
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE *Sorocea bonplandii* (Baillon)
Burger, Lanjouw e Boer (Moraceae).

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PABLO ALBINO PEREIRA

Florianópolis

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE *Sorocea bonplandii* (Baillon)
Burger, lanjouw e Boer (Morácea).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia por Pablo Albino Pereira como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia

ORIENTADOR: Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg

Florianópolis

2005

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE *Sorocea bonplandii* (Baillon)

Burger, lanjouw e Boer (Morácea).

POR

PABLO ALBINO PEREIRA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:

**Prof^a. Dra. Tânia Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

Florianópolis, 10 de outubro de 2005

*“A natureza reservou para si tanta liberdade que
não a podemos nunca penetrar completamente
com o nosso saber e a nossa ciência.”*

Goethe

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste, sobretudo:

À minha orientadora Profa. Miriam de Barcelos Falkenberg cuja orientação, sempre estimulante, e apoio nos momentos mais difíceis foram essenciais;

Ao Prof. Dr. Jorge Palermo, do Departamento de Química Orgânica, da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, da Universidade de Buenos Aires, na Argentina, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear da substância A.9.2.3;

Ao Instituto de Biologia da Universidade de Chengdu (China), pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear das substâncias A7P, C7 e D1;

À Doutoranda Cristina Dagliolo do Instituto de Química de São Carlos pela realização dos espectros de massas da substância ME1;

Ao Prof. Dr. Daniel Falkenberg do Departamento de Botânica – UFSC pela identificação do material vegetal;

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel pelas pequenas e inestimáveis orientações;

À Sra. Solange Dias pela disposição e auxílio sempre presentes;

À todos os colegas de mestrado, sobretudo a Silvana e a, inicialmente colega, e hoje amiga Cíntia;

À toda a minha família;

À Deise que me ajudou a superar os momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
C-EP: FRAÇÃO ÉTER DE PETRÓLEO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO.....	X
RESUMO	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. SOROCEA BONPLANDII (BAILLON) BURGER, LANJOUW E BOER	4
3.2. ENSAIO DE LETALIDADE PARA LARVAS DE ARTEMIA SALINA LEACH	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1. MATERIAIS UTILIZADOS	10
4.1.1. <i>Material Vegetal</i>	10
4.1.2. <i>Solventes e Reagentes</i>	10
4.1.3. <i>Equipamentos</i>	11
4.1.4. <i>Bioensaio de Letalidade para larvas de Artemia salina</i>	11
4.2. PROCEDIMENTOS GERAIS.....	12
4.2.1. <i>Preparação da amostra vegetal</i>	12
4.2.2. <i>Ensaio de letalidade para larvas de Artemia salina Leach</i>	14
4.3. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO	16
4.3.1. <i>Isolamento da substância A7P</i>	16
4.3.2. <i>Isolamento da substância C7</i>	17
4.3.3. <i>Isolamento da substância D1</i>	19
4.3.4. <i>Isolamento da substância A9.2.3</i>	20
4.3.5. <i>Isolamento da substância ME1</i>	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	23
5.2. ENSAIO DE LETALIDADE PARA LARVAS DE ARTEMIA SALINA LEACH	24
5.3. ISOLAMENTO A PARTIR DO EXTRATO CLOROFÓRMICO.....	26
5.3.1. <i>Isolamento da substância A7P</i>	26
5.3.2. <i>Isolamento da substância C7</i>	29
5.3.3. <i>Isolamento da substância D1</i>	33
5.3.4. <i>Isolamento da substância A9.2.3</i>	34
5.4. ISOLAMENTO A PARTIR DO EXTRATO METANÓLICO	37
5.4.1. <i>Isolamento da substância ME1</i>	37
5.5. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA A7P	40
5.6. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA C7	45
5.7. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA D1	65
5.8. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA A9.2.3.....	72
5.9. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ME1	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
7. CONCLUSÕES	98
8. REFERÊNCIAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Soroceína I.	5
Figura 2. Soroceína E.	6
Figura 3. Soroceína F.	6
Figura 4. Soroceína G.	6
Figura 5. Glicosídeo fenólico isolado das cascas.	7
Figura 6. Esquema de preparação dos extratos EP, AC e ME.	13
Figura 7. Esquema de preparação do extrato clorofórmico e seu fracionamento.	14
Figura 8. Esquema de isolamento da substância A7P.	17
Figura 9. Esquema de isolamento da substância C7.	19
Figura 10. Esquema de isolamento da substância D1.	20
Figura 11. Esquema de isolamento da substância A.9.2.3.	21
Figura 12. CCD das frações da coluna A.	27
Figura 13. CCD das frações da coluna A (continuação).	27
Figura 14. CCD da substância A7P.	28
Figura 15. CCD da fração A7S.	29
Figura 16. CCD das frações obtidas na coluna B.	30
Figura 17. CCD das frações obtidas na coluna C.	31
Figura 18. CCD da substância C7 com padrão de β -sitosterol.	32
Figura 19. CCD das frações D1 e D2. Figura 20. CCD da substância D1 com padrão de β -sitosterol 33	
Figura 21. CCD das frações obtidas na coluna A9.	34
Figura 22. CCD da substância A9.2.3 antes da purificação final.	35
Figura 23. CCD da substância A9.2.3 com os padrões de estigmasterol e β -sitosterol.	36
Figura 24. CCD da substância ME1 com padrão de sacarose.	37
Figura 25. CCD da substância ME1 com padrão de sacarose.	38
Figura 26. CCD da substância ME1 com as frações orgânica e aquosa provenientes da hidrólise ácida.	38
Figura 27. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz), em CDCl_3 , da substância A7P.	41
Figura 28. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz), em CDCl_3 , da substância A7P.	42
Figura 29. Estrutura de A7P deduzida a partir dos dados espectroscópicos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, evidenciando os sinais designados na tabela 14.	43
Figura 30. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) da substância C7 em CDCl_3	46
Figura 31. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) expandido da substância C7 em CDCl_3	47
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz) da substância C7 em CDCl_3	48
Figura 33. Subestrutura 1 proposta para C7.	50
Figura 34. Subestrutura 2, proposta a partir da substituição de R_2 pela metila em δ_{H} 1,68 ppm.	50
Figura 35. Deslocamentos químicos (ppm) computados pelo ChemDraw Ultra 9.0 para a subestrutura 3 em azul e em preto àqueles obtidos para C7.	51
Figura 36. Subestrutura 3 com atribuição dos deslocamentos químicos (ppm) obtidos para os prótons (em preto) e carbonos (em azul) de C7.	52
Figura 37. Deslocamentos químicos (ppm) computados pelo ChemDraw Ultra 9.0 para a subestrutura 4 (em azul) e obtidos para C7 (em preto).	53
Figura 38. Subestrutura 5 proposta para C7.	54

Figura 39. Constantes de acoplamento calculadas com Perch versão 2005 para a subestrutura 5.55	
Figura 40. Multipleteo calculado com o software MestreC para o próton em δ_H 1,52 ppm utilizando-se J_{ab} de 6,66 (obtido) e J_{bc} de 7,2 Hz (calculado).	55
Figura 41. Fragmentos já elucidados que formam a estrutura parcial de C7.	57
Figura 42. Estrutura proposta para C7 a partir dos dados de 1H -RMN e ^{13}C -RMN.	58
Figura 43. Designação dos átomos de carbono em ordem decrescente de deslocamento químico, para C7, de acordo com SDBS (2005).	59
Figura 44. Estereoisômeros Z e E do fitol.	61
Figura 45. Fragmento Z.	62
Figura 46. Fragmento E.	62
Figura 47. Estrutura do geranilgeraniol (DEWICK, 2002).	62
Figura 48. Estrutura da vitamina K ₁ (DEWICK, 2002).	63
Figura 49. Estrutura da clorofila a (DEWICK, 2002).	63
Figura 50. Biossíntese do geranilgeranil-pirofosfato (DEWICK, 2002).	64
Figura 51. Espectro de 1H -RMN (600 MHz), em $CDCl_3$, da substância D1.	67
Figura 52. Expansão do espectro de 1H -RMN (600 MHz), em $CDCl_3$, da substância D1.	68
Figura 53. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz), em $CDCl_3$, da substância D1.	69
Figura 54. Subestrutura 1 da substância D1.	70
Figura 55. Subestrutura 2 da substância D1.	71
Figura 56. Subestrutura 3 da substância D1.	71
Figura 57. Estrutura parcial da substância D1, evidenciando as unidades isoprênicas.	71
Figura 58. Espectro de 1H -RMN (500 MHz) obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	74
Figura 59. Espectro de 1H -RMN (500 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	75
Figura 60. Espectro de 1H -RMN (500 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	76
Figura 61. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz) obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	77
Figura 62. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	78
Figura 63. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	79
Figura 64. Espectro de DEPT-135, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	80
Figura 65. Espectro de DEPT-135 expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	81
Figura 66. Espectro de DEPT-135 expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.	82
Figura 67. Estrutura do β -sitosterol.	85
Figura 68. Diagrama de linhas dos dubletos de dubletos ($J=15, 9$ Hz) em δ_H 5,16 e 5,05 ppm, da substância A.9.2.3.	86
Figura 69. Estrutura do estigmasterol.	86
Figura 70. Singleto de baixa intensidade, em δ_H 0,7 ppm, atribuído a Me-18 do estigmasterol.	87
Figura 71. Dubleto ($J \approx 6$ Hz) de baixa intensidade, em δ_H 1,03 ppm, atribuído a Me-21 do estigmasterol.	87
Figura 72. Espectro de infravermelho da substância ME1.	91
Figura 73. Espectro de massas obtido por ESI, no modo negativo ($M-H$) ⁻ , da substância ME1.	92
Figura 74. Espectro de massas obtido por ESI, no modo positivo ($M+Na$) ⁺ , da substância ME1.	92
Figura 75. Espectro de íons filhos obtido por ESI no modo negativo, utilizando-se 20 eV (Ar como gás de colisão), da substância ME1.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações da coluna A.....	16
Tabela 2. Especificações da coluna B.....	17
Tabela 3. Especificações da coluna C.....	18
Tabela 4. Especificações da coluna D.....	20
Tabela 5. Especificações da coluna A9.....	21
Tabela 6. Rendimento das frações C-EP. C-CHCl ₃ e C-AcOEt.....	23
Tabela 7. Rendimentos dos extratos EP, AC e ME.....	23
Tabela 8. Resultados das CL ₅₀ do EB e frações C-EP. C-CHCl ₃ e C-AcOEt.....	24
Tabela 9. Resultados da determinação de CL ₅₀ do EB, fração C-EP e frações A1 a A12.....	24
Tabela 10. Rendimento das frações obtidas na coluna A.....	26
Tabela 11. Rendimento das frações obtidas na coluna B.....	29
Tabela 12. Rendimento das frações obtidas na coluna B.....	30
Tabela 13. Rendimento das frações obtidas na coluna A9.....	34
Tabela 14. Dados do espectro de ¹ H-RMN (600 MHz, CDCl ₃) para A7P.....	40
Tabela 15. Dados do espectro de ¹³ C-RMN (150 MHz, CDCl ₃) para C7.....	40
Tabela 16. Dados do espectro de ¹ H-RMN (600 MHz, CDCl ₃) para C7.....	49
Tabela 17. Dados do espectro de ¹³ C-RMN (150 MHz, CDCl ₃) para C7.....	49
Tabela 18. Apresentação dos fragmentos parciais obtidos dos dados de ¹ H-RMN (600 MHz) e ¹³ C-NMR (150 MHz), CDCl ₃ , δ).....	56
Tabela 19. Possíveis atribuições de deslocamento químico aos carbonos (em negrito) da estrutura parcial de C7.....	58
Tabela 20. Valores de δ _H (ppm) obtidos no espectro de C7 ¹ H-RMN (600 MHz, CDCl ₃ , δ), comparados com dados da literatura (400 MHz, CDCl ₃),(SDBS, 2005) e calculados pelo software Perch v. 2005 (500 MHz, CDCl ₃).	59
Tabela 21. Valores de δ _C (ppm) observados no espectro de C7 ¹³ C-RMN (150 MHz, CDCl ₃ , δ), comparados com dados da literatura (100 MHz, CDCl ₃),(SDBS, 2005) e calculados pelo software ChemDraw Ultra 2005.	60
Tabela 22. Dados do espectro de ¹ H-RMN (600 MHz, CDCl ₃) para D1.....	65
Tabela 23. Dados do espectro de ¹³ C-RMN (150 MHz, CDCl ₃) para D1.....	66
Tabela 24. Dados do espectro de ¹ H-RMN (500 MHz, CDCl ₃) para A.9.2.3.....	72
Tabela 25. Dados do espectro de ¹³ C-RMN (125 MHz, CDCl ₃) para A.9.2.3.....	73
Tabela 26. Comparação dos sinais de ¹ H-RMN de A.9.2.3, β -sitosterol (CDCl ₃ , 400 MHz) e estigmasterol (CDCl ₃ , 400 MHz).	84
Tabela 27. Comparação dos sinais de ¹³ C-RMN de A9.2.3, β -sitosterol e estigmasterol.	84
Tabela 28. Efeito do extrato metanólico de <i>S. bonplandii</i> sobre o TP, TTPa e TT.	95
Tabela 29. Efeito do extrato acetônico de <i>S. bonplandii</i> sobre o TP, TTPa e TT.....	96
Tabela 30. Efeito dos extratos ME e AC sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (6 μmol/L).....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

C-EP: fração éter de petróleo do extrato clorofórmico

C-CHCl₃: fração clorofórmica do extrato clorofórmico

C-AcOEt: fração acetato de etila do extrato clorofórmico

CL₅₀: concentração letal média

RMN-¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN-¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono 13

DEPT: Distortionless enhancement by polarization transfer

δ_H: Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ¹H-RMN

δ_C: Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ¹³C-RMN

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

AcOEt: Acetato de etila

n-BuOH: n-Butanol

EtOH: Etanol

MeOH: Metanol

ADP: Difosfato de adenosina

EP: Éter de petróleo

TT: Tempo de trombina

TP: Tempo de protrombina

TTPa: Tempo de tromboplastina parcial ativada

RESUMO

Sorocea bonplandii (Baillon) Burger, Lanjow e Boer, devido à sua similaridade morfológica com *Maytenus* spp., é utilizada pela população com os mesmos fins medicinais desta. Ao contrário das espécies de *Maytenus*, que possuem inúmeros estudos químicos farmacológicos, as informações a respeito da espécie *Sorocea bonplandii* ainda são incipientes. Neste trabalho foram analisadas as frações éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila - obtidas de um extrato clorofórmico das folhas de *S. bonplandii* – quanto às suas atividades no bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach. A fração com maior bioatividade neste ensaio foi a clorofórmica, da qual foram isolados e identificados, por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , um álcool primário saturado, o diterpeno fitol, um álcool vinílico de cadeia isoprenílica, uma mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol (sendo o primeiro a substância majoritária). Em outra etapa, após deslipidificação das folhas com éter de petróleo, foram preparados os extratos acetônico e metanólico. Deste foi isolado e identificado por espectrometria de massas e espectroscopia de infravermelho, o dissacarídeo sacarose. Os extratos metanólico e acetônico foram avaliados quanto a sua atividade anticoagulante *in vitro*. O extrato acetônico apresentou atividade anticoagulante nos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). O mesmo extrato não apresentou atividade sobre a agregação plaquetária induzida por ADP assim como, no teste de tempo de trombina (TT). O extrato metanólico não demonstrou atividade em nenhum dos ensaios anteriores. O efeito anticoagulante evidenciado neste trabalho, nunca descrito para esta espécie, abre novas perspectivas para futuras investigações químico-biológicas, visando o isolamento e identificação da(s) substância(s) responsável(eis) por esta bioatividade.

Palavras Chave: *Sorocea*, *Moraceae*, *anticoagulante*, *Artemia*.

1. INTRODUÇÃO

Várias evidências históricas, em todo o mundo, demonstram que as plantas medicinais representam a mais antiga e utilizada forma de tratamento. Até meados do século passado a maioria dos fármacos era originária diretamente de fontes vegetais (GILANI e RAHMAN, 2005).

Também existem amplas evidências arqueológicas indicando que as plantas medicinais foram regularmente utilizadas pelos povos pré-históricos. Em muitas culturas antigas, as plantas ou produtos derivados delas, eram ingeridos também com objetivos psicoterapêuticos (ORTIZ, 1975).

O mais provável é que, pela experimentação direta, as populações humanas foram aprendendo a distinguir as plantas úteis e de efeito benéfico, daquelas sem qualquer efeito terapêutico ou tóxico, bem como qual o processamento e combinações que poderiam ser usados para a obtenção de resultados positivos (VEERPORTE e MARASCHIN, 2001).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e, até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

Outro aspecto importante é o papel que os produtos naturais desempenharam no processo de descoberta de fármacos. Cerca de 25% dos fármacos prescritos em o mundo provém de plantas, sendo que dos 252 fármacos considerados básicos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e, muitos outros são substâncias extraídas de plantas (RATES, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de três quartos da população mundial tem as plantas medicinais como único recurso terapêutico (GILANI e RAHMAN, 2005), e 81% não possui acesso a fármacos sintéticos (NYIREDY, 2005).

Embora, esta situação seja mais comum em países em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul, estes dados mostram que em muitas regiões do mundo, as plantas medicinais ocupam um lugar de destaque na terapêutica, fato este não suficientemente apreciado nos países desenvolvidos (NYIREDY, 2005).

Os estudos científicos na área de produtos naturais têm sido conduzidos há mais de um século e, somente na década de 1.980, cerca de 3.500 novas substâncias foram anualmente descobertas (VEERPORTE e MARASCHIN, 2001). Deste total, 2619 substâncias foram isoladas de plantas (ABELSON, 1990).

Apesar destes fatos, nas últimas décadas, devido principalmente ao avanço da química combinatória, o interesse da indústria farmacêutica na pesquisa de produtos naturais tem diminuído. Entretanto, evidências recentes mostram que para algumas doenças complexas, os produtos naturais ainda representam uma valiosa fonte de novas entidades químicas, uma vez que eles apresentam estruturas privilegiadas, selecionadas por mecanismos evolucionários, durante um período de milhões de anos (CALIXTO, 2005).

Juntos, os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade mundial. O Brasil possui cerca de 20 a 22% de todas as plantas e microrganismos. Entretanto, é estimado que não mais que 25.000 espécies vegetais tenham sido objeto de algum tipo de investigação científica (CALIXTO, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para a caracterização de moléculas presentes nas folhas de *Sorocea bonplandii*.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o fracionamento do extrato clorofórmico de *Sorocea bonplandii* monitorado pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach;
- Elucidar a estrutura química das substâncias isoladas, por métodos espectroscópicos.
- Avaliar a atividade anticoagulante, *in vitro*, de diferentes extratos das folhas de *Sorocea bonplandii*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. *Sorocea bonplandii* (Baillon) Burger, Lanjouw e Boer

O gênero *Sorocea* A. St-Hill. contém aproximadamente 22 espécies, algumas das quais morfológicamente muito semelhantes, dificultando assim, a taxonomia do gênero (ROMANIUC-NETO, 1998).

Esta espécie possui distribuição geográfica que vai desde o Rio Grande do Sul até Pernambuco, onde se distribui na floresta pluvial da encosta atlântica (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

A planta é descrita como uma árvore de pequeno porte, de aproximadamente 5 a 6 m de altura; folhas simples, rijas, coriáceas, cor verde-escuro e de margens serrilhadas; ramos eretos, curtos, com casca acinzentada; raízes fasciculadas com pequena profundidade; flores de coloração creme, em inflorescências axilares; frutos tipo baga oblonga, contendo somente uma semente de coloração esbranquiçada (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

Extratos preparados por infusão das folhas de *Maytenus ilicifolia* e de *M. aquifolium* (Celastraceae), popularmente conhecidas por espinheira-santa, são utilizados na medicina popular devido à sua ação antiulcerogênica, comprovada em estudos pré-clínicos (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991; OLIVEIRA, 1991) e clínicos (GEOCZE, *et al.*, 1998). Devido ao fato de *Sorocea bonplandii* possuir características morfológicas muito próximas àquelas das espécies de *Maytenus*, vem sendo utilizada pela população com os mesmos fins destas últimas (ALBERTON, 2002).

S. bonplandii também tem sido encontrada no comércio como adulteração de preparações vendidas como sendo *M. ilicifolia* (ALBERTON, 2002; VILEGAS *et al.*, 1998).

ALBERTON, (2002) através da análise do perfil cromatográfico em CCD, encontraram 5 amostras contendo *S. bonplandii* de um total de 8 amostras comerciais de espinheira-santa vendidos em Florianópolis-SC.

GONZALEZ *et al.* (2001) reportaram que um extrato metanólico das folhas de *S. bonplandii* apresentou um efeito significativo em ensaios de analgesia (*tail flick e writhing test*). O mesmo extrato demonstrou ação antiulcerogênica, tanto em modelos com indução por etanol, quanto por betanecol/indometacina. A administração do extrato por via oral a camundongos, em doses de 500, 900, 1620, 2916 e 5248 mg/kg não produziu mortalidade, nem o aparecimento de sintomas de toxicidade.

Com relação a identificação de metabólitos secundários de *S. bonplandii* os artigos disponíveis são escassos:

FERRARI e MONACHE (2001) reportaram o isolamento, das raízes, de um aducto do tipo DIELS-ALDER, denominado de soroceína I (Figura 1).

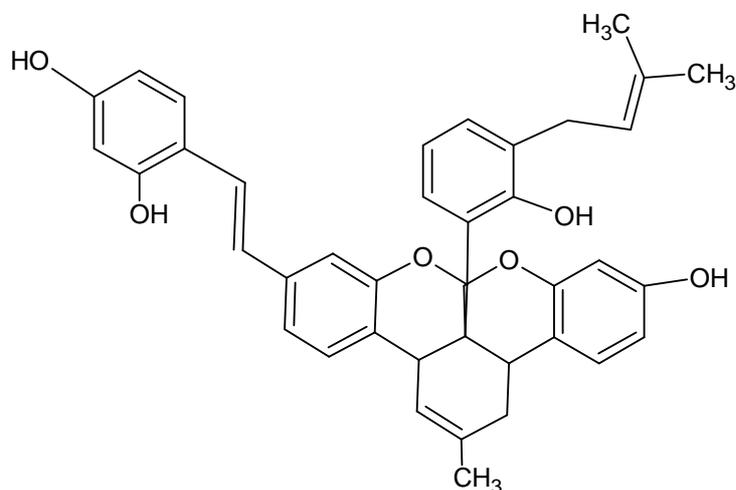


Figura 1. Soroceína I.

FERRARI E MESSANA (1995) isolaram das raízes, flavanonas preniladas denominadas de soroceínas E, F e G (figura 2, 3 e 4).

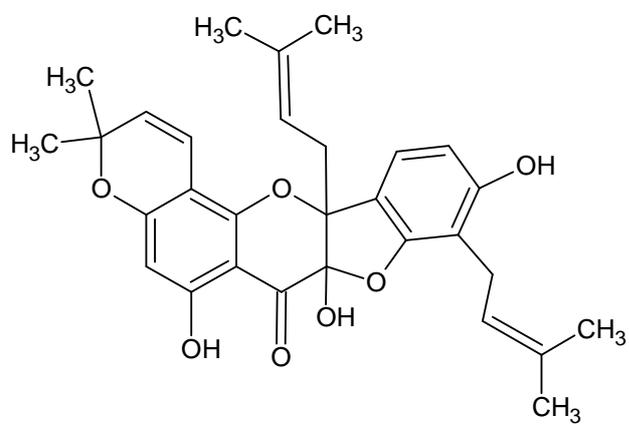


Figura 2. Soroceína E.

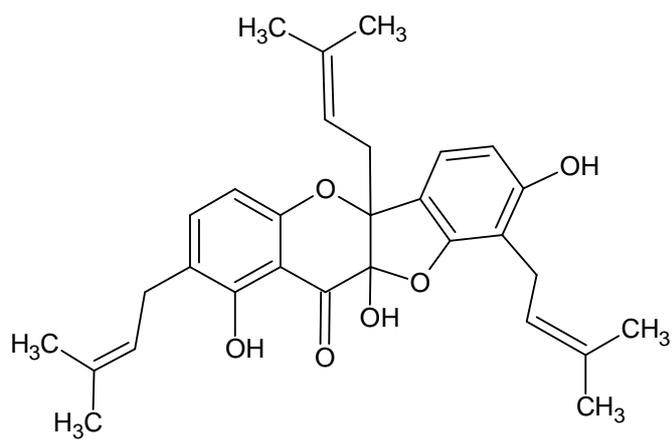


Figura 3. Soroceína F.

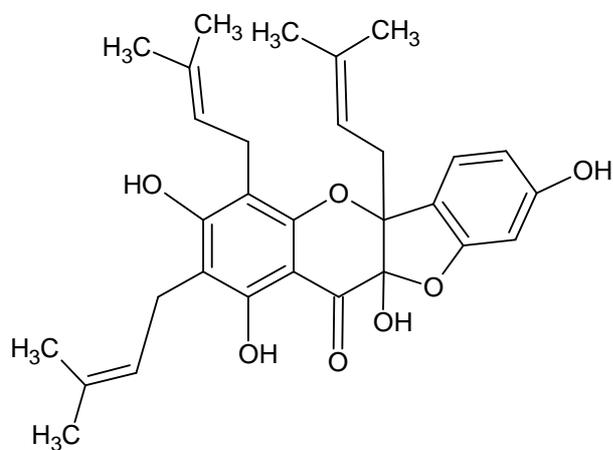


Figura 4. Soroceína G.

Da casca de *S. bonplandii* foi isolado o 3,4-dimetoxifenil-1-O- β -D-apiofuranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo (FERRARI e MONACHE, 2005) (figura 5).

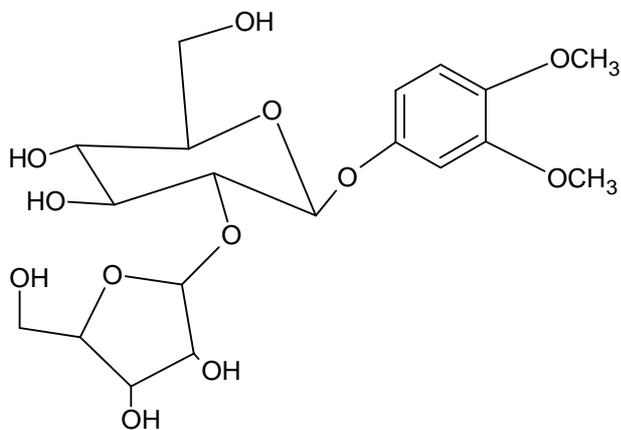


Figura 5. Glicosídeo fenólico isolado das cascas.

A partir de extratos diclorometânicos e hexânicos das folhas de *S. bonplandii* foram isolados triterpenos pentacíclicos derivados do oleanano, ursano e lupano (ANDRADE e VILEGAS, 1998).

3.2. Ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach

Os laboratórios de fitoquímica normalmente não estão preparados para a realização de ensaios biológicos elaborados (MACIEL *et al.*, 2002). Diante disso, muitos têm inserido em suas rotinas de purificação, isolamento e elucidção estrutural, alguns ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo químico de extratos de plantas, na procura de substâncias bioativas (SIQUEIRA *et al.*, 2001).

Um destes bioensaios é o de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach.

A *Artemia salina* (Artemiidae) é um microcrustáceo cosmopolita, pertencente à subclasse Branchiopoda. Este organismo produz cistos, os quais permanecem em diapausa enquanto mantidos secos ou em anaerobiose. Após a hidratação, o embrião é ativado e a eclosão costuma ocorrer dentro de 48 horas, liberando-o ainda ligado à membrana de eclosão. Assim que a membrana se rompe, a larva móvel, chamada de náuplio, é liberada (USEPA, 2002). Os cistos, além de serem de baixo custo e amplamente disponíveis, permanecem viáveis por anos, no estado seco (MEYER *et al.*, 1982; HAMBURGER, 1991; SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Este ensaio é baseado na premissa de que substâncias bioativas são tóxicas em concentrações maiores, e que a letalidade causada a um organismo simples pode ser usada, como meio de monitorar o fracionamento de um extrato vegetal (HAMBURGER, 1991).

Diversos trabalhos fizeram a correlação entre a toxicidade sobre *Artemia salina*, com atividades como antimicótica, antiviral, antimicrobiana (McRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N., 1998) e parasiticida (SAHPAZ e BORIES, 1994). Outros estudos utilizam este modelo para monitorar a presença de uma variedade de substâncias, tais como praguicidas, poluentes ambientais, micotoxinas, anestésicos, toxinas de dinoflagelados, analgésicos opióides, co-carcinógenos e carcinógenos, ésteres de forbol, entre outros (MEYER, 1982).

Este ensaio biológico tem demonstrado uma boa correlação como o modelo de leucemia murina P-388, tendo sido demonstrado a sua utilidade como *screening* para atividade antitumoral (HAMBURGER, 1991).

PARRA et al. (2001), em um estudo utilizando 20 extratos de plantas, encontrou uma boa correlação ($r=0,85$; $p<0,05$) entre este modelo e o de toxicidade aguda por via oral em camundongos. Os autores sugerem, diante dos resultados, que o ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* é útil como um modelo alternativo na predição de toxicidade aguda.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais utilizados

4.1.1. Material Vegetal

As folhas de *Sorocea bonplandii* (Baillon) Burger, Lanjouw e Boer foram coletadas em Florianópolis, inicialmente, em abril de 2003. Uma segunda coleta ocorreu em janeiro de 2005. As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, do Departamento de Botânica-UFSC.

4.1.2. Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados foram de grau analítico, das marcas Nuclear®, Vetec® e Merck®.

Os adsorventes utilizados em cromatografia em coluna foram: sílica gel 60, com granulometria de 0,05 a 0,2 mm Carlo Erba e 0,02 a 0,063 mm Merck.

Nas separações feitas por cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-P), utilizaram-se placas Merck com sílica gel 60 de 2 mm de espessura.

A cromatografia *Flash* foi executada com sílica gel 60 G, para cromatografia em camada delgada da marca Vetec®.

Foram, ainda, utilizadas placas analíticas para cromatografia em camada delgada das marcas Merck® e MN®, com sílica gel 60 de 0,2 mm de espessura.

Para detecção foram utilizados os reagentes vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico.

4.1.3. Equipamentos

A concentração dos extratos e frações foi realizada sob pressão reduzida, em um evaporador rotatório Quimis®.

O espectro de infravermelho da substância ME1 foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu Prestige 2, no Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Catarina. O espectro de massas, desta substância, foi obtido em aparelho Quattro LC Micromass Triple Quadrupole, no Instituto de Química da Universidade Estadual de São Carlos.

Os espectros de RMN das substâncias A7P, C7 e D1 foram obtidos no Instituto de Biologia da Universidade de Chengdu (China) em espectrômetro de RMN Bruker Avance de 600 MHz. Os espectros de RMN da substância A.9.2.3 foram obtidos no Instituto de Química da Universidade Buenos Aires (Argentina), em espectrômetro Bruker AM de 500 MHz.

4.1.4. Bioensaio de Letalidade para larvas de *Artemia salina*

A água utilizada para o ensaio foi obtida junto ao Laboratório de Camarões-UFSC. A mesma, antes de ser utilizada, passou por processo de dupla filtração e tratamento com radiação ultravioleta. Os cistos de *Artemia salina* foram obtidos em lojas especializadas.

4.2. Procedimentos gerais

4.2.1. Preparação da amostra vegetal

4.2.1.1. Preparo dos extratos

Após a coleta as folhas frescas foram colocadas em estufa com circulação de ar, por 48 h à temperatura de 40 °C, sendo em seguida cominuídas em moinho de facas.

O extrato clorofórmico foi preparado a partir da maceração de 1,11 kg de folhas secas cominuídas por meio de 2 macerações sequenciais em CHCl₃ , durante 7 dias.

Uma alíquota de 800 g do material vegetal seco passou por 2 macerações com éter de petróleo, produzindo o extrato EP. O resíduo foi extraído com acetona, dando origem ao extrato AC, e por fim, extraído com metanol, obtendo-se assim, o extrato ME (figura 6). Estes foram avaliados, *in vitro*, quanto a uma possível atividade anticoagulante.

Todos os extratos foram preparados na proporção de 1:10 (m/v) de folhas e solvente, e filtrados sob papel de filtro e concentrados em rotavapor, sob pressão reduzida, até a secura.

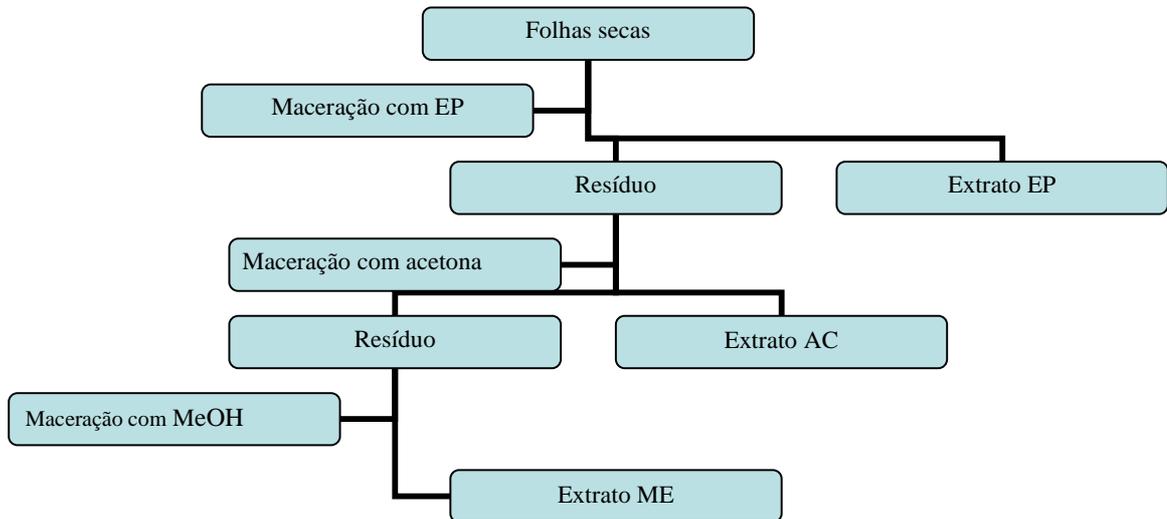


Figura 6. Esquema de preparação dos extratos EP, AC e ME..

4.2.1.2. Fracionamento do extrato bruto clorofórmico

O extrato clorofórmico seco foi ressuspenso em solução de MeOH:H₂O (90:10) (v:v), e posteriormente fracionado, por partição líquido-líquido, com EP, CHCl₃, e AcOEt, produzindo as frações denominadas com a letra C seguida pelas abreviaturas do solventes (figura 7). Estas frações, tiveram sua atividade biológica avaliada pelo teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*. A fração com menor CL₅₀ foi, então, purificada por métodos cromatográficos.

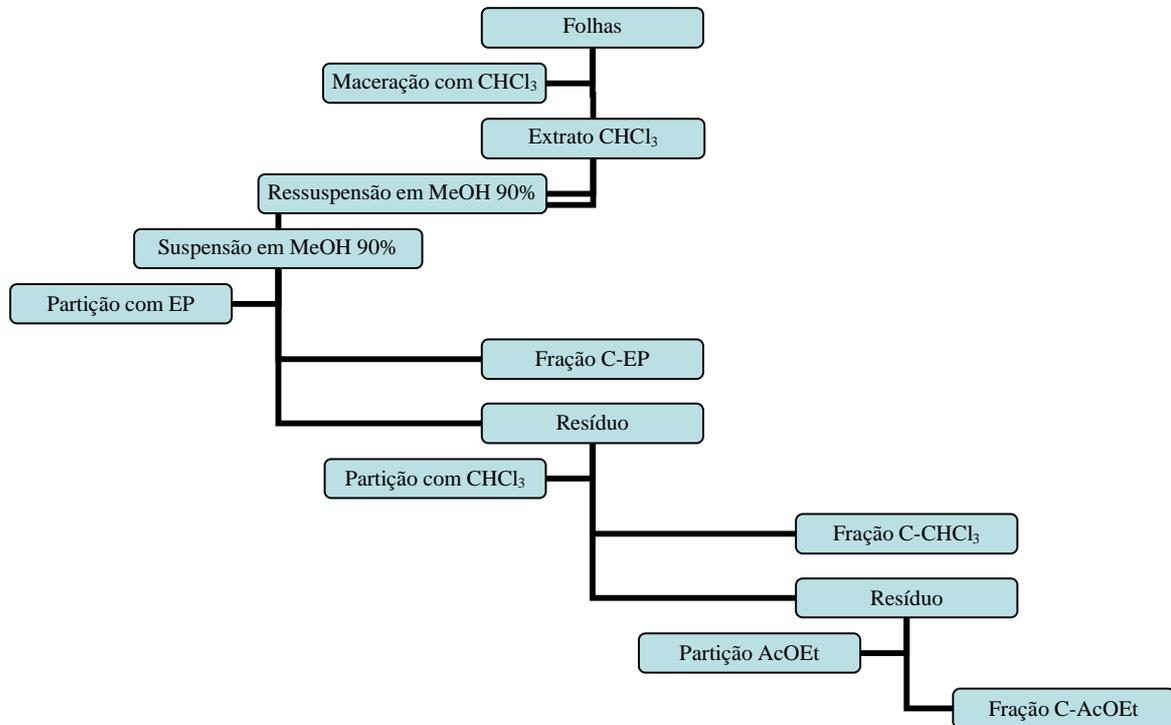


Figura 7. Esquema de preparação do extrato clorofórmico e seu fracionamento.

4.2.2. Ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach

Foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) com algumas modificações.

4.2.2.1. Obtenção das larvas

Os cistos foram colocados para eclodir em água do mar com aeração constante e temperatura mantida próxima de 25 ± 2 °C. O período compreendido entre a incubação dos cistos e a coleta das larvas foi de 48 h.

4.2.2.2. Preparação das amostras

As soluções foram preparadas por diluição seriada, inicialmente nas concentrações de 200, 150, 100, 75, 50 e 25 µg/mL.

As soluções foram preparadas com o solvente adequado para a solubilização das frações e sub-frações sendo o mesmo, posteriormente evaporado. Usaram-se tubos controles do solvente preparados da mesma maneira. Para cada diluição os testes foram realizados em triplicata.

4.2.2.3. Incubação das larvas com o material vegetal

Após o procedimento anterior, foram adicionados 2 mL de água do mar e os tubos foram colocados em sonicador. Após adicionou-se DMSO, até um máximo de 0,05 mL.

As larvas, em número de dez, foram transferidas para cada tubo, e o volume completado para 5 mL com água do mar.

O material vegetal foi incubado com as larvas por 24 h. Após, foi registrado o número de larvas mortas, sendo consideradas como tal, aquelas que se mantiveram imóveis por mais de 10 segundos.

4.2.2.4. Determinação da CL₅₀

O cálculo da concentração letal a 50% foi feito pelo método de análise dos probitos com um intervalo de confiança de 95%, utilizando o software Probit, fornecido pela *Environmental Protection Agency* (USEPA, 2002).

4.3. Isolamento, purificação e identificação

4.3.1. Isolamento da substância A7P

A fração éter de petróleo, obtida do extrato clorofórmico (C-EP), foi fracionada em coluna cromatográfica (figura 8), em 400 g de sílica ge, em gradiente de concentração com os eluentes: EP, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, sendo esta a coluna A. (tabela 1). No final obtiveram-se 51 frações com volume entre 100 e 150 mL que foram reunidas em função do seu perfil cromatográfico em CCD, resultando em 12 frações, codificadas como A1 a A12, em ordem crescente de polaridade. A fração A7 foi solubilizada em éter de petróleo e mantida na geladeira por 48 h, obtendo-se um precipitado branco, que lavado repetidas vezes com éter de petróleo gelado rendeu a substância A7P. O sobrenadante oriundo da fração A7 foi denominado de A7S.

Tabela 1. Especificações da coluna A.

Parâmetros	Fase móvel	Frações
Amostra 10 g C-EP	EP	1-3
	EP: CHCl_3 (7:3)	4-5
Coluna 27 x 6 cm	EP: CHCl_3 (1:1)	6-15
	CHCl_3	18-34
	CHCl_3 :AcOEt (1:1)	35-39
Fase fixa 400 g de sílica 0,05-0,2 mm	AcOEt	40-42
	AcOEt:MeOH (1:1)	43-47
Fluxo 5,5 mL/min	MeOH	48-51

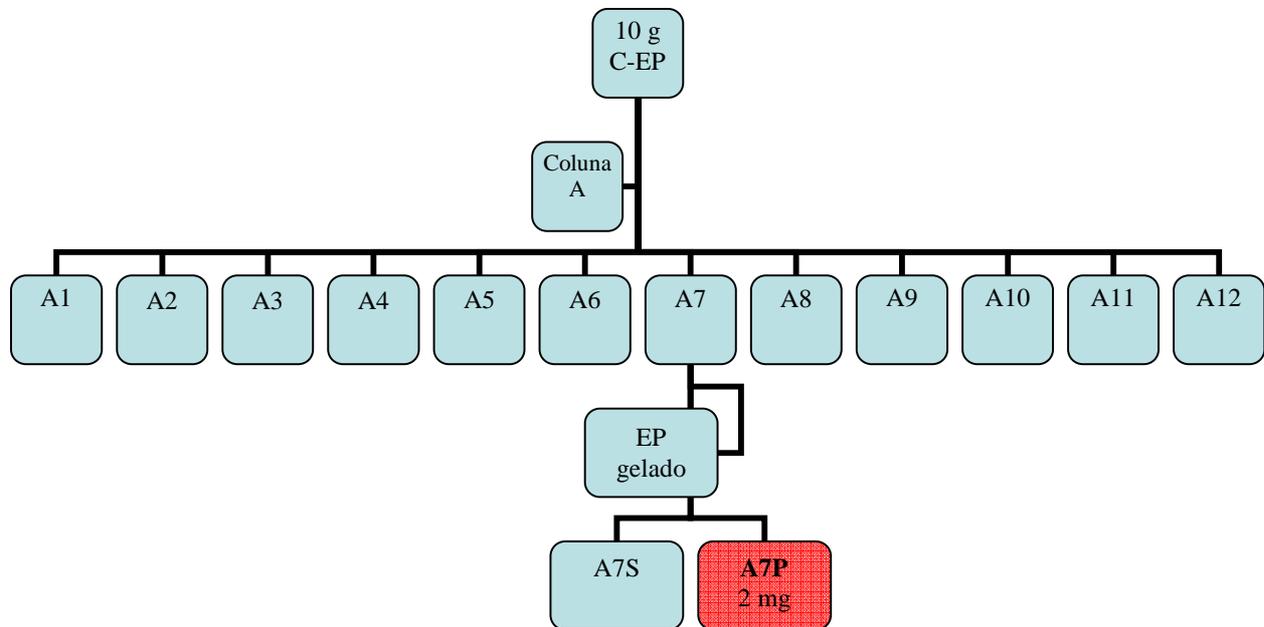


Figura 8. Esquema de isolamento da substância A7P.

4.3.2. Isolamento da substância C7

A sub-fração A7S, com massa de 650 mg, foi cromatografada em coluna com 50 g de sílica gel (figura 9), com eluição por gradiente de concentração com CHCl_3 e AcOEt, sendo esta a coluna **B** (tabela 2). Esta coluna rendeu 32 frações de 10 mL, que foram reunidas segundo seu perfil cromatográfico em CCD, resultando em 5 frações denominadas de B1 a B5.

Tabela 2. Especificações da coluna B.

Parâmetros	Fase móvel	Frações
Amostra 650 mg da fração A7S	CHCl ₃	1-17
Coluna 32,5 x 2,4 cm		
Fase fixa 50 g de sílica 0,05-0,2 mm	CHCl ₃ :AcOEt (90:10)	18-28
Fluxo 3,0 mL/min	AcOEt	29-32

A sub-fração B3, com massa de 178 mg, foi aplicada na coluna C. Esta coluna empacotada com 15 g de sílica gel foi eluída com gradiente de CHCl₃ e acetona (tabela 3), rendendo 28 frações. Estas foram reunidas, segundo o perfil cromatográfico em CCD, resultando nas frações denominadas de C1 a C7. A fração C7 tratava-se de uma substância pura, sendo assim denominada substância C7.

Tabela 3. Especificações da coluna C.

Parâmetros	Fase móvel	Frações
Amostra 178 mg da fração B3	CHCl ₃ :Acetona (95:5)	1-10
Coluna 40 x 1,5 cm		
Fase fixa 15 g de sílica 0,063-0,2 mm	CHCl ₃ : Acetona (90:10)	11-18
Fluxo 2,0 mL/min	CHCl ₃ : Acetona (85:15)	19-28

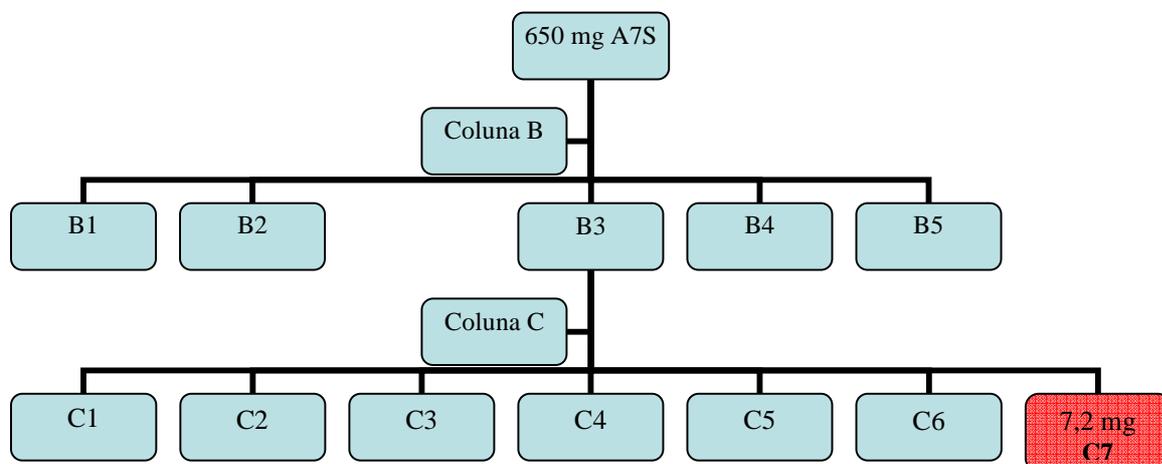


Figura 9. Esquema de isolamento da substância C7.

4.3.3. Isolamento da substância D1

A fração C2, com massa de 40 mg, foi cromatografada em coluna com 4,6 g de sílica gel (figura 10), usando CH_2Cl_2 como eluente (tabela 4). Obtiveram-se 22 frações, que após análise por CCD foram reunidas em 2 frações, denominadas de D1 e D2. A fração D1 apresentava-se pura, sendo denominada substância **D1**.

Tabela 4. Especificações da coluna D.

Parâmetros	Fase móvel	Frações
Amostra 40 mg da fração C2		
Coluna 37 x 1 cm		
Fase fixa 4,5 g de sílica 0,063- 0,2 mm	CH ₂ Cl ₂	1-22
Fluxo 2,5 mL/min		

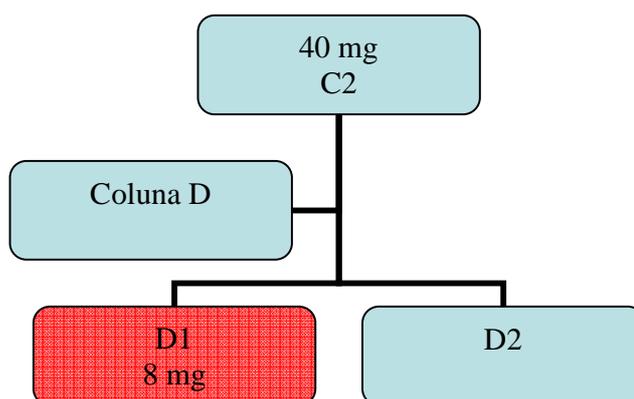


Figura 10. Esquema de isolamento da substância D1.

4.3.4. Isolamento da substância A9.2.3

A fração A9, com massa de 1 g, foi cromatografada em coluna empacotada com 100 g de sílica gel e eluída com CHCl₂:MeOH (90:10) (tabela 5). Foram coletadas 25 frações, que após a análise por CCD foram reunidas em 5 frações, denominadas de A9.1 a A9.5 (figura 11).

Tabela 5. Especificações da coluna A9.

Parâmetros	Fase móvel	Frações
Amostra 1 g da fração A9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)	1-10
Coluna 35 x 3 cm		
Fase fixa 100 g de sílica 0,05-0,2 mm	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)	11-25
Fluxo 2,5 mL/min		

A fração A9.2, com massa de 43,5 mg, foi purificada por CCD-P, eluída com CHCl₂:MeOH (95:5), em 3 frações: A9.2.1, A9.2.2 e A9.2.3. A fração A9.2.3 foi purificada por nova CCD-P, eluída com a mesma fase móvel da primeira (figura 11). Esta purificação cromatográfica rendeu a substância denominada de **A9.2.3**.

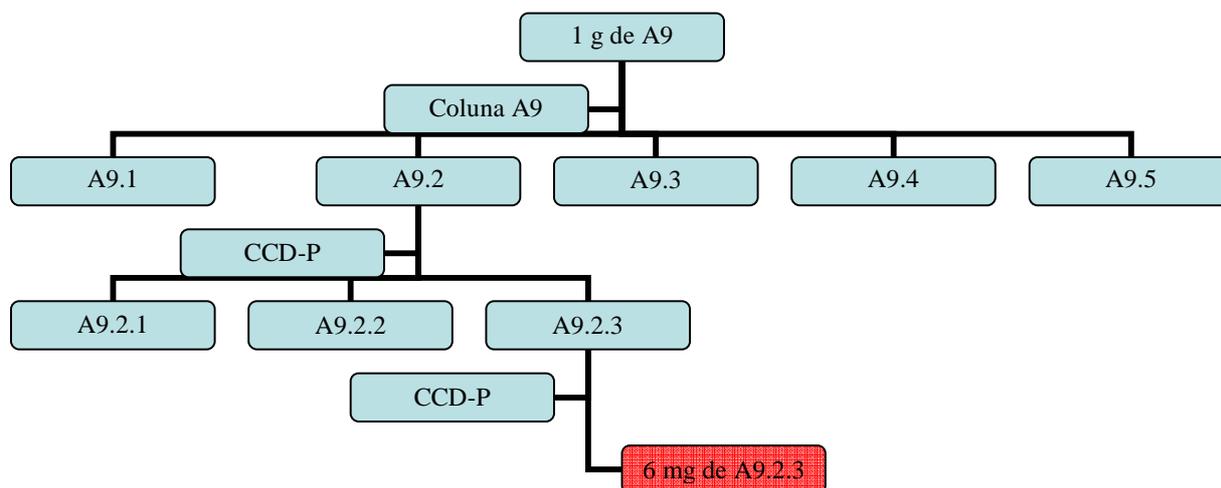


Figura 11. Esquema de isolamento da substância A.9.2.3.

4.3.5. Isolamento da substância ME1

Durante a evaporação do solvente do extrato metanólico das folhas de *Sorocea bonplandii* (figura 6), sob pressão reduzida no rotavapor, ocorreu a precipitação de um material cristalino e incolor. O extrato, com volume parcialmente reduzido, foi mantido em geladeira por 48 h, de forma a facilitar a precipitação. O material foi recolhido e lavado repetidas vezes com MeOH gelado. Por análise em CCD, em diferentes sistemas de eluentes, viu-se tratar de uma substância pura, denominada ME1.

A amostra foi hidrolisada em refluxo, com HCl 10% por 1 hora.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento dos extratos e frações

A extração das folhas de *Sorocea bonplandii* (1.100 g) com CHCl_3 , por maceração resultou em 62 g de extrato seco, ou seja, 5,6 % (m/m).

Os rendimentos das frações C-EP, C- CHCl_3 e C-AcOEt, provenientes do extrato clorofórmico e obtidas por partição líquido-líquido, são apresentados na tabela 6:

Tabela 6. Rendimento das frações C-EP, C- CHCl_3 e C-AcOEt

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)*
C-EP	54,06	87,19
C- CHCl_3	6,31	10,18
C-AcOEt	0,24	1,79

*Relativo ao extrato clorofórmico.

Os extratos EP, AC e ME apresentaram os rendimentos descritos na tabela 7:

Tabela 7. Rendimentos dos extratos EP, AC e ME.

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)*
EP	25,02	3,12
AC	4,41	0,55
ME	8,24	1,03

*Relativo a 800 g de folhas secas.

5.2. Ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach

Os valores de CL_{50} obtidas no ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach, são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Resultados das CL_{50} do EB e frações C-EP. C- $CHCl_3$ e C-AcOEt

Amostra	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm intervalo de confiança a 95%
EB	130,35 [123,81 – 155,28]
C-EP	88,69 [77,27 – 98,64]
C- $CHCl_3$	133,21 [125,90 – 140,05]
C-AcOEt	145,73 [133,81 – 155,28]

Em função dos resultados tabulados, nota-se que apenas a fração C-EP teve CL_{50} inferior ao EB e, portanto maior atividade biológica.

A fração C-EP foi, então, fracionada por cromatografia em coluna (coluna A) produzindo as frações de A1 a A12. Estas foram avaliadas no ensaio de letalidade, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados da determinação de CL_{50} do EB, fração C-EP e frações A1 a A12.

Amostra	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm intervalo de confiança a 95%
EB	128,51 [119,23 – 153,57]
C-EP	90,89 [78,24 – 101,94]
A1	343,87 [232,43 – 460,43]
A2	339,65 [223,45 – 449,81]
A3	440,33 [312,34 – 633,21]
A4	334,63 [250,87 – 412,54]
A5	346,88 [243,23 – 443,19]
A6	444,12 [337,12 – 596,65]
A7	-*
A8	-*
A9	-*
A10	-*
A11	-*

A12

-*

*Os dados não apresentaram convergência que permitissem o cálculo da CL₅₀.

Conforme os dados observados na tabela 9, percebe-se que nenhuma das frações obtidas na coluna A sequer manteve a atividade biológica da fração C-EP; sendo, inclusive, inferior ao EB. Esta constatação sugere que a maior atividade deste extrato pudesse ser devida ao fenômeno de sinergismo entre os vários constituintes do extrato (ELVIN-LEWIS, 2001).

Em virtude da diminuição da atividade após o fracionamento, o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina* foi abandonado como método guia para a purificação dos extratos. Para tanto, passou-se a utilizar somente o perfil cromatográfico das frações.

5.3. Isolamento a partir do extrato clorofórmico

5.3.1. Isolamento da substância A7P

Da coluna A (tabela 1) foram reunidas as frações de A1 a A12, cujo rendimento é apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Rendimento das frações obtidas na coluna A.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)*
A1	0,0046	0,046
A2	0,111	1,11
A3	0,156	1,56
A4	0,2912	2,91
A5	0,3763	3,76
A6	0,4817	4,82
A7	0,7675	7,68
A8	0,3155	3,16
A9	4,6232	46,23
A10	0,4144	4,14
A11	0,3914	3,92
A12	0,0965	0,96

*Relativo a 10 g de EB.

Através da análise por CCD (figuras 12 e 13), das frações A1 a A12, optou-se pela escolha da fração A7 para subsequente fracionamento. A escolha se deveu ao fato da mesma apresentar 2 manchas as quais poderiam ser mais facilmente isoladas, além de que seus 768 mg permitiriam o isolamento com bom rendimento.

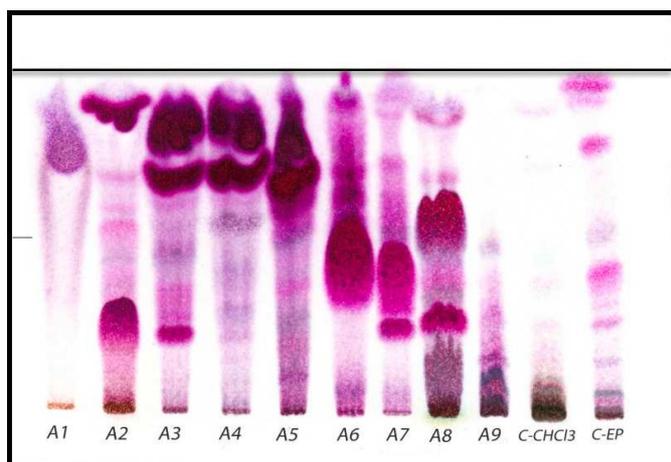


Figura 12. CCD das frações da coluna A.

Eluente: CHCl_3

Fase fixa: gel de sílica F_{254}

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

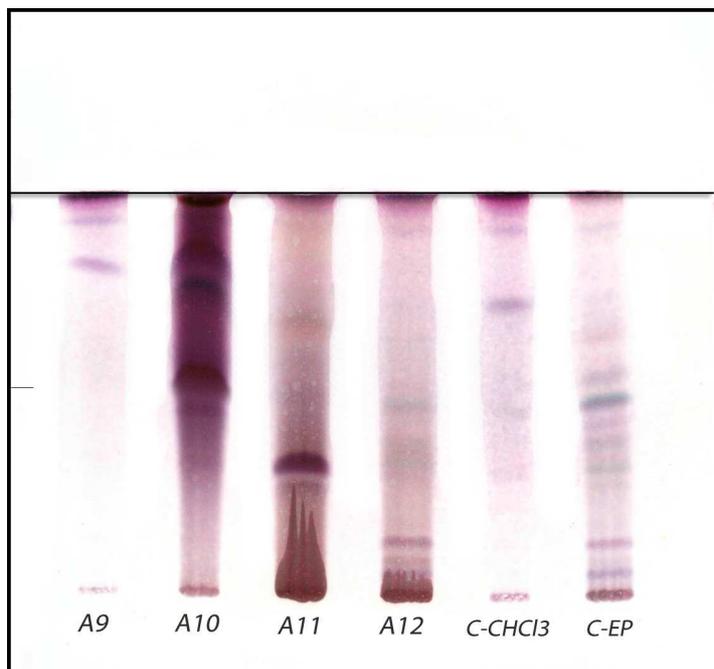


Figura 13. CCD das frações da coluna A (continuação).

Eluente: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)

Fase fixa: gel de sílica F_{254}

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

Após armazenamento da fração A7 em geladeira por 24 h, ocorreu a precipitação de um material branco denominado A7P, com rendimento de 2 mg. O sobrenadante codificado como A7S teve rendimento de 650 mg. O precipitado após sucessivas lavagens com EP gelado, apresentava-se puro, conforme é visto na figura 14, sendo, então, chamado de substância A7P. A substância A7P foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C , e sua elucidação estrutural é apresentada no item 5.5.



Figura 14. CCD da substância A7P.

Eluente: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)

Fase fixa: gel de sílica F_{254}

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

5.3.2. Isolamento da substância C7.

A fração A7S (650 mg) (figura 15) foi purificada na coluna B (tabela 2), e produziu as frações B1 a B5 (figura 16), com rendimentos apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Rendimento das frações obtidas na coluna B.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
B1	67,3	10,41
B2	274,5	42,23
B3	178,4	27,44
B4	71,5	11,00
B5	12,2	1,87

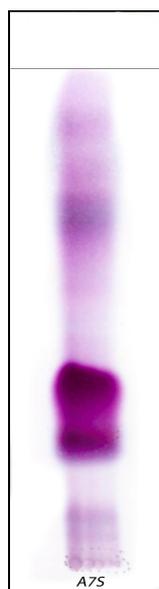


Figura 15. CCD da fração A7S.

Eluente: EP:AcOEt (9:1)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

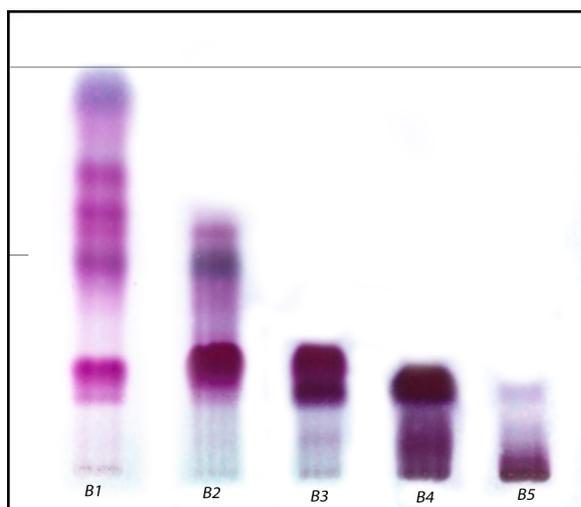


Figura 16. CCD das frações obtidas na coluna B.

Eluente: EP:AcOEt (9:2)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteccção: Reagente anisaldeído sulfúrico

As frações B2 e B3 foram consideradas mais promissoras para nova purificação, por serem as com maior rendimento. Em função da B2 ser uma mistura mais complexa que B3, optou-se por esta última.

A fração B3 foi então purificada com a coluna C (tabela 3) dando origem às frações C1 a C7 (figura 17), com rendimentos apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Rendimento das frações obtidas na coluna B.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
C1	4,7	2,64
C2	40,0	22,47
C3	50,0	28,01
C4	39,0	21,91
C5	17,1	9,60
C6	20,1	11,29
C7	7,2	4,04

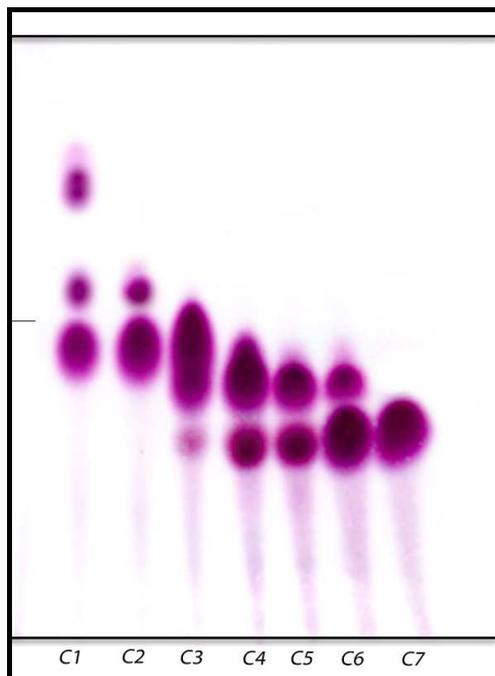


Figura 17. CCD das frações obtidas na coluna C.

Eluente: CH_2Cl_2

Fase fixa: gel de sílica F_{25}

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

Pela análise do cromatograma da figura 17 notou-se que a fração C7 estava pura, como pode ser verificado na figura 18, onde a substância C7 foi cromatografada com padrão de β -sitosterol. A substância C7 foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C , e sua elucidação estrutural é apresentada no item 5.6.

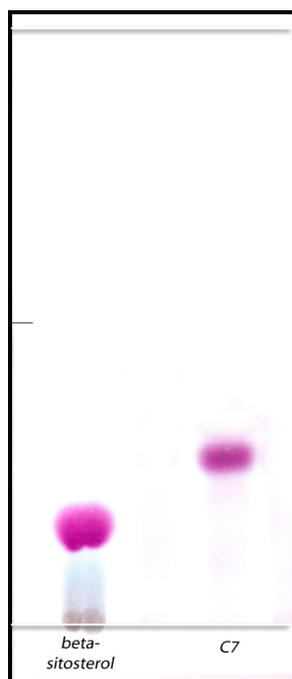


Figura 18. CCD da substância C7 com padrão de β -sitosterol.

Eluente: CH_2Cl_2

Fase fixa: gel de sílica F_{254}

Deteccção: Reagente anisaldeído sulfúrico

5.3.3. Isolamento da substância D1.

A fração C2 (40 mg) foi purificada na coluna D (tabela 4) produzindo as frações D1 e D2, com rendimento de 8 mg e 2 mg, respectivamente.

A análise dos cromatogramas (figura 19 e 20) permitiu concluir que a fração D1 estava pura, sendo denominada substância **D1**, cuja elucidação estrutural é apresentada no item 5.7.

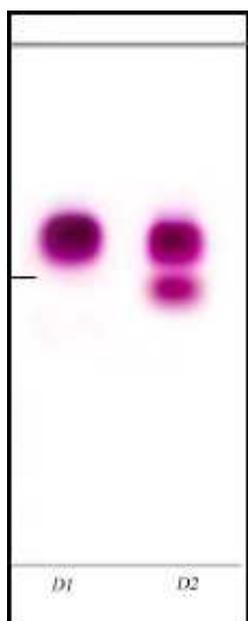


Figura 19. CCD das frações D1 e D2.
com padrão de β -

Eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (98:1)
Fase fixa: gel de sílica F_{254}
Detecção: Reagente anisaldeído sulfúrico

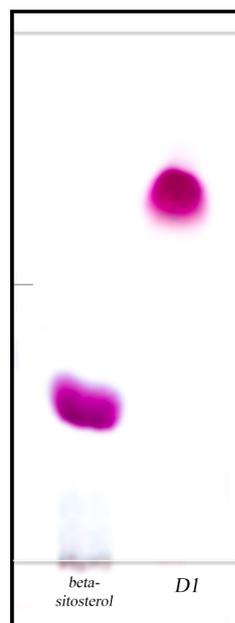


Figura 20. CCD da substância D1
sitosterol

Eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (98:2)
Fase fixa: gel de sílica F_{254}
Detecção: Reagente anisaldeído sulfúrico

5.3.4. Isolamento da substância A9.2.3.

A fração A9 (1 g) foi purificada na coluna A9 (tabela 5), produzindo 5 frações denominadas de A9.1 a A9.5 (figura 21), cujos rendimentos são apresentados na tabela 13, abaixo:

Tabela 13. Rendimento das frações obtidas na coluna A9.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)*
A9.1	98,8	9,88
A9.2	43,5	4,34
A9.3	44,6	4,46
A9.4	101,4	10,13
A9.5	86,2	8,62

*Relativo a 1 g de fração A9.



Figura 21. CCD das frações obtidas na coluna A9.

Eluente: CH_3Cl_3 :MeOH (95:5)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

A fração A9.2, em função do seu perfil cromatográfico, foi purificada por CCD-P e produziu 3 frações, sendo que apenas uma estava razoavelmente pura (figura 22). Esta após nova CCD-P, foi denominada de A9.2.3. Na figura 23 é apresentado um cromatograma desta substância juntamente com padrões de estigmasterol e β -sitosterol. O fato da coloração das 3 substâncias ser muito parecida, quando reveladas com anisaldeído-sulfúrico, além de apresentarem valores de RF similares, é um indicativo de uma possível estrutura esteroidal para a A9.2.3. Para a sua elucidação estrutural foram utilizados espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, os quais são discutidos no item 5.8.

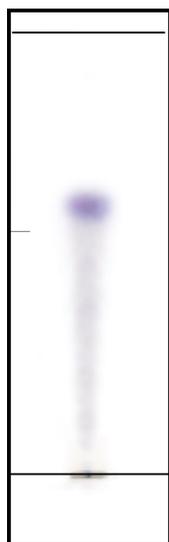


Figura 22. CCD da substância A9.2.3 antes da purificação final.

Eluente: EP:AcOEt (1:1)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

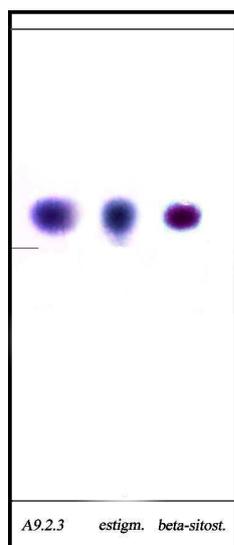


Figura 23. CCD da substância A9.2.3 com os padrões de estigmasterol e β -sitosterol.

Eluente: EP:AcOEt (1:1)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

5.4. Isolamento a partir do extrato metanólico

5.4.1. Isolamento da substância ME1

Durante a maceração das folhas com MeOH houve a precipitação da substância ME1. Foram obtidos 2,1 g desta substância, o que significa um rendimento de 25% em relação à fração metanólica e de 0,26% em relação às folhas.

ME1 apresentou faixa de fusão entre 185 e 190 °C e era solúvel apenas em água, apontando para a possibilidade de ser um glicosídeo altamente polar, ou mesmo um carboidrato.

O cromatograma com padrão de sacarose é mostrado nas figuras 24 e 25. E a figura 26 demonstra o cromatograma obtido após a hidrólise da amostra, com HCl 10% em refluxo por 1 h.

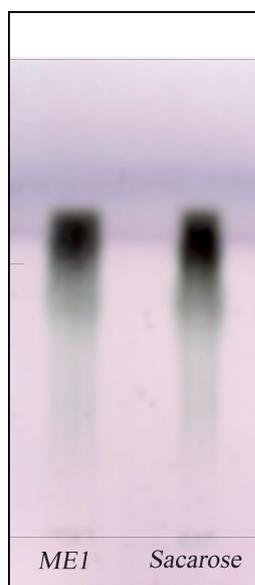


Figura 24. CCD da substância ME1 com padrão de sacarose.

Eluente: EtOH:H₂O:AcOH (97:2:1)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: Reagente anisaldeído sulfúrico

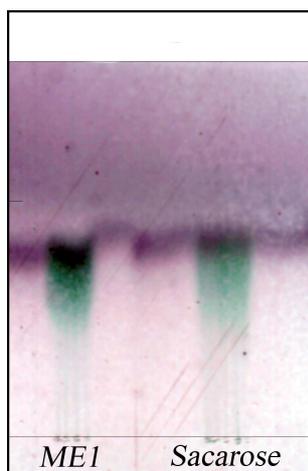


Figura 25. CCD da substância ME1 com padrão de sacarose.

Eluente: i-PropOH:AcOH (99:1)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteccção: Reagente anisaldeído sulfúrico



Figura 26. CCD da substância ME1 com as frações orgânica e aquosa provenientes da hidrólise ácida..

Eluente:AcOEt:MeOH:H₂O:AcOH (70:1:15:14:1)

Fase fixa: gel de sílica F₂₅₄

Deteccção: Reagente anisaldeído sulfúrico

A elucidação estrutural desta substância, a partir de dados de espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas, é apresentada no item 5.9.

5.5. Elucidação estrutural da substância A7P.

A estrutura parcial da substância A7P foi elucidada através da análise dos espectros de ^1H -RMN (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) em CDCl_3 . Estes são apresentados nas figuras 27 e 28, respectivamente.

Nas tabelas 14 e 15, são apresentados os dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respectivamente, obtidos para A7P. Os sinais de ^1H -RMN são designados por letras em ordem decrescente de deslocamentos químicos. Os sinais de ^{13}C -RMN são designados por números, em ordem decrescente de deslocamentos químicos.

Tabela 14. Dados do espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) para A7P.

Designação	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração (^1H)
A	3,64	t	6,66	2
B	1,56	quint	7,80	2
C	1,38 a 1,19	m		66
D	0,88	t	6,90	3

Tabela 15. Dados do espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) para a substância C7.

Designação	δ_{C} (ppm)
1	63,12
2	31,82
3	31,93
4	29,70
5	29,66
6	29,62
7	29,43
8	29,37
9	25,74
10	22,70
11	14,13

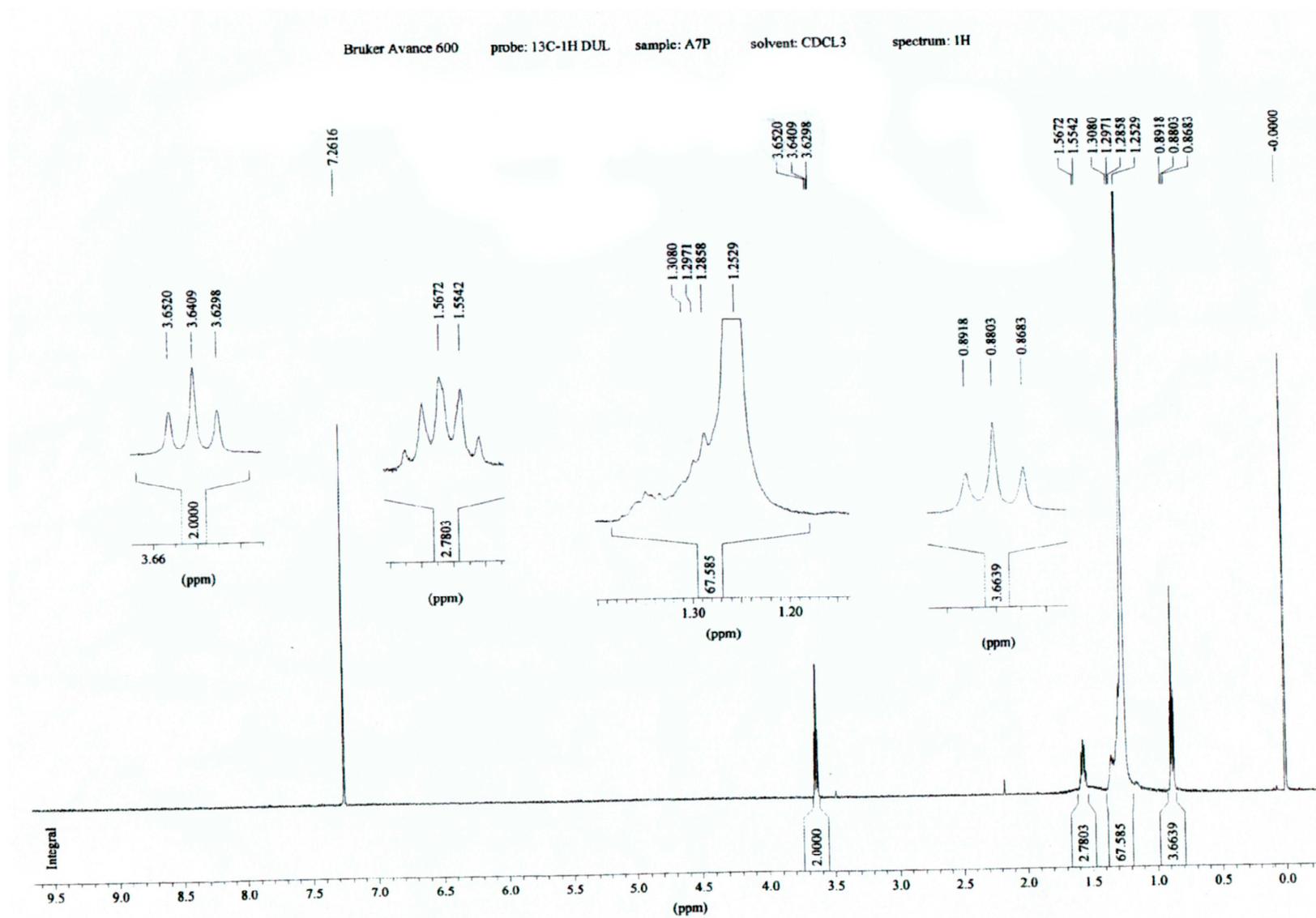


Figura 27. Espectro de ¹H-RMN (600 MHz), em CDCl₃, da substância A7P.

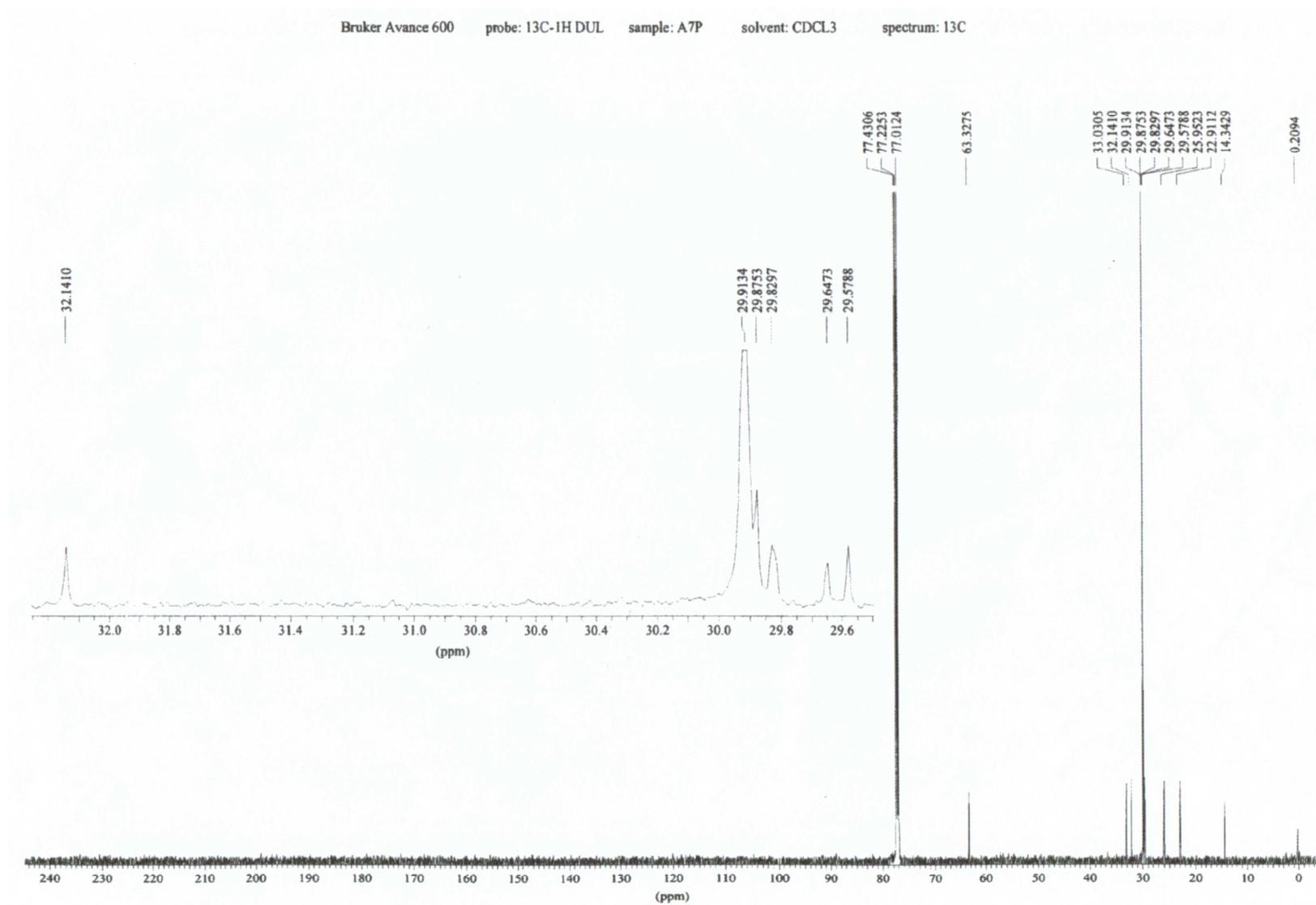


Figura 28. Espectro de ¹³C-RMN (150 MHz), em CDCl₃, da substância A7P.

A discussão a seguir será baseada na análise dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, segundo BREITMAIER (2002) e LAMBERT e MAZOLLA (2003).

No espectro de ^1H -RMN, em δ_{H} 0,88 ppm (sinal D) aparece um tripleto (3 H), com J_{HH} de 6,9 Hz. Este sinal deve corresponder a uma metila ligada a metileno.

No mesmo espectro vê-se um multipletto entre 1,38 e 1,19 ppm (sinal C), em região de deslocamento de metilenos. Devido a grande integração, esta substância contém vários grupos CH_2 .

Em δ_{H} 3,64 ppm (sinal A) existe um tripleto (2 H) com J_{HH} de 6,66 Hz. Este sinal devido ao fato de aparecer em campo baixo e de sua constante de acoplamento, possivelmente se deva a um metileno ligado a um oxigênio e acoplado a outro metileno.

Um penteto está centralizado em δ_{H} 1,56 ppm (2 H) (sinal B), com J_{HH} de 7,80 Hz. Este sinal pode ser atribuído a um metileno acoplado a outros dois metilenos, sendo que um deles é possivelmente aquele que gerou o sinal A.

No espectro de ^{13}C -RMN, vê-se 11 sinais. O sinal em δ_{C} 63,12 ppm pode ser gerado por um CH_2 ligado a um oxigênio. Os 9 sinais entre δ_{C} 31,82 e 22,70 ppm são compatíveis com grupos CH_2 . O sinal em δ_{C} 14,13 ppm é produzido por uma metila.

Diante dos dados espectrais disponíveis, pode-se atribuir a A7P a estrutura de um álcool primário saturado, conforme mostrado na figura 29.

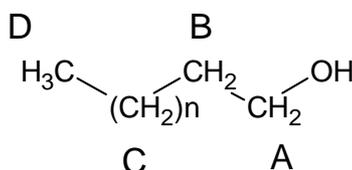


Figura 29. Estrutura de A7P deduzida a partir dos dados espectroscópicos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, evidenciando os sinais designados na tabela 14.

Em função do espectro de ^{13}C -RMN apresentar 11 sinais, A7P talvez seja o undecan-1-ol. Contudo, devido à possibilidade de sobreposição de sinais dos metilenos, a identidade exata de A7P não pode ser confirmada com os dados disponíveis. A confirmação poderia ser obtida por meio de espectrometria de massas, entretanto este experimento não foi realizado.

5.6. Elucidação estrutural da substância C7

Através dos espectros de RMN ^1H (figuras 30 e 31) e ^{13}C (figura 32) foi possível caracterizar os átomos de carbono e hidrogênio que compõem a estrutura da substância isolada e atribuir os deslocamentos químicos de cada carbono e dos prótons correspondentes.

Em δ_{H} 2,18 ppm aparece um singleto (3 H), que por sua alta desblindagem pode ser o sinal de uma metila ligada a carbonila. Este sinal possivelmente se deva a contaminação da amostra com acetona na fase final de sua purificação, uma vez que esta cetona apresenta um singleto em δ_{H} 2,16 (SDBS, 2005). O espectro de ^{13}C -RMN também traz evidências desta contaminação, uma vez que metilas da propanona ressonam em 30,81 ppm e a carbonila em 206,55 ppm (SDBS, 2005), e o espectro de C7 apresenta sinais em 30,86 e em 206 ppm. Estes sinais atribuídos à contaminação da amostra com propanona foram desconsiderados na discussão subsequente.

Nas tabelas 16 e 17 são apresentados os dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respectivamente, obtidos para C7. Os sinais de ^1H -RMN são designados por letras (excetuando o H para se evitar possível confusão), em ordem decrescente de deslocamentos químicos. Os sinais de ^{13}C -RMN são designados por números, em ordem decrescente de deslocamentos químicos.

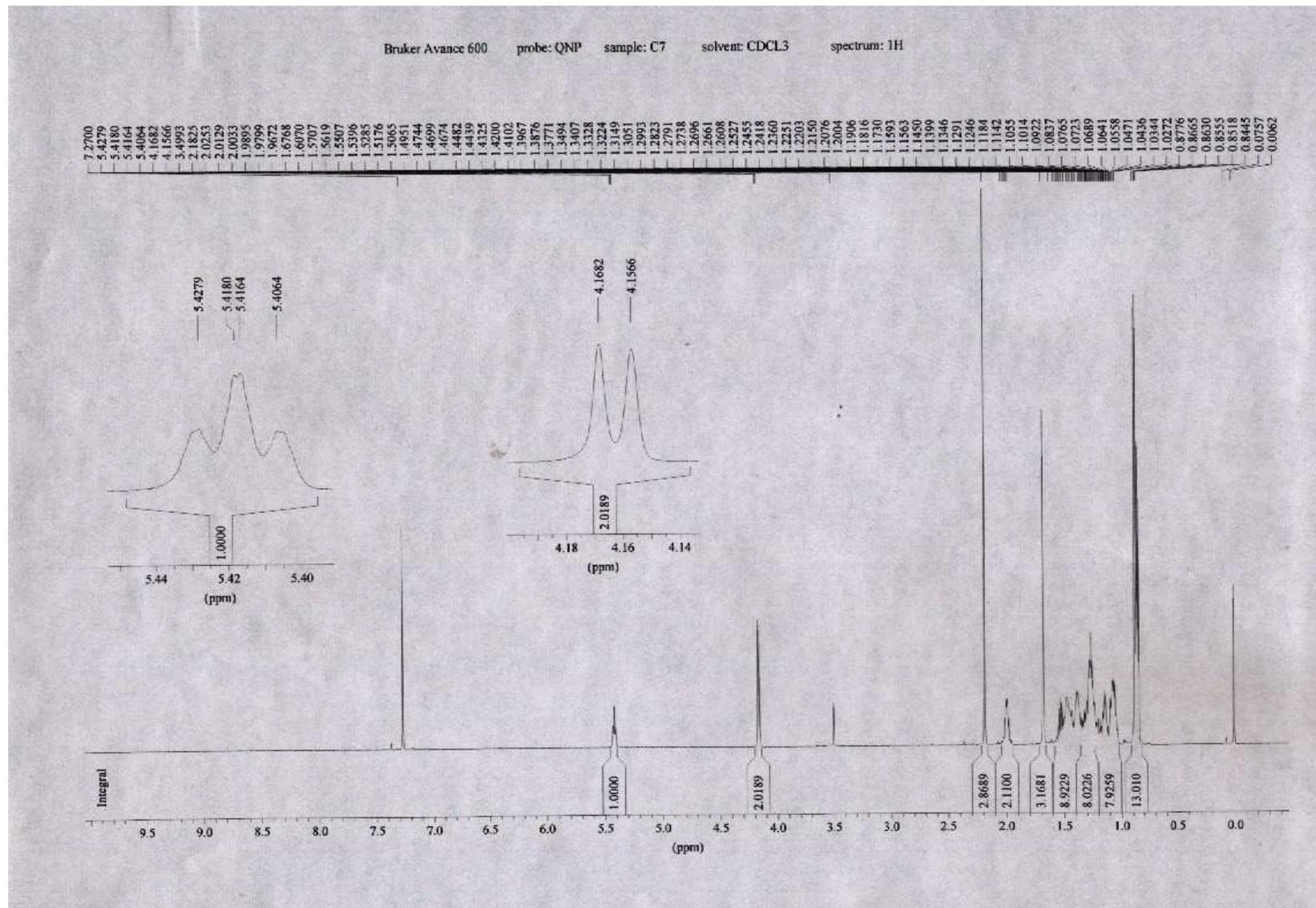


Figura 30. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) da substância C7 em CDCl_3 .

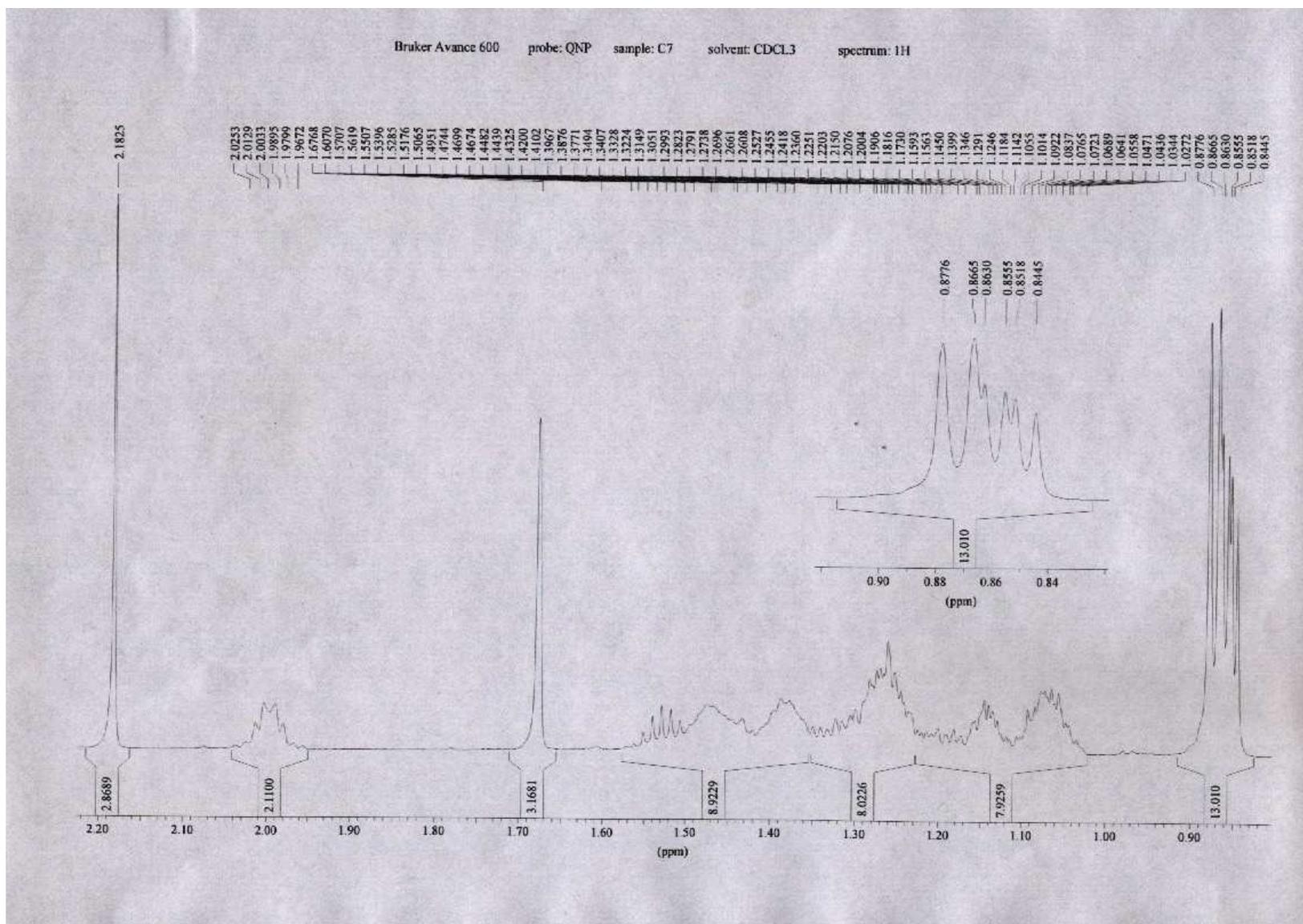


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) expandido da substância C7 em CDCl_3 .

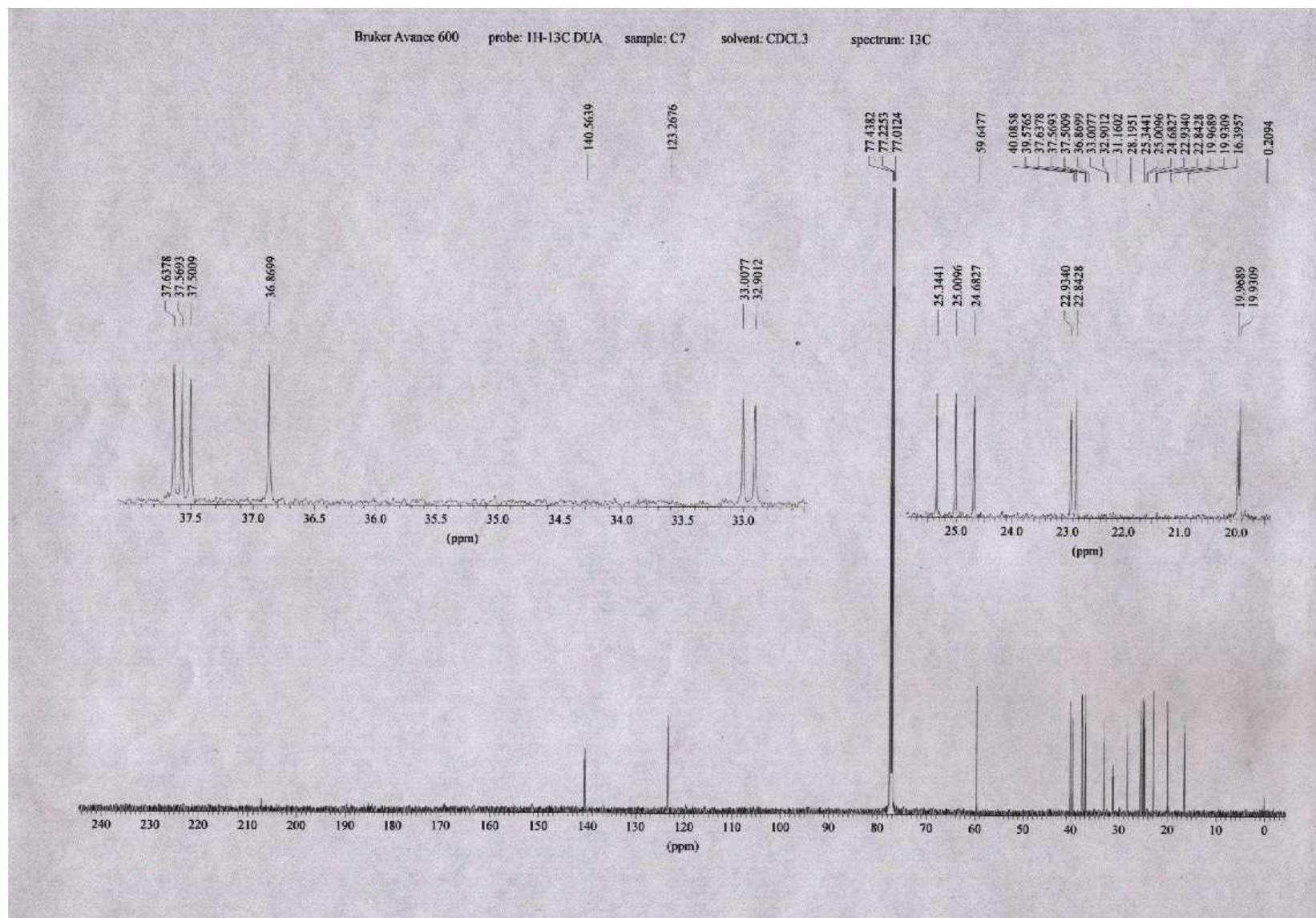


Figura 32. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz) da substância C7 em CDCl₃.

Tabela 16 Dados do espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) para a substância C7.

Designação	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração (^1H)
A	5,41	t	6,96	1
B	4,17	d	6,96	2
C	1,98	m		2
D	1,68	s		3
E	1,52	m	$\approx 6,66$	
F	1,49 a 1,36	m		25
G	1,26 a 1,35	m		
I	1,25 a 1,02	m		
J	0,87	d	6,66	
L	0,86	d	4,50	13
M	0,85	d	4,38	

Tabela 17. Dados do espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) para a substância C7.

Designação	δ_{C} (ppm)
1	140,35
2	123,01
3	59,43
4	39,99
5	39,36
6	37,41
7	37,35
8	37,30
9	36,66
10	32,80
11	32,70
12	28,00
13	25,14
14	25,80
15	24,48
16	22,73
17	22,64
18	19,76
19	19,73
20	16,19

Na avaliação inicial do espectro de ^1H -RMN vê-se um tripleto em δ_{H} 5,41 ppm com integração para 1 H. Seu deslocamento químico é compatível com o de um próton vinílico (BREITMAIER, 2002) e por ser um tripleto, este próton está acoplado com um metileno. Em δ_{H} 4,17 ppm aparece um dubleto com integração para 2 H. Ambos os sinais possuem constante de acoplamento (J_{HH}) de 6,96 Hz, indicando que são gerados por prótons acoplados entre si. Este sistema de spins permite definir a subestrutura abaixo (figura 33):

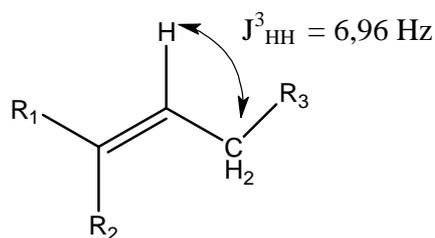


Figura 33. Subestrutura 1 proposta para C7.

Segundo SILVERSTEIN e WEBSTER (2000), acoplamentos vicinais (J_{HH}) como este da subestrutura 1, ocorrem entre 4 e 10 Hz e tipicamente aparecem em 7 Hz, o que corrobora a proposta acima.

Outro singleto aparece δ_{H} 1,68 ppm, com integração de 3 H, que em função de aparecer em campo mais baixo do que o usual, pode ser o sinal de uma metila alílica (LAMBERT e MAZZOLA, 2003). Esta metila poderia ser R₁ ou R₂ da subestrutura 1, apontando para a possibilidade de um fragmento alílico tri-substituídos (figura 34).

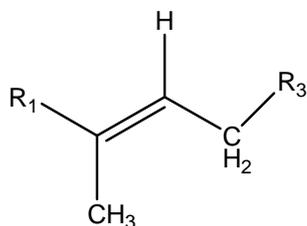


Figura 34. Subestrutura 2, proposta a partir da substituição de R₂ pela metila em δ_{H} 1,68 ppm.

Os prótons desta metila devem acoplar com o hidrogênio alílico (H-C=C-C-H), com constante de acoplamento $^4J_{\text{HH}}$ na faixa de 0-3 Hz (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ 1996), contudo o sinal em δ_{H} parece ser um singlete, ou seja, com $^4J_{\text{HH}}$ igual a zero ou muito pequena para ser visto com a expansão fornecida.

Ao se analisar o dubleto em δ_{H} 4,17 ppm, nota-se que o deslocamento químico deste metileno está em campo mais alto do que o usual para a subestrutura proposta acima (figura 34), que seria em torno de 1,2 a 2,0 ppm (CREWS et al., 1998). Este fato aponta para a possibilidade de R₃ ser um substituinte que esteja desblindando o metileno. Este substituinte poderia ser uma hidroxila. Utilizando-se o software ChemDraw Ultra 9.0® (CambridgeSoft), foram computados os deslocamentos químicos utilizando a proposta de R₃ ser uma hidroxila. Os resultados são colocados na subestrutura 3 (figura 35).

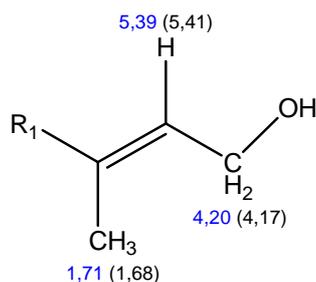


Figura 35. Deslocamentos químicos (ppm) computados pelo ChemDraw Ultra 9.0 para a subestrutura 3 em azul e em preto àqueles obtidos para C7.

Da comparação entre os deslocamentos calculados e aqueles obtidos para a substância C7, pode-se concluir que a subestrutura 3 é compatível com os dados espectrais de ^1H .

Ao se analisar o espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz) (figura 32), destaca-se os sinais em δ_{C} 140,35 e 123,01 ppm, que é uma região característica de carbonos sp^2 (CREWS et al., 1998). Evidencia-se o fato da substância C7 apresentar somente dois carbonos sp^2 , já apresentados na subestrutura 3, sendo que o sinal em δ_{C} 123,01 ppm é atribuído ao carbono ligado ao hidrogênio alílico, e o sinal em δ_{C} 140,35 ppm, ao carbono substituído

pela metila. Por sua vez, o sinal em δ_C 59,43 ppm deve-se à ressonância do carbono metilênico ligado à hidroxila, uma vez que se encontra em região característica de metilenos ligados diretamente ao oxigênio (CREWS *et al.*, 1998). Esta análise corrobora a subestrutura 3 proposta a partir do espectro de ^1H -RMN, e seus deslocamentos químicos podem ser sumarizados conforme a figura 36.

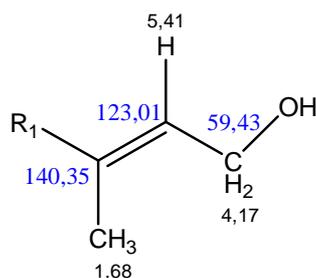


Figura 36. Subestrutura 3 com atribuição dos deslocamentos químicos (ppm) obtidos para os prótons (em preto) e carbonos (em azul) de C7.

Em δ_H 1,98 ppm existe um multiplete cujo deslocamento químico é compatível com a hipótese de ser um metileno na posição R_1 da subestrutura 3 (figura 36), uma vez que o citado sinal possui integração para 2 prótons. Além disso, o deslocamento de 1,98 ppm pode ser devido a sua posição alfa em relação a ligação dupla (LAMBERT e MAZZOLA, 2003).

Tal hipótese foi simulada com o ChemDraw Ultra 9.0® (Camssoft), e a mesma foi corroborada pelo deslocamento obtido para R_1 , conforme pode ser visto na subestrutura 4 (figura 37).

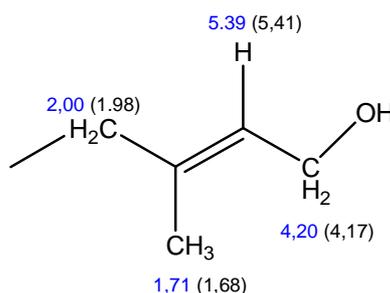


Figura 37. Deslocamentos químicos (ppm) computados pelo ChemDraw Ultra 9.0 para a subestrutura 4 (em azul) e obtidos para C7 (em preto).

O espectro de ^{13}C -RMN apresenta um total de 20 sinais, sendo que, com exceção dos sinais dos carbonos olefínicos (140,35 e 123,01 ppm) do metileno carbinólico (59,43 ppm), todos se encontram entre δ_{C} 16,19 e 39,99 ppm. Esta faixa de deslocamento químico indica carbonos sp^3 de metilas, metilenos e metinos (CREWS *et al.*, 1998).

Correlacionando este achado, vê-se que no espectro de ^1H -RMN, aparecem extensos multipletos entre δ_{H} 1,02 e 1,42 ppm, região característica de metinos e metilenos.

No espectro expandido (figura 32) em δ_{H} 0,85 existe um dubleto com J_{HH} de 4,38 Hz, outro dubleto está em δ_{H} 0,86 ppm (J_{HH} 4,50 Hz), e ainda um terceiro dubleto é visto em δ_{H} 0,87 ppm (J_{HH} 6,66 Hz). Dubletos nesta região do espectro se devem a metilas acopladas com metinos. E tendo em vista que, a integração destes 3 dubletos é em torno de 13, estes sinais são atribuídos a 4 metilas acopladas com CH.

Ainda neste espectro, em δ_{H} 1,52 ppm aparece um multipletos com J_{HH} de 6,66 Hz. Esta é a mesma constante de acoplamento encontrada para a metila em δ_{H} 0,87 ppm, o que demonstra que ambos os sinais se devem a prótons que acoplam entre si. Estes sinais podem ser gerados por um fragmento isopropila ligado a um metileno, conforme subestrutura 5 abaixo (figura 38):

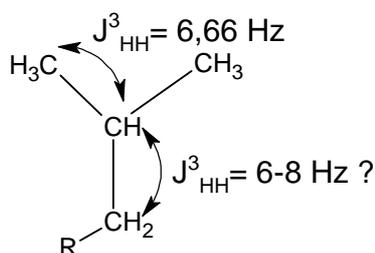


Figura 38. Subestrutura 5 proposta para C7.

Entretanto, para o próton do CH iso-propílico se poderia esperar um sinal complexo como um tripleto de septetos, caso as constantes de acoplamentos fossem suficientemente diferentes.

Contudo, o multiplete em 1,52 ppm, parcialmente sobreposto a outro multiplete, parece ser composto por 9 linhas. Isto é o que se esperaria se a constante de acoplamento (J_{HH}) entre o CH iso-propílico e o CH₂ fosse igual ou próximo a 6,66 Hz. Para acoplamentos vicinais H-C-C-H a constante de acoplamento é na faixa de 6 a 8 Hz (PAVIA *et al.*, 1996), ou seja, bem próxima ao valor de 6,66 Hz, o que explicaria o padrão de noneto.

Para testar esta hipótese foi utilizado o software Perch® versão 2005 (Perch Solutions Ltda.). Este permite desenhar a estrutura desejada e, através de um campo de força da mecânica molecular, a energia da molécula é minimizada, e na seqüência através do método de Monte Carlo combinado com dinâmica molecular são produzidas inúmeras conformações possíveis. Depois de ocorridas as etapas anteriores, o software calcula os deslocamentos químicos para os prótons e as constantes de acoplamentos (J_{HH}).

A simulação com Perch® versão 2005 (PerchSolutions Ltda.) produziu resultados interessantes, uma vez que corroborou as inferências feitas acima. Na figura 39 são apresentados as constantes de acoplamento (J_{HH}) calculados pelo software.

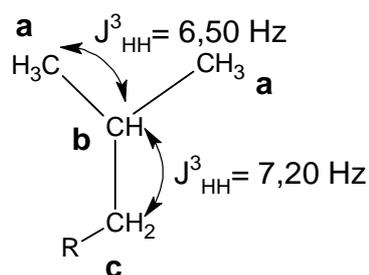


Figura 39. Constantes de acoplamento calculadas com Perch versão 2005 para a subestrutura 5.

Portanto, apesar do sistema de spins da figura 34 ser do tipo A_6MX_2 , as constantes de acoplamento são iguais ou muito próximas ($J_{ab} \approx J_{bc}$), o que faz com ele se comporte como um sistema de pseudo-primeira ordem do tipo A_8X .

Agora utilizando o software MestreC versão 4.4.8.0 (MestreC), o qual simula o padrão de desdobramento de acordo com a entrada dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, produziu-se o multipletto apresentado na figura 35, usando-se para tanto a J_{ab} de 6,66 Hz (obtida para a substância C7) e a J_{bc} de 7,2 Hz calculada com o Perch.

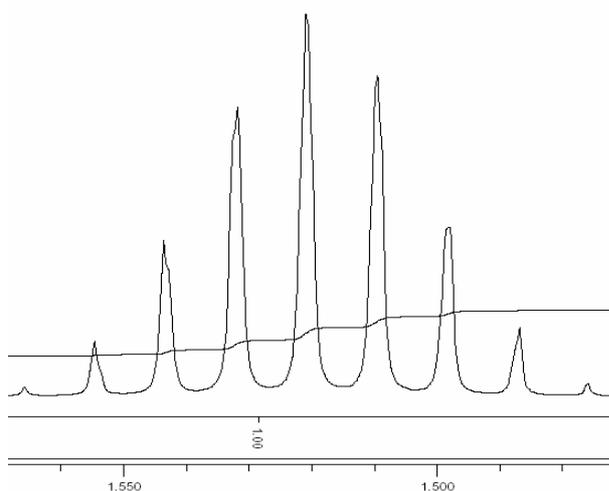
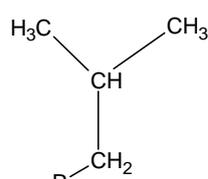
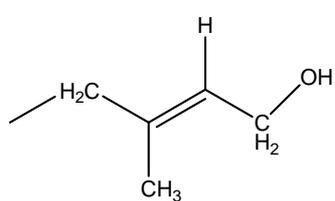


Figura 40. Multipletto calculado com o software MestreC para o próton em δ_{H} 1,52 ppm utilizando-se J_{ab} de 6,66 (obtido) e J_{bc} de 7,2 Hz (calculado).

O multipeto (figura 40) não é de primeira ordem, uma vez que não apresenta os sinais com intensidade segundo o triângulo de Pascal (MACOMBER, 1998). Portanto, o sinal obtido em δ_H 1,52 ppm, está de acordo com a previsão de um sistema de spins de pseudo-primeira ordem do tipo A_8X . Portanto, a subestrutura 5 proposta para C7 é compatível com os dados espectroscópicos.

Sendo assim, das quatro metilas acopladas com metino, duas estão na subestrutura 5 (figura 38). A tabela 18 sumariza os fragmentos discutidos até aqui.

Tabela 18. Apresentação dos fragmentos parciais obtidos dos dados de 1H -RMN (600 MHz) e ^{13}C -NMR (150 MHz), $CDCl_3$, δ).

Fragmentos	1H (J)	^{13}C
	CH ₃ , 0,87, d (6,66 Hz), 6 H CH, 1,52, m (\approx 6,66 Hz) 1 H CH ₂ , 1,02 a 1,42, m	* * *
	OCH ₂ , 4,15, d (6,96 Hz) 2 H = CH, 5,41, t, (6,96 Hz) 1 H CH ₃ , 1,68, s, 3 H CH ₂ , 1,98, m, 2 H =C	59,43 123,01 * * 140,35
2 x CH ₃ -CH-	CH ₃ , 0,86 e 0,85, d (4,50 e 4,38 Hz), 3 H CH, 1,02 a 1,42, m	* *

*Carbono cujo sinal não pode ser atribuído com segurança.

A tabela 18 contabiliza um total de 13 átomos de carbono e 26 de hidrogênio nos fragmentos já elucidados.

A estrutura parcial de C7 contém os fragmentos apresentados na figura 41 abaixo.

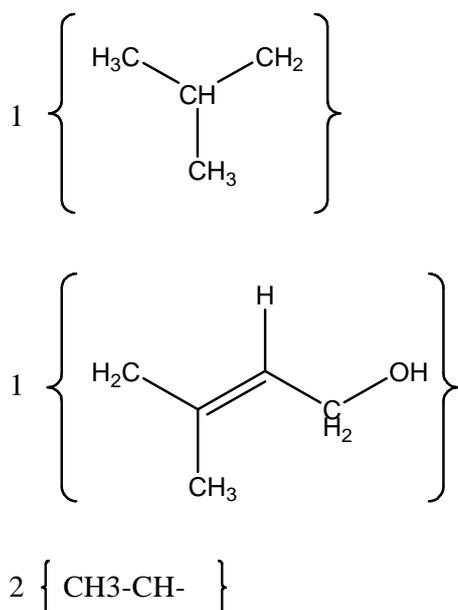


Figura 41. Fragmentos já elucidados que formam a estrutura parcial de C7.

Mesmo não dispondo de um espectro de massas de C7, que permitiria deduzir a estrutura de possíveis fragmentos da molécula, além da fórmula molecular, é factível inferir esta a partir dos dados disponíveis. Partindo-se da informação de que a substância isolada tem 20 carbonos, 1 oxigênio e 1 insaturação, uma possível fórmula molecular seria $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$.

Em virtude do espectro de ^{13}C -RMN mostrar 20 sinais, significa que ainda faltam 7 átomos de carbono, em relação à soma dos fragmentos da tabela 18. Além dos átomos de hidrogênio dos fragmentos já deduzidos, faltam 14 átomos deste elemento, para completar a fórmula acima. Uma inferência plausível seria que estes fragmentos se tratem de 7 metilenos. Tal hipótese é bastante provável uma vez que no espectro de ^1H -RMN aparecem extensos multipletos na região de deslocamento químico do metileno.

Além disso, a tabela abaixo (tabela 19) mostra que existem 10 sinais que podem pertencer a CH_2 ou CH , que ainda não puderam ser atribuídos, e destes, 3 sinais são devidos aos metinos acoplados com metilas, já mostrados na tabela 18. Portanto, dos 10 sinais, sete podem ser atribuídos a metilenos, uma vez que estão em região compatível com o deslocamento químico (δ_{C}) de grupos CH_2 . Sendo assim, estes sete metilenos

forneem os 7 átomos de carbono e os 14 átomos de hidrogênio necessários para a fórmula proposta de $C_{20}H_{40}O$.

Tabela 19. Possíveis atribuições de deslocamento químico aos carbonos (em negrito) da estrutura parcial de C7.

Designação	δ_C (ppm)	Possível tipo de carbono	Atribuição
1	140,35	=CH	-C(CH₃)=CH-
2	123,01	=CH	-C(CH₃)=CH-
3	59,43	CH ₂ -X	-OCH₂-
4	39,99	CH ₂ ou CH	(CH ₃) ₂ -CH- CH₂-
5	39,36	CH ₂ ou CH	ou -CH₂-C(CH₃)=CH-
6	37,41	CH ₂ ou CH	?
7	37,35	CH ₂ ou CH	?
8	37,30	CH ₂ ou CH	?
9	36,66	CH ₂ ou CH	?
10	32,80	CH ₂ ou CH	?
11	32,70	CH ₂ ou CH	?
12	28,00	CH ₂ ou CH ₃	?
13	25,14	CH ₂ ou CH ₃	?
14	25,80	CH ₂ ou CH ₃	?
15	24,48	CH ₂ ou CH ₃	?
16	22,73	CH ₂ ou CH ₃	(CH₃)₂CH-
17	22,64	CH ₂ ou CH ₃	ou
18	19,76	CH ₃	CH₃-C=CH-
19	19,73	CH ₃	ou
20	16,19	CH ₃	2 x CH₃-CH-

Então, a estrutura de C7 pode ser desenhada conforme é apresentada na figura 42 abaixo, onde estão coloridos de azul os fragmentos inicialmente elucidados, e em preto os metileno deduzidos.

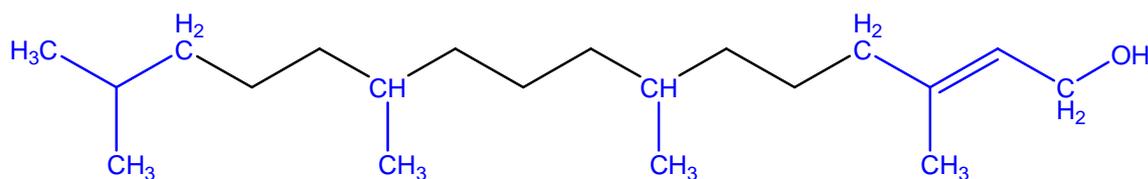


Figura 42. Estrutura proposta para C7 a partir dos dados de 1H -RMN e ^{13}C -RMN.

Esta molécula, um diterpeno, cujo nome oficial é 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol, é comumente conhecida como fitol. Apesar dos dados espectrais apontarem claramente para o fato de C7 ser o fitol, foram comparados os deslocamentos obtidos com aqueles da literatura e ainda com os calculados pelos softwares Perch v. 2005 e ChemDraw Ultra 9.0 (tabela 20 e 21) As designações utilizadas nas tabelas 20 e 21 se referem àquelas colocadas na figura 43.

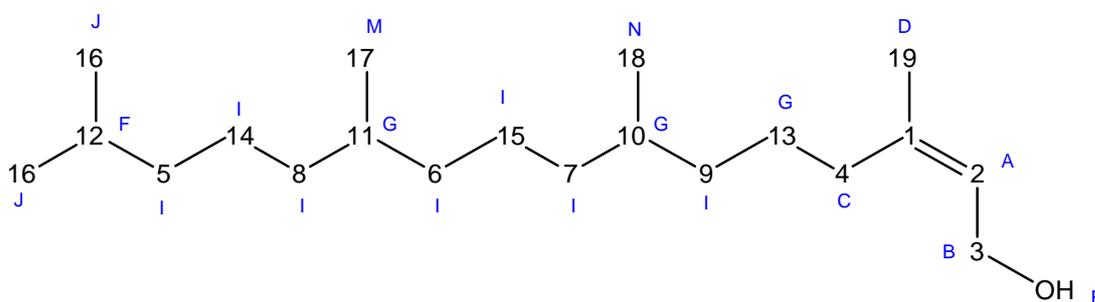


Figura 43. Designação dos átomos de carbono em ordem decrescente de deslocamento químico, para C7, de acordo com SDBS (2005).

Tabela 20. Valores de δ_H (ppm) obtidos no espectro de C7 1H -RMN (600 MHz, $CDCl_3$, δ), comparados com dados da literatura (400 MHz, $CDCl_3$), (SDBS, 2005) e calculados pelo software Perch v. 2005 (500 MHz, $CDCl_3$).

Designação	Substância C7		Fitol (SDBS, 2005)	Perch v.2005	
	δ_H (ppm)	M (J)	δ_H (ppm)	δ_H (ppm)	J (Hz)
A	5,41	t (6,96 Hz)	5,40	5,44	6,00
B	4,17	d (6,96 Hz)	4,14	4,07	6,00
C	1,98	m	1,98	1,93	
D	1,68	s	1,66	1,70	
E			1,66	4,00	
F	1,52	m (\approx 6,66 Hz)	1,52	1,48	7,2 e 6,5
G	1,49 a 1,33	m	1,44 a 1,35	1,47 a 1,33	
I	1,34 a 1,02	m	1,30 a 1,03	1,33 a 1,00	
J	0,87	d (6,66 Hz)	0,87	0,88	6,48
L	0,86	d (4,50)	0,86	0,88	
M	0,85	d (4,38)	0,85	0,87	

Tabela 21. : Valores de δ_C (ppm) observados no espectro de C7 ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3 , δ), comparados com dados da literatura (100 MHz, CDCl_3), (SDBS, 2005) e calculados pelo software ChemDraw Ultra 2005.

Substância C7		Fitol (SDBS, 2005)	ChemDraw Ultra.2005
Designação	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)
1	140,35	140,05	139,0
2	123,01	123,25	122,0
3	59,43	59,35	58,9
4	39,99	39,91	39,6
5	39,36	39,41	39,9
6	37,41	37,46	37,7
7	37,35	37,41	37,7
8	37,30	37,34	37,7
9	36,66	36,72	37,7
10	32,80	32,82	33,3
11	32,70	32,73	33,2
12	28,00	28,00	28,1
13	25,14	25,19	24,9
14	25,80	24,82	24,3
15	24,48	24,50	24,6
16	22,73	22,73	23,2
16	22,64	22,64	23,2
17	19,76	-	21,0
18	19,73	19,75	21,0
19	16,19	16,16	17,4

A análise das tabelas 20 e 21 mostra que os deslocamentos químicos obtidos para C7 são os mesmos do padrão de fitol (SDBS, 2005), com exceção do próton da hidroxila que não pode ser observado no espectro de ^1H -RMN de C7.

Portanto, através da comparação com dados da literatura foi possível concluir que a estrutura química atribuída à substância C7 é realmente a do álcool vinílico 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol, comumente chamado de fitol.

Uma questão ainda em aberto é a estereoquímica da molécula isolada, uma vez que ela pode existir na forma (E) e (Z), conforme a figura 44.

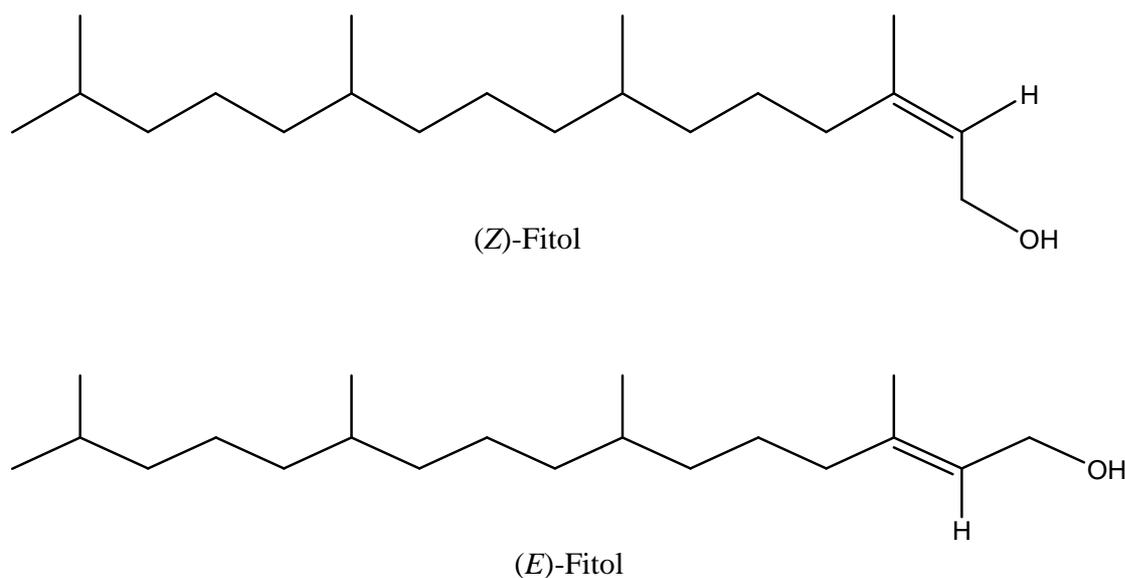


Figura 44. Estereoisômeros Z e E do fitol.

A determinação da estereoquímica de olefinas trissubstituídas pode ser efetivamente realizada através da análise do espectro de NOE diferencial, ou do espectro de correlação NOESY (LAMBERT e MAZOLLA, 2003; MACOMBER, 1998). Entretanto, estes experimentos não foram realizados.

Contudo, analisando-se a influência do efeito γ sobre o deslocamento de ^{13}C , pode-se distinguir entre os isômeros E e Z. Entretanto, em alcenos trissubstituídos este efeito é inferior que em dissustituídos (BREITMAIER, 2002).

Em isômeros (E), onde a metila vinílica é eclipsada por um grupo alquila na posição γ , a mesma ressoa em campo mais alto, uma vez que o ângulo diedro é de 0° , o que blindo o carbono metílico. Em isômeros Z, onde o ângulo diedro é de 180° a blindagem é inferior, e o sinal da metila aparece em campo mais baixo (BREITMAIER, 2002).

Em fragmentos (Z), como aquele apresentado na figura 45 o sinal da metila aparece em δ_{C} próximo a 23 ppm. Enquanto, para fragmentos (E) como aquele da figura 46, a metila tem δ_{C} em torno de 15 ppm (CREWS *et al.*, 1998).

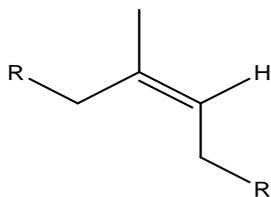


Figura 45. Fragmento Z.

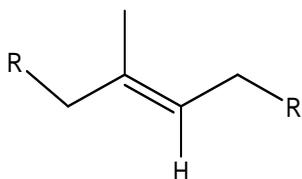
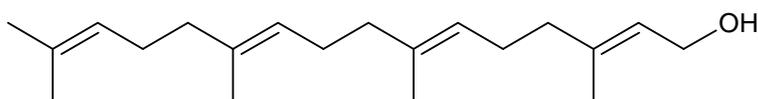


Figura 46. Fragmento E.

Baseado nestes dados pode-se inferir que a substância C7 é o (E)-fitol, uma vez que o deslocamento da metila aparece em 16,19 ppm.

O fitol, que é a forma reduzida do geranylgeraniol (figura 47), é um dos diterpenos mais simples e importantes da natureza, uma vez que forma a cadeia lateral lipofílica da vitamina K₁ (figura 48) e das clorofilas (figura 49) (DEWICK, 2002).



Geranylgeraniol

Figura 47. Estrutura do geranylgeraniol (DEWICK, 2002).

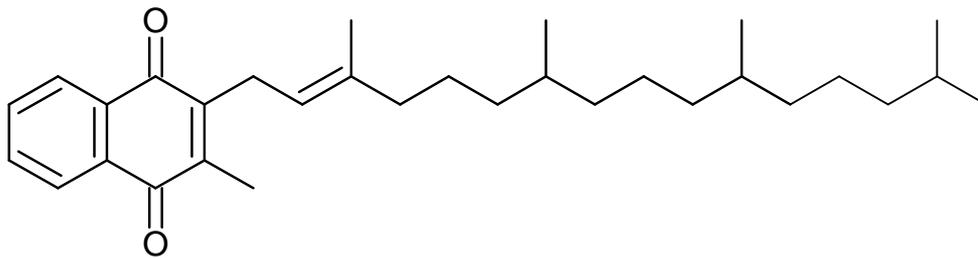


Figura 48. Estrutura da vitamina K₁ (DEWICK, 2002).

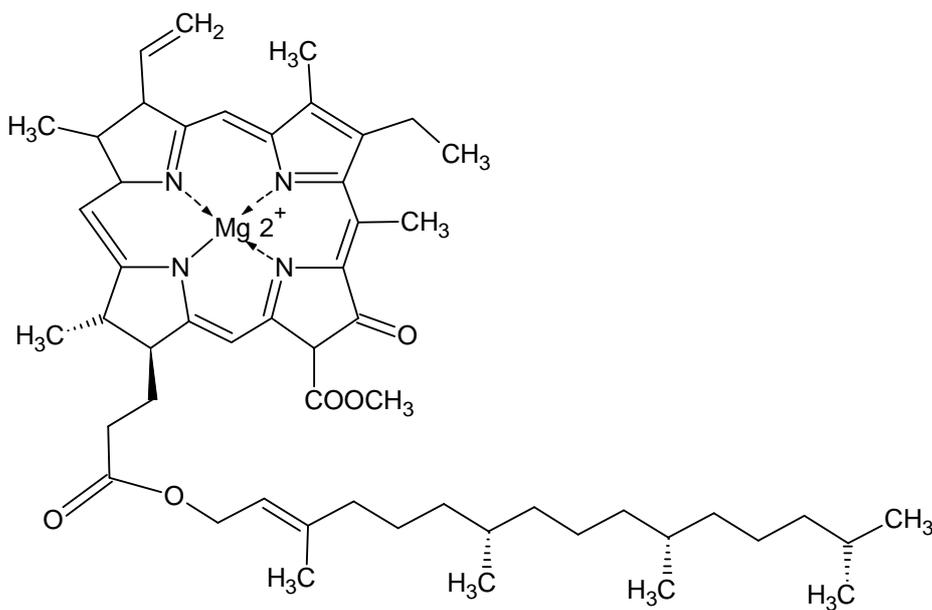


Figura 49. Estrutura da clorofila a (DEWICK, 2002).

Existem evidências de que o geranylgeranyl-pirofosfato (figura 50) está envolvido na formação da ligação éster, assim como nas três reduções necessárias para formar o éster de fitol, após a ligação na molécula de clorofila (DEWICK, 2002).

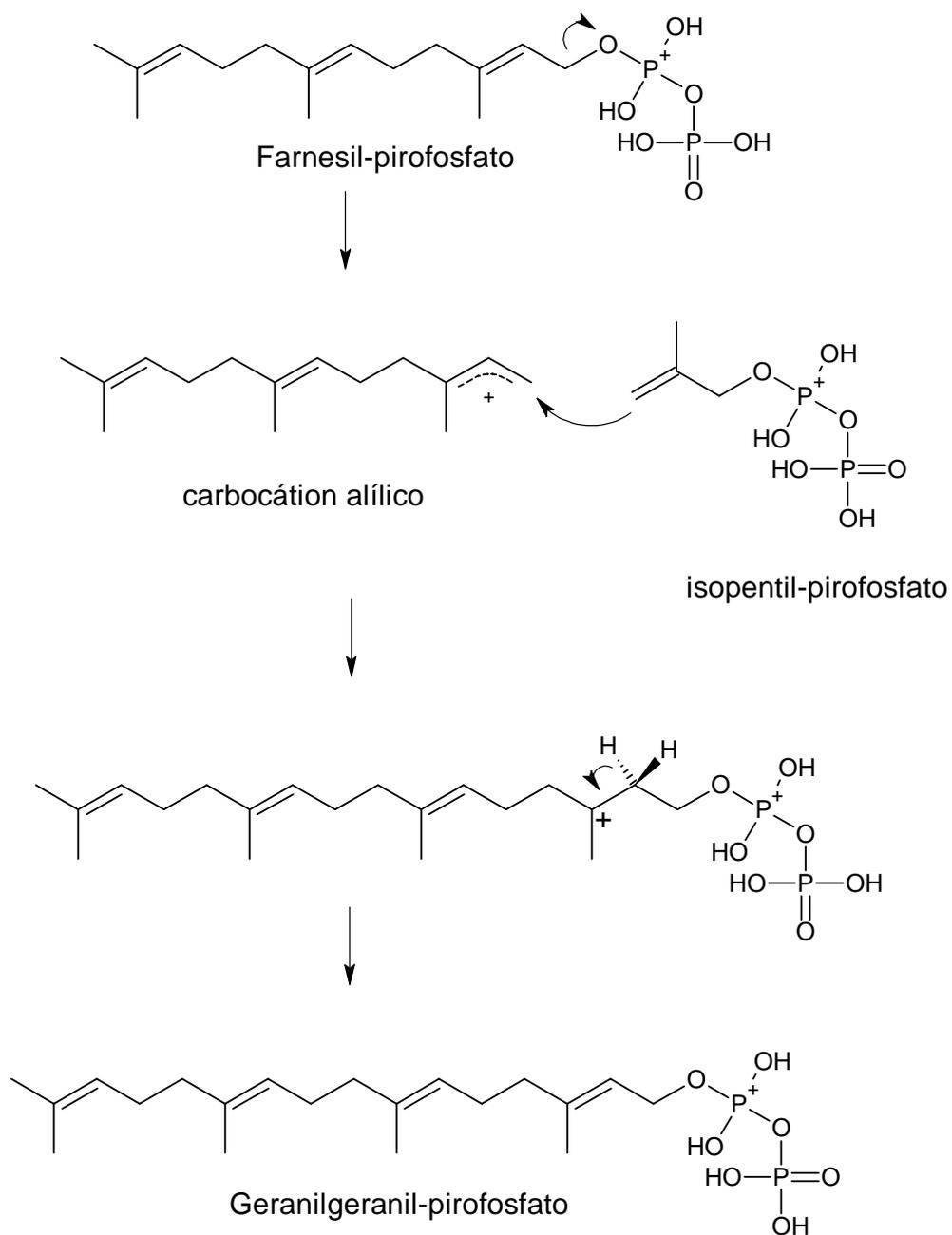


Figura 50. Biossíntese do geranylgeranil-pirofosfato (DEWICK, 2002).

5.7. Elucidação estrutural da substância D1.

A substância D1 se mostrou instável durante a análise de RMN, portanto a determinação total de sua estrutura não pode ser feita. Contudo, foi possível fazer algumas inferências estruturais baseados nos dados de ^1H -RMN (600 MHz) e ^{13}C -RMN em CDCl_3 . O espectro de ^1H -RMN é apresentado nas figuras 51 e 52 e o espectro de ^{13}C -RMN na figura 53.

Nas tabelas 22 e 23, são apresentados os dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respectivamente, obtidos para D1. Os sinais de ^1H -RMN são designados por letras em ordem decrescente de deslocamentos químicos (excetuando a letra H, para se evitar possíveis confusões). Os sinais de ^{13}C -RMN são designados por números, em ordem decrescente de deslocamentos químicos.

Tabela 22. Dados do espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) para D1.

Designação	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração (^1H)
A	5,45	t	7,0	1
B	5.13	m		12
C	4,10	d	7,0	2
D	2,18	s		1
E	2,11 a 1,95	m		54
F	1,74	s		3
G	1,68	s		30
I	1,60	d	5,7	16

Tabela 23. Dados do espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) para D1.

Designação	δ_{C} (ppm)		
		37	25,91
1	140,11	38	25,48
2	136,30	39	23,67
3	135,59	40	23,64
4	135,50	41	23,58
5	135,44	42	19,72
6	135,41	43	17,90
7	135,18	44	16,21
8	135,11		
9	131,47		
10	125,63		
11	125,23		
12	125,20		
13	125,14		
14	125,09		
15	124,73		
16	124,65		
17	124,61		
18	124,47		
19	124,44		
20	124,34		
21	61,43		
22	59,23		
23	40,17		
24	39,97		
25	39,93		
26	37,71		
27	32,41		
28	32,39		
29	32,20		
30	29,43		
31	26,97		
32	26,88		
33	26,84		
34	26,61		
35	26,57		
36	26,51		

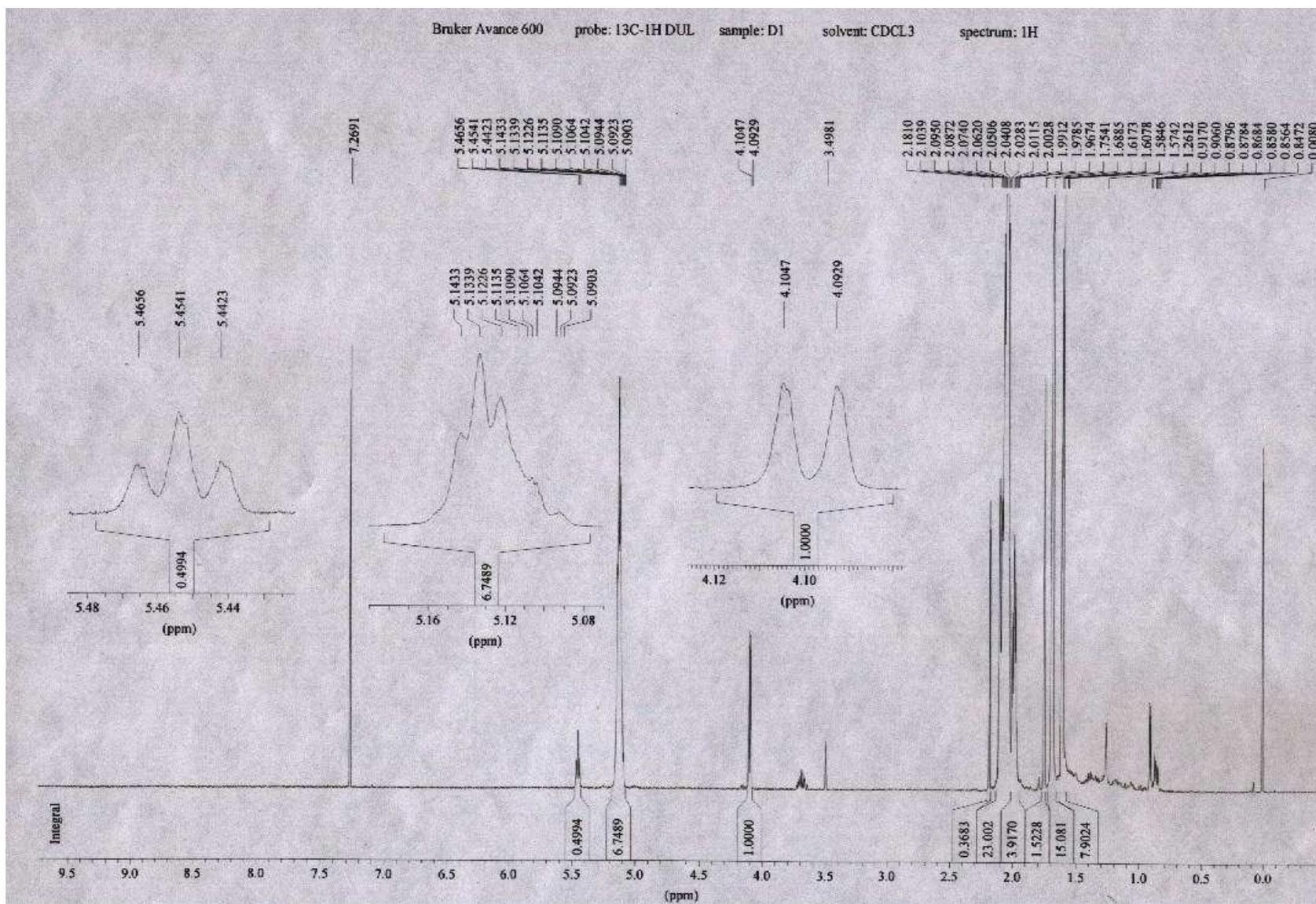


Figura 51. Espectro de ¹H-RMN (600 MHz), em CDCl₃, da substância D1.

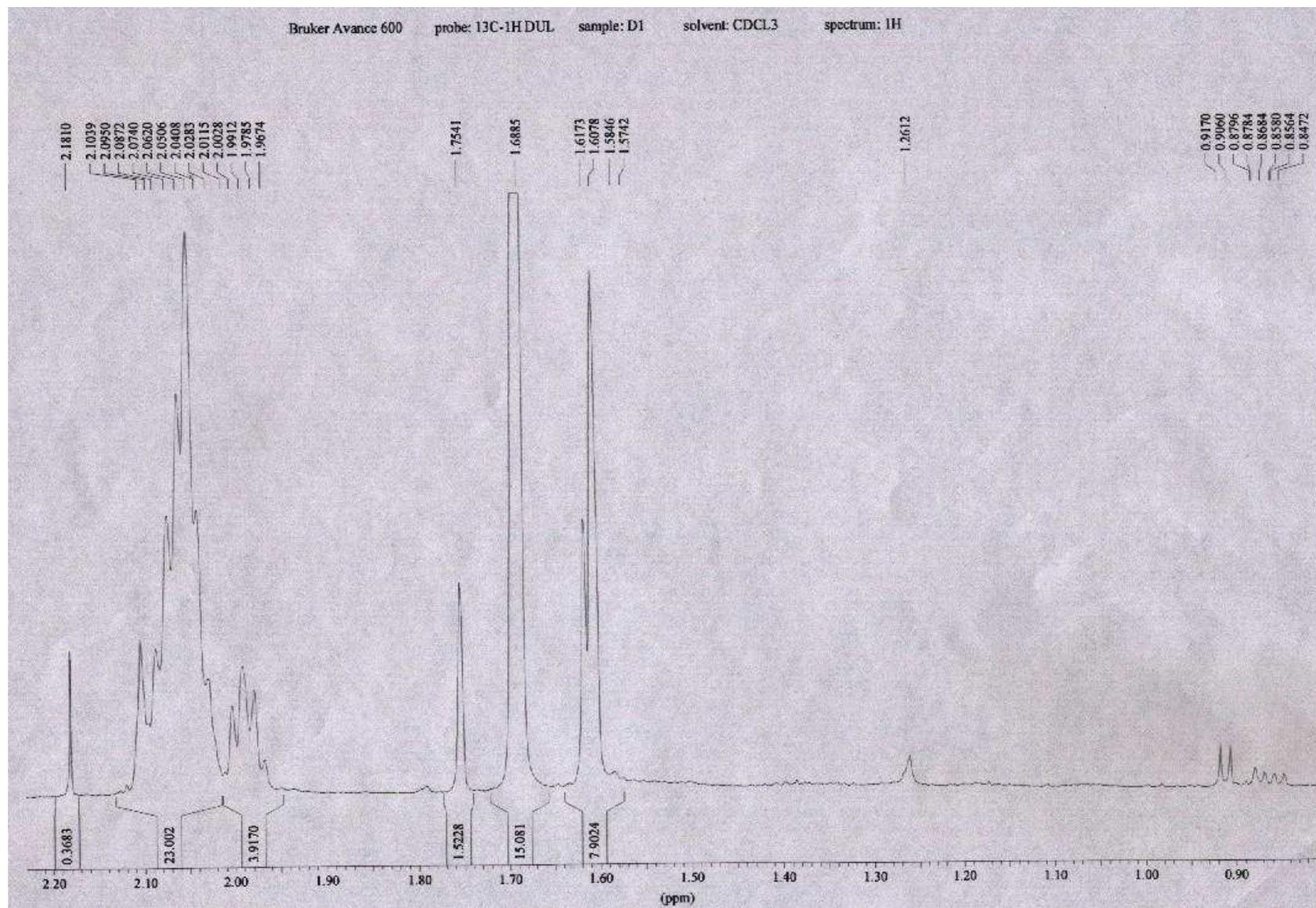


Figura 52. Expansão do espectro de ¹H-RMN (600 MHz), em CDCl₃, da substância D1.

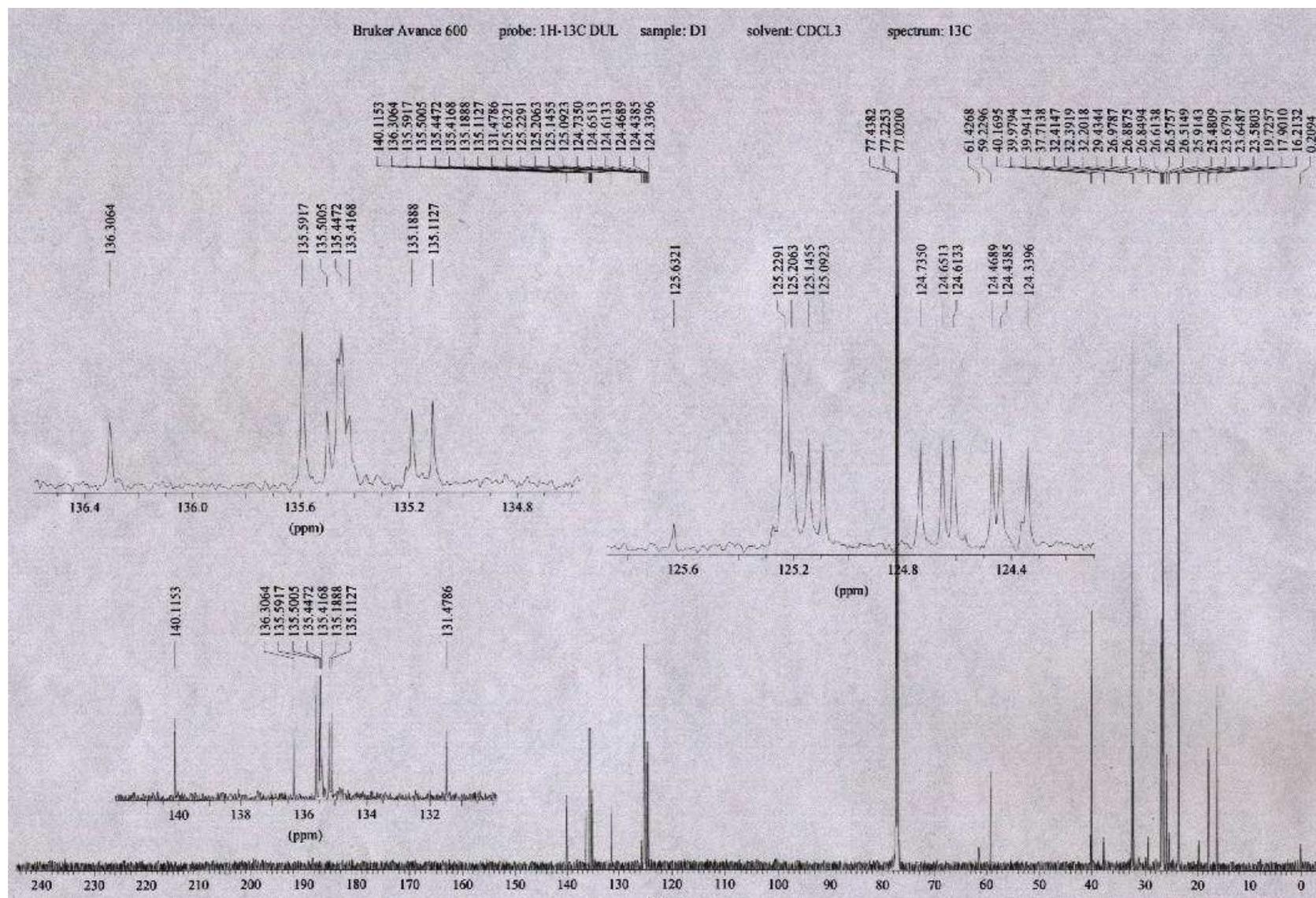


Figura 53. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz), em CDCl_3 , da substância D1.

Os sinais A (5,45 ppm, t, 7,0 Hz, 1 H), C (4,10 ppm, d, 7,0 Hz, 2 H) e G (1,74 ppm, s, 3 H) permitem atribuir a subestrutura de um álcool vinílico com uma metila no carbono 3 (LAMBERT e MAZZOLA, 2003; BREITMAIER, 2002) similar àquela da substância C7 (figura 54).

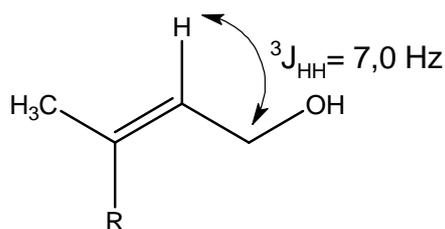


Figura 54. Subestrutura 1 da substância D1.

No espectro de ^{13}C -RMN o sinal em δ_{C} 59,23 ppm pode ser atribuído ao carbono ao qual a hidroxila está ligado (CREWS *et al.*, 1998).

O multipeto (sinal B) centrado em 5,13 ppm (14 H) é compatível com o deslocamento químico de hidrogênios alílicos (PAVIA, 1996). Esta observação é correlacionada aos sinais, no espectro de ^{13}C -RMN, entre δ_{C} 140,11 e 124,34 ppm, pois esta é uma região característica para carbonos olefínicos (PAVIA, 1996).

No ^1H -RMN entre δ_{H} 1,61 e 1,68 ppm ocorrem sinais que podem ser atribuídos a metilas alílicas, em função do seu deslocamento em campo mais baixo (LAMBERT e MAZZOLA, 2003). Estes sinais são confirmados pelo espectro de ^{13}C -RMN, onde aparecem sinais na região de deslocamento químico de grupos metilas.

Estas proposições permitem definir que D1 possui fragmentos como o mostrado na figura 55.

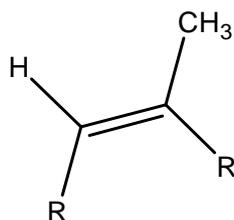


Figura 55. Subestrutura 2 da substância D1.

Os multipletos δ_H 2,11 a 1,95 ppm podem ser atribuídos a metilenos que ligam entre si os fragmentos da subestrutura 2. No espectro de ^{13}C -RMN, existem vários sinais na região entre 20 e 45 ppm, característica de grupos $\text{R-CH}_2\text{-R}$ (PAVIA, 1996), corroborando os dados de ^1H -RMN descritos.

Estas informações permitiram derivar a subestrutura 3 (figura 56).

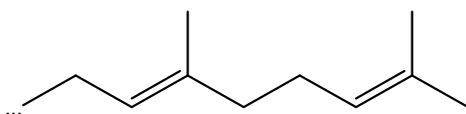


Figura 56. Subestrutura 3 da substância D1.

Tendo em vista que, como já citado, a substância D1 sofreu degradação durante a análise espectroscópica, foi possível apenas sugerir uma estrutura parcial para a mesma que concordasse com as informações disponíveis (figura 57).



Figura 57. Estrutura parcial da substância D1, evidenciando as unidades isoprênicas.

5.8. Elucidação estrutural da substância A9.2.3.

Nas figuras de 58 a 66 são mostrados os espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e DEPT com polarização a 135° obtidos da substância A9.2.3.

Nas tabelas 23 e 24, são apresentados os dados de ^1H -RMN (500 MHz) e ^{13}C -RMN, respectivamente, obtidos para A.9.2.3. Os sinais de ^1H -RMN são designados por letras (excetuando o H para se evitar possível confusão), em ordem decrescente de deslocamentos químicos. Os sinais de ^{13}C -RMN são designados por números, em ordem decrescente de deslocamentos químicos.

Tabela 24. Dados do espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) para a substância A.9.2.3.

Designação	δ_{H} (ppm)
A	5,35 m
B	3,52 m
C	2,32 a 2,20 m
D	2,40 a 1,94 m
E	1,99 a 1,80 m
F	1,70 a 1,62 m
G	1,61 a 1,40 m
I	1,39 a 1,10 m
J	1,01 s
L	0,92 d (6,6 Hz)
M	0,84 t (7,50 Hz)
N	0,83 d (3,5 Hz)
O	0,81 d (6,8 Hz)
P	0,68 s

Tabela 25. Dados do espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) para a substância A.9.2.3.

Designação	δ_{C} (ppm)	n*
1	140,78	0
2	121,73	1
3	71,84	1
4	56,81	1
5	56,12	1
6	50,19	1
7	45,90	1
8	42,36	2
9	42,33	0
10	39,83	2
11	37,30	2
12	36,52	0
13	36,18	1
14	34,00	2
15	31,96	1
16	31,95	2
17	31,72	2
18	29,23	1
19	28,26	2
20	26,17	2
21	24,33	2
22	23,13	2
23	21,12	2
24	19,82	3
25	19,41	3
26	19,07	3
27	18,81	3
28	12,00	3
29	11,88	3

*número de hidrogênios ligados

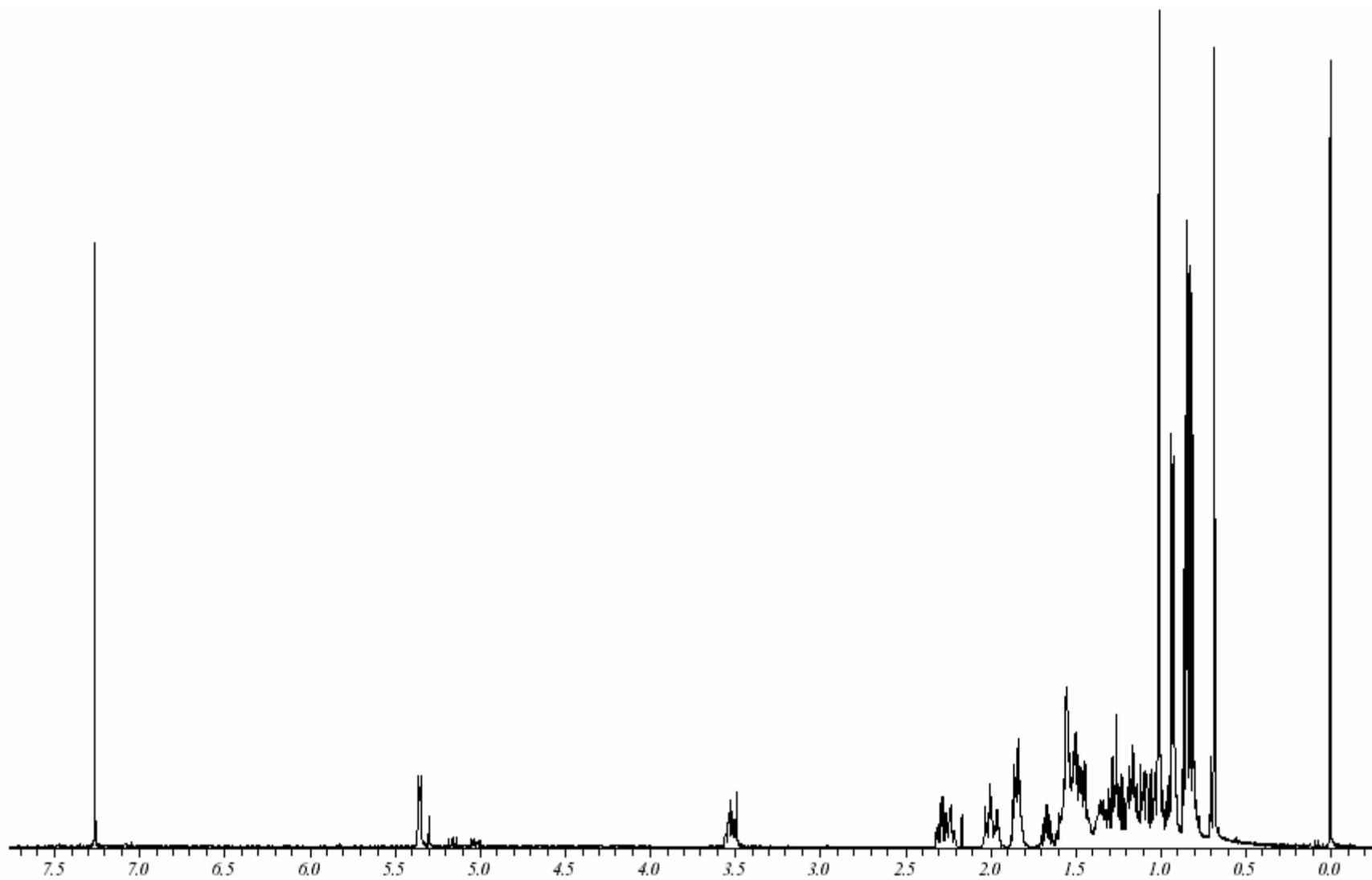


Figura 58. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl_3 .

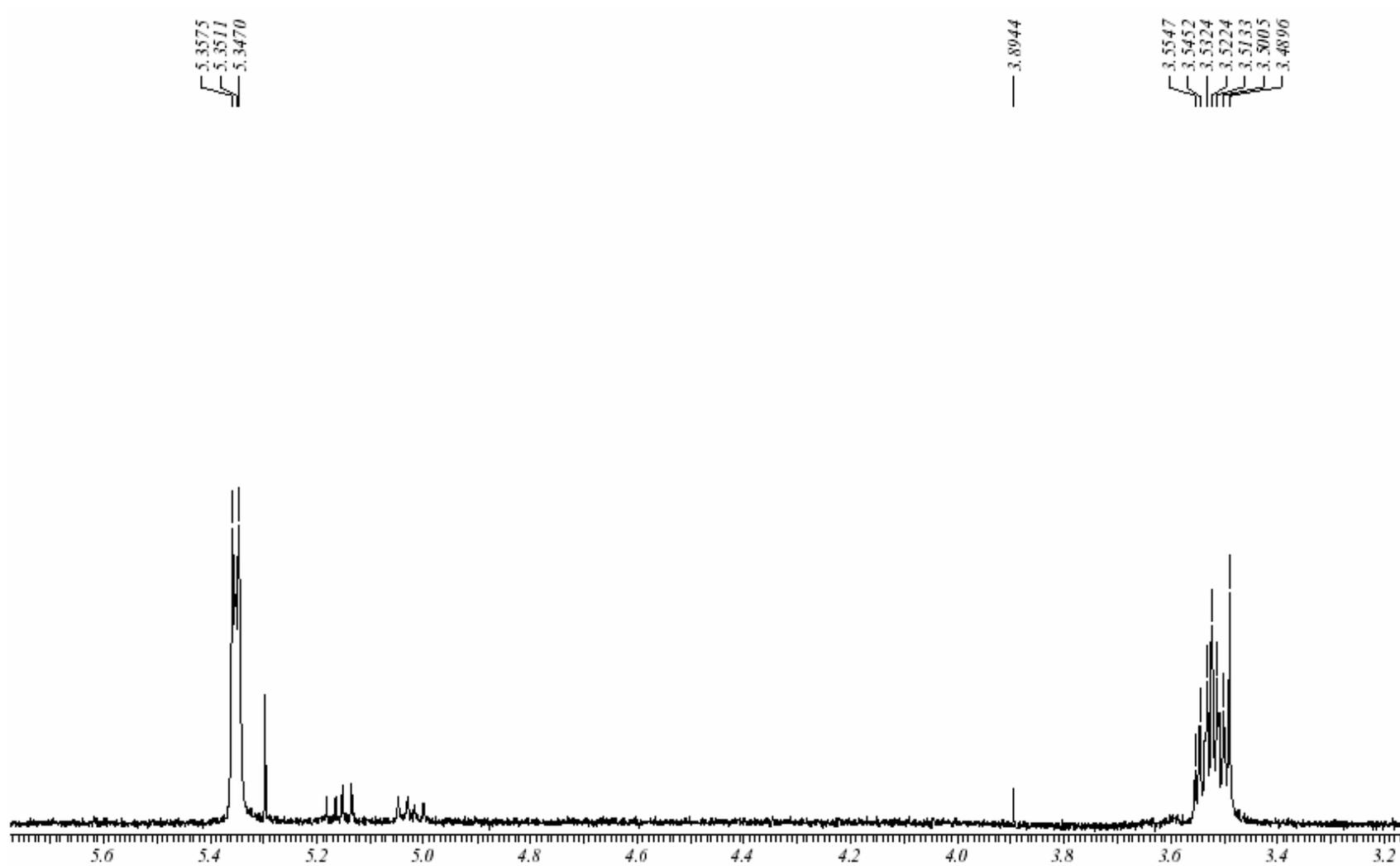


Figura 59. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl_3 .

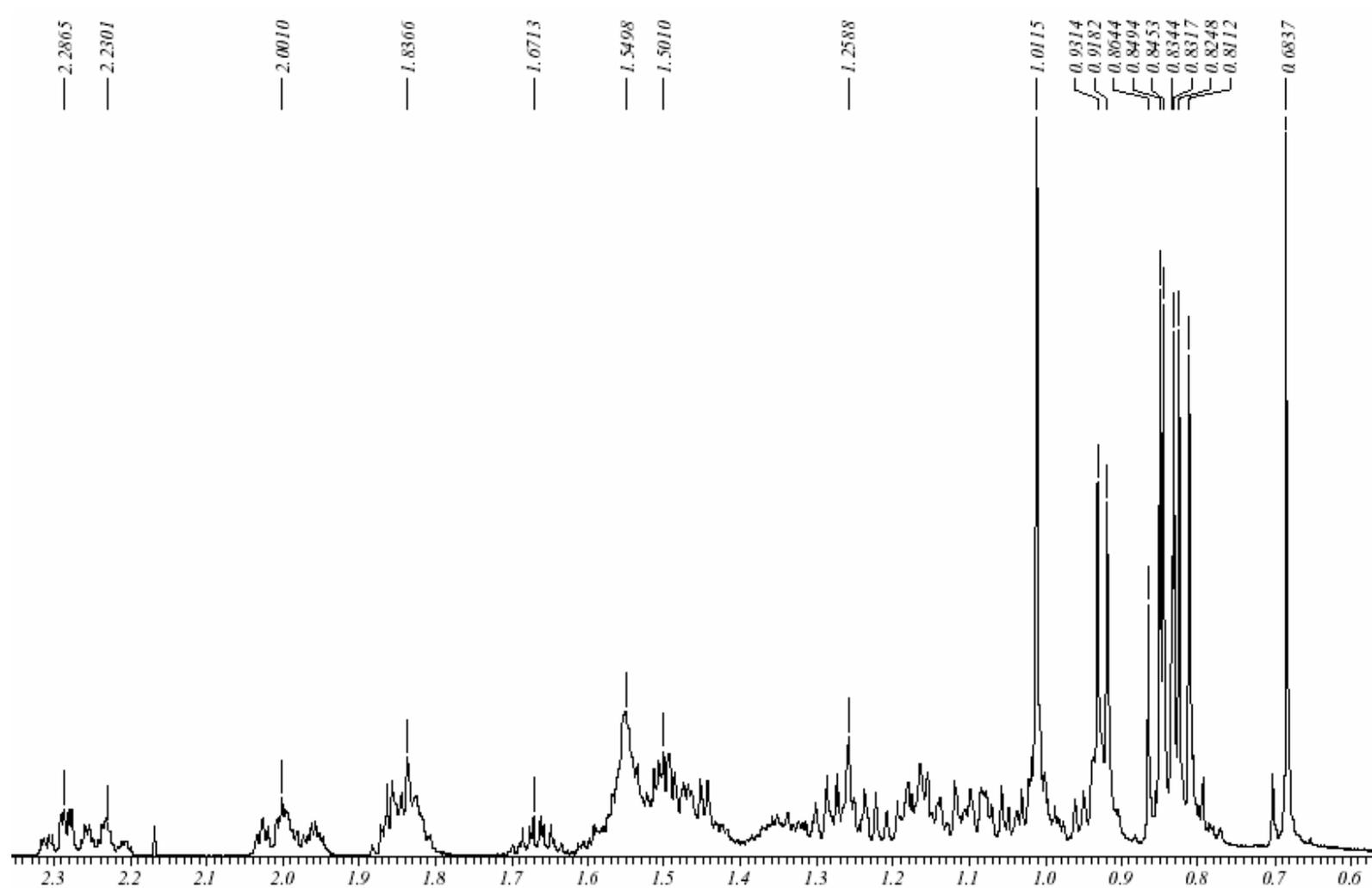


Figura 60. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl₃.

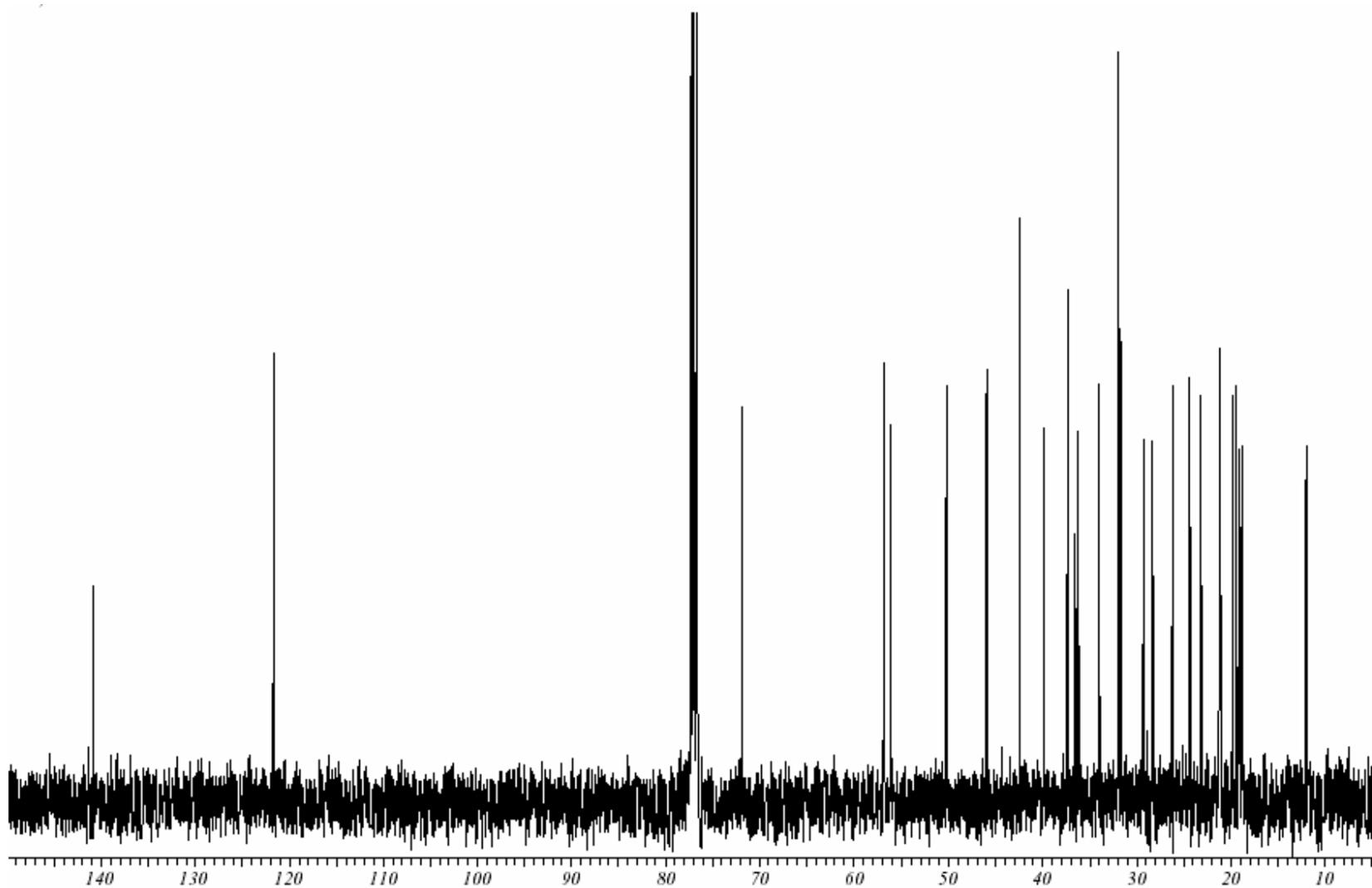


Figura 61. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz) obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl_3 .

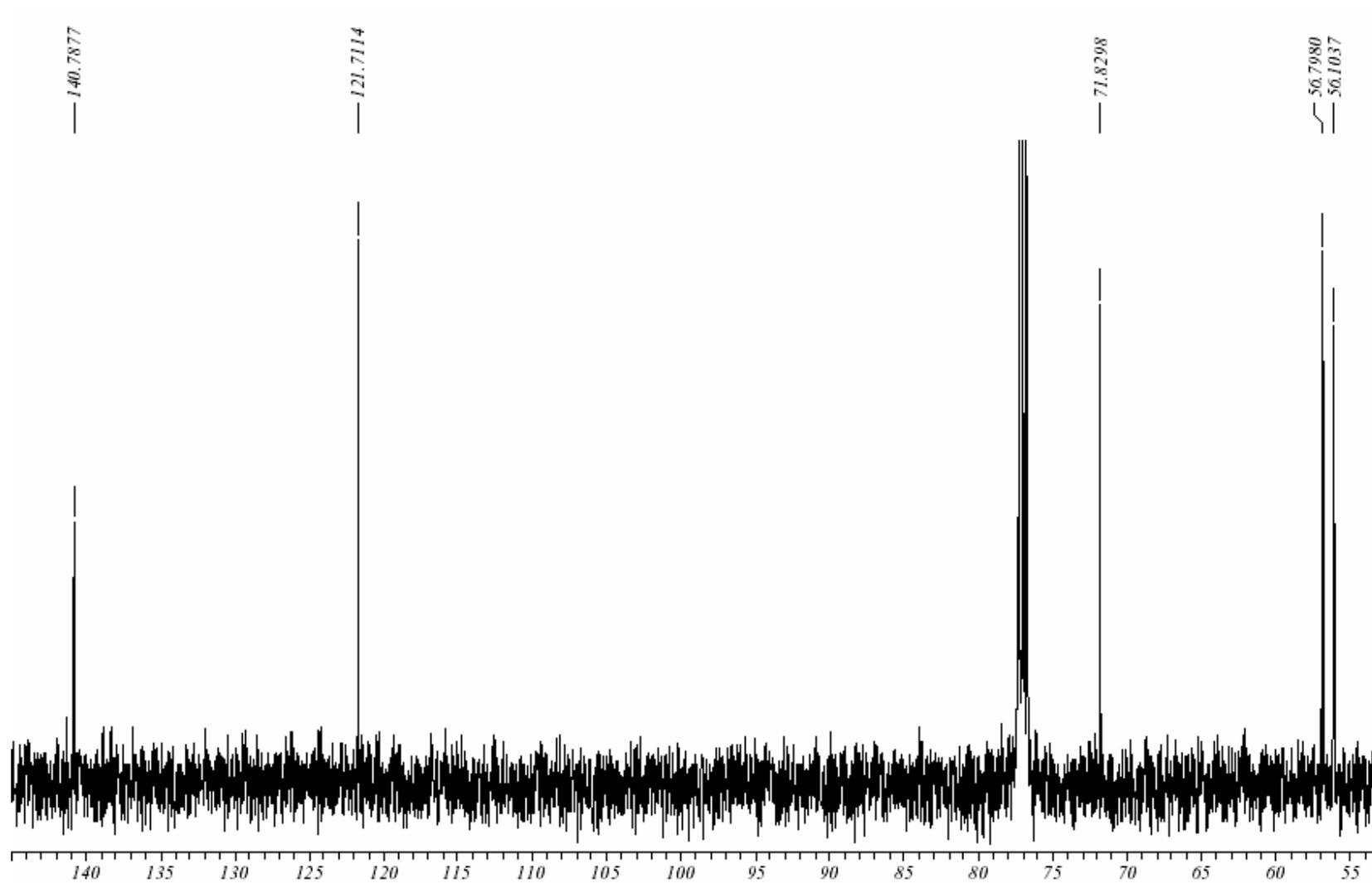


Figura 62. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl_3 .

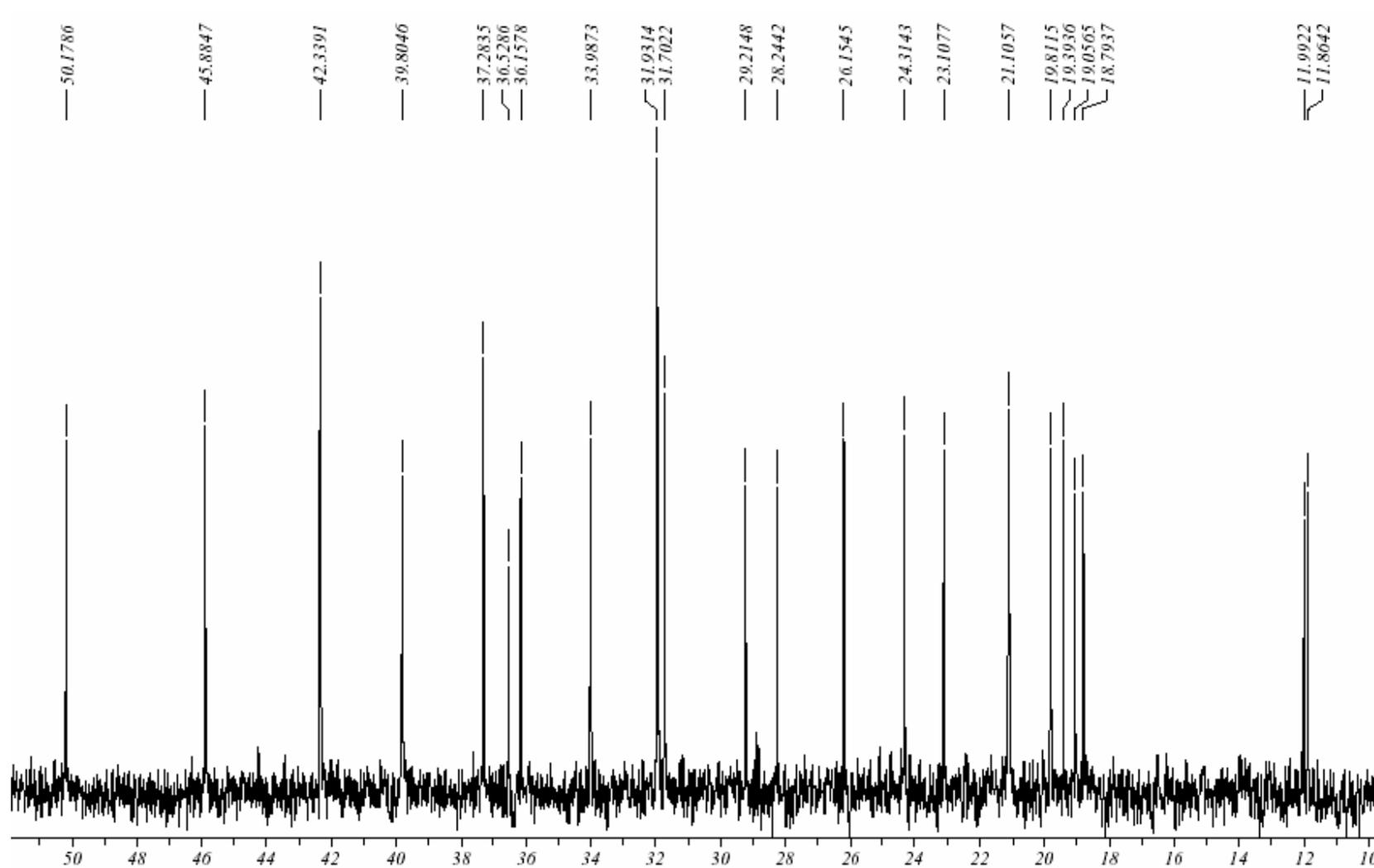


Figura 63. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz) expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl_3 .

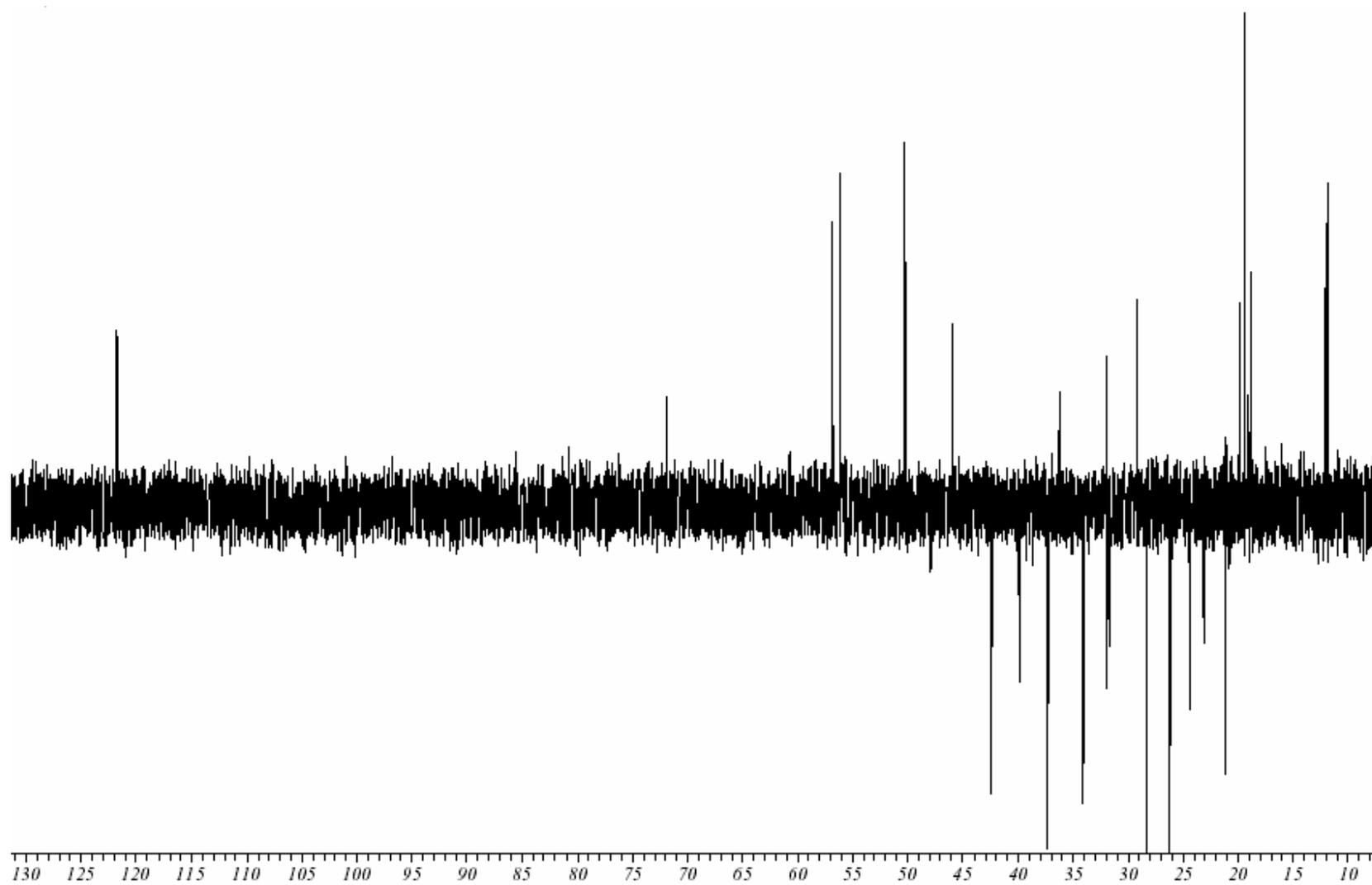


Figura 64. Espectro de DEPT-135, obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl_3 .

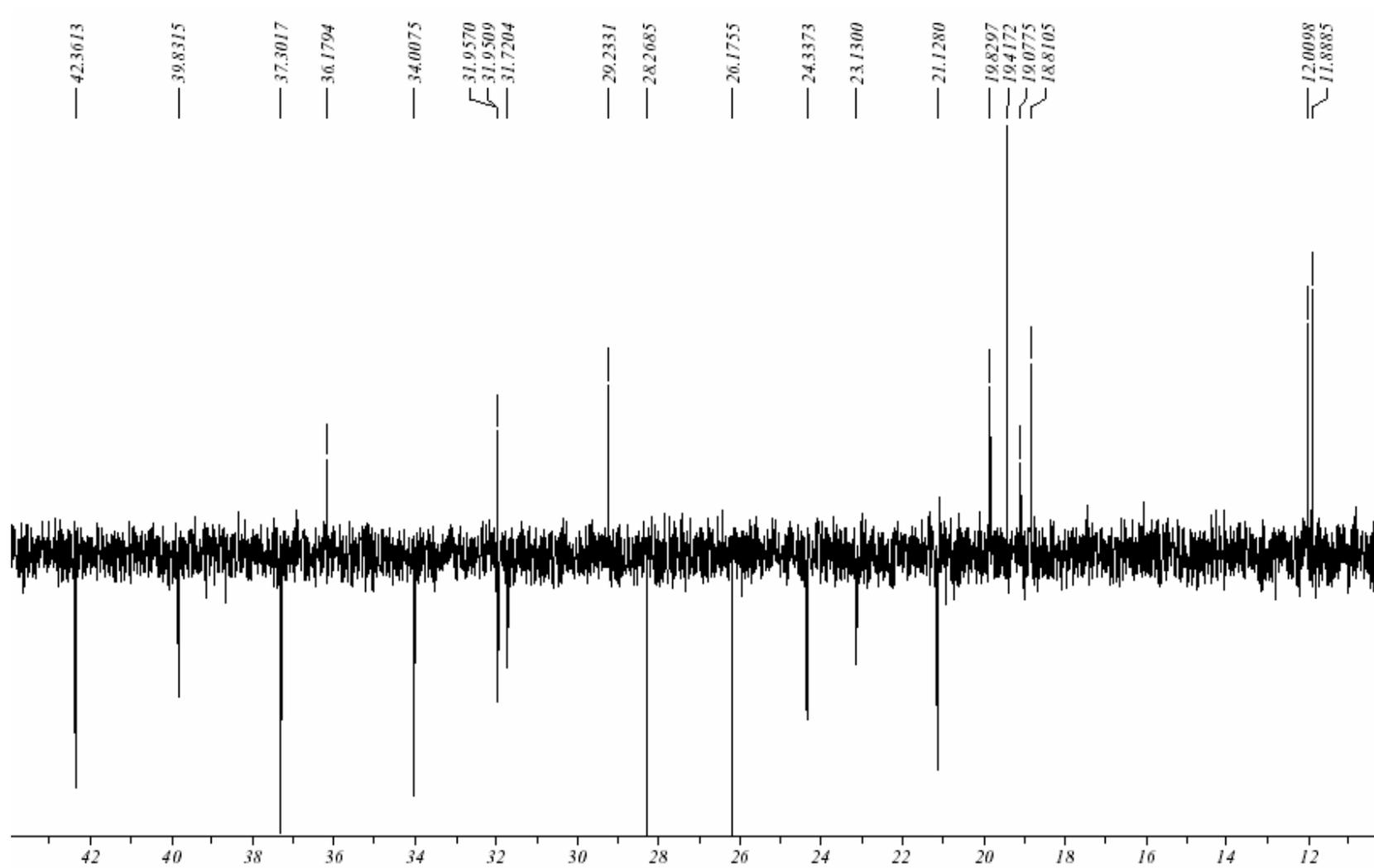


Figura 65. Espectro de DEPT-135 expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em $CDCl_3$.

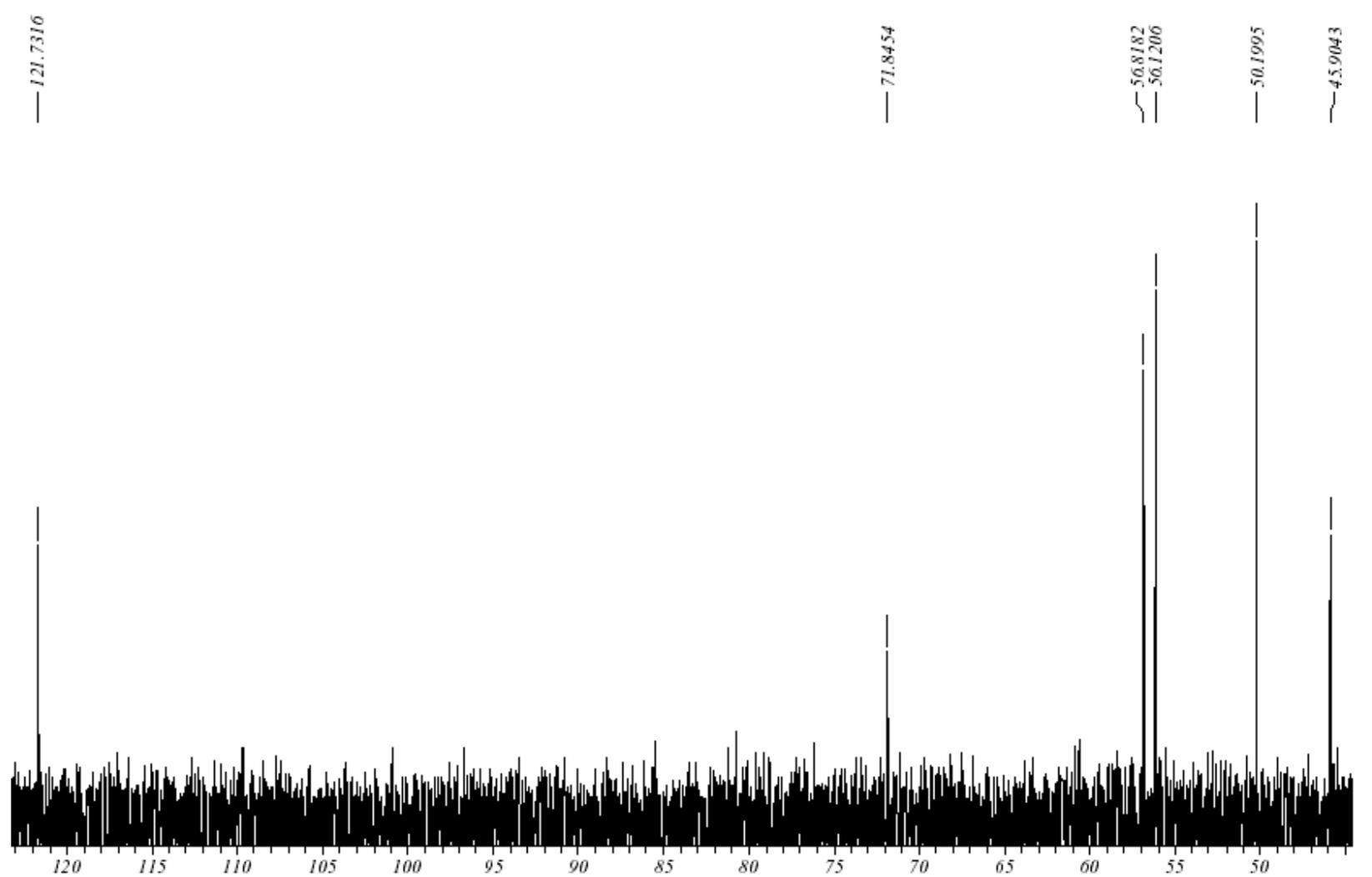


Figura 66. Espectro de DEPT-135 expandido, obtido para a substância A.9.2.3, em CDCl₃.

Tendo em vista, que A.9.2.3 apresentou Rf e coloração similares às aquelas encontradas para os padrões de estigmasterol e β -sitosterol, procurou-se, num primeiro momento, comparar os dados espectrais da substância isolada com aqueles dos citados esteróides.

A análise conjunta dos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT 135 revela a presença de 29 carbonos para A.9.2.3, sendo 11 metilenos e 3 carbonos quaternários obtidos diretamente do experimento de DEPT-135, e a atribuição das 6 metilas e 9 metinos foi deduzida a partir do deslocamento químico dos sinais (tabela 25).

Os sinais em δ_{C} 140,78 e 121,73 ppm são atribuídos a carbonos com hibridação sp^2 , enquanto que o sinal em δ_{C} 71,84 ppm é atribuído a um carbono carbinólico, em função dos seus deslocamentos químicos em região característica (LAMBERT E MAZZOLA, 2003).

No espectro de ^1H -RMN (figura 58), o sinal em δ_{H} 3,52 ppm é atribuído ao CH carbinólico, enquanto o multiplete em δ_{H} 5,35 ppm atribuí-se ao H vinílico, em função da região em que o sinal ocorre (LAMBERT E MAZZOLA, 2003).

Os multipletes de designação de C a I (tabela 24), são atribuídos a hidrogênios metilênicos, uma vez que esta região é característica dos mesmos (LAMBERT E MAZZOLA, 2003).

Os 6 sinais designados de J a P (tabela 24) são produzidos por metilas, corroborando as atribuições feitas no espectro de DEPT (tabela 25). Em função da multiplicidade dos sinais pode-se afirmar que: os sinais J e P são metilas ligadas a carbono quaternário; o sinal L, N e O deve-se a metilas ligadas a CH; e por fim, a metila M está ligada a um CH_2 .

A partir das informações descritas acima, pode-se eliminar a possibilidade de A.9.2.3 ser o estigmasterol, uma vez que este é um $\Delta^{5,22}$ esteróide (DEWICK, 2002), e a substância isolada apresentar apenas 2 sinais de carbono sp^2 .

Na tabela 26 são apresentados uma comparação dos sinais de ^1H -RMN de A.9.2.3, β -sitosterol e estigmasterol, e na tabela 27 é feita a mesma comparação para os sinais de ^{13}C -RMN.

Tabela 26. Comparação dos sinais de ^1H -RMN de A.9.2.3, β -sitosterol (CDCl_3 , 400 MHz) e estigmasterol (CDCl_3 , 400 MHz).

A.9.2.3	β -sitosterol (GARG e NES, 1986; KOJIMA et al., 1990)	Estigmasterol (GARG e NES, 1986; KOJIMA et al., 1990)
5,35 m	5,35 m (H-6)	5,35 m (H-6) 5,15 dd (15, 9 Hz) (H-22) 5,01 dd (15, 9 Hz) (H-23)
3,52 m	3,52 m (H-3)	3,52 m (H-3)
1,01 s	1,01 s (Me-19)	1,01 s (Me-19)
0,92 d (6,6 Hz)	0,92 d (6,5 Hz) (Me-21)	1,02 d (6,5 Hz) (Me-21)
0,84 t (7,50 Hz)	0,84 t (7,5 Hz) (H-29)	0,80 t (7,5 Hz) (H-29)
0,83 d (3,5 Hz)	0,83 d (6,5 Hz) (H-26)	0,84 d (6,5 Hz) (H-26)
0,81 d (6,8 Hz)	0,81 d (6,5 Hz) (H-27)	0,79 d (6,5 Hz) (H-27)
0,68 s	0,68 s (Me-18)	0,69 s (Me-18)

Tabela 27. Comparação dos sinais de ^{13}C -RMN de A9.2.3, β -sitosterol e estigmasterol.

Designação	A.9.2.3	β -sitosterol (KOJIMA et al., 1990)	Estigmasterol (KOJIMA et al., 1990)
1	37,30	37,2	37,2
2	31,72	31,6	31,6
3	71,84	71,8	71,8
4	42,33	42,3	42,3
5	140,78	140,7	140,7
6	121,73	121,7	121,7
7	31,96	31,9	31,9
8	31,95	31,9	31,9
9	50,19	50,1	50,1
10	36,52	36,5	36,5
11	21,12	21,1	21,1
12	39,83	39,8	39,7
13	42,36	42,3	42,2
14	56,81	56,8	56,8
15	24,33	24,3	24,4
16	28,26	28,2	28,9

17	56,12	56,0	55,9
18	11,88	11,9	12,0
19	19,41	19,4	19,4
20	36,18	36,1	40,5
21	18,81	18,8	21,2
22	34,00	33,9	138,3
23	26,17	26,0	129,2
24	45,90	45,8	51,2
25	29,23	29,1	31,9
26	19,82	19,8	21,1
27	19,07	19,0	19,0
28	23,13	23,0	25,4
29	12,00	12,0	12,3

A análise das tabelas 26 e 27 permite caracterizar a substância A.9.2.3, como sendo o esteróide β -sitosterol (figura 67).

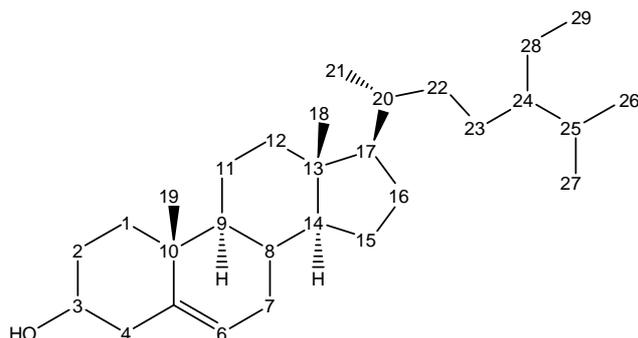


Figura 67. Estrutura do β -sitosterol.

Ainda, no espectro de ^1H -RMN expandido (figura 59), vê-se dois dubletos de dubletos, de baixa intensidade, em δ_{H} 5,16 e 5,05 ppm, ambos com constantes de acoplamento (J_{HH}) de 15 e 9 Hz, conforme pode ser visto na análise do diagrama de linhas abaixo (figura 68).

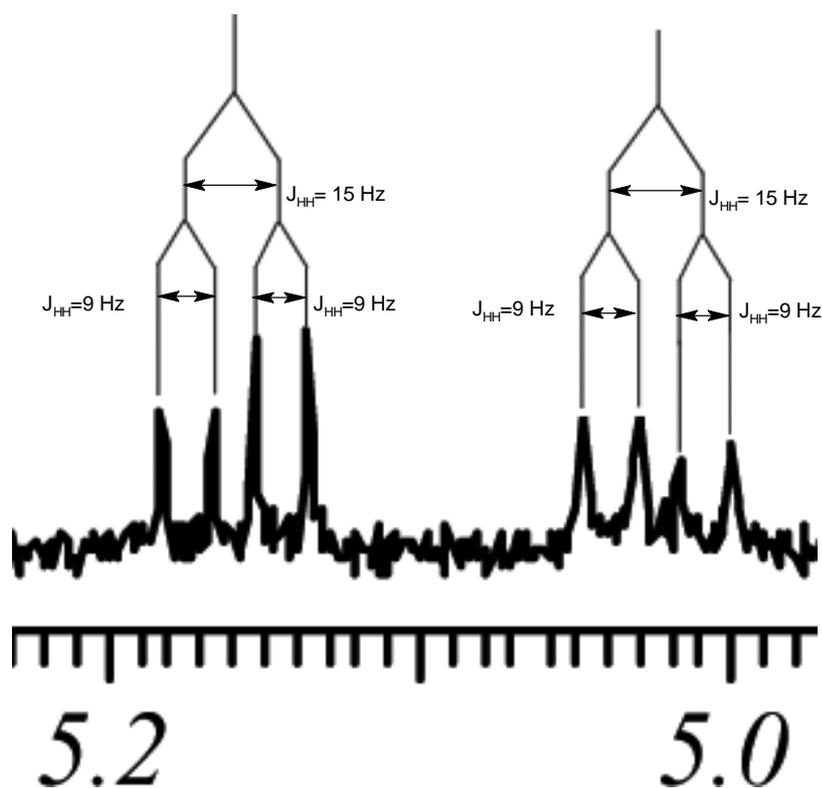


Figura 68. Diagrama de linhas dos dubletos de dubletos ($J=15, 9$ Hz) em δ_H 5,16 e 5,05 ppm, da substância A.9.2.3.

Estes dois sinais têm deslocamento químico e constante de acoplamentos (tabela 26) similares àqueles reportados para o estigmasterol (figura 69). Sendo os sinais gerados pelos prótons alílicos H-22 e H-23 (KOJIMA et al, 1990).

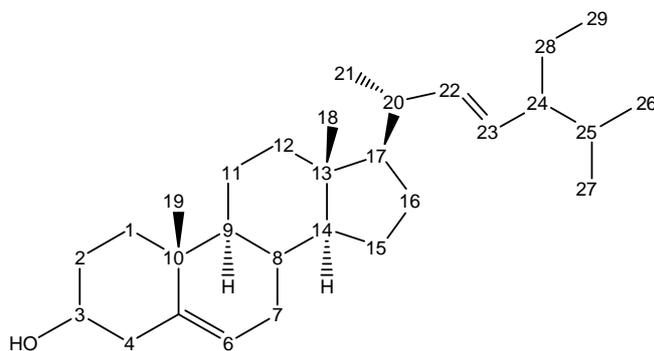


Figura 69. Estrutura do estigmasterol.

Outros sinais, de intensidade baixa, que podem ser atribuídos ao estigmasterol (GARG e NES, 1986; KOJIMA et al., 1990) no espectro de A.9.2.3 são o singlete em δ_H 0,7 ppm (figura 70), que corresponde a Me-18; e o dubleto ($J \approx 6$ Hz) em 1,03 ppm (figura 71), correspondente a Me-21.



Figura 70. Singlete de baixa intensidade, em δ_H 0,7 ppm, atribuído a Me-18 do estigmasterol.

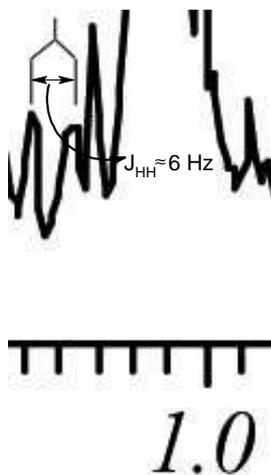


Figura 71. Dubleto ($J \approx 6$ Hz) de baixa intensidade, em δ_H 1,03 ppm, atribuído a Me-21 do estigmasterol.

Portanto, apesar da identidade de A.9.2.3 ser inequívoca, diante dos dados disponíveis, existem evidências de que A.9.2.3 seja uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol, sendo o primeiro o componente majoritário.

5.9. Elucidação estrutural da substância ME1.

Na figura 72 é apresentado o espectro de infravermelho (IV), e nas figuras 73 e 74 são mostrados os espectros de massas obtidos por ESI, nos modos negativo e positivo, respectivamente, e na figura 75 é mostrado o espectro de íons filhos obtido por ESI no modo negativo.

A avaliação do espectro de IV mostra uma banda estreita de deformação axial de OH livre em 3562 cm^{-1} ; em 3380 cm^{-1} aparece uma banda larga devido a OH em ponte de hidrogênio (PAVIA, 1996).

Em 2941 e 2912 cm^{-1} existem bandas de deformação axial simétrica de CH_2 . Outras bandas de CH_2 podem ser vistas em 1458 cm^{-1} devido a deformação angular simétrica e em 732 cm^{-1} , ocasionada por deformação angular simétrica (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; CREWS et. al., 1998; PAVIA, 1998). Em 2895 cm^{-1} existe um sinal fraco que é atribuído a deformação axial de C-H terciário (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; CREWS et. al., 1998).

Entre 1128 e 1000 cm^{-1} vêm-se fortes bandas de absorção características de deformações axiais de ligações C-O (PAVIA, 1996), sendo que o dublete em 1068 e 1053 cm^{-1} pode ser atribuído a ligações C-O em álcoois primários e/ou secundários alicíclicos com anéis de 5 ou 6 átomos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). A banda em 1128 cm^{-1} atribui-se a ligações C-O-C em éteres (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Os sinais em 2360 e 682 cm^{-1} são devidos a absorções do CO_2 (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Os achados do espectro de IV permitem deduzir que ME1 possui em sua estrutura OH alcoólicas, ligações C-O de álcoois primários e/ou secundários alicíclicos, ligações C-O-C características de éteres, além de grupos metileno e metino com carbono sp^3 .

Na figura 73, o espectro de massas obtido com a técnica de ionização por *spray* de elétrons (modo negativo), vê-se o sinal do íon molecular $[\text{M-H}]^-$ em m/z 341. No espectro

obtido no modo positivo (figura 74) o sinal do íon molecular aparece em m/z 365, gerado pela espécie $[M+Na]^+$. Da análise destes espectros de massas, pode-se deduzir que a massa molecular de ME1 seja 342 u.

De forma a obter mais informação estrutural de ME1, foi realizado um experimento de espectrometria de massas de íons filhos, no modo negativo (figura 75).

Em função da análise dos espectros de IV e de massas, assim como da comparação com espectro de IV padrão (SDBS, 2005) além do comportamento cromatográfico (figuras 24 e 25), atribui-se a ME1 a estrutura do dissacarídeo sacarose.

Na figura 76 é apresentada uma proposta de fragmentação para explicar os sinais em m/z 179 e 161 obtidos no espectro de íons filhos no modo negativo (figura 73). O fragmento A é o responsável pelo sinal em m/z 161, uma vez que A deve ser $[M-H-180]^-$. O fragmento B é o responsável pelo sinal que aparece em m/z 179, sendo atribuído a $[M-H-162]^-$.

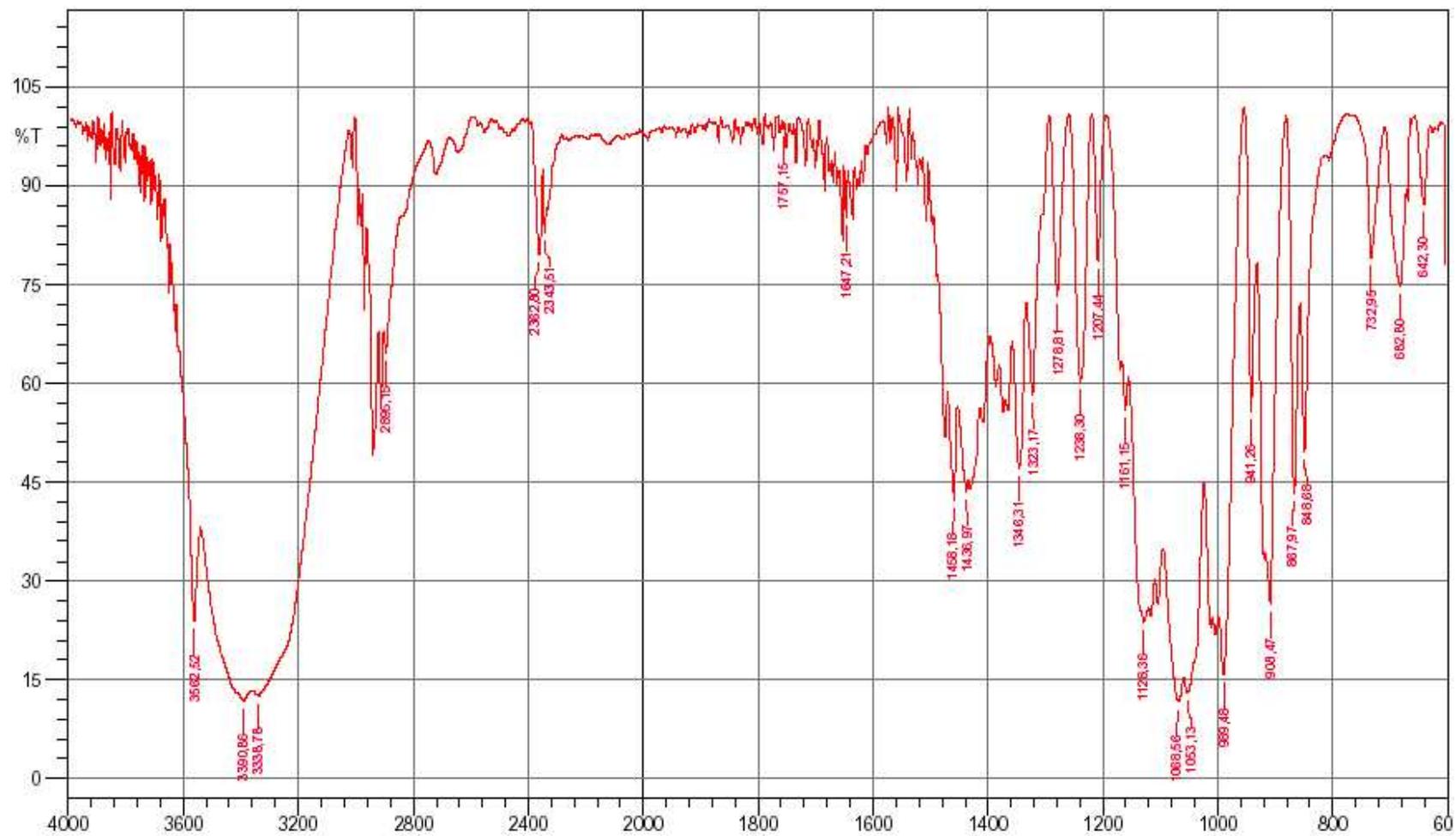


Figura 72. Espectro de infravermelho da substância ME1.

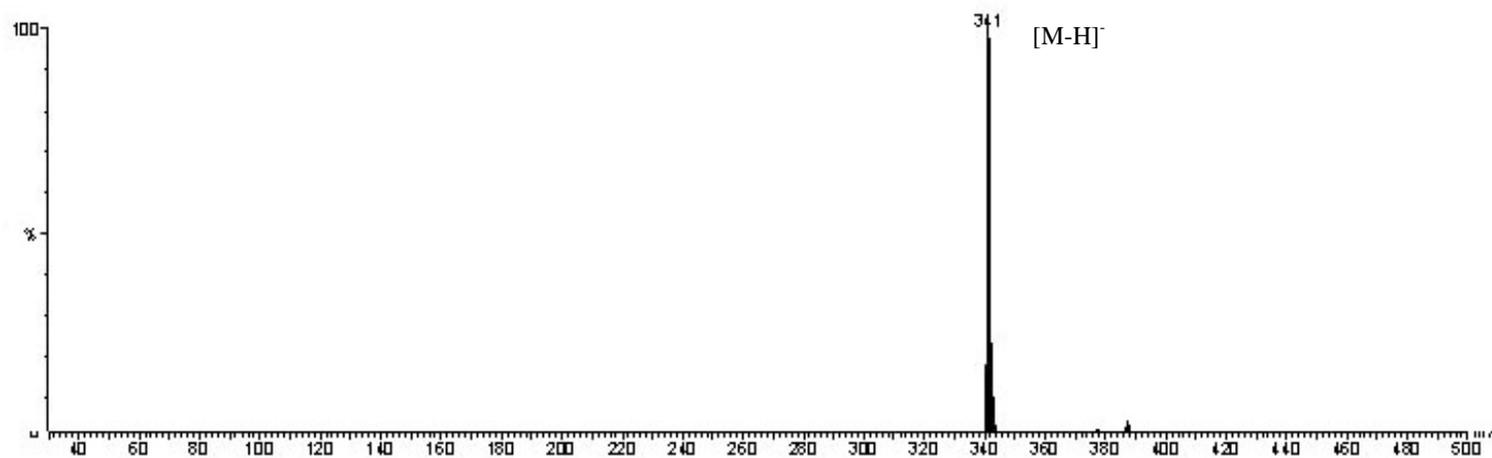


Figura 73. Espectro de massas obtido por ESI, no modo negativo $(M-H)^-$, da substância ME1.

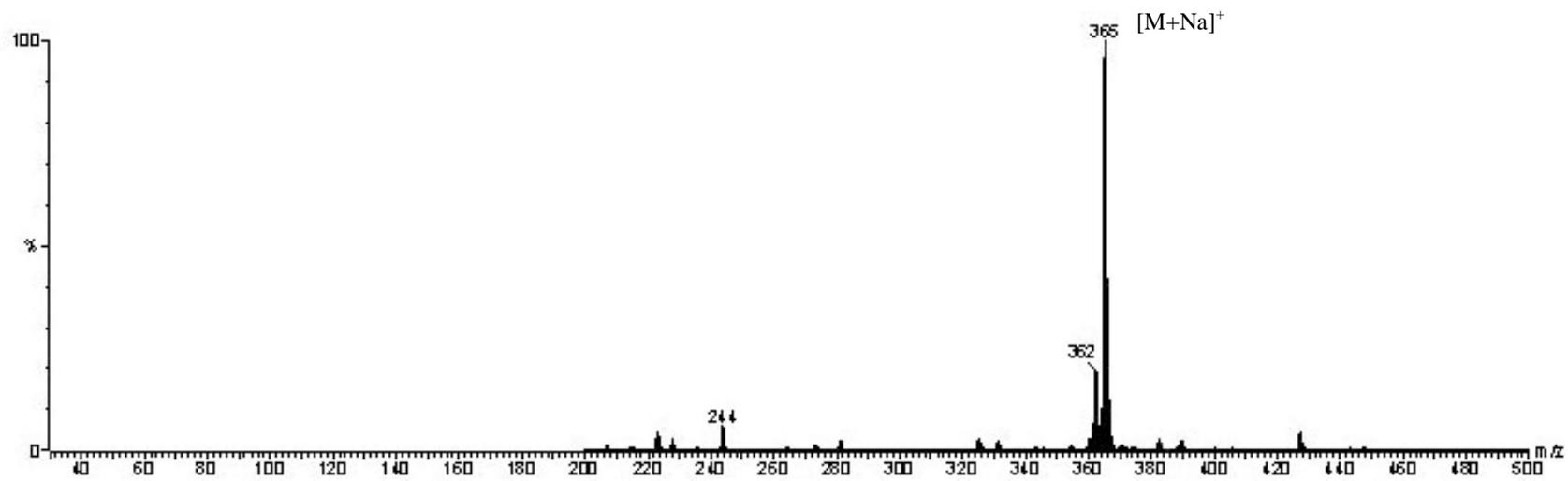


Figura 74. Espectro de massas obtido por ESI, no modo positivo $(M+Na)^+$, da substância ME1.

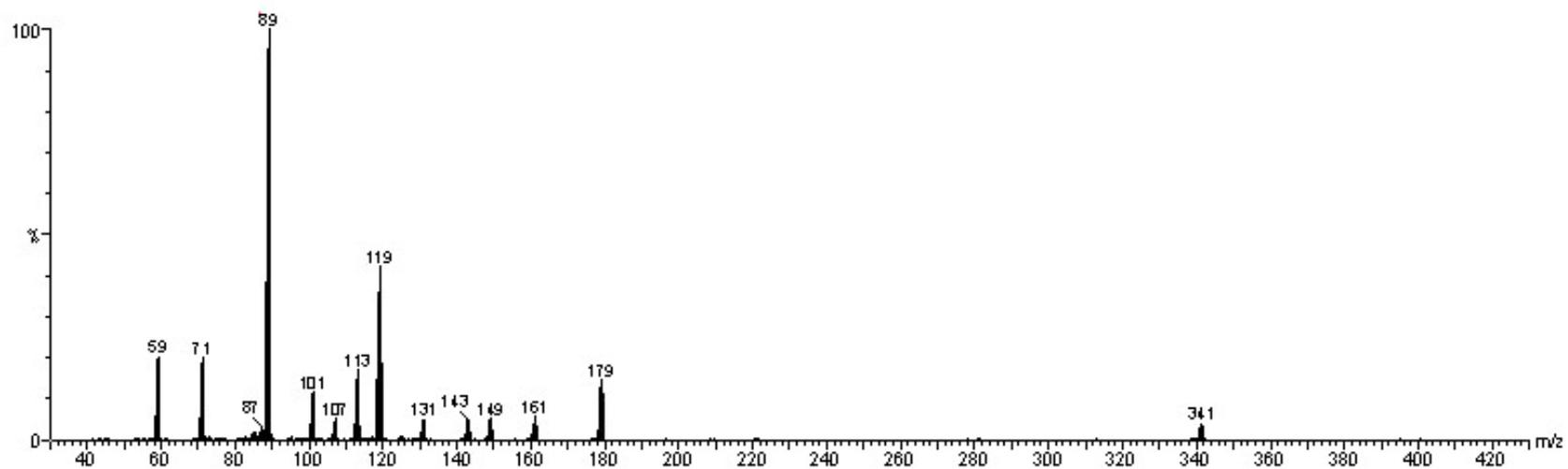


Figura 75. Espectro de íons filhos obtido por ESI no modo negativo, utilizando-se 20 eV (Ar como gás de colisão), da substância ME1.

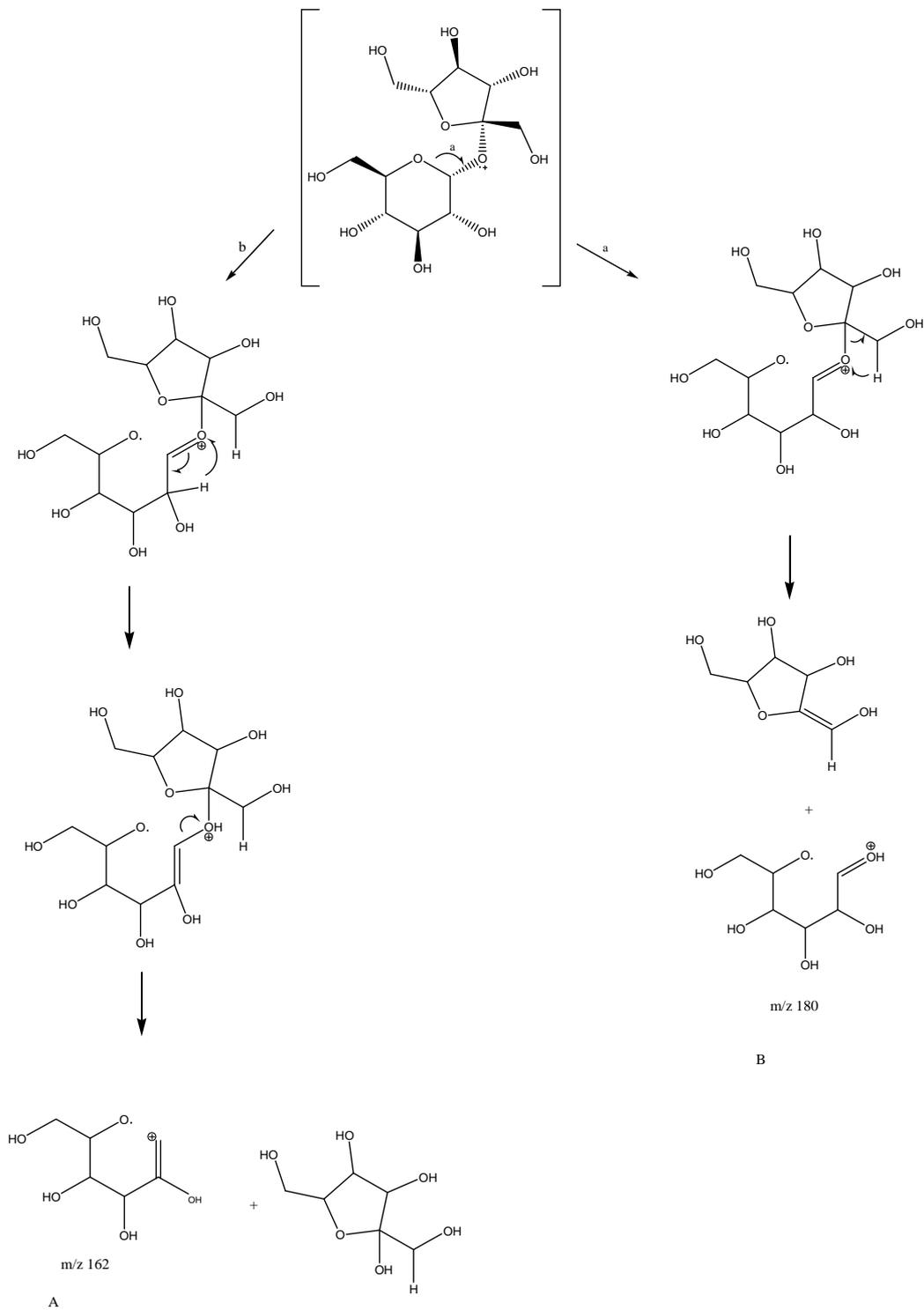


Figura 71. Proposta de fragmentação para ME1 no experimento de íons filhos

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram avaliados quanto a atividade no ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* as frações EP, CHCl₃ e AcOEt do extrato clorofórmico das folhas de *Sorocea bonplandii*. A fração éter de petróleo sofreu investigação química, e dela foram isoladas um álcool saturado, um esteróide, um diterpeno e um poliisoprenóide.

Num segundo momento foram investigados os extratos acetônico e metanólico, sendo que deste, foi isolado sacarose. Estes extratos foram avaliados quanto à possível atividade anticoagulante *in vitro*.

A atividade anticoagulante foi realizada no Laboratório de Hematologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Profa. Dra. Teresinha de Jesus Carvalho Neiva.

Os resultados preliminares são apresentados nas tabelas 28, 29 e 30.

Tabela 28. Efeito do extrato metanólico de *S. bonplandii* sobre o TP, TTPa e TT.

Tratamento	Tempo (s)
TP	
Controle (NaOH 0,05 mol/L)	14,1 ± 0,5
Extrato ME (400 µg/mL)	13,8 ± 0,7
Controle com heparina (0,2 U/mL)	19,9 ± 0,3
TTPa	
Controle (NaOH 0,05 mol/L)	33,5 ± 1,2
Extrato ME (400 µg/mL)	36,4 ± 1,5
Controle com heparina (0,2 U/mL)	57,6 ± 0,6
TT	
Controle (NaOH 0,05 mol/L)	19,6 ± 1,3
Extrato ME (400 µg/mL)	18,2 ± 1,2
Controle com heparina (0,2 U/mL)	> 100

Estatística: n=6; Teste de Tukey: **p < 0,01; *p < 0,05

Tabela 29. Efeito do extrato acetônico de *S. bonplandii* sobre o TP, TTPa e TT.

Tratamento	Tempo (s)
TP	
Controle (NaOH 0,05 mol/L)	14,1 ± 0,5
Extrato AC (12,5 µg/mL)	14,5 ± 0,4
Extrato AC (50 µg/mL)	15,2 ± 0,5
Extrato AC (200 µg/mL)	15,5 ± 0,7
Extrato AC (400 µg/mL)	16,6 ± 0,7*
Controle com heparina (0,2 U/mL)	19,9 ± 0,3
TTPa	
Controle (NaOH 0,05 mol/L)	33,5 ± 1,2
Extrato AC (12,5 µg/mL)	36,0 ± 1,2
Extrato AC (50 µg/mL)	40,6 ± 2,1*
Extrato AC (200 µg/mL)	47,1 ± 1,8**
Extrato AC (400 µg/mL)	50,2 ± 2,6**
Controle com heparina (0,2 U/mL)	57,69 ± 0,6
TT	
Controle (NaOH 0,05 mol/L)	19,6 ± 1,3
Extrato AC (12,5 µg/mL)	18,2 ± 1,2
Extrato AC (50 µg/mL)	18,6 ± 1,2
Extrato AC (200 µg/mL)	14,4 ± 1,3
Extrato AC (400 µg/mL)	19,0 ± 1,6
Controle com heparina (0,2 U/mL)	> 100

Estatística: n=6; Teste de Tukey: **p < 0,01; *p < 0,05

Tabela 30. Efeito dos extratos ME e AC sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (6 µmol/L).

Tratamento	Agregação (%)
Controle	70 ± 4,2
Extrato ME	71 ± 2,3
Extrato AC	66 ± 3,4

Estatística: n=6; Teste de Tukey: **p < 0,01; *p < 0,05

Os resultados iniciais obtidos destes experimentos demonstraram que:

- Os extratos ME e AC, não apresentaram efeito sobre a agregação plaquetária induzida por ADP;

- O extrato metanólico, na dose de 400 µg/mL, não teve efeito sobre os testes TP, TTPa e TT.
- O extrato acetônico das folhas de *Sorocea bonplandii*, nas doses estudadas, não apresentou efeito sobre o teste de TT.
- O extrato acetônico das folhas de *Sorocea bonplandii*, na dose de 400 µg/mL, apresentou atividade anticoagulante no teste de TP ($p < 0,05$).
- O extrato acetônico das folhas de *Sorocea bonplandii*, nas doses de 50 ($p < 0,05$), 200 ($p < 0,01$) e 400 µg/mL ($p < 0,01$), apresentou atividade anticoagulante no teste de TTPa.

O efeito anticoagulante evidenciado neste trabalho, nunca descrito para esta espécie, abre novas perspectivas para posterior investigação químico-biológica, visando o isolamento e identificação da(s) substância(s) responsável(eis) por esta bioatividade. A detecção desta bioatividade evidencia, também, a possibilidade de ocorrência de hemorragias quando do uso interno de preparações das folhas de *Sorocea bonplandi*.

O presente trabalho também permitiu evidenciar a utilidade de alguns softwares, como ferramentas auxiliares na elucidação estrutural de substâncias desconhecidas e na confirmação da estrutura proposta. Foram utilizadas as versões de demonstração dos seguintes softwares:

- ChemDraw 2005 (Camsoft), o qual prediz com razoável exatidão o deslocamento químico em espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , a partir da estrutura desenhada;
- Perch 2005 (PerchSolutions Ltda) (LAATIKAINEN et al., 1996), o qual prediz com boa exatidão o deslocamento químico em espectros de ^1H -RMN, além de simular este espectro, o qual pode ser expandido para análise detalhada, e calcular as constantes de acoplamento (J_{HH}) a partir da estrutura desenhada;
- MestreC 2005 (MestreC), o qual simula o espectro a partir da entrada dos deslocamentos químicos (^1H) e constantes de acoplamento (J_{HH}) observadas, permitindo assim, a comparação do espectro simulado com o observado.

7. CONCLUSÕES

- A fração éter de petróleo foi a que apresentou maior atividade no citado ensaio ($CL_{50} = 88,69 \mu\text{g/mL}$), seguida pela fração clorofórmica ($CL_{50} = 133,21 \mu\text{g/mL}$) e acetato de etila ($CL_{50} = 145,73 \mu\text{g/mL}$). Já o extrato bruto apresentou CL_{50} de $130,35 \mu\text{g/mL}$.
- A fração éter de petróleo, em função da maior bioatividade, foi escolhida para posterior investigação química. Contudo, após o primeiro fracionamento cromatográfico a atividade biológica das sub-frações foi bem inferior àquela observada na fração éter de petróleo, o que justificou o abandono deste bioensaio como guia do fracionamento.
- Da fração éter de petróleo foram isolados e identificados, 5 substâncias, a saber:
 - O álcool vinílico (Z)-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol, comumente chamado de fitol.
 - Uma mistura de sitosterol e estigmasterol, sendo o primeiro o componente majoritário;
 - Um álcool saturado, cujo tamanho da cadeia não pode ser determinado;
 - Um álcool vinílico de cadeia isoprenílica, cujo tamanho não pode ser determinado.
- Do extrato metanólico foi isolado e caracterizado por espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas, o dissacarídeo sacarose.
- O extrato acetônico das folhas de *Sorocea bonplandii* demonstrou significativa atividade anticoagulante, nunca antes descrita para esta espécie vegetal, quando avaliado nos ensaios *in vitro* de tempo de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

-
- O extrato metanólico das folhas de *Sorocea bonplandii*, não apresentou atividade anticoagulante nos ensaios utilizados.
 - Os extratos acetônico e metanólico não apresentaram atividade no teste de tempo de trombina (TT) e sobre a agregação plaquetária.
 - A constatação da significativa atividade anticoagulante para o extrato acetônico das folhas de *Sorocea bonplandii*, abre novas perspectivas para a investigação químico-biológica desta espécie. Além de demonstrar, a possibilidade de ocorrência de risco ao se utilizar esta planta para uso interno, face a possibilidade de hemorragias.

8. REFERÊNCIAS

ABELSON, P.H. Medicine from plants. *Science*. V. 247, p. 513, 1990.

ALBERTON, M.D. Investigação fitoquímica de *Zolernia ilicifolia* (BRONGNIART) VOGEL (FABACEAE): Contribuição ao controle de qualidade de espinheira-santa (*Maytenus spp.*). Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Farmácia – UFSC, 2002. Dissertação de mestrado.

ALBERTON, M.D.; FALKENBERG, D.B.; FALKENBERG, M.D. Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 12, p. 11-13, 2002.

ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W. Constituintes de *Sorocea bonplandii* Baillon. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.19, n.1, p. 129-139, 1998.

BAKER, M. Fur rubbing: Use of medicinal plants by Capuchin monkeys. *American Journal of Primatology*, v. 38, p. 263-270, 1996.

BREITMAIER, E. **Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide**. 3 th. ed. New Jersey: Willey e Sons, 2002.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. (no prelo)

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. **Organic Structure Analysis**. New York: Oxford University Press, 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2 nd. ed. New York: Wiley & Sons, 2002.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of ethnopharmacology*. v. 75, p. 141-164, 2001.

FERRARI, F.; MONACHE, F.D. Sorocein I, a new Diels-Alder type adduct from *Sorocea ilicifolia*. *Fitoterapia*, v.72, p 301-303, 2001.

FERRARI, F.; MESSANA, I. Prenylated flavonones from *Sorocea ilicifolia*. *Phytochemistry*, v.38, p. 251, 1995.

GARG, V.K.; NES, W.R. Occurrence of Δ^5 – sterols in plants producing predominately Δ^7 – sterols: studies on the sterol compositions of six cucurbitaceae seeds, *Phytochemistry*, v. 25, n. 11, p. 2591-2597, 1986.

GEOCZE, S.; VILELE, M.P.; CHAVES, B.D.R.; FERRARI, A.P. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou de úlcera péptica com preparações de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E.A. (coord.) Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” e outras). Brasília: CEME/AFIP, 1998, p.75-87.

GILANI, A.H.; RAHAMN, A. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. (no prelo)

GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y., STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bonplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 41-47, 2001.

HAMBURGER, M.; HOESTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*, v. 29, n.7, p. 2351-2355, 1990.

LAATIKAINEN, R.; NIEMITZ, M.; WEBER, W.; SUNDELIN, S.; HASSINEN, T.; VEPSALAINEN, J. General Strategies for Total-Lineshape-Type Spectral Analysis of NMR Spectra Using Integral-Transform Iterator. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, v. 120, p. 1-10, 1996

LAMBERT, J.B.; MAZZOLA, E.P. **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to principles, applications and experimental methods.** New Jersey: Prentice Hall, 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos interdisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MACOMBER, R.S. **A Complete Introduction a Modern NMR Spectroscopy.** New York: Wiley & Sons, 1998.

McRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Studies on the pharmacological activity of Amazoniam Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, p. 143-172, 1988.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31-34, 1982.

NYIREDY, S. Separation strategies of plant constituents—current status. *Journal of Chromatography B*, v. 812, p. 35-51, 2004.

OLIVEIRA, M.G.M. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 34, p. 29-41, 1991.

PARRA, L.A.; YHEBRA, R.S.; SARDINAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* Leach and estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas Mediciniais da Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem.** São Paulo: Annablume, 2000.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry.** 2 nd. ed. Florida: Saunders, 1996.

ROMANIUC-NETO, S. Biodiversité et spéciation dans le Sud-Est du Brésil et le bassin du Fleuve Paraná: exemple de quelques espèces appartenant à um complexe du genre *Sorocea* A. St.-Hil. (Moraceae), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*, v. 327, n. 10, p. 669-675, 1998.

SAHPAZ, S.C.; BORIES, S.C. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Medica*, v. 60, n.6, p. 538-540, 1994.

SDBS. Spectral Database for Organic Compounds. Disponível em <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_sea>. Acesso em 10 fev. 2005.

SIQUEIRA, J.M.; de BOAVENTURA, M.A.D.; ZIMINIANI, M.G.; REZENDE, U.M. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriucula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina*. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.O; OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G.; da SILVEIRA-FILHO, N.G.; BRAZ, S.; CARLINI, E.A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 34, p. 21-27, 1991.

USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 th. ed. Washington, DC: U.S. environmental Protection Agency, 2002. p. 178-184.

VEERPORTE, R. MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argus, 2001. p. 353-380.

VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; WAUTERS, J.N.; ANGENOT, L. Characterization of adulteration of “espinheira santa”(*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bonplandii* (Moraceae) by high performance thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 9, p. 263-266, 1998.