

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



institutodequímica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

VICTOR FREITAS DE JESUS

**ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Psychotria densicostata* (RUBIACEAE)**

Rio de Janeiro
Dezembro de 2021

Victor Freitas de Jesus

**ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Psychotria densicostata* (RUBIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal do Rio de Janeiro
como parte dos requisitos necessários
para obtenção do grau de Químico –
Atribuições Tecnológicas sob orientação
da Profa. Dra. Ligia Maria Marino Valente
e do Prof. Dr. Rodolfo Santos Barboza.

Rio de Janeiro
Dezembro de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

J642e Jesus, Victor Freitas de
 Estudo químico do extrato metanólico das folhas de
 Psychotria densicostata (Rubiaceae) / Victor
 Freitas de Jesus. -- Rio de Janeiro, 2021.
 92 f.

 Orientadora: Ligia Maria Marino Valente.
 Coorientador: Rodolfo Santos Barboza.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) –
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Química, Bacharel em Química, 2021.

 1. *Psychotria densicostata* Müll.Arg.. 2. Extrato
 metanólico. 3. Extração em fase sólida. 4. Alcaloide
 indólico monoterpênico. 5. Estrictosidina. I.
 Valente, Ligia Maria Marino, orient. II. Barboza,
 Rodolfo Santos, coorient. III. Título.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Química – Atribuições Tecnológicas. Qualquer citação deverá atender às normas éticas científicas.

Victor Freitas de Jesus

Victor Freitas de Jesus

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em: 15 de Dezembro de 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado por:

Sigrid Alafakieff

Profa. Dra. Ligia Maria Marino Valente (DQO-IQ/UFRJ)

Documento assinado digitalmente

gov.br

► Rodolfo Santos Barbara

Data: 15/12/2021 19:57:25-0300

Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dr. Rodolfo Santos Barboza (DQA-IQ/UFRJ)

PRISCILA FABIANA
PAULO DOS
SANTOS:08618251798

Assinado de forma digital por
PRISCILA FABIANA PAULO DOS
SANTOS:08618251798
Dados: 2021.12.15 22:31:37 -0300

Profa. Dra. Priscila Fabiana Paulo dos Santos (Centro Federal de Educação
Tecnológica Celso Suckow da Fonseca – CEFET/RJ – campus Angra dos Reis)

Thiago
Wolff

Assinado digitalmente por Thiago Wolff
DW, Chefe Thiago Wolff
E-mail: jthiago.wolff.com
Receio Eu estou aprovando este documento
com minha assinatura de vincente ao legal
Localização: sua localização ou o endereço da requisição
Data: 2021-12-16 10:48:19.03000

Dr. Thiago Wolff (Instituto SENAI de Inovação em Química Verde – FIRJAN)


Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza (D)

Prof. Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza (DQO-IQ/UFRJ)

“Dedico esse trabalho ao meu avô Edésio (*in memorian*)
e ao meu padrinho Edimilson (*in memorian*),
que me ensinaram valores importantes para toda a vida
e com certeza estariam comemorando esse momento junto comigo.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Eliane e Laércio, que sempre incentivaram meus estudos e apoiaram as minhas vontades e decisões. Agradeço ao meu irmão, que mesmo com a distância, sempre será meu elo familiar mais forte. A vocês lhes devo um mundo de gratidão. Essa conquista não é só minha, ela é nossa! Amo muito vocês!

Agradeço à minha orientadora, Profa. Ligia, que desde 2014 confia no meu potencial e aceitou embarcar nessa jornada que foi da Iniciação Científica até o TCC. Minha vida acadêmica não teria sido a mesma sem os melhores conselhos que tive nesses anos e, com certeza, nossas conversas sobre história e política foram essenciais para a nossa conexão aluno-professora.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Rodolfo, que de referência de parceria em laboratório, tornou-se um dos melhores amigos-acadêmicos que encontrei. Suas aulas, conselhos e apoio durante toda a graduação me fizeram enxergar a referência de profissional que quero me tornar no futuro.

Agradeço ao meu namorado, Aleksander, parceiro de vida. Obrigado por todos os momentos de descontração, todo o carinho e cumplicidade. Estar ao seu lado foi um ponto primordial para deixar mais leve minha passagem pela graduação.

Agradeço a Amanda e Marcelo, que juntos com Alex, formamos o VAMA. Essa conformação de casa, vulgo família, foi a melhor que poderia ter escolhido para mim. O sentimento de irmandade entre nós é algo que alivia a saudade da minha família de sangue. Obrigado por todas as risadas e momentos inesquecíveis que vivemos.

Agradeço aos meus avós, vó Zéza, Vó Lena, vô Bino, tia Carmem, e madrinha Bethe pelos ensinamentos e referência de pessoas que vocês são para mim. Vocês são a minha base e minhas maiores relíquias. Agradeço também a alguns tios, tias e primos que sei que mesmo de longe, estavam na torcida por mim.

Agradeço ao meu grupo maravilhoso de amigos do Rio de Janeiro, os Busaibes. A Thayná, por toda a parceria de laboratório e de vida. Vizinhos de bancada e de vida, quero essa amizade eternizada numa tattoo um dia! A Camila, carioca número um da minha vida, obrigado por todo o acolhimento na sua própria família. Nossa vivência, desde as aulas experimentais naquele verão insuportável até as suas festas de aniversário maravilhosas, me fazem te considerar o meu tesouro carioca. Ao Adel, o amigo árabe que encontrei e que se tornou a melhor parceria de *Minecraft*.

da madrugada. Suas histórias são ensinamentos que o mundo um dia há de conhecer. A faculdade certamente teria sido menos divertida sem vocês.

Agradeço a Beatriz, Bianca, Janaína, Jefferson e Jéssica, amigos paulistas que carrego no coração todos os dias. A gente pode ficar longe por muito tempo, mas a união desse grupo existe para além da vida. Apoio, conselhos, diversão, muito amor e fotos de gatinhos... é isso que eu imagino quando penso em vocês.

Agradeço a minha prima, Elizandra, que mesmo estando milhares de quilômetros de distância, foi sempre uma das maiores incentivadoras e apoiadoras dos meus sonhos. Você é a irmã mais velha que eu sempre quis. Te amo!

Agradeço aos meus amigos Juliano, Dimi, Vivi, Kalícia, Maiara, Yanna, Bruna e Fabio, pelos ótimos momentos que tivemos juntos. Conviver em república certamente foi algo marcante com a presença de cada um de vocês. Saudades das nossas festinhas!

Agradeço aos tantos outros amigos que o IQ/UFRJ me deu, Amanda, Paulo, Diogo, Alex, Marcella, Bia Guerra, Gabriela (Bixete), Geisa, Elisa, Amir, Vinicius, Yayá e Dahra. Cada um de vocês tem um cantinho especial no coração desse paulista aqui. Em especial, agradeço ao Guilherme Priori, que junto da Thayná, foram os melhores coaches de TCC que eu poderia arranjar para momentos de desespero.

Agradeço aos amigos de laboratório 627 do IQ, que ganhei durante os anos de pesquisa científica. Em especial à Jessica, por todos os ensinamentos passados e que foram de grande importância para a confecção desse trabalho.

Agradeço ao Msc. Matheus Oliveira e ao Prof. Dr. Marcelo Marciel pela parceria na etapa de liofilização das minhas amostras. Agradeço ao Prof. Dr. Alviclér Magalhães por todo o suporte nas análises por RMN.

Agradeço ao CAIQ, pela existência e auxílio aos estudantes do IQ/UFRJ. Agradeço à COSQ pelas melhores Semanas da Química que um entusiasta como eu poderia ter. Agradeço ao NuDIQ, o melhor núcleo de diversidade que eu poderia ter participado e que me fez discutir e entender muito da vida e que não está escrito num livro de Química.

Agradeço ao meu terapeuta, Thiago Gouvêa, que me ajudou a encontrar o melhor de mim em mim mesmo. Gratidão eterna por todas as nossas reflexões.

Agradeço, por fim, a todos os membros da equipe de Corrosão do LabMM do Cepel, por darem todo o suporte e acreditarem no meu trabalho. Vocês são a melhor equipe de pesquisa da qual um dia já pensei em fazer parte.

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: Estudo químico do extrato metanólico das folhas de *Psychotria densicostata* (Rubiaceae)

ALUNO: Victor Freitas de Jesus

ORIENTADOR: Profa. Dra. Ligia Maria Marino Valente, DQO – IQ – CCMN – UFRJ.

COORIENTADOR: Prof. Dr. Rodolfo Santos Barboza, DQA – IQ – CCMN – UFRJ.

A biodiversidade brasileira é muito grandiosa, porém pouco estudada quanto à presença de metabólitos secundários que apresentam atividades biológicas de interesse. O gênero *Psychotria* L. é considerado o maior da família Rubiaceae, com aproximadamente 1600 espécies espalhadas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Esse gênero está distribuído por todos os biomas do Brasil e está listado em 10º lugar, com maior número de espécies, sendo 57% endêmicas do país. A espécie *Psychotria densicostata* é endêmica do Brasil, com ocorrência confirmada apenas no estado do Rio de Janeiro e sem registro na literatura de estudos químicos e/ou farmacológicos. Como parte da linha de pesquisa que visa o estudo inédito de espécies nacionais e endêmicas, o presente trabalho visou o estudo químico do extrato metanólico das folhas de *P. densicostata*. A prospecção inicial, monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), indicou a presença de substâncias fenólicas, alcaloides e/ou iridoides. A separação preliminar realizada por cromatografia em coluna (CC) em Sephadex™ LH-20 indicou fortemente a presença de alcaloides. A análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) de uma das frações reunidas resultou em espectro com sinais em regiões com padrões de multiplicidade compatíveis com porções de alcaloides indólicos monoterpênicos comuns em espécies do gênero *Psychotria*. Com o objetivo de se obter uma fração enriquecida nos prováveis alcaloides indólicos presentes no extrato das folhas de *P. densicostata*, empregou-se o método de extração em fase sólida (EFS), em fase reversa (C18), desenvolvido pelo grupo. Essa técnica mostrou-se bastante eficaz para o enriquecimento dos alcaloides. Visando a obtenção de maior quantidade das frações que mostraram a possível presença de alcaloides indólicos, realizou-se um aumento de escala para a separação por EFS a partir de 312,6 mg do extrato bruto. O aumento de escala, realizado pela utilização de cartuchos na EFS produzidos em laboratório, reproduziu os resultados obtidos em escala analítica. O rendimento das frações enriquecidas em alcaloides foi cerca de 18% em relação à massa de extrato, obtendo-se também uma fração majoritária (51%) contendo substâncias com maior polaridade, provavelmente açúcares livres e compostos fenólicos. O processo de otimização de isolamento dos alcaloides envolveu três ciclos de extrações em fase sólida obtendo-se como resultado 2,0 mg de uma fração contendo uma substância majoritária. A análise da fração por técnicas de RMN em uma e duas dimensões permitiu a identificação do alcaloide indólico monoterpênico estrictosidina (**7**), encontrado em outras espécies do gênero *Psychotria*.

PALAVRAS-CHAVE: *Psychotria densicostata* Müll.Arg., extrato metanólico, extração em fase sólida, alcaloide indólico monoterpênico, estrictosidina.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
AcOH	Ácido acético glacial
Bi(NO ₃) ₃ .5H ₂ O	Nitrato de bismuto(III)
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CHCl ₃	Clorofórmio
COSY	<i>homonuclear COrrelation SpectroscopY</i>
δ	Deslocamento químico
δ _C	Deslocamento químico de carbono
δ _H	Deslocamento químico de próton
d	Duplo
dd	Duplo duplo
ddd	Duplo duplo duplo
EFS	Extração em fase sólida
KI	Iodeto de potássio
J	Constante de acoplamento
H ₂ O	Água destilada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCOOH	Ácido fórmico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy</i>
m	Multipleto
MeOH	Metanol
MIA	Alcaloide indólico monoterpênico (do inglês, “ <i>monoterpene indole alkaloid</i> ”)
mult.	Multiplicidade
n-BuOH	álcool n-butílico

NaNO ₂	Nitrito de sódio
NP	Do inglês, “ <i>Natural Products</i> ” (reagente 2-aminoetil-difenilborinato)
OMS	Organização Mundial da Saúde (do inglês, “ <i>World Health Organization</i> ”)
P.A.	Para análise
PDFM	Extrato metanólico bruto das folhas de <i>Psychotria densicostata</i>
PEG	Polietilenoglicol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R _f	Fator de retenção (do inglês, “ <i>retardation factor</i> ”)
s	Simpleto
tl	Tripleto largo
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de espécies de <i>Psychotria</i> pelo globo (POWO, 2017).....	18
Figura 2 – Registros fotográficos de <i>Psychotria densicostata</i> (Mário Gomes, 2019) (arquivo pessoal).....	19
Figura 3 – Cartuchos utilizados na extração em escala analítica EFS1 (cartucho à esquerda) e na extração em escala aumentada EFS2 (cartucho à direita) para comparação dimensional (A) e bomba geradora de vácuo acoplada ao <i>manifold</i> (B).....	28
Figura 4 – Representação esquemática das quatro EFS, com detalhes de partes do <i>manifold</i> , além do material de origem para realização das extrações e o número de frações obtidas. *As frações foram recolhidas em tubos de ensaio ou bêqueres individuais, a fim de mantê-las armazenadas separadamente.....	32
Figura 5 – Aspecto das folhas secas de <i>Psychotria densicostata</i> após processamento.	35
Figura 6 – Aspecto de uma amostra do PDFM destinada à fracionamento.	35
Figura 7 – Perfil cromatográfico em CCD do PDFM para análise de substâncias fenólicas (A) em AcOEt/AcOH/HCOOH/H ₂ O (100:11:11:27), iridoides (B) e alcaloides (C) em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fases móveis e reveladas em UV 254 nm (A1, B1 e C1), em UV 365 nm (A2, B2 e C2) e com reveladores: NP/PEG, em UV 365 nm (A3), reagente de Dragendorff/NaNO ₂ (10%) (B3) e anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (C3). Concentração: 30 mg.mL ⁻¹ ; Volume de aplicação: 10 µL	36
Figura 8 – Perfil cromatográfico em CCD das três frações finais geradas com a CC em Sephadex™ LH-20 a partir do PDFM, em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fase móvel e revelador reagente de Dragendorff/NaNO ₂ (10%) (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 30 mg.mL ⁻¹ ; Volume de aplicação: 10 µL	37
Figura 9 – Perfil cromatográfico em CCD das frações finais geradas com a CC em Sephadex™ LH-20 a partir do PDFM, em CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (60:40:4) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 30 mg.mL ⁻¹ ; Volume de aplicação: 30 µL	38

Figura 10 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD ₃ OD) da fração CC_2 gerada com a CC em Sephadex TM LH-20 do PDFM, com destaque para sinais em regiões com padrões de multiplicidade compatíveis com porções de alcaloides indólicos monoterpênicos comuns em espécies do gênero <i>Psychotria</i> (BERGER et al., 2021; LOPES et al., 2004).	39
Figura 11 – Perfil cromatográfico em CCD das dezesseis frações geradas com a EFS1 a partir do PDFM, em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: não definida; Volume de aplicação: não definido.....	40
Figura 12 – Perfil cromatográfico em CCD das três frações finais geradas com a EFS2 a partir do PDFM, em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fase móvel e reveladores: anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C) e reagente de Dragendorff/NaNO ₂ (10%) (placa D). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 50 mg.mL ⁻¹ (EB) e 25 mg.mL ⁻¹ (demais frações); Volume de aplicação: 10 µL. (EB) Extrato Bruto - PDFM; (1) EFS2_1; (2) EFS2_2; (3) EFS2_3; (Ref) Fração alcaloídica referência de <i>Psychotria leiocarpa</i> (COSTA et al., 2020).	43
Figura 13 – Estrutura química dos três alcaloides indólicos monoterpênicos isolados de folhas de <i>Psychotria leiocarpa</i> : <i>N</i> -glicopiranosilvincosamida (1), vincosamida (2) e ácido estrictosidínico (3) (COSTA et al., 2020).	44
Figura 14 – Dados extraídos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e das correlações nos espectros COSY (^1H - ^1H), HSQC (^1H - ^{13}C) e HMBC (^1H - ^{13}C a longa distância) (400 MHz, CD ₃ OD) da fração EFS2_2 oriunda da separação por EFS do extrato bruto das folhas de <i>Psychotria densicostata</i>	45
Figura 15 – Perfil cromatográfico em CCD das dezessete frações geradas com a EFS3, a partir da fração EFS2_3 (E3), em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: não definida (por conta do rendimento muito baixo, fixou-se um volume de 100 µL de MeOH para ressuspensão das frações); Volume de aplicação: 5 µL. A numeração das frações indica o teor de ACN, em solução aquosa, usado como fase móvel em cada eluição.....	46

Figura 16 – Perfil cromatográfico em CCD das trinta e quatro frações geradas com a EFS4, a partir da fração EFS2_2 (E2), em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: não definida (por conta do rendimento muito baixo, fixou-se um volume de 100 µL de MeOH para ressuspensão das frações); Volume de aplicação: 5 µL. A numeração das frações indica o teor de ACN, em solução aquosa, usado como fase móvel em cada eluição. As frações indicadas com “.1” e “.2” representam a repetição do teor de ACN em duas eluições sucessivas.....	48
Figura 17 – Perfil cromatográfico em CCD das frações de maior interesse geradas com a EFS4, a partir da fração EFS2_2, em <i>n</i> -BuOH/AcOH/H ₂ O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 5 mg.mL ⁻¹ ; Volume de aplicação: 10 µL. A numeração das frações indica o teor de ACN, em solução aquosa, usado como fase móvel em cada eluição. As frações indicadas com “.1” e “.2” representam a repetição do teor de ACN em duas eluições sucessivas.....	49
Figura 18 – Perfil cromatográfico em CCD das frações 10, 11 e 12 geradas com a EFS4, a partir da fração EFS2_2, em AcOEt/AcOH/HCOOH/H ₂ O (100:11:11:27), como fase móvel e revelador NP/PEG, em UV 365 nm (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 5 mg.mL ⁻¹ ; Volume de aplicação: 10 µL.....	50
Figura 19 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da fração EFS4_G1.....	51
Figura 20 – Rota biossintética da estrictosidina (7) (Adaptado de DEWICK, 2002)..	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exemplos de classes e precursores biogenéticos de alcaloides. (Adaptado de BERGER et al., 2021; HENRIQUES et al., 2007)	20
Quadro 2 – Principais parâmetros das EFS realizadas no presente estudo.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados referentes às frações coletadas durante a CC em Sephadex TM LH-20 do PDFM.	26
Tabela 2 – Dados referentes às frações obtidas com a CC em Sephadex TM LH-20 do PDFM.	37
Tabela 3 – Dados referentes às frações obtidas com a EFS1 do PDFM.	41
Tabela 4 – Dados referentes às frações obtidas com a EFS2 do PDFM.	44
Tabela 5 – Dados espectroscópicos obtidos por técnicas de RMN (400 MHz, CD ₃ OD) em 1D e 2D da fração EFS4_G1 comparados a dados da literatura.	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 MATERIAL VEGETAL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	17
1.1.1 A família Rubiaceae Juss.	17
1.1.2 O gênero <i>Psychotria</i> L. e a espécie <i>Psychotria densicostata</i>	17
1.1.3 Metabólitos secundários: o grupo dos alcaloides	19
1.2 TÉCNICAS EMPREGADAS EM ESTUDOS DE PRODUTOS NATURAIS....	21
1.2.1 A extração em fase sólida	22
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO BRUTO	24
3.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	24
3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA	26
3.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	26
3.4.1 Materiais e equipamentos.....	26
3.4.2 Parâmetros das extrações.....	28
3.4.2.1 Primeira extração – EFS1	28
3.4.2.2 Segunda extração – EFS2	29
3.4.2.3 Terceira extração – EFS3	30
3.4.2.4 Quarta extração – EFS4	30
3.4.3 Tratamento das frações	31
3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 PREPARO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO E PROSPECÇÃO INICIAL.....	35

4.2 SEPARAÇÃO PRELIMINAR DOS METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA	36
4.3 SEPARAÇÃO DOS METABÓLITOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ..	39
4.3.1 EFS1	39
4.3.2 EFS2	41
4.3.3 EFS3	45
4.3.4 EFS4	47
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDE INDÓLICO MONOTERPÊNICO	50
5 CONCLUSÕES	53
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICES	62

1 INTRODUÇÃO

A evolução humana carrega intrinsecamente fortes influências da relação do homem com a natureza. O uso de plantas no tratamento de doenças é baseado em conhecimento acumulado e propagado por sucessivas gerações ao longo dos anos (BRASIL, 2015; VALLI et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para milhões de pessoas no mundo a medicina tradicional e os medicamentos fitoterápicos são a única opção de cuidado com a saúde, seja por conta do distanciamento dos centros urbanos ou pelos preços inacessíveis de atendimentos médicos particulares/planos de saúde e de medicamentos industrializados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Há mais de 40 anos a OMS expressa a necessidade de valorizar o uso de plantas medicinais no âmbito sanitário, uma vez que grande parte da população de países em desenvolvimento depende da medicina tradicional. Cerca de 85% dessa população utiliza essas plantas e preparações destas no que se refere à atenção primária à saúde (BRASIL, 2016).

A biodiversidade brasileira é tão grandiosa que, de cerca de 55 mil espécies vegetais catalogadas no país, somente 8% desse quantitativo foi estudado em busca de substâncias bioativas e poucas foram as espécies que tiveram suas propriedades medicinais avaliadas. Como agravante, a perda de espécies vegetais gera a necessidade de políticas públicas de conservação ambiental, visto que as principais causas são o desmatamento, a poluição do meio ambiente, as mudanças climáticas globais (GUERRA; NODARI, 2007), as modificações ambientais para a agricultura e pecuária extensivas e a urbanização (ZAPPI et al., 2018).

As plantas são capazes de produzir inúmeras substâncias cujas funções não estão diretamente relacionadas à manutenção da vida. A esse grupo de metabólitos está associado o metabolismo secundário, que engloba substâncias que garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema (SANTOS, 2007). Essas substâncias são usadas como medicamentos fitoterápicos ou como modelo para sínteses de substâncias de interesse farmacológico, cosmético, agronômico e alimentício (MODOLLO et al., 2019). O conhecimento remanescente acerca das propriedades medicinais de plantas tem se consolidado com avanços científicos e tecnológicos que possibilitaram a modernização da fitoquímica e da química medicinal (VALLI et al., 2012).

1.1 MATERIAL VEGETAL E SUAS CARACTERÍSTICAS

1.1.1 A família Rubiaceae Juss.

A família botânica Rubiaceae Juss. é a quarta maior em número de espécies de todo o reino vegetal (CHIQUIERI; DI MAIO; PEIXOTO, 2004; ROBBRECHT, 1988). As mais de 13000 espécies estão distribuídas em cerca de 600 gêneros (BREMER, 2009; DAVIS et al., 2009; DELPRETE; JARDIM, 2012). Muitas espécies possuem importância econômica e terapêutica reconhecidas, sendo a *Coffea arabica* L., com o nome popular de café, certamente a espécie de Rubiaceae mais difundida no mundo (DAVIS et al., 2009; VALLI; YOUNG; BOLZANI, 2016).

Espécies de Rubiaceae estão espalhadas pelo globo, com maior concentração nas regiões tropicais e subtropicais. Quase metade das espécies e 1/3 dos gêneros ocorrem na região tropical das Américas (DELPRETE; JARDIM, 2012). A nível estrutural, as espécies de Rubiaceae podem ser encontradas em quase todas as formas, mas a maioria costuma apresentar-se como arbustos ou pequenas árvores (DAVIS et al., 2009). Os estudos químicos das espécies mostraram a presença predominante de alcaloides, iridoides, flavonoides e terpenoides, entre outros compostos (CONSERVA; FERREIRA JÚNIOR, 2012; MARTINS; NUNEZ, 2015).

No Brasil, são encontrados em torno de 130 gêneros e 1400 espécies de Rubiaceae (BFG, 2015; CONSERVA; FERREIRA JÚNIOR, 2012). Desse montante, 53% são espécies endêmicas do país e estão distribuídas em diferentes biomas, mas principalmente na Mata Atlântica (BFG, 2015).

As altas taxas de endemismo associadas a perdas e reduções de habitat por conta do desmatamento florestal, como ocorre na Mata Atlântica, agravam a sobrevivência e manutenção das espécies de Rubiaceae (ANDRADE et al., 2015; DAVIS et al., 2009). Além disso, a falta de estudos químicos e farmacológicos que contemplam toda a diversidade da família Rubiaceae reforça a necessidade e importância de mais projetos nessa área (DELPRETE; JARDIM, 2012).

1.1.2 O gênero *Psychotria* L. e a espécie *Psychotria densicostata*

O gênero *Psychotria* L. é considerado o maior da família Rubiaceae (NEPOKROEFF; BREMER; SYTSMA, 1999; ZAPPI; NUNES, 2000), com cerca de

1600 espécies conhecidas (CALIXTO et al., 2016), espalhadas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura 1). Em geral, apresentam-se como arbustos, mas menos frequentemente como árvores, trepadeiras, subarbustos ou herbáceas (POWO, 2017).

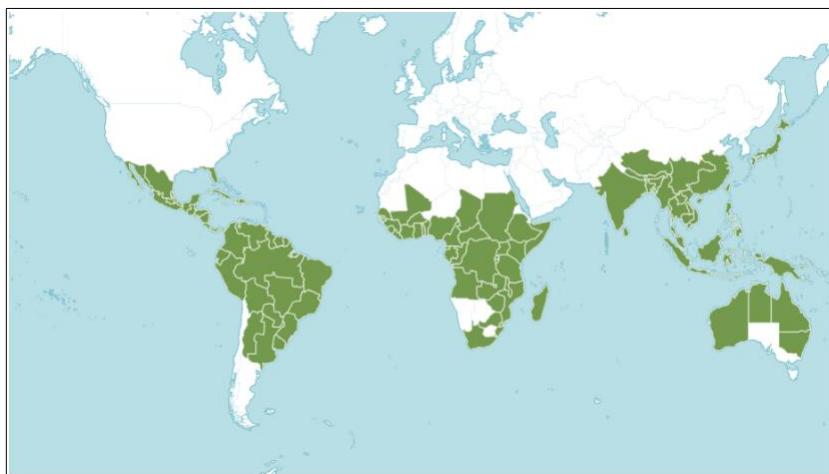


Figura 1 – Distribuição de espécies de *Psychotria* pelo globo (POWO, 2017).

No Brasil, o gênero é considerado o de maior riqueza em estudos florísticos para Angiospermas e de floras para Rubiaceae (TORRES-LEITE et al., 2018). Ele está listado como o 10º com maior número de espécies (251) sendo 57% endêmicas do país (BFG, 2015). A distribuição geográfica desse gênero abrange os 26 estados do país e o Distrito Federal, além de ocorrer em todos os 6 biomas que cobrem o território nacional (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal) (TAYLOR; GOMES; ZAPPI, 2015a).

Espécies de plantas do gênero *Psychotria* são amplamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças gastrointestinais e broncopulmonares, que apresentam sintomas como úlcera, dores de estômago, tosse e bronquite. Estudos caracterizaram o gênero como uma rica fonte de diversos tipos de alcaloides, além de flavonoides, cumarinas, terpenoides e peptídeos cíclicos. Essas substâncias podem ser responsáveis por atividades biológicas como citotóxica, analgésica, antiviral, antifúngica e moduladora da atividade do sistema nervoso central (CALIXTO et al., 2016).

A espécie *Psychotria densicostata* Müll.Arg. (Figura 2, pág. 19) é nativa e endêmica do Brasil, e se apresenta na forma de arbusto. A ocorrência dessa espécie foi confirmada apenas no estado do Rio de Janeiro, em floresta pluvial e restinga, pertencentes ao bioma Mata Atlântica (TAYLOR; GOMES; ZAPPI, 2015b).



Figura 2 – Registros fotográficos de *Psychotria densicostata* (Mário Gomes, 2019; arquivo pessoal).

O registro de informações acerca da espécie *P. densicostata* é tão escasso que ela é classificada como espécie com dados insuficientes (ZAPPI et al., 2018). Embora ainda não tenham sido registrados na literatura estudos químicos e/ou farmacológicos a respeito da espécie, o gênero ao qual ela pertence é caracterizado pela presença de alcaloides indólicos monoterpênicos (MIA) e/ou alcaloides polipirroloindólicos (BERGER et al., 2021; CALIXTO et al., 2016; DE CARVALHO JUNIOR et al., 2017; LOPES et al., 2004).

1.1.3 Metabólitos secundários: o grupo dos alcaloides

Os alcaloides são substâncias nitrogenadas, muitas vezes de natureza básica, possuem estruturas químicas diversas e são encontrados principalmente em plantas. Os alcaloides com o átomo de nitrogênio localizado em um anel heterocíclico são os chamados alcaloides verdadeiros; aqueles com átomo de nitrogênio não localizado no sistema heterocíclico são os protoalcaloides; e, aqueles compostos nitrogenados, com e sem anéis heterocíclicos, que não são derivados de aminoácidos, são os pseudoalcaloides (Quadro 1, pág. 20). Quando o átomo de nitrogênio é oriundo dos aminoácidos tem-se os alcaloides verdadeiros e protoalcaloides. Já quando o átomo de nitrogênio é incorporado por reações de transaminação, o restante da molécula tem como precursores terpenos ou esteroides agrupados ao esqueleto final (pseudoalcaloides). Alguns alcaloides apresentam estrutura combinada com açúcares e outros ocorrem como ésteres ou amidas (DEWICK, 2002; HENRIQUES et al., 2007).

Quadro 1 – Exemplos de classes e precursores biogenéticos de alcaloides.
 (Adaptado de BERGER et al., 2021; HENRIQUES et al., 2007)

Classe	Precursor biogenético	Exemplos de Alcaloides Verdadeiros
Piperidínicos		
Indóis simples		
Polipirroloindólicos		
Classe	Precursor biogenético	Exemplos de Protoalcaloides
Feniletilaminas		
Classe	Precursor biogenético	Exemplos de Pseudoalcaloides
Triterpênicos		
Xantinas		

Entre as propriedades terapêuticas e atividades biológicas dos alcaloides, destacam-se a atividade analgésica (BOTH et al., 2002; REANMONGKOL et al., 2000; YANG et al., 2016), antibacteriana (CONSERVA; FERREIRA JÚNIOR, 2012), anti-inflamatória (QUEIROZ et al., 2017; SIMÕES-PIRES et al., 2006), antimutagênica (DO NASCIMENTO et al., 2007), antioxidante (DO NASCIMENTO et al., 2007; FRAGOSO et al., 2008; MATSUURA et al., 2016), antiviral (COSTA et al., 2020; YANG et al., 2016), no sistema nervoso central (FARIAS et al., 2012), antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica (YANG et al., 2016).

1.2 TÉCNICAS EMPREGADAS EM ESTUDOS DE PRODUTOS NATURAIS

A fitoquímica é um campo de estudo que tem por objetivo pesquisar, conhecer e analisar compostos de natureza química produzidos por espécies vegetais. Em estudos nos quais não se dispõe de dados preexistentes sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar é realizada para obter algum indicativo da presença de metabólitos secundários. A investigação é direcionada para o isolamento ou tratamento em mistura, para a posterior elucidação estrutural dessas substâncias (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

Após o tratamento do material vegetal e obtenção da matriz em sua forma bruta (extrato) – em geral, por imersão em solvente orgânico com auxílio de banho de ultrassom –, aplicam-se técnicas de fracionamento que visam o isolamento e/ou enriquecimento dos analitos de interesse a níveis adequados para identificação (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) são amplamente usadas para verificação do perfil cromatográfico tanto do extrato bruto quanto de amostras resultantes de processos de fracionamento. A cromatografia líquida em coluna (CC) é muito empregada por conta de sua versatilidade no uso de colunas de diferentes tipos e dimensões, além do uso de diversas combinações de fases móveis e fases estacionárias (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007). Técnicas como a de extração em fase sólida (EFS) baseiam-se nos mesmos mecanismos de retenção de substâncias de CC, com separação tanto por adsorção, partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e/ou exclusão (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para a identificação, são usadas análises por ressonância magnética nuclear (RMN) e por espectrometria de massas (EM), bem como espectroscopia de

infravermelho (IV) e de ultravioleta visível (UV-vis). Além disso, é muito comum empregar técnicas cromatográficas, como por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), acopladas à análises por EM. A complexidade de algumas matrizes pode exigir separações preliminares que removam compostos interferentes e que proporcionem o enriquecimento das substâncias de interesse. Para tal, usam-se técnicas extrativas como extração líquido-líquido (ELL), CC, EFS, CCD entre outras, cujo princípio está associado à triagem para separação de substâncias a partir da maior ou menor interação destas com fases móveis/estacionárias (KLEIN-JÚNIOR et al., 2018).

Sobretudo, o uso de EFS deu-se a partir do surgimento de técnicas mais modernas que poderiam ser aplicadas a matrizes altamente complexas. Essa técnica foi introduzida, em meados da década de 1970, para suprir as desvantagens encontradas em ELL. A EFS é uma poderosa ferramenta para extração, concentração de substâncias e remoção de interferentes da matriz (JARDIM, 2010).

1.2.1 A extração em fase sólida

Para a realização da extração são utilizados cartuchos, na forma de seringas, preenchidos com fase estacionária (sorvente/fase sólida) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). A amostra que contém as substâncias de interesse é introduzida no topo do cartucho e aspirada sob pressão negativa. As substâncias mantêm-se no cartucho devido às fortes interações com a fase sólida e são eluídas com a passagem de solventes (ou mistura de solventes) que apresentam maiores forças eluotrópicas. Como principais vantagens da técnica tem-se o menor consumo de tempo e solventes orgânicos, a possibilidade de estudos com amostras de massa reduzida, a não formação de emulsões (como pode ocorrer em extração líquido-líquido), a capacidade de aumentar seletivamente a concentração das substâncias de interesse, volumes reduzidos de resíduos tóxicos e o escalonamento de experimentos. As desvantagens estão, em geral, relacionadas aos custos dos dispositivos para realização da extração, como os cartuchos comerciais e o *manifold* (JARDIM, 2010).

Estudos prévios apresentaram resultados positivos quanto ao enriquecimento de substâncias de interesse a partir de metodologias estabelecidas em EFS (BARBOZA et al., 2018; COSTA et al., 2020; KLEIN-JÚNIOR et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O eixo principal do presente trabalho trata do estudo químico inédito do extrato metanólico das folhas de *Psychotria densicostata* Müll.Arg., espécie de planta endêmica do estado do Rio de Janeiro e pertencente à família Rubiaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral desse trabalho está subdividido em objetivos específicos, conforme descrito a seguir:

- a) obter o extrato metanólico bruto a partir das folhas processadas de *Psychotria densicostata*;
- b) realizar uma prospecção inicial das classes de metabólitos secundários geralmente presentes em espécies da família Rubiaceae;
- c) estabelecer um método de separação e obtenção de frações enriquecidas, nas classes de substâncias de interesse presentes no extrato metanólico, em escala analítica;
- d) aplicar os parâmetros metodológicos de aumento de escala para obtenção de quantidades mássicas de frações enriquecidas nas classes de substâncias de interesse, suficientes para continuidade do trabalho (isolamento e caracterização estrutural);
- e) isolar e purificar as substâncias majoritárias presentes nas frações enriquecidas oriundas do extrato metanólico;
- f) identificar as substâncias isoladas das frações enriquecidas oriundas do extrato metanólico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO BRUTO

As folhas da espécie *Psychotria densicostata* Müll.Arg. foram coletadas em floresta pluvial de encosta, nas dependências do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em 26 de outubro de 2016. A coleta e a classificação botânica da espécie foram realizadas pelo botânico Dr. Mário Gomes do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Uma exsicata está depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número RFA40880. O acesso ao patrimônio genético brasileiro está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A9C4B8A.

Após a coleta, o material foi seco em estufa, à 40 °C. As folhas foram separadas dos galhos e apenas aquelas que não apresentavam manchas ou presença de fungos foram selecionadas para extração. Em seguida, as folhas foram trituradas em triturador industrial (Filizola, Brasil), enquanto os galhos foram reservados para estudos futuros. Ao final dessa etapa, o material triturado foi pesado, totalizando 103,9 g. O material vegetal foi armazenado em frasco de vidro limpo e seco.

Para a obtenção do extrato bruto das folhas de *P. densicostata* partiu-se de 30,2 g do material processado. A extração foi realizada com volumes de 300 mL de metanol (MeOH) grau HPLC (Tedia, Brasil), em banho de ultrassom à temperatura ambiente, em 10 ciclos de 25 min cada (total de 3000 mL de MeOH). A cada ciclo finalizado da extração o solvente foi evaporado à pressão reduzida e em banho à 40 °C. Encerrado o processo de extração, o extrato metanólico bruto (PDFM) foi armazenado em dessecador e a massa resultante mensurada posteriormente.

3.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas com cromatoplacas de alumínio recobertas com gel de sílica 60, com 200 µm de espessura e indicador F-254 (SiliCycle Inc.®, Canadá). As placas utilizadas possuíam dimensões de 8,0 cm de comprimento e largura variável de acordo com a quantidade de amostras a serem avaliadas. Em cada placa foi reservado 1,0 cm na base para a aplicação das

amostras e 0,5 cm de frente de solvente, estabelecendo o comprimento de 6,5 cm de desenvolvimento da corrida cromatográfica.

As fases móveis foram preparadas a partir da necessidade de análises específicas, tomando-se como parâmetro o grupo de substâncias a ser estudado e as condições de monitoramento e revelação. Ao longo do estudo foram utilizadas três diferentes fases móveis: acetato de etila (AcOEt) (Tedia, Brasil), ácido acético glacial P.A. (AcOH) (Vetec, Brasil), ácido fórmico (HCOOH) (Vetec, Brasil) e água destilada (H₂O), na proporção 100:11:11:27 (v/v/v/v); álcool *n*-butílico (*n*-BuOH) grau P.A. (Controltec Química Fina, Brasil), AcOH e H₂O, na proporção 40:10:10 (v/v/v); e clorofórmio grau técnico (CHCl₃) (Vetec, Brasil), MeOH e H₂O, na proporção 60:40:4 (v/v/v) (WAGNER; BLADT, 2009).

A aplicação das amostras foi realizada, após solubilização em MeOH 100%, com auxílio de uma seringa Hamilton TLC com agulha de teflon, referência Z264393-1EA (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA), com capacidade máxima de 25 µL. Para revelação, as placas foram submetidas à incidência de luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Outras condições de monitoramento foram ensaiadas por meio do uso de agentes derivatizantes (reveladores), como descrito abaixo:

- a) monitoramento de substâncias fenólicas, com uso de solução metanólica a 1% (m/v) de 2-aminoetil-difenilborinato (NP) + solução etanólica a 5% (m/v) de polietilenoglicol (PEG), seguido de irradiação sob luz UV a 365 nm;
- b) monitoramento de iridoides, com uso de reagente anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. O reagente anisaldeído sulfúrico foi preparado a partir da mistura de 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de AcOH, 85 mL de MeOH e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄);
- c) monitoramento de alcaloides, com uso de reagente de Dragendorff + solução aquosa a 10% (m/v) de nitrito de sódio (NaNO₂). O reagente de Dragendorff foi preparado a partir da mistura A + B, na proporção 1:1 (v/v), das soluções de 0,85 g de nitrato de bismuto(III) (Bi(NO₃)₃.5H₂O) em 10 mL de AcOH e 40 mL de H₂O aquecida (A) e a solução de 8 g de iodeto de potássio (KI) em 30 mL de H₂O (B).

Os reveladores foram aplicados com borrifador na superfície das placas após as corridas cromatográficas, de acordo com o grupo de metabólitos ao qual são indicados (WAGNER; BLADT, 2009).

3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Parte do extrato PDFM (101,6 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) com Sephadex™ LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suécia), em quantidade suficiente para se atingir 2,5 cm de altura inicial de fase, em uma coluna de vidro de 2,0 cm de diâmetro. A amostra foi aplicada na forma de pastilha, que foi preparada solubilizando o extrato em diclorometano (CH_2Cl_2) (Vetec, Brasil) e adicionando-se, aos poucos, pequenas quantidades de fase estacionária (Sephadex™ LH-20) até completa adsorção.

A fase móvel utilizada inicialmente foi uma mistura de *n*-hexano (Tedia, Brasil) e CH_2Cl_2 , na proporção 4:1 (v/v), seguida de uma mistura de CH_2Cl_2 e acetona (Merck, Alemanha), na proporção 3:2 (v/v) e, finalmente, MeOH 100%. Os volumes coletados de cada fração variaram entre 25 e 75 mL, de acordo com as mudanças visuais de coloração do material extraído (Tabela 1). As frações obtidas ao final do experimento tiveram o solvente evaporado à pressão reduzida e em banho à 40 °C, sendo, posteriormente, pesadas e analisadas por CCD (seção 3.2, pág. 24).

Tabela 1 – Dados referentes às frações coletadas durante a CC em Sephadex™ LH-20 do PDFM.

Fração	Fase móvel de eluição	Volume de recolhimento (mL)
1	Hexano/ CH_2Cl_2 4:1 (v/v)	35
2	CH_2Cl_2 /Acetona 3:2 (v/v)	25
3	CH_2Cl_2 /Acetona 3:2 (v/v)	30
4	CH_2Cl_2 /Acetona 3:2 (v/v)	65
5	CH_2Cl_2 /Acetona 3:2 (v/v)	50
6	CH_2Cl_2 /Acetona 3:2 (v/v)	65
7	CH_2Cl_2 /Acetona 3:2 (v/v)	50
8	MeOH 100%	75

3.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

3.4.1 Materiais e equipamentos

Os experimentos de extração em fase sólida (EFS) em escala analítica foram realizados em cartuchos comerciais da marca Supelco® (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA). A EFS com aumento de escala foi realizada em cartuchos preparados em laboratório a partir de seringas plásticas (Embramac®, Brasil) de 60 mL de capacidade. Os cartuchos comerciais foram utilizados na primeira (EFS1), terceira (EFS3) e quarta

(EFS4) extrações em fase sólida, enquanto os cartuchos preparados foram utilizados na segunda extração (EFS2).

A EFS1 e EFS3 foram feitas em cartuchos do modelo SupelcleanTM (ref. nº 57012), com fase estacionária LC-18 (C18/10%; 500 mg/3 mL) e tamanho médio de partícula de 45 µm. Os cartuchos possuíam 0,9 cm de diâmetro interno e apresentavam 1,5 cm de comprimento de leito, equivalente a cerca de 1 mL de volume de leito. Para as EFS conduzidas no trabalho, o volume de leito corresponde ao volume de solvente que preenche o leito de fase estacionária.

A EFS4 foi feita em cartucho do modelo Discovery[®] (ref. nº 52606-U), com fase estacionária DSC-18 (C18/18%) (1 g/6 mL) e tamanho médio de partícula de 50 µm. O cartucho possuía 1,2 cm de diâmetro interno e apresentava 1,4 cm de comprimento de leito, equivalente a cerca de 2 mL de volume de leito.

Os cartuchos para a EFS2 foram preparados com sílica gel 60, quimicamente modificada com octadecilsilanos (C18/18%), marca LiChroprep[®] RP-18 (Merck, Alemanha), com tamanho de partícula entre 40 e 63 µm. Em cada cartucho foi adicionado aproximadamente 10 g de fase estacionária, de forma a se obter 3,0 cm de comprimento de leito na seringa com 2,7 cm de diâmetro interno, equivalente a cerca de 20 mL de volume de leito (aumento de 20x em relação aos cartuchos comerciais). Três desses cartuchos foram igualmente preparados para utilização simultânea durante a execução da EFS2, a qual representa o aumento de escala da EFS1. A Figura 3A (pág. 28) mostra um exemplo de cartucho comercial usado na EFS1, EFS3 e EFS4 ao lado do cartucho maior que foi preparado para a EFS2.

As extrações foram realizadas em uma câmara de vácuo de 12 compartimentos da marca Supelco[®], modelo VisiprepTM DL SPE Manifold (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA). O fluxo de extração foi controlado por pressão ajustada entre -10 e -20 kPa. A bomba utilizada para geração de vácuo, modelo ME 1C (Vacuubrand, Alemanha) foi acoplada ao *manifold* por meio da abertura frontal, localizada abaixo do manômetro (Figura 3B, pág. 28).

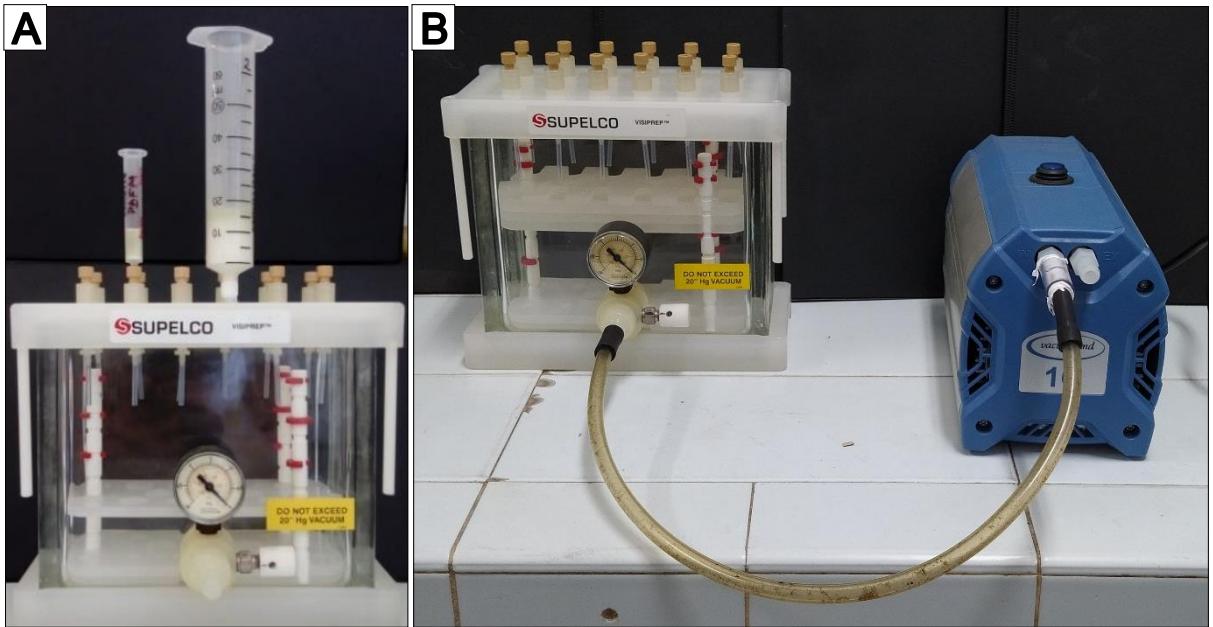


Figura 3 – Cartuchos utilizados na extração em escala analítica EFS1 (cartucho à esquerda) e na extração em escala aumentada EFS2 (cartucho à direita) para comparação dimensional (A) e bomba geradora de vácuo acoplada ao *manifold* (B).

3.4.2 Parâmetros das extrações

O procedimento geral de EFS consistiu em quatro etapas:

- ativação do cartucho, com passagem de acetonitrila (ACN) 100% (Merck, EUA) para remoção de impurezas existentes na fase estacionária;
- condicionamento, com passagem de fase móvel (ACN/H₂O) de mesma composição da primeira etapa de eluição (remoção do solvente usado durante a ativação e consequente condicionamento do cartucho);
- aplicação da amostra, adição da amostra previamente solubilizada com fase móvel (ACN/H₂O) de mesma composição da primeira etapa de eluição;
- etapas de eluição, com passagem de fases móveis (ACN/H₂O) com diferentes composições volumétricas de solventes.

3.4.2.1 Primeira extração – EFS1

A EFS1 iniciou-se pela ativação com 5 mL de ACN 100%, seguida pelo condicionamento com 5 mL de ACN 10%. A aplicação da amostra foi feita com auxílio de pipeta automática, acrescentando 10 mg do PDFM solubilizado em 1 mL de ACN 10%.

As etapas de eluição geraram 16 frações, as quais foram coletadas separadamente: 9 mL de ACN 10%, coletados em três frações de 3 mL (E1 - E3); 9 mL de ACN 15%, coletados em três frações de 3 mL (E4 - E6); 9 mL de ACN 20%, coletados em três frações de 3 mL (E7 - E9); 3 mL de ACN 24% (E10); 3 mL de ACN 28% (E11); 3 mL de ACN 30% (E12); 12 mL de ACN 100%, coletados em quatro frações de 3 mL (E13 - E16). O volume de coletado para cada fração corresponde a 3x o volume de leito.

3.4.2.2 Segunda extração – EFS2

A EFS2 foi realizada simultaneamente com os três cartuchos preparados em laboratório. Ela foi iniciada pela ativação de cada cartucho com 50 mL de ACN 100%, seguida pelo condicionamento de cada cartucho com 50 mL de ACN 10%. A aplicação da amostra foi feita sob a forma de pastilha, após a solubilização de cerca de 100 mg de PDFM em 1 mL de ACN 10%, seguida da adsorção em pequena quantidade de fase estacionária (C18). Foram preparadas três pastilhas, totalizando 300 mg de PDFM, e cada uma foi transferida para um cartucho com auxílio de espátula.

Os cálculos de proporcionalidade foram respeitados para o aumento de escala. Ou seja, a EFS1 foi feita com 10 mg de PDFM em cartucho com 1 mL de volume de leito e 3 mL de fase móvel, enquanto a EFS2 foi feita com 100 mg de PDFM em cada cartucho preparado com 20 mL de volume de leito e 60 mL de fase móvel. Manteve-se igual a relação de 3x o volume de leito para definir o volume de coletado de cada fração.

As etapas de eluição geraram 13 frações para cada cartucho: 180 mL de ACN 10%, coletados em três frações de 60 mL (E1 - E3); 180 mL de ACN 15%, coletados em três frações de 60 mL (E4 - E6); 180 mL de ACN 20%, coletados em três frações de 60 mL (E7 - E9); 60 mL de ACN 24% (E10); 60 mL de ACN 28% (E11); 60 mL de ACN 30% (E12); 60 mL de ACN 100% (E13). Considerou-se uma reproduzibilidade fiel nos três cartuchos preparados e as frações equivalentes foram coletadas juntas.

Uma vez que foram respeitadas as proporcionalidades para o aumento de escala, decidiu-se reunir essas frações baseando-se no padrão de revelação obtido com a CCD das 16 frações da EFS1. Sendo assim, foi feito o monitoramento por CCD (seção 3.2, pág. 24) das três frações finais (EFS2_1, EFS2_2 e EFS2_3). As duas

últimas foram submetidas a um processo de remoção de material graxo com 500 µL de MeOH 100% à temperatura reduzida (-16 °C), durante 24 h. Esse processo foi repetido no dia seguinte, reservando separadamente os sobrenadantes dos precipitados. Ao final, o solvente residual nos frascos dos sobrenadantes foi evaporado à pressão reduzida e em banho à 40 °C, sendo as frações pesadas posteriormente.

3.4.2.3 Terceira extração – EFS3

A fração EFS2_3 tratada com MeOH 100% em temperatura reduzida, foi submetida à EFS3. A etapa de ativação foi feita com 5 mL de ACN 100%, seguida pelo condicionamento com 5 mL de ACN 10%. A aplicação da amostra foi feita com auxílio de pipeta automática, após a solubilização de 25,4 mg da fração EFS2_3 em 1 mL de ACN 10% e transferência total do material, garantida pela lavagem do frasco com mais 1 mL de ACN 10%.

As etapas de eluição geraram 17 frações, as quais foram coletadas separadamente: 2 mL de ACN 10% (E10); 2 mL de ACN 11% (E11); 2 mL de ACN 12% (E12); 2 mL de ACN 13% (E13); 2 mL de ACN 14% (E14); 2 mL de ACN 15% (E15); 2 mL de ACN 16% (E16); 2 mL de ACN 17% (E17); 2 mL de ACN 18% (E18); 2 mL de ACN 19% (E19); 2 mL de ACN 20% (E20); 2 mL de ACN 21% (E21); 2 mL de ACN 22% (E22); 2 mL de ACN 23% (E23); 2 mL de ACN 24% (E24); 2 mL de ACN 25% (E25); 10 mL de ACN 100% (E100). Nesse caso, houve uma redução de volume de fase móvel para 2 vezes o volume de leito já que se fez um aumento gradiente linear da concentração de ACN como fase móvel.

3.4.2.4 Quarta extração – EFS4

A fração EFS2_2 tratada com MeOH 100% em temperatura reduzida, foi submetida à EFS4. A etapa de ativação foi feita com 5 mL de ACN 100%, seguida pelo condicionamento com 5 mL de ACN 10%. A aplicação da amostra foi feita com auxílio de pipeta automática, após a solubilização de 25,9 mg da fração EFS2_2 em 1 mL de ACN 10% e transferência total do material, garantida pela lavagem do frasco com mais 1 mL de ACN 10%.

As etapas de eluição geraram 34 frações, as quais foram coletadas separadamente: 4 mL de ACN 10% (E10); 4 mL de ACN 11% (E11); 4 mL de ACN 12% (E12); 4 mL de ACN 13% (E13); 8 mL de ACN 14%, coletados em frações de 4 mL (E14.1 - E14.2); 8 mL de ACN 15%, coletados em frações de 4 mL (E15.1 - E15.2); 8 mL de ACN 16%, coletados em frações de 4 mL (E16.1 - E16.2); 8 mL de ACN 17%, coletados em frações de 4 mL (E17.1 - E17.2); 8 mL de ACN 18%, coletados em frações de 4 mL (E18.1 - E18.2); 8 mL de ACN 19%, coletados em frações de 4 mL (E19.1 - E19.2); 8 mL de ACN 20%, coletados em frações de 4 mL (E20.1 - E20.2); 8 mL de ACN 21%, coletados em frações de 4 mL (E21.1 - E21.2); 8 mL de ACN 22%, coletados em frações de 4 mL (E22.1 - E22.2); 8 mL de ACN 23%, coletados em frações de 4 mL (E23.1 - E23.2); 8 mL de ACN 24%, coletados em frações de 4 mL (E24.1 - E24.2); 8 mL de ACN 25%, coletados em frações de 4 mL (E25.1 - E25.2); 4 mL de ACN 26% (E26); 4 mL de ACN 27% (E27); 4 mL de ACN 28% (E28); 4 mL de ACN 29% (E29); 4 mL de ACN 30% (E30); 10 mL de ACN 100% (E100).

3.4.3 Tratamento das frações

As frações oriundas dos experimentos de EFS tiveram o solvente orgânico evaporado à pressão reduzida e em banho à 40 °C. O material remanescente foi submetido ao processo de liofilização para remoção da água residual utilizando o liofilizador de bancada modelo L101 (Liobras, Brasil).

Finalizada a etapa de evaporação dos solventes, as frações foram pesadas para fins de cômputo dos rendimentos e monitoradas por CCD (seção 3.2, pág. 24). A partir dos resultados de CCD, algumas frações foram reunidas por similaridade de revelação, sendo as frações CC_2, EFS2_2, EFS2_3, EFS3_G1, EFS3_G3 e EFS4_G1 (detalhamento dos códigos é feito ao longo da discussão dos resultados), posteriormente analisadas por ressonância magnética nuclear.

A Figura 4 (pág. 32) ilustra simplificadamente as quatro EFS realizadas durante o presente estudo. O Quadro 2 (pág. 33) detalha os principais parâmetros estabelecidos para cada EFS.

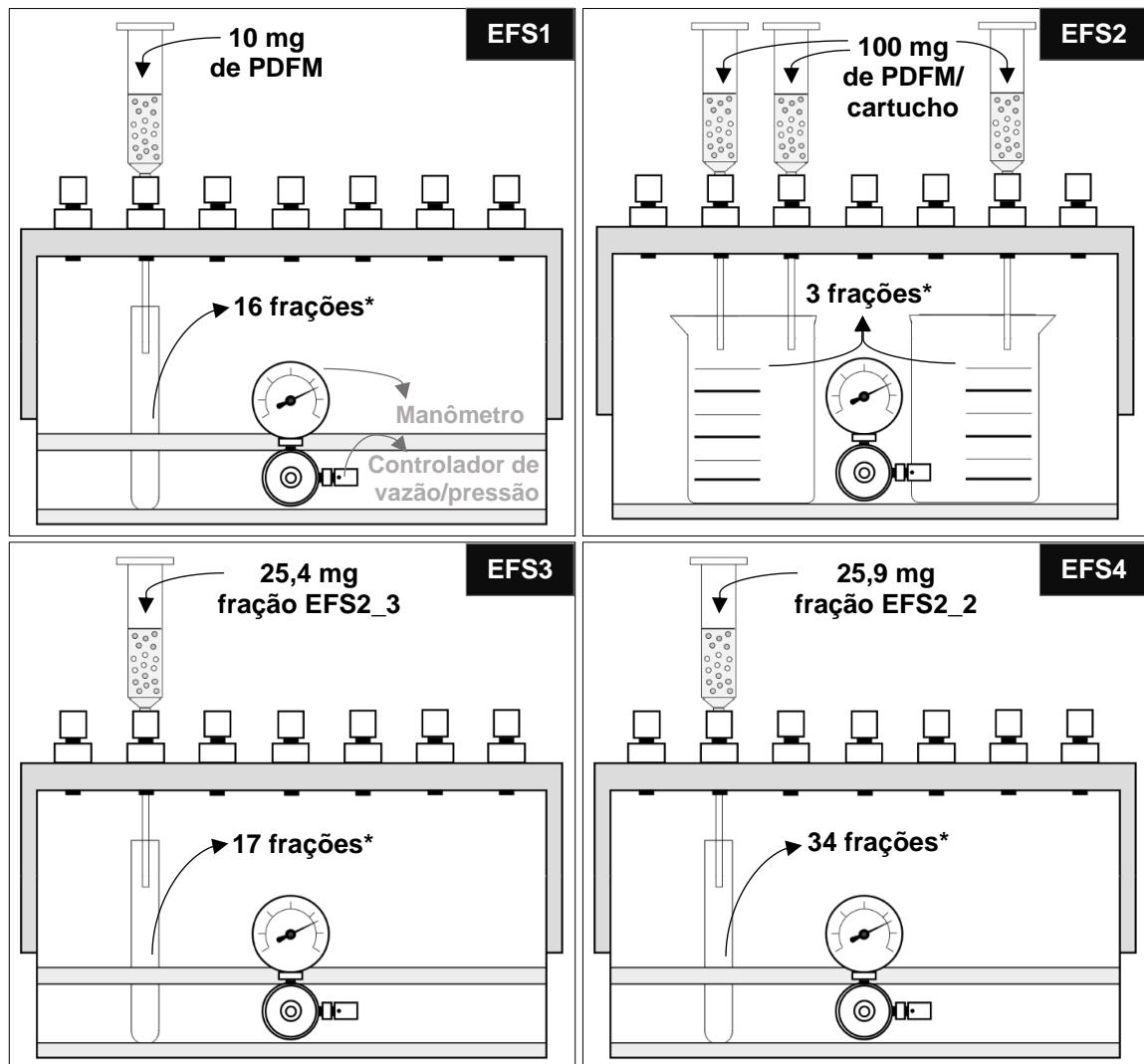


Figura 4 – Representação esquemática das quatro EFS, com detalhes de partes do *manifold*, além do material de origem para realização das extrações e o número de frações obtidas. *As frações foram recolhidas em tubos de ensaio ou béqueres individuais, a fim de mantê-las armazenadas separadamente (Fonte: autor).

Quadro 2 – Principais parâmetros das EFS realizadas no presente estudo.

	EFS1	EFS2*	EFS3	EFS4
Natureza da amostra	Extrato bruto (PDFM)	Extrato bruto (PDFM)	EFS2_3	EFS2_2
Quantidade amostral	10 mg	312,6 mg (± 100 mg/cartucho)	25,4 mg	25,9 mg
Tipo de cartucho	Comercial Quantidade de FE: 500 mg Capacidade total: 3 mL Altura da FE: 1,5 cm Diâmetro: 0,9 cm Volume de leito: 1 mL	Preparado Quantidade de FE: 10 g Capacidade total: 60 mL Altura da FE: 3,0 cm Diâmetro: 2,7 cm Volume de leito: 20 mL	Comercial Quantidade de FE: 500 mg Capacidade total: 3 mL Altura da FE: 1,5 cm Diâmetro: 0,9 cm Volume de leito: 1 mL	Comercial Quantidade de FE: 1 g Capacidade total: 6 mL Altura da FE: 1,4 cm Diâmetro: 1,2 cm Volume de leito: 2 mL
Ativação	5 mL de ACN 100%	50 mL de ACN 100%	5 mL de ACN 100%	5 mL de ACN 100%
Condicionamento (ACN/H₂O)	5 mL de ACN 10%	50 mL de ACN 10%	5 mL de ACN 10%	5 mL de ACN 10%
Gradiente de eluição** (ACN/H₂O)	ACN 10% (3x) ACN 15% (3x) ACN 20% (3x) ACN 24% ACN 28% ACN 30% ACN 100% (4x)	ACN 10% (3x) ACN 15% (3x) ACN 20% (3x) ACN 24% ACN 28% ACN 30% ACN 100%	ACN 10% ACN 11% ACN 12% ACN 13% ACN 12% ACN 13% ACN 14% [...] ACN 22% ACN 23% ACN 24% ACN 25% ACN 100%	ACN 10% ACN 11% ACN 12% ACN 13% ACN 14% (2x) ACN 15% (2x) [...] ACN 24% (2x) ACN 25% (2x) ACN 26% ACN 27% ACN 28% ACN 29% ACN 30% ACN 100%
Volume de recolhimento de cada fração	3 mL	180 mL (60 mL/cartucho)	2 mL e 10 mL [†]	4 mL e 10 mL [†]
Número de frações resultantes	16	3 [‡]	17	34

*Para essa extração foram preparados três cartuchos em paralelo, cada um contendo cerca de 100 mg de amostra; **Cada fase móvel de eluição representa uma nova concentração de ACN usada na extração, sendo repetida duas vezes quando seguida de “(2x)”, três vezes quando seguida de “(3x)” e quatro vezes quando seguida de “(4x)”; [†]O volume de 10 mL foi coletado somente na última fração, de limpeza, com ACN 100%; [‡]Essa extração, por representar o aumento de escala da extração anterior, teve as 13 frações reunidas em 3 frações finais, prevendo-se o mesmo comportamento de separação obtido com a EFS1.

3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UFRJ (LABRMN-IQ/UFRJ), em espectrofotômetro com frequência de ^1H a 400 MHz e ^{13}C a 125 MHz (Bruker Co., EUA). As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD_3OD) 99,8% (Cambridge Isotope Laboratories, EUA) e tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno.

Para o presente estudo, foram realizados experimentos de RMN em uma dimensão (1D), para ^1H e ^{13}C , e em duas dimensões (2D), para acoplamentos ^1H - ^1H (COSY – *homonuclear COrrelation SpectroscopY*), acoplamentos ^1H - ^{13}C à longa distância (HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence spectroscopy*) e acoplamentos ^1H - ^{13}C à curta distância (HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy*). Os espectros foram analisados no programa MestReNova®, versão 6.0.2-5475. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO E PROSPECÇÃO INICIAL

A extração em MeOH 100% das folhas processadas da espécie *Psychotria densicostata* (30,2 g) (Figura 5) (seção 3.1, pág. 24), resultou em 4,8 g de extrato seco (PDFM), que equivale ao rendimento de 15,9%.



Figura 5 – Aspecto das folhas secas de *Psychotria densicostata* após processamento.

O extrato apresentou aparência bastante viscosa e oleosa, com coloração verde escuro intenso (Figura 6), indicativo de carreamento de material graxo e corantes durante o processo extrativo.



Figura 6 – Aspecto de uma amostra do PDFM destinada à fracionamento.

O perfil químico do extrato foi avaliado por CCD em condições cromatográficas e de monitoramento/revelação para análise de três classes de metabólitos secundários: substâncias fenólicas, iridoides e alcaloides. Os resultados são mostrados na Figura 7. As manchas amarelas e laranjas mais intensas na placa A3 quando comparadas às manchas na placa A2, são um indicativo da presença de substâncias fenólicas no extrato, como as flavonas e flavonoides, subclasses dos flavonoides. As manchas escuras na região central das placas B1 e C1 (em destaque), associadas às manchas amarelas e castanhas das placas B3 e C3 (em destaque), podem estar relacionadas à presença de iridoides e/ou alcaloides no extrato.

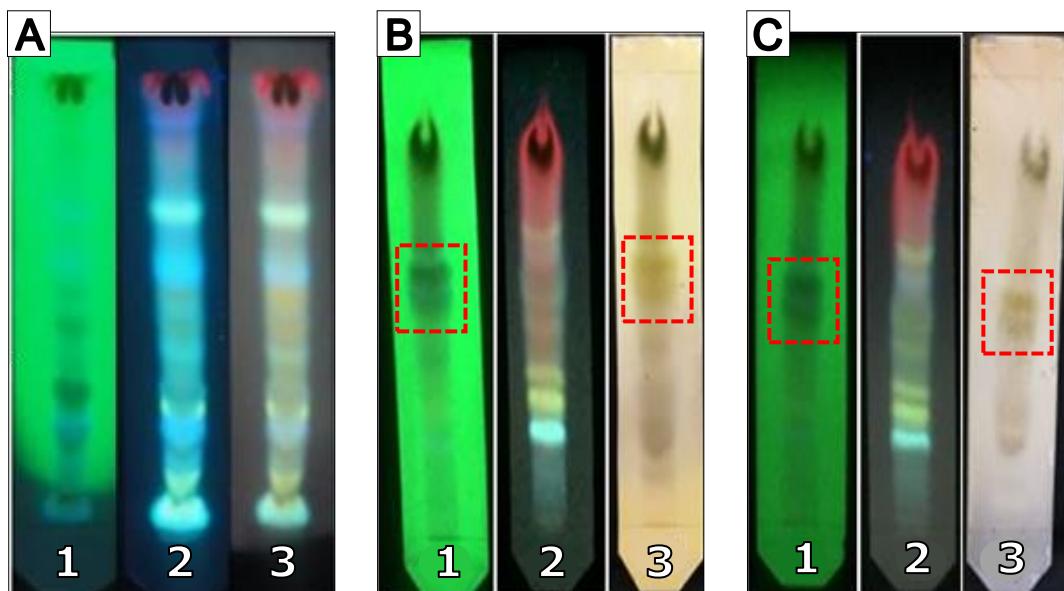


Figura 7 – Perfil cromatográfico em CCD do PDFM para análise de substâncias fenólicas (A) em AcOEt/AcOH/HCOOH/H₂O (100:11:11:27), iridoides (B) e alcaloides (C) em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fases móveis e reveladas em UV 254 nm (A1, B1 e C1), em UV 365 nm (A2, B2 e C2) e com reveladores: NP/PEG, em UV 365 nm (A3), reagente de Dragendorff/NaNO₂ (10%) (B3) e anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (C3). Concentração: 30 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: 10 µL.

4.2 SEPARAÇÃO PRELIMINAR DOS METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

A separação preliminar do material graxo e corantes dos metabólitos detectados por CCD no extrato bruto (101,6 mg) foi realizada por CC em Sephadex™ LH-20 (seção 3.3, pág. 26). As oito frações geradas nessa análise foram monitoradas por CCD (Apêndice A, pág. 63) e, a partir da similaridade no padrão de revelação, decidiu-se por reuni-las em três frações finais, como detalhado na Tabela 2 (pág. 37).

Tabela 2 – Dados referentes às frações obtidas com a CC em SephadexTM LH-20 do PDFM.

Código da fração	Fase móvel de eluição	Frações reunidas	Massa (mg)	Rendimento* (%)
CC_1	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 4:1 (v/v)	1 – 2	32,6	32,1
CC_2	CH ₂ Cl ₂ /Acetona 3:2 (v/v)	3 – 7	13,3	13,1
CC_3	MeOH 100%	8	47,8	47,0

*Os rendimentos foram calculados a partir da massa total de PDFM usado na extração.

O resultado do perfil cromatográfico por CCD das frações reunidas, mostrado na Figura 8, indica fortemente a presença de alcaloides (manchas em destaque nas placas A e C), metabólitos amplamente encontrados em espécies do gênero *Psychotria* (BERGER et al., 2021; LOPES et al., 2004). O objetivo principal foi remover material graxo na fração mais apolar (CC_1), além de concentrar as manchas que indicam a presença de alcaloides nas frações mais polares (CC_2 e CC_3).

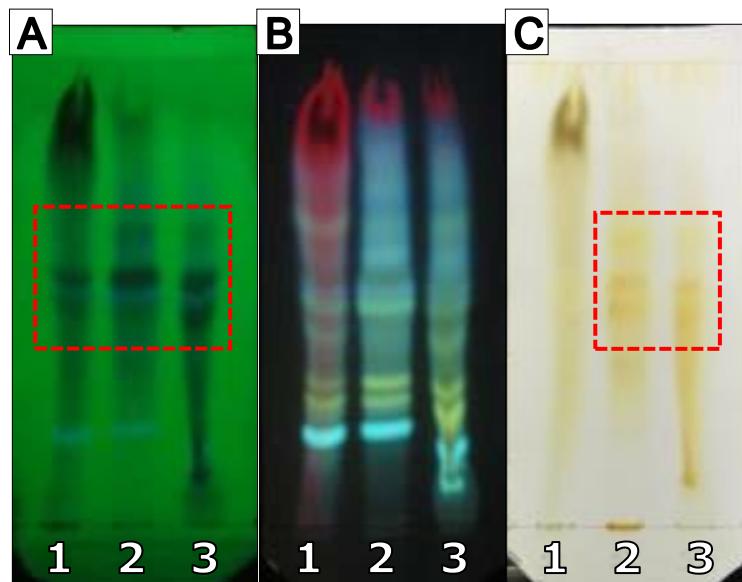


Figura 8 – Perfil cromatográfico em CCD das três frações finais geradas com a CC em SephadexTM LH-20 a partir do PDFM, em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e revelador reagente de Dragendorff/NaNO₂ (10%) (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 30 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: 10 µL.

O resultado do perfil cromatográfico por CCD das frações reunidas, mostrado na Figura 9 (pág. 38), evidenciou um padrão de revelação com manchas largas e concentradas no final da placa (placas A e C), demonstrando alta afinidade dos componentes das frações com a fase móvel utilizada nessa CCD. Esse resultado indica que a fase móvel utilizada nessa CCD não é a mais indicada para monitorar os alcaloides de interesse presentes no PDFM. As manchas escuras na região central

da placa C (em destaque) são indicativo de açúcares livres presentes nas frações (WAGNER; BLADT, 2009).

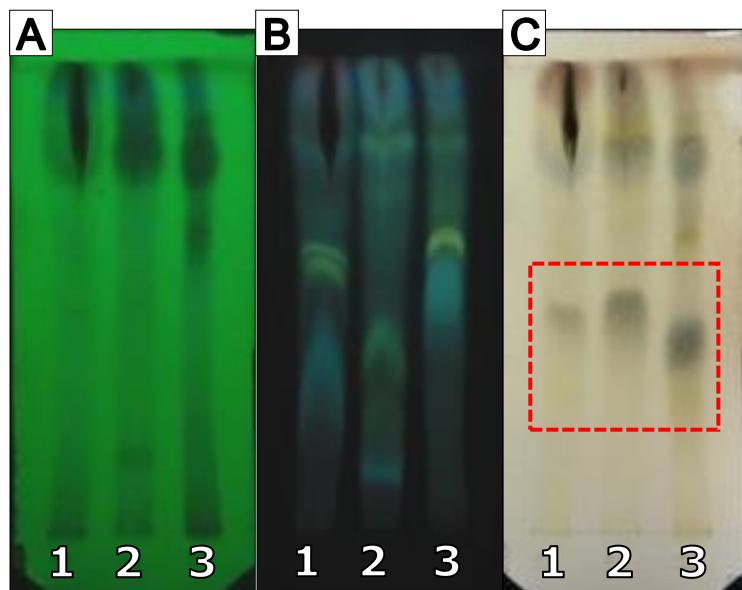


Figura 9 – Perfil cromatográfico em CCD das frações finais geradas com a CC em SephadexTM LH-20 a partir do PDFM, em CHCl₃/MeOH/H₂O (60:40:4) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 30 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: 30 µL.

Parte da fração CC_2 foi submetida à análise por RMN ¹H. O espectro de RMN (Figura 10, pág. 39) apresentou sinais entre δ_H 7,0 e 8,0 ppm, característicos de prótons ligados a carbono sp² aromáticos, com padrão de multiplicidade que corresponde a anel aromático orto-substituído e sinais entre δ_H 5,0 e 6,0 ppm, característicos de prótons de carbono sp² de ligação dupla e prótons cetálicos, ambos similares ao encontrado em alcaloides indólicos monoterpênicos presentes em espécies do gênero *Psychotria* (COSTA et al., 2020). Além disso, observaram-se também sinais entre δ_H 0,7 e 2,5 ppm, característicos de prótons alifáticos e sinais intensos entre δ_H 3,0 e 4,5 ppm, característicos de prótons carbinólicos, sugerindo a presença de açúcares. Esses resultados sugerem fortemente a presença de alcaloides indólicos na fração CC_2.

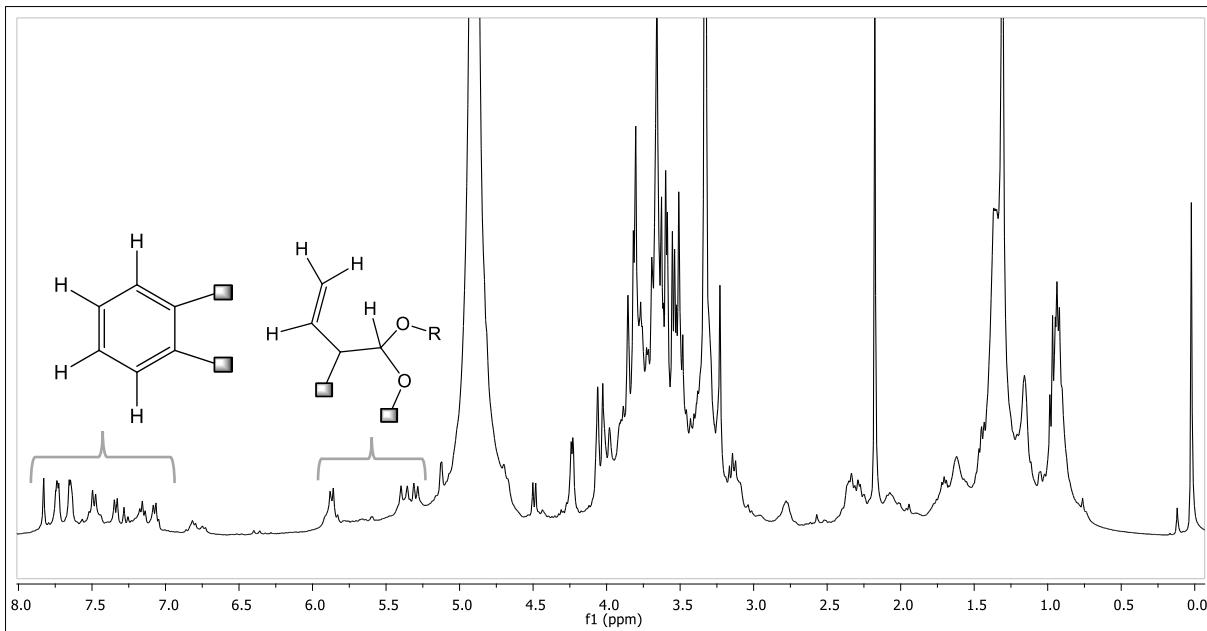


Figura 10 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração CC_2 gerada com a CC em SephadexTM LH-20 do PDFM, com destaque para sinais em regiões com padrões de multiplicidade compatíveis com porções de alcaloides indólicos monoterpênicos comuns em espécies do gênero *Psychotria* (BERGER et al., 2021; LOPES et al., 2004).

Por conta do forte indicativo de presença de alcaloides, possivelmente majoritários, como confirmado pelos resultados anteriores, este grupo metabólitos se tornou o objetivo principal deste trabalho e, portanto, as substâncias fenólicas foram colocadas em segundo plano, para trabalhos futuros.

4.3 SEPARAÇÃO DOS METABÓLITOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Com o objetivo de se obter uma fração enriquecida nos prováveis alcaloides indólicos presentes no extrato das folhas de *P. densicostata*, empregou-se o método de EFS desenvolvido pelo grupo para isolamento dos alcaloides indólicos monoterpênicos do extrato MeOH de folhas de *P. leiocarpa* (COSTA et al., 2020).

4.3.1 EFS1

Primeiramente, realizou-se um experimento de EFS (EFS1) em escala analítica, a partir de 10 mg do extrato bruto (seção 3.4.2.1, pág. 28) em condições bastante similares àquelas desenvolvidas inicialmente por Costa et al. (2020). Foram geradas 16 frações, cujo monitoramento por CCD é mostrado na Figura 11 (pág. 40). A partir da análise das frações e seguindo o padrão de separação das substâncias,

fez-se a reunião das frações em 4 grupos, de acordo com os destaques feitos nas placas B e C.

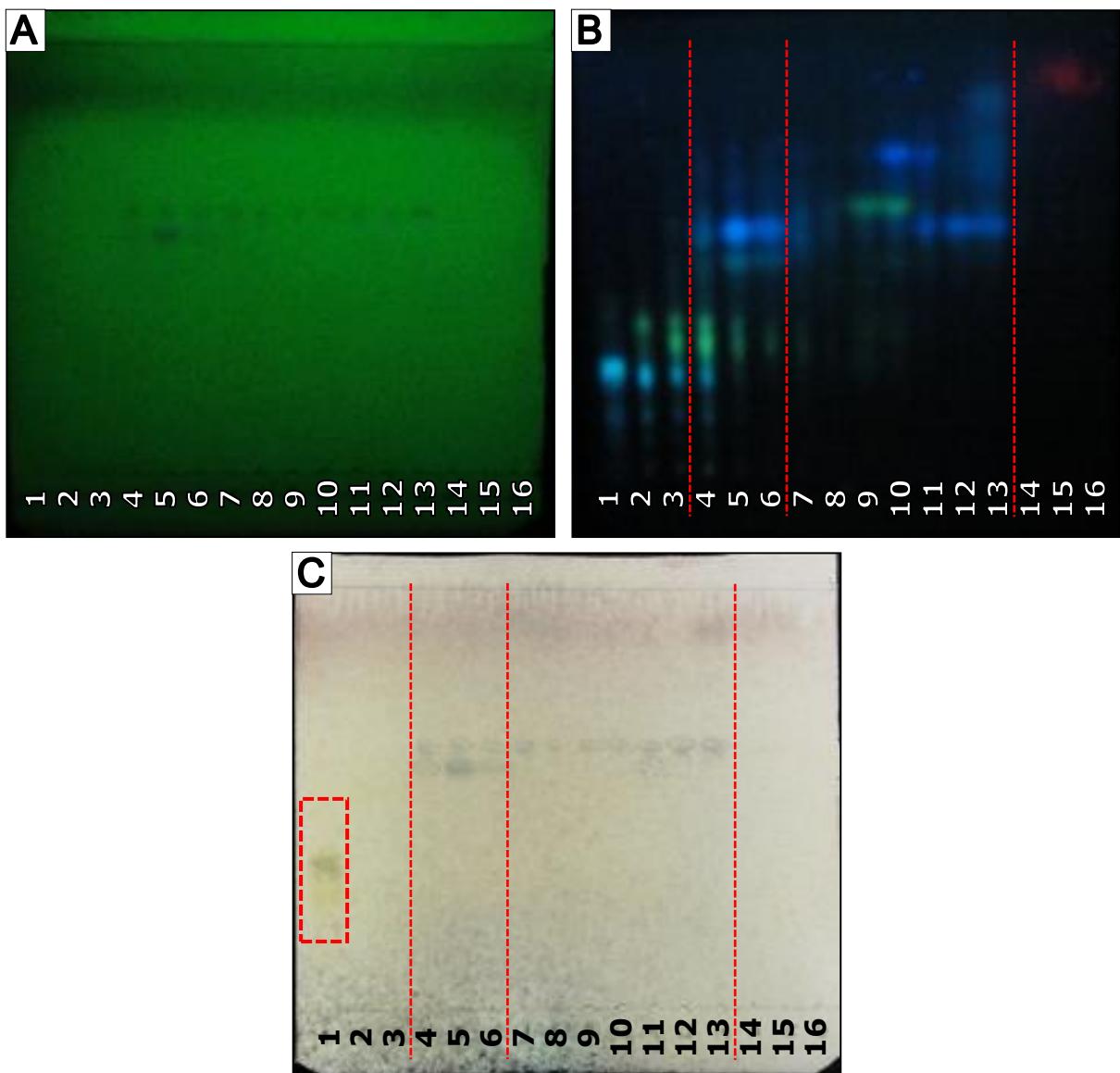


Figura 11 – Perfil cromatográfico em CCD das dezesseis frações geradas com a EFS1 a partir do PDFM, em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: não definida; Volume de aplicação: não definido.

As frações reunidas foram pesadas e codificadas (Tabela 3, pág. 41). A fração reunida EFS1_1 (4,6 mg) não foi visível após revelação sob luz UV 254 nm (Figura 11A) e, revelou após derivatização com anisaldeído sulfúrico (Figura 11C), um padrão de revelação diferente das outras frações obtidas e fator de retenção (*Rf*) menor do que as manchas reveladas com reagente de Dragendorff (Figura 8C, pág. 37), indicando ausência de alcaloides indólicos e a possível presença de

açúcares. As frações reunidas EFS1_2 (0,4 mg) e EFS1_3 (0,4 mg) foram visíveis sob irradiação à 254 nm e derivatização com anisaldeído sulfúrico (Figura 11A e C), apresentando R_f e perfil cromatográfico similares àqueles apresentados após derivatização com reagente de Dragendorff (Figura 8C, pág. 37), indicando a possível presença de alcaloides indólicos. A fração EFS1_4 foi descartada por apresentar-se essencialmente composta por material graxo (manchas avermelhadas sob luz UV 365 nm, placa B da Figura 11).

Tabela 3 – Dados referentes às frações obtidas com a EFS1 do PDFM.

Código da fração	Frações reunidas	Massa (mg)
EFS1_1	1 – 3	4,6
EFS1_2	4 – 6	0,4
EFS1_3	7 – 13	0,4
EFS1_4	14 – 16	-

4.3.2 EFS2

Visando a obtenção de maior quantidade das frações que mostraram a possível presença de alcaloides indólicos, realizou-se um aumento de escala para a separação por EFS a partir de 312,6 mg do extrato bruto (seção 3.4.2.2, pág. 29). De forma a otimizar o processo, 13 frações coletadas foram reunidas em 3 frações finais, de acordo com os perfis cromatográficos (padrão de revelação similar ao mostrado na Figura 11 (pág. 40).

O rendimento das frações obtidas com a EFS em escala analítica (EFS1), associado à possibilidade de supersaturar o cartucho comercial (C18, 500 mg) com muita amostra, mostraram-se como fatores limitantes para a realização do aumento de escala. Sendo assim, sugeriu-se o preparo de cartuchos maiores, em seringas plásticas preenchidas com sílica quimicamente modificada com octadecilsilanos (C18) (seção 3.4.1, pág. 26). A quantidade de fase estacionária utilizada foi vinte vezes mais que aquela utilizada no cartucho comercial da EFS1. O método foi replanejado com a manutenção do volume de leito proporcional à quantidade de fase estacionária (em escala analítica, cartucho comercial de C18, 500 mg de fase estacionária e 1 mL de volume de leito; no aumento de escala, cartuchos confeccionados com 10 g de C18, resultando 20 mL de volume de leito). O aumento de volume de leito poderia provocar uma eluição antecipada dos constituintes do extrato, caso a amostra fosse adicionada

em solução. Por isso, a aplicação foi feita na forma de pastilha, método de preparo que consiste na solubilização da amostra seguida da adsorção desta em uma pequena quantidade de fase estacionária. Dessa maneira, possibilitou-se o uso de amostras em maior quantidade, viabilizando o estudo sobre o efeito do aumento de escala.

O perfil cromatográfico em CCD das 3 frações reunidas (Figura 12, pág. 43) foi comparado com o da fração análoga produzida a partir do extrato MeOH das folhas de *P. leiocarpa* (Figura 12 - Ref). Os resultados evidenciaram o enriquecimento dos alcaloides nas frações EFS2_2 (27,7 mg) e EFS2_3 (30,7 mg) (manchas em destaque na região central das placas A, C e D - Figura 12). Os fatores de retenção (R_f) dessas manchas são similares àqueles apresentados pela amostra de referência, bem como o padrão de revelação com reagente anisaldeído sulfúrico (placa C, em destaque). Contudo, há diferenças no padrão de revelação das manchas com reagente de Dragendorff (placa D, em destaque). De *P. leiocarpa* foram isolados dois alcaloides com anel lactâmico (**1** e **2**) e um alcaloide amino ácido (**3**) (Figura 13, pág. 44) (COSTA et al., 2020). Esses alcaloides não são revelados pelo reagente de Dragendorff (MERCK, 1972). Desse modo, os resultados obtidos para *P. densicostata* parecem indicar a presença de alcaloides com grupo amino livre.

Por conta da fase reversa, C18, (seção 3.4.1, pág. 26) a fração EFS2_1 (159,5 mg) agrupa as substâncias mais polares presentes no PDFM. Ela é caracterizada pela ausência de manchas escuras sob luz UV 254 nm na placa A e mancha escura na base da placa C (Figura 12, pág. 43). A fração EFS2_3 agrupa as substâncias com menor polaridade, confirmada pela maior intensidade de manchas escuras e avermelhadas (material graxo e corantes) no topo das placas A, B e C. A avaliação completa da CCD (Figura 12) explicita a complexidade da mistura de metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie *P. densicostata*, frente às tentativas de separação das substâncias majoritárias presentes no PDFM.

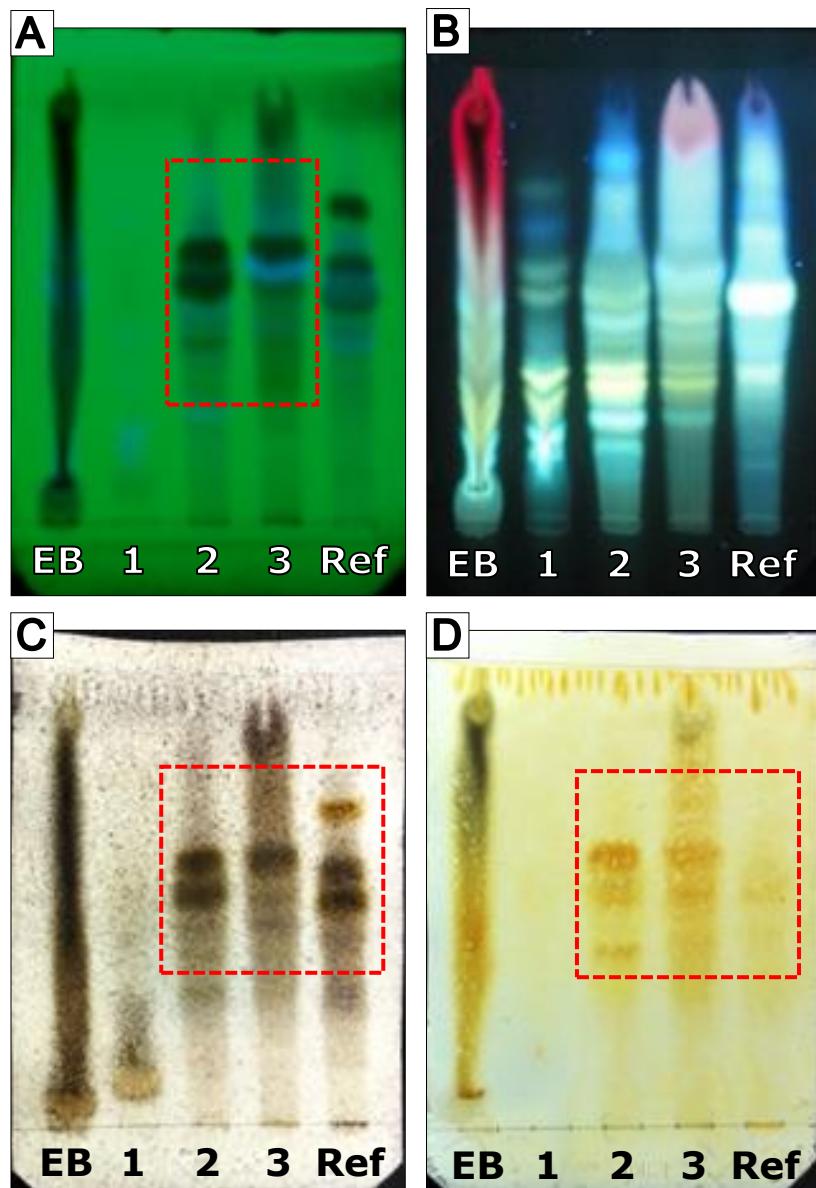


Figura 12 – Perfil cromatográfico em CCD das três frações finais geradas com a EFS2 a partir do PDFM, em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e reveladores: anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C) e reagente de Dragendorff/NaNO₂ (10%) (placa D). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 50 mg.mL⁻¹ (EB) e 25 mg.mL⁻¹ (demais frações); Volume de aplicação: 10 µL. (EB) Extrato Bruto - PDFM; (1) EFS2_1; (2) EFS2_2; (3) EFS2_3; (Ref) Fração alcaloídica referência de *Psychotria leiocarpa* (COSTA et al., 2020).

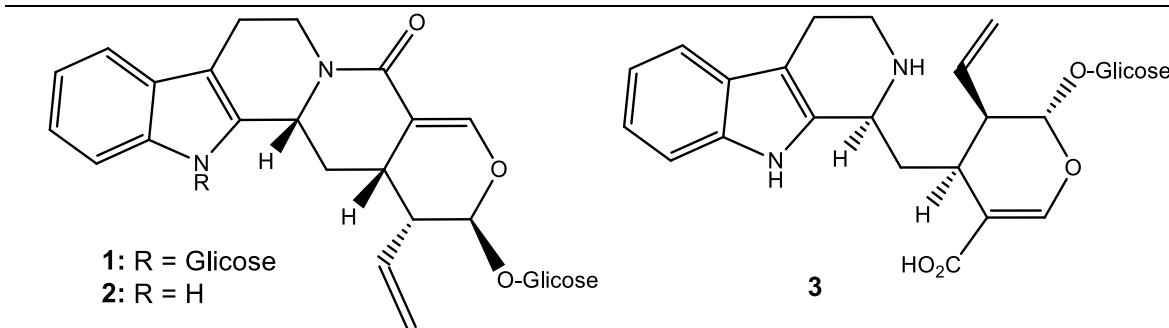


Figura 13 – Estrutura química dos três alcaloides indólicos monoterpênicos isolados de folhas de *Psychotria leiocarpa*: *N*-glicopiranossilvinicosamida (1), vincosamida (2) e ácido estrictosidínico (3) (COSTA et al., 2020).

No intuito de aprimorar a purificação das frações EFS2_2 e EFS2_3, ambas foram submetidas a remoção de material graxo com uso de MeOH à baixa temperatura (seção 3.4.2.2, pág. 29). Assim, segue esquematizado na Tabela 4 os dados referentes às três frações resultantes da EFS2.

Tabela 4 – Dados referentes às frações obtidas com a EFS2 do PDFM.

Código da fração	Frações reunidas	Massas e Rendimentos*	
		Antes do tratamento com MeOH 100%	Após o tratamento com MeOH 100%
EFS2_1	1 – 3	159,5 mg (51,0%)	–
EFS2_2	4 – 7	27,7 mg (8,9%)	27,5 mg (8,8%)
EFS2_3	8 – 13	30,7 mg (9,8%)	28,2 mg (9,0%)

*Os rendimentos foram calculados a partir da massa total de PDFM usado na EFS2.

A fração EFS2_1 é a que apresenta o maior rendimento, não apresentando por CCD a presença de alcaloides indólicos. A fração EFS2_3 mostrou uma redução no rendimento após tratamento com MeOH 100%, uma vez que era a fração com maior concentração de material graxo.

As frações EFS2_2 e EFS2_3 foram submetidas às técnicas de RMN em uma e duas dimensões. A análise detalhada dos espectros e a comparação com dados da literatura (COSTA et al., 2016; PATTIHY-LUKÁTS et al., 1997) indicou a presença de duas substâncias majoritárias na fração EFS2_2, cujos dados de deslocamento químico em RMN ¹H e ¹³C parecem sugerir uma mistura de diastereoisômeros do alcaloide indólico monoterpeno estrictosidina (7) e de uma substância majoritária na fração EFS2_3 cujos dados sugeriram ser estrictosidina (7) (Figura 14, pág. 45; Espectros de RMN em Apêndice B-Apêndice S, págs. 64-81).

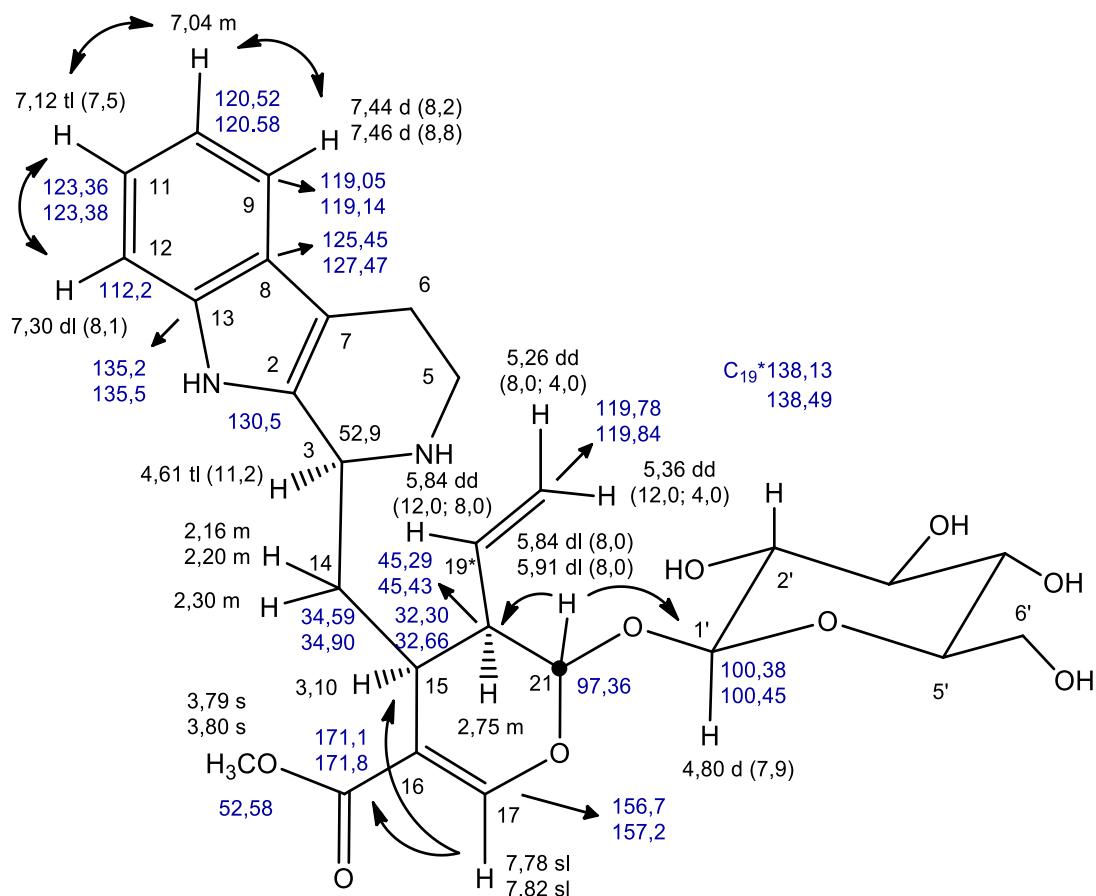


Figura 14 – Dados extraídos dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e das correlações nos espectros COSY (¹H-¹H), HSQC (¹H-¹³C) e HMBC (¹H-¹³C a longa distância) (400 MHz, CD₃OD) da fração EFS2_2 oriunda da separação por EFS do extrato bruto das folhas de *Psychotria densicostata*.

4.3.3 EFS3

A fim de refinar ainda mais a separação obtida, a fração EFS2_3 foi submetida novamente à EFS (seção 3.4.2.3, pág. 30). O resultado do perfil cromatográfico por CCD das 17 novas frações, geradas a partir da fração EFS2_3, é mostrado na Figura 15 (pág. 46). As manchas escuras na placa A (em destaque) revelaram uma substância majoritária em mistura com outras minoritárias.

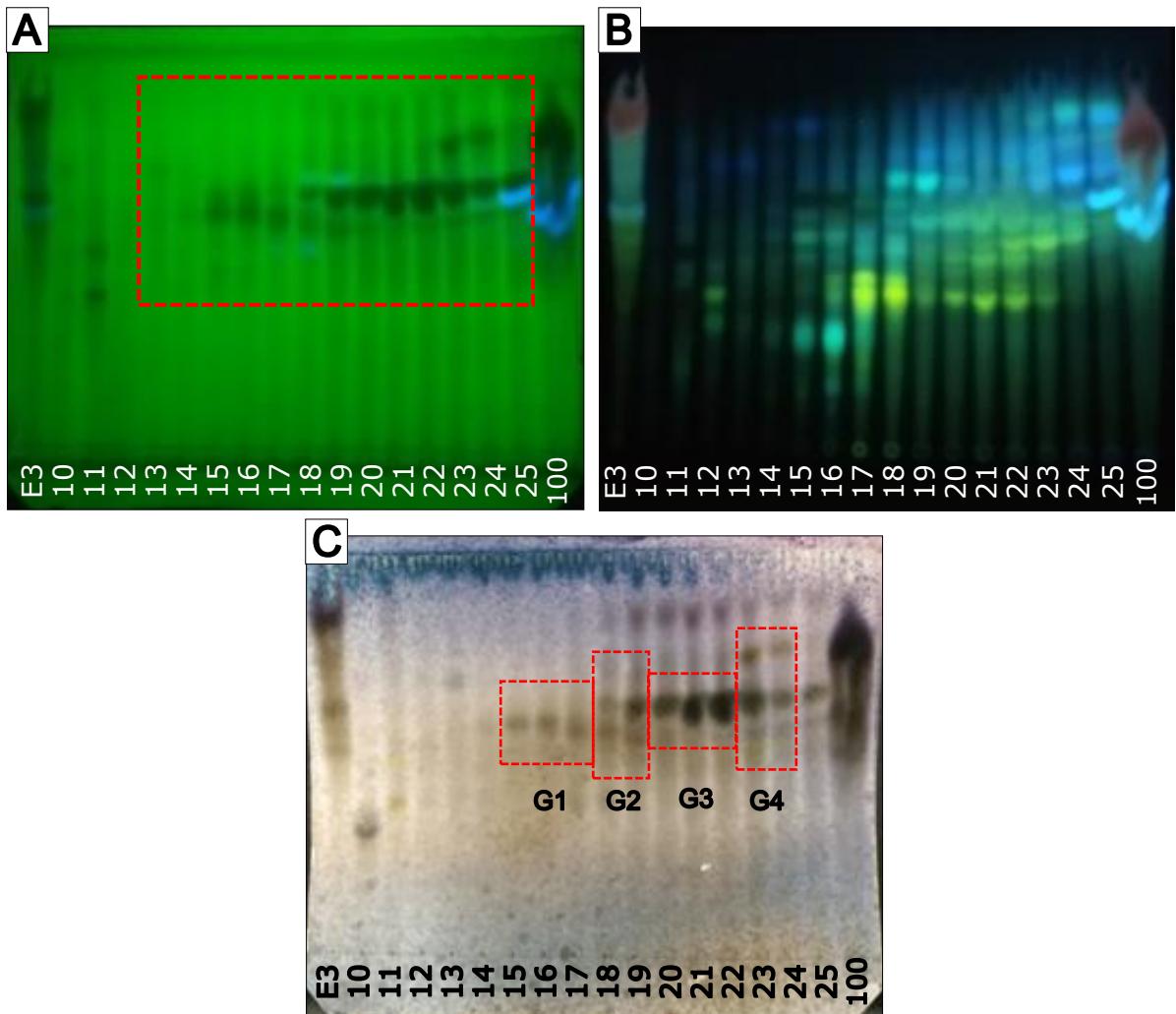


Figura 15 – Perfil cromatográfico em CCD das dezessete frações geradas com a EFS3, a partir da fração EFS2_3 (E3), em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: não definida (por conta do rendimento muito baixo, fixou-se um volume de 100 µL de MeOH para ressuspensão das frações); Volume de aplicação: 5 µL. A numeração das frações indica o teor de ACN, em solução aquosa, usado como fase móvel em cada eluição.

Devido ao baixo rendimento mássico das frações geradas a partir da EFS3 (Apêndice T, pág. 82), quatro grupos de frações foram reunidos por similaridade de revelação (Figura 15C, em destaque). Pelo padrão de revelação, os grupos EFS3_G1 (reunião das frações EFS3_15 a EFS3_17) e EFS3_G3 (reunião das frações EFS3_20 a EFS3_22) apresentaram menos manchas escuras e, supostamente, uma pureza maior de substâncias. Ambas foram enviadas para análise por RMN ¹H, porém os resultados demonstraram-se muito similares aos obtidos com as frações EFS2_2 e EFS2_3, indicando a necessidade de uma purificação mais acurada.

4.3.4 EFS4

Após a apreciação dos resultados da EFS3, viu-se a necessidade de buscar uma otimização do processo de separação e enriquecimento de alcaloides. Para tal, foram aplicados os procedimentos estabelecidos para a EFS4 (seção 3.4.2.4, pág. 30). O resultado do perfil cromatográfico das 34 novas frações, geradas a partir da fração EFS2_2, é mostrado na Figura 16 (pág. 48). As manchas escuras que representam os alcaloides, estão concentradas nas primeiras frações e, assim como na Figura 15 (pág. 46), fica evidente a complexidade composicional das frações enriquecidas até o presente momento.

Para se obter uma melhor resolução da separação por CCD, refez-se a análise apenas com as frações EFS4_12 a EFS4_16.1, e incluindo dois grupos de frações reunidas por similaridade de revelação (em destaque), EFS4_G1 (reunião das frações EFS4_16.2 a EFS4_18.1) e EFS4_G2 (reunião das frações EFS4_27 a EFS4_30). Os rendimentos mássicos das frações estão descritos no Apêndice U (pág. 83). Os resultados da CCD de confirmação do perfil cromatográfico são mostrados na Figura 17 (pág. 49).

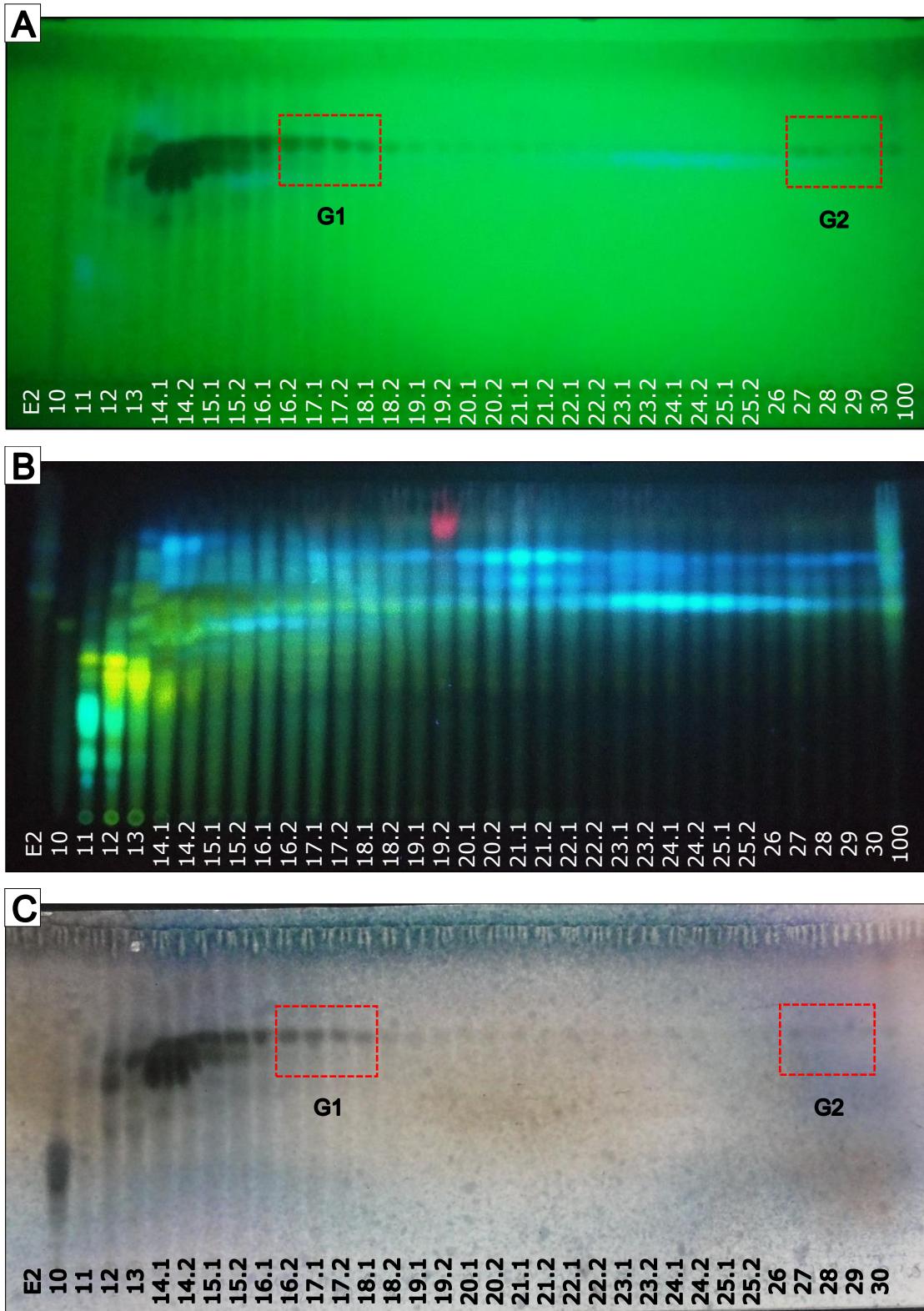


Figura 16 – Perfil cromatográfico em CCD das trinta e quatro frações geradas com a EFS4, a partir da fração EFS2_2 (E2), em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: não definida (por conta do rendimento muito baixo, fixou-se um volume de 100 µL de MeOH para ressuspensão das frações); Volume de aplicação: 5 µL. A numeração das frações indica o teor de ACN, em solução aquosa, usado como fase móvel em cada eluição. As frações indicadas com “.1” e “.2” representam a repetição do teor de ACN em duas eluições sucessivas.

As manchas que representam os alcaloides enriquecidos apresentaram uma boa definição, sendo possível perceber uma separação das duas manchas mais escuras (placas A e C). A fração EFS4_13 apresenta em maior concentração apenas a mancha com menor R_f , enquanto a fração EFS4_G1 apresenta em maior concentração apenas a mancha com maior R_f . Esse resultado indica que é possível separar essas duas manchas, sendo preciso atentar-se à composição de fase móvel de eluição em EFS. A fração EFS4_G1 apresentou apenas uma mancha nas placas A e C e uma infinidade de manchas sob luz UV 365 nm (placa B), as quais podem ser substâncias minoritárias e não identificáveis por análise de RMN.

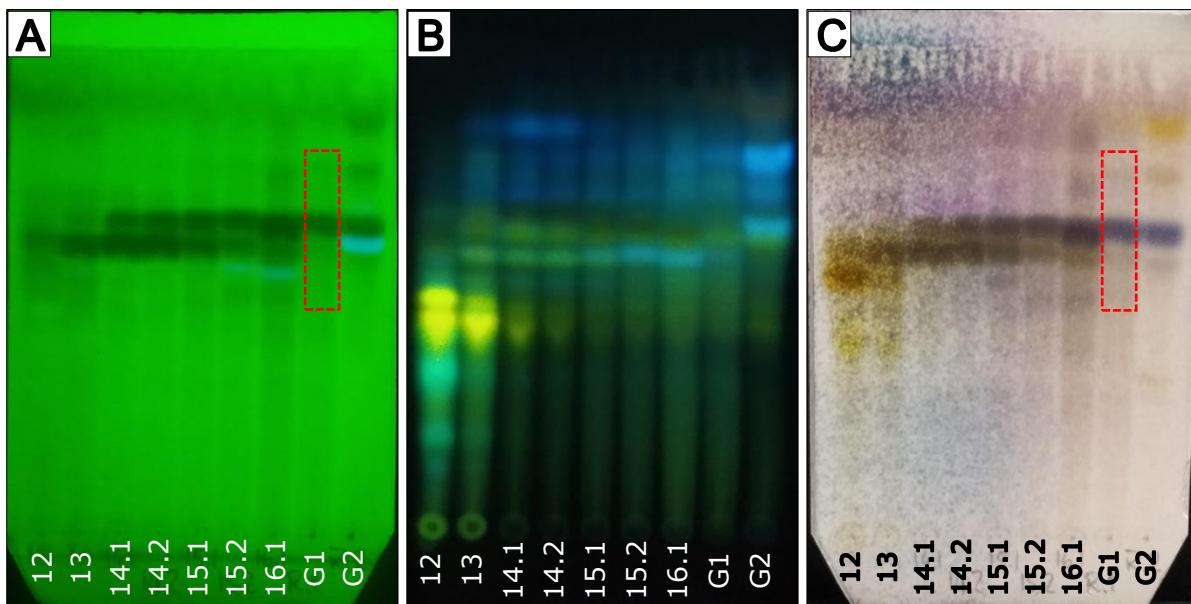


Figura 17 – Perfil cromatográfico em CCD das frações de maior interesse geradas com a EFS4, a partir da fração EFS2_2, em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 5 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: 10 µL. A numeração das frações indica o teor de ACN, em solução aquosa, usado como fase móvel em cada eluição. As frações indicadas com “.1” e “.2” representam a repetição do teor de ACN em duas eluições sucessivas.

As frações 10, 11 e 12 foram analisadas novamente por CCD (Figura 18, pág. 50), por conta do perfil cromatográfico com manchas fluorescentes intensas sob luz UV 254 nm (Figura 16B, pág. 48). As manchas verdes, azuis e alaranjadas mais intensas na placa C, após a derivatização com revelador NP/PEG, indicam a possível presença de substâncias fenólicas. A partir das avaliações dos espectros de RMN em 1D e 2D (Apêndice B-Apêndice S, págs. 64-81), percebeu-se a existência de sinais minoritários que indicaram a existência de substâncias fenólicas, nas frações EFS2_2

e EFS2_3. Esse resultado demonstra um fator de resposta muito maior para essas substâncias fenólicas quando comparadas aos alcaloides presentes no extrato.

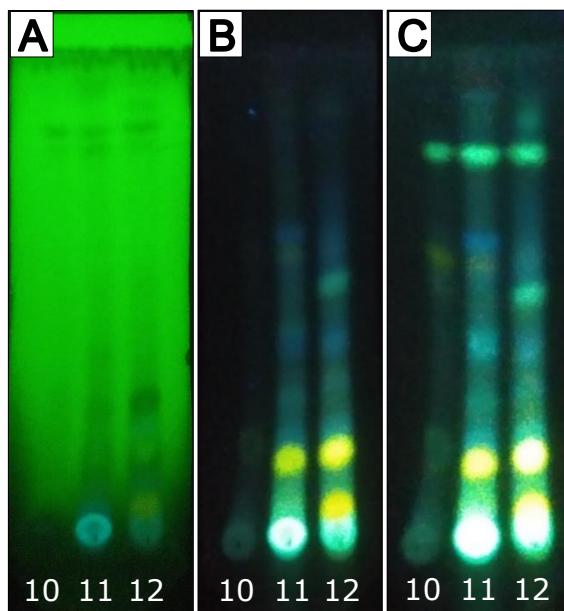


Figura 18 – Perfil cromatográfico em CCD das frações 10, 11 e 12 geradas com a EFS4, a partir da fração EFS2_2, em AcOEt/AcOH/HCOOH/H₂O (100:11:11:27), como fase móvel e revelador NP/PEG, em UV 365 nm (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 5 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: 10 µL.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDE INDÓLICO MONOTERPÊNICO

Os resultados por CCD (Figura 17, pág. 49) das frações de maior interesse geradas com a EFS4 sugeriram a purificação de um alcaloide na fração EFS4_G1. Para verificação desta prerrogativa, essa fração (2,0 mg) foi analisada por técnicas de RMN em 1D (RMN ¹H) e 2D (COSY e HSQC) (Apêndice V-Apêndice DD, pág. 84-92). A análise cuidadosa dos espectros mostrou uma substância amplamente majoritária, mas ainda em mistura, como evidenciado no espectro de RMN ¹H pelos sinais minoritários visíveis especialmente na região entre δ_H 6,5 e 8,0 ppm (Figura 19, pág. 51). A comparação dos dados espectroscópicos obtidos para a fração EFS4_G1 com os dados da literatura permitiu identificar a substância enriquecida do extrato metanólico das folhas da espécie *P. densicostata* por EFS, como o alcaloide indólico monoterpênico estrictosidina (**7**) alcaloide encontrado em outras espécies do gênero *Psychotria* (CALIXTO et al., 2016, 2017; DE CARVALHO JUNIOR et al., 2017, 2019).

A Tabela 5 (pág. 52) correlaciona os dados espectroscópicos da fração EFS4_G1 com dados obtidos na literatura.

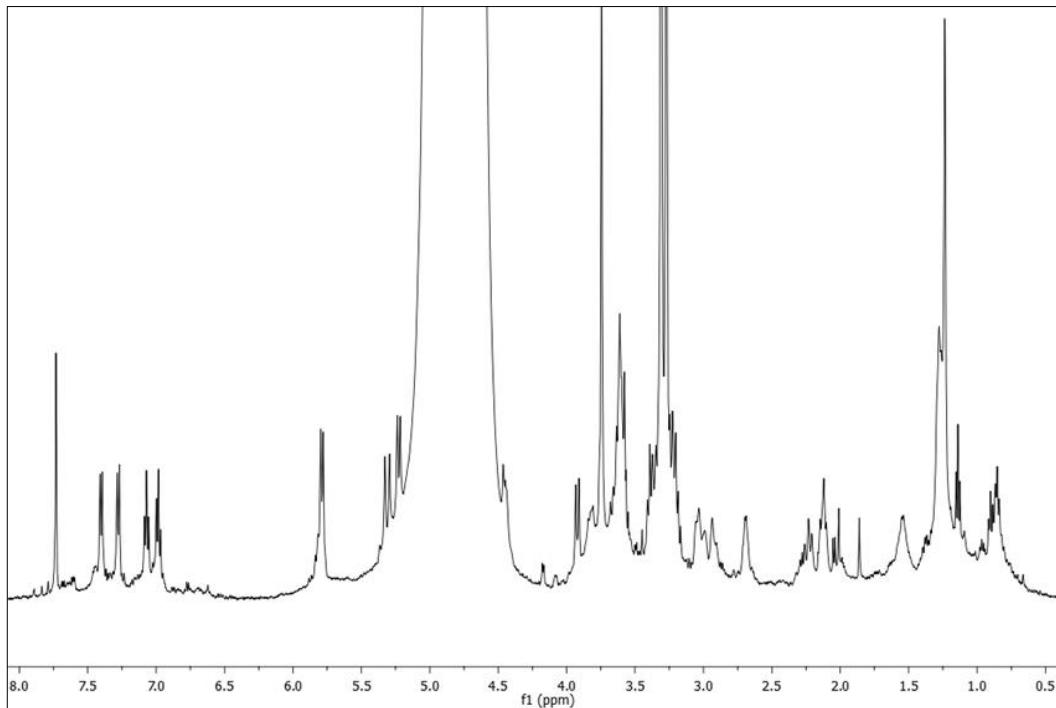


Figura 19 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração EFS4_G1.

A estrictosidina (**7**) é o alcaloide indólico monoterpênico considerado precursor biossintético de outros alcaloides indólicos similares. A rota biossintética da estrictosidina (**7**) é iniciada pela reação de descarboxilação do aminoácido L-triptofano (**4**) gerando a triptamina (**5**), seguida da condensação da triptamina (**5**) com o iridoide secologanina (**6**) (Figura 20) (ANTHONY et al., 2021; DEWICK, 2002).

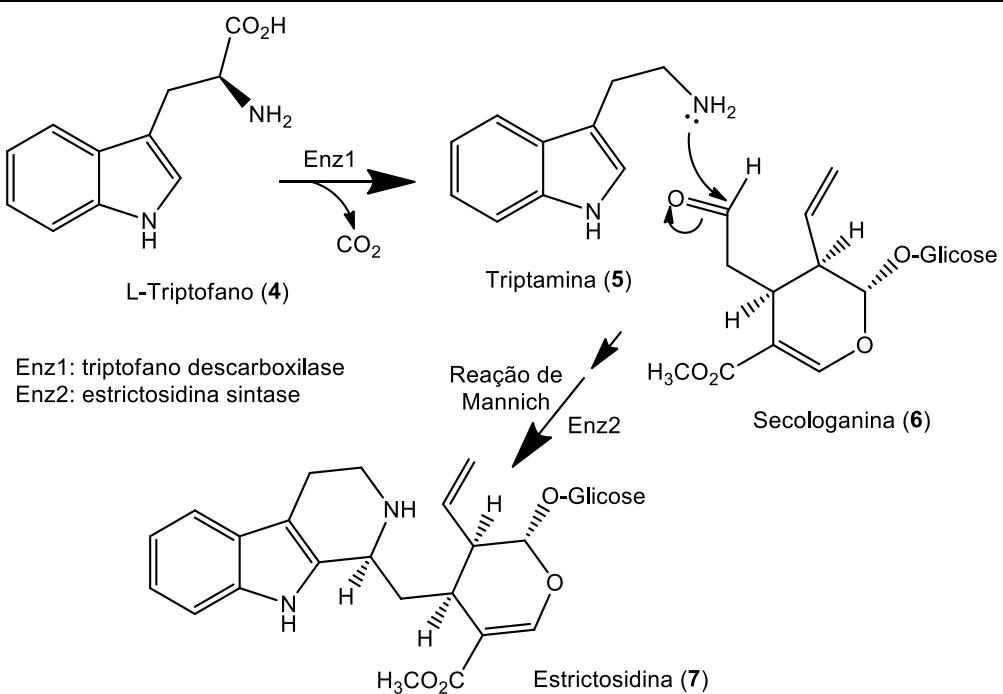


Figura 20 – Rota biossintética da estrictosidina (**7**) (Adaptado de DEWICK, 2002).

Tabela 5 – Dados espectroscópicos obtidos por técnicas de RMN (400 MHz, CD₃OD) em 1D e 2D da fração EFS4_G1 comparados a dados da literatura.

Posição	δ_{H} mult. (J em Hz)			δ_{C} mult. (J em Hz)		
	EFS4_G1	M-2*	M-1*	EFS4_G1**	M-2*	M-1*
2	-		-		130,4	133,2
3	4,49 [#]	4,68 d (11,4)	4,30	51,4	53,4	52,4
5	3,33** e 3,64**	3,74 d (6,0); 3,1 (m)	α : 3,17 β : 3,50	41,3	42,3	42,9
6	3,04** e 2,98**	3,4 t (4,8); 3,0 d (6,6)	α : 2,85 β : 2,95	18,7	23,2	21,0
7		-	-		108,0	107,7
8		-	-		127,2	127,9
9	7,40 d (7,8)	7,47	7,40	117,6	119,1	118,8
10	6,99 m	7,04	6,98	119,1	120,2	120,1
11	7,07 tl (8,0)	7,13	7,07	121,8	123,3	122,7
12	7,28 d (8,0)	7,33	7,29	110,8	112,2	112,0
13		-	-		137,8	137,9
14	2,12 [#] e 2,20 [#]	2,3 ddd (1,8; 11,4; 13,2) e 2,2 ddd (3,6; 12; 13,2)	<i>proS</i> : 2,21 <i>proR</i> : 2,09	33,9	34,7	35,9
15	3,09 [†] m	3,12 d (4,8)	3,06	30,9	32,5	32,5
16	-	-	-		108,6	109,9
17	7,73 s	7,8 s	7,74	155,2	156,6	156,1
18	5,31 d (17,3) 5,23 d (10,6)	5,2 e 5,3 (m)	<i>Z</i> : 5,33 <i>E</i> : 5,24	118,7	119,4	119,5
19	5,76-5,84 m	5,851 dd (3; 12)	5,85	134,2	134	135,7
20	2,69 [†] m	2,7 dd (3,8; 8,4)	2,70	44,0	45,3	45,6
21	5,79 (8,7)	5,853 d (8,4)	5,85	96,2	97,5	97,5
22	-		-		171,3	170,6
1'	4,81**	4,82 (m)	4,80	99,0	100,1	100,3
2'	3,24 [#]		3,45-3,20		74	78,6
3'			3,45-3,20		78	78,0
4'			3,45-3,20		73	74,6
5'			3,45-3,20		71	71,7
6'	3,92 d (11,5) e 3,65 [#]	3,6 e 3,5 (m)	3,97 e 3,65	61,3	62,7	62,9
OCH ₃	3,74 s	3,8 s	3,77	51,2	52,7	52,4

*Modelo M-1, (400 MHz, CD₃OD) (PATTHY-LUKÁTS et al., 1997); modelo M-2 (600 MHz, CD₃OD) (COSTA et al., 2016); **dados extraídos através das correlações ¹H-¹³C no espectro HSQC; [†]sinal sobreposto a outros sinais; [#]dados extraídos através das correlações ¹H-¹H no espectro COSY.

5 CONCLUSÕES

O extrato metanólico das folhas de *P. densicostata* apresentou-se como uma mistura complexa de metabólitos secundários contendo alcaloides indólicos monoterpênicos, classe de compostos comum em espécies do gênero *Psychotria* (BERGER et al., 2021; LOPES et al., 2004). O uso da técnica de extração por cromatografia em coluna, em SephadexTM LH-20, não se mostrou eficiente em termos de enriquecimento dos alcaloides em frações específicas. O uso de extração em fase sólida em fase reversa, baseada em estudo similar aplicado a outra espécie do gênero (COSTA et al., 2020), mostrou-se bastante eficaz para este fim. O aumento de escala de isolamento reproduziu os resultados obtidos em escala analítica. O rendimento das frações enriquecidas em alcaloides foi cerca de 18% em relação à massa de extrato, obtendo-se também uma fração majoritária (51%) contendo substâncias com maior polaridade, provavelmente açúcares livres e compostos fenólicos.

O processo de otimização de isolamento dos alcaloides envolveu três ciclos de extrações em fase sólida obtendo-se como resultado 2,0 mg de uma fração contendo uma substância majoritária. A análise da fração por técnicas de RMN em uma e duas dimensões permitiu a identificação do alcaloide indólico monoterpênico estrictosidina (7), encontrado em outras espécies do gênero *Psychotria* (CALIXTO et al., 2016, 2017; DE CARVALHO JUNIOR et al., 2017, 2019).

O presente trabalho reforçou a importância de se utilizar técnicas diferentes e modernas para extração de metabólitos secundários. O uso de metodologias extractivas, com menos etapas intermediárias e que partam do material bruto são práticas e versáteis. Por consequência, a detecção e/ou isolamento de substâncias torna-se mais viável, colaborando assim para a base de conhecimentos em produtos naturais.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo reforçou a eficácia da metodologia de extração em fase sólida estabelecida pelo grupo para separação e isolamento de substâncias naturais de interesse. Os resultados obtidos estão atualmente sendo a base de uma tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química-IQ-UFRJ, que visa ampliar o conhecimento da composição de alcaloides, o estudo da presença de outros metabólitos e o potencial terapêutico da espécie.

Espera-se que novos estudos com outras espécies do gênero *Psychotria* e com espécies de outros gêneros correlatos da família Rubiaceae possam ser facilitados a partir das técnicas, resultados obtidos e discussões aqui descritas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E. R.; JARDIM, J. G.; SANTOS, B. A.; MELO, F. P. L.; TALORA, D. C.; FARIA, D.; CAZETTA, E. **Effects of habitat loss on taxonomic and phylogenetic diversity of understory Rubiaceae in Atlantic forest landscapes.** *Forest Ecology and Management*, v. 349, p. 73–84, 2015.
- ANTHONY, S. M.; TONA, V.; ZOU, Y.; MORRILL, L. A.; BILLINGSLEY, J. M.; LIM, M.; TANG, Y.; HOUK, K. N.; GARG, N. K. **Total Synthesis of (-)-Strictosidine and Interception of Aryne Natural Product Derivatives “ Strictosidyne ” and “ Strictosamidyne ”.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 143, p. 7471–7479, 2021.
- BARBOZA, R. S.; VALENTE, L. M. M.; WOLFF, T.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; NERIS, R. L. S.; GUIMARÃES-ANDRADE, I. P.; GOMES, M. **Antiviral Activity of Faramea hyacinthina and Faramea truncata Leaves on Dengue Virus Type-2 and Their Major Compounds.** *Chemistry and Biodiversity*, v. 15, n. 2, p. 1–10, 2018.
- BERGER, A.; VALANT-VETSCHERA, K.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L. **A revised classification of the sister tribes Palicoureeae and Psychotrieae (Rubiaceae) indicates genus-specific alkaloid accumulation.** *Phytochemistry Reviews*, 2021.
- BFG - The Brazil Flora Group. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.
- BOTH, F. L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. **Analgesic properties of umbellatine from Psychotria umbellata.** *Pharmaceutical Biology*, v. 40, n. 5, p. 336–341, 2002.
- BRASIL. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso.** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BREMER, B. **A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 96, n. 1, p. 4–26, 2009.

CALIXTO, N. O.; PINTO, M. E. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER, M. C. M.; BOBEY, A. F.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; PINTO, A. C. **The Genus *Psychotria*: Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology and Biological Properties.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 8, p. 1355–1378, 2016.

CALIXTO, N. O.; CORDEIRO, M. S.; GIORNO, T. B. S.; OLIVEIRA, G. G.; LOPES, N. P.; FERNANDES, P. D.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. **Chemical Constituents of *Psychotria nemorosa* Gardner and Antinociceptive Activity.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 5, p. 707–723, 2017.

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

CONSERVA, L. M.; FERREIRA JÚNIOR, J. C. **Borreria and Spermacoce species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities.** *Pharmacognosy Reviews*, v. 6, n. 11, p. 46–55, 2012.

COSTA, J. O.; BARBOZA, R. S.; VALENTE, L. M. M.; WOLFF, T.; GOMES, M.; GALLO, B.; BERRUETA, L. A.; GUIMARÃES-ANDRADE, I. P.; GAVINO-LEOPOLDINO, D.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I. **One-Step Isolation of Monoterpene Indole Alkaloids from *Psychotria leiocarpa* Leaves and Their Antiviral Activity on Dengue Virus Type-2.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 10, p. 2104–2113, 2020.

COSTA, R. A.; PINHEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, K. M. T. DE; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; IANK, J. R.; DA SILVA, N. G.; CABRAL, T. S.; COSTA, E. V. **Structural, vibrational, and electronic properties of the glucoalkaloid strictosidine: A combined experimental and theoretical study.** *Journal of Chemistry*, v. 2016, p. 16, 2016.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; RUHSAM, M.; MOAT, J.; BRUMMITT, N. A. **A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 96, n. 1, p. 68–78, 2009.

DE CARVALHO JUNIOR, A. R.; VIEIRA, I. J. C.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; LIMA, M. A. S.; FERREIRA, R. O.; JOSÉ MARIA, E.; DE OLIVEIRA, D. B. **¹³C-NMR Spectral Data of Alkaloids Isolated from *Psychotria* species (Rubiaceae).** *Molecules*, v. 22, n. 103, p. 1–22, 2017.

DE CARVALHO JUNIOR, A. R.; FERREIRA, R. O.; PASSOS, M. DE S.; BOENO, S. I. DA S.; DAS VIRGENS, L. D. L. G.; VENTURA, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; LASSOUNSKAIA, E.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. **Antimycobacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of Triterpenes and Alkaloids from *Psychotria nuda* (Cham. & Schleidl.) Wawra.** *Molecules*, v. 24, n. 6, p. 1–11, 2019.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. **Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: An overview about the current status and future challenges.** *Rodriguesia*, v. 63, n. 1, p. 101–128, 2012.

DEWICK, P. M. Alkaloides. In: *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2. ed. Chichester (Inglaterra): John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

DO NASCIMENTO, N. C.; FRAGOSO, V.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R. E; FETT-NETO, A. G.; SAFFI, J. **Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 48, n. Dezembro, p. 728–734, 2007.

FALKENBERG, M. DE B.; SANTOS, R. I. DOS; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 1104.

FARIAS, F. M.; PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; BARROS, D. M.; GOTTFRIED, C.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. **Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus.** *Fitoterapia*, v. 83, n. 6, p. 1138–1143, 2012.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C. DO; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R. E.; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. **Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpane indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell.** *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 3, p. 559–566, 2008.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 1104.

JARDIM, I. C. S. F. **Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas.** *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; VIAENE, J.; SALTON, J.; KOETZ, M.; GASPER, A. L.; HENRIQUES, A. T.; VANDER HEYDEN, Y. **The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (Palicourea comb. nov.). Part I: Extraction and fractionation optimization based on metabolic profiling.** *Journal of Chromatography A*, v. 1463, p. 60–70, 2016.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; VIAENE, J.; SLOSSE, A.; HEYDEN, Y. VANDER. Liquid Chromatography for Plant Metabolite Profiling in the Field of Drug Discovery. In: FILHO, V. C. (Ed.). **Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential: Research and Development, Challenges and Perspectives.** 1. ed. Cham (Suíça): Springer, 2018. p. 531.

LOPES, S.; VON POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIA, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. **Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae).** *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, n. 12, p. 1187–1195, 2004.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. **Secondary metabolites from Rubiaceae species.** *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 13422–13495, 2015.

MATSUURA, H. N.; FRAGOSO, V.; PARANHOS, J. T.; RAU, M. R.; FETT-NETO, A. G. **The bioactive monoterpene indole alkaloid N, β -d-glucopyranosyl vincosamide is regulated by irradiance quality and development in *Psychotria leiocarpa*.** *Industrial Crops and Products*, v. 86, p. 210–218, 2016.

MERCK. **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel.** Darmstadt (Alemanha): Editorial Merck, 1972.

MODOLO, L. V.; CHAVES-SILVA, S.; SILVA, T. F. DA; DA-SILVA, C. J. Molecular Biology Tools to Boost the Production of Natural Products: Potential Applications for Brazilian Medicinal Plants. In: MODOLO, L. V.; FOGLIO, M. A. (Eds.). **Brazilian medicinal plants.** 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2019. p. 341.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. J. **Reorganization of the Genus *Psychotria* and Tribe Psychotrieae (Rubiaceae) Inferred from ITS and *rbcL* Sequence Data.** *Systematic Botany*, v. 24, n. 1, p. 5–27, 1999.

PATTHY-LUKÁTS, Á.; KÁROLYHÁZY, L.; SZABÓ, L. F.; PODÁNYI, B. **First Direct and Detailed Stereochemical Analysis of Strictosidine.** *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 2, p. 69–75, 1997.

POWO - Plants of the World Online. ***Psychotria* L.** Royal Botanic Gardens, Kew Science. Disponível em:
<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:326020-2>. Acesso em: 6 out. 2021.

QUEIROZ, G. S.; LUZ, A. B. G.; NASCIMENTO, M. V. P. DOS S.; THOMASI, S. S.; FERREIRA, A. G.; DALMARCO, E. M.; BRIGHENTE, I. M. C. **Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae).** *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 7, n. 4, p. 168–173, 2017.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica.** *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

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

ROBBRECHT, E. **Tropical woody Rubiaceae.** 1. ed. Meise (Bélgica): National Botanic Garden of Belgium, 1988. v. 1. (Opera Botanica Belgica 1).

SANTOS, R. I. DOS. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 1104.

SIMÕES-PIRES, C. A.; FARIA, 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.** v. 2, n. Figure 2, p. 11–16, 2006.

TAYLOR, C.; GOMES, M.; ZAPPI, D. *Psychotria L.* *Psychotria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14153>>. Acesso em: 12 set. 2021a.

TAYLOR, C.; GOMES, M.; ZAPPI, D. *Psychotria densicostata Müll.Arg.* *Psychotria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB39108>>. Acesso em: 12 set. 2021b.

TORRES-LEITE, F.; HOLLUNDER, R. K.; GARBIN, M. L.; CARRIJO, T. T. **Floristic of Rubiaceae in an Atlantic Forest remnant in Espírito Santo, Brazil.** *Rodriguesia*, v. 69, n. 2, p. 561–576, 2018.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. **Microextração por Fase Sólida.** *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, Â. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; DA SILVA BOLZANI, V. **Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry?** *Química Nova*, v. 35, n. 11, p. 2278–2287, 2012.

VALLI, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. **A Beleza Invisível da Biodiversidade: O Táxon Rubiaceae.** *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 1, p. 296–310, 2016.

WAGNER, H.; BLADT, S. (1996). **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2. ed. Berlim: Springer-Verlag, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023.** Hong Kong (China): WHO Press, 2013.

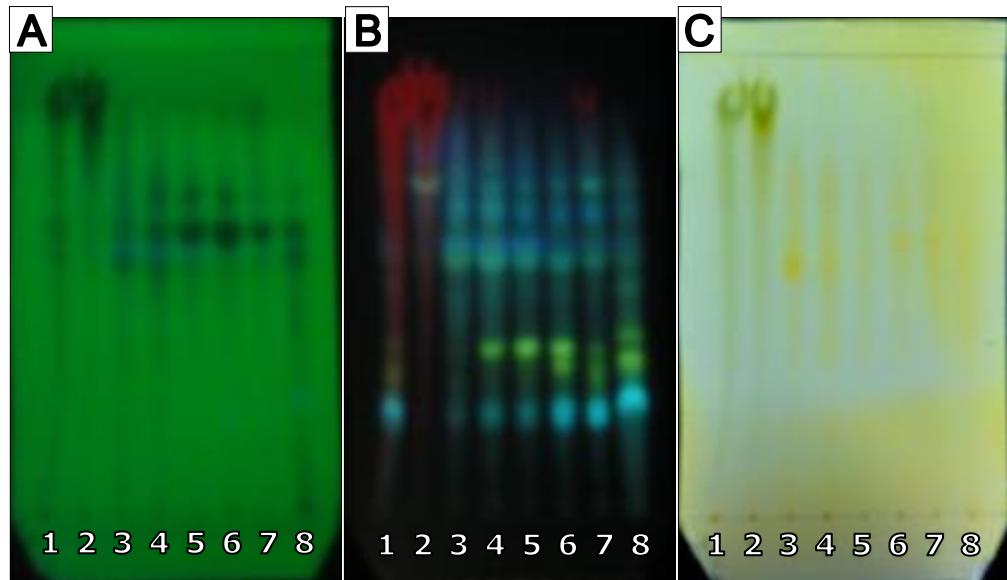
YANG, H.; ZHANG, H.; YANG, C.; CHEN, Y. **Chemical Constituents of Plants from the Genus *Psychotria*.** *Chemistry and Biodiversity*, p. 807–820, 2016.

ZAPPI, D.; OLIVEIRA, J. A. DE; CALIÓ, M. F.; GOMES, M.; NEGRÃO, R.; MORAES, M.; AMARO, R.; MESSINA, T.; WIMMER, F.; NOVAES, L.; MARGON, H. Parte II – Espécies Endêmicas: RUBIACEAE. In: MARTINELLI, G. et al. (Orgs.). **Livro Vermelho da Flora Endêmica do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro; SEA – Secretaria de Estado do Ambiente; Andrea Jakobsson Estúdio, 2018. p. 456.

ZAPPI, D.; NUNES, T. S. **Notes on the Rubiaceae of Northeastern Brazil. I. *Erithalis*, *Psychotria* and *Rudgea*.** *Kew Bulletin*, v. 55, n. 3, p. 655–668, 2000.

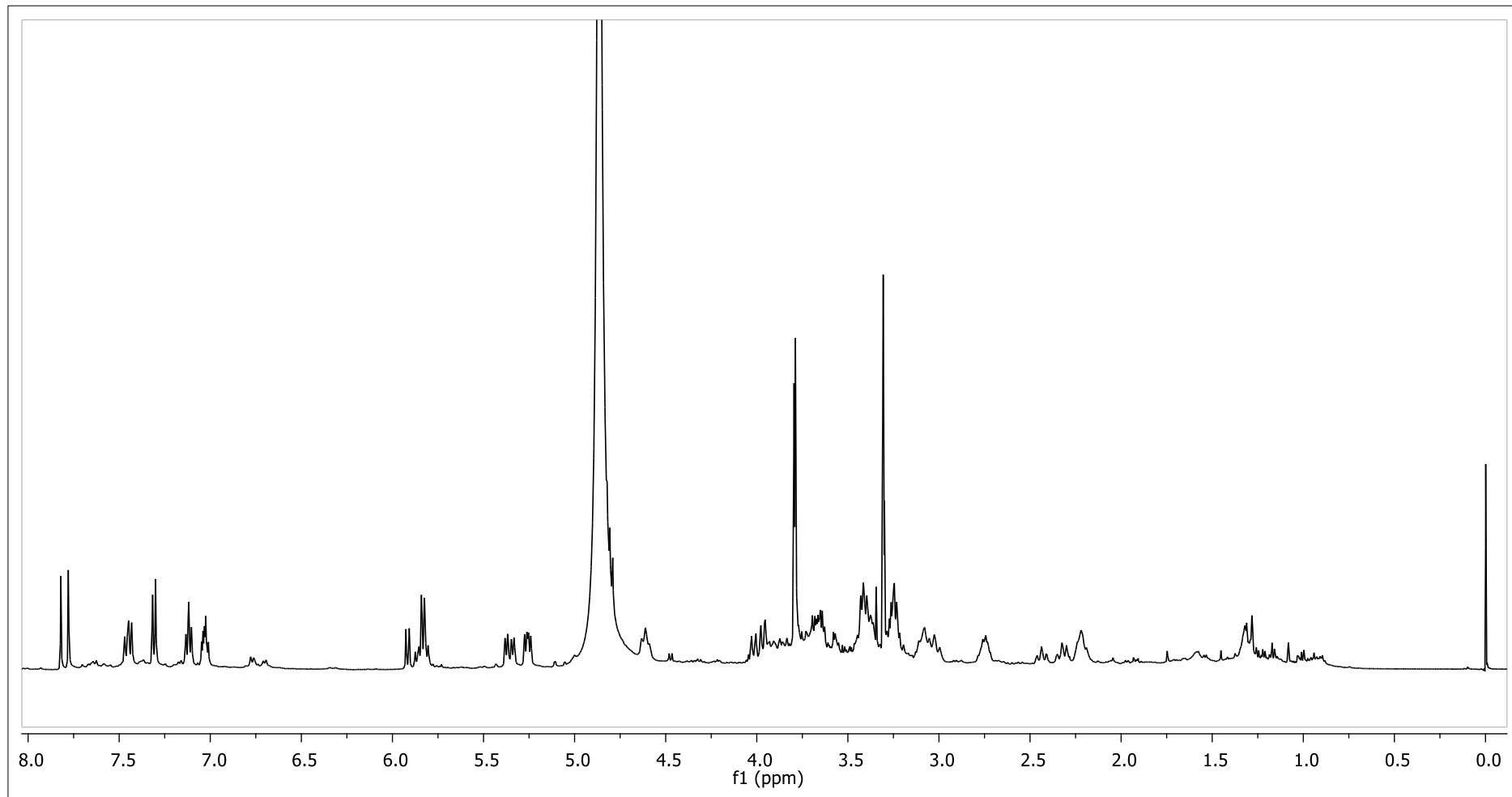
APÊNDICES

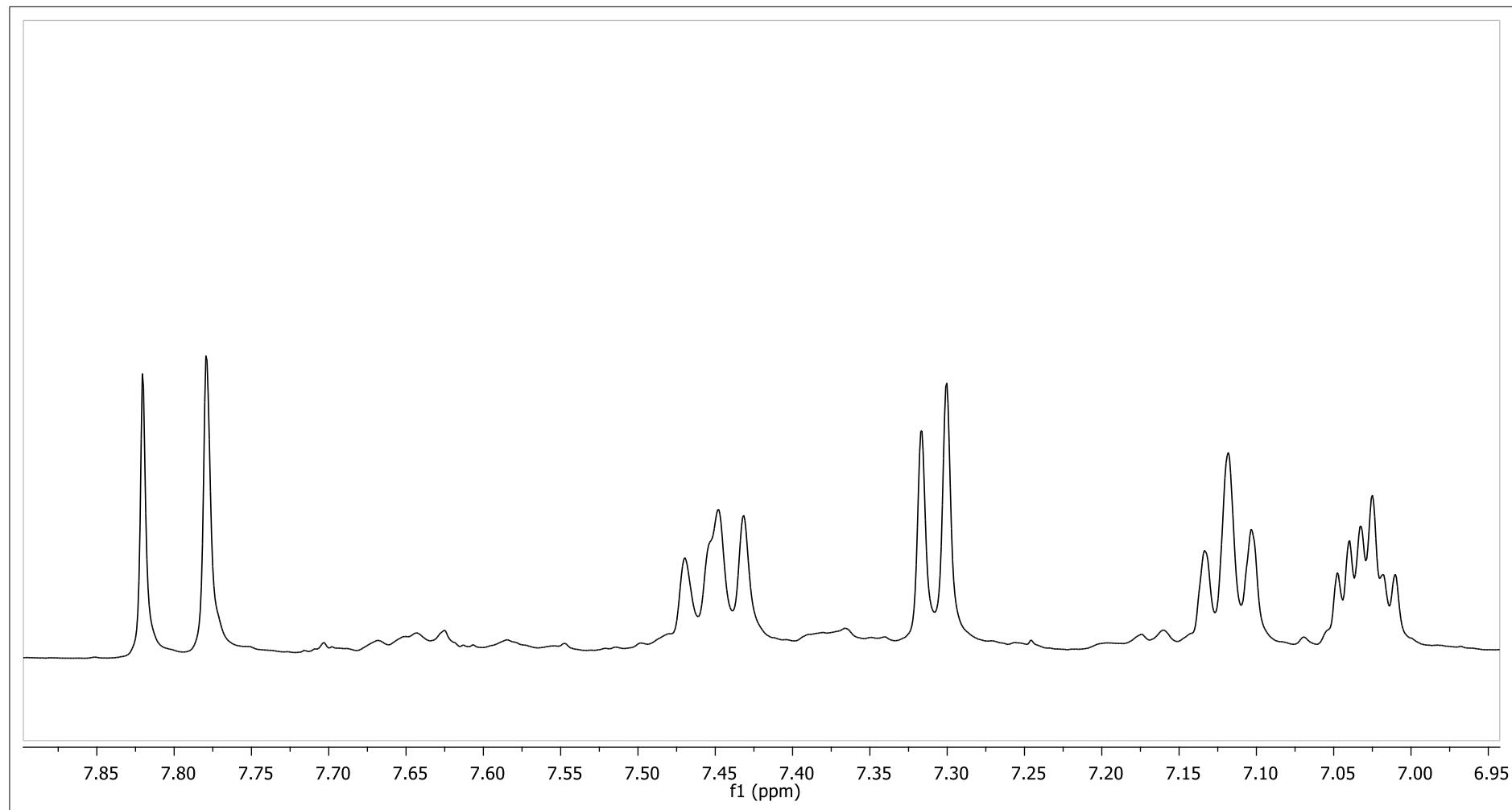
APÊNDICE A – Perfil cromatográfico em CCD de avaliação das oito frações geradas com a CC em SephadexTM LH-20 do PDFM.

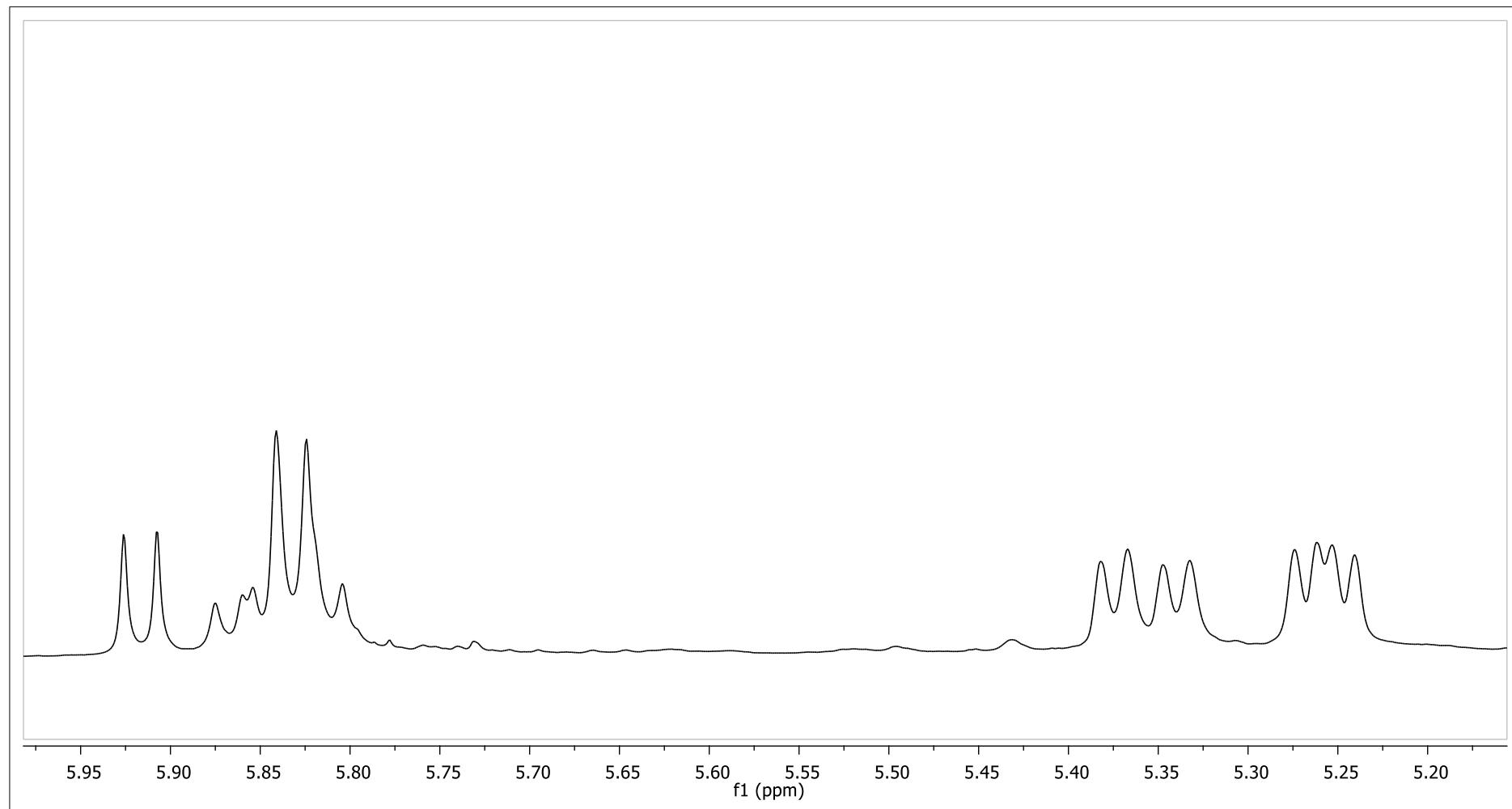


CCD em *n*-BuOH/AcOH/H₂O (40:10:10) como fase móvel e revelador reagente de Dragendorff/NaNO₂ (10%) (placa C). Placas A e B foram reveladas sob luz UV a 254 nm e 365 nm, respectivamente. Concentração: 30 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: não definido, devido à aplicação feita com capilar de vidro (duas aplicações rápidas para cada fração).

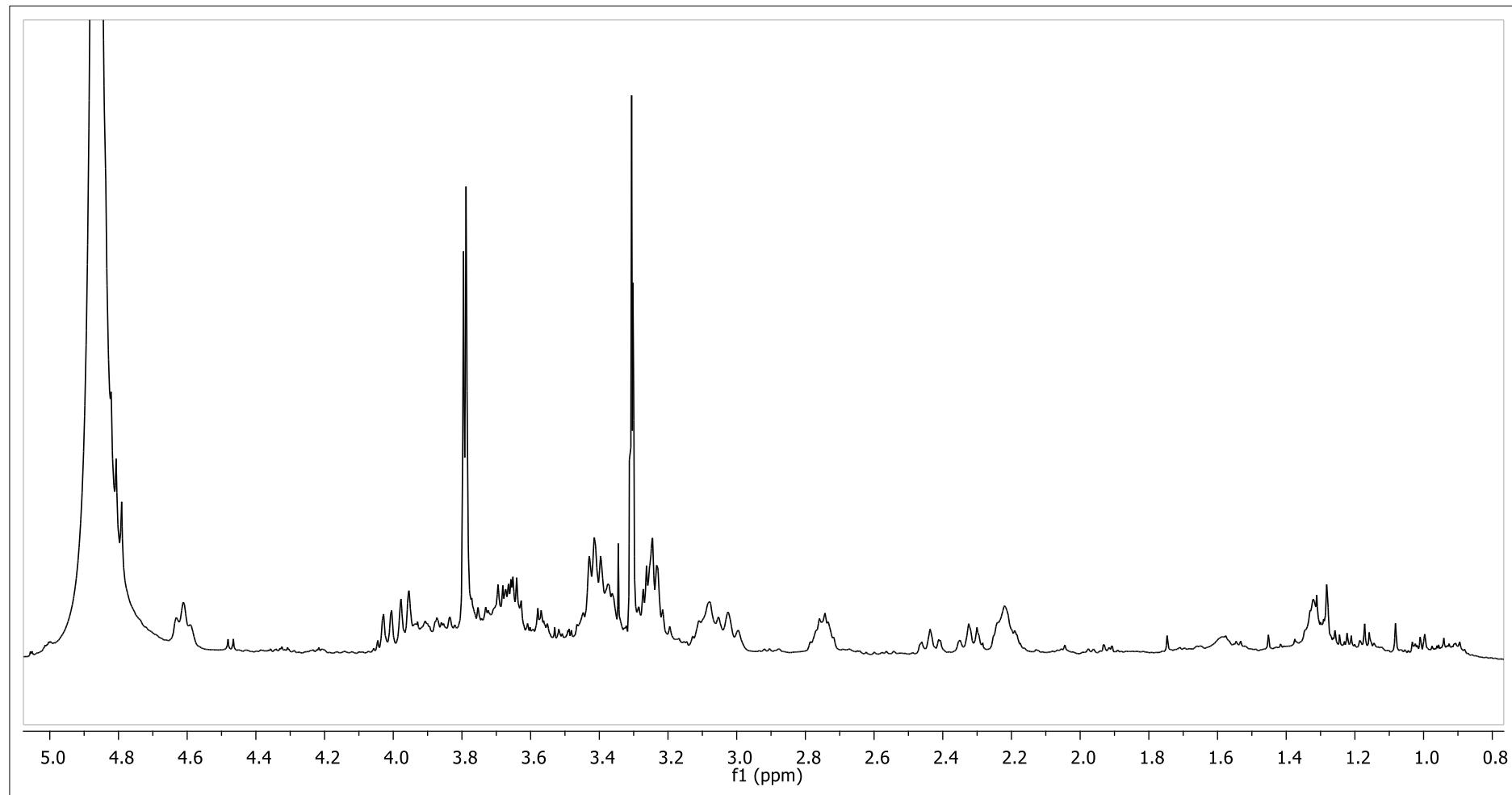
APÊNDICE B – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração EFS2_2.



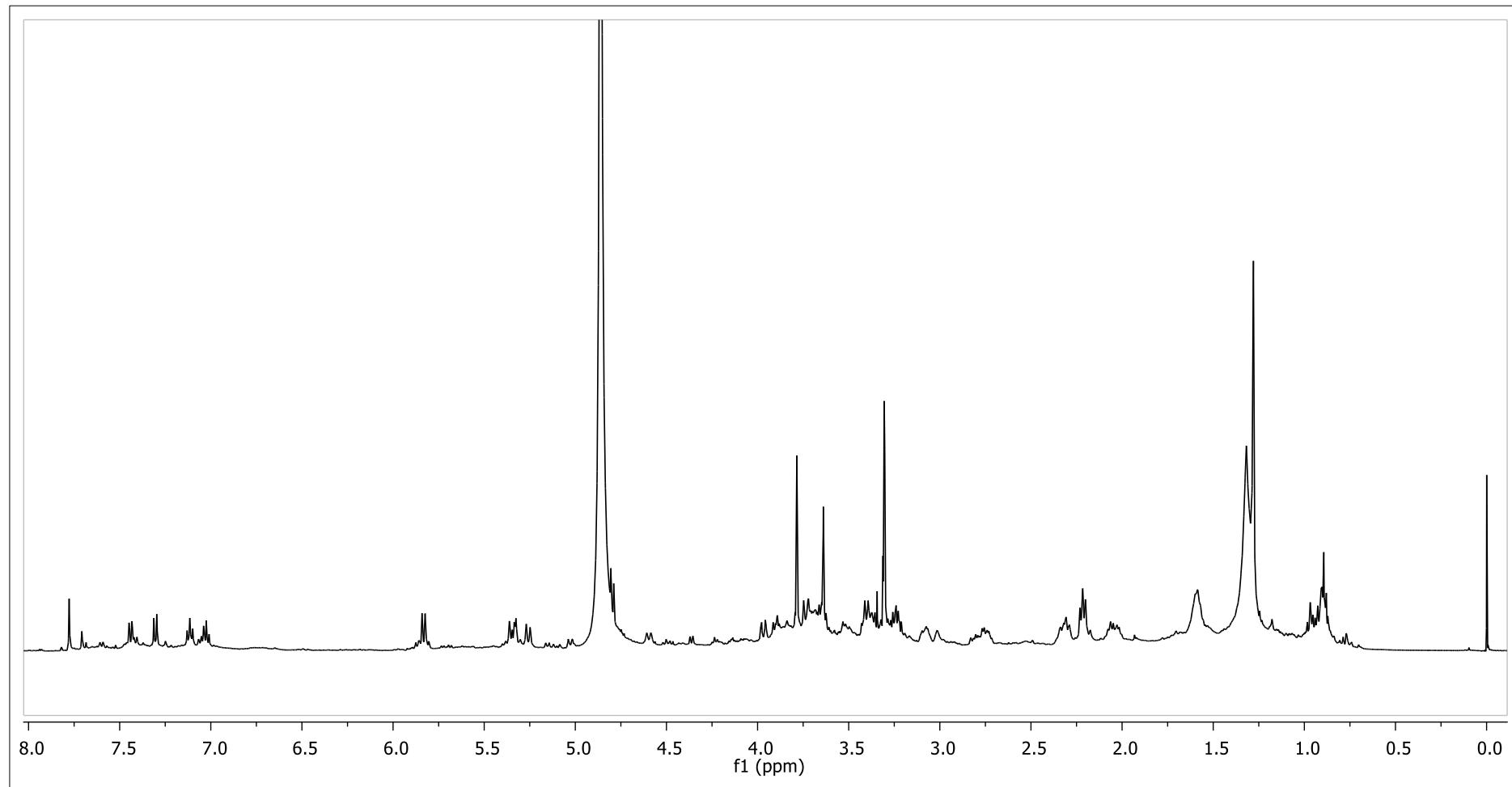
APÊNDICE C – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 7,85 – 6,95 ppm) da fração EFS2_2.

APÊNDICE D – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 5,95 – 5,20 ppm) da fração EFS2_2.

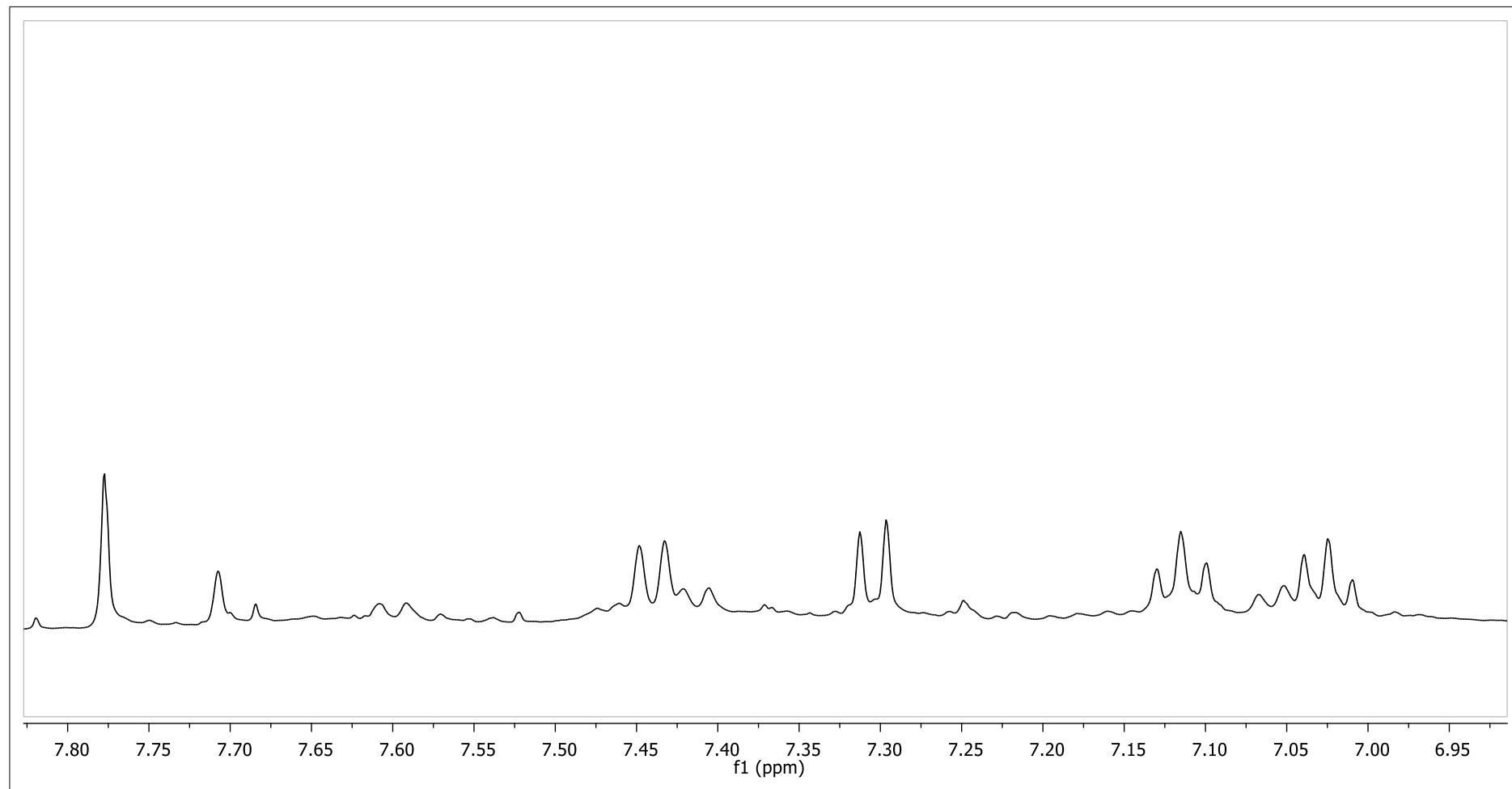
APÊNDICE E – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 5,0 – 0,8 ppm) da fração EFS2_2.

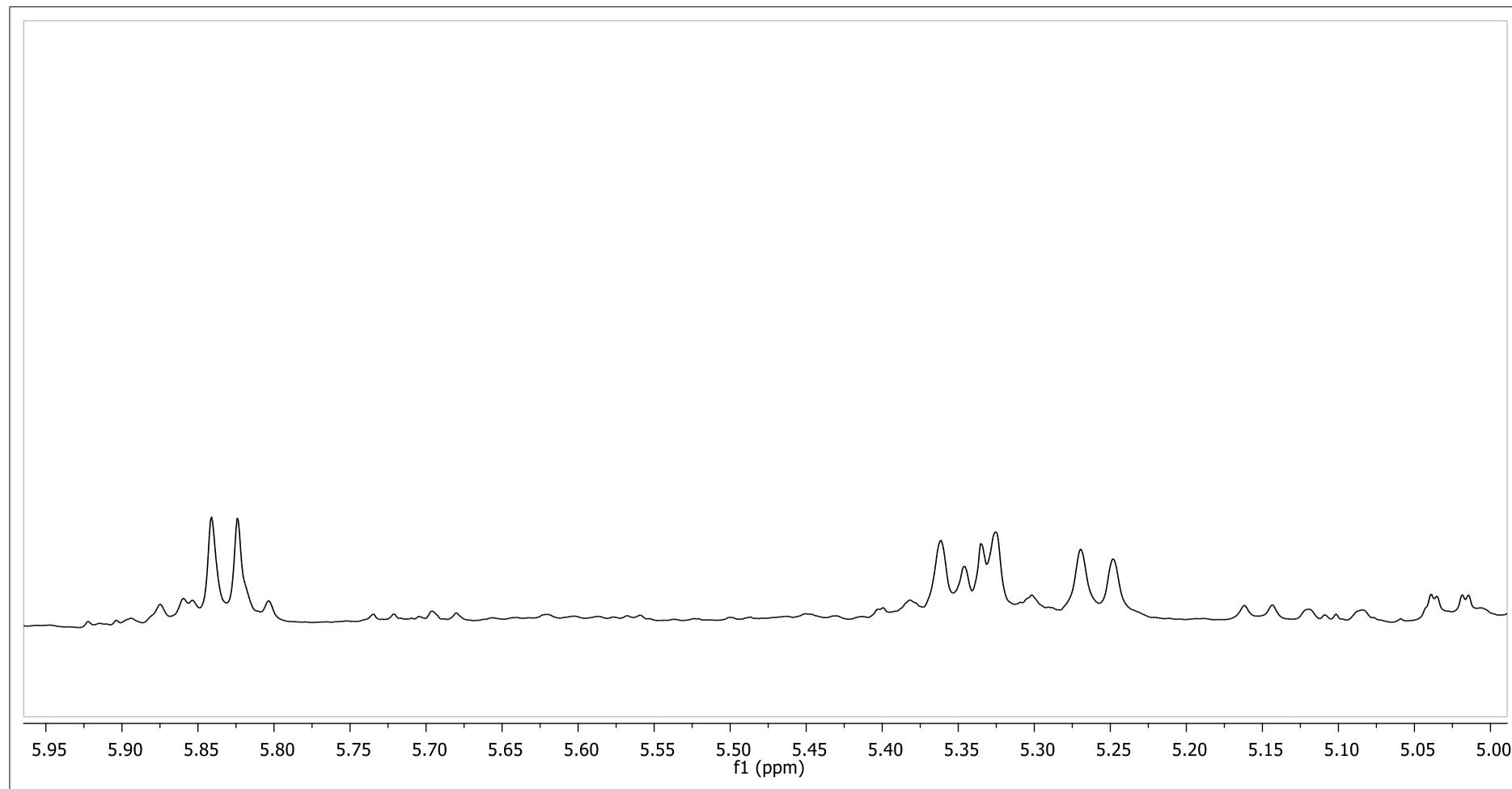


APÊNDICE F – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração EFS2_3.

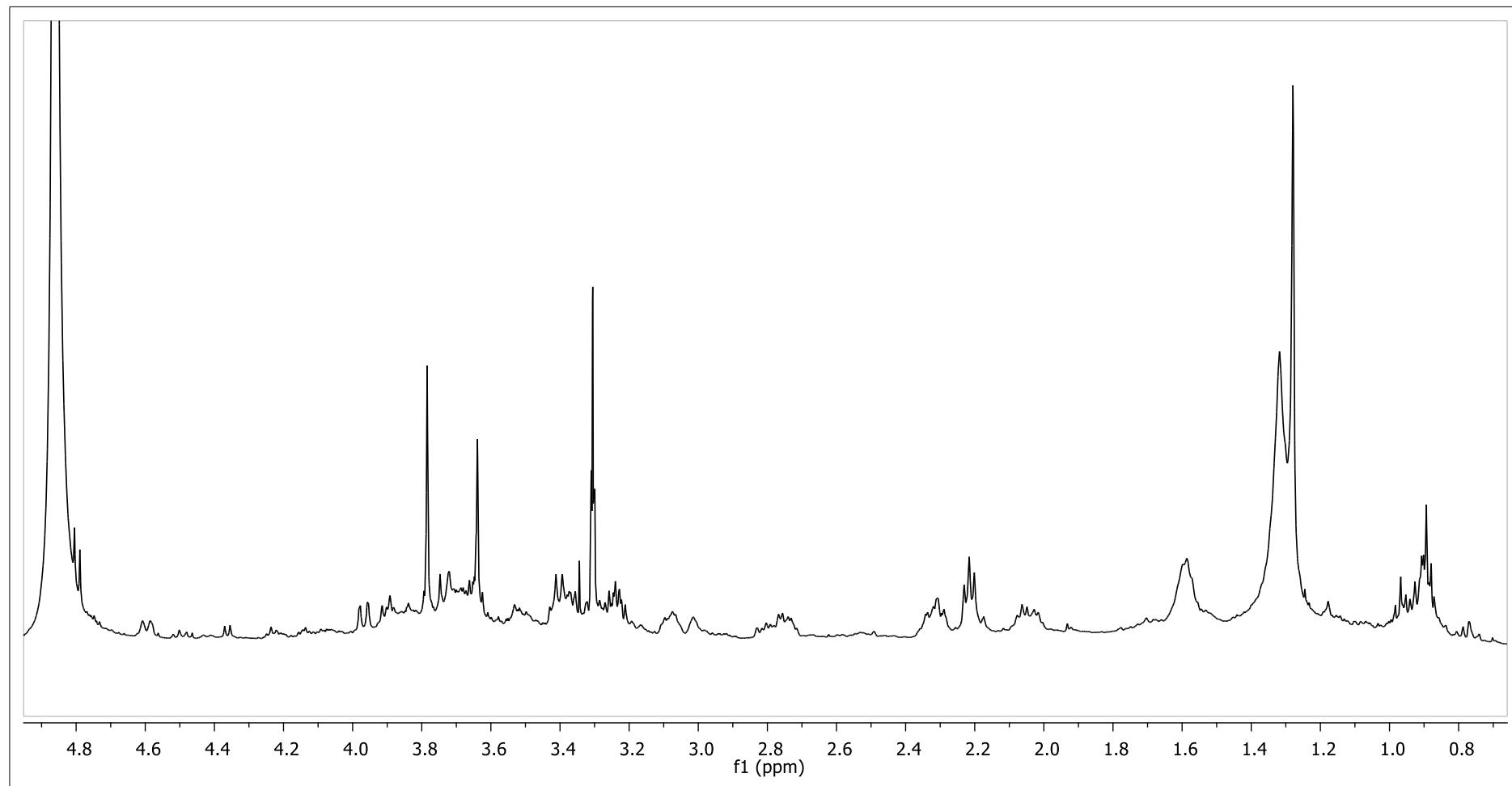


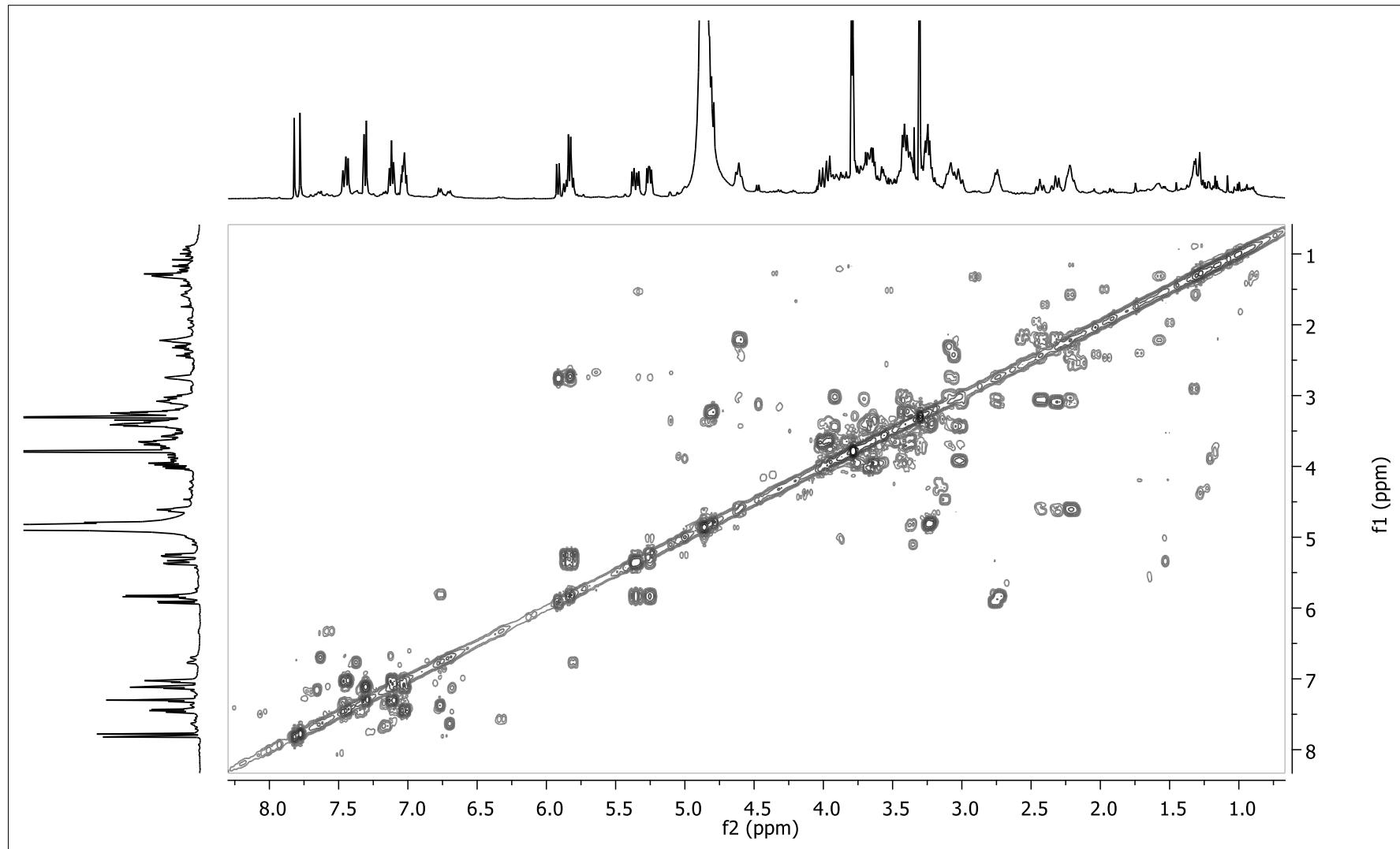
APÊNDICE G – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 7,80 – 6,95 ppm) da fração EFS2_3.

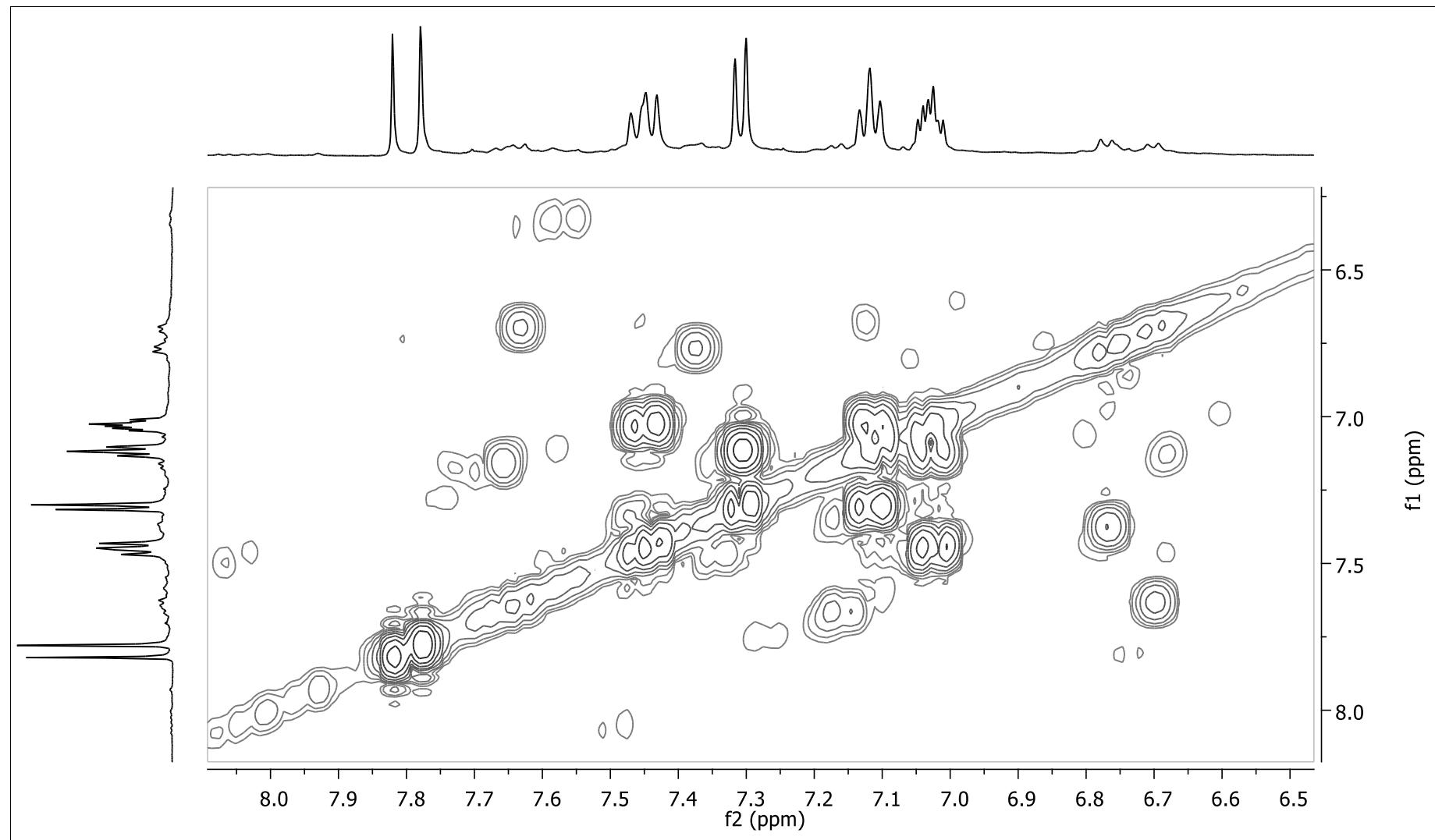


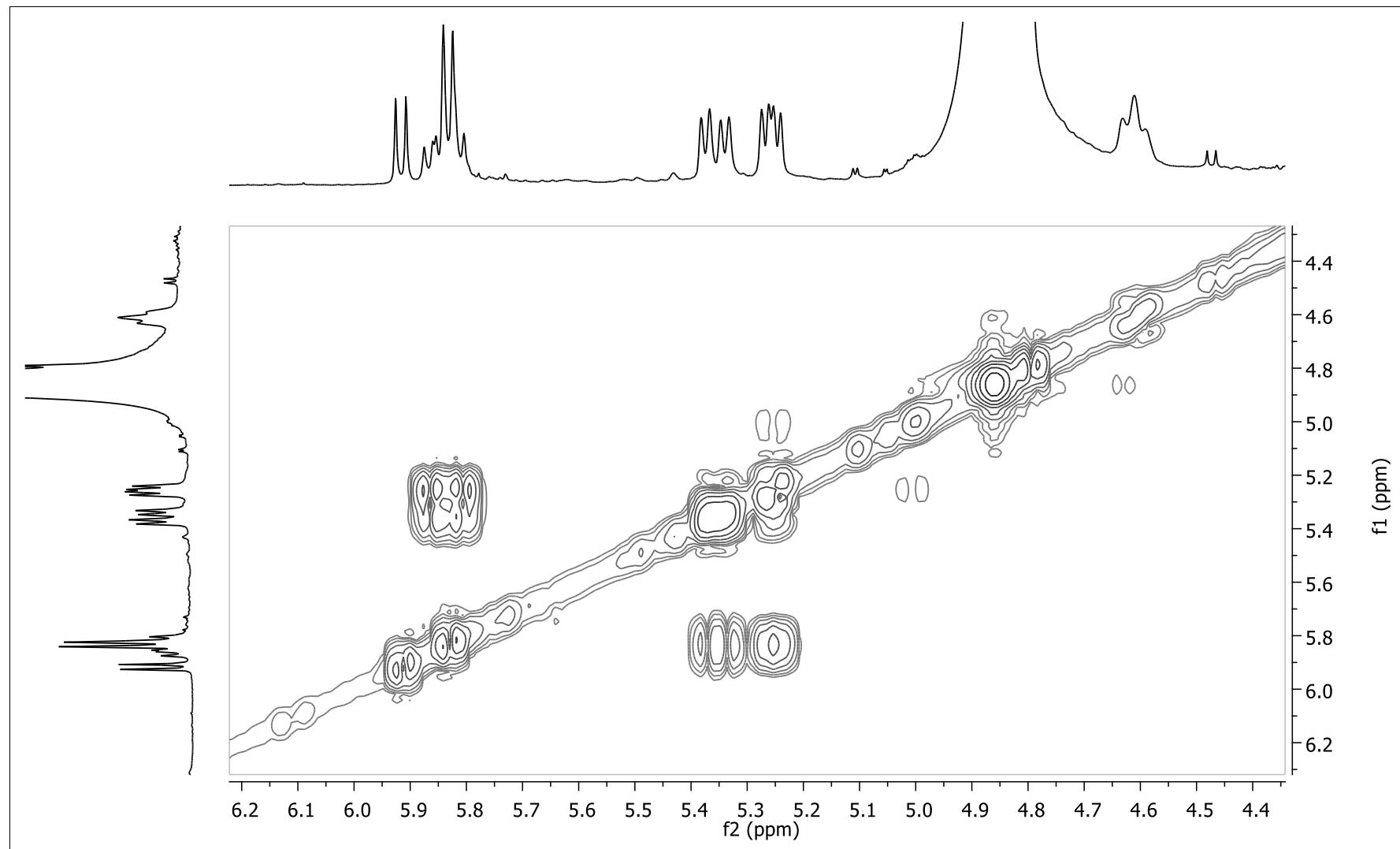
APÊNDICE H – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 5,95 – 5,00 ppm) da fração EFS2_3.

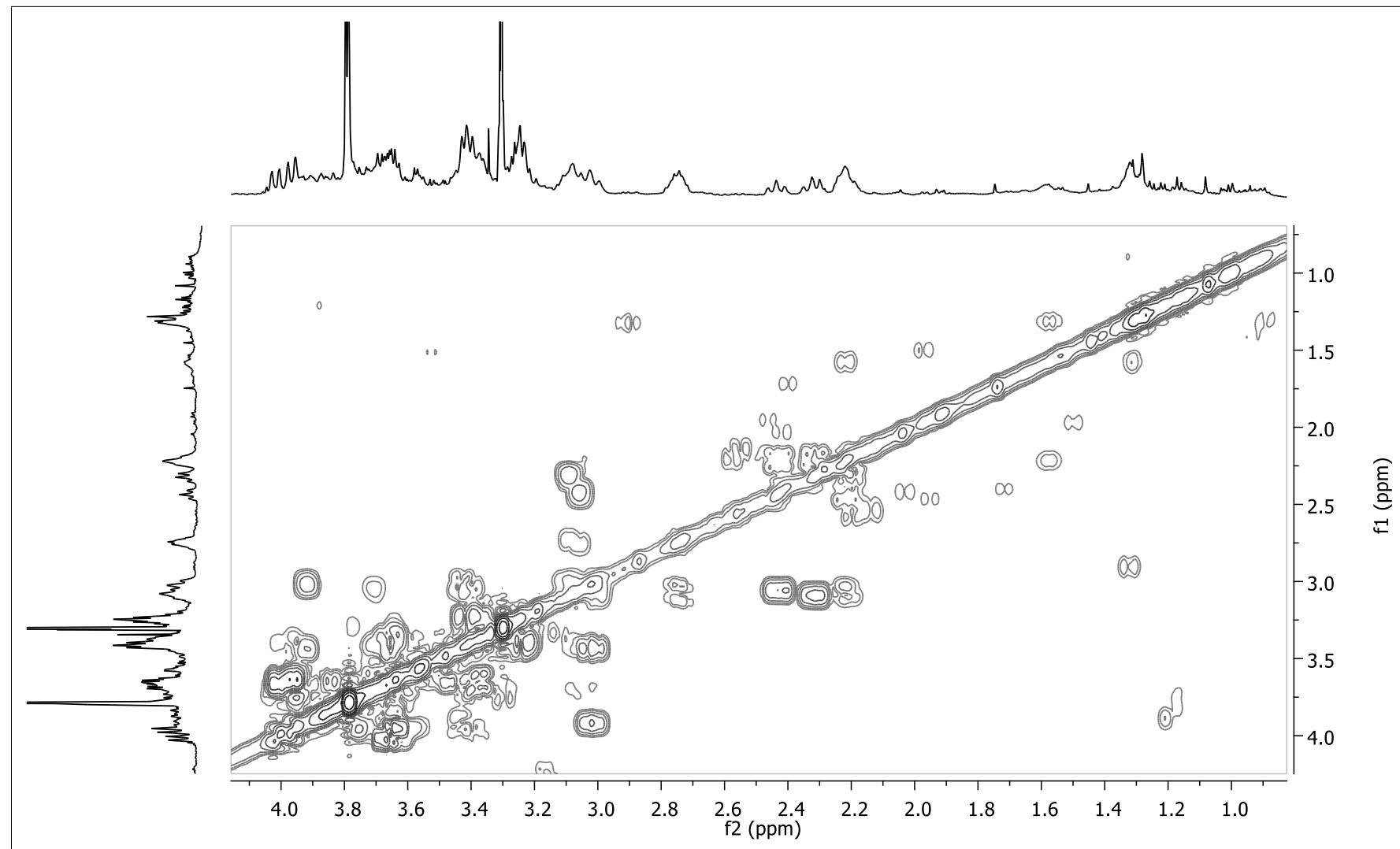
APÊNDICE I – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 4,8 – 0,8 ppm) da fração EFS2_3.

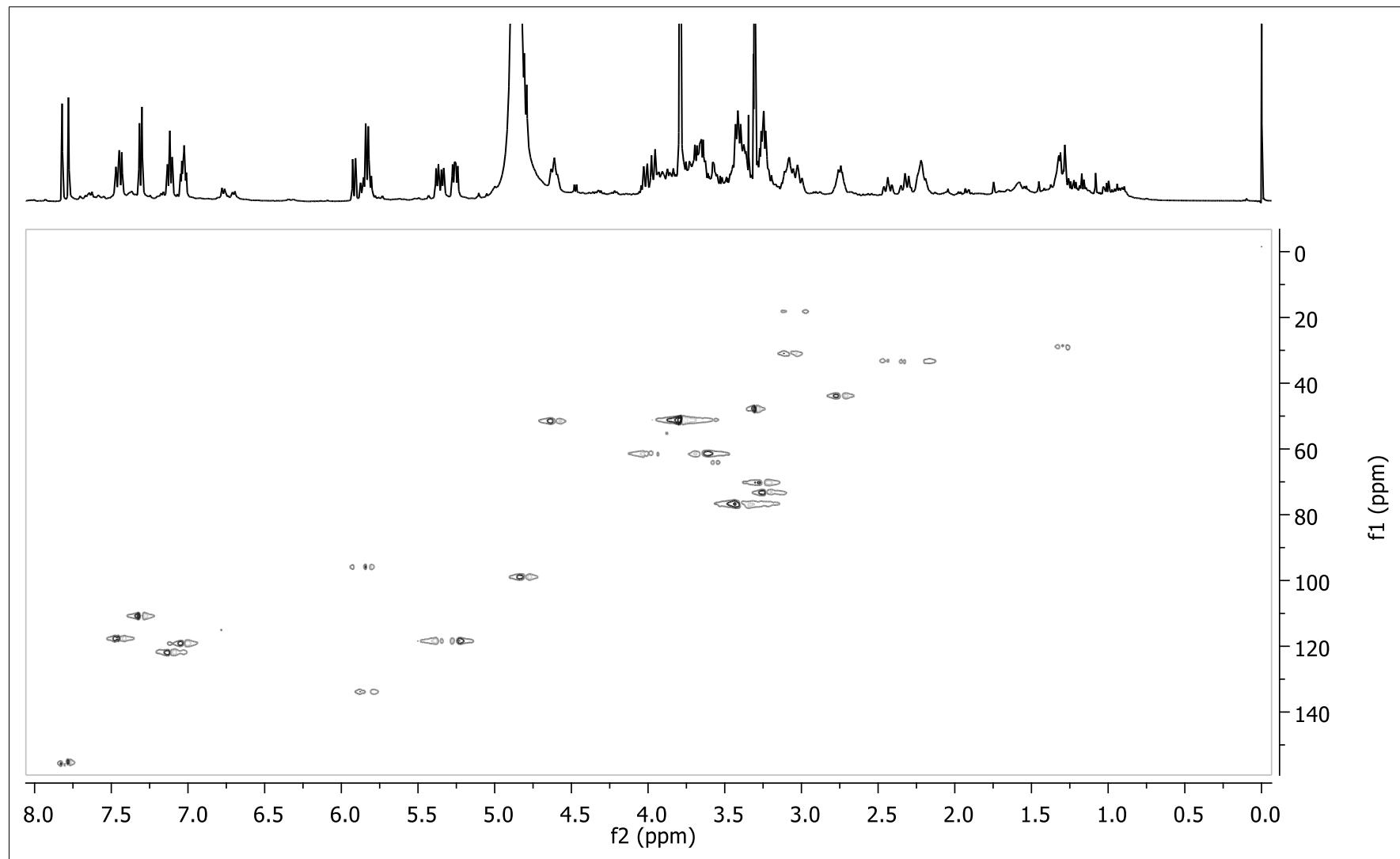


APÊNDICE J – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) da fração EFS2_2.

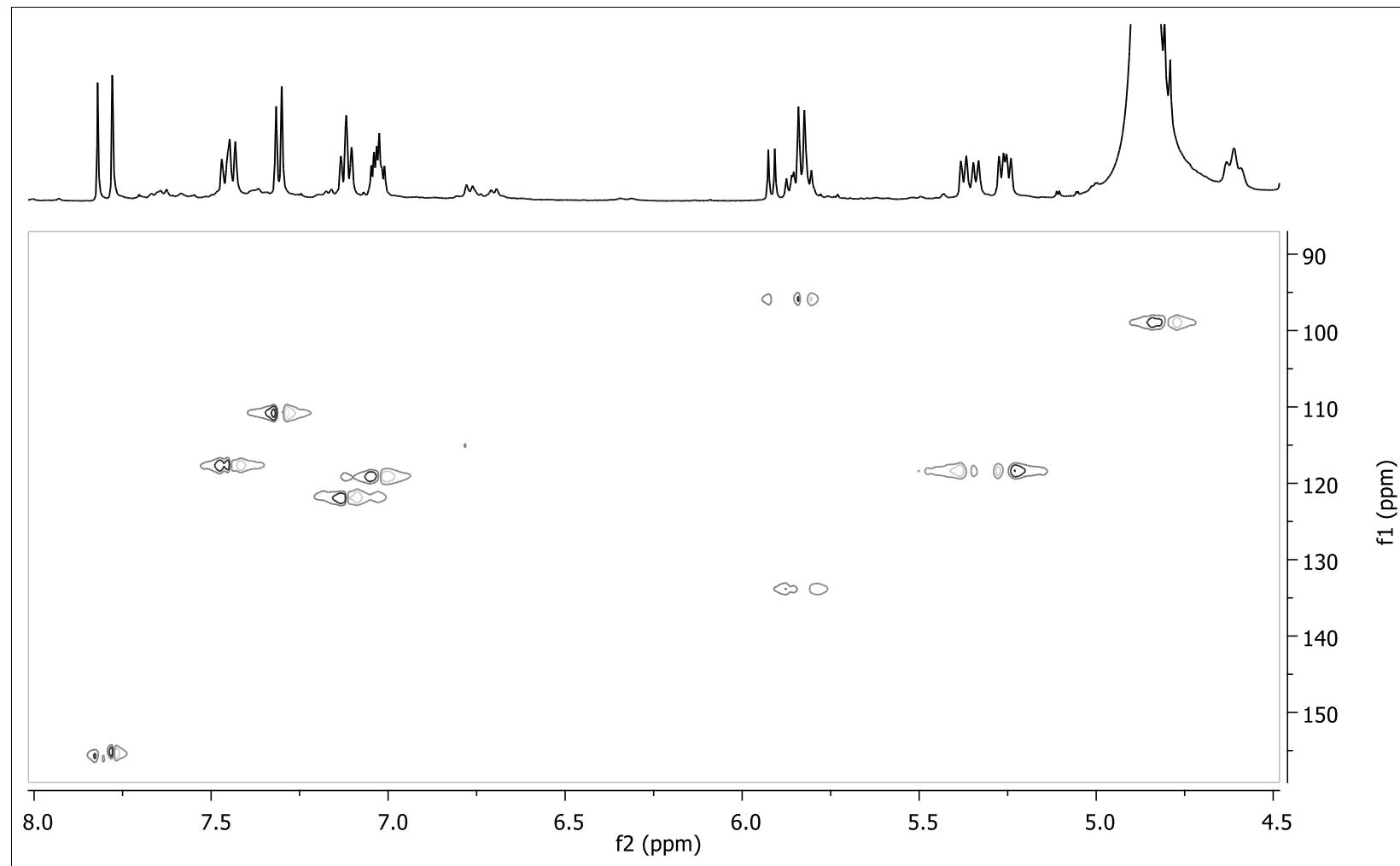
APÊNDICE K – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1 e f2: δ_H 8,0 – 6,5 ppm) da fração EFS2_2.

APÊNDICE L – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1 e f2: δ_H 6,2 – 4,4 ppm) da fração EFS2_2.

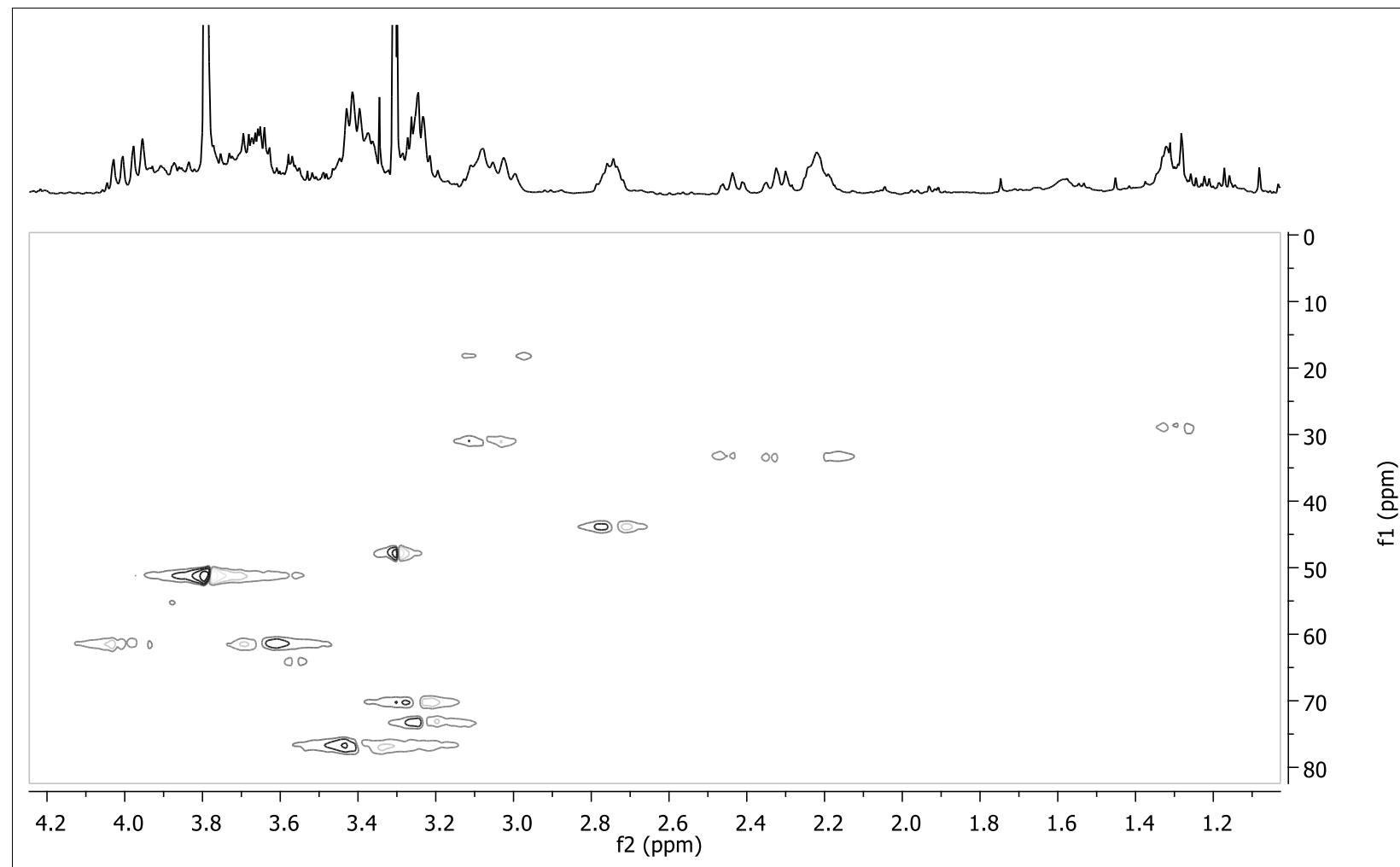
APÊNDICE M – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1 e f2: δ_H 4,0 – 1,0 ppm) da fração EFS2_2.

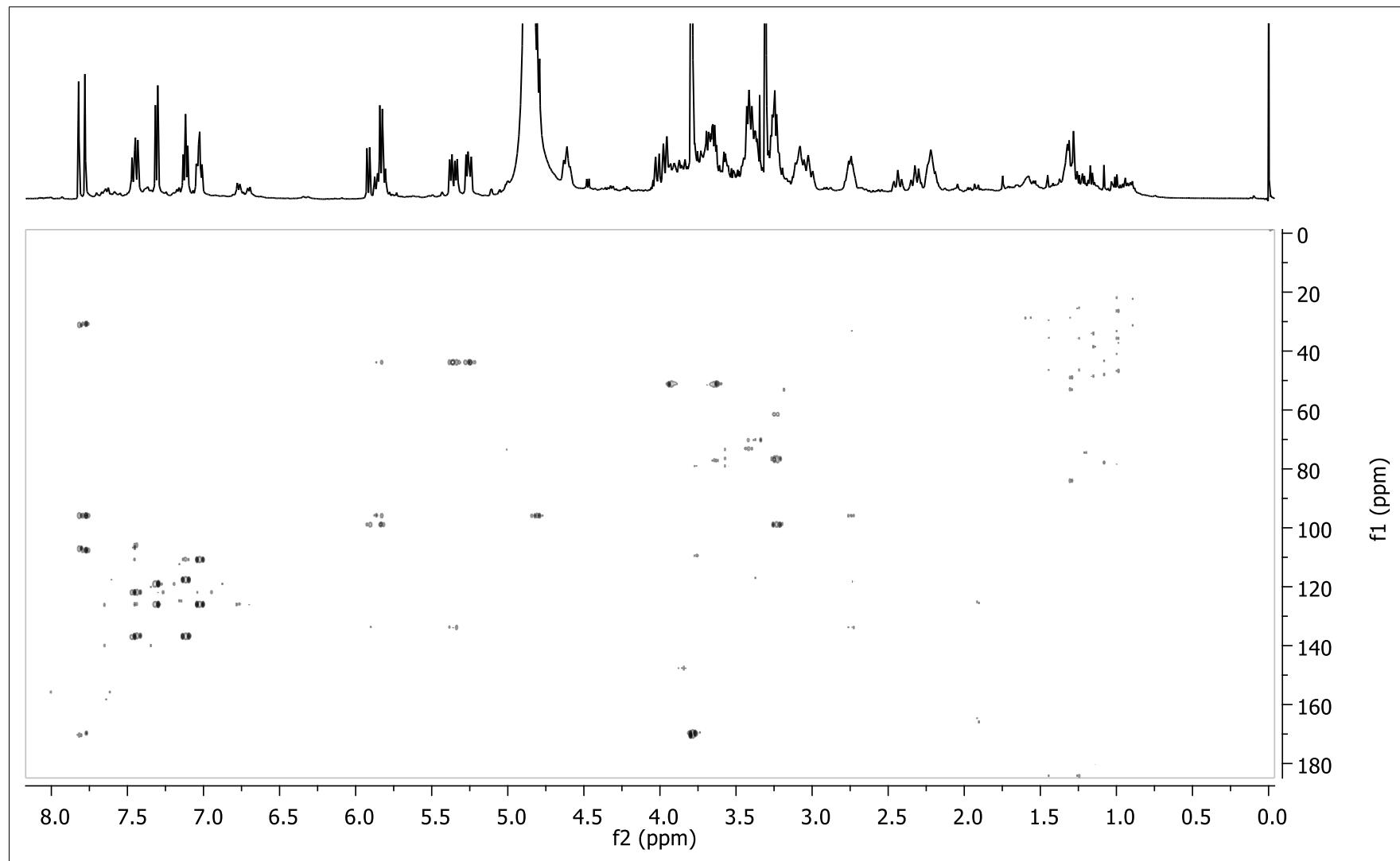
APÊNDICE N – Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD) da fração EFS2_2.

APÊNDICE O – Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ_C 90 – 150 ppm; f2: δ_H 8,0 – 4,5 ppm) da fração EFS2_2.

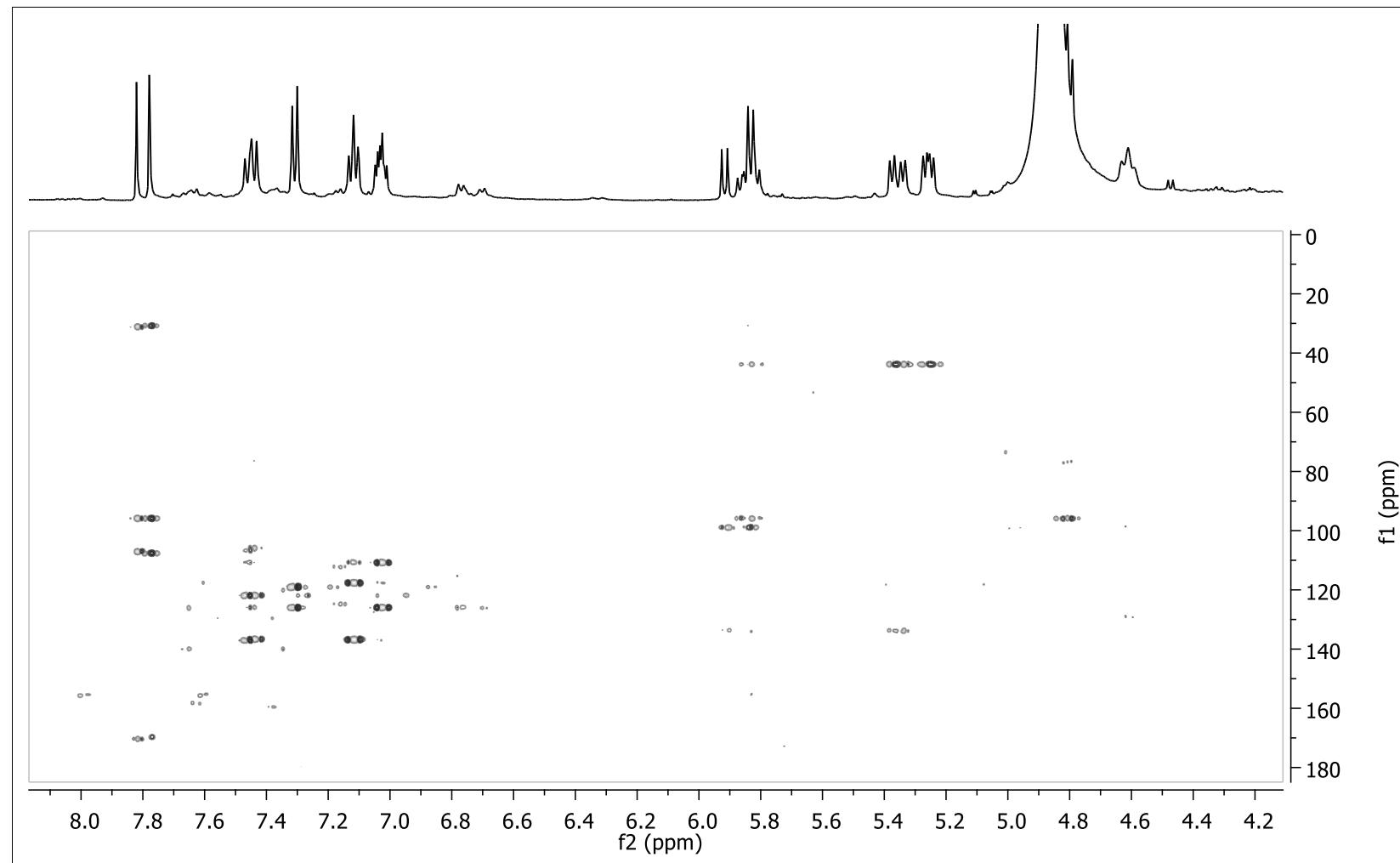


APÊNDICE P – Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ_C 80 – 0 ppm; f2: δ_H 4,2 – 1,2 ppm) da fração EFS2_2.

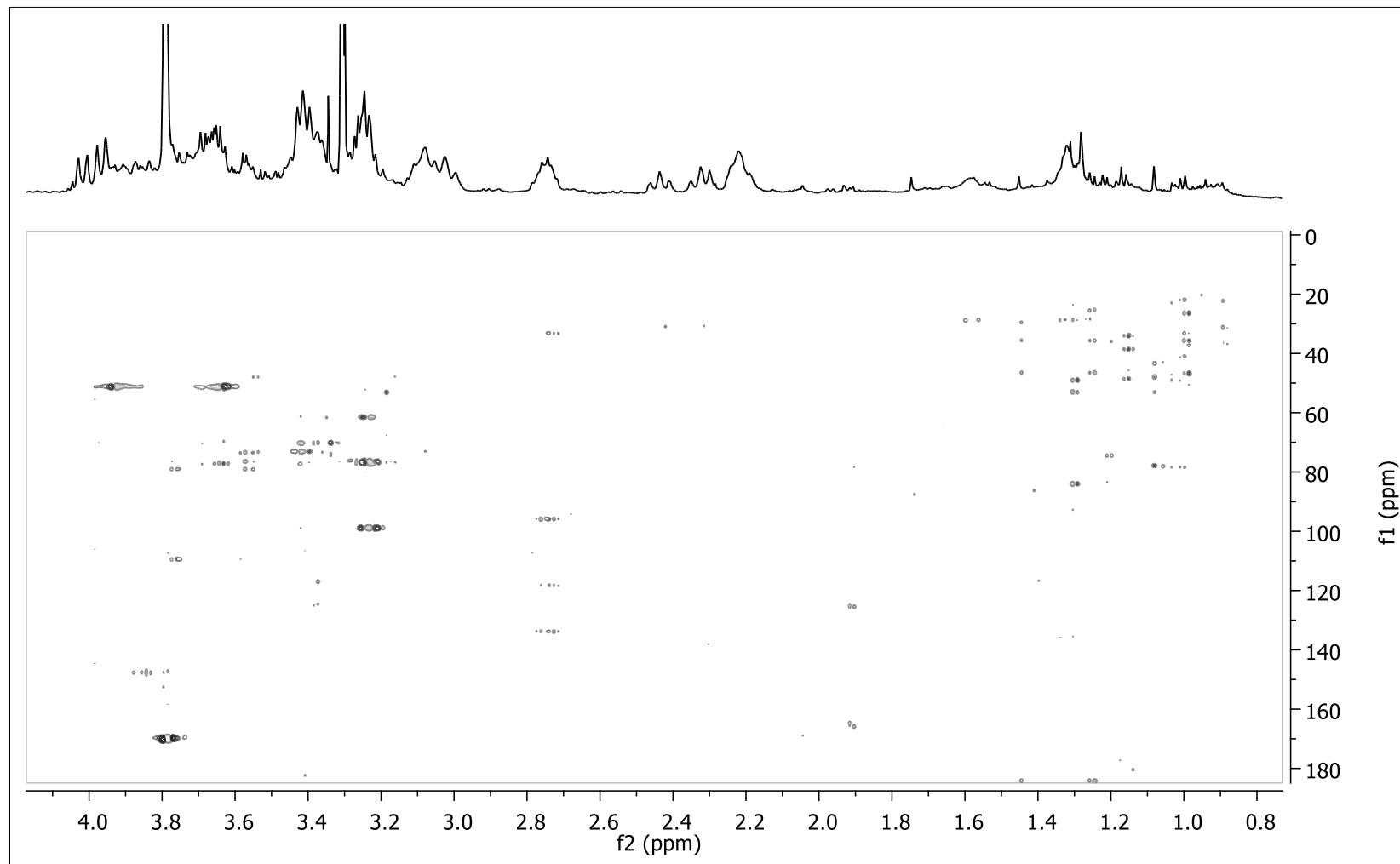


APÊNDICE Q – Espectro HMBC (400 MHz, CD₃OD) da fração EFS2_2.

APÊNDICE R – Espectro HMBC (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ_C 180 – 0 ppm; f2: δ_H 8,0 – 4,2 ppm) da fração EFS2_2.



APÊNDICE S – Espectro HMBC (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ_C 180 – 0 ppm; f2: δ_H 4,0 – 0,8 ppm) da fração EFS2_2.



Apêndice T – Massas e rendimentos das 17 frações geradas com a EFS3 a partir da fração EFS2_3.

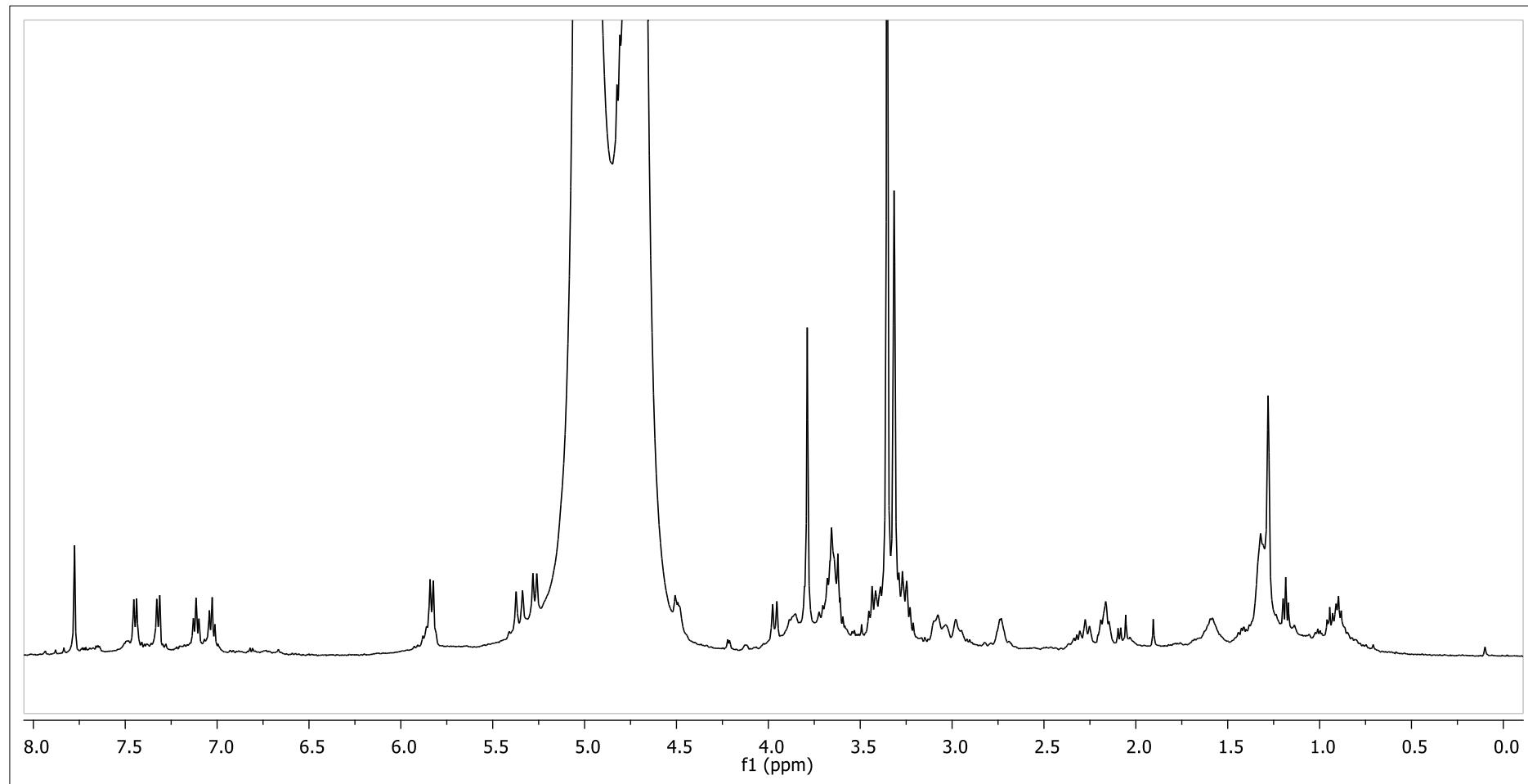
Fração	Massas e Rendimentos*	
	Antes da reunião	Após a reunião**
10	1,4 mg (5,5%)	-
11	0,7 mg (2,8%)	-
12	0,6 mg (2,4%)	-
13	0,8 mg (3,1%)	-
14	0,5 mg (2,0%)	-
15	1,0 mg (3,9%)	
16	0,6 mg (2,4%)	G1
17	0,6 mg (2,4%)	1,8 mg (7,1%)
18	1,1 mg (4,3%)	G2
19	1,0 mg (3,9%)	2,0 mg (7,9%)
20	1,2 mg (4,7%)	
21	1,1 mg (4,3%)	G3
22	1,5 mg (5,9%)	4,6 mg (18,1%)
23	1,0 mg (3,9%)	G4
24	0,7 mg (2,8%)	2,4 mg (9,4%)
25	0,5 mg (2,0%)	-
100	8,1 mg (31,9%)	-
Total	22,4 mg (88,2%)	-

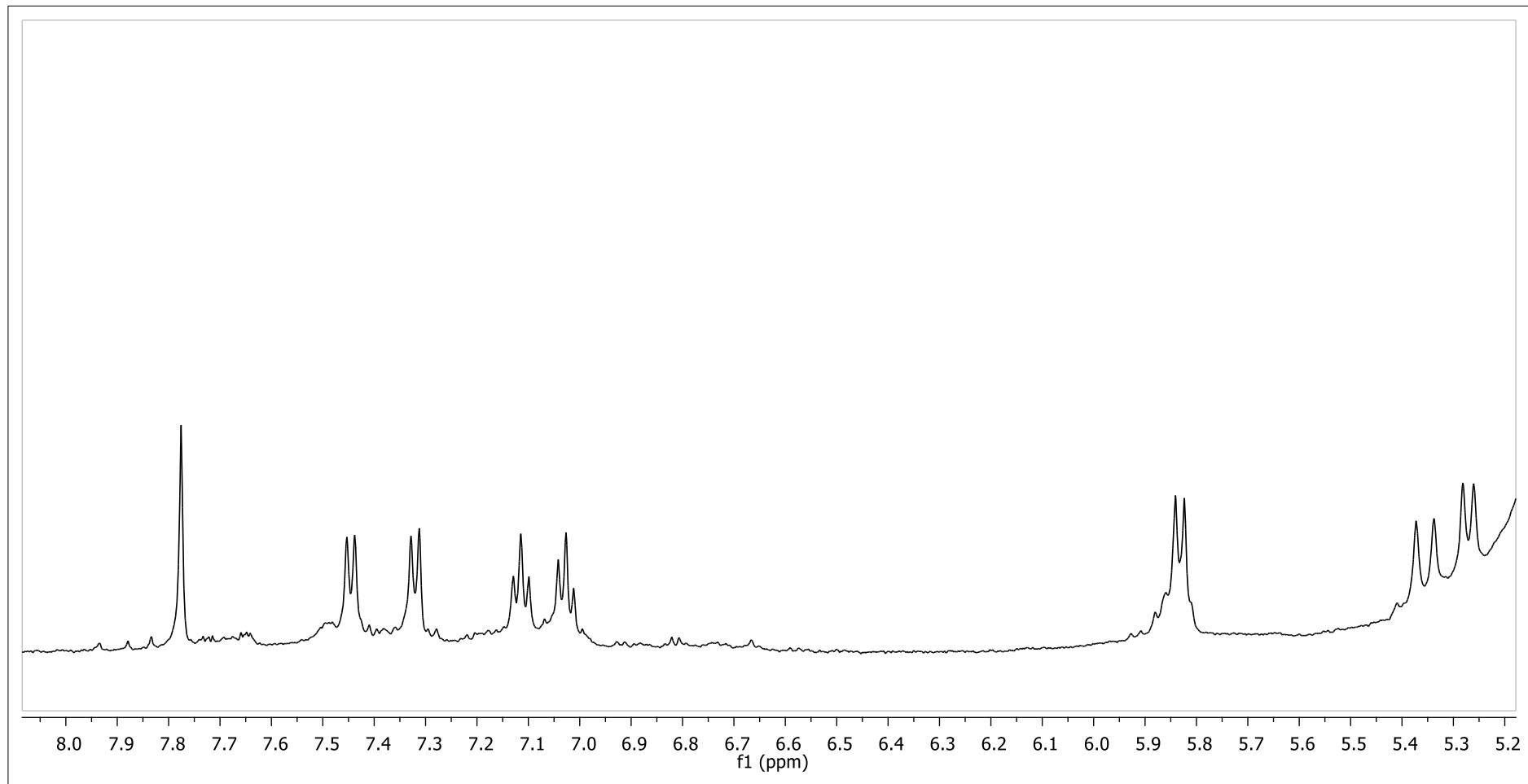
*Os rendimentos foram calculados a partir da massa total da fração EFS2_3 usada na EFS3; **As massas das frações reunidas por similaridade apresentam variações em relação à soma das massas das frações quando separadas por conta do limite de pesagem da balança analítica (0,0001 g).

Apêndice U – Massas e rendimentos das 34 frações geradas com a EFS4 a partir da fração EFS2_2.

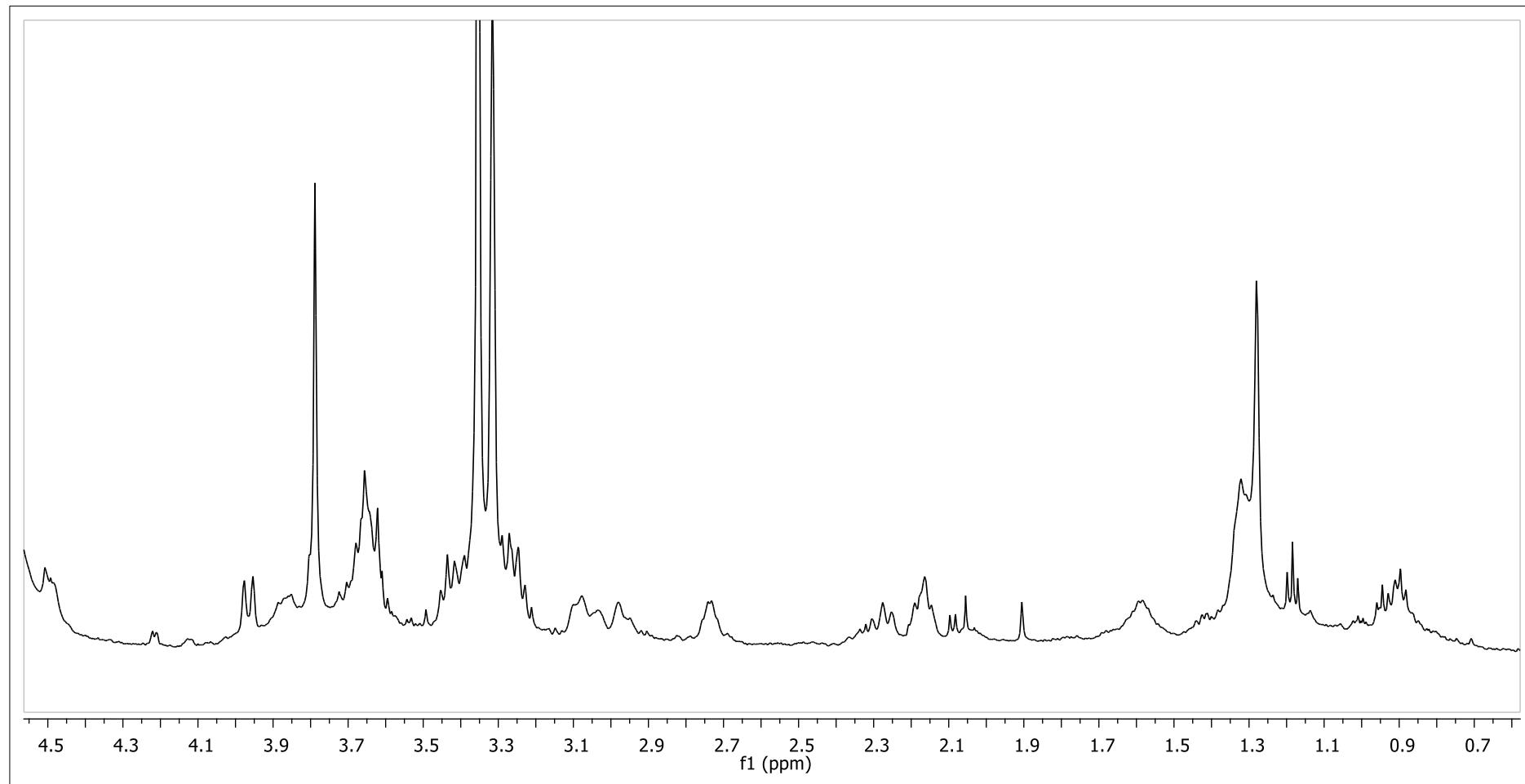
Fração	Massas e Rendimentos*	
	Antes da reunião	Após a reunião**
10	3,0 mg (11,6%)	-
11	0,7 mg (2,7%)	-
12	1,3 mg (5,0%)	-
13	1,5 mg (5,8%)	-
14.1	4,1 mg (15,8%)	-
14.2	2,7 mg (10,4%)	-
15.1	1,9 mg (7,3%)	-
15.2	1,3 mg (5,0%)	-
16.1	0,7 mg (2,7%)	-
16.2	0,8 mg (3,1%)	
17.1	0,7 mg (2,7%)	G1
17.2	0,3 mg (1,2%)	2,0 mg (7,7%)
18.1	0,1 mg (0,4%)	
18.2	< 0,0 mg	-
19.1	< 0,0 mg	-
19.2	0,1 mg (0,4%)	-
20.1	0,2 mg (0,8%)	-
20.2	0,3 mg (1,2%)	-
21.1	0,3 mg (1,2%)	-
21.2	0,1 mg (0,4%)	-
22.1	0,1 mg (0,4%)	-
22.2	0,1 mg (0,4%)	-
23.1	0,2 mg (0,8%)	-
23.2	0,2 mg (0,8%)	-
24.1	0,1 mg (0,4%)	-
24.2	< 0,0 mg	-
25.1	0,1 mg (0,4%)	-
25.2	0,3 mg (1,2%)	-
26	0,3 mg (1,2%)	-
27	0,1 mg (0,4%)	
28	0,1 mg (0,4%)	G2
29	0,2 mg (0,8%)	0,5 mg (1,9%)
30	0,2 mg (0,8%)	
100	0,8 mg (3,1%)	-
Total	22,9 mg (88,4%)	-

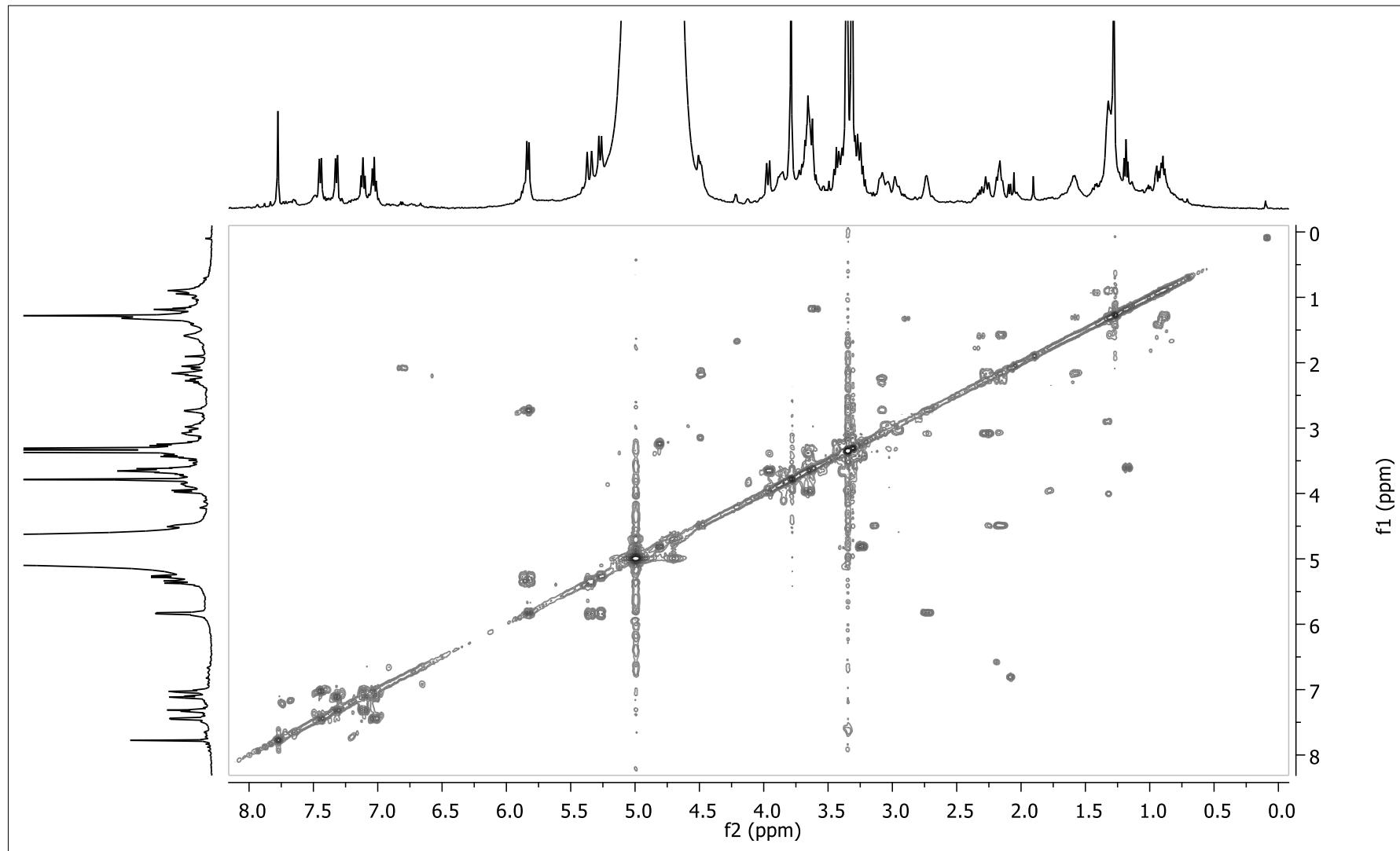
* Os rendimentos foram calculados a partir da massa total da fração EFS2_2 usada na EFS4; **As massas das frações reunidas por similaridade apresentam variações em relação à soma das massas das frações quando separadas por conta do limite de pesagem da balança analítica (0,0001 g).

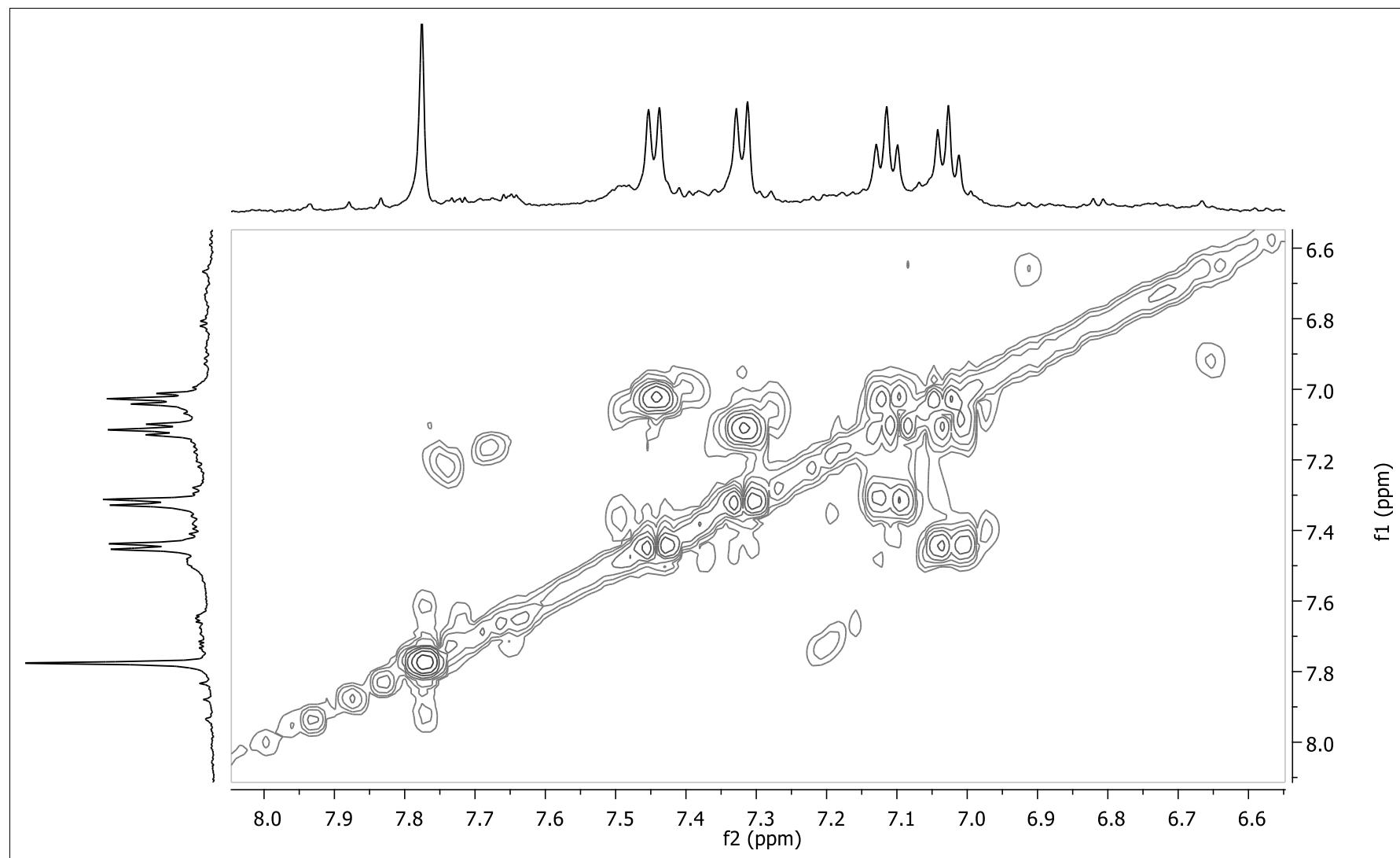
APÊNDICE V – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração EFS4_G1.

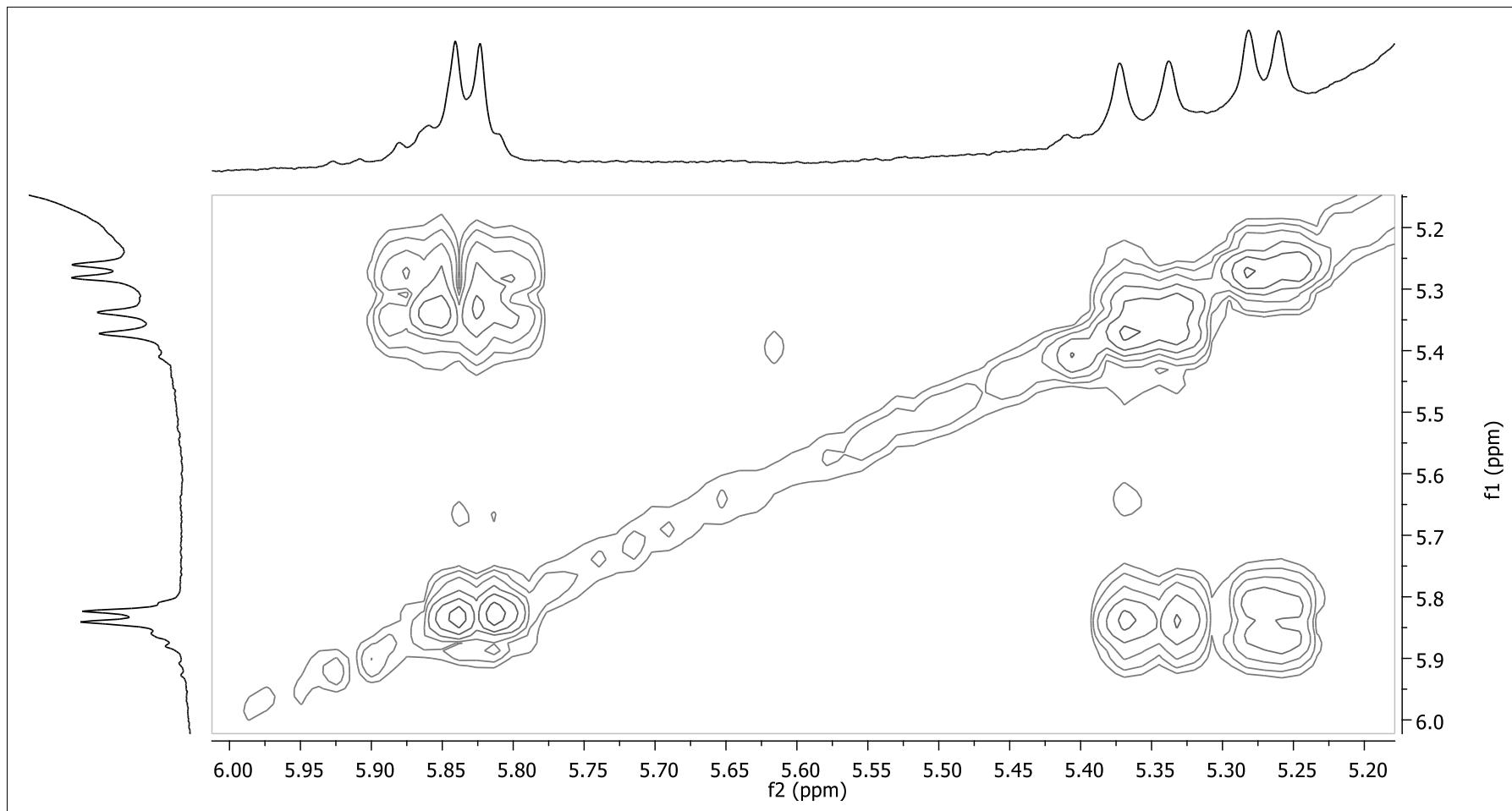
APÊNDICE W – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 8,0 – 5,2 ppm) da fração EFS4_G1.

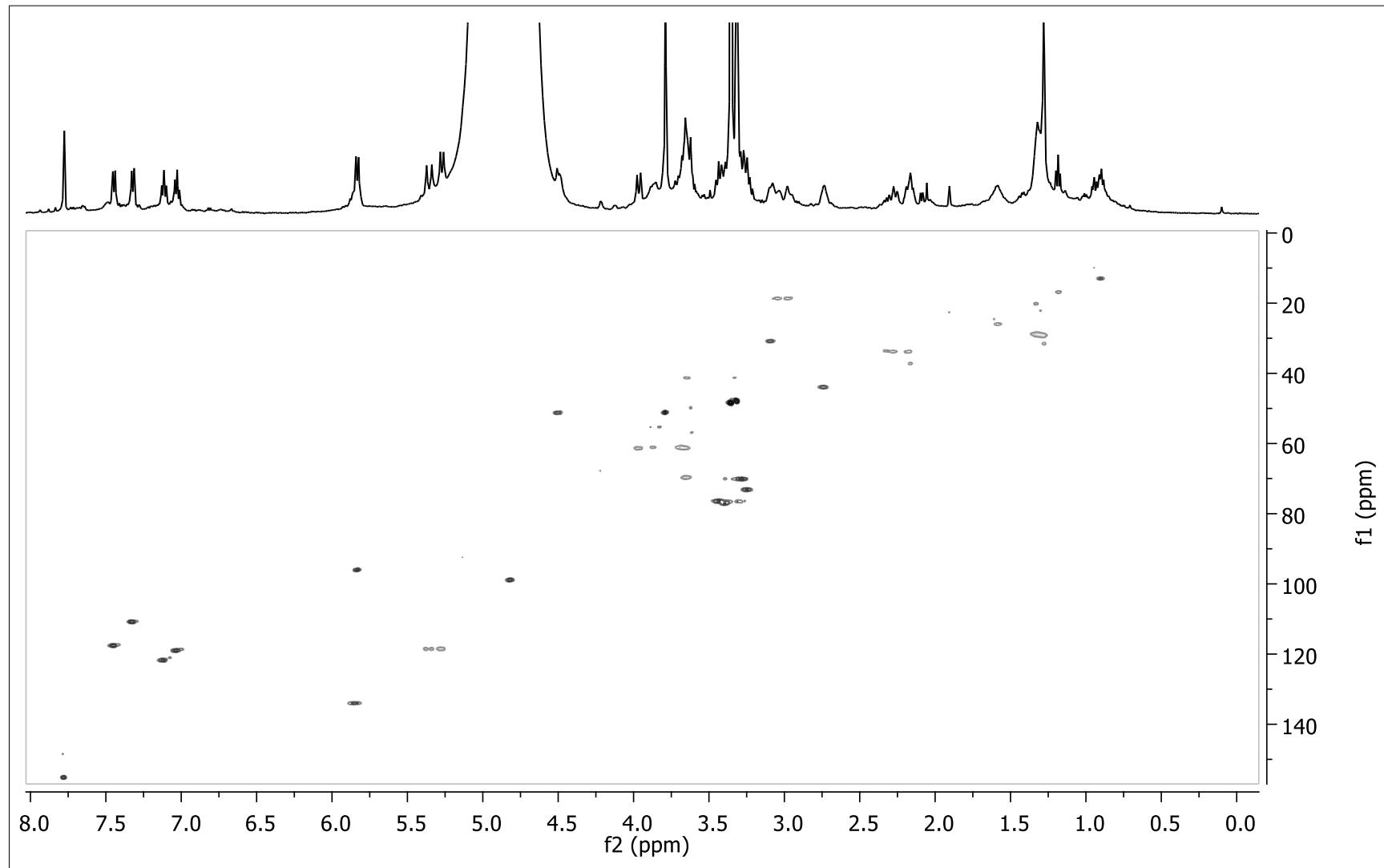
APÊNDICE X – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado (δ_{H} 4,3 – 0,7 ppm) da fração EFS4_G1.



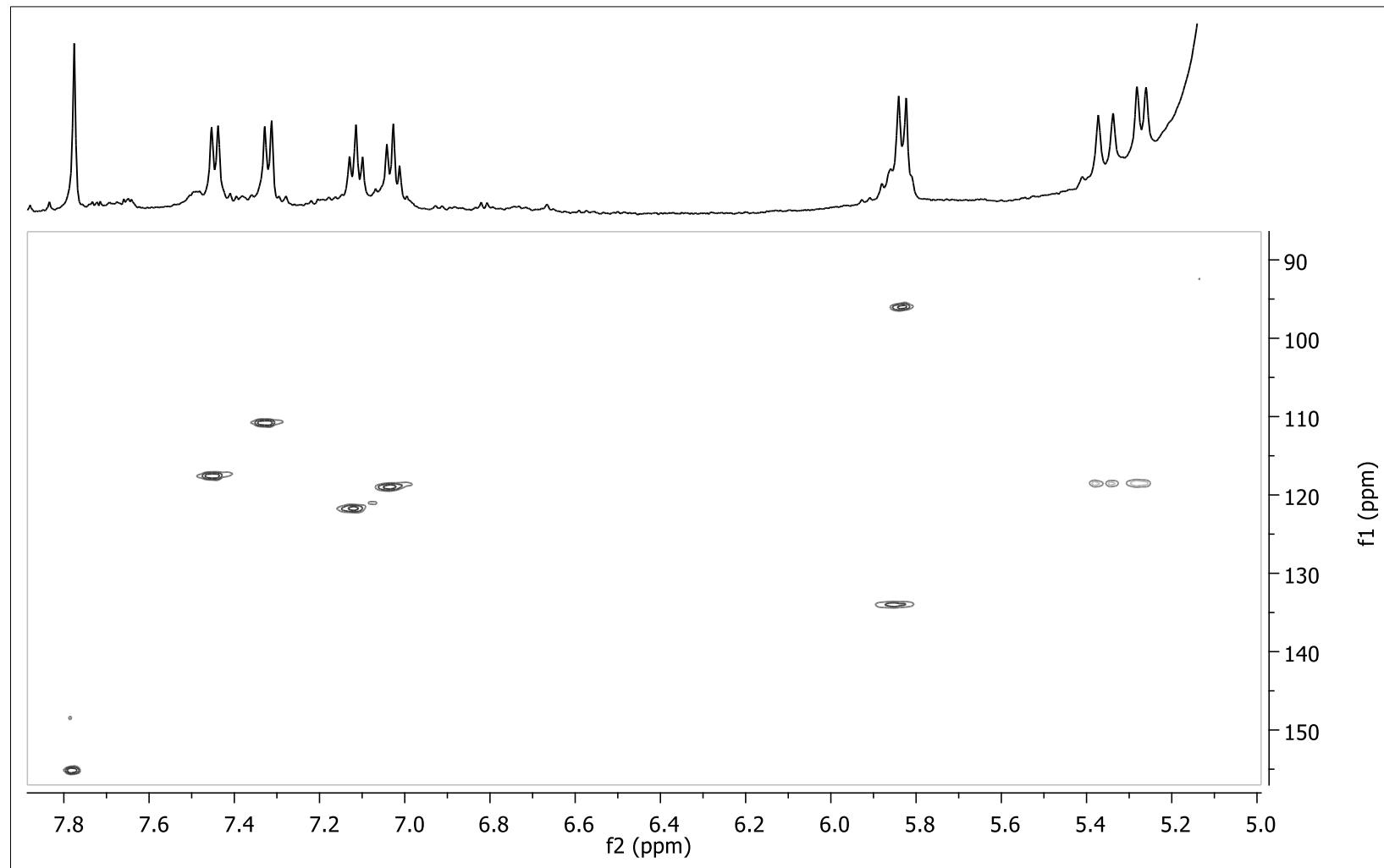
APÊNDICE Y – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) da fração EFS4_G1.

APÊNDICE Z – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1 e f2: δ_H 8,0 – 6,6 ppm) da fração EFS4_G1.

APÊNDICE AA – Espectro COSY (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1 e f2: δ_H 6,0 – 5,2 ppm) da fração EFS4_G1.

APÊNDICE BB – Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD) da fração EFS4_G1.

APÊNDICE CC – Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ_C 90 – 150 ppm; f2: δ_H 7,8 – 5,0 ppm) da fração EFS4_G1.



APÊNDICE DD – Espectro HSQC (400 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ_C 80 – 0 ppm; f2: δ_H 4,4 – 1,0 ppm) da fração EFS4_G1.

