

**Estudo fitoquímico das folhas da espécie *P. goyazensis* e do caule da espécie *P. prunifolia*
(Rubiaceae).**

Joicy Rocha dos Santos^{a‡}(IC), Lucília Kato^{a*†}(PG), Cecília Maria Alves de Oliveira^a
(PG), Piero Giuseppe Delprete^b (PG)

^a*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74001-970, Brasil*

^b*Herbier de Guyane, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR AMAP, B.P.*

165, 97323 Cayenne Cedex, French Guiana, France

* e-mail: lucilia@quimica.ufg.br

Palavras-chave: *Psychotria goyazensis*, *Psychotria prunifolia*, Rubiaceae, Alcalóides

1. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae é a quarta maior das dicotiledôneas, com aproximadamente 650 gêneros e 13.000 espécies (DELPRETE *et. al.*, 2004). A família Rubiaceae é formada principalmente por plantas tropicais lenhosas que consistem principalmente em árvores e arbustos. Essa família pertence ao gênero *Gentianales*. Estudos recentes subdividem esta grande família em quatro subfamílias, nomeadas: Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirrhoideae e Rubioideae (MONGRAND *et. al.*, 2004).

A família Rubiaceae encontra-se distribuída, principalmente, nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, concentrando-se 30% na América do Sul (DELPRETE *et. al.*, 2004). No Brasil são 2000 espécies divididas em 110 gêneros, distribuídos amplamente nos ecossistemas do cerrado, floresta amazônica, mata atlântica, caatingas e restingas (DELPRETE, 1998).

Dentro da família Rubiaceae encontra-se o gênero *Psychotria*, que abrange entre 1000 e 1650 espécies em todo o mundo, e pertence à subfamília Rubioideae (NEPOKROEFF *et. al.*, 1999). O gênero *Psychotria* se destaca principalmente pela presença de alcalóides, principalmente alcalóides indólicos. Alcalóides são importantes exemplos de metabólitos

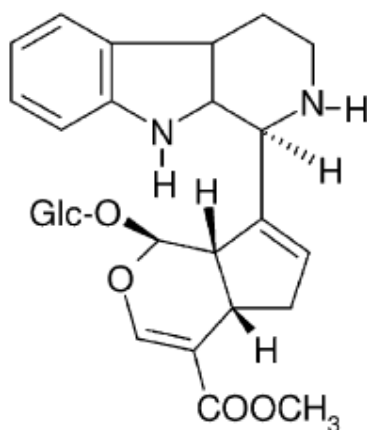
‡ Orientador: Lucília Kato, Orientando: Joicy Rocha dos Santos

† Revisado pelo orientador.

secundários que deram origem à fármacos, como exemplo pode-se citar a morfina, que foi isolada em 1806 e que possui potente atividade hipnoanalgésica (FARIAS, 2006).

A classe de alcalóides predominante no gênero *Psychotria* tem como origem o amino ácido triptofano, sendo na sua maior parte, indol não-iridoidicos (não-monoterpênicos), com destaque no grupo dos triptamínicos (N, N-dimetiltriptamina, N-metiltriptamina), polindólicos (ou derivados metiltriptamínicos) (RIBEIRO, 2010).

Como exemplo, podemos citar que da espécie *P. bahiensis* foram isolados dois alcalóides inéditos com anéis indol-monoterpênicos, a bahienosida A e a bahienosida B (PAUL *et. al.*, 2003). Da espécie *P. umbellata* foi isolado o alcalóide Psychollatine (A), um alcalóide indólico monoterpênico glicosilado (KERBER *et. al.*, 2008), esse alcalóide apresentou atividade analgésica, ansiolítica, antidepressiva e antipsicótica em roedores, também foi comprovada sua atividade antioxidante e antimutagênica (FRAGOSO *et. al.*, 2008).



(A)

Dentre as muitas espécies do gênero *Psychotria* que ocorrem no cerrado goiano, podemos destacar *P. goyazensis* e *P. prunifolia*. A *P. goyazensis* é uma espécie ainda não estudada do ponto de vista fitoquímico. Esta espécie se encontra como arbusto, subarbusto e erva de 0,5-2,5m de altura, pouco ramificado, com caules cilíndricos, distribuída geograficamente no Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa e Brasil. No

Brasil, presente na Bacia Amazônica e no Bioma Cerrado, nos estados de Amazonas, Pará, Mato Grosso, Goiás e Tocantins (DELPRETE, 2010).

A espécie *P. prunifolia*, encontra-se como arbusto ou subarbusto de 0,5-2,0 m de altura, pouco ramificado e com caule cilíndrico, distribuída geograficamente na Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Bolívia e Brasil. No Brasil é encontrada desde a Bacia Amazônica até o sudeste, tendo como limite austral no estado de São Paulo (DELPRETE, 2010). Estudos anteriores realizados dessa espécie levaram ao isolamento, purificação e elucidação estrutural de alcalóides, além do estudo preliminar de atividade citotóxica e antitumoral do extrato etanólico bruto de suas folhas (FARIA *et. al.*, 2010).

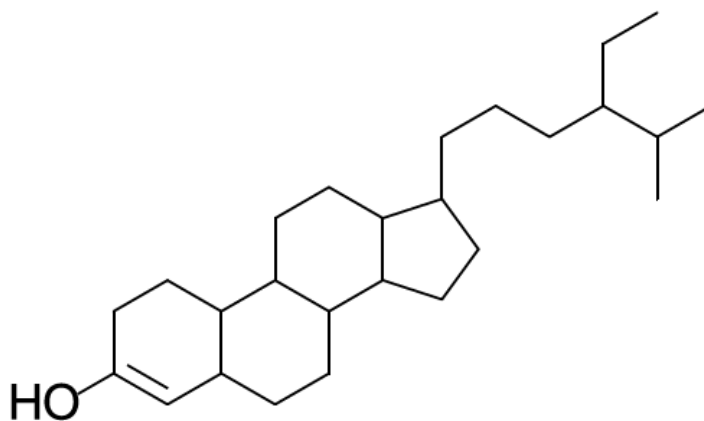
1.1. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo o estudo fitoquímico das folhas da espécie *P. goyazensis* com o isolamento e identificação de metabólitos secundários, e a continuidade do estudo fitoquímico do caule da espécie *P. prunifolia* com o isolamento de alcalóides já isolados anteriormente para estudos posteriores de atividades biológicas, assim como o estudo do perfil cromatográfico de suas frações por CLAE para posteriores separações em escala preparativa.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. *P. goyazensis*

A separação da fração hexânica das folhas de *P. goyazensis* por coluna cromatográfica (sílica gel-60) resultou no isolamento 96,1 mg do esteróide β -sitosterol (**1**), triterpeno comumente presente nas plantas, sua identificação foi feita através da comparação do RF (fator de retenção), em cromatografia de camada delgada, com o padrão previamente isolado.



(I) β -sitosterol

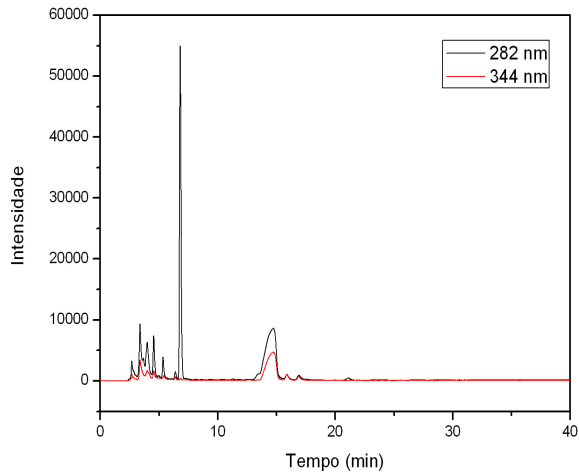
Do fracionamento por cromatografia em coluna da fração acetato não foram isolados metabólitos.

2.2. *P. prunifolia*

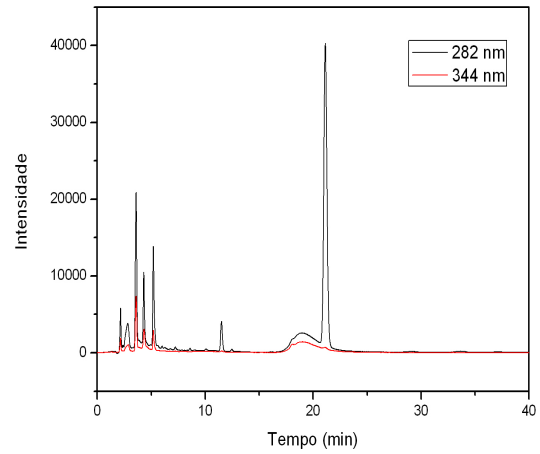
2.2.1. Coluna-1: perfis cromatográficos

A análise por espectroscopia de UV realizado na fração reunida 15 da Coluna-1 determinou que os comprimentos de onda de maior absorção da amostra foram em 282 e 344 nm.

Os cromatogramas obtidos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Figuras 1) da fração reunida 15 mostram que os dois sistemas eluentes (MeOH/H₂O, 70/30 e ACN/H₂O, 30/70) testados provêm uma boa separação entre os picos e ambos podem ser utilizados. Acredita-se que os picos com $t_r=6,5$ min. e 14 min. no cromatograma (I) e os picos com $t_r=19$ min. e 21 min. cromatograma (II) sejam os picos correspondentes aos alcalóides JRPP-12 e JRPP-13. O sistema MeOH/H₂O 70/30 foi escolhido por ser menos dispendioso e apresentar melhor resolução.



(I)

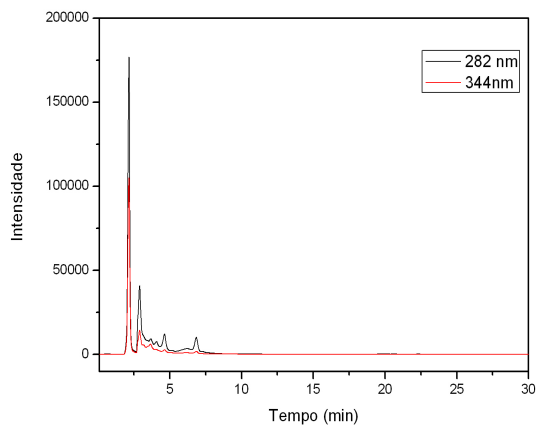


(II)

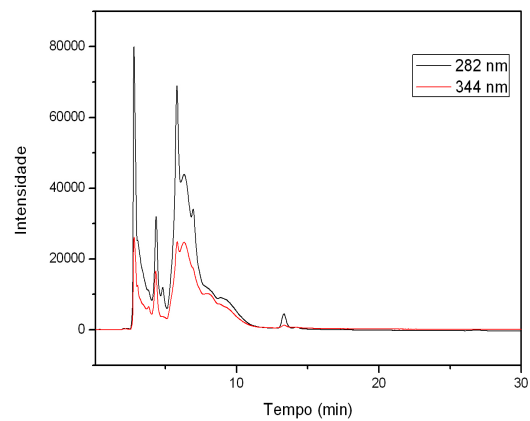
Figura 1: Cromatogramas da fração reunida 15. (I) MeOH/H₂O (70/30);
(II) ACN/H₂O (30/70).

A análise por CLAE das frações reunidas 13 e 14, usando o sistema eluente MeOH/H₂O (70/30) que apresentou uma boa resolução para os alcalóides, não foi eficiente pois as frações são mais complexas.

Um novo sistema eluente deve ser analisado.



(I)

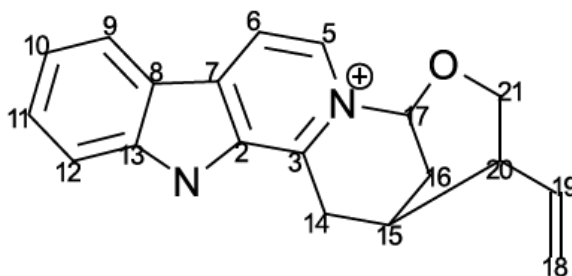


(II)

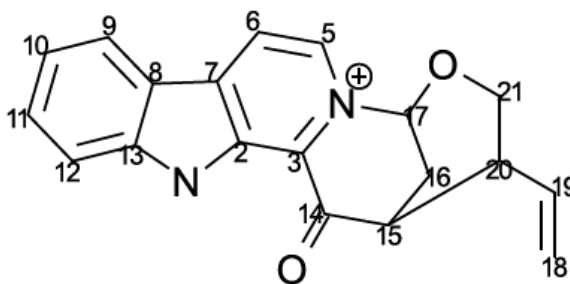
Figura 2: Cromatogramas das frações reunidas (I) 13 e (II) 14.

3.2.2. Coluna-2: Isolamento e identificação

A separação por coluna cromatográfica com sílica gel-60 do extrato bruto do caule de *P. prunifolia* resultou no isolamento de 15,3 mg do alcalóide JRPP-12 (**2**) e 19 mg do alcalóide JRPP-13 (**3**) que foram identificados com base em análises de RMN 1D e 2D comparados com os da literatura (FARIA, 2010).



(2) Alcalóide JRPP-12



(3) Alcalóide JRPP-13

O composto JRPP-12 (**2**) foi obtido como um sólido amarelo e apresentou reação positiva frente ao reagente Dragendorff observada em CCD. Os dados obtidos pelo espectro de RMN ¹H (Tabela 1) mostram deslocamentos e desdobramentos característicos de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, como δ_H 8,38 (d; J= 8,2 Hz) que está correlacionado com o C-9 em δ_C em 122,5. Ao C-10 (δ_C 122,1) é correlacionado o sinal δ_H 7,46 (tl; J= 8,2 Hz) e aos carbonos 11 e 12 (δ_C 112,7 e 131,9) são atribuídos os hidrogênios do multipeto em δ_H 7,79-7,83 (m). Outros dois sinais correspondentes à hidrogênios ligados a carbonos aromáticos aparecem em regiões mais desblindadas em 8,55 (d; J= 6,3 Hz) e 8,45 (d; J= 6,3 Hz) correlacionados aos carbonos C-5 (δ_C 116,2) e C-6 (δ_C 133,3), respectivamente

(Figura 3), são característicos de anel piridínico. A constante de 6,3 Hz (${}^2J_{H5-H6}$) é característica de acoplamento orto para este tipo de anel.

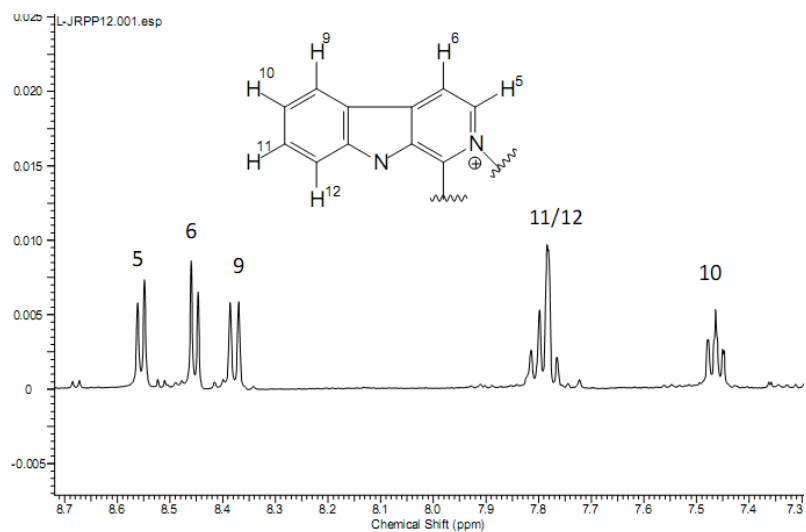


Figura 3: Expansão do espectro de RMN ${}^1\text{H}$ de JRPP-12 (7,3-8,7 ppm).

A unidade vinílica foi atribuída aos carbonos C-18 e C-19 pelo sinal de CH_2 mostrado no espectro de HSQC, tendo o C-18 (δ_{C} 117,2) correlação com os hidrogênios em δ_{H} 5,26 (d; $J= 10,7$ Hz) e δ_{H} 5,13 (d; $J= 17,6$ Hz) e o C-19 (δ_{C} 135,8) correlaciona-se com o hidrogênio em em δ_{H} 5,85 (ddd; $J= 17,6$ Hz; $10,7$ Hz ; $5,7$ Hz) (Figura 4).

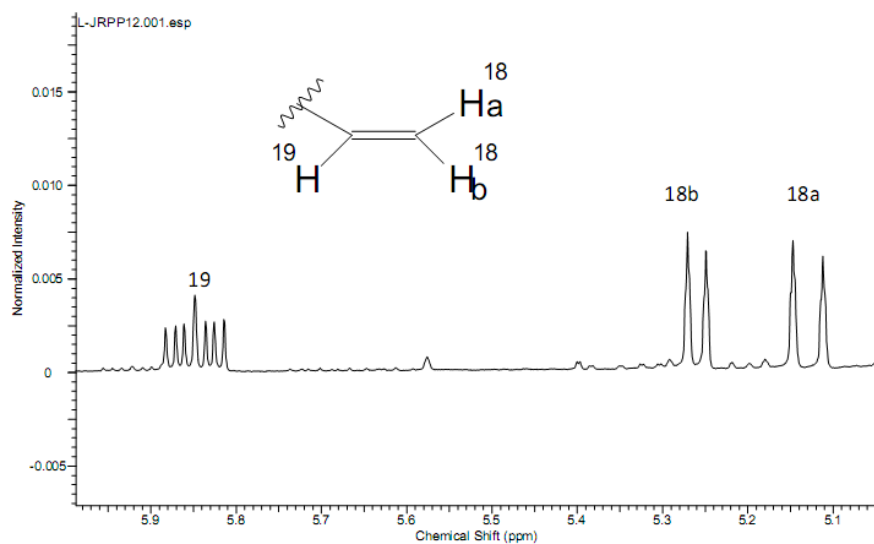


Figura 4: Expansão do espectro de RMN ${}^1\text{H}$ de JRPP-12 (5,1-6,0 ppm).

O sinal do C-17 em δ_C 86,8 correlacionado ao hidrogênio em δ_H 6,39 (sl) no espectro de HSQC (desblindado) sugere a presença da ligação N-C-O e é bem característico do esqueleto ofiorínico.

Os demais hidrogênios da estrutura ofiorínica foram atribuídos por comparação, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Dados de RMN ^1H e HSQC (500 MHz, MeOD/TMS) do composto JRPP-12.

Posição	DADOS OBSERVADOS		DADOS DA LITERATURA (FARIA, 2010)	
	δ_{H} (mult, J Hz, Int)	HSQC	δ_{H} (mult, J Hz, Int)	HSQC
5	8,55 (d;6,3;1H)	116,2	8,41 (d;6,6;1H)	116,0
6	8,45 (d;6,3;1H)	133,3	8,33 (d;6,6;1H)	132,5
9	8,38 (d;8,2;1H)	122,5	8,28 (d;8,1;1H)	122,8
10	7,46 (tl;8,2;1H)	122,1	7,48 (tl;8,1;1H)	122,4
11/12	7,79-7,83 (m)	112,7/131,9	7,76-7,91 (m)	113,2/132,2
14	3,75 (m;2H)	25,2	3,80 (m;2H)	24,8
15	2,76 (sl;1H) 2,52 (d;13,9;1H)	26,7	2,82 (sl;1H) 2,51 (d; 14,1;1H)	25,6
16	2,60 (d;13,9;2H)	29,6	2,62 (d; 14,1;2H)	29,7
17	6,39 (sl;1H)	86,8	6,33 (sl;1H)	86,7
18	5,26 (d;10,7;1H) 5,13 (d;17,6;1H)	117,2	5,28 (d;10,8;1H) 5,08 (d;17,4;1H)	117,9
19	5,85 (ddd;17,6;10,7,5,7;1H)	135,8	5,79 (ddd;17,4;10,8;5,1;1H)	19
20	2,97 (m)	41,1	2,97 (dl;12,3;1H)	41,2
21	3,88 (dd;12,6;5,1;1H) 3,09 (t;12,6;1H)	61,8	3,90 (dd;12,3;6,9;1H) 3,01 (t;12,3;1H)	61,9

O composto JRPP-13 (**3**) foi obtido como um sólido amarelo e apresentou reação positiva frente ao reagente Dragendorff observada em CCD.

Os espectros de RMN ^1H mostram os mesmos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos que no composto JRPP-12, porém, todos estão em regiões mais desblindadas do espectro de RMN ^1H , como δ_{H} 8,49 (d; J= 7,6 Hz) que está relacionado com o C-9 em δ_{C} 124,0. Ao C-10 (δ_{C} 123,5) é correlacionado o sinal δ_{H} 7,54 (t; J= 7,6 Hz) e aos carbonos 11 e 12 (δ_{C} 114,72 e 133,3) são atribuídos os hidrogênios do multiplete em δ_{H} 7,93-7,86 (m). Os sinais em 8,84 (d;J= 5,7 Hz) e 8,99 (d;J= 5,7 Hz) correlacionados aos carbonos C-5 (δ_{C} 134,3) e C-6 (δ_{C} 121,1), também sugere a presença de anel β -cabolínico (Figura 5).

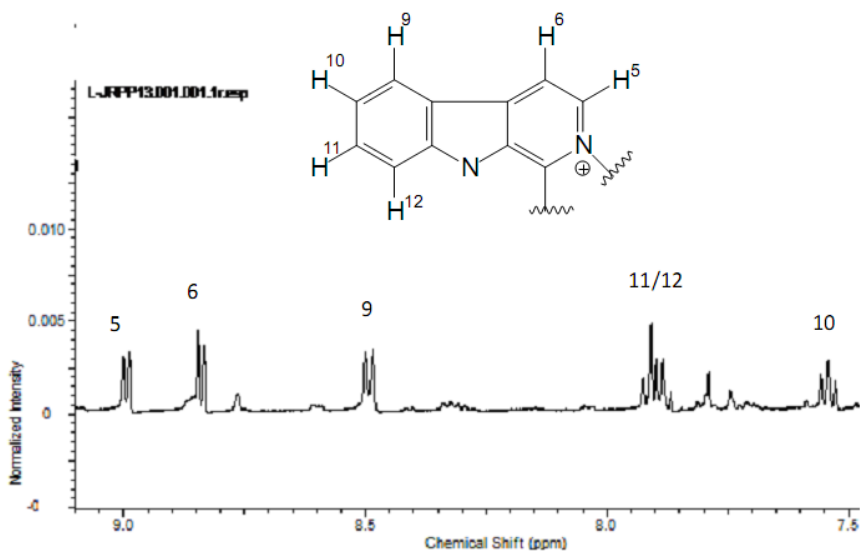


Figura 5: Expansão do espectro de RMN ¹H de JRPP-13 (7,5-9,1 ppm).

Assim como no composto JRPP-12 pode-se observar unidade vinílica, e esta foi atribuída aos carbonos C-18 e C-19 pelo sinal de CH₂ mostrado no espectro de HSQC, tendo o C-18 (δ_C 119,3) correlação com os hidrogênios em δ_H 5,24 (d; J= 16,4 Hz) e δ_H 5,20 (d; J= 13,4 Hz) e o C-19 (δ_C 133,8) correlaciona-se com o hidrogênio em em δ_H 5,85 (ddd; J= 17,1 Hz; 11,4 Hz ; 7,6 Hz).

Também o sinal do C-17 em δ_C 88,2 correlacionado ao hidrogênio em δ_H 6,67 (sl) no espectro de HSQC, em campo baixo, sugere a presença da ligação N-C-O.

A mudança dos deslocamentos em comparação com o composto JRPP-12, sugere-se que ns C-14 tem-se uma carbonila. A ausência de um carbono CH sp³ correlacionado em δ_H 3,5 e a comparação com os dados já descritos (FARIA, 2010) permitiu a identificação do composto JRPP-13 como a estrutura **(3)**.

Tabela 2: Dados de RMN ¹H e HSQC (500 MHz, MeOD/TMS) do composto JRPP-13.

Posição	DADOS OBSERVADOS		DADOS DA LITERATURA (FARIA, 2010)	
	δ H (mult, J Hz, Int)	HSQC	δ H (mult, J Hz, Int)	HSQC
5	8,84 (d;5,7;1H)	134,3	8,89 (d;6,0;1H)	134,1
6	8,99 (d;5,7;1H)	121,1	8,92 (d;6,0;1H)	120,6
9	8,49 (d;7,6;1H)	124,0	8,43 (d;8,0;1H)	123,6
10	7,54 (t;7,6;1H)	123,5	7,57 (td;3,0;8,0;1H)	123,4
11/12	7,93-7,86 (m;2H)	114,2/133,3	7,94-7,88 (m)	113,7/137,2
15	3,3 2,81 (d;13,9;1H)	42,6	3,36 (sl;1H) 2,82 (d; 14,0;1H)	42,8
16	3,03 (dt;13,9;2,5;2H)	28,4	3,05 (d; 14,0;2H)	29,7
17	6,67 (sl;1H)	88,2	6,76 (sl;1H)	87,9
18	5,20 (d;13,4;1H) 5,24 (d;16,4;1H)	119,3	5,25 (d;11,0;1H) 5,22 (d;17,0;1H)	118,9
19	5,69 (ddd;17,1;11,4;7,6;1H)	133,8	5,65 (ddd;17,0;11,0;6,9;1H)	132,8
20	3,21 (sl;1H)	42,1	3,20 (sl;1H)	42,0
21	4,17 (d;7,9;1H)		3,20 (d;7,8;1H) 4,02 (d;7,8;1H)	63,4

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. *P. goyazensis*

As folhas de *P. goyazensis* foram coletadas no município de Pirenópolis, santuário de vida silvestre Vagafogo, identificado pelo Prof. Dr. Pierro Delprete. Foram secas em estufa e moídas (781,5 g). Seu extrato foi preparado com etanol 95% por percolação e concentrado com a evaporação do solvente sob vácuo (44,597g).

O extrato etanólico das folhas foi submetido a uma partição com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se as frações hexânicas (8,6948g), acetato (4,7566g) e metanólica (31,765g).

2,045 g da fração hexânica e 1,048g da fração acetato foram submetidas à separações por coluna cromatográfica com sílica gel 60, utilizando-se como eluentes: hexano, diclorometano e metanol (destilados) em diferentes proporções e ordem crescente de polaridade, obtendo-se, respectivamente, 122 e 88 frações que foram reunidas em 18 e 29 frações por semelhança acompanhada com CCD.

Da fração reunida 7 foram obtidos cristais, que foram lavados com hexano e recristalizados e, acetato de etila, fez-se a solubilização e a solução foi aplicada em uma placa de CCD (cromatografia em camada delgada) juntamente com padrões de β -sitosterol, sitosterol glicosilado e ácido ursólico, tendo a amostra o mesmo RF do padrão de sitosterol (1).

3.2. *P. prunifolia*

O caule de *P. prunifolia* foi coletado no município de Goiânia, o bosque Saint-Hilaire, identificado pelo Prof. Dr. Pierro Delprete, depositado no herbário da Universidade Federal de Goiás, com código Delprete10323. Este caule foi seco em estufa e moído. Seu extrato foi preparado com etanol 95% por percolação e concentrado com a evaporação do solvente sob vácuo.

Do extrato bruto foram realizadas duas separações por coluna cromatográfica utilizando-se hexano, diclorometano e metanol (destilados), como eluentes, em fase crescente de polaridade. Essas colunas foram nomeadas como Coluna-1 (1,06g) e Coluna-2 (0,9944 g) respectivamente.

3.2.1. Coluna-1

Na separação pela Coluna-1 foram coletadas 90 frações que foram analisadas por CCD e reunidas em novas 25 frações por semelhança de polaridade.

Da fração 15, que se mostrou mais pura em CCD, foi preparada uma solução de 0,04 mg/mL. Um espectro de absorção atômica na região do Ultravioleta (UV) foi obtido dessa solução com o objetivo de se escolher os melhores comprimentos de onda para a detecção no CLAE, esse espectro foi obtido em um espectrômetro UV/Vis Perkin Elmer – Lambda 45.

A fração reunida 15 foi analisada por CLAE em um cromatógrafo do Shimadzu CBM-20A por escala analítica, com detector do tipo UV da Shimadzu SPD-20A e comprimentos de onda de 282 e 344 nm, com vazão de 1 mL/min, bomba isocr e injeção de 20 µL, fases móveis MeOH/H₂O 70/30 e Acetonitrila/H₂O 30/70 (sendo todos os solventes com grau de pureza CLAE e H₂O deionizada).

A análise das frações reunidas 13 e 14 foi realizada nas mesmas condições anteriores, mas com somente uma fase móvel (MeOH/H₂O 70/30), com o objetivo de obter-se perfis cromatográficos desses compostos para posteriores separações em escala preparativa.

3.2.2. Coluna-2

Na separação pela Coluna-2 foram coletadas 124 frações. A separação foi acompanhada por CCD e as frações semelhantes foram reunidas. As frações reunidas 26-30 e 37-42 se mostraram puras com reação positiva frente ao reagente Dragendorff, sendo estas nomeadas JRPP-12 e JRPP-13.

As frações JRPP-12 e JRPP-13 foram analisadas por RMN ¹H e HSQC em um espectrômetro Bruker 500 MHz (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C) com solvente MeOD/TMS.

4. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das folhas da espécie *P. goyazensis* resultou no isolamento do esteróide β-sitosterol (**1**).

O estudo fitoquímico do caule da espécie *P. prunifolia* permitiu a identificação dos alcalóides isolados (**2**) e (**3**), pela comparação dos dados espectrais de RMN 1D e 2D com dados já registrados na literatura, e esses alcalóides serão posteriormente submetidos a ensaios de bioatividade. Dessa mesma espécie também foram obtidos os perfis cromatográficos (CLAE) de suas frações para posteriores separações em escala preparativa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DELPRETE, P. G.; Sinopse dos gêneros de Rubiaceae do Brasil. 49º Congresso Nacional de botânica (26 julho – 1 de agosto), Resumos, Salvador-BA, p. 85-86, 1998.

DELPRETE, P. G.; Flora dos estados de Goiás e Tocantins; Goiânia, 2010. (Rubiaceae, V. 40).

DELPRETE, P. G.; N. P.; S. V. Heald; A. Henderson; S. A. Mori; D. W. Stevenson; Rubiaceae, Flowering Plant Families of the American Tropics; Ed. Princeton University Press. New York Botanical Garden Press. 2004.

FARIA, E. O.; KATO, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; CARVALHO, B. G.; SILVA, C.C.; SALES, L. S.; SCHUQUEL, I. T. A.; LACERDA, E. P. S.; DELPRETE, P. G.; Quaternary β -carbonile alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyern. **Phytochemistry letters**, v. 132, p. 113 – 116, 2010.

FARIAS, F. M.; *Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica sobre o sistema nervoso central. Porto Alegre, 2006. Dissertação de mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FRAGOSO, V. ; DO NASCIMENTO, N. C..MOURA D. J.; SILVA, A. C. R.; RICHTER, M. F., SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G.; Antioxidant e antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicologic in vitro**. V 22, p. 559-566, 2008.

KERBER, V. A.; PASSOS, C. S.; VERLI, H.; FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J. P.; HENRIQUES, A. T.; Psychollate, a glucosidic monoterpene indole alkaloid from *Psychotria umbellata*. **Journal of Natural Products**. V. 70, p. 697-700, 2008.

MONGRAND, S.; BADOUC, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M. ; BESSOULE, J. J. ; Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, v. 66, p.549-559, 2005.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYSTMA, K. J.; Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae) Inferred from ITS and rbcL Dequece Data. **Syst. Bot.**, v. 24, p. 5-27, 1999.

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

RIBEIRO, L. C.; Metabólitos secundários obtidos através do estudo das raízes de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm (Rubiaceae), transformações e ensaios biológicos de seu extrato. Goiânia, 2010. Dissertação de mestrado-Universidade Federal de Goiás.