



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



Projeto Final de Curso
IQWX01

**Isolamento dos alcaloides presentes no extrato metanólico das folhas de
Psychotria nemorosa Gardner (Rubiaceae) por extração em fase sólida**

Jéssica de Oliveira Costa

Rio de Janeiro
Setembro/2016

CIP - Catalogação na Publicação

d837i de Oliveira Costa, Jéssica
Isolamento dos alcaloides presentes no extrato metanólico das folhas de *Psychotria nemorosa* Gardner (Rubiaceae) por extração em fase sólida / Jéssica de Oliveira Costa. -- Rio de Janeiro, 2016.
97 f.

Orientador: Rodolfo Santos Barboza.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Bacharel em Química, 2016.

1. *Psychotria nemorosa*. 2. Rubiaceae. 3. Alcaloide indólico. 4. EFS. 5. CLAE. I. Santos Barboza, Rodolfo, orient. II. Título.

JÉSSICA DE OLIVEIRA COSTA

Isolamento dos alcaloides presentes no extrato metanólico das folhas de *Psychotria nemorosa* (Rubiaceae) por extração em fase sólida.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:

Prof. Rodolfo Santos Barboza (IQ-UFRJ)

Dr. Davyson de Lima Moreira (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Débora França de Andrade (IQ-UFRJ)

Rio de Janeiro

Setembro/2016

*Dedico este trabalho aos meus avós,
Domingos (in memoriam) e Filomena (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, força e muita fé para superar as dificuldades que a vida nos impõe pelo caminho.

Agradeço aos meus familiares, Penha, Beto e Carlinhos, que sempre me apoiam, incentivam e acreditam nos meus sonhos e que é a minha base para continuar sendo uma pessoa justa, boa e correta.

Agradeço ao meu namorado, Henrique, que sempre acreditou na minha capacidade mesmo quando eu não confiava e por entender os momentos de ausência.

Agradeço ao meu orientador, Professor Rodolfo Santos Barboza, pela excelente orientação e mesmo com tantas tarefas sempre se fez presente sendo muito atencioso comigo. Obrigada pelas discussões científicas, pela confiança, apoio, perseverança e por ter acrescentado toda sua experiência e conhecimento para dar andamento a este projeto.

Agradeço à Professora Ligia Maria Marino Valente por ser minha orientadora de Iniciação Científica pelos longos anos de graduação e sempre ter confiado em meu trabalho no laboratório. Obrigada por todo conhecimento científico, profissional e pessoal dado nestes anos de parceria.

Aos meus amigos do laboratório 627 agradeço pelo companheirismo, aprendizado, carinho, ajuda, amizade, risadas e diversão que me fará recordar com carinho de todos os momentos vividos.

Aos meus amigos de graduação e amigos “além da UFRJ” agradeço pelo carinho, companheirismo e amizade.

A esta universidade e todo seu corpo docente, além da direção e administração que me proporcionaram as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao Professor Marcelo Marciel e ao Matheus Oliveira pela liofilização das amostras, à Professora Luzineide Tinoco e Thiago Wolff pelas análises de RMN realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises de RMN (LAMAR), à Professora Nanci Garden pelas análises no Espectrofotômetro de UV/VIS, à Professora Denise Freire pela disponibilização do equipamento de CLAE/DAD e à Professora Priscila Santos pela ajuda nas análises em CLAE.

*“Dê ouvidos a seu pai,
porque ele gerou você, e não despreze a velhice de sua mãe. Compre a
verdade e não venda a sabedoria, a disciplina e a inteligência.”*

Provérbios 23, 22-23

RESUMOPROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: ISOLAMENTO DOS ALCALOIDES PRESENTES NO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *PSYCHOTRIA NEMOROSA* GARDNER (RUBIACEAE) POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

ALUNO: Jéssica de Oliveira Costa

ORIENTADOR: Rodolfo Santos Barboza, DQA – Instituto de Química – UFRJ

O gênero *Psychotria* L. (Rubiaceae) contém mais de 1000 espécies distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo. Ele é particularmente caracterizado como uma rica fonte de alcaloides indólicos e iridoides bioativos. A espécie *Psychotria nemorosa* Gardner é endêmica no Brasil, com distribuição em grande parte do território brasileiro. Como parte da linha de pesquisa que busca agentes antivirais de origem vegetal aplicados à terapia da dengue, o extrato metanólico das folhas de *P. nemorosa* quando testado *in vitro* em células de hepatocarcinoma humano infectadas com o vírus Dengue sorotipo 2 apresentou atividade antiviral significativa, não sendo citotóxico. A partir deste extrato foi isolado, por partição líquido-líquido seguida de fracionamento sequencial por cromatografia em coluna (CC) em Sephadex LH-20 e em fase-reversa (C-18), o alcaloide indólico monoterpênico *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida. O desenvolvimento de métodos efetivos para isolamento e purificação de substâncias naturais para estudos complementares e/ou aplicações diversas tem sido um desafio. O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método simples e efetivo de isolamento da *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida e de dois outros alcaloides indólicos presentes no extrato metanólico das folhas da espécie utilizando extração em fase sólida (EFS), tendo como base parâmetros obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Um novo lote de extrato metanólico foi solubilizado em MeOH/H₂O 1:3 (v/v) e particionado com hexano para remoção de material graxo e enriquecimento nos alcaloides. A fração hidrometanólica foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada à um detector de arranjo de diodo (CLAE-FR-DAD) em diversas condições, para avaliação das seletividades cromatográficas de seus constituintes. O alcaloide de referência previamente isolado foi analisado sob as mesmas condições. Os parâmetros cromatográficos obtidos possibilitaram a estimativa dos parâmetros operacionais em EFS: composição do eluente (acetonitrila/H₂O) e volume de eluição. Experimentos planejados a partir destes resultados levaram ao isolamento da *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida. A análise de outras frações da EFS por CLAE e técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensionais revelou o isolamento de outros dois alcaloides indólicos monoterpênicos glicosilados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Técnicas cromatográficas para desenvolvimento de método de isolamento em Química de Produtos Naturais.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal.....	27
3.2 Preparação e particionamento do extrato metanólico	27
3.3 Substância de referência <i>N</i> , β -D-glicopiranosilvincosamida	27
3.4 Cromatografia em camada delgada	28
3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa	28
3.6 Extração em fase sólida.....	29
3.7 Técnicas envolvidas na caracterização das substâncias isoladas	31
3.7.1 Ressonância magnética nuclear.....	31
3.7.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Análises preliminares e pré-fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Psychotria nemorosa</i>	32
4.2 Desenvolvimento de método por extração em fase sólida para isolamento das substâncias polares das folhas de <i>P. nemorosa</i>	35
4.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>P. nemorosa</i>	42
4.3.1 Elucidação estrutural da substância S1	42
4.3.2 Elucidação estrutural da substância S3	45
4.3.3 Elucidação estrutural da substância S2	49
5 CONCLUSÃO	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7 APÊNDICE	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotografia da espécie <i>Psychotria nemorosa</i> (REFLORA, 2010).....	18
Figura 2. Distribuição geográfica da espécie <i>P. nemorosa</i> no Brasil (REFLORA, 2010).....	19
Figura 3. Rota biossintética da strictosamida (DEWICK, 2002).....	20
Figura 4. Alcaloide indólico monoterpênico <i>N,β</i> -D-glicopiranosilvincosamida.....	21
Figura 5. Representação dos tempos de retenção, substância não retida e de retenção ajustado.	24
Figura 6. Esquema experimental para extração em fase sólida (EFS) adaptado de LANÇAS, 2010.....	29
Figura 7. Cromatografia em camada delgada do extrato metanólico das folhas de <i>Psychotria nemorosa</i> (PNM), das frações após partição do extrato (PNMA e PNH) e do alcaloide <i>N,β</i> -D-glicopiranosilvincosamida (Ref.). Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H ₂ O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: 50 mg.mL ⁻¹ (PNH), 1 mg.mL ⁻¹ (Ref.), 25 mg.mL ⁻¹ (PNMA) e 25 mg.mL ⁻¹ (PNH); Volume de aplicação: 10 μL.....	33
Figura 8. Cromatograma em CLAE-FR-DAD. (a) Fração PNMA; (b) <i>N,β</i> -D-glicopiranosilvincosamida; e (c) Espectro da região do UV representativo da <i>N,β</i> -D-glicopiranosilvincosamida (16,8 min). Condições cromatográficas: coluna LiChrocart Lichorspher RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); Comprimento de onda: 225 nm; Concentração: 20 mg.mL ⁻¹ (PNMA) e 2 mg.mL ⁻¹ (<i>N,β</i> -D-glicopiranosilvincosamida); Volume de injeção: 10 μL.	34
Figura 9. Espectro na região do UV da substância referente ao pico com tempo de retenção em 34,9 min no cromatograma da fração PNMA.....	34
Figura 10. Perfis cromatográficos em CCD das frações obtidas a partir da EFS1. (A) Volume de eluição de 3 mL; e (B) Volumes de eluição de 4 mL. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H ₂ O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: indefinida; Volume de aplicação: 20 μL.....	36

Figura 11. Perfil cromatográfico em CCD das frações obtidas a partir da EFS2. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H ₂ O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: indefinida; Volume de aplicação: 20 µL.....	38
Figura 12. Perfil cromatográfico em CCD das frações obtidas a partir da EFS3. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H ₂ O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: indefinida; Volume de aplicação: 20 µL.....	39
Figura 13. Perfil cromatográfico em CCD das substâncias S1, S2 e S3 isoladas da fração PNMA. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H ₂ O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: 1 mg.mL ⁻¹ ; Volume de aplicação: 10 µL.....	40
Figura 14. Cromatogramas em CLAE-FR-DAD das substâncias S1, S2 e S3. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart Lichorspher RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Comprimento de onda: 225 nm; Concentração: 2 mg.mL ⁻¹ ; Volume de injeção: 10 µL.....	42
Figura 15. Espectro de absorção na região do UV da substância S1.....	44
Figura 16. Estrutura química da <i>N</i> ,β-D-glicopiranosilvincosamida.....	44
Figura 17. Principais deslocamentos e correlações observadas nos espectros COSY, HMBC e HSQC da substância S3.....	46
Figura 18. Espectro de absorção na região do UV da substância S3.....	48
Figura 19. Estrutura química da vincosamida.....	48
Figura 20. Esquema representativo do espectro de RMN ¹ H ampliado (δ: 7.50-7.00 ppm) e do espectro de correlações ¹ H- ¹ H COSY ampliado (f1: δ7.50-700 ppm; e f2: δ 6.8-7.7 ppm) da substância S2.....	49
Figura 21. Principais deslocamentos e correlações observados nos espectros COSY, HMBC e HSQC para a substância S2.....	51
Figura 22. Espectro de absorção na região do UV da substância S2.....	53

	Pág.
Figura 23. Estrutura química proposta para a substância S2.....	53
Figura 24. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S1.....	60
Figura 25. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 7.70-7.00 ppm) da substância S1.....	61
Figura 26. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 5.60-4.50 ppm) da substância S1.....	62
Figura 27. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 4.3-2.2 ppm) da substância S1.....	63
Figura 28. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S1.....	64
Figura 29. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.75-7.00 ppm; e f2: δ 6.8-7.9 ppm) da substância S1.....	65
Figura 30. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.5-1.0 ppm; e f2: δ 1.0-6.0 ppm) da substância S1.....	66
Figura 31. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.2-3.1 ppm; e f2: δ 2.6-5.4 ppm) da substância S1.....	67
Figura 32. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.60-5.00 ppm; e f2: δ 4.9-5.9 ppm) da substância S1.....	68
Figura 33. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S3.....	69
Figura 34. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 7.55-6.85 ppm) da substância S3.....	70
Figura 35. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 5.60-4.40 ppm) da substância S3.....	71
Figura 36. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 3.9-1.3 ppm) da substância S3.....	72
Figura 37. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S3.....	73
Figura 38. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.55-6.85 ppm; e f2: δ 6.6-7.8 ppm) da substância S3.....	74

Figura 39. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 6.0-1.0 ppm; e f2: δ 0.5-6.5 ppm) da substância S3.....	75
Figura 40. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.65-5.05 ppm; e f2: δ 4.9-5.8 ppm) da substância S3.....	76
Figura 41. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S3.....	77
Figura 42. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.5-4.7 ppm; e f2: δ 90-150 ppm) da substância S3.....	78
Figura 43. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.8-1.2 ppm; e f2: δ 20-100 ppm) da substância S3.....	79
Figura 44. Espectro HMBC (500 MHz, ¹ H, 125 MHz, ¹³ C, CD ₃ OD) da substância S3.....	80
Figura 45. Espectro HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.5-4.5 ppm; e f2: δ 30-150 ppm) da substância S3.....	81
Figura 46. Espectro HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.5-1.0 ppm; e f2: δ 0-160 ppm) da substância S3.....	82
Figura 47. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da fração S2.....	83
Figura 48. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 7.54-6.94 ppm) da substância S2.....	84
Figura 49. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 6.1-4.4 ppm) da substância S2.	85
Figura 50. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 4.05-3.20 ppm) da substância S2.....	86
Figura 51. Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (δ 3.2-0.8 ppm) da substância S2.	87
Figura 52. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S2.....	88
Figura 53. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.50-7.00 ppm; e f2: δ 6.8-7.7 ppm) da substância S2.....	89

Figura 54. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 6.0-1.5 ppm; e f2: δ 1.5-6.0 ppm) da substância S2.....	90
Figura 55. Espectro COSY (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 6.3-5.1 ppm; δ 4.4-6.6 ppm) da fração S2.....	91
Figura 56. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S2.....	92
Figura 57. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.4-4.8 ppm; e f2: δ 95-150 ppm) da substância S2.....	93
Figura 58. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.5-1.5 ppm; e f2: δ 10-130 ppm) da substância S2.....	94
Figura 59. Espectro HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da substância S2.....	95
Figura 60. Espectro HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 7.60-6.85 ppm; e f2: δ 20-180 ppm) da substância S2.....	96
Figura 61. Espectro HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) ampliado (f1: δ 5.8-1.0 ppm; e f2: δ 20-140 ppm) da substância S2.....	97

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Tempos de retenção (t_R), composição de fase móvel (% ACN), volume de eluição, relação entre os volumes de eluição e de leito e fator de retenção (k) dos principais constituintes da fração PNMA.....	35
Tabela 2. Massas e rendimentos das substâncias S1, S2 e S3 isoladas a partir da fração PNMA por EFS.....	40
Tabela 3. Massas das substâncias S1, S2 e S3 reunidas com as frações isoladas nos experimentos em EFS anteriores.....	41
Tabela 4. Dados em RMN ^1H da substância S1 (500 MHz, CD_3OD) e da N,β -D-glicopiranosilvincosamida (600 MHz, CD_3OD) (Modelo*).....	43
Tabela 5. Dados em RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de S2 e RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75,5 MHz) do <i>epi-strictosidínico</i> (Modelo*) em CD_3OD	47
Tabela 6. Dados em RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de S3 e RMN ^1H (360 MHz) e ^{13}C (62,9 MHz) da vincosamida e strictosamida (Modelo*) em CD_3OD	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOH	Ácido acético
BuOH	Butanol
°C	Graus Celsius
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetros
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
δ	Deslocamento químico
d	Dupleto
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dl	Dupleto largo
ε	Coefficiente de extinção molar
EFS	Extração em fase sólida
FR	Fase reversa
<i>J</i>	Constante de acoplamento
HCOOH	Ácido fórmico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiplique Bond Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz

<i>k</i>	Fator de retenção
L	Comprimento
log	Logaritmo decimal
m	Multiplete
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	milimolar
μL	Microlitros
μm	Micrometros
MeOH	Metanol
MHz	megahertz
min	minutos
mult.	Multiplicidade
MΩ	MegaOhm
nd	Não determinado
nm	Nanômetros
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
P.A.	Para análise
PN	<i>Psychotria nemorosa</i>
PNH	Fração hexânica de <i>Psychotria nemorosa</i>
PNM	Extrato metanólico das folhas de <i>Psychotria nemorosa</i>
PNMA	Fração hidrometanólica de <i>Psychotria nemorosa</i>
ppm	Partes por milhão
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
r	Raio

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
sl	Sinpleto largo
t	Tripleto
td	Triplo duplete
t_{NR}	Tempo de substância não retida
t'_R	Tempo de retenção ajustado
t_R	Tempo de retenção
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
v	vazão
Vis	Visível
V_E	Volume de eluição
V_L	Volume de leito
V_{NR}	Volume de eluição de substância não retida
V_R	Volume de eluição da substância em análise
v/v	Volume por volume

1 INTRODUÇÃO

A família botânica Rubiaceae é composta por 650 gêneros e compreende 13000 espécies, sendo a quarta maior descrita na literatura (FARIA, 2009). Esta família é constituída por árvores de grande, médio e pequeno porte, arbustos, subarbustos e ervas anuais ou perenes, distribuídas em regiões tropicais dos dois hemisférios (ROBBRECHT, 1988; BARROSO, 1991 apud FARIAS, 2006).

O gênero *Psychotria* L., é o maior da família Rubiaceae, abrangendo cerca de 2000 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais do globo (CORRÊA *et al*, 2010). Este gênero é taxonomicamente complexo, podendo ser dividido em três subgêneros de acordo com as características morfológicas e distribuição geográfica. São eles: *Psychotria* (pantropical), *Tetramerae* (inclui espécies da África e Madagascar) e *Heteropsychotria* (neotropical) (FARIAS, 2006).

A espécie *Psychotria nemorosa* Gardner (**Figura 1**) é de pequeno porte e cresce como um arbusto. Trata-se de uma espécie endêmica no Brasil e encontrada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (**Figura 2, p. 19**) (REFLORA, 2010).



Figura 1. Fotografia da espécie *Psychotria nemorosa* (REFLORA, 2010).



Figura 2. Distribuição geográfica da espécie *P. nemorosa* no Brasil (REFLORA, 2010).

Ainda que não existam na literatura, até o momento, registros de estudos químicos e/ou farmacológicos associados à espécie *P. nemorosa*, o gênero ao qual pertence é particularmente caracterizado como uma rica fonte de alcaloides indólicos monoterpênicos e polindólicos bioativos (HENRIQUES *et al*, 2004). Os alcaloides indólicos monoterpênicos são marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Psychotria* L. (LOPES *et al*, 2004; HENRIQUES *et al*, 2004), e destacam-se pelas diversas propriedades terapêuticas como: analgésica (BOTH *et al*, 2002; FRAGOSO, 2007); antimutagênica (BOTH *et al*, 2002; FRAGOSO, 2007; DO NASCIMENTO *et al*, 2007); antioxidante (FRAGOSO, 2007; MATSUURA *et al*, 2013; DO NASCIMENTO *et al*, 2007); anti-inflamatória (MORAES *et al*, 2010) e antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, atividade citotóxica, significativa ação no sistema cardiovascular e analgésica (YANG, 2016).

Os alcaloides são compostos nitrogenados de grande diversidade estrutural (SIMÕES *et al*, 2010). De maneira geral, o átomo de nitrogênio presente nos alcaloides é proveniente de aminoácidos (DEWICK, 2002). Além de aminoácidos, outros precursores são incorporados aos alcaloides, como terpenos ou esteroides (DEWICK, 2002).

Alcaloides indólicos monoterpênicos são derivados do metabolismo do aminoácido triptofano com a secologanina (iridoide) que é um precursor terpenoídico (SIMÕES *et al*, 2010). A strictosidina e a strictosamida, alcaloides encontrados em espécies de *Psychotria*,

são biossintetizados por descarboxilação do L-triptofano pela enzima triptofano-descarboxilase, formando triptamina (FRAGOSO, 2007). A condensação da triptamina com o monoterpene secologanina forma a estrictosidina (FRAGOSO, 2007). Após rearranjo conformacional devido à livre rotação das ligações simples presentes na estrictosidina, uma nova etapa de condensação gera a estrictosamida (**Figura 3**).

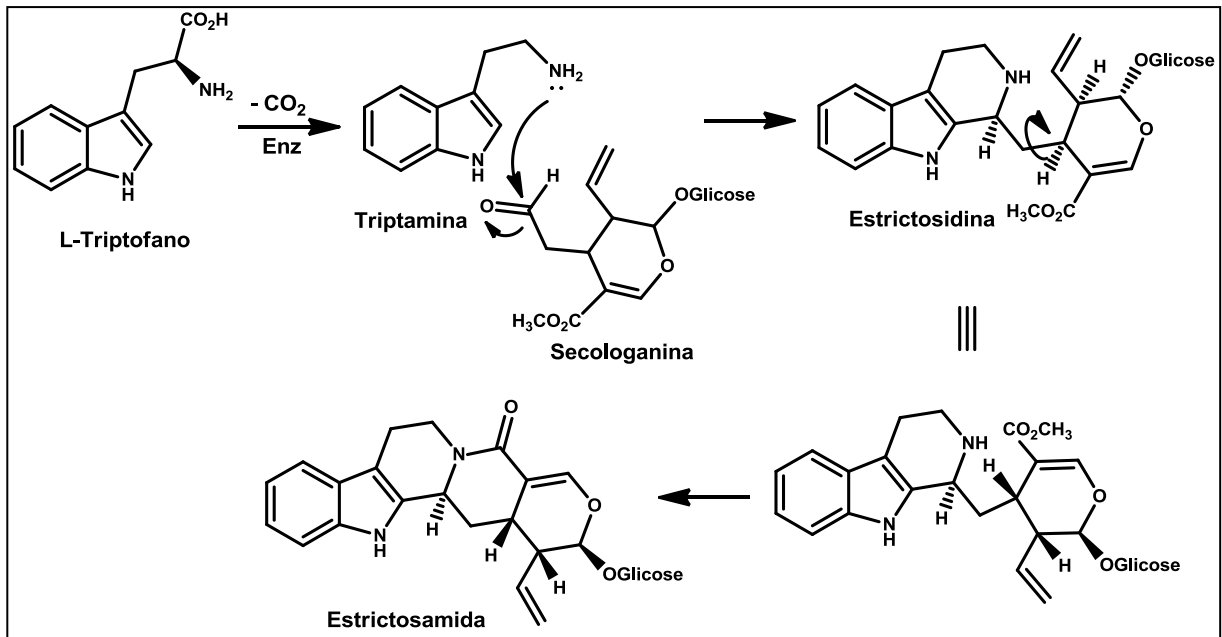


Figura 3. Rota biossintética da estrictosamida (DEWICK, 2002).

As transformações subsequentes, através de diversos rearranjos e/ou reações ainda não muito bem caracterizadas, resultam numa enorme variedade estrutural, com grande número de carbonos assimétricos, levando às diferentes classes de alcaloides indólicos monoterpênicos (SIMÕES *et al*, 2010), sendo conhecidos mais de 3000 tipos, fazendo deste o principal grupo de alcaloides nas plantas (DEWICK, 2002). Rotas sintéticas para produção de alguns alcaloides já foram estabelecidas, no entanto, para diversos outros, como os indólicos monoterpênicos, o baixo rendimento e o alto custo do processo, devido à complexidade estrutural, inviabilizam a produção (KUTCHAN, 1995). Por isso, em muitos casos, a extração de alcaloides a partir da planta produtora permanece sendo a alternativa mais viável.

Como parte da linha de pesquisa que busca agentes antivirais de origem vegetal aplicado à terapia da dengue, o extrato metanólico das folhas de *P. nemorosa* quando testado *in vitro* em células de hepatocarcinoma humano infectadas com o vírus Dengue sorotipo 2

apresentou atividade antiviral significativa, não sendo citotóxico. A partir deste extrato foi isolado, por partição líquido-líquido seguida de fracionamento sequencial por cromatografia em coluna (CC) em Sephadex LH-20 e em fase-reversa (C-18), o alcaloide indólico monoterpênico *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (**Figura 4**) (COSTA *et al*, 2016).

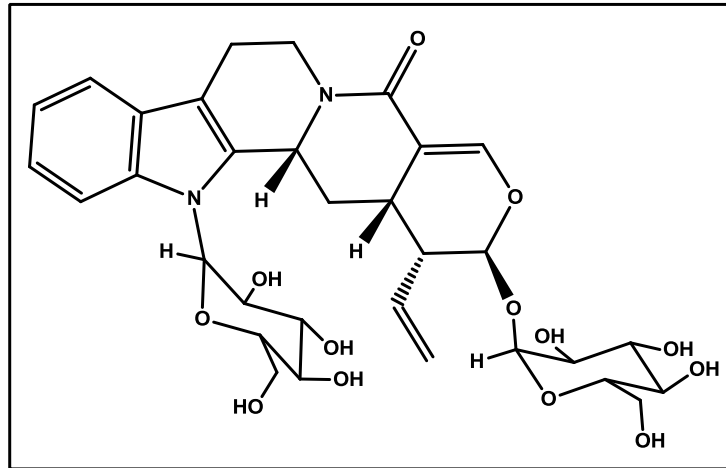


Figura 4. Alcaloide indólico monoterpênico *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida.

O alcaloide *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida foi isolado pela primeira vez a partir do extrato etanólico das folhas de *P. leiocarpa* (HENRIQUES *et al*, 2004). Em estudo recente foi sugerido como modulador do estresse oxidativo, com significativa atividade antioxidante (MATSUURA *et al*, 2016). Estudos de fotorregulação com a espécie *P. leiocarpa* mostraram que em condições especiais de cultivo (comprimentos de onda específicos) havia um aumento da produção de *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (FRAGOSO, 2007).

O largo espectro de propriedades terapêuticas que são atribuídas aos alcaloides indólicos monoterpênicos, a dificuldade de obtenção destas substâncias através de rotas sintéticas economicamente viáveis e a potencial atividade antidengue previamente apresentada pelo extrato metanólico das folhas de *P. nemorosa* motivaram um estudo mais detalhado da espécie no que tange o seu perfil químico e o desenvolvimento de métodos capazes de isolar os alcaloides presentes em suas folhas.

1.1 Técnicas cromatográficas para desenvolvimento de método de isolamento em Química de Produtos Naturais

O desenvolvimento de métodos efetivos para isolamento e purificação em grandes quantidades de substâncias naturais para estudos complementares e/ou aplicações diversas tem sido um desafio. Neste contexto, inserem-se as técnicas de separação cromatográficas cuja utilização tem aumentado expressivamente nas últimas décadas, culminando em um avanço tecnológico significativo em relação às diversas formas de execução. Introduzida no início dos anos 1970 para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido, tais como a separação incompleta das fases, baixas porcentagens de recuperação, uso de materiais facilmente quebráveis e o uso de grande quantidade de solventes orgânicos, a extração em fase sólida (EFS) tornou-se um dos métodos mais populares de preparo de amostra, sendo muito utilizada em análises de rotina (JARDIM, 2010). Trata-se de uma técnica de separação fundamentada na cromatografia líquida clássica (LANÇAS, 2004), cujo fenômeno se dá em uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, o qual contém a fase estacionária, também chamada de sorvente, que são similares àquelas utilizadas em cromatografia líquida em coluna com mecanismos de separação tanto de adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e/ou exclusão. A solução contendo a substância de interesse é introduzida no cartucho e aspirada sob pressão negativa. Após drenagem da fase líquida, a substância é mantida no cartucho pelas fortes interações com a fase estacionária, sendo posteriormente eluída com pequenos volumes de solvente (ou mistura de solventes) de maiores forças eluotrópicas.

Os cartuchos de EFS são disponíveis em diferentes tamanhos e recheados com diferentes quantidades de sorvente. A escolha depende de fatores como: volume da amostra, concentrações e propriedades físico-químicas das substâncias de interesse, quantidade de interferente e complexidade da amostra (FIGUEIREDO *et al*, 2015).

A EFS pode ser usada para quatro importantes propósitos: **1.** Extração e/ou concentração da substância de interesse – “enriquecimento”: passagem de grandes volumes de amostra pela fase sólida com o intuito de reter somente a “substância alvo”. Em seguida, promove-se a remoção da substância de interesse com menores volumes de solvente, deixando-a mais concentrada e livre de interferentes, se comparada à amostra original; **2.** Isolamento de substâncias de interesse: utiliza-se o fenômeno cromatográfico para o isolamento de substâncias de interesse, sendo importante a resolução dos constituintes de uma

determinada matriz, independente da ordem de eluição; **3.** Isolamento da matriz ou limpeza da amostra – “*clean-up*”: empregada na retenção de interferentes da matriz na fase estacionária. Neste caso, se promove a retirada dos interferentes da amostra sem que ocorra, no entanto, a concentração da substância de interesse e; **4.** Estocagem da amostra: geralmente utilizada para análise de amostras cujo transporte até o laboratório analítico seja de difícil execução. Neste caso, as substâncias de interesse são concentradas no cartucho pela passagem de amostra, sendo este armazenado adequadamente e transportado até o laboratório onde serão feitas as análises. Sendo assim, é de suma importância um estudo preliminar sobre a estabilidade das substâncias “estocadas”.

A maioria dos parâmetros que regulam as etapas de processamento em EFS pode ser estimada a partir de estudos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou utilizando os seus princípios teóricos (POOLE, 2003). Assim, os principais parâmetros operacionais em EFS: composição de fase móvel e volume de eluição; podem ser previamente estimados por CLAE através do estudo de seletividade dos constituintes de uma amostra, sendo importantes para a transposição do método, os parâmetros cromatográficos tempo de retenção (t_R), tempo de retenção ajustado (t'_R) e tempo de substância não retida (t_{NR}), para o cálculo dos fatores de capacidade (k) e volumes de eluição (V_E) no sistema em CLAE.

O tempo de retenção ajustado (t'_R) é dado pela diferença entre o tempo de retenção total da substância (t_R) que é computado a partir do início do cromatograma, e o tempo de substância não retida (t_{NR}), sendo este definido como o tempo de residência na coluna de uma substância que não interage com o sistema cromatográfico. Esta relação é mostrada na **Equação 1**. A **Figura 5** esquematiza o t_R , o t'_R e o t_{NR} em um cromatograma.

$$t'_R = t_R - t_{NR}$$

Equação 1

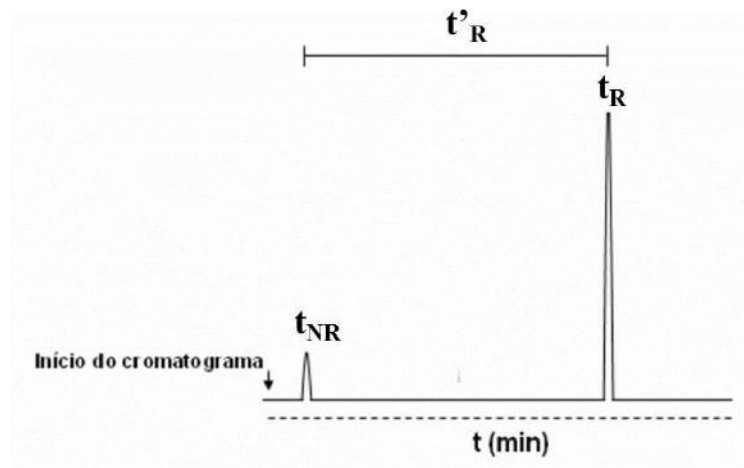


Figura 5. Representação dos tempos de retenção, substância não retida e de retenção ajustado.

A retenção de um componente em um sistema cromatográfico é determinada pelo parâmetro de fator de retenção (k), o qual é definido pela razão t'_R/t_{NR} , conforme a **Equação 2**.

$$k = t'_R/t_{NR} = (t_R - t_{NR})/t_{NR} \quad \text{Equação 2}$$

Quando o método cromatográfico em CLAE possui vazão constante (v) (lembrando que a vazão é definida como o volume de fase móvel por unidade de tempo), pode-se escrever o fator de retenção em função dos volumes de eluição de substância não retida no sistema cromatográfico (V_{NR}) e da substância em análise (V_R), assim como na **Equação 3**.

$$k = (V_R - V_{NR})/V_{NR} \quad \text{Equação 3}$$

Apesar do fator de retenção traduzir, de certa forma, a ordem de eluição dos constituintes de uma determinada amostra, podemos ainda transcrever os volumes de eluição da substância em unidades de volume de leito (V_L), sendo este dependente das dimensões da coluna cromatográfica. Assim, podemos racionalizar a quantidade de “volumes de leito” necessários para eluição de determinada substância, sendo este um parâmetro de suma importância para a transposição de métodos entre a CLAE e a EFS.

Ainda que a CLAE seja uma técnica amplamente utilizada para determinação de perfis qualitativos e quantitativos, bem como para o isolamento e purificação de substâncias a partir de fontes naturais, a EFS por sua simplicidade, baixo custo quando comparada à CLAE e fácil automação tem sido cada vez mais utilizada em diversas áreas, no propósito de isolamento de substâncias de interesse. Em escalas semipreparativa e preparativa, a EFS pode fornecer algumas vantagens sobre a CLAE em termos de tempos reduzidos de análise, menor consumo de solvente, sendo os requisitos de equipamento mais simples e acessíveis, bem como a possibilidade de preparar várias amostras simultaneamente. Sendo assim, para desenvolvimento de método de isolamento da *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida a partir das folhas da espécie *P. nemorosa* (fonte potencial do alcaloide), resolveu-se pela EFS em fase reversa (FR), partindo-se de parâmetros prévios estabelecidos por CLAE-FR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo do presente estudo é o desenvolvimento de método de isolamento por extração em fase sólida (EFS) dos alcaloides presentes no extrato metanólico das folhas da espécie *Psychotria nemorosa* Gardner (Rubiaceae).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter o extrato metanólico das folhas de *P. nemorosa*;
- ✓ Obter fração enriquecida nos alcaloides presentes nas folhas de *P. nemorosa* a partir do extrato metanólico;
- ✓ Investigar a seletividade e a resolução dos constituintes da fração enriquecida por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR);
- ✓ Estimar os parâmetros cromatográficos em CLAE-FR das substâncias constituintes da fração enriquecida;
- ✓ Estimar a partir dos parâmetros cromatográficos em CLAE-FR os parâmetros operacionais em EFS-FR: composição volumétrica da fase móvel e volume de eluição;
- ✓ Aplicar os parâmetros operacionais estimados em EFS para o isolamento dos constituintes da fração enriquecida;
- ✓ Identificar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrofotometria na região do Ultravioleta-visível.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As folhas da espécie *Psychotria nemorosa* Gardner (PN) foram coletadas no Parque Nacional da Reserva Serra dos Órgãos no município de Guapimirim (Rio de Janeiro) no mês de maio de 2014. A espécie foi identificada pelo botânico Dr. Mário Gomes do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico (Rio de Janeiro, Brasil) sendo uma exsicata depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UFRJ sob o código RFA40646. A coleta teve permissão prévia do SISBIO-ICMBio-MMA, número 46504-2.

3.2 Preparação e particionamento do extrato metanólico

As folhas de PN foram secas à temperatura de 40°C em estufa e, em seguida, moídas com auxílio de um liquidificador industrial (Filizola, Brasil). Após este processo o material teve seu tamanho de partícula definido em $\leq 2,00$ mm, por passagem em peneira granulométrica (Bertel, Brasil).

Para obtenção do extrato partiu-se de 4,9 g de folhas processadas que foram extraídas por seis vezes com 75 mL metanol (MeOH) 95 % grau P.A. (Tedia, Brasil) à temperatura ambiente sob banho de ultrassom por 15 minutos. A cada etapa de extração o solvente foi filtrado e evaporado à pressão reduzida a 40°C.

O extrato bruto das folhas de PN (248,4 mg) foi solubilizado em 40 mL de MeOH/H₂O 1:3 (v/v) e particionados 10 vezes com 40 mL de hexano 95% grau P.A. (Tedia, Brasil). A cada ciclo de particionamento, após a separação das fases em funil de separação, o hexano foi tratado com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) (Vetec, Brasil), filtrado e evaporado à pressão reduzida a 40°C. Ao término do processo de partição, o MeOH da fase hidrometanólica foi evaporado à pressão reduzida a 40°C e, posteriormente, a H₂O liofilizada (Liobras modelo L101).

3.3 Substância de referência *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida

O alcaloide *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida previamente isolado do extrato metanólico das folhas de *Psychotria nemorosa* por partição ácido base seguido de cromatografia em coluna (COSTA *et al*, 2016) foi utilizado como substância de referência. A pureza deste material foi determinada em 91% por CLAE-DAD (normalização de área).

3.4 Cromatografia em camada delgada

As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de alumínio recobertas com gel de sílica 60F₂₅₄ (SiliCycle Inc.[®], Canadá). A fase móvel foi preparada pela mistura de butanol (BuOH) grau P.A. (Nuclear, Brasil) / ácido acético glacial (AcOH) (Vetec, Brasil) / água destilada (H₂O) na proporção 40:10:10 (v/v/v) (WAGNER, 2009). As amostras foram aplicadas com auxílio de seringa Hamilton TLC com agulha de teflon (Sigma-Aldrich, referência Z264393-1EA). Foram reservados 1,0 cm de base e 0,5 cm de frente, e o leito de desenvolvimento de 6,0 cm. As bandas foram reveladas pela incidência de luz UV a 254 nm.

3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

Acetonitrila (ACN) grau espectroscópico (Tedia, Brasil) e H₂O ultrapura (água deionizada com resistividade de 18,2 MΩ.cm) (Millipore, EUA) foram usadas para a preparação das fases móveis nas análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa (FR), após filtração em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, Brasil), e sonicação por 15 minutos. Depois da solubilização em MeOH, as amostras foram filtradas em filtros para seringas CHROMAFIL R Xtra PVDF de 0,45 µm de poro e 25 mm de diâmetro (Macherey-Nagel, Alemanha).

O sistema CLAE 1260 Series (Agilent Technologies) constituído por bomba quaternária 61311C Quart Pump VL composta por gabinete de solvente, degaseificador e gradiente de vácuo com quatro canais, amostrador automático G1329B 1260 ALS, detector por arranjo de fotodiodos (DAD) G1315D 1260 DAD VL e forno de coluna G1316A TCC, foi utilizado para as análises cromatográficas das frações geradas e das substâncias isoladas ao longo do estudo. As análises ocorreram em coluna LiChrocart (250 x 4,6 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 µm), acoplada à pré-coluna SupelguardTM LC-18 (20 mm x 4,0 mm, 5 µm), sendo realizadas à temperatura de 40° C, com volume de injeção de 10 µL e detecção a 225 nm. O sistema ACN/H₂O foi utilizado em diversas composições (em função do método de análise), sendo empregada a seguinte programação para o método em gradiente por etapas: 20% ACN por 5 min, 22% ACN por 5 min, 24% ACN por 5 min, 26% ACN por 5 min, 28% ACN por 5 min, 30% ACN 5 min, 100% ACN por 5 min (etapa de lavagem). Adicionalmente, utilizou-se uma etapa de condicionamento da coluna através da passagem, em modo gradiente, da composição de fase 100% ACN até 20% ACN em 5 min,

permanecendo nesta condição por mais 2 min. O tempo total de análise foi de 42 min. A integração dos sinais cromatográficos foi realizada no software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Rev. C.01.07 [27], Agilent Technologies). A vazão utilizada foi de $0,80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O tempo de substância não retida (t_{NR}) da coluna foi mensurado em 1,47 min.

3.6 Extração em fase sólida

Os experimentos em extração em fase sólida (EFS) foram realizados com cartuchos de sílica gel quimicamente modificada com octadecilsilanos (C18/18%), contendo 500 mg de fase estacionária em um volume de leito de 1 mL, sendo o tamanho de partícula de 40-60 μm , o comprimento do leito de 1,2 cm e o diâmetro de leito de 0,9 cm, em cartucho de polipropileno de 3 mL (Applied Separations, EUA). As extrações foram realizadas em manifold de 12 compartimentos (VisiprepTM SPE Vacuum Manifold DL, Supelco, EUA). A carga de amostra para cada cartucho foi de 1 mL de solução na concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, usando como solvente a mesma composição de fase móvel programada para a primeira eluição, sendo a vazão das eluições controlada e mantida entre $1 - 2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A aparelhagem utilizada para os experimentos de EFS encontra-se representada na **Figura 6**, sendo descritas ainda, as etapas envolvidas no processo de extração.

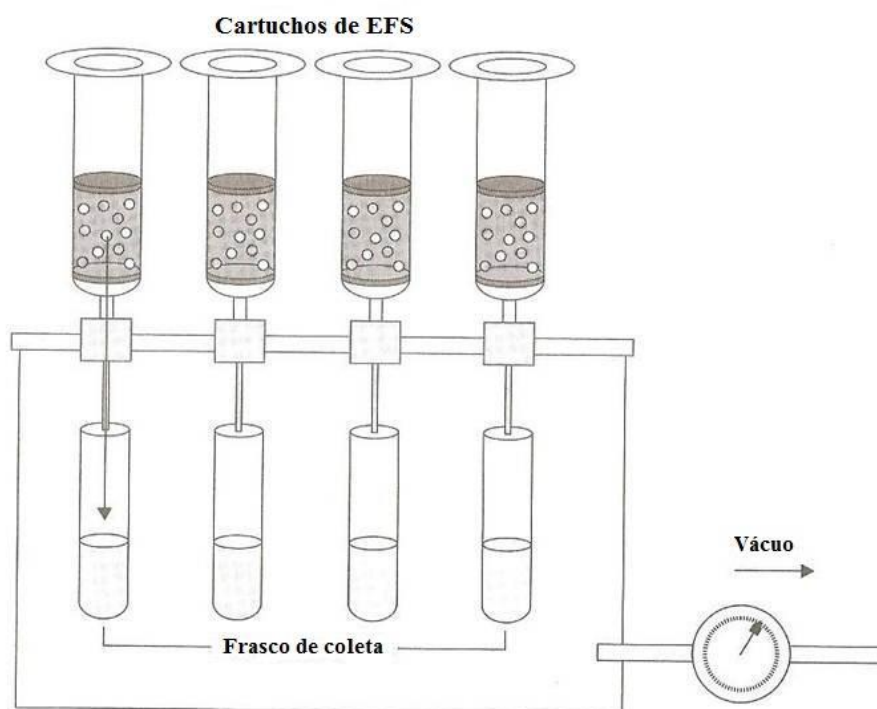


Figura 6. Esquema experimental para extração em fase sólida (EFS) adaptado de LANÇAS, 2010.

1.Ativação dos cartuchos: passagem de ACN 100% para remoção de quaisquer impurezas presentes no cartucho;

2.Condicionamento: remoção do solvente responsável pela ativação (ACN 100%) e condicionamento com fase móvel de mesma composição da primeira etapa de eluição;

3.Aplicação da amostra: adição da carga de amostra através da introdução de 1 mL de solução na concentração 10 mg.mL⁻¹;

4.Etapas de eluição: passagem de diversas composições de fase móvel em ACN/H₂O, para eluição seletiva dos constituintes da amostra.

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

Os experimentos realizados em EFS ao longo do estudo foram os seguintes:

EFS1: **ativação**: 5 mL de ACN 100%; **condicionamento**: 5 mL de ACN 20%; **aplicação da amostra**: 1 mL de solução 10 mg/mL da fração PNMA (em ACN/H₂O 2:8 – ACN 20%); **etapas de eluição**: 3 ou 4 mL de ACN 20% (**E1**), ACN 24% (**E2**), ACN 28% (**E3**), ACN 30% (**E4**) e ACN 100% (**E5**).

EFS2: **ativação**: 5 mL de ACN 100%; **condicionamento**: 5 mL de ACN 20%; **aplicação da amostra**: 1 mL de solução 10 mg/mL da fração PNMA (em ACN 20%); **etapas de eluição**: 12 mL de ACN 20%, coletados em frações de 2 mL (**E1 A-F**), 3 mL de ACN 24% (**E2**), 3 mL de ACN 28% (**E3**), 3 mL de ACN 30% (**E4**) e 3 mL de ACN 100% (**E5**). Experimento realizado em pH 3, sendo o pH ajustado por adição de ácido fórmico 98% (Vetec, Brasil) à mistura ACN/H₂O utilizada como fase móvel.

EFS3: **ativação**: 5 mL de ACN 100%; **condicionamento**: 5 mL de ACN 10%; **aplicação da amostra**: 1 mL de solução 10 mg/mL da fração PNMA (em ACN 10%); **etapas de eluição**: 9 mL de ACN 10%, coletados em frações de 3 mL (**E1 A-C**), 9 mL de ACN 15%, coletados em frações de 3 mL (**E2 D-F**), 9 mL de ACN 20%, coletados em frações de 3 mL (**E3 G-I**), 3 mL de ACN 24% (**E4**), 3 mL de ACN 28% (**E5**), 3 mL de ACN 30% (**E6**) e 3 mL de ACN 100% (**E7**).

3.7 Técnicas envolvidas na caracterização das substâncias isoladas

3.7.1 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Análises por RMN (LAMAR) do IPPN-UFRJ, em espectrofotômetro, modelo VNMR500 (Varian, EUA) com frequência de ^1H a 500 MHz e ^{13}C a 125 MHz. Às análises foram realizadas em metanol deuterado (CD_3OD) 99,8 % (Cambridge, EUA). Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram determinados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Foram realizados experimentos de RMN ^1H , COSY, HMBC e HSQC. Os espectros foram analisados no programa *MestreNova* versão 6.0.2.

3.7.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

O espectrofotômetro UV-2450 (Shimadzu, Brasil) foi utilizado para as análises de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). Para tanto, as frações obtidas por EFS foram solubilizadas em MeOH (grau UV, Tedia, Brasil), gerando soluções com concentrações entre 1,6 e 1,8 mM. As leituras foram realizadas em cubeta de quartzo com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1,0 cm.

Para determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ), realizaram-se leituras de absorção em cinco concentrações diferentes, obtidas pelo incremento de 10, 15, 20, 25 e 30 μL das soluções amostra em cubeta contendo 2000 μL de MeOH. As adições das soluções amostra foram realizadas com o auxílio de seringa Hamilton TLC com agulha de teflon (Sigma-Aldrich, referência Z264393-1EA). Os dados obtidos foram processados utilizando-se o aplicativo *Excel* (Microsoft[®], 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises preliminares e pré-fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Psychotria nemorosa*

O procedimento de extração empregado para as folhas da espécie *Psychotria nemorosa* (PN) (4,9 g) (**Item 3.2, p. 27**) levou à obtenção de 284,6 mg de extrato metanólico (PNM), culminando em um rendimento de 5,8 %.

Como alternativa de enriquecimento nas substâncias polares presentes nas folhas da espécie, o extrato metanólico (248,4 mg) foi solubilizado em MeOH/H₂O 1:3 (v/v) e particionado com hexano (**Item 3.2, p. 27**), levando à obtenção de 202,8 mg de fração hidrometanólica (PNMA) (rendimento de 81,6%) e de 14,6 mg de fração hexânica (PNH) (rendimento de 5,9%).

O monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) das frações remanescentes do procedimento de partição, juntamente com o extrato metanólico bruto (PNM), evidenciou a extração seletiva do material graxo/corantes (**Figura 7, p. 33**), cujas bandas características no sistema cromatográfico utilizado foram detectadas na fração hexânica (PNH) (fatores de retenção igual ou próximos à unidade). Além disso, a análise do perfil cromatográfico da fração hidrometanólica (PNMA) sugeriu o alcaloide indólico monoterpênico *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida como um dos constituintes da fração, por comparação com os parâmetros cromatográficos para a substância referência (Ref.), previamente isolada e analisada sob as mesmas condições. Com isso, a fração MeOH/H₂O (PNMA), enriquecida nas substâncias polares das folhas de *P. nemorosa*, foi utilizada para o prosseguimento do estudo.

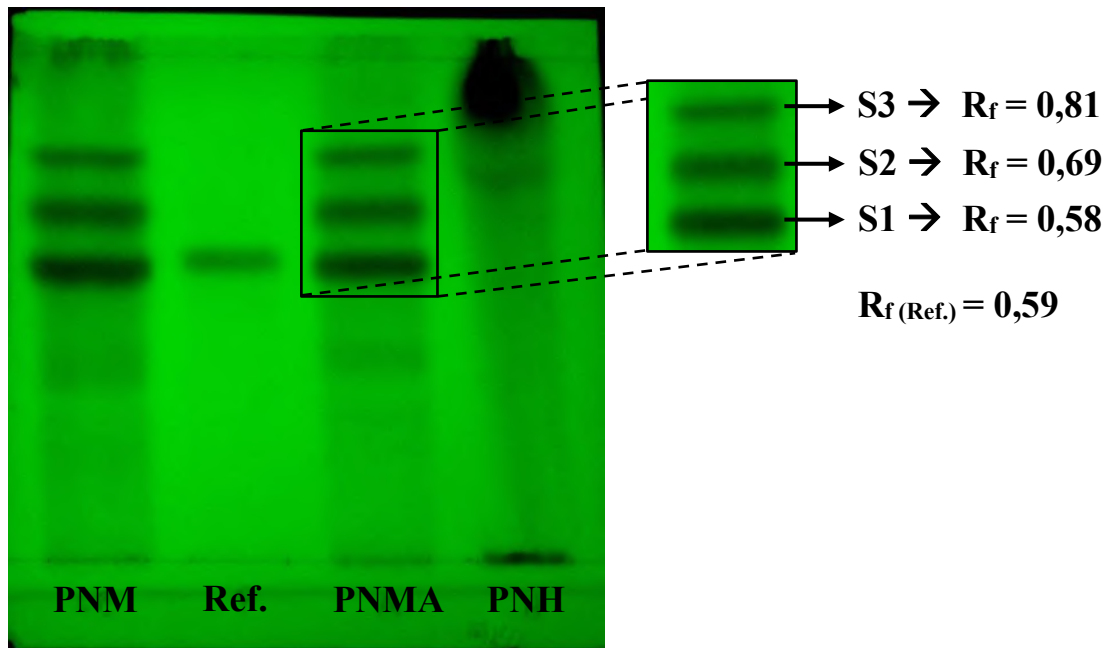


Figura 7. Cromatografia em camada delgada do extrato metanólico da folha de *Psychotria nemorosa* (PNM), das frações após partição do extrato (PNMA e PNH) e do alcaloide *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida (Ref.). Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H₂O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: 50 mg.mL⁻¹ (PNM), 1 mg.mL⁻¹ (Ref.), 25 mg.mL⁻¹ (PNMA) e 25 mg.mL⁻¹ (PNH); Volume de aplicação: 10 μL. R_f: fator de retardação (do inglês “retardation factor”).

Após análise prévia dos constituintes da fração MeOH/H₂O (PNMA) por CCD, foi realizada a análise da fração por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa (FR) com detector de arranjo de diodos (DAD), em escala analítica (Item 3.5, p. 28). O perfil cromatográfico obtido para a fração em 225 nm (Figura 8, p. 34) evidenciou a presença da *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida, cujo tempo de retenção (t_R) foi de 16,8 min (substância referência foi analisada sob as mesmas condições), além de pelo menos duas outras substâncias. A quantificação relativa das substâncias presentes na fração hidrometanólica, por normalização de área, sugeriu a *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida como a substância majoritária da fração (45 %). Os perfis dos espectros na região do UV dos picos referentes à *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida (na fração hidrometanólica ou isolada) foram idênticos e estão representados na Figura 8.

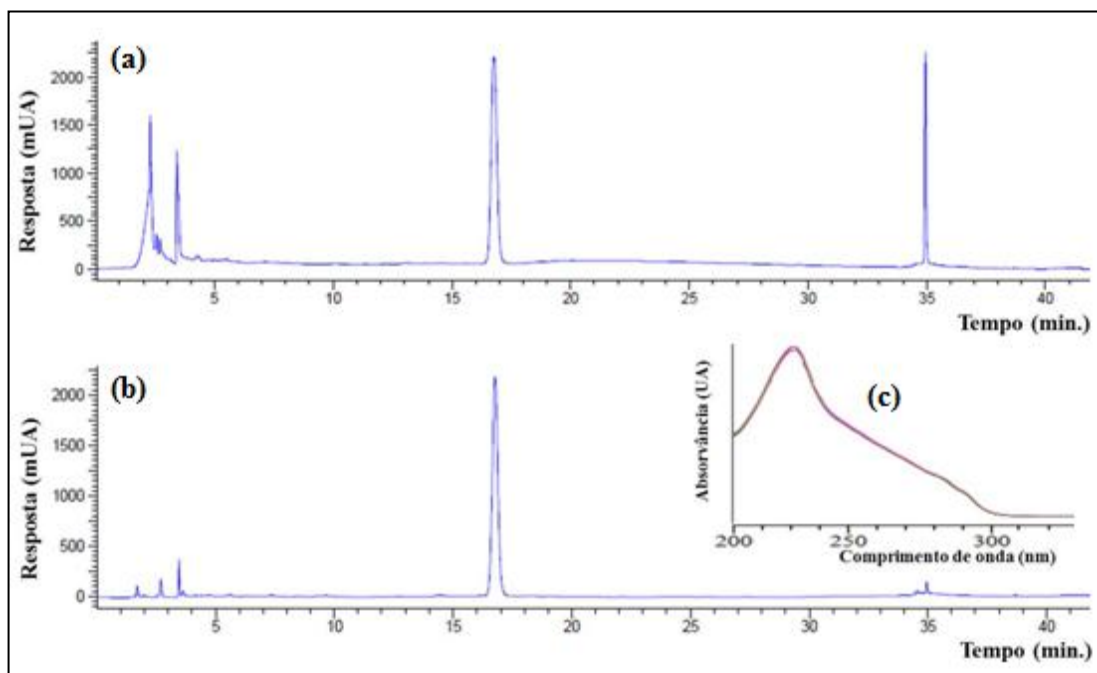


Figura 8. Cromatograma em CLAE-FR-DAD. (a) Fração PNMA; (b) *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida; e (c) Espectro na região do UV representativo da *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida (16,8 min). Condições cromatográficas: coluna LiChrocart LiChrospher RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); Comprimento de onda: 225 nm; Concentração: 20 mg.mL⁻¹ (PNMA) e 2 mg.mL⁻¹ (*N,β*-D-glicopiranosilvincosamida); Volume de injeção: 10 μL.

O espectro de absorção na região do UV obtido para a substância referente ao pico com t_R igual a 34,9 min (**Figura 9**) revelou uma possível similaridade estrutural entre a referida substância e a *N,β*-D-glicopiranosilvincosamida, cujo espectro no UV mostrou-se qualitativamente idêntico (**Figura 8**). Sendo assim, sugeriu-se a presença de pelo menos mais um alcaloide na fração PNMA, no entanto, com polaridade significativamente menor, vista alta retenção no sistema cromatográfico em fase reversa.

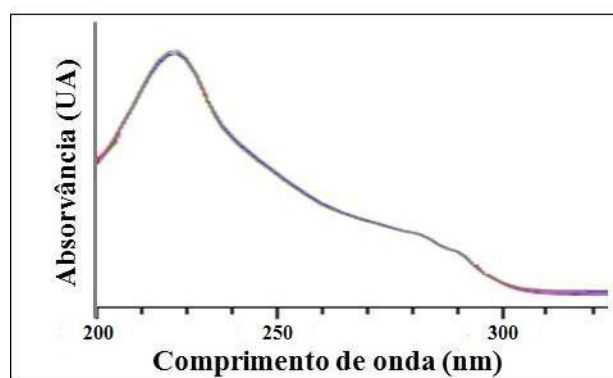


Figura 9. Espectro na região do UV da substância referente ao pico com tempo de retenção em 34,9 min no cromatograma da fração PNMA.

O solvente utilizado para solubilização das amostras analisadas por CLAE-FR-DAD (MeOH, grau espectroscópico), foi analisado sob as mesmas condições para verificação de sua pureza óptica. O perfil cromatográfico (APÊNDICE, p. 59) evidenciou a presença de impurezas com tempos de retenção entre 2-4 min e 33-42 min. Assim, pôde-se inferir uma pureza relativamente maior que a apresentada no cromatograma da *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida.

4.2 Desenvolvimento de método por extração em fase sólida para isolamento das substâncias polares das folhas de *P. nemorosa*

Para estabelecimento dos níveis iniciais a serem explorados no que diz respeito às variáveis operacionais em EFS (composição de fase móvel e volume de eluição), foram avaliadas a partir das condições cromatográficas previamente estudadas em CLAE-FR-DAD, as composições de fase móvel do método cromatográfico e os volumes de eluição nas condições ensaiadas (Item 3.5, p. 28). Desta forma, pôde-se determinar os volumes de eluição em unidades de volume de leito e os fatores de retenção dos constituintes da fração MeOH/H₂O (Tabela 1).

Tabela 1. Tempos de retenção (t_R), composição de fase móvel (% ACN), volume de eluição, relação entre os volumes de eluição e de leito e fator de retenção (k) dos principais constituintes da fração PNMA.

t_R (min)	% ACN	$V_{eluição}$ (mL)	$V_{eluição}/V_{leito}^*$	k^{**}
2,3	20	1,8	0,4	0,5
3,4	20	2,7	0,6	1,3
16,8	24	13,4	3,2	10,4
34,9	100	27,9	6,6	22,6

* $V_{leito} = \pi r^2 L = 3,14 \cdot (0,23)^2 \cdot 25 = 4,1 \text{ cm}^3$; Coluna cromatográfica LiChrocart (250 x 4,6 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 μm); ** $V_{NR} = t_{NR} \nu = 1,47 \text{ min} \times 0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} = 1,18 \text{ mL}$

Baseando-se na faixa de composição de fase móvel na qual os constituintes da fração PNMA foram eluídos (20% a 100% ACN/H₂O (v/v)), resolveu-se pelas seguintes composições de fase móvel: 20-30% ACN/H₂O (v/v) e lavagem final com 100% ACN. Para a decisão sobre os volumes de fase móvel a serem ensaiados (volumes de eluição), foram

avaliados, em unidades de volumes de leito, os volumes de eluição de cada substância. A faixa de volume de eluição encontrada foi de 0,4 a 6,6 volumes de leito. No entanto, as características físico-químicas das fases estacionárias da coluna cromatográfica (14% de carbono e tamanho de partícula de 5 μm) e do cartucho de EFS (18% de carbono e tamanho de partícula de 40-60 μm), nos guiaram ao estudo de volumes de eluição menores que o da substância mais retida (6,6 volumes de leito), uma vez que era esperada uma menor retenção das substâncias nos cartuchos de EFS, principalmente, devido ao menor empacotamento da fase estacionária. Sendo assim, resolveu-se pelos volumes de eluição iguais a três e quatro vezes o volume de leito, ou seja, 3 e 4 mL (volume de leito do cartucho igual a 1 mL). Com isso, o primeiro experimento realizado (**EFS1**) foi pensado para avaliação dos parâmetros iniciais estabelecidos por CLAE:

EFS1: ativação: 5 mL de ACN 100%; **condicionamento:** 5 mL de ACN 20%; **aplicação da amostra:** 1 mL de solução 10 mg/mL da fração PNMA (em ACN/H₂O 2:8 – ACN 20%); **etapas de eluição:** 3 ou 4 mL de ACN 20% (**E1**), ACN 24% (**E2**), ACN 28% (**E3**), ACN 30% (**E4**) e ACN 100% (**E5**).

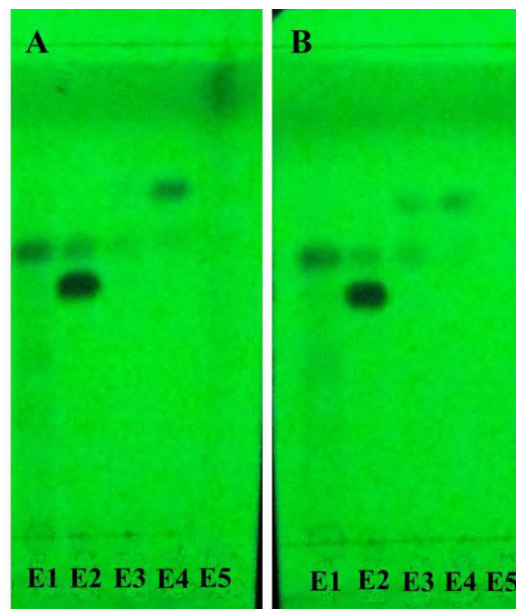


Figura 10. Perfis cromatográficos em CCD das frações obtidas a partir da EFS1. (A) Volume de eluição de 3 mL; e (B) Volume de eluição de 4 mL. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H₂O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: indefinida; Volume de aplicação: 20 μL .

O monitoramento das frações geradas pela execução do experimento **EFS1**, por CCD (**Figura 10**), evidenciou a alta seletividade do sistema cromatográfico ensaiado para as substâncias S1 e S3. No entanto, a substância S2 mostrou-se distribuída entre as etapas de eluição E1 e E4. Este comportamento, geralmente está associado às substâncias cujas quantidades na amostra sejam significativamente elevadas, causando um efeito de espalhamento da mesma. No entanto, uma vez que os resultados em CLAE-FR-DAD sugeriram, nas condições ensaiadas, a substância S1 como o constituinte majoritário da fração PNMA, e ainda assim, a mesma fora eluída em uma única etapa de eluição no sistema cromatográfico em EFS, desconsiderou-se a possibilidade de o “espalhamento” observado para a substância S2 ser devido à sua quantidade na fração. Outra justificativa plausível seria uma possível ionização, cujo resultado seria a formação de diferentes espécies no meio, com diferentes interações com as fases móvel e estacionária do sistema cromatográfico. Esta prerrogativa nos guiou à investigação do efeito da acidez na eluição dos constituintes da fração PNMA, culminando no experimento em EFS (**EFS2**), com pH ajustado em 3 (adição de ácido fórmico – **item 3.6, p. 29**). Com exceção da etapa E1, o volume de eluição escolhido para o ensaio foi de três vezes o volume de leito do cartucho (3 mL), visto que a substância S3 foi eluída unicamente na E4 quando o volume ensaiado foi de 3 mL, enquanto que o volume de 4 mL causou uma distribuição desta substância entre as eluições E3 e E4 (**Figura 10, p. 36**). Para a etapa E1, ajustou-se o volume de eluição para 12 vezes o volume de leito do cartucho no intento da completa eluição de S2, uma vez que esta substância estava presente nas quatro primeiras subfrações da **EFS1** (volume de 12 mL para completa eluição de S2). Para maior separação entre S1 e S2, as frações referentes à primeira etapa de eluição foram recolhidas em alíquotas de 2 mL.

EFS2: ativação: 5 mL de ACN 100%; **condicionamento:** 5 mL de ACN 20%; **aplicação da amostra:** 1 mL de solução 10 mg/mL da fração PNMA (em ACN 20%); **etapas de eluição:** 12 mL de ACN 20%, coletados em frações de 2 mL (**E1 A-F**), 3 mL de ACN 24% (**E2**), 3 mL de ACN 28% (**E3**), 3 mL de ACN 30% (**E4**) e 3 mL de ACN 100% (**E5**).

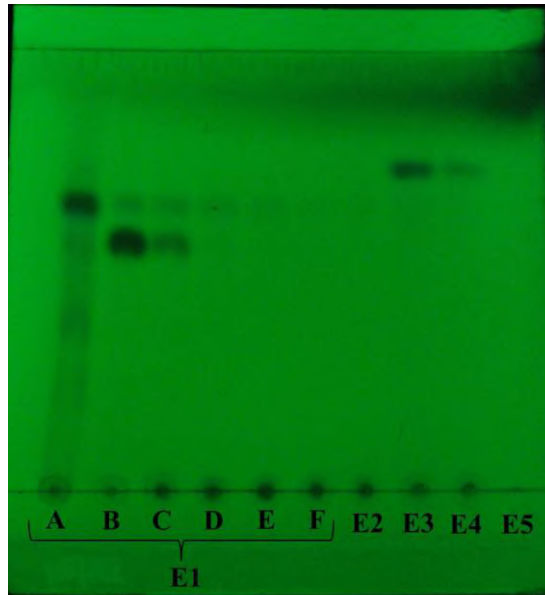


Figura 11. Perfil cromatográfico em CCD das frações obtidas a partir da EFS2. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H₂O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: indefinida; Volume de aplicação: 20 µL.

Através do monitoramento em CCD das frações obtidas pela execução do experimento **EFS2 (Figura 11)** observou-se para a substância S2 o mesmo comportamento cromatográfico apresentado no experimento **EFS1** (efeito de “espalhamento” entre as primeiras etapas de eluição do método em EFS). Ainda que a justificativa mais plausível para este comportamento fosse a possibilidade de ionização de S2, inferiu-se que a acidez ensaiada não fora suficiente para que houvesse apenas uma espécie relativa à substância no meio. No entanto, a utilização de um meio com maior acidez seria inviável, visto os alcaloides serem, em geral, pouco estáveis, podendo ser sensíveis à luz, ao pH e ao aquecimento (SIMÕES *et al.*, 2010).

O aumento no volume de eluição em E1 propiciou que S1 fosse eluída em E1B e E1C, permanecendo em mistura com a substância S2 e, por isso, não havendo melhora na eficiência de separação entre S1 e S2. Com isto, percebeu-se que a força de eluição da mistura ACN/H₂O 2:8 (ACN20%) fora suficientemente forte para promover a eluição de S1 e S2, prejudicando assim, a seletividade entre estas substâncias. Sendo assim, uma nova abordagem em EFS foi proposta (**EFS3**), onde se diminuiu a força eluotrópica da fase móvel inicial através da eluição com ACN 10% e ACN 15%, com volume de eluição de 9 mL em cada composição de fase, e recolhimento em frações de 3 mL. Esta mudança na força eluotrópica teve o intuito de reter a substância S1, enquanto a substância S2 fosse totalmente eluída do meio cromatográfico. O meio ácido não foi utilizado.

EFS3: ativação: 5 mL de ACN 100%; **condicionamento:** 5 mL de ACN 10%; **aplicação da amostra:** 1 mL de solução 10 mg/mL da fração PNMA (em ACN 10%); **etapas de eluição:** 9 mL de ACN 10%, coletados em frações de 3 mL (**E1 A-C**), 9 mL de ACN 15%, coletados em frações de 3 mL (**E2 D-F**), 9 mL de ACN 20%, coletados em frações de 3 mL (**E3 G-I**), 3 mL de ACN 24% (**E4**), 3 mL de ACN 28% (**E5**), 3 mL de ACN 30% (**E6**) e 3 mL de ACN 100% (**E7**).

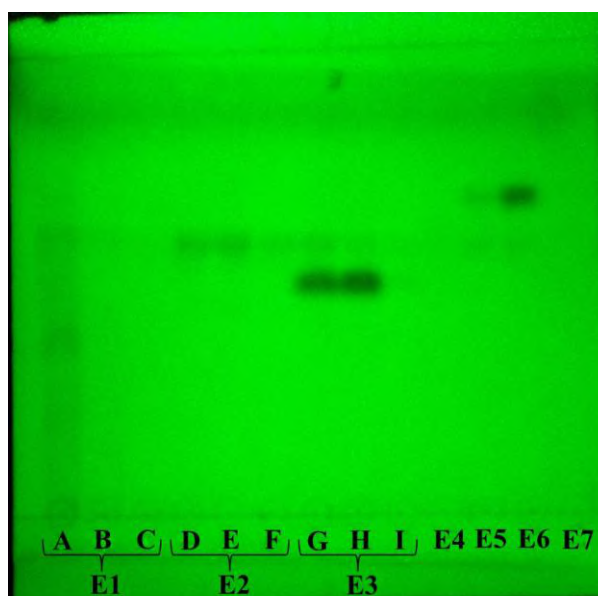


Figura 12. Perfil cromatográfico em CCD das frações obtidas a partir da EFS3. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H₂O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: indefinida; Volume de aplicação: 20 µL.

A análise das frações oriundas do experimento **EFS3** (**Figura 12**) revelou que a diminuição da força eluotrópica corroborou para o aumento da seletividade entre as substâncias S1 e S2, uma vez que a primeira foi detectada nas frações obtidas pelas eluições E3 G e H, e a segunda mostrou-se concentrada nas frações obtidas nas eluições E2 D e E. Outro ponto importante a ser destacado foi a separação da substância S2 dos constituintes de alta polaridade da fração PNMA, cuja eluição se deu na primeira etapa (E1A). A substância S3 foi obtida nas frações oriundas das etapas E5 e E6.

Para obtenção de massa suficiente para a caracterização estrutural das substâncias presentes na fração enriquecida em alcaloides das folhas de *P. nemorosa*, o experimento **EFS3** foi repetido seis vezes, totalizando assim, 60 mg de material fracionado. As frações

obtidas pela execução dos experimentos em EFS referentes às substâncias S1, S2 e S3 foram reunidas e analisadas por CCD (**Figura 13**). As massas e rendimentos obtidos para cada substância são mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Massas e rendimentos das substâncias S1, S2 e S3 isoladas a partir da fração PNMA por EFS.

Amostras	Massa (mg)	Rendimento (%)
S1	4,9	8,2
S2	0,8	1,3
S3	1,5	2,5

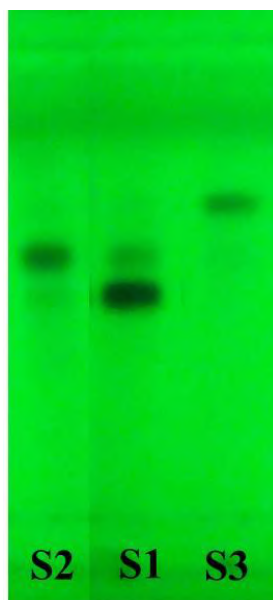


Figura 13. Perfil cromatográfico em CCD das substâncias S1, S2 e S3 isoladas a partir da fração PNMA. Fase estacionária: sílica gel; fase móvel: BuOH/AcOH/H₂O 40:10:10; Comprimento de onda: 254 nm; Concentração: 1,0 mg.mL⁻¹; Volume de aplicação: 10 µL.

Os rendimentos obtidos para as substâncias S1, S2 e S3 (**Tabela 2**) a partir do experimento **EFS3**, ratificou a majoritariedade da substância S1 em relação às outras duas detectadas na fração enriquecida das folhas da espécie estudada, por CCD (**Figura 7, p. 33**). No entanto, a fração oriunda da primeira etapa de eluição do procedimento cromatográfico em EFS (E1A), apresentou rendimento igual a 65,8% (39,5 mg), sugerindo a presença de outros constituintes polares nas folhas de *P. nemorosa*, não revelados em sua totalidade pelas

condições ensaiadas em CCD (**Figura 12, p. 39**). Por esta razão, tornar-se-ia de grande importância o estudo da referida fração, de forma a contribuir para o maior conhecimento a respeito do perfil químico da espécie.

Uma vez que as frações obtidas para S1, S2 e S3 apresentaram massas relativamente pequenas (**Tabela 2, p. 40**), para a continuidade do estudo decidiu-se por reuni-las às frações obtidas nos experimentos anteriores (realizados durante o desenvolvimento do método), a fim de obtenção de massa suficiente para a caracterização estrutural. As massas finais obtidas são mostradas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Massas das substâncias S1, S2 e S3 reunidas com as frações isoladas nos experimentos em EFS anteriores.

Amostras	Massa (mg)
S1	7,1
S2	1,9
S3	2,6

Uma das estratégias gerais para verificação de separações por EFS envolve a comparação com métodos convencionais (VALENTE & AUGUSTO, 2000). Sendo assim, para melhor avaliação do método desenvolvido para isolamento das substâncias S1, S2 e S3, as frações obtidas foram solubilizadas em MeOH/H₂O (1:1) e analisadas por CLAE-FR-DAD nas mesmas condições operacionais da fração PNMA (**Figura 8, p. 34**). A análise dos cromatogramas obtidos (

Figura 14, p. 42) corroborou com os resultados por CCD, revelando o isolamento das substâncias S1, S2 e S3 com purezas relativas, respectivamente, de 95%, 31% e 80% (calculadas por normalização de áreas). O baixo percentual de pureza relativa apresentado pela substância S2 em CLAE-FR-DAD pode ser devido aos maiores fatores de resposta apresentados pelos contaminantes da fração no sistema de detecção utilizado.

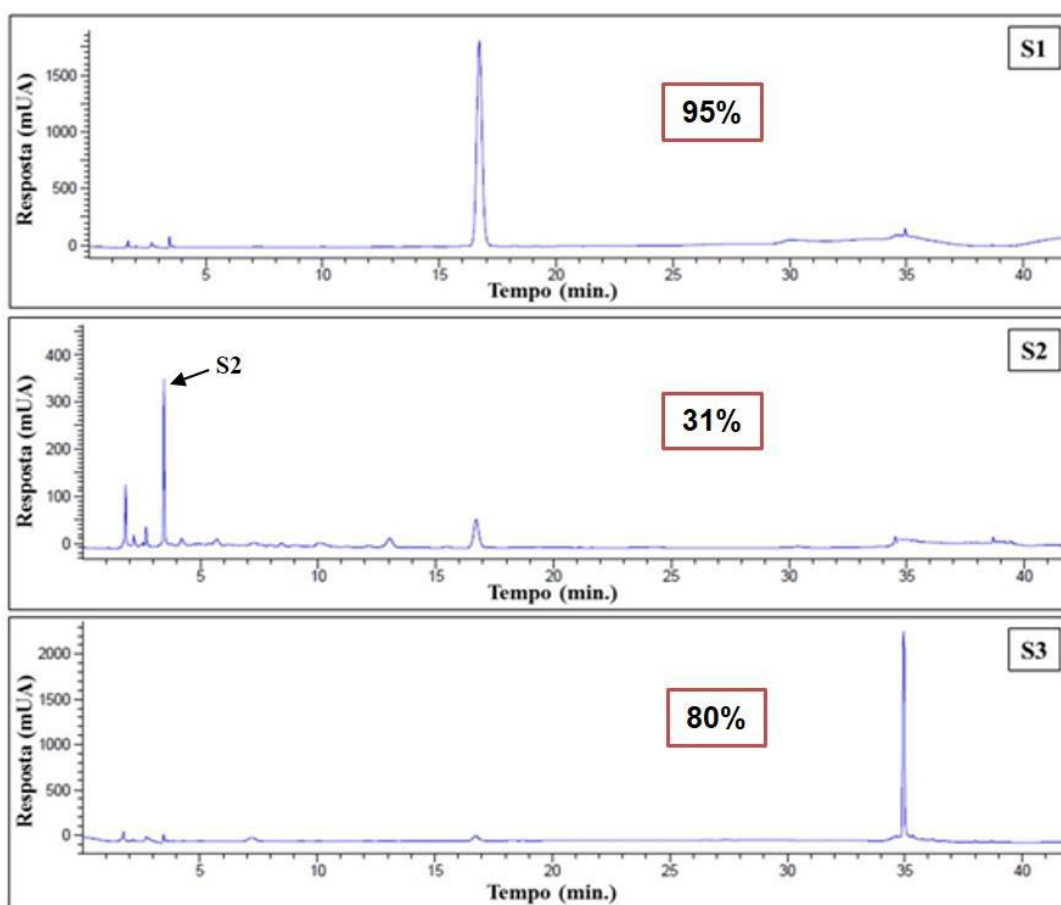


Figura 14. Cromatogramas em CLAE-FR-DAD das substâncias S1, S2 e S3 e respectivas purezas (normalização de área). Condições cromatográficas: coluna LiChrocart LiChrospher RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Comprimento de onda: 225 nm; Concentração: 2 mg.mL⁻¹; Volume de injeção: 10 µL.

4.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas das folhas de *P. nemorosa*

4.3.1 Elucidação estrutural da substância S1

A análise dos parâmetros cromatográficos obtidos por CCD (Figura 7, p. 33) e CLAE-FR-DAD (Figura 8, p. 34) para os constituintes da fração enriquecida nas substâncias polares das folhas de *P. nemorosa* (PNMA) sugeriram a substância S1 como sendo a *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida, devido a similaridade com os parâmetros cromatográficos obtidos nas mesmas condições de análise para esta substância, cujo isolamento e caracterização foram realizados em trabalho anterior do grupo a partir das folhas da espécie (COSTA *et al*, 2016). No entanto, para ratificação do sugerido pelos dados cromatográficos, a fração oriunda do experimento em EFS referente à substância S1 (7,1 mg) foi analisada por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em 1D (RMN ¹H) e 2D (COSY), além da técnica de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

Os espectros de RMN ^1H (**Figura 24-Figura 27, p. 60-63**) e as correlações ^1H - ^1H no espectro COSY (**Figura 28-Figura 32, p. 64-68**) confirmaram a substância S1 como a *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (**Tabela 4**).

Tabela 4. Dados em RMN ^1H da substância S1 (500 MHz; CD_3OD) e da *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (600 MHz; CD_3OD) (Modelo*).

	δ_{H} mult. (<i>J</i> em Hz)	δ_{H} , mult. (<i>J</i> em Hz)		δ_{H} mult. (<i>J</i> em Hz)	δ_{H} mult. (<i>J</i> em Hz)
Posição	S1	Modelo*	Posição	S1	Modelo*
2	-	-	18b	5,26 dl (16,9)	5,26 dd (17,2; 2,0)
3	5,13 m**	5,12 dl (11,3)	19	5,48 m (17,3; 9,8)	5,48 ddd (17,2; 10,2; 9,9)
5a	2,85 td (11,9; 2,9)	2,84 ddd (12,4; 11,8; 3,3)	20	2,74 m	2,75 m
5b	5,05 m (12,4; 3,3)	5,05 ddd (12,4; 4,5; 1,5)	21	5,52 sl	5,51 d (1,9)
6^a	2,66**	2,65 ddd (16,0; 11,8; 4,5)	22	-	-
6b	2,76**	2,78 ddd (16,0; 3,3; 1,5)	1'	4,71 d (7,9)	4,71 d (8,1)
7	-	-	2'	3,23 m	3,24 dd (9,2; 8,1)
8	-	-	3'	3,45-3,52 m	3,37 dd (9,2; 8,8)
9	7,45 d (7,7)	7,44 d (7,8)	4'	3,45-3,52 m	3,54 m
10	7,07 t (7,5)	7,06 ddd (7,8; 7,1; 1,1)	5'	3,45-3,52 m	3,50 m
11	7,12 t (7,8)	7,12 ddd (7,8; 7,1; 1,1)	6'a	3,67 dd (11,9; 5,6)	3,68 dd (12,1; 5,4)
12	7,63 d (8,1)	7,63 d (8,2)	6'b	3,89 dd (11,9)	3,90 dd (12,1; 2,1)
13	-	-	1''	5,12 d (8,8)	5,12 dl (8,9)
14a	1,37 ddl (13,3; 11,0)	1,38 dddd (13,5; 13,5; 11,3; 2,5)	2''	4,13 m	4,13 dd (8,9; 9,0)
14b	2,34 dl (13,2)	2,30 dl (13,5)	3''	3,53 m	3,54 m
15	3,39 m	3,40 m	4''	3,40-3,80 m	3,63 m
16	-	-	5''	3,40-3,80 m	3,54 m
17	7,47 d (1,9)	7,48 d (2,7)	6''a	3,78 dd (12,1; 6,1)	3,79 dd (12,1; 5,9)
18a	5,14 dl (11,0)	5,14 dd (10,2; 2,0)	6''b	3,97 dd (12,2)	3,97 dd (12,1; 2,0)

*Modelo: dados obtidos para *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida, isolada das folhas de *P. leiocarpa* (Henriques *et al.*, 2004). **Sinais coalescidos.

O espectro de absorção na região do UV da fração obtida por EFS referente à substância S1 (concentração de 25,7 μM em MeOH) (**Figura 15**) mostrou absorções máximas em 201 nm ($\log \epsilon = 4,38$) e 225 nm ($\log \epsilon = 4,36$), características da *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (HENRIQUES *et al*, 2004), corroborando com o sugerido pelos resultados cromatográficos e espectroscópicos.

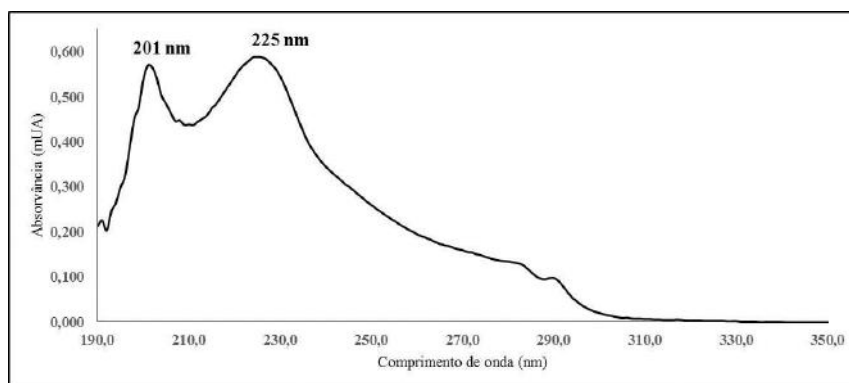


Figura 15. Espectro de absorção na região do UV da substância S1.

Sendo assim, a comparação dos dados cromatográficos (**Figura 8, p. 34**) e espectroscópicos (**Tabela 4, p. 43**), juntamente com a análise por UV permitiram identificar a substância isolada das folhas da espécie *P. nemorosa* por EFS, como o alcaloide indólico monoterpênico *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida.

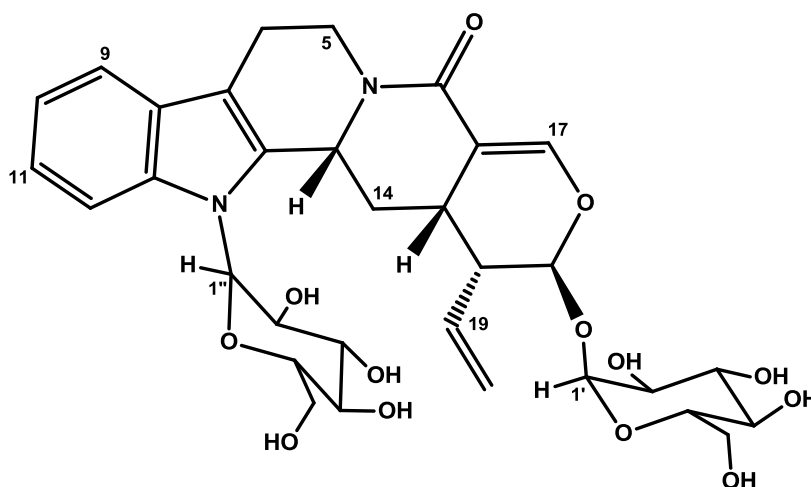


Figura 16. Estrutura química da *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida.

4.3.2 Elucidação estrutural da substância S3

Os resultados obtidos por CLAE-FR-DAD (**Figura 8, p. 34**) da fração enriquecida nas substâncias polares presentes nas folhas de *P. nemorosa* (PNMA) sugeriram uma possível similaridade estrutural entre a substância S1 (*N*, β -D-glicopiranosilvincosamida) e a substância S3, devido os espectros de absorção no UV obtidos por CLAE-FR-DAD terem sido qualitativamente idênticos (**Figura 8c e Figura 9, p. 34**). Sendo assim, sugeriu-se a presença de outro alcaloide na fração PNMA, no entanto, com polaridade significativamente menor, vista alta retenção no sistema cromatográfico em fase reversa. Para verificação desta prerrogativa, a fração oriunda do experimento em EFS referente à substância S3 (2,6 mg) foi analisada por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em 1D (RMN ^1H) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), além da técnica de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

Os dados espectroscópicos observados para a substância S3 nos espectros de RMN ^1H (**Figura 33-36, p. 69-72**) e no espectro COSY (**Figura 37-40, p. 73-76**) mostraram-se muito semelhantes aos obtidos para a substância S1 (*N*, β -D-glicopiranosilvincosamida), corroborando com o sugerido pela análise dos espectros de absorção no UV obtidos em CLAE-FR-DAD. No entanto, algumas alterações foram observadas, sendo a principal diferença, a ausência do sinal referente ao hidrogênio anomérico da unidade de glicose ligada ao nitrogênio. A presença de apenas uma unidade glicosídica foi coerente com a menor polaridade apresentada pela substância S3 em relação à substância S1 no sistema cromatográfico, corroborando desta forma, com os resultados em CLAE-FR.

O espectro de HSQC (**Figura 42, p. 78**) correlacionou o carbono em δ 99,8 ppm ao hidrogênio em δ 4,70 d ($J = 7,9$ Hz, 1H), coerente com a presença da unidade de glicose. O espectro HMBC ampliado (**Figura 46, p. 82**) revelou ainda, a importante correlação do hidrogênio anomérico em δ 4,70 com o carbono do esqueleto alcaloídico em δ 97,2 ppm, evidenciando a conectividade do açúcar com o carbono C-21 da molécula (HENRIQUES *et al*, 2004).

O conjunto de dados espectroscópicos referentes aos espectros de RMN de hidrogênio (^1H) (**Figura 33-36, p. 69-72**), de correlações homonucleares $\text{H}^1\text{-H}^1$ (COSY) (**Figura 37-40, p. 73-76**) e de correlações heteronucleares $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ (HSQC) (**Figura 41-43, p. 77-79**) e (HMBC) (**Figura 44-46, p. 80-82**), evidenciaram a semelhança estrutural da substância S3 com a *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (**Figura 17, p. 46**).

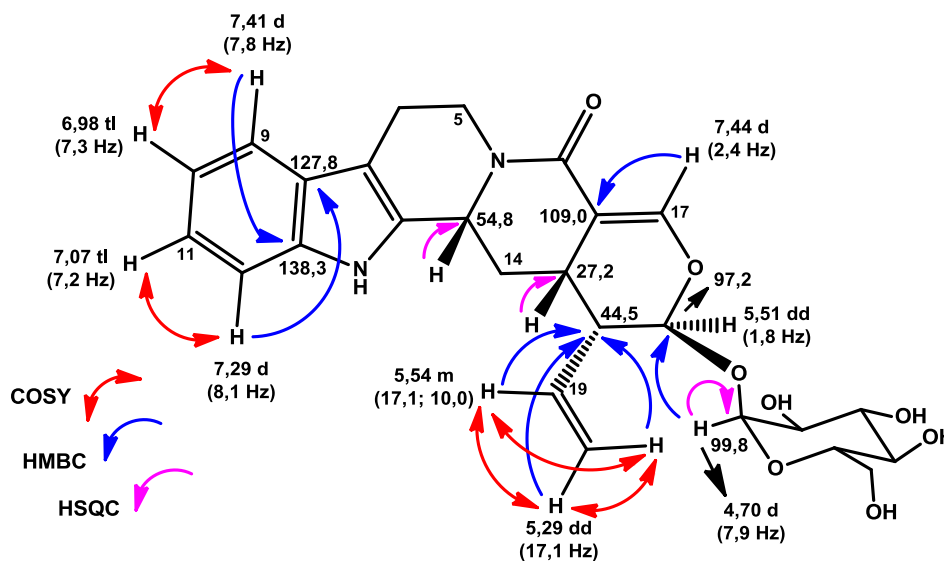


Figura 17. Principais deslocamentos e correlações observadas nos espectros COSY, HMBC e HSQC da substância S3.

Partindo-se do pressuposto de que as substâncias S1 e S3 possuíam mesmas estruturas químicas (ou muito similares), exceto pela ausência da unidade *N*-glicosídica, procurou-se verificar se as pequenas alterações de deslocamentos químicos observadas no espectro de RMN ^1H estavam relacionadas apenas à ausência da unidade de glicose ou a outras mudanças estruturais em relação à S1. Como seriam possíveis mais de uma estrutura para a substância S3 devido à estereoquímica do carbono C-3, que por considerações biossintéticas poderia variar, estudaram-se em um primeiro momento as duas possíveis estruturas relacionadas à configuração absoluta de C-3. A primeira estrutura sugerida foi a da vincosamida, cuja configuração absoluta seria *R*, e a segunda, a da strictosamida, com configuração absoluta *S*. Estudos de confirmação de configurações absolutas por RMN, para estruturas derivadas da secologanina, mostraram a comparação dos dados espectroscópicos para as referidas estruturas (ACHENBACH & BENIRSCHKE, 1997), possibilitando desta forma, a verificação da configuração do carbono C-3 para a substância S3, através da analogia dos seus dados espectroscópicos com os obtidos na literatura (Tabela 5, p. 47).

Tabela 5. Dados em RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) de S3 e RMN ¹H (360 MHz) e ¹³C (62,9 MHz) da vincosamida e estrictosamida (Modelo*) em CD₃OD.

Posição	δ_H mult. (J em Hz)			δ_C mult. (J em Hz)		
	S3	Vincosamida	Estrictosamida	S3	Vincosamida	Estrictosamida
2	-	-	-	nd	134,6	134,8
3	4,93 d (11,8)	4,94 dm (12,0)	5,08 m	54,8	54,8	55,1
5a	2,94 m	2,95 ddd (12,5; 4,5)	3,11 ddd (12,5; 4,5)	41,2	41,2	44,8
5b	5,06 dd (12,0; 3,6)	5,07 ddd (12,5; 4,5; 2,0)	4,95 dd (12,5; 5,5)			
6a	2,69-2,75 m	2,68-2,81 m	2,64-2,72 m	22,0	22,0	22,1
6b	2,69-2,75 m	2,68-2,81 m	2,89-3,01 m			
7	-	-	-	109,3	109,3	110,3
8	-	-	-	127,8	127,9	128,7
9	7,41 d (7,8)	7,42 d (8,0)	7,39 m	119,0	118,8	118,7
10	6,98 t (7,3)	6,99 ddd (8; 1)	6,99 ddd (8; 7; 1,5)	120,1	120,9	120,1
11	7,07 t (7,2)	7,08 ddd (8; 1)	7,08 ddd (8; 7; 1,5)	122,6	122,5	122,5
12	7,29 d (8,1)	7,30 d (8,0)	7,33 dm (8)	112,1	112,0	112,2
13	-	-	-	138,3	138,3	137,8
14a	1,45 dd (13,2)	1,46 ddd (13; 12)	2,05 ddd (14; 5,5)	32,4	32,1	27,3
14b	2,46 dt (13,1; 3,9)	2,47 ddd (13,0; 4,0)	2,47 ddd (14, 4,5, 2)			
15	3,23 m	3,20-3,42 m	2,80 m	27,2	27,3	24,9
16	-	-	-	109,0	109,0	109,2
17	7,44 d (2,4)	7,45 d (2,5)	7,37 d (2)	149,0	149,0	149,2
18a	5,19 dd (10,3; 1,9)	5,19 dd (10; 2)	5,32 dd (10,5; 2,0)	120,4	120,5	120,5
18b	5,29 dd (17,1; 1,8)	5,29 dd (17,5; 2,0)	5,37 dd (17,5; 2)			
19	5,54 m (17,1; 10,0)	5,54 ddd (17,5; 10)	5,66 ddd (17,5; 10,5)	133,7	133,9	134,4
20	2,69-2,82 m	2,68-2,81 m	2,64-2,72 m	44,5	44,5	44,8
21	5,51 dd (17,1; 1,8)	5,51 d (2)	5,41 d (2)	97,2	97,4	98,1
22	-	-	-	nd	166,0	167,1
1'	4,70 d (7,9)	4,70 d (8)	4,57 d (8)	99,8	99,6	100,5
2'	3,18-3,40 m	3,21 dd (9; 8)	2,96 dd (9; 8)	74,7	74,8	74,3
3'	3,18-3,40 m	3,20-3,42 m	3,15-3,32 m	78,3	78,3	78,2
4'	3,18-3,40 m	3,20-3,42 m	3,15-3,32 m	71,4	71,6	71,4
5'	3,18-3,40 m	3,20-3,42 m	3,15-3,32 m	77,9	78,0	78,0
6'a	3,67 dd (12,0; 5,7)	3,68 dd (12; 6)	3,62 dd (12; 6)	62,7	62,7	62,6
6'b	3,90 dd (10,3; 1,9)	3,90 dd (12; 2)	3,86 dd (12, 2)			

*Modelo: ACHENBACH & BENIRSCHKE, 1997; nd = não determinado.

Os dados espectroscópicos da substância S3 mostraram-se mais coerentes com os discutidos na literatura para vincosamida, sugerindo-a como a substância isolada no presente estudo. De forma corroborativa, o espectro de absorção na região do UV da fração obtida por EFS referente à substância S3 (concentração de 23,8 μM em MeOH) (**Figura 18**) mostrou absorções máximas em 202 nm ($\log \epsilon = 4,29$) e 230 nm ($\log \epsilon = 4,45$), características da vincosamida (ITOH *et al*, 2003).

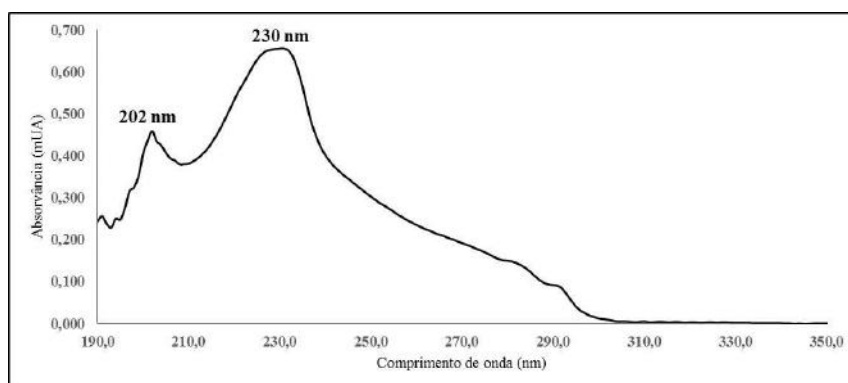


Figura 18. Espectro de absorção na região do UV da substância S3.

Sendo assim, o conjunto formado pelos dados espectroscópicos (**Tabela 5, p. 47**), juntamente com a análise por UV permitiram identificar a substância S3, isolada das folhas da espécie *P. nemorosa* por EFS, como o alcaloide indólico monoterpênico vincosamida.

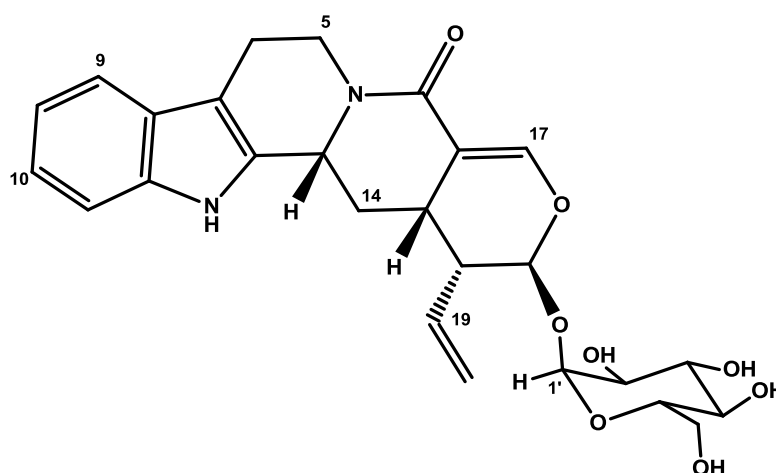


Figura 19. Estrutura química da vincosamida.

4.3.3 Elucidação estrutural da substância S2

Para elucidação estrutural da substância S2, a fração oriunda do experimento em EFS referente a esta substância (1,9 mg) foi analisada por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em 1D (RMN ^1H) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), além da técnica de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

A análise do espectro de RMN ^1H (**Figura 48, p. 84**) evidenciou um conjunto de sinais em δ 7,44 d ($J = 7,9$ Hz, 1H), 7,35 d ($J = 8,1$ Hz, 1H), 7,12 t ($J = 7,6$ Hz, 1H) e 7,02 t ($J = 7,5$ Hz, 1H) relativos a hidrogênios aromáticos. Foram observadas no espectro de COSY (**Figura 53, p. 89**) as correlações existentes entre os hidrogênios com deslocamentos químicos em δ 7,44 e 7,02 e entre os hidrogênios em δ 7,35 e 7,12. Os padrões de deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e multiplicidades, sugeriram um sistema aromático com anel *orto*-dissubstituído similar aos observados para as substâncias S1 (*N*, β -D-glicopiranosilvincosamida) e S3 (vincosamida) (**Figura 20, p. 49**). O espectro de correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C a curta distância (HSQC) (**Figura 57, p. 93**) correlacionou os quatro hidrogênios aromáticos em δ 7,44, 7,35, 7,12 e 7,02 aos carbonos com deslocamentos químicos em δ 118,0, 111,0, 122,1 e 119,3 ppm, respectivamente.

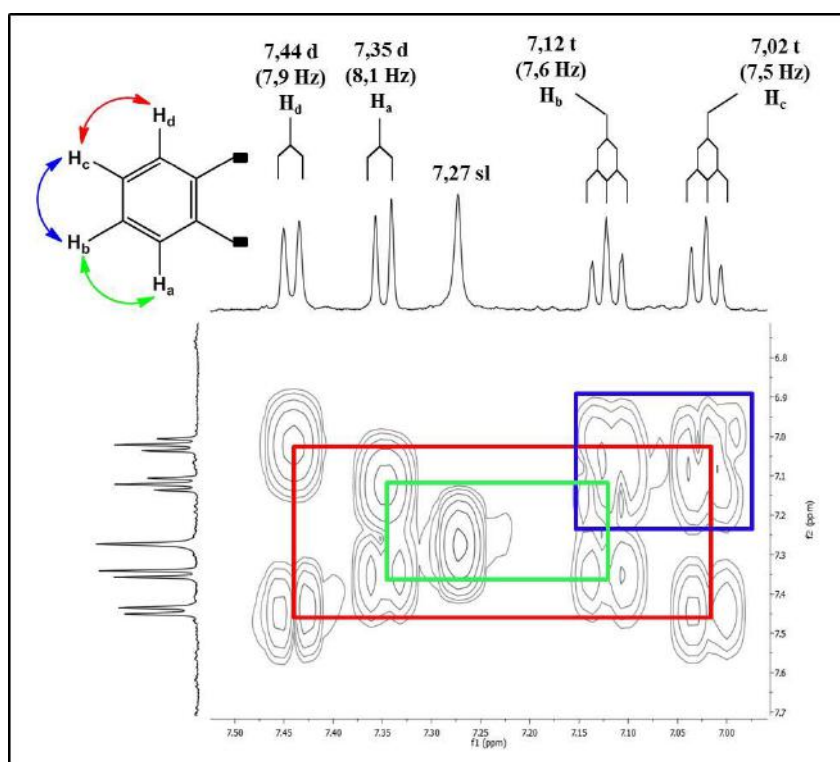


Figura 20. Esquema representativo do espectro de RMN ^1H ampliado (δ : 7.50-7.00 ppm) e do espectro de correlações ^1H - ^1H COSY ampliado (f1: δ 7.50-7.00 ppm; e f2: δ 6.8-7.7 ppm) da substância S2.

Uma vez observada a similaridade dos núcleos aromáticos das substâncias S1, S3 e S2, os dados espectroscópicos foram analisados de forma mais criteriosa na busca de outras semelhanças estruturais entre as referidas substâncias. Com isso, evidenciou-se forte coerência entre seus dados espectroscópicos, nos guiando à possibilidade da substância S2 ser um alcaloide indólico monoterpênico. Uma semelhança entre as substâncias S1, S3 e S2 a ser destacada, foi a presença de um grupamento vinila ($RCH=CH_2$) em ambas as estruturas. Na substância S2, este grupamento foi acusado pela presença de carbonos com deslocamentos químicos iguais a δ 119,0 e 136,5 ppm, referentes à hibridização sp^2 (SILVERSTEIN, 2010), sendo o primeiro correlacionado aos hidrogênios em δ 5,37 d ($J = 10,5$, 1H) e 5,39 d ($J = 17,3$, 1H), e o segundo ao hidrogênio em δ 6,08 m, de acordo com o espectro de HSQC (**Figura 42, p. 78**). O espectro de COSY ampliado (**Figura 55, p. 91**) evidenciou a correlação existente entre o sinal em δ 6,08 m e os sinais em 5,37 d e 5,39 d, confirmando a presença do grupo vinila. O espectro HMBC ampliado (**Figura 44, p. 80**) revelou ainda, a importante correlação dos hidrogênios do grupo vinila com o carbono em δ 45,0 ppm.

O espectro de RMN 1H (**Figura 49, p. 85**) mostrou também um sinal em δ 4,75 d ($J = 7,9$, 1H), ligado ao carbono em δ 99,1 segundo o espectro de HSQC (**Figura 58, p. 94**), sugerindo fortemente a presença de uma unidade de glicose. O espectro HMBC (**Figura 61, p. 97**) revelou a importante correlação do hidrogênio δ 4,75 com o carbono em δ 95,9 ppm.

Ainda que os dados espectroscópicos tenham evidenciado inúmeras similaridades estruturais entre as substâncias S1 e S2, as análises em CCD das frações geradas por EFS a partir da fração enriquecida nas substâncias polares das folhas de *P. nemorosa* (**Figura 10, Figura 11 e Figura 12, p. 36, 38 e 39**) mostraram um comportamento cromatográfico de alargamento de banda para a substância S2. Este resultado revelou a possibilidade da referida substância possuir um ou mais grupamentos ácidos. Assim, nas condições ensaiadas nos experimentos em EFS, poderiam coexistir mais de uma espécie química referente à substância em questão, causando o efeito de espalhamento observado entre as etapas de eluição devido às diferentes interações com o sistema cromatográfico. Corroborando com estes resultados, observou-se para a substância S2 um reduzido tempo de retenção segundo a análise do cromatograma obtido em CLAE-FR-DAD (

Figura 14, p. 42), coerente com uma acentuada polaridade em relação a *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida. A presença de um carbono em δ 173,8 com correlação a longa

distância no espectro HMBC com o sinal em δ 7,27 (sl) evidencia fortemente a presença de uma carboxila de ácido na porção iridoide da substância (**Figura 21**).

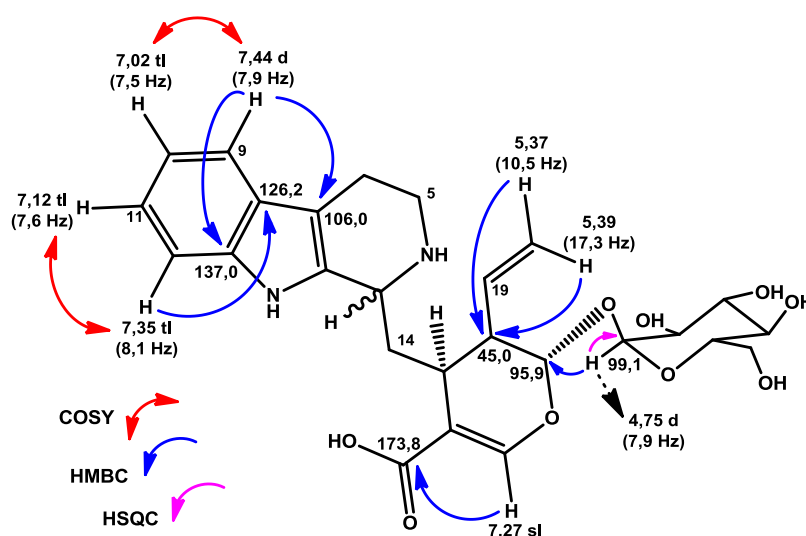


Figura 21. Principais deslocamentos e correlações observados nos espectros COSY, HMBC e HSQC para a substância S2.

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H obtidos para a substância S2, isolada a partir das folhas da espécie *P. nemorosa*, foram compilados e comparados ao modelo mais próximo encontrado na literatura, referente ao ácido *epi*-strictosidínico (centro quiral em C-3, *R*) (DO NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Tabela 6. Dados em RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de S2 e RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75,5 MHz) do ácido *epi*-strictosidínico (Modelo*) em CD_3OD .

Posição	δ_{H} mult.	δ_{H} mult.	δ_{C} mult.	δ_{C} mult.
	(<i>J</i> em Hz)	(<i>J</i> em Hz)	(<i>J</i> em Hz)	(<i>J</i> em Hz)
	S2	Modelo*	S2	Modelo*
2	-	-	nd	129,5
3	4,61 sl	4,54 sl	53,8	59,5
5a	3,45-3,55 m	3,40 m	40,3	51,0
5b	3,45-3,55 m	3,60 m		
6a	3,00-3,03 m	3,02 m		
6b	3,00-3,03 m	3,02 m	18,0	17,3
7	-	-	106,0	106,0
8	-	-	126,2	127,5
9	7,44 d (7,9)	7,46 d (7,8)	118,0	119,0
10	7,02 t (7,5)	7,05 dt (7,8; 0,9)	119,3	120,6
11	7,12 t (7,6)	7,12 dt (7,8; 0,9)	122,1	123,3

12	7,35 d (8,1)	7,32 d (7,8)	111,0	112,3
----	--------------	--------------	-------	-------

*Modelo: dados obtidos para o ácido *epi*-strictosidínico isolado de *Palicourea coriacea* (Do NASCIMENTO *et al.*, 2006); ** Sinais coalescidos; nd = não determinado.

Tabela 6. Dados em RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) de S2 e RMN ¹H (300 MHz) e ¹³C (75,5 MHz) do ácido *epi*-strictosidínico (Modelo*) em CD₃OD (continuação).

Posição	δ_H mult. (J em Hz)	δ_H mult. (J em Hz)	δ_C mult. (J em Hz)	δ_C mult. (J em Hz)
	S2	Modelo*	S2	Modelo*
13	-	-	137,0	138,3
14a	2,45 m	2,25 dt (11,4; 4,2)	33,8	33,0
14b	2,48 m	2,25 dt (11,4; 4,2)		
15	2,94 m	2,94 m	32,9	33,6
16	-	-	114,8	114,5
17	7,27 sl	7,48 sl	149,9	152,4
18a	5,37 (10,5)**	5,22 d (10,5)	118,8	119,0
18b	5,39 (17,3)**	5,30 d (17,4)		
19	6,08 m	5,87 ddd (17,4; 10,5; 7,8)	134,8	136,5
20	2,74 dd (12,9; 7,7)	2,68 m	45,0	45,8
21	5,54 d (7,9)	5,72 d (8,1)	95,9	96,8
22	-	-	173,8	175,0
1'	4,75 d (7,9)	4,76 d (7,8)	99,1	100,3
2'	3,22 m	3,20 m	73,3	74,7
3'	3,39 m	3,40 m	76,6	77,9
4'	3,26 m	3,24 m	70,2	71,8
5'	3,33 m	3,36 m	77,1	78,6
6'a	3,65 m	3,66 m	62,1	63,1
6'b	3,94 dd (11,8; 2,0)	3,96 dl (10,5)		

*Modelo: dados obtidos para o ácido *epi*-strictosidínico isolado de *Palicourea coriacea* (Do NASCIMENTO *et al.*, 2006); ** Sinais coalescidos; nd = não determinado.

Por considerações biogenéticas, seriam possíveis duas estruturas para a substância S2 se levada em consideração a configuração absoluta do centro quiral em C-3 (FRAGOSO, 2007; SIMÕES *et al.*, 2010). A confirmada presença da *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida nas folhas de *P. nemorosa*, sugeriu que o ácido em discussão fosse derivado da vincosamida, cuja configuração absoluta em C-3 é *R*. No entanto, a falta de dados espectroscópicos na literatura que confirmassem esta prerrogativa inviabilizou desconsiderar a possibilidade de a substância S2 ser um ácido derivado da strictosamida, com configuração absoluta *S* em C-3. Sendo assim, propôs-se que a substância S2 fosse um ácido carboxílico derivado da abertura do anel lactâmico de um dos dois referidos alcaloides indólicos monoterpênicos.

O espectro de absorção na região do UV da fração obtida por EFS referente à substância S2 (concentração de 27,2 μM em MeOH) (**Figura 22, p. 53**) mostrou absorções máximas em 201 nm ($\log \varepsilon = 4,42$) e 221 nm ($\log \varepsilon = 4,35$).

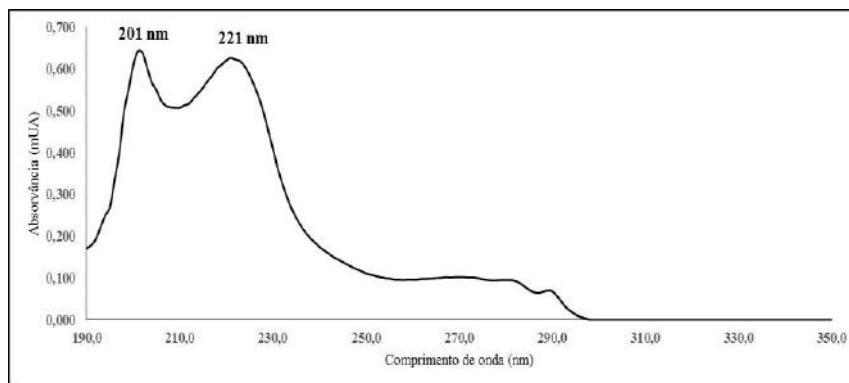


Figura 22. Espectro de absorção na região do UV da substância S2.

O conjunto formado pelos dados espectroscópicos (**Tabela 6, p. 51**), juntamente com a análise por UV permitiram sugerir a substância S2, isolada das folhas da espécie *P. nemorosa* por EFS, como o ácido carboxílico derivado da abertura do anel lactâmico da vincosamida ou da strictosamida (**Figura 23, p. 53**).

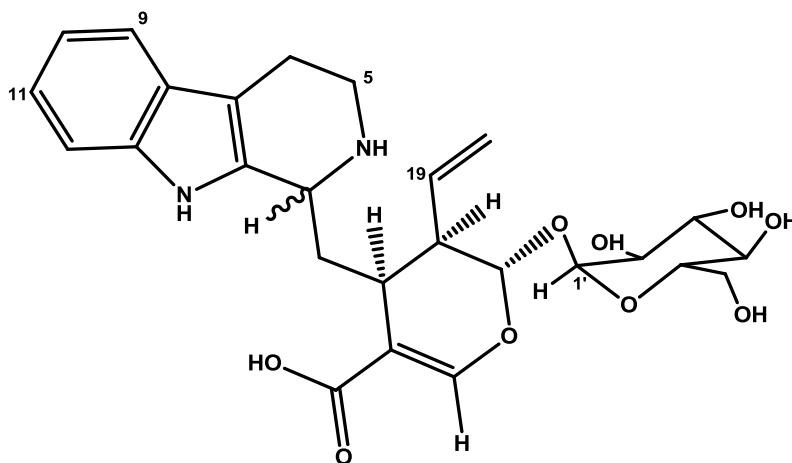


Figura 23. Estrutura química proposta para a substância S2.

5 CONCLUSÃO

Os métodos empregados neste estudo permitiram o isolamento a partir do extrato metanólico das folhas de *P. nemorosa* de três alcaloides glicosilados: *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida, presente em outros exemplares do gênero como a espécie *Psychotria leiocarpa* (HENRIQUES *et al*, 2004), e com significativa atividade antioxidante (MATSUURA *et al*, 2016); a vincosamida, já relatada para espécies do gênero *Nauclea* (ZHANG *et al*, 2001; ITOH, 2003; PI *et al*, 2014) e para a espécie *Triosteum pinnatifidum* (HUANG *et al*, 2014), dentre outras; e de um ácido derivado da abertura do anel lactâmico de um alcaloide indólico monoterpênico, cujo centro esteriogênico em C-3 (ainda não definido) pode ser oriundo da vincosamida ou da strictosamida.

A fração MeOH/H₂O (1:3) obtida na partição com hexano do extrato metanólico das folhas de *P. nemorosa* foi analisada por CCD e CLAE e apresentou a *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida como seu componente majoritário nas condições operacionais utilizadas. A sequência do trabalho envolveu a obtenção de frações enriquecidas nos constituintes polares por extração em fase sólida, cujos parâmetros operacionais iniciais foram mensurados a partir de parâmetros obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Ao final do processo de isolamento, foram obtidas sete frações, dentre as quais, três apresentaram-se enriquecidas nas substâncias supracitadas, sendo então, os principais constituintes da espécie identificados estruturalmente, pelo conjunto de técnicas hífenadas utilizadas no presente trabalho.

As condições desenvolvidas em EFS-FR, em escala analítica, em sistema ACN/H₂O, poderão ser utilizadas como método de isolamento, para as substâncias presentes nas folhas de *P. nemorosa*, e as condições estabelecidas em CLAE-FR, em escala analítica, em sistema ACN/H₂O, poderão ser utilizadas para detecção e/ou isolamento destas substâncias, contribuindo para o conhecimento do perfil químico da espécie, agregando valor aos fitoterápicos formulados e respectivas matérias-primas com este material vegetal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; BENIRSCHKE, M. Confirmation of the absolute configuration of dolichantoside and isodolichantoside by synthesis from (-)-secologanin. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1387-1390, 1997.

BOTH, F. L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A.T.; ELISABETSKY, E. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. **Pharmaceutical Biology** (Lisse, Neth.), v. 40, n. 5, p. 336-341, 2002.

CORRÊA M., A.; JUNG-MENDAÇOLLI L., S.; FORNI-MARTINS R., E. Karyotype characterization of Brazilian species of the genus *Psychotria* L. - subfamily Rubioideae (Rubiaceae). **Kew Bulletin**, v. 65, p. 45-52, 2010

COSTA, J. O.; VALENTE, L. M. M.; BARBOZA, R.S.; WOLFF, T.; MIRANDA, I. A.; GOMES, M. Estudo químico e avaliação do potencial antidengue e antioxidante do extrato metanólico das folhas de *Psychotria nemorosa*. In: **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Goiânia, GO, Brasil. 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2 Ed. Inglaterra: 2002. 515.

DO NASCIMENTO, C. A.; GOMES, M. S.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A. Alkaloids from *Palicourea coriaceae* (Cham.) K. Schum. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 61b, p. 1443-1446, 2006.

DO NASCIMENTO, N. C.; FRAGOSO, V.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R.; 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. 9, p. 728-734, 2007.

FARIA, E. O. **Estudo fitoquímico das folhas da espécie *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyererm (Rubiaceae)**. 2009. 151 f. (Mestre em Química). Instituto de Química, Universidade de Goiás, GO, Brasil.

FARIAS, F. M. ***Psychotria myriantha* M. Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades antiquimiotóxica e sobre o sistema nervoso central**. 2006. 217 f. (Título de doutor). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora, 2015.

FRAGOSO, V. **Alcaloides de *Psychotria*: Fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas**. 2007. 124 (Mestre em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências e Centro de Biotecnologia, Departamento de Biofísica, Universidade do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; VON POSER, G. L.; FETT-NETO, A. G.; SCHRIPEMA, J. *N*, β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 4, p. 449-454, 2004.

HUANG, X.; LI, Y.; SU, Y.; CHAI, X.; YAN, S. Monoterpene indole alkaloids and monoterpene diglycosides from the roots of *Triosteum pinnatifidum*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 30-34, 2014.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NISHI, T. Two chromone-secoiridoid glycosides and three indole alkaloid glycosides from *Neonauclea sessilifolia*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 359-369, 2003.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 13:25, 2010.

KUTCHAN, T. M. Alkaloid biosynthesis-the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1059-70, 1995.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Paulo: RiMa Editora, 2004. 93.

LOPES, S.; VON POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIAS, 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.

MATSUURA, H. N.; FETT-NETO, A. G. The major indole alkaloid *N*, β -D-glucopyranosyl vincosamide from leaves of *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity. **Natural Product Research**. v. 27, p. 402-411, 2013.

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, n. 8, p. 210-218, 2016.

MORAES, T. M. D. S.; HEGGDORNE DE ARAUJO, M.; BERNARDES, N. R.; DE OLIVEIRA, D. B.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F.; DA CUNHA, M. Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic rainforest. **Planta Medica**, v. 77, n. 9, p. 964-970, 2011.

PI, X.; XIE, K.; TU, G.; CAI, T.; YANG, R.; WU, Q.; FU, H. A new indole alkaloid from *Nauclea officinalis* (Pierre ex Pitard) Merr. et Chun. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 5, p. 306-310, 2014.

POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.

REFLORA, **Herbário Virtual**, *Psychotria nemorosa* Gardner, Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do> (Acessado em: Março/2016).

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7th ed. Rio de Janeiro: 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6^aed. 1.reimp. Florianópolis, SC, Brasil: 2010. 1104.

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

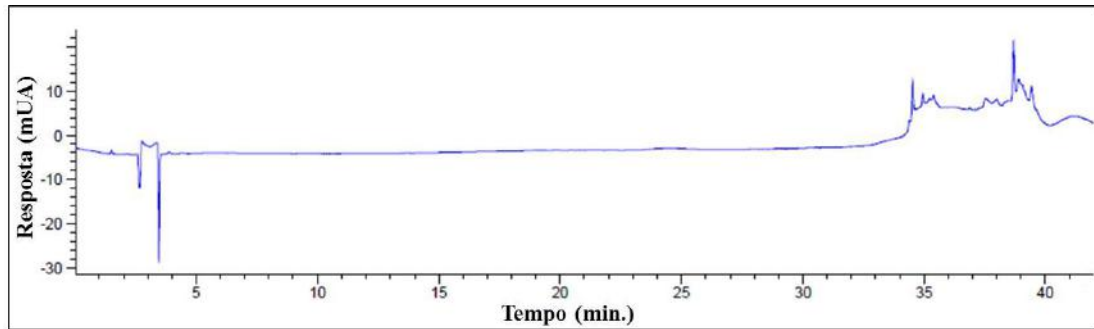
WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: Springer, 2009.

YANG, H.; ZHANG, H.; YANG, C.; CHEN, Y. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Psychotria*. **Chemical Biodiversity**, v. 13, n. 7, p. 807-820, 2016.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. New indole alkaloids from the bark of *Nauclea orientalis*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1001-1005, 2001.

7 APÊNDICE

Cromatograma em CLAE-FR-DAD (**Item 3.5, p. 28**) do MeOH (grau UV, Tedia) utilizado para a solubilização das amostras analisadas ao longo do estudo. Condições cromatográficas: coluna LiChrocart LiChrospher RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); Comprimento de onda: 225 nm; Volume de injeção: 10 μ L.



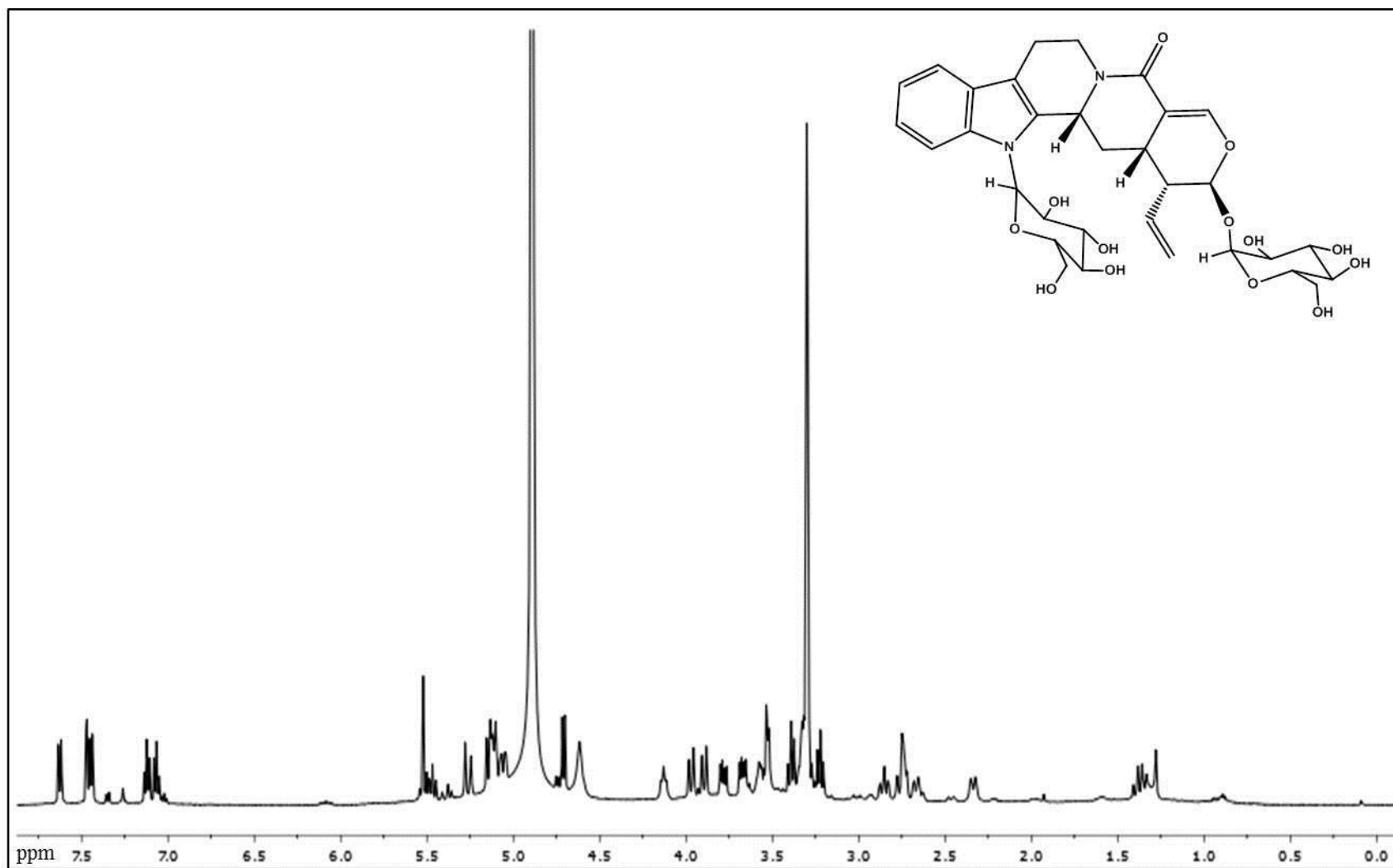


Figura 24. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância S1.

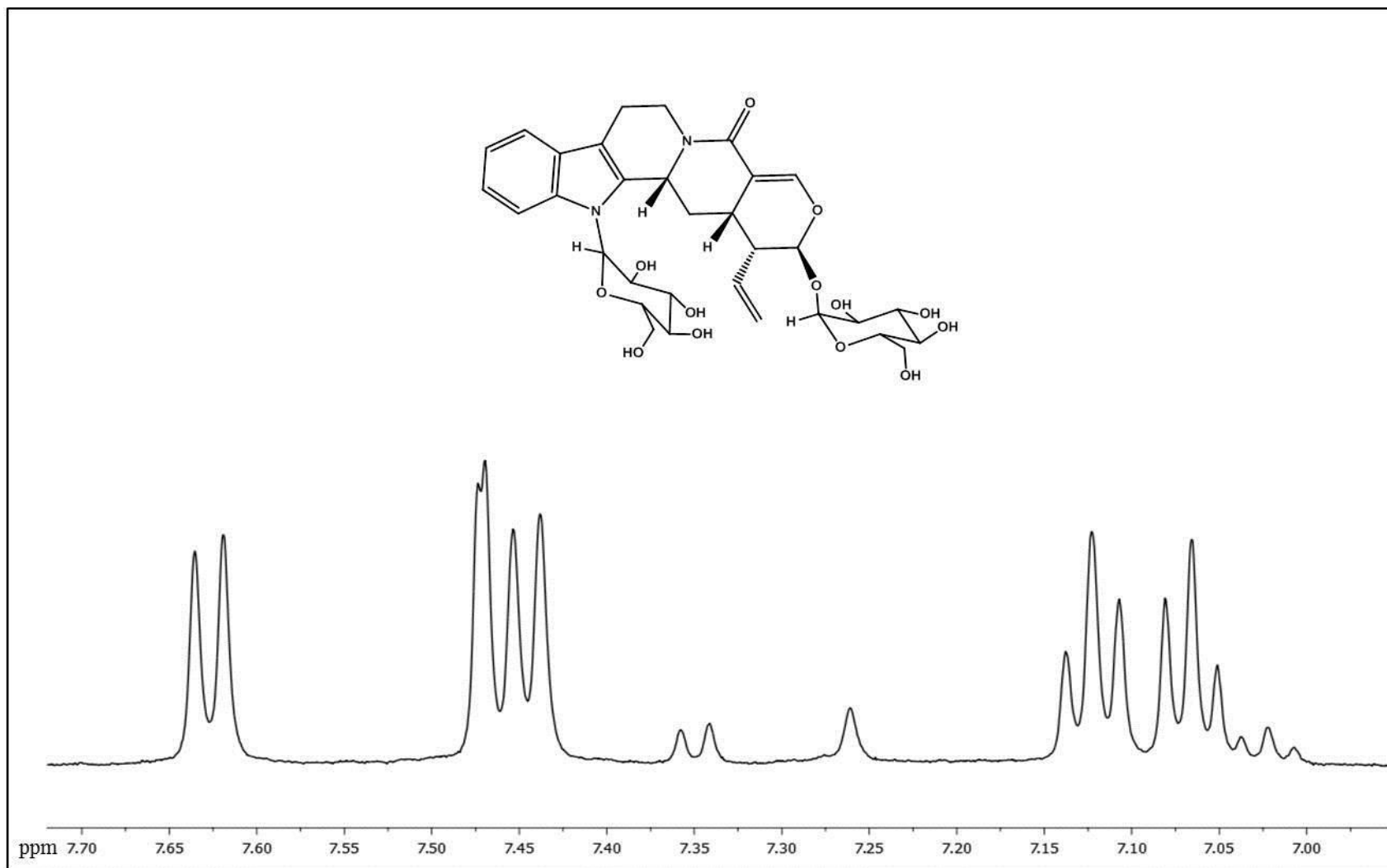


Figura 25. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 7.70 – 7.00 ppm) da substância S1.

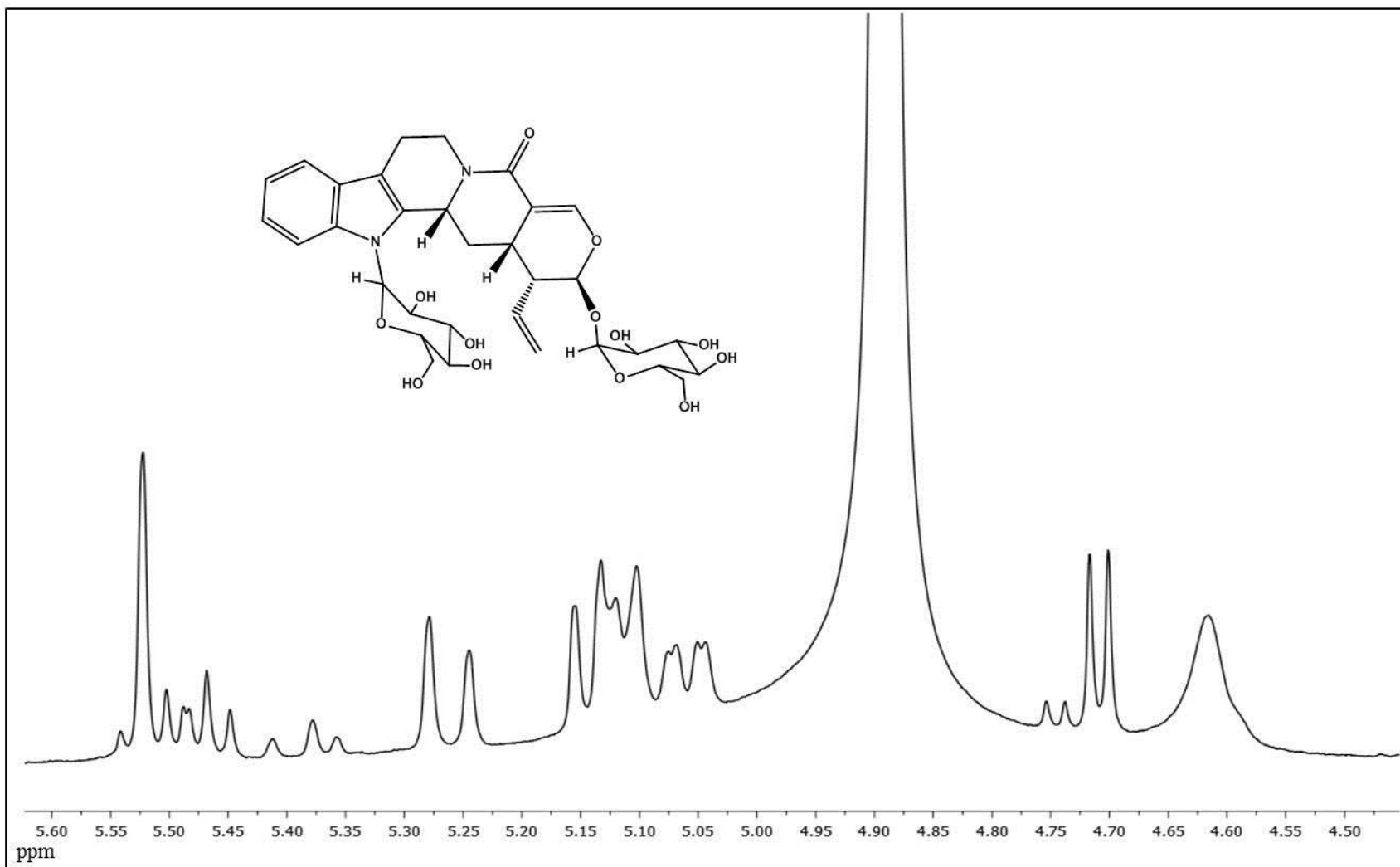


Figura 26. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 5.60 – 4.50 ppm) de da substância S1.

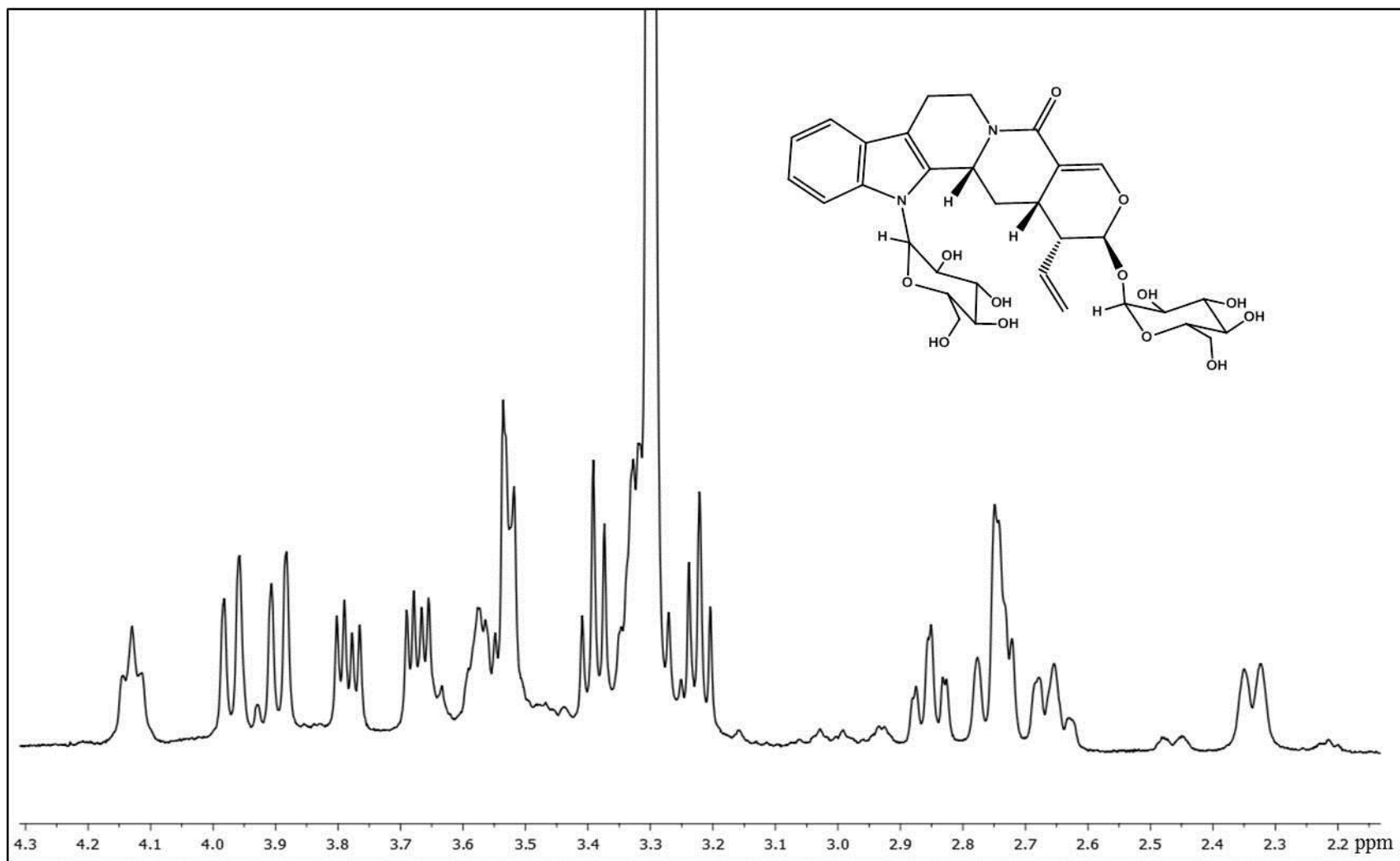


Figura 27. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 4.3 – 2.2 ppm) de da substância S1.

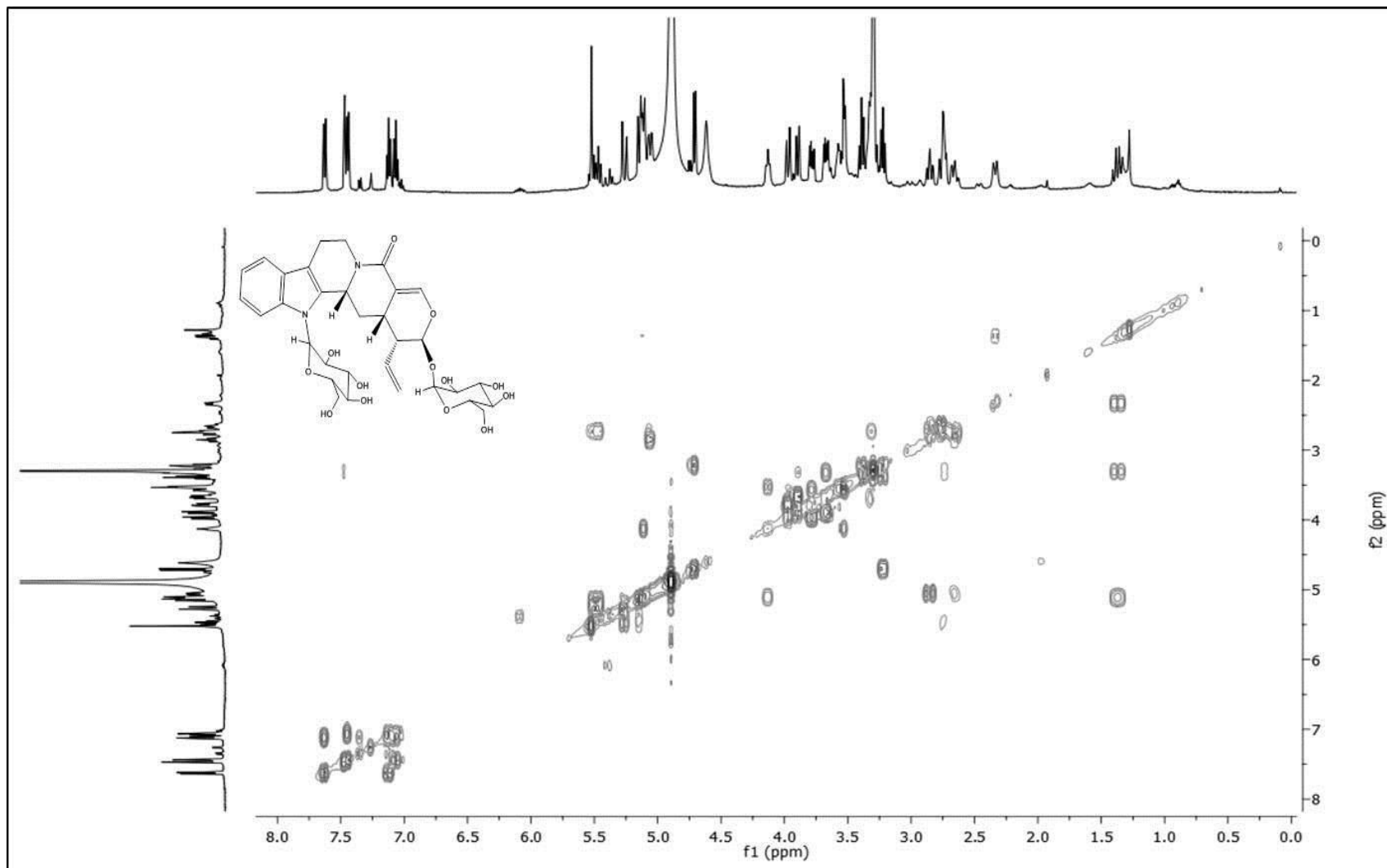


Figura 28. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) da substância S1.

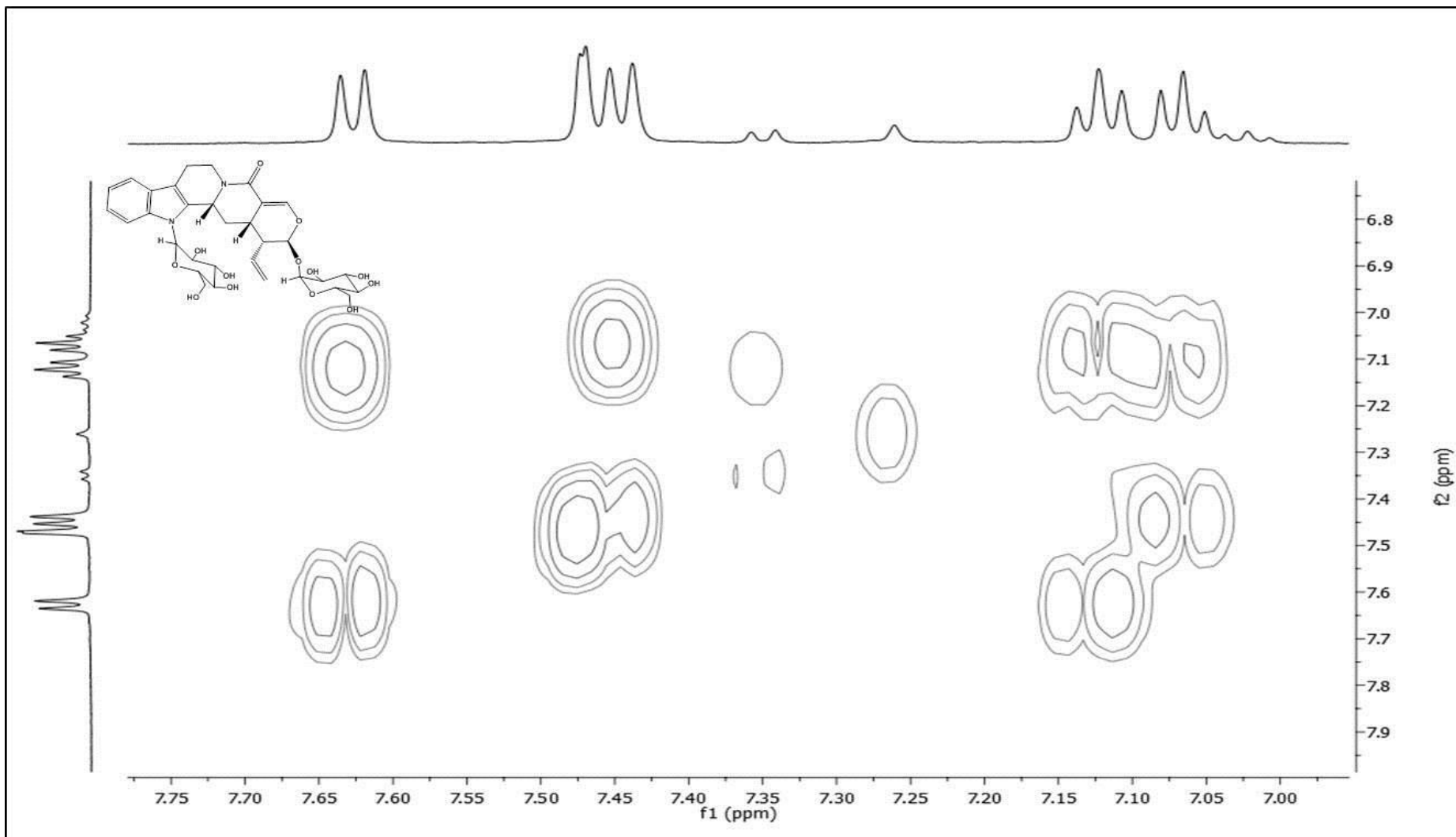


Figura 29. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.75-7.00 ppm; e f2: δ 6.8-7.9 ppm) da substância S1.

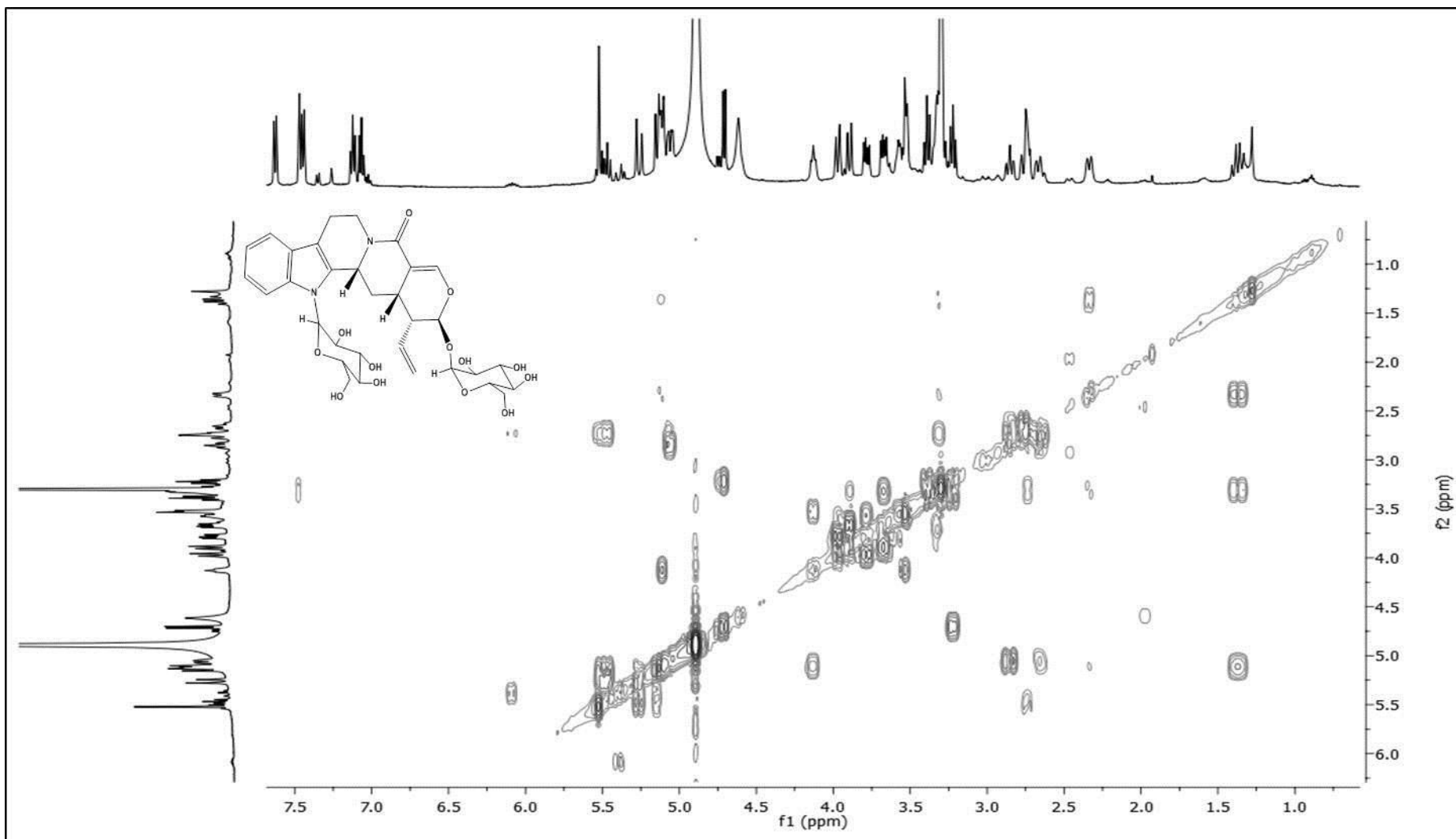


Figura 30. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.5-1.0 ppm; e f2: δ 1.0-6.0 ppm) da substância S1.

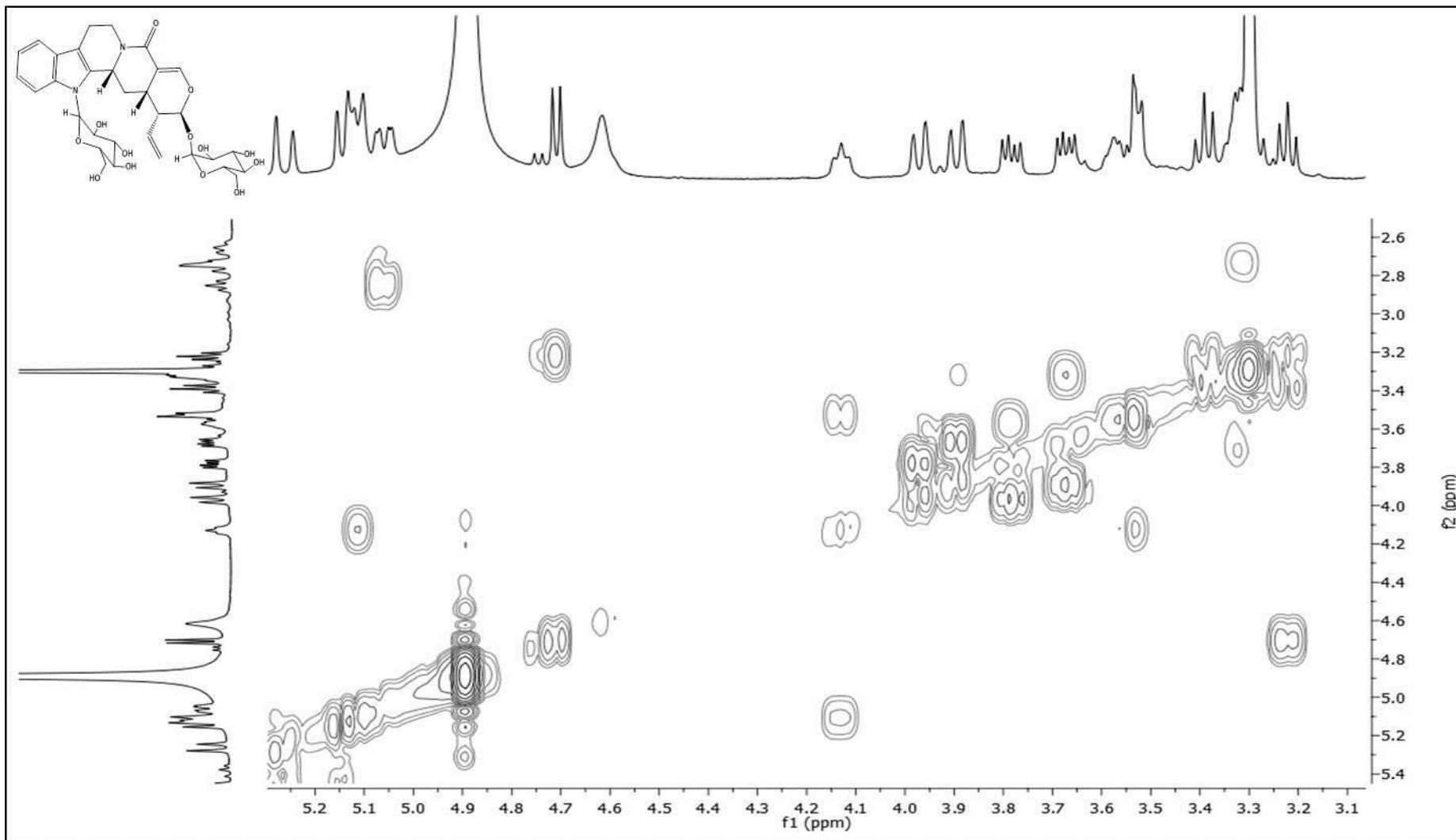


Figura 31. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 5.2-3.1 ppm; e f2: δ 2.6-5.4 ppm) da substância S1.

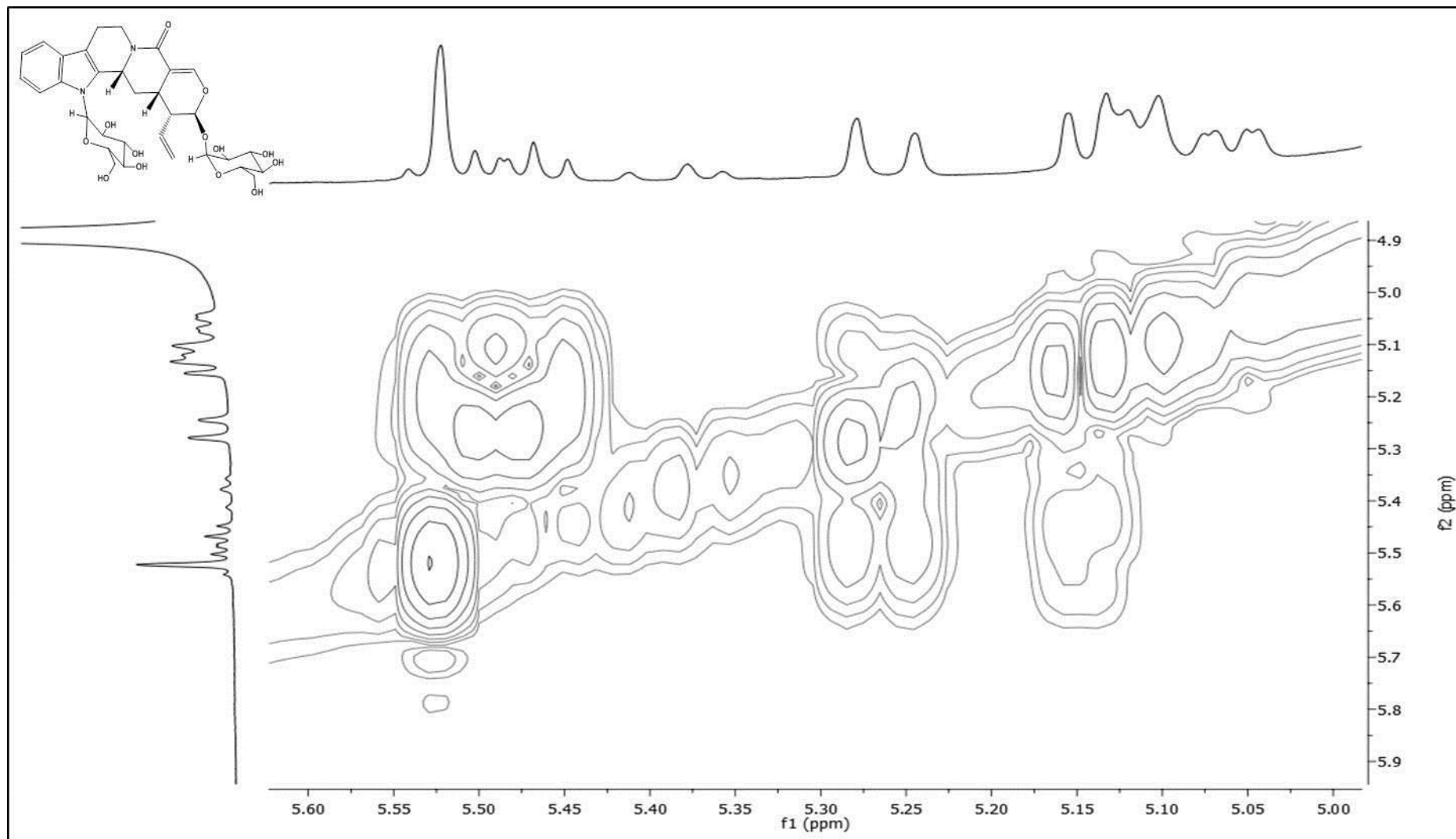


Figura 32. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 5.60-5.00 ppm; e f2: δ 4.9-5.9 ppm) da substância S1.

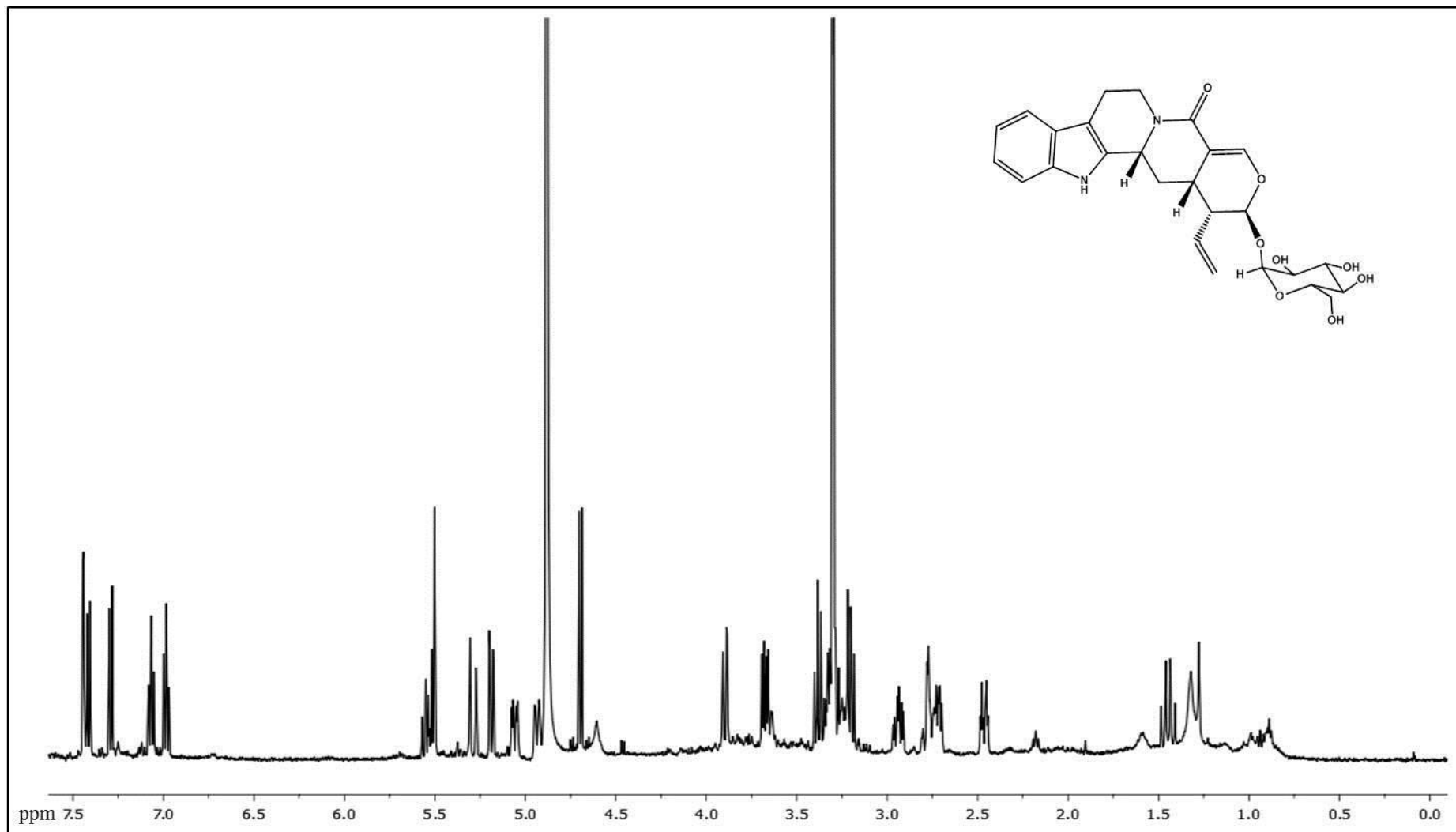


Figura 33. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância S3.

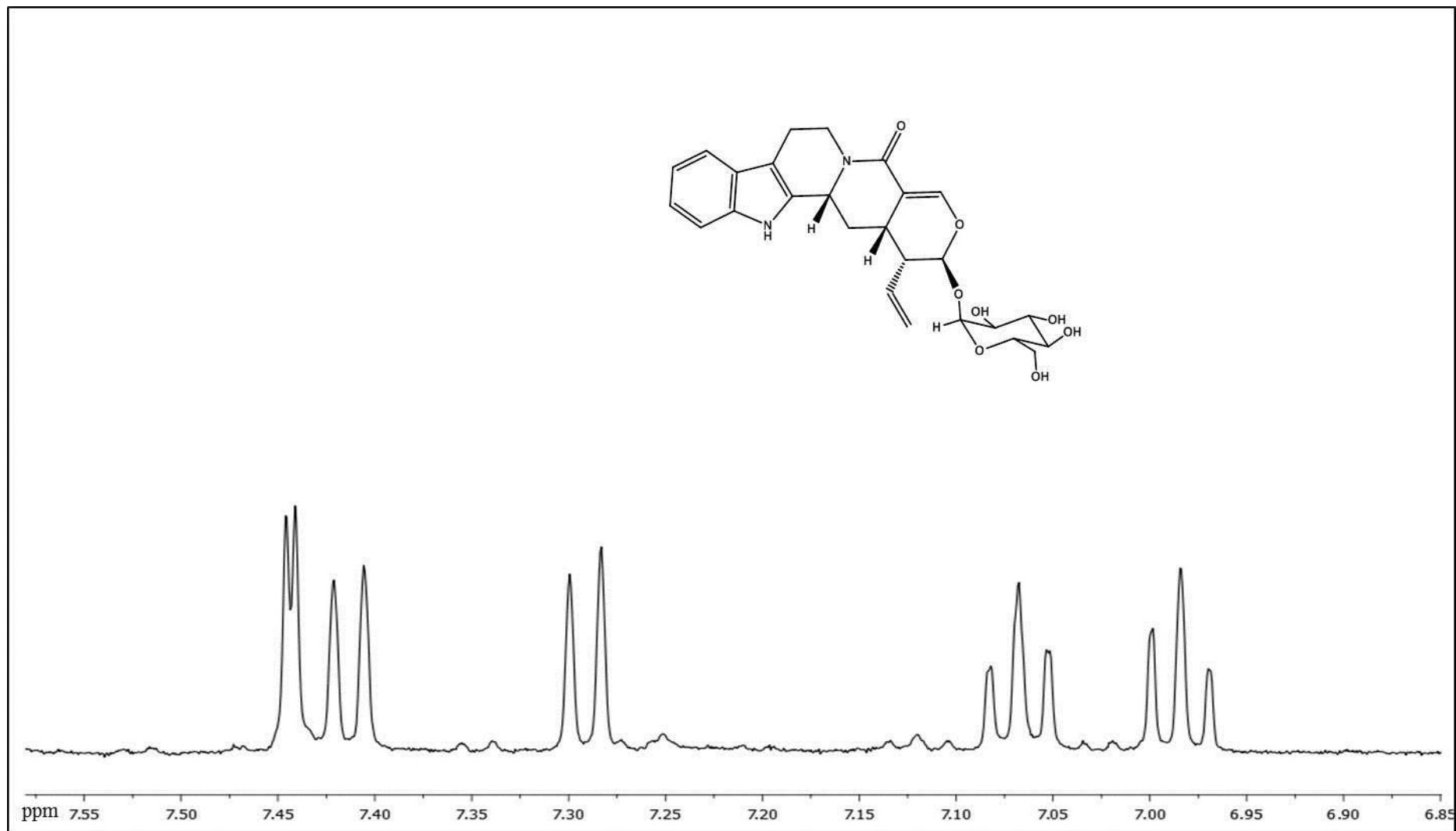


Figura 34. Espectro RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) ampliado (δ 7.55 – 6.85 ppm) da substância S3.

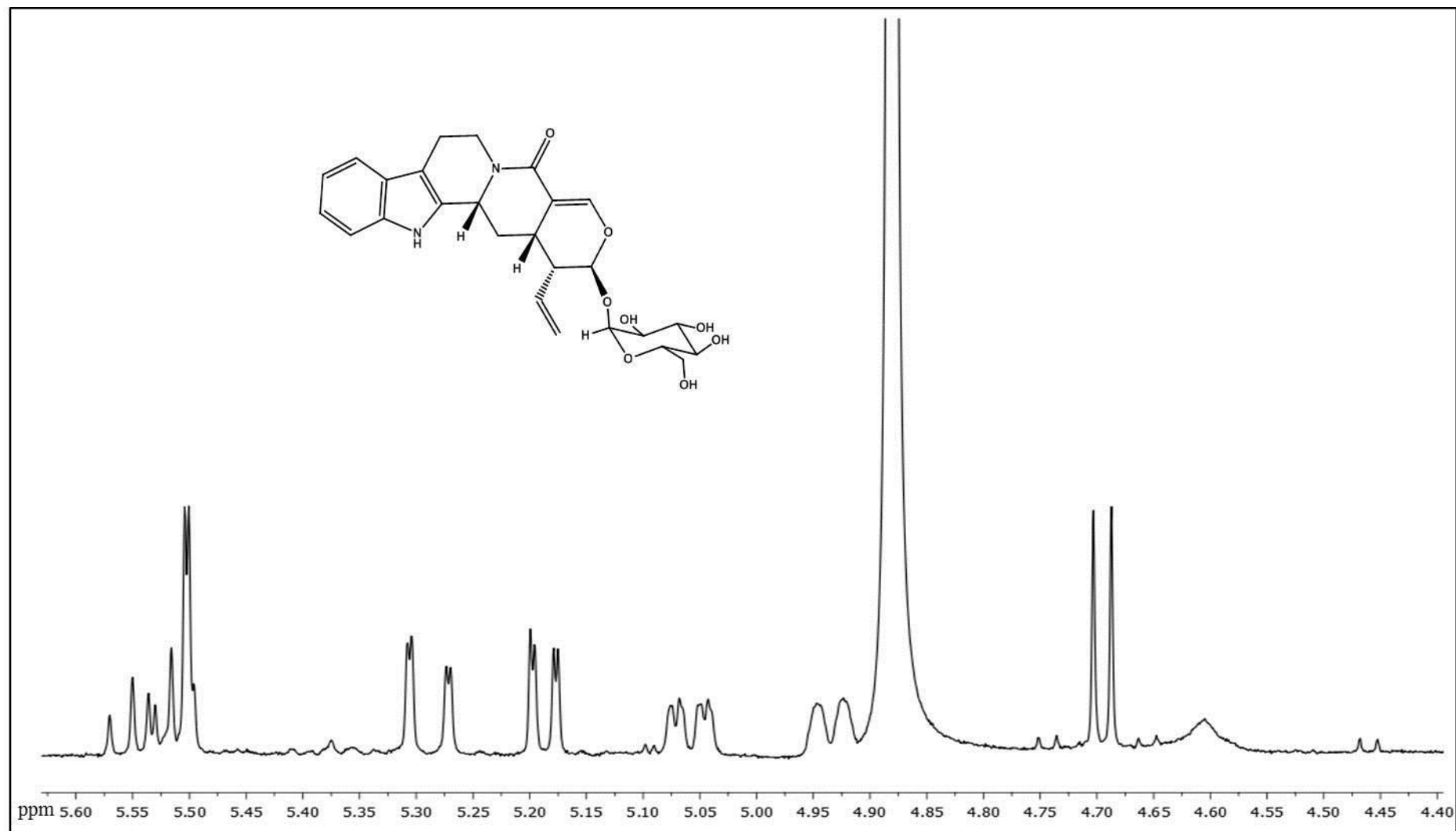


Figura 35. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 5.60 – 4.40 ppm) da substância S3.

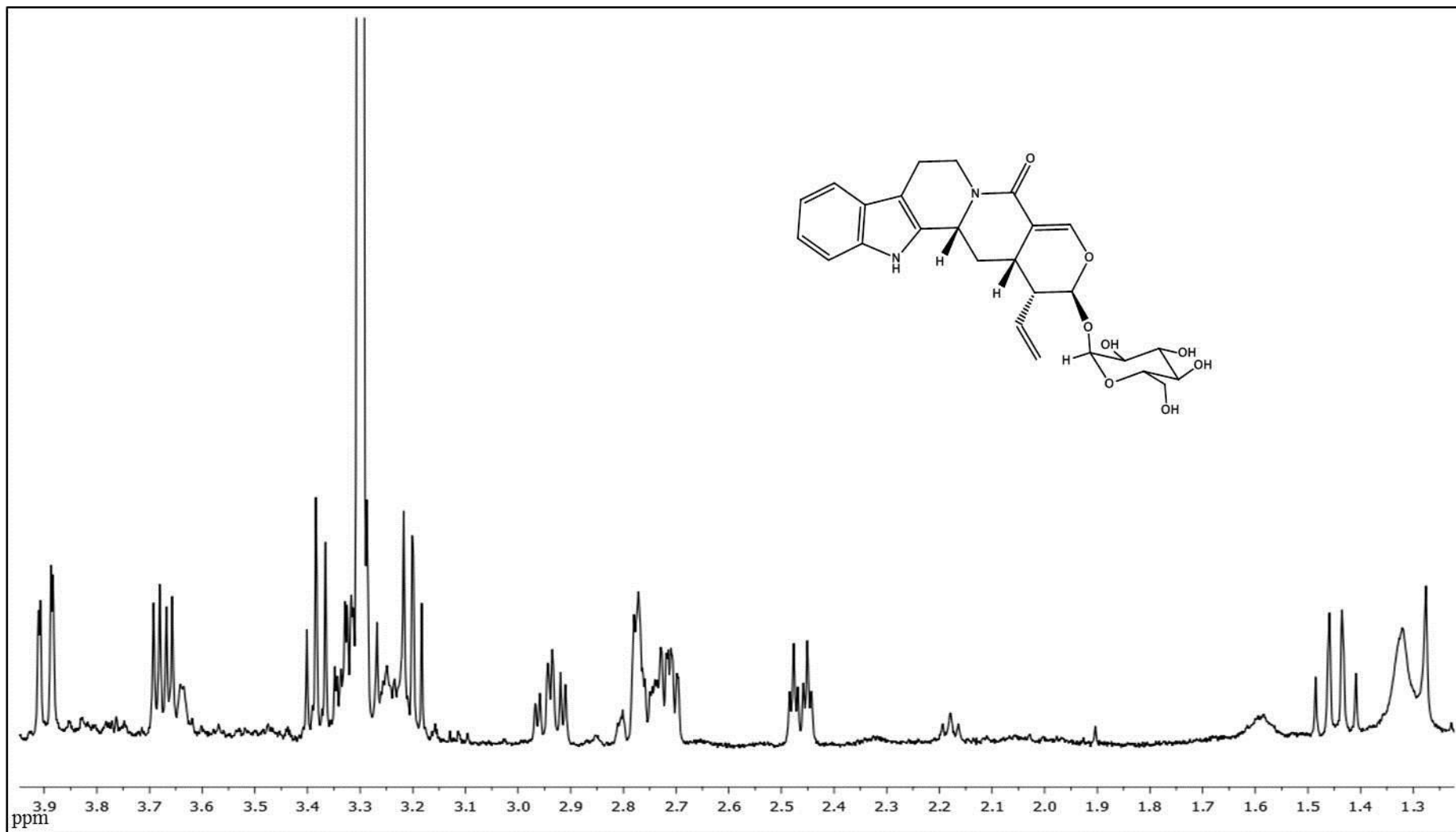


Figura 36. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (3.9 – 1.3 ppm) da substância S3.

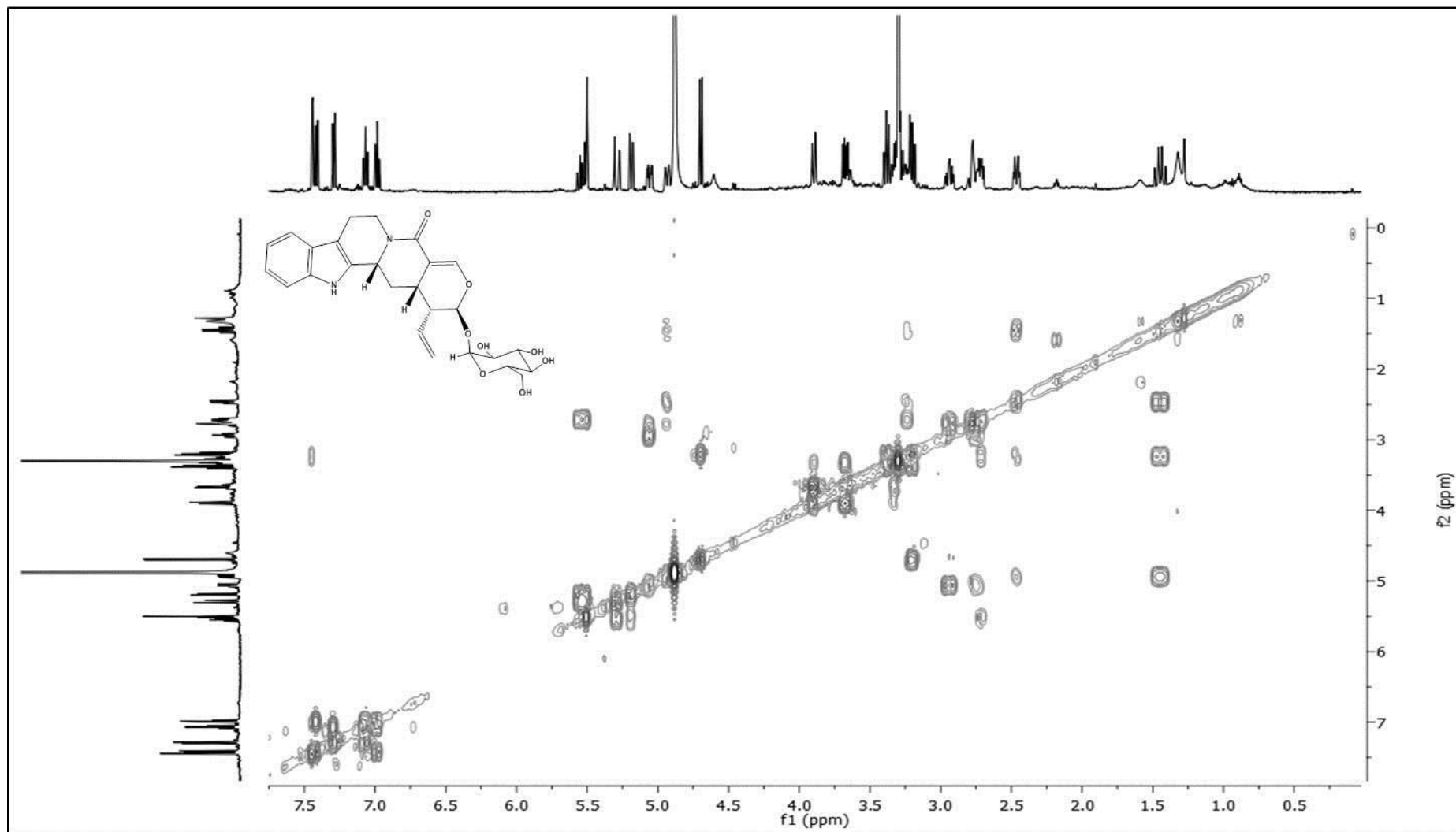


Figura 37. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) da substância S3.

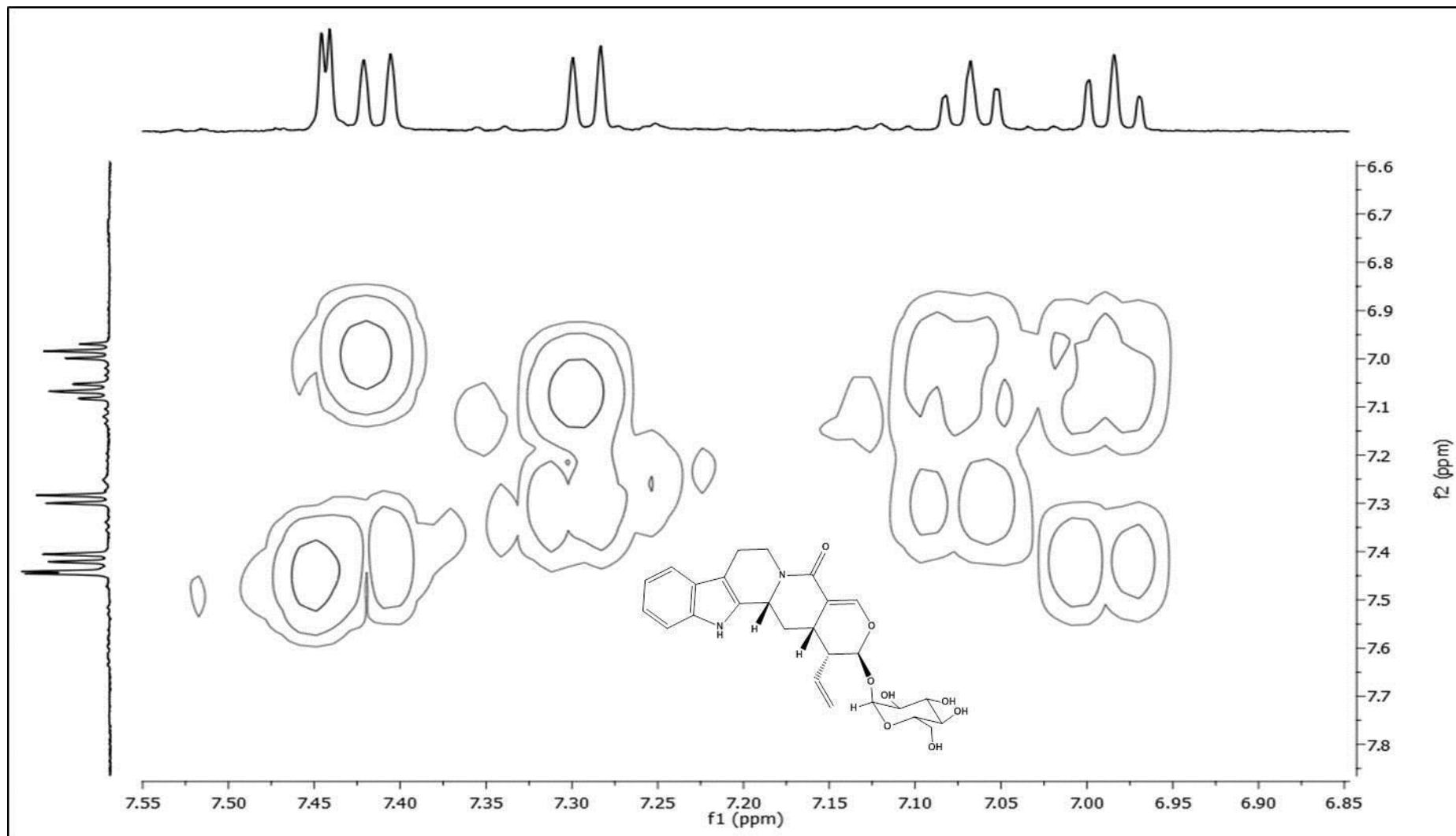


Figura 38. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.55-6.85 ppm; e f2: δ 6.6-7.8 ppm) da substância S3.

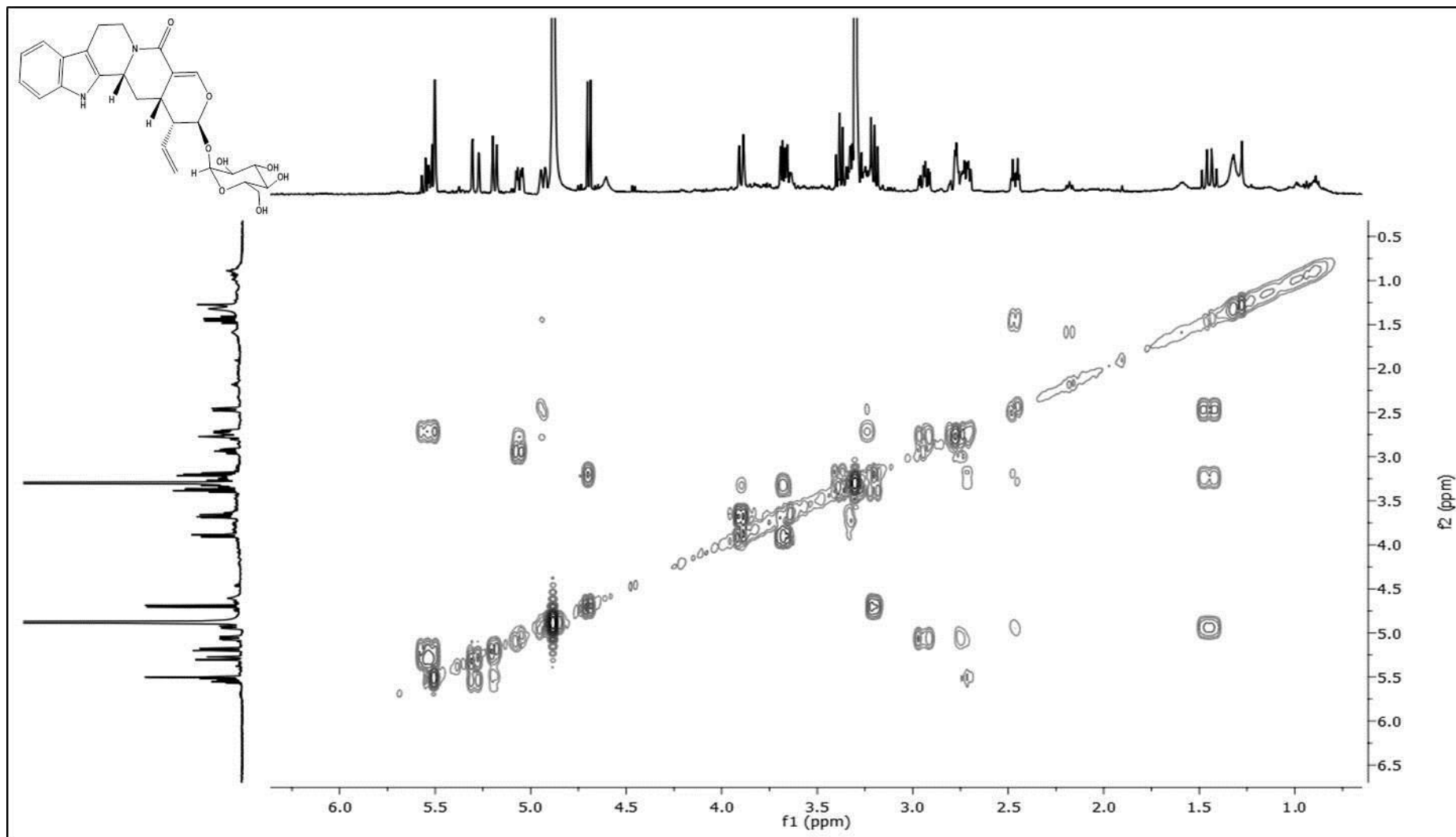


Figura 39. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 6.0-1.0 ppm; e f2: δ 0.5-6.5 ppm) da substância S3.

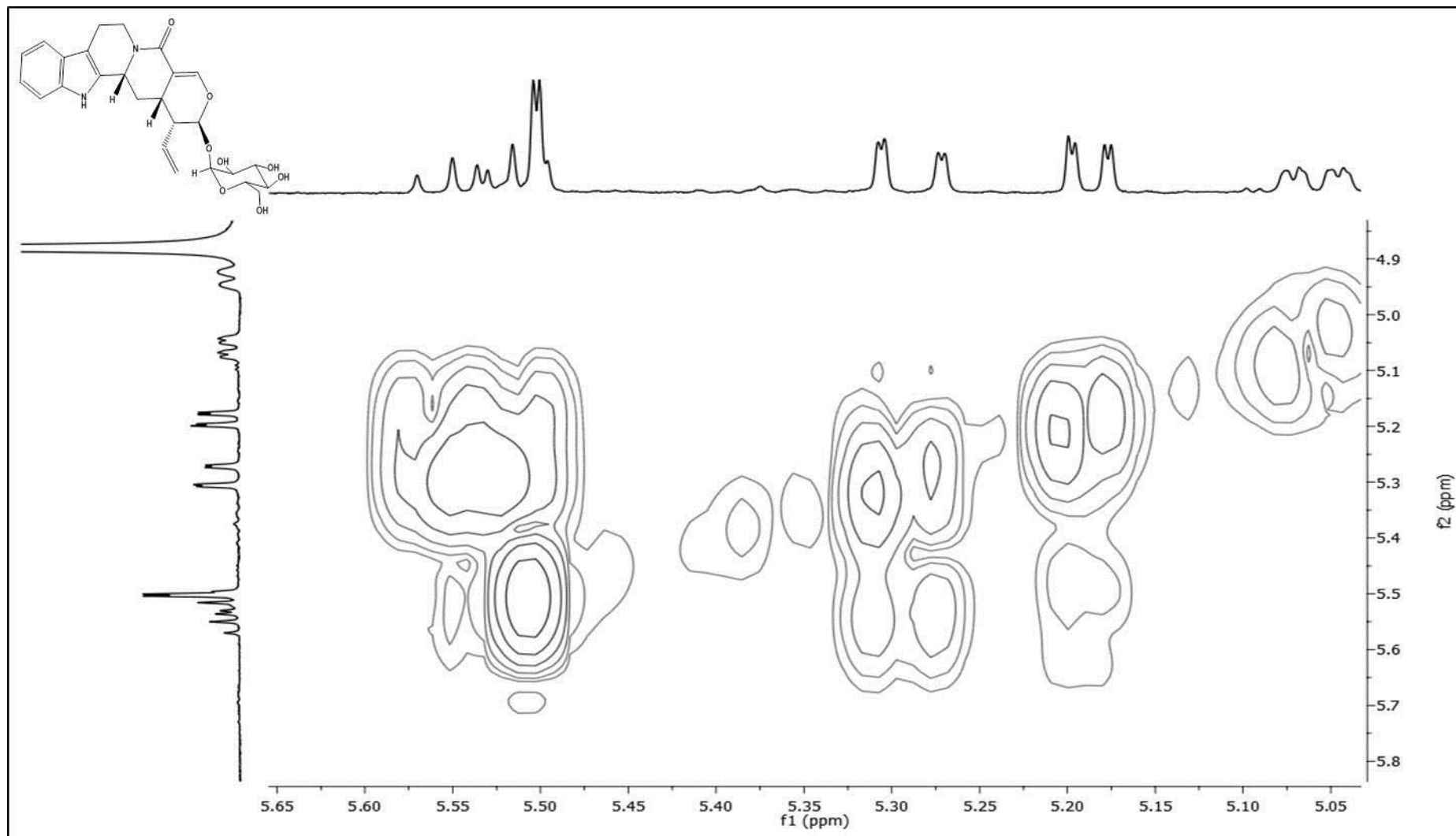


Figura 40. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 5.65-5.05 ppm; e f2: δ 4.9-5.8 ppm) da substância S3.

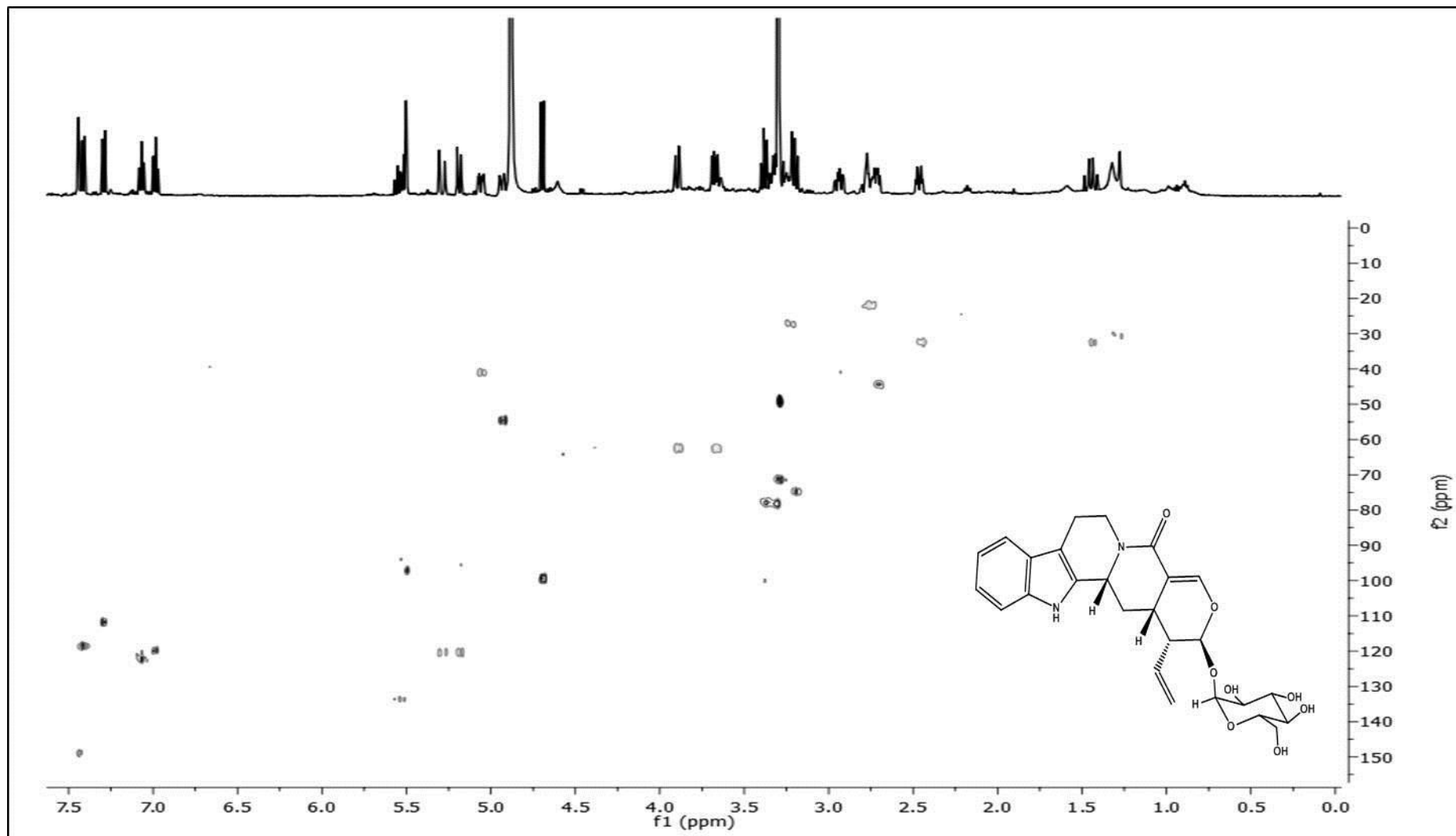


Figura 41. Espectro HSQC (500 MHz, CD₃OD) da substância S3.

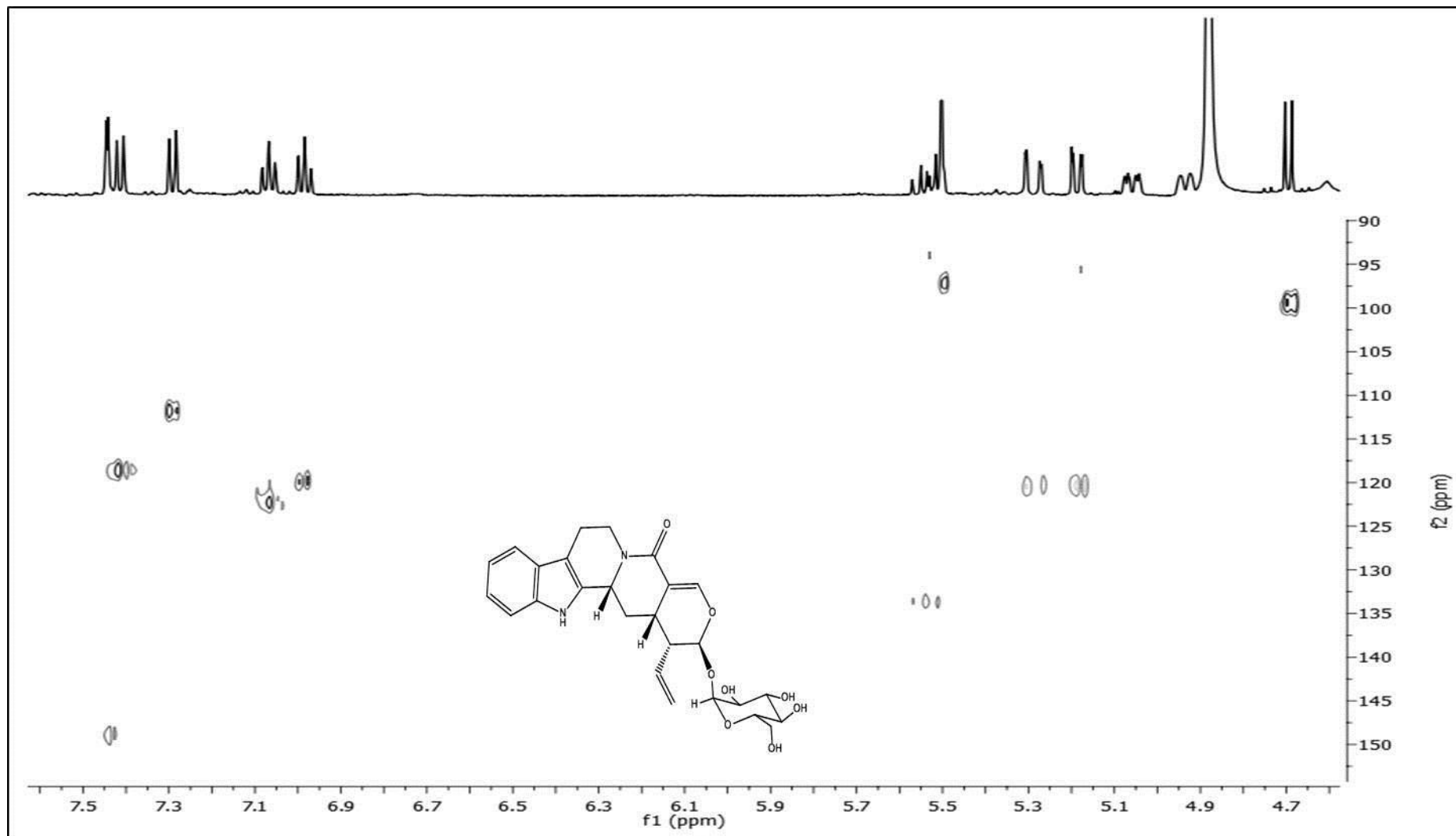


Figura 42. Espectro HSQC (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.5-4.7 ppm; e f2: δ 90-150 ppm) da substância S3.

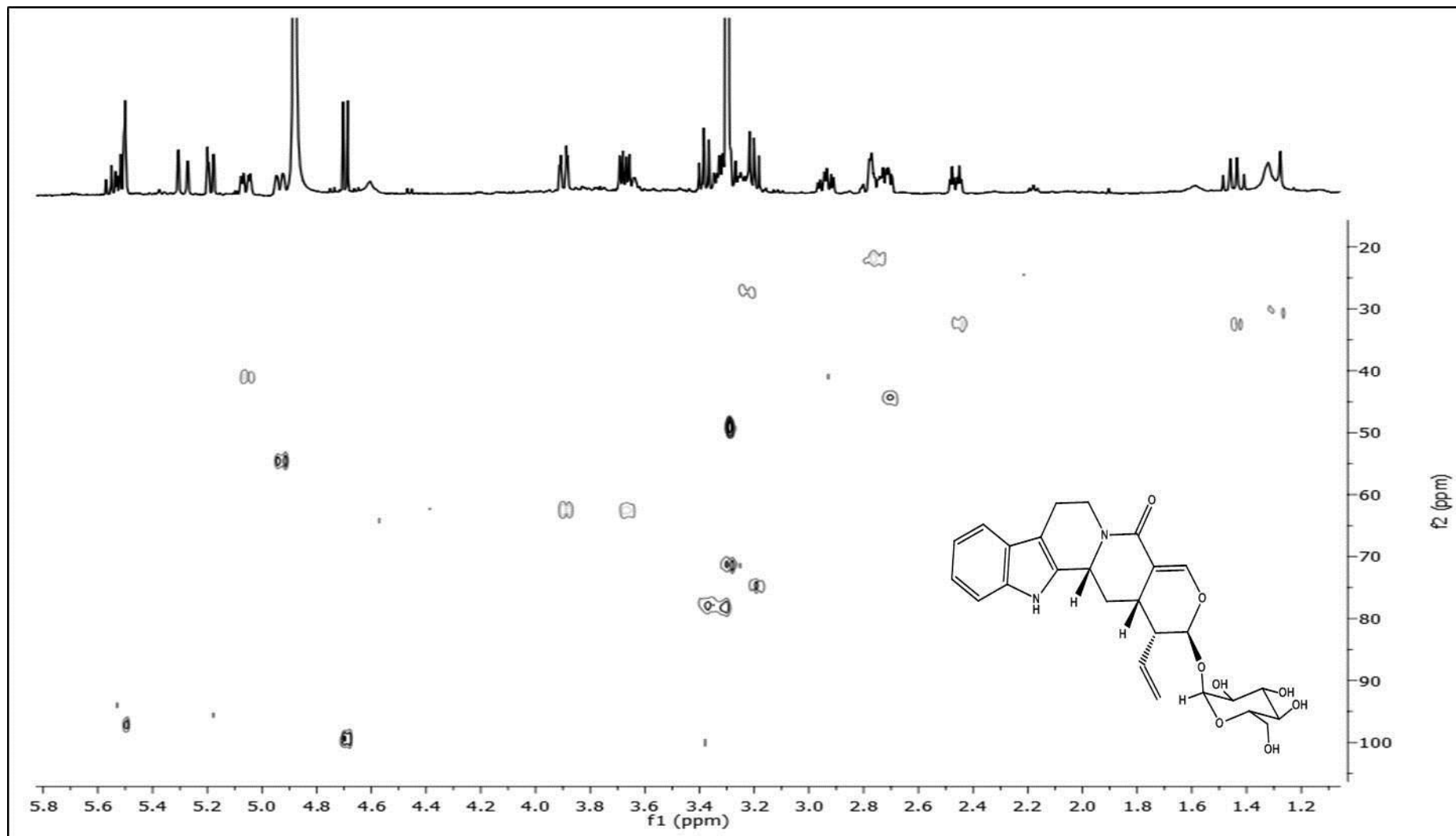


Figura 43. Espectro HSQC (500 MHz, CD_3OD) ampliado (f1: δ 5.8-1.2 ppm; e f2: δ 20-100 ppm) da substância S3.

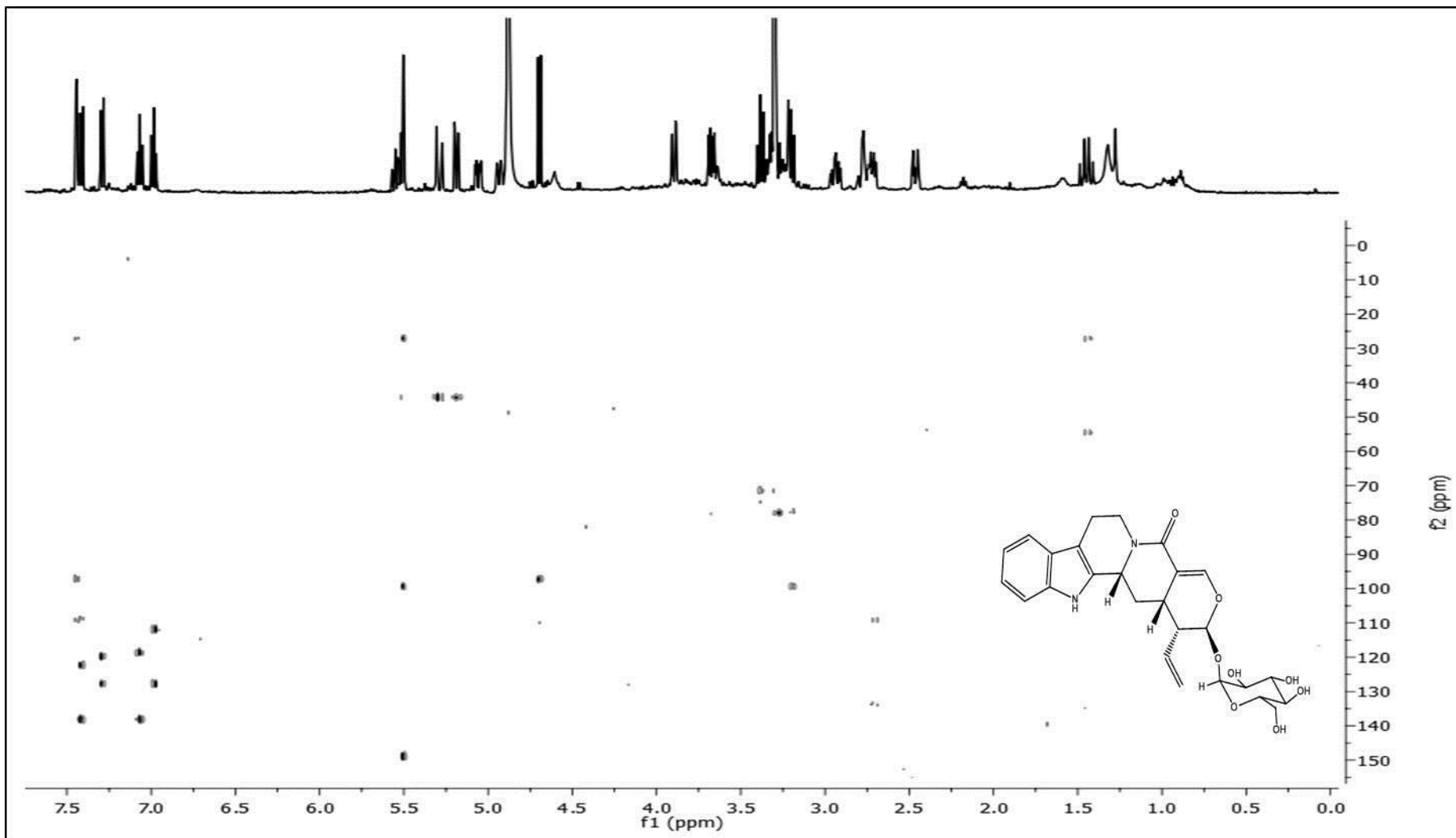


Figura 44. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) da substância S3.

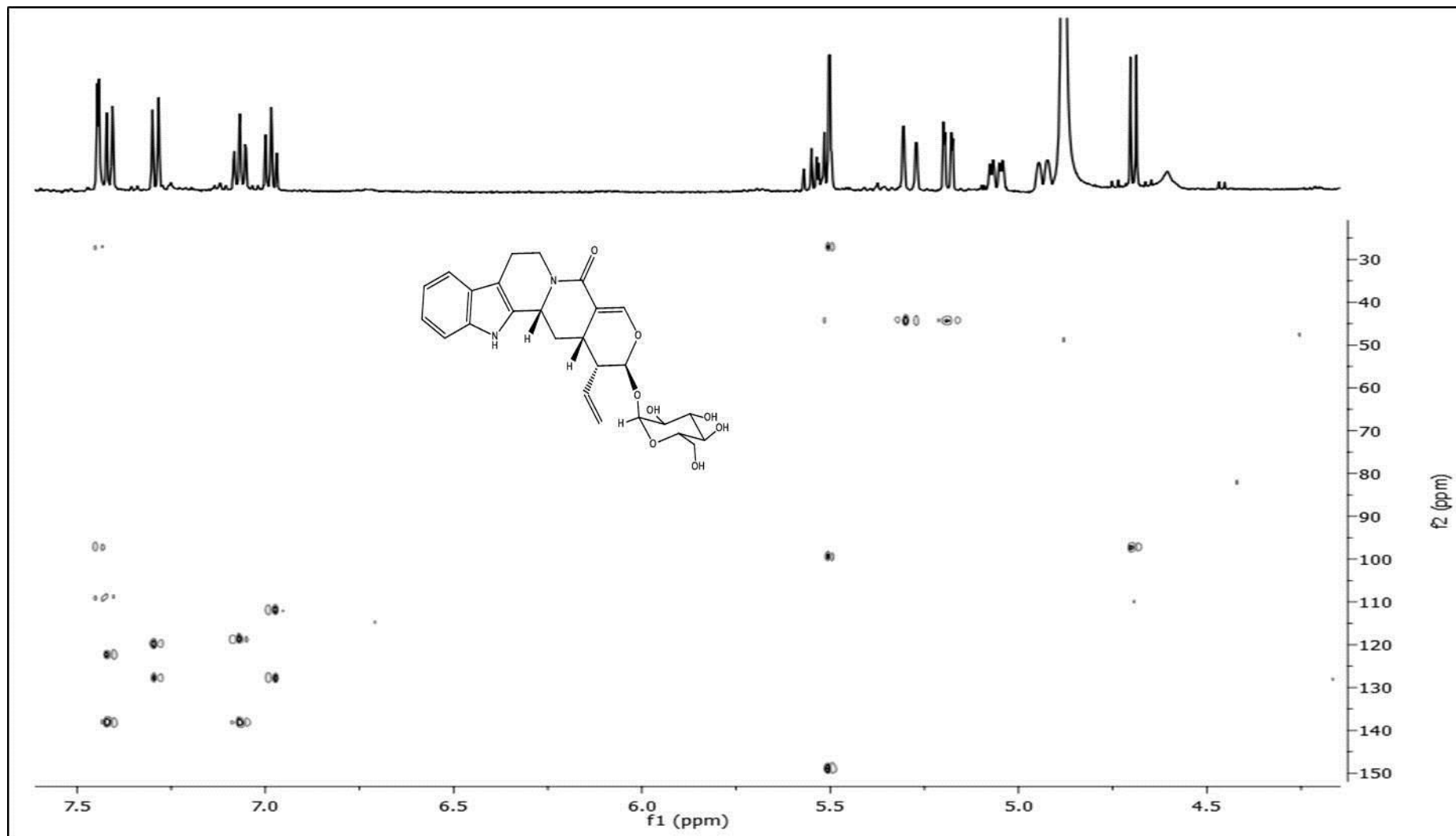


Figura 45. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.5-4.5 ppm; e f2: δ 30-150 ppm) da substância S3.

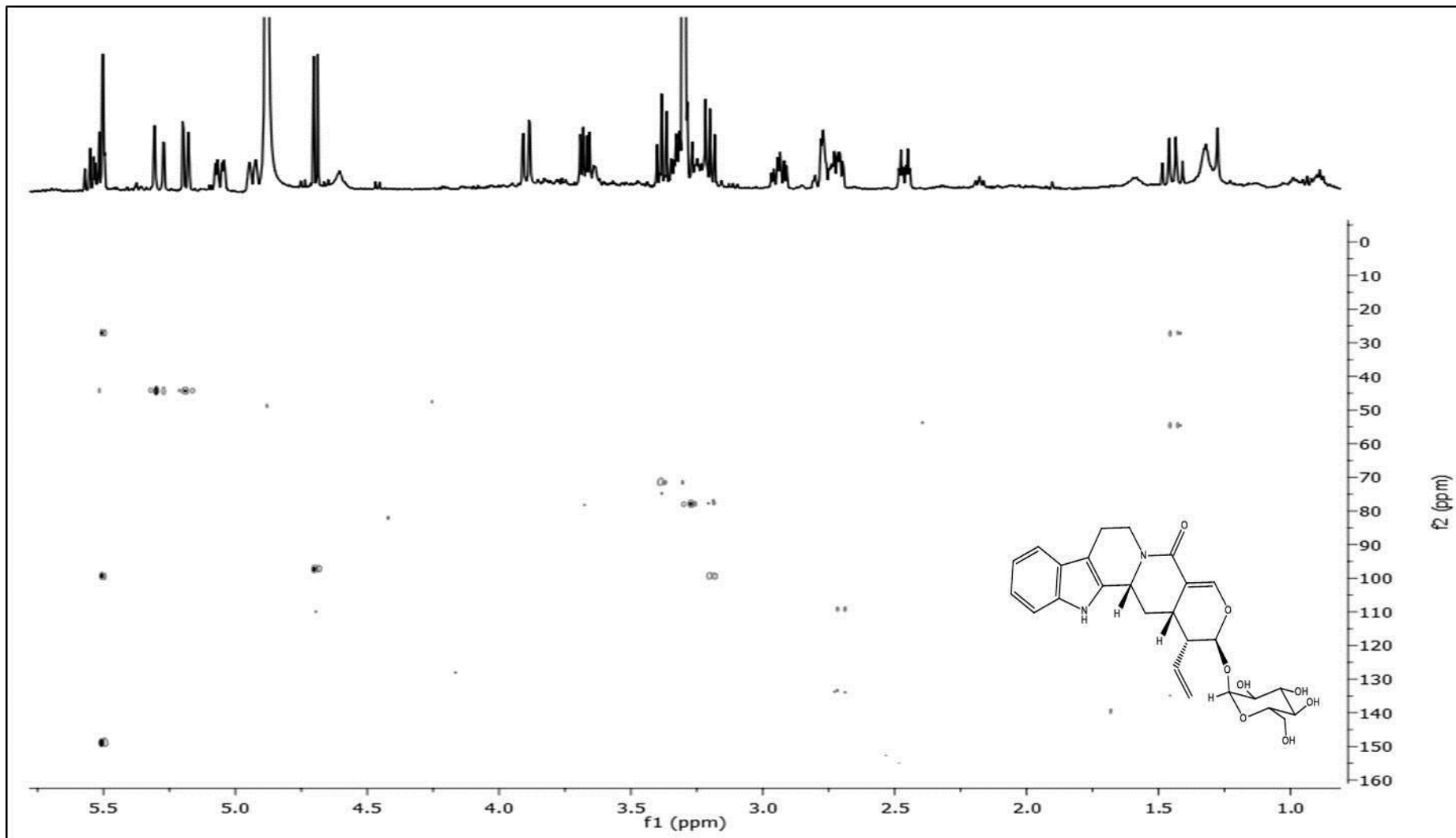


Figura 46. Espectro HMBC (500 MHz, CD_3OD) ampliado (f1: δ 5.5-1.0 ppm; e f2: δ 0-160 ppm) da substância S3.

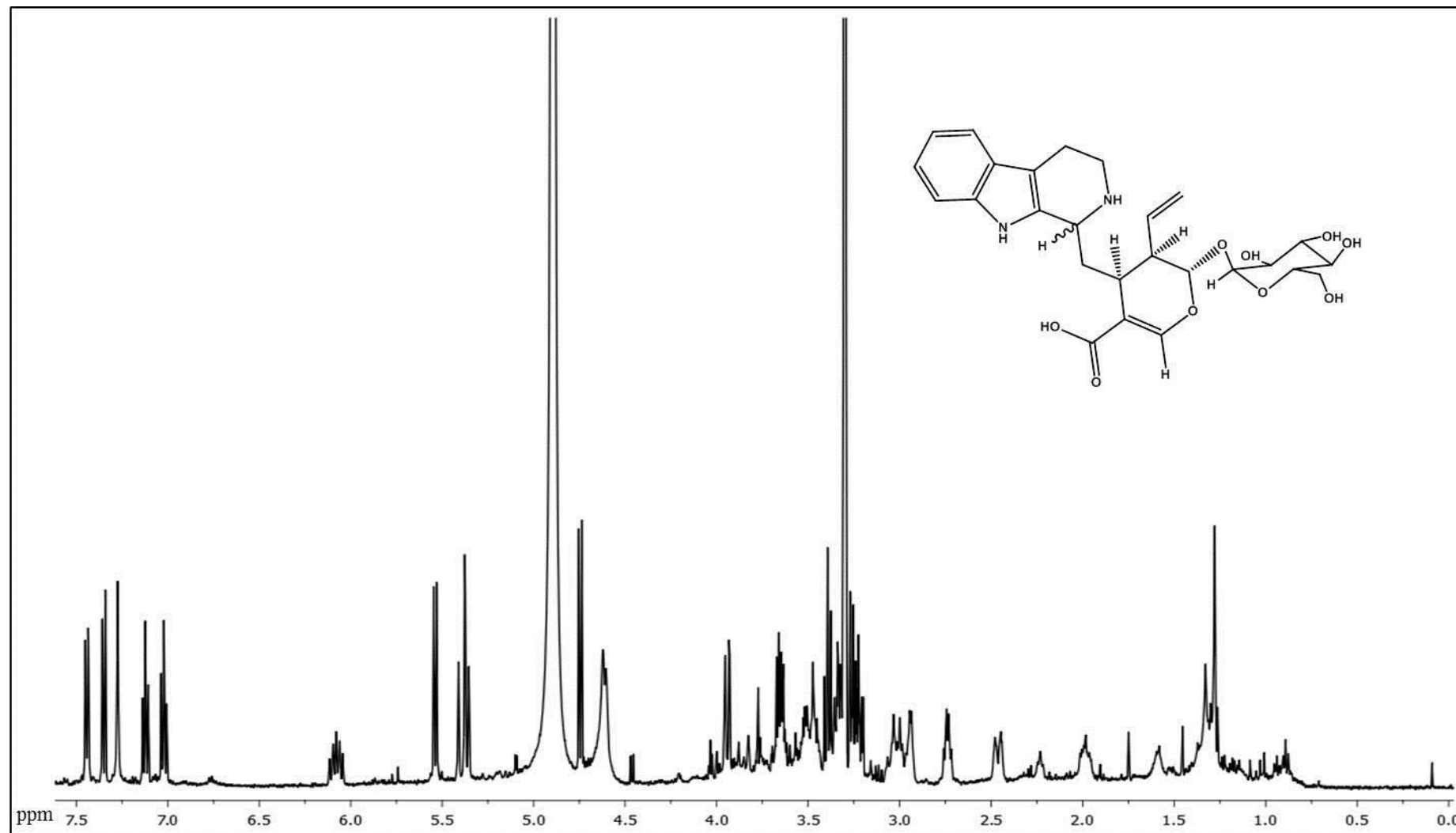


Figura 47. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância S2.

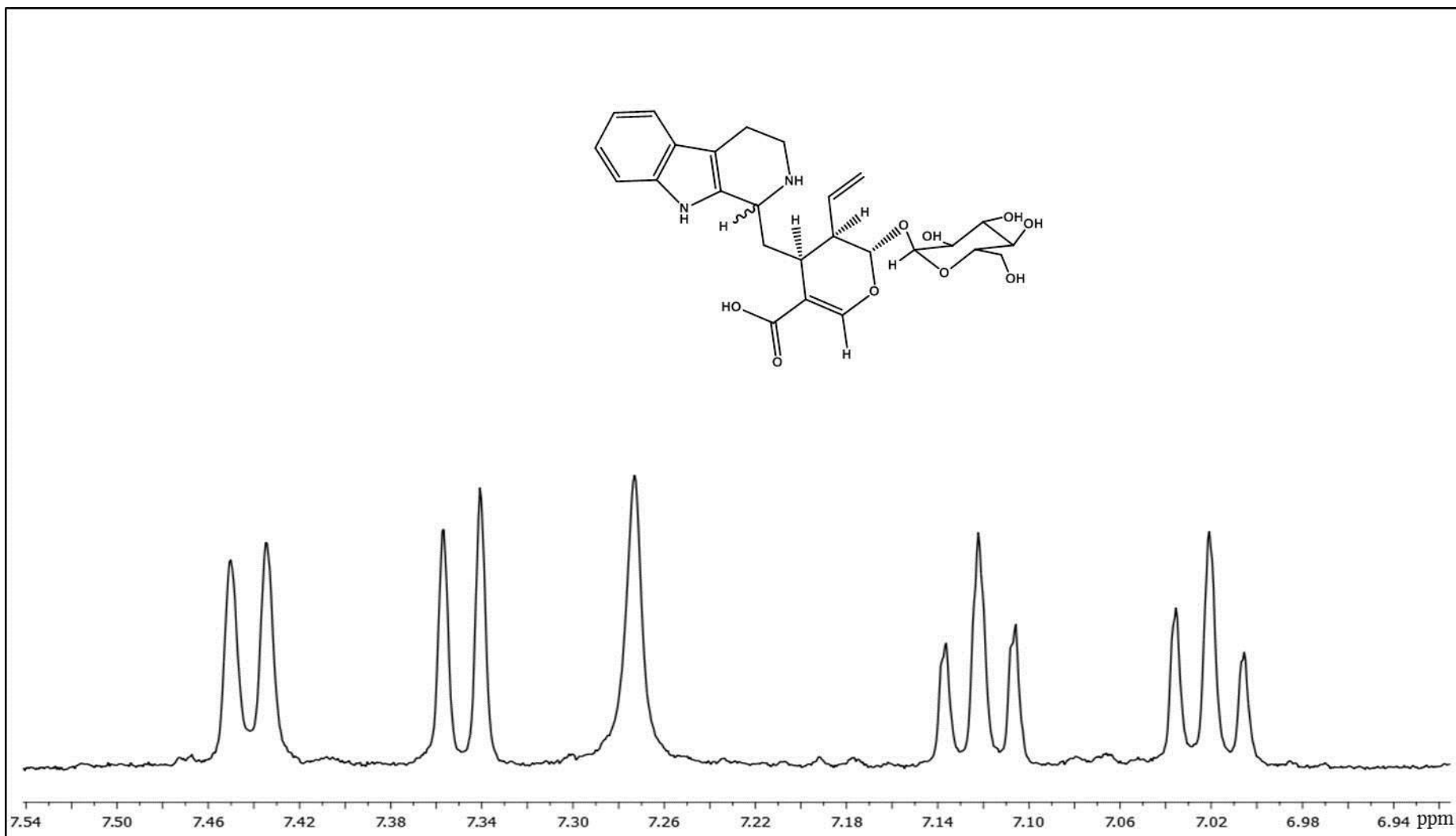


Figura 48. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 7.54-6.94 ppm) da substância S2.

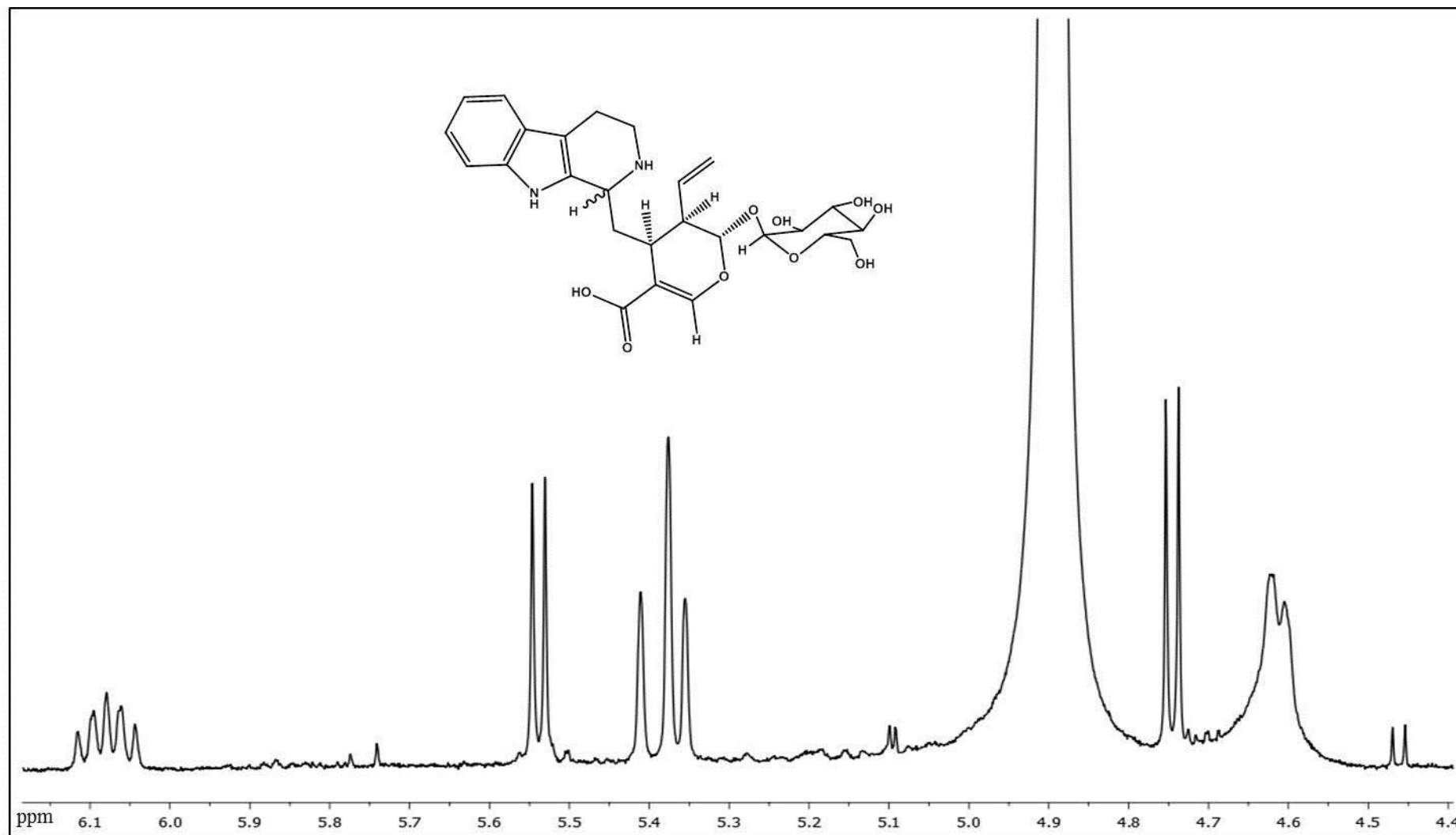


Figura 49. Espectro RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) ampliado (δ 6.1-4.4 ppm) da substância S2.

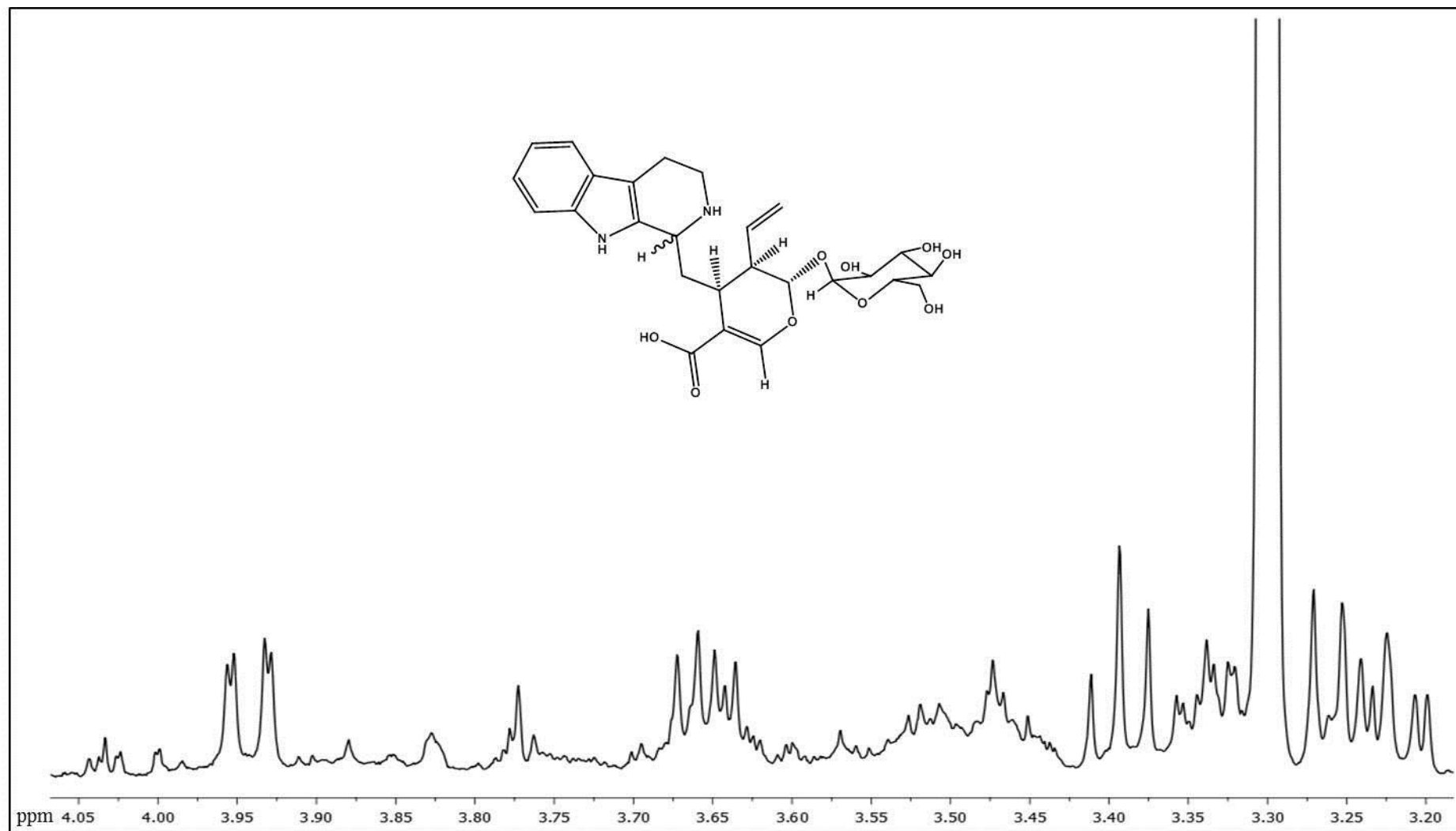


Figura 50. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 4.05-3.20 ppm) da substância S2.

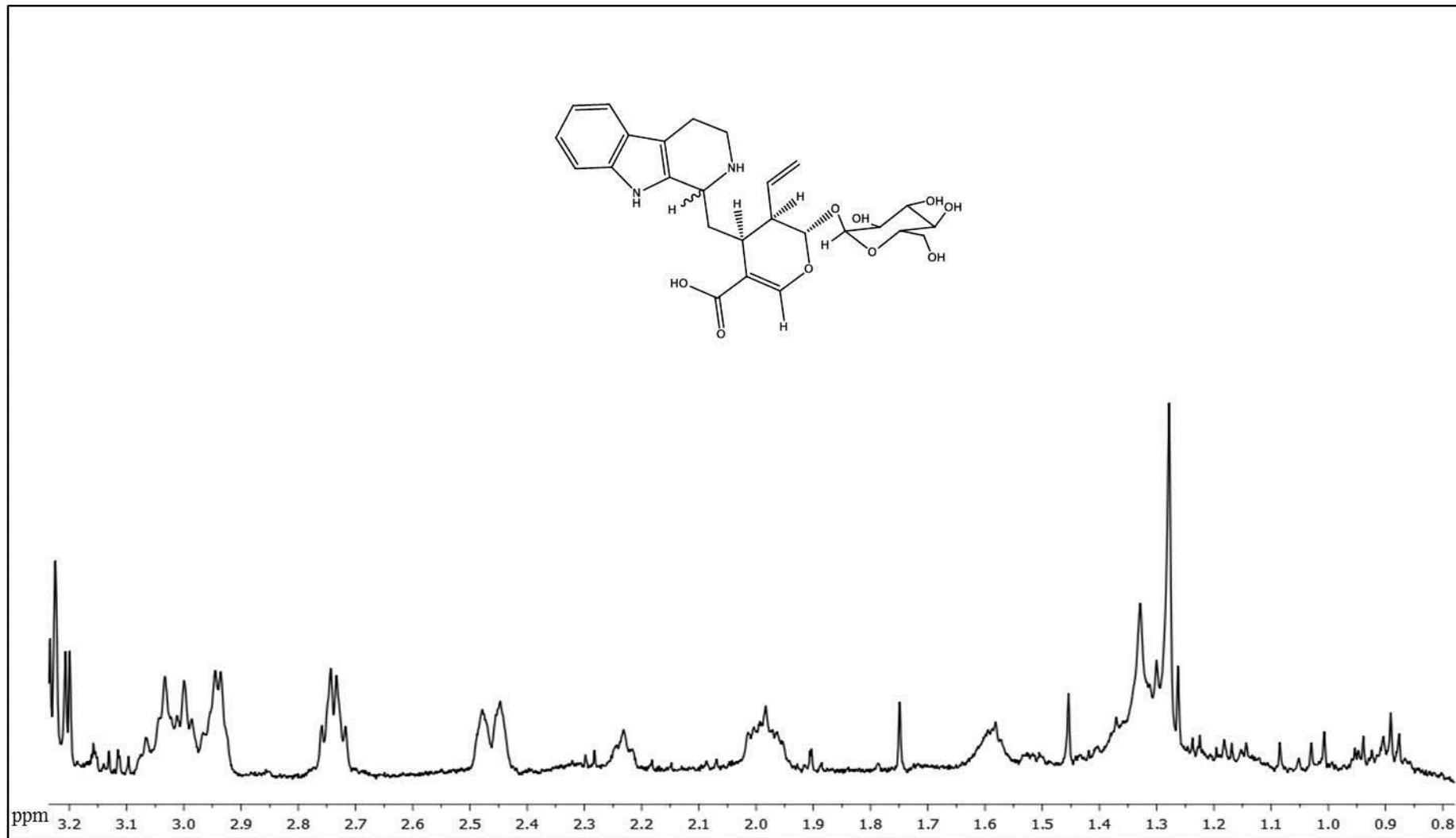


Figura 51. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) ampliado (δ 3.2-0.8 ppm) da substância S2.

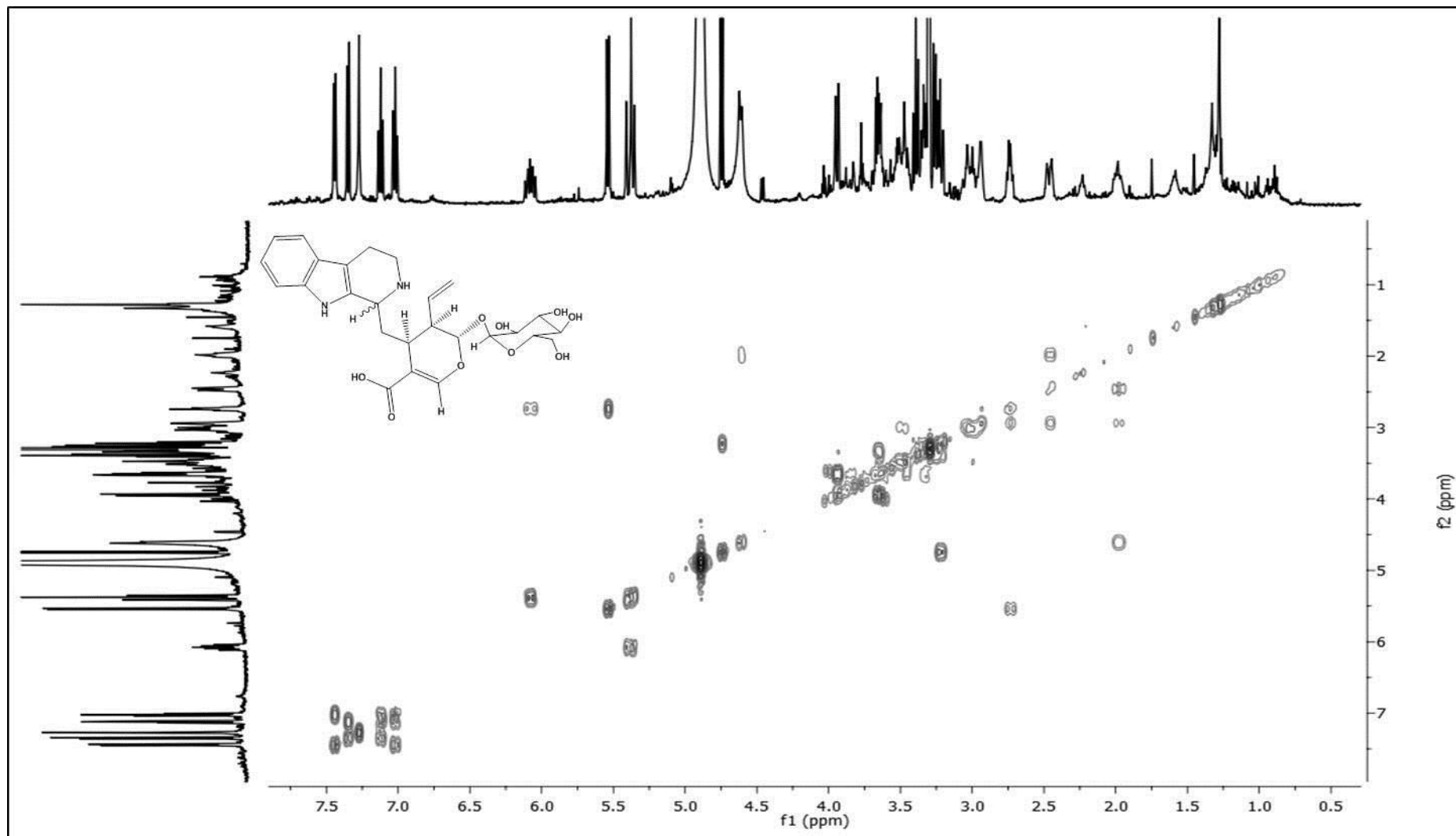


Figura 52. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) da substância S2.

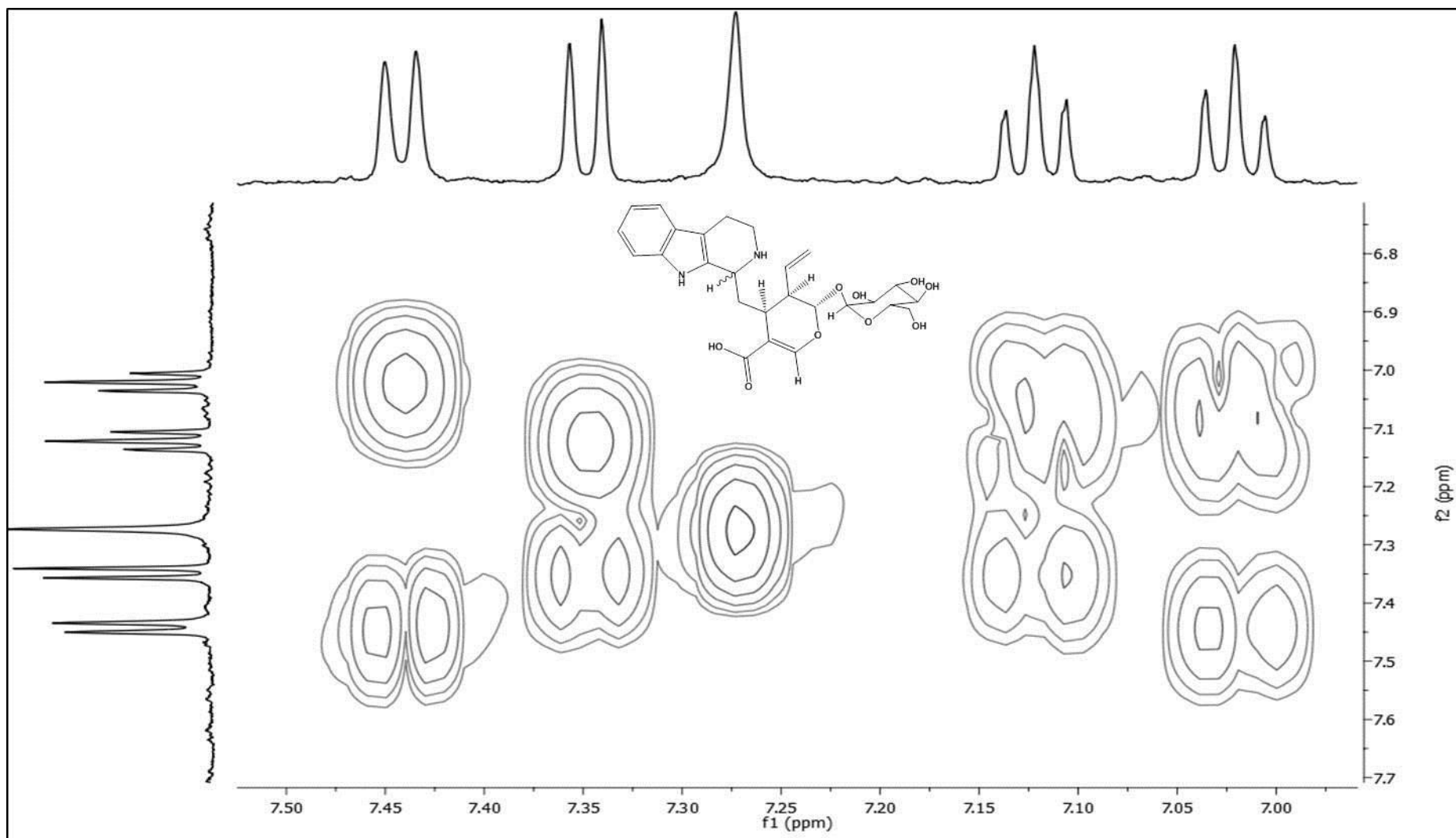


Figura 53. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.50-7.00 ppm; f2: δ 6.8-7.7 ppm) da substância S2.

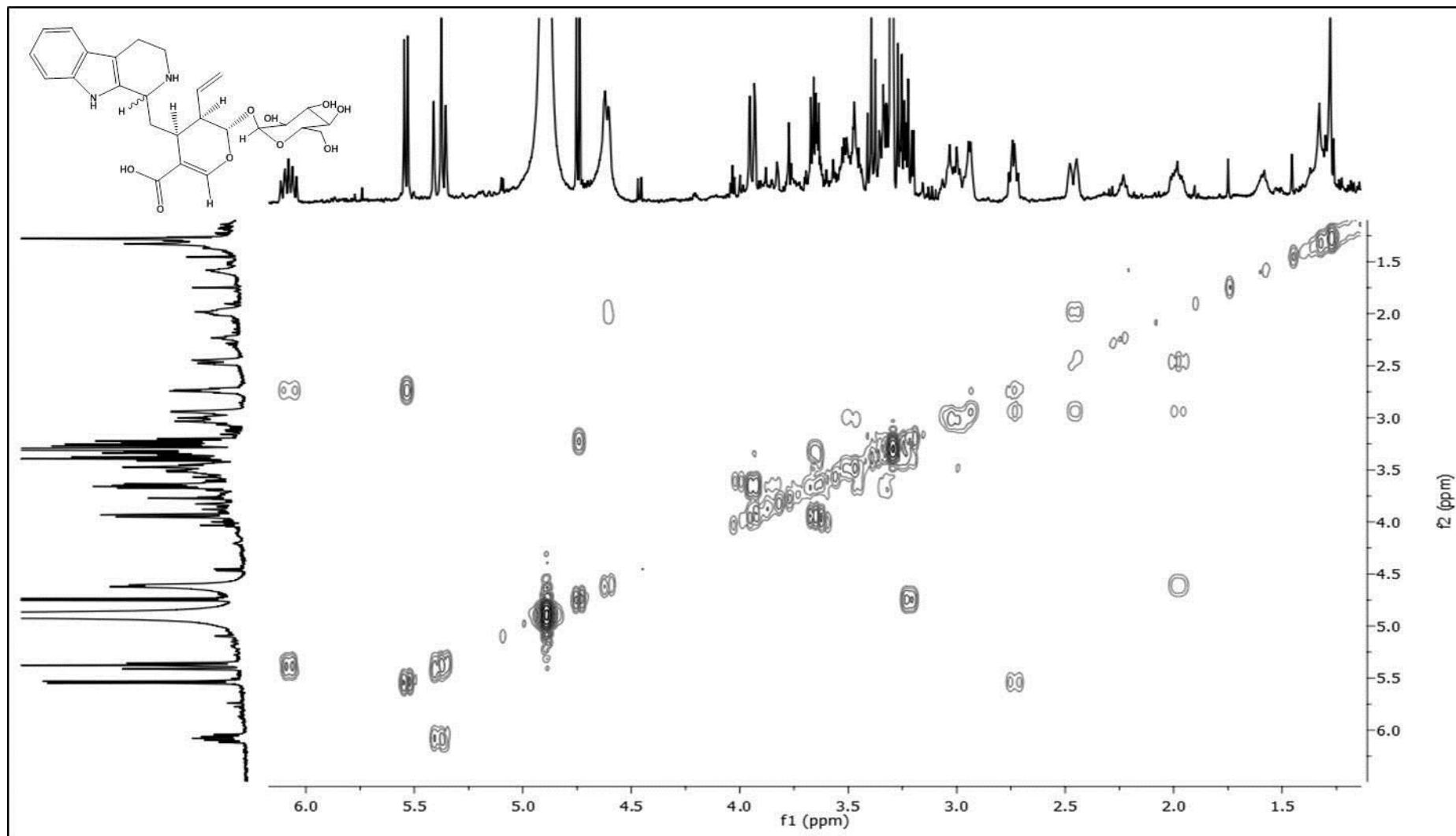


Figura 54. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 6.0-1.5 ppm; f2: δ 1.5-6.0 ppm) da substância S2.

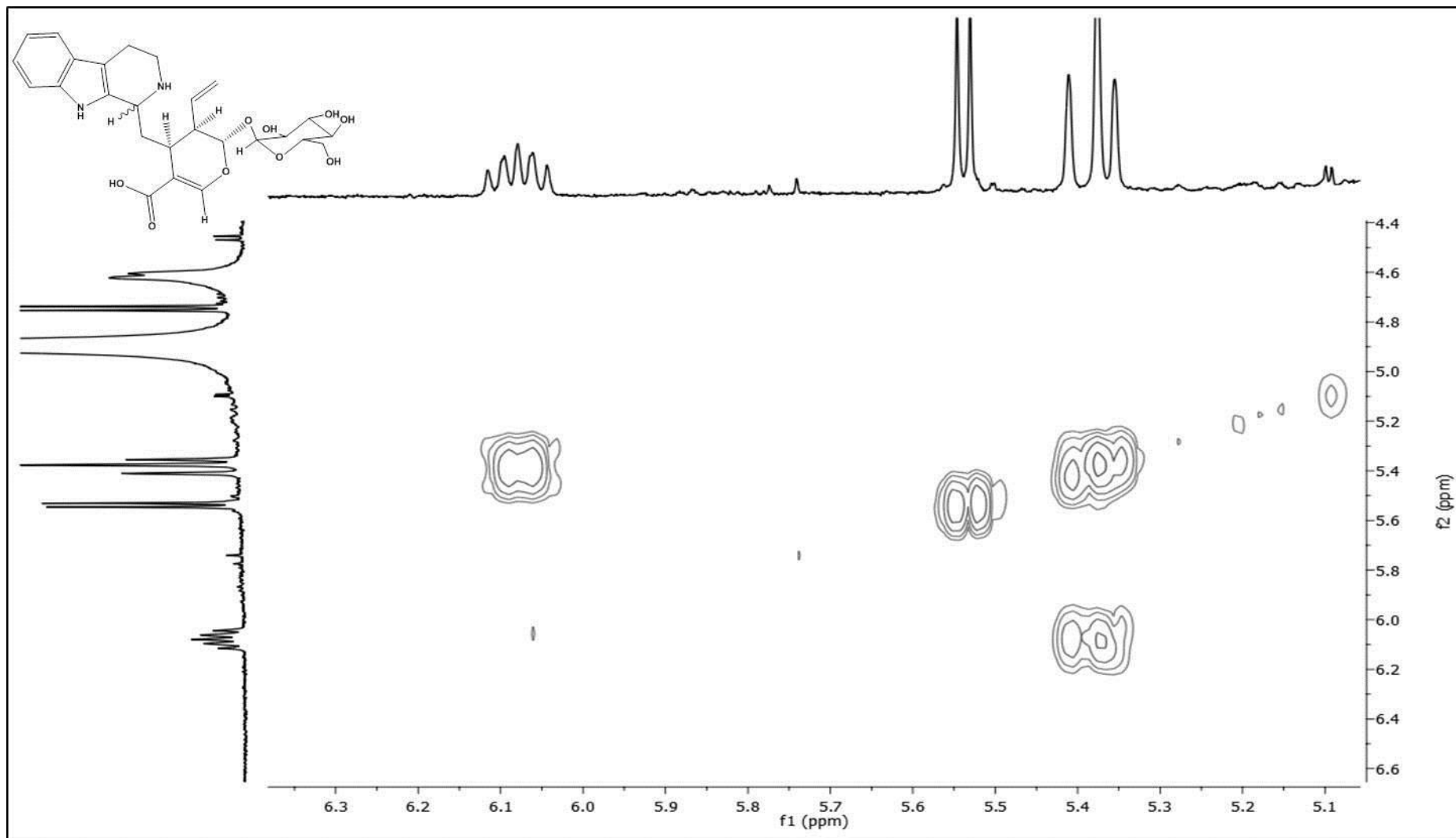


Figura 55. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 6.3-5.1 ppm; f2: δ 4.4-6.6 ppm) da substância S2.

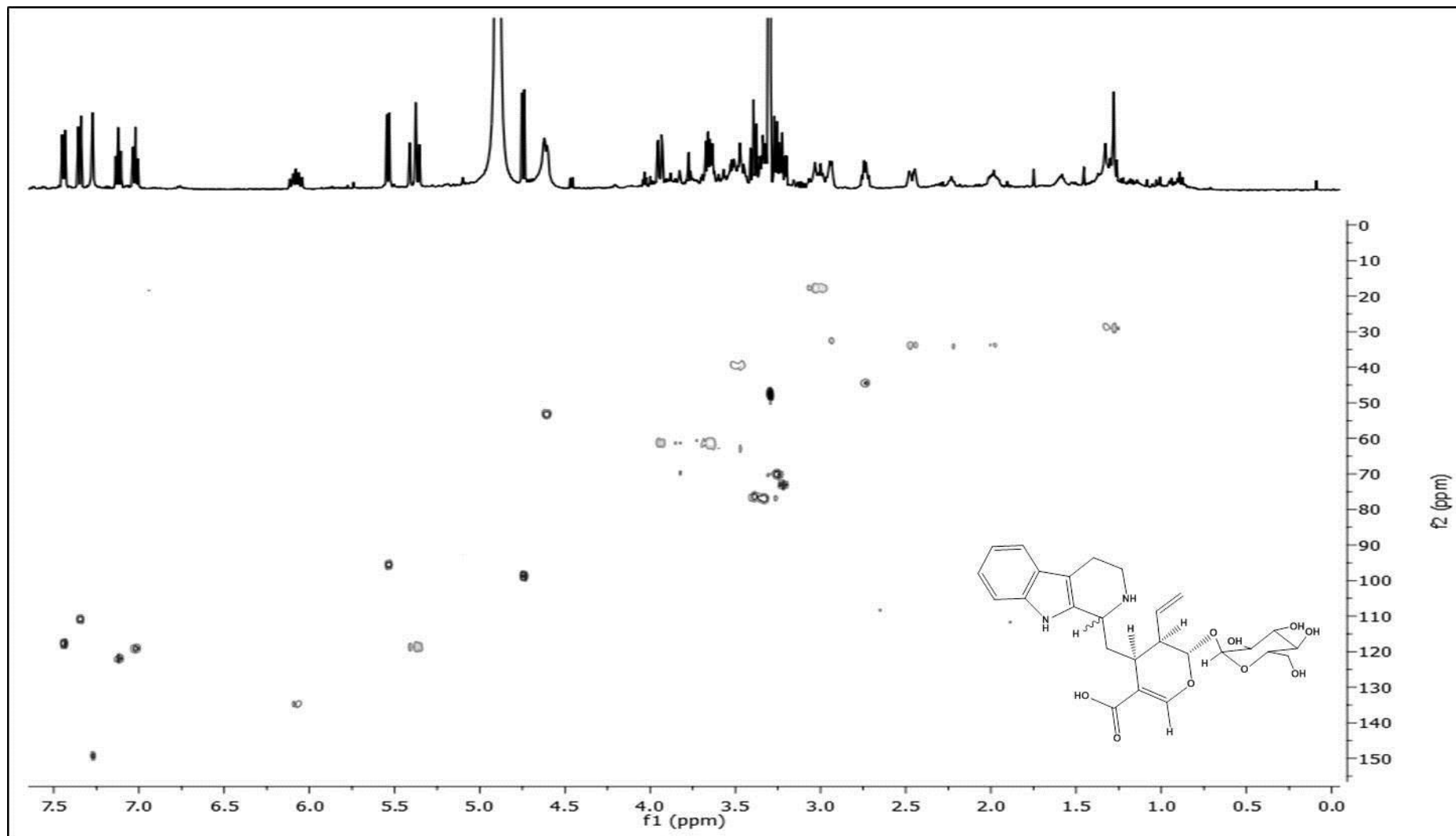


Figura 56. Espectro HSQC (500 MHz, CD₃OD) da substância S2.

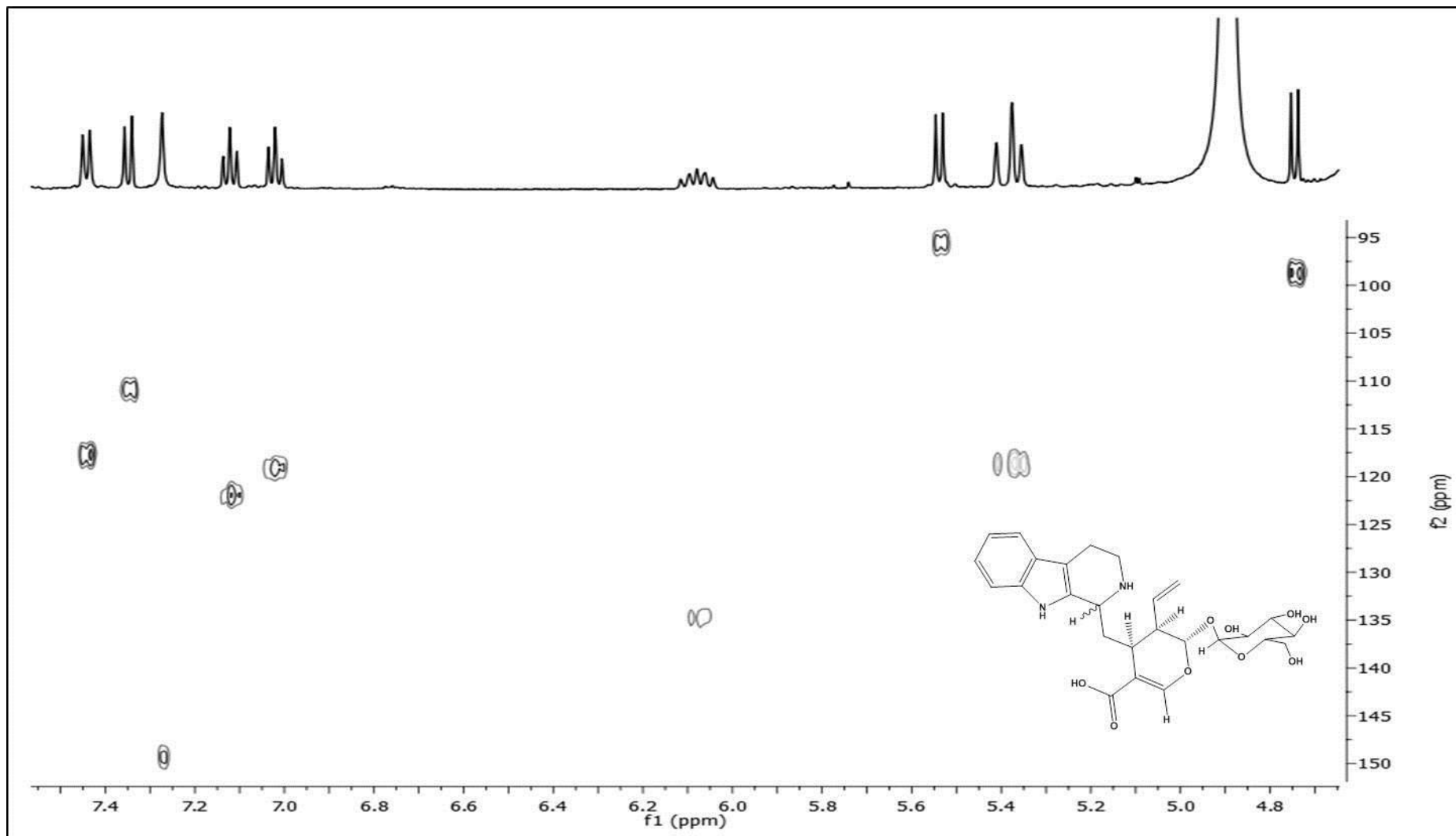


Figura 57. Espectro HSQC (500 MHz, CD_3OD) ampliado (f1: δ 7.4-4.8 ppm; f2: δ 95-150 ppm) da substância S2.

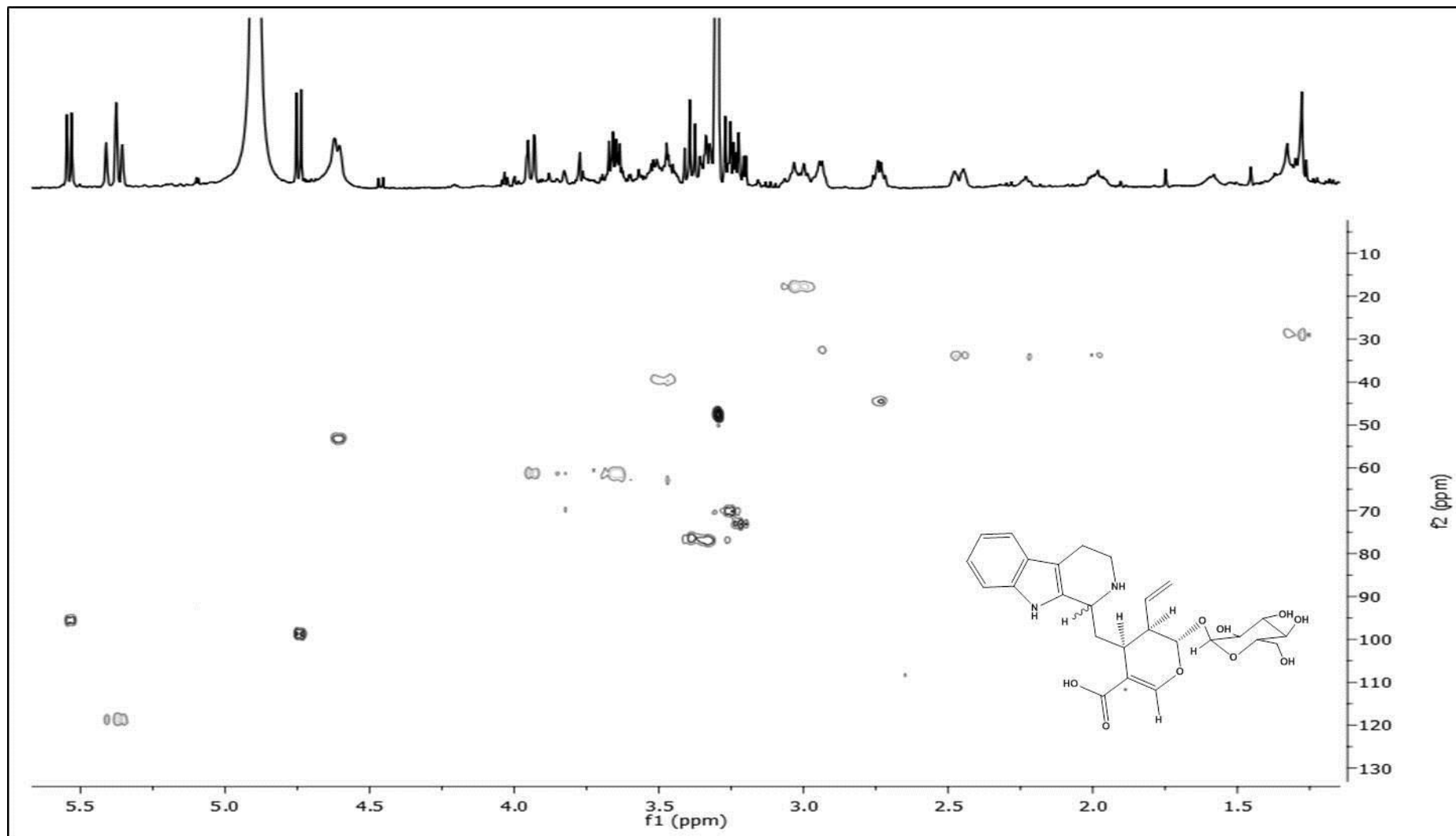


Figura 58. Espectro HSQC (500 MHz, CD_3OD) ampliado (f1: δ 5.5-1.5 ppm; f2: δ 10-130 ppm) da substância S2.

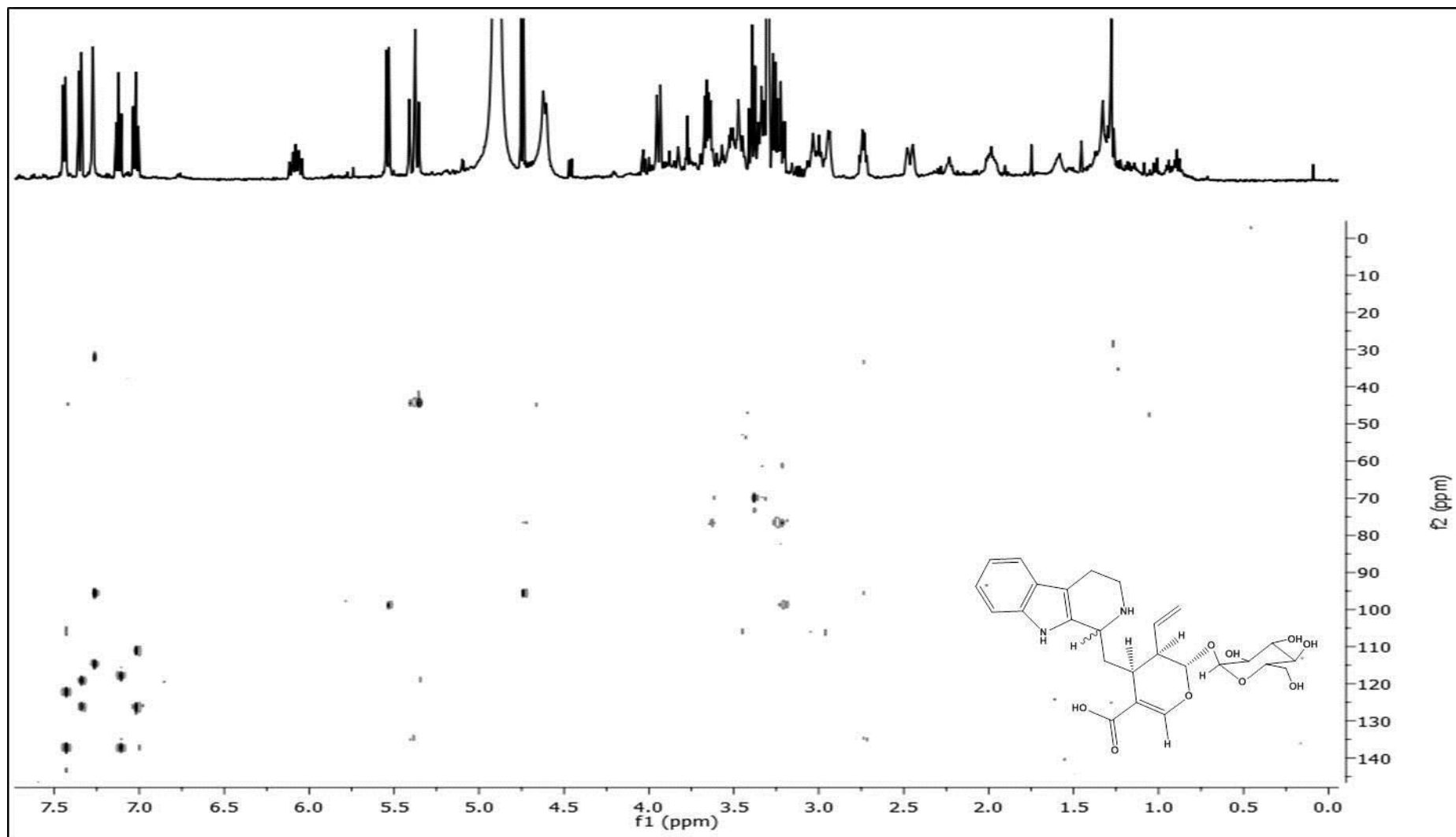


Figura 59. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) da substância S2.

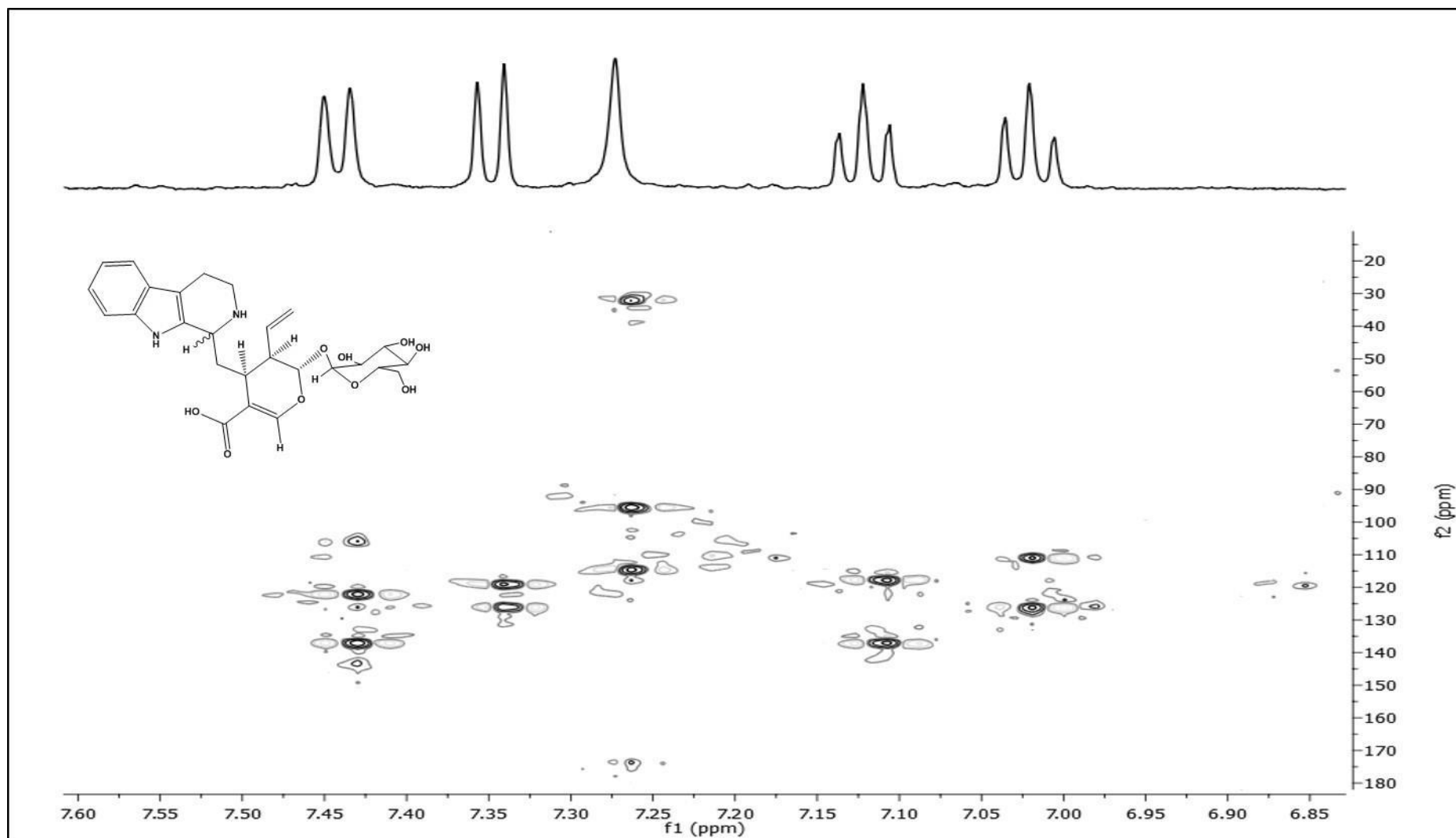


Figura 60. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 7.60-6.85 ppm; f2: δ 20-180 ppm) da substância S2.

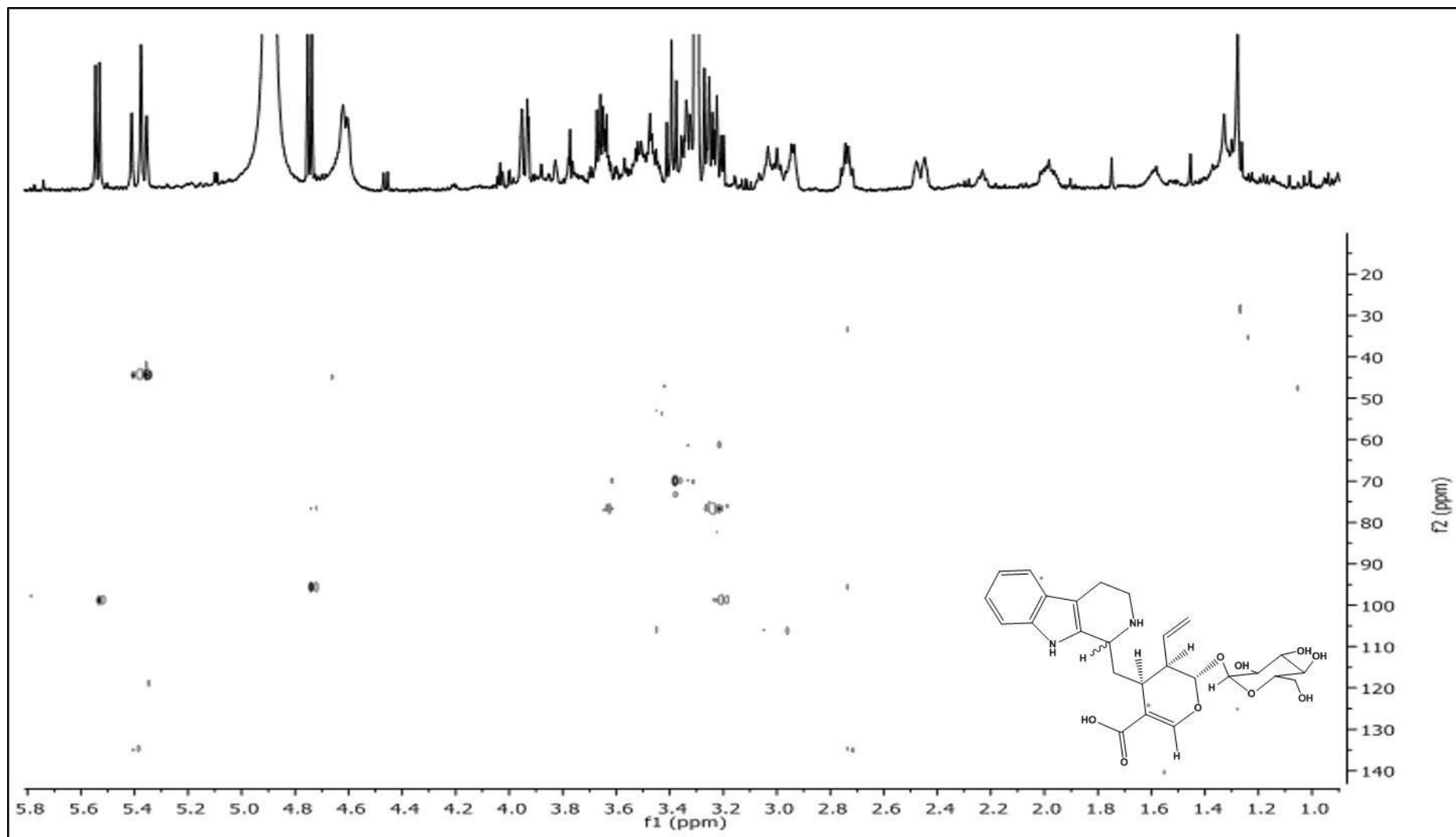


Figura 61. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) ampliado (f1: δ 5.8-1.0 ppm; f2: δ 20-140 ppm) da substância S2.