

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Alcaloides de *Psychotria*: compostos multifuncionais em alvos relacionados com
doenças neurodegenerativas

Carolina dos Santos Passos

Porto Alegre, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Alcaloides de *Psychotria*: compostos multifuncionais em alvos relacionados com
doenças neurodegenerativas

Tese apresentada por **Carolina dos Santos
Passos** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Amélia T. Henriques

Co-orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Porto Alegre, 2012.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível doutorado acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.11.2012, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Carla Dalmaz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto

Universidade Estadual de Maringá

dos Santos Passos, Carolina
Alcaloides de Psychotria: compostos
multifuncionais em alvos relacionados com doenças
neurodegenerativas / Carolina dos Santos Passos. --
2012.
297 f.

Orientadora: Amélia T. Henriques.
Coorientadora: Carmem Gottfried.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2012.

1. Rubiaceae. 2. Psychotria. 3. Alcaloides indol
monoterpenos. 4. colinesterases. 5. monoamina
oxidases. I. Henriques, Amélia T., orient. II.
Gottfried, Carmem, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Laboratório de Plasticidade Neuroglial do Departamento de Bioquímica da UFRGS e no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Genebra. A autora recebeu bolsas de estudos das agências CNPq e CAPES/PDSE (durante estágio sanduíche na Universidade de Genebra).

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Amélia T. Henriques pelas oportunidades de aprendizado proporcionadas desde o período de iniciação científica, pela confiança depositada em meu trabalho, e por seu exemplo como pesquisadora.

À Prof. Dra. Carmem Gottfried pela co-orientação, pela acolhida em seu laboratório e por compartilhar seu conhecimento em bioquímica.

Ao Prof. Dr. Pierre-Alain Carrupt pela oportunidade de estágio no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Genebra e pelos recursos disponibilizados. Também agradeço à Dra. Laurence Marcourt da Universidade de Genebra pelo auxílio com as análises por RMN e por sua contribuição na elucidação estrutural dos compostos isolados.

À Dra. Alessandra Nurisso por compartilhar seus conhecimentos de modelagem molecular, por sua constante motivação e por sua contribuição neste trabalho.

À Dra. Claudia Simões-Pires pela confiança, incentivo e amizade. Agradeço por sua contribuição a este trabalho e por toda ajuda com questões burocráticas e científicas durante o período de estágio.

À Prof. Dra. Miriam Apel pelo auxílio com coletas e análises, pela colaboração e apoio desde antes o início do doutorado.

À Tatiane Soldi pela contribuição fundamental em muitas etapas desse trabalho, pela dedicação e competência.

Aos colaboradores do trabalho: Dr. Sergio Bordignon, Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves, Prof. Dra. Renata Abib e Maria Cristina Guerra.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia pelas discussões científicas, pelos momentos de descontração e amizade. Um agradecimento especial a Juliana, Maria Júlia, Melissa, Renata, Roger e Tiago.

Aos amigos que me acompanharam durante esta jornada acadêmica, alguns de longa data e outros mais recentes: Rafaela, Fabiane, Marcelo, Eduardo, Raquel, Marina e Luiz. Agradeço pelos momentos compartilhados, pelas palavras de incentivo e por todos os cafés.

Aos professores e funcionários da Faculdade da Farmácia da UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS e às agências de fomento CAPES e CNPq pela concessão de bolsas de estudo e financiamento de projetos.

À minha família pelo amor, incentivo, compreensão e por sempre respeitar minhas escolhas e decisões.

RESUMO

Os alcaloides indólicos constituem uma classe de metabólitos secundários extensivamente investigada devido a sua importância terapêutica. Dentre os gêneros capazes de sintetizar estes compostos, *Psychotria* L. (Rubiaceae) destaca-se pela complexa taxonomia e pela variedade de produtos biologicamente ativos, com destaque para os alcaloides indol monoterpênicos (MIAs) descritos para as espécies neotropicais (subg. *Heteropsychotria*). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado os efeitos de alguns desses alcaloides sobre o SNC, onde eles parecem atuar sobre diferentes alvos, a saber, receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C}, glutamatérgicos NMDA e opioides. Nesse contexto, considerando a presença de MIAs em espécies de *Heteropsychotria* e as atividades biológicas atribuídas às substâncias pertencentes a esta classe, torna-se relevante a investigação de espécies do gênero buscando a identificação de compostos capazes de interagir com alvos enzimáticos relacionados com doenças neurodegenerativas. Assim, este trabalho propôs (i) a investigação química de *Psychotria suterella* e *P. laciniata* e (ii) a avaliação dos efeitos de frações e alcaloides isolados de espécies neotropicais de *Psychotria* sobre as enzimas acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE), e monoamina oxidases A e B (MAO-A e MAO-B). Os MIAs angustina, valesiacotamina lactona, *E*-valesiacotamina, *Z*-valesiacotamina, lialosídeo, pauridiantosídeo e strictosamida foram isolados de frações de alcaloides obtidas por extração ácido-base a partir de folhas de *P. suterella* (SAE) e *P. laciniata* (LAE). Além disso, o alcaloide (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo também foi identificado em ambas as espécies. Nesse trabalho verificou-se que frações de *P. suterella* e *P. laciniata* (SAE, LAE e sub-frações), juntamente com os MIAs lialosídeo e strictosamida, foram capazes de inibir as enzimas MAO-A e MAO-B de frações mitocondriais de encéfalos de ratos. Os resultados obtidos indicam seletividade para inibição da MAO-A e atividades mais potentes para as frações SAE, LAE e sub-frações contendo alcaloides do tipo valesiacotamina, que apresentaram valores de IC₅₀ entre 0,57 – 2,02 µg/mL para inibição da MAO-A, e entre 51 – 133 µg/mL para inibição da MAO-B. Adicionalmente, 13 alcaloides isolados de espécies neotropicais de *Psychotria* foram avaliados quanto a seus efeitos sobre as enzimas AChE de *Electrophorus*

electricus, BChE de soro equino e MAO-A e MAO-B humanas. Nesses experimentos, os alcaloides quaternários prunifoleina e 14-oxoprunifoleina foram capazes de inibir não-competitivamente as enzimas *EeAChE* e *eqBChE* (IC₅₀ entre 3,39 e 100 µM) e irreversivelmente a enzima hMAO-A (IC₅₀ de 7,41 e 6,92 µM, respectivamente). Os MIAs angustina, valesiacotamina lactona e *E/Z*-valesiacotamina também inibiram a *eqBChE* (IC₅₀ entre 3,47 e 14 µM) e a hMAO-A (IC₅₀ entre 0,85 e 2,14 µM). Com relação ao perfil de inibição da hMAO-A, angustina comporta-se como um inibidor reversível e competitivo, enquanto que os alcaloides do tipo valesiacotamina parecem atuar como inibidores irreversíveis. Simulações de *docking* molecular foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis interações entre os compostos ativos e os alvos proteicos. Essa abordagem permitiu a obtenção de informações relacionadas com a orientação dos ligantes no sítio ativo das enzimas e interações hidrofóbicas, hidrofílicas e covalentes. Analisados em conjunto, os dados do presente trabalho representam uma nova contribuição para o estudo químico de espécies neotropicais de *Psychotria* L. e apontam para as potencialidades dos alcaloides encontrados nessas espécies como ligantes capazes de atuar sobre múltiplos alvos enzimáticos relacionados com doenças neurodegenerativas.

Palavras chave: *Psychotria suterella*, *P. laciniata*, alcaloides indol monoterpênicos, monoamina oxidases, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, *docking* molecular.

ABSTRACT

Psychotria alkaloids: multi-active compounds on enzymatic targets related to neurodegenerative diseases

The indole alkaloids are a group of secondary metabolites extensively investigated due to their therapeutic importance. Among the species of flowering plants that are able to produce these compounds, *Psychotria* L. (Rubiaceae) is distinguished by its complex taxonomy and by the variety of biologically active products, especially monoterpene indole alkaloids (MIAs), which are described for the Neotropical *Psychotria* species (subg. *Heteropsychotria*). *In vivo* and *in vitro* studies have been demonstrated the effects of some MIAs from *Heteropsychotria* on the CNS, as for example the alkaloids psychollatine and strictosidinic acid, which seem to act on different targets, namely serotonin 5-HT_{2A/C}, glutamate NMDA and opioids receptors. In this context, considering the presence of MIAs in *Heteropsychotria* species and the biological activities described for substances belonging to this class, it becomes relevant to investigate *Psychotria* species aiming at identifying compounds able to interact with enzyme targets related to neurodegenerative diseases. Therefore, this study aimed at (i) the chemical investigation of *Psychotria suterella* and *P. laciniata*, and (ii) the assessment of fractions and alkaloids isolated from *Heteropsychotria* species on acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), and monoamine oxidases A and B (MAO-A and MAO-B) activities. The MIAs angustine, vallesiachotamine lactone, *E*-vallesiachotamine, *Z*-vallesiachotamine, lyaloside, pauridianthoside, and strictosamide were isolated from alkaloid fractions obtained from leaves of *P. suterella* and *P. laciniata*. Furthermore, the alkaloid (*E*)-O-(6')-Cinnamoyl-4''-hydroxy-3'',5''-dimethoxy-lyaloside was identified in both species. In this study it was found that fractions of *P. suterella* and *P. laciniata* (SAE, LAE, and sub-fractions), together with the MIAs lyaloside and strictosamide, were able to inhibit MAO-A and MAO-B obtained from rat brain mitochondria. These experiments also indicated that SAE, LAE, and fractions containing vallesiachotamine-like alkaloids were the most potent for MAO-A and MAO-B inhibition (MAO-A IC₅₀ ranging from 0.57 to 2.02 μ/mL; MAO-B IC₅₀ ranging from 51 to 133 μg/mL), possessing some degree of selectivity

for MAO-A. Additionally, 13 indole alkaloids from *Heteropsychotria* were evaluated regarding their effects on AChE from *Electrophorus electricus*, BChE from equine serum, and human MAO-A and MAO-B. In these experiments, the quaternary β -carboline alkaloids, prunifoleine and 14-oxoprufifoleine, were able to irreversibly inhibit the hMAO-A (IC_{50} of 7.41 and 6.92 μ M, respectively). Both alkaloids also inhibited the *Ee*AChE (IC_{50} of 10 and 3.39 μ M, respectively) and the eqBChE (IC_{50} of 100 and 11 μ M, respectively) in a non-competitive way. For the MIAs angustine, vallesiachotamine lactone and *E/Z*-vallesiachotamine, it was observed eqBChE inhibition with IC_{50} values ranging from 3.47 to 14 μ M, and MAO-A inhibition with IC_{50} values ranging from 0.85 to 2.14 μ M. concerning their modes of inhibition, angustine seems to act as a reversible and competitive MAO-A inhibitor while the vallesiachotamine-like alkaloids behave as irreversible inhibitors, such as prunifoleine and 14-oxoprufifoleine. Docking simulations were performed in order to investigate possible interactions between the active compounds and the protein targets. This theoretical approach afforded complementary information related with binding's mode and possible hydrophobic, hydrophilic or covalent interactions. Taken together, the data from this study consist of a new contribution for the knowledge of the chemistry of Neotropical *Psychotria* L., and point at MIAs and β -carboline alkaloids as potential scaffolds for the development of multifunctional compounds against neurodegeneration.

Keywords: *Psychotria suterella*, *P. laciniata*, monoterpene indole alkaloids, monoamine oxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura II. Proposta para triagem experimental e virtual visando a avaliação de potenciais compostos multifuncionais de interesse para o tratamento das Doenças de Parkinson e de Alzheimer	23
---	----

III. REVISÃO

Figura III1. Esquema representando o mecanismo da desaminação oxidativa de monoaminas catalisado pela MAO mitocondrial.....	53
--	----

IV. ARTIGO 1

Fig. 1. Chromatograms and UV spectra obtained by LC-PDA for the alkaloids fractions of <i>P. suterella</i> (SAE) and <i>P. laciniata</i> (LAE).....	84
Fig. 2. Structures of the alkaloids lyaloside (1), strictosamide (2), vallesiachotamine (3), and isovallesiachotamine (4).....	85
Fig. S1. ¹ H NMR spectra of the three main fractions obtained from the fractionating of SAE-F3 by CPTLC.....	87
Fig. S2. Inhibitory activity of alkaloid fractions and MIAs of <i>P. suterella</i> and <i>P. laciniata</i> on the brain's mitochondrial MAO-A and B.....	89

V. ARTIGO 2

Fig. 1. Chemical structures of the <i>Psychotria</i> alkaloids.....	132
Fig. 2. Lineweaver-Burk plots of AChE activity over a range of substrate concentrations.....	133
Fig. 3. Time-dependent inhibition of hMAO-A.....	134
Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of the human MAO-A activity over a range of substrate concentrations.....	135
Fig. 5. Docking of prunifoleine (12) and 14-oxoprunifoleine (13) in AChE....	136
Fig. 6. Docking of alkaloids 1-4 in MAO-A.....	137
Fig. 7. Docking of prunifoleine (12) and 14-oxoprunifoleine (13) in MAO-A.	138
Fig. 1S. Docking of angustine (1) (A), vallesiachotamine lactone (2) (B), <i>E</i> -vallesiachotamine (3) (C) and <i>Z</i> -vallesiachotamine (4) (D) on BChE.....	148

Fig. 2S_A. Docking of galanthamine, the co-crystalized ligand, in AChE.....	149
Fig. 2S_B. Docking of butyrate, the co-crystalized ligand, in BChE.....	150
Fig. 2S_C. Docking of harmine, the co-crystalized ligand, in MAO-A.....	151

VI. ARTIGO 3

Figure. 1. Chemical structures of the indole alkaloids <i>E</i> -vallesiachotamine (1) and prunifoleine (2).....	167
---	-----

Figure 2. Citotoxic effects of alkaloids 1, <i>E</i> -vallesiachotamine (Vall), and 2, prunifoleine (Pru), on primary astrocytes cell culture.....	165
---	-----

Figure 3. Citotoxic effects of alkaloids 1, <i>E</i> -vallesiachotamine (Vall), and 2, prunifoleine (Pru), on primary astrocytes cell culture.....	166
---	-----

VII. DISCUSSÃO

Figura VII1. Estruturas dos MIAs isolados de <i>P. suterella</i> e <i>P. laciniata</i>	175
---	-----

LISTA DE TABELAS

III. REVISÃO

Tabela III1. Espécies de <i>P.</i> subg. <i>Heteropsychotria</i> investigadas quanto sua composição química.....	35
Tabela III2. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de <i>Psychotria</i> subg. <i>Heteropsychotria</i>	36
Tabela III3. Especificidades de diferentes substratos pelas enzimas MAO-A e MAO-B humanas no córtex cerebral.....	53

IV. ARTIGO 1

Table 1: Description of the main peaks observed in the HPLC-PDA and UHPLC/HR-TOF-MS analyses performed for SAE and LAE.....	80
Table 2: MAO-A inhibitory activity of fractions and monoterpene indole alkaloids from <i>P. suterella</i> and <i>P. laciniata</i>	81
Table 3: MAO-B inhibitory activity of fractions and monoterpene indole alkaloids from <i>P. suterella</i> and <i>P. laciniata</i>	82
Table S1: Description of the main peaks observed in the HPLC-PDA and UHPLC/HR-TOF-MS analyses performed for SAE and LAE fractions obtained by RP-MPLC.....	91
Table S2: ¹ H NMR data for lyaloside (1), strictosamide (2), vallesiachotamine (3), and isovallesiachotamine (4). Spectra recorded at 500 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO, δ values in ppm, <i>J</i> in Hz.....	95

V. ARTIGO 2

Table 1. The IC ₅₀ (pIC ₅₀) values for the inhibition of AChE, BChE, MAOA and MAOB by <i>Psychotria</i> alkaloids.....	129
Table S1. AChE, BChE, MAO-A and MAO-B inhibition (%) displayed by <i>P. laciniata</i> RP-MPLC fractions and controls.....	144
Table S2. AChE, BChE, MAO-A and MAO-B inhibition (%) displayed by <i>Psychotria</i> alkaloids and controls.....	155

Table S3. Lipophilic index of the selected targets..... 157

Table S4. Summary of docking results..... 157

VII. DISCUSSÃO

Tabela VII1. Tabela comparativa da inibição das enzimas MAO-A e MAO-B de rato e humana por frações e alcaloides isolados de *P. suterella* e *P. laciniata*..... 178

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
COMT	Catecol- <i>O</i> -metil-transferase
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear ^1H - ^1H (do inglês <i>Correlation spectroscopy</i>)
DA	Doença de Alzheimer
DH β C	Diidro- β -carbolina (ou diidro- β -carbolínico)
DMT	<i>N,N</i> -dimetil-triptamina
DP	Doença de Parkinson
<i>Ee</i> AChE	Acetilcolinesterase de <i>Electrophorus electricus</i>
eqBChE	Butirilcolinesterase de soro equino
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
hMAO-A	Monoamina oxidase A humana
hMAO-B	Monoamina oxidase B humana
HMBC	Correlação heteronuclear de quantum múltiplo (do inglês <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
HR-TOF-MS	Espectrômetro de massas por tempo de voo em alta resolução
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum simples (do inglês <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>)

IP / PI	Iodeto de propídio
LAE	Fração de alcaloides de <i>Psychotria laciniata</i>
LDH	Lactato desidrogenase
L-DOPA	L-3,4-diidroxi-fenilalanina (Levodopa)
MAO	Monoamina oxidase
MIA _s	Alcaloides indol monoterpénos (do inglês <i>Monoterpene indole alkaloids</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NOESY	Espectroscopia do efeito nuclear overhauser (do inglês <i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>)
rMAO-A	Monoamina oxidase A de rato
rMAO-B	Monoamina oxidase B de rato
RMN de ¹³ C-APT	Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (<i>attached proton test</i>)
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RP-MPLC	Cromatografia líquida preparativa em média pressão com eluição em fase reversa
SAE	Fração de alcaloides de <i>Psychotria suterella</i>
SNC	Sistema nervoso central
THβC	Tetraidro-β-carbolina (ou tetraidro-β-carbolínico)
TOCSY	Espectroscopia de correlação total (do inglês <i>Total correlation spectroscopy</i>)
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
βC	β-Carbolina (ou β-carbolínico)

SUMÁRIO

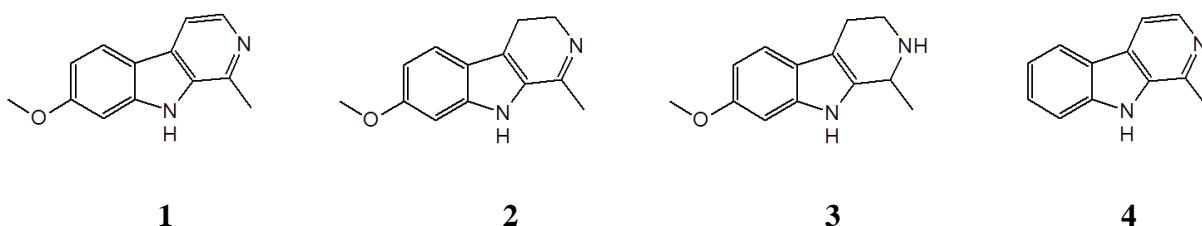
I. INTRODUÇÃO.....	19
Justificativa.....	24
II. OBJETIVOS.....	25
III. REVISÃO DO TEMA.....	29
III.1 Família Rubiaceae.....	31
III.2 Tribo Psychotrieae, Gênero <i>Psychotria</i>	33
<i>III.2.1 Aspectos químicos</i>	34
<i>III.2.2 Aspectos biológicos</i>	46
<i>III.2.3 Psychotria suterella e P. laciniata</i>	49
III.3 Compostos multifuncionais para o tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.....	50
III.4 Monoamina Oxidases (MAOs).....	52
III.5 Colinesterases.....	55
<i>III.5.1 Hipótese colinérgica da Doença de Alzheimer</i>	55
<i>III.5.2 Acetylcholinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)</i>	57
IV. ARTIGO 1. Monoamine oxidase inhibition by monoterpene indole alkaloids and fractions obtained from <i>Psychotria suterella</i> and <i>P. laciniata</i>....	59
V. ARTIGO 2. Indole alkaloids of <i>Psychotria</i> as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors.....	97
VI. ARTIGO 3. Effects of the <i>Psychotria</i> alkaloids <i>E</i>-vallesiachotamine and prunifoleine in the viability of astroglial cells.....	153
VII. DISCUSSÃO GERAL.....	169
VIII. CONCLUSÕES.....	185
IX. PERSPECTIVAS.....	189
X. REFERÊNCIAS.....	193
XI. ANEXOS.....	213

I. INTRODUÇÃO

A pesquisa por metabólitos obtidos a partir de fontes naturais, como plantas, animais e micro-organismos, consiste em uma das abordagens empregadas para o desenvolvimento de fármacos. O interesse por esses produtos, atribuído principalmente a características como diversidade estrutural, complexidade química e capacidade de interação com alvos biológicos, pode ser mensurado a partir de levantamento indicando que aproximadamente 50% dos fármacos aprovados pelo FDA entre 1981-2010 eram produtos naturais ou compostos sintéticos derivados destes (NEWMAN e CRAGG, 2012). Adicionalmente, estimativas do ano de 2008 apontam que 122 derivados de produtos naturais estavam em fases I, II e III de ensaios clínicos, sendo a maioria destes para o tratamento de câncer, doenças infecciosas e condições relacionadas com o sistema nervoso central (SNC), como doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (HARVEY, 2008). Ainda, levantamento dos fármacos aprovados para comercialização no mundo inteiro entre os anos de 2005 e 2010 apontou que 19 fármacos consistiam em produtos naturais ou derivados (MISHRA e TIWARI, 2011).

Os alcaloides indólicos constituem uma classe de metabólitos secundários extensivamente investigada quanto a uma série de efeitos biológicos, como inibição de alvos enzimáticos, além de atividades citotóxica, anti-inflamatória, antimalárica, antiviral e antibacteriana (CORDEL et al., 2001). Dentre os gêneros capazes de sintetizar estes compostos, *Psychotria* L. (Rubiaceae) destaca-se pela variedade de produtos biologicamente ativos. Espécies pantropicais de *Psychotria* (subg. *Psychotria*) caracterizam-se pela presença de alcaloides pirrolidino indólicos, enquanto que as espécies neotropicais (subg. *Heteropsychotria*) parecem sintetizar alcaloides indol monoterpênicos (MIAs). O núcleo indol desses compostos pode ser classificado como β -carbolínico (β C), diidro- β -carbolínico (DH β C) ou tetraidro- β -carbolínico (TH β C); as suas porções terpênicas podem ser glicosiladas ou não glicosiladas (LOPES et al., 2004); e, eventualmente apresentam-se como derivados diretos de iridoides e não de seco-derivados. Adicionalmente, é possível haver *N*-glicosilação na posição N-1 do núcleo indol (HENRIQUES et al., 2004).

A similaridade estrutural verificada entre os MIAs isolados de espécies de *Heteropsychotria* e outros compostos β -carbolínicos pode sugerir o envolvimento desses metabólitos na neurotransmissão serotoninérgica. Alcaloides indólicos β Cs, DH β Cs ou TH β Cs, como harmina (**1**), harmalina (**2**), tetraidro-harmina (**3**) e harmano (**4**) são encontrados em plantas utilizadas por diversas culturas, como alguns povos indígenas da América do Sul, devido às suas propriedades psicotrópicas (McKENNA, 2004). Substâncias pertencentes a esta classe podem apresentar efeitos farmacológicos variados como ligação a receptores benzodiazepínicos, imidazolínicos, serotoninérgicos (5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}) e opioides, bem como inibição das enzimas monoamina oxidase (HERRAIZ, 2007; SAMOYLENKO et al., 2010), catecol-*O*-metil-transferase (YALCIN e BAYRAKTAR, 2010), acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (KHORANA et al., 2012; TORRES et al., 2012). Adicionalmente, outras atividades têm despertado o interesse nesses alcaloides, com destaque para potente atividade antitumoral e atividades antiviral, antimicrobiana e antiparasitária (CAO et al., 2007).



Doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, como Doença de Parkinson (DP) e Doença de Alzheimer (DA), são condições complexas desencadeadas por múltiplos fatores. Assim, considerando a etiologia multifacetada dessas doenças, novas estratégias terapêuticas baseadas no desenvolvimento de compostos que atuem em diferentes alvos bioquímicos e neuronais têm sido investigadas para o tratamento do déficit cognitivo, da disfunção motora, da depressão e da neurodegeneração relacionados com a DP e a DA (YOUJIM E BUCCAFUSCO, 2005; GELDENUYS et al., 2011). NOVAROLI e colaboradores (2005) propuseram abordagem baseada em triagem experimental e virtual visando a descoberta de substâncias capazes de atuar em dois ou mais alvos associados a essas doenças. Os

alvos selecionados consistem nas enzimas acetilcolinesterase (AChE), monoamina oxidase (MAO) e catecol-*O*-metil-transferase (COMT), a deposição de proteína β -amiloide, e o estresse oxidativo. Dentre esses alvos, três são comuns para ambas as doenças (AChE, MAO e estresse oxidativo), e os outros dois são específicos para DP (COMT) e para DA (deposição de proteína β -amiloide). Após a triagem inicial, os compostos capazes de interagir com dois ou mais alvos são selecionados para a realização de ensaios complementares objetivando investigação de seus mecanismos de ação (Figura II).

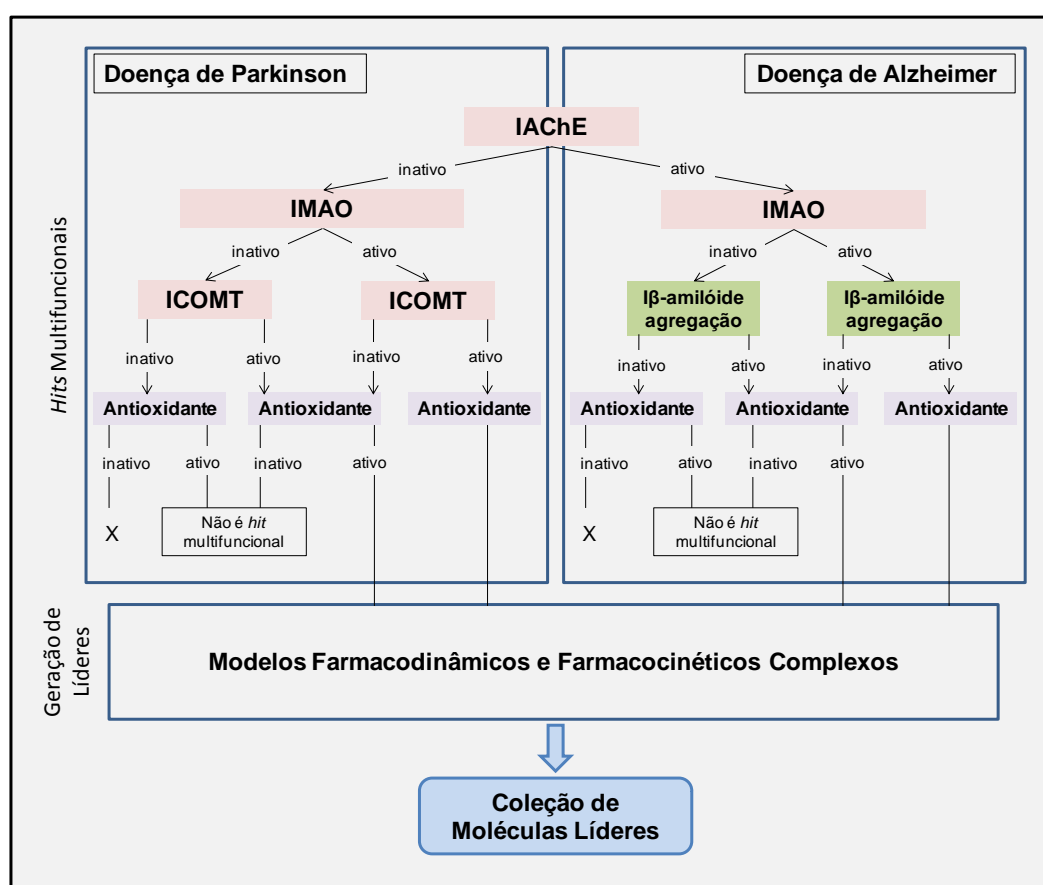


Figura II. Abordagem proposta para triagem experimental e virtual visando a avaliação de potenciais compostos multifuncionais de interesse para o tratamento das Doenças de Parkinson e de Alzheimer. IACHe (inibidores da acetilcolinesterase); IMAO (inibidores da monoamina oxidase); ICOMT (inibidores da catecol-*O*-metil-transferase); I β -amiloide agregação (inibidores da agregação da proteína β -amiloide). Em vermelho estão representados os alvos disponíveis para estudos de modelagem baseada em receptor; em roxo estão apresentados os alvos disponíveis apenas para estudos de modelagem baseada na estrutura do ligante; em verde está representado alvo para o qual ainda não existem modelos para modelagem molecular. Esquema adaptado de NOVAROLI e colaboradores (2005).

Justificativa

Considerando a presença de alcaloides indol monoterpênicos com núcleos β Cs e TH β Cs em espécies de *Psychotria* (subg. *Heteropsychotria*) e as atividades biológicas atribuídas às substâncias pertencentes a esta classe, torna-se relevante a investigação de espécies do gênero buscando a identificação de compostos capazes de interagir com alvos enzimáticos e neuronais relacionados com a etiologia de doenças neurodegenerativas.

Os estudos realizados até o momento com alcaloides isolados de *Psychotria* indicam que essas substâncias são capazes de atuar sobre o SNC afetando, principalmente, os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e glutamatérgico. Adicionalmente, não existem dados na literatura relacionados a possíveis efeitos neuroprotetores e neurotóxicos apresentados por esses compostos. De forma semelhante, não há relatos da atividade desses alcaloides sobre as enzimas MAO e COMT e sobre parâmetros relacionados com estresse oxidativo. Entretanto, estudos realizados com alcaloides β Cs e TH β Cs isolados das espécies *Peganum harmala* e *Banisteriopsis caapi* demonstraram que essas substâncias, e os extratos obtidos desses vegetais, apresentam atividades inibitórias sobre as enzimas COMT e MAO (YALCIN e BAYRAKTAR, 2010; SAMOYLENKO et al., 2010).

II. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consiste na investigação de espécies pertencentes ao gênero *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* (Rubiaceae) visando a identificação de substâncias capazes de aturem em múltiplos alvos enzimáticos relacionados com a patologia de doenças neurodegenerativas.

Os objetivos específicos incluem:

- A investigação química das espécies *Psychotria suterella* Müll. Arg. e *P. laciniata* Vell.;
- A avaliação do efeito de frações e alcaloides de *P. suterella* e *P. laciniata* sobre as enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B) obtidas de frações mitocondriais de encéfalos de ratos;
- A avaliação do efeito de alcaloides isolados de *Psychotria* sobre as enzimas MAO-A humana (hMAO-A), MAO-B humana (hMAO-B), acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (EeAChE) e butirilcolinesterase de soro equino (eqBChE);
- A determinação dos mecanismos de inibição para os alcaloides que apresentarem efeitos sobre os alvos estudados através de ensaios *in vitro* e simulações de *docking* molecular;

A investigação de parâmetros de viabilidade e morte celular em culturas de astrócitos tratadas com os alcaloides que apresentarem atividade nos alvos enzimáticos.

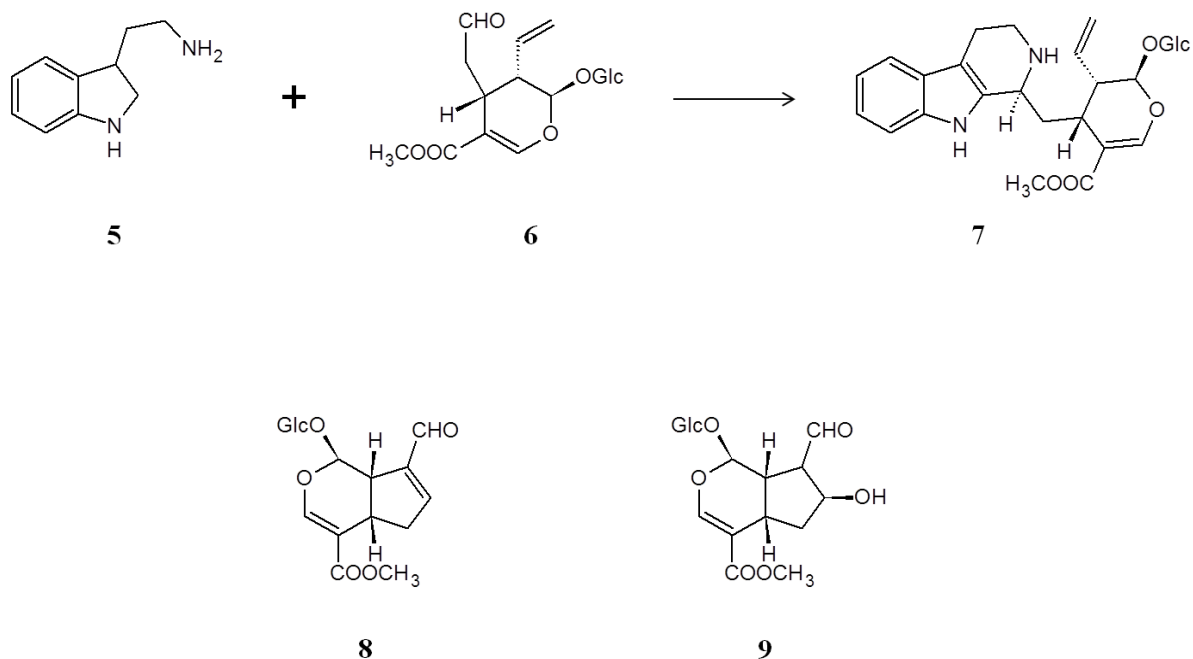
III. REVISÃO DO TEMA

III.1 Família Rubiaceae

Rubiaceae é a quarta maior família dentro do grupo das Angiospermas, compreendendo cerca de 650 gêneros e 13000 espécies. Rubiaceae é composta por árvores de grande, médio ou pequeno porte, arbustos, subarbustos e ervas perenes ou anuais, distribuídas principalmente nas regiões tropicais (ROBBRECHT, 1988), representando uma grande parte da vegetação lenhosa dos trópicos, especialmente das florestas chuvosas (ROBBRECHT, 2005; ROBBRECHT e MANEN, 2006).

Segundo CORDELL e colaboradores (2001), 677 alcaloides foram isolados a partir do estudo de 181 espécies distribuídas em 57 gêneros pertencentes à Rubiaceae. Desses, destacam-se os alcaloides isoquinolínicos com 44 compostos, os quinolínicos com 70 substâncias e os indólicos com 391 estruturas elucidadas.

Os alcaloides indol monoterpênicos (MIAs) são um importante grupo de metabólitos secundários principalmente identificados em Rubiaceae e em outras duas famílias da ordem das Gentianales: Apocynaceae e Loganiaceae. Todos os alcaloides pertencentes a este grupo apresentam origem biossintética comum. O precursor da maioria dos compostos conhecidos é a strictosidina (7), formada através da condensação de uma molécula de triptamina (5) com o monoterpêno (seco-iridoide) secologanina (5) por reação de Pictet-Spengler catalisada pela enzima strictosidina sintetase. A strictosidina é o intermediário central para a síntese de, pelo menos, 3000 alcaloides, com destaque para os compostos indol monoterpênicos. Entretanto variações nas etapas biossintéticas são possíveis; um exemplo é a condensação de triptamina (5) com iridoide precursor tais como geniposídeo (8) e loganina (9) na forma ativa aldeído, conforme descrito para espécies de *P.* subg. *Heteropsychotria* Steyerm. (KERBER et al., 2001; KERBER et al., 2008) e *Palicourea* Aubl. (DÜSMAN et al., 2004; NARINE e MAXWELL, 2009).



Classificações internas dentro de Rubiaceae baseadas em características botânicas foram propostas por autores como BREMEKAMP (1934, 1966), VERDECOURT (1958) e ROBBRECHT (1988, 1993), sendo que este último sugeriu a divisão de Rubiaceae em quatro subfamílias (Rubioidae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Antirheoideae) que, por sua vez, compreendiam 44 tribos. A última subdivisão proposta para Rubiaceae (BREMER e EEIKSSON, 2009) foi realizada através de análises filogenéticas de 534 táxons e 329 gêneros (cerca de metade dos gêneros classificados dentro da família). Os dados observados nesse estudo levaram os autores a suportar a divisão de Rubiaceae nas subfamílias Rubioidae, Cinchonoideae e Ixoroideae, e a distribuição dessas subfamílias em 44 tribos.

O gênero *Psychotria*, que é objeto de investigação desta Tese e de outros projetos do grupo de pesquisa, está classificado dentro da tribo Psychotrieae, incluída na Aliança Psychotrieae da subfamília Rubioidae (BREMER e ERIKSSON, 2009).

III.2 Tribo Psychotrieae, Gênero *Psychotria*

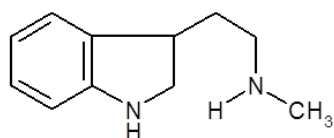
Psychotria L. é o maior gênero dentro da tribo Psychotrieae (família Rubiaceae, subfamília Rubioideae) compreendendo cerca de 2000 espécies de distribuição pantropical (DAVIS et al., 2001). Este gênero é amplamente reconhecido pela presença de espécies que produzem alcaloides bioativos, e por sua complexidade taxonômica, que pode ser atribuída à ausência de caracteres morfológicos suficientes para a delimitação de grupos (MORAES et al., 2011).

STEYERMARK (1972), considerando aspectos botânicos e distribuição geográfica, sugeriu a divisão de *Psychotria* em três subgêneros: *P.* subg. *Psychotria* L. (espécies de distribuição pantropical que apresentam similaridade morfológica com a espécie tipo *P. asiatica* L.), *P.* subg. *Tetramerae* (Hiern) R. Petit (espécies de ocorrência no continente africano, incluindo a ilha de Madagascar), e *P.* subg. *Heteropsychotria* Steyerm. (espécies de ocorrência no continente americano apresentando semelhanças com o gênero neotropical *Palicourea*). Com relação à *Psychotria* neotropicais, ANDERSSON (2002), a partir de abordagem filogenética, propôs a classificação das espécies dentro de dois subgrupos: (i) espécies referidas por STEYERMARK (1972) como *P.* subg. *Psychotria* e (ii) espécies referidas por STEYERMARK (1972) como *P.* subg. *Heteropsychotria*, que constituem um *clade* exclusivamente neotropical com algumas espécies atualmente reconhecidas como pertencentes à *Palicourea*.

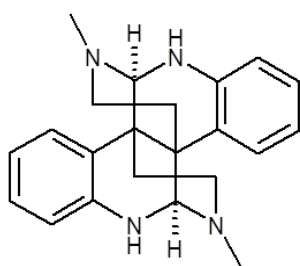
No contexto desta Tese, e de outros trabalhos do grupo de pesquisa envolvendo a investigação química e biológica de *Psychotria*, as espécies estudadas enquadram-se na classificação *P.* subg. *Heteropsychotria* (STEYERMARK, 1972; ANDERSSON, 2002). Portanto, os itens desta revisão relacionados ao gênero irão abordar predominantemente os aspectos químicos e biológicos de *P.* subg. *Heteropsychotria* e também de *Palicourea*.

III.2.1 Aspectos químicos

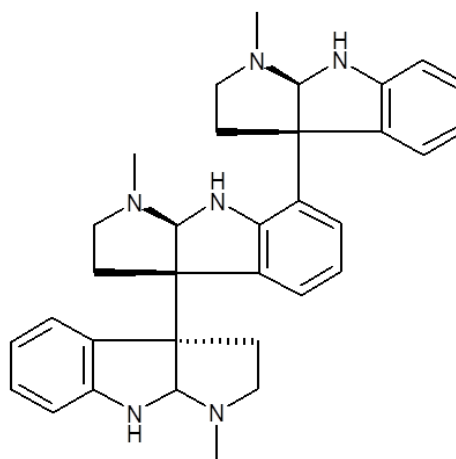
Os alcaloides constituem o principal grupo de metabólitos secundários encontrados em *Psychotria*. As espécies de ocorrência pantropical, cujos aspectos morfológicos se assemelham aos da espécie-tipo *P. asiatica.*, são caracterizadas pela presença de compostos com núcleo pirrolidino indolínico formados através da condensação de duas ou mais unidades de *N*_b-metil-triptamina (**10**). Exemplos dessa classe são os compostos hodgkinsina (**11**) e calicantina (**12**) (VEROTTA et al., 1998). Além disso, alcaloides pirrolidino indolínicos também foram descritos em *Maragaritopsis cymuligera* (Müll. Arg.) C.M. Taylor (= *P. birotula* L.B. Sm. & Downs) (BRAND et al., 2012), que foi transferida de *Psychotria* para *Mararitopsis* C. Wright com base em análises filogenéticas (ANDERSSON, 2001).



10



12



11

As espécies neotropicais de *Psychotria* (subg. *Heteropsychotria*), por sua vez, são caracterizadas pela presença de alcaloides indol monoterpênicos (MIAs) (Tabelas III1 e III2) (LOPES et al., 2004).

Tabela III1. Espécies de *P.* subg. *Heteropsychotria* investigadas quanto sua composição química.

<i>P.</i> subg. <i>Heteropsychotria</i> (Espécie)	Referência
<i>P. dichroa</i> (Standl.) C.M. Taylor	SOLIS et al., 1993
<i>P. carthagenensis</i> Jacq.	LEAL e ELISABETSKY, 1996
<i>P. suterella</i> Müll. Arg.	DE SANTOS et al., 2001
<i>P. bahiensis</i> DC.	PAUL et al., 2003
<i>P. myriantha</i> Müll. Arg.	SIMÕES-PIRES et al., 2006 FARIAS, 2006
<i>P. nuda</i> (Cham. & Schltld.) Wawra	FARIAS et al., 2008
<i>P. prunifolia</i> (Kunth) Steyerl.	FARIA et al., 2010 KATO et al., 2012
<i>P. leiocarpa</i> Cham. & Schltld.	LOPES, 1998 HENRIQUES et al., 2004
<i>P. correae</i> (Dwyer & M.V. Hayden) C.M. Taylor	ACHENBACH et al., 1995
<i>P. brachyceras</i> Müll. Arg.	KERBER, 1999 KERBER et al., 2001
<i>P. umbellata</i> Vell.	KERBER, 1999 KERBER et al., 2008
<i>P. stachyoides</i> Benth.	PIMENTA et al., 2010 ^a PIMENTA et al., 2010b PIMENTA et al., 2011

Tabela III2. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

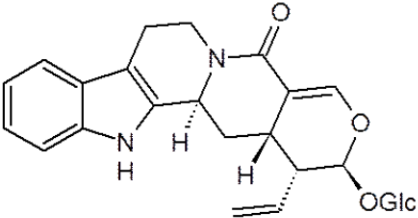
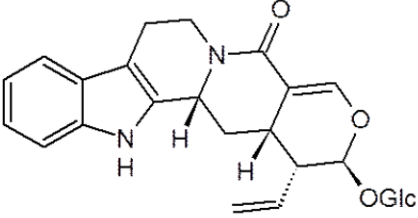
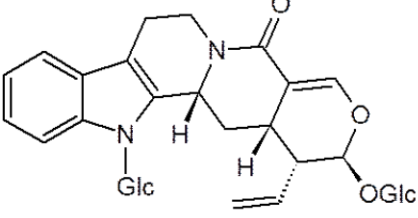
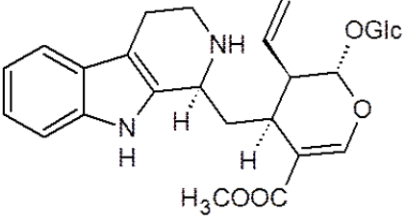
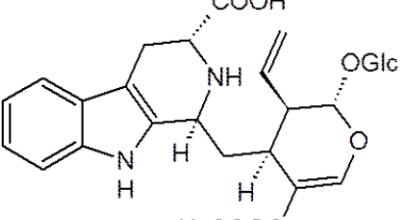
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>Estrictosamida (13)</p>	<i>P. dichroa</i> <i>P. suterella</i> <i>P. bahiensis</i> <i>P. myriantha</i> <i>P. nuda</i> <i>P. prunifolia</i>	SOLIS et al., 1993 DE SANTOS et al., 2001 PAUL et al., 2003 FARIAS, 2006 FARIAS et al., 2008 FARIA et al., 2010
 <p>Vincosamida (14)</p>	<i>P. leiocarpa</i>	LOPES, 1998
 <p>N,β-D-Glicopiranosil-vincosamida (15)</p>	<i>P. leiocarpa</i>	HENRIQUES et al., 2004
 <p>Estrictosidina (16)</p>	<i>P. dichroa</i>	SOLIS et al., 1993
 <p>5α-carbóxi-estricosidina (17)</p>	<i>P. bahiensis</i>	PAUL et al., 2003

Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

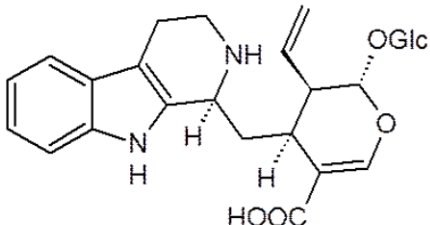
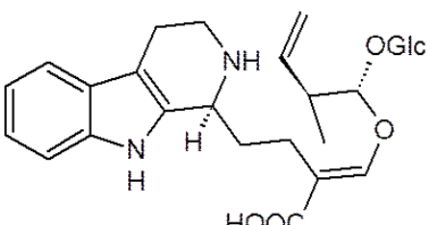
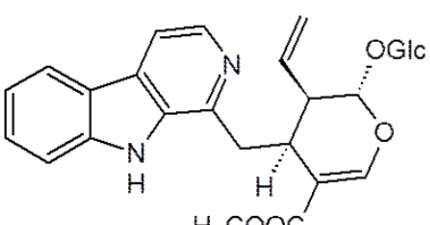
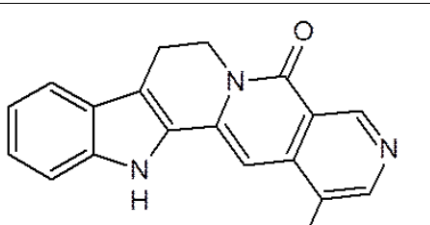
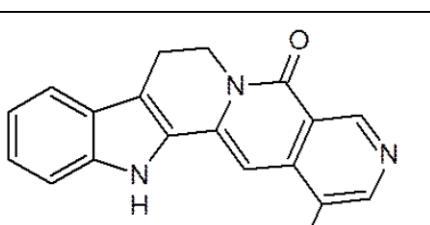
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>Ácido strictosidínico (18)</p>	<i>P. myriantha</i>	SIMÕES-PIRES et al., 2006
 <p>Miriantosina (19)</p>	<i>P. myriantha</i>	SIMÕES-PIRES et al., 2006
 <p>Lialosídeo (20)</p>	<i>P. suterella</i>	DE SANTOS et al., 2001
 <p>Naucleína (21)</p>	<i>P. suterella</i>	DE SANTOS et al., 2001
 <p>Angustina (22)</p>	<i>P. dichroa</i> <i>P. bahiensis</i>	SOLIS et al., 1993 PAUL et al., 2003

Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

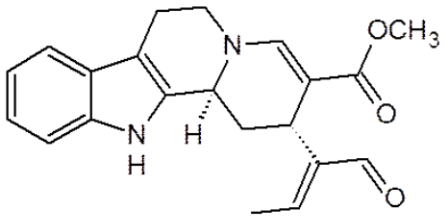
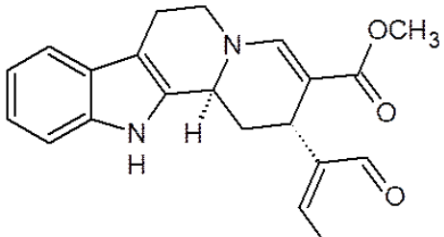
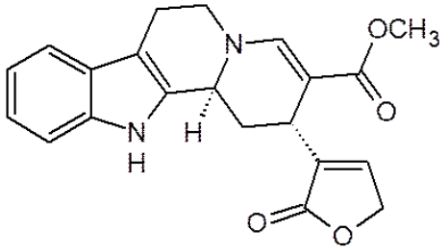
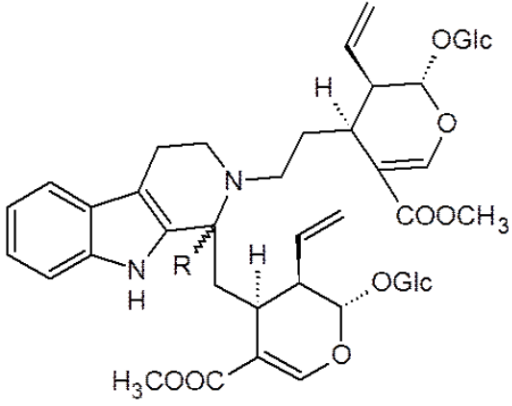
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>E-Valesiacotamina (23)</p>	<i>P. dichroa</i> <i>P. bahiensis</i>	SOLIS et al., 1993 PAUL et al., 2003
 <p>Z-Valesiacotamina (24)</p>	<i>P. bahiensis</i>	PAUL et al., 2003
 <p>Valesiacotamina Lactona (25)</p>	<i>P. dichroa</i>	SOLIS et al., 1993
 <p>Baienosídeo A (R = Hβ) (26) Baienosídeo B (R = Hα) (27)</p>	<i>P. bahiensis</i>	PAUL et al., 2003

Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

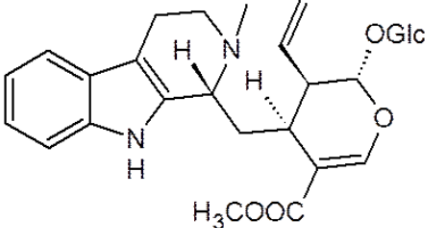
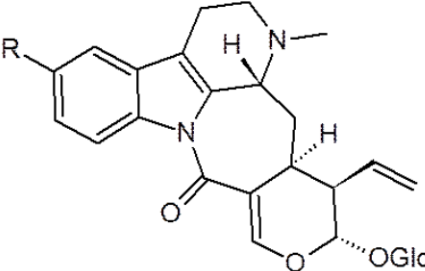
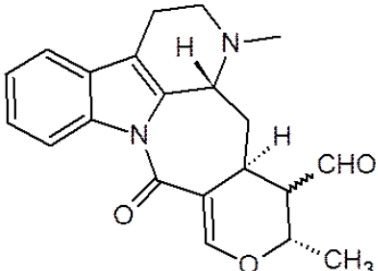
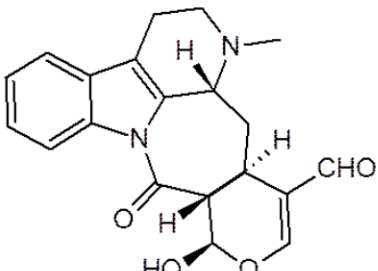
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>Isodolicantoside (28)</p>	<i>P. correae</i>	ACHENBACH et al., 1995
 <p>Correantoside (R = H) (29) 10-Hidroxi-Correantoside (R = OH) (30)</p>	<i>P. correae</i>	ACHENBACH et al., 1995
 <p>Correantina B (αCHO) (31) 20-Epi-correantina B (βCHO) (32)</p>	<i>P. correae</i>	ACHENBACH et al., 1995
 <p>Correantina C (33)</p>	<i>P. correae</i>	ACHENBACH et al., 1995

Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

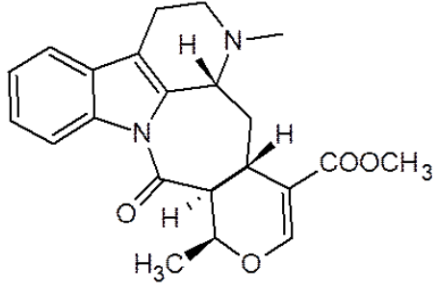
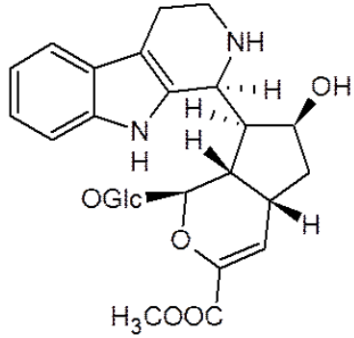
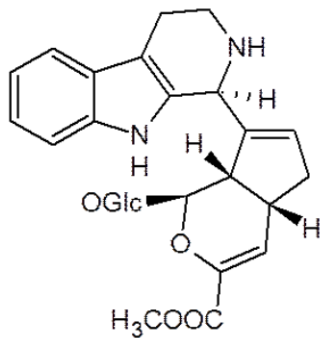
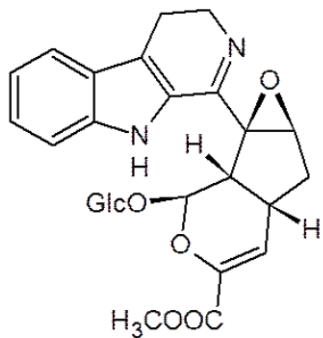
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>Correantina A (34)</p>	<i>P. correae</i>	ACHENBACH et al., 1995
 <p>Braquicerina (35)</p>	<i>P. brachyceras</i>	KERBER et al., 2001
 <p>Psicolatina (36)</p>	<i>P. umbellata</i>	KERBER et al., 2008
 <p>3,4-dehidro-18,19-β-epoxi-psicolatina (37)</p>	<i>P. umbellata</i>	KERBER, 1999

Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

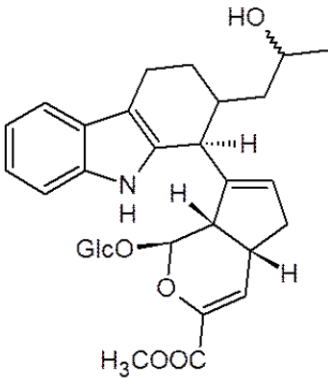
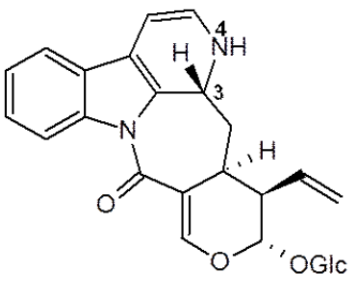
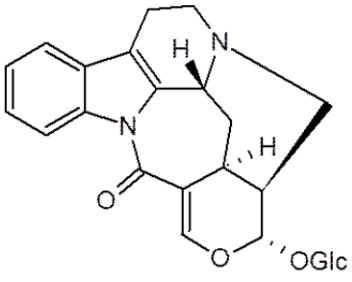
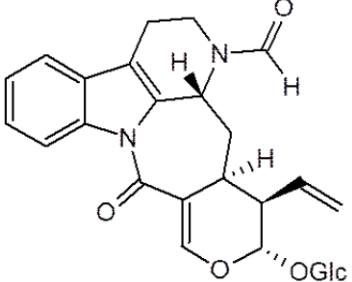
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p><i>N</i>⁴-[1-(2-α-hidroxi-propil)]-psicolatina (38) <i>N</i>⁴-[1-(2-β-hidroxi-propil)]-psicolatina (39)</p>	<i>P. umbellata</i>	KERBER, 1999
 <p>Correantosina E (40) Correantosina F ($\Delta^{3,4}$) (41)</p>	<i>P. stachyoides</i>	PIMENTA et al., 2010a
 <p>Estaquiosídeo (42)</p>	<i>P. stachyoides</i>	PIMENTA et al., 2010b
 <p>Nor-metil-23-oxo-correantosídeo (43)</p>	<i>P. stachyoides</i>	PIMENTA et al., 2010b

Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

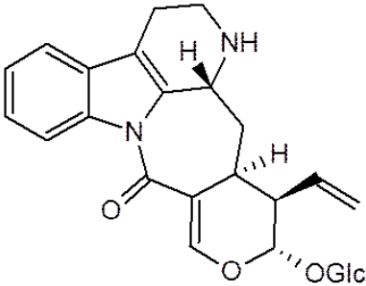
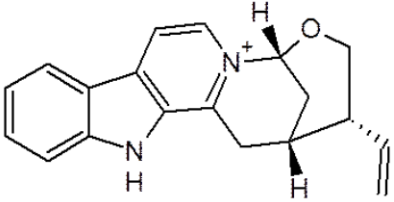
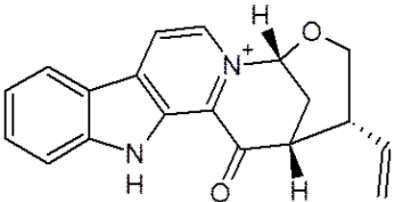
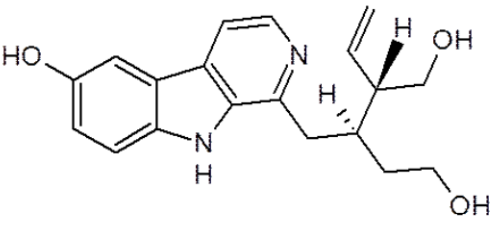
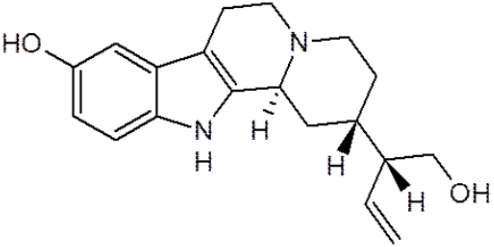
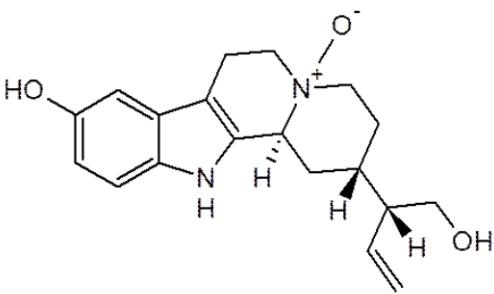
Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>N-Desmetil-correantosídeo (44)</p>	<i>P. stachyoides</i>	PIMENTA et al., 2011
 <p>Prunifoleina (45)</p>	<i>P. prunifolia</i>	FARIA et al., 2010
 <p>14-Oxoprunifoleina (46)</p>	<i>P. prunifolia</i>	FARIA et al., 2010
 <p>10-Hidroxi-is o-deppe aninol (47)</p>	<i>P. prunifolia</i>	KATO et al., 2012
 <p>10-Hidroxi-antirhina (48)</p>	<i>P. prunifolia</i>	KATO et al., 2012

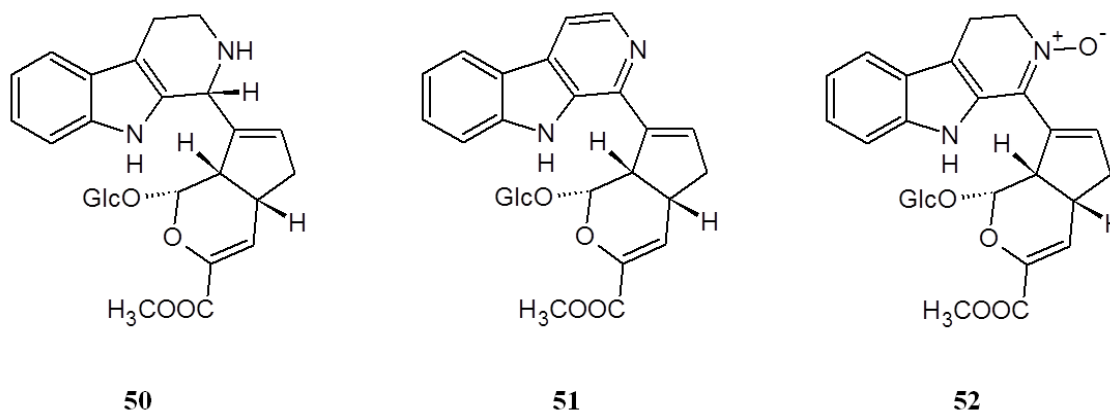
Tabela III2 cont. Estruturas dos alcaloides descritos para espécies neotropicais de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*.

Alcaloide	Espécie	Referências
 <p>N-óxido-10-hidroxi-antirrhina (49)</p>	<i>P. prunifolia</i>	KATO et al., 2012

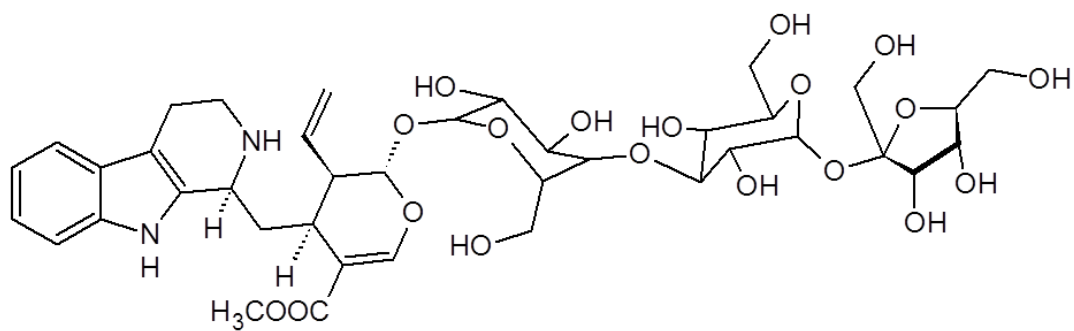
O alcaloide indol monoterpeneo strictosamida (**13**) foi descrito em seis das espécies apresentadas no parágrafo anterior: *P. dichroa*, *P. suterella*, *P. myriantha*, *P. nuda*, *P. prunifolia* e *P. bahiensis* (Tabela III2). Este composto foi inicialmente identificado em espécies de *Nauclea* L. como *N. pobeguinii* (Hua ex Pobég.) Merr. (ZECHES et al., 1985), *N. orientalis* (L.) L. (ERDELMEIER et al., 1991), *N. latifolia* Sm. (SHIGEMORI et al., 2003; KAKUGUSHI et al., 2009) e *N. officinalis* (Pierre & Pit.) Merr. & Chun (XUAN et al., 2004). O isolamento de strictosamida em *P.* subg. *Heteropsychotria* sugere que essa substância pode ser um marcador quimiotaxonômico para o gênero e aponta para uma relação estreita entre os gêneros *Psychotria* e *Nauclea*; este último caracterizado pela presença de MIAs glicosilados (FARIAS et al., 2008).

Também há descrição da presença de MIAs em espécies pertencentes ao gênero neotropical *Palicourea*. De *Palicourea crocea* (Sw.) Roem. et Schultes, coletada na região sul do Brasil, DÜSMAN e colaboradores (2004) isolaram dois alcaloides denominados croceínas A (**50**) e B (**51**). Já NARINE e MAXWELL (2009), a partir da mesma espécie coletada na Costa Rica, isolaram croceína A (**50**), psicolatina (Tabela III2, **36**) e 3,4-dihidro-1-(1-β-D-glucopiranosiloxi-1,4a,5,7a-tetrahidro-4-metoxi-carbonil-ciclopenta[c]piran-7-il)-β-carbolina-N²-óxido (**52**). Considerando que

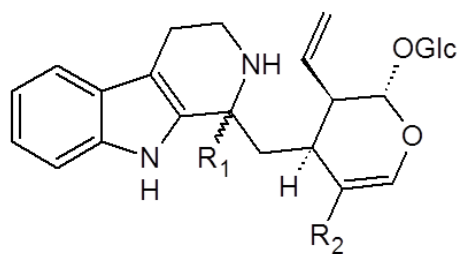
psicolatina foi obtida previamente de *P. umbellata*, suporta-se a hipótese da fusão de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* e de *Palicourea* em um único gênero.



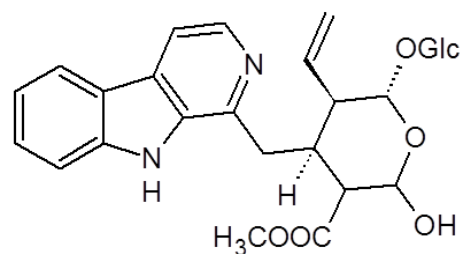
De outra espécie, *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum, foram isolados um alcaloide TH β C glicosilado (**53**) (DO NASCIMENTO et al., 2008), calicantina (**12**), ácido epi-strictosidínico (**54**), uma cetona derivada da strictosidina (**55**), e ácido strictosidínico (Tabela III2, **18**) (DO NASCIMENTO et al., 2006). STUART e WOO-MING (1974), ao investigarem *Palicourea alpina* (Sw.) DC, obtiveram o MIA glicosilado palinina (**56**). Através de estudos com *Palicourea rigida* Kunth, VENCATO e colaboradores (2006) obtiveram *E*-valesiacotamina (Tabela III2, **23**), enquanto que de *Palicourea adusta* Standley foram isolados lialosídeo (Tabela III2, **20**) e seus derivados (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3''-metoxi-lialosídeo (**57**) e (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (**58**) (VALVERDE et al., 1999). Recentemente, BERGER e colaboradores (2012) identificaram diversos alcaloides de *Palicourea acuminata* (Benth.) Borhidi (= *Psychotria acuminata* Benth.), incluindo baienosídeo B (Tabela III2, **27**), 5 α -carbóxi-strictosidina (Tabela III2, **17**), desoxi-cordifolina (**59**) e o inédito lagambosídeo (**60**).



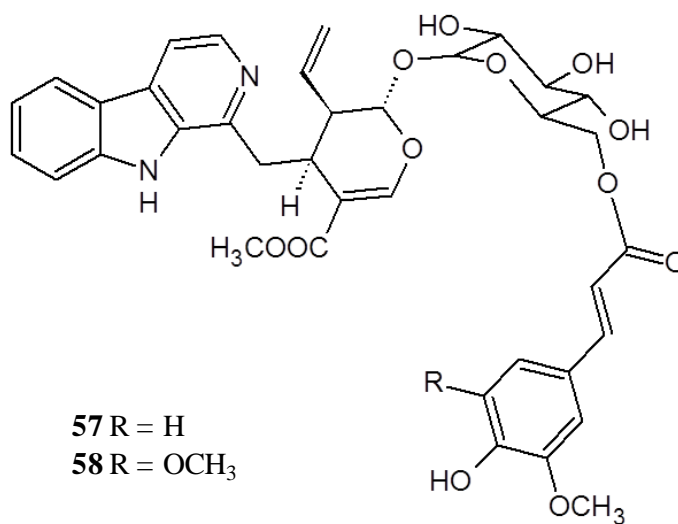
53



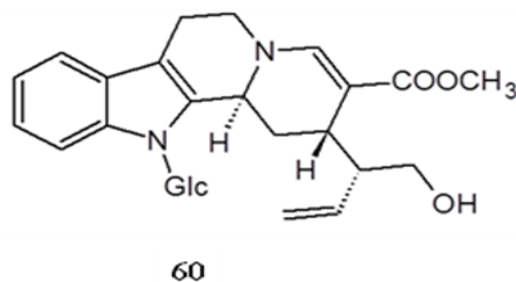
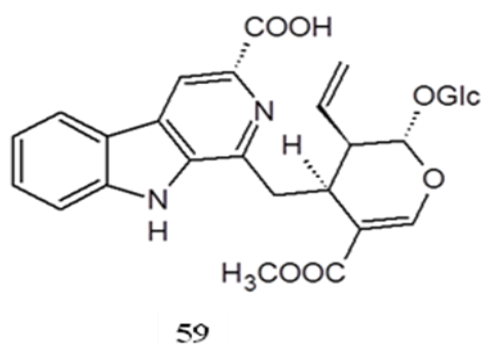
54 $R_1 = H\beta$; $R_2 = COOH$
 55 $R_1 = H\alpha$; $R_2 = COCH_3$



56



57 $R = H$
 58 $R = OCH_3$



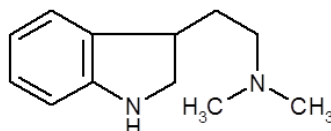
III.2.2 Aspectos biológicos

A utilização popular e tradicional de *Psychotria* ocorrendo em regiões tropicais da Ásia, África, Oceania e Américas foi revisada por ADJIBADÉ (1989). De acordo com esta revisão, os principais usos descritos para espécies de *Psychotria* são tratamento de afecções do aparelho reprodutor feminino, doenças brônquicas, distúrbios gastrointestinais (uso interno), tratamento de afecções cutâneas, “tumores”, úlceras, distúrbios oculares, e febre (uso externo). Além disso, há relatos da utilização de algumas espécies sul americanas no tratamento de doenças do SNC e também como alucinógenos (ADJIBADÉ et al., 1989; LEAL, 1994).

Extratos etanólicos de 10 espécies de *Psychotria* de ocorrência na Mata Atlântica no sudeste do Brasil foram submetidos a ensaios para avaliação de atividade antimicrobacteriana e anti-inflamatória *in vitro*. *P. pubigera* Schltl., *P. ruellifolia* (Cham. & Schltl.) Müll. Arg., e *P. stachyoides* apresentaram importante atividade contra *Mycobacterium bovis* e *M. tuberculosis*, com valores de IC₅₀ inferiores a 4 µg/mL. Adicionalmente, *P. suterella*, *P. stachyoides* e *P. capitata* Ruiz & Pav. (100 µg/mL) apresentaram atividade anti-inflamatória caracterizada pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos (MORAES et al., 2011).

Folhas de *P. viridis* Ruiz. & Pav. e *P. carthagenensis* Jacq. são utilizadas por índios sul americanos, juntamente com *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.V. Morton, no preparo da bebida alucinógena denominada ayahuasca. A análise química

dessas espécies revelou a presença de *N,N*-dimetil-triptamina (DMT) (**61**) em *P. viridis* (RIVIER e LINDGREN, 1972) e a ausência de alcaloides em *P. carthagenensis* (LEAL, 1994; LEAL e ELISABETSKY, 1996).



61

Extratos, frações de alcaloides e compostos isolados de seis espécies de *P.* subg. *Heteropsychotria* de ocorrência no Rio Grande do Sul (*P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella*, *P. brachyceras*, *P. umbellata* e *P. carthagenensis*) foram submetidos a ensaios *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de avaliar seus possíveis efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, antioxidantes, anticolinesterásicos, e outras atividades sobre o SNC. Extratos etanólicos de *P. brachyceras*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella*, *P. umbellata* e *P. carthagenensis* apresentaram moderada atividade analgésica em camundongos (100 – 500 mg/kg). Para os extratos de *P. umbellata* esse efeito analgésico mostrou-se dose-dependente (350 e 500 mg/kg) e reversível por naloxona, indicando atividade do tipo opioide (LEAL, 1994).

Frações de alcaloides de *P. myriantha* e *P. nuda*, juntamente com os alcaloides ácido strictosidínico (Tabela III2, **18**) e miriantosina (**19**), isolados de *P. myriantha*; e strictosamida (**13**), composto majoritário de *P. nuda* (FARIAS et al., 2008) apresentaram atividade inibitória sobre a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, sugerindo potencial ação anti-inflamatória (SIMÕES-PIRES et. al., 2006; FARIAS et al., 2008). Nesses ensaios, as frações de alcaloides de *P. myriantha* e *P. nuda*, assim como os MIAs **13**, **18** e **19** inibiram a migração leucocitária em percentuais superiores a 85%, quando testados na concentração de 100 µg/mL. O alcaloide ácido strictosidínico (**18**) também demonstrou um interessante perfil em modelos *in vitro* e *in vivo* relacionados com o SNC, como atividade

anticolinesterásica (150 µg/mL), atividade analgésica do tipo opioide (FARIAS, 2006) e alterações nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em estruturas cerebrais de roedores (FARIAS et al., 2010; FARIAS et al., 2012).

Psicolatina (nas doses de 200 e 300 mg/kg) (Tabela III2, **36**), alcaloide indol monoterpene glicosilado isolado das folhas de *P. umbellata*, apresentou atividade analgésica moderada em camundongos. Esses efeitos parecem estar associados com a ativação de receptores opioides e com o antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA em modelos de dor induzida por estímulos térmicos e químicos (BOTH et al., 2002). O composto também foi avaliado em modelos comportamentais de ansiedade (atividade ansiolítica nas doses de 7,5 e 15 mg/mL), depressão (atividade antidepressiva nas doses de 3 e 7,5 mg/kg), tremor (supressão de tremores induzidos por oxotremorina nas doses de 3 a 15 mg/kg), memória (comprometimento de memória na dose de 100 mg/kg) e sedação (100 mg/kg), relacionados com a neurotransmissão serotoninérgica, gabaérgica, glutamatérgica e dopaminérgica. Nesses ensaios, psicolatina apresentou um complexo perfil psicofarmacológico associado com a modulação de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C}, glutamatérgicos NMDA e dopaminérgicos D₂ (BOTH et al., 2005; BOTH et al., 2006).

Psicolatina (7.5 e 30 mg/kg), administrada por via intraperitoneal em camundongos, também provocou alterações em parâmetros de estresse oxidativo em ensaios com homogeneizados de córtex e hipocampo. Administração intraperitoneal aguda do alcaloide foi capaz de reduzir os níveis de radicais livres em córtex, bem como de aumentar a capacidade antioxidante total (TAR) em córtex e hipocampo (BOTH, 2005). O efeito de psicolatina sobre o tecido hipocampal também foi avaliado em modelo empregando fatias de hipocampus de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (POG). Nestes ensaios, o alcaloide (50 e 100 µM) apresentou efeitos tóxicos caracterizados por aumento da liberação de LDH intracelular (KONRATH, 2005). Recentemente, o efeito de tratamento i.p. com psicolatina (7,5 mg/kg) sobre os níveis de aminoácidos excitatórios e inibitórios foi avaliado em homogeneizados de córtex pré-frontal e de hipocampo de ratos e camundongos.

Importantes alterações nos níveis de aminoácidos excitatórios foram verificadas em córtex pré-frontal de ambas as espécies de roedores, consistindo em mais um indicativo da atividade dessa substância sobre o SNC. Além disso, esses resultados reforçam a hipótese de envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos centrais verificados para psicolatina (PASSOS, 2008).

A similaridade estrutural verificada entre os MIAs com núcleo TH β C e β C isolados das espécies de *Psychotria* do sul Brasil e compostos β -carbolínicos pode sugerir o envolvimento desses metabólitos na neurotransmissão serotoninérgica. Alcaloides indólicos β Cs ou tetraidro- β -carbolínicos, como harmano (**4**), harmina (**1**) e harmalina (**2**), são compostos encontrados em plantas utilizadas por diversas culturas, como alguns povos indígenas da América do Sul, devido às suas propriedades psicotrópicas (McKENNA, 2004). Estas substâncias podem apresentar efeitos farmacológicos variados como ligação a receptores benzodiazepínicos, imidazolidínicos, serotoninérgicos e opioides, bem como inibição da monoamina oxidase (HERRAIZ, 2007).

III.2.3 Psychotria suterella e P. laciniata

Psychotria suterella Müll. Arg. (Rubiaceae; sinônimo *P. estrellana* Müll. Arg.) é um arbusto com aproximadamente 2 m de altura, que ocorre nas florestas tropicais do sul e sudeste do Brasil, ocorrendo nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (SMITH e DOWNS, 1956; DILLENBURG e PORTO, 1985; TAYLOR, 2010). No Rio Grande do Sul ocorre na floresta atlântica, na encosta meridional do planalto (SOBRAL et al., 2006) e na região do Alto Uruguai (DILLENBURG e PORTO, 1975).

A investigação química das folhas de *P. suterella* levou ao isolamento dos MIAs lialosídeo (**20**) e strictosamida (**13**) e de um alcaloide piridino-indol-quinolizidínico, provavelmente naucletina (**21**). A fração de alcaloides (FA) e os

produtos isolados foram avaliados em modelo de dor induzida por estímulos térmicos (*tail-flick*), onde não foi verificada atividade analgésica. Além disso, FA apresentou toxicidade, caracterizada pela morte de 66% dos animais, na dose mais alta testada (300 mg/kg) (DE SANTOS et al., 2001).

Psychotria laciniata Vell. (Rubiaceae; sinônimos *P. kleinii* L.B. Sm. & Downs e *P. stenocalyx* Müll. Arg.) é um arbusto ou subarbusto que ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil, sendo descrita nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo (TAYLOR, 2010). A ocorrência da espécie no Rio Grande do Sul também já foi documentada. Neste estado a planta ocorre no litoral, habitando a mata pluvial costeira e mata da planície litorânea (DILLEMBURG e PORTO, 1975).

P. suterella e *P. laciniata* são espécies morfológicamente semelhantes. Os caracteres botânicos descritos para diferenciar as duas espécies são o tamanho do cálice floral (3 – 18 cm para *P. suterella*; e 16 – 28 cm para *P. laciniata*) e o tamanho das brácteas da inflorescência (1 – 3 cm para *P. suterella*; e 4 – 7 cm para *P. laciniata*) (KLEIN et al., 2005; GOMES, 2007).

III.3 Compostos multifuncionais para o tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento

As doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, como doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP), são resultantes de múltiplas vias patofisiológicas que contribuem para a cascata neurodegenerativa. Desta forma, compostos multifuncionais, caracterizados por atuarem sobre múltiplos alvos terapêuticos, podem ser considerados como novas alternativas para o tratamento sintomático de DA e DP. O desenvolvimento de fármacos multifuncionais pode

reduzir a utilização concomitante de medicamentos com distintas propriedades farmacocinéticas e, desta forma, diminuir a incidência de interações medicamentosas. Além disso, fármacos capazes de interagir simultaneamente com diferentes alvos podem fornecer maior efeito terapêutico devido a efeitos sinérgicos (NOVAROLI et al., 2005).

As novas estratégias terapêuticas para o tratamento de DA e DP compreendem candidatos a fármacos capazes de atuar sobre múltiplos alvos neuronais e bioquímicos objetivando o tratamento do comprometimento cognitivo, da disfunção motora, da depressão e da neurodegeneração associadas com essas doenças. Exemplos incluem o desenvolvimento de entidades químicas que combinem duas ou mais das seguintes propriedades: (i) inibição da acetilcolinesterase; (ii) ativação ou inibição de subtipos específicos de receptores de acetilcolina ou receptores α -adrenérgicos; (iii) atividade antiinflamatória; (iv) inibição de monoamina oxidases; (v) inibição da catecol-*O*-metil-transferase; (vi) produção de óxido nítrico; (vii) neuroproteção; (viii) atividade anti-apoptótica; e (ix) ativação de genes mitocondriais (YOUUDIM e BUCCAFUSCO, 2005).

NOVAROLI e colaboradores (2005) propuseram abordagem baseada em *screening* experimental e virtual objetivando a identificação de novas moléculas multifuncionais. Nesta abordagem, os alvos selecionados pelos pesquisadores foram as enzimas acetilcolinesterase (AChE), monoamina oxidase B (MAO-B) e catecol-*O*-metil-transferase (COMT), e, também, formação de placas β -amilóides e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (Figura I1). Três desses alvos são relevantes para DA e DP (AChE, MAO e estresse oxidativo) e os outros dois específicos para DA (formação de placas β -amilóides) e para DP (COMT).

III.4 Monoamina Oxidases (MAOs)

A monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) é uma enzima mitocondrial encontrada no cérebro e em tecidos periféricos, que catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como neurotransmissores, aminas vasoativas e aminas xenobióticas (YOUUDIM e BAKHLE, 2006; HERRAIZ, 2007). A oxidação de aminas biogênicas pela MAO resulta na produção de peróxido de hidrogênio e de aldeídos, produtos que podem provocar dano celular oxidativo (COHEN et al., 1997) (Figura III1).

A MAO é responsável pela inativação de muitas substâncias bioativas, incluindo dopamina, serotonina, norepinefrina e tiramina, sendo encontrada em duas isoformas: MAO-A, que apresenta maior afinidade por serotonina, sendo inibida de forma seletiva por clorgilina e moclobemida; e MAO-B, que apresenta maior afinidade por benzilamina e feniletilamina, sendo seletivamente inibida por *L*-deprenil, pargilina e rasagilina (YOUUDIM et al., 2005; HERRAIZ e CHAPARRO, 2006). Por outro lado, tiramina, dopamina e triptamina parecem ser substratos para ambas as isoformas na maioria das espécies de mamíferos (SHIH et al., 1999; YOUUDIM et al., 2006) (Tabela III3).

MAO-A e MAO-B estão localizadas na membrana externa das mitocôndrias da maioria dos tecidos de mamíferos. No entanto, as proporções entre as duas isoenzimas costumam variar em diferentes órgãos e tecidos. No cérebro humano existem diferenças regionais na atividade das MAOs: os núcleos da base (corpo estriado) e o hipotálamo apresentam atividade elevada, enquanto que no cerebelo e no neocórtex verifica-se baixa atividade. Estudos imunistoquímicos indicam que neurônios serotoninérgicos e astrócitos apresentam predominantemente MAO-B, enquanto que neurônios catecolaminérgicos contêm principalmente MAO-A (YOUUDIM et al., 2006). No cérebro de roedores, a MAO-A está presente em células gliais, em astrócitos e em neurônios dopaminérgicos, estando envolvida no metabolismo da dopamina

intraneuronal e também no metabolismo do neurotransmissor liberado na fenda sináptica e recaptado (YOUDIM e BAKHLE, 2006).

Tabela III3. Especificidades de diferentes substratos pelas enzimas MAO-A e MAO-B humanas no córtex cerebral.

Substrato	MAO A			MAO B		
	K_m (μM)	V_{max} pmol min ⁻¹ mg proteína ⁻¹	V_{max}/K_m $\mu\text{mol M}^{-1} \text{min}^{-1}$ mg protein ⁻¹	K_m (μM)	V_{max} pmol min ⁻¹ mg proteína ⁻¹	V_{max}/K_m $\mu\text{mol M}^{-1} \text{min}^{-1}$ mg protein ⁻¹
Adrenalina	125±42	379±54	3,03±1,11	266±9	465±61	1,75±0,23
Dopamina	212±33	680±123	3,21±0,77	229±33	702±158	3,07±0,82
Serotonina	137±24	228±31	1,66±0,37	1093±20	6,6±1,3	0,006±0,001
Noradrenalina	284±17	561±42	1,98±0,19	238±30	321±13	1,35±0,18
2-Feniletilamina	140±22	20±8	0,14±0,06	4±2	309±24	77,3±39,1
Triptamina	35±6	58±5	1,66±0,32	35±8	108±2	2,84±0,60
Tiramina	127±18	182±28	1,43±0,30	107±21	343±48	3,21±0,77

K_m , constante de Michaelis-Menten; V_{max} , velocidade máxima. Dados retirados de YOUDIM e colaboradores (2006).

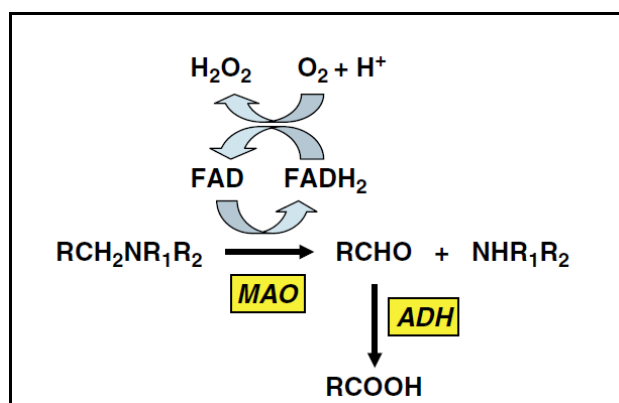


Figura III1. Esquema representando o mecanismo da desaminação oxidativa de monoaminas catalisado pela MAO mitocondrial. O produto primário da reação, o aldeído correspondente à monoamina oxidada, é posteriormente oxidado em reação catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (ADH). O ciclo FAD-FADH₂ gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, por sua vez, é inativado pelas enzimas catalase e glutatona peroxidase. Esquema reproduzido de YOUDIM e BAKHLE (2005).

MAO-A e MAO-B estão localizadas na membrana externa das mitocôndrias da maioria dos tecidos de mamíferos. No entanto, as proporções entre as duas isoenzimas costumam variar em diferentes órgãos e tecidos. No cérebro humano existem diferenças regionais na atividade das MAOs: os gânglios da base (corpo estriado) e o hipotálamo apresentam atividade elevada, enquanto que no cerebelo e no neocórtex verifica-se baixa atividade. Estudos imunistoquímicos indicam que neurônios serotoninérgicos e astrócitos apresentam predominantemente MAO-B, enquanto que neurônios catecolaminérgicos contêm principalmente MAO-A (YOUUDIM et al., 2006). No cérebro de roedores, a MAO-A está presente em astrócitos e em neurônios dopaminérgicos, estando envolvida no metabolismo da dopamina intraneuronal e também no metabolismo do neurotransmissor liberado na fenda sináptica (YOUUDIM e BAKHLE, 2006).

MAO-A e MAO-B constituem dois alvos interessantes para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Inibidores da MAO-A são empregados no tratamento de depressão e transtornos de ansiedade, enquanto que inibidores da MAO-B são utilizados em associação com L-DOPA ou agonistas dopaminérgicos para o tratamento sintomático da Doença de Parkinson (LA REGINA et al., 2008). Ambas as isoformas da enzima parecem estar envolvidas na etiologia da Doença de Alzheimer (DA), havendo relatos relacionados ao aumento da atividade da MAO-B ou ao aumento da expressão do mRNA que codifica esta enzima em hipocampus e córtex cerebrais de pacientes com DA. As alterações na MAO-A induzidas pela DA parecem ser mais complexas, uma vez que atividade enzimática aumentada ou expressão elevada de mRNA são observadas em um maior número de áreas cerebrais, incluindo o lobo frontal do neocórtex, o córtex parietal, o córtex occipital, o córtex temporal e o córtex frontal (KENNEDY et al., 2003).

A atividade da MAO pode ser determinada por ensaios fluorimétricos com o emprego de substratos que, após sofrerem oxidação, produzem compostos fluorescentes, como por exemplo, kinuramina, substrato não-seletivo para MAO-A e

MAO-B (HARAGUCHI et al., 2004; YAN et al., 2004; DITTMANN et al., 2004; LA REGINA et al., 2008; CHIMENTI et al., 2006; VAN DIERMEN et al., 2009). A reação catalisada pela MAO converte kinuramina no produto fluorescente 4-hidroxiquinolina (4-OH), facilmente detectado por fluorescência com $\lambda_{\text{exc}} = 315 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ (MASSEY e CHURCHICH, 1977; HARAGUCHI et al., 2004). Muitos protocolos para avaliação da atividade da MAO já foram descritos. Preparações enzimáticas contendo ambas as isoformas, MAO-A e MAO-B, podem ser obtidas de tecidos como cérebro, fígado e rim de roedores, enquanto que a placenta humana pode ser empregada como fonte de MAO-A. Esses homogenatos, embora sejam amplamente utilizados, apresentam limitações importantes, como moderada atividade específica e a turbidez dos *pellets* microssomais, que podem afetar a exatidão dos resultados obtidos por espectrofotometria. Estes problemas podem ser contornados pela utilização de enzimas recombinantes expressas em leveduras (DITTMANN et al., 2004). Os protocolos utilizados para a investigação de compostos inibidores da MAO foram inicialmente desenvolvidos para a avaliação de substâncias isoladas. Entretanto, a pesquisa de extratos de plantas e de frações purificadas apresenta problemas relacionados com as características destes materiais que, além de serem constituídos por misturas complexas de compostos desconhecidos, apresentam coloração que pode interferir em análises espectrofotométricas (DITTMANN et al., 2004).

III.5 Colinesterases

III.5.1 Hipótese colinérgica da Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma condição caracterizada por perda severa e progressiva da memória e danos nas funções cognitivas, sendo ambos os fatores associados com morte neuronal. A maioria das teorias propostas para explicar a DA

baseia-se em fatores individuais e, desta forma, estas hipóteses falham na tentativa de explicar adequadamente todos os aspectos relacionados com a doença (CRAIG et al., 2011; SHEN, 2004). Dentre as características moleculares observadas na DA incluem-se a formação de depósitos extracelulares de peptídeo β -amiloide (conhecidos como placas neuríticas ou senis), a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares, disfunção colinérgica, além de perda neuronal intensa e alterações sinápticas no córtex cerebral, hipocampo e outras regiões cerebrais associadas com cognição e memória (PARIHAR e HEMNANI, 2004).

A hipótese colinérgica foi a primeira teoria proposta na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos na DA (BARTUS et al., 1982; BARTUS, 2000), levando ao desenvolvimento dos únicos fármacos atualmente aprovados pelo FDA para o tratamento dos sintomas moderados desta doença (HANSEN et al., 2008). Esta teoria baseia-se em experimentos relatando perda de atividade colinérgica em cérebros de pacientes com DA e em estudos com seres humanos e primatas, que sugerem a função do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em processos de aprendizagem e memória. Nestes trabalhos, foi demonstrado que o bloqueio da atividade colinérgica no SNC poderia causar déficits de memória similares àqueles associados ao envelhecimento. Também foi demonstrado que tratamento com agonistas colinérgicos poderia reverter o comprometimento de memória. Esta teoria levou aos primeiros ensaios clínicos que avaliaram os efeitos de inibidores da AChE sobre a memória de pacientes sofrendo de DA (CRAIG et al., 2011).

Dentre os inibidores de colinesterases aprovados pelo FDA para o tratamento sintomático da DA incluem-se: donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Reminyl®) e tacrina (Cognex®). Ensaios clínicos tem demonstrado que esses fármacos causam melhoras estatisticamente significativas das funções cognitivas (SMITH et al., 2011). Entretanto, essa melhora parece ser bastante discreta quando os grupos tratados e os grupos placebos são comparados.

III.5.2 Acetylcholinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)

As colinesterases, enzimas classificadas como acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), são serina hidrolases que catalisam a hidrólise de acetilcolina (AChE e BChE) e de outros ésteres de colina (BChE). A importância da AChE no SNC já é bastante estabelecida e o papel da neurotransmissão colinérgica na DA foi apresentado no item anterior. Embora a BChE tenha muitas funções em comum com a AChE, o seu papel no SNC ainda não está completamente elucidado (GREIG et al., 2005). A BChE, que é encontrada em concentrações elevadas em tecidos periféricos e também no plasma, não tem sido considerada na maioria dos estudos investigando o papel de inibidores de colinesterases em doenças neurodegenerativas (DARVESH et al., 2003).

A BChE é conhecida por catalisar a hidrólise de ACh, de forma menos eficiente que a AChE, e de outros ésteres como cocaína, ácido acetilsalicílico e heroína. Além disso, esta enzima parece exercer um papel importante na inativação de substâncias anticolinesterásicas, como fisostigmina e organofosforados. Com relação a distribuição no SNC, estudos bioquímicos tem demonstrado que existem níveis elevados de BChE no cérebro, e que estes níveis poderiam estar alterados em doenças neurodegenerativas e/ou em decorrência do envelhecimento. Estes trabalhos, que envolviam o isolamento da enzima e a utilização de inibidores desta, poderiam, entretanto, apresentar dados subestimados da distribuição da BChE no SNC. Estudos empregando técnicas histoquímicas permitiram uma demonstração mais acurada da presença de BChE em neurônios, células gliais e em células endoteliais do cérebro humano (DARVESH et al., 2003).

No cérebro humano saudável a atividade da AChE é predominante quando comparada com a da BChE, embora esta última possa estar subestimada (LI et al., 2000). Uma característica importante utilizada para distinguir a AChE da BChE é a sua resposta cinética a concentrações de ACh. A BChE é menos eficiente na hidrólise da ACh em baixas concentrações, mas, quando o substrato encontra-se em

concentrações elevadas, a AChE começa a ser inibida pela ACh. Nestas situações, a BChE torna-se altamente eficiente na hidrólise deste neurotransmissor (LI et al., 2000). Portanto, uma possível função para a BChE no SNC, principalmente quando associada com a glia, é a hidrólise de ACh em condições de elevada atividade cerebral, quando os níveis do neurotransmissor podem atingir concentrações da ordem de micromolar. Nestas situações, a atividade da BChE glial poderia auxiliar a manutenção da função colinérgica normal (GREIG et al., 2005).

A AChE parece estar reduzida em aproximadamente 85% em regiões específicas de cérebros de pacientes sofrendo de DA. Por outro lado, a BChE parece estar aumentada em condições semelhantes. Em cérebros normais estima-se que a razão BChE/AChE corresponda a 0,2 vezes, enquanto que na DA essa razão pode corresponder a até 11 vezes (GIACOBINI, 2003). Estas diferenças na distribuição das duas enzimas em condições normais e patológicas poderiam sugerir um papel adicional para a BChE na DA, além da hidrólise do excesso de ACh. Assim, a inibição seletiva da BChE no SNC poderia consistir em uma estratégia para combater a diminuição do déficit colinérgico associado com a DA (GREIG et al., 2005).

Conforme estudos histoquímicos, alguns neurônios colinérgicos expressam BChE ao invés de AChE. Estima-se que 10 – 15% das células colinesterase-positivas da amígdala e do hipocampo do cérebro humano sejam reguladas pela BChE independentemente da AChE (DARVESH et al., 1998). O aumento na função colinérgica através da inibição desses dois alvos pode, portanto, apresentar importância terapêutica, como demonstrada por ensaios clínicos com rivastigmina (Exelon, Novartis). Neste estudo foi observado que rivastigmina pode diminuir a perda de memória em pacientes com DA em estágio inicial e que essa inibição múltipla de AChE e BChE parece estar associada com essas melhoras na função cognitiva (GIACOBINI et al., 2002). Adicionalmente, níveis elevados de BChE nos cérebros de pacientes sofrendo de DA parecem estar relacionados com a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares (GUILLOZET et al., 1997).

IV. ARTIGO 1

MONOAMINE OXIDASE INHIBITION BY MONOTERPENE INDOLE ALKALOIDS AND FRACTIONS OBTAINED FROM *Psychotria suterella* AND *P. laciniata*

Aceito para publicação no *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2012 (DOI: 10.3109/14756366.2012.666536)

MONOAMINE OXIDASE INHIBITION BY MONOTERPENE INDOLE
ALKALOIDS AND FRACTIONS OBTAINED FROM *Psychotria suterella* AND *P.*
laciniata

Carolina dos Santos Passos¹, Tatiane Cristina Soldi¹, Renata Torres Abib³, Miriam
Anders Apel¹, Cláudia Simões-Pires², Laurence Marcourt², Carmem Gottfried³,
Amélia Teresinha Henriques¹

¹Laboratório Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade
de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne,
Quai Ernest-Ansermet 30, CH-1211 Geneva 4, Switzerland

³Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Address for correspondence: Dr. Amélia T. Henriques, Laboratório de Farmacognosia,
Departamento de Produção de Matéria Prima, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51
33085258, Fax: +55 51 33085437.

E-mail: amelia@farmacia.ufrgs.br

Abstract

Alkaloid fractions of *Psychotria suterella* (SAE) and *P. laciniata* (LAE) as well as two monoterpene indole alkaloids (MIAs) isolated from these fractions were evaluated against monoamine oxidases (MAO-A and -B) obtained from rat brain mitochondria. SAE and LAE were analysed by HPLC-PDA and UHPLC/HR-TOF-MS leading to the identification of the compounds **1**, **2**, **3** and **4**, whose identity was confirmed by NMR analyses. Further, SAE and LAE were submitted to the enzymatic assays, showing a strong activity against MAO-A, characterized by IC₅₀ values of 1.37 ± 1.05 and 2.02 ± 1.08 µg/mL, respectively. Both extracts were also able to inhibit MAO-B, but in higher concentrations. In a next step, SAE and LAE were fractionated by RP-MPLC affording three and four major fractions, respectively. The RP-MPLC fractions were subsequently tested against MAO-A and -B. The RP-MPLC fractions SAE-F3 and LAE-F4 displayed a strong inhibition against MAO-A with IC₅₀ values of 0.57 ± 1.12 and 1.05 ± 1.15 µg/mL, respectively. The MIAs **1** and **2** also inhibited MAO-A (IC₅₀ of 50.04 ± 1.09 and 132.5 ± 1.33 µg/mL, respectively) and -B (IC₅₀ of 306.6 ± 1.40 and 162.8 ± 1.26 µg/mL, respectively), but in higher concentrations when compared with the fractions. This is the first work describing the effects of MIAs found in neotropical species of *Psychotria* on MAO activity. The results suggest that species belonging to this genus could consist of an interesting source in the search for new MAO inhibitors.

Keywords: Rubiaceae, *Psychotria suterella*, *P. laciniata*, monoterpene indole alkaloids, MAO-A, MAO-B

V. ARTIGO 2

INDOLE ALKALOIDS OF *Psychotria* AS MULTIFUNCTIONAL
CHOLINESTERASES AND MONOAMINE OXIDASES INHIBITORS

Aceito para publicação (*Phytochemistry*)

Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors

Carolina S. Passos^{a*}, Claudia A. Simões-Pires^b, Alessandra Nurisso^b, Tatiane C. Soldi^a, Lucilia Kato^c, Cecilia M.A. de Oliveira^c, Emiret O. de Faria^c, Laurence Marcourt^b, Carmem Gottfried^d, Pierre-Alain Carrupt^b, Amélia T. Henriques^{a*}

^aLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 91610-00, Porto Alegre, RS, Brazil

^bSchool of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, CH-1211, Geneva Switzerland

^cInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, UFG, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

^dLaboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding authors: Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 91610-00, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail addresses: amelia@farmacia.ufrgs.br; carolinadspassos@yahoo.com.br

Telephone: +55 51 33085417

Fax: +55 51 33085243

Abstract

Thirteen *Psychotria* alkaloids were evaluated regarding their interactions with acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), and monoamine oxidases A and B (MAO-A and MAO-B), which consist in enzymatic targets related with neurodegenerative diseases. Two quaternary β -carboline alkaloids, prunifoleine (**12**) and 14-oxoprufifoleine (**13**), inhibited AChE, BChE and MAO-A with IC_{50} values corresponding to 10 and 3.39 μ M for **12** and **13** on AChE, 100 and 11 μ M on BChE, and 7.41 and 6.92 μ M on MAO-A. Both compounds seem to behave as noncompetitive AChE inhibitors and time-dependent MAO-A inhibitors. In addition, the monoterpene indole alkaloids (MIAs) angustine (**1**), vallesiachotamine lactone (**2**), *E*-vallesiachotamine (**3**) and *Z*-vallesiachotamine (**4**) inhibited BChE and MAO-A with IC_{50} values ranging from 3.47 to 14 μ M for BChE inhibition and from 0.85 to 2.14 μ M for MAO-A inhibition. Among the tested MIAs, angustine (**1**) is able to inhibit MAO-A in a reversible and competitive way while the vallesiachotamine-like alkaloids (**2-4**) display a time-dependent inhibition on this target. Docking calculations were performed in order to understand the binding mode between the most active ligands and the selected targets. Taken together, our findings established molecular details of AChE, BChE and MAO-A inhibition by quaternary β -carboline alkaloids and MIAs from *Psychotria*, suggesting these secondary metabolites as scaffolds for the development of multifunctional compounds against neurodegeneration.

Keywords: *Psychotria suterella*; *P. laciniata*; *P. leiocarpa*; *P. umbellata*; *P. myriantha*; *P. prunifolia*; Rubiaceae; monoterpene indole alkaloids; quaternary- β -carboline alkaloids; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; monoamine oxidases; molecular docking

VI. ARTIGO 3

EFFECTS OF THE *Psychotria* ALKALOIDS *E*-VALLESIACHOTAMINE AND PRUNIFOLEINE IN THE VIABILITY OF ASTROGLIAL CELLS

A ser submetido à *Phytomedicine* (Após a conclusão dos experimentos de estresse oxidativo)

Effects of the *Psychotria* alkaloids *E-vallesiachotamine* and *prunifoleine* in the viability of astroglial cells

Carolina dos S. Passos^a, Maria Cristina Guerra^b, Carlos Alberto Gonçalves^b, Lucilia Kato^c, Carmem Gottfried^d, Amélia T. Henriques^{a*}

^aLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 91610-00, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, UFG, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

^dLaboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 91610-00, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail adress: amelia@farmacia.ufrgs.br

Telephone: +55 51 33085417

Fax: +55 51 33085243

Abstract

The *in vitro* cytotoxicity of the *Psychotria* alkaloids *E*-vallesiachotamine (**1**) and prunifoleine (**2**) were evaluated in primary culture of rat hippocampal astrocytes after 24 hours of incubation in the presence or absence of each alkaloid (1, 10 and 100 μ M). Alkaloid **1** decreased astrocyte viability only at 100 μ M observed by metiltetrazolium (MTT) reduction (viability corresponding to 8.09 ± 0.75 %), neutral red uptake (viability corresponding to 22.15 ± 0.84 %), and propidium iodide exclusion. Alkaloid **2** did not affected cellular viability. The present work demonstrated for the first time that *E*-vallesiachotamine 100 μ M is cytotoxic to astrocyte cells, suggesting that high concentrations of this compound could impair astrocyte viability and CNS functions.

Keywords: *E*-vallesiachotamine, prunifoleine, astrocyte cells, cell viability, cell integrity.

VII. DISCUSSÃO GERAL

A delimitação de espécies dentro de *Psychotria* L. é um tópico controverso entre especialistas em taxonomia de Rubiaceae (TAYLOR et al., 2010; ANDERSSON, 2002; ROBBRECHT e MANEN, 2006; BREMER, 2009; BREMER e ERIKSSON, 2009). O grande número de espécies de ocorrência pantropical classificadas dentro do gênero e a falta de caracteres botânicos suficientes para a definição de subgrupos podem ser considerados os principais fatores responsáveis pela complexidade atribuída à *Psychotria*. Levando-se em consideração a distribuição geográfica, aspectos botânicos e estudos de filogenética (ANDERSSON, 2001; ANDERSSON, 2002), *Psychotria* pode ser dividido em *P. stricto sensu* (que inclui espécies de ocorrência na África, Ásia e Oceania, apresentando similaridades com a espécie-tipo *P. asiatica* L.) e *Heteropsychotria*. (que inclui espécies de ocorrência no continente americano, apresentando proximidade com o gênero neotropical *Palicourea* e diferindo consideravelmente de *P. stricto sensu*).

Com relação às espécies neotropicais de *Psychotria*, STEYERMARK (1972) sugeriu sua divisão nos subgêneros *Psychotria*, que se aproxima morfológicamente de *P. asiatica* (*P. stricto sensu*), e *Heteropsychotria*, cujas espécies apresentam relação estreita com *Palicourea*, diferindo claramente de *P. stricto sensu* e de outros gêneros africanos pertencentes à tribo Psychotrieae (PETIT, 1964). Adicionalmente, estudos filogenéticos com indivíduos da tribo Psychotrieae (ANDERSSON e ROVA, 1999; NEPOKROEFF, 1999; ANDERSSON, 2002) parecem sugerir sua divisão em dois grupos majoritários: *Psychotria*, que está relacionado com a classificação de PETIT (1964) para *P. stricto sensu*, e *Palicourea*, que inclui *P. subg. Heteropsychotria*, *P. sect. Notopleura* Oerst., *Chassalia* (Poir) Comm., *Chazaliella* (E.M.A. Petit & Verdc) E.M.A. Petit, *Geophila* D. Don, *Margaritopsis* C. Wright, *Readea* Gillespie e *Rudgea* Salisb. Ainda, conforme ANDERSSON e ROVA (1999), NEPOKROEFF (1999) e ANDERSSON (2002), o grupo *Palicourea* pode ser classificado dentro de três subgrupos: (i) grupo formado pelos gêneros *Notopleura* e *Rudgea*; (ii) grupo formado pelos gêneros *P. subg. Heteropsychotria* e *Palicourea*; e (iii) um terceiro grupo compreendendo os gêneros *Chassalia*, *Chazaliella*, *Geophila*, *Hymenocoleus*,

Margaritopsis, e outras espécies de *Psychotria* dos neotrópicos, Ásia, e Oceania que não se enquadram em *P. stricto sensu* (ANDERSSON et al., 2002).

Neste contexto, a investigação dos perfis químicos de espécies da tribo Psychotrieae, e do gênero *Psychotria*, pode consistir em critério complementar aos caracteres botânicos e análises filogenéticas para fins de classificação e delimitação. A maioria dos estudos publicados sobre a química de *Psychotria* descreve a identificação de alcaloides derivados do triptofano. No entanto, apesar de todos esses alcaloides derivarem do mesmo aminoácido precursor, espécies da Ásia e Oceania enquadradas na classificação *P. stricto sensu* tendem a sintetizar compostos com núcleo pirrolidino indolínico (BERETZ et al., 1985; ROTH et al., 1985; ADJIBADE et al., 1986; LIBOT et al., 1987; ADJIBADE et al., 1992; LAJIS et al., 1993; JANNIC et al., 1999; TAKAYAMA et al., 2004; ZHOU et al., 2010; LI et al., 2011), enquanto que espécies de *P. subg. Heteropsychotria* parecem produzir predominantemente alcaloides indol monoterpênicos, assim como muitas espécies de *Palicourea* que já tiveram sua composição química avaliada (ver Revisão do Tema). Entretanto, algumas exceções são observadas com relação à distribuição de alcaloides em *Psychotria (latu sensu)* neotropicais e *Palicourea*. *P. viridis* Ruiz & Pav, que ocorre na região amazônica e é utilizada no preparo da bebida alucinógena ayahuasca, apresenta apenas *N,N*-dimetil-triptamina (**61**) em pequenas concentrações (CALLAWAY et al., 2005; MOURA et al., 2010). *P. colorata* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg. (VEROTTA et al., 1998) e *P. glomerulata* (Donn. Sm.) Steyerem. (SOLIS et al., 1997) são espécies neotropicais de *Psychotria* ocorrendo na América do Sul e América Central que parecem sintetizar apenas alcaloides pirrolidino indolínicos. Finalmente, alcaloides não foram detectados em estudo químico de *P. carthagenesis* Jacq. (LEAL e ELISABETSKY, 1996).

Conforme mencionado anteriormente, a investigação química de espécies de *Heteropsychotria* e *Palicourea* tem levado ao isolamento e identificação de alcaloides indolínicos em ambos os gêneros, com destaque para os alcaloides indol monoterpênicos

(MIAs). Além disso, MIAs não derivados da strictosidina e que parecem apresentar rotas biossintéticas diferenciadas foram descritos para as espécies *Psychotria brachyceras* (KERBER et al., 2001), *P. umbellata* (KERBER et al., 2008) e *Palicourea crocea* (DÜSMAN et al., 2004; NARINE e MAXWELL, 2009). Dentre os compostos identificados em espécies pertencentes a estes dois gêneros incluem-se lialosídeo (VALVERDE et al., 1999; DE SANTOS et al., 2001), *E*-valesiacotamina (SOLIS et al., 1993; PAUL et al., 2003, VENCATO et al., 2006; BERGER et al., 2012) e outros alcaloides citados na revisão deste trabalho. Assim, com base nos dados disponíveis até o momento, é possível sugerir a utilização desses MIAs como caracteres quimiotaxonômicos para a classificação de *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* e *Palicourea*, visto que sua distribuição pode suportar os estudos botânicos que sugerem a transferência de espécies de um gênero para outro ou a fusão desses dois gêneros (TAYLOR et al., 2010; BORHIDI, 2011).

Em continuação ao estudo sistemático de espécies neotropicais de *Psychotria* (subg. *Heteropsychotria*) realizado por nosso grupo de pesquisa, o presente trabalho propôs a investigação química de *P. suterella* Müll. Arg. (que já havia sido objeto de trabalho anterior do grupo) e *P. laciniata* Vell. Ambas as espécies ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil e apresentam similaridades morfológicas que dificultam sua classificação como *P. suterella* ou *P. laciniata* de acordo com as descrições botânicas constantes na Flora Ilustrada Catarinense (KLEIN et al., 2005) e na Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (GOMES, 2007), que estabelecem o comprimento do cálice floral e o tamanho das brácteas das inflorescências como critérios de diferenciação.

As análises cromatográficas das frações obtidas por extração ácido-base a partir de folhas secas de *P. suterella* (fração denominada SAE) e *P. laciniata* (fração denominada LAE) indicaram perfis qualitativos semelhantes (Artigo I). Nos experimentos por HPLC-DAD as frações SAE e LAE apresentaram cinco picos majoritários cujos espectros de UV são indicativos de núcleos β C, TH β C e β -N-

acrilato (DJERASSI et al., 1966). Adicionalmente, nos cromatogramas por UHPLC/HR-TOF-MS foram verificados quatro picos majoritários para ambas as frações. Os íons pseudo-moleculares $[M + H]^+$ observados para esses picos correspondem aos MIAs lialosídeo (pico 1); (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (pico 2); strictosamida (pico 3) e *E/Z*-valesiacotamina (pico 4). A posterior realização de técnicas cromatográficas preparativas (RP-MPLC, Chromatotron[®], RP-HPLC, Sephadex LH-20) permitiu o isolamento e caracterização inequívoca de sete MIAs a partir de SAE e LAE: angustina, valesiacotamina lactona, *E*-valesiacotamina, *Z*-valesiacotamina, lialosídeo, pauridiantosídeo e strictosamida (Figura VII; Artigos I e II). Ainda, a presença de (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (Figura VII; Artigos 1 e 2) nas duas frações pode ser fortemente sugerida pelos resultados obtidos por UHPLC/HR-TOF-MS (m/z 733.2667 $[M + H]^+$; Artigo I), pelo espectro de RMN de ¹H de mistura contendo lialosídeo e este derivado do ácido sinápico (Anexo I), e pela comparação desses dados experimentais com aqueles descritos para o mesmo alcaloide isolado de *Palicourea adusta* (VALVERDE et al., 1999).

A presença de strictosamida e lialosídeo, juntamente com naucletina, em folhas de *P. suterella* havia sido relatada em trabalho anterior do grupo de pesquisa (DE SANTOS et al., 2001). Neste estudo, outros seis MIAs foram identificados em *P. suterella*, sendo pauridiantosídeo e (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo inéditos dentro do gênero *Psychotria*. Além disso, a identificação desses mesmos alcaloides em *P. laciniata* pode sugerir a fusão destas duas espécies. Entretanto, estudos mais abrangentes são necessários para suportar esta hipótese.

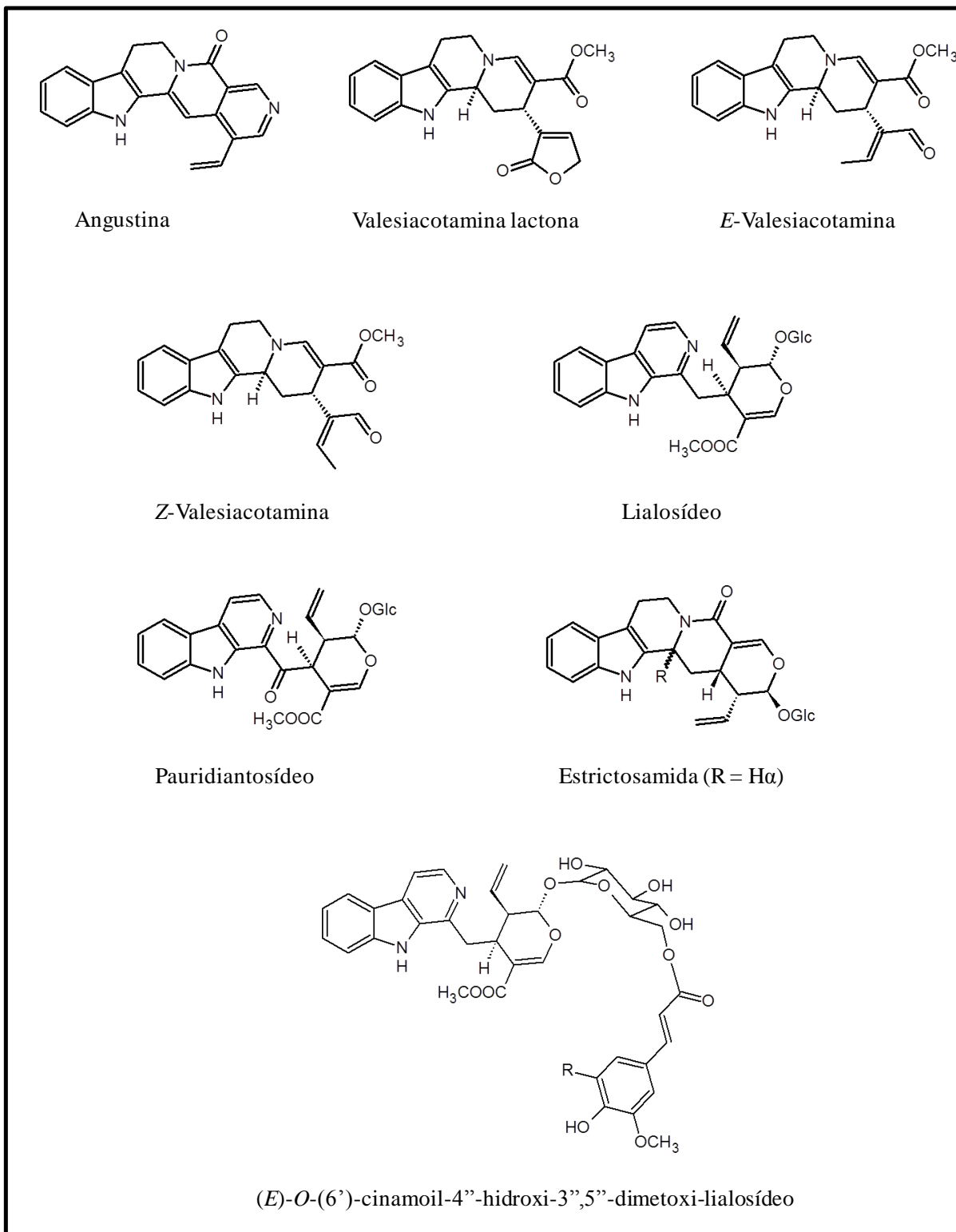


Figura VIII. Estruturas dos MIAs isolados de *P. suterella* e *P. laciniata*. O alcaloide (*E*)-*O*-(6'')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo foi identificado em ambas as espécies, mas seu isolamento não foi possível.

A similaridade estrutural verificada entre os MIAs isolados de espécies de *Heteropsychotria* e outros compostos β -carbolínicos pode sugerir o envolvimento desses metabólitos na neurotransmissão serotoninérgica. Além disso, experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram os efeitos dos alcaloides psicolatina (BOTH et al., 2002; BOTH et al., 2005; BOTH, 2005; BOTH et al., 2006; PASSOS, 2008) e ácido strictosidínico (FARIAS et al., 2010; FARIAS et al., 2012) sobre SNC. Desta forma, o presente trabalho também teve como objetivo a avaliação dos efeitos de frações e alcaloides de *Heteropsychotria* sobre alvos enzimáticos relacionados com doenças neurodegenerativas: as enzimas colinesterases (*EeAChE* e *eqBChE*) e monoamina oxidases (*rMAO-A*, *hMAO-A*, *rMAO-B* e *hMAO-B*).

Inicialmente, as frações SAE e LAE, assim como os alcaloides isolados em trabalhos anteriores do grupo, foram submetidas a ensaios de triagem para a avaliação de seus efeitos sobre os alvos selecionados. Em etapas posteriores as frações obtidas por RP-MPLC e os alcaloides isolados de *P. suterella* e *P. laciniata* também foram submetidos a experimentos de triagem e, após análise dos resultados, os compostos mais ativos foram avaliados quanto a suas concentrações inibitórias e mecanismos de inibição. Além disso, simulações de *docking* molecular foram utilizadas como ferramenta auxiliar para o entendimento das interações entre os alcaloides de *Heteropsychotria* e as macromoléculas proteicas.

Os ensaios para avaliação da atividade de MAO-A e MAO-B foram realizados em frações mitocondriais de encéfalos de ratos (Artigo 1) e também em enzimas humanas (BD Gentest, BD SupersomesTM) (Artigo 2). A comparação dos percentuais de inibição e dos valores de IC_{50} para SAE, LAE, frações de RP_MPLC e para os MIAs lialosídeo, strictosamida e ácido strictosidínico (FARIAS et al., 2012; ANEXO) sugere que tanto as frações quanto os alcaloides avaliados são capazes de inibir as enzimas de rato e humana apresentando potências semelhantes e seletividade frente à isoforma MAO-A (Tabela VI1). De acordo com os dados cristalográficos depositados até o momento na base de dados Protein Data Bank (PDB), as enzimas

hMAO-A e hMAO-B apresentam aproximadamente 70% de homologia estrutural, enquanto que a identidade entre as sequências de aminoácidos da hMAO-A e da rMAO-A é superior a 90% (SON et al., 2008). Adicionalmente, a existência de co-cristais de hMAO-A, hMAO-B e rMAO-A com alguns de seus inibidores seletivos fornecem informações importantes relacionadas com as características estruturais das moléculas seletivas e os tipos de interações envolvidas na ligação proteína-inibidor. Desta forma, os resultados deste trabalho que indicam inibição equipotente da hMAO-A e rMAO-A por frações e MIAs de *Psychotria* estão em conformidade com a homologia sequencial descrita para enzimas dessas duas espécies de mamíferos. A presença de compostos com núcleo β -carbolínico (ou TH β C) em *Heteropsychotria* consiste em indicativo de seletividade para a isoforma MAO-A, estando de acordo com dados descritos na literatura (SAMOYLENKO et al., 2010). Além disso, SON e colaboradores (2008), em trabalho descrevendo um co-cristal da hMAO-A com harmina, estabeleceram os resíduos de aminoácidos localizados nos sítios ativos das duas MAOs que estão relacionados com a seletividade para diferentes substratos e inibidores.

Os alcaloides mais potentes frente à hMAO-A foram angustina, valesiacotamina lactona, *E*-valesiacotamina, *Z*-valesiacotamina, prunifoleina e 14-oxoprufoleina. Todos esses compostos foram capazes de inibir a hMAO-A em percentuais superiores a 95%, com valores de IC₅₀ variando entre 0,8 e 7,5 μ M. Com exceção de angustina, que parece ser um inibidor reversível e competitivo, todas as substâncias testadas demonstraram um perfil tempo-dependente, sugerindo fortemente inibição irreversível da MAO-A (Artigo 2).

Os perfis de inibição das enzimas MAO-A e MAO-B por alcaloides de *Psychotria* consistem em uma significativa contribuição para o estudo dos efeitos de compostos β -carbolínicos sobre estes importantes alvos terapêuticos. Com relação aos mecanismos de inibição, os compostos testados podem ser divididos em dois grupos: inibidores reversíveis competitivos (angustina) e inibidores irreversíveis

(valesiacotamina lactona, *E/Z*-valesiacotamina, prunifoleina e 14-oxoprunifoleina). Ainda, com base nas funções químicas presentes nas moléculas e nos modos de ligação, os inibidores irreversíveis podem ser subdivididos em: *propargylamine-like* (alcaloides quaternários) e *acetylsalicylic acid-like* (alcaloides com núcleo valesiacotamina).

Tabela VIII. Tabela comparativa da inibição das enzimas MAO-A e MAO-B de rato e humana por frações e alcaloides isolados de *P. suterella* e *P. laciniata*.

	Enzimas de rato		Enzimas humanas	
	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
	Inibição (%)^a			
SAE	61,90	30,78	62,98	54,78
LAE	58,06	22,72	76,60	43,48
SAE-F4 ^b	71,09	32,97	42,30	31,47
LAE-F5 ^c	61,00	S.I.	51,44	45,04
	IC₅₀ (μM)			
Lialosídeo	117,5	724,4	181,97	> 100
Estrictosamida	132,5	645,5	141,25	> 100
Ácido strictosidínico ^d	474,67	> 1000	>100	>100
Clorgilina	0,01		0,004	
Pargilina	0,11			0,13

^aEsses percentuais de inibição foram obtidos para concentrações equivalentes a 4 μg/mL para inibição da MAO-A e 40 μg/mL para inibição da MAO-B.

^bSAE-F4 corresponde a fração SAE-F3 do artigo.

^cLAE-F5 corresponde a fração LAE-F4 do artigo 1 e LAE-F5 do artigo 2.

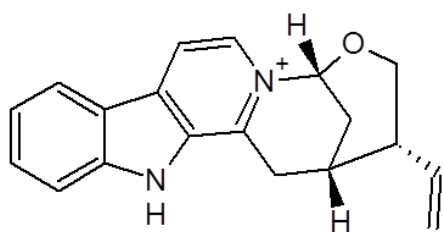
^dAs atividades do ácido strictosidínico sobre rMAO-A e rMAO-B estão descritas em FARIAS et al., 2012 (Anexo 2).

As simulações de *docking* molecular corroboraram os dados experimentais, sugerindo inibição reversível para angustina (interações hidrofóbicas e hidrofílicas) e irreversível para os demais alcaloides. Além disso, com base nas análises dos resultados de *docking*, é possível supor a formação de ligação covalente entre MAO-A, através de seu co-fator FAD (N-5), e os alcaloides de *Heteropsychotria*. Para os MIAs valesiacotamina lactona e *E/Z*-valesiacotamina o mecanismo proposto assemelha-se à inibição irreversível de ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) pelo ácido acetilsalicílico (MARNETT, 2002). Considerando a orientação desses ligantes no sítio ativo da MAO-A, os seus grupos carbóxi-metil poderiam sofrer ataque nucleofílico do N5 do FAD. Já para os alcaloides quaternários prunifoleina e 14-oxoprunifoleina, o mecanismo de inibição proposto assemelha-se àquele descrito para as propargilaminas (clorgilina, pargilina, seleginina rasagilina) sobre MAO-A e MAO-B (DE COLIBUS et al, 2005; BINDA et al., 2004; BINDA et al., 2005). Finalmente, o perfil de inibição reversível e competitivo observado para angustina está em concordância com o descrito para os alcaloides β -carbolínicos harmina e harmano (SON et al., 2008; HERRAIZ et al., 2010).

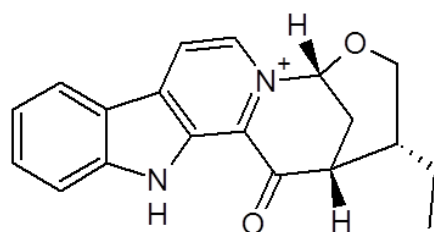
Considerando a busca por compostos capazes de atuar sobre múltiplos alvos relacionados a doenças neurodegenerativas, as frações obtidas de *P. suterella* e *P. laciniata* e os 13 alcaloides isolados dessas frações e de outras espécies de *Heteropsychotria* foram avaliados quanto a seus efeitos sobre as enzimas acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (*EeAChE*) e butirilcolinesterase de soro equino (eqBChE). Os primeiros experimentos realizados consistiram em testes de triagem e, em um segundo momento, ensaios complementares para avaliação de mecanismos de inibição foram realizados para os alcaloides mais promissores.

Os alcaloides β -carbolínicos quaternários prunifoleina e 14-oxoprunifoleina (Figura VI2), descritos em *P. prunifolia* (FARIA et al., 2010), foram os únicos capazes de inibir AChE e BChE com valores de IC_{50} inferiores a 100 μ M. Esses dados estão consistentes com os perfis de inibição já descritos na literatura para substâncias

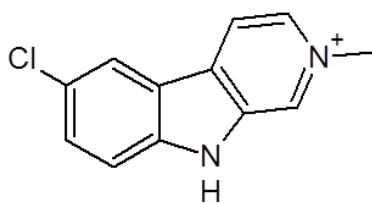
pertencentes a esta classe obtidas de fontes naturais e por semi-síntese (BECHER et al., 2005; BECHER et al., 2009; GEISSLER et al., 2010; SCHOTT et al., 2006; TORRES et al., 2012). Com relação à seletividade, prunifoleina parece ser um inibidor não seletivo para as duas colinesterases, enquanto que 14-oxoprunifoleina apresenta maior afinidade pela AChE (cerca de 10 vezes). Além disso, estudos de cinética enzimática indicaram que ambos os compostos atuam como inibidores não-competitivos da AChE (Artigo 2). Este mesmo perfil de inibição é descrito para a β -carbolina quaternária nostocarbolina (**63**) (BECHER et al., 2009) e para sais sintéticos derivados do harmano (**64,65**) (TORRES et al., 2012).



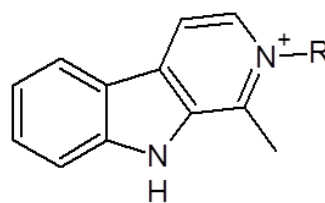
Prunifoleina (**45**)



14-Oxoprunifoleina (**46**)



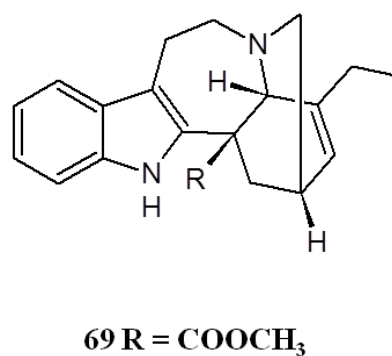
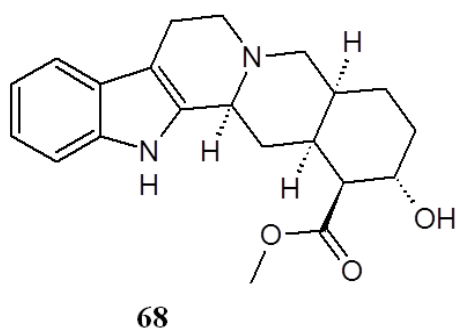
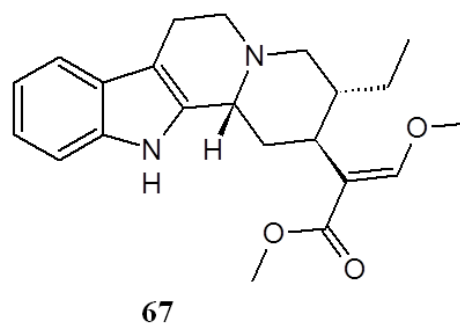
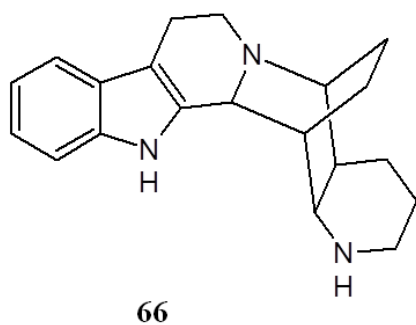
63



64 R = CH₃

65 R = CH₂CH₃

Os MIAs avaliados neste estudo não foram capazes inibir a AChE em percentuais superiores a 50% quando testados na concentração de 100 μM . Por outro lado, angustina, valesiacotamina lactona e *E/Z*-valesiacotamina foram capazes de inibir a BChE com valores de IC_{50} entre 3,57 e 14,12 μM . Estes resultados estão em concordância com trabalho publicado recentemente por BRUNHOFER et al. (2012), no qual os alcaloides indólicos nitrarina (**66**), hirsutina (**67**), rauwolsina (**68**) e catarantina (**69**) inibiram as BChEs de soro equino e humana com potências semelhantes (IC_{50} entre 4,97 e 10,63 μM) às apresentadas pelos alcaloides de *Psychotria*. Também para as enzimas AChE e BChE, as simulações de *docking* molecular complementaram o entendimento dos resultados experimentais, sugerindo possíveis modos de ligação entre os alcaloides e as proteínas estudadas (Artigo II).



O conceito doença neurodegenerativa inclui tanto condições de natureza crônica, como doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e doença de Huntington, quanto condições originadas por insultos agudos, como lesões cerebrais e isquemia. A complexidade e heterogeneidade dessas doenças podem ser evidenciadas pela inexistência, até o momento, de fármacos desenvolvidos com os objetivos de prevenir o processo neurodegenerativo ou recuperar neurônios que sofreram dano. Até o momento, pesquisas na área farmacêutica têm levado apenas ao desenvolvimento de medicamentos capazes de modular os sintomas associados com essas condições clínicas (GELDENHUYS et al., 2011).

Esta lacuna no desenvolvimento de fármacos neuroprotetores e/ou neurorestauradores pode ser atribuída às abordagens empregadas em muitos laboratórios, na indústria farmacêutica e no meio acadêmico, que buscam entidades químicas altamente potentes e seletivas para um único alvo, visando a diminuição de efeitos adversos (GELDENHUYS et al., 2011). Entretanto, essa abordagem “uma doença, um alvo” pode não ser a mais adequada na pesquisa de fármacos para o tratamento de condições complexas como as anteriormente citadas, e também câncer, diabetes e doenças autoimunes (ZIMMERMANN et al., 2007).

Confirmando a tendência que aponta para a investigação de substâncias possuindo múltiplos mecanismos de ação, estudo de revisão publicado em 2005 (MORPHY e RANKOVIC, 2005) identificou 300 trabalhos publicados entre 1990 e 2004 em revistas da área de química medicinal, nos quais foram apresentados compostos delineados com o objetivo de atuarem sobre dois ou mais alvos terapêuticos. Além disso, muitos estudos recentes têm proposto o delineamento de substâncias capazes de atuarem, de forma não seletiva, sobre os alvos investigados no presente estudo (BOLEA et al., 2011; SAMADI et al., 2012).

Os resultados apresentados nesta Tese demonstram as atividades de alcaloides de espécies neotropicais de *Psychotria* sobre alvos enzimáticos associados com doenças neurodegenerativas: AChE, BChE, MAO-A e MAO-B. Levando-se em

conta os perfis de inibição observados, os alcaloides estudados podem ser divididos em dois grupos majoritários: β -carbólicos quaternários e MIAs. Os alcaloides β -carbólicos quaternários apresentaram potências semelhantes para inibição das enzimas AChE, BChE e MAO-A. Os MIAs, por outro lado, foram capazes de inibir as enzimas BChE e MAO-A com potências na ordem de 1 e 10 μ M, respectivamente. Adicionalmente, considerando-se os mecanismos de inibição da hMAO-A, os MIAs poderiam ainda ser subdivididos em MIAs inibidores reversíveis e competitivos da MAO-A (angustina) e MIAs inibidores irreversíveis da MAO-A (valesiacotaminas). Analisados em conjunto, estes dados constituem uma importante contribuição para o estudo das atividades biológicas desses compostos sobre o SNC. Além disso, essas substâncias podem ser consideradas *scaffolds* para o desenvolvimento de inibidores enzimáticos com múltiplos mecanismos de ação para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

VIII. CONCLUSÕES

A investigação química de duas espécies neotropicais pertencentes ao gênero *Psychotria* L., *P. suterella* e *P. laciniata*, levou ao isolamento e/ou identificação de oito alcaloides indol monoterpênicos (MIAs): angustina, valesiacotamina lactona, *E*-valesiacotamina, *Z*-valesiacotamina, lialosídeo, pauridiantosídeo, strictosamida e (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo. Dentre esses compostos, lialosídeo e strictosamida haviam sido isolados de folhas de *P. suterella* em estudo anterior do grupo de pesquisa. Além disso, os MIAs descritos no presente trabalho também ocorrem em outras espécies de *Psychotria* e/ou em espécies pertencentes a outros gêneros da família Rubiaceae, como *Palicourea*.

Frações obtidas de *P. suterella* e *P. laciniata* (frações de alcaloides e frações de RP-MPLC), juntamente com os MIAs lialosídeo e strictosamida, foram testados quanto a sua atividade sobre as enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B) de encéfalos de ratos. Anteriormente à realização dos testes de inibição, os parâmetros para a realização dos ensaios enzimáticos foram otimizados: determinação do K_m do substrato diidrobromidato de kinuramina, determinação da concentração de proteínas e dos valores de IC_{50} para os inibidores seletivos da MAO-A (clorgilina) e da MAO-B (pargilina). As frações de alcaloides de *P. suterella* e *P. laciniata*, assim como frações contendo MIAs do tipo valesiacotamina, apresentaram atividade sobre a MAO-A com valores de IC_{50} entre 0.57 e 2.02 $\mu\text{g/mL}$. Apesar das frações também inibirem a MAO-B, os valores de IC_{50} determinados correspondem a aproximadamente 50 vezes àqueles verificados para a MAO-A, sugerindo certo grau de seletividade para a isoforma A. Contrariamente ao observado para as frações, lialosídeo e strictosamida apresentaram fraca inibição sobre a MAO-A, com valores de IC_{50} correspondendo a 118 e 123 μM , respectivamente. Para inibição da MAO-B, os valores de IC_{50} determinados para esses dois MIAs aproximam-se de 1 mM.

Em etapa posterior, 13 alcaloides isolados de *Heteropsychotria* foram testados quanto as suas atividades sobre as enzimas *EeAChE*, *eqBChE*, *hMAO-A* e *hMAO-B*. Nesses experimentos, os alcaloides β -carbolínicos quaternários prunifoleina e 14-

oxoprunifoleina foram capazes de inibir as enzimas *EeAChE* ($IC_{50} = 10$ e $3.39 \mu\text{M}$, respectivamente), *eqBChE* ($IC_{50} = 100$ e $11 \mu\text{M}$, respectivamente) e *hMAO-A* ($IC_{50} = 7.41$ e $6.92 \mu\text{M}$, respectivamente). Estudos de cinética enzimática sugerem que esses dois compostos inibem a *EeAChE* de forma não competitiva e *hMAO-A* de forma irreversível. Adicionalmente, os MIAs angustina, valesiacotamina lactona e *E/Z*-valesiacotamina inibiram as enzimas *eqBChE* ($IC_{50} = 3.47 - 14 \mu\text{M}$) e *hMAO-A* ($IC_{50} = 0.85 - 2.14 \mu\text{M}$). Com relação aos modos de inibição, angustina parece inibir a *hMAO-A* de forma reversível e competitiva, enquanto que os alcaloides do tipo valesiacotamina parecem atuar como inibidores irreversíveis, conforme observado em experimentos avaliando os efeitos de diferentes tempos de incubação entre enzima e inibidores sobre a atividade da *hMAO-A*. Simulações de *docking* molecular foram realizadas objetivando o estudo das interações entre as substâncias ativas e os alvos estudados. Assim, foram obtidas informações relacionadas com as orientações preferenciais dos ligantes nos sítios ativos da *AChE*, *BChE* e *MAO-A* e também informações relacionadas a possíveis interações hidrofílicas, hidrofóbicas e covalentes entre os alcaloides e as macromoléculas proteicas.

Finalmente, os alcaloides prunifoleina e *E*-valesiacotamina foram selecionados para a realização de ensaios de viabilidade e morte celular em culturas primárias de astrócitos de ratos. Ambos os compostos foram testados em três diferentes concentrações (1, 10 e $100 \mu\text{M}$) por período de incubação de 24 horas. As concentrações testadas compreendem os valores de IC_{50} determinados nos ensaios enzimáticos para inibição da *EeAChE*, *eqBChE* e *hMAO-A*. Os resultados desses experimentos indicaram que prunifoleina, nas três concentrações, e *E*-valesiacotamina, nas concentrações de 1 e $10 \mu\text{M}$, não comprometem a viabilidade e a integridade celular, conforme verificado nos experimentos de redução de MTT, captação de vermelho neutro e captação de iodeto de propídio. Por outro lado, *E*-valesiacotamina $100 \mu\text{M}$ reduziu a viabilidade celular para aproximadamente 20% (calculados em relação ao controle) após 24 horas de incubação.

IX. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos levam às seguintes perspectivas de continuação deste trabalho:

- Avaliação dos efeitos de alcaloides de *Heteropsychotria* sobre a enzima catecol-*O*-metil-transferase (COMT), cujos inibidores são utilizados no tratamento da Doença de Parkinson;
- Investigação dos efeitos de alcaloides de *Heteropsychotria* sobre outros alvos relacionados com doenças neurodegenerativas, como as enzimas histonas desacetilases (HDACs);
- Realização de ensaios objetivando a investigação dos efeitos de prunifoleina e *E*-valesiacotamina sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e sobre a atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em culturas primárias de astrócitos submetidas a dano induzido por H₂O₂;
- Continuidade dos estudos químicos em *P. suterella* e *P. laciniata* visando o isolamento e identificação de seus alcaloides minoritários;
- Estudo químico e biológico de outras espécies de *Heteropsychotria*, e também de espécies pertencentes ao gênero estreitamente relacionado *Palicourea*, objetivando a identificação de alcaloides que apresentem atividades sobre alvos enzimáticos relacionados com doenças neurodegenerativas.

X. REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H.; LOTTES, M.; WAIBEL, R.; KARIKAS, G.A.; CORREA, M.D.; GIPTA, M.P. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 1537-1545, 1995.

ADJIBADÉ, Y.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; ANTON, R. A new alkaloid from *Psychotria forsteriana*. *Planta Medica*, v. 52, p. 523-523, 1986.

ADJIBADÉ, Y. *Pharmacognosie du Psychotria forsteriana* A. Gray (Rubiaceae). *Aspects botanique, chimique et essais pharmacologiques preliminaires*. Paris: Université Louis Pasteur de Strasbourg I, 1989 (Tese de Doutorado).

ADJIBADÉ, Y.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; JUNG, M. L.; BECK, J. P.; ANTON, R. Citotoxicity on human leukemic and rat hepatoma cell lines of alkaloid extracts of *Psychotria forsteriana*. *Planta Medica*, v. 55, p. 567-568, 1989.

ADJIBADÉ, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J. C.; KUBALLA, B.; CABALION, P. Dimeric alkaloids from *Psychotria forsteriana*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 317-319, 1992.

ANDERSSON, L.; ROVA, J. H. E. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 214, p. 161-186, 1999.

ANDERSSON, L. *Margaritopsis* (Rubiaceae, Psychotrieae) is a pantropical genus. *Systematics and Geography of Plants*, v. 71, p. 73-85, 2001.

ANDERSSON, L. Relationships and generic circumscriptions in the *Psychotria* complex (Rubiaceae, Psychotrieae). *Systematics and Geography of Plants*, v. 72, p. 167-202, 2002.

BARTUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental Neurology*, v. 163, p. 495-529, 2000.

BARTUS, R. T.; DEAN, R. L.; BEER, B.; LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, v. 217, p. 408-414, 1982.

BECHER, P. G.; BAUMANN, H. I.; GADEMANN, K. JÜTTNER, F. The cyanobacterial alkaloid nostocarboline: an inhibitor of acetylcholinesterase and trypsin. *Journal of Applied Phycology*, v. 21, p. 103-110, 2009.

BECHER, P. G.; BEUCHAT, J. GADEMANN, K.; JÜTTNER, F. Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor for Nostoc 78-12A. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 1793-1795, 2005.

BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. P. Polyindolic alkaloids from *Psychotria forsteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets. *Planta Medica*, v. 4, p. 300-303, 1985.

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

BINDA, C.; HUBALEK, F.; LI, M.; HERZIG, Y.; STERLING, J.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Crystal structures of monoamine oxidase B in complex with four inhibitors of the N-propargylaminoidan class. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 1767-1774, 2004.

BINDA, C.; HUBÁLEK, F.; LI, M.; HERZIG, Y.; STERLING, J.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Binding of rasagiline-related inhibitors to human monoamine oxidases: a kinetic crystallographic analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 8148-8154, 2005.

BOLEA, I.; JUÁREZ-JIMÉNEZ, J.; DE LOS RIOS, C.; CHIOUA, M.; POUPLANA, R.; LUQUE, F. J.; UNZETA, M.; MARCO-CONTELLAS, J.; SAMADI, A. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of monepezil and *N*-[(5-(Benzyloxy)-1-methyl-1*H*-indol-2-yl)methyl]-*N*-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 8251-8270, 2011.

BORHIDI, A. Transfer of the Mexican species of *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* to *Palicourea* based on morphological and molecular evidences. *Acta Botanica Hungarica*, v. 53, p. 241-250, 2011.

BOTH, F. L. *Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicolatina isolada de Psychotria umbellata (Rubiaceae)*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005 (Tese de Doutorado).

BOTH, F. L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 336-341, 2002.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 374-380, 2005.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 3, p. 342-345, 2006.

BRAND, G.; HENRIQUES, A. T.; PASSOS, C. S.; BALDOQUI, D.; SANTIN, S. M. O.; COSTA, W. F.; SARRAGIOTTO, M. H. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Margaritopsis cymuligera* (Mull. Arg.) C.M. Taylor (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 45, p. 155-157, 2012.

BREMEKAMP, C. E. B. Notes on the Rubiaceae of Surinam. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais*, v. 33, p. 248-308, 1934.

BREMEKAMP, C. E. B. Remarks on the position, the delimitation, and the subdivision of the Rubiaceae. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 15, p. 1-33, 1966.

BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 96, p. 4-26, 2009.

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

BRUNHOFER, G.; FALLARERO, A.; KARLSSON, D.; BATISTA-GONZALEZ, A.; SHINDE, P.; MOHAN, C. G.; VUORELA, P. Exploration of natural compounds as sources of new bifunctional scaffolds targeting cholinesterases and beta amyloid aggregation: the case of chelerythrine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 6669-6679, 2012

CALLAWAY, J. C.; BRITO, G. S.; NEVES, E. S. Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 37, p. 145-150, 2005.

CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A. β -carboline alkaloids: Biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, v.14, p. 479-500, 2007.

CHIMENTI, F.; COTTIGLIA, F.; BONSIGNORE, L.; CASU, L.; CASU, M.; FLORIS, C.; SECCI, D.; BOLASCO, A.; CHIMENTI, P.; GRANESE, A.; BEFANI, O.; TURINI, P.; ALCARO, S.; ORTUSO, F.; TROMBETTA, G.; LOIZZO, A.; GUARINO, I. Quercetin as the active principle of *Hypericum hircinum* exerts a selective inhibitory activity against MAO-A: extraction, biological analysis and computational study. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 945-949, 2006.

COHEN, G.; FAROOQUI, R.; KESLER, N. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 94, p. 4890-4894, 1997.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 183-205, 2001.

CRAIG, L. A.; HONG, N. S.; MCDONALD, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, p. 1397-1409, 2011.

DARVESH, S.; GRANTHAM, D. L.; HOPKINS, D. A. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 393, p. 374-390, 1998.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews in Neuroscience*, v. 4, p. 131-138, 2003.

DAVIS, A.P.; BRIDSON, D.; GOVAERTS, R. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 135, p. 35-42, 2001.

DE COLIBUS, L.; LI, M.; BINDA, C.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Three dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO-A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 12684-12689, 2006.

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

DILLENBURG, C. R.; PORTO, M. L. Rubiaceae - Tribo *Psychotriaceae*. *Boletim do Instituto de Biociências*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 39, p. 1-76, 1985.

DITTMANN, K.; RIESE, U.; HAMBURGER, M. HPLC-based bioactivity profiling of plant extracts: a kinetic assay for the identification of monoamine oxidase A inhibitors using human recombinant monoamine oxidase A. *Phytochemistry*, v. 65, p. 2885-2891, 2004.

DJERASSI, C.; MONTEIRO, H. J.; WALSER, A.; DURHAM, L. J. Alkaloid studies. LVI. The constitution of vallesiachotamine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 88, p. 1792-1798, 1966.

DO NASCIMENTO, C. A.; GOMES, M. S.; LIAO, L. M.; DE OLIVEIRA, C. M.; KATO, L.; DA SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Zeitschrift fuer Naturforschung B: Chemical Sciences*, v. 61, p. 1443-1446, 2006.

DO NASCIMENTO, C.A.; LIÃO, L.M.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A.; SCHUQUEL, I. T. A.; OLIVEIRA, C. M. A. A tetrahydro- β -carboline trisaccharide from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 1104-1107, 2008.

DÜSMAN, L. T., JORGE, T. C. M., DE 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.

ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; ORJALA, J.; BAUMGARTNER, B.; RALI, T.; STICHER, O. New indole alkaloid glycosides from *Nauclea orientalis*. *Planta Medica*, v. 57, p. 149-152, 1991.

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

FARIAS, F. M. *Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades antiqumiotáxica e sobre o sistema nervoso central. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006 (Tese de Doutorado).

FARIAS, F. M., KONRATH, E. L., ZUANAZZI, J. A. S., HENRIQUES, A. T. Strictosamide from *Psychotria nuda* (Cham. et Schltl) Wawra (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 36, p. 919-920, 2008.

FARIAS, F. M.; PASSOS, C. S.; ARBO, M. D. ZUANAZZI, J. A. S.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. Monoamine levels in rat striatum after acute intraperitoneal injection of strictosidinic acid isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae). *Phytomedicine*, v. 17, p. 289-291, 2010.

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* Müll. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus. *Fitoterapia*, v. 83, p. 1138-1143, 2012.

GEISSLER, T.; BRANDT, W.; PORZEL, A.; SCHLENZIG, D.; KEHLEN, A. WESSJOHANN, L.; ARNOLD, N. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 2173-2177, 2010.

GELDENHUYS, W. J.; YODIM, M. B. H.; CAROLL R. T.; VAN DER SCHYF C.J. The emergence of designed multiple ligands for neurodegenerative diseases, *Progress in Neurobiology*, v. 94, p. 347-359, 2011.

GIACOBINI, E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 18, p. S1-S5, 2003.

GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A.; VEROFF, A. E.; CUTLER, N. R. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *Journal of Neural Transmission*, v. 109, p. 1053-1065, 2002.

GOMES, M. In.: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETTI, A. M.; MARTINS, S. E. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: FAPESP, 2007.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K.; WANG, Y.; PEPEU, G.; SCALI, C.; YU, Q. S.; MAMCZARZ, J.; HOLLOWAY, H. W.; GIORDANO, T.; CHEN, D.; FURUKAWA, K.; SAMBAMURTI, K.; BROSSI, A.; LAHIRI, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodents. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, v. 102, p. 17213-17218, 2005.

GUILLOZET, A. L.; SMILEY, J. F.; MASH, D. C.; MESULAM, M. M. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of Neurology*, v. 42, p. 909-918, 1997.

HANSEN, R. A.; GARTLEHNER, G.; WEBB, A. P.; MORGAN, L. C.; MOORE, C. G.; JONAS, D. E. Efficacy and safety of donepezil, galanthamine and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta analysis. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, v. 3, p. 211-225, 2008.

HARAGUCHI, H.; TANAKA, Y.; KABBASH, A.; FUJIOKA, T.; ISHIZU, T.; YAGI, A. Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry*, v. 65, p. 2255-2260, 2004.

HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 894-901, 2008.

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; von POSER, G. L.; FETT-NETO, A. G.; SCHRISPSEMA, J. N-b-D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry*, v. 65, p. 449-454, 2004.

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; von POSER, G. L.; FETT-NETO, A. G.; SCHRISPSEMA, J. N-b-D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry*, v. 65, p. 449-454, 2004.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Analysis of monoamine oxidase enzymatic activity by reversed-phase high performance liquid chromatography and inhibition by β -carboline alkaloids occurring in foods and plants. *Journal of Chromatography A*, v. 1120, p. 237-243, 2006.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V. J.; GUILLÉN, H. Beta-carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 839-845, 2010.

HERRAIZ; T. Identification and Occurrence of β -Carboline Alkaloids in Raisins and Inhibition of Monoamine Oxidase (MAO). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 35, p. 8534-8540, 2007.

JANNIC, V.; GUERITTE, F.; LAPREVOTE, O.; SERANI, L.; MARTIN, M. T.; SEVENET, T.; POTIER, P. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 838-843, 1999.

KAKUGUSHI, Y.; ISHIYAMA, H.; KUBOTA, T.; KOBAYASHI, J. Naucleamide F, a new monoterpene indole alkaloid from *Nauclea latifolia*. *Heterocycles*, v. 79, p. 765-771, 2009.

KATO, L.; OLIVEIRA, C.M.A.; FARIA, E.O.; RIBEIRO, L.C.; CARVALHO, B.G.; SILVA, C.C.; SCHUQUEL, I.T.A.; SANTIN, S.M.O.; NAKAMURA, C.V.; BRITTA, E.A.; MIRANDA, N.; IGLESIAS, A.H.; DELPRETE, P.G. Antiprotozoal alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth.) Steyerem. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, p. 355-360, 2012.

KENNEDY, B. P.; ZIEGLER, M. G.; ALFORD, M.; HANSEN, L. A.; THAL, L. J.; MASLIAH, E. Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO-A and MAO-B in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 110, p. 789-801, 2003.

KERBER, V. A. *Análise dos Alcalóides de Psychotria brachyceras Müll. Arg. e Psychotria umbellata Vell., e o Estabelecimento e Caracterização de Cultura de Células de P. umbellata Vell.* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1999 (Tese de Doutorado).

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

KERBER, V. A.; PASSOS, C.; VERLI, H.; FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J. P.; HENRIQUES, A. T. Psychollatine, a glucosidic monoterpene indole alkaloid from *Psychotria umbellata*. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 697-700, 2008.

KHORANA, N.; CHANGWICHIT, K.; INGKANINAN, K.; UTSINTONG, M. Prospective acetylcholinesterase inhibitory activity of indole and its analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, p. 2885-2888, 2012.

KLEIN, R. M.; REIS, A.; IZA, O. B. Rubiaceae. Parte I – As Plantas / Monografia. *Flora Ilustrada Catarinense*, v. 2. Itajaí, 2002.

KONRATH, E. L. *Investigação in vitro do Efeito Neurotóxico, Antioxidante e Anticolinesterásico de Alcalóides e Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Fatias de Hipocampo Submetidas à Privação de Oxigênio e Glicose.* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2006 (Dissertação de Mestrado).

LA REGINA, G.; SILVESTRI, R.; GATTI, V.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINO, E.; BEFANI, O.; TURINI, P.; AGOSTINELLI, E. Synthesis, structure-activity relationships and molecular modeling studies of new indole inhibitors of monoamine oxidases A and B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 9729-9740, 2008.

LAJIS, N.H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R.F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*. *Planta Medica*, v. 59, p. 383-384, 1993.

LEAL, M. B. *Estudo Psicofarmacológico de Espécies de Psychotria (RUBIACEAE) do Estado do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1994 (Dissertação de Mestrado).

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of Alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.54, p. 37-40, 1996.

LI, B.; STRIBLEY, J. A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L. M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S. H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, v. 75, p. 1320-1331, 2000.

LI, X. N.; ZHANG, Y.; CAI, X. H.; FENG, T.; LIU, Y. P.; LI, Y.; REN, J.; ZHU, H. J.; LUO, X. D. Psychotripine: a new trimeric pyrroloindoline derivative from *Psychotria pilifera*. *Organic Letters*, v. 13, p. 5896-5899, 2011.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESCH, N.; POISSON, J. E.; Rubiaceés d'océanie: alkaloids de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanatu (Nouvelles-Hébrides). *Journal of Natural Products*, v. 50, p. 468-473, 1987.

LOPES, S. O. *Análise química e cultivo in vitro de Psychotria leiocarpa Cham. Et Schltl. e Psychotria carthagenensis Jacq. (Rubiaceae)*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1998 (Dissertação de Mestrado).

LOPES, S. O.; VON POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 1187-1195, 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae

MARNETT, L. J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, v. 68-69, p. 153-164, 2002.

MASSEY, J. B.; CHURCHICH, J. E. Kynuramine, a fluorescent substrate and probe of plasma amine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, p. 8081-8084, 1977.

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

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural Products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MORAES, T. M. S.; ARAÚJO, M. H.; BERNARDES, N. R.; OLIVEIRA, D. B.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F.; DA CUNHA, M. Antimycobacterial Activity and Alkaloid Prospection of *Psychotria* Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Planta Medica*, v. 77, p. 964-970, 2011.

MORAES, T. M. S.; RABELO, G. R.; ALEXANDRINO, C. R.; SILVA NETO, S. J.; DA CUNHA, M. Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Botanica Brasilica*, v. 25, p. 178-190, 2011.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 6523-6543, 2005.

MOURA, S.; CARVALHO, F. G.; DE OLIVEIRA, C. D. R.; PINTO, E.; YONAMINE, M. qNMR: na applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. *Phytochemistry Letters*, v. 3, p. 79-83, 2010.

NARINE, L. L.; MAXWELL, A. R. Monoterpene indole alkaloids form *Palicourea crocea*, v. 2, p. 34-36, 2009.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. Reorganization of the Genus *Psychotria* and the Tribe *Psychotrieae* (RUBIACEAE) Inferred from ITS and rbcL Sequence Data. *Systematic Botany*, v. 24, p. 5-27, 1999.

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

NOVAROLI, L. DAINA, A.; BERTOLINI, F.; DI GIOVANNI, S.; BRAVO, J.; REIST, M.; CARRUPT, P. A. Identification of novel multifunctional compounds for the treatment of some aging related neurodegenerative diseases. *Chimia*, v. 59, p. 315-320, 2005.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 11, p. 456-467, 2004.

PASSOS, C. S. *Psicolatina: caracterização conformacional e avaliação do efeito sobre os níveis de aminoácidos excitatórios e inibitórios em regiões cerebrais de roedores*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008 (Dissertação de Mestrado).

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

PETIT, E. M. A. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles*, v. 34, p. 1-119, 1964.

PIMENTA, A.T.A.; BRAZ-FILHO, R.; DELPRETE, P.G.; SOUZA, E.B.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S. Structure elucidation and NMR assignments of two unusual monoterpene indole alkaloids from *Psychotria stachyoides*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 48, p. 734-737, 2010b.

PIMENTA, A.T.A.; BRAZ-FILHO, R.B.; DELPRETE, P.G.; SOUZA, E.B.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S. Unusual monoterpene indole alkaloids from *Psychotria stachyoides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 38, p. 846-849, 2010a.

PIMENTA, A.T.A.; UCHÔA, D.E.A.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S. Alkaloid and other chemical constituents from *Psychotria stachyoides* Benth. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2216-2219, 2011.

RIVIER, L. LINDGREEN, J. E. “Ayahuasca”, the south America hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation. *Economic Botanic*, v. 26, p. 101-129, 1972.

ROBBRECHT, E. Advances in Rubiaceae macrosystematics. *Opera Botanica Belgica*, v. 6, p. 1-200, 1993.

ROBBRECHT, E. Monographic and systematic studies in Rubiaceae. National Botanic Garden of Belgium. Bélgica, 2005. Disponível em <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.php>. Acesso em 25.05.2011.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica*, v. 1, p. 1-271, 1988.

ROBBRECHT, E.; MANEN, J. F. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoidae and Rubioideae. *Systematics and Geography of Plants*, v. 76, p. 85-145, 2006.

ROTH, A.; KUBALLA, B.; CABALION, P.; ANTON, R. Preliminary study of the alkaloids of *Psychotria forsteriana*. *Planta Medica*, v. 51, p. 289-289, 1985.

SAMADI, A.; DE LOS RIOS, C.; BOLEA, I.; CHIOUA, I.; IRIEPA, I.; MORALEDA, I.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; GÁLVEZ, E.; VALDERAS, C.; UNZETA, M.; MARCO-CONTELLAS, J. Multipotent MAO and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of heterocyclic substituted alkyl and cycloalkyl propargyl amine. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 251-262, 2012.

SAMOYLENKO, V.; RAHMAN, Md. M.; TEKAWANI, B. L.; TRIPATHI, L. M.; WANG, Y. H.; KHAN, S. I.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S.; JOSHI, V. C.; MUHAMMAD, I. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p. 257-367, 2010.

SCHOTT, Y.; DECKER, M.; ROMMELSPACHER, H.; LEHMANN, J. 6-Hydroxy- and 6-methoxy- β -carbolines as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 5840-5843, 2006.

SHEN, Z. X. Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Medical Hypothesis*, v. 63, p. 308-321, 2004.

SHIGEMORI, H.; KAGATA, T.; ISHIYAMA, H.; MORAH, F.; OHSAKI, A. KOBAYASHI, J. Naucleamides A-E, new monoterpene indole alkaloids from *Nauclea latifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, V. 51, p. 58-61, 2003.

SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annual Reviews in Neuroscience*, v. 22, p. 197-217, 1999.

SIMÕES-PIRES, C.A.; FARIAS, F.M.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T.; HOSTETTMANN, K. Indole monoterpenes with antichemotactic activity from *Psychotria myriantha*: chemotaxonomic significance. *Natural Product Communications*, v. 1, p. 1101-1106, 2006.

SMITH, A.; KOBAYASHI, K.; CHAPPELL, N.; HOXSEY, D. The controversial promises of cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease and related dementias: a qualitative study of caregiver's experiences. *Journal of Aging Studies*, v. 25, p. 397-406, 2011.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J.; Resumo preliminar das Rubiáceas de Santa Catarina. *Sellowia*, v. 7, p. 16-86, 1956.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B. E.; IAROCCA, J.; RODRIGUES, R. S. Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. 1 ed. São Carlos: RiMA Editora, 2006.

SOLIS, P. N.; RAVELO, A. G.; PALENZUELA, J. A.; GUPTA, M. P.; GONZALEZ, A.; PHILLIPSON, J. D. Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*. *Phytochemistry*, v. 44, p. 963-969, 1997.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. Alkaloids from *cephaelis dichroa*. *Phytochemistry*, v. 33, p. 1117-1119, 1993.

SON, S. Y.; MA, J.; KONDOU, Y.; YOSHIMURA, M.; YAMASHITA, E.; TSUKIHARA, T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substances/inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, v. 105, p. 5739-5744, 2008.

STEYERMARK, J.A. *Psychotria*. In: MAGUIRE, B.M. & Collaborators eds. The Botany of Guayana Highland – Part IX. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, v. 23, p. 404-717, 1972.

STUART, K. L.; WOO-MING, R. B. *Palicourea* alkaloids. Structure of Palinine. *Tetrahedron Letters*, v. 44, p. 3853-3856, 1974.

TAKAYAMA, H.; MORI, I.; KITAJIMA, M.; AIMI, N.; LAJIS, N. H. New type of trimeric and pentameric indole alkaloids from *Psychotria rostrata*. *Organic Letters*, v. 6, p. 2945-2948, 2004.

TAYLOR, C. M.; LORENCE, D. H.; GEREAU, R. E. *Rubiacearum americanum magna hama pars XXV*: The nocturnally flowering species of *Psychotria domingensis* – *Coussarea hondensis* group plus three other Mesoamerican *Psychotria* species transfer to *Palicourea*. *Novon*, v. 20, p. 481-492, 2010.

TAYLOR, C. 2010. *Psychotria* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014224>. Acesso em 25.05.2011.

TORRES, J. M.; LIRA, A. F.; SILVA, D. R.; GUZZO, L. M.; SANT'ANNA, C. M. R.; KÜMMERLE, A. E.; RUMJANEK, V. M. Structural insights into cholinesterases inhibition by harmane β -carbolinium derivatives: a kinetics – molecular modeling approach. *Phytochemistry*, v. 81, p. 24-30, 2012.

VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; MANFRED, H. β -carboline monoterpene glycosides from *Palicourea adusta*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 1485-1489, 1999.

VAN DIERMEN, D.; MARSTON, A.; BRAVO, J.; REIST, M.; CARRUPT, P. A. Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, p. 397-401, 2009.

VENCATO, I.; DA SILVA, F. M.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; TANAKA, C. M. A.; DA SILVA, C. C.; SABINO, J. R. Vallesiachotamine. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, v. 62, p. o429-o431, 2006.

VERDECOURT, B. Remarks on the classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin Botanique de L'État*, v. 28, p. 209-281, 1958.

VEROTTA L; PILATI, T.; TATO, M.; ELISABTSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES D.S. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 3, p. 392-396, 1998.

XUAN, W. D.; CHEN, H. S.; YUAN, Z. X.; ZHU, P. Alkaloidal constituents from *Nauclea officinalis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 3, p. 181-183, 2004.

YALCIN, D.; BAYRAKTAR, O. Inhibition of catechol-*O*-methyltransferase (COMT) by some plant derived alkaloids and phenolics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 64, p. 162-166, 2010.

YAN, Z.; CALDWELL, G. W.; ZHAO, B.; REITZ, A. B. A high-throughput monoamine oxidase inhibition assay using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 18, p. 834-840, 2004.

YOUDIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, p. S287-S296, 2006.

YOUDIM, M. B. H.; BUCCAFUSCO, J. J. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 26, p. 27-35, 2005.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F.; The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews in Neuroscience*, v. 7, p. 295-309, 2006.

YOUDIM, M. B. H.; FRIDKIN, M.; ZHENG, H. Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 126, p. 317-326, 2005.

ZECHES, M.; RICHARD, B.; GUEYE-M'BAHIA, L.; LE MEN-OLIVIER, L.; DELAUDE, C. Constituants des écorces de racine de *Nauclea pobeguinii*. *Journal of Natural Products*, v. 48, p. 42-46, 1985.

ZHOU, H.; HE, H. P.; WANG, Y. H.; HAO, X. J. A new dimeric alkaloid from the leaf of *Psychotria colocarpa*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 93, p. 1650-1652, 2010.

ZIMMERMANN, G. R.; LEHÁR, J.; KEITH, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of parts. *Drug Discovery Today*, v. 12, p. 34-42, 2007.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 (Artigo 4): Strictosidinic acid, isolated from <i>Psychotria myriantha</i> Müll. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus.....	219
Anexo 2 : Dados espectroscópicos do alcaloide strictosamida (13).....	225
Anexo 3 : Dados espectroscópicos do alcaloide lialosídeo (20).....	235
Anexo 4 : Dados espectroscópicos do alcaloide angustina (22).....	241
Anexo 5 : Dados espectroscópicos do alcaloide <i>E</i> -valesiacotamina (23).....	249
Anexo 6 : Dados espectroscópicos do alcaloide <i>Z</i> -valesiacotamina (24).....	257
Anexo 7 : Dados espectroscópicos do alcaloide valesiacotamina lactona (25).....	265
Anexo 8 : Dados espectroscópicos do alcaloide pauidiantosídeo (62).....	273
Anexo 9 : Dados espectroscópicos do alcaloide (<i>E</i>)- <i>O</i> -(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (58).....	285
Anexo 10 : Parecer – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS).....	289
Anexo 11 : Artigos publicados durante o período de doutorado.....	293

ANEXO 1

Artigo 4: STRICTOSIDINIC ACID, ISOLATED FROM *Psychotria MYRIANTHA* MULL. ARG. (RUBIACEAE), DECREASES SEROTONIN LEVELS IN RAT HIPPOCAMPUS

Fitoterapia 83: 1138-1143, 2012

ANEXO 2

Dados espectroscópicos do alcaloide strictosamida (13)

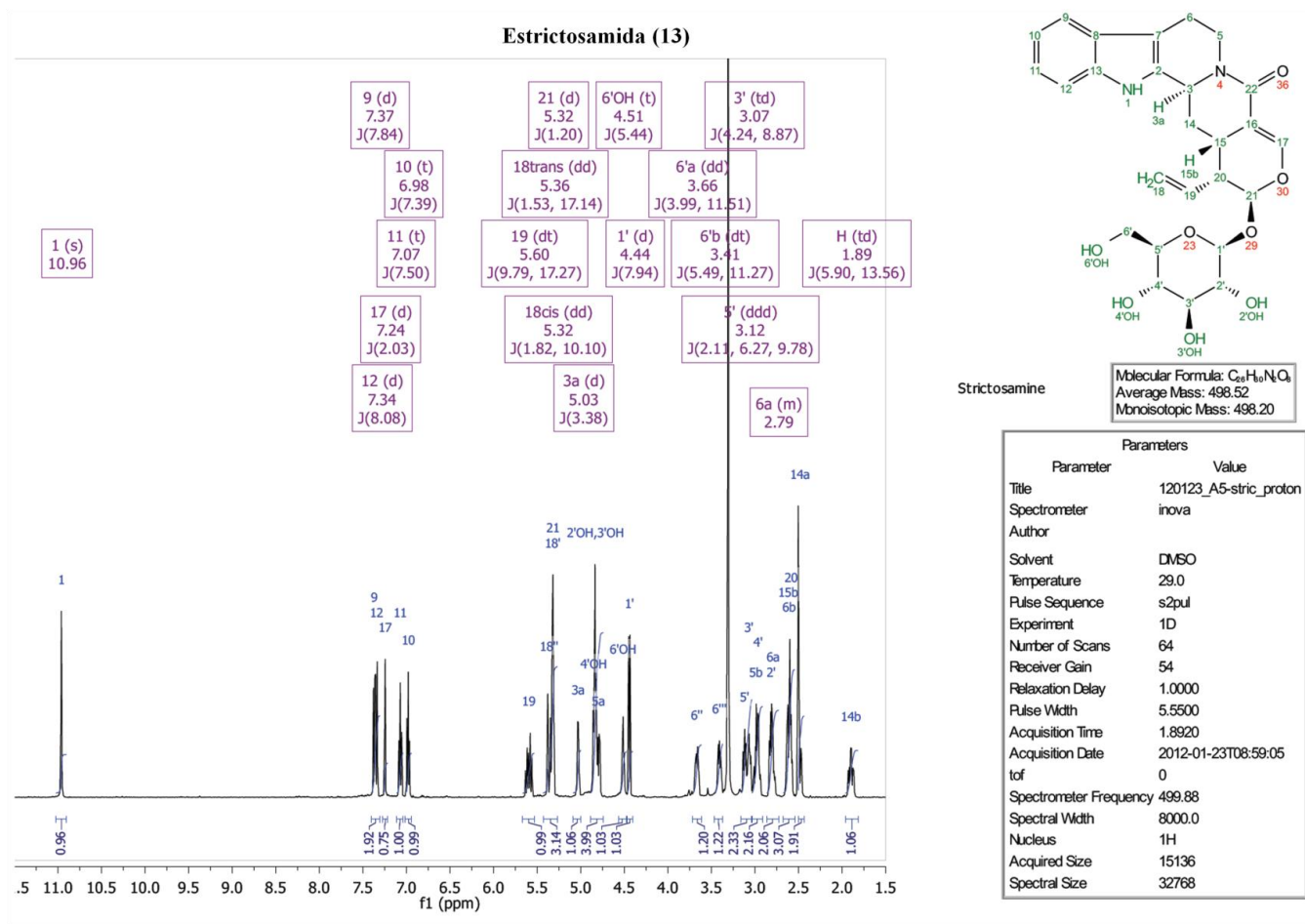


Figura A2.1. Espectro de RMN de ^1H do MIA estrictosamida (DMSO-d₆; 500 MHz).

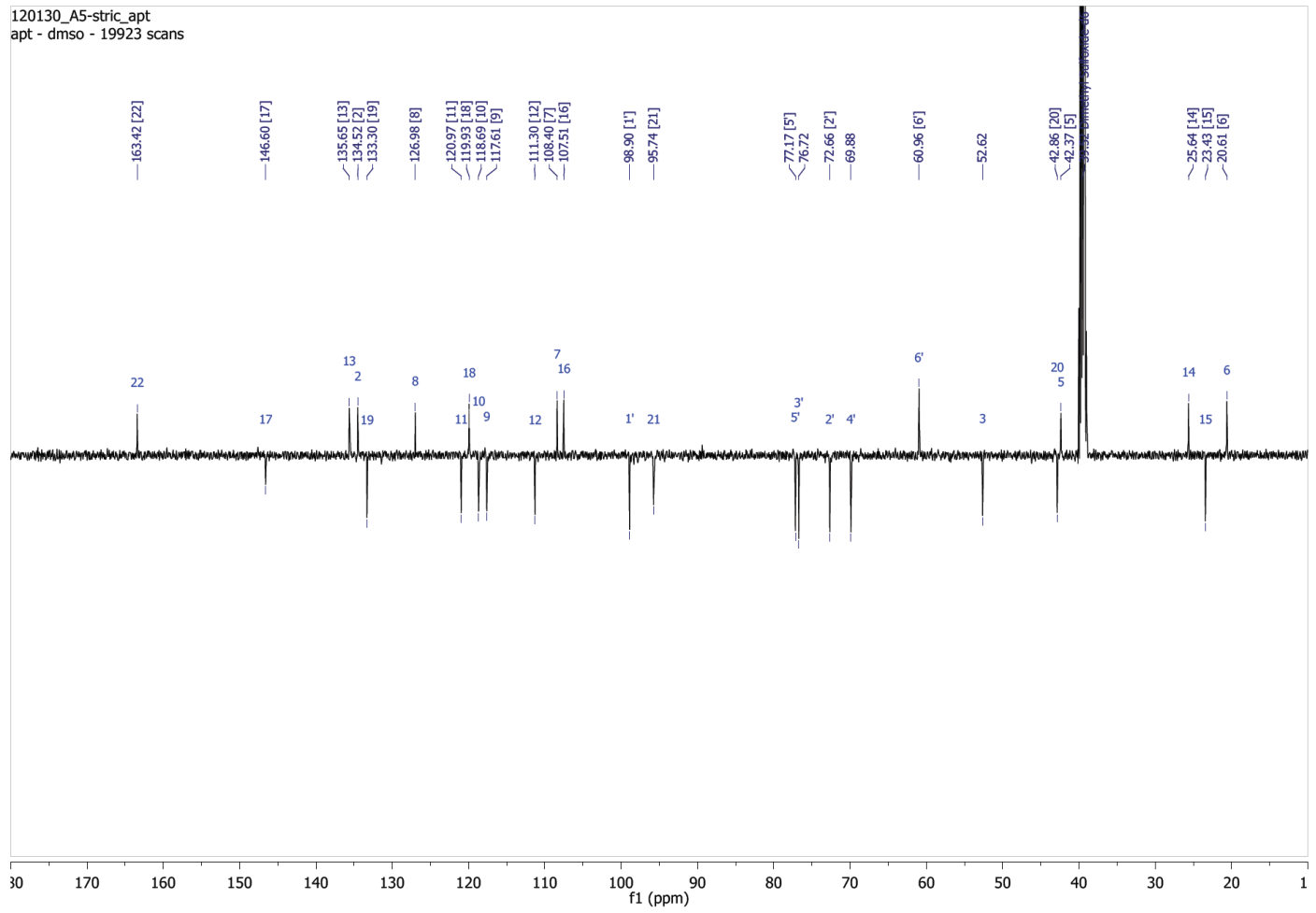


Figura A2.2. Espectro de RMN de ^{13}C -APT do MIA strictosamida (DMSO-d₆; 125 MHz).

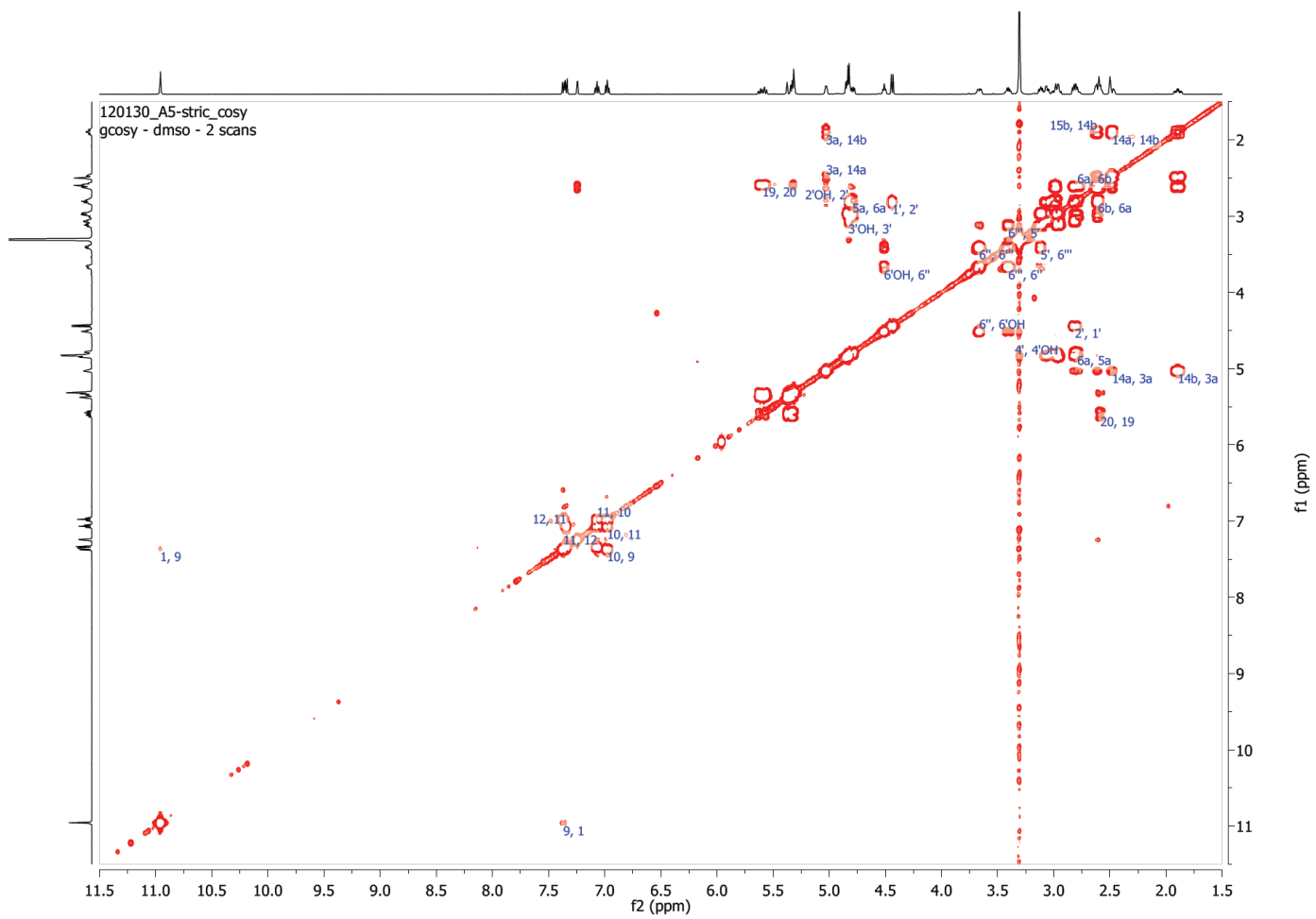


Figura A2.3. Espectro de ^1H - ^1H COSY do MIA strictosamida (DMSO- d_6 ; 500 MHz).

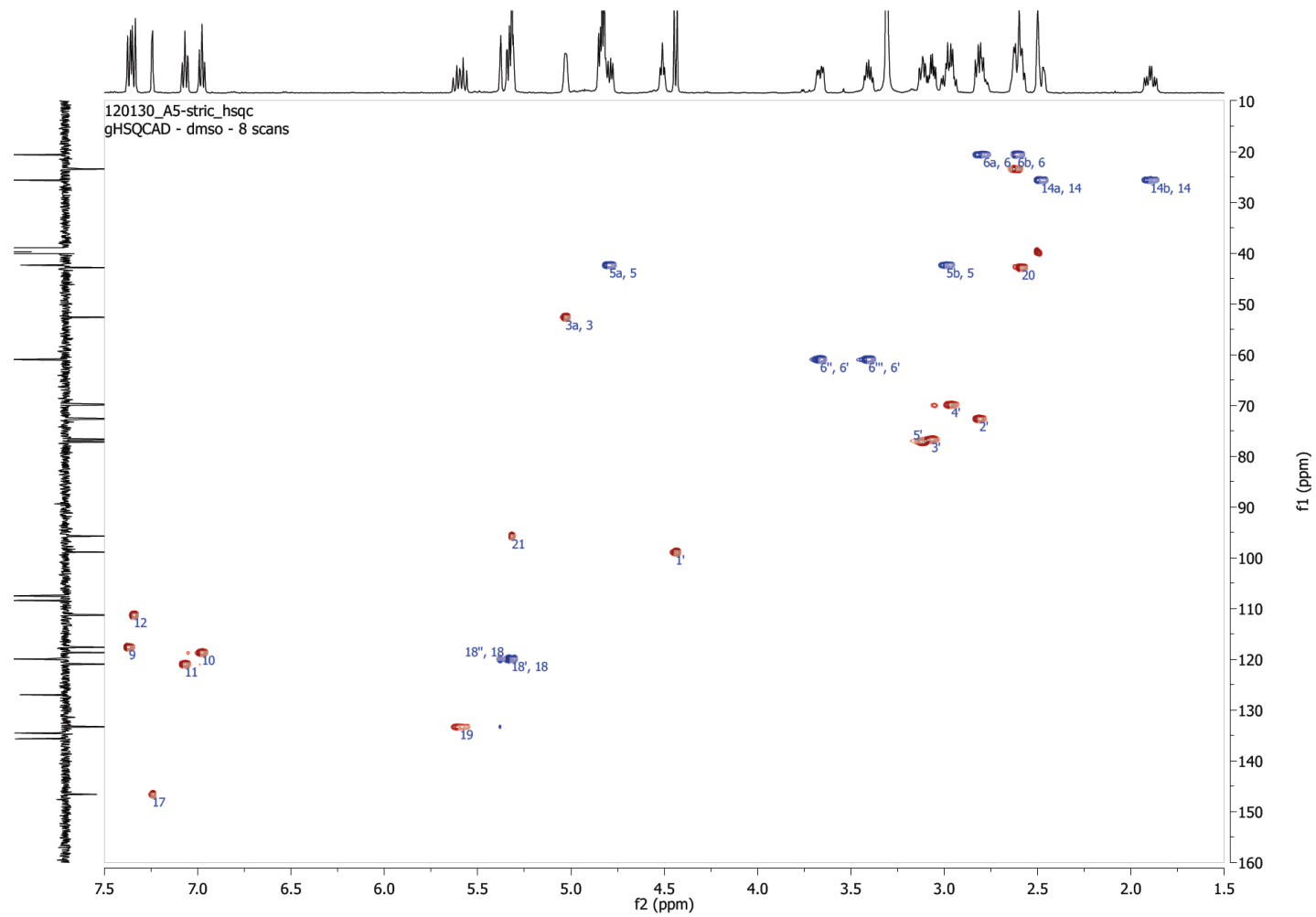


Figura A2.4. Espectro de HSQC do MIA strictosamida (DMSO-d₆; 500 MHz).

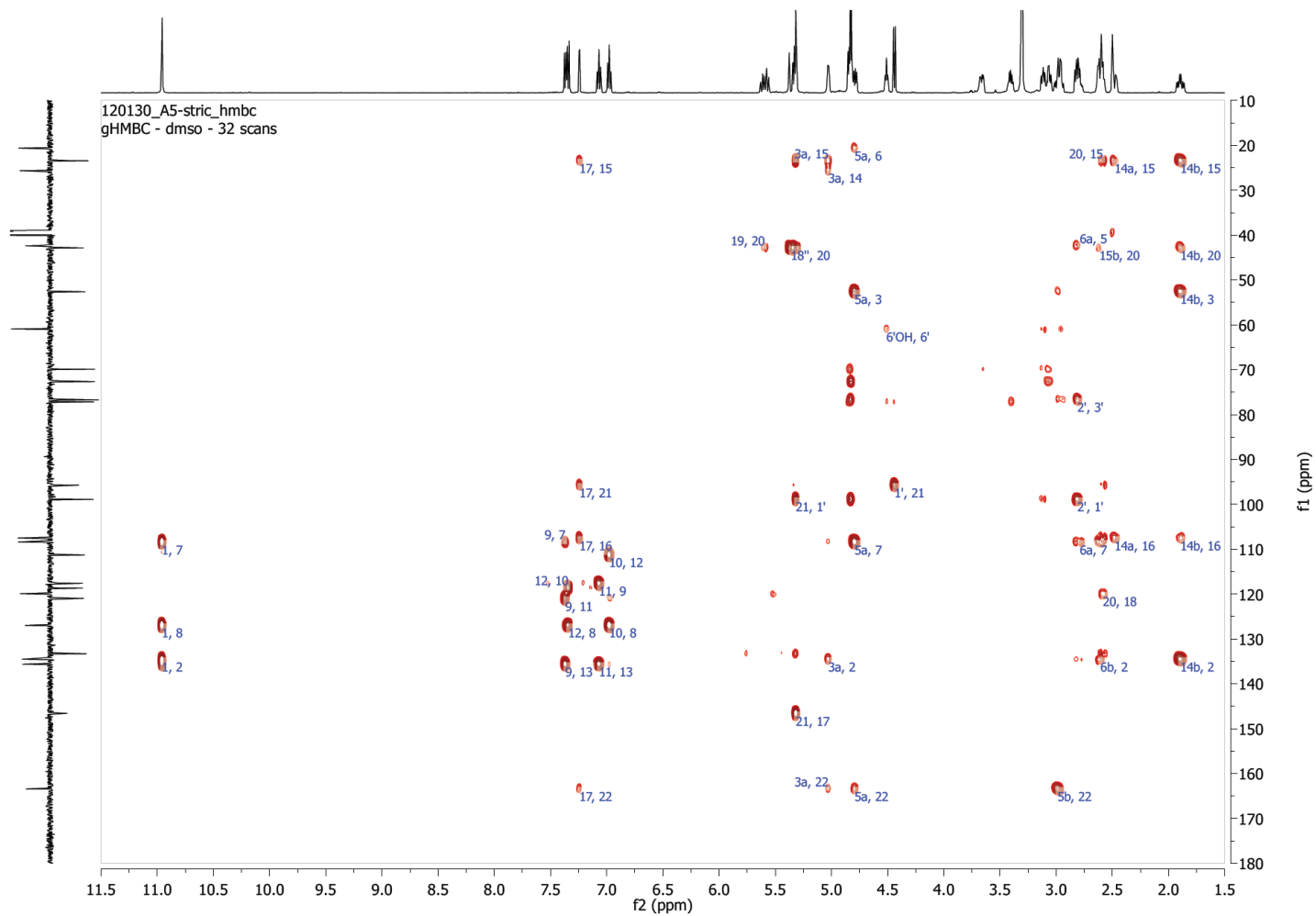


Figura A2.5. Espectro de HMBC do MIA strictosamida (DMSO-d₆; 500 MHz).

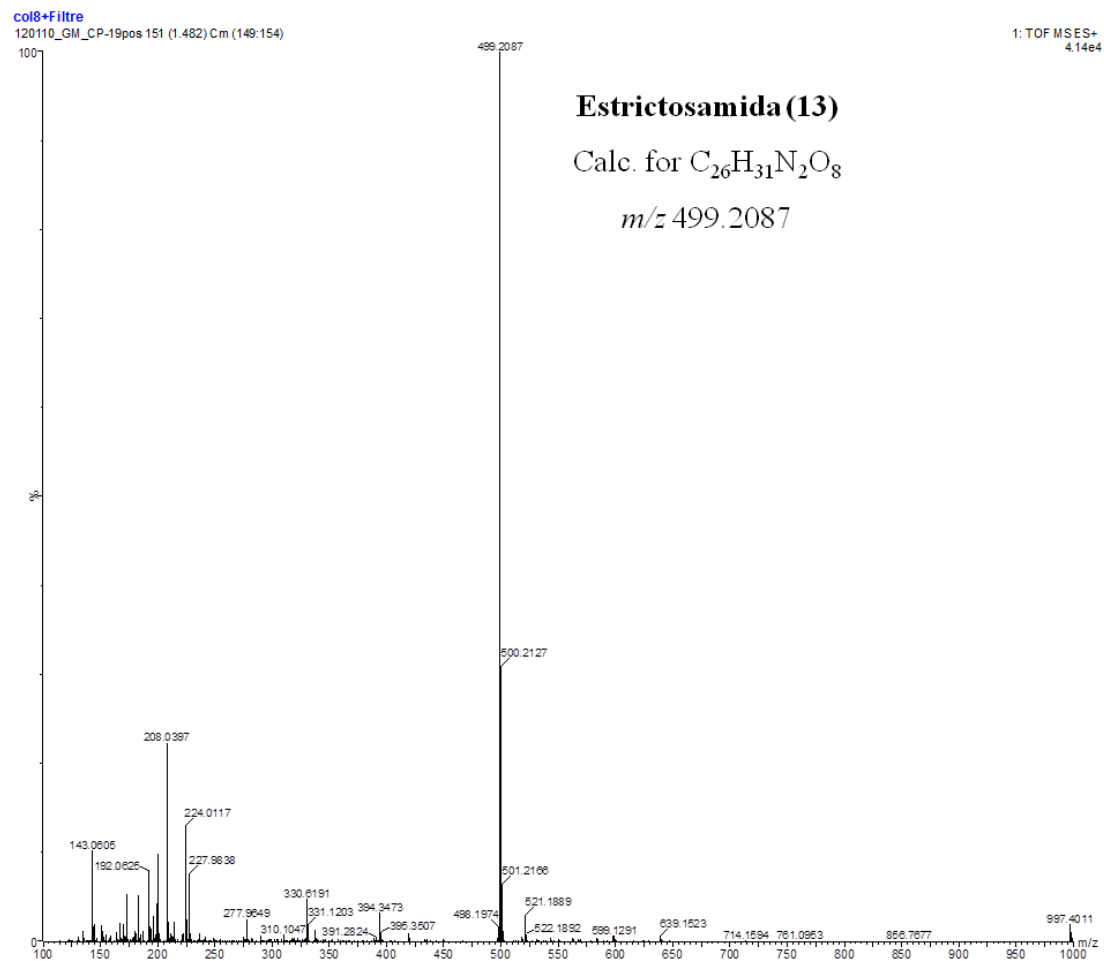


Figura A2.6. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA estrictosamida (UHPLC/HR-TOF-MS).

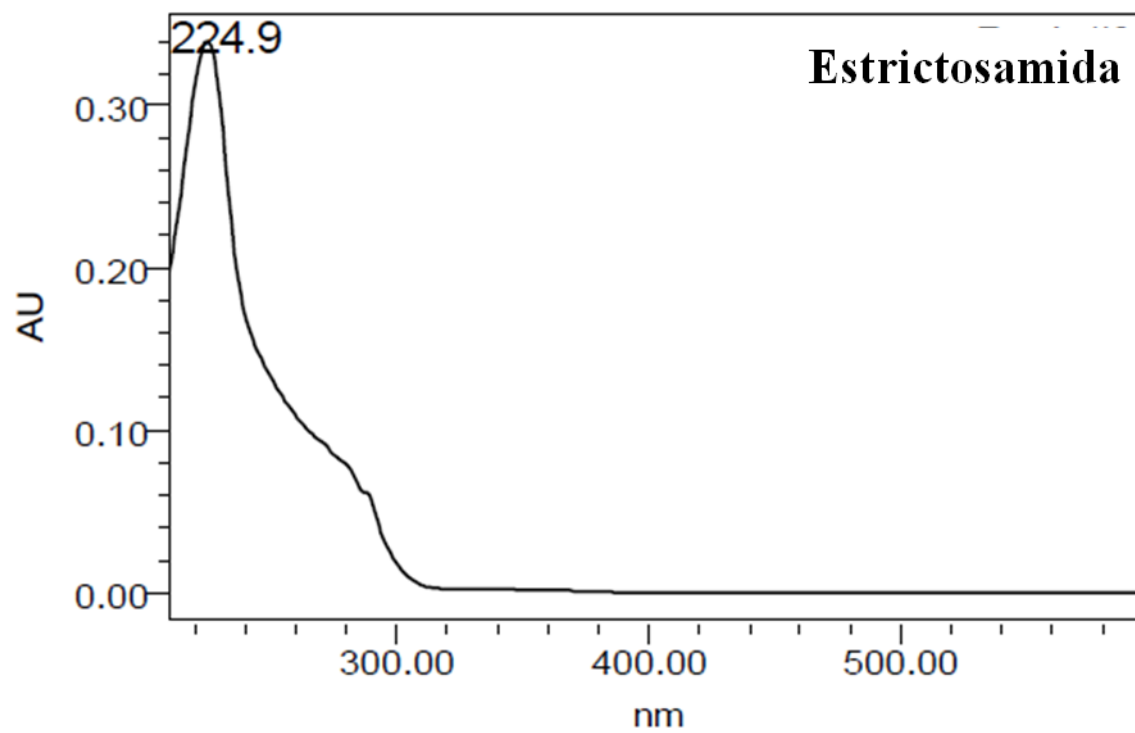


Figura A2.7. Espectro de UV do MIA estricteosamida (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 3

Dados espectroscópicos do alcaloide lialosídeo (20)

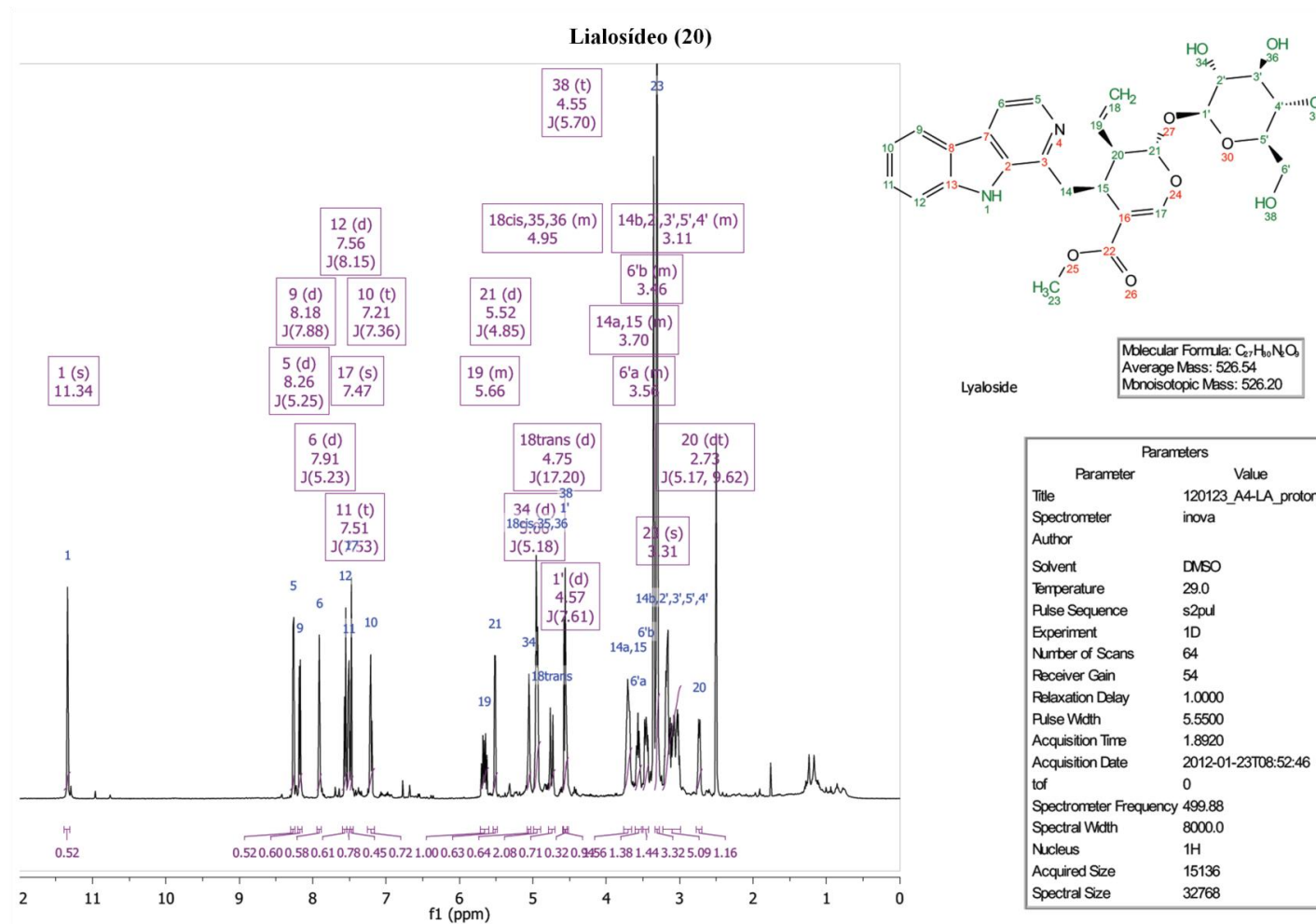


Figura A3.1. Espectro de RMN de ¹H do MIA lialosídeo (DMSO-d₆; 500 MHz).

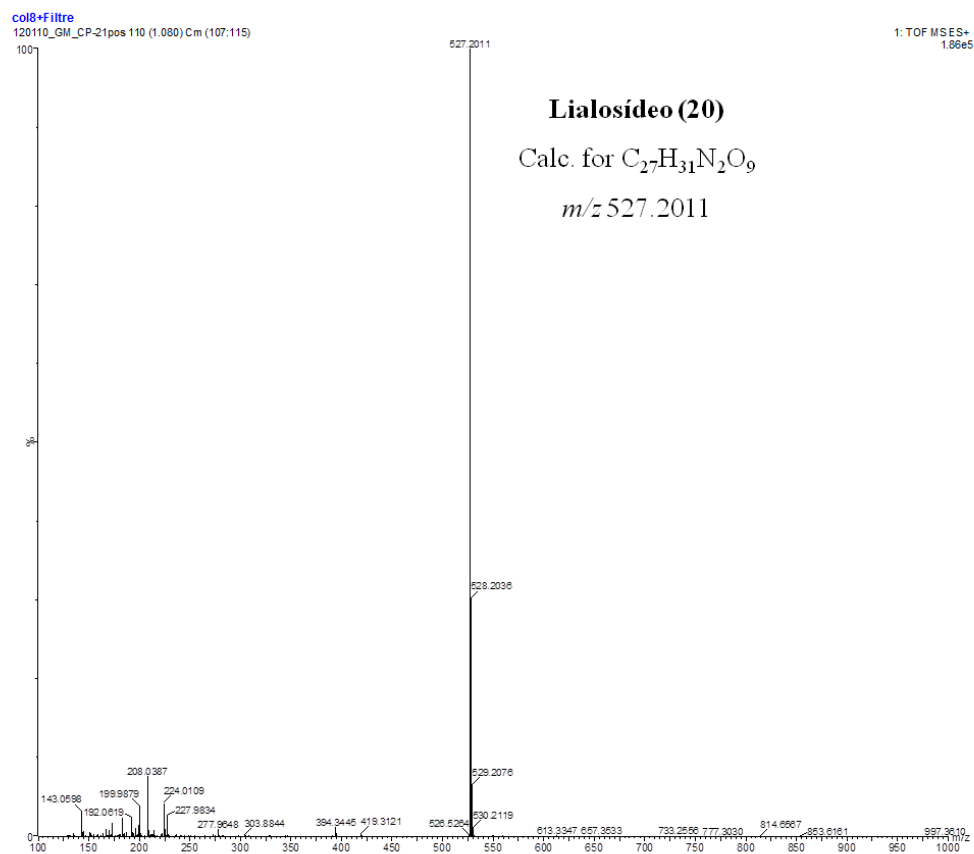


Figura A3.2. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA lialosídeo (UHPLC/HR-TOF-MS).

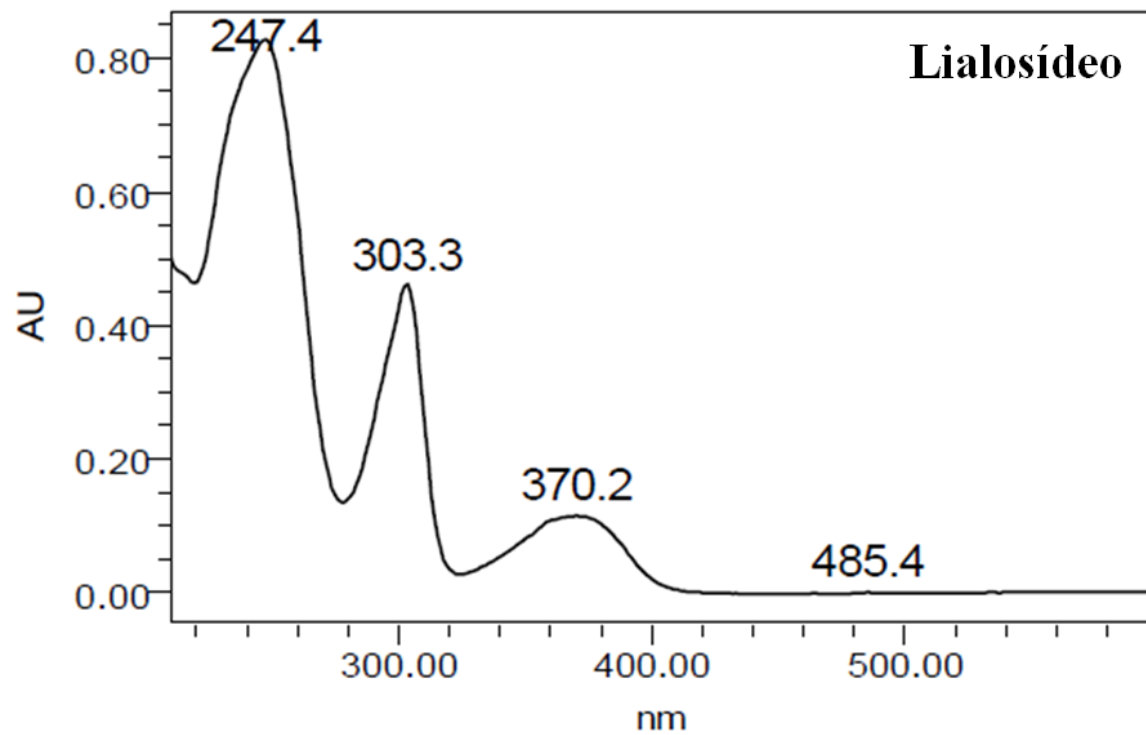


Figura A3.3. Espectro de UV do MIA lialosídeo (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 4

Dados espectroscópicos do alcaloide angustina (22)

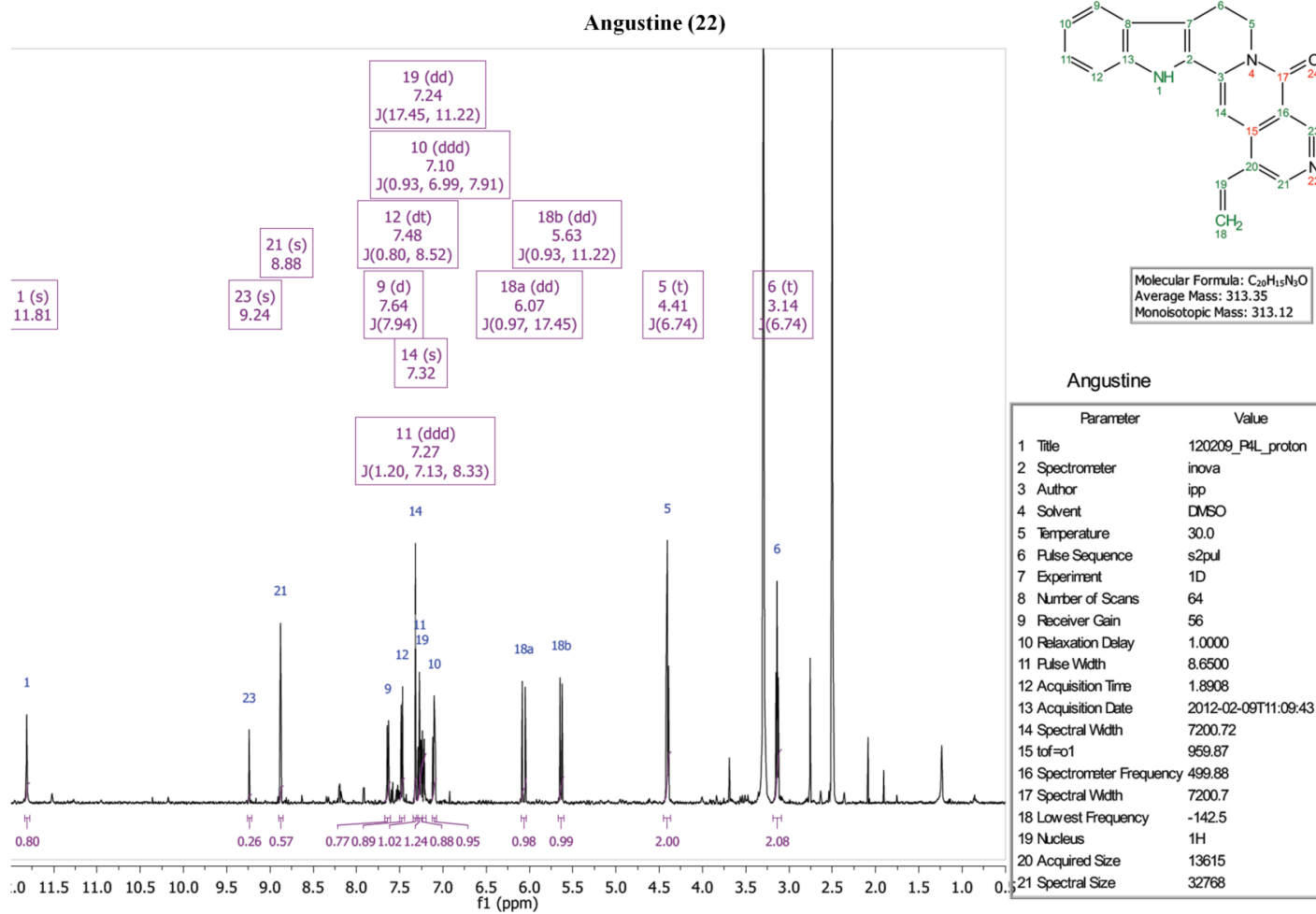


Figura A4.1. Espectro de RMN de ¹H do MIA angustina (DMSO-d₆; 500 MHz).

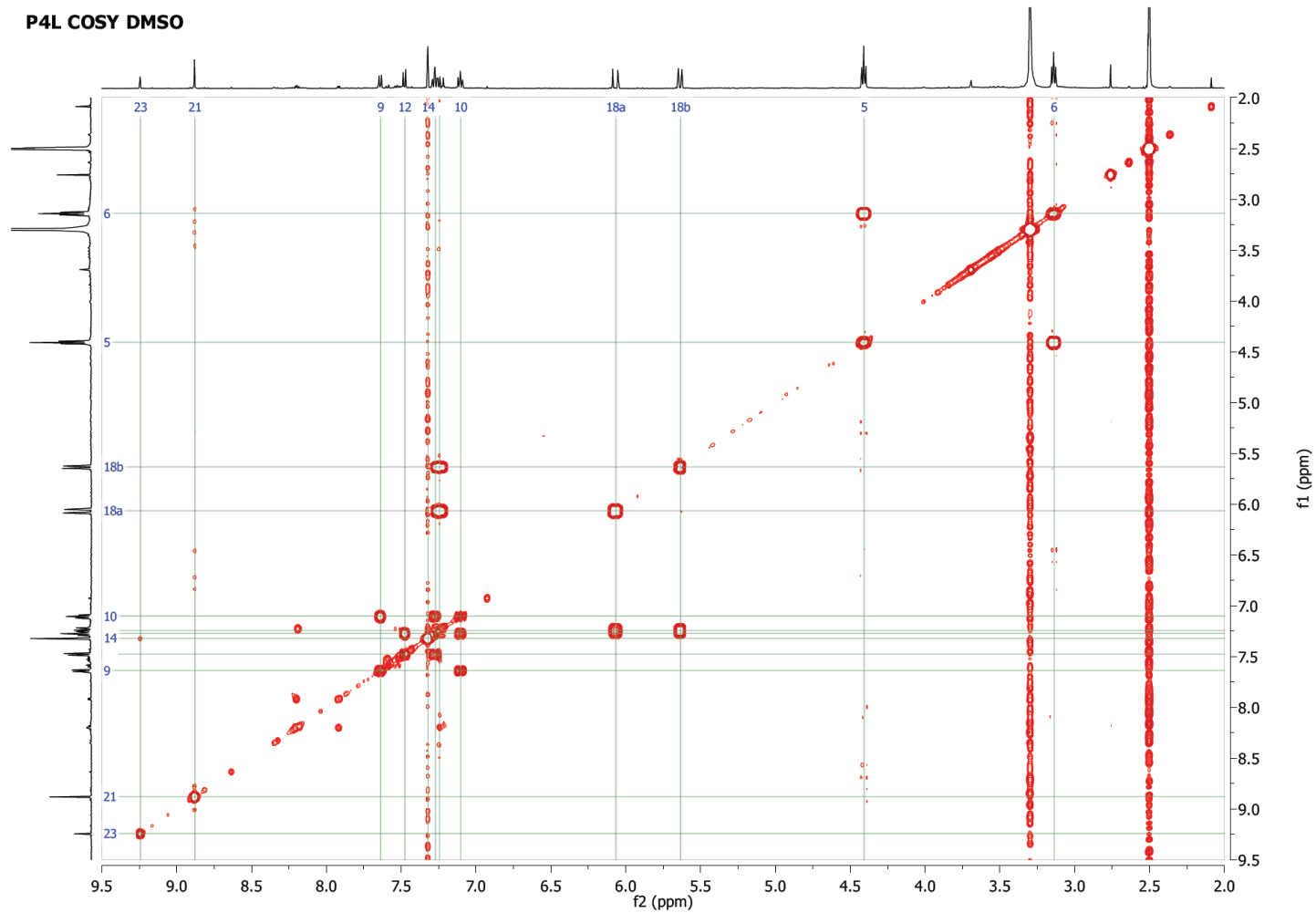


Figura A4.2. Espectro de ^1H - ^1H COSY do MIA angustina (DMSO- d_6 ; 500 MHz).

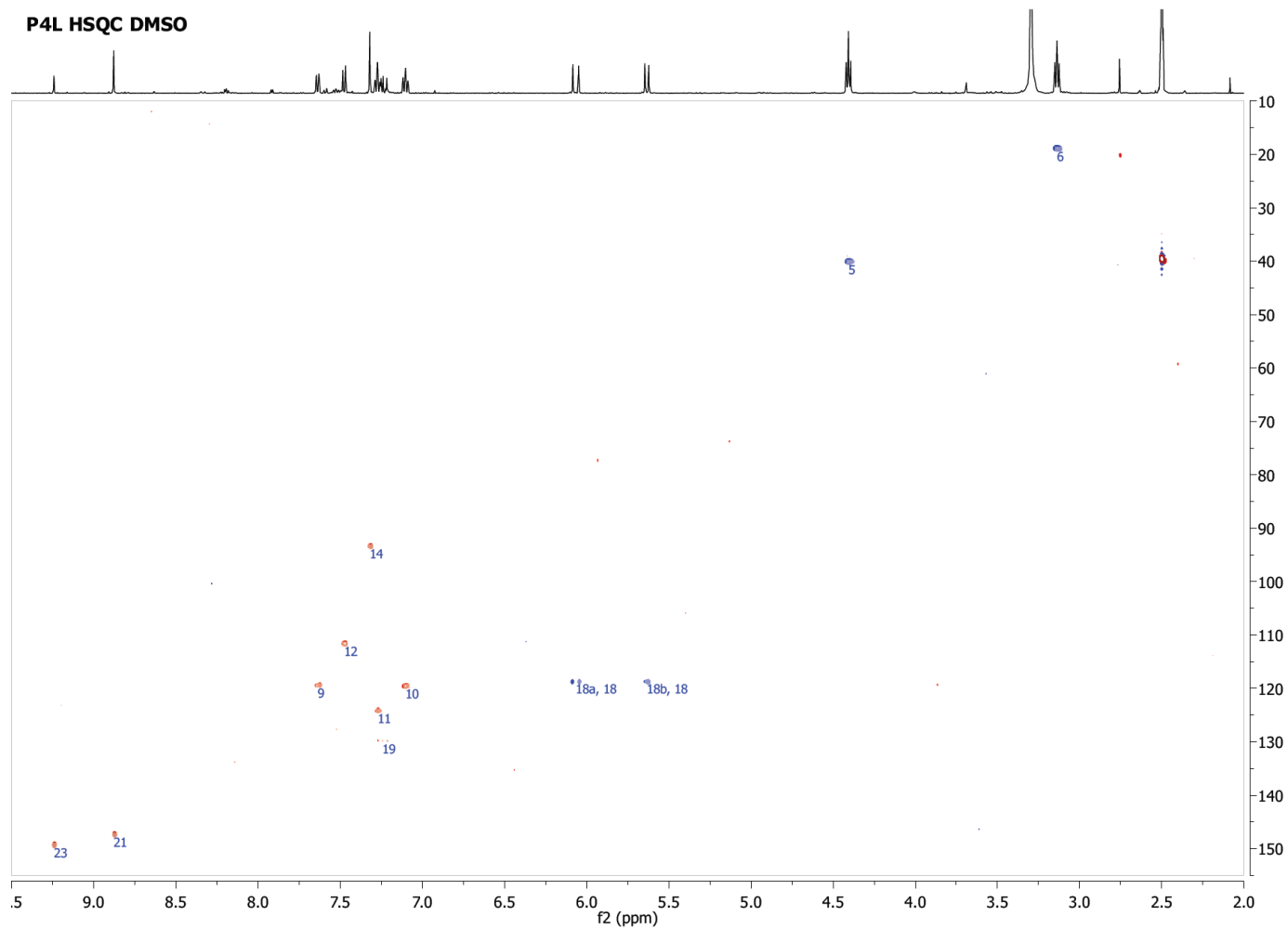


Figura A4.3. Espectro de HSQC do MIA angustina (DMSO-d₆; 500 MHz).

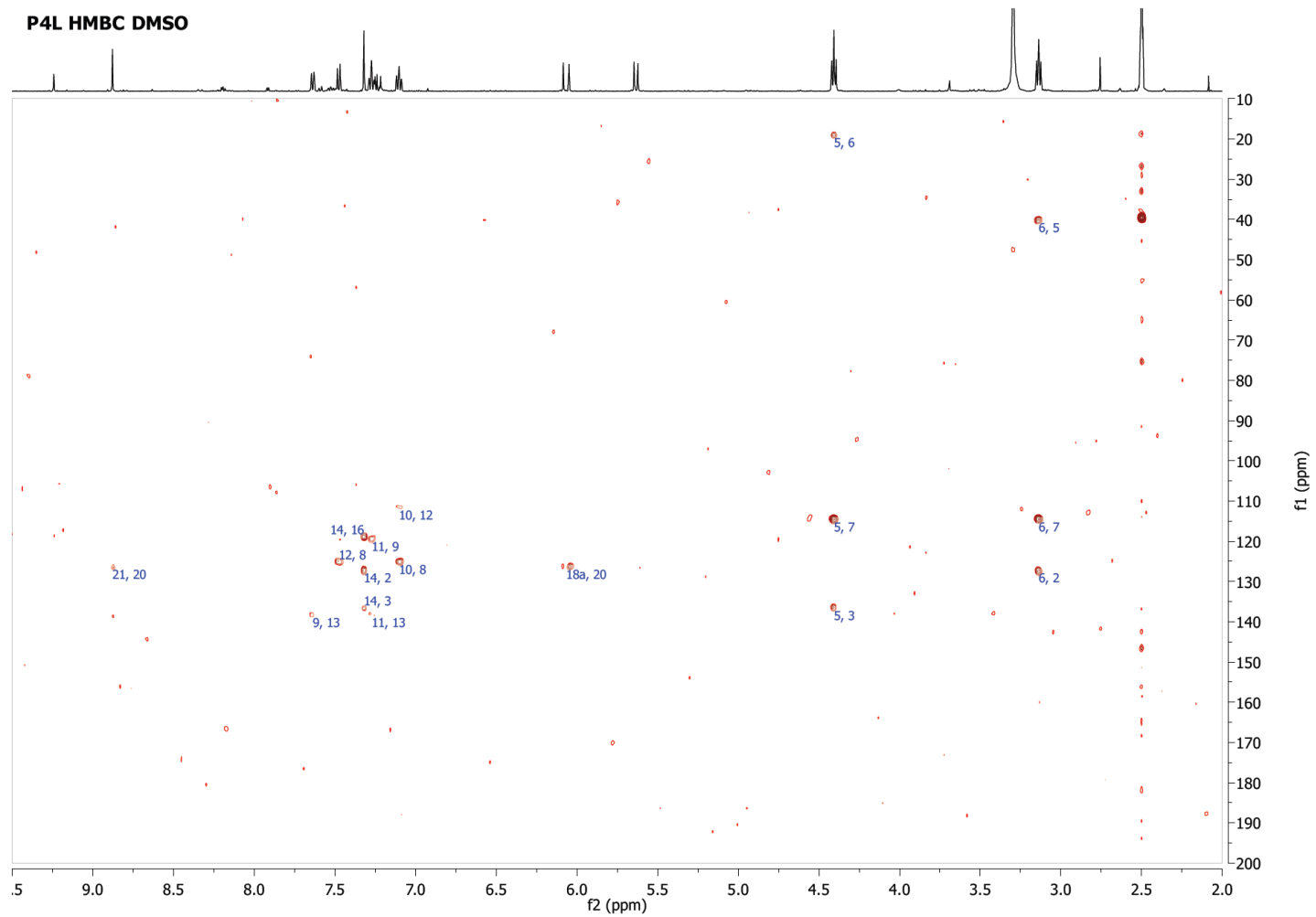


Figura A4.4. Espectro de HMBC do MIA angustina (DMSO-d₆; 500 MHz).

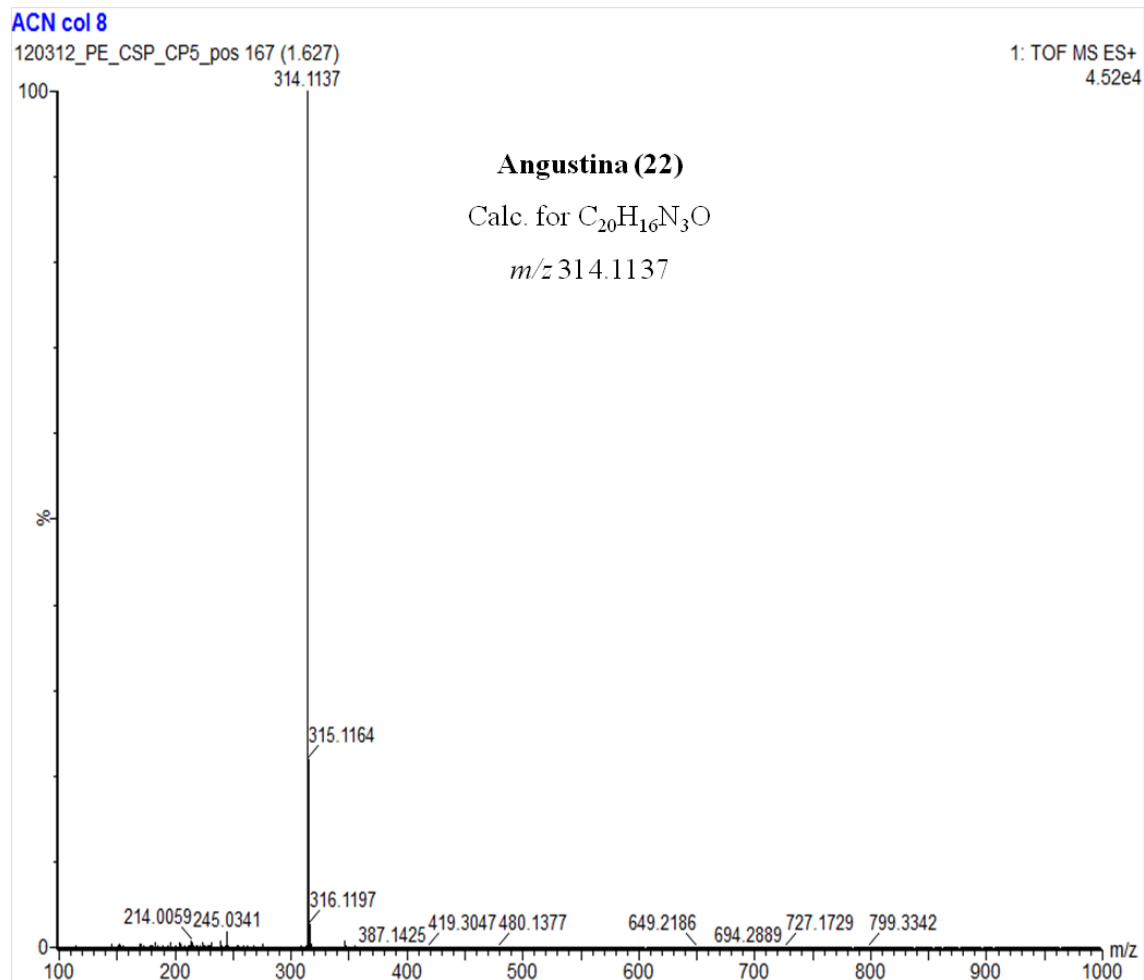


Figura A4.5. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA angustina (UHPLC/HR-TOF-MS).

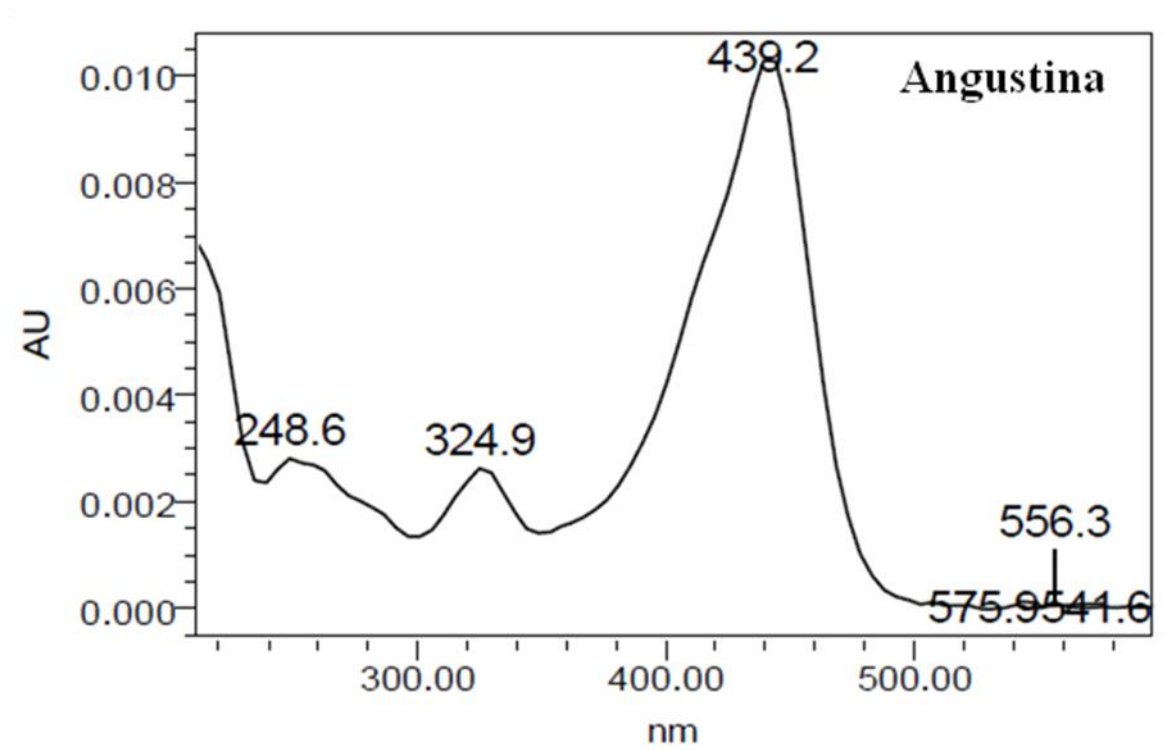


Figura A4.6. Espectro de UV do MIA angustina (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 5

Dados espectroscópicos do alcaloide *E*-valesiacotamina (23)

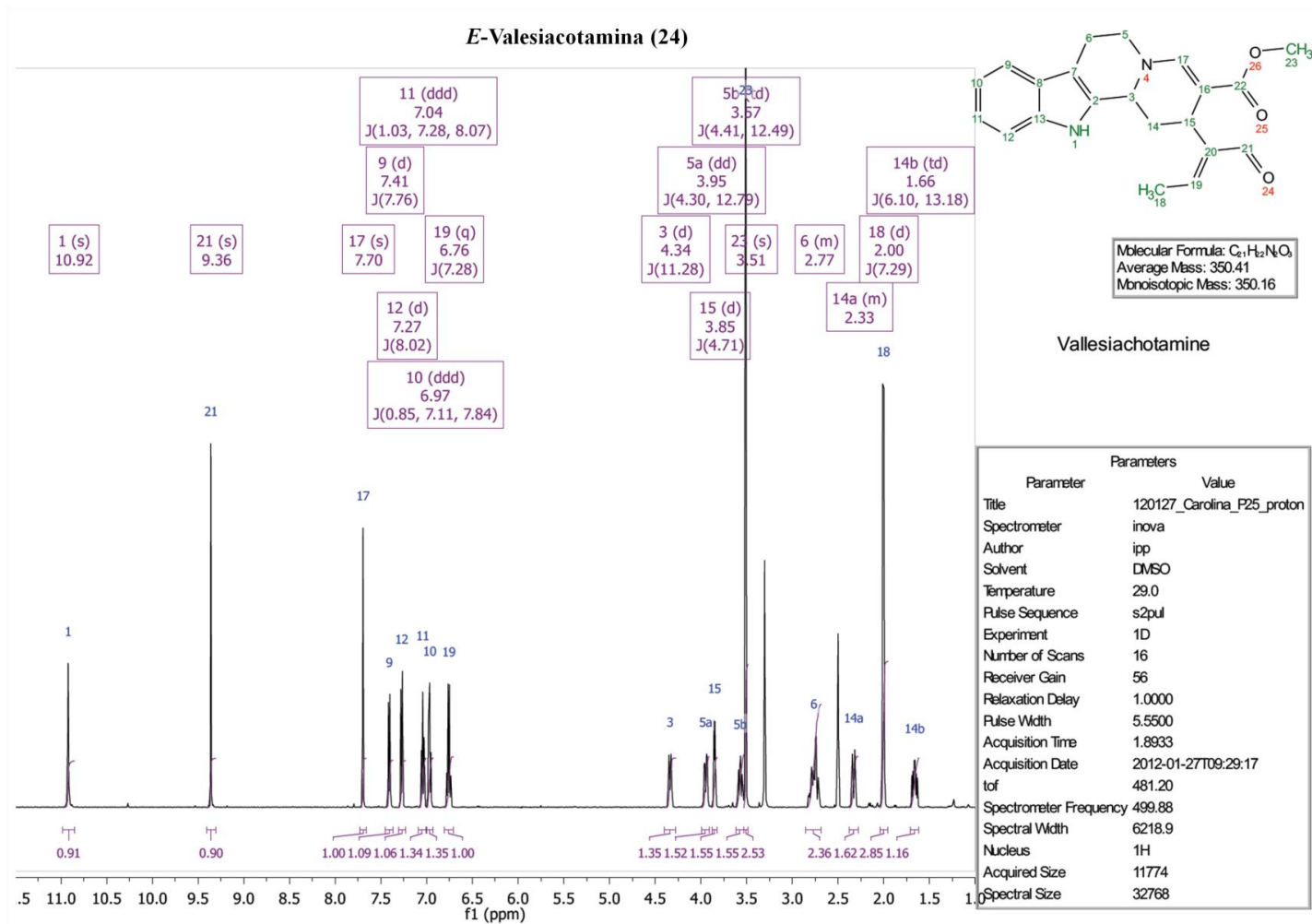


Figura A5.1. Espectro de RMN de ¹H do MIA *E*-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

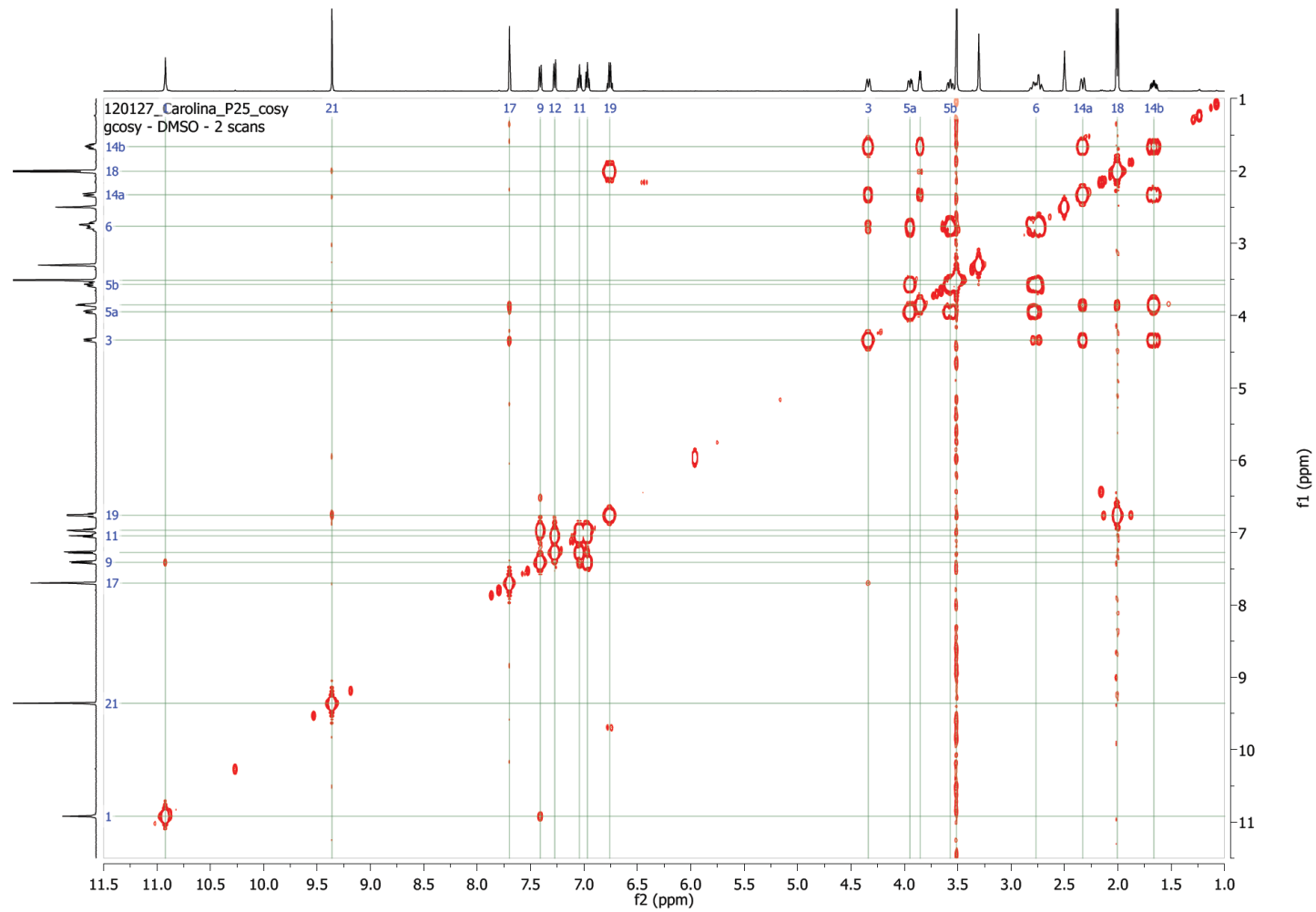


Figura A5.2. Espectro de ^1H - ^1H COSY do MIA E-valesiacotamina (DMSO- d_6 ; 500 MHz).

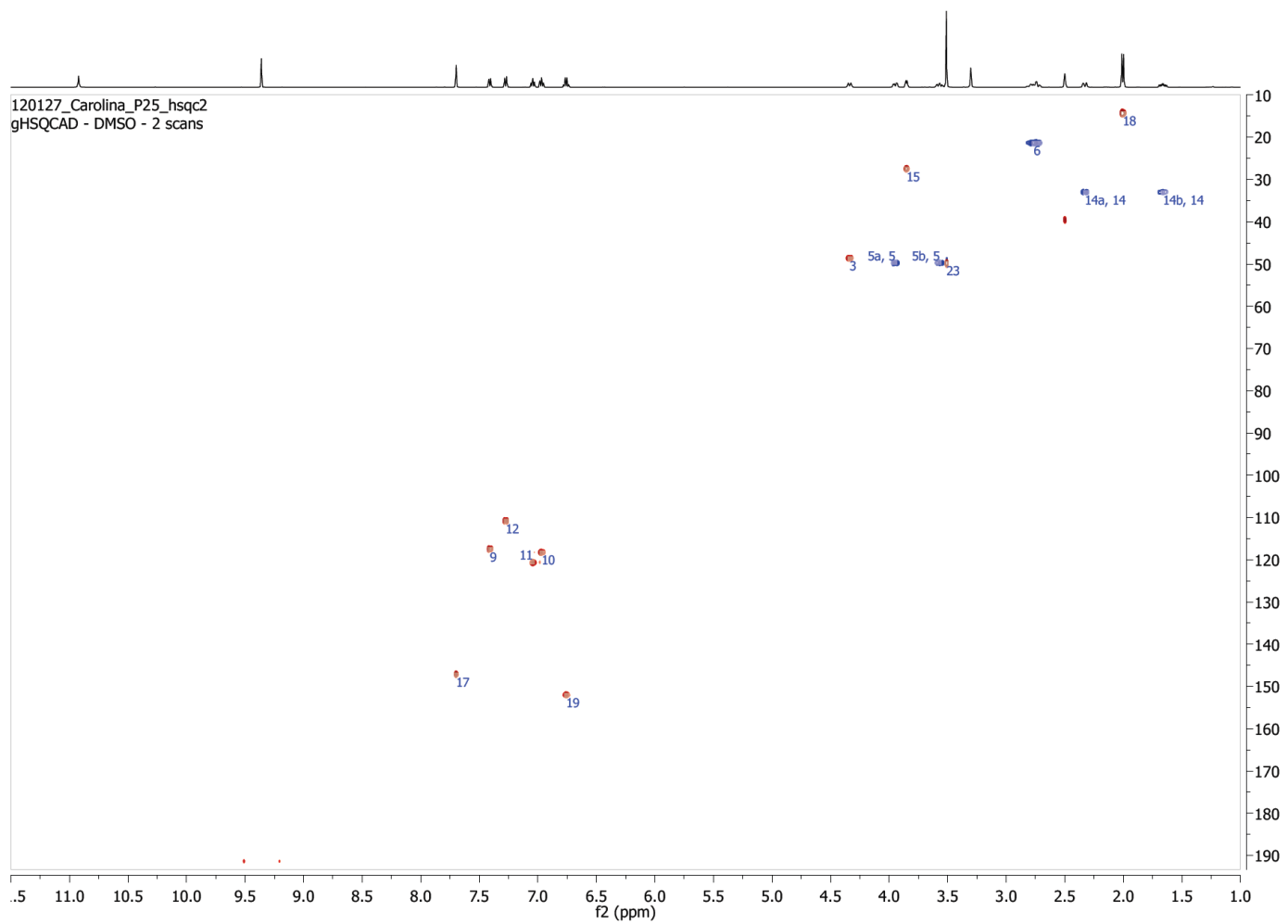


Figura A5.3. Espectro de HSQC do MIA E-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

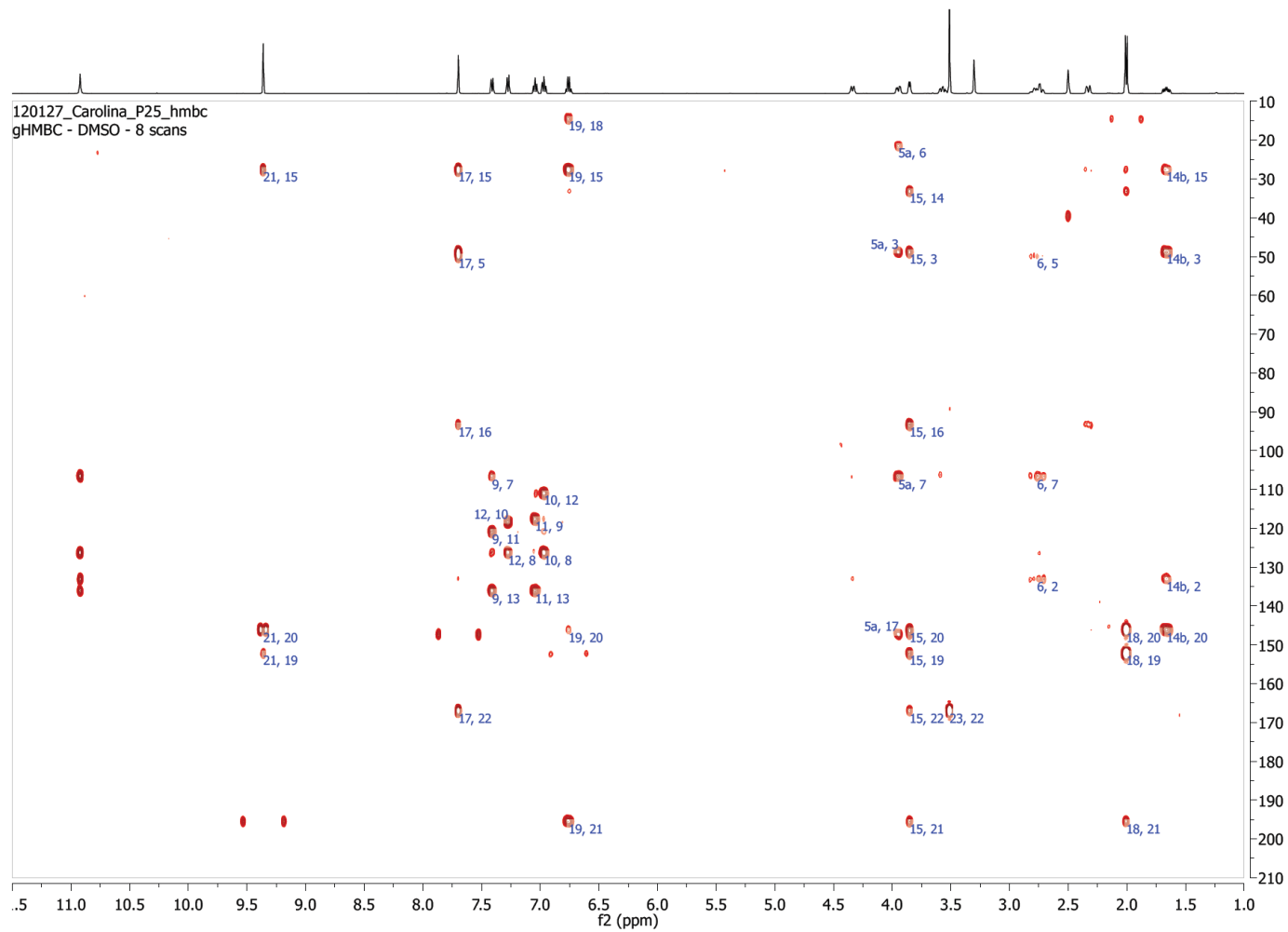


Figura A5.4. Espectro de HMBC do MIA E-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

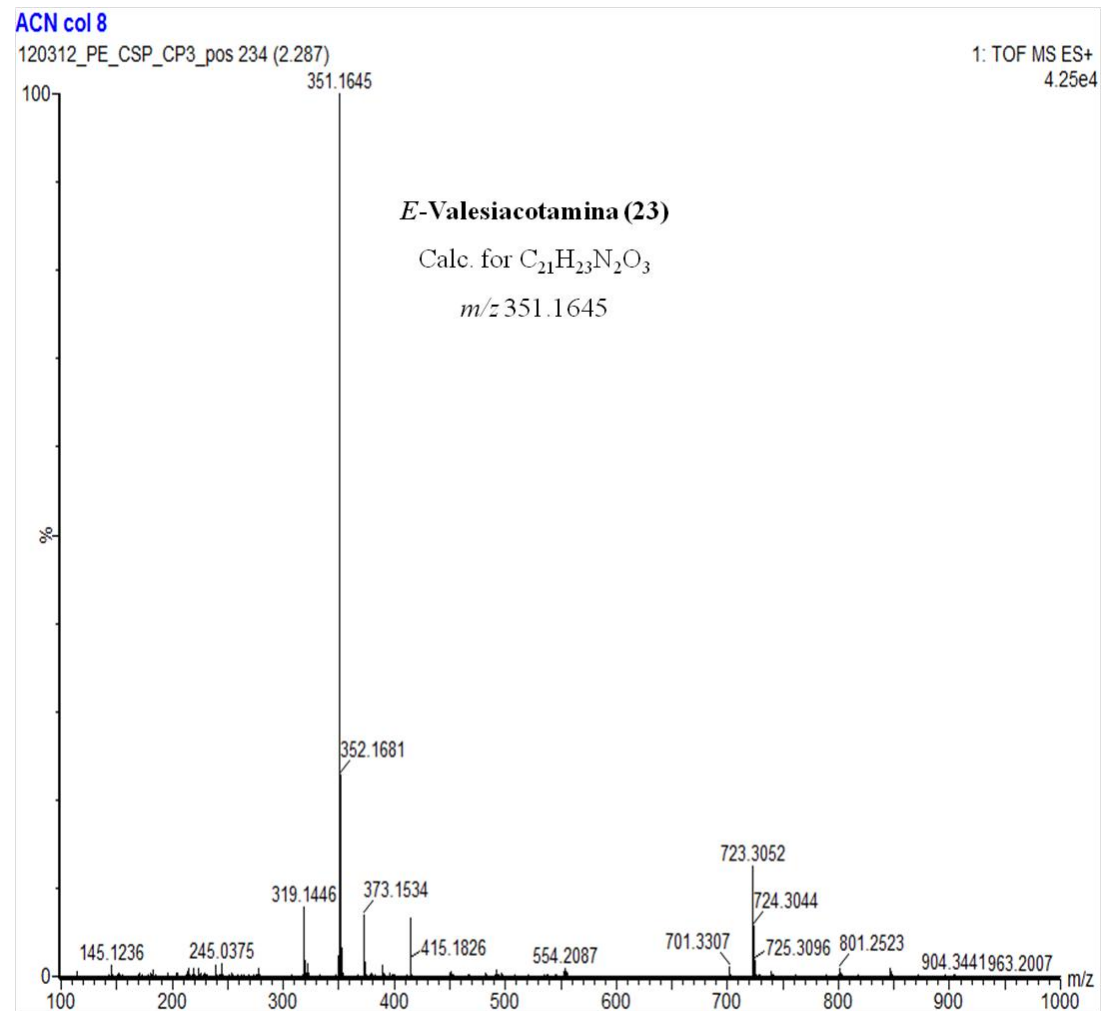


Figura A5.5. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA *E*-valesiacotamina (UHPLC/HR-TOF-MS).

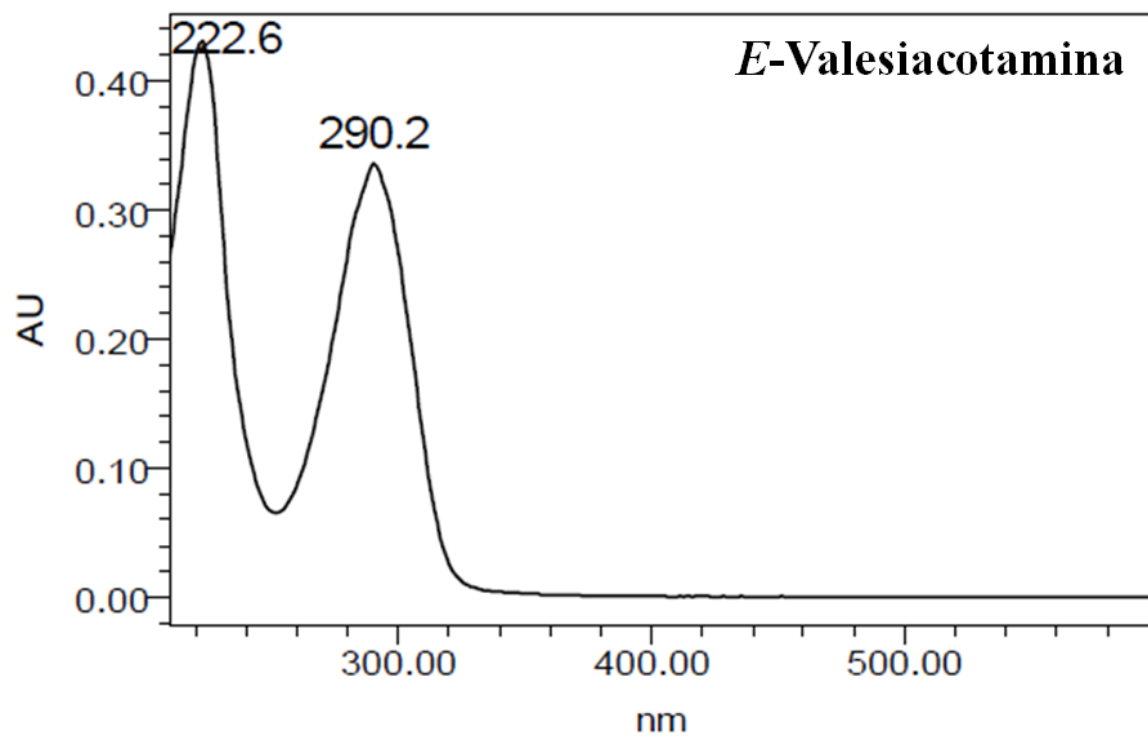


Figura A5.6. Espectro de UV do MIA E-valesiacotamina (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 6

Dados espectroscópicos do alcaloide Z-valesiacotamina (24)

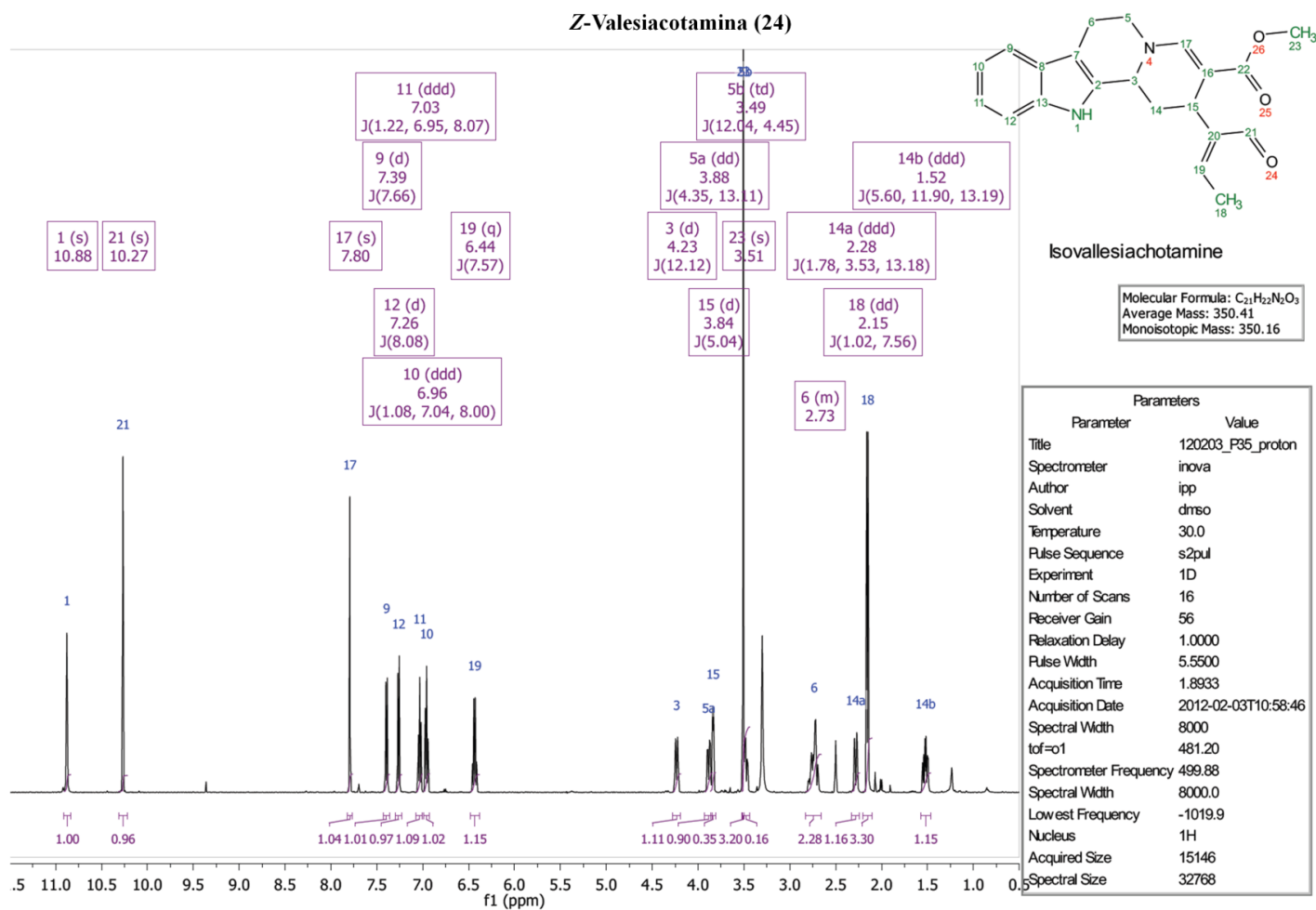


Figura A6.1. Espectro de RMN de ¹H do MIA Z-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

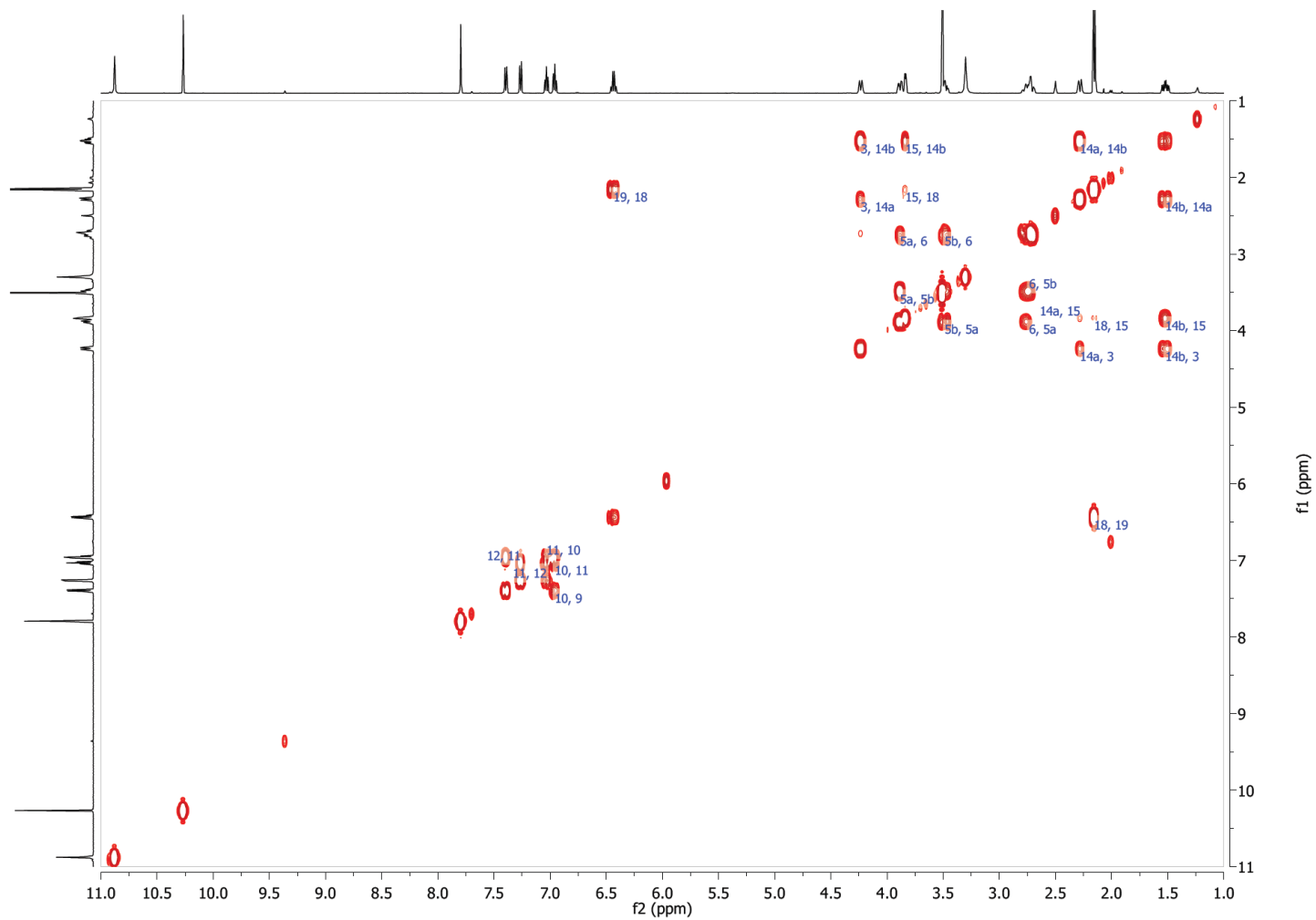


Figura A6.2. Espectro de ^1H - ^1H COSY do MIA Z-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

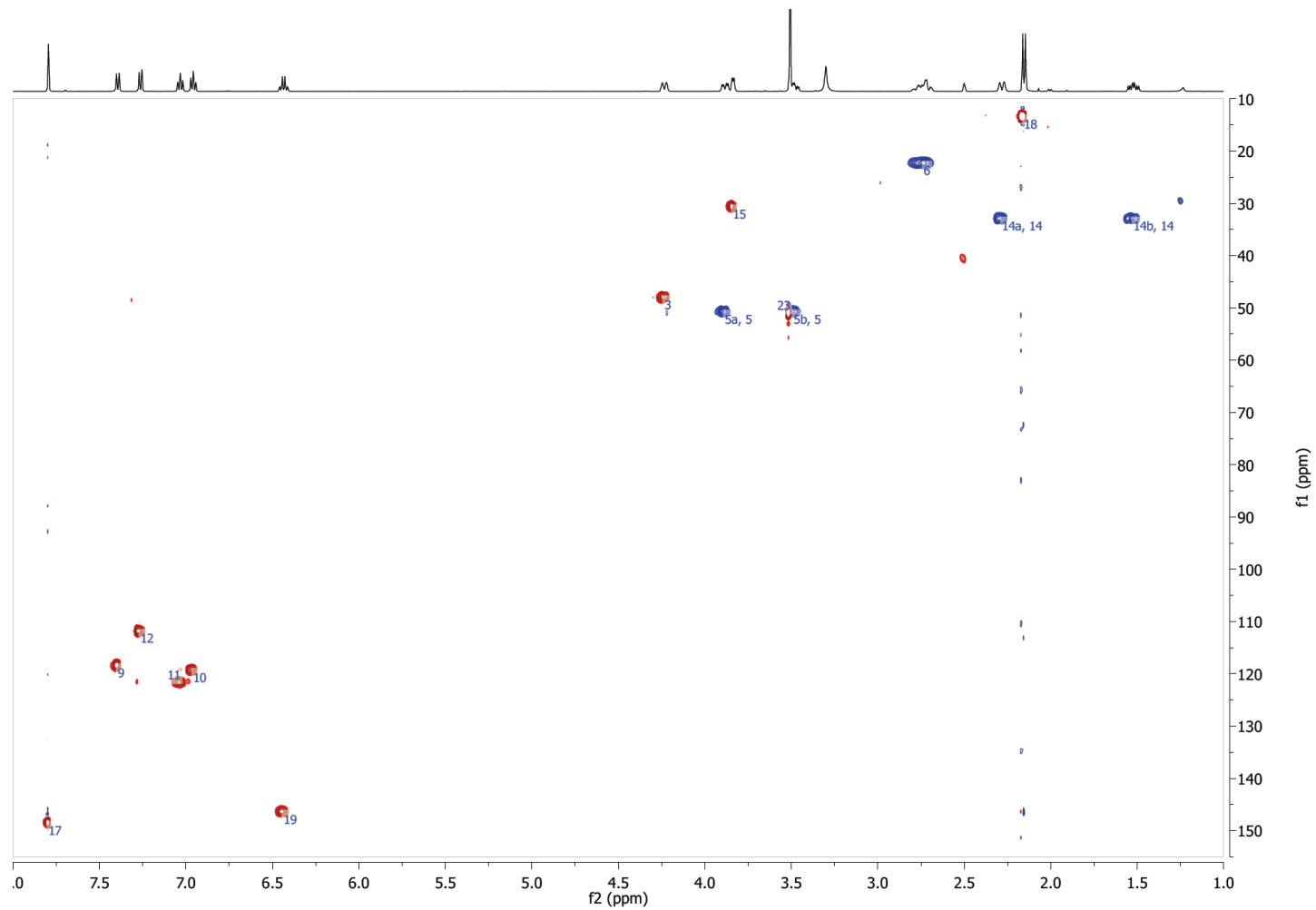


Figura A6.3. Espectro de HSQC do MIA Z-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

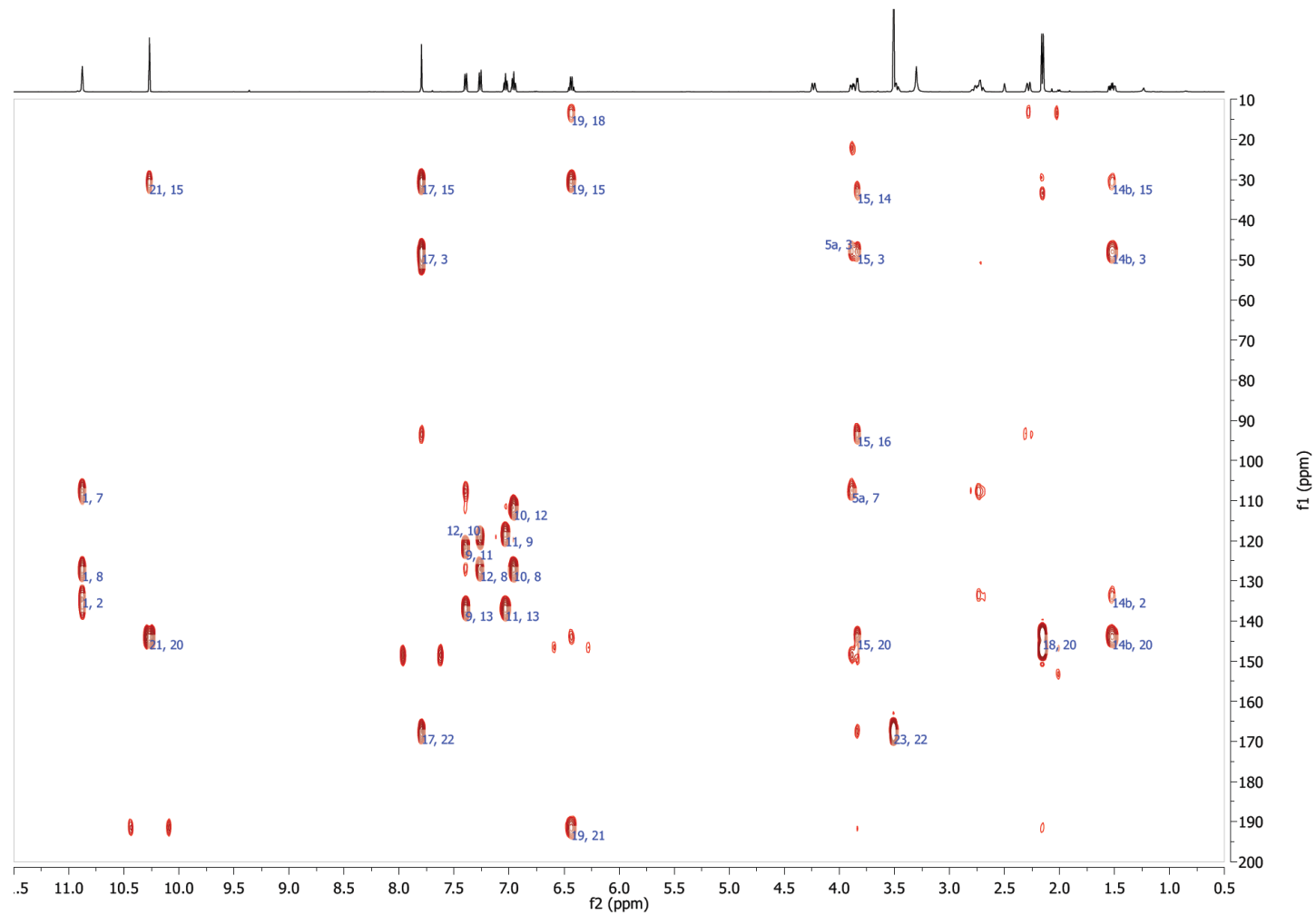


Figura A6.4. Espectro de HMBC do MIA Z-valesiacotamina (DMSO-d₆; 500 MHz).

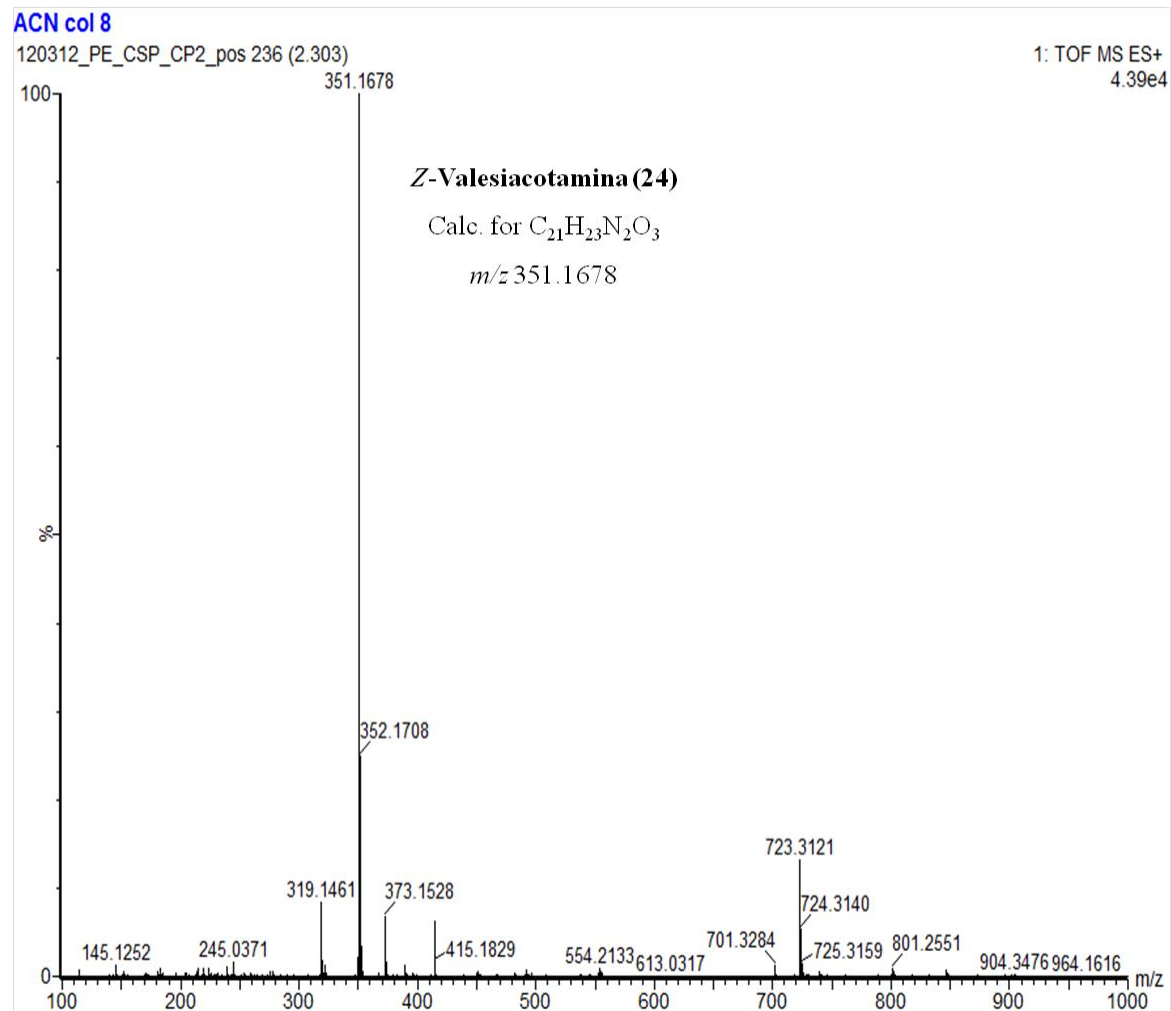


Figura A6.5. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA Z-valesiacotamina (UHPLC/HR-TOF-MS).

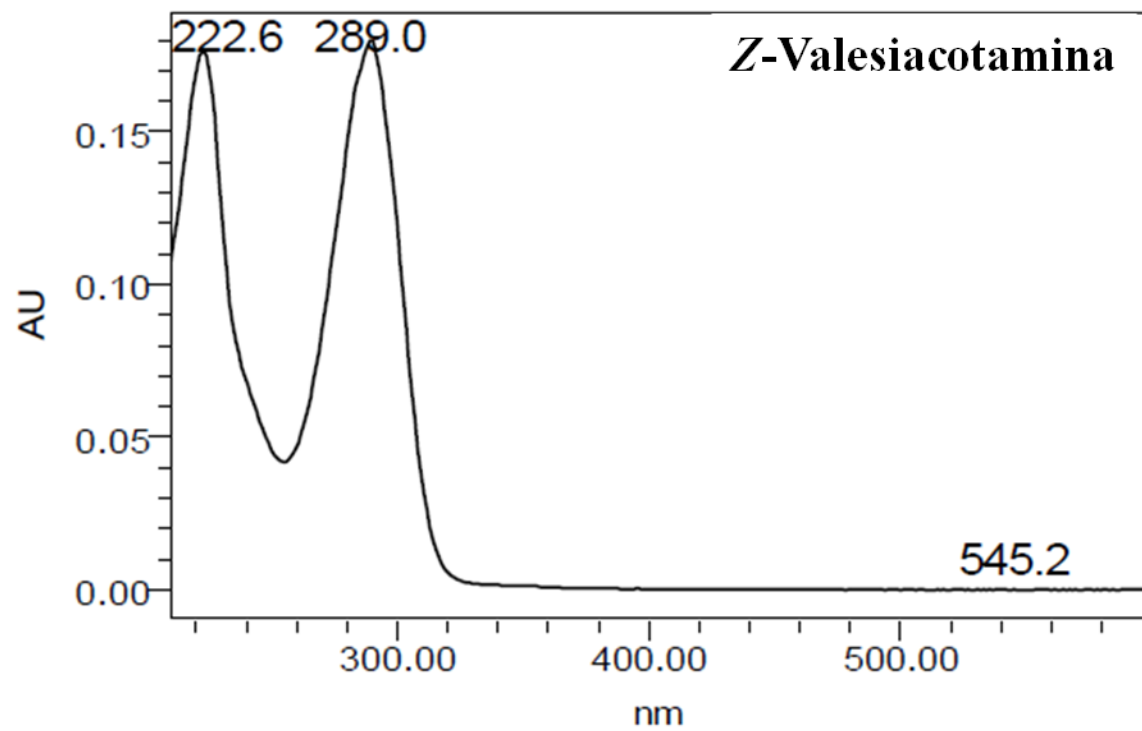


Figura A6.6. Espectro de UV do MIA Z-valesiacotamina (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 7

Dados espectroscópicos do alcaloide valesiacotamina lactona (25)

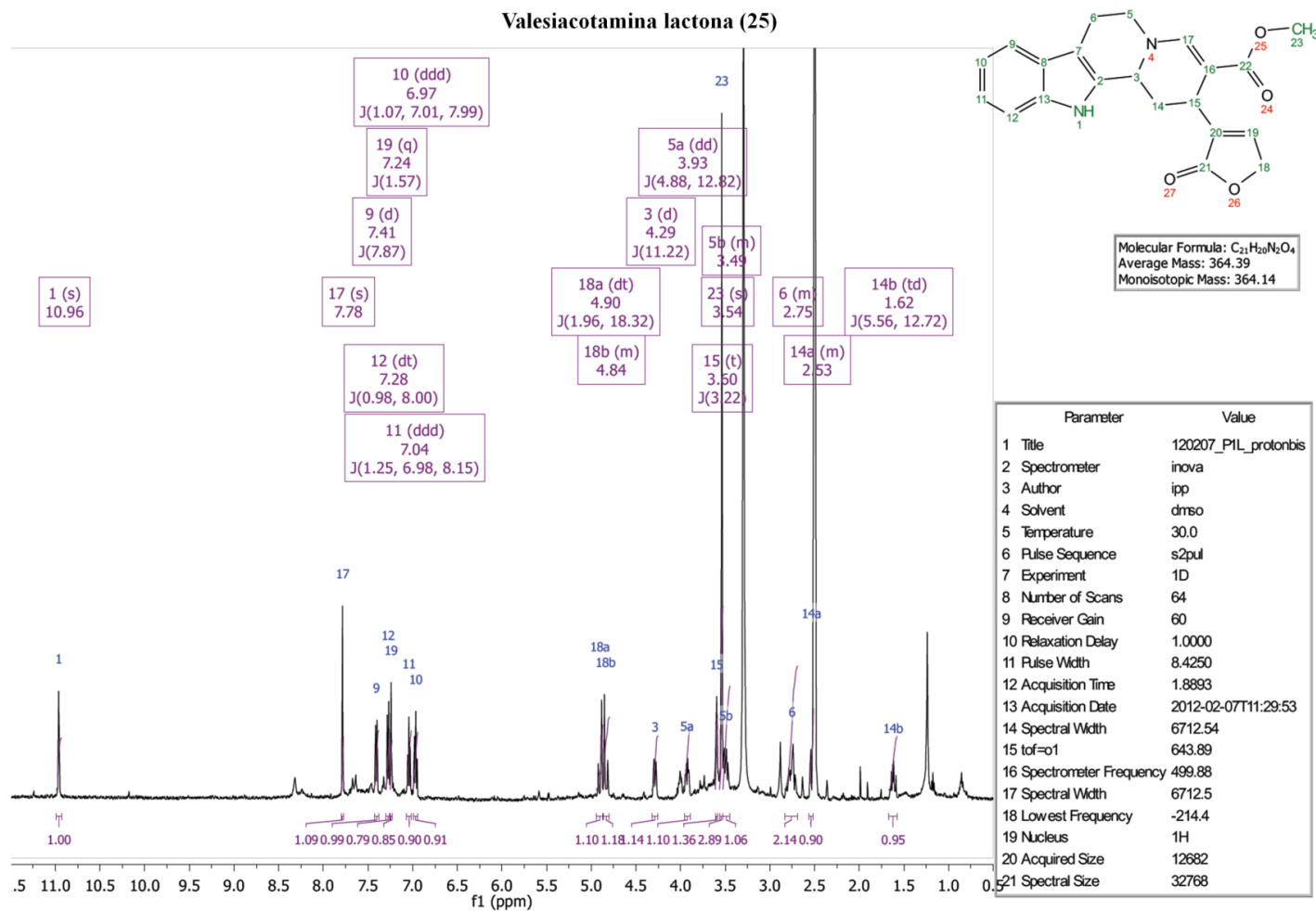


Figura A7.1. Espectro de RMN de ¹H do MIA valesiacotamina lactona (DMSO-d₆; 500 MHz).

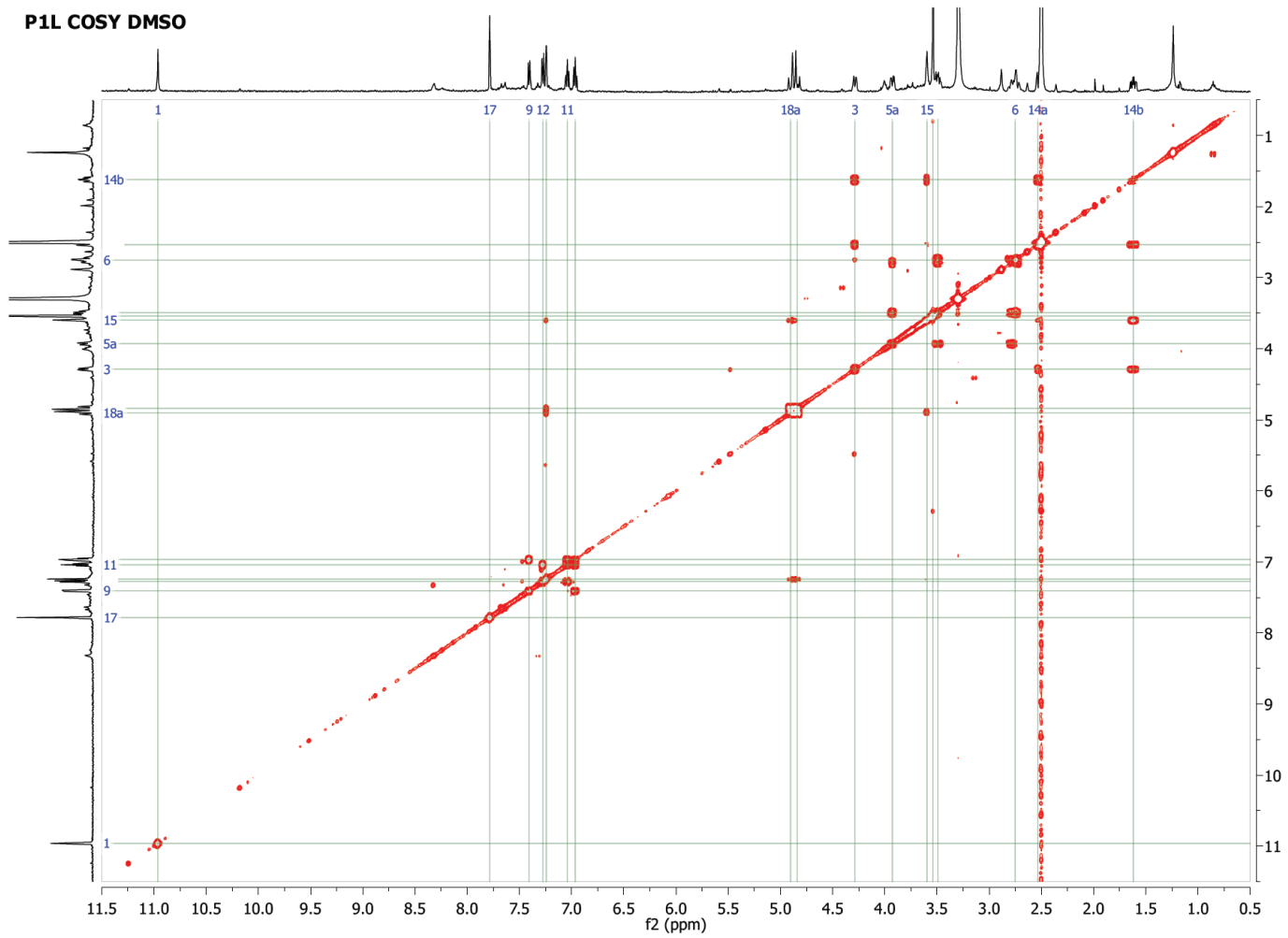


Figura A7.2. Espectro de ^1H - ^1H COSY do MIA valesiacotamina lactona (DMSO- d_6 ; 500 MHz).

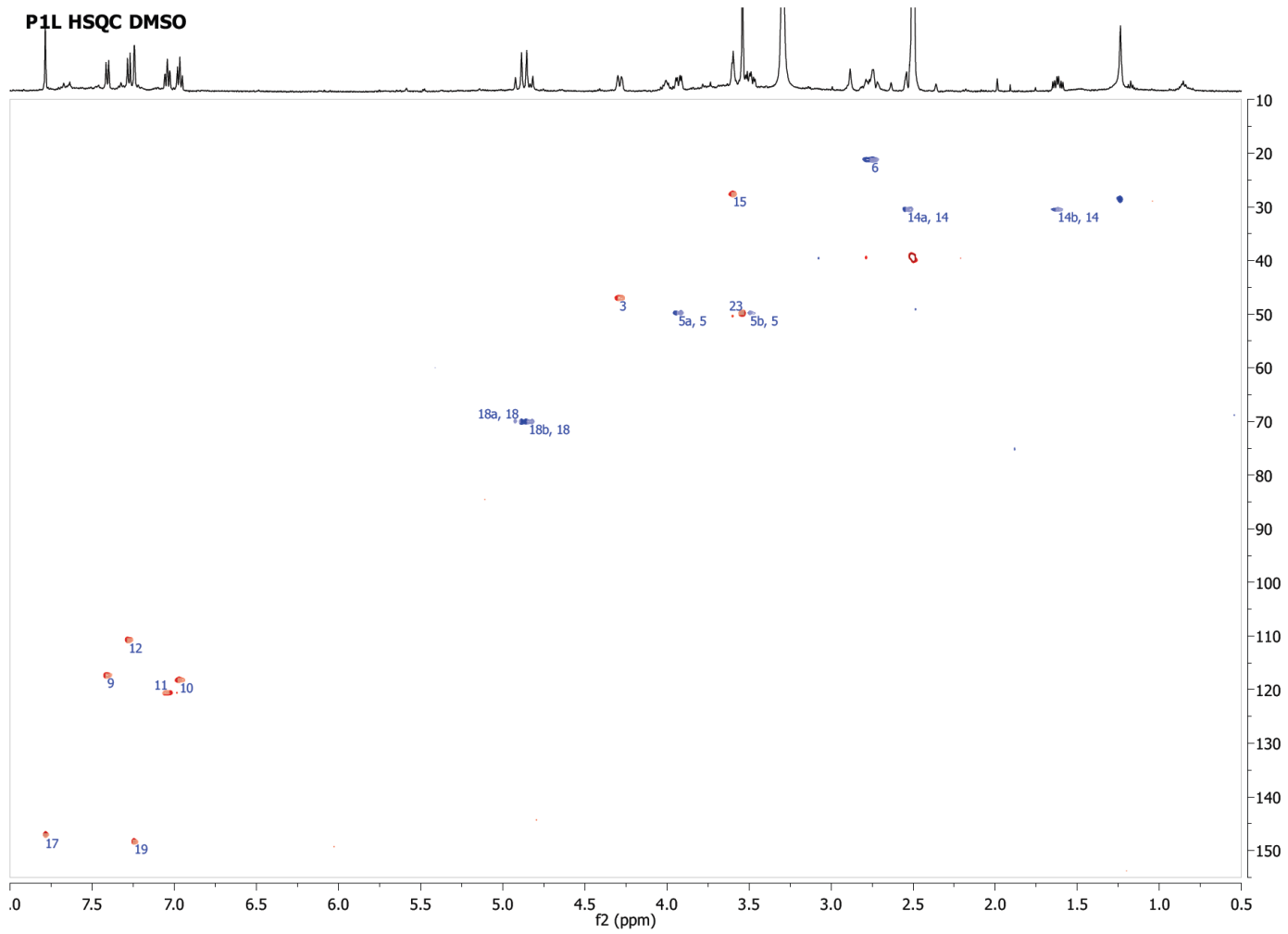


Figura A7.3. Espectro de HSQC do MIA valesiacotamina lactona (DMSO-d₆; 500 MHz).

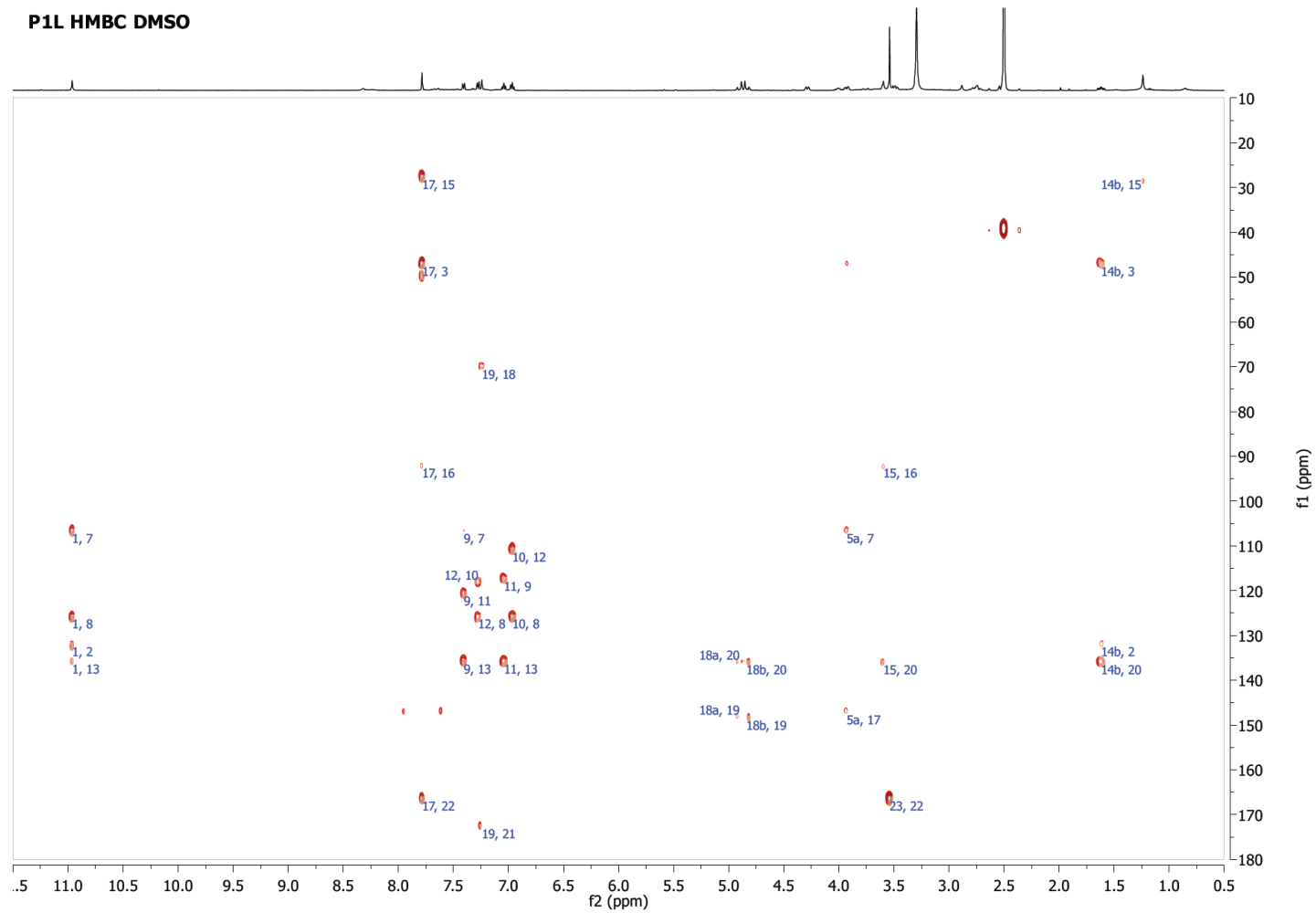


Figura A7.4. Espectro de HMBC do MIA valesiacotamina lactona (DMSO-d₆; 500 MHz).

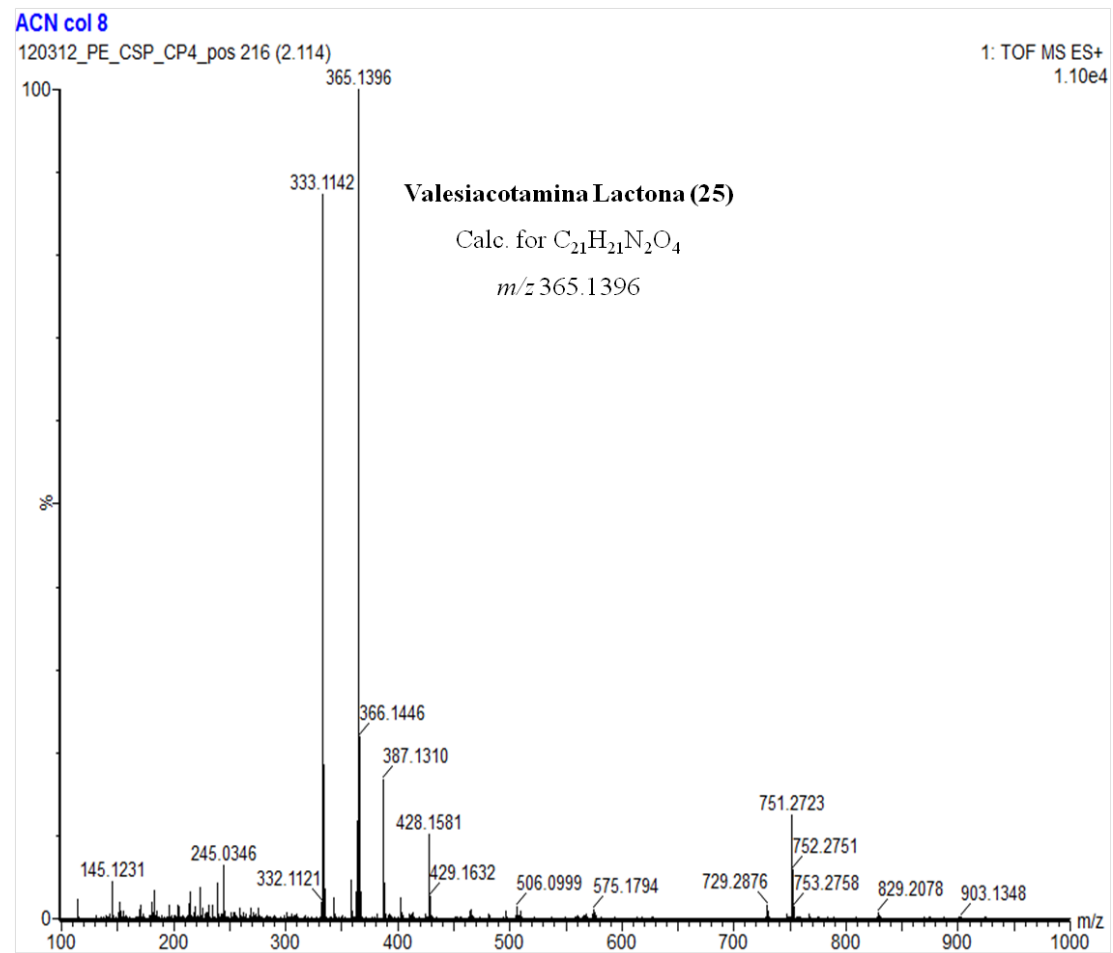


Figura A7.5. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA valesiacotamina lactona (UHPLC/HR-TOF-MS).

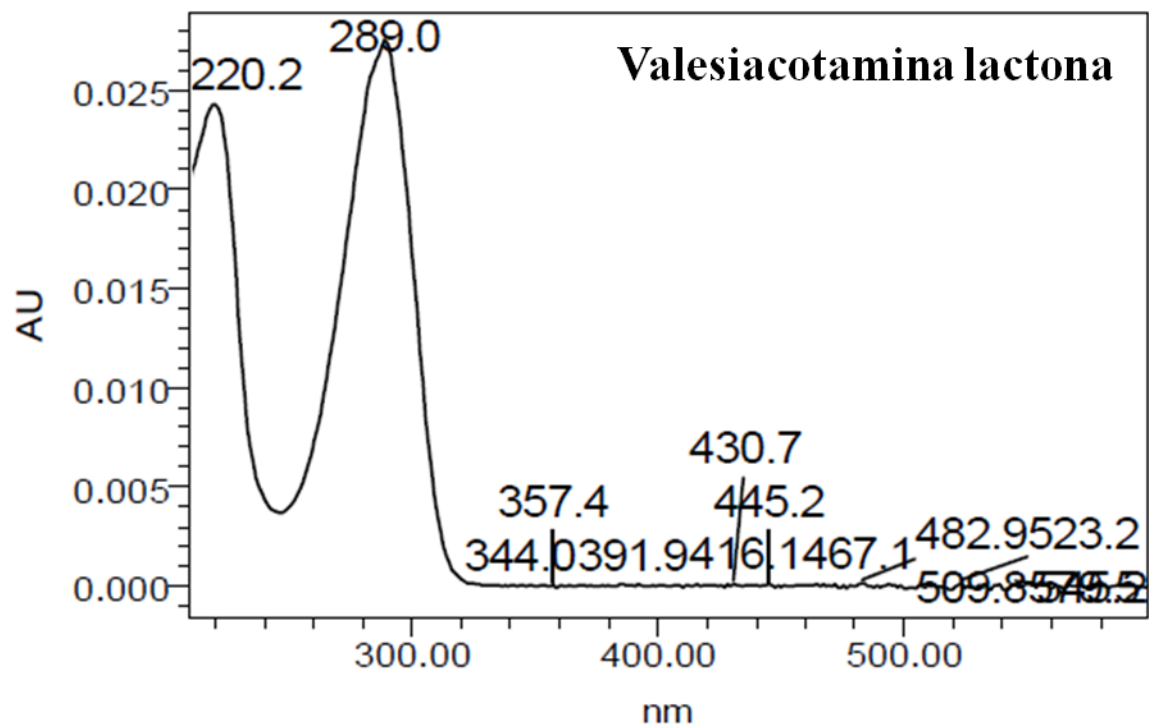


Figura A7.6. Espectro de UV do MIA valesiacotamina lactona (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 8

Dados espectroscópicos do alcaloide pauidiantosídeo (62)

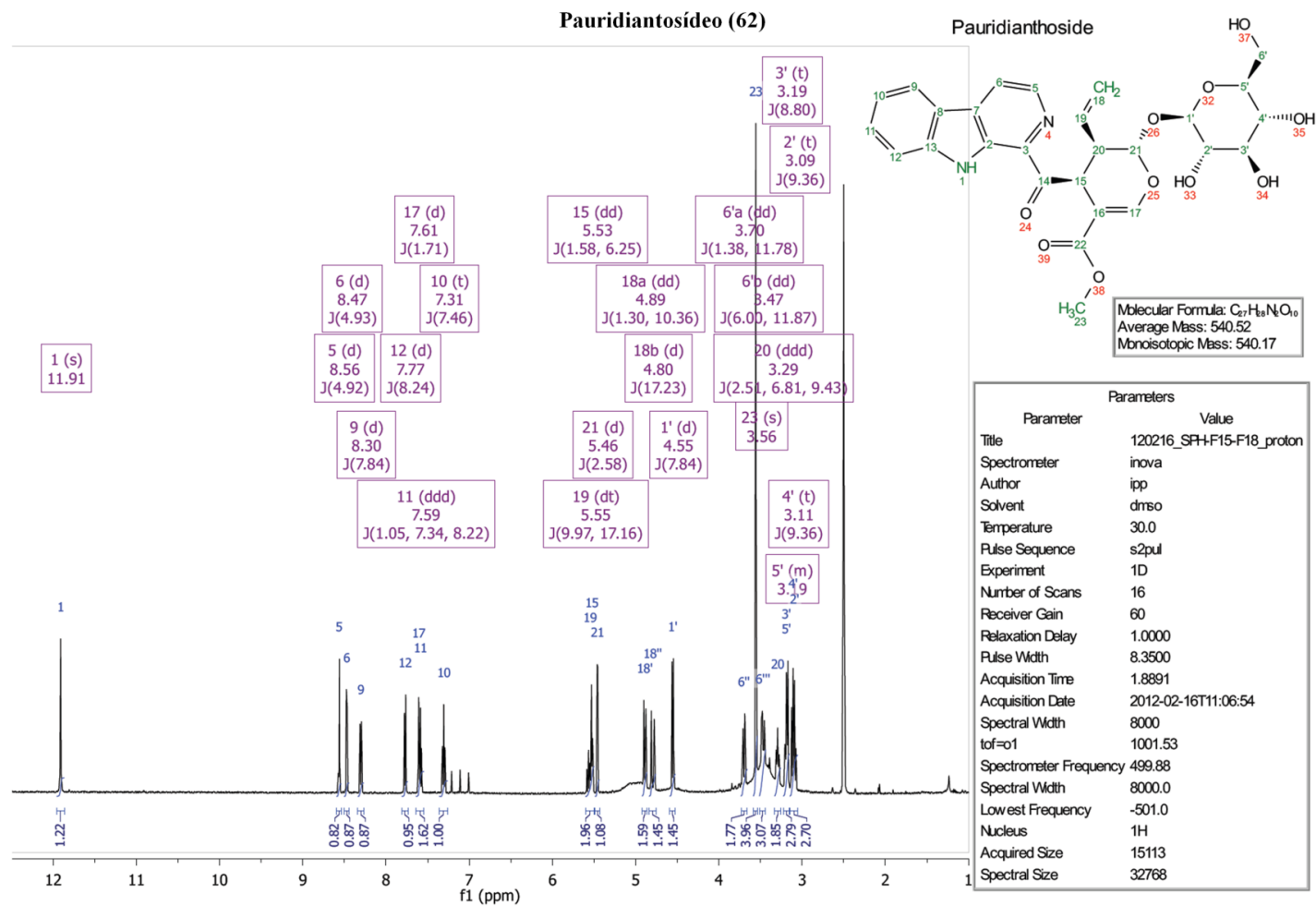


Figura A8.1. Espectro de RMN de ¹H do MIA pauridiantosídeo (DMSO-d₆; 500 MHz).

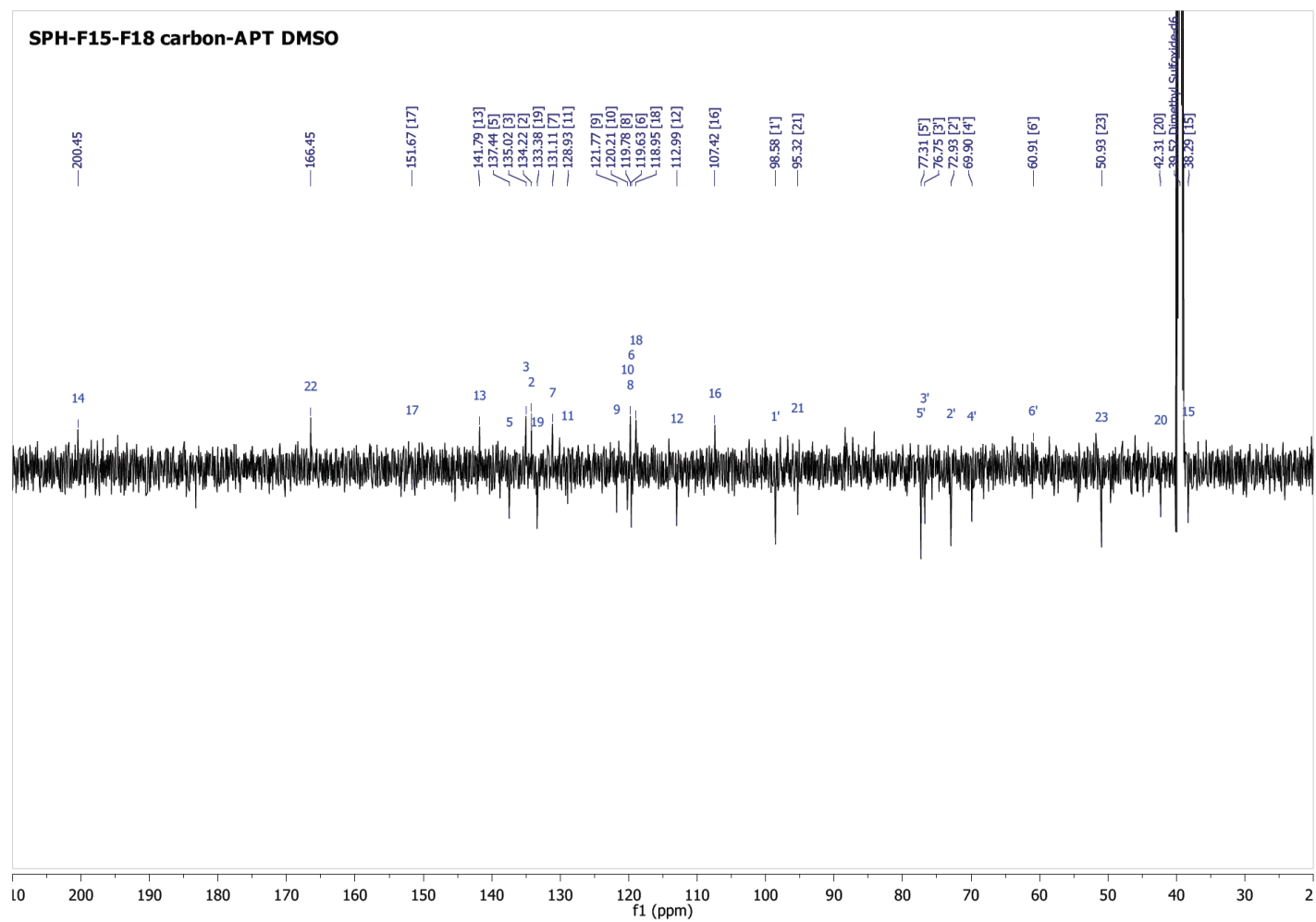


Figura A8.2. Espectro de RMN de ^{13}C -APT do MIA pauridiantosídeo (DMSO-d₆; 125 MHz).

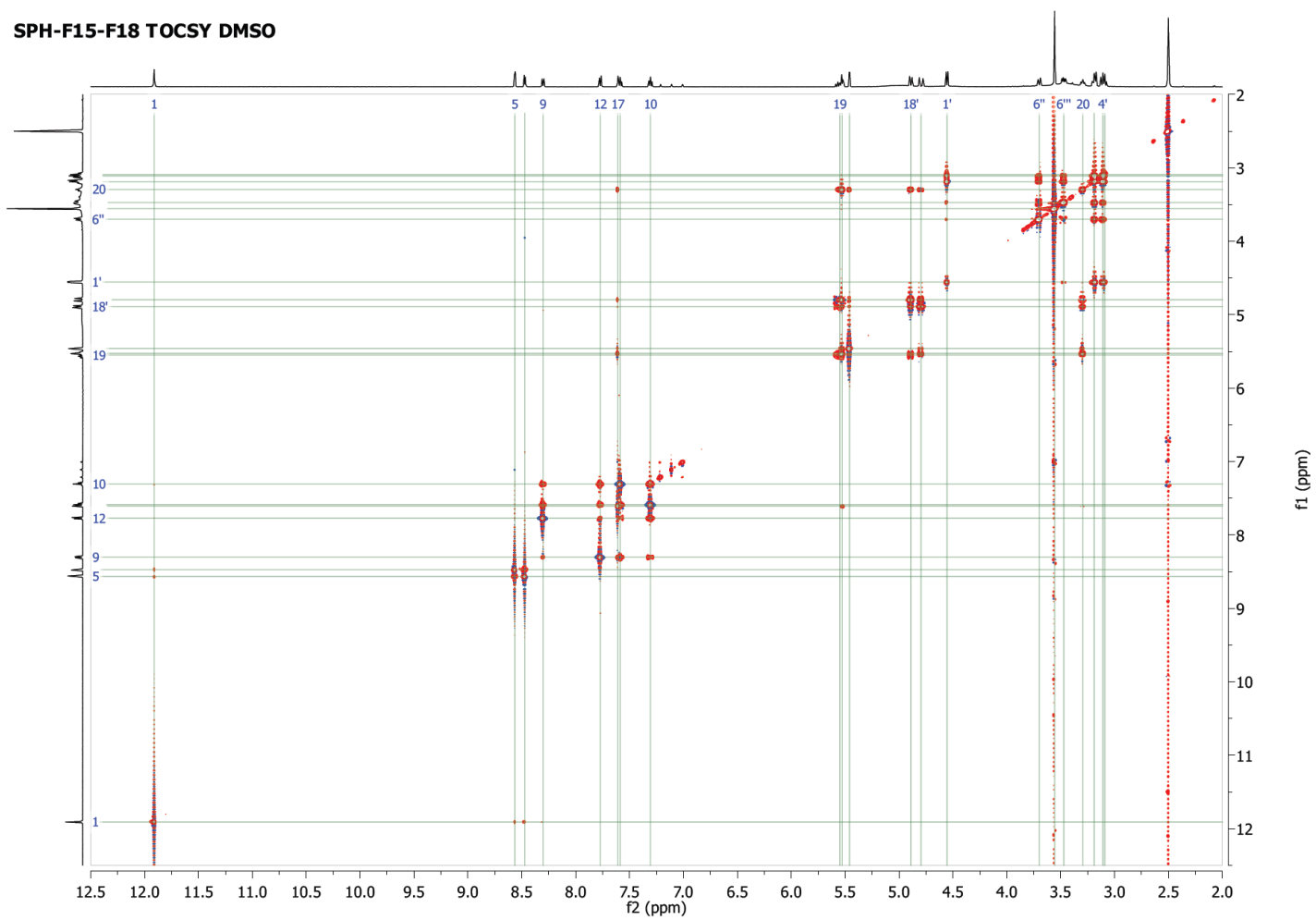


Figura A8.4. Espectro de TOCSY do MIA paucidiantosídeo (DMSO-d₆; 500 MHz).

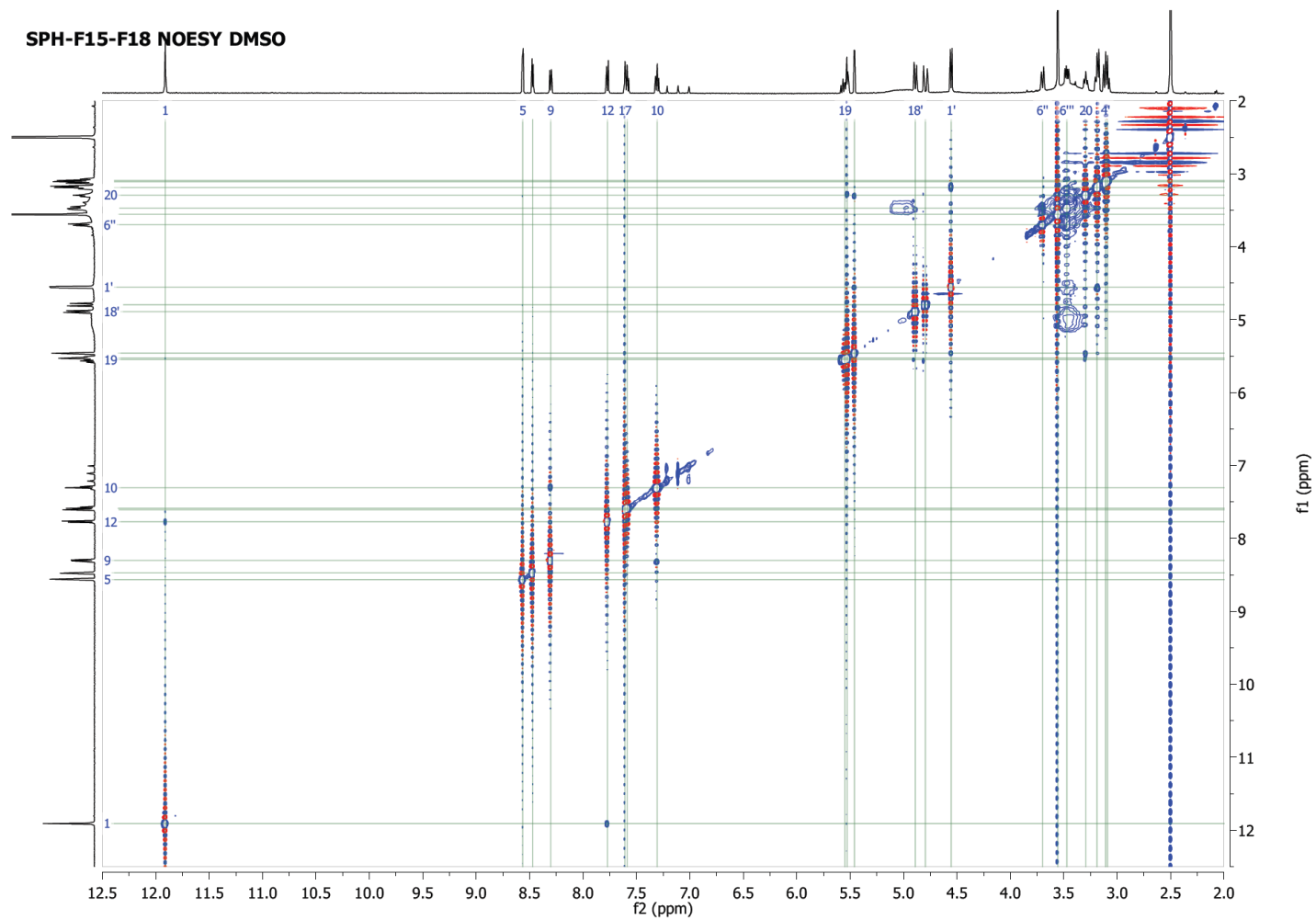


Figura A8.5. Espectro de NOESY do MIA paucidantosídeo (DMSO-d₆; 500 MHz).

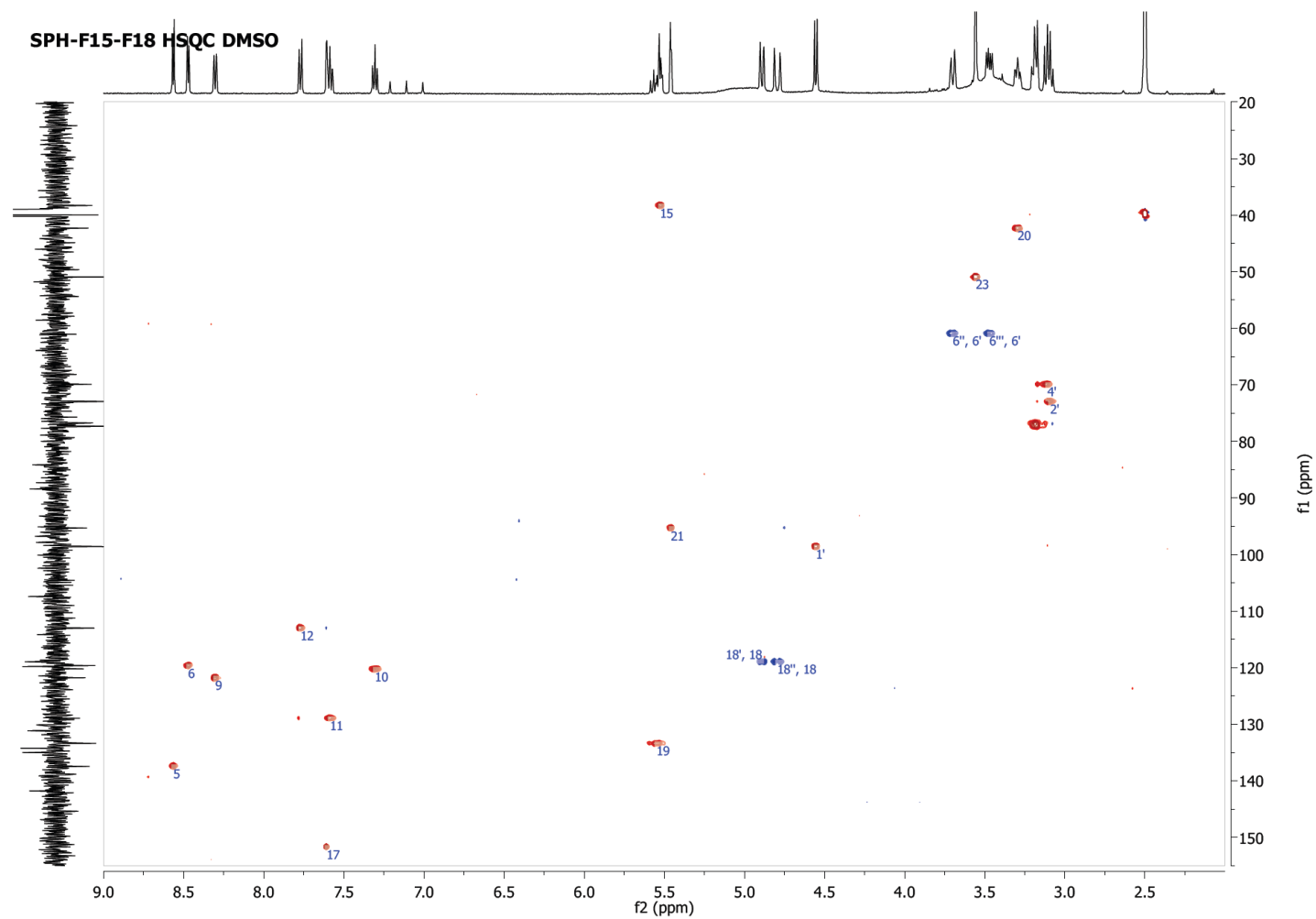


Figura A8.6. Espectro de HSQC do MIA paucidiantosídeo (DMSO-d₆; 500 MHz).

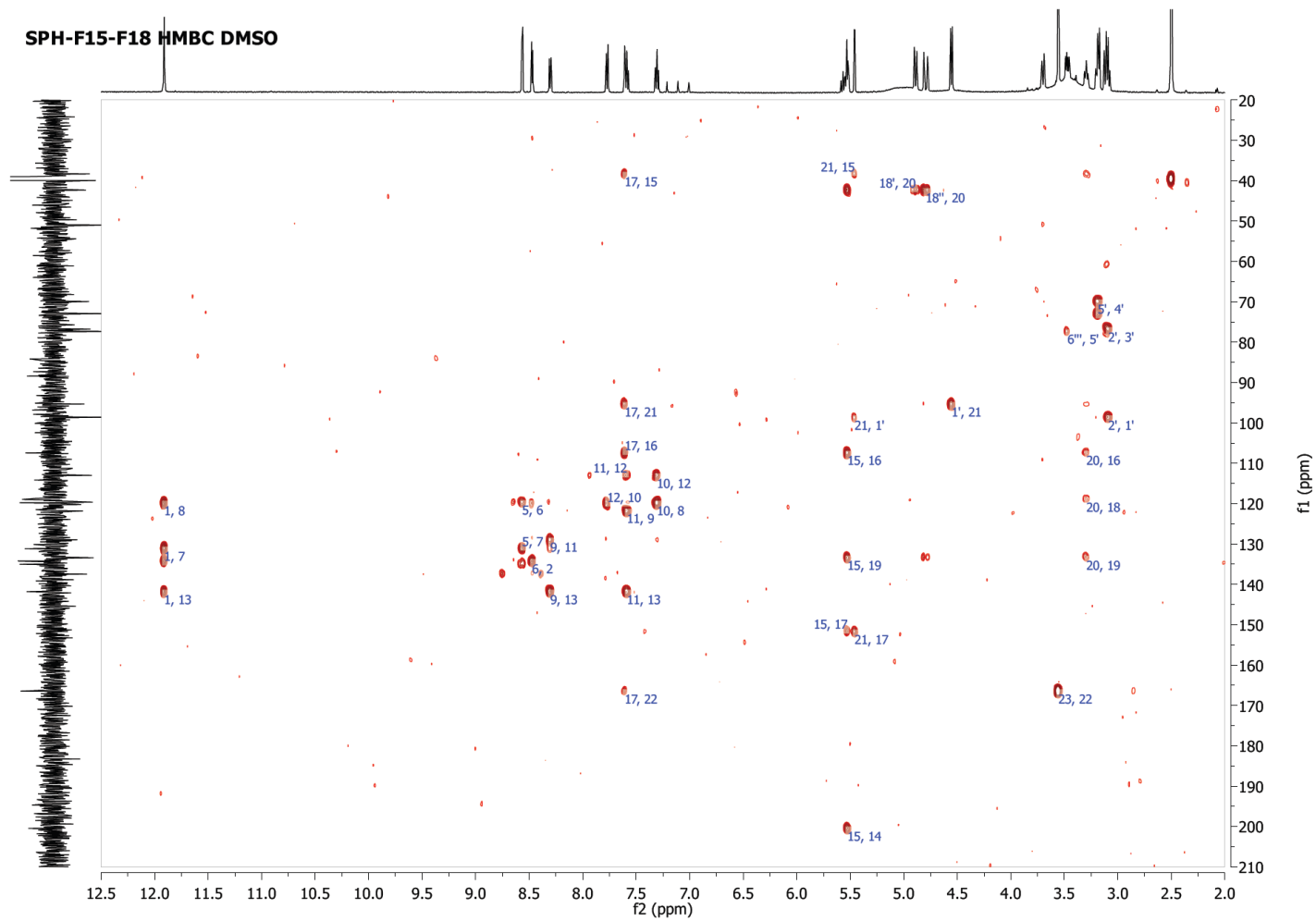


Figura A8.7. Espectro de HMBC do MIA pauidantosídeo (DMSO-d₆; 500 MHz).

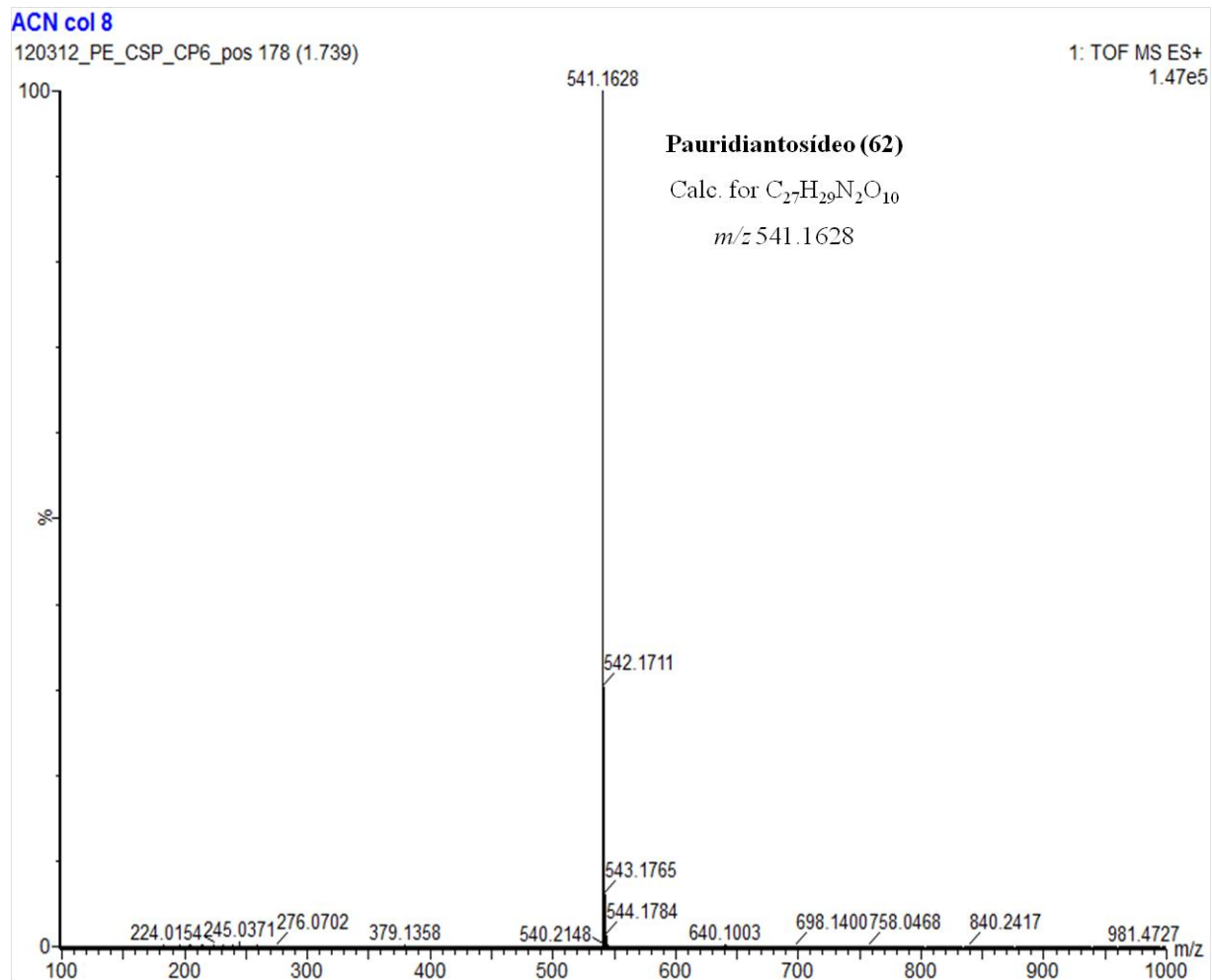


Figura A8.8. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA pauridiantosídeo (UHPLC/HR-TOF-MS).

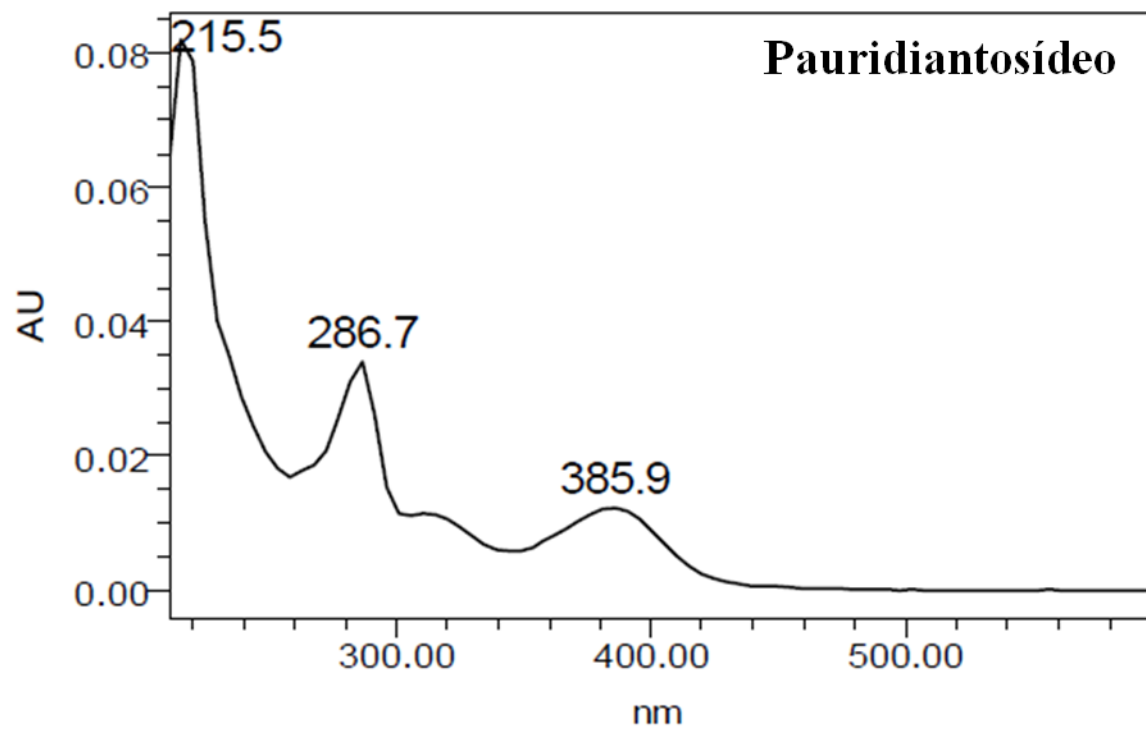


Figura A8.9. Espectro de UV do MIA pauridiantosídeo (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 9

Dados espectroscópicos do alcaloide (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-
lialosídeo (**58**)

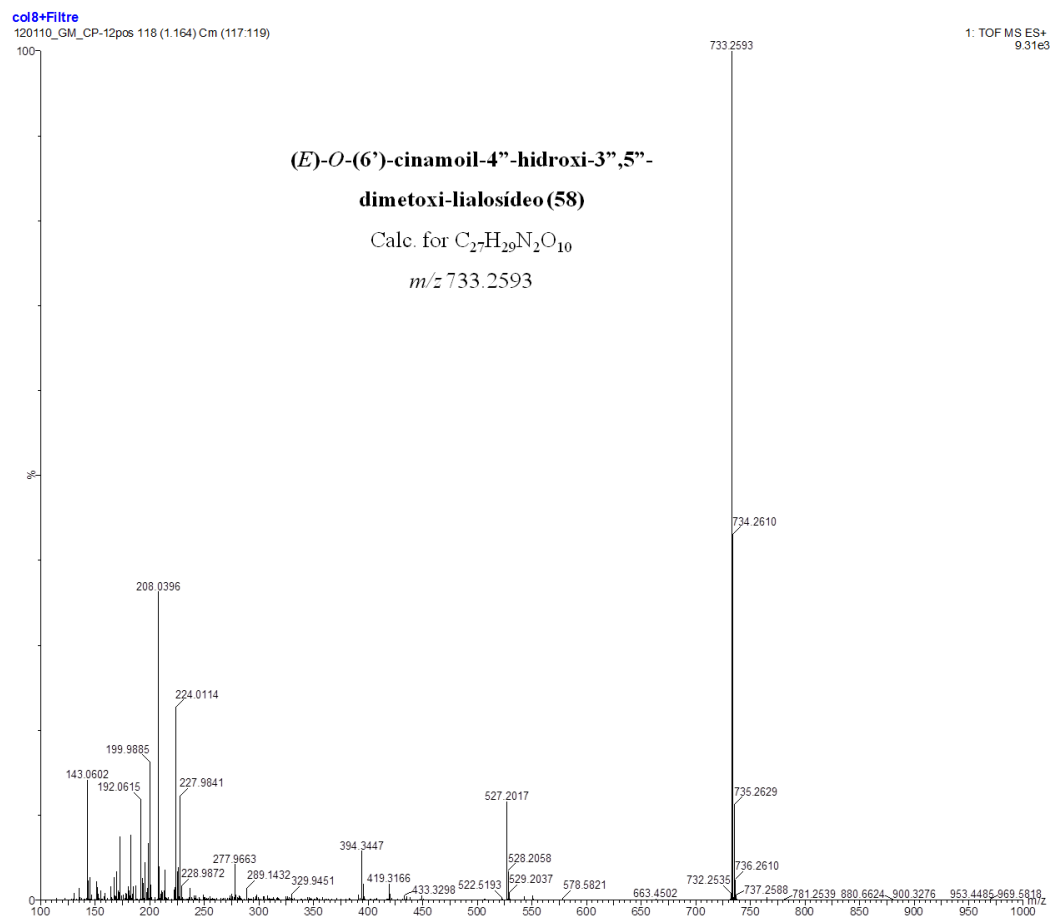


Figura A9.1. Espectro de HRESIMS $[M + H]^+$ do MIA (E)-O-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3''',5'''-dimetoxi-lialosídeo (UHPLC/HR-TOF-MS).

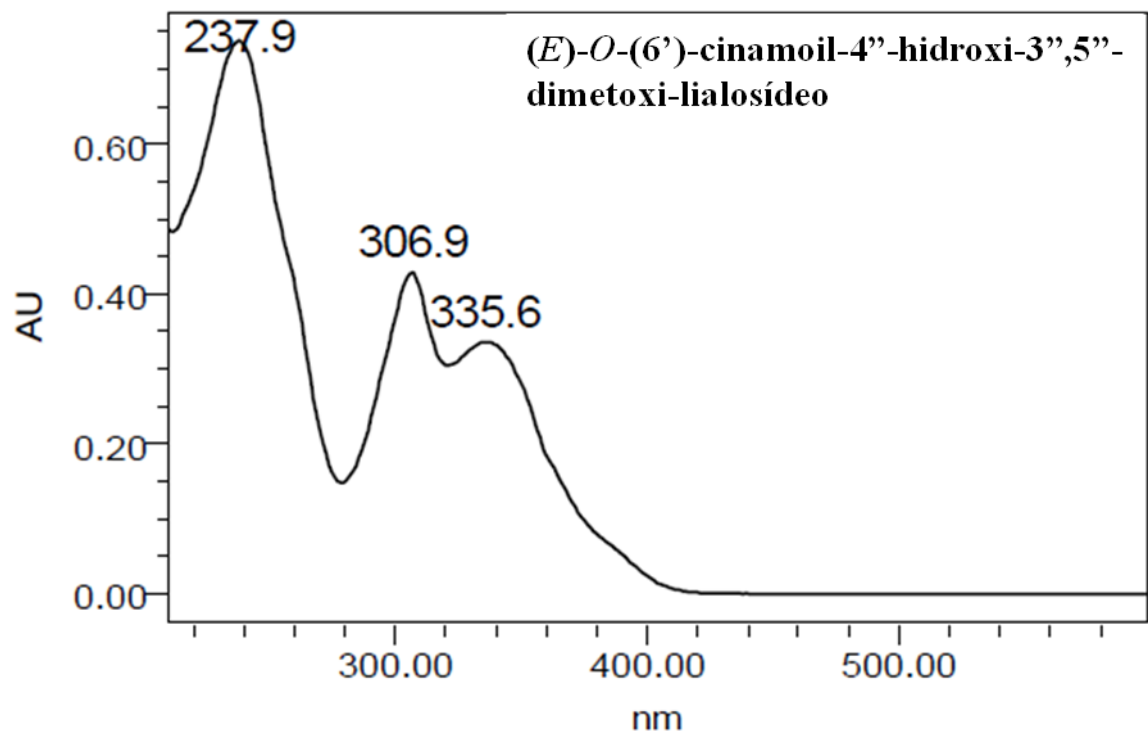


Figura A9.2. Espectro de UV do MIA (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-lialosídeo (HPLC-DAD; gradiente binário de água – acetonitrila; TFA 0,05%).

ANEXO 10

Parecer – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética Na Utilização De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

O Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 17247

Título: AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS ISOLADOS DE Psychotria PARA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOFÁRMACOS

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

AMELIA TERESINHA HENRIQUES - coordenador desde 01/12/2008
CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED - pesquisador desde 01/12/2008
CAROLINA DOS SANTOS PASSOS - pesquisador desde 01/12/2008
ARIELA PINTO BUMBEL - pesquisador desde 01/12/2008

O mesmo foi aprovado pelo Comissão De Ética Na Utilização De Animais, em reunião realizada em 08/06/2010 - NA SALA DE REUNIÕES, DO 6º ANDAR DO PRÉDIO DA REITORIA, NO CAMPUS CENTRAL., por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho nacional de Saúde.

Porto Alegre, Terça-Feira, 8 de Junho de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

ANEXO 10

Artigos publicados durante o período de doutorado

Artigos Publicados

1. Konrath, E.L.; Neves, B.M.; Lunardi, P.S.; Passos, C.S.; Simões-Pires, A.; Ortega, M.G.; Gonçalves, C.A.; Moreira, J.C.; Henriques, A.T. **Investigation of the in vitro and in vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts.** Journal of Ethnopharmacology 139: 58-67, 2012.
2. Sfair, L.L.; Graeff, J.S.; Paim, C.S.; Passos, C.S.; Steppe, M.; Schapoval, E.E.S. **Photodegradation kinetics, cytotoxicity assay and determination by stability-indicating HPLC method of mianserin hydrochloride.** Die Pharmazie 67: 490-494, 2012.
3. Farias, F.M.; Passos, C.S.; Arbo, M.A.; Barros, B.; Gottfried, C., Steffen, V.M.; Henriques, A.T. **Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Müll. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in hippocampus.** Fitoterapia 83: 1138-1143, 2012.
4. Brand, G.; Henriques, A.T.; Passos, C.S.; Baldoqui, D.C.; de Oliveira Santin, S.M.; Ferreira da Costa, W.; Sarragiotto, M.H. **Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Margaritopsis cymuligera* (Müll. Arg.) C.M. Taylor (Rubiaceae).** Biochemical Systematics and Ecology 45: 155-157, 2012.
5. Farias, F.M.; Passos, C.S.; Arbo, M.D.; Zuanazzi, J.A.S.; Steffen, V.M.; Henriques, A.T. **Monoamine levels in rat striatum after acute intraperitoneal injection of strictosidinic acid isolated from *Psychotria myriantha* Müll. Arg. (Rubiaceae).** Phytomedicine 17: 289-291, 2010.
6. Passos, C.S.; Arbo, M.D.; Rates, S.M.K.; Von Poser, G.L. **Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC).** Revista Brasileira de Farmacognosia 19: 140-149, 2010.

Artigos Aceitos

1. 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 2012, DOI: 10.3109/14756366.2012.666536.
2. Lange, A.D.C.; Gasperin, F.T.; Passos, C.S.; Todeschini, V.; Volpato, N.M.; Schapoval, E.E.S. **Stability-indicating LC assay with determination of system suitability limits by a robustness test for sitagliptin in tablets and assessment of cytotoxicity for degradation products**. Current Pharmaceutical Analysis 8, 1-8, 2012.
3. Konrath, E.L.; Neves, B.M.; Passos, C. dos S.; Lunardi, P.S.; Ortega, M.G.; Cabrera, J.L.; Gonçalves, C.A.; Henriques, A.T. ***Huperzia quadrifariata* and *Huperzia reflexa* alkaloids inhibit acetylcholinesterase activity *in vivo* in mice brain**. Phytomedicine 2012, DOI: 10.1016/j.phymed.2012.08.009.

Resumos em Eventos Científicos

1. Passos, C.S.; Simões-Pires, C.; Marcourt, L.; Nurisso, A.; Henriques, A.T.; Carrupt, P.A. Alkaloids from *Psychotria* as multifunctional cholinesterases and monoamine oxidases inhibitors. **22nd International Symposium on Medicinal Chemistry**, 2012, Berlin, Germany.

2. Simões-Pires, C.; Passos, C.S.; Ryckewaert, L.; Henriques, A.T.; Carrupt, P.A. Alkaloids from *Psychotria* as HDAC inhibitors: a multifunctional approach against neurodegeneration. **International Symposium on Medicinal Chemistry**, 2012, Berlin, Germany.

3. Passos, C.S.; Both, F.L.; Steffen, V.M.; Kerber, V.A.; Henriques, A.T. Effect of sub-chronic treatment with psychollatine in the mice light/dark paradigm. **42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2010, Ribeirão Preto, Brazil.

4. Passos, C.S.; Gottfried, C.; Henriques, A.T.; Evaluation of *Psychotria* metabolites for identification of potential new MAO inhibitors. **II Encontro Anual do PPGCF – UFRGS**, 2010, Porto Alegre, Brazil.

5. Passos, C.S.; Abib, R.T.; Gottfried, C.S.; Henriques, A.T. Optimization of a microplate assay method to identify monoamine oxidase inhibitors. **XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2010, João Pessoa, Brazil.

6. Passos, C.S.; Apel, M.A.; Marin, R.; Andrade, J.M.M.; Kerber, V.A.; Henriques, A.T. Effect of the monoterpene indole alkaloid psychollatine, from *Psychotria umbellata*, on polimorphonuclear neutrophils chemotaxis. **2nd Brazilian Conference on Natural Products**, 2009, São Pedro, Brazil.

7. Passos, C.S.; Gottfried C.; Henriques, A.T. Evaluation of *Psychotria* metabolites for identification of potential new drugs. **I Encontro do PPGCF da UFRGS**, 2009, Porto Alegre, Brazil.