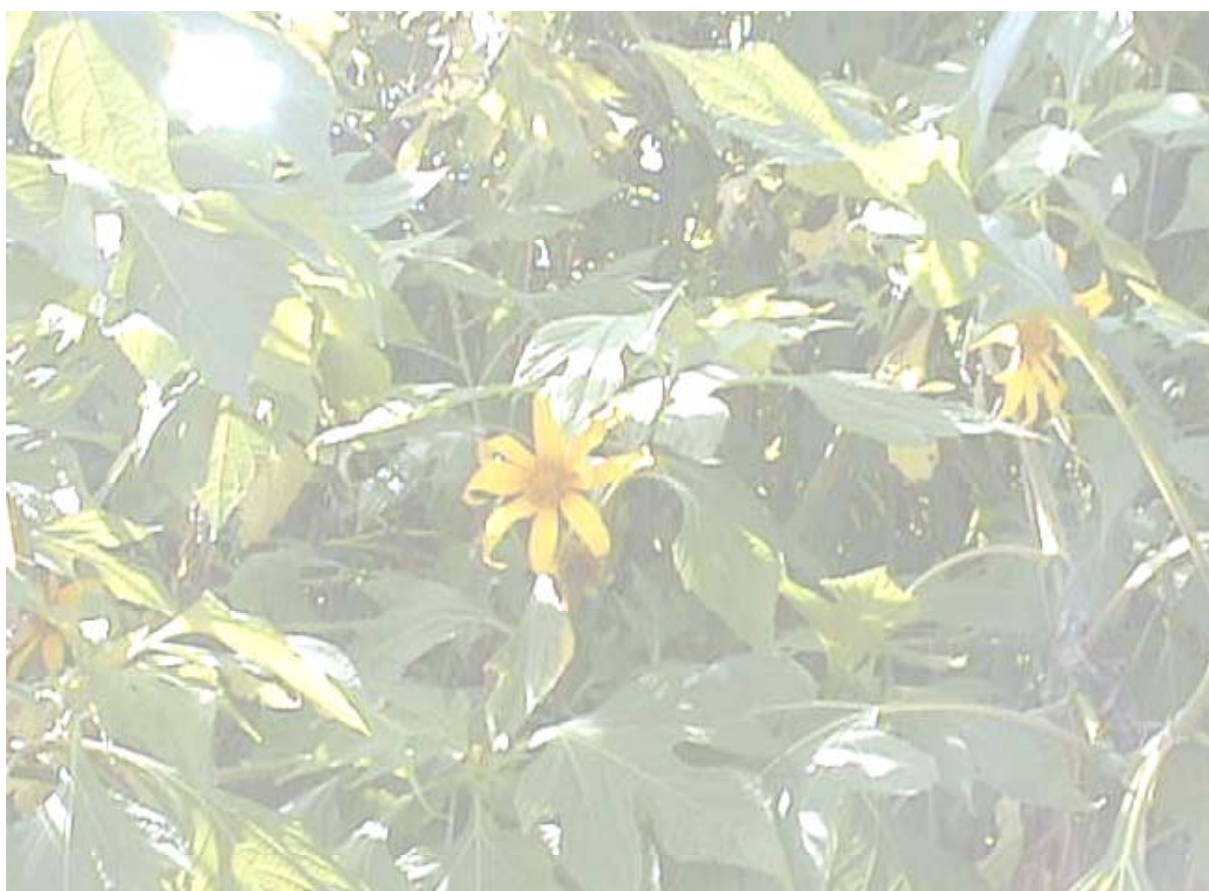




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**ORIENTADOR**  
**MOACIR GERALDO PIZZOLATI**

**Florianópolis, 2003.1**

**PRISCILA DE BEM SILVA.**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Tithonia diversifolia*  
CULTIVADA NO HERBÁRIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO (HU)**

*Trabalho de conclusão do curso de Química,  
executado durante o semestre 2003.1, apresentada  
pela disciplina QMC 5231 – Estágio Supervisionado  
na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC,  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Bacharel em Química.*

**Coordenador de Estágio:** Prof.º Eduardo Antônio  
Pinheiro.

**Orientador do estágio :** Prof.º Moacir Geraldo  
Pizzolatti.

Florianópolis / SC  
Semestre 2003.1

*“A Natureza acha um meio, onde pode-se equilibrar tudo o que existe, assim cada ser vivo tem sua devida função e utilidade na Terra. Sendo assim da mesma forma que existe uma doença sempre existirá uma cura, mesmo sem encontrarmos.”*

*(Autor de origem desconhecida)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele eu estaria perdida em meus pensamentos;

Aos meus pais Cida e Braz pelo apoio, carinho e paciência no decorrer da minha vida;

Ao professor Moacir por permitir o uso de seu laboratório e sua orientação para o estágio;

Aos diversos professores que contribuíram para a minha formação;

Ao meu namorado Valmes que teve muito carinho, paciência nos diversos momentos e me ajudou neste trabalho;

As dicas dos professores: Inês, Marina, Marcos Sá, Miguel (pelos espectros), Carasek;

As aulas do Davi que me ensinou a usar o programa RMN <sup>1</sup>H e a Aline pelo programa CG;

Aos colegas de laboratório LQPN: Karina, Okima, Luciano, Pedro, Verdi, Juliana, Daniela, Cristian, Luís Fernando, Heros e Fabiana;

As funcionárias da limpeza (sem eles os laboratórios e salas estariam inadequadas), a técnica Marilena pelo fornecimento de material, ao pessoal do Xerox do CFM (que me quebrou o galho muitas vezes), as funcionárias da BSCFM pela grande ajuda, todos os meus colegas de faculdade, aos alunos da orgânica exp. I, a galera dos Centros Acadêmicos de QMC e FSC, aos meus amigos Alexandre Parize, Rabino, Paulo, Poly, Katiúcia, Luciano Campestrini, Pubi, Kely e muitos outros amigos.

**ÍNDICE GERAL**

<b>ABREVIACÕES</b>	vi
<b>RESUMO</b>	vii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1. Curiosidades	01
1.2. Conceitos	04
1.3. A Planta em Estudo	05
1.3.1. Descrição Botânica	05
<b>2. OBJETIVO</b>	08
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	09
<b>3.1. Parte I: Marcha Analítica do Extrato Bruto</b>	09
<b>3.2. Parte II: Ensaio para identificação de açúcares</b>	14
<b>3.3. Parte III: Extração e isolamento</b>	20
<b>3.4. Parte IV: Obtenção e Análise do Óleo Essencial</b>	22
<b>4. DADOS E RESULTADOS</b>	24
<b>4.1. Parte I: Marcha Analítica</b>	24
<b>4.2. Parte II: Ensaio para identificar açúcares</b>	25
<b>4.3. Parte III: Extração e isolamento</b>	25
<b>4.5. Parte IV: Obtenção do Óleo Essencial</b>	41
<b>5. CONCLUSÃO</b>	43
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	44

**ABREVIACOES**

PF	Ponto de fusão
IV	Infravermelho
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
Hex	Hexano
EtOH	Etanol
AcOEt	Acetato de Etila
D <sub>2</sub> O	gua Deuterada
MeOH	Metanol
Ext.	Extrato
Sol.	Solução
CG	Cromatografia  Gás
CC	Cromatografia de Coluna (sílica gel)
$\delta_{as}$	Deformação Angular Assimétrica
$\delta_a$	Deformação Angular Simétrica
$\nu_{as}$	Deformação Axial Assimétrica
$\nu_a$	Deformação Axial Simétrica

## RESUMO

A planta estudada *Tithonia diversifolia*, utilizada como adubo em plantações, flores na apicultura, as folhas no alimento de animais (boi, carneiro, etc.). O extrato das folhas apresenta sesquiterpenos lactonas, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, leucoantocianidinas, glicosídeos esteroidais, triterpênicos e fitoesteróis. As análises por IV permitiram-nos identificar a presença predominante de grupos funcionais hidrofílicos e lactonas.

As análises por RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) confirmaram a presença destes grupos funcionais e apresentam perfis compatíveis com a presença de sesquiterpenos lactonas.

As análises em CG com a frações isoladas mostram a predominância de picos na faixa de eluição de sesquiterpenos.

O óleo essencial extraído das flores por hidrodestilação renderam 0,06%. A análise por CG do óleo essencial mostram como principais compostos os monoterpenos, apresentando também picos na faixa de eluição de sesquiterpenos e diterpenos.

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> – Resultados dos grupos funcionais	24
<b>TABELA 2</b> – RMN <sup>1</sup> H 200 MHz da fração TD 35/40	30
<b>TABELA 3</b> – RMN <sup>13</sup> C 50 MHz da fração TD 35/40	32
<b>TABELA 4</b> – Frações de <i>Tithonia</i> sendo comparada de RMN <sup>13</sup> C com o Composto 11 <sup>22</sup>	38
<b>TABELA 5</b> – Frações de <i>Tithonia</i> sendo comparada de RMN <sup>13</sup> C com o Composto 13 <sup>22</sup>	38
<b>TABELA 6</b> – Frações de <i>Tithonia</i> sendo comparada de RMN <sup>13</sup> C com o Composto 2 <sup>23</sup>	38
<b>TABELA 7</b> – Frações de <i>Tithonia</i> sendo comparada de RMN <sup>13</sup> C com o Composto 4 <sup>a24</sup>	39
<b>TABELA 8</b> – Frações de <i>Tithonia</i> sendo comparada de RMN <sup>13</sup> C com o Composto 5 <sup>24</sup>	39



**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Preparação geral de extratos por diversos métodos	03
<b>Figura 2</b> – Foto da <i>Tithonia diversifolia</i> , tirada no herbário do HU por Valmes Bertechini Júnior.	05
<b>Figura 3</b> – Estrutura do Targitinin C	07
<b>Figura 4</b> – Esquema dos ensaios modificados, feitos para identificar grupos funcionais.	13
<b>Figura 5</b> – Esquema do ensaio modificado para identificação de açúcares na fase aquosa da <i>Tithonia diversifolia</i>	19
<b>Figura 6</b> – Esquema do processo experimental feito com a <i>Tithonia diversifolia</i> .	21
<b>Figura 7</b> – Flor da <i>Tithonia diversifolia</i> .	23
<b>Figura 8</b> – Desenho do esquema de extração do óleo essencial, desenhado por Priscila de Bem Silva.	23
<b>Figura 9</b> – Esquema para extração do óleo essencial das flores de <i>Tithonia diversifolia</i> .	23
<b>Figura 10</b> – Placas de Cromatografia de camada deslgada (CCD)	26
<b>Figura 11</b> – Espectro de Infra-vermelho da fração TDA - 32	26
<b>Figura 12</b> – Espectro de Infra-vermelho da fração TDA - 50	27
<b>Figura 13</b> – Espectro de Infra-vermelho da fração TDA - 44	27
<b>Figura 14</b> – Espectro de Infra-vermelho da fração TDA - 63	28
<b>Figura 15</b> - Placa de Cromatografia de camada deslgada (CCD)	28
<b>Figura 16</b> – Placa de Cromatografia de camada deslgada (CCD)	28
<b>Figura 17</b> – Cromatografia à Gás da fração TD 35/40	29
<b>Figura 18</b> – RMN <sup>1</sup> H 200 MHz da fração TD – 35/40 em acetona	30
<b>Figura 19</b> – RMN <sup>1</sup> H 200 MHz da fração TD 35/40 em acetona + D <sub>2</sub> O	31

<b>Figura 20</b> – RMN $^{13}\text{C}$ 50 MHz da fração TD35/40 em acetona	31
<b>Figura 21</b> – Placa de Cromatografia de camada deslgada (CCD)	32
<b>Figura 22</b> – Cromatografia à Gás da fração TDA <sub>1</sub> – 2/4 em diclorometano	33
<b>Figura 23</b> – RMN $^1\text{H}$ 200 MHz da fração TDA <sub>1</sub> – 2/4 em $\text{CDCl}_3$	33
<b>Figura 24</b> – RMN $^{13}\text{C}$ 50 MHz da fração TDA <sub>1</sub> – 2/4 em $\text{CDCl}_3$	34
<b>Figura 25</b> - Cromatografia à Gás da fração TDA <sub>2</sub> – 3 em acetona	34
<b>Figura 26</b> – RMN $^1\text{H}$ 200 MHz da fração TDA <sub>2</sub> – 3 em acetona deuterada.	35
<b>Figura 27</b> – RMN $^1\text{H}$ 200 MHz da fração TDA <sub>2</sub> – 3 em acetona deuterada + $\text{D}_2\text{O}$	35
<b>Figura 28</b> – RMN $^{13}\text{C}$ 50 MHz da fração TDA <sub>2</sub> – 3 em acetona deuterada	36
<b>Figura 29</b> - Cromatografia à Gás da fração TDA <sub>3</sub> – 2 em diclorometano	36
<b>Figura 30</b> – RMN $^1\text{H}$ 200 MHz da fração TDA <sub>3</sub> – 2 em $\text{CDCl}_3$	37
<b>Figura 31</b> – RMN $^{13}\text{C}$ 50 MHz da fração TDA <sub>3</sub> – 2 em $\text{CDCl}_3$	37
<b>Figura 32</b> – Cromatografia à Gás do óleo essencial das flores em diclometano	41

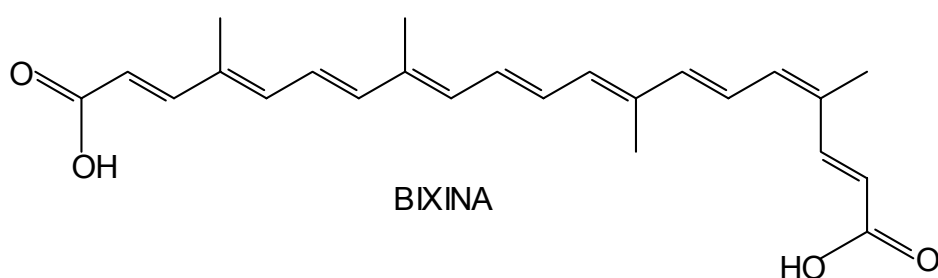
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Curiosidades

O genovês Cristovão Colombo descobriu o que hoje conhecemos por América, convicto de que chegara ao Extremo Oriente. Como lá existia um certo arbusto cujas folhas cheiravam a canela, não hesitou: era canela. Que melhor prova do que essa poderia ter Colombo? Estava no Oriente das especiarias. Ao acharem algumas raízes nas matas, os homens de Colombo as levaram ao mestre Sanchez que, sem hesitar, disse tratar-se do precioso ruibarbo da China.<sup>1</sup>

Na carta de Pero Vaz de Caminha a El-rei D. Manoel, considerada por muitos como “a certidão de nascimento do Brasil”, o escrivão dá a notícia da descoberta da nova terra que os descobriram batizaram de Ilha Vera Cruz. Além da nudez das índias e de suas pinturas, chamaram a atenção do cronista alguns ouriços que os índios levaram aos portugueses.<sup>1</sup>

Estes ouriços nada mais eram do que a bixácea – *Bixa orella*, conhecida como urucu, palavra de origem tupi que significa vermelho. A tintura dos indígenas era feita com as sementes, cujo o principal corante é o norcarotenóide bixina. Este foi o primeiro cis-polieno reconhecido na natureza. Este corante, muitas vezes, era extraído das sementes com óleo de andiroba, obtido dos frutos de *Carapa guaianensis*, uma árvore da família Meliaceae. Este óleo além de servir para a preparação da tintura, foi muito usado como gás de iluminação e para o preparo de sabão. É também usado em móveis para protegê-los contra o ataque de insetos.<sup>1</sup>



Hoje, a bixina além de ser um dos corantes naturais mais usados para a coloração de alimentos, é também utilizado em filtros solares.<sup>1</sup>

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. 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 cultivadas em quintais residenciais.<sup>2</sup>

De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial.<sup>2</sup>

Os metabólitos secundários produzidos por plantas, melhor conceituados, segundo Gottlieb como metabólitos especiais, tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas já então conhecidas como medicinais. Desses estudados foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregadas no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina, cânfora e cocaína.<sup>3</sup>

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos.<sup>3</sup>

É importante ressaltar também que, devido ao fantástico desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, nas últimas décadas- mais recentemente de instrumentos analíticos hifenados, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados, muitos destes ainda sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna. Mesmo considerando o grande número de produtos produzidos por síntese.<sup>3</sup>

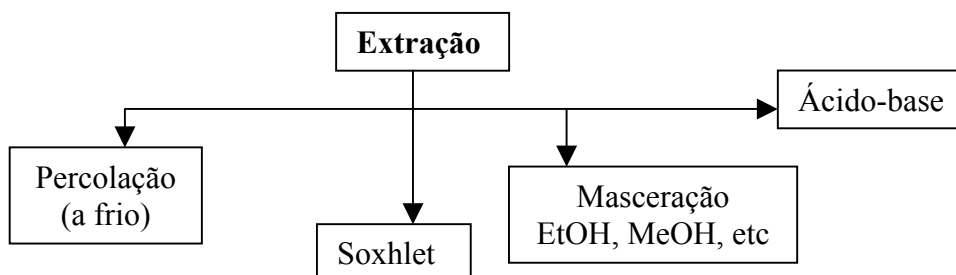
Em geral a escolha de uma determinada planta medicinal é feita através da abordagem etnofarmacológica. Uma vez definida a espécie vegetal a ser estudada, define-se também o local da coleta (origem da espécie vegetal escolhida: amazônica; cerrado; mata atlântica; pantanal; caatinga; manguezal; etc.) Nesta fase inicial do trabalho científico, o pesquisador deve estar completamente inteirado da literatura sobre a planta escolhida, porque muitas vezes, plantas medicinais são investigadas parcialmente, validando, portanto, o interesse em novas investigações científicas.<sup>2</sup>

Com a escolha da planta definida e o local de coleta estabelecido, e o levantamento bibliográfico efetuado e o projeto de pesquisa elaborado, parte-se então, para a coleta da planta. A planta escolhida deve ser seguramente identificada.<sup>2</sup>

Etapa de coleta, destinada ao estudo fioquímico e/ou farmacológico, consta de uma única coleta ou várias coletas. Neste último caso, as coletas poderão ser realizadas em épocas diferentes do ano e/ou locais diferentes. Caso haja coleta em regiões diferentes inicia-se novamente todo o processo de identificação botânica, por que muitas vezes plantas diferentes são conhecidas popularmente pelo mesmo nome.<sup>2</sup>

Durante a coleta, os seguintes itens devem ser cuidadosamente monitorados: separação e etiquetagem do material coletado: embalagem em sacos plásticos; transporte do material; pesagem do material seco; moagem; armazenagem; obtenção do extratos. A secagem pode ser realizada ao sol, á sombra ou em estufa, sempre com circulação de ar. Caso haja interesse de óleo essencial,<sup>2</sup> o mesmo deve ser analisado com a planta fresca e imediatamente após a coleta .

Preparação geral de extratos:



**Figura 1** – Preparação geral de extratos por diversos métodos.<sup>2</sup>

A identificação dos compostos orgânicos deve ser feita através das seguintes análises espectroscópicas:

- 1) *espectroscopia na região do infravermelho (IV)* – o espectro de IV interpretado em termos de presença ou ausência de grupos funcionais;
- 2) *espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN) de <sup>1</sup>H e Carbono 13 (<sup>13</sup>C)* – determina a natureza e o ambiente químico dos hidrogênios e carbonos, respectivamente. É a técnica mais importante para a investigação da estrutura molecular;
- 3) *espectrometria de massas (EM)* – fornece dados sobre a massa molecular e a fórmula molecular e contribuir para a elucidação estrutural com a identificação de fragmentos característicos da molécula.<sup>2</sup>

A seleção correta de testes biológicos específicos, permitirá uma avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal, fornecendo também, informações sobre a toxicidade da planta.<sup>2</sup>

## 1.2. Conceitos

A química assume em muitos aspectos as características de ciência transdisciplinar, como é a matemática: “uma ciência que fornece os meios essenciais e a linguagem fundamental para o correto entendimento de outras disciplinas científicas.”<sup>4</sup>

Os organismos vivos são constituídos por substâncias químicas e delas dependem para sobreviver, mantendo-se de três classes principais de gêneros alimentícios: carboidratos, gorduras e proteínas.<sup>4</sup>

As próximas fases da química de produtos naturais do metabolismo secundário não envolverão somente a descoberta de novas estruturas e catalogação dos constituintes das espécies estudadas. Além disto, as atividades devem ser ampliadas para investigar exaustivamente as propriedades farmacológicas e ecológicas de metabólitos secundários isolados, para explorar a capacidade bioprodutiva de culturas de células e tecido e para investigar microorganismos em meios de cultura preparados artificialmente. A biopreparação de produtos com estereoquímica definida e a introdução e modificação biosseletivas de grupos funcionais em substratos naturais ou sintéticos dependem de rotas biogênicas que precisam ser conhecidas cientificamente. Assim, evidencia-se a necessidade imperiosa de formar pesquisadores no País para investigações biossintéticas.<sup>4</sup>

Na cromatografia de camada delgada, na separação de substâncias lipófilas, é muito mais vantajoso do que a cromatografia em papel. Ultimamente, se ampliou este método também para a separação de combinações hidrófilas e em alguns casos (componentes de proteína e de ácido nucleico) foi comparado sistematicamente com a cromatografia de papel. Se pode demonstrar que, ampliando substâncias apropriadas na capa, é bom para casos de separação de aminoácidos nucleotídeos, menor que a cromatografia de papel.<sup>5</sup>

As vantagens mais importantes da cromatografia de capa fina dão excelente nitidez, alta sensibilidade e grande rapidez. Alguma separação, que sobre papel necessita de muitas horas, se pode fazer numa capa fina apropriada em poucos minutos.<sup>5</sup>

Se denomina cromatografia um procedimento, na qual uma solução de substâncias a separar se desprende numa direção predeterminada por uma disposição de aparatos, por meio de uma matéria sólida, insolúvel, inorgânica ou orgânica, mais ou menos finamente

repartida, sendo retidos os componentes na medida individualmente distinta. Como mecanismo fundamental a partição dos compostos por fases líquidas eluentes.<sup>5</sup>

### 1.3. A Planta Em Estudo



**Figura 2** – Foto da *Tithonia diversifolia*, tirada no herbário do HU, por Valmes Bertechini Júnior.

A planta coletada no herbário de plantas medicinais do HU (Hospital Universitário), e identificada pelo botânico Daniel de Barcelos Falkenberg, professor do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como sendo *Tithonia diversifolia*.

#### 1.3.1. Descrição Botânica:

Planta herbácea da família Asteracea, originária da América Central. Possui grande adaptação, tolera condições de acidez e baixa fertilidade no solo. Possui rápido crescimento, baixa demanda de insumos e manejo para seu cultivo. Apresenta

características nutricionais importantes para sua condeação como espécie com potencial na alimentação animal.<sup>6</sup>

Na Colômbia, se utiliza na apicultura e alimentação de vacas, carneiros, ovelhas e porcos. Também utilizados como cerca viva para rodear os sítios onde se colocam colmeias e áreas de mata para proteção fontes de água. Se utiliza também como espécie ornamental e em parcelas de produção agrícola com alta diversidade para atrair insetos benéficos.<sup>6</sup>

Possui de 1,5 a 4,0 metros de altura, com ramos fortes subtomentosas, folhas alternas, suas folhas possuem de 3 a 5 pontas, florecência por flores amarelasde 3 a 6 cm de longitude e coroa amaral de 8 mm diâmetro.<sup>6</sup>

***Nomes comuns:***

Mão-de-Deus, Arnica<sup>6</sup>, Notaantsy (mixe)<sup>6</sup>, Tacote Amarillo, Sunflower Mexicano<sup>7</sup>, Tithonia<sup>7</sup>, Sonneblom de Mexikaanse<sup>7</sup>, umbabane<sup>7</sup>, marigold da árvore<sup>8</sup>, sunflower do shrub<sup>8</sup>, sunflower japonês<sup>8</sup>, renga do pua<sup>8</sup> (consoles de cozinheiro); rengarenga do tiare<sup>8</sup> (consoles de cozinheiro (Aitutaki); kavakava<sup>8</sup>, matala<sup>8</sup> (Niue).

***Localidades:***

Está localizada em diversos país: África do sul<sup>8</sup>, China<sup>8</sup>, Colombia<sup>7</sup>, México<sup>7</sup>, Brasil<sup>7</sup>, América Central e Sul<sup>7</sup>, Hawai<sup>8</sup>, etc.

Os fazendeiros que trabalham com o *Kenya Woodfuel* e programa de Agroforestry (KWAP) identificaram um arbusto local como tendo o potencial ajudar a infestacões da térmita do controle. Os fazendeiros, envolvidos no projeto como a parte de uma aproximação do cálculo rural participativo identificaram térmitas como um problema sério em suas fazendas. Uma experiência do fazendeiro, fazendo um chá de fresco ou a cinza da *Tithonia diversifolia* (sabido também como o marigold da árvore, ou o sunflower selvagem), do *Cassia siamea* e dos *Cassia spectabilis* e de aplicá-la às árvores afetadas, desde que proteção das térmitas por até 45 dias. Um outro fazendeiro, que tivesse um problema com térmitas subterrâneas, fêz uma solução baseada nos extratos levedura da *Tithonia diversifolia* e do *Melia azedarach*, que controlaram as pestes quando derramados em seus ninhos. Após dois anos da pesquisa, os resultados da fazenda mostraram o tratamento o mais eficaz para ser uma solução feita de *Tithonia diversifolia*, de *Vernonia amygdalina* e da *Agave sisalana*. Não somente esta solução controlou térmitas, mas contribuiu também à fertilidade de solo. Usar estes recursos



locais evitou a necessidade compra pesticidas químicos. Além disso, os fazendeiros foram relatados como sendo entusiásticos sobre o uso de *Tithonia* e de sua eficácia.<sup>9</sup>

Em várias pesquisas já realizadas com a planta em questão mostrou várias utilidades tais como anti-diarréico, atividade antiamebiano<sup>10, 11</sup>, antimalarial, antiplasmódio (princípio ativo decido a um serquiterpenlactona o Targitinin C, fig. 03)<sup>12</sup>, externamente as folhas são usadas para o tratamento de hematomas, feridas e por propriedades anti-inflamatórias.<sup>13,14</sup> Possui atividade para diabetes<sup>15</sup> e como quimio preventivo de câncer (antiproliferação) em bioensaios executados com câncer de cólon humano.<sup>16</sup>

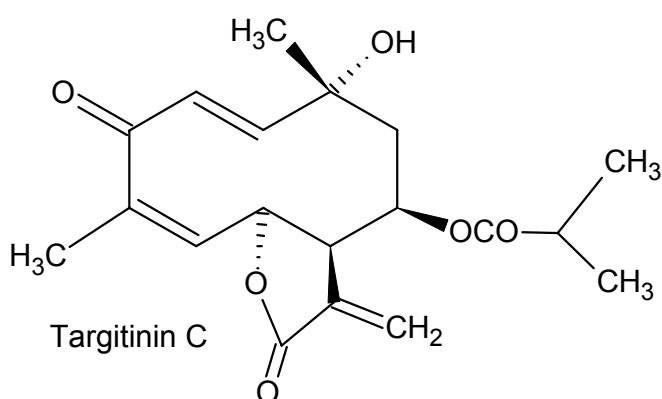


Figura 03 – Estrutura do Targitinin C, da *Tithonia diversifolia*<sup>12</sup>.

## 2. OBJETIVOS

- Preceder a separação e o isolamentos de metabólitos utilizando técnicas de separação envolvendo extração líquido-líquido e cromatografia líquido-sólido em sílica gel;
- Extração do óleo essencial por hidrodestilação e análise do mesmo por cromatografia gasosa;
- Identificação dos grupos funcionais dos metabólitos isolados através da análises espectroscópicas de IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , CG e comparação com dados da literatura;
- Análise sistemática de açúcares.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Parte I: *Marcha Analítica do Extrato Bruto*

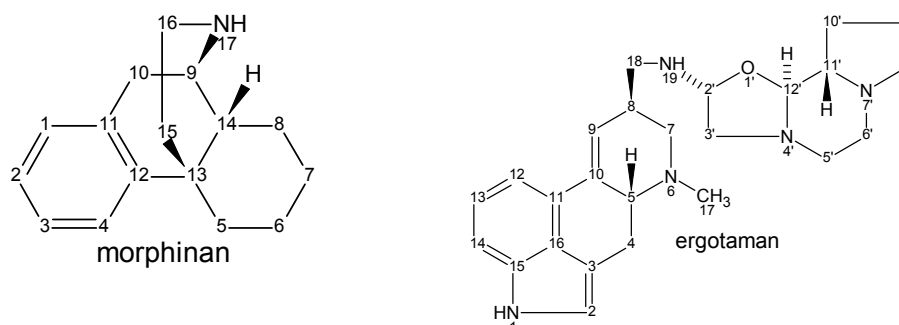
Este é um ensaio qualitativo, na busca de grupos funcionais no extrato bruto. Segue-se o fluxograma da Marcha Analítica<sup>17, 18</sup>, ilustrado na fig. 4.

As estruturas abaixo são apenas exemplos ilustrativos dos grupos.

#### ❖ Reativos utilizados para a identificação de ALCALÓIDES

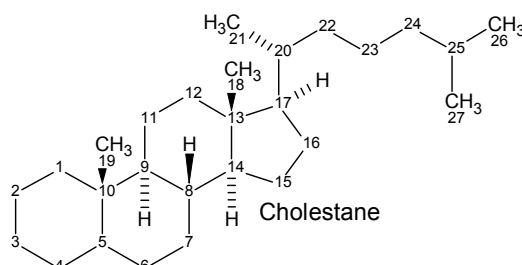
- *Meyer*: dissolve-se 1,36 de cloreto de mercúrio em 60 mL de água destilada. Depois, adiciona-se uma solução de 5,0g de KI e 10 mL de água destilada. Completa-se a 100 mL com água.
- *Dragendorff*: dissolve-se 8,0g de subnitrato de bismuto  $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  em 20 mL de  $HNO_3$  e 27,2 g KI em 50 mL de água. Mistura-se as duas soluções e deixa-se repousando por 24 horas, completa-se com 100 mL de água destilada.
- *Beltrand*: Se dissolvem 5,0g de ácido sílico-tungstico são dissolvidos em uma solução de ácido sulfúrico 6N de 100 mL.

As reações são positivo quando se observa a formação de um precipitado ou turbidez no tubo.  
Ex.:



#### ❖ Reativos utilizados para a identificação de ESTERÓIDES, FITOESTERÓIDES e GLICOSÍDEOS ESTERÓIDES E TRITERPÊNICOS

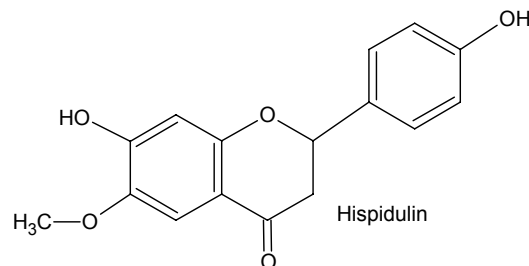
- *Prova de Liebermann-Burchard*: Mistura-se 1,0 mL de anidrido acético com 1,0 mL de clorofórmio, resfria-se e adiciona-se uma gota de ácido sulfúrico concentrado. A reação é positiva quando aparece uma coloração laranja.
- *Prova de Rosenheinn*: Uma solução cloroformica da substância se põe em contato com ácido tricloroacético 90% em água destilada. É positivo para coloração intensa violeta que depois de 20 minutos muda para azul.
- Ex.:



### ❖ Identificação de FLAVONÓIDES e FLAVONÓIDES GLICOSÍDEOS

- Os extratos alcoólicos incolores ou ligeiramente amarelos de um vegetal, se tratados com limalhas de magnésio e três gotas de ácido clorídrico concentrado, observa-se imediatamente uma coloração alaranjado, roxo-azulado ou violeta.

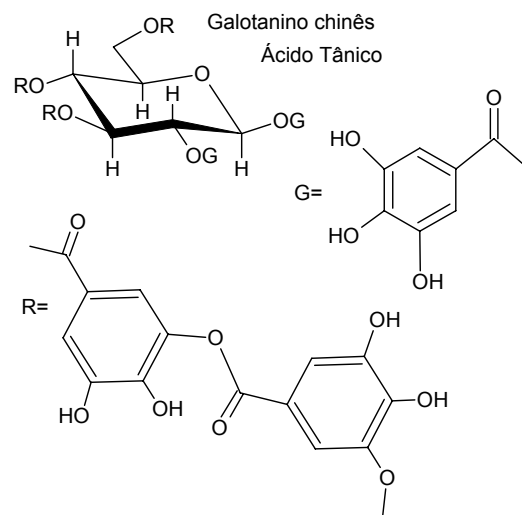
Ex.:



### ❖ Identificação de TANINOS

- Cloreto Férrico: Adiciona-se 1 gota de  $\text{FeCl}_3$  1% dissolvidos em água destilada sobre 0,2 mL de solução aquosa da substância (em tubo de ensaio). A reação é positiva, se aparecer uma coloração verde, azul ou pardo escuro.
- Gelatina 1%: 0,2 mL de solução aquosa da substância mais o volume igual de gelatina 1% (solução de gelatina: 1,0g de gelatina de qualidade farmacológica dissolvida em 100 mL de água a 10% de NaCl). A reação é positiva com o aparecimento de turbidez ou precipitado.

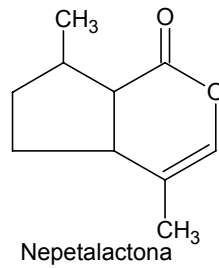
Ex.:



### ❖ Identificação de SESQUITERPEN-LACTONAS

- Prova de Baljet: Prepara-se 2 soluções de volumes iguais que mistura-se antes de usar. Solução A ( 1,0g de ácido pícrico em 100 mL de etanol) e solução B (10g de hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada). Para 2-3 mg de composto se adiciona 3-4 gotas do reativo. A reação é positiva ao observar a formação de coloração alaranjada ou vermelho escuro.

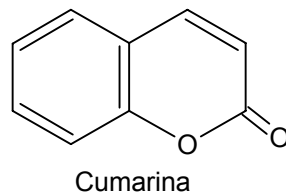
Ex.:



#### ❖ Identificação CUMARINAS

- Aplica-se uma gota da solução etérea sobre um papel filtro, onde o mesmo é exposto à luz ultravioleta (365nm). O teste é considerado positivo com o desenvolvimento de fluorescência.

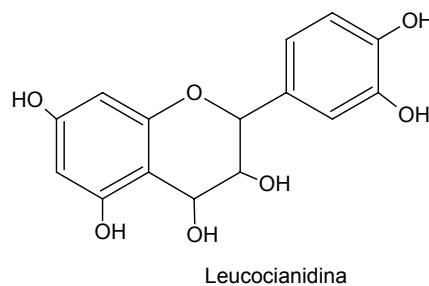
Ex.:



#### ❖ Identificação de LEUCOANTOCIANIDINAS

- Coleta-se 0,2 mL da solução a se analisada e adiciona-se 2-3 gotas de HCl concentrado e leva-se a ebulição em bico de Bunsen. A reação é positiva com o aparecimento de uma coloração vermelha.

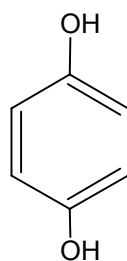
Ex:



#### ❖ Identificação de GRUPOS FENÓLICOS

- A 2 mL da solução aquosa obtida acima, adiciona-se 2 gotas de solução de FeCl<sub>3</sub> 1%. O desenvolvimento de coloração azul ou vermelha confirma a presença de fenóis.

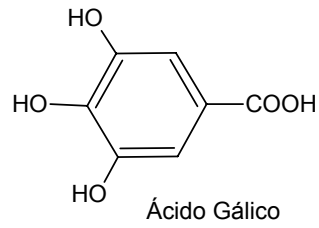
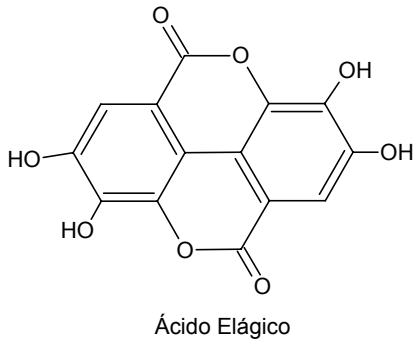
Ex.:



### ❖ Identificação de ÁCIDOS ORGÂNICOS

- Evaporar 10 mL de solução até a secura e adicionar 5 mL de água destilada.  
Determinar o pH da solução, se for ácido confirma-se a presença de ácidos orgânicos.

Ex.:



No esquema a seguir, demonstra a ordem de identificação dos grupos funcionais, fig. 4.

## Fluxograma da Marcha Analítica

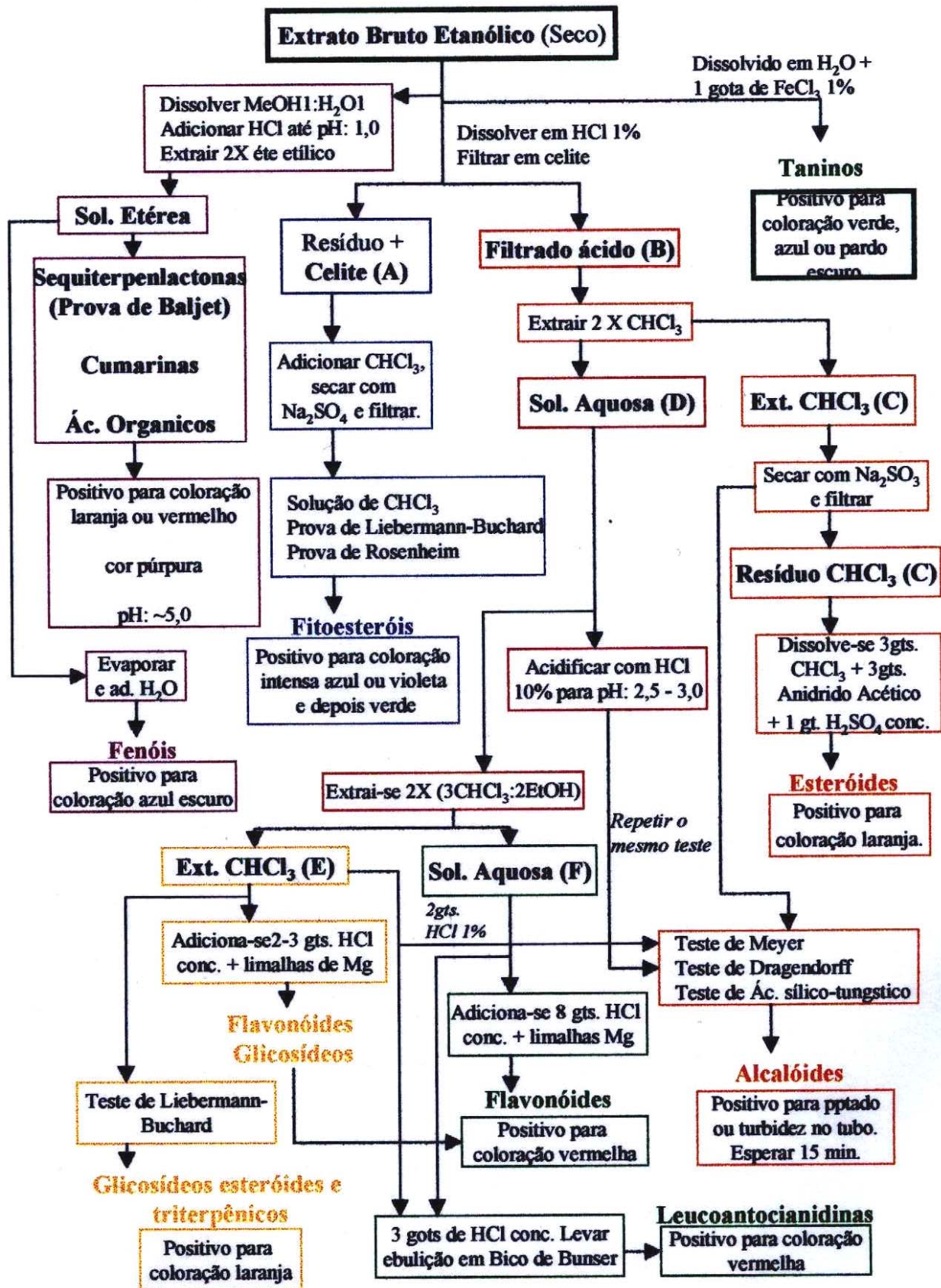


Figura 4 - Esquema dos ensaios modificados, feitos para identificar grupos funcionais.

### 3.2. Parte II: Ensaio para identificação de açúcares<sup>19</sup>

Realizou-se ensaios com as duas fases aquosas obtidas (fig. 5), uma que passou por processo normal de extração e a outra passou por um processo de extração ácido e base.

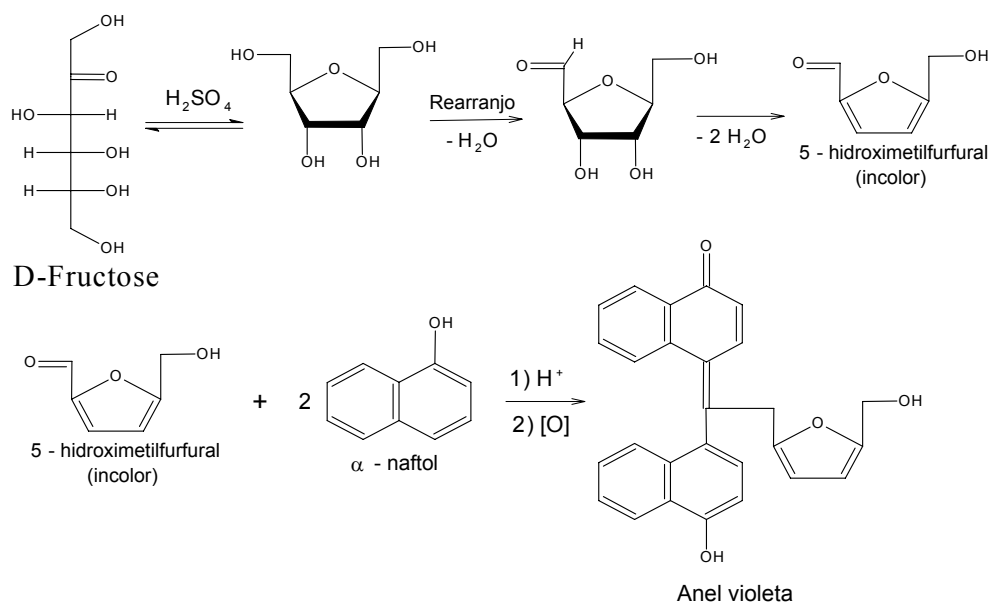
Usou-se Reagentes e tubos de ensaio para os testes, descritos abaixo.

#### ❖ Reativo de Molisch

Uso na determinação qualitativa de carboidratos.

Dissolve-se 20 g de alfa-naftol em 100 mL de álcool. Para usar este reagente coloca-se 1 mL de amostra num tubo de ensaio e adiciona-se 2 gotas deste reagente. Agitar e acrescentar lentamente, pelas paredes mantendo o tubo inclinado e sem agitação e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nessa proporção. Haverá coloração vermelhada ou violeta na forma de um anel, separando em duas camadas, positivo para a presença de carboidratos.

Reação:

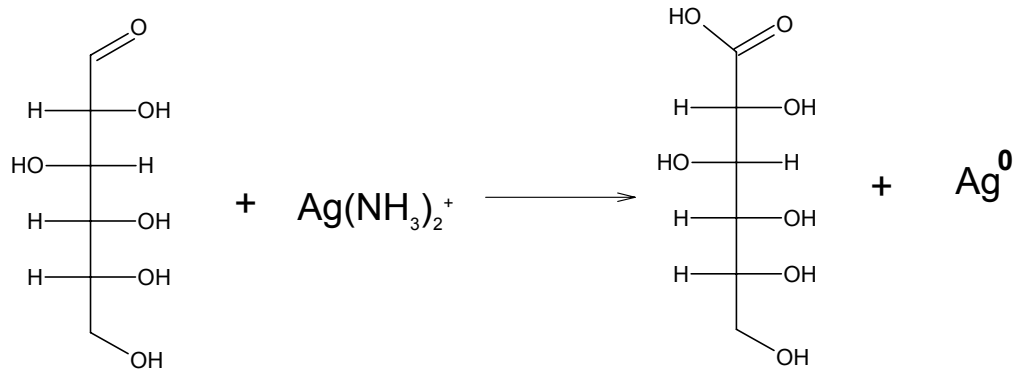


#### ❖ Prova de Tollens (espelho de prata)

Misturar em um tubo de ensaio 1,0 mL de solução de nitrato de prata 5%, 1 mL de hidróxido de amônio 105 e 1 mL de solução da amostra. Aquecer brandamente em banho-maria sem agitar. Verificar o espelhamento da superfície interna do tubo, sendo positivo para açúcar redutor.



Reação:



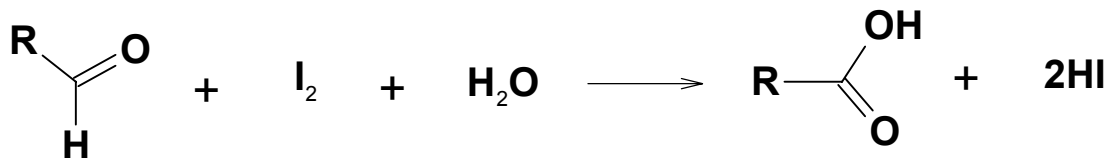
D-Glucose

❖ Prova de Lugol

Solução: Dissolve-se 100g de KI e 50 g de  $\text{I}_2$  em 100 mL de água e completa-se a 1 litro.

Em um tubo de ensaio colocar 5 mL de água destilada, 10 gotas de amostra e uma gota da solução de Lugol. Verificar mudança de coloração. Aquecer o tubo de ensaio e anotar mudança na coloração. Resfriar e verificar novamente a mudança de coloração. A coloração azul indica a presença de amido e a coloração amarelo ou incolor, trata-se de mono ou dissacarídeo.

Reação:



❖ Teste de Benedict

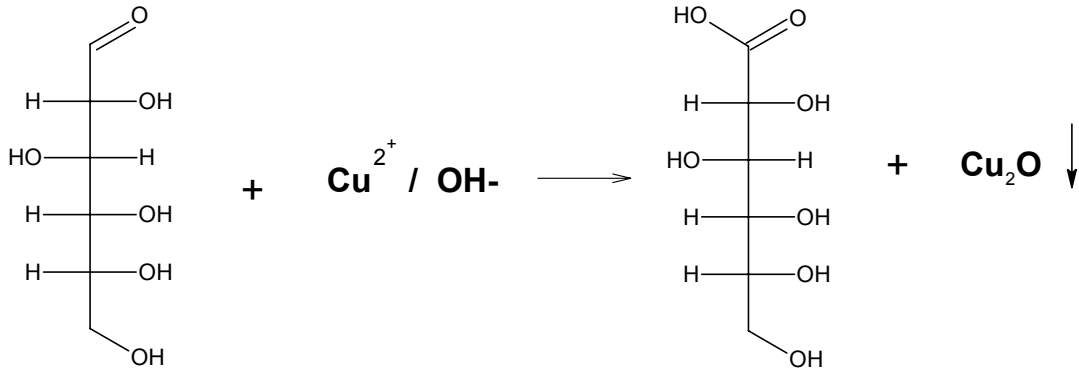
Uso na determinação qualitativa de glicose.

Solução: Dissolve-se 173g de citrato de sódio e 100g de carbonato de sódio anidro em cerca de 800 mL de água quente, filtra-se, se necessário, e dilui-se com água até 850 mL de volume total. Em seguida, coloca-se gradativamente a solução de sulfato de cobre (17,3 g dissolvidas em 100 mL de água) agitando-se continuamente e leva-se a 1 litro. Esta solução é o reagente reformado de Fehling e forma quantitativamente um precipitado que pode ir de vermelho a verde por aquecimento com solução de glicose.

Coloca-se em um tubo de ensaio 2,5 mL do reativo de Benedict, uma pedra de porcelana e aquecer até a ebulição, no bico de Bunsen. Adicionar-se então 5 gotas de amostra. Ferver, suavemente, por cerca de 30 segundos a um minuto.

Indicando o precipitado confirma a presença de dissacarídeo redutor.

Reação:



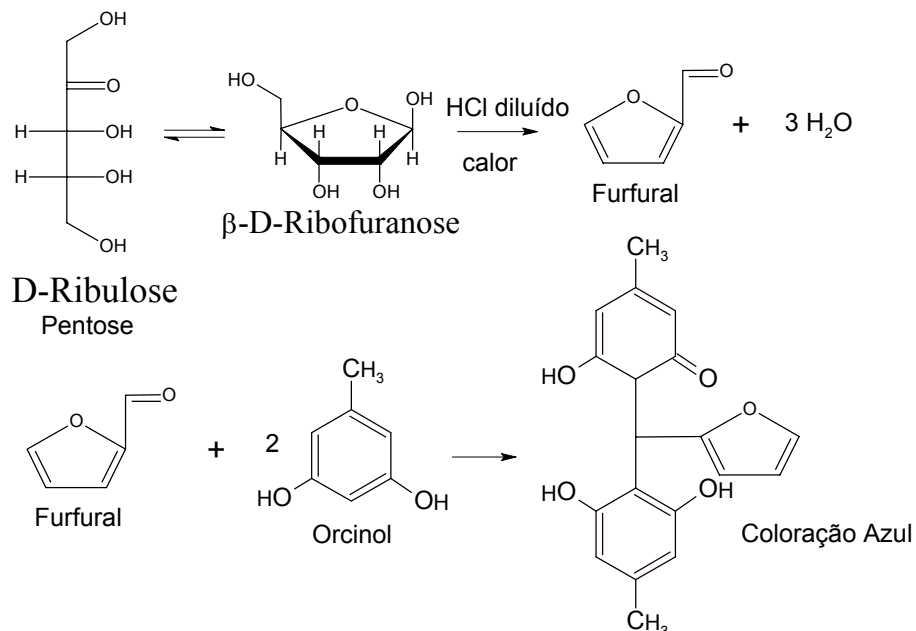
## D-Glucose

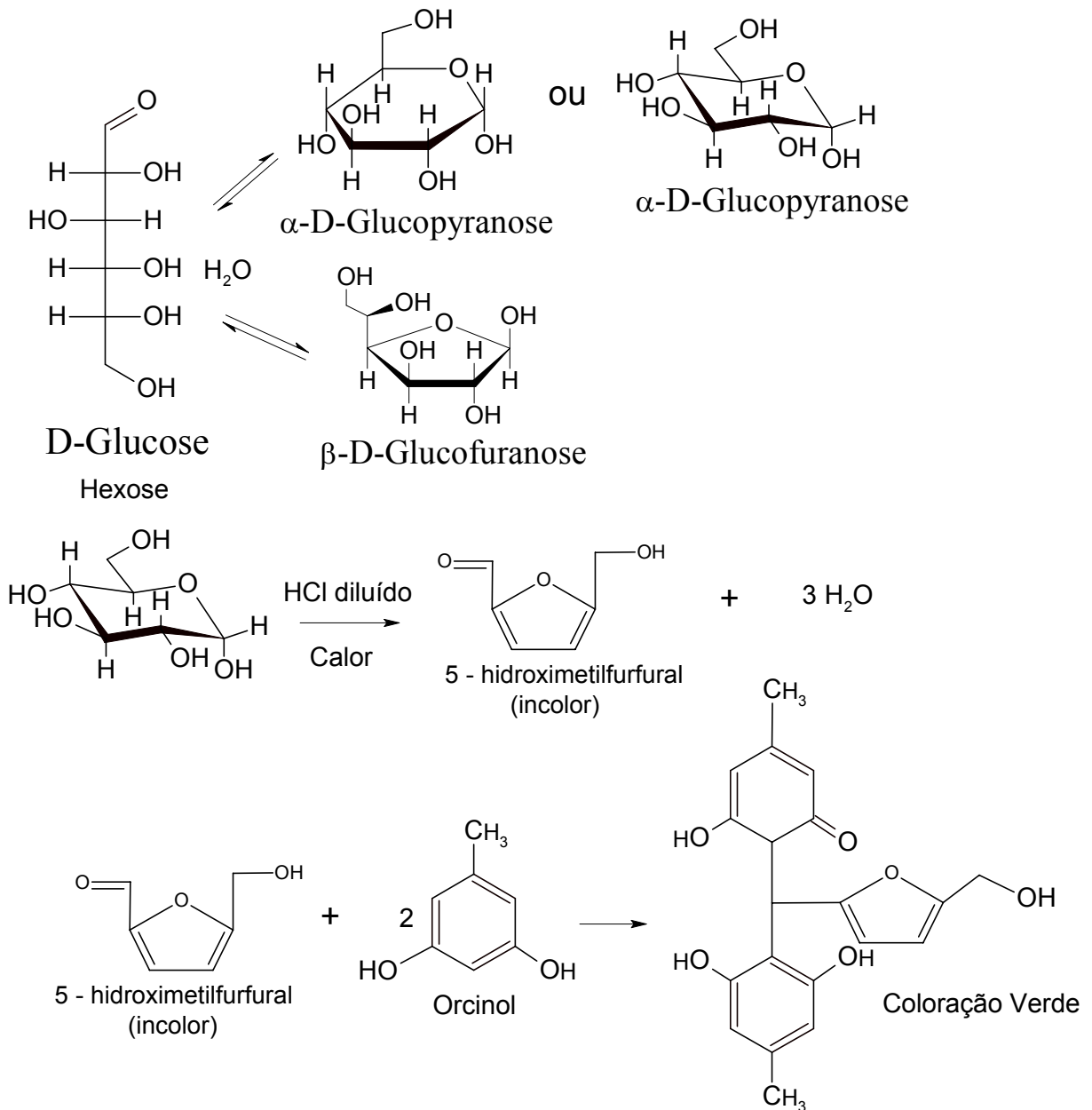
### ❖ Prova de Bial

Reativo: 10 mL de HCl concentrado sendo adicionado lentamente à 18 mL de água, e a esta mistura foi adicionado 2 mL de solução aquosa 6% de orcinol e adicionado 3 gotas de FeCl<sub>3</sub> 10%.

Em um tubo de ensaio colocar 4,5 mL de reagente de Bial e 0,5 mL de amostra. Colocar em banho-maria fervente e observar a cor por cerca de 15 minutos. Apresentado a coloração verde indica a presença de hexoses e a coloração azul indica a presença de pentoses.

Reação:





#### ❖ Prova de Seliwanoff

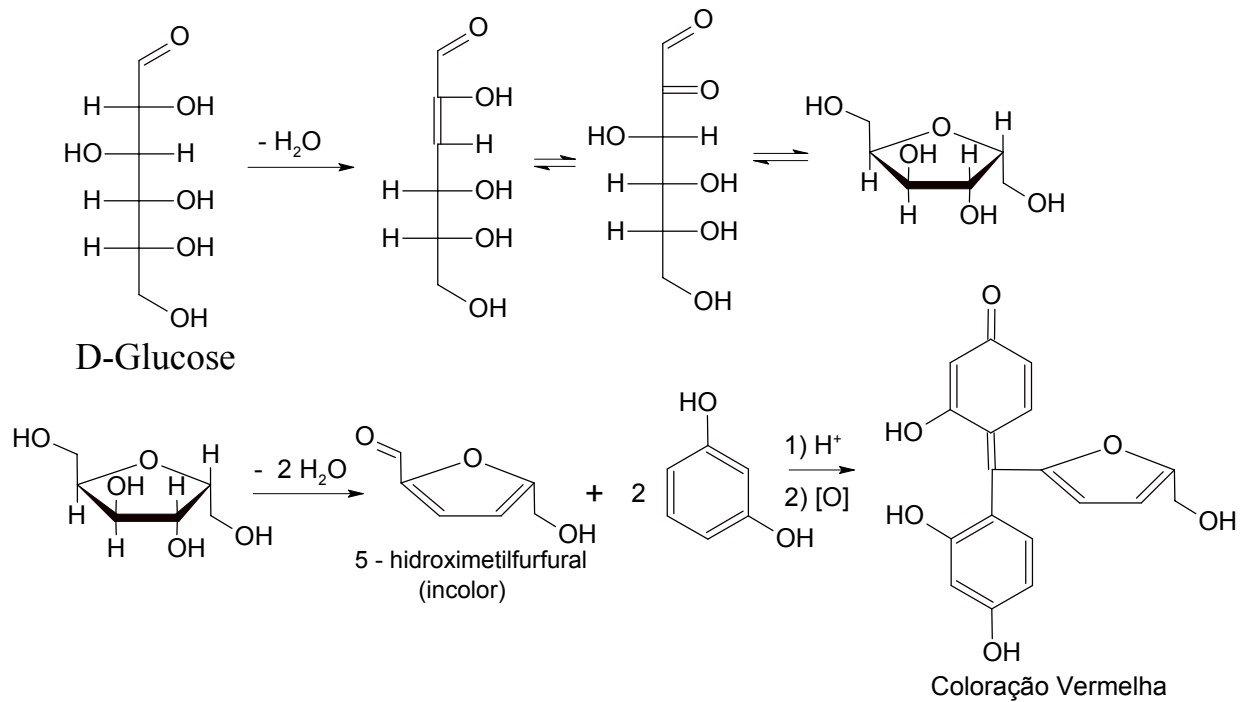
Uso na determinação de frutose.

Reativo: dissolve-se 0,05 g de resorcina em 100 mL de HCl (1:2).

Ferver prolongadamente em um tubo de ensaio, 2,5 mL de reativo de Seliwanoff aos quais se tenha adicionado 3 a 5 gotas de amostra.

Esta solução dá pelo tempo de formação de uma coloração ou precipitado vermelho em banho-maria, menor de 15 minutos indica aldose, exemplo à glicose e maior de 15 minutos indica cetose, exemplo à frutose.

Reação:

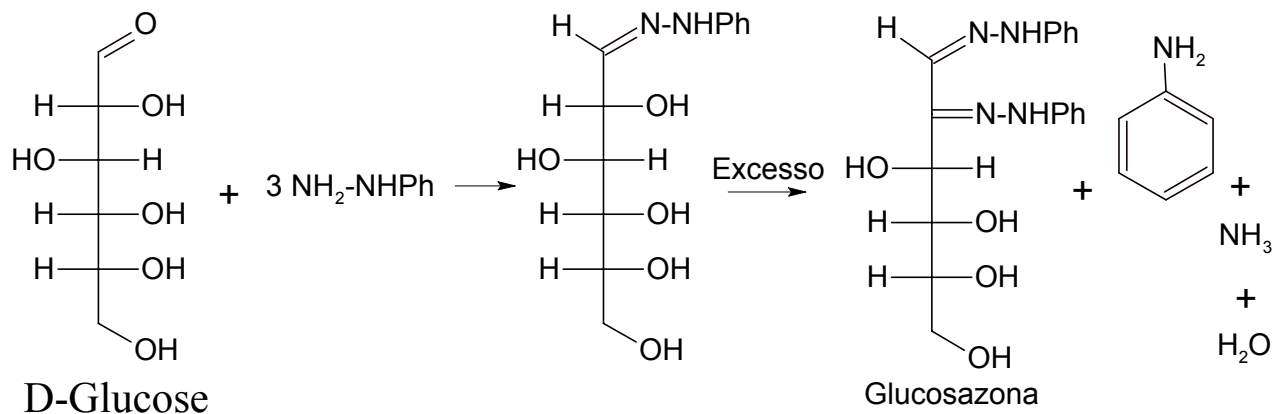


#### ❖ Síntese de Osazona

Dissolve-se 0,2 g de amostra em 4,0 mL de água num tubo de ensaio e agite cuidadosamente com 0,4 g de cloridrato de fenil-hidrazina, 0,6 g de acetato de sódio tri-hidratado (ou 0,36 g se o acetato de sódio for anidro) e 0,4 mL de solução aquosa saturada de bissulfito de sódio. Tape levemente o tubo com um para-filme e deixe em banho-maria por 30 minutos, com agitação ocasional. Adicione 5,0 mL de água destilada e resfrie em banho de gelo. Colete por filtração, lavando com água gelada. Seque o produto e determine o ponto de fusão (Ex.: glicosazona PF: 166°C, maltosazona PF: 206°C). Se necessitar, recristalize o produto em etanol 60% ou piridina diluída.

Confirmação pelo ponto de fusão, confirmando a presença de monossacarídeos.

Reação:



Os ensaios foram realizados segundo o fluxograma para ensaios de açúcares<sup>19</sup>, ilustrado na fig. 5.

### Fluxograma Parte de Ensaio para Açúcares

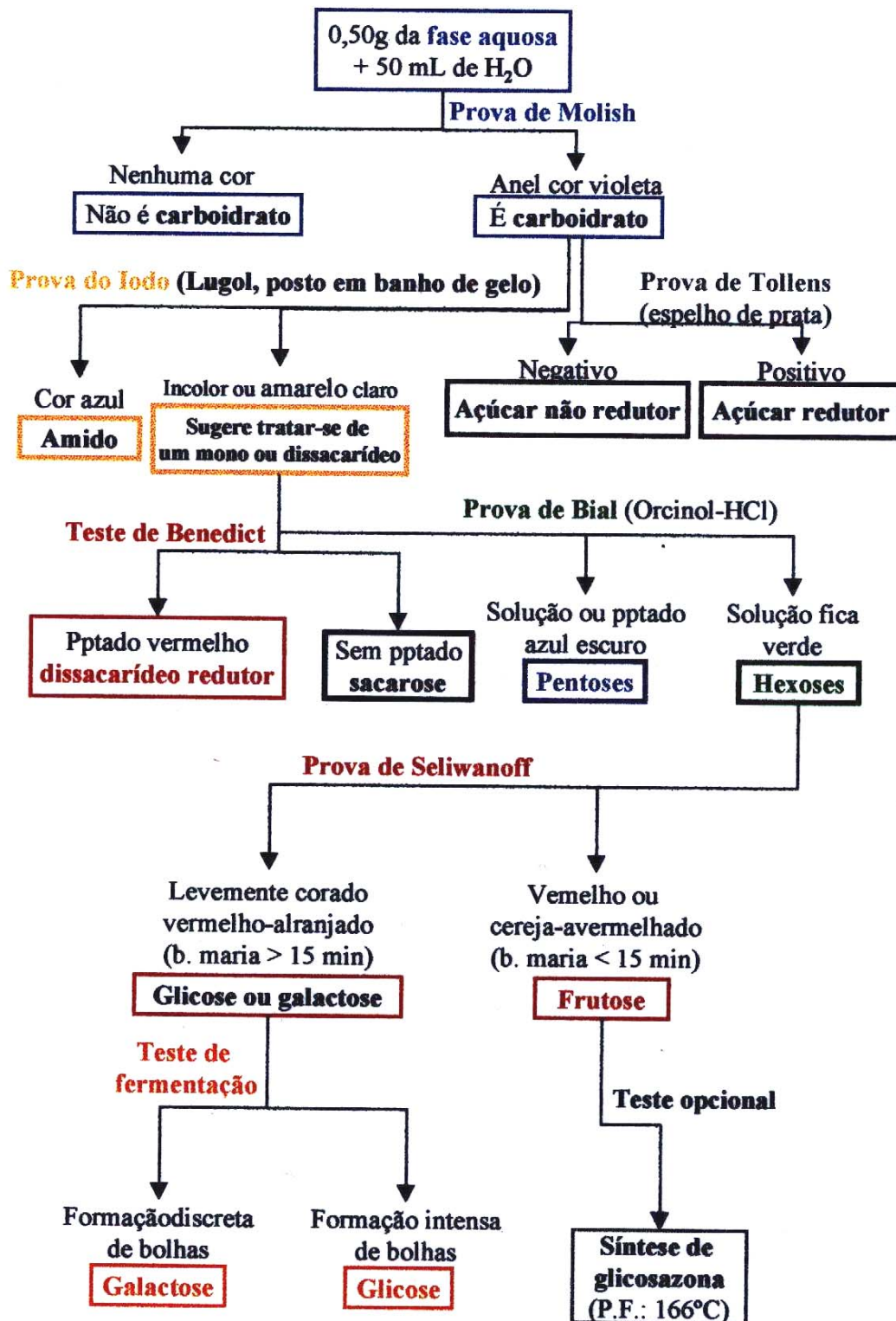


Figura 5 - Esquema do Ensaio modificado para Identificação de Açúcares na Fase Aquosa da *Tithonia diversifolia*

### 3.3. Parte III: Extração e isolamento

As folhas de *Tithonia diversifolia* coletadas no dia 28/08/2002, foram secas em estufa com circulação de ar, pesadas (387,70gr de folhas), picadas e colocadas em masceração por 15 dias em solução alcoólica (EtOH).

O extrato obtido foi concentrado em rotoevaporador, este foi submetido a extrações líquido- líquido com funil de separação, usando como solventes extratores o hexano, clorofórmio e acetado de etila. Este procedimento resultou na obtenção de 4 extratos.

O extrato em clorofórmio da *Tithonia diversifolia* foi fracionado em coluna de sílica gel (TDA) 2,5 cm de diâmetro por 25,0 cm de altura de sílica; as colunas TDA<sub>1</sub>, TDA<sub>2</sub> e TDA<sub>3</sub> de 1,0 cm de diâmetro e 10 cm de altura de sílica gel.

As amostra analisadas no Espectrofotômetro de Infra-Vermelho (Modelo: IV-Perkin Elmer FTIR – 16 PC) em filme.

As análises em RMN H<sup>1</sup> 200 MKz e C<sup>13</sup> 50 MHz (Modelo: Bruker AC 200 MHz).

Condições de análise do Cromatógrafo a Gás (Modelo: Shimadzu CG-14B)

- Tempo de análise: 0-50 min
- Programação de temperatura: 10°C/min
- Temperatura da coluna: 60-295°C
- Temperatura do detector: 235°C
- Temperatura do injetor: 235°C
- Tipo de Coluna: 5% fenil – 95% metilsilicone
- Comprimento da coluna: 30 metros
- Solvente utilizado: diclorometano e acetona para as amostras.

Este procedimento experimental seguindo o fluxograma mostrado na fig. 6.

### Fluxograma da Parte Experimental

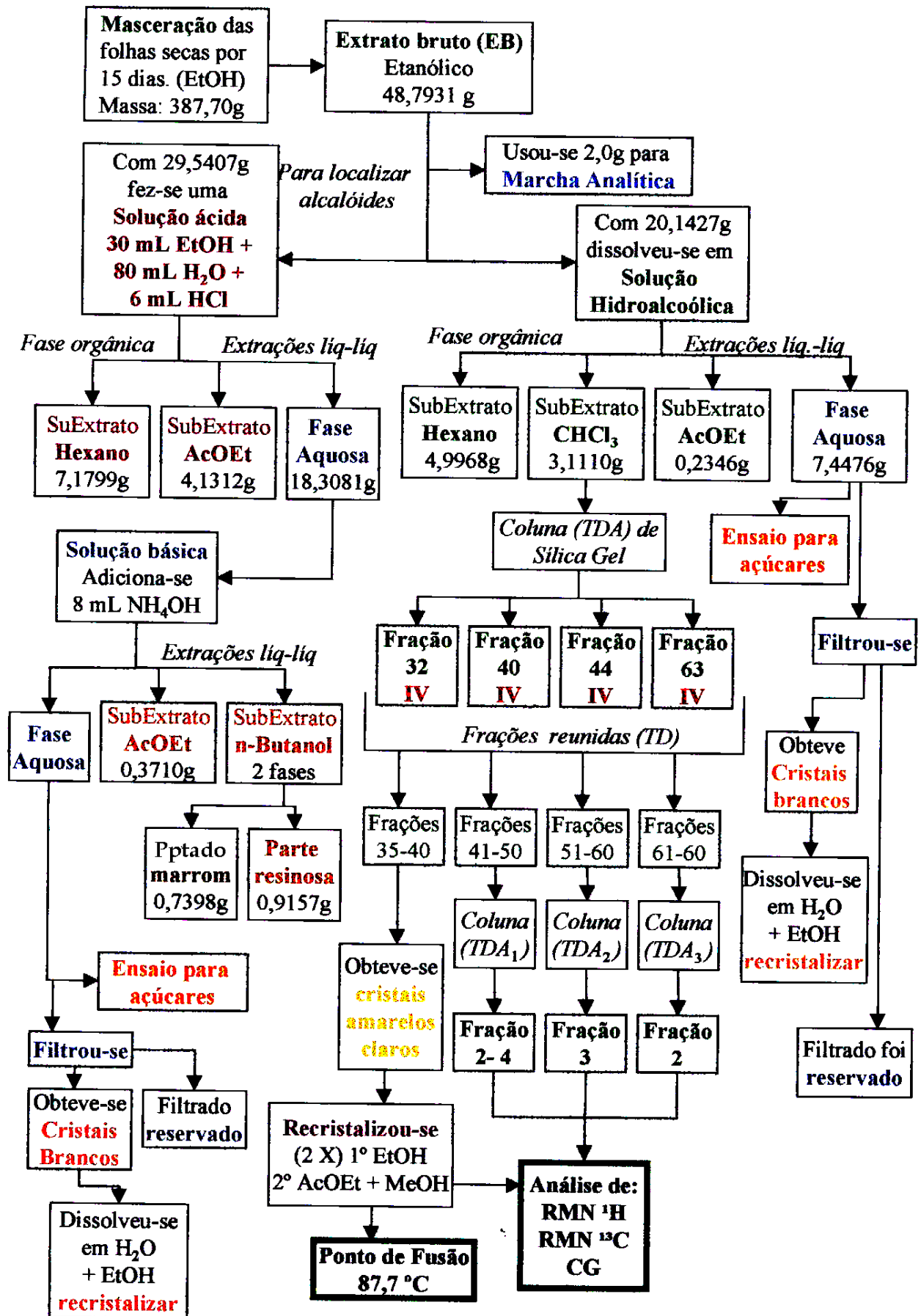


Figura 6 - Esquema do processo experimental feito com a *Tithonia diversifolia*

### 3.4. Parte IV: *Obtenção e Análise do Óleo Essencial*

O óleo essencial obtido por hidrodestilação a partir de 521,3 g de flores (pétalas + miolo), coletadas em 26/ 05/ 2002.

O óleo essencial obtido foi analisado por CG nas condições:

Análise de Cromatógrafo a Gás (Modelo: Shimadzu CG-14B)

- Tempo de análise: 0-60 min
- Programação de temperatura: 5°C/min
- Temperatura da coluna: 40-290°C
- Temperatura do detector: 235°C
- Temperatura do injetor: 235°C
- Tipo de Coluna: 5% fenil – 95% metilsilicone
- Comprimento da coluna: 30 metros
- Solvente utilizado: diclorometano

Pode-se visualizar no fluxograma de Obtenção de Óleo essencial, ilustrado a seguir na fig.

9.



## Fluxograma Obtenção do Óleo Essencial



Figura 7 - Flor da *Tithonia diversifolia* (figura retirada da pág. <http://www.hear.org.pier/tidiv.html>.)

Foram coletadas  
521,285g de  
flor (pétalas +  
miolo)

Extraindo-se o óleo  
através de  
Clevenger

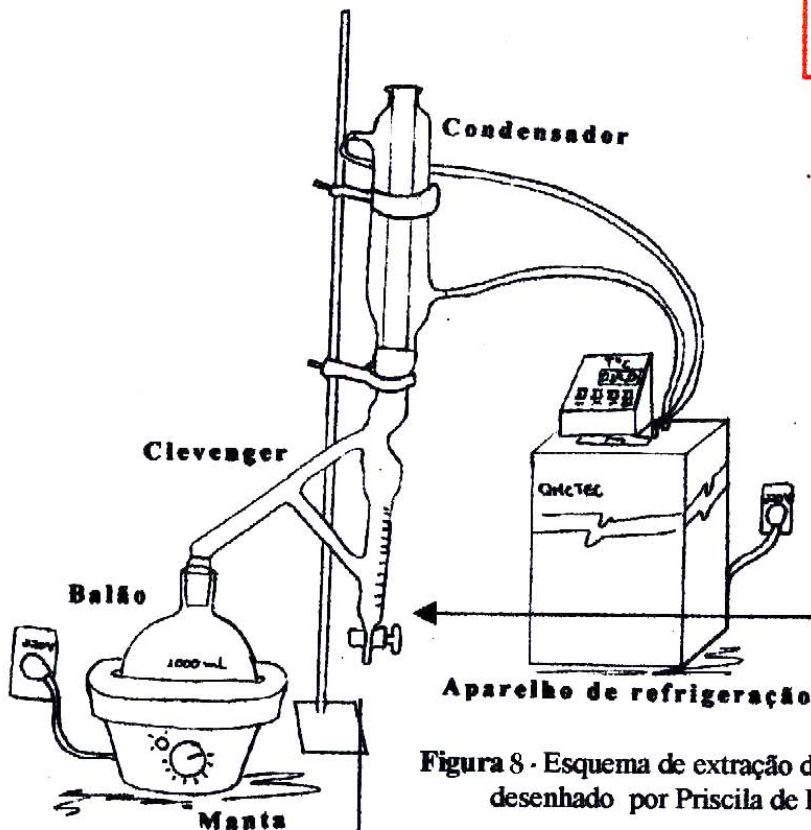


Figura 8 - Esquema de extração do óleo essencial desenhado por Priscila de Bem Silva.

Óleo Essencial  
0,3 mL (0,06% de rendimento)

Análise por:  
CG

Figura 9 - Esquema para a Extração do Óleo Essencial das flores de *Tithonia diversifolia*.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto coletado, obtido através da maceração com etanol das folhas de *Tithonia diversifolia*, antes de ser particionado em frações líquido-líquido (hexano, clorofórmio e acetato de etila), foi realizado uma marcha analítica e realizado o teste com acidificação do meio para a identificação alcalóides. E do particionamento foram analisados os subextrato de clorofórmio, através deste procedeu-se o fracionamento em colunas de sílica gel para o isolamento dos constituintes ativos e a fase aquosa para suposta identificação de açúcares.

A planta em questão produz flores que foram analisadas, através do seu óleo essencial em um cromatógrafo a gás.

##### 4.1. Parte I: *Marcha Analítica*

A tabela abaixo, apresenta os resultados da marcha analítica da planta.

Classe de compostos		Positivo	Negativo
Cumarinas			X
Sesquiterpenos-lactonas		X	
Ácidos Orgânicos		X	
Fenóis		X	
Taninos	FeCl <sub>3</sub> 1%	X	
	Gelatina 1%	X	
Alcalóides (resíduo aquoso D)	Meyer		X
	Dragendorff		X
	Beltrand		X
Alcalóides (resíduo CHCl <sub>3</sub> C)	Meyer		X
	Dragendorff		X
	Beltrand		X
Esteróides (resíduo CHCl <sub>3</sub> C)			X
Flavonóides (resíduo aquoso F)		X	
Leucoantocianidinas (resíduo aquoso F)		X	
Flavonóides Glicosídeos (resíduo E)			X
Leucoantocianidinas (resíduo E)		X	
Glicosídeos esteróidais e triterpênicos (resíduo E)		X	
Alcalóides (resíduo E)	Meyer		X
Fitoesteróis (celite A)	Liebermann-Buchard	X	
	Resenheim	X	

**Tabela 1** – Grupos Funcionais. Referência bibliográfica n.º 17,18 e 20.

De acordo com os resultados obtidos a presença de sesquiterpenos-lactonas confere com o existente na literatura.

#### **4.2. Parte II: Ensaio para identificar açúcares.**

As duas fases aquosas obtidas de todo o processo experimental (a fase acidificada em seguida basificada e a fase aquosa particionada, ilustrado no fluxograma da fig. 6), deram os mesmos resultados nos ensaios para açúcares, sendo assim apresentou característica de carboidratos da classe das cetoexoses (positivo para possível presença de Frutose) isto se confirma com a síntese da osazona, onde o seu derivado a glicosazona que possui P.F. 166°C, a fase aquosa normas apresentou PF 165,3°C e a fase aquosa que passou pelo processo de extração ácido – base apresentou PF 161,3°C, juntamente com a observação de coloração verde, na prova de Bial<sup>20</sup>, refere-se a presença de hexoses.

A observação de açúcares redutores pela prova de Tollens<sup>20</sup> (aparecendo o espelho de prata no vidro) e teste de Benedict<sup>20</sup>, apresentado pelo precipitado vermelho, são indicadores de mono ou dissacarídeos redutores; no teste de fermentação não apresentou nenhuma formação de bolhas.

Estes dados nos leva que a fase aquosa se trata de uma mistura, possuindo carboidratos na sua composição.

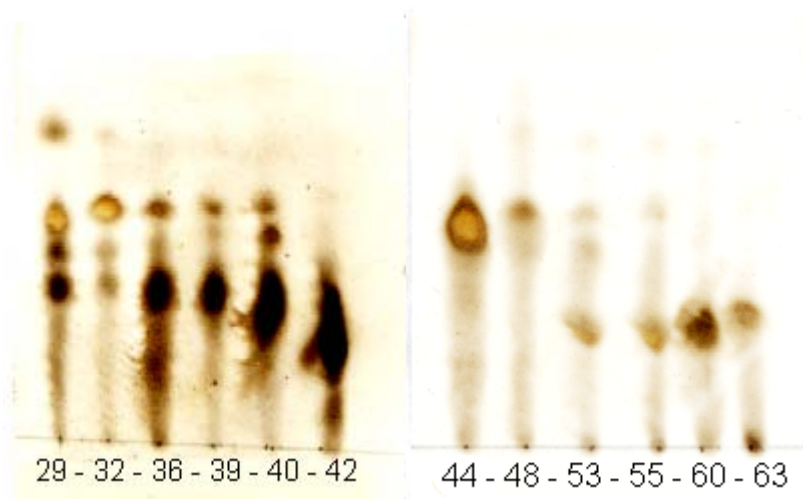
#### **4.3. Parte III: Extração e isolamento**

Os extratos obtidos por processo de extração líq – líq com ácido e base processo feito, principalmente para identificar presença de alcalóides, através de CCD visualizada com reagentes específicos para alcalóides: Reagente Dragendorff<sup>21</sup> e Reagente Iodo 5% e Iodeto de Potássio 10%<sup>21</sup>.

Estes testes foram negativos para alcalóides.

Seguindo o fluxograma da fig. 6, obtivemos o fracionamento com a purificação de algumas frações como mostrado pelas CCD ilustradas na fig. 10.

Coluna TDA:



**Figura 10** - Placas de cromatografia de camada delgada (Tipo: DC – Alufolien Kieselgel 60 – ohne fluoreszenzinkikator – 25 folien 20 x 20 cm – Schichtdicke 0,2 mm. No qual todas as placas foram feitas)

Dados:

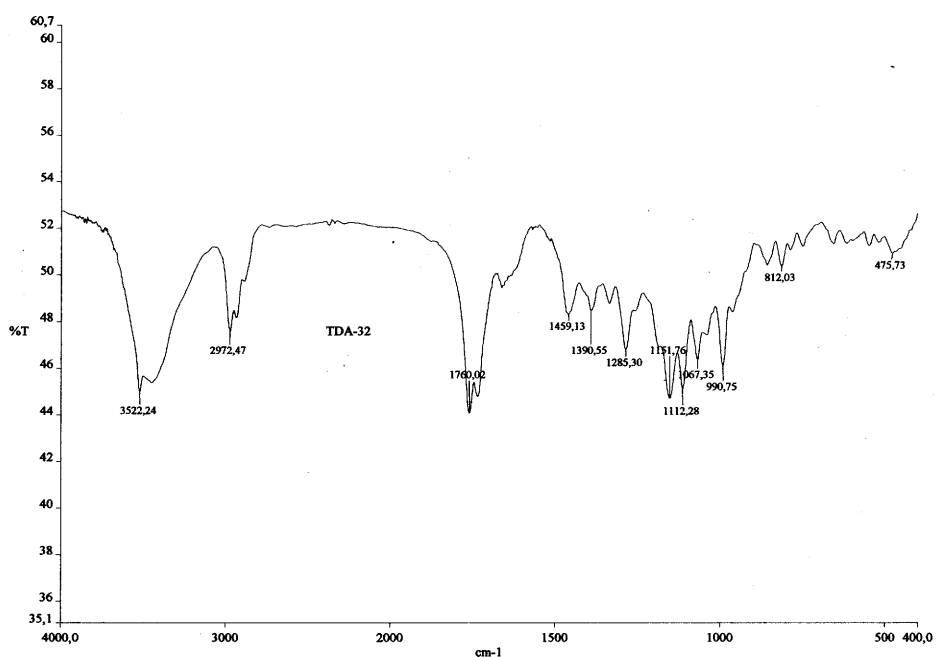
**Eluente:** 70% Hex : 30% AcOEt

**Revelador:** solução de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$  2N

As frações TDA existentes nas placas acima foram escolhidas para analisar no IV:

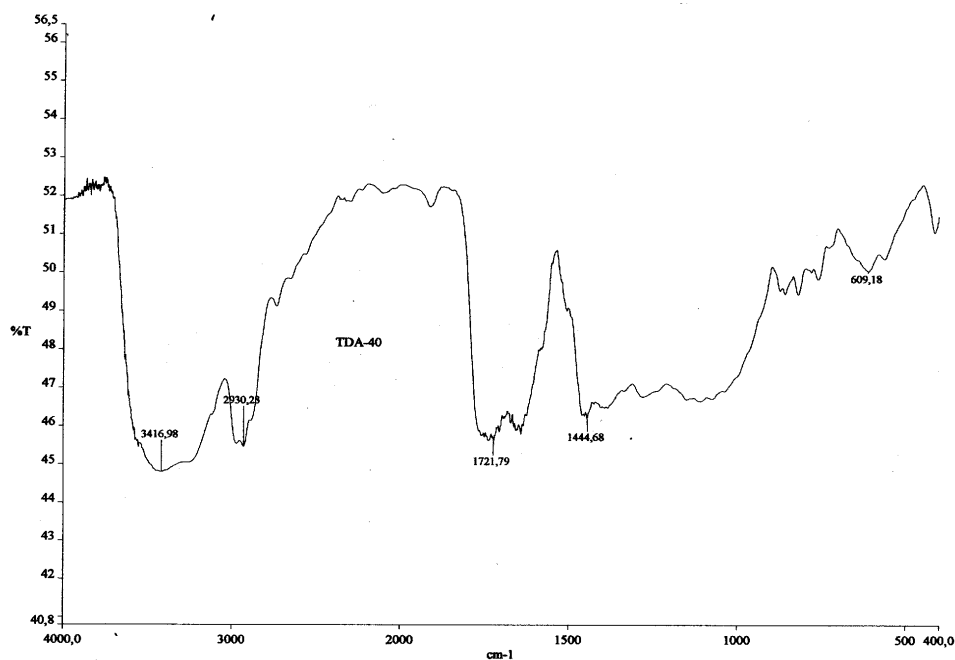
32 – 40 – 44 – 63.

Com as análises do espectro de infra-vermelho (IV) dos compostos acima, nota-se as absorções que identificam os principais grupos funcionais presentes nos compostos, pode-se observar abaixo e foram interpretados da seguinte forma:



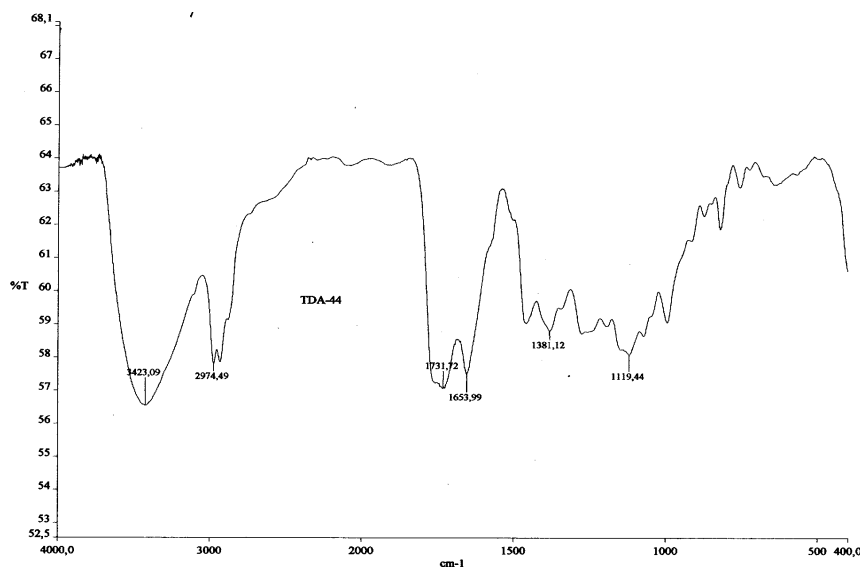
**Figura 11** – Espectro de Infra-vermelho em filme da fração TDA 32.

$\nu_{s(\text{OH})} = 3522,24 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{s(\text{CH})} = 2972,47 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{s(\text{C=O})} = 1760,02 \text{ cm}^{-1}$  e  $\delta_{as(\text{C-O})} = 1112,28 \text{ cm}^{-1}$  e  $1151,76 \text{ cm}^{-1}$ .



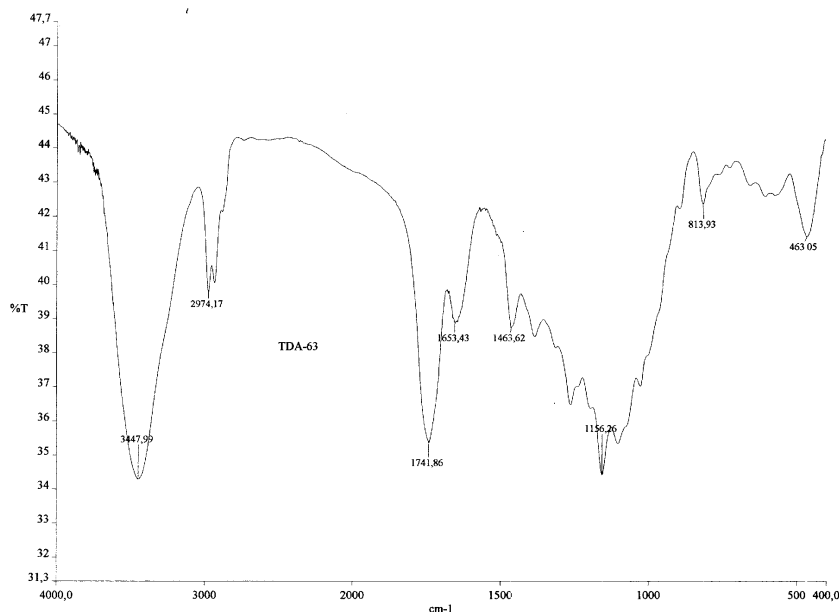
**Figura 12** – Espectro de Infra-vermelho em filme da fração TDA – 40.

$\nu_{s(\text{OH})} = 3416,98 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{s(\text{C=O})} = 1721,79 \text{ cm}^{-1}$



**Figura 13** – Espectro de Infra-vermelho em filme da fração TDA – 44.

$\nu_{s(\text{OH})} = 3423,09 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{s(\text{CH})} = 2974,49 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta_{as(\text{C-O})} = 1119,44 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{s(\text{C=O})} = 1731,72 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 14** – Espectro de Infra-vermelho em filme da fração TDA – 63.

$\nu_{s(OH)} = 3447,99 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{s(CH)} = 2974,17 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{s(C=O)} = 1741,86 \text{ cm}^{-1}$  e  $\delta_{as(C-O)} = 1156,26 \text{ cm}^{-1}$ .

Em seguida as frações semelhantes na CCD foram reunidas.

**Eluente:** 50% Hex : 50% AcOEt

**Frações TD:** ( / significa reunião)

1 – 9/12

2 – 13/18

3 – 19

4 – 20/21

5 – 22/24

6 – 25/34

7 – **35/40**

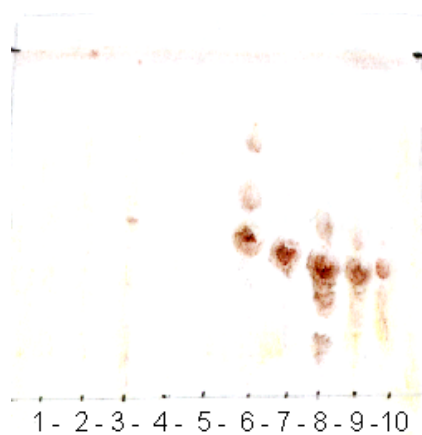
8 – 41/43

9 – 44/47

10 – 48/50

Reunir TD – **41/50**

**Revelador :** solução de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 2N}$



**Figura 15** - Placa de cromatografia de camada delgada.

**Eluente:** 50% Hex : 50% AcOEt

**Frações TD:** ( / significa reunião)

1 – 48/50

2 – 51/53 Reunir TD – **51/60**

3 – 54/60

4 – **61/66**

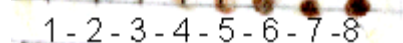
5 – 67/69

6 – 70/73

7 – 74/78

8 – 79/80

**Revelado:** solução de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 2N}$

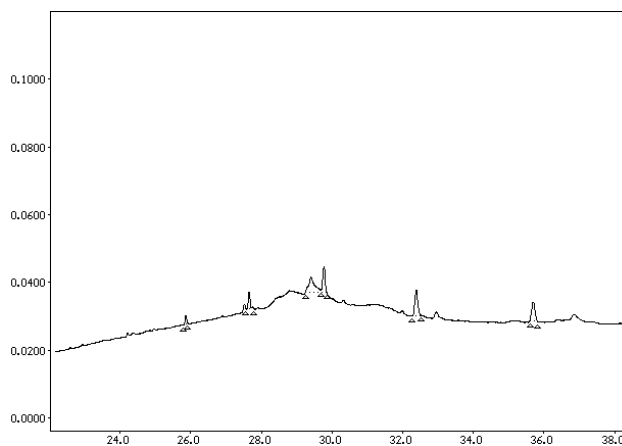


**Figura 16** - Placa de cromatografia de camada delgada.

As frações destacadas em vermelho foram escolhidas para serem estudadas.

A fração TD – 35/40 formou cristais, onde foram separados do sobrenadante e recristalizados duas vezes. Em seguida feitas as análises.

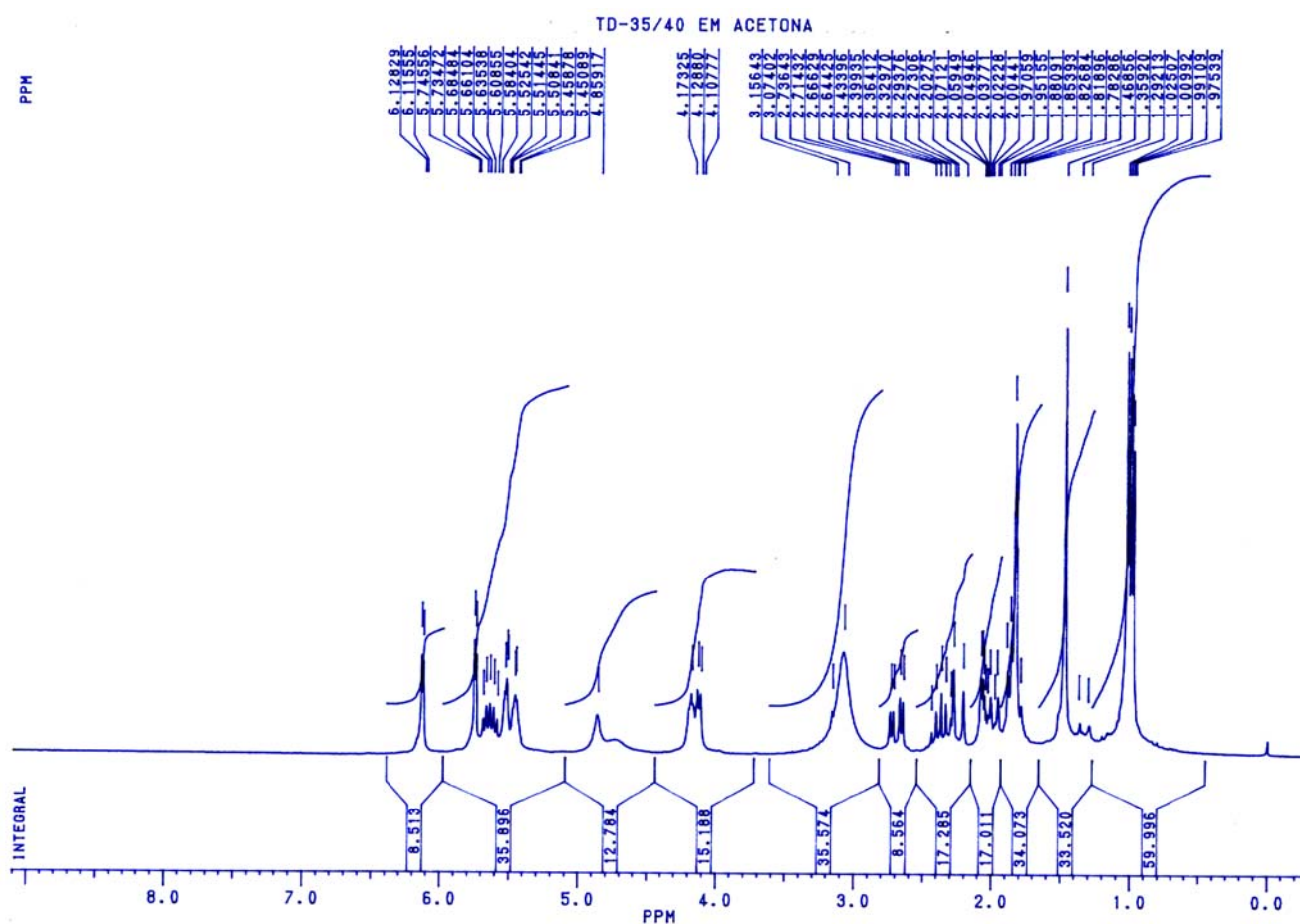
#### **Amostra TD 35/40**



**Figura 17** – Cromatografia a gás da fração TD 35/40

Como se pode observar pela CCD e pelo espectro de  $^{13}\text{C}$ , a fração TD 35/40, está pura. Não encontramos dados de  $^{13}\text{C}$  na literatura de *Tithonia diversifolia* compatíveis a de nossa amostra, indicando ser possivelmente um composto novo para a espécie.

A fórmula molecular deduzida pelo RMN  $^{13}\text{C}$  é  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6$ , porém faltou o EM para confirmar fórmula mínima exata, será necessário a realização de outras análises do tipo COSY, HECTOR, etc... e uma pesquisa mais ampla na literatura de sesquiterpenos para a caracterização estrutural destes compostos isolados.



**Figura 18** – RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da fração TD – 35/40 em acetona.

$\delta_{\text{H}}$	n° H	J Hz
0,98	3 d	3,00
1,01	3 d	3,14
1,47	3 s	
1,82	4 m	
2,00	1 d	10,5
2,20	1 m	
2,24	1 d	14,0
2,30	1 q	6,80
2,27	1 dd	14,0
3,00	2 (OH)	
4,12	1 dd	4,20
4,17	1 m	
4,86	OH	
5,46	1 m	
5,51	1 m	
5,63	1 q	4,70
5,74	1 d	2,50
6,12	1 d	2,50

**Tabela 2** – RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da fração TD 35/40



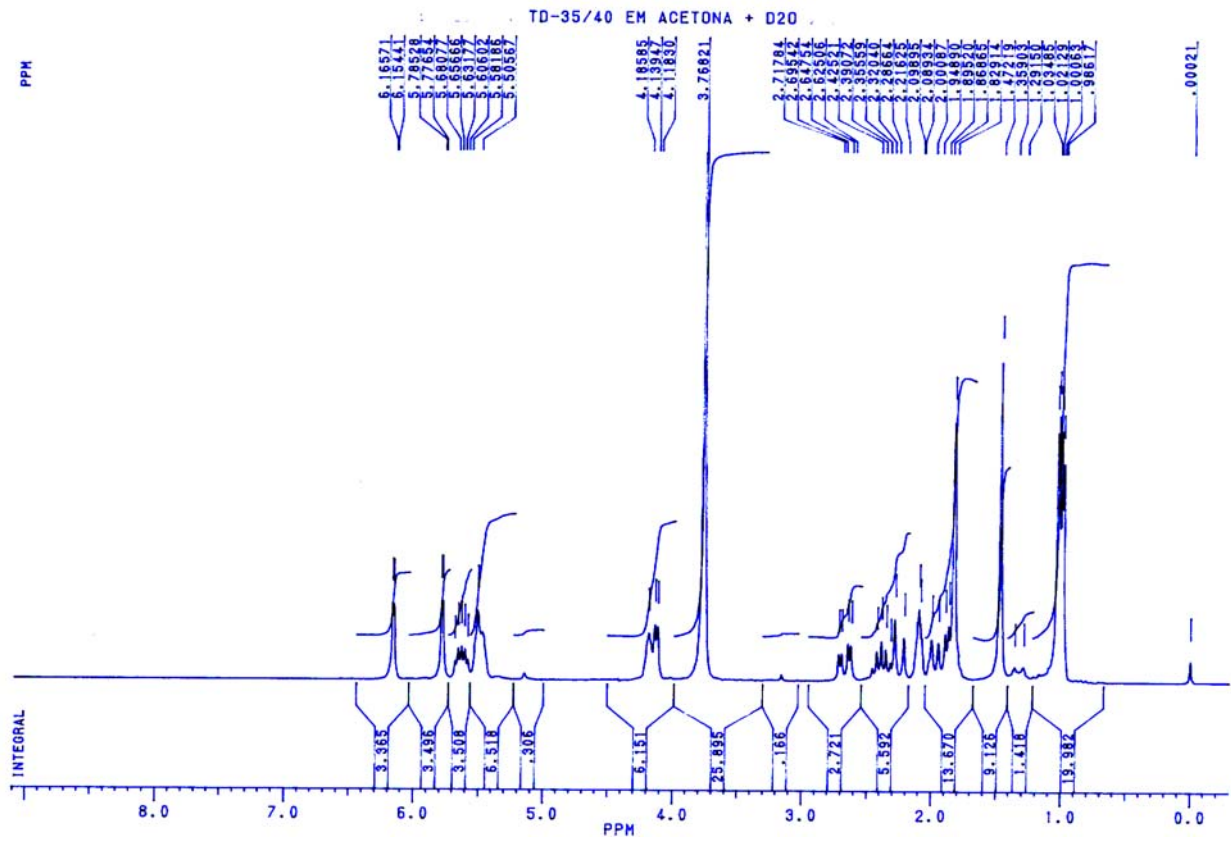


Figura 19 – RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da fração TD – 35/40 em acetona +  $\text{D}_2\text{O}$ .

Através deste espectro pode-se visualizar onde estão as águas (OH).

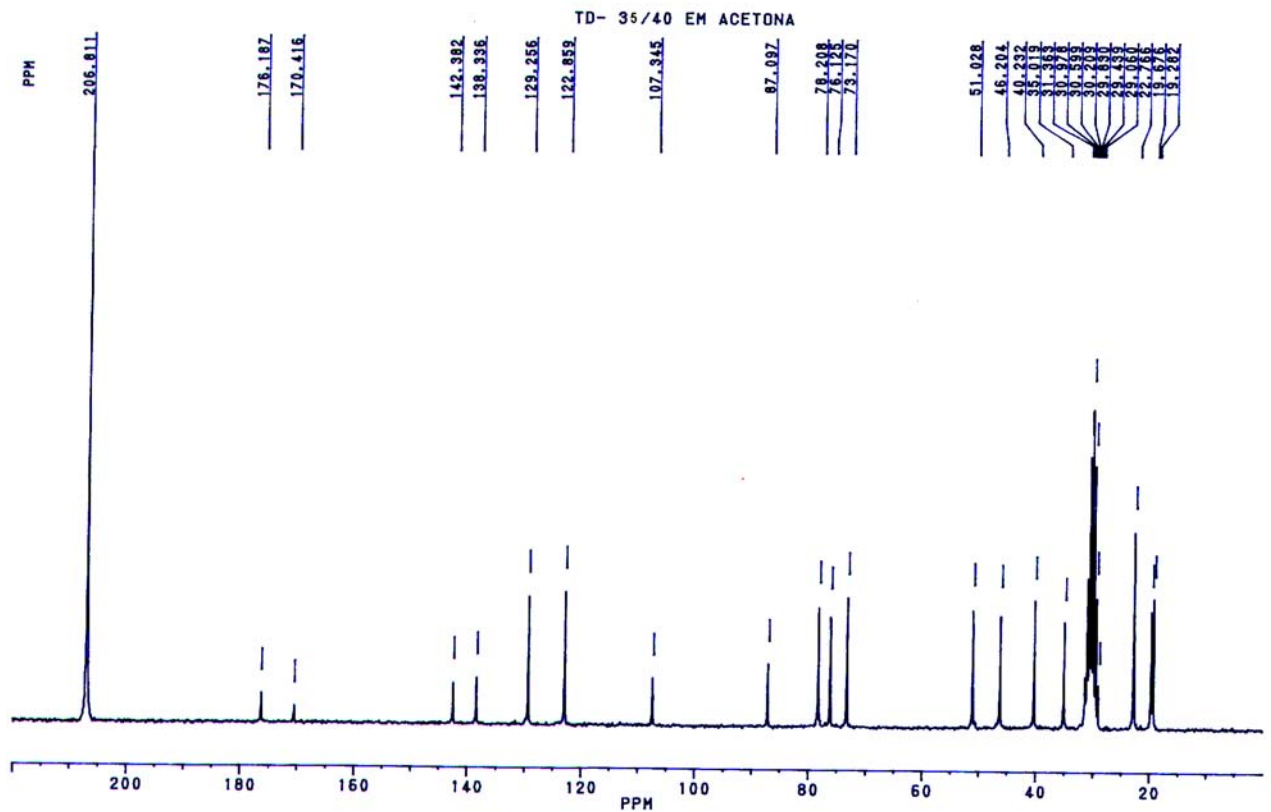


Figura 20 – RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) da fração TD 35/40 em acetona

$\delta_c$	
19.5	CH <sub>3</sub>
19.7	CH <sub>3</sub>
22.8	CH <sub>3</sub>
32.0	CH
40.2	CH <sub>2</sub>
46.2	CH <sub>2</sub>
51.0	CH <sub>3</sub>
73.1	CH
76.1	CH
78.2	CH
87.1	C
107.3	C
122.9	CH <sub>2</sub>
129.2	CH
138.3	C
142.4	C
170.4	C
176.2	C

**Tabela 3** – RMN <sup>13</sup>C (50 MHz) da fração TD 35/40

As outras amostras escolhidas, fez-se uma coluna para cada uma como resultados as que destacaram-se:

- Coluna A<sub>1</sub> com fração TD – 41/50 (TDA<sub>1</sub> – 2/4)
- Coluna A<sub>2</sub> com fração TD – 51/60 (TDA<sub>2</sub> – 3)
- Coluna A<sub>3</sub> com fração TD – 61/66 (TDA<sub>3</sub> – 2)



**Eleuente:** 50%AcOEt: 50%Hex.

**Frações:**

**1 – TDA<sub>1</sub> – 2/4**

2 - TDA<sub>1</sub> – 5/6

3 - TDA<sub>1</sub> – 16

**4 – TDA<sub>2</sub> – 3**

5 – TDA<sub>2</sub> – 4

6 – TDA<sub>3</sub> – 1

**7 – TDA<sub>3</sub> – 2**

8 – TDA<sub>3</sub> – 3

**Revelador Iodo**

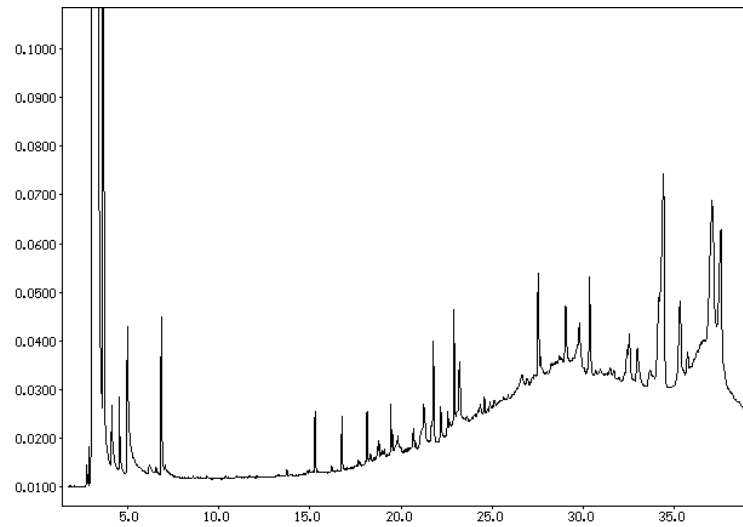
**Revelado** Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> . 2N

**Figura 21** - Placas de cromatografia de camada delgada

Como pode-se observar na CCD da fig. 21 as amostra 1, 4 e 7 reveladas mostraram manchas significativas de difícil separação, por possuírem características parecidas, sendo que na amostra 1 apresenta 1 mancha mas possuindo 2 cores, na amostra 4 e 7 apenas 1 cor.

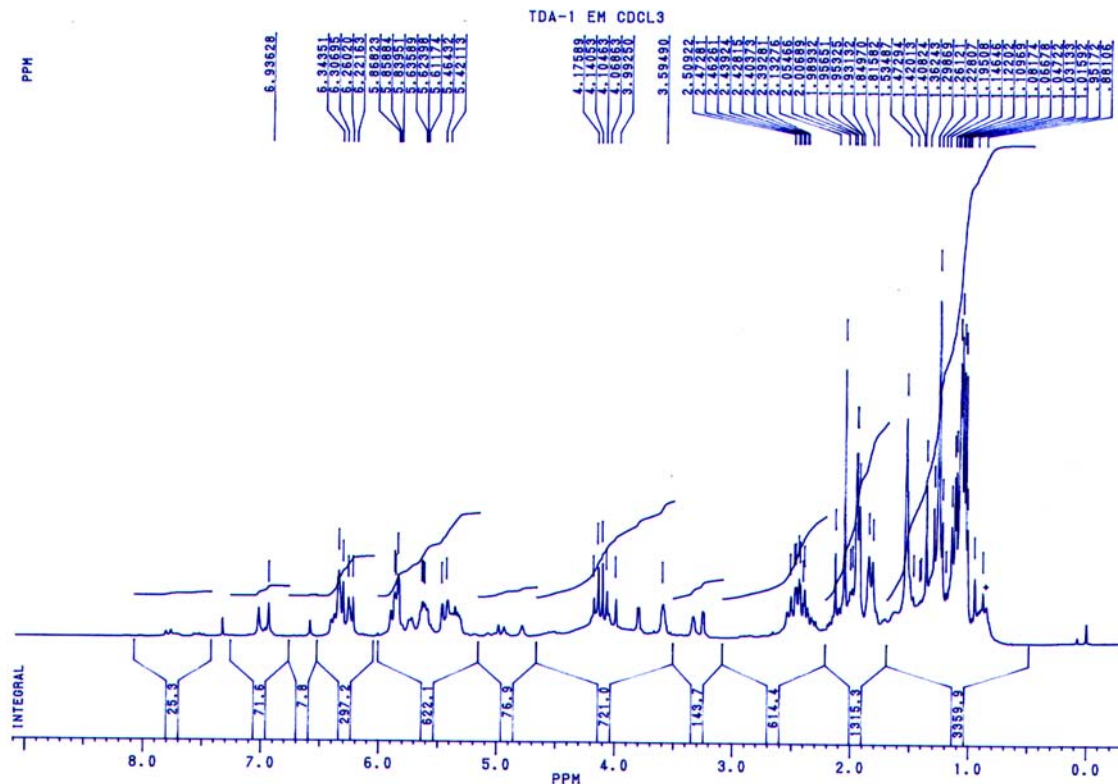
Estas amostras foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e CG.

#### Amostra TDA<sub>1</sub> – 2/4



**Figura 22** – CG da fração TDA<sub>1</sub> – 2/4 em diclorometano.

O cromatograma da fig. 22 mostra que a fração TDA<sub>1</sub>, tem composição complexa. Desta forma os espectros  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Também apresentam uma complexidade de sinais, porém, comparado com os dados da literatura para *Tithonia diversifolia*, podemos dizer que se trata de uma mistura de sesquiterpenos, pois estão na área correspondente, devido ao tempo de retenção (20 a 35 min).



**Figura 23** – RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da fração TDA<sub>1</sub> – 2/4 em  $\text{CDCl}_3$ .

**OBS:** O sinal de (+) no início do espectro indica que há mais picos no qual o aparelho não pode indicar por falta de espaço. Sendo que já existe um número grande de picos.

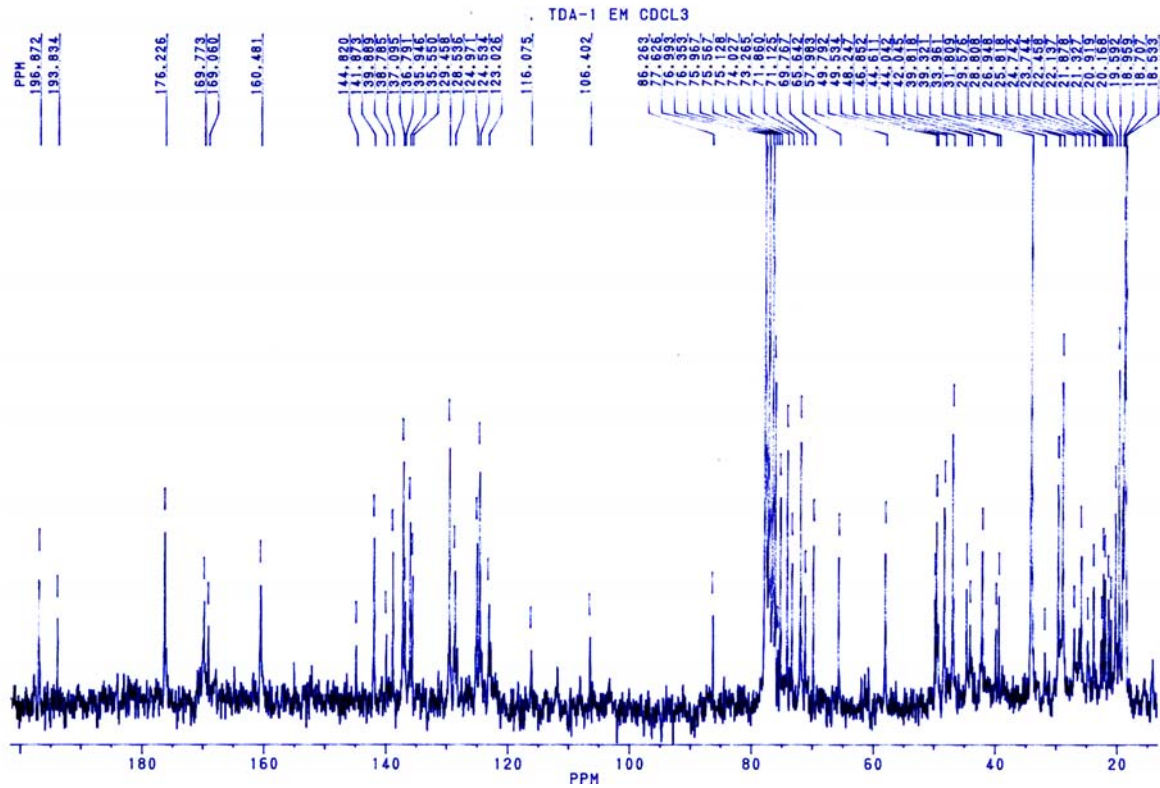


Figura 24 – RMN <sup>13</sup>C 50 MHz da fração TDA<sub>1</sub> – 2/4 em CDCl<sub>3</sub>

### Amostra TDA<sub>2-3</sub>

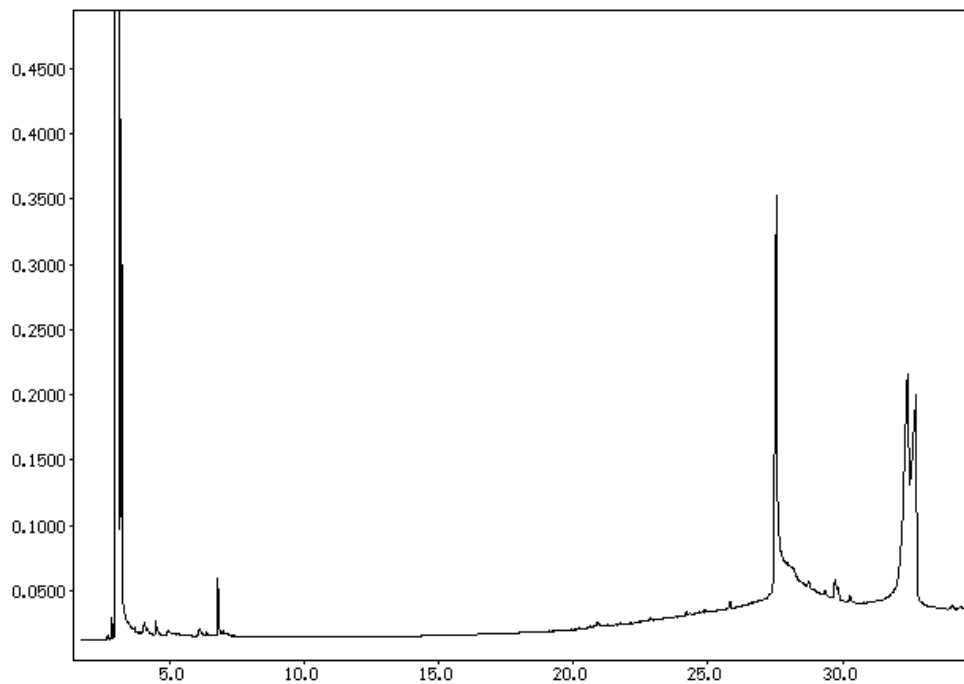


Figura 25 – CG da fração TDA<sub>2</sub> – 3 em Acetona

A fração TDA<sub>2</sub>, como mostra o cromatograma da fig. 25, é uma mistura  $\cong 3$  de sesquiterpenos (compostos com 15 carbonos) devino ao número de carbonos existentes no espectro, que podem ser confirmados pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H 200 MHz e <sup>13</sup>C 50 MHz das fig. 26 e 27 e confere com os dados da literatura<sup>22,24</sup>.

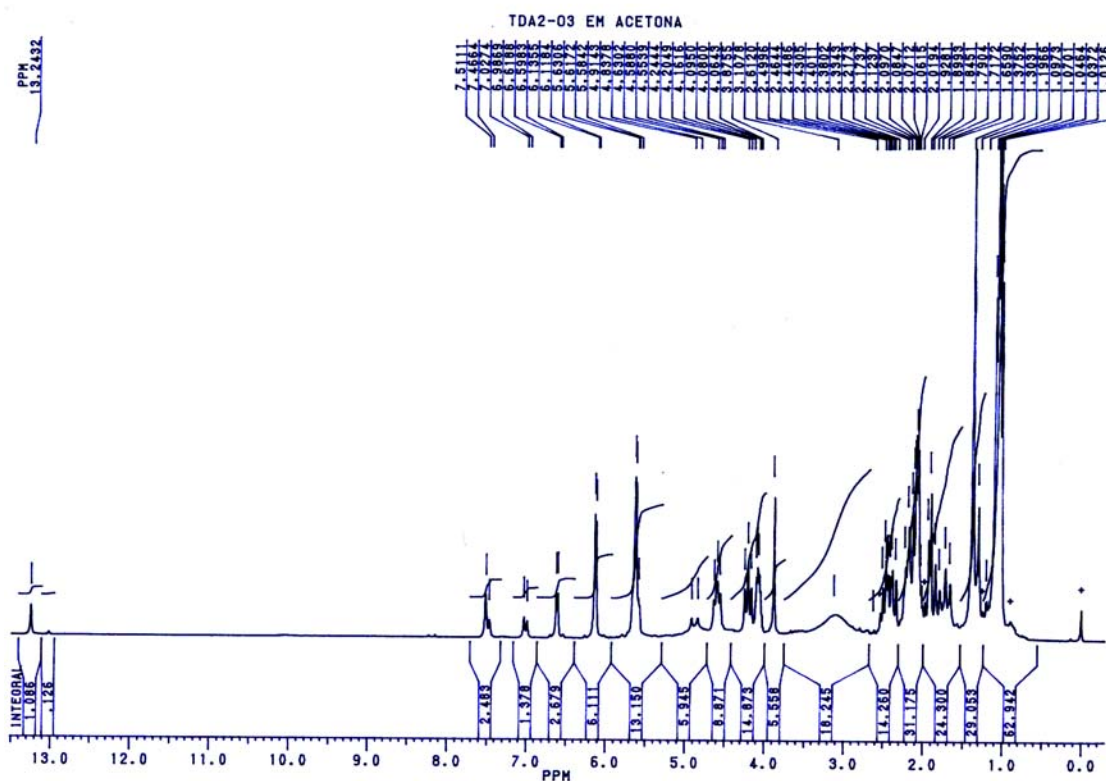


Figura 26 – RMN <sup>1</sup>H 200 MHz da fração TDA<sub>2</sub> – 3 em Acetona deuterada.

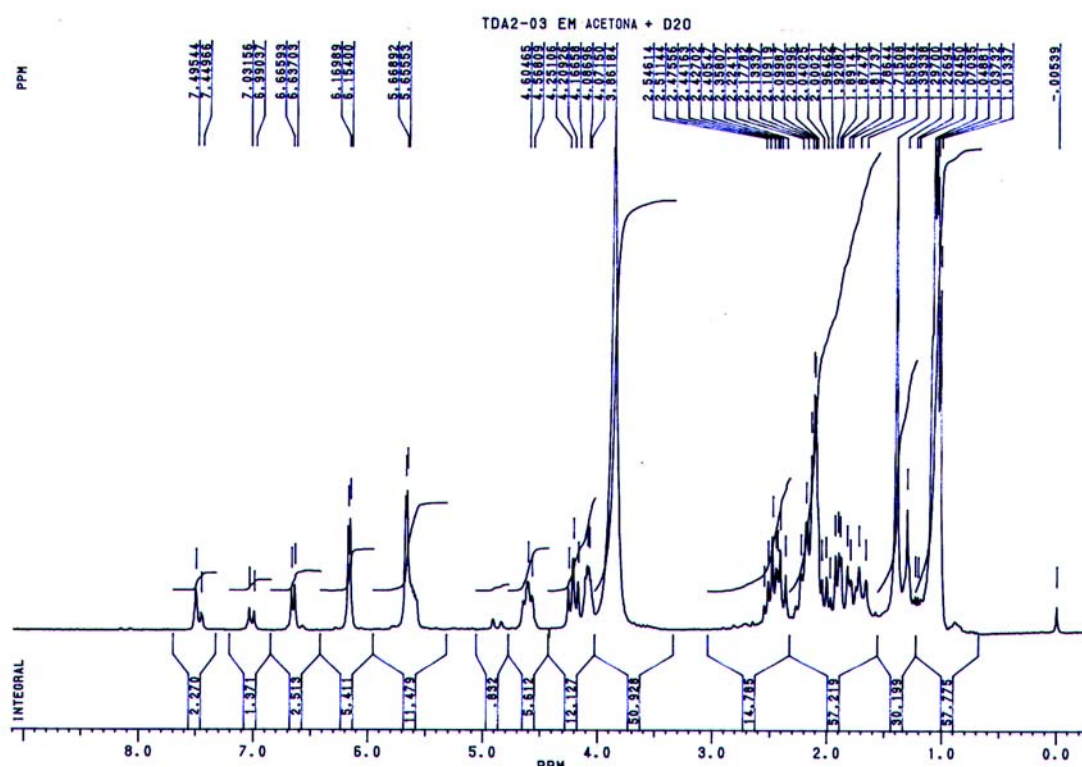


Figura 27 – RMN <sup>1</sup>H 200 MHz da fração TDA<sub>2</sub> – 3 em Acetona deuterada + D<sub>2</sub>O

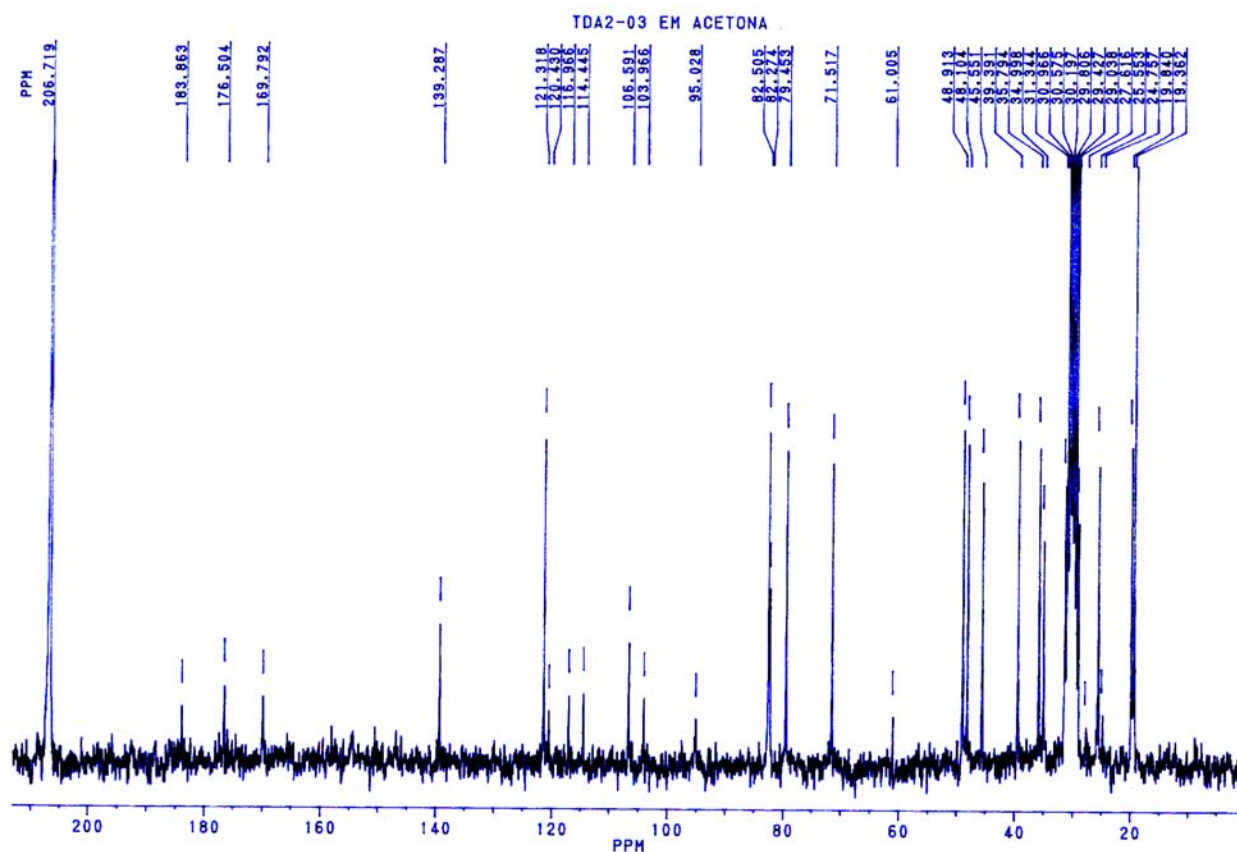


Figura 28– RMN  $^{13}\text{C}$  50 MHz da fração TDA<sub>2</sub> – 3 em Acetona deuterada

### Amostra TDA<sub>3</sub> – 2

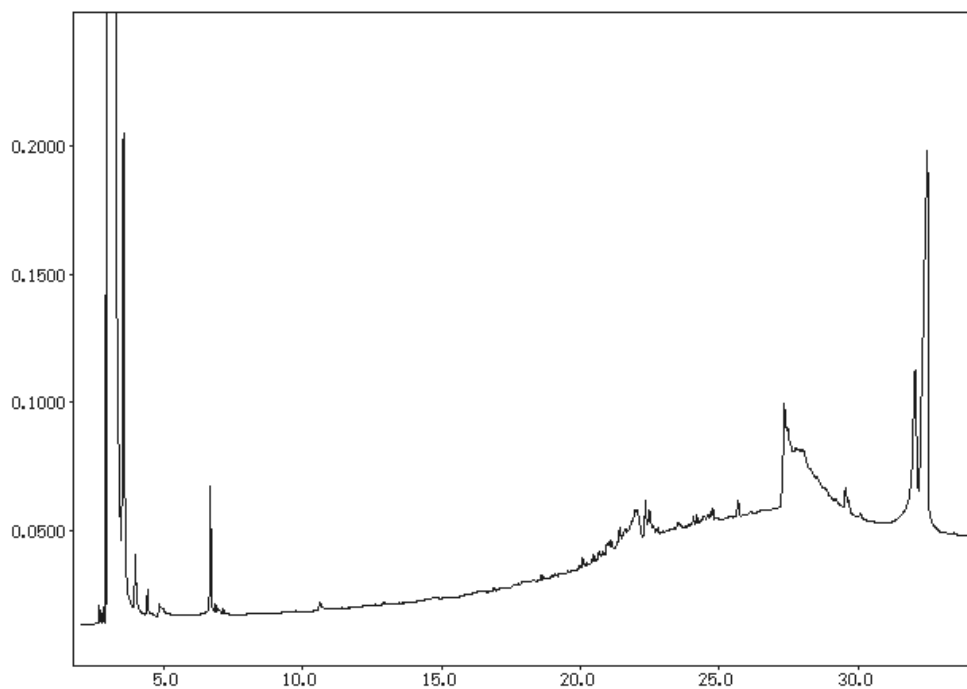


Figura 29 – CG da fração TDA<sub>3</sub> – 2 em  $\text{CHCl}_3$ .

O cromatograma da fig. 29 mostra que a fração TDA<sub>3</sub>, é uma mistura de sesquiterpenos, isso pode-se visualizar no espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , devido a complexidade de sinais existentes.

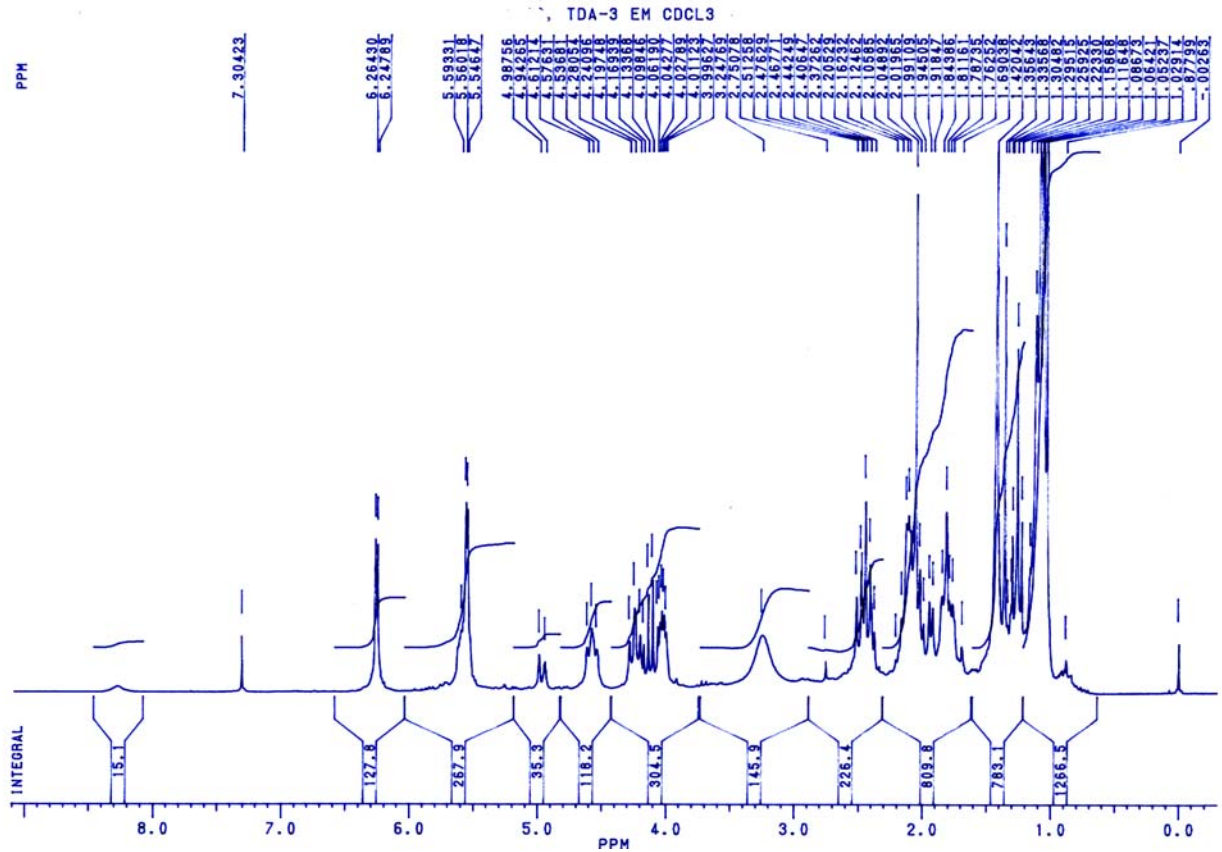


Figura 30 – RMN <sup>1</sup>H 200 MHz da fração TDA<sub>3</sub> – 2 em CDCl<sub>3</sub>

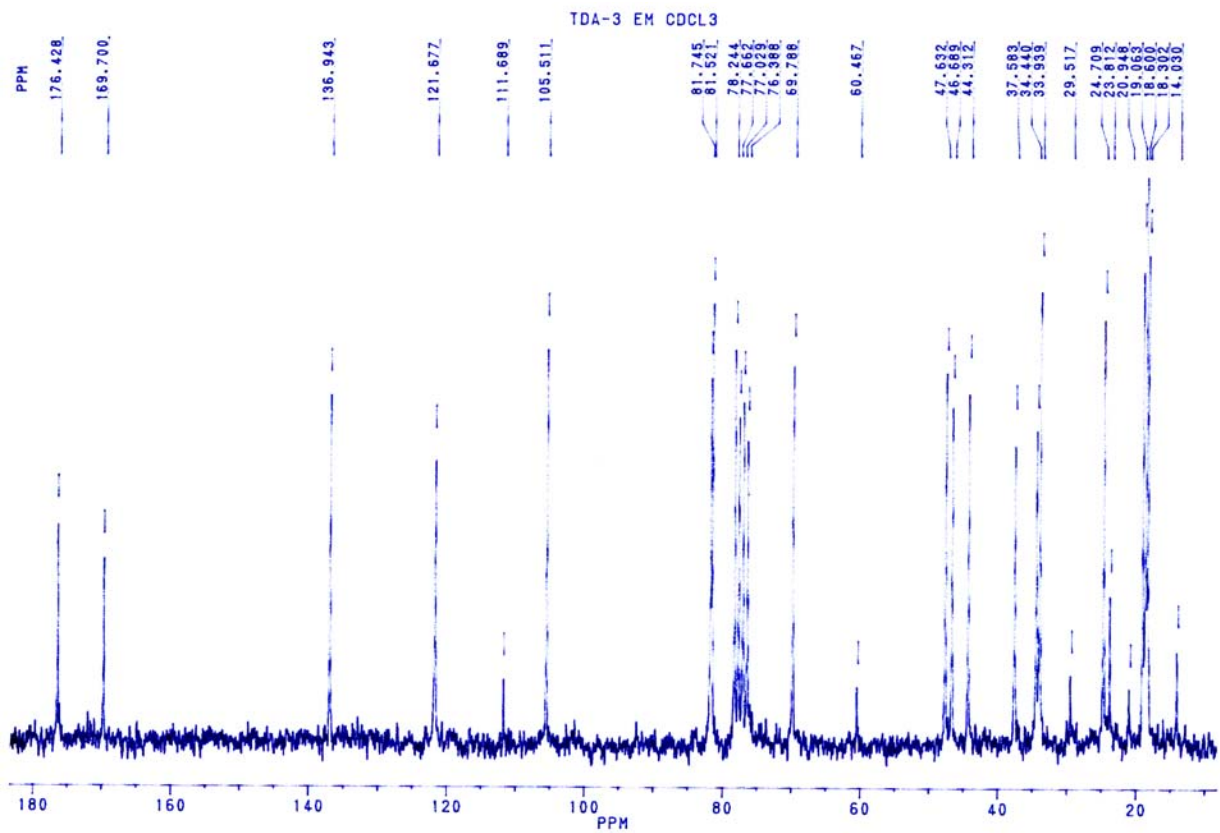


Figura 31 – RMN <sup>13</sup>C 50 MHz da fração TDA<sub>3</sub> – 2 em CDCl<sub>3</sub>

Logo abaixo, comparamos todos os RMN  $^{13}\text{C}$  de 50 MHz das amostras em questão obtidas neste trabalho com os compostos encontrados na literatura da planta.

Posição	11 <sup>22</sup>	TD -35/40	TDA <sub>1</sub> - 2/4	TDA <sub>2</sub> - 3	TDA <sub>3</sub> - 2
1	38,5	40,20	38,81	39,39	37,58
2	33,3		33,96		33,93
3	110,2	107,34			111,68
4	35,5	35,02		35,79	34,44
5	37,8				37,58
6	80,0	78,21		79,45	81,52
7	60,0			61,00	60,46
8	69,4		69,76		69,78
9	47,1	46,20	46,85	48,10	47,63
10	78,5	78,21		79,45	78,24
11	42,9		42,04		
12	178,7	176,18			
13	13,6				14,03
14	28,5		28,80	27,61	29,51
15	15,6				14,03

**Tabela 4** – Frações de *Tithonia* sendo comparada o RMN  $^{13}\text{C}$  de 100 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do composto 11<sup>22</sup>.

Posição	13 <sup>22</sup>	TD -35/40	TDA <sub>1</sub> - 2/4	TDA <sub>2</sub> - 3	TDA <sub>3</sub> - 2
1	39,6	40,23	39,32	39,39	
2	31,9	31,36	31,80	31,34	
3	111,6	107,34			111,68
4	45,6	46,20	44,61	45,55	44,31
5	38,1		39,32	39,39	37,58
6	81,8			82,27	81,74
7	47,6		46,85	48,10	47,63
8	69,8		69,76		69,78
9	41,3		42,04	39,39	
10	79,8	78,21		79,45	78,24
11	137,2	138,33	137,09		136,94
12	169,4	170,41	169,77	169,79	169,70
13	121,3	122,85		121,31	121,67
14	25,5		25,818	25,55	24,70
15	14,7				14,03
	176,3	176,19	176,22	176,50	176,42
OMe	48,6		48,247	48,91	47,63
OMe	34,0	35,02		34,99	34,44
OR	19,1	19,28	19,59	19,36	19,06
OR	18,0		18,53		18,30

**Tabela 5** – Frações de *Tithonia* sendo comparada com o RMN  $^{13}\text{C}$  de 100 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do composto 13<sup>22</sup>.

Posição	2 <sup>23</sup>	TD -35/40	TDA <sub>1</sub> - 2/4	TDA <sub>2</sub> - 3	TDA <sub>3</sub> - 2
1	43,8		42,04		44,31
2	30,5	31,36	31,80	31,44	29,51
3	38,9		39,32	39,39	37,58
4	77,5	76,12			78,24
5	119,4			120,43	



6	48,9		48,24	48,91	47,63
7	41,4	40,232	42,04		
8	31,8	31,36	31,80	31,34	
9	34,4	35,02	33,96	34,99	34,44
10	60,1			61,00	60,46
11	138,8	138,33	138,78	139,28	
12	171,7	170,42	169,77		
13	128,8	129,25	128,53		
14	25,8		25,81	25,55	24,70
15	26,9		26,94	27,61	
C=O	173,1				
OMe	29,6		29,57		29,51
OR	28,9		28,80		

**Tabel 6-** Frações de *Tithonia* sendo comparada com o RMN  $^{13}\text{C}$  de 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do composto  $2^{23}$ .

Posição	$4a^{24}$	TD -35/40	TDA <sub>1</sub> - 2/4	TDA <sub>2</sub> -3	TDA <sub>3</sub> - 2
1	86,11	87,09	86,26		
2 $\alpha$	41,94	40,23	39,81		
3	106,19	107,34	106,40	106,59	105,51
4	139,15	138,33	138,78	139,28	
5	130,42	129,25	129,45		
6	75,90	76,12	75,96		
7	49,19	51,02	49,79	48,91	
8	70,46		69,76	71,51	69,78
9 $\alpha$	35,11	35,01		35,79	34,44
10	81,79			82,27	81,74
11	136,39		136,79		136,94
12	169,38	170,41	169,77	169,79	169,70
13	122,17	122,85	123,02	121,31	121,67
14	25,94		25,81	25,55	24,70
15	21,77	22,76	22,45		20,94
1'	175,79	176,18	176,22	176,50	176,45
2'	33,84		33,96	34,99	33,93
3'	18,44	19,28	18,95	19,36	18,30
4'	19,93	19,67	19,59	19,84	19,06
OMe'	58,33		57,98		
OMe	49,73	51,02	49,79	48,91	

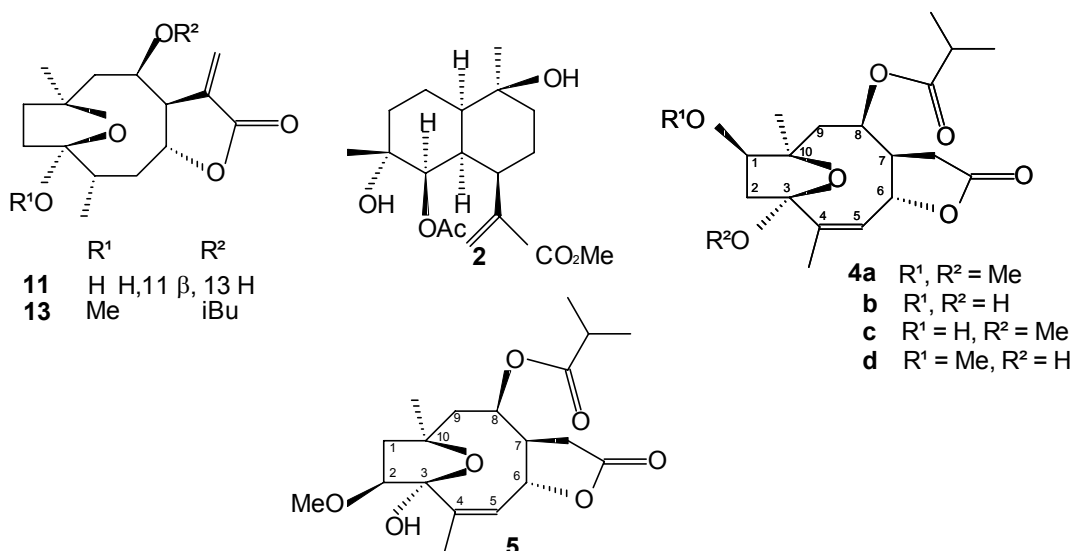
**Tabel 7 -** Frações de *Tithonia* sendo comparada com o RMN  $^{13}\text{C}$  de 50 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do composto  $4a^{24}$ .

Posição	$5^{24}$	TD -35/40	TDA <sub>1</sub> - 2/4	TDA <sub>2</sub> -3	TDA <sub>3</sub> - 2
1 $\alpha$	41,20	40,23	39,81		
2	86,30	87,09	86,26		
3	105,90		106,40	106,59	105,51
4	139,87	138,33	138,78	139,28	
5	128,30	129,25	128,53		
6	74,91	73,17	74,02		
7	49,72		49,79	48,91	
8	71,02		71,12	71,51	
9	39,48	40,23	39,32	39,39	
10	85,09		86,26		

11	135,89		135,94		136,94
12	169,68	170,41	169,77	169,79	169,70
13	122,76	122,85	123,02	121,31	121,67
14	21,93	22,76	21,87		20,94
15			21,32		
1'	175,80	176,18	176,22	176,50	176,42
2'	33,89		33,96	34,99	33,93
3'	18,50	19,28	18,53	19,36	18,60
4'	18,89	19,67	18,95	19,84	18,30
OMe'	57,90		57,98		

**Tabel 8** - Frações de *Tithonia* sendo comparada com o RMN  $^{13}\text{C}$  de 50 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do composto 5<sup>24</sup>.

### Estruturas dos compostos da literatura

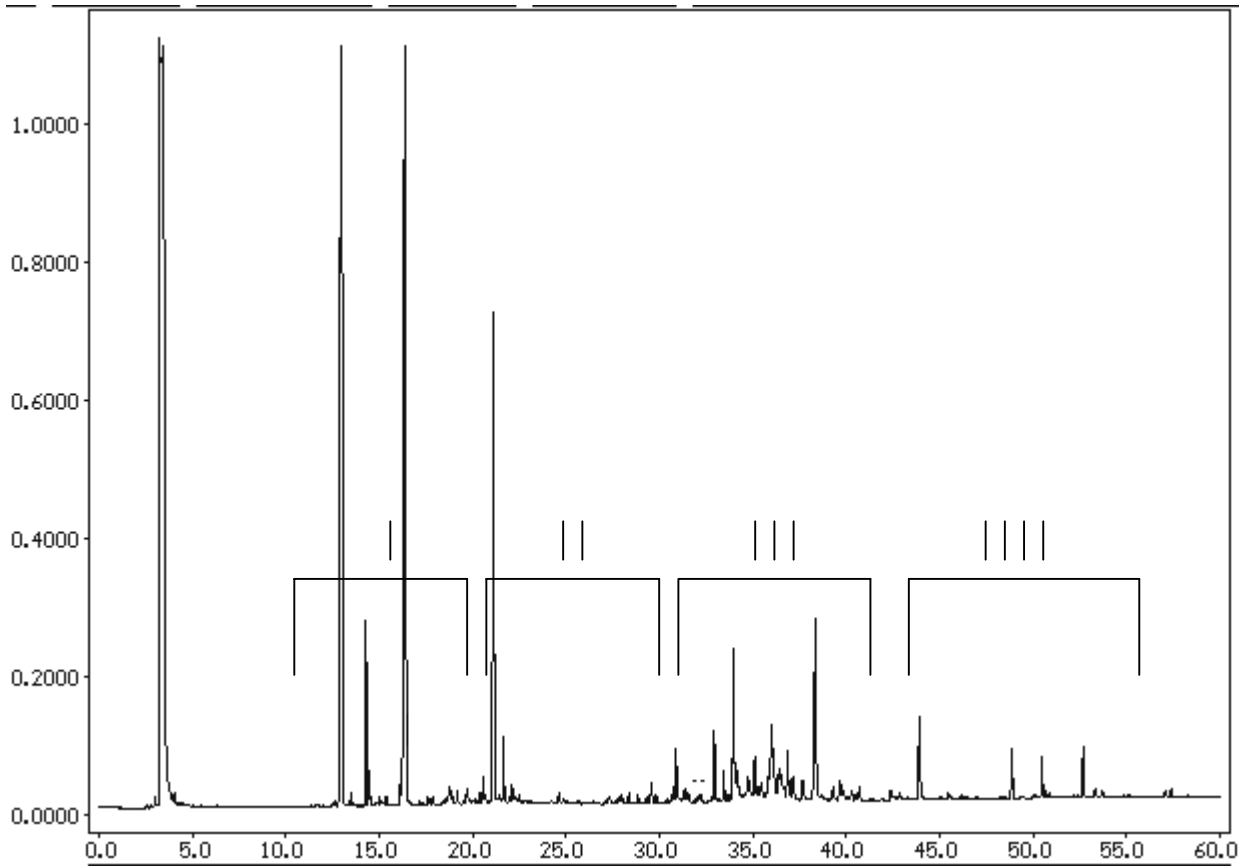


De acordo com as comparações, mostrou-se que as amostras TDA35/40, possui características parecidas com as estruturas 4a e 5; TDA<sub>1-2/4</sub> apresenta das estruturas 13, 4a e 5; TDA<sub>2-3</sub> apresenta das estruturas 13 e 2; TDA<sub>3-2</sub> apresenta das 11, 13 e 4a.

Sendo que o processo de separação foi insuficiente para o isolamento do composto, com mistura dos mesmos e a presença de impurezas.

#### 4.4 Parte IV: Obtenção do Óleo Essencial

Abaixo a cromatografia gasosa do óleo essencial obtido das flores de *Tithonia diversifolia*:



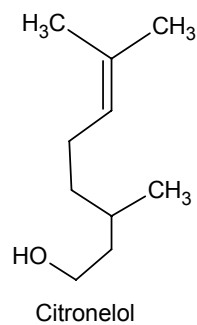
**Figura 31** – CG do Óleo Essencial em diclorometano.

O primeiro pico do cromatografo é o solvente (0 a 5 min.).

As estruturas abaixo, são apenas ilustrativas de terpenos, como exemplos.

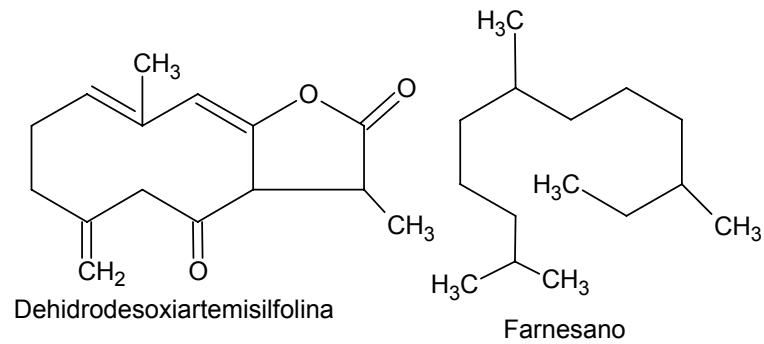
**Área I** - entre 10 a 20 min. , região de monoterpenos (10C).

Ex.:



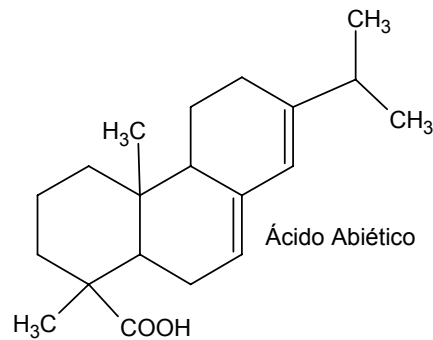
**Área II** – entre 20 a 25 min., região de sesquiterpenos (15C).

Ex.:



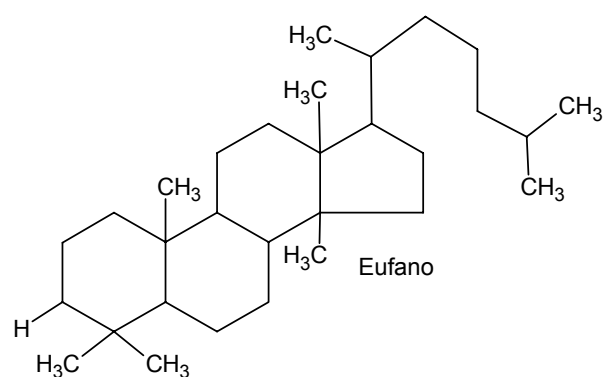
**Área III** – entre 27 a 40min., região de diterpenos (20C).

Ex.:



**Área IIIII** – entre 45 e 55, região de triterpenos. (30C)

Ex.:



Possui picos majoritários na região de monoterpenos.

Usou-se como base a bibliografia 25.

## 5. CONCLUSÃO

Devido a falta de tempo, não foi possível a realização de todas as análises necessárias para a conclusão mais segura com referência as estruturas, gerando apenas suposições.

Com os dados espectroscópicos obtidos e sua comparação com o dados de sesquiterpenos na literatura de *Tithonia diversifolia* podemos concluir que as frações purificadas são constituídas de sesquiterpenos lactonas, sendo que pelo menos 2 destes compostos possivelmente ainda não foram isolados desta espécie.

O óleo essencial mostrou uma composição complexa pela análise de cromatografia gasosa, com predominância de monoterpenos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

1. PINTO, Angelo C., O Brazil dos Ciajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira, **Química nova**, vol.18(6), pg. 608-615, 1995.
2. MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Angelo C.; JUNIOR, Valdir F. Veiga, Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares, **Química Nova**, vol. 25(3), pg. 429-438, 2002.
3. MONTANARI, C. A.; Bolzani, V. S., Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais, **Química Nova**, vol. 24(1), pg.105-111, 2001.
4. FILHO, Raimundo Braz, Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perpectivas. A Peregrinação de um Pacatubano., **Química nova**, vol. 15(5), pg. 405-445, 1994.
5. RANDERATH, Kurt, **Cromatografia de Capa Fina**, pg. 3 e 7, Edidiones Urno, 1º edição, S.A. 1969.
6. KATO, Clara I. Ríos , ***Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray, una plana com potencial para la produccion sostenible en el trópico.**, Fundación Centro para la Investigación em Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV), [clara@cipav.org.co](mailto:clara@cipav.org.co), Cali, Colombia.
7. <http://www.geocities.com/wessaaliens/species/species.htm>, ***Tithonia diversifolia***, 23/05/2003, 01:10 am.
8. <http://www.hear.org/pier/tidiv.htm>, ***Tithonia diversifolia* (Hemseley) A. Cinzento, Asteraceae**, 23/05/2003, 01:30 am.
9. [http://spore.cta.int/spore75/SP3\\_75A.html](http://spore.cta.int/spore75/SP3_75A.html), ***Tithonia soletra* o problema para térmitas**, boletim de notícias de ILEIA, Dezembro 1997., OS Países Baixos, [ileia@antenna.nl](mailto:ileia@antenna.nl)
10. TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A. J., Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 61(1), pg. 57-65, May 1998.
11. TONA, L; KAMBU, K; MESIA, K; CIMANGA, K; APERS, S; DE BRUYNE, T; PIETERS, L; TOTTE, J; VLIETINCK, A J, Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo, **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology** , vol. 6(1), pg. 59-66, March 1999.

12. GOFFIN, E.; ZIEMONS, E.; DE MOL, P.; DE MADUREIRA, Maria do Céu; MARTINS, A. P.; DA CUNHA, A. P.; PHILIPPE, G.; TITS, M.; ANGENOT, L.; FREDERICH, MICHEL, In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C, **Planta Medica**, vol. 68(6), pg. 543-545, June 2002.
13. RÜNGELER, P; LYSS, G; CASTRO, V; MORA, G; PAHL, H L; MERFORT, I , Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets, **Planta Medica**, vol. 64(7), , pg. 588-593, October 1998.
14. Kuo, Y H; Chen, C H, Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*, **Journal of Natural Products**, vol. 61(6), June 26, pg. 827-828, 1998.
15. MIURA, T.; FURUTA, K.; YASUDA, A.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; ISHIHARA, E.; ISHIDA, T.; TANIGAWA, K., Antidiabetic effect of nitobegiku in KK-Ay diabetic mice, **The American Journal of Chinese Medicine** , vol. 30(1), pg. 81-86, 2002.
16. GU, Jian-Qiao; GILLS, Joell J; PARK, Eun Jung; MATA-GREENWOOD, Eugenia; HAWTHORNE, Michael E; AXELROD, Franklin; CHAVEZ, Pedro I; FONG, Harry H S; MEHTA, Rajendra G; PEZZUTO, John M; KINGHORN, A Douglas, Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity, **Journal of Natural Products**, vol. 65(4), pg. 532-536, April 2002.
17. SOUZA, Miriam Pinheiro de *et al.* **Constituintes Químicos Ativos de Plantas Mediciniais Brasileiras**, Fortaleza: Edições EUFC, Laboratório de Produtos Naturais, 1991.
18. MATOS, F. J. Abreu. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições EUFC, 1988.
19. LITWACK, Gerard., **Bioquímica Experimental: Un manual de laboratório**, Traducción española por el Prof.º Dr. Bernabé Sanz Pérez, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, pg. 87, 1967.
20. MORITA, Tokio; ASSUMPÇÃO, Rosejy M. V., **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**, 2ª edição, Editora Edgard Blucher LTDA, 1972
21. KIRCHNER, Justus G., Techniques Of Chemistry, **Thin-Layer Chromatography**, vol. XIV, second edition, pg. 219 e 225, 1978
22. SCHUSTER, A.; STOKES, S.; PAPASTERGIOU, F.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene Lactones from Two *Tithonia* Species, **Phytochemistry**,

- vol. 31(9), pg. 3139-3141, 1992.
23. BORDOLOI, M.; BARUA, N. C.; GHOSH, A. C. An Artemisinic Acid Analogue From *Tithonia diversifolia*, **Phytochemistry**, vol. 41(2), pg. 557-559, 1996.
  24. PEREIRA, P. S.; DIAS, D. A.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T.; HERZ, W. Sesquiterpene Lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*, **Phytochemistry**, vol. 45(7), pg. 1445-1448, 1997.
  25. PATITUCCI, M. L.; JUNIOR, V. F. V.; PINTO, Angelo C. Utilização de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução na Detecção de Classe de Terpenos em Extratos Brutos Vegetais, **Química Nova**, vol. 18(3), pg. 262 – 265, 1995.