



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES E SÍNTESE DE FLAVONOIDES  
ENCONTRADOS EM *Poincianella pyramidalis* (FABACEAE) E  
ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* (MALVACEAE)

**JOSÉ CÂNDIDO SELVA DE OLIVEIRA**

Salvador

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**JOSÉ CÂNDIDO SELVA DE OLIVEIRA**

ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES E SÍNTESE DE FLAVONOIDES  
ENCONTRADOS EM *Poincianella pyramidalis* (FABACEAE) E  
ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* (MALVACEAE)

**Prof. Dr. Jorge Maurício David**

**Orientador**

Tese submetida ao colegiado do curso de Pós-graduação em Química da UFBA para obtenção do grau de Doutor em Química.

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Oliveira, José Cândido Selva de.

Isolamento de constituintes e síntese de flavonoides encontrados em *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae) e análise fitoquímica de *Theobroma cacao* (Malvaceae). / José Cândido Selva de Oliveira. - 2014.

170 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2014.

1. Produtos naturais. 2. Flavonoides. 3. Fitoquímica. 4. *Poincianella pyramidalis* 5. Leguminosa. 6. *Theobroma cacao*. David, Jorge Maurício. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD - 583.32

CDU - 547.9

**JOSÉ CÂNDIDO SELVA DE OLIVEIRA**

ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES E SÍNTESE DE FLAVONOIDES  
ENCONTRADOS EM *Poincianella pyramidalis* (FABACEAE) E  
ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* (MALVACEAE).

Tese submetida ao colegiado do curso de Pós-  
graduação em Química da UFBA para obtenção  
do grau de Doutor em Química.

**Aprovada em: 07/03/2014**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. ADEMIR EVANGELISTA DO VALE (UFBA)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LUCIANA LUCAS MACHADO (UFOB)**

---

**Prof. Dr. SILVIO DO DESTERRO CUNHA (UFBA)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. JUCENI PEREIRA DAVID (UFBA)**

---

**Prof. Dr. JORGE MAURICIO DAVID (UFBA)**

**Orientador**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados filhos José Luiz S. S. de Oliveira e Maria Cândida S. S. de Oliveira pelos diversos momentos de alegria proporcionados e por serem a minha principal fonte de energia e inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha amada e querida esposa Lourinalda Luiza D. S. S. de Oliveira pela confiança, companheirismo, compreensão e incentivo durante essa jornada.

Aos nossos filhos Matheus Luiz S. Greenburg, José Luiz S. S. de Oliveira e Maria Cândida S. S. de Oliveira pelos momentos de alegria proporcionada.

A minha mãe Miriam S. C. Leão que sempre me ajudou e aconselhou nos momentos mais difíceis e que tem me incentivado nas minhas batalhas pessoais e profissionais.

A meus irmãos Edwirges S. C. Leão, Edmar C. Leão Filho e Juliana S. C. Leão pela força e incentivo nesta caminhada.

Ao professor Dr. Jorge M. David pela amizade, orientação, apoio, incentivo e dedicação para meu desenvolvimento técnico e científico ao longo deste período.

Ao professor Dr. Marcelo S. da Silva e o técnico do LTF/UFPB Vicente C. de Oliveira pela amizade e obtenção de espectros de RMN - 1 D e 2 D.

Aos colegas de laboratório 110, Bruno Oliveira, Iblize (Bel), Darlan Coutinho, Rauldenis Almeida, Larissa Cavalcante, Larissa Pinto, Patrícia Assis, Clayton Queiroz, Mariluze Cruz, Edlene, André, Fábio, Eliezer Barreto, Maysa, Daiana, Miúcha, Dayse Cassiano, Klauber, Vanessa, Sobral e Amanda.

Os colegas Nélio, Cristiano, Deivison, Karioca e Cleiton pelo apoio e companhia nos momentos mais brutais dos ensaios do Blast Agony e Defunthosed.

Aos professores que acompanharam meu desenvolvimento acadêmico ao longo desta jornada, Dr. Frederico G. Cruz, Dr. Silvio D. Cunha, Dr. Mauricio M. Victor e Dr<sup>a</sup>. Valeria B. Riatto do IQ-UFBA e Dr<sup>a</sup>. Juceni P. David FF-UFBA.

Ao CNPq e CAPES pela concessão das bolsas de Mestrado e Doutorado, respectivamente.

***José Cândido S. Oliveira***

## RESUMO

Os extratos MeOH de *Poincinella pyramidalis* (caatingueira), obtidas da casca da raiz (PPCR) e das flores (PPF), bem como, as frações orgânicas obtidas por partição, foram submetidas a testes de atividade citotóxica, antioxidante e anticolinesterásica. O teste citotóxico contra *Artemia salina* revelou atividade moderada para fase AcOEt em PPCR. Assim como, a fase AcOEt de PPCR apresentou 75% de inibição no teste anticolinesterásico. Para a atividade antioxidante, as fase AcOEt e BuOH de PPF foi a mais ativa, sendo atribuída a presença de galato de metila (**PPF3**). Por meio de processos cromatográficos foi possível isolar da fase DCM de PPF as substâncias **PPF1** (alcoóis graxos), **PPF2a-b** ( $\beta$ -sitosterol/estigmasterol), **PPF3** (galato de metila) e **PPF4** ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirina). Além dessas, foram isoladas da fase hexano de PPCR ésteres metílicos (**PPCR1**) e o biflavonoide 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona-6 $\alpha$ -2''',4'''-dihidroxi-4''-metoxidihidrochalcona (**PPCR3**). Da fase hidroMeOH de PPCR foram isoladas as substâncias **PPCR2** (ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo) e outro biflavonoide **PPCR4** (5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3 $\alpha$ -2'''-hidroxi-4''',4''-dimetoxidihidrochalcona). Sendo **PPCR3** e **PPCR4** inéditas na literatura. O extrato hexano de *Theobroma cacao* (cacau) obtido das sementes (STC) foi analisado por RMN e revelou presença de triacilglicerídeos. A otimização e fracionamento do extrato MeOH de *T. cacao* utilizando CCC levou ao isolamento simultâneo de teobromina (**2**), teofilina (**3**) e cafeína (**4**), fase móvel hexano:AcOEt (2:3) e estacionária MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1). Um método analítico foi desenvolvido empregando HPLC/DAD com coluna fase reversa C-18 para a quantificação de **2**, **3** e **4** nos extrativos em fase ácida/básica e nas frações **STC6-22** e **STC23-67** obtidas por CCC. Assim, os teores de **2** e **4** para no extrato MeOH de *T. cacao* e frações obtidas por CCC foram determinados. A teofilina (**3**) detectada e quantificada na fração **STC6-22** em baixa concentração (0,78 mg/g) em relação a **2** e **4**. A apigenina (**6**) foi sintetizada utilizando dois métodos distintos ("A" e "B"). O método "B" apresentou rendimento de 74% em uma única etapa. A síntese de derivados *O*-metilados forneceu bons rendimentos (> 90%). As substâncias isoladas/sintetizadas foram submetidas à atividade anticolinesterásica do qual, são inativas. As mesmas foram elucidadas a partir de dados de IV, UV, EM,  $\alpha$ [D], RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (BB e APT), RMN de correlação (HMQC, HSQC e HMBC).

**Palavras-chave:** *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Flavonoides*, *Biflavonoides*, *Metilxantinas*.

## ABSTRACT

The MeOH extracts from *Poincinella pyramidalis* (caatingueira), obtained of bark root (PPCR) and flowers (PPF), as well the organic fractions obtained by partition, have been tested for cytotoxicity, antioxidant and anticholinesterasic activity. The cytotoxic test against *Artemia salina* showed moderate activity for AcOEt phase in PPCR. Well the EtOAc phase of PPCR showed 75% inhibition on anticholinesterasic test. For the antioxidant activity, the EtOAc and BuOH phase of PPF was the most active, being attributed to the presence of methyl gallate (**PPF3**). For chromatographic process was possible to isolate the DCM phase of PPF the substances **PPF1** (fatty alcohols), **PPF2a-b** ( $\beta$ -sitosterol/stigmasterol), **PPF3** (methyl galate) and **PPF4** ( $\alpha$ - and  $\beta$ -amirin). Besides these, were isolated from the hexane phase PPCR methyl esters (**PPCR1**) and the biflavonoid 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone-6 $\alpha$ -2''',4'''-dihydroxy-4''-methoxy dihydrochalcone (**PPCR3**). The HidroMeOH phase of PPCR were the isolated substances **PPCR2** (3,3'-dimethoxy-4-hydroxyellagicacid-4'- $\beta$ -D-xylopiranoside) and other biflavonoid **PPCR4** (5-hidroxy-7,4'-dimethoxyflavone-3 $\alpha$ -2'''-hidroxy-4''',4''-dimethoxydihydrochalcone). Being **PPCR3** and **PPCR4** unpublished in literature. Hexane extract of *Theobroma cacao* (cacau) obtained from the seeds (STC) was analyzed by NMR and revealed the presence of triacylglycerides. The optimization and fractionation of MeOH extract of *T. cacao* using CCC led to the simultaneous isolation of theobromine (**2**) Theophylline (**3**) and caffeine (**4**), mobile phase hexane:EtOAc (2:3) and stationary MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1). An analytical method was developed employing HPLC/DAD with reverse phase column C-18 for the measurement of **2**, **3** and **4** in the extractives acid/base phase and the **STC6-22** and **STC23-67** fractions obtained by CCC. So, the levels of **2** and **4** for the MeOH extract of *T. cacao* and fractions obtained by CCC were determined. Theophylline (**3**) detected and quantified in the fraction **STC6-22** low concentration (0.78 mg/g) in relation the **2** and **4**. Apigenin (**6**) was synthesized using two different methods ("A" and "B"). The method "B" had a yield of 74% in one step. The synthesis of *O*-methylated derivatives provided good yields (> 90%). The isolated/synthesized substances were submitted to anticholinesterasic activity which are inactive. The same were elucidated from data of IR, UV, MS,  $\alpha$ [D], <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (BB and APT) NMR correlation (HMQC, HSQC and HMBC).

**Keywords:** *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Flavonoids*, *Biflavonoids*, *Methylxanthines*.

## SUMÁRIO

CAPITULO 1 - Estudo químico <i>Poincianella pyramidalis</i> .....	18
1 - INTRODUÇÃO .....	18
1.1 - Química de Produtos Naturais.....	18
1.2 - Família Fabaceae.....	19
1.3 - Subfamília Caesalpinoideae .....	20
1.4 - Descrição botânica de <i>P. pyramidalis</i> .....	20
1.5 - Características gerais de <i>P. pyramidalis</i> .....	20
1.6 - Substâncias isoladas de <i>P. pyramidalis</i> .....	22
1.7 - Aspectos gerais sobre os biflavonoides.....	24
2 - OBJETIVOS .....	26
2.1 - Gerais .....	26
2.2 - Específicos.....	26
3 - EXPERIMENTAL .....	27
3.1 - Coleta de material para estudo químico .....	27
3.2 - Análises espectroscópicas .....	29
3.2.1 - Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis).....	29
3.2.2 - Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	29
3.2.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	29
3.2.4 - Medida de Rotação Ótica Especifica .....	29
3.3 - Análises espectrométricas.....	30
3.3.1 - Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatográfica Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).....	30
3.3.2 - Eletron Spray Ionization – Microtof (ESI/EM).....	30
3.4 - Análises de outra natureza .....	31
3.4.1 - Ponto de fusão (PF) .....	31
3.4.2 - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) .....	31
3.5 - Testes biológicos e bioquímicos.....	31
3.5.1 - Teste citotóxico contra <i>Artemia salina</i> .....	31
3.5.2 - Seqüestro de Radical Livre (SRL) DPPH .....	32
3.5.3 - Atividade anticolinesterásica.....	33
3.6 - Realização dos experimentos.....	33
3.7 - Isolamento das substâncias presentes nas flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	33
3.7.1 - Alcoóis graxos .....	33
3.7.2 - $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.....	34
3.7.3 - Galato de metila.....	35
3.7.4 - $\alpha$ - e $\beta$ -amirina.....	36
3.8 - Isolamento das substâncias presentes na casca da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	38
3.8.1 - Ésteres metílicos derivados de ácidos graxos.....	38
3.8.2 - Derivado do ácido elagico glicosilado.....	38
3.8.3 - Biflavonoide PPCR3.....	41
3.8.4 - Biflavonoide PPCR4.....	41
4 - RESULTADOS E DISCUSÃO .....	44
4.1 - Rendimento dos extratos .....	44
4.2 - Atividades biológicas e bioquímicas .....	44
4.2.1 - Letalidade contra <i>Artemia salina</i> .....	44
4.2.2 - Teste do seqüestro do radical livre DPPH .....	45
4.2.3 - Atividade anticolinesterásica.....	47
4.3 - Elucidação estrutural das substâncias isoladas nas flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	48

4.3.1 - Identificação dos alcoóis graxos (PPF1) .....	48
4.3.2 - Identificação de esteróides (PPF2a-b) .....	56
4.3.3 - Identificação do galato de metila (PPF3) .....	58
4.3.4 - Identificação da $\alpha$ - e $\beta$ -amirina (PPF4a-b) em mistura .....	62
4.4 - Elucidação estrutural das substâncias isoladas na casca da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	65
4.4.1 - Identificação dos ésteres metílicos derivados de ácidos graxos .....	65
4.4.2 - Identificação do ácido Ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PPCR2).....	70
4.4.3 - Elucidação estrutural do biflavonoide PPCR3.....	80
4.4.4 - Elucidação estrutural do biflavonoide PPCR4.....	89
5 - CONCLUSÃO .....	97
6 - REFERÊNCIAS .....	98
CAPITULO 2 - Estudo químico <i>Theobroma cacao</i> .....	104
1 - INTRODUÇÃO .....	104
1.1 - Família Malvaceae.....	104
1.2 - Subfamília Sterculiaceae .....	104
1.3 - A espécie <i>Theobroma cacao</i> .....	105
2 - OBJETIVOS .....	109
2.1. Gerais.....	109
2.2. Específicos .....	109
3 - EXPERIMENTAL .....	110
3.1 - Coleta da amostra e preparação dos extratos.....	110
3.2 - Construção da curva padrão.....	110
3.3 - Preparação das amostras para análise por HPLC e CCC .....	111
3.4 - Extração ácido/base dos Alcaloides (Metilxantinas).....	111
3.5 - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) .....	113
3.6 - Cromatografia em Contra-Corrente (CCC).....	114
3.7 - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).....	116
3.8 - Realização dos experimentos.....	116
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	117
4.1 - Caracterização do extrato hexânico das sementes de <i>T. cacao</i> .....	117
4.2 - Quantificação das metilxantinas.....	122
5 - CONCLUSÃO .....	127
6 - REFERÊNCIAS .....	128
CAPITULO 3 - Síntese de flavonoides e derivados.....	130
1 - INTRODUÇÃO .....	130
1.1 - Aspectos gerais sobre flavonoides.....	130
1.2 - Importância dos flavonoides .....	131
2 - OBJETIVOS .....	136
2.1 - Gerais .....	136
2.2 - Específicos .....	136
3 - EXPERIMENTAL .....	137
3.1 - Realização dos experimentos.....	137
3.2 - Análises espectroscópicas .....	138
3.2.1 - Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis).....	138
3.2.2 - Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	138
3.2.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	138
3.3 - Análises de outra natureza .....	138
3.3.1 - Ponto de fusão (PF) .....	138

3.3.2 - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) .....	138
3.4 - Análise retrosintética para síntese dos flavonoides.....	138
3.5 - Síntese de flavona - Apigenina (6).....	140
3.5.1 - Método “A” .....	140
3.5.2 - Método “B” .....	142
3.6 - Reação de permetilação .....	142
3.7 - Síntese de derivados em flavonoides naturais .....	142
3.7.1 - Hidrólise da hesperidina (52) .....	143
3.7.2 - Metilação de 4'-metoxi-5, 7, 3'-hidroxiflavona (53) .....	144
3.7.3 - Iodação de 3', 4', 7-metoxi-5-hidroxiflavona (56) .....	145
4 - RESULTADOS E DISCUSÃO .....	146
4.1 - Elucidação estrutural do halocetoareno (42), apigenina (6) e derivados .....	146
4.2 - Síntese de outros halocetoarenos .....	156
4.3 - Síntese de derivados permetilados em flavonoides.....	157
5 - CONCLUSÕES.....	167
6 - REFERENCIAS .....	168

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>P. pyramidalis</i> : A - espécie <i>in natura</i> e B - inflorescências objeto de estudo .....	21
Figura 2. Distribuição geográfica da espécie <i>P. pyramidalis</i> .....	21
Figura 3. Substâncias isoladas das folhas de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> ( <i>P. pyramidalis</i> ) .....	22
Figura 4. Substâncias isoladas do caule de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> ( <i>P. pyramidalis</i> ) .....	23
Figura 5. Substâncias isoladas da casca da raiz de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> ( <i>P. pyramidalis</i> ) .....	23
Figura 6. Alguns biflavonoides de ocorrência mais comuns .....	24
Figura 7. Diferentes sub-classes de biflavonoides: A – bisflavonoide e B/C – biflavonoide ..	25
Figura 8. Mapa do Brasil com ampliação do bioma Caatinga demarcando as duas áreas de coletas .....	27
Figura 9. Estrutura do 1,2-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) .....	32
Figura 10. Marcha química realizada no isolamento das substâncias identificadas no extrato MeOH bruto das flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	37
Figura 11. Marcha química realizada no isolamento das substâncias identificadas no extrato MeOH bruto das casca da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	43
Figura 12. AA do padrão e das fases orgânicas das cascas das raízes de <i>P. pyramidalis</i> .....	46
Figura 13. AA do padrão e das fases orgânicas das flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	46
Figura 14. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância PPF1 .....	48
Figura 15. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância PPF1 .....	49
Figura 16. Reação de silição em alcoóis. R = cadeia aquilica .....	50
Figura 17. Cromatograma de íons totais da mistura de alcoóis graxos na amostra PPF1 .....	50
Figura 18. EM dos alcoóis graxos registrados no CG ( $\text{C}_{22}$ - $\text{C}_{32}$ ) .....	53
Figura 19. Fragmentações do derivado siliado do Docosan-1-ol .....	54
Figura 20. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura PPF2a e PPF2b isolada na fase DCM das flores de <i>P. Pyramidalis</i> .....	56
Figura 21. Estrutura química do sitosterol (PPF2a) e estigmasterol (PPF2b) isolados em mistura .....	57
Figura 22. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de PPF3 isolada das flores de <i>P. Pyramidalis</i> .....	58
Figura 23. Estrutura química do galato de metila (PPF3) .....	59
Figura 24. Cromatograma obtido por HPLC de PPF3 .....	59
Figura 25. Espectro no UV de PPF3 .....	60
Figura 26. Cromatograma obtido por HPLC do galato de metila ( <i>S. brasiliensis</i> ) .....	60
Figura 27. Espectro no UV do galato de metila ( <i>S. brasiliensis</i> ) .....	61
Figura 28. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura PPF4a e PPF4b .....	62
Figura 29. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura PPF4a e PPF4b .....	62
Figura 30. Estrutura química da $\beta$ -amirina (PPF4) .....	63
Figura 31. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de ésteres metílicos de PPCR1 .....	65
Figura 32. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do oleato de metila *SDBS - No. 8872HSP-00-604 .....	66
Figura 33. Cromatograma da mistura de ésteres metílicos de PPCR1 .....	67
Figura 34. Ésteres metílicos derivados de ácidos graxos identificados por CG/EM de PPCR1 .....	67
Figura 35. EM 70 eV de (PPCR1-a) – tetradecanoato de metila MS = 242 .....	68
Figura 36. EM 70 eV de (PPCR1-b) – hexadecanoato de metila MS = 270 .....	68
Figura 37. EM 70 eV de (PPCR1-c) – oleato de metila MS = 296 .....	69
Figura 38. EM 70 eV de (PPCR1-d) – octadecanoato de metila MS = 298 .....	69
Figura 39. Cromatograma obtido por HPLC da substância PPCR2 TR = 6 min .....	70
Figura 40. Espectro no UV da substância PPCR2 .....	70

Figura 41. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{DMSO}_{d-6}$ ) da substância PPCR2.....	71
Figura 42. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB e APT (75 MHz, $\text{DMSO}_{d-6}$ ) da substância PPCR2..	72
Figura 43. Espectro no IV em pastilha de KBr da substância PPCR2 .....	73
Figura 44. Espectro completo de gHMQC da substância PPCR2.....	73
Figura 45. Ampliação do espectro de gHMQC da substância PPCR2.....	74
Figura 46. Estrutura química do ácido elágico .....	74
Figura 47. Espectro completo de gHMBC da substância PPCR2 .....	75
Figura 48. Ampliação do espectro de gHMBC da substância PPCR2.....	75
Figura 49. Correlações observadas no gHMBC da substância PPCR2.....	76
Figura 50. Espectro completo de NOESY da substância PPCR2.....	76
Figura 51. Ampliação do espectro de NOESY da substância PPCR2.....	77
Figura 52. EM de alta resolução da substância PPCR2.....	77
Figura 53. Estrutura do ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielágico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosídeo .....	78
Figura 54. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ completo (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PPCR3.....	80
Figura 55. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ - APT completo (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PPCR3.....	81
Figura 56. Espectro de gHMQC completo da substância PPCR3.....	82
Figura 57. Espectro de gHMBC completo da substância PPCR3 .....	83
Figura 58. Correlações observadas no espectro de gHMBC da substância PPCR3.....	83
Figura 59. Proposta inicial para substância PPCR3. ....	84
Figura 60. Espectro no UV da substância PPCR3.....	85
Figura 61. Espectro no UV da substância PPCR3 (azul); adição de $\text{AlCl}_3$ (verde) e com adição de $\text{HCl}$ (vermelho).....	85
Figura 62. Espectro no UV da substância PPCR3 (preto); adição de $\text{AcONa}$ (vermelho) e após 5 minutos (vermelho) .....	86
Figura 63. Espectro no UV da substância PPCR3 (vermelho); adição de $\text{NaOMe}$ (verde) e após 5 minutos (verde) .....	86
Figura 64. EM no modo de impacto de elétrons 70 eV da substância PPCR3.....	87
Figura 65. Fragmentações observadas no EM da substância PPCR3. ....	87
Figura 66. Espectro no IV da substância PPCR3 .....	88
Figura 67. Espectro no IV da substância CRCP7 .....	88
Figura 68. Estrutura química da substância PPCR3 .....	88
Figura 69. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância PPCR4.....	89
Figura 70. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ - APT (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância PPCR4 .....	90
Figura 71. Espectro de gHSQC completo da substância PPCR4 .....	91
Figura 72. Espectro de gHMBC completo da substância PPCR4.....	92
Figura 73. Correlações observadas no gHMBC para substância PPCR4.....	94
Figura 74. Espectro no IV em pastilha de KBr da substância PPCR4 .....	94
Figura 75. Espectro no UV da substância PPCR4.....	95
Figura 76. EM de alta resolução da substância PPCR4.....	95
Figura 77. Estrutura da substância PPCR4 (F.M. = $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{O}_9$ ).....	96
Figura 78. Fruto da espécie <i>Theobroma cacao</i> .....	105
Figura 79. Distribuição geográfica da espécie <i>T. cacao</i> .....	106
Figura 80. Sintomas da vassoura de bruxa em frutos do cacau.....	106
Figura 81. Estrutura química dos alcaloides: teobromina (2), teofilina (3) e cafeína (4).....	107
Figura 82. Fruto de <i>T. cacao</i> . Foto: Prof. Dra. Mariluze P. Cruz (UFBA) .....	110
Figura 83. A: Cromatograma dos padrões de metilxantinas e B: Cromatograma bidimensional relacionado com espectro no UV.....	113
Figura 84. Procedimento inicial antes de usar o CCC, A e B são as duas fases orgânicas imiscíveis.....	114

Figura 85. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do extrato hexânico bruto das sementes de cacau.....	117
Figura 86. Designações dos principais sinais observados no RMN de $^1\text{H}$ .....	118
Figura 87. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do extrato hexânico bruto das sementes de cacau .....	118
Figura 88. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto obtido do extrato hexânico das sementes de cacau .....	119
Figura 89. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto obtido do extrato hexânico bruto das sementes de cacau.....	119
Figura 90. Cromatograma da CG dos ésteres metílicos das sementes de cacau .....	120
Figura 91. Espectros de massas dos ésteres metílicos identificados (1a-c).....	121
Figura 92. Substâncias TCS1a-c extraídas inicialmente na forma de triacilglicerídeos .....	121
Figura 93. Cromatograma do extrato MeOH bruto das sementes de <i>T. cacao</i> . O pico 1 = substância (2) e pico 3 = substância (4).....	122
Figura 94. Cromatograma da extração em fase ácida.....	123
Figura 95. Cromatograma da extração em fase básica .....	124
Figura 96. Cromatograma da fração STC 6-22 .....	125
Figura 97. Cromatograma registrado da fração STC 23-67. ....	126
Figura 98. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para: Padrão (preto); Extrato MeOH bruto das sementes de <i>T. cacao</i> (azul) e fração do CCC STC 23-67 (rosa) .....	127
Figura 99. Biossíntese de flavonoides .....	131
Figura 100. Estrutura fundamental do esqueleto tipo 1,3-difenil-propano de flavonoides (1) chalconoides, (2) Auronoides, (3) flavonoides e (4) flavanas .....	132
Figura 101. Estrutura química da agathisflavona (39) .....	139
Figura 102. Análise retrosintética para obtenção da apigenina (6) .....	139
Figura 103. Síntese do derivado halocetoareno (42) utilizando microondas .....	141
Figura 104. Síntese da apigenina (6) .....	141
Figura 105. Síntese da apigenina (6) partindo da (+/-)-naringenina (5).....	142
Figura 106. Estrutura química da hesperidina (52) utilizado para derivatizações.....	143
Figura 107. Hidrólise da hesperidina (52) em meio ácido. ....	144
Figura 108. Síntese da 3',4',7'-metoxi-5-hidroxi-flavona (56) .....	145
Figura 109. Possíveis produtos esperados na iodação da substância (56).....	145
Figura 110. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42).....	146
Figura 111. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42).....	147
Figura 112. Espectro no IV da apigenina (6) em pastilha de KBr. A: IV apigenina sintética (6) e B: apigenina (SDBS) .....	148
Figura 113. Mecanismo proposto na reação na síntese da apigenina (6) .....	149
Figura 114. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para a (+/-)-naringenina (5) .....	150
Figura 115. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para a (+/-)-naringenina (5) .....	150
Figura 116. Cromatograma da (+/-)-naringenina (5).....	151
Figura 117. Espectro no UV da (+/-)-naringenina (5).....	152
Figura 118. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO}_{d-6}$ , 300 MHz) da apigenina (6) em mistura com 3-iodo-apigenina (46) .....	152
Figura 119. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO}_{d-6}$ , 75 MHz) da mistura 6 e 46 .....	153
Figura 120. Proposta mecanística na formação da apigenina (6) .....	153
Figura 121. Síntese da substância (49) partindo do pirrogalol (47) .....	157
Figura 122. Estrutura das substâncias (+/-)-naringenina (5) e quercetina (38). ....	157
Figura 123. Cromatograma da (+/-)-naringenina permetilada (50).....	158

Figura 124. Espectro no UV da (+/-)-naringenina permetilada (50) .....	158
Figura 125. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da (+/-)-naringenina permetilada (50) .....	159
Figura 126. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da (+/-)-naringenina permetilada (50) .....	160
Figura 127. Estrutura química da (+/-)-naringenina permetilada (50) .....	160
Figura 128. Cromatograma da quercetina permetilada (51).....	161
Figura 129. Espectro no UV da quercetina permetilada (51).....	161
Figura 130. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (51) .....	162
Figura 131. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (51) .....	162
Figura 132. Estrutura química da quercetina permetilada (51) .....	163
Figura 133. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de 60 e 62.....	164
Figura 134. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de 60 e 62.....	164
Figura 135. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância (63) .....	165
Figura 136. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da apigenina permetilada triodada (64) .....	166

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fracionamento da fase DCM obtida do extrato bruto em MeOH das flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	34
Tabela 2. Resultado da coluna cromatográfica da fração 5-7 obtida da fase DCM das flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	35
Tabela 3. Resultado da coluna cromatográfica da fração 27-28 obtida da fase DCM das flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	36
Tabela 4. Fracionamento cromatográfico da fração 10-26 obtida da fase DCM das flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	36
Tabela 5. Fracionamento da fase hexânica obtida do extrato bruto em MeOH das cascas das raízes de <i>P. pyramidalis</i> .....	38
Tabela 6. Resultado da coluna cromatográfica da fase hidroMeOH obtida do extrato bruto em MeOH das cascas das raízes de <i>P. pyramidalis</i> .....	39
Tabela 7. Resultado da coluna cromatográfica da fração 41-92 obtida da fase hidroMeOH das cascas das raízes de <i>P. pyramidalis</i> .....	39
Tabela 8. Resultado da coluna cromatográfica da fração 15-20 obtida da fase hidroMeOH das cascas da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	40
Tabela 9. Resultado da coluna em Sephadex LH-20 da fração 30-35 obtida da fase MeOH das cascas da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	40
Tabela 10. Resultado da coluna cromatográfica da fração 10-12 obtida da fase hexano das cascas das raízes de <i>P. pyramidalis</i> .....	41
Tabela 11. Resultado da coluna em Sephadex LH-20 da fração 20-33 obtida da fase MeOH das cascas da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	42
Tabela 12. Resultado da coluna em Sephadex LH-20 da fração 6-15 obtida da fase MeOH das cascas da raiz de <i>P. pyramidalis</i> .....	42
Tabela 13. Rendimento das fases obtidas a partir dos extratos brutos MeOH de <i>P. pyramidalis</i> .....	44
Tabela 14. Atividade antioxidante das fases obtidas do extrato MeOH das cascas das raízes e flores de <i>P. pyramidalis</i> .....	45
Tabela 15. Alcoóis graxos identificados em PPF1 por CG/EM.....	55
Tabela 16. Dados de RMN de <sup>13</sup> C de PPF4a-b e da literatura*.....	64
Tabela 17. Substâncias identificadas por CG/EM de PPCR1 .....	68
Tabela 18. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'-β-D-xilopiranosideo .....	79
Tabela 19. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da substância PPCR3.....	84
Tabela 20. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da substância PPCR4.....	93
Tabela 21. Parâmetros empregados no CCC para purificação das metilxantinas do extrato MeOH bruto das sementes <i>T. cacao</i> .....	115
Tabela 22. Teores das metilxantinas em mg/L do LD e LQ.....	123
Tabela 23. Resultado das frações obtidas do CCC.....	125
Tabela 24. Teores das metilxantinas teobromina (2), teofilina (3) e cafeína (4).....	126
Tabela 25. Diferentes tipos de esqueletos básicos e exemplos de flavonoides. ....	132
Tabela 26. Dados de RMN da 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42) .....	147
Tabela 27. Dados de RMN da (+/-)-naringenina (5). ....	151
Tabela 28. Dados de RMN da apigenina (6) em mistura com 46 .....	154
Tabela 29. Dados de RMN da 3-iodo-apigenina (46) em mistura com 6.....	155
Tabela 30. Dados de RMN da apigenina (6) pura .....	156

**ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AA – Atividade Antioxidante

ACN – Acetonitrila

AcOEt – Acetato de etila

AcONa – Acetato de Sódio

AChE – Acetilcolina

AcSCo–A – Acetil Coenzima–A

AlCl<sub>3</sub> – Cloreto de Alumínio

APT – Attached Proton Test

BB – Broad Band

BuOH – Butanol

CC – Coluna Cromatográfica

CCC – Cromatografia em Contra-Corrente

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio deuterado

CHCl<sub>3</sub> – Clorofórmio

CRL – Consumo de Radical Livre

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Mínima

d – dubleto

DCM – Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

dd – duplodubleto

DMSO – Dimetil sulfoxido

EM – Espectro de Massas

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EtOH – Etanol

FeCl<sub>3</sub> – Cloreto Férrico

HCl – Ácido clorídrico

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

HSCo-A – Coenzima-A

Hz – Hertz

ID – Inserção Direta

*J* – constante de acoplamento

KBr – Brometo de Potássio

LD – Limites de Detecção

LQ – Limites de Quantificação

LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

m – multipletto

MeOH – Metanol

MHz – Megahertz

NaOMe – Metóxido de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NOESY – Nuclear Overhauser effect spectroscopy

PA – Para Análise

PPF – *Poincianella pyramidalis* Flores

PPCR – *Poincianella pyramidalis* Casca da Raiz

q – quarteto

RF – Rate of Flow (Taxa de Fluxo)

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

s – singleto

SDBS – Spectral Database for Organic Compounds

t – tripleto

TCS – *Theobroma cacao* sementes

TMSCl – Cloreto de trimetilsilano

T<sub>R</sub> – Tempo de Retenção

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

## CAPITULO 1 - Estudo químico *Poincianella pyramidalis*

---

### 1 - INTRODUÇÃO

---

#### 1.1 - Química de Produtos Naturais

A química de produtos naturais atualmente trata de estudos químicos e farmacológicos em substâncias isoladas de fontes naturais, ou seja, produzidos por organismos vivos, ex.: plantas, bactérias e fungos. Contudo, o uso de plantas e o conhecimento de algumas de suas propriedades terapêuticas têm acompanhado o homem desde os primórdios de sua história. Um dos exemplos é o estudo sistemático de plantas medicinais documentado no *Papyrus Ebers*, escrito a cerca de 1.500 anos a.C. que enumera aproximadamente cem doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO *et al.* 2002).

O estudo de plantas medicinais tem sido uma tradição nas áreas de pesquisa em Botânica, Farmacognosia e Farmacologia. Fármacos derivados de plantas demonstram possuir uma importância global nas economias dos diferentes países industrializados. Atualmente são utilizadas na medicina aproximadamente 119 substâncias químicas puras que são extraídas de plantas superiores. Por outro lado, das 25 drogas farmacêuticas mais vendidas nos EUA, doze são derivados de produtos naturais. O Brasil é um país privilegiado em termos de biodiversidade. Entre os ecossistemas ricos em variedades vegetais, destaca-se a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga. O Brasil, apesar da grande biodiversidade, somente uma percentagem muito pequena de sua flora tem sido estudada sob o ponto de vista químico, e uma percentagem menor ainda de estudos realizados sobre as atividades dessas plantas e de suas substâncias. Em 1987 estimava-se que de um total de aproximadamente 60 mil espécies, somente em 880 algum estudo químico havia sido realizado (BAHIA, 2002). Apesar de este levantamento refletir dados de aproximadamente 25 anos atrás, pode-se considerar que não houve uma mudança abrupta no conhecimento da composição química da flora brasileira na última década. Ressaltando que a comunidade científica tem intensificado estudos interdisciplinares, no intuito de testar biologicamente as substâncias isoladas.

A pesquisa em Química dos Produtos Naturais tem possibilitado encontrar novos modelos estruturais e substâncias bioativas, o que tem contribuído muito para a pesquisa e obtenção de novos medicamentos bem como para a produção de fitoterápicos. Dentre os candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos a partir de fontes naturais destacam-se substâncias com atividades anticancerígenas, antimicrobianas e antivirais usados nas doenças infecciosas (DAVID & DAVID, 2002).

## 1.2 - Família Fabaceae

Na família Leguminosae, os legumes devem ser reconhecidos e classificados nela. Contudo, o nome alternativo Fabaceae é aceito desde 1978 e apesar de ambígua são utilizadas para toda a família Leguminosae ou apenas a Papilionoideae (LEWIS & SCHRIRE, 2003). Desta forma, aqui será considerada como família Fabaceae, ao qual, pertence à divisão das Angiospermas, classe Dicotiledôneas da ordem Rosales possui em torno de 670 gêneros e 17.500 espécies, distribuídos nas zonas tropicais e subtropicais e presentes em quase todo o mundo (LEWIS, 1987). O seu fruto é variado, mas em geral são legumes. Nos países em desenvolvimento, o cultivo de leguminosas consta do meio mais eficaz para o aumento da produção de proteínas vegetais. Muitas espécies da família Fabaceae são economicamente importantes como plantas forrageiras, produtoras de fibras, tintas, gomas, resinas, óleos, adubo verde e ainda como alimento. Na família Fabaceae encontramos exemplos de espécies com interesse alimentício, tais como: ervilha (*Pisum sativum*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) entre outros (LEWIS, 1987).

De acordo com Lewis (LEWIS, 1987 e LEWIS & SCHRIRE, 2003), se reconhece nesta família três subfamílias importantes: Mimosoideae (5 tribos, 63 gêneros), Papilionoideae = Faboideae (31 tribos, 443 gêneros) e Caesalpinioideae (5 tribos, 152 gêneros).

Do ponto de vista químico, cada subfamília tende a possuir certos grupos característicos de flavonoides e outros compostos polifenólicos. A subfamília Mimosoideae é rica em catequinas, leucoantocianidinas e outros taninos, a subfamília Caesalpinioideae contém elagitaninos (gênero *Caesalpinia*) e a Papilionoideae caracteriza-se por ter isoflavonas e rotenóides, mas também, são ricas em antocianidinas e flavonóis glicosilados (HARBONE & MABRY, 1982).

### 1.3 - Subfamília Caesalpinoideae

A subfamília Caesalpinoideae compreende cerca de cinco tribos e 152 gêneros. Esta subfamília está muito bem representada no Brasil, sendo o gênero *Cassia* com o maior número de espécies. Outros gêneros freqüentemente encontrados são *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Bauhinia*, *Copaifera*, *Hymenaea* e *Swartzia* (SCHULTZ, 1984).

A espécie *P. pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz, anteriormente classificada como *Caesalpinia pyramidalis* Tul. foi reclassificada e agora pertence a um gênero com menor número de espécies, representadas por *Poincianella pyramidalis* L. P. Queiroz, *P. pluviosa* (DC.) L. P. Queiroz e *P. bracteosa* (Tul.) L. P. Queiroz (QUEIROZ, 2009). Contudo, estudos em espécies do gênero *Caesalpinia*, onde estava antes classificada, revelam propriedades biológicas interessantes para suas espécies, tais como: antibióticos (SAAEDE & SABIR, 2001), antidiabéticos (SHARMA *et al.* 1997) para *C. bonducella*; antimaláricos (KURIA *et al.* 2001; DEHARO *et al.* 2001) para *C. volkensii* e *C. pluviosa* (*P. pluviosa* (DC.) L. P. Queiroz); além da atividade anti-inflamatória (HIKINO *et al.* 1977; CARVALHO *et al.* 1996) para *C. sappan* e *C. ferrea*.

Dados da literatura reportam para a espécie *P. pyramidalis* atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (SANTOS *et al.* 2011), atividade moluscicida (SANTOS *et al.* 2012), antiproliferativa e antioxidante (MELO *et al.* 2010) e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (SARAIVA *et al.* 2012).

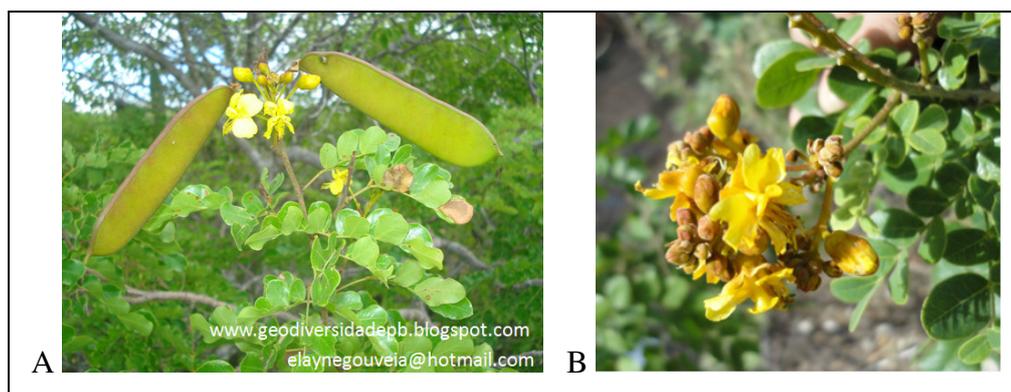
### 1.4 - Descrição botânica de *P. pyramidalis*

A espécie *P. Pyramidalis* pertence ao reino Plantae, divisão das Magnoliophyta e classe Magnoliopsida da ordem Fabales (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>). Na família Fabaceae, *P. Pyramidalis* faz parte da subfamilia Caesalpinoieae da tribo Caesalpinieae. Contudo, atualmente a mesma passou do gênero *Caesalpinia* para *Poincianella*, passando a ser conhecida como *Poincianella pyramidalis* (QUEIROZ, 2009).

### 1.5 - Características gerais de *P. pyramidalis*

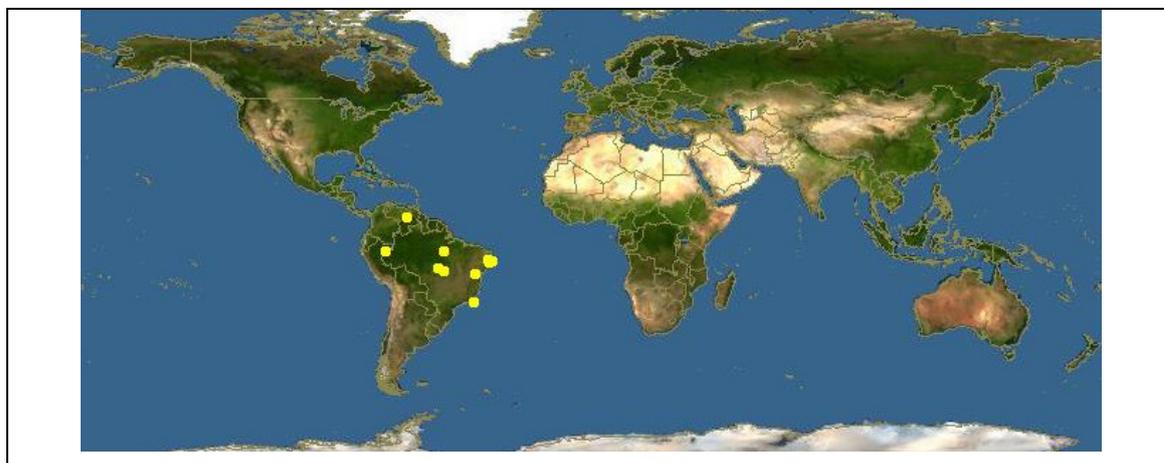
*P. pyramidalis* é conhecida popularmente como “caatingueiro”, “catinga-de-porco” ou “pau-de-rato” e suas folhas são empregadas no preparo de infusos e decoctos prescritos na medicina popular. A espécie *P. pyramidalis* (Figura 1) pode alcançar até 4 m de altura e

possuem flores amarelas dispostas em racemos poucos maiores ou tão longo quanto às folhas. Esta espécie representa uma das plantas sertanejas cujos gomos brotam às primeiras manifestações de umidade anunciadoras do período das chuvas. Durante esta fase de desenvolvimento o gado procura as suas folhas para alimentação, desprezando-as pouco depois, talvez pelo cheiro desagradável que adquirem ao crescer (BAHIA, 1979).



**Figura 1.** *P. pyramidalis*: A - espécie *in natura* e B - inflorescências objeto de estudo

No mapa abaixo (Figura 2), encontra-se a distribuição geográfica da espécie *P. pyramidalis* reportadas na literatura.



**Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *P. pyramidalis*

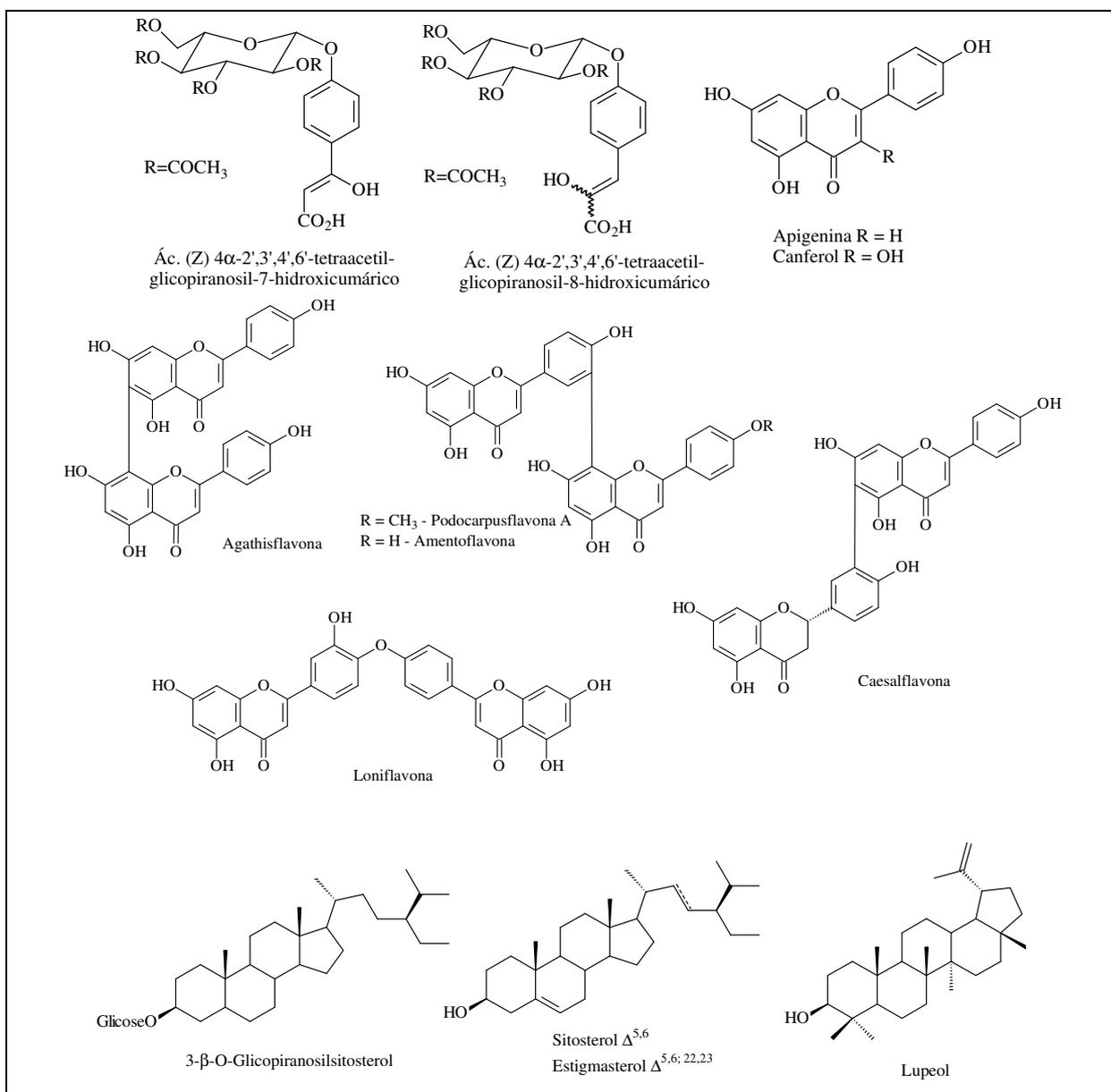
[http://www.discoverlife.org/nh/maps/Plantae/Dicotyledoneae/Fabaceae/Caesalpinia/map\\_of\\_Caesalpinia\\_pyramidalis.jpg](http://www.discoverlife.org/nh/maps/Plantae/Dicotyledoneae/Fabaceae/Caesalpinia/map_of_Caesalpinia_pyramidalis.jpg) (Acesso 10/12/2013).

É uma espécie de ampla dispersão no Nordeste semi-árido, podendo ser encontrada em diversas associações vegetais, crescendo bem nas várzeas úmidas, chegando a atingir mais de

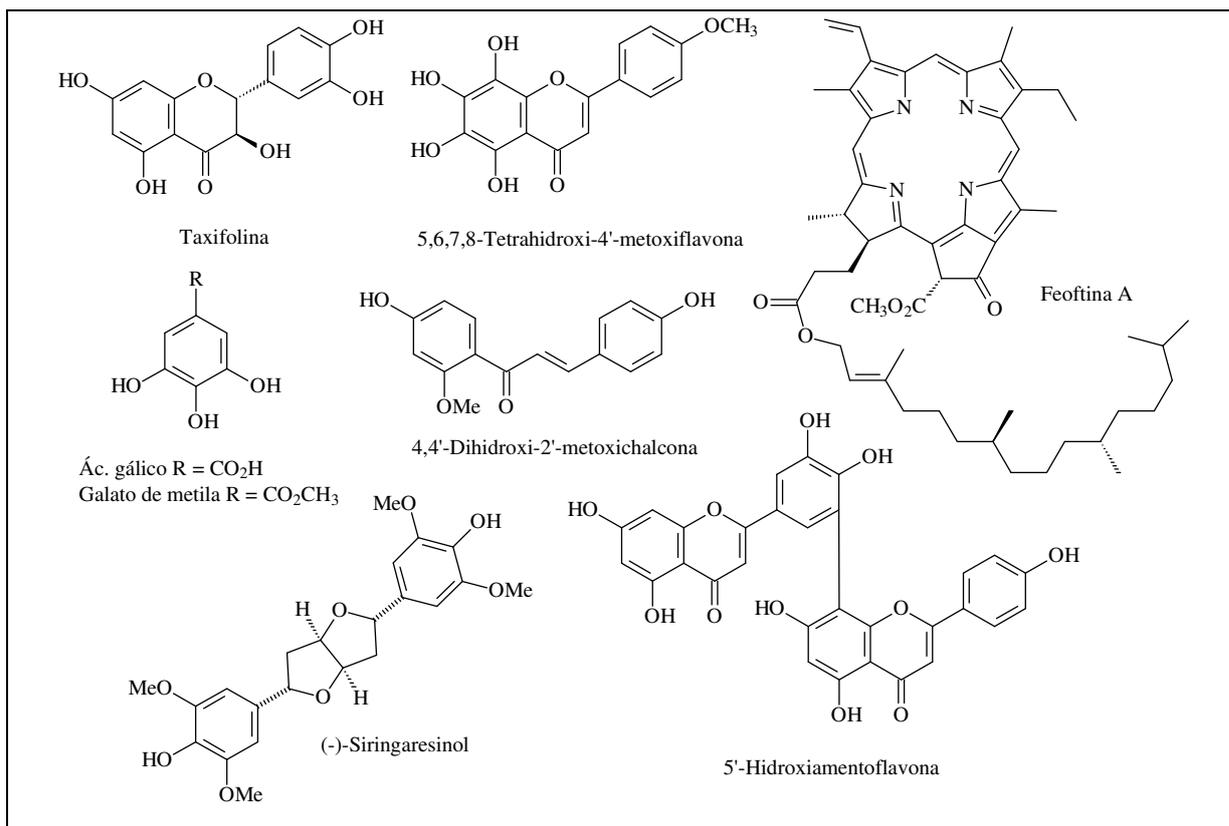
10 m e poucos centímetros de diâmetro na base. No Brasil ocorrem nos Estados do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, sendo considerada endêmica do bioma Caatinga (MAIA, 2004).

### 1.6 - Substâncias isoladas de *P. pyramidalis*

Nas Figuras 3 e 4 encontram-se as substâncias isoladas a partir de estudos anteriores com as folhas e o caule de *P. pyramidalis*, respectivamente (MENDES *et al.* 2000; BAHIA *et al.* 2005; BAHIA *et al.* 2006).

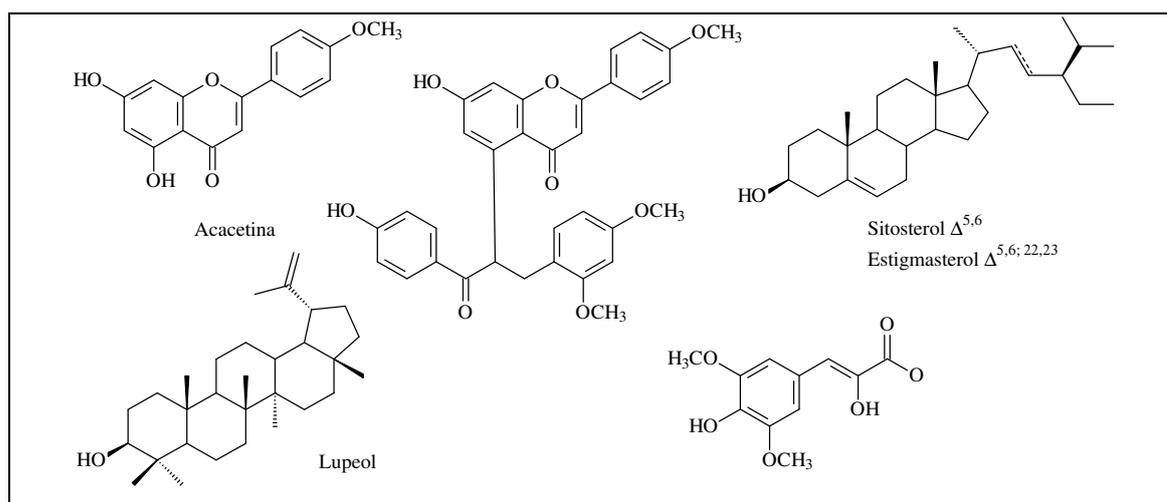


**Figura 3.** Substâncias isoladas das folhas de *Caesalpinia pyramidalis* (*P. pyramidalis*)



**Figura 4.** Substâncias isoladas do caule de *Caesalpinia pyramidalis* (*P. pyramidalis*)

Na Figura 5 encontram-se as substâncias que já foram isoladas na casca da raiz de *P. pyramidalis* (OLIVEIRA, 2010).

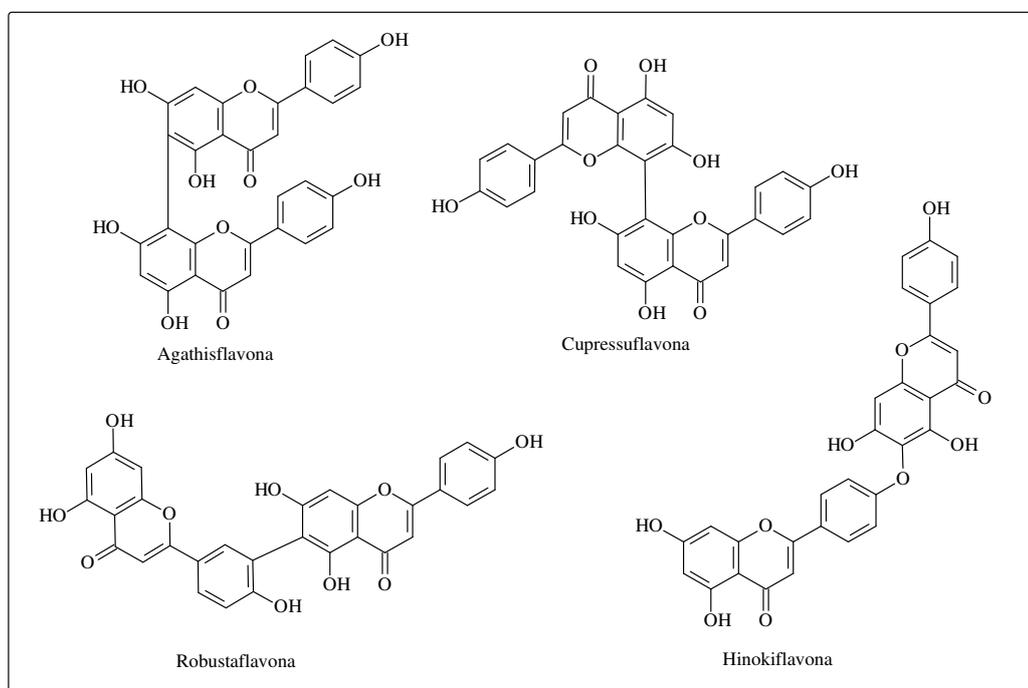


**Figura 5.** Substâncias isoladas da casca da raiz de *Caesalpinia pyramidalis* (*P. pyramidalis*)

### 1.7 - Aspectos gerais sobre os biflavonoides

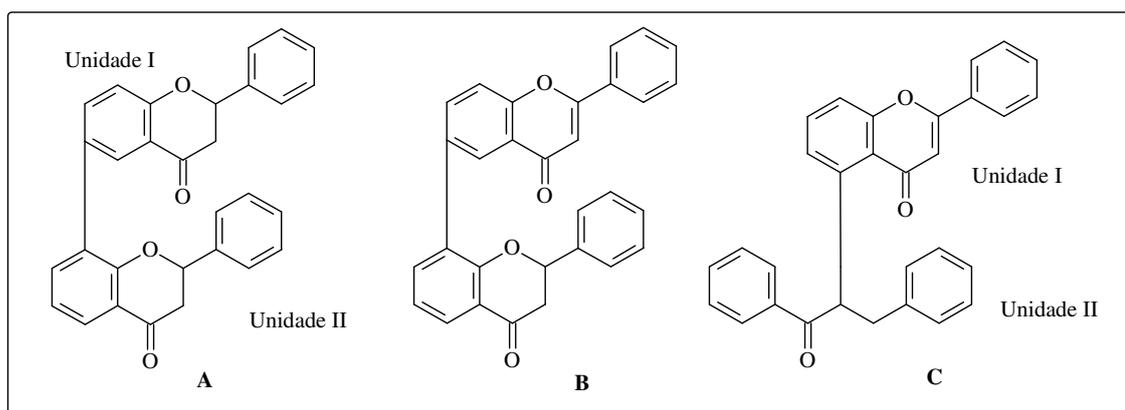
A ocorrência de biflavonoides é conhecida há quase um século com o primeiro relato da presença de ginkgentina (*Ginkgo biloba*) em 1929. Desde então, mais de mil ocorrências de biflavonoides foram registradas em plantas e muitas atividades biológicas, têm sido relacionadas a essa classe de substâncias. Os biflavonoides constituem uma classe de flavonóides diméricos, sendo formados por unidades de flavonas e flavanonas apresentando padrão de oxigenação nas posições 5,7,3' e/ou 4' (HARBORNE, 1993).

Segundo Harbone (1993), os biflavonoides podem ser classificados pelo tipo de ligação entre os monômeros ou pelo tipo de núcleo fundamental. A ligação das unidades pode ser através da ligação carbono-carbono ou carbono-oxigênio-carbono. Os biflavonoides mais conhecidos possui como estrutura básica a 5,7,4'-trihidroxiavona (apigenina) e apresentam a ligação C-C entre as combinações de apigeninas em C-3' e C-8", formando a amentoflavona e seus éteres metílicos. Outros exemplos de dimerização são entre os carbonos 6-8" (ex. agathisflavona), 8-8" (ex. cupressuflavona) e 3'-6" (ex. robustaflavona). O grupamento mais comum da série C-O-C são as hinokiflavonas com ligação entre os carbonos 6-4" (Figura 6).



**Figura 6.** Alguns biflavonoides de ocorrência mais comuns

A palavra biflavonoide é empregada comumente para designar qualquer composto que possua duas unidades de flavonoides unidas seja ela por ligação C-C ou C-O-C. Por outro lado, pelo núcleo fundamental para dímeros de flavonoides, o mesmo pode ser classificado como bisflavonoide quando as duas unidades são iguais, independente do grau de oxigenação e a posição da ligação entre cada unidade. Como exemplo, podemos citar a bisflavanona (Figura 7A), biflavonas, biauronas e etc. E biflavonoide quando as duas unidades são diferentes (Figura 7B e C).



**Figura 7.** Diferentes sub-classes de biflavonoides: A – bisflavonoide e B/C – biflavonoide

Os biflavonóides são encontrados em grandes variedade ou quantidades em diferentes plantas e em muitos tecidos vegetais. Apesar disso o seu papel biológico não é claro. A função mais importante seria a de agir como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos. Os biflavonoides são compostos de ocorrência natural que possuem importantes atividades farmacológicas incluindo antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e anticancerígena. Entretanto, a atividade anticancerígena de biflavonoides é baixa (ZHENG *et al.* 2004). Além de inibir o desenvolvimento de diversos fungos e um bom agente protetor contra os raios ultravioletas nas folhas (SEIGLER, 2003).

Os estudos com a casca da raiz de *P. pyramidalis* conduziram ao isolamento de diferentes biflavonoides em relação aos que foram relatados na literatura, do qual, é formado por uma unidade flavona e outra dihidrochalcona (OLIVEIRA, 2010). Dessa forma o presente trabalho tem como objetivo continuar com a investigação fitoquímica e biológica de substâncias isoladas na casca da raiz e nas flores de *P. pyramidalis*.

---

## 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1 - Gerais

- Preparar extratos brutos em MeOH da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis*;
- Obter fases orgânicas de diferentes polaridades (Hexano, AcOEt, DCM, CHCl<sub>3</sub> e BuOH) a partir dos extratos brutos em MeOH da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis*;
- Submeter os extratos orgânicos brutos e as fases de diferentes polaridades da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis* à atividade antioxidante, citotóxica contra *Artemia salina* e anticolinesterásica;
- Fracionar por meio de cromatografia em coluna as fases orgânicas bioativas obtidas da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis*;

### 2.2 - Específicos

- Isolar constituintes químicos presentes na casca da raiz e nas flores da espécie *P. pyramidalis*;
- Contribuir e ampliar o conhecimento químico das espécies da família Fabaceae presentes no Estado da Bahia e Pernambuco;
- Elucidar por métodos espectroscópicos e espectrométricos a estrutura química das substâncias puras, semi-puras ou em misturas obtidas no fracionamento das fases orgânicas da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis*;
- Submeter às substâncias isoladas a atividade anticolinesterásica.

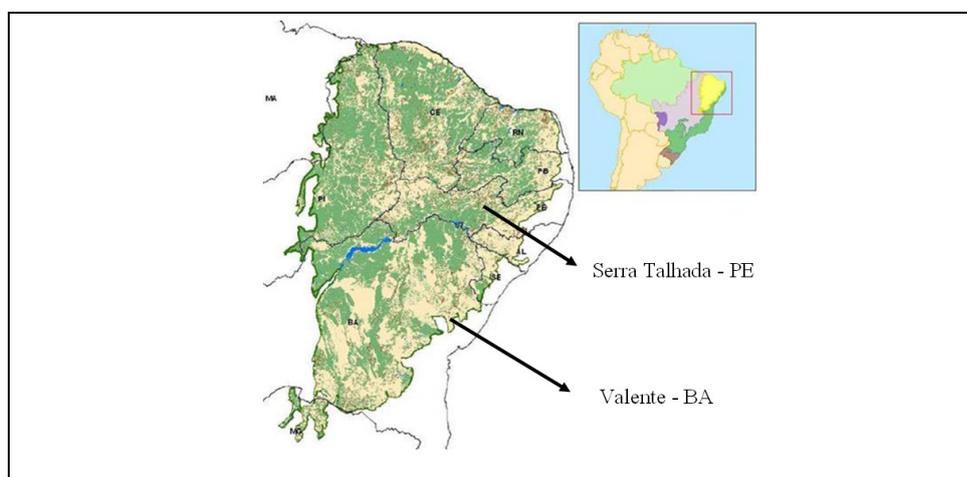
---

### 3 - EXPERIMENTAL

---

#### 3.1 - Coleta de material para estudo químico

A raiz de *P. pyramidalis* foi coletada na cidade de Valente – BA e suas flores na cidade de Serra Talhada – PE, ambas as regiões predomina o bioma Caatinga (Figura 8). Uma exsicata da espécie coletada em Serra Talhada foi depositada no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob o numero #71432#.



**Figura 8.** Mapa do Brasil com ampliação do bioma Caatinga demarcando as duas áreas de coletas

<http://revistaescola.abril.com.br/geografia/pratica-pedagogica/biomas-brasileiros-parte-5-caatinga-558287.shtml>. Acesso em 06/11/2013.

Para moagem das amostras foi utilizado um moinho de facas Thomas Wiley Laboratory Mill – Model 4. Em seguida, a casca da raiz (402,80 g), o cilindro central da raiz (4665,32 g) e as flores (113,38 g) de *P. pyramidalis* foram submetidas à extração exaustiva com MeOH (6 x 48 horas), pelo método de maceração. O solvente extrator empregado foi recuperado em evaporador rotativo da marca Buchi 461 (40 °C,  $\pm$  120 rpm) sob baixa pressão restando no final seus respectivos extratos brutos em MeOH.

Para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram empregadas placas de Sílica gel comerciais 20x20 da Altech. Os métodos de revelação das CCDC consistiram de exposição das placas à radiação, empregando-se lâmpada ultravioleta em cabine apropriada da marca Spectroline model CM-10 equipada com lâmpada Spectroline model Enf-260 C nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, vapores de iodo em cuba de vidro com tampa, reagente Liebermann-Burchard.

O reagente de Liebermann-Burchard, utilizado para identificação de triterpenos e esteróides foi preparada misturando 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético, posteriormente essa mistura foi cuidadosamente adicionada a 50 mL de etanol resfriado em banho de gelo. Este reagente foi utilizado borrifando-se as placas e posteriormente aquecendo-as em chapa de aquecimento até 100 °C.

A solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> (10%) foi preparada em EtOH. As placas foram borrifadas com solução de FeCl<sub>3</sub> sendo positivo quando há o aparecimento de manchas escura (preta).

As CC empregadas para isolamento dos constituintes químicos foram escolhidas com base na massa das amostras a ser submetida ao processo de separação. Para as CC em adsorção em sílica gel foram utilizadas sílica gel 60 (63-200 µm) e sílica gel 60 H (70-230 µm) ambas da Acros®, para CC em permeação em gel utilizou-se Sephadex LH-20 da Pharmacia.

Todas as frações obtidas das CC realizadas foram coletadas em balões de 250 mL, com exceção das frações coletadas nas colunas em Sephadex LH-20, que foi utilizado frascos de vidro com aproximadamente 10 mL. Todas as frações foram monitoradas por CCDC, agrupadas quando necessário (ex. semelhança de RF e reveladores específicos) e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo, transferidas para recipientes previamente tarados e seus rendimentos calculados no término de cada coluna cromatográfica.

Os solventes utilizados na CC foram de grau analítico PA das marcas QUIMEX® para CHCl<sub>3</sub>, DCM, MeOH, EtOH, AcOEt e Hexano e SINTH® para BuOH.

Para a reação de sililação, a substância **PPF1** foi solubilizada em piridina onde se adicionam os reagentes *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e o trimetilclorosilano (TMSCl), reagentes empregados em reações de sililação.

## **3.2 - Análises espectroscópicas**

### **3.2.1 - Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis)**

Os espectros no UV/Vis foram obtidos em Espectrofotômetro Varian – Cary 50 Conc UV – Visible Spectrophotometer instalado no Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo da Varian no modo scan com varredura de 900 a 200 nm. Para medidas de absorvância para mensurar atividade antioxidante utilizando DPPH, as amostras foram analisadas em comprimentos de onda em 515 nm.

### **3.2.2 - Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

Os espectros na região de IV foram registrados em equipamento Shimadzu, modelo IR Affinity – 1, Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, instalado no Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras foram submetidas a análise em pastilha de KBr. Antes das medidas, uma pastilha contendo apenas KBr foi preparada e utilizada para calibrar (zerar) o equipamento, garantindo qualidade na obtenção dos espectros.

### **3.2.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foi realizada em RMN Varian Gemini 300 (UFBA) que operava em 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$  e os espectros bidimensionais foram gerados em RMN Varian 500 (LTF-UFPB) operando em 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Outras amostras foram submetidas à Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) do qual os espectros de RMN foram gerados em equipamento da Varian operando em 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . E ainda, outros espectros de RMN bidimensionais foram realizados na Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) em RMN Bruker operando em 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

### **3.2.4 - Medida de Rotação Ótica Especifica**

Dentre as substâncias isoladas neste estudo químico, observou-se que algumas poderiam desviar o plano da luz polarizada por possuírem pelo menos um centro estereogênico em seu

esqueleto carbônico. Assim, os dados foram obtidos em Polarímetro Perkin Elmer Precisely, modelo 343, instalado no IQ-UFBA. As amostras foram analisadas em cubas de 0,6 mL, utilizando DCM ou  $\text{CHCl}_3$  como solventes na análise.

### **3.3 - Análises espectrométricas**

#### **3.3.1 - Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatográfica Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)**

A análise cromatográfica (CG) foi obtida utilizando um aparelho Hewlett Packard 5890 SERIES II equipado com um detector de ionização de chama (FID) e com coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu\text{m}$ ); A análise de GC/MS em equipamento HP 5890B SERIES II, acoplado a um espectrômetro de massas HP-5971, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB5 (30 m x 0.25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 220 °C e 285 °C. Usou-se o hélio como gás de arraste, a uma vazão de 1 mL/min; o programa de temperatura da coluna foi 40 °C (1 minuto) até 220 °C a 4 °C/min; 220 °C até 280 °C a 20 °C/min. Os espectros de massas foram obtidos com um impacto eletrônico de 70 eV, 0,84 scan/sec de m/z 40 a 550. Uma solução de 1,5  $\mu\text{L}$  com 10 mg do análio em AcOEt foi injetada. A identificação foi realizada pela comparação do EM de padrões de massas reportados na literatura (ADAMS, 2007), bem como pela comparação direta das sugestões EM disponíveis na biblioteca do computador (Wiley, com 250.000 compostos), contemplando apenas as similaridades entre os fragmentos no EM.

#### **3.3.2 - Eletron Spray Ionization – Microtof (ESI/EM)**

Os espectros de ESI/EM de baixa resolução foram obtidos na Central Analítica da USP em equipamento Esquire 3000 Plus - Bruker Daltonics no modo negativo. Os ESI/EM de alta resolução em equipamento MICROTOF – Bruker Daltonics no modo positivo para **PPCR4** e negativo para **PPCR2**.

### **3.4 - Análises de outra natureza**

#### **3.4.1 - Ponto de fusão (PF)**

Os dados de PF foram obtidos em aparelho digital da Micro Química, modelo MQAPF – 301, podendo chegar até 330 °C, considerando-se as opções de programação. Inicialmente as leituras foram obtidas com programação de aquecimento variando 20 °C/min. Obtidas os primeiros dados de PF, considerando também as amostras que não fundiram. Portanto, outra leitura foi realizado, desta vez com aquecimento variando entre 5 ou 10 °C/min. Em todas as análises de PF, as amostras foram analisadas em pequenas placas de vidro (lamínulas) com medidas de 2 x 2 cm e submetidas ao registro de seus respectivos PF.

#### **3.4.2 - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)**

As análises foram realizadas em HPLC da DIONEX, modelo UltiMate 3000 equipado com sistema de bombas quaternária LPG-3400SD, conectado ao Detector de Arranjo Diodo (PDA) modelo VWD-3100, DAD programado para comprimento de onda de 240 nm, 265 nm, 270 nm, 320 nm e 360 nm. Auto-injetor dos analítos e dos padrões e compartimento para coluna ACC-3000. Coluna DIONEX Acclaim R 120, C18 5 µm 120 Å 2,1 x 100 mm. Fase móvel tida como base, gradiente iniciando com 15:85 (MeOH:Solução ácido fórmico 0,2%) até 100% de metanol e tempo de corrida de 15 min. O fluxo da fase móvel foi de 0,7 mL/min. e volume de injeção de 2 µL. Os parâmetros podem variar conforme a natureza das frações ou substâncias em análise.

### **3.5 - Testes biológicos e bioquímicos**

#### **3.5.1 - Teste citotóxico contra *Artemia salina***

Para a realização do bioensaio contra *Artemia salina*, foi utilizada a metodologia proposta por Meyer (MEYER *et al.* 1982) com modificações. Todas as fases obtidas pela cromatografia de partição e os extratos brutos foram testadas contra *Artemia salina*.

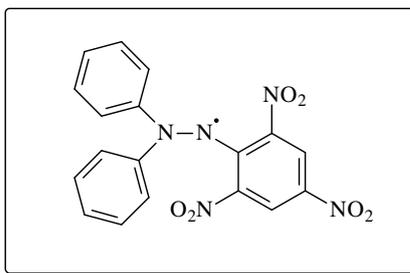
Inicialmente para cada fase obtida das cascas das raízes (quatro fases) e das flores (três fases) de *P. pyramidalis*, foram preparadas 25 mL de solução estoque, de cada fase e/ou extrato bruto separadamente, na concentração de 1 µg/mL de solução marinha artificial. A solução estoque foi diluída para obter sete concentrações finais (25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250

$\mu\text{g/mL}$ ). Para facilitar a diluição das fases em solução salina, fez-se necessário a utilização de DMSO, TWEEN 80 e/ou EtOH. O branco (padrão) foi preparado utilizando a mesma quantidade de DMSO, TWEEN 80 e/ou EtOH utilizados para solubilizar cada fase obtida do processo de partição separadamente e diluindo-se para a concentração de  $250 \mu\text{g/mL}$ , o mesmo se fez para os extratos brutos. Todo o teste foi realizado em triplicata em frascos de vidro de 10 mL, sendo adicionado 10 nauplios a cada frasco, contendo 5 mL de solução análise. A contagem dos nauplios vivos e mortos foi realizada após o período de 24 horas de incubação sob ausência de luz. Consideram-se mortos os naupilis que não se movimentarem por um tempo de 5 a 10 segundos.

Os valores da  $CL_{50}$  foram obtidos através do método Probit de análise, com limite de confiança de 95% (FINNEY, 1971) e os critérios de classificação da toxicidade com base nos níveis de  $CL_{50}$  em *A. salina* foram os mesmos estabelecidos por Dolabela (DOLABELA, 1997), a saber: altamente tóxico ( $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$ ), moderadamente tóxico (entre  $80 \mu\text{g/mL}$  e  $250 \mu\text{g/mL}$ ) e com baixa toxicidade ou não tóxico ( $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ).

### 3.5.2 - Seqüestro de Radical Livre (SRL) DPPH

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada seguindo metodologia descrita na literatura (MILIAUSKAS *et al.* 2004 e SOUSA *et al.* 2007), monitorando-se o consumo do radical livre estável DPPH, 1,2-difenil-2-picril-hidrazil (Figura 9) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações.



**Figura 9.** Estrutura do 1,2-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

Uma solução estoque de DPPH em metanol  $40 \mu\text{g/mL}$  foi preparada e armazenada em recipiente âmbar. Para o teste uma alíquota de 0,3 mL da solução amostra ou controle positivo foi adicionado a 2,7 mL de solução de DPPH em cubeta com volume de 3 mL. As amostras foram analisadas em seis concentrações diferentes (25, 50, 100, 150, 200 e  $250 \mu\text{g/L}$ ). A

medida da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda 515 nm, usando como controle positivo ácido gálico. As leituras foram realizadas no ato da mistura ( $t_0$ ) após 15 minutos ( $t_{15}$ ), em seguida  $t_{30}$  e  $t_{60}$ . Todas as concentrações das amostras foram avaliadas em triplicata. As atividades obtidas foram comparadas com aquelas apresentadas por antioxidantes conhecidos tais como o 2,6,-diterc-butil-4-metoxifenol (BHT), galato de propila e o  $\alpha$ -tocoferol.

### 3.5.3 - Atividade anticolinesterásica

A avaliação da atividade anticolinesterásica consistiu no método quantitativo fotométrico de detecção da ação inibitória contra a enzima acetilcolina (AChE). Assim, um análogo da AChE, o acetilticolina, é empregado como substrato. A atividade enzimática é avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise da acetilticolina produzindo ácido acético e tiocolina. A tiocolina reage então com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato], conhecido como reagente de Ellman, produzindo o íon colorido 5-tio-2-nitrobenzoato, cuja formação pode ser medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm.

### 3.6 - Realização dos experimentos

Para a elaboração e execução dos fracionamentos das amostras de *P. pyramidalis*, assim como, as atividades citotóxicas e biológicas foram desenvolvidas no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto de Química da UFBA, sob supervisão do Prof. Dr. Jorge Mauricio David.

### 3.7 - Isolamento das substâncias presentes nas flores de *P. pyramidalis*

#### 3.7.1 - Alcoóis graxos

A mistura de alcoóis graxos (**PPF1**) foram isoladas da fase DCM obtida do extrato MeOH bruto das flores de *P. pyramidalis*. A fase DCM (2,748 g) foi submetida a coluna em sílica gel 60 utilizando como eluente DCM e mistura de DCM:MeOH em gradiente de polaridade crescente e volume das frações de aproximadamente 120 mL coletados em balões de 250 mL. Ao final da coluna, coletaram-se quarenta e cinco frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando no final dezesseis frações majoritárias (Tabela 1).

**Tabela 1.** Fracionamento da fase DCM obtida do extrato bruto em MeOH das flores de *P. pyramidalis*

Frações	Eluente	Massa (mg)	Frações	Eluente	Massa (mg)
1	100%	106,7	17-21	100%	47,3
2	100%	202,2	22-26	100%	11,0
3	100%	156,2	<b><u>27-28</u></b>	95:5	<b><u>500,7</u></b>
<b><u>4</u></b>	100%	<b><u>89,1</u></b>	29-32	95:5	136,5
<b><u>5-7</u></b>	100%	<b><u>104,9</u></b>	33-36	9:1	295,8
8	100%	41,2	37-38	7:3	304,3
9-12	100%	107,4	39-43	1:1	339,4
13-16	100%	60,1	44-45	MeOH	88,5
		Total			2591,3

A fração **4** (89,1 mg) após a evaporação total do solvente a temperatura ambiente, foi observado a formação de cristais brancos em meio de material graxo. O reagente de Lieberman-Burchard permitiu identificar que a mesma poderia ser de natureza triterpenica ou esteroidal. Portanto, a fração **4**, foi submetida a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do qual observou-se sinais característicos de triterpenos.

Desta forma, a fração **4** foi submetida à recristalização em DCM seguida de “lavagem cuidadosa” com hexano (2 x 5 mL), para não dissolver os cristais formados. Assim, obteve-se o sólido branco e a solução da “lavagem”. Esperava-se que os cristais fossem triterpenos. Contudo, análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identifica-lá como sendo de uma mistura de alcoóis graxos (**PPF1** – 20,1 mg).

### 3.7.2 - $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

A fração **5-7** (104,9 mg, Tabela 1) foi submetida a CC em sílica gel 60 utilizando como eluente hexano e mistura de hexano:AcOEt em gradiente de polaridade crescente e volume das frações de 50 mL coletados em balões de 100 mL. Ao final da coluna, coletaram-se trinta e quatro frações que após análise por CCDC e reveladas com reagente de Lieberman-Burchard permitiu agrupar as semelhantes, restando oito frações majoritárias (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultado da coluna cromatográfica da fração 5-7 obtida da fase DCM das flores de *P. pyramidalis*

Frações	Eluente	Massa (mg)	Frações	Eluente	Massa (mg)
1-3	95:5	10,1	16-21	9:1	7,1
4-5	95:5	4,6	22-27	8:2	6,6
<b><u>6-9</u></b>	95:5	<b><u>34,7</u></b>	28-33	1:1	6,9
10-15	95:5	12,0	34	MeOH	11,8
Total					93,8

O reagente de Lieberman-Burchard permitiu identificar em quais frações existe a presença de substâncias triterpênicas e esteroidais. Desta forma, a fração **6-9** (34,7 mg) apresentou-se na forma de sólido cristalino de cor branca. Após aplicação da fração **6-9** e da fração contendo a mistura de esteróides, sitosterol e estigmasterol, isolada da casca da raiz de *P. pyramidalis* (OLIVEIRA, 2010) em CCDC eluindo-se com hexano:AcOEt (95:5) e reveladas com reagente de Lieberman-Burchard, mostrou semelhança na eluição e na coloração após aquecimento.

### 3.7.3 - Galato de metila

O galato de metila (**PPF3**) foi isolado da fase DCM obtida do extrato MeOH bruto das flores de *P. pyramidalis*. A fração **27-28** (500,7 mg, Tabela 1) foi submetida a coluna em sílica gel 60 utilizando como eluente DCM e mistura de DCM:MeOH em gradiente de polaridade crescente e volume das frações de 50 mL coletados em balões de 100 mL. Ao final da coluna, coletaram-se trinta e quatro frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando seis frações majoritárias (Tabela 3, pág. 36).

**Tabela 3.** Resultado da coluna cromatográfica da fração 27-28 obtida da fase DCM das flores de *P. pyramidalis*

Frações	Eluente	Massa (mg)	Frações	Eluente	Massa (mg)
1-3	100%	17,1	<b><u>10-26</u></b>	95:5	<b><u>199,6</u></b>
4-6	99:1	30,6	27-31	9:1	18,1
7-9	99:1	188,9	32-34	MeOH	9,9
		Total			464,2

A fração **10-26** (199,6 mg) foi submetida a coluna em sílica gel 60 utilizando como eluente DCM:MeOH (95:5) em gradiente de polaridade crescente e volume das frações de aproximadamente 15 mL. Ao final da coluna, coletaram-se trinta e nove frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando cinco frações majoritárias (Tabela 4).

**Tabela 4.** Fracionamento cromatográfico da fração 10-26 obtida da fase DCM das flores de *P. pyramidalis*

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-3	83,1	13-19	10,6
4-10	13,7	20-39	12,9
<b><u>11-12</u></b>	<b><u>55,5</u></b>		
Total		175,8	

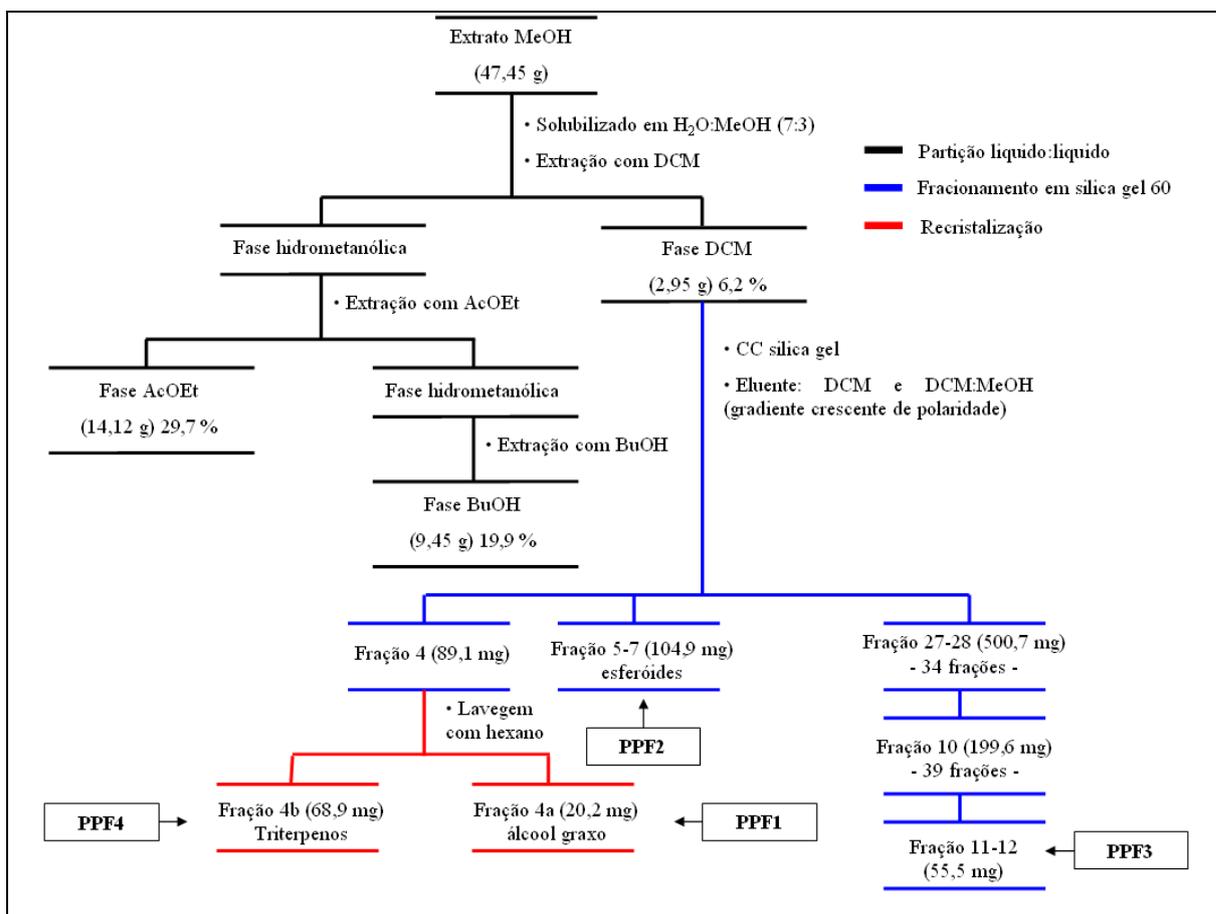
A fração **11-12** (55,5 mg) com  $\text{CHCl}_3$ , apresentou formação de precipitado (ppt) insolúvel em  $\text{CHCl}_3$ . Desta forma, a fração **11-12** foi filtrada lavando-se o ppt com  $\text{CHCl}_3$  seguida da lavagem com MeOH que dissolveu o ppt. Após a evaporação do solvente de cada amostra filtrada as mesmas foram submetidas à análise por CCDC do qual revelou uma maior pureza do material solúvel em MeOH. Portanto, a fração **11-12** resultou em duas sub-frações, designadas de **A** e **B**. As massas de **A** e **B** foram, respectivamente, 22,4 mg e 32,2 mg.

#### 3.7.4 - $\alpha$ - e $\beta$ -amirina

Na fração **4** (89,1 mg, Tabela 1, pág. 34), após recristalização e lavagem dos cristais com hexano, revelou que na parte solúvel em hexano há a presença da  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (**PPF4**) em

mistura com o álcool graxo. Portanto, a  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina foram identificadas na fase DCM obtida do extrato MeOH bruto das flores de *P. pyramidalis* em mistura.

Na figura abaixo (Figura 10) encontra-se o fluxograma geral realizado no isolamento das substâncias presentes na flor de *P. pyramidalis*.



**Figura 10.** Marcha química realizada no isolamento das substâncias identificadas no extrato MeOH bruto das flores de *P. pyramidalis*

### 3.8 - Isolamento das substâncias presentes na casca da raiz de *P. pyramidalis*

#### 3.8.1 - Ésteres metílicos derivados de ácidos graxos

Os ésteres metílicos (**PPCR1a-d**) foram isolados da fase hexano obtida da extração líquido-líquido do extrato MeOH bruto da casca da raiz de *P. pyramidalis* (1,29 g; 1,66%). Assim, 1,10 g da fase hexano foi submetida à CC sob sílica gel 60 utilizando hexano e mistura de hexano:AcOEt em gradiente de polaridade crescente. O fracionamento foi realizado sendo coletados volumes de aproximadamente 100 mL. Foram coletadas dezesseis frações que após análise por CCDC, permitiu agrupar as semelhantes, restando no final sete frações majoritárias (Tabela 5).

**Tabela 5.** Fracionamento da fase hexânica obtida do extrato bruto em MeOH das cascas das raízes de *P. pyramidalis*

Fração	Eluente	Massa (mg)	Fração	Eluente	Massa (mg)
<u>1-2</u>	hexano	<u>192,4</u>	<u>10-12</u>	1:1	<u>204,1</u>
3-4	9:1	124,3	13-14	3:7	31,1
5-8	9:1	252,7	15-16	AcOEt	5,6
9	7:3	122,0			
		Total			832,2

A partir do fracionamento desta fase, na fração **1-2** (192,4 mg), foi possível isolar a mistura das substâncias designada **PPCR1**, que após a evaporação total do solvente apresentou aspecto viscoso de coloração amarela.

#### 3.8.2 - Derivado do ácido elágico glicosilado

A substância **PPCR2** foi isolada da fase  $\text{CHCl}_3$ , obtida a partir da extração líquido:líquido do extrato MeOH bruto da casca da raiz de *P. pyramidalis* (25,40 g; 32,62%). A fase  $\text{CHCl}_3$  foi submetida a uma nova partição, onde solubilizou-se essa fase  $\text{CHCl}_3$  em mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5) e extraída com hexano. Em seguida a fase hidroMeOH (22,95 g) foi submetida a CC sob sílica gel 60 utilizando  $\text{CHCl}_3$  e mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH em gradiente de polaridade crescente. O fracionamento foi realizado sendo coletados com volumes de aproximadamente 100 mL. Um total de noventa e oito frações foram coletadas e após análise

em CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando no final nove frações majoritárias (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultado da coluna cromatográfica da fase hidroMeOH obtida do extrato bruto em MeOH das cascas das raízes de *P. pyramidalis*

Fração	Eluente	Massa (g)	Fração	Eluente	Massa (g)
1-10	100%	0,1866	<b><u>41-92</u></b>	8:2	<b><u>11,8826</u></b>
11-19	100%	0,0929	93-96	1:1	0,6804
<b><u>20-33</u></b>	100%	<b><u>0,1443</u></b>	97	MeOH	1,0754
34-36	9:1	4,4513	98	H <sub>2</sub> O	0,1801
37-40	9:1	2,3447			
Total					21,0383

Parte da fração **41-92** (9,1694 g) foi submetida a coluna em sílica gel 60 utilizando como eluente CHCl<sub>3</sub> e mistura de CHCl<sub>3</sub>:MeOH em gradiente de polaridade crescente e volume das frações de 50 mL. Ao final da coluna, coletaram-se oitenta e seis frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando no final dezessete frações majoritárias (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultado da coluna cromatográfica da fração 41-92 obtida da fase hidroMeOH das cascas das raízes de *P. pyramidalis*

Frações	Eluente	Massa (mg)	Frações	Eluente	Massa (mg)
1-2	100%	228,5	39-42	7:3	372,6
3-8	100%	784,5	43-44	7:3	150,3
9-10	9:1	291,0	45-51	1:1	511,0
11-14	9:1	407,1	52-53	1:1	153,8
<b><u>15-20</u></b>	9:1	<b><u>774,3</u></b>	54-66	3:7	497,1
21-24	8:2	1462,1	67-74	3:7	330,7
25-29	8:2	937,8	75-76	3:7	760,0
30-31	8:2	259,3	77-86	MeOH	1937,2
32-38		663,4			
Total					18920,7

A fração **15-20** (774,3 mg) foi submetida a coluna em sílica gel 60 utilizando como eluente DCM e mistura de DCM:MeOH em gradiente de polaridade crescente, coletou-se as frações com volume de 50 mL. Ao final da coluna, coletaram-se trinta e seis frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando no final nove frações majoritárias (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resultado da coluna cromatográfica da fração 15-20 obtida da fase hidroMeOH das cascas da raiz de *P. pyramidalis*

Frações	Eluente	Massa (mg)	Frações	Eluente	Massa (mg)
1-2	100%	19,4	19-23	7:3	158,8
3-5	100%	71,5	24-29	1:1	175,8
6-7	9:1	59,8	<b><u>30-35</u></b>	<b><u>1:1</u></b>	<b><u>115,1</u></b>
8-13	9:1	104,8	36	MeOH	15,9
14-18	7:3	55,4			
Total					175,8

A fração **30-35** (115,1 mg) foi submetida a coluna em Sephadex LH-20 utilizando como eluente isocrático o MeOH e coletadas com volume médio de 50 mL. Ao final da coluna, obteve-se assim oito frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando quatro frações majoritárias (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resultado da coluna em Sephadex LH-20 da fração 30-35 obtida da fase MeOH das cascas da raiz de *P. pyramidalis*

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
<b><u>1-2</u></b>	<b><u>25,8</u></b>	4-5	26,7
3	14,4	6-8	32,5
Total			99,4

Assim, na fração **1-2** (25,8 mg) foi possível isolar a substância **PPCR2** do qual, após a evaporação total do solvente, apresentou aspecto de sólido amorfo de cor amarela.

### 3.8.3 - Biflavonoide PPCR3

O biflavonoide (**PPCR3**) foi isolado da fase hexano, obtida da extração líquido:líquido da fase  $\text{CHCl}_3$  da casca da raiz de *P. pyramidalis* (1,29 g; 1,66%). A partir do fracionamento da fase hexano, na fração **10-12** (204,1 mg - Tabela 5, pág. 38) apresentou dois spots. Assim, a mesma foi submetida à coluna cromatográfica em Sephadex LH-20 utilizando como eluente isocrático uma mistura de MeOH:DCM (1:1). Foram obtidas vinte frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final duas frações majoritárias (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resultado da coluna cromatográfica da fração 10-12 obtida da fase hexano das cascas das raízes de *P. pyramidalis*

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
1-15	185,3	<b><u>16-20</u></b>	<b><u>18,8</u></b>
Total		204,1	

Na fração **16-20 (PPCR3)** foi possível isolar a substância designada **PPCR3**, que após a evaporação total do solvente se apresentou com aspecto viscoso e de coloração marrom.

### 3.8.4 - Biflavonoide PPCR4

A substância **PPCR4** foi isolada da fase  $\text{CHCl}_3$ , obtido a partir da extração líquido:líquido do extrato MeOH bruto da casca da raiz de *P. pyramidalis* (25,40 g; 32,62%). A fase  $\text{CHCl}_3$  foi submetida a uma nova partição, na qual, solubilizou-se a fase  $\text{CHCl}_3$  em mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5) que foi extraída com hexano. Em seguida a fase hidroMeOH (22,95 g) foi submetida a CC sob sílica gel 60 e utilizando  $\text{CHCl}_3$  e mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH em gradiente de polaridade crescente (Tabela 6, pág. 39).

A fração **20-33** (113,2 g) foi submetida em coluna Sephadex LH-20 utilizando como eluente isocrático DCM:MeOH (1:1) e coletadas com volume médio de 2 mL. Ao final da coluna, obtiveram-se quinze frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando no final duas frações majoritárias (Tabela 11, pág. 42).

**Tabela 11.** Resultado da coluna em Sephadex LH-20 da fração 20-33 obtida da fase MeOH das cascas da raiz de *P. pyramidalis*

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-5	38,6	<b><u>6-15</u></b>	<b><u>74,3</u></b>
Total		112,9	

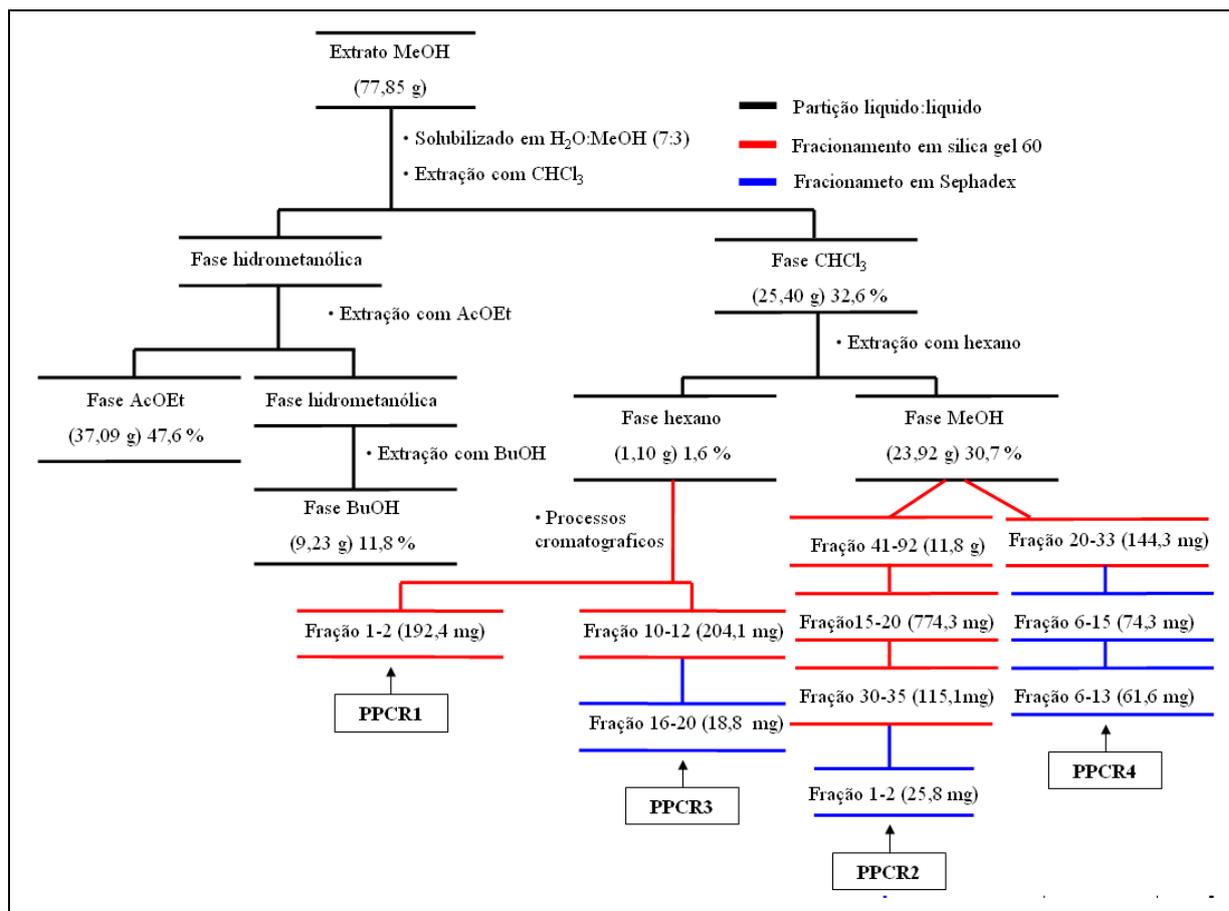
A fração **6-15** foi submetida à coluna em Sephadex LH-20 utilizando como eluente isocrático DCM:MeOH (1:1) e coletadas com volume médio de 2 mL. No final, obtiveram-se treze frações que após análise por CCDC permitiu agrupar as semelhantes, restando duas frações majoritárias (Tabela 12).

**Tabela 12.** Resultado da coluna em Sephadex LH-20 da fração 6-15 obtida da fase MeOH das cascas da raiz de *P. pyramidalis*

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-5	5,0	<b><u>6-13</u></b>	<b><u>61,6</u></b>
Total		66,6	

Na fração **6-13 (PPCR4)** foi possível isolar a substância **PPCR4** com aspecto viscoso de coloração marrom.

Na Figura 11, pág. 43 encontra-se o fluxograma geral realizado no isolamento das substâncias presentes na casca da raiz de *P. pyramidalis*.



**Figura 11.** Marcha química realizada no isolamento das substâncias identificadas no extrato MeOH bruto das casca da raiz de *P. pyramidalis*.

Assim, todas as substância isoladas neste estudo foram caracterizadas utilizando técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e através de espectros bidimensionais de RMN (HMQC e HMBC), IV, UV, EM, α[D] e CG/EM.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSÃO

### 4.1 - Rendimento dos extratos

O percentual extrativo para casca da raiz e flores de *P. pyramidalis* foram respectivamente, 22,8% e 42,5%. Para a partição foram utilizadas 77,85 g de extrato MeOH bruto da casca da raiz e para as flores foram utilizadas 44,14 g de extrato MeOH bruto. O rendimento das fases obtidas foi calculado a partir da massa do material inicialmente utilizado. Na Tabela 13 encontram-se os rendimentos para as fases de diferentes polaridades obtidas no final de cada processo de partição.

**Tabela 13.** Rendimento das fases obtidas a partir dos extratos brutos MeOH de *P. pyramidalis*

<b>Extrato ou Fase Orgânica</b>	<b>Casca da raiz</b>	<b>Flores</b>
Extrato MeOH bruto	91,84 g/22,8%	48,21 g/42,5%
Fase hexânico	1,29 g/1,66%	-
Fase diclorometano	-	2,96 g/6,24%
Fase acetato de etila	37,09 g/47,64%	14,12 g/29,76%
Fase metanólico	23,92 g/30,72%	-
Fase butanólico	9,23 g/11,85%	9,45 g/19,92%

### 4.2 - Atividades biológicas e bioquímicas

#### 4.2.1 - Letalidade contra *Artemia salina*

A atividade contra *Artemia salina* foi baseada na mortalidade dos nauplius em presença dos constituintes químicos de cada extrato ou fase orgânica, diluído em meio salino. Após a incubação por 24 horas observou-se que algumas das fases testadas de *P. pyramidalis* apresetam atividade tóxica para os nauplius de *A. salina*. A fase acetato de etila (AcOEt) da casca da raiz apresentou maior toxicidade seguido da fase hidroMeOH, com CL<sub>50</sub> de 149,12 e 193,98 µg/mL, respectivamente. Enquanto que, para a fase hexano, a CL<sub>50</sub> foi de 535,55

$\mu\text{g/mL}$ , sendo considerada atóxica nas concentrações testadas. Bem como a fase BuOH que apresentou  $\text{CL}_{50}$  de 228,97  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o menos tóxico em relação às fases polares. Logo, em ordem crescente de citotoxicidade para casca da raiz temos as fases: acetato de etila > metanólico > butanólico. Por outro lado, para as flores de *P. pyramidalis* o extrato bruto MeOH e a fase DCM foram atóxicos. Enquanto que as fases AcOEt e BuOH apresentaram baixa toxicidade nas concentrações testadas, com  $\text{CL}_{50}$  de > 400  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, com exceção da fase hexânica da casca da raiz e o extrato MeOH bruto e fase DCM das flores de *P. pyramidalis*, todos os outros são moderadamente tóxicos segundo Dolabela, que considera altamente tóxicos ( $\text{CL}_{50}$  de < 80  $\mu\text{g/mL}$ ), moderadamente tóxico ( $\text{CL}_{50}$  entre 80 a 250  $\mu\text{g/mL}$ ) e atóxicos ( $\text{CL}_{50}$  de > 250  $\mu\text{g/mL}$ , DOLABELA, 1997).

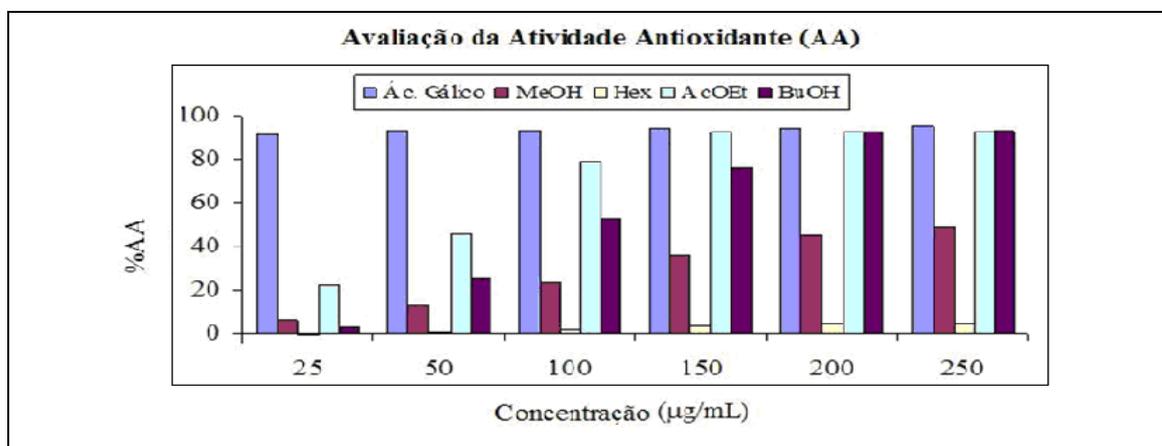
#### 4.2.2 - Teste do seqüestro do radical livre DPPH

Soluções MeOH do controle positivo, extratos brutos e fases orgânicas de diferentes polaridades foram preparados individualmente na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , que em seguida foram diluídas em seis concentrações diferentes (25, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ). As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ ) foram realizadas a 515 nm, no 1°, 15°, 30° minuto. Para o teste em branco foi utilizada 2,7 mL de solução de DPPH e 0,3 mL MeOH. Na Tabela 14 encontram-se sumarizadas a porcentagem da atividade antioxidante expressa no seqüestro do radical livre (SRL) DPPH dos extratos brutos e fases orgânicas de diferentes polaridades e do padrão utilizado (ácido gálico).

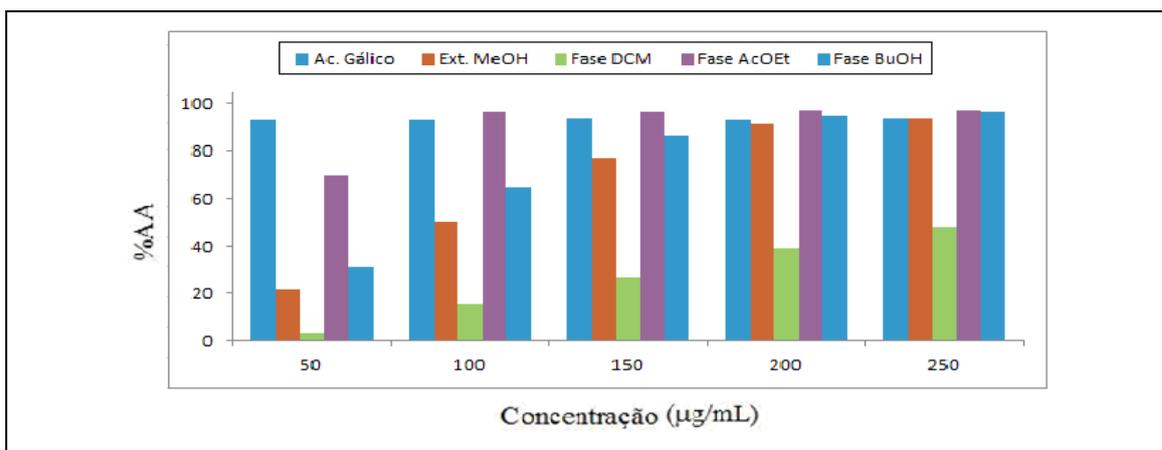
**Tabela 14.** Atividade antioxidante das fases obtidas do extrato MeOH das cascas das raízes e flores de *P. pyramidalis*

[ ] $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Ác. gálico	Casca da raiz			Flores			
		Fase			Fase			Extrato
		Hex	hidroMeOH	AcOEt	DCM	AcOEt	BuOH	MeOH
50	92,85	0.73	13.4	46.34	3,31	69,58	30,89	-
100	92.92	1.58	23.12	79.27	15,33	96,28	64,19	49,97
150	94.54	3.62	35.91	92.12	27,04	96,51	86,48	77,27
200	94.81	4.27	45.56	92.47	39,26	96,59	95,04	91,85
250	95.03	4.45	48.82	92.75	47,71	96,97	96,12	94,22

Na Figura 12 e 13 encontram-se o gráfico em colunas da atividade antioxidante do controle positivo (ácido gálico) e das fases orgânicas da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis*, respectivamente.



**Figura 12.** AA do padrão e das fases orgânicas das cascas das raízes de *P. pyramidalis*



**Figura 13.** AA do padrão e das fases orgânicas das flores de *P. pyramidalis*

Observa-se que, para as fases orgânicas de ambas as partes, seja casca da raiz ou flores, a atividade antioxidante é mais acentuada nas fases AcOEt e BuOH em relação aos demais extratos. Contudo, a fase AcOEt e BuOH das flores foram mais ativas em relação as mesmas fases da casca da raiz. Este fato está relacionado com a maior exposição das flores a radiação UV em relação às raízes. Portanto, a biossíntese de substâncias capazes de minimizar os efeitos da radiação nas flores é maior. Por outro lado, a fase hidroMeOH da casca de raiz apresentou atividade antioxidante de aproximadamente 50% na concentração de 200 µg/mL e para as flores, o estrato MeOH bruto apresenta atividade de 50% na metade da concentração

(100 µg/mL) quando comparada com a fase hidroMeOH da casca da raiz. Sendo estes resultados positivos na avaliação preliminar utilizando DPPH.

#### **4.2.3 - Atividade anticolinesterásica**

Todas as amostras obtidas das flores foram avaliadas na concentração de 2,5 mg/mL. Enquanto que, as fases CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e BuOH da casca da raiz foram avaliadas respectivamente na concentração de 2,5; 3,0 e 1,5 mg/mL.

As fases BuOH das flores e a fase CHCl<sub>3</sub> da casca da raiz apresentaram inibição enzimática de 45%. A fase AcOEt da casca da raiz foi a que apresentou maior atividade sobre a enzima acetilcolina com 75% de inibição. As demais apresentaram inibição < 35%. Por outro lado, dentre as fases que apresentaram atividade só a fase CHCl<sub>3</sub> da casca da raiz tiveram metabolitos isolados e identificados.

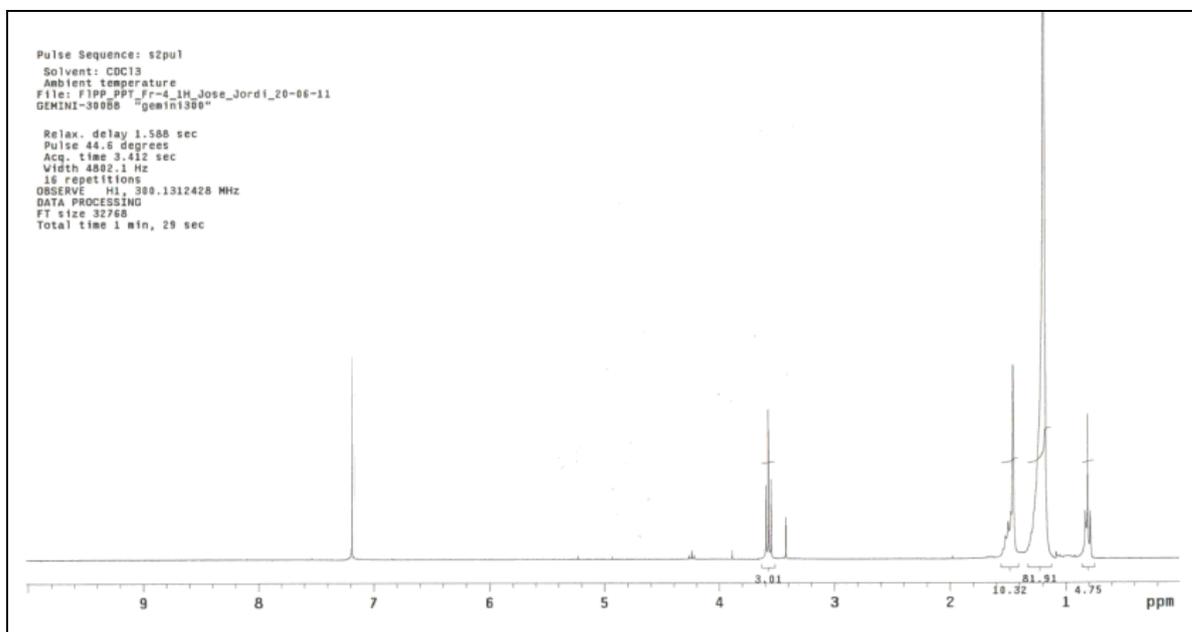
Em relação às substâncias puras, foram avaliadas as atividades anticolinesterásicas, das naturais **PPCR2, PPCR3, PPCR4**.

Todas as substâncias foram avaliadas na concentração de 500 µMol/mL. Esta concentração é utilizada para estabelecer se as substâncias em estudo são ou não ativas. Contudo, após o tratamento dos dados obtidos, todas as substâncias foram inativas no teste de atividade anticolinesterásica.

### 4.3 - Elucidação estrutural das substâncias isoladas nas flores de *P. pyramidalis*

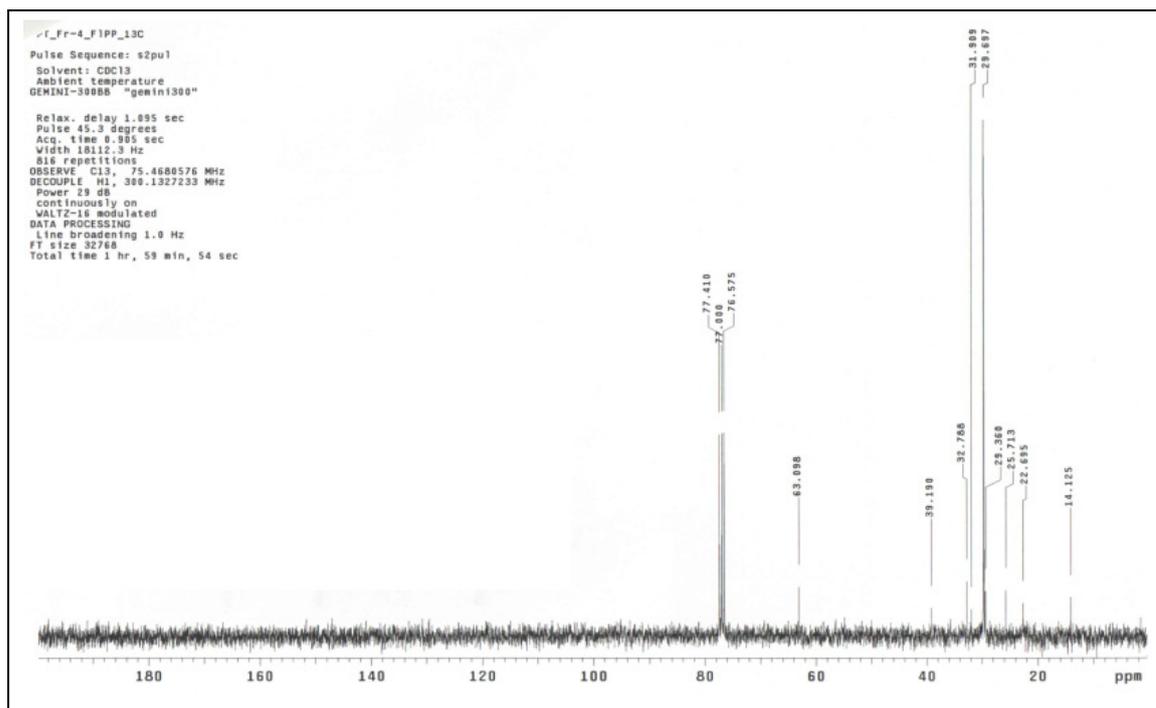
#### 4.3.1 - Identificação dos alcoóis graxos (PPF1)

Os alcoóis graxos (**PPF1**, 20,2 mg) possuem aspecto sólido amorfo de cor branca. Seu PF varia de 78,0 – 78,5 °C. Análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 14) revelou a presença de quatro sinais entre  $\delta$  4,0 a 0,5. Dois tripletos podem ser observados, um em  $\delta$  3,52 ( $J = 6,6$  Hz) característico de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, e outro em  $\delta$  0,81 ( $J = 6,9$  Hz) de metilas terminais comumente observados em espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de substâncias com cadeia alquílica linear.



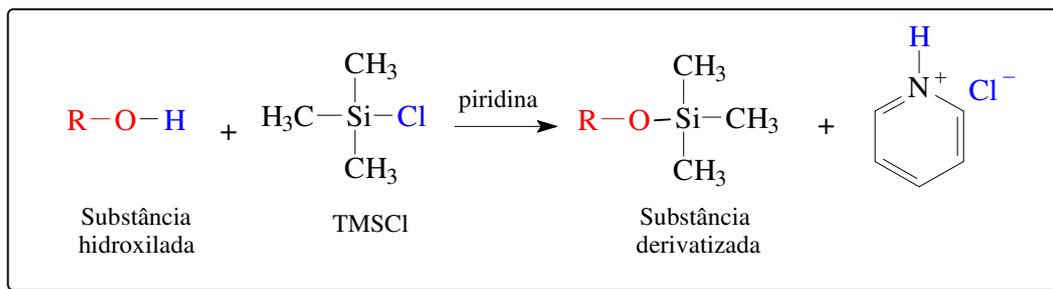
**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **PPF1**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB (Figura 15, pág. 49) revelou um total de nove sinais, entre estes sinais observados o em  $\delta$  63,0 e o em  $\delta$  14,1 confirmaram a presença de carbono oximetilênico e a metila terminal, respectivamente. Os demais sinais são referentes às unidades  $-\text{CH}_2-$  (metilênicos) presentes na estrutura carbônica, que a caracterizam, como sendo de álcool de cadeia longa, ou simplesmente de álcool graxo.



**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **PPF1**

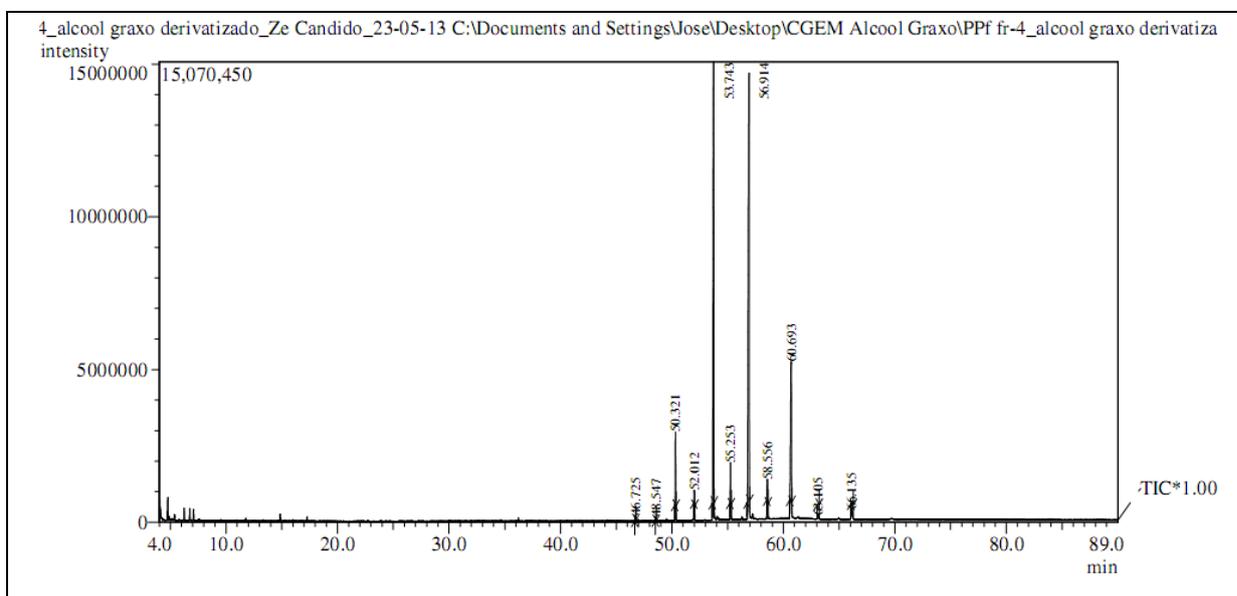
Portanto, de acordo com análise dos espectros de RMN ficou claro que na substância **PPF1** pode ser constituída de uma mistura de alcoóis graxos. Desta forma, a análise de RMN é limitada por não poder determinar com exatidão quantos alcoóis estão presentes na mistura. Contudo, a técnica de CG/EM é uma das melhores formas para analisar misturas, às vezes complexa, de compostos orgânicos. Um dos problemas ao se analisar um álcool por CG/EM é a eliminação de  $\text{H}_2\text{O}$ , que pode gerar outras fragmentações e desta forma o íon molecular pode não ser visualizado. Portanto, uma derivatização na substância **PPF1**, antes da análise de CG/EM, fez-se necessário. A melhor metodologia para formação de derivados de alcoóis para análise por CG/EM é transformando os mesmos em derivados trimetilsilil (Figura 16, pág. 50), cuja reação é comumente chamada de sililação (BARBOSA *et al.* 2005). Essa transformação auxilia na identificação da mistura, pois a adição do grupo trimetilsilil (TMS) ao grupo funcional polar da substância, neste caso, o grupo  $-\text{OH}$ , confere estabilidade térmica e química, além de maior volatilidade.



**Figura 16.** Reação de silição em alcoóis. R = cadeia aquilica

A formação do trimetilsilil éter é uma técnica muito comum para o preparo de derivados de alcoóis, esteroides, alcoóis terpênicos e outros compostos tais como ácidos, aminas, tióis entre outros (BARROS, 2003).

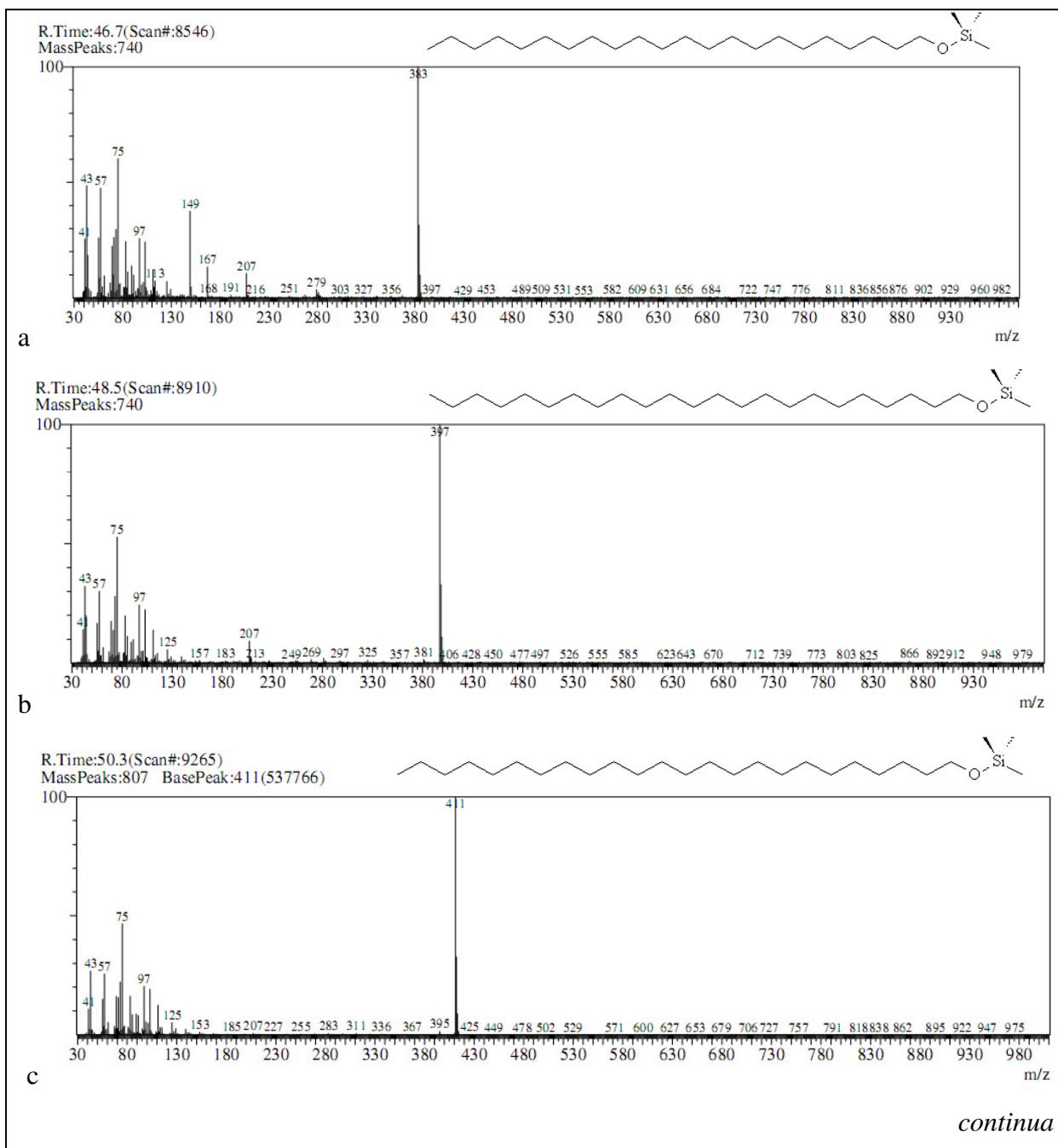
Os compostos derivatizados foram injetados no CG/EM e identificados de acordo com as fragmentações propostas a partir dos espectros de massas obtidos, em comparação com espectros existentes no banco de dados (Wiley 229.000) do aparelho e com dados da literatura. Na análise por CG/EM observa-se a presença de onze sinais entre os tempos de retenção ( $T_R$ ) 45 min. a 70 min. (Figura 17).

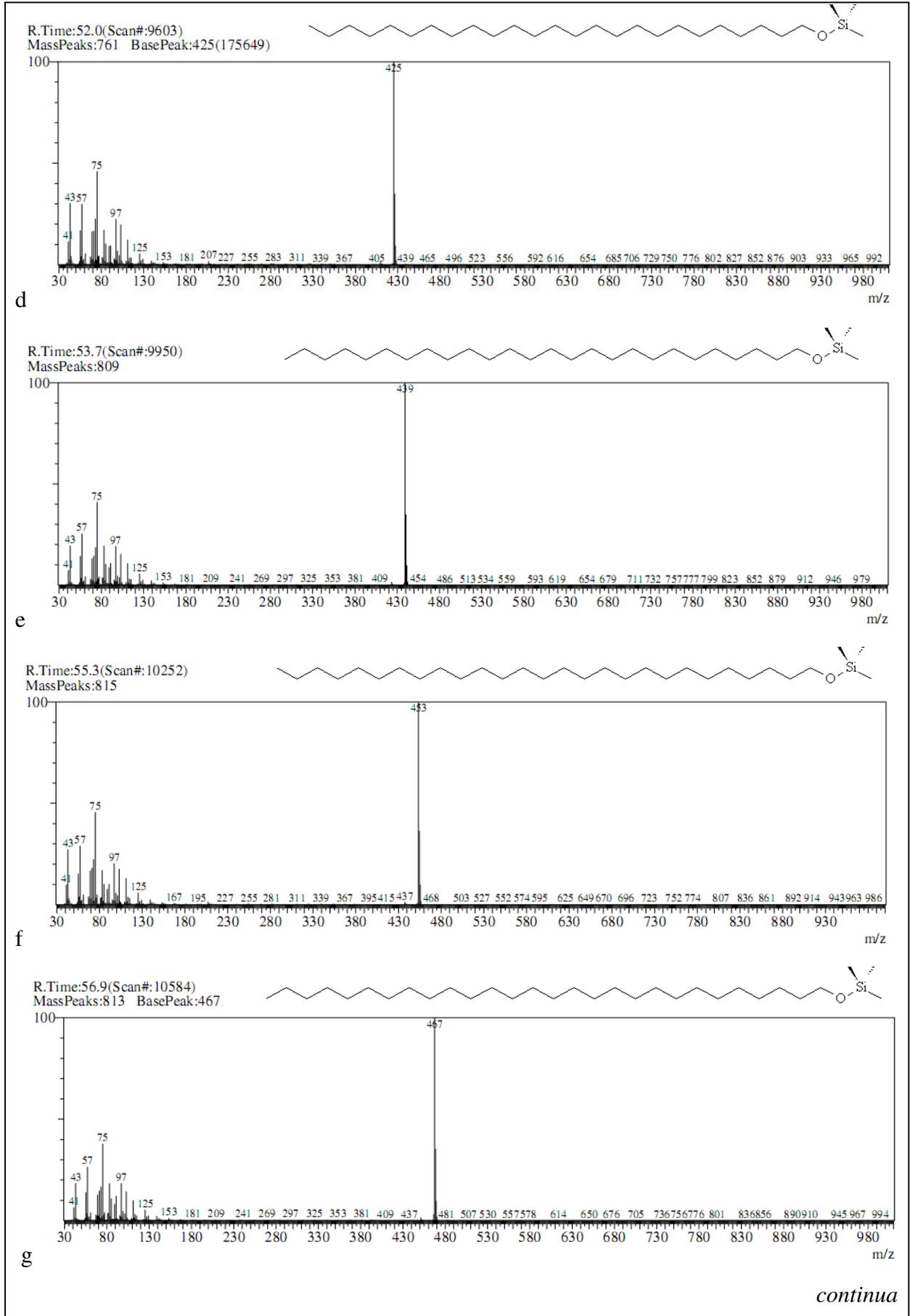


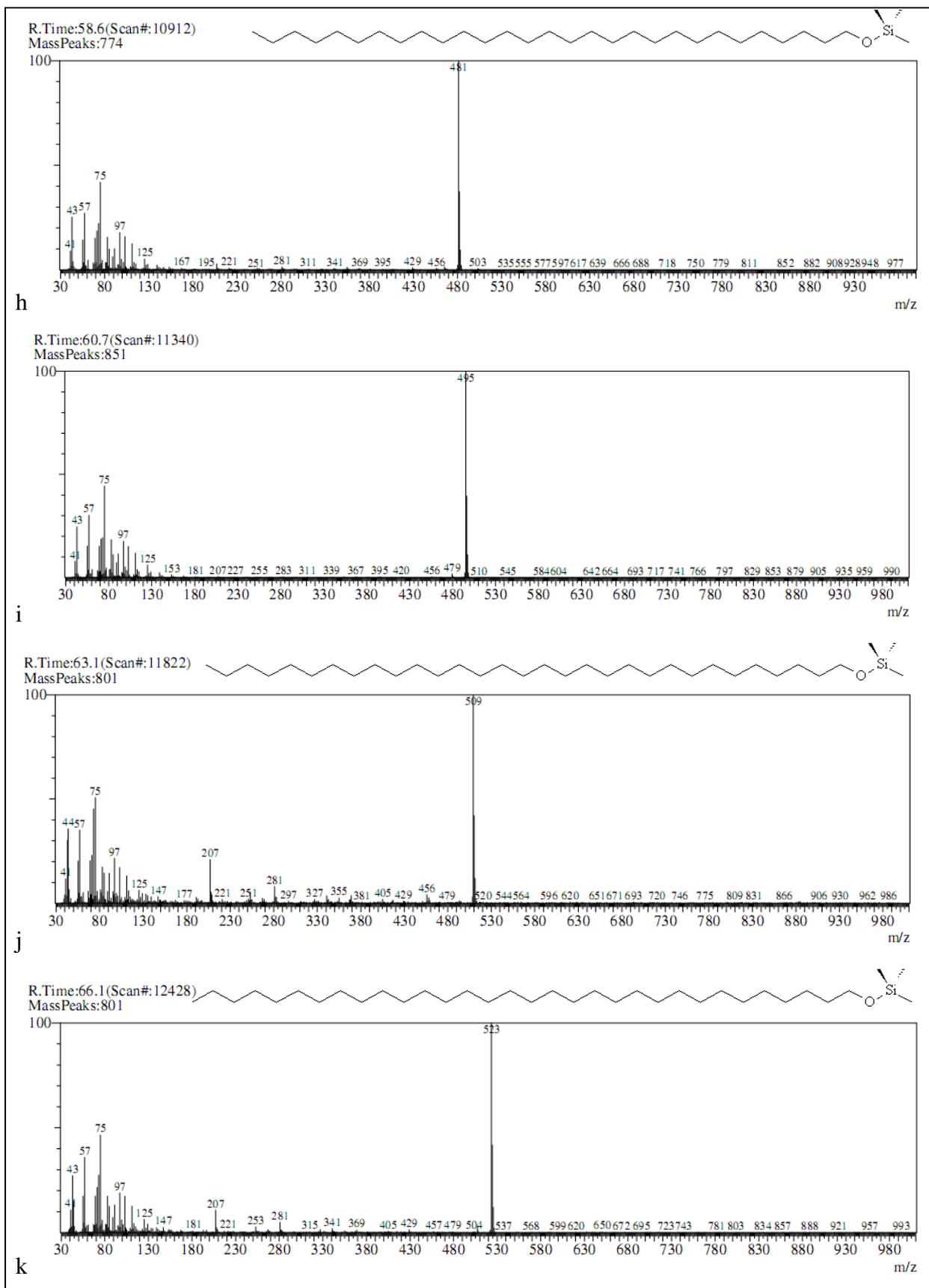
**Figura 17.** Cromatograma de íons totais da mistura de alcoóis graxos na amostra PPF1

Dentre os onze sinais, à presença majoritária de duas substâncias, uma com  $T_R = 53,743$  min. e outra com  $T_R = 56,914$  min. sendo a área percentual relativa na mistura de 34,89 e 39,75 %, respectivamente.

Antes de caracterizar os componentes na mistura, os espectros de massas (EM) foram analisados e considerados apenas os que possuem fragmentações características para alcoóis graxos sililados. Após identificar quais os picos referentes aos alcoóis graxos concluiu-se que para cada pico identificado, o pico posterior possui uma unidade  $\text{CH}_2$  a mais na estrutura carbônica em relação ao seu antecessor, ou seja, na mistura temos uma serie homologa de alcoóis graxos. A seguir, podemos observar todos os EM obtidos na análise da mistura de alcoóis graxos (Figura 18 a-k).

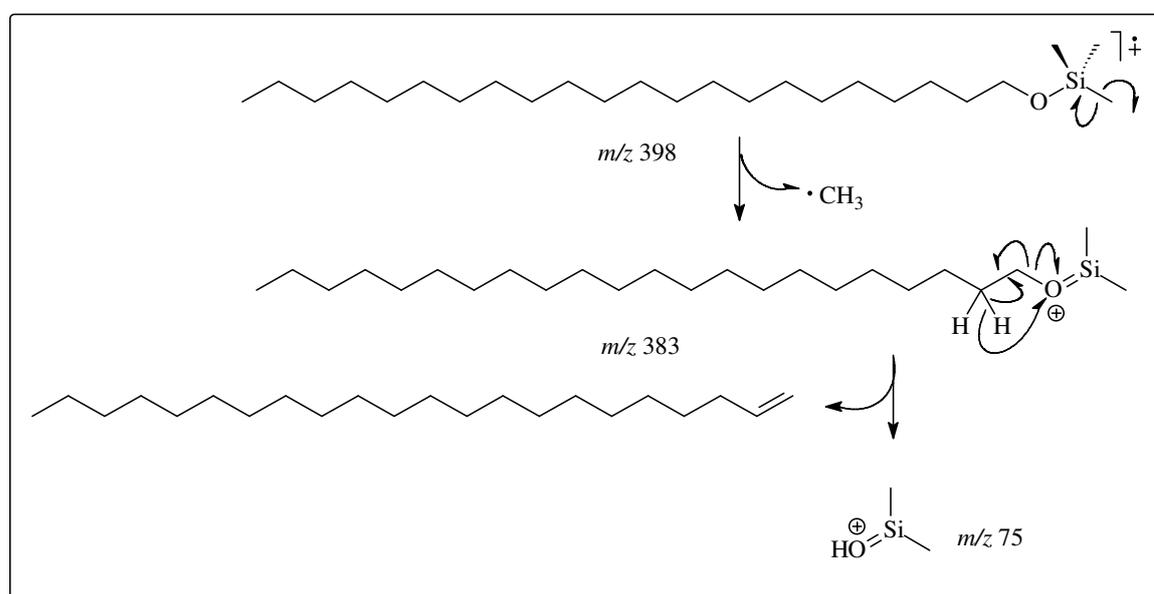






**Figura 18.** EM dos alcoóis graxos registrados no CG (C<sub>22</sub>-C<sub>32</sub>)

O docosan-1-ol (0,24%) eluído com  $T_R = 46,72$  min. no cromatograma de íons totais foi à primeira substância registrada. Além do docosan-1-ol, também estão presentes os alcoóis da série homologa tricosan-1-ol, tetracosan-1-ol, pentaconan-1-ol, hexacosan-1-ol, eptacosan-1-ol, octacosan-1-ol, nonacosan-1-ol, triacontan-1-ol, hentriacontan-1-ol e dotriacontan-1-ol. A identificação foi realizada com base no fragmentograma do espectro de massas (Figura 18 a-k, pág. 51 a 53). O pico do íon molecular dos derivados de TMS nem sempre está presente, mas o pico  $[M - 15]^+$  relativo a perda de um grupo  $\text{CH}_3$  ( $M - 15$ ) é quase sempre intenso (SILVERSTEIN *et al.* 2002), como ocorre nos alcoóis de cadeia longa. Os fragmentos característicos para a identificação dos alcoóis como o docosan-1-ol (Figura 18a, pág. 51) são  $m/z$  383  $[M - \text{CH}_3]^+$  e 75  $[(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}]^+$ , como pode ser observado na Figura 19.



**Figura 19.** Fragmentações do derivado sililado do Docosan-1-ol

Na tabela 15 (pág. 55) encontram-se os alcoóis graxos identificados na amostra **PPF1**.

**Tabela 15.** Alcoóis graxos identificados em **PPF1** por CG/EM

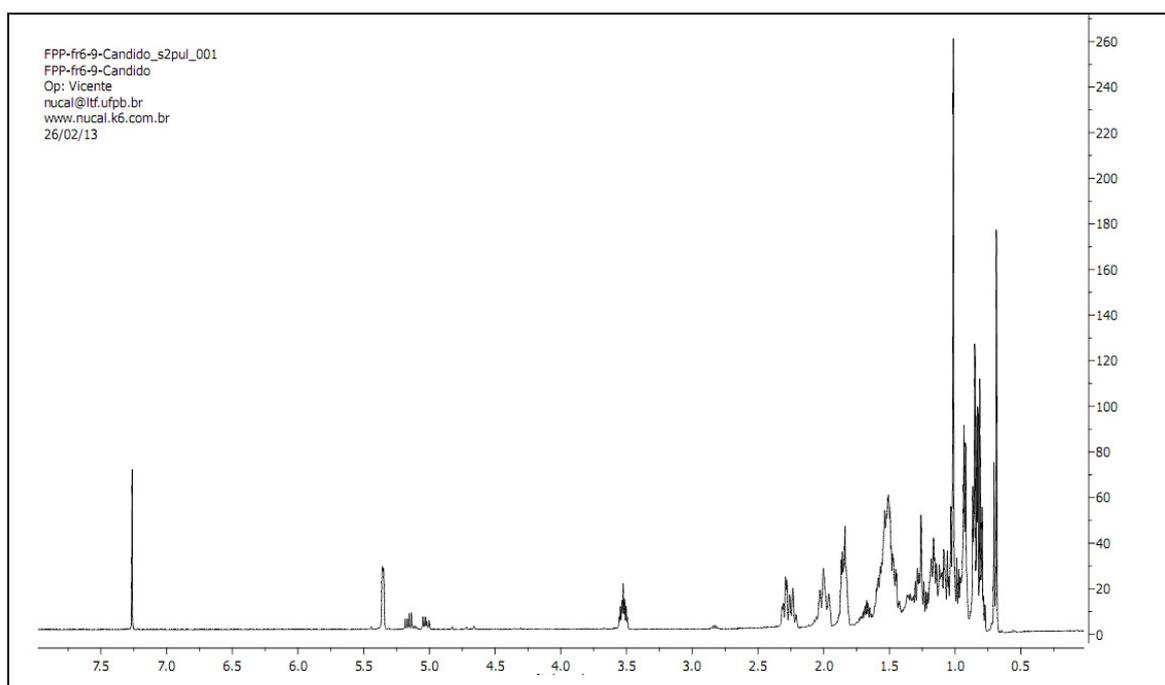
<b>Substância</b>	<b>N° de C</b>	<b>T<sub>R</sub></b>	<b>M<sup>+</sup> – 15</b>	<b>M<sup>+</sup></b>	<b>%*</b>
1	22	46,725	383	398	0,24
2	23	48,547	397	412	0,18
3	24	50,321	411	426	4,13
4	25	52,012	425	440	1,28
<b>5</b>	<b>26</b>	<b>53,743</b>	<b>439</b>	<b>454</b>	<b>34,89</b>
6	27	55,253	453	468	2,70
<b>7</b>	<b>28</b>	<b>56,914</b>	<b>467</b>	<b>482</b>	<b>39,75</b>
8	29	58,556	481	496	2,14
<b>9</b>	<b>30</b>	<b>60,693</b>	<b>495</b>	<b>510</b>	<b>13,48</b>
10	31	63,105	509	524	0,31
11	32	66,135	538	538	0,90
<b>Total</b>					<b>100</b>

\* Área percentual relativa na mistura.

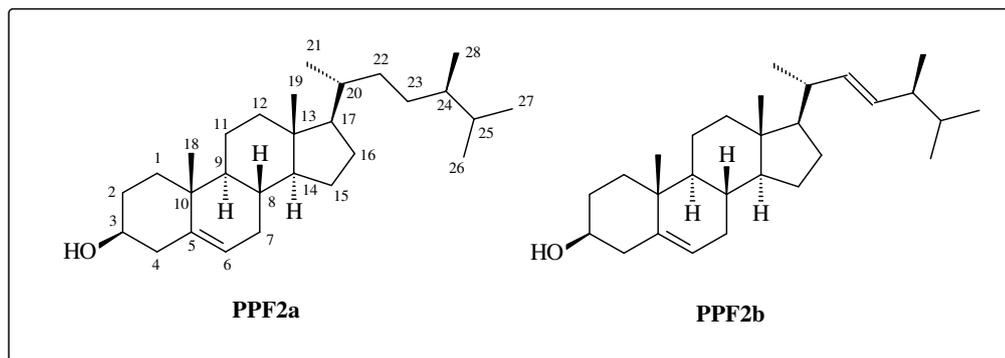
#### 4.3.2 - Identificação de esteróides (PPF2a-b)

Os esteróides são biossintetizados tanto pela rota do ácido mevalônico (mevalonato) quanto pela rota do deoxixilulose fosfato. A rota do ácido mevalônico é formada por três moléculas de acetil coenzima-A (AcSCo-A). Esta rota conduz a uma série de compostos diferentes dos produzidos pela rota do acetato (AcSCo-A). A rota do deoxixilulose fosfato é formada pela combinação de dois intermediários da via glicolítica, o ácido pirúvico e o gliceraldenido 3-fosfato. As rotas do mevalonato e deoxixilulose fosfato são juntas responsáveis pela biossíntese de vários metabolitos terpênicos e esteroidais (DEWICK, 2002).

Assim, **PPCR2** obtida da fase DCM, foi submetida à análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20) que confirmou a presença da mistura dos esteróides sitosterol (**PPF2a**) e estigmasterol (**PPF2b**), freqüentemente encontrados em plantas e previamente isolados nas folhas, caule e casca da raiz de *P. pyramidalis*. O sitosterol (**PPF2a**) e estigmasterol (**PPF2b**) foram identificados pela comparação direta de seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com os disponíveis em nosso grupo de pesquisa (MENDES, 1996; BAHIA, 2007 e OLIVEIRA, 2010). Assim, outros espectros não foram necessários para elucidação da mistura que se encontra na proporção de 3:2, calculado com base na integral dos hidrogênios metilênicos e metínicos do sitosterol/estigmasterol (Figura 21), respectivamente.



**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura **PPF2a** e **PPF2b** isolada na fase DCM das flores de *P. Pyramidalis*

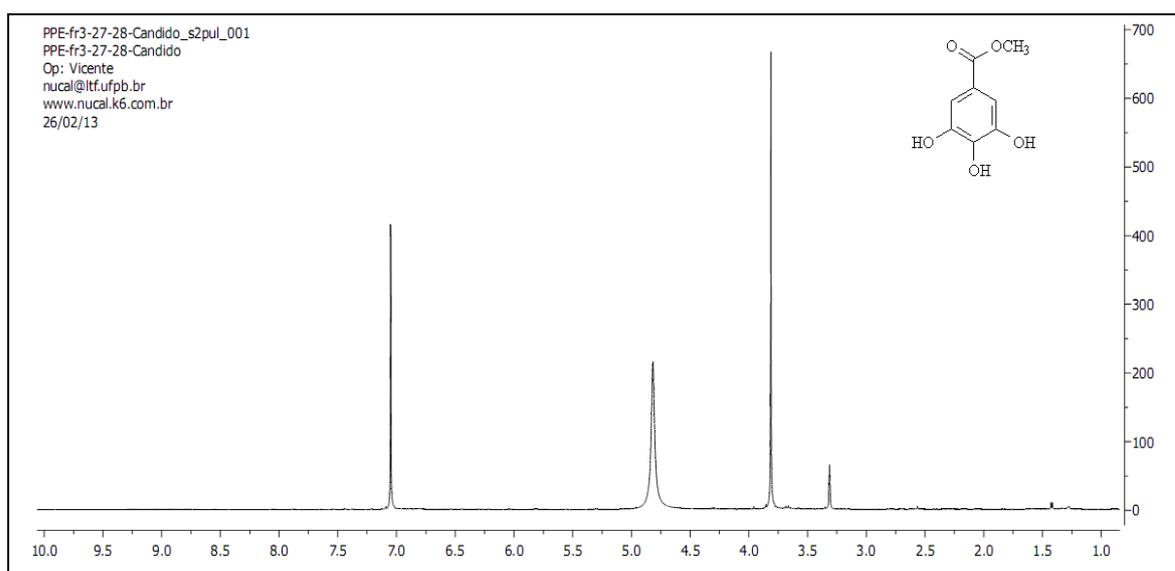


**Figura 21.** Estrutura química do sitosterol (**PPF2a**) e estigmasterol (**PPF2b**) isolados em mistura

### 4.3.3 - Identificação do galato de metila (PPF3)

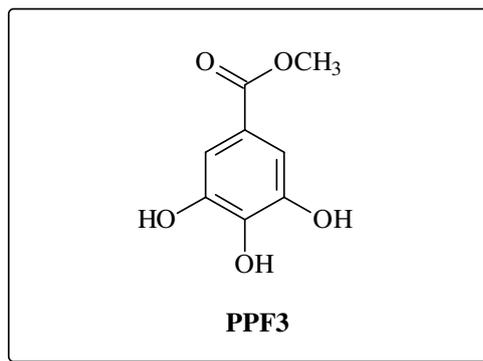
Os compostos fenólicos são produzidos via rota AcSCo–A, um produto de degradação de carboidratos ou ainda via malonato, formado a partir de unidades de AcSCo–A. São precursores importantes na biossíntese de diversos policetídeos (MANN, 1994).

A substância **PPF3** (32,2 mg) obtida da fase DCM, apresentou-se na forma de sólido amorfo de coloração levemente amarela. Seu PF variou de 256,6 – 258,9 °C. Ainda apresentou resultado positivo utilizando revelador para compostos fenólicos (FeCl<sub>3</sub>), uma solução de cloreto férrico. Assim, a **PPF3** foi submetida à análise de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 22) que apresentou apenas dois singletos, um em  $\delta$  7,04 e outro em  $\delta$  3,80 integrados para dois e três hidrogênios, respectivamente. Estes sinais são característicos de substâncias fenólicas com grupo metoxílico presente em sua estrutura. Com esses dados foi possível identificar que a substância **PPF3** é o galato de metila.



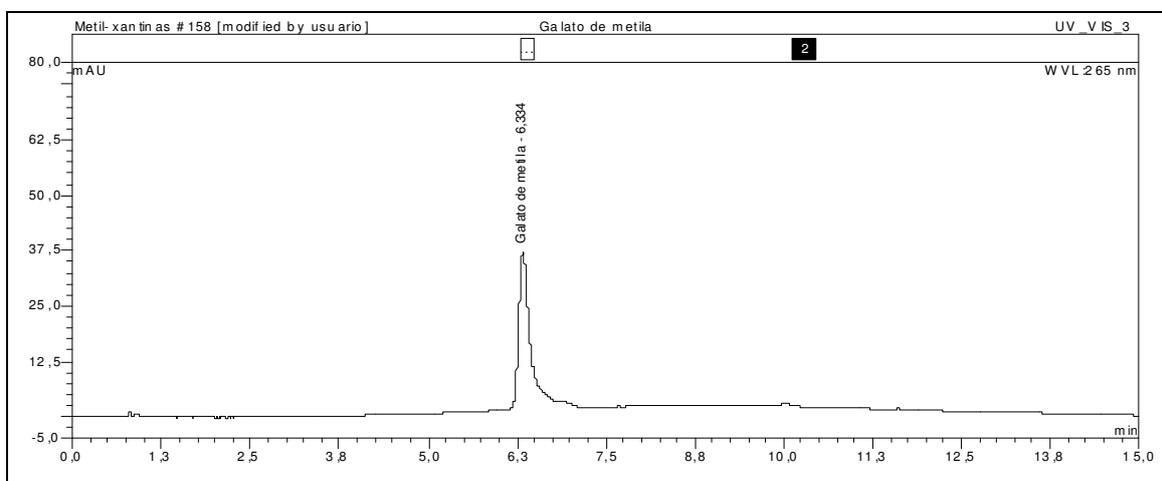
**Figura 22.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **PPF3** isolada das flores de *P. pyramidalis*

O galato de metila (**PPF3** - Figura 23, pág. 59) foi previamente relatado sua presença nas folhas de *P. pyramidalis* (MENDES, 1996).



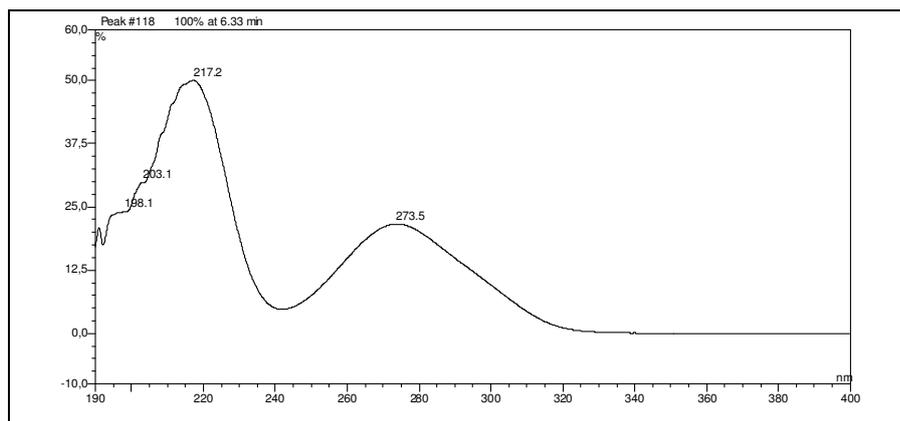
**Figura 23.** Estrutura química do galato de metila (**PPF3**)

Como não foi possível realizar o espectro de RMN <sup>13</sup>C para **PPF3**, a mesma foi analisada por HPLC-DAD, que gerou o cromatograma (Figura 24), utilizando sistema em gradiente iniciando com mistura de MeOH e solução de ácido fórmico 0,2% na proporção de 1:99 até 100% de MeOH. O fluxo de 0,4 mL/min, programado para 15 min. que forneceu um cromatograma e um espectro no UV cuja melhor resolução se observa no comprimento de onda em 265 nm.



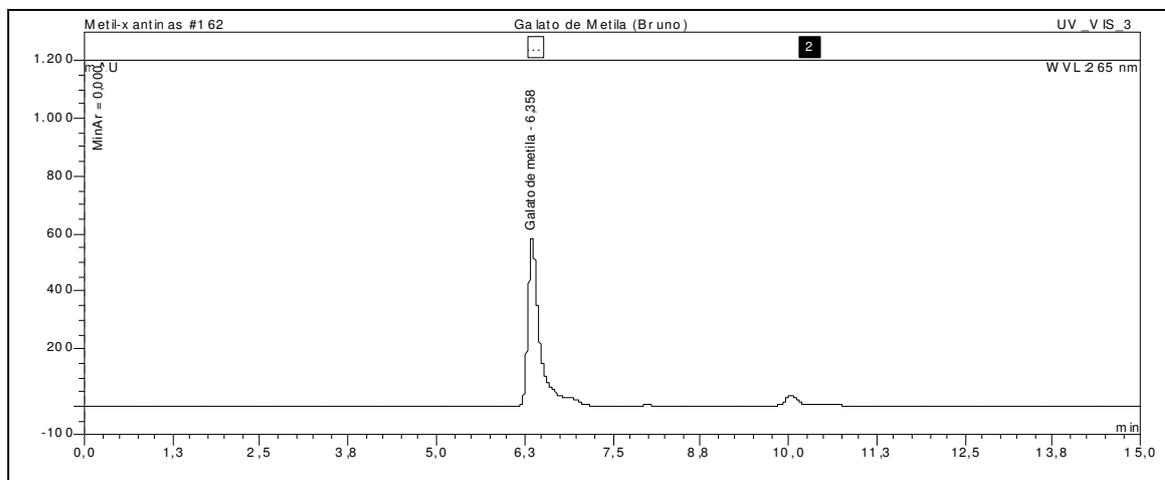
**Figura 24.** Cromatograma obtido por HPLC de **PPF3**

Desta forma, foi registrado um tempo de retenção ( $T_R$ ) de 6,33 minutos para **PPF3** e seu respectivo espectro no UV (Figura 25, pág. 60) apresenta dois máximos de absorção, um em 217 nm e outra em 273 nm.

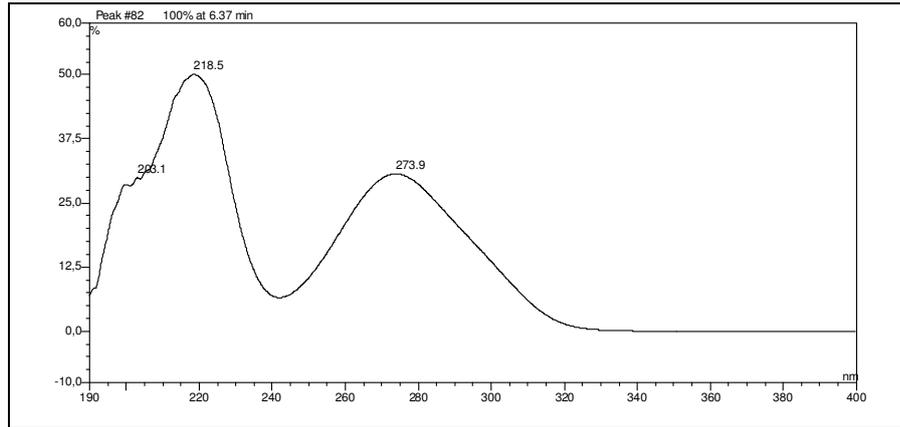


**Figura 25.** Espectro no UV de **PPF3**

Uma amostra de galato de metila, isolado e identificado no caule de *Schinopsis brasiliensis* por Moreira em 2009 foi utilizada como padrão na identificação do galato de metila presente na fração **11-12B**. Assim, o padrão de galato de metila foi injetado no HPLC nas mesmas condições de análise submetida à **PPF3**. Assim, o cromatograma (Figura 26) do galato de metila (*S. brasiliensis*) e seu espectro no UV (Figura 27, pág. 61) correspondem ao registrado para a fração **11-12B**.



**Figura 26.** Cromatograma obtido por HPLC do galato de metila (*S. brasiliensis*)

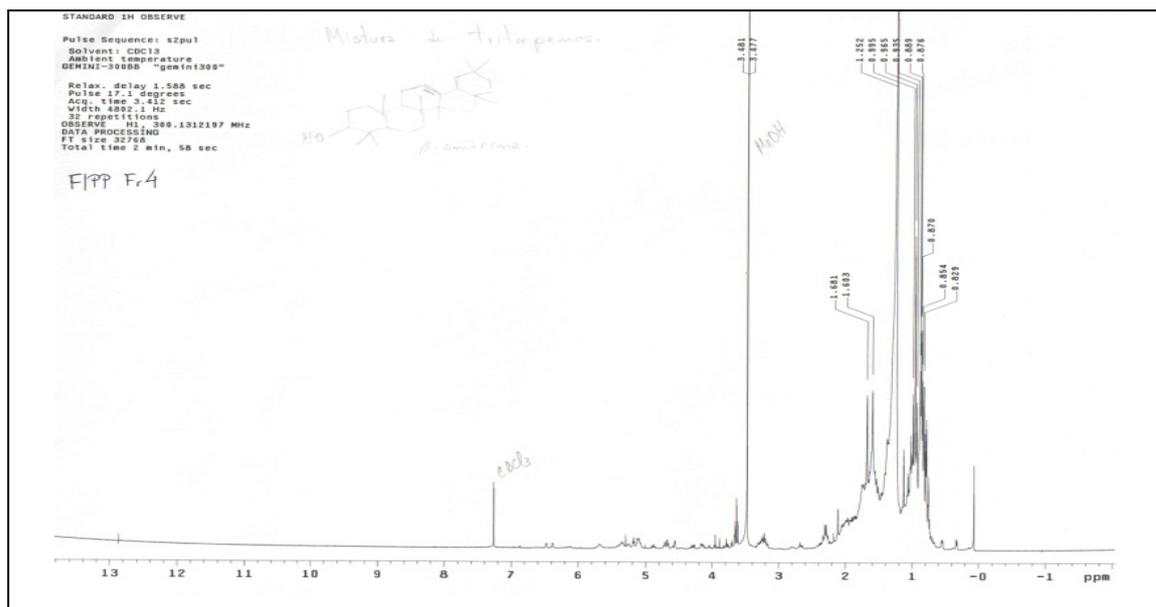


**Figura 27.** Espectro no UV do galato de metila (*S. brasiliensis*)

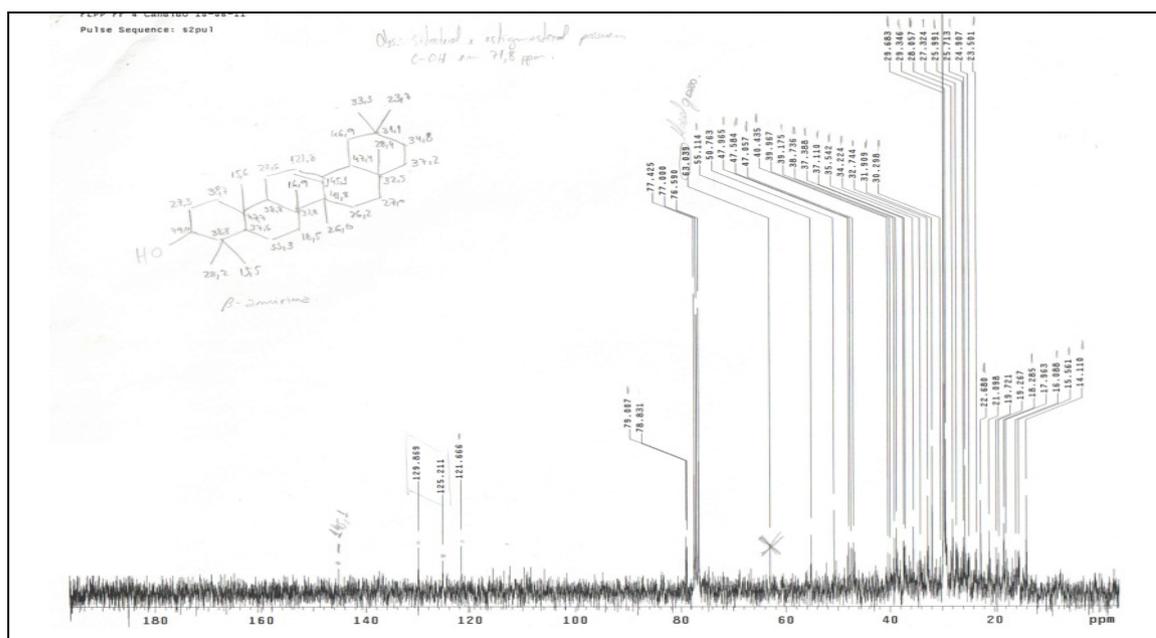
Portanto, foi registrado um tempo de retenção ( $T_R$ ) = 6,35 min. para o galato de metila (*S. brasiliensis*) e  $T_R$  = 6,33 min. para **PPF3** quando submetidas às mesmas condições de análise, além de um espectro no UV idêntico entre as amostras analisadas. Portanto, inferiu-se à que **PPF3** trata-se do galato de metila.

#### 4.3.4 - Identificação da $\alpha$ - e $\beta$ -amirina (PPF4a-b) em mistura

A substância **PPF4a-b** (89,1 mg) foi isolada em mistura com **PPF1**. O reagente de Lieberman-Burchard permitiu identificar que a mesma poderia ser de natureza triterpênicas ou esteroidais. Assim, essa substância, foi submetida à análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 28) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 29) do qual observou-se sinais característicos de triterpenos.

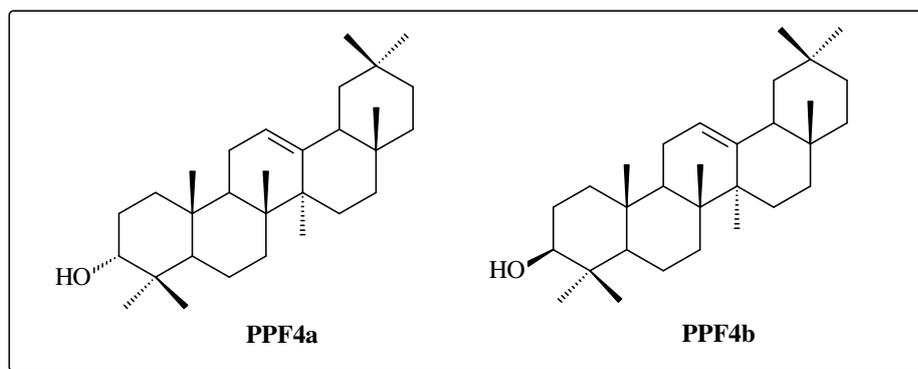


**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura **PPF4a** e **PPF4b**



**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura **PPF4a** e **PPF4b**

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância **PPF4a** e **PPF4b** foi realizada subtraindo os sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  referentes aos dos alcoóis graxos (**PPF1**). Portanto, excluindo-se os sinais dos alcoóis graxos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na mistura foi possível identificar  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (**PPF4a-b**, Figura 30) através de comparação com dados da literatura (LIMA *et al.* 2004). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  o carbono em C-3 de **PPF4a** ( $\alpha$ -amirina) é registrado em  $\delta$  78,8 (oximetínico) e carbonos da ligação dupla (C-12 e C-13) apresentam deslocamentos químicos de  $\delta$  129,8 e  $\delta$  125,2. Ainda no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  o carbono em C-3 de **PPF4b** ( $\beta$ -amirina) é registrado em  $\delta$  79,0 (oximetínico) e os carbonos da ligação dupla, os carbonos C-12 e C-13 apresentam deslocamento químico de  $\delta$  121,8 e  $\delta$  145,1, respectivamente. Desta forma, o que temos é uma mistura binária de triterpenos com alcoóis graxos.



**Figura 30.** Estrutura química da  $\beta$ -amirina (**PPF4**)

Os dados observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **PPF4a-b** foram comparados com dados descritos na literatura e encontram-se sumarizados na Tabela 16 (pág.64).

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **PPF4a-b** e da literatura\*

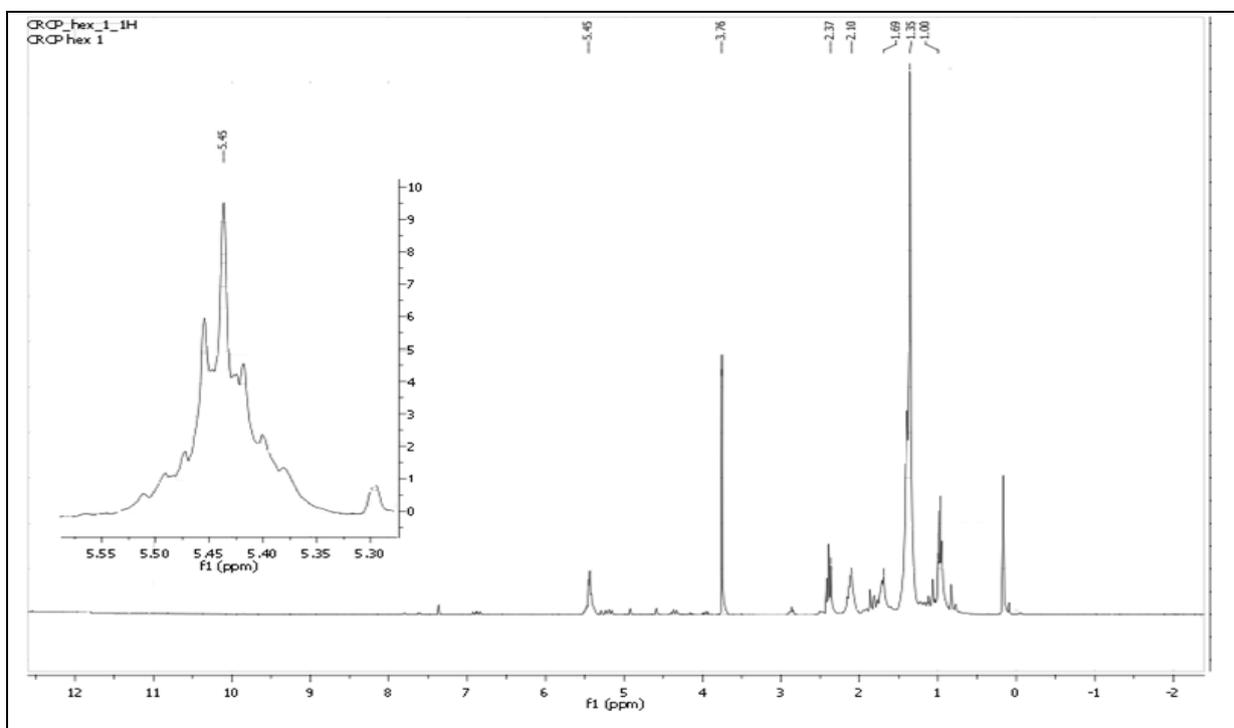
<b>Posição</b>	$^{13}\text{C}^*$	$^{13}\text{C}$	<b>Posição</b>	$^{13}\text{C}^*$	$^{13}\text{C}$
1	38,7	38,7	16	27,0	27,3
2	27,3	27,3	17	32,5	32,7
3	79,0	79,0	18	47,4	47,9
4	38,8	38,7	19	46,9	47,0
5	55,3	55,1	20	31,1	31,9
6	18,5	18,2	21	34,8	34,2
7	32,8	32,7	22	37,2	37,1
8	38,8	39,1	23	28,2	28,0
9	47,7	47,5	24	15,5	15,5
10	37,6	37,3	25	15,6	16,0
11	23,6	23,5	26	16,9	17,9
12	121,8	121,6	27	26,0	25,7
13	145,1	145,1	28	28,4	29,3
14	41,8	40,4	29	33,3	34,2
15	26,2	25,9	30	23,7	22,6

\* LIMA *et al.* 2004

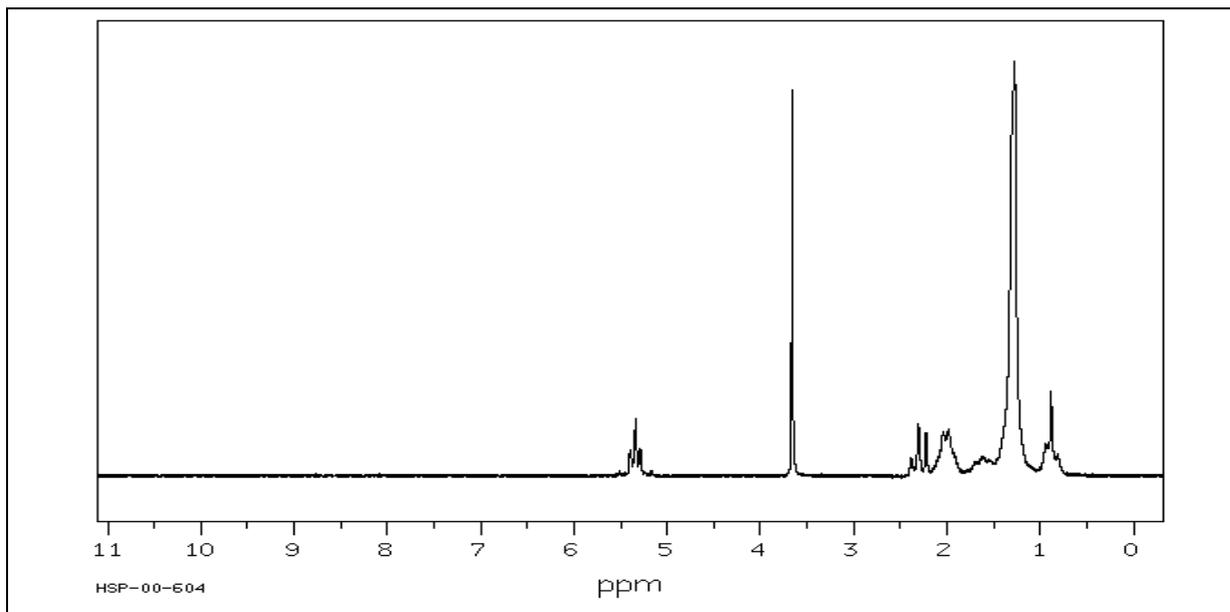
#### 4.4 - Elucidação estrutural das substâncias isoladas na casca da raiz de *P. pyramidalis*

##### 4.4.1 - Identificação dos ésteres metílicos derivados de ácidos graxos

De acordo com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **PPCR1** (Figura 31) ficou claro que esta era uma mistura e os sinais são característicos de ésteres derivados de ácidos graxos saturados e insaturados. Sendo assim, o sinal em  $\delta$  5,33 (m), integrado para dois hidrogênios, possuem a mesma multiplicidade observada para o oleato de metila (9-octadecenoato de metila\*, Figura 32, pág. 66). Por outro lado, o sinal em  $\delta$  3,65 (s), integrado para seis hidrogênios, indicam que há uma mistura de pelo menos dois ésteres metílicos derivados de ácidos graxos na análise de **PPCR1**.



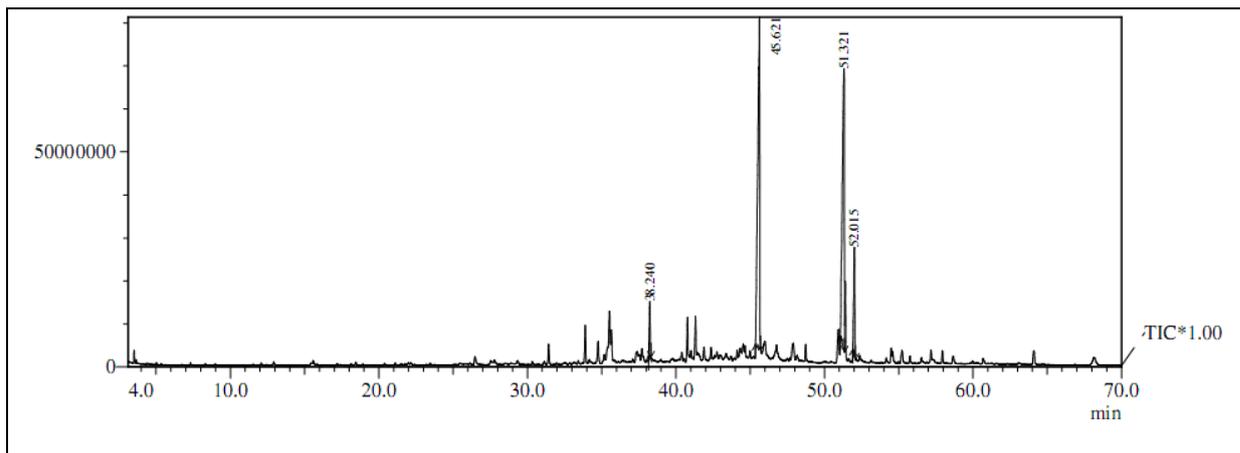
**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de ésteres metílicos de **PPCR1**



**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do oleato de metila \*SDBS - No. 8872HSP-00-604

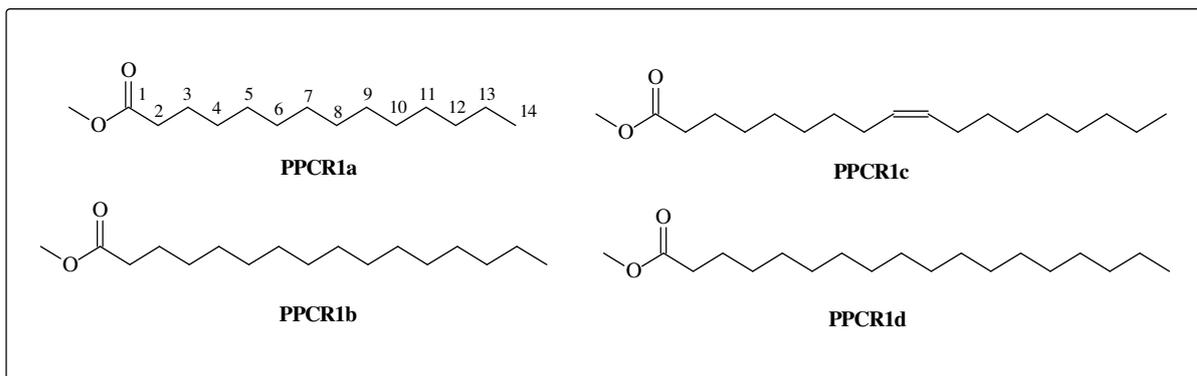
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **PPCR1**, há presença de um sinal em  $\delta$  174,66 que é característico de carbonos acílicos de ésteres, e a presença de dois sinais em  $\delta$  130,25 e  $\delta$  129,98 referentes aos carbonos olefínicos, além da presença do sinal em  $\delta$  51,70 correspondente ao carbono oximetílico ( $-\text{OCH}_3$ ). Uma metila também foi identificada em  $\delta$  14,37 e vários sinais de carbonos metínicos ( $-\text{CH}_2-$ ) entre  $\delta$  22,96 a  $\delta$  34,38. Estes sinais, juntamente com os obtidos do RMN  $^1\text{H}$  **PPCR1** (Figura 31, pág. 65), correspondem ao oleato de metila. Por outro lado, não foi possível estabelecer qual éster metílico encontra-se em mistura com o oleato de metila.

O óleo obtido na **PPCR1** foi analisado por CG/EM no modo ionização por impacto de elétrons. O cromatograma da fração **1-2** (Figura 33, pág. 67) apresentou dois sinais com intensidades superiores a 40% e seus espectros de massas possuem fragmentações que corroboram que sejam de ésteres metílicos derivados de ácidos graxos saturados e insaturados, como observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 33.** Cromatograma da mistura de ésteres metílicos de **PPCR1**

Pela análise minuciosa de todos os picos observados no CG/EM pode-se identificar a presença de pelo menos quatro ésteres metílicos de ácidos graxos (Figura 34). Contudo, pela área relativa dos picos no cromatograma de **PPCR1** há apenas dois (**PPCR1-b** e **PPCR1-c**) majoritários na mistura.



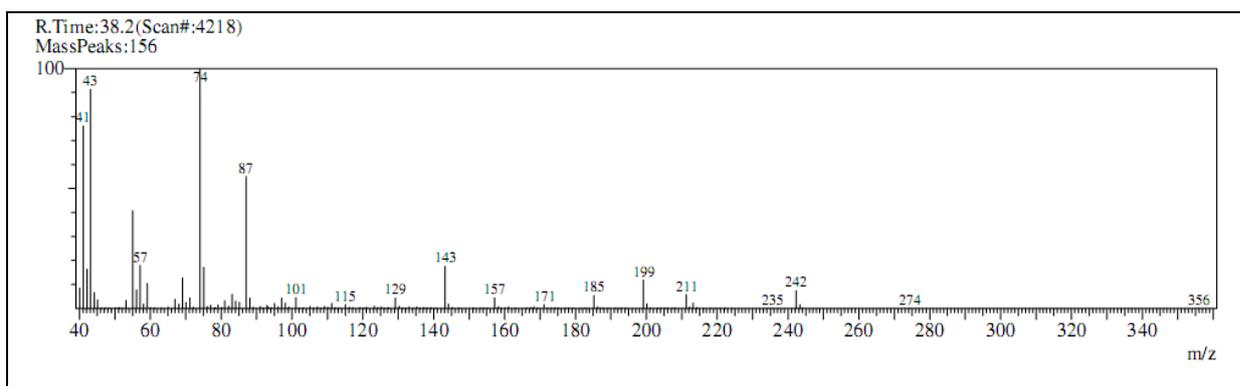
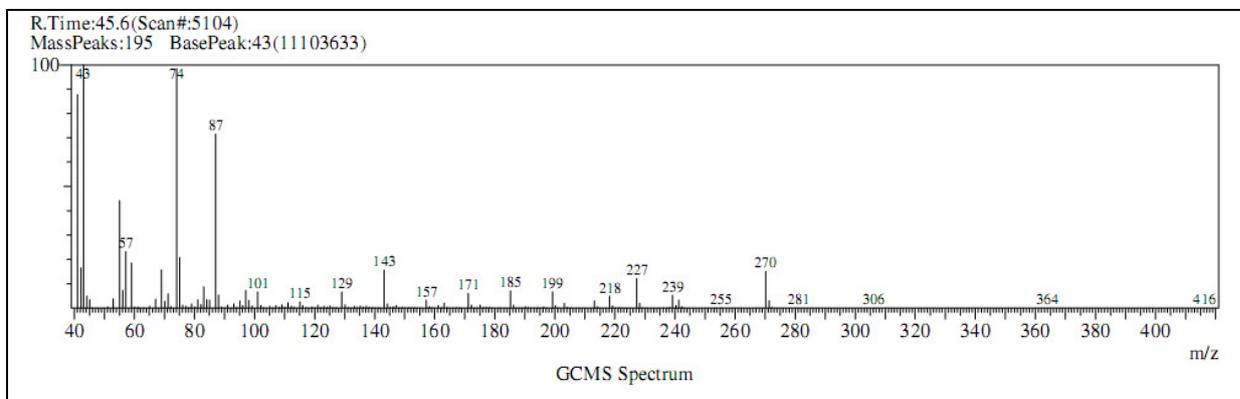
**Figura 34.** Ésteres metílicos derivados de ácidos graxos identificados por CG/EM de **PPCR1**

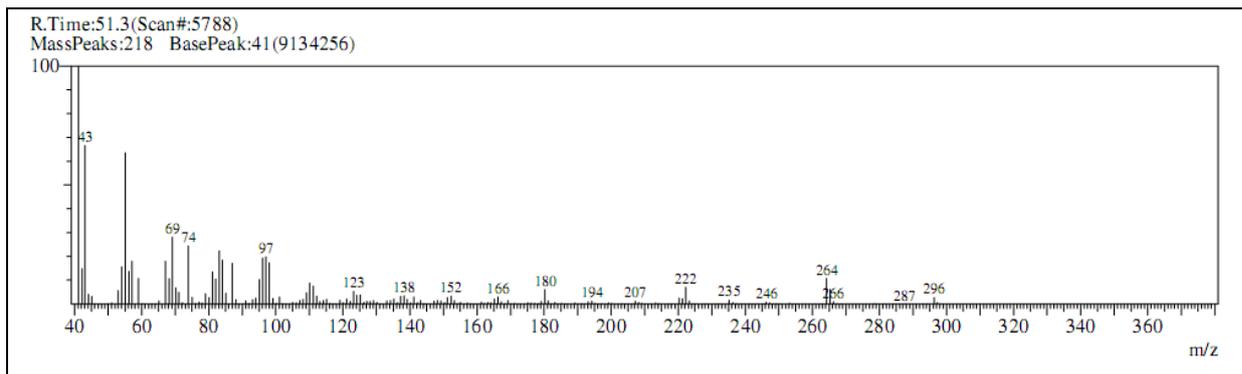
Desta maneira, foram identificados em **PPCR1** a mistura dos ésteres metílicos tetradecanoato de metila (**PPCR1-a**) hexadecanoato de metila (**PPCR1-b**), oleato de metila (**PPCR1-c**) e octadecanoato de metila (**PPCR1-d**). Sendo que, os majoritários foram hexadecanoato de metila (**PPCR1-b** – 46,19%) e oleato de metila (**PPCR1-c** – 41,66%). Na Tabela 17 (pág. 68) observa-se a proporção de cada éster metílico um em relação ao outro, identificados em **PPCR1**.

**Tabela 17.** Substâncias identificadas por CG/EM de **PPCR1**

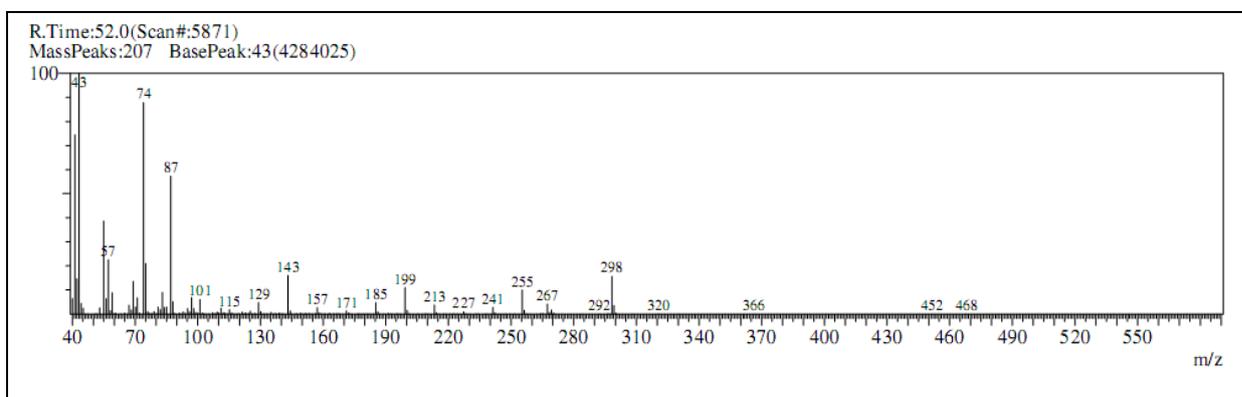
Substâncias	Tempo de Retenção	%
Tetradecanoato de metila	38,24	3,79
Hexadecanoato de metila	45,62	46,19
Oleato de metila	51,32	41,66
Octadecanoato de metila	52,01	8,36
<b>Total</b>		<b>100,00</b>

Sendo assim, ficou claro que na amostra em análise existe realmente uma mistura de ésteres metílicos derivados de ácidos graxos. Sendo atribuído aos respectivos espectros de massas as substâncias (**PPCR1 a, b e d**) como sendo o ésteres metílicos saturado (Figura 35, 36 e 38) e a substância (**PPCR1-c**) como sendo um éster metílico insaturado bastante comum na natureza, o oleato de metila (Figura 37, pág. 69).

**Figura 35.** EM 70 eV de (**PPCR1-a**) – tetradecanoato de metila MS = 242**Figura 36.** EM 70 eV de (**PPCR1-b**) – hexadecanoato de metila MS = 270



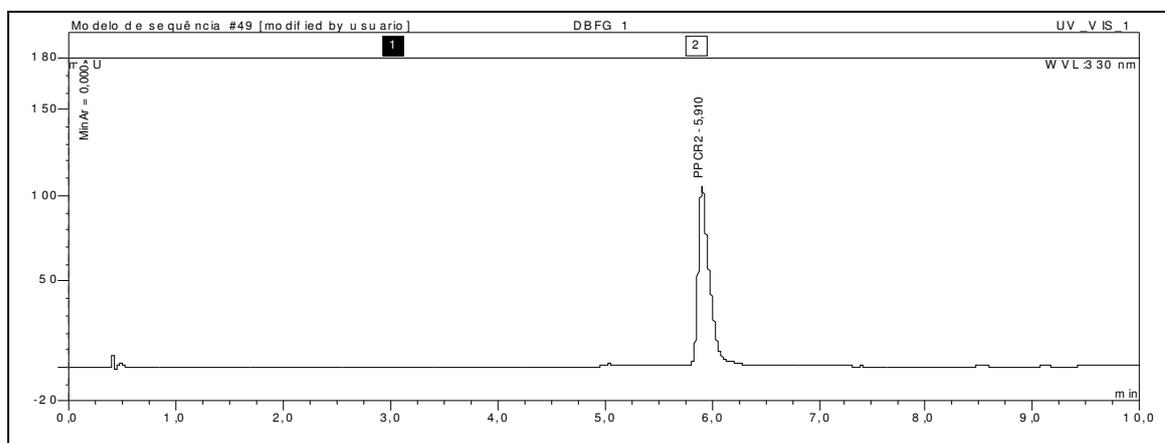
**Figura 37.** EM 70 eV de (PPCR1-c) – oleato de metila MS = 296



**Figura 38.** EM 70 eV de (PPCR1-d) – octadecanoato de metila MS = 298

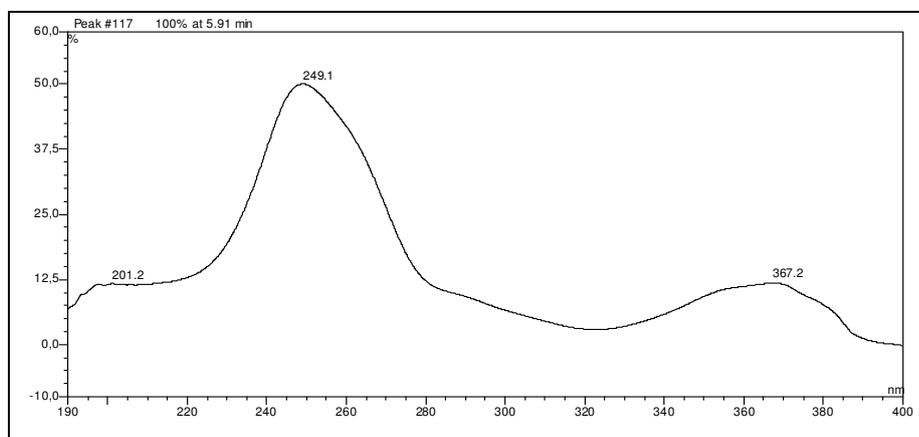
#### 4.4.2 - Identificação do ácido Ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PPCR2).

A substância **PPCR2** foi isolada da fase  $\text{CHCl}_3$  das cascas das raízes de *P. pyramidalis*, na forma de sólido amorfo amarelo, PF de 169,3 – 171,7 °C. A pureza da amostra foi avaliada por análise em HPLC-DAD da DIONEX. Assim, utilizando coluna analítica da DIONEX, modelo Acclaim® 120, C18 – 5  $\mu\text{m}$  – 120 Å (2,1 x 100 mm), injeção automática de 5  $\mu\text{L}$  da solução analítica em sistema de eluição no gradiente inicial de 10% de MeOH em 90% de solução 0,2% ácido fórmico e finalizando com 100% de MeOH. O fluxo de 0,8 mL/min. conduziu um menor tempo de análise, que não excedeu 10 minutos. O cromatograma obtido apresentou um pico com  $T_R$  de 6 min. (Figura 39).



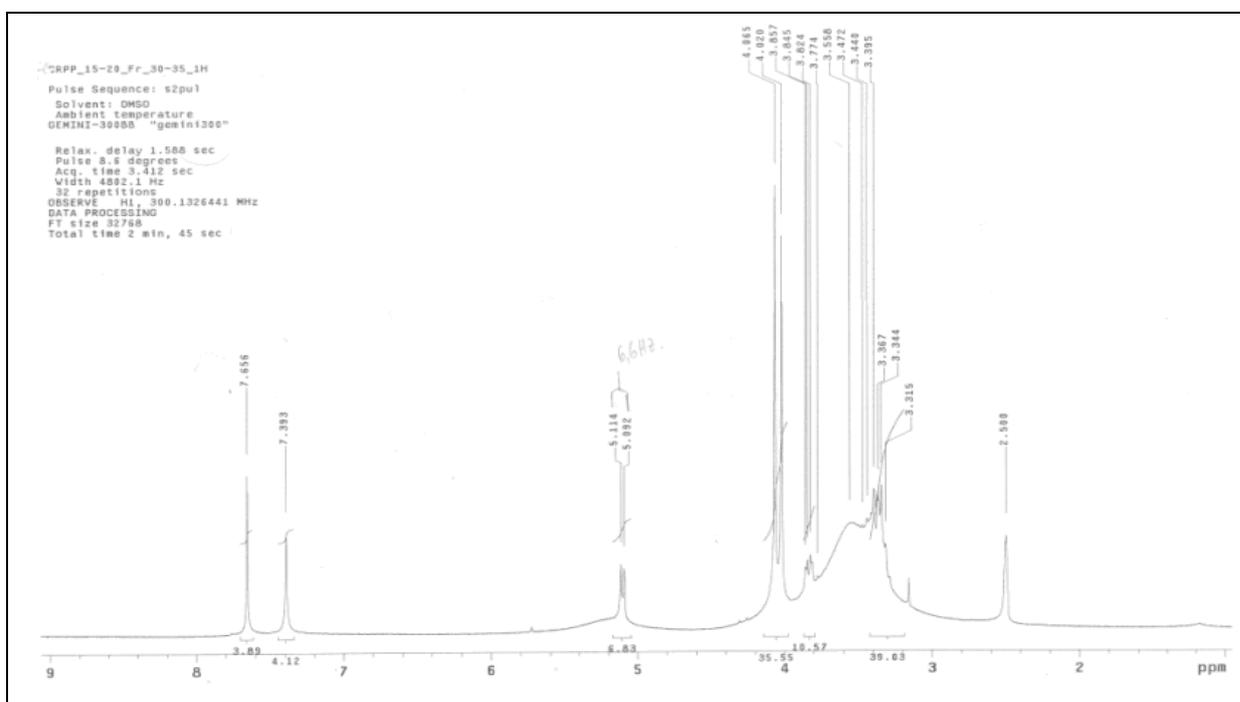
**Figura 39.** Cromatograma obtido por HPLC da substância **PPCR2**  $T_R = 6$  min

O espectro no UV revelou duas bandas, uma em 249 nm e outra em 367 nm indicando presença de sistemas aromáticos ou conjugados de elétrons  $\pi$  (Figura 40).



**Figura 40.** Espectro no UV da substância **PPCR2**

A substância **PPCR2** foi analisada por RMN e seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 41) observa-se dois sinais na região de hidrogênios ligados a sistema aromático, um em  $\delta$  7,30 e outro em  $\delta$  7,02 ambos na forma de singletos e integrados para um hidrogênio cada. Pode ser verificado também um dubleto em  $\delta$  4,86 ( $J = 6,6$  Hz) característico de hidrogênio anomérico de um *O*-glicosídeo, que corrobora devido às multiplicidades observadas entre  $\delta$  3,15 a  $\delta$  3,85 dos demais hidrogênios do glicosídeo. Dois singletos referentes a grupos metoxílicos também são observados, um em  $\delta$  3,94 e outro em  $\delta$  3,89 e integrados para três hidrogênios cada. Mediante a obtenção do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO}_{d-6}$  ficou impossível calcular as constantes de acoplamento para a unidade glicosídica, uma vez que, o sinal de água aparece na região dos mesmos. A resolução do espectro indicou que se tratava de um benzenóide simétrico e glicosilado.

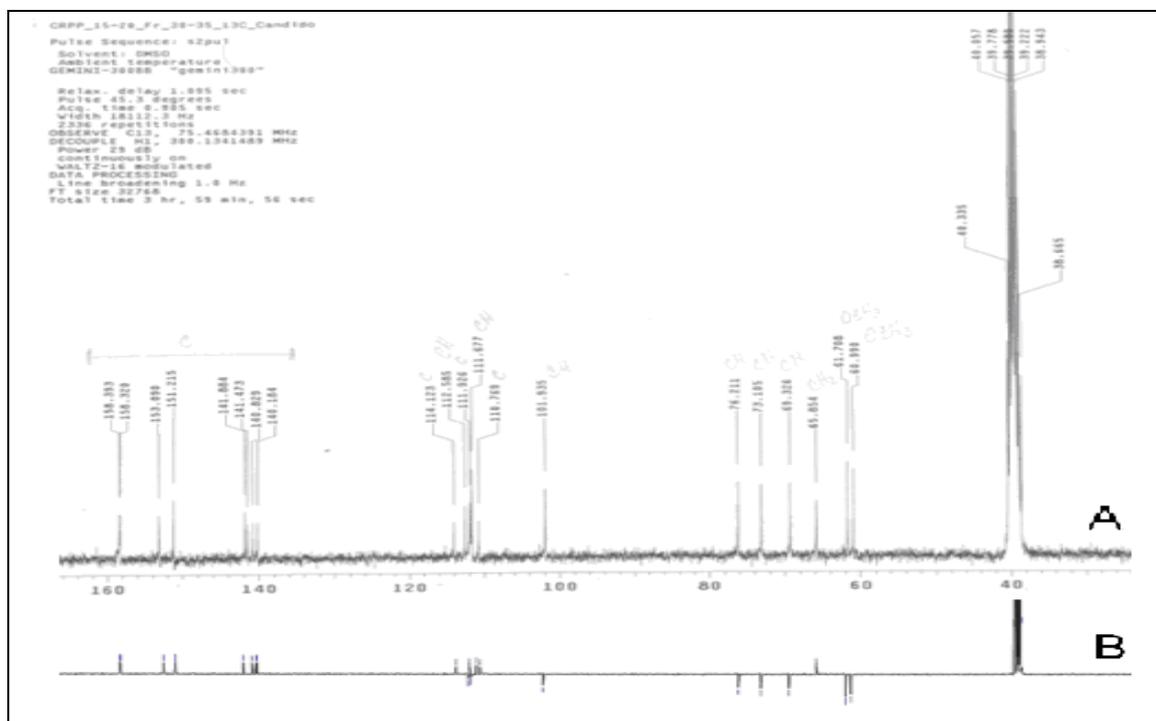


**Figura 41.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}_{d-6}$ ) da substância **PPCR2**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB da substância **PPCR2** (Figura 42A, pág. 72) revelou a presença de vinte e um carbonos, dos quais eram impossíveis de serem estabelecidos em apenas uma unidade benzoila. Assim, dos vinte e um sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , cinco são de uma unidade glicosídica (incluindo o carbono anomérico em  $\delta$  102,6). Os demais estão em  $\delta$  76,6;  $\delta$  73,6;  $\delta$  69,9 e  $\delta$  66,2. A presença de duas metoxilas foi confirmada, uma em  $\delta$  61,8 e outra em  $\delta$  61,1. Os demais carbonos do benzenóide estão entre  $\delta$  110,9 a  $\delta$

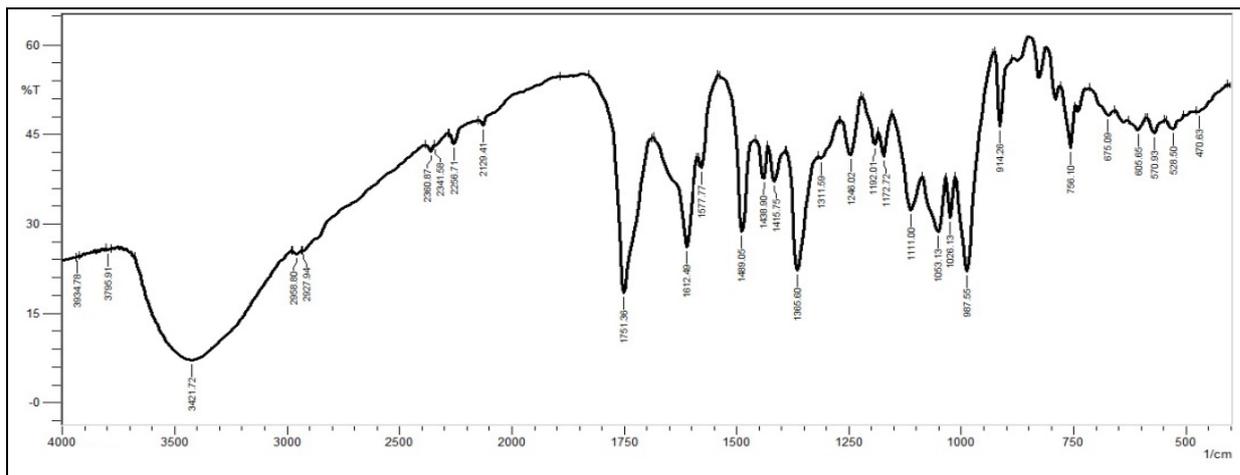
158,8. Estes dados sugerem que o benzenóide possui dois anéis aromáticos possivelmente interligados e com um deles ligado a uma unidade de açúcar.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT (Figura 42B) revelou a presença de doze carbonos não hidrogenados, seis metínicos, um metilêno e dois de oximetílico (metoxila). No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 42A) possui sinais duplicados em  $\delta$  158,7 e  $\delta$  158,8 característicos de carbonilas lactônicas ligadas diretamente a anéis aromáticos. Observa-se sinais do glicosídeo com carbono anomérico em  $\delta$  1012,6 indicativo de *O*-glicosídeo. Esses dados de RMN aliados a fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$ , obtida no ESI-EM (Figura 52, pág. 77) sugerem que o açúcar é uma unidade de xilose e uma do ácido elágico (Figura 46, pág. 74).



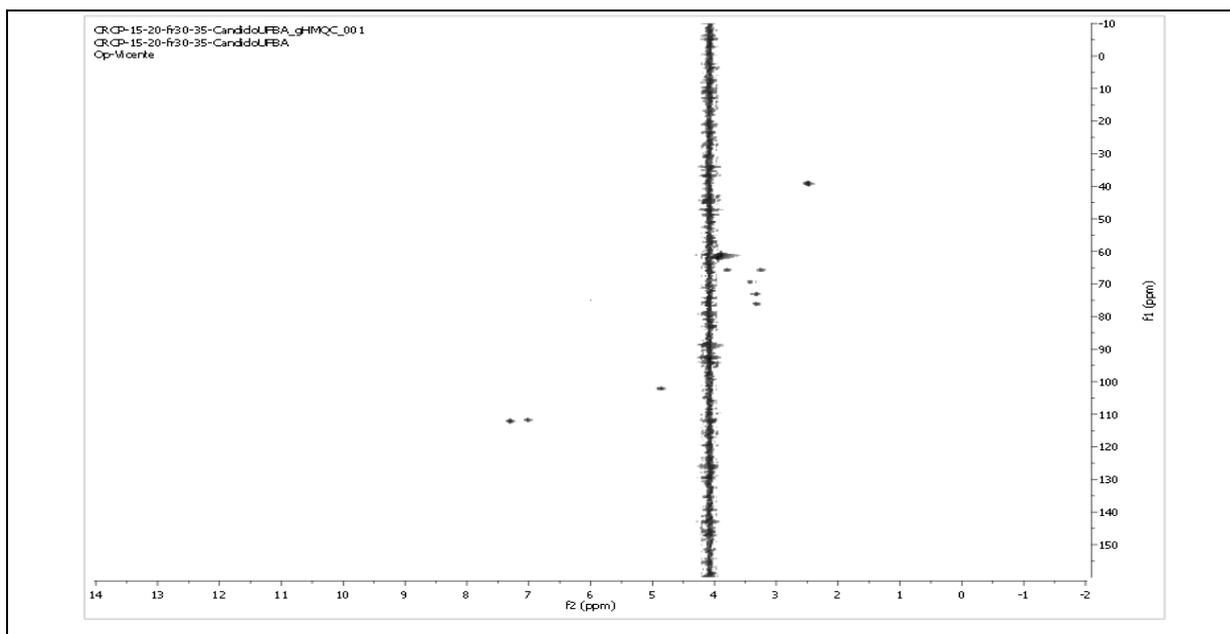
**Figura 42.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB e APT (75 MHz,  $\text{DMSO}_{d-6}$ ) da substância **PPCR2**

Análise no IV (Figura 43, pág. 73) revelou bandas características de grupos hidroxílicos ( $-\text{OH}$ ) em  $3421\text{ cm}^{-1}$ , de grupo carbonílico em  $1751\text{ cm}^{-1}$  e eter conjugado na porção alcoólica e deformação axial de grupos metoxílicos ( $\text{O}-\text{CH}_3$ ) em  $2958; 2927\text{ cm}^{-1}$ .

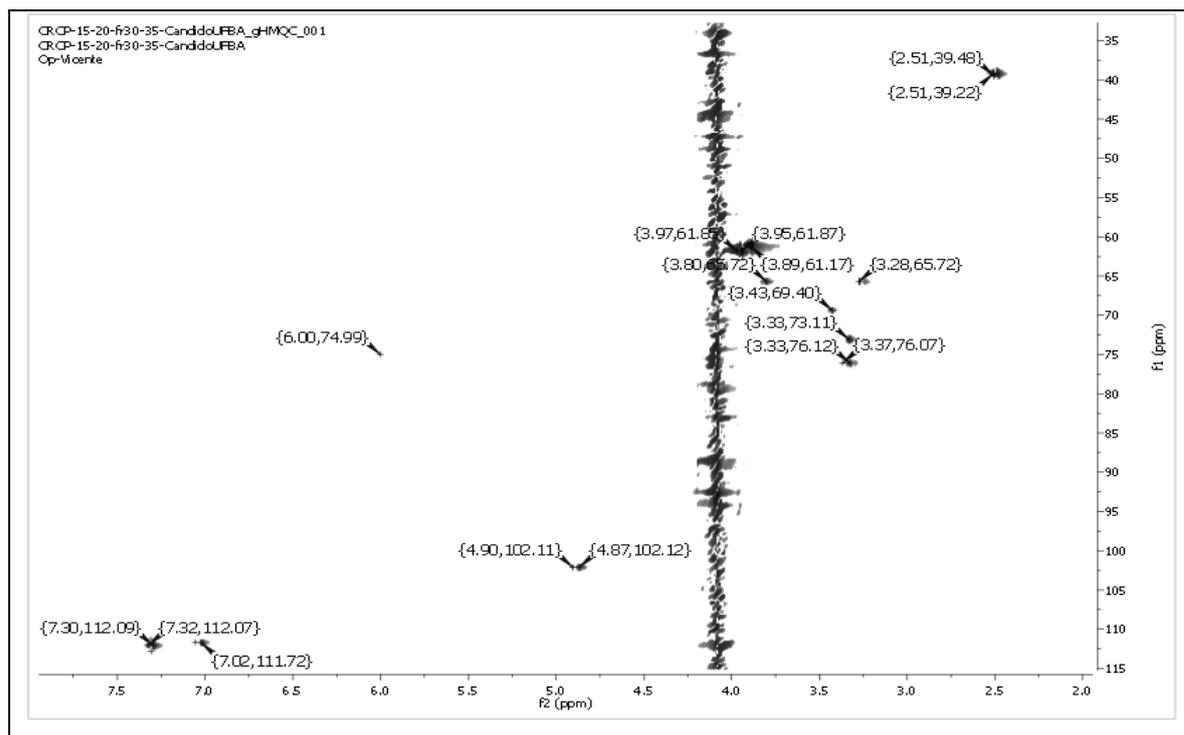


**Figura 43.** Espectro no IV em pastilha de KBr da substância **PPCR2**

Análise do espectro bidimensional de relação direta de H e C, gHMQC (Figura 44) e sua ampliação (Figura 45, pág. 74) revelou correlações diretas de carbonos e hidrogênios do grupo metoxila, que se sabe que possui dois, devido a análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 42, pág. 72), sendo estas correlações observadas em  $\delta$  3,89 (s) -  $\delta$  61,1 (t) e  $\delta$  3,94 (s) -  $\delta$  61,8 (t). Podem ser também observados as correlações entre  $\delta$  7,02 (s) - 112,8 (d) e  $\delta$  7,30 (s) -  $\delta$  112,5 (d) do grupo metínico do anel aromático e as correlações do glicosídeo  $\delta$  3,27 (m) -  $\delta$  66,2 (d);  $\delta$  3,32 (m) -  $\delta$  76,6 (d);  $\delta$  3,33 (m) -  $\delta$  73,6 (d);  $\delta$  3,42 (m) -  $\delta$  69,9 (d) e  $\delta$  4,86 (d;  $J = 6,6$  Hz) -  $\delta$  102,6 (t).

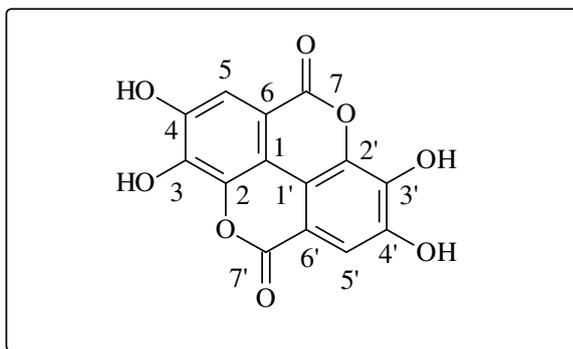


**Figura 44.** Espectro completo de gHMQC da substância **PPCR2**

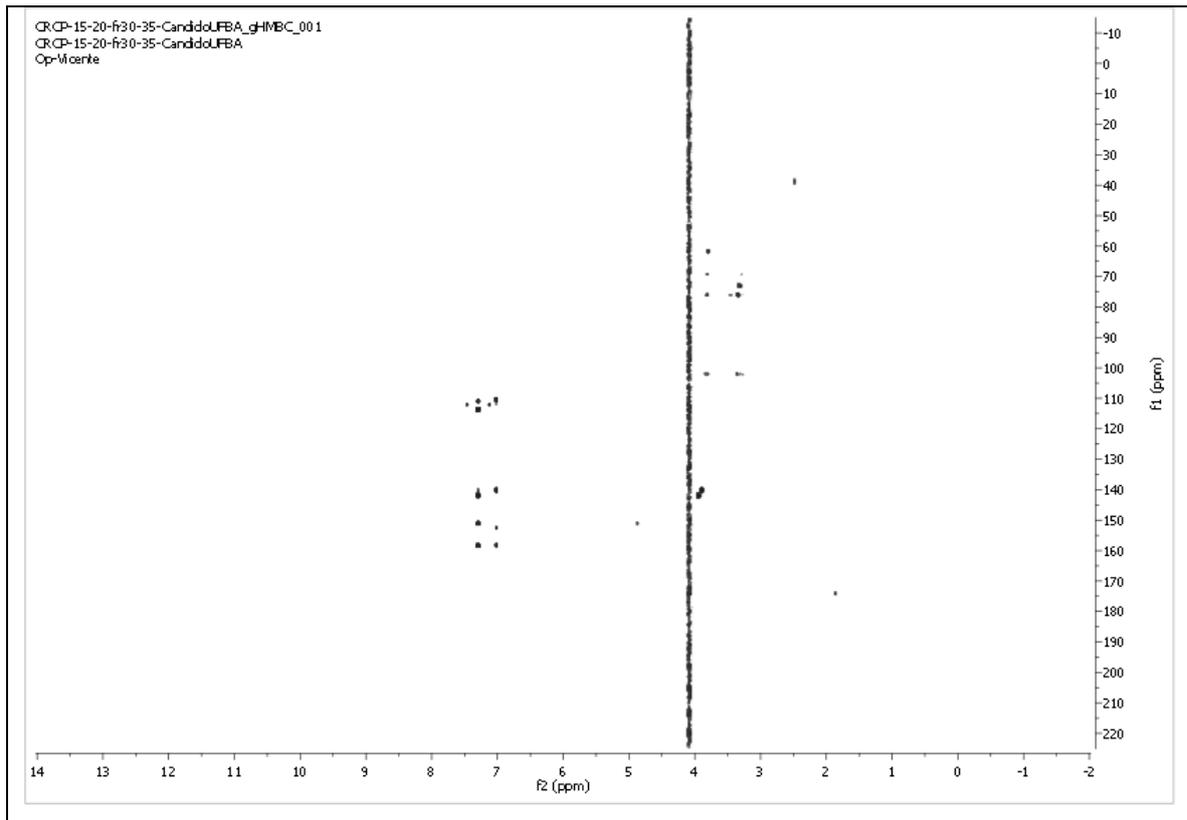


**Figura 45.** Ampliação do espectro de gHMQC da substância **PPCR2**

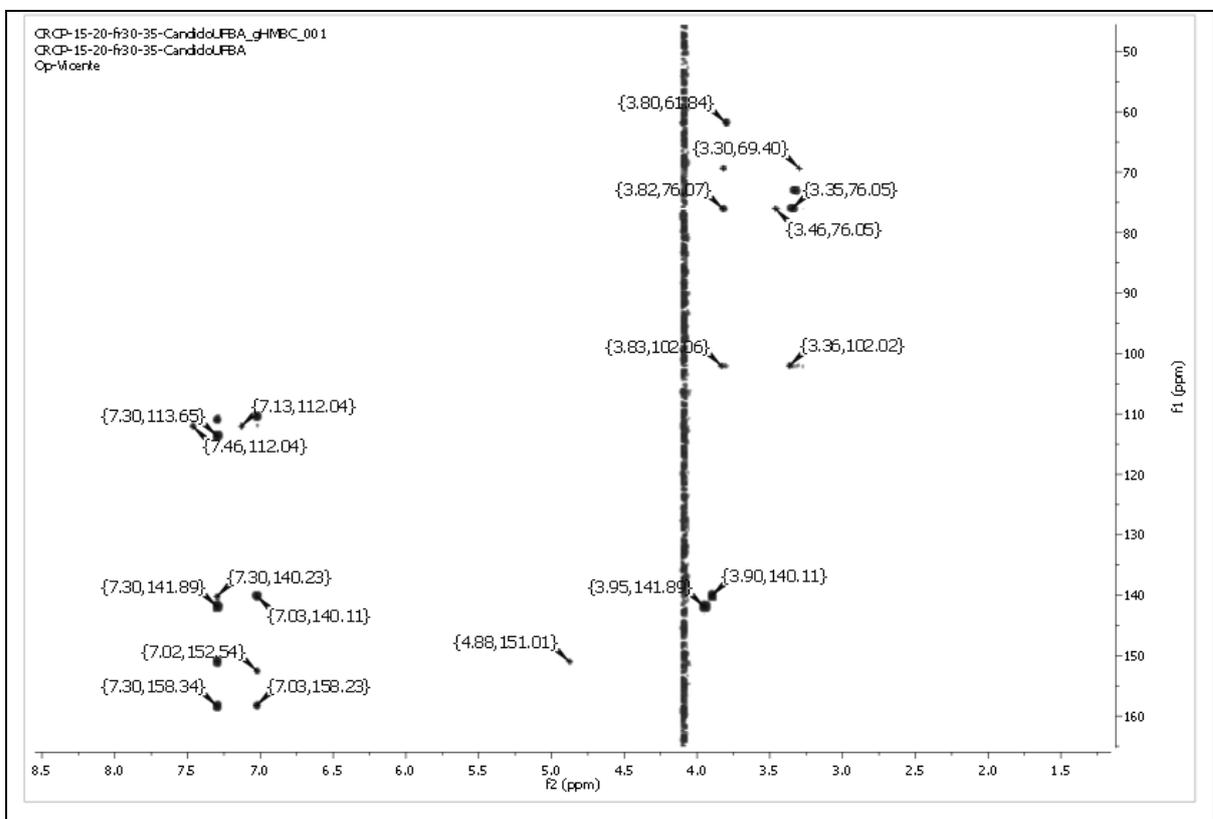
No entanto, a análise bidimensional do espectro de gHMBC (Figura 47, pág. 75) e sua ampliação (Figura 48, pág. 75) permitiu estabelecer quais os sinais que fazem parte de cada unidade aromática. Assim, o singlete em  $\delta$  7,02, observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , correlaciona a múltiplas ligações com os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  158,7;  $\delta$  153,0;  $\delta$  140,7 e  $\delta$  110,9. A outra unidade aromática possui o sinal de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  7,30 se correlacionando com os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  158,8;  $\delta$  151,5;  $\delta$  141,2;  $\delta$  112,3 e  $\delta$  111,5 do RMN de  $^{13}\text{C}$ . Depois de estabelecida as correlações observadas no gHMBC, IV e UV e comparadas com o UV do ácido gálico e ácido elágico inferiu-se que a substância **PPCR2** é derivada do ácido elágico (Figura 46) corroborada pela duplicidade nos sinais de RMN  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 46.** Estrutura química do ácido elágico

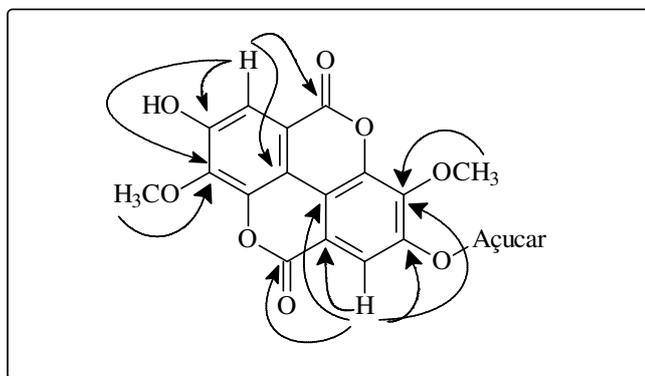


**Figura 47.** Espectro completo de gHMBC da substância **PPCR2**



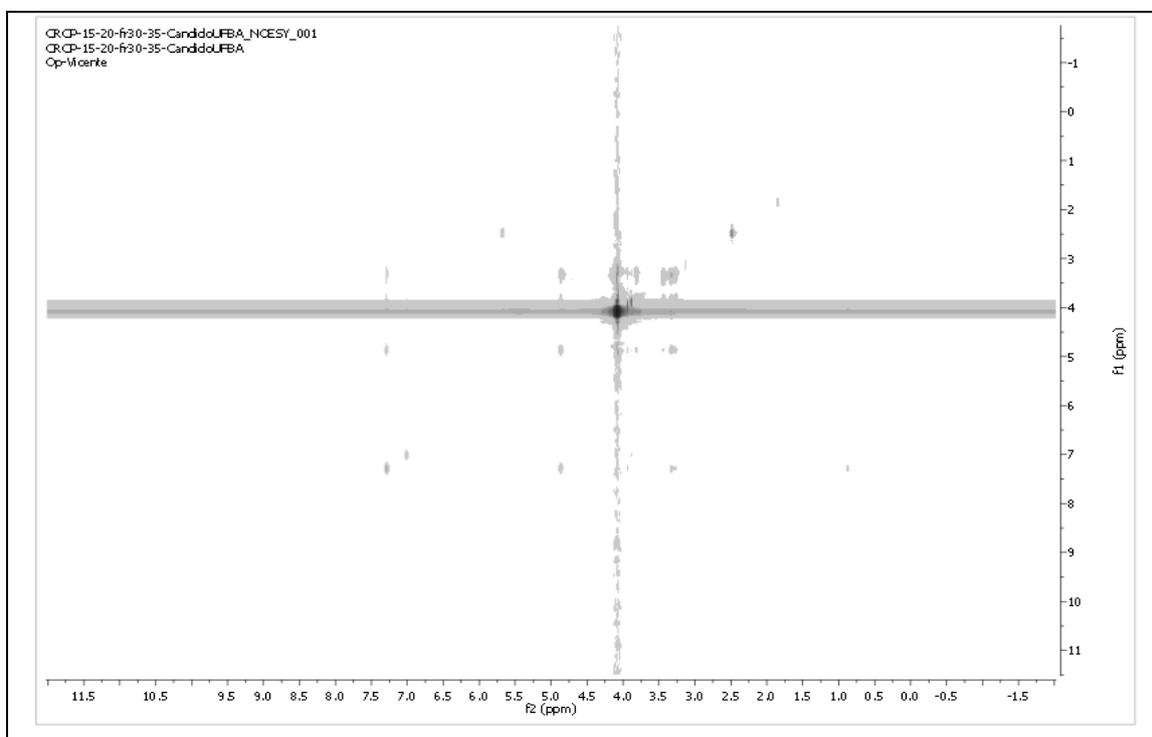
**Figura 48.** Ampliação do espectro de gHMBC da substância **PPCR2**

As correlações observadas através do espectro bidimensional de gHMBC (Figura 47, pág. 75), tornou possível estabelecer a vizinhança de cada carbono da substância **PPCR2**. Desta forma, estas correlações são mostradas na estrutura química parcial (Figura 49).

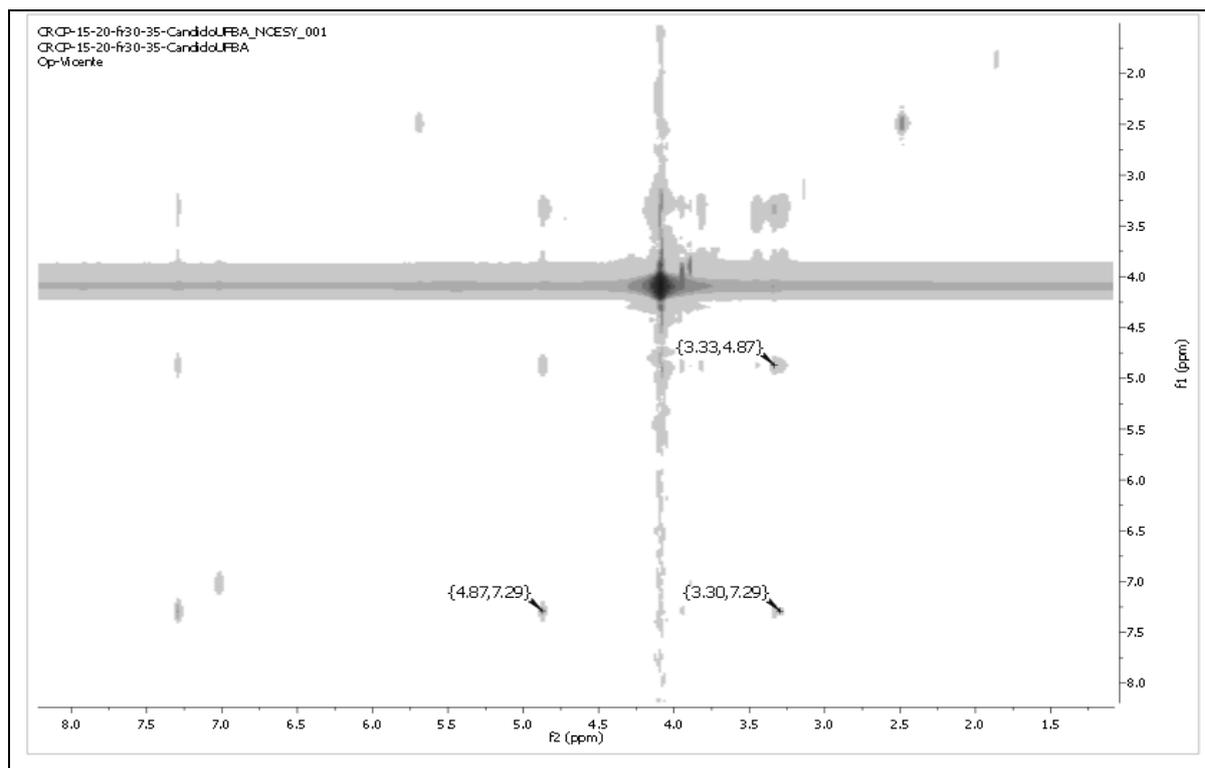


**Figura 49.** Correlações observadas no gHMBC da substância **PPCR2**

Após, análise do espectro bidimensional NOESY (Figura 50) e sua ampliação (Figura 51, pág. 77) pode ser observado às relações espaciais dos hidrogênios do glicosídeo, com destaque para o hidrogênio anomérico ( $\delta$  4,86 d,  $J = 6,6$  Hz) e o hidrogênio H-5' em  $\delta$  7,30, permitindo localizar um *O*-glicosídeo na posição 4'.

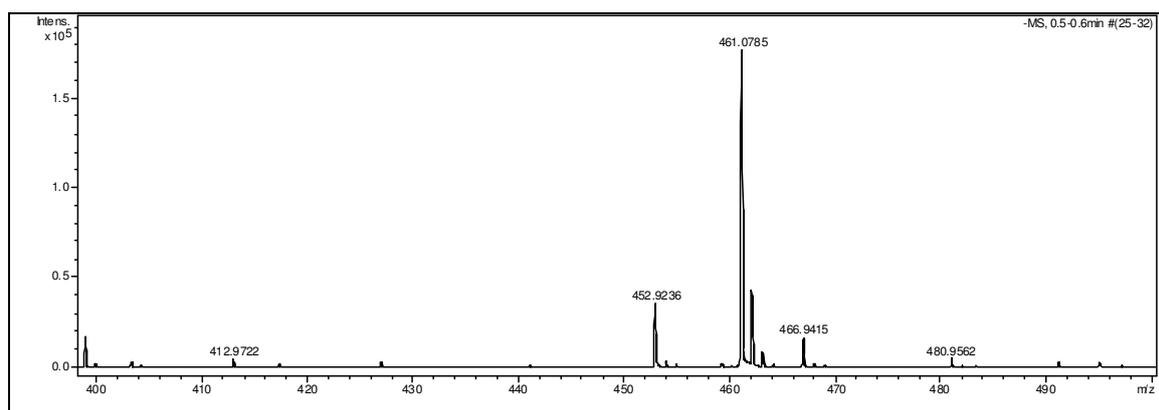


**Figura 50.** Espectro completo de NOESY da substância **PPCR2**



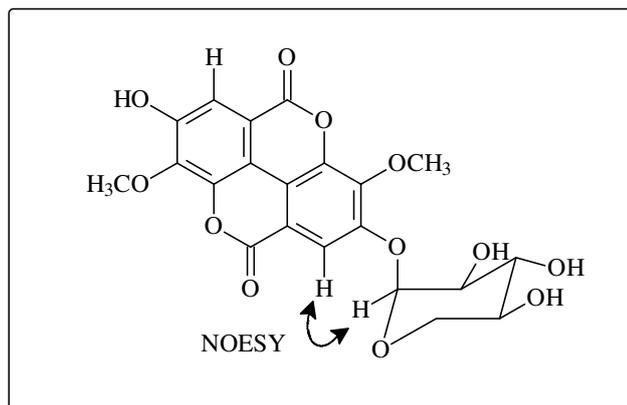
**Figura 51.** Ampliação do espectro de NOESY da substância **PPCR2**

A identificação do glicosídeo foi realizada através da análise do espectro ESI-EM de alta resolução registrado no modo negativo (Figura 52). Esse espectro apresentou íon pseudomolecular em  $m/z$  461,0785 [ $M^+ - 1$ ], (calculado – 462,079826; observado – 462,0864). Sugerindo a formula molecular é  $C_{21}H_{18}O_{12}$ .



**Figura 52.** EM de alta resolução da substância **PPCR2**

Unindo todas as informações espectrais obtidas e comparando com dados da literatura (GAO *et al.* 2013; ZENG *et al.* 2013; TOMCZYK, 2011), ficou claro que a substância **PPCR2** é ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (Figura 53).



**Figura 53.** Estrutura do ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo

Embora derivados do ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-glicosideo já tenham sido isolados em espécies da família Fabaceae (ALVES, 2012) a presença do ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo (**PPCR2**) ainda não foi relatada em plantas dessa família.

O ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo (**PPCR2**) ocorre também nas raízes das espécies da família Rosaceae, ex.: *Potentilla recta* L., *Drymocallis rupestris* (L.) e Sojak (syn.) *Potentilla rupestris* L. (TOMCZYK, 2011). Nas raízes de espécies da família Euphorbiaceae, ex.: *Euphorbia pekinensis* (ZENG *et al.* 2013), *Euphorbia hylonoma* (GUO *et al.* 2011), *Euphorbia fischeriana* que possui atividade anti-HBV (YU & HOU, 2010) e *Euphorbia soongarica* (SHI *et al.* 2006) e etc.

Na Tabela 18 (pág. 79) observam-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  e suas correlações observadas no espectro de gHMBC do ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo (**PPCR2**).

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo

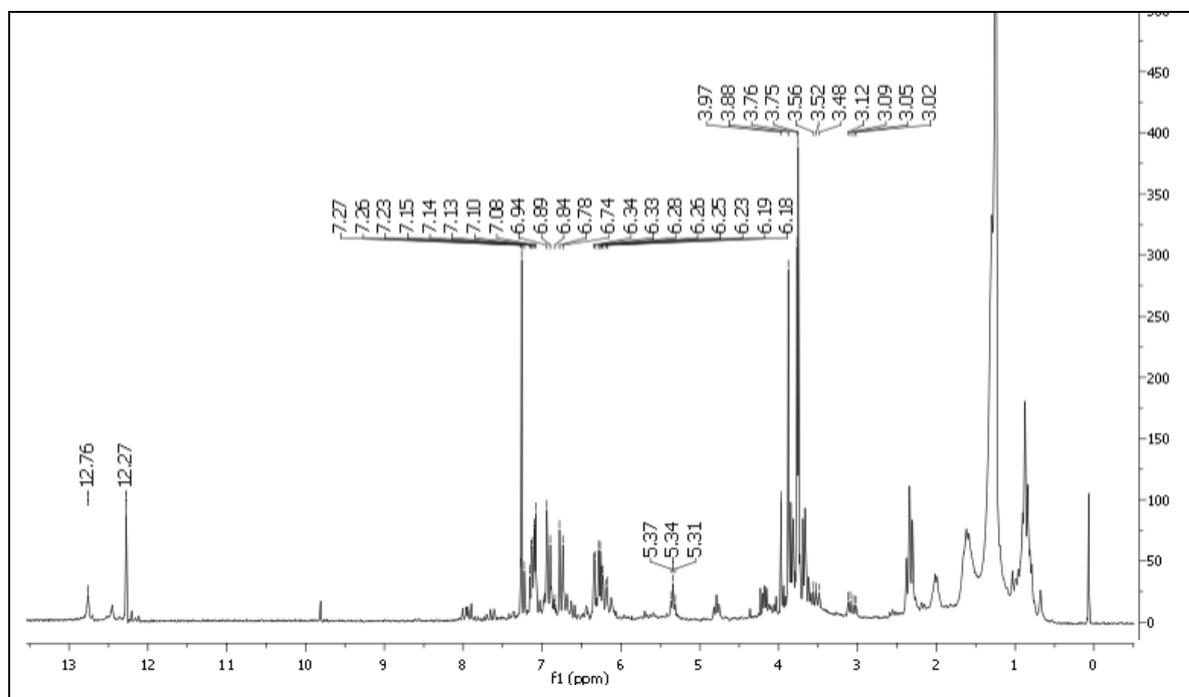
<b>Ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'-<math>\beta</math>-D-xilopiranosideo</b>			
<b>Posição</b>	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	<b>gHMBC</b>
1	-	110,9	-
2	-	140,2	-
3	-	141,2	-
4	-	151,9	-
5	7,30 (s)	112,1	158,8; 151,2; 141,2 e 112,3
6	-	111,5	-
7	-	158,7	-
1'	-	114,2	-
2'	-	140,7	-
3'	-	142,4	-
4'	-	153,0	-
5'	7,02 (s)	112,5	158,7; 153,0; 140,7 e 110,9
6'	-	112,3	-
7'	-	158,8	-
1''	4,86 (d, $J = 6,6$ )	102,6	153,0
2''	3,33 (m)	73,6	76,1; 73,1 e 102,1
3''	3,27 (m)	66,2	76,1 e 102,1
4''	3,42 (m)	69,9	76,1
5''	3,32 (m)	76,6	102,1
-OCH <sub>3</sub>	3,89 (s) e 3,94 (s)	61,6 e 62,3	61,6; 142,4 e 62,3; 141,2

Deslocamento químico em ppm e constantes de acoplamento em Hertz (Hz)

#### 4.4.3 - Elucidação estrutural do biflavonoide PPCR3

A substância codificada como **PPCR3**, apresenta-se como óleo de coloração marrom. A substância **PPCR3** foi caracterizada por análise de dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  bem como, através de dados obtidos nos espectros bidimensionais de RMN (gHMQC e gHMBC), IV, UV, EM e  $\alpha$ [D].

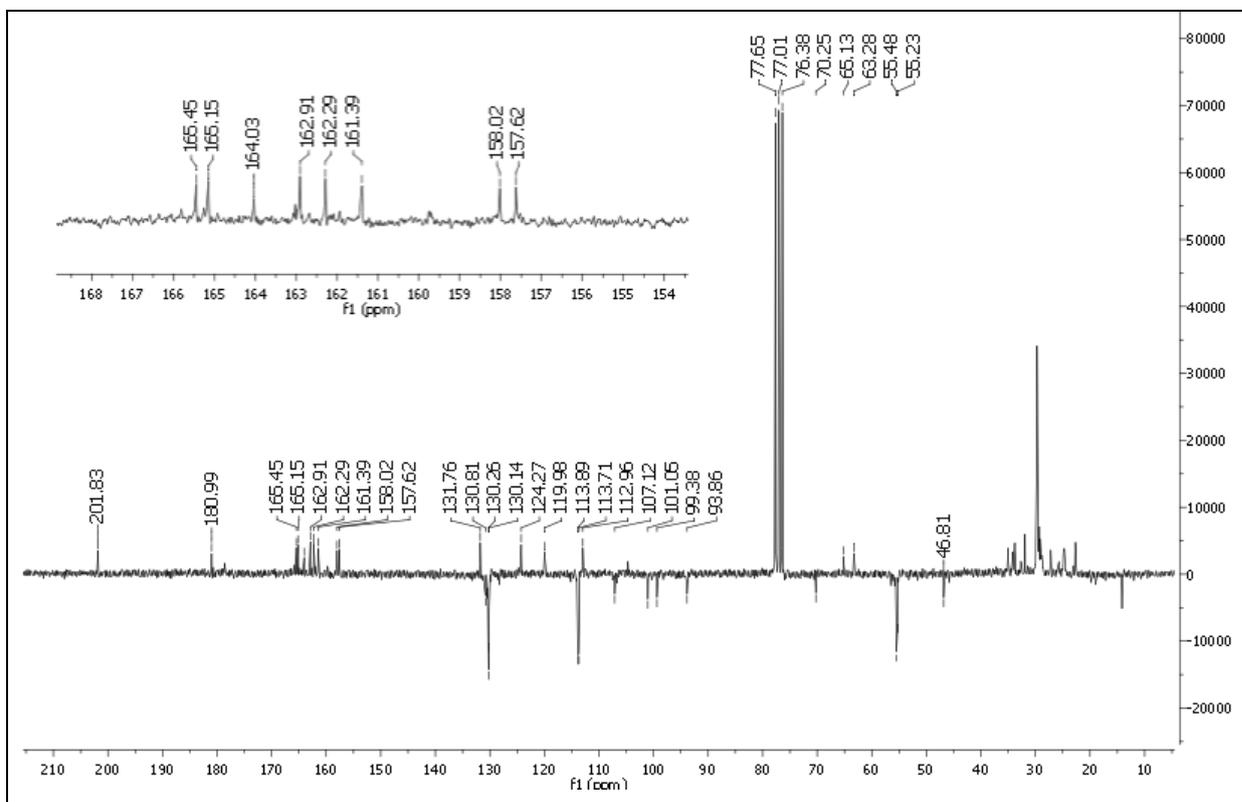
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **PPCR3** (Figura 54) apresenta sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em  $\delta$  7,20 (d,  $J = 8,0$  Hz) –  $\delta$  6,93 (d,  $J = 8,0$  Hz) e  $\delta$  7,10 (d,  $J = 9,0$  Hz) –  $\delta$  6,78 (d,  $J = 9,0$  Hz) indicativos de dois sistemas aromáticos 1,4 dissubstituídos característicos de anéis B de duas unidades de flavonoides. A presença de singletos entre  $\delta$  3,97 a  $\delta$  3,76 indicam que a substância possui grupos metoxílicos. Outros sinais na forma de tripleto em  $\delta$  5,34; t,  $J = 6,3$  Hz e duplos dubletos em  $\delta$  3,07; dd,  $J = 6,3$  e 13,9 Hz e  $\delta$  3,54; dd,  $J = 6,3$  e 13,9 Hz que corroboram com a presença de uma dihidrochalcona (OLIVEIRA, 2010). A presença de dois sinais em  $\delta$  12,27 e  $\delta$  12,76 integrados para um hidrogênio cada, característicos de hidroxilas em C-5 queladas com o grupo carbonílico em C-4 de flavonoides, sugerem a presença de duas unidades flavonoidicas.



**Figura 54.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  completo (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PPCR3**

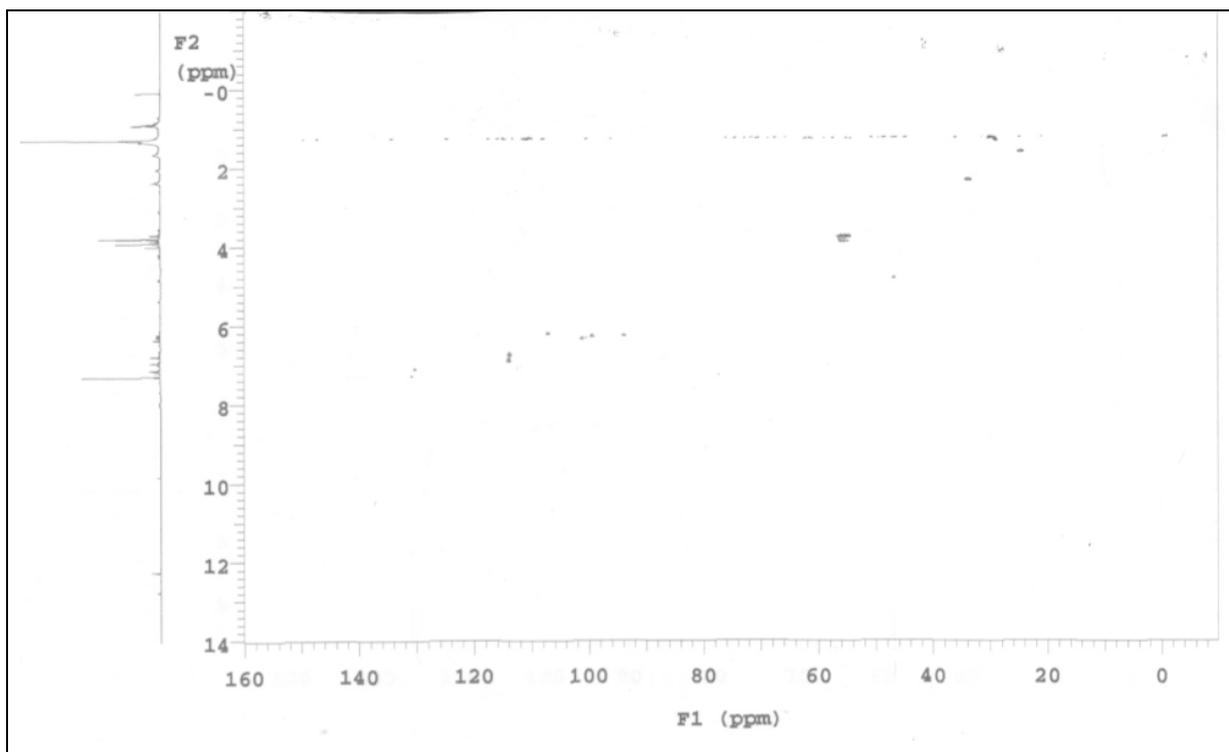
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT (Figura 55, pág. 81) foi possível confirmar a presença dos grupos metoxílico ( $\delta$  55,4 e  $\delta$  55,2). Além de duas carbonilas, uma em  $\delta$  180,9 característica

de flavonas e outra em  $\delta$  201,8 característica de di-hidrochalconas. Nesse espectro também foi observada a presença de sinais duplicados em  $\delta$  113,7 –  $\delta$  113,8 e  $\delta$  130,1 –  $\delta$  130,2 corroborando com a presença de anéis aromáticos 1,4 dissustituídos, possivelmente pertencente ao anel B da unidade de flavona e da di-hidrochalcona.



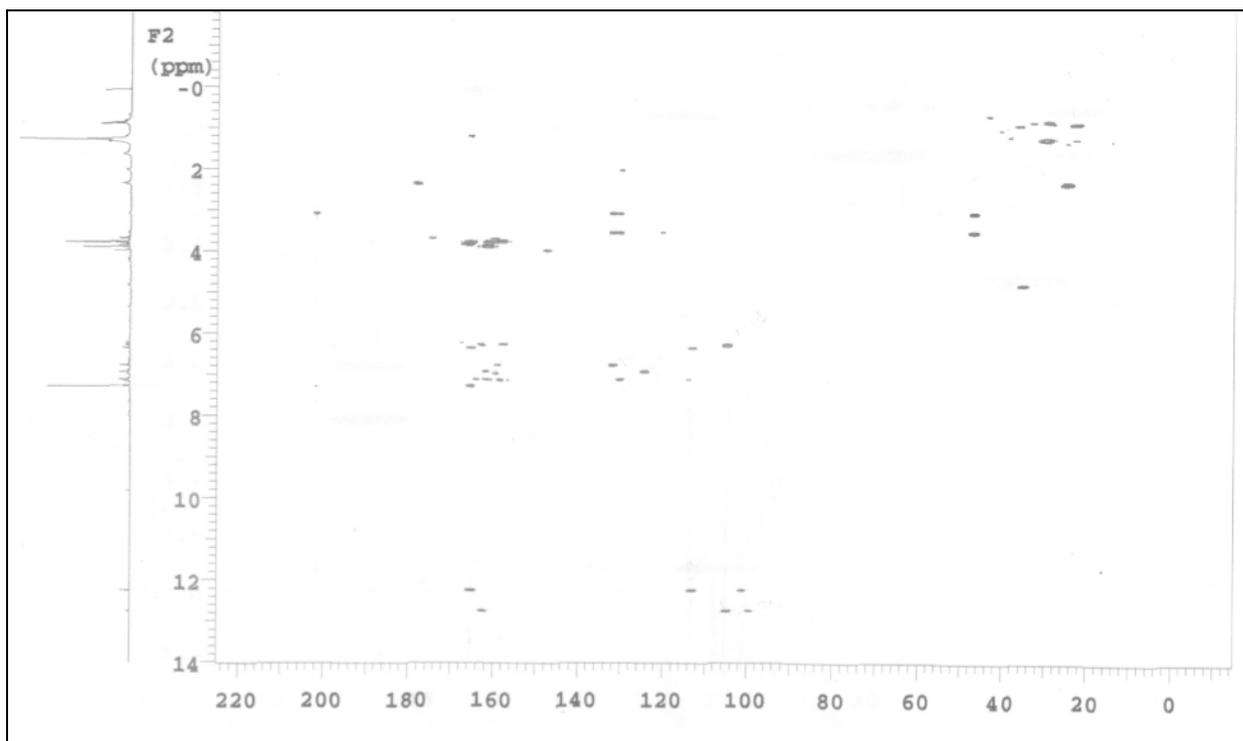
**Figura 55.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  - APT completo (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PPCR3**

No espectro de gHMQC (Figura 56, pág. 82) da substância **PPCR3** pode-se observar a relação direta dos hidrogênios em C- $\alpha$  ( $\delta$  4,79; t,  $J = 6,3$  Hz) e C- $\beta$  ( $\delta$  3,07; dd,  $J = 6,3$  e 13,9 Hz e  $\delta$  3,54; dd,  $J = 6,3$  e 13,9 Hz) com os carbonos em  $\delta$  45,8 (CH) e  $\delta$  34,9 ( $\text{CH}_2$ ), respectivamente, confirmando que uma das unidades do biflavonoide era uma dihidrochalcona. As correlações dos carbonos em  $\delta$  113,8 (CH) e  $\delta$  113,7 (CH) com os hidrogênios  $\delta$  6,93 (d,  $J = 8,0$  Hz) e  $\delta$  6,78 (d,  $J = 9,0$  Hz), respectivamente. Assim como os carbonos em  $\delta$  130,2 (CH) e  $\delta$  130,1 (CH) com os hidrogênios  $\delta$  7,20 (d,  $J = 8,0$  Hz) e  $\delta$  7,10 (d,  $J = 9,0$  Hz). Essas correlações foram importantes para a localização dos picos referentes a cada anel aromático 1,4-dissustituído dos anéis B das duas unidades no biflavonoide.



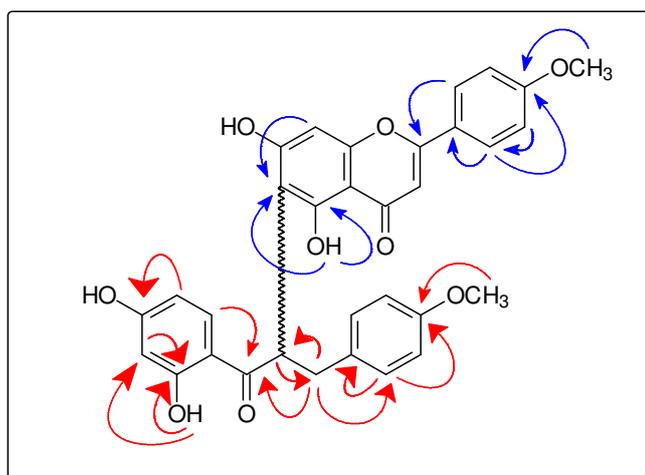
**Figura 56.** Espectro de gHMQC completo da substância **PPCR3**

Pelo espectro de gHMBC (Figura 57, pág. 83) da substância **PPCR3** pode-se observar a relação direta dos hidrogênios da di-hidrochalcona do carbono C- $\alpha$  ( $\delta$  4,79; t,  $J = 6,3$  Hz) com  $\delta$  34,9 (C-  $\beta$ ), sendo esta correlação de fundamental importância devido ao C- $\alpha$  possuir apenas um hidrogênio (metínico). Os hidrogênios do carbono C- $\beta$  ( $\delta$  3,07; dd,  $J = 6,3$  e 13,9 Hz e  $\delta$  3,54; dd,  $J = 6,3$  e 13,9 Hz) com os sinais de carbono  $\delta$  45,8 (C-  $\alpha$ );  $\delta$  113,7 e  $\delta$  201,8 definindo a vizinhança da porção acíclica da di-hidrochalcona. Os demais hidrogênios do biflavonoide **PPCR3** apresentam outras correlações, tais como os hidrogênios em  $\delta$  6,93 (d,  $J = 8,0$  Hz) com carbono  $\delta$  130,2 e hidrogênio  $\delta$  6,78 (d,  $J = 9,0$  Hz) com carbono  $\delta$  130,1. O hidrogênio  $\delta$  7,20 (d,  $J = 8,0$  Hz) com os carbonos  $\delta$  164,0 e 131,7. E o hidrogênio  $\delta$  7,10 (d,  $J = 9,0$  Hz) com os carbonos  $\delta$  162,2;  $\delta$  158,0 e  $\delta$  124,2. O hidrogênio em  $\delta$  6,24 (s) atribuído ao C-8 se correlaciona com carbono em  $\delta$  112,9 (C-6), um carbono não hidrogenado, inferindo que a junção das unidades seja do C- $\alpha$  da di-hidrochalcona com C-6 da flavona. E o hidrogênio da  $\delta$  7,22 (d,  $J = 9,0$  Hz) se correlacionando com 201,8. Devido o experimento ter sido realizado em  $\text{CDCl}_3$  (apolar e aprótico) foi possível observar as correlações dos hidrogênio dos grupos hidroxílico quelados com as carbonilas. Desta forma, o hidrogênio hidroxílico em  $\delta$  12,27 (s) correlaciona com os carbonos  $\delta$  165,1;  $\delta$  112,9 e  $\delta$  104,6. E o outro hidrogênio hidroxílico quelado em  $\delta$  12,76 (s) com os carbonos  $\delta$  165,4 e  $\delta$  99,3. Estas correlações são observadas na Figura 58 (pág. 83).



**Figura 57.** Espectro de gHMBC completo da substância **PPCR3**

De acordo com as análises de RMN uni e bidimensionais, juntamente com a comparação dos dados obtidos com os dados de estudo anterior na casca da raiz de *P. pyramidalis* (OLIVEIRA, 2010) atribuiu-se os sinais a substância **PPCR3** (Figura 59, pág. 84) para cada unidade flavanoidica, a unidade I (flavona) e Unidade II (di-hidrochalcona) conforme descrito na Tabela 19 (pág. 84).

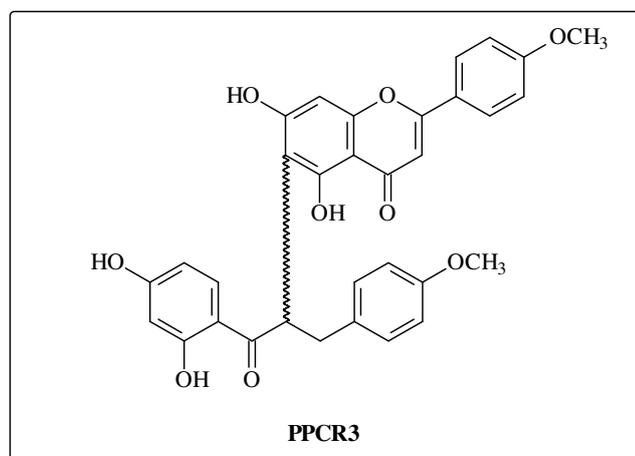


**Figura 58.** Correlações observadas no espectro de gHMBC da substância **PPCR3**

Tabela 19. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **PPCR3**

Flavona - Unidae I			Di-hidrochalcona - Unidade II		
Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	162,2	$\alpha$	4,79 (t, $J = 6,0$ )	45,8
3	6,32 (s)	101,0	$\beta$	3,07/3,54 (dd, $J = 6,0$ e 14,0)	34,9
4	-	180,9	$\beta'$	-	201,8
5	-	165,1	1''	-	131,7
6	-	112,9	2''-6''	7,22 (d, $J = 9,0$ )	130,1
7	-	162,8	3''-5''	6,78 (d, $J = 9,0$ )	113,7
8	6,24 (s)	93,8	4''	-	164,0
9	-	161,3	1'''	-	119,9
10	-	104,6	2'''	-	165,4
1'	-	124,2	3'''	6,27 (d, $J = 2,0$ )	99,3
2' - 6'	7,20 (d, $J = 8,8$ )	130,2	4'''	-	157,6
3' - 5'	6,93 (d, $J = 8,8$ )	113,8	5'''	6,20 (dd, $J = 2,0$ e 8,0)	107,1
4'	-	158,0	6'''	7,25 (d, $J = 8,0$ )	130,7
OCH <sub>3</sub>	3,75 (s)	55,4	OCH <sub>3</sub>	3,79 (s)	55,2
OH	12,27 (s)	-	OH	12,76 (s)	-

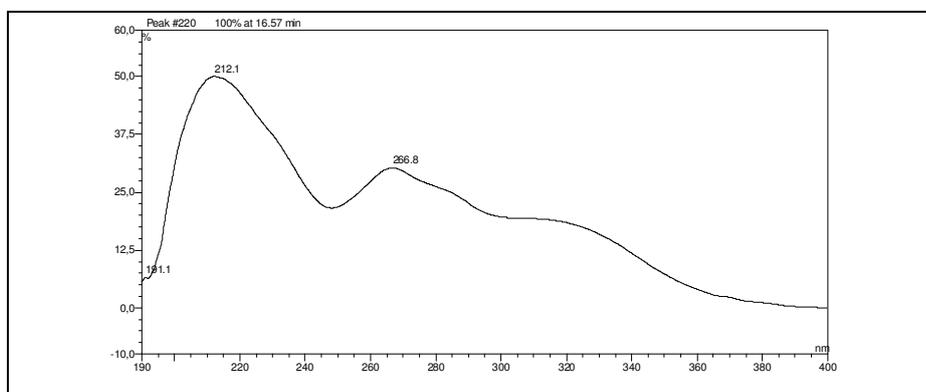
Deslocamento químico em ppm e constantes de acoplamento em Hertz (Hz)



**Figura 59.** Proposta inicial para substância **PPCR3**.

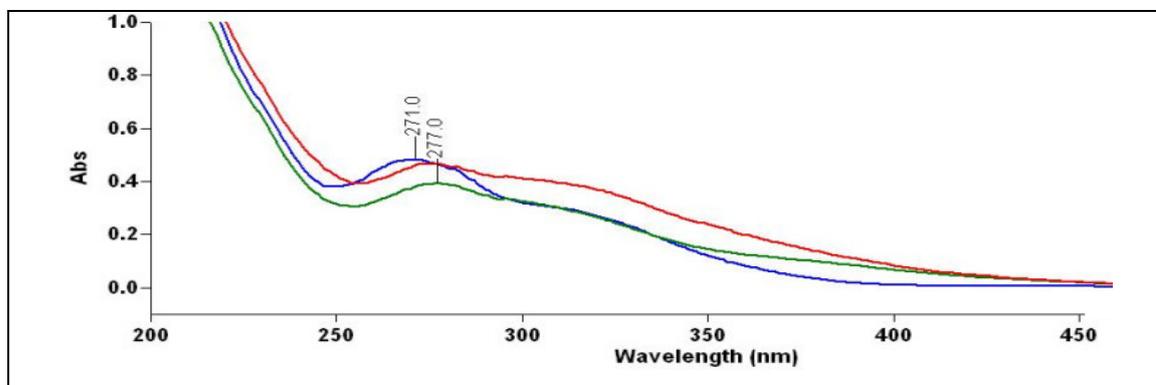
Mediante os resultados, pode-se propor que a substância **PPCR3** é um biflavonoide formado de uma unidade de flavona e unidade di-hidrochalcona (Figura 59, pág. 84).

Para confirmação da estrutura proposta, o biflavonoide **PPCR3** foi submetido à análise no UV/Vis (Figura 60) utilizando reagentes de deslocamento de modo a confirmar em quais posições os grupos hidroxílicos estão ligados no biflavonoide. Assim, o espectro de UV/Vis é realizado após adição, a substância em análise, do reagente  $\text{AlCl}_3$  e outro com  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  para reconhecer grupos hidroxílicos em C-5 de flavonoides. Após adição de  $\text{AcONa}$  os espectros demonstram presença de grupos hidroxílicos em C-7 (anel A de flavanoides) e, com a adição de  $\text{NaOMe}$  reconhecem a presença de grupos hidroxílicos em C-3 e 4' nos anéis C e B, respectivamente (MARTINEZ, 2005).



**Figura 60.** Espectro no UV da substância **PPCR3**

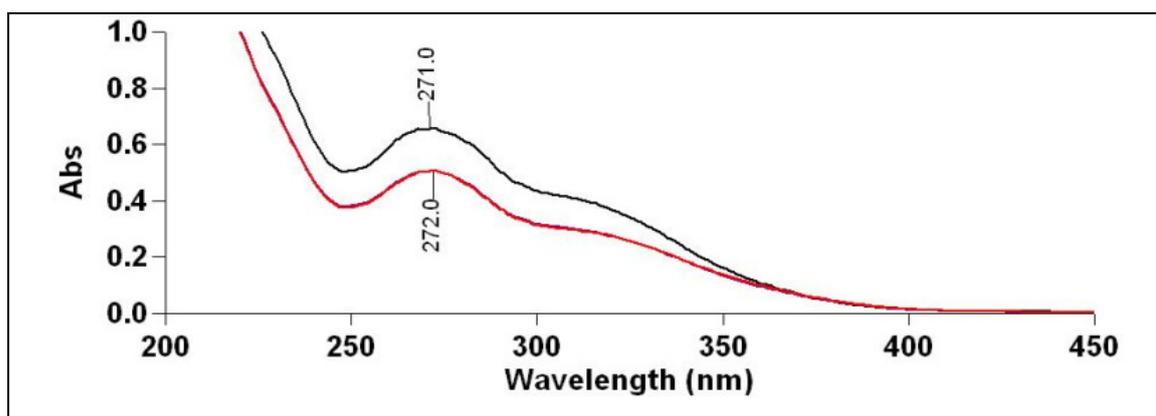
Os espectros no UV da substância **PPCR3** foram registrados, como se observa na Figura 61, utilizando  $\text{AlCl}_3$  seguida de adição de  $\text{HCl}$ .



**Figura 61.** Espectro no UV da substância **PPCR3** (azul); adição de  $\text{AlCl}_3$  (verde) e com adição de  $\text{HCl}$  (vermelho)

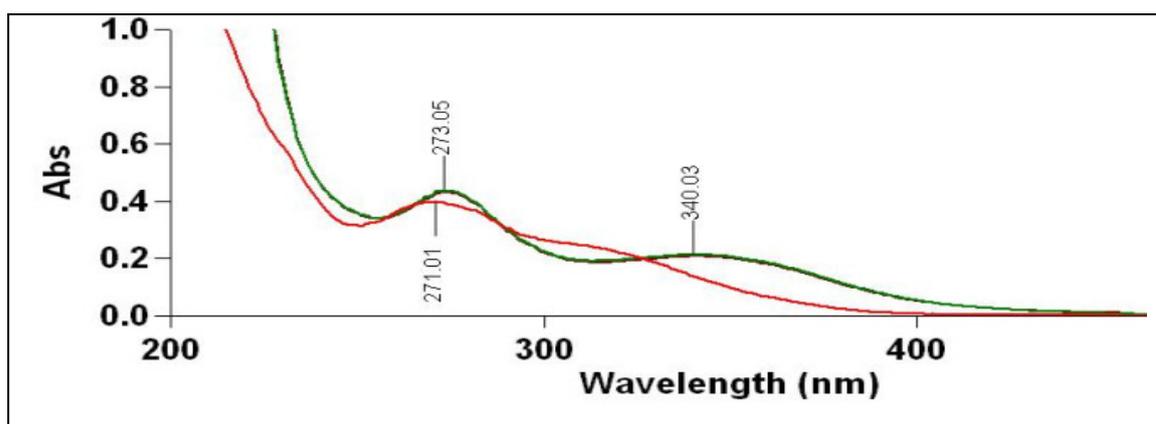
Com adição de  $\text{AlCl}_3$  (verde) seguida da adição de  $\text{HCl}$  (vermelho) fica claro que existe grupo hidroxílico na posição 5, uma vez que, não houve rompimento do complexo formado. Contudo, o deslocamento da banda é sutil, devido ao impedimento estérico da unidade dihidrochalcona.

O espectro no UV da substância **PPCR3** com adição de  $\text{AcONa}$  (Figura 62) não mostrou diferenças significativas, concluindo que a mesma possui grupo hidroxílico na posição 7.



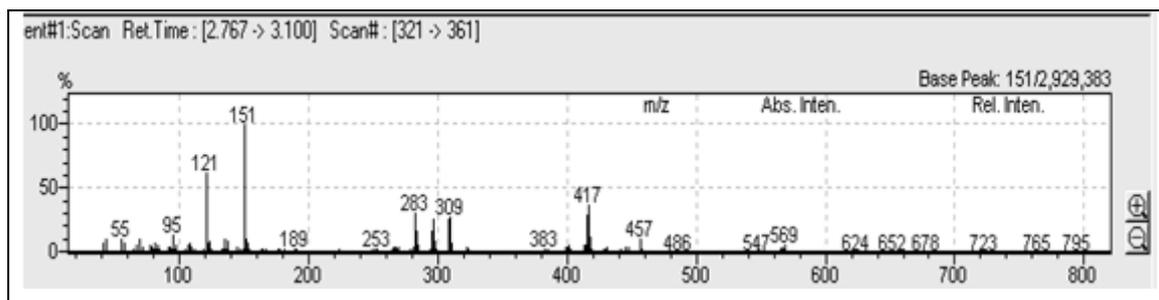
**Figura 62.** Espectro no UV da substância **PPCR3** (preto); adição de  $\text{AcONa}$  (vermelho) e após 5 minutos (vermelho)

Por outro lado quando se adiciona  $\text{NaOMe}$  a substância **PPCR3** observa-se um deslocamento batocrômico revelando uma segunda banda em 340 nm (Figura 63).



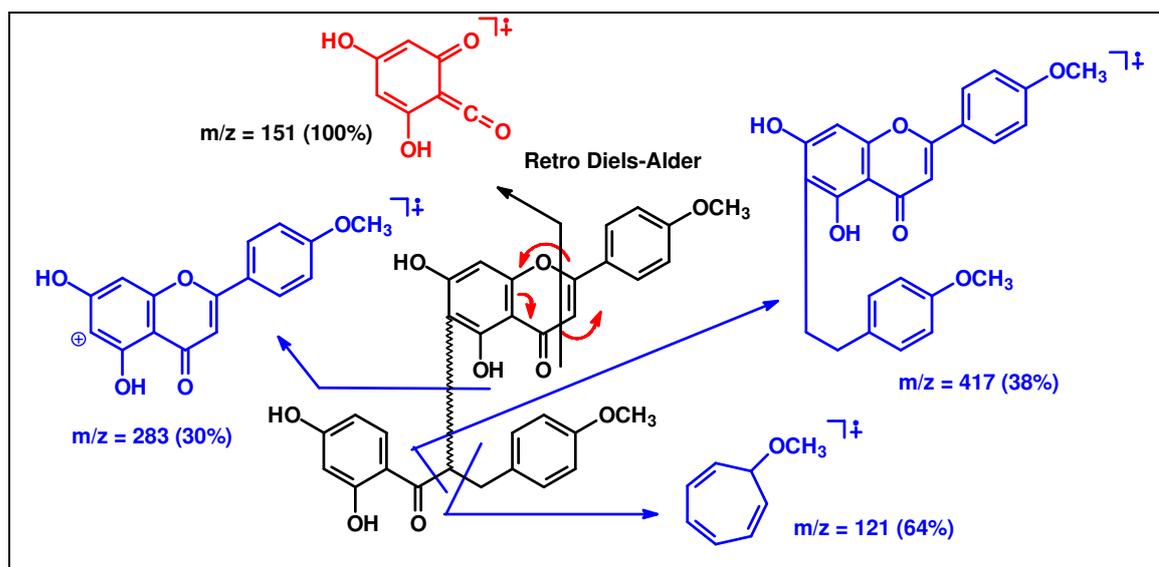
**Figura 63.** Espectro no UV da substância **PPCR3** (vermelho); adição de  $\text{NaOMe}$  (verde) e após 5 minutos (verde)

Finalmente, a amostra foi submetida à análise de EM no modo impacto eletrônico a 70 eV. O EM (Figura 64) possui fragmentações características observadas para flavonoides.



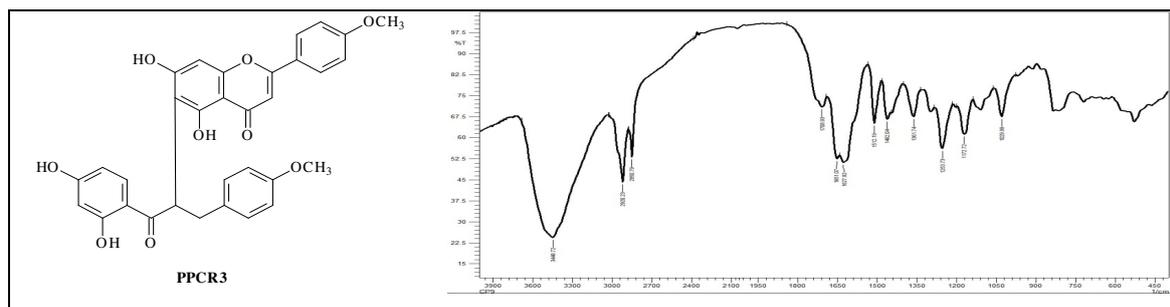
**Figura 64.** EM no modo de impacto de elétrons 70 eV da substância **PPCR3**

O pico do íon molecular não foi observado no EM. Contudo, o espectro mostrou picos em  $m/z$  151 (100%), 121 (64%) e o pico da fragmentação entre a junção do biflavonoide em 283 (30%), 309 (28%) e 417 (38%). Logo, baseado nas fragmentações observadas no EM, os picos majoritários foram identificados e encontram-se na Figura 65.



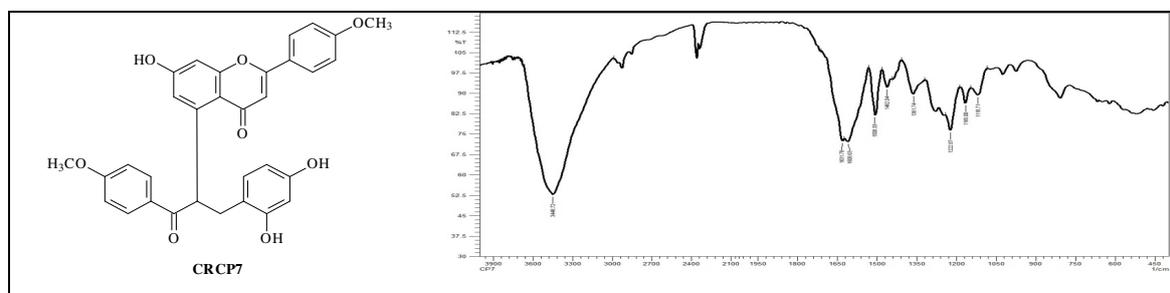
**Figura 65.** Fragmentações observadas no EM da substância **PPCR3**.

O espectro no IV da substância **PPCR3** (Figura 66) foi obtido e comparado com o IV da substância **CRCP7** (Figura 67) isolado na casca da raiz de *P. pyramidalis* (OLIVEIRA, 2010).



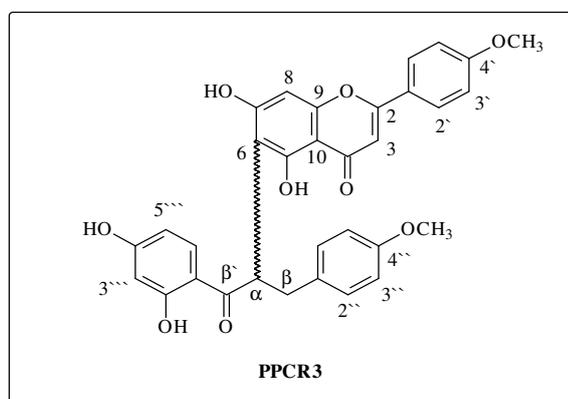
**Figura 66.** Espectro no IV da substância **PPCR3**

O espectro no IV (Figura 66) revelou a presença de grupos hidroxílicos em  $3445\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial dos grupos oximetílicos em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  e duas carbonilas, uma conjugada em  $1627\text{ cm}^{-1}$  e a outra não conjugada em  $1651\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 67.** Espectro no IV da substância **CRCP7**

Por fim, a substância **PPCR3** teve sua rotação específica mensurada em  $\alpha[D] +59$  (1,4; DCM), indicando não se tratar de uma mistura racêmica, ou seja, a mesma é um produto biossintetizado pela planta. Portanto, com base nas análises realizadas na substância **PPCR3** sua nomenclatura é 5,7-dihidroxi-4'-methoxiflavona-6 $\alpha$ -2''',4'''-dihidroxi-4''-methoxidihidrochalcona (Figura 68) inédita na literatura.

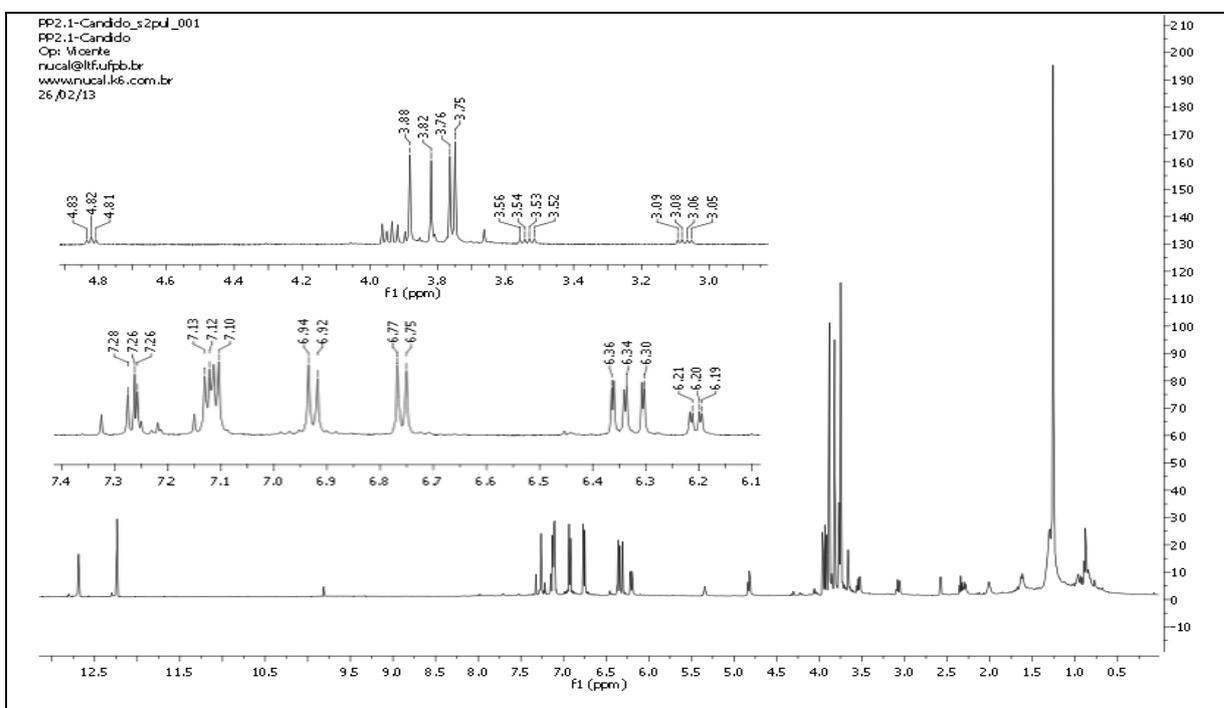


**Figura 68.** Estrutura química da substância **PPCR3**

#### 4.4.4 - Elucidação estrutural do biflavonoide PPCR4

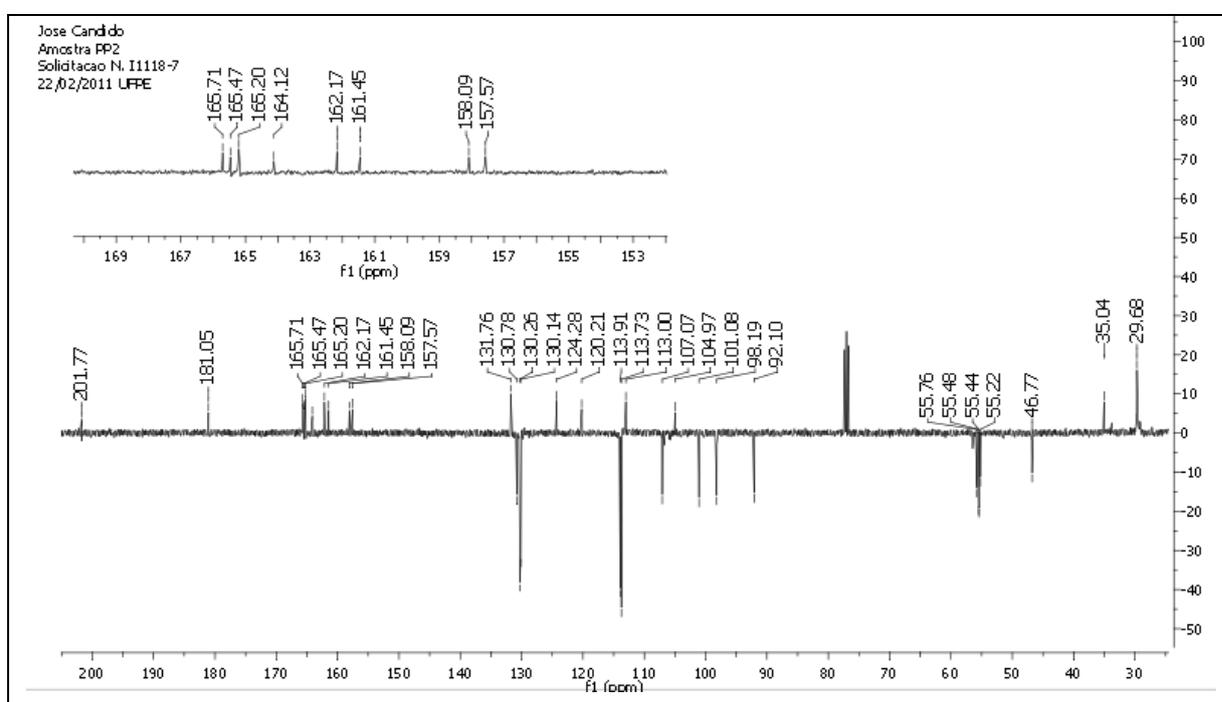
A substância designada **PPCR4** se apresentou com aspecto viscoso de coloração marrom e foi caracterizada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e através de espectros bidimensionais de RMN (gHSQC e gHMBC), IV, UV, EM e  $\alpha$ [D].

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PPCR4** (Figura 69) apresenta sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em  $\delta$  7,26 (d,  $J = 9,3$  Hz);  $\delta$  7,13 (d,  $J = 9,0$  Hz);  $\delta$  6,93 (d,  $J = 9,0$  Hz) e  $\delta$  6,77 (d,  $J = 8,7$  Hz) indicativos da presença de dois sistemas aromático 1,4 dissustituídos em anéis B de flavonoides. Observa-se também, três sinais na forma de dubletos, um em  $\delta$  6,37 (d,  $J = 1,8$  Hz);  $\delta$  6,35 (d,  $J = 2,7$  Hz) e  $\delta$  6,32 (d,  $J = 2,4$  Hz), além de um duplo dubleto em  $\delta$  6,21 (dd,  $J = 9,0$  e  $2,7$  Hz). Outros sinais na forma de tripleto ( $\delta$  4,82; t,  $J = 6,3$  e  $7,5$  Hz) e duplos dubletos ( $\delta$  3,08; dd,  $J = 6,3$  e  $13,9$  Hz e  $\delta$  3,55; dd,  $J = 7,5$  e  $13,9$  Hz) corroboram com a presença de uma unidade di-hidrochalcona (OLIVEIRA, 2010). A presença de dois sinais em  $\delta$  12,23 e  $\delta$  12,68 característicos de hidroxilas na posição C-5 queladas a com carbonila em C-4 de flavonoides e foi sugestivo da presença de dois núcleos flavonoidicos com OH no C-5 livre. A presença de singletos entre  $\delta$  3,97 a  $\delta$  3,76 indicam que a substância possui grupos metoxílicos.



**Figura 69.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **PPCR4**

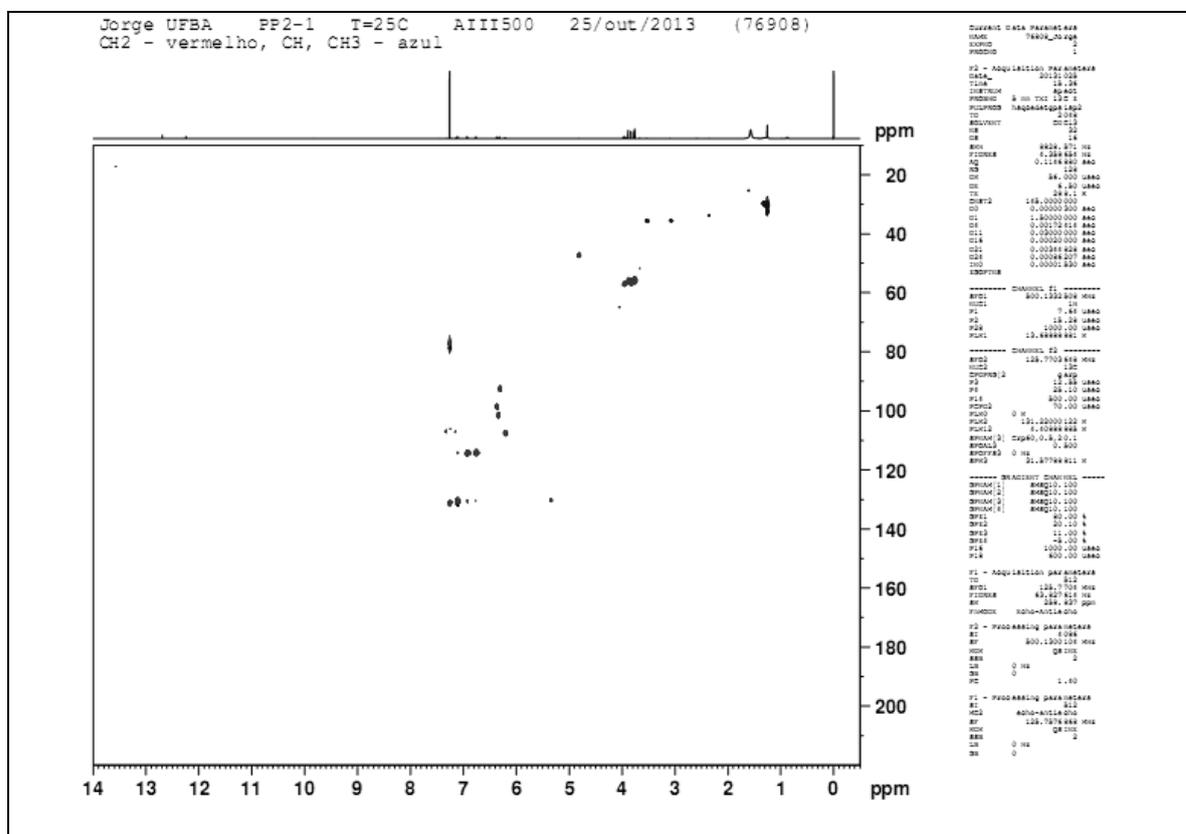
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  – APT (Figura 70) evidenciou a presença dos grupos metoxílicos pelos sinais registrados entre  $\delta$  55,7 a  $\delta$  55,2. Foi possível também verificar a presença de vários sinais entre  $\delta$  90,0 a  $\delta$  165,0 dentre eles quinze de carbonos quaternários incluindo as duas carbonilas, uma em  $\delta$  181,0 característica de flavonas e outra em  $\delta$  201,7 referente a uma unidade di-hidrochalcona. Os sinais em  $\delta$  46,7 (CH) e  $\delta$  35,0 ( $\text{CH}_2$ ) pertencem a carbonos da porção  $\text{C}_3$  de uma unidade dihidrochalcona. Nesse espectro também foi observada a presença de sinais duplicados em  $\delta$  113,7 –  $\delta$  113,9 e  $\delta$  130,1 –  $\delta$  130,2 indicativo de dois anéis aromáticos 1,4 dissubstituídos, possivelmente do anel B das unidades de flavonoide e dihidrochalcona. Estes dados foram indicativos da natureza biflavonoidica desta substância.



**Figura 70.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  – APT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **PPCR4**

No espectro de gHSQC (Figura 71, pág. 91) da substância **PPCR4** reporta a relação direta dos hidrogênios da dihidrochalcona e da unidade flavona com seus respectivos carbonos. Assim, a porção  $\text{C}_3$  da dihidrochalcona possui o  $\text{C-}\alpha$  ( $\delta$  4,82; t,  $J = 6,3$  e  $7,5$  Hz) e  $\text{C-}\beta$  ( $\delta$  3,08; dd,  $J = 6,3$  e  $13,9$  Hz e  $\delta$  3,55; dd,  $J = 7,5$  e  $13,9$  Hz) correlacionando-se com os carbonos em  $\delta$  46,7 (CH) e  $\delta$  35,0 ( $\text{CH}_2$ ), respectivamente. Os hidrogênios  $\delta$  6,93 (d,  $J = 9,0$  Hz) e  $\delta$  6,77 (d,  $J = 8,7$  Hz) com os carbonos em  $\delta$  113,9 (CH) e  $\delta$  113,7 (CH), respectivamente. Assim como os hidrogênios  $\delta$  7,20 (d,  $J = 9,0$  Hz) e  $\delta$  7,10 (d,  $J = 8,7$  Hz) com os carbonos em  $\delta$  130,2 (CH) e  $\delta$  130,1 (CH), respectivamente. Os carbonos  $\delta$  130,7 ( $\delta$  7,32; d,  $J = 9,0$  Hz),  $\delta$  107,0 ( $\delta$  6,20; dd,  $J = 2,7$  e  $9,0$  Hz),  $\delta$  101,0 ( $\delta$  6,34; d,  $J = 2,7$  Hz),  $\delta$  98,2 ( $\delta$  6,36; d,  $J = 2,4$  Hz) e  $\delta$  92,1 ( $\delta$

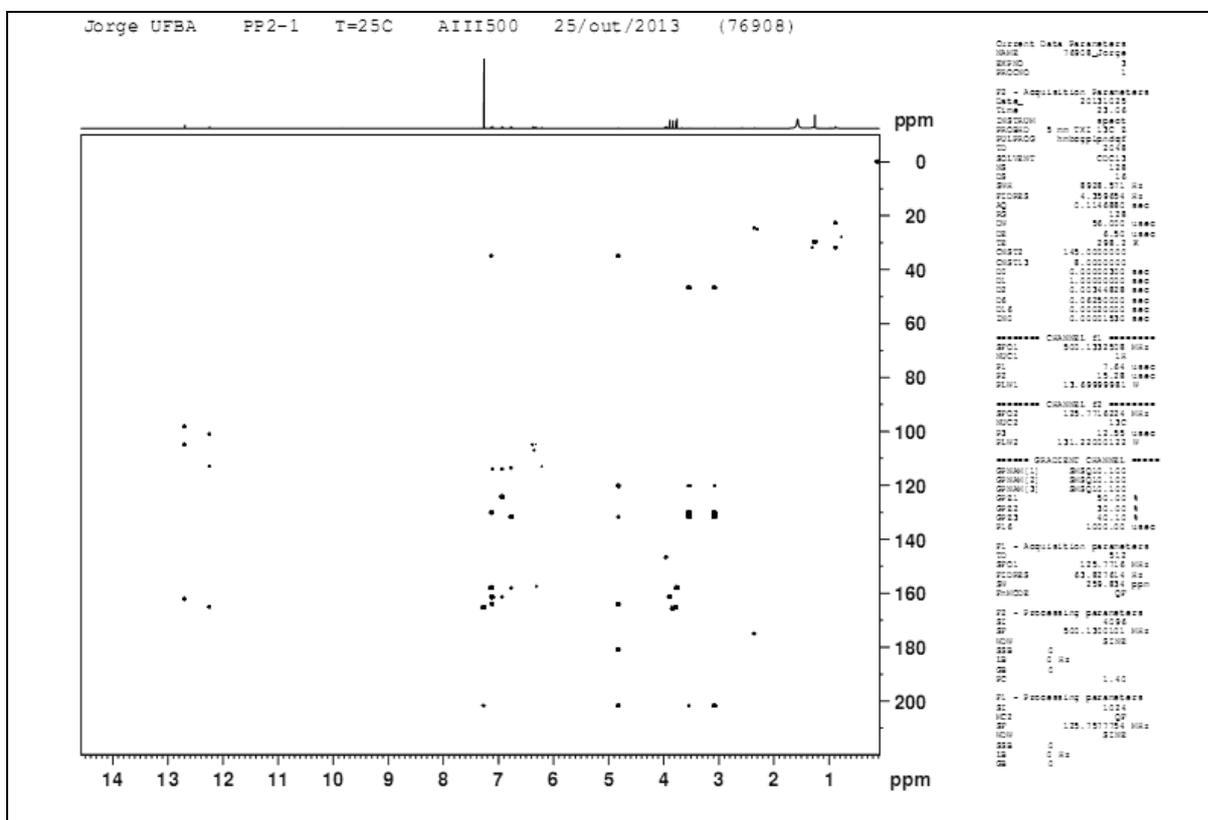
6,31; d,  $J = 1,8$  Hz). Estes dados foram importantes para proposição da estrutura do biflavanoide a partir das relações observadas em conjunto no espectro bidimensional gHMBC.



**Figura 71.** Espectro de gHSQC completo da substância **PPCR4**

No mapa de contorno de gHMBC (Figura 72, pág. 92) da substância **PPCR4** é observada a correlação dos hidrogênios da dihidrochalcona do carbono C- $\alpha$  ( $\delta$  4,82; t,  $J = 6,3$  e  $7,5$  Hz) com os sinais dos carbonos registrados em  $\delta$  35,0;  $\delta$  120,2;  $\delta$  131,7;  $\delta$  164,1;  $\delta$  181,0 e  $\delta$  201,7. Estes dados indicam que os hidrogênios do carbono C- $\beta$  ( $\delta$  3,08; dd,  $J = 6,3$  e  $13,9$  Hz e  $\delta$  3,55; dd,  $J = 7,5$  e  $13,9$  Hz) correlacionam com os carbonos  $\delta$  46,7;  $\delta$  120,2;  $\delta$  130,7;  $\delta$  131,7 e  $\delta$  201,7. Confirmando os demais hidrogênios da di-hidrochalcona e da flavona correlacionam com os hidrogênios  $\delta$  6,93 (d,  $J = 9,0$  Hz) com carbono  $\delta$  113,9;  $\delta$  124,2 e  $\delta$  161,4. O hidrogênio em  $\delta$  6,77 (d,  $J = 8,7$  Hz) com os carbonos  $\delta$  113,7;  $\delta$  131,7 e  $\delta$  152,5. Os hidrogênios em  $\delta$  7,20 (d,  $J = 9,0$  Hz) com os carbonos  $\delta$  113,9;  $\delta$  161,4 e  $\delta$  164,1. E os hidrogênios em  $\delta$  7,10 (d,  $J = 8,7$  Hz) com os carbonos  $\delta$  35,0;  $\delta$  130,1 e  $\delta$  157,5. O hidrogênio em  $\delta$  6,20 (dd,  $J = 2,7$  e  $9,0$  Hz) correlaciona-se com carbono  $\delta$  113,0 e o  $\delta$  6,34 (d,  $J = 2,7$  Hz) com os carbonos  $\delta$  107,0 e  $\delta$  113,0. Devido o experimento ter sido realizado em  $\text{CDCl}_3$ , foi possível observar os acoplamentos dos grupos hidroxílicos quelados com as

carbonilas. Desta forma, o hidrogênio hidroxílico em  $\delta$  12,2 (s) correlaciona com os carbonos  $\delta$  101,0; e  $\delta$  165,4. E o outro hidrogênio hidroxílico em  $\delta$  12,7 (s) com os carbonos  $\delta$  98,2;  $\delta$  104,9 e  $\delta$  162,1.



**Figura 72.** Espectro de gHMBC completo da substância **PPCR4**

A espécie *P. pyramidalis* também produz biflavonoides em suas cascas das raízes. Por outro lado, estes possuem uma unidade flavona e outra di-hidrochalcona. Portanto, um dos grandes problemas é descobrir o grau de oxigenação e a conectividade entre as duas unidades. Desta maneira, o espectro de gHMBC da substância **PPCR4** quando analisado o hidrogênio do carbono C- $\alpha$  ( $\delta$  4,82; t,  $J = 6,3$  e  $7,5$  Hz) que se correlaciona com os carbonos em  $\delta$  35,0;  $\delta$  120,2;  $\delta$  131,7;  $\delta$  164,1;  $\delta$  181,0 e  $\delta$  201,7. Ficou claro que sua conectividade com a unidade da flavona se faz na posição C-3, uma vez que, o carbono C- $\alpha$  esta na vizinhança das duas carbonilas  $\delta$  181,0 e  $\delta$  201,7.

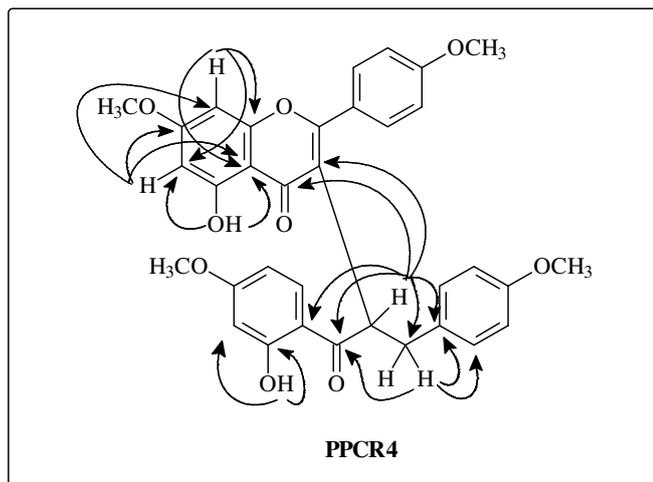
De acordo com as análises de RMN uni e bidimensionais, juntamente com a comparação dos dados obtidos com os dados de estudo anterior na casca da raiz de *P. pyramidalis* (OLIVEIRA, 2010) atribuiu-se os sinais a substância **PPCR4** (Figura 73, pág. 93) para cada

unidade flavanoidica, a unidade I (flavona) e Unidade II (di-hidrochalcona) conforme descrito na Tabela 20.

**Tabela 20.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **PPCR4**

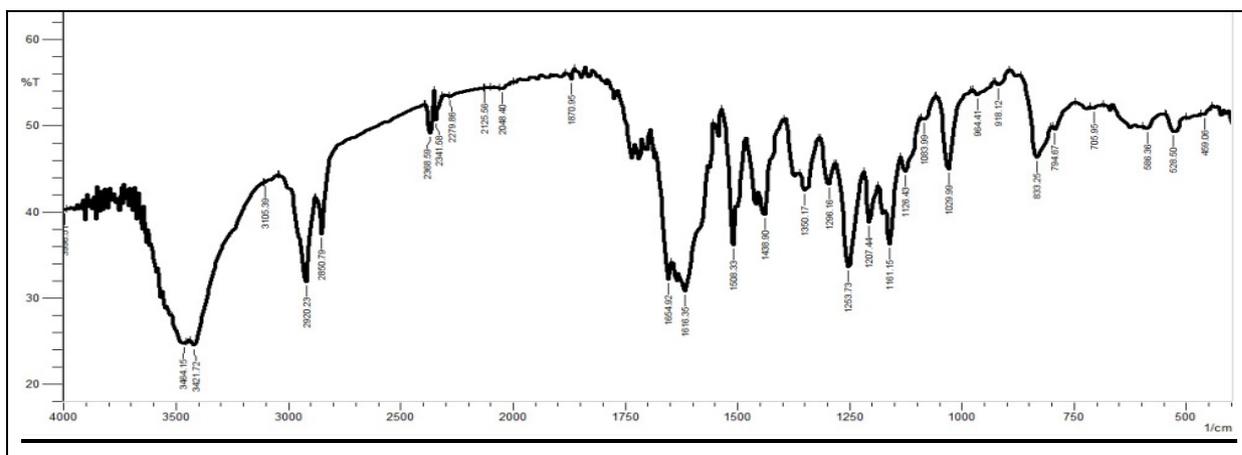
Flavona - Unidade I			Dihidrochalcona - Unidade II		
Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	164,1	A	4,82 (t, $J = 6,3$ e $7,5$ )	46,7
3	-	120,2	B	3,08/3,55 (dd, $J = 6,3$ ; $7,5$ e $13,9$ )	35,0
4	-	181,0	$\beta'$	-	201,7
5	-	165,2	1''	-	131,7
6	6,36 (d, $J = 2,4$ )	98,2	2''-6''	7,10 (d, $J = 8,7$ )	130,1
7	-	162,1	3''-5''	6,77 (d, $J = 8,7$ )	113,7
8	6,31 (d, $J = 1,8$ )	92,1	4''	-	157,5
9	-	158,1	1'''	-	113,0
10	-	104,9	2'''	-	165,4
1'	-	124,2	3'''	6,34 (d, $J = 2,7$ )	101,0
2' - 6'	7,20 (d, $J = 9,0$ )	130,2	4'''	-	165,7
3' - 5'	6,93 (d, $J = 9,0$ )	113,9	5'''	6,20 (dd, $J = 2,7$ e $9,0$ )	107,0
4'	-	161,4	6'''	7,32 (d, $J = 9,0$ )	130,3
OCH <sub>3</sub>	3,75 (s)/3,82 (s)	55,2/55,4	OCH <sub>3</sub>	3,76 (s)/3,88 (s)	55,4/55,7
OH	12,20 (s)	-	OH	12,60 (s)	-

Deslocamento químico em ppm e constantes de acoplamento em Hertz (Hz)



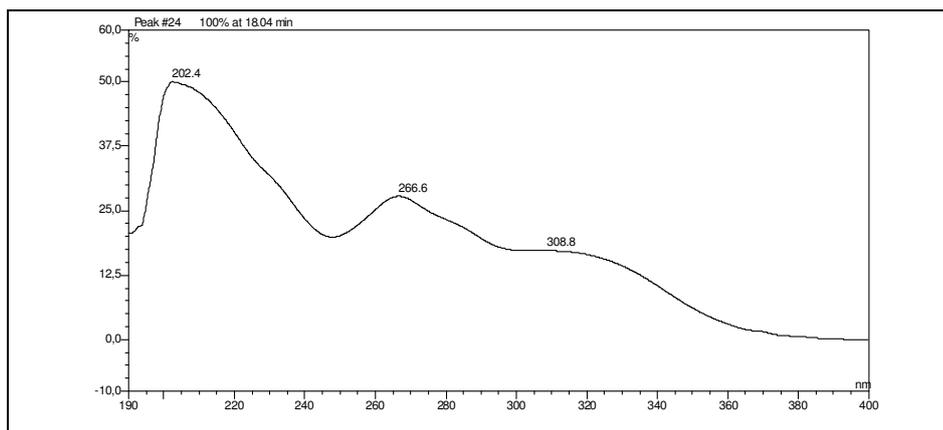
**Figura 73.** Correlações observadas no gHMBC para substância **PPCR4**

A substância **PPCR4** foi submetida à análise no IV em pastilha de KBr (Figura 74) que apresentou banda característica de grupo  $\text{-OH}$  ( $3464\text{ cm}^{-1}$ ), banda de  $\text{C-H}$  de grupos oximetílicos ( $2920$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ ) e bandas de grupo  $\text{C=O}$ , carbonila ( $1654$  e  $1616\text{ cm}^{-1}$ ).



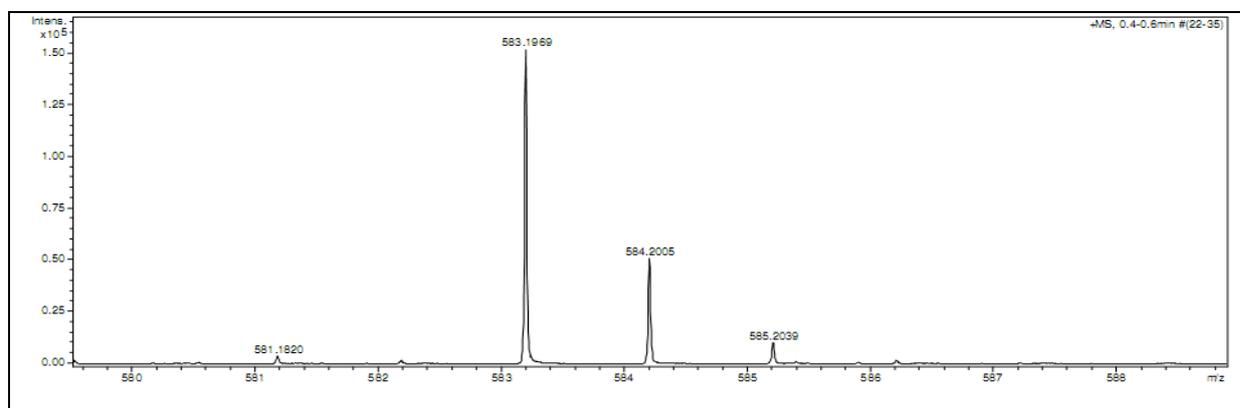
**Figura 74.** Espectro no IV em pastilha de KBr da substância **PPCR4**

Com relação ao espectro no UV da substância **PPCR4** (Figura 75, pág. 94), foi possível visualizar bandas de absorção semelhantes aos observados no espectro no UV de **PPCR3**.



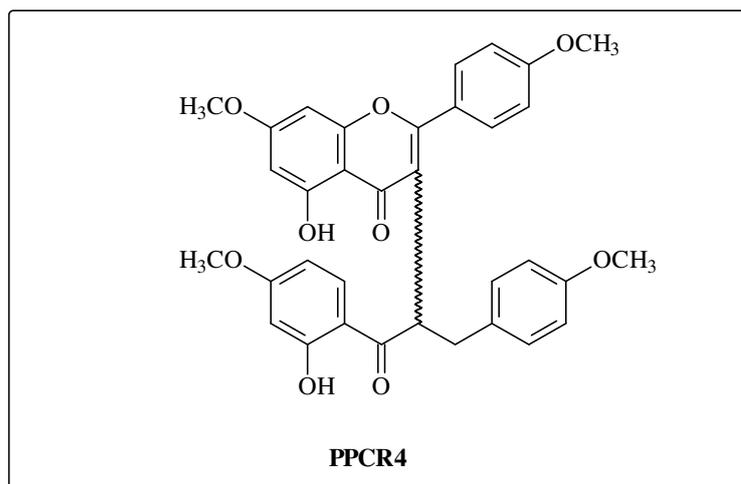
**Figura 75.** Espectro no UV da substância **PPCR4**

A conclusão estrutural se realizou quando a substância **PPCR4** foi submetida à análise de EM de alta resolução (Figura 76) no modo positivo. A massa exata registrada  $m/z = 583,1969$  [ $M^+ + 1$ ] correspondente ao pico do íon molecular com adição de um hidrogênio ( $m/z = 1,0079$ ). Portanto, o íon molecular [ $M^+$ ] exato  $m/z$  582,1880 (calculado - 582.1889; observado - 582,1890) que corresponde a fórmula molecular  $C_{34}H_{30}O_9$ .



**Figura 76.** EM de alta resolução da substância **PPCR4**

Portanto, a substância **PPCR4** trata é 7,4'-dimetoxi-5-hidroxi-flavona-3 $\alpha$ -4'',4''''-dimetoxi-2''''-hidroxidihidrochalcona (Figura 77, pág. 96) inédita na literatura e possui  $\alpha[D] + 14$ .



**Figura 77.** Estrutura da substância **PPCR4** (F.M. = C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>)

---

## 5 - CONCLUSÃO

---

Através de processos cromatográficos empregados nos extratos brutos da casca da raiz foi possível isolar dois novos biflavonoides. O 5,7-dihidroxi-4'-methoxiflavona-6 $\alpha$ -2''',4'''-dihidroxi-4''-methoxidihidrochalcona (**PPCR3**) e 5-hidroxi-7,4'-dimethoxiflavona-3 $\alpha$ -2'''-hidroxi-4''',4''-dimethoxidihidrochalcona (**PPCR4**) ambos de ocorrência inédita na literatura. Além do ácido 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielagico-4'- $\beta$ -D-xilopiranosideo (**PPCR2**) inédito na família Fabaceae e ésteres metílicos derivados de ácidos graxos (**PPCR1a-d**) constituído principalmente de hexadecanoato de metila (**PPCR1b**) e oleato de metila (**PPCR1c**) que são frequentemente encontrados em plantas.

Por outro lado, nas flores foram obtidos uma mistura de onze alcoóis graxos (**PPF1**) saturados e homólogos com cadeia carbônica variando de 22 a 32 átomos de carbonos. Sendo considerado metabolito importante para sobrevivência da espécie *P. pyramidalis*. Além do isolamento de mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (**PPF2a-b**), assim como o galato de metila (**PPF3**) e mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (**PPF4**).

A atividade citotóxica, antioxidante e anticolinesterásica foram avaliadas. Os resultados sugerem que nas fases orgânicas obtidas do extrato bruto da casca da raiz e das flores de *P. pyramidalis* existem substâncias com potencial biológico importantes. Porém, ainda não foi possível isolar as substâncias responsáveis por estas atividades. Assim, no teste de letalidade contra *Artemia salina* ficou claro que existem substâncias que podem causar algum tipo de intoxicação se consumida demasiadamente pela atribuição popular. Por outro lado, a atividade antioxidante revelou que as mesmas fases que apresentaram resultado significativo no teste citotóxico, são as mesmas que possuem maiores propriedades antioxidantes. Refletindo também na atividade anticolinesterásica, que revelou 75% de inibição da enzima na hidrólise da acetilcolina para a fase AcOEt da casca da raiz. Contudo, as substâncias individualmente não apresentaram atividades.

---

## 6 - REFERÊNCIAS

---

ADAMS, R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Illinois, 4<sup>th</sup> edition.

ALVES, C. Q. Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de Leguminosae: *Diocleia virgata* e *Cenostigma macrophyllum*. 2012, 227 folhas. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

BAHIA, SEPLANTEC. 1979. Subsecretária de Ciência e Tecnologia. Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia. Salvador.

BAHIA, M. V. Estudo químico de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). 2002. 104 folhas. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

BAHIA, M. V.; DOS SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. 2005. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society. 16 (6), 1402-1405.

BAHIA, M. V.; BATISTA, J. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. 2006. Outros biflavonóides de *Caesalpinia pyramidalis*, 29<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN – 210, Águas de Lindóia – SP.

BAHIA, M. V. Ocorrência de biflavonoides e derivado de ácido benzóico do cerne e folhas de *Caesalpinia pyramidalis* e *Peltophorum dubium* (LEGUMINOSAE). 2007, 248 folhas. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; CRUZ, M. P. 2005. Composição química de extrativos lipofílicos e polares de madeira de *Eucalyptus grandis*. Science & Engineering Journal. 15 (2), 13-20.

BARROS, C. S. R. F. Compostos orgânicos de baixo peso molecular de *Eucalyptus globulus*: Comportamento durante o cozimento kraft da madeira e branqueamento da pasta celulósica. 2003. Dissertação (Doutoramento em Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal Ethnopharmacology*. 53, 175-178.

DAVID, J. M. & DAVID, J. P. 2002. Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Vol. único, 6ª edição.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEDO, C.; MUÑOZ, V.; SAUVIN, M. A. 2001. Search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal Ethnopharmacology*. 77 (1), 91-98.

DEWICK, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Copyright John Wiley & Sons, Ltd, 2<sup>nd</sup> edition. ISBN 0470846275 (Electronic).

DOLABELA, M. F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-*Trypanosoma Cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 1997, 128 folhas. Belo Horizonte: UFMG. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

FINNEY, D. J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press: 3ª edition.

GAO, S.; YE, K-H; ZHANG, Y.; ZHOU, G-X. 2013. Chemical constituents from barks of *Pterocarya stenoptera*. *Zhongcaoyao*. 44 (7), 803-807.

GUO, Z.; XU, Y. HAN, L.; BO, X.; HUANG, C.; NI, L. 2011. Antioxidant and cytotoxic activity of the acetone extracts of root of *Euphorbia hylonoma* and its ellagic acid derivatives. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (23), 5584-5589.

HARBORNE, J. B. & MABRY, T. J. 1982. The flavonoids: Advances in research. London: Chapman and Hall.

HARBORNE, J. B. 1993. The Flavonoids Advances in Research Since 1986. CRC Press. 676 páginas.

HIKINO, H.; TAGUSHI, T.; FUJIMURA, H.; HIRAMATSU, Y. 1977. Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood. *Planta Medica*. 31 (3), 214-220.

KURIA, K. A. M.; DE COSTER, S.; MURIUKI, G.; MASENGO, W.; KIBWAGE, I.; HOOGMARTENS, J.; LAEKEMAN, G. M. 2001. Antimalarial activity of *Ajuga remota* (Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae): In vitro confirmation of ethnopharmacological use. *Journal Ethnopharmacology*. 74 (2), 141-148.

LEWIS, G. P. 1987. Legumes of Bahia. Whitstasble: Kew Royal Botanic Gardens.

LEWIS, G. P. & SCHRIRE, B. D. 2003. Leguminosae or Fabaceae? Advances in Legume Systematics, part 10, Higher Level Systematics, pp 1-3. Royal Botanic Gardens, Kew.

LIMA, M. P.; BRAGA, P. A. C.; MACEDO, M. L.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. 2004. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic implications. *The Journal of Brazilian Chemical Society*. 15 (3), 385-394.

MAIA, G. N. 2004. Catingueira. In: Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: Leitura e Arte. 159-169.

MANN, J. 1994. Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxford University Press. 1<sup>st</sup> edition. ISBN 0 19 855677 2 (Hbk).

MARTINEZ, A. M. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacêutica, Universidad de Antioquia – Medellín.

MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; ALMEIDA E CASTRO, V. T. N.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. *Molecules*. 15, 8534-8542.

MENDES, C. C. Metabolitos secundarios presentes nas folhas de *Caesalpinia pyramidalis* e *Byrsonima microphyla*. 1996, 66 folhas. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. 2000. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*, *Fitoterapia*. 71, 205-207.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*. 45 (5), 31-34.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85, 231-237.

MOREIRA, B. O. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL. (Anacardiaceae), 2009, 127 folhas. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

OLIVEIRA, J. C. S. Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (LEGUMINOSAE). 2010. 74 folhas. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. 2002. *Química Nova*. 25 (1), 45-61.

QUEIROZ, L. P. 2009. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana: Editora Universitária da UEFS, 1º edição.

SANTOS, C. A.; PASSOS, A. M. P. R.; ANDRADE, F. C.; CAMARGO, E. A.; ESTEVAM, C. S.; SANTOS, M. R. V.; THOMAZZI, S. M. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21 (6), 1077-1083.

SANTOS, E. A.; CARVALHO, C. M.; COSTA, A. L. S.; CONCEIÇÃO, A. S.; MOURA, F. B. P.; SANTANA, A. E. G. 2012. Bioactivity evaluation of plant extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

SARAIVA, A. M.; SARAIVA, C. L.; GONÇALVES, A. M.; SOARES, R. R.; MENDES, F. O.; CORDEIRO, R. P.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. 2012. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 48 (1), 147-154.

SEIGLER, D. S. 2003. Phytochemistry of Acacia-sensu lato. Biochemical Systematics and Ecology. 31 (8), 845-873.

SAAED, M. A. & SABIR, A. W. 2001. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. Fitoterapia. 72 (7), 807-809.

SCHULTZ, A. R. H. 1984. Introdução à botânica sistemática. Porto Alegre: Editora universitária, 4<sup>o</sup> edição.

SHARMA, S. R.; DWIVEDI, S. K.; SWARUP, D. 1997. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. Journal Ethnopharmacology. 58 (1), 39-44.

SHI, X.; DU, X.; KONG, L. 2006. Studies on chemical constituents in roots of *Euphorbia soongarica*. Zhongguo Zhongyao Zazhi. 31 (18), 1503-1506.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, Inc. 7<sup>th</sup> edition.

SOUSA, C. M. M.; E SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAUJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova. 30 (2), 351-355.

TOMCZYK, M. 2011. Secondary metabolites from *Potentilla recta* L. and *Drymocallis rupestris* (L.) Sojak (syn. *Potentilla rupestris* L.) (Rosaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 39 (4-6), 893-896.

YU, M. & HOU, A. 2010. Anti-HBV constituents from *Euphorbia fischeriana*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. 35 (22), 3002-3006.

ZENG, Y.; HOU, P-Y; MA, B-J; GU, L-Q; BI, K-S; CHEN, X-H. 2013. Isolation and identification of chemical constituents from roots of *Euphorbia pekinensis* Rupr. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*. 30 (3), 178-181.

ZHENG, X.; MENG, W. D.; QING, F. L. 2004. Synthesis of *gem*-difluoromethylenated biflavonoid via the Suzuki coupling reaction. *Tetrahedron Letters*. 45, 8083-8085.

## CAPITULO 2 - Estudo químico *Theobroma cacao*

---

### 1 - INTRODUÇÃO

---

#### 1.1 - Família Malvaceae

A família Malvaceae possui distribuição predominantemente pantrópica, incluindo cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de 80 gêneros e 400 espécies. A família Malvaceae é uma valiosa fonte de fibras, alimentos, bebidas, fármacos, madeira e paisagismo. Dentre as espécies florestais nativas do Brasil, destacam-se os gêneros *Ceiba*, antes classificadas como *Chorisia* (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2009) *Ceiba speciosa* (paineira) e *Ceiba pentandra* (sumaúma). Assim como, *Theobroma cacao* (cacau) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu). [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies\\_arboreas\\_brasileiras/arvore/CONT000\\_fu1ekyj602wyiv807nyi6s9rqihfq.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000_fu1ekyj602wyiv807nyi6s9rqihfq.html) (Acesso 10/12/2013).

#### 1.2 - Subfamília Sterculiaceae

A subfamília Sterculiaceae pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta e classe Magnoliopsida, subclasse Dilleniidae da ordem Malvales. É uma subfamília difundida nas regiões tropicais, sobretudo na América e África, com cerca de 70 gêneros e 430 espécies. Estudos recentes em filogenia da *Angiosperm Phylogeny Group* (APG) incluem esta família em Malvaceae, como subfamília denominada Sterculioideae. A utilização como família ou subfamília não está definida, porque os estudos ainda não são conclusivos.

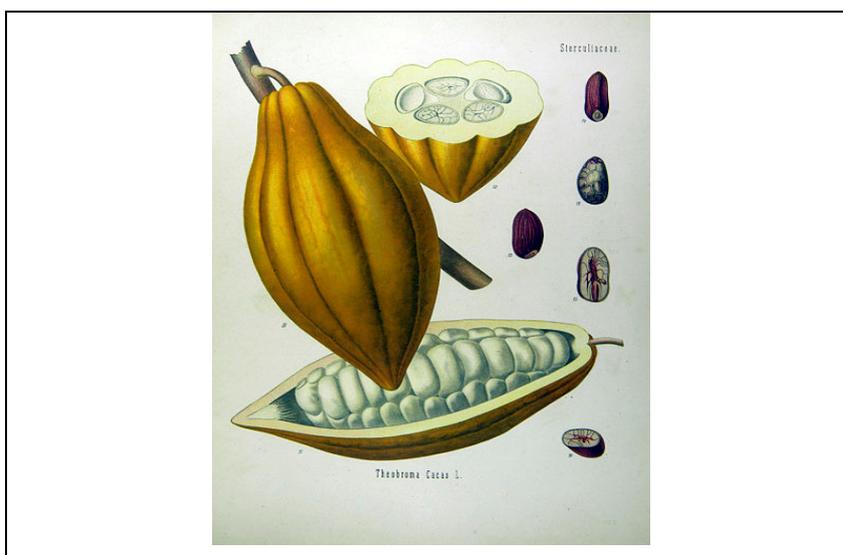
São arbustos ou árvores, de flores coloridas e pequenas. Os frutos são folículos ou cápsulas, que se abrem na maturação revelando sementes nuas. Alguns frutos permanecem fechados e suas sementes são envolvidos em uma polpa adocicada.

É uma família importante economicamente devido a três espécies cultivadas em vários países tropicais: a cola (*Cola acuminata*), cujas sementes são usadas na produção de uma bebida homônima, usada como base para refrigerantes; o cacauieiro (*T. cacao*), cultura importante no

Brasil, que é o quinto produtor mundial (o primeiro é a Costa do Marfim, responsável por mais de quarenta por cento da produção mundial). Das sementes de cacau se faz a manteiga de cacau, licor de cacau e o chocolate e o cupuaçu (*T. grandiflorum*), fruto amazônico cuja polpa é usada em doces e sorvetes e cujas sementes produzem um alimento similar ao chocolate, o cupulate. Há outras espécies de menor valor como fonte de alimento, como o chichá ou xixá (*Sterculia chicha*), que produz pequenas sementes negras que, tostadas, são saborosas e nutritivas, embora essa espécie seja cultivada mais pelas suas qualidades ornamentais. Há ainda várias espécies ornamentais entre árvores e arbustos, com floração abundante e colorida, algumas vezes aromática, outras vezes com flores de odor desagradável, como o próprio chichá. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sterculiaceae> (Acesso 10/12/2013).

### 1.3 - A espécie *Theobroma cacao*

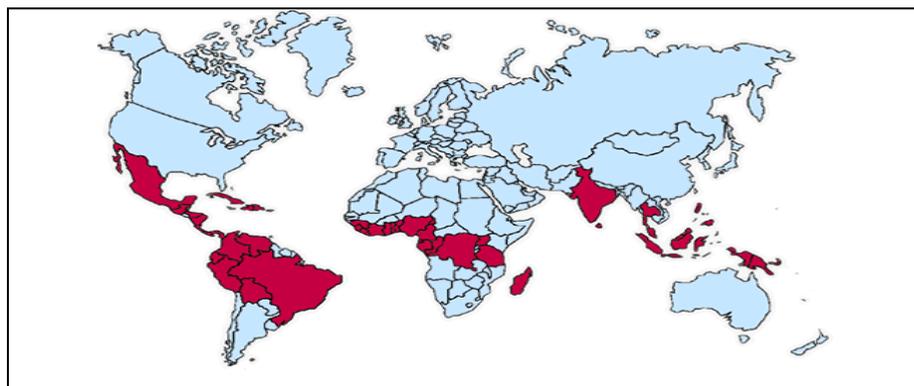
*T. cacao* (Figura 78) conhecido popularmente como cacau é uma planta da subfamília Sterculiaceae, nativa das florestas quentes e úmidas das terras baixas do México e da América Central e das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (NAKAYAMA *et al.* 1996 e JOLY, 2002). Esta espécie é cultivada com o objetivo principal de produzir chocolate a partir de suas amêndoas secas, além de outros produtos como polpa, suco, geléia, destilados finos, sorvete e cosméticos (PINTO, 1999 e JOHNSON *et al.* 2009).



**Figura 78.** Fruto da espécie *Theobroma cacao*

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Theobroma\\_cacao\\_-\\_K%C3%B6hler%E2%80%93s\\_Medizinal-Pflanzen-137.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Theobroma_cacao_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-137.jpg) (Acesso 10/12/2013).

O cacau é originário das regiões tropicais da América Central (CUENTA & NAZÁRIO, 2004). Assim, atualmente a *T. cacao* é uma espécie amplamente distribuída nos continentes asiático, africano e americano (Figura 79). No Brasil, o cultivo iniciou-se primeiramente na Amazônia, onde já existia em estado natural, próximo ao clima do México, devido ao Rio Amazonas e finalmente chegou à Bahia, onde melhor se adaptou ao solo e ao ambiente marinho, e causou o chamado "Boom" da época de 1930.



**Figura 79.** Distribuição geográfica da espécie *T. cacao*

[http://www.sweetriot.com/cacaofun/cacao\\_map.php](http://www.sweetriot.com/cacaofun/cacao_map.php) (Acesso 10/12/2013).

O Estado da Bahia é o maior produtor com cerca de 90% do cacau produzido no Brasil, cuja produção corresponde a mais ou menos 5% da produção mundial, sendo a Costa do Marfim o maior produtor do planeta, com aproximadamente 40% do total. Contudo, sua capacidade produtiva foi reduzida em 60% com o advento da vassoura-de-bruxa (Figura 80), causada pelo fungo fitopatogênico *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, atualmente *Moniliophthora pernicioso*. O Brasil, então, passou do patamar de país exportador de cacau para importador, não sendo completamente auto-suficiente do produto (PINTO, 1999).

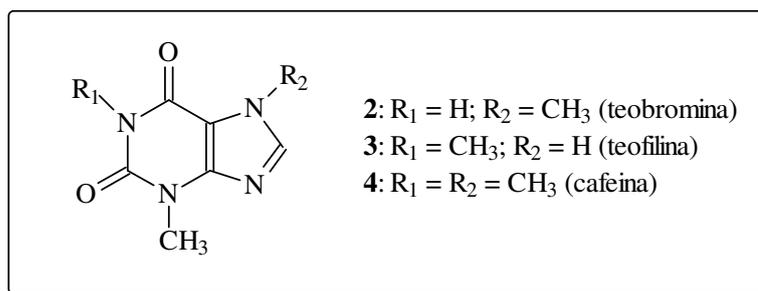


**Figura 80.** Sintomas da vassoura de bruxa em frutos do cacau

<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm> 09/10/2013

Apesar da enfermidade, o cacau ainda se constitui numa grande alternativa econômica para o Sul da Bahia com o desenvolvimento de técnicas de enxertia de hastes de plantas resistentes à vassoura em árvores vulneráveis aos ataques do fungo, conhecida como “clonagem” pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC (PINTO, 1999). Com o apoio do órgão, cultivares clonais mais resistentes ao fungo têm sido introduzidas, porém formas mais severas de controle do patógeno ainda precisam ser descobertas. Essas formas podem vir futuramente com os resultados do **Projeto Genoma Vassoura de Bruxa**, que visa estudar o genoma do fungo e elaborar estratégias mais eficientes no seu controle biológico. É uma iniciativa da CEPLAC que conta com o apoio da EMBRAPA e de laboratórios de universidades da Bahia como: UFBA, UESC e UEFS, além de São Paulo na UNICAMP.

A qualidade das amêndoas do cacau depende de muitos fatores tais como genótipo, manejo agrônômico, fatores do solo, condições climáticas e o mais importante a tecnologia pós colheita (JOHNSON *et al.* 2009 e FANG *et al.*, 2008). Porém, o que define essa qualidade são o aroma e o sabor, propriedades difíceis de serem comparadas. Por esta razão, é importante analisar e quantificar as metilxantinas (Figura 81), teobromina (**1**), teofilina (**2**) e cafeína (**3**) porque estas afetam o genótipo e o sabor dos grãos de cacau (THOMAS *et al.* 2004 e LO COCO *et al.* 2007). E são os principais alcaloides presentes no cacau e seus derivados. Estas substâncias são alcaloides purínicos que apresenta potente ação biológica, tais como, estimuladora do sistema nervoso central, vaso dilatadores ou construtores (NAKAYAMA *et al.* 1996).



**Figura 81.** Estrutura química dos alcaloides: teobromina (**2**), teofilina (**3**) e cafeína (**4**)

A literatura reporta o emprego de outra técnica de cromatografia líquida capaz de conduzir ao isolamento de substâncias de interesse farmacológico. A técnica, conhecida como Cromatografia em Contra-Corrente (CCC), dentre várias aplicações reportadas na literatura utilizando CCC (MARSTON & HOSTETTMANN, 1994 e GARRARD, 2005), merece

destaque o método de isolamento da risinina das folhas de *Ricinus communis* (LEITE *et al.* 2005) e o efeito dos alcanos em sistemas pluviais (BERTHOD *et al.* 2005).

Por outro lado, uma das preocupações que afeta todo o mundo, atualmente, é descoberta por novas fontes de energia renováveis. Com esta visão, o desenvolvimento de biodiesel substituindo o diesel de petróleo foi um grande avanço nesta área de pesquisa. Desta forma, vários grupos de pesquisa no Brasil e no mundo continuam incessantemente buscando novas fontes alternativas de matérias primas para obtenção de óleos ou ceras. Uma vez que, os óleos vegetais e ceras possuem cadeia carbônica derivada de ácido graxo, assemelhando-se à cadeia carbônica do diesel. Portanto, os óleos e ceras são matérias primas ideais na produção de biodiesel.

Nesta perspectiva, o estudo químico realizado com a espécie *T. cacao* revelou que em suas sementes (amêndoas) existe uma quantidade considerável de cera, sendo também uma alternativa na produção de biodiesel. Logo, o objetivo deste trabalho foi isolar simultaneamente as metilxantinas presentes no extrato MeOH bruto das sementes de cacau através do uso da cromatografia em contra-corrente (CCC) e quantificá-las por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) criando um método de validação. Assim como, a análise de seus ésteres metílicos, presentes no extrato hexânico bruto das sementes de *T. cacao* e comparar seus constituintes com os descritos na literatura.

---

## 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1. Gerais

- Preparar extratos brutos em hexano e em MeOH das sementes de *Theobroma cacao* para análise de seus constituintes.

### 2.2. Específicos

- Identificar a composição química do extrato bruto em hexano obtida da semente de *T. cacao*;
- Isolar as metilxantinas presentes no extrato bruto em MeOH das sementes de *T. cacao* utilizando CCC;
- Quantificar as metilxantinas e desenvolver um método analítico utilizando HPLC;
- Comparar os teores de metilxantinas em diferentes amostras de sementes de *T. cacao*.

---

### 3 - EXPERIMENTAL

---

#### 3.1 - Coleta da amostra e preparação dos extratos

O fruto “não-clonado” (Figura 82) da espécie *T. cacao* foi obtido na Cidade de Ilhéus que fica localizada no sul da Bahia. As sementes de *T. cacao* (52,07 g) foram secas a 50 °C em estufa com circulação de ar. Em seguida, as sementes foram trituradas em moinho de facas Thomas Wiley Laboratory Mill – Model 4, seguida de extração com hexano e MeOH, respectivamente. O método de extração utilizado foi maceração a temperatura ambiente. O pó das sementes foram acondicionados em erlenmeyer de 250 mL seguida da adição de hexano para obter-se o extrato apolar e posteriormente o polar com MeOH. A maceração com hexano (5 x 100 mL, com intervalos de 48 horas entre cada extração) resultou em um extrato de cor bege e aspecto sólido a temperatura ambiente. Por outro lado, a maceração com MeOH (5 x 100 mL, com intervalos de 48 horas entre cada extração) forneceu um extrato de coloração púrpura, escura e pastosa. Os solventes utilizados nas extrações foram recuperados em evaporador rotativo da Buchi 461 (40 °C,  $\pm$  120 rpm) sob baixa pressão, obtendo-se no final os extratos brutos da semente de *T. cacao*.



**Figura 82.** Fruto de *T. cacao*. Foto: Prof. Dra. Mariluze P. Cruz (UFBA)

#### 3.2 - Construção da curva padrão

A curva padrão foi obtida de acordo com a relação linear entre a área do pico obtido por aplicação dos padrões de metilxantinas adquiridos comercialmente pela SIGMA-ALDRICH.

Portanto, para a construção da curva foram utilizados no mínimo cinco concentrações. Desta forma, as concentrações para teobromina (1) foram de 1,9; 5,7; 9,5; 13,3 e 17,1 µg/mL, para teofilina (2) foram de 1,5; 4,5; 7,5; 10,5, 13,5 e 16,5 µg/mL e para cafeína (3) foram 1,3; 3,9; 6,5; 9,1; 11,7; 14,3; 16,9 e 19,5 µg/mL. Assim, foi possível preparar em um mesmo vial a mistura das três metilxantinas de concentrações conhecidas mas sem exceder a concentração de 2 mg/mL. Ao final das análises para obtenção da curva, o equipamento, conhecendo-se as concentrações exatas de cada metilxantina, pode converter os dados automaticamente para os valores da faixa da curva padrão facilitando desta forma a interpretação dos dados registrados.

### **3.3 - Preparação das amostras para análise por HPLC e CCC**

Inicialmente, as amostras analisadas por HPLC foram dissolvidas em MeOH, utilizando como solvente orgânico na fase móvel. As metilxantinas levaram longos tempos a serem eluídas quando utilizado MeOH, além de picos largos grandes mal resolvidos. Contudo, o emprego de ACN foi utilizada como solvente orgânico, substituindo o MeOH, proporcionou menores tempos de análise. No entanto, os picos ainda eram grandes e mau resolvidos. Portanto, como as análises utilizando MeOH ou ACN como solventes orgânicos, o problema na resolução do cromatograma persistia. Assim, na solubilização das amostras substituiu-se MeOH por mistura de H<sub>2</sub>O:MeOH (4:1) que favoreceu a solubilização das amostras e melhorando a resolução dos cromatogramas e com picos melhores resolvidos, com maior simetria e considerados ideais para a determinação das metilxantinas e construção da curva padrão. Portanto, as amostras foram preparadas dissolvendo-as em mistura de H<sub>2</sub>O:MeOH (4:1) e filtradas em cartucho C18. Após este processo, a solução filtrada passa a ser analisada no HPLC.

Para a amostra submetida à purificação no CCC, esta foi dissolvida na fase estacionária, constituída numa mistura de H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1), previamente definida por CCDC e descrita no item 3.6 (Página 112). Após a solubilização do extrato na fase estacionária o mesmo foi filtrado através de papel de filtro analítico antes da injeção no CCC.

### **3.4 - Extração ácido/base dos Alcaloides (Metilxantinas)**

O extrato MeOH bruto das sementes de *T. cacao* (957,1 mg) foi dissolvido em 30 mL de solução contendo ácido sulfúrico 2% e particionado com diclorometano (5 x de 40 mL). Após a extração em fase ácida, a fase aquosa foi alcalinizada adicionando hidróxido de amônia 25%

até um pH 10 e extraído com  $\text{CHCl}_3$  (3 x de 50 mL). Obtendo-se no final da extração o resíduo da fase ácida e da fase básica.

Para o método empregado na CCDC o mesmo descrito no **CAPÍTULO 1** item **3.1** (Página 28) foi utilizado.

Todas as frações obtidas no CCC foram coletadas em tubos de ensaio de 20 mL. Todas as frações foram monitoradas por CCDC, agrupadas quando necessário (ex. semelhança de RF) e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo, transferidas para recipientes previamente tarados e seus rendimentos calculados no final do processo de extração.

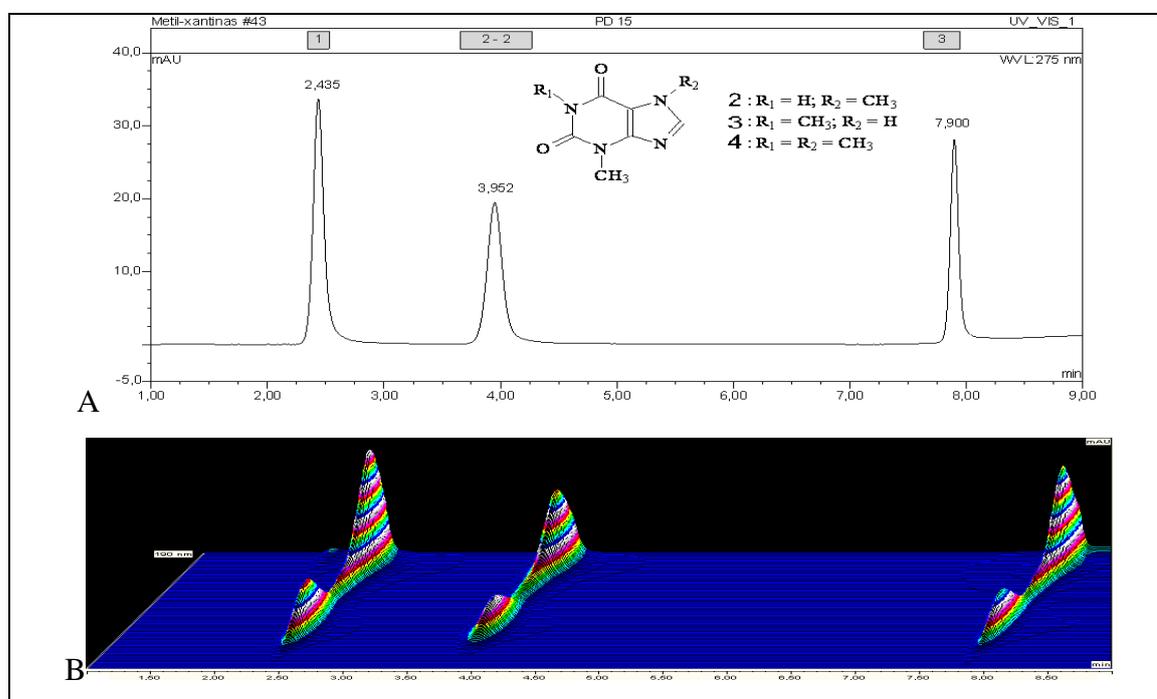
Os solventes utilizados nas análises de grau analítico PA foram das marcas QUIMEX® para  $\text{CHCl}_3$ , DCM, MeOH, EtOH, AcOEt e Hexano.

Para solventes orgânicos de alta pureza, utilizados no HPLC, o MeOH e ACN foram da marca TEDIA e água milli-Q. Para solventes orgânicos de grau analítico, utilizados no CCC, o hexano, AcOEt, MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e  $\text{CHCl}_3$  utilizados foram da marca QUEMIS. Para extração ácida e básica foram utilizados  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e hidróxido de amônia de marcas VETEC e QUIMEX®, respectivamente. Papéis tornassol indicador de pH utilizados da marca analytiCals® Carlo Erba. Padrões de teofilina, teobromina e cafeína foram da marca SIGMA®.

A obtenção dos ésteres metílicos foi conduzida por reação de hidrólise do triacilglicerídeo, realizada utilizando refluxo em solução EtOH/KOH (100 ml/300 mg) por 2 horas. A mistura reacional foi concentrada em cerca de 80% utilizando evaporador rotativo. Foram adicionados 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e realizada três extrações com DCM (100 mL, cada). Desta forma, foram obtidos os ácidos graxos livres. Logo, a formação dos ésteres derivados do ácido graxo livre foi realizada utilizando os ácidos graxos livre em MeOH na proporção de 0,5 mg:35 mL. Seguida de adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,75 mL) e levada a refluxo por 2 horas. No termino da reação, ao resfriar a temperatura ambiente, foram adicionadas 20 mL de solução saturada de NaCl seguida de três extrações com DCM (100 mL, cada). O produto extraído com DCM foi filtrado em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrado em evaporador rotativo sob baixa pressão. Todas as etapas foram analisadas por CCDC. Após estes procedimentos, os ésteres metílicos foram obtidos com sucesso.

### 3.5 - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

As análises foram realizadas em HPLC da DIONEX, modelo UltiMate 3000 equipado com sistema de bombas quaternária LPG-3400SD, conectado ao Detector de Arranjo Diodo (PDA) modelo VWD-3100, DAD programado para comprimento de onda de 270 nm. Auto-injetor dos analitos e dos padrões e compartimento para coluna ACC-3000. Os padrões de metilxantinas (1 mg/mL), foram injetados no HPLC 2  $\mu$ L no modo isocrático a 40 °C e a fase móvel empregada foi mistura de H<sub>2</sub>O:ACN (95:5) com fluxo de 0,6 mL/min e tempo de análise com 10 min. Utilizou-se coluna analítica SHIM-PACK VP-ODS®, 150 mm x 2.0 mm C18 fase reversa. Desta forma, o extrato MeOH das sementes de *T. cacao*, assim como, os extrativos ácido/básico, os padrões das metilxantinas e frações do CCC foram dissolvidos em H<sub>2</sub>O:MeOH (4:1), filtrado em cartucho C18 e analisados por HPLC. Foram determinados os T<sub>R</sub> dos padrões das metilxantinas e obtidos seus respectivos espectros no UV. O método desenvolvido no HPLC, de modo a atingir uma condição de cromatografia que podem contemplar a separação de (2), (3) e (4) no menor tempo possível foi elaborada. Desta forma, foi possível obter um cromatograma contendo a mistura de metilxantinas bem resolvido e com tempo de análise de 10 min. (Figura 83A).

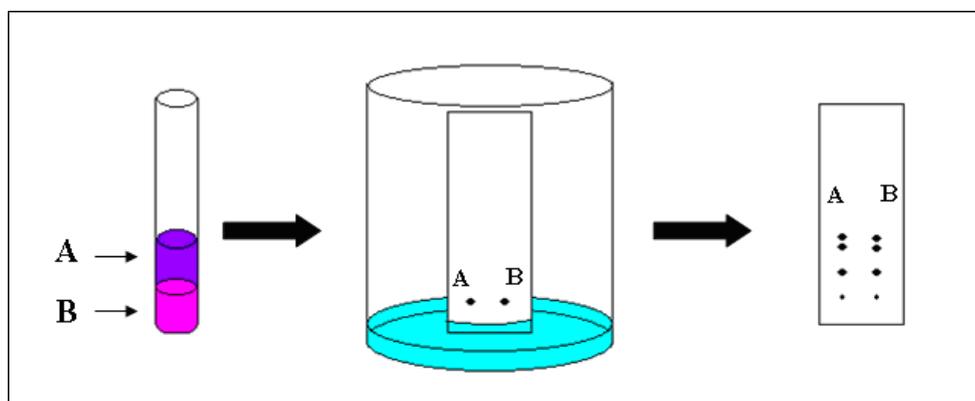


**Figura 83.** A: Cromatograma dos padrões de metilxantinas e B: Cromatograma bidimensional relacionado com espectro no UV

### 3.6 - Cromatografia em Contra-Corrente (CCC)

O equipamento utilizado foi Quattro CCC<sup>TM</sup> Mk5, QuikPrep<sup>TM</sup> equipado com quatro colunas com volumes de: 1° - 62,0; 2° - 68,0; 3° - 66,0 e 4° - 70 mL. Foram utilizadas apenas duas colunas do CCC, a 2° e a 3°, resultando em 134 mL. Velocidade inicial do rotor em 280 rpm variando até 860 rpm. A corrida foi realizada em fase normal, devido à maior solubilidade do extrato MeOH das sementes de *T. cacao* na fase aquosa, e dois litros do sistema foram preparados para serem utilizados no CCC. A bomba do HPLC da Varian foi utilizada para bobear fase estacionária e móvel a 5,0 mL/min. A injeção da amostra foi realizada manualmente pelo loop de 10 mL. Um coletor de frações automático da Varian, modelo 704 ProStar foi programado para 250 gotas utilizando tubos de ensaio de 10 mL.

A seleção das fases móvel e estacionária para uso no CCC foi baseada no coeficiente de distribuição das metilxantinas nas fases orgânicas (Hexano:AcOEt; 2:3) e aquosa (MeOH:H<sub>2</sub>O; 1:1) presente no extrato MeOH de sementes de *T. cacao*. As fases orgânicas e aquosa foram analisadas por CCDC no sistema de eluição CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1). Houve semelhança na eluição da fase orgânica e da fase aquosa, aplicada na mesma placa, separadamente (Figura 84).



**Figura 84.** Procedimento inicial antes de usar o CCC, A e B são as duas fases orgânicas imiscíveis

Esta técnica confirmou a escolha do melhor sistema a ser usado no CCC para separação das metilxantinas. Assim, o sistema utilizado foi composto por: Hexano:AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 2:3:1:1 em v/v/v/v.

Portanto, uma vez definido o sistema móvel e estacionário, o próximo passo foi otimização da operação do CCC. Para a separação das metilxantinas foi utilizada apenas duas colunas, a segunda e terceira, totalizando um volume final de 134 mL e as frações coletadas automaticamente utilizando coletor da Varian, modelo 704 ProStar.

As colunas do CCC foram primeiramente preenchidas bombeando a fase estacionária (MeOH:H<sub>2</sub>O), antes de injetar a amostra, em seguida, a amostra (0,9 g/7,0 mL) foi solubilizada no sistema de solventes da fase estacionaria e injetada manualmente pelo loop com auxílio de seringa de vidro com volume de 10 mL. Posteriormente o CCC é ligado e a fase móvel (Hexano-AcOEt) passa a ser bombeada. As frações (10 mL) foram coletadas automaticamente, após não se observar saída de fase estacionária, saindo apenas fase móvel. O volume de arraste foi de 60 mL, a cabeça da coluna e calda foram de 55 mL cada. Os parâmetros de análise utilizados no CCC encontram-se descritos na Tabela 21 (pág. 115).

**Tabela 21.** Parâmetros empregados no CCC para purificação das metilxantinas do extrato MeOH bruto das sementes *T. cacao*

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Hexano:AcOEt (2:3)
Fase estacionaria	H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1)
Velocidade do rotor	280 rpm até 860 rpm
Fluxo da fase móvel	5,0 mL.min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	7,0 mL

Após o termino da análise, todas as frações obtidas foram secas sob ventilação em capela e ressolubilizadas em MeOH. Desta forma, foram agrupadas conforme semelhanças na eluição visualizadas nas placas de CCDC. Todas as frações foram monitoradas aplicando-se os padrões das metilxantinas em suas respectivas CCDC utilizando CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1) como eluente.

As análises por HPLC ajudou na determinação dos tempos de retenção dos padrões das metilxantinas (**2**, **3** e **4**), e seus respectivos espectros no UV. Os tempos de retenção do material extraído da fase ácida quanto da fase básica também foram registrados e quantificados, assim como, a fração STC 6-22 e STC 23-67 obtida do CCC, todas analisadas sob as mesmas condições de análise dos padrões.

### **3.7 - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)**

A análise de CG/EM foi realizada conforme descrito no **CAPITULO 1** item **3.3.1** (Página 30).

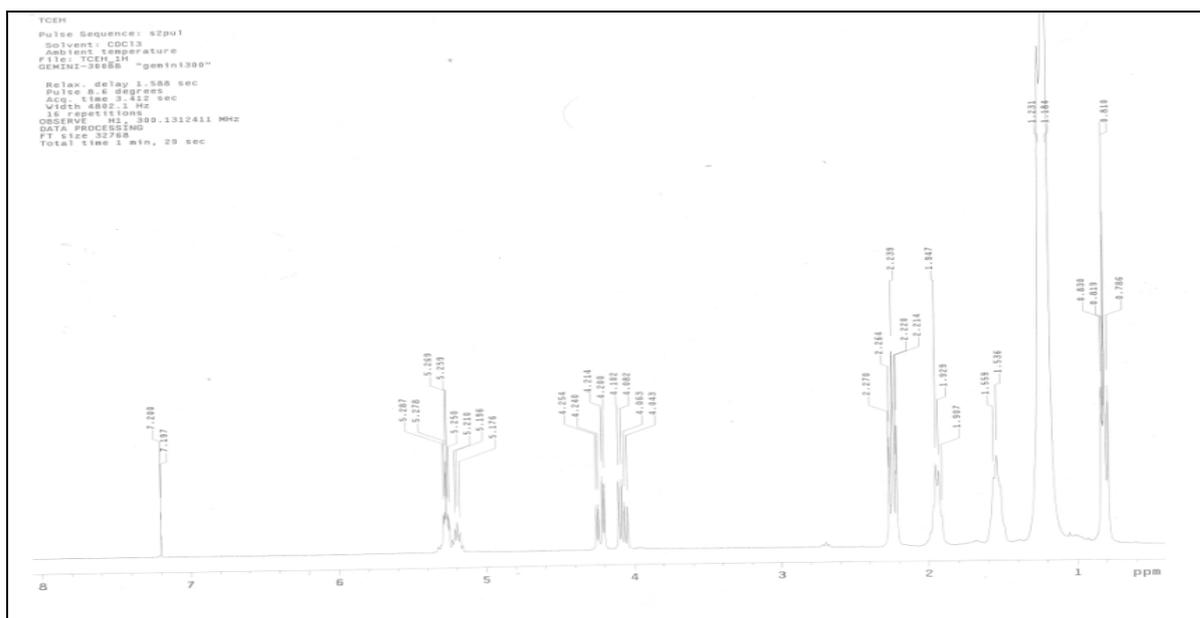
### **3.8 - Realização dos experimentos**

Para a elaboração das atividades no HPLC, foram utilizadas as dependências físicas do Laboratório do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto de Química da UFBA, sob supervisão do Prof. Dr. Jorge Mauricio David. E as atividades no CCC foram desenvolvidas no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFBA, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juceni Pereira David.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

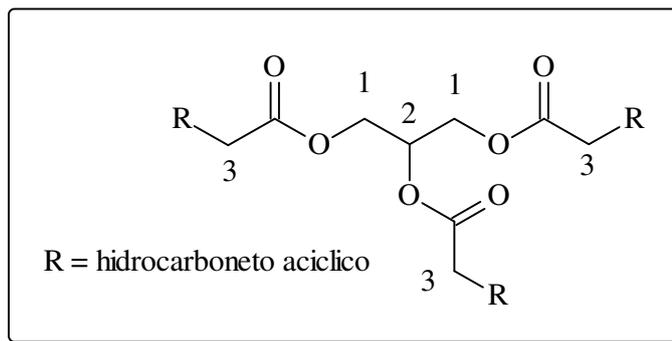
### 4.1 - Caracterização do extrato hexânico das sementes de *T. cacao*

O extrato hexânico bruto das sementes de cacau (*T. cacao*) foi obtido por maceração com hexano. O percentual extrativo foi de 8,61% (4,48 g). Após evaporação total do solvente o extrato se apresentou com aspecto de cera com coloração acinzentada. O extrato hexânico foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 85) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 87). Os espectros revelaram sinais característicos de triacilglicerídeos.



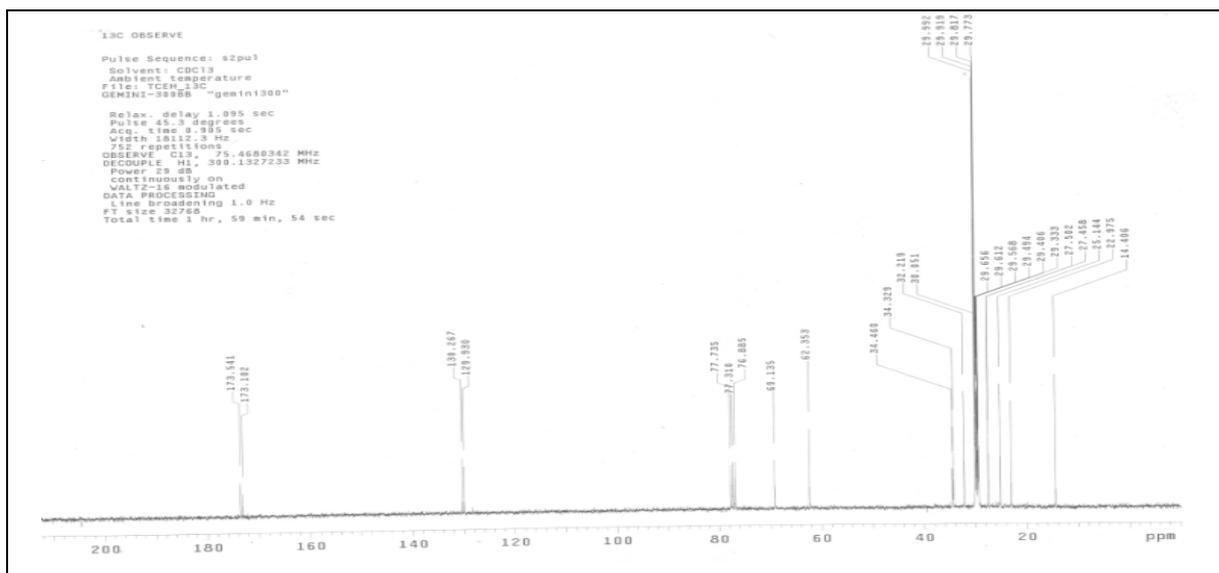
**Figura 85.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do extrato hexânico bruto das sementes de cacau

Os sinais em  $\delta$  2,23 (dt) é característicos de hidrogênios metileno vizinhos a carbonila (n. 3 – Figura 86, pág. 118),  $\delta$  4,22 e  $\delta$  4,07 (dd) de hidrogênio oximetileno 1 e 3 da cadeia triacil (n. 1 – Figura 86, pág. 118) e  $\delta$  5,19 (m) do hidrogênio oximetileno 2 do grupo triacil (Figura 86, pág. 118) e hidrogênio alílicos em  $\delta$  5,26, característicos de insaturações na cadeia carbônica derivada de ácido graxo.



**Figura 86.** Designações dos principais sinais observados no RMN de  $^1\text{H}$

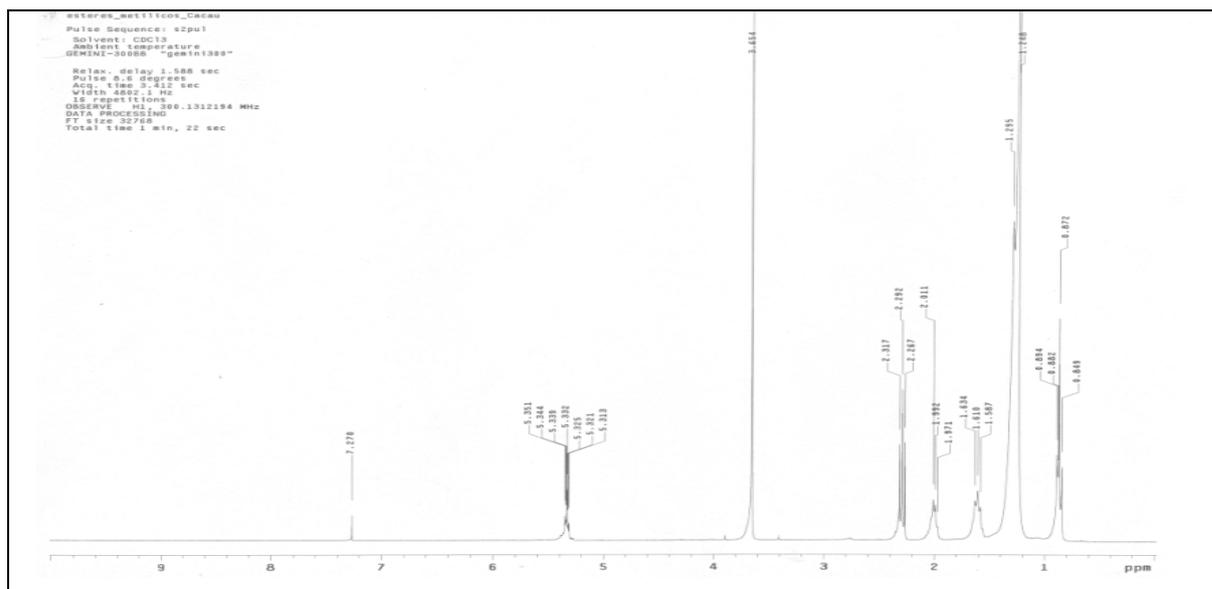
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 87) corroborou na determinação dos triacilglicerídeos, apresentando sinais característicos desta classe de substâncias. Portanto, os principais sinais observados foram duas carbonilas, uma em  $\delta$  173,5 e outra em  $\delta$  173,1 e os carbonos do grupo triacil em  $\delta$  69,1 (CH) e  $\delta$  62,3 (CH<sub>2</sub>). Assim como os carbonos alílicos em  $\delta$  130,2 e  $\delta$  129,9.



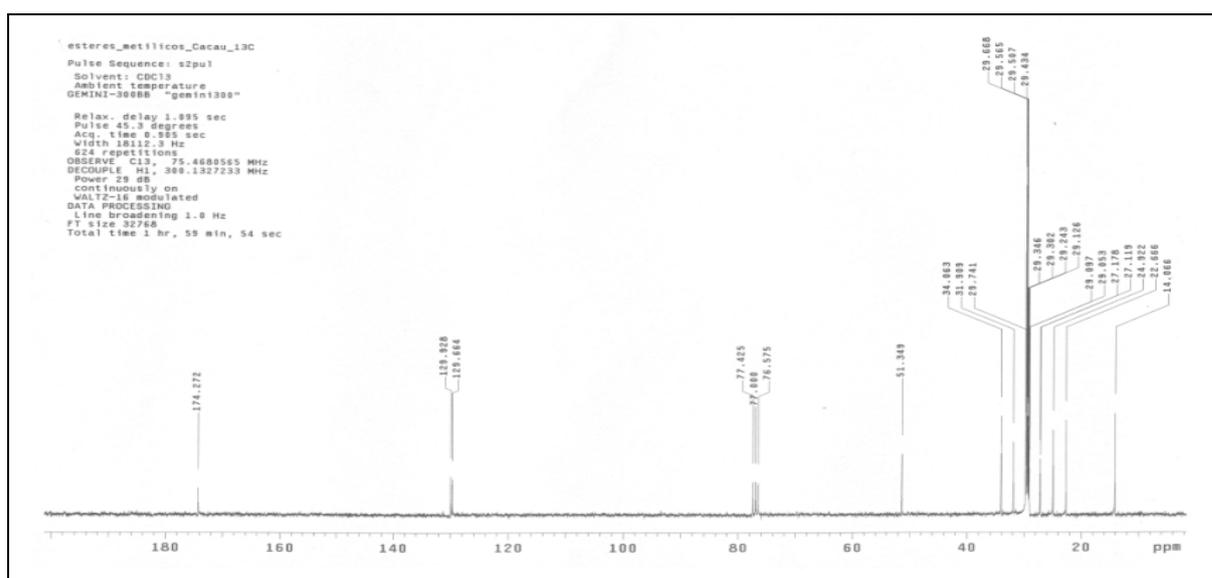
**Figura 87.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do extrato hexânico bruto das sementes de cacau

Contudo, há certa dificuldade em estabelecer qual ou quais triacilglicerídeo(s) esta(ão) presente(s) no extrato hexânico bruto. Desta forma, a CG/EM é uma técnica que pode ser empregada para determinar misturas desta classe de substância. Porém é necessário transformar os triacilglicerídeos em uma molécula menor, neste caso em ésteres metílicos derivados de ácidos graxos. Assim, foi realizada uma reação de hidrólise do triacilglicerídeo seguida de metilação do ácido graxo livre. Após o procedimento reacional, os ésteres

metílicos (74,8 mg) foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 88 e 89) do qual revelou que o processo reacional funcionou para obtenção dos ésteres metílicos, sendo constatada mediante ausência dos sinais do grupo triacil, assim como, pelo aparecimento do sinal referente ao grupo metoxílico em  $\delta$  3,65 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $\delta$  51,3 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , e apenas uma carbonila em  $\delta$  174,2. Portanto, ficou claro que os triacilglicerídeos foram convertidos em ésteres metílicos derivados de ácidos graxos.



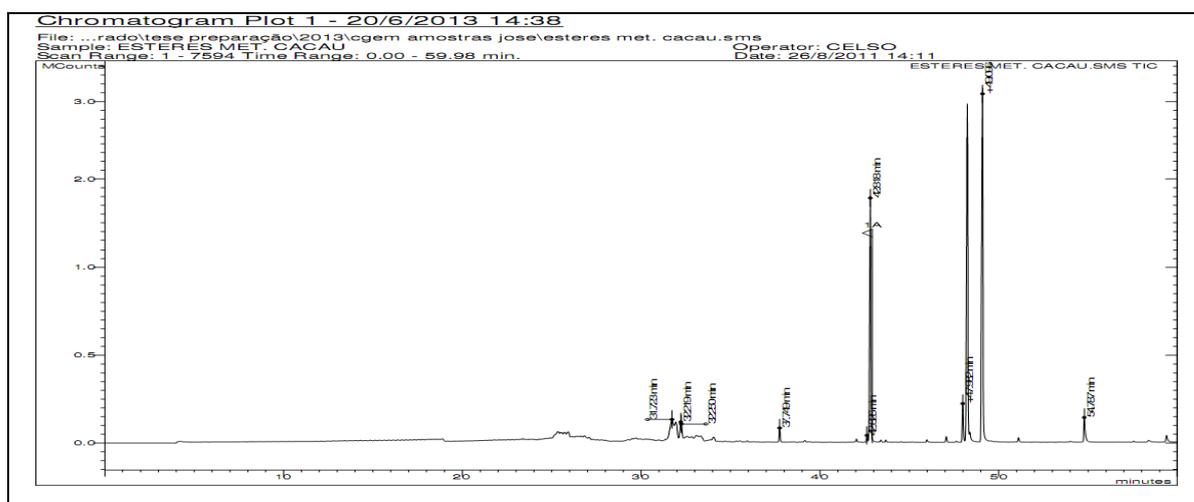
**Figura 88.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto obtido do extrato hexânico das sementes de cacau



**Figura 89.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto obtido do extrato hexânico bruto das sementes de cacau.

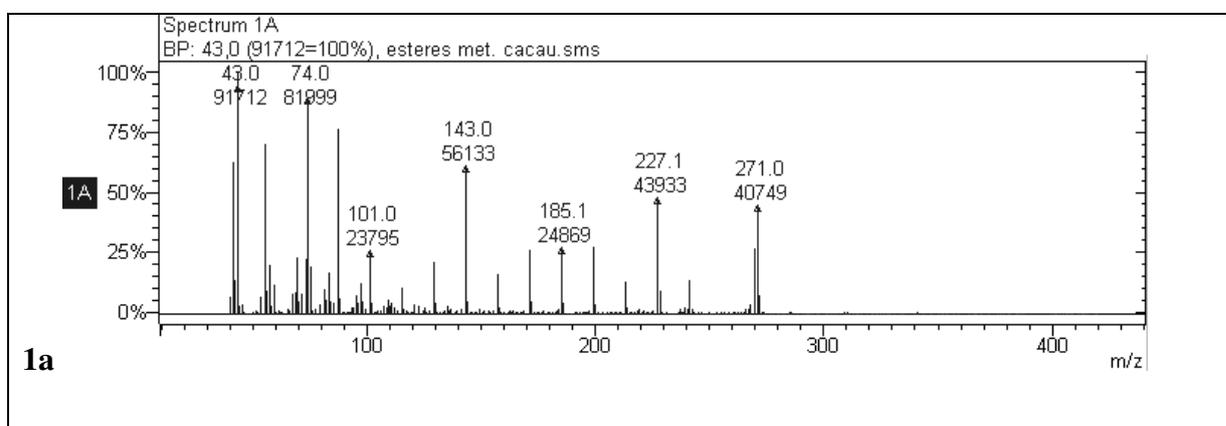
O produto obtido foi caracterizado como uma mistura de ésteres metílicos e se apresentaram na forma de um óleo amarelo e sua elucidação foi realizada utilizando técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e CG/EM.

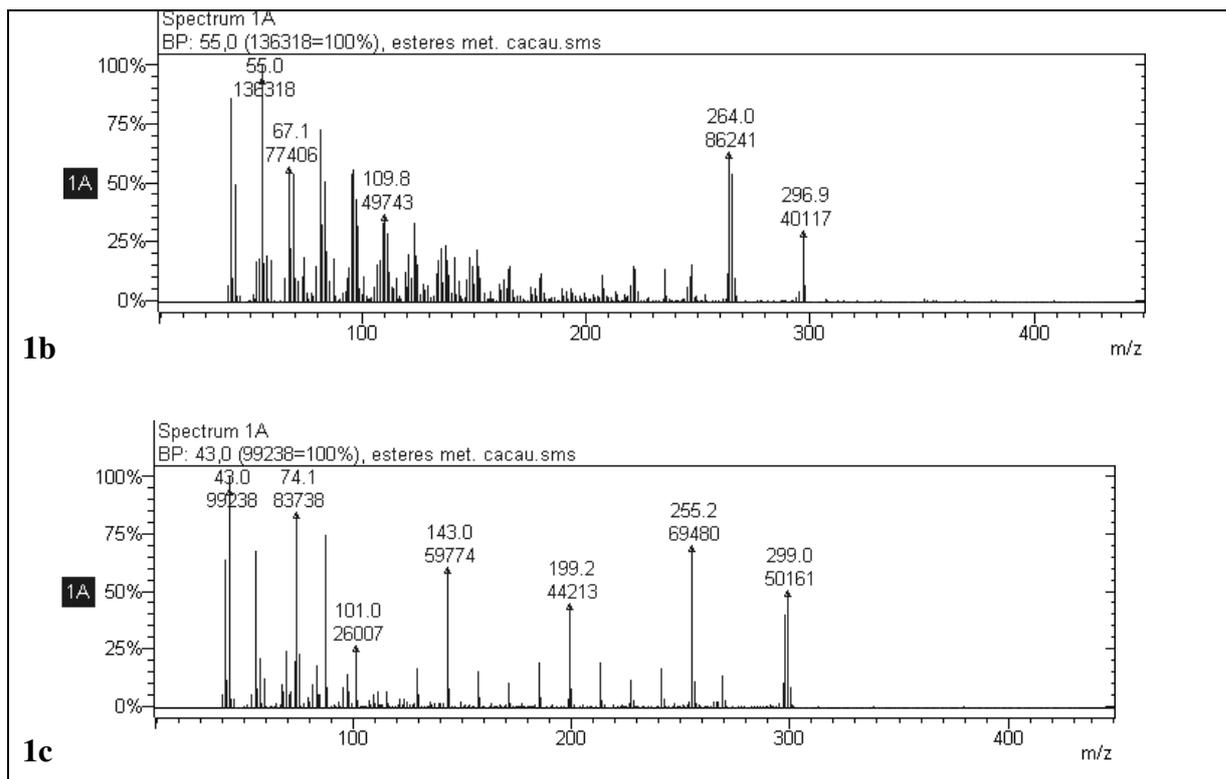
O óleo obtido foi analisado por CG/EM e em seu cromatograma (Figura 90) apresentou três sinais intensos. Seus respectivos EM possuem fragmentações que indicam ésteres metílicos derivados de ácidos graxos saturados e insaturados, como observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 90.** Cromatograma da CG dos ésteres metílicos das sementes de cacau

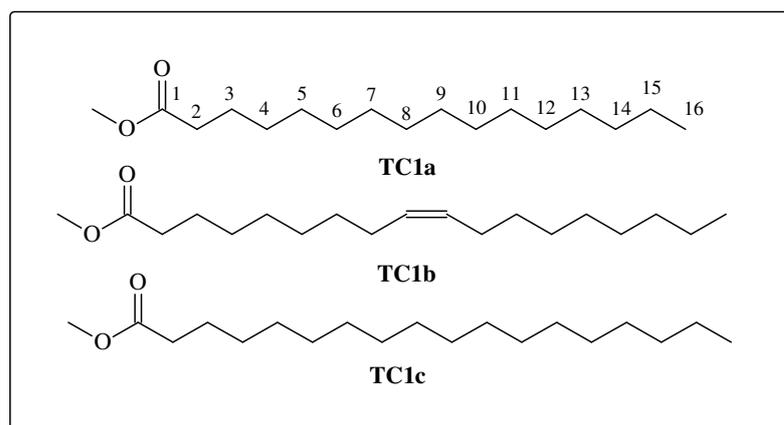
Contudo, dentre todos os picos observados no CG apenas os picos mais intensos foram identificados como ésteres metílicos por meio dos seus respectivos EM (Figura 91) apresentaram não só o pico base em 74 mais o pico do íon molecular em 270 (**1a**), 296 (**1b**) e 298 (**1c**), os outros picos observados são impurezas do solvente empregado.





**Figura 91.** Espectros de massas dos ésteres metílicos identificados (**1a-c**)

Sendo assim, ficou claro que na amostra em análise existe realmente uma mistura de ésteres metílicos derivados de ácidos graxos. Sendo atribuídas aos respectivos espectros de massas as substâncias **TCS1a** e **TCS1c** como sendo de ésteres metílicos saturado e a substância **TCS1b** de um éster metílico insaturado bastante comum na natureza, o oleato de metila (Figura 92).



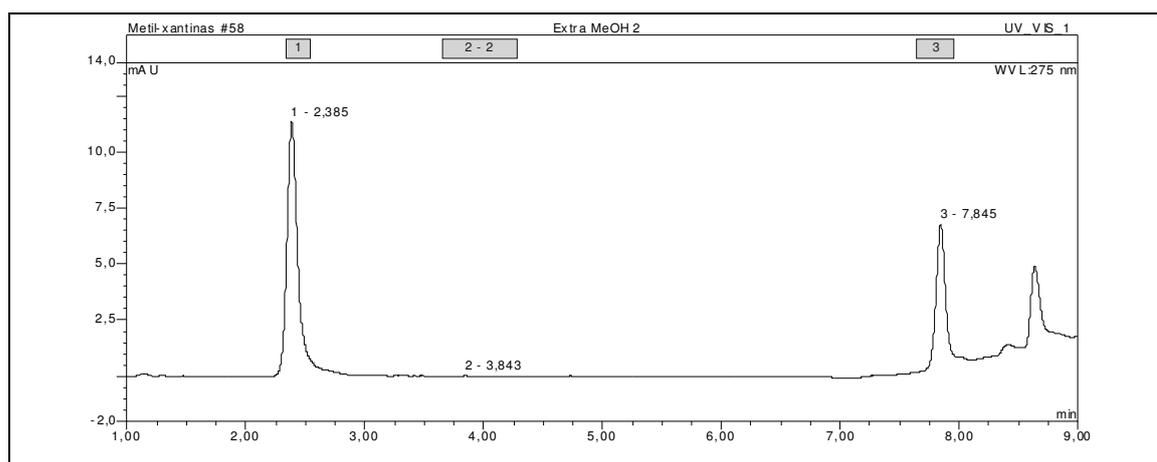
**Figura 92.** Substâncias **TCS1a-c** extraídas inicialmente na forma de triacilglicerídeos

Assim, a mistura foi caracterizada revelando a presença dos ésteres metílicos como: hexadecanoato de metila (**TC1a**), oleato de metila (**TC1b**) e octadecanoato de metila (**TC1c**)

na proporção aproximada de 25:35:35, respectivamente. Esta análise permitiu concluir que os teores dos ácidos derivados de **TCS1a-c** são praticamente os mesmos no estudo das sementes e de produtos advento do cacau (WINKLER, 1962; HURST *et al.* 2001). Portanto, caracterizando-se um padrão de qualidade para frutos de *T. cacao* de procedência não clonada.

#### 4.2 - Quantificação das metilxantinas

O percentual extrativo para o extrato MeOH foi de 6,86% (3,57 g). De acordo com a relação linear entre as áreas dos picos obtidos quando aplicados os padrões de metilxantinas, em diferentes concentrações, foi determinado os teores de teobromina (**2**), teofilina (**3**) e cafeína (**4**) no extrato MeOH bruto das sementes de cacau (Figura 93), usando a equação da reta obtida a partir da curva padrão das metilxantinas.



**Figura 93.** Cromatograma do extrato MeOH bruto das sementes de *T. cacao*. O pico 1 = substância (**2**) e pico 3 = substância (**4**)

A selectividade foi avaliada por meio de comparações do tempo de retenção e espectros no UV dos padrões e das amostras como também através de similaridade dos picos.

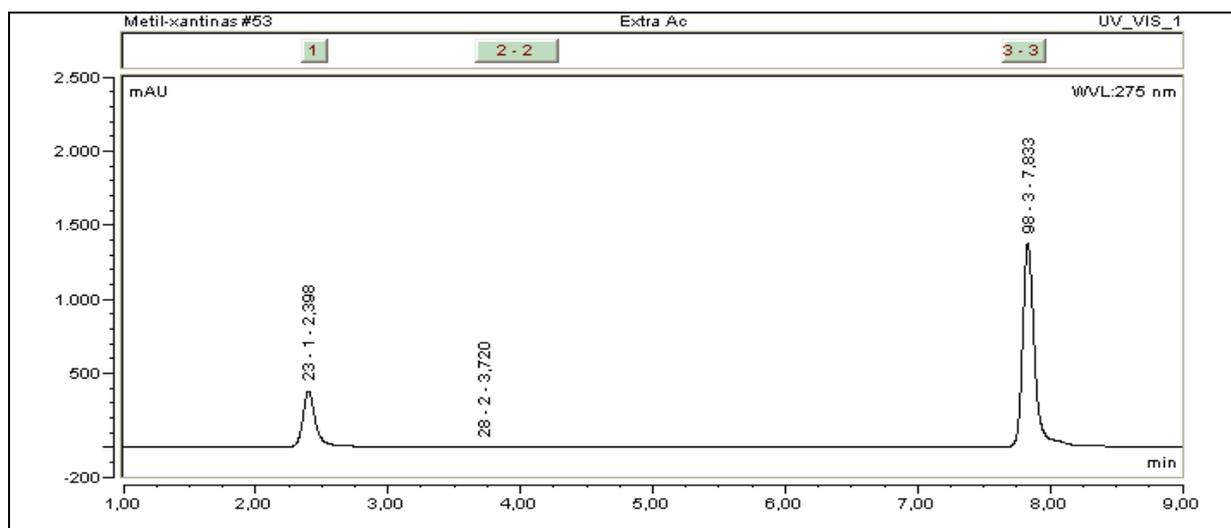
Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) apresentaram concentrações suficientemente pequenas para quantificar todos os analitos. Assim, na Tabela 22 (pág. 123) encontram-se as concentrações em mg/L observadas no LD e LQ.

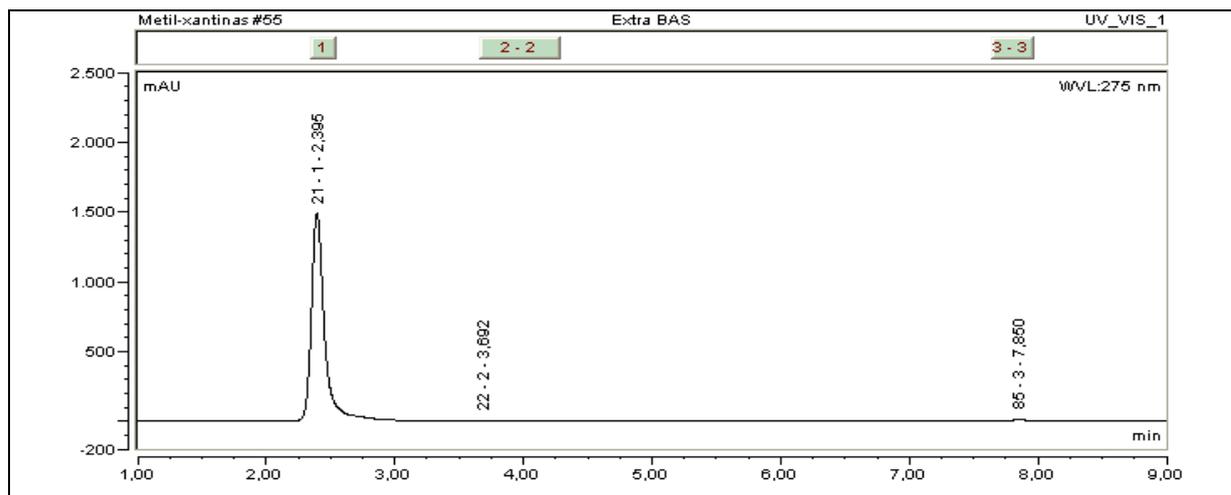
**Tabela 22.** Teores das metilxantinas em mg/L do LD e LQ

Substância	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Teobromina (2)	0,2	0,7
Teofilina (3)	0,1	0,4
Cafeina (4)	0,8	2,6

A linearidade foi obtida para todos os compostos nos intervalos de 1,9-17,1 para (2), 1,5-16,5 para (3) e de 1,3-19,5 para (4). A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação de três amostras do mesmo extrato e todos eram de 1,1% para (2), 1,4% de (3) e 1,3% para a (4), todos abaixo de 5%, como recomendado (RIBANI *et al.* 2004).

As extrações em fase ácida (Figura 94) e em fase básica (Figura 95, pág. 124) também foram analisadas no HPLC e quantificadas. Portanto, na fase ácida encontram-se presentes teobromina (2) e cafeina (4) com teores de 176,0 e 716,4 mg/g de extrato bruto, respectivamente. Na fase básica foi observada a presença das mesmas metilxantinas presentes na fase ácida. Contudo, a teobromina (2) esta em menor quantidade na fase ácida e na fase básica a ela é a substância majoritária com teor de 659,7 mg/g de extrato MeOH bruto e a cafeina (4) a substância minoritária apresentando teor de 6,0 mg/g de extrato MeOH bruto.

**Figura 94.** Cromatograma da extração em fase ácida



**Figura 95.** Cromatograma da extração em fase básica

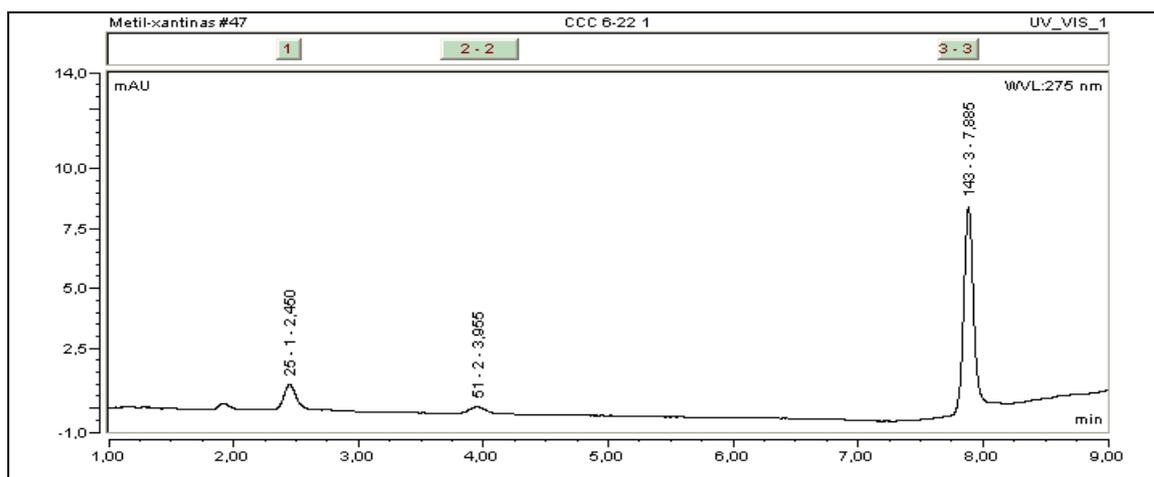
Devido ao processo de extração em fase ácida e em fase básica ocorrerem na mesma amostra, a acidificação da amostra seguida de extração com  $\text{CHCl}_3$  revelou a presença de teobromina (2) e cafeína (4), sendo o último a substância majoritária. Quando a solução ácida é basificada e extraída novamente com  $\text{CHCl}_3$ , obtêm praticamente teobromina (2). Uma vez que, a cafeína (4) foi extraída quase que totalmente na extração em fase ácida. Já a teofilina (3) não foi detectada em nenhuma das fases obtidas do extrato nem no próprio extrato MeOH bruto. Não sendo detectada nas análises com amostra de sementes de cacau utilizadas neste estudo.

Após o desenvolvimento e otimização do método analítico para determinação das metilxantinas (2, 3 e 4), o próximo passo foi determinar qual o sistema (fase móvel e fase estacionária) seria mais indicado para promover o isolamento individual ou simultâneo das três metilxantinas utilizando o CCC. Assim, o extrato MeOH bruto foi analisado por CCDC em vários tipos e proporções de mistura binária de solventes. Pois, o segredo é descobrir qual mistura quaternária resulte no final em uma mistura bifásica e que a amostra analisada tenha suas substâncias com afinidades semelhantes quando submetida a esta determinada mistura bifásica. Após a elaboração das condições analíticas, o extrato MeOH bruto de sementes de *T. cacao* (901,7 mg) foram injetados no CCC, conforme descrito anteriormente. A análise gerou um total de cem frações, coletadas em tubos de ensaio de 10 mL. Todas as frações foram analisadas por CCDC. Com auxílio da CCDC as frações foram agrupadas conforme semelhança na eluição. Sendo assim, no final do processo cromatográfico restaram quatro frações majoritárias (Tabela 23, pág. 125).

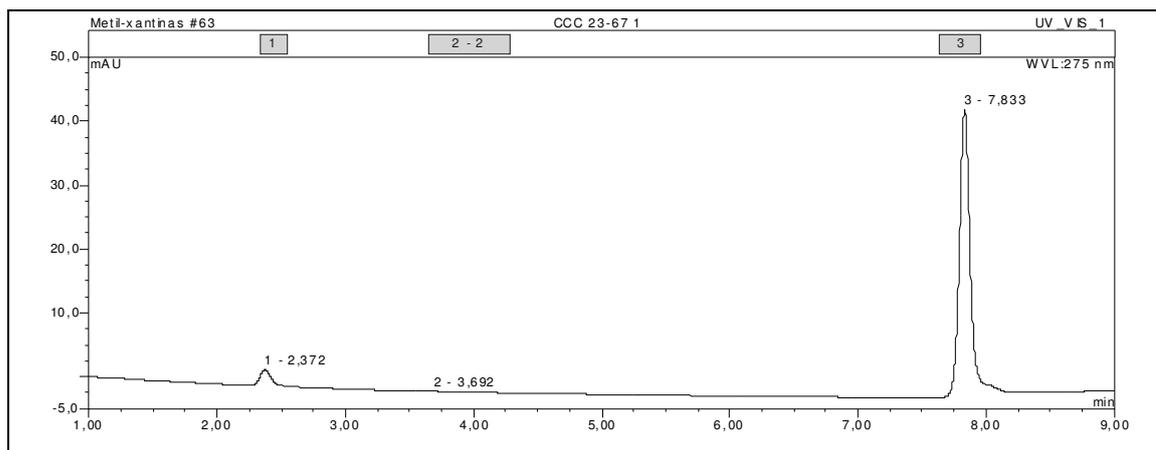
**Tabela 23.** Resultado das frações obtidas do CCC

Fração	Massa	Fração	Massa
STC 1-5	1,5 mg	<b>STC 23-67</b>	<b>72,0 mg</b>
<b>STC 6-22</b>	<b>97,8 mg</b>	STC 68-100	694,2 mg
TOTAL		0.8655g	

Das frações obtidas no CCC apenas a **STC 6-22** (Figura 96) mostrou a presença das três metilxantinas, principalmente a teofilina (**3**). O teor da substância **3** é tão baixo na matriz que só foi detectada quando o extrato MeOH bruto das sementes de cacau foi fracionada utilizando CCC. Desta forma, o método foi eficiente na separação por CCC das metilxantinas envolvidas neste estudo, comprovado pela presença da teofilina (**3**), uma vez que, sua detecção ocorreu apenas na fração **STC 6-22**.

**Figura 96.** Cromatograma da fração **STC 6-22**

A fração **STC 23-67** também revelou a presença de metilxantinas, cujo rendimento extrativo foi de 7,98%. Fato esse comprovado pela análise qualitativa de todas as frações do CCC por CCDC, eluídas juntamente com a mistura dos padrões em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH - 9:1 e pela comparação do tempo de retenção dos padrões utilizados (Figura 83, pág. 113).



**Figura 97.** Cromatograma registrado da fração **STC 23-67**.

Na Tabela 24 encontram-se sumarizadas os resultados obtidos da quantificação de todas as amostras obtidas da mesma matriz de *T. cacao*.

**Tabela 24.** Teores das metilxantinas teobromina (2), teofilina (3) e cafeína (4)

Amostras	Ext. MeOH	STC 6-22	STC 23-67	Fase ácida	Fase básica
Massa de amostra (mg)	1,7	1,3	1,1	1,4	1,7
Conc. (2) µg/mL	9,52	0,73	16,04	123,21	560,73
Conc. (3) µg/mL	< LD	0,51	< LD	< LD	0,56
Conc. (4) µg/mL	52,38	0,75	306,32	501,46	5,13
Massa de (2) µg	19,04	1,54	32,08	246,42	1121,46
Massa de (3) µg	-	1,02	-	-	1,13
Massa de (4) µg	104,76	1,50	612,63	1002,93	10,26
Teor de (2) mg/g	11,20	1,12	29,16	176,02	659,68
Teor de (3) mg/g	-	0,78	-	-	0,66
Teor de (4) mg/g	61,62	1,16	556,94	716,38	6,04

No cromatograma da fração **STC 23-67** (Figura 97) a cafeína (4) é a substância majoritária. Assim como, o cromatograma da fração **STC 23-67** é similar ao cromatograma da extração em fase ácida (Figura 94, pág. 123). Sendo assim, no sistema cromatográfico empregado, ou seja, a fase móvel utilizada no CCC, uma mistura homogênea de Hexano:AcOEt (3:2). Portanto, a polaridade da cafeína influenciou em suas condições de separação em relação as outras metilxantinas.

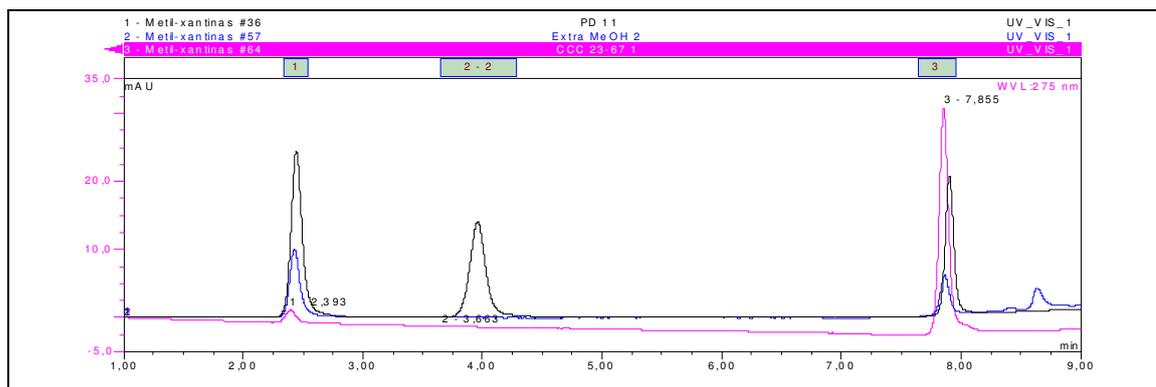
---

## 5 - CONCLUSÃO

---

A análise dos teores dos ésteres metílicos em **TC1a-c** corroborou com os descritos na literatura (HURST *et al.* 2001). Contudo, outros ésteres não foram identificados neste estudo. Portanto, caracterizando também como padrão de qualidade para sementes de *T. cacao* de procedência não clonada.

Os resultados obtidos no CCC foram satisfatórios, levando ao isolamento simultâneo das três metilxantinas (**2**, **3** e **4**) dos demais constituintes do extrato. Assim, como no isolamento da cafeína (**4**). Fato este, observado pela identificação dos mesmos por HPLC comparando seus respectivos tempos de retenção (Figura 98).



**Figura 98.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos para: Padrão (preto); Extrato MeOH bruto das sementes de *T. cacao* (azul) e fração do CCC **STC 23-67** (rosa)

As quantidades de teobromina (**2**) e cafeína (**4**) presentes no extrato MeOH bruto de sementes de cacau foram de 11,2 e 61,6 mg/g, respectivamente. A teofilina (**3**) foi detectada apenas em uma das frações obtidas por CCC, nas demais, apresentou baixo limite de detecção não podendo ser quantificada no extrato bruto. Portanto, com este método analítico (HPLC), foi possível identificar e quantificar as três metilxantinas (**2**, **3** e **4**) com tempo de análise de 10 minutos. Este curto prazo leva a uma diminuição de solventes e aplicabilidade nas análises rotineiras no controle de qualidade de cacau e de seus derivados, utilizando as metilxantinas (**2**, **3** e **4**) como um bioindicador da qualidade das sementes do cacau.

---

## 6 - REFERÊNCIAS

---

- BERTHOD, A., HASSOUN, M., RUIZ-ANGEL, M. J. 2005. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 383, 327-340.
- CUENCA, M. A. G. & NAZÁRIO, C. C. 2004. Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. 72, 1678-1953.
- FANG, J. Y., WETTEN, A. & JOHNSTON, J. 2008. Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. *Plant Cell Reports*. 27, 453-461.
- GARRARD, I. J. 2005. Simple approach to the development of a CCC solvent selection protocol suitable for automation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 28 (12-13), 1923.
- HURST, W. J.; TARKA, S. M.; DOBSON, G.; REID, C. M. 2001. Determination of conjugated linoleic acid (CLA) concentration in milk chocolate. *Journal and Agricultural Food Chemistry*. 49, 1264-1265.
- JOHNSON, E. S., BEKELE, F. L., BROWN, S. J., SONG, Q., ZHANG, D., MEINHARDT, L. W., SCHNELL, R. J. 2009. Population structure and genetic diversity of the trinitario cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop Science*. 49, 564-572.
- JOLY, A. B. 2002. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 13ª edição.
- LEITE, A. C., CABRAL, E. C., SANTOS, D. A. P., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., SILVA, M. F. G. F. 2005. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) através de cromatografias em contracorrente. *Química nova*. 28 (6), 983-985.

LO COCO, F., LANUZZA, F., MICALI, G., CAPPELLANO, G. 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in by-products of cupuaçu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 45 (5), 273-275.

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. 1994 Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives. *Journal of Chromatography A*. 658 (2), 315-341.

NAKAYAMA, L. H. I., SOARES, M. K. M., & APPEZZATO-DA-GLORIA, B. 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). *Scientia Agricola*. 53 (1), 73.

PINTO, L. R. M. 1999. ©CEPLAC/CEPEC - Centro de Pesquisa do Cacau - Manejo de Cacaueiros Clonados.

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 27 (5), 771-780.

THOMAS, J. B., YEN, J. H., SCHANTZ, M. M., PORTER, B. J., SHARPLESS, K. E. 2004. Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in standard reference material 2384, baking chocolate, using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (11), 3259-3263.

[Tropicos.org](http://Tropicos.org). [Missouri Botanical Garden](http://Missouri Botanical Garden). 23 Aug 2009 - *Ceiba pentandra* L. (Acesso 10/12/2013).

WINKLER, W. O. 1962. Report on the analysis of cacao products. *Journal of the Association of Official Agricultural*. 45, 551-554.

## CAPITULO 3 - Síntese de flavonoides e derivados

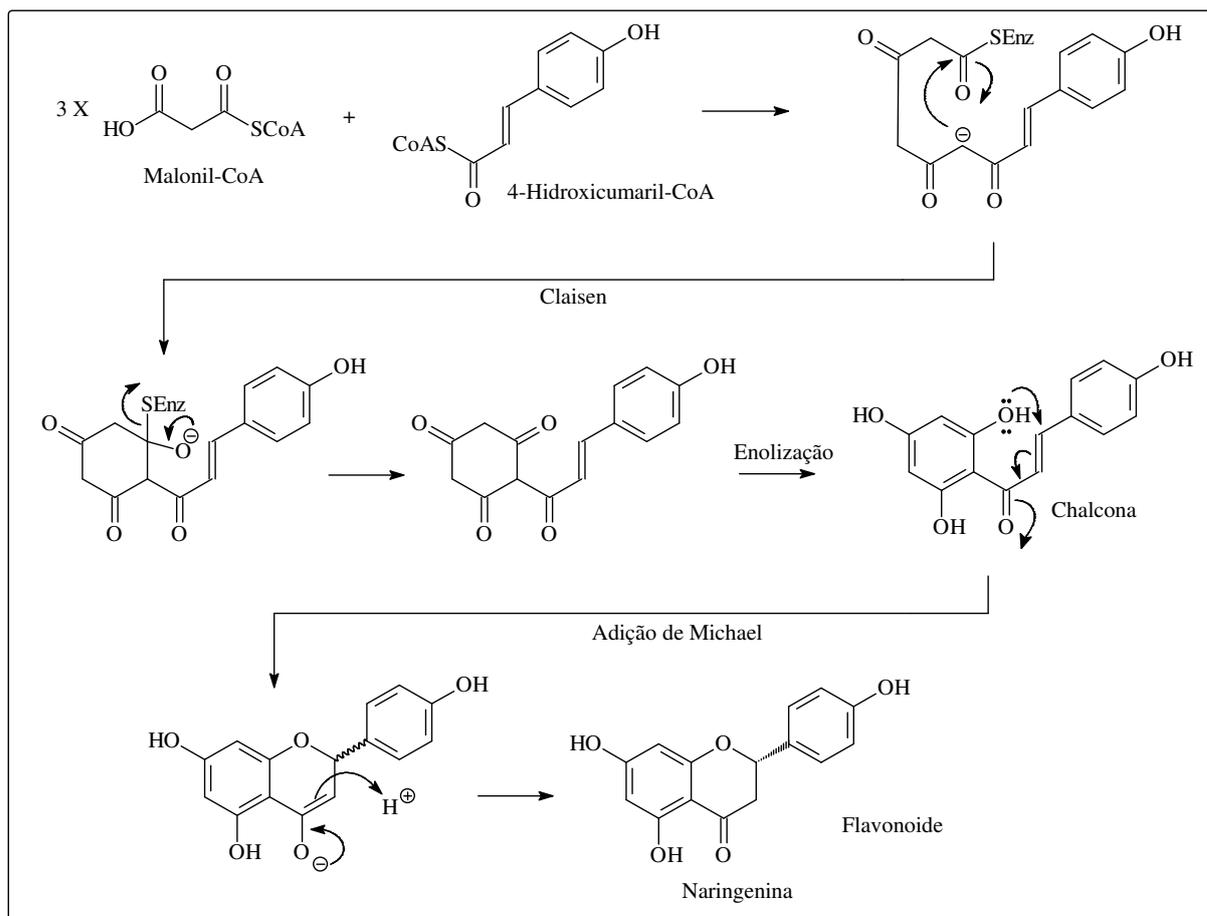
---

### 1 - INTRODUÇÃO

---

#### 1.1 - Aspectos gerais sobre flavonoides

Os flavonoides representam uma classe de substâncias naturais de vasta ocorrência no reino vegetal. Atualmente mais de 8.000 flavonoides são conhecidos, sendo que este número está crescendo constantemente devido à grande diversidade estrutural decorrentes das diferentes possibilidades de padrões de hidroxilação, metoxilação, glicosilação, acilação e isoprenilação (VAN TONDER, 2008). Os flavonoides são compostos polifenólicos de ocorrência natural e muito comum na dieta humana, pois estão presentes em diversos frutos e vegetais (LIU *et al.* 2010). Os flavonoides contêm quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental. Todos os flavonoides monoméricos possuem um esqueleto básico do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> sendo que alguns ocorrem com anéis heterocíclicos ou como moléculas acíclicas na porção C<sub>3</sub> do esqueleto flavanoídico. As acíclicas pertencem ao grupo das chalconas enquanto que, as heterocíclicas ao grupo dos flavonoides. Estes compostos são oriundos do metabolismo secundário de plantas e animais sendo produzidos segundo uma rota mista envolvendo as rotas do acetato e chiquimato (Figura 99).



**Figura 99.** Biossíntese de flavonoides

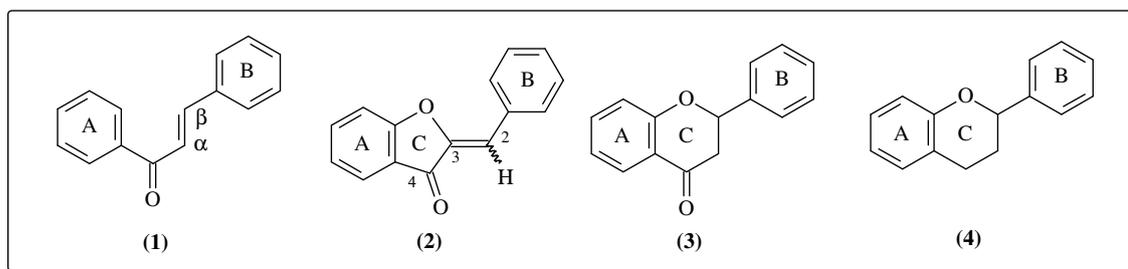
## 1.2 - Importância dos flavonoides

Os flavonoides exercem efeito de proteção contra os raios UV e impedem a invasão microbiana patogênica nas plantas. Dados da literatura mostram que os flavonoides possuem um papel importante na interação inseto-plantas. Nas plantas são atribuídas diversas funções aos flavonoides como, por exemplo, proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta e visível (UV/Vis); proteção contra ataque de insetos, fungos, vírus e bactérias; controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibição de enzimas, atraentes de polinizadores (ROMANELLI *et al.* 2010) e antioxidantes (NAKANISHI *et al.* 2009).

Por outro lado, os flavonoides apresentam diversas atividades biológicas importantes para o homem: antialérgica, antimutagênicos, antifúngica (SEGAWA *et al.* 2009), antiinflamatória (LAHEY & RAJADHYAKSHA, 2004), antiviral, antitumoral, anticancerígena (KALE *et al.* 2008; UNDELL, 2005), além de efeitos que afetam o metabolismo de mamíferos (MIDDLETON & KANDASWAMI, 1994), anti-diabética (AHRENS & THOMPSON, 2008)

e inibidores do HIV transcriptase reversa e DNA topoisomerase I (URGAONKAR & SHAW, 2007). Portanto, dentre as diversas atividades atribuídas aos flavonoides, destacam-se nos estudos com a apigenina e a quercetina, pois são alguns dos flavonoides mais abundantes na natureza (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2009).

Segundo Agrawal os flavonoides são divididos em dez classes. Porém devido a sua grande diversidade estrutural os flavonoides podem ser classificados de acordo com a ausência ou presença do anel heterocíclico C (pirano ou furano), seu esqueleto fundamental, se do tipo 1,3; 1,2 ou 1,1-difenil-propano e pelo padrão de substituição do anel central C (AGRAWAL, 1989). Um exemplo de esqueleto 1,3-difenil-propano é mostrado na Figura 100, do qual constituem quatro classes.

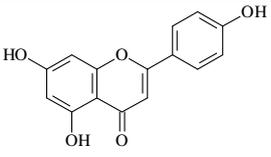
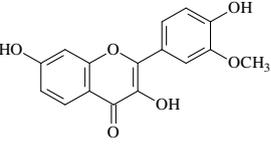
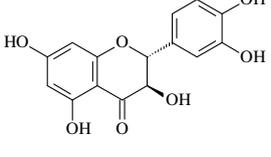
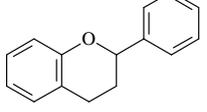
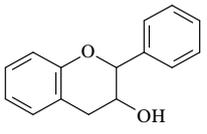
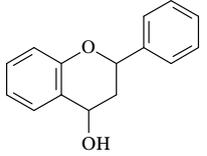
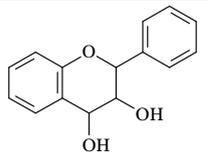
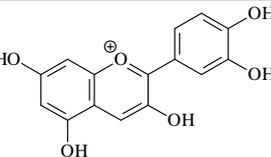
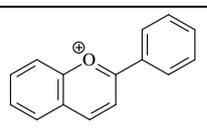
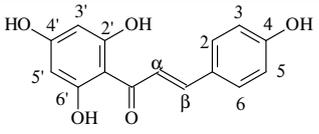
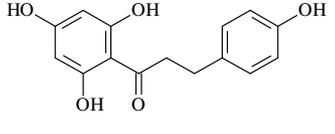


**Figura 100.** Estrutura fundamental do esqueleto tipo 1,3-difenil-propano de flavonoides (1) chalconoides, (2) Auronoides, (3) flavonoides e (4) flavanas

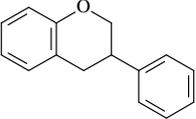
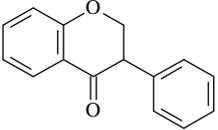
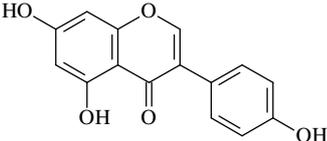
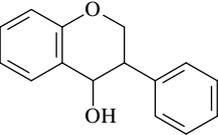
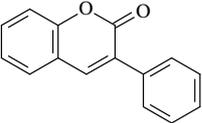
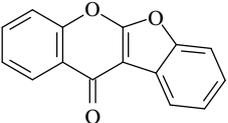
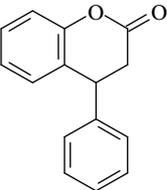
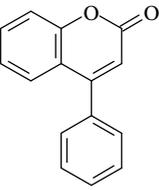
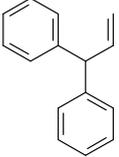
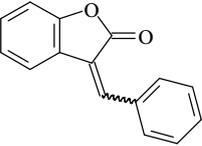
Na Tabela 25, encontram-se diversos esqueletos flavonoídicos bastante comuns nas plantas. Contudo, existe grande interesse econômico por esta classe de compostos em decorrência das diferentes propriedades dos flavonoides como, principalmente em seus aspectos farmacológicos.

**Tabela 25.** Diferentes tipos de esqueletos básicos e exemplos de flavonoides.

Categoria	Estrutura	Tipo	Nome comum
Flavanona (Dihidroflavona)		1,3	(5) Naringenina

Flavona		1,3	<b>(6)</b> Apigenina
Flavonol		1,3	<b>(7)</b> Geraldol
Flavononol (Dihidroflavonol)		1,3	<b>(8)</b> Taxifolina
Flavana		1,3	<b>(9)</b>
Flavan-3-ol		1,3	<b>(10)</b>
Flavan-4-ol		1,3	<b>(11)</b>
Flavan-3,4-diol		1,3	<b>(12)</b>
Antocianidina		1,3	<b>(13)</b> Cianidina
Antocianina		1,3	<b>(14)</b>
Chalcona		1,3	<b>(15)</b> Nonaringenina
$\beta'$ -Chalcanona (Dihidrochalcona)		1,3	<b>(16)</b>

$\beta'$ -Chalcanol		1,3	(17)
B-Chalconol		1,3	(18)
$\beta$ -Chalconona		1,3	(19)
Chalceno		1,3	(20)
Chalcan-1,3-diona		1,3	(21)
$\beta$ -Chalcanol		1,3	(22)
Aurona		1,3	(23)
Auronanol (Dihidrauronol)		1,3	(24)
Auronol		1,3	(25)
Pterocarpana		1,2	(26) Isomedicarpina
Coumestano		1,2	(27)

Isoflavana		1,2	<b>(28)</b>
Isoflavanona		1,2	<b>(29)</b>
Isoflavona		1,2	<b>(30)</b> Genisteina
Isoflavonol		1,2	<b>(31)</b>
3-Fenil-coumarina		1,2	<b>(32)</b>
Coumaronocromona		1,2	<b>(33)</b>
Neoflavanona		1,1	<b>(34)</b>
Neoflavona		1,1	<b>(35)</b>
1-fenil-alilbenzeno		1,1	<b>(36)</b>
Isoaurona		1,1	<b>(37)</b>

---

## 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1 - Gerais

- Sintetizar, isolar e identificar flavonas/flavonois e seus derivados.

### 2.2 - Específicos

- Sintetizar apigenina e comparar os rendimentos com dados da literatura;
- Sintetizar derivados metoxilados da (+/-) naringenina, quercentina e apigenina;
- Sintetizar derivados iodados visando à síntese de biflavonoides;
- Identificar por métodos espectroscópicos a estrutura química das substâncias sintetizadas.
- Submeter às amostras sintéticas a atividade anticolinesterásica.

---

### 3 - EXPERIMENTAL

---

#### 3.1 - Realização dos experimentos

Para a elaboração e execução das atividades sintéticas, foram utilizadas as dependências físicas do Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos do Departamento de Ciências Moleculares da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob supervisão do Prof. Dr. Celso Amorim Câmara e no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais (GPPN) do Instituto de Química da UFBA, sob supervisão do Prof. Dr. Jorge Mauricio David, sendo as atividades anticolinesterásica exclusivamente desenvolvidas no GPPN-UFBA.

Para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram empregadas placas comerciais 20x20 da Merck®, Sigma e Whatmann. Os métodos de revelação das CCDC consistiram de exposição das placas à radiação, empregando-se lâmpada ultravioleta em cabine apropriada da marca Spectroline model CM-10 equipada com lâmpada Spectroline model Enf-260 C nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, vapores de iodo em cuba de vidro com tampa, solução de 2,4-dinitro-fenil-hidrazina para reconhecer grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas e solução reveladora de flavonoides, (2-aminoetoxi)-difetilborano.

A solução reveladora de flavonoides, (2-aminoetoxi)-difetilborano (SIGMA®-ALDRICH) é obtida solubilizando 1,0 g de (2-aminoetoxi)-difetilborano em 100 mL de EtOH.

Para solventes orgânicos de alta pureza, utilizados no HPLC, o MeOH foi da marca TEDIA e água milli-Q. Para solventes orgânicos de grau analítico, utilizados na CC, o hexano, AcOEt, MeOH, DCM e CHCl<sub>3</sub> utilizados foram da marca QUEMIS. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> PA empregado foi de procedência da VETEC.

As substâncias (+/-)-naringenina (**5**), quercetina (**38**), cloroacetoneitrila (**44**) e *para*-hidroxibenzaldeído (**45**) foram obtidos comercialmente pela SIGMA®-ALDRICH.

## **3.2 - Análises espectroscópicas**

### **3.2.1 - Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis)**

Descrito no **CAPITULO 1** item **3.2.1** (Página 29).

### **3.2.2 - Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

Descrito no **CAPITULO 1** item **3.2.2** (Página 29).

### **3.2.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ) foi gerada em RMN Varian Gemini 300 (UFBA) que operava em 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Outros espectros foram obtidos na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) do qual os espectros de RMN foram gerados em equipamento da Varian operando em 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

## **3.3 - Análises de outra natureza**

### **3.3.1 - Ponto de fusão (PF)**

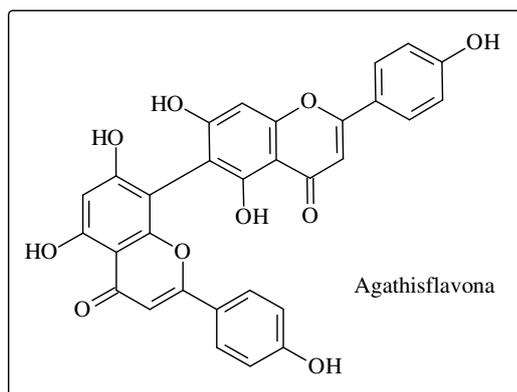
Descrito no **CAPITULO 1** item **3.4.1** (Página 30).

### **3.3.2 - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)**

Descrito no **CAPITULO 1** item **3.4.2** (Página 30).

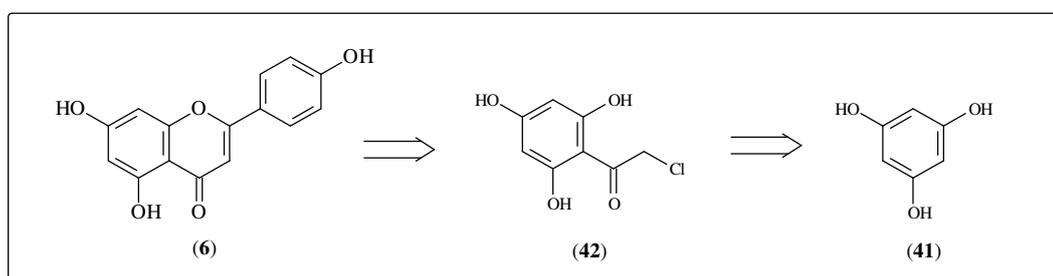
## **3.4 - Análise retrosintética para síntese dos flavonoides**

Com base em estudos anteriores realizados pelo Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais (GPPN-IQ/UFBA) com a espécie *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae) foi possível detectar e quantificar diferentes biflavonoides presentes em suas folhas (BAHIA *et al.* 2010). Dentre os biflavonoides presentes nas análises, a agathisflavona (**39** - Figura 101) é a substância majoritária que compõe os extratos das folhas de *P. pyramidalis*, coletados no Estado da Bahia (BAHIA *et al.* 2010).



**Figura 101.** Estrutura química da agathisflavona (**39**)

Por outro lado, foram identificadas apigenina (**6**) e kaempferol (**40**) em mistura numa das frações obtidas do extrato das folhas de *P. pyramidalis*. Logo, utilizamos como modelo em sínteses orgânicas a apigenina (**6**) e outros flavonoides. Assim, uma abordagem retrosintética foi elaborada com base em conhecimentos prévios de química orgânica e na literatura especializada visando à síntese da apigenina (**6**) e derivados *O*-metilados e iodados que poderiam ser usados na síntese de biflavonoides. Logo, analisando quais os melhores métodos para obtenção da apigenina (**6**), foram considerados a disponibilidade de reagentes e valor agregado aos mesmos, rendimentos da reação e diminuição na produção de subprodutos e poluentes para o meio ambiente. Assim, segundo análise da literatura (ZHENG *et al.* 2004) foram elaboradas diversas propostas retrosintética. Contudo, a melhor proposta foi partindo do floroglucinol (**41**) para síntese do intermediário halocetoareno (**42**), seguida de formação da apigenina (**6** – Figura 102).



**Figura 102.** Análise retrosintética para obtenção da apigenina (**6**)

A síntese da substância (**42**) foi conduzida empregando o floroglucinol (**41**) como reagente de partida. Entretanto, antes de utilizá-lo fez-se necessário deixá-lo em estufa a 120 °C por um período de 24 h para remoção de moléculas de água de seu retículo cristalino, em seguida, o mesmo foi acondicionado em frasco de vidro e guardado em dessecador.

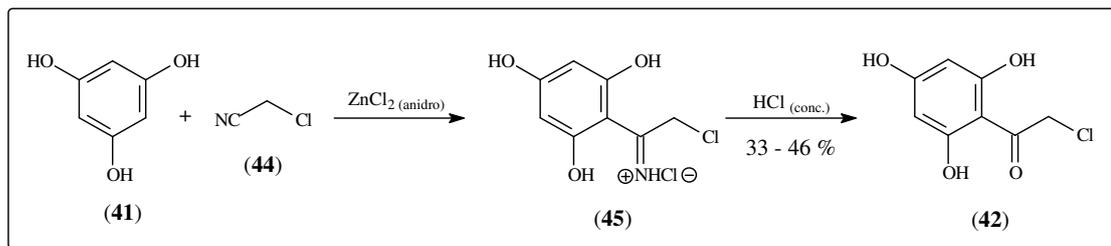
Uma rota alternativa para obtenção de flavonoides e derivados foi seguida partindo-se de substâncias naturais e sintéticas, tais como: (+/-) naringenina (**5**), quercetina (**38**) e hesperidina (**43**). Visando obter seus derivados metoxilados e iodados.

### 3.5 - Síntese de flavona - Apigenina (**6**)

#### 3.5.1 - Método “A”

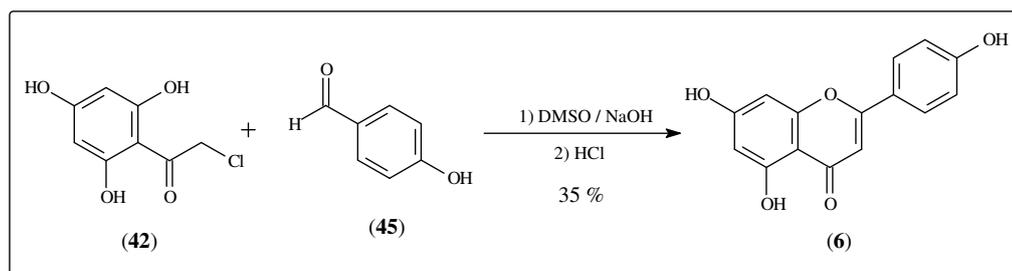
Antes da síntese da apigenina (**6**) é necessário sintetizar um precursor halocetoareno (**42**). Logo, Zheng *et al.* desenvolveram uma metodologia para obtenção de halocetoarenos em 2004. Contudo, apresenta-se como uma reação bastante complexa de promover. Assim, na síntese do halocetoareno (**42**) foi utilizado as substâncias, floroglucinol (100 mg - **41**) e cloroacetonitrila (100  $\mu$ L - **44**), como reagentes de partida, em presença de um ácido de Lewis, neste caso o  $ZnCl_2$  anidro (109 mg). Como solvente da reação, utilizou-se inicialmente DCM (10 mL), que antes da reação foi destilado em presença de pentóxido de fósforo e a reação foi realizada sob atmosfera de Argônio. A reação requer geração de HCl *in situ*. Portanto, foi adaptado a geração de HCl “seco” para a mistura reacional gotejando  $H_2SO_4$  em  $CaCl_2$  que por sua vez libera HCl e  $H_2O$ , sendo os mesmos borbulhados em  $H_2SO_4$ , para retenção de água no  $H_2SO_4$ , finalizando no borbulhamento de HCl “seco” na mistura reacional (ARNÁIZ, 1995). Todo material reacional ficou sob agitação contínua e à temperatura ambiente. Contudo, a partir de uma hora (1:00 h) de reação até três horas (3:00 h) de reação não houve modificação no aspecto da mistura reacional que ficou aglomerada no agitador magnético. Sucessivas tentativas de extrair o produto do meio nos levaram a conclusão que a reação não funcionou quando utilizado as condições descritas.

A reação foi conduzida tentativamente de forma alternativa utilizando um forno micro-ondas doméstico e sem geração de HCl *in situ*. Utilizando-se esse procedimento foi obtido sucesso quando misturados de floroglucinol (**41**) e cloroacetonitrila (**44**) em presença do  $ZnCl_2$  anidro e na ausência de solventes. A reação se processou em um minuto e meio. Em seguida o material foi acidificado com gotas de HCl concentrado. O halocetoareno (**42**) foi isolado utilizando coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e mistura de hexano:AcOEt em gradiente de polaridade crescente obtendo-se o halocetoareno (**42**) em hexano:AcOEt (3:7 – Figura 103, pág. 141).



**Figura 103.** Síntese do derivado halocetoareno (42) utilizando microondas

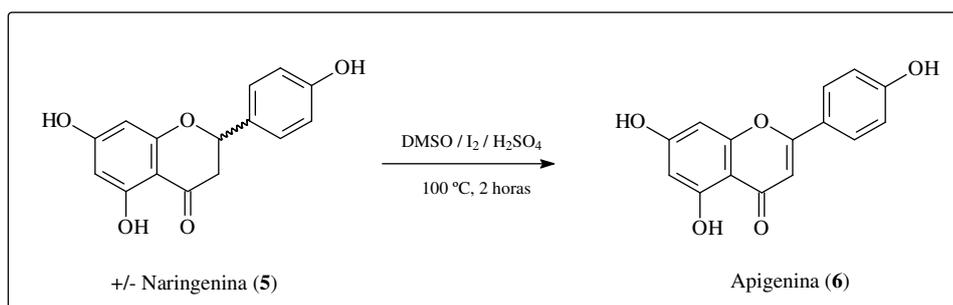
Entretanto, para sintetizar a apigenina (6), o halocetoareno (42) em presença de *para*-hidroxibenzaldeído (45) obtido comercialmente, pode-se conduzir a formação da apigenina (6). Segundo Zheng *et al.* apigenina (6) pode ser obtida quando a 2-cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42) e *para*-hidroxibenzaldeído (45) reagem na presença de uma solução básica hidroetanólica de NaOH seguida de acidificação com HCl. Por outro lado, não foi possível reproduzir esta reação e assim foi tentado um procedimento alternativo repetindo a reação sem utilização da solução básica hidroetanólica. Na terceira tentativa, foram adicionadas duas pastilhas de NaOH na 2-cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42), seguida da adição do *para*-hidroxibenzaldeído (45). A mistura foi realizada manualmente com auxílio de bastão de vidro e banho ultra-sônico. No final foram adicionados cinco gotas de HCl concentrado, porém mediante a análise por CCDC observamos que não houve reação entre as espécies envolvidas. Por outro lado, satisfatoriamente a conversão na apigenina (6), utilizando a 2-cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42) ocorreu quando foi utilizado DMSO/NaOH sob agitação contínua, seguida de adição de *para*-hidroxibenzaldeído (45). Após duas horas de reação, foi adicionado HCl concentrado (Figura 104). Após análise por CCDC estima-se que todo o reagente foi consumido para formar a apigenina (6). Contudo, esta metodologia levou ao produto desejado com apenas 35% de conversão e assim optamos por mudar a rota para obtenção da apigenina (6), pois este método, principalmente, se mostrou economicamente desfavorável.



**Figura 104.** Síntese da apigenina (6)

### 3.5.2 - Método “B”

A alternativa foi conduzir a síntese da apigenina (**6**) utilizando (+/-) naringenina (**5**). Desta forma, a (+/-) naringenina (75,5 mg – 0,18 mmol - **5**) foi dissolvida em 2mL de DMSO e aquecida até 100 °C. Em seguida, adicionou-se pequenas porções de I<sub>2</sub> (20 mg – 0,08 mmol) e 0,7 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A reação foi monitorada por CCDC em intervalos de 30 minutos. A reação finalizou após duas horas (Figura 105).



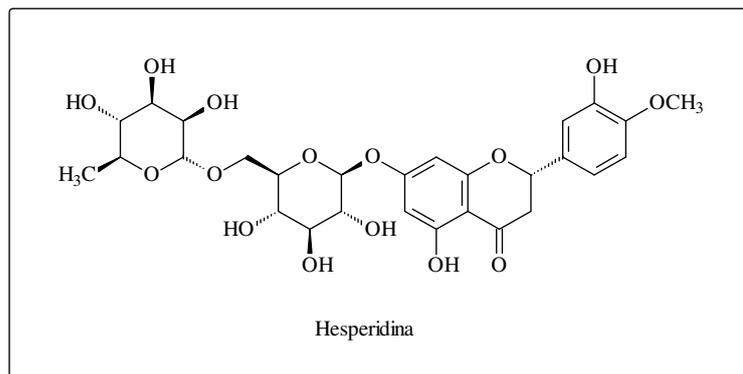
**Figura 105.** Síntese da apigenina (**6**) partindo da (+/-)-naringenina (**5**)

### 3.6 - Reação de permetilação

Para promover a conversão dos derivados permetilados faz-se necessário preparar uma solução do flavonoide em acetona e adicionar 1,1 equiv. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1,1 equiv. de dimetil sulfato, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, para cada hidroxila livre (SILVA *et al.* 2009). A mistura reacional foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente e monitorada por CCDC. Contudo vale Ressaltar que tanto para promover a metilação de todas as hidroxilas de um flavonoide, inclusive no C-5 é necessário realizar a reação com equiv. um pouco superior para que seja capaz de promover a permetilação (CAMARA *et al.* 2002).

### 3.7 - Síntese de derivados em flavonoides naturais

Antes de iniciar as reações de derivatizações nos flavonoides adquiridos comercialmente pela SIGMA-ALDRICH, na síntese de derivados que podem até ser empregados na síntese de biflavonoides. Estas derivatizações empregadas são: metoxilações e halogenações. Assim, foi utilizada uma flavona glicosilada, a hesperidina (**52**), isolada das cascas de frutas cítricas (laranja) em aulas práticas do curso de Licenciatura em Química da UFRPE (Figura 106).

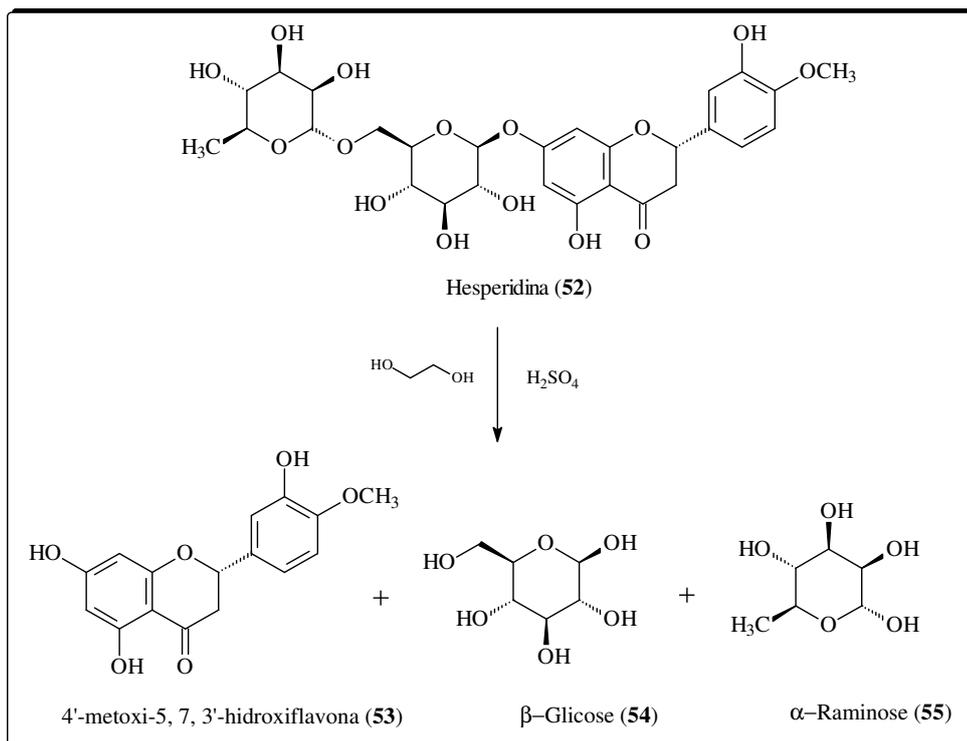


**Figura 106.** Estrutura química da hesperidina (**52**) utilizado para derivatizações.

O foco principal utilizando a hesperidina (**52**) foi obter no final dos processos reacionais uma flavona iodada nas posições C-6 ou C-8. Para este fim, as etapas envolvidas em tal processo contemplam a hidrólise da substância (**52**), proteção das hidroxilas fenólicas e por fim, iodação seletiva em C-6 ou C-8.

### 3.7.1 - Hidrólise da hesperidina (**52**)

A hesperidina (**52**) foi submetida à hidrólise em meio ácido (Figura 107). Assim, 585,4 mg da substância (**52**) foi adicionada em erlemeyer de 50 mL. Em seguida adicionou-se 10 mL de etileno glicol e 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado sob agitação contínua a temperatura ambiente.

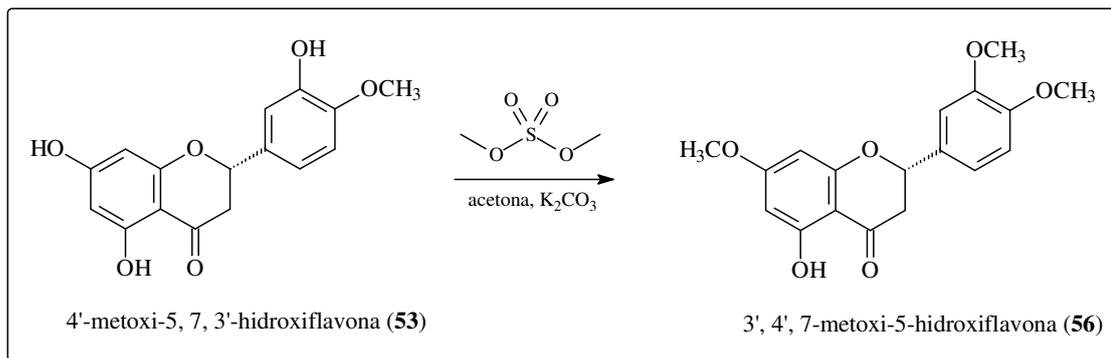


**Figura 107.** Hidrólise da hesperidina (52) em meio ácido.

Após uma hora de reação observou-se através de CCDC (DCM:MeOH - 9:1) que não havia mais reagente para sofrer hidrólise. Assim, no final da reação, foram adicionados à mistura 50 mL de água destilada e realizada três extrações com CHCl<sub>3</sub>. Obtendo-se assim a substância (53) livre das unidades de açúcar (54) e (55).

### 3.7.2 - Metilação de 4'-metoxi-5, 7, 3'-hidroxiflavona (53)

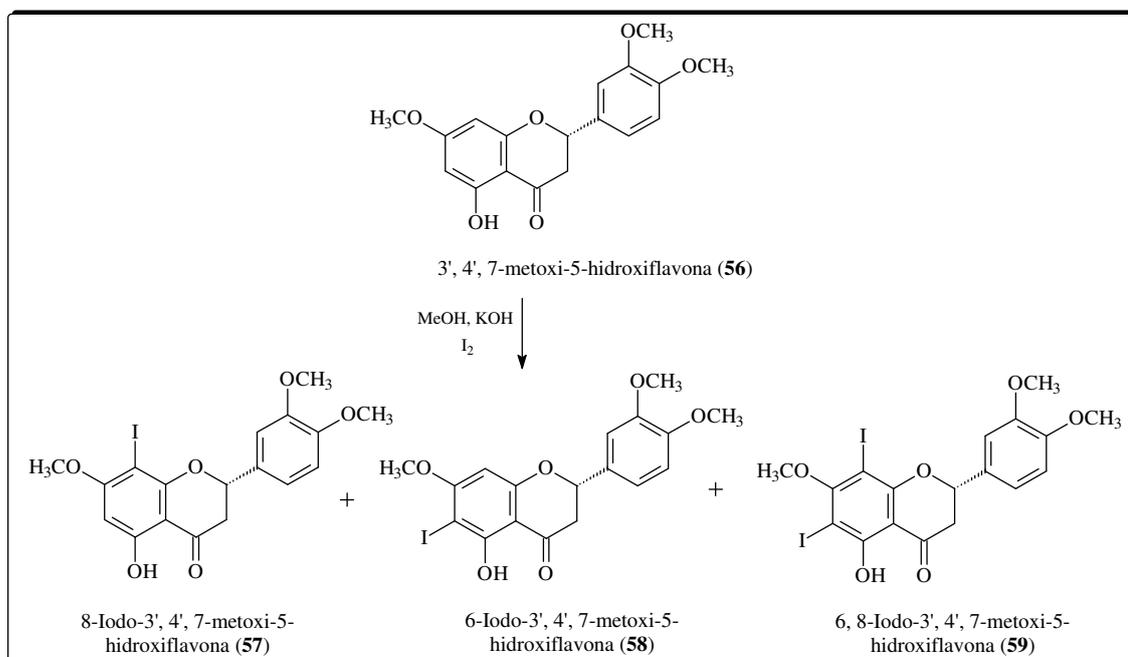
O produto de hidrólise da hesperidina (53 - 100 mg, 0,302 mMol) foram dissolvidas em acetona (15 mL), em seguida foi adicionado 456 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 equivalentes para 2 hidroxilas) e 0,72 mL de dimetil sulfato (0,44 equivalentes para 2 hidroxilas). A mistura foi agitada durante duas horas a temperatura ambiente. Em seguida a mistura reacional foi neutralizada utilizando uma solução de NH<sub>4</sub>Cl 20% (50 mL/10 g), filtrada e solubilizada em acetona e tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após a análise por CCDC observou-se que todo o reagente tinha sido consumido na reação (Figura 108, pág. 145), constatada principalmente pela diferença de RF.



**Figura 108.** Síntese da 3',4',7'-metoxi-5-hidroxi flavona (**56**)

### 3.7.3 - Iodação de 3', 4', 7-metoxi-5-hidroxi flavona (**56**)

A substância (**56**), foi dissolvido em MeOH seguida de adição de solução de KOH/MeOH (40 mg/100 mL) sob agitação contínua. O iodo (10 mg, 0,04 mMol) foram adicionados a mistura reacional em pequenas porções e agitada por três horas a temperatura ambiente. Em seguida o produto foi extraído em DCM (3 x 20 mL) e seca em evaporador rotativo (Figura 109). Após análise por CCDC observou-se alguns spots, possivelmente de iodação ocorrida em posições diferentes no flavonoide. Assim, era de se esperar três substâncias como produtos formados, considerando que a iodação ocorresse apenas no anel A do flavonoide em questão.

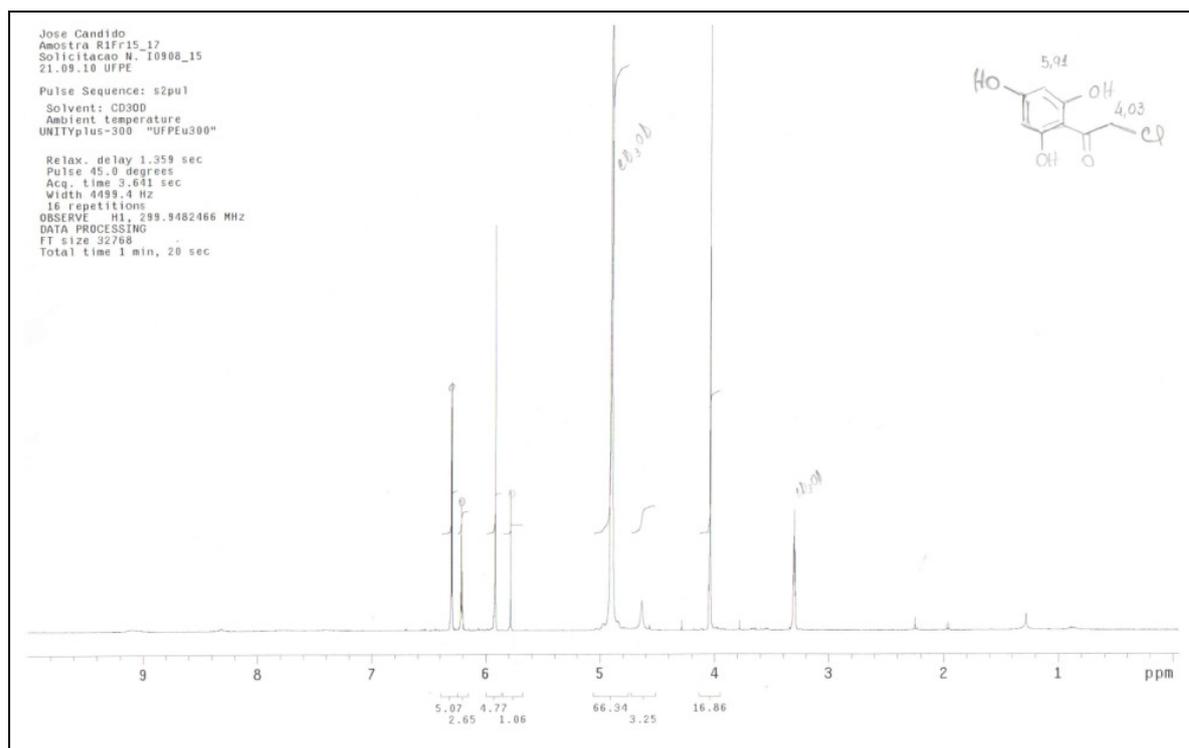


**Figura 109.** Possíveis produtos esperados na iodação da substância (**56**)

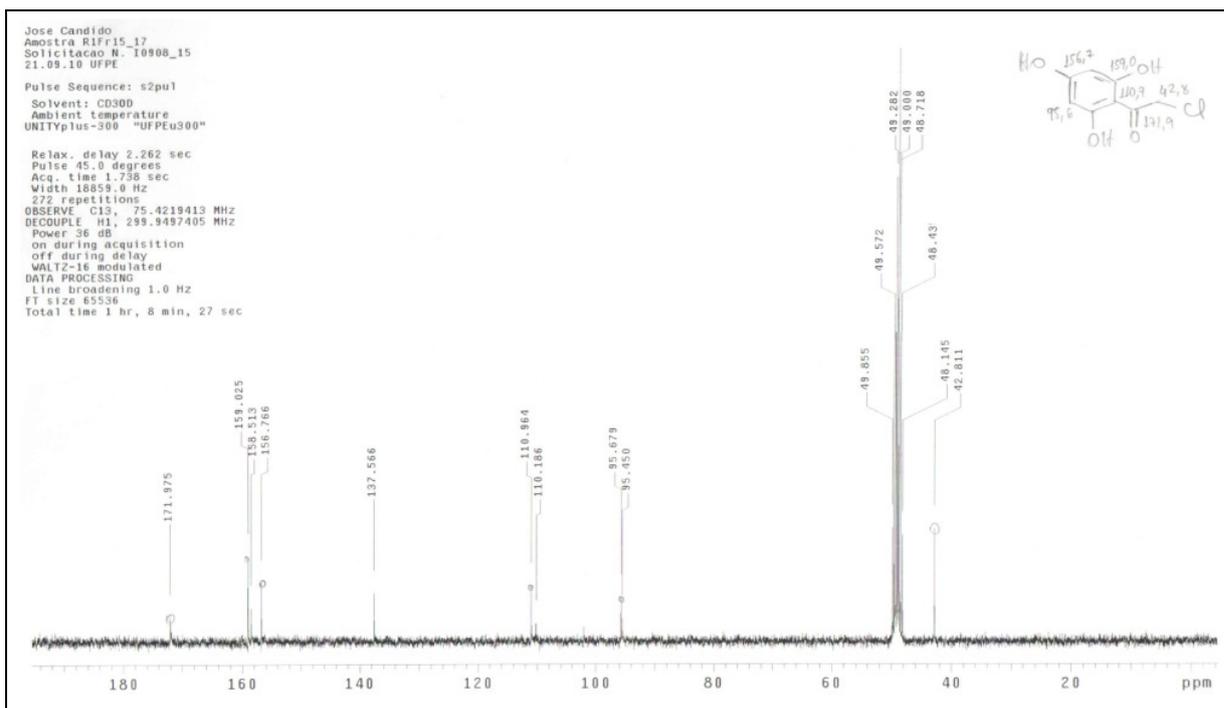
## 4 - RESULTADOS E DISCUSÃO

### 4.1 - Elucidação estrutural do halocetoareno (42), apigenina (6) e derivados

Após a reação entre floroglucinol (41) e cloroacetnitrila (44), foi formado o halocetoareno (42) que foi isolado utilizando CC sob sílica gel e como eluente uma mistura de hexano:AcOEt 1:1. Os rendimentos variam de 33% a 46% de conversão, conforme reação da Figura 103 (pág. 141). O halocetoareno (42) foi submetido à análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 110) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 111, pág. 147).



**Figura 110.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (42)



**Figura 111.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (**42**)

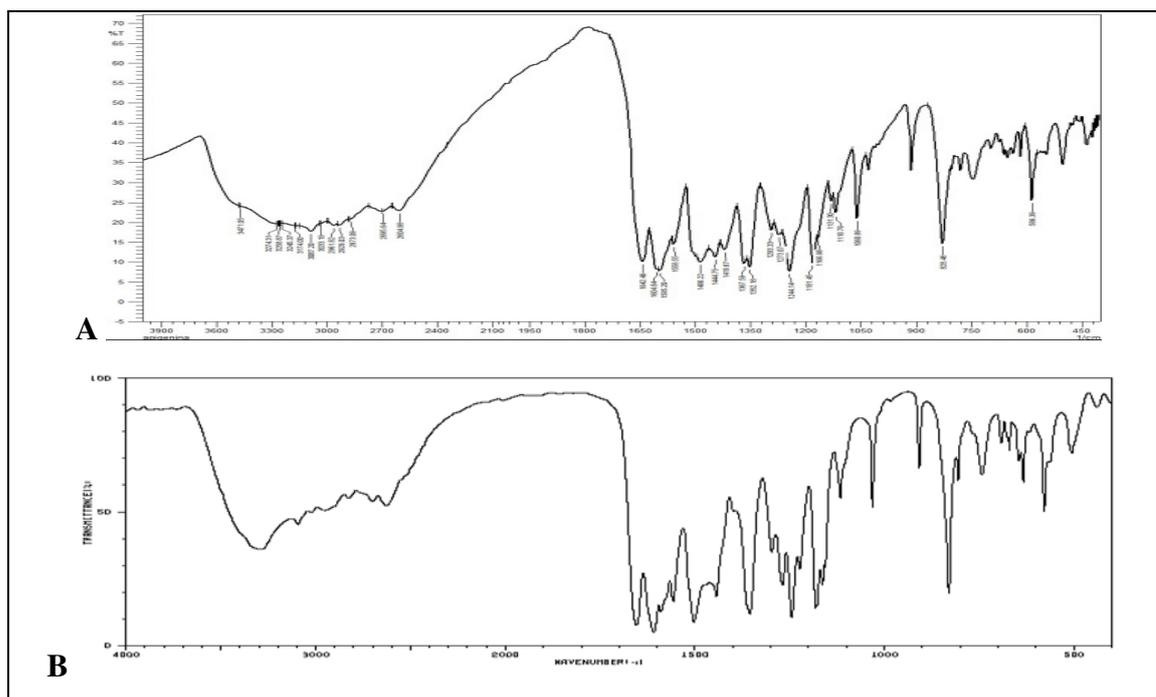
Com base na análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi possível caracterizar o produto halocetoareno (**42**) como a 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (Tabela 26).

**Tabela 26.** Dados de RMN da 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (**42**)

Estrutura	Posição	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
<p>(<b>42</b>)</p>	1	-	110,1
	2-6	-	156,7
	3-5	5,91 (s)	95,6
	4	-	158,5
	1'	-	171,9
	2'	4,03 (s)	42,8

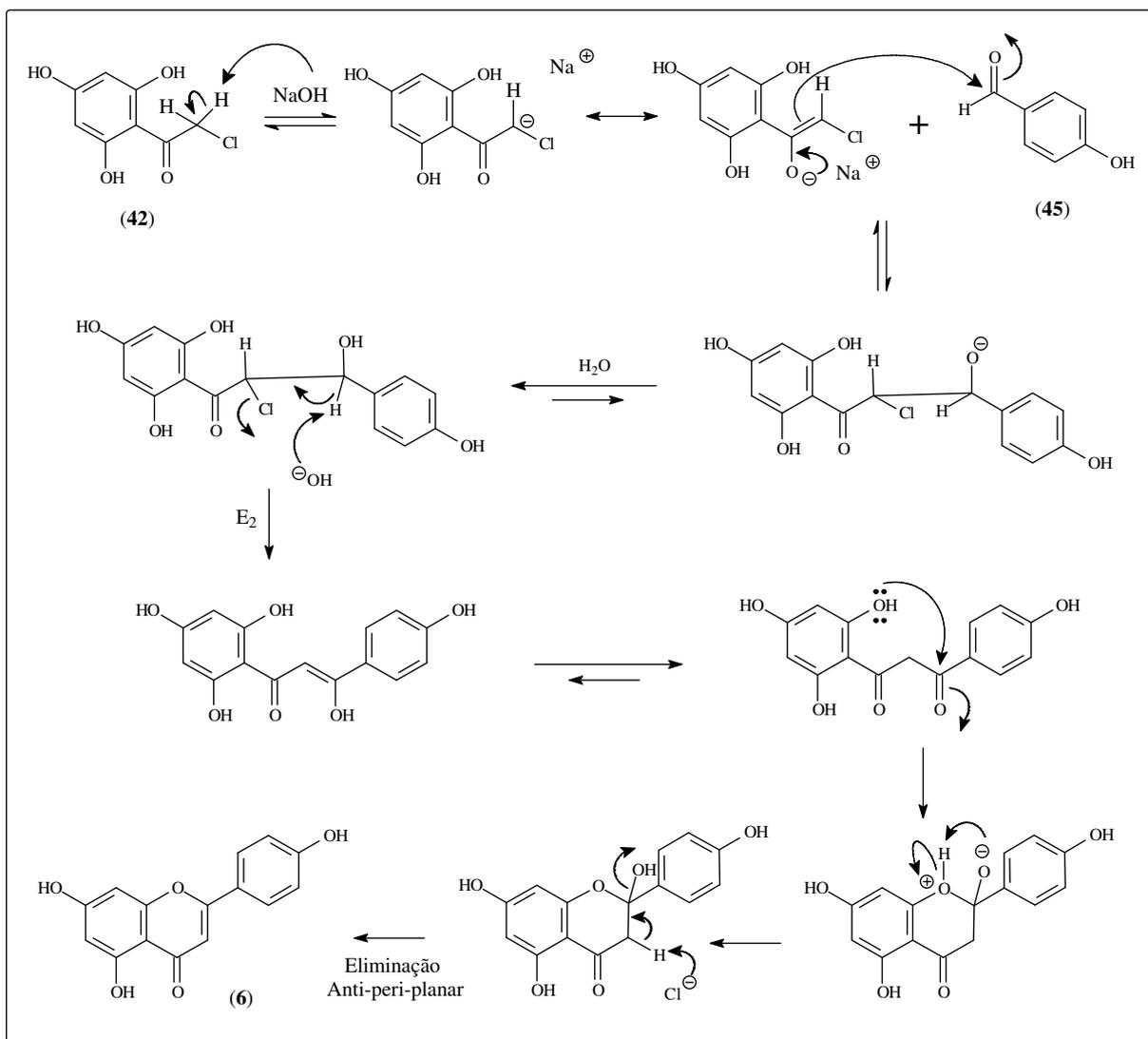
A reação de formação da cetona aromática (halocetoareno) é conhecida como síntese de Houben-Hoesch e pode ser aplicado em compostos aromáticos substituídos (KURTI & CZAKO, 2005). Apesar da síntese do halocetoareno (**42**) atender um dos princípios da Química Verde, do qual dispensa o uso de solventes, não foi possível conduzir esta síntese

com rendimentos superiores a 50%. Entretanto, a síntese da apigenina (**6**) foi realizada utilizando 2-cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (**42**) e *para*-hidroxibenzaldeído (**45**). Após submeter à mistura reacional em coluna cromatográfica utilizando CHCl<sub>3</sub>:MeOH (8:2) foi possível obter a apigenina (**6**) com apenas 35% de conversão. Assim, devido à demanda de tempo e limitações nas análises de RMN, a apigenina (**6**) foi caracterizada apenas utilizando o espectro no IV (Figura 112A) em comparação com o espectro no IV da apigenina, disponível na *homepage* do SDBS (Figura 112B).



**Figura 112.** Espectro no IV da apigenina (**6**) em pastilha de KBr. A: IV apigenina sintética (**6**) e B: apigenina (SDBS)

Para a reação de obtenção da apigenina (**6**) utilizando as substâncias (**42**) e (**45**) um mecanismo reacional foi proposto (Figura 113, pág. 149).



**Figura 113.** Mecanismo proposto na reação na síntese da apigenina (6)

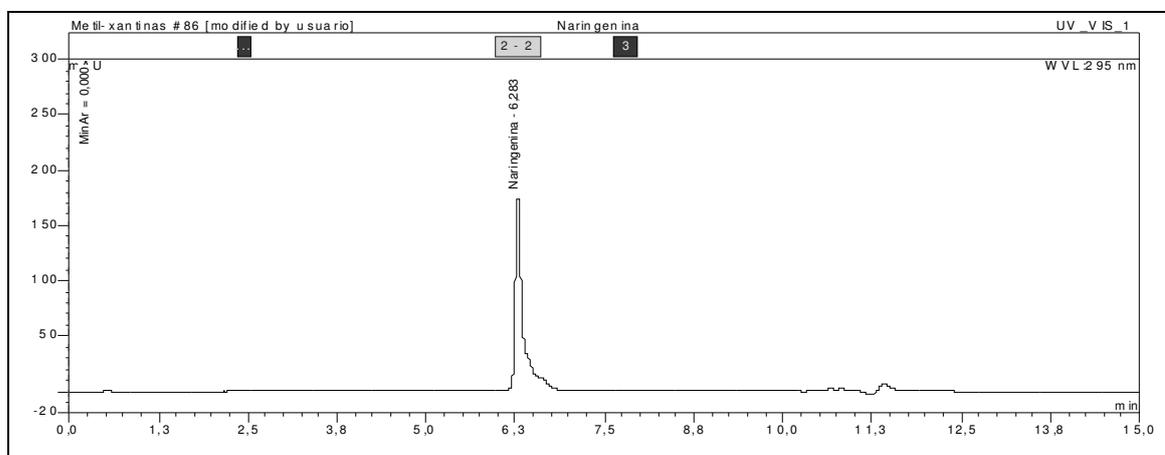
Devido aos baixos rendimentos alcançados na conversão da apigenina (6) partindo do floroglucinol (41), conduziu-se a síntese da apigenina (6) utilizando como reagente de partida uma flavonona, (+/-)-naringenina (5) que também foi obtida comercialmente (SIGMA). Assim, a metodologia descrita por Bovicelli, que promove uma oxidação no anel C de flavononas (BOVICELLI *et al.* 2007) foi empregada na síntese da apigenina (6). Antes de realizar a oxidação da (+/-)-naringenina (5), foi realizada uma análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 114, pág. 150) e (Figura 115, pág. 150), respectivamente, para comparações futuras entre reagentes de partida, produtos e subprodutos formados nos processos reacionais.

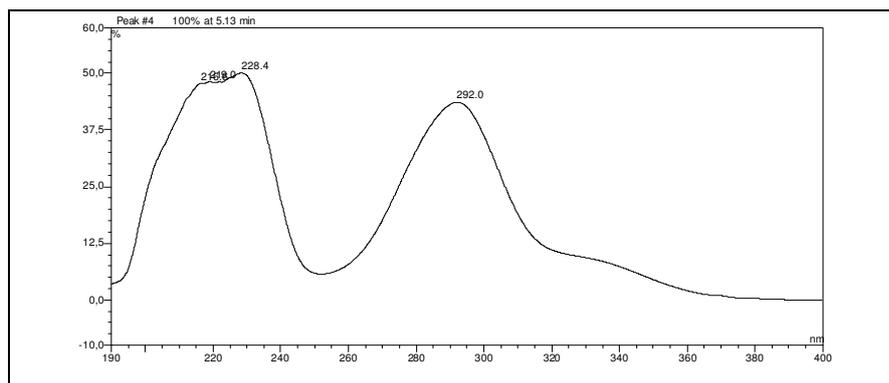


**Tabela 27.** Dados de RMN da (+/-)-naringenina (**5**).

Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
<b>2</b>	5,45 (dd, $J = 2,7$ e $12,6$ Hz)	78,4
<b>3<sup>a</sup></b>	2,71 (dd, $J = 12,6$ e $2,7$ Hz)	42,0
<b>3<sup>b</sup></b>	3,29 (dd, $J = 12,6$ e $2,7$ Hz)	
<b>4</b>	-	196,4
<b>5</b>	-	163,5
<b>6</b>	5,92 (s)	95,8
<b>7</b>	-	166,6
<b>8</b>	5,92 (s)	95,0
<b>9</b>	-	162,9
<b>10</b>	-	101,8
<b>1'</b>	-	128,8
<b>2'-6'</b>	7,34 (dd, $J = 1,8$ e $8,8$ Hz)	128,4
<b>3'-5'</b>	6,83 (dd, $J = 8,8$ e $1,8$ Hz)	115,2
<b>4'</b>	-	157,7
<b>-OH</b>	12,19 (s)	-

A (+/-)-naringenina (**5**) também foi monitorada por HPLC no intuito de acompanhar processos reacionais ou verificação da pureza das frações obtidas nas colunas cromatográficas ou preparativas. Assim, na Figura 116 e na Figura 117 (pág. 152) encontra-se o cromatograma e o espectro no UV, respectivamente.

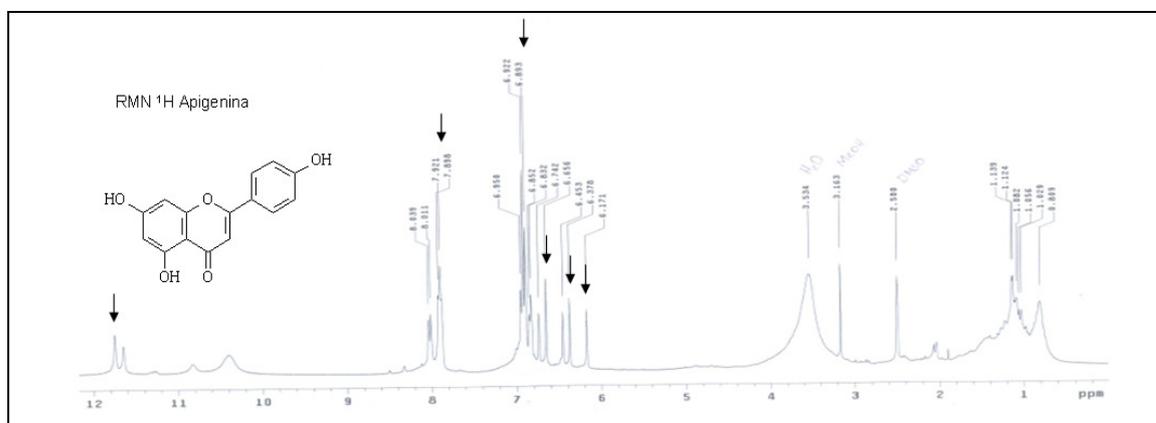
**Figura 116.** Cromatograma da (+/-)-naringenina (**5**)



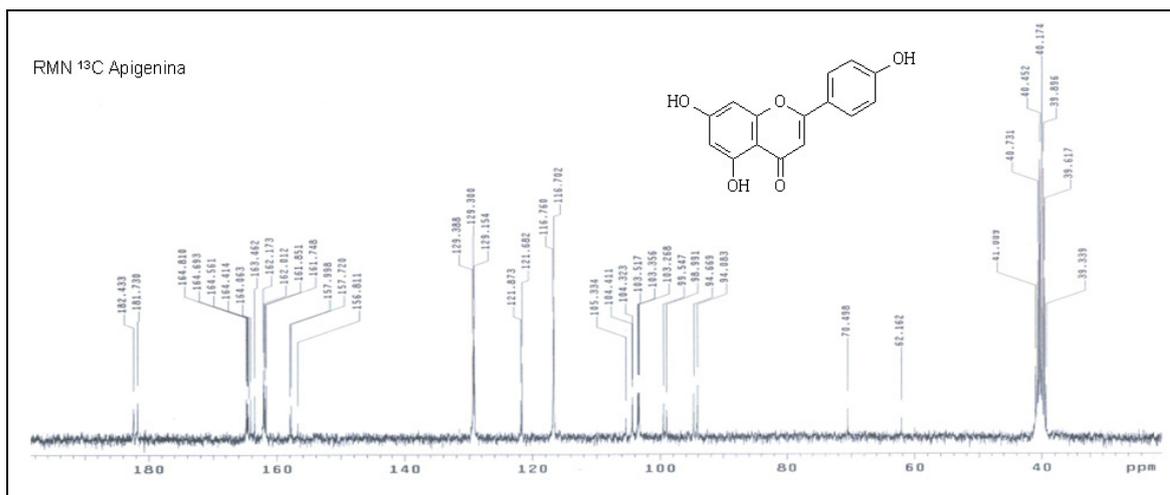
**Figura 117.** Espectro no UV da (+/-)-naringenina (**5**)

As condições das análises no HPLC foram conduzidas utilizando coluna DIONEX Acclaim® 120, C18 5  $\mu\text{m}$  120Å (2,1 x 100 mm). Fase móvel em gradiente iniciando com 15:85 (MeOH:Solução ácido fórmico 0,2%) até 100% de metanol. Tempo de corrida = 15 min. Com fluxo de 0,7 mL/min. E volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$ . Desta forma, a (+/-)-naringenina (**5**) registrou um tempo de retenção (TR) de 6,283 min. E espectro no UV com dois máximos de absorção um em 228 e outro em 292 nm.

Assim, a (+/-)-naringenina (**5**) foi convertida em apigenina (**6**). Porém, ao fracionar a mistura reacional em sílica gel 60 utilizando como eluente e mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH em gradiente de polaridade crescente, gerou 30 frações de 10 mL cada. Após análise por CCDC, as frações conforme semelhanças na eluição foram agrupadas e a fração 15-23 que continha o produto de interesse foi submetida à RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura 118 e 119, pág. 153). Contudo, a apigenina (**6**) não se encontrava pura. Portanto, a substância em mistura com apigenina (**6**) foi identificada como sendo a 3-iodo-apigenina (**46**).

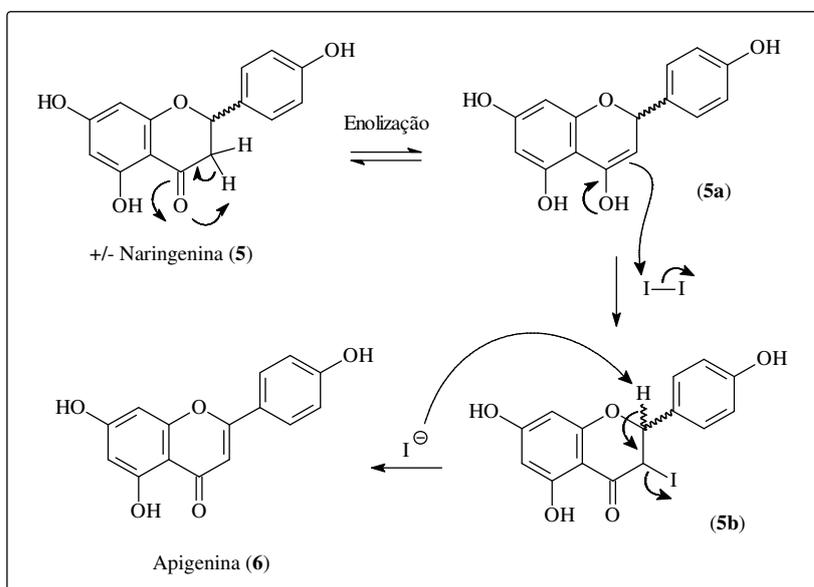


**Figura 118.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d-6}$ , 300 MHz) da apigenina (**6**) em mistura com 3-iodo-apigenina (**46**)



**Figura 119.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}_d-6$ , 75 MHz) da mistura **6** e **46**

Analisando a proposta mecanística, na Figura 120, para a síntese da apigenina (**6**), a solubilização da (+/-)-naringenina (**5**) em DMSO pode levar a sua enolização. O enol da (+/-)-naringenina (**5a**) reage com iodo catalítico formando uma 3-iodo flavanona (**5b**). A remoção do próton em C-2 leva a formação da dupla ligação do anel C (flavona) seguida de eliminação de cátion  $\text{I}^+$ .



**Figura 120.** Proposta mecanística na formação da apigenina (**6**)

Ao analisar os espectros de RMN nos deparamos com sinais duplicados. Contudo, segundo análise por CCDC não se observava indicio de mistura. Desta forma, o produto de interesse não foi exclusivamente formado. Assim, encontrando-se em mistura. Desta forma, pelos

dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  é suspeita a presença do intermediário sintético 3-iodo naringenina na mistura com apigenina (**6**). Por outro lado, a hipótese de que nesta mistura não temos um intermediário da reação e sim outro produto formado, mediante as condições experimentais, nos leva a acreditar que as possíveis variações de temperatura do laboratório possa ter influenciado na formação da substância (**46**). Assim, segundo o mecanismo proposto não há formação de flavona iodada em C-3 e sim uma flavanona iodada em C-3. Contudo, mesmo na mistura foi possível perceber a presença da apigenina (**6**) e atribuir seus respectivos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparar com dados descritos por Agrawal (Tabela 28), assim como, os sinais da 3-iodo-apigenina (**46** - Tabela 29, pág. 155).

**Tabela 28.** Dados de RMN da apigenina (**6**) em mistura com **46**

Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}^*$
<b>2</b>	-	164,6	164,2
<b>3</b>	6,17; (s)	103,2	103,1
<b>4</b>	-	182,4	182,0
<b>5</b>	-	161,7	161,5
<b>6</b>	6,65; (s)	98,9	99,1
<b>7</b>	-	164,0	163,9
<b>8</b>	6,37; (s)	94,0	94,4
<b>9</b>	-	157,7	157,7
<b>10</b>	-	104,3	104,1
<b>1'</b>	-	121,6	121,6
<b>2'-6'</b>	7,91; (dd, $J = 8,7$ Hz)	129,1	128,6
<b>3'-5'</b>	6,91; (dd, $J = 8,7$ Hz)	116,70	116,3
<b>4'</b>	-	162,0	161,2
<b>-OH</b>	11,82; (s)	-	-

\* AGRAWAL, 1989.

**Tabela 29.** Dados de RMN da 3-iodo-apigenina (**46**) em mistura com **6**

Posição	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	164,8
<b>3</b>	-	70,4
<b>4</b>	-	181,7
<b>5</b>	-	161,8
<b>6</b>	6,74; (s)	99,5
<b>7</b>	-	164,4
<b>8</b>	6,45; (s)	94,6
<b>9</b>	-	157,9
<b>10</b>	-	104,4
<b>1'</b>	-	121,8
<b>2'-6'</b>	8,02; (d, <i>J</i> = 8,4 Hz)	129,3
<b>3'-5'</b>	6,84; (d, <i>J</i> = 8,4 Hz)	116,76
<b>4'</b>	-	162,1
<b>-OH</b>	11,64; (s)	-

Na literatura encontramos metodologias aplicadas à síntese de 3-iodo flavonas utilizando 2'-hidroxichalconas (IQBAL *et al.* 1982) além da síntese de 3-iodo tioflavonas e tiocromonas (ZHANG & LI, 1993). Porém, não há relatos da obtenção de 3-iodo flavona a partir de uma flavanona (**5**).

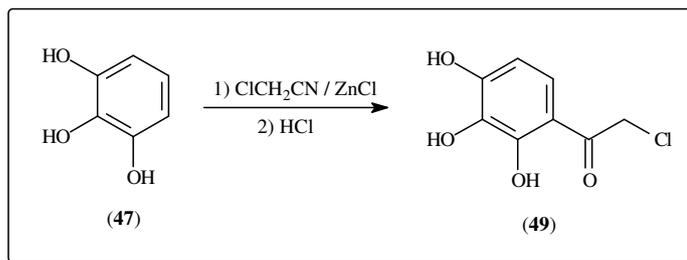
Por outro lado, apigenina (**6**) foi obtida com 74% de rendimento utilizando a mesma metodologia descrita por Bovicelli e isolada utilizando Sephadex LH-20. Eluída no modo isocrático utilizando MeOH como fase móvel. Sendo a última substância a eluir. Os dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da apigenina (**6**) pura estão sumarizados na Tabela 30 (pág. 156).

**Tabela 30.** Dados de RMN da apigenina (**6**) pura

Posição	RMN <sup>1</sup> H (δ - ppm)	RMN <sup>13</sup> C (δ - ppm)
<b>2</b>	-	166,2
<b>3</b>	6,68; (s)	103,6
<b>4</b>	-	182,9
<b>5</b>	-	162,7
<b>6</b>	6,21; (s)	99,3
<b>7</b>	-	164,9
<b>8</b>	6,48; (s)	94,1
<b>9</b>	-	159,0
<b>10</b>	-	103,7
<b>1'</b>	-	122,7
<b>2'-6'</b>	7,78; (d, <i>J</i> = 8,5 Hz)	129,4
<b>3'-5'</b>	6,85; (d, <i>J</i> = 8,5 Hz)	116,9
<b>4'</b>	-	164,3
<b>-OH</b>	10,7; (s)	-

#### 4.2 - Síntese de outros halocetoarenos

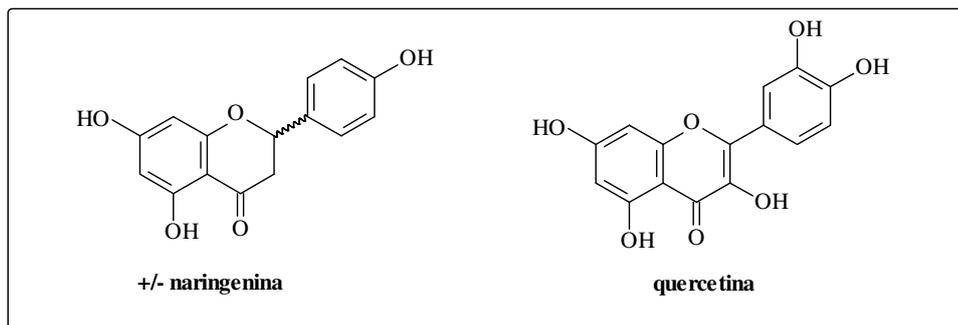
A reação de formação da cetona aromática (halocetoareno) é conhecida como síntese de Houben-Hoesch e pode ser aplicado em compostos aromáticos substituídos nas posições 1,2; 1,3; 1,4; 1,3,5 além de núcleos pirrolidínicos e indólicos (KURTI & CZAKO, 2005). Por outro lado, utilizando a mesma metodologia descrita para a obtenção da substância (**42**), foram utilizados outros reagentes de partida na obtenção de seus respectivos derivados halocetoarenos. As outras substâncias utilizadas na obtenção destes derivados foram o pirrogalol (**47**) e 1-naftol (**48**). Após procedermos à reação utilizando os mesmos parâmetros utilizados na síntese da substância (**42**) variando apenas o tempo em minutos, pôde-se observar, através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), que não houve reação entre o 1-naftol (**48**) com cloroacetoneitrila (**44**), por outro lado o pirrogalol (**47**) e cloroacetoneitrila (**44**) reagiram para formação do halocetoareno correspondente. Sendo esta metodologia, aplicada também a sistemas aromáticos substituídos nas posições 1,2,3 (Figura 121, pág. 157).



**Figura 121.** Síntese da substância (49) partindo do pirrogalol (47)

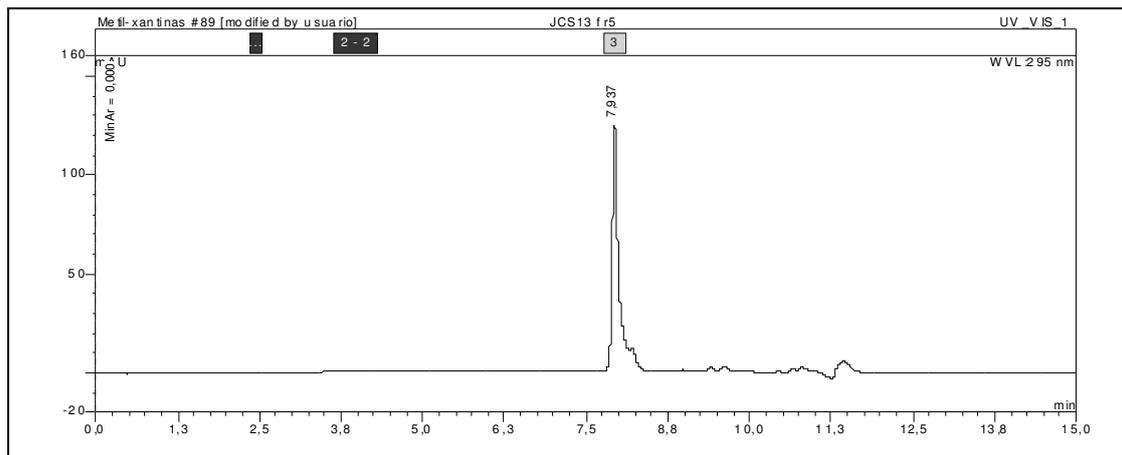
#### 4.3 - Síntese de derivados permetilados em flavonoides

Os derivados permetilados em flavonoides são aqueles que tiveram todos os prótons de seus grupos hidroxílicos (-OH) substituídos por grupos metílicos (-CH<sub>3</sub>). Portanto, para obtenção dos derivados permetilados foram utilizados como reagentes de partida a (+/-)-naringenina (5) e quercetina (38 - Figura 122).

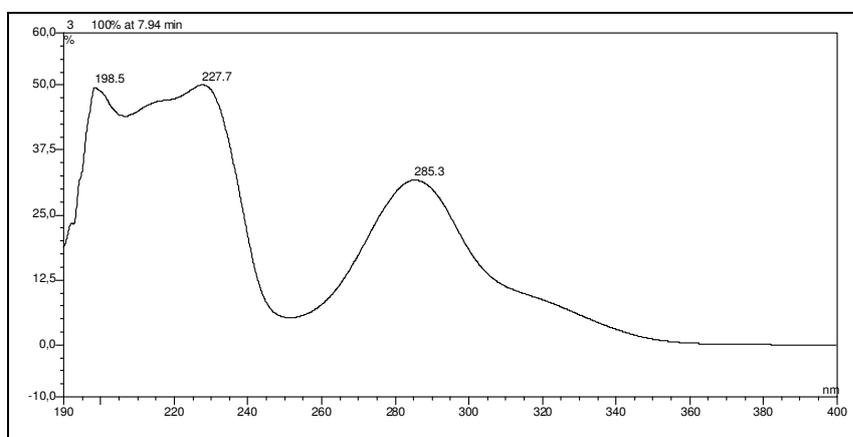


**Figura 122.** Estrutura das substâncias (+/-)-naringenina (5) e quercetina (38).

A (+/-)-naringenina (5) foi submetida à reação de permetilação e após o término da reação a mesma foi submetida a CC em sílica gel 60 utilizando CHCl<sub>3</sub>:MeOH como eluentes em grau de polaridade crescente. Foram obtidas oito frações de 250 mL cada. A fração 5 obtida com proporção de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (8:2) foi analisada por HPLC utilizando fluxo de 0,6 ml/min e injeção de 2 μL em coluna C18 Dionex com eluição em gradiente iniciando com 15% de MeOH e 85% solução 0,2% de ácido fórmico até 100% de MeOH, tempo de análise = 15 min. O cromatograma (Figura 123, pág. 158) apresentou apenas um único pico com tempo de retenção de ~ 8 min. e registrado seu espectro no UV (Figura 124, pág. 158).

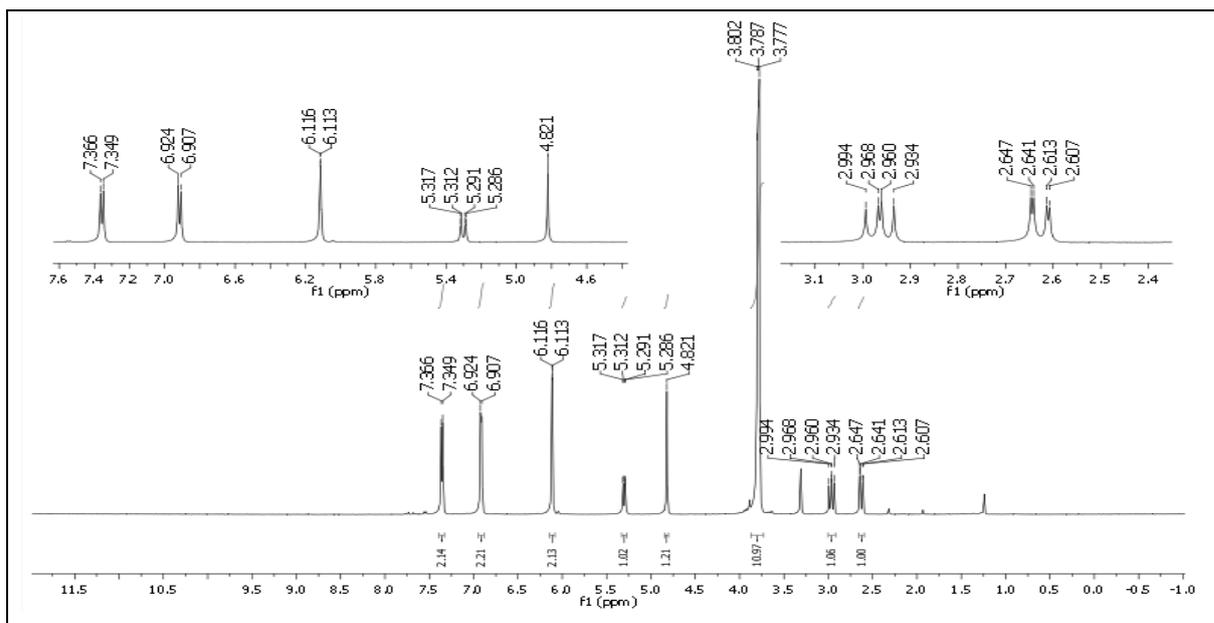


**Figura 123.** Cromatograma da (+/-)-naringenina permetilada (**50**)



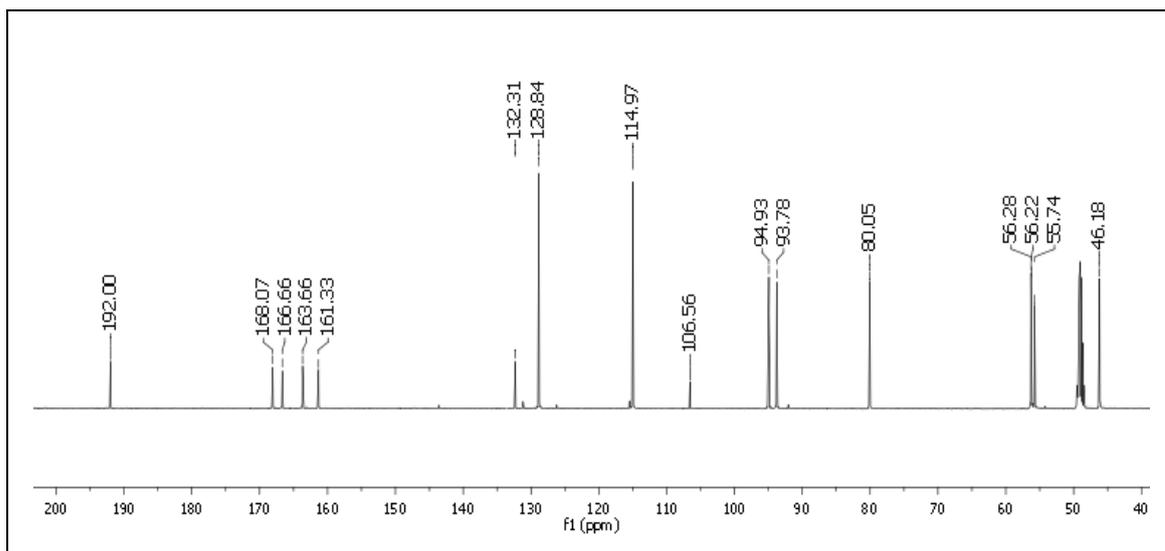
**Figura 124.** Espectro no UV da (+/-)-naringenina permetilada (**50**)

A confirmação da (+/-)-naringenina permetilada (**50**), ou seja, 5,7,4'-trimetoxi-naringenina foi realizada pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 125, pág. 159) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 126, pág. 160).



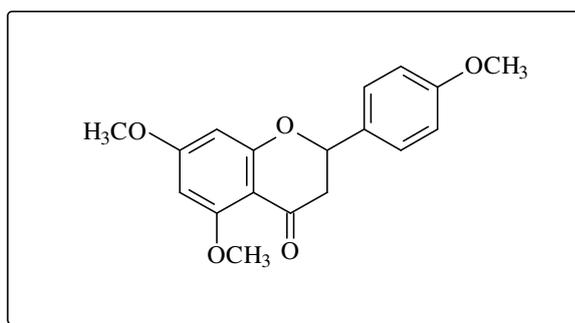
**Figura 125.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da (+/-)-naringenina permetilada **(50)**

O espectro RMN de <sup>1</sup>H da (+/-)-naringenina permetilada **(50)** apresenta dois dubletos, um em  $\delta$  7,35 (2-H, d,  $J = 10,0$  Hz) e outro em  $\delta$  6,91 (2-H, d,  $J = 10,0$  Hz) característicos do anel B 1,4-dissubstituído. Dois singletos característicos do H-8 e H-6 do anel A em  $\delta$  6,11 (1-H, s) e  $\delta$  4,82 (1-H, s), respectivamente. Além do duplo dubleto em  $\delta$  5,29 (1-H, dd,  $J = 5,0$  e 10,0 Hz) do C-2 oximetínico do anel C. E por fim, os duplos dubletos do C-3 metilênico do racemato da (+/-)-naringenina permetilada, um em  $\delta$  2,96 (1-H, dd,  $J = 10,0$  e 15,0 Hz) e outro em  $\delta$  2,61 (1-H, dd,  $J = 10,0$  e 15,0 Hz). A presença de três singletos,  $\delta$  3,80 (3-H, s),  $\delta$  3,78 (3-H, s) e  $\delta$  3,77 (3-H, s) de grupos metoxilicos confirma as posições C-5, C-7 e C-4' substituídas.



**Figura 126.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da (+/-)-naringenina permetilada (50)

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da substância (50) apresenta treze sinais sendo os registrados em  $\delta$  114,97 (2-C) e  $\delta$  128,84 (2-C), totalizando os quinze carbonos do esqueleto flavanoidico. Assim, a (+/-)-naringenina permetilada (178,5 mg, Figura 127) foi obtida com rendimento superior a 90%. É um sólido amorfo amarelo e possui PF variando de 82,6 – 84,8 °C.

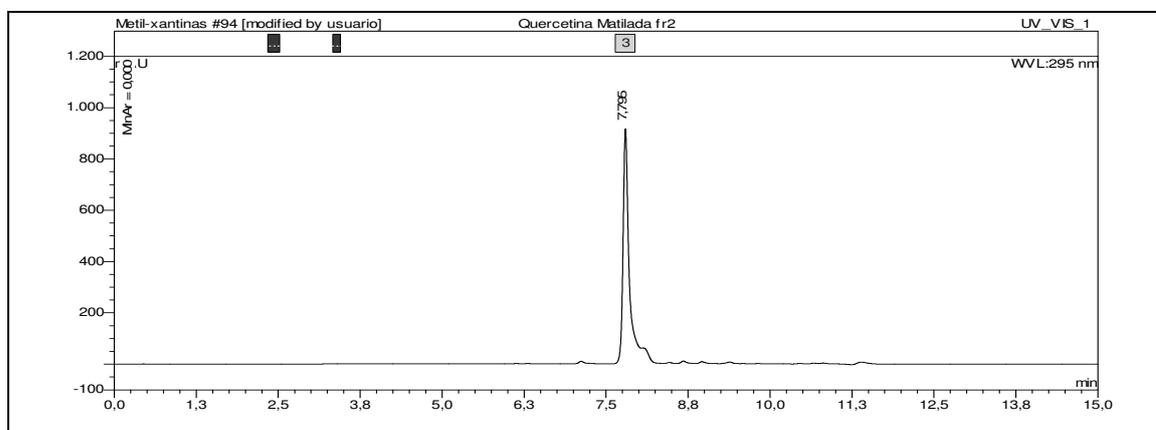


**Figura 127.** Estrutura química da (+/-)-naringenina permetilada (50)

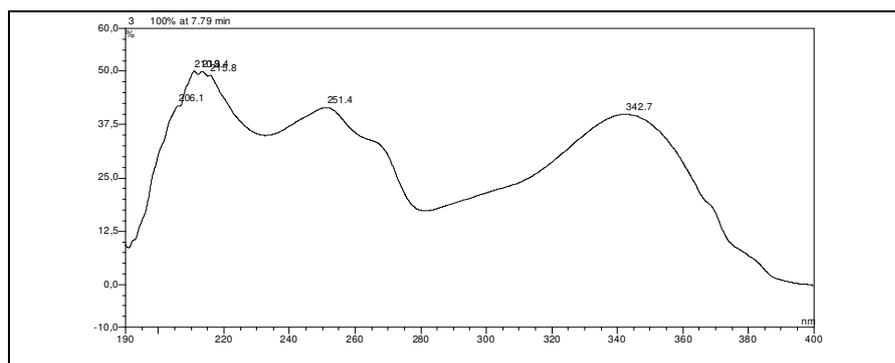
Apesar da (+/-)-naringenina permetilada (50) ser puramente sintética, a mesma só foi relatada em espécies da família Meliaceae (ZHANG *et al.* 2012 e ZHANG *et al.* 2012) e Compositae (MARIEZCURRENA, 1978).

A quercetina (38) também foi submetida à reação de permetilação e após o término da reação a mesma foi submetida a CC em sílica gel 60 utilizando  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  como eluentes em grau de polaridade crescente. Foram obtidas duas frações de 500 mL cada. A fração 2 obtida

com 10% de MeOH foi analisada por HPLC utilizando os mesmos procedimentos empregado para a (+/-)-naringenina (**5**). O cromatograma (Figura 128) apresentou um único pico com tempo de retenção de 7,795 min. e registrado seu espectro no UV (Figura 129).

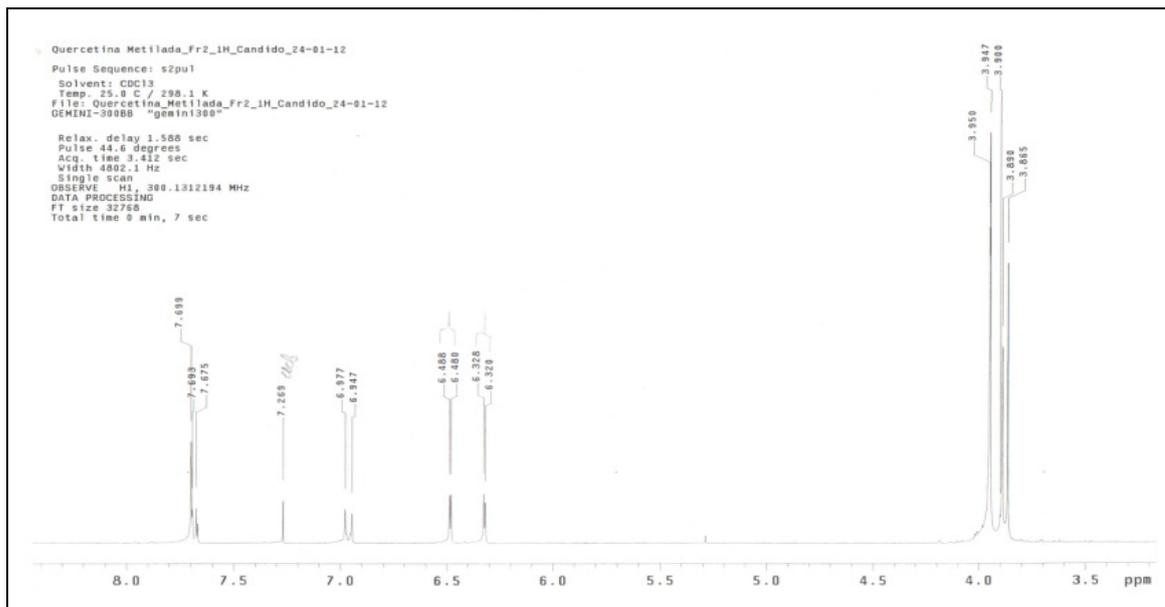


**Figura 128.** Cromatograma da quercetina permetilada (**51**).



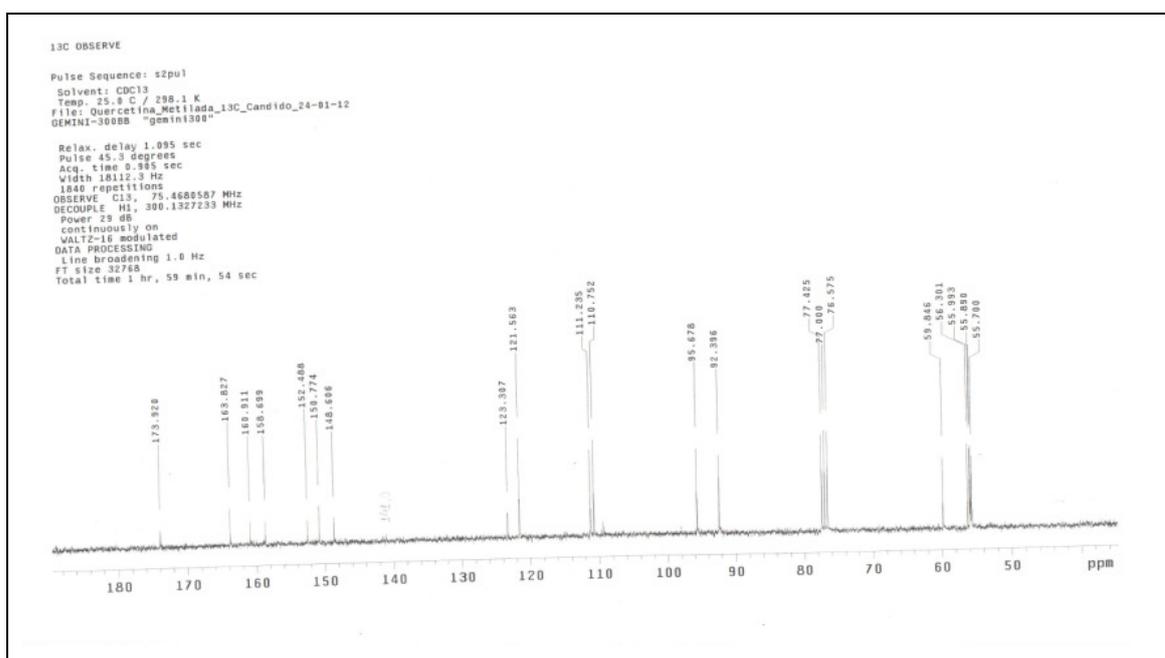
**Figura 129.** Espectro no UV da quercetina permetilada (**51**).

A confirmação da quercetina permetilada (**51**), ou seja, 3,5,7,3',4'-pentametoxi quercetina foi realizada pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 130, pág. 162) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 131, pág. 162).



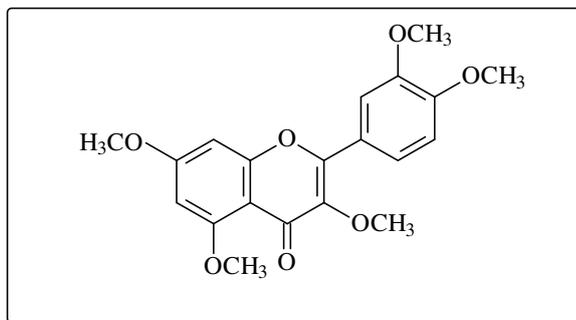
**Figura 130.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (**51**)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quercetina permetilada (**51**) apresenta dubletos em  $\delta$  6,32 (1-H, d,  $J = 2,4$  Hz), outro em  $\delta$  6,48 (1-H, d,  $J = 2,4$  Hz) característicos dos H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Outro dubleto em  $\delta$  6,95 (1-H, d,  $J = 9,0$  Hz) do H-5' do anel B. O dubleto do H-6'  $\delta$  7,68 (1-H, d,  $J = 9,0$  Hz) e o sigleto do H-2' em  $\delta$  7,69 (1-H, s). Cinco singletos de grupos metoxilicos confirma as substituições nas posições C-3, C-5, C-7, C-3' e C-4'.



**Figura 131.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (**51**)

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da quercetina permetilada (**51**, Figura 132) apresenta quinze sinais dos carbonos do esqueleto flavanoidico. Assim, confirmou-se que na fração **2** temos a substância 3,5,7,3',4'pentametoxi quercetina (99,2 mg), um sólido amorfo branco com PF variando de 146,8 – 149,2 °C e obtida com rendimento de 80,5% a 93,1%.



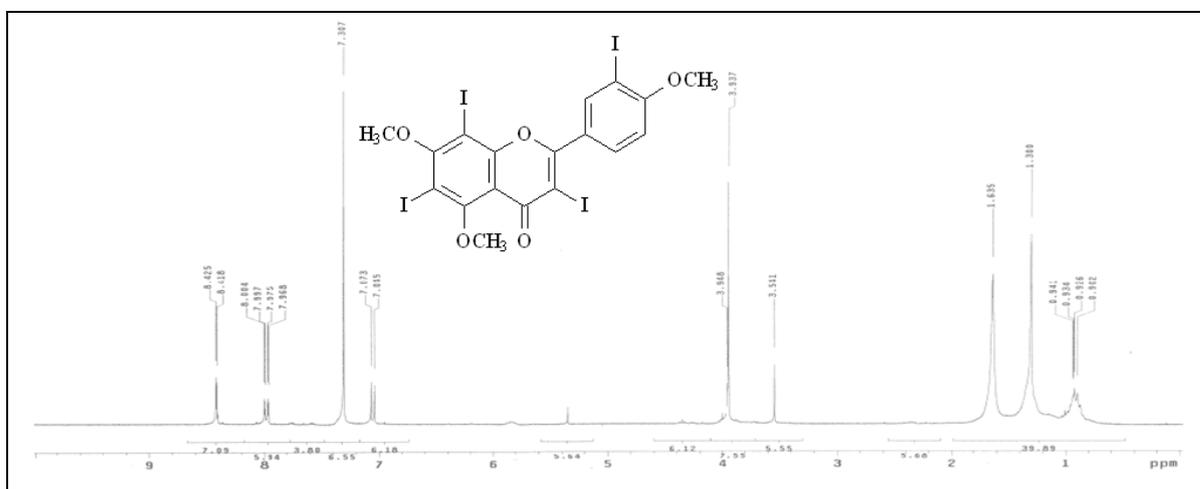
**Figura 132.** Estrutura química da quercetina permetilada (**51**)

Ambas as reações de metilação utilizando  $(\text{OMe})_2\text{SO}_2$  conduziram a rendimentos superiores a 90%. Estes dados corroboram com os descritos na literatura, que reportam rendimentos de 20 a 93% (BARONTINI *et al.* 2010).

Por outro lado, a fração com mistura da apigenina (**6**) com 3-iodo-apigenina (**46**) foi submetida à metilação utilizando a metodologia com sulfato de dimetila. Estimava-se que a hidroxila em C-5 permanecesse inalterada, devido a uma forte interação de ligação de hidrogênio com o grupo carbonila adjacente em C-4 e pela diminuição da quantidade de dimetil sulfato administrada. A mistura reacional foi submetida à coluna cromatográfica em sílica gel 60 eluidas com  $\text{CHCl}_3$  e mistura de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  em gradiente de polaridade crescente resultando em quinze frações. A fração do qual se esperava o produto desejado foi analisado por RMN. Portanto, através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura 133, pág. 164) e (Figura 134, pág. 164), respectivamente, ficou clara a presença de dois produtos, caracterizando a mistura de flavonoides obtidos na etapa da purificação. apigenina 5,7,4' trimetoxilada (**61**) em mistura com 3-iodo apigenina permetilada (**62**).



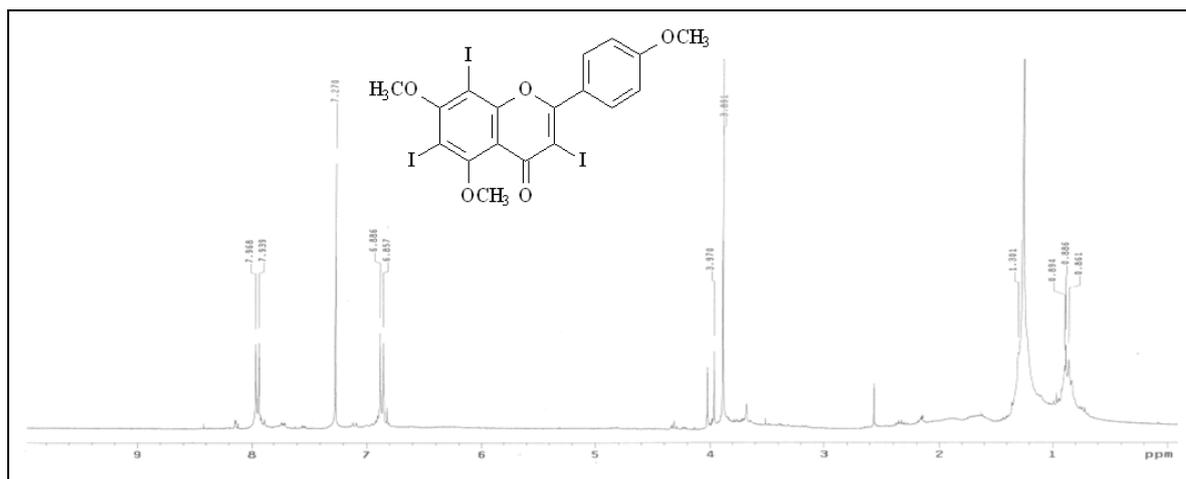
Algumas frações foram analisadas só por RMN de  $^1\text{H}$ . Porém, devido à pequena massa obtida da CC. A fração **AI3** indica a presença de apigenina permetilada (**60**) iodada nas posições 3,6,8 e 3' (Figura 135).



**Figura 135.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância (**63**)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância (**63**) apresentou sinais característico de sistema aromático 1,3,4 – trisubstituído, característico do anel B do flavonoide. Observa-se um sinal de grupos metoxilicos em  $\delta$  3,93 e três sinais na região de hidrogênios aromáticos, um em  $\delta$  7,05 (d,  $J = 8,4$  Hz), outro em  $\delta$  7,98 (dd,  $J = 2,1$  Hz e 8,4 Hz) e último em  $\delta$  8,42 (d,  $J = 2,1$  Hz). Estas informações levou a caracterização da substância (**63**) como sendo 3,6,8,3'-tetraiodo-5,7,4'-trimetoxiflavona.

Outra fração analisada por RMN de  $^1\text{H}$  foi a (**AI: 6-8**). Observa-se a presença de sistema aromático 1,4 – disubstituído e os sinais dos hidrogênios de grupos metoxilicos em  $\delta$  3,89 (Figura 136, pág. 166). Dois sinais na região de hidrogênios aromáticos são observados, um em  $\delta$  6,87 (d,  $J = 8,7$  Hz) e outro em  $\delta$  7,95 (d,  $J = 8,7$  Hz). Estas informações levou a caracterização da substância (**64**) como sendo 3,6,8,-triiodo-5,7,4'-trimetoxiflavona.



**Figura 136.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da apigenina permetilada triodada (**64**)

Em relação às substâncias puras, foram avaliadas as atividades anticolinesterásicas, das sintéticas **6**, **50**, e **51**.

As substâncias foram avaliadas na concentração de 500 μMol/mL. Esta concentração é utilizada para estabelecer se as substâncias em estudo são ou não ativas. Contudo, após o tratamento dos dados obtidos, as substâncias **6**, **50**, e **51** foram inativas no teste de atividade anticolinesterásica.

---

## 5 - CONCLUSÕES

---

Este trabalho permitiu analisar, providenciar e criar meios para síntese de compostos orgânicos de origem natural e outros puramente sintéticos. Contudo, novas experiências foram vivenciadas conduzindo na possibilidade de sintetizar o halocetoareno 2-Cloro-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-etanona (**42**) utilizando um forno microondas em apenas um minuto e meio com rendimentos que variam de 33% a 46%. Neste procedimento levou em consideração os princípios da Química Verde, no sentido de que a reação foi contemplada sem uso de solventes, assim como, o curto tempo na reação. Foi sintetizado outro derivado halocetoareno (**49**) utilizando o pirrogalol (1,2,3-trihidroxibenzeno) nas mesmas condições, porém, comum rendimento não significativo. O halocetoareno é um precursor importante para obtenção de flavonoides e com isso conduziu-se a reação de obtenção da apigenina (**6**) em DMSO que apresentou 35% de conversão. Por outro lado, devido ao custo elevado de reagentes e rendimento global da reação da apigenina partindo do floroglucinol (**41**), optamos pela substituição do reagente de partida. Tornando, assim, mais viável economicamente, a síntese da apigenina (**6**) partindo da (+/-)-naringenina (**5**) que apresentou rendimento de 74% na conversão. Além da obtenção dos derivados permetilados da (+/-)-naringenina (**5**), apigenina (**6**) e quercetina (**38**) e iodados derivados da apigenina (**6**). Contudo, as substâncias sintéticas **6**, **50**, e **51** foram avaliadas no teste anticolinesterásico, não apresentando atividade sobre a enzima.

---

## 6 - REFERENCIAS

---

AGRAWAL, P. K. 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier.

AHRENS, M. J. & THOMPSON, D. L. 2008. Composition and method for treating diabetes and metabolic disorders. US20080234364.

ARNÁIZ, F. J. 1995. A convenient way to generate hydrogen chloride in the freshman lab. Journal of Chemical Education. 72 (10), 1139.

BAHIA, M. V.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. 2010. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. Quimica Nova. 33 (6), 1297-1300.

BARONTINI, M.; BERNINI, R.; CRISANTE, F. ; FABRIZI, G. 2010. Selective and efficient oxidative modifications of flavonoids with 2-iodoxybenzoic acid (IBX). Tetrahedron. 66, 6047-6053.

BOVICELLI, P.; D'ANGELO, V. COLLALTO, D.; VERZINA, A.; D'ANTONA, N.; LAMBUSTA, D. 2007. Efficient synthesis of polyoxygenated flavones from naturally occurring flavanones. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 59 (12), 1697-1701.

CAMARA, C. A.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. 2002. Azepines from the intramolecular Prins cyclization of an aminoderivative of lapachol. Tetrahedron. 58, 6135-6140.

IQBAL, J.; FATMA, W.; SHAIDA, W. A.; RAHMAN, W. 1982. A one-step synthesis of 3-iodoflavones from 2'-hydroxychalcones. Journal of Chemical Research, Synopses. 4, 92.

KALE, A.; GAWANDE, S.; KOTWA, S. 2008. Câncer Phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level. Phytotherapy Research. 22, 567-577.

KURTI, L & CZAKO, B. 2005. Strategic applications of named reactions in organic synthesis, Elsevier Academic Press, 30.

- LAHEY, T. P. & RAJADHYAKSHA, V. J. 2004. Inhibition by 3-deoxyflavonoids of T-lymphocyte activation and therapies related thereto. US20040209825.
- LIU, H. L.; JIANG, W. B.; XIE, M. X. 2010. Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 5, 1-13.
- MARIEZCURRENA, R. 1978. 5,7,4'-trimethoxyflavanone. *Acta Cryst.* B34, 2322-2324.
- MIDDLETON Jr, E. E. & KANDASWAMI, C. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology. In: *The flavonoids advances in research since 1986*. Edited by Harbone, J. R. London Chapman & Hall, 619.
- NAKANISHI, K., YANASE, E., SPARROW, J. R. 2009. Antioxidant flavonoid derivatives, WO2009064485.
- ROMANELLI, G. P.; VIRLA, E. G.; DUCHOWICZ, P. R.; GADDI, A. L.; RUIZ, D. M.; BENNARDI, D. O.; ORTIZ, E. V.; AUTINO, J. C. 2010. Sustainable synthesis of flavonóide derivatives, QSAR study and insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 6290-6295.
- SEGAWA, S.; YASUI, K.; YASUI, N.; KURIHARA, T. 2009. Antiallergic composition. US2009028970.
- SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. 2009. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* AGRA & NEE E *S.paludosum* MORIC. *Química Nova*. 32 (5), 1119-1128.
- UNDELL, R. G. 2005. Soft gel capsules containing polymethoxylated flavones and palm oil tocotrienols. US20050249803.
- URGAONKAR, S. & SHAW, J. T. 2007. Synthesis of Kaempferitrin. *The Journal of Organic Chemistry*. 72, 4582-4585.
- VAN TONDER, J. H. 2008. Studies directed at the stereoselective synthesis of flavonoids through the hydrogenation of prochiral precursors. *Dissertação de mestrado*, University of the Free State Bloemfontein.

YUNES, R. A. & CECHINEL-FILHO, V. 2009. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí, Editora Univali, 2ª Edição.

ZHANG, F. & LI, Y. 1993. Synthesis of 3-iodo derivatives of flavones, thioflavones and thiochromones. *Synthesis*. 6, 565-567.

ZHANG, H.; XU, H-H.; SONG, Z-J.; CHEN, L-Y.; WEN, H.J. 2012. Molluscicidal activity of *Aglaia duperreana* and the constituents of its twigs and leaves. *Fitoterapia*. 83, 1081-1086.

ZHANG, H.; SONG, Z-J.; CHEN, W-Q.; WU, X-Z.; XU, H-H. 2012. Chemical constituents from *Aglaia odorata* Lour. *Biochemical Systematics and Ecology*. 41, 35-40.

ZHENG, X.; MENG, W. D.; QING, F. L. 2004. Synthesis of *gem*-difluoromethylenated biflavonoid via the Suzuki coupling reaction. *Tetrahedron Letters*. 45, 8083-8085.