

## Introdução

Os alcalóides indólicos constituem uma classe de metabólitos secundários extensivamente investigados devido a sua importância terapêutica<sup>1</sup>. Dentre os gêneros capazes de sintetizar alcalóides indólicos, *Psychotria* (Rubiaceae) destaca-se pela variedade de produtos biologicamente ativos<sup>2,3</sup>.

Catecol-O-metil-transferase (COMT) é uma enzima que tem a função de inativar neurotransmissores através da metilação de catecolaminas utilizando S-adenosilmetionina como doador de grupos metil (Figura 1). Esta enzima pode ser encontrada em tecidos periféricos e no Sistema Nervoso Central (SNC), onde desempenha um papel importante na doença de Parkinson<sup>4</sup>.

Considerando a importância dos alcalóides indol monoterpênicos (MIAs) de *Psychotria* e as atividades biológicas descritas para substâncias pertencentes a esta classe, o objetivo deste trabalho consiste na avaliação do efeito de frações e de MIAs isolados de *Psychotria* sobre a enzima COMT.

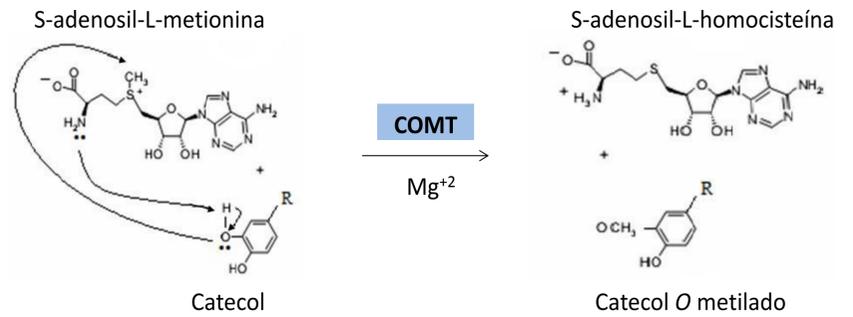


Figura 1. Representação esquemática da reação de metilação catalisada pela COMT.

## Materiais e Métodos

As frações de alcalóides foram obtidas por extração ácido-base e submetidas a análise cromatográfica por CLAE/DAD para avaliação de seus perfis. A fração de alcalóides de *P. suterella* foi denominada SAE, enquanto que a fração de alcalóides de *P. laciniata* foi denominada LAE (Figura 2).

Antes da otimização dos parâmetros do ensaio de inibição da COMT, realizou-se o doseamento de proteínas da fração contendo a enzima (COMT de fígado suíno; Sigma-Aldrich) conforme método de Lowry, com modificações (Figura 3).

### Doseamento de Proteínas

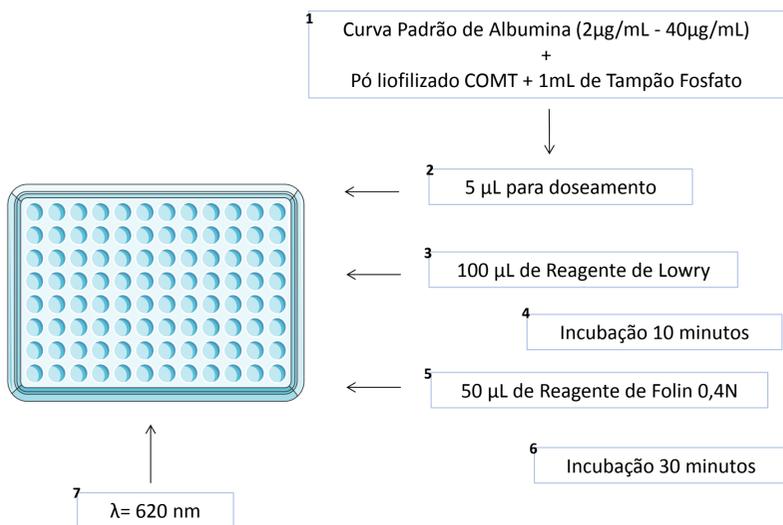


Figura 3. Esquema representando o doseamento de proteínas da fração contendo a COMT.

### Parâmetros Iniciais para Otimização do Ensaio Enzimático

- Tampão Fosfato de Potássio (100mM; Ph 7,4)
- Substratos :
- Esculetina (4µM) e S-adenosilmetionina (0µM - 100µM)
- COMT (Sigma Aldrich – 150 unidades/mg de proteína ; 10, 15 e 20µg/mL)
- Produto formado na reação: Escopoletina (curva padrão: 2,5mmol – 25,0mmol)
- Detecção por fluorescência
  - $\lambda_{em} = 355 \text{ nm}$
  - $\lambda_{exc} = 460 \text{ nm}$

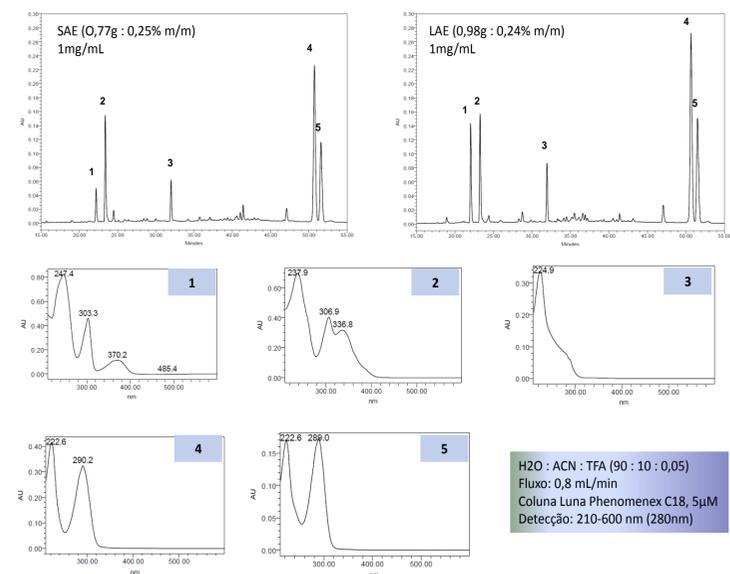


Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE/DAD dos extratos de alcalóides de *P.suterella* (SAE) e *P.laciniata* (LAE). Também são apresentados espectros de UV dos picos majoritários.

A partir de SAE e LAE dois alcalóides indol monoterpênicos, lialosídeo e strictosamida (Figura 4), foram isolados por CLMP utilizando sílica C18 como fase estacionária e eluição em modo isocrático. Além disso, os picos 4 e 5 observados na Figura 4 correspondem aos alcalóides valesiacotamina e isovalesiacotamina, que foram posteriormente isolados por CLAE semi-preparativa.

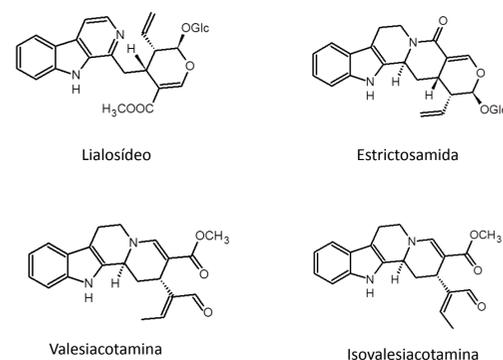


Figura 4. Estruturas dos alcalóides isolados e os que estão em presença majoritária nas frações SAE e LAE.

## Resultados e Discussão

Para a dosagem de proteínas os resultados encontrados foram:

- FCM = 45,98 µg/A
- Concentração COMT = 789,70 µg de proteína/mL

Na otimização dos parâmetros para o ensaio enzimático foi construída uma curva padrão do produto escopoletina utilizando concentrações entre 2,5 mmol – 25,0 mmol (Figura 5). No entanto, foram verificados problemas nos ensaios de cinética enzimática, relacionados com a fluorescência emitida pelo substrato esculetina.

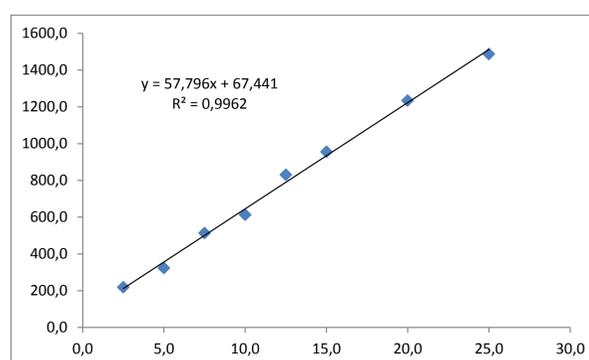


Figura 5. Curva Padrão de Escopoletina.

## Perspectivas

- Experimentos para otimização dos parâmetros para o ensaio enzimático;
- Testar atividade de frações e alcalóides isolados de *P. suterella* e *P. laciniata* sobre a enzima COMT;