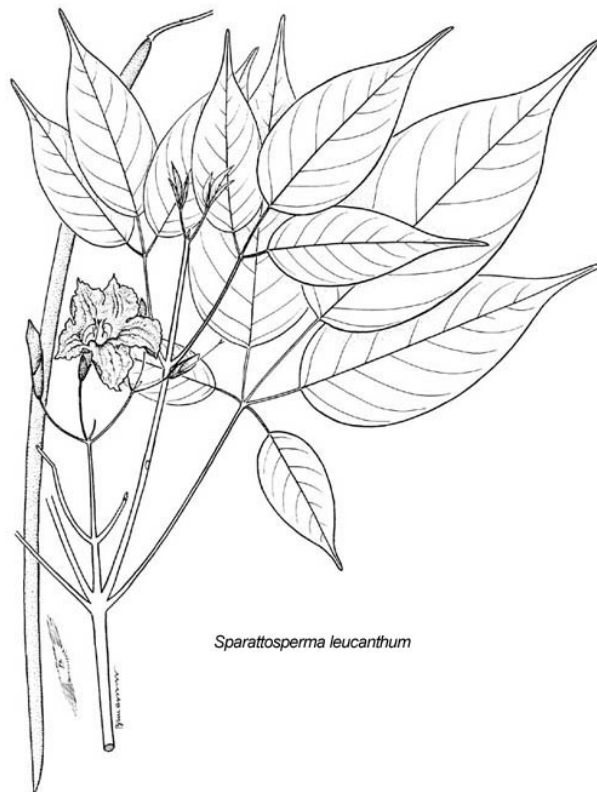


Universidade Federal do Rio de Janeiro

Sparattosperma leucanthum: ANATOMIA FOLIAR E
ISOLAMENTO DE FLAVONÓIDES POR
CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

FERNANDA DAS NEVES COSTA

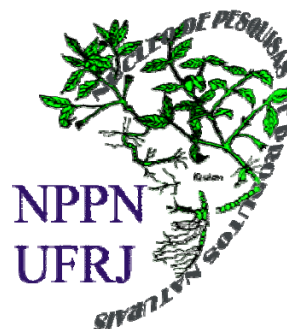


Sparattosperma leucanthum

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Sparattosperma leucanthum: Anatomia Foliar e
Isolamento de Flavonóides por Cromatografia
Contracorrente

FERNANDA DAS NEVES COSTA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química de Produtos Naturais,
Núcleo de Pesquisas em Produtos
Naturais, da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a. Gilda Guimarães Leitão
Co-orientador: Dr. Ricardo Cardoso Vieira

Rio de Janeiro
Outubro de 2009

Ficha Catalográfica

Costa, Fernanda das Neves.

Sparattosperma leucanthum: Anatomia Foliar e Isolamento de Flavonóides por Cromatografia Contra Corrente/ Fernanda das Neves Costa. Rio de Janeiro: UFRJ, NPPN, 2009.

xxiv, 139f: il.; 31 cm.

Orientadora: Gilda Guimarães Leitão. Co-orientador: Ricardo Cardoso Vieira.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ NPPN/ Programa de Pós graduação em Química de Produtos Naturais, 2009.

Referências bibliográficas: f. 132-139.

1. Cromatografia contracorrente. 2. *Sparattospema leucanthum*. 3. Flavonóides. I. Gilda Guimarães Leitão e Ricardo Cardoso Vieira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Programa de Pós graduação em Química de Produtos Naturais. III. *Sparattosperma leucanthum*: Anatomia Foliar e Isolamento de Flavonóides por Cromatografia Contracorrente.

Sparattosperma leucanthum: Anatomia Foliar e
Isolamento de Flavonóides por Cromatografia Contra
Corrente

FERNANDA DAS NEVES COSTA

Dissertação Submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química de Produtos
Naturais para Obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Gilda Guimarães Leitão

Co-orientador: Ricardo Cardoso Vieira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ___/___/2009

Dr. Gilda Guimarães Leitão (NPPN/ UFRJ)

Dr. Wagner Vilegas (IQ-UNESP/Araraquara)

Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva (NPPN-UFRJ)

Dr^a. Ana Cláudia Macedo Vieira (FF-UFRJ)

Rio de Janeiro

2009

Dedico esta dissertação aos meus pais, Álvaro e Fátima, por terem me proporcionado chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Álvaro e Fátima, responsáveis pela base de minha educação, por terem me apoiado e incentivado a seguir esse caminho, privando-se inúmeras vezes de várias coisas para que eu chegasse até aqui. Obrigada principalmente por todo o amor e por terem me dado tudo o que sou.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo prazer da convivência, por todo o incentivo e colaboração.

Ao meu namorado, Guilherme, por me fazer sonhar novamente e por me mostrar que nada é impossível.

A Prof. Dr. Gilda Guimarães Leitão pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade. Agradeço por despertar em mim o entusiasmo e a paixão não só pela vida acadêmica, mas também pela fitoquímica.

A Dr. Lisandra de Abreu Nery pelos ensinamentos referentes às práticas laboratoriais, imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Cardoso Vieira agradeço pela orientação.

A Prof. Dr. Ana Joffily pelos cortes anatômicos e toda a paciência e ajuda a mim dispensada.

A Prof. Dr. Suzana Guimarães Leitão pelo uso do CLAE e obtenção dos espectros.

A Dr. Luciana Pereira Rangel pela confecção dos testes de atividade ATPásica.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do NPPN.

Aos amigos da Pós-Graduação do NPPN que me ajudaram a vencer a dificuldade do curso. Em especial ao Fábio pela amizade, apoio e conselhos.

Aos amigos do laboratório, Gabriel e Thiago, pelos inúmeros momentos de descontração e apoio mútuo.

A todos os estagiários do laboratório Caroline, Diogo, Fernanda Silva, Fernanda Xavier, Ingrid, Jéssica e Juliana pela imensurável ajuda.

A minha cunhada, Raquel, pela tradução da descrição macroscópica, por todos os artigos e pela amizade.

As minhas amigas de infância, Luana e Nathalia, pela amizade a mim dedicada durante os últimos 18 anos.

A CAPES pela bolsa concedida.

“O dom de saber nunca se completa enquanto não se almeja o dom de ensinar.”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Sparattosperma leucanthum: Anatomia Foliar e Isolamento de Flavonóides
por Cromatografia Contracorrente

FERNANDA DAS NEVES COSTA

Orientadores: Gilda Guimarães Leitão e Ricardo Cardoso Vieira

A presente dissertação teve como objetivo ampliar o conhecimento de *Sparattosperma leucanthum* (Bignoniaceae), conhecida popularmente como “ipê branco”, por meio do estudo anatômico, biológico e químico. A descrição anatômica das folhas foi realizada com o intuito de se criar um padrão de identificação, uma vez que esta espécie apresenta inúmeras sinonímias botânicas. O extrato etanólico bruto de folhas de *S. leucanthum*, que apresentou ótimos resultados frente a testes de atividade antioxidante e atividade inibitória ATPásica da enzima Pdr5p, foi particionado em solventes de polaridade crescente. Da partição em acetato de etila foram isolados os flavonóides 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona, pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo e pinocembrina-7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo utilizando cromatografia contracorrente (CCC) em duas etapas. Estudo pormenorizado do comportamento dos flavonóides em diversos sistemas de solventes definiu o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 como o melhor solvente para a 1ª etapa, onde foi isolada a pinocembrina-7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo. Na segunda etapa obteve-se o isolamento da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona e pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo com os sistemas AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10 e BuCN-ACN-H₂O 5:10:10, sendo este último inédito na literatura. Todas os fracionamentos foram realizadas em dois equipamentos: P. C. Inc. (volume da coluna 80 ml e 1,6 mm d.i.) e MKS Quattro HT-Prep (volume da coluna 95 ml e 2,1 mm d.i.). As estruturas foram elucidadas com base em dados de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais.

Palavras-Chave: Cromatografia contracorrente, *Sparattosperma leucanthum*, Flavonóides.

ABSTRACT

Sparattosperma leucanthum: Leaves Anatomy and Flavonoid Isolation by Countercurrent Chromatography

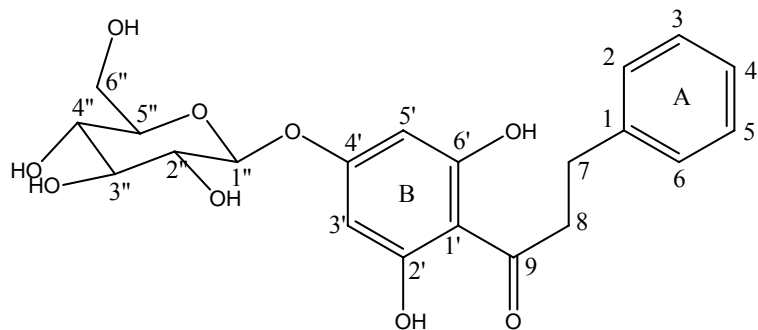
FERNANDA DAS NEVES COSTA

Orientadores: Gilda Guimarães Leitão e Ricardo Cardoso Vieira

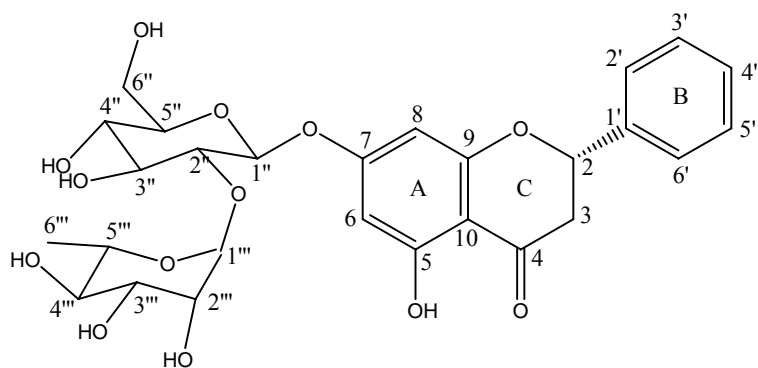
This study aimed to expand the knowledge of *Sparattosperma leucanthum*, popularly known as “ipê branco”, through its anatomic, biological and chemical characterization. The description of its leaves was performed in order to develop a key for identifying this species, since it has several botanical synonyms. The crude ethanolic extract of *S. leucanthum* leaves, that presented great results when submitted to antioxidant activity and Pdr5p ATPase activity assays, was partitioned between water and solvents of increasing polarities. From the ethyl acetate extract, the flavonoids dihydrochalcone 2',4',6'-trihydroxy-4'-O-β-D-glicoside, pinocembrin 7-O-β-neohesperidoside and pinocembrin-7-O-β-(6"-O-acetyl) neohesperidoside were isolated using a two-step countercurrent chromatography operation. Detailed studies of flavonoids behavior in several solvent systems was performed and define Hex-EtOAc-MeOH-H₂O 4:10:4:10 as the best solvent for the isolation of pinocembrin-7-O-β-(6"-O-acetyl) neohesperidoside at the first step. In the second step EtOAc-BuOH-H₂O 8:2:10 and BuCN-ACN-H₂O 5:10:10 (the last one is new in the literature) were used as solvent system to isolate 2',4',6'-trihydroxy-4'-O-β-D-glicoside dihydrochalcone and pinocembrin 7-O-β-neohesperidoside. All separations were performed in two different equipments: P. C. Inc. (coil volume 80 ml and i.d. 1.6 mm) and MKS Quattro HT-Prep (coil volume 95 ml and i.d. 2.1 mm). Their structures were identified by 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR.

Key-words: Countercurrent chromatography, *Sparattosperma leucanthum*, Flavonoids.

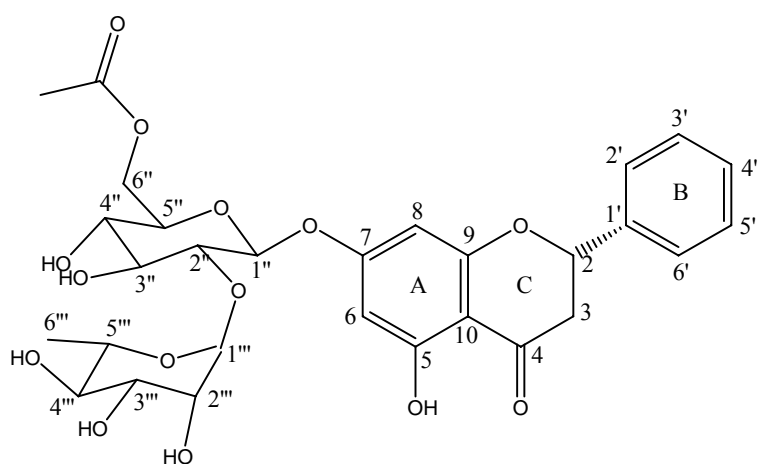
LISTA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



2',4',6'-trihidroxi-4'-O- β -D-glicosil Di-hidrochalcona



Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo



Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pinocebrina 7-O-8-neohesperidosídeo	4
Figura 2. <i>Sparattosperma leucanthum</i>	6
Figura 3. <i>Sparattosperma leucanthum</i> – Detalhe das folhas e flores	7
Figura 4. <i>Sparattosperma leucanthum</i> – Detalhe das folhas e frutos	7
Figura 5. Estrutura básica C ₆ -C ₃ -C ₆ dos flavonóides	8
Figura 6. Biossíntese da chalcona	10
Figura 7. Biossíntese das principais classes de flavonóides	10
Figura 8. Esquema da coleta do material botânico <i>Sparattosperma leucanthum</i> para herborização, análise fitoquímica e descrição anatômica	21
Figura 9. Obtenção do extrato bruto e partição de folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	24
Figura 10. Plano transversal da região mediana do peciólulo de <i>Sparattospermum leucanthum</i> . 1. Aspecto geral. 2. Face adaxial evidenciando a epiderme unisseriada recoberta por cutícula delgada e lisa, e o colênquima do tipo anelar. 3. Detalhe do tricoma tector unisseriado. 4. Face abaxial evidenciando parênquima cortical com células com paredes delgadas e colênquima do tipo anelar (cabeça de seta). 5-6. Feixe vascular (Xi – xilema e Fl – floema), mostrando grupos de fibras perivasculares (seta) na região abaxial (5) e na projeção lateral (6)	44
Figuras 11. Terço médio da lâmina foliar de <i>Sparattospermum leucanthum</i> . 1-2. Epiderme em vista frontal evidenciando tricomas glandulares. 2. Note estômatos do tipo anomocíticos. 3-7. Secção transversal evidenciando epiderme unisseriada na região intercostal e bordo (seta). 3. Região intercostal com uma camada de parênquima paliçádico (Pa) e parênquima lacunoso frouxo (Pl). 4. Detalhe do tricoma tector. 5. Detalhe do tricoma glandular. 6-7. Bordo fletido em direção a face abaxial	45
Figuras 12. Secção transversal da nervura mediana de <i>Sparattospermum leucanthum</i> . 1. Nervura mediana e lateral evidenciando domácia com cripta (*). 2. Face adaxial evidenciando parênquima cortical com células com paredes delgadas e colênquima do tipo anelar (colchete). 3. Feixe vascular (Xi – xilema e Fl – floema). 4. Cripta da domácia mostrando células epidérmicas retangulares (seta)	46
Figura 13. Precipitado obtido durante a extração líquido-líquido com CHCl ₃	47
Figura 14. Análise fitoquímica preliminar da partição em AcOEt feita por CCD eluída com a fase orgânica do sistema acetato de etila-acetona-água 25:10:5 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	48
Figura 15. Cromatograma relativo a análise fitoquímica preliminar da partição em AcOEt feita por CLAE utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H ₂ O 40:60 até 100:0 em 35 min), λ = 240 nm	49
Figura 16. Espectros de UV relativos aos picos I (a), II (b) e III (c)	50

Figura 17. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O 1:1:1:1. (S) Superior. (I) Inferior revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	52
Figura 18. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O. (S) Superior. (I) Inferior. (a) 5:9:5:9, (b) 4:10:4:10 e (c) 2:12:2:12 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	53
Figura 19. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando o sistema Hex-AcOEt-X-H ₂ O. (S) Superior. (I) Inferior. (d) X=EtOH, 4:10:4:10; (e) X= <i>n</i> PrOH; 4:10:4:10; (f) X= <i>iso</i> PrOH; 4:10:4:10; (g) X= <i>n</i> BuOH; 4:10:2:10 e (h) X= <i>iso</i> BuOH 4:10:2:10 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	56
Figura 20. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando o sistema Hex-AcOEt-X-MeOH-H ₂ O. (S) Superior. (I) Inferior. (i) X= <i>n</i> PrOH, 4:10:0,5:4:10; (j) X= <i>n</i> PrOH 4:10:1:4:10; (k) X= <i>n</i> BuOH 4:10:0,5:4:10; (l) X= <i>n</i> BuOH 4:10:0,7:4:10; (m) X= <i>n</i> BuOH 4:10:1:4:10 e (n) X= <i>n</i> BuOH 4:10:1,2:4:10 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	58
Figura 21. CCD relativa ao primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando equipamento P.C.Inc. e o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O 4:10:4:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	60
Figura 22. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H ₂ O 40:60 até 100:0 em 35 min) do primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> . (a) Fração 2. (b) Fração 4	61
Figura 23. Pinocebrina-7- <i>O</i> -β-(6"- <i>O</i> -acetil) neohesperidosídeo	61
Figura 24. Precipitado obtido nos tubos 49 e 50 do primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i>	62
Figura 25. CCD relativa ao primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando equipamento Quattro HT-Prep MKS e o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O 4:10:4:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	63
Figura 26. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H ₂ O 40:60 até 100:0 em 35 min) do segundo fracionamento da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> (a) Fração 2. (b) Fração 4	63
Figura 27. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H ₂ O 40:60 até 100:0 em 35 min) fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> por cromatografia de filtração em gel. (a) Fração 1. (b) Fração 2. (c) Fração 3	66
Figura 28. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H ₂ O 40:60 até 100:0 em 35 min) do fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> por CLAE semi-preparativa. (a) Fração 1. (b) Fração 2	69
Figura 29. CCD referente ao teste de sistema de solventes para a Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando o sistema AcOEt-BuOH-H ₂ O. (S) Superior. (I) Inferior. (a) 9:1:10; (b) 8:2:10; (c) 7:3:10	71

Figura 30. CCD relativa ao primeiro fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando equipamento P.C.Inc. e o sistema AcOEt-BuOH-H ₂ O 8:2:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	73
Figura 31. 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicose Di-hidrochalcona	73
Figura 32. CCD relativa ao segundo fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando equipamento Quattro HT-Prep MKS e o sistema AcOEt-BuOH-H ₂ O 8:2:10, eluição em modo normal CCD revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	74
Figura 33. Estrutura da (A) piridina, (B) acetonitrila e (C) butironitrila	74
Figura 34. CCD referente ao teste de sistema de solventes para a Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando o sistema BuCN-ACN-H ₂ O (d) 1:0,2:1; (e) 1:0,5:1; (f) 0,5:0,5:1 e (g) 0,5:1:1 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	75
Figura 35. CCD relativa ao terceiro fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando equipamento P.C.Inc. e o sistema BuCN-ACN-H ₂ O 5:10:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	76
Figura 36. CCD relativa ao terceiro fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> utilizando equipamento Quattro HT-Prep MKS e o sistema BuCN-ACN-H ₂ O 5:10:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH	77
Figura 37. 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicosil Di-hidrochalcona	78
Figura 28. Ligações de hidrogênio intramoleculares ocorrentes entre as hidroxilas em C-2' ou C-6' e a carbonila em C-9 da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona	81
Figura 39. Pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo	91
Figura 40. Ligação de hidrogênio intramolecular ocorrente entre a hidroxila em C-5 e a carbonila em C-4 da flavanona Pinocembrina-7-O-β-neohesperidosídeo	94
Figura 41. Pinocembrina 7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	107
Figura 42. Gráfico de atividade antioxidante x concentração	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas das separações dos constituintes da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> por CCC	29
Tabela 2. Condições cromatográficas das separações dos constituintes da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de <i>S. leucanthum</i> por CCC	37
Tabela 3. <i>K</i> das substâncias majoritárias da partição em AcOEt de <i>S. leucanthum</i> calculados por CLAE	54
Tabela 4. Tabela da família de sistema de solventes AcOEt-BuOH-H ₂ O	70
Tabela 5. <i>K</i> das substâncias relativas aos picos I e II da partição em AcOEt de <i>S. leucanthum</i>	72
Tabela 6. Dados de RMN de ¹³ C da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona comparados a valores citados na literatura	79
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona comparados a valores citados na literatura	82
Tabela 8. Correlação entre dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona	83
Tabela 9. Dados de RMN de ¹³ C da Pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura	92
Tabela 20. Dados de RMN de ¹ H da Pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura	96
Tabela 11. Correlação entre dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da flavanona pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo	98
Tabela 13. Dados de RMN de ¹³ C da Pinocembrina 7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura	108
Tabela 13. Dados de RMN de ¹ H da Pinocembrina 7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura	111
Tabela 14. Correlação entre dados de RMN de ¹ H da flavanona pinocembrina 7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	113
Tabela 15. Correlação entre dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da flavanona pinocembrina 7-O-β-(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	115
Tabela 16. Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e partições em hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol de folhas de <i>S. leucanthum</i>	128

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1.** Fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento P.C. Inc., o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 e eluição em modo normal 28
- Fluxograma 2.** Fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 e eluição em modo normal 28
- Fluxograma 3.** Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia de filtração em gel 32
- Fluxograma 4.** Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia com fase líquida de alta eficiência 32
- Fluxograma 5.** Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento P.C. Inc., o sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10 e eluição em modo normal 34
- Fluxograma 6.** Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, o sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10 e eluição em modo normal 34
- Fluxograma 7.** Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento P.C. Inc., o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O 5:5:10 e eluição em modo normal 36
- Fluxograma 8.** Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O 5:5:10 e eluição em modo normal 36

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (100 MHz) da di-hidrochalcona 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil	85
Espectro 2. Espectro de RMN de ^1H em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da di-hidrochalcona 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil	86
Espectro 2(1). Espectro de RMN de ^1H expandido na região aromática (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona, escala em Hertz	87
Espectro 3. Espectro HSQC em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da di-hidrochalcona 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil	88
Espectro 3 (1). Espectro HSQC expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{HD}_5\text{N}$) da di-hidrochalcona 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil	89
Espectro 3 (2). Espectro HSQC expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da di-hidrochalcona 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil	90
Espectro 4. Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (100MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo	100
Espectro 5. Espectro de RMN de ^1H em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo	101
Espectro 5 (1). Espectro de RMN de ^1H expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo	102
Espectro 5 (2). Espectro de RMN de ^1H expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo (a) Expansão 2H, C-3. (b) Expansão 1H, C-2	103
Espectro 6. Espectro HSQC em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo	104
Espectro 6 (1). Espectro HSQC expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo	105
Espectro 6 (2). Espectro HSQC expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina-7-O- β -neohesperidosídeo	106
Espectro 7. Espectro de ^{13}C RMN em MeOD (100 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	117
Espectro 8. Espectro de ^1H RMN em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	118
Espectro 9. Espectro de ^1H RMN em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	119
Espectro 9 (1). Espectro de RMN de ^1H expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo (a) Expansão 2H, C-3. (b) Expansão 1H, C-2	120
Espectro 10. Espectro COSY H-H em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo	121

Espectro 11. Espectro HSQC em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7- <i>O</i> - β -(6''- <i>O</i> -acetil) neo-hesperidosídeo	122
Espectro 11 (1). Espectro HSQC expandido em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7- <i>O</i> - β -(6''- <i>O</i> -acetil) neo-hesperidosídeo	123
Espectro 11 (2). Espectro HSQC expandido em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7- <i>O</i> - β -(6''- <i>O</i> -acetil) neo-hesperidosídeo	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Fator de Separação
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BuCN	Butironitrila
BuOH	Butanol
CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
C ₅ D ₅ N	Piridina Deuterada
CLAE	Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	Deslocamento Químico
D.A.D.	Detector de Conjunto de Fotodiodos
d.a.p.	Diâmetro a Altura do Peito
d.i.	Diâmetro Interno
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HSQC	Heeronuclear Single Quantum Coherence
<i>i</i> BuOH	<i>iso</i> -Butanol
<i>i</i> PrOH	<i>iso</i> -Propanol
<i>K</i>	Coefficiente de Partição
MDR	Multidrug Resistance
MeOD	Metanol Deuterado
MeOH	Metanol
<i>n</i> BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> PrOH	<i>n</i> -Propanol
P.A.	Para Análise
PEG	Polietilenoglicol

ppm	Partes por Milhão
PrOH	Propanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-18	Sílica com fase ligada (octadecilsilano)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultra-Violeta
V _{eluição}	Volume de Eluição

SUMÁRIO

LISTA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xvi
LISTA DE ESPECTROS	xvii
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biodiversidade como Fonte de Novos Princípios Ativos	1
1.2 A Família Bignoniaceae	2
1.2.1 O Gênero <i>Sparattosperma</i>	3
1.2.2 A Espécie <i>Sparattosperma leucanthum</i>	4
1.2.2.1 Descrição Macroscópica	5
1.2.2.2 Descrição Microscópica	7
1.3 Flavonóides	8
1.4 Atividade Antioxidante	11
1.5 Resistência a Múltiplas Drogas	12
1.6 Cromatografia Contracorrente	13
1.6.1 Vantagens da Cromatografia Contra Corrente	14
1.6.2 A Escolha do Sistema de Solventes	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Gerais	18
3.1.1 Solventes	18
3.1.2 Cromatografia em Camada Delgada	18
3.1.3 Cromatografia de Filtração em Gel	19
3.1.4 Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência	19

3.1.5 Cromatografia Contracorrente	19
3.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	20
3.1.7 Espectroscopia no Ultra-Violeta	21
3.1.8 Critérios de Pureza	21
3.2 Coleta do Material Botânico	21
3.3 Herborização e Identificação da Espécie	22
3.4 Análise Anatômica	22
3.5 Fitoquímica	23
3.5.1 Obtenção do Extrato e Partições	23
3.5.2 Análise Preliminar da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	24
3.5.3 Fracionamento da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i> por Cromatografia Contracorrente	25
3.5.3.1 Teste de Partição em Tubo de Ensaio para Seleção de Sistema de Solventes	25
3.5.3.2 Cálculo do Coeficiente de Partição por Cromatografia com fase Líquida de Alta Eficiência	25
3.5.3.3 Preparo do Sistema de Solventes e Amostra para Cromatografia Contracorrente	26
3.5.3.4 Separação dos Constituintes da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> por Cromatografia Contracorrente	26
3.5.4 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	30
3.5.4.1 Fracionamento da Fração da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> por Cromatografia de Filtração em Gel	30
3.5.4.2 Fracionamento da Fração da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> por Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência	30
3.5.4.3 Fracionamento da Fração da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> por Cromatografia Contracorrente	33
3.5.5 Análise e Identificação das Substâncias por Espectroscopia de UV e Ressonância Magnética Nuclear	38

3.6 Testes Biológicos	40
3.6.1 Atividade Antioxidante	40
3.6.2 Inibição da Atividade ATPásica da Pdr5p	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Descrição Anatômica	42
4.2 Fitoquímica	47
4.2.1 Obtenção do Extrato e Partições	47
4.2.2 Análise Preliminar da Partição em Acetato de Etila	48
4.2.3 Fracionamento da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	51
4.2.3.1 A Escolha do Sistema de Solventes	51
4.2.3.2 Fracionamento da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i> por Cromatografia Contracorrente	59
4.2.4 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	64
4.2.4.1 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> através de Cromatografia de Filtração em Gel ...	64
4.2.4.2 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> por Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência	67
4.2.4.3 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de <i>S. leucanthum</i> por Cromatografia Contracorrente	70
4.2.5 Análise e Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas	78
4.2.5.1 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicose Dihidrochalcona	78
4.2.5.2 Pinocembrina-7-O-β-neohesperidosídeo	91
4.2.5.3 Pinocembrina-7-O-β-(6"-O-acetil) neohesperidosídeo	107
4.2.6 Testes biológicos	125
4.2.6.1 Atividade Antioxidante	125
4.2.6.2 Atividade Inibitória de Resistência a Múltiplas Drogas	130

5. CONCLUSÕES 131

REFERÊNCIAS 132

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade como Fonte de Novos Princípios Ativos

Biodiversidade pode ser definida como variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Ela pode ser entendida como uma associação de vários componentes hierárquicos: ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida (DOBSON, 1996). Uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativa desigual dos seus componentes no espaço geográfico. Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica (SIMÕES *et al.*, 2000).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse patrimônio genético possui sua maior potencialidade no campo de desenvolvimento de novos medicamentos. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais (CALIXTO, 2003).

As plantas são reconhecidas pela sua capacidade em produzir uma grande quantidade de metabólitos secundários e o homem usou, durante séculos, muitas espécies para tratar uma variedade de doenças. Esses metabólitos secundários sintetizados pelas plantas são usados para diferentes propósitos, como regulação de crescimento, interações inter e intra-específicas e defesa contra predadores e infecções. Muitos desses produtos naturais apresentam atividades biológicas e farmacológicas interessantes e são usados como agentes de quimioterapia ou servem como ponto de partida no desenvolvimento de novos tratamentos (SOUZA-FAGUNDES, *et al.* 2002).

O estudo dos metabólitos secundários (produtos naturais) produzidos pelas plantas tem recebido expressiva importância no processo de descoberta de medicamentos, seja como produtos totalmente de origem natural, produtos derivados de produtos naturais ou produtos sintéticos baseados em modelos de produtos naturais. A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de fontes naturais tais como extratos de plantas, tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente úteis que se têm se revelado importantes no tratamento de doenças (SHU, 1998).

1.2 A Família Bignoniaceae

As Bignoniaceae são eudicotiledôneas da ordem Lamiales. Apresentam cerca de 860 espécies distribuídas em 104 gêneros (FISCHER *et al.*, 2004). Os gêneros mais numerosos são *Tabebuia* Gomes ex DC. (100 spp), *Arrabidaea* DC. (70 spp), *Adenocalymma* Mart. ex Meisn. (50 spp) e *Jacaranda* Juss. (40 spp). Esse táxon angiospérmico reúne espécies pantropicais, mas predominantemente neotropicais, com poucos representantes nas regiões temperadas (JUDD *et al.*, 1999), sendo de ocorrência freqüente no continente americano. No Brasil, plantas desta família ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul. Não possuindo um *habitat* único, podem ser encontradas nos Cerrados, Mata Atlântica e região Amazônica (PAULETI, 2003).

Espécies desta família apresentam importância econômica o que, somado a utilização florística, justifica o aprofundamento do seu estudo. Diversas Bignoniaceae são utilizadas na construção civil, carpintaria e confecção de instrumentos musicais devido a natureza rígida de sua madeira (gêneros *Catalpa* Scop., *Cybistax* Mart. ex Meisn., *Paratecoma* Kuhl. e *Tabebuia*); são indicadas em projetos de reflorestamento em áreas degradadas e de preservação permanente; além de projetos de ornamentação e arborização urbana, devido a beleza de suas florações (*Arrabidaea* DC.,

Eccremocarpus Ruiz & Pav., *Jacaranda*, *Macfadyena* A. DC., *Pyrostegia* C. Presl, *Spathodea* P. Beauv., *Tabebuia* e *Tecoma* Juss.) (GENTRY, 1992; LORENZI, 1992; MABBERLEY, 1997).

Várias espécies de Bignoniaceae apresentam potencial medicinal e/ou farmacológico, sendo frequentemente citadas em levantamentos etnobotânicos. Algumas atividades biológicas foram comprovadas experimentalmente, como as atividades antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana (ANDRADE & HEINRICH, 2005; FERREIRA *et al.* 2000; GAFNER *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2003).

Atualmente, a família é dividida em sete tribos baseado em sua distribuição geográfica, hábito e morfologia do fruto (MABBERLEY, 1997), sendo elas Bignonieae, Coleeae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Oroxyleae, Tourrettieae e Tecomeae.

Nas últimas décadas as espécies de Bignoniaceae foram extensamente estudadas do ponto de vista fitoquímico. Destaca-se a ocorrência de alcalóides, flavonóides, quinonas e iridóides (CIPRIANI, 2006).

1.2.1 O Gênero *Sparattosperma*

O gênero *Sparattosperma* pertence a tribo Tecomae (GENTRY, 1992), que é a mais estudada do ponto de vista químico, apresentando 740 substâncias isoladas, sendo esta química dominada por terpenóides e quinonas (CIPRIANI, 2006).

Este gênero possui quatro espécies: *S. ellipticum*, *S. neurocalyx*, *S. stenocarpum* e *S. vernicosum*. Todas as espécies pertencentes a este gênero possuem inúmeras sinonímias botânicas (GENTRY, 1992).

Tais espécies encontram-se praticamente inexploradas sob o ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico. O único relato de estudo fitoquímico do gênero *Sparattosperma* é o isolamento do componente majoritário, pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo (**Figura 1**), uma

flavanona glicosilada, de extrato etanólico de frutos de *S. vernicosum*, utilizando cromatografia em coluna com gel de sílica (KUTNEY *et al.*, 1970).

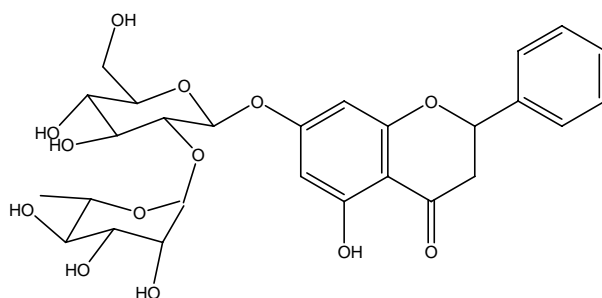


Figura 1. Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo

1.2.2 A Espécie *Sparattosperma leucanthum*

A espécie *S. leucanthum* (Vell.) K. Schum (**Figuras 2-4**), inicialmente denominada *Bignonia leucantha*, foi primeiramente descrita em 1894 por Schumann. Possui como sinônimas botânicas: *S. lithontripticum* Mart. ex DC, *S. stenocarpum* Bureau & K.Schum, *S. vernicosum* Bureau & K.Schum, *Spathodea vernicosa* Cham., *Tecoma salzmanni* DC. e *Tecoma subvernica* DC..

S. leucanthum é conhecida popularmente como “caroba-branca”, “ipê-branco”, “ipê-bóia”, “ipê-batata”, dentre outros (SALOMÃO *et al.*, 2003). Ocorre desde a Venezuela e Peru até o sul do Brasil (LORENZI, 2000). Nativa do Brasil, típica da Mata Atlântica, é encontrada no Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo (GENTRY, 1992). Sua madeira é amplamente utilizada na construção civil e naval.

1.2.2.1 Descrição Macroscópica (GENTRY, 1992)

Hábito

Sparattosperma leucanthum é caracterizada como árvore, 10-25 m de altura, 70cm dap. (diâmetro a altura do peito), com casca fibrosa variando de lisa a grossa e fissurada; ramos subtetragonais, com estrias longitudinais quando jovens, marrons quando senis.

Folhas

As folhas são compostas, 5-foliolada, pecíolo 2,5-14cm, folíolos 3-17x1,5-7cm, elípticos a lanceolados ou oblongo-oval, base cuneada a truncada, ápice acuminado a longo-acuminado, membranácea, margem inteira a serrulada, relativamente rígida e envernizada devido a epiderme contendo muitas glândulas, glabros a pilosos nas nervuras.

Inflorescência

A inflorescência é terminal, panícula, menor que as folhas, glabra a pulberulenta, brácteas e bractéolas caducas.

Flores

As flores são brancas ou róseas com estrias rosa-escuras, cálice 12-22x6-9 mm, irregularmente tubular-campanulado, apiculado, irregularmente bilabiado ou subespatulado na antese, glabro a pulberulento na base, ocasionalmente com estrias longitudinais, corola 2,5-4cm compr., ampla, tubular-campanulada, achatada dorsi-ventralmente, glabra no exterior do tubo, pubescente no interior do tubo, glandular-pubescente na inserção dos estames, lobos irregularmente laciniados, estames didínamos, filetes ca. 2 cm comprimento, anteras 3-4 mm comprimento, ovário 3-4x1-2 mm, oblongo, costado longitudinalmente, superfície glandular, disco 1,5x2 mm, cilíndrico.

Frutos

O fruto possui 21-54x0,5-1,2 cm, linear, ápice atenuado, base obtusa, glabro ou lepidoto; sementes 0,2-0,4x 3-5,5 cm.



Figura 2. *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum. (www.arvores.brasil.nom.br)



Figura 3. *Sparattosperma leucanthum* – Aspecto das folhas e flores
(www.arvores.brasil.nom.br)



Figura 4. *Sparattosperma leucanthum* – Aspecto das folhas e frutos
(www.arvores.brasil.nom.br)

1.2.2.2 Descrição Microscópica

O conhecimento de anatomia vegetal é muito importante em fitoquímica, uma vez que o trabalho se inicia com a coleta e posterior identificação da espécie em estudo.

Em adição ao exame macroscópico e ao uso de vários testes químicos, a avaliação microscópica é essencial como critério de autenticação para uma correta identificação do material vegetal a ser utilizado (DICKISON, 2000).

Esta identificação é feita comparando a planta em estudo com um padrão que possua descrições pormenorizadas existentes em literatura especializada (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Na ausência de padrões podem ocorrer equívocos quanto a determinação da espécie.

A espécie *S. leucanthum* não apresenta caracterização anatômica descrita na literatura, o que resulta na identificação errônea da espécie e, conseqüentemente em um número grande de sinônimos botânicos.

1.3 Flavonóides

Flavonóides são substâncias fenólicas amplamente encontradas em tecidos vasculares de plantas, incluindo folhas, frutos, raízes e caules (ANDLAUER & FURST, 1998; DI CARLO *et al.*, 1999; PIETTA, 2000).

A unidade C₁₅ básica consiste de dois anéis benzênicos, A e B, conectados por uma cadeia de três carbonos (DEWICK, 2002), formando a unidade C₆-C₃-C₆ (**Figura 5**). Na maior parte dos flavonóides esta cadeia é fechada, formando um anel heterocíclico – anel C.

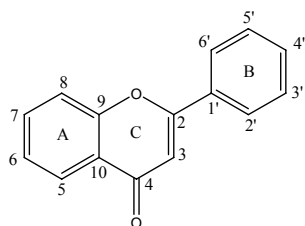


Figura 5. Estrutura básica C₆-C₃-C₆ dos flavonóides

Com mais de 6500 substâncias conhecidas (RAUHA *et al.*, 2001), todos os flavonóides são produzidos pela mesma rota biossintética, a qual incorpora precursores da via do acetato e do chiquimato (STRACK & WRAY, 1994; DEWICK, 2002). Flavonóides são biossintetizados a partir de uma unidade iniciadora de cinamoil-CoA e uma unidade extensora utilizando três moléculas de malonil-CoA, gerando um policetídeo, que passa por uma reação do tipo Claisen formando um anel aromático (HARBORNE, 1982) (**Figura 6**).

As **chalconas** agem como precursoras de todos os derivados de flavonóides, dando origem a duas outras classes (**Figura 7**):

- a. **Auronas** são formadas através da ciclização na posição α ;
- b. **Flavanonas** são formadas através da ciclização na posição β . Essa reação biossintética é catalisada enzimática e estereoespecificamente, originando um único enantiômero.

As **flavanonas** podem então seguir três rotas distintas, originando outras classes (**Figura 7**):

- c. **Flavonas** são formadas pela inserção de uma ligação dupla entre C-2 e C-3 através de uma reação em duas etapas. A primeira etapa compreende a formação de 2-hidroxi-flavanona seguida da eliminação de água.
- d. **Flavonóis** são formados de maneira análoga. A primeira etapa compreende a formação de 3-hidroxi-flavanona (**Di-hidroflavonóis**) seguida da hidroxilação em C-2, formando a 2,3-di-hidroxi-flavanona e então, eliminação de água.
- e. **Isoflavonóides** são formados através de rearranjo oxidativo do grupamento fenila de C-3 para C-2.

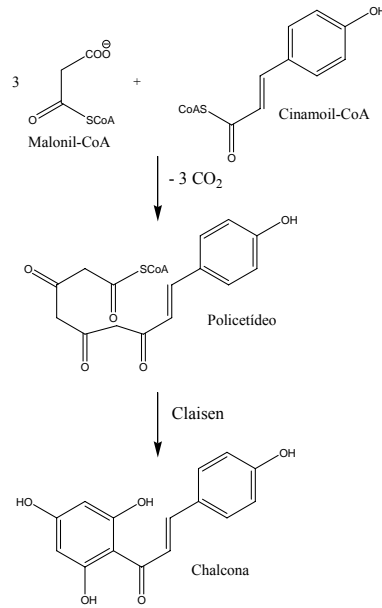


Figura 6. Biossíntese da chalcona

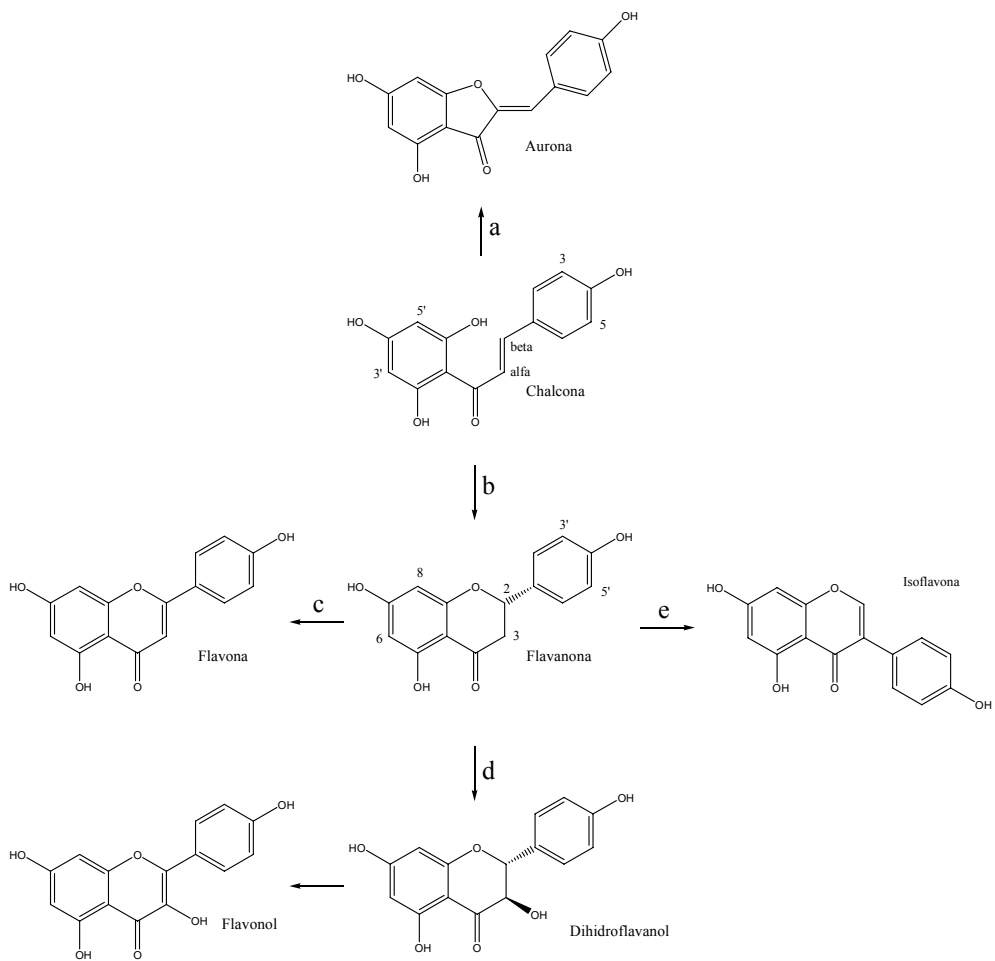


Figura 7. Biossíntese das principais classes de flavonóides

As diversas classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição (DI CARLO *et al.*, 1999; PIETTA, 2000; PETERSON & DWYER, 1998). Além das diferentes classes de flavonóides há ainda variações quanto hidroxilação, glicosilação, metilação, acilação, prenilação e sulfatação (RIJKE *et al.*, 2006). Flavonóides são considerados os componentes químicos mais estáveis em plantas.

O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades. Ensaio biológicos revelam que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos apresentando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório e antiplaquetário (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES *et al.*, 2000). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoreduções, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases (FERGUSON, 2001; HAVSTEEN, 2002).

1.4 Atividade Antioxidante

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (CERRUTI, 1991;

1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres e tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (ROY & KULKARNI, 1996; WITZUM, 1994). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN *et al.*, 1998).

A utilização de substâncias antioxidantes encontradas na dieta ou mesmo sintéticas é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e farmacêutica (HALLIWELL *et al.*, 1995).

1.5 Resistência a Múltiplas Drogas

A quimioterapia ocupa um importante lugar entre as estratégias de combate ao câncer. Infelizmente, células cancerígenas frequentemente continuam a crescer, pois desenvolvem mecanismos de resistência. Isso constitui o maior problema no tratamento desta patologia (SIMON & SCHINDLER, 1994). Entre os diferentes mecanismos de resistência, a Resistência Pleiotrópica contra uma série de drogas ou fenótipo celular de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR, do inglês “Multidrug Resistance”) é frequentemente encontrada (PIETRO *et al.*, 1992). Sua ocorrência é tanto intrínseca e imediata quanto de desenvolvimento progressivo durante o tratamento quimioterápico (LVEILLE-WEBSTER & ARIAS, 1995). Esse tipo de MDR foi descrito primeiramente para células cancerosas, sendo promovido para uma proteína transportadora transmembranar, chamada glicoproteína-P. Após sua descoberta, um grande número de proteínas homólogas foi descrito em diferentes organismos (LAGE, 2003). Essas

proteínas pertencem a superfamília dos transportadores ABC. Elas usam energia a partir da hidrólise de ATP para exsudar drogas citotóxicas para fora das células cancerígenas, tornando-as assim resistentes a quimioterapia (GOTTESMAN & PASTAN, 1993).

Células cancerígenas que superexpressam a glicoproteína-P exibem resistência cruzada a uma variedade de drogas que divergem estruturalmente (ENDIOCOTT & LING, 1989; GOTTESMAN & PASTAN, 1993). Transportadores ABC homólogos a glicoproteína-P de mamíferos são encontrados em outros organismos, como *Candida glabrata* (Cdr1p e pdh1p) (LUPETTI et al., 2002) e *Saccharomyces cerevisiae* (Pdr5p) (DECOTTIGNIES, 1994) apresentando cerca de 70% de homologia, tornando-os um ótimo modelo para estudos na busca de inibidores para a glicoproteína-P.

1.6 Cromatografia Contracorrente

Cromatografia contra-corrente (CCC) é essencialmente uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida é retida no aparelho sem a utilização de suporte sólido (CONWAY, 1990; BERTHOD, 1991). Na maior parte de tipos de CCC, uma das fases permanece estacionária enquanto a outra passa através desta. O princípio fundamental de separação envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo a proporção relativa de soluto que passa para cada fase determinada pelo seu respectivo coeficiente de partição (K) (MARSTON & HOSTETTMANN, 1994). CCC é uma versão automatizada da extração líquido-líquido, comparável a repetidas partições do analito entre duas fases líquidas imiscíveis por agitação contínua em funil de separação (WINTERHALTER, 2007).

Desde a introdução da cromatografia contra corrente em 1970 (ITO & BOWMAN, 1970), a técnica se evoluiu rapidamente.

Os primeiros aparelhos desenvolvidos utilizando força gravitacional para retenção da fase líquida estacionária, CCC de gotículas e CCC de rotação locular, foram substituídos por equipamentos mais eficientes, que utilizavam força centrífuga para retenção da fase líquida estacionária: CCC hidrostático e CCC hidrodinâmico. O sistema hidrostático utiliza um único eixo de rotação, promovendo campo de força centrífuga constante ao longo de toda a coluna. O sistema hidrodinâmico utiliza dois eixos de rotação, mimetizando o movimento planetário, promovendo campo de força centrífuga variável ao longo da coluna, o que produz zonas de mistura e de separação das fases, auxiliando o processo de partição e conseqüente separação (ITO, 1991).

1.6.1 Vantagens da Cromatografia Contracorrente

A CCC possui vantagens importantes e particulares em comparação aos métodos cromatográficos convencionais utilizados para o isolamento e purificação de produtos naturais. Dentre as vantagens da técnica podemos citar (CONWAY, 1990; MARSTON & HOSTETTMANN, 1994):

- a. Versatilidade – quantidade e polaridade da amostra, os sistemas de solventes utilizados nas separações podem ser compostos por inúmeros solventes em inúmeras proporções, a eluição pode ser feita em modo normal ou inverso;
- b. Eficiência e rapidez;
- c. Economia – é necessário somente investimento inicial da compra do equipamento, as colunas são praticamente indestrutíveis, os sistemas de solventes utilizados nas separações são, em sua maioria, aquosos;
- d. Previsibilidade e reprodutibilidade – retenção das substâncias é determinada pelo coeficiente de partição;

- e. A ausência de suporte sólido evita a adsorção irreversível de amostras contendo substâncias polares. A recuperação da amostra é total, não ocorre modificações químicas ou perda da atividade biológica.

1.6.2 A Escolha do Sistema de Solventes

Técnicas cromatográficas convencionais utilizam apenas uma fase para eluir analitos de matrizes adsortivas ou de suportes sólidos revestidos com fase líquida. Em contraste, a CCC utiliza sistema de solventes bifásico, uma das fases é usada como fase estacionária e a outra como fase móvel (ITO, 2005).

A utilização de sistema de solventes composto por duas fases líquidas permite a escolha de grande número de solventes em diversas combinações possíveis. A seleção do sistema de solventes é o passo mais importante em CCC e o sucesso da separação depende dessa escolha.

O sistema de solventes adequado deve satisfazer algumas condições básicas (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006):

- a. Formação de duas fases;
- b. A amostra deve ser estável e solúvel no sistema;
- c. O tempo de separação das fases após agitação (tempo de decantação) deve ser inferior a 30 s para assegurar uma retenção satisfatória da fase estacionária;
- d. O coeficiente de partição (K) das substâncias deve estar na faixa de $0,5 < K < 2,0$ e o fator de separação ($\alpha = K_2/K_1$, $K_2 > K_1$) entre duas substâncias deve ser superior a 1,5 para assegurar uma separação eficiente;
- e. É recomendado que as fases superior e inferior do sistema bifásico tenham volumes próximos para evitar desperdício de solvente.

Inúmeros exemplos de sistemas de solventes utilizados em CCC podem ser encontrados na literatura (ABOTT & KLEIMAN, 1991; FOCAULT, 1994; HOSTETTMANN *et al.*, 1998; OKA *et al.*, 1991). A escolha do sistema ideal pode ser feita por diferentes métodos. Os mais comumente utilizados são:

- a. Busca na literatura por artigos que relatem o isolamento de substâncias similares por CCC. Os sistemas utilizados podem ser testados e modificados de acordo com a necessidade da amostra.
- b. Busca sistemática utilizando tabelas de sistemas de solventes, onde o mesmo sistema de solventes é misturado em diversas proporções variando suavemente a polaridade desde o mais hidrofóbico até o mais hidrofílico (FOCAULT, 1994; FRIESEN & PAULI, 2007; GARRARD, 2005; ITO, 2005).
- c. Utilização de diagramas ternários (FOCAULT & CHEVOLOT, 1998). Estes indicam a composição exata das fases estacionária e móvel e permitem o preparo independente de cada uma.
- d. Utilização de tabelas do ‘melhor solvente’, onde primeiro deve ser escolhido um solvente no qual a sua amostra é totalmente solúvel e então este será repartido entre outros dois solventes imiscíveis entre si e miscíveis no ‘melhor solvente’ (FOCAULT, 1994; FOCAULT & CHEVOLOT, 1998).

A cromatografia contracorrente tem se mostrado bastante útil no isolamento e purificação de produtos de origem natural (FISCHER *et al.*, 1991; KUBO, 1991; LEITÃO, 2005; MARSTON & HOSTETTMANN, 1994), principalmente substâncias de média a alta polaridade, que tendem a sofrer adsorção irreversível quando submetidas a fracionamento por técnicas cromatográficas convencionais.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação de mestrado visa ampliar o conhecimento anatômico, biológico e químico do gênero *Sparattosperma* através do estudo da espécie *Sparattosperma leucanthum*. Tem como objetivos específicos:

- Caracterizar anatomicamente a folha de *S. leucanthum*.
- Isolar as substâncias majoritárias da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia contracorrente e outras técnicas cromatográficas acessórias.
- Estudar características dos sistemas de solventes utilizados no isolamento das substâncias majoritárias da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia contracorrente e seu comportamento frente a modificações.
- Identificar as substâncias majoritárias da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* por ressonância magnética nuclear e espectroscopia de UV.
- Realizar ensaios biológicos para atividade antioxidante e atividade inibitória ATPásica da enzima Pdr5p para o extrato etanólico bruto; partições em hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol; e substâncias majoritárias da partição em acetato de etila de *S. leucanthum*.

3. METODOLOGIA

3.1 Gerais

3.1.1 Solventes

Foram utilizados solventes em grau para análise (P.A.) nas cromatografias em camada delgada e coluna e na obtenção dos extratos, e em grau espectroscópico nas cromatografias líquida de alta eficiência e contracorrente (Tedia – Brasil). Soluções aquosas foram preparadas com água pura produzida por sistema de água Milli-Q (18.2M Ω). Todas as misturas de solventes foram feitas volume a volume (v/v).

Foram utilizados solventes deuterados (metanol e piridina) em todas as análises por Ressonância Magnética Nuclear.

3.1.2 Cromatografia em Camada Delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placa de gel de sílica com 0,2 mm de espessura com suporte de alumínio (AL 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm MERCK®). A eluição foi feita em cuba de vidro com a fase orgânica do sistema acetato de etila-acetona-água 25:10:5. A visualização das substâncias em CCD foi feita através de detecção via radiação ultravioleta (Spectroline modelo CL-80) nos comprimentos de onda curta (254 nm) e pelo uso de revelador químico solução de ácido sulfúrico a 20% em metanol com posterior aquecimento.

3.1.3 Cromatografia por Filtração em Gel

A cromatografia por filtração em gel foi efetuada em coluna de 43 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro interno utilizando gel de Sephadex LH-20 (25-100 μ SIGMA-ALDRICH®) como fase estacionária e MeOH como fase móvel.

3.1.4 Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) foi efetuada em cromatógrafo Lachron Merck HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma interface D-7000, uma bomba L-7100, um detector de feixe de diodos (D.A.D.) L-7450A e um desgaseificador de solventes L-7612. As injeções foram feitas manualmente. No modo analítico foi utilizada uma válvula injetora equipada com uma alça de injeção de 20 μ l e uma coluna Lichrosorb RP-18 (partículas de 5 μ m de tamanho, 250 x 4.6 mm d.i.). No modo semi-preparativo foi utilizada uma válvula injetora equipada com uma alça de injeção de 100 μ l e uma coluna Lichrosorb RP-18 (partículas de 7 μ m de tamanho, 250 x 25 mm d.i.).

3.1.5 Cromatografia Contracorrente

As separações por cromatografia contracorrente (CCC) foram efetuadas em dois aparelhos:

- a) Multilayer Coil Separator Extractor (P. C. Inc., Potomac, MD, EUA) equipado com uma coluna tripla em PTFE (15 ml; d.i. 1,0 mm + 80 ml; d.i. 1,6 mm + 230 ml; 1,6 mm). As separações foram feitas utilizando a coluna de 80 ml, d.i. 1,6 mm e alça de injeção de 5 ml para injeção da amostra no sistema cromatográfico.

- b) MKS Quattro HT-Prep (AECS Ltd., Reino Unido) equipado com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em PTFE (26 ml; d.i. 1,0 mm + 236 ml; d.i. 3,2 mm e 95 ml; 2,0 mm + 98 ml; 2,0 mm). As separações foram feitas utilizando a coluna de 95 ml, d.i. 2,1 mm e alça de injeção de 5 ml para introdução da amostra no sistema cromatográfico.

A velocidade de rotação de ambos os aparelhos é ajustável de 0 a 1000 rpm, o plano de rotação do equipamento P. C. Inc. é horizontal e do equipamento Quattro HT-Prep MKS é vertical. Os sistemas são equipados com bomba de fluxo contínuo (Scientific Systems Inc., Lab Alliance) e coletor de frações automático Dynamax FC-1 (Rainin, Woburn, MA, EUA).

Os sistemas de solventes utilizados formam duas fases. A fase inferior/ aquosa foi utilizada como estacionária e a fase superior/ orgânica foi utilizada como móvel (modo de eluição normal) em todas as separações.

3.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos utilizando espectrômetro Bruker Avance DRX400 (Karlsruhe, Alemanha) a 25°C, operando a 400.13 MHz para ^1H e 100.61 para ^{13}C . Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). As áreas relativas aos sinais de absorção foram obtidas por integração eletrônica. A calibração dos espectros foi feita com o sinal do TMS (preferencialmente) ou com o sinal do solvente utilizado. Os processamentos dos espectros foram realizados utilizando-se o *software* MestReC.

3.1.7 Espectroscopia no Ultra-Violeta

Os espectros na região do ultra-violeta (UV) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro SHIMADZU modelo U.V.-1601 com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm QS HELLMMA®.

3.1.8 Critérios de Pureza

Os critérios de pureza adotados foram a observação de sinal único em CCD e posteriormente em CLAE.

3.2 Coleta do Material Botânico

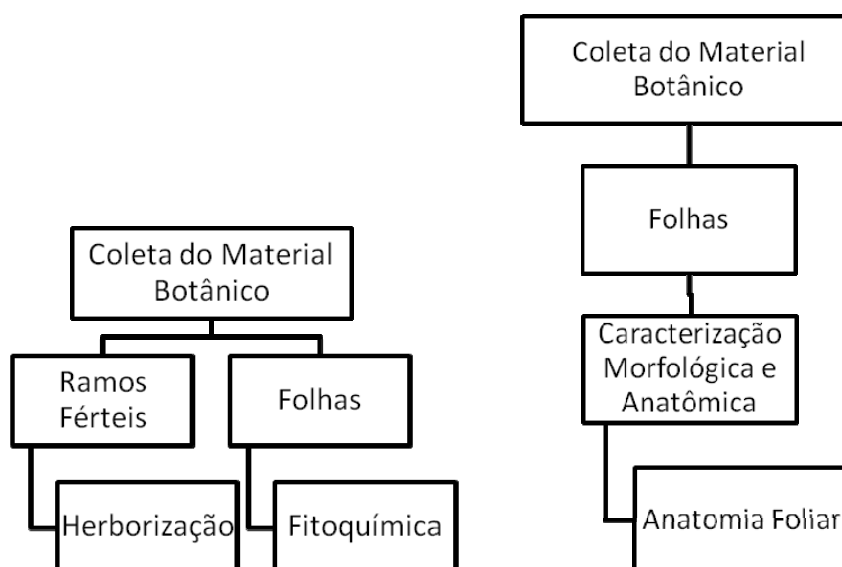


Figura 8. Esquema da coleta do material botânico *Sparattosperma leucanthum* para herborização, análise fitoquímica e descrição anatômica

O material botânico de *Sparattosperma leucanthum* (**Figura 8**) foi coletado na Mata Boa Vista, próximo à cidade de Levy Gaspariam (Rio de Janeiro, Brasil) para herborização e análise fitoquímica.

O material botânico de *Sparattosperma leucanthum* (**Figura 8**) foi coletado no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) para a descrição anatômica.

3.3 Herborização e Identificação da Espécie

Os ramos férteis coletados foram prensados em jornal para a confecção de exsicata que foi depositada no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número de registro RFA 31775. A identificação taxonômica foi feita por Sebastião José da Silva Neto do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil.

3.4 Análise Anatômica

As observações dos caracteres anatômicos foram realizadas no maior folíolo de folhas localizadas nos 5 ou 7 nós e, posteriormente, fixadas em etanol 70%.

Os cortes, no plano transversal, foram realizados na região mediana do peciólulo, da nervura principal, da região intercostal e do bordo, do folíolo, com espessura entre 15-20 μm , utilizando-se de micrótomo de deslize. Os fragmentos foram embebidos em uma solução de Polietileno Glicol P.M. 1500 (PEG) a 20% em água e deixados em estufa a 60° C até a evaporação total da água. Após a inclusão, as amostras foram emblocadas em PEG puro (BURGER & RITCHER, 1991). As seções foram coradas com Azul de Astra e Safranina e montadas conforme técnicas usuais de anatomia (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951).

Para os estudos das faces adaxial e abaxial da epiderme, em vista frontal, foram retirados pequenos retângulos do terço médio da lâmina foliar, procedendo-se à dissociação pelo método de Jeffrey (JOHANSEN, 1940).

3.5 Fitoquímica

3.5.1 Obtenção do Extrato e Partições

As folhas de *S. leucanthum* foram secas em estufa a 50°C e posteriormente moídas em moinho de facas. As folhas secas e moídas (840 g) foram submetidas à maceração estática a frio com etanol 96°GL, originando um total de 145 g de extrato bruto etanólico seco. Parte do extrato bruto seco (45 g) foi ressuspenso em metanol/água (3:9) e fracionado por partições líquido-líquido sucessivas em solventes orgânicos de diferentes polaridades, obtendo-se as partições em hexano (5,2 g), clorofórmio (7,7 g), acetato de etila (4,5 g) e butanol (5,0 g) (**Figura 9**). A eliminação dos solventes do extrato e partições foi feita sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Fisatom) equipado com banho de aquecimento e os resíduos de água remanescentes foram retirados com aparelho de liofilização (E-C Modulyo, LabConco). O extrato e as partições foram enviados para testes biológicos como será descrito posteriormente no item 3.6.

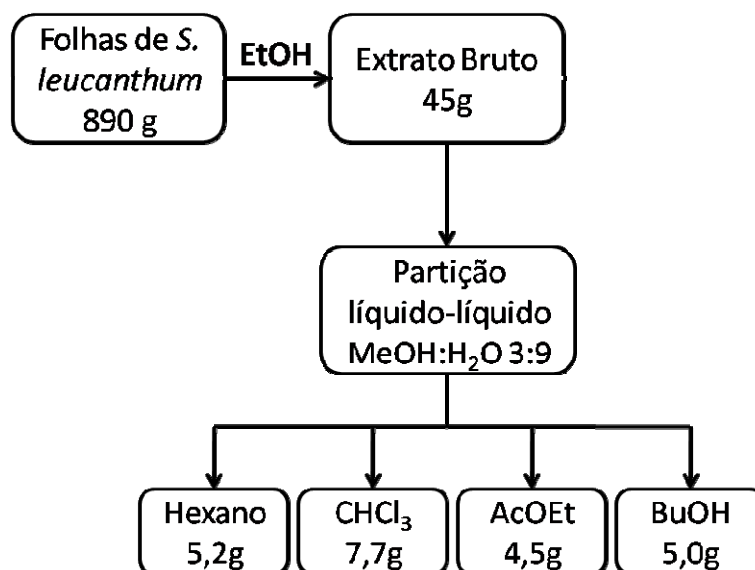


Figura 9. Obtenção do extrato bruto e partição de folhas de *Sparattosperma leucanthum*

3.5.2 Análise Preliminar da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *Sparattosperma leucanthum*

A análise preliminar da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* foi feita por CCD e CLAE analítica.

A placa de CCD foi eluída com a fase orgânica do sistema acetato de etila-acetona-água 25:10:5 e revelada com radiação UV e solução de ácido sulfúrico a 20% em metanol com posterior aquecimento.

CLAE analítica utilizou coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente. A fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O (acidificada com ácido acético glacial, pH3) com gradiente linear de 40% → 100% de MeOH em 35 min, utilizando-se fluxo de 1 ml/min. As injeções foram feitas manualmente com uma válvula injetora equipada com uma válvula de injeção de 20µl. O cromatograma foi obtido com detecção no UV (D.A.D.) a 240 nm a temperatura ambiente.

3.5.3 Fracionamento da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *Sparattosperma leucanthum* por Cromatografia Contracorrente

3.5.3.1 Teste de Partição em Tubo de Ensaio para Seleção de Sistema de Solventes

O teste para seleção do sistema de solventes para CCC, em tubo de ensaio, foi feito com a adição de pequena quantidade (alguns miligramas) da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* em pequena quantidade do sistema de solventes (1-2 mililitros) em equilíbrio seguida de agitação manual. Após decantação, iguais volumes de ambas as fases foram aplicados em placa de CCD. As placas foram eluídas e a concentração relativa das substâncias da amostra em cada fase do sistema de solventes bifásico foi visualizada.

3.5.3.2 Cálculo do Coeficiente de Partição por Cromatografia com fase Líquida de Alta Eficiência

O cálculo do coeficiente de partição por CLAE foi feito com a adição de pequena quantidade da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* em pequena quantidade do sistema de solventes em equilíbrio, em concentração de 0,5 mg/ml seguida de agitação manual. Após decantação das fases, estas foram separadas em funil de separação e os solventes evaporados em evaporador rotatório. Os resíduos obtidos das fases foram ressolubilizados em 5 ml de metanol e submetidas a CLAE analítica. O coeficiente de partição foi calculado pela razão da área do pico da substância na fase estacionária pela área do pico na fase móvel.

3.5.3.3 Preparo do Sistema de Solventes e Amostra para Cromatografia Contracorrente

Os sistemas de solventes selecionados para a separação por CCC foram misturados nas proporções definidas e equilibrados em funil de separação a temperatura ambiente. As fases superior e inferior foram separadas pouco antes de serem utilizadas e degaseificadas em aparelho de ultra-som (Unique Modelo USC-700) por 15 min.

A solução contendo a amostra foi preparada por solubilização da amostra, com auxílio de aparelho de ultra-som, em mistura 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes.

3.5.3.4 Separação dos Constituintes da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* por Cromatografia Contracorrente

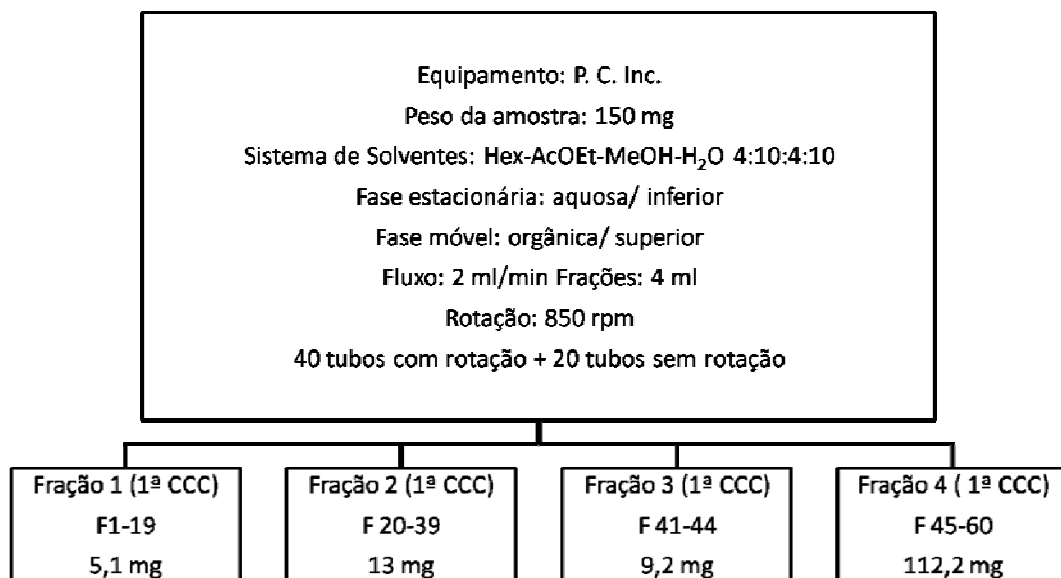
O primeiro fracionamento da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* foi realizado no equipamento da P.C. Inc. (**Tabela 1**, página 29) com o sistema de solventes hexano-acetato de etila-metanol-água (Hex-AcOEt-MeOH-H₂O) nas proporções 4:10:4:10, eluição em modo normal, fluxo de 2 ml, frações de 4 ml. 150 mg de amostra foi solubilizada em 5 ml do sistema de solventes (1:1). Foram recolhidas 40 frações com a rotação ligada a 850 rpm e 20 frações com a rotação desligada. A retenção de fase estacionária foi de 80%.

As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 1**, página 28) e posteriormente analisadas por CLAE.

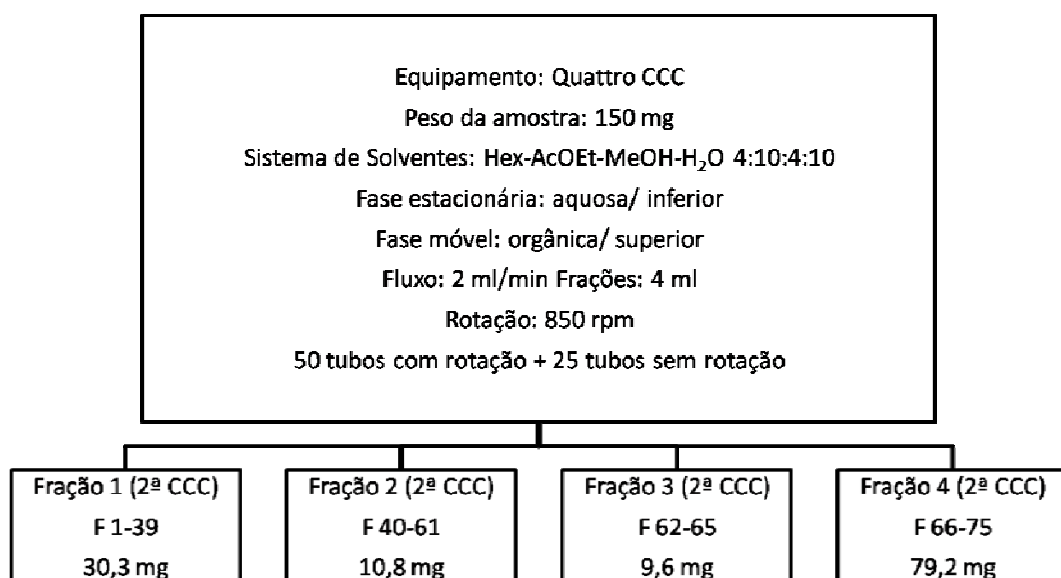
O segundo fracionamento da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* foi realizado no equipamento da Quattro HT-Prep MKS (**Tabela 1**, página 29) nas mesmas condições anteriores. Foram recolhidas

50 frações com a rotação ligada a 850 rpm e 25 frações com a rotação desligada. A retenção de fase estacionária foi de 85%.

As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 2**, página 28) e posteriormente analisadas por CLAE.



Fluxograma 2. Fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento P.C. Inc., o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 e eluição em modo normal.



Fluxograma 2. Fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 e eluição em modo normal.

Tabela 4. Condições cromatográficas das separações dos constituintes da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC

Equipamento	Volume e diâmetro	Fluxo	Rotação	Sistema de Solvente	Retenção de Fase Estacionária	Modo de Eluição	Amostra	Frações
P. C. Inc.	80 ml 1,6 mm	2 ml/ min Frações de 4 ml	Horizontal 850 rpm	Hex-AcOEt- MeOH-H ₂ O 4:10:4:10	80%	Normal	150 mg em 5 ml	40 frações com rotação ligada + 20 frações sem rotação
Quattro HT- Prep MKS	95 ml 2,1 mm	2 ml/ min Frações de 4 ml	Vertical 850 rpm	Hex-AcOEt- MeOH-H ₂ O 4:10:4:10	85%	Normal	150 mg em 5 ml	50 frações com rotação ligada + 25 frações sem rotação

3.5.4 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *Sparattosperma leucanthum*

A fração 4 proveniente do fracionamento da partição em AcOEt de Folhas de *S. leucanthum* por CCC foi submetida a nova separação por diferentes técnicas cromatográficas.

3.5.4.1 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* por Cromatografia de Filtração em Gel

A Fração 4 obtida do fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC foi submetida a cromatografia em coluna (43 cm de altura e 2 cm de diâmetro) utilizando Sephadex LH-20 como gel de filtração e MeOH como fase móvel. 30 mg de amostra foram solubilizados em 2,5 ml de MeOH. O fluxo utilizado foi de 5 gotas/min e 30 frações de 2 ml foram recolhidas.

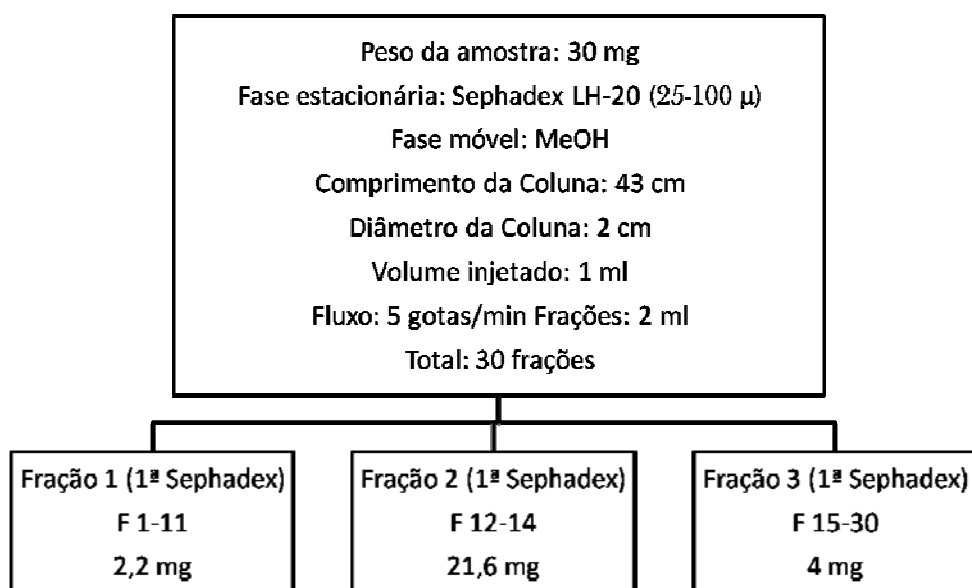
As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 3**, página 32) e posteriormente analisadas por CLAE.

3.5.4.2 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* por Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência

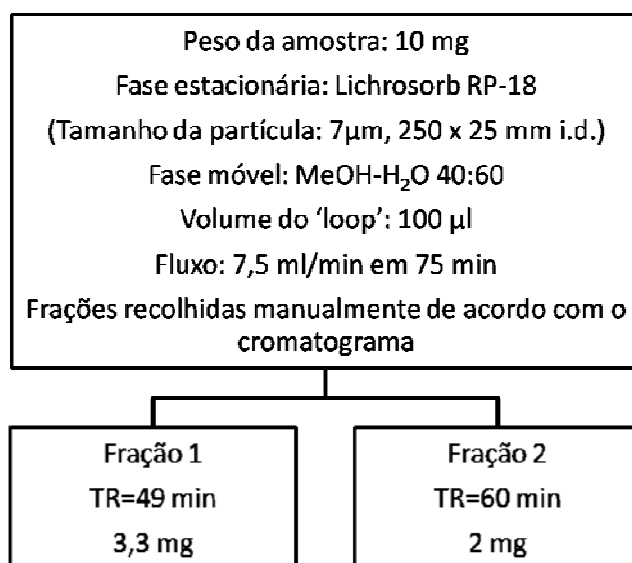
A Fração 4 obtida do fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC foi submetida a separação por CLAE semi-preparativa utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo isocrático. A fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O (acidificada com ácido acético glacial até pH3) 40:60, 7,5 ml/ min, durante 75

min. 10 mg de amostra foram solubilizadas em 100 μ l de MeOH. A injeção foi feita manualmente. O cromatograma foi obtido com detecção no UV (D.A.D.) a 240 nm e temperatura ambiente.

As frações foram recolhidas manualmente e posteriormente analisadas por CLAE (**Fluxograma 4**, página 32).



Fluxograma 3. Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia de filtração em gel



Fluxograma 4. Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia com fase líquida de alta eficiência

3.5.4.3 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* por Cromatografia Contracorrente

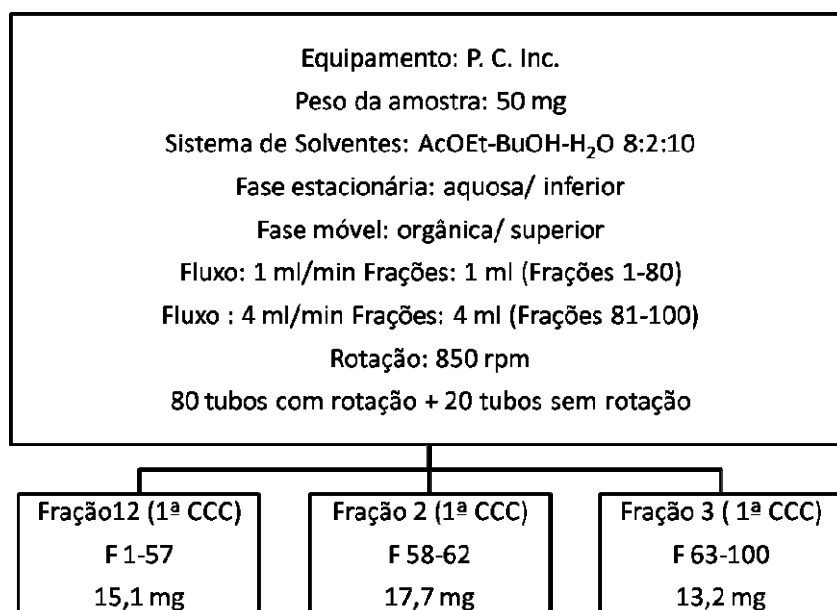
A Fração 4 obtida do fracionamento da partição em AcOEt de Folhas de *S. leucanthum* por CCC foi submetida a separação por CCC com os sistemas de solventes acetato de etila-butanol-água (AcOEt-BuOH-H₂O) e butironitrila-acetonitrila-água (BuCN-ACN-H₂O) em dois equipamentos diferentes.

A primeira separação da Fração 4 partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* realizada por CCC utilizou o sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O nas proporções 8:2:10, eluição em modo normal. 50 mg de amostra foram solubilizadas em 5 ml do sistema de solventes (1:1). Foram recolhidas 80 frações de 1 ml a um fluxo de 1 ml/ min com a rotação ligada a 850 rpm e 20 frações 4 ml a um fluxo de 4 ml/ min com a rotação desligada. O equipamento utilizado foi da marca P. C. Inc. (**Tabela 2**, página 37). A retenção de fase estacionária foi de 83%.

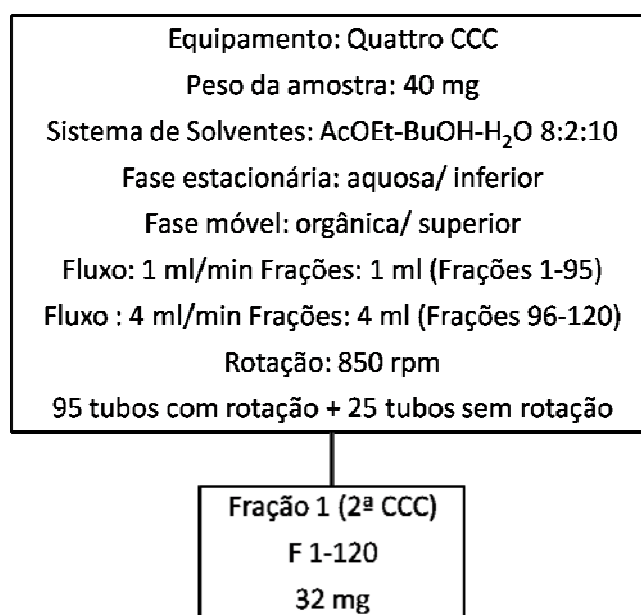
As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 5**, página 34) e posteriormente analisadas por CLAE.

A segunda separação da Fração 4 da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* foi realizado no equipamento da Quattro HT-Prep MKS (**Tabela 2**, página 37) nas mesmas condições anteriores. A retenção de fase estacionária foi de 81%.

As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 6**, página 34).



Fluxograma 5. Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento P.C. Inc., o sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10 e eluição em modo normal.



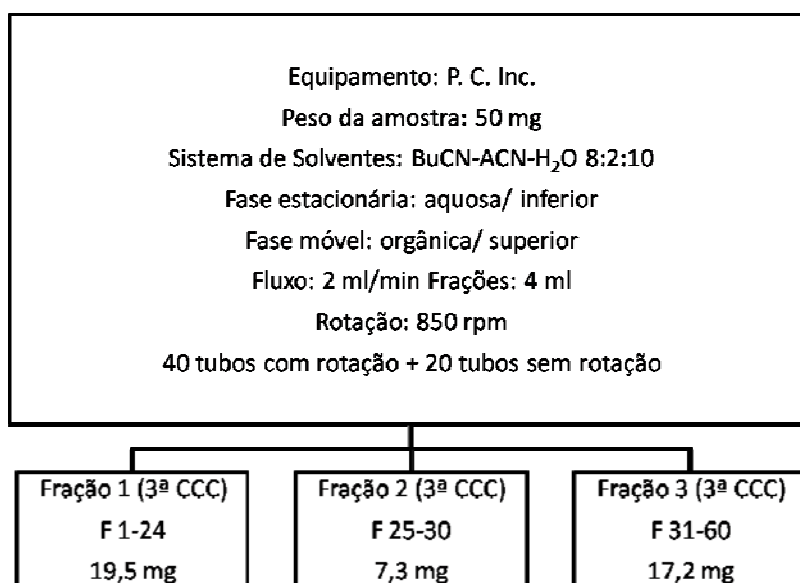
Fluxograma 6. Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, o sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10 e eluição em modo normal.

A terceira separação da Fração 4 da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* realizada por CCC utilizou o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O nas proporções 5:10:10, eluição em modo normal, fluxo de 2 ml, frações de 4 ml. 50 mg de amostra foram solubilizadas em 5 ml do sistema de solventes (1:1). Foram recolhidas 40 frações com a rotação ligada a 850 rpm e 20 frações com a rotação desligada. Foi utilizado o equipamento da P. C. Inc. (**Tabela 2**, página 37). A retenção de fase estacionária foi de 85%.

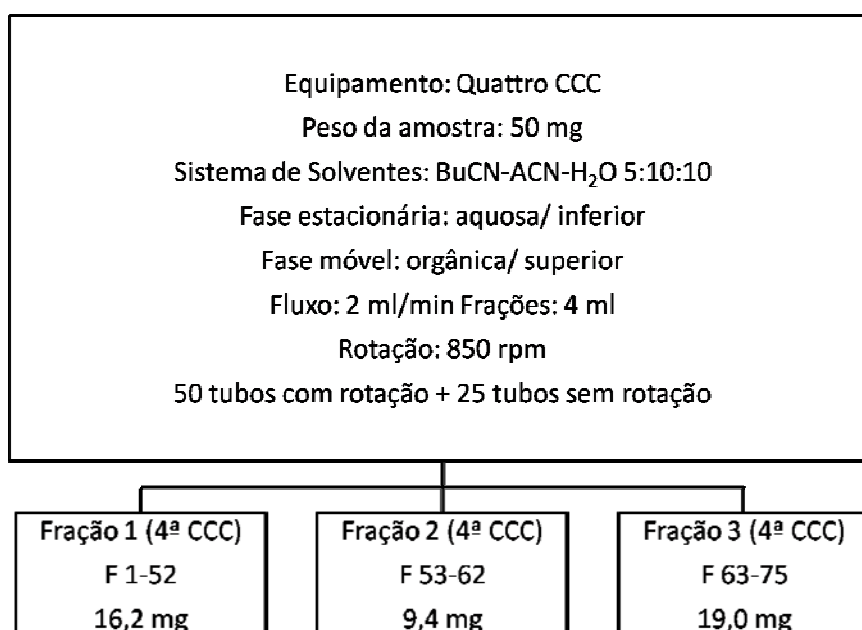
As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 7**, página 36) e posteriormente analisadas por CLAE.

A quarta separação da Fração 4 da partição em acetato de etila de folhas de *S. leucanthum* foi realizado no equipamento da Quattro HT-Prep MKS (**Tabela 2**, página 37) nas mesmas condições anteriores. A retenção de fase estacionária foi de 82%.

As frações recolhidas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica por CCD (**Fluxograma 8**, página 36) e posteriormente analisadas por CLAE.



Fluxograma 7. Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento P.C. Inc., o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O 5:5:10 e eluição em modo normal.



Fluxograma 8. Fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O 5:5:10 e eluição em modo normal.

Tabela 2. Condições cromatográficas das separações dos constituintes da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CCC

Equipamento	Volume e diâmetro	Fluxo	Frações	Rotação	Sistema de Solvente	Retenção de Fase Estacionária	Modo de Eluição	Amostra
P. C. Inc.	80 ml 1,6 mm	1 ml/ min Frações de 1 ml	80 tubos com rotação	Horizontal 850 rpm	AcOEt-BuOH-H ₂ O 8:2:10	83%	Normal	50 mg em 5 ml
Quattro HT-Prep MKS	95 ml 2,1 mm	4 ml/ min Frações de 4 ml	20 tubos sem rotação	Vertical 850 rpm	AcOEt-BuOH-H ₂ O 8:2:10	81%	Normal	40 mg em 5 ml
P. C. Inc.	80 ml 1,6 mm	2 ml/ min Frações de 4 ml	40 frações com rotação ligada + 20 frações sem rotação	Horizontal 850 rpm	BuCN-ACN-H ₂ O 5:10:10	85%	Normal	50 mg em 5 ml
Quattro HT-Prep MKS	95 ml 2,1 mm	2 ml/ min Frações de 4 ml	50 frações com rotação ligada + 25 frações sem rotação	Vertical 850 rpm	BuCN-ACN-H ₂ O 5:10:10	82%	Normal	40 mg em 5 ml

3.5.5 Análise e Identificação das Substâncias por Espectroscopia de UV e Ressonância Magnética Nuclear

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através de métodos instrumentais de espectroscopia de UV e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H , COSY ^1H - ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C) e técnicas bidimensionais (HSQC).

Todos os dados obtidos foram comparados a dados da literatura.

- 2',4',6'-tri-hidroxi 4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona

UV $\lambda^{\text{MeOH}}_{\text{nm}}$: 261,8; 256,0.

^1H RMN (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 3,9-4,6 (5H, glicose); 3,93 (2H, *q*, C7); 4,25 (2H, *q*, C8); 5,75 (1H, *d*, C1-G); 7,17, (2H, *d*, C-3' e C-5'); 7,18-7,47 (5H, *m*, anel A).

^{13}C RMN (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 40,37 (CH_2 , C-7); 47,87 (CH_2 , C-8); 63,49 (CH_2 , C-6^G); 72,24 (CH, C-4^G); 76,10 (CH, C-5^G); 80,08 (CH, C-2^G); 80,21 (CH, C-3^G); 103,35 (CH, C-1^R); 103,49 (cada CH, C-3' e C5'); 114,63 (cada CH, C-3 e C-5); 127,26 (CH, C-4); 129,90 (cada CH, C-2 e C-6); 130,18 (C, C-1); 143,75 (C, C-1'); 159,06 (C, C-4'); 162,42 (cada C, C-2' e C-6'); 207,47 (C, C-4).

- Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo

UV $\lambda^{\text{MeOH}}_{\text{nm}}$: 324,6; 284,0.

^1H RMN (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1,75 (3H, *d*, C-6^R); 3,01 (2H, *dq*, C3); 4,0-4,8 (10H, glicose e rhamnose); 5,37 (1H, *dd*, C2); 5,67 (1H, *d*, C-1^G); 6,35 (1H, *s*, C-1^R); 6,65, (1H, *s*, C6); 6,71 (1H, *s*, C8); 7,34-7,50 (5H, *m*, anel B); 12,4 (1H, *s*, OH em C5).

^{13}C RMN (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 20,16 (CH_3 , C-6^R); 44,64 (CH_2 , C-3); 63,21 (CH_2 , C-6^G); 71,18 (CH, C-5^R); 72,25 (CH, C-4^G); 73,66 (CH, C-3^R); 73,99 (CH, C-2^R); 75,29 (CH, C-4^R); 78,98 (CH, C-5^G); 80,12 (CH, C-2^G); 80,41 (CH, C-3^G); 70,72 (CH, C-2); 97,43 (CH, C-8); 99,09 (CH,

C-6); 100,58 (CH, C-1^G); 103,74 (CH, C-1^R); 105,58 (C, C-10); 128,09 (cada CH, C-2' e C-6'); 130,31 (CH, C-4'); 130,38 (cada CH, C-3' e C-5'); 140,52 (C, C-1'); 164,61 (C, C-9); 165,71 (C, C-7); 167,47 (C, C-5); 197,88 (C, C-4).

▪ Pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo

UV $\lambda^{\text{MeOH}}_{\text{nm}}$: 322,6; 284,0.

¹H RMN (400 MHz, MeOD): δ 1,32 (3H, *d*, C-6^R); 1,97 (3H, *s*, MeCO); 2,90 (2H, *dq*, C3); 3,2-4,0 (9H, glicose e rhamnose); 5,06 (1H, *d*, C-1^G); 5,28 (1H, *s*, C-1^R); 5,49 (1H, *dd*, C2); 6,17, (1H, *s*, C6); 6,23 (1H, *s*, C8); 7,38-7,52 (5H, *m*, anel B).

¹H RMN (400 MHz, C₅D₅N): δ 1,79 (3H, *d*, C-6^R); 1,99 (3H, *s*, MeCO); 3,07 (2H, *dq*, C3); 4,0-5,0 (8H, glicose e rhamnose); 5,63 (1H, *d*, C-1^G); 6,40 (1H, *s*, C-1^R); 5,46 (1H, *dd*, C2); 6,62 (1H, *s*, C6); 6,72 (1H, *s*, C8); 7,42-7,59 (5H, *m*, anel B).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD): δ 16,87 (CH₃, C-6^R); 19,35 (CH₃, MeCO); 43,00 (CH₂, C-3); 63,31 (CH₂, C-6^G); 68,62 (CH, C-5^R); 70,40 (CH, C-4^G); 70,78 (CH, C-3^R); 70,79 (CH, C-2^R); 72,53 (CH, C-4^R); 74,08 (CH, C-5^G); 77,46 (CH, C-2^G); 77,57 (CH, C-3^G); 79,45 (CH, C-2); 95,64 (CH, C-8); 96,80 (CH, C-6); 98,12 (CH, C-1^G); 101,10 (CH, C-1^R); 103,59 (C, C-10); 126,08 (cada CH, C-2' e C-6'); 128,36 (CH, C-4'); 128,41 (cada CH, C-3' e C-5'); 138,71 (C, C-1'); 162,99 (C, C-9); 163,51 (C, C-7); 165,05 (C, C-5); 171,31 (C, MeCO); 196,73 (C, C-4).

3.6 Testes Biológicos

3.6.1 Atividade Antioxidante

Avaliações quanto a atividade antioxidante foram realizadas pelo método fotocolorimétrico do DPPH (MENSOR *et al.*, 2001).

O extrato etanólico e as partições obtidas das folhas de *S. leucanthum*, foram inicialmente solubilizadas em etanol e diluído a concentrações de 250, 125, 50 e 25 µg/ml. 1 ml de solução 0,3 mM de DPPH foi adicionado a 2,5 ml das soluções dos extratos. Após 30 min, os valores de absorbâncias foram medidos a 518 nm em espectrofotômetro de UV e convertidos para porcentagem de atividade antioxidante. O controle foi preparado a partir de 1,0 ml de etanol diluído em 2,5 ml do extrato. Os testes foram realizados em triplicata. A partir dos dados obtidos em leitura no espectrofotômetro foi realizado um gráfico de atividade antioxidante x concentração e a CE₅₀ foi obtida a partir da equação da reta do gráfico. Foi utilizada tintura de *Ginkgo biloba* EGB761 como padrão comparativo.

3.6.2 Inibição da Atividade ATPásica da Enzima Pdr5p

Todos os testes para avaliar a atividade inibitória do extrato bruto de folhas de *S. leucanthum* e suas partições foram feitos pela doutoranda Luciana Pereira Rangel no Laboratório de Bioquímica Microbiana, do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da UFRJ, sob orientação do Professor Dr. Antônio Ferreira Pereira.

A atividade ATPásica foi medida pela incubação de aproximadamente 13,0 µg/ml de proteína a 37°C em um volume final de 50 µg/ml na presença de um meio de reação padrão contendo ATP 3 mM, MgCl₂ 4 mM e Tris-HCl

100 mM ajustado para pH 7,5, além dos inibidores enzimáticos (para outras ATPases e/ou fosfatases de membrana) azida sódica 7,5 mM, molibdato de amônio 0,3 mM e KNO₃ 75 mM. A reação, realizada em microplacas de 96 poços, era disparada pela adição da enzima e paralisada após 60 minutos, pela adição de 200 µg/ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (p/v) (DULLEY, 1965). O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP foi medido utilizando um leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) a 660 nm (FISKE & SUBBAROW, 1925).

Neste meio também foram adicionados o extrato etanólico e as partições obtidas das folhas de *S. leucanthum* diluídas em DMSO.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Descrição Anatômica

A caracterização anatômica foi realizada com o intuito de desenvolver um modelo para identificação de *Sparattosperma leucanthum*, uma vez que esta espécie possui inúmeras sinonímias botânicas.

Peciólulo – Na região mediana, *S. leucanthum* apresenta no plano transversal, o peciólulo com formato plano convexo com duas projeções laterais, voltadas para face adaxial (**Figura 10 (1)**). A epiderme é unisseriada recoberta por cutícula delgada e lisa (**Figura 10 (2)**), e com tricomas tectores unisseriados com 2 ou 3 células (**Figura 10 (1e3)**). O colênquima do tipo anelar é encontrado subjacente a epiderme, em toda a extensão do peciólulo, exceto nas expansões laterais (**Figura 10 (2e4)**). O parênquima cortical apresenta células com paredes delgadas e pequenos espaços intercelulares (**Figura 10 (4)**). O sistema vascular está organizado por um feixe cilíndrico central maior, circundado por grupos de fibras, e dois feixes vasculares menores nas projeções laterais (**Figura 10 (1e5)**). No floema, os elementos de transporte e células companheiras ocorrem em grupos, separados por células de parênquima. O xilema está constituído por elementos de proto e metaxilema, dispostos em séries radiais, separados por células parenquimáticas (**Figura 10 (5)**).

Lâmina foliar – As faces adaxial e abaxial da epiderme apresentam em vista frontal, células com formato poligonal, e paredes anticlinais delgadas, curvas a levemente sinuosas (**Figura 11 (1e2)**). As folhas são hipoestomáticas, com estômatos anomocíticos (**Figura 11 (2)**) distribuídos ao longo da lâmina foliar, exceto sob a nervura principal.

Na região intercostal, no plano transversal, a lâmina foliar tem a epiderme unisseriada e revestida por cutícula lisa delgada (**Figura 11 (3-7)**), observa-se tricomas tectores semelhantes aos observados no pecíolulo (**Figura 11 (3e4)**) e tricomas glandulares constituídos por uma célula do tipo peduncular curta de parede espessa e um conjunto de células apicais, formado por oito células secretoras, constituindo a cabeça da glândula (**Figura 11 (1, 2 e 5)**).

O mesofilo é dorsiventral com apenas uma camada de parênquima paliádico e três ou quatro camadas de parênquima lacunoso com células levemente arredondadas e afrouxadas, formando espaços intercelulares, voltada para a face abaxial (**Figura 11 (3)**).

O bordo apresenta-se fletido em direção a face abaxial com epiderme unisseriada e extremidade do bordo ocupada por elementos de parênquima clorofilado e células com compostos fenólicos (**Figura 11 (6e7)**).

A nervura mediana, no plano transversal, apresenta a epiderme uniestratificada com tricomas tectores semelhantes aos observados na região intercostal. Junto à epiderme é observado colênquima anelar 3-4 camadas na face adaxial e 2-3 na face abaxial. Parênquima cortical é observado subjacente ao colênquima nas faces abaxial e adaxial (**Figura 12 (1e2)**). A região vascular da nervura mediana apresenta-se fechada com disposição e organização dos tecidos condutores semelhantes a observada no pecíolulo (**Figura 12 (1e3)**). Os feixes menores estão distribuídos ao longo da lâmina foliar, envolvidos por uma bainha de células parenquimáticas clorofiladas.

Na face abaxial da lâmina foliar foram observadas domácias nas axilas da nervura mediana com as laterais (**Figura 12 (1)**). As criptas são revestidas por uma epiderme unisseriada com células de formato retangular (**Figura 12 (4)**). Internamente as domácias são constituídas por elementos do tecido fundamental que se dispõem frouxamente. Na face abaxial a epiderme apresenta configuração semelhante ao restante da lâmina foliar (**Figura 12 (1)**).

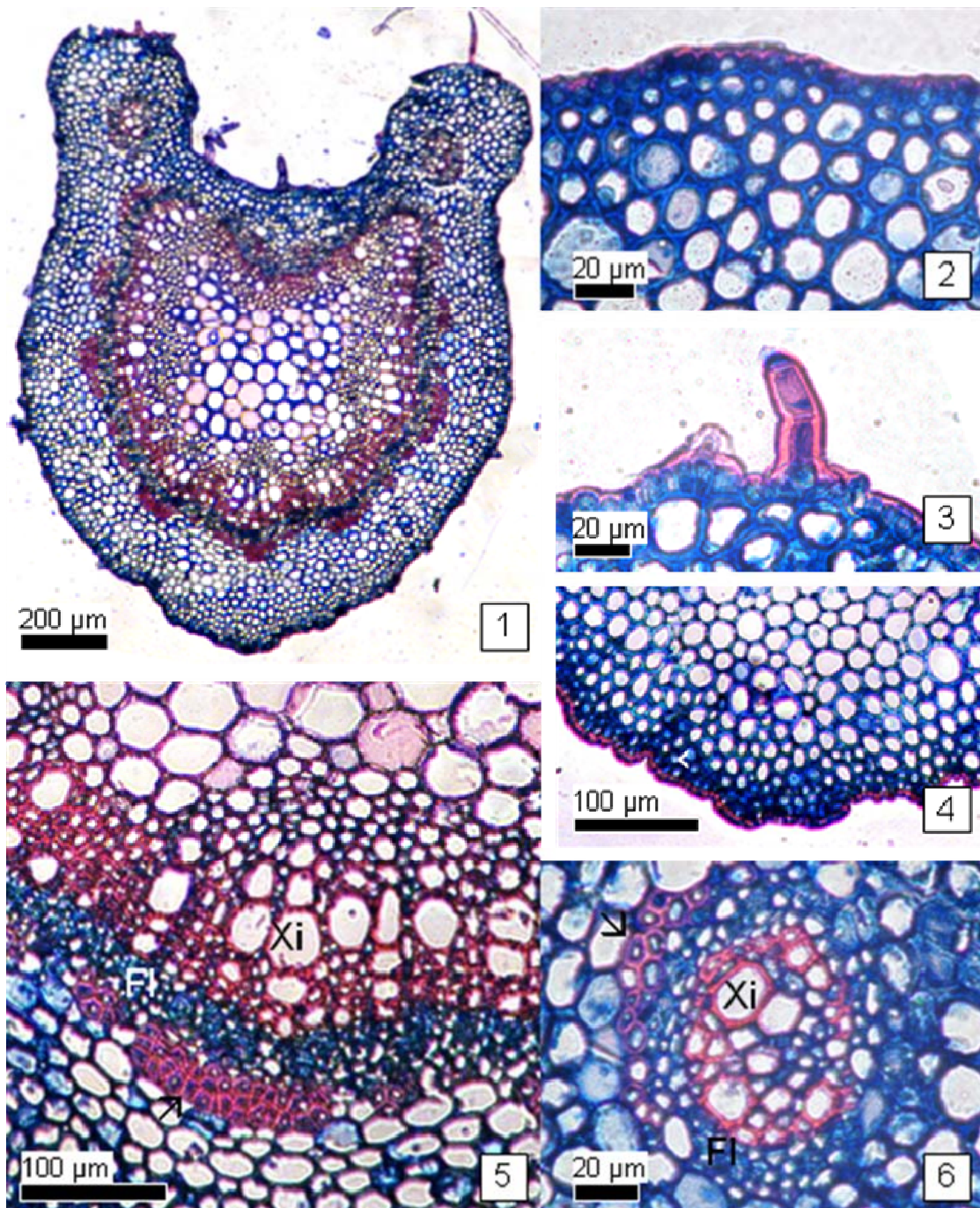


Figura 10. Plano transversal da região mediana do peciólulo de *Sparattospermum leucanthum*. 1. Aspecto geral. 2. Face adaxial evidenciando a epiderme unisseriada recoberta por cutícula delgada e lisa, e o colênquima do tipo anelar. 3. Detalhe do tricoma tector unisseriado. 4. Face abaxial evidenciando parênquima cortical com células com paredes delgadas e colênquima do tipo anelar (cabeça de seta). 5-6. Feixe vascular (Xi – xilema e Fl – floema), mostrando grupos de fibras perivasculares (seta) na região abaxial (5) e na projeção lateral (6).

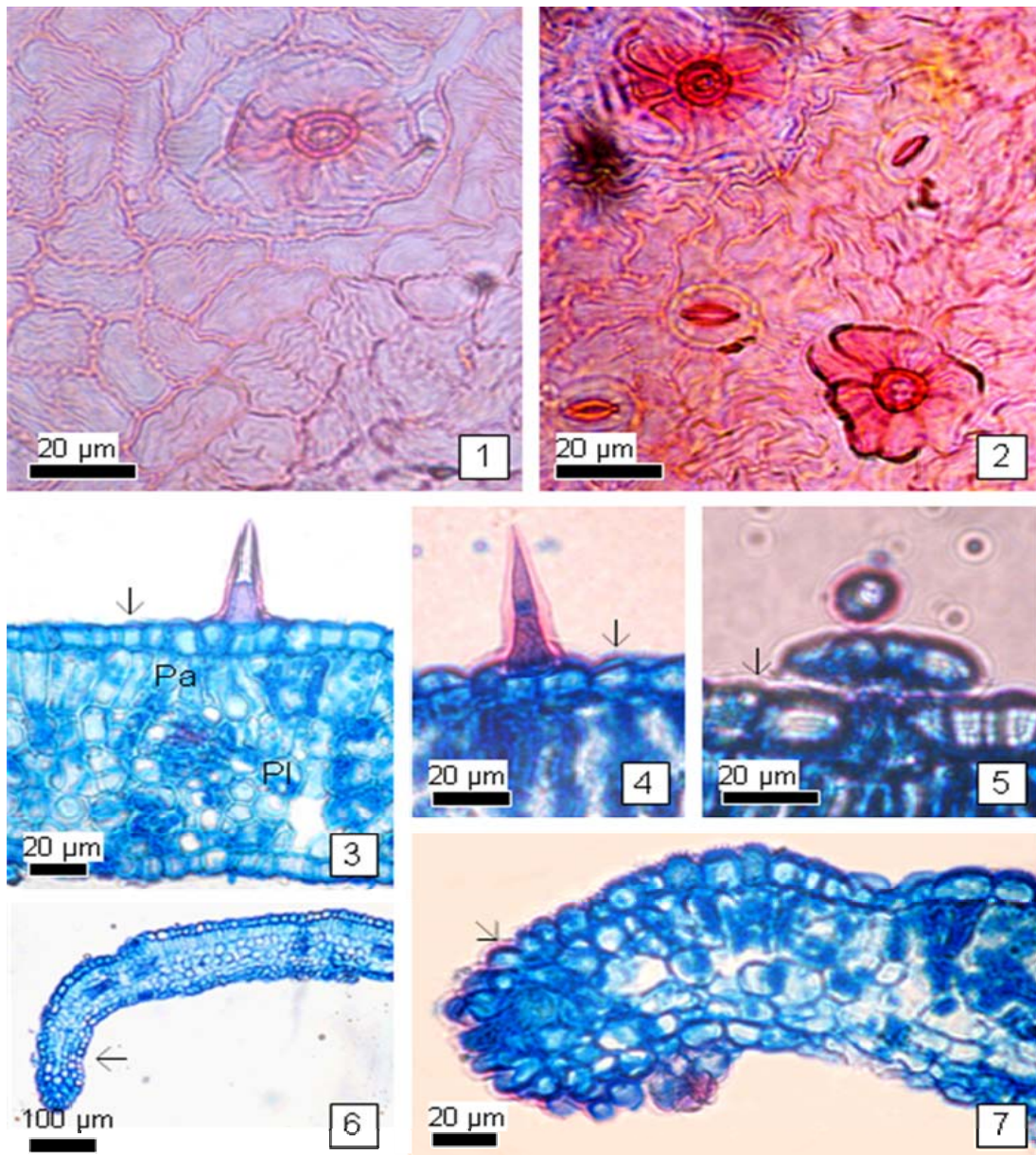


Figura 11. Terço médio da lâmina foliar de *Sparattospermum leucanthum*. 1-2. Epiderme em vista frontal evidenciando tricomas glandulares. 2. Note estômatos do tipo anomocíticos. 3-7. Secção transversal evidenciando epiderme unisseriada na região intercostal e bordo (seta). 3. Região intercostal com uma camada de parênquima paliçádico (Pa) e parênquima lacunoso frouxo (Pl). 4. Detalhe do tricoma tector. 5. Detalhe do tricoma glandular. 6-7. Bordo fletido em direção a face abaxial.

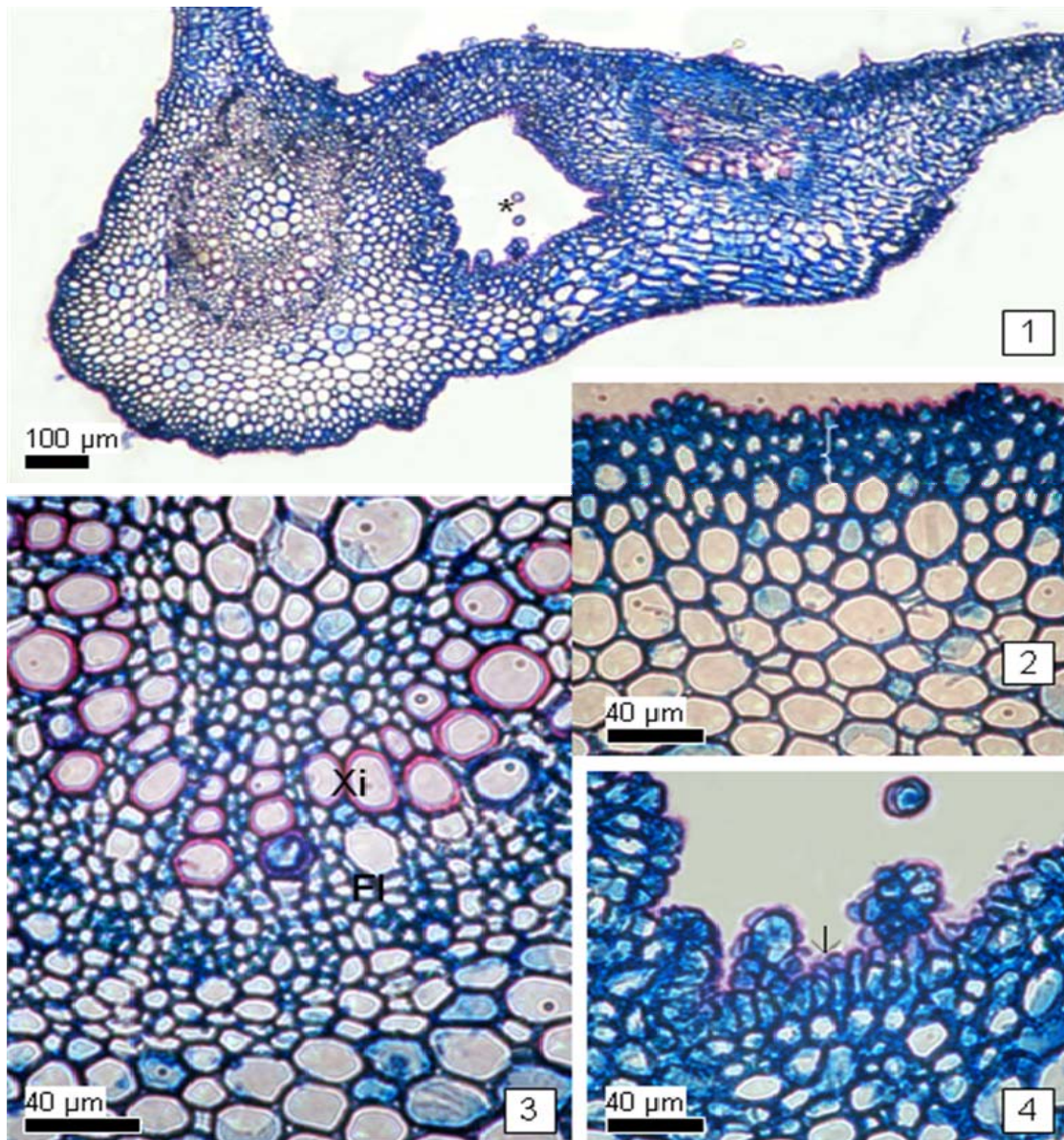


Figura 12. Secção transversal da nervura mediana de *Sparattospermum leucanthum*. 1. Nervura mediana e lateral evidenciando domácia com cripta (*). 2. Face adaxial evidenciando parênquima cortical com células com paredes delgadas e colênquima do tipo anelar (colchete). 3. Região vascular (Xi – xilema e Fl – floema). 4. Cripta da domácia mostrando células epidérmicas retangulares (seta).

4.2 Fitoquímica

4.2.1 Obtenção do Extrato e Partições

O extrato bruto de folhas de *S. leucanthum* foi obtido por maceração estática com etanol 96 °GL por ser um solvente de baixo custo e capaz de extrair substâncias de amplo espectro de polaridade. O extrato etanólico bruto obtido apresentou pronunciada atividade antioxidante (NERY, 2008) e efeito inibitório sobre a atividade enzimática da ATPase Pdr5p (RANGEL *et al.* 2008).

O fracionamento do extrato etanólico bruto foi feito através de extração líquido-líquido por partição entre água e solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol) bioguiado por testes de atividade antioxidante. Os resultados serão descritos posteriormente no item 4.2.6 (Página 127).

Durante a extração líquido-líquido com clorofórmio, ocorreu a precipitação de cerca de 8 gramas de um pó fino e amarelado (**Figura 13**). A substância foi identificada como pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo (**Figura 1**, página 4) – previamente isolada de frutos de *S. vernicosum*, sinonímia botânica de *S. leucanthum* – por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (KUTNEY *et al.*, 1970). E teve sua estrutura foi confirmada por espectroscopia de UV.



Figura 13. Precipitado obtido durante a extração líquido-líquido com CHCl_3

4.2.2 Análise Preliminar da Partição em Acetato de Etila

A análise fitoquímica preliminar da partição em AcOEt, que apresentou alta atividade antioxidante foi feita por CCD e CLAE.

A placa de CCD, eluída com a fase orgânica do sistema acetato de etila-acetona-água 25:10:5, apresentou três manchas majoritárias escuras quando reveladas com radiação UV e coloração amarelada quando reveladas quimicamente com solução de ácido sulfúrico a 20% em metanol (**Figura 14**), evidenciando a presença flavonóides e/ou derivados fenólicos (HARBONE & MABRY, 1982).

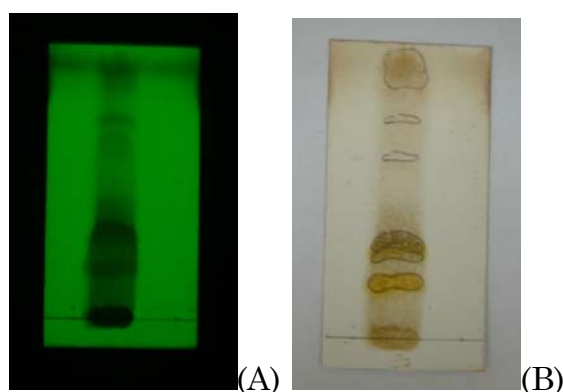


Figura 14. Análise fitoquímica preliminar da partição em AcOEt feita por CCD eluída com a fase orgânica do sistema acetato de etila-acetona-água 25:10:5. (A) CCD revelada com radiação UV. (B) CCD revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

O cromatograma obtido por CLAE apresentou três picos majoritários com tempos de retenção 6,59; 10,43 e 16,21 min (**Figura 15**).

Não foi possível quantificar as substâncias presentes na partição pela insolubilidade do extrato na fase móvel utilizada.

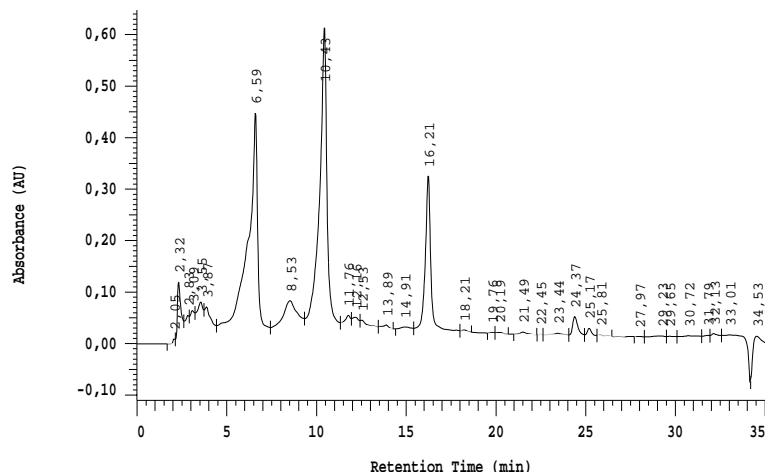
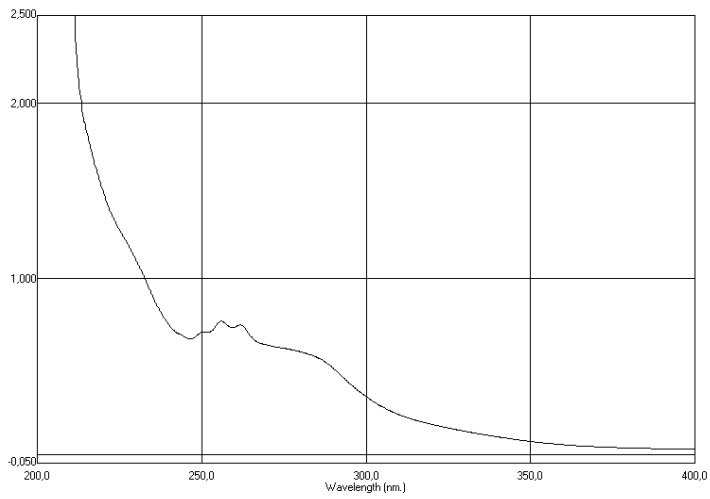


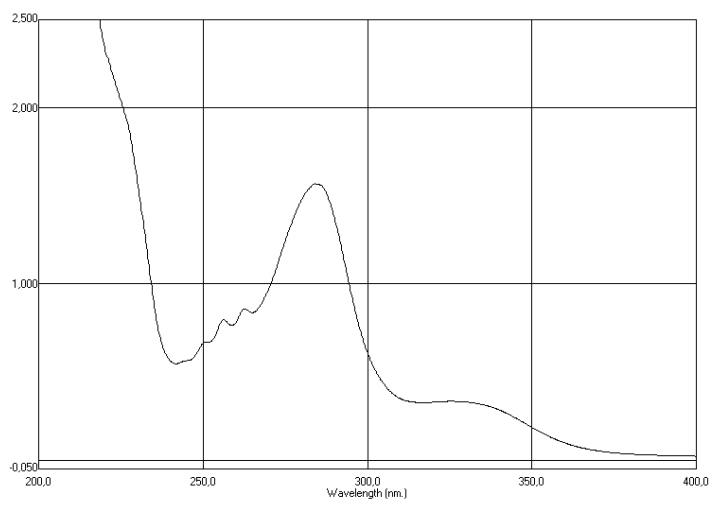
Figura 15. Cromatograma relativo a análise fitoquímica preliminar da partição em AcOEt feita por CLAE utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H₂O 40:60 até 100:0 em 35 min), $\lambda = 240$ nm.

O pico I apresentou espectro de UV com $\lambda_{\text{max}} = 261,8$ e $256,0$ nm; o pico II apresentou espectro de UV com $\lambda_{\text{max}} = 324,6$ e $284,0$ nm e o pico III apresentou espectro de UV com $\lambda_{\text{max}} = 322,6$ e $284,0$ nm (**Figura 16**).

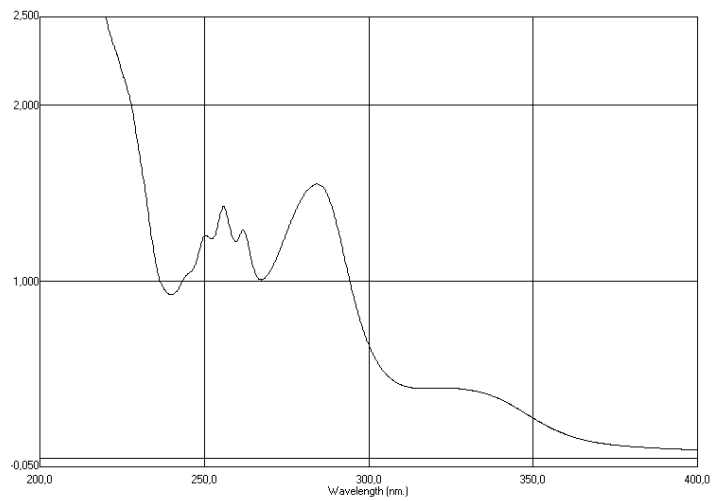
As absorções do espectro de UV do pico I foram típicas de derivados benzênicos (PAVIA *et al.*, 2001) e as absorções do espectro de UV dos picos II e III foram típicas flavanonas (MABRY *et al.*, 1970).



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Espectros de UV relativos aos picos I (a), II (b) e III (c).

4.2.3 Fracionamento da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *Sparattosperma leucanthum*

4.2.3.1 A Escolha do Sistema de Solventes

O sucesso da separação por CCC depende em grande parte da escolha do sistema de solventes ideal para a separação. A seleção do sistema de solventes é o passo mais importante no desenvolvimento da CCC e é estimado em 90% de todo o trabalho. Em contraste com cromatografias líquidas convencionais, CCC utiliza um sistema de solventes bifásico, onde uma das fases servirá de fase móvel e a outra de fase estacionária. A utilização de sistemas com duas fases imiscíveis resulta em um número extremamente grande de escolha de combinações de solventes possíveis com um amplo leque de polaridade (STICHER, 2008).

O sistema de solventes adequado deve satisfazer as seguintes condições (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006): (i) para assegurar uma retenção satisfatória da fase estacionária, o tempo de separação das fases após agitação deve ser menor que 30 segundos; (ii) para uma separação eficiente, os coeficientes de partição (K) das substâncias devem estar na faixa de $0,5 < K < 2,0$; e o fator de separação ($\alpha = K_2/K_1$, $K_2 > K_1$) entre duas substâncias deve ser superior a 1,5; (iii) a fim de evitar desperdício de solvente, é recomendado que o sistema de solventes bifásico tenha fases com volumes próximos.

Sistemas de solventes bifásicos para aplicação em CCC têm sido organizados em famílias que são compostas por solventes misturados em diferentes proporções. Uma família se distingue de outra pela faixa de polaridade que abrange, fornecendo meios metodológicos de busca do sistema de solventes ideal (FRIESEN & PAULI, 2007).

A primeira família de sistema de solventes testada para separar os constituintes da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi Hexano-Acetato de Etila-Metanol-Água (Hex-AcOEt-MeOH-H₂O) introduzido por

Oka em 1991 (OKA *et al.*, 1991) por ser um sistema que abrange uma ampla faixa de polaridade. Este versátil sistema de solventes quaternário pode ser considerado como a combinação de dois sistemas binários: Hex-MeOH e AcOEt-H₂O. A faixa de polaridade varia de baixa (Hex-MeOH 1:1) a média (AcOEt-H₂O 1:1) (FOCAULT, 1998).

Os testes com o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O devem ser iniciados pela proporção 1:1:1:1 e a polaridade do sistema deve ser aumentada ou diminuída de acordo com a necessidade (FOCAULT, 1998). O aumento da polaridade do sistema é feita com a diminuição da proporção de hexano relativa a de acetato de etila e diminuição da proporção de metanol relativa a água. Inversamente, a diminuição da polaridade do sistema é feita com o aumento da proporção de hexano relativa a de acetato de etila e diminuição da proporção de água relativa a de metanol.

Este sistema foi testado na proporção acima indicada pelo teste de partição em tubo de ensaio seguido da visualização da concentração relativa das substâncias da amostra em cada fase do sistema bifásico em placa de CCD. A concentração das substâncias na fase estacionária aquosa foi infinitamente maior que na fase móvel orgânica (**Figura 17**), indicando a necessidade de aumentar a polaridade do sistema.



Figura 17. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 1:1:1:1. (S) Superior. (I) Inferior revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

O aumento da polaridade do sistema foi feito aumentando a proporção de água relativa a de metanol e diminuindo a proporção de hexano relativa a de acetato de etila, mantendo o somatório total de cada fase. As proporções do sistema de solventes testadas em seguida foram:

- a. Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 5:9:5:9
- b. Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10
- c. Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 2:12:2:12

Os testes foram feitos pelo teste de partição em tubo de ensaio (**Figura 18**) seguido do cálculo do *K* por CLAE (**Tabela 3**, página 54).

A partição em AcOEt apresentou solubilidade razoável nos três sistemas testados.



Figura 18. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O. (S) Superior. (I) Inferior. (a) 5:9:5:9, (b) 4:10:4:10 e (c) 2:12:2:12 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

Tabela 3. *K* das substâncias majoritárias da partição em AcOEt de *S. leucanthum* calculados por CLAE

	Sistema de Solventes	K Pico I^a	α	K Pico II^b	α	K Pico III^c
a	Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O 5:9:5:9	66,0	1,8	36,3	2,9	12,7
b	Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O 4:10:4:10	47,5	2,8	17,1	12	1,45
c	Hex-AcOEt-MeOH-H ₂ O 2:12:2:12	5,64	1,3	4,40	5,8	0,762
d	Hex-AcOEt-EtOH-H ₂ O 4:10:4:10	58,0	2,8	20,6	5,2	3,95
e	Hex-AcOEt- <i>n</i> PrOH- H ₂ O 4:10:4:10	12,6	1,1	14,1	1,0	14,4
f	Hex-AcOEt- <i>i</i> PrOH-H ₂ O 4:10:4:10	12,4	1,2	15,0	1,1	14,1
g	Hex-AcOEt- <i>n</i> BuOH- H ₂ O 4:10:2:10	4,59	2,1	2,10	1,6	1,32
h	Hex-AcOEt- <i>i</i> BuOH- H ₂ O 4:10:2:10	4,57	1,5	2,97	3,3	0,894
i	Hex-AcOEt- <i>n</i> PrOH- MeOH-H ₂ O 4:10:0,5:4:10	20,3	1,2	25,1	3,9	5,23
j	Hex-AcOEt- <i>n</i> PrOH- MeOH-H ₂ O 4:10:1:4:10	19,9	1,2	24,3	2,8	7,17
k	Hex-AcOEt- <i>n</i> BuOH- MeOH-H ₂ O 4:10:0,5:4:10	8,13	1,0	7,97	5,3	1,49
l	Hex-AcOEt- <i>n</i> BuOH- MeOH-H ₂ O 4:10:0,7:4:10	7,02	1,4	4,95	3,5	1,42
m	Hex-AcOEt- <i>n</i> BuOH- MeOH-H ₂ O 4:10:1:4:10	5,72	1,8	3,11	2,8	1,12
n	Hex-AcOEt- <i>n</i> BuOH- MeOH-H ₂ O 4:10:1,2:4:10	4,17	1,0	3,05	3,1	0,999

^a Pico I com tempo de retenção de 6,59 min

^b Pico II com tempo de retenção de 10,45 min

^c Pico III com tempo de retenção de 16,21 min

Quando o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 5:9:5:9 foi testado, a concentração das substâncias da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* permaneceu alta na fase estacionária aquosa, inutilizando-o.

Nos testes com os sistemas Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 e 2:12:2:12, a partição das substâncias entre as fases foi mais homogênea. A substância relativa ao pico III repartiu-se igualmente entre as fases e poderia ser separada das outras duas em ambos os sistemas. A concentração das substâncias relativas aos picos I e II permaneceu alta na fase estacionária aquosa do sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10. Aumentando a polaridade deste sistema pela modificação da proporção para 2:12:2:12, as três substâncias poderiam ser isoladas em uma única longa corrida, porém o valor de α não estava dentro da faixa ideal para que houvesse separação eficiente das mesmas.

Optou-se então por utilizar o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O nas proporções 4:10:4:10 como ponto de partida para novos testes de sistemas a partir de variações deste, com o intuito de isolar as três substâncias majoritárias da partição em AcOEt de *S. leucanthum* em uma única corrida.

Algumas variações desta família de sistema de solventes, incluem a modificação do álcool (MeOH) por etanol (EtOH), propanol (PrOH) ou butanol (BuOH); a inclusão de um quinto solvente, BuOH ou PrOH; a troca de AcOEt por CH₂Cl₂ ou CHCl₃; dentre outras menos comuns.

A modificação do álcool altera as propriedades do sistema bifásico. Segundo Focault, que estudou a influência que alcoóis exercem sobre o sistema bifásico (FOCAULT, 1994), MeOH e EtOH provocam variações principalmente na composição da fase aquosa, PrOH provoca variações na composição de ambas as fases, enquanto BuOH provoca variações majoritárias na composição da fase orgânica.

Foram testados os seguintes sistemas de solventes:

- d. Hex-AcOEt-EtOH-H₂O 4:10:4:10;
- e. Hex-AcOEt-*n*PrOH-H₂O 4:10:4:10;
- f. Hex-AcOEt-*iso*PrOH-H₂O 4:10:4:10;
- g. Hex-AcOEt-*n*BuOH-H₂O 4:10:2:10;
- h. Hex-AcOEt-*iso*BuOH-H₂O 4:10:2:10.

Os testes foram feitos pelo teste de partição tubo de ensaio (**Figura 19**) seguido do cálculo do K por CLAE (**Tabela 3**, página 54). Os sistemas utilizando *n*BuOH e *iso*BuOH tiveram a proporção modificada para que não houvesse discrepância significativa quanto aos volumes relativos de cada fase.

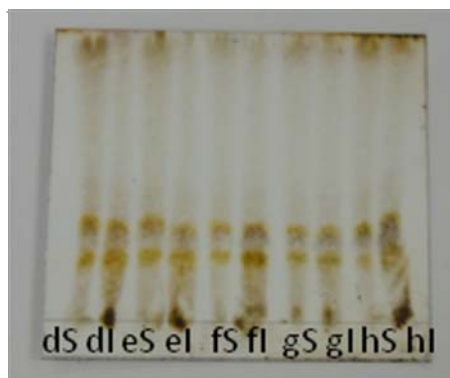


Figura 19. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando o sistema Hex-AcOEt-X-H₂O. (S) Superior. (I) Inferior. (d) X=EtOH, 4:10:4:10; (e) X=*n*PrOH; 4:10:4:10; (f) X= *iso*PrOH; 4:10:4:10; (g) X= *n*BuOH; 4:10:2:10 e (h) X= *iso*BuOH 4:10:2:10 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

A troca de MeOH por EtOH mantendo a proporção do sistema (Hex-AcOEt-EtOH-H₂O 4:10:4:10) acarretou ligeiro aumento da concentração das substâncias na fase aquosa estacionária: $K_{\text{Pico I}}$, $K_{\text{Pico II}}$ e $K_{\text{Pico III}}$ aumentaram de 47,5; 17,1 e 1,45 para 58,0; 20,6 e 3,95 respectivamente, o que já era esperado se levarmos em consideração o fato de EtOH provocar variações principalmente na fase aquosa. Este sistema foi descartado.

Os alcoóis *n* e *isoPrOH* demonstraram comportamento semelhante frente ao teste com os sistemas de solventes Hex-AcOEt-*nPrOH*-H₂O e Hex-AcOEt-*isoPrOH*-H₂O na proporção 4:10:4:10. Houve diminuição do *K* para as substâncias relativas aos picos I e II e aumento do *K* para a substância relativa ao pico III. Estes sistemas foram descartados.

BuOH portou-se como modificador orgânico, auxiliando a passagem das substâncias da fase aquosa para a fase orgânica dentro dos sistemas Hex-AcOEt-*nBuOH*-H₂O e Hex-AcOEt-*isoBuOH*-H₂O na proporção 4:10:2:10. Houve diminuição do $K_{\text{Pico I}}$, do $K_{\text{Pico II}}$ e do $K_{\text{Pico III}}$ de 47,5; 17,1 e 1,45 para 4,59; 2,10 e 1,32 (sistema contendo *nBuOH*) e 4,57; 2,97 e 0,894 (sistema contendo *isoBuOH*) respectivamente, inserindo tais valores dentro da faixa ideal para separação. Estes sistemas não puderam ser utilizados devido a baixa solubilidade da partição em AcOEt nestes, sendo portanto, descartados.

A inclusão de um quinto solvente, PrOH ou BuOH, ao sistema quaternário Hex-AcOEt-MeOH-H₂O acarretará em modificações dependentes das propriedades do álcool. O álcool *nPrOH* provoca variações na composição de ambas as fases por possuir cadeia carbônica capaz de interagir com a fase orgânica e grupamento hidroxila capaz de interagir com a fase aquosa. O coeficiente de partição tende a 1 a medida que a proporção de *nPrOH* aumenta no sistema. O álcool *nBuOH* é considerado um modificador orgânico por ser miscível na fase orgânica (Hex-AcOEt) e somente parcialmente miscível na fase aquosa (MeOH-H₂O) (FRIESEN & PAULI, 2007). O coeficiente de partição tenderá a diminuir à medida em que a proporção de *nBuOH* aumenta no sistema, auxiliando a passagem das substâncias da fase aquosa para a fase orgânica.

Na tentativa de aumentar a polaridade do sistema e repartir igualmente as substâncias entre as fases, foram testados os seguintes sistemas de solventes:

- i. Hex-AcOEt-*n*PrOH-MeOH-H₂O 4:10:0,5:4:10;
- j. Hex-AcOEt-*n*PrOH-MeOH-H₂O 4:10:1,0:4:10;
- k. Hex-AcOEt-*n*BuOH-MeOH-H₂O 4:10:0,5:4:10;
- l. Hex-AcOEt-*n*BuOH-MeOH-H₂O 4:10:0,7:4:10;
- m. Hex-AcOEt-*n*BuOH-MeOH-H₂O 4:10:1,0:4:10;
- n. Hex-AcOEt-*n*BuOH-MeOH-H₂O 4:10:1,2:4:10.

Os testes foram feitos pelo teste de partição em tubo de ensaio (**Figura 20**) seguido do cálculo do *K* por CLAE (**Tabela 3**, página 54).

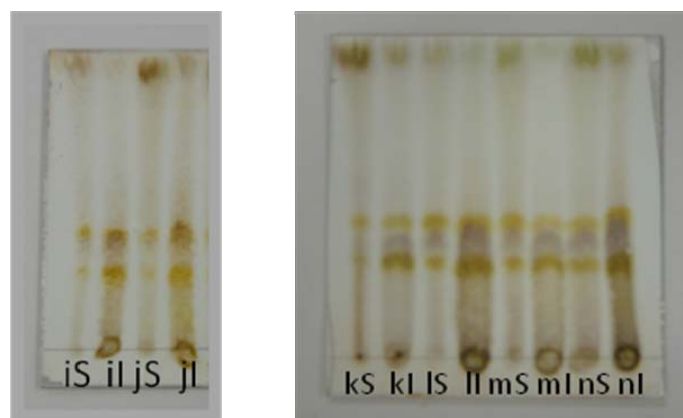


Figura 20. CCD relativa ao teste de sistema de solventes para a partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando o sistema Hex-AcOEt-X-MeOH-H₂O. (S) Superior. (I) Inferior. (i) X=*n*PrOH, 4:10:0,5:4:10; (j) X=*n*PrOH 4:10:1,0:4:10; (k) X=*n*BuOH 4:10:0,5:4:10; (l) X=*n*BuOH 4:10:0,7:4:10; (m) X=*n*BuOH 4:10:1,0:4:10 e (n) X=*n*BuOH 4:10:1,2:4:10 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

O álcool *n*PrOH demonstrou comportamento semelhante frente ao teste com os sistemas de solventes Hex-AcOEt-*n*PrOH-MeOH-H₂O nas proporções 4:10:0,5:4:10 e 4:10:1,0:4:10. Houve diminuição do *K* para as substâncias relativas aos picos I e II e aumento do *K* para a substância relativa ao pico III. Estes sistemas foram descartados por apresentar altos valores de *K* e baixos valores de α , ambos fora da faixa ideal para separação.

O álcool *n*BuOH portou-se como modificador orgânico, auxiliando a passagem das substâncias da fase aquosa para a fase orgânica dentro do sistema Hex-AcOEt-*n*BuOH-MeOH-H₂O. Houve diminuição nos valores de

K a medida que aumentamos a proporção de n BuOH no sistema: $K_{\text{Pico I}}$, do $K_{\text{Pico II}}$ e do $K_{\text{Pico III}}$ 8,13; 7,97 e 1,49 na proporção 4:10:0,5:4:10; 7,02; 4,95 e 1,42 na proporção 4:10:0,7:4:10; 5,72; 3,11 e 1,12 na proporção 4:10:1,0:4:10 e 4,17; 3,05 e 0,999 na proporção 4:10:1,2:4:10.

O único sistema que proporcionou valores de K e α ideais foi Hex-AcOEt- n BuOH-MeOH-H₂O 4:10:1,0:4:10, porém não pode ser utilizado devido a baixa solubilidade da partição em AcOEt neste, sendo portanto, descartado.

Após a não obtenção de êxito em todas as modificações feitas no sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O na proporção 4:10:4:10 inicialmente testada, optou-se por utilizá-lo a fim de isolar a substância relativa ao pico III e obter uma fração menos complexa para posterior separação.

4.2.3.2 Fracionamento da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *Sparattosperma leucanthum* por Cromatografia Contracorrente

O primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi feito por CCC com o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10 no equipamento da P. C. Inc.. A retenção da fase estacionária foi de 80%. Foram recolhidas 60 frações, das quais as primeiras 40 com a rotação ligada e as últimas 20 com a rotação desligada, o que significa a eluição de substâncias até $K = 2$ (duas vezes o volume da coluna) para eluição completa da substância referente ao pico III ($K = 1,45$) e posterior fracionamento da fase estacionária (Metodologia, item 3.5.3.4, página 26; **Fluxograma 1**, página 28; **Tabela 1**, página 29).

As frações foram reunidas segundo semelhança cromatográfica por CCD (**Figura 21**) e as reuniões foram analisadas por CLAE. Da Fração 2 (F 20-39) foi possível o isolamento da flavanona referente ao pico III,

identificada como pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo (**Figuras 22a e 23**) através de métodos espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura (GONZÁLEZ & POMILIO, 1981). Da Fração 4 (F 45-60) obteve-se a mistura dos flavonóides referentes aos picos I e II (**Figura 22b**).

Ocorreu precipitação de um pó amarelado nos tubos 49 e 50 (**Figura 24**) que foi filtrado, pesado (1,9 mg) e analisado através de métodos espectroscópicos de UV e de RMN ¹H. Por comparação com dados obtidos anteriormente, identificou-se a substância como pinocembrina 7-*O*-β-neo-hesperidosídeo (**Figura 1**, página 4), isolada inicialmente por precipitação durante a confecção da partição clorofórmica do extrato bruto de folhas de *S. leucanthum*.

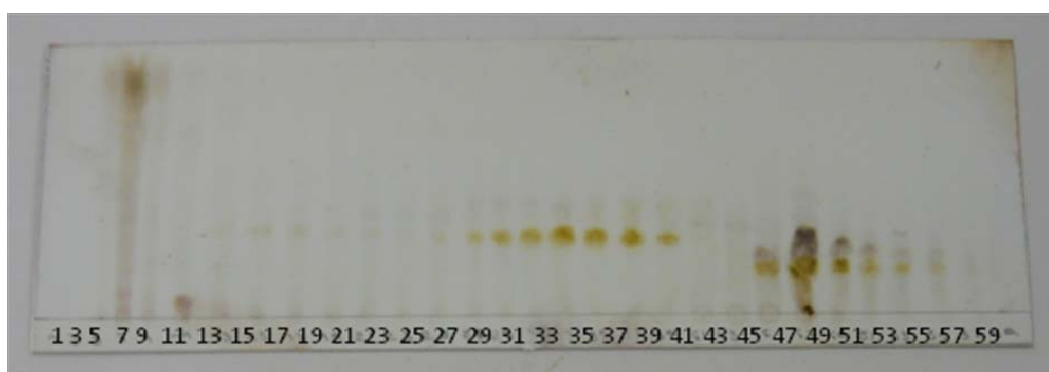
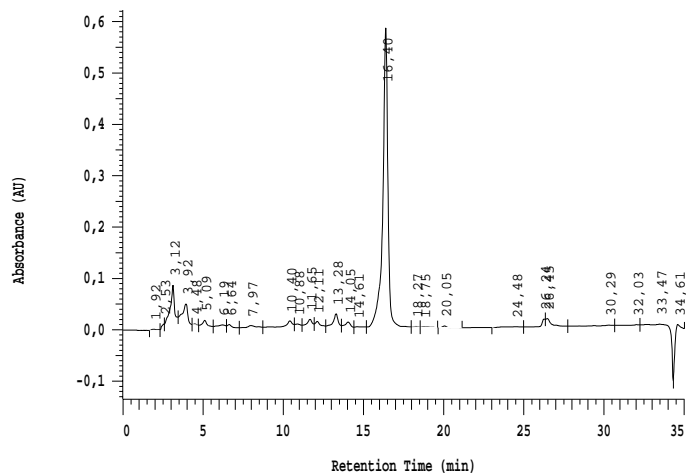
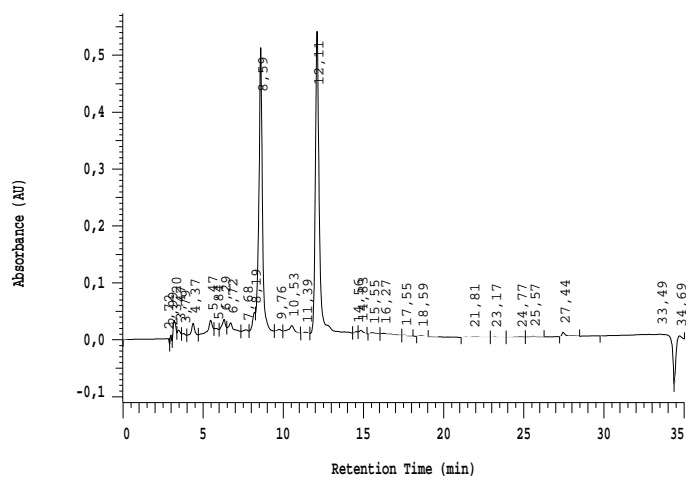


Figura 21. CCD relativa ao primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando equipamento P.C.Inc. e o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.



(a)



(b)

Figura 22. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H₂O 40:60 até 100:0 em 35 min) do primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum*. (a) Fração 2. (b) Fração 4.

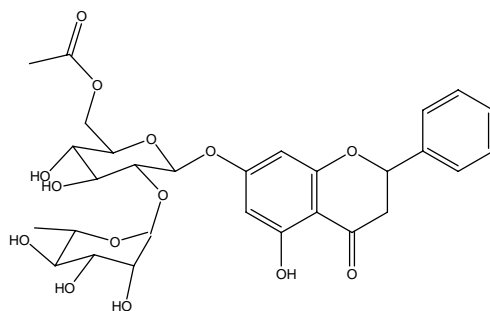


Figura 23. Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo.

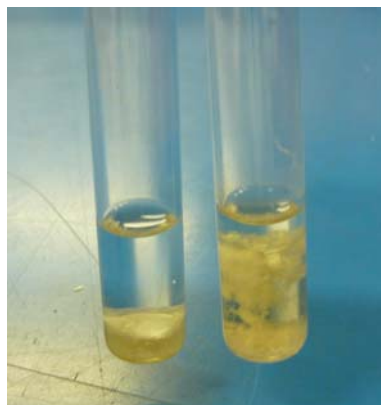


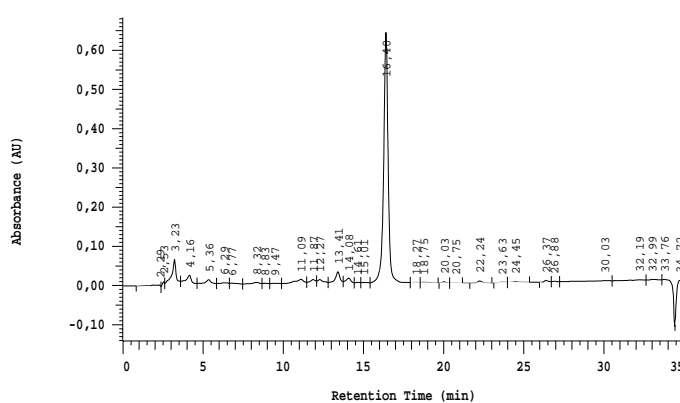
Figura 24. Precipitado obtido nos tubos 49 e 50 do primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum*.

O segundo fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi feito por CCC nas mesmas condições descritas anteriormente porém utilizando o equipamento Quattro HT-Prep MKS, na coluna de 95 ml de volume e 2,1 mm de diâmetro interno. A retenção da fase estacionária foi de 85%. Houve eluição de substâncias até $K = 2$ (50 frações) e posterior fracionamento da fase estacionária (25 frações), somando um total de 75 frações (Metodologia, item 3.5.3.4, página 26; **Fluxograma 1**, página 28; **Tabela 1**, página 29).

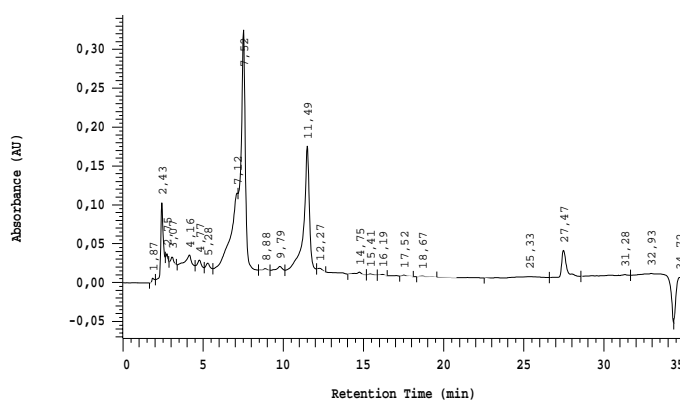
As frações foram reunidas segundo semelhança cromatográfica por CCD (**Figura 25**) e as reuniões foram analisadas por CLAE. Da Fração 2 (F 40-61) foi possível o isolamento da pinocembrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo (**Figura 23**) referente ao pico III (**Figura 26**). Da Fração 4 (F 66-75) obteve-se a mistura dos flavonóides referentes aos picos I e II (**Figura 26**).



Figura 25. CCD relativa ao primeiro fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando equipamento Quattro HT-Prep MKS e o sistema Hex-AcOEt-MeOH-H₂O 4:10:4:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.



(a)



(b)

Figura 26. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H₂O 40:60 até 100:0 em 35 min) do segundo fracionamento da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* (a) Fração 2. (b) Fração 4.

A diferença quanto ao volume de eluição da substância referente ao pico I (1^oCCC: $V_{\text{eluição}}=80$ a 156 ml correspondendo a aproximadamente $K=1,48$ e 2^oCCC: $V_{\text{eluição}}=160$ a 244 ml correspondendo a aproximadamente $K=2,13$) e quanto a massa de material obtido nas frações de ambos os fracionamentos (1^aCCC: F1=5,1; F2=13,0; F3=9,2 e F4=112,2 mg e 2^aCCC: F1=30,3; F2=10,8; F3=9,6 e F4=79,2 mg) deve-se a insolubilidade do extrato no sistema de solventes utilizado.

É importante observar que as colunas cromatográficas, possuindo volumes e diâmetros internos distintos, se comportaram de maneira semelhante frente as mesmas condições de separação.

4.2.4 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *Sparattosperma leucanthum*

A mistura de flavonóides referentes aos picos I e II foi recuperada das separações anteriores, reunidas e re-submetida a fracionamento.

4.2.4.1 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* através de Cromatografia de Filtração em Gel

A cromatografia por filtração em gel foi utilizada no fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* (**Fluxograma 3**, página 32) principalmente por possuir propriedades desejáveis tais como: simplicidade, praticidade e condições amenas. Alguns trabalhos na literatura relatam o isolamento de flavonóides por coluna de filtração em gel utilizando Sephadex LH-20 (HARBONE, *et al.* 1975).

As frações foram reunidas segundo semelhança cromatográfica por CCD em três frações principais e as reuniões foram analisadas por CLAE (**Figura 27**). Das Frações 1 e 3 obteve-se o isolamento dos flavonóides referentes ao pico I e II respectivamente.

A resolução cromatográfica foi ruim, acarretando em uma separação ineficiente, onde somente uma pequena parte foi separada do todo: dos 30mg de amostra injetada, foram isoladas apenas 2,2 mg da substância referente ao pico I e 4,0mg da substância referente ao pico II. Na cromatografia por filtração em gel existe uma correlação entre o volume no qual a substâncias é eluída e seu tamanho molecular. A distribuição das substâncias entre a fase móvel e a fase estacionária depende de efeitos estéricos, induzindo moléculas grandes a emergirem da coluna antes que as pequenas (COLLINS, 2006). A ineficiência cromatográfica se deu pelo fato da mistura em questão possuir moléculas de tamanhos semelhantes.

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos espectroscópicos.

Por comparação com dados obtidos anteriormente, identificou-se a estrutura da substância referente ao pico II (espectroscopia de RMN de ^1H e UV) como pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo (**Figura 1**, página 4), isolada inicialmente por precipitação durante a confecção da partição clorofórmica e durante o primeiro fracionamento da partição em AcOEt por CCC. Não foi possível elucidar a estrutura da substância referente ao pico I.

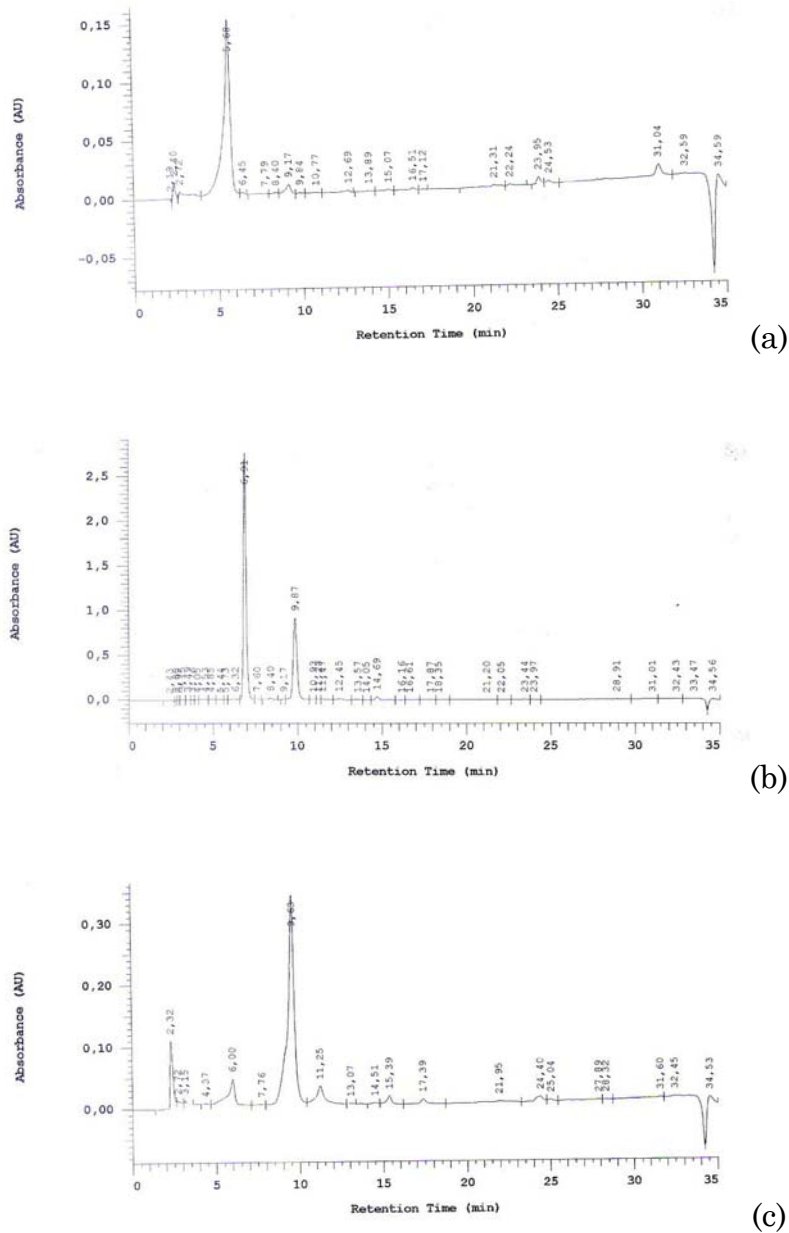


Figura 27. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H₂O 40:60 até 100:0 em 35 min) fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por cromatografia de filtração em gel. (a) Fração 1. (b) Fração 2. (c) Fração 3.

4.2.4.2 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* por Cromatografia com Fase Líquida de Alta Eficiência

A mistura de flavonóides referentes aos picos I e II foi submetida a fracionamento por CLAE semi-preparativa utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo isocrático na tentativa de separar os dois flavonóides.

A fase móvel utilizada foi estabelecida após testes preliminares em escala analítica onde as melhores condições de separação foram otimizadas:

- a. Sistema MeOH-H₂O 60:40 (pH=3) resultou na eluição das substâncias referentes aos picos I e II com tempos de retenção iguais a 2,80 e 3,55 min respectivamente, indicando a necessidade de aumentar a polaridade do sistema.
- b. Sistema MeOH-H₂O 50:50 (pH=3) resultou na eluição das substâncias referentes aos picos I e II com tempos de retenção iguais a 3,63 e 5,81 min respectivamente, indicando que o aumento da polaridade do sistema ocasionou aumento na diferença entre os tempos de retenção, melhorando a resolução.
- c. Sistema MeOH-H₂O 40:60 (pH=3) resultou na eluição das substâncias referentes aos picos I e II com tempos de retenção iguais a 6,32 e 13,49 min respectivamente. Este foi o sistema escolhido como fase móvel.

Todos os sistemas foram acidificados com ácido acético glacial.

A primeira tentativa de fracionamento da mistura de flavonóides por CLAE semi-preparativa utilizou o sistema isocrático MeOH-H₂O 40:60 (pH=3), 10 mg de amostra solubilizadas em 100 µl, fluxo de 7,5 ml/ min e 50 min de corrida. A substância referente ao pico I teve tempo de retenção de 45,92 min enquanto a substância referente ao pico II eluiu em aproximadamente 67 min, extrapolando o tempo estimado para a corrida.

A segunda tentativa de fracionamento da mistura de flavonóides por CLAE semi-preparativa utilizou o sistema isocrático MeOH-H₂O 40:60 (pH=3), 10 mg de amostra solubilizadas em 100 µl, fluxo de 8,5 ml/ min e 60 min de corrida. O aumento do fluxo acarretou na eluição conjunta das substâncias.

A terceira tentativa de fracionamento da mistura de flavonóides por CLAE semi-preparativa utilizou o sistema isocrático MeOH-H₂O 40:60 (pH=3), 10 mg de amostra solubilizadas em 100 µl, fluxo de 7,5 ml/ min e 75 min de corrida. Os flavonóides referentes ao pico I e II tiveram tempos de retenção de 46,35 e 60,45 min. As frações foram coletadas manualmente. O cromatograma foi obtido com detecção no UV (D.A.D.) a 240 nm e temperatura ambiente (**Fluxograma 4**, página 32).

As frações obtidas foram concentradas e analisadas por CLAE (**Figura 28**).

As substâncias referentes aos picos I e II foram isoladas e analisadas através de métodos espectroscópicos de RMN ¹H e UV para confirmação da estrutura isolada anteriormente, pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo (**Figura 1**, página 4). Novamente não foi possível elucidar a estrutura da substância referente ao pico I pela pequena quantidade de material isolado.

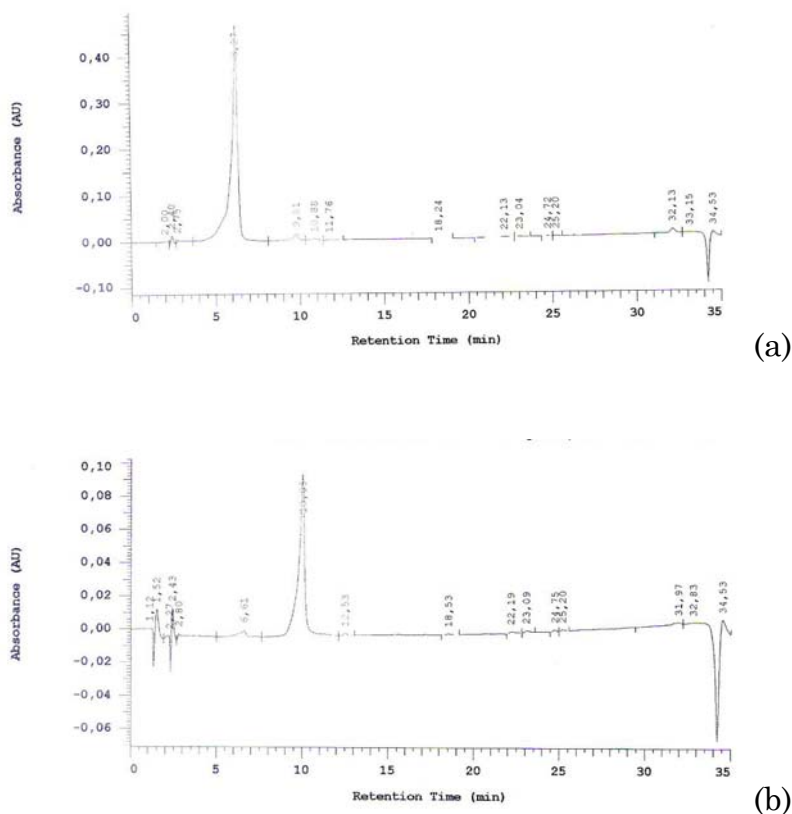


Figura 28. Cromatograma obtido por CLAE analítica utilizando coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente linear (MeOH-H₂O 40:60 até 100:0 em 35 min) do fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* por CLAE semi-preparativa. (a) Fração 1. (b) Fração 2.

Este método de isolamento se mostrou melhor quando comparado ao anterior (filtração em gel). A relação entre a quantidade de substância isolada e o investimento de tempo e solvente foi mais proveitosa.

A busca por técnicas de separação eficazes e práticas, onde a escolha das fases estacionária e móvel consumissem pouco tempo nos levaram a substituir a CCC utilizada inicialmente por cromatografia de filtração em gel e CLAE.

Os resultados obtidos nestes tipos cromatográficos nos incentivaram a retornar a técnica de CCC, que requer uma escolha minuciosa do sistema de solventes, porém uma vez escolhido, a quantidade de solvente utilizado e o tempo requerido para a separação são pequenos e a quantidade de substância isolada é apreciável.

4.2.4.3 Fracionamento da Fração 4 da Partição em Acetato de Etila de Folhas de *S. leucanthum* por Cromatografia Contracorrente

Os altos valores de K obtidos para as substâncias referentes aos picos I e II com o sistema de solventes Hex-AcOEt-MeOH-H₂O indicaram a necessidade de sistemas de solventes de polaridade maior para a separação dessas substâncias.

A família de sistema de solventes composta por Acetato de Etila-Butanol-Água (AcOEt-BuOH-H₂O) é ideal para substâncias de média a alta polaridade. Este sistema consiste de dois solventes miscíveis (AcOEt e BuOH) e um terceiro solvente (H₂O) imiscível nos dois anteriores (FOCAULT, 1994).

A organização geral desta família pode ser descrita como solvente orgânico-modificador orgânico-água. Neste caso, o álcool é considerado o modificador orgânico, uma vez que é miscível com AcOEt e pouco miscível com H₂O. Existe uma faixa bastante limitada de polaridade, visto que as proporções de solvente variam de AcOEt-H₂O 1:1 até BuOH-H₂O 1:1 (**Tabela 4**) (FRIESEN & PAULI, 2007).

Tabela 4. Tabela da família de sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O

AcOEt	BuOH	H ₂ O
10	0	10
9	1	10
8	2	10
7	3	10
6	4	10
5	5	10
4	6	10
3	7	10
2	8	10
1	9	10
0	10	10

Os testes foram feitos pelo teste de partição em tubo de ensaio seguido da visualização da concentração relativa das substâncias da amostra em cada fase do sistema bifásico em placa de CCD (**Figura 29**) e posterior cálculo do K (**Tabela 5**, página 72). Os sistemas testados foram:

- a. AcOEt-BuOH-H₂O 9:1:10;
- b. AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10;
- c. AcOEt-BuOH-H₂O 7:3:10.

A Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi razoavelmente solúvel no sistema de solventes em questão.



Figura 29. CCD referente ao teste de sistema de solventes para a Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando o sistema AcOEt-BuOH-H₂O. (S) Superior. (I) Inferior. (a) 9:1:10; (b) 8:2:10; (c) 7:3:10.

Dentre os sistemas testados, AcOEt-BuOH-H₂O 9:1:10 apresentou-se pouco polar, concentrando as substâncias relativas aos picos I e II na fase estacionária aquosa e AcOEt-BuOH-H₂O 7:3:10 apresentou-se muito polar, concentrando as substâncias relativas aos picos I e II na fase móvel orgânica. As substâncias apresentaram K dentro da faixa ideal ($K_{\text{Pico I}}=1,15$ e $K_{\text{Pico II}}=0,559$) utilizando o sistema AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10, proporção de polaridade intermediária entre as duas anteriores.

Tabela 5. K das substâncias relativas aos picos I e II da partição em AcOEt de *S. leucanthum*

	Sistema de Solventes	$K_{\text{Pico I}}$	α	$K_{\text{Pico II}}$
a	AcOEt-BuOH-H ₂ O 9:1:10	1,86	1,8	1,01
b	AcOEt-BuOH-H ₂ O 8:2:10	1,15	2,1	0,559
c	AcOEt-BuOH-H ₂ O 7:3:10	0,362	1,2	0,441
d	BuCN-ACN-H ₂ O 10:2:10	1,94	1,8	1,09
e	BuCN-ACN-H ₂ O 10:5:10	2,25	1,1	1,99
f	BuCN-ACN-H ₂ O 5:5:10	2,30	1,2	1,88
g	BuCN-ACN-H ₂ O 5:10:10	2,33	1,8	1,26

O primeiro fracionamento por CCC da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi feito com o sistema de solventes AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10, eluição em modo normal, no equipamento da P. C. Inc. A retenção da fase estacionária foi de 83%. Foram recolhidas 100 frações, das quais as primeiras 80 com a rotação ligada, o que significa a eluição de substâncias até $K = 1$ (uma vez o volume da coluna) para eluição completa da substância referente ao pico II ($K = 0,559$) e posterior esvaziamento da coluna (Metodologia, item 3.5.4.3, página 33; **Fluxograma 5**, página 34; **Tabela 2**, página 37).

As frações foram reunidas segundo semelhança cromatográfica por CCD (**Figura 30**). Da Fração 1 (F 1-57) foi possível o isolamento da flavanona referente ao pico II, identificada como pinocembrina 7-*O*- β -neohesperidosíde (**Figura 1**, página 4). Da Fração 3 (F 63-100) foi possível o isolamento da di-hidrochalcona referente ao pico I, identificada como 2',4',6'-trihidroxi-4'-*O*- β -D-glicosil di-hidrochalcona (**Figura 31**). Ambas as substâncias foram identificadas através de métodos espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura (LIN, J. H. & LIN,

Y. T., 1999; POMILIO, A. B. & GROS, E. G., 1979; XU, Y. *et al.*, 1993) e tiveram suas estruturas confirmadas por espectroscopia de UV.

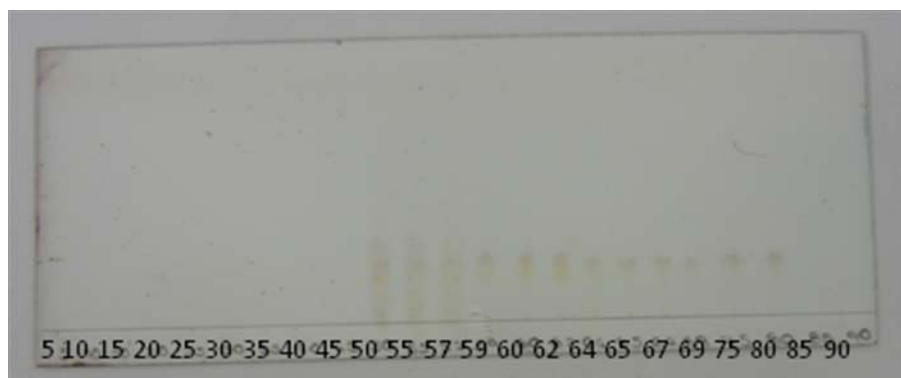


Figura 30. CCD relativa ao primeiro fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando equipamento P.C.Inc. e o sistema AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

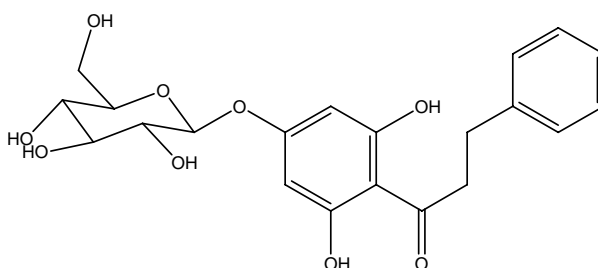


Figura 31. 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil Di-hidrochalcona

O segundo fracionamento da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi feito por CCC com o mesmo sistema de solventes e condições utilizadas anteriormente, porém no equipamento da Quattro HT-Prep MKS. A retenção da fase estacionária foi de 81%. Foram recolhidas 95 com a rotação ligada, o que significa a eluição de substâncias até $K = 1$ e posterior esvaziamento da coluna (Metodologia, item 3.5.4.3, página 33; **Fluxograma 6**, página 34; **Tabela 2**, página 37).

Não houve separação das substâncias neste aparelho (**Figura 32**).

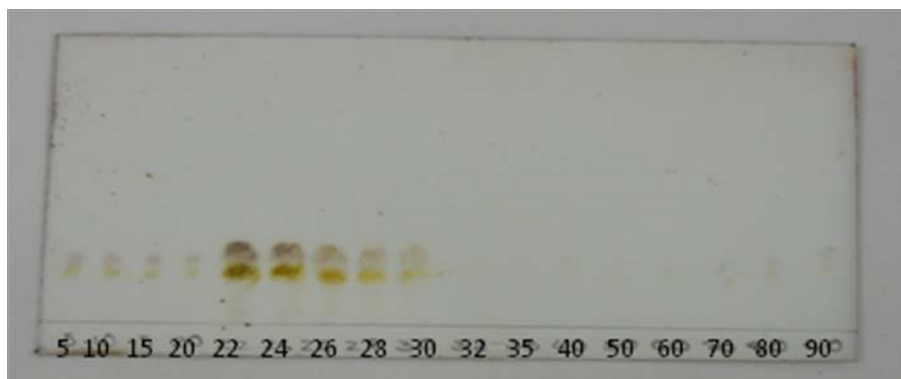


Figura 32. CCD relativa ao segundo fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando equipamento Quattro HT-Prep MKS e o sistema AcOEt-BuOH-H₂O 8:2:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

Na tentativa de melhorar a solubilidade da Fração 4 no sistema de solventes utilizado para o fracionamento, o sistema de solvente Butironitrila-Acetonitrila-Água (BuCN-ACN-H₂O) foi testado. Esse sistema foi escolhido para testes pela presença de solventes nitrogenados (**Figura 33**), em semelhança a piridina, solvente utilizado para análise por RMN, no qual as substâncias do extrato são solúveis.

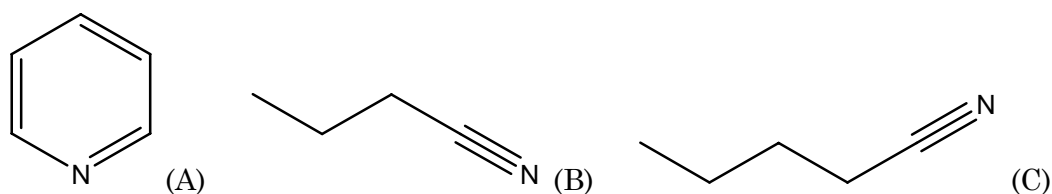


Figura 33. Estrutura da (A) piridina, (B) acetonitrila e (C) butironitrila.

A organização geral desta família pode ser descrita como solvente orgânico-modificador aquoso-água. Neste caso, a acetonitrila é considerada o modificador aquoso, uma vez que é miscível com H₂O e parcialmente miscível com BuCN.

Os testes foram feitos pelo teste de partição em tubo de ensaio (**Figura 34**) seguido do cálculo do K por CLAE (**Tabela 5**, página 72). Os sistemas testados em seguida foram:

- d. BuCN-ACN-H₂O 10:2:10;
- e. BuCN-ACN-H₂O 10:5:10;
- f. BuCN-ACN-H₂O 5:5:10;
- g. BuCN-ACN-H₂O 5:10:10.

A solubilidade da Fração 4 da partição em AcOEt folhas de *S. leucanthum* teve ligeira melhora no sistema de solventes em questão.



Figura 34. CCD referente ao teste de sistema de solventes para a Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando o sistema BuCN-ACN-H₂O (d) 1:0,2:1; (e) 1:0,5:1; (f) 0,5:0,5:1 e (g) 0,5:1:1 revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

A concentração das substâncias referentes aos picos I e II foram altas na fase estacionária aquosa do sistema BuCN-ACN-H₂O 10:2:10. O aumento da proporção de ACN no sistema BuCN-ACN-H₂O (10:5:10) piorou a partição das substâncias entre as fases, favorecendo a passagem das substâncias da fase orgânica para a fase aquosa. Novos ajustes foram feitos a fim de obter valores de K e α dentro da faixa ideal para que haja separação eficiente, o que foi conseguido com o sistema BuCN-ACN-H₂O 5:10:10.

O terceiro fracionamento por CCC da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi feito com o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O 5:10:10 no equipamento da P. C. Inc. A retenção da fase estacionária foi de 85%. Foram recolhidas 60 frações, das quais as primeiras 40 com a rotação ligada (eluição de substâncias até $K = 2$) para eluição completa da substância referente ao pico III ($K = 1,26$) e posterior fracionamento da fase estacionária (Metodologia, item 3.5.4.3, página 33; **Fluxograma 7**, página 36; **Tabela 2**, página 37).

As frações foram reunidas segundo semelhança cromatográfica por CCD (**Figura 35**). Da Fração 1 (F 1-24) obteve-se o isolamento da flavanona referente ao pico II, identificada como pinocembrina 7-*O*- β -neohesperidosídeo (**Figura 1**, página 4). Da Fração 3 (F 31-60) obteve-se a di-hidrochalcona referente ao pico I, identificada como 2',4',6'-trihidroxi-4'-*O*- β -D-glicosil Di-hidrochalcona (**Figura 31**, página 75).

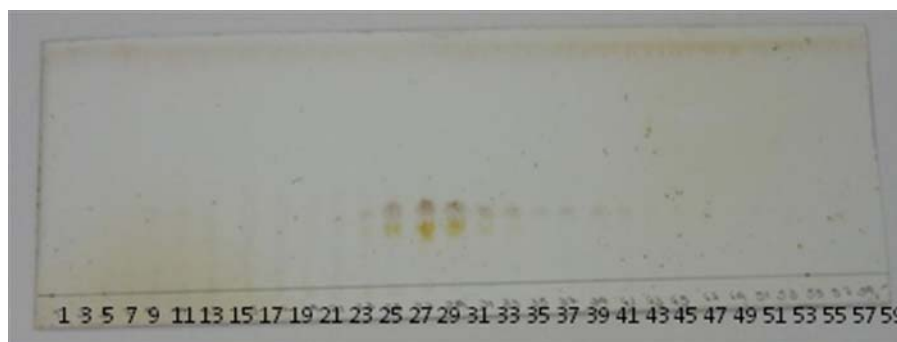


Figura 35. CCD relativa ao terceiro fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando equipamento P.C.Inc. e o sistema BuCN-ACN-H₂O 5:10:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

O quarto fracionamento por CCC da Fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* foi feito com o sistema de solventes BuCN-ACN-H₂O 5:10:10, nas mesmas condições anteriores, porém com o aparelho da Quattro HT-Prep MKS. A retenção da fase estacionária foi de 82%. Houve eluição de substâncias até $K = 2$ (50 frações) e posterior fracionamento da fase estacionária (25 frações) (Metodologia, item 3.5.4.3, página 33; **Fluxograma 8**, página 36; **Tabela 2**, página 37).

As frações foram reunidas segundo semelhança cromatográfica por CCD (**Figura 36**). Da Fração 1 (F 1-52) obteve-se o isolamento da flavanona referente ao pico II (**Figura 1**, página 4). Da Fração 3 (F 63-75) obteve-se o isolamento da di-hidrochalcona referente ao pico I (**Figura 31**, página 75).

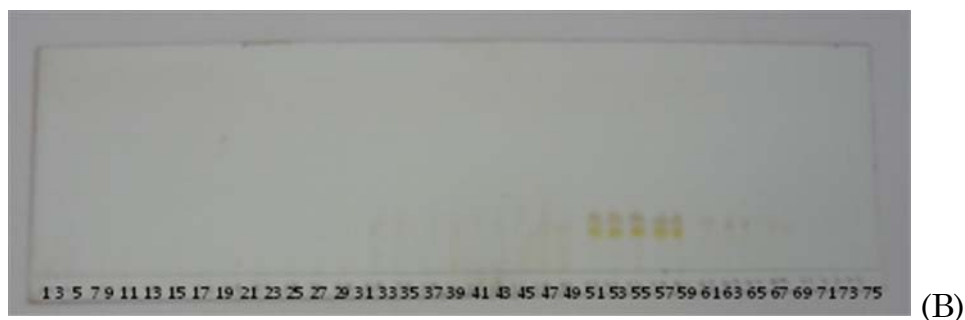


Figura 36. CCD relativa ao terceiro fracionamento da fração 4 da partição em AcOEt de folhas de *S. leucanthum* utilizando equipamento Quattro HT-Prep MKS e o sistema BuCN-ACN-H₂O 5:10:10, eluição em modo normal revelada com solução de ácido sulfúrico a 20% em MeOH.

Observa-se que apesar da escolha do sistema de solventes ser trabalhosa, uma vez escolhido, a CCC é previsível, extremamente econômica e principalmente, preparativa.

Com uma única corrida, obteve-se quantidade de amostra suficiente para ser analisada por diferentes técnicas espectroscópicas, sendo possível elucidar sua estrutura.

4.2.5 Análise e Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

4.2.5.1 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil Di-hidrochalcona

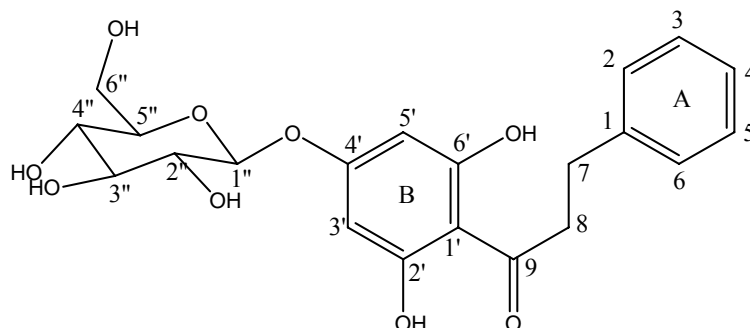


Figura 37. 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil Di-hidrochalcona

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 1**, página 88) mostrou a presença de 21 carbonos cujos valores (**Tabela 6**) são compatíveis com os da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona (**Figura 37**) isolada anteriormente de folhas de *Loranthus kaoi* (LIN & LIN, 1999) e obtida de forma sintética (HERMOSO *et al.*, 2003).

Os valores dos deslocamentos químicos obtidos não reproduziram os valores encontrados na literatura (LIN & LIN, 1999) provavelmente devido a diferenças quanto ao solvente utilizado para análise.

Tabela 6. Dados de RMN de ^{13}C da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona comparados a valores citados na literatura

Carbono	RMN ^{13}C	
	100 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	75 MHz DMSO- d_6
1	130,189	141,5
2	127,264	128,3
3	129,903	128,3
4	103,496	125,8
5	129,903	128,3
6	127,264	128,3
7	47,868	30,1
8	41,179	45,2
9	207,471	204,7
1'	143,759	105,2
2'	162,428	163,8
3'	114,630	95,0
4'	159,065	163,4
5'	114,630	95,0
6'	162,428	163,8
C1 Glicose	103,358	99,5
C2 Glicose	76,100	73,0
C3 Glicose	80,088	76,4
C4 Glicose	72,248	69,4
C5 Glicose	80,210	75,1
C6 Glicose	63,491	60,5

^a LIN & LIN, 1999

Cadeia Carbônica – C₃

É possível destacar o deslocamento químico de 207,47 ppm típico de carbonila cetônica relativo ao C-9 e os valores 41,18 e 47,87 ppm relativos aos etilenos em C-8 e C-7 respectivamente, evidenciando o esqueleto di-hidrochalcônico (AGRAWAL, 1989). C-7 apresentou-se mais deslocado que C-8 por estar mais desprotegido, devido ao efeito da carbonila.

Anel A

O sinal em 130,19 ppm foi atribuído ao C quaternário do anel A (C-1) por estar mais desprotegido que os outros carbonos do mesmo anel. Levando-se em consideração a influência do substituinte sobre o deslocamento químico de anéis aromáticos monossustituídos (PRETSCH, 1980; SILVERSTEIN, 2000) pôde-se correlacionar C-3 e C-5 ao deslocamento químico de 129,90 ppm; C-2 e C-6 ao de 127,26 ppm e C-4 ao de 103,50 ppm. Os pares C-2' e C-6'/ C-3' e C-5' apresentaram o mesmo deslocamento químico devido a simetria do substituinte fenila.

Anel B

O valor de 162,43 ppm foi relacionado aos carbonos C-2' e C-6' e o valor de 159,07 ppm ao C-4' do anel aromático B que se apresentam mais desprotegidos que os outros carbonos do mesmo anel por estarem ligados a grupamentos hidroxila. C-1' apresentou deslocamento químico de 143,76 ppm por ter como substituinte uma carbonila. C-3' e C-5' apresentaram deslocamento químico de 114,50 ppm. Os pares C-2' e C-6'/ C-3' e C-5' apresentaram o mesmo deslocamento químico devido a simetria da molécula.

A glicosilação de hidroxilas produz modificações nos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C da aglicona, principalmente nos carbonos diretamente envolvidos na derivatização (AGRAWAL, 1989). Em geral, o sinal do carbono fenólico cai em campos mais altos – C-4' – e os carbonos em posições orto e para em relação a este, em campos mais baixos – C-1', C-2' e C-6'.

A presença de ligação glicosídica na hidroxila em C-2' ou C-6' dificilmente é encontrada devido a presença de ligação de hidrogênio intramolecular (**Figura 38**) com a carbonila em C-9 e devido a presença de impedimento estérico durante a biossíntese desta molécula. A derivatização nestas hidroxilas provocam alterações no espectro de ^{13}C RMN: C-2'/C-6' apresentariam deslocamento químico aproximadamente 5 ppm mais alto e

C-9, 5 ppm mais baixo que o normal (AGRAWAL, 1992). Como não é o caso deste espectro, há confirmação de que a derivatização ocorre na hidroxila em C-4'.

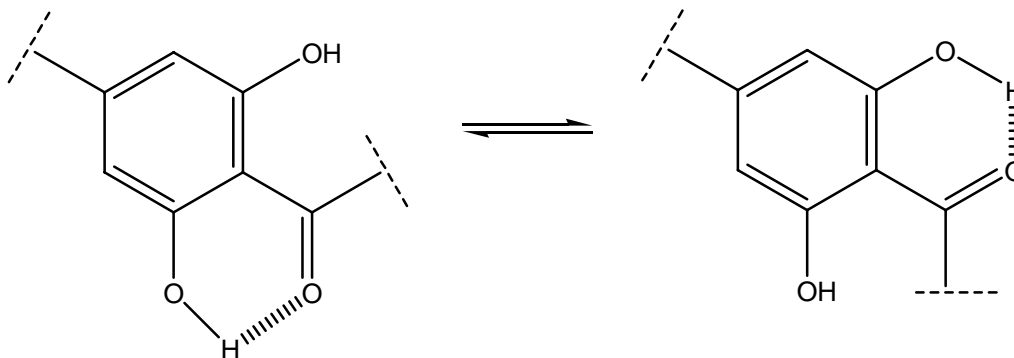


Figura 28. Ligações de hidrogênio intramoleculares ocorrentes entre as hidroxilas em C-2' ou C-6' e a carbonila em C-9 da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona

Glicosídeo

Valores encontrados na literatura (AGRAWAL, 1989; 1992) indicaram que o açúcar presente é a glicose. O carbono anomérico apresentou deslocamento químico de 103,36 ppm, confirmando a presença da ligação O-glicosídica. Os outros carbonos da glicose apresentaram deslocamentos químicos de 76,10; 80,09; 72,25; 80,21 e 63,49 (C-2^G, C-3^G, C-4^G, C-5^G e C-6^G respectivamente).

A análise do espectro de RMN de ¹H (**Espectro 2**, página 89) mostrou sinais (**Tabela 7**) compatíveis com a presença de um anel benzênico monossustituído – anel A – e um anel benzênico 1,2,4,6-sustituído – anel B – além dos sinais referentes ao etileno e ao glicosídeo.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H da 2',4',6'-trihidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona comparados a valores citados na literatura

Hidrogênio	^1H RMN	
	400 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	300 MHz Acetona- d_6^a
2H, C-7	<i>m</i> 3,93	<i>t</i> 2,85
5H, açúcar	<i>m</i> 3,9-4,6	-
2H, C8	<i>q</i> 4,25	<i>t</i> 3,28
1H, C-1 ^G	<i>d</i> 5,75	<i>d</i> 4,84
2H, C-3' e C-5'	<i>d</i> 7,17	<i>s</i> 6,03
5H, anel A	<i>m</i> 7,18-7,47	<i>m</i> 7,16-7,30
1H, OH em C-6'	-	<i>s</i> 12,2

^a LIN & LIN, 1991.

Cadeia Carbônica – C₃

É possível destacar a presença do multipeto com deslocamento químico de 3,93 ppm relativo a 2H em C-7 e o quarteto em 4,25 ppm relativo a 2H do C-8, ambos pertencentes aos grupamentos etileno. Os hidrogênios em C-7, vizinhos ao grupamento fenila, apresentam-se mais protegidos que os hidrogênios em C-8, vizinhos ao grupamento carbonila (PRETSCH *et al.*, 1980). Esses dados foram posteriormente confirmados por espectro HSQC.

Anéis A e B

O multipeto entre 7,18 e 7,47 ppm corresponde aos 5H do anel A. O dupeto em 7,17 ppm foi relacionado aos 2H de C-3' e C-5' do anel B, apresentando $J=1,0$ Hz (**Espectro 2(1)**), característico de acoplamento em *meta* (SILVERSTEIN, 2000).

Glicosídeo

O hidrogênio relativo ao carbono anomérico da glicose apresentou-se como um dupeto com deslocamento químico de 5,75 ppm e teve sua configuração β determinada pelo valor de $J=6,3$ Hz, comparáveis com valores encontrados na literatura (AGRAWAL, 1992). Os outros hidrogênios

da glicose apresentaram-se como multipletos com deslocamento químico entre 3,9 e 4,6 ppm.

A análise do espectro HSQC (**Espectro 3**, páginas 90-92) mostrou a correlação entre os sinais de hidrogênio e de carbono (**Tabela 8**), confirmando a estrutura da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona isolada.

Tabela 8. Correlação entre dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona

Carbono	RMN ^{13}C	RMN ^1H
	100 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	400 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$
2	127,264	
3	129,903	
4	103,496	<i>m</i> 7,18-7,47
5	129,903	
6	127,264	
7	47,868	<i>m</i> 3,93
8	41,179	<i>m</i> 4,25
3'	114,630	<i>d</i> 7,17
5'		
C1 Glicose	103,358	<i>d</i> 5,75
C2 Glicose	80,210	
C3 Glicose	80,088	
C4 Glicose	72,248	<i>m</i> 3,9-4,6
C5 Glicose	76,100	
C6 Glicose	63,491	

Cadeia Carbônica – C₃

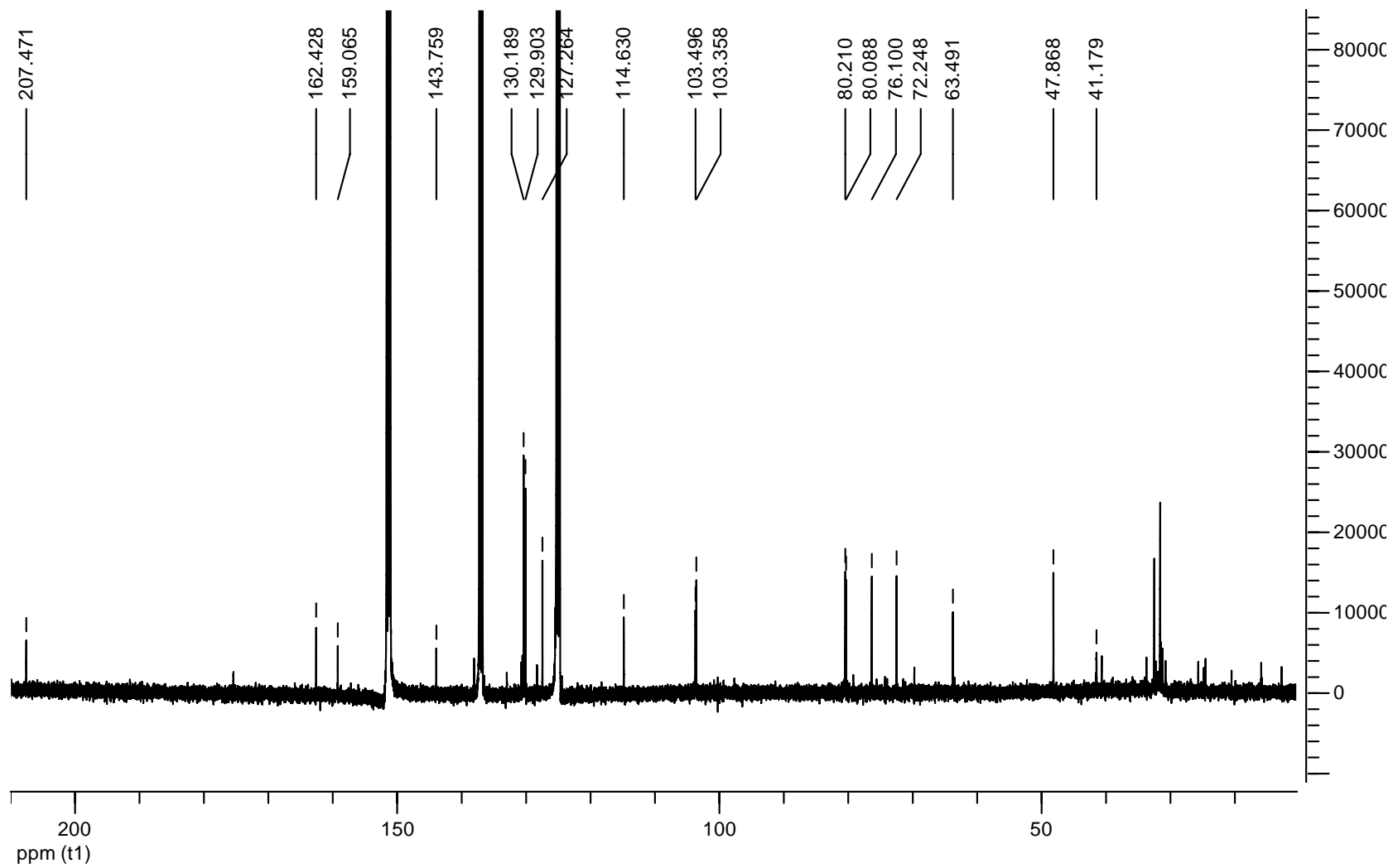
Com esse espectro foi possível correlacionar o multipletos em 3,93 ppm referente aos 2H do C-7 ao sinal de C em 41,18 ppm e o multipletos em 4,25 ppm referente aos 2H do C-8 ao sinal de C em 31,28 ppm.

Anéis A e B

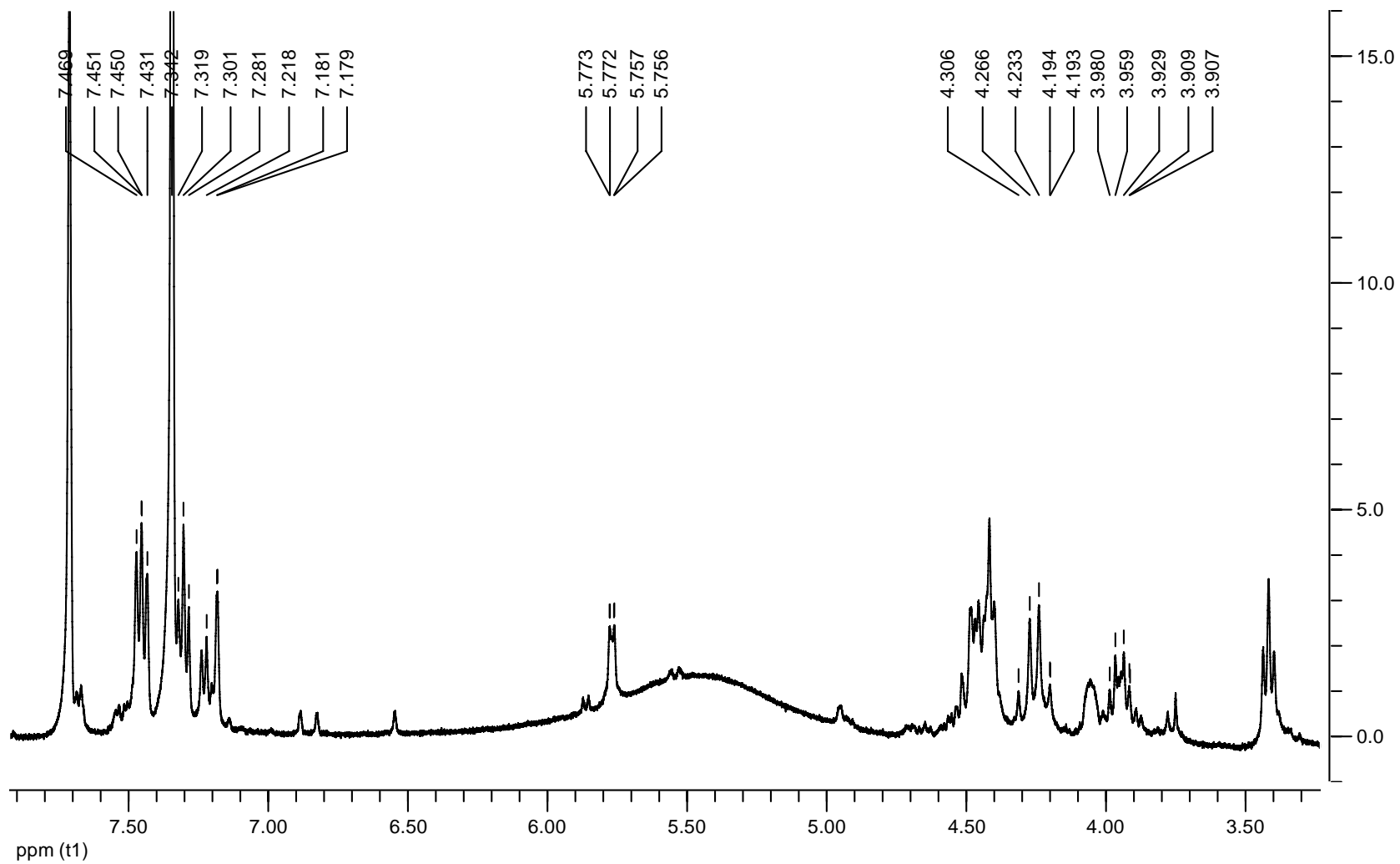
O deslocamento químico em 103,50 ppm referente aos carbonos C-3' e C-5' do anel aromático B se correlacionou ao duplete em 7,17 ppm. Os sinais entre 128 e 131 ppm atribuídos aos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel A tiveram relação com o multiplete entre 7,18-7,47 ppm.

Glicosídeo

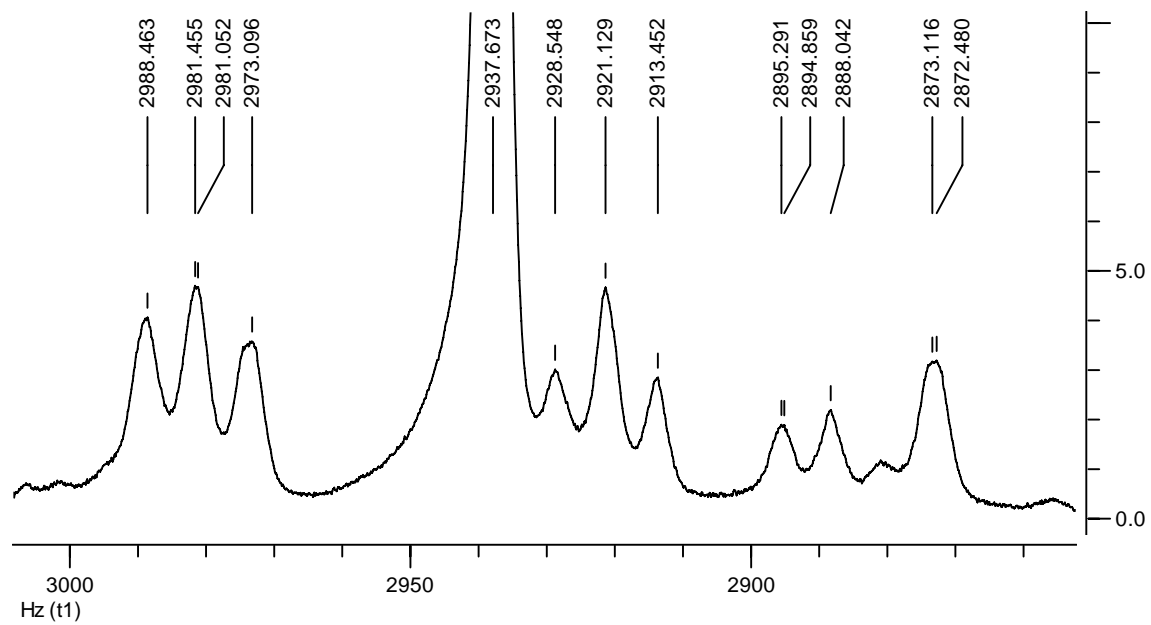
O carbono anomérico da glicose, que apresentou deslocamento químico de 103,36 ppm, foi correlacionado ao duplete em 5,75 ppm.



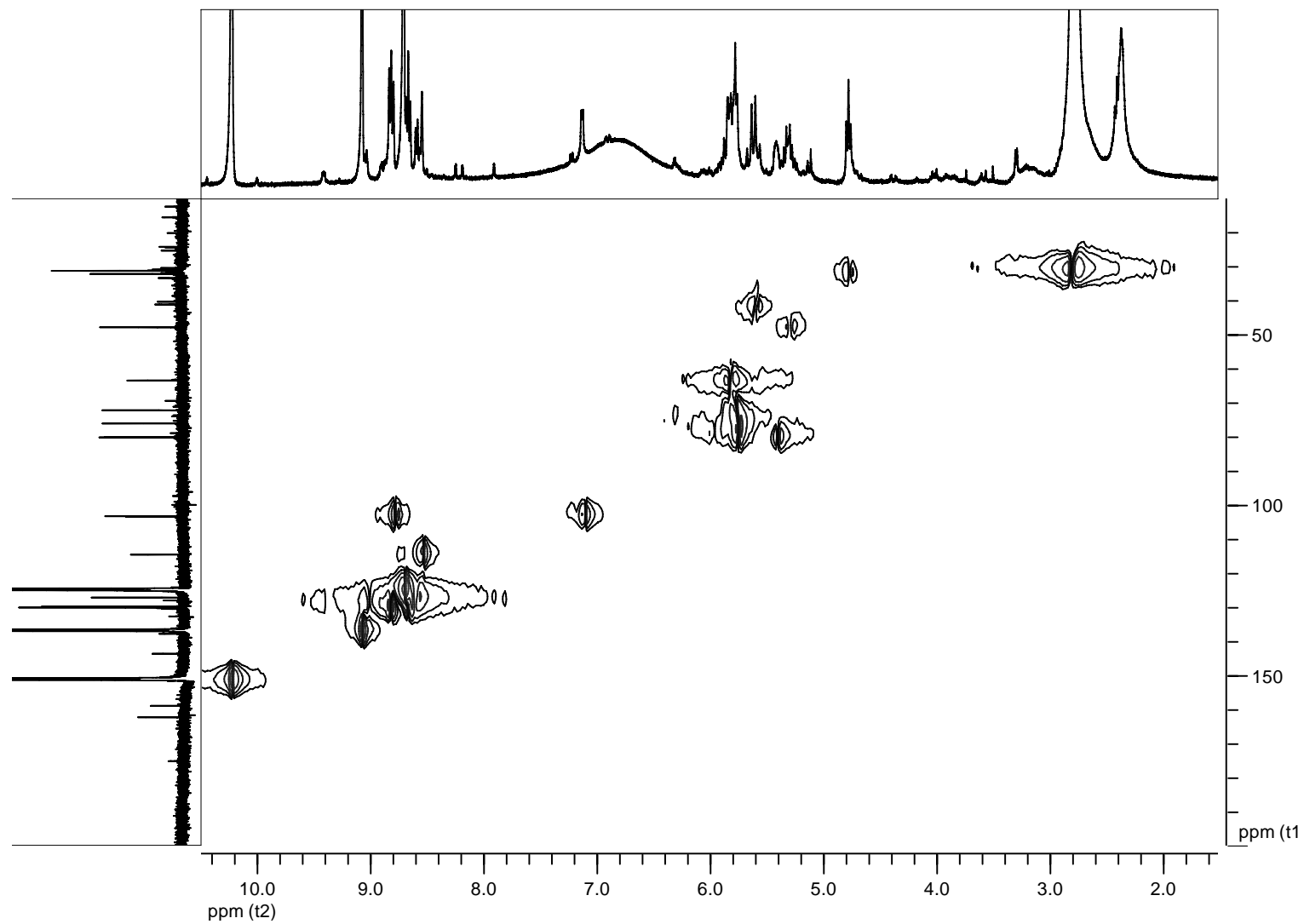
Espectro 1. Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (100 MHz) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona



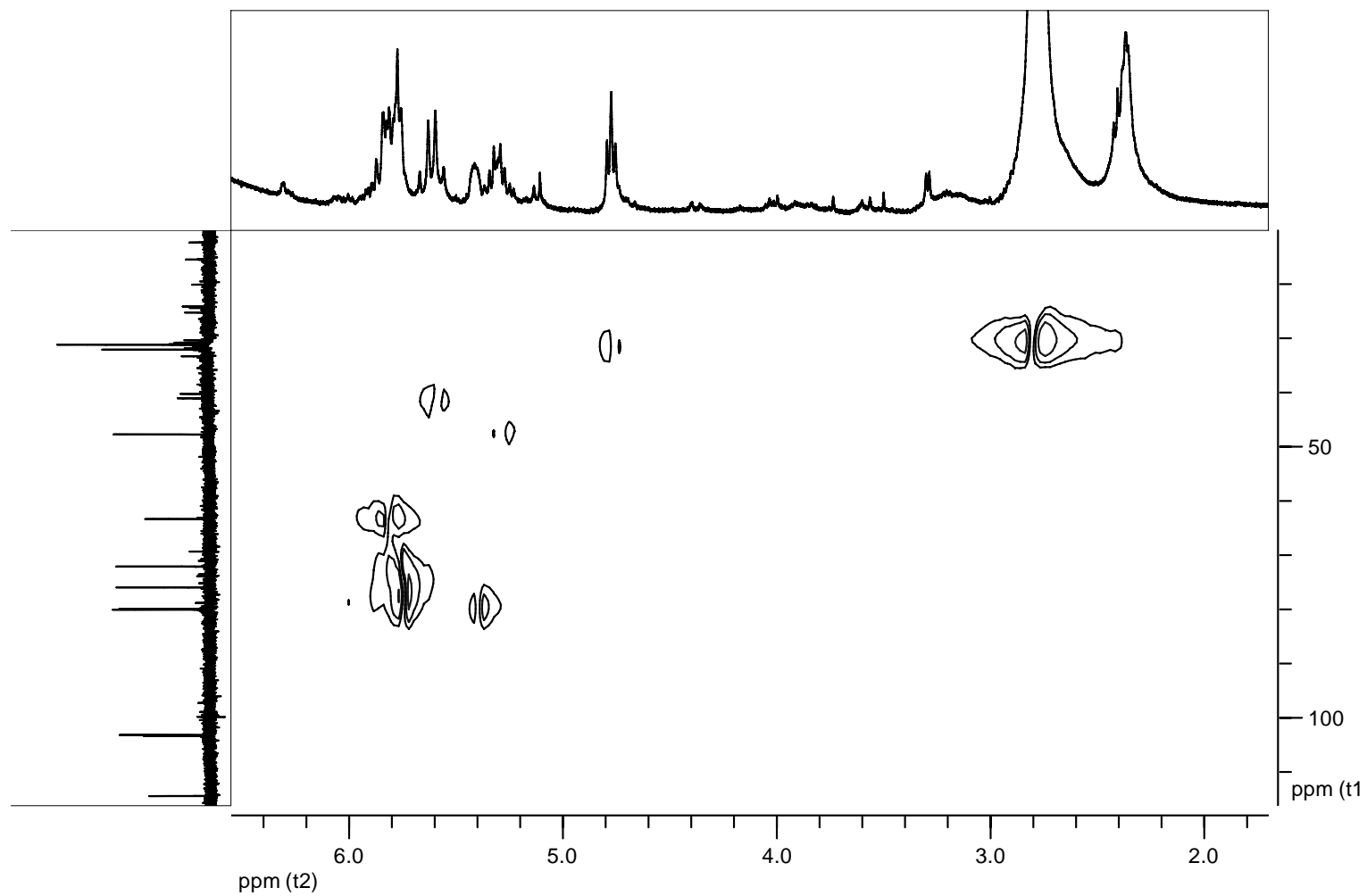
Espectro 2. Espectro de RMN de ^1H em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona



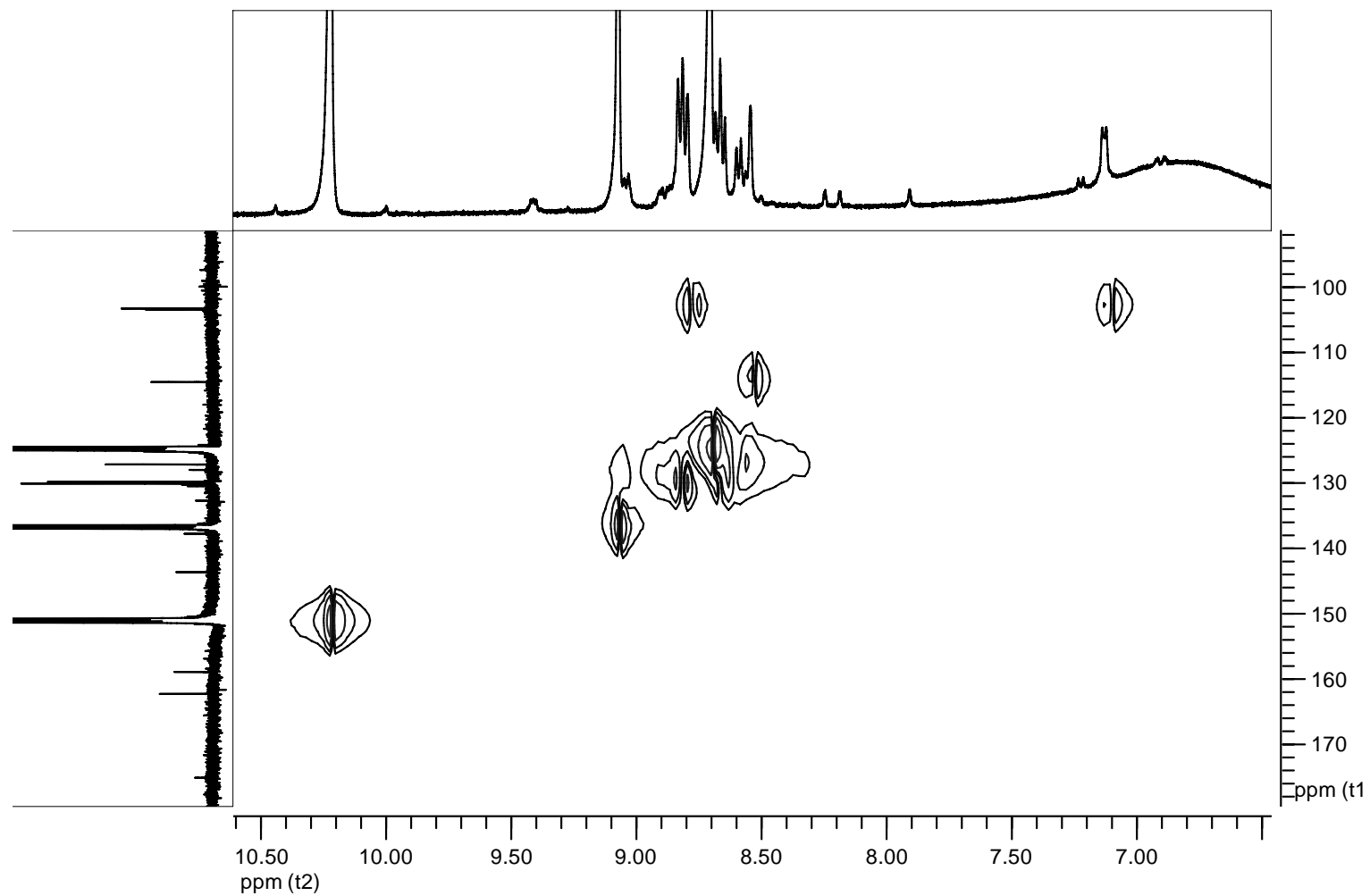
Espectro 2(1). Espectro de RMN de ^1H expandido na região aromática (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona, escala em Hertz.



Espectro 3. Espectro HSQC em C_5D_5N (400 MHz) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona



Espectro 3 (1). Espectro HSQC expandido (400 MHz, C₅HD₅N) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona



Espectro 3 (2). Espectro HSQC expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona

4.2.5.2 Pinocembrina 7-O- β -neohesperidosídeo

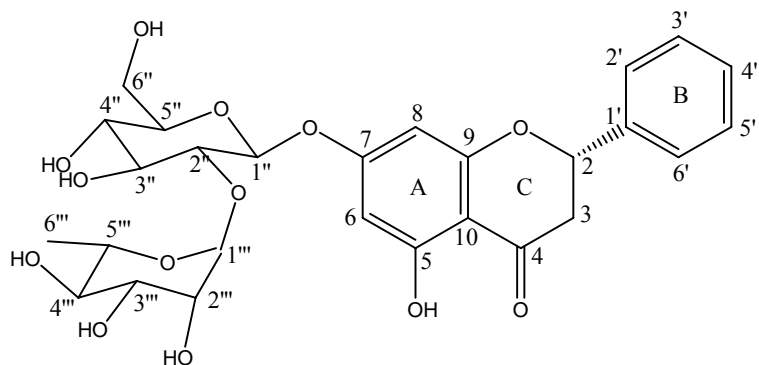


Figura 39. Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 4**, página 102) mostrou a presença de 27 carbonos cujos valores (**Tabela 9**) são compatíveis com os da flavanona pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo (**Figura 39**) isolada anteriormente de frutos de *S. vernicosum* (KUTNEY *et al.*, 1970) e de outras fontes vegetais (POMILIO & GROS, 1979; XU *et al.*, 1993).

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C da Pinocebrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura.

Carbono	RMN ^{13}C	Pinocebrina 7- <i>O</i> - β - neo-hesperidosídeo ^a
	100 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	100,6 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$
2	80,721	79,4 (CH)
3	44,646	43,4 (CH ₂)
4	197,884	196,5 (C)
5	167,475	164,4 (C)
6	99,096	99,4 (CH)
7	165,710	166,2 (C)
8	97,433	96,2 (CH)
9	164,614	163,3 (C)
10	105,589	104,4 (C)
1'	140,520	139,2 (C)
2'	128,095	126,8 (CH)
3'	130,389	129,1 (CH)
4'	130,310	129,0 (CH)
5'	130,389	129,1 (CH)
6'	128,095	126,8 (CH)
C1 Glicose	100,582	102,4 (C)
C2 Glicose	80,123	79,1 (CH)
C3 Glicose	80,416	77,8 (CH)
C4 Glicose	72,254	72,7 (CH)
C5 Glicose	78,986	78,8 (CH)
C6 Glicose	63,211	62,0 (CH ₂)
C1 Rhamnose	103,741	97,9 (CH)
C2 Rhamnose	73,992	72,3 (CH)
C3 Rhamnose	73,666	71,1 (CH)
C4 Rhamnose	75,290	74,0 (CH)
C5 Rhamnose	71,180	69,8 (CH)
C6 Rhamnose	20,165	18,8 (CH ₃)

^a XU *et al.*, 1993

Anel C

É possível destacar o deslocamento químico de 197,88 ppm relativo ao C da carbonila (C-4) e os valores 80,72 e 44,65 ppm relativos aos C da ligação simples (C-2 e C-3 respectivamente) do anel C, característicos de flavanonas (AGRAWAL, 1989). C-2 apresentou-se mais deslocado que C-3 por estar mais desprotegido.

Anel B

Os sinais referentes aos carbonos do anel B foram atribuídos levando-se em consideração o efeito e a simetria promovida pelo substituinte fenila (PRETSCH, 1980; SILVERSTEIN, 2000). O sinal em 140,52 ppm foi atribuído ao C-1' do anel B por estar mais desprotegido que os outros carbonos do mesmo anel. Pôde-se correlacionar C-3 e C-5 ao deslocamento químico de 130,39 ppm; C-2 e C-6 ao deslocamento químico de 128,10 ppm e C-4 ao deslocamento químico de 130,31 ppm.

Anel A

Os valores entre 164 e 168 ppm foram relacionados aos carbonos C-5, C-7 e C-9 do anel aromático A que se apresentam mais desprotegidos por estarem ligados a grupamentos hidroxila. C-10 apresentou deslocamento químico de 105,589 ppm. C-6 e C-8 apresentaram deslocamentos químicos de 99,096 e 97,433 ppm respectivamente.

A glicosilação de hidroxilas produz modificações nos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C da aglicona, principalmente nos carbonos diretamente envolvidos na derivatização (AGRAWAL, 1989). Em geral, o sinal do carbono fenólico cai em campos mais altos – C-7 – e os carbonos em posições orto e para em relação a este, em campos mais baixos – C-6, C-8 e C-10.

A presença de ligação glicosídica na hidroxila em C-5 dificilmente é encontrada devido a presença de ligação de hidrogênio intramolecular (**Figura 40**) com a carbonila em C-4 e devido ao impedimento estérico durante a biossíntese da molécula. A derivatização nesta hidroxila provoca diversas alterações no espectro de RMN de ^{13}C : C-5 apresentaria deslocamento químico aproximadamente 5 ppm mais alto e C-4, 5 ppm mais baixo que o normal (AGRAWAL, 1992). Como não é o caso do espectro desta flavanona, concluiu-se que a glicosilação esteja em outra posição.

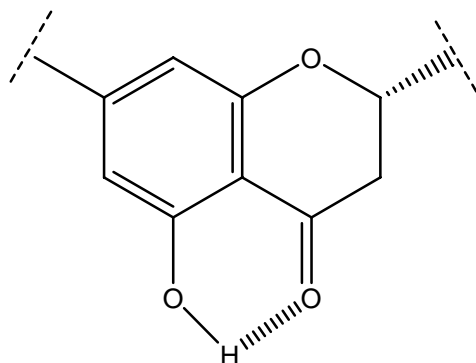


Figura 40. Ligação de hidrogênio intramolecular ocorrente entre a hidroxila em C-5 e a carbonila em C-4 da flavanona Pinocembrina-7-O- β -neohesperidosídeo

Glicosídeo

A comparação do espectro obtido com valores da literatura (AGRAWAL, 1989; 1992) indicou a presença de uma glicose e uma rhamnose. Os carbonos anoméricos da glicose e rhamnose apresentaram deslocamentos químicos de 100,58 e 103,74 ppm respectivamente, confirmando a presença da ligação O-glicosídica. O sinal em 20,17 ppm corroborou a presença da rhamnose, característico do grupamento metila em C-6.

A estrutura do diglicosídeo em flavonóides O-glicosilados pode ser assinalada no espectro de RMN de ^{13}C , pelo fato de haver modificações quanto ao deslocamento químico na ligação interglicosídica. A glicosilação de hidroxilas glicosídicas provoca efeito- α (o carbono hidroxilado envolvido na glicosilação cai em campos mais baixos) e efeito- β (carbonos adjacentes ao carbono hidroxilado envolvido na glicosilação caem em campos mais altos) (AGRAWAL, 1989).

A distinção entre as três formas isoméricas de rhamnosilglicosídeos – neohesperidosídeos [rhamnosil-(1 \rightarrow 2)-glucosídeos]; rutinósídeos [rhamnosil-(1 \rightarrow 6)-glucosídeos] e rhamnosil-(1 \rightarrow 4)-glucosídeos – pode ser determinada com base nos deslocamentos químicos do resíduo glicose (AGRAWAL, 1989).

Em rutinósídeos, o sinal referente ao C-6 da glicose cai em campos mais altos, aproximadamente 5 ppm de diferença devido ao efeito α da rhamnosilação. Em neohesperidosídeos, o sinal referente ao carbono

anomérico da glicose cai em campos mais altos, aproximadamente 2 ppm de diferença devido ao efeito β da rhamnosilação em C-2, sendo portanto, o mais importante na determinação da ligação (1 \rightarrow 2). C-1 e C-6 possuem absorções normais na presença da ligação glicosídica 1 \rightarrow 4 (AGRAWAL, 1989).

Por conseguinte, o deslocamento químico do C-1 da glicose foi de extrema importância para a identificação da ligação 1 \rightarrow 2. O valor do C-2 da glicose reforçou a conclusão da existência da ligação rhamnosil-(1 \rightarrow 2)-glicosídeo por estar acima do valor encontrado na literatura: 75,2 ppm (AGRAWAL, 1992).

Outros carbonos da glicose apresentaram deslocamentos químicos de 80,12; 80,42, 72,25; 78,99 e 63,21 ppm (C-2^G, C-3^G, C-4^G, C-5^G e C-6^G respectivamente) e os da rhamnose de 73,99; 73,67; 75,29 e 71,18 ppm (C-2^R, C-3^R, C-4^R e C-5^R respectivamente).

A análise do espectro de RMN de ¹H (**Espectro 5**, páginas 103-105) mostrou a presença de sinais compatíveis (**Tabela 10**) com a presença do anel A flavonoídico 5,7,9,10-substituído e do anel B monossustituído, além dos sinais referentes aos hidrogênios do etileno do anel C e aos hidrogênios dos açúcares.

Tabela 50. Dados de RMN de ^1H da Pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura.

Hidrogênio	^1H RMN	Pinocembrina 7-O- β - neo-hesperidosídeo	Pinocembrina 7-O- β - neo-hesperidosídeo
	400 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	400 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^{\text{a}}$	100 MHz DMSO- d_6^{b}
3H, C6-R	<i>d</i> 1,75	<i>d</i> 1,78	<i>d</i> 1,15
2H, C3	<i>dd</i> 3,17 <i>dd</i> 2,86	<i>dd</i> 3,2 <i>dd</i> 2,89	<i>m</i> 2,6-3,0
10H, açúcar	<i>m</i> 4,0-4,8	<i>m</i> 4,03-4,79	<i>m</i> 3,2-4,8
1H, C2	<i>dd</i> 5,37	<i>dd</i> 5,4	<i>dd</i> 5,69
1H, C1-G	<i>d</i> 5,67	<i>d</i> 7,6	<i>m</i> 5,1-5,4
1H, C1-R	<i>s</i> 6,35	<i>s</i> 4,79	
1H, C6	<i>s</i> 6,65	<i>d</i> 6,73	<i>d</i> 6,13
1H, C8	<i>s</i> 6,71	<i>d</i> 6,67	<i>d</i> 6,19
5H, anel B	<i>m</i> 7,34-7,50	<i>m</i> 7,35-7,59	<i>m</i> 7,5
1H, OH em C-5	<i>s</i> 12,4	<i>s</i> 12,46	<i>s</i> 11,8

^a XU *et al.*, 1993.

^b POMILIO & GROS, 1979.

Anel C

É possível destacar os dois duplos dupletos com deslocamento químico de 3,17 e 2,86 ppm relativo a 2H em C-3 apresentando $J_{\text{geminal}}=17$ Hz, $J_{\text{gauche}}=1$ Hz e $J_{\text{ante}}=11$ Hz (**Espectro 5 (2)a**, Página 105). O duplo duplete em 5,37 ppm relativo a 1H do C-2 apresentando $J_{\text{gauche}}=1$ Hz e $J_{\text{ante}}=11$ Hz (**Espectro 5 (2)b**, Página 105). Os hidrogênios em C-2, vizinhos ao grupamento fenila, são mais protegidos que os hidrogênio em C-3, vizinhos ao grupamento carbonila (PRETSCH *et al.*, 1980), apresentando maior deslocamento químico. Esses dados foram posteriormente confirmados por espectro de HSQC.

Anéis A e B

Os simpletos em 6,71 e 6,65 ppm foram relacionados, respectivamente, aos 2H de C-6 e C-8 do anel A. O multiplete entre 7,18 e 7,47 ppm correspondem aos 5H do anel B.

O simpleto em 12,4 ppm foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5. O sinal alargado é ocasionado pela ligação de hidrogênio intramolecular entre a hidroxila em C-5 e a carbonila em C-4 (**Figura 40**, Página 96).

Glicosídeo

O hidrogênio relativo ao carbono anomérico da rhamnose apresentou-se como um simpleto em 6,35 ppm enquanto o hidrogênio relativo ao carbono anomérico da glicose apresentou-se como um duplete com deslocamento químico de 5,67 ppm. O valor de $J=7,6$ Hz possibilitou determinar a configuração β para a glicose (AGRAWAL, 1992). A presença da rhamnose foi confirmada pelo sinal em 1,75 ppm correspondente a metila em C-6.

Houve discrepância entre os valores dos carbonos anoméricos do espectro obtido e dados da literatura (XU *et al.*, 1993). Os sinais referentes a estes hidrogênios foram posteriormente confirmados por espectro HSQC.

A análise do espectro HSQC (**Espectro 6**, página 106-108) mostrou a correlação entre sinais heteronucleares de hidrogênio e de carbono (**Tabela 11**), auxiliando no reconhecimento das correlações e confirmando a estrutura da flavanona pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo isolada.

Tabela 11. Correlação entre dados de RMN de ^1H e ^{13}C da flavanona pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo

Carbono	^{13}C RMN	^1H RMN	
	100 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	400 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	
2	80,721	<i>dd</i> 5,37	
3	44,646	<i>dd</i> 3,17 <i>dd</i> 2,86	
6	99,096	<i>s</i> 6,65	
8	97,433	<i>s</i> 6,71	
2'	128,095	<i>m</i> 7,34-7,50	
3'	130,389		
4'	130,310		
5'	130,389		
6'	128,095		
C1 Glicose	100,582		<i>d</i> 5,67
C2 Glicose	80,123	<i>m</i> 4,03-4,79	
C3 Glicose	80,416		
C4 Glicose	72,254		
C5 Glicose	78,986		
C6 Glicose	63,211		
C1 Rhamnose	103,741		<i>s</i> 6,35
C2 Rhamnose	73,992	<i>m</i> 4,03-4,79	
C3 Rhamnose	73,666		
C4 Rhamnose	75,290		
C5 Rhamnose	71,180		
C6 Rhamnose	20,165		<i>d</i> 1,75

Anel C

Neste espectro foi possível correlacionar o duplete em 5,37 ppm referente ao ^1H do C-2 com o sinal de C em 80,72 ppm e os dois duplos quartetos em 3,17 e 2,86 referente aos 2H do C-3 com o sinal de C em 44,65 ppm.

Anel B

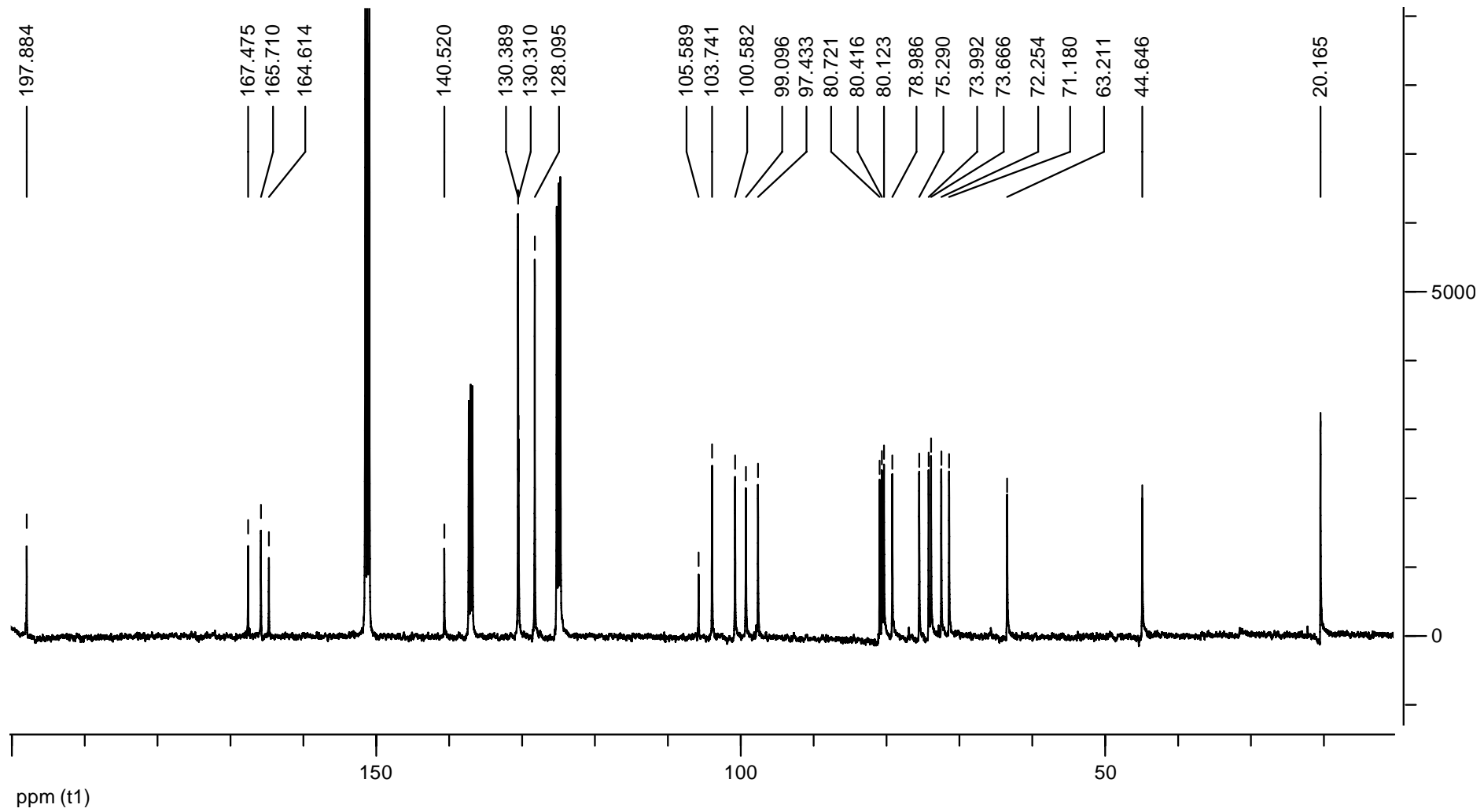
Os sinais entre 128 e 131 ppm atribuídos aos carbonos C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6 do anel B tiveram relação com o multiplete entre 7,34-7,50 ppm.

Anel A

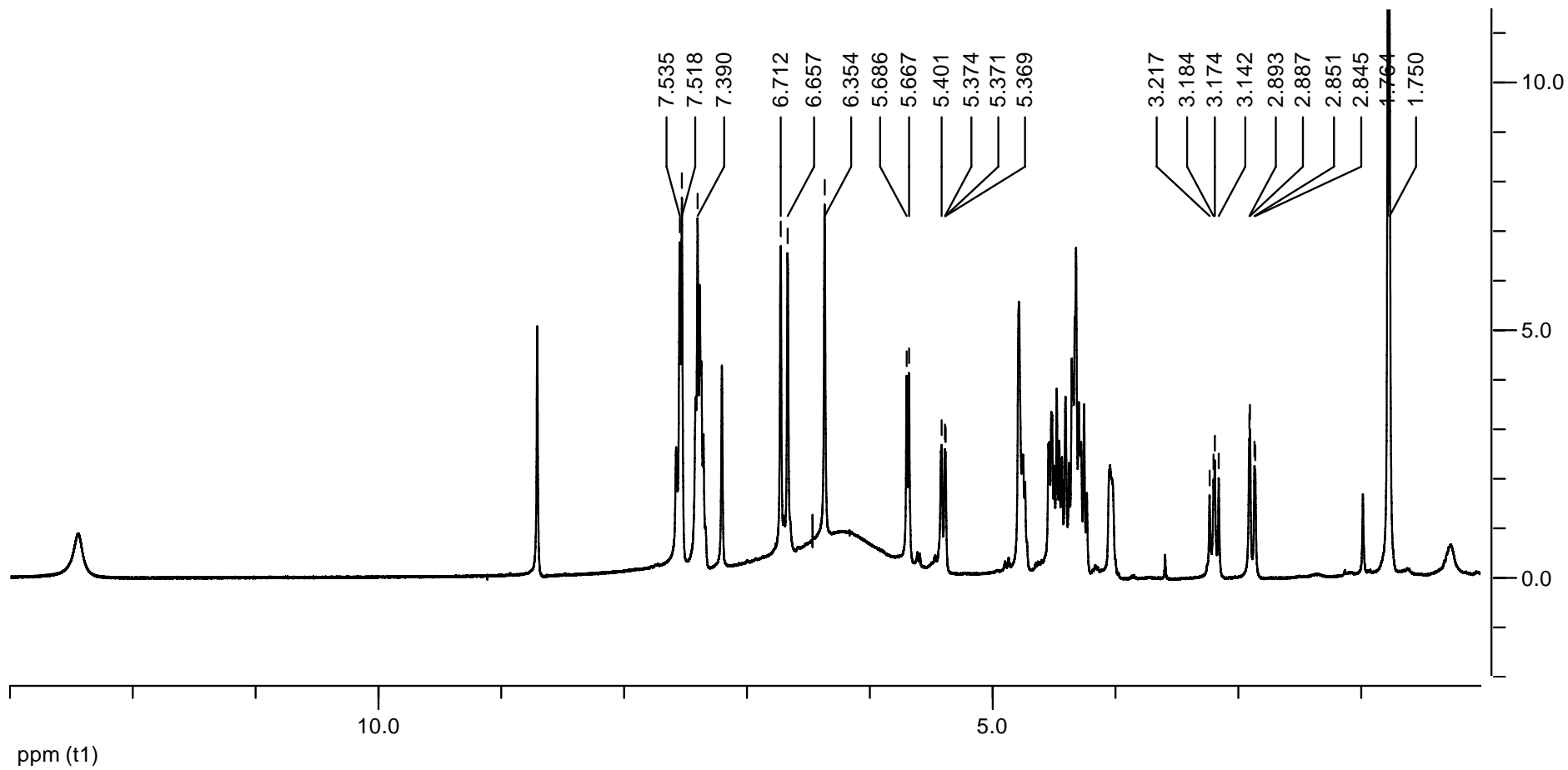
Os deslocamentos químicos em 99,10 e 97,43 ppm referentes aos carbonos C-6 e C-8 do anel aromático A se correlacionaram aos dois simpletos em 6,65 e 6,71 respectivamente.

Glicosídeos

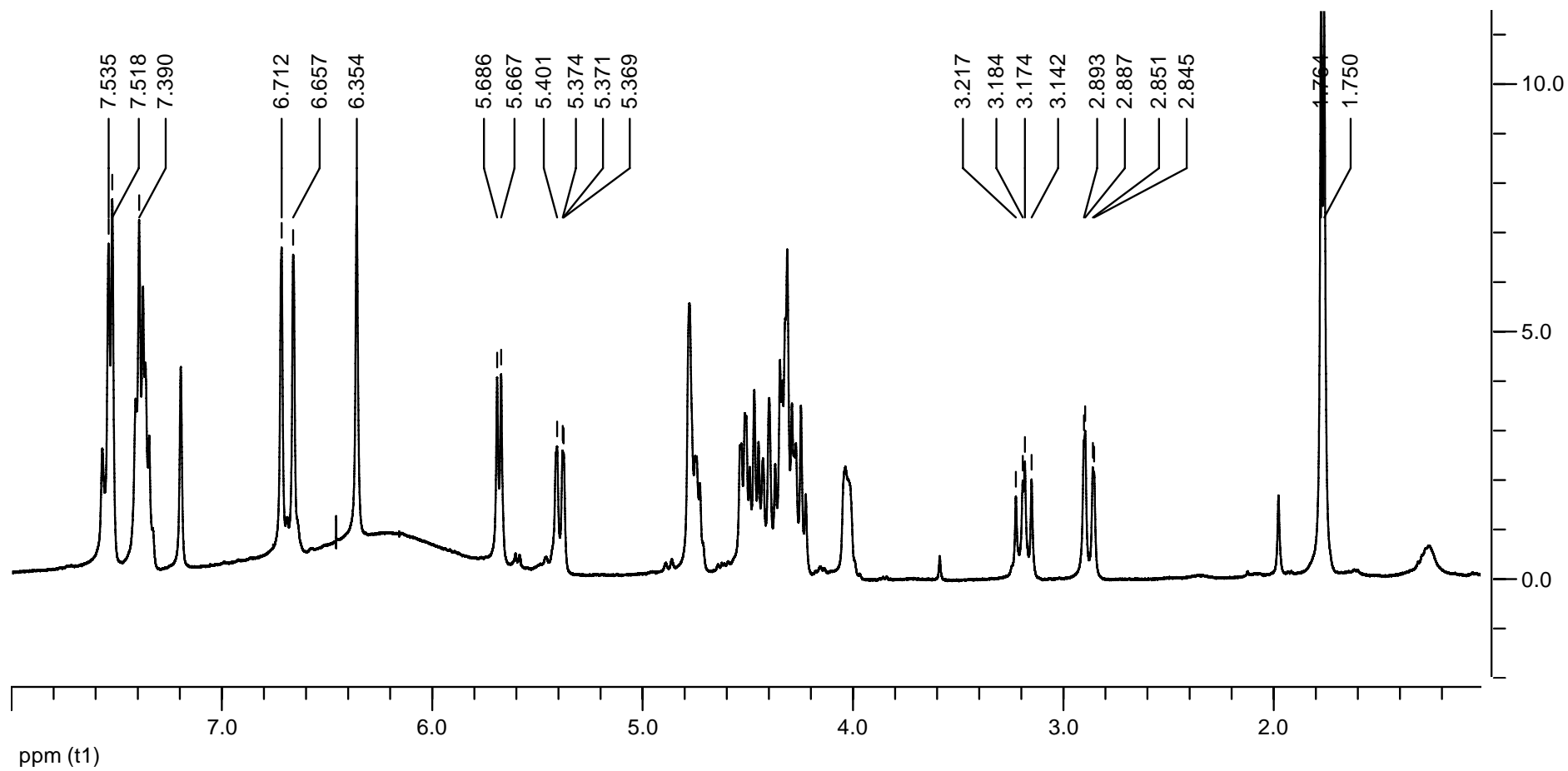
Os carbonos anoméricos da glicose e rhamnose, que apresentaram deslocamentos químicos de 100,58 e 103,74 ppm respectivamente, foram correlacionados ao duplete em 5,67 ppm e ao simpleto em 5,35 ppm respectivamente. O sinal em 20,17 ppm referente ao grupamento metila em C-6 da rhamnose foi relacionado ao duplete em 1,75 ppm.



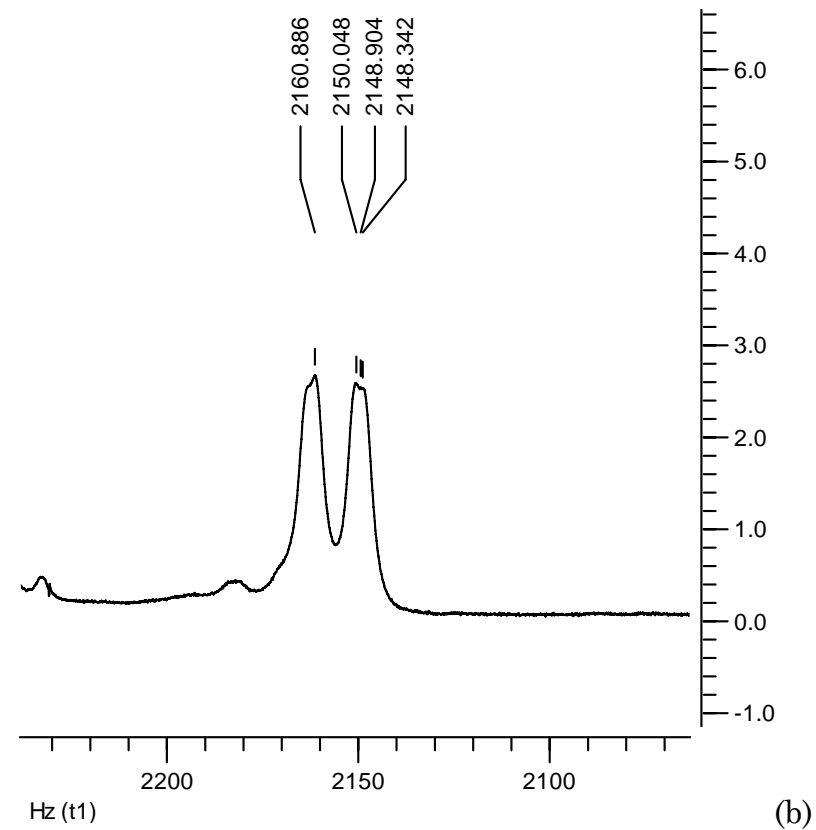
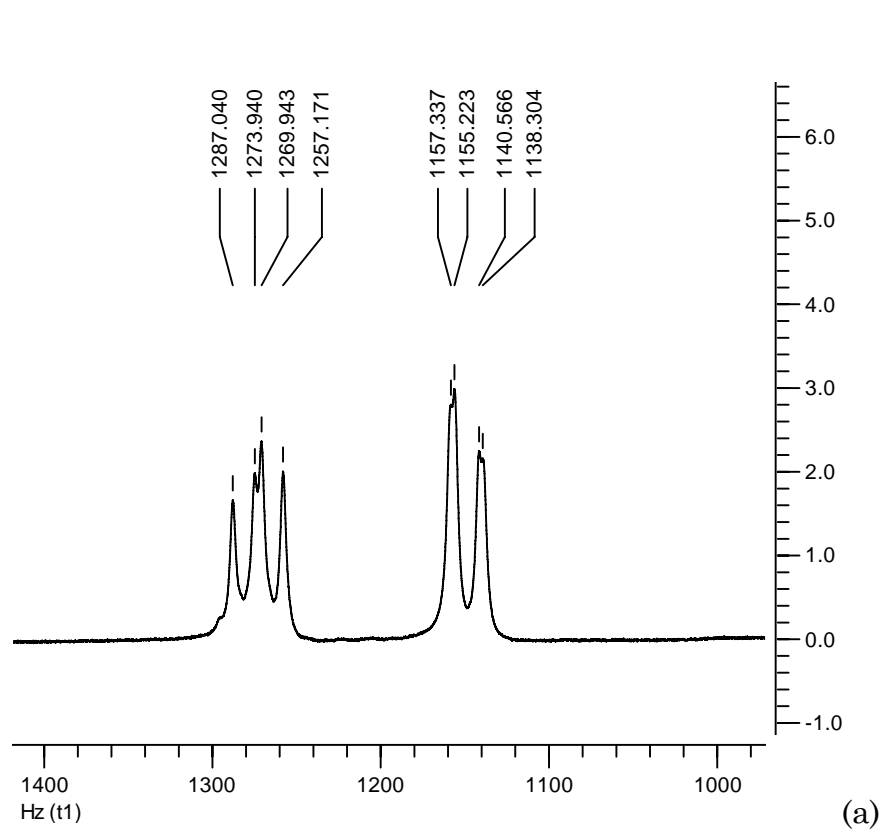
Espectro 4. Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (100MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo



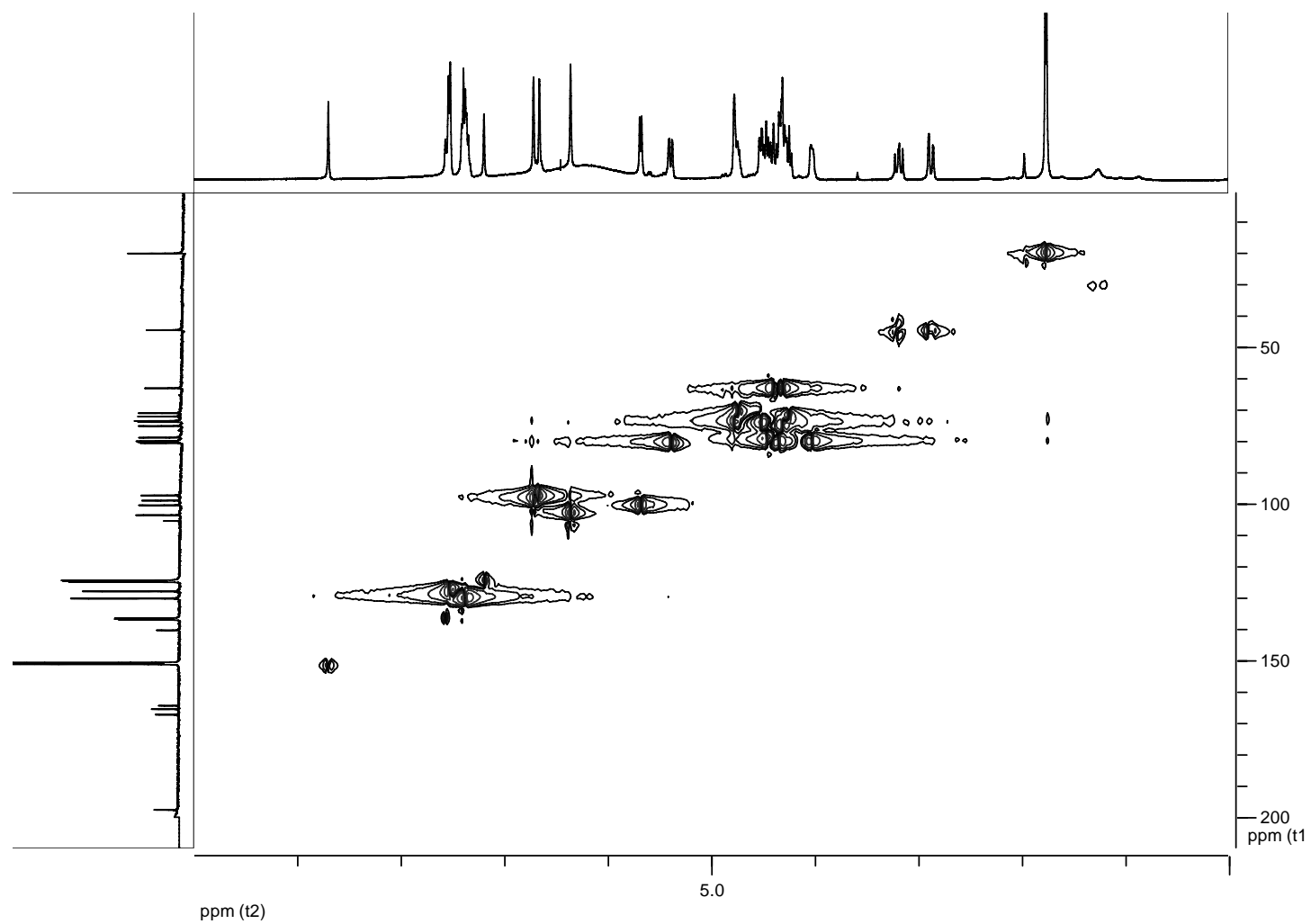
Espectro 5. Espectro de RMN de ^1H em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo



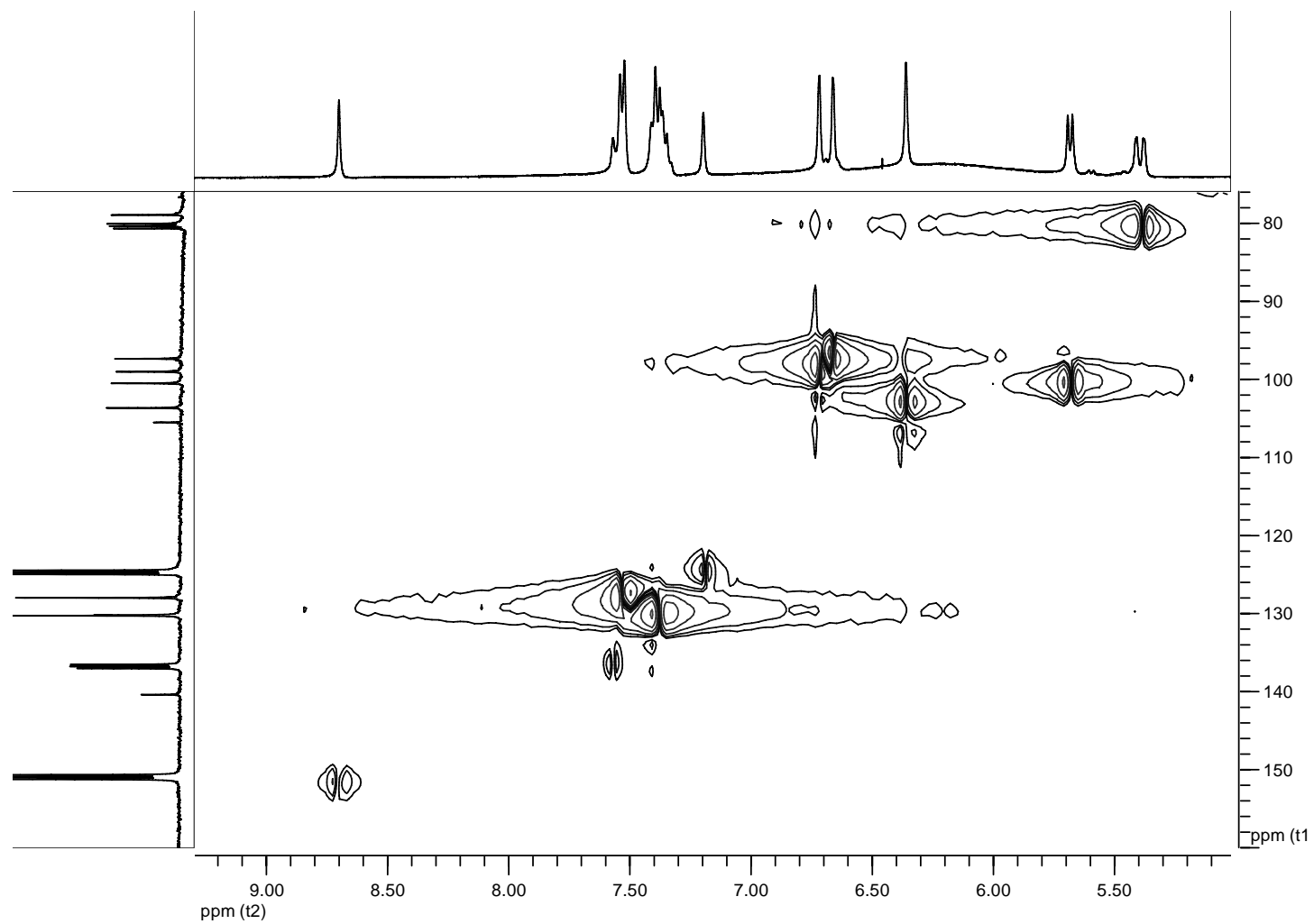
Espectro 5 (1). Espectro de RMN de ^1H expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo



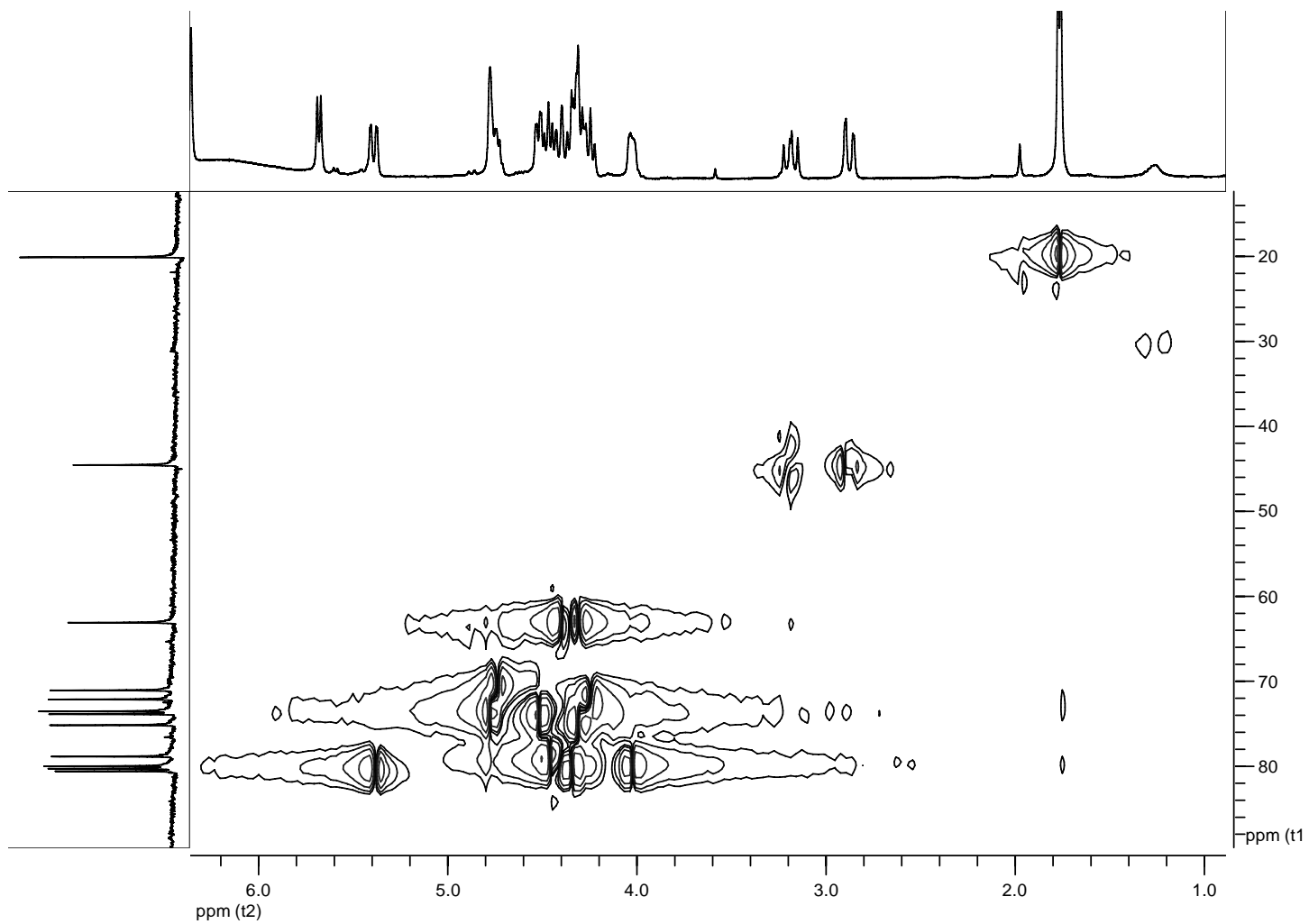
Espectro 5 (2). Espectro de RMN de ^1H expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo (a) Expansão 2H, C-3. (b) Expansão 1H, C-2. Escala em Hz.



Espectro 6. Espectro HSQC em C_5D_5N (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -neo-hesperidosídeo



Espectro 6 (1). Espectro HSQC expandido (400 MHz, C₅D₅N) da flavanona Pinocembrina 7-*O*-β-neo-hesperidosídeo



Espectro 6 (2). Espectro HSQC expandido (400 MHz, C₅D₅N) da flavanona Pinocembrina-7-*O*-β-neohesperidosídeo

4.2.5.3 Pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo

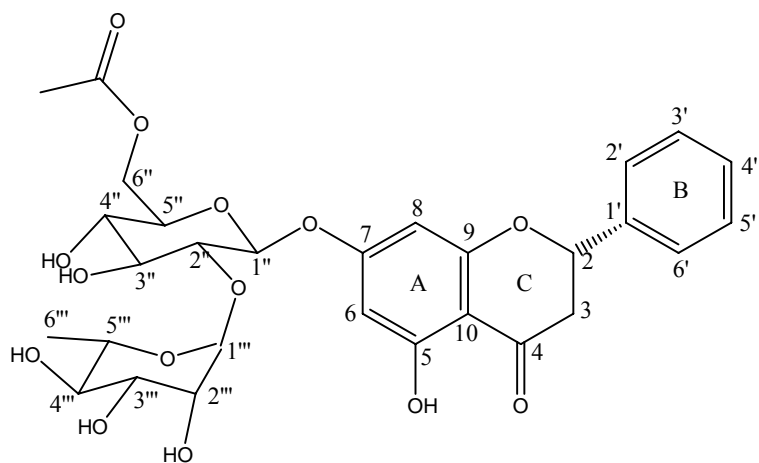


Figura 41. Pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 7**, página 119) mostrou a presença de 29 carbonos cujos valores (**Tabela 12**) são compatíveis com os da flavanona pinocembrina-7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo (**Figura 41**) isolada anteriormente de partes aéreas de *Nierembergia hippomanica* (GONZÁLEZ & POMILIO, 1982).

Tabela 16. Dados de RMN de ^{13}C da Pinocebrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neoheesperidosídeo comparados a valores citados na literatura.

Carbono	^{13}C RMN	Pinocebrina 7- <i>O</i> - β -(6''- <i>O</i> -acetil) neoheesperidosídeo	Pinocebrina 7- <i>O</i> - β -(6''- <i>O</i> -acetil) neoheesperidosídeo
	100 MHz MeOD	75,46 MHz $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^a$	25,17 MHz DMSO- d_6^a
2	79,452	79,63	78,80
3	43,003	43,50	42,18
4	196,736	196,64	196,71
5	163,518	164,09	162,83
6	96,807	97,78	96,55
7	165,056	166,08	164,63
8	95,643	96,43	95,26
9	162,994	163,34	162,55
10	103,592	104,46	103,35
1'	138,716	139,00	138,37
2'	126,089	129,08	126,60
3'	128,412	126,84	128,88
4'	128,363	-	128,50
5'	128,412	126,84	126,88
6'	128,089	129,08	126,60
MeCO	171,310	-	169,65
MeCO	19,350	20,46	20,80
C1 Glicose	98,127	99,46	97,38
C2 Glicose	77,464	77,56	76,14
C3 Glicose	77,573	79,09	76,96
C4 Glicose	70,400	71,27	70,05
C5 Glicose	74,086	75,61	73,66
C6 Glicose	63,313	64,35	62,30
C1 Rhamnose	101,101	102,45	100,42
C2 Rhamnose	70,799	72,71	70,44
C3 Rhamnose	70,781	72,35	70,33
C4 Rhamnose	72,537	74,02	71,84
C5 Rhamnose	68,620	69,92	68,30
C6 Rhamnose	16,875	18,81	17,93

^a GONZÁLEZ & POMILIO, 1982.

Anel C

É possível destacar o deslocamento químico de 196,74 ppm relativo a C da carbonila (C-4) e os valores 79,45 e 43,00 ppm relativos aos C da ligação simples (C-2 e C-3 respectivamente) do anel C, característicos de

flavanona (AGRAWAL, 1989). C-2 apresentou-se mais deslocado que C-3 por apresentar-se mais desprotegido.

Anel B

Os sinais referentes aos carbonos do anel B foram atribuídos levando-se em consideração o efeito e a simetria promovida pelo substituinte fenila (PRETSCH, 1980; SILVERSTEIN, 2000). O pico em 138,72 ppm foi atribuído ao carbono quaternário (C-1') do anel B por estar mais deslocado que os outros carbonos do mesmo anel. C-3 e C-5 foram atribuídos aos deslocamentos químicos de 128,41 ppm; C-2 e C-6 ao deslocamento químico de 126,09 ppm e C-4 ao deslocamento químico de 128,36 ppm.

Anel A

Os valores entre 162 e 166 ppm foram relacionados aos carbonos C-5, C-7 e C-9 do anel aromático A que se apresentam mais desprotegidos por estarem ligados a grupamentos hidroxila. C-10 apresentou deslocamento químico de 103,592 ppm. C-6 e C-8 apresentaram deslocamentos químicos de 96,807 e 95,643 ppm respectivamente.

A glicosilação de hidroxilas produz modificações nos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C da aglicona, principalmente nos carbonos diretamente envolvidos na derivatização (AGRAWAL, 1989). Em geral, o sinal do carbono fenólico cai em campos mais altos – C-7 – e os carbonos em posições orto e para em relação a este, em campos mais baixos – C-6, C-8 e C-10.

Como comentado anteriormente, a presença de ligação glicosídica na hidroxila em C-5 dificilmente é encontrada devido a presença de ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila em C-4 (AGRAWAL, 1992) e devido ao impedimento estérico durante a biossíntese da molécula. Como não é o caso do espectro desta flavanona, concluiu-se que a glicosilação ocorra em outra posição.

Glicosídeo

A comparação do espectro obtido com valores da literatura indicou a presença de uma glicose e uma rhamnose (AGRAWAL, 1989; 1992). Os carbonos anoméricos da glicose e rhamnose apresentaram deslocamentos químicos de 100,582 e 103,741 ppm respectivamente, confirmando a presença da ligação O-glicosídica. O sinal em 20,165 ppm, característico do grupamento metila em C-6, corroborou a presença da rhamnose.

A estrutura do diglicosídeo foi assinalada no espectro de RMN de ^{13}C , como foi feito anteriormente na elucidação estrutural da pinocembrina 7-O- β -neo-hesperidosídeo, pelo fato de haver modificações quanto ao deslocamento químico na ligação interglicosídica (AGRAWAL, 1989), nos levando a concluir que se tratava novamente de neo-hesperidosídeo.

O deslocamento químico do C-1 da glicose foi de extrema importância para a identificação da ligação 1 \rightarrow 2. O valor do C-2 da glicose reforçou a conclusão da existência da ligação rhamnosil-(1 \rightarrow 2)-glicosídeo por estar acima do valor encontrado na literatura, 75,2 ppm (AGRAWAL, 1992).

A presença dos sinais em 171,310 e 19,350 ppm foram característicos de carbonila e metila de um grupamento acetila (SILVERSTEIN, 2000), que estaria ligado em alguma hidroxila dos resíduos glicosídicos, já que as hidroxilas flavonoídicas estão “ocupadas”.

A acetilação de glicosídeos de flavonóides pode ser facilmente determinada por espectro de RMN de ^{13}C . O carbono α a derivatização cai em campos mais baixos (de 0,5 a 3,0 ppm), enquanto o carbono β cai em campos mais altos (1,5 a 3,0 ppm) (AGRAWAL, 1989), devido ao efeito retirante de elétrons do substituinte acetila.

Comparando-se os valores de deslocamento químico de neo-hesperidosídeo (ISMAIL & ALAM, 2001; WEBBY & BOASE, 1999) com neo-hesperidosídeos acetilados (GONZÁLEZ *et al.*, 1981; RIPPERGER, 1981), pôde-se concluir que a acetilação ocorreu no C-6 da glicose, cujo deslocamento químico do carbono α foi de 63,211 ppm e do carbono β foi de 78,986 ppm.

Outros carbonos da glicose apresentaram deslocamentos químicos de 80,123; 80,416 e 72,254 ppm (C-2^G, C-3^G e C-4^G respectivamente) e os da rhamnose de 73,992; 73,666; 75,290 e 71,180 ppm (C-2^R, C-3^R, C-4^R e C-5^R respectivamente).

A análise do espectro de RMN de ¹H (**Espectros 8 e 9**, páginas 120-122) mostrou a presença de sinais compatíveis (**Tabela 13**) com a presença do anel A flavonoídico 5,7,9,10-substituído e do anel B monossustituído, além dos sinais referentes aos hidrogênios do etileno do anel C, aos hidrogênios dos açúcares e ao metileno do grupamento acetila.

Tabela 13. Dados de RMN de ¹H da Pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo comparados a valores citados na literatura.

Hidrogênio	1H RMN	1H RMN	Pinocembrina 7- <i>O</i> -β-(6''- <i>O</i> -acetil) neo-hesperidosídeo
	400 MHz MeOD	400 MHz C ₅ D ₅ N	
3H, C6-R	<i>d</i> 1,32	<i>d</i> 1,79	<i>d</i> 1,78
3H, MeCO	<i>s</i> 1,97	<i>s</i> 1,99	<i>s</i> 1,98
2H, C3	<i>t</i> 3,15	<i>t</i> 3,25	<i>dq</i> 3,04
	<i>d</i> 2,81	<i>d</i> 2,89	
9H,	3,20-4,00	4,00-5,00	4,10-5,05
Hidrogênios dos açúcares			
1H, C2	<i>d</i> 5,49	<i>d</i> 5,46	<i>dd</i> 5,45
1H, C1-G	<i>d</i> 5,06	<i>d</i> 5,63	<i>d</i> 5,72
1H, C1-R	<i>s</i> 5,28	<i>s</i> 6,40	<i>d</i> 6,35
1H, C-6	<i>s</i> 6,17	<i>s</i> 6,68	<i>d</i> 6,68
1H, C-8	<i>s</i> 6,23	<i>s</i> 6,72	<i>d</i> 6,72
5H, anel B	<i>m</i> 7,38-7,52	<i>m</i> 7,42-7,59	<i>m</i> 7,45-7,50

^a GONZÁLEZ & POMÍLIO, 1982.

Primeiramente o espectro de ^1H RMN foi feito em MeOD e por apresentar diferenças marcantes quanto aos deslocamentos químicos apresentados na referência (GONZÁLEZ & POMÍLIO, 1982), o espectro foi refeito em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Abaixo serão discutidos os valores obtidos em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Anel C

É possível destacar o triplete e o duplete com deslocamentos químicos de 3,25 e 2,89 ppm relativos a 2H em C-3 apresentando $J_{\text{geminal}}=16$ Hz e $J_{\text{ante}}=13$ Hz (**Espectro 9 (1)a**, página 122). O duplete em 5,46 ppm relativo a 1H do C-2 apresentando $J_{\text{ante}}=13$ Hz (**Espectro 9 (1)b**, página 122). Os hidrogênios em C-2, vizinhos ao grupamento fenila, são mais protegidos que os hidrogênio em C-3, vizinhos ao grupamento carbonila, apresentando menor deslocamento químico (PRETSCH *et al.*, 1980). Esses dados foram posteriormente confirmados por espectro de HSQC.

Anéis A e B

Os sinais em 6,68 e 6,72 ppm foram relacionados, respectivamente, aos 2H de C-6 e C-8 do anel A. O multiplete entre 7,18 e 7,47 ppm correspondem aos 5H do anel B.

Não foi possível observar o simpleto relativo ao hidrogênio da hidroxila em C-5.

Glicosídeo

O hidrogênio relativo ao carbono anomérico da rhamnose apresentou-se como um simpleto em 6,40 ppm enquanto o hidrogênio relativo ao carbono anomérico da glicose apresentou-se como um duplete com deslocamento químico de 5,63 ppm. O valor de $J=7,4$ Hz possibilitou determinar a configuração β para a glicose (AGRAWAL, 1992). A presença da rhamnose foi confirmada pelo sinal em 1,79 ppm correspondente a metila em C-6.

É interessante observar a diferença de mais de 1 ppm no deslocamento químico do C-1 da rhamnose nos espectros obtidos em MeOD e C₅D₅N.

A análise do espectro COSY ¹H-¹H (**Espectro 10**, página 123) mostrou a correlação homonuclear dos sinais dos hidrogênios (**Tabela 14**), confirmando a estrutura da flavanona pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo isolada.

Tabela 14. Correlação entre dados de RMN de ¹H da flavanona pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo

Hidrogênio	1H RMN	Hidrogênio
400 MHz		
MeOD		
3H, C6-R	<i>d</i> 1,32	9H, açúcares;
3H, MeCO	<i>s</i> 1,97	-
2H, C3	<i>t</i> 3,15 <i>d</i> 2,81	1H, C2
9H, açúcares	3,20-4,00	3H, C6-R; 1H, C1-G; 1H, C1-R
1H, C2	<i>d</i> 5,49	2H, C3
1H, C1-G	<i>d</i> 5,06	9H, açúcares
1H, C1-R	<i>s</i> 5,28	9H, açúcares
1H, C-6	<i>s</i> 6,17	-
1H, C-8	<i>s</i> 6,23	-
5H, anel B	<i>m</i> 7,38-7,52	-

Anel C

Neste espectro foi possível comprovar a correlação entre o duplete referente ao 1H do C-2 e os sinais referentes aos 2H do C-3.

Glicosídeo

Os sinais referentes aos 9H dos açúcares mostraram relação com o duplete em 1,32 ppm relacionado aos 3H do C-6 da rhamnose, com o duplete em 5,06 ppm relacionado ao carbono anomérico da glicose e com o simpleto em 5,28 ppm relacionado ao carbono anomérico da rhamnose.

A análise do espectro HSQC (**Espectro 11**, página 124-126) mostrou a correlação entre sinais heteronucleares de hidrogênio e de carbono (**Tabela 15**), auxiliando no reconhecimento das correlações e confirmando a estrutura da flavanona pinocembrina-7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neohesperidosídeo isolada.

Tabela 15. Correlação entre dados de RMN de ^1H e ^{13}C da flavanona pinocembrina 7- O - β -(6''- O -acetil) neo-hesperidosídeo

Carbono	^{13}C RMN	^1H RMN
	100 MHz MeOD	400 MHz MeOD
2	79,452	<i>d</i> 5,49
3	43,003	<i>t</i> 3,15 <i>d</i> 2,81
6	96,807	<i>s</i> 6,17
8	95,643	<i>s</i> 6,23
2'	126,089	<i>m</i> 7,38-7,52
3'	128,412	
4'	128,363	
5'	128,412	
6'	128,089	
MeCO	19,350	<i>s</i> 1,97
C1 Glicose	98,127	<i>d</i> 5,63
C2 Glicose	77,464	3,20-4,00
C3 Glicose	77,573	
C4 Glicose	70,400	
C5 Glicose	74,086	
C6 Glicose	63,313	<i>s</i> 6,40
C1 Rhamnose	101,101	
C2 Rhamnose	70,799	
C3 Rhamnose	70,781	
C4 Rhamnose	72,537	
C5 Rhamnose	68,620	
C6 Rhamnose	16,875	<i>d</i> 1,32

Anel C

Neste espectro foi possível correlacionar o duplete em 5,49 ppm referente ao 1H do C-2 com o sinal de C em 79,452 ppm e os sinais em 2,90 ppm referente aos 2H do C-3 com o sinal de C em 43,003 ppm.

Anel B

Os sinais entre 128 e 131 ppm atribuídos aos carbonos C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6 do anel B tiveram relação com o multiplete entre 7,34-7,50 ppm.

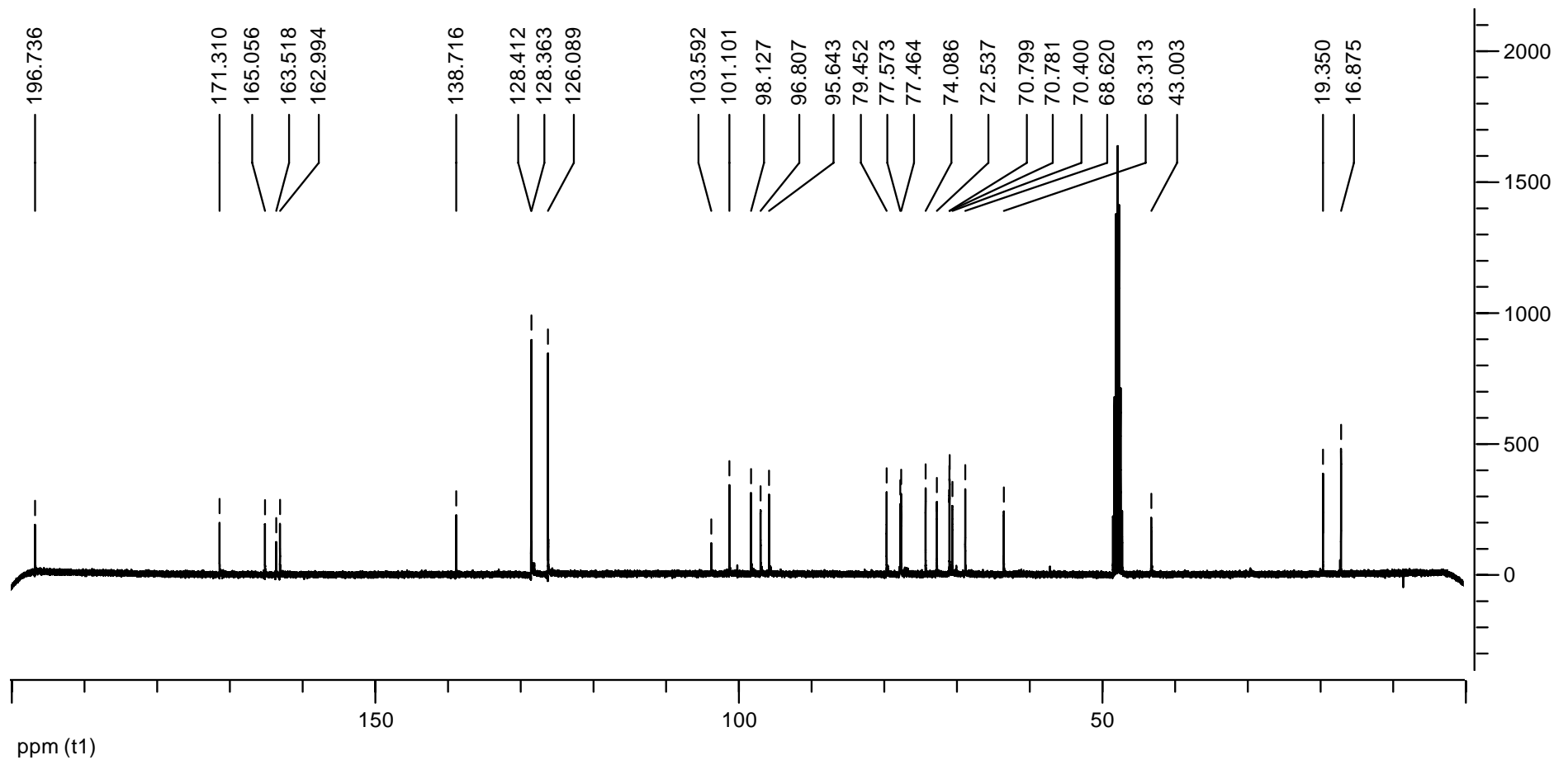
Anel A

Os deslocamentos químicos em 99,096 e 97,433 ppm referentes aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, do anel aromático A se correlacionaram ao duplete em 6,65 e 6,71 respectivamente.

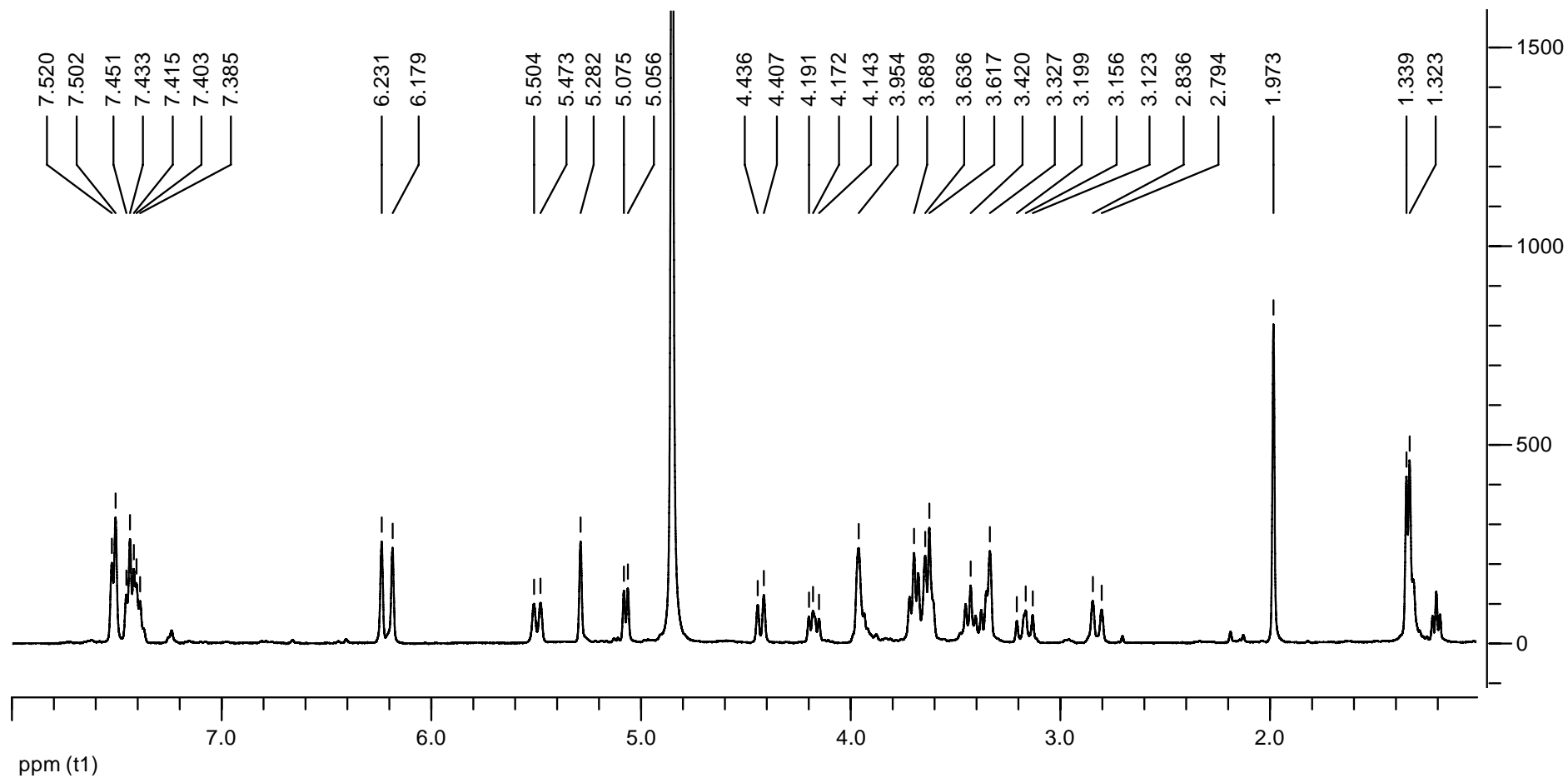
Glicosídeos

Os carbonos anoméricos da glicose e rhamnose, que apresentaram deslocamentos químicos de 100,582 e 103,741 ppm foram correlacionados ao duplete em 5,67 ppm e ao simpleto em 5,35 ppm respectivamente. O sinal em 20,165 ppm referente ao grupamento metila em C-6 da rhamnose foi relacionado ao duplete em 1,75 ppm.

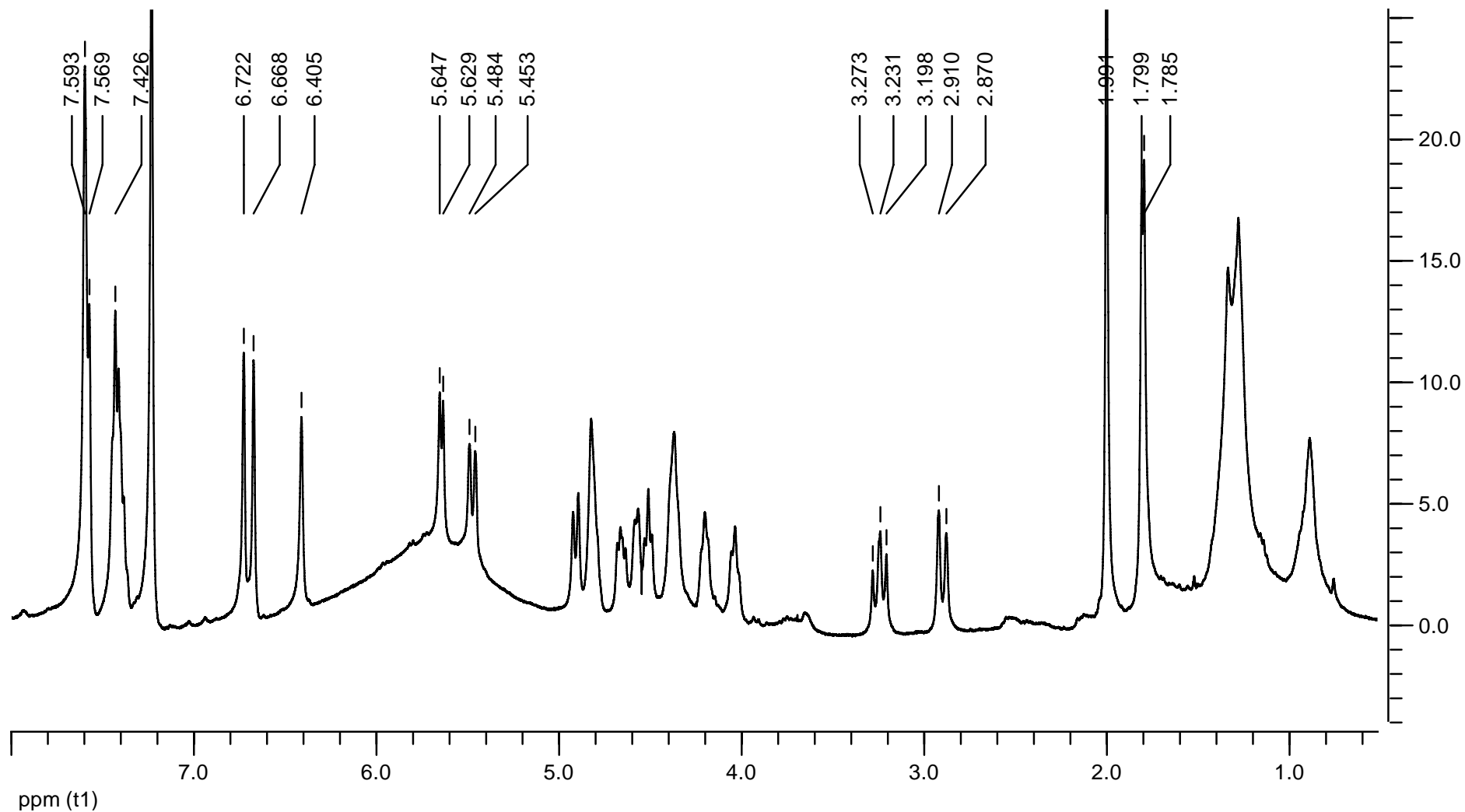
Também é importante relacionar o sinal em 19,350 ppm atribuído a metila do grupamento acetila com o simpleto referente aos 3H em 1,97 ppm.



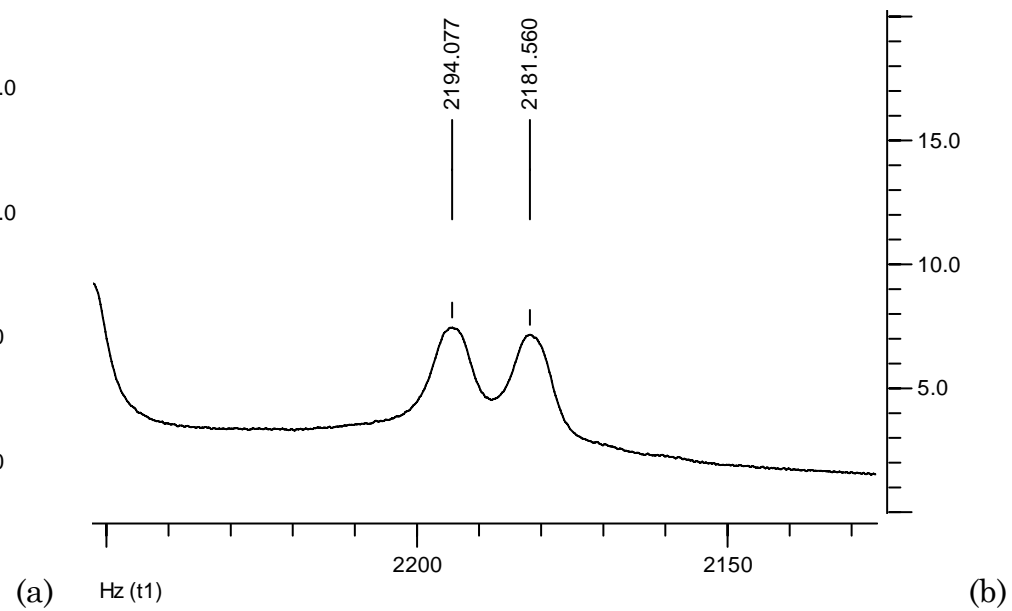
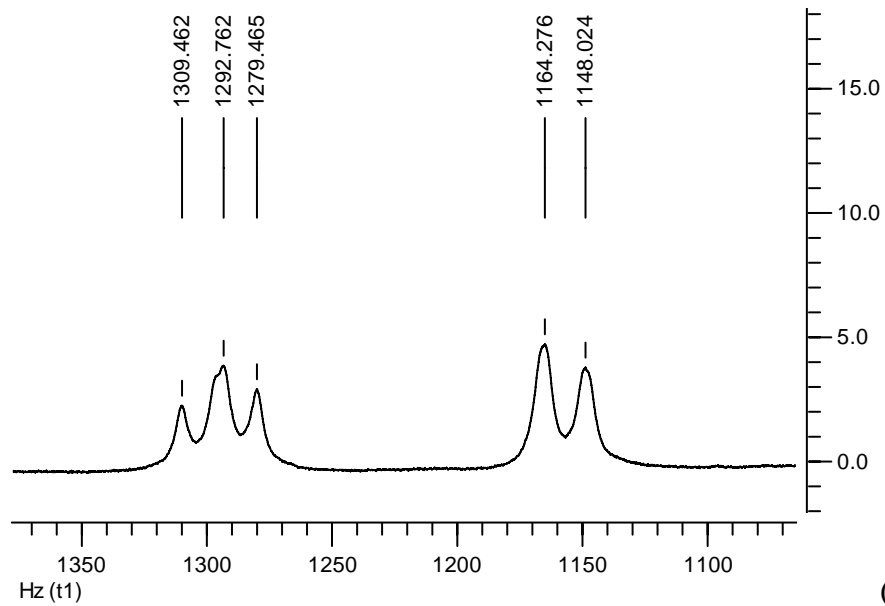
Espectro 7. Espectro de ^{13}C RMN em MeOD (100 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo



Espectro 8. Espectro de ^1H RMN em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo

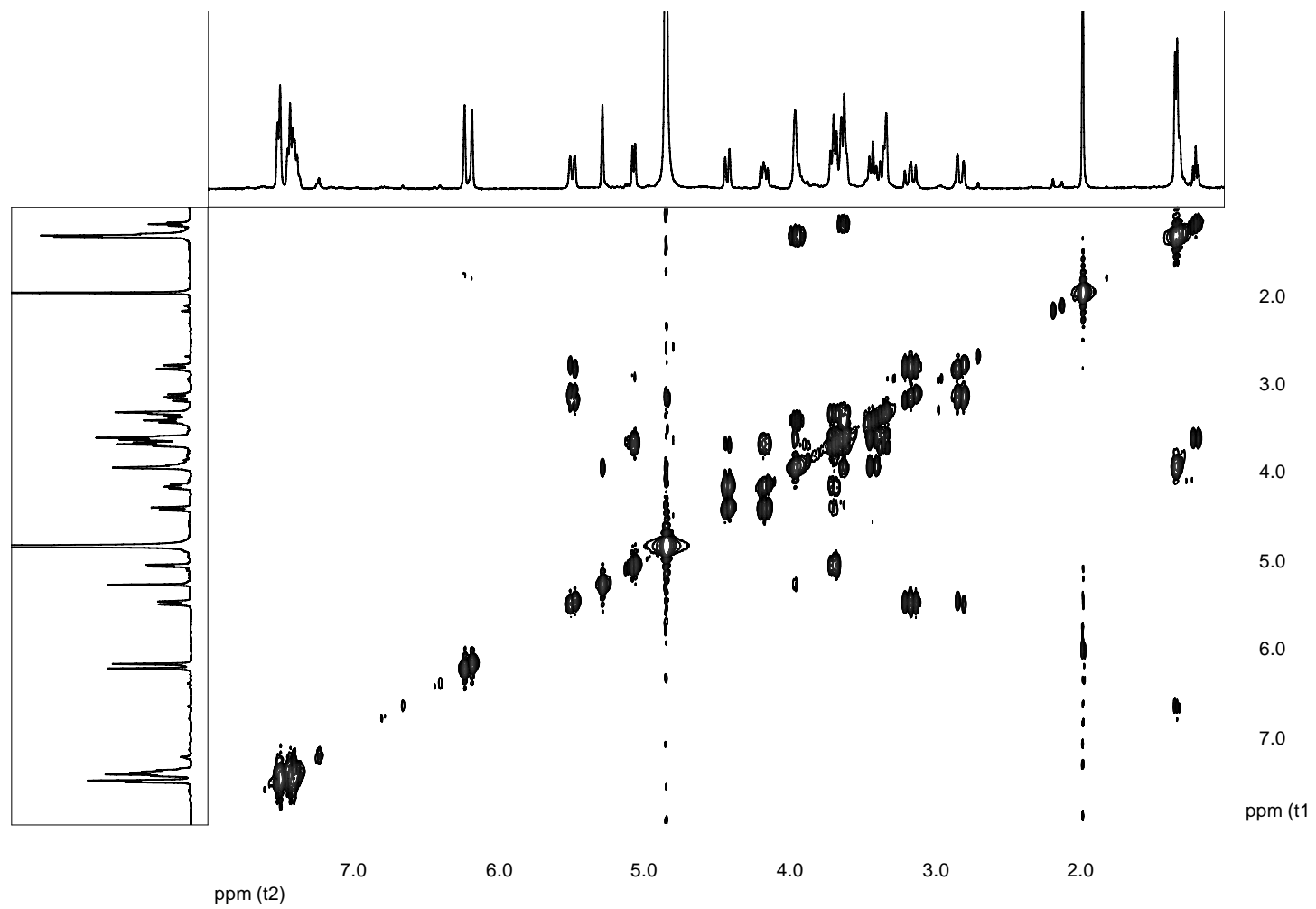


Espectro 9. Espectro de ^1H RMN em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo

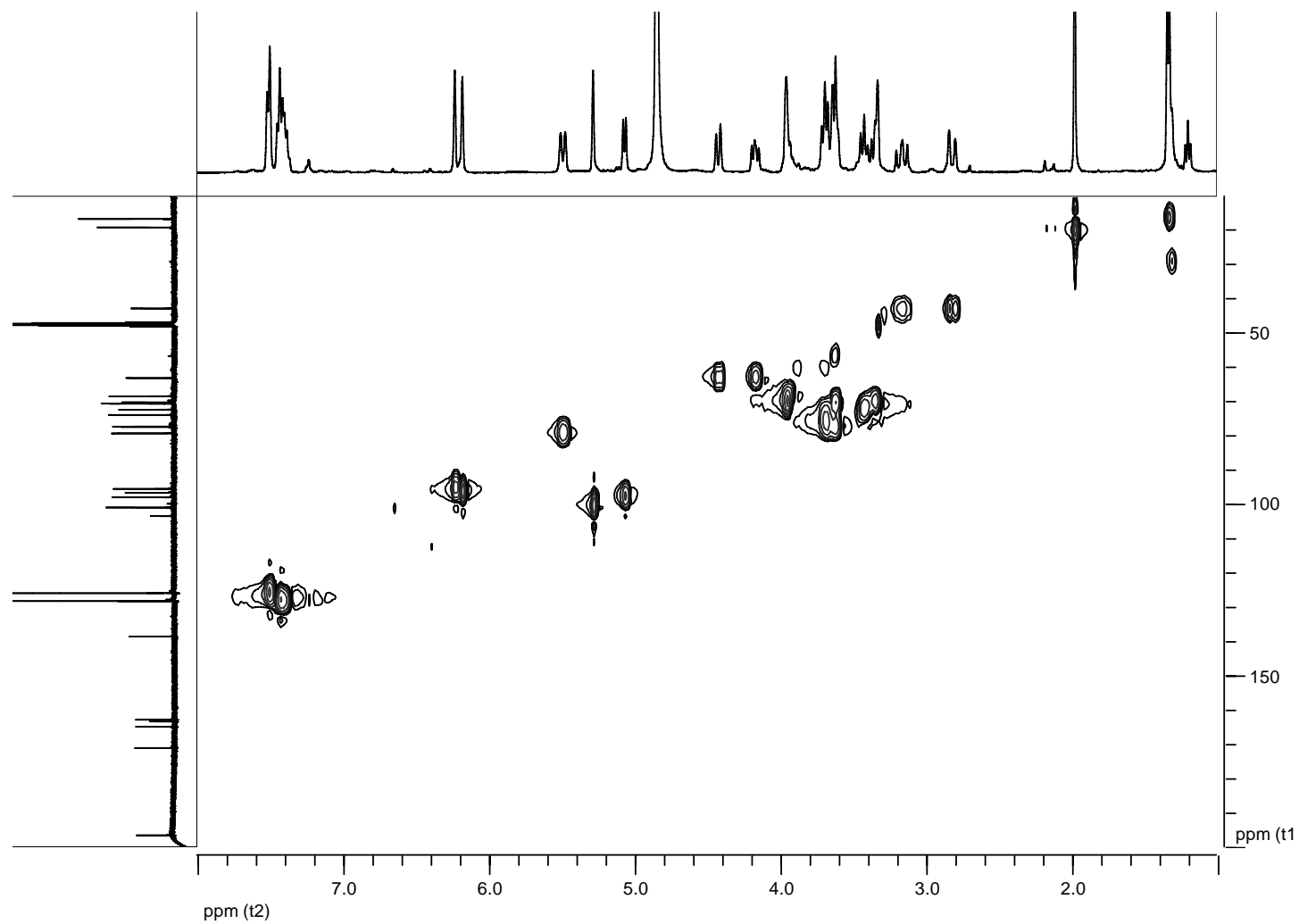


Espectro 9 (1). Espectro de RMN de ^1H expandido (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo

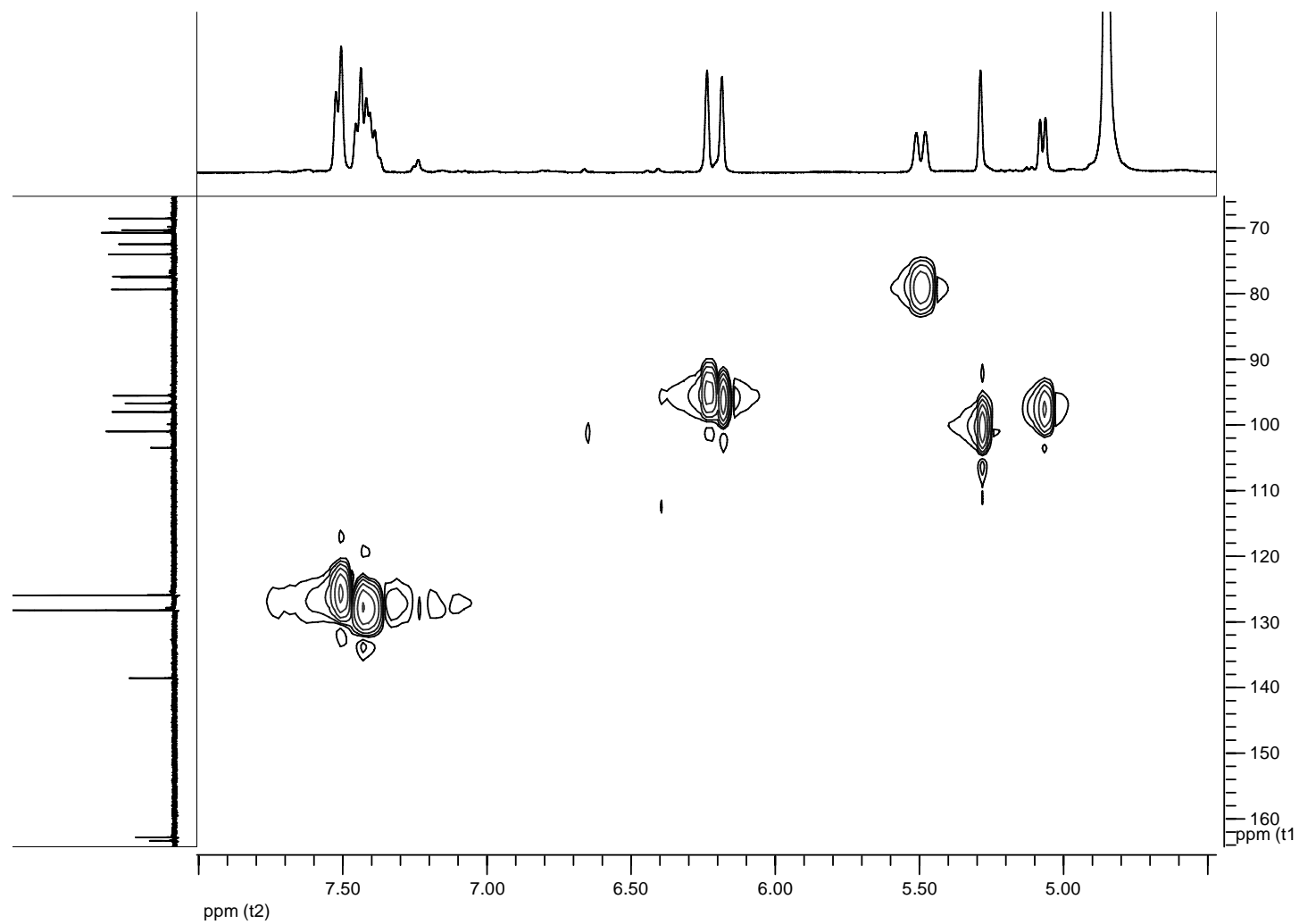
(a) Expansão 2H, C-3. (b) Expansão 1H, C-2.



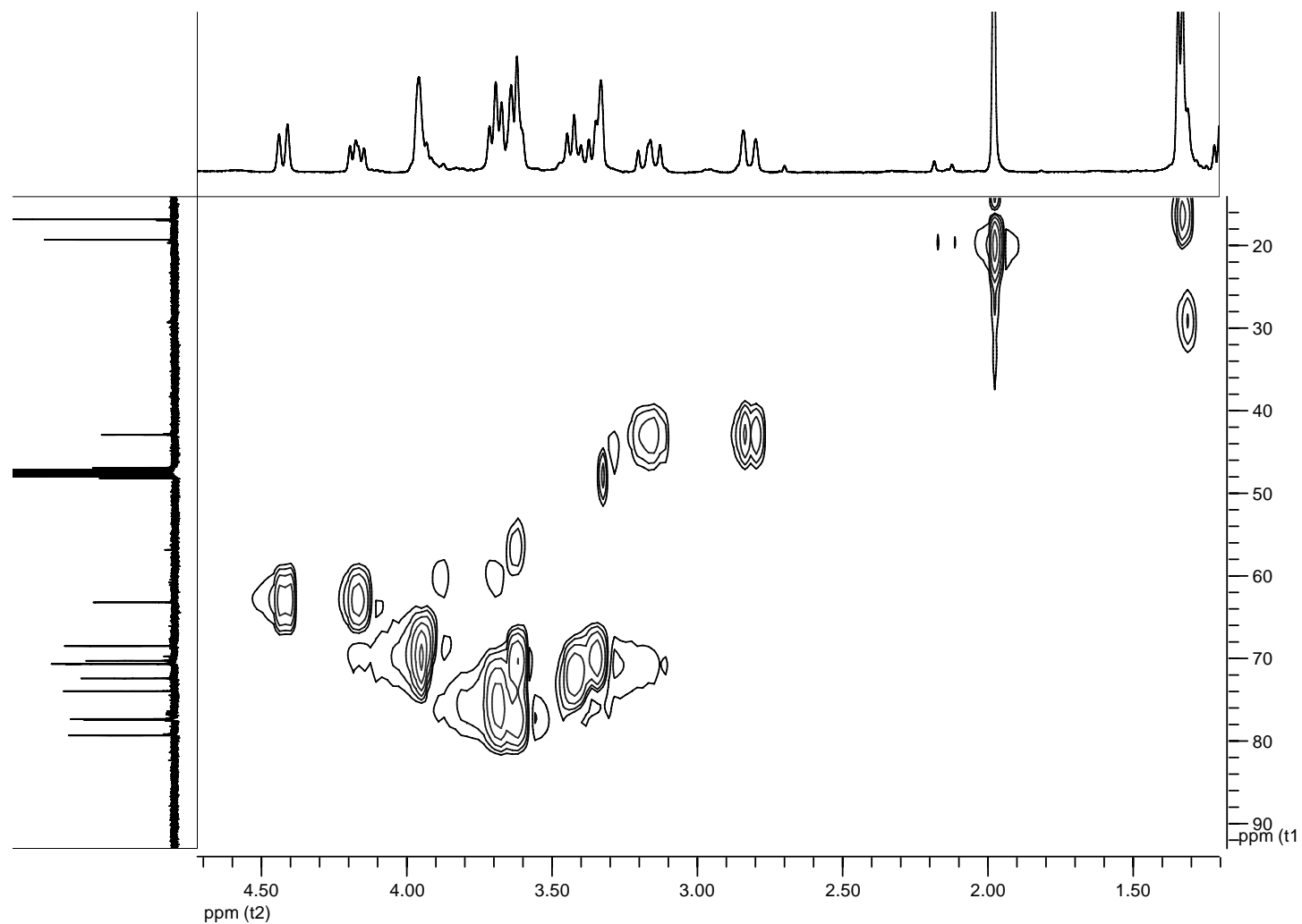
Espectro 10. Espectro COSY H-H em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*-β-(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo



Espectro 11. Espectro HSQC em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo



Espectro 11 (1). Espectro HSQC expandido em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-*O*- β -(6''-*O*-acetil) neo-hesperidosídeo



Espectro 11 (2). Espectro HSQC expandido em MeOD (400 MHz) da flavanona Pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neo-hesperidosídeo

4.2.6 Testes biológicos

4.2.6.1 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico utilizando radical DPPH (Metodologia, item 3.6.1, página 28) inicialmente com o extrato bruto e em seguida com as partições com a intenção de bioguiar o fracionamento.

O modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de H ($\text{DPPH}\bullet + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}\bullet]_n$), incluindo substâncias fenólicas (ROGINSKY & LISSI, 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; MENSOR *et al.*, 2001).

O novo radical formado ($\text{A}\bullet$) pode seguir a interação radical-radical para gerar moléculas estáveis, através da colisão de radicais com a abstração de um átomo de um radical para outro ($\text{DPPH}\bullet + \text{A}\bullet \rightarrow \text{DPPH}\bullet\text{-A}$; $\text{A}\bullet + \text{A}\bullet \rightarrow \text{A-A}$), embora essas reações secundárias sejam dificultadas. O consumo de $\text{DPPH}\bullet$ é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância a 517 nm diminui como um resultado de uma alteração na coloração violeta característica para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes na amostra através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (ESPÍN *et al.*, 2000).

O extrato bruto etanólico de folhas de *S. leucanthum* demonstrou inicialmente uma atividade antioxidante boa ($\text{CE}_{50} = 45,26 \mu\text{g/ml}$) (NERY, 2008) quando comparado ao padrão, tintura comercial de *Ginkgo biloba*

EGB761 ($CE_{50} = 40,72 \mu\text{g/ml}$). As partições em clorofórmio, acetato de etila e butanol apresentaram $CE_{50} = 2586,9; 121,27$ e $106,18 \mu\text{g/ml}$, respectivamente (**Tabela 16, Figura 42**). Não foi possível calcular o CE_{50} da partição hexânica, por apresentar um valor muito baixo, atribuído ao fato de esta partição não apresentar substâncias de caráter fenólico, essenciais para a existência de atividade antioxidante (NAMJO, *et al.* 1996), uma vez que utilizou-se o radical DPPH como reagente.

Baseado no mecanismo de redução da molécula de DPPH é possível inferir que a ação antioxidante das partições em AcOEt e BuOH devem-se à presença de substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis, tais como os flavonóides (MENSOR *et al.*, 2001).

Dentre as partições que apresentaram melhor atividade antioxidante, escolheu-se aleatoriamente iniciar o trabalho pela partição em AcOEt, que foi submetida a análise preliminar por CCD e CLAE (item 4.2.2, página 48) e posterior fracionamento por CCC (item 4.2.3, página 51).

As substâncias majoritárias isoladas da partição em AcOEt, 2',4',6'-trihidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona, pinocembrina 7-O- β -neohesperidosídeo e pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neohesperidosídeo, tiveram suas atividades antioxidantes inferidas com base na relação estrutura x atividade, uma vez que não foram totalmente solúveis em EtOH, solvente utilizado no teste de atividade antioxidante.

As flavanonas não apresentam diversos fatores estruturais importantes para que haja atividade antioxidante: a ausência de hidroxilas disponíveis no anel A – as hidroxilas em C-7 e C-5 encontram-se glicosilada e quelada com a carbonila em C-4, respectivamente (YOKOZAWA *et al.* 1997); a ausência de hidroxilas no anel B (RICE-EVANS, 1996); a ausência da ligação dupla no anel C, interrompendo a conjugação, o que não permite a deslocalização de elétrons para que haja estabilização do radical (RICE-EVANS, 1996).

É possível deduzir que a di-hidrochalcona possua atividade antioxidante pouco mais elevada que as flavanonas pelo fato desta apresentar a hidroxila em C-6' livre (YOKOZAWA *et al.* 1997).

Tabela 16. Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e partições em hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol de folhas de *S. leucanthum*

Amostra	[] mg/ml	ABS branco	ABS controle	ABS amostra	D ABS	% AAO	% AAOM
Extrato Bruto	250	0,0305	0,3617	0,1061	0,0756	79,10	79,33
		0,0305	0,3617	0,1072	0,0767	78,79	
		0,0305	0,3617	0,1025	0,072	80,09	
	125	0,0153	0,3617	0,1366	0,1213	66,46	66,19
		0,0153	0,3617	0,1456	0,1303	63,98	
		0,0153	0,3617	0,1306	0,115	68,12	
	50	0,0057	0,3617	0,1812	0,1755	51,48	52,42
		0,0057	0,3617	0,1991	0,193	46,53	
		0,0057	0,3617	0,1531	0,1474	59,25	
25	0,0042	0,3617	0,2299	0,2257	37,60	39,75	
	0,0042	0,3617	0,2152	0,211	41,66		
	0,0042	0,3617	0,2213	0,2171	39,98		
Partição Hexano	250	0,0148	0,6937	0,6487	0,6339	8,62	5,06
		0,0148	0,6937	0,6797	0,6649	4,15	
		0,0148	0,6937	0,6919	0,6771	2,39	
	125	0,0077	0,6937	0,6772	0,6695	3,49	1,29
		0,0077	0,6937	0,6702	0,6625	4,50	
		0,0077	0,6937	0,73	0,722	-4,12	
	50	0,0035	0,6937	0,7229	0,7194	-3,70	-3,64
		0,0035	0,6937	0,7257	0,722	-4,11	
		0,0035	0,6937	0,7188	0,7153	-3,11	
25	0,0023	0,6937	0,7321	0,7298	-5,20	-3,68	
	0,0023	0,6937	0,7559	0,7536	-8,63		
	0,0023	0,6937	0,6765	0,6742	2,81		
Partição CHCl ₃	250	0,0573	0,3617	0,1814	0,1241	65,69	67,86
		0,0573	0,3617	0,187	0,1297	64,14	
		0,0573	0,3617	0,1522	0,0949	73,76	
	125	0,0289	0,3617	0,1508	0,1219	66,30	58,93
		0,0289	0,3617	0,1968	0,1679	53,58	
		0,0289	0,3617	0,1848	0,156	56,90	
	50	0,0134	0,3617	0,2354	0,222	38,62	41,59
		0,0134	0,3617	0,2239	0,211	41,80	
		0,0134	0,3617	0,2147	0,2013	44,35	
25	0,006	0,3617	0,23	0,224	38,07	34,34	
	0,006	0,3617	0,244	0,238	34,20		
	0,006	0,3617	0,2565	0,2505	30,74		
Partição AcOEt	250	0,0139	0,3617	0,074	0,0601	83,38	82,75
		0,0139	0,3617	0,0759	0,062	82,86	
		0,0139	0,3617	0,079	0,0651	82,00	
	125	0,0081	0,3617	0,0762	0,0681	81,17	80,48
		0,0081	0,3617	0,0823	0,0742	79,49	
		0,0081	0,3617	0,0776	0,070	80,79	
	50	0,006	0,3617	0,0994	0,0934	74,18	70,39
		0,006	0,3617	0,1155	0,110	69,73	
		0,006	0,3617	0,1244	0,1184	67,27	
25	0,0049	0,3617	0,1849	0,18	50,24	55,86	
	0,0049	0,3617	0,1403	0,1354	62,57		
	0,0049	0,3617	0,1685	0,1636	54,77		

Partição BuOH	250	0,004	0,3617	0,1024	0,0984	72,80	70,31
		0,004	0,3617	0,1229	0,1189	67,13	
125	0,004	0,004	0,3617	0,1089	0,1049	71,00	70,68
		0,0042	0,3617	0,1108	0,1066	70,53	
		0,0042	0,3617	0,1075	0,1033	71,44	
50	0,0042	0,0042	0,3617	0,1125	0,108	70,06	43,03
		0,0024	0,3617	0,1975	0,1951	46,06	
		0,0024	0,3617	0,2354	0,233	35,58	
25	0,0024	0,0024	0,3617	0,1925	0,1901	47,44	27,00
		0,0017	0,3617	0,2688	0,2671	26,15	
		0,0017	0,3617	0,2822	0,2805	22,45	
		0,0017	0,3617	0,2462	0,2445	32,40	

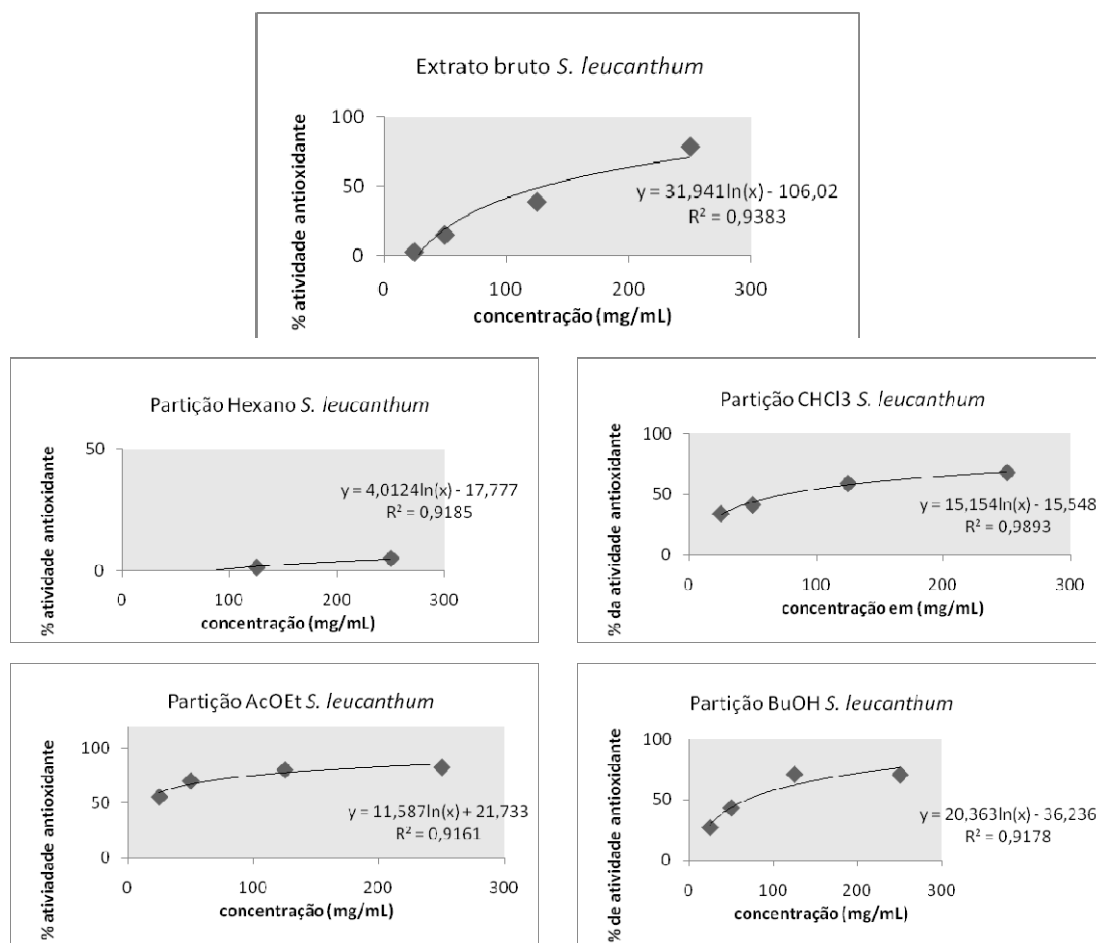


Figura 42. Gráfico de atividade antioxidante x concentração

4.2.6.2 Atividade Inibitória de Resistência a Múltiplas Drogas

A Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae*, um transportador ABC homólogo a glicoproteína-P de mamíferos (DECOTTIGNIES, 1994), foi utilizada como modelo no estudo de metabólitos secundários de plantas como agentes reversíveis a resistência a múltiplas drogas (RANGEL *et al.*, 2008).

O extrato bruto etanólico de folhas de *S. leucanthum* demonstrou inicialmente uma ótima atividade inibitória ATPásica da Pdr5p ($IC_{50} = 37,82 \mu\text{g/ml}$) (RANGEL *et al.*, 2008). Não foi possível calcular o IC_{50} das partições em hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol por não apresentar solubilidade no meio utilizado para realizar o teste.

Com base na polaridade das partições, no resultado de atividade antioxidante (item 4.2.6.1) e no isolamento prévio de uma flavanona glicosilada de *S. vernicosum* (KUTNEY *et al.*, 1970), tendo em vista a promissora atividade de flavonóides como agentes reversíveis a resistência a múltiplas drogas (CONSEIL, *et al.*, 2000; DI PIETRO *et al.*, 2002; MORRIS & ZHANG, 2006), escolheu-se iniciar o trabalho pela partição em AcOEt, que foi submetida a análise preliminar por CCD e CLAE (item 4.2.2, página 48) e posterior fracionamento por CCC (item 4.2.3, página 51).

As substâncias majoritárias isoladas da partição em AcOEt, 2',4',6'-trihidroxi-4'-O- β -D-glicosil di-hidrochalcona, pinocembrina 7-O- β -neohesperidosídeo e pinocembrina 7-O- β -(6''-O-acetil) neohesperidosídeo, não tiveram suas atividades medidas devido a mudança da metodologia utilizada inicialmente para o extrato bruto.

Pode-se inferir que a interação flavonóide x enzima não será eficiente pela ausência de requisitos estruturais básicos para a interação: hidroxila livre em C-3 e C-5 e ligação dupla ente C-2 e C-3 (MORRIS & ZHANG, 2006), além da presença do açúcar (DI PIETRO *et al.*, 2002).

5. CONCLUSÕES

Este estudo ampliou o conhecimento anatômico, biológico e químico da espécie *Sparattosperma leucanthum* (Bignoniaceae).

A descrição anatômica das folhas de *S. leucanthum* apresentada nesta dissertação serve de base para futuras identificações da espécie, uma vez que esta espécie possui inúmeros sinônimos botânicos.

Os ensaios biológicos para atividade antioxidante e atividade inibitória ATPásica da enzima Pdr5p para o extrato etanólico bruto apresentaram ótimos resultados, despertando o interesse para este estudo.

O isolamento e identificação das substâncias majoritárias da partição em acetato de etila foram alcançados por meio do uso de cromatografia contracorrente. A utilização desta técnica permitiu o isolamento de três flavonóides através de fracionamento em duas etapas: 2',4',6'-tri-hidroxi-4'-O-β-D-glicosil di-hidrochalcona, pinocembrina 7-O-β-neo-hesperidosídeo e pinocembrina-7-O-β-(6"-O-acetil) neo-hesperidosídeo.

Estudo pormenorizado do comportamento dos flavonóides em diversos sistemas de solventes possibilitou a utilização dos sistemas mais adequados a separação dos mesmos, incluindo um novo sistema, BuCN-ACN-H₂O, nunca antes descrito na literatura.

Este isolamento também foi realizado por outras técnicas cromatográficas (cromatografia de filtração em gel e cromatografia com fase líquida de alta eficiência) evidenciando as vantagens da CCC frente a outras técnicas: versatilidade, eficiência, rapidez, economia, previsibilidade e recuperação total da amostra.

Devido a insolubilidade estes flavonóides não tiveram seu potencial antioxidante testado e devido a modificações na metodologia empregada também não puderam ser testados frente a atividade inibitória ATPásica. Com base na relação estrutura x atividade, pode-se inferir que as atividades das substâncias isoladas não são promissoras.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, T. P.; KLEIMAN, R. Solvent selection guide for counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v.538, p.109-118, 1991.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Studies in Organic Chemistry, v. 34, Agrawal PK, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, v.31, p.3307-3330, 1992.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. **Cereal Foods World**, v.43, p.356-360, 1998.
- ANDRADE, A. C.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.325-348, 2005.
- BERTHOD, A. Practical approach to high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.550, p.677-693, 1991.
- BURGER, L.M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. NOBEL, São Paulo, 1991.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 3, 2003.
- CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v.21, p.1-5, 1991.
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v.344, p.862-863, 1994.
- CIPRIANI, F. A. **Dissertação de Mestrado: Aspectos quimiotaxonômicos da Família Bignoniaceae**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2006.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, 2006.
- CONSEIL, G.; DECOTTIGNIES, A.; JAULT, J.-M.; COMTE, G.; BARRON, D.; GOFFEAU, A.; DI PIETRO, A. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v.39, p.6910-6917, 2000.

CONWAY, W. D. **Counter-Current Chromatography: Apparatus, Theory and Applications**. VCH Publishers Inc., New York, 1990.

DECOTTIGNIES, A.; KOLACZKOWSKI, M.; BALZI, E.; GOFFEAU, A. Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.12797-12803, 1994.

DEWICK, P. M., **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**, 2^aed., John Wiley & Sons Ltd, England, 2002.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v.65, p.337-353, 1999.

DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. Harcourt Academic Press. New York, 2000.

DOBSON, A. P. **Conservation and biodiversity**. Scientific American Library, New York, 1996.

DULLEY, J. Determination of inorganic phosphate in the presence of detergents or protein. **Analytical Biochemistry**, v.67, p.91-96, 1965.

ENDIACOTT, J. A.; LING, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Annual Reviews Biochemistry**, v.58, p.137-171, 1989.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 648-656, 2000.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v.475, p.89-111, 2001.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v.23, p.42-46, 2000.

FISCHER, N.; WEINREICH, B.; NITZ, S.; DRAWERT, F. Applications of high-speed counter-current chromatography for the separation and isolation of natural products. **Journal of Chromatography**, v.538, p.193-202, 1991.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. J. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v.66, p.375-400, 1925.

FOCAULT, A. P. **Centrifugal Partition Chromatography**, Chromatographic Science Series, v. 68, Marcel Dekker, New York, 1994.

FOCAULT, A. P.; CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. **Journal of Chromatography A**, v.808, p.3-22, 1998.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1151, p.51-59, 2007.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; EVANS, H. S.; HOSTETTMANN, K. Antifungal e antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v.42 p.1315-1320, 1996.

GARRARD, I. J. Simple approach to the development of a CCC solvent selection protocol suitable for automation. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.28, p.1923-1935, 2005.

GENTRY, A. H. **Bignoniaceae part II – Tribe Tecomae**. Flora Neotropica, v.25 (2), New York Botanical Garden, New York, 1992.

GONZÁLEZ, M. D.; POMILIO, A. B. Two acylated flavanone glycosides from *Nierembergia hippomanica*. **Phytochemistry**, v.21, p.757-759, 1982.

GONZÁLEZ, M. D.; POMILIO, A. B.; GROS, E. G. An acylated flavonoid from *Nierembergia hippomanica*. **Phytochemistry**, v.20, p.1174-1175, 1981.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual Reviews Biochemistry**, v.62, p. 385-427, 1993.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.601-617, 1995.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids**. Academic Press, NY, 1975.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**. Chapman and Hall, London, 1982.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992 – Review. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p.67– 202, 2002.

HERMOSO, A.; JIMÉNEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PIÑERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.3975-3980, 2003.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel citotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**, v.72, p.676-679, 2001.

ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support. **Science**, v.167, p.281-283, 1970.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1065, p.145-168, 2005.

ITO, Y. Recent advances in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v.538, p.3-25, 1991.

JOHANSEN, D. **Plant Microtechnique**. Mc Graw Hill Book Company, New York, 1940.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 1999.

KUBO, I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. **Journal of Chromatography**, v.538, p.3-25, 1991.

KUTNEY, J. P.; WARNOCK, W. D. C.; GILBERT, B. Pinoembrin 7- β -neohesperidoside, a flavanone glycoside from *Sparattosperma vernicosum*. **Phytochemistry**, v.9, p.1877-1878, 1970.

LAGE, H. ABC-Transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p.188-199, 2003.

LEITÃO, G. G. Uso de cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. **Revista Fitos**, v.1, p.48-52, 2005.

LEVEILLE-WEBSTER, C. R.; ARIAS, I. M. The biology of the P-glycoprotein. **Journal of Membrane Biology**, v.143, p.89-102, 1995.

LIN, J.-H.; LIN, Y.-T. Flavonoids from the leaves of *Loranthus kaoi* (Chao) Kiu. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.7, p.185-190, 1999.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. V.2, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. V.1, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2000.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p. 76-81, 2002.

MABBERLEY, D.J. The Plant Book - A Portable Dictionary of the Vascular Plants. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

MABRY, J. T.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M.B. Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, 1970.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v.658, p.315-341, 1994.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p.181-194, 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO G. G.; LEITÃO S. G.; REIS, S. A.; SANTOS, C. T.; COUBE, S. C. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v.15, p. 127-130, 2001.

MORRIS, M. E.; ZHANG, S. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. **Life Sciences**, v.78, p.2116-2130, 2006.

NAMJO, F.; GOTTO, K.; SETO, R.; SUZUKI, M.; SAKAI, M.; HARA, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, p.895-902, 1996.

NERY, L. A. **Tese de Doutorado: Prospecção de metabólitos secundários em plantas de dois fragmentos de Mata Atlântica.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Rio de Janeiro, 2008.

OKA, F.; Oka, H.; Ito, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.538, p.99-105, 1991.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia.** Editora Atheneu, São Paulo, 1998.

PARK, B. S.; LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T.; LEE, S. E.; TAKEOKA, G. R. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.295-300, 2003.

PAULETTI, P.; BOLZANI, V.S. ; YOUNG, M. C. Constituintes Químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v.26, p.641-643, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy – A guide for students of organic chemistry**, Third Edition. Brooks/ Cole Thomson Learning, USA, 2001.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, p.1995-2018, 1998.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIETRO, A. Di.; CONSEIL, G.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; DAYAN, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; TROMPIER, D.; STEINFELS, E.; JAULT, J. M.; WET, H. de; MAITREJEAN, M.; COMTE, G.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A. M.; DUMONTET, C.; McINTOSH, D. B.; GOFFEAU, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BARRON, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cellular and Molecular Life Science**, v.59, p.307-322, 2002.

POMILIO, A. B.; GROS, E. G. Pinocembrin 7-neohesperidoside from *Nierembergia hippomanica*. **Phytochemistry**, v.18, p.1410-1411, 1979.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.67, p.289-297, 1997.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v.7, p.9-16, 1998.

PRETSCH, E.; CLERC, T, SEIBL, J., SIMON, W **Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgânicos por métodos espectroscópicos**, Springer Verlag, Berlín-Heidelberg, 1980.

RANGEL, L. P.; ABREU, L. F.; ANDRADE, A. R.; LEITÃO, S. G.; LEITAO, G. G.; PEREIRA, A. F. Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.30-36, 2008.

RAUHA, J. P.; VUORELA, R.; KOSTIAINEN, R. Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.36, p.1269-1280, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal Chromatography A*, v.1112, p.31-63, 2006.

RIPPERGER, H. 4'''-O-acetylsarotanoside, a novel flavanone glycoside from *Nierembergia hippomanica*. **Phytochemistry**, v.20, p.1757-1758, 1981.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.

ROY, P., KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, v.34, p.563-570, 1996.

SALOMÃO, A. N.; SOUZA-SILVA, J. C.; DAVIDE. A. C.; GONZÁLES, S.; TORRES, R. A. A.; WETZEL, M. M. V. S.; FIRETTI, F.; CALDAS, L. S. **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do cerrado**. Rede de Sementes do Cerrado, Brasília, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI J. A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276, 1998.

SASS, J.E. **Botanical Microtechnique**. Iowa State College Press, Iowa, 1951.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. LTC Editora, Rio de Janeiro, 2000.

STRACK, D.; WRAY, V. **The Flavonoids**. Champman & Hall, UK, 1994.

SHU, Y. Z. Recent natural product based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v.215, p.213- 219, 1993.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC, Florianópolis, 2000.

SIMON, S. M.; SCHINDLER, M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.91, p.3497-3504, 1994.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; QUEIROZ, A. B. R.; FILHO, O. A. M.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1207-1212, 2002.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Report**, v.25, p.517-554, 2008.

WEBBY, R. F.; BOASE, M. R. Peonidin 3-O-neohesperidoside and other flavonoids from *Cyclamen persicum* petals. **Phytochemistry**, v.52, p.939-941, 1999.

WINTERHALTER, P. Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. **Trends in Food Science Technology**, v.18, p.507-513, 2007.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, v.344, p.793-795, 1994.

XU, Y.; KUBO, I.; MA, Y. A citotoxic flavanone glycoside from *Onychium japonicum*: structure of onychin. **Phytochemistry**, v.33, p.510-511, 1993.

YOKOSAWA, T.; DONG, E.; WU LIU, Z.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research**, v.11, p.446-449, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)