

CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E  
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Clitoria fairchildiana* Howard: UMA  
CONTRITUIÇÃO PARA O ESTUDO DO GÊNERO *Clitoria*  
(FABACEAE)

**DÉBORA CONTAGEM DE QUEIROZ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO de 2008

CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E  
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Clitoria fairchildiana* Howard: UMA  
CONTRITUIÇÃO PARA O ESTUDO DO GÊNERO *Clitoria*  
(FABACEAE)

**DÉBORA CONTAGEM DE QUEIROZ**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Leda Mathias

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO de 2008

CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E  
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Clitoria fairchildiana* Howard: UMA  
CONTRITUIÇÃO PARA O ESTUDO DO GÊNERO *Clitoria*  
(FABACEAE)

**DÉBORA CONTAGEM DE QUEIROZ**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Laura Jane Moreira Santiago (D. Sc. Ciências Biológicas) – UNIRIO

---

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (D. Sc. Química Orgânica) – UENF

---

Prof. Edmilson José Maria (D. SC. Química Orgânica) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Leda Mathias (D. Sc., Química de Produtos Naturais) – UENF  
(Orientadora)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Manoel e Elaine, os grandes incentivadores de minha vida, a minha irmã Alice, amiga de sempre e a meu marido Marcelo incentivador e companheiro de todas as horas.

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar com essas palavras minha sincera gratidão a todos que de certa forma contribuíram na realização deste trabalho.

A Deus pela vida, oportunidades concedidas e por me dar força para superar as dificuldades do dia-a-dia.

Aos meus maravilhosos pais, pelo amor, apoio, incentivo e por me ensinarem a importância dos estudos. Sem eles nada seria possível.

A minha irmã Alice pelo amor, amizade e compreensão.

Ao meu marido Marcelo pela amizade, carinho, companheirismo, paciência e incentivo.

Aos meus familiares pelo incentivo constante e por torcerem por mim.

A professora Leda Mathias pela amizade, paciência e pelas valiosas orientações que somaram no meu conhecimento.

Aos professores Ivo José Curcino Vieira e Raimundo Braz Filho pela orientação e amizade.

Ao professor Carlos pelas preciosas ajudas, idéias e amizade.

Aos amigos que compõem o grupo de pesquisa de produtos naturais e que fazem a rotina de trabalho mais prazerosa, Cecília, Elaine, Fernanda, Graziella, Ildomar, Jucimar, Lanamar, Lara, Leonardo, Márcia, Moema, Vinícius, Virgínia e Wagner.

A amiga Raquel pela amizade e incentivo.

A amiga Luisa companheira de sempre.

Aos técnicos do LCQUI.

## SUMÁRIO

	p.
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Esquemas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Quadros .....	xix
Lista de Fluxogramas .....	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvi
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xix
<b>Capítulo 01:</b> Introdução .....	1
Referências Bibliográficas .....	2
<b>Capítulo 02:</b> Considerações Botânicas .....	3
2.1. Considerações botânicas sobre a família Fabaceae .....	3
2.2. Considerações botânicas sobre o gênero <i>Clitoria</i> .....	4
2.3. Considerações botânicas sobre a espécie <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	4
2.4. Uso na medicina popular e aspectos farmacológicos do gênero <i>Clitoria</i> .....	5
2.5. Referências Bibliográficas .....	8
<b>Capítulo 03:</b> Objetivos .....	11
<b>Capítulo 04:</b> Pesquisa Bibliográfica .....	12
4.1. Pesquisa bibliográfica dos constituintes químicos do gênero <i>Clitoria</i> com registro na literatura .....	12
4.2. Referências Bibliográficas .....	16
<b>Capítulo 05:</b> Substâncias Isoladas .....	18
5.1. Flavonóides isolados de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	18
5.2. Esteróides e terpenóides isolados de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	18
5.3. Dissacarídeos isolados de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	18
<b>Capítulo 06:</b> Determinação Estrutural .....	19
6.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	19
6.1.1. Flavonóides .....	19
6.1.2. Flavonóide SM-07 .....	20

6.1.3. Mistura dos Flavonóides CFM-01A e CFM-01B .....	40
6.1.4. Determinação Estrutural da Substância CFM-01B.....	61
6.1.5. Mistura dos Flavonóides CFM-03A e CFM-03B .....	76
6.1.6. Determinação Estrutural da Mistura de Substâncias SM-05A e SM-05B .....	101
6.2. Esteróides e Terpenóide .....	130
6.2.1. Mistura do Esteróide CFFH-01 e do Diterpeno Linear CFFH-02 .....	130
6.2.2. Mistura dos Esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 .....	147
6.3. Dissacarídeo .....	166
6.3.1. Um Breve Histórico sobre o Dissacarídeo Sacarose .....	166
6.3.2. Dissacarídeo SMA-01 (Sacarose Peracetilada) .....	167
6.4. Referências Bibliográficas .....	179
<b>Capítulo 07: Atividade Antioxidante e Flavonóides Totais .....</b>	<b>181</b>
7.1. Determinação da Atividade Antioxidante dos Extratos de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	181
7.2. Resultados e Discussões da Determinação da Atividade Antioxidante .....	183
7.3. Determinação do Teor de Flavonóides Totais dos Extratos de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	185
7.4. Resultados e Discussões da Determinação do Teor de Flavonóides Totais dos Extratos de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	186
7.5. Referências Bibliográficas .....	189
<b>Capítulo 08: Atividade Citotóxica .....</b>	<b>191</b>
8.1. Avaliação da Atividade Citotóxica frente às Larvas de <i>Artemia salina</i> .....	191
8.2. Resultados e Discussões da Avaliação da Atividade de Citotóxica frente às Larvas de <i>Artemia salina</i> .....	191
8.3. Referências Bibliográficas .....	193
<b>Capítulo 09: Procedimento Experimental .....</b>	<b>194</b>
9.1. Levantamento Bibliográfico .....	194
9.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal .....	194
9.3. Secagem e Moagem do Material Vegetal .....	194
9.4. Materiais e Reagentes Utilizados .....	194

9.5. Preparação dos Extratos Brutos .....	195
9.6. Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexânico .....	196
9.7. Fracionamento Cromatográfico do Extrato Metanólico .....	200
9.8. Fracionamento Cromatográfico do Extrato Metanol/Água .....	209
9.9. Métodos de Análise Utilizados .....	212
9.10. Avaliação da Atividade Antioxidante .....	212
9.11. Avaliação dos Flavonóides Totais .....	213
9.12. Avaliação da Atividade Citotóxica .....	214
9.13. Referências Bibliográficas .....	215
<b>Capítulo 10: Conclusões .....</b>	<b>216</b>



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 01</b> – Constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Clitoria</i> com registro na literatura .....	12
<b>Tabela 02</b> – Deslocamentos químicos dos carbonos do anel C de flavonóides .....	19
<b>Tabela 03</b> – Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) da substância SM-07, em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) ....	22
<b>Tabela 04</b> - Dados espectrais de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) da mistura dos flavonóides CFM-01-A e CFM-01B, em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) ....	42
<b>Tabela 05</b> - Dados espectrais de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) da mistura dos flavonóides CFM-01-A e CFM-01B, em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) ....	43
<b>Tabela 06</b> – Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) do flavonóide CFM-01B, em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm)...	63
<b>Tabela 07</b> – Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) das substâncias CFM-03A e CFM-03B , em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) .....	79
<b>Tabela 08</b> – Dados espectrais, da literatura, de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) da substância SM-05 , em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) .....	80
<b>Tabela 09</b> – Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) da substância SM-05 , em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) .....	104
<b>Tabela 10</b> – Dados espectrais de HMQC e HMBC da substância SM-05, em MeOD. Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) .....	105
<b>Tabela 11</b> – Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) do fitol (CFFH-01) e do lupeol (CFFH-02), em CDCl <sub>3</sub> . Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) .....	133
<b>Tabela 12</b> - Dados espectrais de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) das substâncias CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05, em CDCl <sub>3</sub> . Deslocamentos químicos $\delta_c$ (em ppm) ..	150
<b>Tabela 13</b> – Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ de sacarose octaacetilada (SMA-01), (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	168
<b>Tabela 14</b> – Dados espectrais de RMN $^{13}\text{C}$ de sacarose octaacetilada (SMA-01), (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	169

<b>Tabela 15</b> – Valores de EC <sub>50</sub> dos extratos de <i>C. fairchildiana</i> , utilizando Rutina como padrão .....	184
<b>Tabela 16</b> – Teor de Flavonóides Totais (TFT) dos extratos de <i>C. fairchildiana</i> , utilizando a Rutina como padrão .....	187
<b>Tabela 17</b> – Valores obtidos do teste de letalidade frente às larvas de <i>Artemia salina</i> .....	192

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 01</b> – Proposta de fragmentação do fitol (CFFH-01) .....	131
<b>Esquema 02</b> – Proposta de fragmentação do lupeol (CFFH-02) .....	132
<b>Esquema 03</b> – Proposta de fragmentação para as substâncias CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 .....	149
<b>Esquema 04</b> – Possível interação entre DPPH e o flavonóide rutina .....	183
<b>Esquema 05</b> – Formação do complexo de Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio .....	186

## Lista de Figuras

<b>Figura 01</b> – Fotografia da espécie <i>C. fairchildiana</i> .....	5
<b>Figura 02</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância SM-07.....	23
<b>Figura 03</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H integrado da substância SM-07.....	24
<b>Figura 04</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância SM-07 (região 6,2 a 7,9 ppm) .....	25
<b>Figura 05</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância SM-07 (região 6,8 a 7,8 ppm) .....	26
<b>Figura 06</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância SM-07.....	27
<b>Figura 07</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância SM-07 (região 89 a 170 ppm) .....	28
<b>Figura 08</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância SM-07 (região 79 a 190 ppm) .....	29
<b>Figura 09</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT da substância SM-07 (região 50 a 200 ppm) .....	30
<b>Figura 10</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT da substância SM-07 (região 90 a 180 ppm) .....	31
<b>Figura 11</b> – Espectro de COSY ( <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H ) da substância SM-07.....	32
<b>Figura 12</b> – Espectro de HMQC da substância SM-07.....	33
<b>Figura 13</b> – Ampliação do espectro de HMQC da substância SM-07.....	34
<b>Figura 14</b> – Espectro de HMBC da substância SM-07.....	35
<b>Figura 15</b> – Ampliação do espectro de HMBC da substância SM-07 (região 5,9 - 6,5 PPM).....	36
<b>Figura 16</b> – Ampliação do espectro de HMBC da substância SM-07 (região 5,0 - 6,5 PPM).....	37
<b>Figura 17</b> – Ampliação do espectro de HMBC da substância SM-07 (região 6,5 – 7,2 PPM).....	38
<b>Figura 18</b> – Ampliação do espectro de HMBC da substância SM-07 (região 7,4 – 8,0 PPM).....	39
<b>Figura 19</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos flavonóides CFM-01A e CFM-01B .....	44
<b>Figura 20</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos flavonóides	

CFM-01A e CFM-01B (região 0 a 8,5 ppm) .....	45
<b>Figura 21</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 0,7 a 3,2 ppm) .....	46
<b>Figura 22</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 5,6 a 8,6 ppm) .....	47
<b>Figura 23</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B .....	48
<b>Figura 24</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 61 a 79 ppm) .....	49
<b>Figura 25</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 94 a 106 ppm) .....	50
<b>Figura 26</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 1144 a 124 ppm) .....	51
<b>Figura 27</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 128 a 152 ppm) .....	52
<b>Figura 28</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B (região 157 a 181 ppm) .....	53
<b>Figura 29</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos flavonóides	
CFM-01A e CFM-01B .....	54
<b>Figura 30</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos	
flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região 61 - 79 ppm) .....	55
<b>Figura 31</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos	
flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região 87 - 102 ppm) .....	56
<b>Figura 32</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos	
flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região 101 - 117 ppm) .....	57
<b>Figura 33</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos	
flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região 117 - 133 ppm) .....	58
<b>Figura 34</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos	
flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região 135 - 150 ppm) .....	59
<b>Figura 35</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- APT da mistura dos	
flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região 158 - 182 ppm) .....	60
<b>Figura 36</b> – Espectro de infravermelho da substância CFM-01B.....	64
<b>Figura 37</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide CFM-01B.....	65
<b>Figura 38</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide SM-09	

(região 3,1 - 3,9 ppm) .....	66
<b>Figura 39</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide CFM-01B	
(região 4,4 – 5,5 ppm) .....	67
<b>Figura 40</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide CFM-01B	
(região 6,0 – 7,0 ppm) .....	68
<b>Figura 41</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância CFM-01B.....	69
<b>Figura 42</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância CFM-01B	
(região 83 a 106 ppm) .....	70
<b>Figura 43</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância CFM-01B	
(região 60 a 190 ppm) .....	71
<b>Figura 44</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância CFM-01B	
(região 109 a 128 ppm) .....	72
<b>Figura 45</b> – Espectro de HMBC da substância CFM-01B.....	73
<b>Figura 46</b> – Espectro de HMQC da substância CFM-01B.....	74
<b>Figura 47</b> – Espectro de NOESY da substância CFM-01B.....	75
<b>Figura 48</b> – Espectro de infravermelho das substâncias CFM-03A e	
CFM-03B .....	81
<b>Figura 49</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das substâncias CFM-03A e CFM-03B .....	82
<b>Figura 50</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H das substâncias CFM-03A e	
CFM-03B (região 1,1 – 1,4 ppm) .....	83
<b>Figura 51</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H das substâncias CFM-03A e	
CFM-03B (região 4,3 – 5,3 ppm) .....	84
<b>Figura 52</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H das substâncias CFM-03A e	
CFM-03B (região 6,1 – 7,0 ppm) .....	85
<b>Figura 53</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H das substâncias CFM-03A e	
CFM-03B (região 7,4 – 8,3 ppm) .....	86
<b>Figura 54</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C das substâncias CFM-03A e CFM-03B ....	87
<b>Figura 55</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C das substâncias	
CFM-03A e CFM-03B (região 83 a 106 ppm) .....	88
<b>Figura 56</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C das substâncias	
CFM-03A e CFM-03B (região 66 a 78 ppm) .....	89
<b>Figura 57</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C das substâncias	
CFM-03A e CFM-03B (região 90 a 132 ppm) .....	90
<b>Figura 58</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C das substâncias	

CFM-03A e CFM-03B (região 150 a 180 ppm) .....	91
<b>Figura 59</b> – Espectro de COSY das substâncias CFM-03A e CFM-03B .....	92
<b>Figura 60</b> – Ampliação do espectro de COSY das substâncias CFM-03A e CFM-03B (região 0 a 9,0 ppm) .....	93
<b>Figura 61</b> – Ampliação do espectro de COSY das substâncias CFM-03A e CFM-03B (região 0,3 a 2,1 ppm) .....	94
<b>Figura 62</b> – Ampliação do espectro de COSY das substâncias CFM-03A e CFM-03B (região 2,9 a 4,4 ppm) .....	95
<b>Figura 63</b> – Ampliação do espectro de COSY das substâncias CFM-03A e CFM-03B (região 6,0 a 8,3 ppm) .....	96
<b>Figura 64</b> – Espectro de HMQC das substâncias CFM-03A e CFM-03B .....	97
<b>Figura 65</b> – Ampliação do espectro de HMQC das substâncias CFM-03A e CFM-03B (região 2,8 a 5,3 ppm) .....	98
<b>Figura 66</b> – Ampliação do espectro de HMQC das substâncias CFM-03A e CFM-03B (região 3,0a 9,0 ppm) .....	99
<b>Figura 67</b> – Espectro de HMBC das substâncias CFM-03A e CFM-03B .....	100
<b>Figura 68</b> – Correlação entre hidrogênio anomérico e o hidrogênio H-8 do anel A $\delta_H$ (6,4).....	103
<b>Figura 69</b> – Espectro de infravermelho das substâncias SM-05A e SM-05B .....	106
<b>Figura 70</b> – Espectro de RMN $^1H$ da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	107
<b>Figura 71</b> – Espectro de RMN $^1H$ integrado da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	108
<b>Figura 72</b> – Espectro de RMN $^1H$ integrado da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	109
<b>Figura 73</b> – Ampliação do espectro de RMN $^1H$ da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 1,0 – 2,2 ppm) .....	110
<b>Figura 74</b> – Ampliação do espectro de RMN $^1H$ da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 3,2 – 3,9 ppm) .....	111
<b>Figura 75</b> – Ampliação do espectro de RMN $^1H$ da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 6,1 – 7,0 ppm) .....	112
<b>Figura 76</b> – Ampliação do espectro de RMN $^1H$ da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 7,5 – 8,2 ppm) .....	113

<b>Figura 77</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C-PENDANT da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	114
<b>Figura 78</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- PENDANT da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 60 – 83 ppm) .....	115
<b>Figura 79</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- PENDANT da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 99 – 122 ppm) .....	116
<b>Figura 80</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- PENDANT da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 113 – 124 ppm) .....	117
<b>Figura 81</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C- PENDANT da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 140 – 180 ppm) .....	118
<b>Figura 82</b> – Espectro de HMBC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	119
<b>Figura 83</b> – Ampliação do espectro de HMBC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 7,4 – 8,1 ppm) .....	120
<b>Figura 84</b> – Ampliação do espectro de HMBC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 6,6 – 7,2 ppm) .....	121
<b>Figura 85</b> – Espectro de HMQC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	122
<b>Figura 86</b> – Ampliação do espectro de HMQC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 2,7 – 4,1 ppm) .....	123
<b>Figura 87</b> – Ampliação do espectro de HMQC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 3,7 – 6,4 ppm) .....	124
<b>Figura 88</b> – Ampliação do espectro de HMQC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 5,9 – 8,2 ppm) .....	125
<b>Figura 89</b> – Ampliação do espectro de HMQC da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 7,1 – 8,8 ppm) .....	126
<b>Figura 90</b> – Espectro de NOESY da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	127
<b>Figura 91</b> – Ampliação do espectro de NOESY da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B (região 5,4 – 8,8 ppm) .....	128
<b>Figura 92</b> – Espectro de COSY da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B .....	129
<b>Figura 93</b> – Espectro de infravermelho das substâncias CFFH-01 e CFFH-02 .....	134



<b>Figura 94</b> – Cromatograma de gás da mistura das substâncias CFFH-01 e CFFH-02 .....	135
<b>Figura 95</b> – Espectro de massa da substância fitol (CFFH-01) .....	136
<b>Figura 96</b> – Espectro de massa da substância lupeol (CFFH-02) .....	137
<b>Figura 97</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) .....	138
<b>Figura 98</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 0,6 - 1,8 ppm).....	139
<b>Figura 99</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 1,8 - 3,3 ppm).....	140
<b>Figura 100</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 3,1 - 4,3 ppm).....	141
<b>Figura 101</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 4,1 - 4,8 ppm).....	142
<b>Figura 102</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 5,3 - 5,5 ppm).....	143
<b>Figura 103</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) .....	144
<b>Figura 104</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 13 - 44 ppm) .....	145
<b>Figura 105</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02) (região 46 - 60 ppm) .....	146
<b>Figura 106</b> – Cromatograma de gás da mistura das substâncias CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 .....	151
<b>Figura 107</b> – Espectro de massa (70 eV) do esteróide CFFH-03 .....	152
<b>Figura 108</b> – Espectro de massa (70 eV) do esteróide CFFH-04 .....	153
<b>Figura 109</b> – Espectro de massa (70 eV) do esteróide CFFH-05 .....	154
<b>Figura 110</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 .....	155
<b>Figura 111</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 0,6 - 1,7 ppm) .....	156
<b>Figura 112</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 0,6 - 2,3 ppm) .....	157

<b>Figura 113</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 3,3 – 3,9 ppm) .....	158
<b>Figura 114</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 5,0 – 5,4 ppm) .....	159
<b>Figura 115</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 .....	160
<b>Figura 116</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 11 – 32 ppm) .....	161
<b>Figura 117</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 33 – 72 ppm) .....	162
<b>Figura 118</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 2,9 – 4,0 ppm) .....	163
<b>Figura 119</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 4,7 – 5,5 ppm) .....	164
<b>Figura 120</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura dos esteróide CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 6,0 – 8,2 ppm) .....	165
<b>Figura 121</b> – Espectro de infravermelho da substância SMA-01 .....	170
<b>Figura 122</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância SMA-01 .....	171
<b>Figura 123</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H integrado da substância SMA-01 .....	172
<b>Figura 124</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H integrado da substância SMA-01 (região 1,8 – 2,3 ppm) .....	173
<b>Figura 125</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H integrado da substância SMA-01 (região 3,8 – 4,6 ppm) .....	174
<b>Figura 126</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H integrado da substância SMA-01 (região 4,8 – 5,7 ppm) .....	175
<b>Figura 127</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância SMA-01.....	176
<b>Figura 128</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância SMA-01 (região 166 – 173 ppm) .....	177
<b>Figura 129</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância SMA-01 (região 60 – 103 ppm) .....	178
<b>Figura 130</b> – Análise antioxidante qualitativa dos extratos brutos .....	183
<b>Figura 131</b> – Avaliação do potencial antioxidante (%AA x Concentração) ...	185
<b>Figura 132</b> – Estrutura do flavonóide quercetina e os requisitos que definem um flavonóide como potencial antioxidante .....	188

## Lista de Quadros

<b>Quadro 01</b> – Rotenona e seus análogos .....	6
<b>Quadro 02</b> – Rotenóides isolados de raízes de <i>Clitoria macrophylla</i> .....	7
<b>Quadro 03</b> – Rotenóides com atividade antiinflamatória isolados de raízes de <i>C. fairchildiana</i> .....	7
<b>Quadro 04</b> – Estruturas das antocianinas isoladas do gênero <i>Clitoria</i> com registros na literatura .....	14
<b>Quadro 05</b> – Estruturas dos rotenóides isolados do gênero <i>Clitoria</i> com registro na literatura .....	14
<b>Quadro 06</b> – Estrutura dos flavonóides isolados do gênero <i>Clitoria</i> com registros na literatura .....	15
<b>Quadro 07</b> – Classes de flavonóides .....	20

## Lista de Fluxogramas

<b>Fluxograma 01</b> – Preparação dos extratos brutos de folhas de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	195
<b>Fluxograma 02</b> – Fracionamento do extrato hexânico de folhas de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	197
<b>Fluxograma 03</b> – Fracionamento do extrato metanólico de folhas de <i>Clitoria fairchildiana</i> – Parte em Acetato .....	202
<b>Fluxograma 04</b> – Fracionamento do extrato metanólico de folhas de <i>Clitoria fairchildiana</i> – Parte em Butanol .....	204
<b>Fluxograma 05</b> – Fracionamento do extrato metanólico de folhas de <i>Clitoria fairchildiana</i> utilizando Cromatografia de Contracorrente .....	207
<b>Fluxograma 06</b> – Fracionamento do extrato MeOH/H <sub>2</sub> O de folhas de <i>Clitoria fairchildiana</i> .....	210

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

AA%	Porcentagem de Atividade Antioxidante
Abs	Absorbância
APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografia em Coluna
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva a 50%
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
cm <sup>-1</sup>	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
COSY	Correlation Spectroscopy
DL <sub>50</sub>	Dose Letal suficiente para 50% da população testada
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
$\delta$	Deslocamento químico (ppm)
<i>d</i>	sinal duplo
<i>dd</i>	duploduplete
<i>dl</i>	sinal duplo largo
EM	Espectro de Massas
eV	elétron volt
Glc	glicose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em Hertz)
$\lambda$	Comprimento de Onda

<i>m</i>	sinal múltiplo
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
nm	nanômetro
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
p.	página
ppm	Parte por milhão
RDA	Rearranjo do tipo Diels-Alder
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
Rha	Raminose
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	sinal simples
<i>sl</i>	sinal largo
<i>t</i>	sinal triplo

## RESUMO

QUEIROZ, Débora Contagem de; Universidade Estadual do Norte Fluminense; novembro de 2008; Constituintes químicos e avaliação citotóxica e antioxidante de folhas de *Clitoria fairchiliana* Howard: uma contribuição a química do gênero *Clitoria* (Fabaceae); Orientadora: Leda Mathias; Co-orientadores: Raimundo Braz-Filho e Ivo José Curcino Vieira

O estudo fitoquímico dos extratos de folhas de um espécime de *Clitoria fairchildiana* Howard (Fabaceae) coletada no Município de São Francisco de Itabapoana (RJ) em janeiro de 2006, conduziu ao isolamento e a identificação de constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais. Do extrato hexânico das folhas foram isoladas dois terpenóides: fitol e lupeol e três esteróides: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Do extrato metanólico foram isolados sete flavonóides: 3,3',4',5,7-pentaidroxiflavonol, 5,7,4'-triidroxiglicopiranosilflavonol, 5,7,3',4'-tetraidroxiglicopiranosilflavonol, 3,5,4'-triidroxi-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilflavonol, 3,5,3',4'-tetraidroxi-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilflavonol, 5,7,4'-triidroxi-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1''' $\rightarrow$ 2''')-flavonol, 5,7,3',4'-tetraidroxi-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1''' $\rightarrow$ 2''')-flavonol. Do extrato hidroalcoólico foi isolado um dissacarídeo: sacarose peracetilada.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através de técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a uma e duas dimensões, infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM), bem como por comparação com dados da literatura.

Paralelo à investigação fitoquímica os extratos brutos das folhas foram avaliados quanto à citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina* Leach e antioxidante utilizando o método com DPPH. Ambas as atividades foram observadas significativamente no extrato metanólico o qual se mostrou rico em flavonóides.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Débora Contagem de; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, November 2008; Chemical constituents and cytotoxic and antioxidant evaluation of leaves of *Clitoria fairchildiana* Howard: a contribution to the study of the genus *Clitoria* (Fabaceae); Advisor: Leda Mathias, Co-mentors: Raimundo Braz-Filho and Ivo José Curcino Vieira.

Phytochemical study of extracts from leaves of a specimen of *Clitoria fairchildiana* Howard (Fabaceae) collected in the city of São Francisco de Itabapoana (RJ) in January 2006, led to the isolation and identification of constituents of different classes of special metabolites. Of hexane extract of the leaves had been isolated two terpenoids: phytol and lupeol and three steroids: campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol. Of the methanol extract had been isolated seven flavonoids: 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavonol, 5,7,4'-trihydroxyglucopyranosylflavonol, 5,7,3',4'-tetrahydroxyglucopyranosylflavonol (**CFM-01B**), 3,5,4'-trihydroxy-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosylflavonol, 3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosylflavonol, 5,7,3',4'-trihydroxy-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2''')-flavonol, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2''')-flavonol. Of the hydroalcoholic extract had been isolated from a disaccharide: sucrose peracetylated.

The structural determination of the substances was carried through  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR techniques to one and two dimensions, infrared (IR), mass spectrometry (MS) and by comparison with literature data.

Parallel to the phytochemical investigation, the crude extracts from the leaves had been evaluated through of cytotoxicity against *Artemia salina* larvae and antioxidant using the DPPH method. Both activities had been significantly observed in the methanol extract of which had been isolated the flavonoids.



## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clitoria* pertence à família Fabaceae e conta com cerca de 60 espécies, que são encontradas dentro do cinturão tropical e com poucas espécies em áreas temperadas do globo (Barroso *et. al.*, 1991; Fantz, 1991).

*Clitoria fairchildiana* Howard é uma árvore muitíssimo empregada na arborização urbana, principalmente no Rio de Janeiro, e, em menor escala, noutros Estados da União, devido ao seu rápido crescimento. Alcança tamanho médio, produzindo boa sombra, além de enfeitar o ambiente em virtude das suas bonitas e magnas flores roxo-azuladas-clara, que florescem a partir de dezembro e permanecem até fevereiro. É facilmente propagável pelas sementes, que germinam otimamente, e com crescimento bastante rápido (Rizzini & Mors, 1995).

---

### 1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Ichaso, C. L. F., Costa, C. G., Guimarães, E. T. (1991). *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa, UFV. v. 2. p. 15-97.

Fantz, P.R. (1991). *Ethnobotany of Clitoria (Leguminosae)*. *Economic Botanic*, 45: 511.

Rizzini, C.T. & Mors, W.B. (1995). *Botânica Econômica Brasileira*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Âmbito Cultural.

## 2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae pertencente à ordem Fabales apresenta ampla distribuição geográfica e cerca de 650 gêneros e mais de 18.000 espécies (Barroso *et al.*, 1991).

São plantas que possuem hábitos variados, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perene e também trepadeiras, que vivem nos mais variados ambientes, latitudes e altitudes, mas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Joly, 2002; Chagas & Pimentel, 2003).

Várias espécies são utilizadas como plantas forrageiras, outras como fonte de taninos, resinas e madeiras finas para fabricação de mobílias em geral (Robbins *et al.*, 1964; Heywood, 1971).

Algumas espécies apresentam a capacidade de aumentar a fertilidade do solo, pelo fato de viverem simbioticamente com certas bactérias, como *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*, capazes de fixar o nitrogênio do ar (Joly, 2002).

Apresenta grande importância econômica, pois constitui-se de inestimável fonte de alimentos, como por exemplo o feijão, a soja, o amendoim, a lentilha, entre outros (Heywood, 1971; Rawitscher, 1979; Buckingham, 1994)

A família é subdividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae, sendo que no Brasil estima-se a ocorrência de 56 gêneros e 2.800 espécies na subfamília Mimosoideae; 152 gêneros e 2.800 espécies na Caesalpinoideae e 482 gêneros e 12.000 espécies na subfamília Papilionoideae (Barroso *et al.*, 1991).

Esta última representa o grupo mais evoluído da família e é de distribuição mundial. A maioria de seus representantes arbóreos é encontrada nos trópicos e hemisfério sul e os arbustivos e herbáceos em regiões temperadas do globo (Hutchinson, 1967; Heywood, 1971; Barroso *et al.*, 1991).

A espécie em estudo apresenta a seguinte classificação botânica:

CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA	
CLASSE	ANGIOSPERMAE
SUBCLASSE	DICOTILEDONEAE
SUPERORDEM	ROSIDAE
ORDEM	FABALES
FAMÍLIA	FABACEAE
SUBFAMÍLIA	PAPILIONOIDEAE
TRIBO	GLYCINIAE
GÊNERO	CLITORIA
ESPÉCIE	<i>Clitoria fairchildiana</i>

## 2.2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE O GÊNERO *Clitoria*

O gênero *Clitoria* apresenta aspecto lenhoso, folhas ressupinadas, flores papilionáceas, cálice infundibular com bractéolas, estípulas e estipelas persistentes e ovários pedunculares (Fantz, 1991; Correia, 1975).

O nome *Clitoria* vem de clitóris, referindo-se a semelhança da forma da corola da flor com o aparelho genital feminino (Barroso *et. al.*, 1991).

## 2.3. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A ESPÉCIE *Clitoria fairchildiana*

Conhecida popularmente como sombreiro é uma árvore que alcança de 6 a 12 m de altura, muito racemosa, de rápido crescimento, com folhas trifolioladas, acuminadas, com nervuras laterais oblíquas, aproximadas entre si, retilíneas e mais ou menos paralelas; estípulas subuladas e ovaladas; inflorescência, pubescente, pedunculada e multiflorada; fruto mediano, achatado, percorrido por uma crista espessa, longitudinalmente, em duas faces opostas e valvas que quando maduras, separam-se e retorcem-se em hélice; sementes globosas e escuras; flores azuis vistosas de grande efeito ornamental, geralmente com cerca de 5,5 - 6,0 cm de comprimento (Lorenzi, 1998; Correia, 1975; Rizzini, 1961) (**Figura 01**, p. 05).



**Figura 01.** Fotografia da espécie *C. fairchildiana*

#### **2.4. USO NA MEDICINA POPULAR E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DO GÊNERO *Clitoria***

Várias espécies do gênero já foram utilizadas na medicina popular no tratamento da esterilidade e em casos de distúrbios menstruais (Morton, 1983), e alguns autores relatam a utilização dessas plantas como antídoto contra picadas de cobra e escorpiões do gênero *Buthus* e *Palamnoeus* (Chopra *et. al.*, 1958).

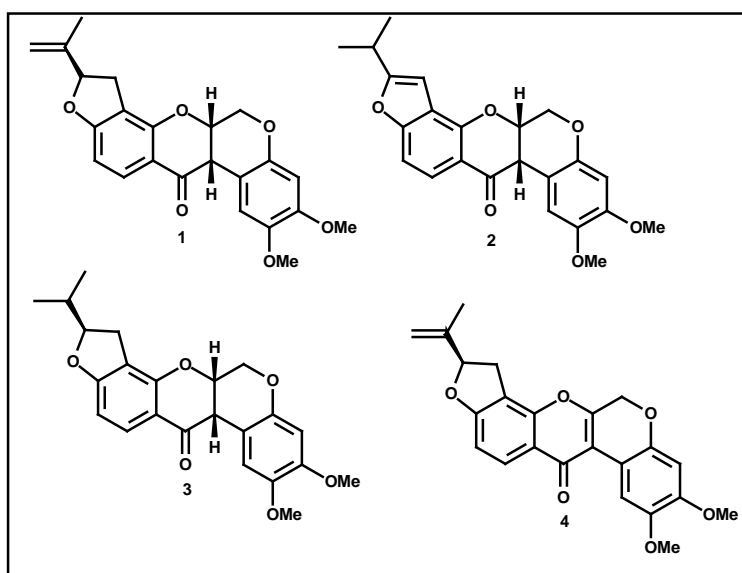
Em algumas regiões do Brasil as raízes de *C. guaianensis*, uma “catuaba”, são colocadas na cachaça e utilizadas como afrodisíaco. O uso destas com esta finalidade tem sido motivo de controvérsias e várias analogias têm sido feitas entre a morfologia das flores e o aparelho genital feminino (Descourtilz, 1826).

A espécie mais pesquisada quanto à ação medicinal é *C. ternatea* a qual é atribuída propriedades laxante, diurética (Fantz, 1991), antiinflamatória, analgésica (Parimala *et. al.*, 2003) e relaxante da musculatura uterina

(Itthipanichpong *et. al.*, 2001), além da presença de proteína com atividades antimicrobiana e inseticida encontrada em suas sementes (Kelemu *et. al.*, 2004). Testes com extrato metanólico das partes aéreas dessa espécie mostraram atividade no sistema nervoso central, atuando como antidepressivo e reduzindo as sensações de ansiedade e estresse, porém não se sabe, até o momento, a substância responsável pela atividade (Jain *et. al.*, 2003).

Algumas espécies do gênero contêm rotenona (1), substância conhecida por suas propriedades inseticida e ictiotóxica, que, também, é atribuída, em menor escala, aos seus análogos isorotenona (2), diidrorotenona (3) e desidrorotenona (4) (**Quadro 01**, p. 06). Em São Paulo, espécies cultivadas de *C. laurifolia* são resistentes ao ataque de fungos e insetos. Na Tailândia o suco do tubérculo de *C. macrophylla* é vaporizado sobre vegetais para matar insetos e o suco das raízes em búfalos para matar vermes que se alojam nas costas desses animais (Smith, 1907).

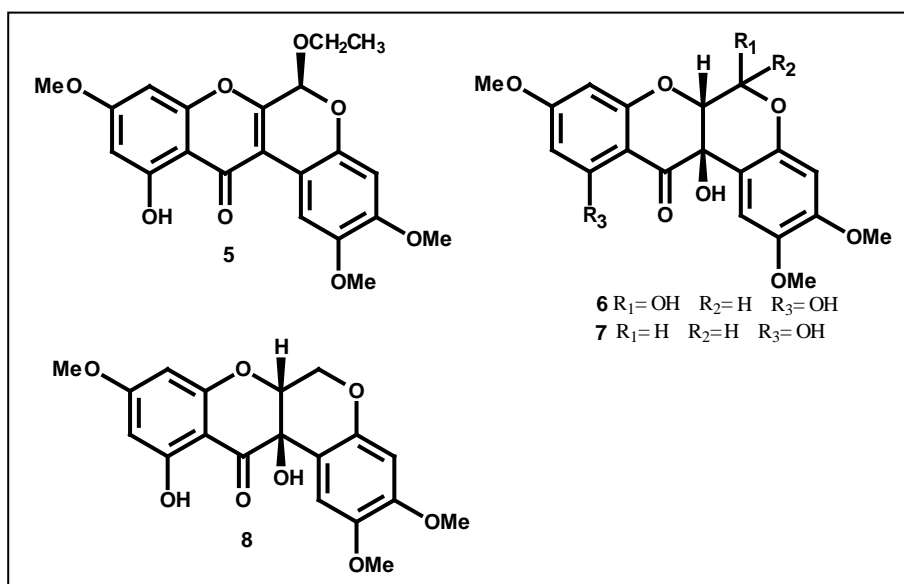
As raízes de *C. javitense* possuem um odor com forte ação repelente contra insetos, enquanto que as flores são utilizadas como atraentes de formigas e abelhas (Chopra *et. al.*, 1958; Gardner & Bennet, 1956).



**Quadro 01- Rotenona e seus análogos**

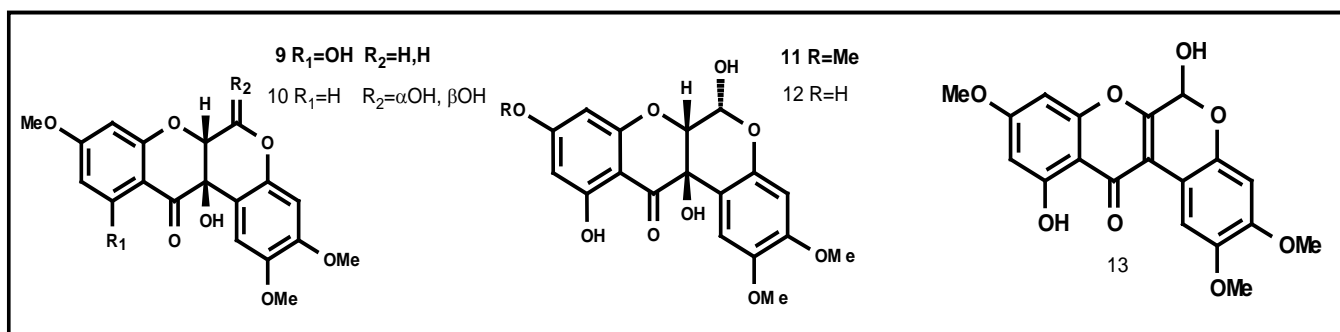
Na espécie *C. macrophylla* os rotenóides stemonacetal (Shientong *et. al.*, 1974) (5) e o clitoriacetal (Silva *et. al.*, 1998) (6), reputados como antiinflamatório e antipirético e o 6-desoxiclitoracetal (Silva *et. al.*, 1998) (7),

reputado como citotóxico em células P- 388 de leucemia linfocítica podem ser destacados (**Quadro 02**, p.07).



**Quadro 02 - Rotenóides isolados de raízes de *Clitoria macrophylla***

A utilização de rotenóides devido as suas propriedades inseticida e ictiotóxica é conhecida desde a antiguidade e vários ensaios são descritos na literatura mostrando a ação de rotenóides sobre insetos e animais de sangue quente. A rotenona, principal representante da classe, apresenta maior toxidez para peixes e insetos do que para mamíferos (Feinstein & Jacobsen, 1963). Outras atividades são atribuídas aos rotenóides, como por exemplo, atividade antiinflamatória. O **quadro 03** (p. 07) mostra alguns exemplos de rotenóides com comprovada atividade antiinflamatória (Silva *et. al.*, 2002).



**Quadro 03 – Rotenóides com atividade antiinflamatórios isolados de raízes de *C. fairchildiana***

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Ichaso, C. L. F., Costa, C. G., Guimarães, E. T. (1991). *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa, UFV. v. 2. p. 15-97.
- Buckingham, J. (1994). *Ed. Dictionary of Natural Products*. Chapman & Hall: London. 1774: p.283, 3856.
- Chagas, M. G. S., Pimentel, R M. (2003). *Anatomia ecológica de três espécies da família Fabaceae num fragmento de floresta estacional*. *Anais do 54º Congresso Nacional de Botânica*. Belém.
- Chopra, R.N., Honda, K. L. & Kapur, L. D. (1958). In: *Indigenous drugs of India*. 2nd (ed. By U. N. Dhur & Sons). Calcutta, p. 501, 600, 604, 606, 607.
- Correia, P.M. (1975). *Dicionário de Plantas Medicinais do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura-Instituto brasileiro de desenvolvimento florestal. v. VII. Rio de Janeiro, p. 139.
- Descourtiz, M.E. (1826). *Sur les Nauchées, genre nouveau dans la famille des legumineuses*. *Memoires de la Société Linnéene*, Paris. v. 4, p. 6.
- Fantz, P.R. (1991). *Ethnobotany of Clitoria (Leguminosae)*. *Economic Botanic*, 45: 511.
- Feinstein, L. & Jacobsen, M. (1963). *Insecticides occurring in higher plants*. In: *Progress in the chemistry of natural products*. v. 10 (ed. By L. Zechmeister). Springer Verlag. Vienna, p. 436.
- Gardner, C & Bennet, H. W. (1956). *The toxic plants of Western Australia*. *Western Australia Newspaper*, Perth.
- Heywood, V.H. (1971) *The Biology and chemistry of the Umbelliferae*, Academic. New York, p. 438.



- 
- Hutchinson, J. (1967). *The genera of flowering plants*. England: Oxford University Press. v. 2, p. 659.
- Itthipanichpong, C., Ruangrunsi, N., Saibundasak, K. (2001). *Relaxant effect of 6- deoxyclitorial on smooth muscle preparation. Journal of Medicinal Association of Thai*. 84 (1): 208-15.
- Jain, N. N., Ohal, C. C., Shroff, S. K., Bhutada, R. H., Somani, R. S., Kasture, V. S., Kasture, S. B. (2003). *Clitoria ternatea and the CNS. Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 75: 529-536.
- Joly, A. B. (2002). *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. Biblioteca universitária. p. 371-382.
- Kelume, S., Cardona, C., Segura, G. (2004). *Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of Clitoria ternateae, a tropical forage legume. Plant Physiology and Biochemistry* 45: 867-873.
- Lorenzi, H. (1998). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odense: Plantarum. p. 352.
- Morton, J. F. (1983). In: *Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas to Yuacatan* (ed. by Charles C. Thomas). Springfield, Il. p. 303.
- Parimala, B. D., Boominaathan, R., Subhash, C. M. (2003). *Anti-inflammatory, analgesis and antipyretic properties of Clitoria ternateae root. Fitoterapia*, 74 (4): 345-9.
- Rawitscher, F. (1979). *Elementos Básicos de Botânica*. p. 318-319.
- Rizzini, C. T. (1961). *Clitoriae brasilienses (Leguminosae)*. *Arquivos do Jardim Botânico*, XVII, 171.

---

Robbins, W. W., Weier, T. E., Stoching, C. R., Wiley, J., Sons, (1964) inc. *An Introduction to Plant Science*. 3 Ed. New York: London, Sydney p 562-565.

Shientong, D. Dovanavik, T., Uaprasert, V. & Renssumaram, S. (1974). Constituents of Thai medicinal plants. III. *New rotenoid compounds-stemonacetal, stemonal and stemone*. *Tetrahedron Letters*, 23: 2015.

Silva, B.P., Bernardo, R.R. & Parente, J.P. (1998). *Rotenoids from roots of Clitoria fairchildiana*. *Phytochemistry* 49 (6): 1787-1789.

Silva, B.P., Bernardo, Parente, J.P. (2002). *Antiinflammatory Activity of Rotenoids from Clitoria fairchildiana*. *Phytotherapy*, 16. S87-S88.

Smith, J. E. (1907). In: Rees, A. *The Cyclopaedia*. 8:16:*Clitoria*. Longman, Hurst, Rees, Orme & Brown, London.

### 3. OBJETIVOS

- ✓ O estudo fitoquímico de folhas da espécie *Clitoria fairchildiana*.
- ✓ Avaliação da atividade citotóxica frente às larvas de *Artemia salina* dos extratos brutos de folhas de *C. fairchildiana*.
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos de folhas de *C. fairchildiana*.

#### 4. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

##### 4.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO GÊNERO *Clitoria* COM REGISTRO NA LITERATURA

Pesquisa realizada no *Chemical Abstracts*, *Webofscience*, *Cyros etc.* registra apenas 03 espécies do gênero *Clitoria* estudadas fitoquimicamente, *C. ternateae*, *C. fairchildiana* e *C. macrophylla*, cujos metabólitos especiais pertencem as seguintes classes de substâncias: antocianinas, rotenóides e flavonóides.

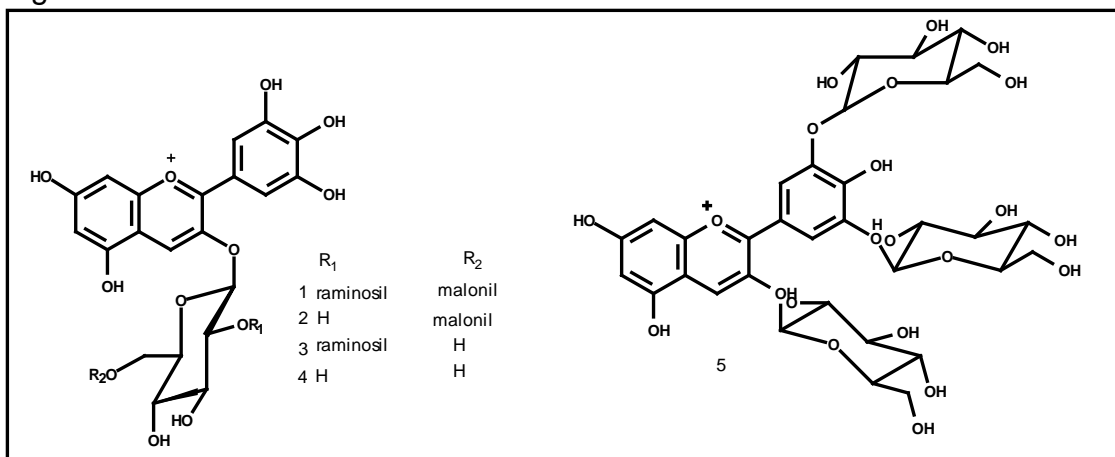
Na **Tabela 01**, p. 12 e 13, encontram-se os resultados desta pesquisa, mostrando as espécies estudadas e seus respectivos constituintes isolados e identificados. As estruturas estão representadas no **Quadro 04, 05 e 06**. p. 14 e 15.

**Tabela 01** – Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Clitoria* com registro na literatura.

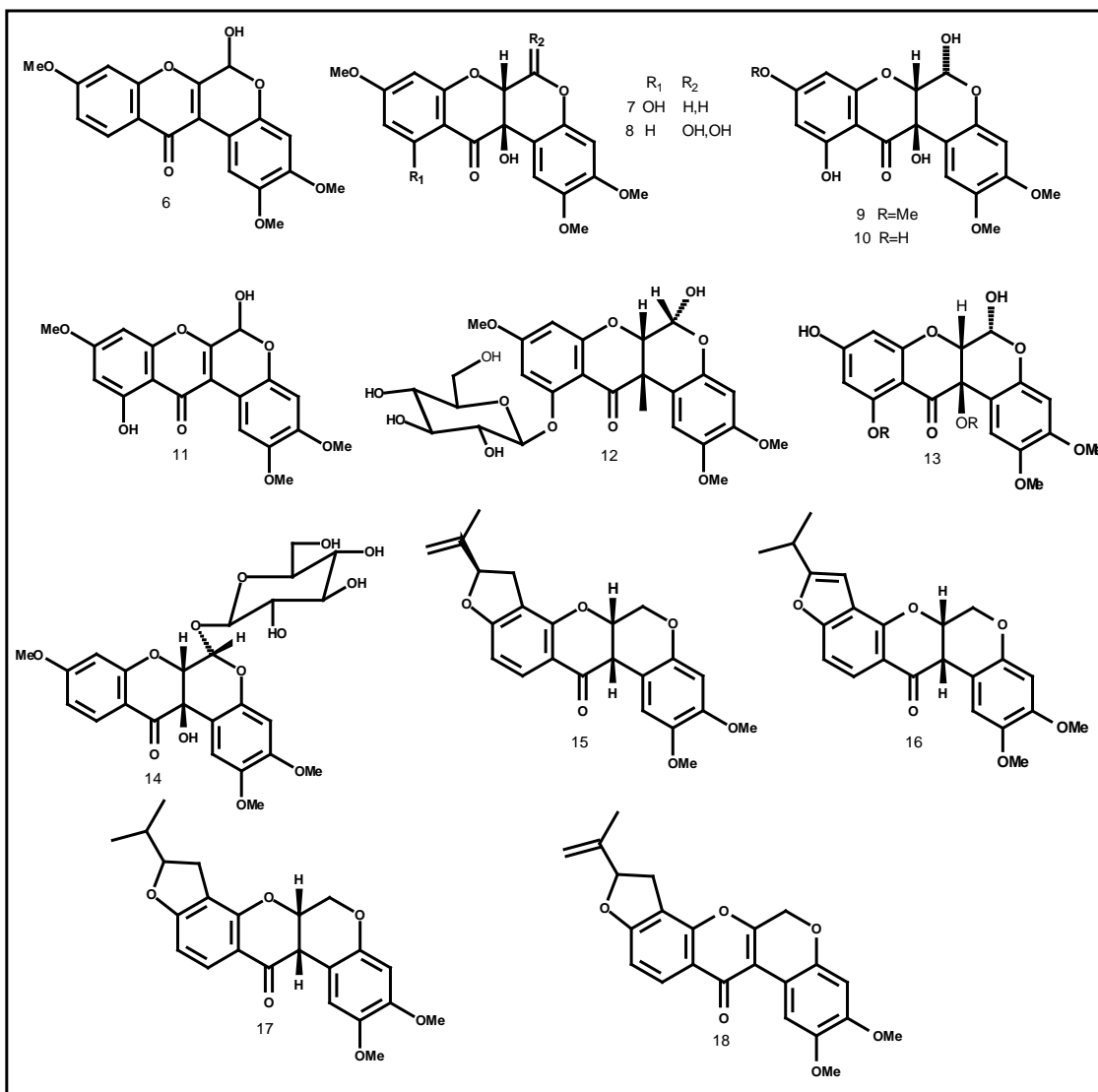
Substância	Espécie	Estrutura	Ref.
Delfinidina 3-O-(2"-O- $\alpha$ -raminopiranosil-6"-O-malonil)- $\beta$ -glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	01	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Delfinidina 3- O -(6"-o-malonil)- $\beta$ - glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	02	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Delfinidina 3-neoesperidosila	<i>C. ternateae</i>	03	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Delfinidina 3-O- $\beta$ - glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	04	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Delfinidina 3,3',5'-tri-O- $\beta$ -D-glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	05	Tehara <i>et. al.</i> , 1990a
6-hidroxi-2,3,9-trimetoxi-[1]-benzopirano[3,4-b][1] benzopirano-12 (6H)-ona	<i>C. fairchildiana</i>	06	Mathias, <i>et. al.</i> , 2005
6-deoxiclitoriacetal	<i>C. macrophylla</i>	07	Lin <i>et. al.</i> , 1992
11-deoxiclitoriacetal	<i>C. fairchildiana</i>	08	Mathias, <i>et. al.</i> , 1998a
Clitoriacetal	<i>C. macrophylla</i> , <i>C. fairchildiana</i>	09	Tagushi <i>et. al.</i> , 1977; Silva <i>et. al.</i> , 1998a
9-demethylclitoriacetal	<i>C. fairchildiana</i>	10	Silva <i>et. al.</i> , 1998a
Stemonal	<i>C. fairchildiana</i>	11	Shientong <i>et. al.</i> , 1974; Silva <i>et. al.</i> , 1998a
Clitoriacetal 11- O - $\beta$ -D- glicopiranosila	<i>C. fairchildiana</i>	12	Silva <i>et. al.</i> , 1998b

6a, 12a-diidro-6,9,11,12a-tetraidroxi-2,3-dimetoxi-[1]benzopirano[3,4-b][1] benzopiran-12(6H)-ona	<i>C. fairchildiana</i>	13	Silva <i>et. al.</i> , 1998b
11 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosilrotenóide	<i>C. fairchildiana</i>	14	Mathias <i>et. al.</i> , 1998b
Rotenona	<i>C. macrophylla</i>	15	Tagushi <i>et. al.</i> , 1977
Isorotenona	<i>C. macrophylla</i>	16	Tagushi <i>et. al.</i> , 1977
Diidorotenona	<i>C. macrophylla</i>	17	Tagushi <i>et. al.</i> , 1977
Desidorotenona	<i>C. macrophylla</i>	18	Tagushi <i>et. al.</i> , 1977
Canferol-3-O-(2''-O- $\alpha$ -raminosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	19	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Quercetina-3-O (2''-O- $\alpha$ -raminosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	20	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Miricetina-3-2-raminosilrutinosila	<i>C. ternateae</i>	21	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Quercetina-3-2-raminosilrutinosila	<i>C. ternateae</i>	22	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Canferol-3-2-raminosilrutinosila	<i>C. ternateae</i>	23	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Canferol 3-neoesperidosila	<i>C. ternateae</i>	24	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Quercetina 3-neoesperidosila	<i>C. ternateae</i>	25	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Miricetina 3-neoesperidosila	<i>C. ternateae</i>	26	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Canferol 3-rutinosila	<i>C. ternateae</i>	27	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Quercetina 3-rutinosila	<i>C. ternateae</i>	28	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Miricetina 3-rutinosila	<i>C. ternateae</i>	29	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Canferol 3- glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	30	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Quercetina 3- glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	31	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
Miricetina 3- glicopiranosila	<i>C. ternateae</i>	32	Kazuma <i>et. al.</i> , 2003
5,7-diidroxi, 4'-metoxi-isoflavona	<i>C. fairchildiana</i>	33	Gomes <i>et. al.</i> , 2005
5,4'-diidroxi, -7metoxi-isoflavona	<i>C. fairchildiana</i>	34	Gomes <i>et. al.</i> , 2005
5,7,4'-triidroxiisoflavona	<i>C. fairchildiana</i>	35	Gomes <i>et. al.</i> , 2005
5,7,4'-triidroxiiflavanona	<i>C. fairchildiana</i>	36	Gomes <i>et. al.</i> , 2005

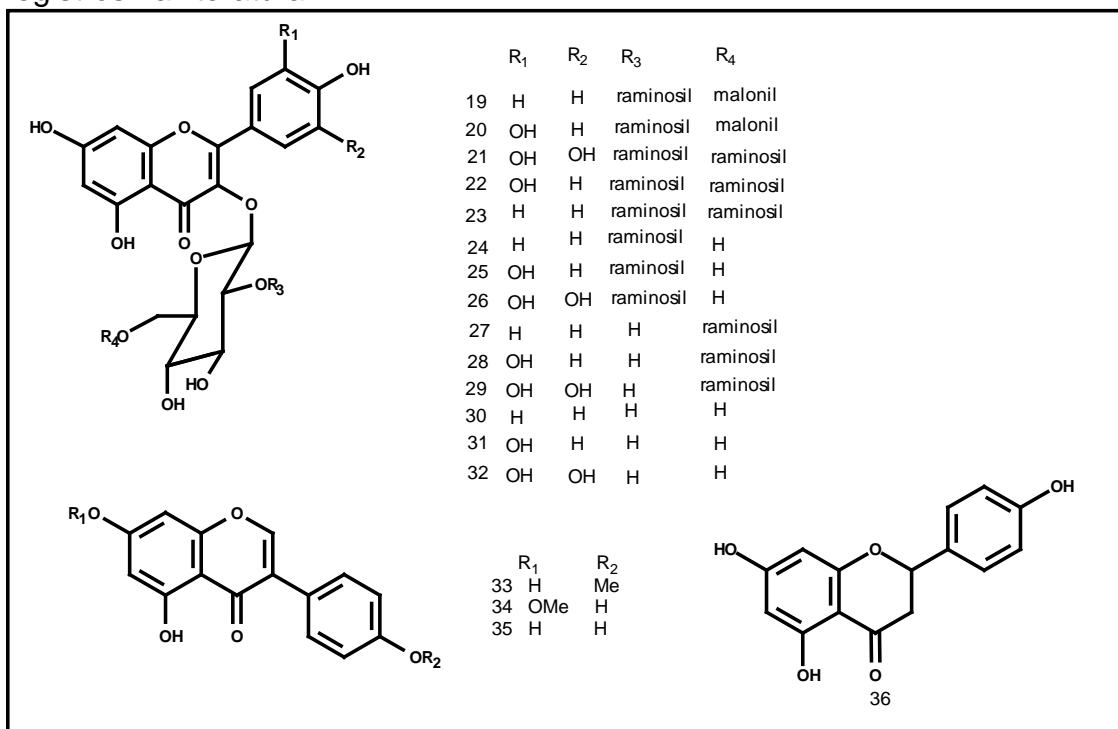
**Quadro 04** – Estrutura das antocianinas isoladas do gênero *Clitoria* com registros na literatura



**Quadro 05** – Estrutura dos rotenóides isolados do gênero *Clitoria* com registros na literatura



**Quadro 06** – Estrutura dos flavonóides isolados do gênero *Clitoria* com registros na literatura



#### 4.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gomes, M.S. da R., Júnior, J. G. R., Pereira, A. H. F., Carvalho de, M. G., Carvalho de, A. G. (2005). *Flavonóides isolados de Clitoria fairchildiana Howard (Leguminosae). Livro de Resumos da 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, PN-269.
- Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M. (2003). *Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea. Phytochemistry* 62 (2): 229-237.
- Lin, L.J.; Ruanguingsi, N.; Cordell G.A. ; Shieh, H. L. ; You, M. & Pezzuto, J. M. (1992). *6-Deoxyclitoriacetal from Clitoria macrophyla. Phytochemistry*, 31 (12): 4329.
- Mathias, L. Mors, W. B. & Parente, J. P. (1998a). *The rotenoids from seeds of Clitoria fairchildiana. Phytochemistry* 48 (8):1449.
- Mathias, L., Vieira, I. J. C., Braz-Filho, R. & Rodrigues-Filho, E. (1998b). *Novel 11 $\alpha$ -O- $\beta$ -D- glucopyranosylrotenoid isolated from Clitoria fairchildiana. Natural Product Letters*. 11: 119.
- Mathias, L., da Silva, B. P., Mors, W. B., Parente, J. P. (2005). *Isolation and structural elucidation of a novel rotenoid from the seeds of Clitoria fairchildiana. Natural Product Research*. 19 (4) 325-329.
- Shientong, D. Dovanavik, T., Uaprasert, V. & Renssumaram, S. (1974). *Constituents of Thai medicinal plants. III. New rotenoid compounds- stemonacetal, stemonal and stemone. Tetrahedron Letters*, 23: 2015.
- Silva, B.P., Bernardo, R.R. & Parente, J.P. (1998a). *Rotenoids from roots of Clitoria fairchildiana. Phytochemistry*, 49 (6): 1787.
- Silva, B.P., Bernardo, R.R. & Parente, J.P. (1998b). *Clitoriacetal 11—O-beta-D- glucopyranoside from Clitoria fairchildiana. Phytochemistry*, 47 (1): 121.



---

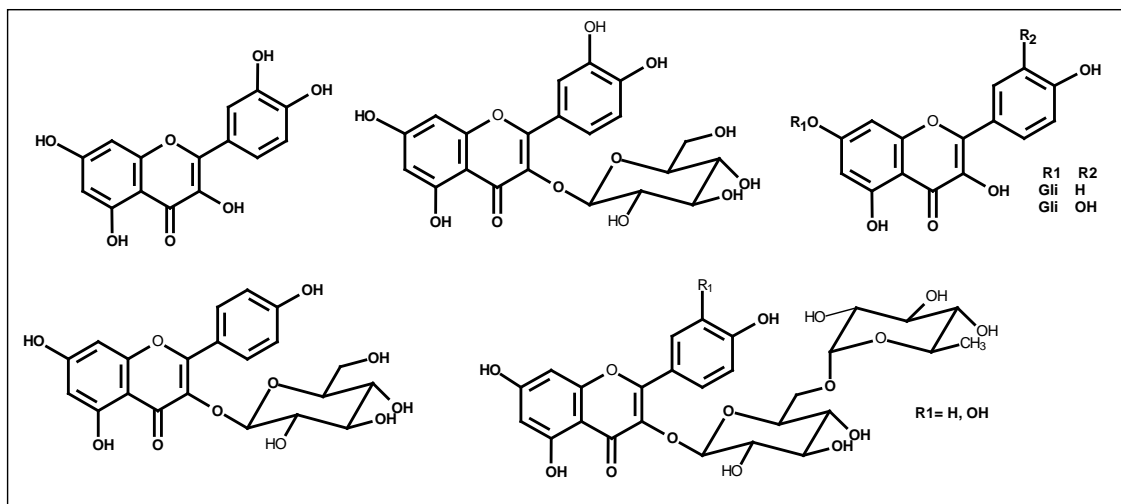
Tagushi, H., Kanchanapee, P. & Amatayakul, T. (1977). *The constituents of Clitoria macrophylla Wall. Cat. Thai medicinal plant. The structure of a new rotenoid, clitoriactal. Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 25(5): 1026.

Tehara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. & Osajima, Y. (1990a). *Further structural elucidation of the anthocyanin, deacylaternatin, from Clitoria ternatea. Phytochemistry*, 29 (11): 3686.

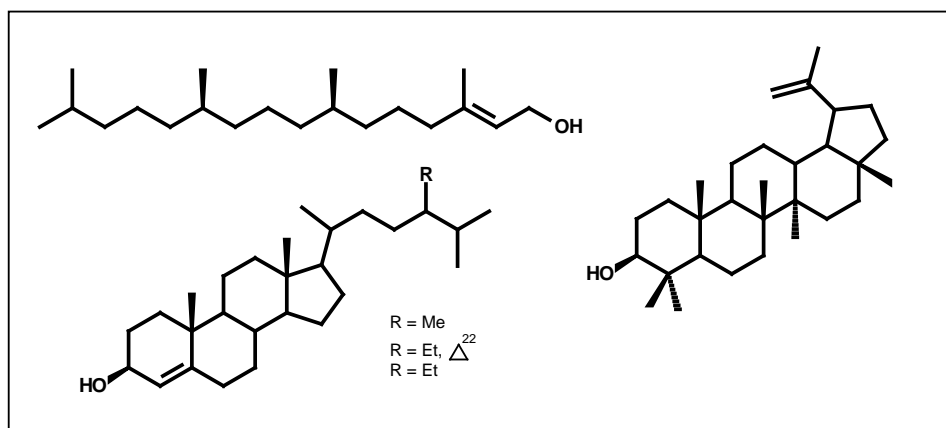
## 5. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Do extrato das folhas de *C. fairchildiana* foram isolados: 07 flavonóides, 03 esteróide, 01 diterpeno linear, 01 triterpeno e 01 dissacarídeo.

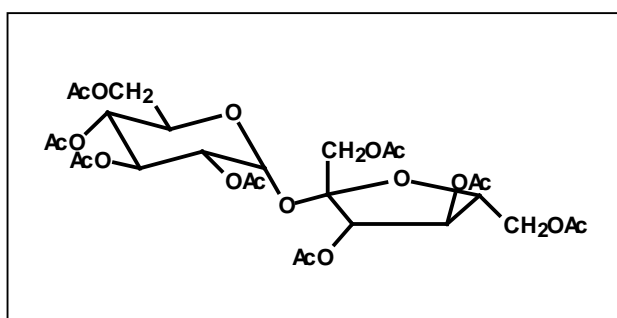
### 5.1. FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana*



### 5.2. ESTERÓIDES E TERPENÓIDES ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana*



### 5.3. DISSACARÍDEO ISOLADO DE *Clitoria fairchildiana*



## 1 6. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

### 6.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana*

O estudo fitoquímico da espécie *Clitoria fairchildiana* após utilização de vários métodos cromatográficos levou ao isolamento das seguintes substâncias: no extrato hexânico das folhas: CFFH-01, CFFH-02, CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05; do extrato metanólico das folhas: CFM-01A, CFM-01B, CFM-03A, CFM-03B, SM-05A, SM-05B e SM-07 e do extrato hidroalcoólico das folhas: SMA-01.

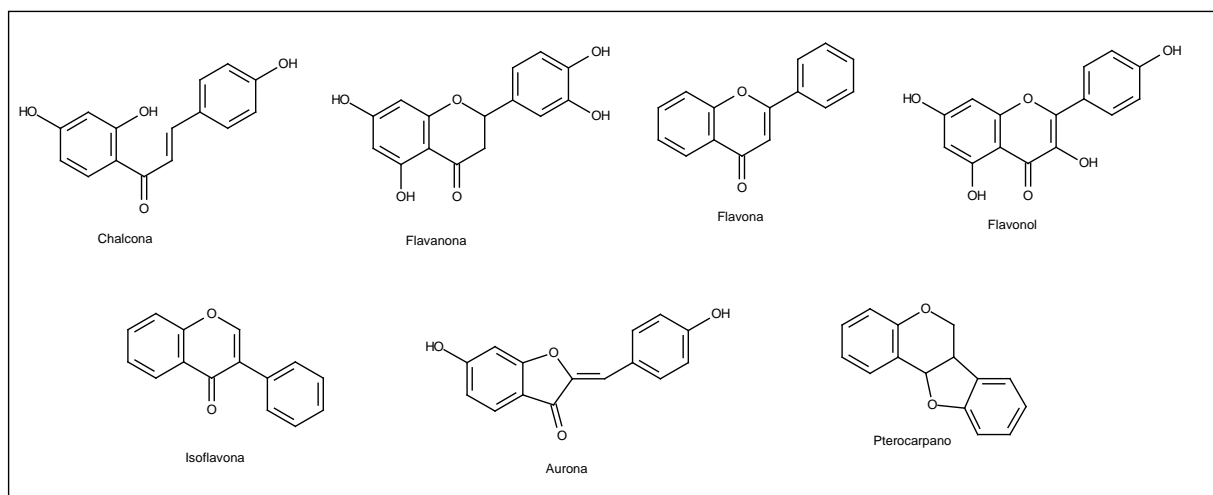
#### 6.1.1. FLAVONÓIDES

A ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  através do deslocamento químico dos três átomos de carbono do anel C ajuda na distinção dos diferentes tipos de aglicona (**Tabela 02**, p. 19, **Quadro 07**, p. 20). No que diz respeito ao deslocamento químico de RMN  $^1\text{H}$  de flavonóides podemos sumarizar que os prótons dos anéis **A** e **B** aparecem entre  $\delta_{\text{H}}$  6,0-8,0 e são dependentes da presença de hidrogênios *orto* ou *meta* ( $J_{\text{orto}} \approx 7,9$  Hz e  $J_{\text{meta}} \approx 1,0-2,5$  Hz) (Agrawal & Markham, 1989).

**Tabela 02.** Deslocamento químico dos carbonos do anel **C** de flavonóides\*

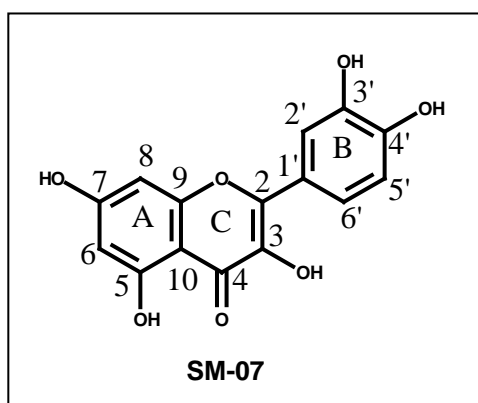
Classes	C-2/ multiplicidade	C-3/ multiplicidade	>C=O/ multiplicidade
Chalcona	136,9-145,4( <i>d</i> )	116,6-128,1( <i>d</i> )	188,6-194,6( <i>s</i> )
Flavanona	75,0-80,3( <i>d</i> )	42,8-44,6( <i>t</i> )	189,5-195,5( <i>s</i> )
Flavona	160,5-165,0( <i>s</i> )	103,0-11,8( <i>d</i> )	176,3-184( <i>s</i> )
Flavonol	145,0-150,0	136,0-139,0	172,0-177,0
Isoflavona	149,8-155,4( <i>d</i> )	122,3-125,9( <i>s</i> )	174,5-181,0( <i>s</i> )
Aurona	146,1-147,7( <i>s</i> )	111,6-111,9( <i>d</i> ) (=CH-)	182,5-182,7( <i>s</i> )
Pterocarpano	66,4-66,5( <i>t</i> ) (C-6)	39,5-40,2(C-6a)	78,4-78,5( <i>d</i> ) (C-11a)

\*Marham & Chari, 1976



**Quadro 07 – Classes de flavonóides**

### 6.1.2 FLAVONÓIDE SM-07



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 02**, p.23, **Tabela 03**, p.22) da substância SM-07, observou-se absorções características de anel A com padrão de substituição *meta* em  $\delta_{\text{H}}$  [6,2 (1H, *d*,  $J=1,8$  Hz) e 6,4 (1H, *d*)] e anel B com padrão de substituição *orto* em  $\delta_{\text{H}}$  [6,9 (1H, *d*,  $J=8,2$ ) e 7,2 (1H, *d*,  $J=8,2$ )] e *meta*  $\delta_{\text{H}}$  [7,7 (1H, *s*)] e no espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 06**, p.27., **Tabela 03**, p.22) os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  [98,1 (C-6); 93,2 (C-8); 114,6 (C-2'); 114,8 (C-5') e 120,3 (C-6')]. Os carbonos não hidrogenados do anel A foram identificados pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  [161,1 (C-5); 164,7 (C-7); 156,9 (C-9) e 103,3 (C-10)] enquanto que os do anel B estão caracterizados pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  [122,8 (C-1'); 144,9 (C-3') e 146,6 (C-4')]. A carbonila em ligação hidrogênio com a hidroxila em C-5 está representada pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  [175,9 (C-4)].

Para confirmar a posição das hidroxilas no anel A e B foram realizados espectros bidimensionais COSY (**Figura 11**, p. 32) e HMQC (**Figura 12**, p. 33) e HMBC (**Figura 14** p. 35).

O COSY mostra correlação entre 6,8 (5') e 7,6 (6'), e o mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ( $^1J_{CH}$ ) (**Figura 12**, p. 33) permitiu confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -APT, através das correlações existentes entre o carbono CH-6 a  $\delta_c$  (98,1) com o hidrogênio H-6 a  $\delta_H$  (6,2); o carbono CH-8 a  $\delta_c$  (93,2) com o hidrogênio H-8 a  $\delta_H$  (6,4); o carbono CH-2' a  $\delta_c$  (114,6) com o hidrogênio H-2' a  $\delta_H$  (7,7); o carbono CH-5' a  $\delta_c$  (114,9) com o hidrogênio H-5' a  $\delta_H$  (6,8); o carbono CH-6' a  $\delta_c$  (120,3) com o hidrogênio H-6' a  $\delta_H$  (7,6).

O mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC ( $^nJ_{CH}$ ) permitiu correlacionar de forma inequívoca os assinalamentos da substância SM-07 através das correlações do carbono CH-5 a  $\delta_c$  (161,1) com o hidrogênio H-6 a  $\delta_H$  (6,2); do carbono CH-7 a  $\delta_c$  (164,7) com o hidrogênio H-6 a  $\delta_H$  (6,2); do carbono CH-5' a  $\delta_c$  (114,91) com o hidrogênio H-6' a  $\delta_H$  (7,6); do carbono CH-8 a  $\delta_c$  (93,2) com o hidrogênio H-6 a  $\delta_H$  (6,2); do carbono CH-6 a  $\delta_c$  (98,1) com o hidrogênio H-8 a  $\delta_H$  (6,4); do carbono CH-10 a  $\delta_c$  (103,3) com os hidrogênios H-6 a  $\delta_H$  (6,2) e H-8 a  $\delta_H$  (6,4); do carbono CH-1' a  $\delta_c$  (122,8) com o hidrogênio H-5' a  $\delta_H$  (6,8); do carbono CH-3' a  $\delta_c$  (144,9) com o hidrogênio H-5' a  $\delta_H$  (6,8); do carbono CH-2' a  $\delta_c$  (114,6) com o hidrogênio H-6' a  $\delta_H$  (7,6); do carbono CH-6' a  $\delta_c$  (120,3) com o hidrogênio H-2' a  $\delta_H$  (7,7); do carbono CH-4' a  $\delta_c$  (146,6) com o hidrogênio H-2' a  $\delta_H$  (7,7).

**Tabela 03.** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da substância **SM-07**, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm).

	HMQC		HMBC		Markham & Chari, 1976*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>					
2	147,5	-			147,7
3	135,9	-			136,5
4	175,9	-			176,2
5	161,1	-	H-6		160,9
7	164,7	-	H-6		164,3
9	156,9	-			156,6
10	103,3	-		H-8, H-6	103,4
1'	122,8	-		H-5'	125,4
3'	144,9	-		H-5'	145,4
4'	146,6	-		H-2'	148,1
<b>CH</b>					
6	98,1	6,2 ( <i>d</i> , 1,8)		H-8	98,5
8	93,2	6,4 ( <i>d</i> , 1,8)		H-6	93,7
2'	114,6	7,7 ( <i>s</i> )		H-6'	116,7
5'	114,9	6,8 ( <i>d</i> , 8,2)	H-6'	-	116,3
6'	120,3	7,6 ( <i>d</i> , 8.2)		H-2'	121,7

\*(DMSO)

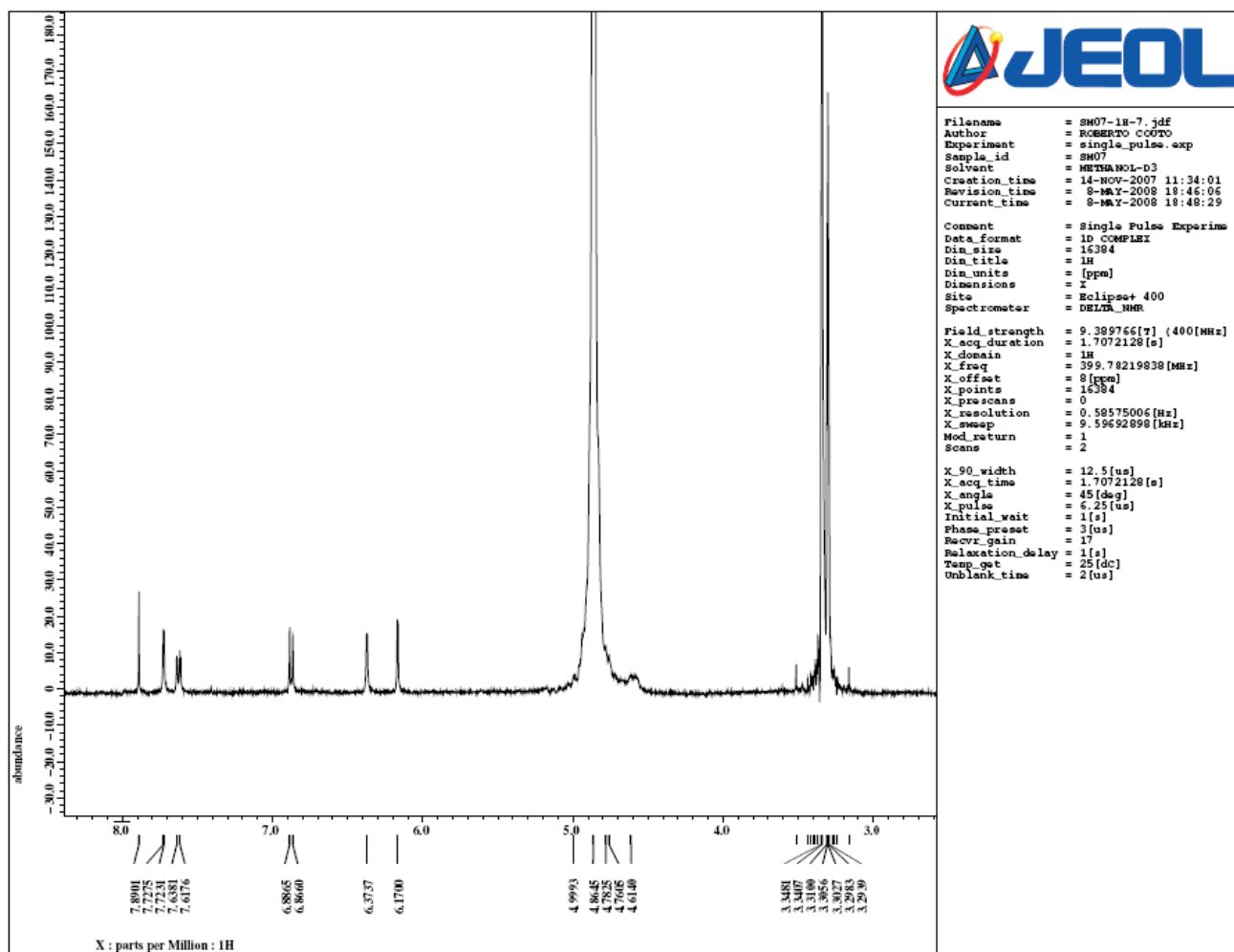
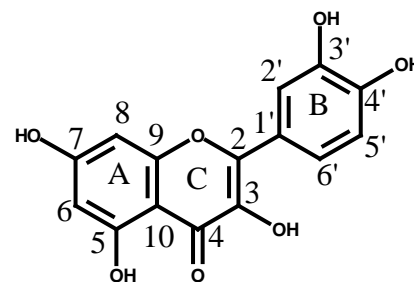


Figura 02 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância SM-07

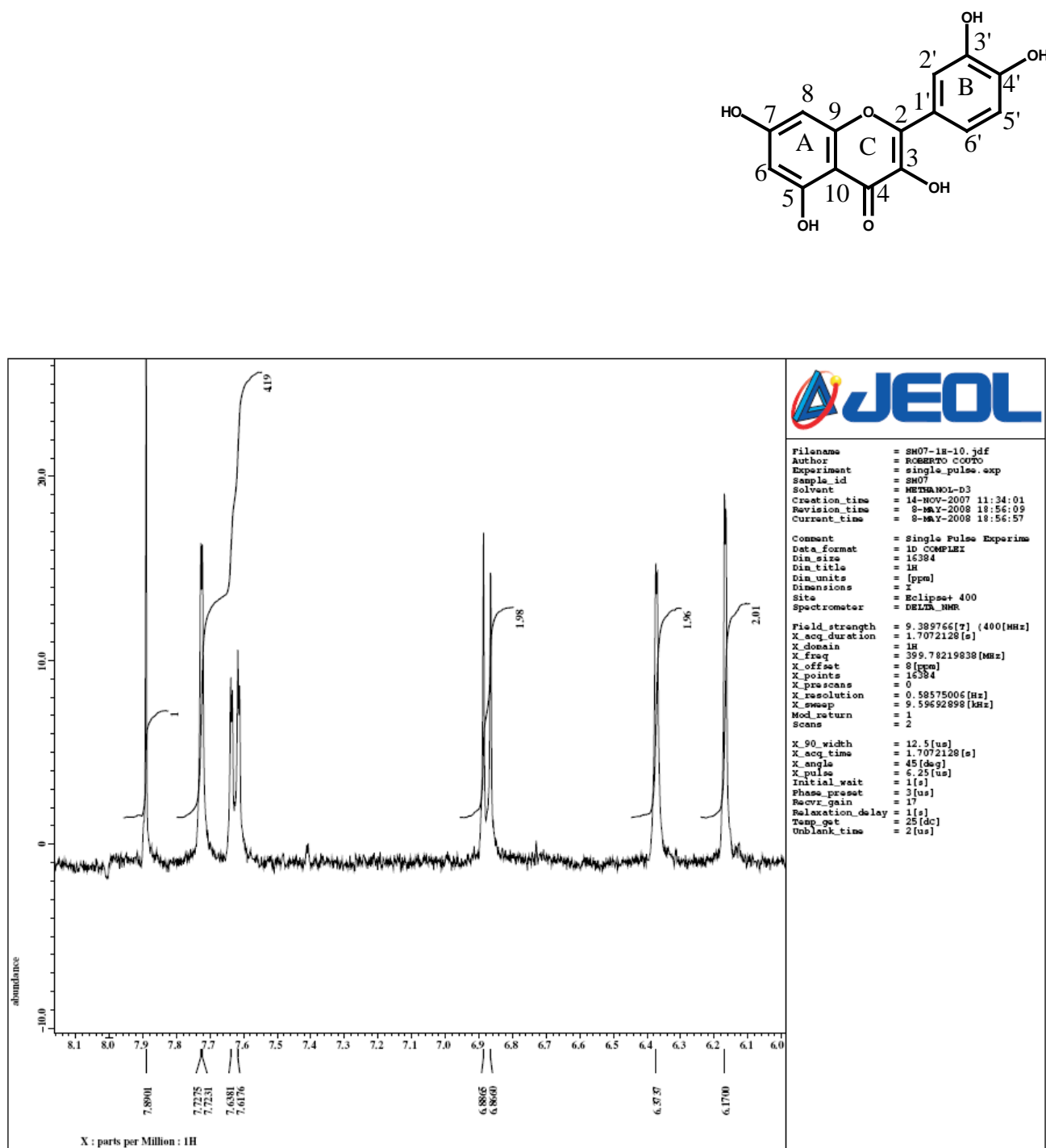
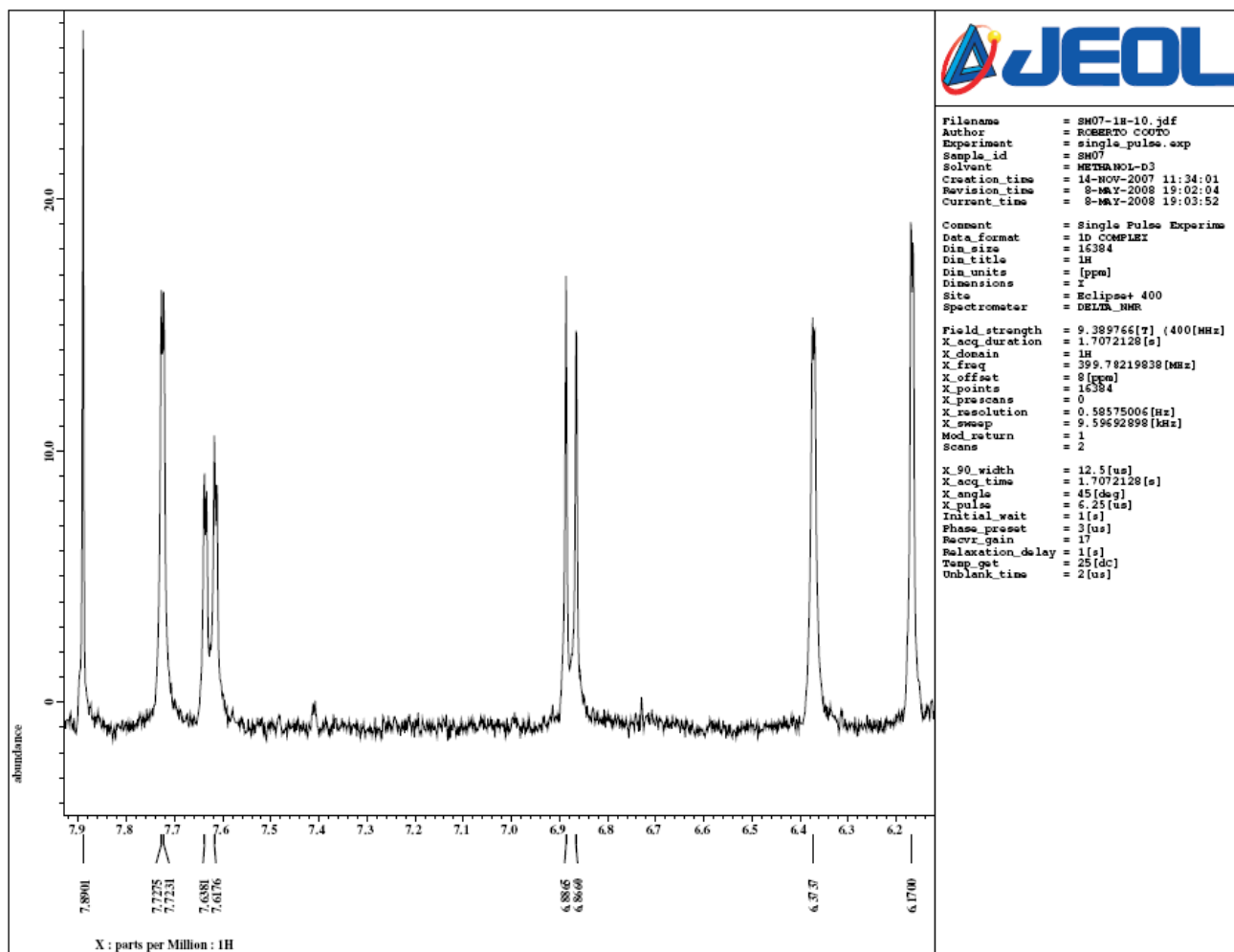
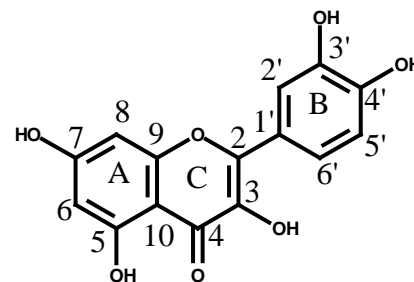
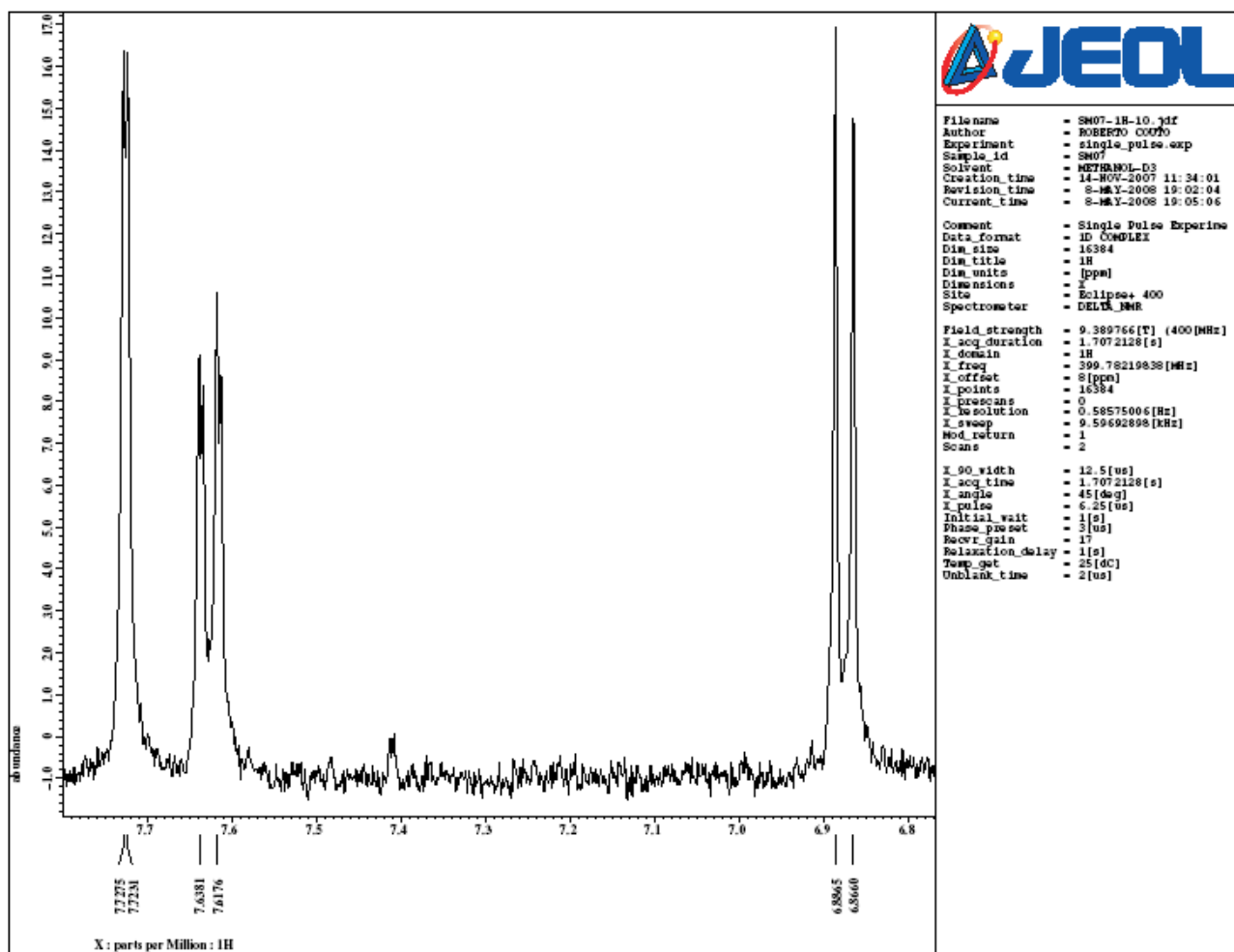
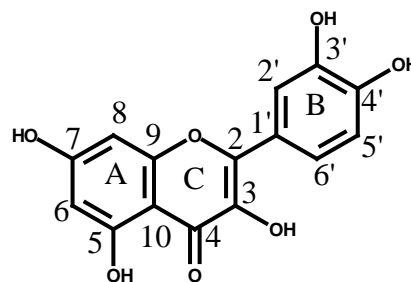


Figura 03 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H integrada da substância **SM-07**





**Figura 04** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **SM-07**  
(região de 6,2 a 7,9 ppm)



**Figura 05** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **SM-07**  
(região de 6,8 a 7,8 ppm )

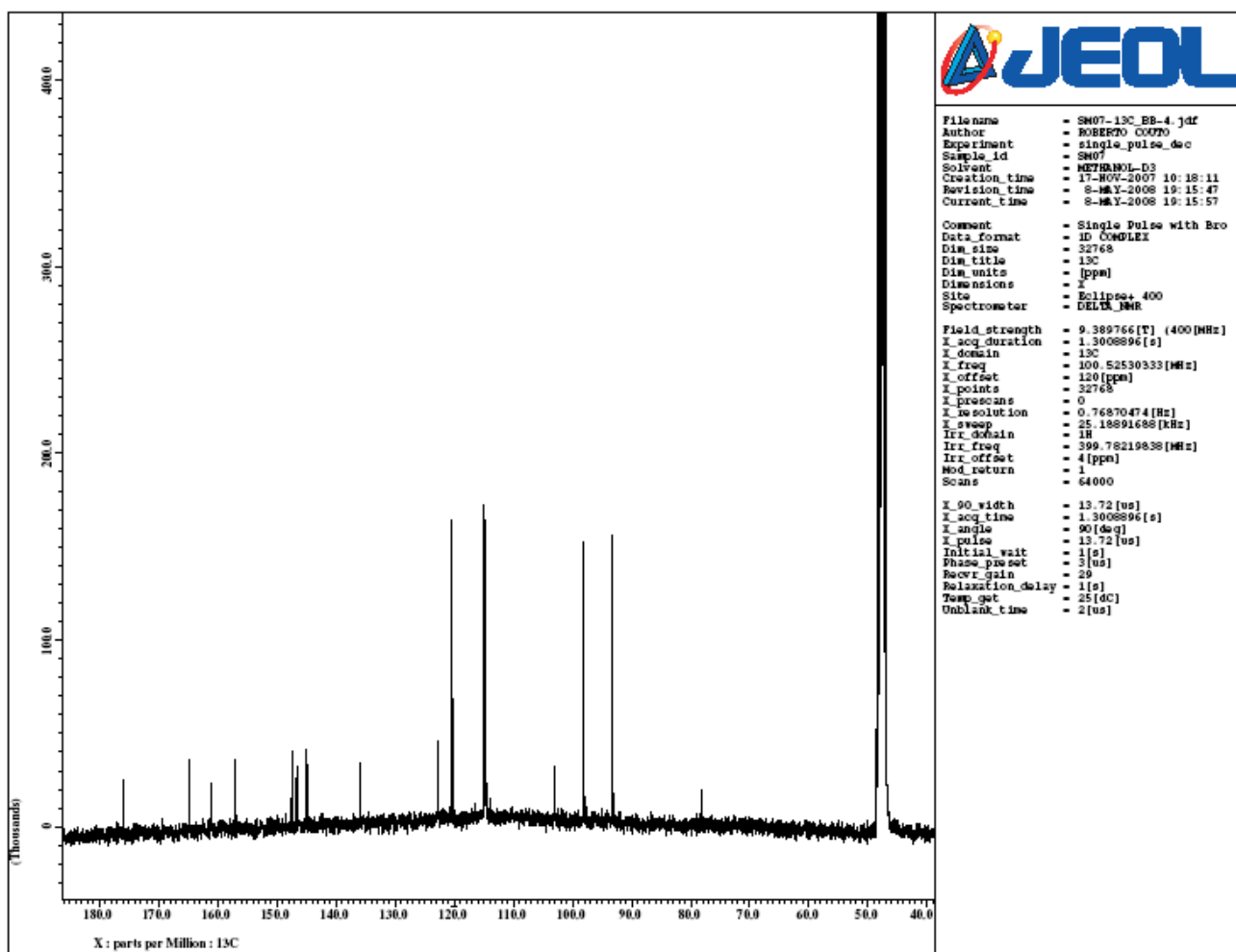
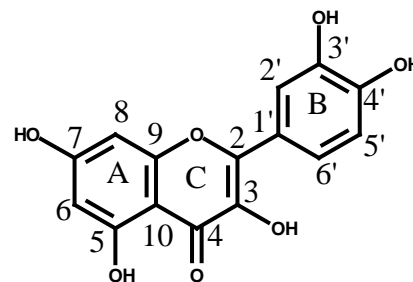
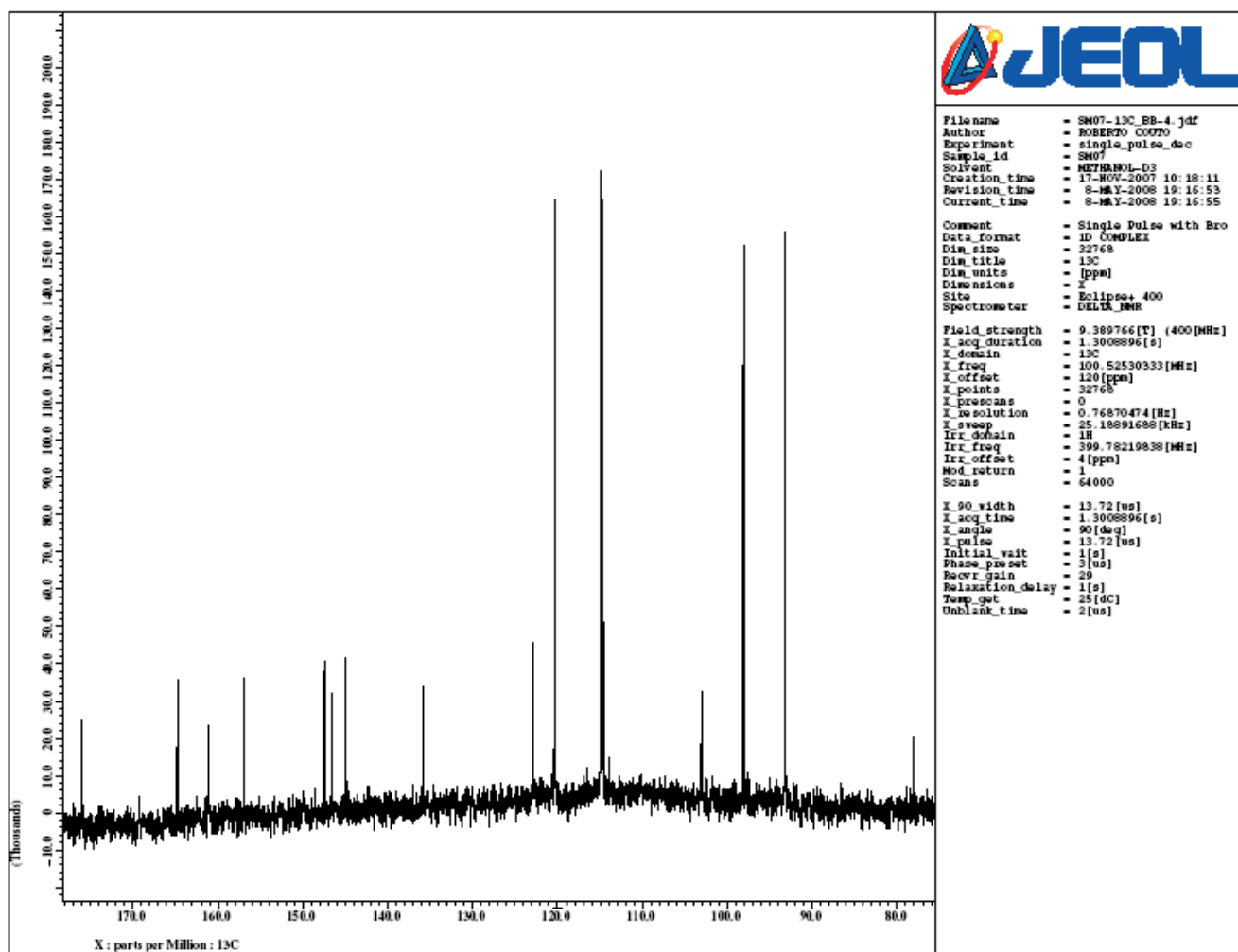
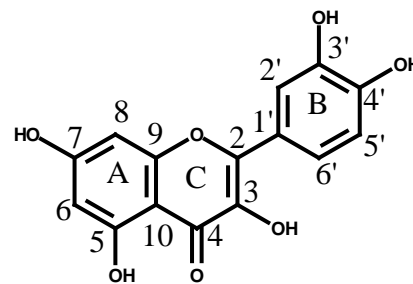
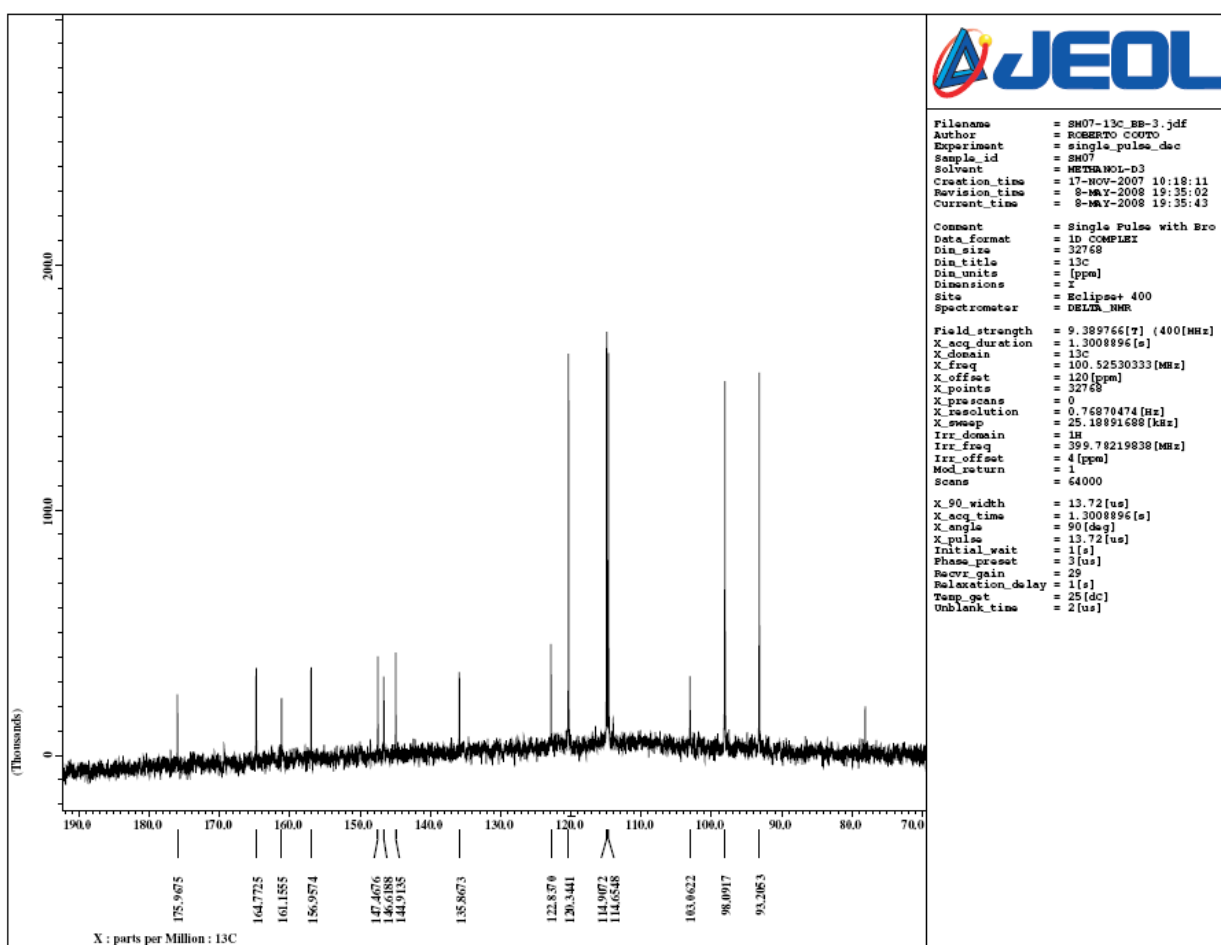
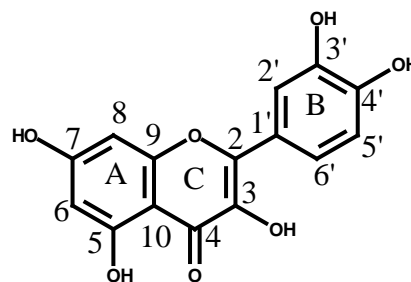


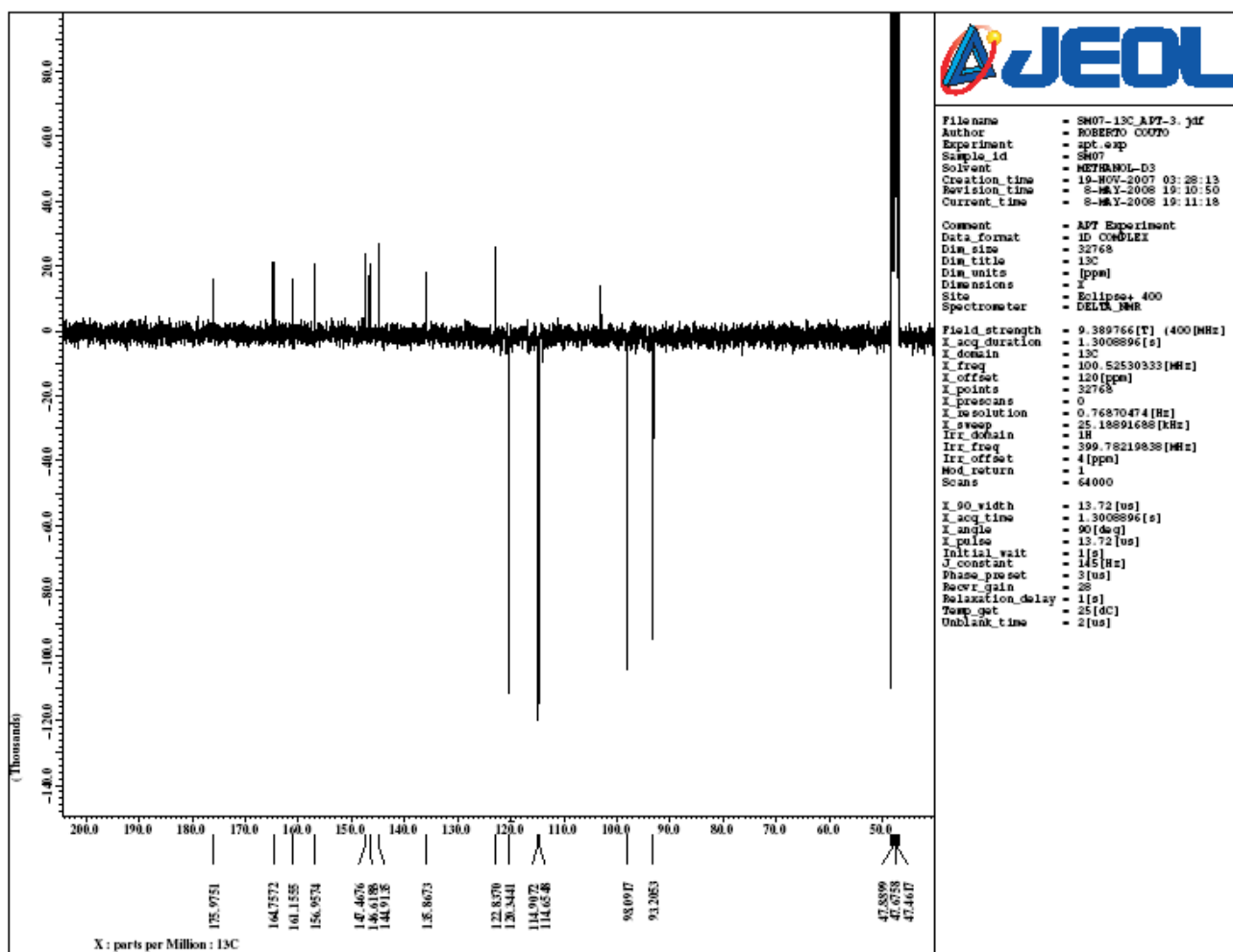
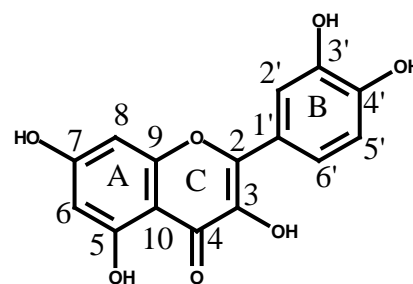
Figura 06 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância SM-07



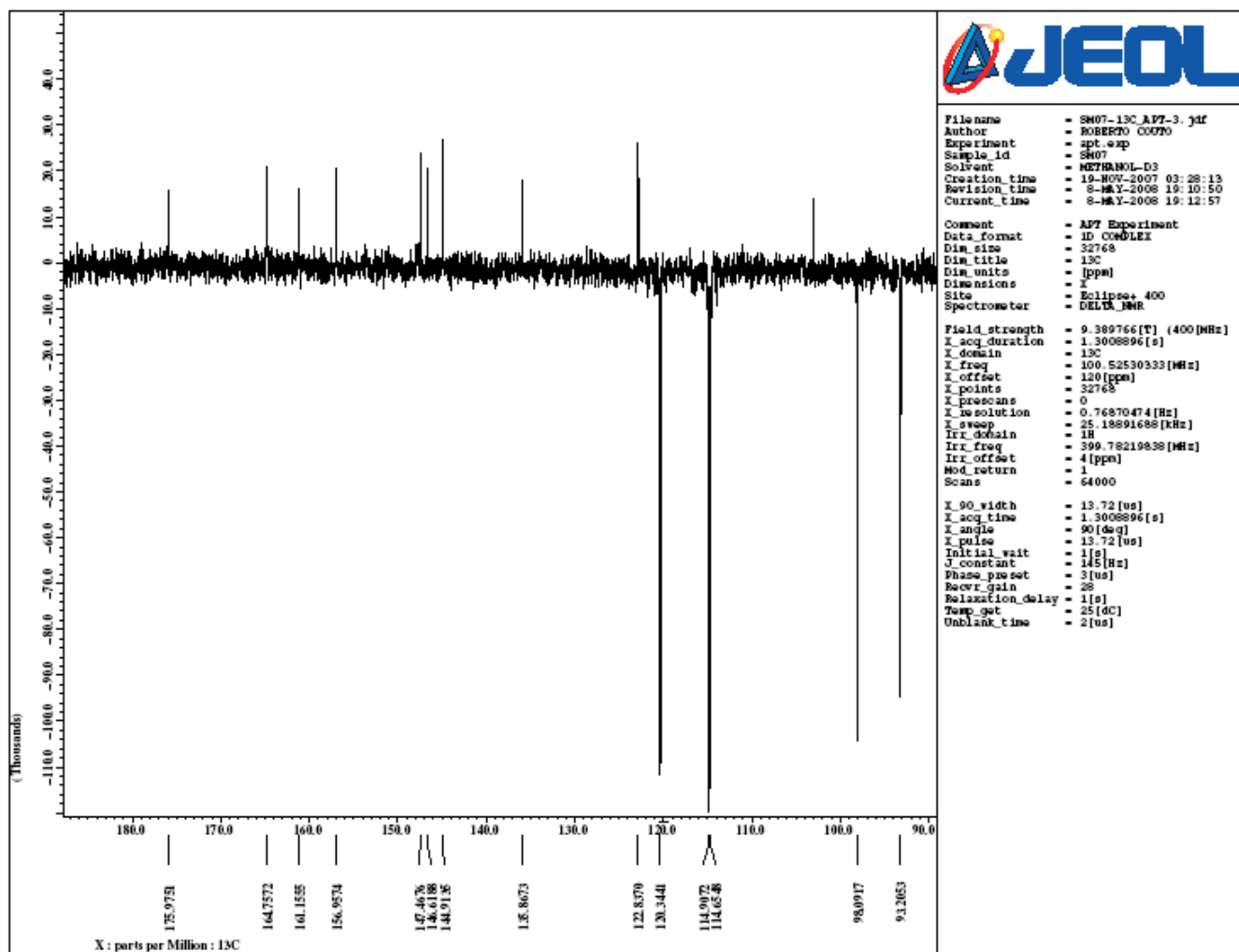
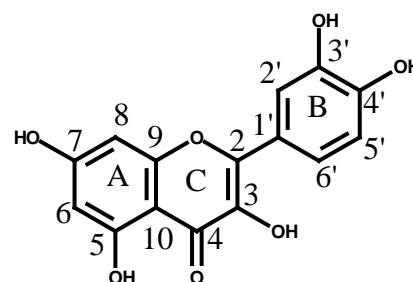
**Figura 07** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **SM-07**  
(região de 89 a 170 ppm)



**Figura 08** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **SM-07**  
(região de 79 a 190 ppm)



**Figura 09** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT da substância **SM-07**  
(região de 50 a 200 ppm)



**Figura 10** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT da substância **SM-07**  
(região de 90 a 180 ppm)

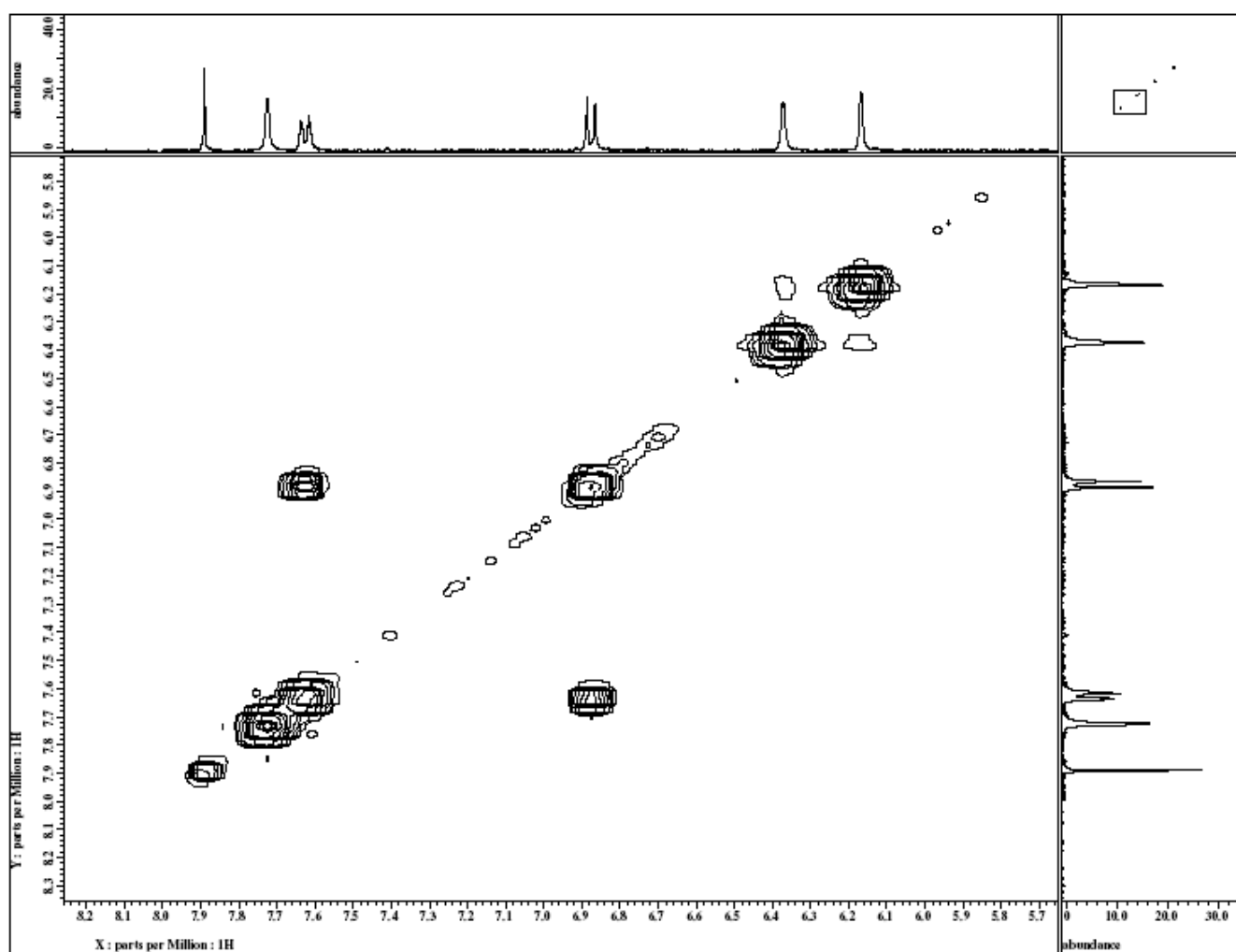
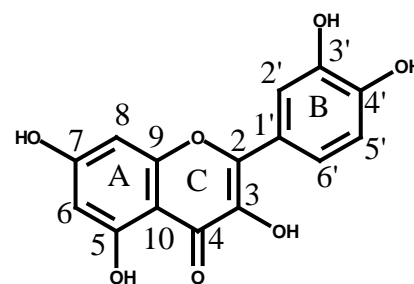


Figura 11 – Espectro de COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) da substância **SM-07**



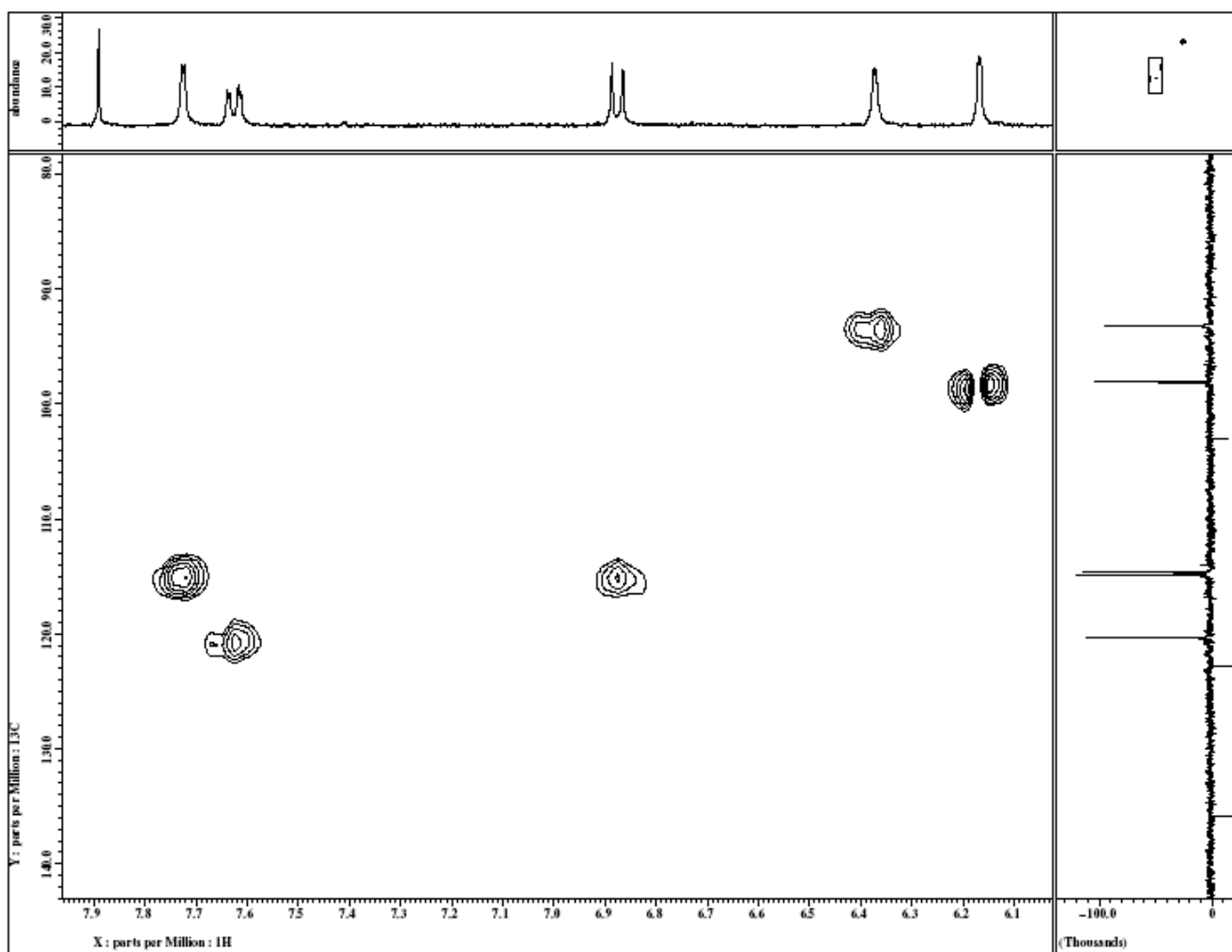
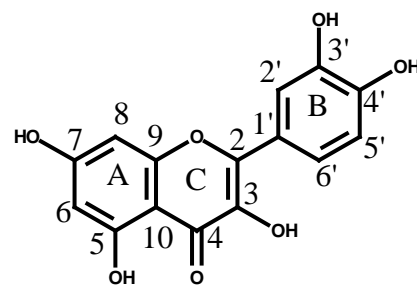
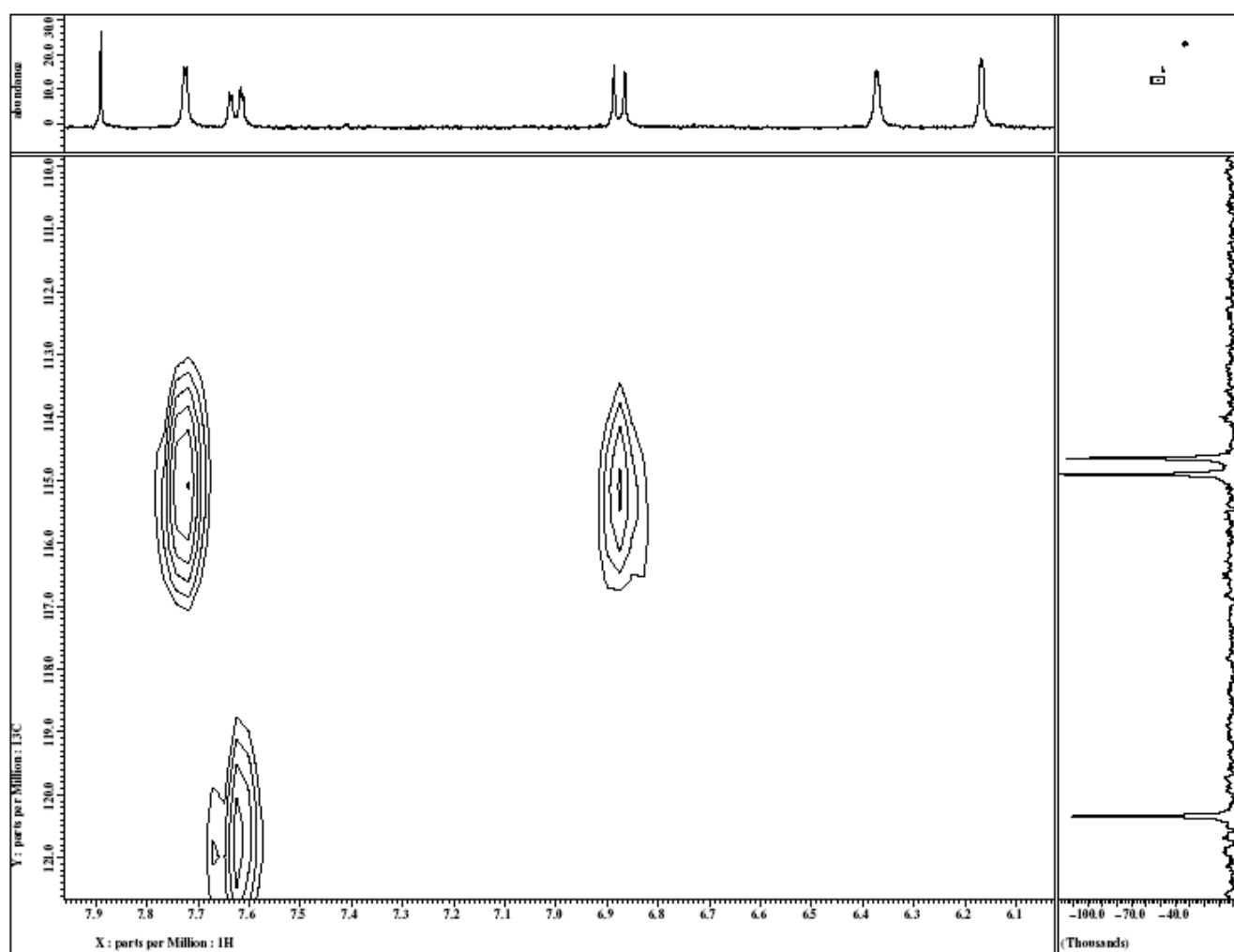
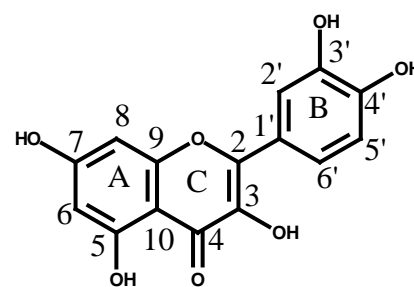


Figura 12 – Espectro de HMQC da substância **SM-07**



**Figura 13** – Ampliação do espectro de HMBC da substância **SM-07**  
(região de 6,1 a 7,9 ppm )

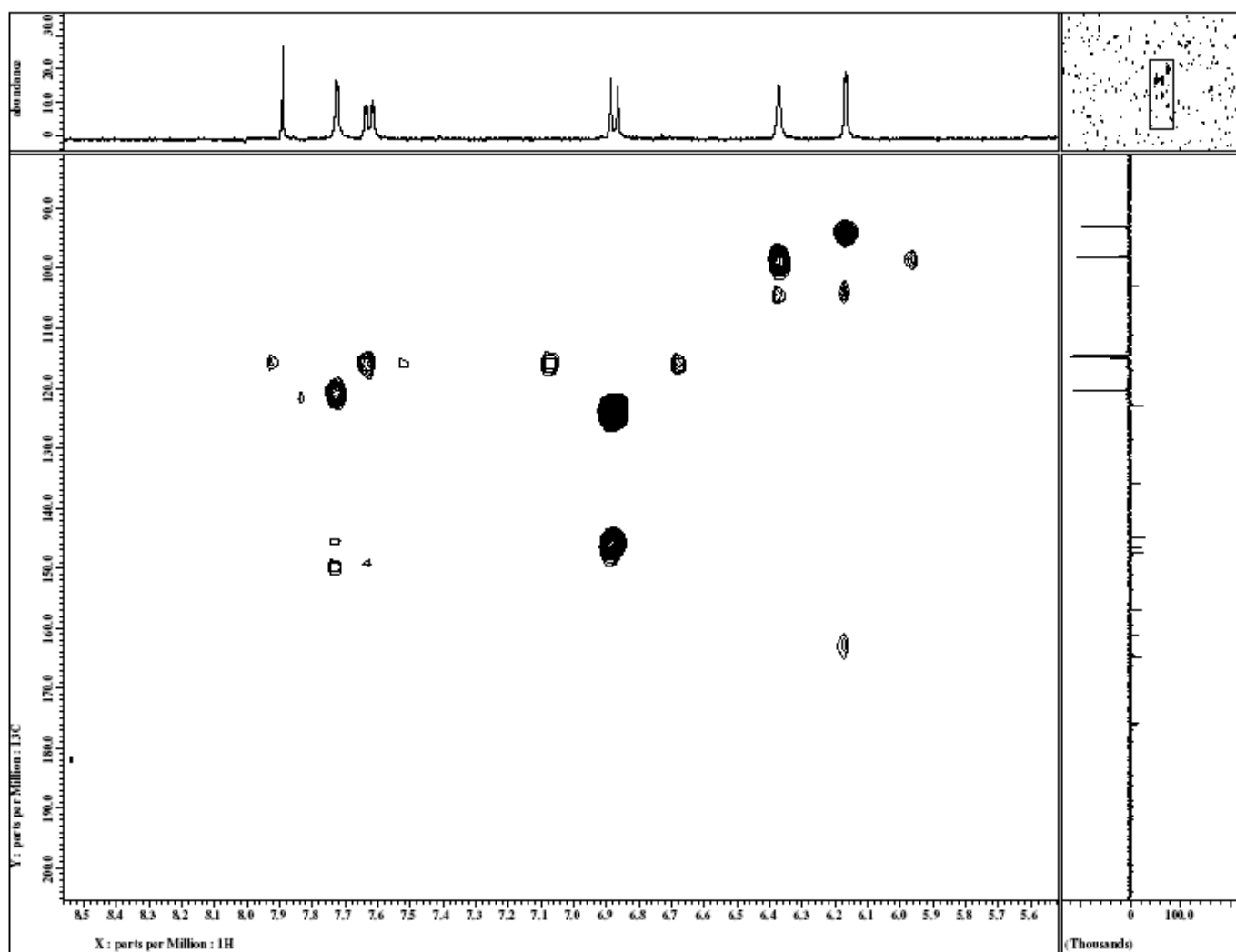
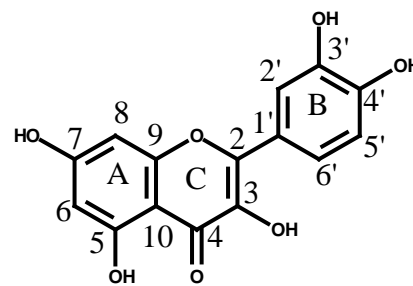
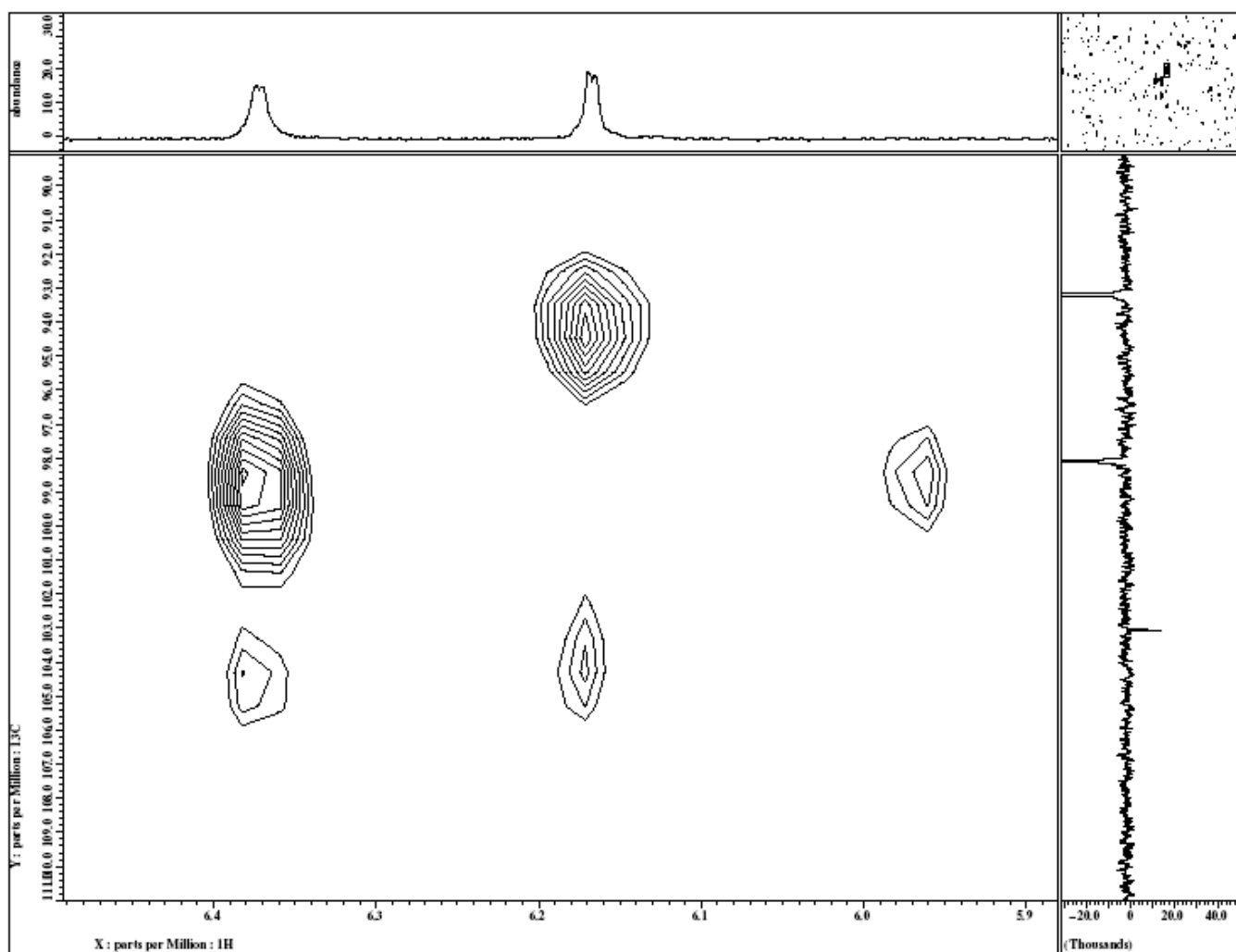
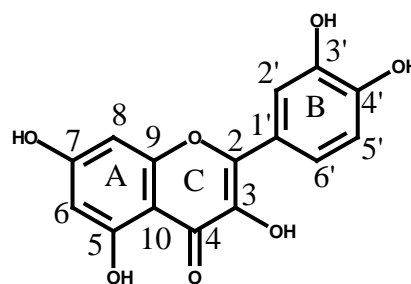
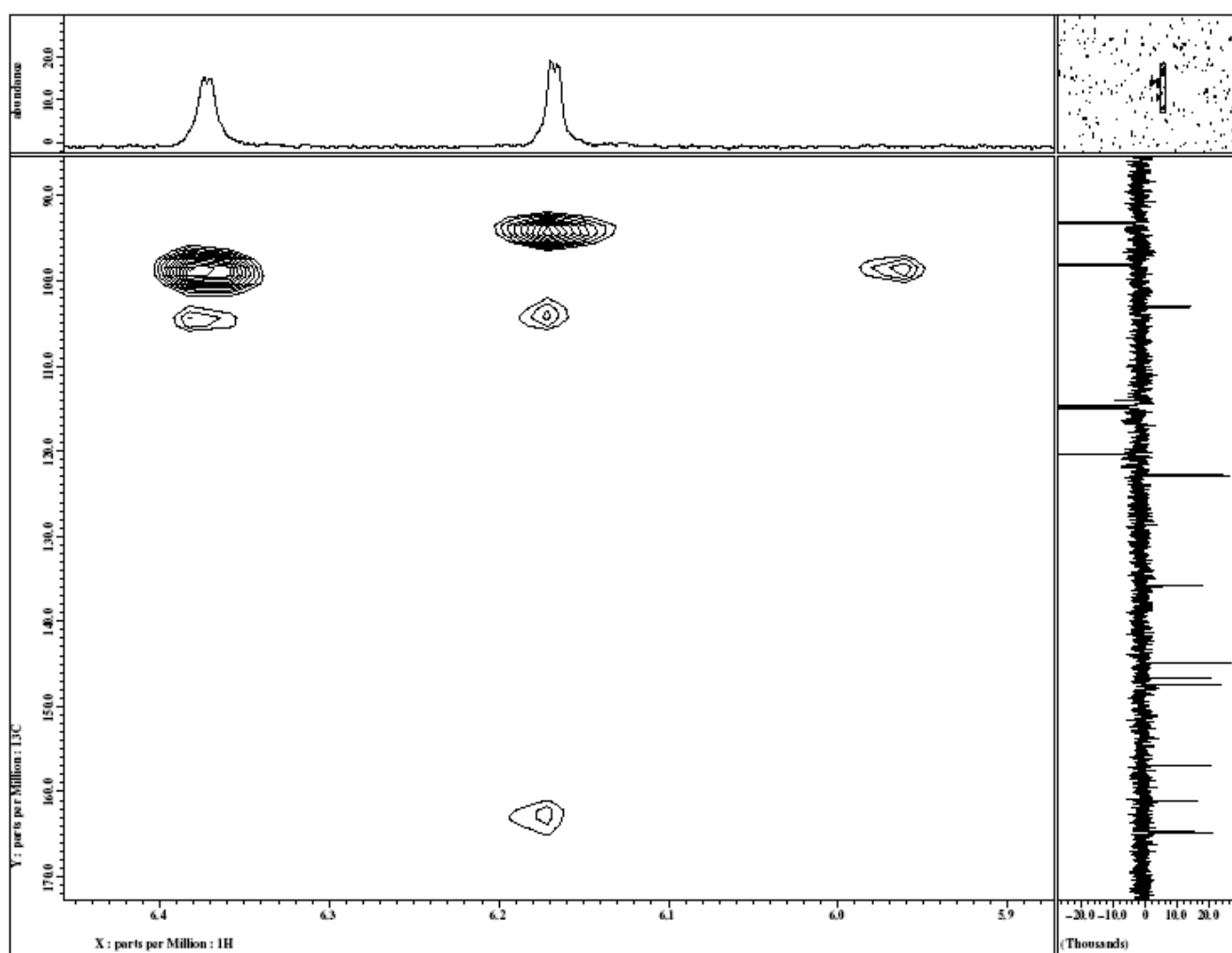
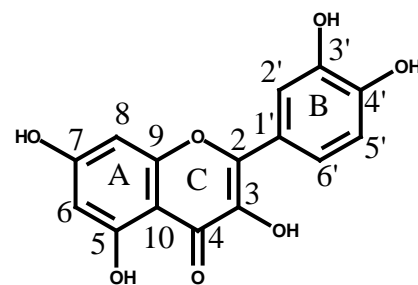


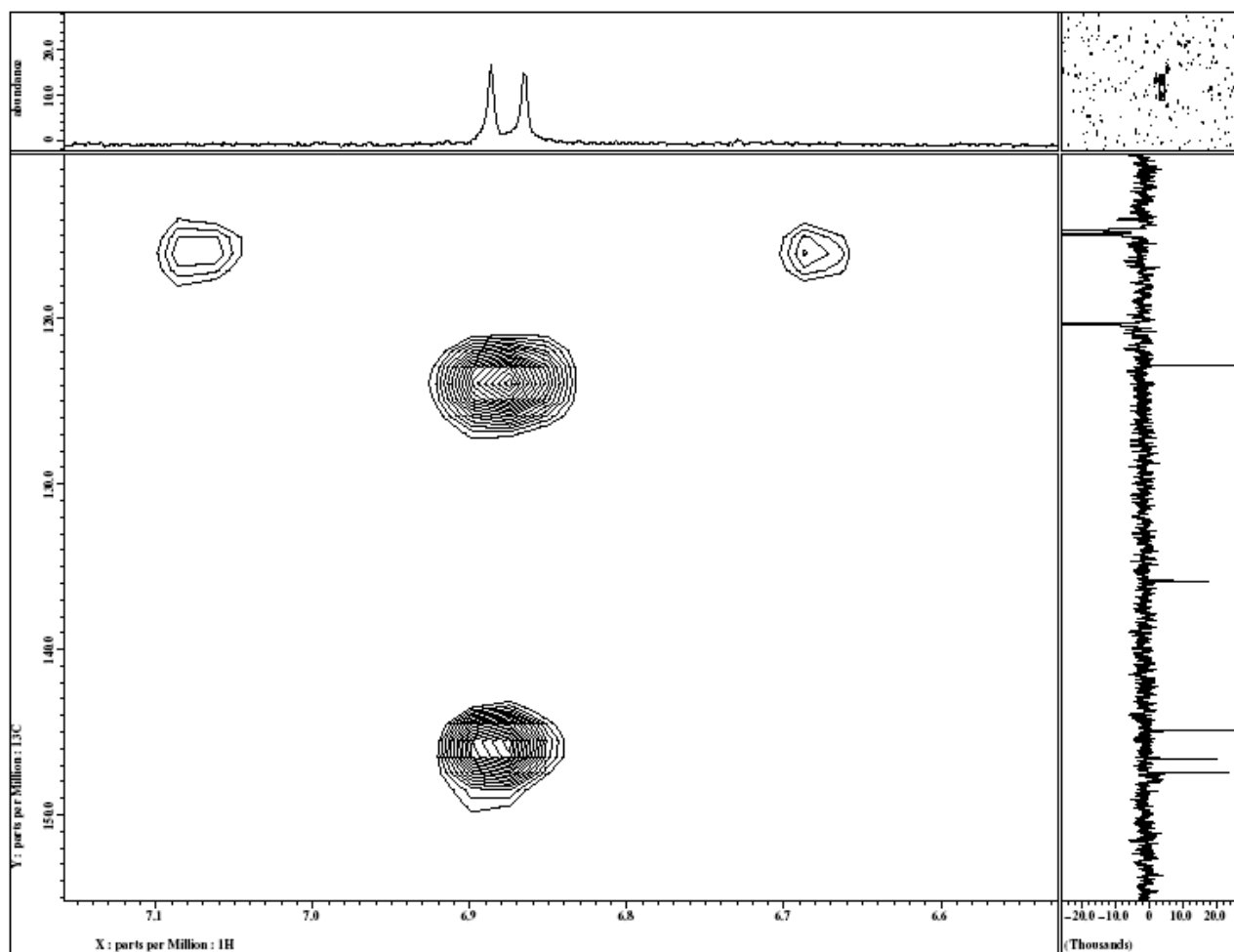
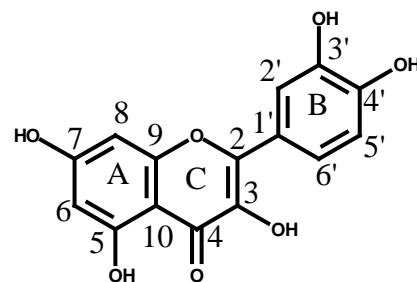
Figura 14 – Espectro de HMBC da substância SM-07



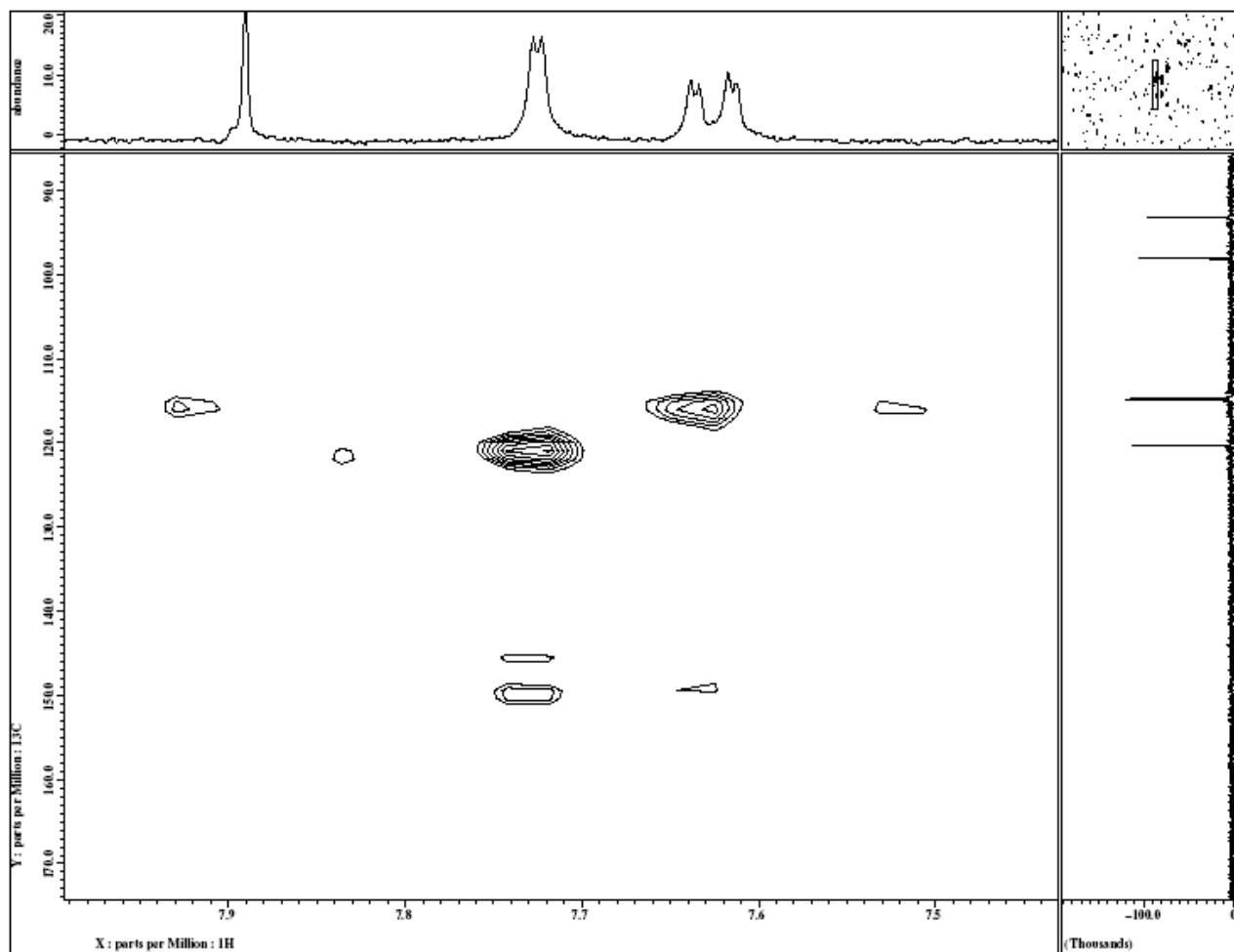
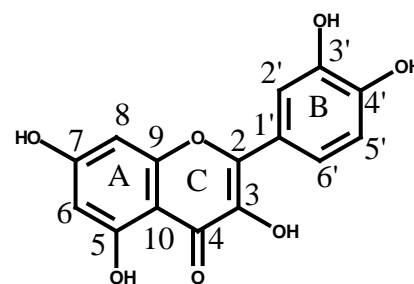
**Figura 15** – Ampliação do espectro de HMBC da substância **SM-07**  
(região de 5,9 a 6,5 ppm )



**Figura 16** – Ampliação do espectro de HMBC da substância **SM-07**  
(região de 5,9 a 6,5 ppm )

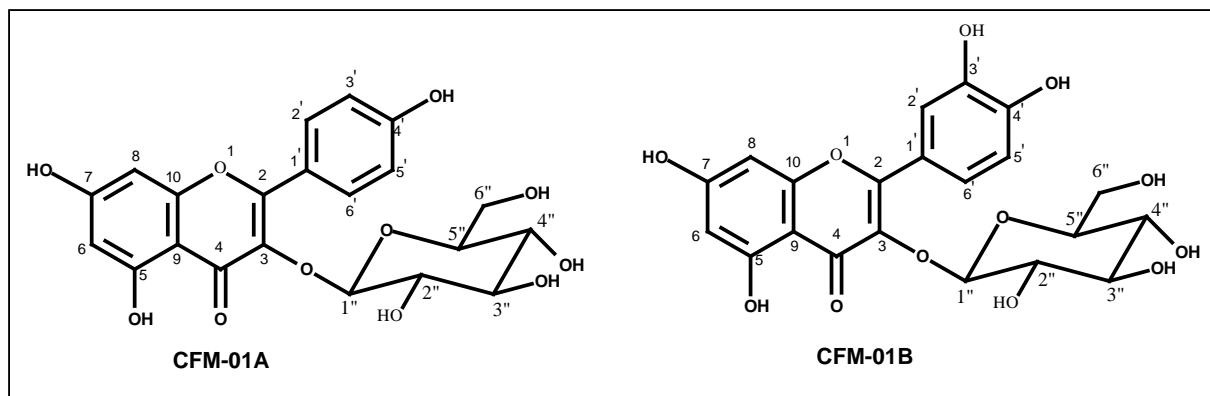


**Figura 17** – Ampliação do espectro de HMBC da substância **SM-07**  
(região de 6,5 a 7,2 ppm )



**Figura 18** – Ampliação do espectro de HMBC da substância **SM-07**  
(região de 7,4 a 8,0 ppm )

### 6.1.3 MISTURA DOS FLAVONÓIDES CFM-01A E CFM-01B



As substâncias **CFM-01A** e **CFM-01B** obtidas do extrato metanólico das folhas de *C. fairchildiana* mostrou-se após várias análises em CCDA em diversos sistemas de eluentes como uma única mancha de cor escura sob radiação UV 254 nm.

A solubilidade dessas substâncias em metanol, revelação de cor castanha com orcinol sulfúrico e cor verde-escura em cloreto férrico sugere tratar-se de uma mistura de flavonóides glicosilados.

A elucidação estrutural dessas substâncias foi possível através de estudos comparativos de dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  constantes da literatura (Kazuma *et. al.*, 2003).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 19**, p. 44) apresentou sinais na região de  $[\delta_{\text{H}} 3,5-5,3]$  que juntamente com os sinais na região de  $[\delta_{\text{C}} 61,9-104,3]$  no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , sugerem a presença de resíduo de açúcar.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  também apresentou sinais adicionais na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  (6,2- 8,0) característico dos anéis A e B de flavonóides.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 23**, p. 48) parcialmente desacoplado de  $^1\text{H}$  revelou a presença de 34 sinais que, juntamente com os resultados obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , confirmam a presença de um esqueleto flavonoídico na mistura de substâncias.

A substância **CFM-01A** está caracterizada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pela presença dos sinais a  $\delta_{\text{C}}$  179,36 (C-4) característicos de carbonila em ponte com hidroxila a C-5  $[\delta_{\text{C}}$  162,88]. O anel **A** está caracterizado pelos sinais a  $\delta_{\text{C}}$  [162,88 (C-5), 101,12 (C-6), 166,53 (C-7), 94,90 (C-8), 158,43 (C-9), 105,47 (C-10)]. Os sinais a  $\delta_{\text{C}}$  [122,82 (C-1'), 132,23 (C-2', 6'), 116, 04 (C-3', 5')] caracterizam o anel aromático



**B**, enquanto que os sinais  $\delta_c$  [158,40, 135,56 e 179,36] caracterizam o anel heterocíclico **C**. O resíduo de açúcar está caracterizado pelos sinais a  $\delta_c$  104,35 (carbono anomérico), 75,66 (C-2), 78,28 (C-3), 71,28 (C-4), 78,02 (C-5) e 62,48 (C-6).

A substância **CFM-01B** está caracterizada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pela presença dos sinais a  $\delta_c$  179,41 (C-4) característicos de carbonila em ponte com hidroxila a C-5 [ $\delta_c$  162,89]. O anel aromático **A** está caracterizado pelos sinais a  $\delta_c$  162,89 (C-5), 101,12 (C-6), 166,48 (C-7), 94,90 (C-8), 158,99 (C-9), 105,47 (C-10). Os sinais a  $\delta_c$  122,95 (C-1'), 116,10 (C-2'), 149,85 (C-3'), 149,85 (C-4'), 117,55 (C-5') e 123,20 (C-6') caracterizam o anel aromático **B**, enquanto que os sinais  $\delta_c$  158,99; 135,56 e 179,41 caracterizam o anel heterocíclico **C**. O resíduo de açúcar está caracterizado pelos sinais a  $\delta_c$  100,12 (carbono anomérico), 75,03 (C-2), 78,28 (C-3), 69,96 (C-4), 77,08 (C-5) e 61,88 (C-6).

As substâncias **CFM-01 A** e **B** já foram isoladas no gênero na espécie *C. ternateae* (Kazuma *et. al.*, 2003).

**Tabela 04.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B**, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm).

	CFM-01A		Literatura*
<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	158,4	-	158,5
3	135,6	-	135,5
4	179,4	-	179,5
5	162,9	-	163,1
7	166,5	-	166,0
9	158,4	-	159,1
10	105,5	-	105,7
1'	122,8	-	122,8
4'	149,8	-	161,6
<b>CH</b>			
6	101,1	6,17 (s)	99,9
8	94,9	6,36 (s)	94,7
2'	132,2	8,06 (d, 8,4Hz)	132,3
3'	116,0	7,72 (d)	116,1
5'	116,0	7,72 (d)	116,1
6'	132,2	8,06 (d, 8,4Hz)	132,1
1''	104,3	-	104,1
2''	75,7	3,0 – 4,0 (m)	75,7
3''	78,3	3,0 – 4,0 (m)	78,0
4''	71,3	3,0 – 4,0 (m)	71,4
5''	78,0	3,0 – 4,0 (m)	78,4
<b>CH<sub>2</sub></b>			
6''	62,5	3,0 – 4,0 (m)	62,6

\* Kazuma *et. al.*, 2003

**Tabela 05.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B**, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm).

	CFM-01B		Literatura*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>			
2	158,9	-	158,5
3	135,6	-	135,6
4	179,4	-	179,5
5	162,9	-	163,1
7	166,5	-	166,0
9	158,9	-	159,1
10	105,5	-	105,7
1'	122,9	-	123,2
3'	145,9	-	149,8
4'	149,8	-	145,9
<b>CH</b>			
6	101,1	6,17 (s)	99,9
8	94,9	6,36 (s)	94,7
2'	116,1	7,83 (s)	116,0
5'	117,5	6,86 (d)	114,9
6'	132,2	7,57 (d)	123,1
1''	100,1	-	104,2
2''	75,0	3,0 – 4,0 (m)	75,7
3''	78,3	3,0 – 4,0 (m)	78,1
4''	69,9	3,0 – 4,0 (m)	71,2
5''	77,1	3,0 – 4,0 (m)	78,4
<b>CH<sub>2</sub></b>			
6''	61,9	3,0 – 4,0 (m)	62,6

\* Kazuma *et. al.*, 2003

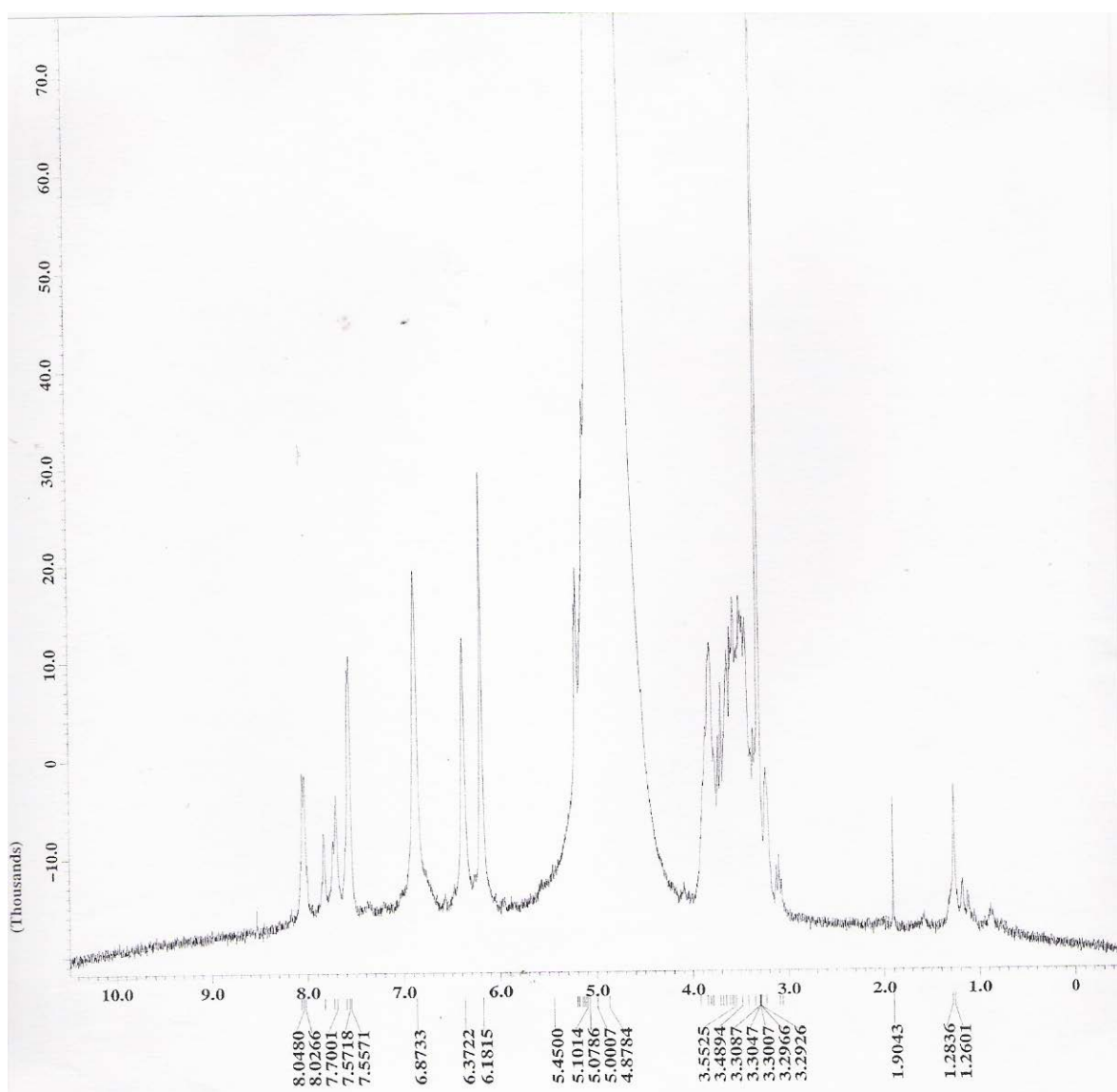
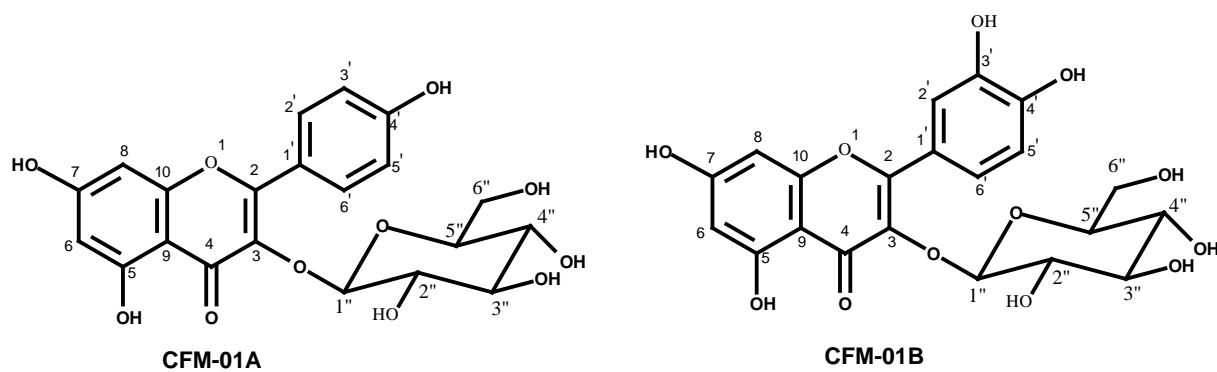
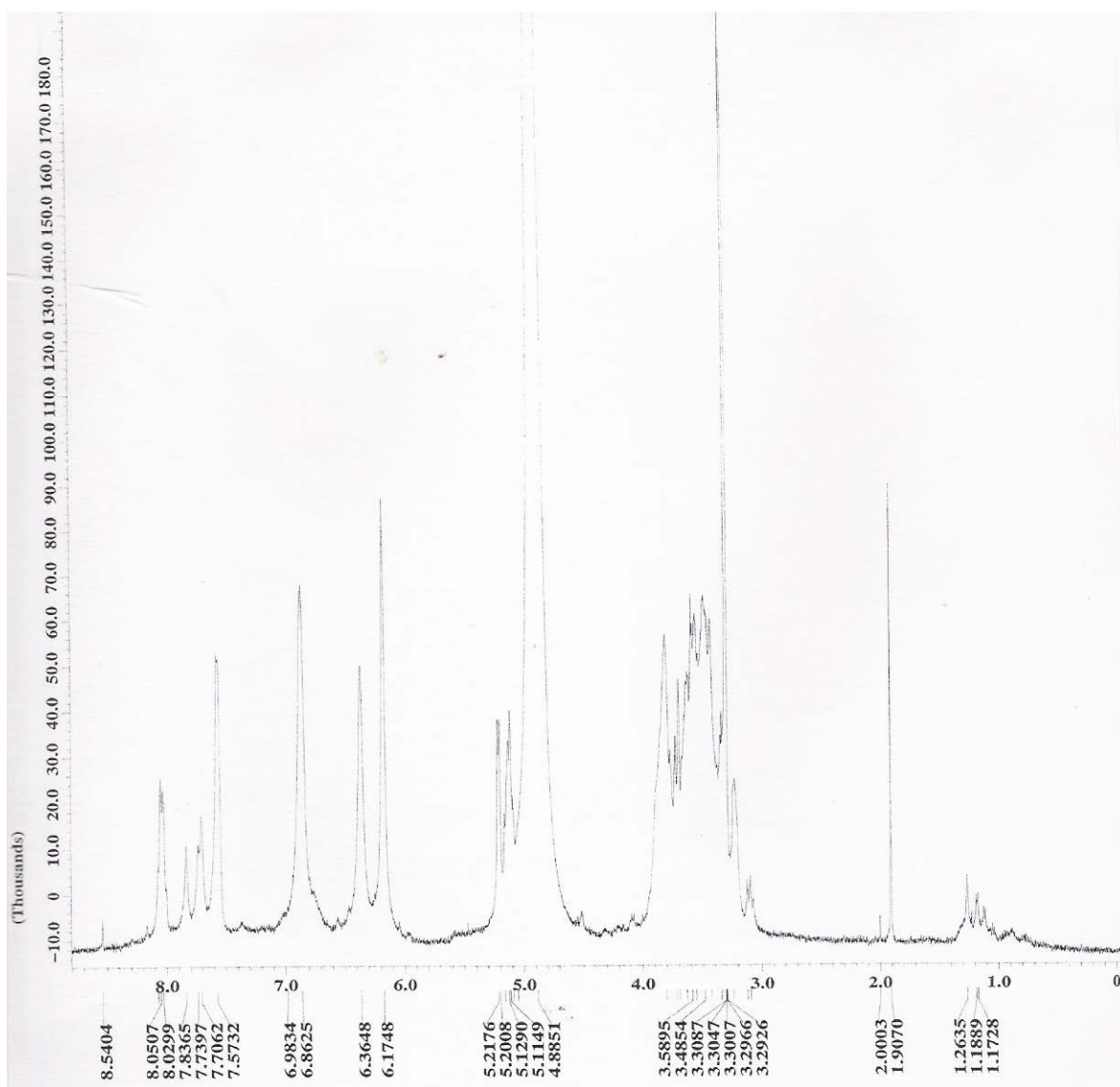
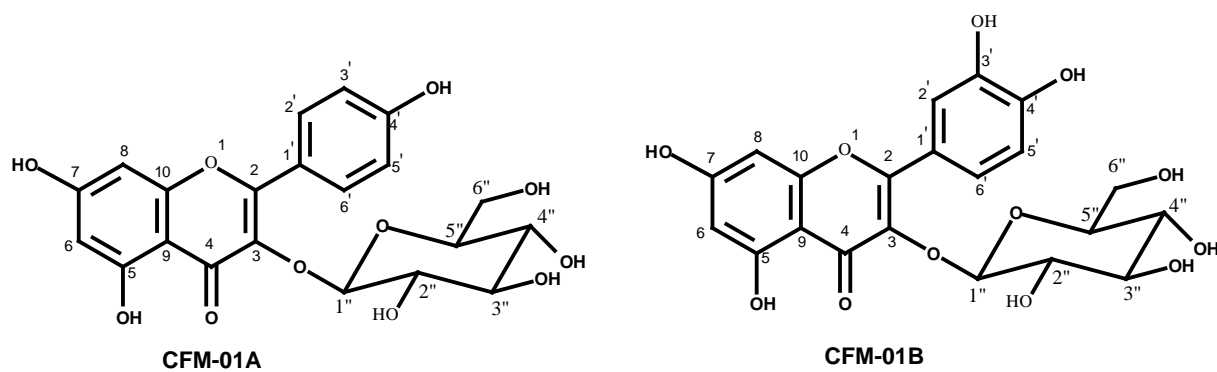
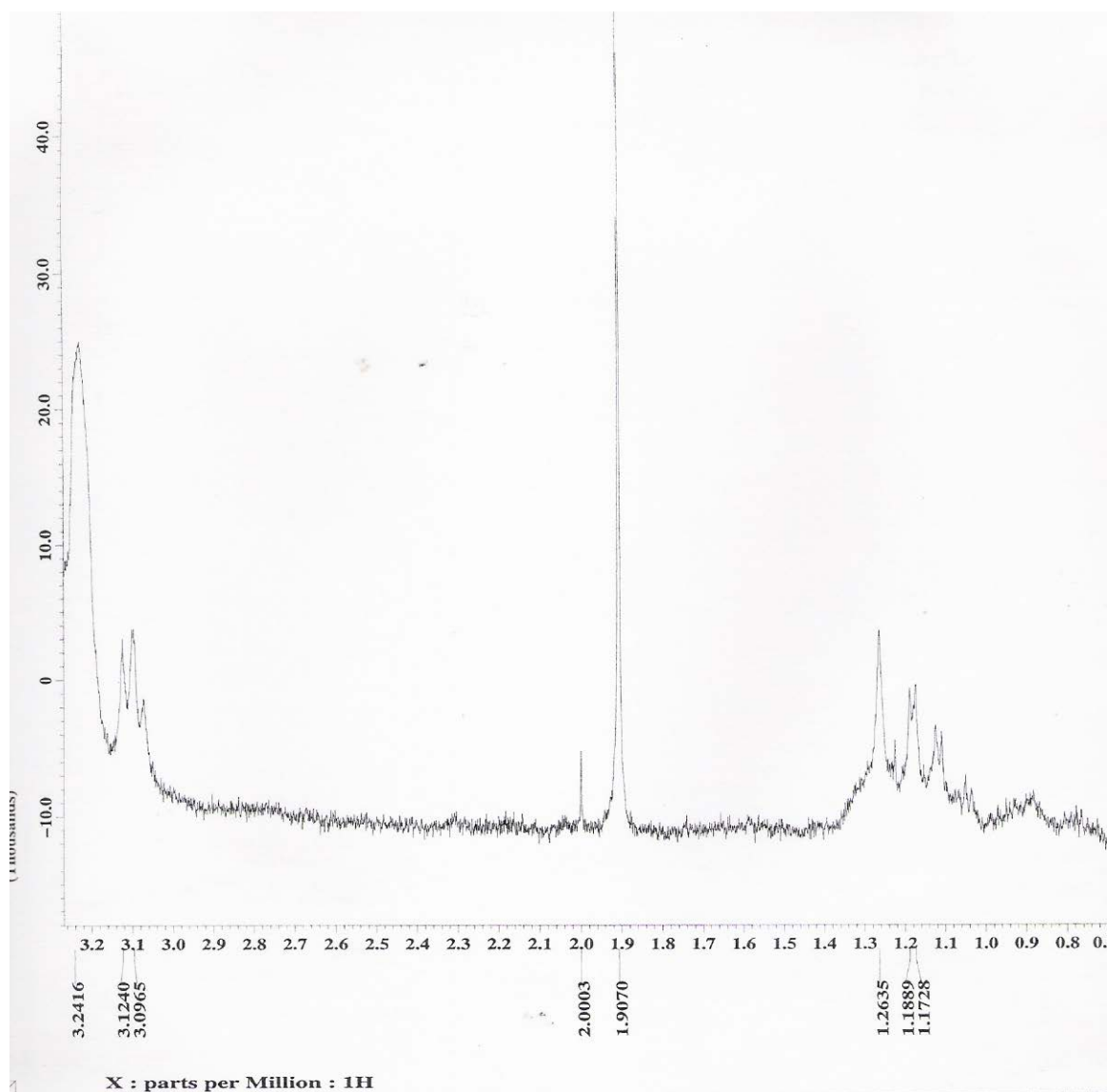
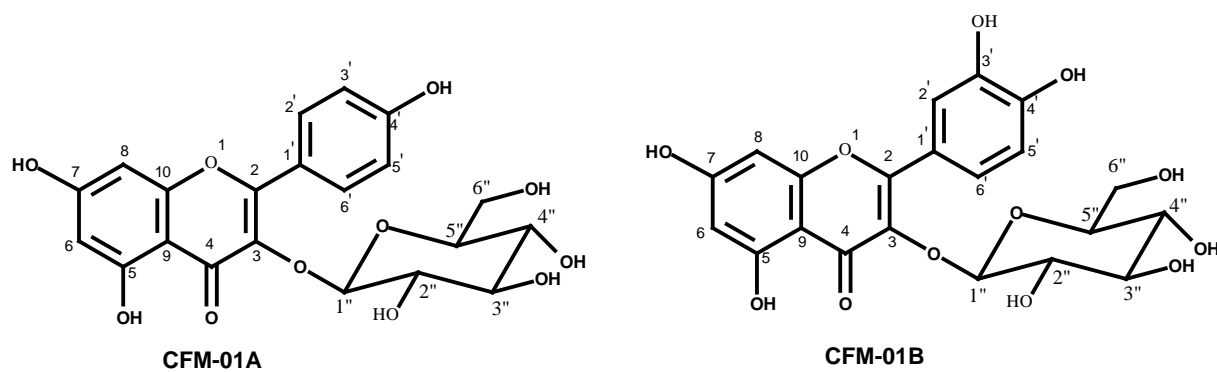


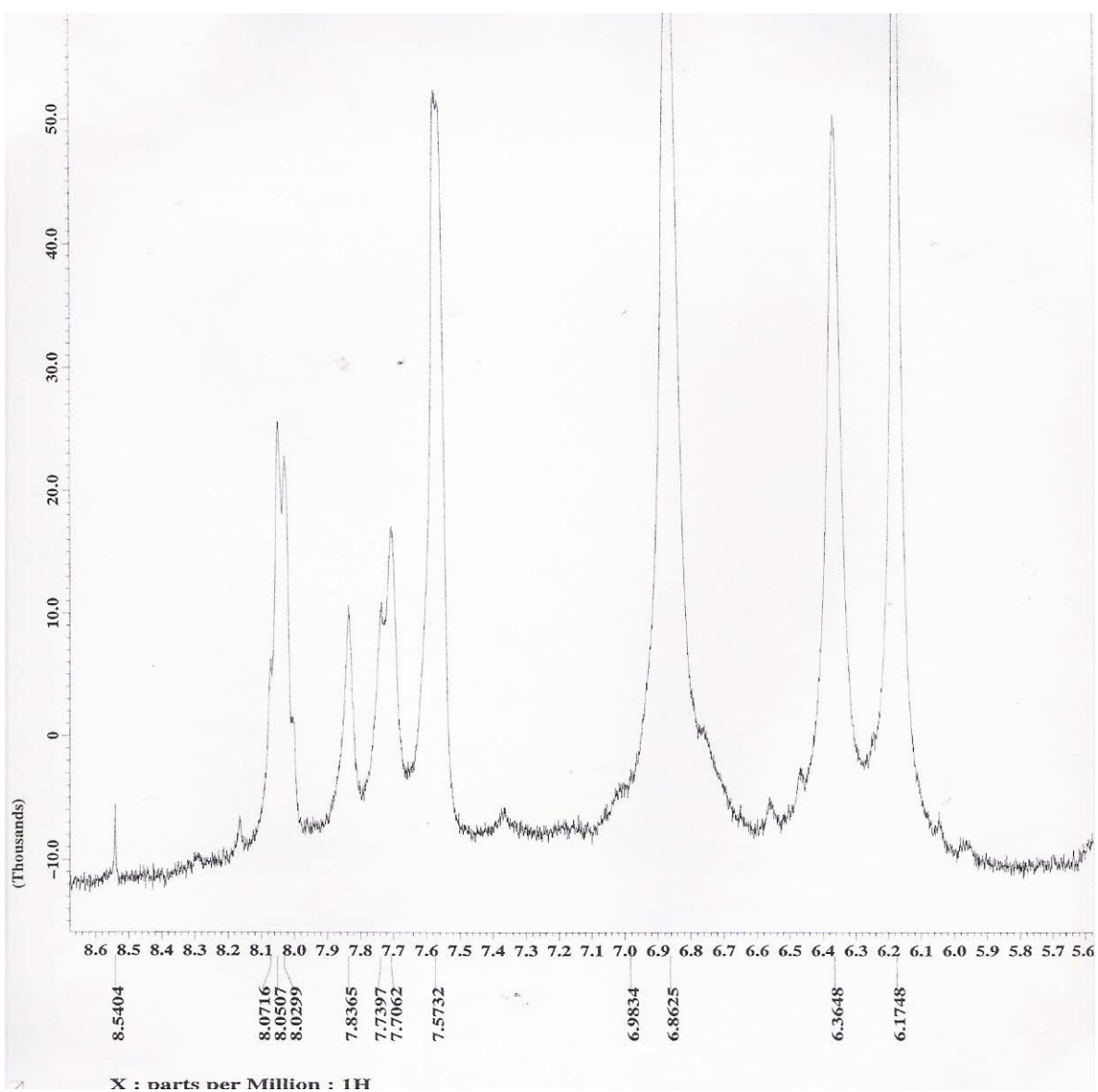
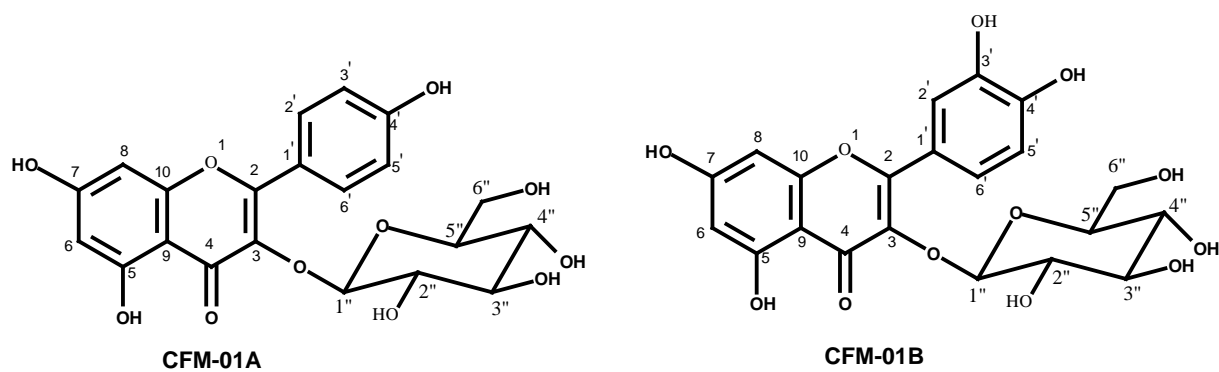
Figura 19 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B**



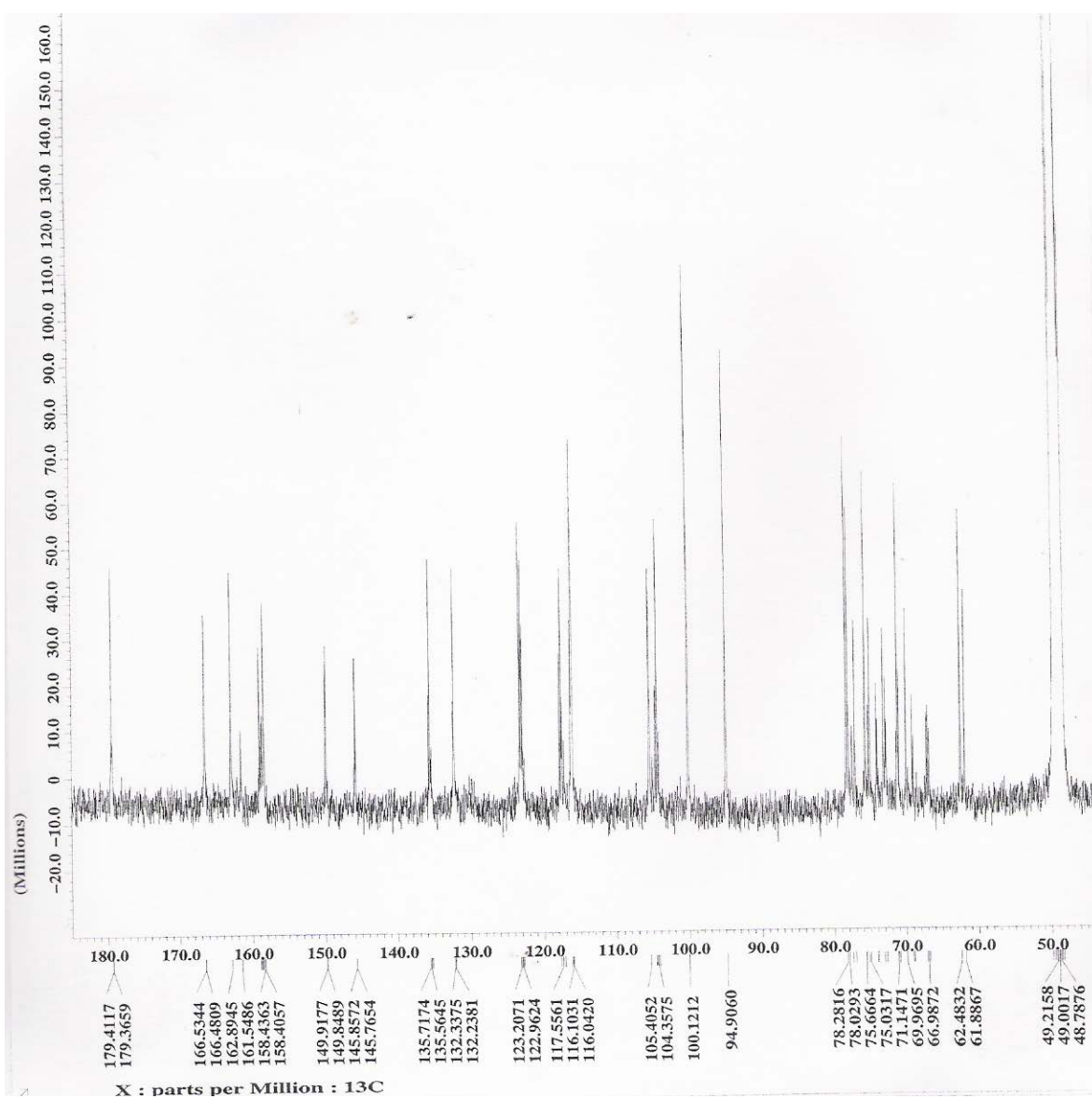
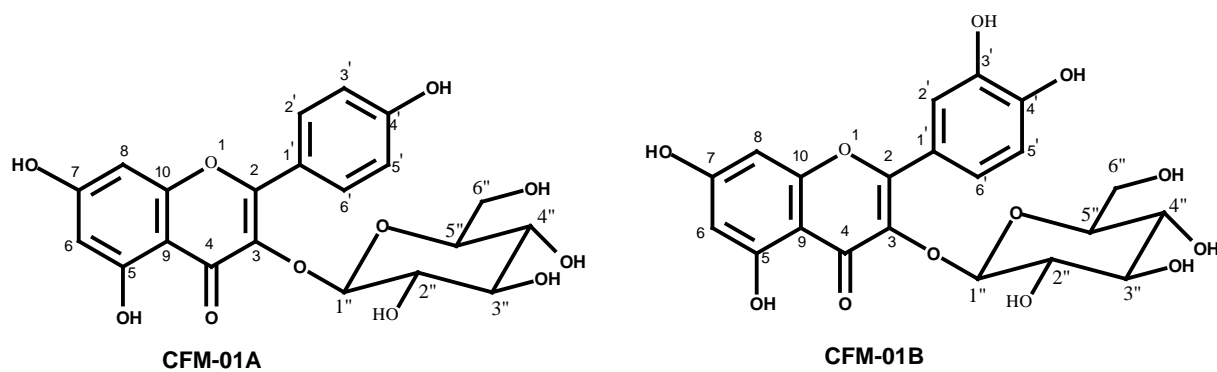
**Figura 20** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 0 – 8,5 ppm)



**Figura 21** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 0,7 – 3,2 ppm)

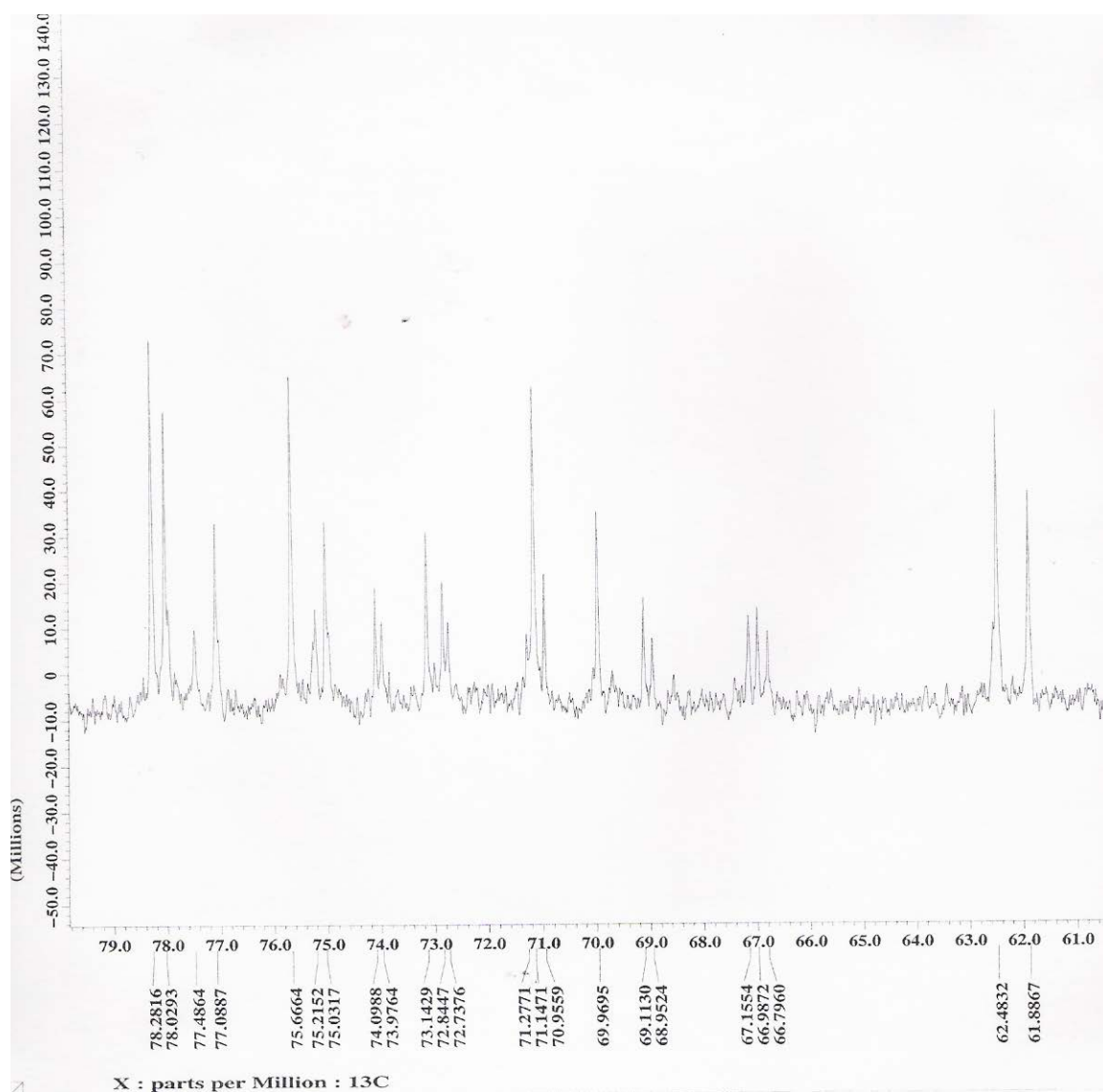
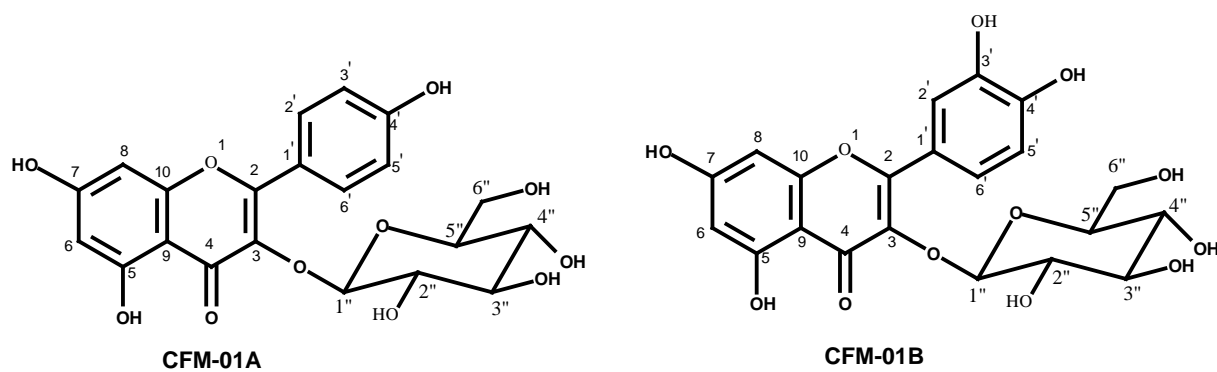


**Figura 22 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 5,6 – 8,6 ppm)**

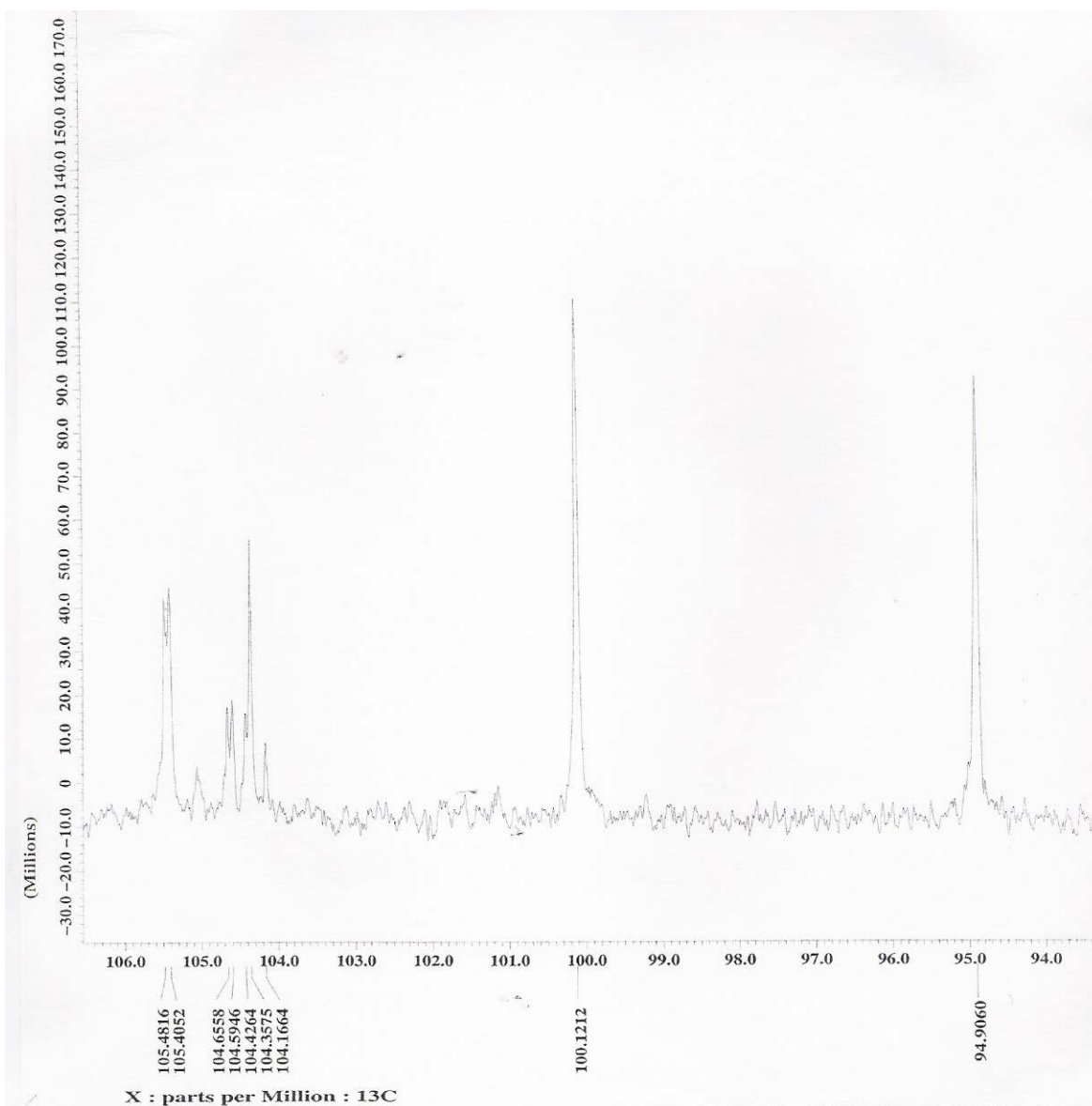
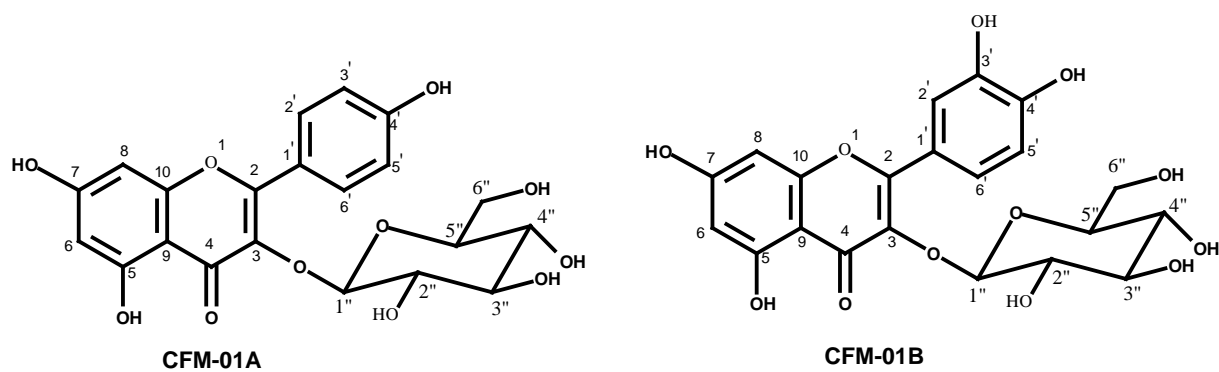


**Figura 23** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B**

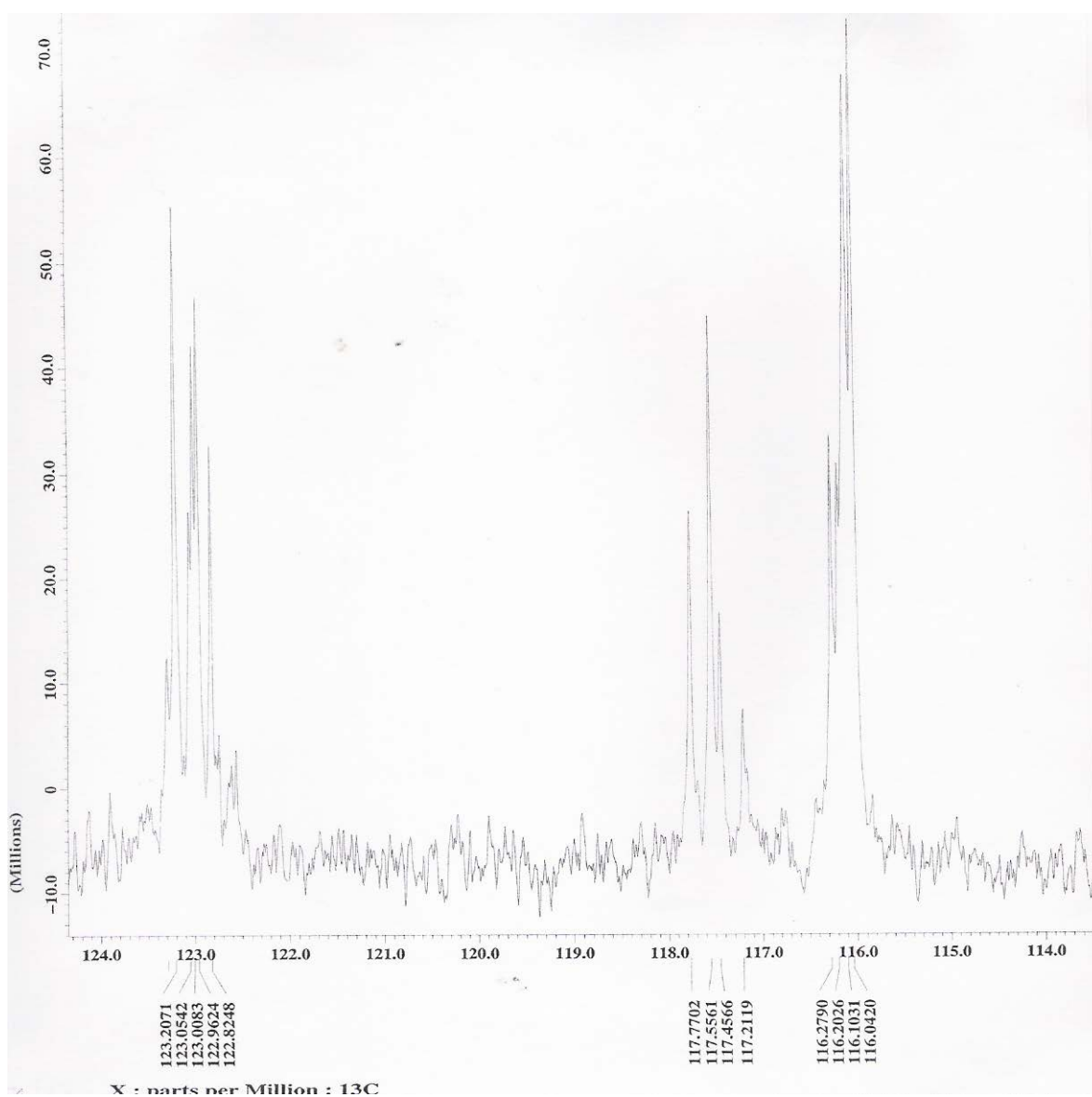
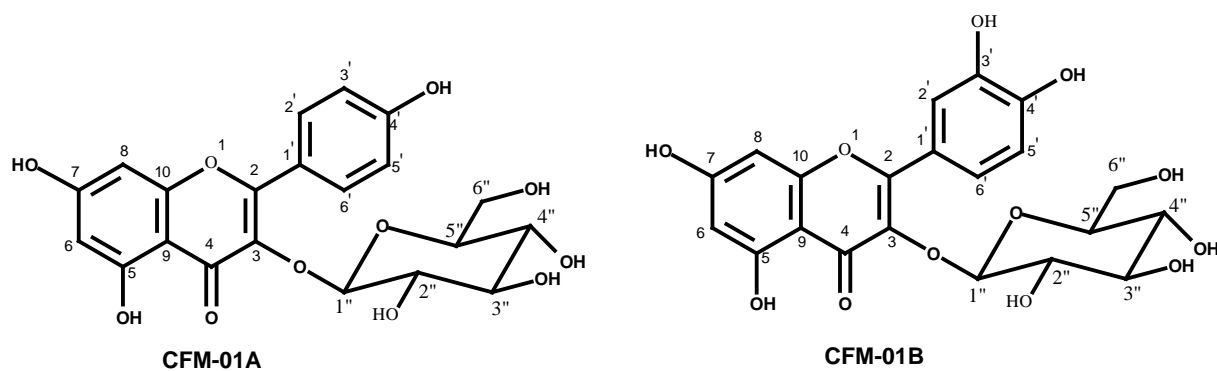




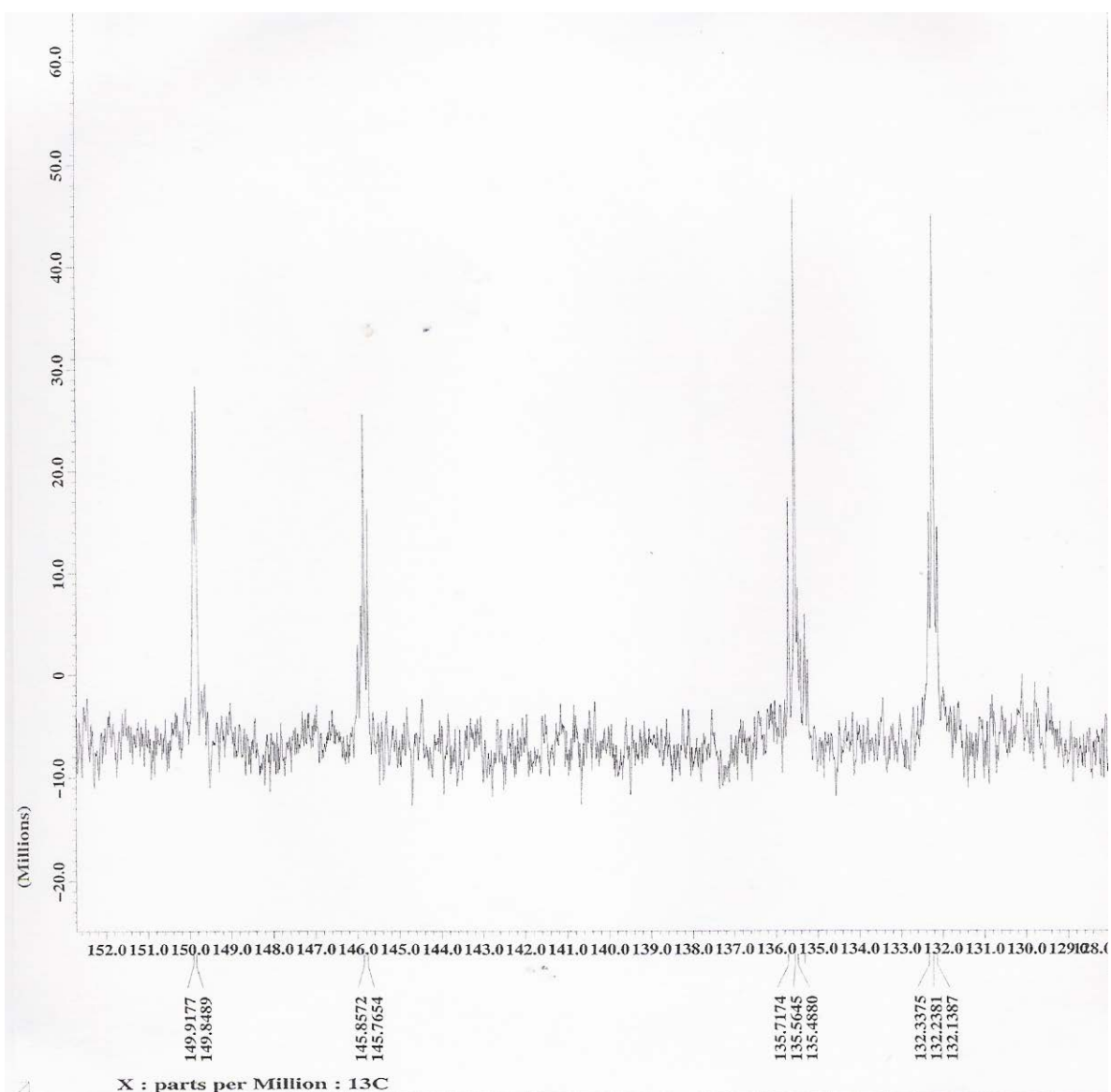
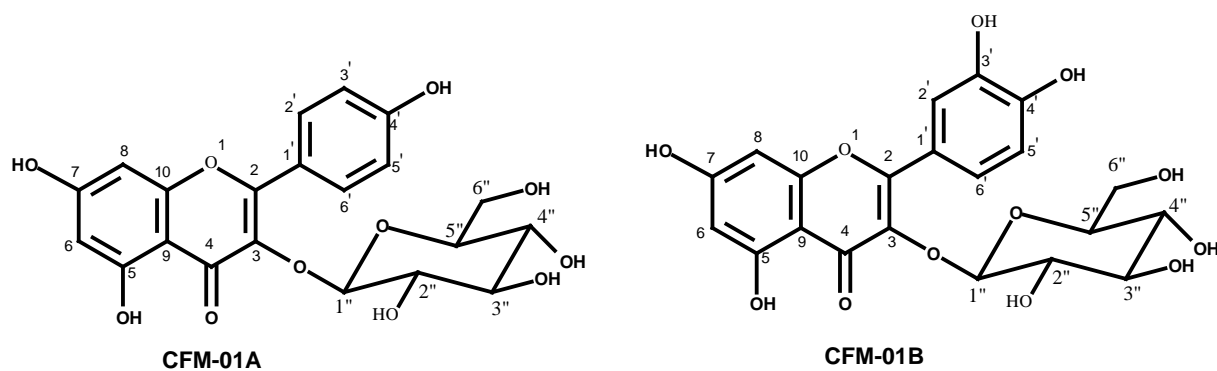
**Figura 24** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 61 – 79 ppm)



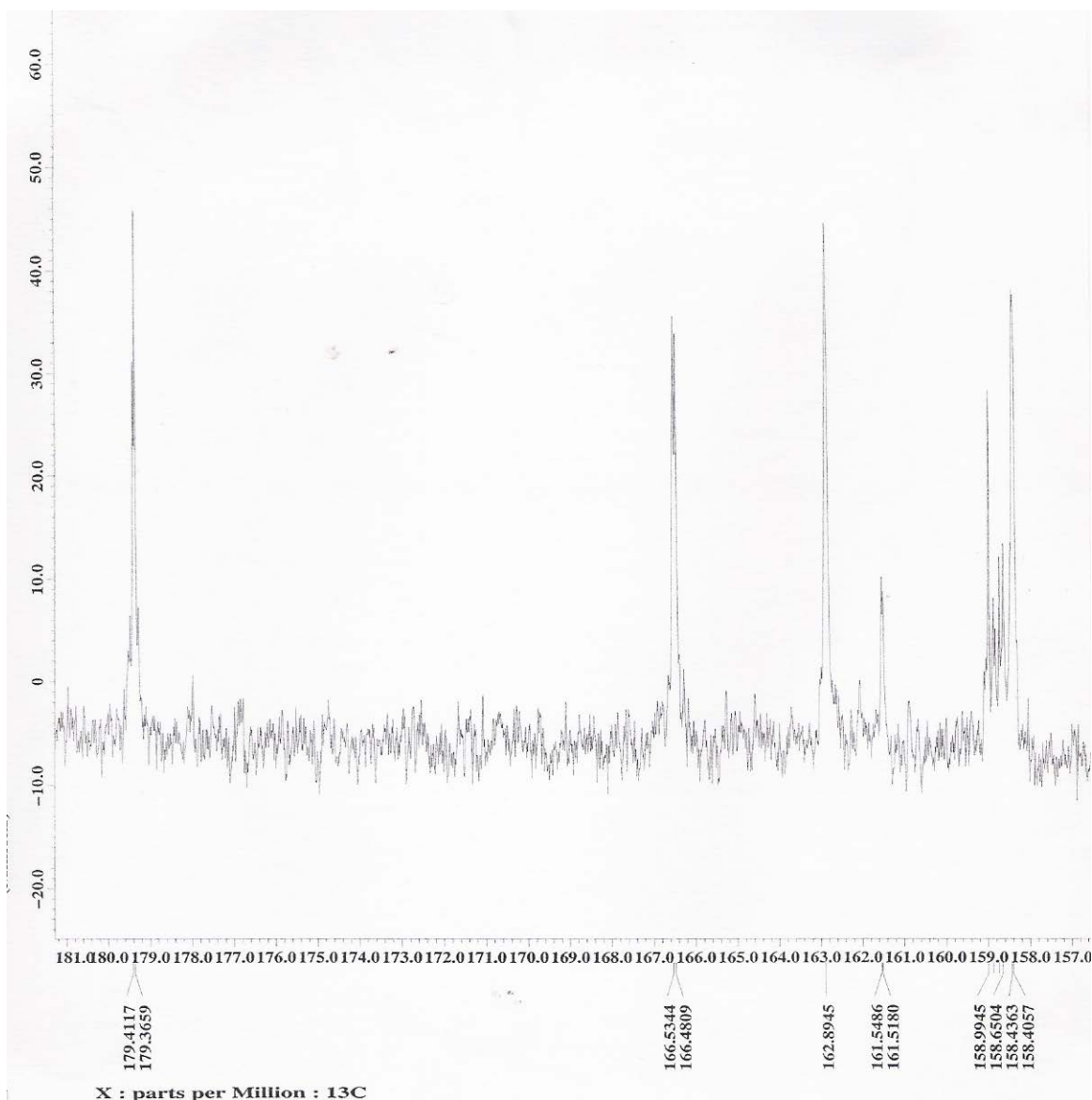
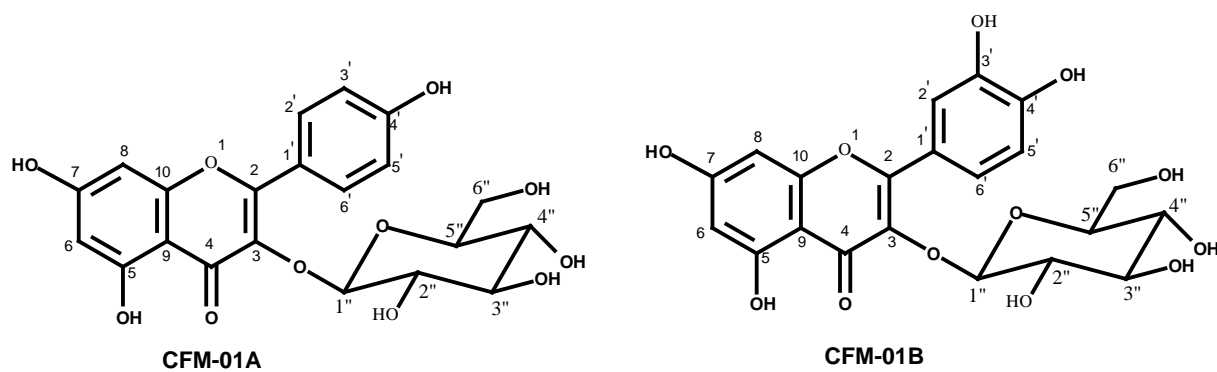
**Figura 25** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 94 – 106 ppm)



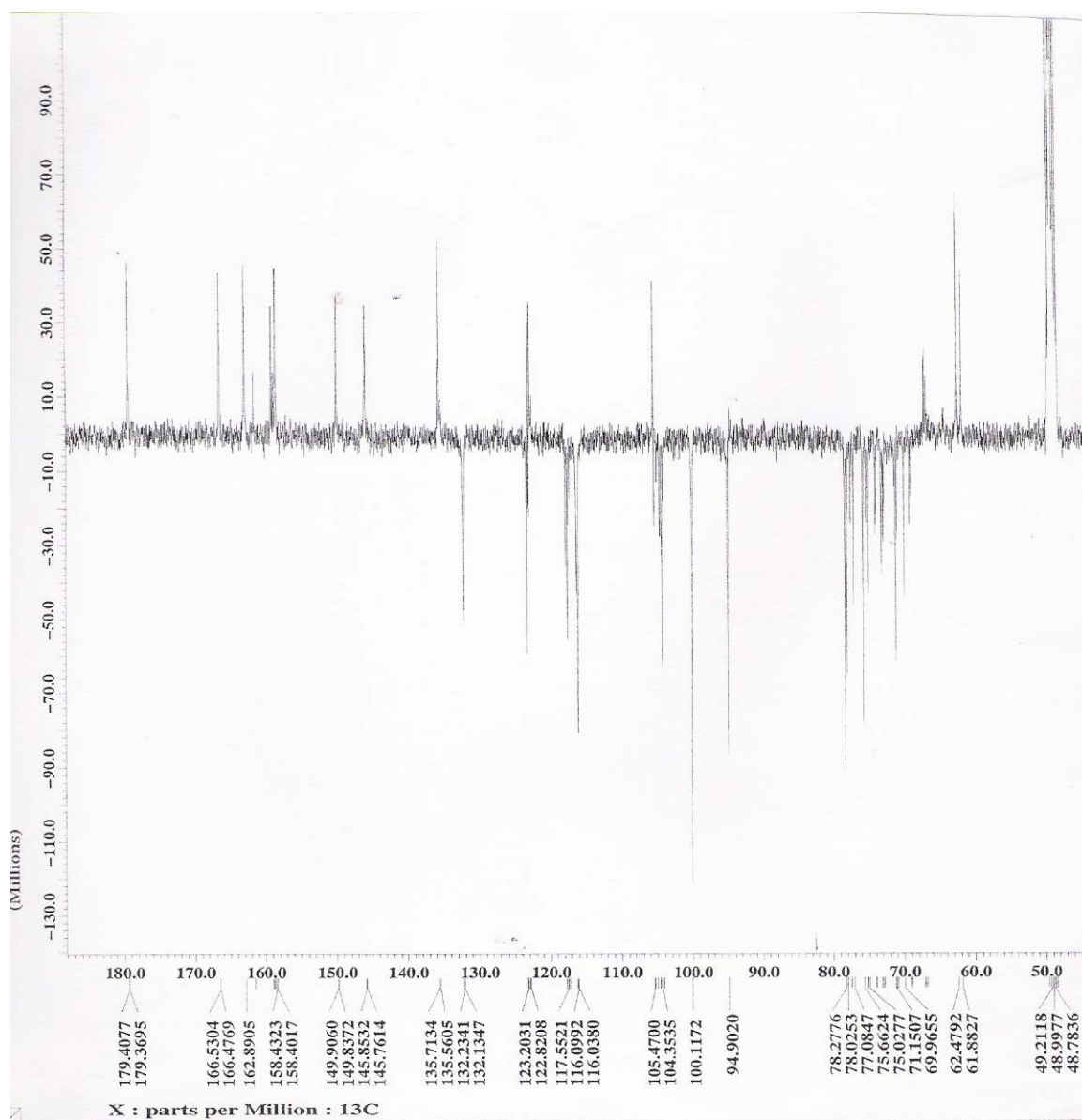
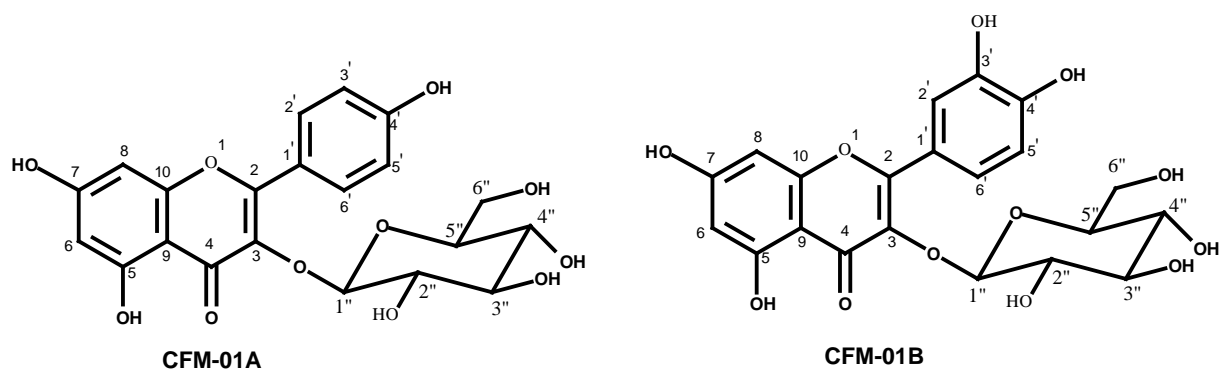
**Figura 26** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 114 – 124 ppm)



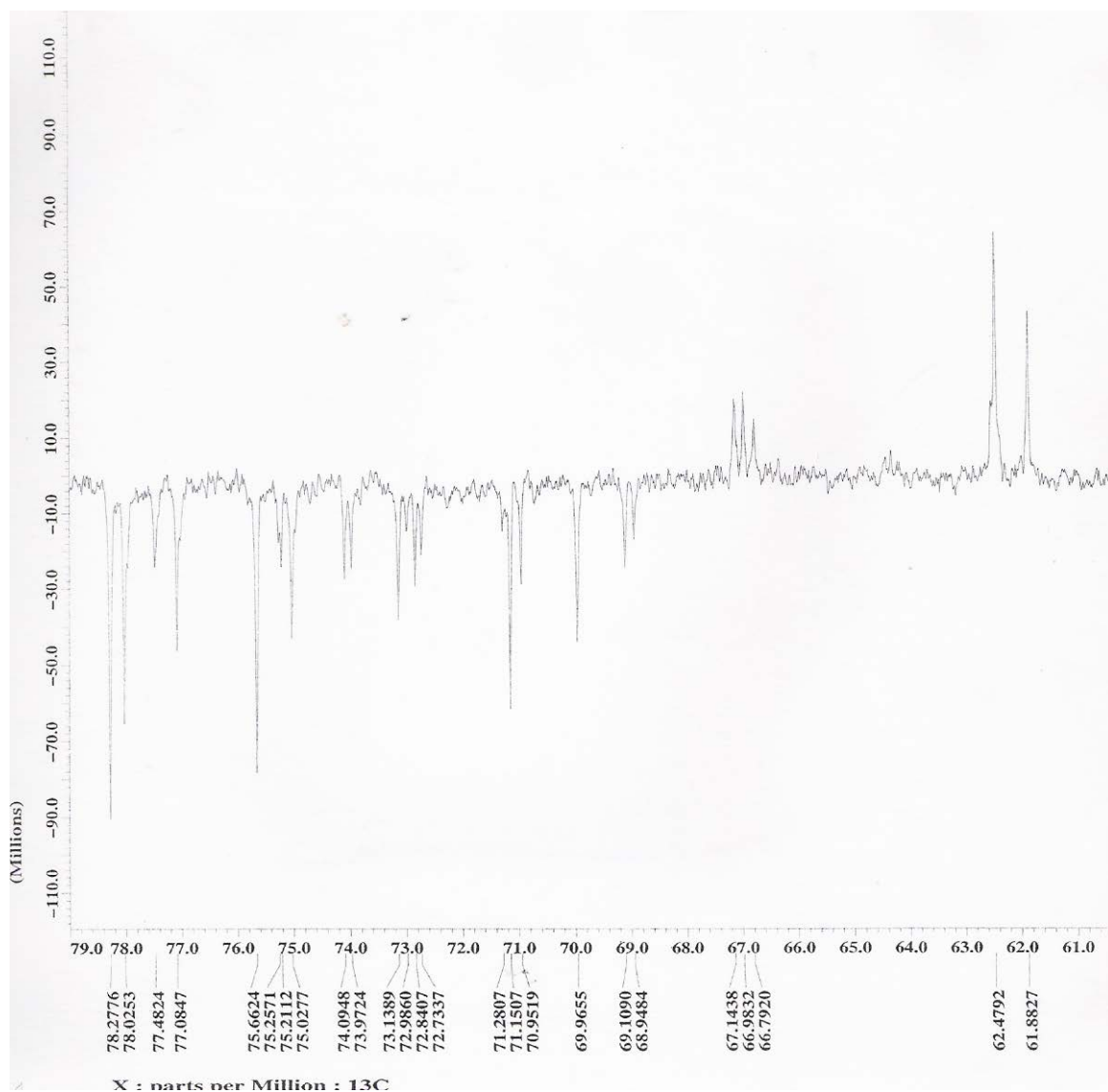
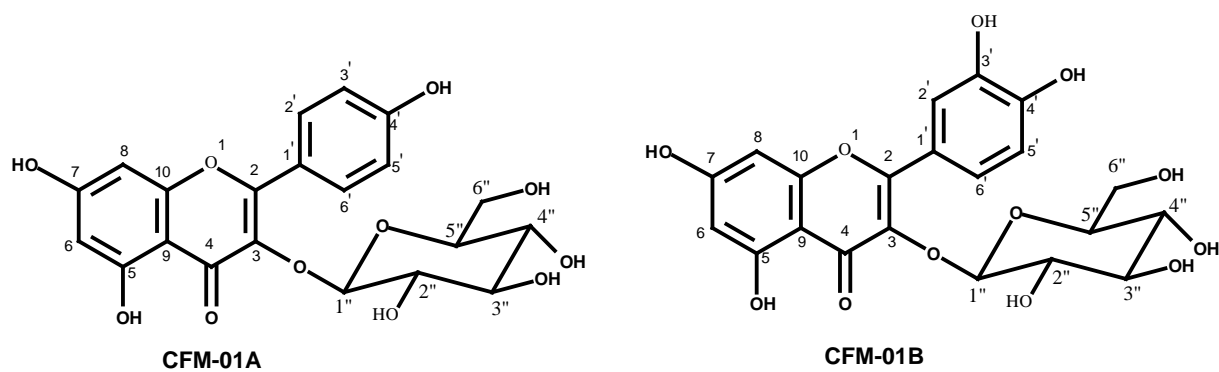
**Figura 27** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 128 – 152 ppm)



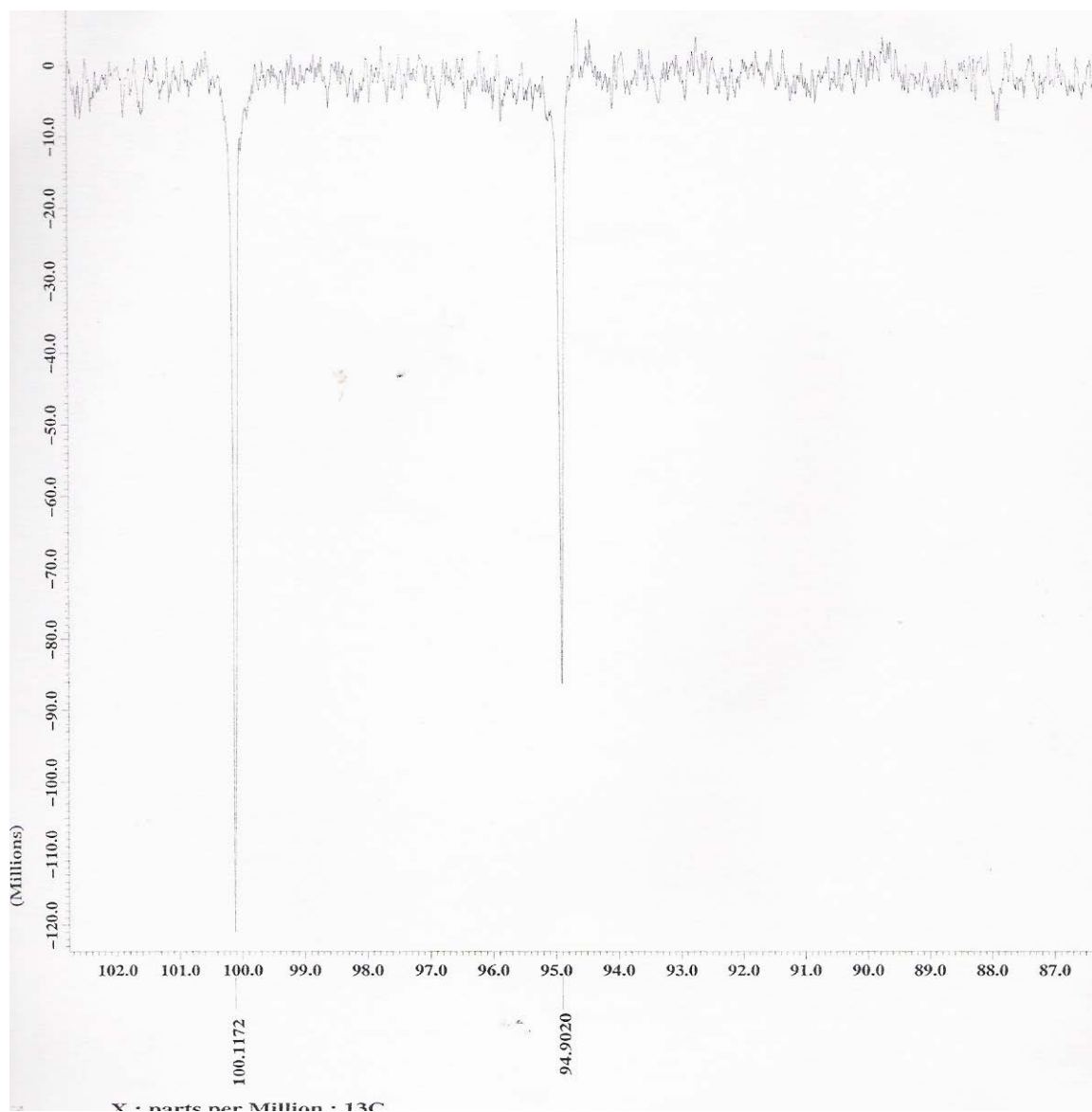
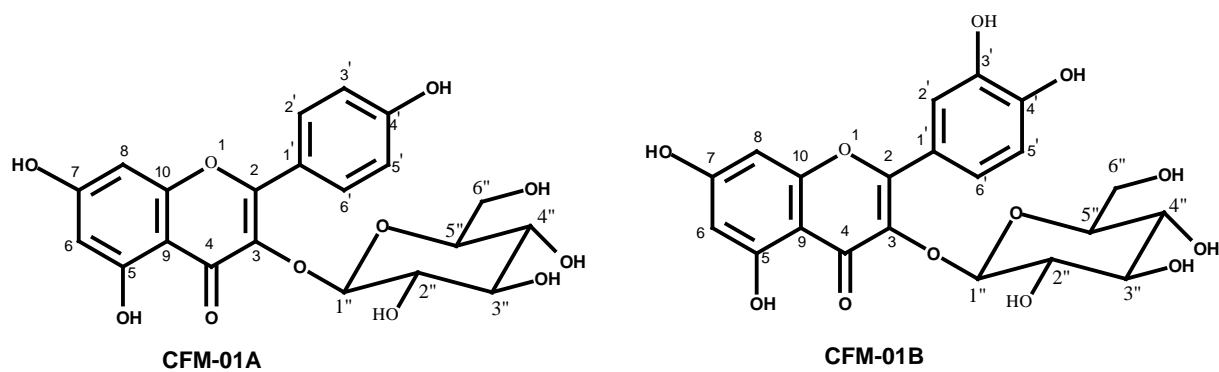
**Figura 28** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 157 – 181 ppm)



**Figura 29 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides CFM-01A e CFM-01B**

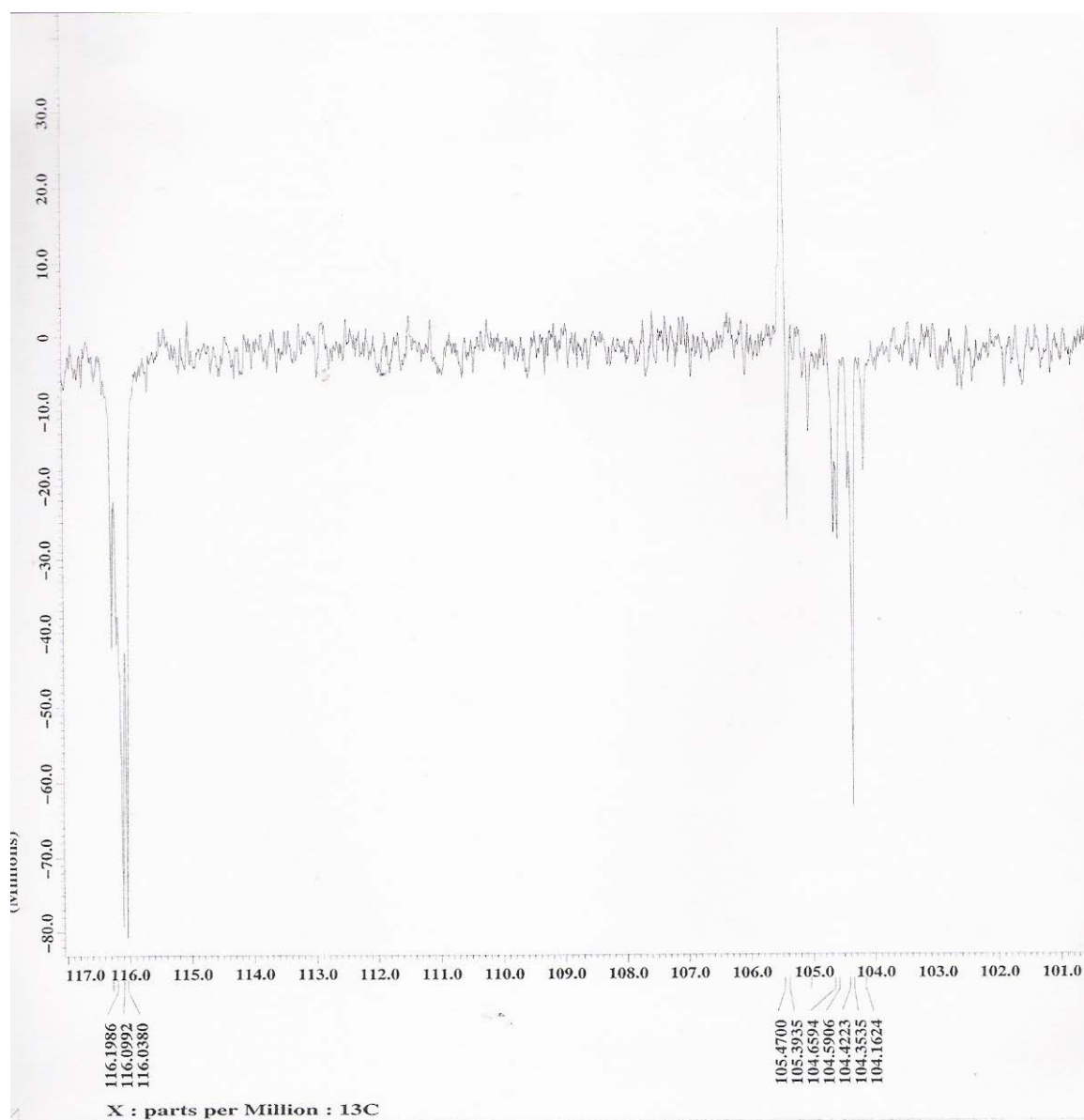
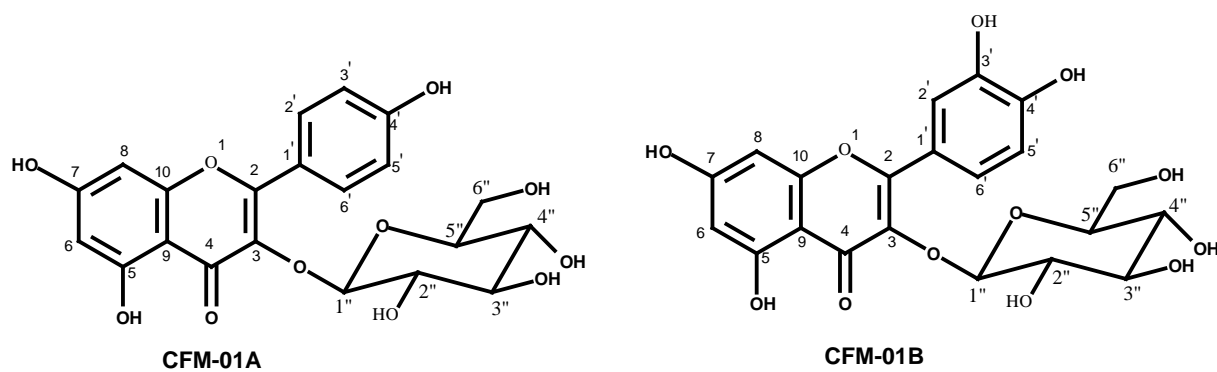


**Figura 30** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides CFM-01A e CFM-01B (região de 61 – 79 ppm)

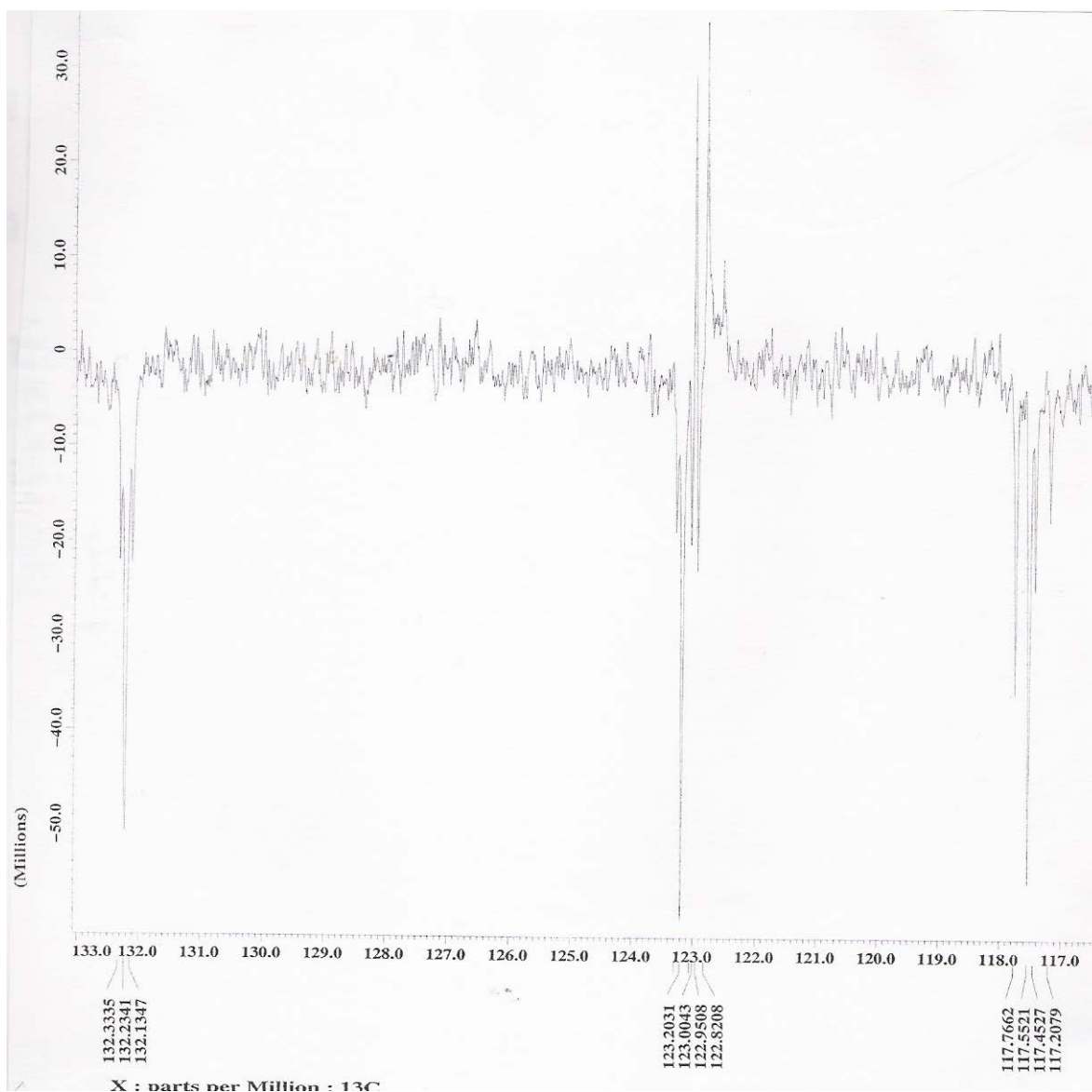
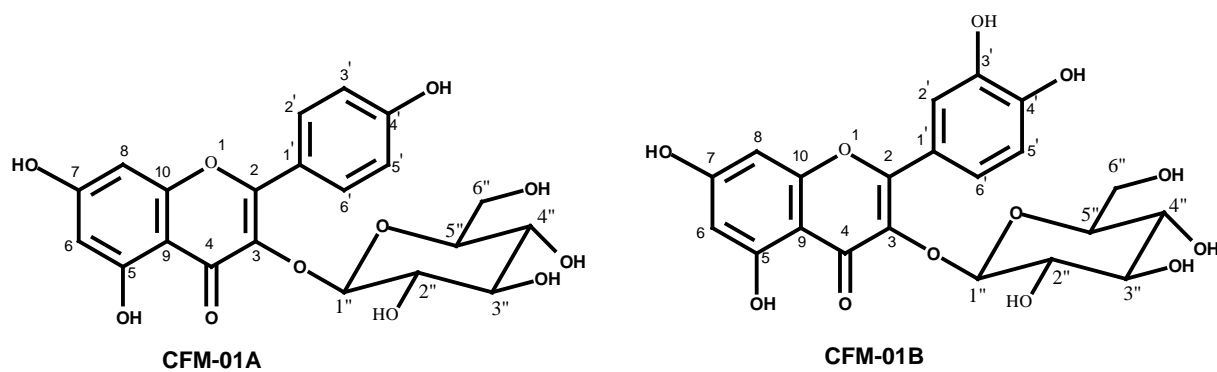


**Figura 31** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 87 – 102 ppm)

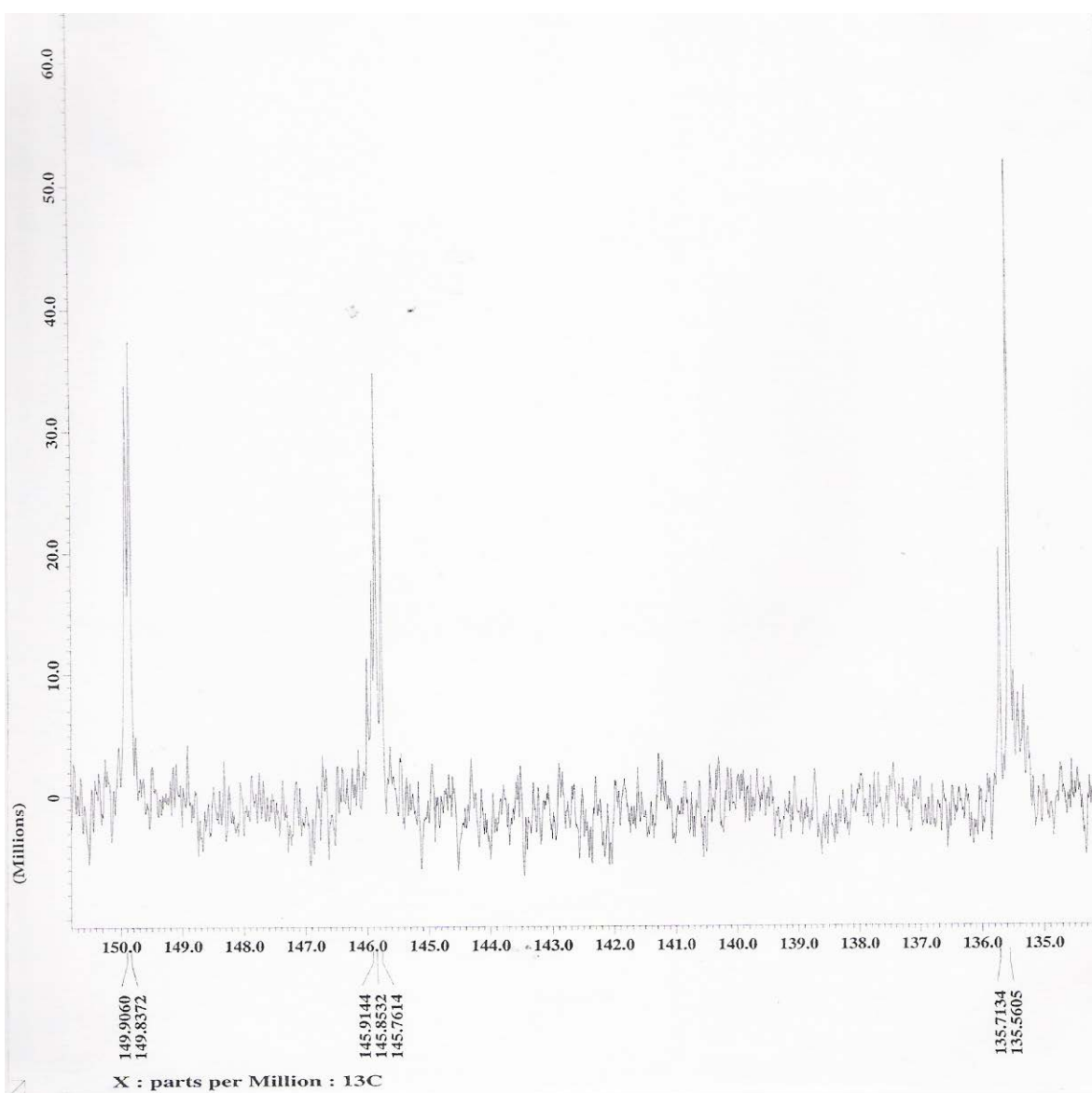
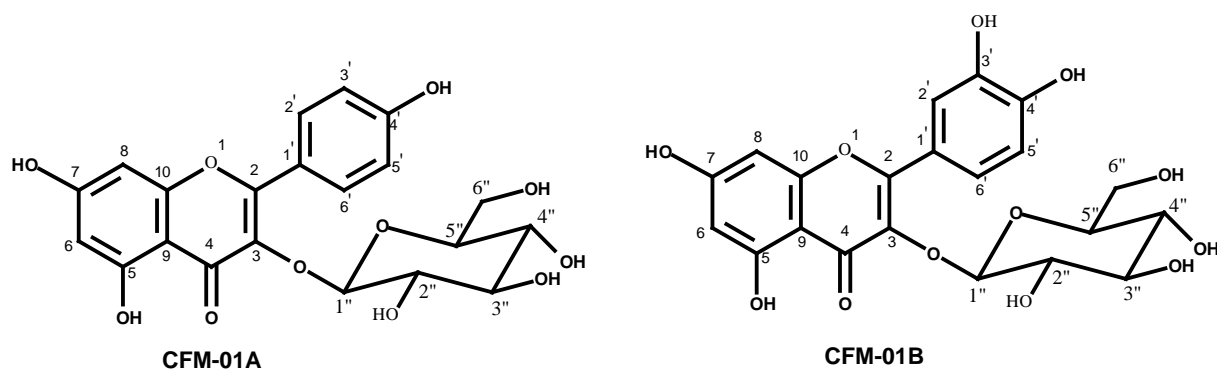




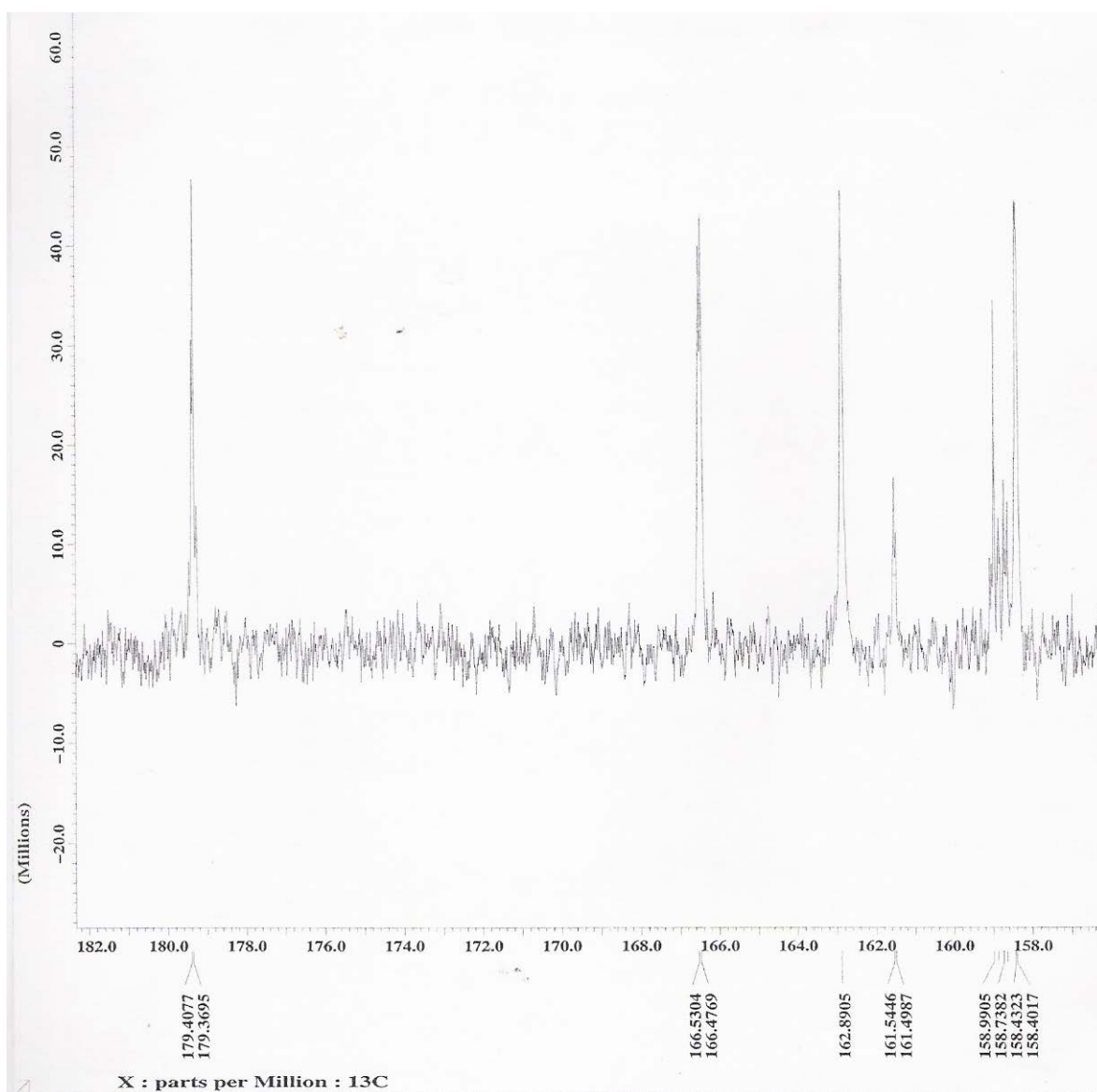
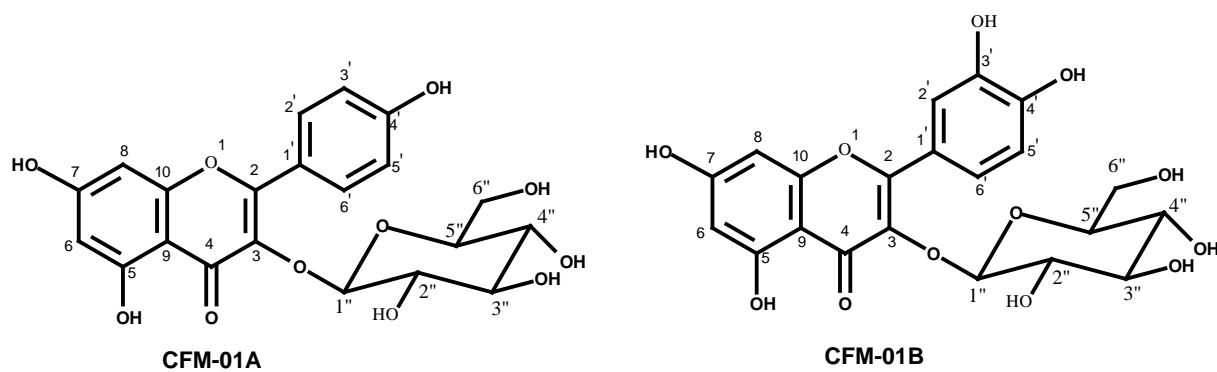
**Figura 32** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 101 – 117 ppm)



**Figura 33** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 117 – 133 ppm)

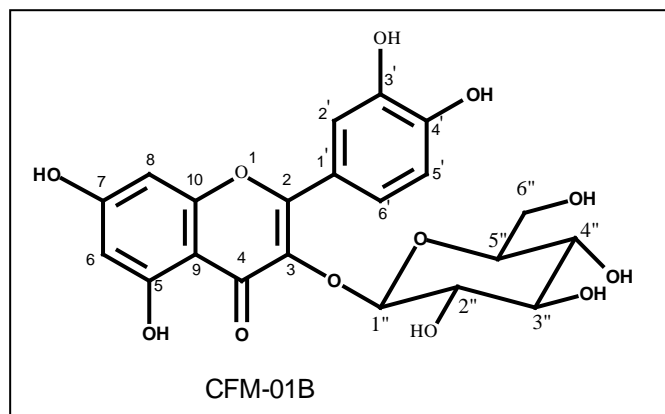


**Figura 34** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 135 – 150 ppm)



**Figura 35** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT da mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B** (região de 158 – 182 ppm)

#### 6.1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA CFM-01B



A substância **CFM-01B** apresentou quando revelada, com solução etanólica de cloreto férrico, coloração esverdeada, que indicou a presença de grupos fenólicos na molécula.

O espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 36**, p. 64) apresentou intenso sinal em  $\nu_{\text{OH}}$   $3224 \text{ cm}^{-1}$  indicando a presença de ligações de hidrogênio, em  $\nu_{\text{C=O}}$   $1658 \text{ cm}^{-1}$  sinal característico de grupo carbonila em ligação de hidrogênio intramolecular. A presença de anéis aromáticos foi confirmada através dos sinais em  $\nu_{\text{C=C}}$   $1604$ . Os sinais em  $\nu_{\text{C-OH}}$   $1199$ ,  $1118$ ,  $1060$  e  $1010 \text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de grupos oximetínicos e metilênicos.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 37**, p. 65) apresentou sinais na região de  $[\delta_{\text{H}} 3,2-5,3]$  que juntamente com os sinais na região de  $[\delta_{\text{C}} 61,2-77,0]$  no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , sugerem a presença de resíduo de açúcar.

A presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  (6,2- 8,0) e de acordo com as multiplicidades caracteriza a substância como sendo um flavonóide.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (**Figura 41**, p. 69) revelou a presença de 21 sinais que, juntamente com os resultados obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , confirmam a presença de um esqueleto flavonoídico ligado a um resíduo de açúcar na substância.

A substância **CFM-01B** está caracterizada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pela presença dos sinais a  $\delta_{\text{C}}$   $178,1$  (C-4) característicos de carbonila em ponte com hidroxila a C-5 [ $\delta_{\text{C}}$   $161,6$ ]. O anel aromático **A** está caracterizado pelos sinais a  $\delta_{\text{C}}$   $161,6$  (C-5),  $98,6$  (C-6),  $164,8$  (C-7),  $93,5$  (C-8),  $157,0$  (C-9),  $104,3$  (C-10). Os sinais

a  $\delta_c$  121,9 (C-1'), 114,7 (C-2'), 144,5 (C-3'), 148,5 (C-4'), 116,3 (C-5') e 121,7 (C-6') caracterizam o anel aromático **B**, enquanto que os sinais  $\delta_c$  157,7; 134,3 e 178,1 caracterizam o anel heterocíclico **C**. A presença de um sinal em fase positiva no experimento de  $^{13}\text{C}$ -APT em  $\delta_c$  61,2 indica que o resíduo de açúcar trata-se de uma glicose. O resíduo de açúcar está caracterizado pelos sinais a  $\delta_c$  103,1 (carbono anomérico), 74,4 (C-2), 77,0 (C-3), 69,9 (C-4), 76,8 (C-5) e 61,2 (C-6).

A substância **CFM-01B** já foi isolada no gênero na espécie *C. ternateae* (Kazuma *et. al.*, 2003).

**Tabela 06.** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) do flavonóide **CFM-01B**, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm).

C	$\bar{\delta}_{\text{C}}$	$\bar{\delta}_{\text{C}}$ (Kazuma, <i>et. al.</i> , 2003)	$\bar{\delta}_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	157,7	158,5	-	-	H-2'; H-6'
3	134,3	135,6	-	-	H-1''
4	178,1	179,5	-	-	-
5	161,6	163,1	-	H-6	-
7	164,8	166,0	-	H-8	-
9	157,0	159,1	-	H-8	-
10	104,3	105,7	-	-	H-6; H-8
1'	121,9	123,2	-	H-2'	H-5'
3'	144,5	149,8	-	H-2'	H-5'
4'	148,5	145,9	-	H-5'	H-6'; H-2'
<b>CH</b>					
6	98,6	99,9	6,16 (s)	-	H-8
8	93,5	94,7	6,34 (s)	-	H-6
2'	114,7	116,0	7,70 (s)	-	-
5'	116,3	114,9	6,85 (d, 8,2 Hz)	H-6'	-
6'	121,7	123,1	7,56 (d, 8,2 Hz)	H-5'	H-2'
1''	103,1	104,2	5,22 (d, 7,0 Hz)	H-2''	-
2''	74,4	75,7	3,46 (m)	H-6''	-
3''	77,0	78,1	3,24 (m)	H-4''; H-2''	-
4''	69,9	71,2	3,35 (m)	H-3''	H-6''; H-2''
5''	76,8	78,4	3,30 (m)	H-4''	-
<b>CH<sub>2</sub></b>					
6''	61,2	62,6	3,71 (dd, 14,1; 2,4) 3,58	-	H-4''

\*(DMSO)

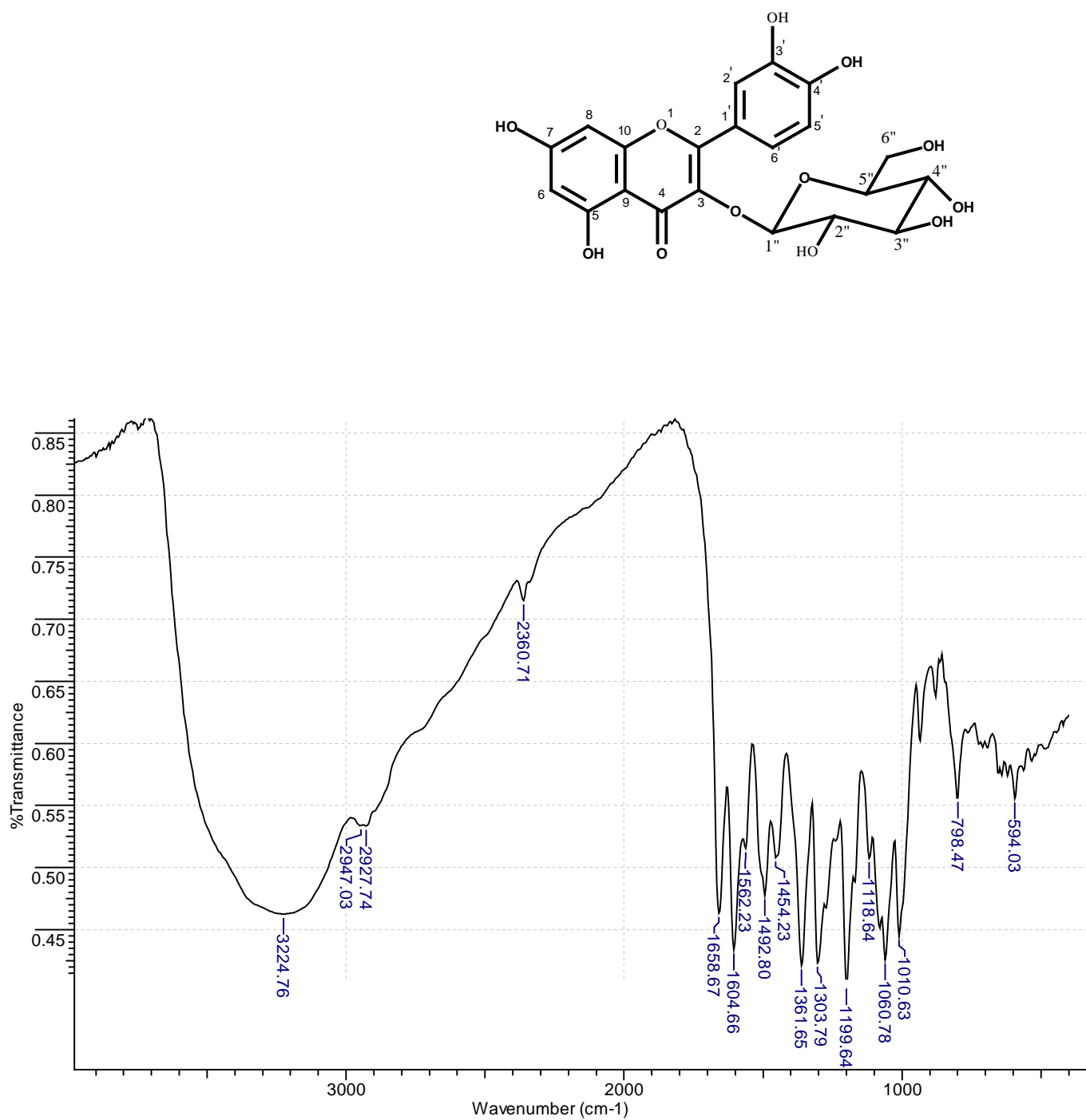


Figura 36 - Espectro de infravermelho da substância **CFM-01B**



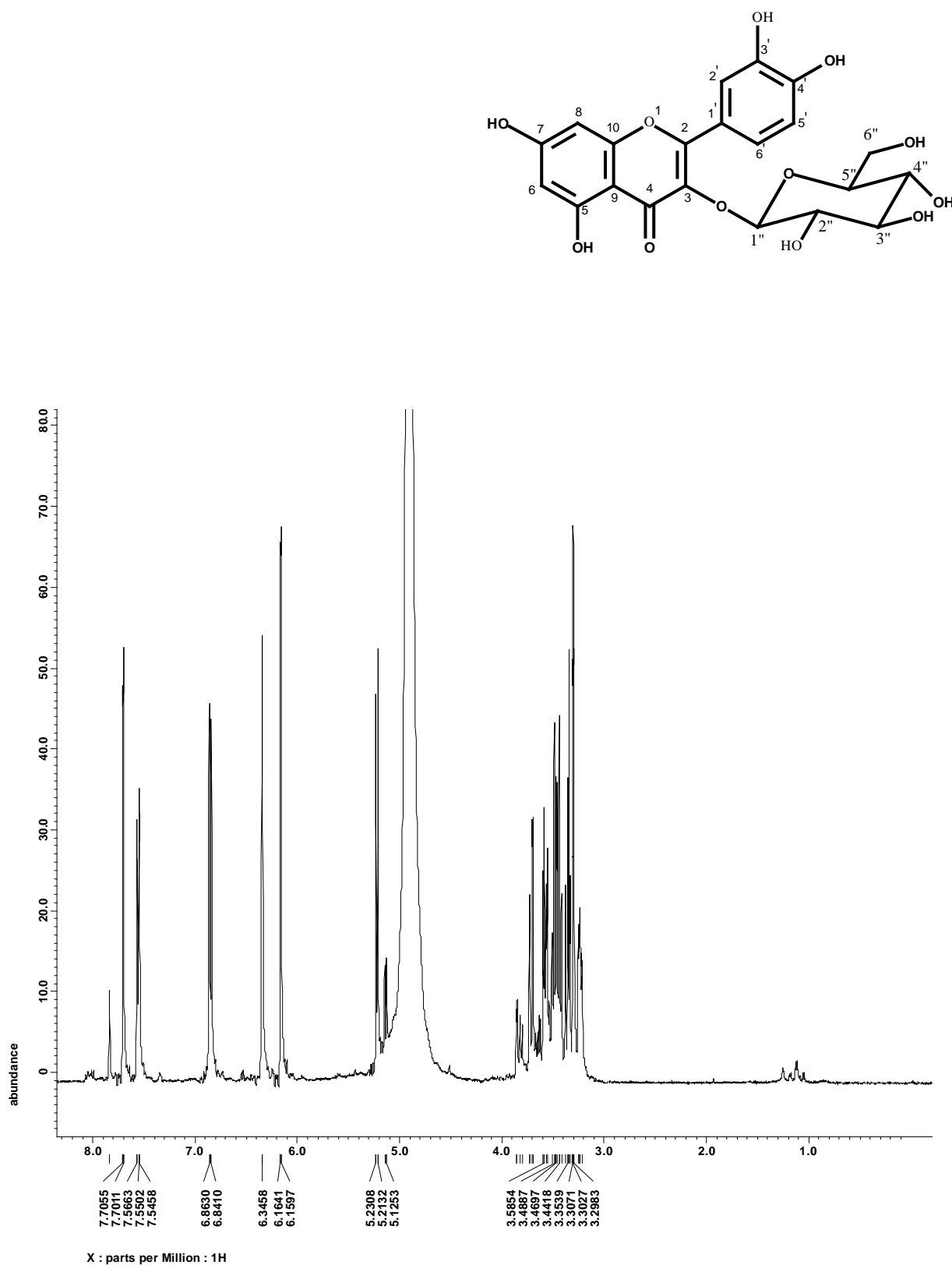


Figura 37 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do flavonóide **CFM-01B** (400 MHz, MeOD).

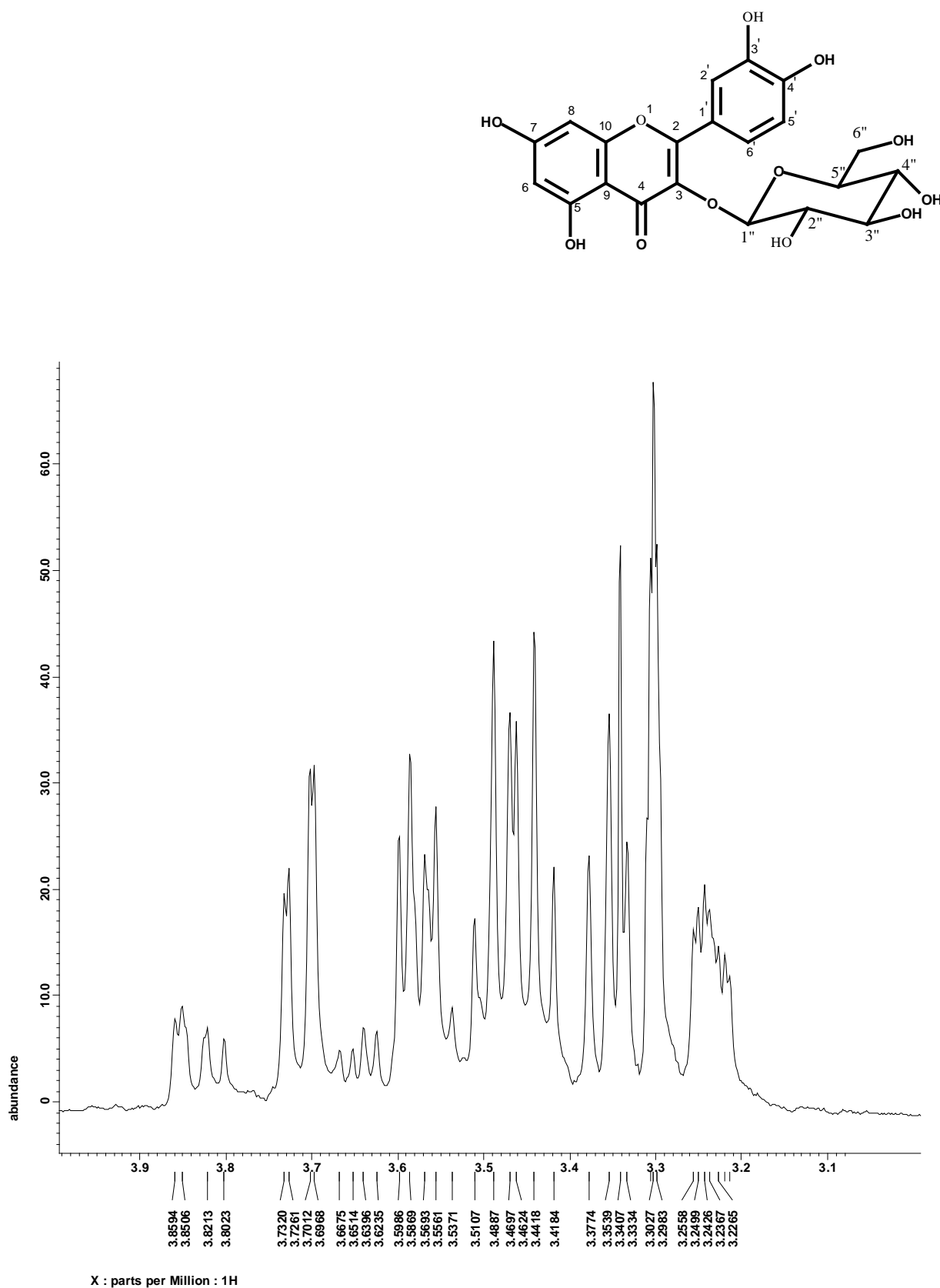
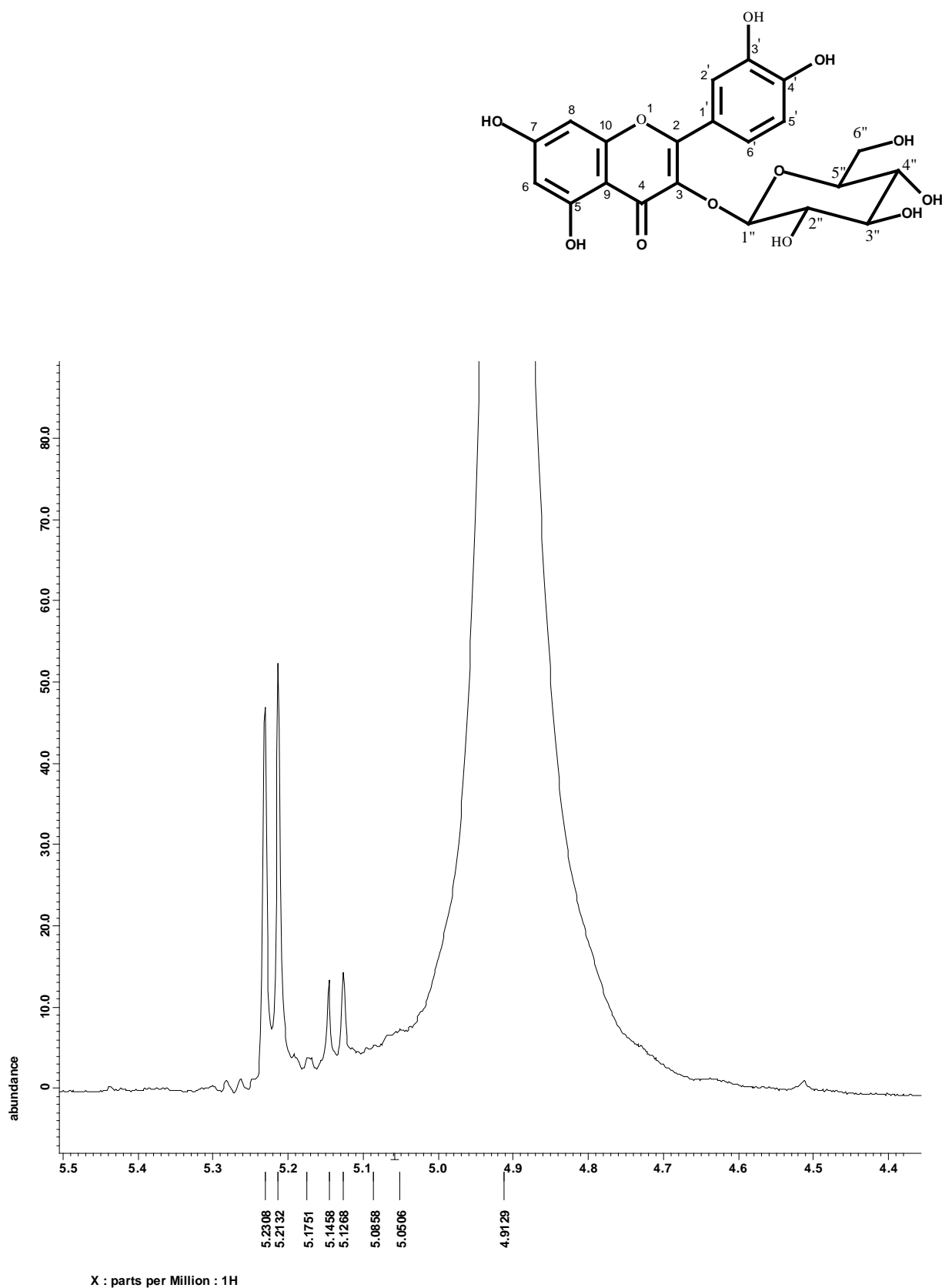
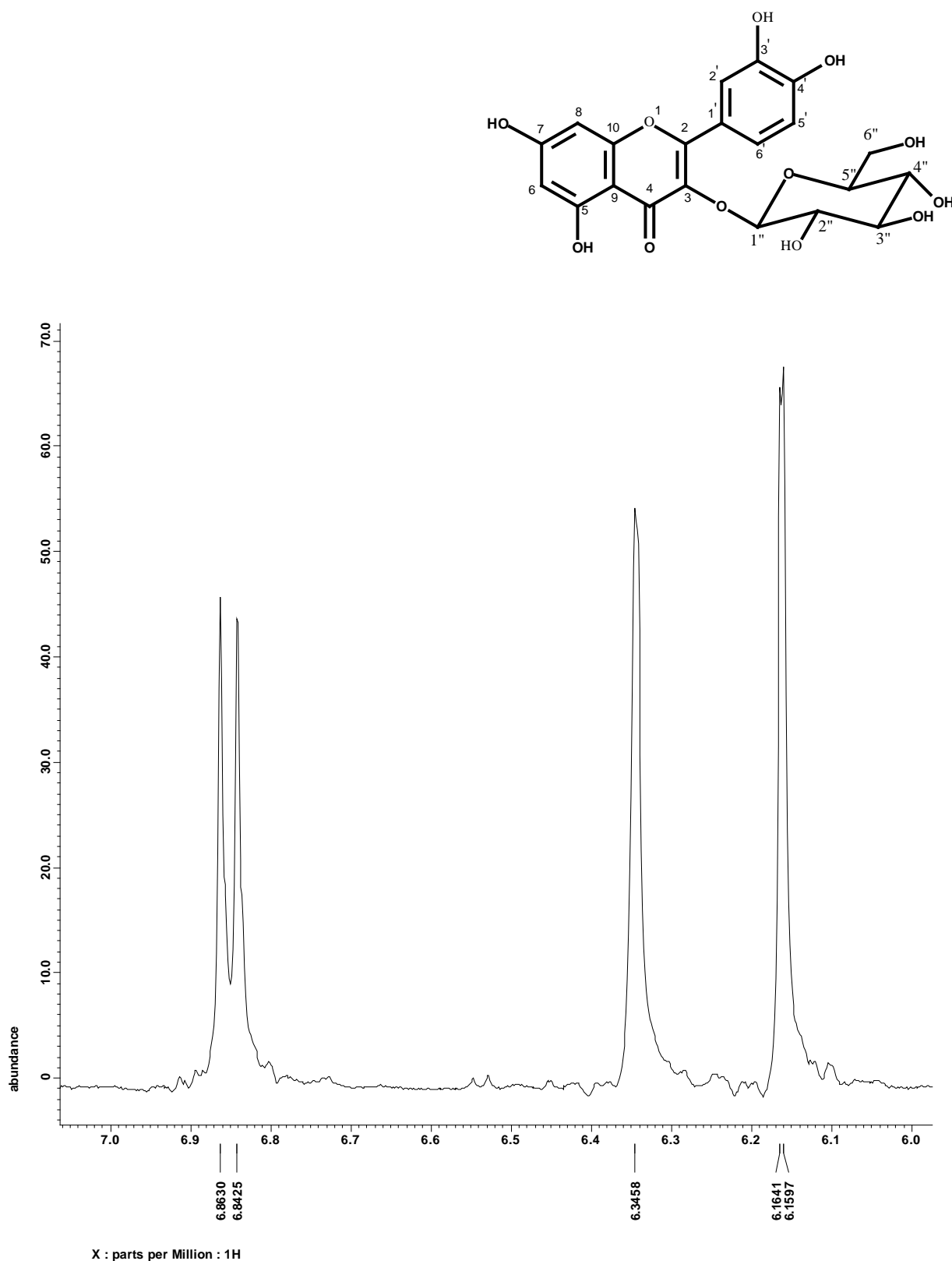


Figura 38 – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H do flavonóide **CFM-01B** (região de 3,1 – 3,9 ppm)



**Figura 39** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **CFM-01B**  
(região de 4,4 – 5,5 ppm)



**Figura 40** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **CFM-01B**  
(região de 6,0– 7,0 ppm)

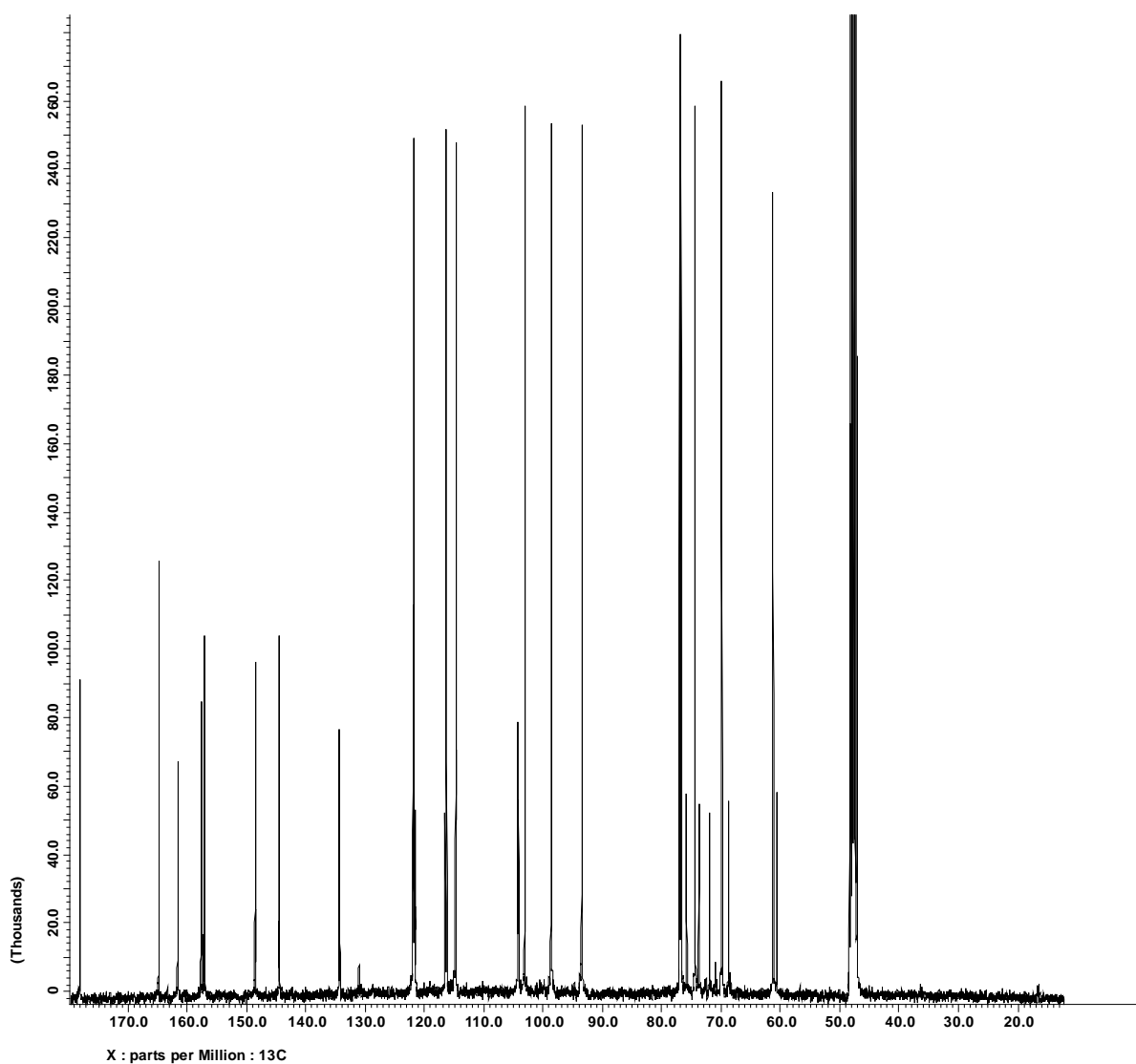
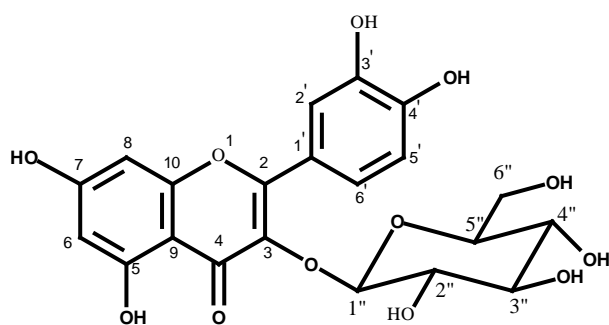
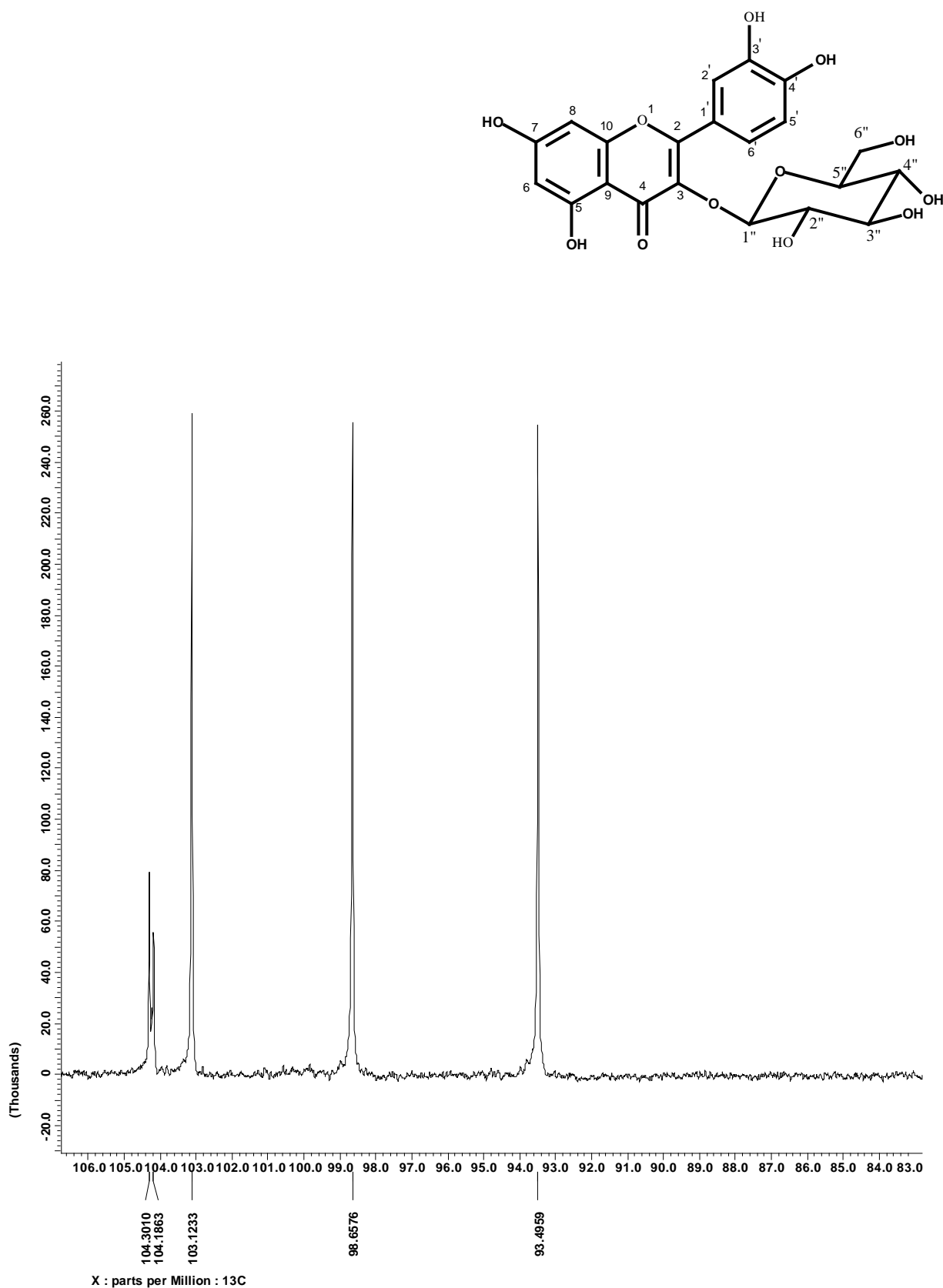
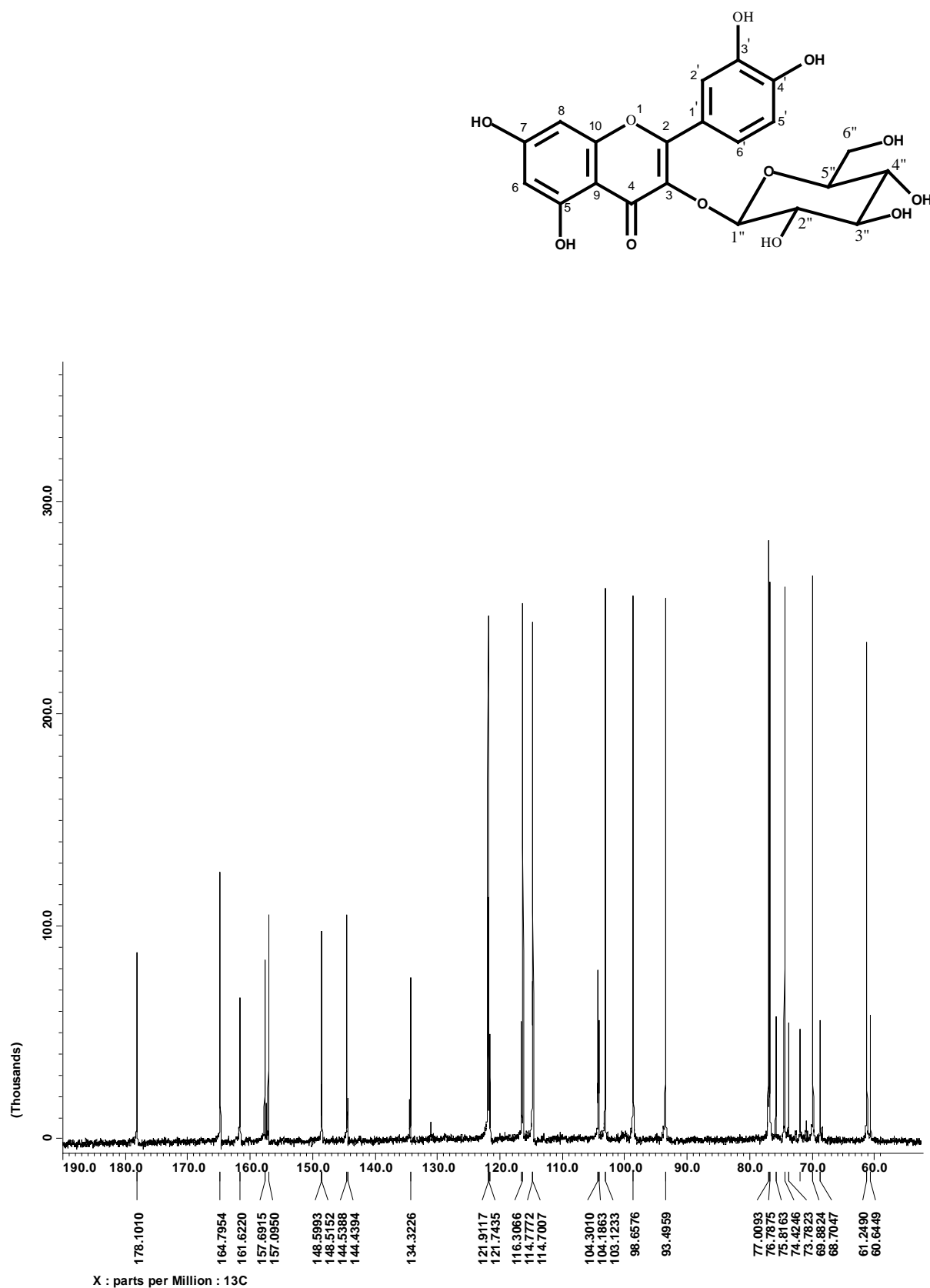


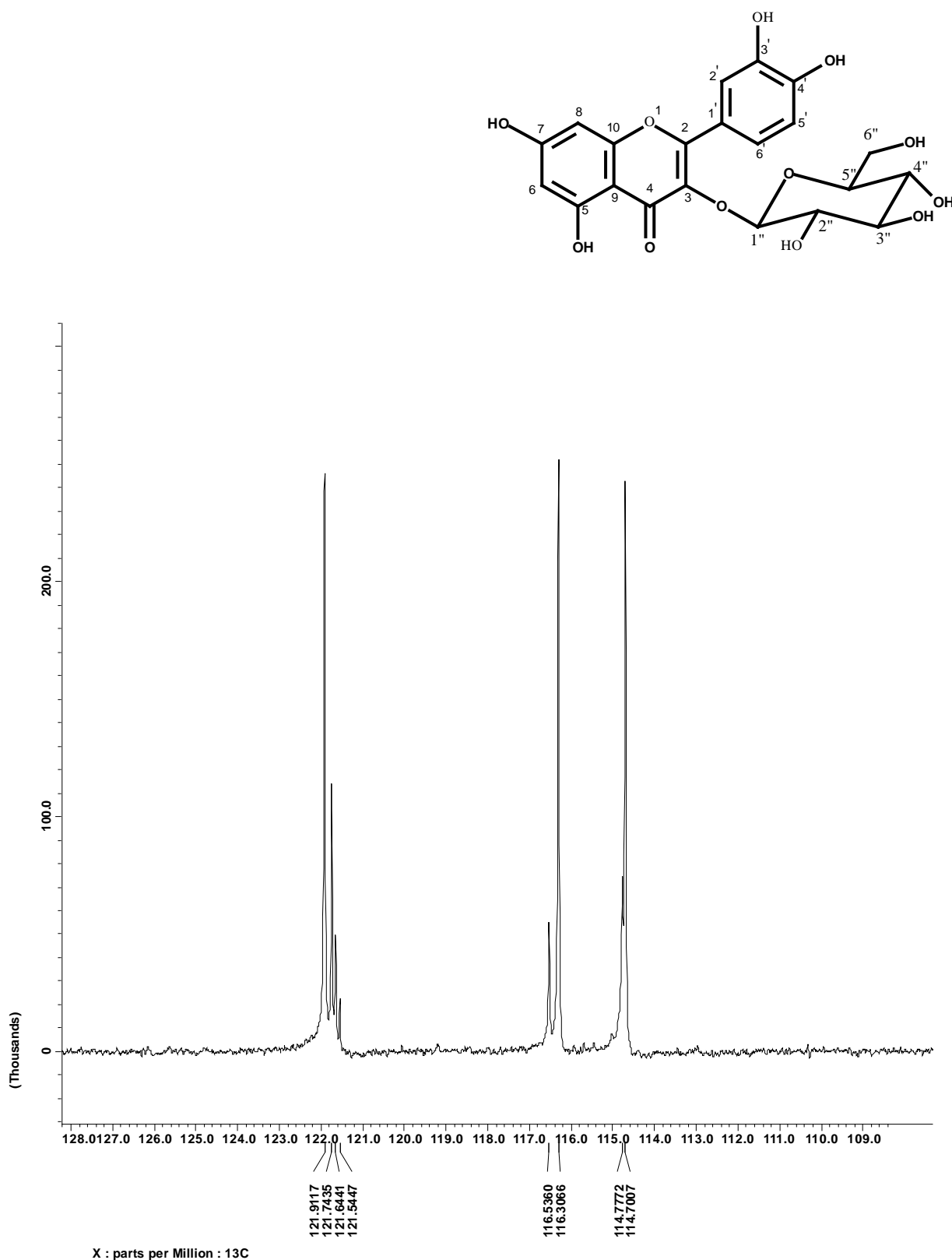
Figura 41 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância CFM-01B



**Figura 42** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **CFM-01B**  
(região de 83 – 106 ppm)



**Figura 43** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **CFM-01B**  
(região de 60 – 190 ppm)



**Figura 44** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **CFM-01B**  
(região de 109 – 128 ppm)



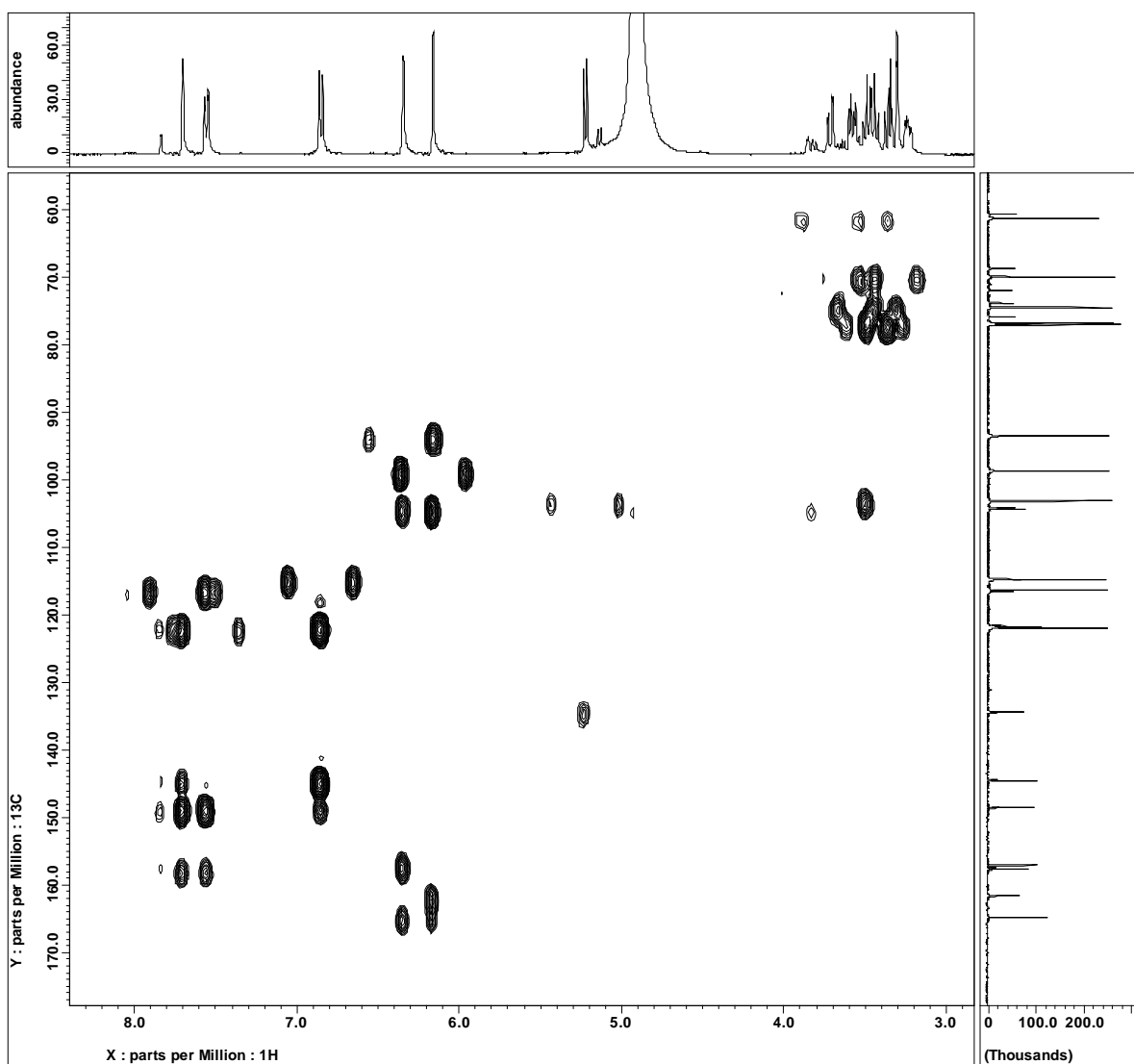
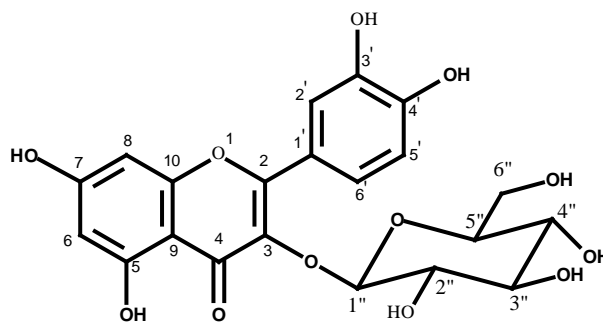


Figura 45 – Espectro de HMBC da substância CFM-01B

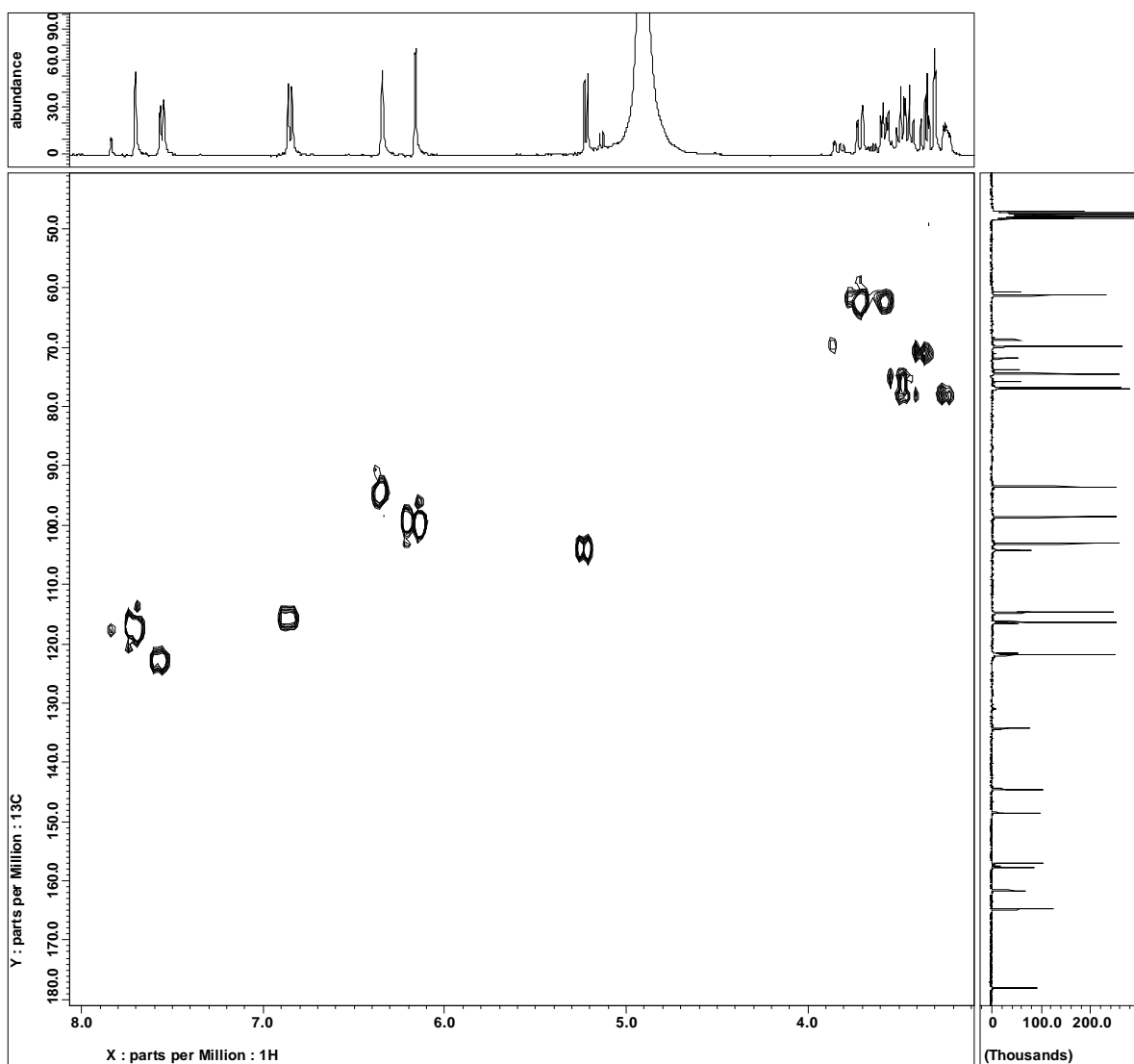
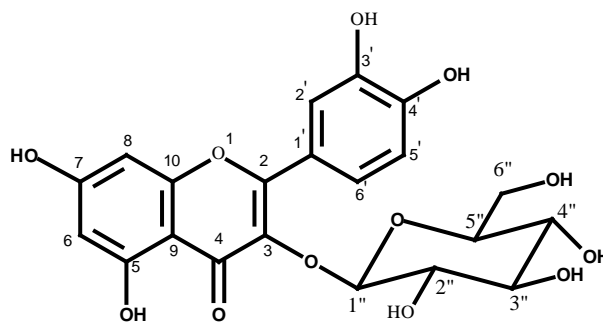


Figura 46 – Espectro de HMQC da substância CFM-01B

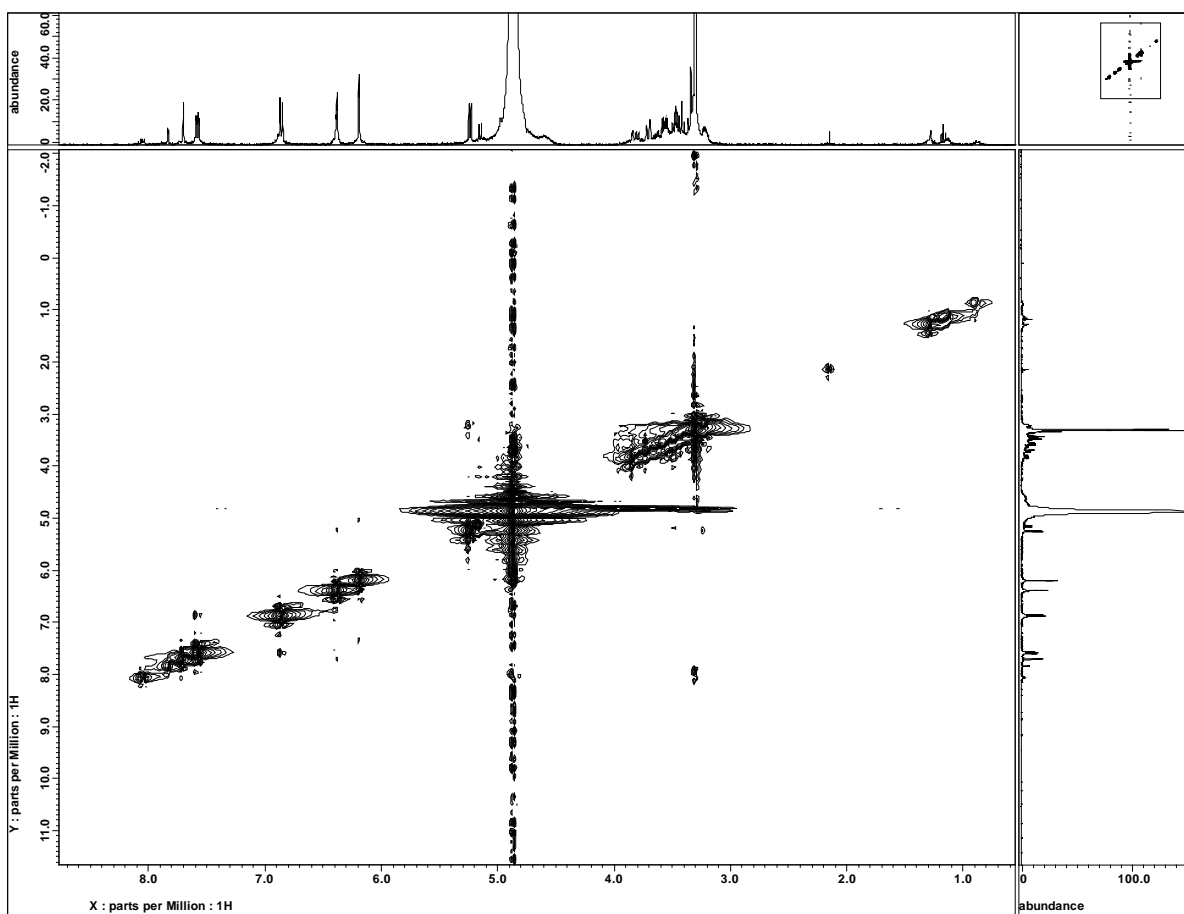
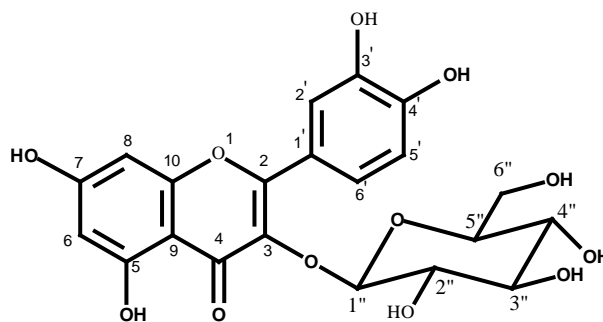
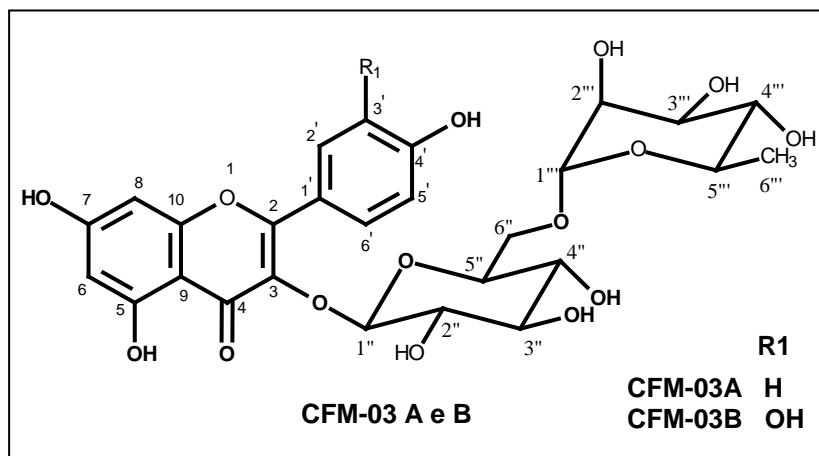


Figura 47 – Espectro de NOESY da substância **CFM-01B**

### 6.1.5. MISTURA DOS FLAVONÓIDES CFM-03A E CFM-03B



A mistura de substâncias codificadas de **CFM-03A** e **CFM-03B** apresentaram-se como uma única mancha em CCDA em vários sistemas de solventes.

O espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 48**, p. 81) apresentou intenso sinal em  $\nu_{\text{OH}}$   $3440\text{ cm}^{-1}$  indicando a presença de ligações de hidrogênio intermolecular, em  $\nu_{\text{C=O}}$   $1654\text{ cm}^{-1}$  sinal característico de grupo carbonila em ligação de hidrogênio intramolecular. A presença de anéis aromáticos foi confirmada através dos sinais em  $\nu_{\text{C=C}}$   $1747\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C-H}}$   $2854\text{ cm}^{-1}$ . A natureza glicosídica destas substâncias foi indicada pelo número de sinais oximetilênicos e oximetínicos observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

A elucidação estrutural dessas substâncias foi possível através de estudos comparativos de dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  constantes da literatura (Kazuma *et. al.*, 2003).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 54**, p. 87) parcialmente desacoplado de  $^1\text{H}$  revelou a presença de 28 sinais que, juntamente com os resultados obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , confirmam a presença de um esqueleto flavonoídica na mistura de substâncias.

A substância **CFM-03A** está caracterizada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pela presença dos sinais a  $\delta_{\text{C}}$  178,0 (C-4) característicos de carbonila em ponte com hidroxila a C-5 [ $\delta_{\text{C}}$  165,4]. O anel aromático **A** está caracterizado pelos sinais a  $\delta_{\text{C}}$  165,4 (C-5), 98,9 (C-6), 165,7 (C-7), 93,7 (C-8), 160,2 (C-9), 103,5 (C-10). Os sinais a  $\delta_{\text{C}}$  122,2 (C-1'), 131,1 (C-2', 6'), 116, 0 (C-3', 5') caracterizam o anel aromático **B**,

enquanto que os sinais  $\delta_c$  161,6, 135,560 e 178,0 caracterizam o anel heterocíclico **C**.

A substância **CFM-03B** está caracterizada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pela presença dos sinais a  $\delta_c$  178,1 (C-4) característicos de carbonila em ponte com hidroxila a C-5 [ $\delta_c$  161,8]. O anel aromático **A** está caracterizado pelos sinais a  $\delta_c$  161,8 (C-5), 98,9 (C-6), 165,7 (C-7), 93,7 (C-8), 160,2 (C-9), 104,3 (C-10). Os sinais a  $\delta_c$  121,7 (C-1'), 116,6 (C-2'), 145,5 (C-3'), 148,6 (C-4'), 116,6 (C-5') e 121,6 (C-6') caracterizam o anel aromático **B**, enquanto que os sinais  $\delta_c$  135,0; 178,1 e 161,8 caracterizam o anel heterocíclico **C**.

Os resíduos de açúcar de ambas as estruturas estão caracterizados pelos sinais a  $\delta_c$  104,7 [carbono anomérico (C-1'')], 75,9 (C-2''), 76,8 (C-3''), 71,0 (C-4''), 76,9 (C-5''), 68,9 (C-6'') e 103,5 [carbono anomérico (C-1''')], 72,6 (C-2'''), 72,5 (C-3'''), 73,8 (C-4'''), 70,1 (C-5'''), 16,6 (C-6'''), os quais foram comparados com os deslocamentos químicos de carboidratos registrados na literatura (Agrawal, 1989, **Tabela 08**, p.80) e atribuídos aos resíduos de glicose e ramnose.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 49**, p. 82) da mistura de substâncias apresentou sinais na região de  $\delta_H$  (3,3-5,1) que juntamente com os sinais na região de  $\delta_c$  (68,1-104,8) no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , sugerem a presença de resíduos de açúcares. Sendo que os sinais a  $\delta_c$  (18, 2 e 16,6) sugerem a presença de ramnose como sendo um dos açúcares.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  também apresentou sinais adicionais na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  (6,2 a 8,0) característicos dos anéis A e B das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B**. A análise mais detalhada desse espectro mostra que dois desses sinais mantêm entre si interação *meta* e deslocamentos químicos compatíveis  $\delta_H$  [6,2 (s, H-6) e 6,4 (s, H-8); sistema AX], com o anel aromático A de flavonóides 5,7-dissubstituídos e os sinais a  $\delta_H$  [6,9 (d, J=8,3, H-3'-5'); e 8,0 (d, J=8,6, H-2'-6'); com sistema AB de flavonóides com anel B 4'-monooxigenado e a  $\delta_H$  [7,9 (s, H-2'), 6,9 (d, J=8,3, H-5') e 7,6 (m, H-6')] com sistema AMX de flavonóides com anel B 3',4'-dioxigenado. Sendo assim, as unidades aglicônicas dos glicosídeos CFM-03A e CFM-03B foram caracterizadas como 3,4',5,7-tetraidroxiflavonol (canferol) e 3,3',4,5,7-pentaidroxiflavonol (quercetina). A presença dos dois resíduos de açúcar foi reconhecido pelos sinais correspondentes a dois hidrogênios anoméricos a  $\delta_H$  [5,0

(d) e 4,5 (s), além do sinal do grupo metila característico do carboidrato ramnose  $\delta_H$  [1,1 (d,  $J=6,5$ )].

A comparação dos dados de RMN de **CFM-03A** e **CFM-03B** com os constantes na literatura para o canferol e quercetina mostraram que ocorreram desproteções características de glicosilação no carbono C-3. O deslocamento químico em direção a frequência alta verificado no carbono metilênico da glicose  $\delta_C$  [68,6 (C-6)] também é indicativo de que a ligação glicosídica entre glicose e ramnose ocorre entre o C-6 da glicose e C-1 da ramnose (6 $\rightarrow$ 1). Desse modo, o conjunto desses dados permitiram propor para as substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** a estrutura do 5, 7, 4'-triidroxi-3-O- $\beta$ -glicopiranosil-(1''' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilflavonol (canferol) e 5,, 7, 3', 4'-tetraidroxi-3-O- $\beta$ -glicopiranosil(1''' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilflavonol (rutina) respectivamente.

Essas substâncias já foram isoladas na espécie *C. ternateae* (Kazuma *et. al.*, 2003).

**Tabela 07.** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) das substâncias CFM-03A e CFM-03B, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_c$  (em ppm).

	CFM-03A		CFM-03B		$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$		
C						
2	161,6	-	157,3	-	1H-1''	
3	135,0	-	135,0	-		
4	178,0	-	178,1	-		
5	165,4	-	161,8	-		
7	165,7	-	165,7	-		
9	160,2	-	160,2	-		
10	103,5	-	104,3	-	1H-8; 1H-6	
1'	122,2	-	121,7	-	1H-6'	
3'	116,0	-	145,5	-		
4'	160,2	-	148,6	-	1H-2'; 1H-6'	
CH						
6	98,9	6,2 (s)	98,9	6,2 (s)	1H-8	
8	93,7	6,4 (s)	93,7	6,4 (s)	1H-6	
2'	131,1	8,0 (d, J=8,6)	116,6	7,9		1H-5'
3'	116,3	6,9 (d, J=8,3)	144,5	--	1H-5'; 1H1'	1H-6'
5'	116,6	6,9 (d, J=8,3)	116,6	6,9 (d, J=8,3)	1H-3'	
6'	131,0	8,0 (d, 8,6)	121,6	7,6 (m)		
			Unidade carboidrática			
1''	104,7	5,0 (d)	104,7	5,0 (d)		
2''	75,9	-	75,89			
3''	76,9	3,4	76,9	3,4		
4''	71,0	3,5	71,1	3,5		
5''	76,9	3,3	76,9	3,3		
6''	68,9	3,8-3,7	68,4	3,8-3,7	1-H6'''	
1'''	103,4	4,5	103,5	4,5		
2'''	72,6	3,6	72,6	3,6		
3'''	72,5	-	72,5	-		
4'''	73,8	3,3	73,8	3,3		
5'''	70,1	-	70,1	-		
6'''	18,2	1,1 (d, J=6,5)	16,6	1,1 (d, J=6,5)		

**Tabela 08.** Dados espectrais, da literatura, de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) das substâncias CFM-03A e CFM-03B, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_c$  (em ppm).

	CFM-03A		CFM-03B	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$
C				
2	161,5	-	158,5	-
3	135,5	-	135,6	-
4	179,4	-	179,4	-
5	163,0	-	163,0	-
7	166,0	-	166,0	-
9	158,6	-	159,3	-
10	105,7	-	105,7	-
1'	122,8	-	123,1	-
3'	116,1	6,9 (d, 9,0)	145,8	-
4'	159,4	-	149,8	-
CH				
6	99,9	6,2 (d, 1,8)	99,9	6,2 (d, 2,0)
8	94,9	6,4 (d, 1,8)	94,9	6,4 (d, 2,0)
2'	132,4	8,1 (d, 9,0)	117,7	7,7 (d, 2,1)
5'	116,1	6,9 (d, 9,0)	116,1	6,9 (d, 8,5)
6'	132,4	8,1 (d, 9,0)	123,5	7,6 (dd, 2,1; 8,5)
Unidade carboidrática				
1''	104,6	5,2 (d, 7,3)	104,7	5,1 (d, 7,7)
2''	75,8	3,4 (dd, 7,3; 8,8)	75,7	3,5 (dd, 7,7; 8,9)
3''	78,1	3,4 (t, 8,8)	78,2	3,4 (t, 8,9)
4''	71,5	3,2 (t, 8,8)	71,4	3,3 (t, 8,9)
5''	77,2	3,2 (ddd, 1,0; 6,1; 8,8)	77,2	3,3 (ddd, 1,2; 6,1; 8,9)
6''	68,6	3,4 (dd, 6,1; 12,5)	68,6	3,4 (dd, 6,1; 11,0)
1'''	102,4	4,5 (d, 1,5)	102,4	4,5 (d, 1,5)
2'''	72,1	3,6 (dd, 1,5; 3,2)	72,1	3,6 (dd, 1,5; 3,4)
3'''	72,3	3,5 (dd, 3,2; 9,5)	72,3	3,5 (dd, 3,4; 9,6)
4'''	73,9	3,3 (t, 9,5)	73,9	3,3 (t, 9,6)
5'''	69,7	3,4 (dd, 6,1; 9,5)	69,7	3,4 (dd, 6,1; 9,6)
6'''	17,9	1,1 (d, 6,1)	17,9	1,1 (d, 6,2)

\*Kazuma *et. al.*, 2003



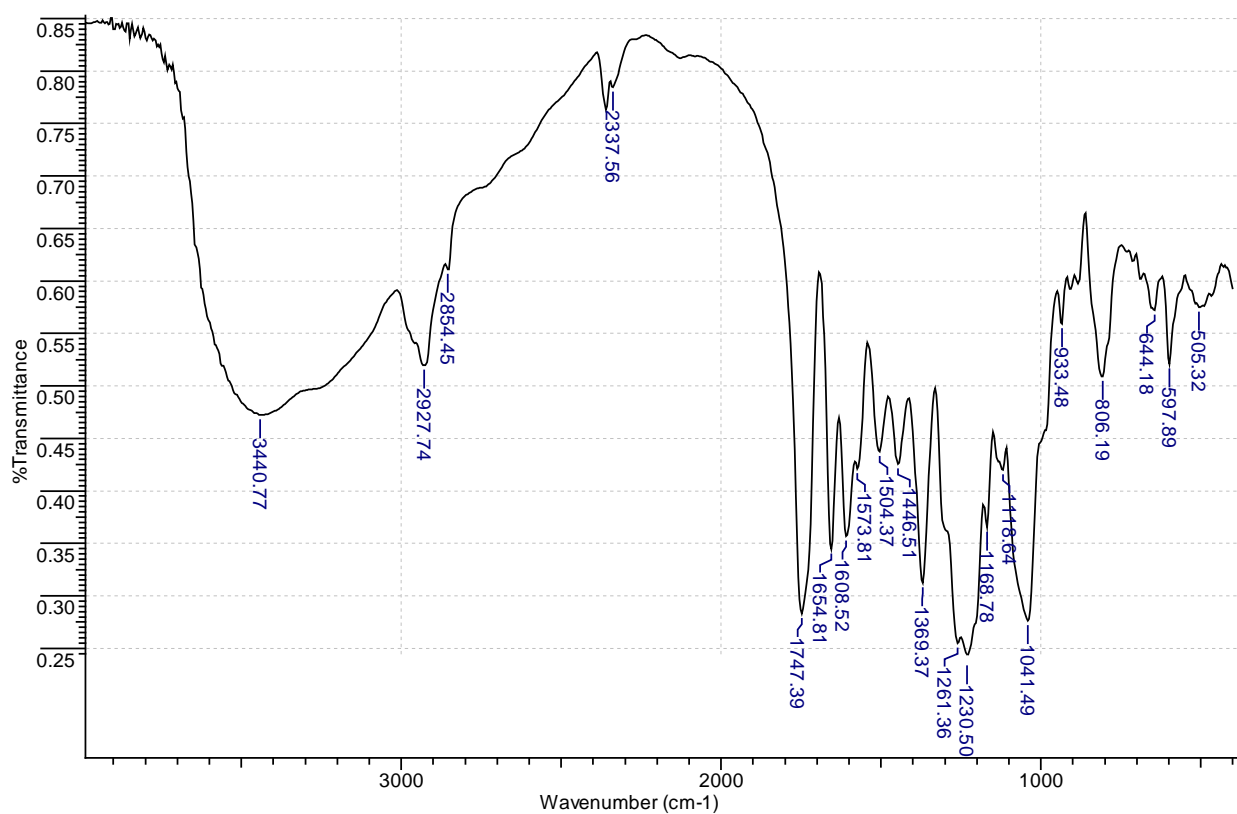
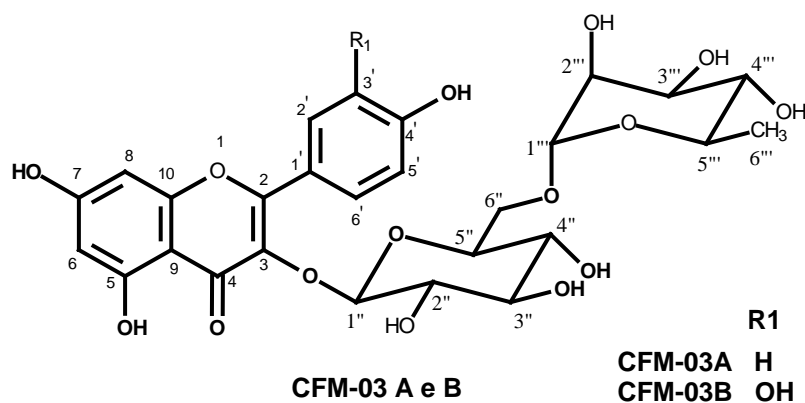
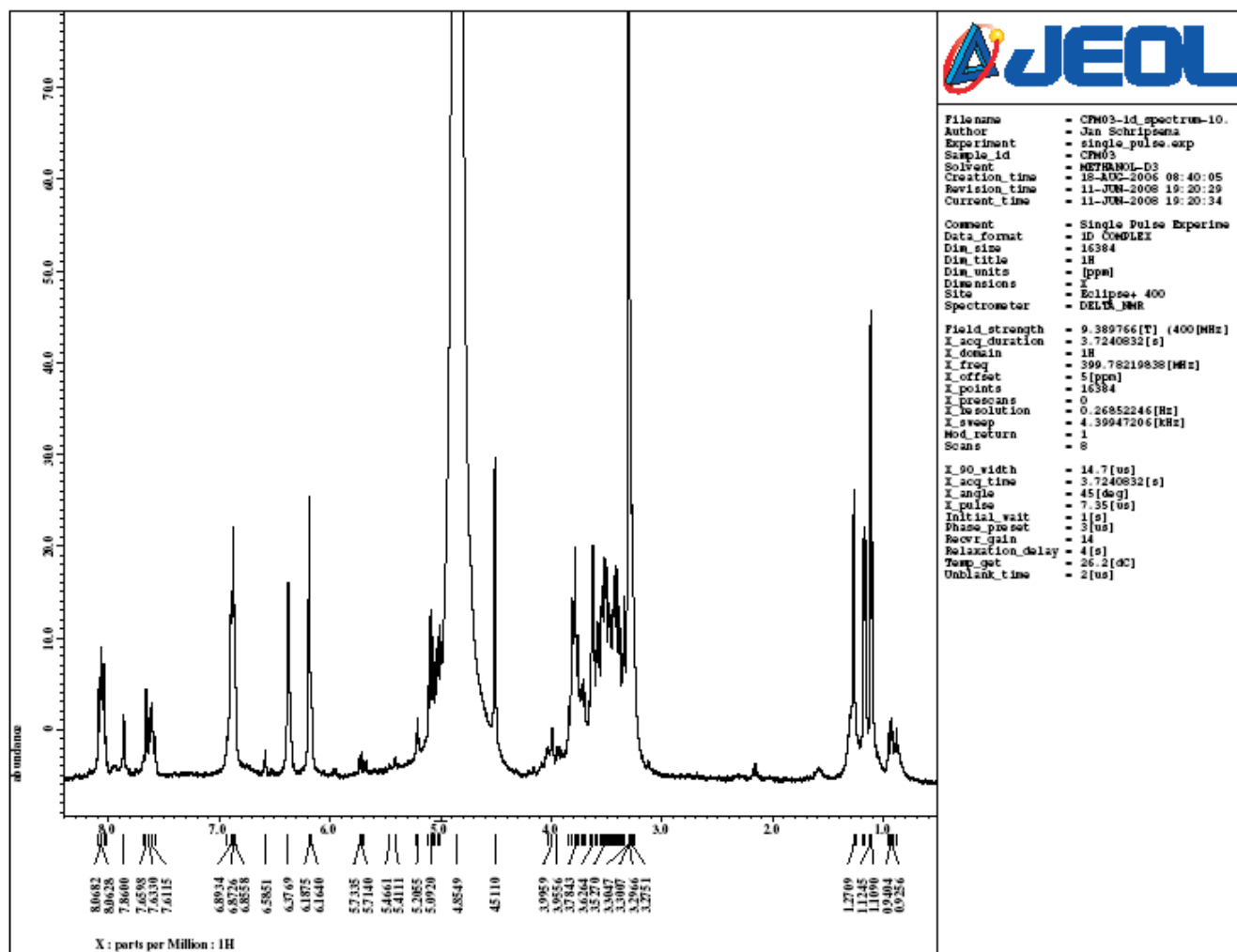
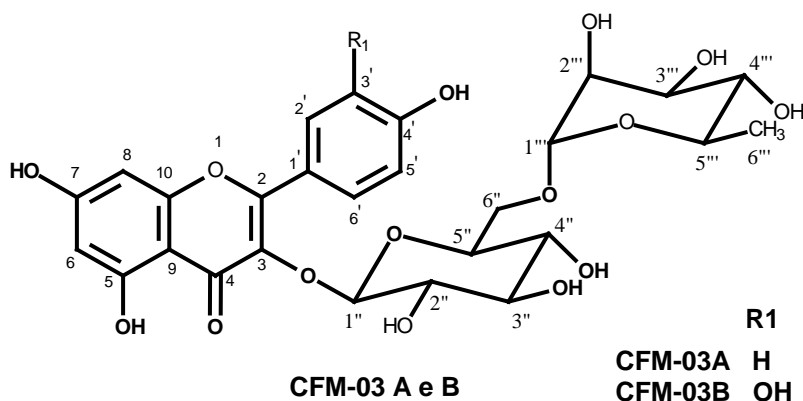
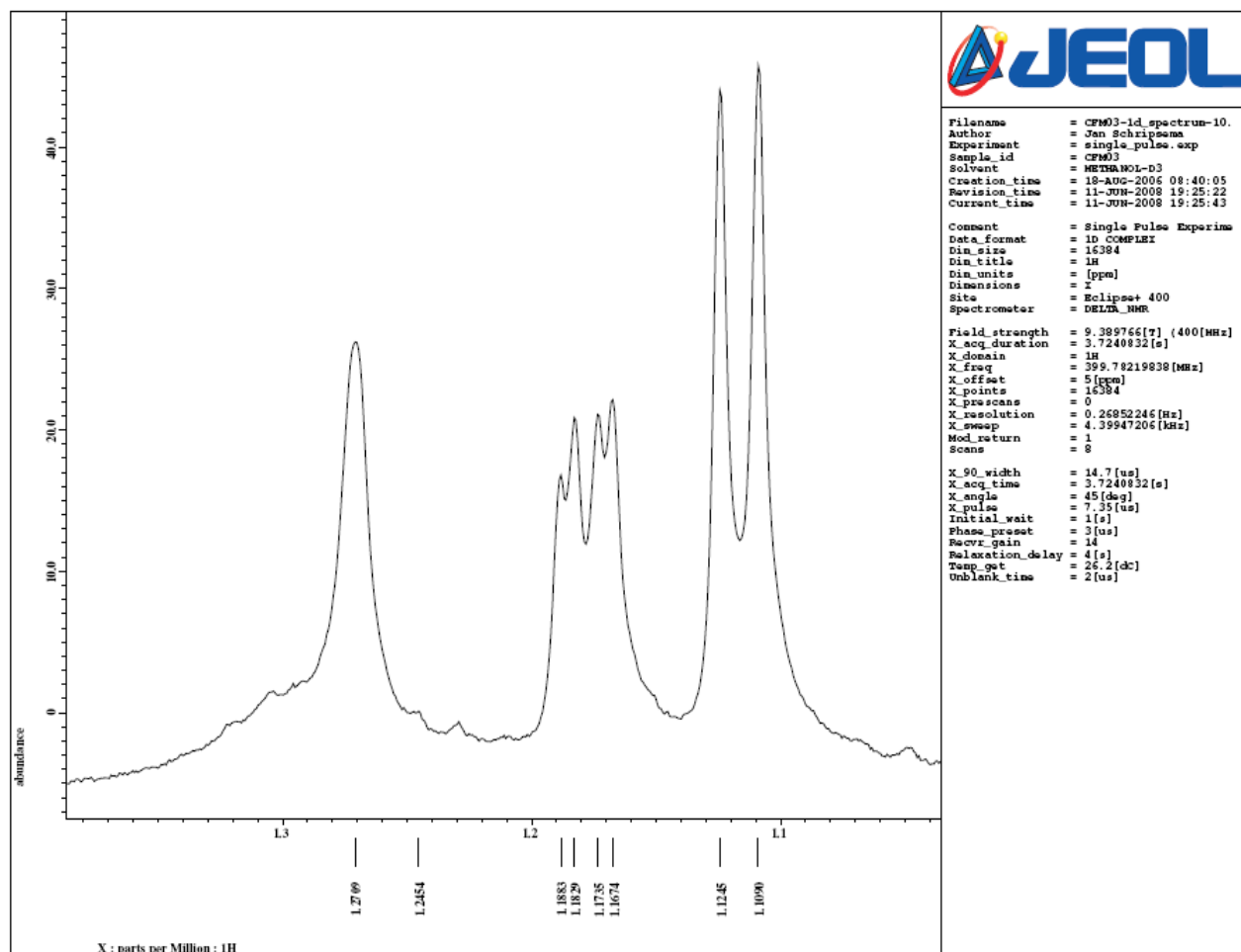
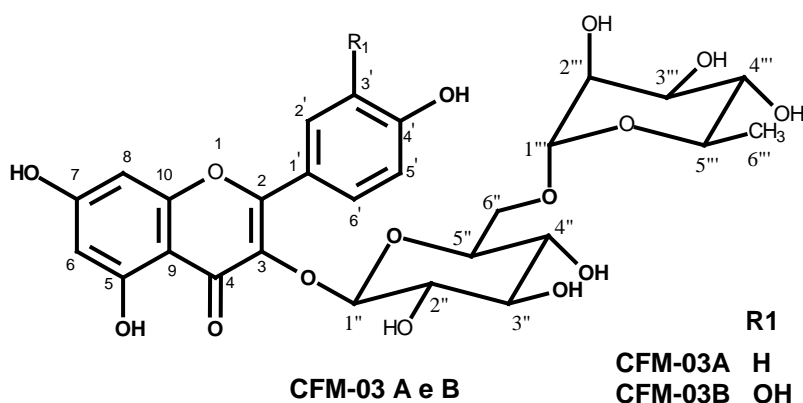


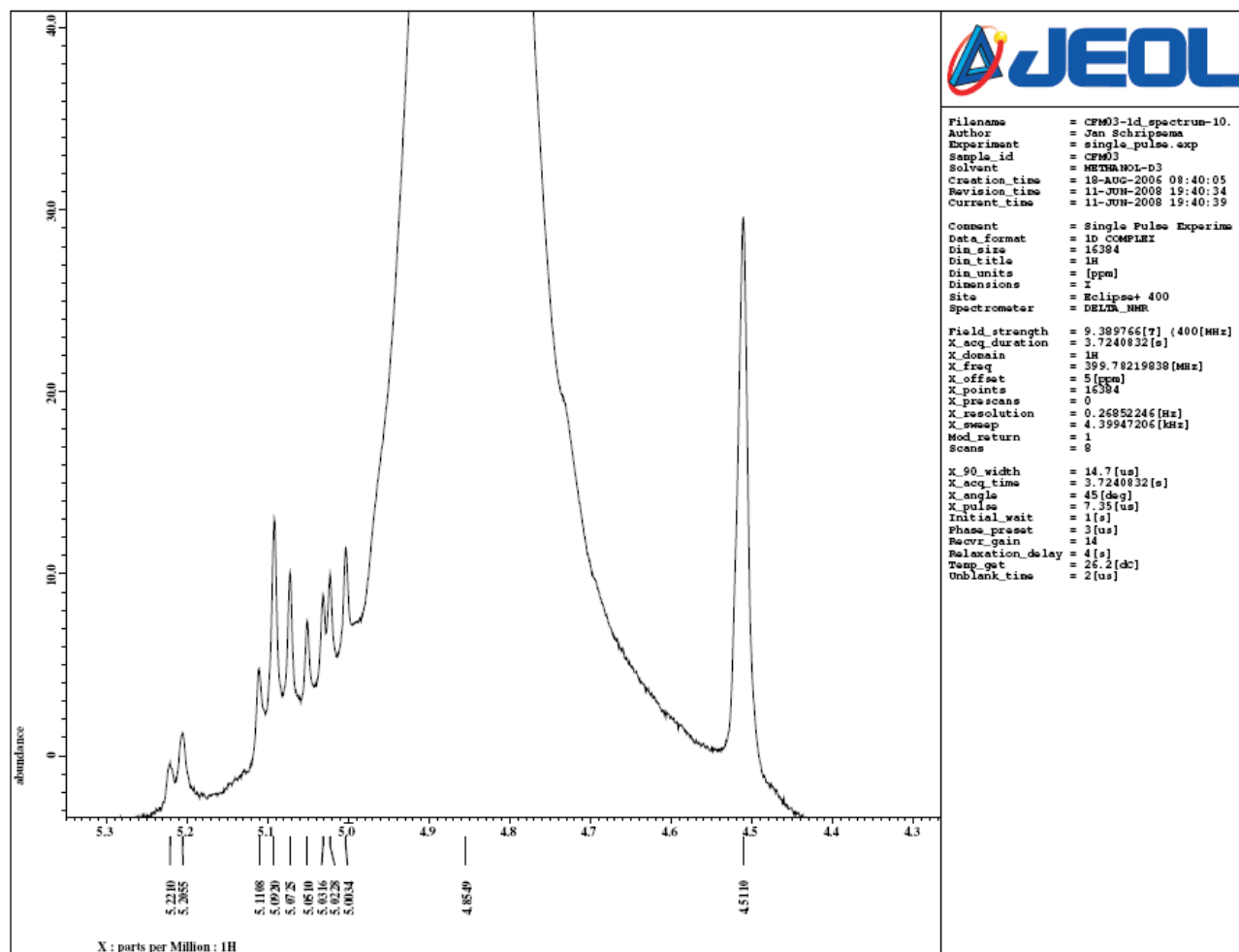
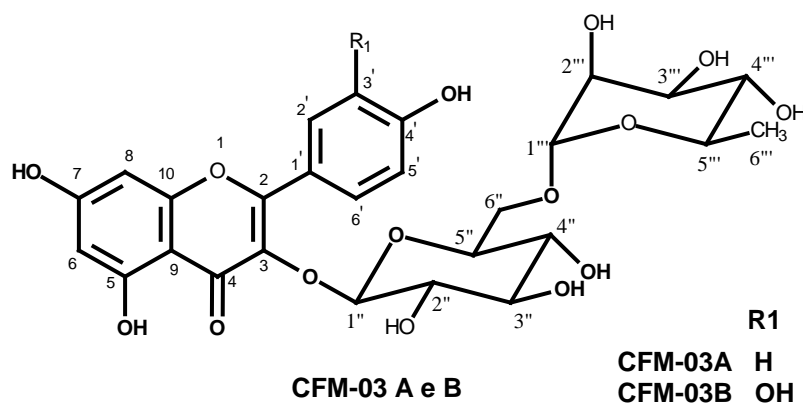
Figura 48 - Espectro de infravermelho das substâncias CFM-03A e CFM-03B



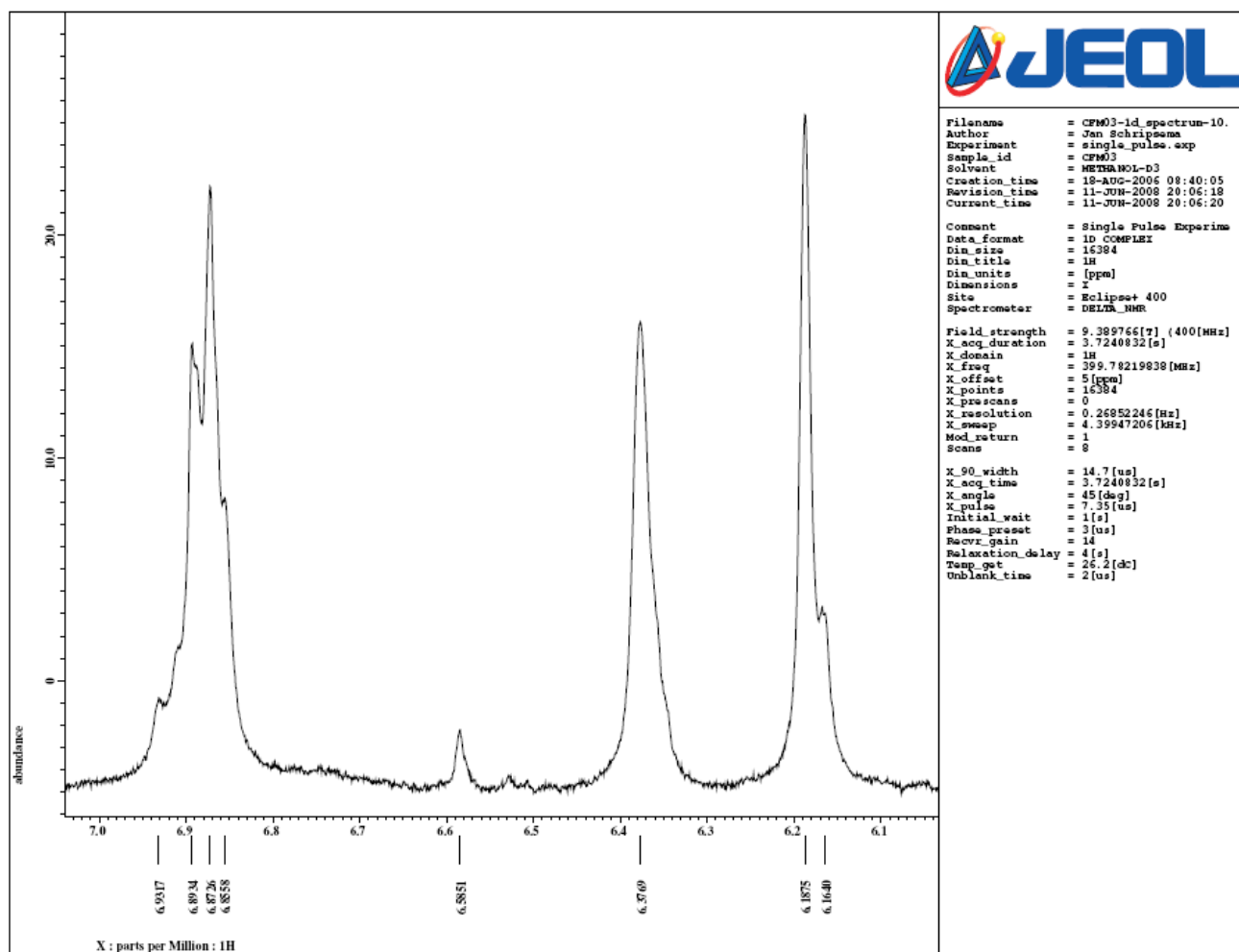
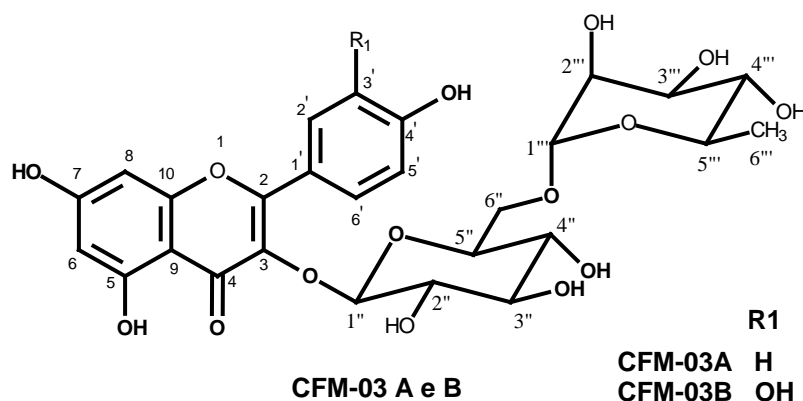
**Figura 49 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H das substâncias CFM-03A e CFM-03B**



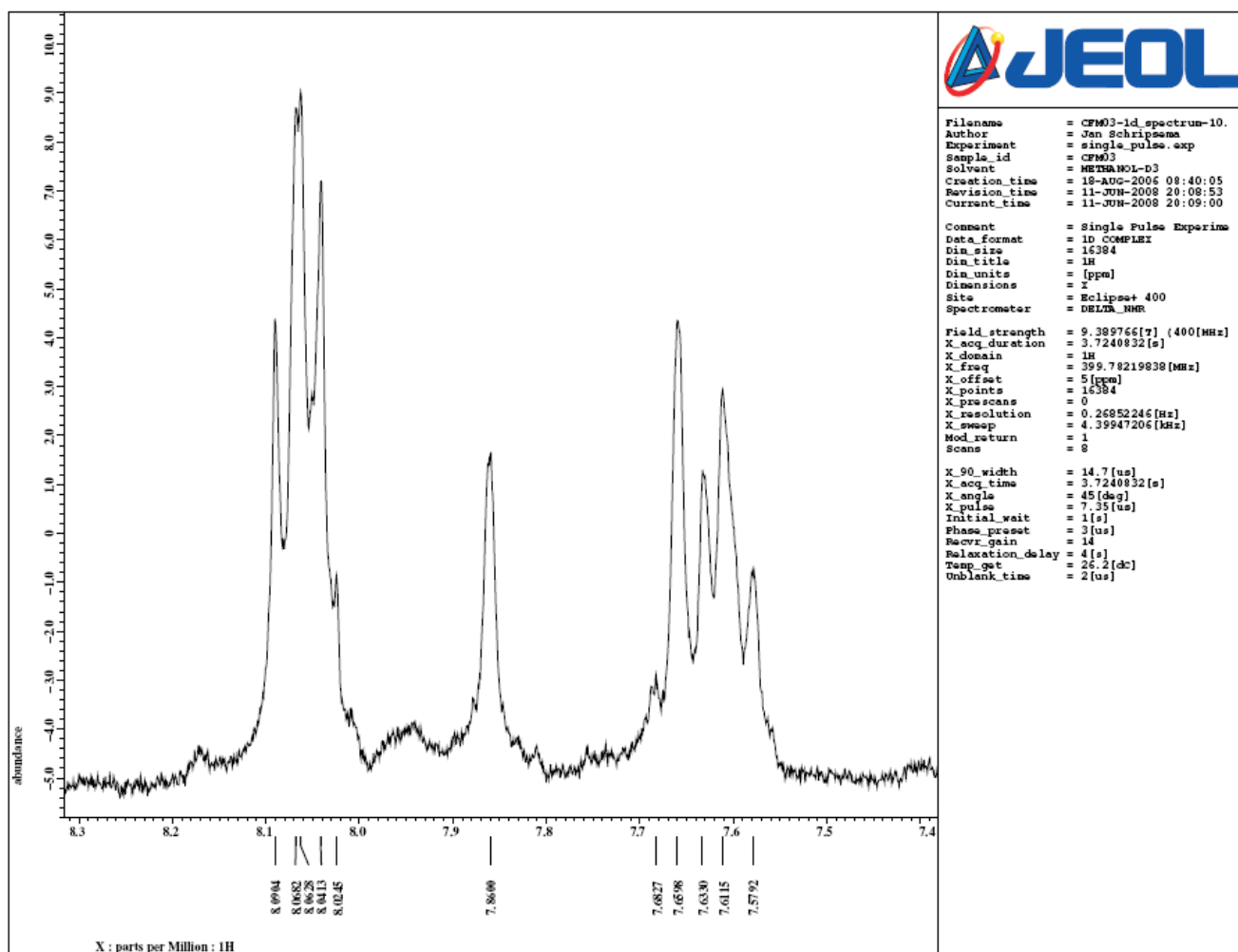
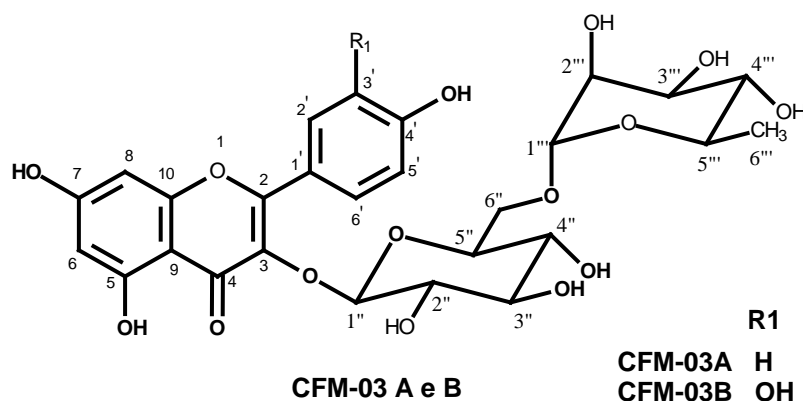
**Figura 50** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 1,1 – 1,4 ppm)



**Figura 51** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 4,3 – 5,3 ppm)



**Figura 52** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 6,1 – 7,0 ppm)



**Figura 53** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 7,4 – 8,3 ppm)

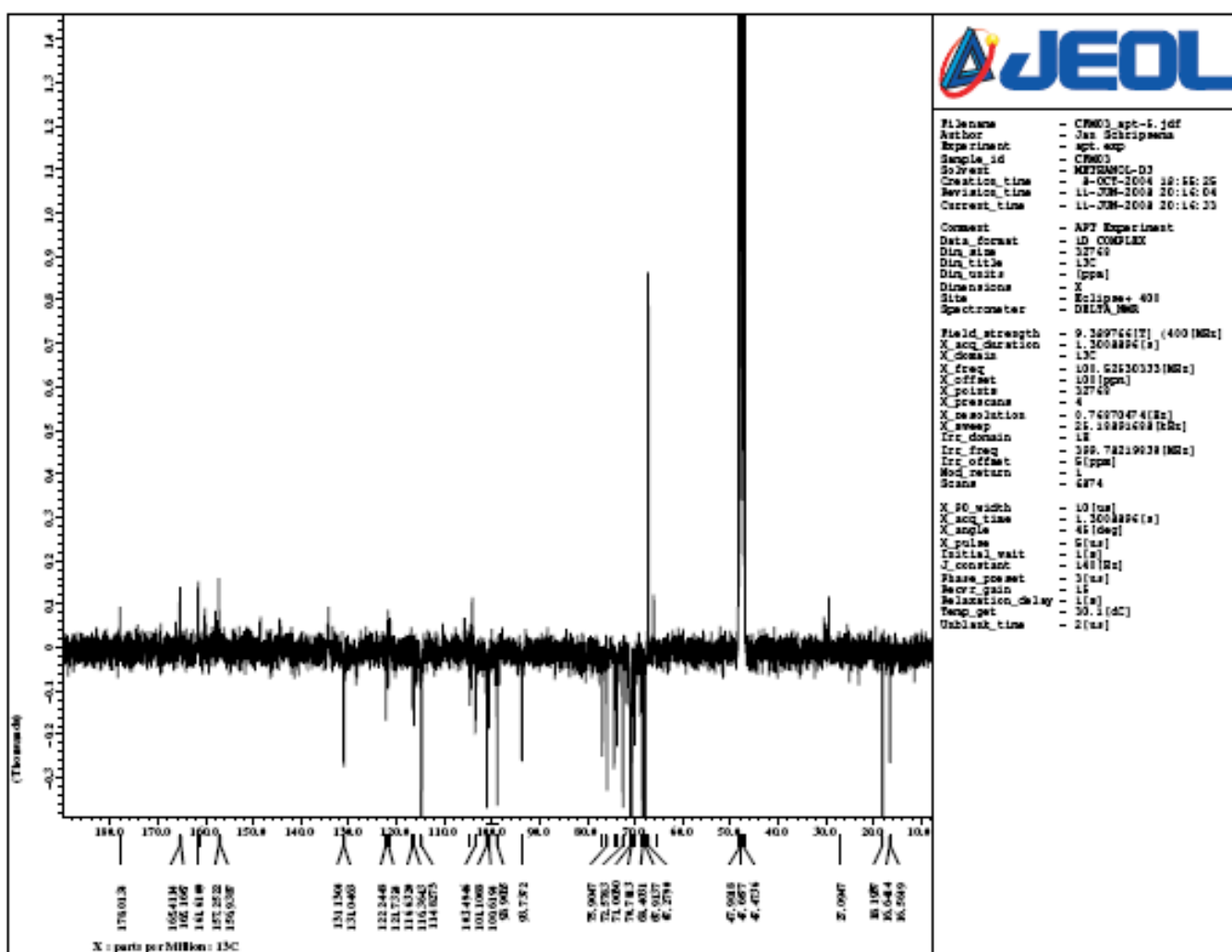
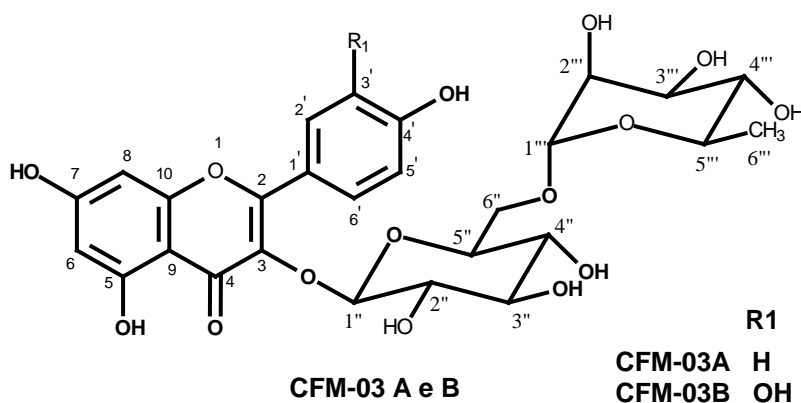
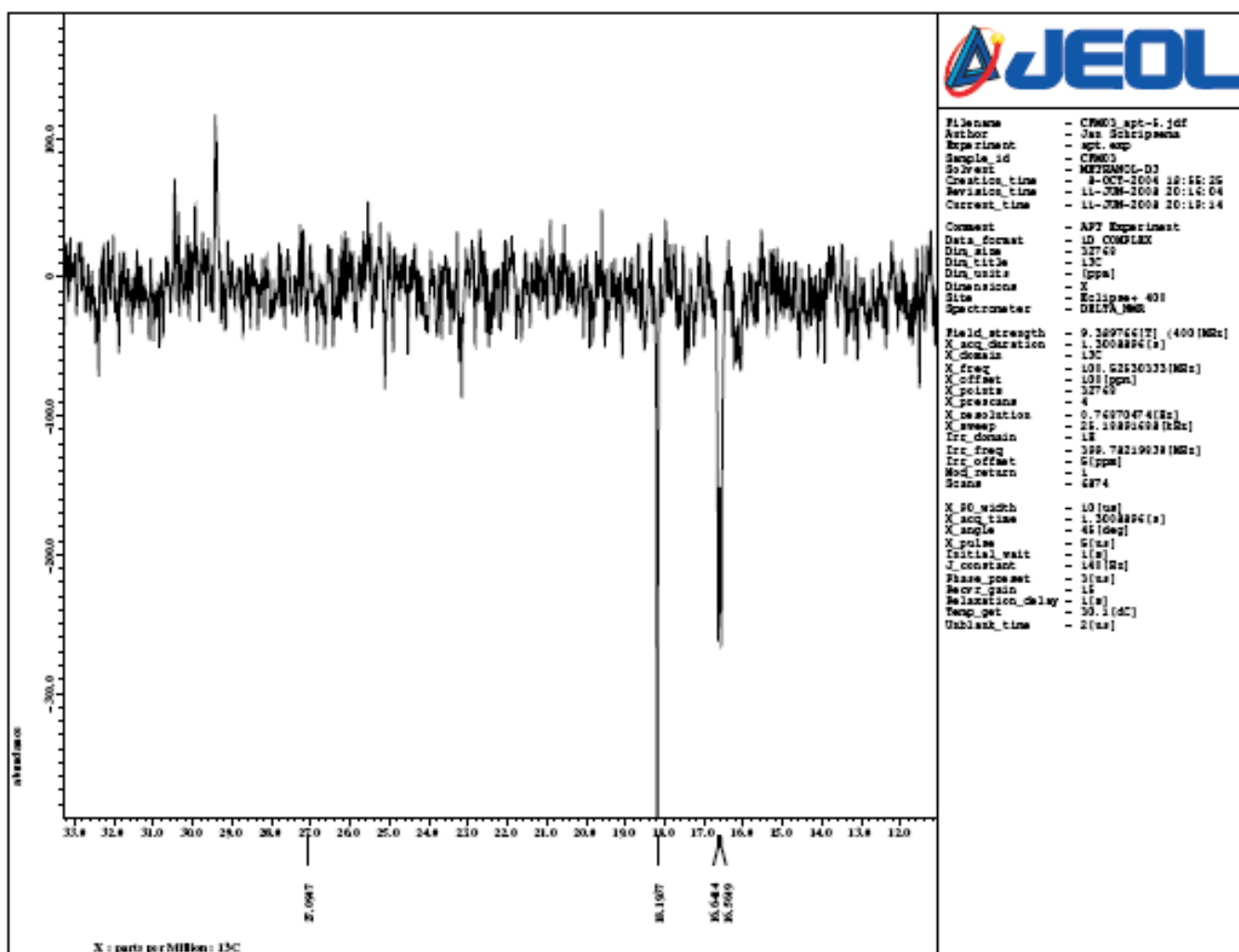
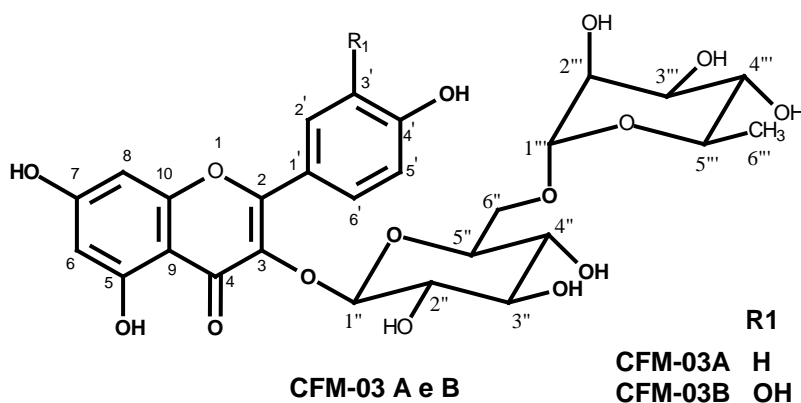
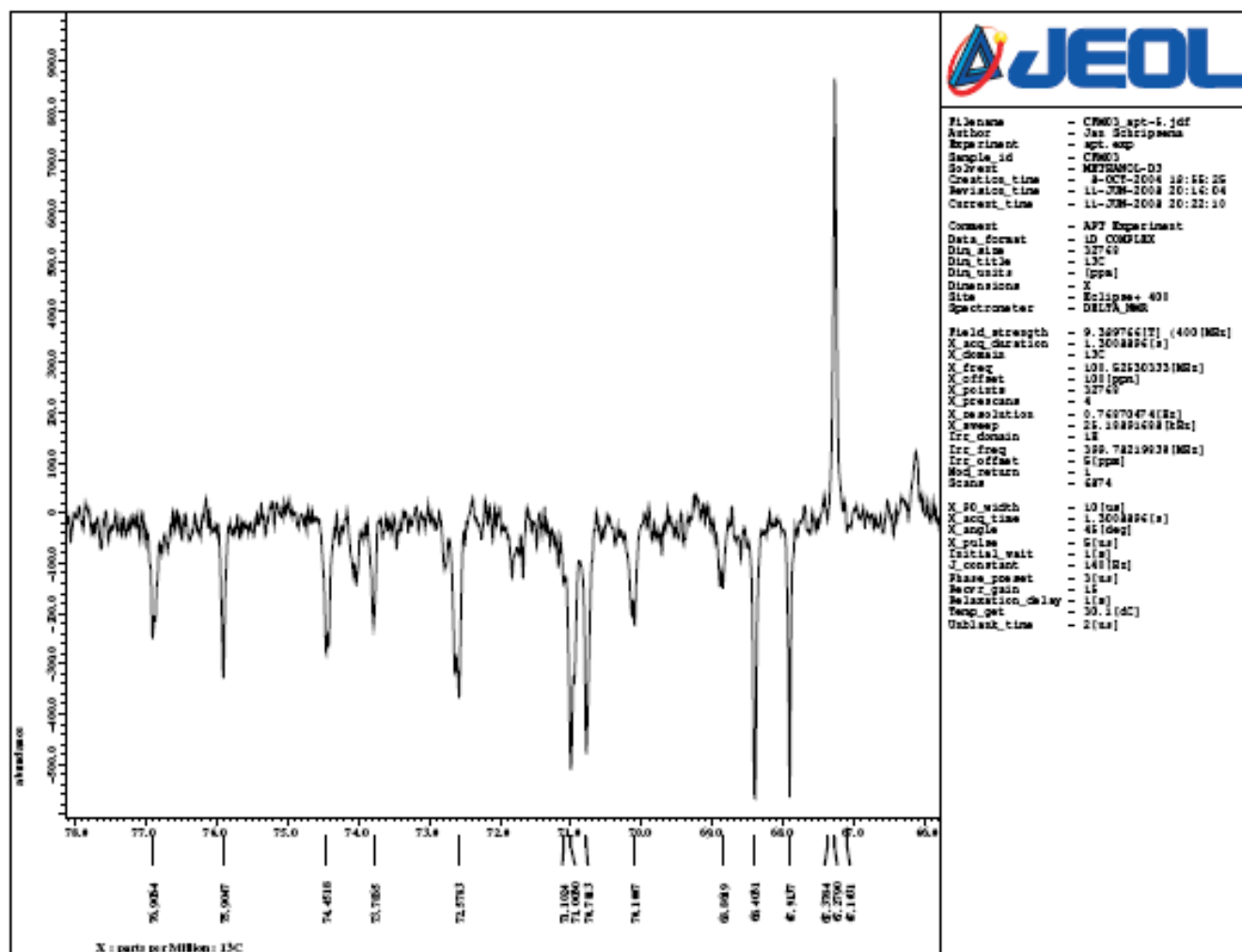
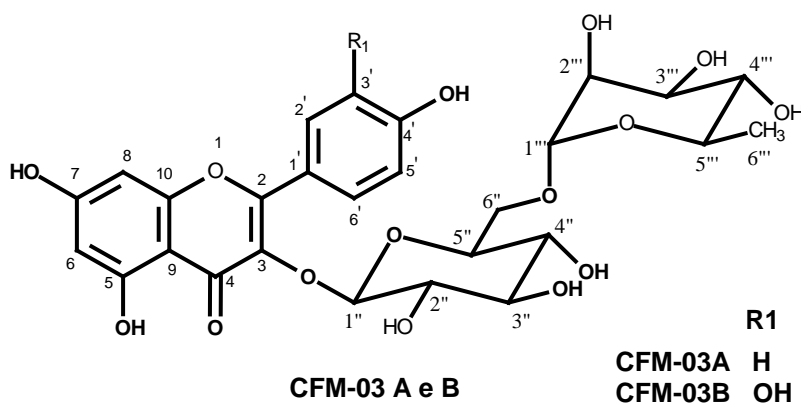


Figura 54 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias CFM-03A e CFM-03B

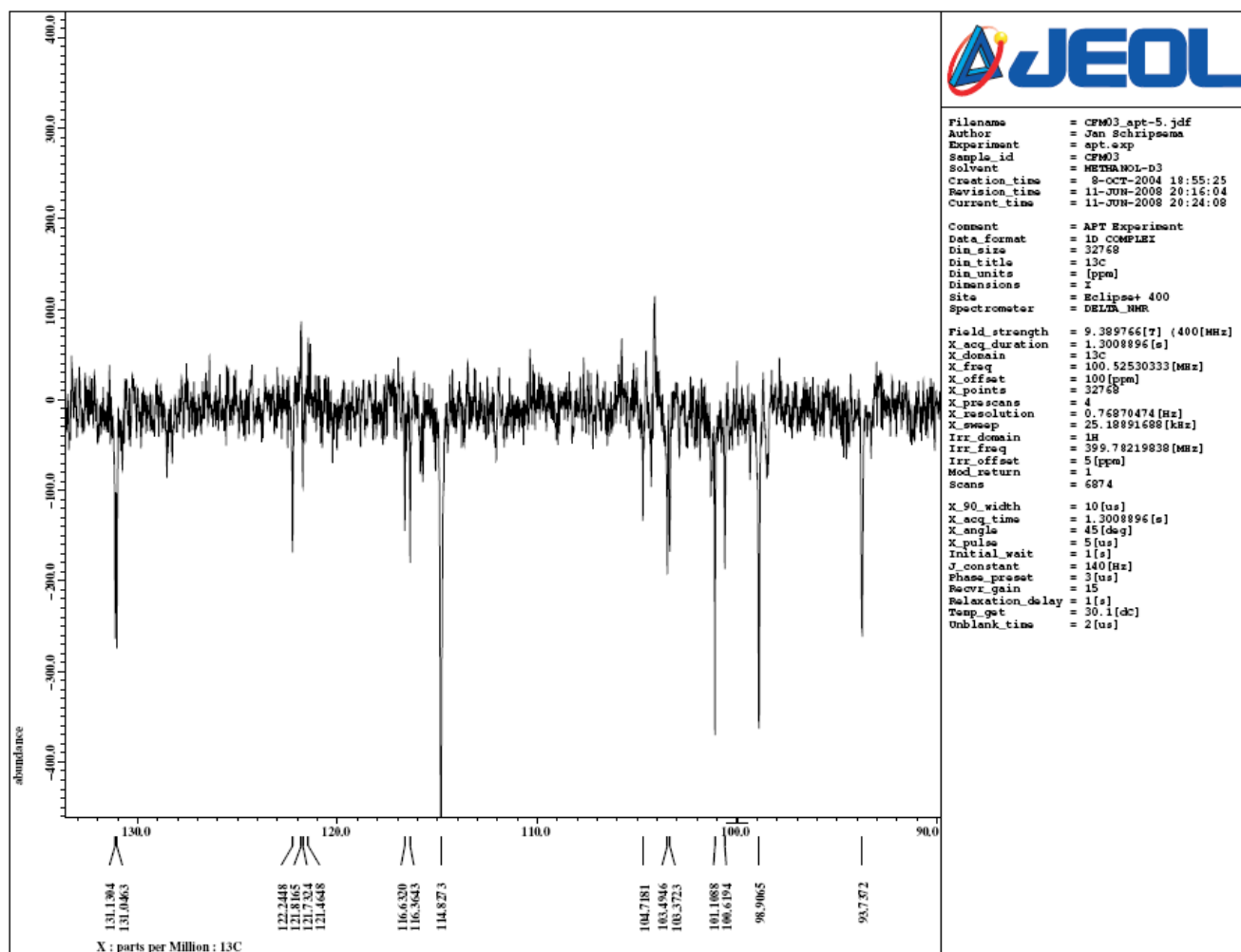
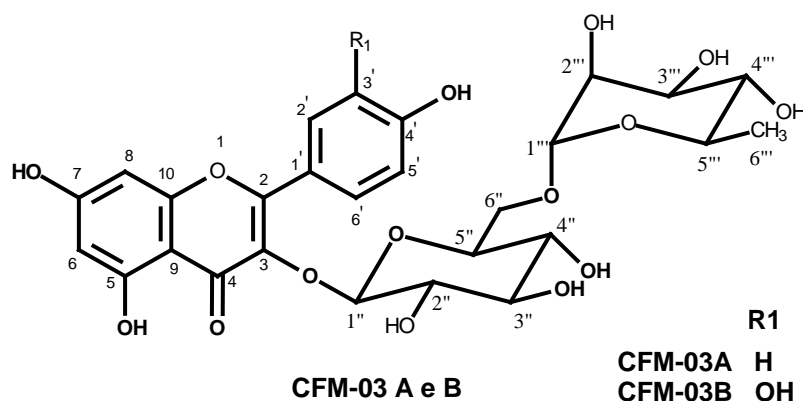


**Figura 55** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 12 – 33 ppm)

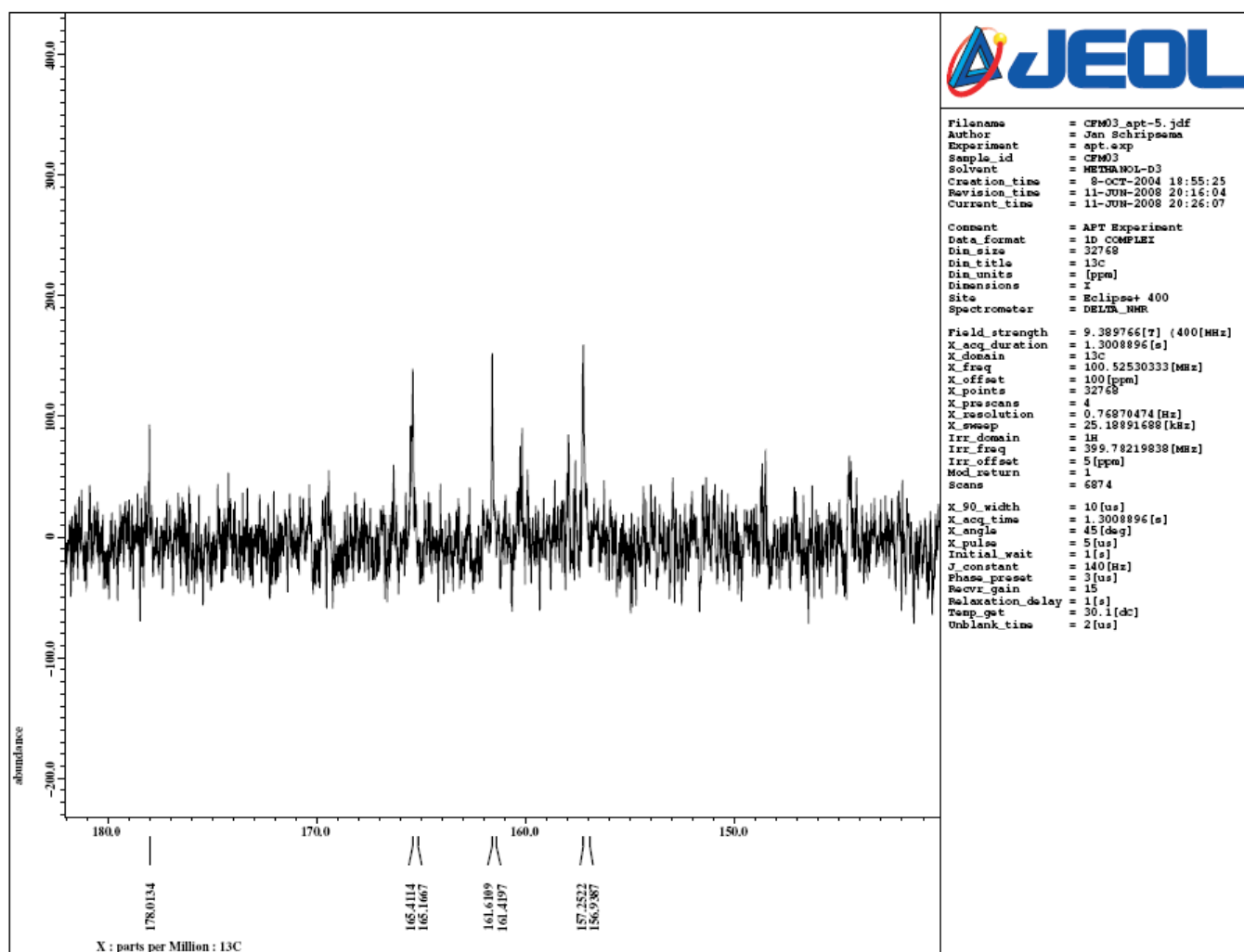
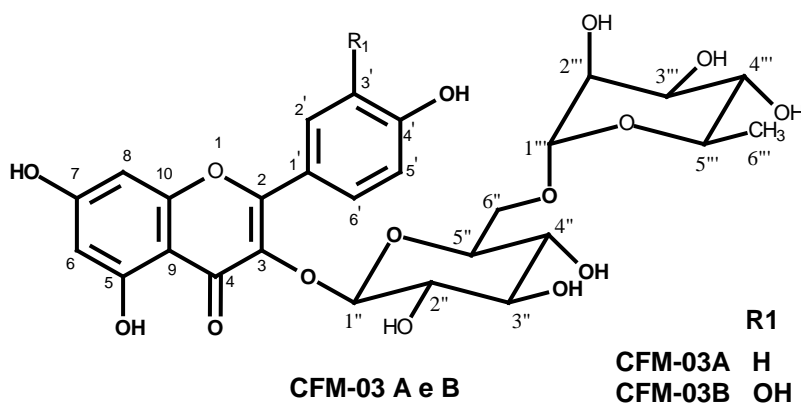




**Figura 56** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 66 – 78 ppm)



**Figura 57** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 90 – 132 ppm)



**Figura 58** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 150 – 180 ppm)

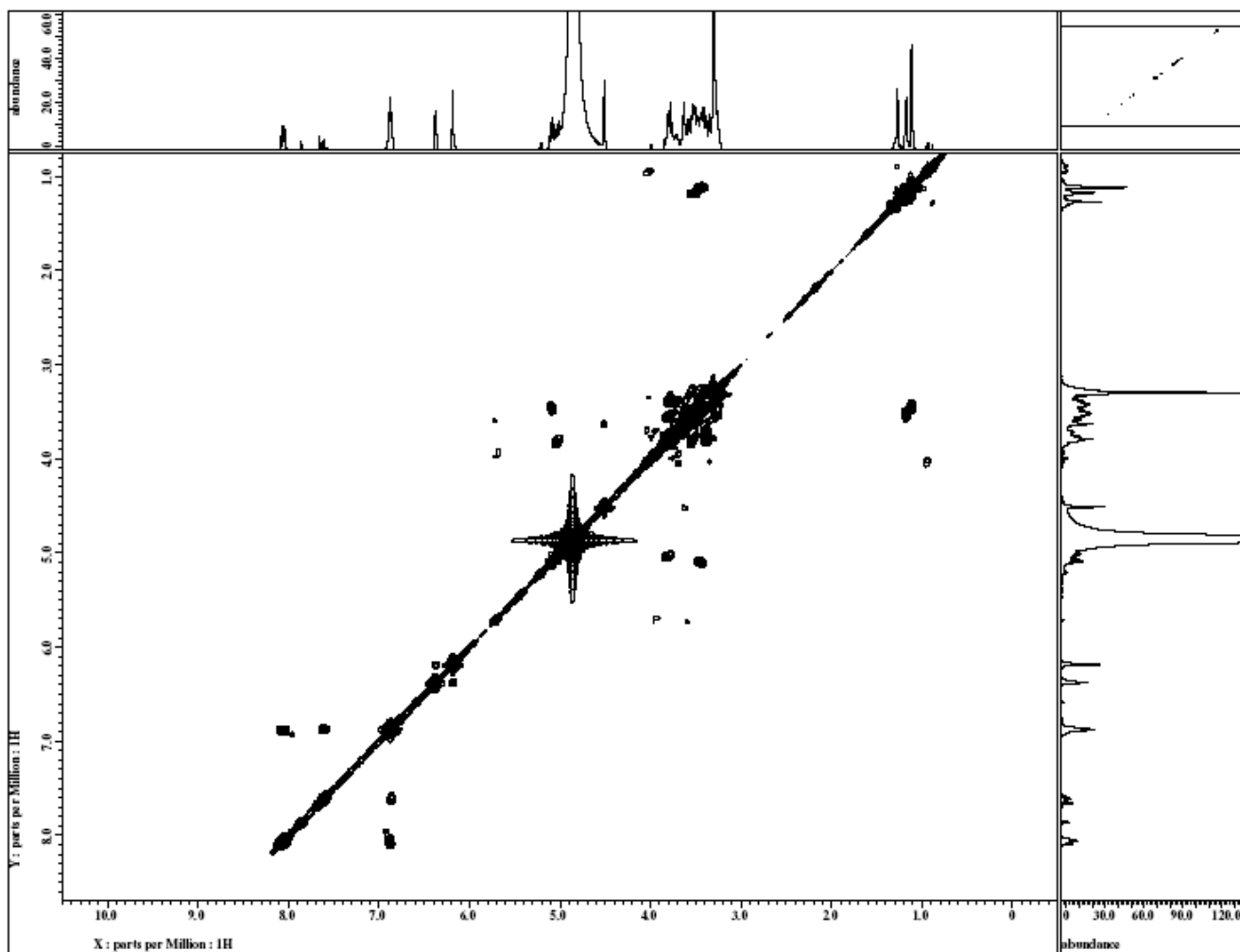
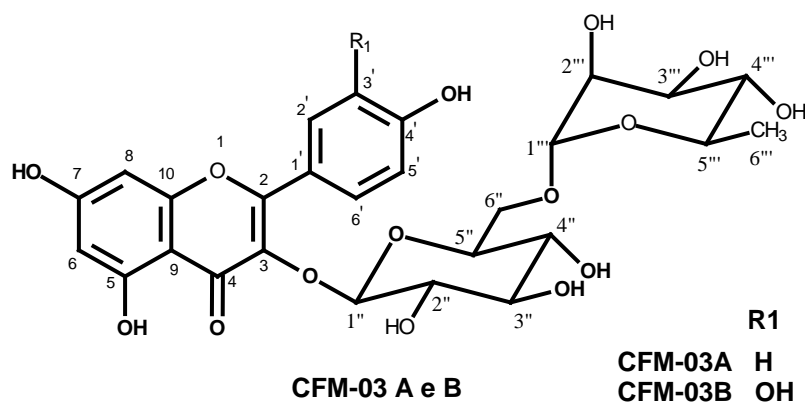
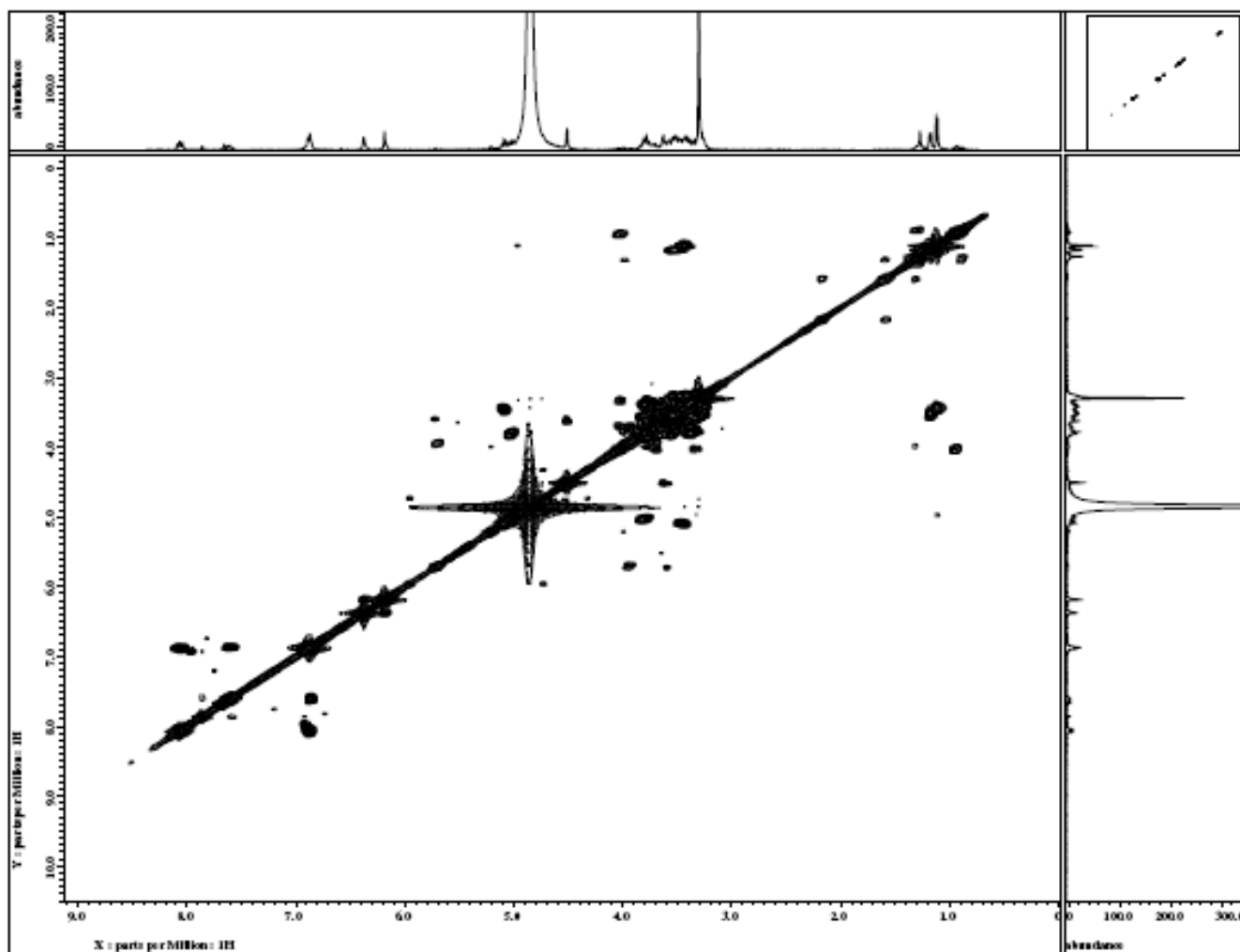
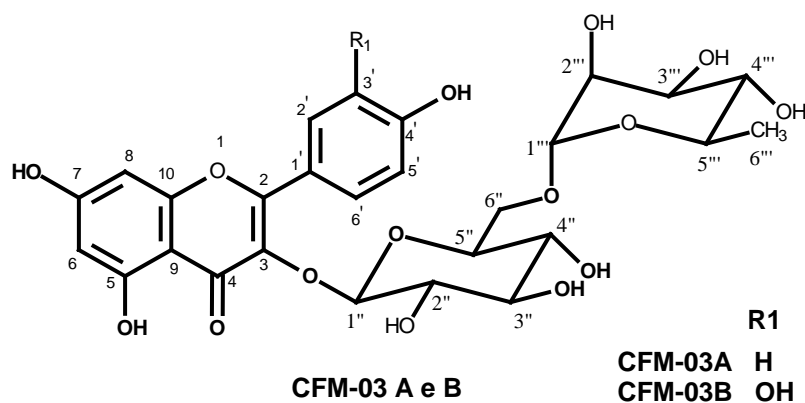
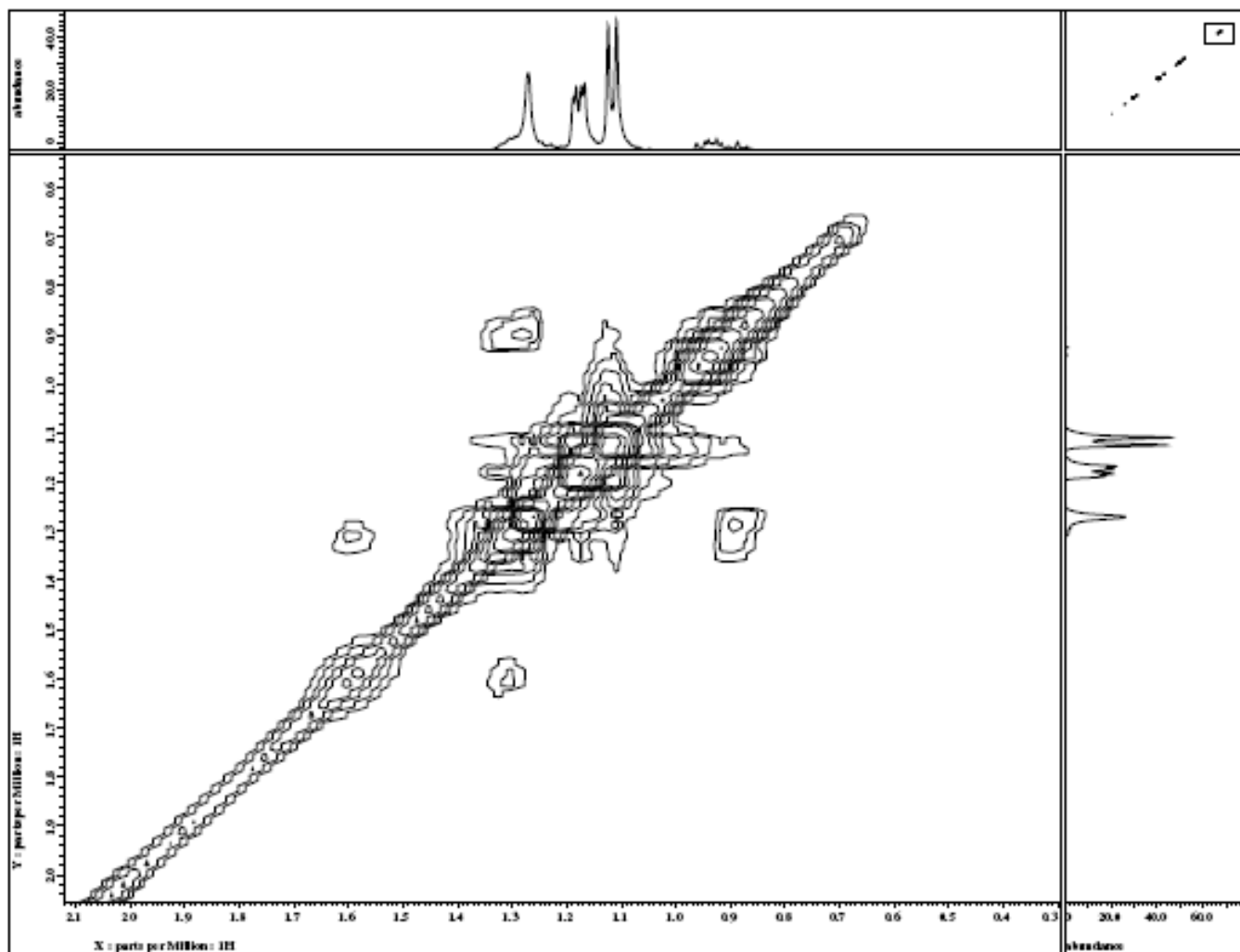
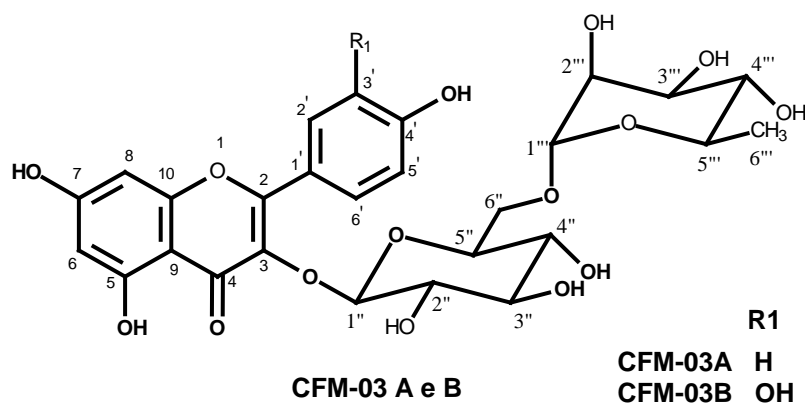


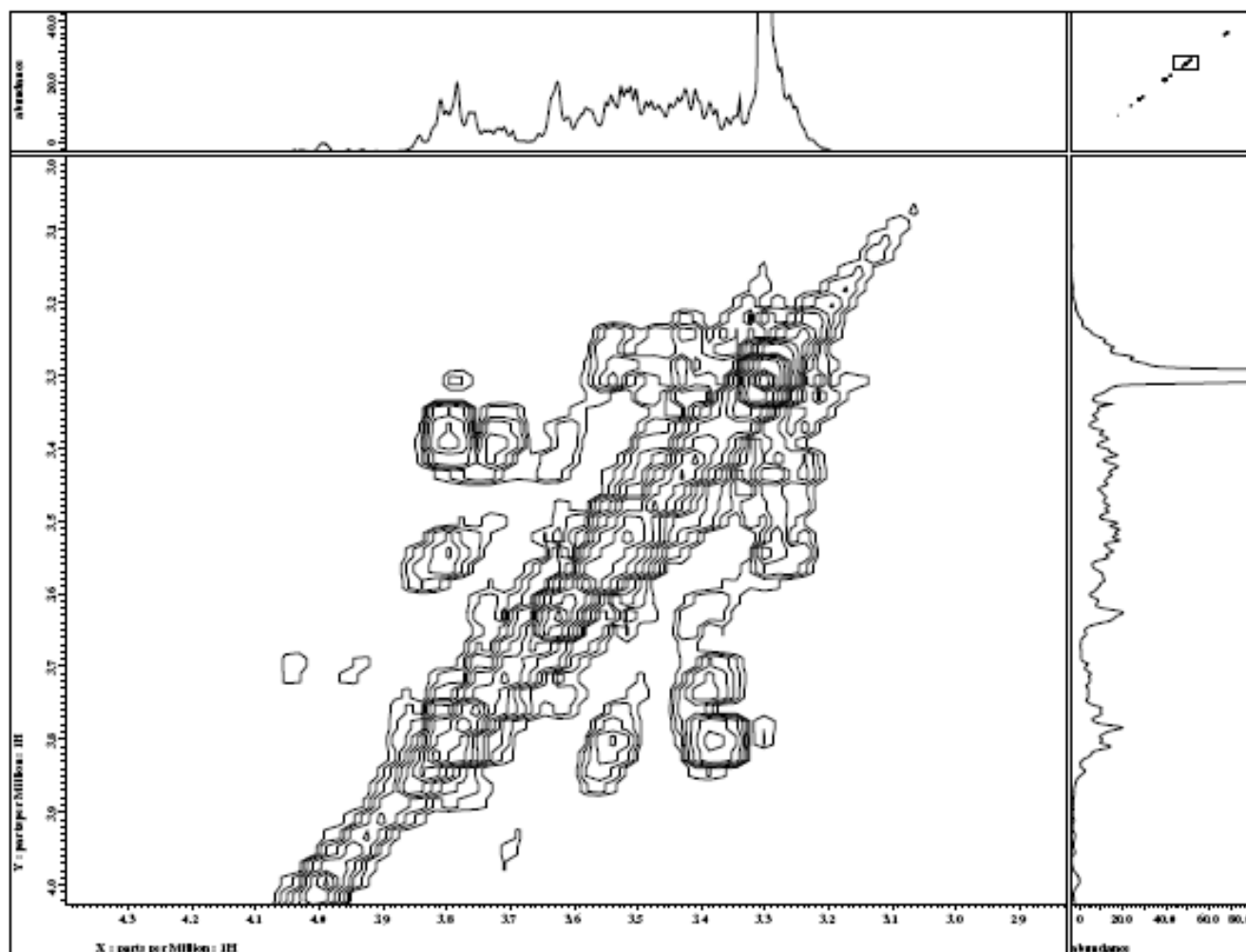
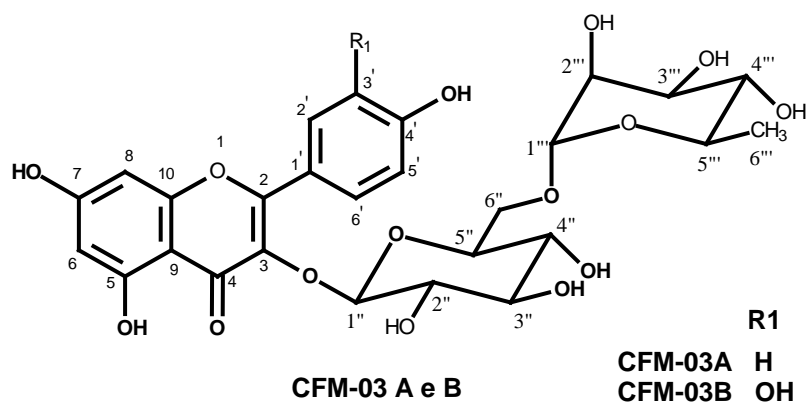
Figura 59 – Espectro de COSY das substâncias CFM-03A e CFM-03B



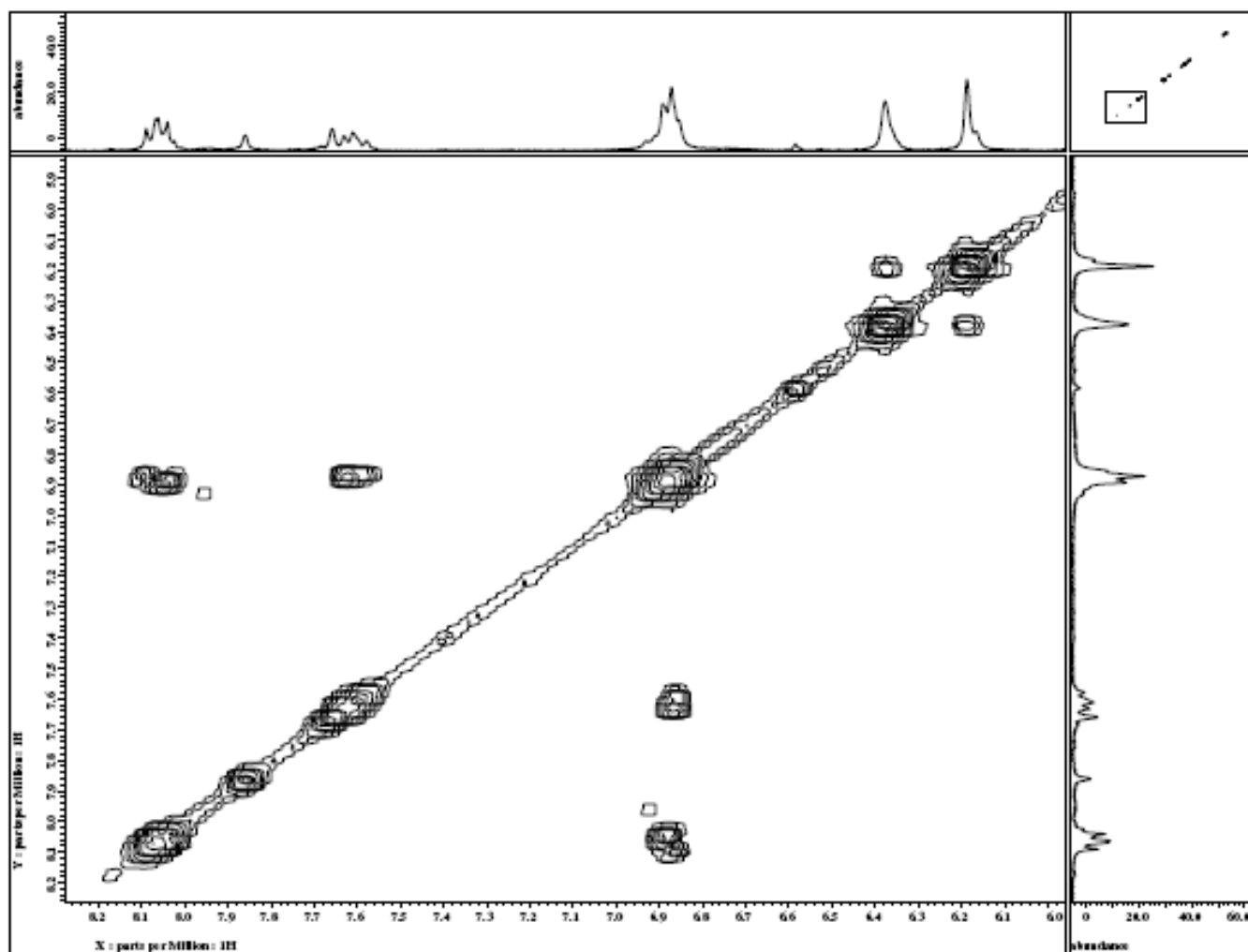
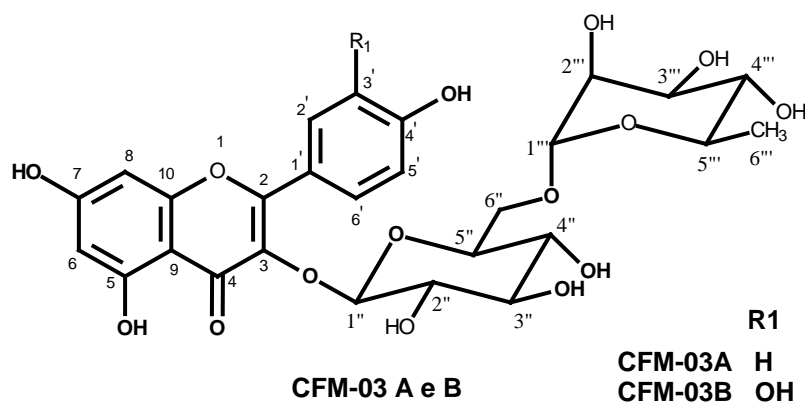
**Figura 60** – Ampliação do espectro de COSY das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B**  
 (região de 0 – 9,0 ppm)



**Figura 61** – Ampliação do espectro de COSY das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B**  
(região de 0,3 – 2,1 ppm)

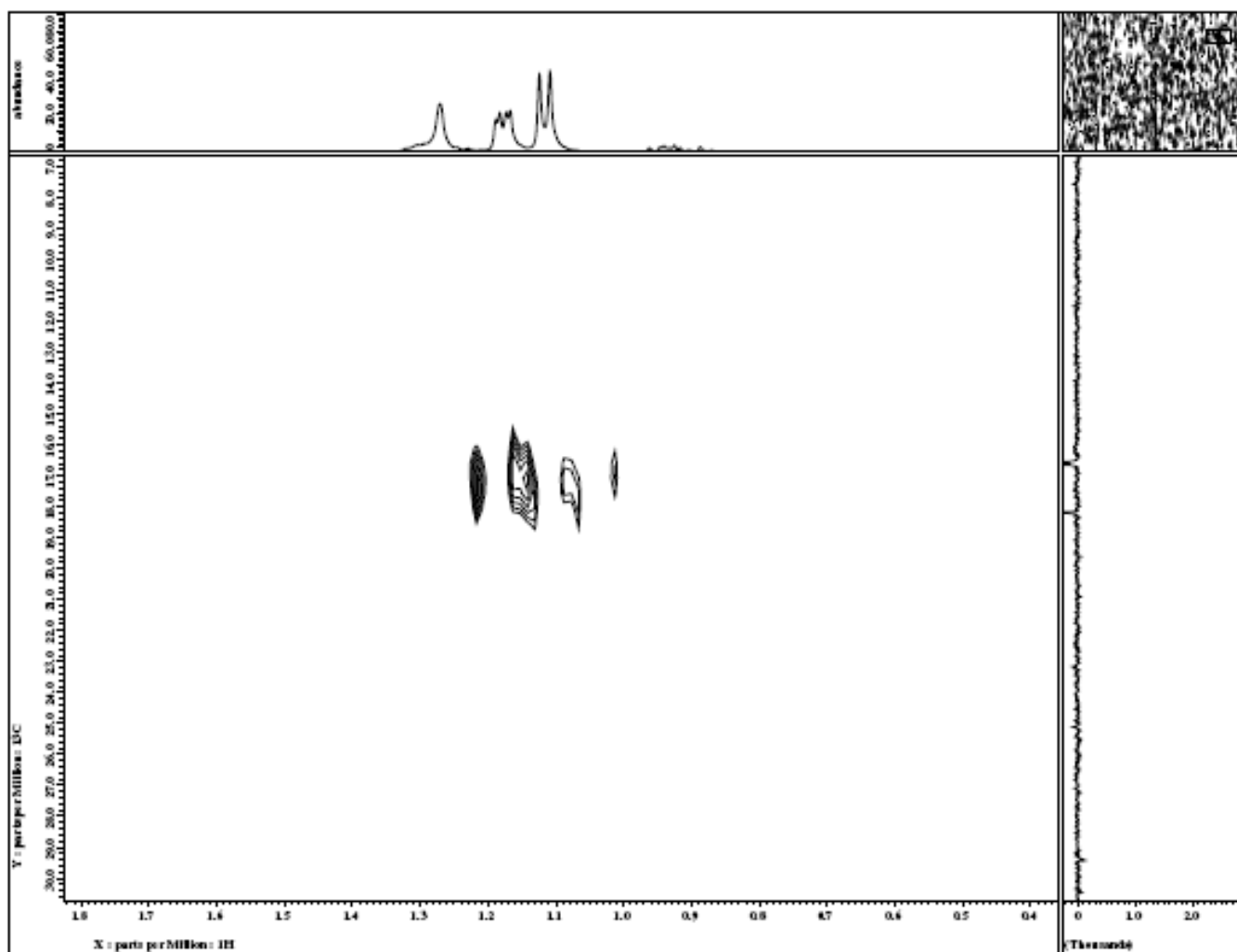
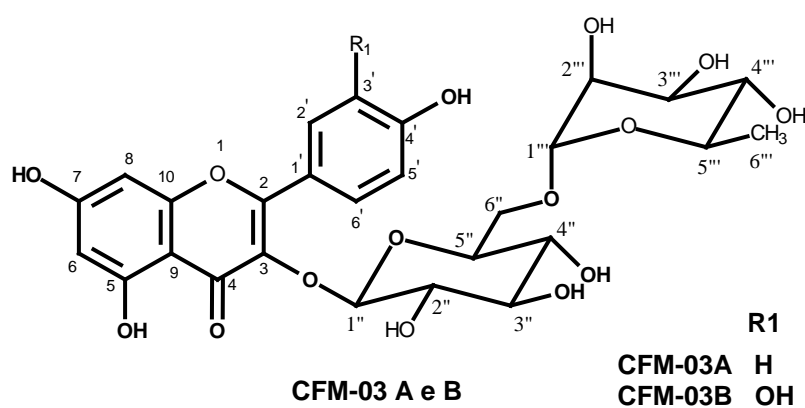


**Figura 62** – Ampliação do espectro de COSY das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 2,9– 4,4 ppm)

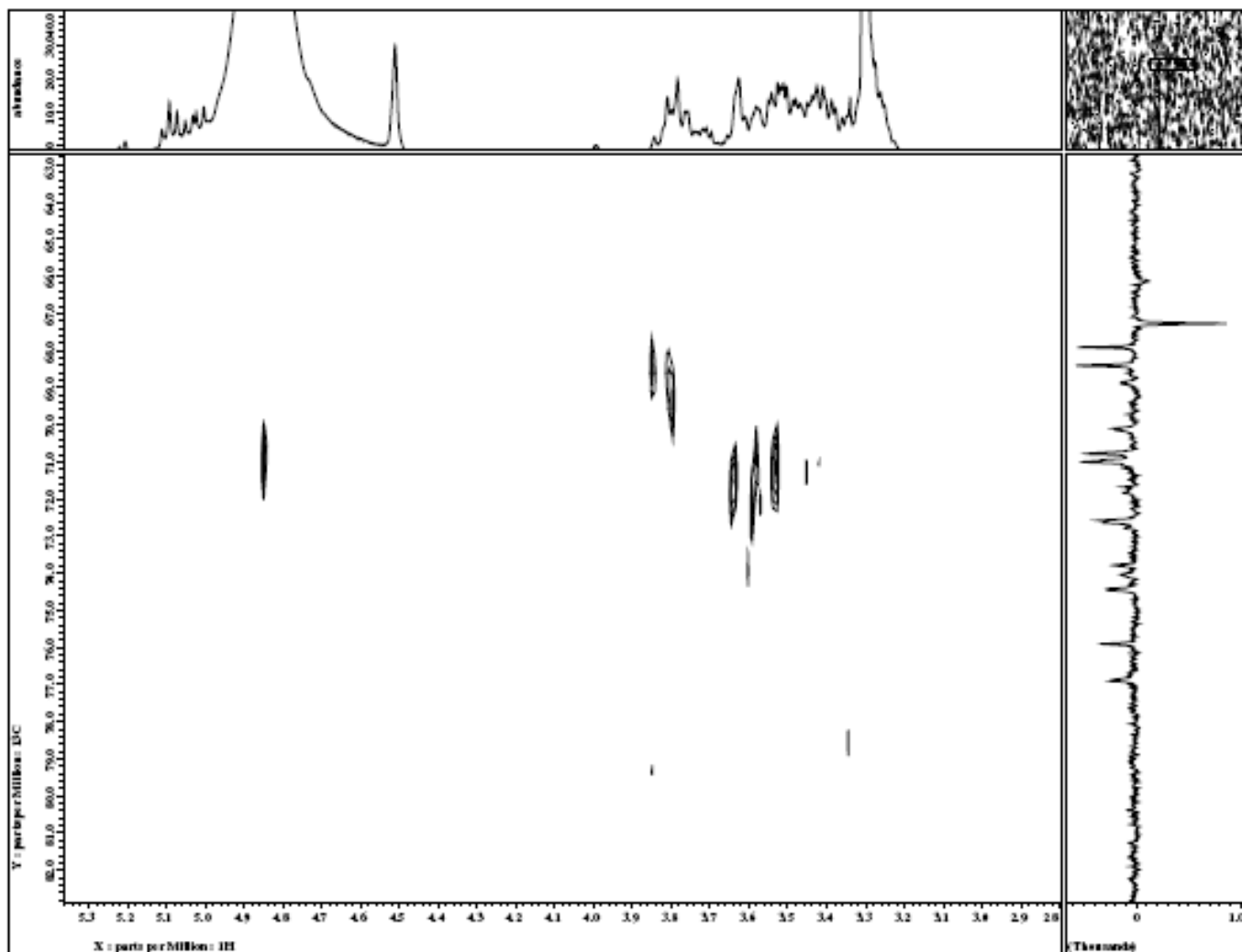
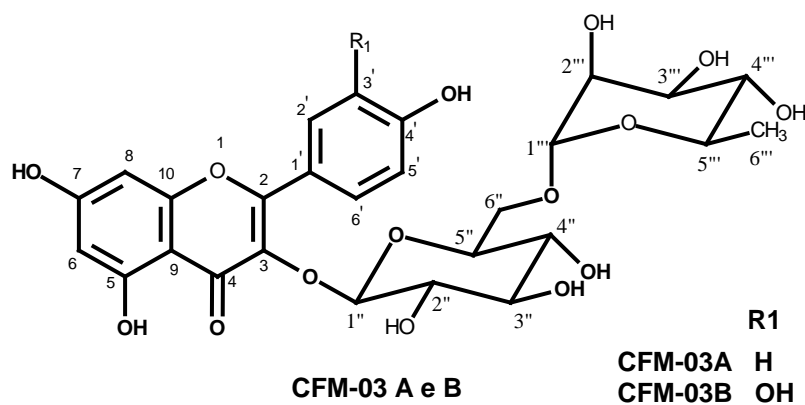


**Figura 63** – Ampliação do espectro de COSY das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 6,0 – 8,3 ppm)

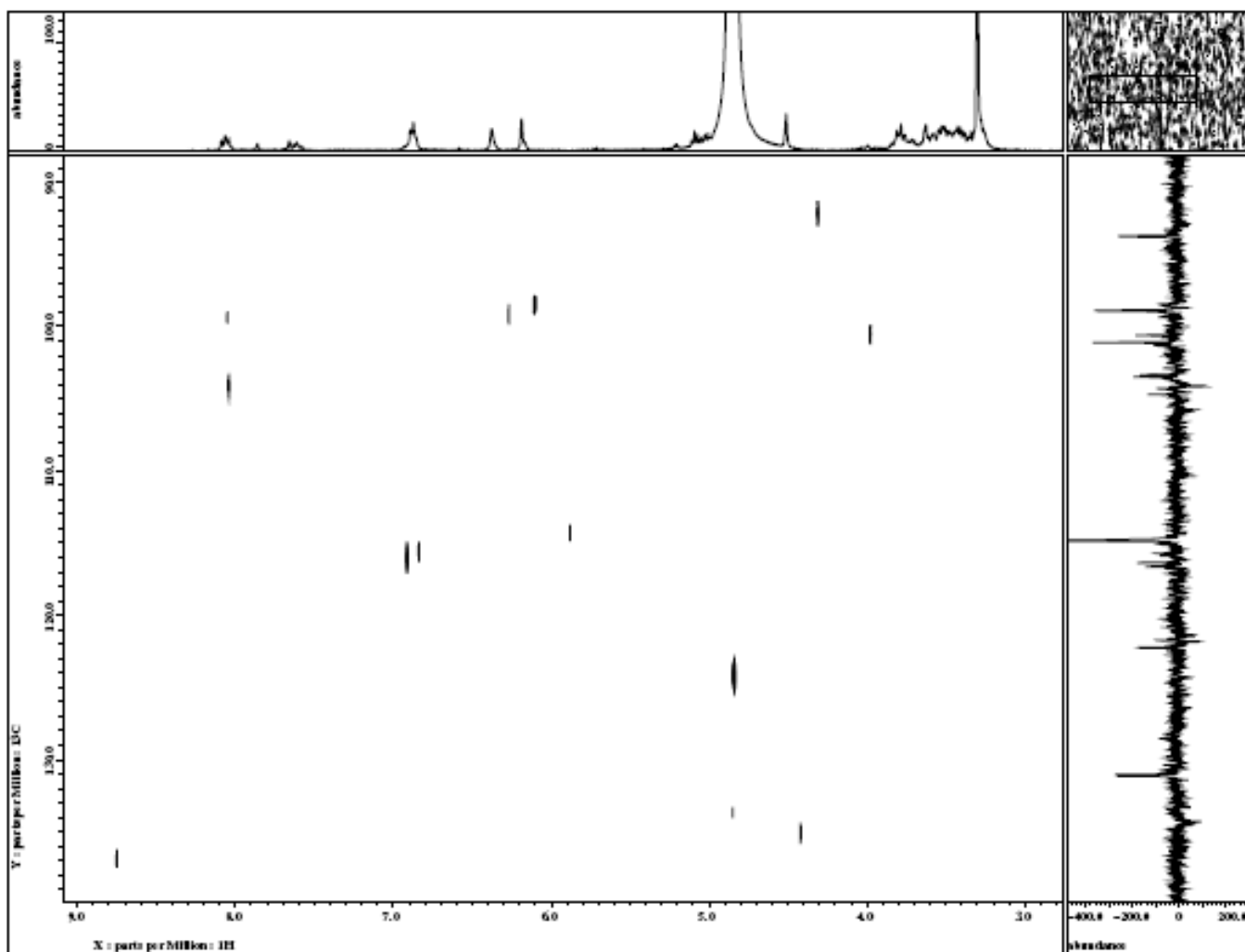
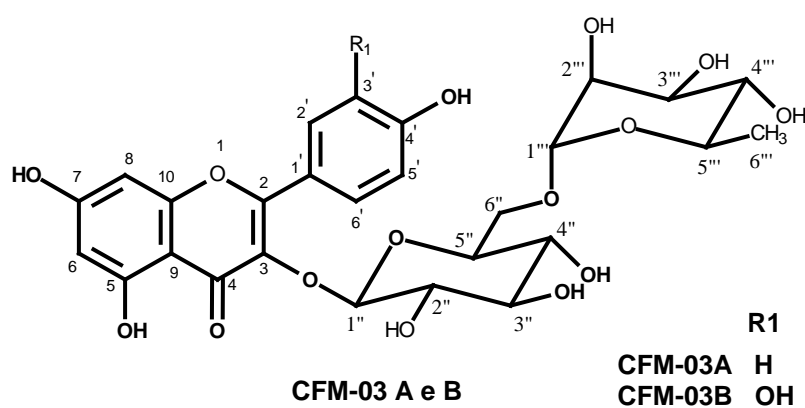




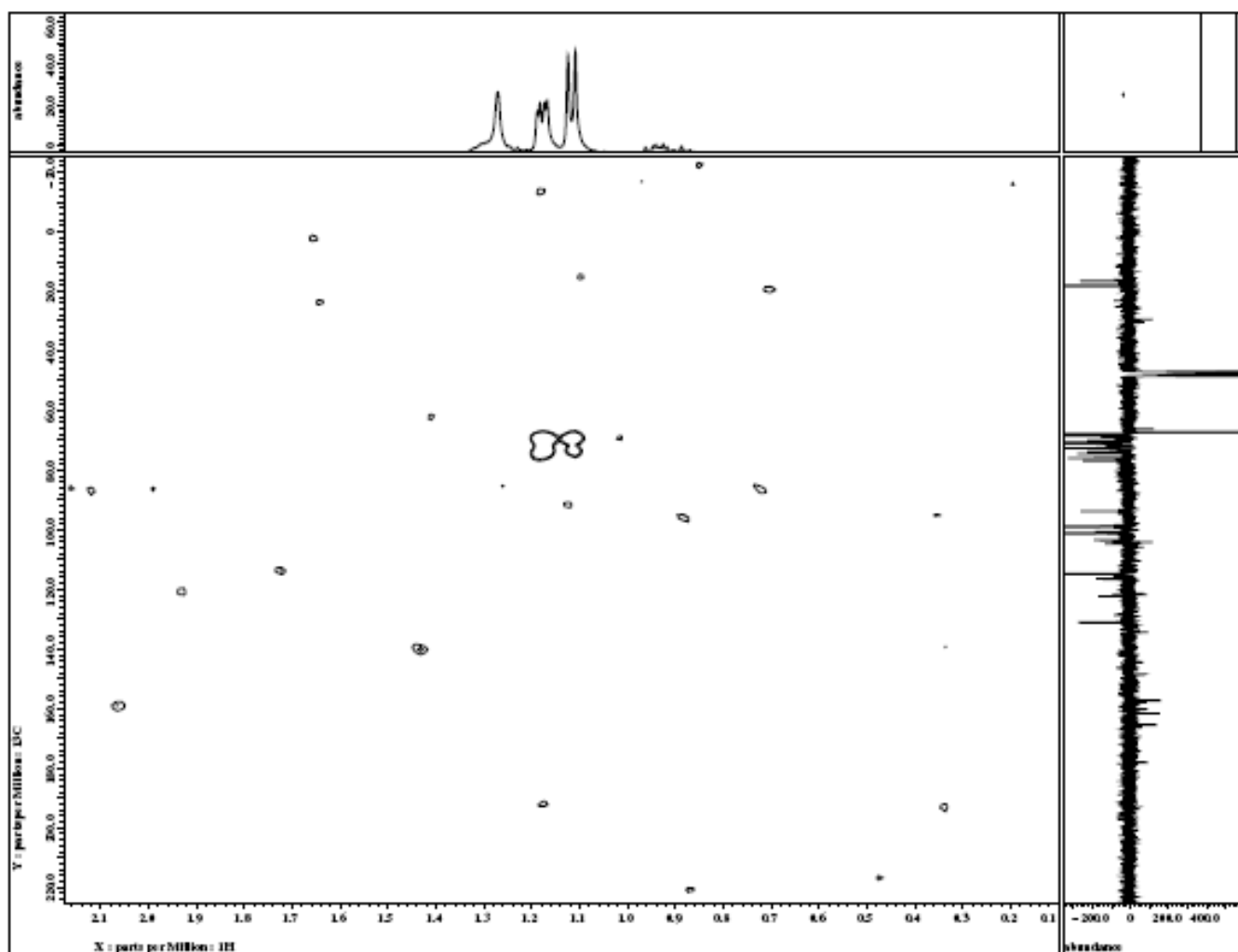
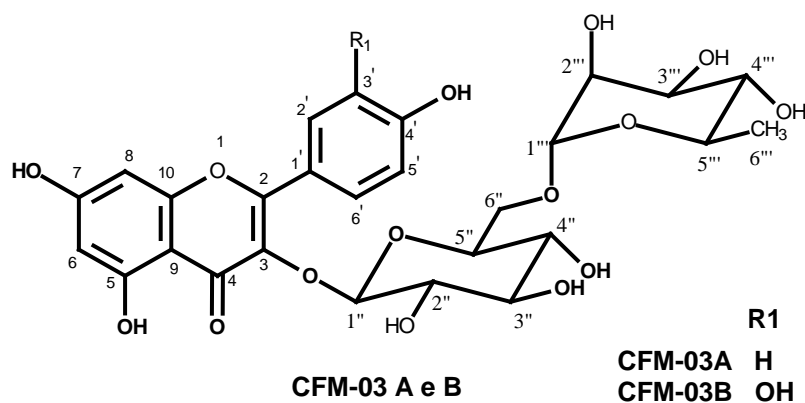
**Figura 64** – Espectro de HMBC das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B**



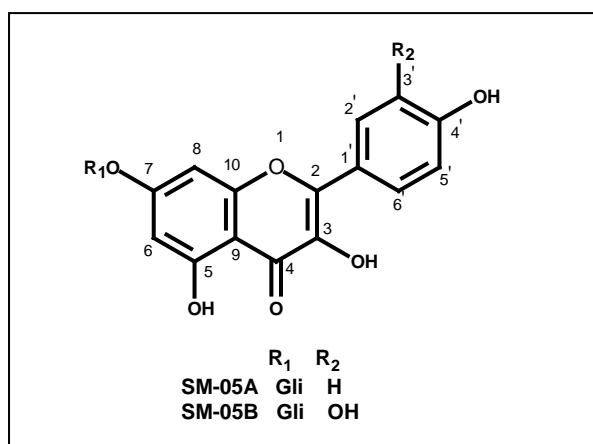
**Figura 65** – Ampliação do espectro de HMQC das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 2,8 – 5,3 ppm)



**Figura 66** – Ampliação do espectro de HMQC das substâncias **CFM-03A** e **CFM-03B** (região de 3,0 – 9,0 ppm)



### 6.1.6- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA MISTURA DE SUBSTÂNCIAS SM-05A E SM-05B



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 70**, p. 107; **Tabela 09**, p. 104) da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** apresentou um perfil de substância flavonoídica semelhante ao da substância SM-07, com exceção de sinais adicionais na região de  $\delta_{\text{H}}$  (3,0 -5,2) que juntamente com os sinais na região de  $\delta_{\text{C}}$ , 60,6 e 61,2 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 77**, p. 114), sugerem a presença um resíduo de açúcar. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou também dois sinais duplos na região de hidrogênios aromáticos  $\delta_{\text{H}}$  (6,2,  $J= 2,3$  Hz e 6,4  $J= 2,3$  Hz) referentes aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente de anel A de flavonóides substituídos nas posições 5 e 7 (Harbone, 1996). A substância **SM-05A** foi caracterizada como um flavonóide derivado do canferol pela presença de dois sinais duplos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  a  $\delta_{\text{H}}$  (7,7 e 6,8) característicos dos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel aromático B de derivado de canferol. A substância **SM-05B** foi caracterizada como um derivado da quercetina pela presença de sinais a  $\delta_{\text{H}}$  (7,7, 6,8 e 7,6) característicos de hidrogênios H-2', H-5' e H-6') do anel aromático B da quercetina (Harbone, 1996).

A presença do resíduo de açúcar pôde ser deduzida a partir dos sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  (5,2 e 3,2). A ampliação dos sinais dos hidrogênios anoméricos permitiu observar a presença de dois hidrogênios anoméricos em  $\delta_{\text{H}}$  (5,2,  $J= 7,6$  Hz e 5,1,  $J=7,6$  Hz). A configuração relativa da unidade de açúcar foi determinada através da constante de acoplamento entre H-1 e H-2. Valores próximos a 1,5 Hz indicam configuração  $\alpha$ , enquanto que valores próximos a 7,0-9,0 Hz indicam configuração  $\beta$  (Harbone, 1996).

Sendo assim estabeleceu-se a configuração  $\beta$  para o resíduo de açúcar da mistura de flavonóides.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 77**, p. 114) também exibiu dois carbonos anoméricos em  $\delta_{\text{C}}$  (103,0 e 104,1). A região entre  $\delta_{\text{C}}$  (68,7 e 77,0) apresentou-se complexa com vários sinais. Comparando-se os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do resíduo de açúcar e o anel A do canferol-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e quercetina-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**Tabela 09**, p. 104) observou-se proximidade de valores (Agrawal, 1989), podendo sugerir a presença de um resíduo de glicose na posição 7 de ambos os flavonóides.

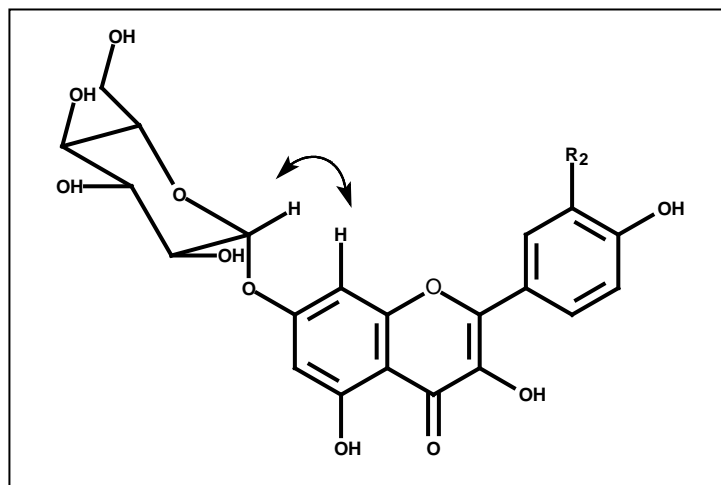
O mapa de correlação homonuclear RMN-COSY (**Figura 92**, p. 129) forneceu correlações diretas entre os hidrogênios H-6 (6,2  $\delta$ ) e H-8 (6,4 $\delta$ ) pertencentes ao anel A de ambos os flavonóides e os hidrogênios [H-2'/6' (8,0  $\delta$ ) e H-3'/5' (6,9  $\delta$ )] e [H-2' (7,7  $\delta$ ) e H-6' (7,6  $\delta$ ); H-5' (6,8  $\delta$ ) e H-6' (7,6  $\delta$ )] pertencentes ao anel B dos flavonóides SM-05A e SM-05B, respectivamente.

O mapa de correlação heteronuclear RMN-HMQC (**Figura 85**, p. 122) forneceu correlações diretas entre carbonos e hidrogênios. No caso do hidrogênio H-6 observou-se correlação como carbono a  $\delta_{\text{C}}$  98,6 e para o hidrogênio H-8 observou-se correlação com o carbono a  $\delta_{\text{C}}$  93,4. Foram também observadas correlações entre o hidrogênio H- H-2' com o carbono a  $\delta_{\text{C}}$  114 (C-3'); H-6' com o carbono a  $\delta_{\text{C}}$  121,9; H-5' com o carbono 114,8 e também entre os hidrogênios anoméricos e os carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  103 e 104.

O mapa de correlação heteronuclear RMN-HMBC (**Figura 82**, p. 119) que fornece interações à longa distância, foi importante para confirmar as atribuições dos hidrogênios e carbonos da aglicona. Também foram observadas correlações entre os hidrogênios a  $\delta_{\text{H}}$  6,2 (H-8) e  $\delta_{\text{C}}$  93,6 (C-6) e 161,6 (C-5), 104,2 (C-10),  $\delta_{\text{H}}$  6,4 (C-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,38 e  $\delta_{\text{C}}$  (175,5) 7,6 (148,6) 7,6 (114,9) 6,8 (122 e 121), 144,5 e 148,9.

O mapa de interação espacial RMN-NOESY (**Figura 90**, p.127) mostrou correlação existente entre o hidrogênio anomérico e o H-8 no anel A flavonóidico.

Sendo assim, a mistura das substâncias **SM-05A** e **SM-05B** é composta pelo canferol-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e quercetina-7O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.



**Figura 68** – Correlação entre hidrogênio anomérico e o hidrogênio H-8 do anel A  $\delta_H$  (6,4)

**Tabela 09.** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da substância SM-05, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm).

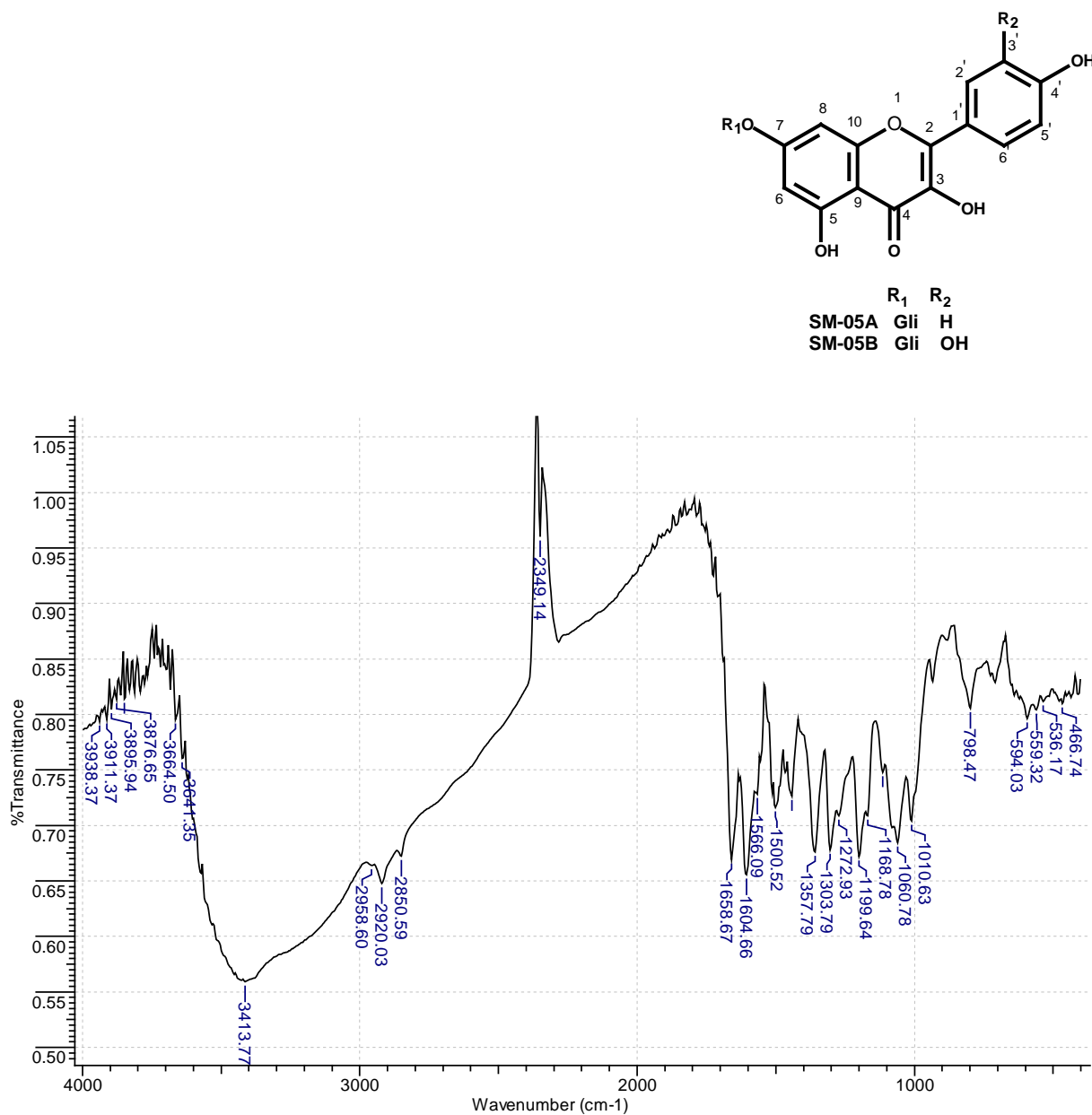
Mistura		SM-05A (mono)		SM-05B (di)	
<b>C</b>	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{H}}$
2		148,5		148,5	
3		134,3		134,3	
4		178,1		178,1	
5		161,1		161,1	
7		165,1		165,1	
9		156,1		156,1	
10		103,0		103,0	
1'		121,8		121,8	
3'		114,6 (CH)		116,2	
4'		157,6		157,6	
<b>CH</b>					
6		98,8	6,2 (s)	98,7	6,2 (s)
8		94,4	6,4 (s)	93,5	6,4 (s)
2'	114,7	130,8		116,1	7,7(d)
3'	131,0			144,6	
5'	131,7	114,6 (CH)	6,8 (d)	114,8	6,8 (d)
6'	121,7/121,9	130,8		121,7	7,6 (dd)
1''		104,1	5,2 (d, J=7,6)	104,2	5,1 (d, J=7,6)
2''		75,9		76,8	
3''		77,1		77,1	
4''		71,8		69,9	
5''		74,4		73,7	
6''		77,1		77,1	



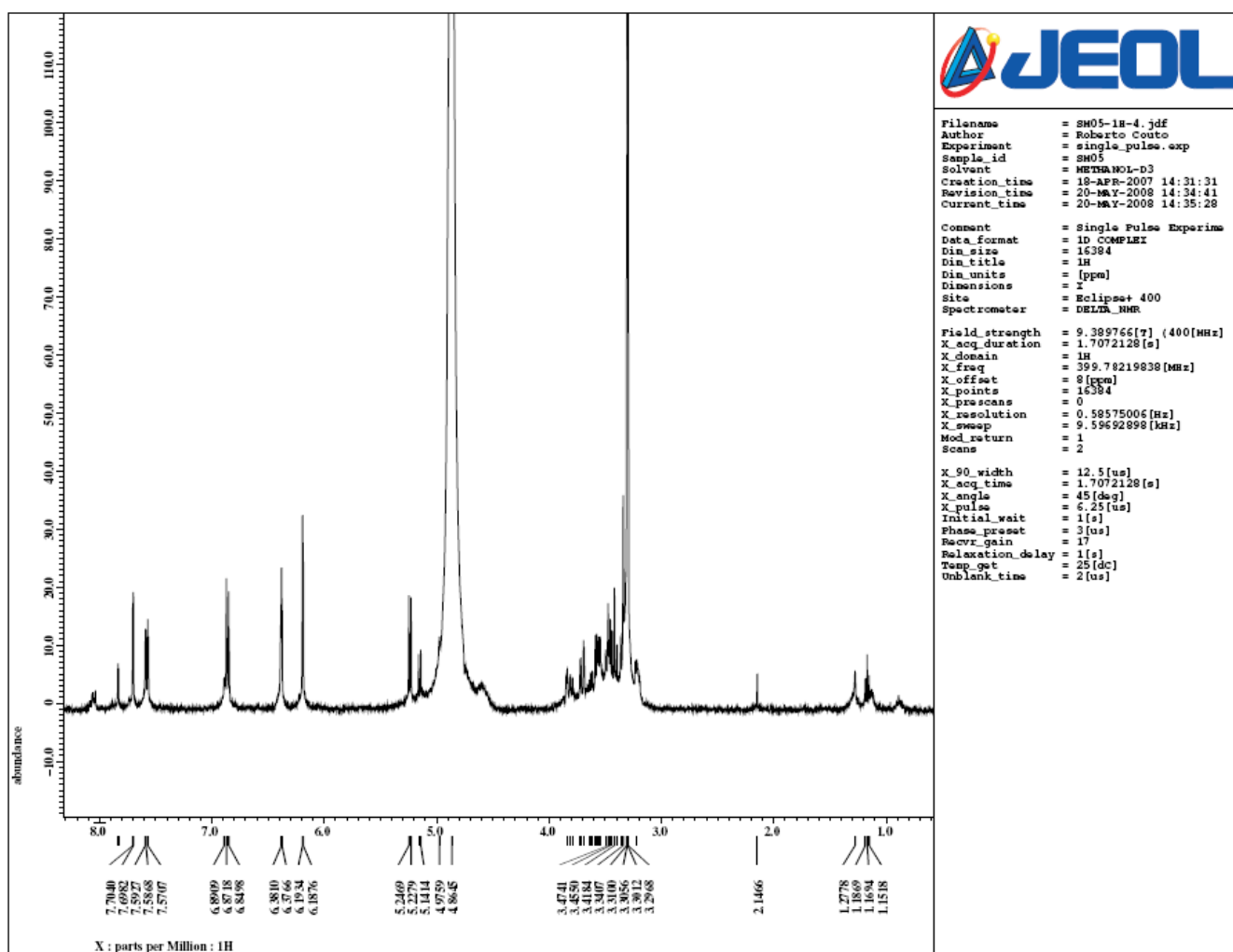
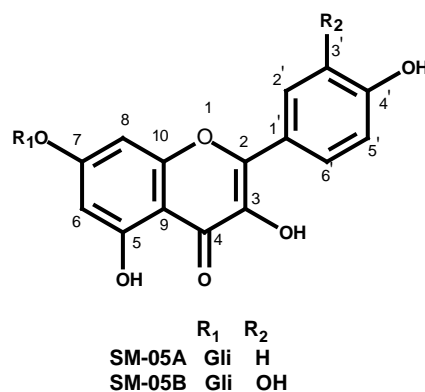
**Tabela 10.** Dados espectrais de HMQC e HMBC da substância SM-05, em MeOD. Deslocamentos químicos  $\delta_C$  (em ppm).

	HMQC		HMBC		Markham & Chari, 1976*
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$
<b>C</b>					
2	148,5	-			147,7
3	134,3	-			136,5
4	178,1	-			176,2
5	161,6	-	H-6		160,9
7	165,1	-	H-6		164,3
9	157,6/15 7,1	-			156,6
10	104,2	-		H-8, H-6	103,4
1'	122,8	-		H-5'	125,4
3'	144,9	-		H-5'	145,4
4'	146,6	-		H-2'	148,1
<b>CH</b>					
6	98,7/98,8	6,2 (d, 1,8)		H-8	98,5
8	93,5/94,4	6,4 (s)		H-6	93,7
2'	114,7	7,7 (s)		H-6'	116,7
5'	114,8	6,8 (d, 8,2)	H-6'		116,3
6'	121,8/12 1,7	7,6 (d, 8.2)		H-2'	121,7

\*(DMSO)



**Figura 69** – Espectro de infravermelho da mistura das substâncias **SM-05A** e **SM-05B**



**Figura 70** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **SM-05A** e **SM-05B**

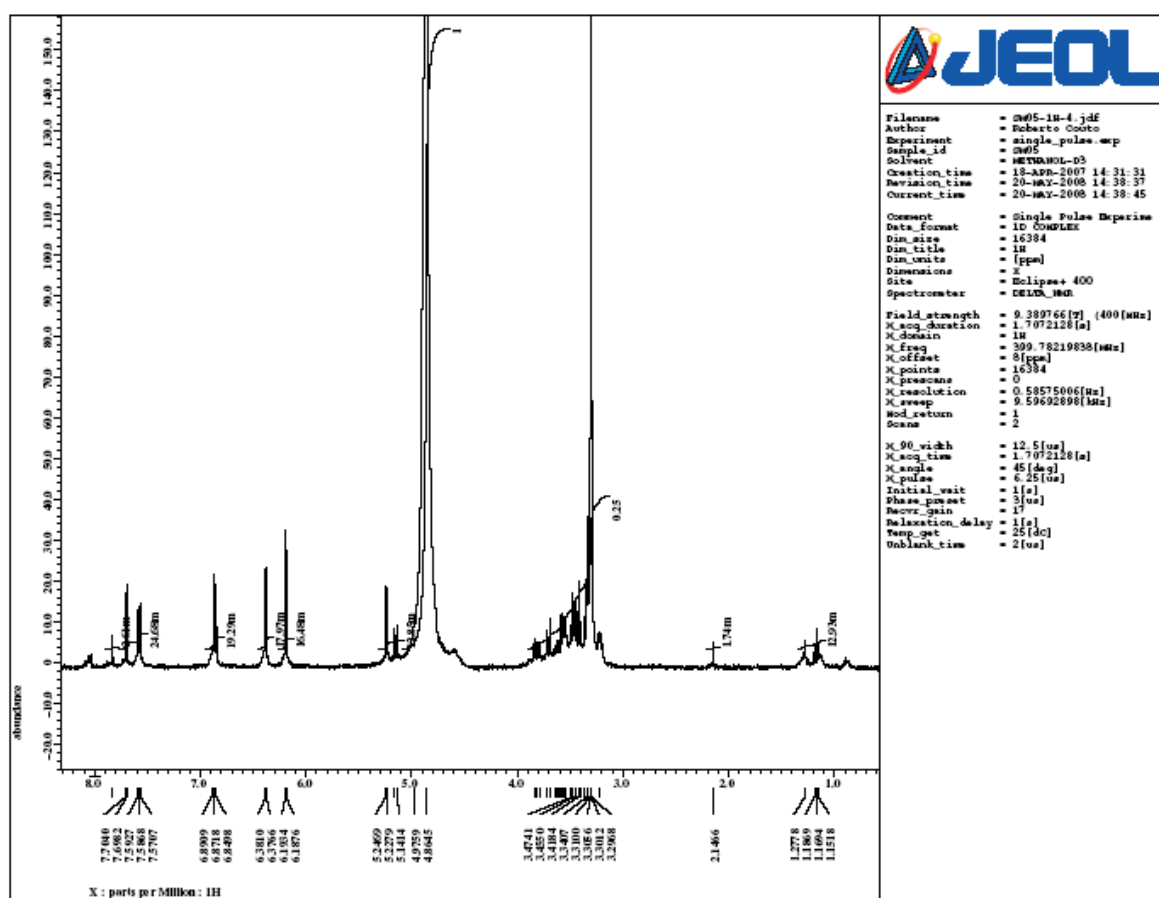
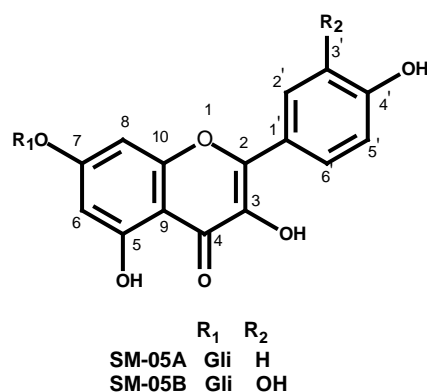
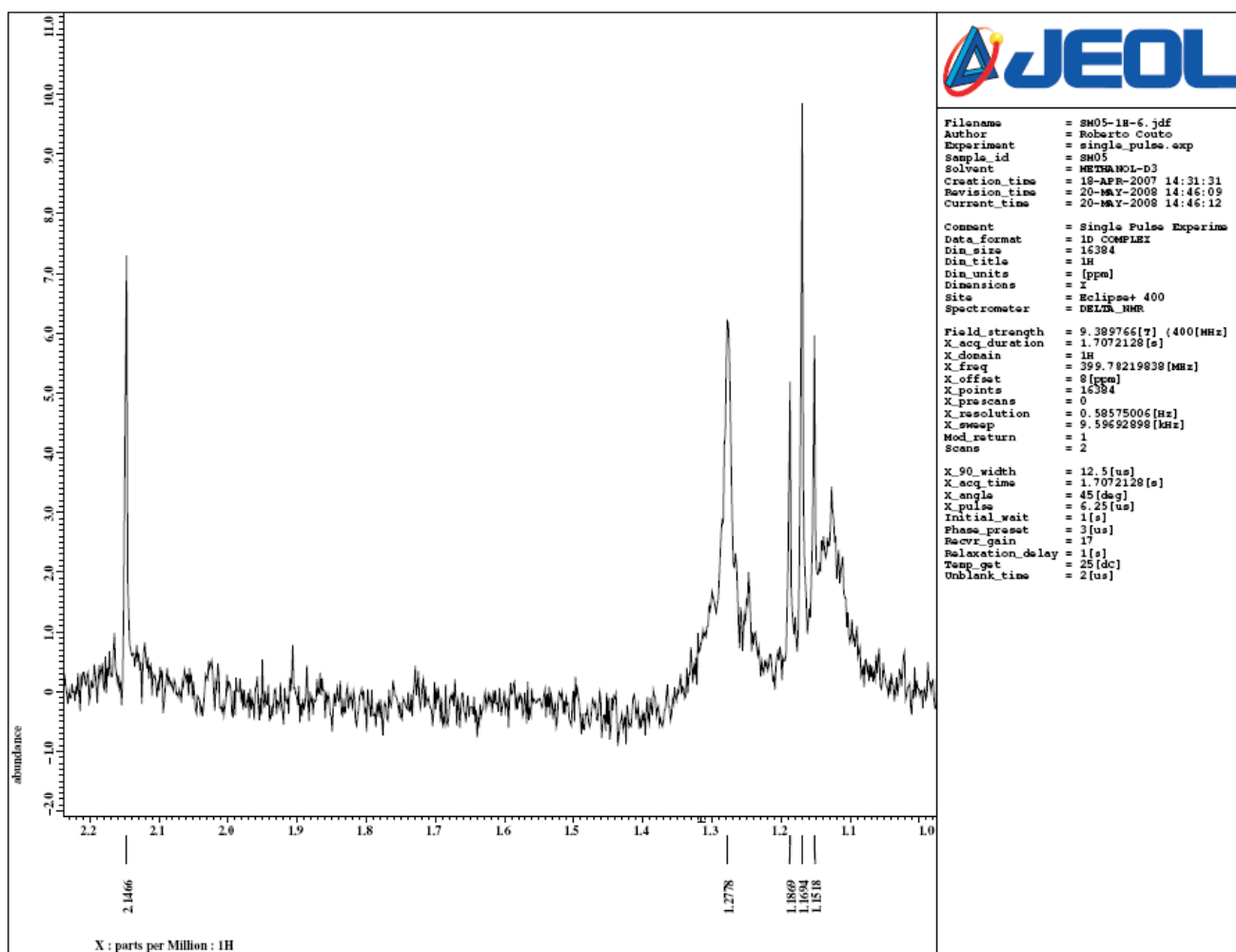
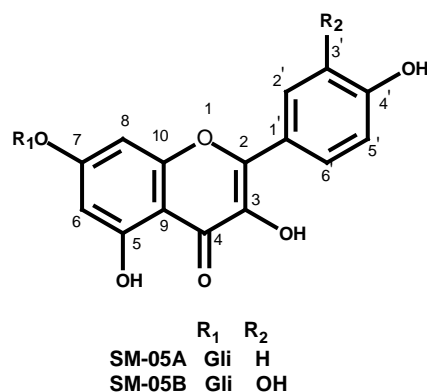
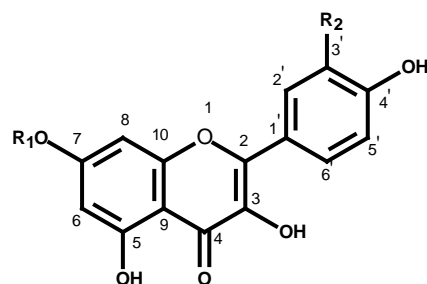


Figura 71 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  integrado da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B**

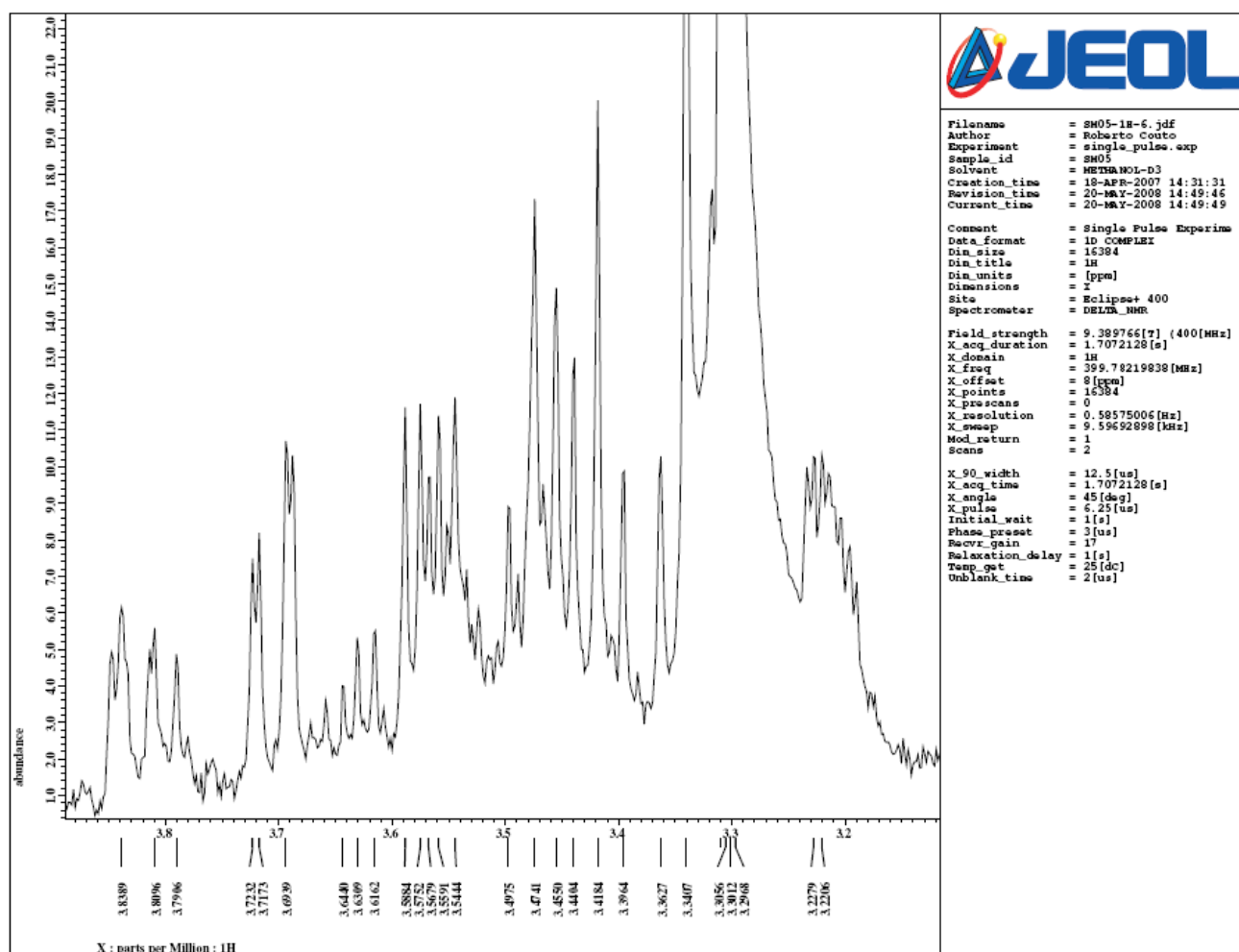




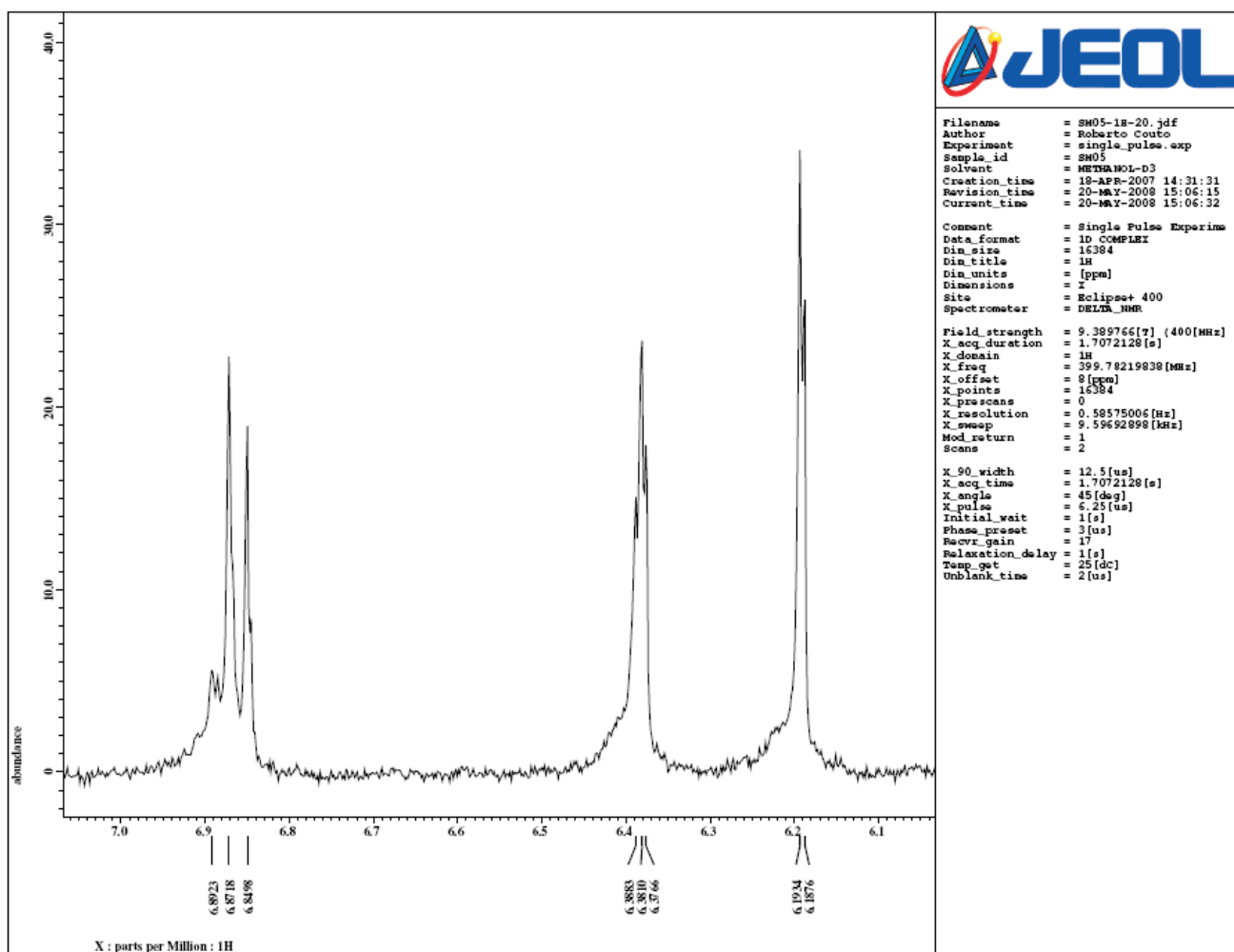
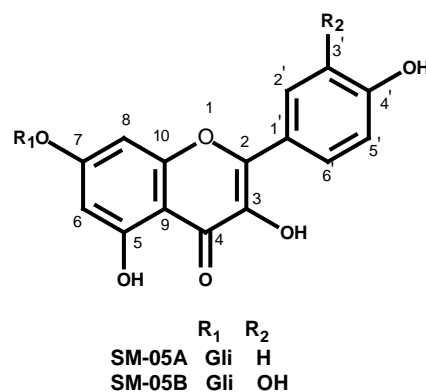
**Figura 73** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 1,0 – 2,2 ppm)



R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 SM-05A Gli H  
 SM-05B Gli OH

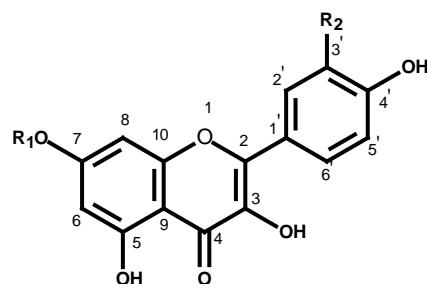


**Figura 74** – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura de substância **SM-05A** e **SM-05B** (região 3,2 – 3,9 ppm)

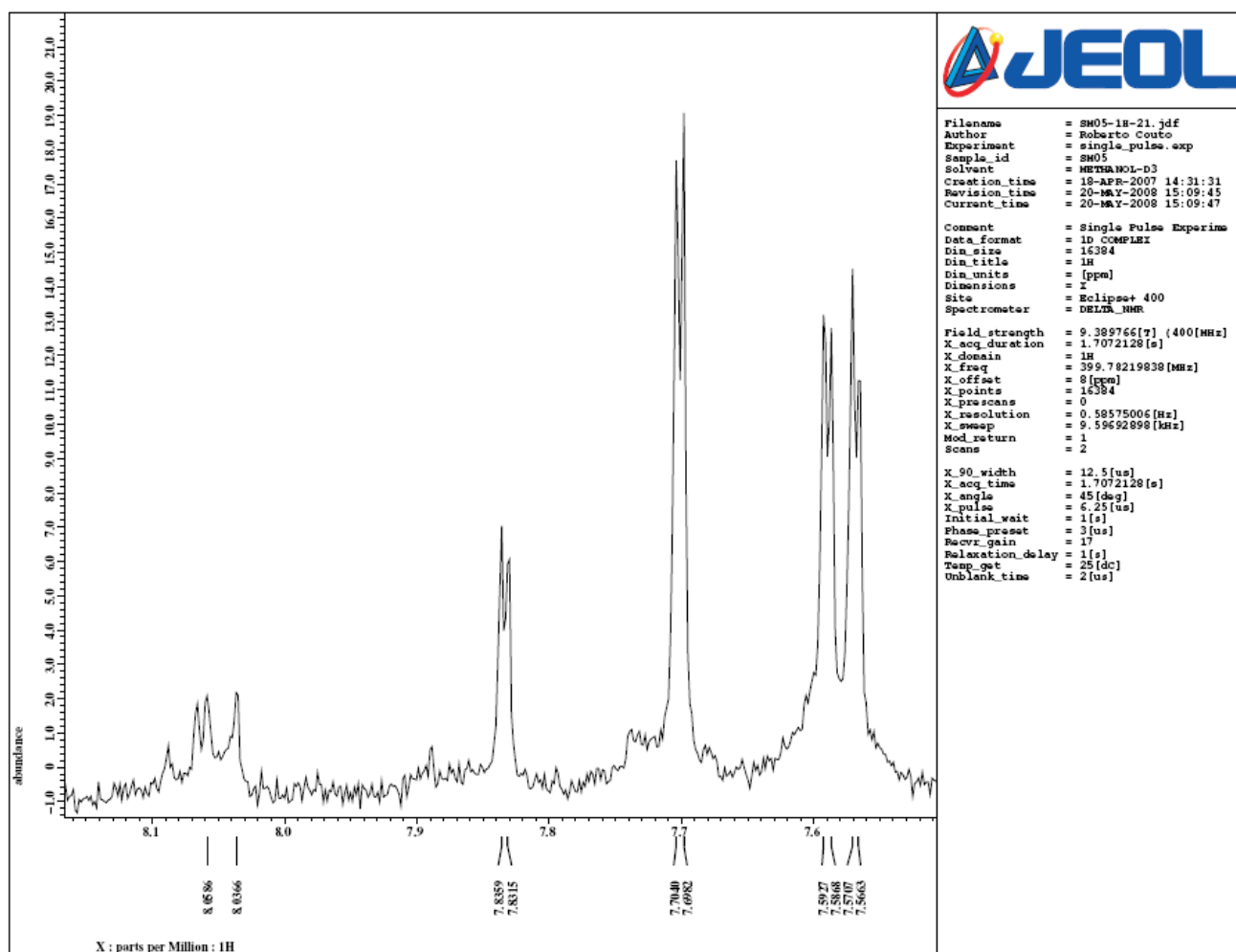


**Figura 75** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de substâncias **SM-05** e **SM-05B** (região 6,1 – 7,0 ppm)

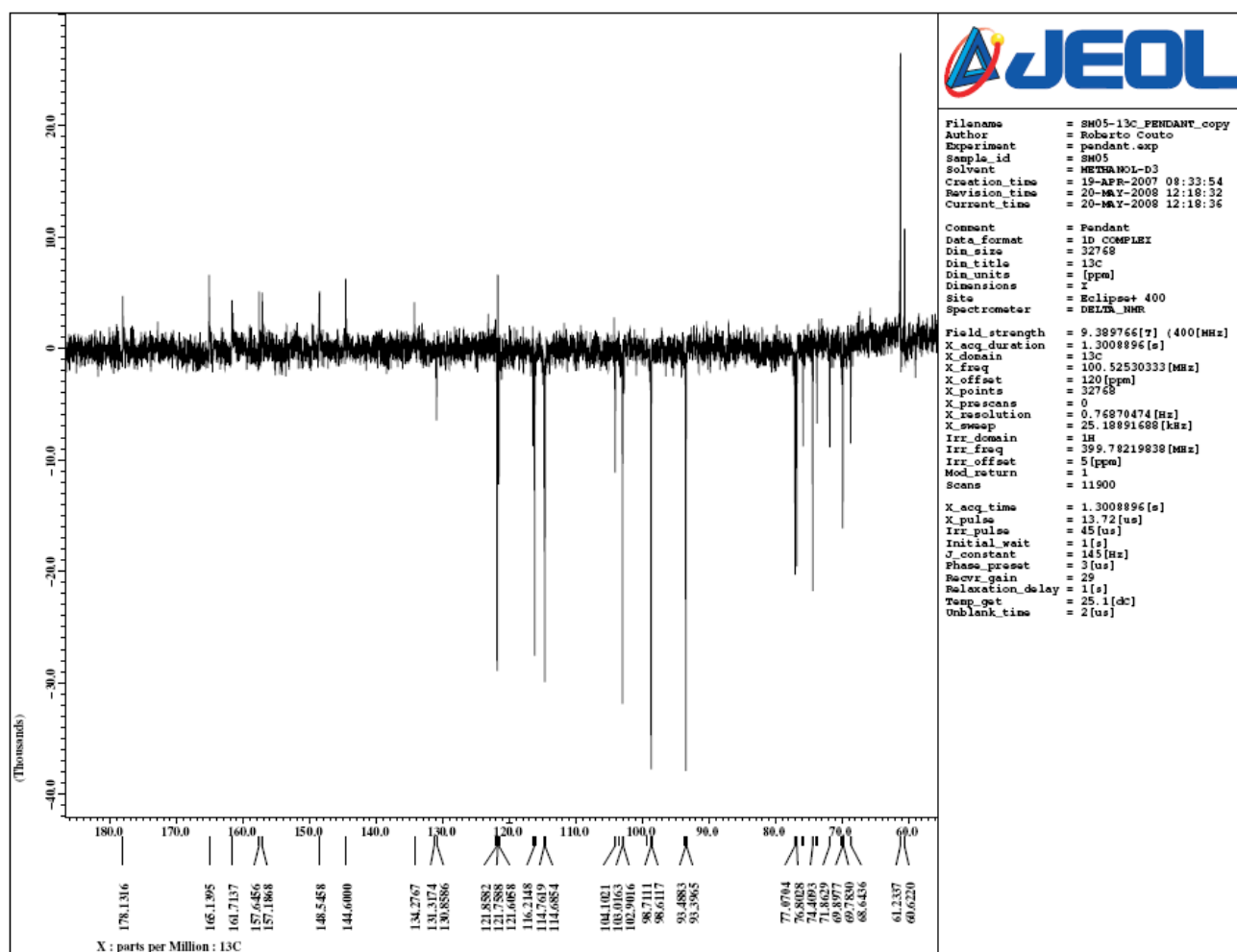
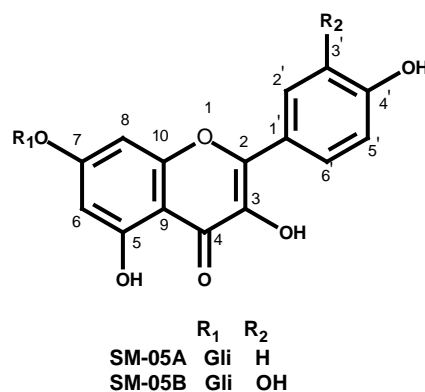




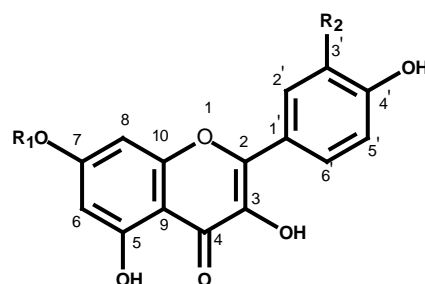
R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 SM-05A Gli H  
 SM-05B Gli OH



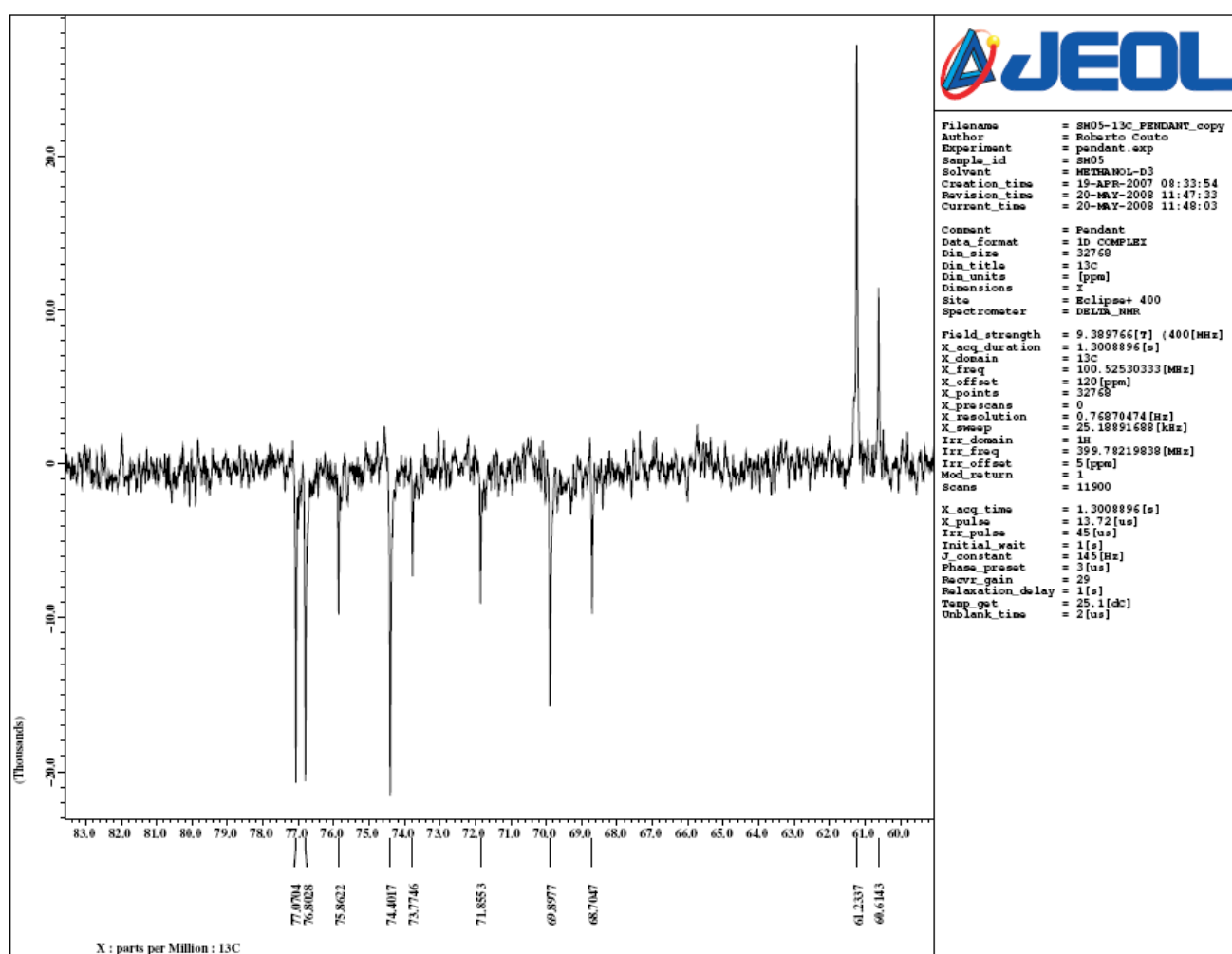
**Figura 76** – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 7,5 – 8,2 ppm)



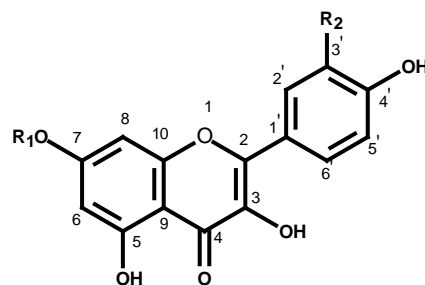
**Figura 77** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ - PENDANT da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B**



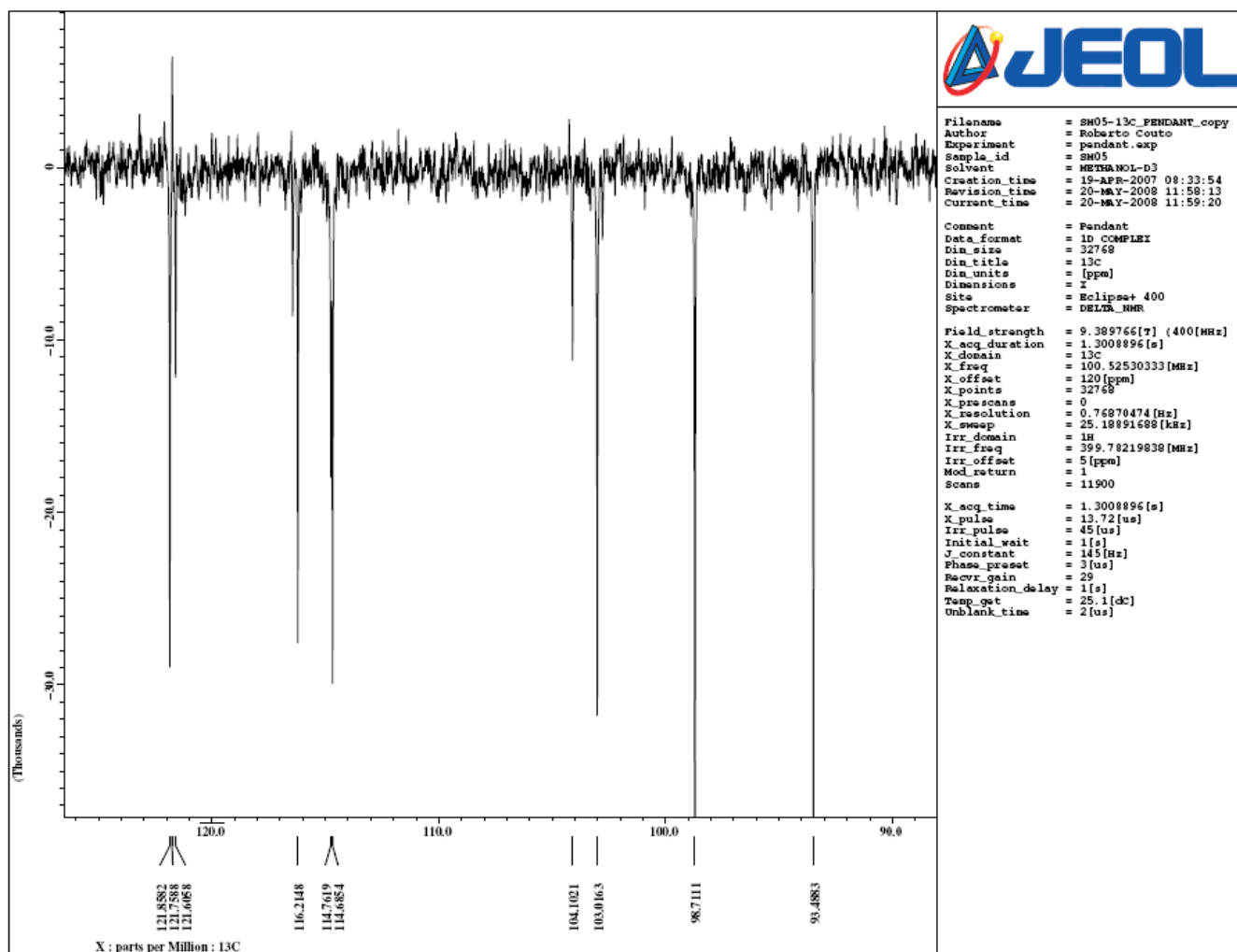
R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 SM-05A Gli H  
 SM-05B Gli OH



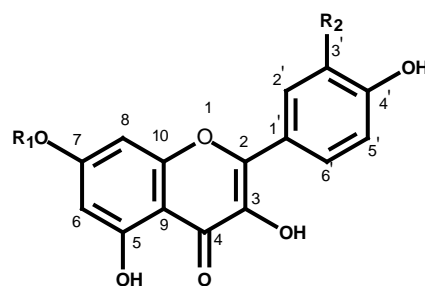
**Figura 78** – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup>C- PENDANT da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 60 – 83 ppm)



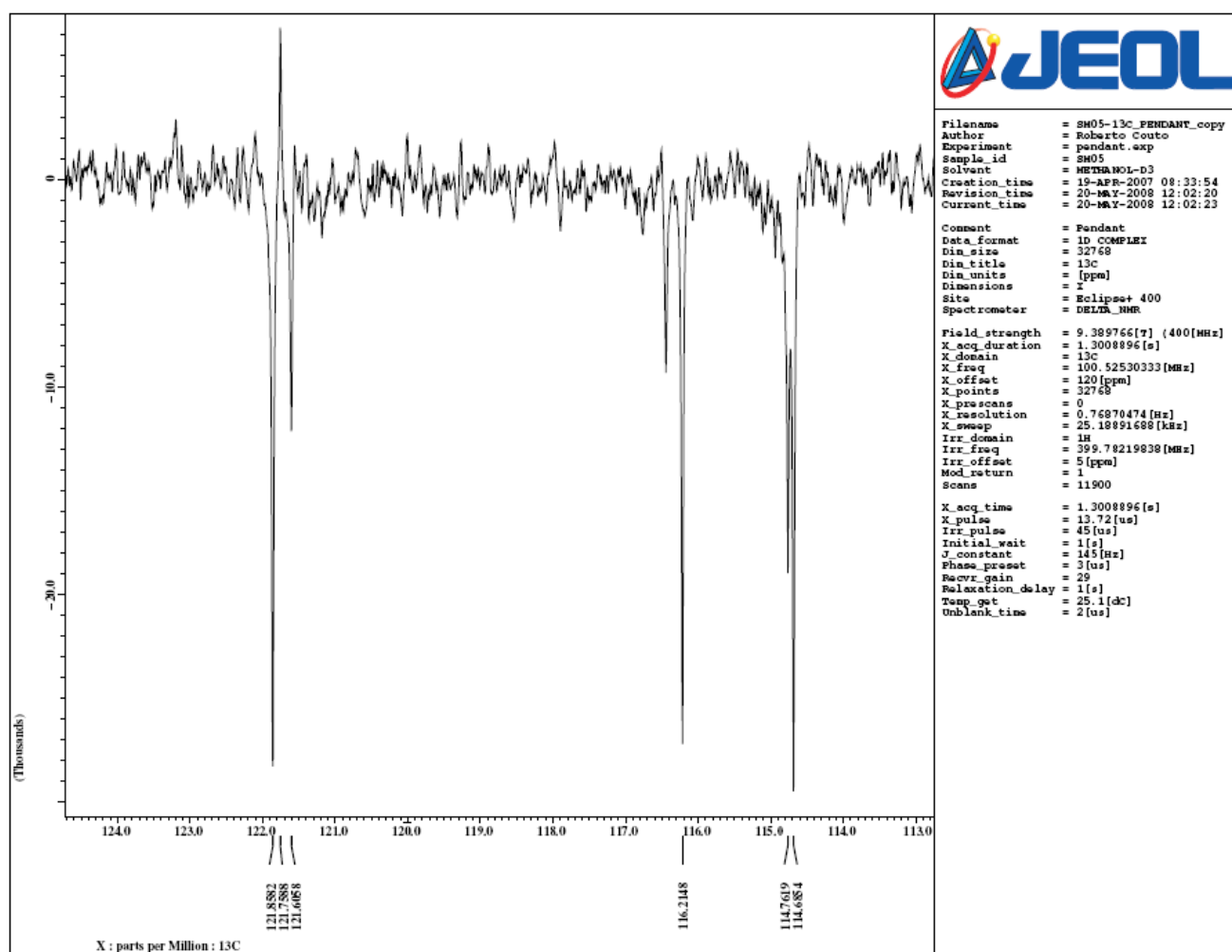
R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 SM-05A Gli H  
 SM-05B Gli OH



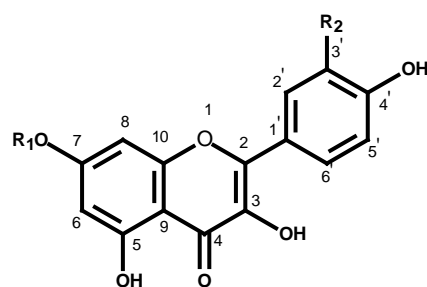
**Figura 79** – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup>C- PENDANT da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 99 – 122 ppm)



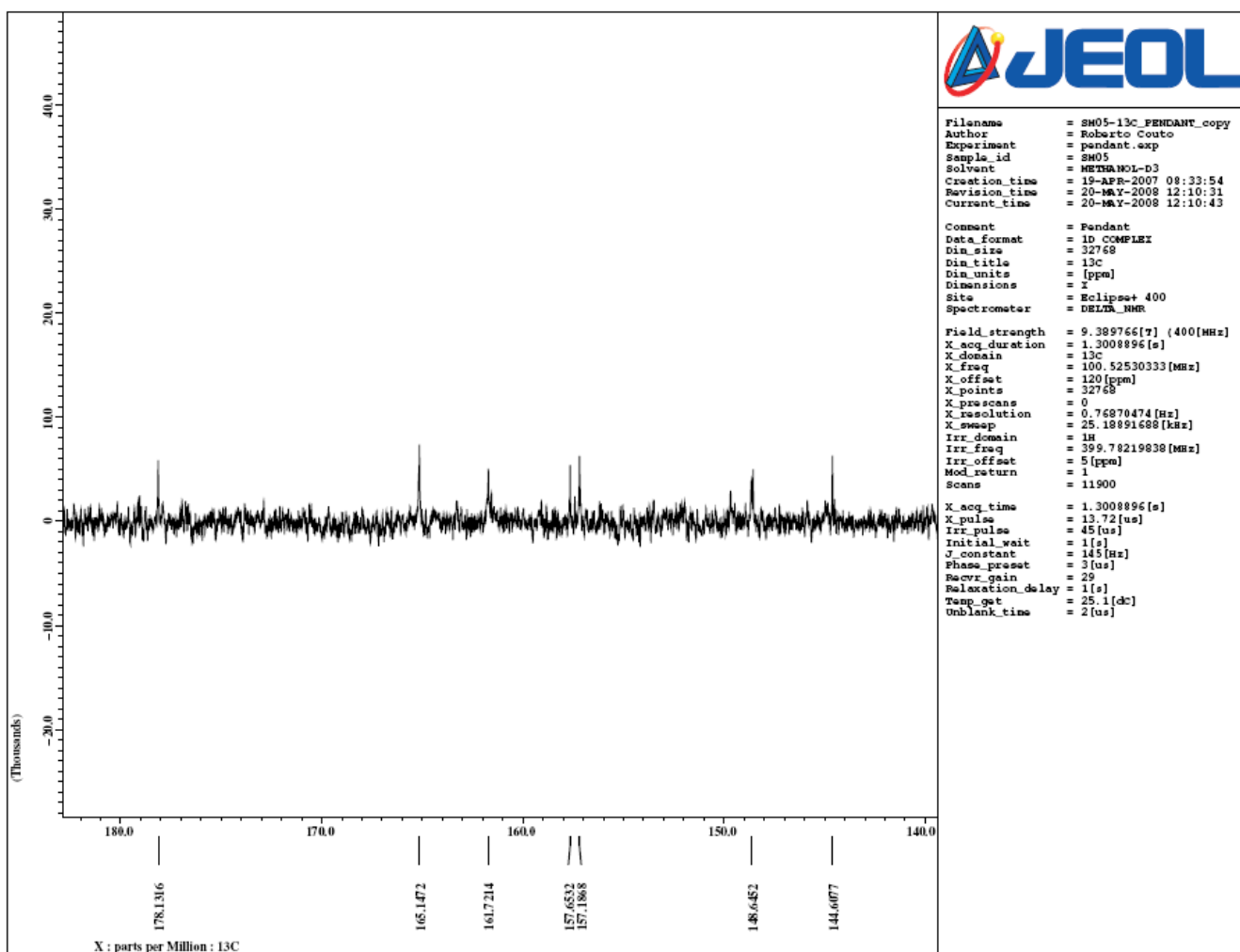
R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 SM-05A Gli H  
 SM-05B Gli OH



**Figura 80** – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup>C- PENDANT da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 113 – 124 ppm)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
SM-05A	Gli	H
SM-05B	Gli	OH



**Figura 81** – Ampliação do espectro de RMN <sup>13</sup>C- PENDANT da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 140 – 180 ppm)

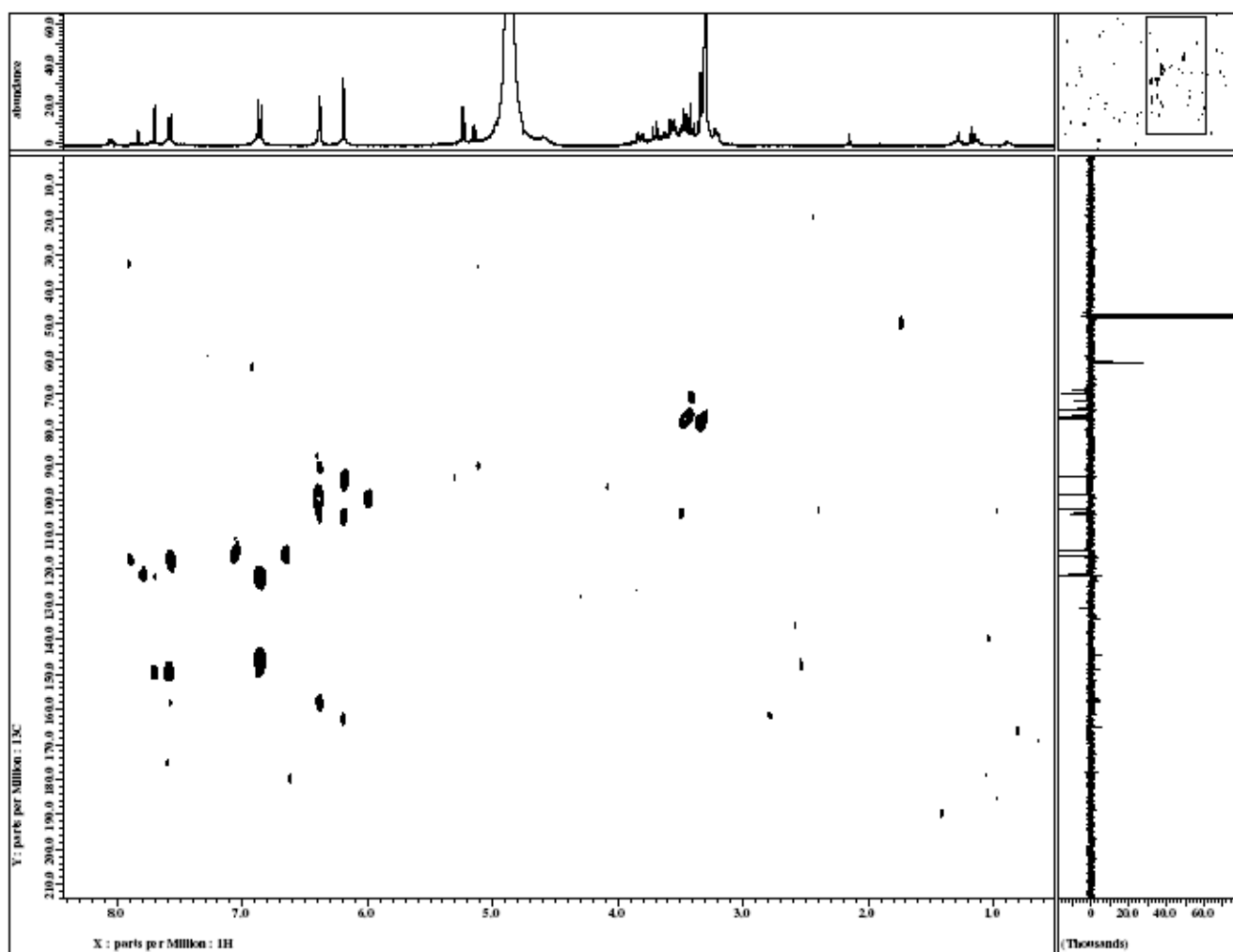
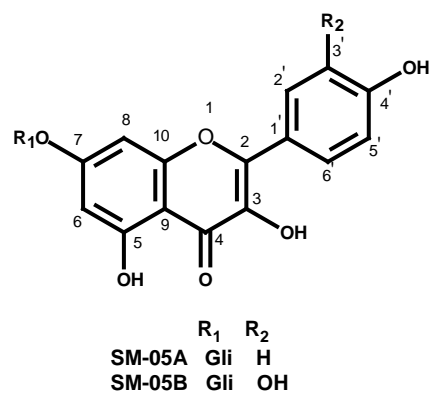
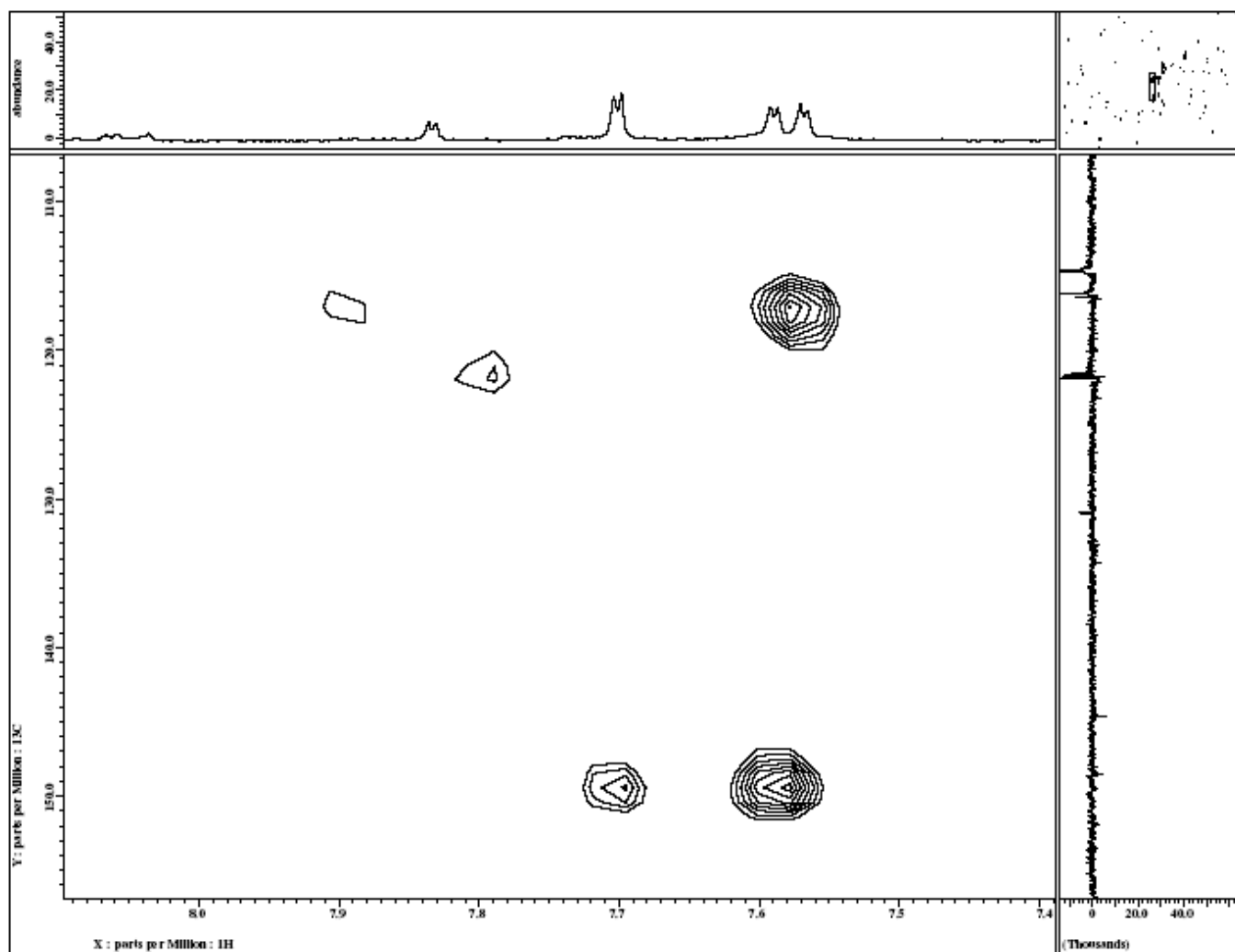
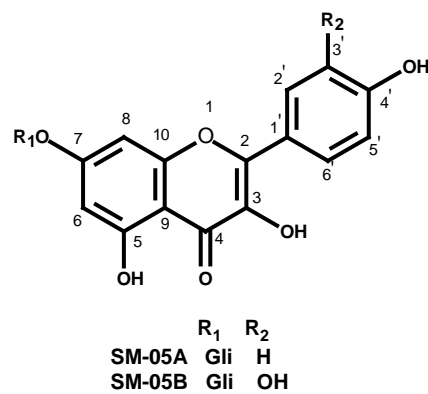
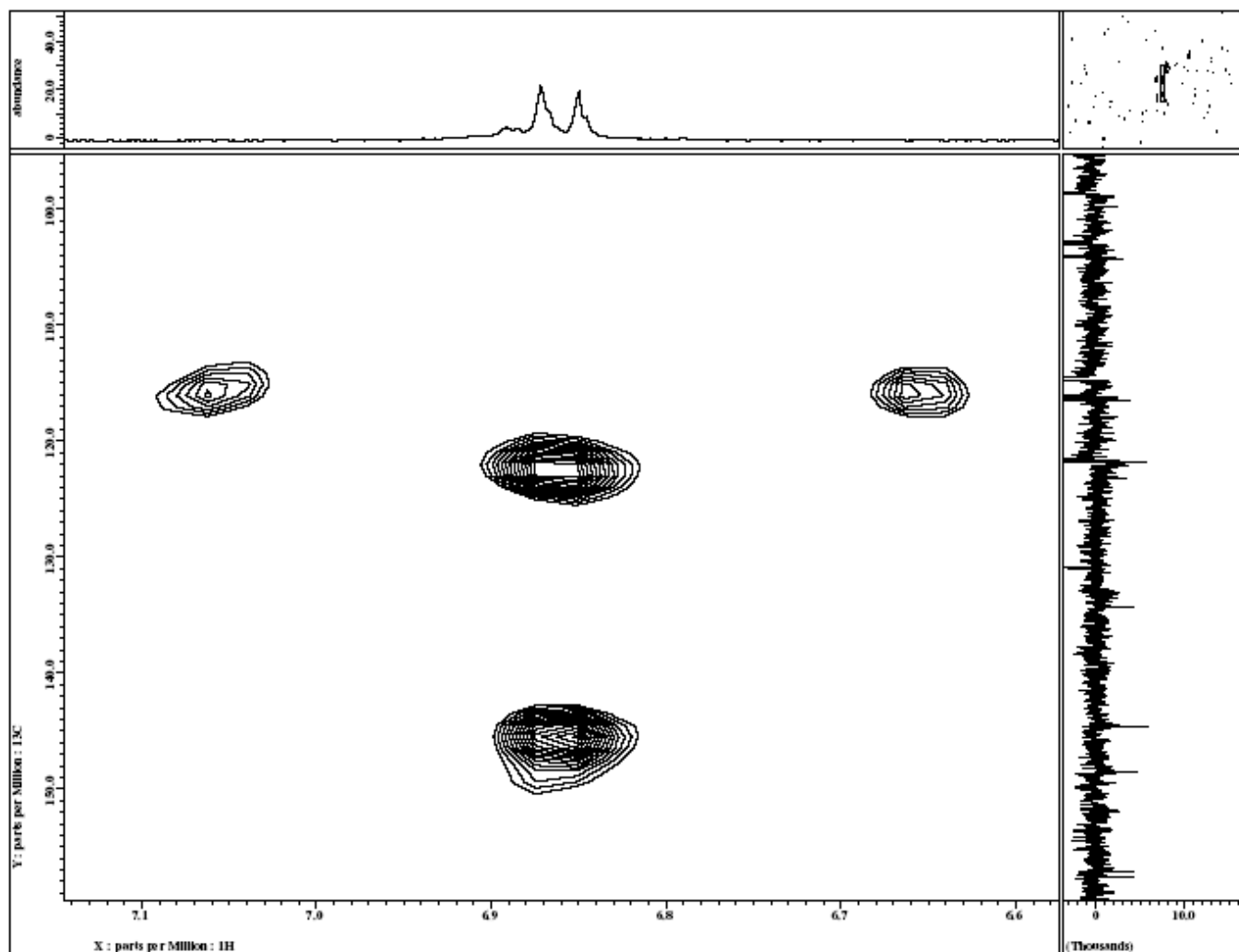
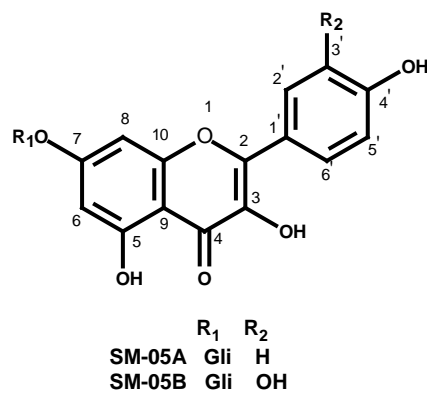


Figura 82 – Espectro de HMBC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B**



**Figura 83** – Ampliação do espectro de HMBC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 7,4 – 8,1 ppm)





**Figura 84** – Ampliação do espectro de HMBC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 6,6 – 7,2 ppm)

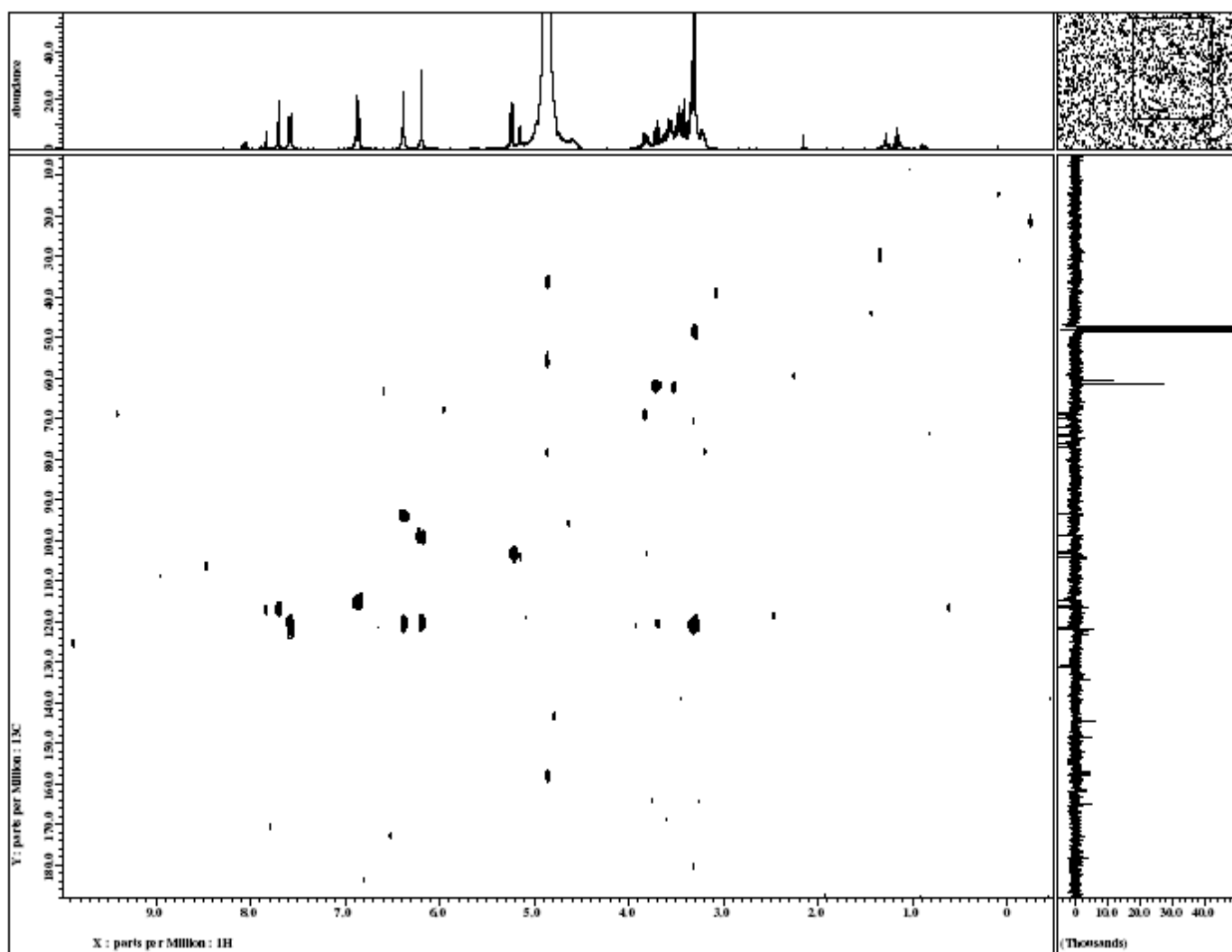
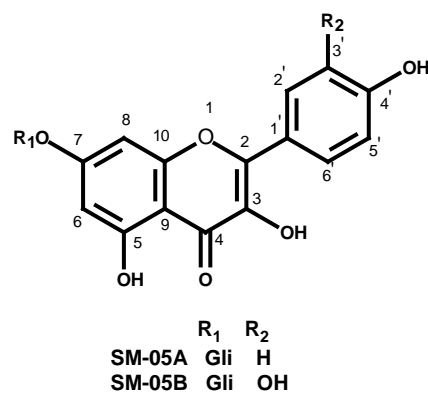
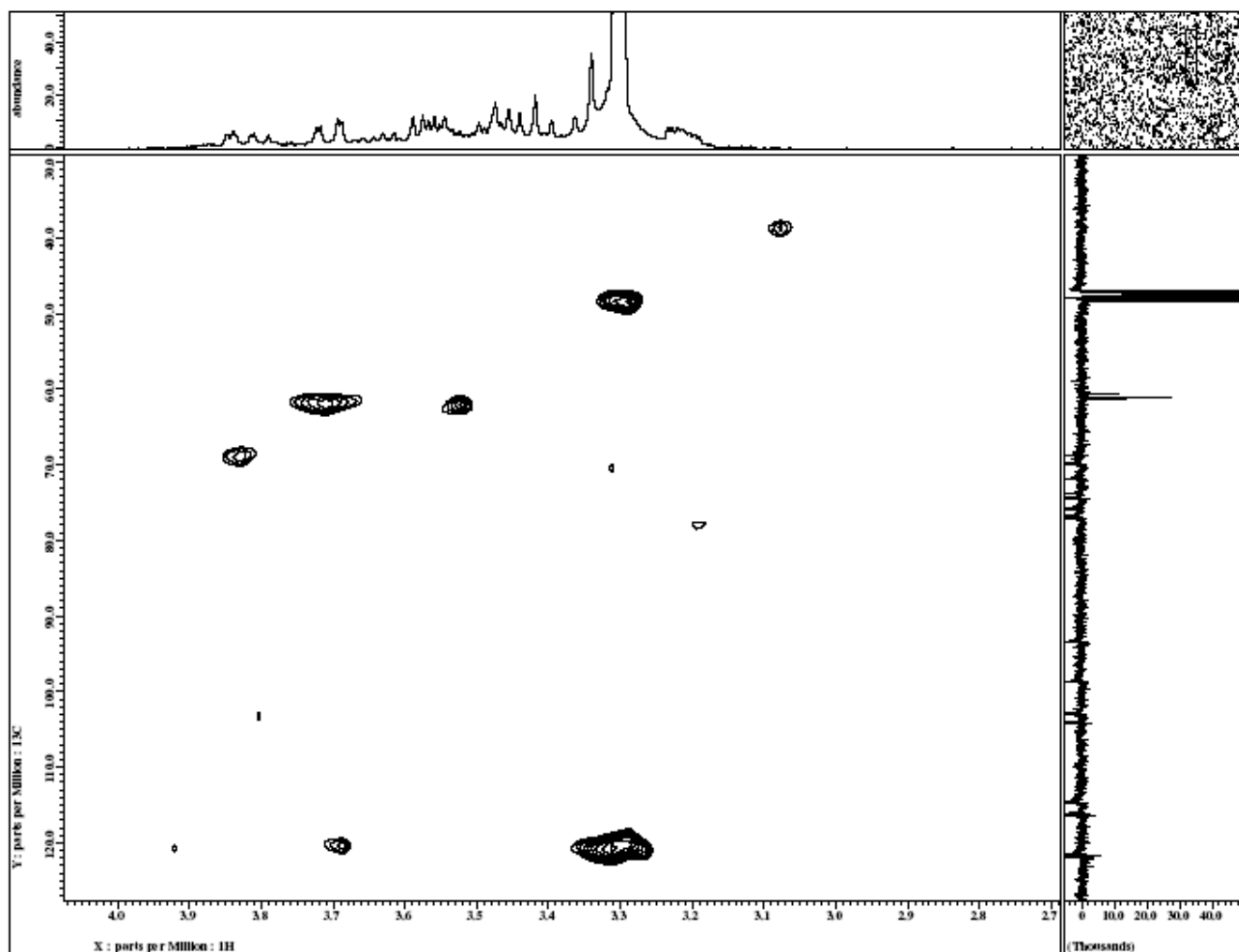
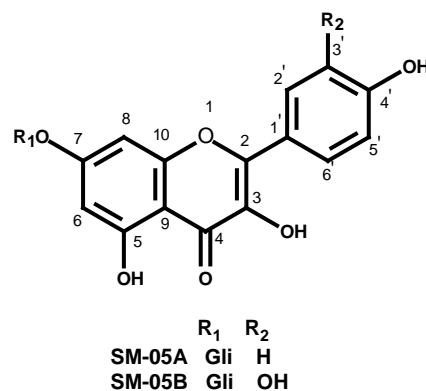
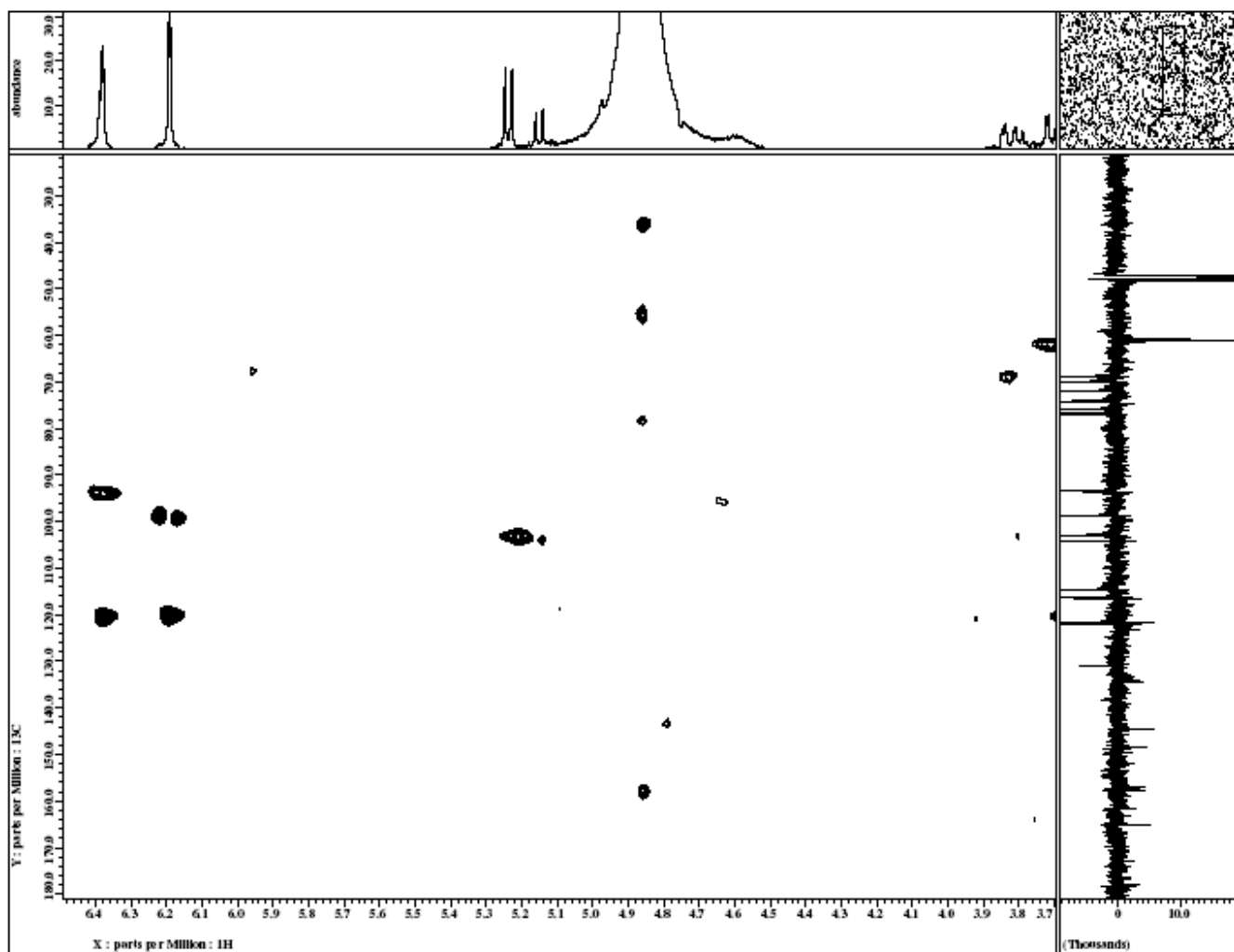
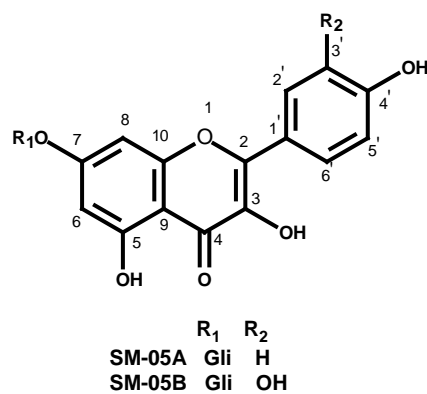


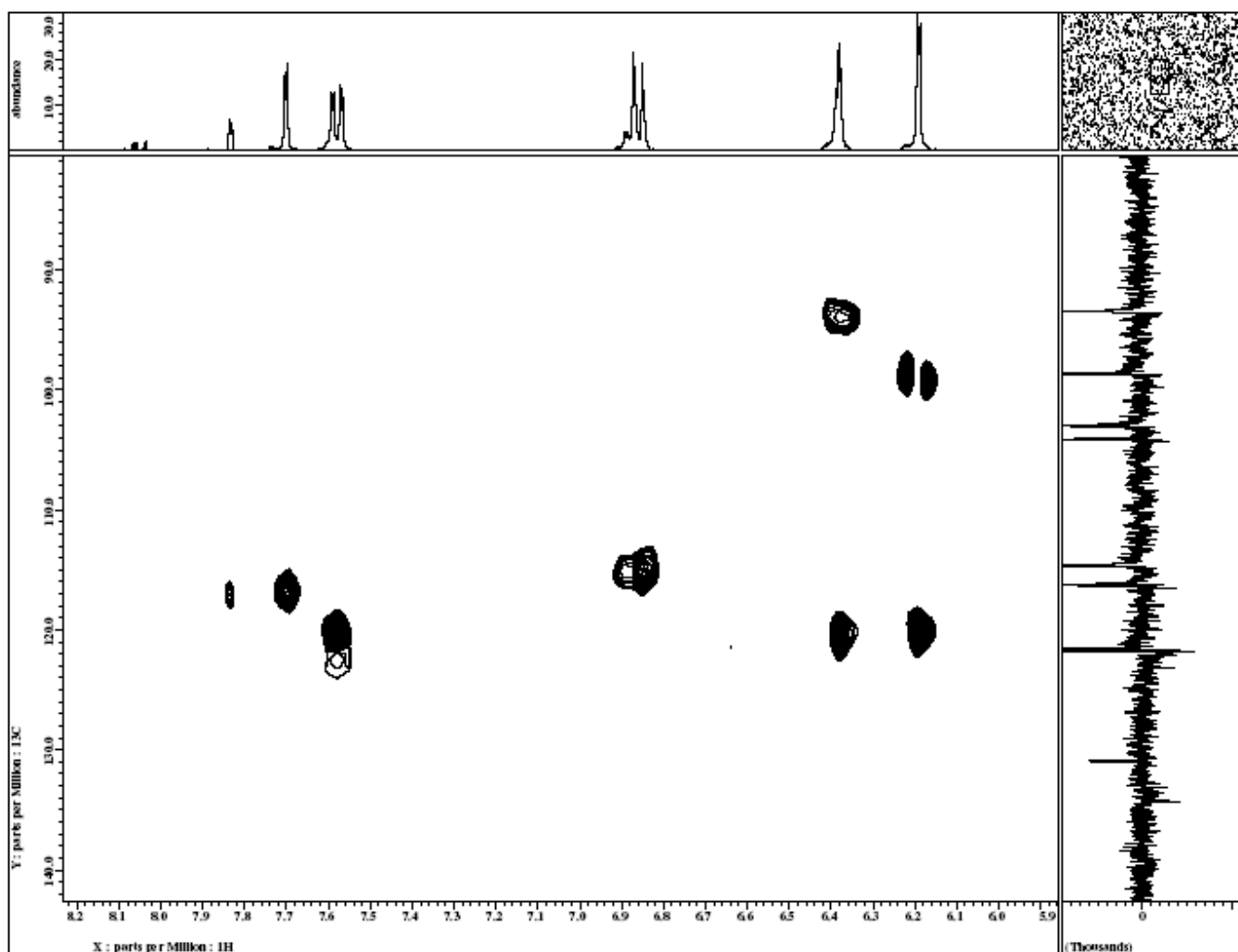
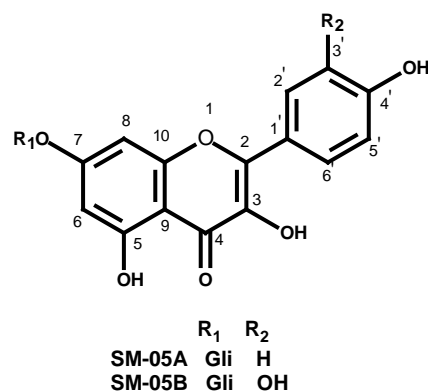
Figura 85 – Espectro de HMBC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B**



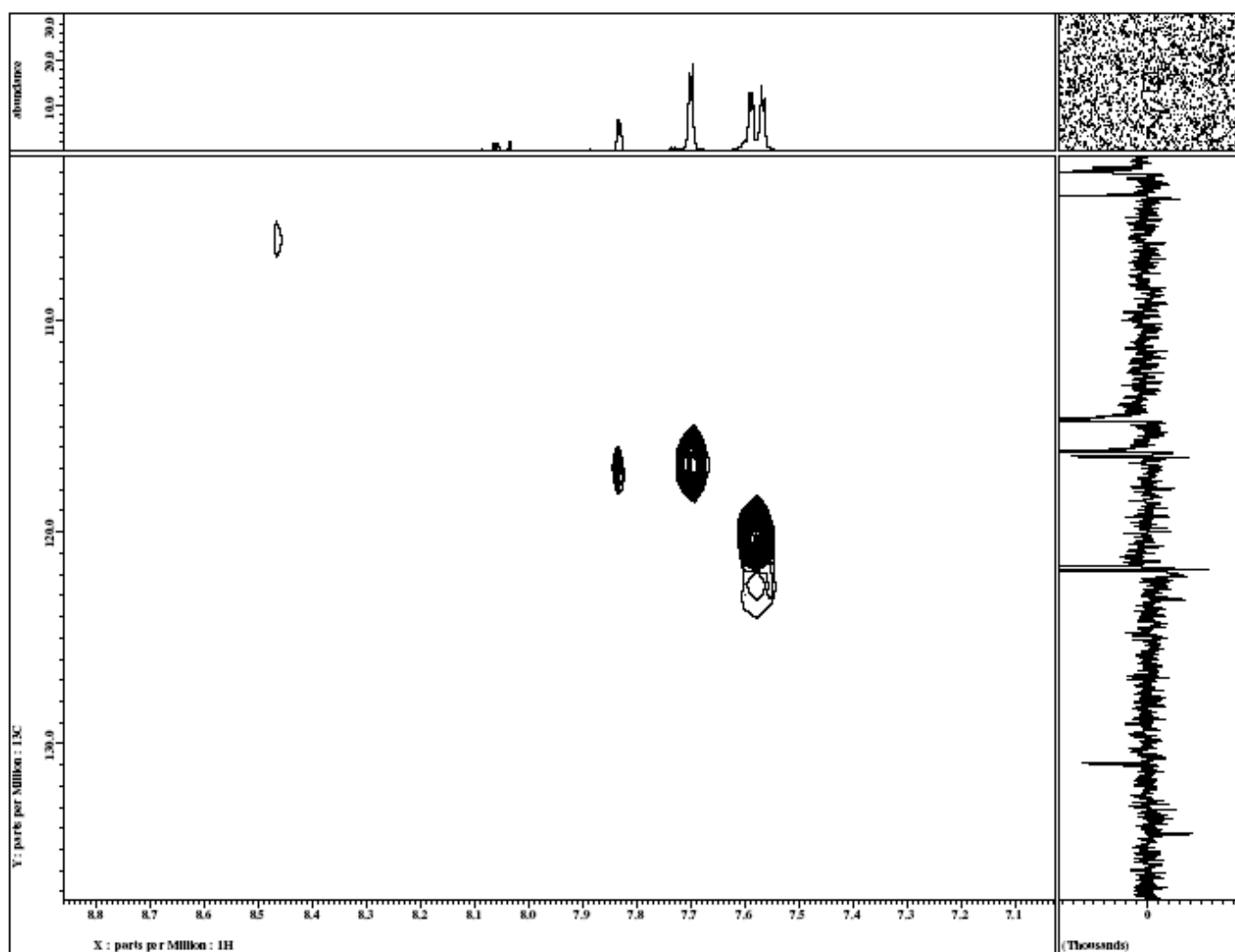
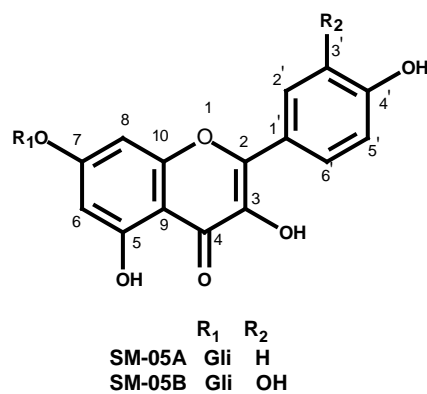
**Figura 86** – Ampliação do espectro de HMQC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 2,7– 4,1 ppm)



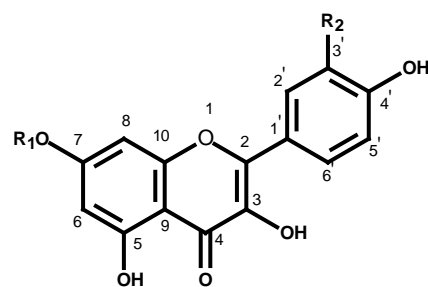
**Figura 87** – Ampliação do espectro de HMPC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 3,7 – 6,4 ppm)



**Figura 88** – Ampliação do espectro de HMBC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 5,9 – 8,2 ppm)



**Figura 89** – Ampliação do espectro de HMQC da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 7,1 – 8,8 ppm)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
SM-05A	Gli	H
SM-05B	Gli	OH

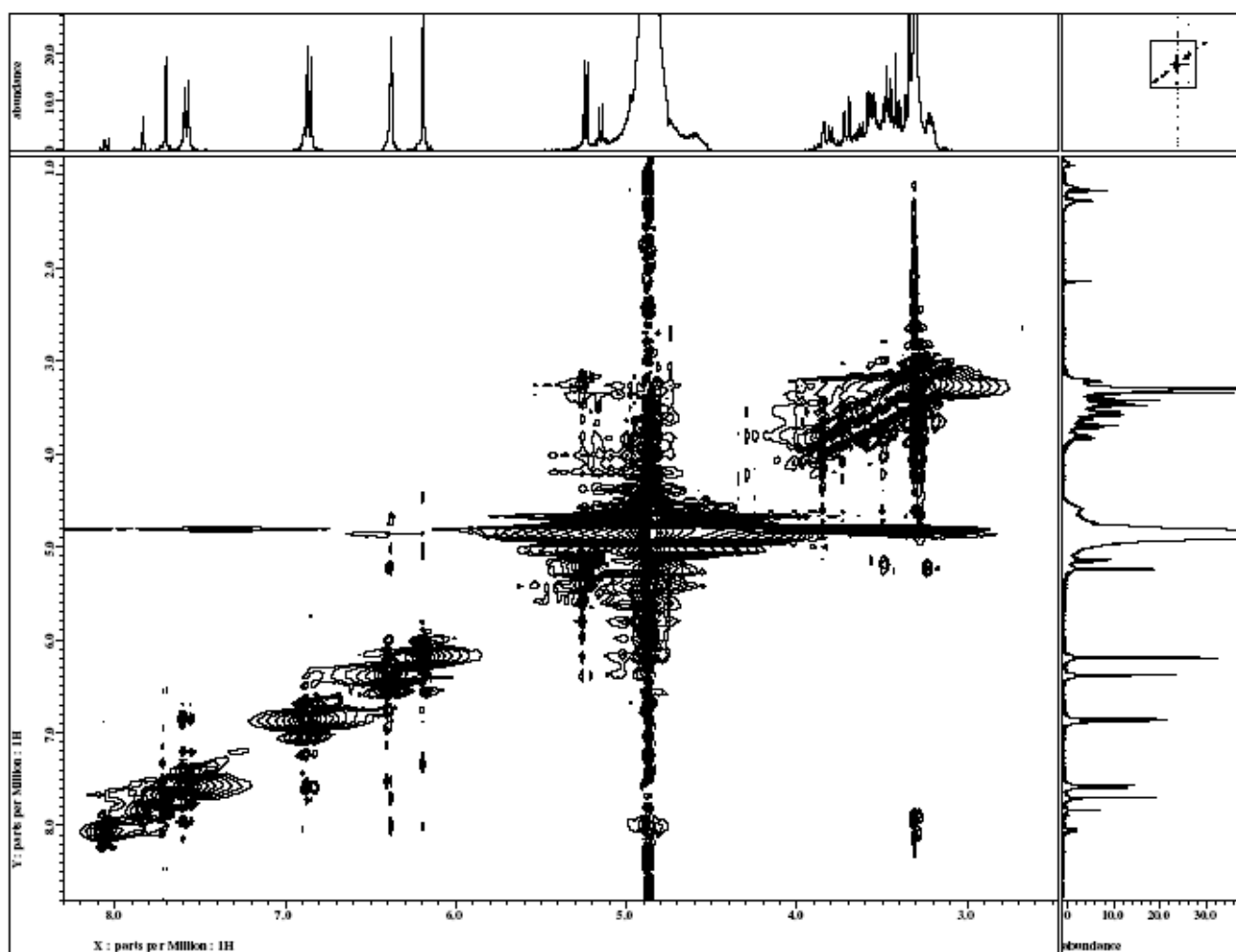
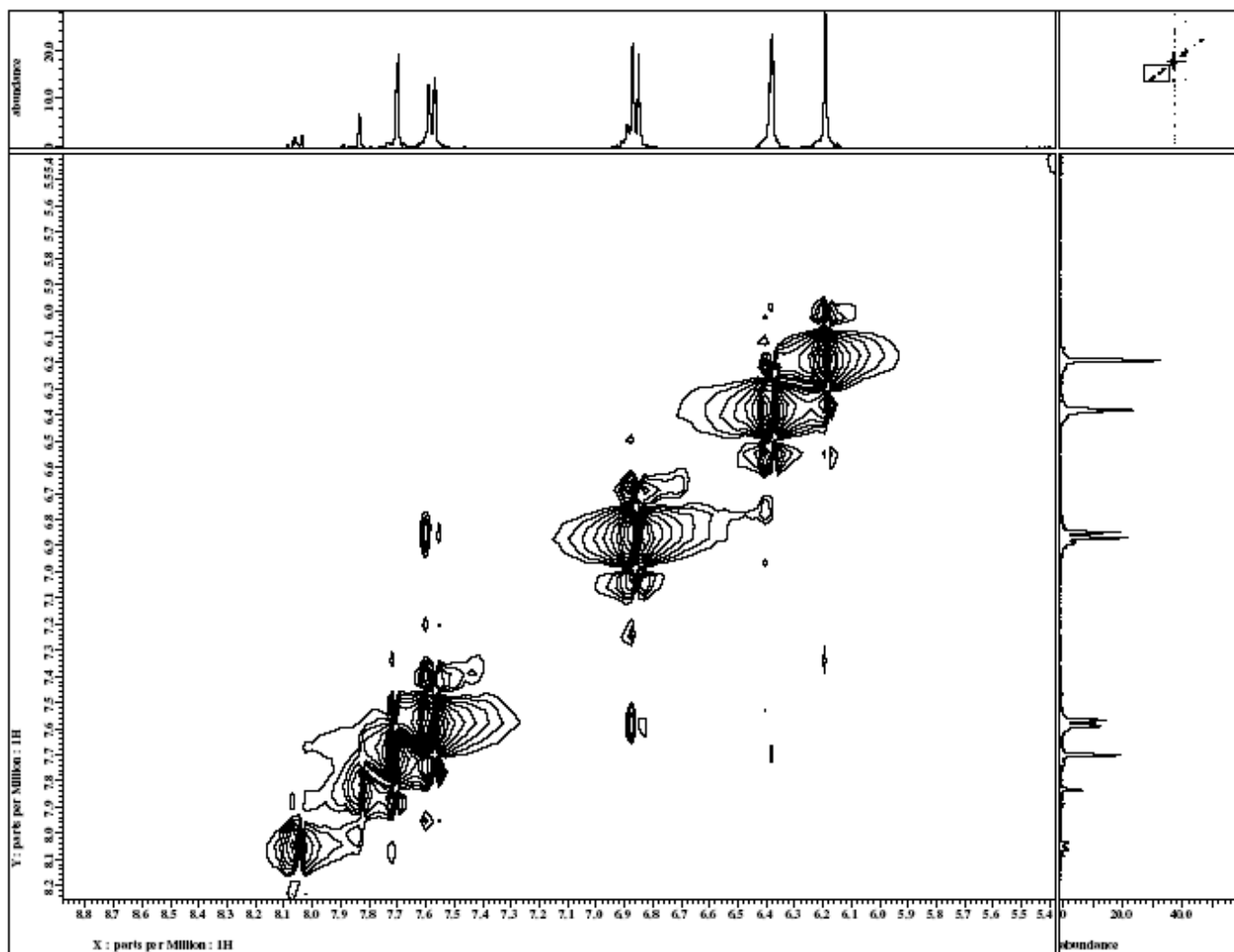
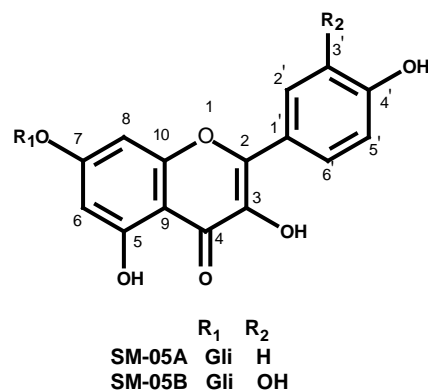


Figura 90 – Espectro de NOESY da mistura de substâncias SM-05A e SM-05B



**Figura 91** – Ampliação do espectro de NOESY da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B** (região 5,4 – 8,8 ppm)



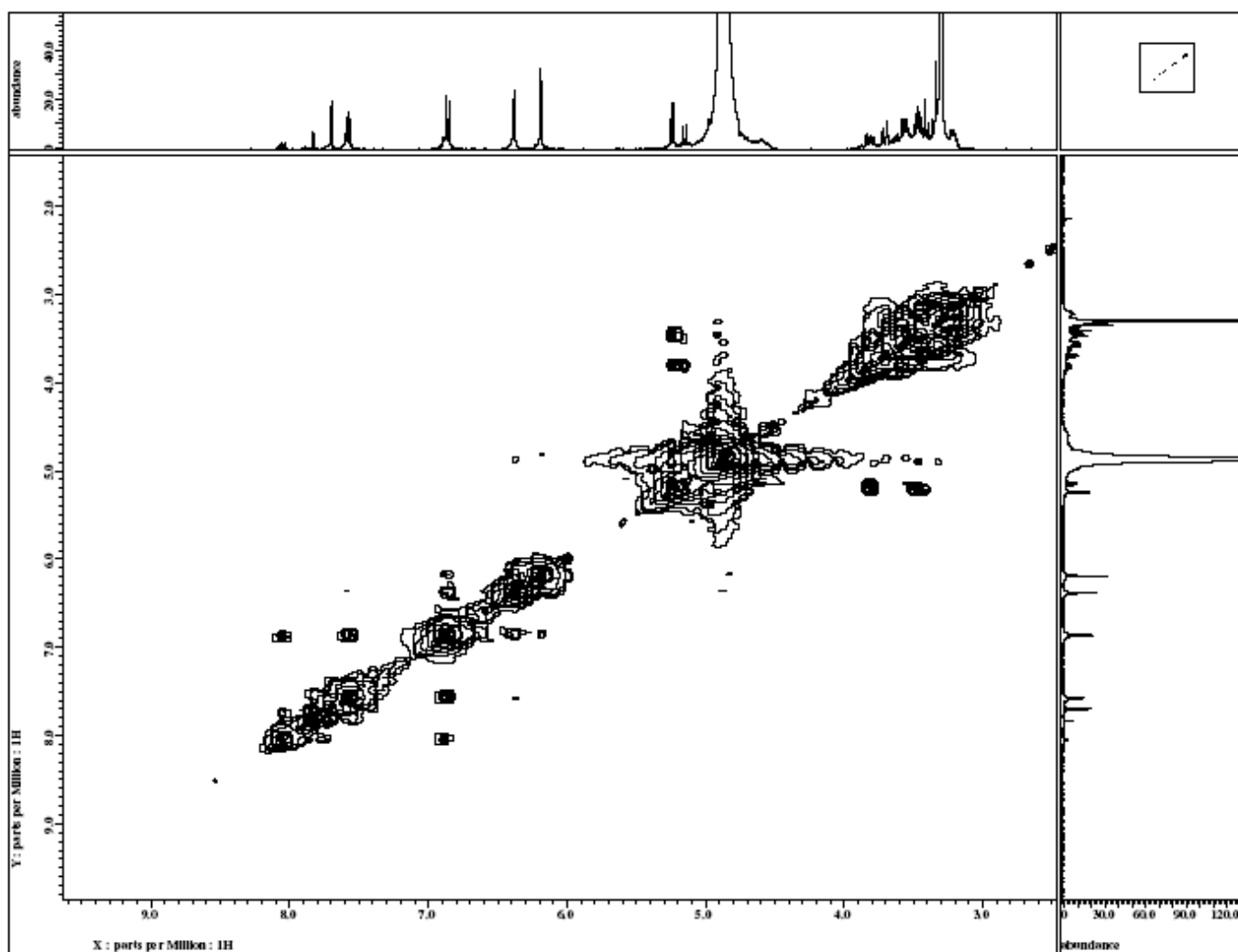
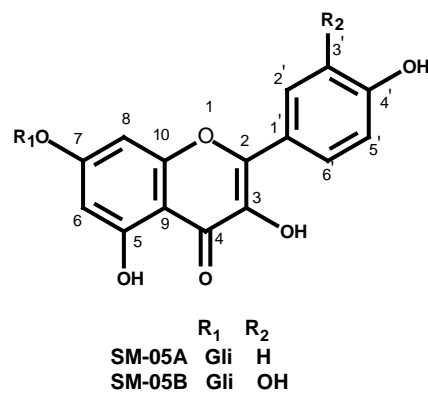
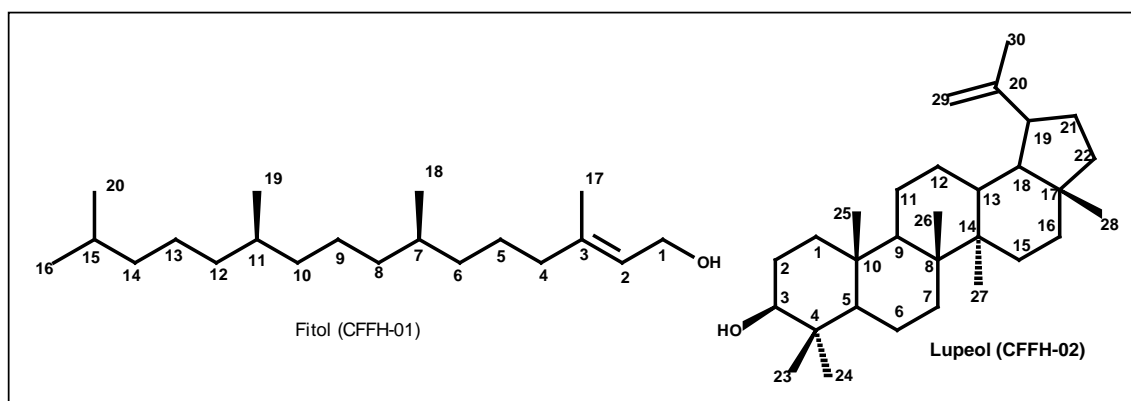


Figura 92 – Espectro de COSY da mistura de substâncias **SM-05A** e **SM-05B**

## 6.2. ESTERÓIDES E TERPENÓIDES

### 6.2.1. MISTURA DO ESTERÓIDE CFFH-01 E DO DITERPENO LINEAR CFFH-02



O cromatograma de gás da mistura de substâncias apresenta picos com tempo de retenção  $t_{R1} = 9,5$  min (20,8%) e  $t_{R2} = 20,3$  min (79,2%) (**Figura 94**, p. 135). , sugerindo mistura do diterpeno linear fitol (**CFFH-01**) e do triterpeno lupeol (**CFFH-02**) respectivamente.

A análise dos fragmentogramas (**Figura 95**, p. 135 e **Figura 96**, p. 137) originados por cada pico obtidos no espectrômetro de massas quando comparados com o banco de dados da biblioteca do equipamento permitiu identificar  $t_{R1}$  como sendo o diterpeno linear fitol (CFFH-01,  $m/z = 296$ ) e  $t_{R2}$  como sendo o triterpeno lupeol (CFFH-02,  $m/z = 426$ ).

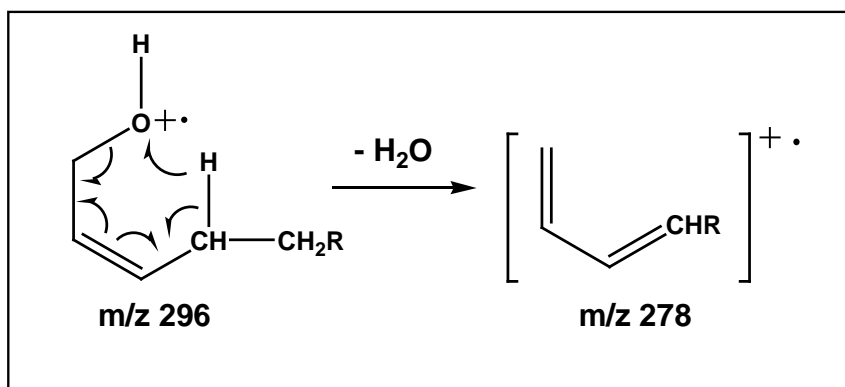
A presença do fitol na mistura [PM = 296 ( $C_{20}H_{40}O$ )] esta caracterizada pela presença de um pico a  $m/z$  278, compatível com a perda de 18 unidades de massa atômica ( $M^+ - 18$ ), relativo à da perda de uma molécula de  $H_2O$  da molécula (**Esquema 01.**, p. 131). O pico a  $m/z = 426$  apresentou-se compatível com a fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$  e foi atribuído ao pico do íon molecular do lupeol. Também foram observados os picos a  $m/z = 189$  (quebra do tipo retro Diels-Alder do anel **C**) e  $m/z = 203$  característicos de triterpenos pentaciclicos da classe lupano (**Esquema 02**, p. 132).

A análise dos espectros de RMN  $^1H$  (**Figura 97**, p. 138) confirmou tratar-se de uma mistura de substâncias. Nele podemos notar a presença de sete sinais simples, relativos a grupos metilas, sendo que um deles em  $\delta_H$  1,68 (Me-30), atribuído a um grupo metila ligado a um carbono  $sp^2$ . Também foram observados dois sinais duplos largos na região de hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  4,68 ( $d$ ,  $J=1,8$  Hz, H-29a) e 4,56 ( $d$ ,

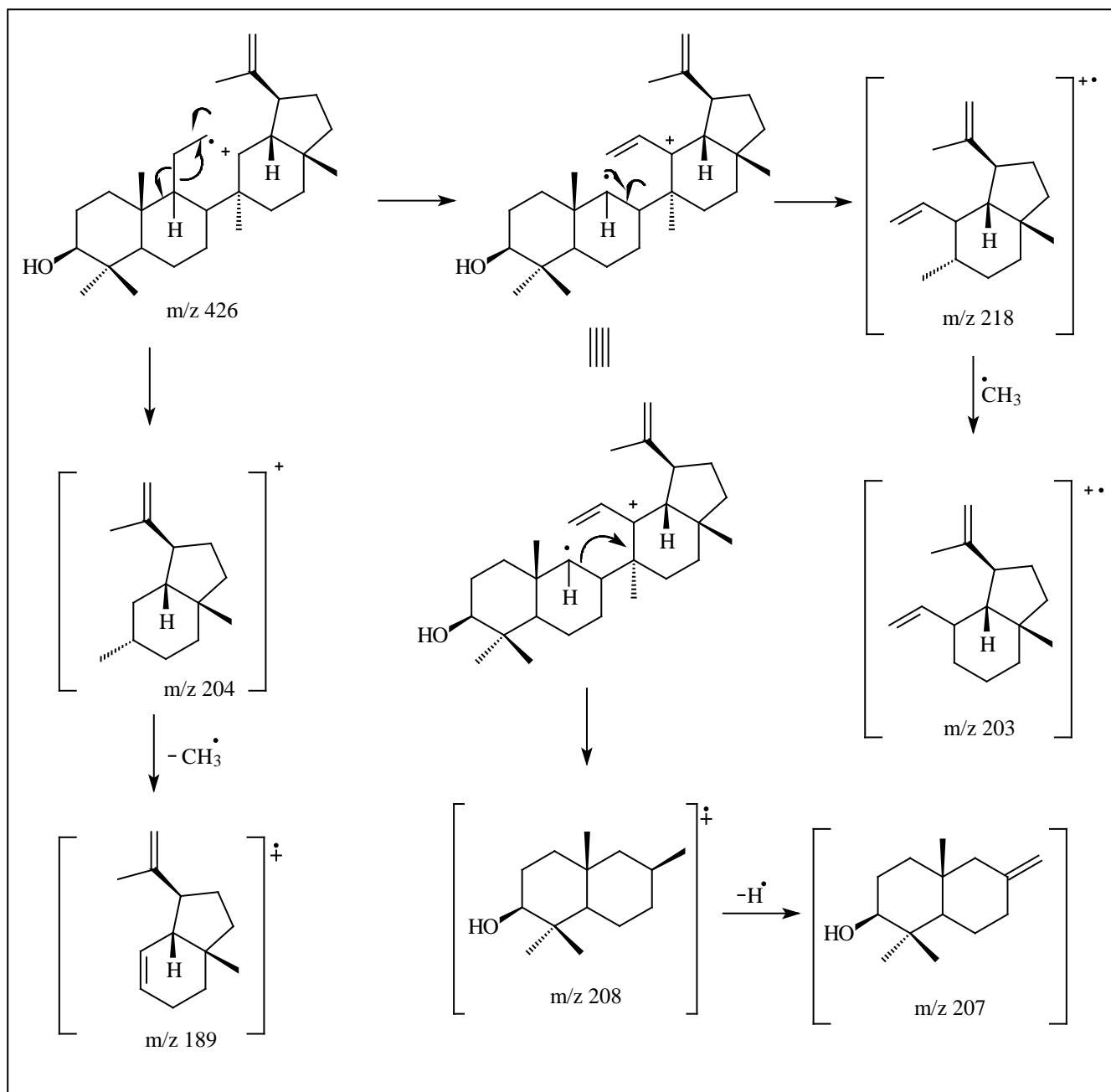
$J=1,0$  Hz, H-29b), confirmando a existência de um grupo metilênico terminal. O sinal em  $\delta_H$  3,17 (*dd*,  $J=10,9$  e  $5,3$  Hz, H-3ax), caracteriza a presença de um grupo hidroxila HO- $\beta$  ligado ao átomo de carbono C-3, e o triplo sinal duplo em  $\delta_H$  2,36 (*td*,  $J=5,7$  e  $11,4$  Hz) o hidrogênio olefínico.

Na análise do espectro de RMN  $^{13}C$  (**Figura 103**, p. 144) foi observado a presença de dois carbonos olefínicos ( $sp^2$ ) em  $\delta_c$  150,8 (C-20) e 109,30 (C-29), um carbono oxigenado em  $\delta_c$  78,96 (C-3), e outros sinais de carbonos  $sp^3$  quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos.

Vale ressaltar que a substância CFFH-01 (fitol) é um álcool altamente hidrófobo com 20 átomos de carbonos (6, 7, 10, 11, 14,15-hexaidrogeranilgeraniol) cuja importância dentro classe dos diterpenos lineares deve-se ao fato de constituir a cadeia lateral lipofílica da molécula de clorofila A (Torsell, 1997).



**Esquema 01** – Proposta de fragmentação do fitol (CFFH-01)



**Esquema 02** – Proposta de fragmentação do lupeol (CFFH-02)

**Tabela 11.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$ (100 MHz) do fitol (**CFFH-01**) e do lupeol (**CFFH-02**), em  $\text{CDCl}_3$ . Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm)

Carbono	Fitol	Literatura*	Lupeol	Literatura**
1	59,3	59,4	38,7	38,6
2	123,0	123,1	27,4	27,3
3	140,2	140,2	78,9	78,9
4	39,9	39,9	38,8	38,8
5	25,1	25,1	55,3	55,2
6	36,6	36,6	18,3	18,2
7	34,2	32,7	34,3	34,2
8	37,4	37,3	40,8	40,7
9	24,4	24,5	50,4	50,3
10	32,7	32,4	37,1	37,1
11	34,2	32,8	20,9	20,9
12	37,4	37,3	25,1	25,0
13	24,7	24,8	38,1	38,0
14	39,9	39,3	42,8	42,7
15	27,9	28,0	27,4	27,4
16	22,6	22,6	35,6	35,5
17	22,7	22,7	43,0	42,9
18	19,7	19,7	48,3	48,2
19	19,6	19,7	47,9	47,9
20	16,1	16,1	150,8	150,8
21	-	-	29,8	29,8
22	-	-	40,0	39,9
23	-	-	28,0	27,9
24	-	-	15,3	15,3
25	-	-	16,1	16,1
26	-	-	16,0	15,9
27	-	-	14,5	14,5
28	-	-	18,0	17,9
29	-	-	109,3	109,3
30	-	-	19,3	19,2

\*Aridoni *et. al.*, 1999

\*\* Mahato &amp; Kundu, 1994

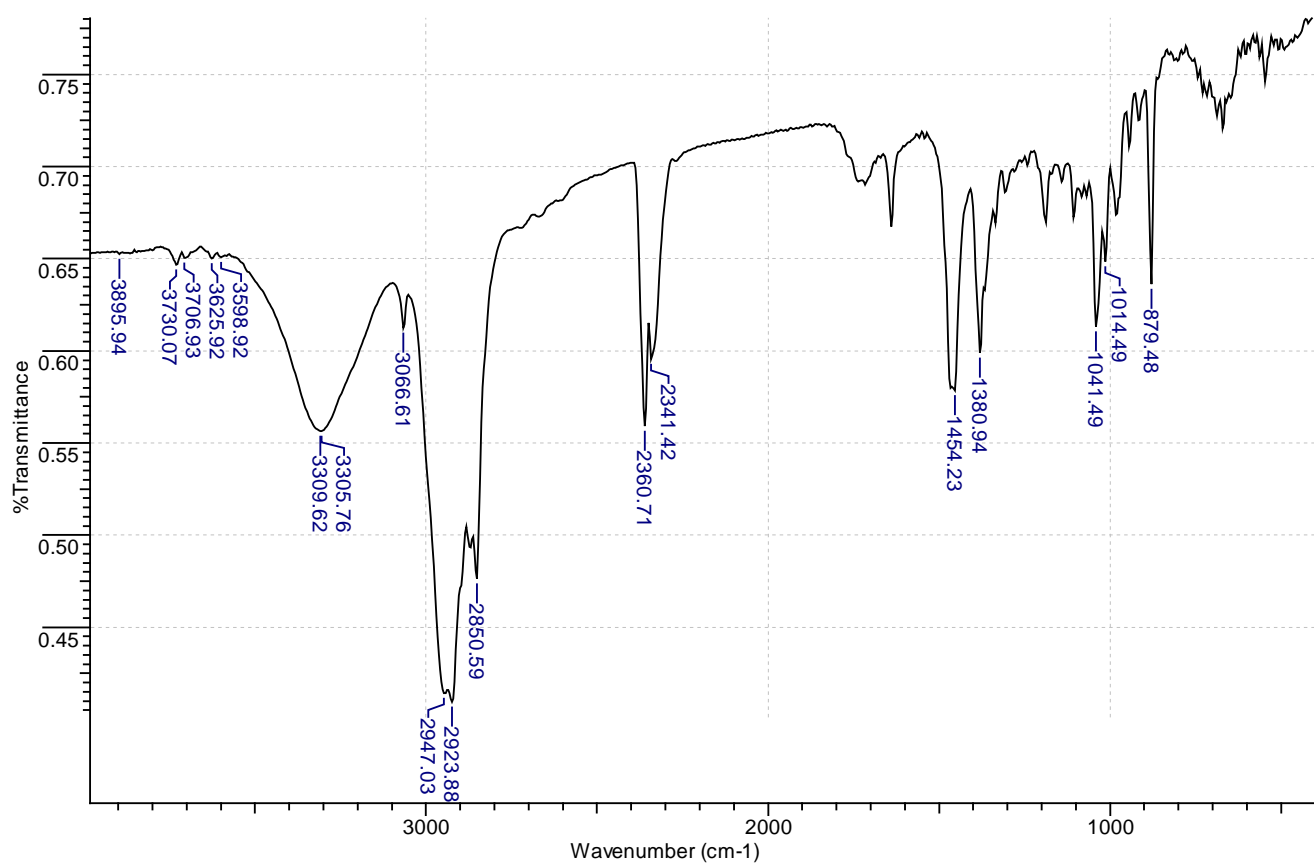
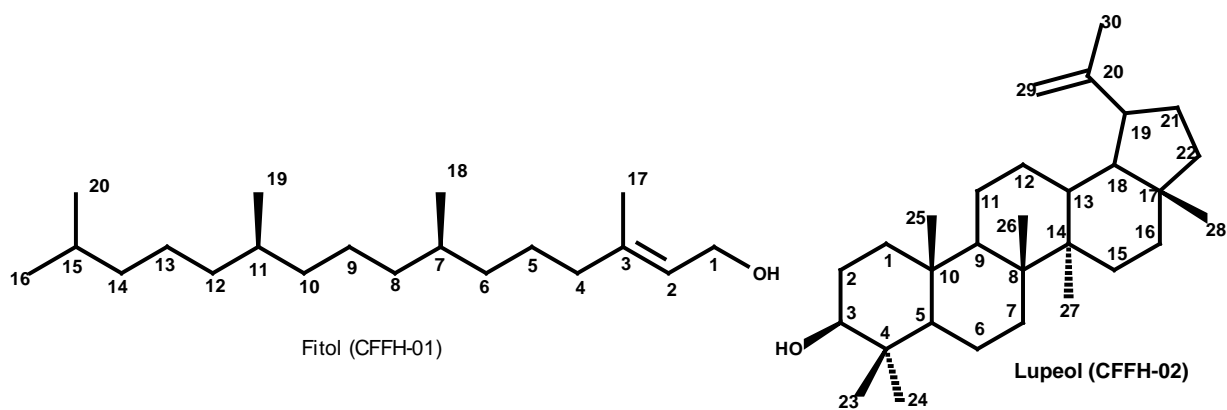
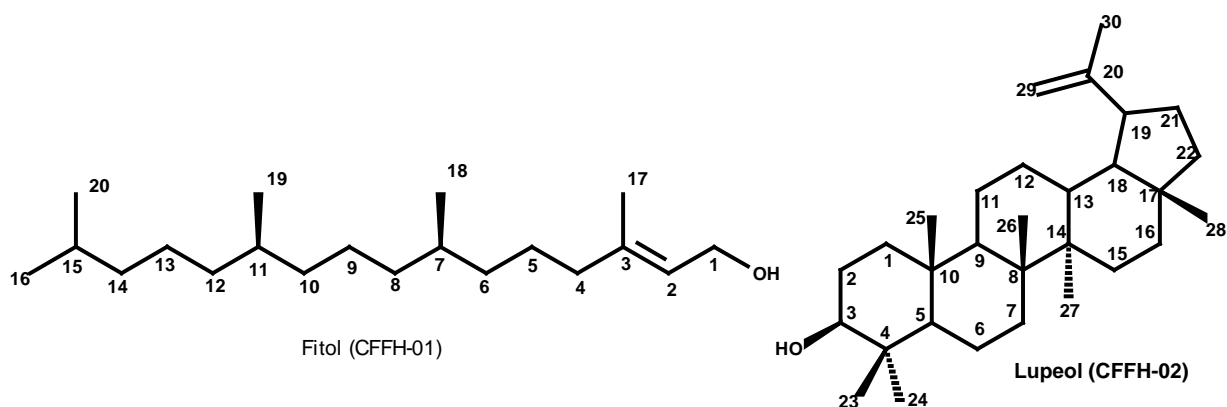


Figura 93 – Espectro de infravermelho das substâncias CFFH-01 e CFFH-02



```

*** CLASS-5000 *** \ Report No. = 1 Data : CFH01.D01 02/12/05 17:10:22
Sample      : cfh01
ID         :
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Type      : Unknown
Operator   : Wallace T C
Method File Name : ALK1.MET
Vial No.   : 1
Barcode    :
  
```

\*\*\*\* Peak Report \*\*\*\*

PKNO	R.Time	I.Time - F.Time	Area	Height	A/H(sec)	MK %Total	Name
1	9.506	9.467 - 9.625	8040882	5870894	1.370	20.79	
2	20.350	20.042 - 20.600	30644822	3617555	8.471	79.21	
Total			38685704			100.00	



**Figura 94** - Cromatograma de gás da mistura das substâncias fitol (**CFFH-01**) e lupeol (**CFFH-02**)

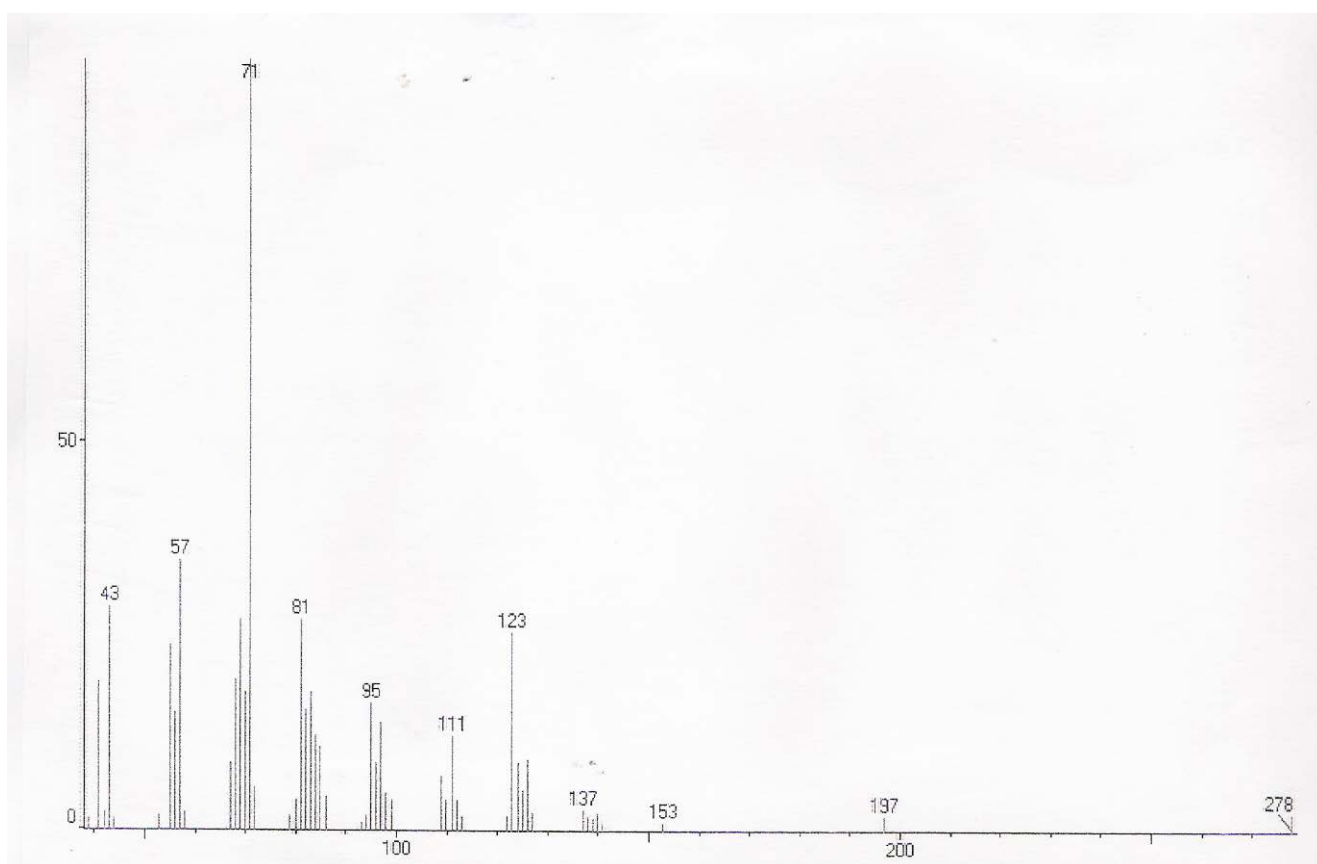
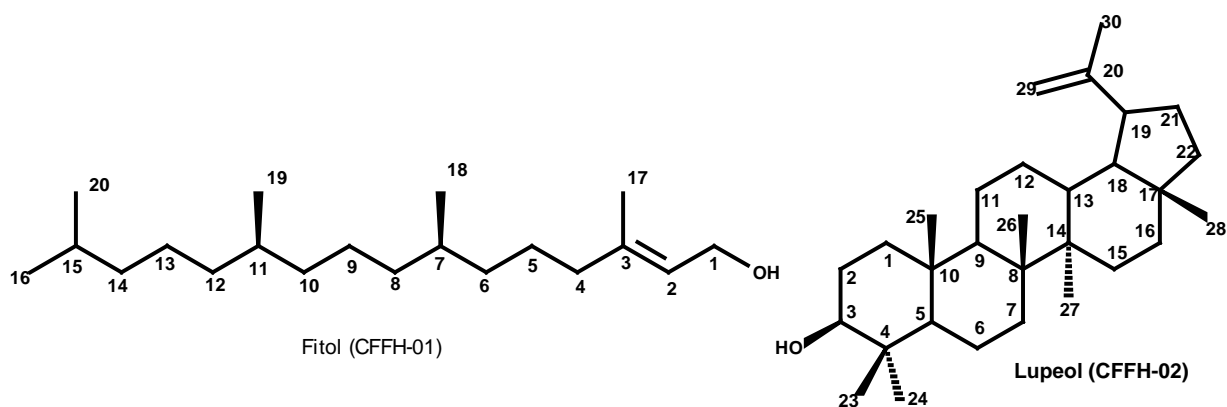


Figura 95 - Espectro de massas da substância fitol (CFFH-01)



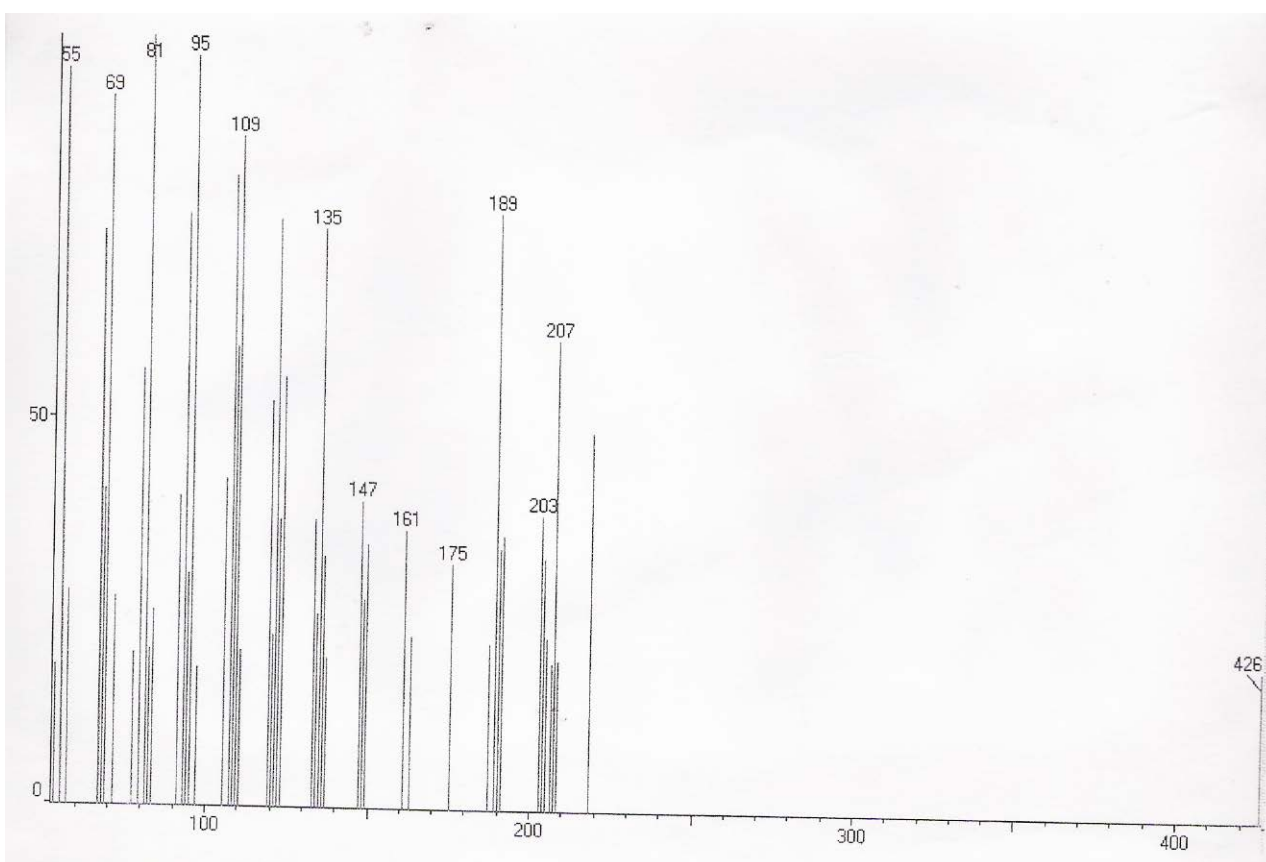
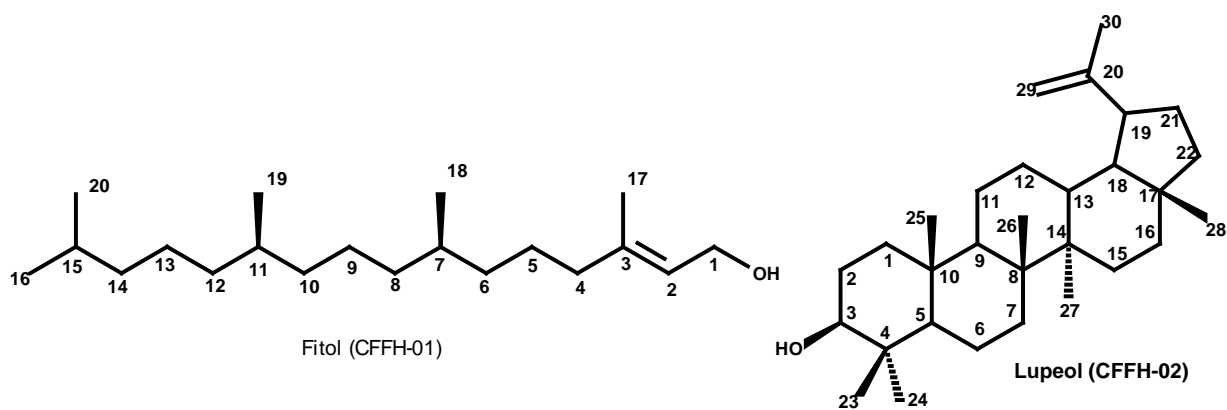


Figura 96 - Espectro de massas da substância lupeol (CFFH-02)

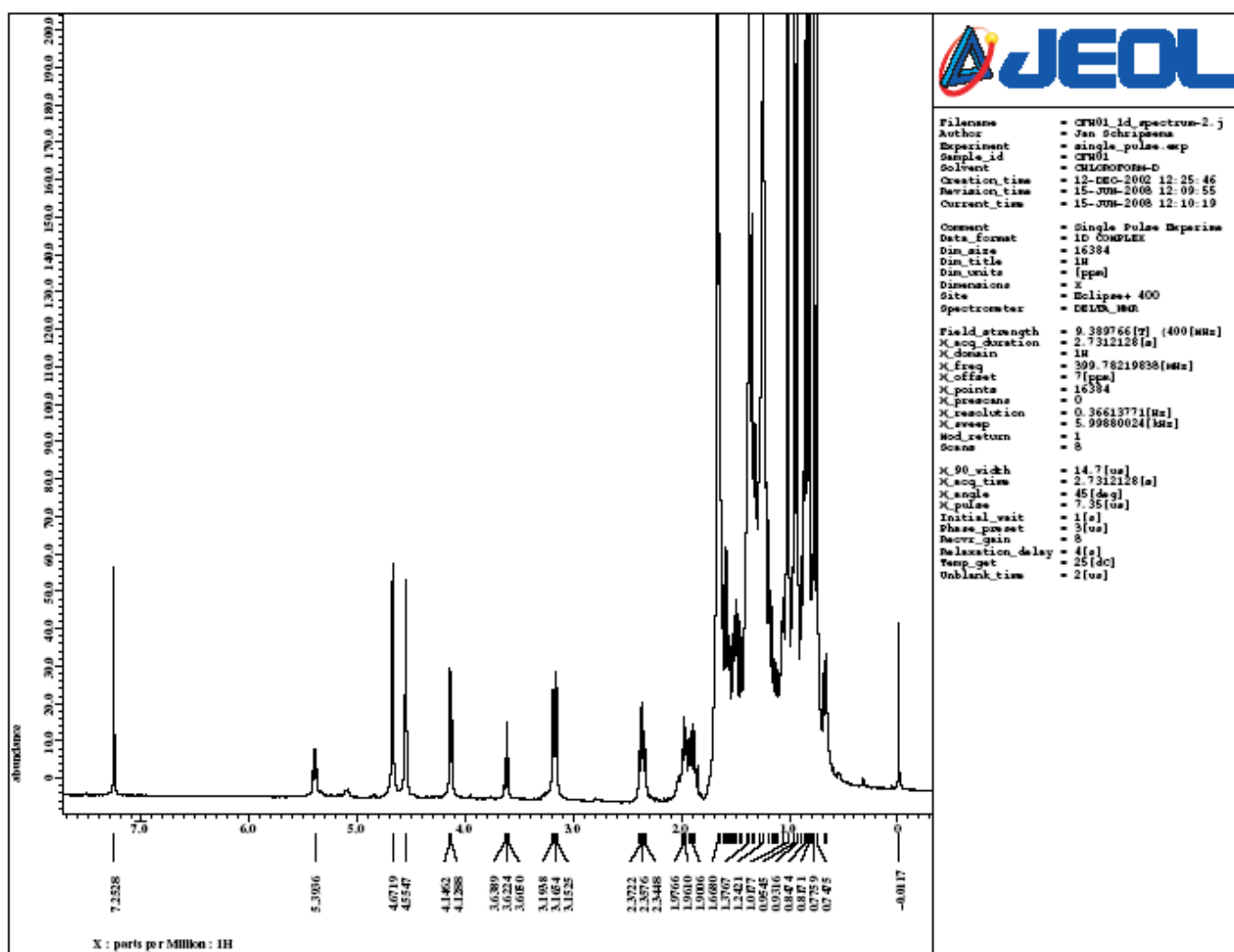
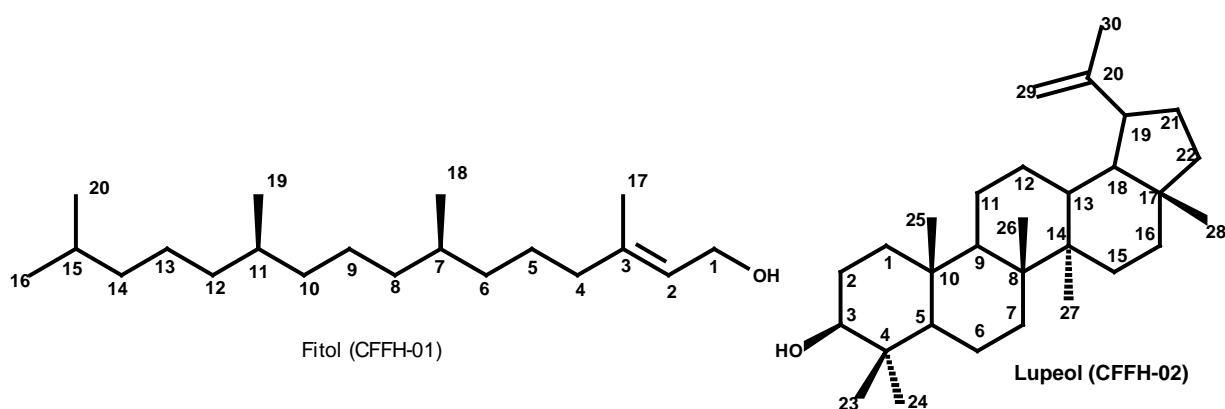
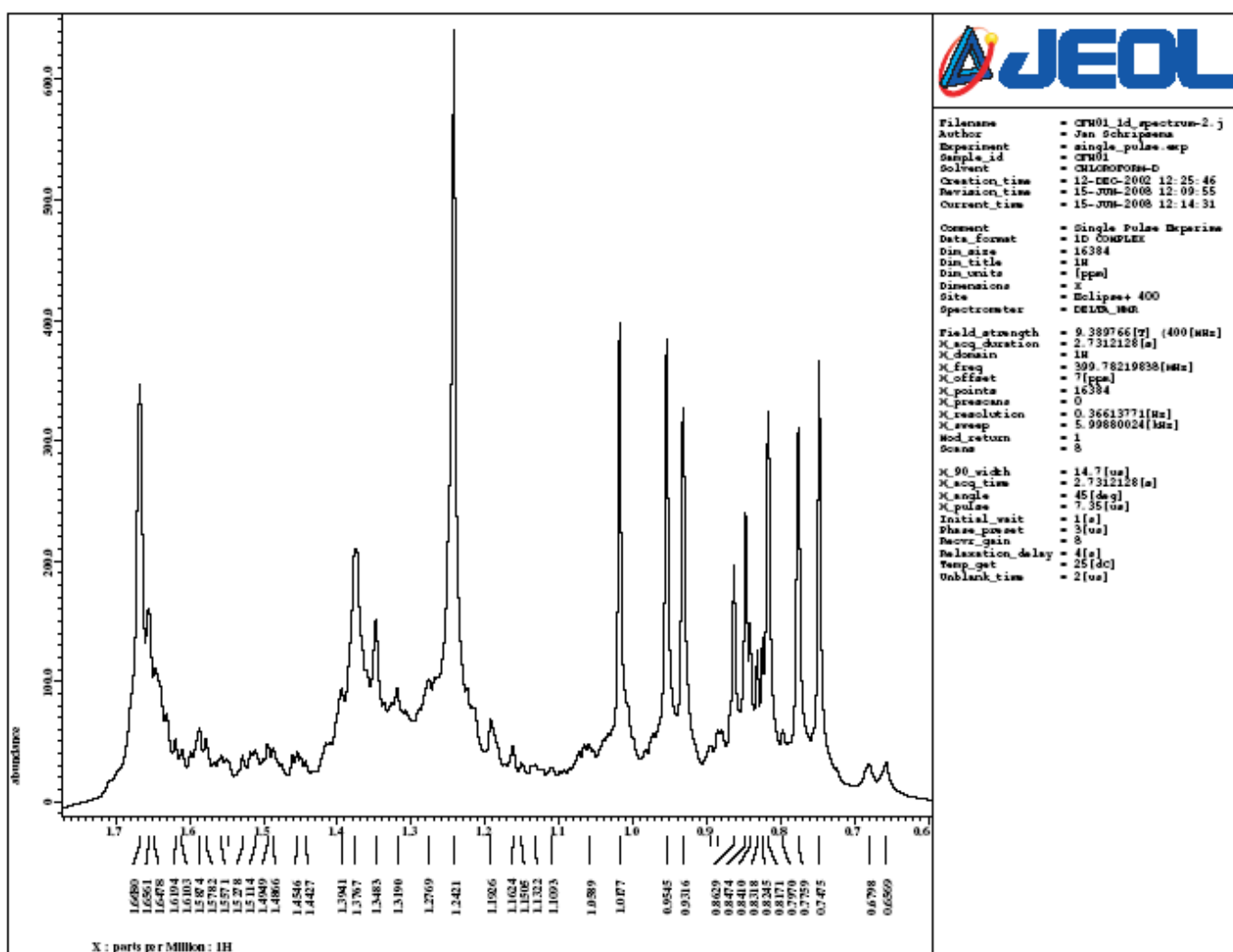
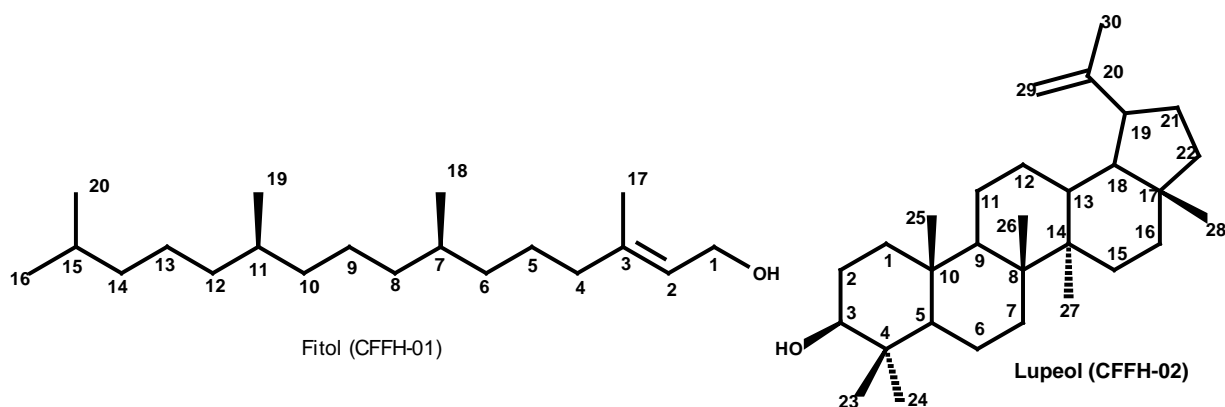


Figura 97 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias fitol (CFFH-01) e lupeol (CFFH-02)



**Figura 98** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura do diterpeno **CFFH-01** e do triterpeno **CFFH-02** (região 0,6 – 1,8 ppm)

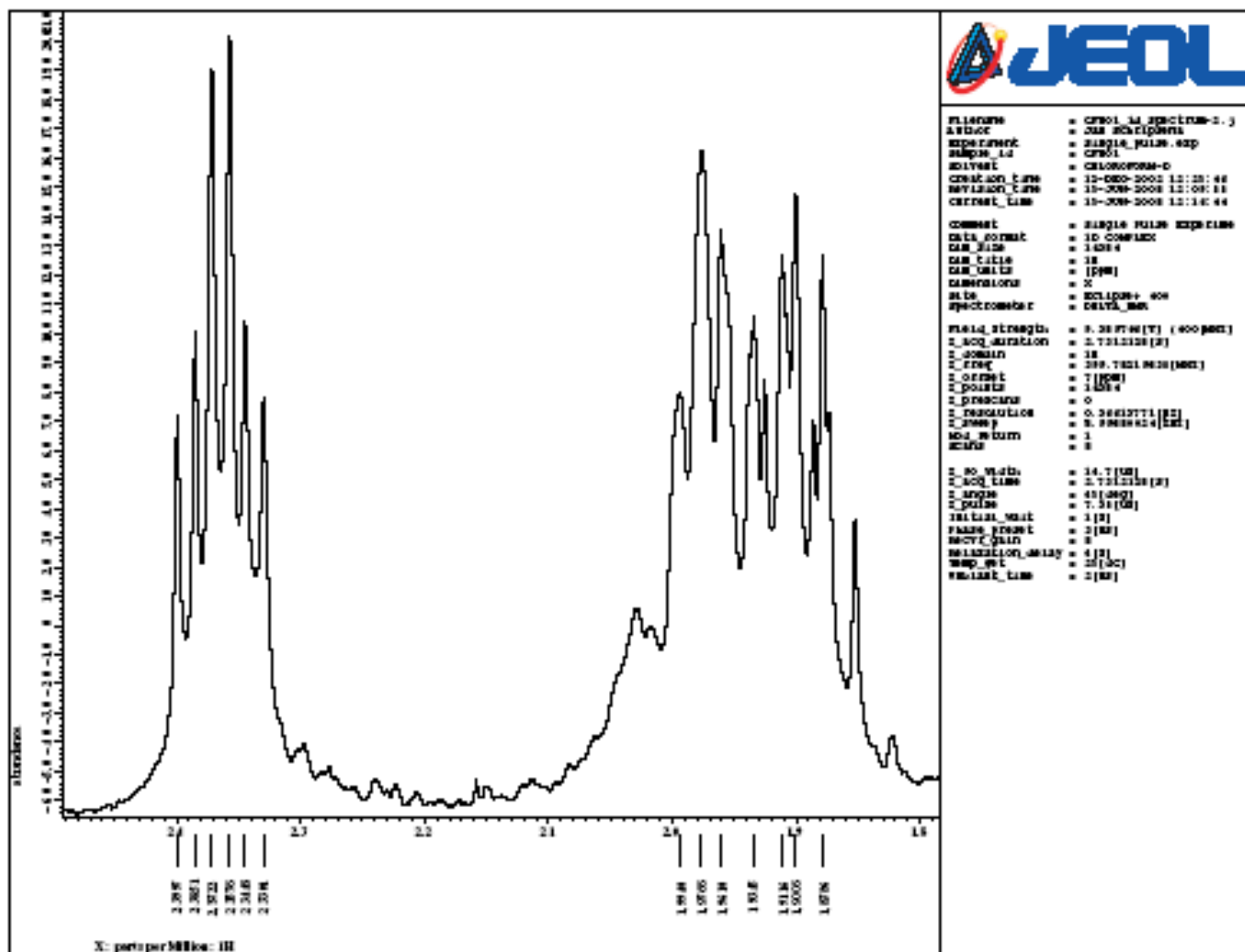
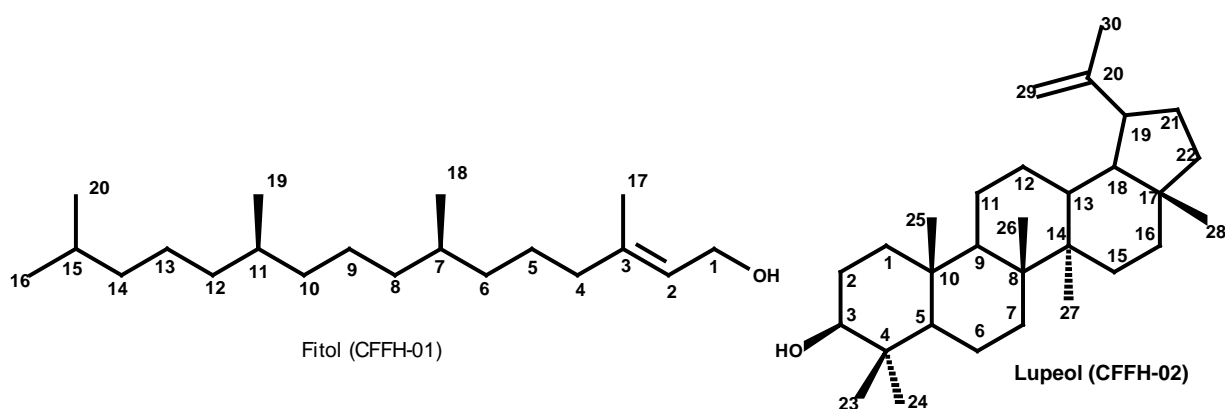
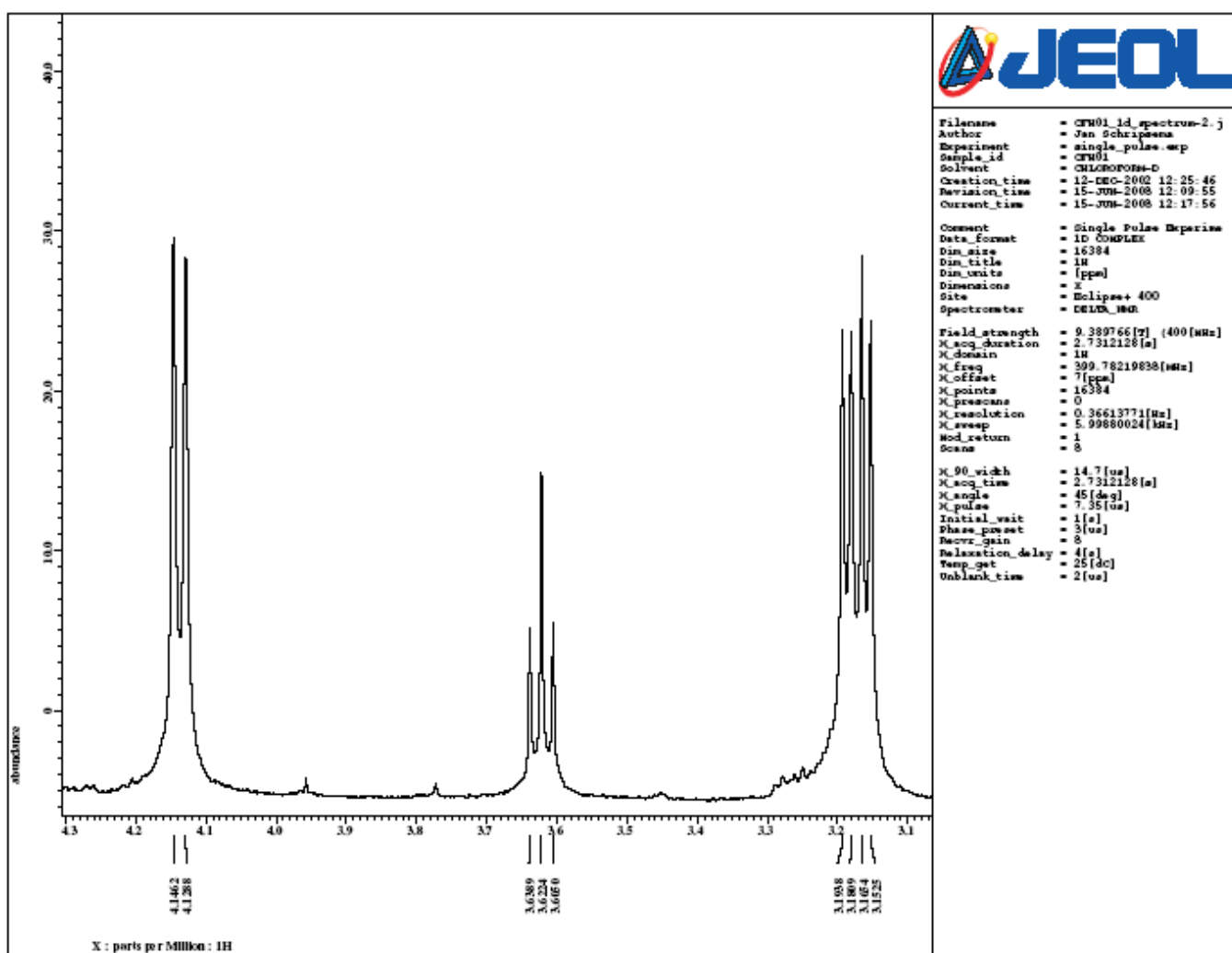
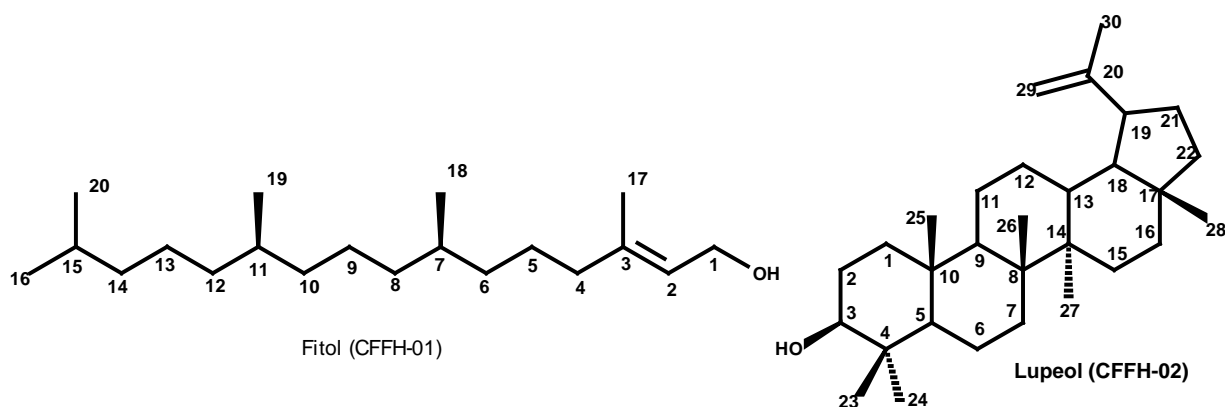


Figura 99 – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura do diterpene **CFFH-01** e do triterpene **CFFH-02** (região 1,8 – 3,3 ppm)



**Figura 100** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura do diterpene **CFFH-01** e do triterpene **CFFH-02** (região 3,1 – 4,3 ppm)

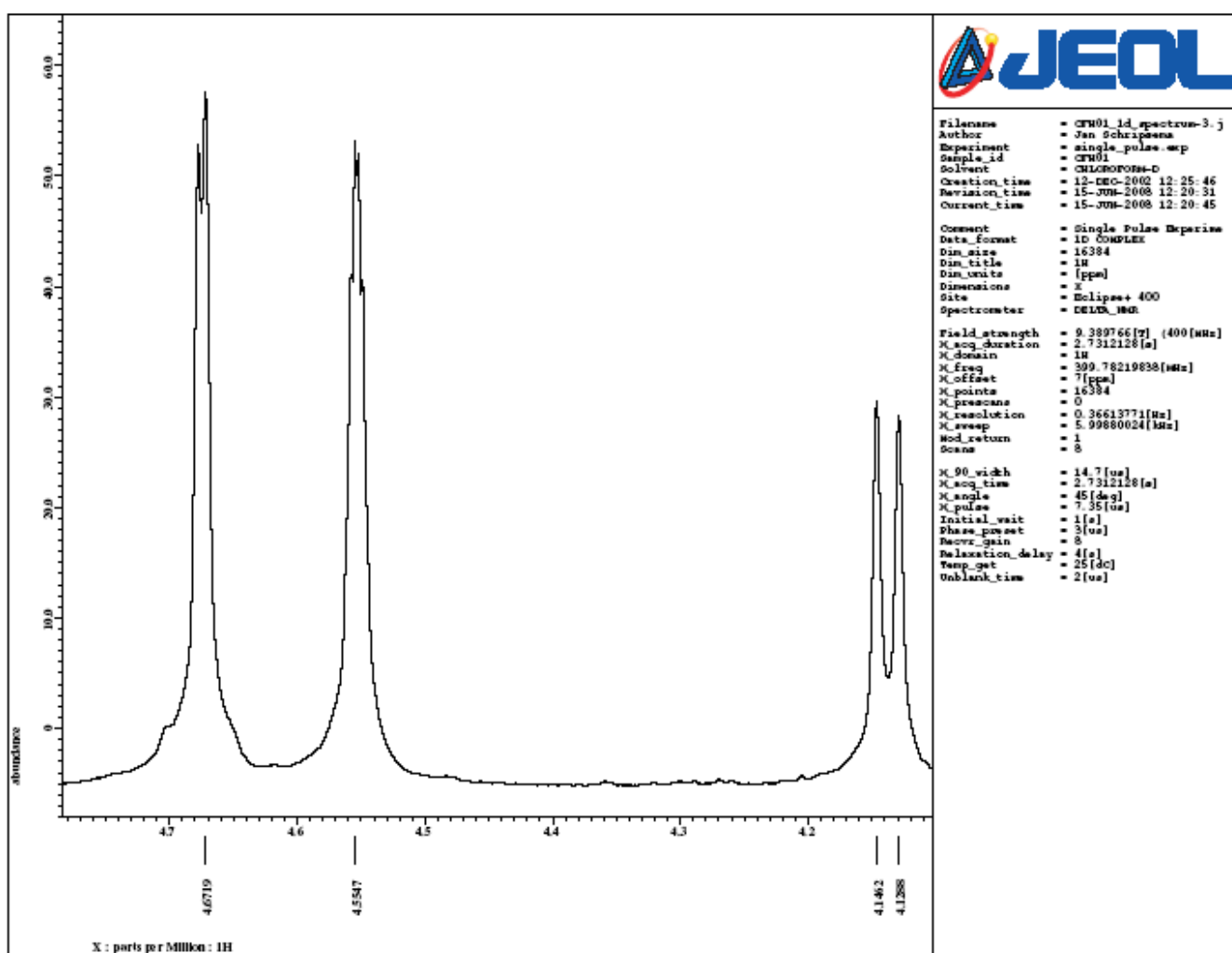
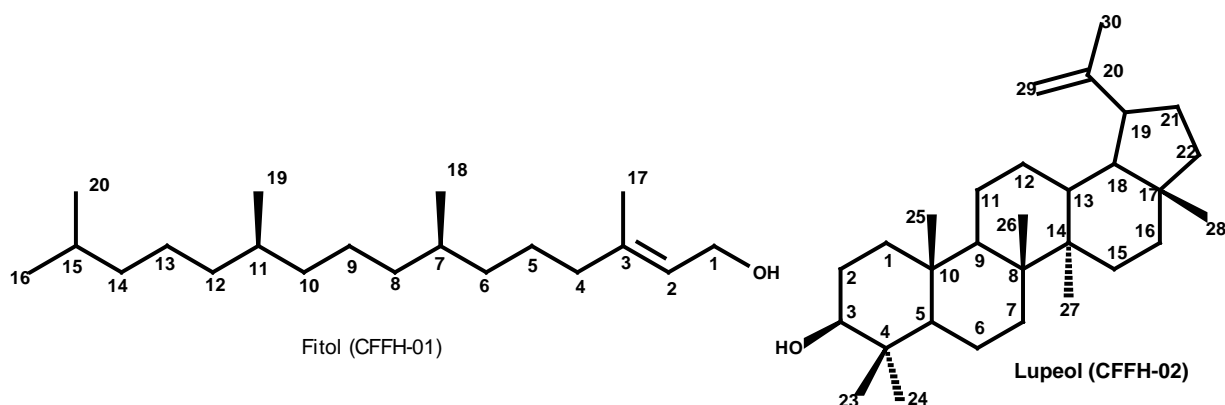
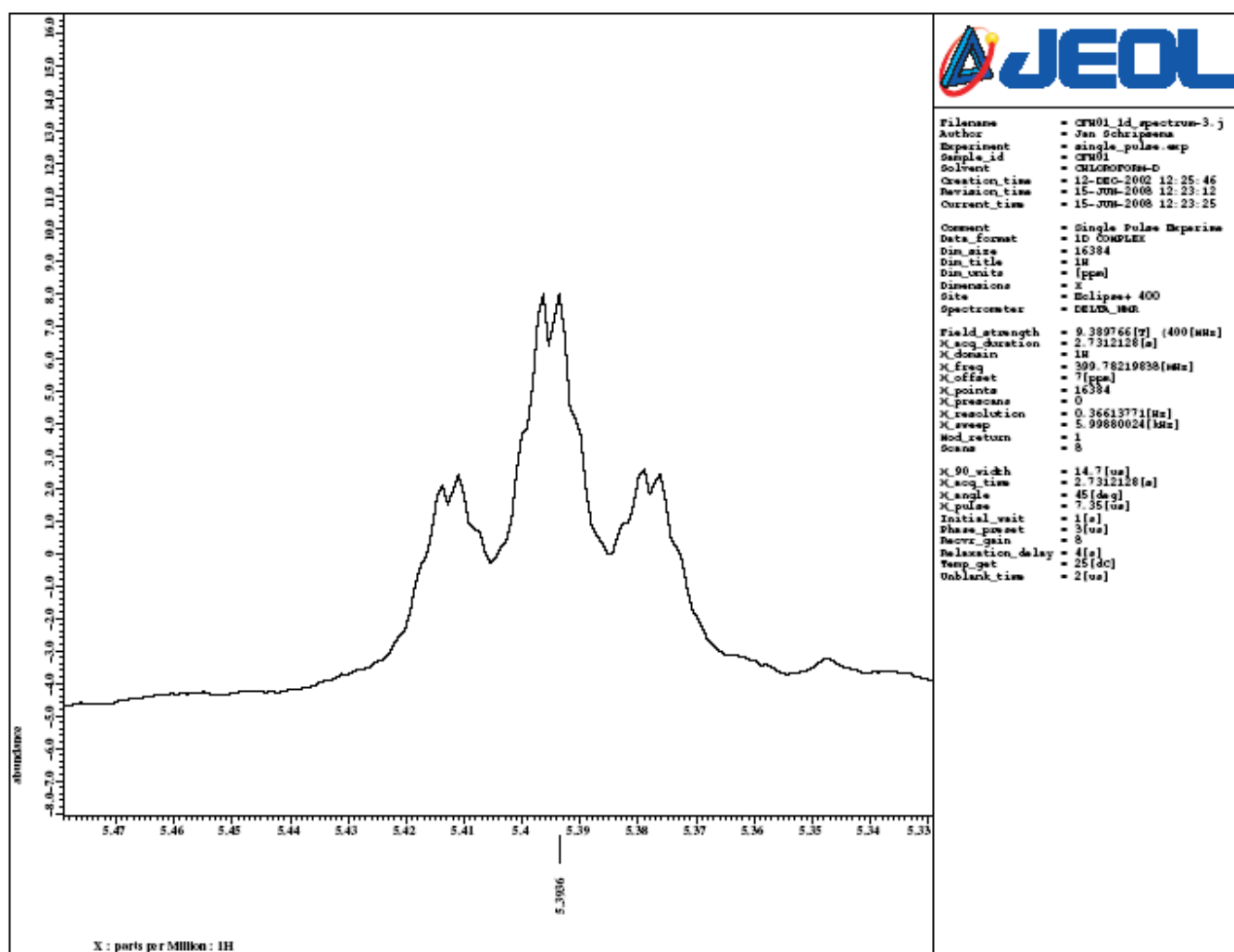
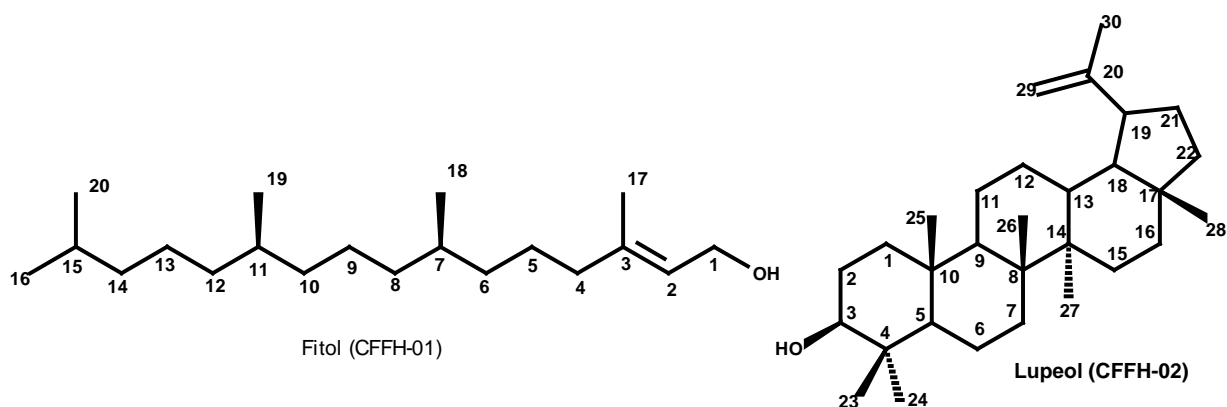


Figura 101 – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura do diterpeno **CFFH-01** e do triterpeno **CFFH-02** (região 4,1 – 4,8 ppm)



**Figura 102** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura do diterpeno **CFFH-01** e do triterpeno **CFFH-02** (região 5,3 – 5,5 ppm)

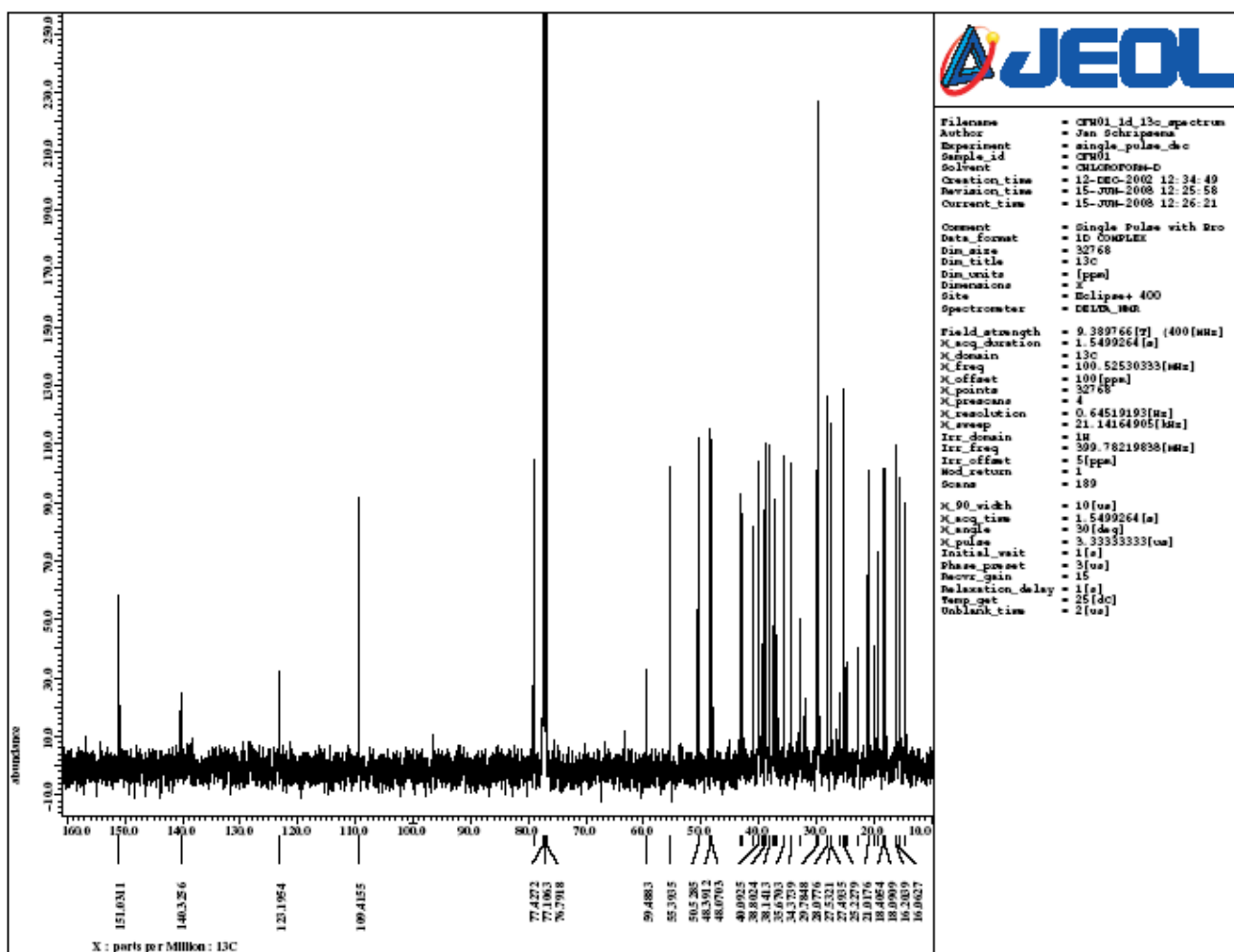
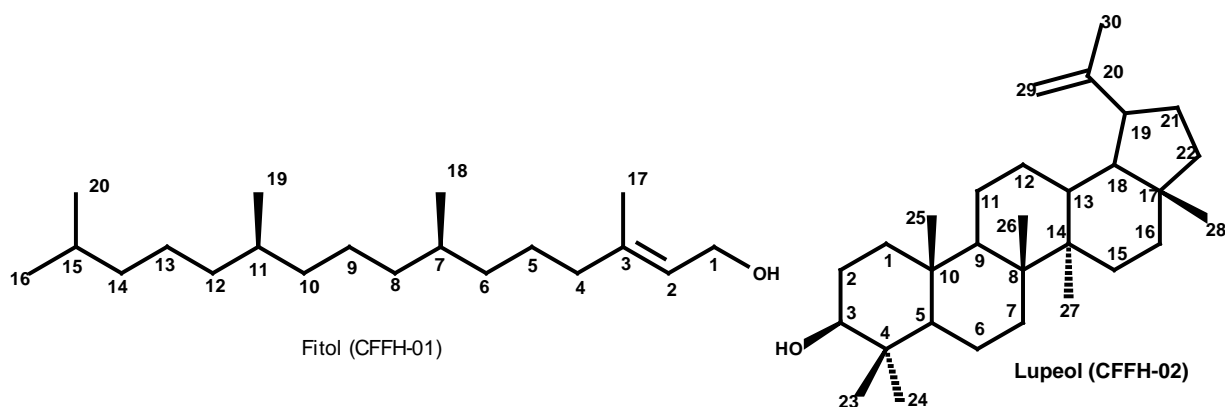


Figura 103 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura do diterpeno **CFFH-01** e do triterpeno **CFFH-02**



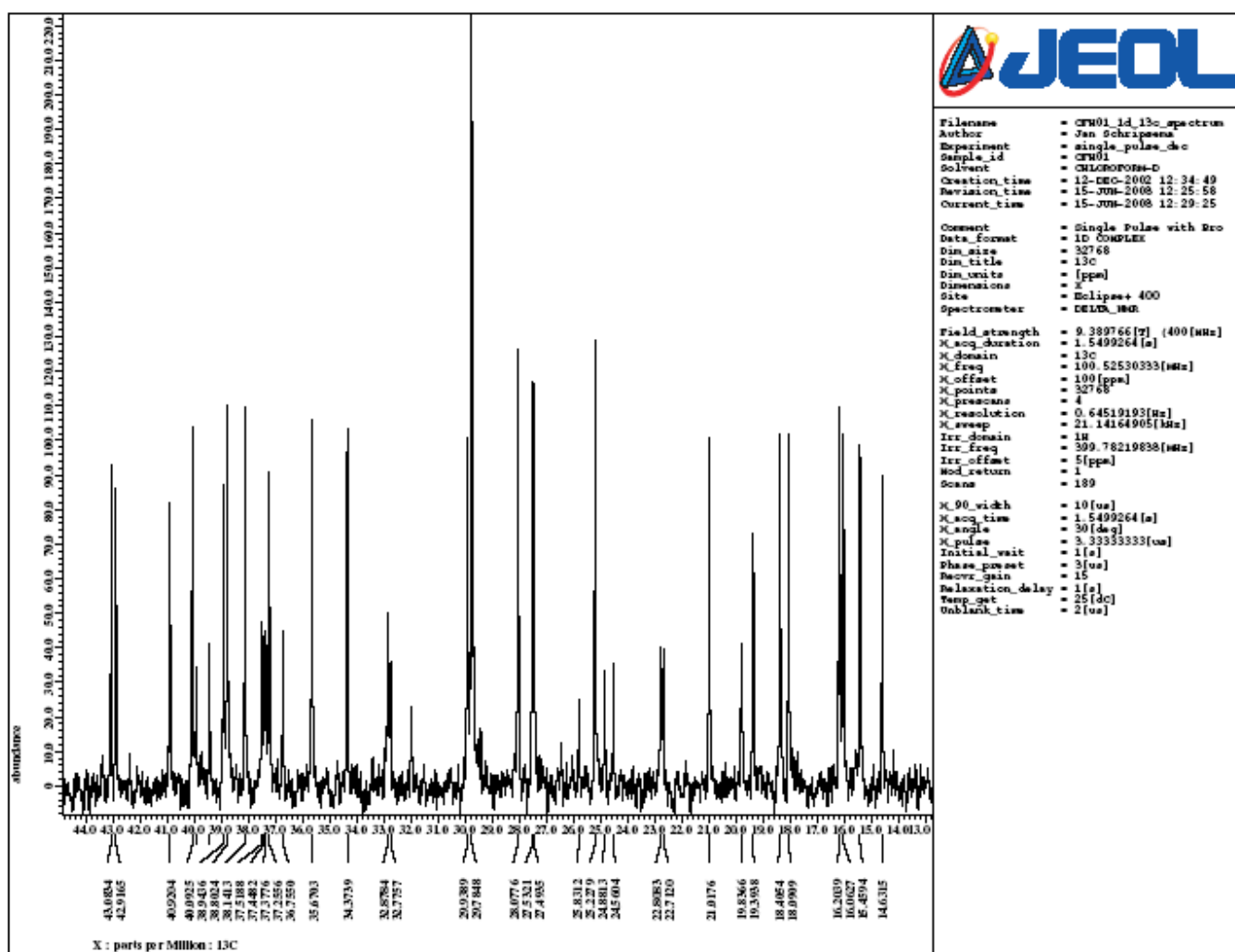
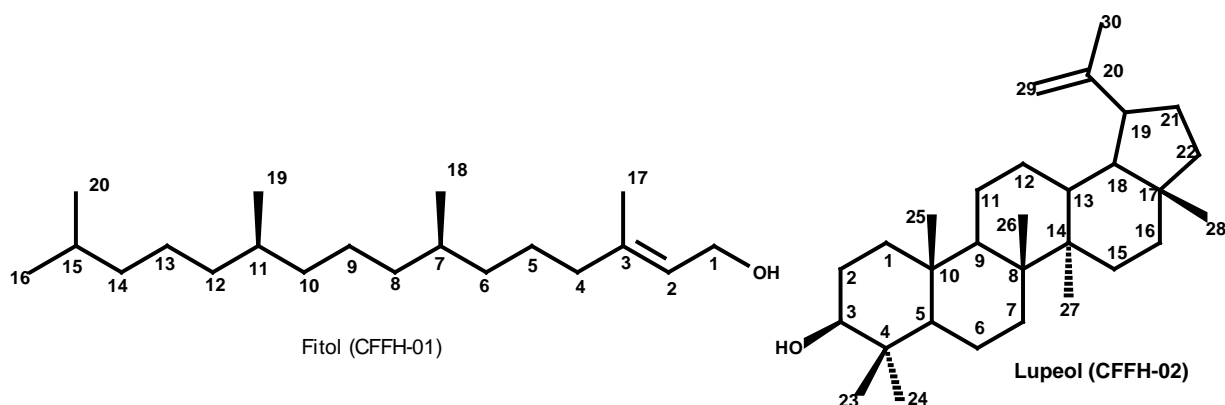


Figura 104 – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura do diterpene CFFH-01 e do triterpene CFFH-02 (região 13 – 44 ppm)

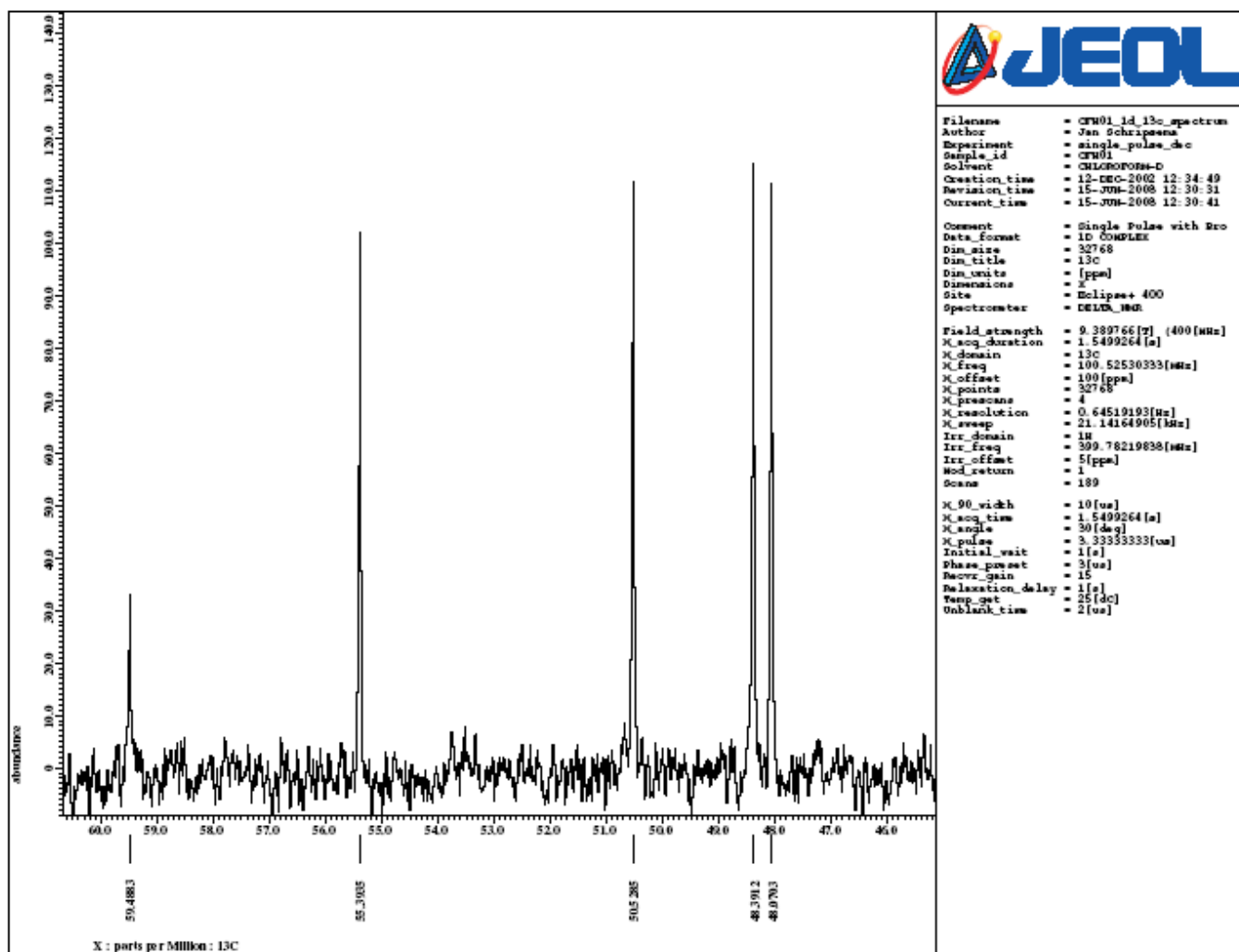
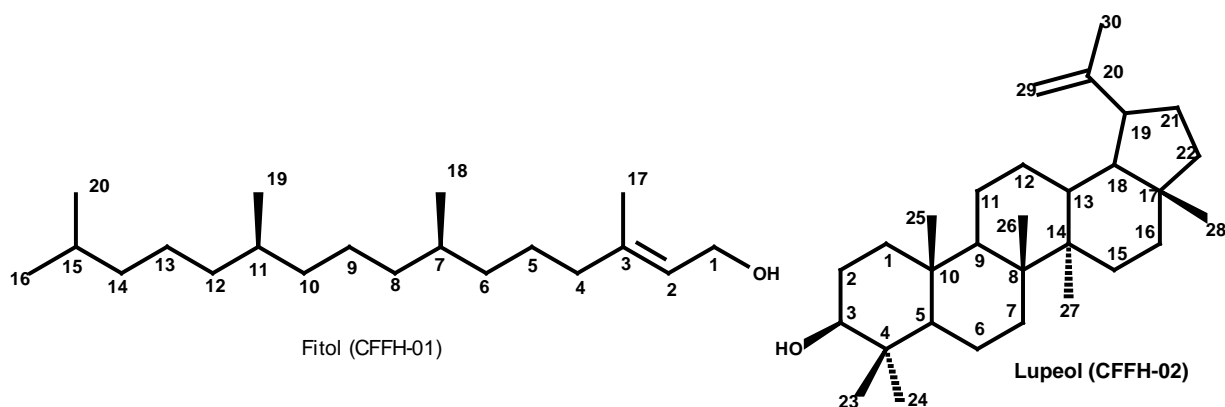
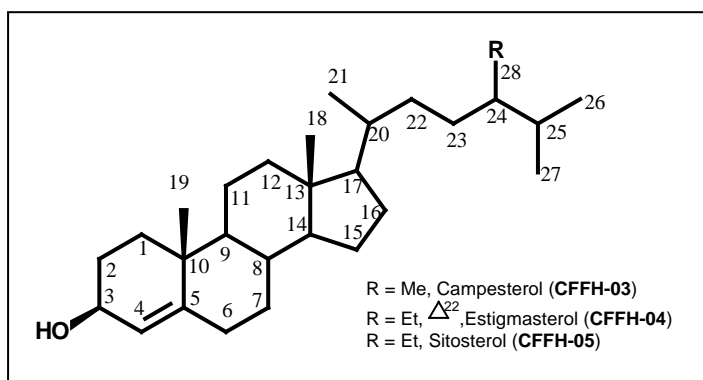


Figura 105 – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura do diterpene **CFFH-01** e do triterpene **CFFH-02** (região 46 – 60 ppm)

### 6.2.2. MISTURA DOS ESTERÓIDES CFFH-03, CFFH-04 E CFFH-05



Os fitoesteróides são freqüentemente encontrados dentro do reino vegetal, sendo que os mais comuns dentro desta classe de substâncias são o estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol. No entanto, quase sempre estas substâncias ocorrem em misturas devido às suas semelhanças estruturais, dificultando desse modo sua separação através de técnicas cromatográficas usuais. Sendo assim, na maioria das vezes, a identificação dessas substâncias quando misturadas é realizada através da análise de dados obtidos utilizando-se as técnicas de cromatografia de gás acoplada ao espectrômetro de massas e espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono-13.

O cromatograma de gás apresentou três picos com tempo de retenção  $t_{R1}$  = 17,5 min (4,5%),  $t_{R2}$  = 18,0 min (12,9 %) e  $t_{R3}$  = 19,0 min (82,5 %) (**Figura 106**, p. 151), A análise dos fragmentogramas no CG-EM obtidos a partir de cada pico permitiu identificar  $t_{R1}$  como sendo o campesterol (CFFH-03,  $m/z$  = 400),  $t_{R2}$  como sendo o estigmasterol (CFFH-04,  $m/z$  = 412 e  $t_{R3}$  como sendo o sitosterol (CFFH-05,  $m/z$  = 412) respectivamente (**Figura 107.**, p. 152; **Figura 108**, p. 153 e **Figura 109**, p. 154).

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 110**, p. 155) da mistura de fitoesteróides evidenciou um duplete de linhas largas em  $\delta_{\text{H}}$  5,35, relativo ao hidrogênio H-6; um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,52 relativo ao hidrogênio H-3 e ainda um grande acúmulo de sinais intensos na região de  $\delta_{\text{H}}$  2,28 a 0,68, relativos aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

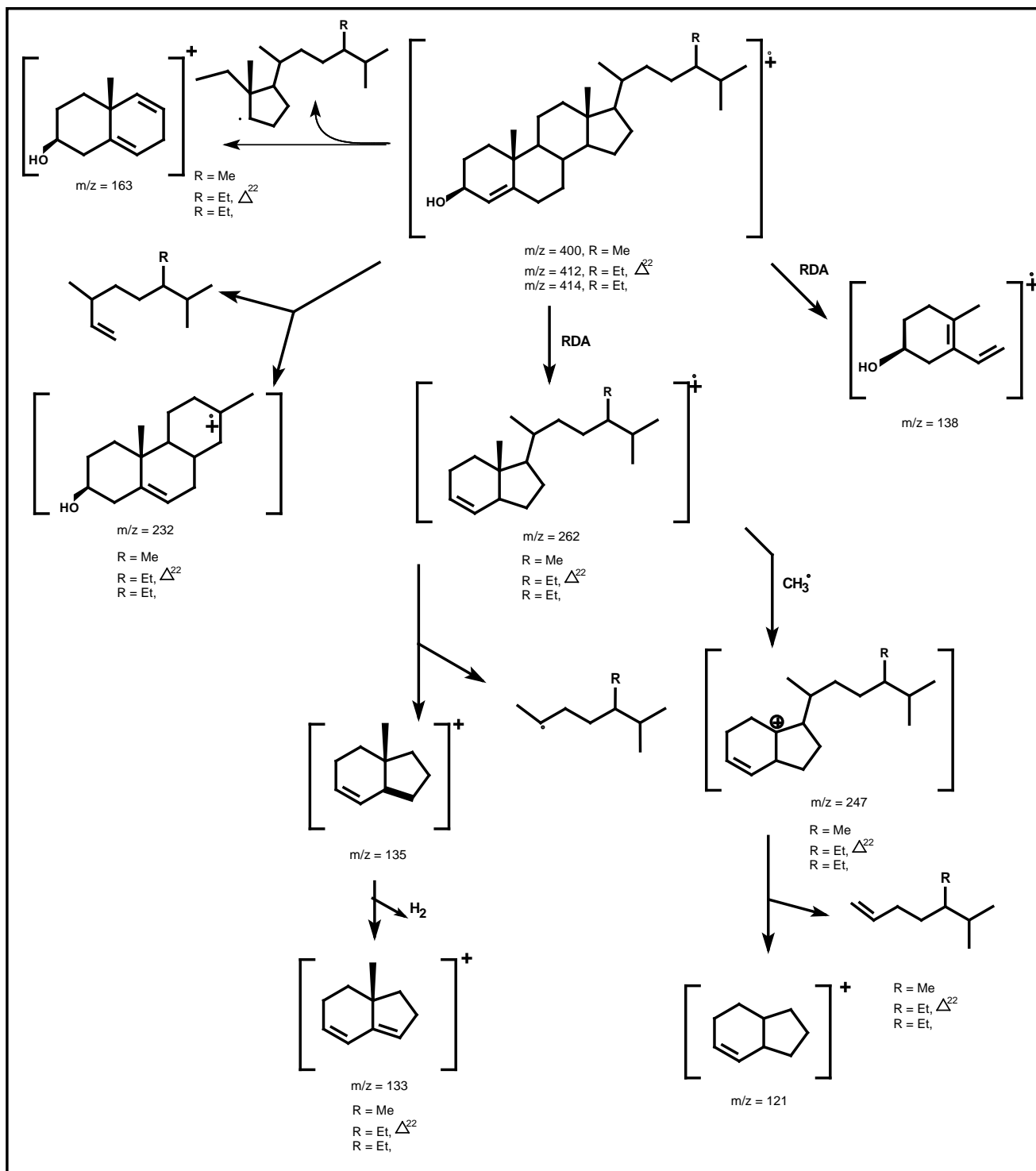
Campesterol e sitosterol apresentam grande semelhança estrutural (com exceção de um grupo metilênico a menos no átomo de carbono C-24 da cadeia lateral), que mostra uma grande semelhança nos seus espectros de RMN  $^1\text{H}$ , porém a identificação da presença do estigmasterol é possível observando-se as absorções dos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral em  $\delta_{\text{H}}$  5,03 (*dd*,  $J=8,8$  e  $15,4$  Hz, H-22) e 5,14 (*dd*,  $J=8,8$  e  $15,2$  Hz, H-23).

Outros sinais relativos ao campesterol aparecem em  $\delta_{\text{H}}$  [5,03 (*dd*,  $J=8,8$  e  $15,4$  Hz, H-22) e 5,14 (*dd*,  $J=8,8$  e  $15,2$  Hz, H-23)] relativas aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral.

A distinção entre o  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol foi evidenciada através da análise dos sinais observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 115**, p. 160.) em  $\delta_{\text{C}}$  121,70 e 140,80 (**C-6** e **C-5**) de ambas as estruturas e  $\delta_{\text{C}}$  129,30 e 138,29 (**C-23** e **C-22**), presentes apenas no estigmasterol (Seo *et. al.*, 1988).

Desse modo, os dados fornecidos pelos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , aliados a comparação com dados existentes na literatura (Breitmaier & Voelter, 1987) foi possível à atribuição dos sinais de cada esteróide com bastante coerência. Sendo assim, a **Tabela 12** (p. 150) resume os deslocamentos químicos atribuídos a cada fitoesteróides presentes na mistura.

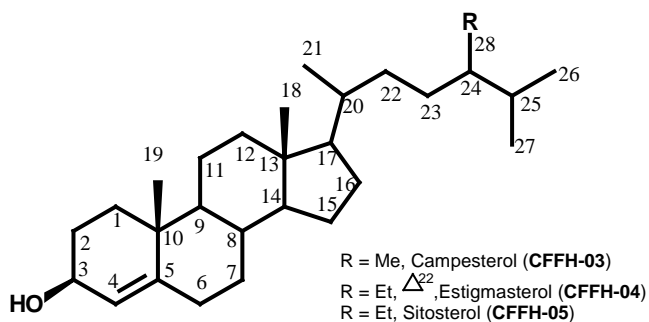
**Esquema 03 - Proposta de fragmentação para as substâncias CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (Ogunkoya, 1981; Muccino & Djerassi, 1974)**



**Tabela 12** - Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da substância **CFFH-03**, **CFFH-04** e **CFFH-05**, em  $\text{CDCl}_3$ . Deslocamentos químicos  $\delta_{\text{C}}$  (em ppm).

Carbono	CFFH-03	Literatura*	CFFH-04	Literatura*	CFFH-05	Literatura*
1		37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
2		31,9	31,9	31,9	31,9	31,9
3		71,8	71,8	71,8	71,8	71,8
4		42,2	42,3	42,2	42,3	42,4
5		140,7	140,8	140,7	140,8	140,7
6		121,7	121,7	121,7	121,7	212,7
7		33,9	34,0	33,9	34,0	33,9
8		31,9	31,9	31,9	31,9	31,9
9		50,1	50,2	50,1	50,2	50,1
10		36,1	36,2	36,1	36,5	36,1
11		21,1	21,1	21,1	21,1	21,1
12		39,8	39,8	39,8	39,8	39,8
13		42,3	42,3	42,3	42,3	42,3
14		56,8	56,8	56,8	56,8	56,8
15		24,3	24,3	24,3	24,3	24,3
16		28,9	28,9	28,9	28,9	28,9
17		56,0	56,1	56,0	56,1	56,0
18		12,3	12,0	12,3	12,0	12,3
19		19,4	19,4	19,4	19,4	19,4
20		37,3	39,8	39,8	39,8	39,8
21		14,1	19,1	20,5	18,8	18,8
22		32,0	138,3	138,3	31,9	32,0
23		31,6	129,3	129,3	26,2	26,0
24		45,8	50,2	51,2	45,9	45,8
25		31,9	31,7	31,9	29,7	29,0
26		21,2	21,2	21,2	19,8	19,8
27		20,2	19,8	19,8	19,8	19,8
28		18,2	25,4	25,4	23,1	23,0
29		-	12,00	-	11,9	-
30		-	37,3	-	37,3	-

\*Seo, *et al.*, 1988

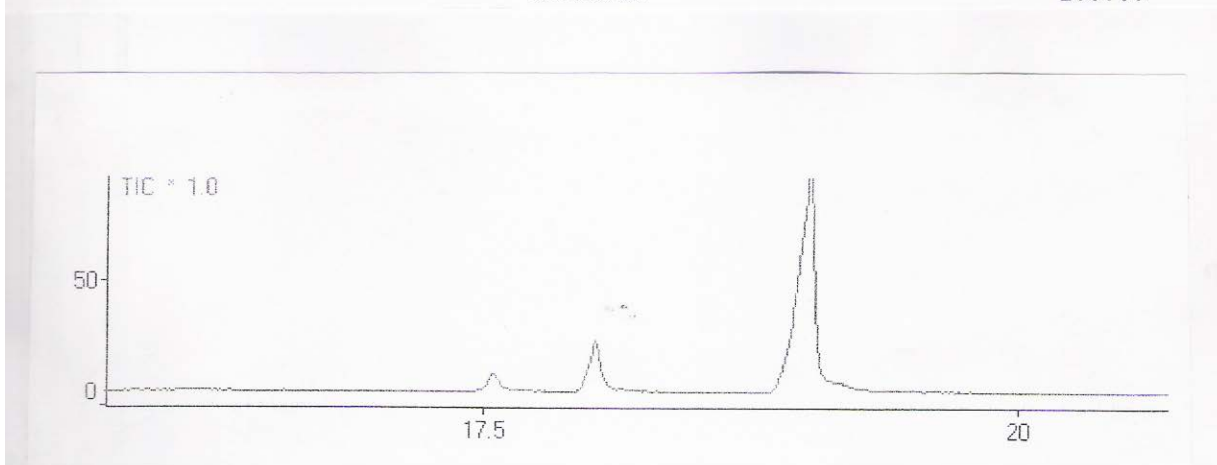


\*\*\* CLASS-5000 \*\*\* Report No. = 1 Data : CFH-03.D01 02/12/11 10:56:11  
 Sample : cfh-03  
 ID :  
 Sample Amount : 1  
 Dilution Factor : 1  
 Type : Unknown  
 Operator : Wallace T C  
 Method File Name : ALK1.MET  
 Vial No. : 1  
 Barcode :

\*\*\*\* Peak Report \*\*\*\*

PKNO	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Height	A/H(sec)	MK	%Total	Name
1	17.550	17.467	17.700	720320	169238	4.256		4.58	
2	18.020	17.908	18.175	2033229	497028	4.091	S	12.93	
3	19.021	18.808	19.350	12976421	2359631	5.499		82.49	

-----  
 Total 15729969 100.00



**Figura 106** – Cromatograma de gás da mistura das substâncias CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05

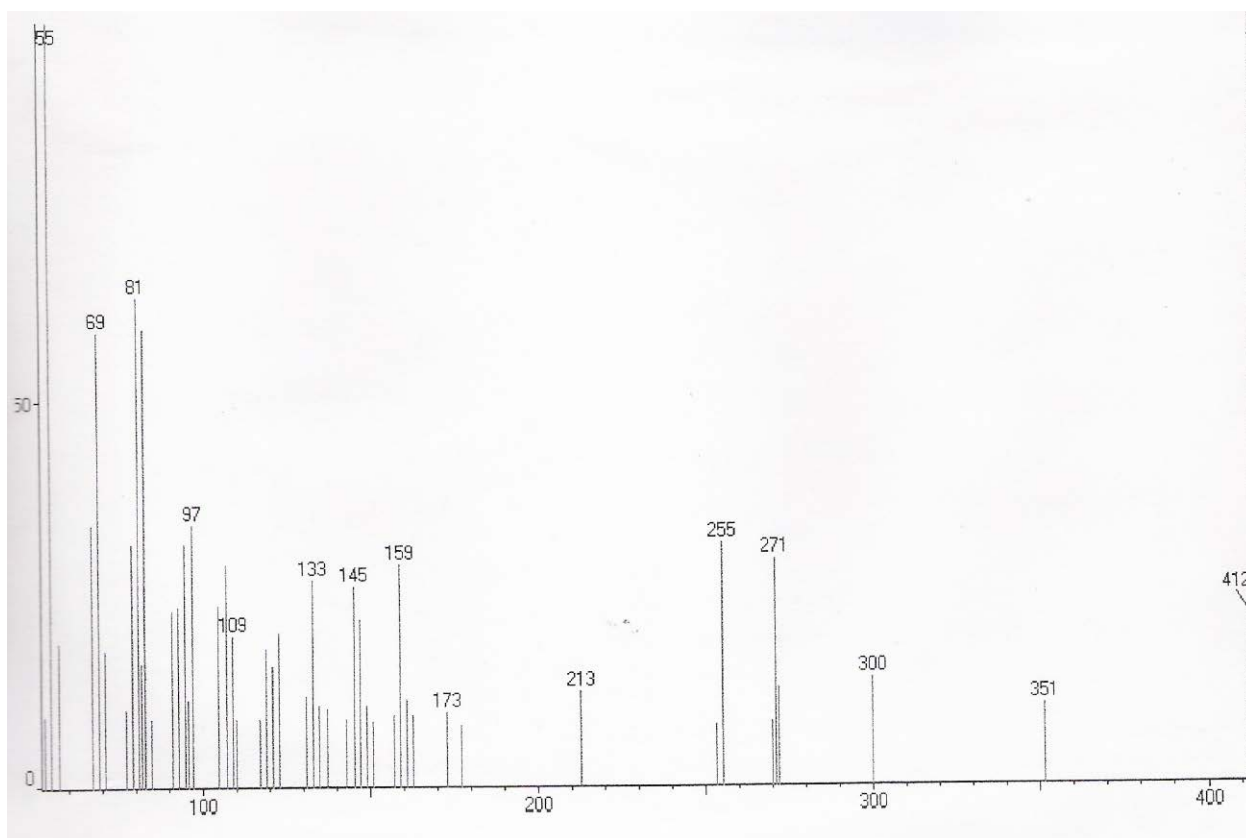
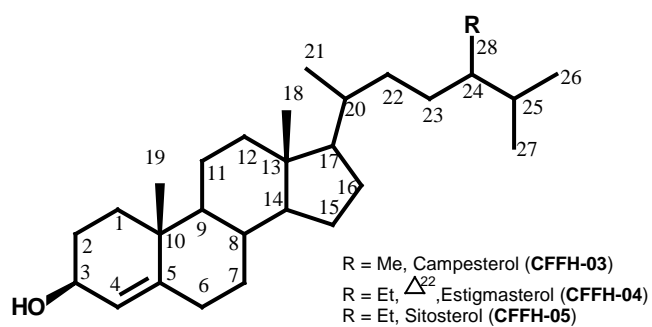


Figura 107 - Espectro de Massas (70 eV) do esteróide CFFH-03



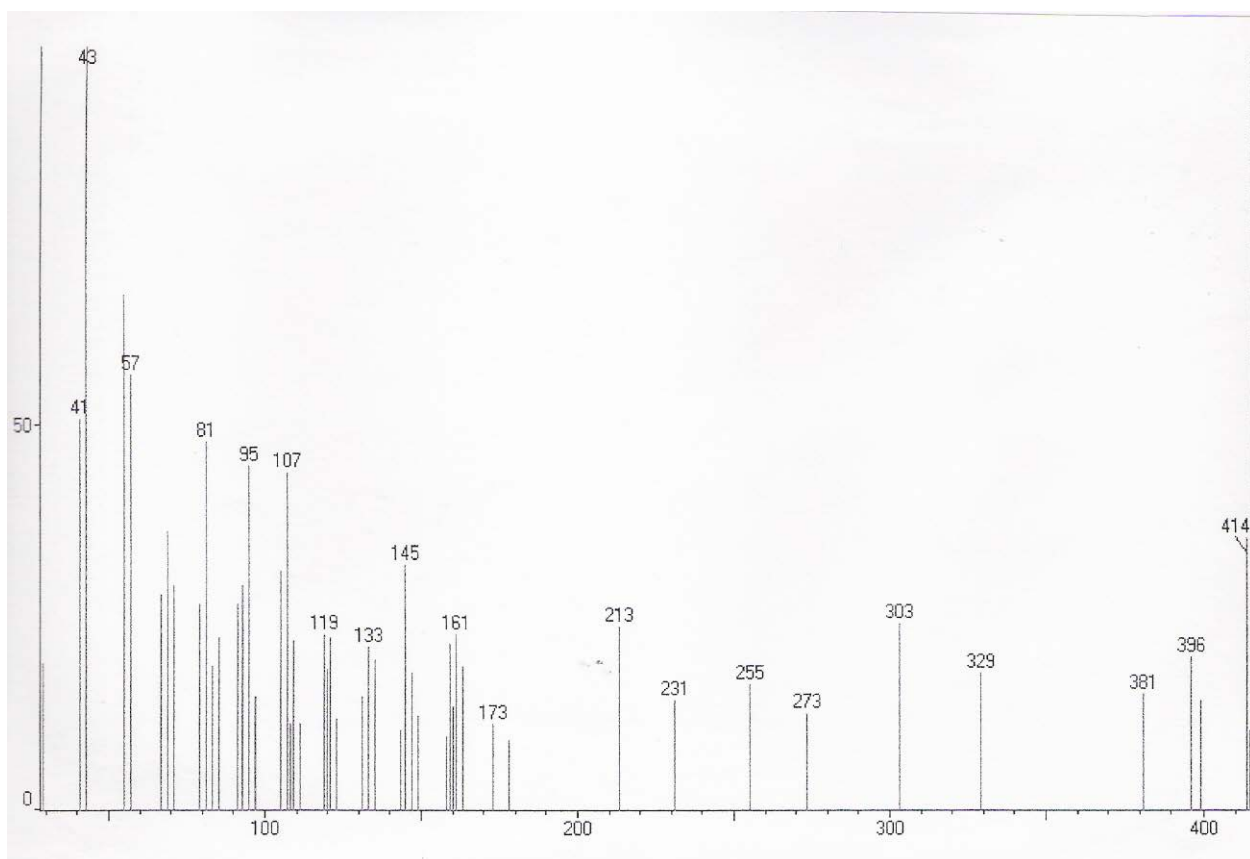
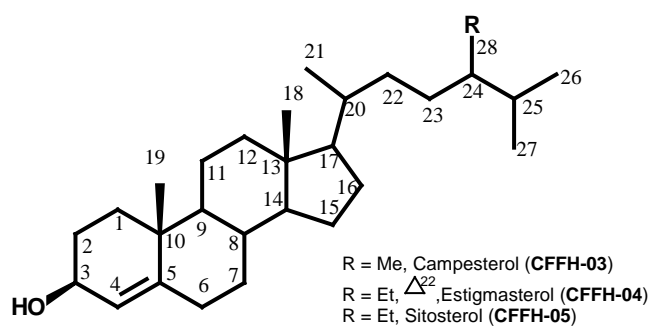


Figura 108 - Espectro de Massas (70 eV) do esteróide CFFH-04

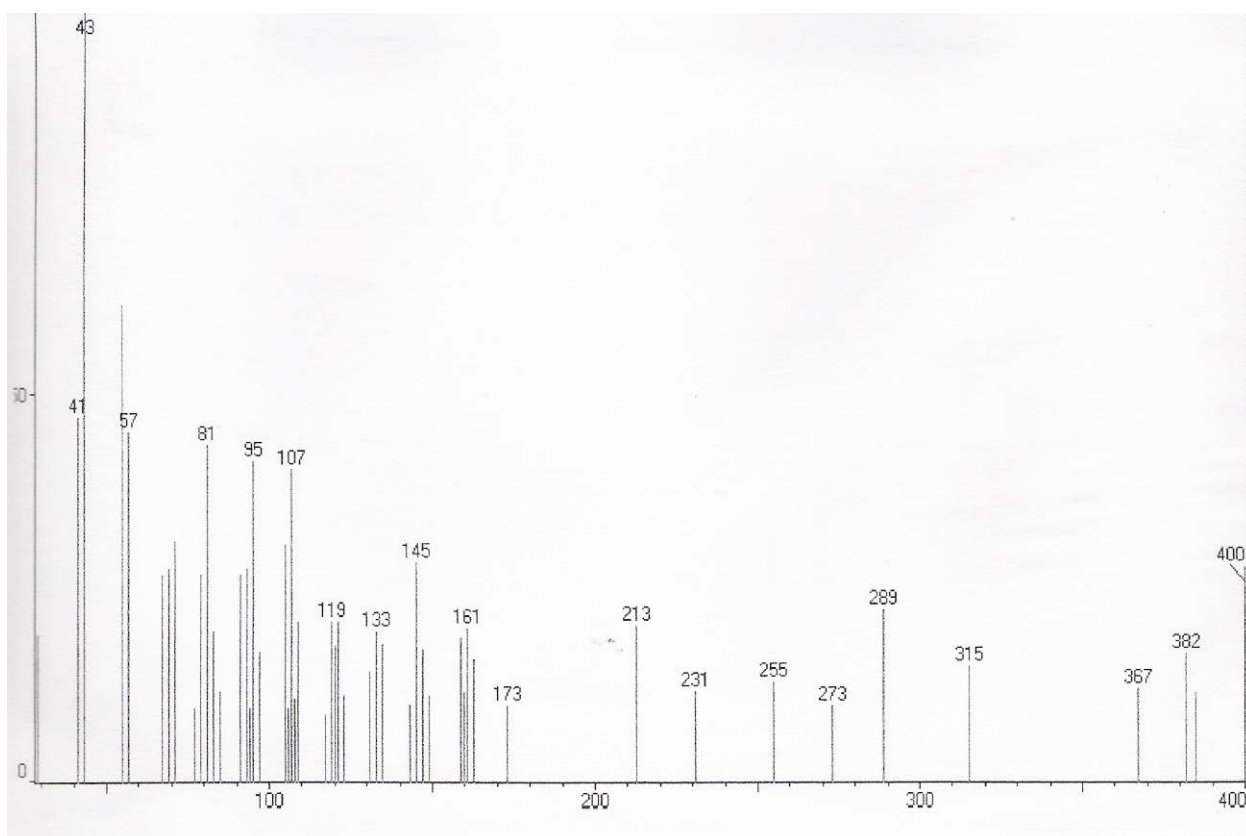
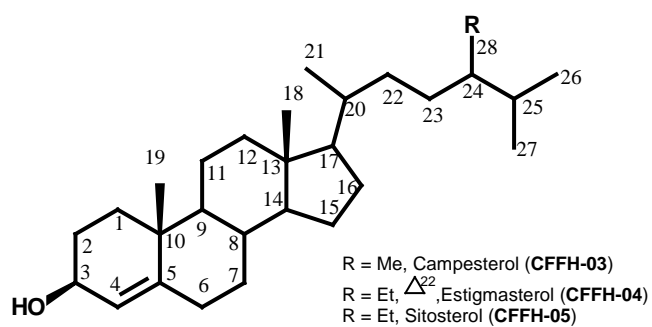


Figura 109 - Espectro de Massas (70 eV) do esteróide CFFH-05

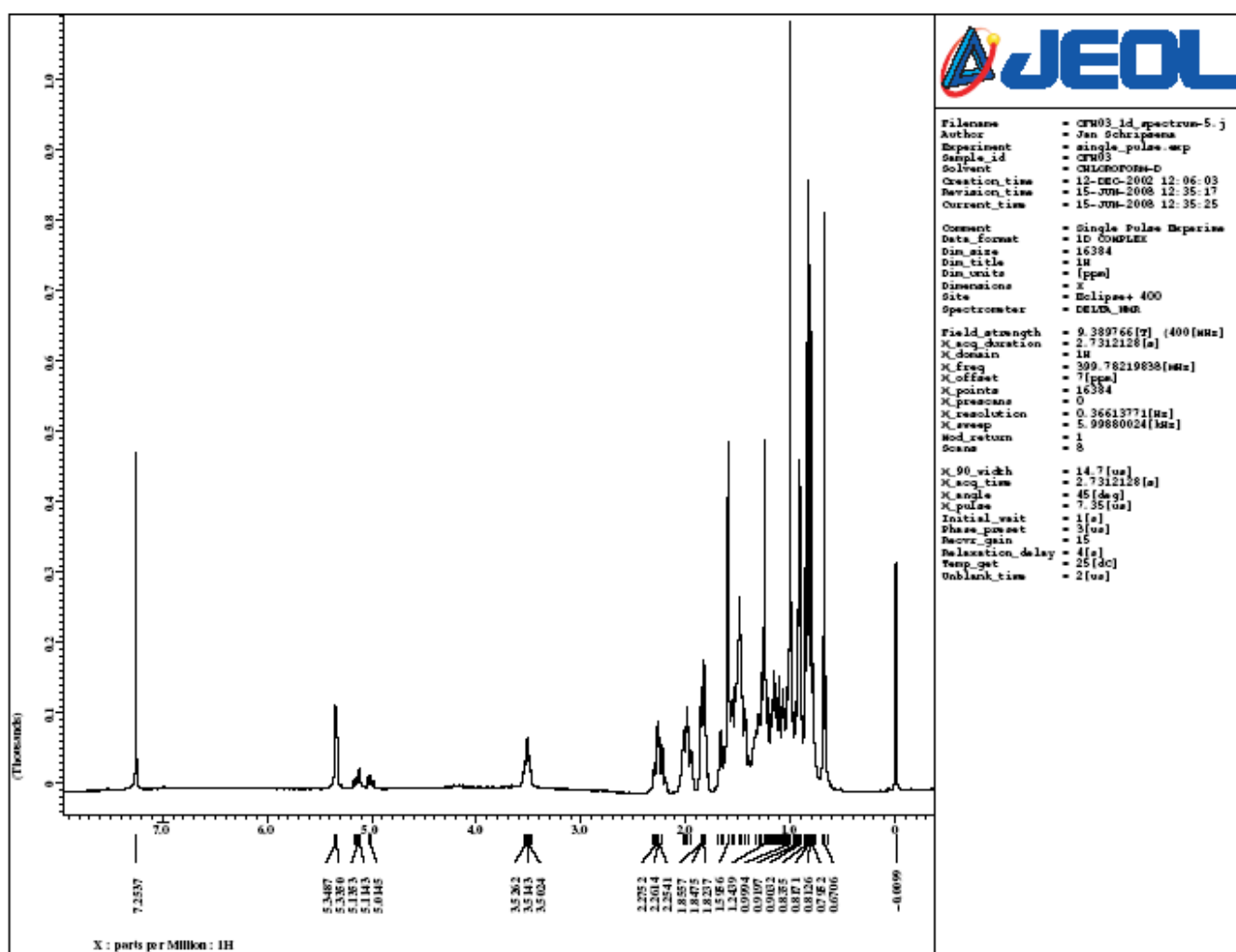
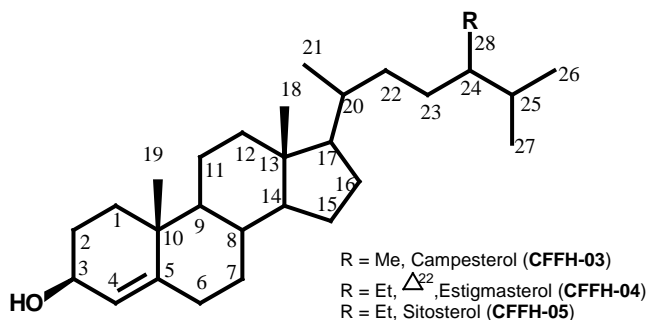


Figura 110 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05

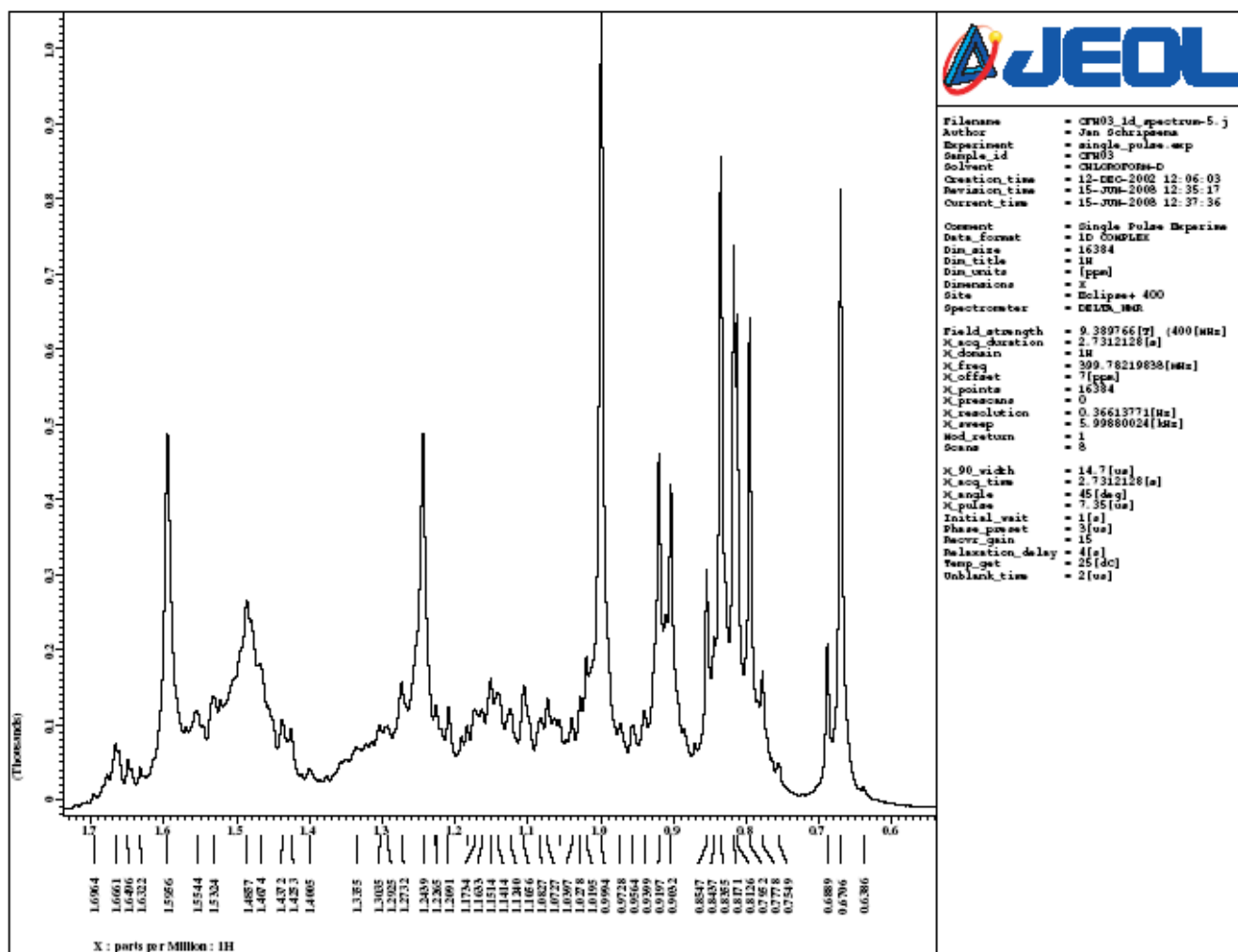
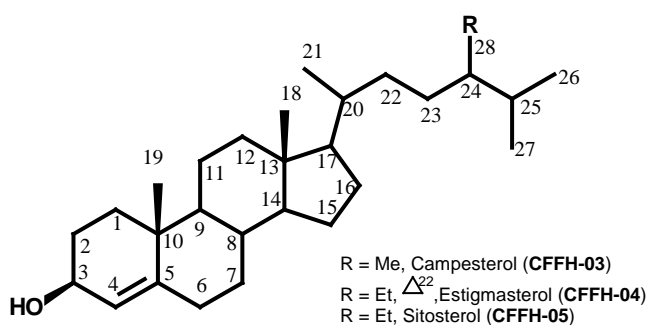


Figura 111 – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 0,6 – 1,7 ppm)

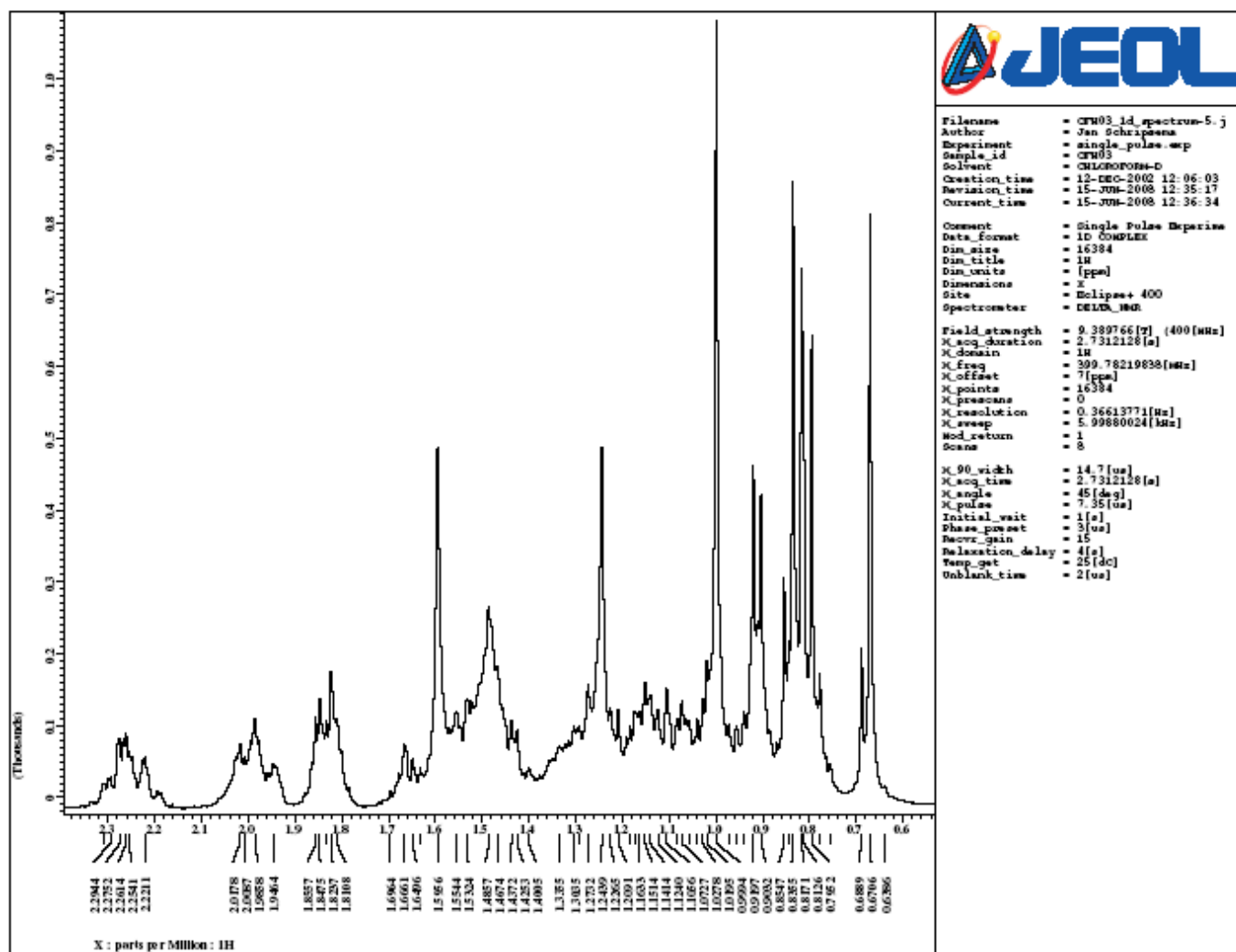
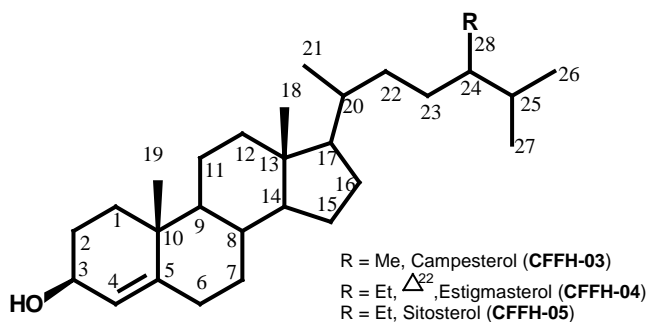


Figura 112 – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 0,6 – 2,3 ppm)

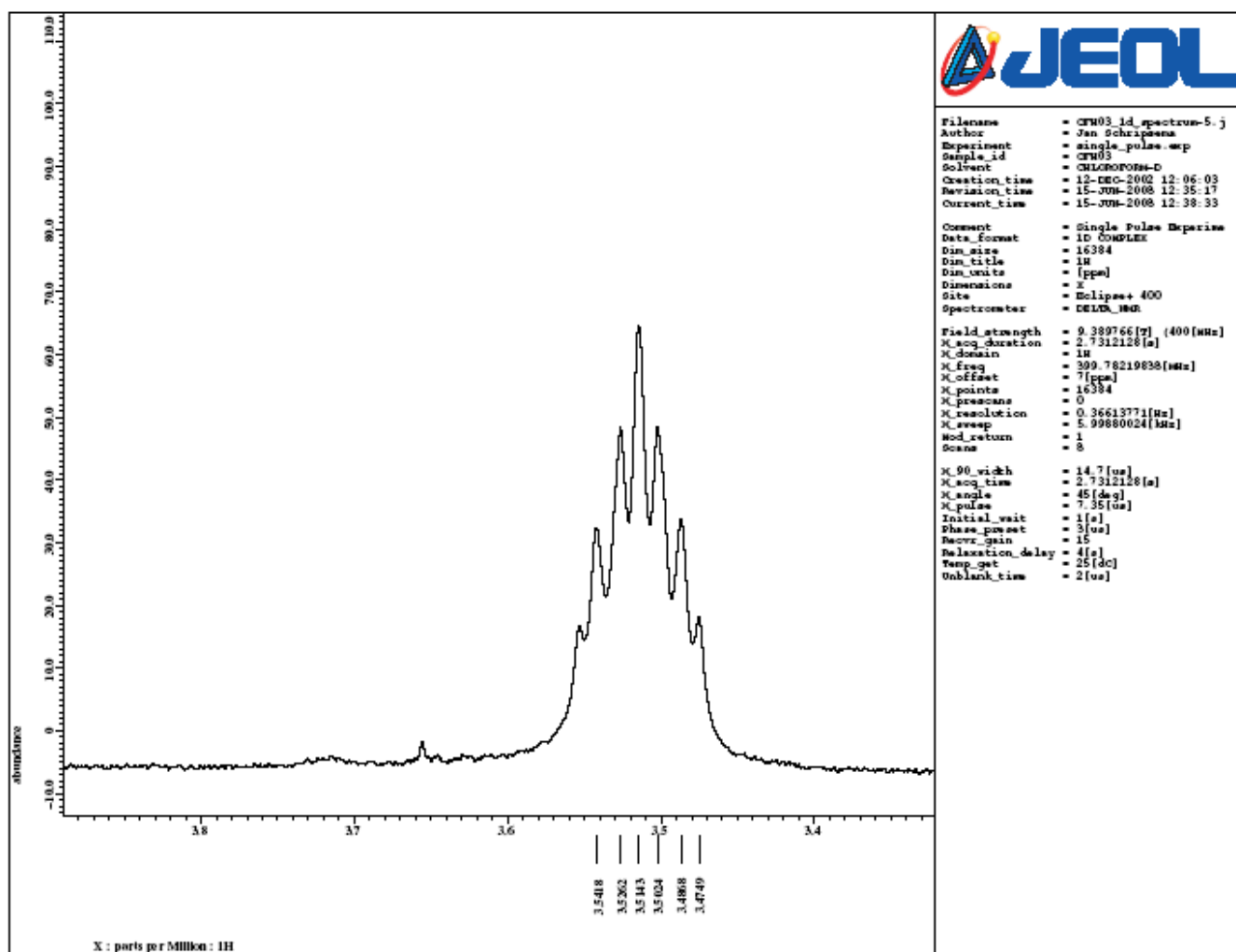
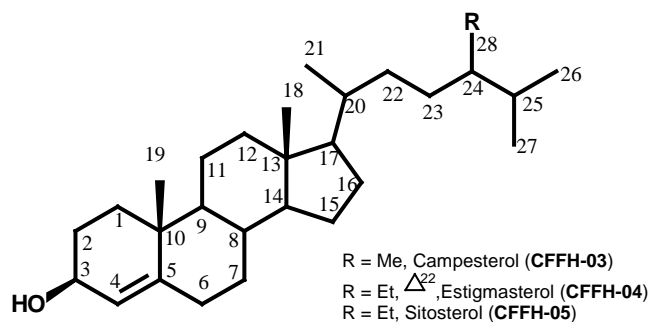
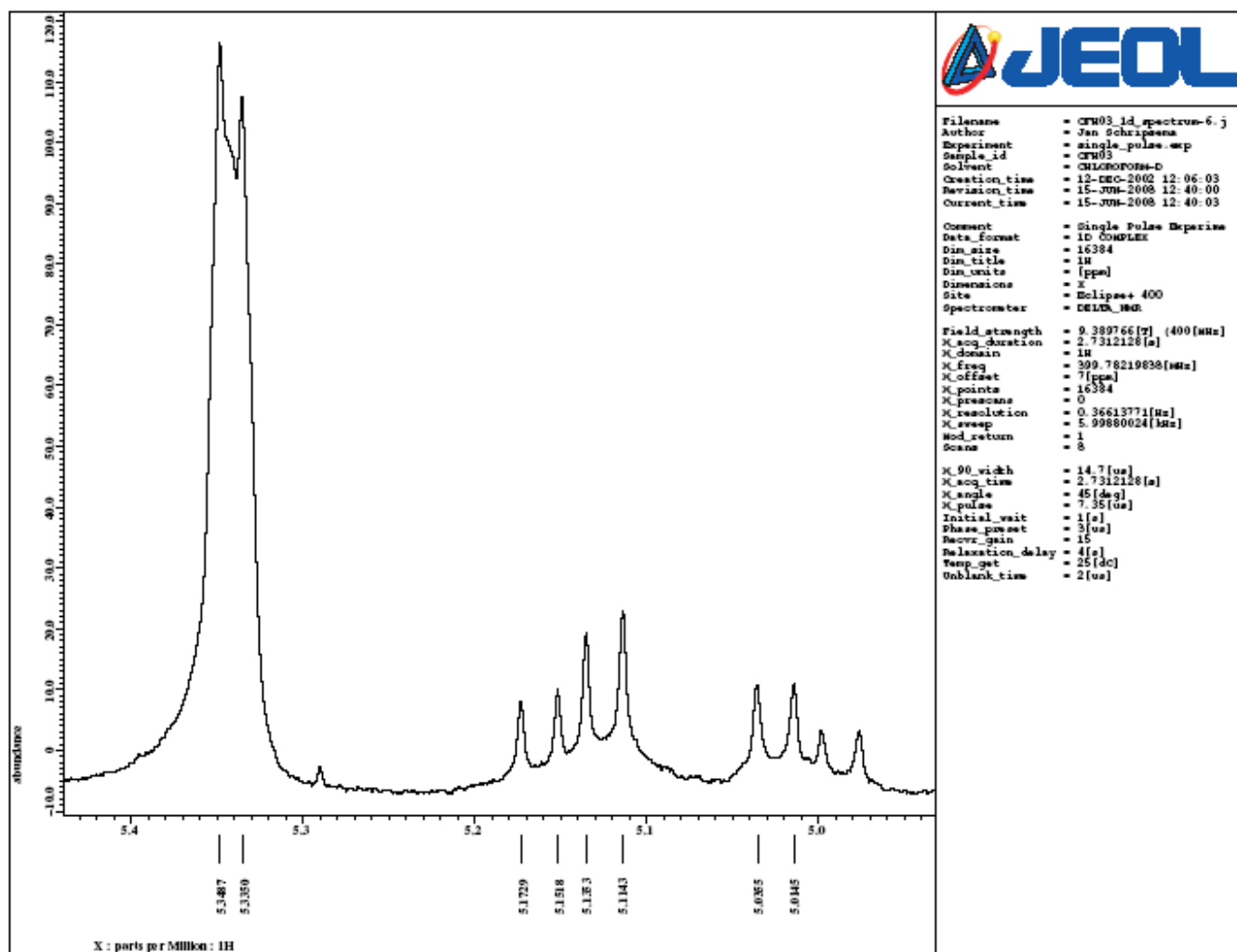
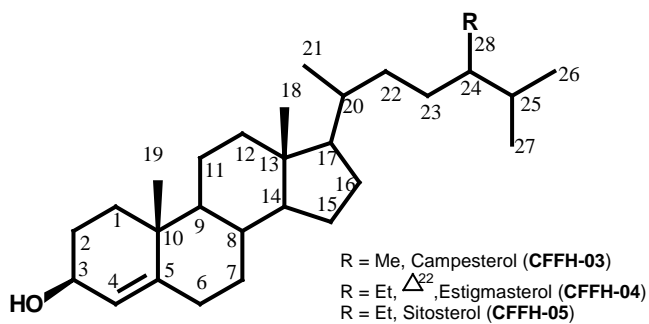


Figura 113 – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos esteróides **CFFH-03**, **CFFH-04** e **CFFH-05** (região 3,3 – 3,9 ppm)



**Figura 114** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos esteróides **CFFH-03**, **CFFH-04** e **CFFH-05** (região 5,0 – 5,4 ppm)

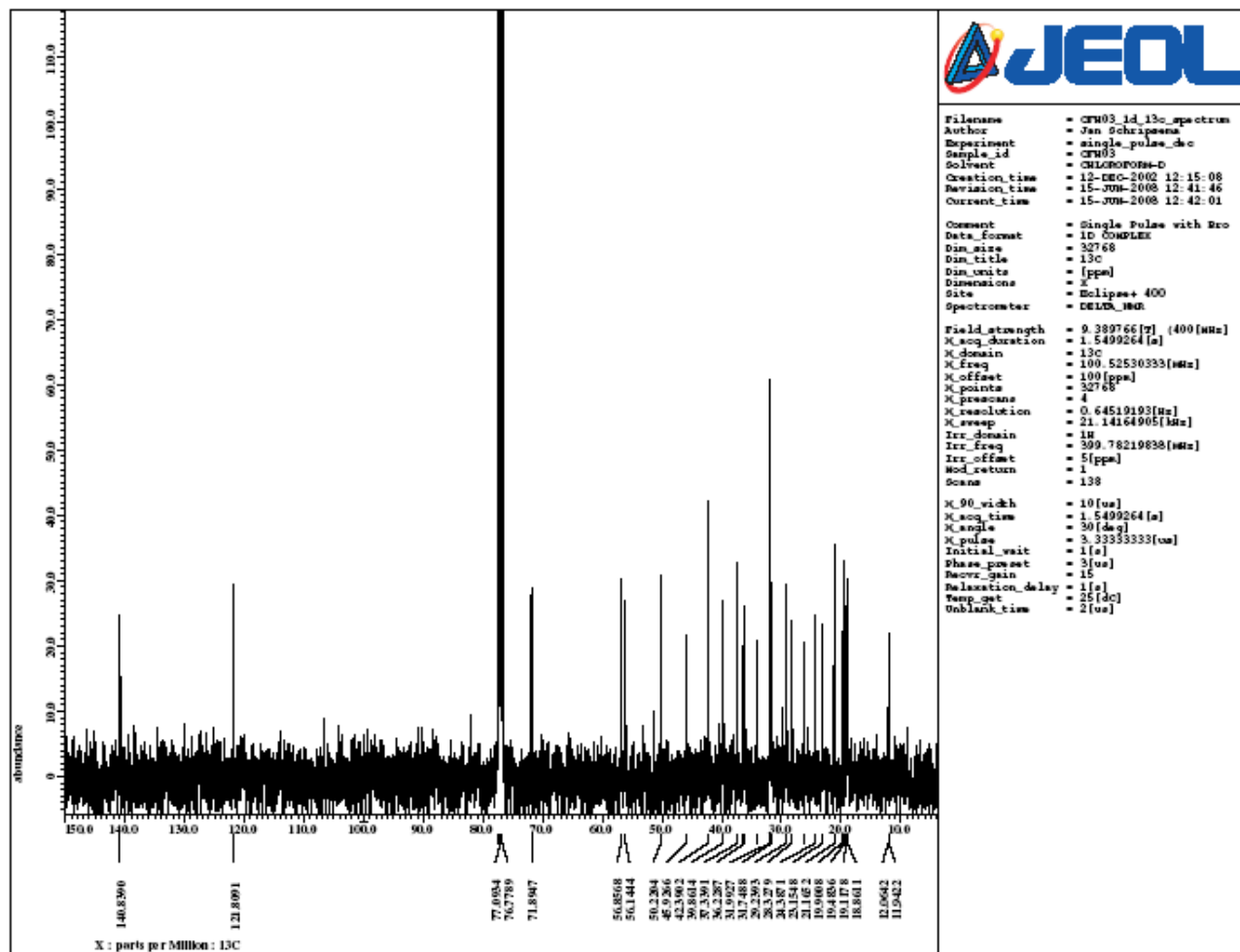
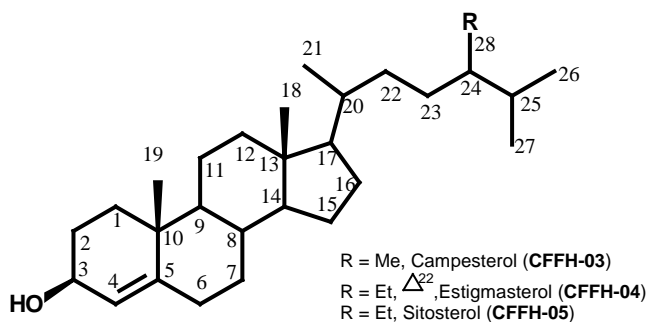


Figura 115 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05



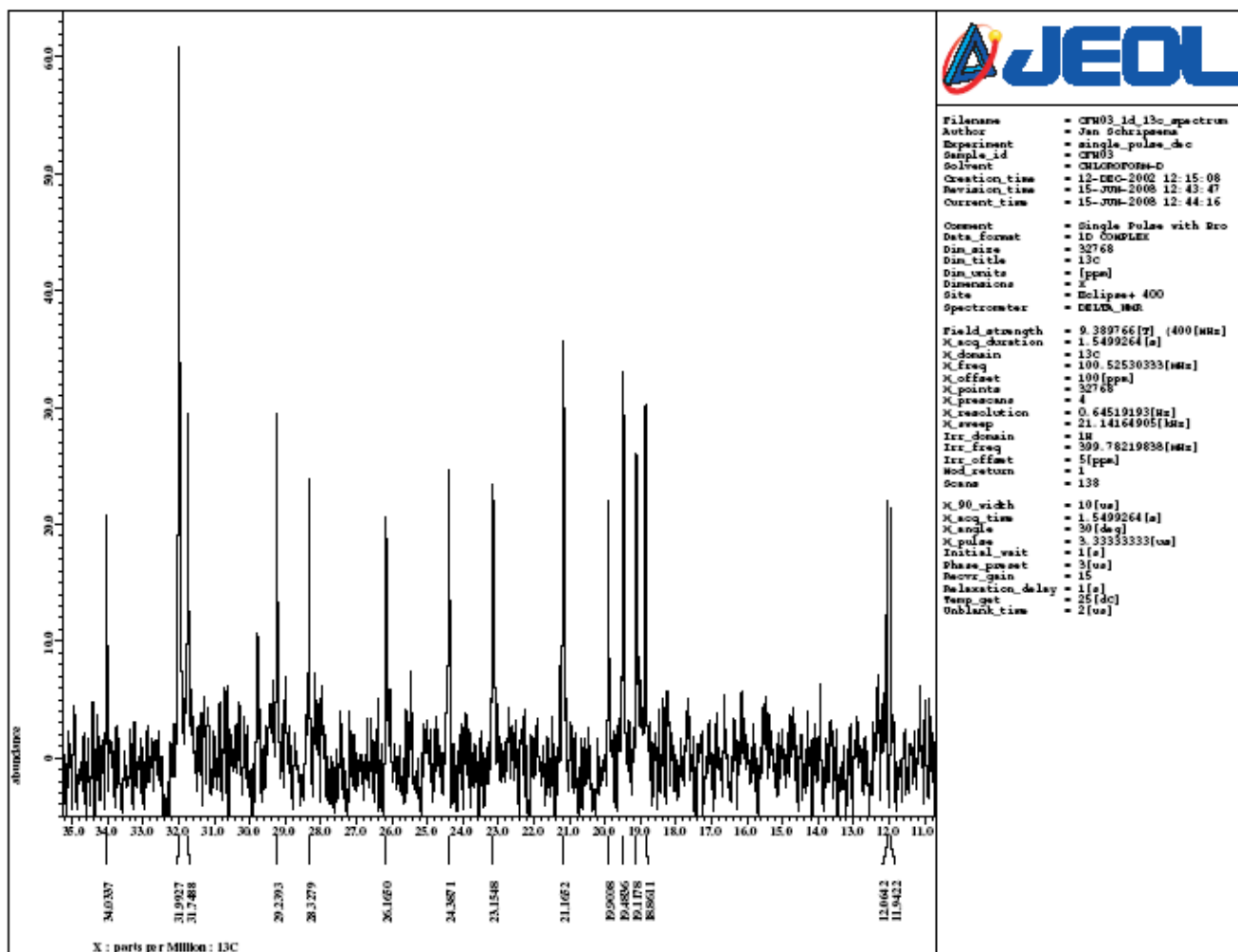
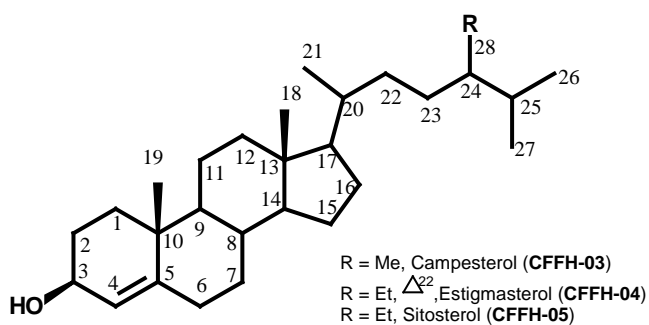


Figura 116 – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 11 – 32 ppm)

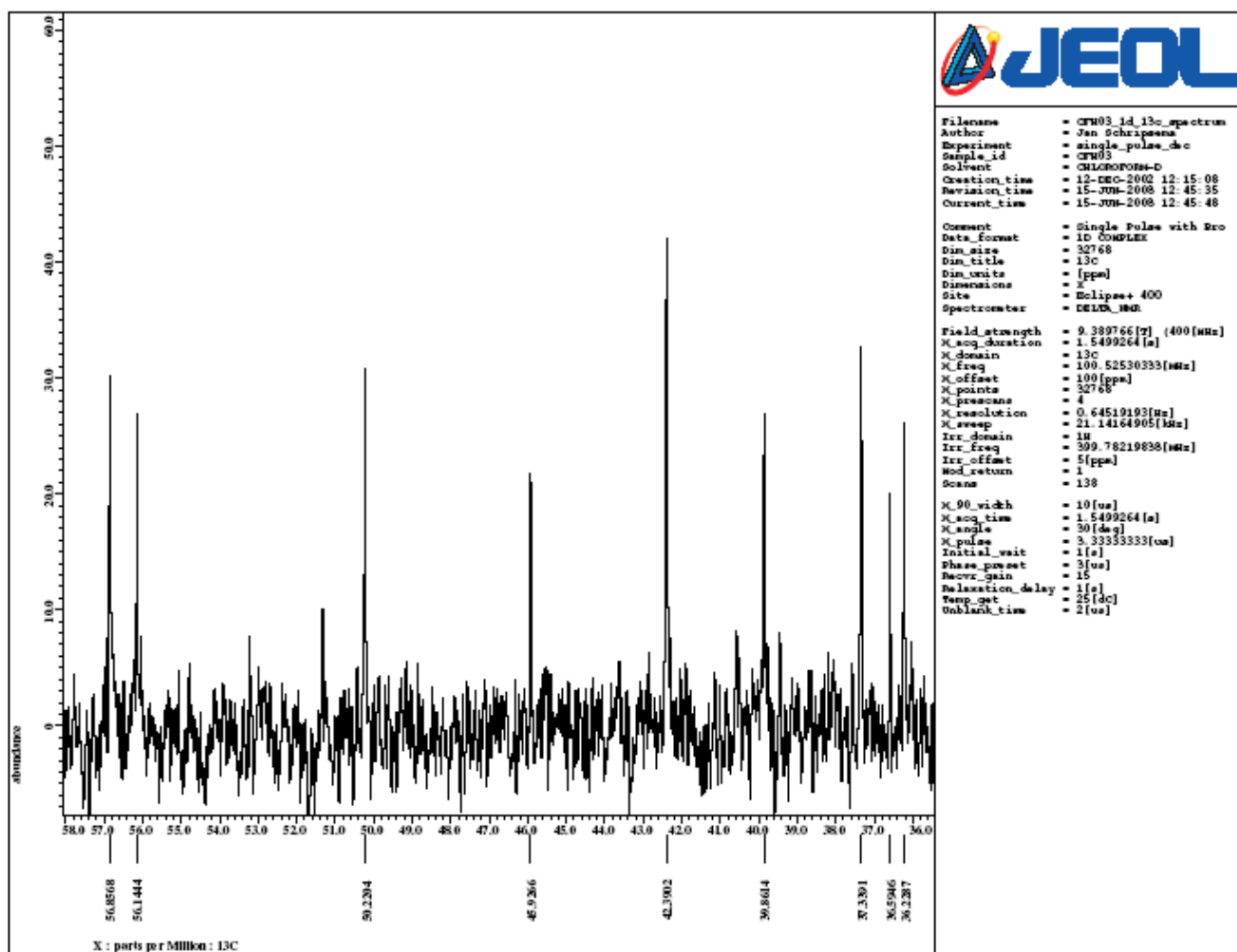
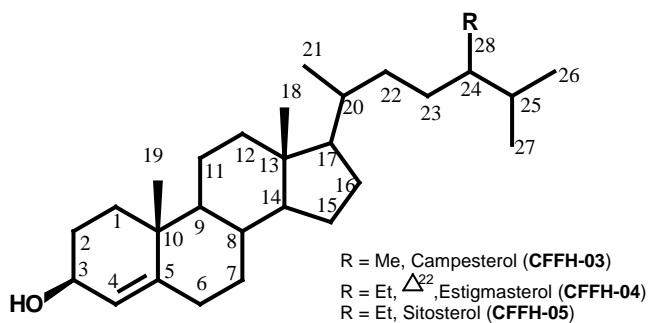


Figura 117 – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 33 – 72 ppm)

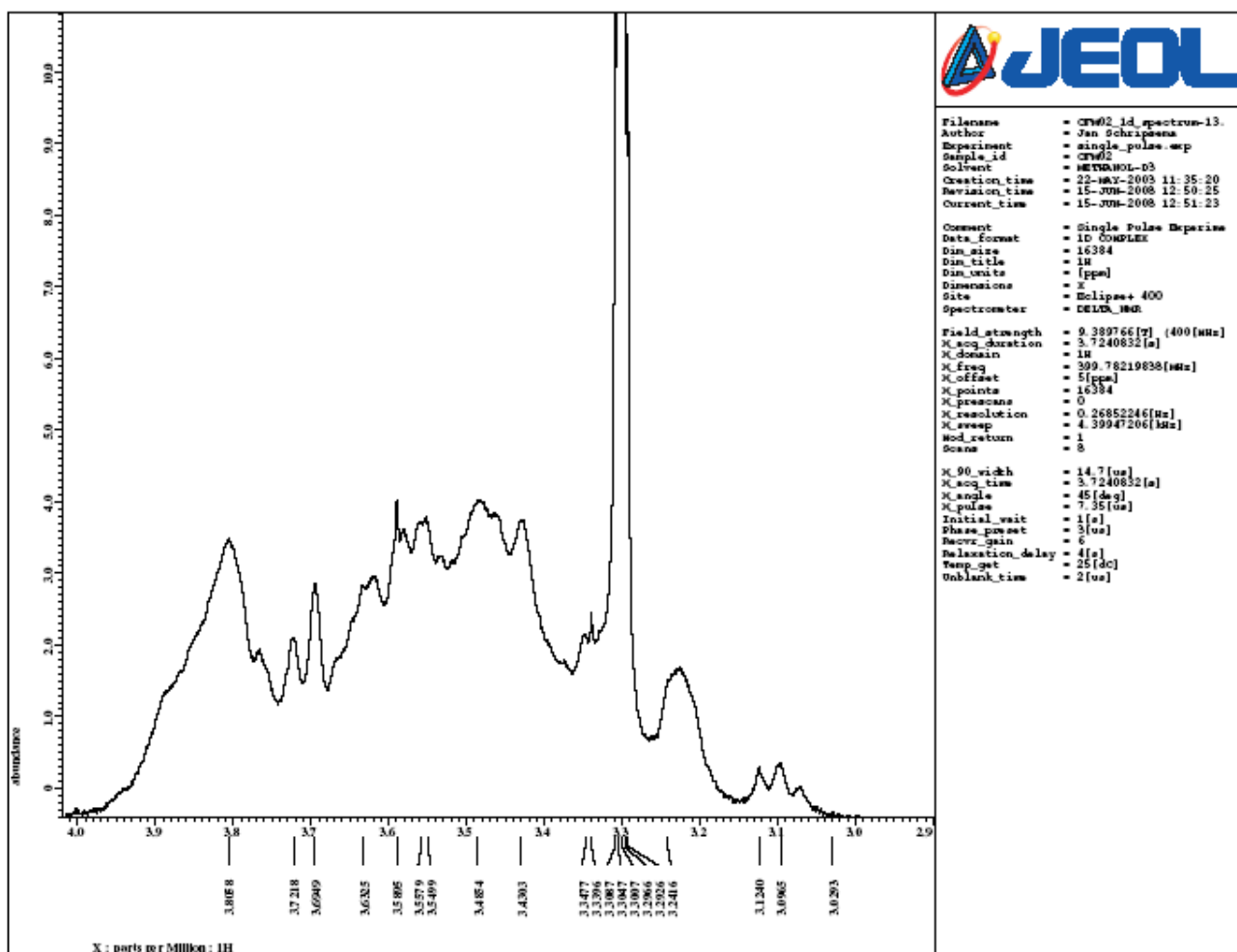
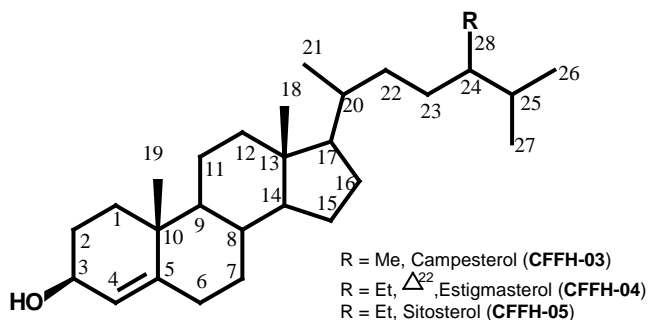
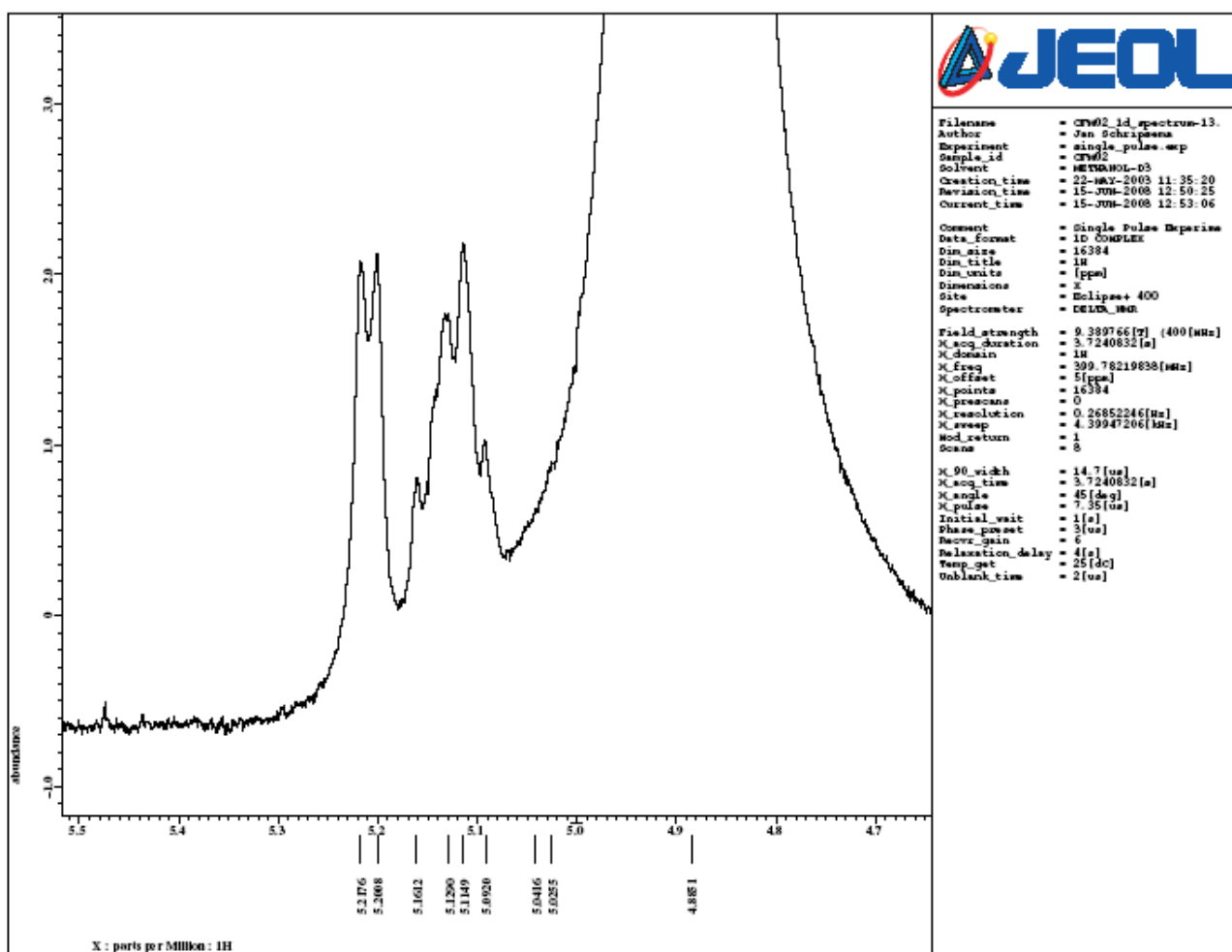
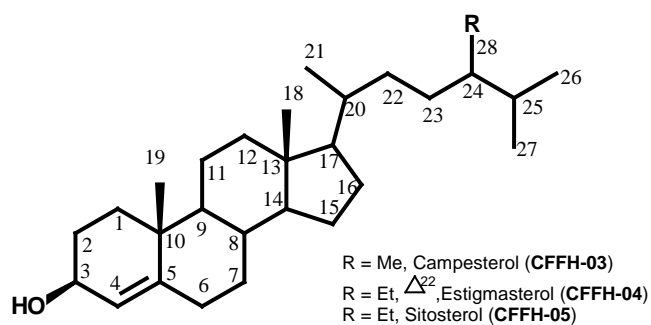
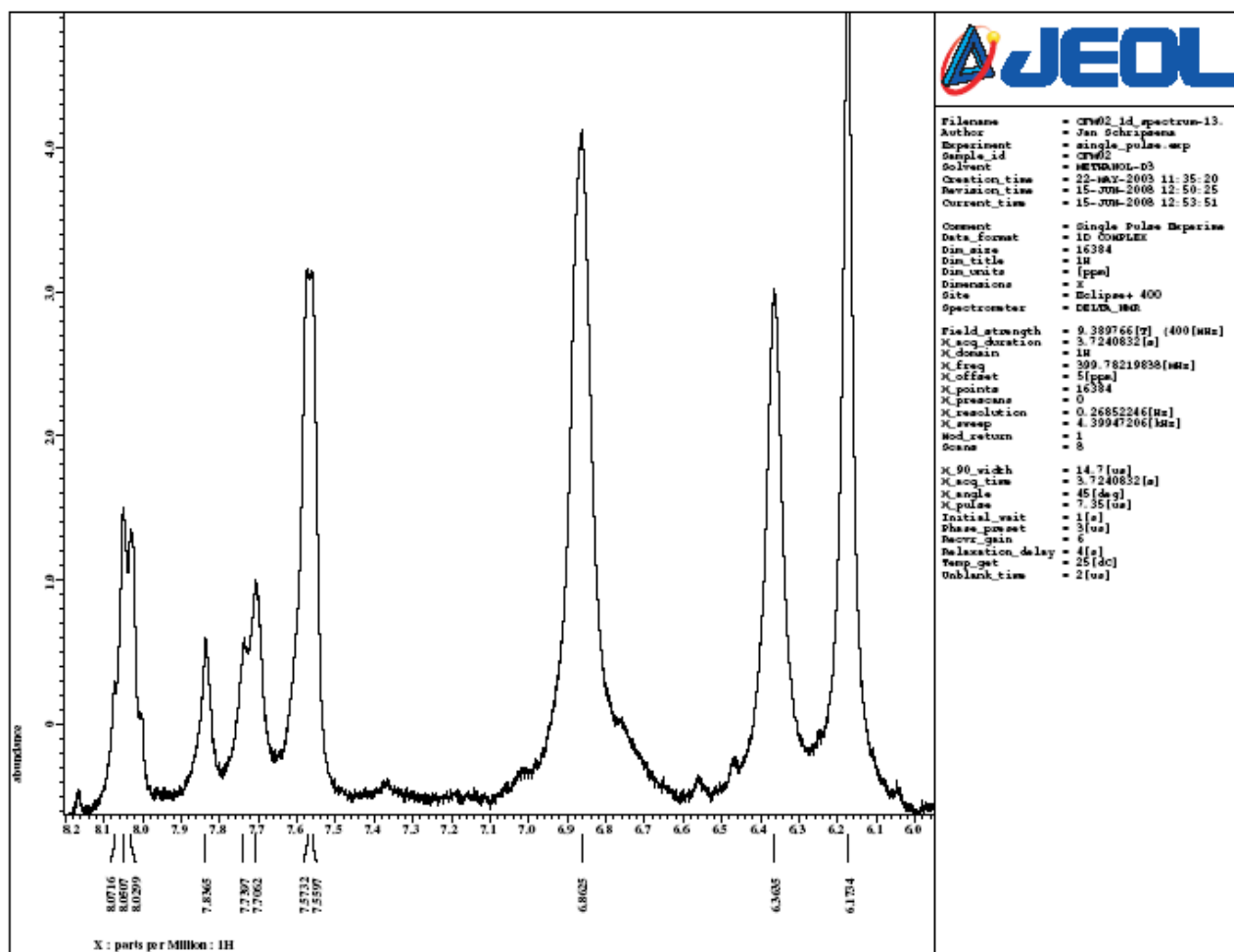
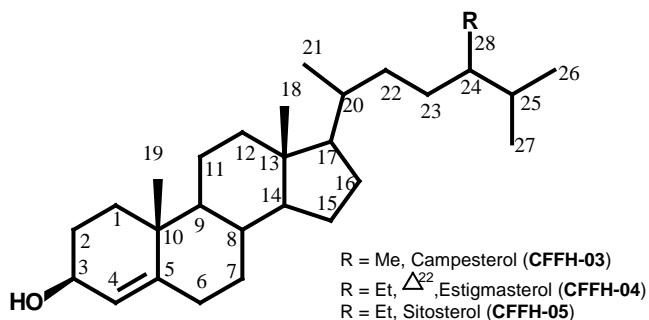


Figura 118 – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos esteróides CFFH-03, CFFH-04 e CFFH-05 (região 2,9 – 4,0 ppm)



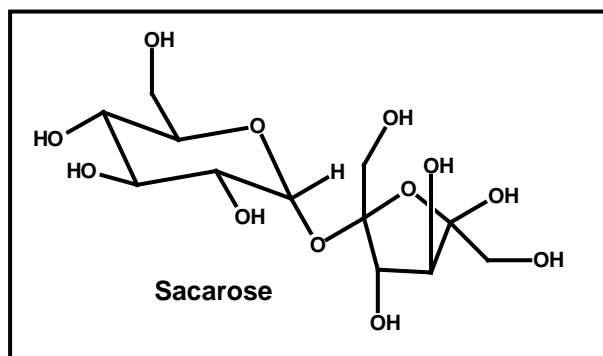
**Figura 119** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos esteróides **CFFH-03**, **CFFH-04** e **CFFH-05** (região 4,7 – 5,5 ppm)



**Figura 120** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura dos esteróides **CFFH-03**, **CFFH-04** e **CFFH-05** (região 6,0 – 8,2 ppm)

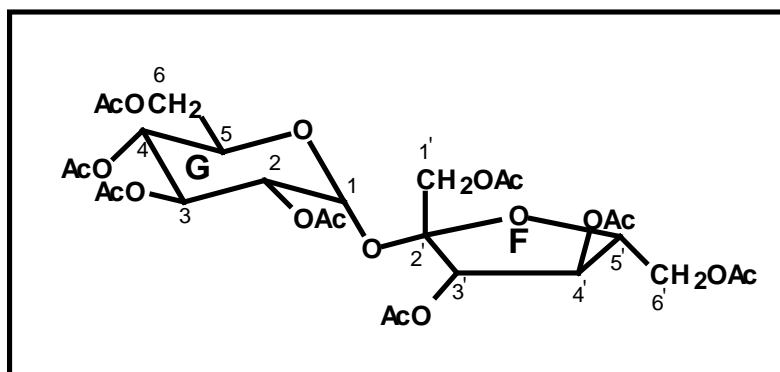
### 5.3. DISSACARÍDEO

#### 5.3.1. SACAROSE



Sacarose é um dissacarídeo cuja hidrólise produz uma molécula de glicose e outra de frutose. Sua produção pela planta ocorre na realização do processo de fotossíntese. A sacarose é também o açúcar mais abundante encontrado na natureza. Sua produção entre as plantas superiores ocorre principalmente na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e na beterraba (*Beta vulgaris*), sendo que o suco da cana-de-açúcar, a garapa, contém cerca de 15-20% de sacarose enquanto que o suco da beterraba contém 14-18%. Sua produção a partir da cana-de-açúcar e utilização como alimento e adoçante data de 2000 a.C. A cana-de-açúcar é uma planta tropical de hábito perene originária do Pacífico do Sul e pertencente ao gênero *Saccharum* (Barbosa-Filho *et. al.*, 2000).

### 6.3.2 DISSACARÍDEO SMA-01 (SACAROSE PERACETILADA)



O espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 121**, p. 170) apresentou sinal intenso em  $\nu_{C=O}$   $1762\text{ cm}^{-1}$  característico de carbonila de éster, os sinais em  $\nu_{CH_3}$   $2966$ ,  $1434$  e  $1373\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de grupos metílicos na molécula. Os sinais em  $\nu_{C-O}$   $1226$ ,  $1218\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de grupos oximetínicos na molécula.

A substância SMA-01 foi identificada como sacarose na forma de seu derivado peracetilado, seu espectro de RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$  (**Figura 122**, p. 171; **Tabela 13**, p. 168) apresentou absorções referentes ao H-1 (hidrogênio anomérico) em  $\delta_H$  5,7 (*d*), ao hidrogênio H-2 em  $\delta_H$  4,9 (*dd*), ao H-4  $\delta_H$  5,1 (*t*,  $J= 9,9\text{ Hz}$ ), ao H-5  $\delta_H$  4,2 (*m*) e ao H-6 entre  $\delta_H$  4,1- 4,2, todos atribuídos ao resíduo de glicose; as metilas dos grupos acetila mostraram absorções características entre  $\delta_H$  2,0 e 2,2 (sinais simples). No espectro de RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ , **Figura 127**, p. 176; **Tabela 14**, p. 169), os sinais entre  $\delta_C$  20,5 e 20,6 e os oito sinais entre  $\delta_C$  169,4 e 170,6 foram atribuídos aos grupos acetilas ( $CH_3$  e  $C=O$ ), respectivamente. Os sinais atribuídos aos carbonos do resíduo de frutose foram localizados a  $\delta_C$  63,5 ( $CH_2$ , C-6),  $\delta_C$  74,9 ( $CH$ , C-4),  $\delta_C$  75,6 ( $CH$ , C-3),  $\delta_C$  70,2 ( $CH$ , C-5) e  $\delta_C$  103,9 ( $CH$ , C-2), sendo este último atribuído ao carbono anomérico da frutose envolvido na ligação glicosídica entre os dois açúcares. Os sinais atribuídos aos hidrogênios do resíduo de frutose foram localizados H-1 em  $\delta_H$  4,1 (*s*), H-3 em  $\delta_H$  4,6 (*d*,  $J= 2,9$ ), H-4 em  $\delta_H$  5,3 (*t*,  $J= 5,9$ ), H-5 em  $\delta_H$  4,2 (*s*) e H-6 entre  $\delta_H$  4,4 - 4,3.

Para o resíduo de glicose foram atribuídas as seguintes absorções características  $\delta_C$  61,6 ( $CH_2$ , C-6),  $\delta_C$  68,1 ( $CH$ , C-4),  $\delta_C$  68,4 ( $CH$ , C-5),  $\delta_C$  69,5 ( $CH$ , C-3),  $\delta_C$  70,2 ( $CH$ , C-2) e  $\delta_C$ .89,8 ( $CH$ , C-1) [(carbono anomérico da glicose)]. A

confirmação destas atribuições se deu através de comparação de dados da literatura (Nishida, 1986; Binkley, 1969).

**Tabela 13.** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  de sacarose octaacetilada (**SMA-01**) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Hidrogênio	SMA-01	SMA-01 OAC ( $\text{CH}_3$ )*	Literatura*	Literatura*
G1	5,6 ( <i>d</i> , $J=2,9$ )	-	5,69	-
G2	4,9 ( <i>dd</i> , $J=7,6$ )	2,1	4,87	2,10
G3	5,4 ( <i>t</i> , $J=5,9$ )	2,0	5,44	2,02
G4	5,1 ( <i>t</i> , $J=5,9$ )	2,0	5,08	2,05
G5	4,2 ( <i>m</i> )	-	4,28	-
G6	4,1; 4,2	2,1	4,14; 4,28	2,10
F1	4,1 ( <i>s</i> )	2,1	4,17	2,12
F2	-	-	-	-
F3	5,6 ( <i>d</i> , $J=2,9$ )	2,2	5,47	2,18
F4	5,3 ( <i>t</i> , $J=5,9$ )	2,1	5,36	2,11
F5	4,2	-	4,21	-
F6	4,4; 4,3	2,1	4,35; 4,29	2,12

\* Dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz (Nishida, 1986).



**Tabela 14.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de sacarose octaacetilada (**SMA-01**) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Carbono	SMA-01	SMA-01		SMA-01	Literatura*	
		(C=O)	(CH <sub>3</sub> )			
G1	89,8	-	-	89,93	-	-
G2	70,2	170,0	20,6	70,26	170,07	20,64
G3	69,5	169,9	20,6	69,61	170,01	20,66
G4	68,1	169,4	20,6	68,17	169,50	20,61
G5	68,4	-	-	68,50	-	-
G6	61,6	170,6	20,5	61,75	170,66	20,58
F1	62,8	170,1	20,6	62,85	170,09	20,69
F2	103,9	-	-	104,02	-	-
F3	75,6	169,6	20,5	75,68	169,65	20,56
F4	74,9	169,9	20,6	74,98	169,88	20,72
F5	70,2	-	-	70,14		-
F6	63,5	170,4	20,6	63,63	170,46	20,63

\* Dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (Nishida, 1986).

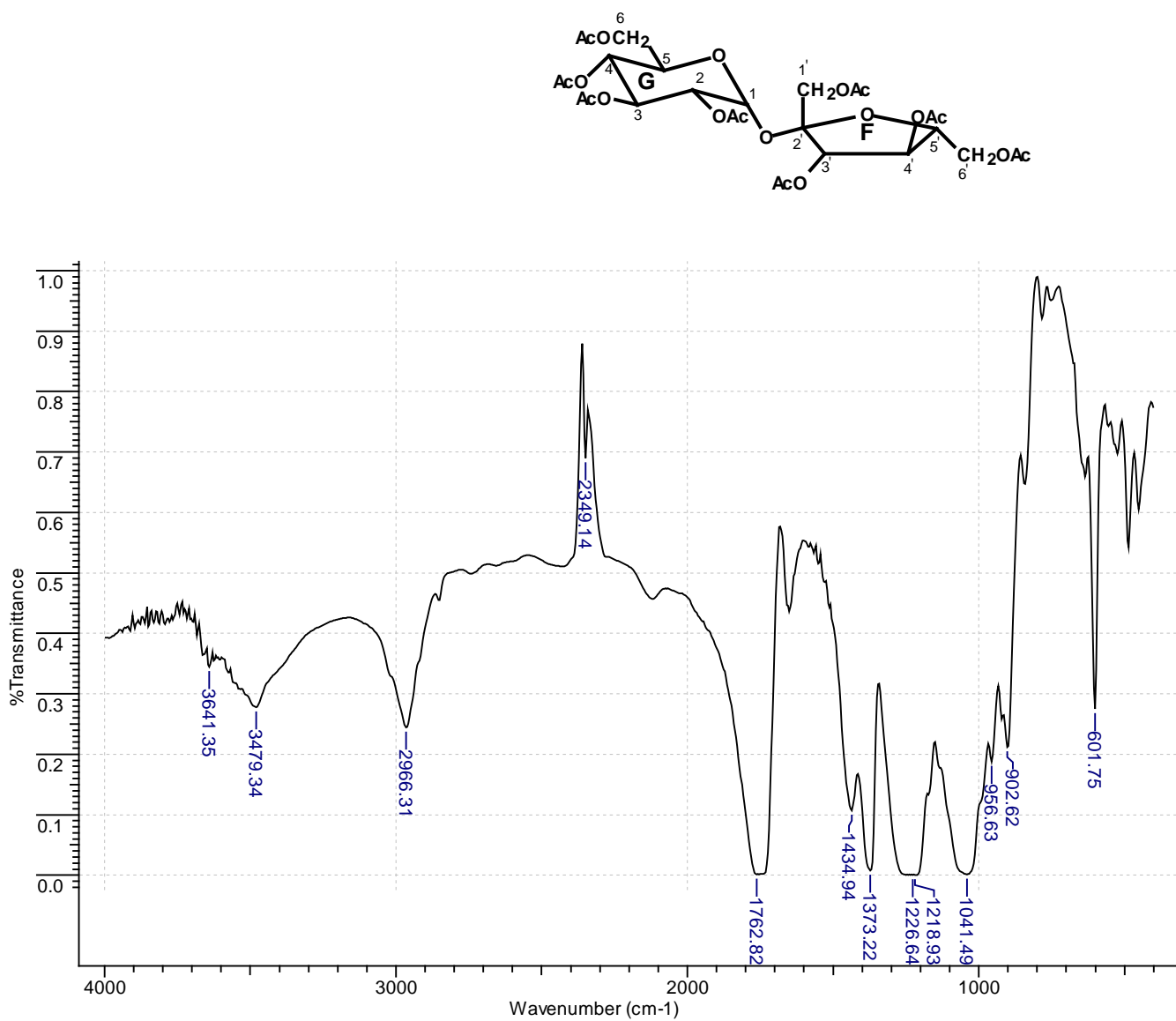


Figura 121 - Espectro de infravermelho da substância SMA-01

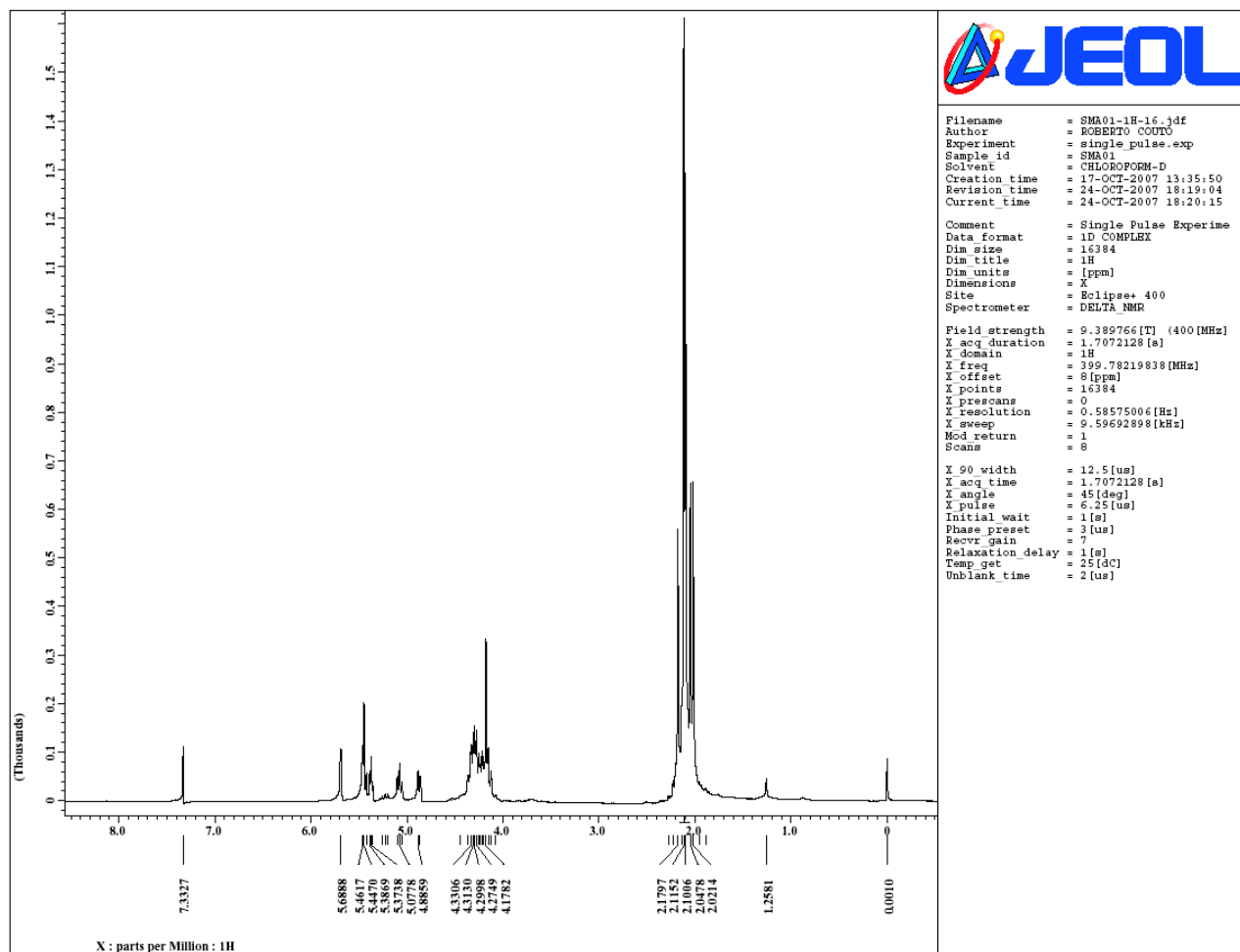
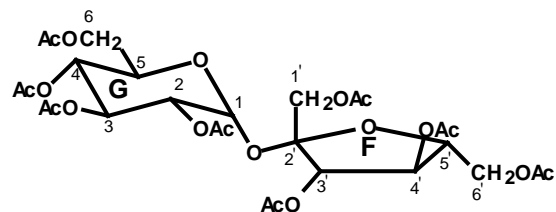


Figura 122 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância SMA-01

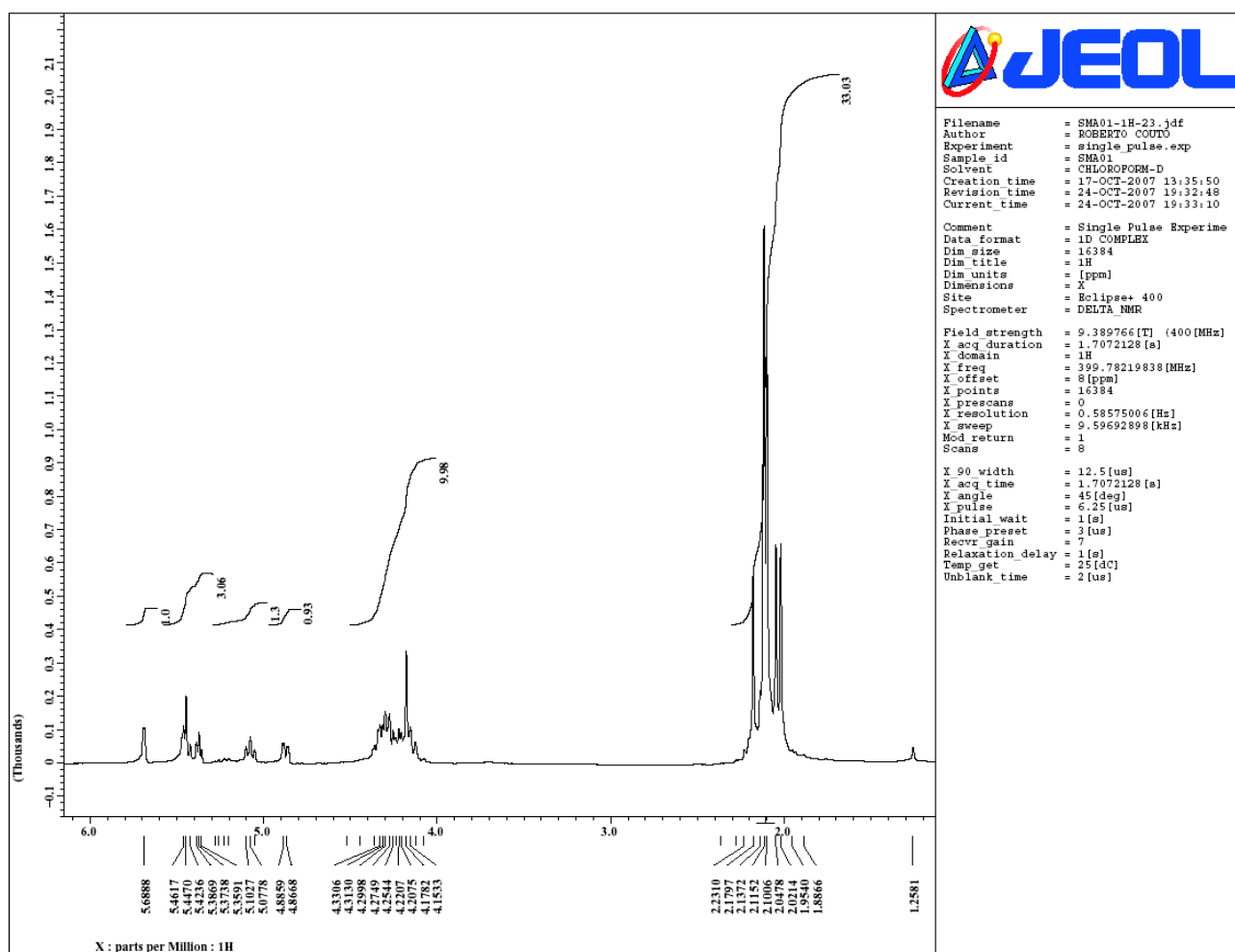
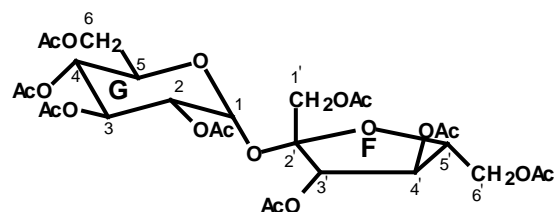
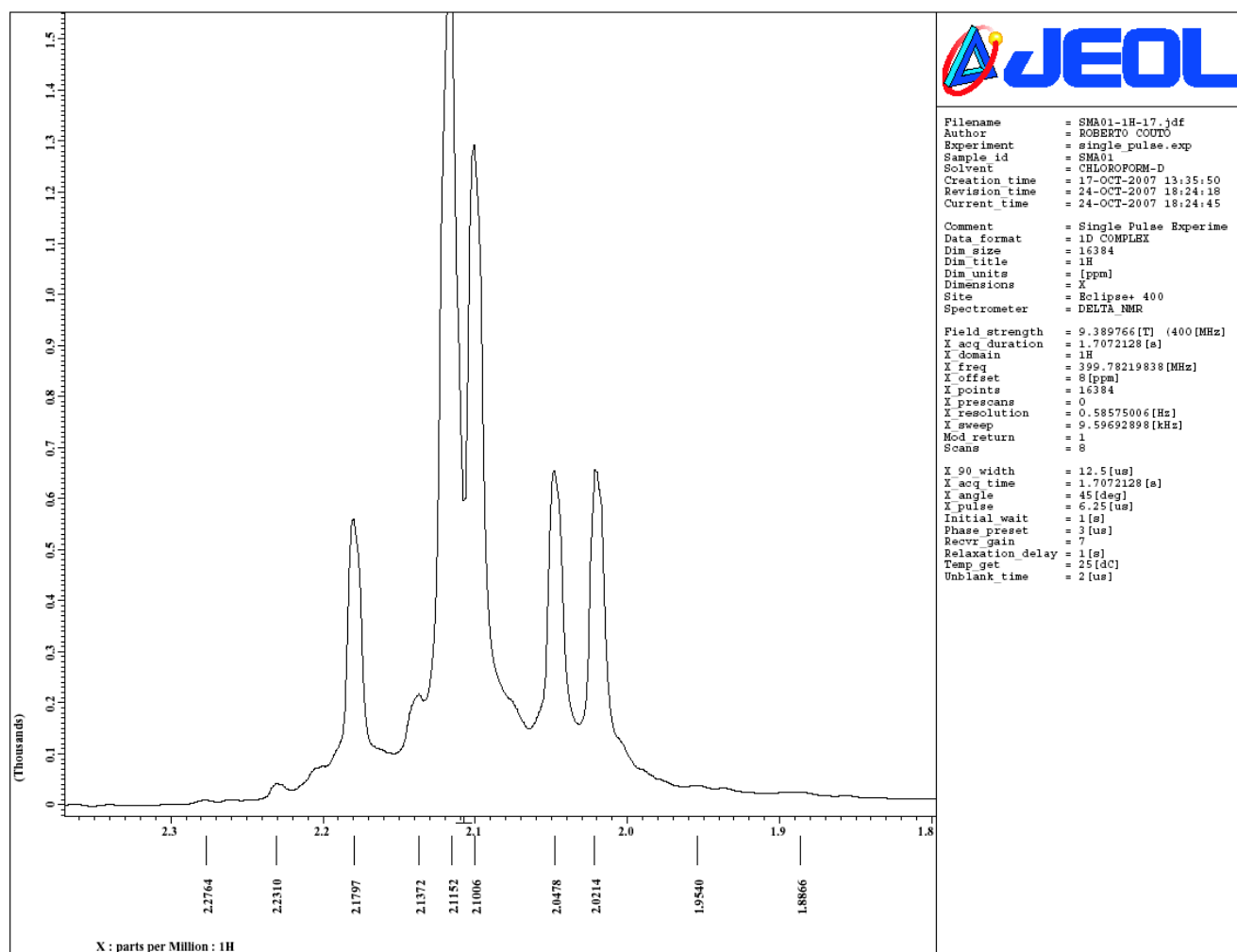
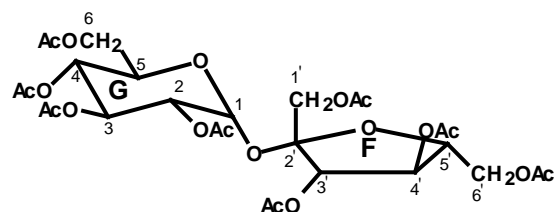
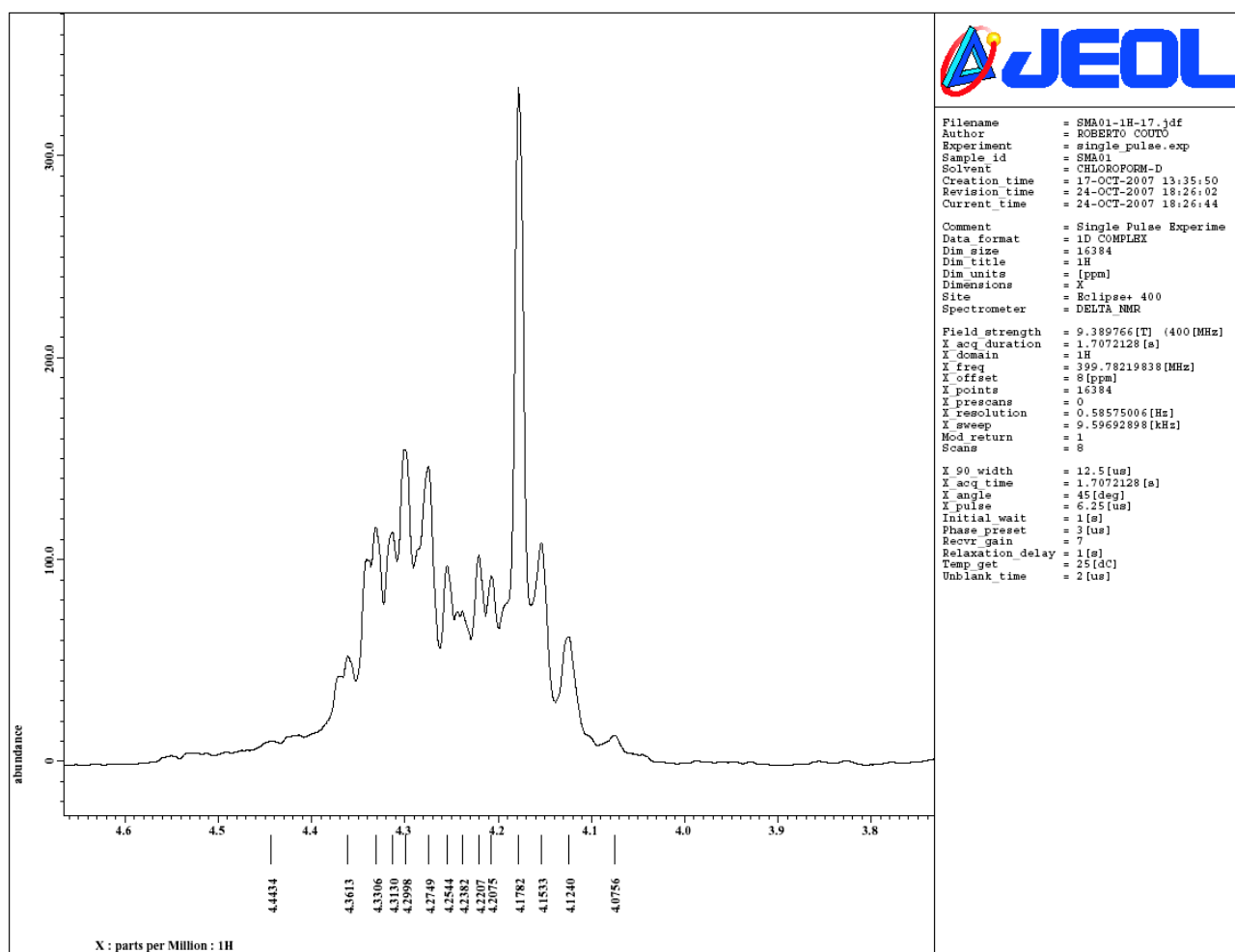
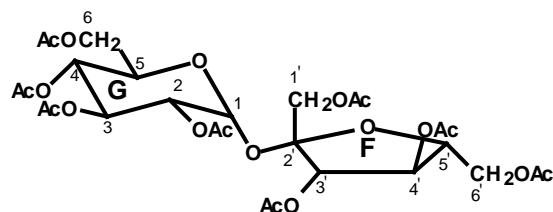


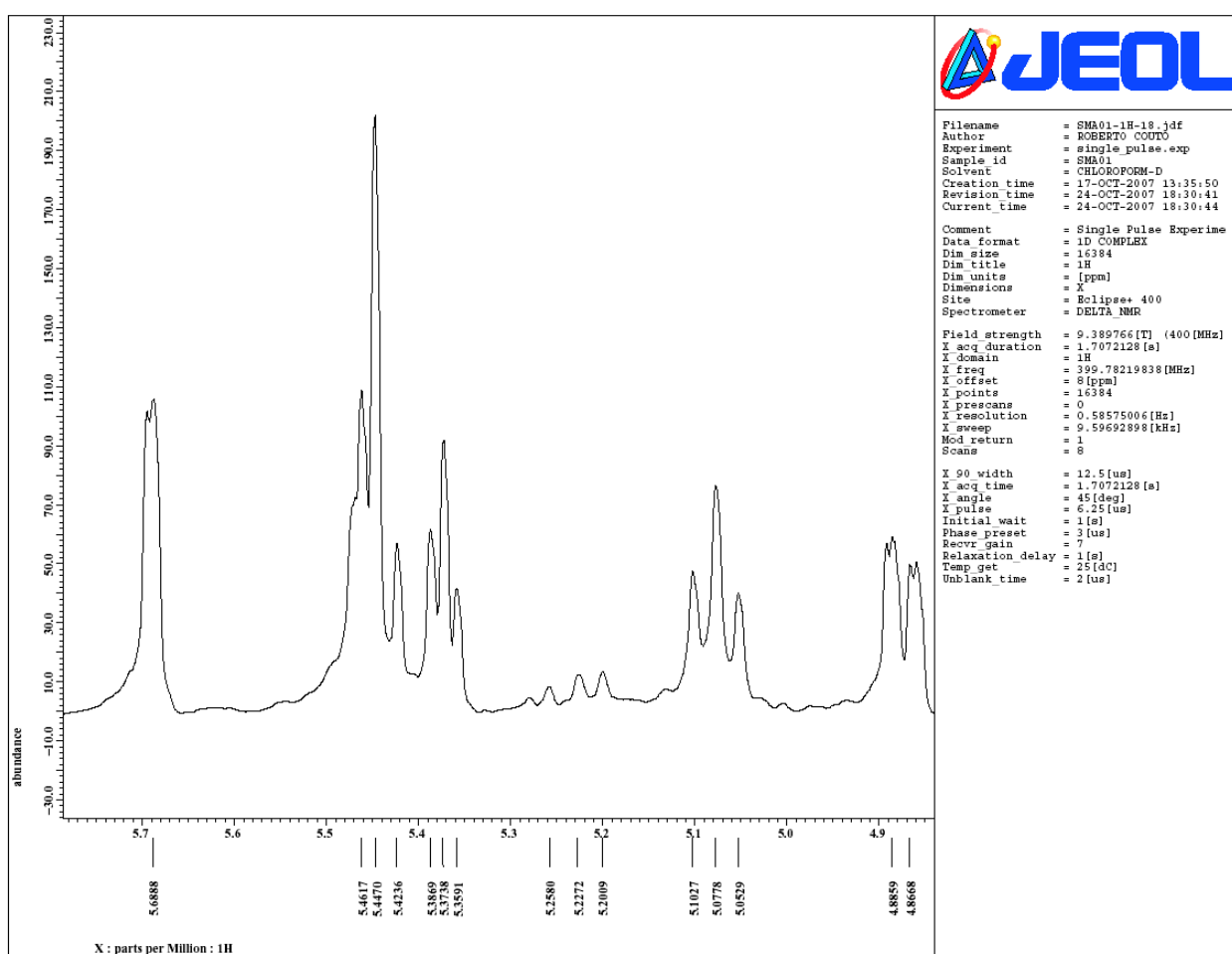
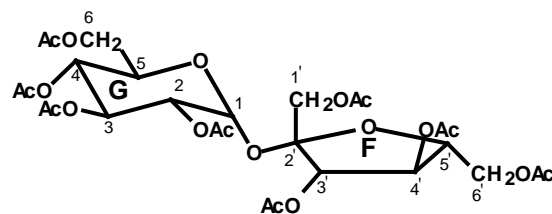
Figura 123 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  integrado da substância SMA-01



**Figura 124** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância SMA-01 (região 1,8 – 2,3 ppm)



**Figura 125** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **SMA-01** (região 3,8 – 4,6 ppm)



**Figura 126**– Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância SMA-01 (região 4,8 – 5,7 ppm)

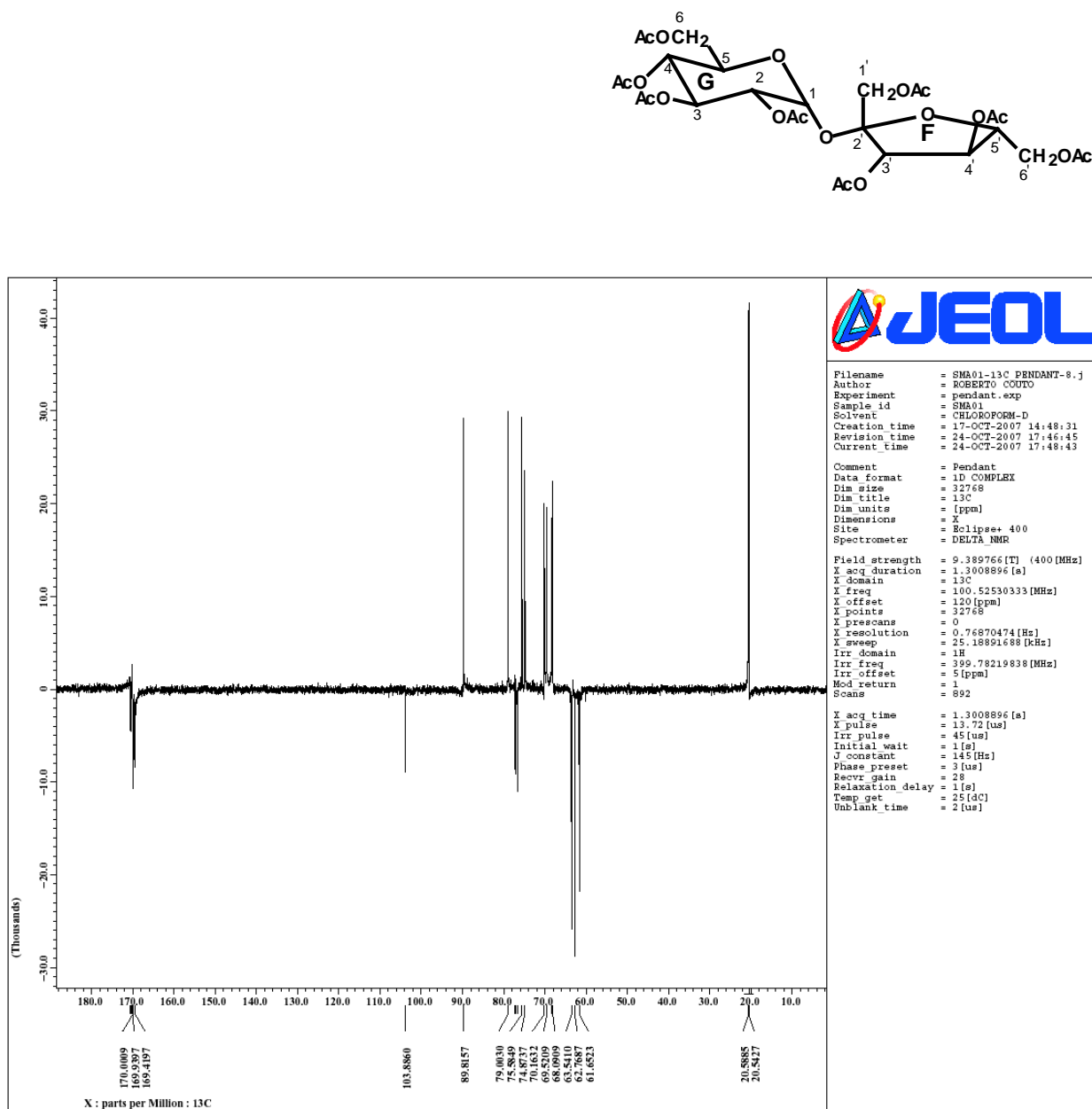
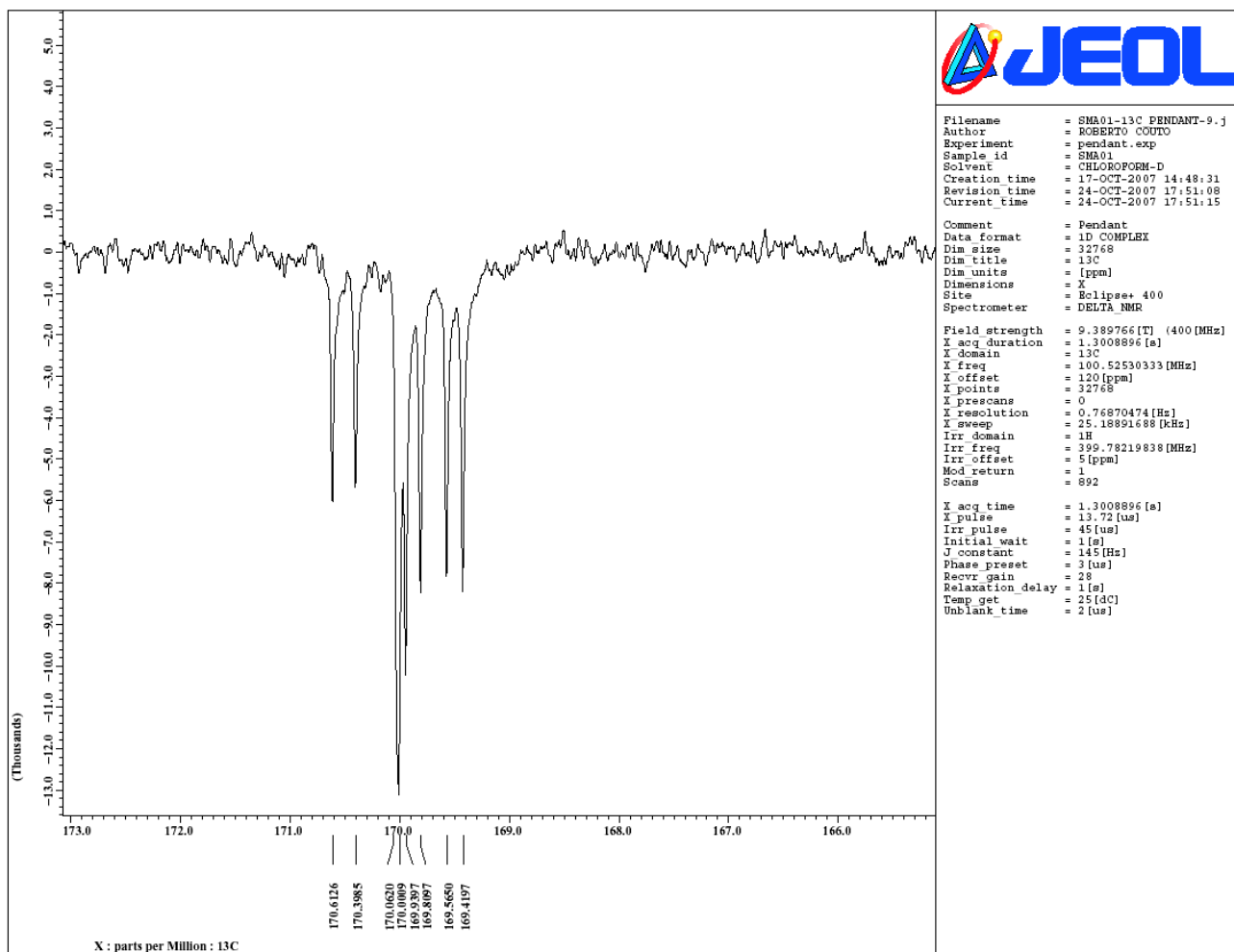
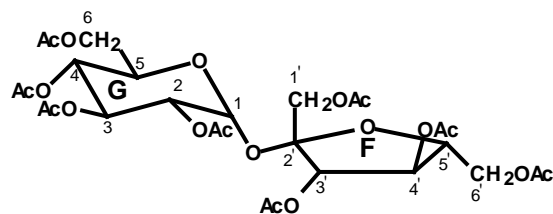
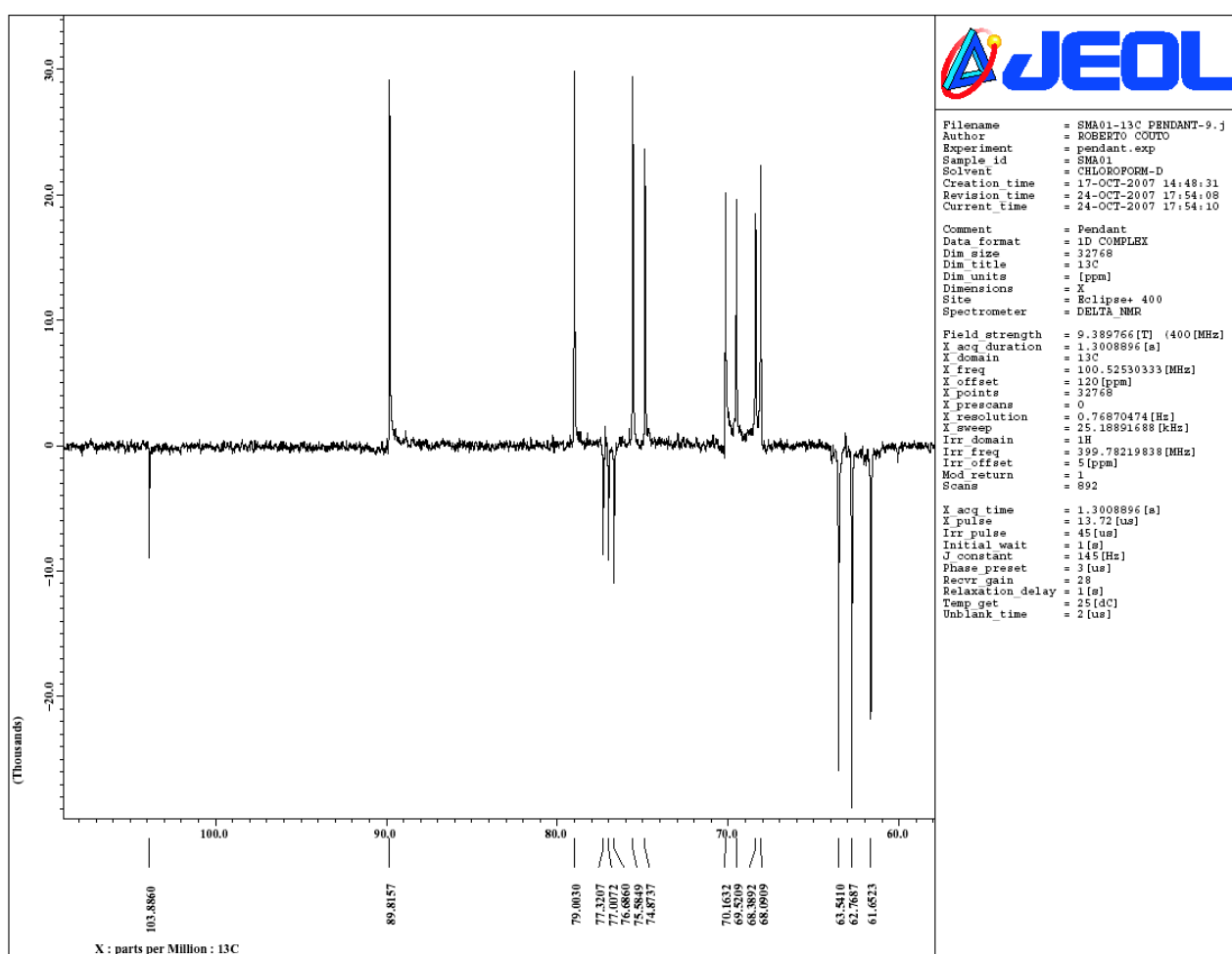
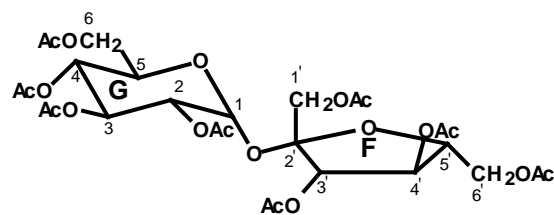


Figura 127 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância SMA-01





**Figura 128** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **SMA-01** (região 166 – 173 ppm)



**Figura 129** – Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **SMA-01** (região 60 – 103 ppm)

#### 6.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, P. K. (1989). *Studies in Organic Chemistry 39: Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Oxford, New York, Tokyo: Elsevier 564p.
- Aridoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewiez, T., Zenk, M. M., Bacher, A. (1999). *Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (4): 1309-1314.
- Barbosa-Filho, J. M., Pamplona, F. V., Rabelo, L. A., Lemos, V.S., Piuvesam, M.R., de Souza, M. F. V., da Cunha, E. V. L., da Silva, M. S., Macedo, R. O. (2000). *Uma revisão sobre a ocorrência de sacarose no reino vegetal. Farmácia & Química.* v. 33. p. 22-2000.
- Binkley, W. W., Horton, D. & Bhacca, N. S. (1969). Physical studies on oligosaccharides related to sucrose. Part I. NMR studies on the peracetate of sucrose, 1-ketos and nystose. *Carbohydrate Research.* 10(2): 245-258.
- Breitmaier, E., Voelter, W. (1987). *Carbon-13 NMR Spectroscopy High-Resolution Methods and Application in Organic Chemistry and Biochemistry*. Third Edition, VCH, Weinheim. p. 515.
- Harbone, J. B. (1996). *The flavonoids: Advances in Research*. Chapman & Hall ed. London. P. 464.
- Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M. (2003). *Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea. Phytochemistry* 62 (2): 229-237.
- Mahato, S. B., Kundu, A. P. (1994). *<sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient feature.* 37(6): 1517-1575.

- Markam, K. R., Chari, V. M. (1976). *Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. The flavonoids Advances research*. London: (ed. By Harboline, J. H. & Mabry, T. J.), Chapman and Hill, (83), 113p.
- Muccino, R. R., Djerassi, C. (1974). *Mass Spectrometry in Strutral and Stereochemical Problems. CCXXXIX. Elucidation of the Ring D Cleavage in Lanostane*. Journal of the American Chemical Society. 96:2. 546-560.
- Nishida, T., Enzell, C. R. & Morris, G. A. (1986). Concerted use of homo and hetero-nuclear 2D NMR: <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H assignment of sucrose octaacetate. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 24(2): 179-182.
- Ogunkoya, L. (1981). Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, v. 20. p. 121-126.
- Seo, S., Womori, A., Yoshimura, Y., Takeda, K., Seto, H., Ebizuka, K., Noguchi, H., Sankawa, U. (1988). *Biosynthesis of sitosterol, cycloartenol, and 24-methylenecycloartanol in tissue-cultures of higler-plants and of ergosterol in yeast from [1,2-C-13 (2)] – acetate and [2-C-13-H-2 (3)] – acetate and [5-C-13-H-2 (2)] MVA*. *Journal of the Chemical Society – Perkin transactions* 1(8): 2407-2414.
- Torssell, K. B. G. (1997). *Natural Product Chemistry – A mechanistic, biosynthetic and ecological approach*. Second Edition. *A potekarso Cienteten*. Swedish Pharmaceutical Society, p. 480.

## 7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FLAVONÓIDES TOTAIS

### 7.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Clitoria fairchildiana*

Várias evidências têm mostrado que dietas ricas em vegetais, frutas e grãos podem reduzir o risco de inúmeras doenças, e os benefícios desses alimentos, segundo alguns autores, estão associados à presença de substâncias antioxidantes.

Assim, a necessidade de pesquisas sobre antioxidantes naturais é necessária, principalmente, porque estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) podem provocar efeitos indesejáveis nos organismos humano e animal, apresentando, entre outras, atividade carcinogênica (Rodrigues *et. al.*, 2003).

Entre os antioxidantes que têm recebido maior atenção, por sua ação benéfica, estão às vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenóides e os flavonóides, mas, sem dúvida, os flavonóides constituem o grupo mais representativo, encontrado com elevada diversidade de formas. As maiores fontes desses flavonóides na dieta humana estão no chá, cebola, maçã e vinho tinto (Yunes & Calixto, 2001).

Dessa forma, as propriedades antioxidantes dos flavonóides têm atraído à atenção, pois eles protegem contra o dano oxidativo, o que contribui para a prevenção de importantes patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento e cânceres (Rice-Evans, 2001).

A oxidação é parte fundamental da vida dos organismos aeróbicos no processo de geração de energia, no entanto o oxigênio é um forte oxidante, o que torna possível uma série de oxidações secundárias, as quais podem acarretar graves conseqüências se os seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente (Silva, 2008).

A redução completa do oxigênio molecular resulta em água como produto final da cadeia respiratória, porém podem ocorrer situações em que o oxigênio é parcialmente reduzido, resultando como produto final dessas reações secundárias vários intermediários, como o radical hidroxil, com alto poder oxidante. Outras fontes de espécies oxidantes são poluentes do ar, fumo, radiação UV e uma dieta rica em ácidos poliinsaturados (Silva, 2008).

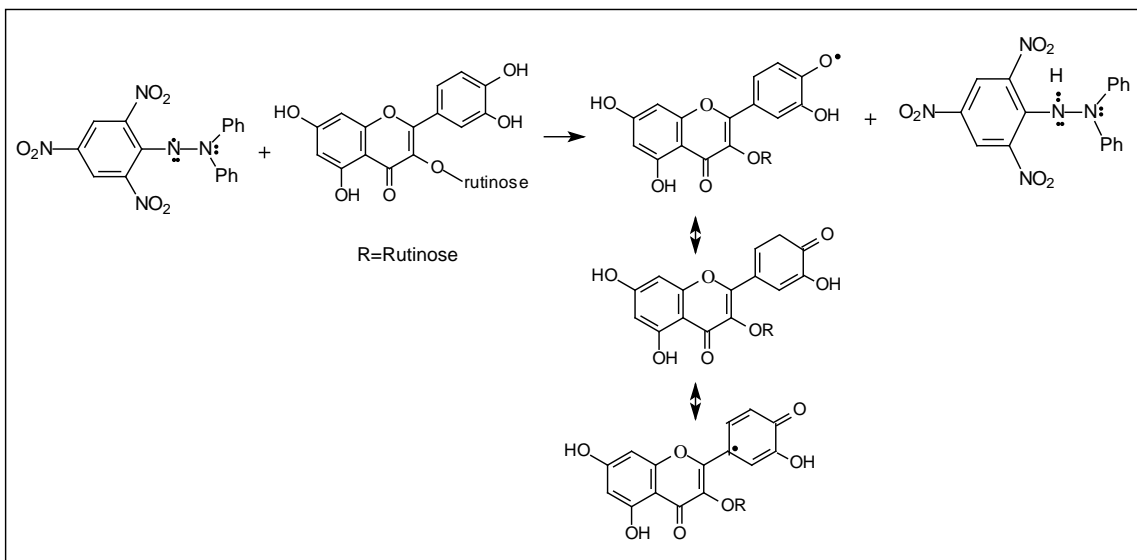
Nesse contexto, tem sido proposto que os flavonóides bloqueiam as reações em cadeia provocadas pelos radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) através da doação de átomos de hidrogênio a esses radicais, formando flavonóides-radicaís, que são espécies mais estáveis. Por outro lado, já foi reportado que os flavonóides têm a capacidade de seqüestrar o ânion radical superóxido. (Yunes & Calixto, 2001).

No **Esquema 04** (p. 183) estão propostas as possíveis interações que ocorrem entre o DPPH e o flavonóide rutina. É importante ressaltar, que o mecanismo reacional entre o antioxidante e o DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante (Bondet *et. al.*, 1997).

De modo geral, a atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavonoil formado, reatividade em frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (Barreiros *et. al.*, 2006).

A atividade antioxidante pode ser analisada utilizando o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) como capturador de radical livre, uma vez que é uma maneira rápida e fácil de ser realizado em laboratório. O DPPH é um radical livre a temperatura ambiente e produz uma solução violeta em etanol. Essa coloração é reduzida dependendo da presença de espécies antioxidantes (Mensor *et. al.*, 2001).

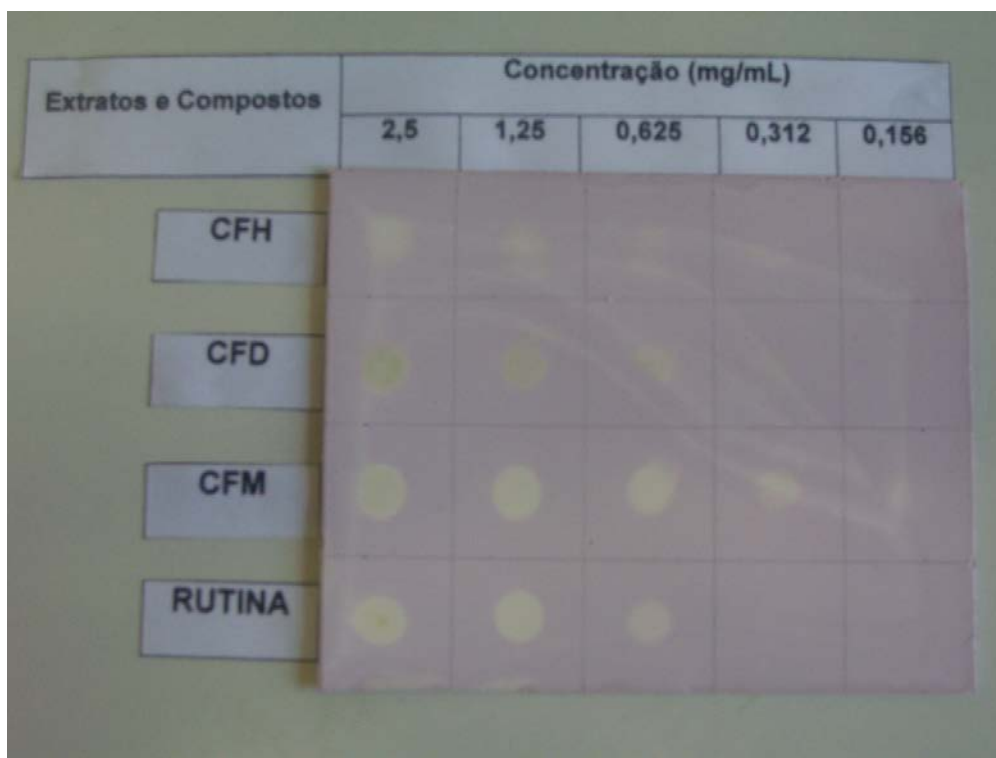
No teste proposto é utilizado como padrão o flavonóide rutina para comparação com as amostras analisadas, visto que estudos anteriores comparando os efeitos do  $\alpha$ -tocoferol, do ácido ascórbico e da rutina no processo de peroxidação, mostram a rutina como potente inibidor de radicais livres, devido à capacidade da rutina em neutralizar radicais hidroxil e superóxido (Cotelle *et. al.*, 1992).



**Esquema 04- Possível interação entre DPPH e o flavonóide rutina**

**7.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

A análise qualitativa dos extratos brutos indicou a presença de atividade antioxidante mais pronunciada no extrato metanólico (CFM) quando comparados ao controle positivo (Rutina), que possui atividade em praticamente todas as concentrações testadas (**Figura 130**, p. 183).



**Figura 130.** Análise antioxidante qualitativa dos extratos brutos

**Legenda:**CFH – Extrato hexânico de *C. fairchildiana*CFD – Extrato em diclorometano de *C. fairchildiana*CFM – Extrato metanólico de *C. fairchildiana*

De posse dos resultados obtidos na análise qualitativa realizou-se a análise quantitativa, na qual se obteve os resultados da  $EC_{50}$  (**Tabela 15**, p. 184) de cada extrato conforme tabela abaixo.

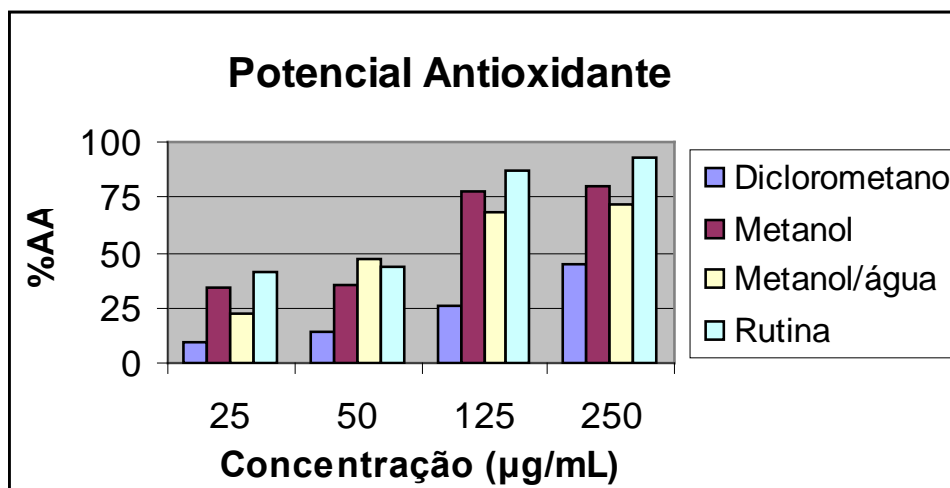
**Tabela 15** - Valores de  $EC_{50}$  dos extratos de *C. fairchildiana*, utilizando a Rutina como padrão.

<b>Espécie</b>	<b>Extrato</b>	<b><math>EC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>C. fairchildiana</i>	Diclorometânico (folhas)	1378, 10
	Metanólico (folhas)	42,18
	Hidroalcoólico (folhas)	93,62
Rutina	Metanólico	26,96

Os valores de  $EC_{50}$  indicam a Concentração Efetiva suficiente para obter 50% do máximo da eficiência estimada em 100% para reduzir o radical livre DPPH. De acordo com os resultados obtidos observamos correlação entre as análises qualitativa e quantitativa, na qual ambas indicam o extrato metanólico com maior atividade antioxidante, fato que também está em acordo à investigação fitoquímica, que indica o referido extrato como rico em flavonóides, especialmente os flavonóides rutina e quercetina.

Pode-se ainda observar, de acordo com a **Figura 131** (p. 185), que há um aumento linear da porcentagem de atividade antioxidante com o aumento da concentração.





**Figura 131** - Avaliação do potencial antioxidante (%AA x Concentração).

### 7.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS DE *Clitoria fairchildiana*

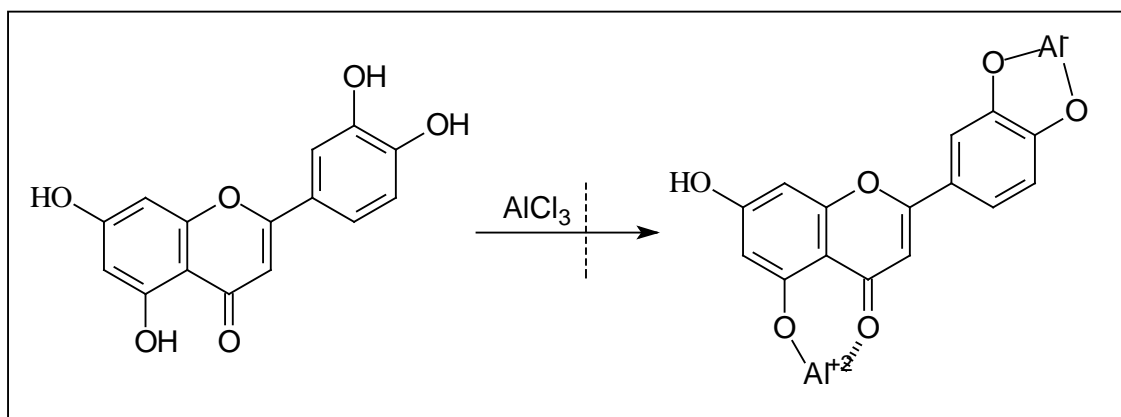
Nos últimos anos, várias evidências têm indicado os radicais livres e outros oxidantes como responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como cânceres, doenças cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Souza *et. al.*, 2007).

Assim, é crescente o interesse em encontrar antioxidante naturais como forma de prevenir essa série de doenças, principalmente flavonóides, por serem substâncias naturais que apresentam efeito importante contra espécies reativas de oxigênio derivadas de radicais livres, podendo interagir e penetrar na camada lipídica da membrana, prevenindo a lipoperoxidação e, conseqüentemente, as doenças associadas aos radicais livres (Zheng *et. al.*, 2003).

Então, com o intuito de correlacionar a atividade antioxidante com o teor de flavonóides presentes nos extratos da espécie em estudo foi utilizada a metodologia proposta por Rio (1996) modificada, onde se utiliza rutina como padrão, em solução de cloreto de alumínio (Santos & Blatt, 1998).

O uso de cloreto de alumínio no diagnóstico de grupamentos químicos em flavonóides ocorre pelo fato dele ser um reagente promotor de desvio batocrômico e hipocrômico em espectrometria no UV-visível, onde o cátion alumínio forma complexos com os flavonóides em solução metanólica

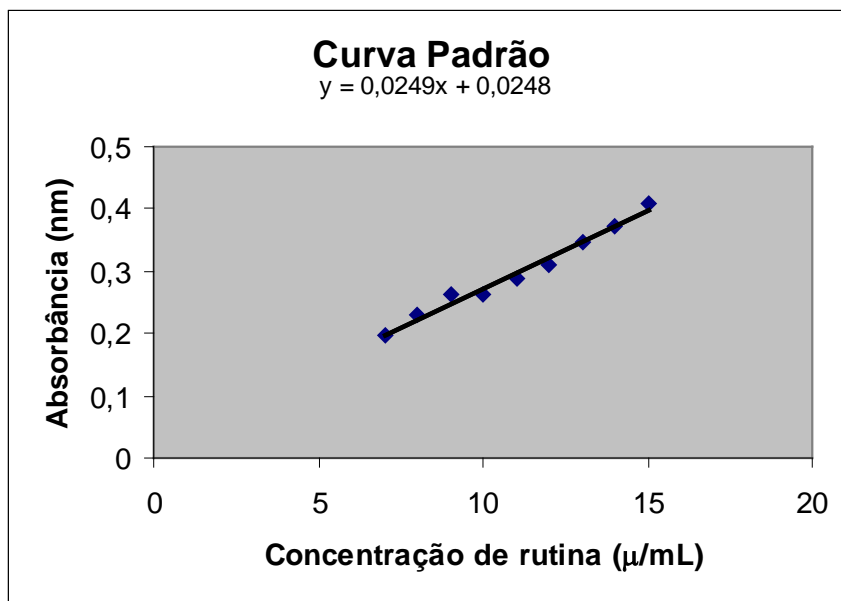
(Esquema 05, p. 186), ocorrendo na análise espectrométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação na coloração. Assim, é possível quantificar o teor de flavonóides totais em extratos brutos (Woisky, 1996).



**Esquema 05 - Formação do complexo de Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Markham, 1982)**

#### 7.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS DE *Clitoria fairchildiana*

De posse dos valores de absorbância da rutina em diferentes concentrações foi realizada a regressão linear. Assim, o teor de flavonóides totais contidos nos extratos analisados foi calculado usando a equação baseada na curva padrão.



$$A = 0,0249 C + 0,0248$$

Onde: A é a absorbância

C é o teor de flavonóides (µg/g)

Então, substituíram-se os valores de absorbância dos extratos e obteve-se o teor de flavonóides totais (**Tabela 16**, p. 187).

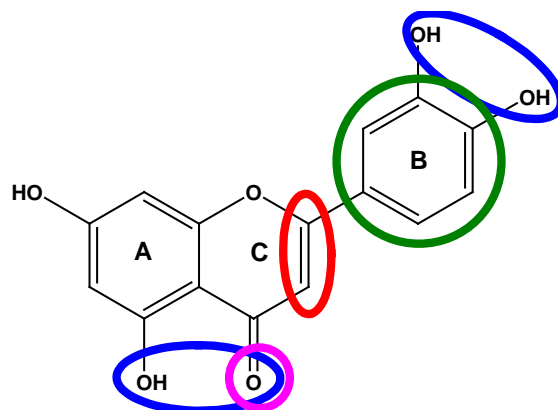
**Tabela 16** – Teor de Flavonóides Totais (TFT) dos extratos de *C. fairchildiana*, utilizando a Rutina como padrão.

Espécie	Extrato	TFT (µg/mL)	Desvio Padrão
<i>C. fairchildiana</i>	Metanólico (folhas)	1,4155	$1,41 \times 10^{-4}$
	Hidroalcoólico (folhas)	não detectado	-

Podemos então concluir que o extrato metanólico apresenta considerável teor de flavonóides, fato este que confirma os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante, a qual mostra esse extrato como o de maior potencial antioxidante. Sendo assim, podemos dizer que o potencial antioxidante deste extrato esta relacionado com o percentual de flavonóides contidos no extrato.

De acordo com o resultado obtido cada ml de extrato metanólico apresenta cerca de 1,4 µg de flavonóides e dentre eles podemos destacar a

rutina, canferol e quercetina, os quais possuem os requisitos básicos que definem um flavonóide como potencial antioxidante. Dentro desses requisitos o mais importante deles é o sistema catecol ou anel B diidroxilado. Outros fatores importantes são: presença de insaturação no anel C, presença de função 4-oxo no anel C e a presença de outras funções capazes de quelar íons de metais de transição como o cobre e ferro (**Figura 132**, p. 188) (Williams, *et. al.*, 2004).



**Figura 132** - Estrutura do flavonóide quercetina e os requisitos que definem um flavonóide como potencial antioxidante

## 7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. P.; David, J. M. (2006). *Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. Química Nova*. v. 29. p. 113-123.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997), *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. Lebensm-Wiss. u.- Technol.* 30, 609-615.
- Cotelle, N., Bernier, J. L., Henichat, J. P., Catteau, J., Gaydou, E., Wallet, J. C. (1992). *Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. Free Radic Biol Med.* 13 (3), p. 211.
- Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitão, S. G. (2001). *Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidante Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. Phytotherapy Research.* 15. 127-130.
- Rice-Evans, C. (2001). *Flavonoids Antioxidants. Current Medicinal Chemistry.* v. 8, 797-807.
- Rodrigues, H. G., Diniz, Y. S., Faine, L. A., Almeida, J. A., Fernandes, A. H., Lourenzi, E., Novelli, B. (2003). *Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. Revista de Nutrição.* v. 16, n 13.
- Santos, M. D., Blatt, C. T. T. (1998). *Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. Revista Brasileira de Botânica.* v. 21, n 2.
- Silva, M. B. S. (2008). *Flavonóides com capacidade antioxidante.* Química Aplicada – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

- Souza, C. M. M., Silva, H. R., Vieira Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S., Chaves, M. H. (2007). *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais*. *Química Nova*. v. 30, nº 2. p. 351-355.
- Woisky, R. G. (1996). *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. *Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências farmacêuticas da USP*, para obtenção do grau de Mestre em Fármacos de medicamentos, p.74.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E., Evans-Rice, C. (2004). *Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules? Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 36, No. 7, p. 838-849.
- Yunes, R. S., Calixto, J. B. (2001). *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. UNOESC, SC. Chapecó, ARGOS Editora Universitária, p. 320-326.
- Zheng, Y., Wang, C. Y., Want, S. Y., Zheng, W. (2003). *Effect of Hingh-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v. 51, p. 7162-7169.

## 8. ATIVIDADE CITOTÓXICA

### 8.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS LARVAS DE *Artemia salina*

Avaliações biológicas preliminares é uma etapa importante que vem cada dia mais, sendo inserida na rotina dos laboratórios de Produtos Naturais. Por não dispor de condições necessárias para testes mais elaborados é preciso que o teste seja caracterizado por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Nesse perfil, um dos testes mais utilizados é o da avaliação citotóxica frente às larvas de *Artemia salina*.

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas (Siqueira *et. al.*, 1998). O único parâmetro envolvido no bioensaio é a morte ou vida dos microcrustáceos em contato com o material analisado e os dados obtidos são facilmente tratados estatisticamente (Cavalcante *et. al.*, 2000).

O primeiro trabalho relativo ao uso desse microcrustáceo em bioensaios data de 1956, e desde então ele vem sendo bastante utilizado (Cavalcante *et. al.*, 2000). Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade frente a *A. salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida (Siqueira *et. al.*, 1998), além da correlação entre a toxicidade sobre o microcrustáceo e a citotoxicidade para células cancerosas do tipo P-388 (Meyer *et. al.*, 1982).

Segundo McLaughlin, os extratos são considerados ativos se apresentarem valores de  $DL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$  e as substâncias puras são consideradas muito ativas se apresentarem valores de  $DL_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$  (McLaughlin *et. al.*, 1982).

### 8.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS LARVAS DE *Artemia salina*

Os valores obtidos experimentalmente (**Tabela 17**, p. 192), mostram o extrato MeOH como o de maior atividade citotóxica frente às larvas de *A. salina*, visto que a  $DL_{50}$  obtida é de  $59,4 \mu\text{g/mL}$ , isto é  $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$ .

Os extratos de baixa polaridade, hexânico e diclorometânico, também apresentaram atividade, o que está de acordo com dados encontrados na literatura (Galotta & Boaventura, 2005), a qual relata atividade citotóxica para fitoesteróides e triterpenos. Sendo assim, há concordância entre os dados da literatura e a investigação fitoquímica, uma vez que essa classe de substância foi encontrada no extrato hexânico.

O extrato que não apresentou letalidade contra a larva ( $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ) foi o MeOH/H<sub>2</sub>O, visto que é um extrato predominantemente rico em açúcares.

**Tabela 17.** Valores obtidos do teste de letalidade frente às larvas de *Artemia salina*

<b>Amostra</b>	<b>DL<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
Extrato em Hexano	372,0
Extrato em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	433,0
Extrato em MeOH	59,4
Extrato em MeOH/H <sub>2</sub> O (80:20)	1686,2



### 8.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cavalcante, M. F., de Oliveira, M. C. C., Velandia, J. R., Echevarria, A. (2000). *Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a Artemia salina lech. Química Nova*, 23 (1): 20-22.
- Galotta, A. L. Q. A., Boaventura, M. A. D. (2005). *Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (Euterpe precatória MART., Arecaceae). Química Nova*, 28 (4): 610-613.
- McLaughlin, J. L. Colman-Saizarbitoria, T. e Anderso J.E. (1982). *Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, p.18, 13-18.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.F., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982). *Brine Shrimp a Convenient Genera Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica*, 45,31.
- Siqueira, M.J., Bomm, D.M., Pereira, G.F.N., Garcez, S.W., Boaventura, D.A. M. (1998). *Estudo fitoquímico de Unonopsis lindmanii-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a Artemia salina Leach. Química Nova*. 21(5).

## **9. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **9.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO**

O levantamento bibliográfico foi realizado através de pesquisas bibliográficas de periódicos em bibliotecas e em sítios disponíveis na INTERNET.

### **9.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO**

As folhas de um espécime de *Clitoria fairchildiana* foram coletadas de árvore da arborização urbana no Município de São Francisco do Itabapoana em janeiro de 2006.

### **9.3. SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL**

As folhas (949 g), de um espécime de *Clitoria fairchildiana*, foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho do tipo Willey.

### **9.4. MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS**

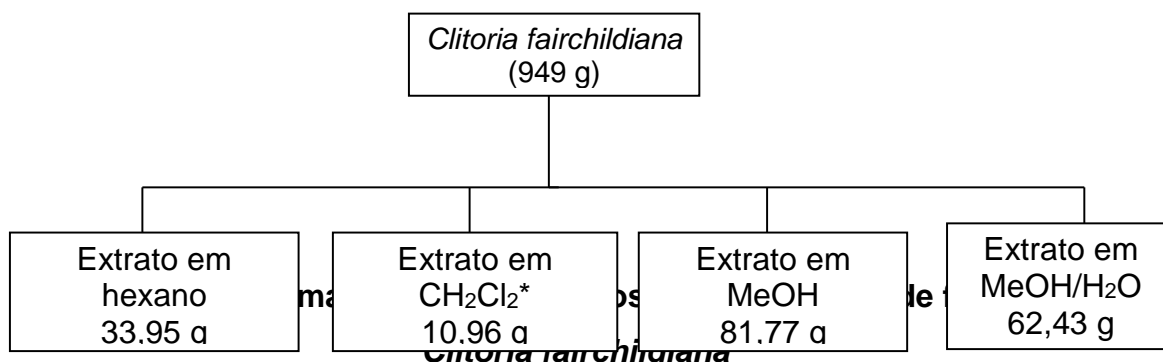
No processo de extração, fracionamento e purificação foram utilizados os seguintes materiais:

- Na etapa de extração bem como no fracionamento e purificação foi utilizado solventes Synth e Vetec;
- A concentração dos extratos e frações foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Büchi B-480 e Fisatom 802;
- As soluções aquosas foram liofilizadas em liofilizador Thermo Savant;
- Nas etapas de fracionamento e purificação, foram utilizadas, sílica gel 60G (0,063-0,200 mm) Merck, sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) Merck, sílica gel silanizada 60 (0,063-0,200 mm) Merck, Sephadex LH-20 Pharmacia e celulose microcristalina Merck.

- Utilizou como agente dessecante: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro Vetec;
- Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> e RP-18 F<sub>254</sub> Merck;
- As cromatoplasmas foram reveladas através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda  $\lambda = 254$  e  $366$  nm e/ou com revelador cromatogênico (vanilina sulfúrica, sulfato cérico e solução alcoólica de cloreto férrico).
- Cromatógrafo contracorrente Modelo DCC-300 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)

### 9.5. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Depois de moída e pesadas (949 g) às folhas foram submetidas à maceração exhaustiva com hexano e após filtração e eliminação do solvente, foram obtidos 33,95 g (3,58 % do peso da planta seca) de extrato hexânico bruto. O material vegetal após extração com hexano foi submetido à nova extração utilizando diclorometano como solvente, fornecendo 10,96 g (1,15% do peso da planta seca) de extrato bruto em diclorometano. Após extração com diclorometano o material vegetal foi novamente submetido à extração utilizando-se metanol como solvente fornecendo 81,77 g (8,62 % do peso da planta seca) de extrato metanólico bruto. E por fim, o material vegetal foi submetido à extração utilizando metanol e água na proporção de 8:2, fornecendo 62,43 g (6,58% do peso da planta seca) do extrato bruto em metanol/água.



\* Fração não estudada pelo fato de análise preliminar em CCDA com vários sistemas de solventes ter revelado principalmente a presença de clorofila.

### 9.6. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO HEXÂNICO

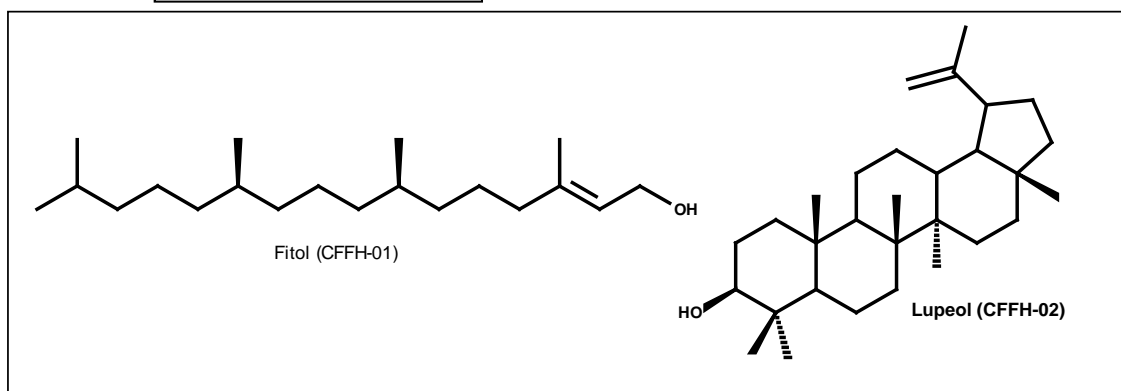
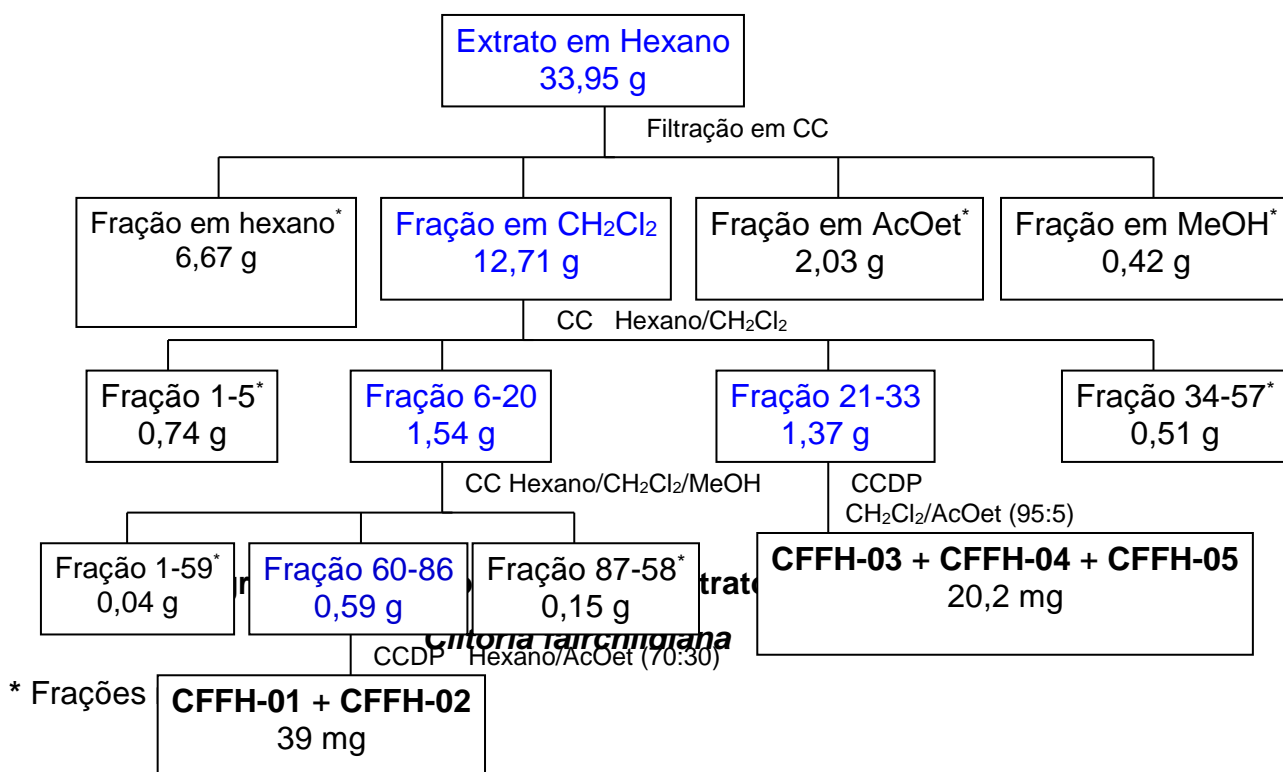
O extrato em hexano (33,95 g) foi submetido à filtração em coluna de sílicagel (sob pressão) em funil de filtro sinterizado, utilizando a seguinte escala de solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento foram obtidas 4 frações que foram concentradas à pressão reduzida em evaporador rotativo.

A fração de diclorometano foi fracionada em coluna de sílicagel com os solventes hexano, diclorometano e metanol em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento foram obtidas 57 frações. As frações que apresentaram o mesmo R<sub>f</sub> quando analisadas por CCDA foram reunidas.

A subfração obtida da união das frações de número 6-20 (1,54 g) foi fracionada em coluna de sílica gel com os solventes hexano, diclorometano e metanol em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento foram obtidas 88 frações. As frações que apresentaram o mesmo R<sub>f</sub> quando analisadas por CCDA foram reunidas.

A subfração obtida da união das frações de número 60-86 foi submetida a processo de purificação em CCDP utilizando como eluente diclorometano e metanol (70:30), resultando no isolamento da mistura de fitol (**CFFH-01**) e do triterpeno lupeol (**CFFH-02**).

Da subfração obtida da união das frações de número 21-33 (1,37 g) foi retirada uma alíquota de 0,40 g que foi submetida a processo de purificação em CCDP utilizando como eluente diclorometano e acetato de etila (95:5). Este procedimento resultou no isolamento da mistura de esteróides estigmasterol (**CFFH-03**), sitosterol (**CFFH-04**) e campesterol (**CFFH-05**).



### Fitol (CFFH-01)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** = C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O

**P.M.** = 296 u.m.a.

**P.F.** (mistura) = 67° C

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[α]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade** = clorofórmio

**Espectrometria de massas:** (70 eV) *m/z*: 296 (M<sup>+</sup>), 278, 123, 71.

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  59,3 (C-1), 123,0 (C-2), 140,2 (C-3), 39,9 (C-4), 25,1 (C-5), 36,6 (C-6), 34,2 (C-7), 37,4 (C-8), 24,4 (C-9), 32,7 (C-10), 34,2 (C-11), 37,4 (C-12), 24,7 (C-13), 39,9 (C-14), 27,9 (C-15), 22,6 (C-16), 22,7 (C-17), 19,7 (C-18), 19,6 (C-19), 16,1 (C-20)

**Lupeol (CFFH-02)**

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** =  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$

**P.M.** = 426 u.m.a.

**P.F.** (mistura) =  $67^\circ\text{C}$

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

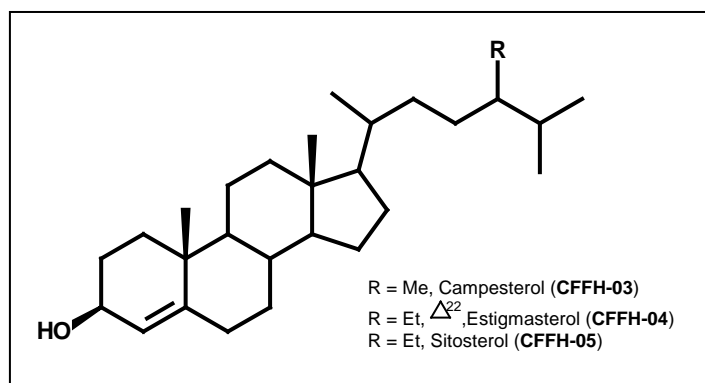
**$[\alpha]_D$ :** não determinado

**Solubilidade** = clorofórmio

**Espectrometria de massas:** (70 eV)  $m/z$ : 426 ( $\text{M}^+$ ), 203, 189, 81.

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz):**  $\delta$  38,7 (C-1), 27,4 (C-2), 78,9 (C-3), 38,8 (C-4), 55,3 (C-5), 18,3 (C-6), 34,3 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,1 (C-10), 20,9 (C-11), 25,1 (C-12), 38,1 (C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,6 (C-16), 42,9 (C-17), 48,3 (C-18), 47,9 (C-19), 150,8 (C-20), 29,8 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 15,3 (C-24), 16,1 (C-25), 16,0 (C-26), 14,5 (C-27), 18,0 (C-28), 109,3 (C-29), 19,3 (C-30).

**Ergost-5-en-3-ol (CFFH-03), Estigmast-5,22-dien-3-ol (CFFH-04) e Estigmast-5-en-3-ol (CFFH-05): Campesterol, Estigmasterol e  $\beta$ -Sitosterol**



### Campesterol (CFFH-03)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** = C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O

**P.M.** = 400 u.m.a.

**P.F.** (mistura) = não determinado

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade** = clorofórmio

**Espectrometria de massas:** (70 eV) *m/z*: 400 (M<sup>+</sup>), 289, 43.

### Estigmasterol (CFFH-04)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** = C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O

**P.M.** = 412 u.m.a.

**P.F.** (mistura) = não determinado

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade** = clorofórmio

**Espectrometria de massas:** (70 eV) *m/z*: 412 (M<sup>+</sup>), 81, 55.

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Hz):**  $\delta$  37,3 (C-1), 31,9 (C-2), 71,8 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 34,0 (C-7), 31,9 (C-8), 50,2 (C-9), 36,2 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,8 (C-14), 24,3 (C-15), 28,9 (C-16), 56,1 (C-17), 12,0 (C-18), 19,4 (C-19), 39,8 (C-20), 18,8 (C-21),

31,9 (C-22), 26,2 (C-23), 45,9 (C-24), 29,7 (C-25), 19,8 (C-26), 19,8 (C-27), 23,1 (C-28).

### **$\beta$ -sitosterol (CFFH-05)**

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** = C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O

**P.M.** = 414 u.m.a.

**P.F.** (mistura) = não determinado

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[\alpha]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade** = clorofórmio

**Espectrometria de massas:** (70 eV) *m/z*: 414 (M<sup>+</sup>), 396, 213, 145, 107, 43.

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Hz):**  $\delta$  37,3 (C-1), 31,9 (C-2), 71,8 (C-3), 42,3 (C-4), 140,8 (C-5), 121,7 (C-6), 34,0 (C-7), 31,9 (C-8), 50,2 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,8 (C-14), 24,3 (C-15), 28,9 (C-16), 56,1 (C-17), 12,0 (C-18), 19,4 (C-19), 39,8 (C-20), 19,1 (C-21), 31,9 (C-22), 26,2 (C-23), 49,90 (C-24), 29,68 (C-25), 19,80 (C-26), 19,80 (C-27), 23,12 (C-28), 11,87 (C-29).

## **9.7. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO**

Uma alíquota do extrato metanólico (35,76 g) foi particionada entre MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOet (I) e MeOH/H<sub>2</sub>O/ BuOH (II), obtendo-se 2 frações.

A fração (I) foi submetida a filtração em coluna de gel de sílica utilizando os seguintes solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOet, Acetona e MeOH/H<sub>2</sub>O em ordem crescente de polaridade.

A fração em AcOet foi submetida a partição em coluna de celulose utilizando como solvente AcOet saturado com água e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Após este procedimento foram obtidas 21 subfrações.

A subfração 21 foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluído com MeOH resultando na mistura dos flavonóides **CFM-01A** e **CFM-01B**.



A fração (II) foi fracionada em coluna de sílica silanizada utilizando com eluente H<sub>2</sub>O/MeOH na proporção de 2:1.

Após este procedimento foram obtidas 110 frações. As frações que apresentaram o mesmo R<sub>f</sub> quando analisadas em CCDA foram reunidas.

A subfração 34-39 foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluido com MeOH.

Após este procedimento foram obtidas 97 frações.

A subfração 47-67 foi fracionada em cromatografia de coluna de sílica flash com os solventes H<sub>2</sub>O/AcOet/Acetona na proporção 1:3:2, resultando na mistura dos flavonóides **CFM-03A** e **CFM-03B**.

A subfração 68-97 foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluido com MeOH resultando na mistura dos flavonóides **SM-05A** e **SM-05B**.

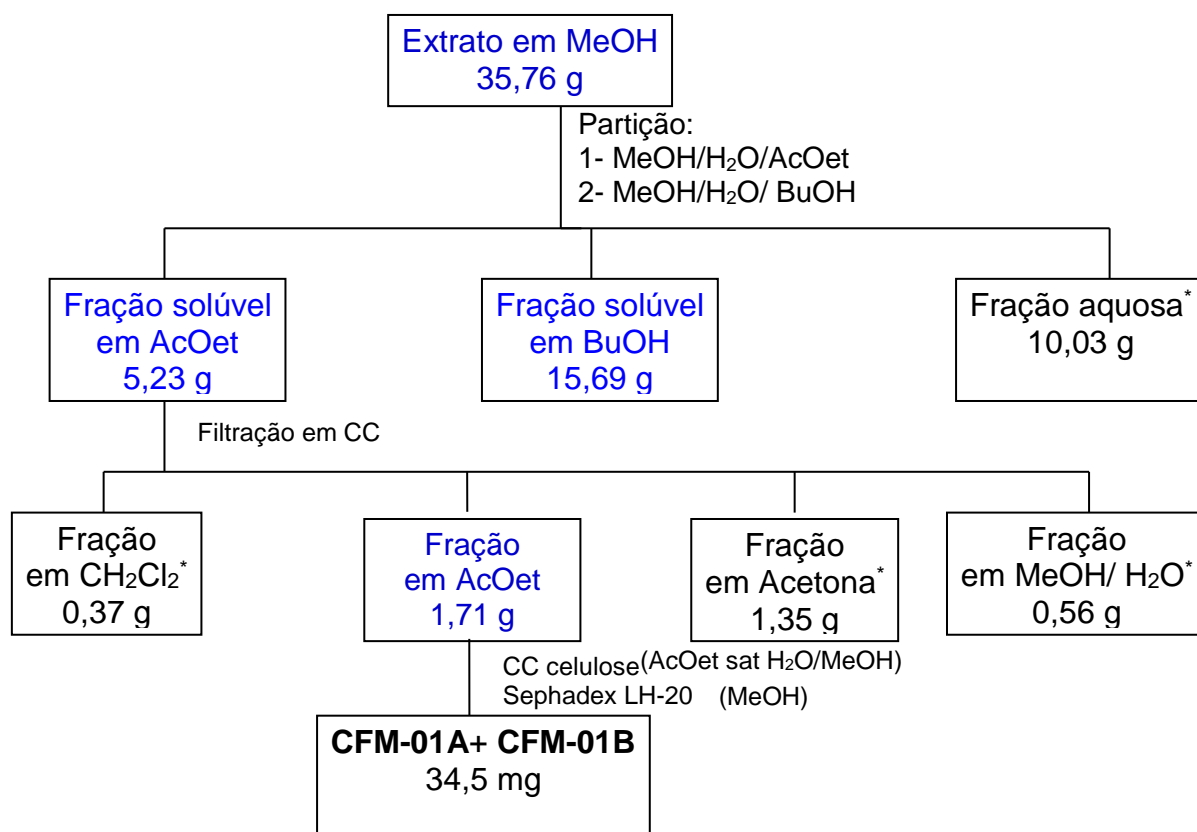
Outra alíquota do extrato metanólico (m= 2,6 g) foi submetida à Cromatografia de gotas contracorrente, operando a temperatura ambiente no modo descendente e com a fase inferior (menos polar) da mistura CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (7:13:8) utilizada como fase móvel e a fase superior (mais polar) como fase estacionária (Hostettman, *et. al.*, 1984).

Então, o extrato foi dissolvido na parte menos polar da mistura e aplicado no cromatógrafo através de um *loop* de 20 mL de amostra. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min e a quantidade de amostra coletada foi de 5 mL. O progresso da separação foi monitorado através de cromatografia em camada delgada (Si gel 60) utilizando a fase estacionária (utilizada no cromatógrafo) como solvente de desenvolvimento.

Este procedimento produziu 237 frações de 5 mL que foram reunidas de acordo com semelhança de R<sub>f</sub>, resultando em 10 frações.

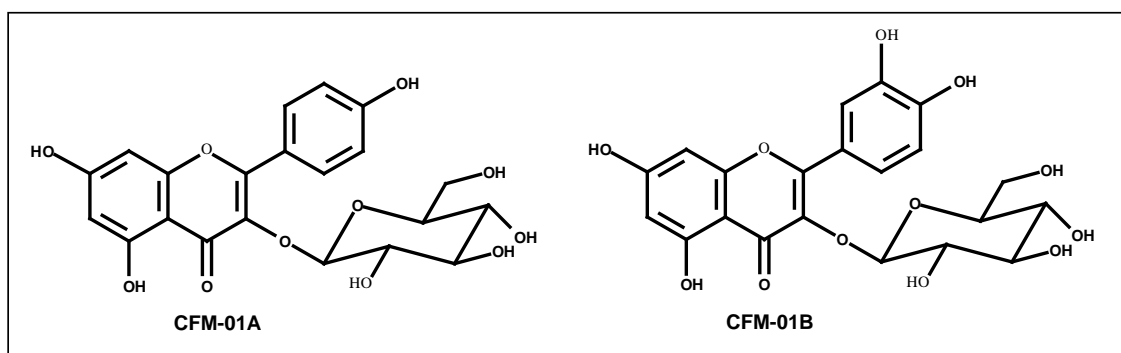
A subfração 5 foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluido com MeOH resultando no flavonóide **SM-07**.

A subfração 9 foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluido com MeOH resultando no flavonóide **CFM-01B**.



**Fluxograma 03. Fracionamento do extrato metanólico de folhas de  
*Clitoria fairchildiana* – Parte em Acetato**

\* Frações não estudadas.



**Flavonóide (CFM-01A)**

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** = C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

**P.M.** = 448 u.m.a.

**P.F.** (mistura) = não determinado

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[α]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade** = metanol

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Hz):** δ 158,4 (C-2), 135,6 (C-3), 179,4 (C-4), 162,9 (C-5), 101,1 (C-6), 166,5 (C-7), 94,9 (C-8), 158,4 (C-9), 105,5 (C-10), 122,8 (C-1'), 132,2 (C-2'), 116,0 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,0 (C-5'), 132,2 (C-6'), 104,3 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,3 (C-3''), 71,3 (C-4''), 78,03 (C-5''), 62,5 (C-6'').

**Flavonóide (CFM-01B)**

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**F.M.** = C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

**P.M.** = 456 u.m.a.

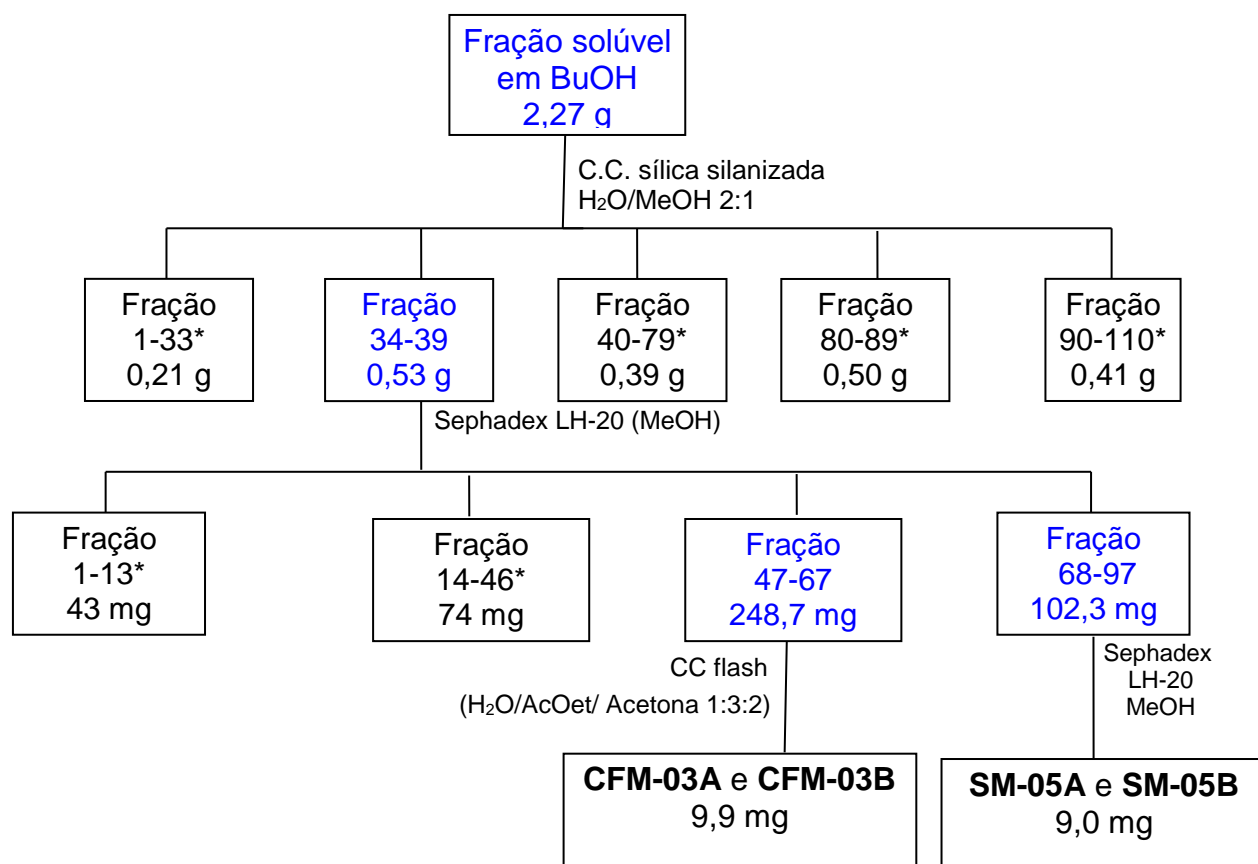
**UV:** não determinado

**IV:** 3224 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>OH</sub>), 1658 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C=O</sub>), 1604 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C=C</sub>)

**[α]<sub>D</sub>:** não determinado

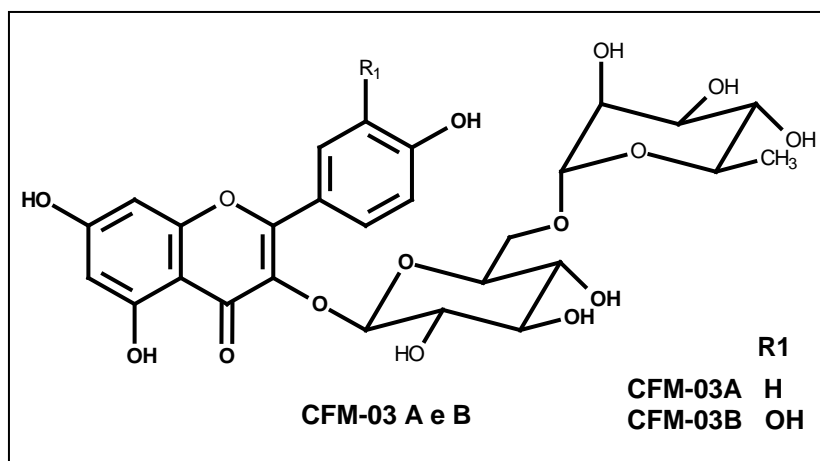
**Solubilidade** = metanol

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Hz):** δ 158,9 (C-2), 135,6 (C-3), 179,4 (C-4), 162,9 (C-5), 101,1 (C-6), 166,5 (C-7), 94,9 (C-8), 158,9 (C-9), 105,5 (C-10), 122,9 (C-1'), 116,1 (C-2'), 145,9 (C-3'), 149,8 (C-4'), 117,5 (C-5'), 132,2 (C-6'), 100,1 (C-1''), 75,0 (C-2''), 78,3 (C-3''), 69,9 (C-4''), 77,1 (C-5''), 61,9 (C-6'').



**Fluxograma 04. Fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Clitoria fairchildiana* – Parte em Butanol**

\* Frações não estudadas.



### Flavonóide (CFM-03A)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**PF** (mistura): 187,3 °C

**UV:** não determinado

**IV:** 3440  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 1747  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1654, 806 e 597  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 2854  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ),

**$[\alpha]_{\text{D}}$ :** não determinado

**Solubilidade** = metanol

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz):**  $\delta$  158,6 (C-2), 134,6 (C-3), 179,4 (C-4), 163,7 (C-5), 100,2 (C-6), 166,7 (C-7), 95,0 (C-8), 159,5 (C-9), 105,5 (C-10), 123,2 (C-1'), 132,4 (C-2'), 116,1 (C-3'), 161,2 (C-4'), 116,1 (C-5'), 132,4 (C-6'), 104,8 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,2 (C-3''), 69,7 (C-4''), 77,2 (C-5''), 68,6 (C-6'') 102,4 (C-1'''), 72,3 (C-2'''), 72,1 (C-3'''), 73,9 (C-4'''), 69,2 (C-5'''), 19,5 (C-6''').

### Flavonóide (CFM-03B)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**PF** (mistura): 187,3 °C

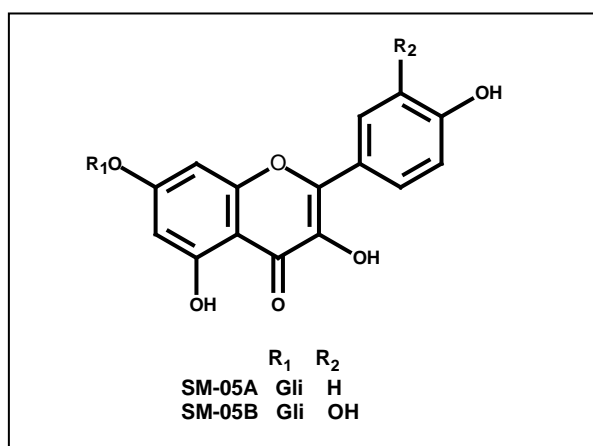
**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**$[\alpha]_{\text{D}}$ :** não determinado

**Solubilidade** = metanol

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz):**  $\delta$  158,6 (C-2), 135,6 (C-3), 179,4 (C-4), 163,7 (C-5), 101,1 (C-6), 166,7 (C-7), 94,9 (C-8), 159,5 (C-9), 105,5 (C-10), 123,1 (C-1'), 117,7 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,0 (C-4'), 117,2 (C-5'), 123,5 (C-6'), 104,7 (C-1''), 75,8 (C-2''), 78,2 (C-3''), 69,7 (C-4''), 77,2 (C-5''), 68,6 (C-6'') 101,9 (C-1'''), 72,3 (C-2'''), 72,1 (C-3'''), 73,9 (C-4'''), 69,2 (C-5'''), 19,5 (C-6''').



### Flavonóide (SM-05A)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**PF** (mistura): 186,4 °C

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade =** metanol

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz):**  $\delta$  148,5 (C-2), 134,3 (C-3), 178,1 (C-4), 161,1 (C-5), 98,8 (C-6), 165,1 (C-7), 94,4 (C-8), 156,1 (C-9), 103,0 (C-10), 121,8 (C-1'), 130,8 (C-2'), 131,0 (C-3'), 157,6 (C-4'), 114,6 (C-5'), 130,8 (C-6'), 104,1 (C-1''), 75,9 (C-2''), 77,1 (C-3''), 71,8 (C-4''), 74,4 (C-5''), 77,1 (C-6'').

### Flavonóide (SM-05B)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**PF** (mistura): 186,4 °C

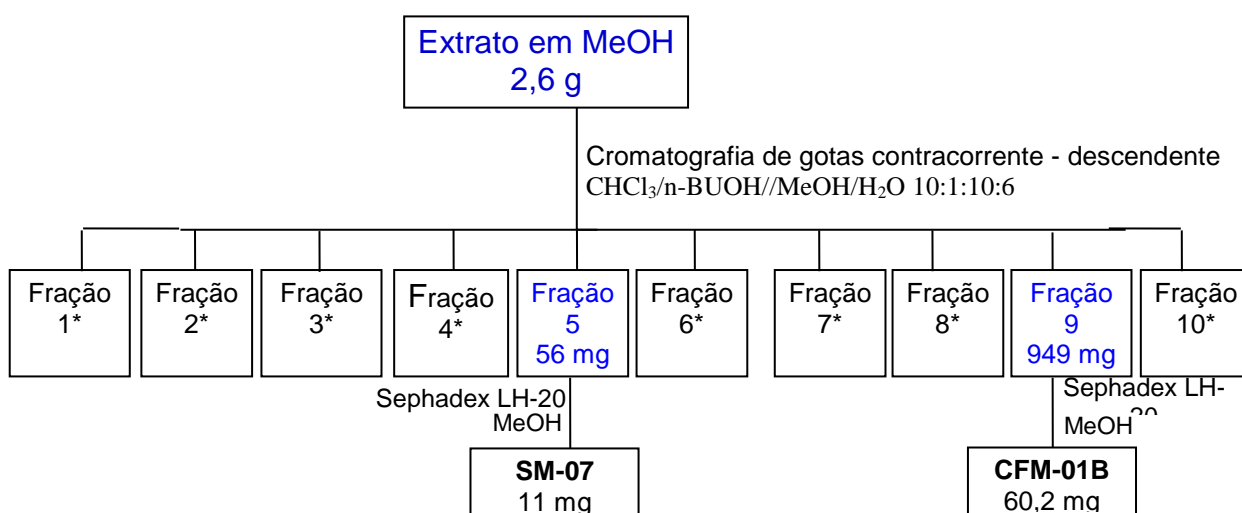
**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>:** não determinado

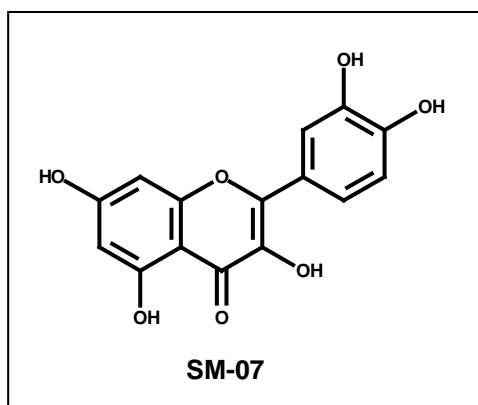
**Solubilidade** = metanol

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{H}_2$ ):**  $\delta$  148,5 (C-2), 134,3 (C-3), 178,1 (C-4), 161,1 (C-5), 98,7 (C-6), 165,1 (C-7), 93,5 (C-8), 156,1 (C-9), 103,0 (C-10), 121,8 (C-1'), 116,1 (C-2'), 116,2 (C-3'), 157,6 (C-4'), 114,8 (C-5'), 121,7 (C-6'), 104,2 (C-1''), 76,8 (C-2''), 77,1 (C-3''), 69,9 (C-4''), 73,7 (C-5''), 77,1 (C-6'').



**Fluxograma 05. Fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Clitoria fairchildiana* utilizando a Cromatografia de gotas contracorrente**

\*Frações não estudadas.



### Flavonóide (SM-07)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

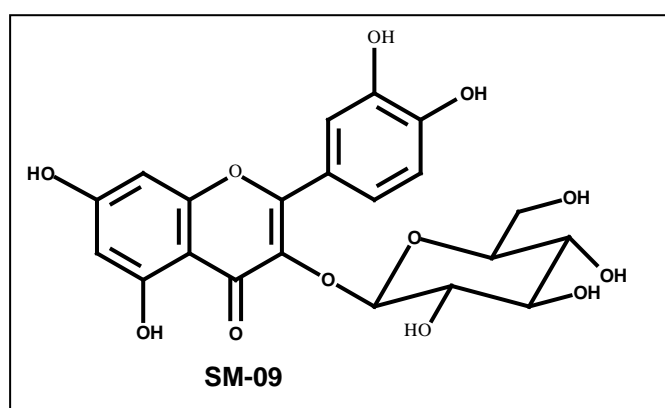
**UV:** não determinado

**IV:** 3224  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 1604  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1658, 798 e 594  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 2927  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ),

**$[\alpha]_{\text{D}}$ :** não determinado

**Solubilidade =** metanol

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz):**  $\delta$  147,5 (C-2), 135,9 (C-3), 175,9 (C-4), 161,1 (C-5), 98,1 (C-6), 164,7 (C-7), 93,2 (C-8), 156,9 (C-9), 103,3 (C-10), 122,8 (C-1'), 114,6 (C-2'), 144,9 (C-3'), 146,6 (C-4'), 114,9 (C-5'), 120,3 (C-6').



### Flavonóide (CFM-01B)

**Aspecto físico:** sólido cristalino branco

**PF:** 184,3°C

**UV:** não determinado



IV: não determinado

$[\alpha]_D$ : não determinado

**Solubilidade** = metanol

**Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz):**  $\delta$  157,7 (C-2), 134,3 (C-3), 178,1 (C-4), 161,1 (C-5), 98,6 (C-6), 164,8 (C-7), 93,5 (C-8), 157,0 (C-9), 104,3 (C-10), 121,9 (C-1'), 114,7 (C-2'), 144,5 (C-3'), 148,5 (C-4'), 116,3 (C-5'), 121,7 (C-6'), 103,1 (C-1''), 74,4 (C-2''), 77,0 (C-3''), 69,9 (C-4''), 76,8 (C-5''), 61,2 (C-6'').

### 9.8. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANOL/ÁGUA

Parte do extrato metanol/água (31,29 g) foi particionada entre MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , sendo que a parte solúvel em MeOH foi parcionada em AcOet, obtendo-se, assim, duas frações, uma solúvel em acetato e outra insolúvel.

A fração solúvel em AcOet foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluido com MeOH.

Após este procedimento foram obtidas 52 frações. As frações que apresentaram o mesmo  $R_f$  quando analisadas em CCDA foram reunidas.

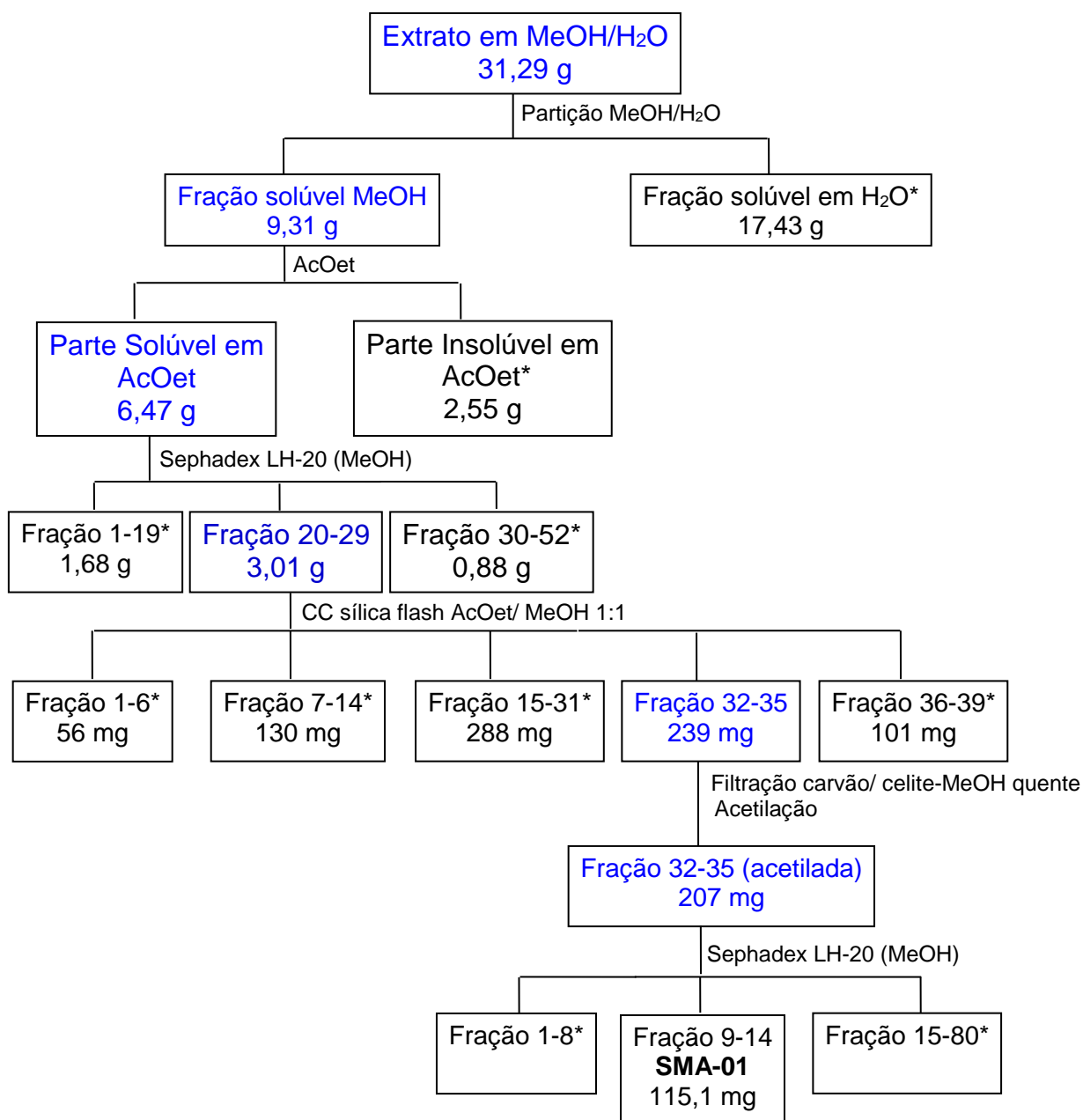
A subfração 20-29 foi submetida à cromatografia de sílica flash eluída com AcOet/MeOH na proporção 1:1.

Após este procedimento foram obtidas 39 frações.

A subfração 32-35 (m= 239 g) foi submetida à filtração em carvão ativo e, posteriormente em celite, utilizando-se MeOH à quente.

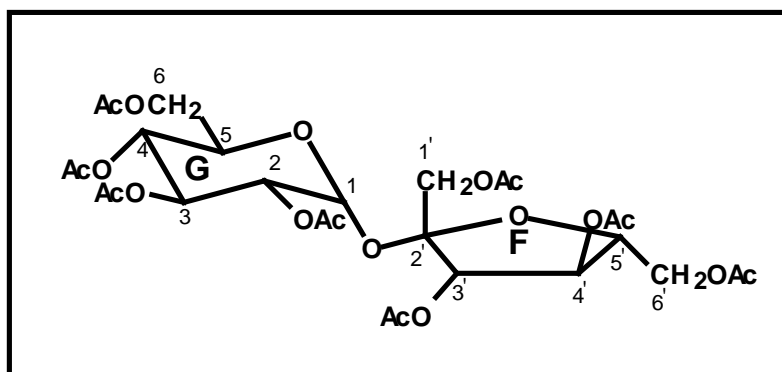
A subfração 32-35 (m= 207 g) depois de filtrada foi acetilada, utilizando piridina e anidrido acético (2:3) e, após este procedimento foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 eluido com MeOH.

Após este procedimento foram obtidas 80 frações. As frações que apresentaram o mesmo  $R_f$  quando analisadas em CCDA foram reunidas, resultando no açúcar **SMA-01**.



**Fluxograma 06. Fracionamento do extrato MeOH/H<sub>2</sub>O de folhas de *Clitoria fairchildiana***

- Frações não estudadas.



### Dissacarídeo (SMA-01)

**Aspecto físico:** óleo amarelo

**PF:** 80° C

**UV:** não determinado

**IV:** não determinado

**[α]<sub>D</sub>:** não determinado

**Solubilidade =** metanol

**Espectrometria de RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Hz): δ 89,8 (G-1), 70,2 (G-2), 69,5 (G-3), 68,1 (G-4), 68,4 (G-5), 61,6 (G-6), 62,8 (F-1), 103,9 (F-2), 75,6 (F-3), 74,9 (F-4), 70,2 (F-5), 63,5 (F-6), 170,0 (G-2, C=O), 169,9 (G-3, C=O), 169,4 (G-4, C=O), 170,6 (G-6, C=O), 170,1 (F-1, C=O), 169,6 (F-3, C=O), 169,9 (F-4, C=O), 170,4 (F-6, C=O), 20,6 (G-2, CH<sub>3</sub>), 20,6 (G-3, CH<sub>3</sub>), 20,6 (G-4, CH<sub>3</sub>), 20,5 (G-6, CH<sub>3</sub>), 20,6 (F-1, CH<sub>3</sub>), 20,5 (F-3, CH<sub>3</sub>), 20,6 (F-4, CH<sub>3</sub>), 20,6 (F-6, CH<sub>3</sub>), .

### 9.9. MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS

No processo de isolamento e identificação dos compostos químicos isolados foram utilizados os seguintes métodos de análise:

- Espectrometro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), registrados em espectrômetro Jeol Eclipse, operando a uma frequência de 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ .
- Espectrometro de gás acoplados ao massas (CG-EM), aparelho CGMS-QP 5050 SHIMADZU.
- Cromatógrafo contracorrente Modelo DCC-300 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)

### 9.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nas análises, qualitativa e quantitativa, foi empregado o método com o DPPH como radical livre (Mensor *et al.*, 2001; Argolo *et al.*, 2004).

No método qualitativo foi feita uma solução estoque 5,00 mg/mL em etanol com os extratos e com o controle positivo, os quais foram diluídos nas seguintes concentrações: 2,50; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg/mL. Aplicou-se 2 $\mu\text{L}$  de cada concentração dos extratos, do controle positivo (rutina) e do negativo (etanol) em uma cromatofolha de sílica gel 60 e em seguida imergiu-se a cromatofolha em uma solução etanólica 0,3 mM de DPPH durante 15 segundos. A observação da atividade antioxidante foi confirmada com a mudança de coloração das amostras aplicadas na placa de sílica e comparação com o controle positivo.

No método quantitativo uma solução estoque de concentração 1,00 mg/mL foi preparada com 10,0 mg de extrato em 10,0 mL de etanol. Esta solução foi submetida a diluições de: 25,0; 50,0; 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ . A análise foi realizada reagindo-se 1,00 mL de uma solução etanólica de DPPH 0,30 mM com 2,50 mL de cada concentração dos extratos em triplicata. Após 30 minutos, fez-se a leitura em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a 518 nm.

Os valores das absorvâncias foram convertidos para porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle\ negativo}} \right\}$$

O valor da concentração efetiva necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado em 100% (EC<sub>50</sub>) foi calculado através de uma regressão linear para cada extrato onde a abscissa representa a concentrações da amostra e a ordenada à porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%).

Como controle positivo foi utilizando o flavonóide rutina Merk® utilizando o mesmo procedimento feito para os extratos. Esse controle foi utilizado para comparação dos valores de (EC<sub>50</sub>) das amostras analisadas, onde valores menores ou próximos aos obtidos para o controle indicam que as amostras são ativas.

Como controle negativo foi utilizado 1 mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura do branco foi feita com 2,5 mL de cada diluição das amostras mais 1 mL de etanol.

### **9.11. AVALIAÇÃO DOS FLAVONÓIDES TOTAIS**

Na determinação do teor de flavonóides totais foi utilizada a metodologia de Rio (1996) modificado, a qual utiliza a rutina como padrão, em solução de cloreto de alumínio.

As amostras (10,0 mg ) foram solubilizadas em MeOH/H<sub>2</sub>O na proporção 70:30, respectivamente, até completar um volume de 250 mL. Dessa solução inicial foi utilizada uma alíquota de 15 mL, que foi diluída para 50 mL, e posteriormente, adicionado solução de cloreto de alumínio (2% em metanol).

Após 30 minutos, fez-se a leitura em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a 425 mn.

### 9.12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

O teste de letalidade frente às larvas de *A. salina* foi feito segundo metodologia proposta por McLaughlin (1982).

Utilizou-se para o bioensaio 50 mg de amostra dos extratos brutos. As amostras foram solubilizadas na mistura de solvente composto por H<sub>2</sub>O e DMSO [3:2 (5 mL)] e diluídas nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 ppm. Os ensaios foram realizados em quaduplicatas.

Os ovos do microcrutáceo foram colocados em água do mar artificial durante 48 horas sem presença de luz para que fossem eclodidos. Após a eclosão dos ovos, retirou-se 15 larvas que foram adicionadas nos tubos de ensaio. Com a adição da amostra e das larvas completou-se o volume do tubo para 5 mL com água do mar artificial. Após um período de 24 horas em presença de luz realizou-se a contagem dos indivíduos mortos e vivos.

Os dados obtidos (porcentagem de mortos e vivos) foram analisados pelo programa Finney Probit, desenvolvido por McLaughlin para análise estatística e determinação dos valores de DL<sub>50</sub>, a qual é a dose necessária para matar 50% dos indivíduos testados..

Valores de DL<sub>50</sub> ≤ 1000 são considerados ativos para extratos.

No teste em branco foram utilizados 50 ppm de H<sub>2</sub>O:DMSO (3:2).

No controle positivo utilizou-se o oxidante dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), comparado com a massa e as concentrações da amostra analisada, na qual tem-se a morte de todos os indivíduos.

Na preparação da água do mar artificial foram utilizados os seguintes sais, nas seguintes proporções para preparação de 1L da solução; NaCl (24g), CaCl<sub>2</sub> .2H<sub>2</sub>O (1,5g), KBr (0,1g), KCl (0,7g), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,0g), NaHCO<sub>3</sub> (0,2g) e MgCl .6H<sub>2</sub>O (11g).

Para eclosão dos ovos foi utilizado um microaquário (14x7,5cm) dividido ao meio por uma peneira.

As análises foram realizadas em quaduplicata.

### 9.13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argolo, A. C. C., Sant'Ana, A. E. G., Pletsch, M., Coelho, L. C. B. B. (2004). Antioxidant activity of leaves form *Bauhinia monandra*. *Bioresouce Technology*, 95. p. 229-233.
- Hostettmanm, K., Appolonia, C., Domon, B., Hostettmanm, M. (1984). *Droplet Countercurrent Chromatography – New Application in Natural Products Chemistry*. *Journal of Liquid Chromatography*, 7(2), 231-242.
- McLaughlin, J. L. Colman-Saizarbitoria, T. e Anderso J.E. (1982). *Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales*. *Revista de la Sociedad Venezoelana de Química*, p.18, 13-18.
- Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitão, S. G. (2001). *Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidante Activity by the Use of DPPH Free Radical Method*. *Phytotherapy Research*. 15. 127-130.
- Rio, R. G. W. (1996). *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

## 10. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das folhas de *Clitoria fairchildiana* resultou no isolamento de diferentes classes de metabólitos especiais. Do extrato hexânico das folhas foram isoladas dois terpenóides: fitol (**CFFH-01**) e lupeol (**CFFH-02**) e três esteróides: campesterol (**CFFH-03**), estigmasterol (**CFFH-04**) e  $\beta$ -sitosterol (**CFFH-05**). Do extrato metanólico foram isolados sete flavonóides: 3,3',4',5,7-pentaidroxiflavonol (**SM-07**), 5,7,4'-triidroxiglicopiranosilflavonol (**CFM-01A**) 5,7,3',4'- tetraidroxiglicopiranosilflanonol (**CFM-01B**) 3,5,4'-triidroxidi-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilflavonol (**SM-05A**), 3,5,3',4'-tetraidroxi-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilflavonol (**SM-05B**), 5,7,4'-triidroxidi-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1''' $\rightarrow$ 2''')-flavonol (**CFM-03A**), 5,7,3',4'-tetraidroxi-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1'' $\rightarrow$ 6'')-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1''' $\rightarrow$ 2''')-flavonol (**CFM-03A**). Do extrato hidroalcoólico foi isolado um dissacarídeo: sacarose peracetilada (**SMA-01**).

A avaliação da citotoxicidade com larvas de *Artemia salina* indicou o extrato metanólico como ativo, fato que está de acordo com o estudo fitoquímico, visto que nesse extrato foi identificada a presença de flavonóides.

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos usando o método com o radical livre DPPH, confirmou a correlação existente entre a atividade e a presença de substâncias fenólicas no extrato. O extrato que apresentou maior potencial foi o extrato metanólico.

O presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie *Clitoria fairchildiana* e da avaliação da atividade citotóxica e antioxidante.



## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

07/2009

Queiroz, Débora Contagem de

Constituintes químicos e avaliação citotóxica e antioxidante de folhas de *Clitoria fairchildiana* Howard: uma contribuição para o estudo do gênero *Clitoria* (Fabaceae) / Débora Contagem de Queiroz. – Campos dos Goytacazes, 2008.

xix, 214 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2008.

Orientadora: Leda Mathias.

Área de concentração: Produtos naturais.

Bibliografia: f. 213

1. *Clitoria fairchildiana* 2. Fabaceae 3. Flavonóides 4. DPPH 5. *Artemia salina* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

CDD 547.8