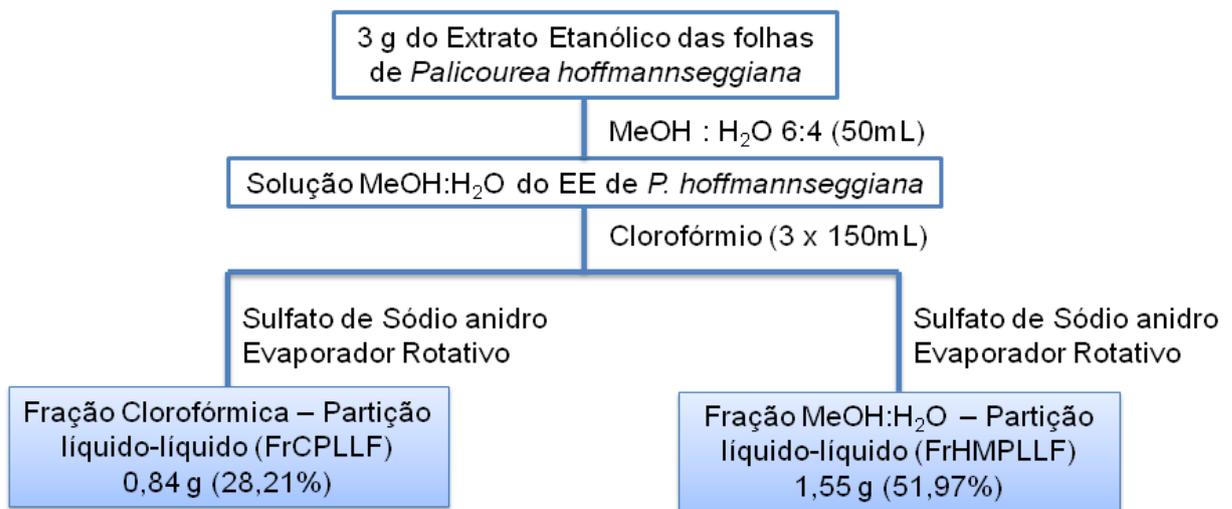


Figura 10. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico (EEFPH-2) de folhas por partição líquido-líquido.

Legenda: FrCPLLF - Fração clorofórmica, obtida por meio de partição líquido-líquido; FrHMPLLF - Fração hidrometanólica, obtida por meio de partição líquido-líquido.

4.8.7 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A prospecção fitoquímica por CCD foi realizada de acordo com a metodologia de prospecção fitoquímica da Wagner & Bladt (1996), com os extratos de *P. hoffmannseggiana*, portanto, extrato etanólico dos caules (EECPH) e das folhas

(EEFPH); extrato hidroetanólico dos caules na proporção 7:3 (EHEC7:3) e das folhas (EHEF7:3); extrato hidroetanólico dos caules na proporção 1:1 (EHEC1:1) e das folhas (EHEF1:1); extrato aquoso dos caules (EACPH) e das folhas (EAFPH). Uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi solubilizada em 1,0 mL de metanol, em tubos do tipo Eppendorf. As classes de metabólitos secundários pesquisadas nas amostras foram alcaloides, cumarinas, esteroides e triterpenos, geninas antracênicas e naftoquinônicas, geninas flavônicas, heterosídeos antracênicos, heterosídeos cardiotônicos, heterosídeos flavônicos, polifenóis, taninos e saponinas. Foram empregadas placas de sílica gel 60 G (Merck®), para cromatografia em camada delgada (CCD). As fases móveis, os reveladores e amostras de referência constam do Quadro 02.

Quadro 02. Condições utilizadas na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada - CCD

| Metabólitos | Fase móvel | Amostra de referência | Revelador | Resultados |
|---|---|------------------------------|---------------------------------------|---|
| Alcalóides | Álcool <i>n</i> -butílico: Acetona: Ácido acético: Água (35:35:10:20) | Quinina | Reagente de Dragendorff | Manchas de cor marrom ou alaranjada (vis.) |
| Cumarinas | Fase móvel: Tolueno: Éter (1:1) saturado com ácido acético | Cumarina (1,2-benzopirona) | Hidróxido de potássio a 5% em metanol | Manchas de coloração verde - azulada à luz UV ₃₆₅ e intensificação da fluorescência após revelação com hidróxido de potássio a 5%. |
| Triterpenos e Esteróides | Hexano: Acetato de etila (7:3) | β-sitosterol | Reagente de Lieberbanm-Burchard | Manchas de coloração marrom ou acinzentada no visível e fluorescência do alaranjado ao vermelho em luz UV ₃₆₅ . |
| Geninas Antracênicas e Naftoquinônicas | Tolueno: Acetona: Clorofórmio (81:11:8) | 1,8-di-hidroxi-antraquinona | Hidróxido de potássio a 5% em metanol | Manchas de cor laranja ao vermelho ou amarelo no visível e fluorescências de cor do alaranjado ao vermelho à luz UV ₃₆₅ |
| Geninas Flavônicas | Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27) | Quercetina | Cloreto de alumínio a 2% em metanol | Manchas amareladas no visível e fluorescência amarelo - esverdeada em luz UV ₃₆₅ |
| Heterosídeos Antracênicos | Acetato de etila: metanol: água (81:11:8) | Aloína | Hidróxido de potássio a 5% em metanol | Manchas de cor laranja ao vermelho no visível e fluorescências de cor do alaranjado ao vermelho no |

| | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------|---|--|
| | | | | UV ₃₆₅ ou manchas amarelas no visível e fluorescências de cor alaranjada no UV ₃₆₅ . |
| Heterosídeos Cardiotônicos | Acetato de etila: Metanol: Água (81:11:8) | Digoxina | Reativo de Kedde | Manchas de coloração rosa ou azul-violácea no visível |
| Heterosídeos Flavônicos | Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27) | Rutina | Cloreto de alumínio a 2% em metanol, com aquecimento a 100 °C por 5 minutos | Manchas de cor amarela no visível e fluorescência amarelo-esverdeada em luz UV ₃₆₅ . |
| Polifenóis e taninos | Álcool butílico normal: Ácido acético: Água (40:10:50) Fase superior | Ácido tânico | Soluções de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%. | Manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada no visível. |
| Saponinas | Clorofórmio: Ácido acético: Metanol: Água (15:8:3:4) | Fração de saponinas | Anisaldeído sulfúrico, com aquecimento a 100°C | Manchas de cor azul ou azul-violeta no visível. |

Fonte: WAGNER & BLADT, 1996.

4.8.8 PERFÍS CROMATOGRÁFICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJOS DE DIODO (CLUE-DAD) E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-ESI-EM/EM)

4.8.8.1 Preparo das Amostras

As amostras utilizadas nas análises foram os extratos e frações obtidos como descrito nos itens anteriores. Cada amostra (5 mg) foi pesada em tubo Eppendorf para as análises por UPLC-DAD e 2 mg para análises por CLUE-ESI-EM/EM, e solubilizada em 1 mL de metanol grau CLAE ou água filtrada em sistema Milli-Q. Em seguida as amostras foram submetidas a sonicação em ultrassom, a 10.000 rpm, por 20 minutos, seguindo-se centrifugação por 10 minutos e filtração em membrana de filtração de 22 µm, coletando-se apenas o sobrenadante que foi armazenando em tubos vials para as análises por CLUE-DAD-ESI-EM/EM. Em todas as etapas, foram empregados solventes grau CLAE e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q.

4.8.8.2 Parâmetros Cromatográficos para análises por CLUE-DAD

Para as análises por CLUE – DAD utilizou-se cromatógrafo Waters Acquity Ultra Performance LC, detector PDA. A coluna utilizada foi de fase reversa RP-18 LiChroCART® RP 18. A temperatura do forno da coluna manteve-se a 40 °C e a temperatura do amostrador manteve-se em 10 °C. O volume de injeção da amostra foi de 2 µL e utilizou-se uma metodologia de perfil exploratório, com tempo de varredura de 28 min., em gradiente linear de 5 a 95%, utilizando-se água deionizada (MilliQ) acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico, passando por um período isocrático e, posteriormente, voltando-se à condição inicial (Tabela 01). As leituras foram feitas em detector de UV-DAD nos comprimentos de onda de 220 – 400 nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de onda de 220, 280 e 330 nm.

Tabela 01: Condições cromatográficas utilizadas nas análises por CLUE-DAD.

| Condições cromatográficas | | | |
|---------------------------|----------------|-----------|-----------|
| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A | Eluente B |
| 0 | 0,3 | 5 | 95 |
| 23 | 0,3 | 95 | 5 |
| 25 | 0,3 | 95 | 5 |
| 28 | 0,3 | 5 | 95 |

Legenda: Eluente A = Acetonitrila grau CLAE acidificada com ácido fórmico (0,1% HCOOH); Eluente B = água ultrapura acidificada com ácido fórmico (0,1% HCOOH)

4.8.8.3 Parâmetros cromatográficos para as análises por CLUE-DAD-ESI-EM/EM

Para o registro dos perfis cromatográficos por CLUE-DAD utilizou-se cromatógrafo Waters Acquity Ultra Performance LC, detector PDA e TQ Detector. Utilizou-se coluna de fase reversa RP-18 Acquity UPLC BEH (partículas 2,1 x 50 mm, 1,7 μ m), fluxo de 0,3 mL/min e manteve-se o forno da coluna a 40 °C.

Injetou-se um volume de 4 μ L da amostra, com a eluição em gradiente utilizando água ultrapura acidificada com ácido fórmico (0,1% HCOOH) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1% HCOOH). O programa de eluição iniciou linear de 0 a 10 min (5 – 95% Acetonitrila - ACN), mantendo a seguir, um curto período de eluição isocrática de 10 a 11 min (95% ACN), com posterior retorno a condição de eluição inicial pelo período de 11 a 13 min (5% ACN) (Tabela 02).

Para a obtenção dos espectros de massas as amostras foram ionizadas por spray de elétrons, registrando-se uma varredura completa (TIC ou Full Scan) e outra sequencial ou tandem (EM/EM), nos modos positivo e negativo. O equipamento utilizado foi Waters ACQUITY® TQD, equipado com analisador quadrupolo. As análises foram realizadas com as seguintes condições de operação do aparelho: voltagem do capilar de 3,5 kV; temperatura do capilar 320 °C; temperatura de dessolvatação 320°C; gás de colisão argônio; voltagem do cone 5 kV, ionização - 4kV e do orifício do cone -60 kV. As amostras foram injetadas em um fluxo contínuo de 0,1 μ L/min. Os registros dos espectros foram feitos com energia de 30 eV na faixa de m/z 100 a 2000 Da.

Tabela 02: Condições cromatográficas utilizadas nas análises por CLUE-DAD-ESI-EM/EM.

| Condições cromatográficas | | | |
|---------------------------|----------------|-----------|-----------|
| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A | Eluente B |
| 0 | 0,3 | 5 | 95 |
| 10 | 0,3 | 95 | 5 |
| 11 | 0,3 | 95 | 5 |
| 13 | 0,3 | 5 | 95 |

Legenda: Eluente A = Acetonitrila grau CLAE acidificada com ácido fórmico (0,1% HCOOH); Eluente B = água ultrapura acidificada com ácido fórmico (0,1% HCOOH).

4.8.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO*

O cultivo de *P. falciparum* resistente à cloroquina (W2) foi realizado de acordo com a metodologia de Rieckmann e colaboradores (1978), com modificações. A cepa de *P. falciparum* (W2) foi cultivado em placas de cultivo com hematócrito a 5%, utilizando hemácias humanas, em meio RPMI completo, suplementado com tampão HEPES (25 mM), bicarbonato de sódio (21 mM), hipoxantina (300 mM), glicose (11 mM), gentamicina (40 mg/mL) e 10 % (v/v) de plasma humano inativado, ou seja, ausente de patógenos e leucócitos.

Colocou-se o cultivo em placas de Petri, acondicionadas em estufa a 37 °C, com aproximadamente 5% de CO₂. Diariamente, confeccionaram-se esfregaços e gota espessa do cultivo corados com Giemsa para avaliar as formas do parasito e o percentual da parasitemia. Quando a parasitemia estava superior a 6 % com formas trofozoítas e esquizontes, o cultivo foi sincronizado pela metodologia do sorbitol, descrita por Lambros e Vanderberg (1979). Quando a parasitemia foi superior a 10%, e estava sincronizada, realizou-se o ensaio de atividade antiplasmódica.

Neste contexto, a avaliação *in vitro* das amostras foi realizada com hemácias infectadas por *P. falciparum*, cepa resistente à cloroquina (W2), por meio da quantificação da enzima Lactato Desidrogenase do *Plasmodium falciparum* (PfLDH), de acordo com a metodologia realizada rotineiramente em nosso laboratório na Faculdade de Farmácia, UFMG (GONTIJO et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020). Os ensaios *in vitro* foram realizados pela Doutoranda do PPGCF/UFMG, Maria Fernanda Alves do Nascimento.

As culturas sincronizadas no estágio de anel, com parasitemia a 2% e hematócrito de 1%, foram distribuídas em microplacas de 96 poços, no volume de 180 µL em cada poço, e adicionou-se 20 µL das amostras, nas concentrações de 50 e

100 µg/mL. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo). O antimalárico padrão utilizado foi a cloroquina. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C, por 48 h, com amostras e controles. Após o período de incubação as microplacas foram congeladas (-20 °C) por no mínimo 24 h, para promover a lise das hemácias.

Em outra placa de 96 poços adicionou-se 100 µL/poço do reagente Malstat, além de 25 µL/poço da solução NBT/PES. Enfim, transferiu-se 15 µL do conteúdo de cada poço da placa teste para esta segunda placa que foi incubada por 1 h, a 37 °C, ao abrigo da luz. A leitura foi feita em espectrofotômetro Stat Fax®, no comprimento de onda de 540 nm. Considerou-se a média de produção da enzima *Pf*LDH dos controles positivos como 100% de viabilidade e 0% de viabilidade a média dos controles negativos. Partindo desses valores, calculou-se a viabilidade dos parasitos.

A avaliação da viabilidade do *P. falciparum* na presença das amostras teste foi demonstrada pelo percentual de redução ou inibição (% Red) do crescimento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) na presença de diferentes amostras. Calculado através da seguinte equação:

$$\% \text{ Red} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostras})}{100} \times 100$$

4.9 Análises estatísticas

Os resultados da % de redução do crescimento de *P. falciparum* foram expressos como média ± desvio padrão das determinações em triplicata. A atividade antiplasmódica foi determinada para duas concentrações (100 e 50 µg/mL) dos diferentes extratos e frações e os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot 12.5 com α = 0,05 (SYSTAT, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação do material vegetal e extrações

Após lavagem, secagem e moagem do material vegetal da primeira coleta, obteve-se 1,67 kg de pó dos caules e 711,42 g do pó das folhas. Destes, foram utilizados 500 g do pó dos caules e 200 g do pó das folhas para o preparo dos extratos etanólicos; 10 g de pó de cada parte da planta foram empregados para a obtenção dos extratos hidroetanólicos na proporção 7:3; 10 g para a obtenção dos extratos hidroetanólicos na proporção 1:1; e 10 g de cada para obtenção dos extratos aquosos. Dos extratos etanólicos das folhas e dos caules (Figura 07) foram obtidos 13,00 g e 16,63 g, respectivamente, com rendimentos de 8,31% das folhas e 2,60% dos caules (Tabela 03). Portanto, obteve-se um maior rendimento do extrato das folhas, este fato pode ser justificado devido à concentração de clorofila ser maior nas folhas.

A partir de folhas da segunda coleta, após lavagem, secagem e moagem, foram obtidos 250 g de material vegetal pulverizado, dos quais 200 g foram utilizados para a obtenção do extrato etanólico por maceração. Este processo resultou em 6,26 g de extrato etanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana* – 2ª coleta (EEFPH-2), com um rendimento de 3,13%.

A preparação dos extratos hidroetanólicos (Figura 07) na proporção de 7:3 forneceu 0,54 g do extrato das folhas e 0,36 g do extrato dos caules. Já dos extratos hidroetanólicos na proporção de 1:1 foram obtidos 0,84 g do extrato das folhas e 0,45 g do extrato dos caules. Para os extratos aquosos foram obtidos 0,83 g de extrato de folhas e 0,45 g dos caules (Tabela 03). Em síntese, os extratos obtidos das folhas foram os que apresentaram um maior rendimento com todos os diferentes solventes em comparação aos rendimentos dos extratos dos caules.

O emprego de diferentes métodos de extração fornece extratos com diferenças significativas na sua constituição em termos de metabólitos secundários (SILVEIRA et al., 2008). A percolação com solventes polares, como metanol ou etanol, à temperatura ambiente, é o método mais utilizado para o preparo dos extratos, pois evita a formação de artefatos produzidos pela interação do solvente com os metabólitos quando se empregam altas temperaturas (MACIEL et al., 2002).

Estudos realizados por Trabulsi Filho e colaboradores (2013) demonstraram que os processos de maceração e percolação produzem resultados mais expressivos, destes o processo de percolação se destaca, mostrando melhor rendimento, devido a dinâmica com a difusão do líquido extrator ser mais acentuada neste processo.

Os rendimentos das extrações variaram de acordo com a solução extratora utilizada, obtendo-se um maior rendimento com a solução hidroetanólica 1:1. Na literatura, muitos autores recomendam a utilização deste sistema de solventes para a extração, visto que se assemelha às tinturas utilizadas em fitoterapia (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Os teores de alguns metabólitos secundários nos extratos podem resultar das interferências do líquido extrator com os metabólitos, visto que Trabulsi Filho e colaboradores (2013) demonstraram que a quantidade de alcaloides, compostos fenólicos, taninos hidrolizáveis, esteroides, flavonóis, catequinas e flavonas podem sofrer esta influência.

Diferentes rendimentos foram obtidos pelas extrações de alcaloides (Figuras 08 e 09, pág. 50 e 52, respectivamente) com diferentes solventes extratores (Tabelas 04 e 05, pág. 63 e 64). Nas extrações ácido-base, as frações *n*-butanólicas apresentaram um maior rendimento em comparação às outras frações obtidas. Este resultado deve-se à alta polaridade do *n*-butanol que é capaz de extrair substâncias não extraídas pelos outros solventes e substâncias de polaridades mais altas, como alguns alcaloides e iridoides, classes de metabólitos secundários presentes no gênero, principalmente derivados glicosilados (SILVA, 2007; CALIXTO et al., 2016). Moraes (2013) isolou o alcaloide bahienosida A, que é um glicosídeo, da fração *n*-butanólica de *Psychotria* sp. Além disso, Naves (2014) obteve um rendimento de 25% da fração *n*-butanólica e desta isolou um alcaloide indólico monoterpênico, o ácido strictosidínico, também um glicosídeo.

Tabela 03. Rendimentos dos extratos etanólicos, hidroetanólicos e aquosos de folhas e caules de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta do material vegetal.

| Extratos | Folhas | | | Caules | | |
|-------------------------------|--|------------------------------------|----------------|--|------------------------------------|----------------|
| | Quantidade de material vegetal utilizada (g) | Quantidade de extratos obtidos (g) | Rendimento (%) | Quantidade de material vegetal utilizada (g) | Quantidade de extratos obtidos (g) | Rendimento (%) |
| Extrato etanólico | 200 | 16,63 | 8,31 | 500 | 13,00 | 2,60 |
| Extrato hidroetanólico 7:3 | 10 | 0,54 | 5,44 | 10 | 0,36 | 3,61 |
| Extrato hidroetanólico 1:1 | 10 | 0,84 | 8,40 | 10 | 0,53 | 5,30 |
| Extrato aquoso | 10 | 0,83 | 8,38 | 10 | 0,45 | 4,51 |
| Extrato etanólico – 2° coleta | 200 | 6,26 | 3,13 | - | - | - |

Tabela 04. Rendimentos das extrações de alcalóides de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta do material vegetal pelo método A (Figura 08).

| Método A - Pó da planta | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|
| Amostras | Caules | | Folhas | |
| | Quantidade de extratos obtidos (mg) | Rendimento (%) | Quantidade de extratos obtidos (mg) | Rendimento (%) |
| F. <i>n</i> -Hexano | 1,9 | 0,01 | 1,8 | 0,01 |
| F. Dcm. (pH10) | 84,4 | 0,84 | 89,9 | 0,89 |
| F. <i>n</i> -BuOH | 11,3 | 0,11 | 29,2 | 0,29 |

Legenda: F. *n*-Hexano = Fração hexânica; F. Dcm = Fração diclorometânica; *n*-BuOH = Fração *n*-butanólica.

Tabela 05. Rendimentos das extrações de alcalóides a partir do extrato etanólico de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta pelo método B (Figura 09).

| Método B - Extrato etanólico das folhas | | |
|--|---|-----------------------|
| Amostras | Quantidade de frações obtidas (mg) | Rendimento (%) |
| F. CHCl ₃ Ácido | 203,7 | 2,03 |
| F. CHCl ₃ Neutro | 31,2 | 0,31 |
| F. CHCl ₃ Básico | 16,1 | 0,16 |
| F. AcOEt | 76,3 | 0,76 |
| F. <i>n</i> -BuOH | 1241,8 | 12,98 |

Legenda: F. CHCl₃ = Fração clorofórmica; F. AcOEt = Fração de acetato de etila; F. *n*-BuOH = Fração *n*-butanólica.

Partindo-se de 3 g do extrato etanólico das folhas – 2° coleta (EEFPH-2) foi realizada a partição líquido-líquido, obtendo-se duas frações, a fração clorofórmica e a fração MeOH:H₂O (6:4). As quantidades e os rendimentos de cada fração desta extração encontram-se na Tabela 06.

Tabela 06. Rendimentos das frações obtidas na partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da segunda coleta.

| Amostras | Quantidade de frações obtidas (mg) | Rendimento (%) |
|--------------------------------|---|-----------------------|
| F. CHCl ₃ | 846,5 | 28,21 |
| F. MeOH:H ₂ O (6:4) | 1559,3 | 51,97 |

Legenda: F. CHCl₃ = Fração clorofórmica; F. MeOH:H₂O = Fração metanol:água.

A extração líquido-líquido é um método de separação amplamente utilizado em laboratórios, devido à sua simplicidade e baixo custo. Por meio deste método é possível separar substâncias de diferentes polaridades, utilizando-se dois solventes imiscíveis, onde a separação destas substâncias ocorre por diferentes afinidades ao líquido extrator (SHAH et al., 2016; TSHEPELEVITSH et al., 2017). Este processo é amplamente utilizado na pesquisa fitoquímica, sendo utilizados métodos similares, modificados ou baseados no método de Kupchan, o qual consiste em uma partição do extrato etanólico com diferentes solventes (KUPCHAN et al., 1980; NABAVI et al., 2020). Os rendimentos das diferentes frações obtidas neste processo, no presente

caso, mostraram uma predominância de compostos com maior afinidade pela fase hidrometanólica (MeOH:H₂O), mais polar do que a fase clorofórmica (Tabela 06).

5.2. Análises farmacognósticas

As análises farmacognósticas foram realizadas com o material vegetal obtido da primeira coleta. A análise granulométrica demonstrou que $55 \pm 0,2\%$ do material vegetal pulverizado dos caules ficaram retidos no tamis de malha de 355 μm , sendo classificado, segundo a farmacopeia brasileira (5^a Edição), como pó moderadamente grosso e $50,8 \pm 0,8\%$ do material das folhas ficaram retidos na malha de 710 μm , sendo classificado como pó grosso (Tabela 07). A determinação da granulometria do pó refere-se ao tamanho das partículas do material vegetal que se está trabalhando e interfere diretamente na eficiência do processo extrativo (SIMÕES et al., 2007).

As plantas são constituídas por diversas partes, com estruturas histológicas bastante heterogêneas, a exemplo têm-se as raízes e caules com tecidos bem compactados, além das folhas e flores com tecidos mais delicados. Visto que a penetração dos solventes depende da consistência do tecido do material vegetal, portanto, deve-se considerar que a granulometria deve ser menor quando utilizar materiais mais rígidos (SIMÕES et al., 2007). Os caules são tecidos compactados, portanto, a granulometria moderadamente grossa, provavelmente, interferiu na extração e conseqüentemente no rendimento dos extratos dos caules, que se demonstrou inferior aos rendimentos dos extratos obtidos a partir das folhas.

Tabela 07. Resultados das análises granulométricas do pó de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta.

| Malha dos tamis | Resultados (%) * | |
|-------------------|------------------|----------------|
| | Caule | Folha |
| 1,70 mm | $0,2 \pm 0,2$ | $7,5 \pm 2,5$ |
| 710 μm | $14,1 \pm 0,1$ | $50,8 \pm 0,8$ |
| 355 μm | $55 \pm 0,2$ | $25,6 \pm 1$ |
| 250 μm | $13,6 \pm 0,4$ | $6,7 \pm 0,1$ |
| 180 μm | $8,2 \pm 1$ | $4,4 \pm 0,2$ |
| 125 μm | $4,2 \pm 0,2$ | $3,1 \pm 1,1$ |
| Coletor | $4,7 \pm 1,3$ | $1,9 \pm 0,9$ |

*Média da retenção do pó (%) \pm Desvio padrão

Na aferição do pH do material vegetal, foram determinados pH de $6,8 \pm 0,00$ para os caules e de $6,64 \pm 0,01$ para as folhas, demonstrando-se uma semelhança no pH e o caráter neutro de ambas as amostras. Os resultados sugerem predominância de metabólitos de caráter neutro tanto nas folhas como nos caules desta espécie.

Outro parâmetro avaliado foi a perda por dessecação, pelo qual se determina o teor de umidade da amostra. Os resultados, $9,91 \pm 0,08$ para os caules e $14,75 \pm 0,10$ para as folhas (Tabela 08), encontram-se dentro dos parâmetros exigidos, de 8 - 14% pela farmacopeia brasileira (5ª edição), para a umidade. Vale ressaltar que a determinação do teor de umidade do pó é um parâmetro importante para a conservação e armazenamento da amostra, visto que a umidade favorece o crescimento de fungos, leveduras e bactérias, além de interferir na estabilidade química da amostra, por favorecer a hidrólise de substâncias (PAULA & PETROVICK, 1997; SIMOES et al., 2007).

O teor de cinzas totais também foi um parâmetro farmacognóstico avaliado, sendo que nos caules foi de $2,5 \pm 0,2$ e nas folhas foi de $5,8 \pm 0,1$ (Tabela 08). Estes resultados encontram-se dentro do limite aceitável pela farmacopeia brasileira (5ª edição), que é de até 14% de cinzas totais. Este parâmetro é importante para o controle de qualidade da amostra, visto que avalia a quantidade de material inorgânico presente no material vegetal, seja presente intrinsecamente na amostra, sejam substâncias aderentes de forma extrínseca à amostra (BRAGA et al., 2007; SIMÕES et al., 2007; SOBOTA et al., 2016). O resultado dentro do limite sugere a ausência de adulterantes na amostra (BRASIL, 2010). Assim como a granulometria, o teor de cinzas pode interferir no rendimento dos extratos, notando-se um maior teor de cinzas no material vegetal das folhas, o qual apresentou maior rendimento nas obtenções dos extratos.

Outro estudo realizado no material vegetal foi a determinação do índice de espuma, para verificar a presença de saponinas nas amostras trabalhadas. Os resultados mostraram-se positivo para a presença desta classe de metabólitos secundários (Tabela 08). Os caules apresentaram um índice de espuma maior que a amostras das folhas, apresentando de altura de espuma acima de 1 cm no tubo contendo a diluição de 2 mL de decocto da amostra em 8 mL de água destilada, enquanto as folhas apresentaram espuma acima de 1 cm no tubo contendo 4 mL do decocto diluído em 6 mL de água destilada. Saponinas podem ser usadas como

adjuvante para um aumento da absorção de medicamentos, devido o aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção (CASTEJAN, 2011). Entretanto, alguns compostos desta classe são capazes de levar a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue, por desorganizar as membranas destas células e alterar a sua permeabilidade (SCHENKEL et al., 2001; ALVARES, 2006).

Tabela 08. Dados farmacognósticos dos pós de cascas e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta.

| Parâmetros | Resultados * | |
|---------------------|-------------------------|--------------|
| | Caules | Folhas |
| Granulometria | Pó moderadamente grosso | Pó grosso |
| pH | 6,8 ± 0,00 | 6,64 ± 0,01 |
| Umidade (%) | 9,91 ± 0,08 | 14,75 ± 0,10 |
| Teor de cinzas (%) | 2,5 ± 0,2 | 5,8 ± 0,1 |
| Índice de espuma ** | 500 | 250 |

* Média ± Desvio padrão

** O índice de espuma é um número inteiro, sem unidade

5.3 Prospecção fitoquímica por CCD

Os resultados da prospecção fitoquímica realizada com o extrato etanólico obtido do material vegetal da primeira coleta podem ser observado, em síntese, no Quadro 03 e as placas cromatográficas são mostradas nas Figuras 11 a 14.

Nas Figuras 11 a 14 as CCDs 1 para alcaloides, reveladas com o reagente de Dragendorff, a coloração da amostra de referência (quinina) aparece nitidamente em todas elas. No entanto, uma coloração fraca aparece somente para o extrato etanólico dos caules de *Palicourea hoffmannseggiana* (EECPH – Figura 11. CCD 1 - A), enquanto que nas CCDs 2, sob luz UV, de todas estas figuras, tanto para a quinina, como para as amostras em análise, observam-se manchas com fluorescência azul turquesa, caracterizando, possivelmente, a presença de alcaloides, cumarinas ou derivados de ácidos cinâmicos. A não observação de coloração com o reativo de Dragendorff pode ser explicada pelo baixo teor de alcaloides nos extratos e à menor sensibilidade do teste químico em relação à fluorescência na luz UV. A presença de alcalóides era prevista uma vez que ocorrem em espécies do gênero *Palicourea*, sendo a classe de metabólito mais estudada no gênero (CALIXTO et al., 2016; MORAES, 2013). Um estudo anterior de *Psychotria hoffmannseggiana* realizado por Naves (2014) relatou o isolamento de cinco

alcaloides desta espécie, destes, três são indólicos, um é polindólico e um indólico monoterpênico (Figura 02), também foi isolada uma cumarina (Figura 03. b). Além disso, Oliveira e colaboradores (2013) isolaram desta espécie os alcaloides harmano (Figura 02. a) e o ácido strictosidinico (Figura 02. b), enquanto PAUL e colaboradores (2003) isolaram os alcaloides 5 α -carboxistrictosidina (Figura 02. f), (*E*)/(*Z*)-vallesiachotamina (Figura 02. g), Angustina (Figura 02. h), bahienosida A (Figura 02. i) e B (Figura 02. j), strictosamida (Figura 02. k).

Uma coloração azul turquesa é observada nas CCDs 3 das Figuras 11 (A- extrato etanólico dos caules) e 13 (A- extrato hidroetanólico (1:1) dos caules), à luz UV, para uma cumarina mais polar do que a amostra de referência. Nas demais figuras (12 e 13 – CCD 3) as manchas apresentam uma fraca coloração azulada, tanto nas amostras quanto no padrão de cumarina. Diversas cumarinas já foram isoladas do gênero. Da espécie em estudo, *P. hoffmannseggiana*, Naves (2014) obteve a isoescopoletina do extrato etanólico das folhas. Moreno e colaboradores (2014) detectaram escopoletina em *P. vellosiana* e Benevides e colaboradores (2004) isolaram duas cumarinas, psoraleno e umbeliferona, de *P. spectabilis*.

Manchas de cor rósea, e outras acinzentadas, em CCDs reveladas com reagente de Lieberbanm-Burchard, correspondem a esteroides e triterpenos, respectivamente, e são observadas apenas nas CCDs 4 A e B Figura 11, sendo que na CCD 5 à luz UV, manchas amareladas com bordas azuis correspondem a esteroides, como se pode deduzir a partir da mancha da amostra de referência, β -sitosterol/C. Do extrato hexânico de *P. viridis* foram isolados e caracterizados três esteroides, 24-metilenocicloartenol, β -sitosterol e estigmasterol, e um triterpeno, o esqualeno (SOARES, 2015). No presente estudo pode-se observar nos testes fitoquímicos por CCD (Figuras 11 a 14) uma ausência de esteroides e triterpenos com o aumento da polaridade da solução extratora.

Geninas antracênicas e naftoquinônicas estão ausentes na CCD 6, à luz UV, visto que há uma ausência de manchas de cor alaranjada ao vermelho à luz UV₃₆₅ nas CCDs (Figuras 11 a 14, CCD 6. A e B), enquanto observam-se colorações alaranjada a vermelho em todas as figuras na amostra de referência (CCD 6 – C; 1,8-di-hidroxi-antraquinona). Apesar da ausência nas amostras estudadas, sob a nomenclatura de *Psychotria rubra*, sinonímia de *Palicourea hoffmannseggiana*, Hayashi e colaboradores (1987) isolaram e identificada uma naftoquinona, a psychorubrina.

Manchas de geninas flavônicas não foram observadas na CCD 7 (revelada com cloreto de alumínio) e na CCD 8 (à luz UV), nas quais a amostra de referência (quercetina) apresenta manchas amarelas, as manchas com fluorescência azul devem ser devidas a cumarinas ou alcaloides. Não há dúvida quanto à ausência de heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos, como se vê nas CCDs 9, 10, enquanto que mancha nítida é observada para a amostra de referência, a aloína.

Heterosídeos cardiotônicos estão ausentes em todos os extratos (Figura 11 a 14 – CCD 11), uma vez que não se observam manchas de coloração rósea nestas CCDs reveladas com o reativo de Kedde, sendo que o padrão digoxina apresenta mancha rósea (CCD 11 – C). A presença de flavonóis e flavonas em extratos etanólicos de folhas e caules de *Psychotria hoffmannseggiana*, foi relatada por Mendonça e colaboradores (2015) na prospecção fitoquímica pelo método de precipitação ou mudança de coloração. Sob a nomenclatura de *P. rubra*, sinonímia da *P. hoffmannseggiana*, foram obtidos os heterosídeos flavônicos, 6-hidroxi-luteolina-7-O-rutinosídeo e luteolina-7-O-rutinosídeo (LU et al., 2014). De *P. serpens* já foram isolados e identificados os flavonoides rutina, quercetina e kaemferol (LIN et al., 2015).

Em todas as CCDs reveladas com solução de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2% foram observadas manchas azuladas referentes a polifenóis e taninos (CCD 13), nas amostras (CCD 11. A e B) e também na amostra de referência (ácido tânico). Entretanto, algumas placas mostraram uma fraca coloração (Figura 11 e 12. CCD 13), que pode ser explicada pelo baixo teor destes metabólitos. Mendonça e colaboradores (2015) realizaram uma prospecção fitoquímica pelo método de precipitação ou mudança de coloração, dos extratos etanólicos brutos dos caules e folhas de *P. hoffmannseggiana* e relataram a presença de fenóis e taninos.

Manchas de coloração azul-violácea foram observadas para o extrato etanólico dos caules (Figura 11. CCD14 – A), extratos hidroetanólicos (7:3) de folhas e caules (Figura 12. CCD14 – A e B), extrato hidroetanólicos (1:1) dos caules (Figura 13. CCD14 – A) e extratos aquosos de caules e folhas (Figura 14. CCD14 – A e B), no visível, quando reveladas com anisaldeído. Zhang e colaboradores (2013) isolaram e identificaram 8 saponinas triterpênicas, em uma espécie não identificada de *Psychotria* sp., os psychotrianosídeos A-G e o ardisianosídeo D.

Quadro 03. Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos de cascas e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta por cromatografia em camada delgada (CCD).

| Metabólitos | Resultados | | | | | | | |
|---|------------|-------|---------|---------|---------|----------|-------|-------|
| | EECPH | EEFPH | EHEC7:3 | EHEF7:3 | EHEC1:1 | EHEF71:1 | EACPH | EAFPH |
| Alcaloides | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cumarinas | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Esteroides e triterpenos | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Geninas antracênicas e naftoquinônicas | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Geninas flavônicas | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Heterosídeos cardiotônicos | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Heterosídeos flavônicos | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Polifenóis e taninos | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Saponinas | + | + | + | + | + | + | + | + |

Legenda: EECPH = Extrato etanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana*; EEFPH = Extrato etanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana*; EHEC7:3 = Extrato hidroetanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana* na proporção 7:3; EHEF7:3 = Extrato hidroetanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana* na proporção 7:3; EHEC1:1 = Extrato hidroetanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana* na proporção 1:1; EHEF1:1 = Extrato hidroetanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana* na proporção 1:1; EACPH = Extrato aquoso dos caules de *P. hoffmannseggiana*; EAFPH = Extrato aquoso dos caules de *P. hoffmannseggiana*. * Fraca coloração pelo Reagente de Dragendorff.

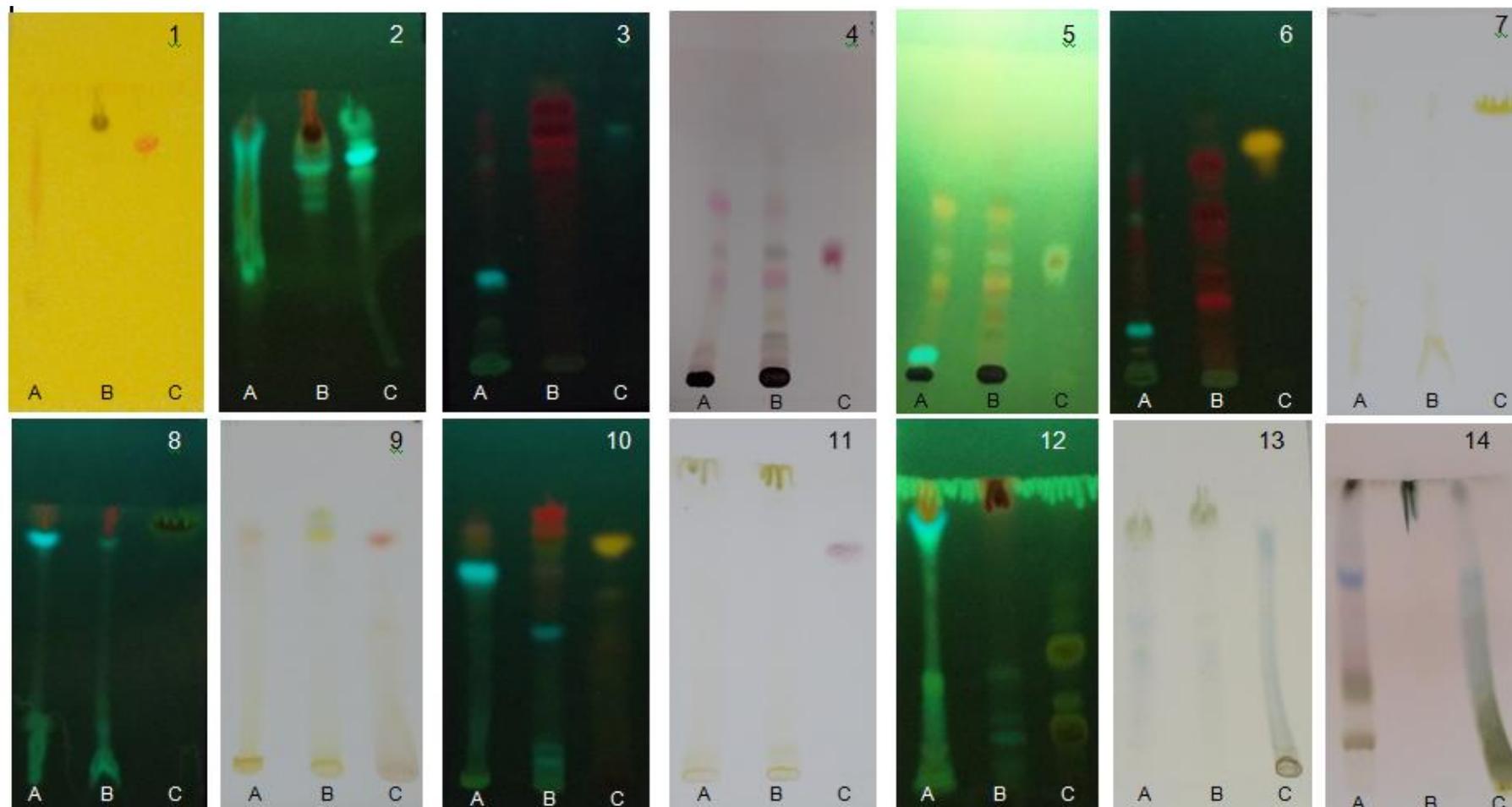


Figura 11. Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de caules e folha de *Palicourea hoffmannseggiana*.

Legenda: CCDs 1, 2 – Alcaloides; CCD 3 – Cumarinas; CCDs 4, 5 – Esteroides e triterpenos; CCD 6 – Geninas antracênicas e naftoquinônicas; CCDs 7, 8 – Geninas flavônicas; CCDs 9, 10 – Heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos; CCD 11 – Heterosídeos cardiotônicos; CCD 12 – Heterosídeos flavônicos; CCD 13 – Polifenóis e taninos; 14 – Saponinas; A – Extrato Etanólico dos Caules de *P. hoffmannseggiana* (EECPH); B – Extrato Etanólico das Folhas de *P. hoffmannseggiana* (EEFPH); Amostras de referência 1C/2C – Quinina; 3C – Cumarina; 4C/5C – β -sitosterol; 6C – 1,8-Dihidroiantraquinona; 7C/8C – Quercetina; 9C/10C – Aloína; 11C – Digoxina; 12C – Rutina; 13C – Ácido tânico; 14C – Fração de saponinas.

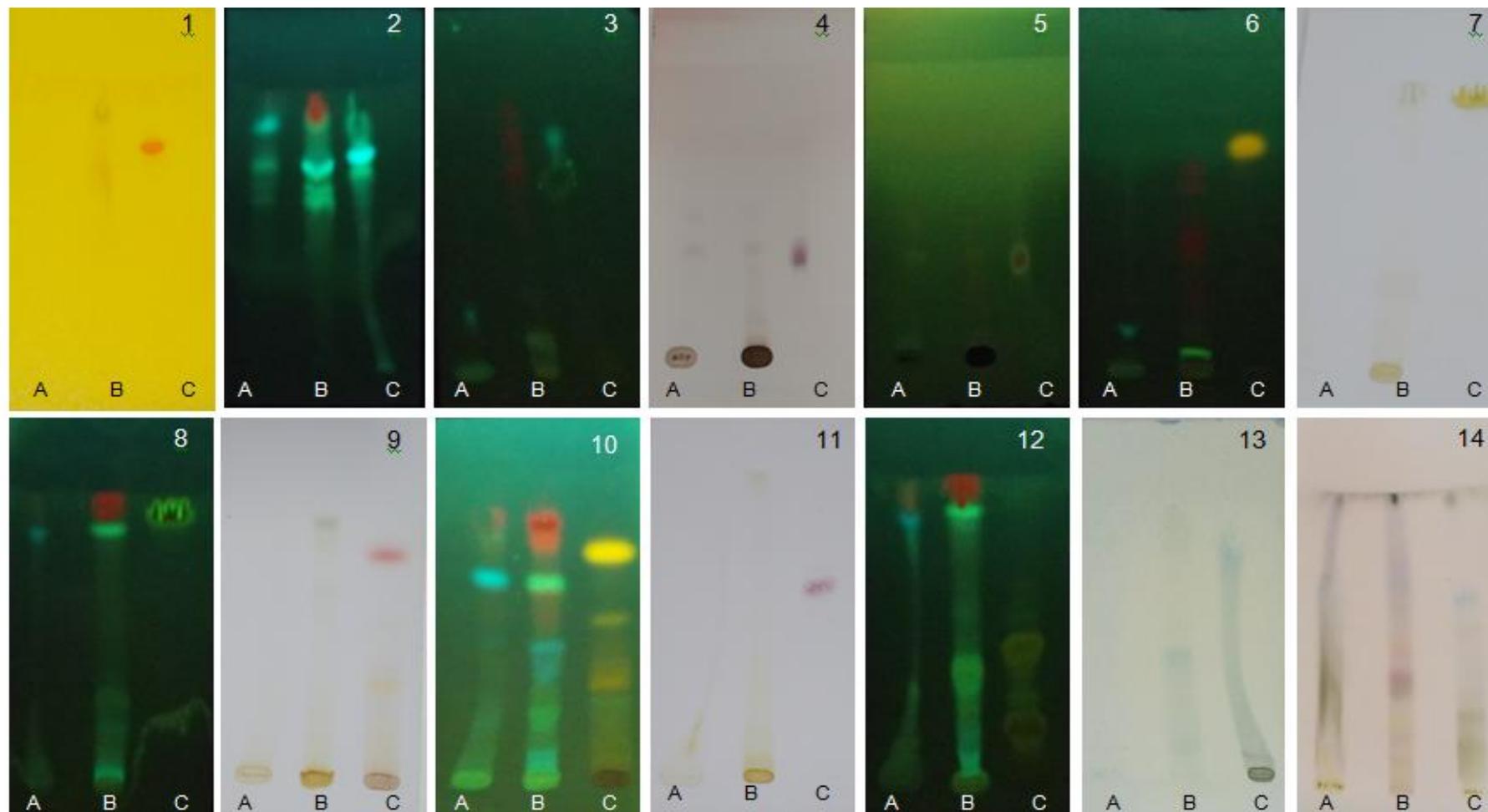


Figura 12. Prospecção fitoquímica dos extratos hidroetanólicos (7:3) de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*.

Legenda: CCDs 1, 2 – Alcaloides; CCD 3 – Cumarinas; CCDs 4, 5 – Esteroides e triterpenos; CCD 6 – Geninas antracênicas e naftoquinônicas; CCDs 7, 8 – Geninas flavônicas; CCDs 9, 10 – Heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos; CCD 11 – Heterosídeos cardiotônicos; CCD 12 – Heterosídeos flavônicos; CCD 13 – Polifenóis e taninos; 14 – Saponinas; A – Extrato Hidroetanólico (7:3) dos Caules de *P. hoffmannseggiana* (EHEC7:3); B – Extrato Hidroetanólico (7:3) das Folhas de *P. hoffmannseggiana* (EHEF7:3); Amostras de referência 1C/2C – Quinina; 3C – Cumarina; 4C/5C – β -sitosterol; 6C – 1,8-Dihidroxi-antraquinona; 7C/8C – Quercetina; 9C/10C – Aloína; 11C – Digoxina; 12C – Rutina; 13C – Ácido tânico; 14C – Fração de saponinas.

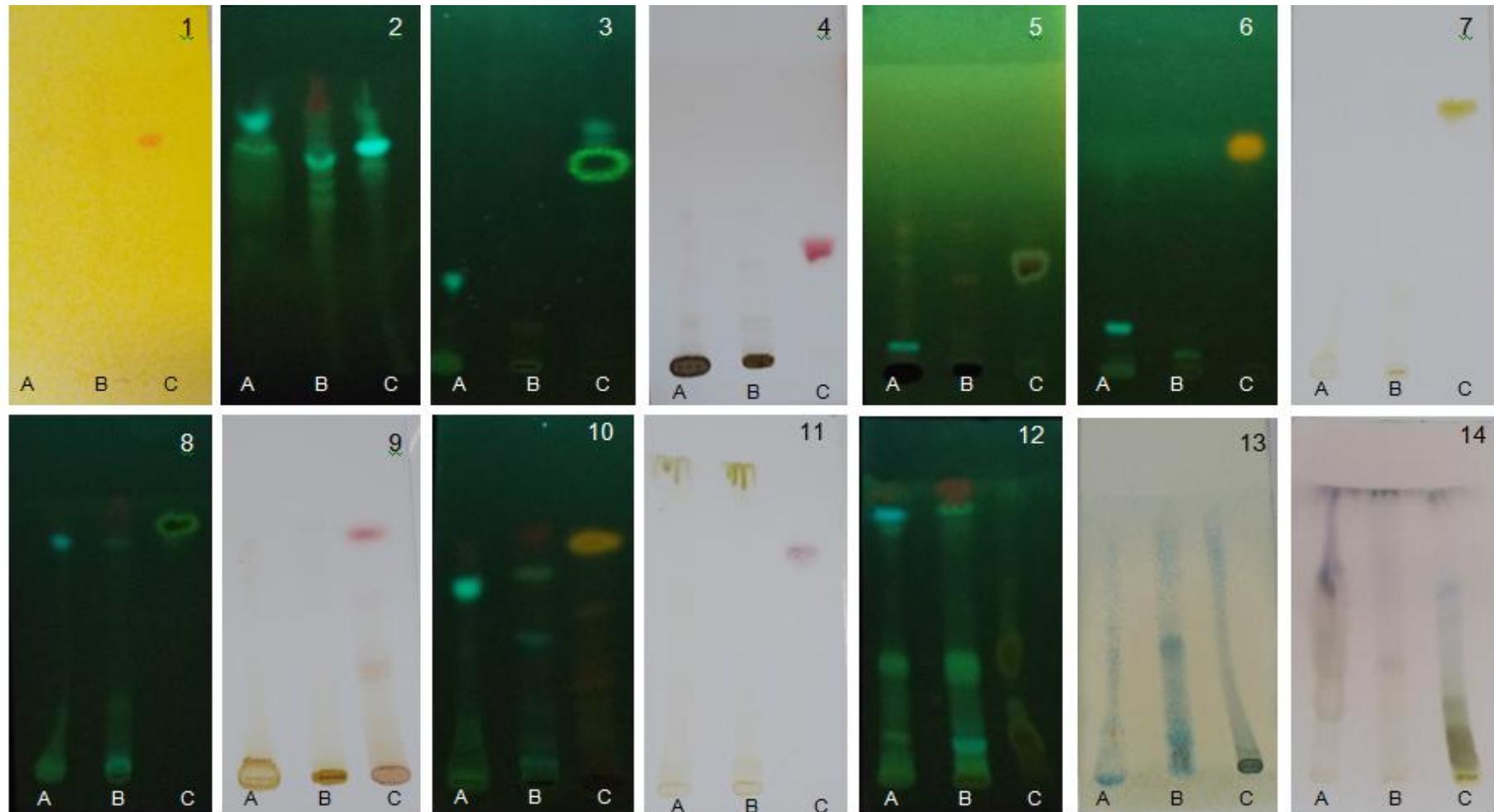


Figura 13. Prospecção fitoquímica dos extratos hidroetanólicos (1:1) de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*.

Legenda: CCDs 1, 2 – Alcaloides; CCD 3 – Cumarinas; CCDs 4, 5 – Esteroides e triterpenos; CCD 6 – Geninas antracênicas e naftoquinônicas; CCDs 7, 8 – Geninas flavônicas; CCDs 9, 10 – Heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos; CCD 11 – Heterosídeos cardiotônicos; CCD 12 – Heterosídeos flavônicos; CCD 13 – Polifenóis e taninos; 14 – Saponinas; A – Extrato Hidroetanólico (1:1) dos Caules de *P. hoffmannseggiana* (EHEC1:1); B – Extrato Hidroetanólico (1:1) das Folhas de *P. hoffmannseggiana* (EHEF1:1). Amostras de referência 1C/2C – Quinina; 3C – Cumarina; 4C/5C – β -sitosterol; 6C – 1,8-Dihidroxi-antraquinona; 7C/8C – Quercetina; 9C/10C – Aloína; 11C – Digoxina; 12C – Rutina; 13C – Ácido tânico; 14C – Fração de saponinas.

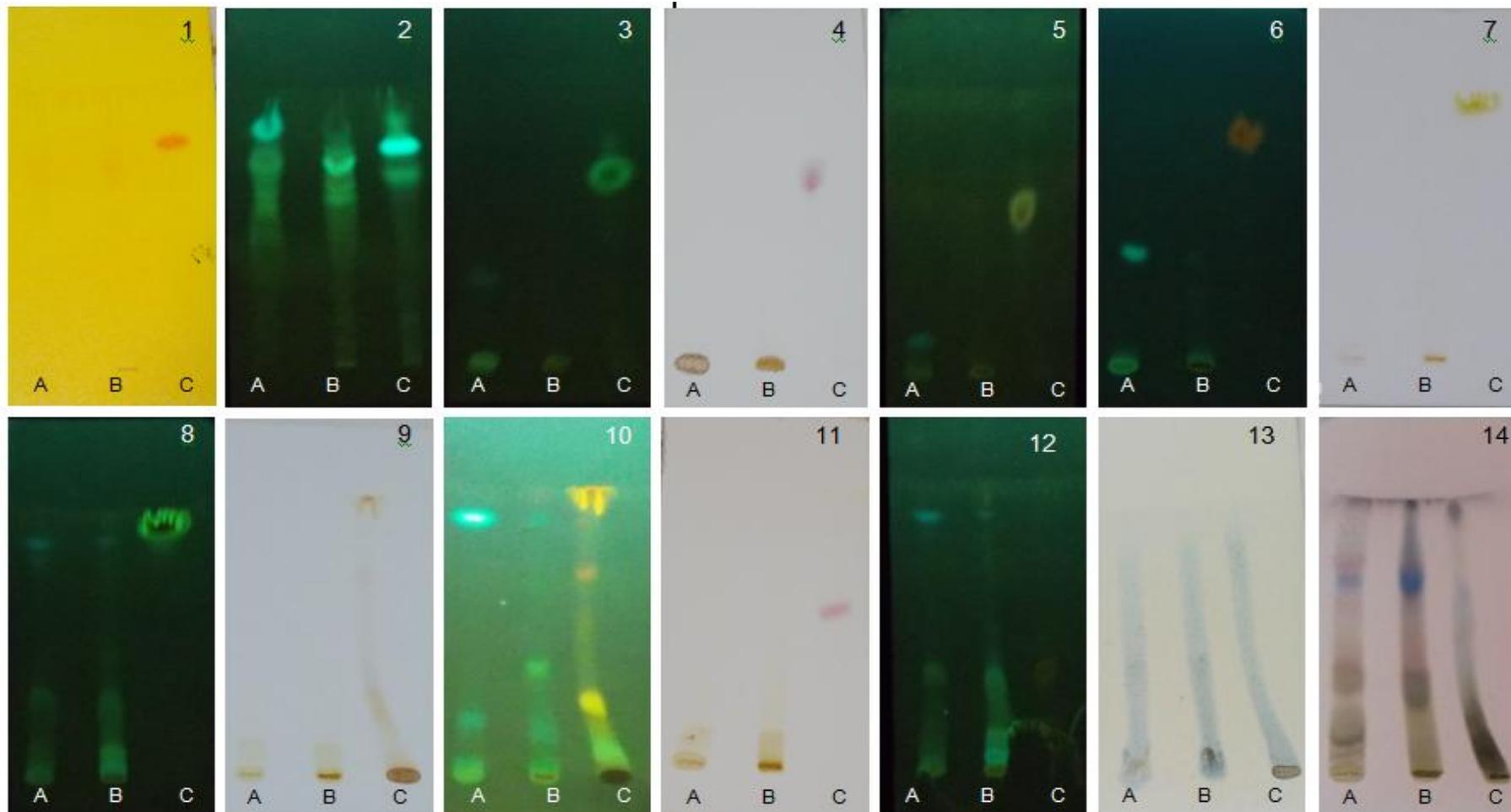


Figura 14. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*.

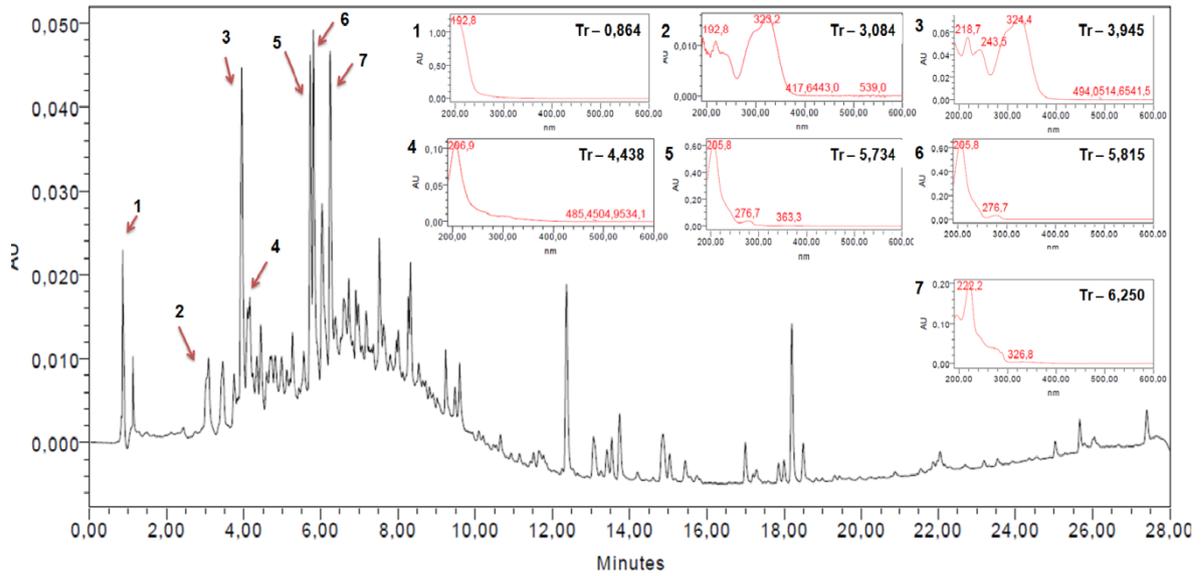
Legenda: CCDs 1, 2 – Alcaloides; CCD 3 – Cumarinas; CCDs 4, 5 – Esteroides e triterpenos; CCD 6 – Geninas antracênicas e naftoquinônicas; CCDs 7, 8 – Geninas flavônicas; CCDs 9, 10 – Heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos; CCD 11 – Heterosídeos cardiotônicos; CCD 12 – Heterosídeos flavônicos; CCD 13 – Polifenóis e taninos; 14 – Saponinas; A – Extrato Aquoso dos Caules de *P. hoffmannseggiana* (EACPH); B – Extrato Aquoso das Folhas de *P. hoffmannseggiana* (EAFPH); Amostras de referência 1C/2C – Quinina; 3C – Cumarina; 4C/5C – β -sitosterol; 6C – 1,8-Dihidroxi-antraquinona; 7C/8C – Quercetina; 9C/10C – Aloína; 11C – Digoxina; 12C – Rutina; 13C – Ácido tânico; 14C – Fração de saponinas.

5.4 Perfís cromatográficos dos extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* da primeira coleta por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos - CLUE-DAD

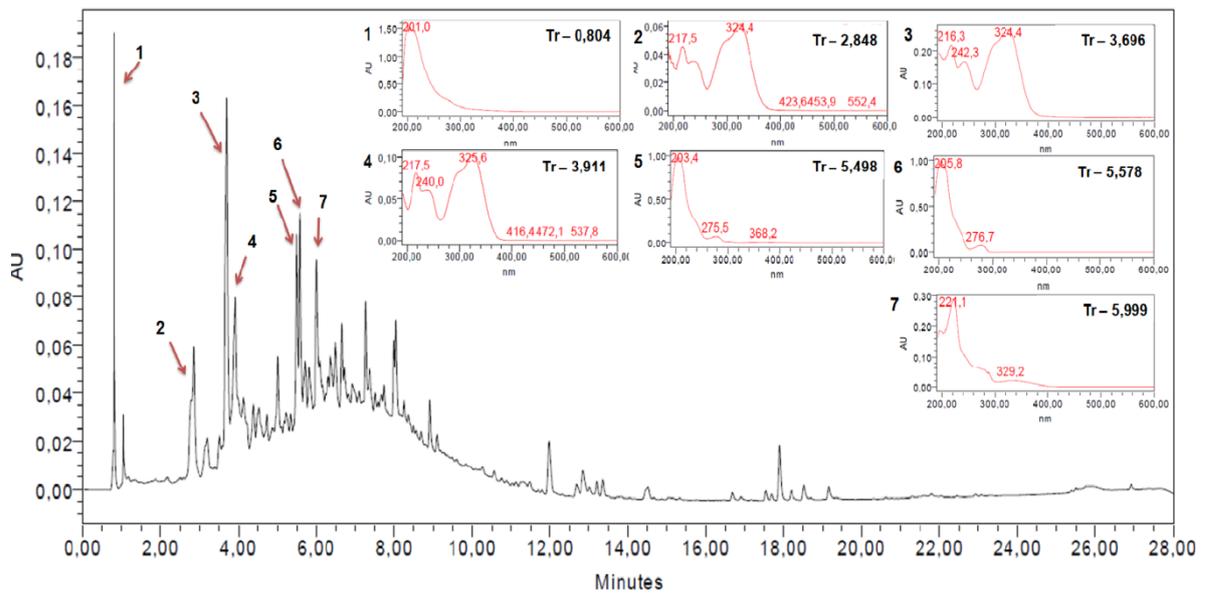
Nas Figuras 15 a 24 são mostrados os perfís cromatográficos por CLUE-DAD das diferentes amostras registrados a 280 nm, com tempo de varredura de 28 min.

Dessa forma, os extratos etanólicos de caules (EEC; Figura 15A) e folhas (EEF; Figura 17A); os extratos hidroetanólicos (7:3) também de caules (EHEC7:3; Figura 15B) e folhas (EHEF7:3; Figura 17B); os extratos hidroetanólicos 1:1 de caules (EHEC1:1; Figura 16A) e de folhas (EHEF1:1; Figura 18A) e os extratos aquosos de caules (EAC; Figura 16B) e de folhas (EAF; Figura 18B) apresentam perfís muito semelhantes, com predominância de picos de substâncias polares ($T_r < 10$ min), observando-se a co-ocorrência de algumas substâncias, como infere-se a partir da proximidade de tempos de retenção (T_r) e semelhanças de espectros no UV. Nota-se, claramente, uma menor complexidade dos extratos aquosos que são muito semelhantes apresentando oito picos mais intensos. É interessante ressaltar que estes mesmos picos estão presentes nos cromatogramas dos demais extratos que são, contudo, tanto mais complexos quanto maior o teor de etanol.

Os espectros no UV de alguns dos picos mais intensos apresentam perfís muito distintos o que pode ser relacionado à presença de diversas classes de substâncias naturais. Além disso, alguns dos metabólitos estão presentes em diferentes extratos como se pode deduzir a partir dos T_r s e espectros no UV. Como é o caso do pico no T_r 3,91 min e absorção no UV ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de, aproximadamente, 218, 243, 324 nm. Diversos cromatogramas apresentam picos com estas mesmas características de absorção no UV ($\lambda_{m\acute{a}x}$), conforme pode ser visualizado nos cromatogramas das Figura 15A, 15B; e Figura 16A, 16B, espectros 2 a 4; Figura 17A, 17B e Figura 18A, 18B, espectros 2 a 4.



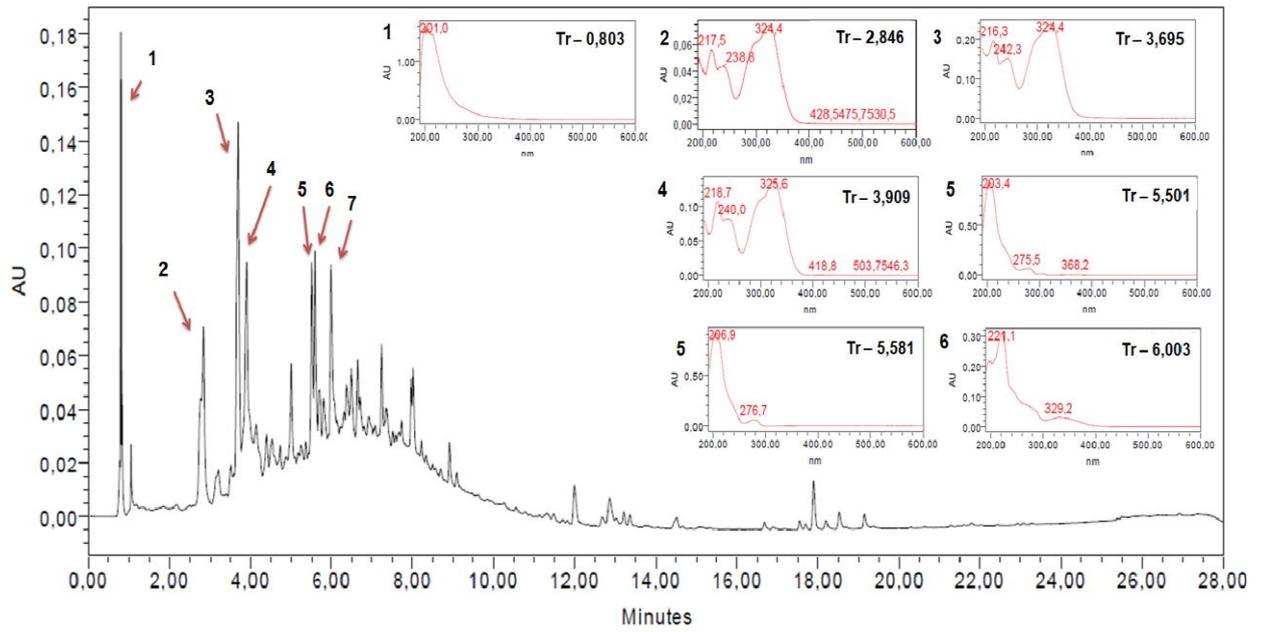
A



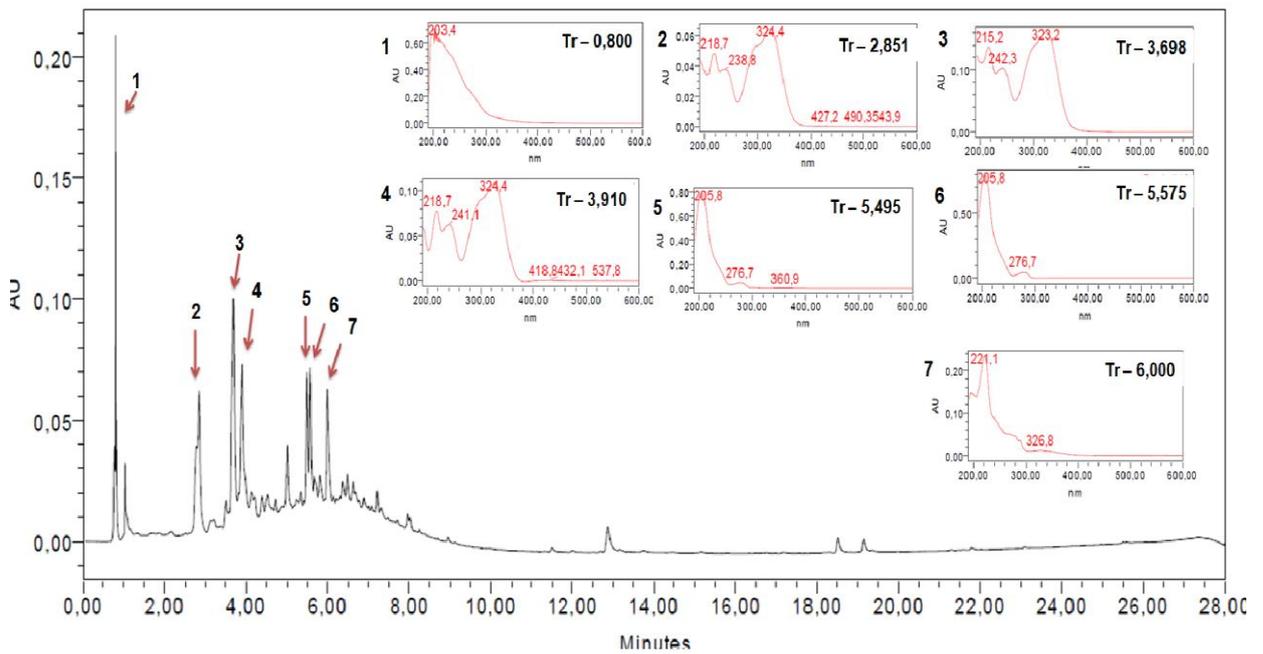
B

Figura 15. Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos etanólico e hidroetanólico (7:3) de caules de *Palicourea hoffmannseggiana*. Detecção em 280 nm.

Legenda: A – Extrato etanólico de caules (EECPH); B – Extrato hidroetanólico 7:3 de caules (EHEC7:3).



A



B

Figura 16. Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos hidroetanólico (1:1) e aquoso de caules de *Palicourea hoffmannseggiana*. Detecção em 280 nm.

Legenda: A – Extrato hidroetanólico (1:1) de caules (EHEC1:1); B – Extrato aquoso de caules (EACPH).

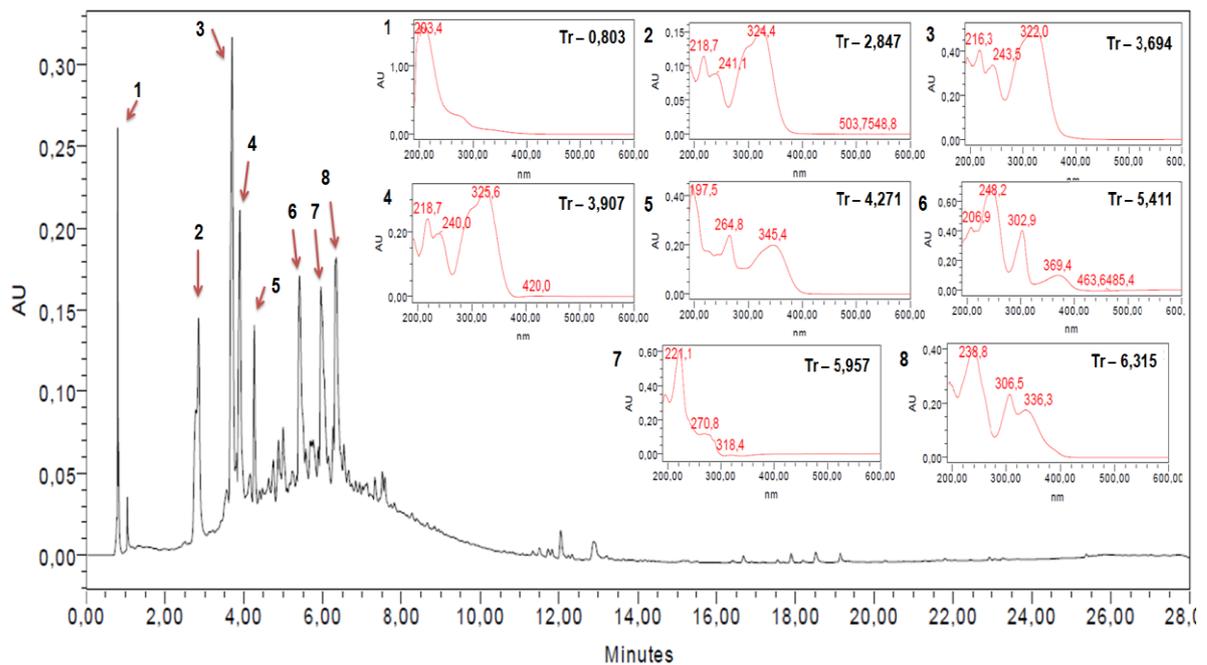
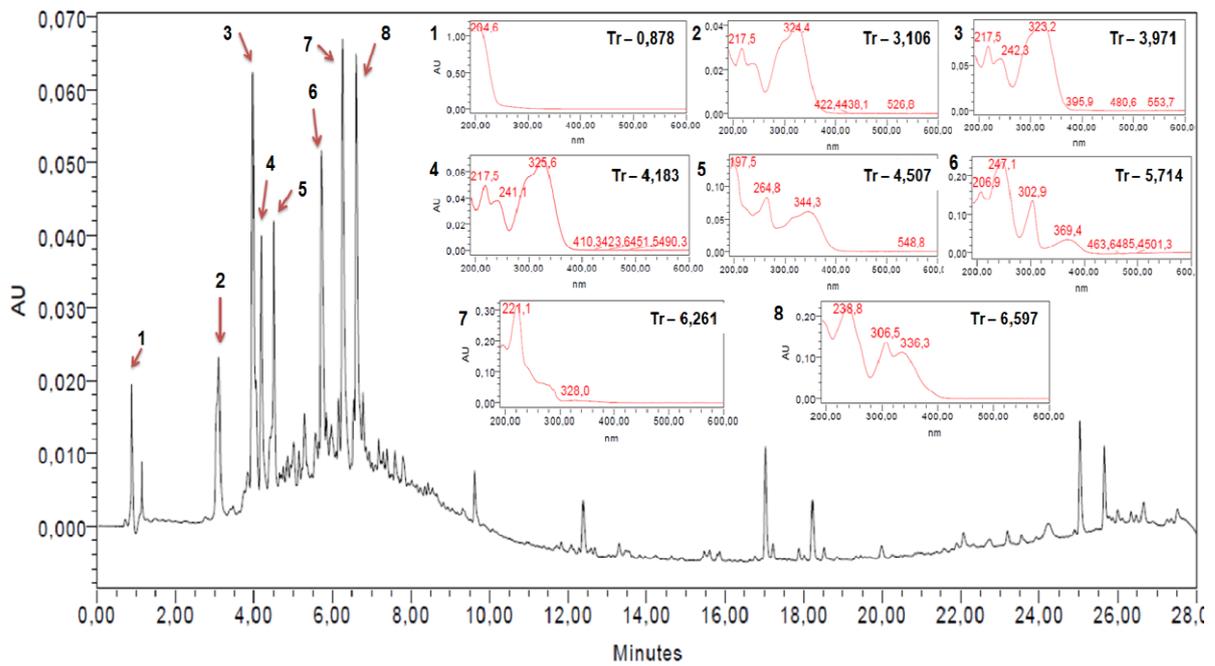
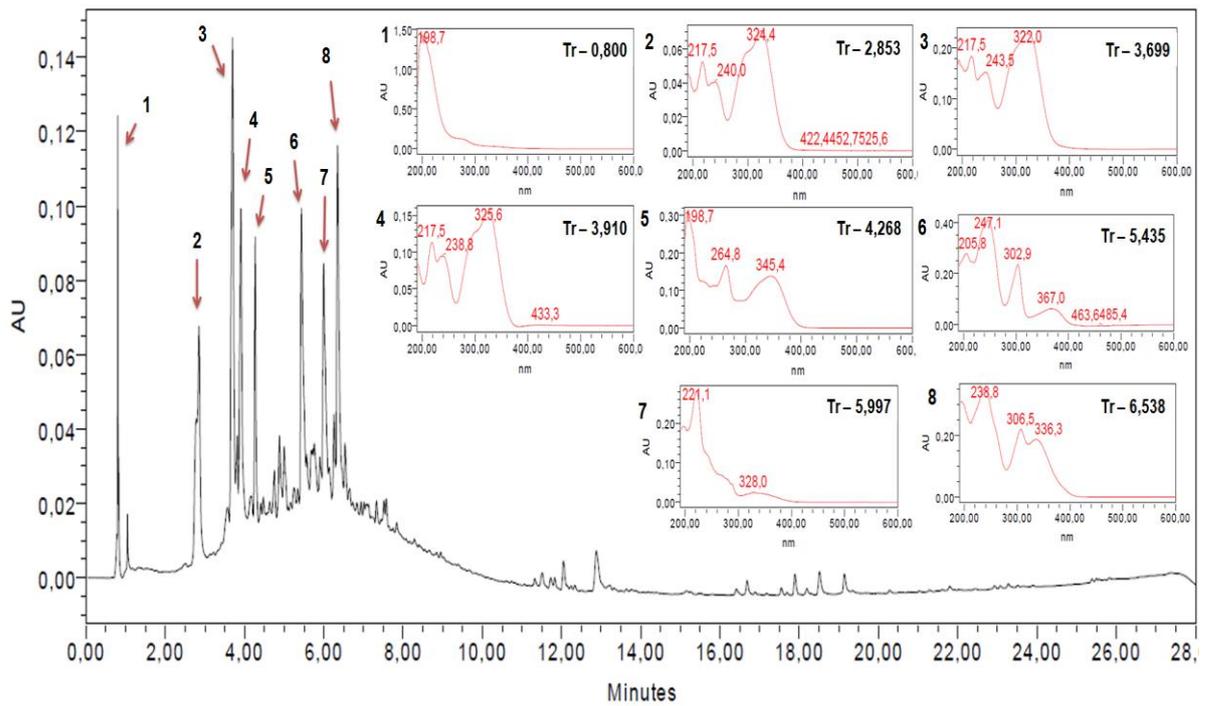
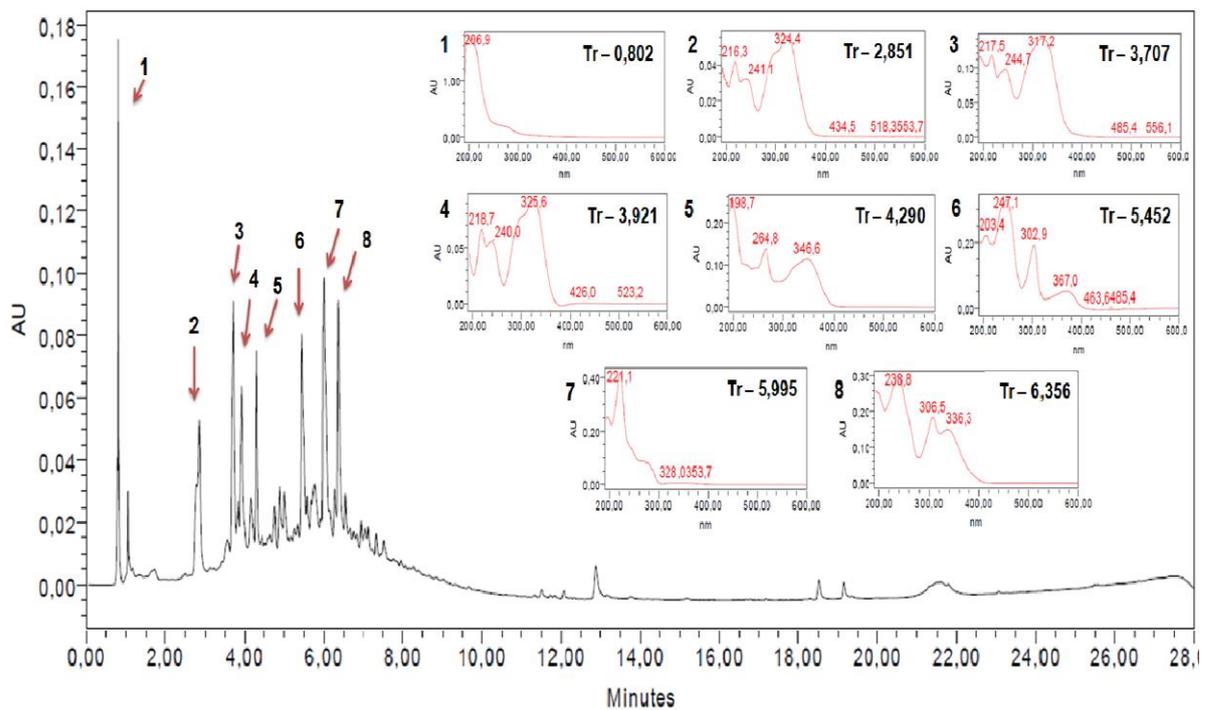


Figura 17. Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos etanólico, hidroetanólico (7:3) de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*. Detecção em 280 nm.

Legenda: A – Extrato etanólico de folhas (EEFPH); B – Extrato hidroetanólico 7:3 de folhas (EHEF7:3).



A



B

Figura 18. Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) dos extratos hidroetanólico (1:1) e aquoso de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*. Detecção em 280 nm.

Legenda: A – Extrato hidroetanólico (1:1) de folhas (EHEF1:1); B - Extrato aquoso de folhas (EAFPH).

5.4.1. PERFÍS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS - CLUE-DAD DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÕES ÁCIDO-BASE A PARTIR DE CAULES E FOLHAS DE *PALICOUREA HOFFMANNGESIANA* (Métodos A e B)

Quanto às frações obtidas pelos processos para separação de alcaloides por extrações ácido-base pelo método A (Figura 8; pág. 50) nota-se que os perfis cromatográficos das frações diclorometânicas, correspondentes a extrações das soluções aquosas alcalinas (pH 9-10) de caules (FrDCMetA; Figura 19A) e folhas (FrDFMetA; Figura 19B) são muito semelhantes, apresentando, ambos, dois picos majoritários de substância de baixa polaridade (Tr 25,400 min, 79,04% área, 27,057 min, 10,41% área, nas folhas e Tr 25,387 min, 83,38% área, 27,041 min, 10,64 % área, nos caules). A presença destas substâncias nas amostras pode ser devido à contaminação externa, oriundo de materiais de uso rotineiro no laboratório, como pipetas plásticas descartáveis, tubos do tipo eppendorf, ponteiras descartáveis para micropipetas, tampas de borrachas usadas em frascos de estocagem de amostras, entre outras fontes (ZACHOW, 2016).

É interessante destacar que esta fração foi obtida com o mesmo rendimento (0,84%) a partir de caules e folhas (Figura 8; pág. 50). Picos de muito baixa intensidade aparecem em Trs 4 – 6 min e poderiam corresponder a alcaloides uma vez que estas frações se originaram da extração com HCl 1N a qual foi posteriormente alcalinizada com hidróxido de amônio, seguindo-se extração com diclorometano. É possível que a presença dos ftalatos anteriormente apontados, sejam responsáveis pela baixa intensidade dos picos em Trs 4 – 6 min. Já as frações alcaloídicas *n*-butanólicas obtidas pelo método A, a partir de folhas (FrBFMetA; Figura 20A), e de caules (FrBCMétA; Figura 20B), apresentam predominância de constituintes de alta polaridade, destacando-se três picos majoritários, entre 5 – 6 min, com espectros no UV semelhantes, devendo, portanto, corresponder a alcaloides mais polares que não teriam sido completamente extraídos por diclorometano.

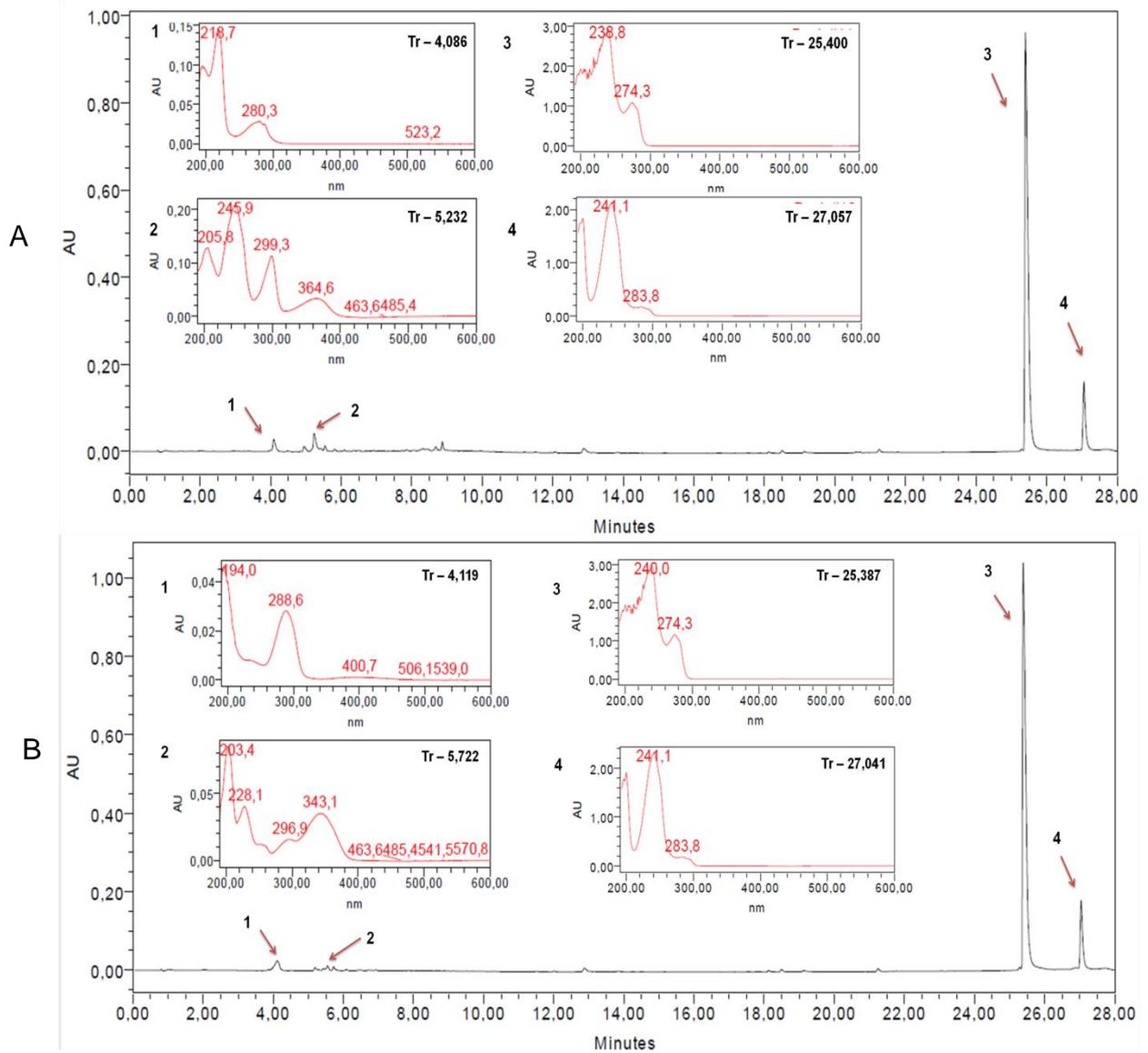


Figura 19 - Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das frações diclorometânicas de *Palicourea hoffmannseggiana* obtidas por extrações ácido-base pelo método A. Detecção em 280 nm.

Legenda: A - Fração alcaloídica diclorometânica das folhas de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método A (FrDFMetA); B - Fração alcaloídica diclorometânica do caule de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método A (FrDCMetA).

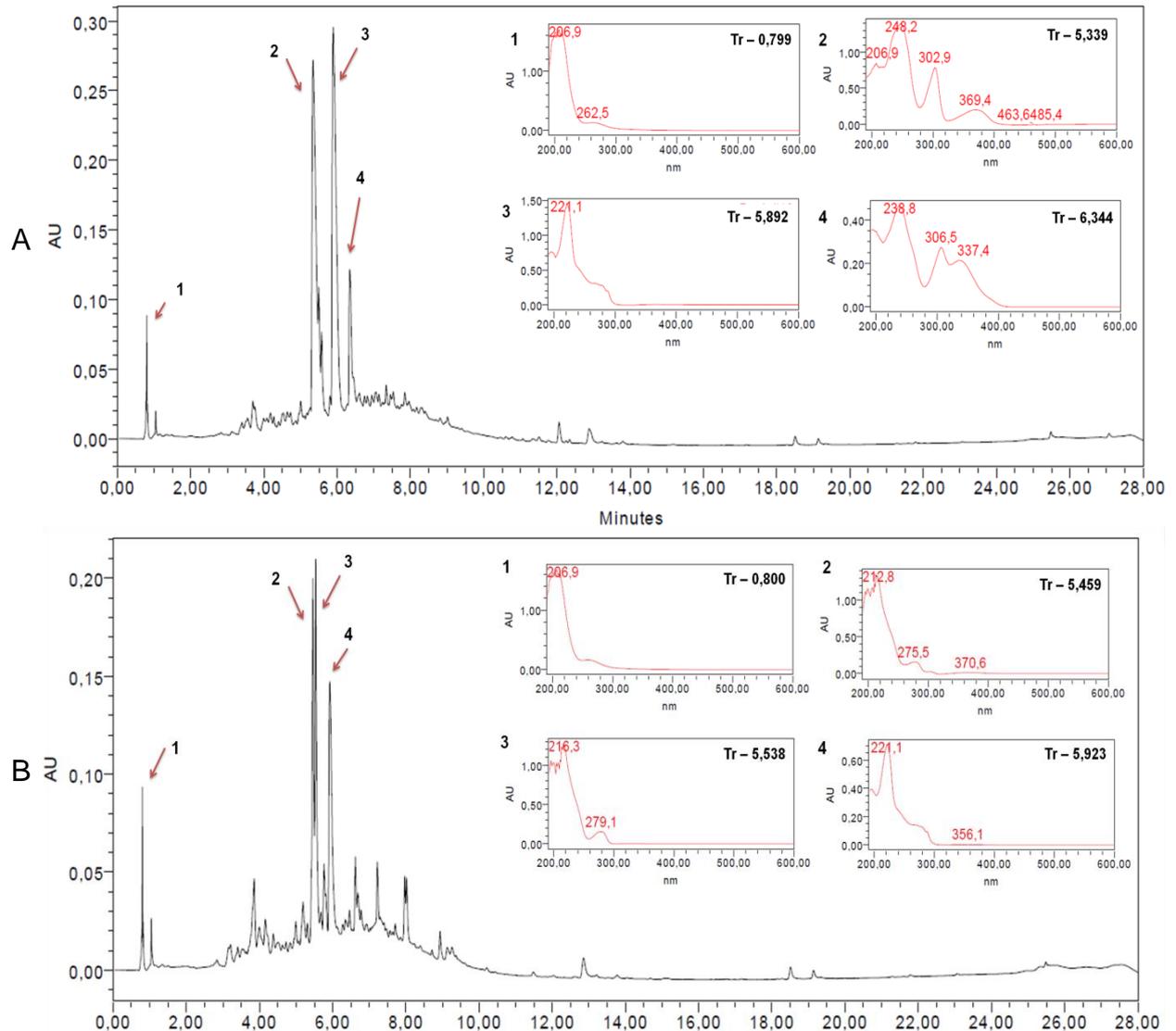
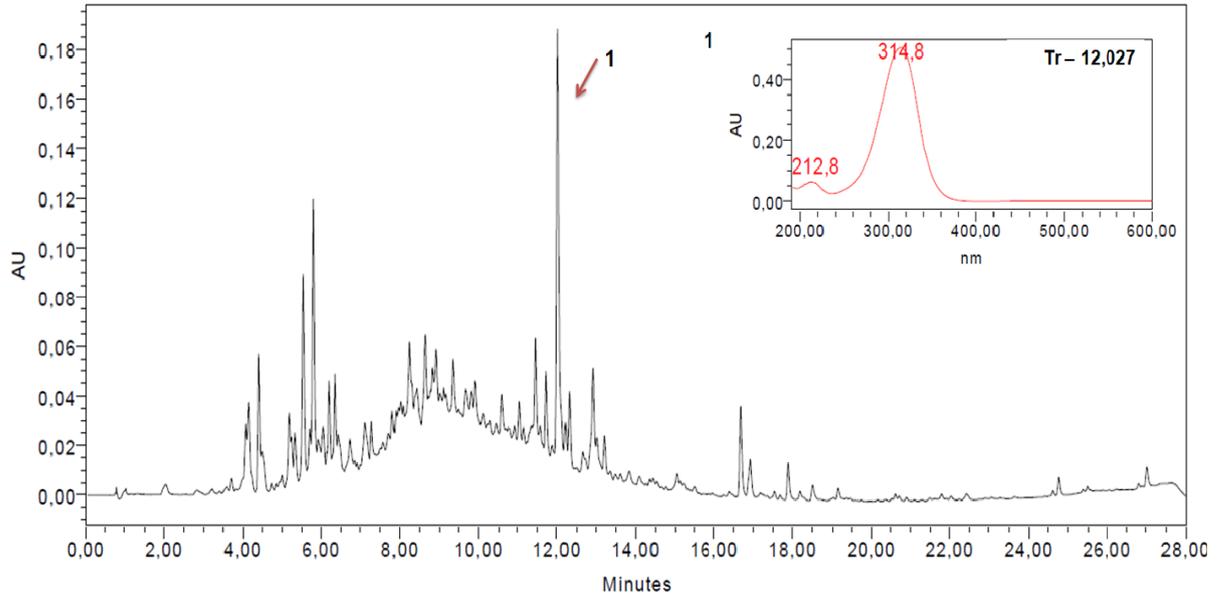


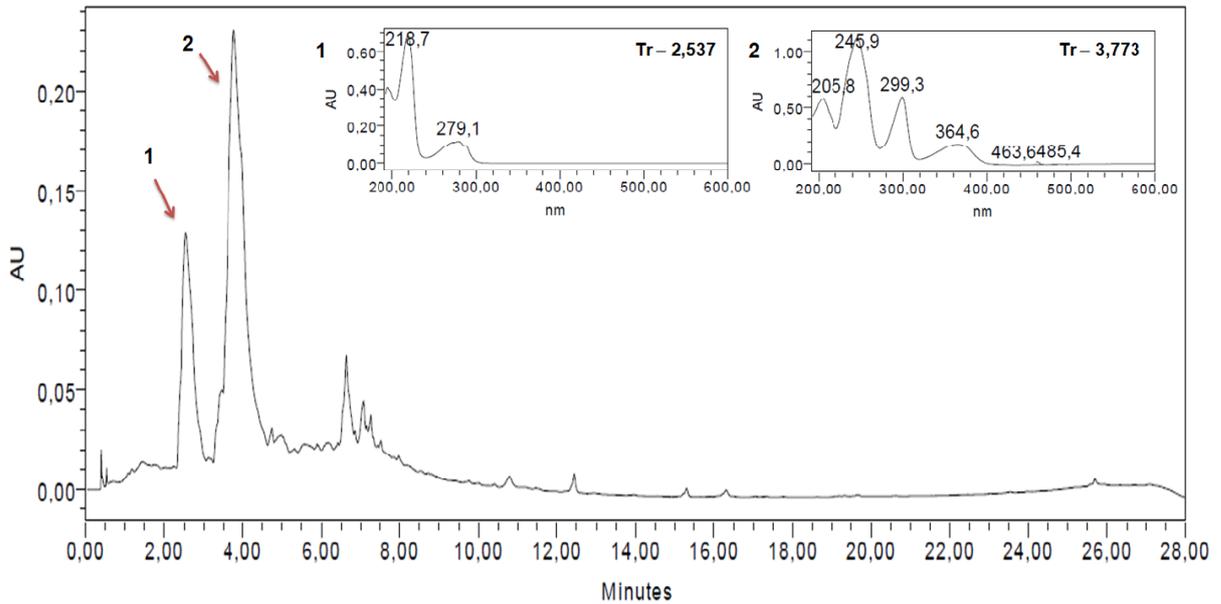
Figura 20 - Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das frações butanólicas de *Palicourea hoffmannseggiana* obtidas por extrações ácido-base pelo método A. Detecção em 280 nm.
Legenda: A - Fração alcaloídica butanólica das folhas de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método A (FrBFMetA); B - Fração alcaloídica butanólica dos caules de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método A (FrBCMetA).

Outro processo para separação de alcaloides (Método B; Figura 9; pág. 52) foi realizado a partir do extrato etanólico das folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*, empregando-se ácido acético, em vez de ácido clorídrico 1N, alcalinizações a diferentes pHs e extrações com clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol (NAVES, 2014, com modificações). A fração clorofórmica obtida a partir da fase aquosa ácida de folhas de *P. hoffmannseggiana* (FrCAcMetB; Figura 21A), correspondendo, portanto, a constuíntes não alcaloídicos, é muito complexa, com predominância de substâncias mais polares (Tr < 12min), destacando-se um pico

intenso em Tr 10,402 min (λ_{\max} 320,8 nm). O cromatograma da fração clorofórmica obtida a partir da fase aquosa neutra a pH 7 (FrCNMetB; Figura 21B), podendo, portanto, conter alcaloides, mostrou dois picos mais intensos, em Tr 2,537 min e 3,773 min, o segundo sendo mais intenso do que o primeiro, e ambos devendo corresponder a alcaloides de diferentes classes estruturais, tendo em vista a diferença marcante entre seus espectros no UV. Já o cromatograma da fração clorofórmica, resultante da extração da fase aquosa alcalina a pH 9-10, apresentou um pico predominante em Tr 3,534 min (FrCMetB; Figura 22A) que é semelhante àquele registrado em Tr 2,537 min na Figura 21B, uma vez que apresentam os mesmos espectros no UV. Na fração acetato de etila (FrAcOEtMetB) obtida a partir da fase aquosa alcalina (pH 9-10) pelo método B (Figura 22B) observam-se picos muito próximos relativos a substâncias de alta polaridade, dentre os quais se destaca um pico em Tr 9,013 min (λ_{\max} 225,8 nm). O cromatograma da fração *n*-butanólica obtida, também, a partir da fase aquosa alcalina a pH 9-10 (FrBMetB) pelo método B (Figura 23), mostrou a predominância de substâncias de alta polaridade, com três picos mais intensos em Tr 5,310 min; 5,882 min e 6,315 min, correspondendo a espectros no UV bem distintos, possivelmente de alcaloides indólicos monoterpênicos já isolados desta espécie (NAVES, 2014; OLIVEIRA et al., 2013).



A



B

Figura 21 - Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das amostras obtidas a partir de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* por extrações ácido-base pelo método B. Detecção em 280 nm.

Legenda: A - Fração clorofórmica ácida de folhas de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método B (FrClAcMetB); B - Fração clorofórmica neutra de folhas de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método B (FrClNMetB).

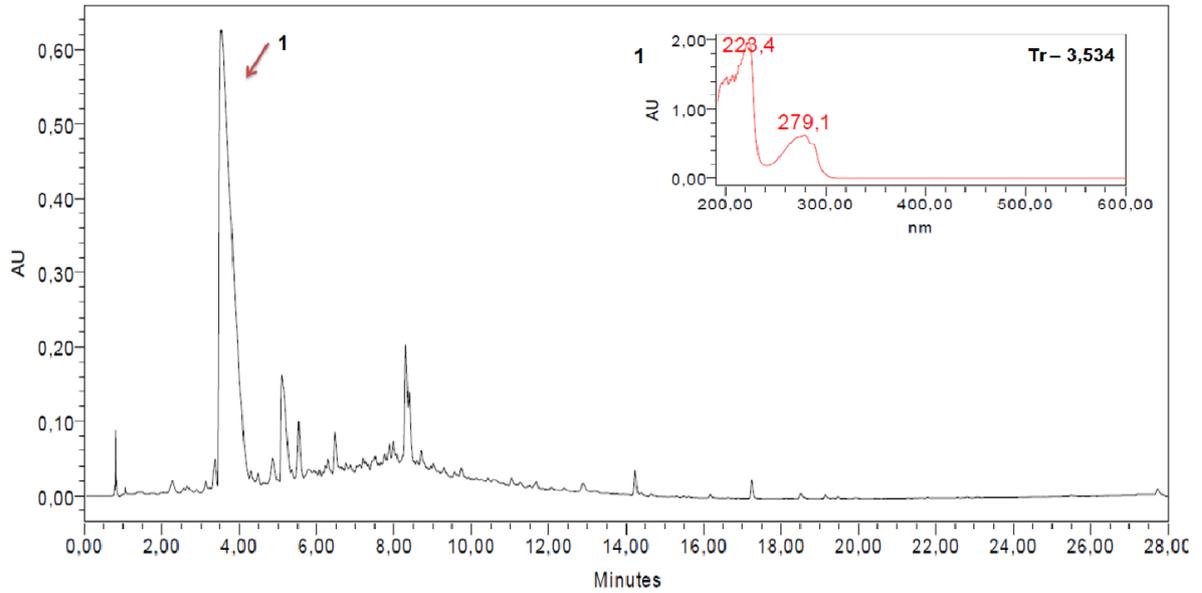
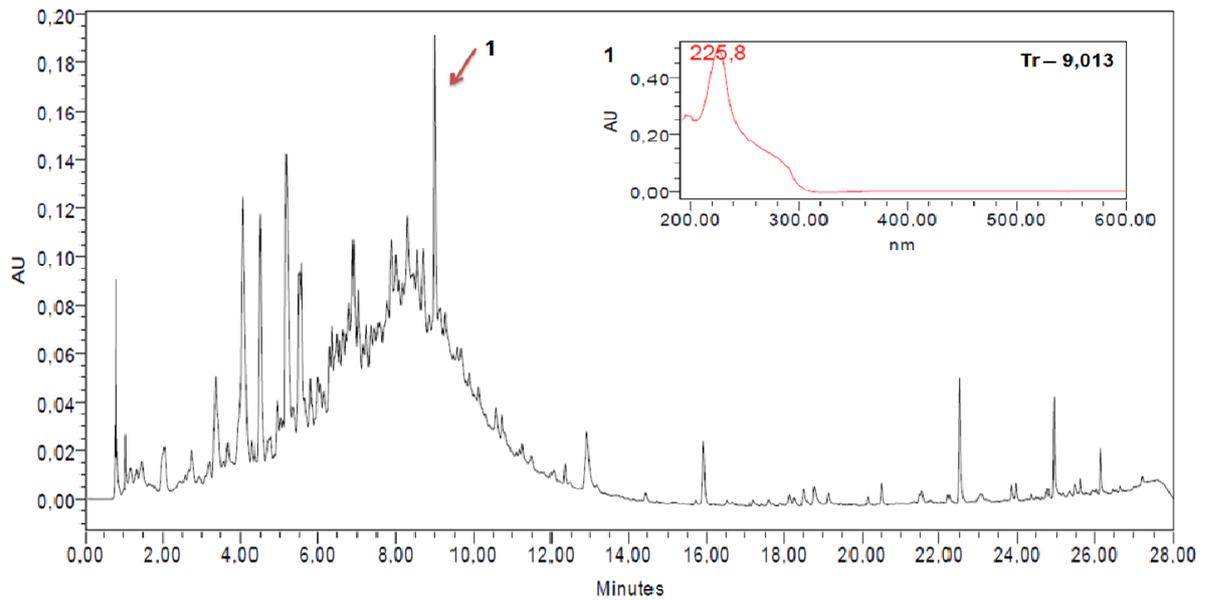
**A****B**

Figura 22 - Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das amostras obtidas a partir de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* por extrações ácido-base pelo método B. Continuação. Detecção em 280 nm.

Legenda: A - Fração clorofórmica básica de folhas de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método B (FrCIBMetB); B - Fração de acetato de etila básica de folhas de *P. hoffmannseggiana*, obtida pelo método B (FrAcOETMetB).

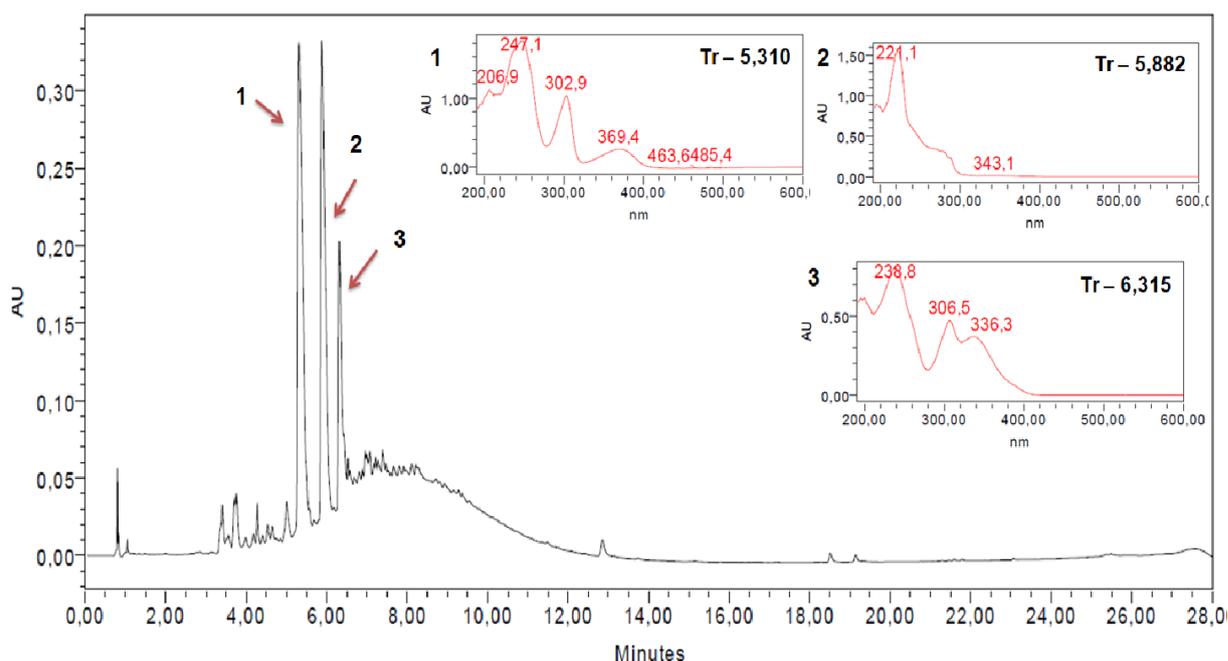


Figura 23 - Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) da fração *n*-butanólica básica de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*, obtida pelo método B (FrBMetB). Detecção em 280 nm.

5.4.2 PERFÍS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIÓDOS - CLUE-DAD DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *PALICOUREA HOFFMANNGESIANA*

O extrato etanólico de folhas da 2ª coleta do material vegetal foi submetido a partições líquido-líquido, conforme consta da Figura 10 (pág. 53). A solução hidrometanólica (MeOH:H₂O 6:4) do EEPH2 foi extraída com clorofórmio obtendo-se uma fração hidrometanólica e uma fração clorofórmica. Nota-se uma diferença marcante entre os perfis cromatográficos destas frações por CLUE-DAD (Figura 24). A fração clorofórmica (FrCPLL - Fração clorofórmica por partição líquido-líquido; Figura 24A) apresenta perfil muito complexo, na região de constituintes de mais alta polaridade (Tr < 12 min) com destaque para o pico intenso em 6,472 min, e três picos mais intensos na região de TR > 12 min (Trs 11,619; 19,222 e 25,580 min). A fração hidrometanólica (FrHMPLL - Fração hidrometanólica por partição liq-liq; Figura 24B) tem um perfil menos complexo, com predominância de sete picos mais intensos com Trs < 12 min (0,810; 3,831; 4,042; 4,388; 5,530; 6,067 e 6,431 min). Os espectros no UV dos metabólitos correspondentes aos picos mostrados na Figura 24B sugerem tratar-se de alcaloides indólicos monoterpênicos ($\lambda_{\text{máx}} \sim 245$;

303; 360 nm) já isolados desta espécie e de outras espécies deste gênero, como *P. suterella* e *P. laciniata* (SANGSTER & STUART, 1964; NAVES, 2014; PASSOS et al., 2013).

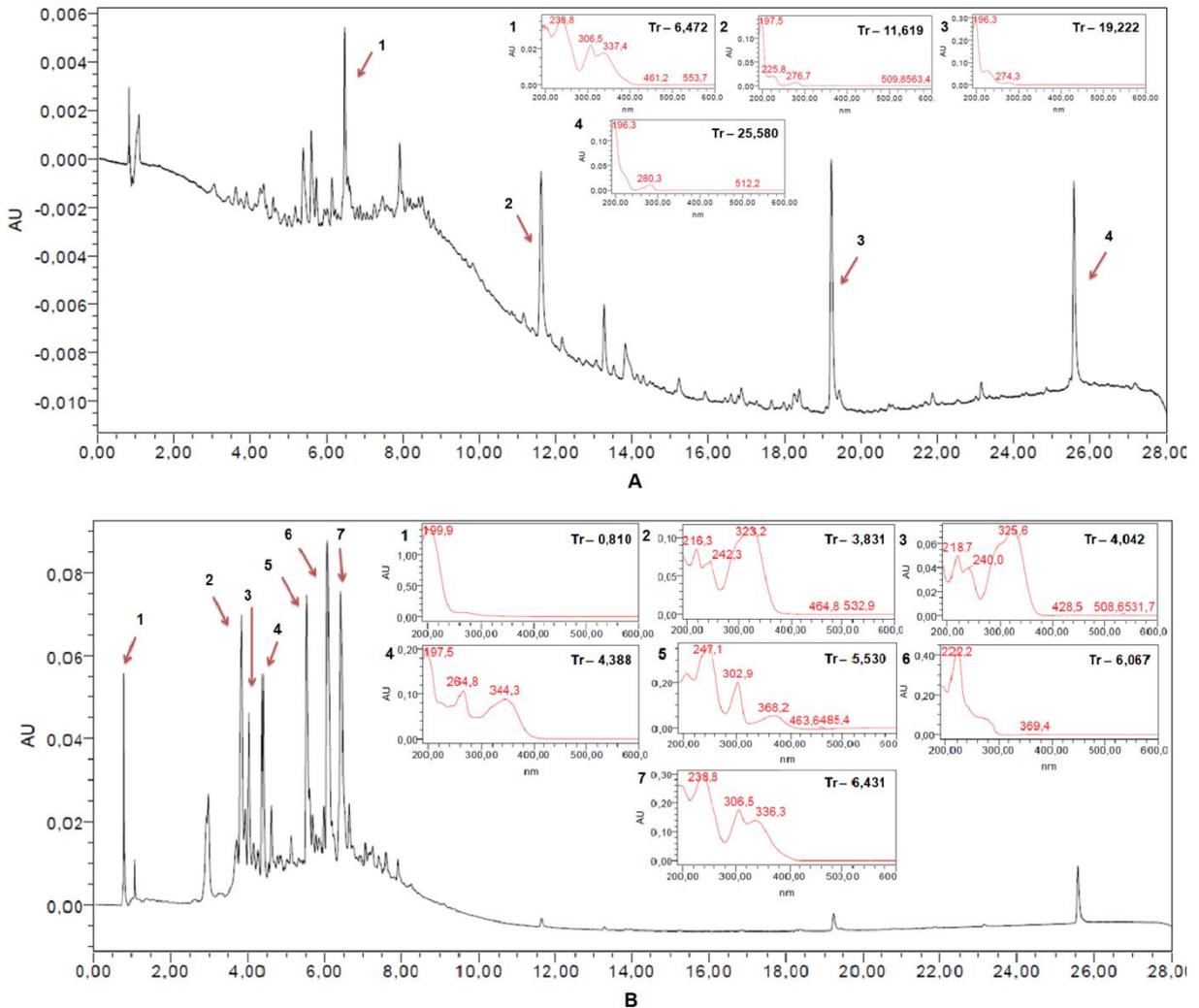


Figura 24 - Cromatogramas por CLUE-DAD (Waters) das frações obtidas a partir de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* por partições líquido-líquido (método C). Detecção em 280 nm.

Legenda: A - Fração clorofórmica obtida por partição líquido-líquido (FrCPLL); B - Fração hidrometanólica obtida por partição líquido-líquido (FrHMPLL)

5.5 Atividade antiplasmódica de extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*

A Tabela 09 apresenta os resultados da atividade antiplasmódica e os dados estatísticos para os diferentes extratos e frações avaliados.

Os resultados para o Grupo 1 (Tabela 09) demonstram que todos os extratos foram inativos, visto que apresentaram % Red < 50%, mesmo na concentração mais alta (100 µg/mL). Sabe-se que variando os métodos extrativos, a temperatura, o solvente e o tempo de extração, a composição química do extrato pode ser alterada e, com isso, alterar também a atividade biológica da amostra (SARKIS, 2014; ARAÚJO, 2019). Entretanto, a utilização de diferentes métodos de obtenção dos extratos (maceração, sonicação e decocção) e líquidos extrativos (etanol 96° GL, EtOH:H₂O 7:3; EtOH:H₂O 1:1, e água) não influenciou na redução da parasitemia, que ficou na faixa de 20 – 40%. Assim, a similaridade da atividade antiplasmódica das diversas amostras estão associada à semelhança dos perfis fitoquímicos dos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos, tanto do caule quanto das folhas, como pode ser observado nos cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento Waters Acquity Ultra Performance LC, detector PDA e TQ Detector (CLUE-DAD-ESI-EM), como mostrado na Figura 25. Alguns picos, como assinalados na Figura 25, estão presentes em todos os cromatogramas, diferindo em intensidade, o que permite inferir sobre os teores dos metabólitos correspondentes, uma vez que as amostras injetadas em cromatógrafo foram preparadas em condições padronizadas (5 mg de amostra solubilizado em 1mL de MeOH grau CLAE, volume de injeção no equipamento = 2µL).

Tabela 09. Porcentagem de inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum* (W2) frente a extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* avaliados pelo método da Lactato Desidrogenase do parasito (PfLDH) e dados estatísticos para atividade antiplasmódica

| Amostras | % Inibição do crescimento | |
|---|---------------------------|--------------------------|
| | [100,0 µg/mL] | [50,0 µg/mL] |
| ¹ Grupo 1 | | |
| Ext. EtOH caule (EECPH-1) | 24,0 ± 9,9 ^A | 24,0 ± 9,9 ^A |
| Ext. EtOH/H ₂ O Caule (7/3) (EHEC7:3) | 33,0 ± 7,0 ^A | 30,0 ± 4,2 ^A |
| Ext. EtOH/H ₂ O (1/1) Caule (EHEC1:1) | 37,0 ± 0,0 ^A | 28,0 ± 2,8 ^A |
| Ext. H ₂ O Caules (EACPH) | 39,5 ± 0,7 ^A | 25,5 ± 12,0 ^A |
| Ext. EtOH Folhas (EEFPH-1) | 26,0 ± 4,2 ^A | 25,0 ± 5,6 ^A |
| Ext. EtOH/H ₂ O (7/3) Folhas (EHEF7:3) | 31,0 ± 1,4 ^A | 27,5 ± 3,5 ^A |
| Ext. EtOH/H ₂ O (1/1) Folhas (EHEF1:1) | 37,0 ± 7,0 ^A | 35,5 ± 6,3 ^A |
| Ext. H ₂ O Folhas (EAFPH) | 33,0 ± 1,4 ^A | 25,5 ± 2,1 ^A |

| ² Grupo 2 | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Ext. EtOH Caule (EECPH-1) | 24,0 ± 9,9 ^C | 24,0 ± 9,9 ^{BC} |
| Fr. DCM Caule (FrDCMetA) | 65,5 ± 10,6^A | 60,5 ± 3,5^A |
| Fr. <i>n</i> -BuOH Caule (FrBCMetA) | 52,5 ± 2,1 ^B | 37,5 ± 2,1 ^B |
| Ext. EtOH Folhas (EEFPH-1) | 26,0 ± 4,2 ^C | 25,0 ± 5,6 ^C |
| Fr. DCM Folhas (FrDFMetA) | 64,0 ± 1,4^A | 59,5 ± 4,9^A |
| Fr. <i>n</i> -BuOH Folhas (FrBFMetA) | 27,5 ± 3,5 ^C | 25,0 ± 1,4 ^C |
| ³ Grupo 3 | | |
| Ext. EtOH Folhas (EEFPH-1) | 26,0 ± 4,2 ^D | 25,0 ± 5,6 ^C |
| Fr. CHCl₃ Ac. (FCAcMetB) | 80,0 ± 8,4^B | 73,5 ± 6,3^A |
| Fr. CHCl₃ Neu. (FCNMetB) | 78,5 ± 2,1^B | 76,5 ± 0,7^A |
| Fr. CHCl₃ Bas. (FrCBMetB) | 92,5 ± 0,7^A | 67,0 ± 1,4^{AB} |
| Fr. AcOEt Bas. (FrAcOEtMetB) | 65,0 ± 7,0^C | 24,5 ± 7,7^C |
| Fr. <i>n</i> -BuOH (FrBMetB) | 23,0 ± 2,8 ^D | 16,5 ± 0,7 ^C |
| ⁴ Grupo 4 | | |
| Ext. EtOH 2°Coleta (EEPHF-2) | 71,0 ± 4,2^B | 43,0 ± 4,2^B |
| Fr. CHCl₃ (FCPLLF-2) | 96,5 ± 4,9^A | 88,0 ± 2,8^A |
| Fr. MeOH:H ₂ O (FHMPLLF-2) | 51,5 ± 2,1 ^C | 36,5 ± 3,5 ^B |
| Controle Positivo | | |
| Cloroquina | 100,0 ± 0,0 [*] | 100,0 ± 0,0 [*] |

Notas: As médias (± DP, n = 3) seguidas por letras diferentes foram significativamente diferentes nas colunas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). As análises estatísticas da redução da parasitemia em 100,0 e 50,0 µg/mL foram realizadas separadamente para cada concentração, bem como para cada grupo analisado. * A análise estatística da atividade antiplasmodica do controle (cloroquina) foi realizada separadamente com cada amostra e concentração, e significativa para $p < 0,05$. ¹ Grupo 1: Extratos; ²Grupo 2: Extração de alcaloides (Método A); ³ Grupo 3: Extração de alcaloides (Método B); ⁴ Grupo 4: Partição líquido-líquido. As frações potencialmente ativas encontram-se destacadas em negrito.

Legendas: Ext.: Extrato; Fr.: Fração; EtOH: etanol; H₂O: água; CHCl₃: clorofórmio; AcOEt: acetato de etila; *n*-BuOH: *n*-butanol; DCM: diclorometano; EECPH - Extrato etanólico de caules de *P. hoffmannseggiana*; EHEC7:3 - Extratos hidroetanólicos (7:3) de caules de *P. hoffmannseggiana*; EHEC1:1 - Extratos hidroetanólicos (1:1) de caule de *P. hoffmannseggiana*; EACPH - Extrato aquoso dos caules de *P. hoffmannseggiana*; EEFPH-1 - Extrato etanólico de folhas de *P. hoffmannseggiana*, 1° coleta; EEFPH-2 - Extrato etanólico de folhas de *P. hoffmannseggiana*, 2° coleta; EHEF7:3 - Extratos hidroetanólicos (7:3) de folhas de *P. hoffmannseggiana*; EHEF1:1 - Extratos hidroetanólicos (1:1) de folhas de *P. hoffmannseggiana*; EAFPH - Extrato aquoso das folhas de *P. hoffmannseggiana*; FrDFMetA - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10; FrDCMetA - Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10; FrBFMetA - Fração alcaloídica butanólica de folhas, obtida pelo método A a pH 9 – 10; FrBCMetA - Fração alcaloídica butanólica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10; FrCAcMetB - Fração clorofórmica ácida de folhas, obtida pelo método B; FrCNMetB - Fração clorofórmica neutra de folhas obtida pelo método B; FrCBMetB - Fração clorofórmica básica de folhas, obtida pelo método B; FrAcOetMetB - Fração de acetato de etila básica de folhas, obtida pelo método B; FrBMetB - Fração *n*-butanólica básica de folhas, obtida pelo método B; FrCPLLF - Fração clorofórmica, obtida por meio de partição líquido-líquido; FrHMPLLF - Fração hidrometanólica, obtida por meio de partição líquido-líquido.



Figura 25. Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos dos caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*, destacando-se os picos presentes em todos os cromatogramas. Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) Extrato etanólico dos caules (EECPH-1); (B) Extrato hidroetanólico (7:3) dos caules (EHEC7:3); (C) EHEC1:1 – Extrato hidroetanólico (1:1) dos caules; (D) EACPH – Extrato aquoso dos caules; (E) EEPH-1 – Extrato etanólico das folhas; (F) EHEF7:3 – Extrato hidroetanólico (7:3) das folhas; (G) EHEF1:1 – Extrato hidroetanólico (1:1) das folhas; (H) EAFPH – Extrato aquoso das folhas.

É importante enfatizar que extratos etanólicos são, frequentemente, avaliados na triagem de plantas para atividades biológicas e, em sendo inativos, como no presente caso, em geral se exclui a possibilidade de investigar os efeitos de componentes minoritários. Com o objetivo de identificar metabólitos minoritários presentes em *P. hoffmannnggesiana* possivelmente ativos foram realizadas as extrações ácido-base para separação de alcaloides pelos métodos A e B, bem como por partição líquido-líquido, sendo as frações obtidas significativamente mais ativas quando avaliadas para atividade antiplasmódica *in vitro*, como descrito em itens anteriores.

5.5.1 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE CAULES E FOLHAS DE *PALICOUREA HOFFMANNGESIANA* E DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS OBTIDAS PELO MÉTODO A, DADOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES POR CLUE-DAD (Grupo 2 Tabela 09)

Os resultados demonstram a eficácia do fracionamento pelo método A, visto que as frações diclorometânicas, tanto dos caules quanto das folhas, apresentaram significativo aumento da atividade antiplasmódica, com % Red de aproximadamente 65% e foram, portanto, ativas, enquanto que os extratos etanólicos correspondentes foram inativos (% Red < 50) (Tabela 09). A fração *n*-butanólica de caules (FrBCMetA) apresentou baixa atividade antiplasmódica (% Red $52,5 \pm 2,1$) enquanto aquela de folhas foi inativa (% Red < 50). Os perfis cromatográficos das frações diclorometânicas de caules (FrDCMetA) e de folhas (FrDFMetA), por CLUE-DAD, registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM\EM (Figura 26), são semelhantes e caracterizam-se por apresentarem picos de baixa intensidade para metabólitos polares (Trs < 4 min) e dois picos mais intensos de constituintes de baixa polaridade (Trs > 9 min). Quanto às frações extraídas com *n*-butanol, observa-se que se diferenciam na faixa de Tr < 4min, sendo que aquela oriunda de caules tem um perfil muito semelhante ao do extrato etanólico original, enquanto naquela oriunda de folhas, destacam-se dois picos nesta região (Trs 2,57 min e 3,04 min). Os perfis cromatográficos das frações *n*-butanólicas refletem uma diferença acentuada no teor de alcaloides nos extratos etanólicos de folhas e caules, levando-se em conta as intensidades de picos correspondentes e o fato de que os cromatogramas foram registrados em condições padronizadas. As diferenças marcantes nas intensidades dos picos nos cromatogramas da fração *n*-butanólica dos caules (FrBCMetA; Figura

26C) e da fração *n*-butanólica das folhas (FrBFMetA; Figura 26F) podem justificar a diferença significativa entre os resultados dos testes biológicos destas frações que apresentaram % Red $52,5 \pm 2,1\%$ e $27,5 \pm 3,5\%$, respectivamente.

A atividade antiplasmódica das frações obtidas pelo Método A para separação de alcaloides estão relacionadas às suas composições químicas, fato confirmado pelas suas similaridades indicadas pelos dados estatísticos o que pode ser atribuído à semelhança dos seus perfis cromatográficos, como já mostrado na Figura 26 e, também, na Figura 27, no qual os picos presentes em mais de um cromatograma são destacados em azul. Entretanto a fração diclorometânica dos caules (FrDCMetA; Figura 26B) diferencia-se da fração diclorometânica das folhas (FrDFMetA; Figura 26E) pela presença de um pico em Tr 2,17 min, destacado em verde na Figura 27B, contudo, esta diferença não interferiu na atividade biológica das frações.

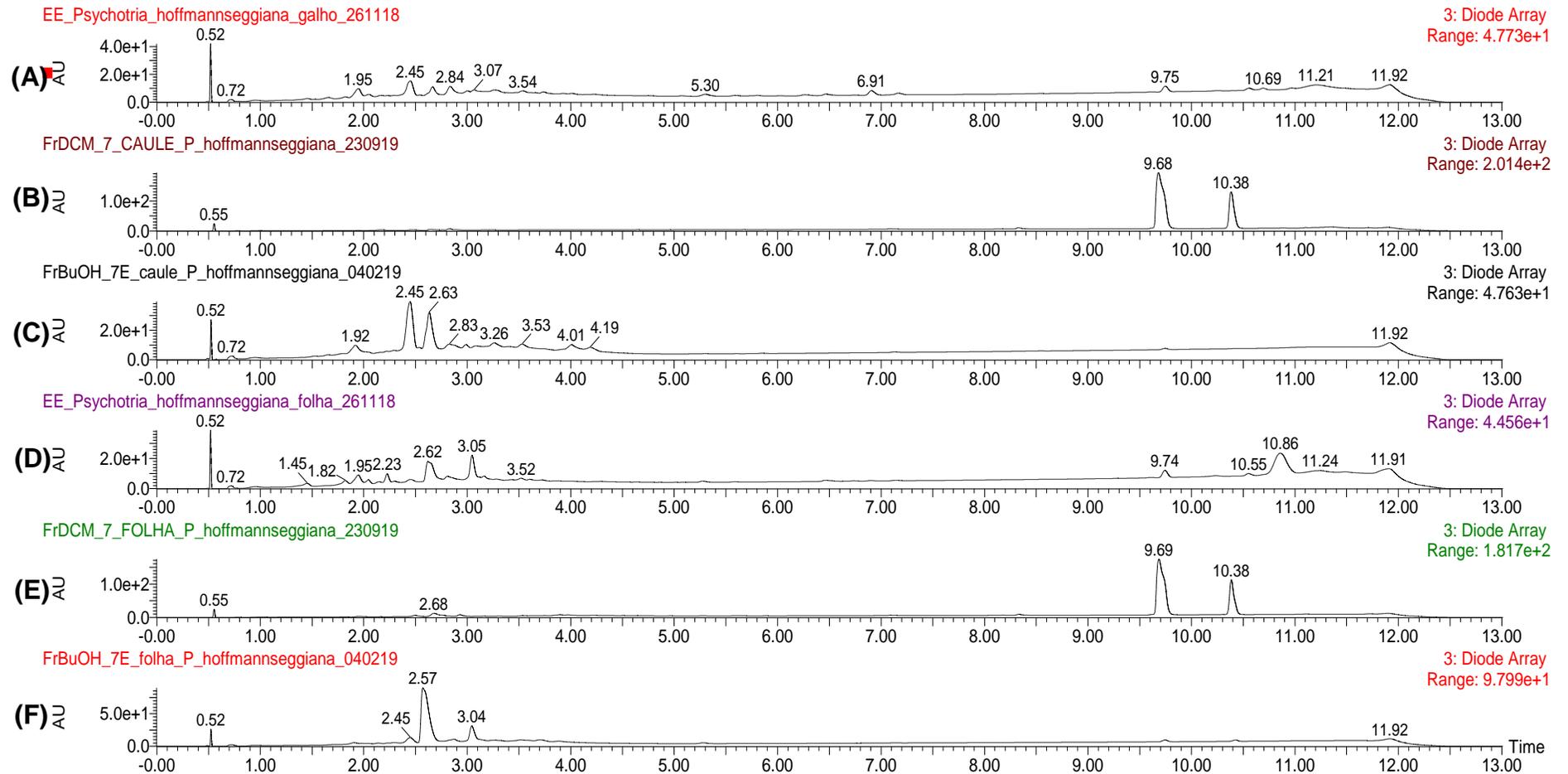


Figura 26. Cromatogramas por CLUE-DAD, registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM, dos extratos etanólicos de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* e das frações obtidas pelo método A de extração de alcaloides. Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules (EECPH); (B) - Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (C) - Fração alcaloídica butanólica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrBCMetA); (D) – Extrato etanólico das folhas (EEFPH); (E) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (F) - Fração alcaloídica butanólica de folhas, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrBFMetA).

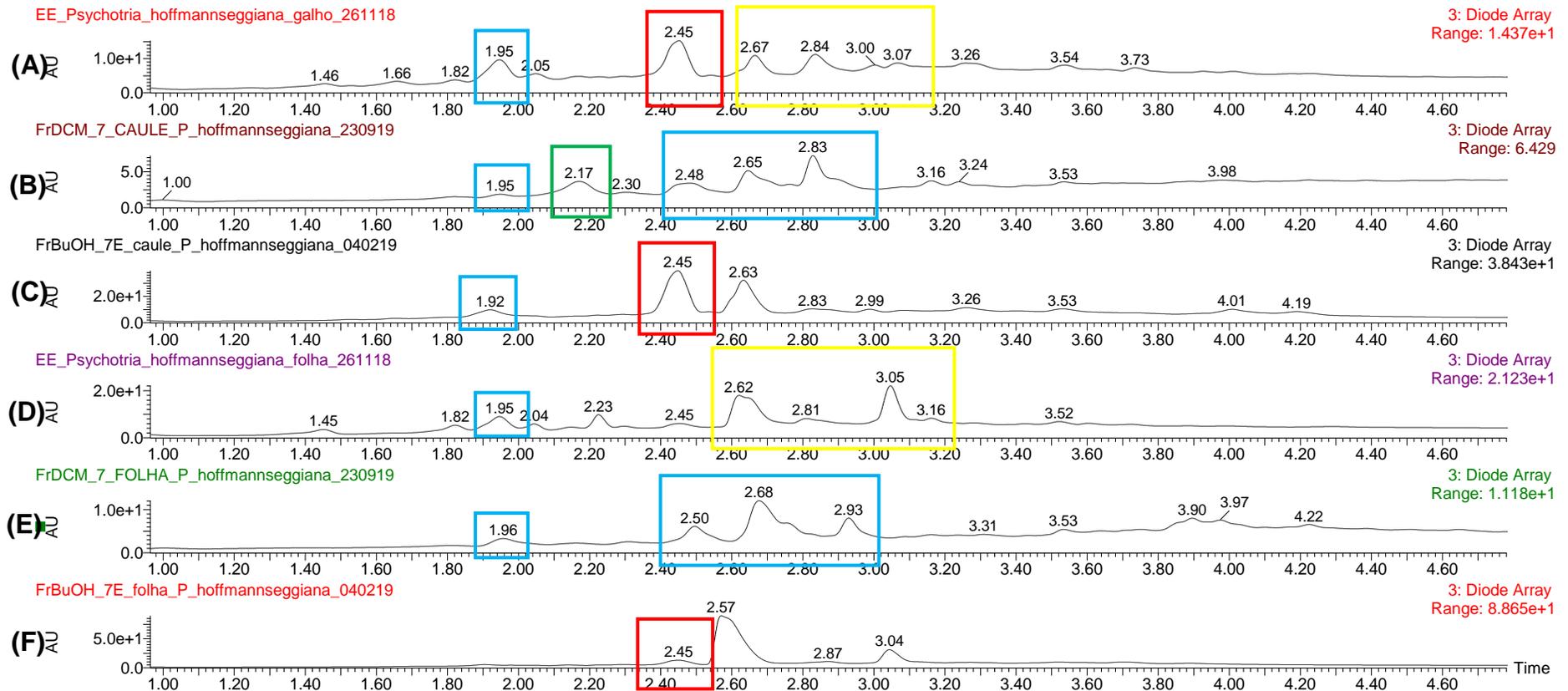


Figura 27. Expansão dos cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos e frações de *Palicourea hoffmannseggiana*, obtidas pelo método A de extração de alcaloides (Tr 0 – 5 min). Detecção em 220 nm.

Nota: Em azul estão destacados os picos semelhantes entre as frações diclorometânicas dos caules (Cromatograma B) e das folhas (coleta 1) (Cromatograma E) e aqueles presentes em torno de Tr 1,90 min nos cromatogramas C, D e E. Em verde encontra-se destacado o pico presente apenas na fração diclorometânica dos caules (cromatograma B). Em vermelho são destacados os picos diferentes entre as frações butanólica dos caules (cromatograma C) e das folhas (cromatograma F). Em amarelo estão destacados picos semelhantes nos extratos dos caules e folhas. **Legenda:** (A) – Extrato etanólico dos caules (EECPH); (B) - Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (C) - Fração alcaloídica butanólica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrBCMétA); (D) – Extrato etanólico das folhas (coleta 1) (EEFPH-1); (E) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas (coleta 1), obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (F) - Fração alcaloídica butanólica de folhas, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrBFMetA).

5.5.2 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE FOLHAS DE *PALICOUREA HOFFMANNGESIANA* OBTIDOS PELO MÉTODO B, DADOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES POR CLUE-DAD

Os resultados dos ensaios de atividade antiplasmódica das frações obtidas pelo método B constam do Grupo 3 (Tabela 09) e mostram a eficácia deste método pelo aumento da atividade antiplasmódica de algumas frações em relação ao extrato etanólico de folhas que foi inativo. As frações clorofórmicas obtidas por extração das fases aquosas ácida a pH 1 – 2 (FrCAcMetB) e neutra a pH 7 (FrCNMetB) e básica a pH 9-10 (FrCBMetB) apresentaram boa atividade antiplasmódica nas duas concentrações avaliadas; a fração em acetato de etila básica a pH 9-10 (FrAcOEtMetB) foi ativa somente na concentração mais alta enquanto que a fração *n*-butanólica foi inativa nas duas concentrações. É interessante destacar que as frações mais ativas foram aquelas extraídas com clorofórmio, um solvente mais polar do que o diclorometano e menos polar do que o *n*-butanol, usado no Método A, demonstrando que as substâncias ativas são melhor extraídas por este solvente.

Os perfis cromatográficos do extrato etanólico de folhas de *P. hoffmanngesianna* da coleta 1 e das frações obtidas a partir deste, pelo método B para separação de alcaloides (Figura 28), mostram alta seletividade nas condições empregadas. A fração clorofórmica, obtida na extração da fase aquosa ácida (FrCAcMetB), tem um perfil significativamente diferente daquele do extrato etanólico (EEFPH-1), principalmente em $T_{rs} > 3,40$ min, observando-se que praticamente não apareciam nesta região, no cromatograma do extrato etanólico, inferindo-se que se trata de constituintes minoritários, de natureza neutra ou ácida. Por outro lado, na faixa de $T_r < 3,20$ min observam-se picos mais intensos, também ausentes no cromatograma do extrato etanólico. Este é um resultado bastante distinto daquele obtido no método A, em que se empregou diclorometano na extração (Figura 08, pág. 35). Nas frações clorofórmicas, resultantes das extrações da fase aquosa neutra (pH 7, FrCNMetB) e da fase aquosa básica (pH 9-10, FrCBMetB) predominam dois picos largos, em T_r 2,40 e 1,83 min, respectivamente, ambos fracos nos cromatogramas do extrato etanólico e na fração *n*-butanólica, e ausente na fração clorofórmica ácida. Na fração em acetato de etila (FrAcOetMetB), o pico em T_r 2,48 min está, possivelmente, contido no pico intenso e largo do cromatograma da fração neutra (FrCNMetB), apresentando, na faixa de T_r 2,60 a

4,60 min, um perfil muito semelhante àquele da fração clorofórmica extraída a pH 9-10 (FrCBMetB). Já na fração básica *n*-butanólica (FrBMetB) observam-se dois picos, o primeiro, em Tr 2,56 min, é mais intenso e pode estar superposto àquele pico largo em 2,40 min no cromatograma das fração clorofórmica neutra (FrCNMetB), sendo o segundo, em Tr 3,03 min, mais fraco; ambos estão presentes no cromatograma do extrato etanólico e são, provavelmente, alcaloides indólicos monoterpênicos glicosilados já descritos nesta espécie, pois apresentam UV relativo à esta classe de alcaloides (NAVES, 2014; OLIVEIRA et al., 2013).

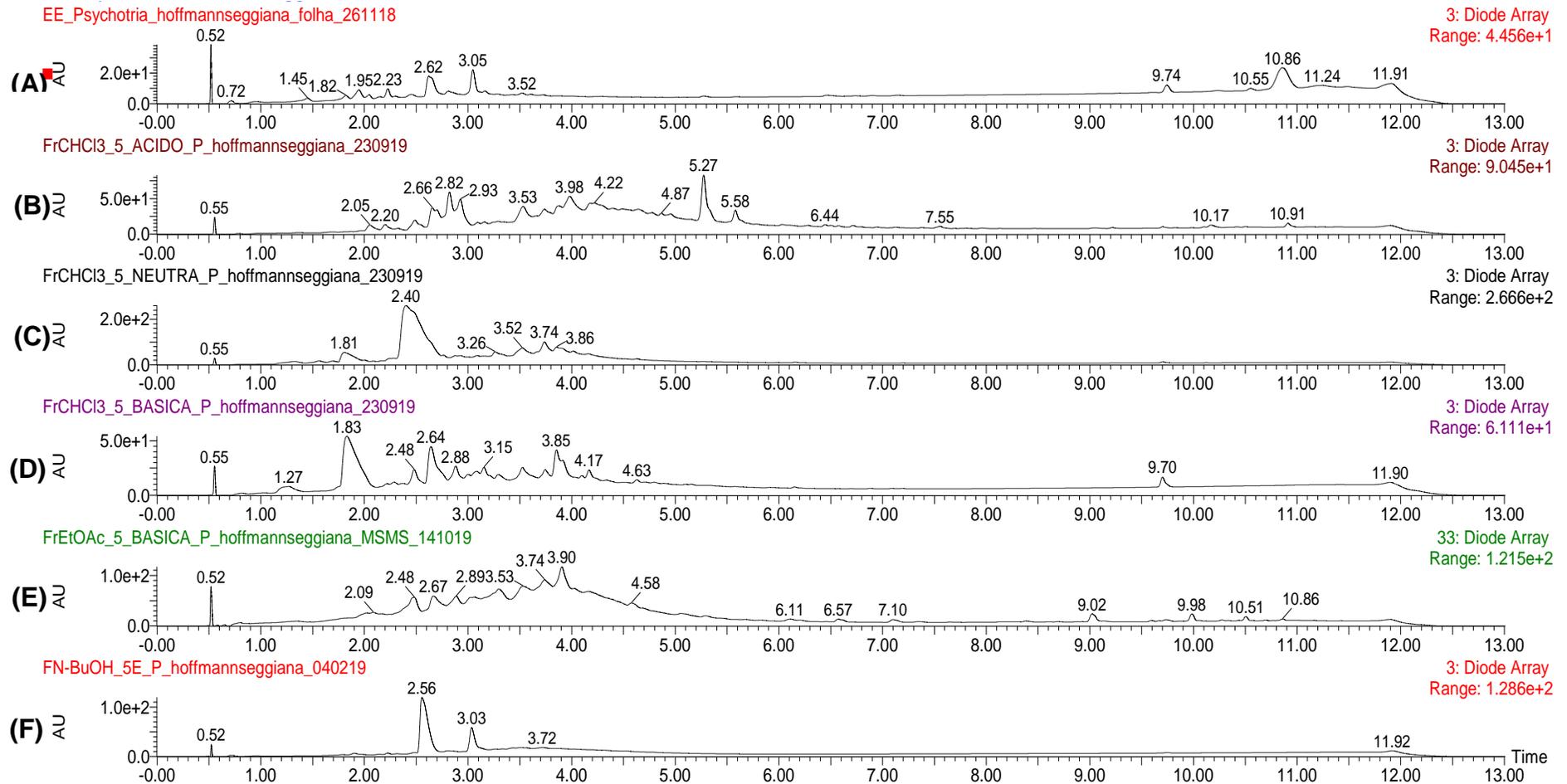


Figura 28. Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM do extrato etanólico de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* e das frações obtidas pelo método B de extração de alcaloides. Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) – Extrato etanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana* (EEFPH); (B) – Fração clorofórmica ácida (FrCAcMetB); (C) – Fração clorofórmica neutra (FrCNMetB); (D) – Fração clorofórmica básica (FrCBMetB); (E) – Fração acetato de etila básica (FrAcOEtMetB); (F) – Fração butanólica básica (FrBMetB).

5.5.3 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA PELO MÉTODO *P*LDH DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *PALICOUREA HOFFMANNGESIANA*, DADOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES POR CLUE-DAD

A Tabela 09 (Pág. 88) mostra os resultados referentes às amostras do Grupo 4, compreendendo a avaliação da atividade antiplasmódica em termos da % Red (porcentagem de redução do crescimento) do *P. falciparum* (W2) para o extrato etanólico das folhas da coleta 2 e da fração clorofórmica (FrCPLLF), obtida a partir da solução hidrometanólica (FrHMPLLF), por partição líquido-líquido, juntamente com os dados da análise estatística para avaliar a similaridade entre estas frações. Este fracionamento foi muito eficiente uma vez que, ocorreu um aumento na atividade antiplasmódica do extrato etanólico da coleta 2, levando a uma fração clorofórmica muito ativa, em ambas as concentrações nos testes realizados, sendo que a fração hidrometanólica apresentou % Red próxima a 50% (pouco ativa), na concentração mais alta (100 µg/mL) e % Red < 50% (inativa), na concentração mais baixa (50 µg/mL).

Os cromatogramas das Figuras 29A e 29B registrados por UPLC-DAD no equipamento Waters Acquity Ultra Performance LC, detector PDA, mostram uma similaridade entre os perfis fitoquímicos dos extratos etanólicos de folhas da primeira e segunda coletas. Já os cromatogramas das Figuras 29C e 29D são das frações resultantes da partição líquido-líquido, a primeira correspondendo à fração clorofórmica (FrCPLLF), mostrou a presença de substâncias de alta a média polaridade, com picos na faixa de Tr 2 a 7 min, enquanto que o o segundo cromatograma, correspondente à fração hidrometanólica (FrHMPLLF), tem predominância de substâncias de alta polaridade (Tr < 3,40 min) .

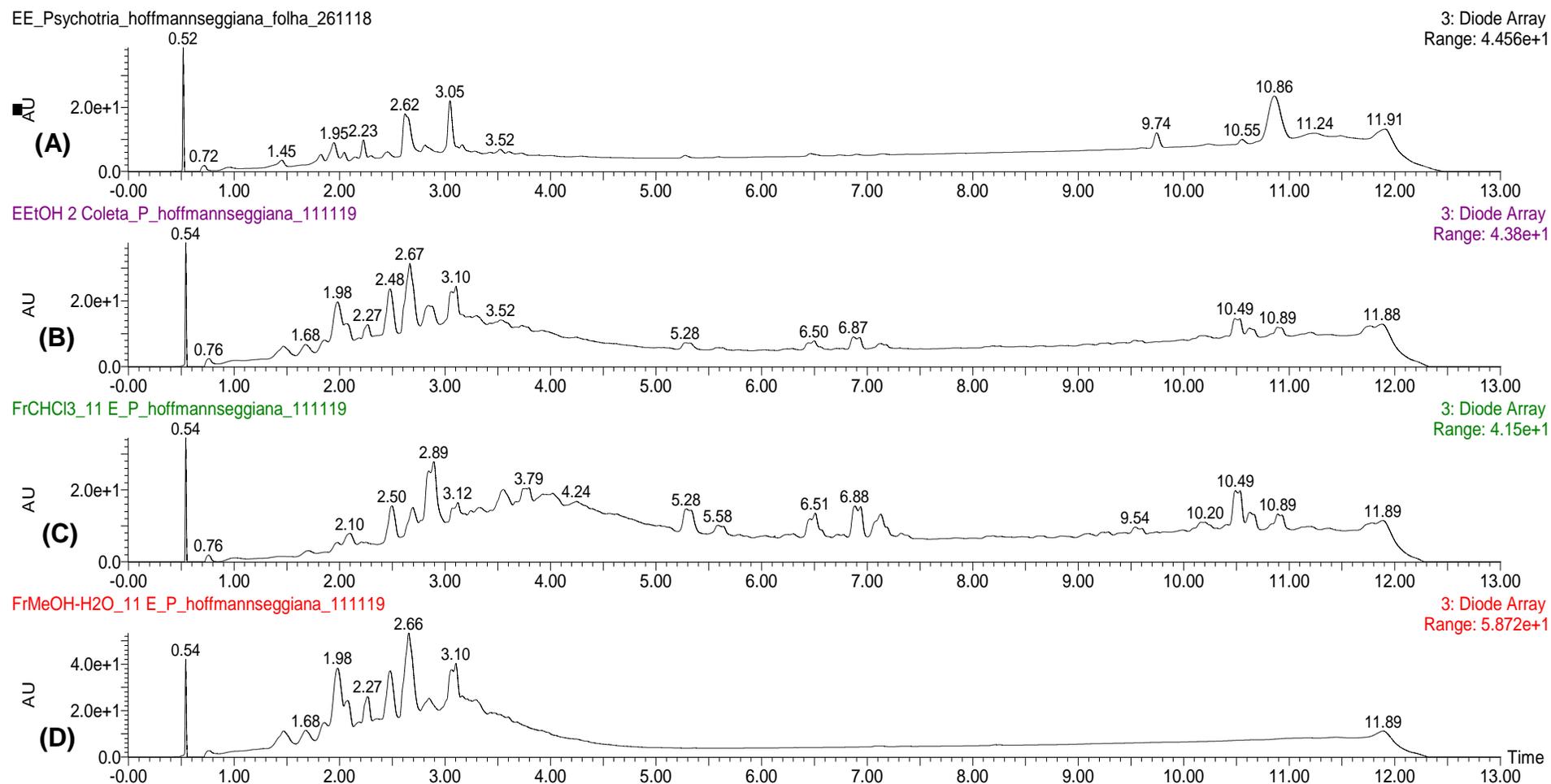


Figura 29. Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM do extrato etanólico de folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* (coletas 1 e 2) e das frações obtidas por partição líquido-líquido. Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) – Extrato etanólico das folhas (coleta 1) de *P. hoffmannseggiana*; (B) – Extrato etanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana* (coleta 2); (C) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLL); (D) – Fração hidrometanólica partição líquido-líquido (FrHMPPLL).

Em síntese, as frações obtidas com diclorometano na extração de alcaloides pelo método A (FrDCMetA e FrDFMetA, Grupo 2 Tabela 09), aquelas extraídas com clorofórmio pelo método B (FrCAcMetB, FrCNMetB, FrCBMetB e FrAcOEtMetB Grupo 3, Tabela 09) e as frações obtidas pela partição líquido-líquido (FrCPLLF, Grupo 4 Tabela 09) foram ativas, apresentando um percentual de redução (% Red) do crescimento de parasito entre 64 - 96%, na concentração de 100 µg/mL. Esta atividade pode estar relacionada à presença de alcaloides indólicos e β-carbolínicos em *P. hoffmannseggiana*, como descrito no presente trabalho e, anteriormente, por Naves (2014).

Entre os alcaloides β-carbolínicos presentes nas espécies do gênero, pode-se destacar o harmano cuja amostra comercial foi testada em relação a sua atividade antiplasmódica, e também amostra isolada de *Guiera senegalensis* (Combretaceae), planta de uso popular no Mali para o tratamento da malária (FIOT et al., 2006; ANCOLIO et al., 2002). Estudos utilizando uma amostra comercial do alcaloide harmano mostraram uma CI₅₀ de 2,48 µg/mL, por meio de teste *in vitro* frente a cepa K1 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum*, sendo considerado como moderadamente ativo (MONTEIRO et al., 2014). Contudo, outro estudo utilizando também amostra comercial do mesmo alcaloide, apresentou resultado negativo em testes *in vitro* frente a cepas K1 multi-resistente K1, porém os testes *in vivo*, realizados pelo mesmo autor, apresentaram moderada atividade contra cepa NK65 de *P. berghei* (MONTIOIA, 2017).

Há poucos dados sobre atividade antiplasmódica de alcaloides de espécies do gênero *Palicourea*, porém existem alguns relatos sobre atividade antimalárica de espécies do gênero *Psychotria*. A benz(g)isoquinolina-5,10-diona, isolado de *Psychotria camponutans*, apresentou CI₅₀ = 4 µmol/mL frente a cepa K-1 de *P. falciparum* cloroquina resistente (SOLIS et al., 1995). Os alcaloides isoquinolínicos isolados de *P. klugii* (klugina, 7'-O-dimetlisocefaelina, cefaelina e isocefaelina) foram avaliados frente a duas cepas de *P. falciparum* W-2 cloroquina resistente, e D-6, sensível a cloroquina. Os alcaloides klugina e cefalina apresentaram as melhores atividades, com valores de CI₅₀ de 98,90 a 61,65 nmol/mL para a cepa W-2 e de 80,51 a 84,57 nmol/mL para a cepa D-6, mostrando-se semelhantes à cloroquina (CI₅₀ D-6 56,27 nmol/mL; CI₅₀ W2 120 nmol/mL) (MUHAMMAD et al., 2003).

5.6 Comparação dos perfís cromatográficos por CLUE-DAD dos extratos etanólicos de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* e das frações com atividade antiplasmódica *in vitro*

Nos itens anteriores foram apresentados os resultados dos ensaios de atividade antiplasmódica para extratos e frações obtidos a partir de caules e folhas de *P. hoffmannseggiana* por diferentes métodos de extração, juntamente com seus perfís cromatográficos por CLUE-DAD, registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM/EM, tendo sido mostrados, também, os dados estatísticos para avaliação das similaridades entre as atividades antiplasmódicas destas amostras.

Neste ítem será considerada a Tabela 10, a qual mostra os resultados dos testes *in vitro* de atividade antiplasmódica para as frações ativas que apresentaram % Red > 50, e do extrato etanólico de folhas (EEFPH-1) o qual, embora inativo, foi incluído nesta tabela como referência. Serão realizadas comparações entre as frações ativas de acordo com suas similaridades em termos de suas atividades antiplasmódica, contida na Tabela 10. Os extratos etanólicos de caules (EECPH) e folhas (EEFPH-1) apresentaram baixa redução de parasitemia (% Red < 50), são estatisticamente equivalentes (Tabela 09), e os seus perfís registrados por CLUE-DAD no equipamento por CLUE-DAD-ESI-EM/EM, são qualitativamente muito semelhantes (Figura 25A e Figura 25B), o que permite inferir que os constituintes majoritários são inativos. As frações alcalóidicas extraídas com diclorometano pelo método A na extração de soluções aquosas básicas (pH 9 - 10) de caules (FrDCMetA) e folhas (FrDFMetA) apresentaram atividade antiplasmódica moderada (% Red ~ 65), em ambas as concentrações e são estatisticamente equivalentes (Tabela 10). Já as frações obtidas pelo método B, a saber, a fração clorofórmica ácida (FrCAcMetB), a fração clorofórmica neutra (FrCNMetB) e a fração clorofórmica básica (FrCBMetB), bem como a fração clorofórmica obtida por partição líquido-líquido (FrCPLL) foram as mais ativas, com porcentagem de redução de parasitemia na faixa de $78,5 \pm 2,1\%$ a $96,5 \pm 0,7\%$.

Tabela 10. Porcentagem de inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum* (W2) do extrato etanólico de folhas da coleta 1 e das frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* avaliados pelo método da Lactato Desidrogenase do parasito (P_fLDH) e dados estatísticos

| Amostras | % Inibição do crescimento |
|----------|---------------------------|
|----------|---------------------------|

| | [100,0 µg/mL] | [50,0 µg/mL] |
|---|--------------------------------|-------------------------------|
| Ext. EtOH Folhas (EEFPH-1) | 26,0 ± 4,2 ^D | 25,0 ± 5,6 ^E |
| Fr. DCM Caule (FrDCMetA) | 65,5 ± 10,6^C | 60,5 ± 3,5^D |
| Fr. DCM Folhas (FrDFMetA) | 64,0 ± 1,4^C | 59,5 ± 4,9^D |
| Fr. CHCl₃ Ac. (FCAcMetB) | 80,0 ± 8,4^B | 73,5 ± 6,3^B |
| Fr. CHCl₃ Neu. (FCNMetB) | 78,5 ± 2,1^B | 76,5 ± 0,7^B |
| Fr. CHCl₃ Bas. (FrCBMetB) | 92,5 ± 0,7^A | 67,0 ± 1,4^C |
| Fr. CHCl₃ (FCPLLF-2) | 96,5 ± 4,9^A | 88,0 ± 2,8^A |
| Controle Positivo | | |
| Cloroquina | 100,0 ± 0,0 * | 100,0 ± 0,0 * |

Notas: As médias (± DP, n = 3) seguidas por letras diferentes foram significativamente diferentes nas colunas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). As análises estatísticas da redução da parasitemia em 100,0 e 50,0 µg/mL foram realizadas separadamente para cada concentração, bem como para cada grupo analisado. * A análise estatística da atividade antiplasmodica do controle (cloroquina) foi realizada separadamente com cada amostra e concentração, e significativa para $p < 0,05$.

Os perfis cromatográficos por CLUE-DAD das amostras ativas frente ao *Plasmodium falciparum*, contidas na Tabela 10 são mostrados nas Figuras 30 e 31, a primeira com uma varredura dos Trs de 0 a 13 min, e a segunda para cromatogramas expandidos, com varreduras de Trs de 0 a 8 min. Os cromatogramas 30A e 30B, correspondentes aos extratos etanólicos de caules (EECPH) e folhas (EEFPH), são muito semelhantes, foram inativas e os respectivos extratos são estatisticamente equivalentes, como já foi discutido anteriormente (pág 87-91). As Figuras 30C e 30D referem-se às frações alcaloídicas diclorometânicas obtidas pelo método A, a pH 9 – 10, de folhas (FrDFMetA) e de caules (FrDCMetA) e distinguem-se das demais por apresentarem dois picos destacados de substâncias de baixa polaridade (Trs 9,68 e 10,38 min). As Figuras 30E, 30F, 30G e 30H mostram os perfis das três frações obtidas pelo método B, a saber fração clorofórmica ácida (FrCAcMetB), fração clorofórmica neutra (FrCNMetB) e fração clorofórmica básica (FrCBMetB), além da fração clorofórmica obtida por partição líquido-líquido (FrCPLLF). Das frações obtidas pelo método B, aquelas resultantes das extrações com clorofórmio das frações aquosas a pH 1-2 (FrCAcMetB) e pH 7 (FrCNMetB) foram ativas e estatisticamente equivalentes, no entanto seus perfis cromatográficos são muito distintos, o primeiro com um pico mais intenso em Tr 5,27 min e o segundo no Tr 2,40 min sendo que ambas apresentam picos de baixa intensidade na faixa de Trs de 3 a 4 min. Já a fração clorofórmica resultante da extração da

camada aquosa básica a pH 9-10, também pelo método B (FrCBMetB), e a fração clorofórmica obtida na partição líquido-líquido com a camada hidrometanólica oriunda do extrato etanólico de folhas da segunda coleta do material vegetal (FrCPLLF) e que foram as mais potentes, apresentaram picos de baixa intensidade na faixa de Tr 2,50 a 4,50 min e diferem porque na primeira observa-se um pico intenso e largo em Tr 1,83 min, enquanto no segundo, picos fracos ocorrem nas faixas de 2,50 a 7,50 min e também de 9 a 11 min. Os presentes resultados mostram a importância de se realizar fracionamentos de extratos etanólicos inativos e/ou empregar métodos de extração seletivos na fase de triagem, o que permite detectar frações ativas contendo constituintes ativos que são minoritários nos extratos brutos iniciais. Estes mesmos cromatogramas por CLUE-DAD, mas registrados de modo expandido na faixa de Trs 0 a 8 min, são mostrados na Figura 31, com melhor visibilidade das intensidades dos picos, destacando-se mudanças nos perfis dos cromatogramas 30C e 30D que, nestas condições, apresentam picos de substâncias polares na faixa de 1 a 3 min. Deve-se destacar que, na Figura 31, o pico em 2,45 min é mais intenso no cromatograma (A) – Extrato etanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana*, coleta 1 (EECPH-1) do que no cromatograma B- Extrato etanólico das folhas, coleta 1 (EEFPH-1) e que este se intensificou no cromatograma F-Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB). Observou-se, também, que o pico em 1,82 min, muito fraco nos cromatogramas dos extratos etanólicos (cromatogramas A e B), apresenta-se como majoritário no cromatograma G- Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB). Com relação à fração clorofórmica oriunda da partição líquido-líquido (cromatograma H - Fração clorofórmica, partição líquido-líquido, FrCPLLF), embora tenha sido a mais ativa (% Red ~96%), apresentou um perfil muito semelhante àquele do cromatograma da fração E Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB) na faixa de 2,0 a 5,70 min com o aparecimento de picos de baixa intensidade na faixa de 6,20 a 7,50 min. As diferenças nos perfis cromatográficos destas amostras é uma demonstração clara de que processos de fracionamentos preliminares de extratos etanólicos podem levar a amostras com diferentes composições fitoquímicas facilitando a etapa seguinte de isolamento de substâncias bioativas.

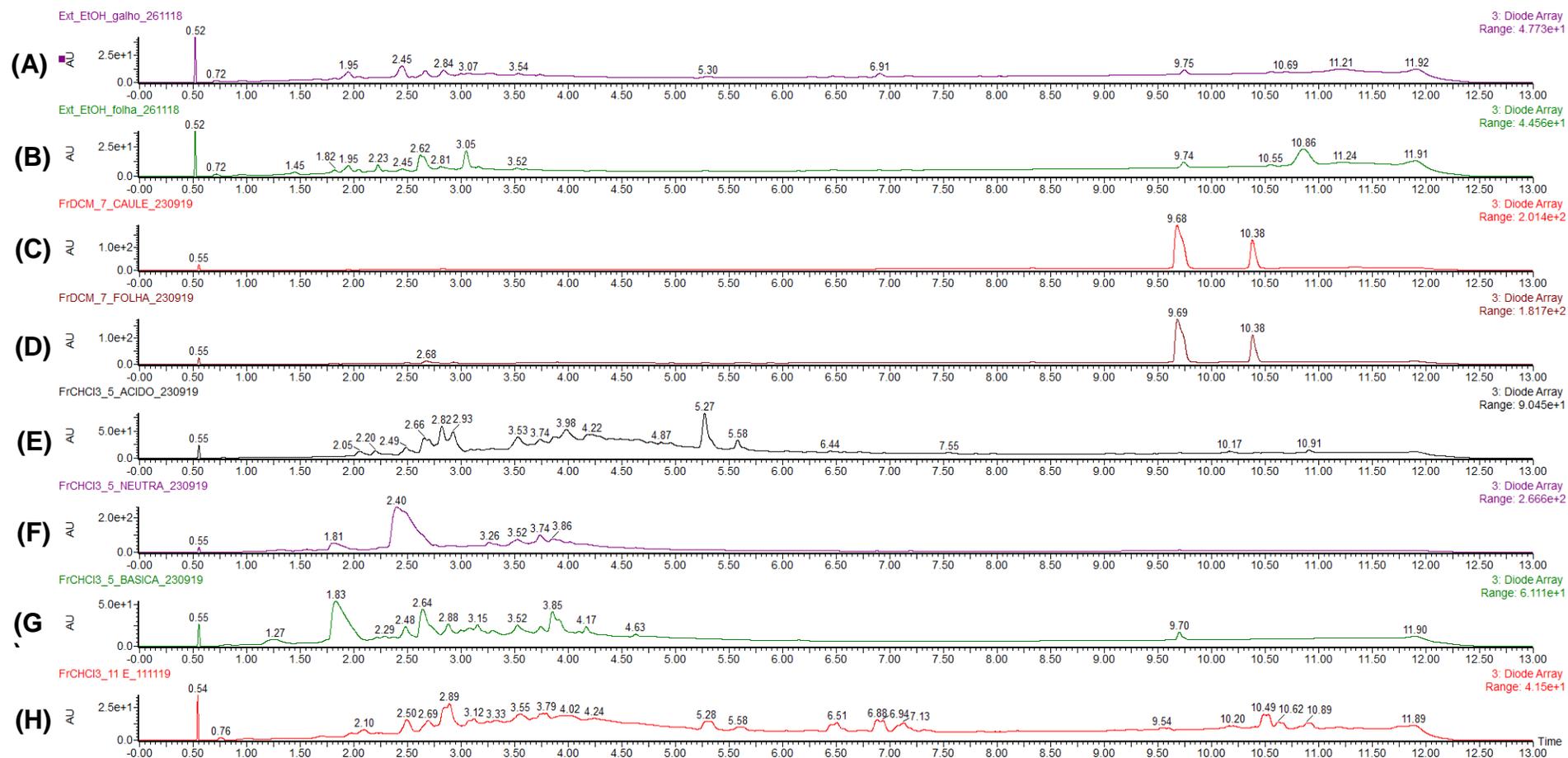


Figura 30. Cromatogramas por CLUE-DAD registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos etanólicos de caules e folhas e de frações ativas obtidas a partir de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (TR 0 –13 min). Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana*, 1^o coleta (EECPH-1); (B) – Extrato etanólico das folhas, 1^o coleta (EEFPH-1); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, à pH 9 – 10 (FrDCMetA); (D) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, à pH 9 – 10 (FrDFMetA); (E) Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB); (F) - Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB); (G) Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB); (H) - Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLLf).

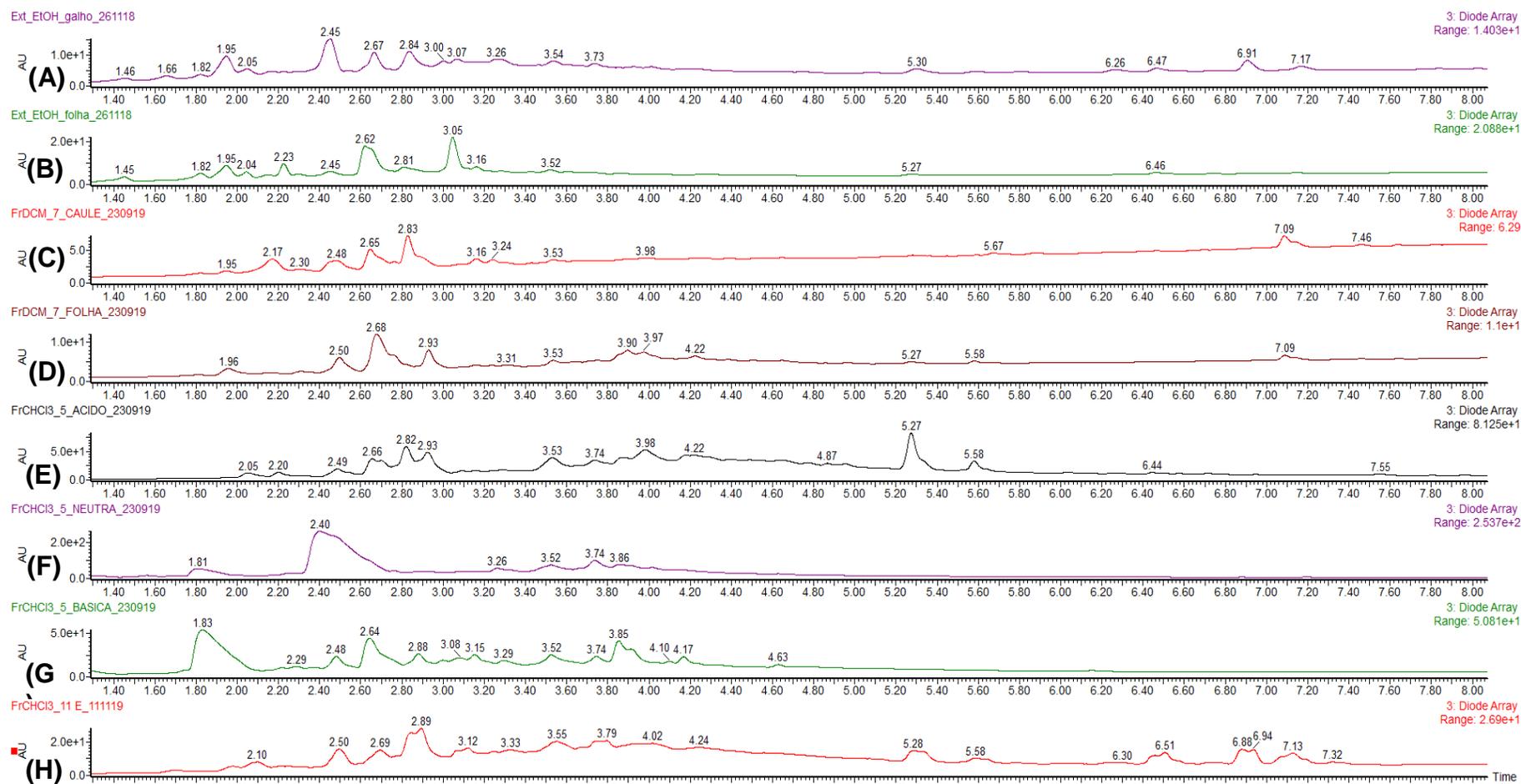


Figura 31. Cromatogramas por CLUE-DAD expandidos e registrados no equipamento CLUE-DAD-ESI-EM dos extratos etanólicos de caules e folhas e frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (TR 0 – 8 min). Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *P. hoffmannseggiana*, coleta 1 (EECPH-1); (B) – Extrato etanólico das folhas, coleta 1 (EEFPH-1); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (D) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (E) – Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB); (F) – Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB); (G) – Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB); (H) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLLf).

5.7 Caracterização e identificação por CLUE-DAD-ESI-EM\EM de constituintes dos extratos de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* - Grupo 1 (Tabela 09)

Neste ítem serão discutidos os dados de CLUE-DAD-ESI-EM\EM que levaram à identificação de constituintes majoritários dos extratos etanólicos de caules e de folhas (coletas 1 e 2) os quais foram inativos nos testes *in vitro* de atividade antiplasmódica (Tabela 09). Os cromatogramas de íons totais (*TIC*) ou de varredura completa (*Full Scan*) destes extratos apresentam perfis muito semelhantes, nos modos positivo e negativo (ESI^+ e ESI^-) como mostrado, respectivamente, nas Figuras 32 e 33, destacando os principais picos, que são semelhantes nos extratos, m/z 355, 513, 517, 719 no ESI^+ e seus respectivos íons no ESI^- .

Alguns dos picos mais intensos nos cromatogramas de íons totais do extrato etanólico das folhas de *P. hoffmannseggiana* (EEFPH-1) correspondem aos TRs 1,45, 1,82 e 1,95 min no cromatograma UPLC-DAD (Figura 34), os dados de UV e MS foram: $\lambda_{max} \sim 217, 280sh, 325$ nm; m/z 353,09 $[M - H]^-$, juntamente com os fragmentos m/z 191,40 $[M - H - 162]^-$ e 161,26 $[M - H - 192]^-$, resultado da perda de um radical cafeoil acilium e um radical ácido quínico, respectivamente. Esses dados levaram à identificação dos ácidos clorogênico, neoclorogênico e criptoclorogênico, embora não seja possível definir qual pico corresponde a cada um dos isômeros. A presença destes compostos já foi relatada para as espécies dos gêneros *Notopleura*, *Psychotria* e *Palicourea* (BERGER et al., 2016). Entretanto, não há relatos do isolamento destas substâncias a partir de *Palicourea hoffmannseggiana* e nem em outras espécies pertencentes ao gênero.

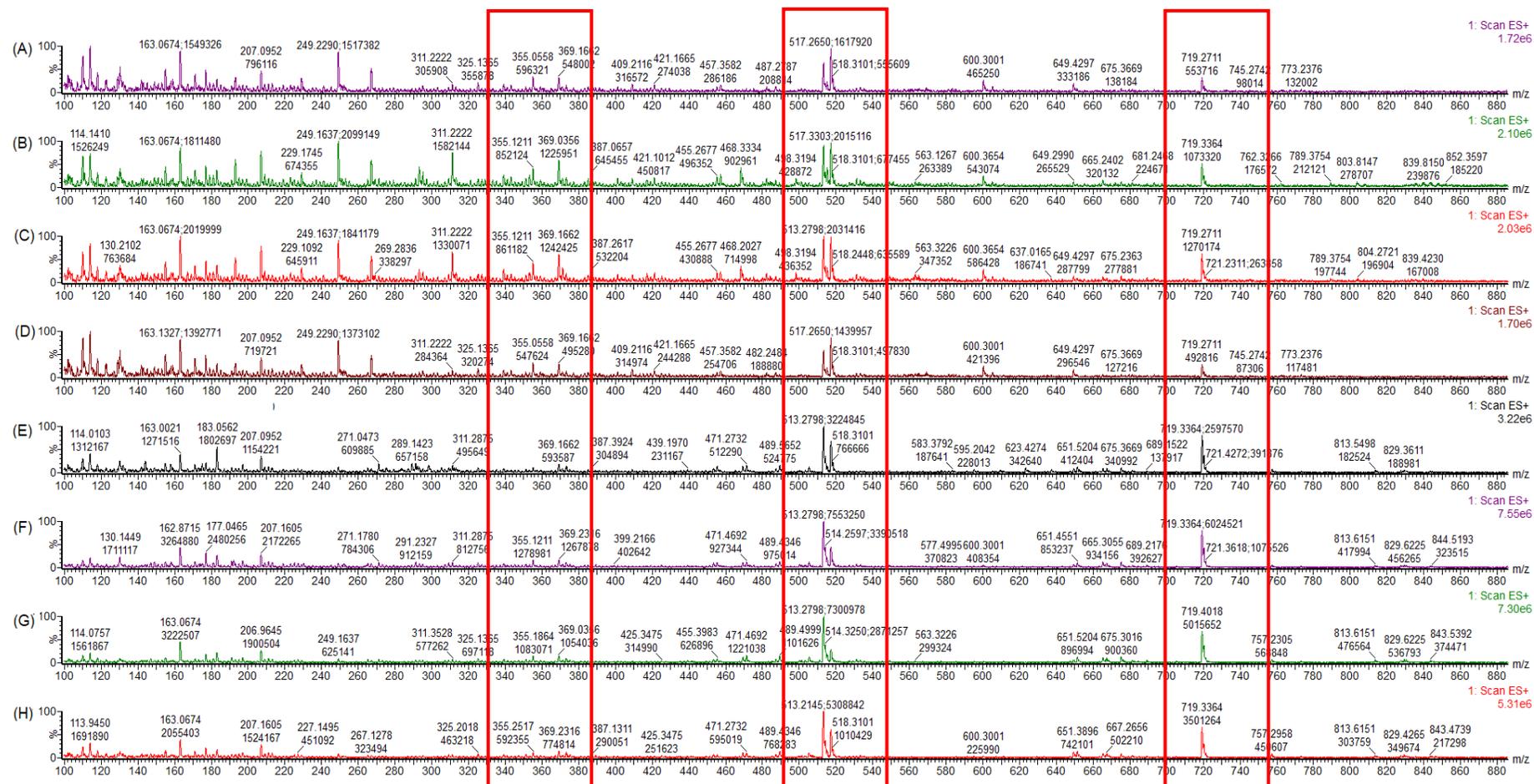


Figura 32. CLUE-ESI-MS expandido (TIC Scan Positivo) de Extrato Etanólico, Extratos hidroetanólicos e extratos aquosos de *Palicourea hoffmannsegiana* caules e folhas (Grupo 1).

Legenda: (A) - Extrato etanólico - caule (EECPH), (B) - Extrato hidroetanólico 7:3 -caule (EHEC7:3), (C) - Extrato hidroetanólico 1:1 -caule (EHEC1:1), (D) – Extrato Aquoso – caules (EACPH), (A) - Extrato etanólico - folhas (EEFPH), (B) - Extrato hidroetanólico 7:3 - folhas (EHEF7:3), (C) - Extrato hidroetanólico 1:1 - folhas (EHEF1:1), (D) – Extrato Aquoso – folhas (EAFPH).

Nota: Barras vermelhas indicam picos presentes em todos os extratos dos caules e folhas (m/z 355, 513, 517 e 719).

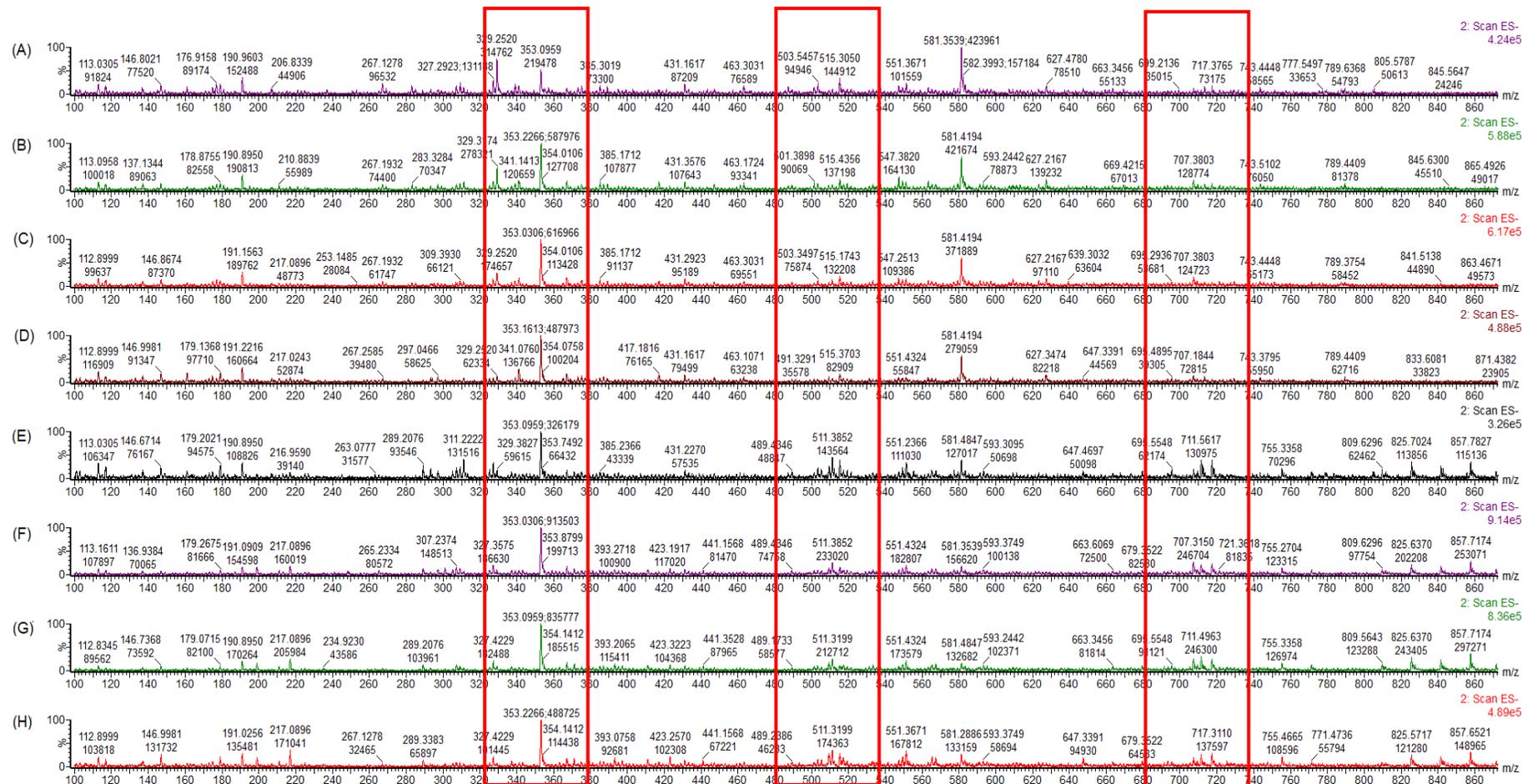


Figura 33. CLUE-ESI-MS expandido (TIC Scan Negativo) de Extrato Etanólico, Extratos hidroetanólicos e extratos aquosos de *Palicourea hoffmannseggiana* caules e folhas (Grupo 1).

Legenda: (A) - Extrato etanólico - caule (EECPH), (B) - Extrato hidroetanólico 7:3 -caule (EHEC7:3), (C) - Extrato hidroetanólico 1:1 -caule (EHEC1:1), (D) - Extrato Aquoso - caules (EACPH), (E) - Extrato etanólico - folhas (EEFPH), (F) - Extrato hidroetanólico 7:3 - folhas (EHEF7:3), (G) - Extrato hidroetanólico 1:1 - folhas (EHEF1:1), (H) - Extrato Aquoso - folhas (EAFPH).

Nota: Barras vermelhas indicam picos presentes em todos os extratos dos caules e folhas (m/z 353, 511, 515 e 717).

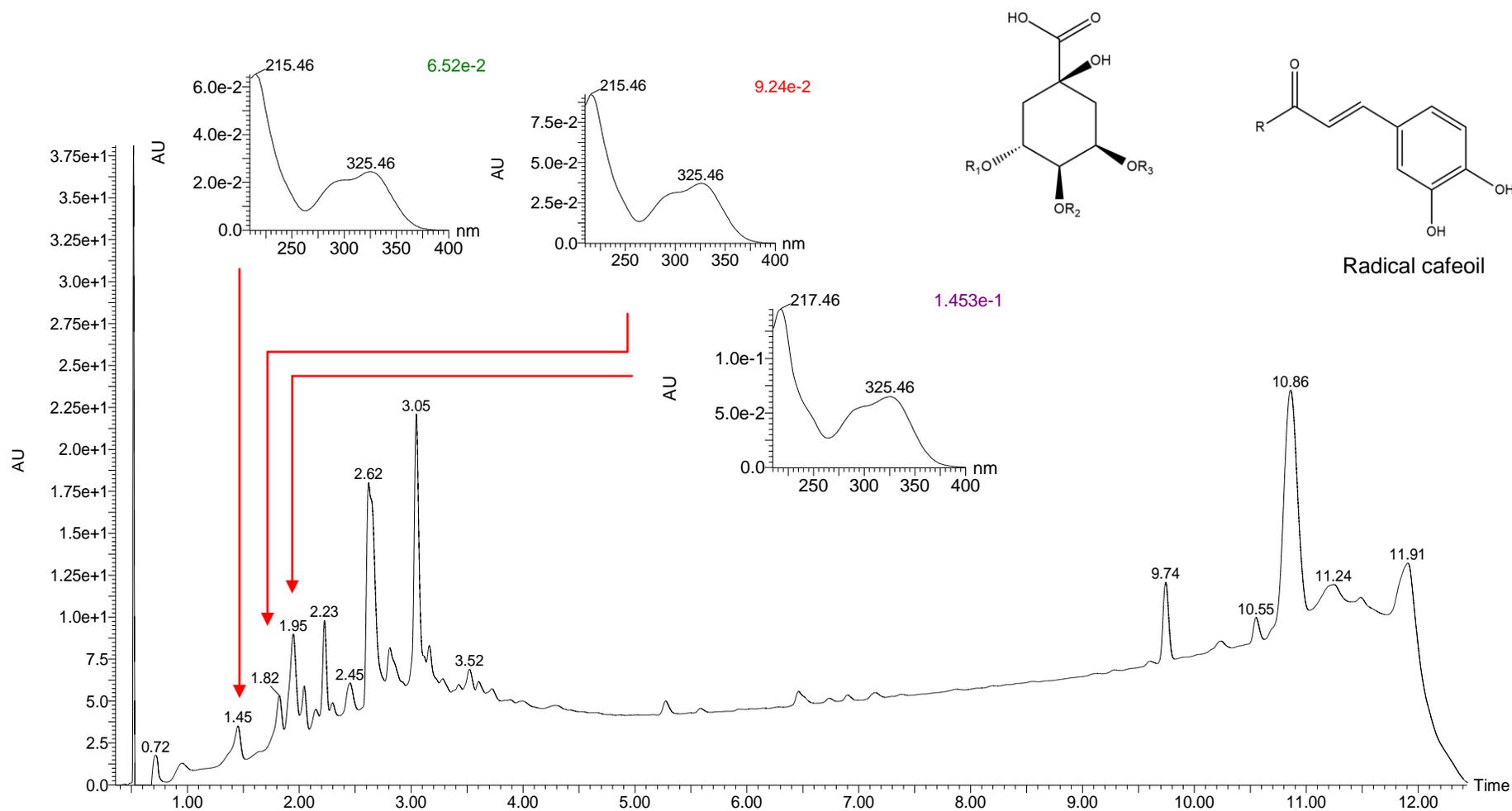


Figura 34. Cromatograma CLUE-DAD do extrato etanólico das folhas (EEFPH-1) e espectros no UV dos picos nos Trs 1,45, 1,82 e 1,95 min.

Nota:

- $R_1 = \text{Cafeoil}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$ (ácido clorogénico – 354 Da);
- $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{Cafeoil}$ (ácido criptoclorogénico – 354 Da);
- $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Cafeoil}$ (ácido neoclorogénico – 354 Da)

Três outros picos mais intensos mostrados no cromatograma UPLC-DAD encontram-se nos TRs 2,62, 2,81 e 3,05 min (Figura 34). Os dois primeiros foram identificados como possíveis isômeros configuracionais dos ácidos lialosídico e estritosidínico. O primeiro, à TR 2,62 min, foi identificado como ácido lialosídico (Figura 38B) com base nos seguintes dados de UV e MS (ESI⁺ e ESI⁻): $\lambda_{\max} \sim 217, 303, 350\text{sh nm}$; $m/z 513,28 [M + H]^+$ e $m/z 511,38 [M - H]^-$. Este dado, associado a um padrão de fragmentação semelhante deste ácido, permitiu sugerir que se tratasse do ácido lialosídico (Figura 35), um alcaloide presente nos gêneros *Psychotria* e *Palicourea* (CALIXTO et al., 2016; MAGEDANS et al., 2019; MOURA et al., 2020). Fragmentações esperadas confirmaram a identificação do ácido lialosídico, pelos picos em $m/z 351 \text{ Da } [M + H - 162]^+$ resultante da perda de glicose, $m/z 469 \text{ Da } [M + H - 44]^+$ resultante da descarboxilação, e $m/z 333 \text{ Da } [M + H - 162 - 18]^+$, resultante de uma desidratação após perda de glicose (Figura 35).

O ácido lialosídico é um alcaloide já isolado de espécies do gênero *Psychotria* e *Palicourea* (GONTIJO et al., 2019; BERGER et al., 2017). Estudos de atividade biológica deste composto, isolado de outra espécie, a *Sickingia williamsi*, demonstrou uma atividade antiespasmódica (AQUINO et al., 1996). Contudo, não foram encontrados estudos sobre a atividade antiplasmódica deste alcaloide.

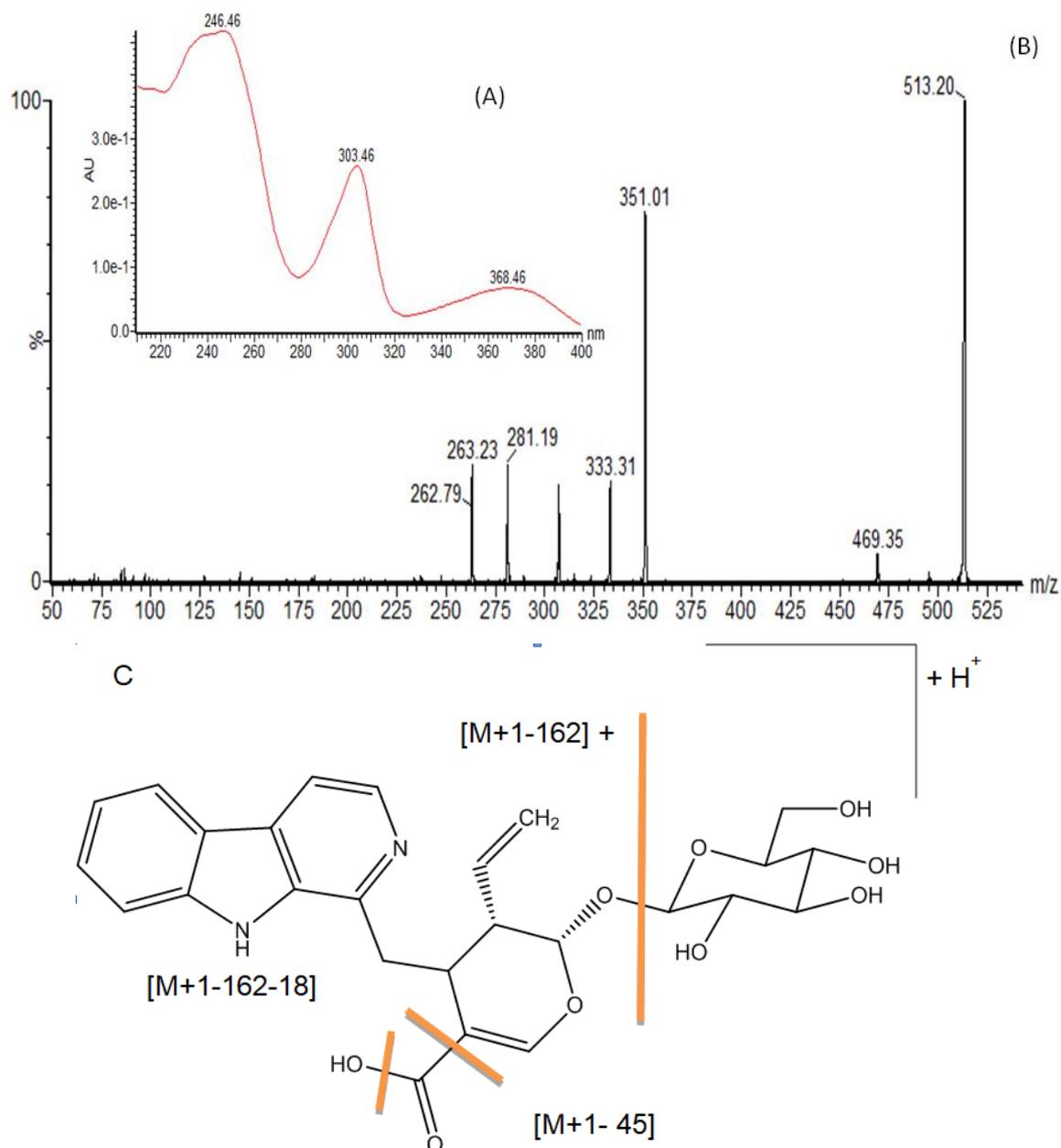


Figura 35. Espectro no UV (A), Espectro de massas ESI⁺ (B) e fragmentações (C) do ácido lialosídico, identificado nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*.

O metabólito com Tr 2,81 min foi identificado como um isômero do ácido estridosidínico m/z 515,37 [M - H], possui fragmentações semelhantes (Figura 36), como a perda de glicose m/z 355,26 [M + H - 162]⁺, seguida pela perda de CO₂ m/z 307,19 [M + H - 162 - 44]⁺, uma fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) da fração de secologanina deu m/z 284,94 [M + H - 232]⁺, m/z 182,06 deve corresponder à unidade indol após a perda da porção secologanina-glicose [M + H - 330]⁺, além de m/z 144,24 correspondente a C₁₀H₁₀N + [M + H - 373]⁺ que provavelmente é

derivado por uma fissão heterocíclica em anel (HRF) do núcleo indólico. A presença de isômeros do ácido lialosídico e do ácido estrictosidínico em diferentes extratos de folhas e caules de *P. hoffmannseggiana* está de acordo com dados da literatura para várias espécies de *Palicourea*, das quais já foram isolados o ácido estrictosidínico (BERGER et al., 2012, 2015, 2017; KLEIN-JUNIOR et al., 2017), e o seu isômero o ácido epi-strictosidínico (Figura 38C; NASCIMENTO et al., 2006), porém só há relatos do isolamento do ácido lialosídico nas espécies do gênero, não havendo relatos de isolamento de outro isômero (BERGER et al., 2017).

O ácido estrictosidínico é um alcaloide já isolado desta espécie (NAVES, 2014; OLIVEIRA et al., 2013). Os efeitos do ácido estrictosidínico isolado de folhas de *Psychotria myriantha*, sobre os níveis de monoamino oxidases no hipocampo de ratos mostrou que este alcaloide age na transmissão dopaminérgica por inibição da atividade da monoamino oxidase A (MAO A) o que sinaliza para uma potencial ação na depressão, no aprendizado e na memória (FARIAS et al., 2012). Além deste estudo, também se demonstrou que o ácido estrictosidínico isolado de *Hunteria zeylanica* possui efeito analgésico e atividade antipirética (REANMONGKOL et al., 2000). Contudo, não foram observados estudos sobre ação antiplasmódica desta substância.

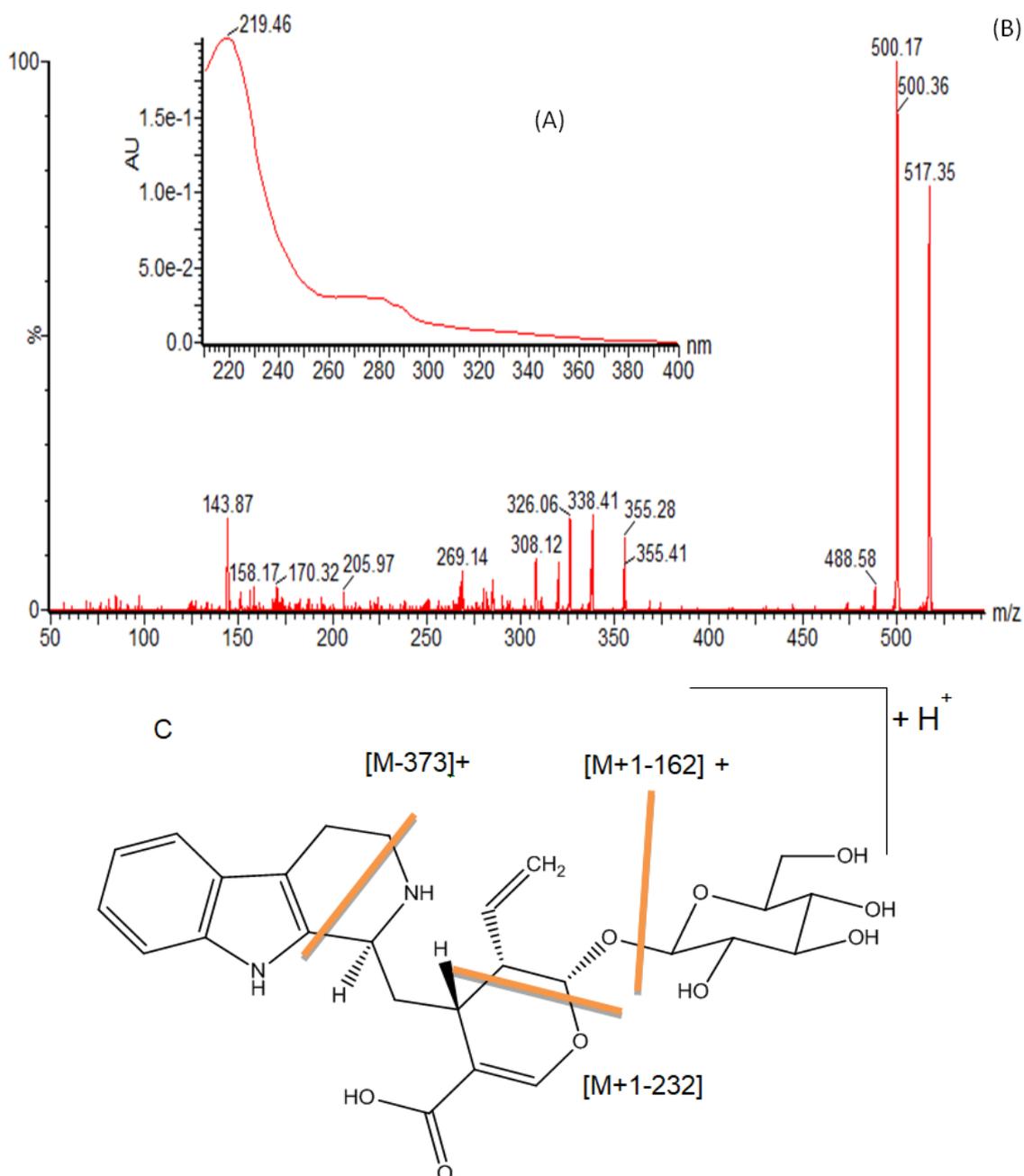


Figura 36. Espectro no UV (A), Espectro de massas ESI⁺ (B) e fragmentações (C) do ácido strictosidínico, identificado nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de *P. hoffmannseggiana*.

!

No cromatograma por CLUE-DAD (Figura 34) observa-se o pico em Tr 3,05 min, correspondente a uma substância de íon molecular protonado em m/z 719 Da $[M + H]^+$ e, portanto, com MM 718. Os máximos de absorção no UV (λ_{\max} 235, 306 e 340 nm) para esta substância (Figura 37) são compatíveis com o espectro de alcaloides monoterpêno indólicos (FARIAS, 2006). Nos espectros de massas sequenciais (EM\EM) para estes íons, foram observados íons fragmentários similares a alguns daqueles do ácido lialosídico, o que corrobora a hipótese de se

tratar de um alcaloide monoterpeneo indólico (AMI). Uma busca na biblioteca eletrônica Scifinder® mostrou a não existência de qualquer alcaloide com estrutura de massa molar compatível com o íon molecular registrado. Este fato sugere que esta substância deve ser inédita, e análises EM\EM mostraram perdas típicas de alcaloides monoterpeneo indólicos glicosilados, como descrito a seguir.

Os dados ESI⁺ e ESI⁻ MS [M + H]⁺ 719,33 e [M - H]⁻ 717,44 (Figura 32 e 33), juntamente com fragmentações características de MS, apontam para a perda de um radical sinapoil acilium para dar m/z 513,25 [M + H - 206]⁺, junto com a perda de uma unidade de glicosilsinapoil em m/z 351,22 [M + H - 368]⁺ para os quais 368 = 162 + 206, além de outro fragmento de diagnóstico em 206,92 [M + H - 512]⁺ derivado da perda do resíduo de ácido lialosídico. Além disso, para o MS³ de m/z 206,92 [M + H]⁺ os íons característicos em m/z 191,67 [M + H - 15]⁺, m/z 175,84 [M + H - 31]⁺ e m/z 145,48 [M + H - 62]⁺ comprovam a presença de um resíduo sinapoila. Não foi encontrada referência no Scifinder® para este alcalóide, com o MM 718 Da. Portanto, esse é possivelmente um novo alcaloide monoterpeneo indólico. A estereoquímica *E* e a localização 6'-O do resíduo sinapoila proposto para o ácido sinapoil-lialosídico representam um novo alcaloide com similaridade estrutural a outros derivados relacionados, como o sinapoil-lialosídeo, um éster metílico conhecido, além dos ésteres metílicos previamente detectados (*E*)-O-6'-feruloil-lialosídeo e (*E*)-O-6'-sinamoil-lialosídeo que foram detectados e também isolados das espécies *Palicourea* e *Psychotria* (VALVERDE et al., 1999; BERGER et al., 2015; QUEIROZ et al., 2017; GONTIJO et al., 2019). O isolamento e a elucidação estrutural por análises espectroscópicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Dicroísmo Circular (DC) deste novo derivado AMI para confirmar essa estrutura será parte da continuação do trabalho fitoquímico com *P. hoffmannseggiana*.

Estes três alcaloides indólicos monoterpênicos estão presentes nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de *P. hoffmannseggiana* como também nas frações *n*-butanólicas das extrações ácido-base. Suas estruturas apresentam três carbonos quirais na unidade monoterpênica sendo que, para o ácido strictosidínico é conhecido um isômero, o ácido 3-*epi*-strictosidínico, já isolado da espécie *Palicourea coriácea* (NASCIMENTO et al., 2005).

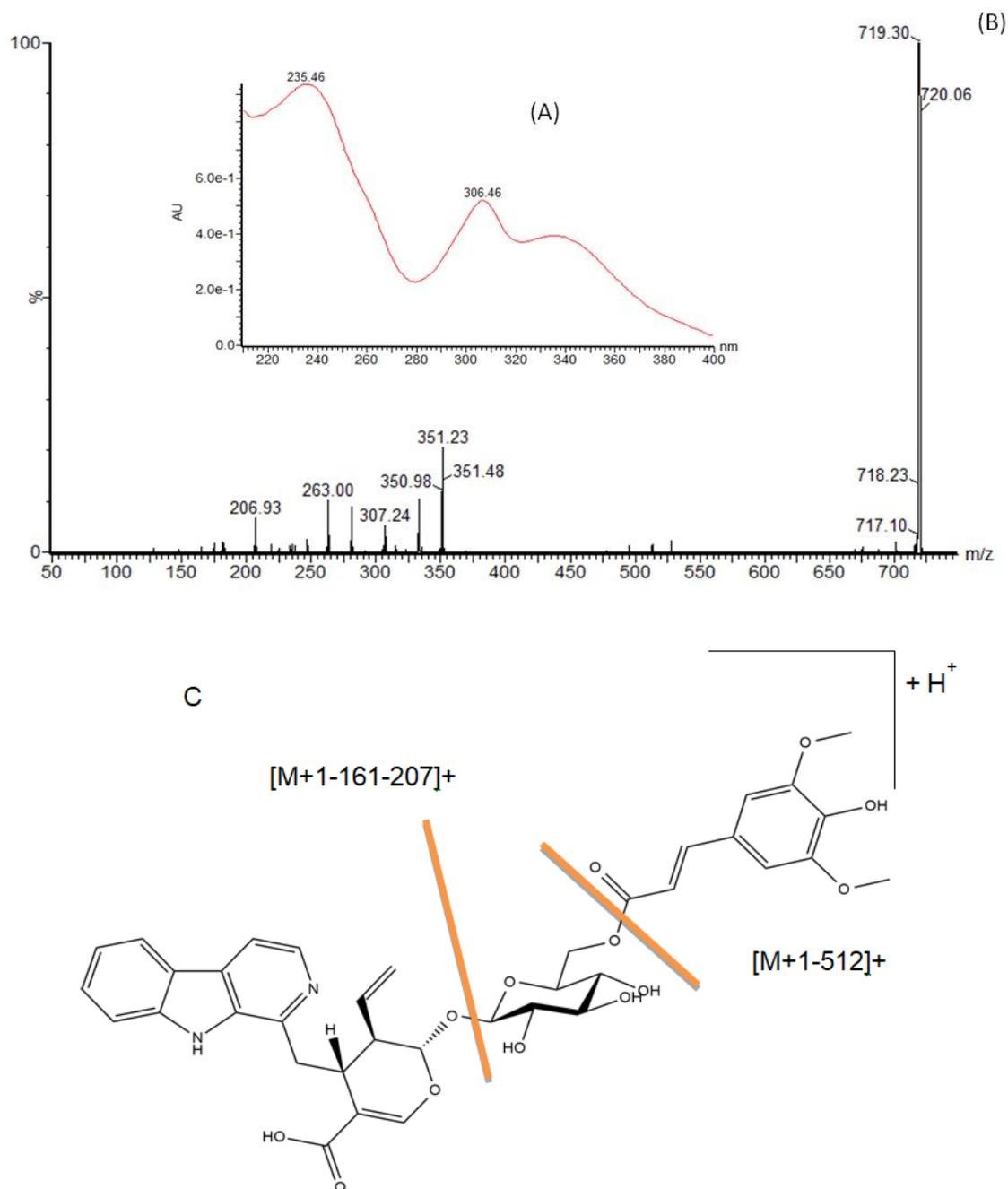


Figura 37. Espectro no UV (A), Espectro de massas ESI⁺ (B) do ácido (*E*)-*O*-6'-sinapoil-lialosídico identificado nos extratos etanólicos, hidroetanólicos (7/3 e 1/1) e aquosos de caules e folhas de *P. hoffmannseggiana*.

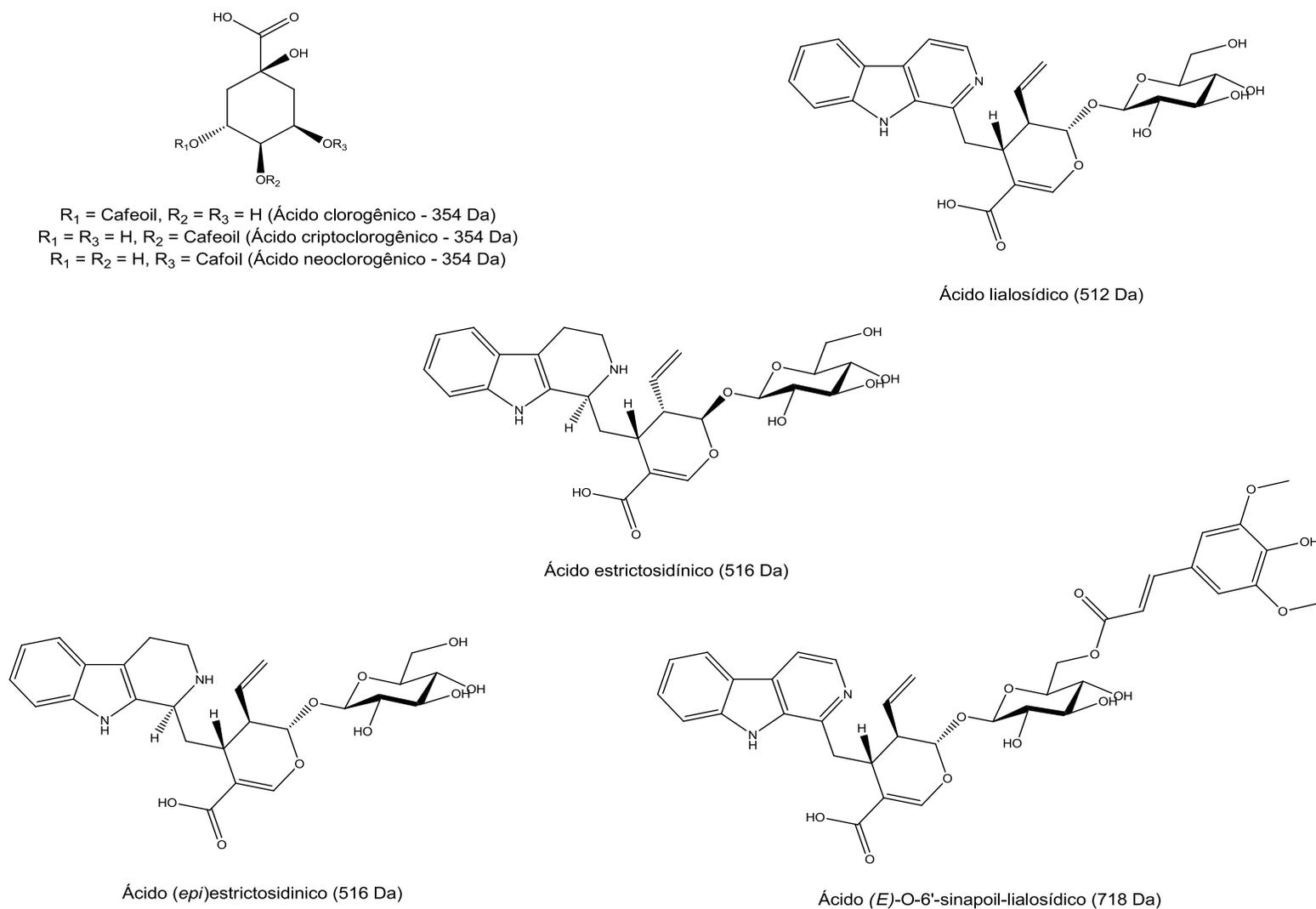


Figura 38. Estruturas dos principais compostos identificados no extrato etanólico (Grupo 1, Tabela 09) das folhas de *P. hoffmannseggiana* por CLUE-DAD-ESI-MS².

Considerando em conjunto, esses resultados mostraram que o aumento da polaridade dos solventes extrativos (EtOH → EtOH/H₂O 7/3 → EtOH/H₂O 1/1 → H₂O), bem como os diferentes métodos extrativos (maceração, banho de ultrassom e decocção) não tiveram uma mudança significativa na atividade antiplasmodica dos extratos do grupo 1 (Tabela 09). No entanto, um aumento significativo na atividade antiplasmodica das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico de folhas de *P. hoffmannseggiana* (1^o coleta), foi observado como pode ser visto pela comparação dos resultados para os Grupos 1 e 2 (Tabela 09). Além disso, os isômeros do ácido clorogênico, bem como os AMLs identificados nos extratos etanólicos das folhas, não foram detectados nas frações bioativas das folhas e caules de *P. hoffmannseggiana*. Esses compostos são responsáveis pelos maiores picos nas frações *n*-BuOH (Grupos 2 e 3, Tabela 09) que não mostraram atividade antiplasmodica, com inibição do crescimento de parasitas < 50%. Assim, pode-se inferir que o ácido lialosídico e seu derivado sinapoila, bem como o ácido estritosidínico e os isômeros do ácido clorogênico, podem não apresentar ação antiplasmodica significativa.

5.7.1 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR CLUE-DAD-ESI-EM\EM DE CONSTITUINTES POTENCIALMENTE ATIVOS PRESENTES NAS FRAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

A seguir serão discutidos os dados CLUE-DAD-ESI-EM\EM referentes às frações que apresentaram atividade antiplasmodica *in vitro* e constam da Tabela 10 (pág. 90) as quais apresentaram porcentagem de redução da parasitemia acima de 50% (% Red > 50). No item anterior, foi discutida a identificação dos constituintes referentes aos extratos etanólicos de caules (EECPH) e folhas da primeira (EEFPH-1) e segunda coleta (EEFPH-2), os quais, embora inativos, foram incluídos na Tabela 10, para fins de comparação.

Os cromatogramas de ions totais (TIC) no modo positivo e negativo das amostras ativas são mostrados nas Figuras 40 - 43 registrados nas varreduras de 0 a 1550 Da e de 0 a 720 Da. Na Figura 40 e 42 pode-se observar que, de um modo geral, os picos ocorrem em valores de *m/z* abaixo de 720 Da, no modo positivo, e abaixo de 900 Da, no modo negativo, o que justifica o registro destes cromatogramas expandidos para melhor visibilidade (Figura 41 e 43). Nos perfís

cromatográficos ESI⁺ dos extratos etanólicos de caules e folhas destacam-se os picos em m/z 513, 517 e 719, este último sendo nitidamente mais fraco no extrato etanólico de caules (Figuras 41A) do que no extrato etanólico de folhas (Figuras 41B). Estes picos foram identificados como sendo correspondentes aos ácidos lialosídico, strictosidinico e sinapoil lialosídico (Figura 38B-D).

Os cromatogramas por CLUE-DAD das frações alcaloídicas diclorometânicas de folhas (FrDFMetA) e caules (FrDCMetA) obtidas pelo método A, a pH 9 – 10, mostram perfís semelhantes de metabólitos minoritários com $T_{rs} < 3,0$ min como se observa nos cromatogramas estendidos (Figuras 39C e 39D), fato que pode justificar a semelhança entre os resultados de atividade antiplasmódica destas amostras. Além disso, alguns picos presentes nas frações diclorometânicas se sobrepõem a picos presentes nos extratos, discutidos anteriormente, destacadas com setas na Figura 39. Os cromatogramas de íons totais (TIC) destas frações (Figuras 41C e 41D), destacados com barra de cor vermelha, apresentam, como característica particular, pares de picos com diferenças de 44 Da como por exemplo m/z 371 e 327, m/z 437 e 393 Da. Estas diferenças são devidas a uma unidade guanidina entre pares de amidas de um mesmo ácido cinâmico com as aminas agmatina e putrescina na região de valores mais altos de m/z (> 300 Da). Características semelhantes foram observadas em extratos etanólicos de caules e folhas de *Palicourea sessilis* (SAMULSKI et al., 2020) e foram atribuídos a amidas derivadas de ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico com aminas, como putrescina, agmatina e espermina, com massas moleculares abaixo daquelas observadas nas frações de *Palicourea hoffmannseggiana*. Poucos picos de metabólitos de massas mais baixas ($m/z < 300$) são também observados nestas frações, mas não foram identificados porque não foi possível efetuar as análises das fragmentações dos picos correspondentes por UPLC-ESI-EMEM, devido ao não funcionamento dos laboratórios de pesquisa na Faculdade de Farmácia UFMG, durante o período da pandemia do coronavirus.

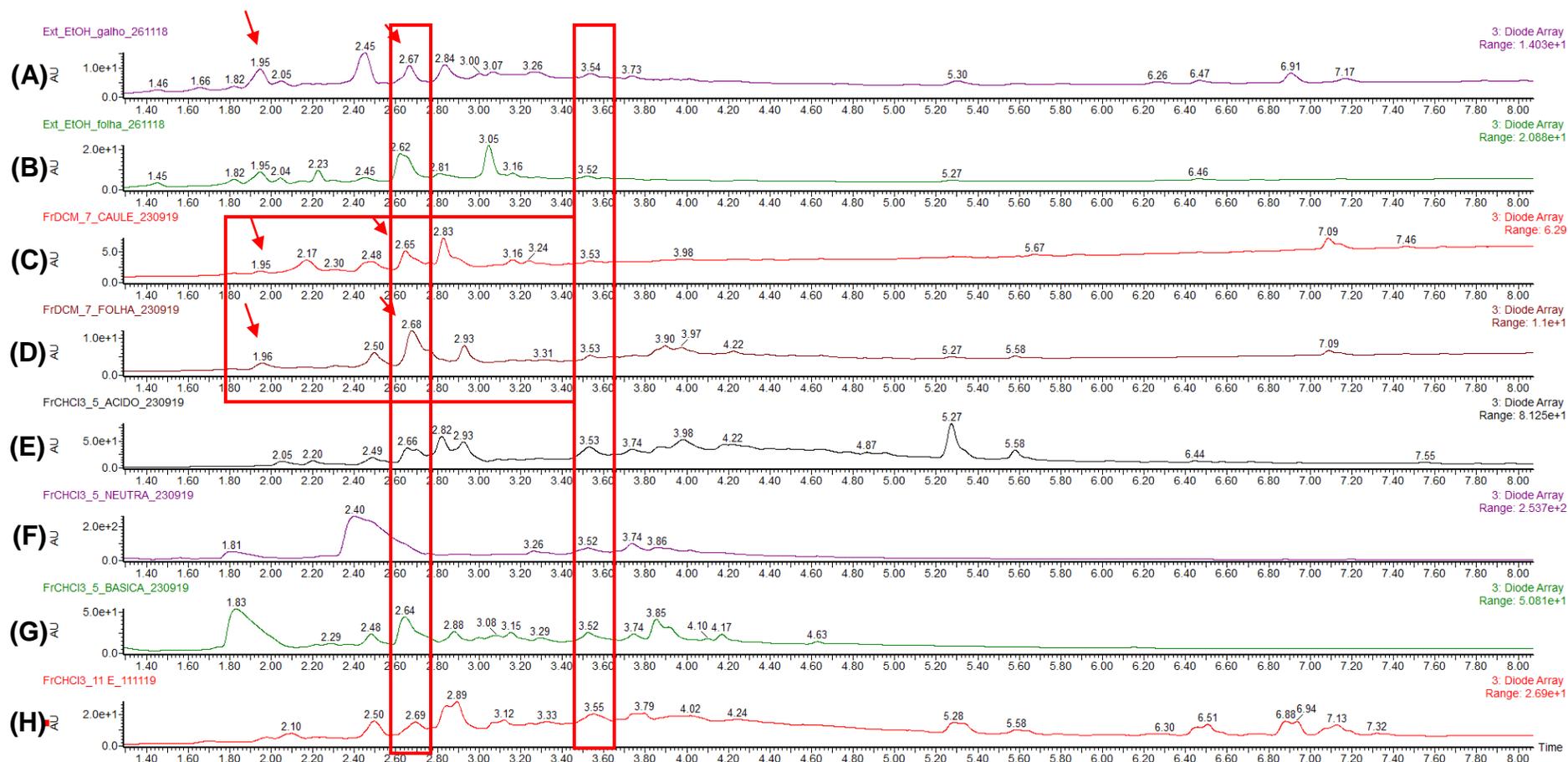


Figura 39. Cromatograma UPLC-DAD do extrato etanólico dos caules e das folhas e frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da *Pf*LDH. Detecção em 220 nm.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *Palicourea hoffmannseggiana* (EEFPH); (B) – Extrato etanólico das folhas (EEFPH-1); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (D) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (E) - Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB); (F) Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB); (G) - Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB); (H) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLL). **Nota:** Encontram-se destacados em vermelho as semelhanças entre amostras. Picos semelhantes presentes nos extratos e frações destacadas com setas.

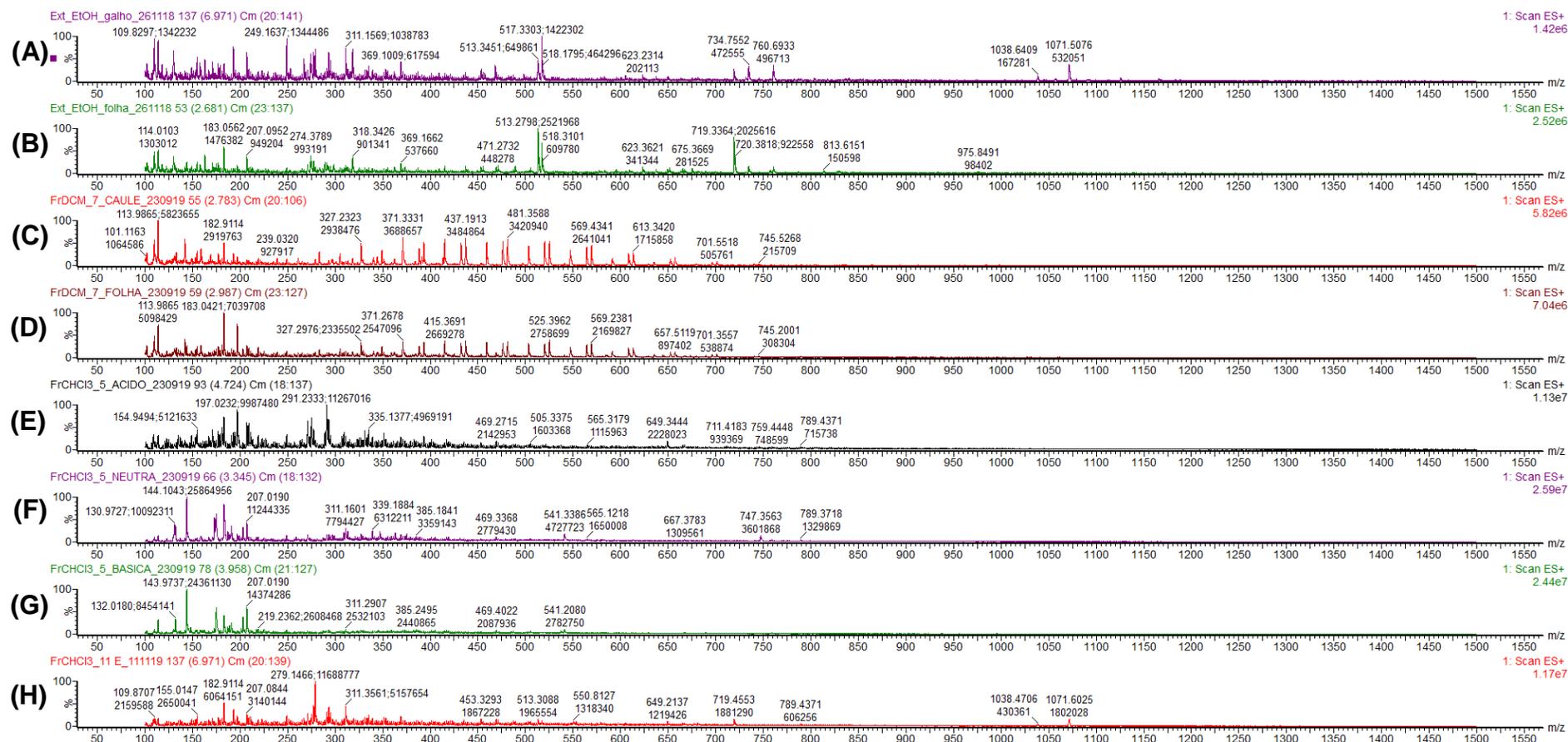


Figura 40. Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização positivo (ESI⁺), Varredura 0 a 1550 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *Palicourea hoffmannseggiana* (EEFPH); (B) – Extrato etanólico das folhas (EEFPH-1); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (D) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (E) - Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB); (F) Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB); (G) - Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB); (H) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLLf).

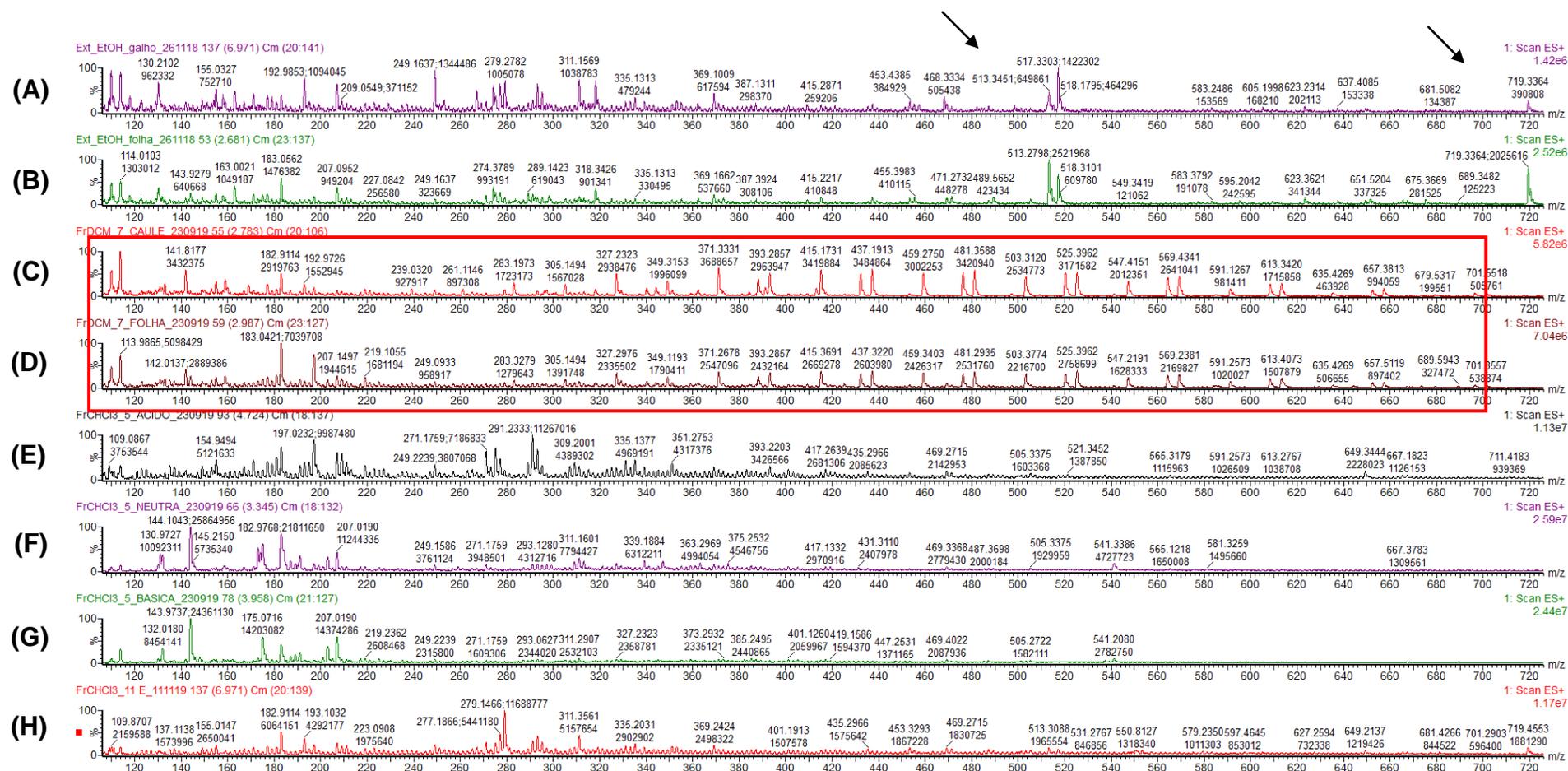


Figura 41. Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização positivo (ESI⁺), Varredura 0 a 720 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *Palicourea hoffmannseggiana* (EEFPH); (B) – Extrato etanólico das folhas (EEFPH); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDCM₇MetA); (D) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFM₇MetA); (E) - Fração clorofórmica ácida, método B (FrC_{Ac}MetB); (F) Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNM₇MetB); (G) - Fração clorofórmica básica, método B (FrCBM₇MetB); (H) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLL₇MetB). **Nota:** Destacado em vermelho as frações diclorometânica obtida pelo método A dos caules (FrDCM₇MetA) e das folhas (FrDFM₇MetA), demonstrando a semelhança entre as frações.

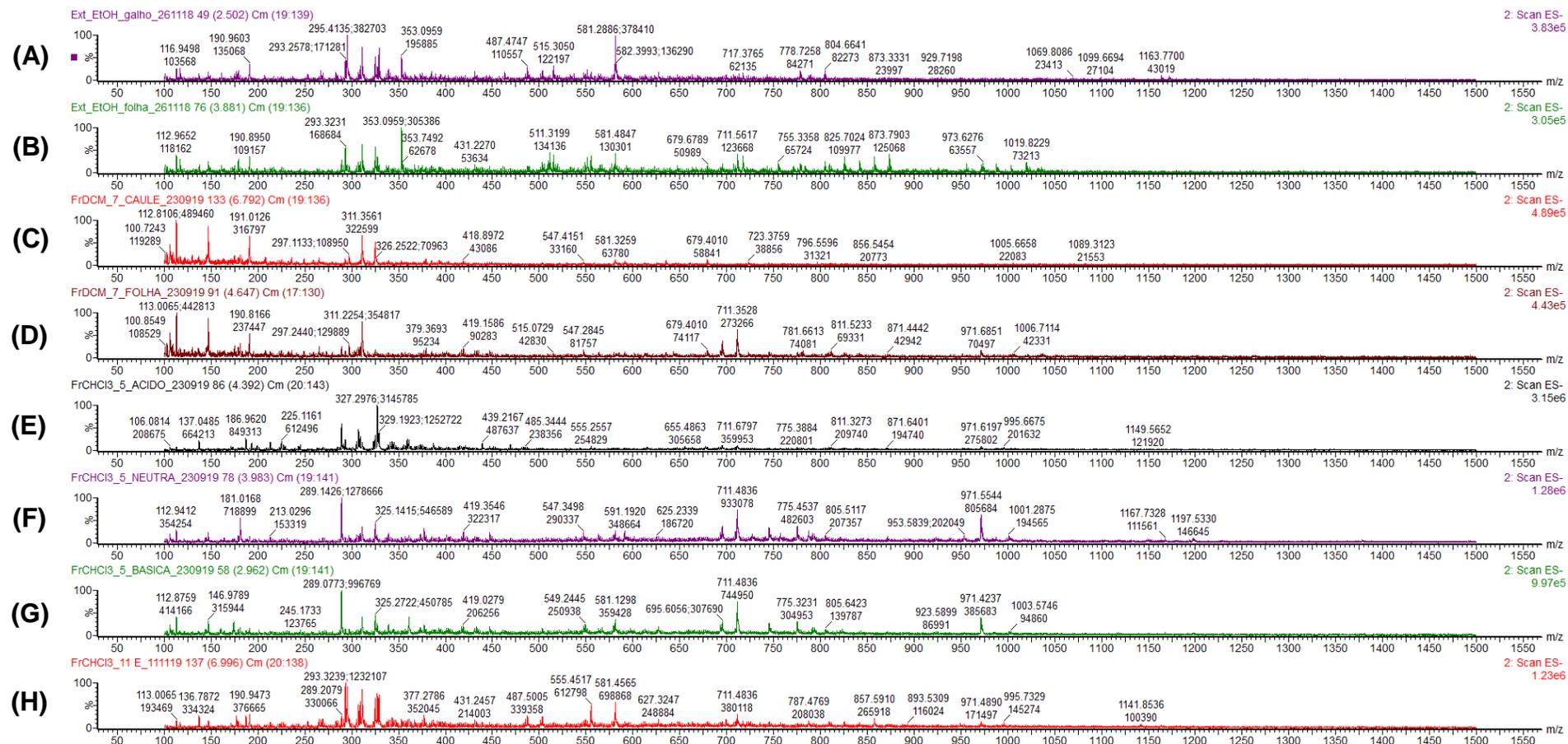


Figura 42. Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização negativo (ESI⁻), varredura 0 a 1550 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *Palicourea hoffmannseggiana* (EEFPH); (B) – Extrato etanólico das folhas (EEFPH); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (D) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (E) - Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB); (F) Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB); (G) - Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB); (H) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLLf).

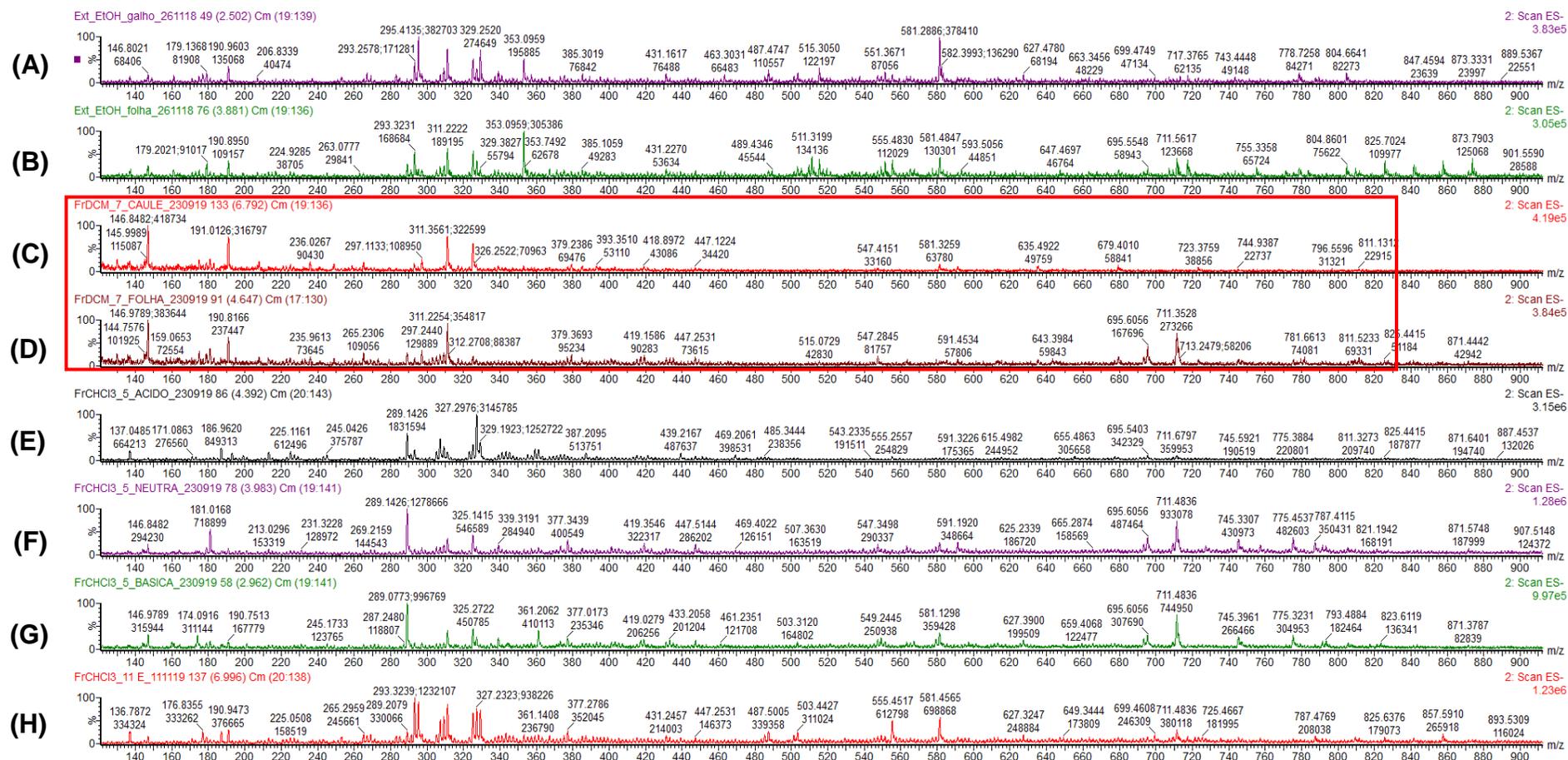


Figura 43. Cromatogramas expandidos de íons totais (TIC) registrados por CLUE-ESI-EM no modo de ionização negativo (ESI⁻), varredura 0 a 900 Da, dos extratos etanólicos e das frações ativas de caules e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) pelo método da PfLDH.

Legenda: (A) – Extrato etanólico dos caules de *Palicourea hoffmannseggiana* (EEFPH); (B) – Extrato etanólico das folhas (EEFPH); (C) – Fração alcaloídica diclorometânica do caule, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDCMetA); (D) - Fração alcaloídica diclorometânica de folhas, obtida pelo método A, a pH 9 – 10 (FrDFMetA); (E) - Fração clorofórmica ácida, método B (FrCAcMetB); (F) Fração clorofórmica neutra, método B (FrCNMetB); (G) - Fração clorofórmica básica, método B (FrCBMetB); (H) – Fração clorofórmica, partição líquido-líquido (FrCPLLf). **Nota:** Destacado em vermelho as frações diclorometânica obtida pelo método A dos caules (FrDCMetA) e das folhas (FrDFMetA), demonstrando a semelhança entre as frações.

Os cromatogramas por CLUE-DAD das frações ativas obtidas pelo Método B (Tabela 10, pag. 101), a saber, fração clorofórmica ácida (FrCAcMetB), fração clorofórmica neutra (FrCNMetB), e fração clorofórmica básica (FrCBMetB) foram apresentados na Figuras 21 e 22 (pág. 84 e 85) e os Trs para os picos mais proeminentes, assim como seus dados de UV e MS (modo positivo e negativo), foram mostrados nas Figuras 40-43. Nota-se que os espectros no UV são característicos de núcleo indólico, presente em tetra-hidro- β -carbolinas e triptaminas ($\lambda_{\text{máx}}$ 220, 279 nm), bem como em alcaloides β -carbolínicos ($\lambda_{\text{máx}}$ 246, 299, 365 nm) (SANGSTER & STUART, 1964; WANG et al., 2010). A identificação dos principais picos dessas frações é discutida a seguir.

A) Fração clorofórmica neutra (FrCNMetB) - No cromatograma por CLUE-DAD desta fração (Figura 39) destaca-se o pico em Tr 2,40 min, o mais intenso dessa fração, com espectro no UV característico de um alcaloide β -carbolínico ($\lambda_{\text{máx}}$ 246, 299, 365 nm), ao qual corresponde, no cromatograma de íons totais, os íons moleculares em m/z 182,97 $[M + H]^+$ e 181,01 $[M - H]^-$, nos modos positivo (Figura 41F) e negativo (Figura 43F). O espectro no UV deste pico é indicativo de uma β -carbolina com um grupo metila, inferido a partir do íon molecular protonado $[M + H]^+$ em m/z 182,97, e pelo íon fragmentário em m/z 115,05 $[M + H - 68]^+$ derivado do núcleo de uma β -carbolina, por uma perda do radical $C_3H_4N_2\cdot$ por fissão do anel heterocíclico. Entretanto, como pode ser notado na Figura 39F, o pico alargado no Tr 2,40 min pode estar relacionado à co-eluição de compostos isoméricos com m/z 182,97 $[M + H]^+$. De fato, três metil- β -carbolinas naturais que suportam um grupo metila nas posições 1 ou 4 são conhecidas (Figura 44; SHI et al., 2017) e os dados atuais não permitem fazer distinção entre os dois possíveis isômeros constitucionais. A presença de íons moleculares desprotonados $[M - H]^-$ em m/z 180,88 pode ser considerado indicativo da exclusão do composto 2-metil- β -carbolina como um dos isômeros, pois este não apresentaria ionização negativa significativa devido à ausência da ligação NH.

B) Fração clorofórmica básica de folhas (FrCBMetB) - Nos cromatogramas por CLUE DAD (Figura 39G) destacam-se três picos em Trs

1,83 min (UV λ_{\max} 220, 279 nm), 2,64 min (UV λ_{\max} 246, 299, 365nm) e 3,85 min (UV λ_{\max} 220, 279 nm). A seguir, serão discutidos os dados referentes a análises por CLUE-DAD-ESI-EM/EM de constituintes relacionados a estes picos.

B-1) Ao pico em Tr 1.83 min corresponde um ion molecular protonado em m/z 175,07 $[M + H]^+$ (Figura 41G), atribuído à *N*-metil-triptamina (Figura 44) para a qual foram observados os seguintes ions fragmentários em m/z 115,09 $[M + H - 60]^+$, devido a perda do radical $C_3H_{10}N\bullet$, outro em m/z 143,05 $[M + H - 32]^+$ devido à perda do radical $CH_6N\bullet$, um terceiro em m/z 91,17 correspondente a $[M + H - 84]^+$, derivado da perda do radical $C_5H_{10}N\bullet$, e m/z 77,25 $[M + H - 98]^+$, todos estes relacionados a diferentes fragmentações do tipo fissão do núcleo heterocíclico do núcleo indólico e que são coerentes com a literatura (CHEN et al., 2008; OUYANG et al., 2009).

B-2) Ao constituinte relacionado ao pico em Tr 2,64 min, nos cromatograma por CLUE-DAD, mostrados na Figura 39G, corresponde o espectro no UV característico de um alcaloide β -carbolínico (UV λ_{\max} 246, 299, 365 nm). Os cromatogramas de íons totais nos modos positivo e negativo forneceram ions moleculares em m/z 183,10 $[M + H]^+$ (Figura 41G) e m/z 180,88 $[M - H]^-$ (Figura 43G). Este pico está presente também na fração clorofórmica neutra (FrCNMetB) e sua análise consta do item A, conforme discutido na análise da fração clorofórmica neutra (item a) e com base no fragmento de íons em m/z 141,24 $[M + H - 42]^+$ resultante da perda de $C_2H_4N\bullet$, que foi tomada como indicação da localização do grupo metila em C-1, correspondendo, portanto, ao conhecido harmano (Figura 44). Outros fragmentos como m/z 167,80 $[M + H - 15]^+$, 115,05 $[M + H - 68]^+$, 88,99 $[M + H - 94]^+$ e 65,07 $[M + H - 118]^+$ também estão presentes e estão de acordo com a literature, sendo típicos de β -carbolinas (LI et al., 2014). A literatura demonstrou que o alcaloide harmano já foi avaliado em relação à sua atividade antiplasmódica, apresentando resultados positivos *in vitro*, frente cepas K1, cloroquina-resistente, e *in vivo*, frente cepas NK65 de *P. berghei* (MONTAIA, 2017; MONTEIRO, et al., 2014).

B-3) Ao metabólito do pico em Tr 3,85 min; UV λ_{\max} 220, 279 nm; m/z 203,23 $[M + H]^+$ corresponde o pico de íon molecular negativo em m/z 201,33 $[M - H]^-$ (Figura 43G) que é atribuído à *N*-acetil-triptamina (m/z 203,23 $[M + H]^+$) (Figura 44), caracterizado pelos íons fragmentários em m/z 159,84 $[M + H - 43]^+$, devido à perda de um grupo acetila, e m/z 143,97 $[M + H - 59]^+$ pela perda do radical $CH_3COHN\cdot$.

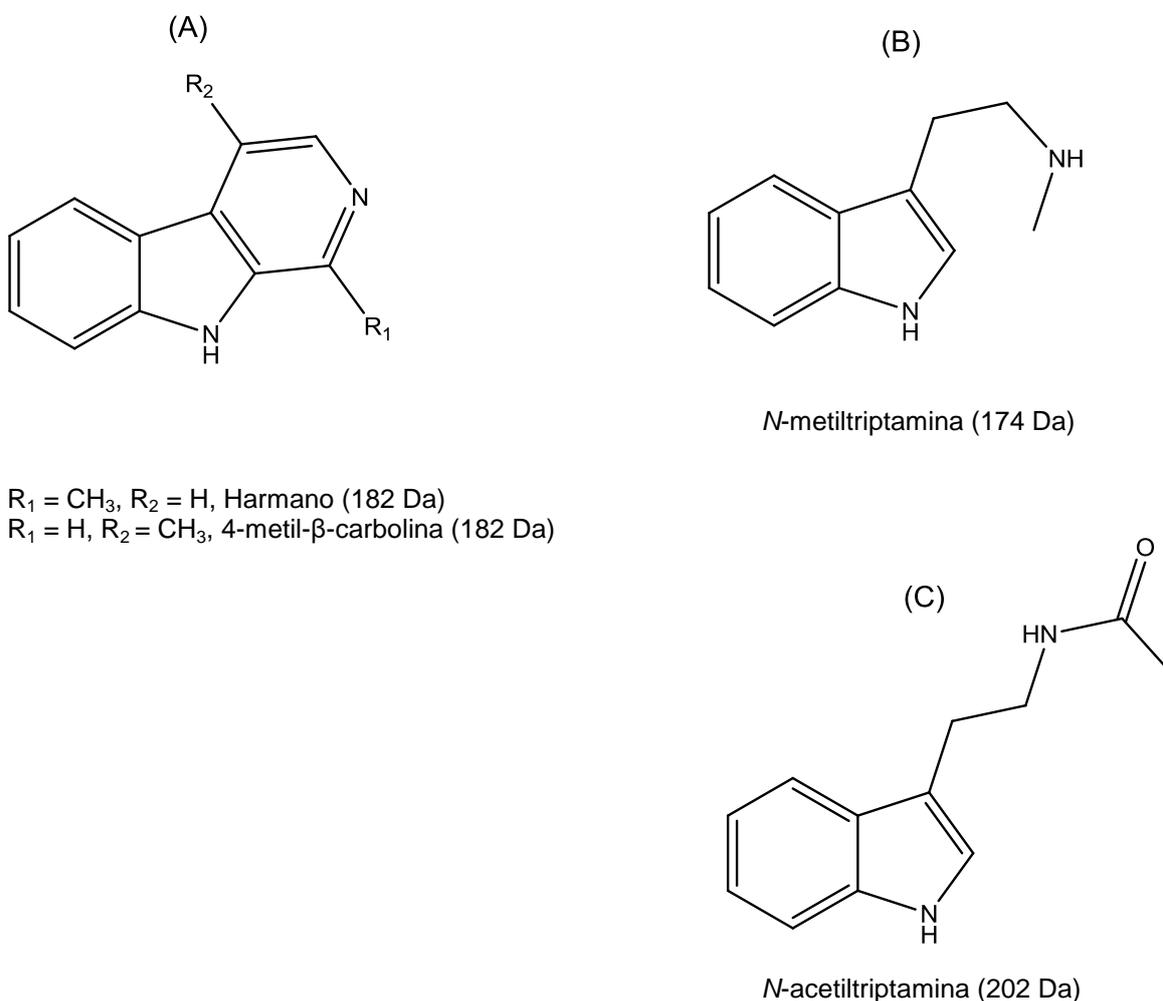


Figura 44. Estruturas químicas das substâncias identificadas nas frações ativas de *Palicourea hoffmannseggiana* por extração de alcaloides.

Das frações obtidas por partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico de folhas da coleta 2, a fração clorofórmica (FCPLL) foi mais ativa, com % Red $96,5 \pm 4,9$ e $88,0 \pm 2,8$, nas concentrações de $100,0 \mu\text{g/mL}$ e $50,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente,

enquanto que a fração hidrometanólica (FMHPLL) com % Red de $51,5 \pm 2,1$ e $36,5 \pm 3,5$, nas concentrações de 100,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 09 pag 74), foi considerada inativa .

Em relação ao extrato obtido a partir do material da segunda coleta, é possível notar a semelhança na composição dos extratos etanólicos das folhas da primeira e da segunda coleta (Figura 45). Sendo os picos nos Trs 1,45; 1,82 e 1,95 min já identificados como os ácidos clorogênico, neoclorogênico e criptoclorogênico, apesar de não ter sido identificado qual substância corresponde a cada pico. Os picos nos Trs 2,62; 2,81 e 3,05 min foram identificados como sendo devidos aos alcaloides indólicos monoterpênicos, ácido lialosídico, ácido strictosidínico e (*E*)-*O*-6'-sinapoil-lialosídeo. O cromatogramas de ions totais (TIC) no modo positivo da fração clorofórmica (FrCPLL), apresentou o pico de m/z 182 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Figura 41, pág. 121), correspondente ao alcaloide indólico, harmano.

Por outro lado, significativas diferenças nos cromatogramas CLUE-DAD dos extratos etanólicos da primeira e segunda coletas são observadas a partir do Tr 5 min, fato que pode estar diretamente relacionado à diferença de atividade antiplasmódica destes dois extratos (Tabela 09 pag.88). De fato, após a partição líquido-líquido, os picos referentes aos compostos com $\text{Tr} > 5$ min são observados em maior intensidade na fração clorofórmica em relação à fração $\text{MeOH:H}_2\text{O}$, sendo que a primeira se mostrou significativamente maior atividade antiplasmódica. Espectros no UV (λ_{max} 230 nm) indicam que estes compostos devem pertencer à classe do iridoides, sendo que esta absorção no UV pode ser atribuída a um grupo carbonila α, β - insaturado, muito frequente em iridoides. Em a consulta à literatura sobre a ocorrência de iridoides de diversos tipos estruturais não se encontraram dados correspondentes àqueles de UV e EM o que faz supor tratar-se de um novo iridoide.

Os iridoides são monoterpênicos que possuem esqueleto iridano e sistema de anéis ciclopentano[C]pirano, formado a partir da ciclização alternativa do pirofosfato de geranila (GPP). Os processos de glicosilação, epoxidação, hidroxilação e esterificação com introdução de grupos metila ou derivados do ácido chiquímico propiciam uma grande variedade estrutural aos iridoides (SOUSA & CHAVES, 2019). Metabólitos desta classe apresentam diversas atividades biológicas relatadas na literatura, como atividade antifúngica, antibacteriana, anticancerígena, hipoglicemiantes, anti-hiperlipidêmico, anti-inflamatório,

hepatoprotetor, antioxidante, imunomodulador, antiviral, antiprotozoário (DINDA et al., 2007; DINDA et al., 2011). Estudos de Tamura e colaboradores (2010) isolaram cinco iridoídes conjugados com fenilpropanoídes da espécie *Morinda morindoides*, pertencente à família Rubiaceae, e demonstraram a atividade antiplasmódica destas substâncias sendo consideradas pelos autores como potenciais candidatos a fármacos antimaláricos.

Em relação à espécie em estudo, sob a nomenclatura de *Psychotria rubra*, sinonímia botânica de *Palicourea hoffmannseggiana*, já foram isolados dois iridoídes glicosilados, a psyrubrina A e 6 α -hidroxigeniposídeo (LU et al., 2014). Este último apresentou atividade imunossupressora nos estudos de Chang e colaboradores (2005). Entretanto não há dados referentes à atividade antiplasmódica das mesmas.

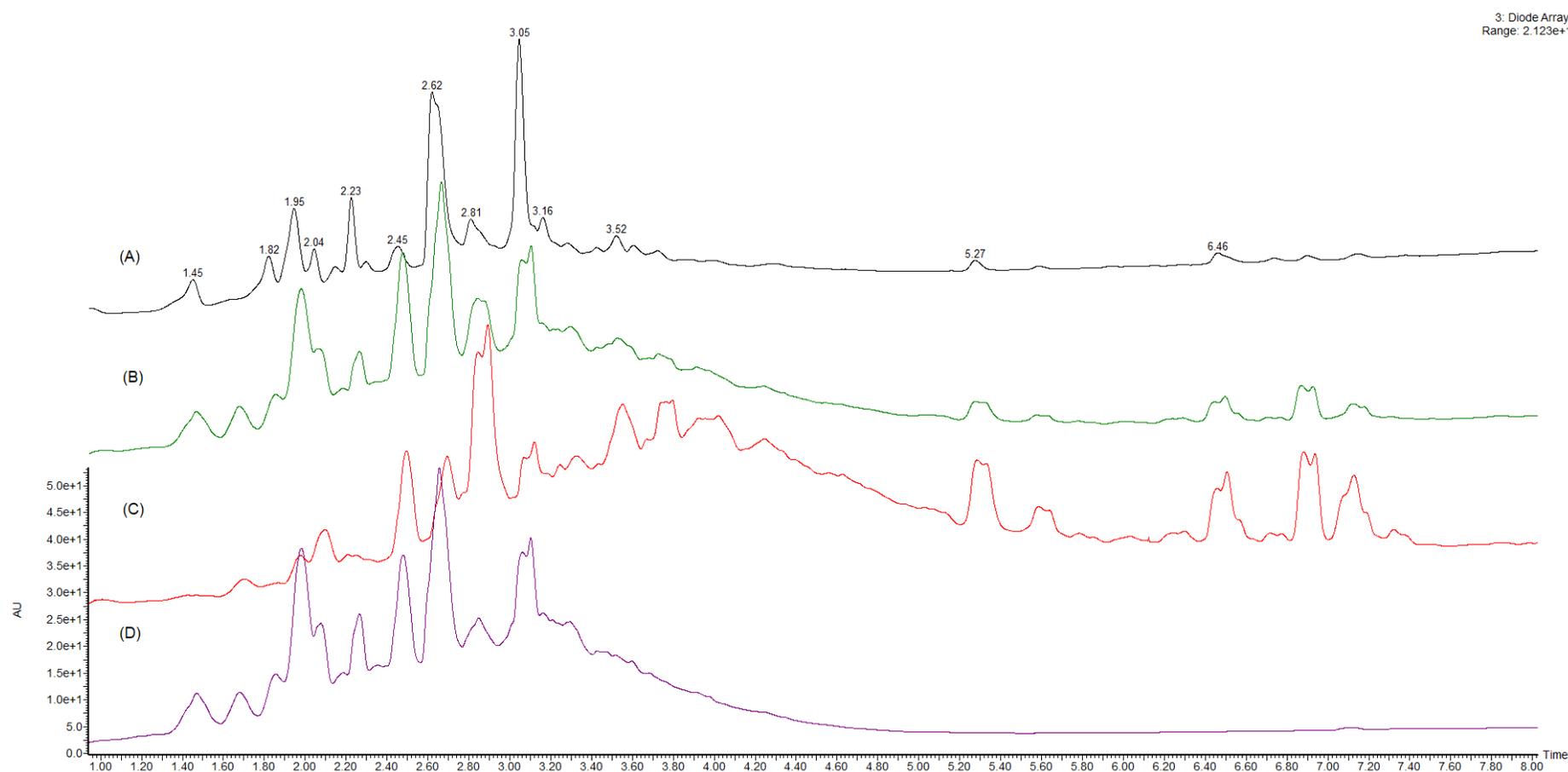


Figura 45. Cromatogramas UPLC-DAD expandidos dos extratos etanólicos, coleta 1 (EEFPH-1) e coleta 2 (EEFPH-2) e das frações obtidas por partição do EEFPH-2 de *Palicourea hoffmannseggiana* (Grupo 4, tabela 09), a 220 nm.

Legenda: (A) - Extrato etanólico das folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*, 1° coleta (EEFPH-1); (B) - Extrato etanólico das folhas de *Palicourea hoffmannseggiana*, 2° coleta (EEFPH-2); (C) - Fração clorofórmica da partição liquido-líquido do EEFPH-2 (FrCPLL); (D) - Fração hidrometanólica da partição liquido-líquido do EEFPH-2 (FrHMPLL).

Conforme discutido, as frações bioativas são constituídas principalmente por alcalóides de β -carbolínicos, que são alcalóides quimicamente tricíclicos, possuindo um esqueleto básico de um pirido [3, 4-b] indol. Entre esses alcalóides, a harmina e a harmalina apresentaram atividade antiplasmodica moderada *in vitro* (IC₅₀ 8,0 e 25,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) contra *Plasmodium falciparum* (ASTULLA et al., 2008). Além disso, harmano e tetrahydroharmano isolados de *Guiera senegalensis* (Combretaceae), uma planta do Mali com uso tradicional para tratamento da malária, apresentaram atividade antimalária significativa (IC₅₀ menor que 4 $\mu\text{g/mL}$) (ANCOLIO et al., 2002; FIOT et al., 2006). Esses alcalóides β -carbolínicos simples também foram encontrados em plantas sul-americanas como *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) e *Psychotria viridis* (Rubiaceae), que são ingredientes na bebida alucinógena Ayahuasca, usada na Amazônia, e também encontrada em outras espécies de *Psychotria* e *Palicourea* (Rubiaceae). Neste sentido, há ainda uma ampla revisão sobre a atividade antimalária de alcalóides β -carbolínicos naturais contra diferentes cepas de *P. falciparum*, incluindo variadas diversificações da estrutura tricíclica básica e complexas, isoladas de várias espécies de esponjas marinhas, inicialmente relatadas por sua potente citotoxicidade e, em seguida, por sua potência antimalária variável (ASHOK et al., 2013). Entretanto este alcaloide demonstrou a moderada citotoxicidade em monócitos humanos, e possível genotoxicidade (GIORGIO et al., 2004).

Por outro lado, não foram encontrados relatos sobre a atividade antiplasmodial/antimalária da β -carbolina, 4-metil- β -carbolina, e triptaminas, *N*-metiltriptamina e *N*-acetiltriptamina, de *Palicourea hoffmannesi* (Schult.) Borhidi e seus sinônimos.

6 CONCLUSÃO

A caracterização de extratos e frações obtidos por fracionamento de extratos etanólicos de cascas e folhas de *Palicourea hoffmannseggiana* por análises por CLUE-DAD e CLUE-DAD-ESI-EM\EM combinadas com os ensaios *in vitro* de atividade antiplasmódica, permitiu identificar as principais substâncias presentes nesta espécie, bem como inferir sobre compostos potencialmente relacionados à ação observada. Nos extratos etanólicos, hidroetanólicos e aquosos foram identificados dois alcaloides monoterpênicos indólicos (AMI), os ácidos strictosidínico e lialosídico, e um terceiro AMI inédito que foi caracterizado como um ácido sinapoil-lialosídico. Estes alcaloides se concentram nestes extratos que apresentaram baixa ou nenhuma atividade antiplasmódica, enquanto frações obtidas por extrações ácido-base e partições líquido-líquido, contendo, principalmente, alcaloides β -carbolínicos, foram significativamente ativos. No entanto, entre os alcaloides identificados, somente o harmano possui relatos anteriores de exibir uma atividade antimalárica pronunciada. Além disso, a espécie *Palicourea hoffmannseggiana*, que é amplamente distribuída no Brasil, mostrou-se fonte de alcalóides monoterpênicos indólicos, como o ácido strictosidínico, de efeitos conhecidos no sistema nervoso central. Portanto, *P. hoffmannseggiana* é, pela primeira vez, apontada como fonte de alcaloides antiplasmódicos. Em síntese, a presente triagem, guiada por bioensaios *in vitro* e análises por CLUE-EM, demonstrou que fracionamentos preliminares são recomendados para não negligenciar resultados negativos em testes biológicos de extratos brutos. A realização dos processos de fracionamento de extratos etanólicos aqui descritos, em escala maior, certamente proporcionará frações ativas promissoras de interesse para o desenvolvimento de fitomedicamentos e/ou isolamento de metabólitos de interesse farmacêutico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, A.A.A. **Influência da adição de extrato de *Yucca schidigera* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais.** 47f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006;

ANCOLIO, C.; AZAS, N.; MAHIOU, V.; OLLIVIER, E.; DI GIORGIO, C.; KEITA, A.; TIMON-DAVID, P.; BALANSARD, P. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 646–649, 2002;

AQUINO, R.; CAPASSO, A.; DE SIRONNE, F.; GAROFALO, L.; PIZZA, C.; SORRENTINOT, L. Inhibiting activity of some glucoindolalkaloids and iridoids from *Sickingia williamsii* on electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 161-166, 1996;

ARAÚJO, M. G. G. **Utilização de diferentes solventes na extração dos compostos bioativos da pimenta rosa.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em nutrição). Universidade Federal de Campina Grande, 2019;

ASHLEY, E. A.; PHYO, A. P.; WOODROW, C. J. Malaria. **Lancet**, v. 391, p. 1608–1621, 2018;

ASHOK, P.; GANGULY, S.; MURUGESAN, S. Review on in-vitro anti-malaria activity of natural β -carboline alkaloids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 1778-1791, 2013;

ASTULLA, A.; KAZUMASA, Z.; 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;

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 8, p. 565–569, 2004;

BENNET, G. F.; WARREN, M. W. Transmission of a new strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. **The Journal of Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 79-80, 1965;

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

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

BERGER, A.; PREINFALK, A.; ROBIEN, W.; BRECKER, L.; VALANT-VETSCHERA, K.; SCHINNERL, J. New reports on flavonoids, benzoic- and chlorogenic acids as rare features in the *Psychotria alliance* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 66, p. 145-153, 2016;

BERGER, A.; TANUHADI, E.; BRECKER, L.; SCHINNERL, J.; VALANT-VETSCHERA, K. Chemodiversity of tryptamine-derived alkaloids in six Costa Rican *Palicourea* species (Rubiaceae-Palicoureeae). **Phytochemistry**, v. 143, p. 124-131, 2017;

BOTH, F. L. **Avaliação do perfil psicofarmacológico de psycholatina isolada de *Psychotria umbellata***. 133 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, 2005;

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R. NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 28(3), p. 287-290, 2007;

BRASIL. **Farmacopeia brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 546 f., 2010;

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 190 f., 2016;

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de imunizações e doenças transmissíveis. Brasília, 76 f., 2020;

BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 170, n. 6, p. 766-793, 2009;

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012;

BURGESS, S. J.; KELLY, J. X.; SHOMLOO, S.; WITTLIN, S.; BRUN, R.; LIEBMANN, K.; PEYTON, D. H. Synthesis, structure-activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53 (17), p. 6477–6489, 2010;

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78 (Suplemento 1), p. 98-106, 2008;

CALIXTO, N. O.; PINTO, M. E. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER, M. C. M.; BOBEY, A. F.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; PINTO, A. C. The genus *Psychotria*:

phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27 (8), p. 1355-1378, 2016;

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**. v. 48 (2), p. 219-237, 2010;

CASTEJAN, F. V. **Taninos e saponinas**. 2011. 26 f. Seminário Aplicado (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2011;

CAZARIM, M. S.; UETA, J. Café: uma bebida rica em substâncias com efeitos clínicos importantes, em especial a cafeína. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 35(3), p. 363-370, 2014;

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

CHANG, W. L.; WANG, H. Y.; SHI, L. S.; LAI, J. H.; LIN, H. C. Immunosuppressive iridoids from the fruits of *Gardenia jasminoides*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1683-1685, 2005;

CHEN, B.H.; LIU, J.T.; CHEN, W.X.; CHEN, H.M.; LIN, C.H. A general approach to the screening and confirmation of tryptamines and phenethylamines by mass spectral fragmentation. **Talanta**. v. 74, p. 512-517, 2008;

CIOTONEA, C.; CERNATESCU, C. Biological active effects of Foskolin. **Buletinul Institutului Politehnic din Iasi**. v. 56 (60), fasc. 4, p. 97-105, 2010;

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K.-S. SHAMSUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 165–171, 2008;

CROTTI, A. E. M.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. **LC-hyphenated techniques: Uses in the structural elucidation of low- and high molecular weight compounds**. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. ISBN 8130801329, p. 99 - 141, 2006;

CRUZ, J. C.; SILVA, C. A. S.; HAMERSKI, L. Natural products from endophytic fungi associated with rubiaceae species. **Journal of Fungi**.v. 6 (128), 2020;

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; RUHSAM, M.; MOAT, J.; BRUMMITT, N. A. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, p. 68 – 78, 2009;

DELPRETE, P. G. **Rubiaceae** – Parte I: Introdução, gênero a – h. In: Rizzo. Flora dos estados de Goiais e Tocantins. v. 40. IRD/UFG, Universidade Federal de Goiais, 2010;

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

DELPRETE, P. G.; KIRKBRIDE JR., J. H. New combinations and new names in *Palicourea* (Rubiaceae) for species of *Psychotria* subgenus *Heteropsychotria* occurring in the Guianas. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**. v. 10(2), p. 409-442, 2016;

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica**. 2ª Edição, Editora UNESP, 2002;

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, Part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55(2), p. 159-222, 2007;

DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, Part 4. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 59(7), p. 803-833, 2011;

DUARTE, P. **Estudo da presença de polimorfismos associados à resistência de *P. falciparum* aos ACTs em Timor Leste**. 56 f. Dissertação (Mestrado em parasitologia médica. Universidade Nova de Lisboa, 2019;

DUSMAN, L. T.; JORGE, T. M.; SOUZA, M. C.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C.; BOCCA, C. C.; BASSO, E. A.; SARRAGIOTTO, M. H. Monoterpene indole alkaloids from *Palicourea crocea*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1886-1888, 2004;

ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNICIO, R. Z. N.; LOPES, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 784-806, 2014;

FARIAS, F. M. ***Psychotria myriantha* Mull Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades antiqumiotóxica e sobre o sistema nervoso central**. 224 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006;

FARIAS, F. M.; PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; BARROS, D. M.; GOTTFRIED, C.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus. **Fitoterapia**, v. 86(6), p. 1138-1143, 2012;

FELÍCIO, R.; OLIVEIRA, A. L. L.; Deboni, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64(3), p. 39-42, 2012;

FERREIRA JÚNIOR, M.; VIEIRA, A. O. S. Espécies arbóreo-arbustivas da família Rubiaceae Juss. na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 289-336, 2015;

FERREIRA, A. B. **Plantas utilizadas no tratamento de malária e males associados por comunidades tradicionais de Xapuri, AC e Pauni, AM.** 196 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015;

FERREIRA, R. G.; AZEVEDO, R. C. S.; REINERS, A. A. O.; SOUZA, T. G.; FONTES, C. J. F. Adesão ao tratamento da malária e fatores contribuintes. **Revista eletrônica de enfermagem**. v. 6(1), p. 35-43, 2014;

FIOT, J.; SANON, S.; AZAS, N.; MAHIO, V.; JANSEN, O.; ANGENOT, L.; OLLIVIER, E.; Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae), **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.173–178, 2006;

FIRMO, W. DA C. A.; MENEZES, V. DE J. M.; PASSOS, C. E. DE C.; DIAS, C. N. ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de pesquisa**, São Luiz, v. 18, n. especial, p. 90-95, dez. 2011;

FLORA DO BRASIL. **Jardim botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB210>. Acessado no dia 17 de agosto de 2020;

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. DOS; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, Vol. 31, No. 5, 1271-1278, 2008;

GARGOMINY, O. ***Palicourea hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi**. TAXREF. Version 4.6. UMS PatriNat (OFB-CNRS-MNHN), Paris. <https://doi.org/10.15468/vqueam>. Global Biodiversity Information Facility – GBIF. Disponível em: GBIF.com. Acessado no dia 28 de agosto de 2020;

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 779-810, 2015;

GESSNER, A. Nobelprize 2015 for phytomedicine. **Phytoscience**, v. 1, p. 13, 2015;

GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* activity of the β -carboline alkaloids harmine, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 106(3-4), p. 67–74, 2004;

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenizadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinações de suas variações populacionais e temporais.** 254 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007;

GOMES, A. P.; RODRIGO ROGER VITORINO, R. R.; MENDES, T. A.; PEREIRA, S. O.; MIGUEL, P. S. B.; BRAGA, L. M.; MOREIRA, T. R.; SANTANA, L. A. A infecção

pelo gênero *Plasmodium*: epidemiologia, profilaxia e controle no Brasil. **Vittalle – Revista de Ciências da Saúde**. v. 30(2), p. 47-58, 2018;

GONTIJO, D. C. **Triagem de extratos vegetais para atividade antiplasmódica de espécies vegetais selecionadas por critério etológico e estudo fitoquímico biomonitorado de *Xylopiá sericea* A.St. Hil. (Annonaceae)**. 176 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016;

GONTIJO, D. C.; BRANDÃO, G. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiplasmodial activity and cytotoxicity, isolation of active alkaloids, and dereplication of *Xylopiá sericea* leaves ethanol extract by UPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, p. 260-269, 2019;

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

GONTIJO, D. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B. Phytochemistry and antiplasmodial activity of *Xylopiá sericea* leaves, **Natural Product Research**, p. 1-4, DOI: 10.1080/14786419.2019.1577838, 2019;

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C. L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28(2), p.129-139, 2007;

GREENWOOD, B. M.; FIDOCK, D. A.; KYLE, D. E.; KAPPE, S. H. I.; ALONSO, P. L.; COLLINS, F. H.; DUFFY, P. E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 126-1276, 2008;

HAYASHI, T.; SMITH, F. T.; LEE, K.-H. Antitumor agents. 89.' Psychorubrin, a new cytotoxic naphthoquinone from *Psychotria rubra* and its structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 30, p. 2005-2008, 1987;

HELLEMOND, J. J. V.; RUTTEN, M.; KOELEWIJN, R.; ZEEMAN, A.; VERWEIJ, J. J.; WISMANS, P. J.; KOCKEN, C.H.; GENDEREN, P. J. J. V. Human *Plasmodium knowlesi* infection detected by rapid diagnostic tests for malaria. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 15, No. 9, 2009;

JUNG-MENDAÇOLLI, S.L. **Rubiaceae**. In Flora Fanerógama do estado de São Paulo. FAPESB/RIMA, São Paulo, v.5, p.259-447, 2007;

KALA, S. C. Medicinal attributes of family *Rubiaceae*. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 5, p. 179-181, 2015;

KFFURI, C. W. **Etnobotânica de plantas antimaláricas em comunidades indígenas da região do alto Rio Negro – Amazonas – Brasil**. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP. Botucatu – São Paulo, 2014;

KLEIN-JUNIOR, L.; CRETTON, S.; ALLARD, P.; GENTA-JOUVE, G.; PASSOS, C.; SALTON, J.; BERTELLI, P.; PUPIER, M.; JEANNERAT, D.; VANDER, Y.; GASPER, A.; WOLFENDER, J.; CHRISTEN, P.; HENRIQUES, A. Targeted isolation of monoterpene indole alkaloids from *Palicourea sessilis*. **Journal of Natural Products**, v.80, p. 3032-3037, 2017;

KUPCHAN, S. M.; STREELMAN, D. R.; SNEDEN, A. T. Psorospermin, a new antileukemic xanthone from *Psorospermum febrifugum*. **Journal of natural products**, v. 43(2), p. 296-301, 1980;

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979;

LANÇAS, F. M. A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **The Scientia Chromatographica**, v. 1(2), p. 35-61, 2009;

LI, S.; LIU, W.; TENG, L.; CHENG, X.; WANG, Z.; WANG, C. Metabolites identification of harmaline *in vitro/in vivo* in rats by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.91, p. 53-62, 2014;

LIN, C. Z.; WU, A. Z.; ZHONG, Y.; WANG, Y. M.; PENG, G. T.; SU, X. J.; LIU, B. X.; DENG, Y.; ZHU, C. C.; ZHANG, C. X. Flavonoids from *Psychotria serpens* L., a herbal medicine with anti-cancer activity. **The Journal of Cancer Research Updates**. V.4, p. 60–64, 2015;

LIU, W. & LIU, Y. Youyou Tu: significance of winning the 2015 nobel prize in physiology or medicine. **The Cardiovascular Diagnosis and Therapy**. v. 6(1), p. 1-2, 2016;

LU, H.-X.; LIU, L.-Y.; LI, D.-P.; LI, J.-Z.; XU, L.-C. A new iridoid glycoside from the root of *Psychotria rubra*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 57, p. 133-136, 2014;

LY, S. N.; GARAVITO, A.; BLOCK, O. D.; ASSELMAN, P.; GUYEUX, C.; CHARR, J. C.; JANSSENS, S.; MOULY, A.; HAMON, P.; GUYOT, R. Chloroplast genomes of Rubiaceae: Comparative genomics and molecular phylogeny in subfamily Ixoroideae. **Plos One**. v. 30. p. 1 - 21, 2020;

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

MAGEDANS, Y. V. S.; RODRIGUÊS-CORRÊA, K. C. S.; COSTA, C. T.; MATSUURA, H. N.; FETT-NETO, A. G. Sustainable production of bioactive alkaloids

in *Psychotria* L. of southern Brazil: propagation and elicitation strategies. **Acta Botanica Brasilica**. v. 33(4), p. 607-617, 2019;

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

MEDA, J. D. **Pesquisa de mutações pontuais em genes de *Plasmodium falciparum* associadas à resistência aos antimaláricos em Timor-Leste**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Nova de Lisboa, 2017;

MELEGARI, M. Principi attivi di origine vegetale. Farmaci di semi-sintesi: storia, attualità, prospettive. **Atti della Società dei Naturalisti e Matematici di Modena**. v. 145, p. 273-280, 2014;

MELÉNDEZ-GÓMEZ, C.; KOUZNETSOV, V. Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. **Universitas Scientiarum**, v. 10, n. 2, p. 5-18, 2005;

MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. DA; ANDRADE, A. O.; ALENCAR, S.R.; MACHADO, M. E Prospecção fitoquímica de *Psychotria colorata* (willd. Ex. R. & s.) Müll. Arg. e *P. hoffmannseggiana* (r. & s.) Müll. Arg. **Caderno de Cultura e Ciência**, v.13, n.2, 2015;

MENDOZA, H.; RAMIRÉZ, B. R.; JIMENÉZ, L. C. Rubiaceae de Colombia. Guia ilustrado de gêneros. **Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt**, ISBN 8151-31-7, 351p., 2004;

MONTEIRO, S. M.; POHLIT, A. M.; SILVA, L. F. R. **Atividade antimalárica *in vitro* de alcaloides indólicos e seus derivados semi-sintéticos**. III Congresso de Iniciação Científica do INPA – CONIC. ISSN 2178 9665. Manaus, 2014;

MONTOIA, A. **Síntese de derivados carbazólicos e β -carbolínicos e avaliação da atividade antimalárica *in vitro***. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal do Amazonas, 208 f., 2017;

MORAES, A. P. **Alcaloides indólicos das partes aéreas de *Psychotria* sp. (Rubiaceae) e síntese de tiohidantoínas e tioureias derivadas de aminoácidos e do R-(+)-limoneno**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, 2013;

MORAES, A. P. **Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e distribuição espacial dos metabólitos secundários das folhas de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por DESI-MS direto e indireto**. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 213 f., 2017;

MORENO, B. P.; FIORUCCI, L. L. R.; CARMO, M. R. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; BALDOQUI, D. C. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). **Biochemical systematic and ecology**, v. 56, p. 80-82, 2014;

MOURA, V. M.; AMES, F. Q.; PEIXOTO, M. A.; AMORIN, A. M. A.; POMINI, A. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; BERSANI-AMADO, C. A.; SANTIN, S. M. O.

Cytotoxicity and anti-inflammatory effects of the extract, fractions and alkaloids from *Palicourea minutiflora* (Rubiaceae), **Natural Product Research**, DOI: 10.1080/14786419.2019.1710704, 2020;

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; BEDIR, E.; TAKAMATSU, S.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 962-967, 2003;

MÜLLER, I. B.; HYDE, J. E. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. **Future Microbiology**, v. 5(12), p. 1857–1873, 2010;

NABAVI, S. M.; SAEEDI, M.; NABAVI, S. F.; SILVA, A. S. **Recent advances in natural products analysis**. ISBN 9780128175194, 878 p., Elsevier, 2020;

NASCIMENTO, C. A.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L. Alcalóides indólicos monoterpênicos glicosilados de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). In: Congresso de Pesquisa, Ensino E Extensão Da UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos do II Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação da UFG**, 2005;

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

NASCIMENTO, M. S.; PINA, N. DI P. V.; DA SILVA, A. S. B.; GOMES, L. F. DOS S.; DE VASCONCELLOS, F.; Brandão, G. C.; DO NASCIMENTO, M. F. A.; de Oliveira, A. B.; BARBOSA, W. L. R. *In vitro* antiplasmodial activity and identification, using tandem LC-MS, of alkaloids from *Aspidosperma excelsum*, a plant used to treat malaria in Amazonia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 99-109, 2018;

NASCIMENTO, M. F. A.; BORGATI, T. F.; SOUZA, L. C. R.; TAGLIATI, C. A.; OLIVEIRA, A. B. *In silico*, *in vitro* and *in vivo* evaluation of natural Bignoniaceae naphthoquinones in comparison with atovaquone targeting the selection of potential antimalarial candidates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 401, 115074, 2020;

NAVES, R. F. **Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria hoffmannseggiana* Roem. & Schult (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. Instituto de Química, 212 f., 2014;

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004;

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v. 79, p. 629–661, 2016;

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. v. 83, p. 770–803, 2020;

OLIVEIRA, A. M.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. β -Carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 50, 2013;

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009;

OUYANG, Y.Z.; LIANG, Y.Z.; LI, S.; LUO, X.; ZHANG, L.; TANG, Z.; WANG, Q.; XU, X. Interpretation of the characteristic fragmentation mechanism through determining the initial ionization site by natural spin density: A study on the derivatives of thryptophan and tryptamine, **International Journal of Mass Spectrometry**. v.286, p. 112-121, 2009;

PASSOS, C. S.; SOLDI, T. C.; ABIB, R. T.; APEL, M. A.; SIMÕES-PIRES, C.; MARCOURT, L. GOTTFRIED, C.; HENRIQUES, A. T. Monoamine oxidase inhibition by monoterpene indole alkaloids and fractions obtained from *Psychotria suterella* and *Psychotria laciniata*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28(3), p. 611–618, 2013;

PAUL, J. A. H.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Novel bis (monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. **Journal of Nature Products**. v. 66(6), p. 752-754, 2003;

PAULA, I. C.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela). **Caderno de farmácia**, v. 13(2), p. 143-145, 1997;

PEREIRA, M. S. & BARBOSA, M. R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamília Rubioideae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n.2, p. 455-470. 2006;

PILON, A. C. **Desenvolvimento de métodos analíticos de desreplicação por RMN, EM e análise multivariada do perfil metabolômico de espécies de Solanaceae com potencial biológico**. 163 f. Tese (Doutorado em química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2015;

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n. 4, 2007;

PORTO, D. D.; HENRIQUES, A. T.; FETT-NETO, A. G. Bioactive alkaloids from South American *Psychotria* and related species. **The open bioactives compounds journal**, v. 2, p. 29-36, 2009;

QUEIROZ, G.S.; LUZ, A.B.G.; NASCIMENTO, M.V.P.; THOMASI, S.S.; FERREIRA, A.G.; DALMARCO, E.M.; BRIGHENTE, I.M.C. Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae), **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, p. 168-173, 2017;

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Rang & Dale. **Farmacologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 808 p., 2012;

REANMONGKOL, W.; SUBHADHIRASAKUL, S.; KONGSANG, J.; TANCHONG, M.; KITTI, J. Analgesic and antipyretic activities of n-butanol alkaloids extracted from the stem bark *Hunteria Zeylanica* and its major constituent, strictosidinic acid, in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 38(1), p. 68–73, 2000;

RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J.; MRENA, J.E. Drug sensivity of *Plasmodium falciparum*. An in vitro microtechnique. **Lancet**, v. 7, p. 22-23, 1978;

ROCHA, P. R. N. **Validação de planejamento quimiométrico para extração e quantificação de alcaloides aporfínicos na planta *Unonopsis duckei* R.E.FR por cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial**. 97 f. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal Do Amazonas. Manaus, 2017;

RODRIGUES, M. V. N.; Rehder, V. L. G.; Sartoratto, A.; Boaventura Júnior, S.; Santos, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multicência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, 2006;

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos**. 49 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018;

ROSA, E. A.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Ferreira, H. D.; Silva, C. C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20(4), p. 484-488, 2010;

ROSAS, M. J. Prevenção da malária. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 19, p. 263-266, 2003;

SAMULSKI, G. B.; GONTIJO, D. C.; MOREIRA, N. C.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B. Dereplication of *Palicourea sessilis* ethanol extracts by UPLC-DAD-ESI-MS/MS discloses the presence of hydroxycinnamic acid amides and the absence of monoterpene indole alkaloids, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 92, 104114, 2020;

SANGSTER, A. W. & STUART, K. L. Ultraviolet spectra of alkaloids. **Chemical Reviews**, v. 65(1), p. 69–130, 1964;

SANTOS, A. L. P.; SANTOS, C. O.; ROSA, N. R.; SOUZA, P. MAZETO, T. K. Efeito da cafeína no organismo. **Rev. Saberes**, Rolim de Moura, v. 3, n. Esp., p. 45-52, 2015;

SARKIS, J. R. **Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de tecnologias elétricas no gergelim**. 228 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014;

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap. 27, p. 597-619, 2001;

SHAH, V. H.; PHAM, V.; LARSEN, P.; BISWAS, S.; FRANK, T. Liquid-Liquid Extraction for Recovering Low Margin Chemicals: Thinking beyond the Partition Ratio. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.55(6), p. 1731-1739, 2016;

SHI, Y.; WANG, R.; ZHU, X.; XU, D.; LIU, W.; FENG, F. A self-feedback network based on liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry for system identification of β -carboline alkaloids in *Picrasma quassioides*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-11, 2017;

SILVA, V. C. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. 330 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2007;

SILVA, L. F. R. **Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: Estudos *in vitro*, *in vivo* e de mecanismo de ação**. Tese (Doutorado). Programa multi-institucional de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014;

SILVEIRA, P. F. DA; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008;

SIMÕES, C. M. O.; SEBENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS, Porto Alegre. Editora da UFSC, Florianópolis. 6° edição. 1104 p., 2007;

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

SOBOTA, J. F.; PINHO, M. G.; OLIVEIRA, V. B. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Revista Fitos**, v. 10(1), p. 1-93, 2016;

SOLIS, P. N.; LANG'AT', GUPTA, M. P.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; PHILLIPSON, J. D. Bio-active compounds from *Psychotria camponutans*. **Planta Medica**, v. 61, p. 62-65, 1995;

SOUZA, L. M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. Tese de doutorado (Ciências-bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008;

SOUSA, E. A.; CHAVES, M. H. Iridoides e atividades biológicas de espécies da tribo Gardenieae: uma contribuição quimiotaxonômica para a família Rubiaceae. **Revista Virtual de Química**, v. 11 (6), p. 1767-1801, 2019;

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. 252 f. Editora UFOP, Ouro Preto, 2011;

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

SPRENGER, R. F. **Caracterização de quatro espécies de Quebra-pedra utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas em múltiplos estágios**. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal de São Carlos, 2011;

STANDLEY, P. C. Rubiaceae. In: J. F. Macbride (editor), **Flora of Peru**. Field Museum of Natural History, Bot. Ser. v. 13(6), p. 3-261, 1936;

STEYERMARK, J. A. *Palicourea*. In: J.A. Steyermark & B. Maguire (eds.). Flora of the Guayana Highlands. **Memoirs of New York Botanical Garden**. v. 23, p. 227-832, 1972;

SYSTAT SYSTAT version 13, Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com;

TAMURA, S.; KUBATA, B. K.; SYAMSURIZAL; ITAGAKI, S.; HORII, T.; TABA, M. K.; MURAKAMI, N. New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from *Morinda morindoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 1520–1523, 2010;

TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in México and Central América. **Systematic Botany Monographs**, v. 26, p. 1-102, 1989;

TAYLOR, C. M. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 84(2), p. 224-262, 1997;

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia (Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro)**. v. 58(3), p. 549-616, 2007;

TAYLOR, C. M., B. E. HAMMEL & D. H. LORENCE. **Rubiaceae**. En: Manual de Plantas de Costa Rica. Vol. VII. B.E. Hammel, M.H. Grayum, C. Herrera & N. Zamora (eds.). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. St. Louis. v. 129, p. 464–779, 2014;

TEIXEIRA, L.A.G.; MACHADO, I.C. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 853. 2004;

TRABULSI FILHO, F. A.; ANDRADE, K. C. DE S.; SILVA, E. C. DA; CASTRO, A. T. O.; BATISTA, M. C. A.; RIBEIRO, M. N. DE S. AMARAL, F. M. M. DO. Estudo de padronização de extratos de *Anacardium occidentale* L na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas. **Caderno de pesquisa**. v. 20, n. especial, 2013;

TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/27904261>. Acessado em 15 de fevereiro de 2020;

TSHEPELEVITSH, S.; HERNITS, K.; JENCO, J.; HAWKINS, J. M.; MUTEKI, K.; SOLICH, P.; LEITO, I. Systematic optimization of liquid-liquid extraction for isolation of unidentified components. **ACS Omega**, v. 2, p. 7772-7776, 2017;

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. β -Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochemistry**, v.52, p. 1485-1489, 1999;

VENANZI, E.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Resistencia a los antimaláricos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 29 (suppl. 1), p. 72-75, 2016;

VENCATO I.; SILVA, F. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; TANAKA, C. M. A.; SILVA, C. C.; SABINO, J. R. Vallesiachotamine. **Acta Crystallographica**, v. 62, p. 429-431, 2006;

VERMA, A.; LAAKSO, I.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T. A Simplificated procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* Combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. **Molecules**, v. 12, p. 1307-1315, 2007;

VILAÇA, M. J. L. **Artemisinina no tratamento da malária: perspectivas futuras**. 31 f. Dissertação (mestrado integrado em medicina). Universidade do Porto, 2010;

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2 ed. Berlin: **Springer**. 384 f. 1996;

WANG, S. B.; YANG, X. Y.; DU, G.-H. Tubocurarine. In: **Natural Small Molecule Drugs from Plants**. Springer, Singapore. p. 337-341, 2018;

WANG, Y.H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANI, B.L.; KHAN, I.A.; MILLER, L.S.; CHAURASIYA, N.D.;RAHMAN, M.M.; TRIPATHI, L.M.; KHAN, S.I.; JOSHI, V.C.; WIGGER, F.T.; MUHAMMAD, 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;

WIKSTRÖM, N.; BREMER, B.; RYDIN, C. Conflicting phylogenetic signals in genomic data of the coffee family (Rubiaceae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 0, p. 1-21, 2020;

World malaria report 2019. ISBN: 978-92-4-156572-1; Geneva: World Health Organization; 2019;

XU, Z.; CHANG, L. **Identification and Control of Common Weeds: Volume 3**. ISBN 978-981-10-5403-7, Springer Singapore, 2017;

ZACHOW, L. L. **Extração, composição química e avaliação das atividades de inibição enzimática e antimicrobiana de *Leonurus sibiricus* L.** 122 f. Dissertação (mestrado em química). Universidade Federal de Santa Maria, 2016;

ZHANG, C.-X.; ZHANG, D.-M.; CHEN, M.-F.; GUAN, S.-Y.; YAO, J.-H.; HE, X.-X.; LEI, L.-F.; ZHONG, Y.; WANG, Z.-F.; YE, W.-C. Antiproliferative triterpenoid saponins from the stem of *Psychotria* sp. **Planta Medica**, v. 79, p. 978–986, 2013.