UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula

ILDOMAR ALVES DO NASCIMENTO

Sob a Orientação do Professor
Dr. Raimundo Braz Filho

e Co-orientação do Professor
Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ
Novembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXTATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ILDOMAR ALVES DO NASCIMENTO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM 22/11/2013

_____
Raimundo Braz Filho. Dr. PPGQ-UFRRJ
(Orientador)

_____
Mário Geraldo de Carvalho. Dr. PPGQ-UFRRJ
(Co-orientador e Presidente)

_____
Rodrigo Rodrigues de Oliveira. Dr. CCT-LCQUI-UENF

_____
Roberto Carlos Campos Martins. Dr. IPPN-UFRJ

_____
Luciano Ramos Suzart. Dr. DEQUIM-UFRRJ

_____
Marcia Cristina Campos de Oliveira. Dra. DEQUIM-UFRRJ

Dedico esta tese a: Francisco, Antônia, Itamar, Conceição, Ivan, Graziella e Mateus.

AGRADECIMENTOS:

- a Deus por me acompanhar até este momento da caminhada;

- Ao professor Dr. Raimundo Braz Filho, pela orientação, amizade e ensinamentos e pelo apoio na realização deste trabalho.

- Ao professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pela orientação, amizade e ensinamentos e pelo apoio na realização deste trabalho.

- Ao colegiado e aos professores do Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de defesa da tese.

- A todos os meus amigos do curso que me propiciaram ótimos momentos na Rural e na Uenf e dos quais sinto uma grande falta (em ordem alfabética): Ari, Bauer, Ceará, Juliana, Luciano, Marcelo (pouca sombra), Mário Sérgio, Marli, Regina, Luiz Roberto (Pilha).

- Aos amigos de república, que durante anos formaram uma família: André, Fábio, Júlia, Tathiara e Milton, e dos quais também sinto muita falta.

- Aos técnicos do ICE-UFRRJ sem os quais nosso trabalho não seria possível.

-Aos professores: Dra Leda Mathias; Dr. Carlos Matos; Dr. Ivo Cursino; Dr. Edmilson Valentin do LCQUI-UENF que me acolheram no laboratório e me auxiliaram muito na realização deste trabalho.

Aos técnicos da UENF pelas diversas análises realizadas neste trabalho.

-Aos meus pais Francisco e Antônia que apesar do pouco estudo, sempre me mostraram a importância da educação na minha vida e sem os quais eu não teria chegado até aqui.

- Aos meus irmãos: Itamar, Ivan e Conceição pelo que sempre me admiraram e incentivaram na minha jornada.

RESUMO

NASCIMENTO, Ildomar Alves do. **Estudo Fitoquímico de *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula**. 2013. 169p Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Esta é a primeira investigação fitoquímica de *Mimosa artemisiana* (Leguminosae-Mimosoideae). A espécie foi coletada em Paracambi, RJ. Descreve-se o isolamento e identificação das susbstâncias quercetrina, miricetrina, 3,5,4 '-triidroxi-6,7-dimetoxiflavona (6,7-dimetilcanferol), flavonolignanas dos extratos de folhas; e 3-O-β-D-glucopiranosil sitosterol, lupeol, sitostenona, estigmastenona, campestenona, sitosterol, estigmasterol, campesterol, metil-indol-3-carboxilato e indol-3-carboxaldeido dos extratos da madeira desta planta. Este é o primeiro registro de 6,7-dimetoxi, 4'-hidroxi-flavona e os flavonolignanas neste gênero. O isolamento de todos os metabolitos foi realizado por meio de métodos cromatográficos e as estruturas foram elucidadas com base nos espectros de IV, massas, RMN ^{1}H, ^{13}C e comparação com os dados da literatura e análise de CG-EM de misturas.

Palavras-chave: *Mimosa artemisiana*, flavonoides, flavonolignanas

ABSTRACT

NASCIMENTO, Ildomar Alves do Nascimento. **Phytochemical Study of *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula**. 2013. 169p. Thesis (Doctorate in Chemistry, Organic Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This is the first phytochemical investigation of *Mimosa artemisiana* (Leguminosae-Mimosoideae). The species was colleted in Paracambi, RJ. Describing the isolation and identification of quercitrin, myricitrin, 3,5,4´-trihydroxi-6,7-dimethoxyflavone (6,7-dimethylkaempferol), flavolignans, 3-O-*β*-D-glucopyranosil sitosterol, lupeol, sitostenone, stigmastenone, campestenone, sitosterol, stigmasterol, campesterol, methyl indole-3-carboxilate and indole-3-carboxaldehyde in the extracts from the leaves and wood of this plant. This is the first registry of 6,7-dimethoxy,4'-hydroxy-flavona and the flavonolignans in this genera. The isolation of all metabolites was made by chromatographic methods and the structures were established on the basis of IR, MS, ^{1}H and ^{13}C NMR spectra analysis, comparison with literature data and GC-MS of mixtures analysis.

Key words: *Mimosa artemisiana*, flavonoids, flavolignans.

Lista de Tabela, quadros e figuras

Esquema 1: Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *M. artemisiana*.....19
Esquema 2: Partição do extrato metanólico de *M. artemisiana.*.....20
Esquema 3: Fracionamento da partição em clorofórmio.....21
Esquema 4: Fracionamento do extrato obtido mediante a partição com acetato de etila.....22
Esquema 5: Fracionamento do resíduo obtido através da partição com *n*-butanol.....23
Esquema 6: Estudo da fração em diclorometano e em acetato de etila.....24
Esquema 7: Biossíntese geral de flavonóides.....28
Esquema 8: Biossintese geral de flavonolignanas.....30
Figura 1: Espectro de infravermelho, em pastilha de KBr, da substância 1.....32
Figura 2: Espectro de RMN (500 MHz) de 1 obtido em metanol-d_4.....34
Figura 3: Ampliação de espectro de RMN ^{1}H de 1 entre δ_H 5,35 e 7,32.....35
Figura 4: Ampliação do espectro de RMN ^{1}H de 1, entre δ_H 3,28 e 4,20.....36
Figura 5: Espectro bidimensional ^{1}HX^{1}H COSY (500 MHz) de 1 em metanol-d_4.....37
Figura 6: Espectro de RMN ^{13}C desacoplado (125 MHz) obtido em metanol-d_4.....38
Figura 7: Espectro bidimensional (HMQC) de 1.....39
Figura 8: Ampliação do espectro de HMQC de 1.....40
Figura 9: Ampliação do espectro bidimensional HMQC de 1.....41
Figura 10: Espectro bidimensional (HMBC) de 1.....42
Figura 11: Ampliação do espectro de HMBC de 1.....43
Figura 12: Ampliação do espectro de HMBC de 1.....44
Figura 13: Ampliação do espectro HMBC de 1.....44
Figura 14: Ampliação do espectro de HMBC de 1.....45
Figura 15: Ampliação do espectro de HMBC de 1.....45
Figura 16: Espectro de IV da substância 2, obtido em pastilha de KBr.....47
Figura 17: Espectro de RMN 1H (500 MHz) de 2 obtido em metanol-d_4.....49
Figura 18: Ampliação do espectro de RMN ^{1}H (500 MHz) de 2.....49
Figura19: Espectro bidimensional ^{1}H X ^{1}H COSY de 2 obtido em metanol-d_4.....50
Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) de 2 em metanol-d_4.....51
Figura 21: Ampliações do espectro de RMN ^{13}C APT de 2.....51
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (HBBD) de 2.....52

Figura 23: Ampliação de espectro de RMN ^{13}C de 2.....52
Figura 24: Ampliações do espectro de RMN ^{13}C de 2.....53
Figura 25: Espectro bidimensional HMQC de 2 obtido em metanol-d_4.....53
Figura 26: Ampliação do espectro de HMQC de 2, destacando a correlação entre C5/H5.....54
Figura 27: Espectro de correlação HMBC de 2 (400 MHz) obtido em metanol-*d_4*.....55
Figura 28: Ampliações do espectro de correlação HMBC de 2.....55
Figura 29: Espectro de infravermelho de 3 em pastilha de KBr.....56
Figura 30: Espectro de RMN de ^{1}H 3 (400 MHz) obtido em metanol-*d_4*.....59
Figura 31: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H de 3.....59
Figura 32: Espectro de correlação ^{1}H X ^{1}H COSY (400 MHz) de 3 obtido em metanol-*d_4*...60
Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C, APT, (100 MHz) de 3 obtido em metanol-d_4.....61
Figura 34: Ampliações do espectro de RMN ^{13}C, APT, de 3.....61
Figura 35: Espectro de HMQC (400 MHz) 3 obtido em metanol-*d_4*.....62
Figura 36: Espectro de HMBC de 3 (400 MHz) obtido em metanol-*d_4*.....63
Figura 37: Ampliação do espectro de HMBC de 3. As correlações $^{2,3}J_{HC}$ observadas no espectro estão representadas em 3.....63
Figura 38: Espectro bidimensional NOESY (400 MHz) de 3 onde é observado o Efeito Nuclear Ovenhauser (NOE) (Vide estrutura de 3) entre os hidrogênios da metoxila ligada ao C-7 e o H-8. Este sinal de correlação espacial confirma a posição proposta para a metoxila..64
Figura 39: Espectro de infravermelho (ATR) da mistura de esteróides (4), (5) e (6).....66
Figura 40: Cromatograma da mistura de esteróides (4), (5) e (6).....67
Figura 41: Espectro de massas, obtido por Impacto de Elétrons de (4), (5) e (6).....67
Figura 42: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz) de (4), (5) e (6) obtido em $CDCl_3$.....68
Figura 43: Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) de (4), (5) e (6) obtido em $CDCl_3$.....69
Figura 44: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C APT de (4), (5) e (6).....69
Figura 45: Cromatograma gasoso da mistura de esteróides (7), (8) e (9).....71
Figura 46: Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70 eV) de (7), (8) e (9).....72
Figura 47: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz) da mistura de (7), (8) e (9). 73
Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura (7), (8) e (9). No detalhe, a ampliação dos sinais entre δ_C 70,9-72,6.....74
Figura 49: Ampliação de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de (7), (8) e (9)..75
Figura 50: Espectro na região do infravermelho de (10).....77
Figura 51: Cromatograma gasoso do lupeol (10).....78

Figura 52: Espectro de massas do lupeol (10), obtido por impacto de elétrons (70 eV).....78
Figura 53: Espectro de RMN ^{1}H (200 MHz) do lupeol (10).....79
Figura 54: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) do lupeol (10). 80
Figura 55: Proposta de fragmentação de massa da substância (10).....82
Figura 56: Espectro de infravermelho da saponina esteroidal (11) obtido por ATR.. 84
Figura 57: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz) de (11) em CD_3OD + $CDCl_3$.....84
Figura 58: Ampliações do espectro de RMN ^{1}H de (11).....85
Figura 59: Espectro de RMN $^{1}HX^{1}H$ COSY (400 MHz) de (11) em CD_3OD + $CDCl_3$.....86
Figura 60: Ampliação do espectro de RMN ^{1}H X ^{1}H COSY (11) em CD_3OD + CDCl.....86
Figura 61: Espectro de ^{13}C APT (100 MHz) de (11) obtido em CD_3OD + $CDCl_3$. 87
Figura 62: Ampliações do espectro de ^{13}C APT de (11).....87
Figura 63: Espectro de bidimensional HSQC (400 MHz) de (11) em CD_3OD + $CDCl_3$.....88
Figura 64: Ampliação do espectro bidimensional HSQC (400 MHz) de (11) em CD_3OD + $CDCl_3$.....89
Figura 65: Espectro bidimensional HMBC de (11) obtido em CD_3OD + $CDCl_3$.....89
Figura 66: Ampliações de espectro bidimensional HMBC de (11).....90
Figura 67: Espectro de infravermelho das flavonolignanas (12) e (13) em pastilha de KBr....95
Figura 68: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz) obtido em DMSO-d_6 de (12 + 13). 96
Figura 69: Ampliação do Espectro de RMN ^{1}H de (12 + 13).....96
Figura 70: Ampliação do Espectro de RMN ^{1}H (12 + 13).....97
Figura 71: Ampliação do Espectro de RMN ^{1}H (12 + 13).....97
Figura 72: Espectro bidimensional ^{1}H X ^{1}H COSY (400 MHz) de (12 + 13) obtido em DMSO-d_6.....98
Figura 73: Espectro de RMN ^{13}C PENDANT (100 MHz) de (12 + 13) em DMSO-d_6.....99
Figura 74: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C PENDANT (100 MHz) de (12 + 13).. 99
Figura 75: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C PENDANT (100 MHz) de (12 + 13).....100
Figura 76: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C PENDANT (100 MHz) de (12 + 13).....100
Figura 77: Espectro bidimensional HSQC (400 MHz) de (12 + 13) em DMSO-d_6.....101
Figura 78: Ampliações do espectro bidimensional HSQC de (12 + 13).....102
Figura 79: Espectro bidimensional HMBC (400 MHz) de (12 + 13) em DMSO-d_6.....103
Figura 80: Ampliação do espectro bidimensional HMBC (400 MHz) de (12 + 13) em DMSO-d_6.....103

Figura 81: Espectro de NOESY 1D (400 MHz) de (12 + 13) obtido em DMSO-d_6. A irradiação no sinal δ_H 3,77 (3'', 4''-OCH_3) resultou em nOe nos sinais em δ_H 6,82 (H-5'') e δ_H 7,04 (H-2'').....104
Figura 82: Espectro NOESY 1D (400 MHz) de (12 + 13) obtido em DMSO-d_6. A irradiação no sinal em δ_H 7,661 (H-2') provocou nOe no sinal em δ_H 6,87 (H-3). 104
Figura 83: Espectro bidimensional NOESY (400 MHz) de (12 + 13) em DMSO-d_6.....105
Figura 84: Ampliações do espectro bidimensional NOESY (400 MHz) de (12 + 13).....106
Figura 85: Espectro de massas de alta resolução de (12).....109
Figura 86: Espectro de massas de alta resolução de (13).....109
Figura 87: Espectro de infravermelho de (14) obtido em KBr.....110
Figura 88: Cromatograma e espectro de massas (IE, 70 eV) de (14).....111
Figura 89: Espectro de RMN de ^1H de (14) obtido em acetona-d_6.....111
Figura 90: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de (14).....112
Figura 91: Espectro de RMN de $^1Hx^1H$ COSY de (14).....112
Figura 92: Espectro de ^{13}C APT de (14) obtido em acetona-d_6.....113
Figura 93: Ampliação do espectro de ^{13}C APT de (14) obtido em acetona-d_6.....113
Figura 94: Espectro de HMQC de (14) obtido em acetona-d_6.....114
Figura 95: Ampliação do espectro de HMQC de (14) obtido em acetona-d_6.....114
Figura 96: Ampliação do espectro de HMQC de (14) obtido em acetona-d_6.....115
Figura 97: Espectro de infravermelho de (15) obtido em KBr.....116
Figura 98: Cromatograma gasoso e espectro de massas de (IE, 70 eV) de (15).....117
Figura 99: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de (15).....118
Figura 100: Ampliação do espectro de RMN ^1H (15).....118
Figura 101: Espectro de $^1HX^1H$ COSY de (15).....119
Figura 102: Ampliação do espectro $^1HX^1H$ COSY de (15).....119
Figura 103: Espectro de ^{13}C APT (100 MHz) de (15).....120
Figura 104: Ampliação do espectro de ^{13}C APT (100 MHz) de (15).....120
Figura 105: Ampliação doe espectro de ^{13}C APT (100 MHz) de (15).....121
Figura 106: Espectro de HMQC de (15).....121
Figura 107: Ampliação do espectro de HMQC de (15).....122

Figura 108: Ampliação do espectro de HMQC de (15).....122
Figura 109: Espectro de HMBC de (15).....123
Figura 110: Ampliação do espectro de HMBC de (15).....123
Figura 111: Ampliação do espectro de HMBC de (15).....123
Figura112: Cromatograma de alta eficiência da mistura MAEC16-21.....124
Figura 113: Espectro de massas de alta resolução do correspondente ao sinal 1 do cromatograma.....125
Figura 114: Espectro de massas correspondente ao sinal 3 do cromatograma.....127
Figura 115: Espectro de massas correspondente ao sinal 4 do cromatograma.....129
Figura 116: Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz) de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$. 132
Figura 117: Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz) de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.. 132
Figura 118: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.....133
Figura 119: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.....133
Figura 120: Espectro de RMN ^{1}HX (125 MHz) de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.....134
Figura 121: Ampliação do espectro de RMN $^{1}HX^{1}H$ COSY (125 MHz) de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.....134
Figura 122: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.....135
Figura 123: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC de MAEC16-21 em metanol-*d*$_4$.....136
Figura 124: Espectro bidimensional NOESY apresentando NOE entre a MeO-3'' e o H.....137
Figura 125: Gráficos da avaliação da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *M. artemisiana*.....141
Tabela 1: Dados de RMN ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) do flavonol glicosilado 1 em CD_3OD.....33
Tabela 2: Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de 2 obtidos em metanol-d_4.....48
Tabela 3: Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C de 3 obtidos em metanol-d_4.....58
Tabela 4: Dados de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de (4), (5) e (6) em $CDCl_3$.....70
Tabela 5: Dados de RMN de ^{1}H (200 MHz) e ^{13}C PND (50 MHz) de (10) obtidos em $CDCl_3$.....81

Tabela 6: Dados de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de (11) obtidos em CD_3OD + $CDCl_3$.....91 e 92
Tabela 7: Dados de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) referentes a substância (12) obtidos em DMSO-d_6.....107
Tabela 8: Dados de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) referentes a substância (13) obtidos em DMSO-d_6.....108
Tabela 9: Dados de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) referentes a substância (16) obtidos em Metanol-d_4.....138
Tabela 10: Avaliação da capacidade antioxidante de extratos brutos e frações de extratos das folhas de *M. artemisiana*.....142
Tabela 11. Teor de Flavonóides Totais (TFT).....145
Tabela 12 - Resultados obtidos do dosamento (FT).....147

Lista de Abreviações e Símbolos

δ	deslocamento químico
M^+	Pico do íon moleular
Ac	Acetila
AcOEt	Acetato de etila
aq	Aquoso
APT	Attached Proton Test
cc	Cromatografia em coluna
ccd	Crmatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectromeria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	COrrelated SpectroscopY
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dl	Dubleto largo
BBD	Band Broad Decoupled
APT	Attached Proton Transfer
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-*d6*	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	Hydrogen Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantun Coherence
HSQC	Heteronuclear Multiple-Quantun Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento em Hertz
M	Multipleto
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
PND	Proton Noise Decoupling
q	Quarteto
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	Sinal simples ou simpleto
sl	Sinal simples largo ou simpleto largo
t	Tripleto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 A Química de Produtos Naturais 1

1.2 O gênero *Mimosa* L. 3

1.3 Plantas de Gênero *Mimosa* L. com Atividade Biológica ou Usadas Popularmente no Tratamento de Enfermidades 15

2 OBJETIVOS 17

3.1 Equipamentos e Reagentes 17

3.2 Coleta do Material Vegetal 17

3.3 Preparo dos Extratos das Folhas de *M. artemisiana* 17

3.4 Preparo dos Extratos da Madeira de *M. artemisiana* 18

3.5 Fracionamento dos Extratos 18

3.5.1 Extrato hexânico das folhas 18

3.5.2 Extrato metanólico das folhas 20

3.5.2.1 Estudo da partição em clorofórmio 20

3.5.2.2 Estudo da partição em acetato de etila 21

3.5.2.3 Estudo da partição em *n*-butanol 22

3.5.3 Extrato metanólico dos galhos 23

3.5.3.1 Estudo da partição em diclorometano e em acetato de etila 23

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 27

4.1 Considerações Biossintéticas 27

4.2 Determinação Estrutural da Substância (1) 31

4.3 Determinação Estrutural da Substância (2) 46

4.4 Determinação estrutural da Substância (3) 56

4.5 Determinação Estrutural da Mistura dos Cetoesteróides (4), (5), e (6) 65

4.6 Determinação Estrutural dos Esteróides (7), (8) e (9). 71

4.7 Determinação Estrutural da Substância (10) 76

4.8 Determinação Estrutural da Saponina Esteroidal (11) 83

4.9 Determinação Estrutural das flavonolignanas (12) e (13) 93

4.10 Determinação Estrutural da Substância (14) 110

4.11 Determinação Estrutural da Substância (15) 116
4.12 Determinação da Substância (16) 124

5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Mimosa artemisiana*. 139
5.1 Introdução 139
5.2 Metodologia 140
5.3 Resultados da Atividade Antioxidante dos Extratos da Folhas de *M. artemisiana* 141

6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS (TFT) NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Mimosa artemisiana*. 143

7 AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS 146

8 CONCLUSÕES 148

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 149

1 INTRODUÇÃO

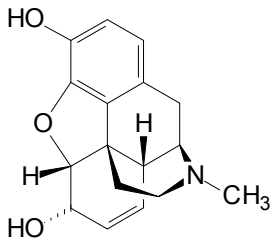
1.1- A Química de Produtos Naturais

Os produtos naturais são substâncias produzidas por plantas, animais, microrganismos e fungos com as mais variadas funções dentro do organismo que as produzem. A química de produtos naturais tem como alvo principal o isolamento e a identificação de metabólitos biossintetizados por estes seres vivos. O trabalho do químico de produtos naturais reveste-se de grande importância uma vez que o conhecimento da estrutura química da substância é imprescindível para a realização de estudos interdisciplinares com outras áreas de conhecimento, tais como: botânica, zoologia, biologia, farmacologia, medicina humana e veterinária, entomologia, ecologia, entre outras.

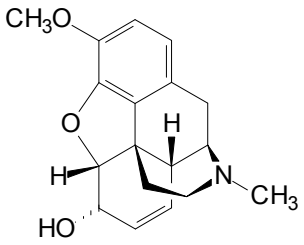
Durante séculos, países como Egito, China e Índia têm utilizado produtos naturais como a base das suas respectivas medicinas. A Organização Mundial de Saúde estima que produtos naturais tenham papel importante na saúde de 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Os produtos naturais estão presentes no desenvolvimento de aproximadamente 40% das drogas disponíveis no mercado atualmente, sendo que cerca de 25% deste total são provenientes de plantas, 13% de microganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003).

É inegável que o principal foco da pesquisa em produtos naturais é a descoberta de medicamentos. A literatura está repleta de exemplos de substâncias de origem natural utilizadas como fármacos, assim como estudos objetivando a descoberta de novas drogas.

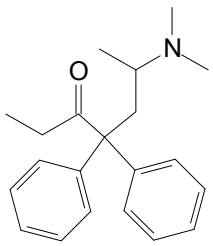
Um exemplo clássico é a morfina (**1**) substância analgésica poderosa pertencente a classe do opióides e isolada de *Papaver somniferum* L. A metilação da morfina leva a formação da codeína, (**2**) um opióide de ação analgésica menos potente que a morfina. Os estudos a morfina e a codeína levaram os cientistas a sintetizarem uma série de substâncias analgésicas poderosas, os opióides (ou seja, similares aos opiáceos): metadona (**3**), meperidina (**4**), oxicodona (**5**) e o propoxifeno (**6**).



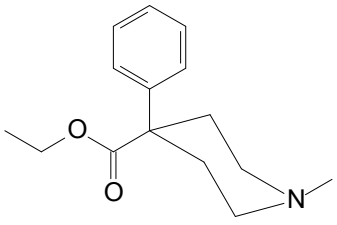
1



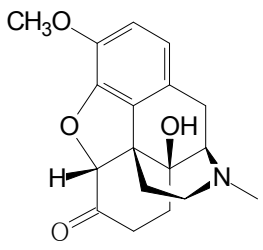
2



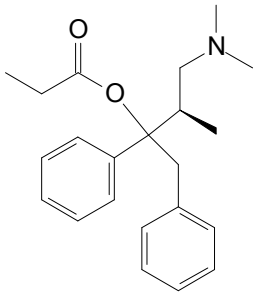
3



4

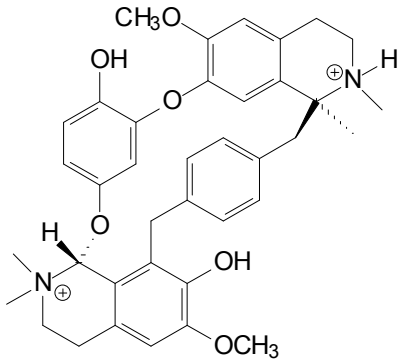


5



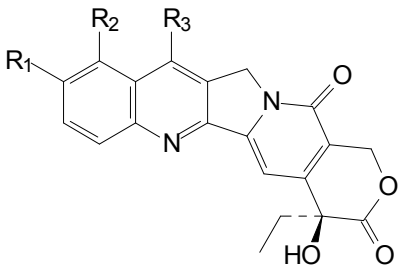
6

Alguns grupos indígenas da Amazônia costumam preparar uma mistura paralisante composta por várias ervas e utilizada na captura de animais. Essa mistura é conhecida como curare e a principal espécie vegetal é o cipó *Chondodendrum tomentosum* Ruiz e Pavon. A partir do curare, foi isolada a *d*-tubocurarina (**7**) uma substância com efeito paralisante muscular utilizada em operações cirúrgicas.



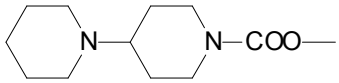
7

A camptotecina (**8**) isolada de *Camptotheca acuminata* Decne é resultado de um estudo onde centenas de milhares de extratos foram submetidos a *screening*. Esta substância levou ao desenvolvimento das drogas topotecano (**9**) e o irinotecano (**10**) na segunda metade do século XX. Estes fármacos constituem uma alternativa na terapia antitumoral. (SIMÕES ET AL.; 2001; MORAIS E BRAZ FILHO, 2007).



8: $R_1= R_2= R_3= H$

9: $R_1= OH$; $R_2= CH_2N(CH_3)_2$; $R_3= H$

10: $R_1=$ 

;

$R_2= H$; $R_3= CH_2CH_3$

A literatura está repleta de outros exemplos do sucesso da química de produtos naturais. Todos os casos apresentam dois fatores em comum: (**1**) a tarefa é árdua necessitando de tempo e infraestrutura e (**2**) o trabalho é interdisciplinar envolvendo diversas áreas de conhecimento. O Brasil como detentor da maior biodiversidade do planeta, apresenta potencial, como nenhum outro país, para grandes descobertas e realizações nesta área.

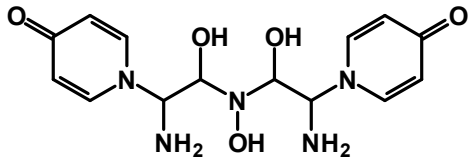
1.2 O gênero *Mimosa* L.

A justificativa mais comum para se realizar estudo químico de plantas é a necessidade de se descobrir substâncias naturais com atividade biológica. A necessidade de estimular pesquisas neste sentido é evidente no meio científico mundial. A procura de substâncias que podem ser usadas como medicamentos, servirem como modelo ou matéria prima para síntese de fármacos tem sido razão do emprego de bilhões de dólares por grupos de pesquisas dos países desenvolvidos. Inúmeras drogas são obtidas de plantas e muitas atividades terapêuticas são controladas por estes medicamentos que são empregados em forma de produtos naturais, derivados ou sintetizados.

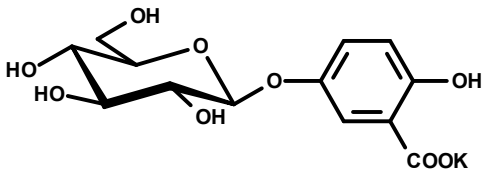
A espécie vegetal em estudo neste presente trabalho é *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula, pertencente ao gênero *Mimosa* L., família Leguminosae, subfamília Mimosoideae. Este gênero contém cerca de 400 espécies, sendo abundante, principalmente na América do Sul (YUSUF e col. 2003). No entanto, este é pouco estudado quanto a sua composição química.

Não há registros na literatura sobre estudos que relatem a investigação direcionada para o isolamento e a determinação estrutural de substâncias provenientes do metabolismo especial de *M. artemisiana*. Contudo, há alguns trabalhos sobre estudos químicos de outras espécies deste gênero como, por exemplo, *M. pudica*, chamada planta sensitiva (LOBSTEIN e col., 2002) ou dormideira, devido ao fechamento rápido das suas folhas quando estas são tocadas . Nesta planta ainda foi observado um outro movimento: fechamento das folhas durante a noite e abertura destas quando está próximo do amanhecer. Este movimento, que funciona como um relógio biológico, é chamado de ***nictinástico*** e é observado em outras espécies vegetais, principalmente em leguminosas (UEDA e YAMAMURA, 1999; UEDA e col., 2000). Diversas substâncias controlam este movimento. Ueda e col. Identificaram a sustância conhecida como mimopudina (**11**) e o 5-O-β-D- glucopiranosil gentisato de potássio (**12**) como algumas das responsáveis por este fenômeno em *M. pudica*. Estudos recentes avaliam a atividade de taninos isolados *M. pudica* no tratamento de picada de cobras. A farmacognosia da espécie aponta que tradicionalmente a espécie já é utilizada pela população de países asiáticos no tratamento de picadas de cobras e de escorpião. No momento da picada do animal peçonhento, a raiz de *M. pudica* é mastigada junto

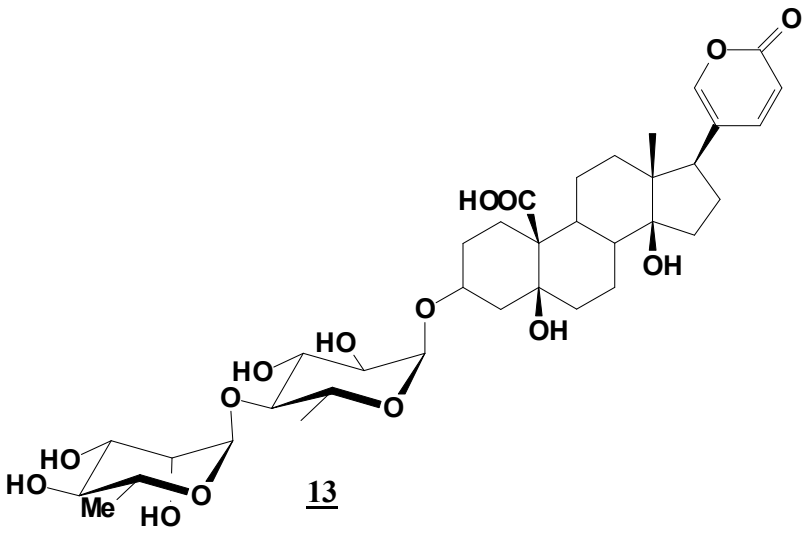
com três folhas de *Azadirachta indic*a e a mistura é aplicada no local da picada. Outra forma de utilização é produzir uma pasta aquecida com as raízes de *M. pudica* e 21 pimentas pretas, aplicar a mistura na área da picada e enfaixar. Seu uso é bastante comum entre encantadores de serpentes (AMBIKABOTHY, J. e col., 2011). Outra atividade atribuída a *M. pudica* é o combate a inflamações da vias respiratórias. O extrato etanólico inibiu a atividade de células inflamatórias e reduziu a secreção de muco pelas mesmas. Os estudos sugerem que o extrato de M. pudica pode ser uma alternativa no tratamento da asma (YANG, E. J. e col., 2011). Em 2001, YADAVA e YADAV isolaram a substância bufadienolídeo (**13**) das sementes de *M. pudica*.



11



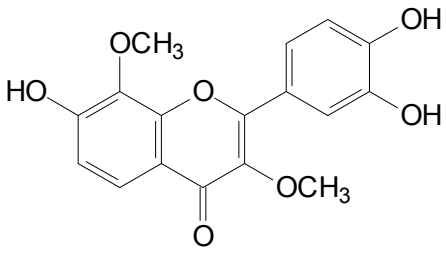
12



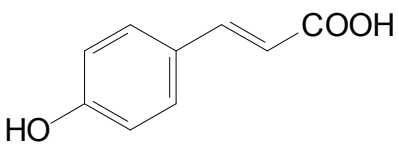
13

Das folhas de *M . Pudica* também foi isolado um 5-desoxiflavonol (**14**) e o ácido *p*-hidroxi-cinâmico (**15**). A substância (**14**) pertence a um grupo não muito comum de flavonóides onde o oxigênio em **C-5** é perdido durante a biossíntese. Tais metabólitos são característicos de leguminosas, onde os 5-hidroxi e 5-desidroxiflavonóides co-existem como resultado da ação conjunta da chalcona redutase e chalcona sintase (KIRK e col., 2003). Substâncias do tipo 5-

desoxiflavonol também foram isoladas de outra espécie de leguminosa: *Schizolobium parahybae* (Leguminosae-caesalpinoideae).

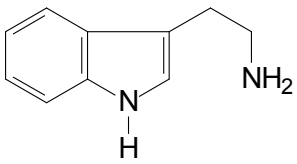


14

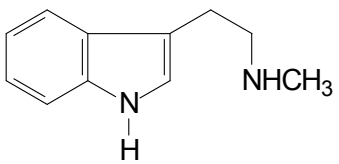


15

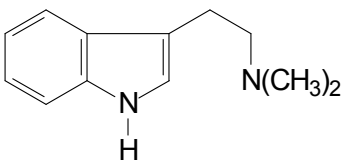
Na espécie *M. somnians* foi detectada a presença de triptamina (**16**) e N-metil-triptamina (**17**). Em *M. verrucosa* e *M. hostilis* foi encontrada N,N-dimetiltriptamina (DMT) (**18**). A espécie *M. hostilis* é usada por tribos de Pernambuco, Brasil, para preparar um potente bebida alucinógena conhecida como "vinho de jurema" (GUPTA E ARIAS, 1979; PACHTER e col., 1959). OHSAKI e col (2006) isolaram e identificaram os diterpenos (**19**-**23**), os flavonóides (**24**-**32**) e as chalconas (**33**-**36**) das folhas e dos galhos de *M. hostilis*.



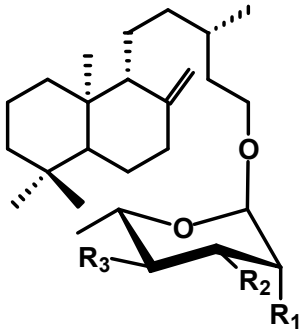
16



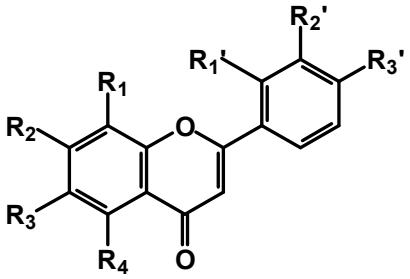
17



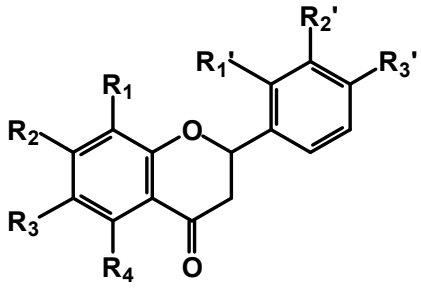
18



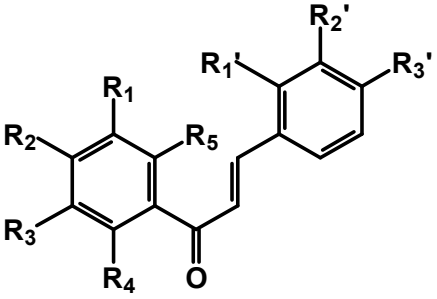
19: R_1= OAc; R_2= OAc; R_3= OH
20: R_1= OAc; R_2= OH; R_3= OH
21: R_1= OH; R_2= OAc; R_3= OH
22: R_1= OH; R_2= OAc; R_3= OH
23: R_1= OAc; R_2= OAc; R_3= OH



24: R_1= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_2= R_4= $R_{3'}$= OH (apigenina)
25: R_2= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_1= R_4= $R_{3'}$= OH
26: R_1= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_4= $R_{3'}$= OH; R_2= OMe (genkawanina)
27: R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_2= R_4= $R_{3'}$= OH; R_1= OMe

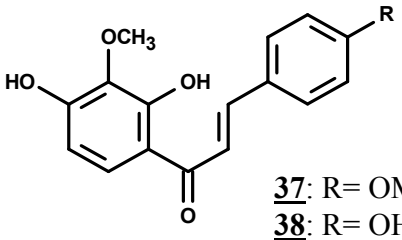


28: R_1= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$; R_2= R_4= OH; $R_{3'}$= OMe
29: R_1= R_2= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_3= OH; R_4= $R_{3'}$= OMe
30: R_1= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_4= $R_{3'}$= OH; R_2= OMe (sakuranetina)
31: R_1= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_2= R_4= $R_{3'}$= OH (naringenina)
32: R_1= R_3= $R_{2'}$= H; R_4= $R_{1'}$= $R_{3'}$= OH; R_2= OMe (antocarpanona)

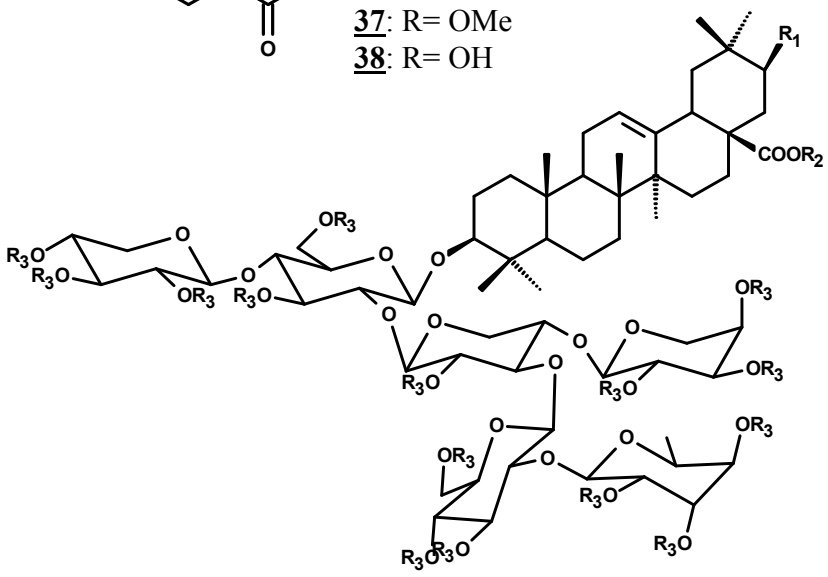


33: R_1= R_3= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_4= R_5= H; R_2= $R_{3'}$= OMe
34: R_1= R_3= R_5= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_2= R_4= $R_{3'}$= OH (isoliquiritigenina)
35: R_1= R_3= R_5= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_2= R_4= OH; $R_{3'}$= OMe
36: R_2= R_3= R_5= $R_{1'}$= $R_{2'}$= H; R_1= R_4= $R_{3'}$= OH

As chalconas kukulcaninas A (**37**) e B (**38**) e as saponinas mimonosideo A (**39**), C (**40**) e B (**41**) foram isoladas da madeira de *M. tenuiflora* L (JIANG e col., 1991).

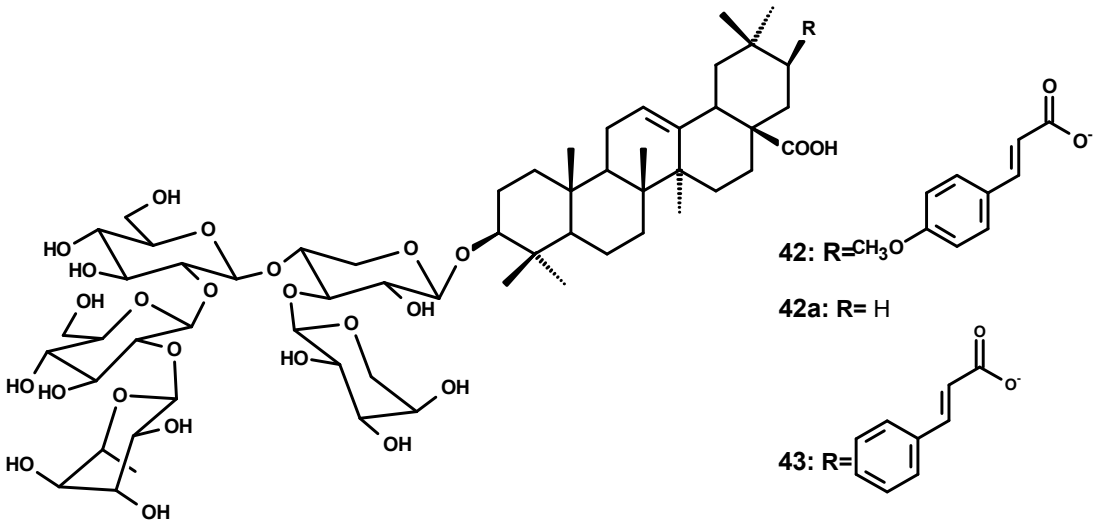


37: R= OMe
38: R= OH

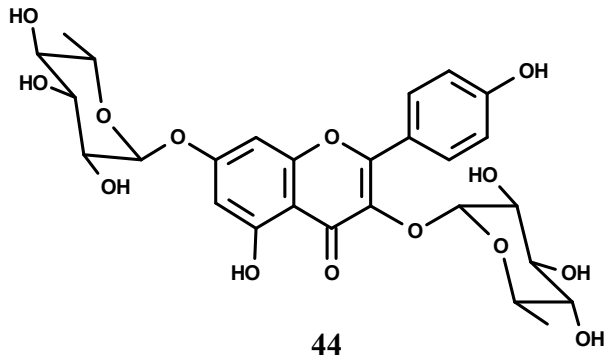


39: R_1= H; R_2= Raminose; R_3= H
40: R_1= OH; R_2= Raminose; R_3= H
41: R_1= R_2= R_3= H

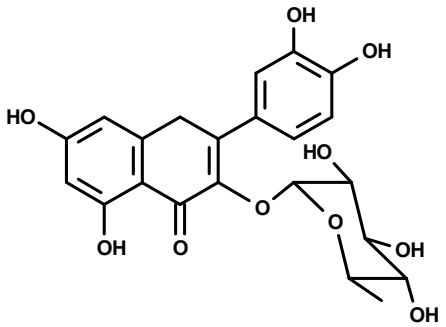
As saponinas triterpênicas (**42**), (**42a**) e (**43**) foram isoladas da madeira *M. pigra* (ENGLERT e col., 1995).



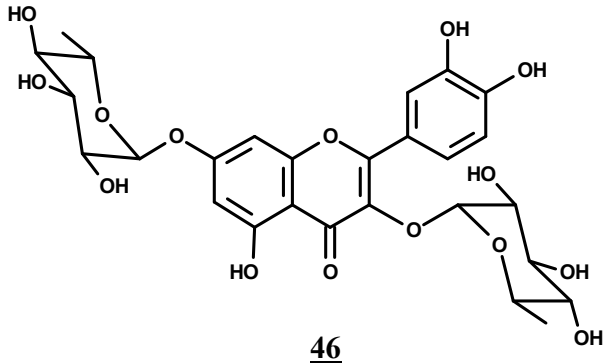
Das espécies *M. pigra* e *M. invisa* foram identificados os flavonóides glicosilados: kaempferol 3,7-di-raminosídeo **(44)**, quercetina 3-raminosídeo (**45**), quercetina 3,7-diraminosídeo (**46**), kaempferol 3-raminosídeo (**47**), quercetina 3-rutinosídeo (**48**), luteolina 7-arabinosídeo (**49**), além das agliconas quercetina 7-metil-éter (**50**), kaempferol (**51**), apigenina (**52**) (YUSUF e col., 2003). Recentemente, RAKOTOMALALA e col. (2013) relataram as atividades antioxidante e antiinflamatória e o efeito vaso relaxante dos extratos de *M. pigra* e identificaram as substâncias (**53**-**59**).



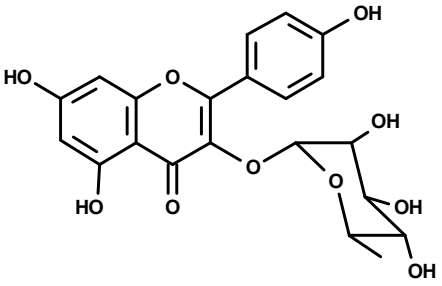
44



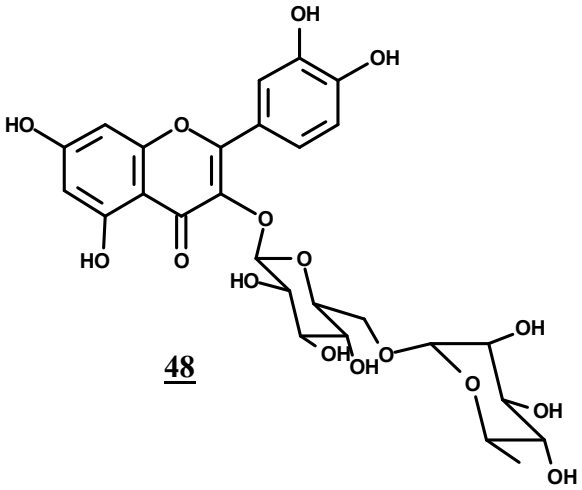
45



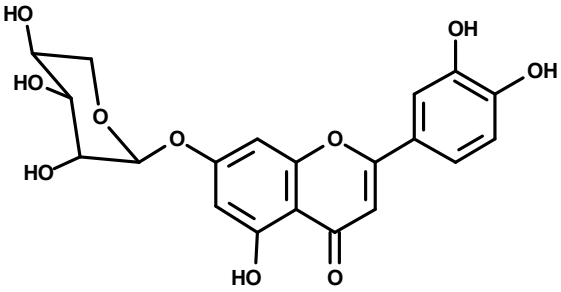
46



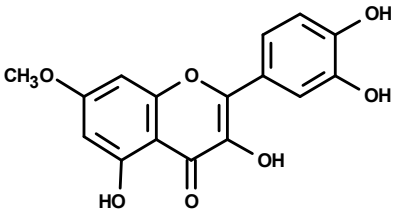
47



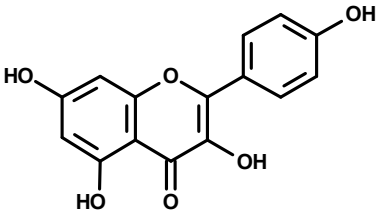
48



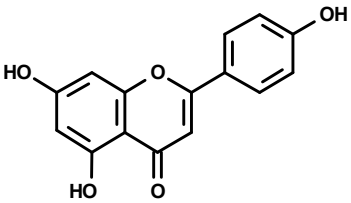
49



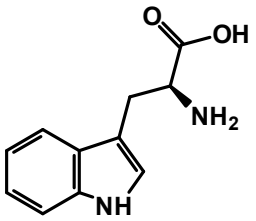
50



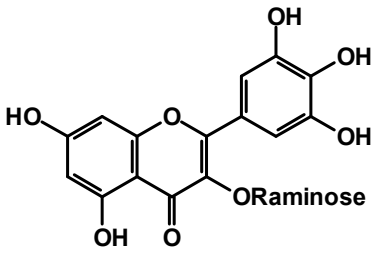
51



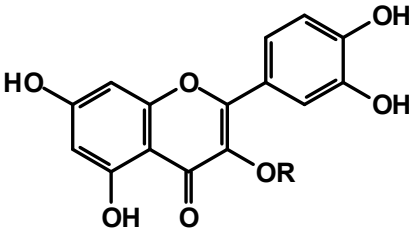
52



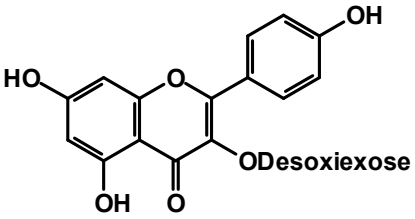
53



54

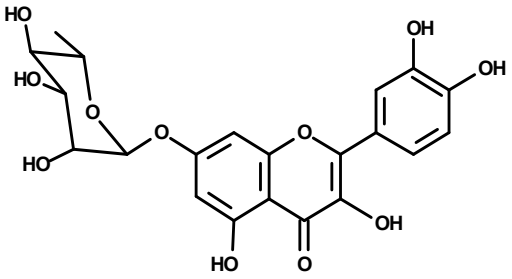


55: R= hexose
56: R= pentose
57: R= raminose
58: R= H (quercetina)

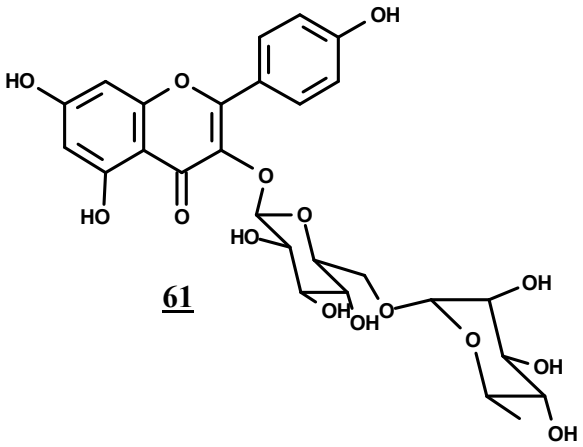


59

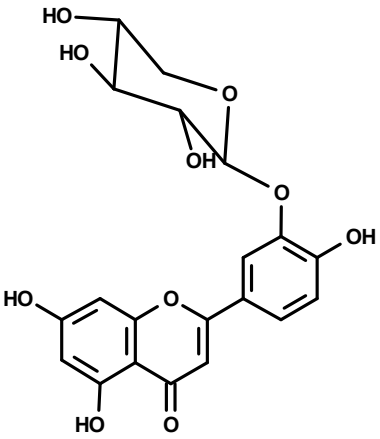
Das espécies *M. pudica* e *M. longihirsuta* foram isoladas a aglicona (**50**) e os flavonóides glicosilados: quercetina 7-raminosídeo (**60**), kaempferol 3-rutinosídeo (**61**) e luteolina 3'-xilosídeo (**62**) (Yusuf e col., 2003).



60

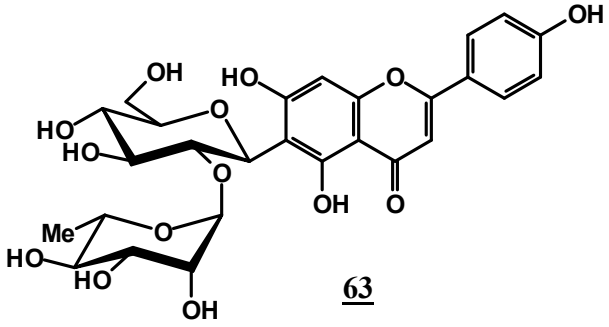


61

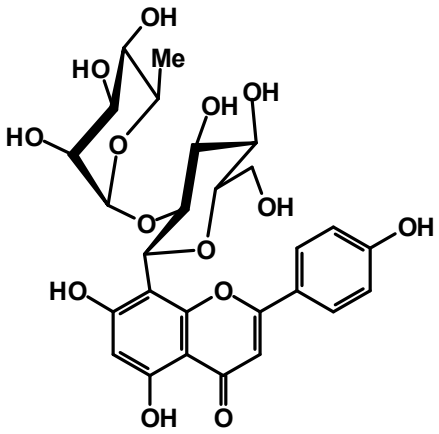


62

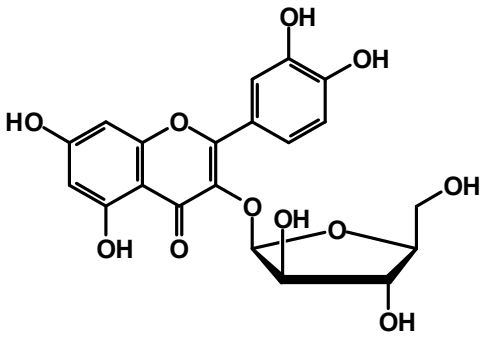
Investigação fitoquímica de *Mimosa xanthocentra* forneceu os C-glicosídeos (**63** e **64**) e os 3-O-glicosídeos (**65** e **66**) (CAMARGO e col. 2012).



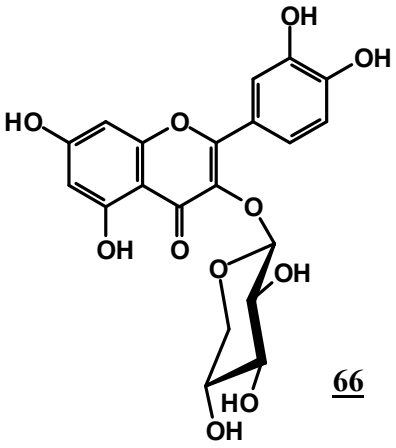
63



64

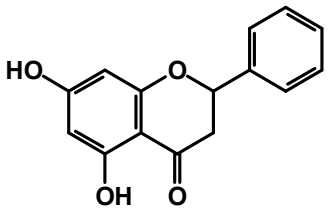


65

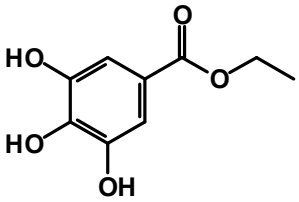


66

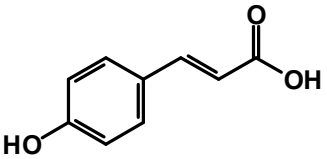
Mimosa paraibana é uma espécie popularmente também conhecida como jurema. Estudos químicos e farmacológicos relataram a atividade citotóxica e antioxidante dos extratos das suas partes aéreas. Além disso, é relatado o isolamento e identificação das substâncias (**67**-**72**) (NUNES e col., 2008).



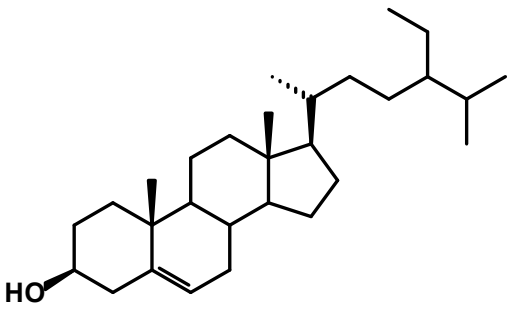
67



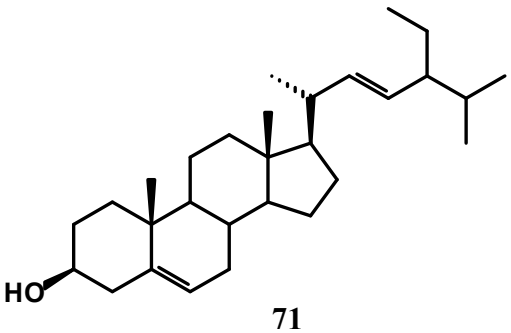
68



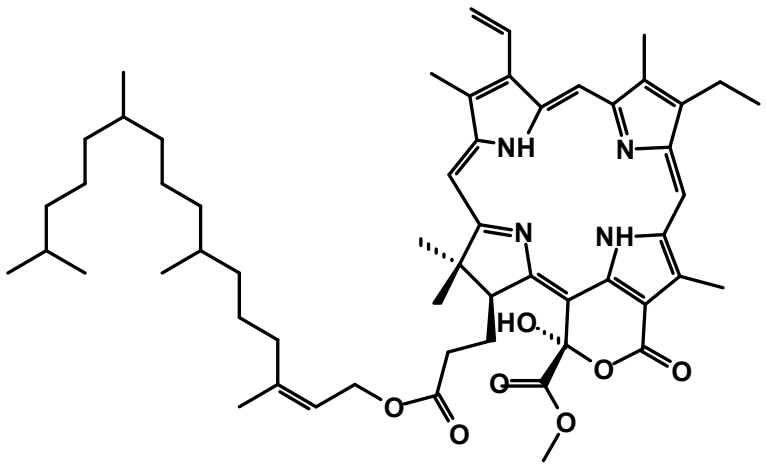
69



70

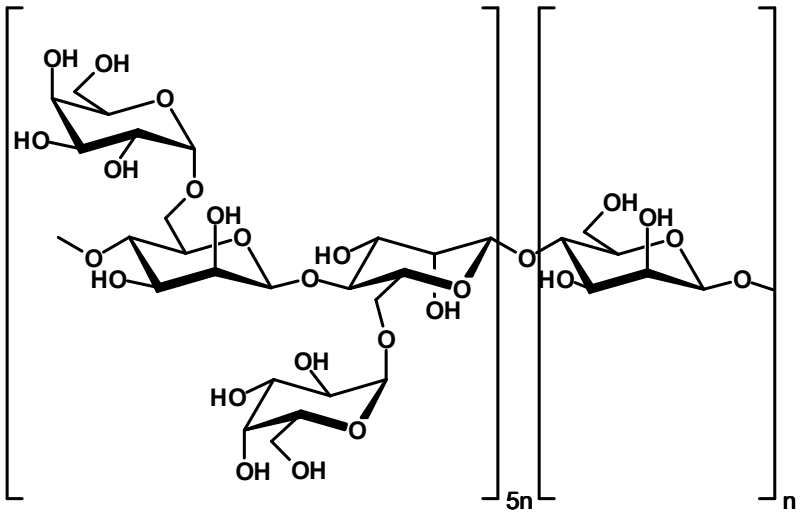


71



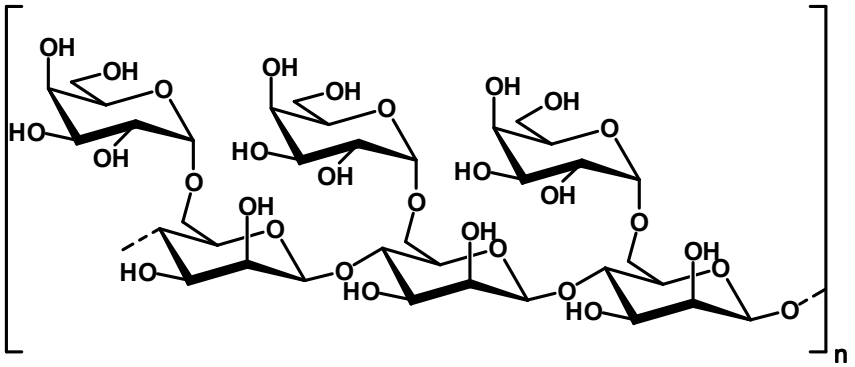
72

A espécie *Mimosa scabrella* (bracatinga) apresenta estudos farmacológicos promissores. As suas sementes são ricas em carboidratos, entre os quais se destacam as galactomananas (**73**). Estes carboidratos possuem a capacidade de formar complexos estáveis com oxovanadio (IV/V) e tais complexos foram potencialmente ativos frente a células tumorais. Previamente, já haviam sido relatadas ações insulino-mimética e atividade contra leishmaniose (NOLETO, e col.).



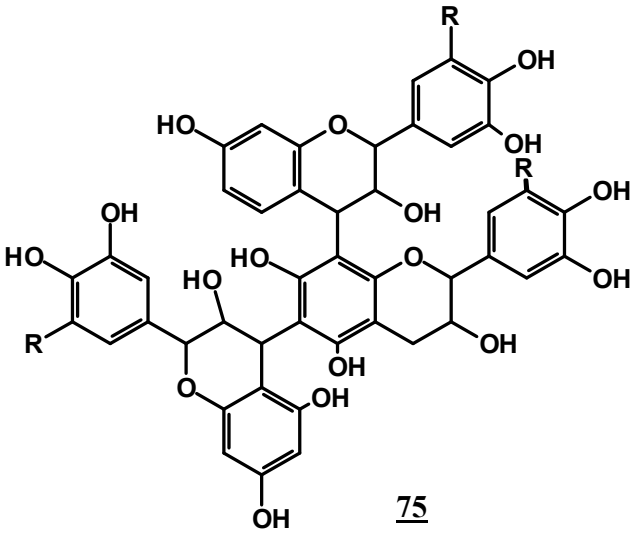
73

Em outro estudo com *M. scabrella*, as galctomananas (**74**) foram submetidas a transformação química com grupamento sulfato. As galactomananas sulfatadas apresentaram atividade antiviral (dengue, febre amarela e herpes) (CHRESTANI, F. e col.).



74

Recentemente, extratos aquosos de espécies de *Mimosa*, ricos em taninos (**75**), foram usados para prevenir processos de corrosão metálica. A partir dos anos noventa, a pesquisa buscando o desenvolvimento destes "inibidores verdes" tem se intensificado. Acredita-se que as moléculas inibidoras interajam por adsorção a superfície metálica formando uma película protetora (GERENGI, H. et al).



75

1.3 Plantas de Gênero *Mimosa* L. com Atividade Biológica ou Usadas Popularmente no Tratamento de Enfermidades

Neste item, pretende-se apresentar espécies de *Mimosa* que são utilizadas pelas populações de diversos lugares do planeta com a intenção de aproveitar suas atividades biológicas. Espécies cuja atividade dos extratos foi comprovada por ensaios biológicos *in vitro* ou *in vivo* ou aquelas que forneceram metabólitos ativos também serão citadas.

► ***M. tenuiflora syn. Mimosa hostilis*** (jurema-preta): a madeira moída é usada no tratamento de queimaduras e prevenção de inflamações. A população utiliza como medicamento para acelerar a regeneração de pele queimada. No México, em 1982, esta planta foi utilizada para aplacar o sofrimento de vítimas da erupção do vulcão Chichional; de queimaduras provocadas pela explosão de uma tubulação de gás natural em San Juanico, 1984; e de tripulantes queimados devido à queda e incêndio de uma linha aérea em Toluca, 1986 (DOMINGUEZ e col., 1989; YULIN e col., 1991). Os índios Pancarú do interior do estado de Pernambuco usam-na em rituais místico-religiosos. A bebida é preparada a partir das raízes da planta e é chamada "vinho de jurema". Segundo os praticantes do ritual, ocorre o transporte do indivíduo para mundos estranhos possibilitando o contato com a alma dos mortos. Essa bebida foi imortalizada no romance "Iracema" do escritor brasileiro, José de Alencar (PACHTER e col., 1959).

► ***M. verrucosa***: utilizada por tribos indígenas para preparação de uma bebida potencialmente alucinógena (GUPTA e ARIAS, 1979); usada como sedativo, febrífugo e contra ulceras; atividade antioxidadante dos extrato metanólico e aquoso (DESMARCHELIER e col., 1999);

► ***M. pudica***: na Índia, o extrato das raízes é utilizado como remédio contra picadas de cobra, *Naja kaouthia*, (MAHANTA e MUKHERJEE, 2001); as folhas e o caule são utilizados contra picadas de escorpião (GIRISH e col., 2004); tratamento de dor de cabeça, insônia, diarréia e febre. (NGO BUM e col., 2004);

► ***M. artemisiana*** (jurema-branca): também usada no preparo de bebida alucinógena; (http://www.socioambiental.org/website/pib/epi/pankaru/rit.shtm; http://www.socioambiental.org/website/pib/epi/tumbalala/ritual.shtm); atividade antioxidante *in vitro* dos extratos em acetato de etila, *n*-butanol e em metanol, usando o radical livre DPPH.

2 OBJETIVOS

♦ Este trabalho pretende contribuir para o conhecimento da composição química da espécie vegetal *Mimosa artemisiana* (Leguminosae-Mimosoideae) através do isolamento de metabólitos especiais.

♦ Chegar ao isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos envolvendo principalmente métodos cromatográficos e espectrométricos. Se for necessário estas substâncias poderão ser submetidas a transformações químicas.

♦ Avaliar as atividades biológicas dos extratos e das substâncias abundantes. Isto poderá ser feito por pesquisadores especialistas de outros departamentos da UFRRJ e de outras instituições.

♦ Contribuir com o cadastramento fitoquímico das espécies da flora nacional, para ser utilizado futuramente em taxonomia química das famílias, estudo de Evolução e Ecologia Química e em outras áreas de conhecimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e Reagentes

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C, uni- e bi-dimensionais, foram registrados em espectrômetro Jeol Eclipse, operando a uma freqüência de 400 MHz para ^{1}H e 100 MHz para ^{13}C e em espectrômetro Bruker Avance III^{TM} operando a uma freqüência de 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C. Os solventes utilizados foram: $CDCl_3$, D_3COD e $DMSO_{d6}$, utilizando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em *ppm* e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer FT-IR 1600 em pastilhas de KBr. Os espectros de massas foram obtidos no aparelho GC/EM - QP-5050 Shimadzu com ionização com impacto de elétrons a 70 eV. Os pontos de fusão, sem correção, foram obtidos em aparelho MQAPF - 301 da Microquímica. A concentração dos extratos e frações foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Buchi B-480 e Fisatom 802. Análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi realizada em cromatofolhas de sílica gel 60 GF_{254}, RP-18 F_{254s} e Celulose (Merck). As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 e 365 nm e/ou aspersão com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento, ou solução alcoólica de cloreto férrico hexaidratado com leitura no instrumento Bel Photoonics 1105). Os critérios de pureza adotados foram a observação de uma única mancha em (CCDA), variando-se a fase móvel. Nas separações cromatográficas em coluna (CC), foram utilizados dois tipos de sílica: sílica gel 60 G (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM) Merck e Vetec e sílica gel 60 G (0,04-0,063 mm; 230-400 mesh ASTM e MERCK). Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em cromatógrafo Shimadzu modelo SPD-M10A, com módulo comunicador modelo CBM10, coluna de fase reversa C18 e detector de massas Shimadzu MS2010.

3.2 Coleta do Material Vegetal

O espécime de *M. artemisiana* em estudo foi coletado no Município de Paracambi pelo Engenheiro Florestal Fábio de A. Fonseca. As partes estudadas foram folhas e galhos.

3.3 Preparo dos Extratos das Folhas de *M. artemisiana*

As folhas secas (495,8 g) foram submetidas à extração com *n*-hexano por maceração exaustiva. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório e após seco em dessecador forneceu 15 g de material.

Em seguida iniciou-se a extração com metanol, também por maceração exaustiva. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida fornecendo 35 g de extrato.

3.4 Preparo do Extrato da Madeira de *M. artemisiana*

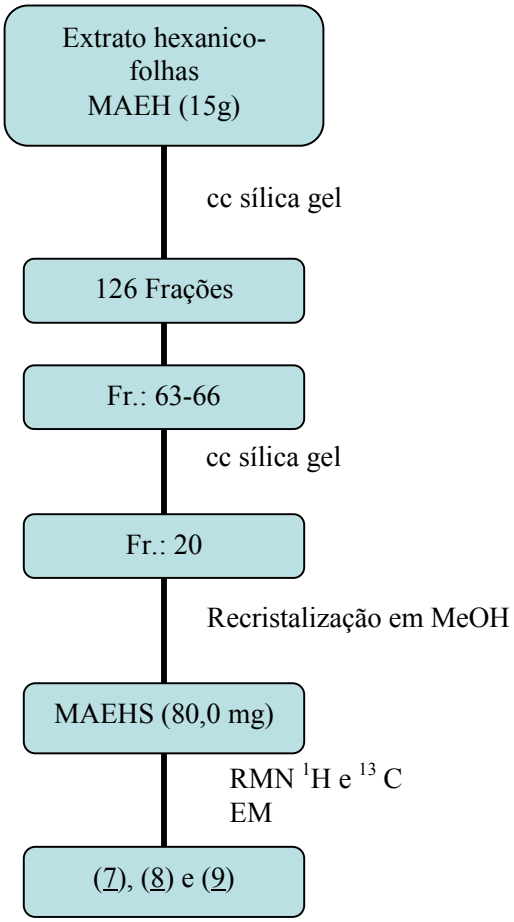
A madeira seca e moída de *M. artemisiana* (3,5 kg) foi submetida à maceração exaustiva com metanol à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e após seco forneceu 70 g de extrato bruto.

3.5 Fracionamento dos Extratos

3.5.1 Extrato hexânico de folhas

O extrato hexânico (**MAFH,** 15 g) foi fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como fase móvel hexano puro, hexano:acetato de etila (10%, 20%, 30% de acetato de etila) e acetato de etila puro. 126 frações (15 ml cada) foram recolhidas e reunidas segundo a semelhança observada na análise por cromatografia de camada fina. As frações 63-66 foram reunidas e submetidas a cromatografia em coluna com gel de sílica utilizando como fase móvel hexano:diclorometano em ordem crescente de polaridade (0%, 10%, 20%, 30%, 50% e 100% de diclorometano), fornecendo 50 frações de 10 ml. A subfração 20 forneceu um precipitado que foi separado e recristalizado em metanol. Forma obtidos 80,0 mg de um material cristalino (**Esquema 1**). A análise dos espectros permitiu reconhecer a presença dos esteróides: sitosterol (**7**), estigmasterol (**8**) e campesterol (**9**).

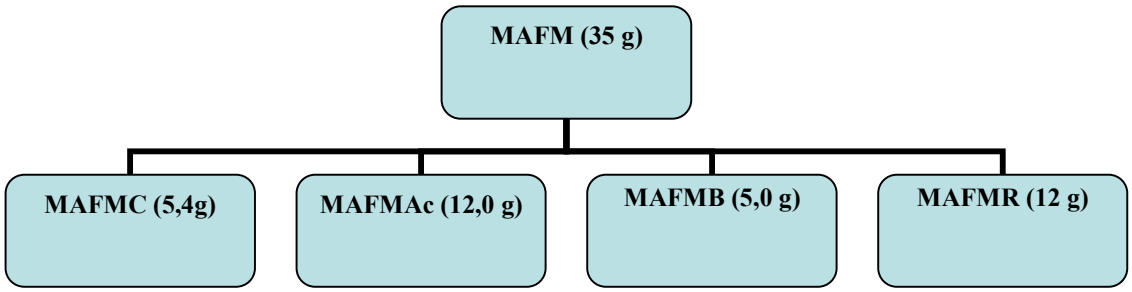
Esquema 1: Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *M. artemisiana*.



3.5.2 Extrato metanólico de folhas

O extrato metanólico de *M. artemisiana* **MAFM** (35 g) foi solubilizado em metanol:água (1:1) e submetido a sucessivas extrações com clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente, obtendo-se as frações **MAFMC** (5,4 g), **MAFMAc** (12,0 g), **MAFMB** (5,0 g) e o resíduo **MAFMR** (12 g) (**Esquema 2**).

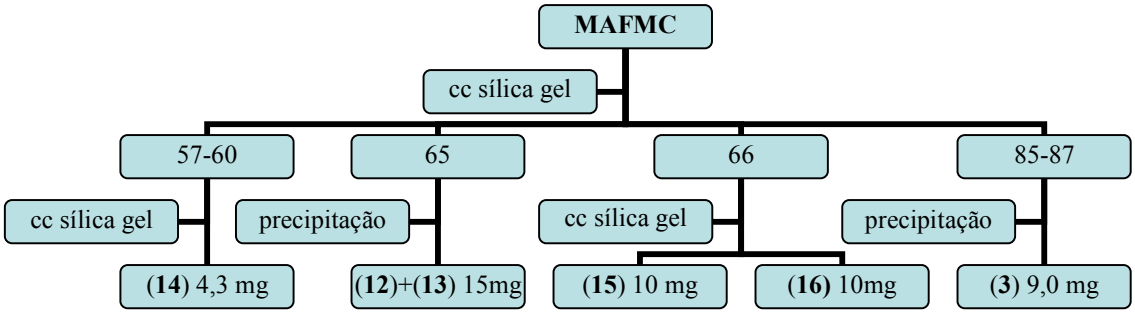
Esquema 2: Partição do extrato metanólico de *M. artemisiana.*



3.5.2.1- Estudo da partição em clorofórmio

A fração **MAFMC** (5,4 g) foi submetida a cromatografia em coluna com gel sílica, eluída com mistura de hexano:acetato de etila em ordem crescente de polaridade (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100% de acetato de etila). Foram recolhidas 100 frações (20 ml cada). Após análise em cromatografia de camada fina, foram selecionadas as subfrações 57-60, 65, 66 e 85-87 para estudo. O grupo de subfrações 57-60 (40 mg) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica (técnica flash) sendo eluída com diclorometano. As frações 15-19 forneceram uma substância que foi identificada como o indol-3-carboxilato de metila (**14**) (4,3 mg). A fração 66 (37 mg) foi submetida ao mesmo procedimento acima fornecendo nas frações 12-16 a substância (**16**) e nas frações 20-32 o indol-3-carboxialdeído (**15**). A fração 65 forneceu um precipitado amarelo que após filtração forneceu as substâncias (**12**) e (**13**). O grupo de frações 85-87 também forneceu um precipitado amarelo que foi separado por filtração e identificado como o flavonóide (**3**) (**Esquema 3**).

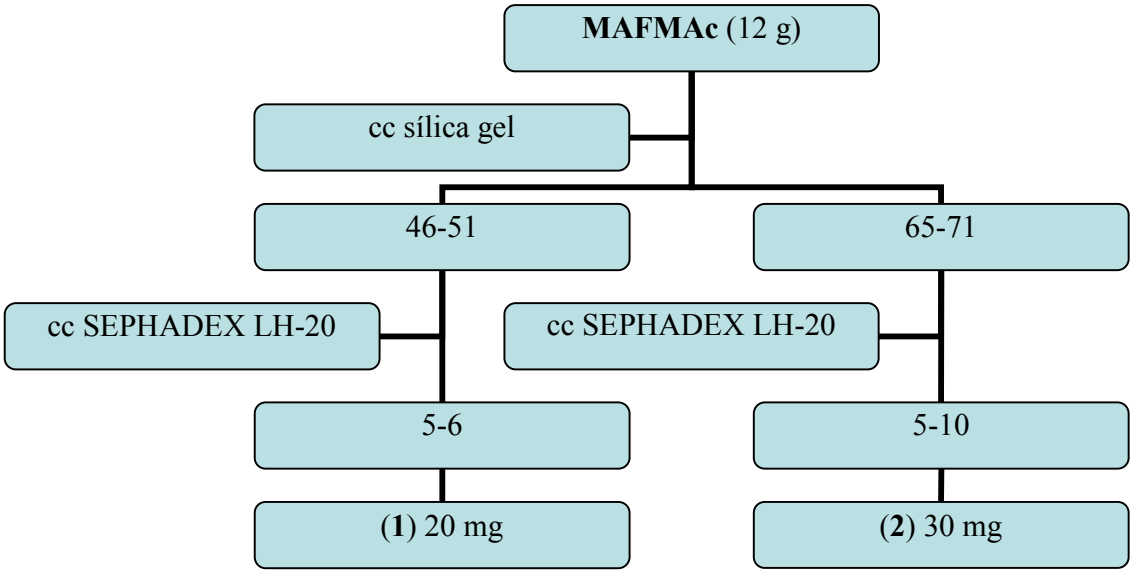
Esquema 3: Fracionamento da partição em clorofórmio.



3.5.2.2- Estudo da partição em acetato de Etila

A fração **MAFMAc** (12 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica usando como eluente mistura de $CHCl_3$:CH_3OH em ordem crescente de polaridade (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 100% de metanol). Recolheram-se 119 frações (15 ml cada fração), que foram reunidas após análise em cromatografia de camada fina. Nas frações 46-51 foi observada a formação de um precipitado amarelo (35,0 mg). Essa fração foi submetida à cromatografia de coluna com sephadex LH-20, eluida com metanol e foram recolhidas 36 frações (10 ml cada fração). As frações 5-6 (20 mg) forneceram um precipitado amarelo, solúvel em metanol, e revelou teste positivo para substâncias fenólicas na reação com o reagente cloreto férrico. Estas foram reunidas e, após analise com RMN ^{1}H e ^{13}C, identificou-se a quercetina-3-O-raminosídeo (**1**). As frações 65-71 (57 mg) também revelaram teste positivo para substâncias fenólicas com o reagente cloreto férrico e forneceu um precipitado alaranjado. Este material foi submetido a cromatografia em sephadex LH-20 eluído com metanol e recolheram-se 40 frações. As frações 5-10 forneceram um precipitado amarelo (30 mg, PF 189-192 ^{o}C) que, após análise com RMN de ^{1}H e ^{13}C e comparação com valores da literatura, permitiu identificar este material como a miricetina-3-O-raminosídeo (**2**) (**Esquema 4**).

Esquema 4: Fracionamento da partição em acetato de etila.

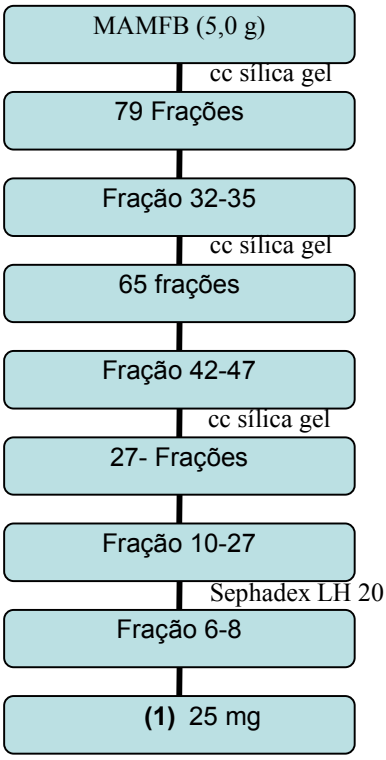


3.5.2.3- Estudo da partição em *n*-butanol

O resíduo seco obtido a partir da partição com *n*-butanol foi chamado **MAMFB** (5,0 g). Este extrato foi fracionado em coluna de sílica gel 60, usando como fase móvel a mistura acetato de etila:metanol (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 100%). Foram recolhidas 79 frações (100 mL aproximadamente) (**Esquema 5**). As frações foram agrupadas segundo a semelhança observada em CCF.

A fração **MAMFB 32-35** foi cromatografada em sílica gel 60 utilizando com fase móvel clorofórmio:metanol em ordem crescente de polaridade (10%, 30%; 50%; 70%; 100%). 65 frações foram recolhidas e reunidas após análise em CCF. A fração 42-47 foi submetida a uma cromatografia de coluna em sílica gel, usando com fase móvel a mistura clorofórmio:metanol em ordem crescente de polaridade (10%, 30%; 50%; 70%; 100%). Foram recolhidas 27 frações. A fração 10-27 foi cromatografada em coluna de Sephadex LH 20 para fornecer nas frações 6-8 um sólido amorfo (15,0 mg). A amostra foi seca e enviada para a obtenção dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C. Após a análise dos dados de RMN, concluiu-se que a amostra tratava-se da substância (**1**).

Esquema 5: Fracionamento do resíduo obtido através da partição com *n*-butanol.



3.5.3- Extrato metanólico dos galhos

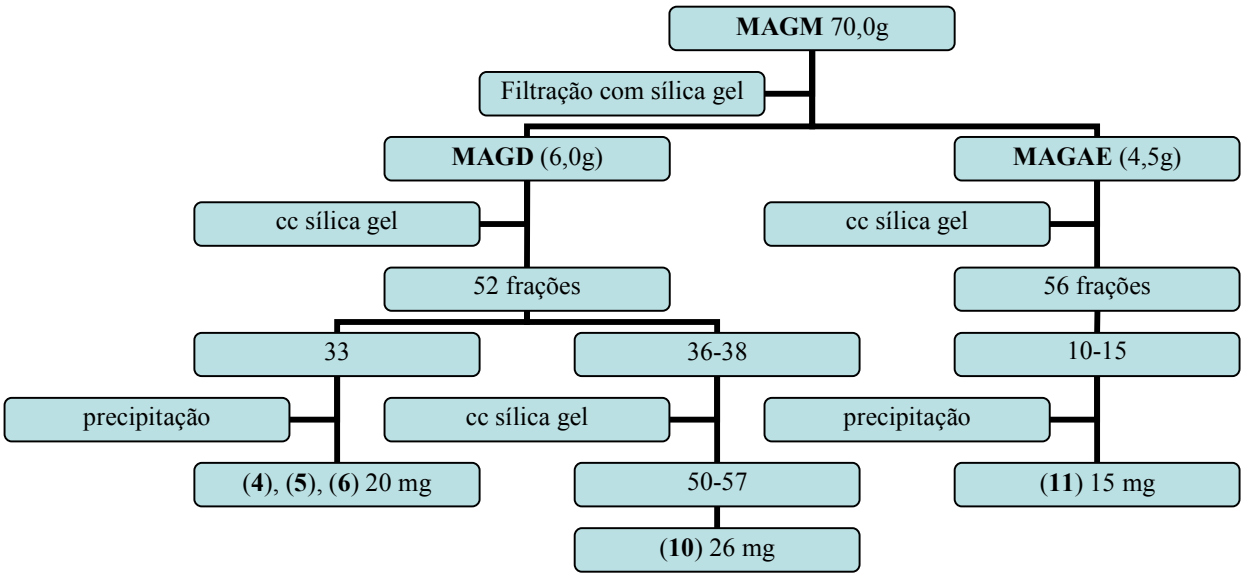
O extrato metanólico de galhos de *M. artemisiana* (**MAGM,** 70,0 g) foi adsorvido em sílica para coluna (1:1). A mistura obtida foi aplicada sobre uma camada de sílica para coluna em funil de Buchner e filtrado a pressão reduzida com diclorometano, acetato de etila, acetato de etila:metanol (7:3) e metanol (100 %). As soluções obtidas com cada solvente foram concentrados com destilação à pressão reduzida e secos. As frações obtidas foram codificadas da seguinte forma: **MAGD** (fração em diclorometano), **MAGAE** (fração em acetato de etila), **MAGAEM** (fração em acetato de etila:metanol) e **MAGM** (fração em metanol).

3.5.3.1- Estudo da partição em diclorometano e em acetato de etila

O resíduo proveniente da filtração com diclorometano (**MAGD**; 6,0 g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica usando mistura de hexano/diclorometano (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, e 100% de diclorometano) como eluente e recolhidas 52 frações (20 ml cada fração). As frações foram reunidas segundo a semelhança observada em cromatografia de camada fina e escolheram-se as frações MAGD-33 e MAGD-36-38 para estudo. A fração MAGD-33 forneceu um sólido branco impuro que, após análise com espectro de RMN de ^{1}H e ^{13}C e espectrometria de massas acoplada a cromatografia a gás; conduziu à identificação da mistura dos esteróides (**4**), (**5**) e (**6**). A fração MAGD-36-38 foi cromatografada em coluna de gel

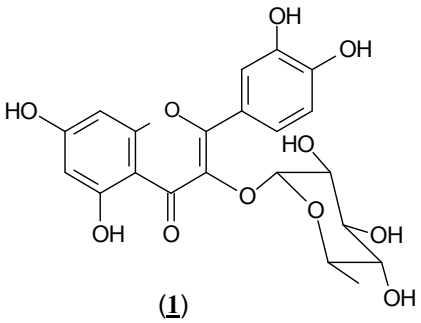
de sílica, utilizando diclorometano como eluente e recolheram-se 87 frações. Estas foram reunidas de acordo com semelhança por análise em cromatografia de camada fina. O grupo de frações 50-57 forneceu um sólido cristalino branco (26,0 mg) cuja análise dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C e espectro de massas foi identificado como lupeol (**10**). A fração **MAGAE** (4,5 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica e eluida com mistura de hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade até acetato de etila 100%. Foram recolhidas 56 frações (20 ml cada fração). As frações 10-15 forneceram um precipitado branco amorfo (15 mg) que apresentou coloração azul-violácea quando revelado com Reagente de Liebermann-Buchard cuja análise do espectro de RMN ^{1}H e ^{13}C conduziu à identificação do glicosídeo (**11**) (**Esquema 6**).

Esquema 6: Estudo da partição em diclorometano e em acetato de etila.

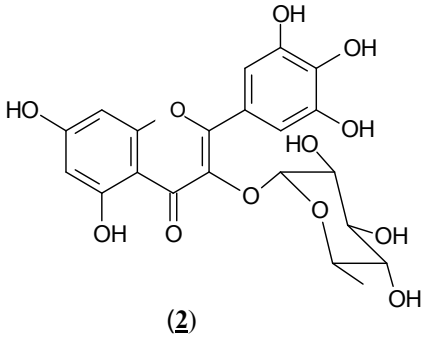


Resultados:

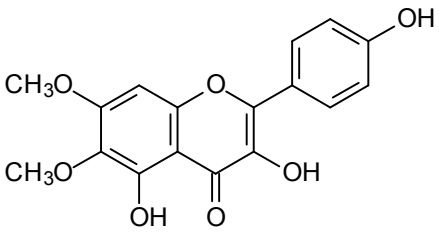
O estudo do metabolismo especial de ***M. artemisiana*** levou ao isolamento e identificação das seguintes substâncias:



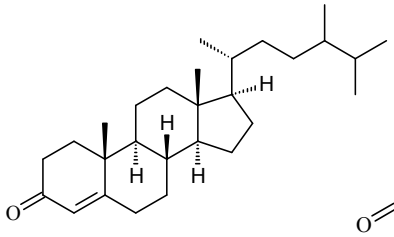
(**1**)



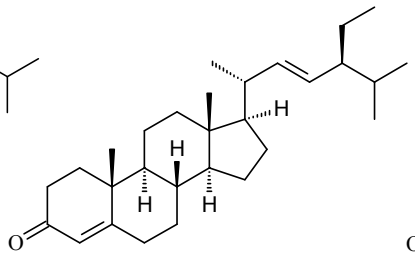
(**2**)



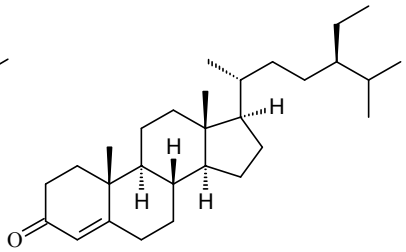
(**3**)



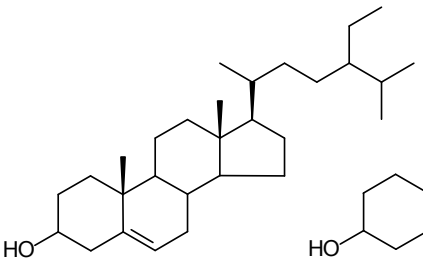
(**4**)



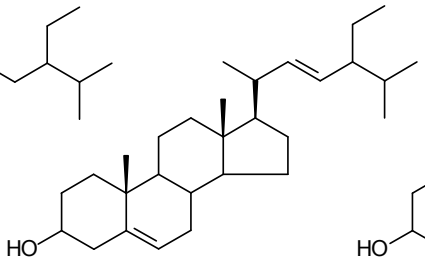
(**5**)



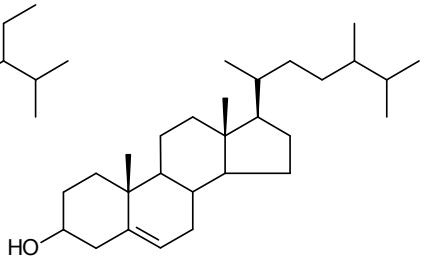
(**6**)



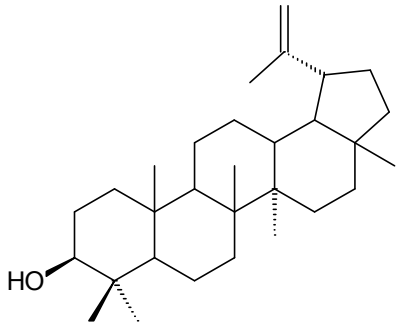
(**7**)



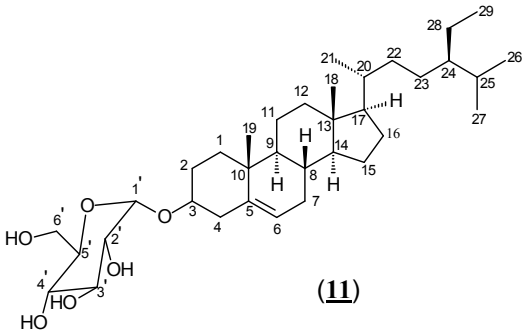
(**8**)



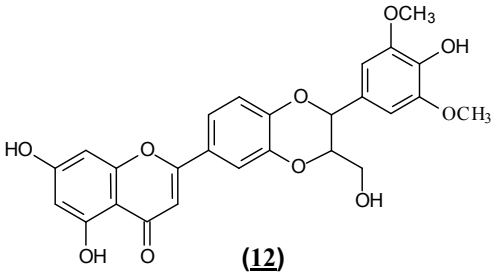
(**9**)



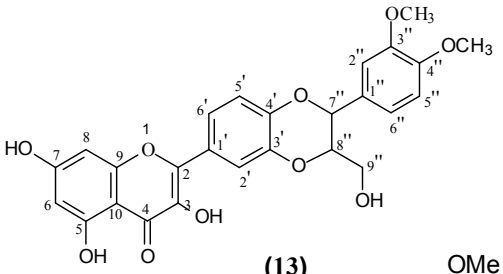
(10)



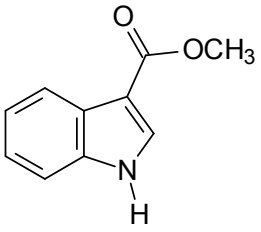
(**11**)



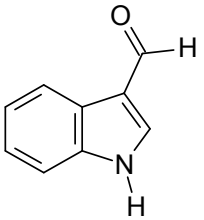
(12)



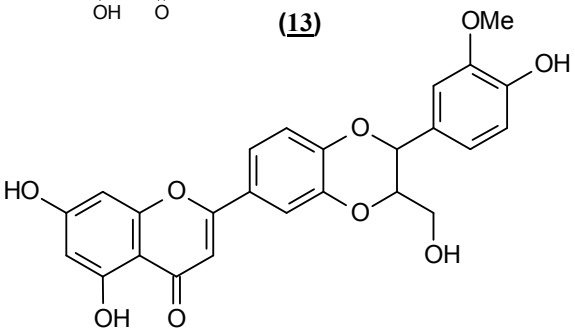
(13)



(14)



(15)

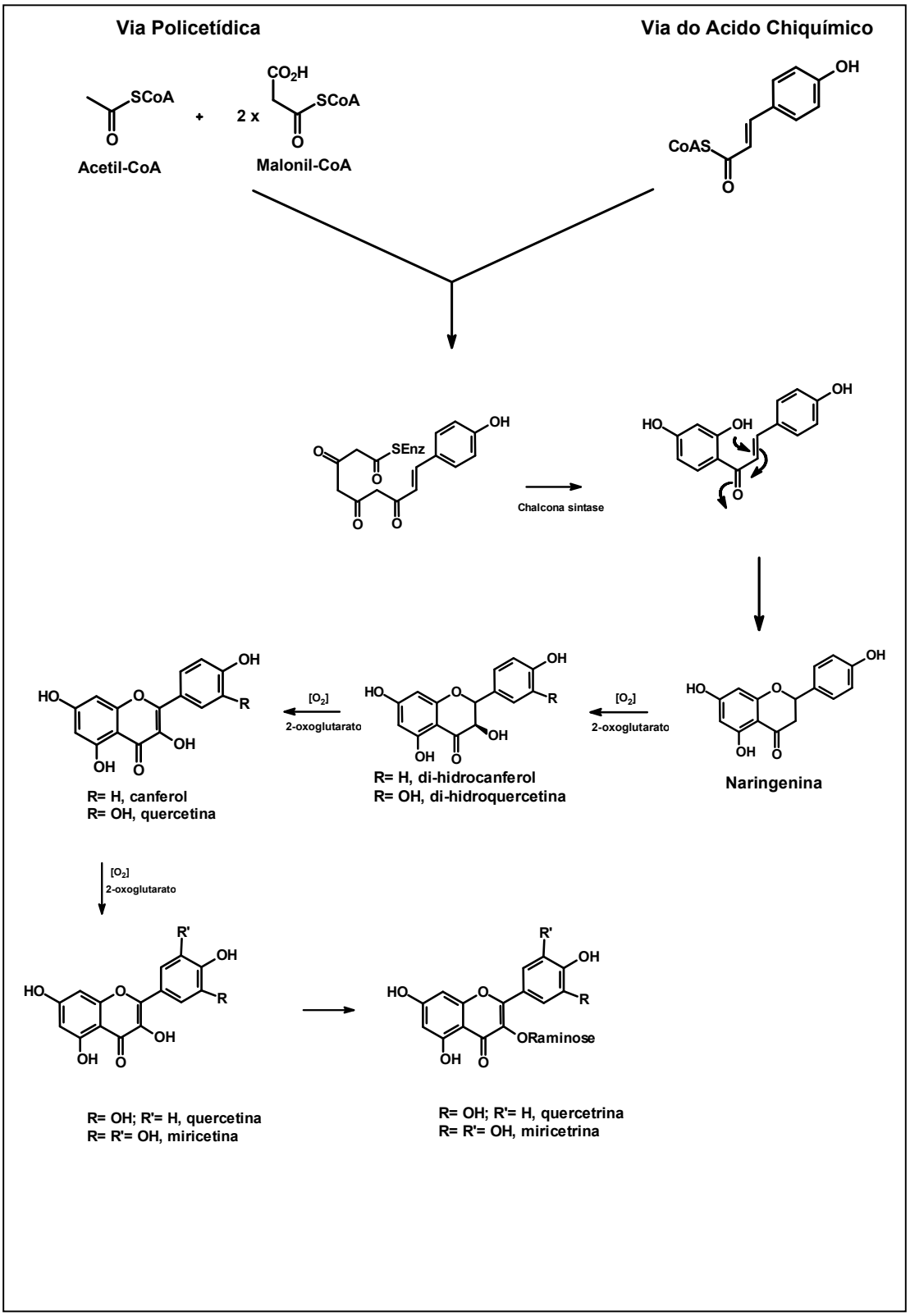


(16)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

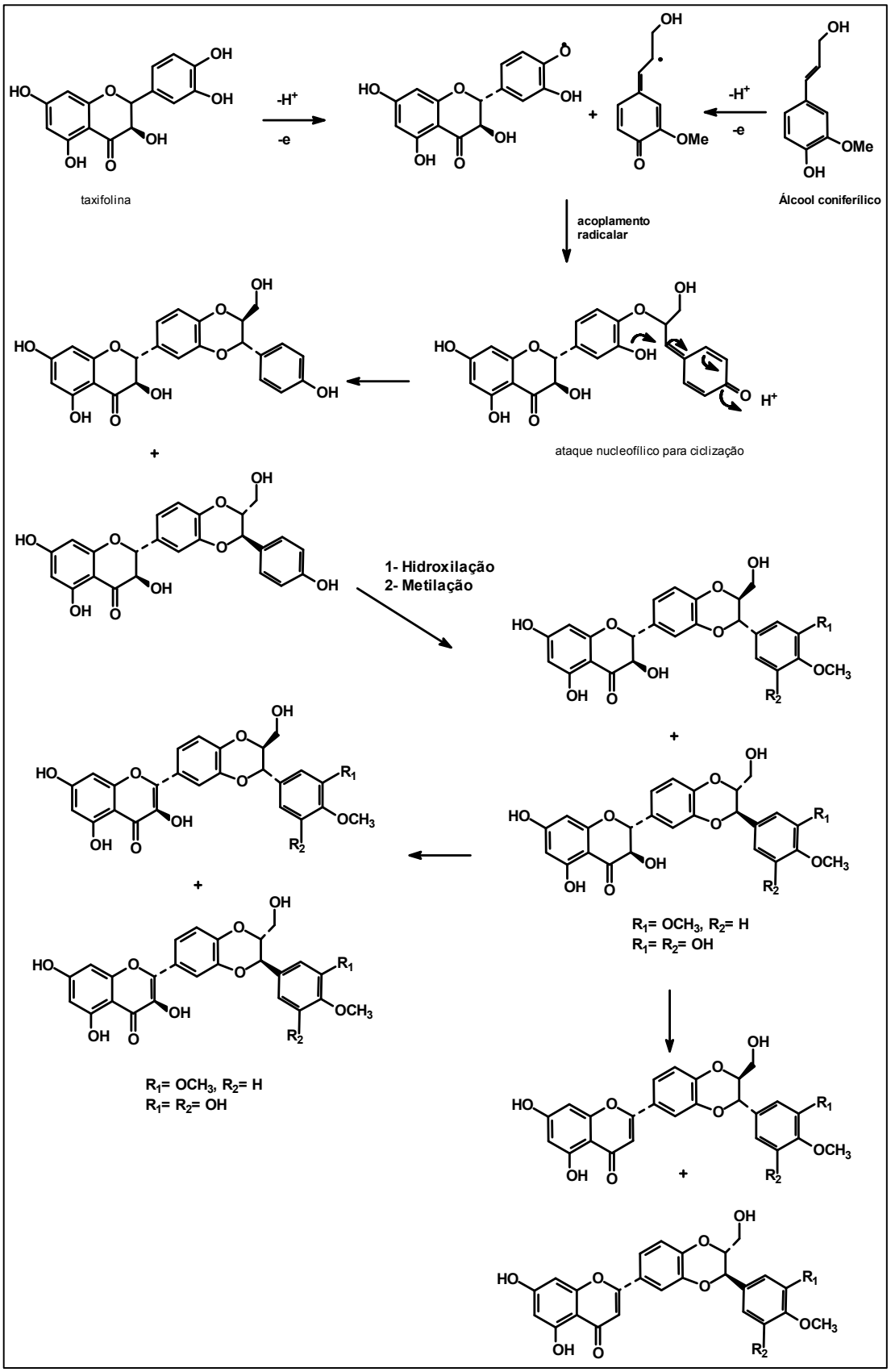
4.1- Considerações Biossíntéticas

Neste trabalho, relatamos o isolamento e a identificação estrutural de flavonóides e flavonolignanas entre outras substâncias. Os flavonóides são biossintetizados a partir de condensação entre o precursor cinamoil-CoA (Via do Chiquimato) e três moléculas de malonil-CoA (Via do Acetato) (**Esquema 7**) (DEWICK, P. M.). O processo inicialmente produz um policetídeo que sob a ação da enzima chalcona sintase é transforamdo em uma chalcona. A chalcona age com precursor de uma vasta quantidade e tipos de flavonóides. Uma etapa chave na biossíntese do esqueleto de uma flavonóide é a formação do anel heterocíclico de seis membros que tem origem no ataque nucleofílico tipo Michael do grupamento fenol sobre a cetona α,β-insaturada produzindo uma flavanona. Diversas transformações no esqueleto da flavanona conduzirão a formação flavonas, flavonóis, antocianidinas, catequinas e outras substâncias da classe dos flavonóides.



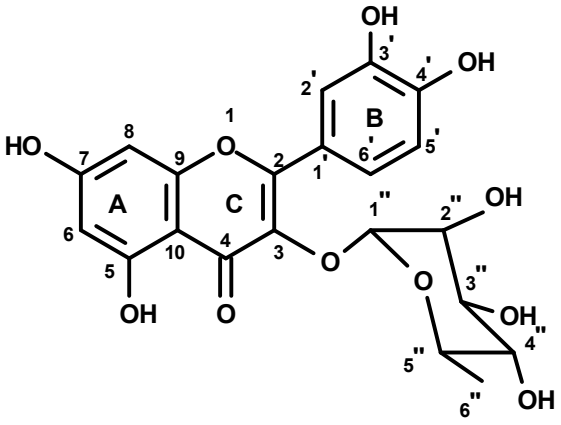
Esquema 7: Biossíntese geral de flavonóides.

As flavonolignanas são compostos formados pela combinação entre um flavonóide e um fenilpropanóide, geralmente álcool coniferílico, através de um processo denominado acoplamento oxidativo. No Esquema: estão representadas algumas etapas do formação do esqueleto de algumas flavonolignanas. O processo tem início com a combinação do radical livre formado a partir do diidroflavonol taxifolina com o radical livre do álcool coniferílico. O acoplamento radicalar leva a formação de um aduto que cicliza através de ataque nucleofílico.



Esquema 8: Biossintese geral de flavonolignanas.

4.2- Determinação Estrutural da Substância 1



A análise dos dados espectrais (IV, RMN ^{1}H e ^{13}C (1D e 2D)) da substância **1** permitiu atribuir a estrutura do flavonóide quercetrina para esta substância.

O espectro na região do infravermelho de **1** (Figura 1) apresentou frequências de absorção, ν (cm^{-1}) em: 3460,31 (banda intensa de deformação axial de em ligação hidrogênio intermolecular); 2926,45 (deformação axial de –OH em ligação hidrogênio intramolecular); 1655,10 (deformação axial de C=O conjugada a anel aromático); 1608,49 (deformação axial de C=C de anel aromático); 1360,46 (deformação angular de C–O–H); 1197,75 (deformação angular Aril–O–H); 1058,47 e 1125,87 (deformação axial C–O–C).

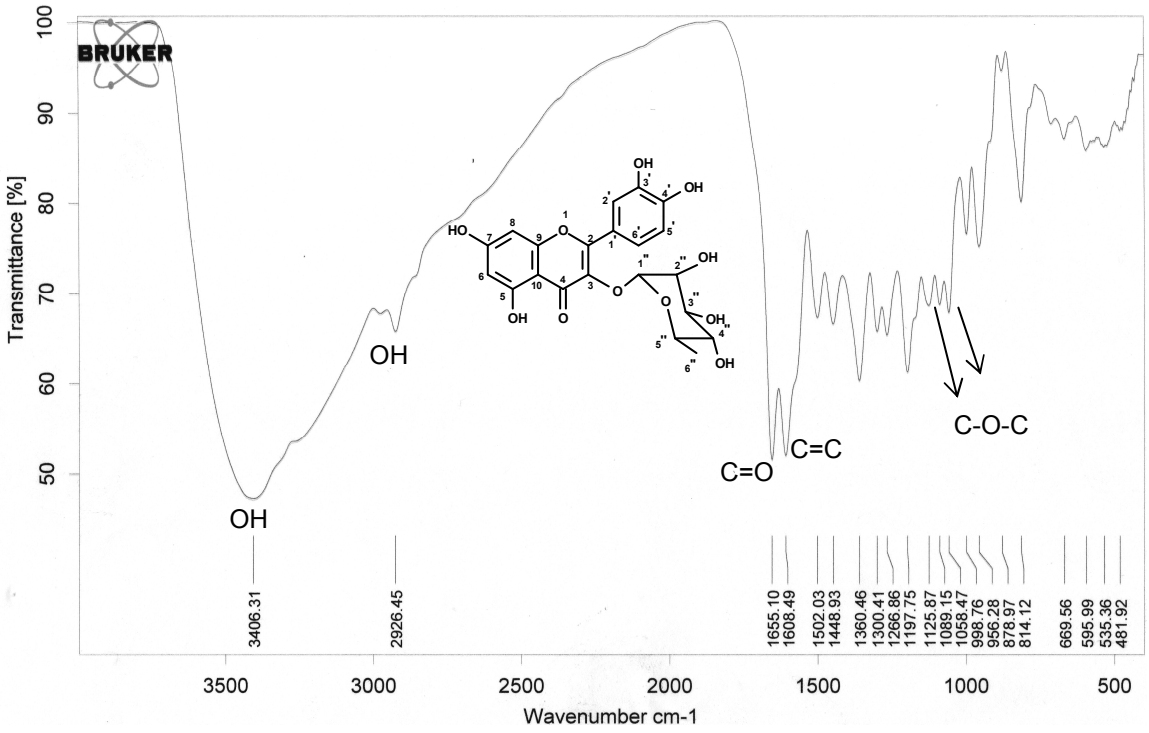


Figura 1: Espectro de infravermelho, em pastilha de KBr, da substância 1.

Os espectros de RMN ^{1}H (1 D) (Figura 2) e 2 D ^{1}H x ^{1}H COSY (Figura 5) do flavonóide **1** revelaram sinais de átomos de hidrogênio típicos dos sistemas AB do anel A e ABC do anel B de um esqueleto de flavonóide. Estes sistemas foram confirmados pelo espectro 2D ^{1}H x ^{1}H COSY onde pode ser observada os sinais de correlação correspondentes às interações spin-spin do H-6 (δ_H 6,19; d; J= 1,8 Hz) com H-8 (δ_H 6,35; d; J= 1,8 Hz) e do H-6' (δ_H 7,29; dd; J_1= 8,3 Hz; J_2= 2,0 Hz) com H-5' (δ_H 6,89; d; J= 8,3 Hz) e H-2' (δ_H 7,32; d; J= 2,0 Hz). O espectro de HMQC (Figura 7, 8 e 9) apresentou correlações ($^{1}J_{CH}$) entre os sinais atribuídos aos H-6 (δ_H 6,19) e H-8 (δ_H 6,35) com os carbonos em δ_C 100,2 (C-6) e δ_C 94,9 (C-8). Com o espectro de HMQC, ainda foi possível estabelecer as correlações diretas ($^{1}J_{CH}$): CH-6' (δ_C / δ_H, 123,0 / 7,29); CH-5' (δ_C / δ_H, 116,52 / 6,89) e CH-2' (δ_C / δ_H, 117,08 / 7,32). As atribuições feitas aos átomos de hidrogênio e carbono dos anéis A e C do flavonóide foram confirmadas no espectro de HMBC (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15): **H-6** (δ_H 6,19) apresenta correlação a duas ligações ($^{2}J_{CH}$) com C-5 (δ_C 163,38) e C-7 (δ_C 166,23); e correlação a três ligações ($^{3}J_{CH}$) com C-10 (δ_C 106,01) e C-8 (δ_C 94,90); **H-8** (δ_H 6,35) apresenta correlação a duas ligações ($^{2}J_{CH}$) com C-7 (δ_C 166,23) e com C-9 (δ_C 158,71); e correlação a três ligações ($^{3}J_{CH}$) com C-10 (δ_C 106,01) e C-6 (δ_C 100,2). Os hidrogênios H-2', H-5' e H-6' apresentaram correlações a longa distância ($^{n}J_{CH}$) com os sinais em 123,13 (C-1') e 159,45 (C-2) evidenciando o padrão de substituição e os valores de deslocamento químico sugeridos. A presença da unidade carboidrática raminose foi sugerida baseada na presença do sinal em δ_H 0,92 (d; J= 6,1 Hz) e δ_C 17,60 atribuídos ao grupamento metila (C-6'') observados nos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (Figura 6). Os sinais em δ_H 5,33 (d= 1,33; J= 1,2 Hz)

e δ_C 103,71 também sugeriram a presença da raminose pois são sinais característicos dos H e C anoméricos desse açúcar substituindo o átomo de H na posição 3-OH. A ligação da unidade de açúcar nessa posição foi confirmada através do espectro de HMBC que mostrou a correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre os sinais em δ_H 5,33 (H-1'') e o sinal em δ_C 136,88 (C-3). As atribuições e correlações dos demais átomos de carbono e hidrogênio da substância estão descritas na Tabela 1 e estão de acordo com os valores encontrados na literatura (AGRAWAL, 1989; SANTOS e col., 2005).

Tabela 1: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) do flavonol glicosilado 1 em CD_3OD.

	HMQC		**HMBC**	
	δ_C	**δ_H [mult; ^nJ (Hz)]**	**$^2J_{CH}$**	**$^3J_{CH}$ e $^4J_{CH}$**
C				
2	159,45	-		H-2'; H-6'; H-5'
3	136,38	-		H-1''
4	179,80	-		H-8
5	163,38	-	H-6	
7	166,23	-	H-6; H-8	
9	158,71	-	H-8	
10	106,01	-		H-6; H-8
1'	123,13	-	H-2'; H-6'	H-5'
3'	146,59	-	H-2'	H-5'; H-6'
4'	149,97	-	H-5'	H-2'; H-6'
CH				
6	100,2	6,19 (d; 1,8)		H-8
8	94,90	6,35 (d; 1,8)		H-6
2'	117,08	7,32 (d; 2,0)		H-6'
5'	116,52	6,89 (d; 8,3)		
6'	123,00	7,29 (dd; 8,3; 2,0)		H-2'
		Carboidrato		
1''	103,71	5,33 (d; 1,2)		
2''	72,06	4,20 (dd; 3,3; 1,2)	H-1''; H-3''	H-4''
3''	72,28	3,73 (dd; 9,5; 3,3)	H-2''; H-4''	H-1''
4''	73,42	3,31 (t; 9,5)	H-3''; H-5''	H-2''; 3H-6''
5''	72,18	3,40 (dq; 9,5; 6,1)	H-4''; 3H-6''	H-1''
6''	17,60	0,92 (d; 6,1)		

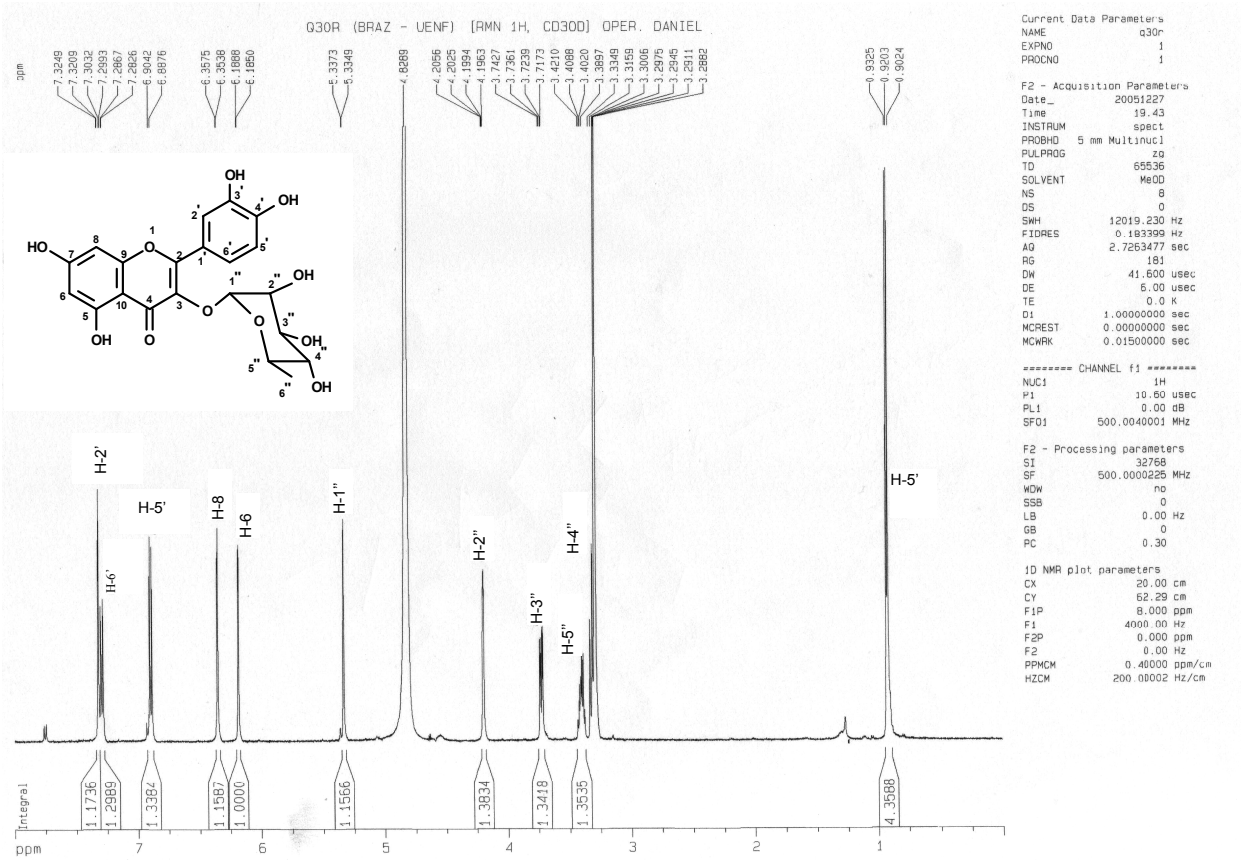


Figura 2: Espectro de RMN (500 MHz) de 1 obtido em metanol-d_4.

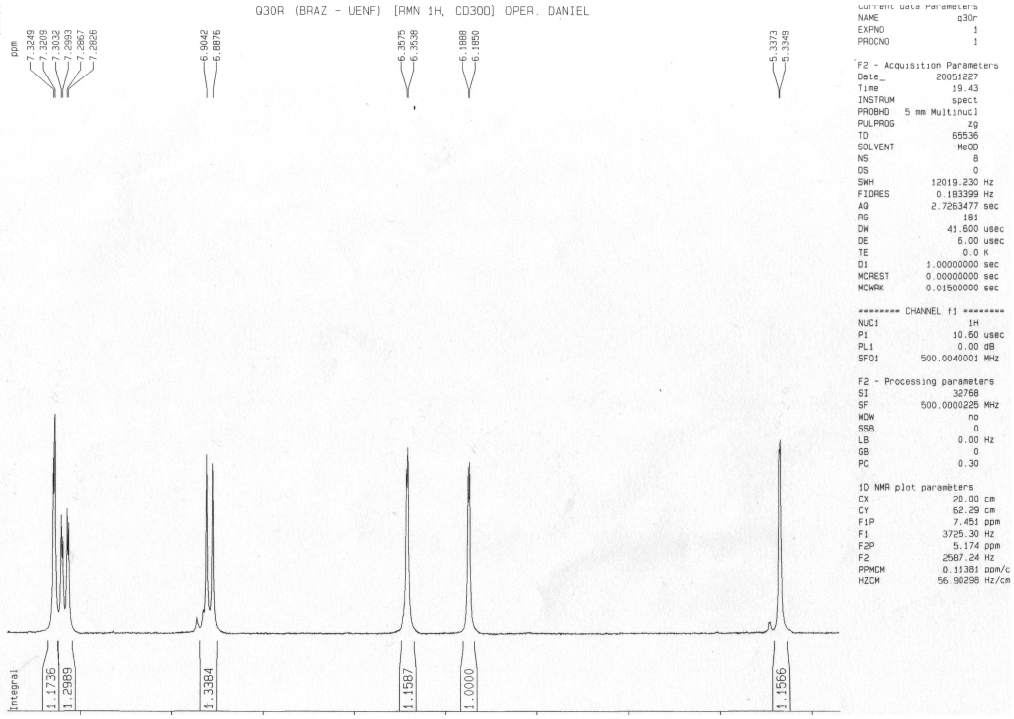


Figura 3: Ampliação de espectro de RMN de ^{1}H de 1 entre δ_H 5,35 e 7,32.

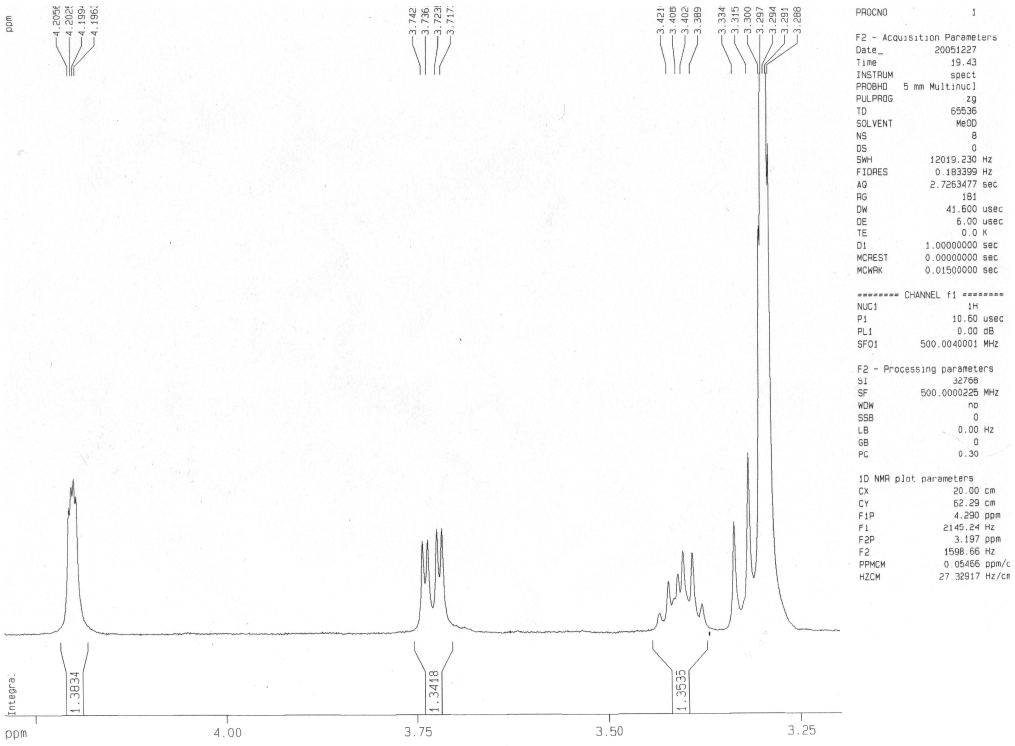


Figura 4: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H de 1, entre δ_H 3,28 e 4,20.

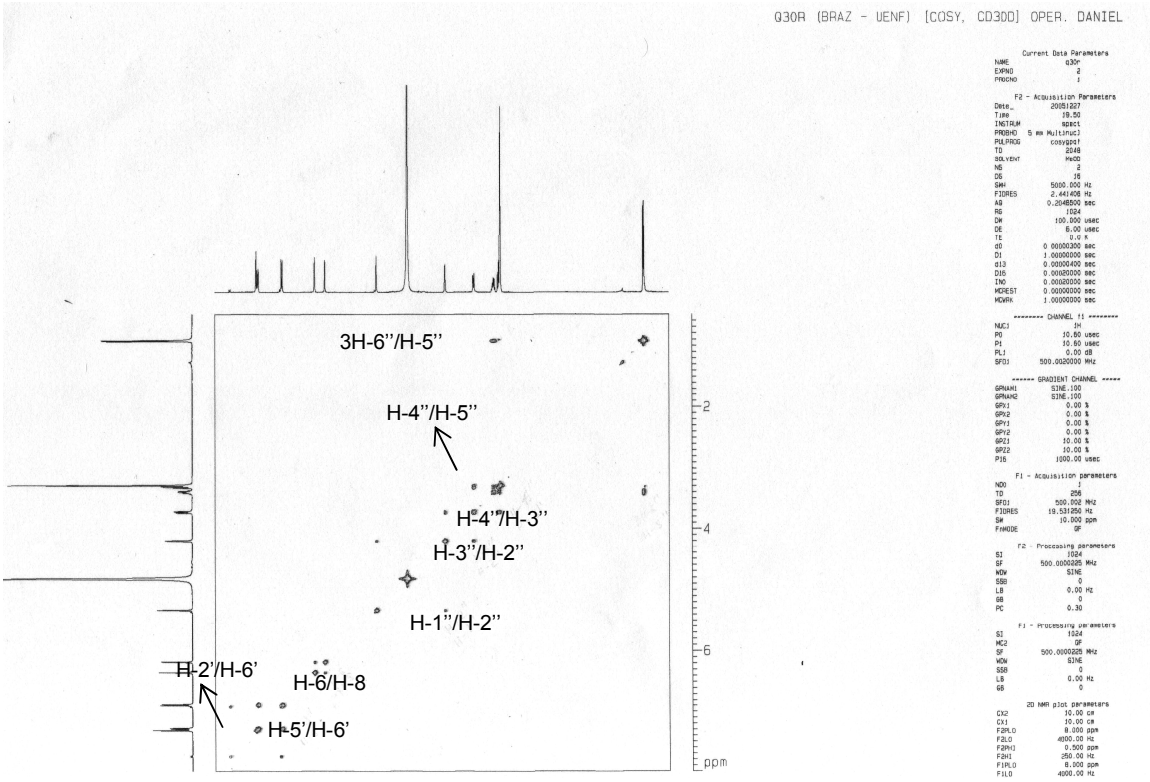
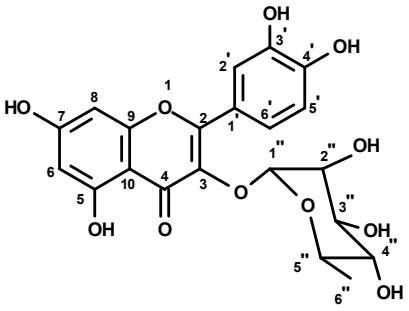


Figura 5: Espectro bidimensional HXH COSY (500 MHz) de 1 em metanol d_4.



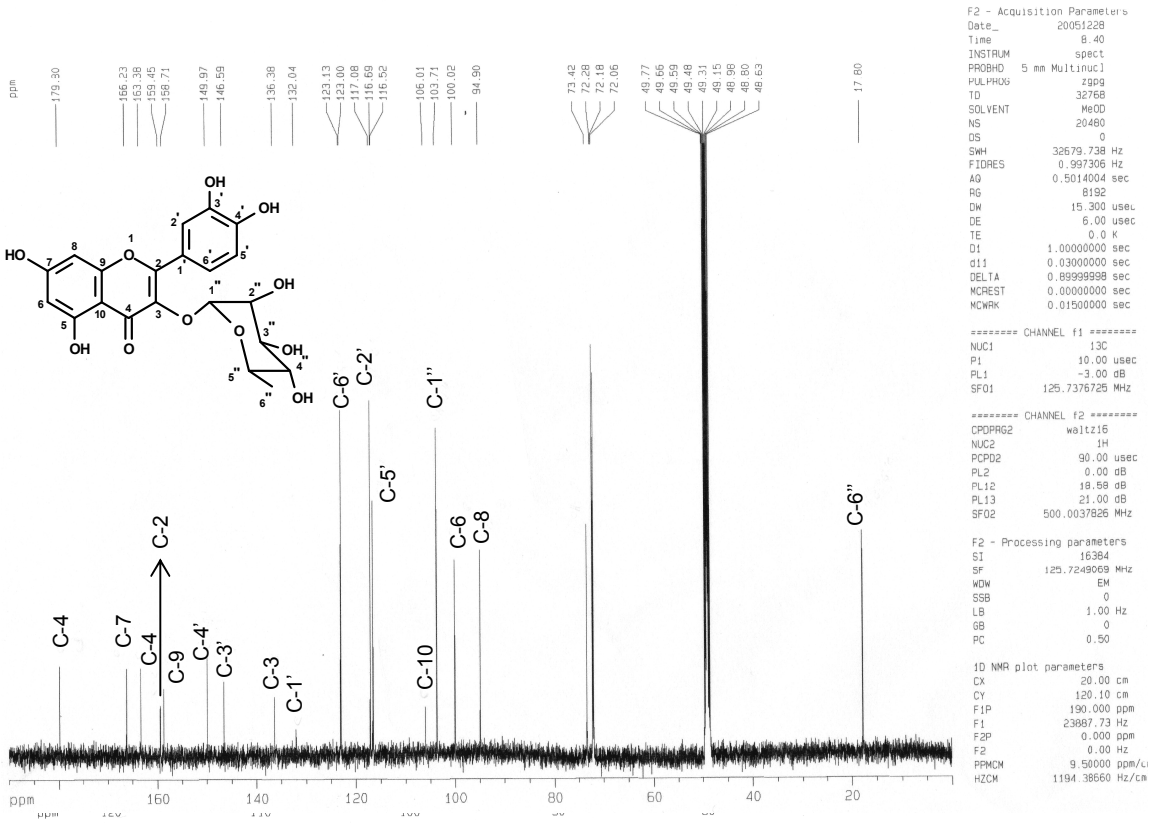


Figura 6: Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125 MHz) obtido em metanol-d_4.

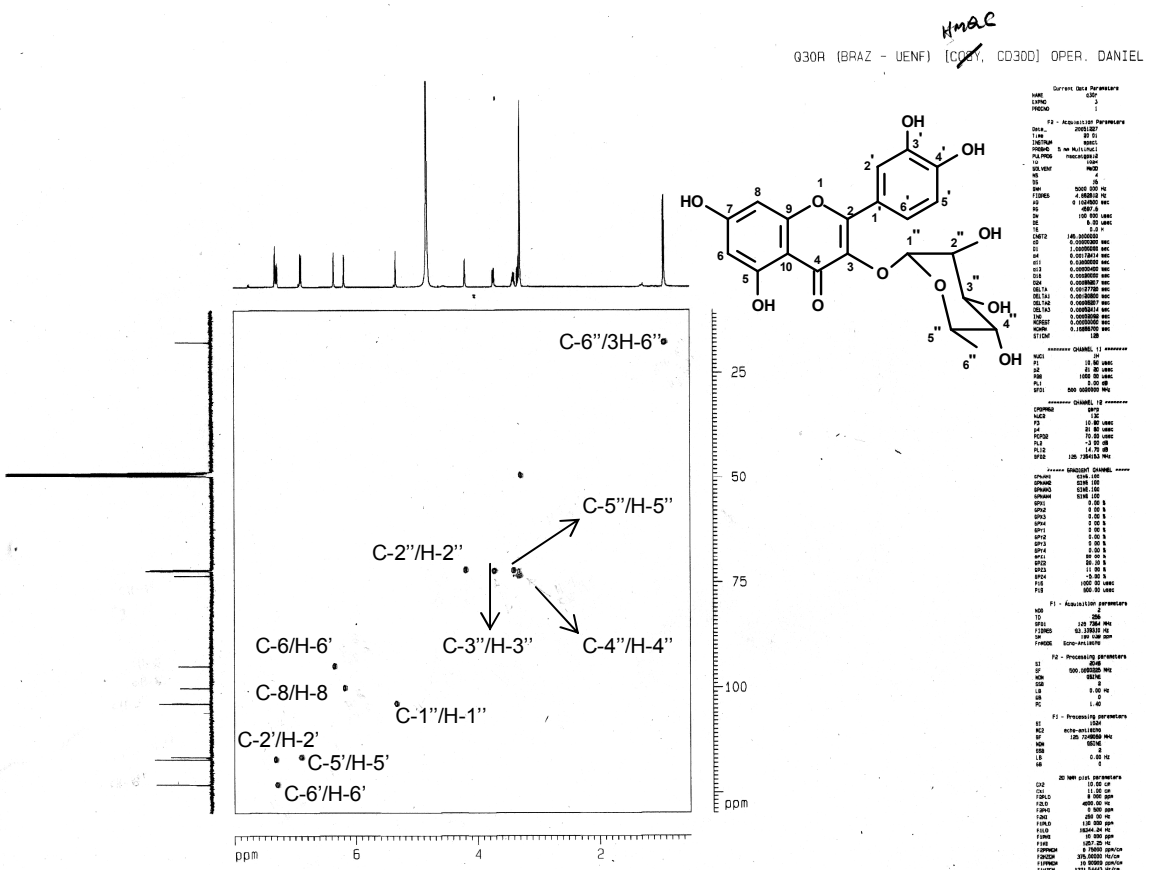


Figura 7: Espectro bidimensional (HMQC) de <u>1</u>.

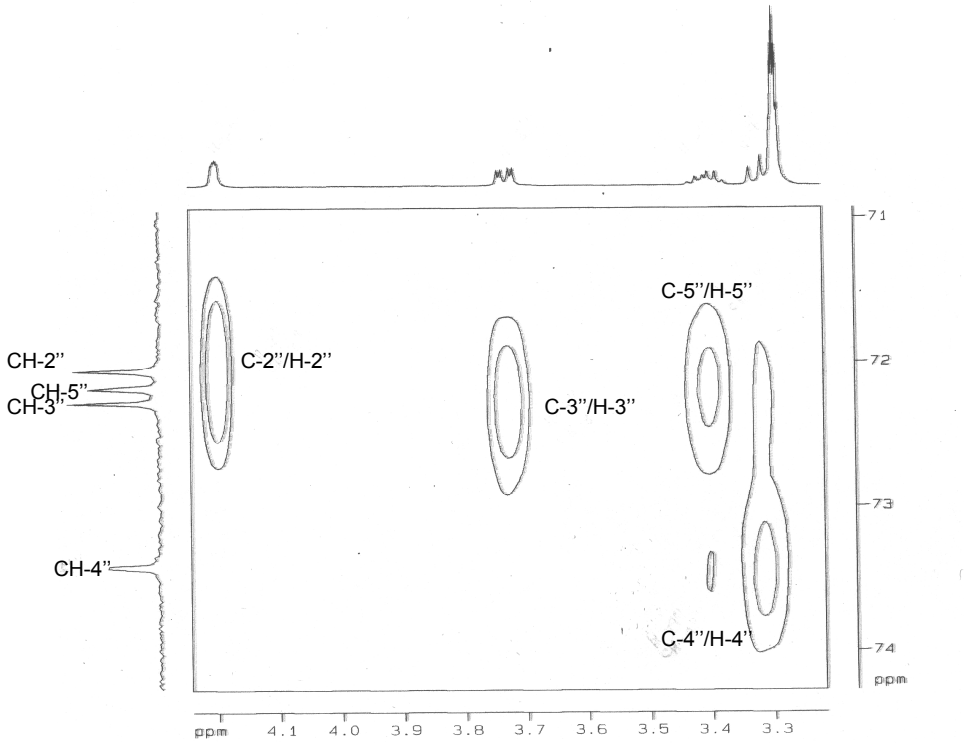


Figura 8: Ampliação do espectro de HMQC de 1.

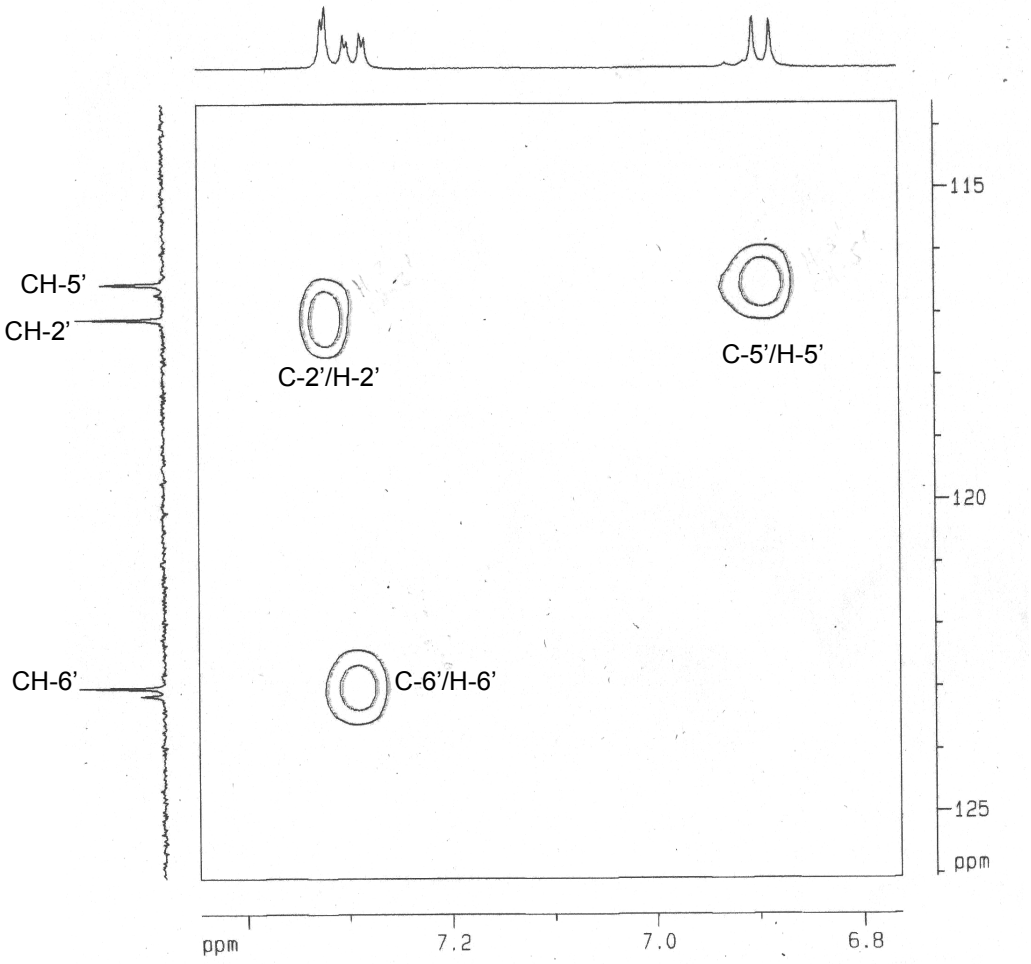


Figura 9: Ampliação do espectro bidimensional HMQC de 1.

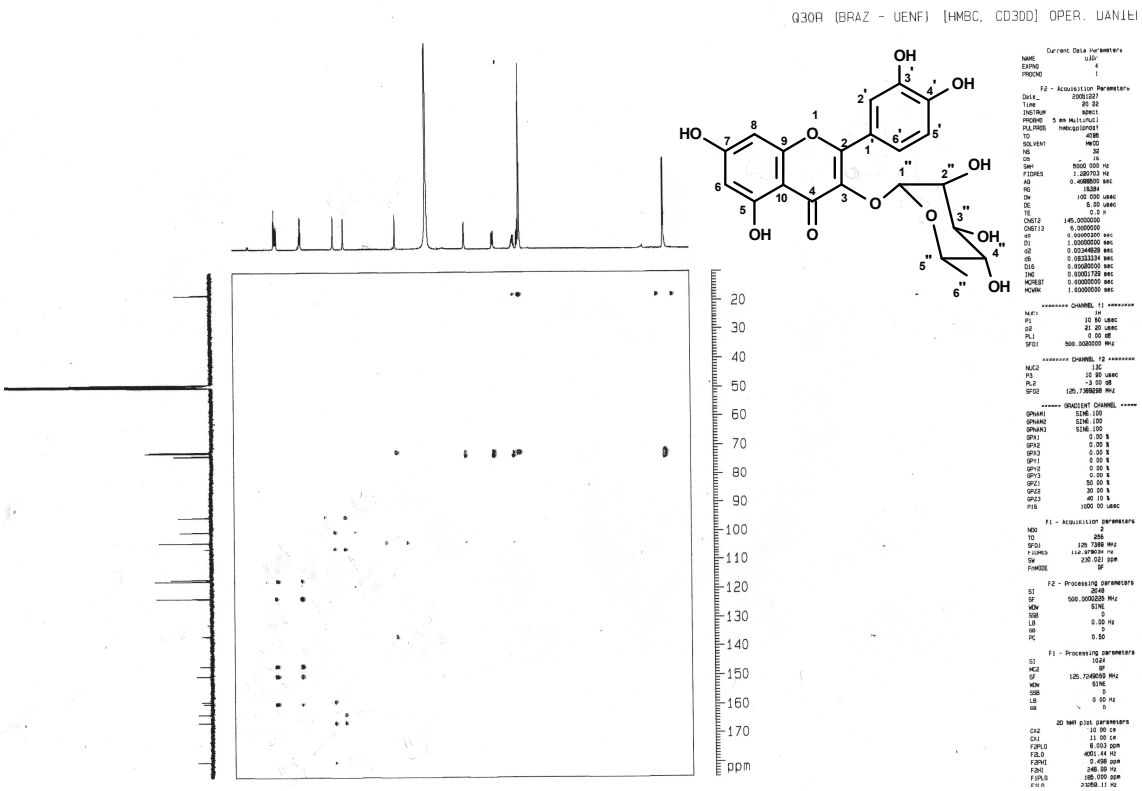


Figura 10: Espectro bidimensional (HMBC) de 1.

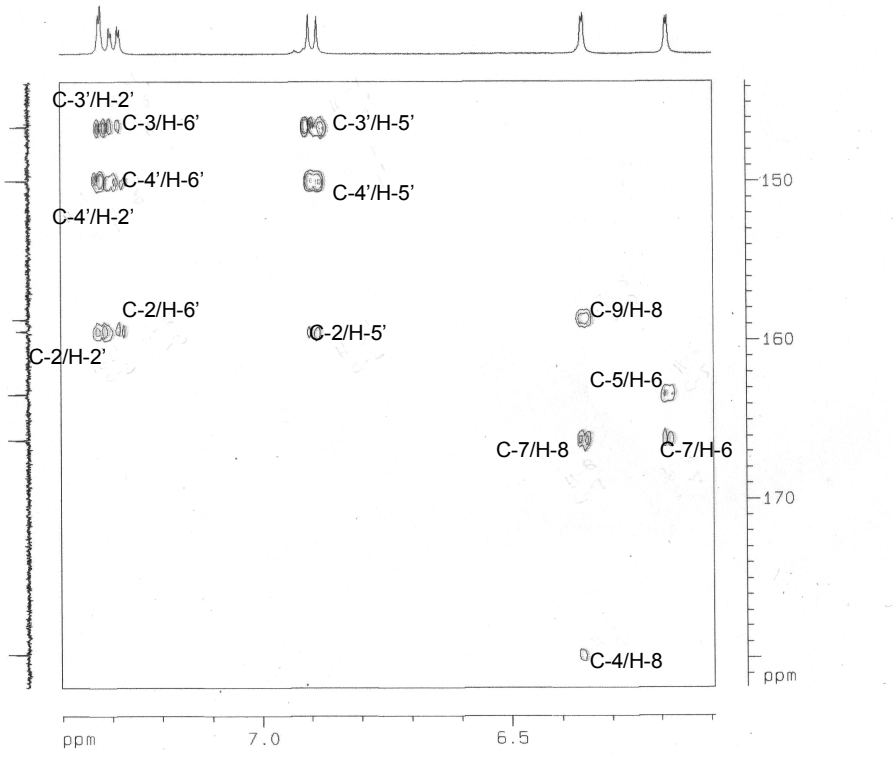


Figura 11: Ampliação do espectro de HMBC de 1.

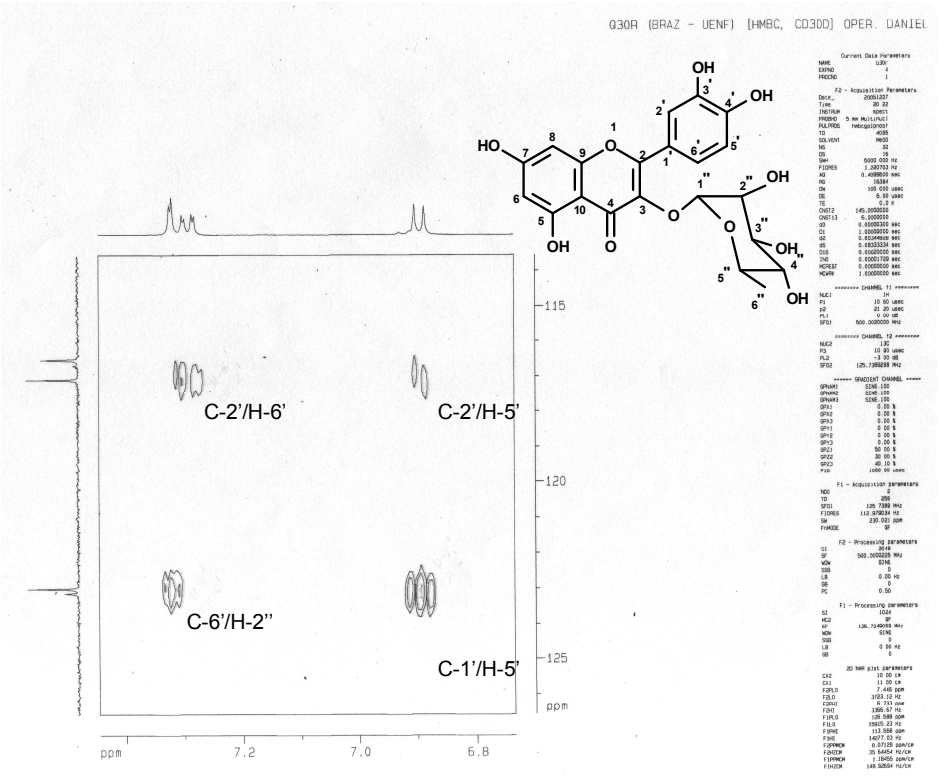


Figura 12: Ampliação do espectro de HMBC de 1.

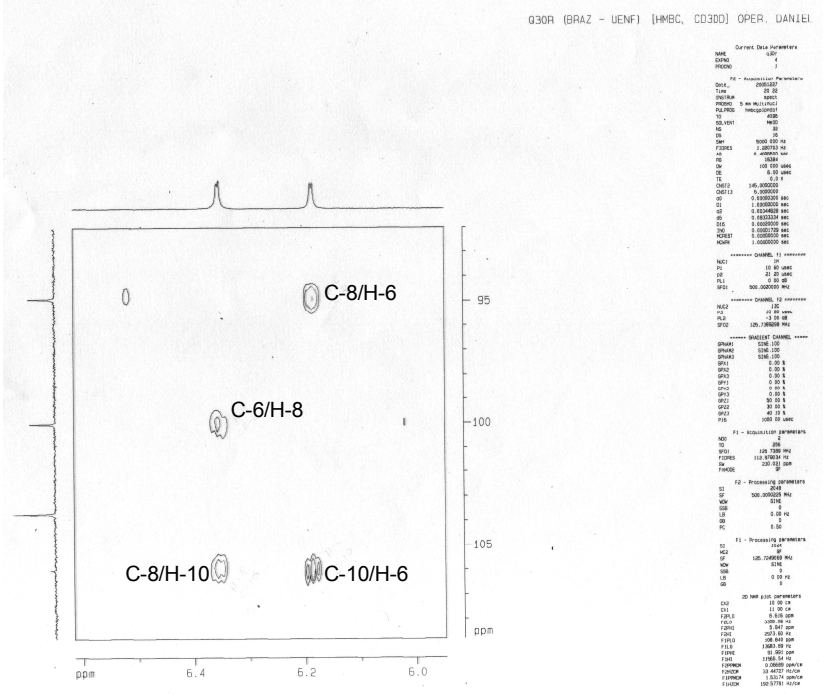


Figura 13: Ampliação do espectro HMBC de 1.

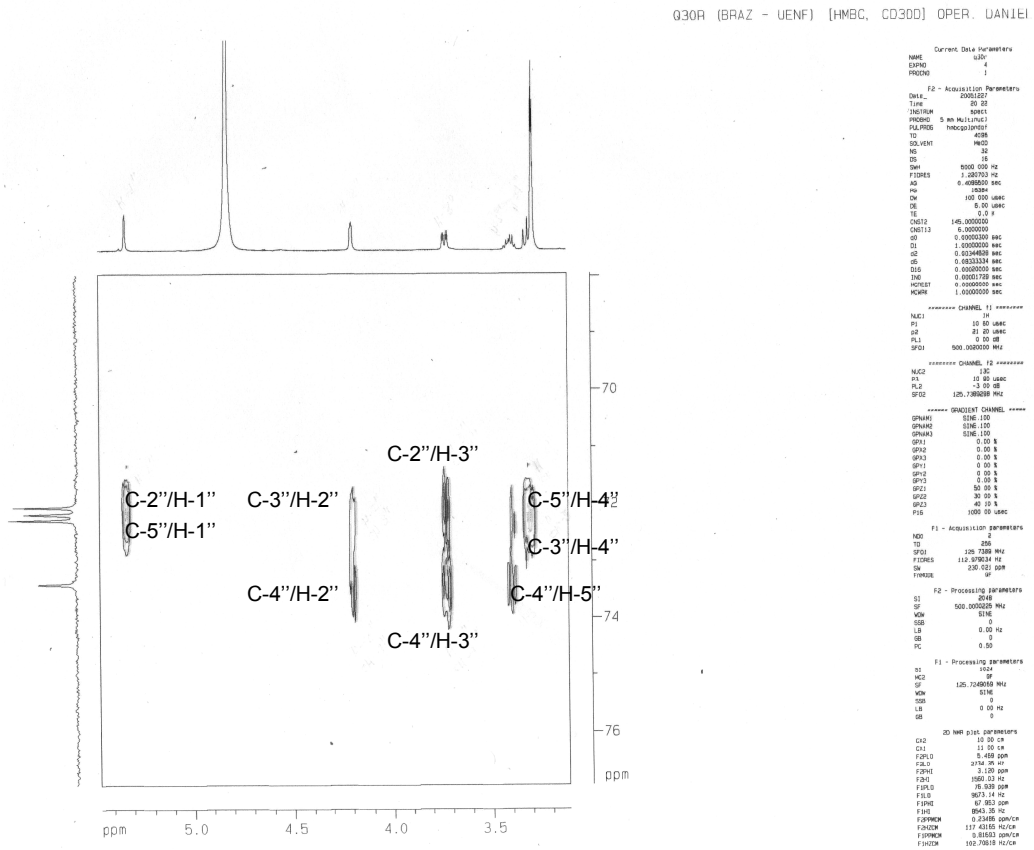


Figura 14: Ampliação do espectro de HMBC de <u>1</u>.

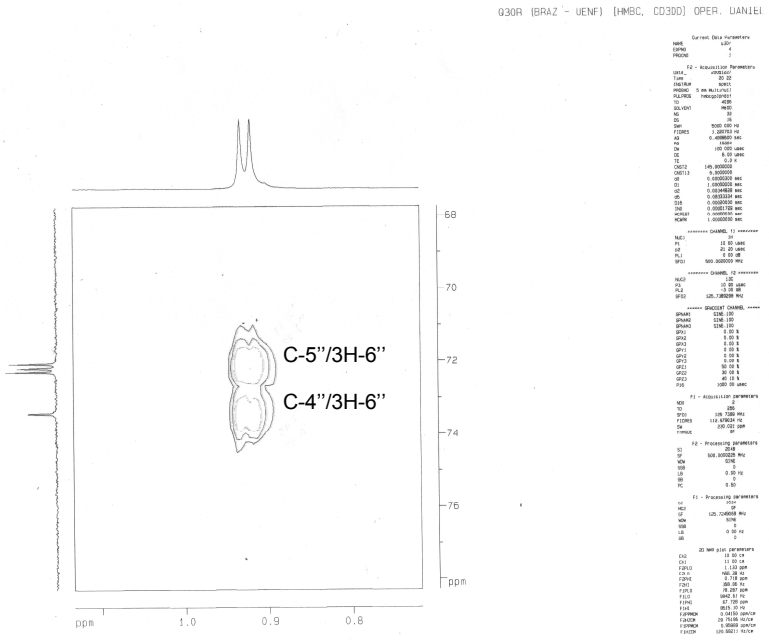
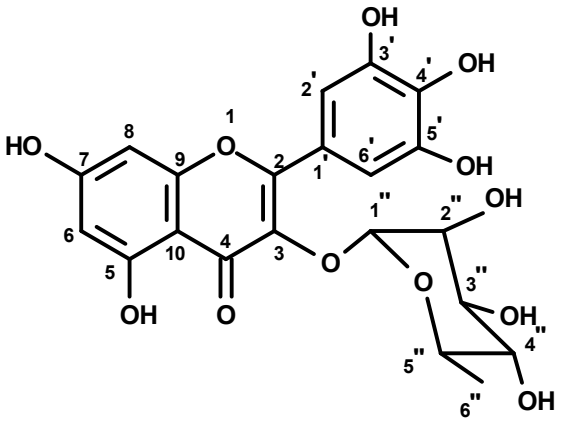


Figura 8: Ampliação do espectro de HMBC de <u>1</u>.

4.3 - Determinação Estrutural da Substância 2



A completa atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos da substância foi realizada utilizando-se as seguintes técnicas: RMN de ^{1}H (1D), ^{1}H x ^{1}H COSY; RMN ^{13}C; APT; HMQC ($^{1}J_{CH}$) e HMBC ($^{2}J_{CH}$ e $^{3}J_{CH}$).

O espectro de infravermelho **2** (Figura 16) apresentou principais frequências de absorção, ν (cm^{-1}), em: 3431,75 (banda intensa de deformação axial de em ligação hidrogênio intermolecular); 2923,45 (deformação axial de –OH em ligação hidrogênio intramolecular); 1651,37 (deformação axial de C=O conjugada a anel aromático); 1615,94 (deformação axial de C=C de anel aromático); 1383,71 (deformação angular de C–O–H); 1202,89 (deformação angular Aril–O–H); 1166,42 e 1091,19 (deformação axial C–O–C).

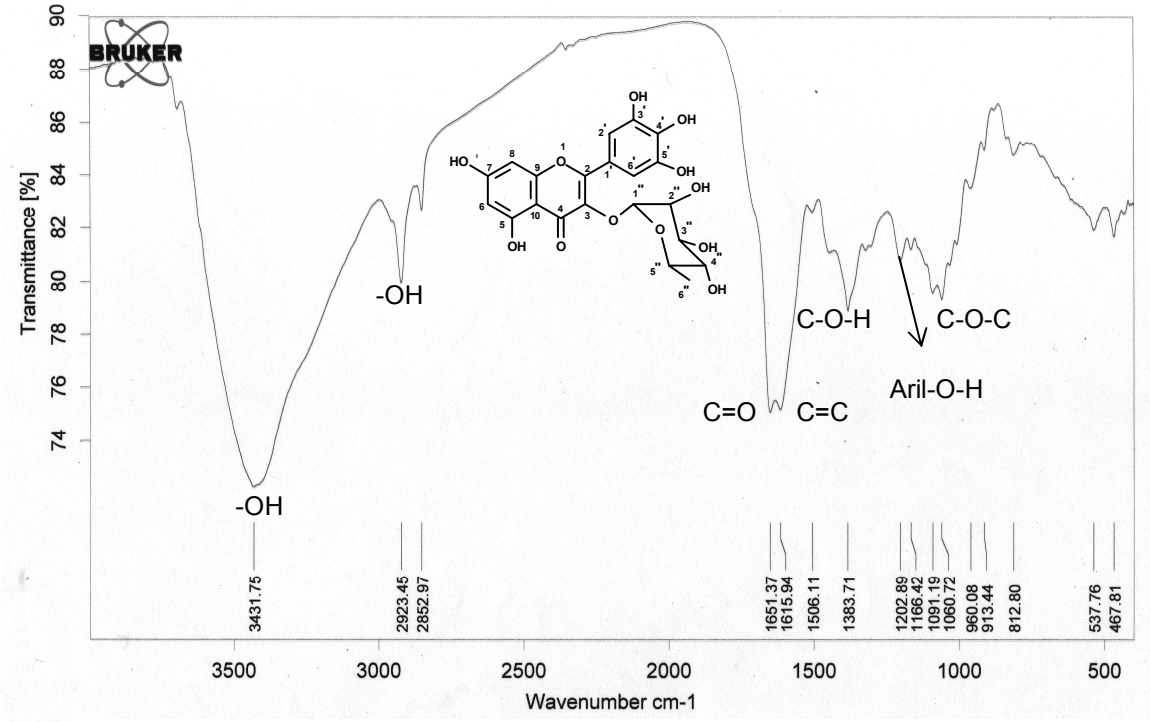


Figura 9: Espectro de IV da substância 2, obtido em pastilha de KBr.

O espectro de RMN de ^{1}H de **2** (Figuras 17 e 18) de apresentou sinais típicos de substituição para o padrão miricetina. O anel A de **2** apresentou dubletos em δ_H 6,18 (d; J= 2,1 Hz) e δ_H 6,35 (d; J= 2,1 Hz) referentes aos H-6 e H-8, respectivamente. O acoplamento entre esses dois hidrogênios foi confirmado no espectro de RMN H x H COSY (Figura 19). O espectro de RMN de **2** apresentou ainda um singleto intenso em δ_H 6,93 (2H) atribuídos aos H-2' e H-6' anel B do flavonóide. O flavonóide mostrou sinais de absorções no espectro de RMN ^{1}H correspondente a uma unidade de açúcar representado pelos sinais de hidrogênio em δ_H 5,30 (d; J= 1,4 Hz; 1-H) e um sinal duplo em δ_H 0,95 (d; J= 6,2 Hz; 3-H). Esses sinais sugeriram a presença da raminose sendo atribuídos aos H-1'' e H-6'' (CH_3) do carboidrato, respectivamentes. A comparação dos espectros de RMN ^{1}H, RMN ^{13}C (HBBD) (Figuras 22, 23 e 24) e RMN ^{13}C APT (Figuras 20 e 21) permitiu identificar os sinais correspondentes a carbonos não hidrogenados (11 carbonos), metínicos (três sinais representando quatro carbonos sp^2 e cinco sinais representando cinco carbonos sp^3 oxigenados) e um carbono metílico (grupo metila da raminose em δ_C 17,8 correlacionando com o sinal em δ_H 0,95 (d; J= 6,2 Hz) no espectro HMQC (Figuras 25 e 26) . O sinal em 103,81, atribuído ao carbono anomérico C-1'', apresentou sinal correlação no espectro de HMQC com o sinal em δ_H 5,30 (d, 1,4 Hz) atribuído ao H-1''. Os demais sinais da unidade carboidrática foram confirmados pela presença de correlação no espectro HMQC entre os seguintes sinais: δ_C 72,0 (C-2'') / δ_H 4,2 (dd; J_1= 1,4 Hz; J_2= 3,2; H-2''); δ_C 72,2 (C-3'') / δ_H 3,7 (dd; J_1= 3,2 Hz; J_2= 9,5 Hz; H-3''); δ_C 73,5 (C-4'') / δ_H 3,3 (t; H-4'') e δ_C 72,2 (C-5'') / δ_H 3,5 (dq; H-5'') (AGRAWAL, 1989; SANTOS e col., 2005; MAHMOUD e col., 2001).

Tabela 2: Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de 2 obtidos em metanol-d_4.

	HMQC		HMBC	
	δ_C	δ_H [mult; ^{n}J (Hz)]	$^{2}J_{CH}$ (Hz)	$^{3}J_{CH}$ e $^{4}J_{CH}$
C				
2	159,60	-		H-2'; H-6'
3	136,47	-		H-1''
4	180,00	-		
5	163,39	-	H-6	
7	166,17	-	H-8	
9	158,70	-	H-8	
10	106,01	-		H-6; H-8
1'	122,08	-	H-2'; H-6'	
3'	147,03	-	H-2'	
4'	138,00	-	-	H-2'; H-6'
5'	147,03		H-6'	
CH				
6	100,00	6,18 (d; 2,1)		H-8
8	94,86	6,35 (d; 2,1)		H-6
2'	109,72	6,93 (s)		
6'	109,72	6,39 (s)		
1''	103,81	5,30 (d; 1,4)		
2''	72,05	4,20 (dd; 1,4; 3,2)	H-1''	
3''	72,29	3,76 (dd; 3,2; 9,5)	H-4''	H-1''
4''	73,52	3,32 (t; 9,5)	H-3''	3H-6''
5''	72,20	3,50 (dq; 9,5; 6,2)	3H-6''	H-1''
6''	17,83	0,95 (d; 6,2)		H-4''

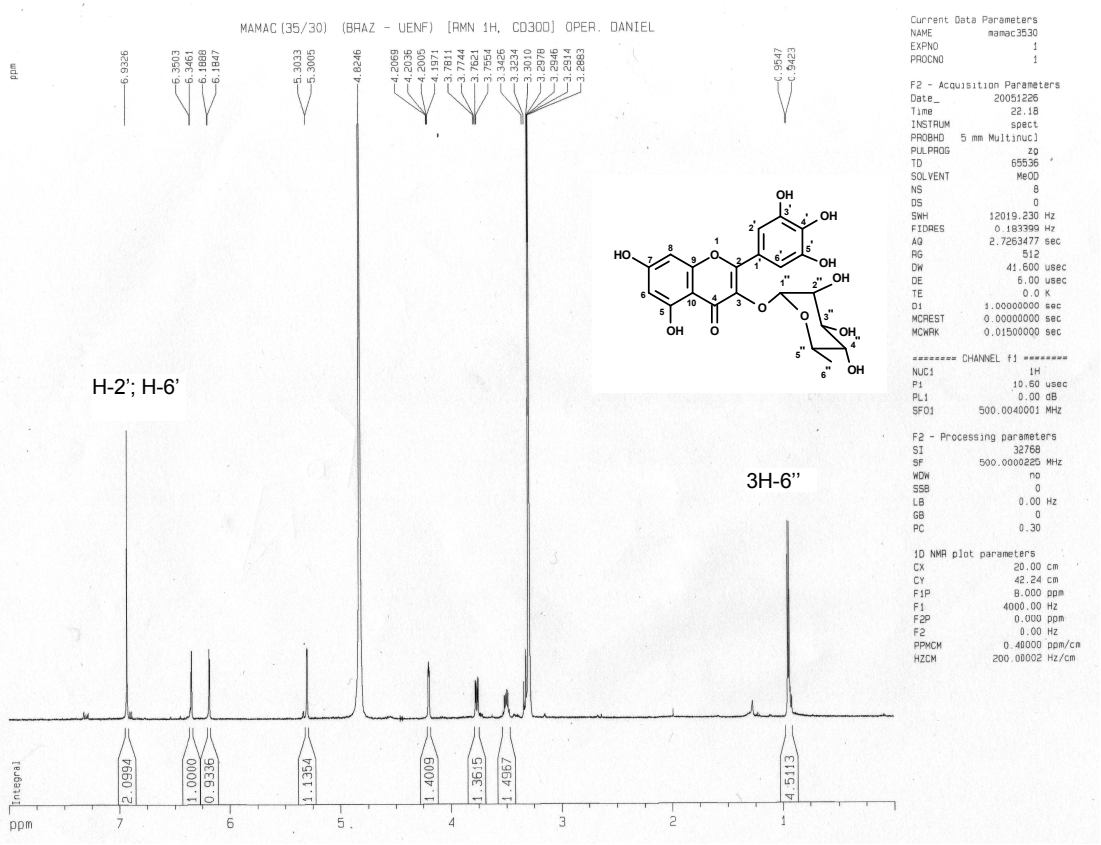


Figura 17: Espectro de RMN 1H (500 MHz) de 2 obtido em metanol-d_4.

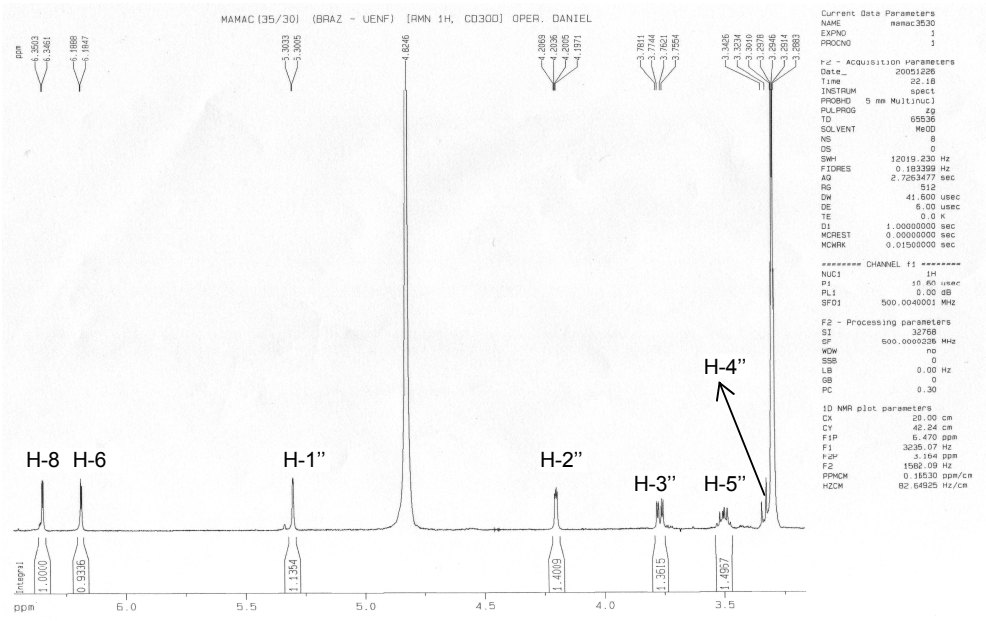
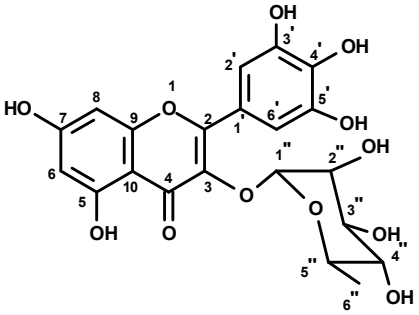


Figura 18: Ampliação do espectro de RMN ^{1}H (500 MHz) de 2.



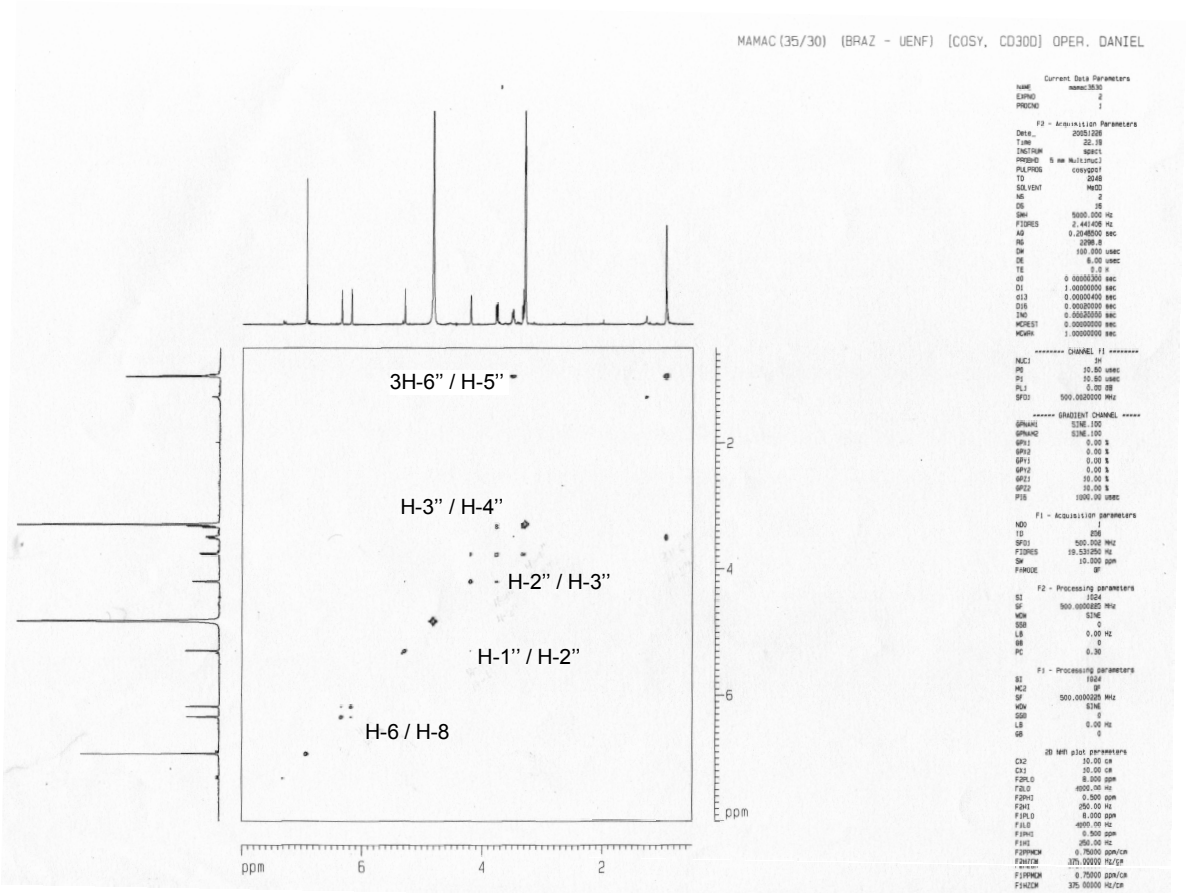


Figura 19: Espectro bidimensional H X H COSY de 2 obtido em metanol-d_4.

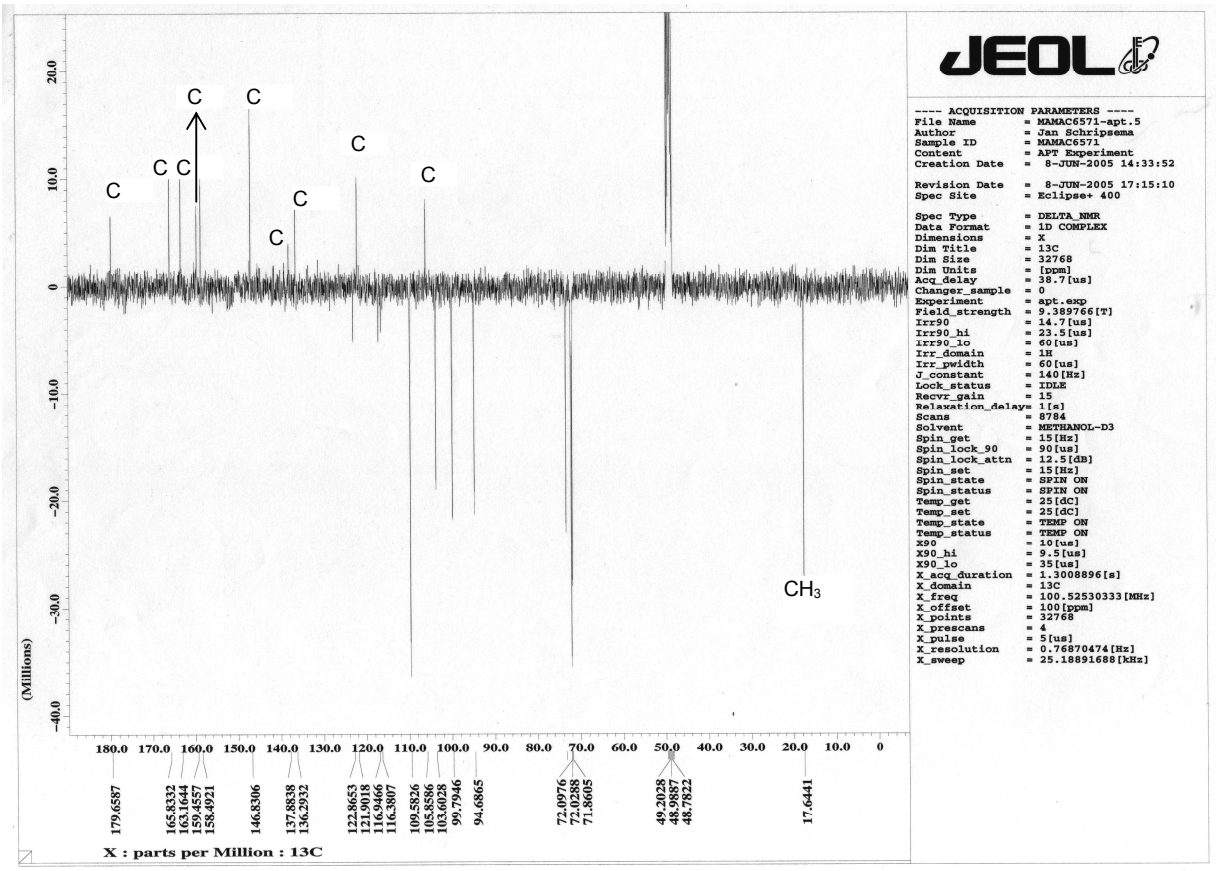


Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) de 2 em metanol-d$_4$.

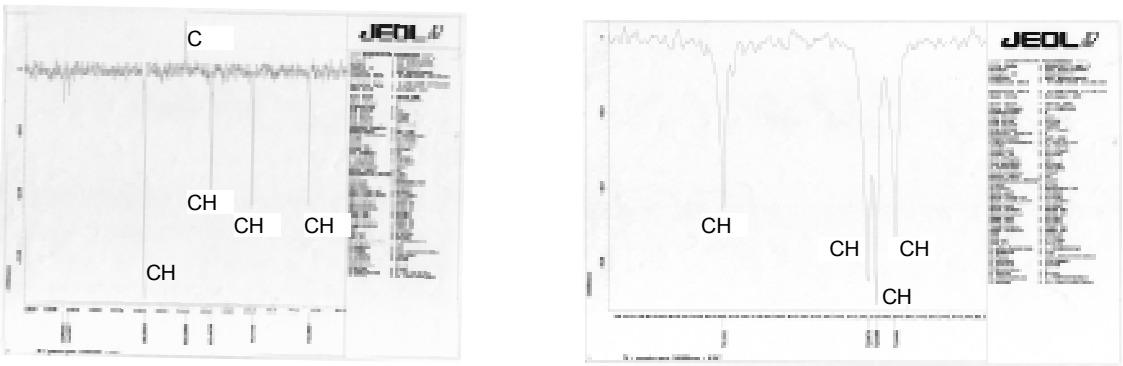


Figura 21: Ampliações do espectro de RMN ^{13}C APT de 2.

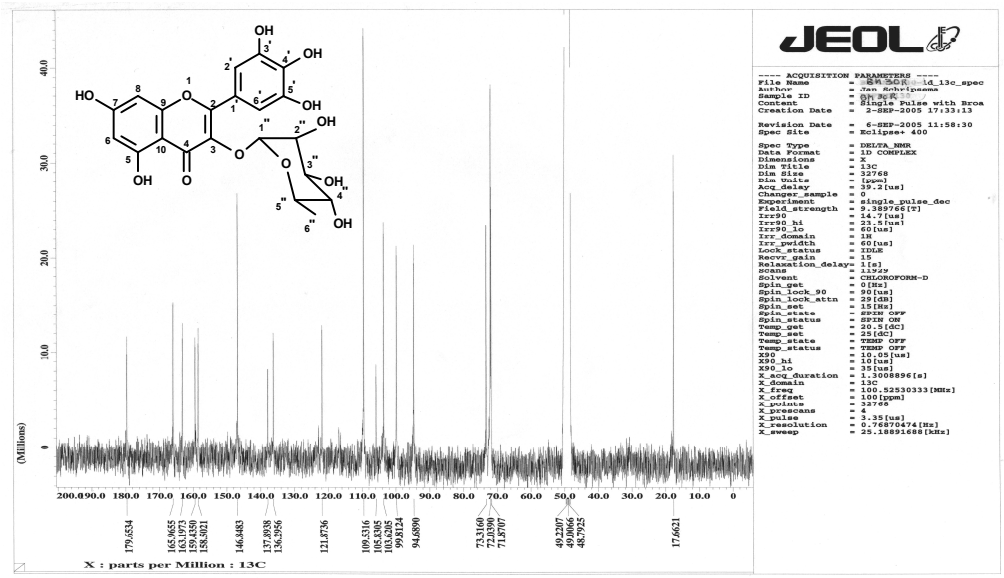


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (HBBD) de 2.

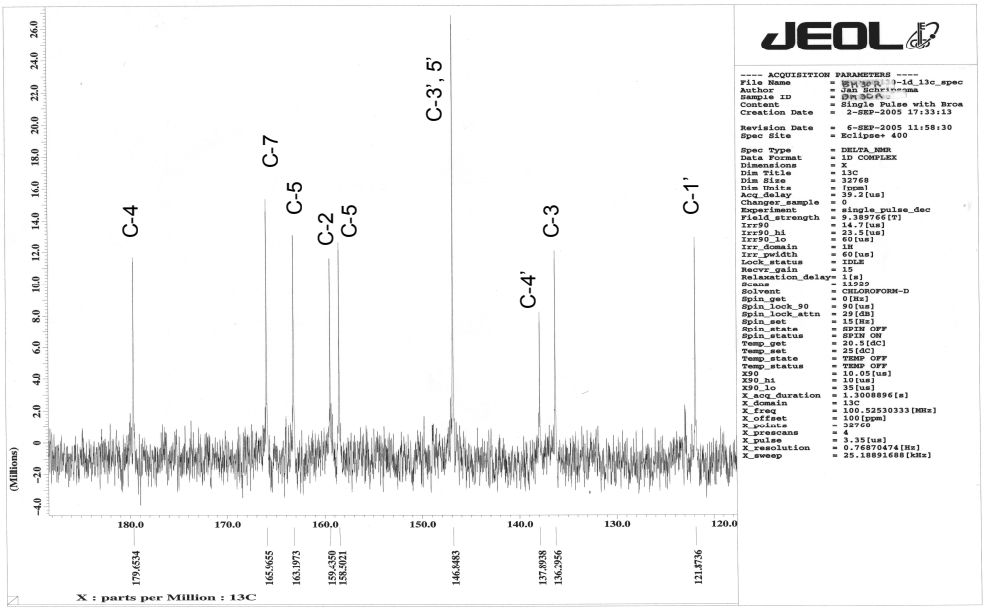


Figura 23: Ampliação de espectro de RMN ^{13}C de 2.

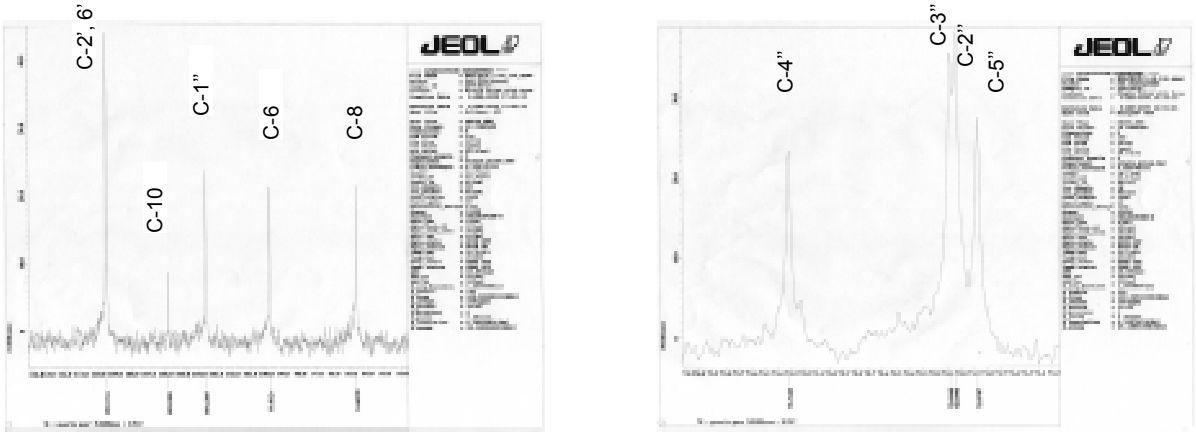


Figura 24: Ampliações do espectro de RMN ^{13}C de 2.

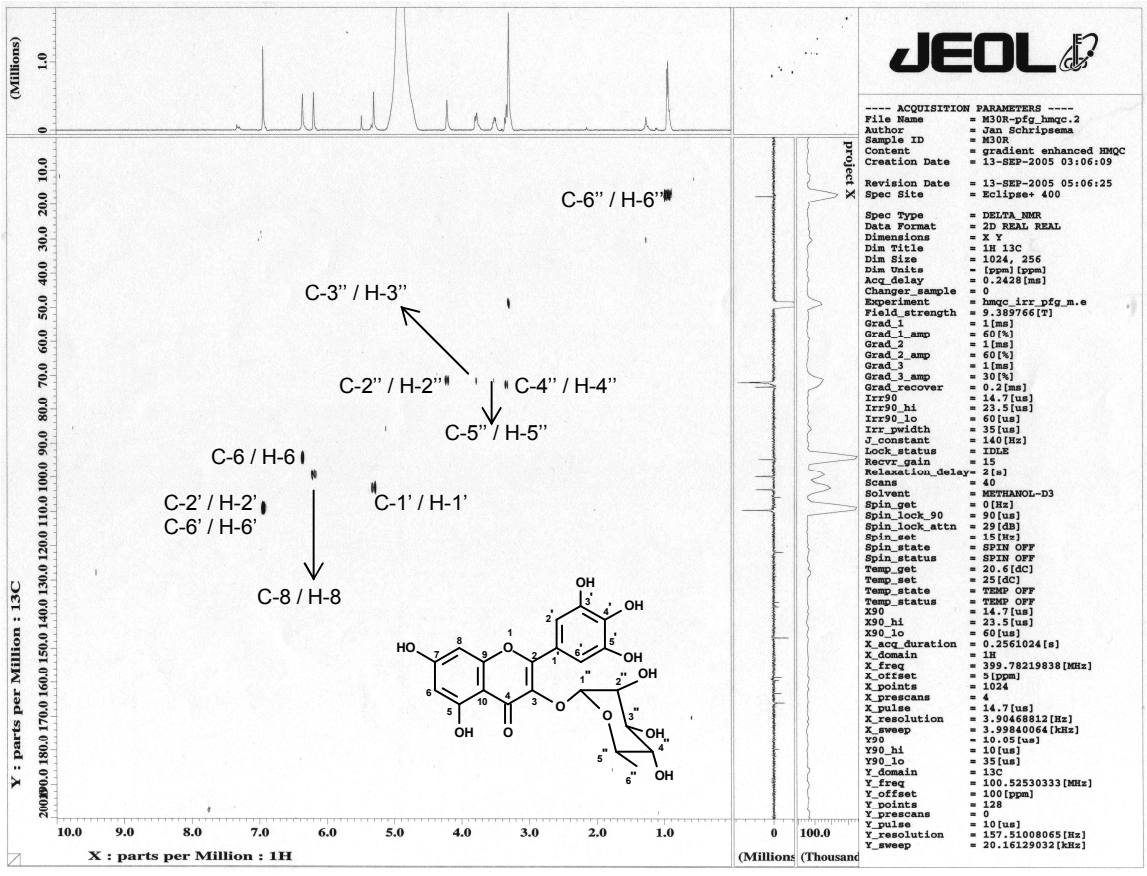


Figura 25: Espectro bidimensional HMQC de 2 obtido em metanol-d$_4$.

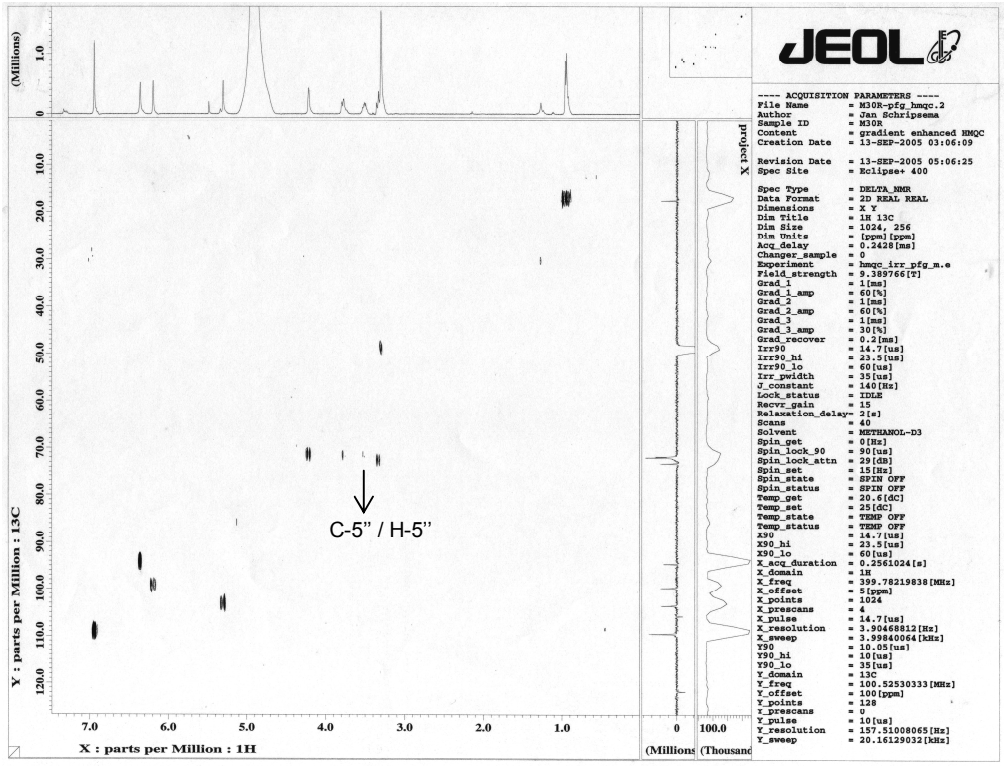


Figura 26: Ampliação do espectro de HMQC de 2, destacando a correlação entre C-5 / H-5.

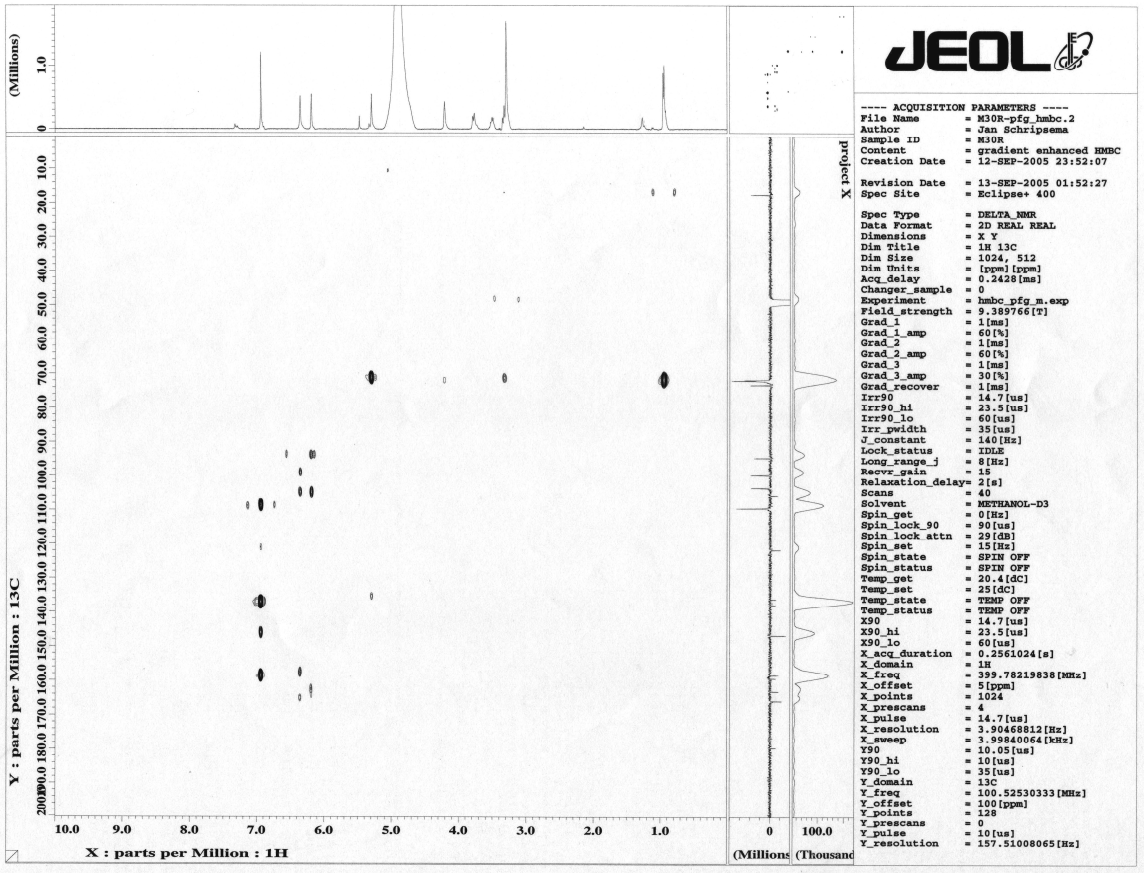


Figura 27: Espectro de correlação HMBC de 2 (400 MHz) obtido em metanol-d_4.

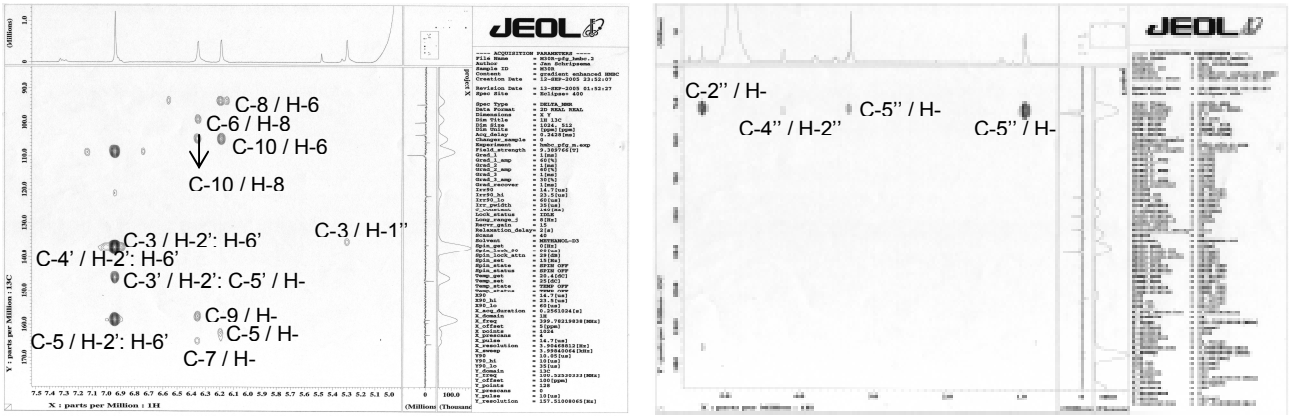
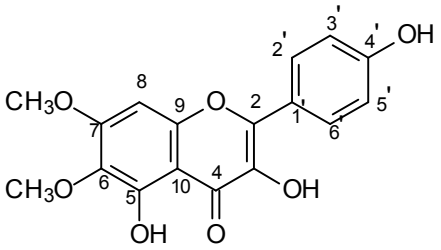


Figura 28: Ampliações do espectro de correlação HMBC de 2.

4.4- Determinação Estrutural daSsubstância 3



A elucidação estrutural da substância **3** foi realizada mediante seus espectros de IV, RMN de ^{1}H e ^{13}C, uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura (WEI e col., 2004; PANDEY e col., 2005; CÓRDOVA e col., 2006).

O espectro de infravermelho **3** (Figura 29) apresentou principais frequências de absorção, ν (cm^{-1}), em: 3337,59 (banda intensa de deformação axial de em ligação hidrogênio intermolecular); 2923,45 (deformação axial de –OH); 1651,42 (deformação axial de C=O conjugada a anel aromático); 1615,94, 1492,18 e 1448,61 (deformação axial de C=C de anel aromático); 1367,60 (deformação angular de O–H); 1202,89 (deformação axial Aril–O–H); 1166,42 e 1063,79 (deformação axial C–O).

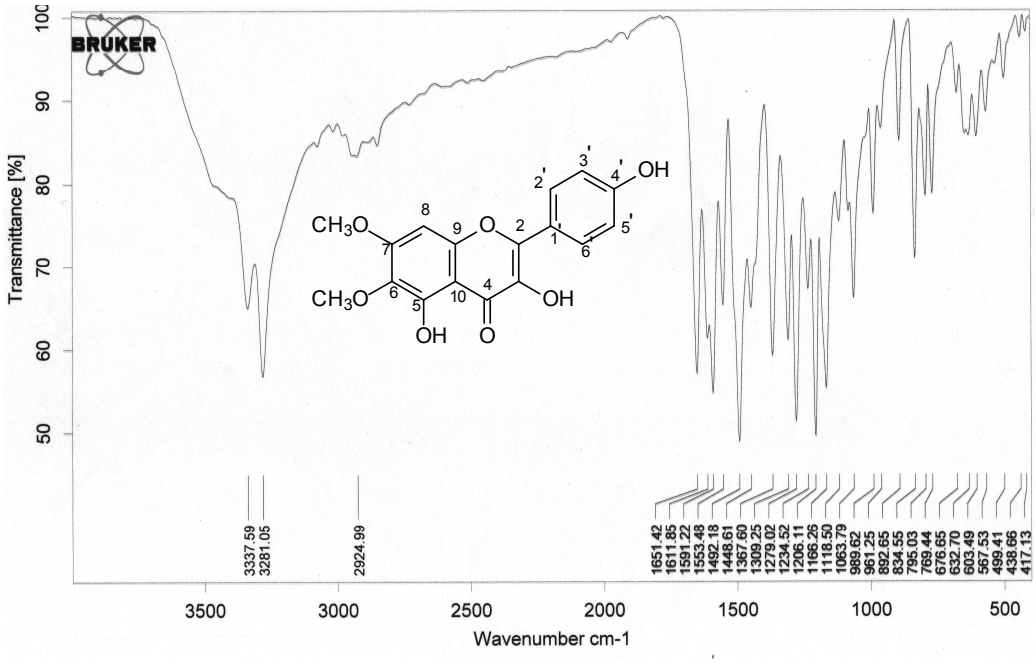


Figura 29: Espectro de infravermelho de 3 em pastilha de KBr.

A estrutura da 3, 5, 4'- tri-hidróxi-6,7-dimetóxiflavona, **3**, foi determinada com base nos seus espectros unidimensionais de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e experimentos bidimensionais ^{1}H x ^{1}H COSY, HMQC, HMBC e NOESY). O espectro de RMN ^{1}H (Figura 30 e 31) de **3** (CD_3OD) exibiu dois sinais simples em δ_H 3,85 e 3,95 sugerindo a presença de dois grupos metoxila e três sinais de hidrogênios ligados a anel benzênico. O sinal simples em δ_H 6,65 sugere a existência de um anel A é trissubstituído e foi atribuído ao H-8. O espectro de correlação bidimensional NOESY (Figura 38) exibiu um sinal de interação espacial entre os sinais simples em δ_H 3,95 e δ_H 6,65. A existência dessa correlação confirma a existência de um grupamento metoxila ligado ao carbono C-7 e vizinho ao H-8. O espectro de RMN ^{1}H apresentou sinais adicionais em δ_H 8,1 (d; 8,8 Hz; 2H) e 6,9 (d; 8,8 Hz; 2H) típicos de um sistema AA'BB' do anel B do flavonóide *para hidróxi* substituído. Esse padrão de substituição teve sua confirmação realizada através do experimento de correção homonuclear $^{1}Hx^{1}H$ COSY (Figura 32) onde o acoplamento entre os hidrogênios vizinhos estão bem evidentes. Estes hidrogênios foram assinalados para os H-2'; 6' (δ_H 8,1) e H-3'; 5' (δ_H 6,9). Essas atribuições estão de acordo com os valores da literatura. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 33 e 34) apresentou sinais em δ_C 131,2 (C-6), 158,5 (C-7), 60,3 (6-OCH_3) e 55,9 (7-OCH_3) que estão de acordo com os valores propostos na literatura para dois grupos metoxila em C-6 e C-7 no anel A do flavonóide. No espectro de HMQC (Figura 35) foi possível observar as correlações dos acoplamentos $^{1}J_{CH}$ entre os: C-8/H-8; C-2',6'/H-2',6'; C-3',5'/H-3',5' e os C/H metílicos das metoxilas. Mais uma informação útil para a confirmação desse padrão de substituição foi obtida através do mapa de correlação HMBC (Figuras 36 e 37). Com ele foi possível obervar os acoplamento a duas ligações ($^{2}J_{CH}$) C-7/H-8; C-9/H-8 e C-10/H-8; e os acoplamentos a três ligações ($^{3}J_{CH}$) C-6/H-8, C-6/CH_3O-6 e C-7/CH_3O-7. O sistema AA'BB' do anel B do flavonóide também foi confirmado pelos sinais de correlação ($^{3}J_{CH}$) no espectro de HMBC entre: C-2/H-2', 6'; C-1'/ H-3', H-5' e C-4'/H-2', 6'. Na figura as setas indicam as correlações observadas no espectro de HMBC. Todas as correlações observadas nos espectros de HMQC, HMBC e ^{1}H x ^{1}H COSY estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C de 3 obtidos em metanol-d_4.

	^{1}H-^{13}C-HMQC-$^{1}J_{CH}$		^{1}H-^{13}C-HMBC-$^{n}J_{CH}$		δ_C Literatura	δ_C Literatura
C	δ_C	δ_H	$^{2}J_{CH}$	$^{3}J_{CH}$		
2	147,6			H-2'/H-6'	147,3	147,4
3	135,9				135,7	137,1
4	176,2				176,1	177,0
5	151,2				151,0	153,0
6	131,2			Me-8; H-8	131,2	133,1
7	158,5		H-8	MeO-7	158,5	160,5
9	152,2		H-8		151,5	153,0
10	104,3			H-8	104,3	105,5
1'	122,1			H-3'/H-5'	121,6	123,4
4'	158,9			H-2'/H-6'	159,3	160,2
CH						
8	90,6	6,6; (s)		H-2'/H-6'	91,2	91,1
2'/6'	129,6	8,1; d; 8,8			129,5	130,3
3'/5'	115,2	6,9; d; 8,8			155,4[#]	116,1
MeO-6	60,3	3,8; (s)			60,4	60,4
MeO-7	55,9	3,9; (s)			56,5	56,4

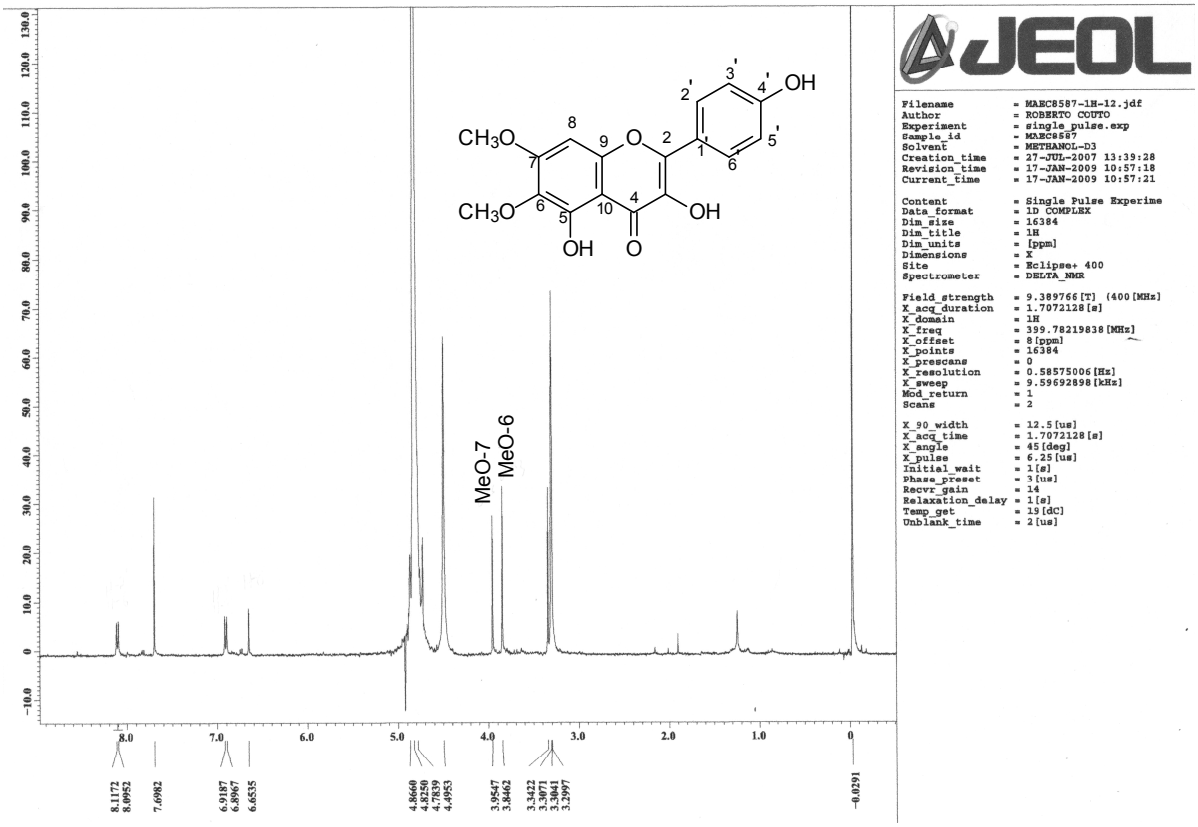


Figura 30: Espectro de RMN de ^{1}H 3 (400 MHz) obtido em metanol-d$_4$.

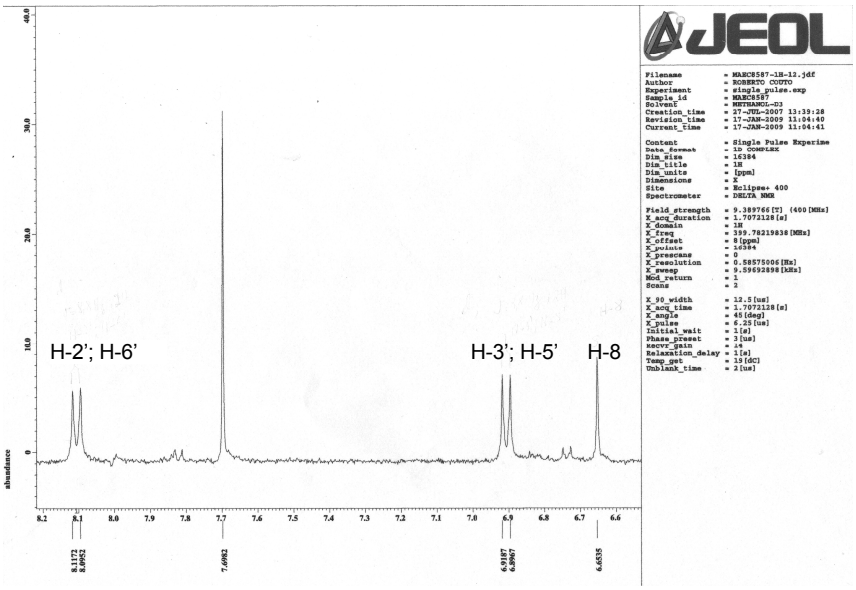


Figura 31: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H de 3.



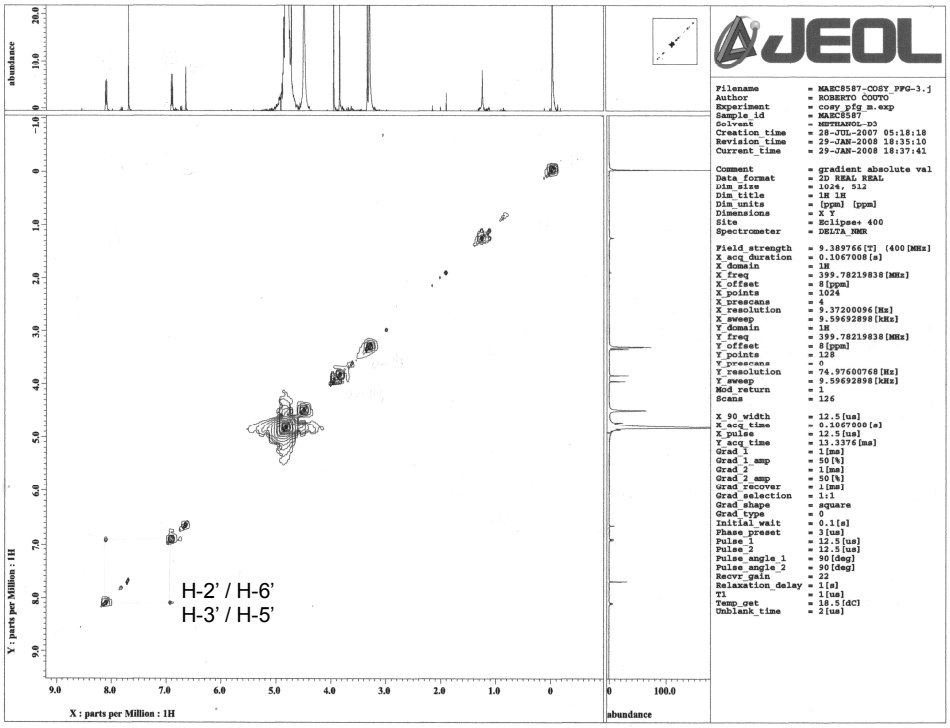
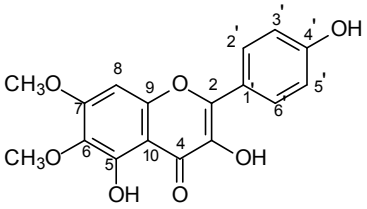


Figura 32: Espectro de correlação H X H COSY (400 MHz) de 3 obtido em metanol-d_4



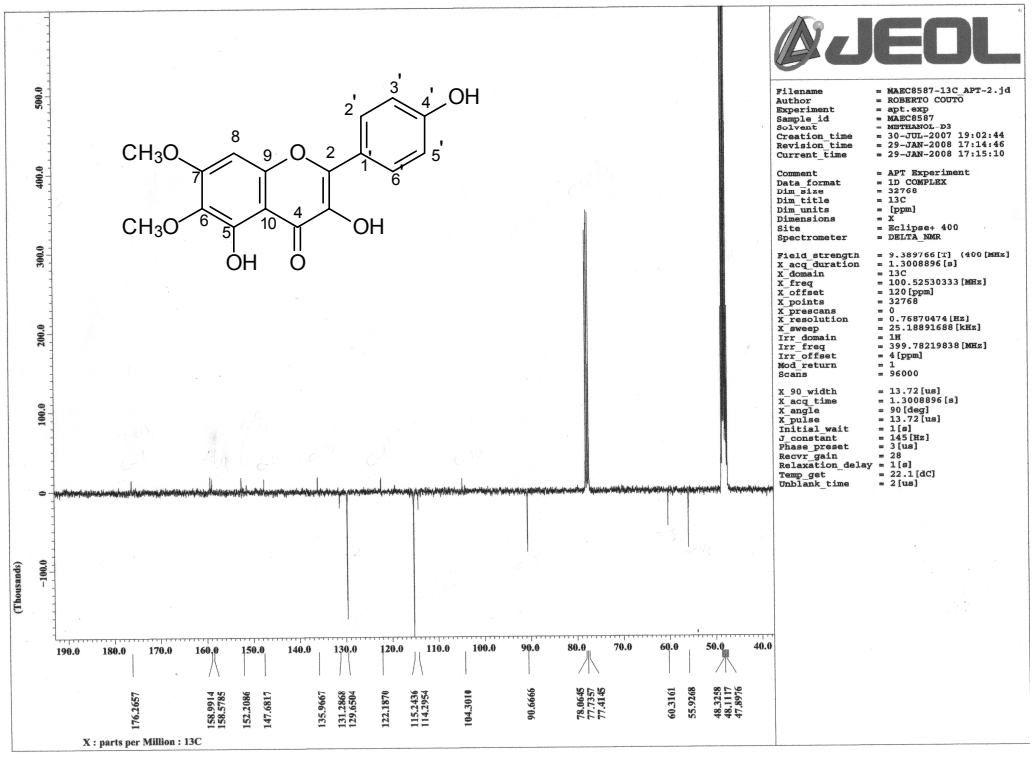


Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C, APT, (100 MHz) de 3 obtido em

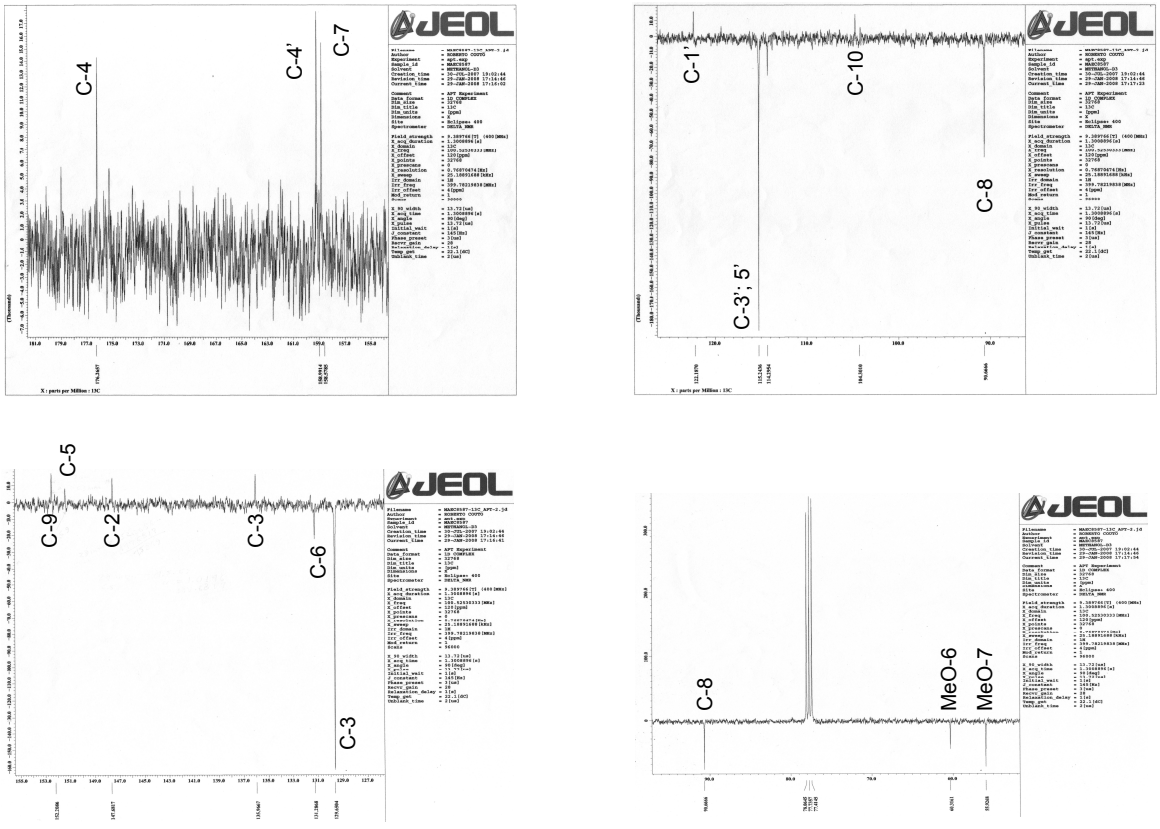


Figura 34: Ampliações do espectro de RMN ^{13}C, APT, de 3.

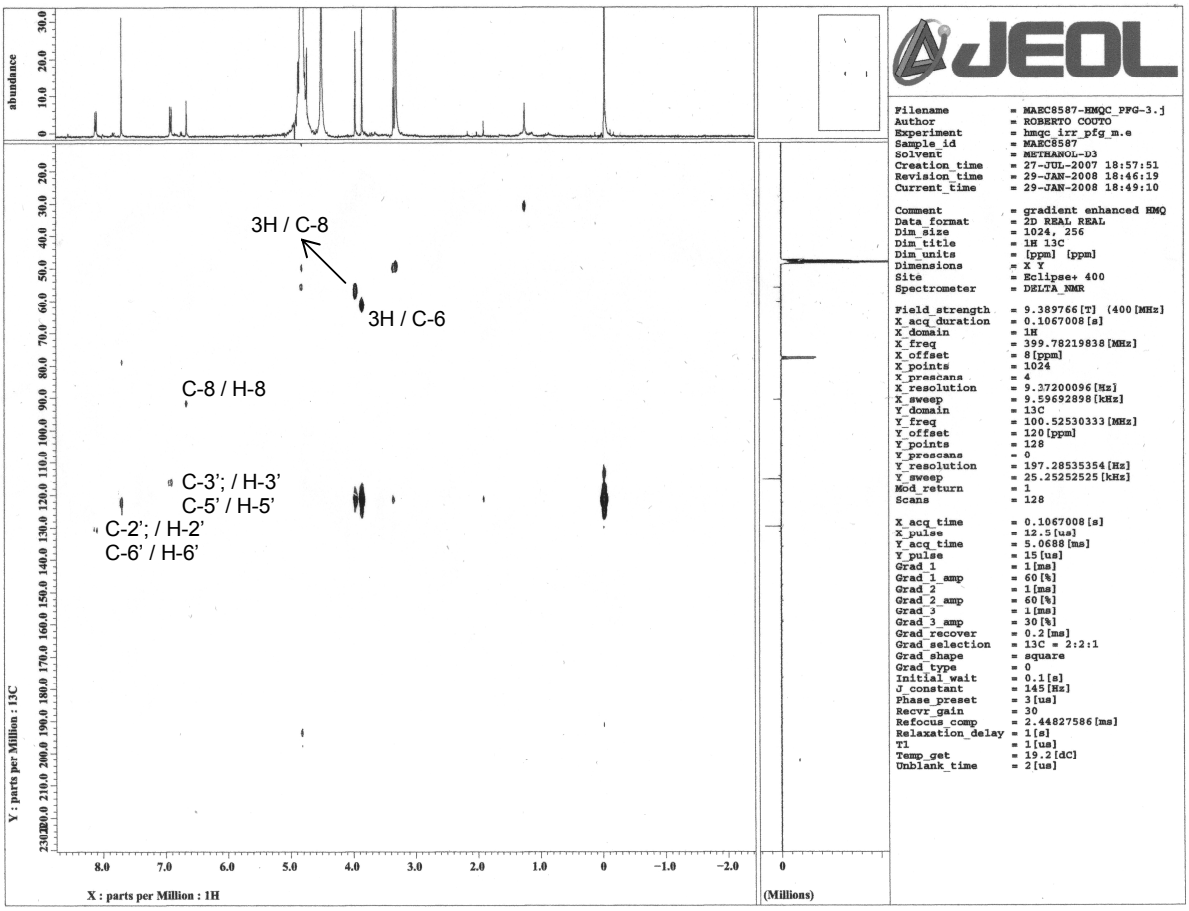
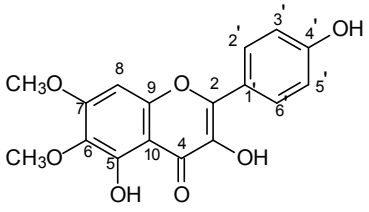


Figura 35: Espectro de HMQC (400 MHz) 3 obtido em metanol –d_4.



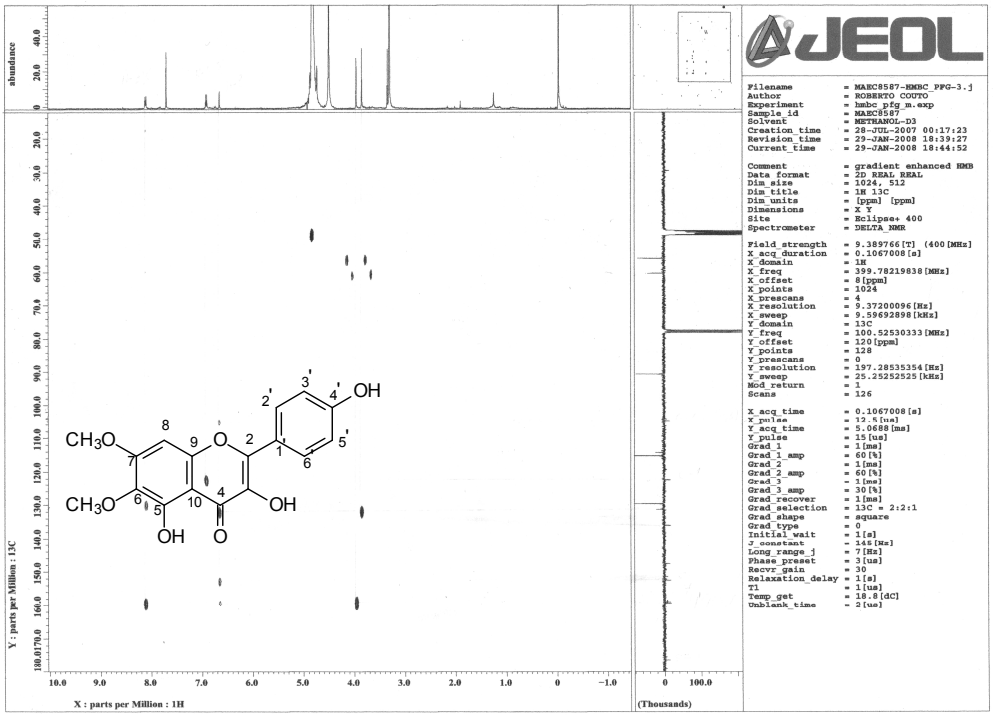


Figura 36: Espectro de HMBC de 3 (400 MHz) obtido em metanol-d_4.

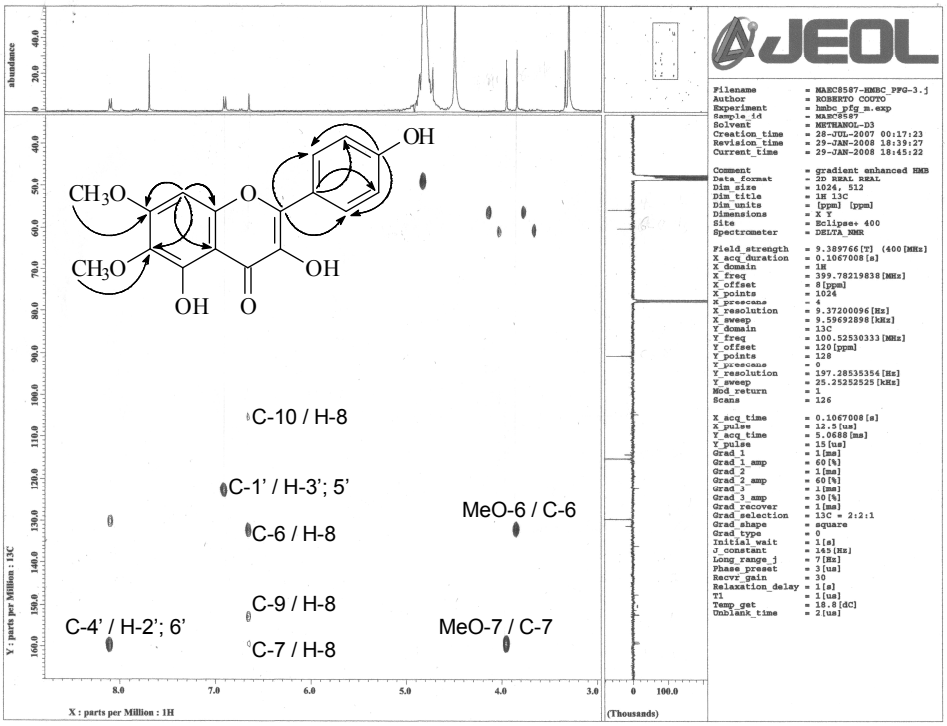


Figura 37: Ampliação do espectro de HMBC de 3. As correlações $^{2,3}J_{CH}$ observadas no espectro estão representadas em 3.

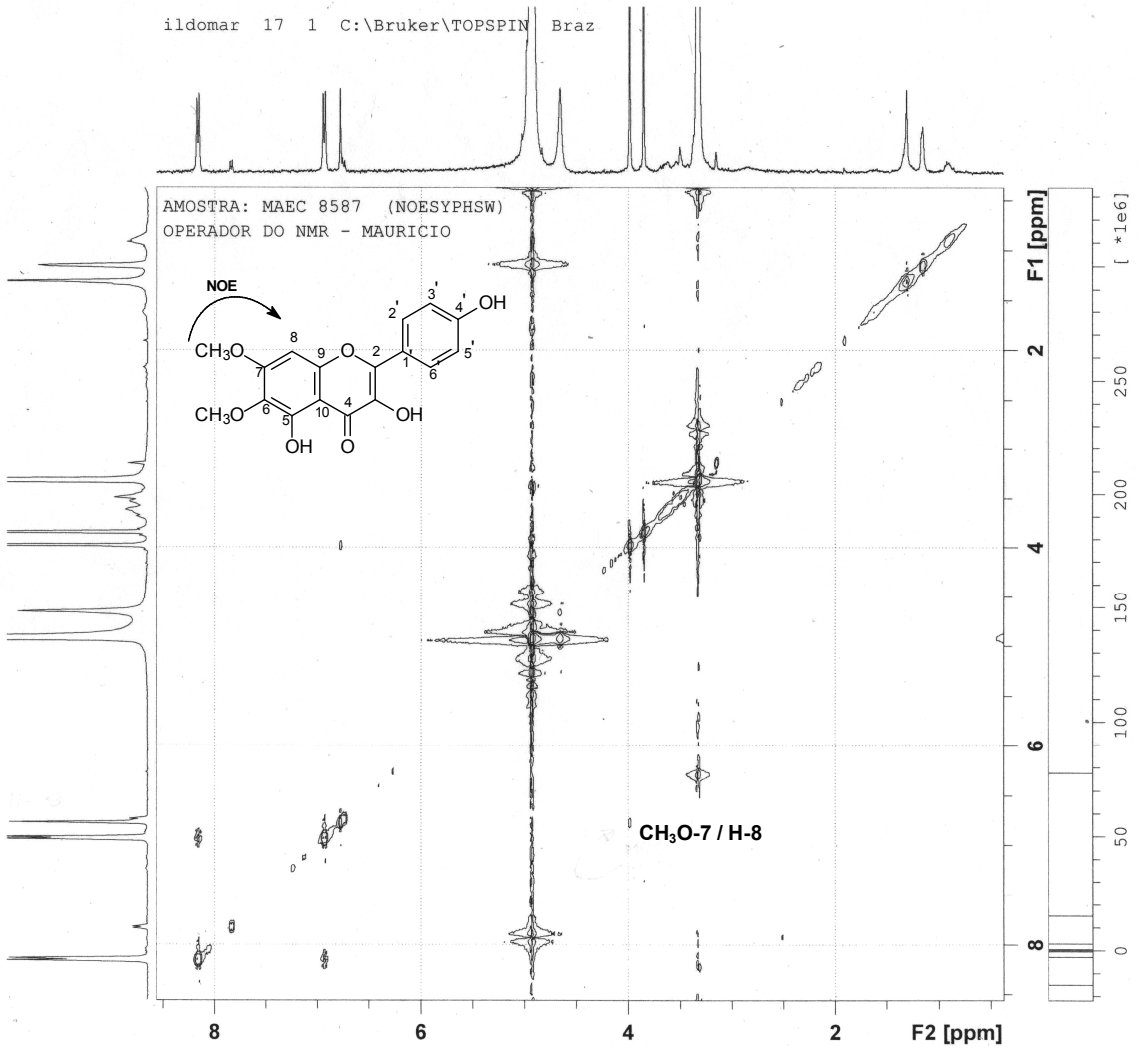
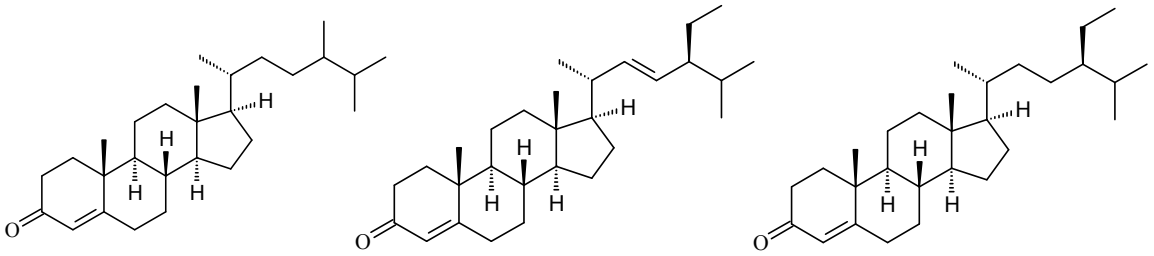


Figura 38: Espectro bidimensional NOESY (400 MHz) de 3 onde é observado o Efeito Nuclear Ovenhauser (NOE) (Vide estrutura de 3) entre os hidrogênios da metoxila ligada ao C-7 e o H-8. Este sinal de correlação espacial confirma a posição proposta para a metoxila.

4.5 Determinação Estrutural da Mistura dos Cetoesteróides (4), (5), e (6)



4 5 6

Os esteróides (**4**), (**5**) e (**6**) tiveram suas estruturas elucidadas mediante os seus espectros de CG/EM, IV e RMN de ^{1}H e ^{13}C (APT). O espectro de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa indicou a presença três substâncias majoritárias (Figuras 40 e 41). Essas substâncias apresentaram picos de íon molecular, [M^{+}], em m/z 398, (**4**), [massa molecular calculada: 398,354866 ($C_{28}H_{46}O$)]; m/z 410, (**5**) [massa molecular calculada: 410,354866 ($C_{29}H_{46}O$)] e m/z 412, (**6**), [massa molecular calculada: 412,370516 ($C_{29}H_{48}O$)].

O espectro na região do infravermelho de (**4**), (**5**) e (**6**) apresentou bandas de absorção em: 2958,00 cm^{-1}, 2933,85 e 2868,27 cm^{-1} de deformação axial grupamento CH, CH_2 e CH_3 (sp^3) de hidrocarbonetos saturados; 1710,93 cm^{-1} (deformação axial de carbonila α, β-insaturada).

O espectro de RMN de ^{1}H da mistura de esteróides apresentou sinais característicos para esta classe de substâncias em: δ_H 5,71 (sinal simples) referente ao H-4 vinílico de (**4**), (**5**) e (**6**) e os sinais em 5,12 (*dd*; J_1= 14,3; J_2= 8,1) e 5,01 (*dd*; J_1= 14,3; J_2= 8,1) referentes aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 de (**5**), respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (APT) dos esteróides demonstrou a presença de ligações duplas carbono-carbono em δ_C 171,86 (carbono não hidrogenado) e δ_C 123,70 (carbono hidrogenado); e indicou a presença de uma carbonila conjugada em δ_C 199,79. Esses sinais podem ser atribuídos ao grupamento enona representados pelos C-5, CH-4 e C-3 de (**4**), (**5**) e (**6**), respectivamentes. Os valores de deslocamento químico estão de acordo com os relatados na literatura para cetoesteróides α,β-insaturados. Os sinais dos carbonos vinílicos em δ_C 138,12 e 129,39 foram atribuídos aos C-22 e C-23 do esteróide (**5**), de acordo com aqueles relatados na literatura (FORGO e KOVÉR, 2004; MACARI e col., 1990; KONTIZA e col., 2006).

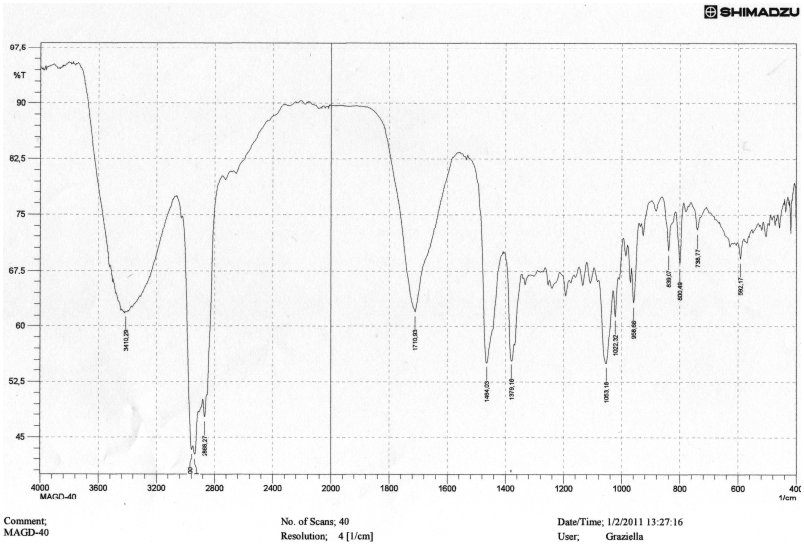


Figura 39: Espectro de infravermelho (ATR) da mistura de esteróides (4), (5) e (6).

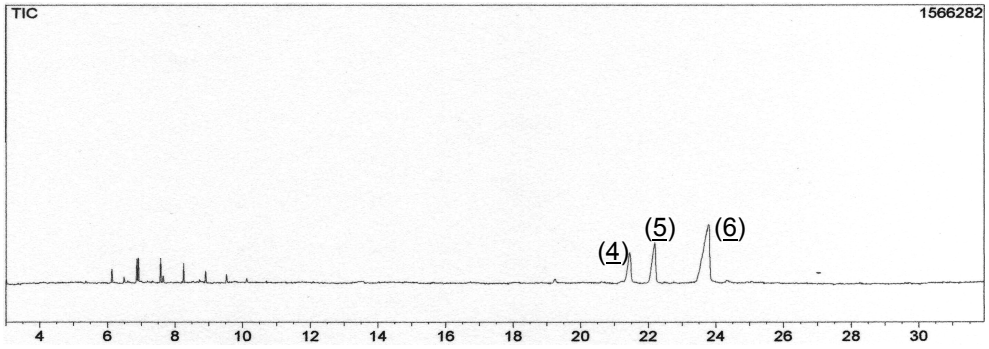


Figura 40: Cromatograma da mistura de esteróides (4), (5) e (6).

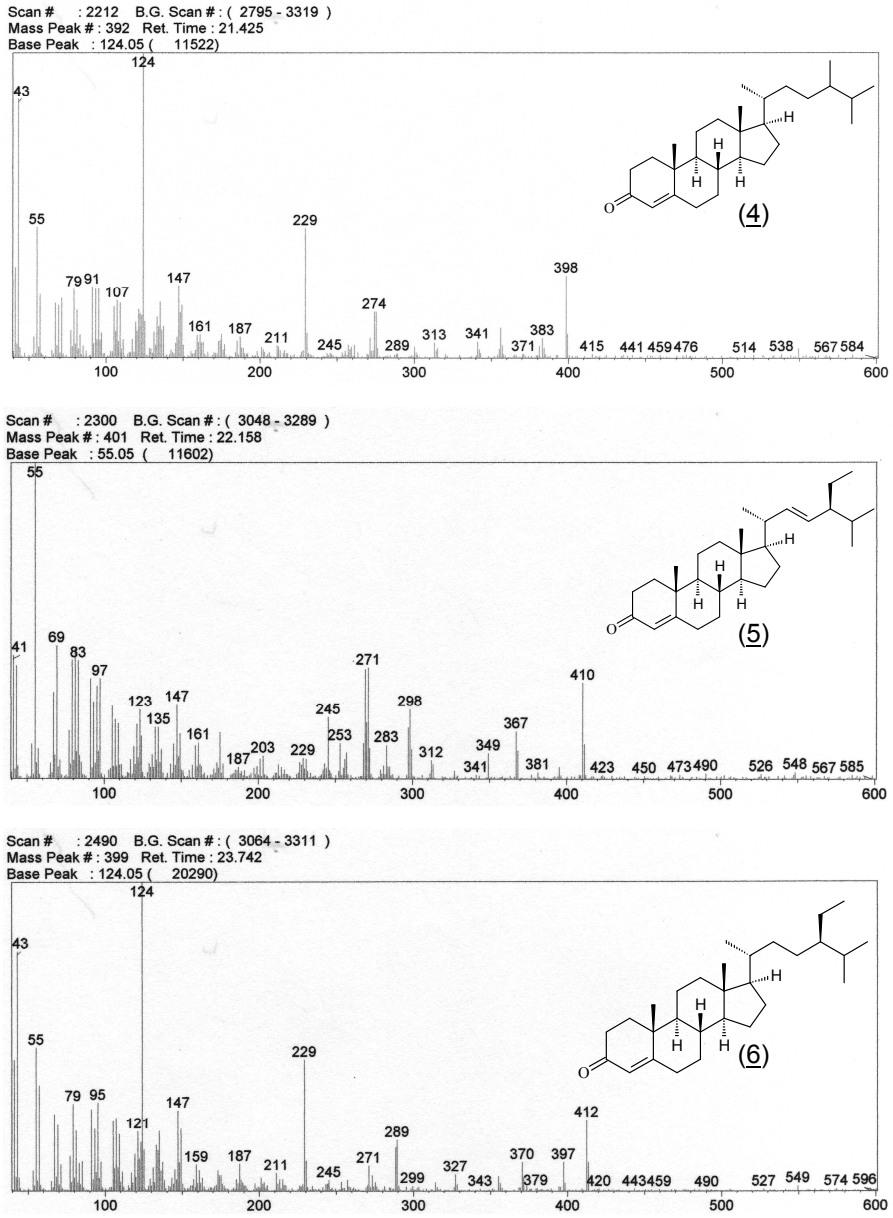


Figura 41: Espectro de massas, obtido por Impacto de Elétrons de (4), (5) e (6).

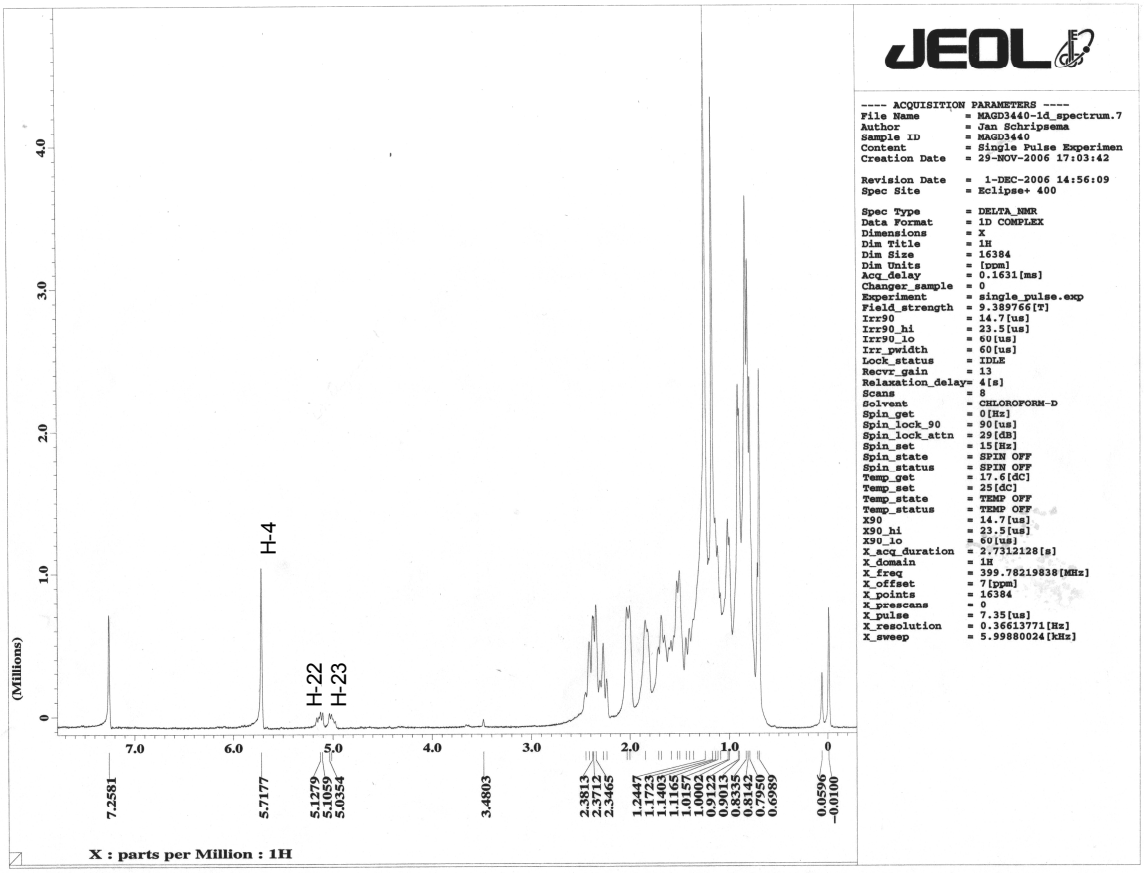


Figura 42: Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz) de (4), (5) e (6) obtido em $CDCl_3$.

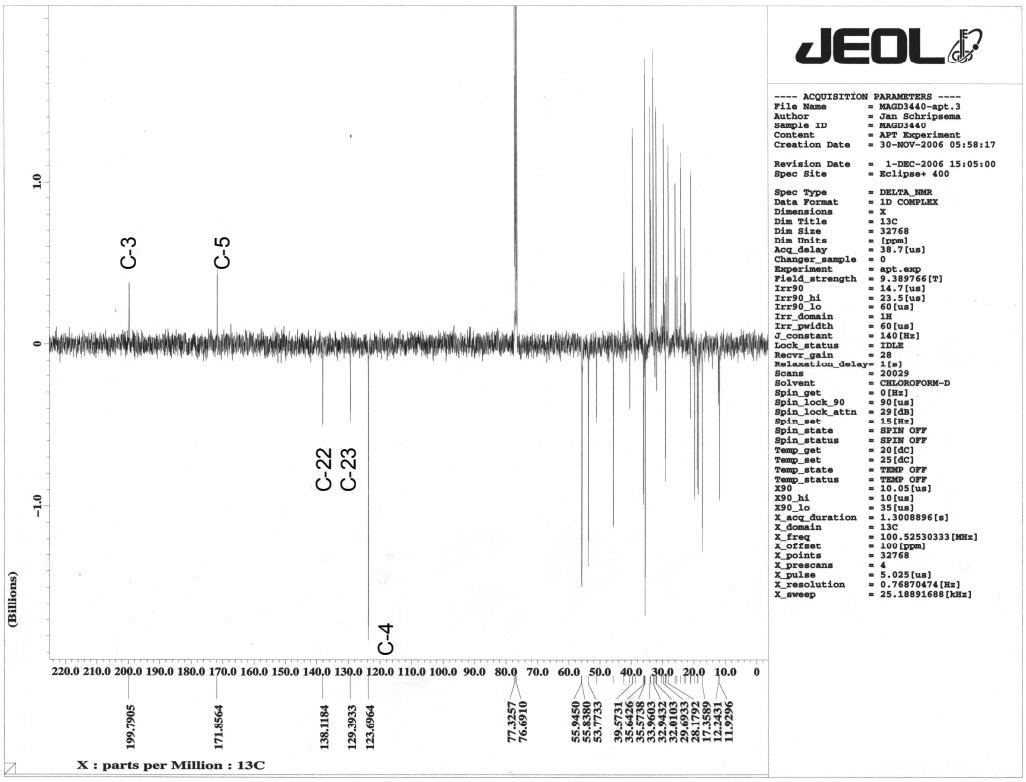


Figura 43: Espectro de RMN ^{13}C APT (100 MHz) de (4), (5) e (6) obtido em $CDCl_3$.

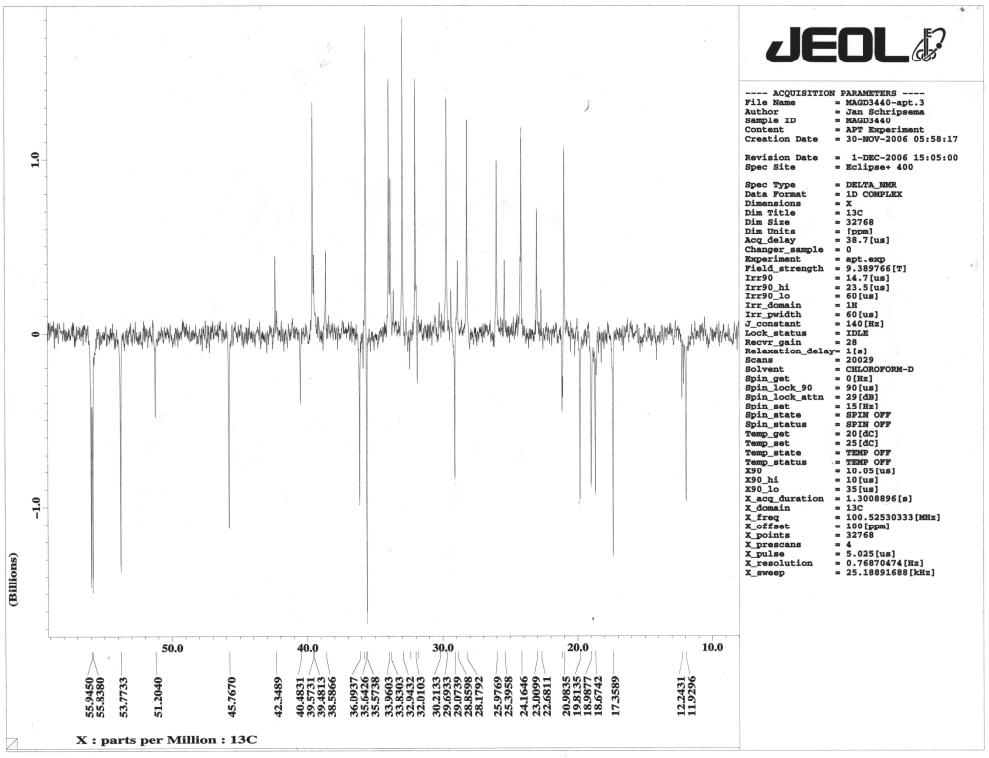


Figura 44: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C APT de (4), (5) e (6).