Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae)

Endler Marcel Borges

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências, Área: Química

RIBEIRÃO PRETO - SP

2006

ENDLER MARCEL BORGES

Estudo Fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner
(Asteraceae-Eupatorieae)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira

Ribeirão Preto
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Endler Marcel

Estudo Fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner
(Asteraceae-Eupatorieae). Ribeirão Preto, 2006.

82 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Química.

Orientadora: Oliveira, Dionéia Camilo Rodrigues de

1. Asteraceae. 2. Eupatorieae. 3. *Trichogonia menthaefolia*
Gardner.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Endler Marcel Borges

Estudo Fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Orientador(a) _____

Instituição _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª. Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira, pela orientação.

À Prof^ª. Dr^ª. Diones Aparecida dias pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela coleta do material vegetal

Ao Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes pela colaboração

À minha avó e pelo apoio, incentivo e compreensão.

À minha mãe e pelo apoio, incentivo e compreensão.

À funcionária Virgínia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao José Carlos Tomaz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela amizade.

Aos pós-graduandos Humberto Sakamoto e Renata Takeara pelas valiosas lições.

À Mailyn por todo o carinho.

À Poly, pelo incentivo, apoio, auxílio e companheirismo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À FAPESP pelo auxílio á pesquisa concedido.

À CAPES pelo auxílio indireto.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas	i
Lista de tabelas	i
Lista de figuras	i
Resumo	i
Abstract	i
Metabólitos isolados	i
1. Introdução	01
1.1. Considerações gerais	01
1.2. A fitoquímica e o novo milênio	03
1.3. Família, tribo, subtribo, gênero e espécie	05
2. Objetivos	10
3. Materiais e métodos	11
3.1. Fases estacionárias para cromatografia	11
3.2. Solventes e reagentes	12
3.3. Instrumentos	12
3.4. Métodos	13
3.4.1. Metodologia utilizada nas análises por CG	13
3.4.2. Metodologia para a obtenção dos espectros massas	14
3.4.3. Metodologia para o preparo das amostras a serem cromatografadas	14
4. Procedimento experimental	15
4.1. Coleta e identificação do material vegetal	15
4.2. Preparação dos extratos brutos	15
4.3. Isolamento e purificação dos constituintes químicos do extrato em diclorometano	17
4.3.1. Isolamento dos constituintes químicos das frações obtidas da CLV do extrato em diclorometano	18
4.4. Isolamento dos constituintes químicos do extrato metanólico	21
5. Identificação estrutural	23
5.1. Identificação estrutural do sesquiterpeno 6 α -angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (1)	23
5.2. Identificação estrutural do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-12-eno (2)	26
5.3. Identificação estrutural da mistura dos triterpenos presentes na fração TmD-5 (3, 4, 5 e 6)	29
5.4. Identificação estrutural dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11)	33
5.5. Identificação estrutural do flavonóide ramnocitrina (12)	38
5.6. Identificação estrutural do flavonóide ramnocitrina 3-O- β -galactopiranosídeo (13)	41
6. Conclusões	44
7. Referências bibliográficas	46

Lista de Abreviaturas

Tr – tempo de retenção relativo

Rf - fator de retenção

CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CC - Cromatografia em Coluna Clássica

CG - Cromatografia de fase Gasosa

FID – *Flame Ionization Detector*

EM – Espectrometria de Massas

EM-EM – Espectrometria de Massas Sequencial

DEPT 135⁰ – *Distorsioneless Enhancement by Polarization Transfer 135⁰*

HMQC – *Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

PND – *Proton Noise Decoupling*

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

AcOEt – Acetato de Etila

Et₂O – Éter Etílico

MeOH – Metanol

CH₂Cl₂ – Diclorometano

CHCl₃ – Clorofórmio

DMSO-d₆ - Dimetilsulfóxido Deuterado

TmD – Extrato bruto de *Trichogonia menthaefolia* em Diclorometano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fitoquímica de espécies de <i>Trichogonia</i>	8
Tabela 2-	CLV do extrato em diclorometano da <i>Trichogonia menthaefolia</i>	17
Tabela 3-	CC da fração TmD-6	22
Tabela 4-	Dados de RMN ^1H da substância 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno comparados com os dados da literatura (Bohlmann <i>et al.</i> , 1981b).....	24
Tabela 5-	Dados de RMN obtidos dos espectros de ^{13}C (PND e DEPT 135 $^\circ$) e nos mapas de contorno do HMQC (δ em ppm, CDCl_3)	25
Tabela 6-	Dados de RMN ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-12-eno comparados com os valores da β -amirina (Mahato <i>et al.</i> , 1994)	28
Tabela 7-	Dados do espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para β -amirina e lupeol comparados com os dados da literatura (Mahato <i>et al.</i> , 1994).....	30
Tabela 8-	Dados do espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para pseudotaraxasterol e taraxasterol comparados com os dados da literatura (Mahato <i>et al.</i> , 1994).....	31
Tabela 9-	Identificação das substâncias presentes em TmD-5 (Coluna HP-50).....	32
Tabela 10-	Identificação das substâncias presentes em TmD-5 (Coluna HP-1).....	32
Tabela 11-	Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para os esteróides β -sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (Kojima <i>et al.</i> , 1990).....	35
Tabela 12-	Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para os esteróides estigmast-7-en-3 β -ol e espinasterol comparados com a literatura (Kojima <i>et al.</i> , 1990).....	36
Tabela 13-	Identificação da mistura de esteróides (coluna HP-50)	37
Tabela 14-	Identificação da mistura de esteróides (coluna HP-1)	37
Tabela 15-	Dados do espectro de RMN ^1H do flavonóide ramnocitrina comparados com a literatura (Barberá <i>et al.</i> , 1986) e (Harborne, 1995)	39

Tabela 16-	Dados do espectro de RMN ^{13}C (δ em ppm, DMSO- d_6) do flavonóide ramnocitrina comparados com a literatura (Agrawal <i>et al.</i> , 1989)	39
Tabela 17-	Dados do espectro de RMN ^1H do flavonóide ramnocitrina comparados com os da ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo	42
Tabela 18-	Valores de RMN ^1H do flavonóide ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo comparados com os valores da literatura (Barberá <i>et al.</i> , 1986).....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema representativo da obtenção dos extratos brutos do pó de <i>T. menthaefolia</i>	16
Figura 2-	Fluxograma do trabalho experimental realizado com o extrato diclorometânico de <i>T. menthaefolia</i>	19
Figura 3-	Fluxograma do trabalho experimental realizado com o extrato metanólico de <i>T. menthaefolia</i>	22
Figura 4-	Proposta de fragmentação da ramnocitrina no modo positivo que confirma a metoxila em C7 (March & Miao., 2004)	40
Figura 5-	Proposta de fragmentação para a ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (13) (March <i>et al.</i> , 2006).....	43
Figura 6-	Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 400MHz) do sesquiterpeno 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (1).....	48
Figura 7-	Expansões de parte do espectro presente na figura 6.....	49
Figura 8-	Expansões de parte do espectro presente na figura 6.....	50
Figura 9-	Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do sesquiterpeno 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (1).....	51
Figura 10-	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do sesquiterpeno 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (1).....	52
Figura 11-	Mapas de contorno do HMQC.....	53
Figura 12-	Expansão dos mapas de contorno do HMQC presente na figura 11	54
Figura 13-	Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 400MHz) do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-eno (2).....	55
Figura 14-	Expansões de parte do espectro presente na figura 13.....	56
Figura 15-	Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-eno (2).....	57
Figura 16-	Expansões de parte do espectro presente na figura 15.....	58
Figura 17-	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-eno (2).....	59

Figura 18-	Cromatograma obtido por CG da mistura de triterpenos: A- padrão de referência, B- β -sitosterol (7), C- β -amirina (3), D- lupeol (4), E- pseudotaraxasterol (6) e F- taraxasterol (5) (coluna HP-1)	60
Figura 19-	Cromatograma obtido por CG da mistura de triterpenos: A- padrão de referência, B- β -sitosterol (7), C- β -amirina (3), D- lupeol (4), E- pseudotaraxasterol (6) e F- taraxasterol (5) (coluna HP-50).....	61
Figura 20-	Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 400MHz) da mistura dos triterpenos (3, 4, 5 e 6).....	62
Figura 21-	Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) da mistura dos triterpenos (3, 4, 5 e 6).....	63
Figura 22-	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) da mistura dos triterpenos (3, 4, 5 e 6).....	64
Figura 23-	Cromatograma dos padrões dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-50).....	65
Figura 24-	Cromatograma dos padrões dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-1).....	65
Figura 25-	Análise por CG da mistura dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-50).....	66
Figura 26-	Análise por CG da mistura dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-1).....	66
Figura 27-	Enriquecimento com padrões na mistura dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-50).....	67
Figura 28-	Espectro de RMN ^1H (δ em ppm; CDCl_3 , 400MHz) da mistura dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11).....	68
Figura 29-	Expansões de parte do espectro presente na figura 28.....	69
Figura 30-	Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) da mistura dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11).....	70
Figura 31-	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) da mistura dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11).....	71
Figura 32-	Espectro de RMN ^1H (δ em ppm; DMSO-d_6 , 400MHz) do flavonóide ramnocitrina (12).....	72

Figura 33-	Expansões de parte do espectro presente na figura 32.....	73
Figura 34-	Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; DMSO- d_6 , 100MHz) do flavonóide ramnocitrina (12).....	74
Figura 35-	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 0 135°, δ em ppm; DMSO- d_6 , 100MHz) do flavonóide ramnocitrina (12).....	75
Figura 36-	EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina (12).....	76
Figura 37-	EM-EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina (12).....	77
Figura 38-	EM-EM no modo positivo do flavonóide ramnocitrina (12).....	78
Figura 39-	Espectro de RMN de ^1H do flavonóide ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (13) (δ em ppm, DMSO- d_6 , 400MHz).....	79
Figura 40-	Expansão de parte do espectro presente na figura 39.....	80
Figura 41-	EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (13).....	81
Figura 42-	EM-EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (13).....	82

Resumo

BORGES, E.M. **Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae)**. 2006. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Neste trabalho estamos apresentando o estudo fitoquímico das partes totais da espécie *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae). O material vegetal foi coletado em Furnas – MG e a partir do pó seco foram preparados os extratos em diclorometano e em metanol, em seqüência. Do extrato diclorometânico foram isolados: o sesquiterpeno 6 α -angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno, o triterpeno 3 α -hidroxi-olean-12-eno, os triterpenos lupeol, taraxasterol, pseudotaraxasterol e 3 β -hidroxi-olean-12-eno (identificados em mistura), os esteróides β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, estimast-7-en-3 β -ol e espinasterol (identificados em mistura) e o flavonóide ramnocitrina. Do extrato metanólico foi isolado o flavonóide ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo. Estas substâncias, após isolamento e purificação por métodos cromatográficos, foram identificadas com o auxílio de várias técnicas espectroscópicas como: EM, EM-EM, RMN de ^1H , ^{13}C (PND; DEPT 135°) e a técnica bidimensional HMQC. Na identificação das misturas de triterpenos e esteróides a cromatografia de fase gasosa também foi utilizada.

Abstract

BORGES, E.M. **Phytochemistry study of *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae)**. 2006. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

In this study we are presenting the results of the phytochemical investigation of the *Trichogonia menthaefoli* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae). This specie was collected in Furnas – MG. Dichlorometanic and methanolic extracts were prepared from the dried powder plant material. These extracts were fractioned through chromatographic methods. The dichloromethanic extract furnished the: sesquiterpene 6 α -angeloyloxy-eudesm-4(15)-ene; triterpenes: 3 α -hydroxy-olean-12-ene, lupeol, taraxasterol, pseudo-taraxasterol and 3 β -hydroxy-olean-12-ene (identified in mixture) and the steroids: sitosterol, stigmasterol, stigmast-7-en-3 β -ol, spinasterol and campesterol (identified in mixture) and the flavonóide rhamnocitrin. The methanolic extract afforded the flavonoid rhamnocitrin 3-*O*- β -galactopyranoside. Compound identification was performed by using a variety of spectroscopic methods, such as: MS, MS-MS, ^1H and ^{13}C NMR and HMQC bidimensional technique. The identification of mixtures (triterpenes and steroids) was also performed by gas chromatography in addition to other spectroscopic methods.

Metabólitos Isolados

Sesquiterpeno

6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (**1**)

Triterpenos

3 α -hidroxi-olean-12-eno (**2**).

epi- β -amirina (**2**)

3 β -hidroxi-olean-12-eno (**3**).

β -amirina (**3**)

lupeol (**4**)

taraxasterol (**5**)

pseudotaraxasterol (**6**)

Esteróides

Flavonóides

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

A importância dos produtos naturais é ilustrada por Gragg e colaboradores, em seu trabalho eles verificaram que 157 das 520 (30%) novas drogas aprovadas pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos num período de 12 anos (1983-1994) eram produtos naturais ou seus derivados. Isto é uma evidência da importância e do crescimento da fitoterapia, seja em países pobres onde não existem outras alternativas ou em países ricos onde programas bem direcionados buscam novas alternativas onde os métodos comumente utilizados pelas indústrias farmacêuticas não correspondem as expectativas (Cordell, 2000).

A fitoterapia data de antes do início do cristianismo perfazendo pergaminhos, escritas e conhecimentos transmitidos de pai para filho, que sobreviveram até os dias atuais. Mas foi apenas em 1524 que Paracelsus atentou pela necessidade de descobrirmos o que as plantas medicinais possuíam que era capaz de promover a cura. Foi quando ele escreveu “Archidoxa” do “Arcanum”, o primeiro relato a respeito da procura pelos princípios ativos (Cordell, 2000).

Esta necessidade de descobrir as entidades responsáveis pela cura, as quais foram propostas inicialmente por Paracelsus começou por volta de 1780 com o trabalho de Scheele, onde se estudava os ácidos orgânicos de várias espécies de plantas medicinais. Os trabalhos de Scheele e seus antecessores esbarraram em recursos experimentais extremamente limitados (Cordell, 2000).

No final do século XIX, a química se constituiu como disciplina científica moderna, com os trabalhos de Lavoisier, Berzelius e Liebig, sendo esta a época em que química e medicina caminharam juntos, foi esta a época em que os mais importantes alcalóides da

medicina convencional, tais como morfina, atropina, papaverina, codeína e efedrina foram descobertos (Cordell, 2000).

Foi nesta época que o exemplo mais clássico de medicamento concebido através de produtos naturais, a aspirina (Acido Acetil Salicílico) foi desenvolvido, a história da aspirina começou a alguns milênios na Europa, Ásia e África onde se usava as cascas da *Salix alba* para combater a febre e a dor, em 1898, Felix Hoffman, sintetizou um composto de caráter menos ácido, acetilando o grupo hidroxila na posição *orto*, descobrindo assim a aspirina, que hoje comemora um centenário e representa cerca de 1,2% do mercado mundial de medicamentos (Cordell, 2000).

No entanto após a revolução industrial do século XIX, mais especificamente entre 1901 e 1970, teve início a procura de substâncias químicas de origem sintética que pudessem ser utilizadas como medicamentos, o exemplo mais clássico disto são os trabalhos realizados por Ehrlich e outros realizados entre 1909 e 1935 e da descoberta das Sulfas por Ernest Foumeau (Cordell, 2000).

Este período ficou marcado pela descoberta das mais importantes substâncias sintéticas, tais como: amilocaína, procaína, ácido-5-etil-5-fenilbarbitúrico e a famosa penicilina advinda de experiências com fungos. Iniciando-se assim uma nova era onde as grandes indústrias farmacêuticas estagnaram suas pesquisas com produtos naturais, e as indústrias farmacêuticas começaram a apostar violentamente nos métodos de *screening* (Cordell, 2000).

Os métodos de *screening* utilizando compostos de origem sintética, semi-sintética e química combinatória se mostraram demasiadamente sedutores frente a compostos de origem natural como os extratos de plantas, culturas de fungos e fermentações bacterianas, uma vez que compostos de origem natural geralmente estão presentes como misturas complexas de

difícil separação assim como na maioria dos casos, salvo raras exceções, são de difícil elucidação estrutural (Filho & Yunes, 2001).

1.2. A fitoquímica e o novo milênio

Durante os últimos anos a atenção da indústria farmacêutica tem se voltado novamente para os produtos naturais, em especial por causa de três novas drogas de origem vegetal; taxol, etoposídeo e artemisinina (Phillipson, 2001).

O taxol é obtido das cascas do *Taxus brevifolia*, sendo sua atividade contra o câncer conhecida desde a década de 60, o taxol teve sua estrutura elucidada em 1971 e apenas na década de 90, que o taxol e seu análogo semi-sintético o taxotere tiveram sua eficiência comprovada contra o câncer de ovário e seio. Cabe também ressaltar que para obter 1900g de taxol são necessárias 27.300kg de cascas ou seja aproximadamente 6.000 árvores (Cordell, 1995). A busca por uma fonte de taxol capaz de atender as demandas do mercado, culminou na semi-síntese e na síntese total do taxol, revolucionando a química orgânica sintética (Viegas *et al.*, 2006).

O etoposídeo é a principal substância presente na resina da *Podophyllum peltatum*, sendo que esta substância inibe a divisão celular, sendo seu análogo semi-sintético eficiente no combate ao câncer de pulmão e testículos (Phillipson, 2001).

A artemisinina isolada como princípio ativo da *Artemisia annua*, se mostrou eficaz contra a malária, sendo que a descoberta da mesma impulsionou o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas como: β -arteméter, o arte-éter e o artesunato de sódio todos estes derivados semi-sintéticos da artemisinina (Viegas *et al.*, 2006).

As pesquisas com o taxol, etoposídeo e artemisinina impulsionaram a indústrias farmacêuticas a investirem novamente em pesquisas com produtos naturais, sendo que a

maior parte dos esforços com produtos naturais tem como objetivo a descoberta de novas drogas anti-câncer, um reflexo disto é que no período de 1983-1994, 61% das novas drogas anti-câncer provinham de produtos naturais (Cordell, 2000). No entanto o principal interesse das pesquisas com produtos naturais, atualmente, não é produzir drogas melhores do que as que já existem no mercado e sim **fornecer novas alternativas**. Dentre os milhares de exemplos que podem ser dados existem três que convém serem destacados:

O *Ginkgo biloba* utilizado no controle de problemas vasculares cerebrais, de memória e com propriedades neuroprotetoras ilustra um exemplo de fitoterápico de sucesso. A partir dos extratos dessa planta, Nakanishi e colaboradores isolaram os ginkgolídeos-A, B, C, e M que demonstraram importantes propriedades antitrombóticas (Viegas *et al.*, 2006).

Do extrato da erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*), foi isolado a hipericina, utilizada como antidepressivo. Aparentemente, as propriedades atribuídas a este extrato devem-se a hiperforina, que compreende uma mistura de tautômeros. Atualmente na Alemanha para cada 30 mil receitas de fluoxetina (Prozac) são emitidas 200 mil de *Hypericum sp.* (Filho & Yunes, 2001).

O gossipol, obtido do óleo de semente do algodão (*Gossypium sp.*), foi amplamente utilizado na China como contraceptivo masculino, propriedade confirmada em 1980 (Viegas *et al.*, 2006).

Desta maneira a fitoquímica desempenha um papel importante na medida em que com o isolamento, purificação e identificação estrutural de substâncias químicas, implementa a literatura com informações químicas que podem ser utilizadas, após estudos biológicos, como fontes alternativas frente às drogas existentes no mercado além de fornecer novos modelos de fármacos, para química medicinal (modelagem molecular).

1.3. Família, tribo, subtribo, gênero e espécie.

A família Asteraceae (Compositae) é a maior de todas as famílias, compreendendo 1535 gêneros e mais de 23.000 espécies conhecidas, distribuídas por 3 subfamílias e 17 tribos. Sendo o conceito de subfamília recente, tanto é que as subfamílias Asteroideae e Cichorioideae se tornaram conhecidas por volta de 1970, e a subfamília Barnadesioideae foi descrita apenas em 1992, por sua vez os conceitos de tribo são bem mais antigos, tendo seu início por volta de 1900 com os trabalhos pioneiros de Henri Cassini e Carl Linnaeus (Bremer, 1994).

As espécies da família Asteraceae são amplamente distribuídas pelo mundo, mas é particularmente abundante no oeste dos Estados Unidos e do México, no sul do Brasil, ao longo dos Andes, nas Áreas Mediterrâneas, Sudeste Asiático, Ásia Central, Sul da África e Austrália (Bremer, 1994).

A tribo Eupatorieae compõe a maior parte das asteraceas nas regiões Neotropicais, a qual também se apresenta nos Estados Unidos e Canadá, assim como por todo Hemisfério Ocidental. Integrantes da tribo que foram introduzidos nas ilhas do pacífico acabaram se espalhando pelo Velho Mundo. Com base nos conceitos atuais, a tribo tem 200 gêneros conhecidos, correspondendo a aproximadamente 10% das asteraceas (King & Robinson, 1987).

Em virtude da grande diversidade da flora ao longo do mundo, esta tribo não é bem compreendida, ocasionando erros nas identificações botânicas. Estudos mais elaborados começaram a serem feitos em 1970. Estes novos estudos levaram os taxonomistas King e Robinson (1987) a sugerirem um novo sistema de classificação, o qual fez com que surgissem três novos gêneros *Ageratina*, *Ayapana* e *Campuloclinium* cujas espécies pertenciam ao gênero *Eupatorium* (King & Robinson, 1987).

Atualmente não é atribuída grande importância econômica a tribo, no entanto existem exemplos bem claros de espécies importantes como por exemplo: *Eupatorium cannabinum* usada na Índia no tratamento de úlceras e na Itália na medicina homeopática; espécies de *Mikania* são usadas na América do Sul e na África no tratamento de mordidas de serpentes; óleos essenciais de *Trilisa odoratissima* como agente fixador em perfumes e o uso das folhas secas para adicionar sabor ao tabaco; *Koanophyllon tinctorium* e *K. albicaule* são poderosos corantes; *Stevia rebaudiana* é a muito tempo conhecida pelo seu sabor doce e como um possível substituto para o açúcar; *Austroeu patorium inulaefolium* foi utilizada no Uruguai no controle de natalidade e muitas outras utilidades (King & Robinson, 1987).

Estudo mais recente a respeito da química das espécies da tribo Eupatorieae indica que esta apresenta alcalóides pirrolizidínicos, no entanto estes alcalóides são diferentes dos produzidos pelo seu parente próximo, a tribo Senecioneae (King & Robinson, 1987).

Quanto aos flavonóides, estão presentes em todas as inflorescências das espécies da tribo Eupatorieae especialmente as de coloração amarela (King & Robinson, 1987).

Uma outra característica química importante do grupo é a presença em seus óleos essenciais de benzofuranos, os quais são responsáveis por muitas das espécies da tribo Eupatorieae serem venenosas. A característica das plantas da tribo apresentar benzofuranos é tão marcante que a presença dos mesmos no gênero *Isocarpha* foi usada como argumento para colocar este gênero dentro desta tribo (King & Robinson, 1987).

Monoterpenos na forma de derivados do timol, ocorrem esporadicamente dentro da tribo Eupatorieae, estes ocorrem na *Bishovia boliviensis*, na *Mikania officinalis* e *M. purpurascens*, duas espécies endêmicas do Brasil. Já os sesquiterpenos ocorrem largamente ao longo da tribo (King & Robinson, 1987).

A subtribo Gyptidinae é uma das maiores subtribos dentro da tribo Eupatorieae. Esta subtribo atinge sua maior diversidade no Cerrado brasileiro onde a subtribo Critoniinae é rara (King & Robinson, 1987).

Dos 27 gêneros pertencentes à subtribo Gyptidinae, 23 estão concentrados na América do Sul, estando apenas 2 gêneros concentrados nos Estados Unidos e no México, *Conoclinium* e *Tamaulipa*. O gênero *Lourteigia* é natural de grandes altitudes ocorrendo ao longo do norte dos Andes. O gênero *Neocuatrecasia* só é encontrado no Peru e na Bolívia. Os gêneros *Trichogonia* e *Barrosoa* estão concentrados no Brasil, apresentando apenas algumas espécies distribuídas pela Venezuela e Colômbia (King & Robinson, 1987).

O gênero *Trichogonia* é reconhecido pelo papo plumoso que é encontrado na maioria das espécies deste gênero. Em todo caso o gênero *Helogyne* também apresenta papo plumoso o que pode causar confusão entre as espécies, este gênero é genuinamente brasileiro, sendo uma característica das espécies brasileiras, a presença de glândulas ao longo do tubo da corola (King & Robinson, 1987).

A espécie *T. menthaefolia* é endêmica do Brasil e nenhum estudo fitoquímico foi realizado até o momento com esta espécie, assim como nenhuma avaliação biológica do gênero foi conduzida.

Na tabela 01 estão descritas as espécies de *Trichogonia* que passaram por algum estudo químico.

Tabela 01: Fitoquímica de espécies de *Trichogonia*

Espécie	Polaridade do extrato	Parte da planta	Classes químicas	Referências Bibliográficas
<i>Trichogonia prancii</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, esteróides e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	raízes	Sesquiterpenos, esteróides e derivados furânicos da acetofenona	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984
<i>Trichogonia grazielae</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos e derivados da acetofenona	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	raízes	Sesquiterpenos e derivados da acetofenona	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
<i>Trichogonia scottmorii</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, sesquiterpenóides, esteróides e derivados da acetofenona	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
<i>Trichogonia salviaefolia</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, esteróides, ácidos graxos e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	raízes	Sesquiterpenos e derivados da acetofenona	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
	MeOH:Et ₂ O: éter de petróleo 1:1:1, v:v:v	planta total	Lactona sesquiterpênica e diterpeno	Baruah <i>et al.</i> , 1985
	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Diterpenos e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984
<i>Trichogonia villosa</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, esteróides, derivados da acetofenona e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a
	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	raízes	Sesquiterpenos, derivados da acetofenona e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981a

	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, diterpenos e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984
<i>Trichogonia gardneri</i>	Hexano:AcOEt 3:1, v:v	aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	Vichnewski <i>et al.</i> , 1985
<i>Trichogonia hirtifolia</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, esteróides, derivados da acetofenona, derivados do benzofurano e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984
<i>Trichogonia santosii</i>	Et ₂ O:éter de petróleo 1:2, v:v	aéreas	Sesquiterpenos, esteróides, derivados da acetofenona, cromenos, derivados do isoeugenol, triterpenos e lactonas sesquiterpênicas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984

Conclusivamente o perfil químico encontrado nas espécies de *Trichogonia* é expresso pelos sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, derivados da acetofenona, esteróides e triterpenos.

2. Objetivos

Tendo em vista a importância do estudo químico e da avaliação biológica de nossa flora nativa, em especial de Asteraceae, em função de sua representativa participação na mesma, considerando que o gênero *Trichogonia* é genuinamente brasileiro e estando bem representado na família, com apenas oito espécies investigadas quimicamente e que a *Trichogonia menthaefolia* Gardner é endêmica do Brasil e nenhum estudo fitoquímico foi conduzido até o momento com esta espécie, parece justificado o estudo da composição química da mesma.

Os objetivos do presente estudo são o isolamento e a identificação de componentes químicos micromoleculares dos extratos diclorometânico e metanólico das partes totais desta espécie vegetal coletada em seu habitat natural.

3. Materiais e métodos

3.1. Fases estacionárias para Cromatografia

Para o preparo de colunas cromatográficas clássicas foram utilizados como fases estacionárias sílica gel 60 específica para colunas, da marca Merck, com tamanho de partícula 62-200 μm , Sephadex LH –20 da marca Sigma, com tamanho de partícula 25-100 μ e sílica gel 60 H, com tamanho de partícula de 63-200 μm . As duas primeiras fases estacionárias foram utilizadas em CC e a última em CLV.

Para as análises por CG foram utilizadas colunas HP-1 (metilsilicone) e HP-50 (metilfenilsilicone), ambas com (30m x 0,25mm x 0,25mm).

Para o preparo das CCDC foi utilizado sílica 60GF₂₅₄, da marca Merck, com tamanho de partícula de 5-40 μm em uma camada de 0,25mm aplicada em placas de vidro de 5x20, 10x20 e 20x20 cm.

Para o preparo das CCDP foi utilizado como fase estacionária sílica gel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ da marca Merck, em uma camada de 1mm aplicada em placas de vidro 20x20 cm.

3.2. Solventes e Reagentes

Solventes deuterados (CDCl_3 e DMSO-d_6) das marcas Aldrich e Merck foram utilizados para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Para o fracionamento dos extratos, foram utilizados os solventes de grau comercial, os quais foram submetidos à destilação fracionada.

Para revelar as placas cromatográficas, CCDC e CCDP, foi utilizada uma mistura de anisaldeído/metanol/ácido acético glacial/ácido sulfúrico 1:80:20:5 e luz UV com comprimento de onda de 254 e 366 nm (lâmpada UVGL-25), respectivamente.

3.3. Instrumentos

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C , PND, DEPT 135° e HMQC foram registrados em espectrômetro Brucker Avance DRX-400, operando a 400 MHz para o ^1H e 100MHz para o ^{13}C .

Para as análises em CG foi utilizado o equipamento Hewlett Packard 5890 serie 2.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo: ultrOTOFG-ESI-TOF Mass Spectrometer Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA.

3.4. Métodos

3.4.1. Metodologia utilizada nas análises por CG

- Coluna capilar HP-50

Temperatura do injetor: 260°C

Temperatura FID: 330°C

Temperatura da coluna: Gradiente de temperatura 105°C até 200°C (13°C/mim); 200°C até 240°C (5°C/mim – 20mim); 240°C até 280°C (10°C/mim – 10mim).

Gás de arraste: Hidrogênio com *Split* 1:50

Velocidade Linear: 45cm/seg a 250°C

- Coluna capilar HP-1

Temperatura do injetor: 260°C

Temperatura FID: 330°C

Temperatura da Coluna: 250°C por 12mim; 250°C até 280°C a 6°C/mim

Gás de Arraste: Hidrogênio com *Split* 1:50

Velocidade Linear: 46cm³/seg a 250°C

3.4.2. Metodologia para a obtenção dos espectros massas

Condições do experimento: Bomba de Infusão, Fluxo 180µL/h.

Fase móvel para a solubilização: MeOH:H₂O (8:2)

O aparelho é de alta resolução necessitando de calibração interna e externa antes de serem realizadas as análises. Usa-se para calibração interna uma solução do sal sódico do

ácido trifluoracético e na calibração externa uma solução de Formiato de Sódio, à 10mM, para adquirir os espectros em alta resolução.

3.4.3. Metodologia para o preparo das amostras a serem cromatografadas

- *no CG*

As amostras foram adsorvidas em pequena quantidade de sílica gel 60 e aplicadas em uma pipeta de Pasteur e eluída com 10mL de hexano e posteriormente com 15mL de clorofórmio. A solução em hexano é descartada e a solução em clorofórmio é concentrada para posterior análise no CG, antes da qual é solubizada em clorofórmio.

- *nas CC com o uso da fase sólida silicagel 60*

As amostras foram adsorvidas em pequena quantidade de sílica 60 e aplicadas no topo das CC.

- *nas CC com o uso da fase sólida Sephadex LH-20*

As amostras foram solubilizadas em metanol e centrifugadas por 5 minutos, posteriormente os precipitados foram retirados e a fase líquida foi aplicada diretamente no topo das CC.

4. Procedimento experimental

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal (partes totais) foi coletado em seu habitat natural em Furnas - MG numa estrada de terra a 1 km do mirante da represa, na época da floração em 18/04/1998 pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, recebendo o n^o NPL 130.

Este material vegetal foi identificado como *Trichogonia menthaefolia* Gardner pelo taxonomista Dr. José L. Panero, do Departamento de Botânica da Universidade do Texas, Estados Unidos. Uma exsicata do espécimen (n^o SPFR 04958) encontra-se no Herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

4.2. Preparação dos extratos brutos

Após ser estabilizada em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C, todas as partes do material coletado foram pulverizadas em moinho de faca.

O pó seco (500g) passou pelo processo de maceração exaustiva, à temperatura ambiente, com solventes em ordem crescente de polaridade (primeiro diclorometano e depois metanol). Em seguida, os solventes foram removidos (sobre pressão reduzida), obtendo-se assim os extratos brutos de média polaridade e de alta polaridade.

Figura 01: Esquema representativo da obtenção dos extratos brutos do pó de *T. menthaefolia*

4.3. Isolamento e Purificação dos constituintes químicos do extrato em diclorometano

O fracionamento do extrato bruto em diclorometano foi realizado através de uma CLV utilizando-se 35g do mesmo, em uma coluna de vidro de dimensões compatíveis e 500g de sílica gel 60. A coluna cromatográfica foi eluída com solventes em ordem crescente de polaridade, sendo o volume aproximado de cada fração 500ml, exceto a fração 1 onde o volume de solvente utilizado foi 5L, obtendo-se 144 frações que posteriormente foram reunidas por CCDC.

Tabela 02: CLV do extrato em diclorometano da *Trichogonia menthaefolia*

Eluente	Frações	Código	Massa total (g)
Hexano 100%	01	TmD-1	0,24
Hexano/AcOEt 9,5:0,5	02-16	TmD-2	6,42
Hexano/AcOEt 9:1	17-29	TmD-3	1,79
Hexano/AcOEt 8:2	30-43	TmD-4	4,27
Hexano/AcOEt 7:3	44-57	TmD-5	3,86
Hexano/AcOEt 1:1	58-73	TmD-6	4,05
Hexano/AcOEt 3:7	74-84	TmD-7	1,97
Hexano/AcOEt 2:8	85-95	TmD-8	1,23
AcOEt 100%	96-108	TmD-9	2,98
AcOEt/MeOH 9,5:0,5	109-111	TmD-10	0,78
AcOEt/MeOH 9:1	112-122	TmD-11	2,69
AcOEt/MeOH 7:3	123-138	TmD-12	3,48
Etanol 100%	137-144	TmD-13	0,52

4.3.1. Isolamento dos constituintes químicos das frações obtidas da CLV do extrato em diclorometano

A escolha de uma fração para submetê-la às separações cromatográficas foi baseada em três critérios:

Massa da fração: frações cujas massas eram da ordem de unidades de grama ou menor não foram utilizadas.

Análise dos espectros de RMN ^1H : a observação das feições espectrais permitiu inferir sobre a presença ou não de micromoléculas que seriam de interesse ao estudo.

Perfil da amostra em CCDC: se a amostra apresentasse poucos pontos na CCDC ela seria submetida a uma CCDP, se a fossem vários pontos ela seria submetida a uma CC.

Figura 02: Fluxograma do trabalho experimental realizado com o extrato diclorometânico de *T. menthaefolia*

Isolamento dos constituintes químicos da fração TmD-1

A fração TmD-1 (237,1mg) foi submetida a uma CCDP utilizando-se clorofórmio como fase móvel, onde o sesquiterpeno 6α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (**1**) (5mg) foi isolado em Rf: 0,77 apresentando coloração azul frente ao revelador químico.

Isolamento dos constituintes químicos da fração TmD-3

Uma porção da fração TmD-3 (500mg) foi submetida a uma CCDP utilizando-se clorofórmio como fase móvel, onde o triterpeno 3α -hidroxi-olean-12-eno (**2**) (6mg) foi isolada em Rf: 0,8 apresentando coloração azul frente ao revelador químico.

Isolamento dos constituintes químicos da fração TmD-5

A fração TmD-5 (3,86g) tem aparência de um sólido amorfo branco, a partir da qual os terpenos, β -amirina (**3**), lupeol (**4**), taraxasterol (**5**), pseudotaraxasterol (**6**) e β -sitosterol (**7**), foram identificados em mistura, através das análises do CG de uma pequena quantidade da fração TmD-5 (10mg). Mais detalhes ver no item 5.3.

Isolamento dos constituintes químicos da fração TmD-6

Uma porção da fração TmD-6 (1,2g) foi submetida a uma CC utilizando-se 150g de sílica gel como fase estacionária e eluída com solventes em ordem crescente de polaridade, partindo de 100% de hexano até 100% diclorometano e então metanol:diclorometano 1:1 e metanol 100%.

As frações 28 e 29 (162mg) foram reunidas e submetidas a uma CCDP em Hexano/AcOEt 7:3 fornecendo a mistura dos esteróides β -sitosterol (**7**), estigmasterol (**8**), campesterol (**9**) (100mg), estigmast-7-en-3 β -ol (**10**) e espinasterol (**11**) em Rf: 0,32 apresentando absorção intensa na lâmpada de UV nos comprimentos de onda 256 e 366nm. Esta mistura teve seus constituintes químicos identificados através das análises do CG de uma pequena quantidade da mistura de esteróides (10mg). Mais detalhes ver no item 5.4.

Tabela 03: CC da fração TmD-6

Frações	Fase móvel	Volume
1-5	Hexano 100%	400ml
6-11	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 9,5:0,5	550ml
12-15	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 9:1	300ml
16 e 17	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 7:3	400ml
18	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 1:1	100ml
19-25	CH ₂ Cl ₂ 100%	800ml
26 e 27	CH ₂ Cl ₂ /Metanol	200ml
28-32	CH ₂ Cl ₂ /Metanol	500ml
33 e 34	CH ₂ Cl ₂ /Metanol	200ml
35-42	Metanol 100%	700ml

Isolamento dos constituintes químicos da fração TmD-10

Uma porção da fração TmD-10 (532mg) foi submetida a uma CC utilizando-se Sephadex-LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, recolhendo-se frações de 10mL, num total de 55 frações.

As frações 42-50 forneceram o flavonóide ramnocitrina (**12**) (25mg) praticamente puro.

4.4. Isolamento dos constituintes químicos do extrato metanólico

O extrato metanólico (18,0g) foi dissolvido em 150 mL de metanol, ocorrendo a completa solubilização do mesmo. Em seguida particionou-se com hexano, por 10 vezes (200mL cada).

A solução metanólica resultante foi concentrada e a massa obtida foi de 8,0g, sendo que apenas 3,23g foi submetido a uma CC utilizando-se Sephadex-LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, recolhendo-se 62 frações de 30ml cada.

As frações 43-53 forneceram o flavonóide ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo (**13**) (32mg).

Figura 03: fluxograma do trabalho experimental realizado com o extrato metanólico de *T. menthaefolia*

5. Identificação estrutural

5.1. Identificação estrutural do sesquiterpeno 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (1).

A substância 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno, foi identificada pela análise das informações contidas nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , PND, DEPT 135 $^\circ$ e HMQC (p. 48-54).

Esta substância já tinha sido isolada das partes aéreas da *Ageratum fastigiatum* (Eupatorieae, Asteraceae, Bohlmann *et al.*, 1981b).

Os principais sinais observados no espectro de RMN ^1H (Figuras 06, 07 e 08, p. 48, 49 e 50) foram:

- dubletos em $\delta 0,91$ e $\delta 0,89$ ambos integrando para 3H cada e com J 7,1 Hz referentes aos hidrogênios 12 e 13 do grupamento isopropil;
- o singlete em $\delta 0,77$ integrado para 3H indica que a estrutura sesquiterpênica apresenta um grupo metil;
- os singletos largos em $\delta 4,76$ e $\delta 4,54$ integrados para 1H cada, referem-se aos hidrogênios do grupo metileno, H-15a e H-15b;

- o dubleto largo em $\delta 2,08$ integrando para 1H e com valor de J 10,6 Hz, foi atribuído ao H-5. Este valor de J é típico de acoplamento *axial-axial*, por sua vez a posição *axial* deste hidrogênio define a junção *trans* do anel em C5;
- o duplo dubleto em $\delta 5,14$ integrando para 1H e J 10,4 e 10,1 Hz, foi atribuído ao H-6. O valor deste δ infere em um hidrogênio oximetínico e os valores de J são típicos de acoplamento *axial-axial*. Tais observações definem a posição *axial* deste hidrogênio assim como a de seus vizinhos em C5 e C7;
- os hidrogênios do grupo angelato estão bem evidentes, pelo quádruplo quadrupletos em $\delta 5,93$ integrando para 1H e J 7,2 e 1,5 Hz referente ao hidrogênio na posição 3', com os duplos quadrupletos em $\delta 1,89$ integrando para 3H e J 7,2 e 1,5 Hz referente aos hidrogênios da metila na posição 4' e com o multipletos em $\delta 1,83$ integrando para 3H referente aos hidrogênios da metila na posição 5';

Tabela 04: Dados de RMN ^1H da substância 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno comparados com os dados da literatura (Bohlmann *et al.*, 1981b)*

Hidrogênio	δ , J e multiplicidade realizado em 270 MHz (literatura)	δ , J e multiplicidade (1)
H-3a	2,28; dl; 12,0	2,30; m
H-3b	1,95; m	1,94; m
H-5	2,08; dl; 11,0	2,08; dl; 10,6
H-6	5,15; dd; 11,0 e 10,0	5,14; dd; 10,4 e 10,1
H-11	1,95; m	1,7; m
H-12	0,93; d; 7,0	0,91; d; 7,1
H-13	0,91; d; 7,0	0,89; d; 7,1
H-14	0,79; s	0,77; s
H-15a	4,67; sl	4,76; sl
H-15b	4,54; sl	4,54; sl
H-3'	5,93; qq; 7,0 e 1,5	5,93; qq; 7,2 e 1,5
H-4'	1,90; dq; 7,0 e 1,5	1,89; dq; 7,2 e 1,5
H-5'	1,83; dq; 7,0 e 1,5	1,83; m

* δ em ppm e J em Hz (obtido em CDCl_3)

Posteriormente os dados constantes dos espectros de RMN ^{13}C (PND e DEPT 135°) e HMQC (figuras 09, 10, 11 e 12, p. 51, 52, 53 e 54), corroboraram com a proposta estrutural.

Analisando os espectros de RMN ^{13}C (PND e DEPT 135°) podemos observar os carbonos metilênicos - 1, 2, 8 e 9 - em δ 40,21, δ 18,30, δ 38,08 e δ 42,15 respectivamente, sendo que os hidrogênios destes grupos metilênicos não podem ser observados no espectro de RMN ^1H porque os mesmos aparecem na região de δ 1,3-1,75. Através dos mapas de contorno do HMQC foi possível observar correlações importantes, confirmando a atribuição dos carbonos.

Tabela 05: Dados de RMN obtidos dos espectros de ^{13}C (PND e DEPT 135°) e nos mapas de contorno do HMQC (δ em ppm, CDCl_3).

Carbonos	Tipos de carbonos	δ	Correlações retiradas do HMQC
C-1	CH_2	40,21	1,30-1,75
C-2	CH_2	18,30	1,30-1,75
C-3	CH_2	24,21	1,94 e 2,30
C-4	C	146,39	
C-5	CH	55,98	2,08
C-6	CH	70,92	5,14
C-7	CH	49,51	1,30-1,75
C-8	CH_2	38,08	1,30-1,75
C-9	CH_2	42,15	1,30-1,75
C-10	C	38,09	
C-11	CH	26,14	1,70
C-12	CH_3	16,12	0,91
C-13	CH_3	21,39	0,89
C-14	CH_3	17,57	0,77
C-15	CH_2	106,67	4,54 e 4,76
C-1'	C	168,38	
C-2'	C	128,71	
C-3'	CH	135,69	5,93
C-4'	CH_3	15,43	1,89
C-5'	CH_3	20,68	1,82

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (PND, DEPT 135°) e os mapas de contorno do HMQC se encontram no anexo 01.

5.2. Identificação estrutural do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-12-eno (2).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 13 e 14, p. 55 e 56) apresentou uma grande quantidade de sinais na região de δ 1,16-0,86 indicando a presença de substância de natureza terpênica, sendo que na região de δ 1,16-0,86 são observados oito singletos com as mesmas integrais (δ 1,16, δ 1,14, δ 1,09, δ 1,04, δ 1,00, δ 0,99, δ 0,95 e δ 0,85), um multipletto em δ 5,62 referente a hidrogênio olefínico e um multipletto em δ 3,47 referente a hidrogênio oximetínico. Os dados dos espectros de RMN ^{13}C (PND e DEPT 135 $^\circ$) (Figuras 15, 16 e 17, p. 57 e 58 e 59) apontaram para um triterpeno da classe olean-12-eno uma vez que os valores de deslocamentos químicos para os carbonos C12 e C13 estão entre $\sim\delta$ 122 e $\sim\delta$ 145 e são observados oito metilas, dez carbonos secundários, cinco carbonos terciários e sete carbonos quaternários. O valor do deslocamento químico do carbono C3 (δ 76,37) indica que este tem uma hidroxila ligada em α (Mahato *et al.*, 1994).

Posteriormente a amostra foi submetida a uma análise por CG em uma coluna HP-1, adicionando à amostra padrões de triterpenos. A análise por CG mostrou que o mesmo apresenta Tr (com relação ao colesterol) muito próximo ao da β -amirina, sendo o Tr da amostra 1,317 e o da β -amirina 1,420.

Uma vez que os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e o Tr da substância em análise são muito parecidos com os da β -amirina, concluímos tratar-se de um epímero da β -amirina, ou seja com a hidroxila em C3 na posição *axial* (α). No intuito de descobrir a influência dos deslocamentos químicos, quando a hidroxila esta em *axial* ou *equatorial* (α ou β), comparamos os valores de RMN ^{13}C das substâncias A e B que também são da família olean-12-eno e diferem entre si apenas na posição da hidroxila.

Comparando os valores de RMN de ^{13}C (Mahato *et al.*, 1994) das substâncias A e B podemos observar que os carbonos C3, C5 e C24 são os que sofrem maior influência, com a alteração da estereoquímica da hidroxila na posição 3. Feito esta observação e estendendo esta comparação entre a β -amirina e a substância **2**, podemos concluir que as duas substâncias são idênticas diferindo uma da outra apenas pela posição da hidroxila em C3.

A título de comparação os valores de RMN de ^{13}C da substância **2** e da β -amirina estão apresentados na tabela 06.

Tabela 06: Dados de RMN ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) do triterpeno 3α -hidroxi-olean-12-eno comparados com os valores da β -amirina (Mahato *et al.*, 1994).

Carbonos	3α -hidroxi-olean-12-eno	β -amirina
1	35,06	28,7
2	29,70	27,3
3	76,37	79,0
4	39,28	38,8
5	49,66	55,3
6	18,21	18,5
7	30,34	32,8
8	39,28	38,8
9	43,04	47,7
10	37,82	37,7
11	23,63	23,6
12	122,09	121,8
13	141,57	145,5
14	40,81	41,8
15	27,80	26,2
16	27,00	27,0
17	34,60	32,5
18	47,41	47,4
19	não observado	46,9
20	30,08	31,1
21	34,83	34,8
22	36,01	37,2
23	28,94	28,8
24	19,62	15,5
25	18,42	15,6
26	16,21	16,9
27	25,45	26,6
28	32,40	28,4
29	34,52	33,3
30	25,45	23,7

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (PND e DEPT 135°) se encontram no anexo 02.

5.3. Identificação estrutural da mistura de triterpenos presentes na fração TmD-5 (3, 4, 5 e 6)

A fração TmD-5 apresentou em seu espectro de RMN ^1H (Figura 20, p. 62) uma grande quantidade de sinais entre $\delta 0,76$ e $\delta 1,07$, referente a grupos metílicos e um multipeto entre $\delta 3,17$ e $\delta 3,25$ referente aos hidrogênios hidroximetínicos, sendo que todos os triterpenos identificados na fração TmD-5 - após análise do CG - tem em comum uma hidroxila em β na posição 3. Quanto aos hidrogênios olefinicos também são observados, aparecendo como multipletos em $\delta 4,62$ e $\delta 4,60$.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 21, p.63) também há evidências da presença de triterpenos devido a grande quantidade de sinais entre $\delta 35,0$ - $14,0$ referentes a grupos metílicos e o sinal em $\delta 79,07$ referente a carbono contendo uma hidroxila ligada na posição β , como é típico da grande maioria dos triterpenos.

A análise do espectro de RMN ^{13}C na região dos carbonos olefinicos foi de grande importância para a identificação dos triterpenos, uma vez que estes são bem evidentes neste

espectro, com os sinais: δ 121,7 (C12) e δ 145,2 (C13) (β -amirina); δ 151,0 (C20) e δ 109,3 (C29) (lupeol); δ 139,2 (C20) e δ 119,4 (C21) (pseudotaraxasterol) e δ 154,6 (C20) e δ 107,1 (C30) (taraxasterol) (Olea & Roque, 1990, Mahato *et al.*, 1994).

A título de ilustração todos os valores de RMN ^{13}C dos triterpenos identificados em mistura na fração TmD-5 assim como os respectivos valores da literatura seguem nas tabelas 7 e 8.

Tabela 07: Dados do espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para β -amirina e lupeol comparados com os dados da literatura (Mahato *et al.*, 1994).

Carbonos	β -amirina		lupeol	
	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>
1	28,7	29,4	38,7	38,9
2	27,3	27,4	27,4	27,4
3	79,0	79,0	78,9	79,0
4	38,8	39,0	38,8	38,8
5	55,3	55,4	55,3	55,4
6	18,5	18,2	18,3	18,2
7	32,8	32,8	34,2	34,5
8	38,8	39,3	40,8	40,9
9	47,7	48,6	50,4	50,4
10	37,7	38,7	37,1	38,7
11	23,6	22,6	20,9	22,6
12	121,8	121,7	25,1	28,0
13	145,5	145,2	38,8	40,9
14	41,8	42,0	42,8	50,4
15	26,2	26,2	27,4	27,4
16	27,0	27,4	35,5	34,5
17	32,5	31,9	43,0	38,9
18	47,4	47,2	48,8	48,7
19	46,9	46,8	47,9	46,8
20	31,1	31,9	150,9	151,0
21	34,8	34,5	29,8	29,4
22	37,2	37,1	40,0	39,3
23	28,8	29,4	28,8	29,4
24	15,5	15,4	15,4	15,4
25	15,6	15,4	16,1	16,3
26	16,9	16,3	15,9	16,3
27	26,6	26,7	14,5	14,1
28	28,4	28,0	18,0	18,3
29	33,3	34,0	109,3	109,3
30	23,7	23,7	19,3	19,5

Tabela 08: Dados do espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para pseudotaraxasterol e taraxasterol comparados com os dados da literatura (Mahato *et al.*, 1994)

Carbonos	pseudotaraxasterol		taraxasterol	
	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>
1	38,8	38,9	38,8	38,8
2	27,4	27,4	27,4	27,8
3	79,0	79,6	79,0	79,0
4	38,8	38,8	38,8	38,8
5	55,3	55,4	55,4	55,4
6	18,3	18,2	18,3	18,2
7	34,3	34,5	34,1	34,5
8	41,1	41,0	40,9	41,0
9	50,4	50,5	50,5	50,5
10	37,1	38,7	37,1	38,7
11	21,6	22,6	21,4	22,6
12	27,6	28,0	26,6	26,7
13	39,2	38,2	39,2	39,4
14	42,3	42,0	42,0	42,0
15	27,0	27,4	26,6	27,4
16	36,6	37,1	38,3	38,8
17	34,4	34,5	34,5	34,5
18	48,8	48,7	48,7	48,7
19	36,6	42,0	39,4	39,3
20	138,8	139,2	154,6	154,6
21	118,9	119,2	25,6	25,6
22	42,2	42,0	38,9	38,9
23	28,8	29,4	28,8	29,4
24	15,4	15,4	15,4	15,4
25	16,3	16,3	16,8	16,4
26	16,1	16,3	15,9	16,3
27	14,8	15,3	14,8	15,3
28	17,7	18,3	19,5	19,5
29	22,5	22,7	25,5	25,5
30	21,7	21,5	107,7	107,1

Convém destacar que o sinal de C21 do pseudotaraxasterol não pode ser observado no espectro de DEPT 135° (Figura 22, p. 64), pelo fato da concentração do pseudotaraxasterol em TmD-5 ser muito menor do que a concentração dos demais triterpenos.

A confirmação dos triterpenos presentes em TmD-5 foi feita por CG, através de análises nas colunas HP-1 e HP-50. As análises foram feitas comparando os tempos de retenções relativos dos picos presentes na mistura de triterpenos com os tempos de retenção relativo de padrões autênticos. Através destas comparações foi possível confirmar a presença

dos terpenos β -amirina (**3**), lupeol (**4**), taraxasterol (**5**), pseudotaraxasterol (**6**) e β -sitosterol (**7**), sendo que os dados referentes às análises por CG (Figuras 18 e 19 - p. 60 e 61) nas colunas HP-50 e HP-1 se encontram nas tabelas 9 e 10.

Tabela 09: Identificação das substâncias presentes em TmD-5 (Coluna HP-50)

Compostos	Tempo de retenção (mistura de triterpenos)	Tempo de retenção relativo*(mistura de triterpenos)	Tempo de retenção relativo (Padrões)
β -amirina	27,953	1,315	1,315
lupeol	30,456	1,432	1,432
pseudotaraxasterol	34,159	1,606	1,605
taraxasterol	34,843	1,639	1,638
β -sitosterol	25,420	1,195	1,193

*com relação ao colesterol 21,262

Tabela 10: Identificação das substâncias presentes em TmD-5 (Coluna HP-1)

Compostos	Tempo de retenção (mistura de triterpenos)	Tempo de retenção relativo*(mistura de triterpenos)	Tempo de retenção relativo (Padrões)
β -amirina	16,543	1,269	1,295
lupeol	18,689	1,351	1,351
pseudotaraxasterol	20,555	1,486	1,484
taraxasterol	20,555	1,486	1,486
β -sitosterol	16,543	1,269	1,270

*com relação ao colesterol 13,826

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (PND e DEPT 135°) e os cromatogramas se encontram no anexo 03.

5.4. Identificação estrutural da mistura de esteróides (7, 8, 9, 10 e 11)

O espectro de RMN ^1H (Figuras 28 e 29, p. 68 e 69) da mistura em análise apresenta vários sinais entre $\delta 0,7$ e $\delta 1,0$ correspondendo a grupos metílicos, vários sinais entre $\delta 1,0$ e $\delta 2,0$ que podem ser atribuídos a grupos metilênicos, um multipeto em $\delta 3,5$ (H-3) referente à hidrogênios hidroximetínicos, dois duplos dubletos em $\delta 5,0$ (H23) e $\delta 5,1$ (H22) com J 15 e 8,5Hz e um multipeto em $\delta 5,35$ referente a hidrogênios olefinicos. Todos esses sinais no RMN evidenciam a presença de fitosteróides (Kojima *et al.*, 1990).

Na literatura (Kojima *et al.*, 1990) os autores descrevem os hidrogênios olefinicos (H-6) do β -sitosterol (7) e do stigmasterol (8) como um multipeto em $\delta 5,35$ e os hidrogênios hidroximetínicos (H-3) como um multipeto em $\delta 3,53$. Por sua vez os hidrogênios olefinicos

(H-7) do estigmast-7-en-3 β -ol (**10**) e do espinasterol (**11**) são descritos como multipletos em δ 5,16 e δ 5,15 respectivamente e os hidrogênios hidroximetínicos como multipletos em δ 3,60 e δ 3,59 respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C (Figuras 30 e 31, p. 70 e 71) a presença de esteróides também é averiguada devido aos sinais:

- δ 140,8 e δ 121,7: C5 e C6 do β -sitosterol (**7**);
- δ 140,7, δ 121,7, δ 138,3 e δ 129,2: C5, C6, C22 e C23 do estigmasterol (**8**);
- δ 138,3 δ 117,5: C7 e C8 do estigmast-7-en-3 β -ol (**10**);
- δ 117,5, δ 138,3, δ 138,6 e δ 129,3: C7, C8, C22 e C23 do espinasterol (**11**);

Estes fitoesteróides tem em comum uma hidroxila em β na posição 3, sendo que os C3 do β -sitosterol (**7**) e do estigmasterol (**8**) aparecem em δ 71,8 e os C3 do estigmast-7-en-3 β -ol (**10**) e do espinasterol (**11**) em δ 71,0 (Kojima *et al.*, 1990). Convém destacar que o sinal referente ao carbono C3 dos esteróides estigmast-7-en-3 β -ol e espinasterol não pode ser observado no PND, sendo observado apenas no espectro de DEPT 135 $^\circ$ com intensidade muito menor que o sinal δ 71,8 (veja Figura 31, p.71).

A presença de campesterol (**9**) não foi evidenciada por RMN ^1H e ^{13}C uma vez que esta substância tem seus deslocamentos químicos referentes aos carbonos da ligação dupla idênticos aos do β -sitosterol (**7**) (o contrário também poderia ser dito).

A título de ilustração todos os valores de RMN ^{13}C dos esteróides identificados em mistura assim como os valores da literatura seguem nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para os esteróides β -sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (Kojima *et al.*, 1990).

Carbonos	β -sitosterol		estigmasterol	
	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>
1	37,2	37,3	37,2	37,3
2	31,6	31,9	31,6	31,9
3	71,8	71,8	71,8	71,8
4	42,3	42,3	42,3	42,3
5	140,7	140,8	140,7	140,7
6	121,7	121,7	121,7	121,7
7	31,9	31,9	31,9	31,9
8	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,1	50,2	50,1	50,2
10	36,6	36,5	36,6	36,5
11	21,1	21,1	21,1	21,1
12	39,9	40,5	39,7	40,5
13	42,3	42,3	42,2	42,2
14	56,6	56,9	56,6	56,9
15	24,3	24,4	24,4	24,4
16	28,8	28,9	28,9	28,9
17	56,0	56,0	55,9	56,0
18	11,9	12,1	12,0	12,1
19	19,4	19,4	19,4	19,4
20	36,1	36,5	40,5	40,5
21	18,8	19,0	21,2	21,2
22	33,9	31,9	138,3	138,3
23	26,6	25,4	129,2	129,3
24	45,5	42,3	51,2	51,2
25	29,1	28,9	31,9	31,7
26	19,9	21,1	21,1	21,1
27	19,0	19,4	19,0	19,4
28	23	24,4	25,4	25,4
29	12,0	12,1	12,3	12,3

Tabela 12: Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para os esteróides estigmast-7-en-3 β -ol e espinasterol comparados com a literatura (Kojima *et al.*, 1990).

Carbonos	estigmast-7-en-3 β -ol		espinasterol	
	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>	<i>literatura</i>	<i>experimental</i>
1	37,1	37,3	37,1	37,3
2	31,4	31,7	31,4	31,7
3	71,0	71,1	71,0	71,1
4	37,9	37,3	38,0	37,3
5	40,2	40,5	40,2	40,5
6	29,6	28,9	29,6	28,9
7	117,4	117,5	117,4	117,5
8	139,6	138,3	139,5	138,3
9	49,4	50,1	49,4	50,1
10	34,4	36,6	34,4	36,6
11	21,5	21,2	21,5	21,2
12	39,5	40,5	39,4	40,5
13	43,4	42,3	43,3	42,3
14	55,0	56,0	55,1	56,0
15	23,0	23,0	23,0	23,0
16	27,9	28,3	28,5	28,3
17	56,0	56,0	55,8	56,0
18	11,8	12,1	12,0	12,1
19	13,0	12,3	13,0	12,3
20	36,6	36,5	40,8	40,5
21	18,9	19	21,4	21,1
22	33,8	31,9	138,8	138,3
23	26,1	25,4	129,4	129,3
24	45,8	42,3	51,2	51,2
25	29,1	28,9	31,9	31,9
26	19,8	21,1	21,1	21,1
27	19,0	19,4	19,4	19,4
28	22,9	21,2	25,4	25,4
29	11,9	12,1	12,3	12,3

Deve ser destacado que sendo as estruturas destes esteróides muito semelhantes, a identificação dos mesmos em mistura utilizando-se apenas métodos físicos não seria possível, desta forma a composição da mistura de esteróides foi confirmada pelas análises em CG (Figuras 23, 24, 25 e 26 e 27, p. 65, 66 e 67) feitas nas colunas HP-50 e HP-1 utilizando-se os tempos de retenções relativos e o método de enriquecimento com padrões. Nas tabelas 13 e 14 seguem as informações contidas nos cromatogramas.

Tabela 13: Identificação da mistura de esteróides (coluna HP-50).

Compostos	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo*		
	<i>Padrões</i>	<i>Mistura de esteróides</i>	<i>Padrões*</i>	<i>Mistura de esteróides**</i>
campesterol	24,101	24,052	1,105	1,106
stigmasterol	24,805	24,733	1,137	1,139
β -sitosterol	26,173	26,092	1,200	1,200
estigmast-7-en-3 β -ol	26,698	26,637	1,224	1,224
espinasterol	28,146	28,046	1,291	1,291

*com relação ao colesterol 21,805

**com relação ao colesterol 21,744

Tabela 14: Identificação da mistura de esteróides (coluna HP-1)

Compostos	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo		
	<i>Padrões</i>	<i>Mistura de esteróides</i>	<i>Padrões*</i>	<i>Mistura de esteróides**</i>
campesterol	16,098	15,925	1,162	1,158
stigmasterol	16,726	16,565	1,207	1,205
β -sitosterol	17,465	17,362	1,260	1,263
estigmast-7-en-3 β -ol	17,723	17,525	1,279	1,275
espinasterol	18,607	18,427	1,343	1,340

*com relação ao colesterol 13,855

**com relação ao colesterol 13,750

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , (PND e DEPT 135°) e cromatogramas se encontram no anexo 04.

5.5. Identificação estrutural do flavonóide ramnocitrina (12)

ramnocitrina (12)

Os sinais presentes no espectro de RMN ^1H da amostra em análise (Figuras 32 e 33 p. 72 e 73) indicam a presença de flavonóide, uma vez que são observados hidrogênios aromáticos (δ 8,2-6,3) e fenólicos (δ 12,5-9,5). Os sinais que caracterizam o flavonóide em análise são: dubletos em δ 8,09 e δ 6,94 com J 9Hz típicos de acoplamento *orto* no anel B integrando para dois hidrogênios cada, os dubletos em δ 6,75 e δ 6,35 com J 2Hz, típico de acoplamento *meta* no anel A integrando para um hidrogênio cada e o singlete em δ 3,86 integrando para 3 hidrogênios o que indica a presença de uma metoxila, no entanto a localização da mesma não pode ser feita por simples análise deste espectro, podendo estar nas posições 3, 7 ou 4'.

A comparação entre os valores obtidos de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 32, 33, 34 e 35, p. 72-75) com os valores da literatura para o flavonóide ramnocitrina apresentam ótima concordância, como prova disto os valores experimentais e da literatura estão apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Dados do espectro de RMN ^1H do flavonóide ramnocitrina comparados com a literatura (Barberá *et al.*, 1986) e (Harborne, 1995)*

Hidrogênios	δ , J e multiplicidade realizado em 200.13 MHz (Barberá <i>et al.</i> , 1986)	δ , J e multiplicidade (Harborne <i>et al.</i> , 1995)	δ , J e multiplicidade (12)
6	6,34; (2,2); <i>d</i>	6,39; (2,1); <i>d</i>	6,35; (2,0); <i>d</i>
8	6,73; (2,2); <i>d</i>	6,75; (2,1); <i>d</i>	6,75; (2,0); <i>d</i>
2'	8,07; (8,8); <i>d</i>	8,10; (8,9); <i>d</i>	8,09; (9,0); <i>d</i>
3'	6,93; (8,8); <i>d</i>	6,89; (8,9); <i>d</i>	6,94; (9,0); <i>d</i>
5'	6,93; (8,8); <i>d</i>	6,89; (8,9); <i>d</i>	6,94; (9,0); <i>d</i>
6'	8,07; (8,8); <i>d</i>	8,10; (8,9); <i>d</i>	8,09; (9,0); <i>d</i>
OMe	3,85; s	-----	3,86; s
5-OH	12,60; sl	-----	12,48; sl

* δ em ppm e J em Hz (obtidos em DMSO- d_6)

Tabela 16: Dados do espectro de RMN ^{13}C (δ em ppm, DMSO- d_6) do flavonóide ramnocitrina comparados com a literatura (Agrawal *et al.*, 1989)

Carbonos	Tipos de carbonos	δ experimental (12)	δ literatura (Agrawal <i>et al.</i> , 1989)
C-2	C	147,6	147,2
C-3	C	136,3	135,9
C-4	C	176,4	176,0
C-5	C	160,7	160,3
C-6	C-H	97,9	97,4
C-7	C	165,2	164,9
C-8	C-H	92,4	92,1
C-9	C	156,4	156,1
C-10	C	104,4	104,0
C-1'	C	121,9	121,0
C-2'	C-H	129,9	129,4
C-3'	C-H	115,8	115,4
C-4'	C	159,7	159,3
C-5'	C-H	115,8	115,4
C-6'	C-H	129,9	129,4

Embora os dados de RMN ^1H e ^{13}C sejam suficientes para confirmar o flavonóide ramnocitrina, também foi o espectro de massas no modo negativo e EM-EM no modo positivo (Figuras 36 e 38 – p. 76 e 78), onde os picos do íon molecular são condizentes com a ramnocitrina $[\text{M}-\text{H}]$ 299,0559 e $[\text{M}+\text{H}]$ 301,0799, respectivamente.

A espectrometria de massas também auxiliou na confirmação da posição da metoxila, feita por EM-EM no modo positivo (Figura 38, p. 78) onde a presença dos fragmentos m/z

121,0347, m/z 179,0430, m/z 167,0412 e m/z 151,0450, confirmam a posição da metoxila em C-7 (estes fragmentos se encontram propostos na Figura 04). Deve ser destacado que a utilização de EM-EM no modo positivo na determinação da posição de metoxilas no esqueleto de flavonóides é descrita por March e Miao (2004).

A ramnocitrina também foi submetida à EM-EM (Figura 37, p. 77) no modo negativo, mas os fragmentos presentes no espectro não foram conclusivos na determinação da posição da metoxila.

Figura 04: Proposta de fragmentação da ramnocitrina no modo positivo que confirma a metoxila em C7 (March & Miao, 2004).

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (PND e DEPT 135°) e de EM se encontram no anexo

5.6. Identificação estrutural do flavonóide ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo (13).

ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo (13)

O flavonóide ramnocitrina já tinha sido isolado e identificado no estudo do extrato de média polaridade (diclorometano), a comparação direta dos espectros de RMN ^1H (Figuras 32 e 33, p. 72 e 73) do flavonóide ramnocitrina com o espectro (Figuras 39 e 40, p. 79 e 80) da sua versão glicosilada levaram a entender que de fato os esqueletos carbônicos eram os mesmos (veja os dados na tabela 17) e o dubleto em $\delta 5,43$ de $J 7,6\text{Hz}$ indica que o açúcar presente é a β -D-galactopiranoose.

De acordo com Barberá *et al.*, (1986) quando um flavonóide é glicosilado na posição 3 ocorre uma alteração nos deslocamentos químicos dos hidrogênios 2' e 6', no entanto estas alterações não são previsíveis e geralmente levam a equívocos, mas por sua vez quando um flavonóide é glicosilado na posição 4' ocorre uma desblindagem dos hidrogênios 3' e 5' em torno de 0,3 ppm. Uma vez que o glicosídeo só pode estar nas posições 3 e 4' e não é observada nenhuma desblindagem em torno de 0,3 ppm nos hidrogênios 3' e 5' em relação a ramnocitrina podemos concluir que o açúcar está na posição 3.

A título de comparação os valores de RMN ^1H da ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo são comparados com os valores da literatura (Barberá *et al.*, 1986) e apresentados na tabela 18.

Tabela 17: Dados do espectro de RMN ^1H do flavonóide ramnocitrina comparados com os da ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo*

Hidrogênios	δ , J e multiplicidade da ramnocitrina (12)	δ , J e multiplicidade da ramnocitrina 3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (13)
6	6,35; (2,0), <i>d</i>	6,39; (2,2), <i>d</i>
8	6,75; (2,0), <i>d</i>	6,75; (2,2), <i>d</i>
2'	8,09; (9,0), <i>d</i>	8,12; (9,0), <i>d</i>
3'	6,94; (9,0), <i>d</i>	6,88; (9,0), <i>d</i>
5'	6,94; (9,0), <i>d</i>	6,88; (9,0), <i>d</i>
6'	8,09; (9,0), <i>d</i>	8,12; (9,0), <i>d</i>
OMe	3,86; s	3,87; s
5-OH	12,48; sl	12,66; sl

* δ em ppm e J em Hz (obtidos em DMSO- d_6)**Tabela 18:** Valores de RMN ^1H do flavonóide ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo comparados com os valores da literatura (Barberá *et al.*, 1986)*

Hidrogênio	δ , J e multiplicidade da literatura	δ , J e multiplicidade (13)
6	6,37; (2,1), <i>d</i>	6,39; (2,2), <i>d</i>
8	6,74; (2,1), <i>d</i>	6,75; (2,2), <i>d</i>
2' e 6'	8,09; (8,9), <i>d</i>	8,12; (9,0), <i>d</i>
3' e 5'	6,88; (8,9), <i>d</i>	6,88; (9,0), <i>d</i>
OMe	3,86; s	3,87; s
5-OH	12,60 sl	12,66, sl
H''-1	5,40; (7,5), <i>d</i>	5,43; (7,6), <i>d</i>

* δ em ppm e J em Hz (obtidos em DMSO- d_6)

A ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo também foi submetida a EM no modo negativo (figuras 41, p. 81) onde o fragmento $[\text{M}-\text{H}]$ m/z 461,1054 confirma a estrutura proposta. Por sua vez o espectro de EM-EM no modo negativo (Figura 42, p. 82) não foi conclusivo na determinação da posição do açúcar, mas ajudou a confirmar a estrutura proposta. Os fragmentos que ajudaram na confirmação da estrutura são: m/z 298,0461, referente à perda do açúcar e m/z 283,0239, referente à perda da metila do fragmento anterior. Todos os fragmentos observados no espectro de EM-EM no modo negativo estão descritos na figura 05 de acordo com March *et al* (2006).

Figura 05: Propostas de fragmentação para a ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo (**13**) (March *et al.*, 2006).

Os espectros de RMN de 1H , EM e EM-EM no modo negativo se encontram no anexo

06.

6. Conclusões

A meta principal deste trabalho era traçar um perfil fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner, com base no isolamento e identificação dos componentes químicos micromoleculares dos extratos diclorometânico e metanólico das partes totais desta espécie vegetal. Neste sentido foram isolados e identificados os compostos:

A partir do extrato diclorometânico:

- 6 α -angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (**1**);
- 3 α -hidroxi-olean-12-eno (**2**);
- β -amirina (**3**), lupeol (**4**), taraxasterol (**5**) e pseudotaraxasterol (**6**) - identificados em mistura;
- β -sitosterol (**7**) estigmasterol (**8**), campesterol (**9**), estigmast-7-em-3 β -ol (**10**) e espinasterol (**11**) - identificados em mistura;
- ramnocitrina (**12**).

A partir do extrato metanólico:

- ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo (**13**).

Comparando o perfil fitoquímico das espécies já estudadas por (Bohlmann *et al.*, 1981a), (Bohlmann *et al.*, 1984), (Baruah *et al.*, 1985) e (Vichnewski *et al.*, 1985) com os resultados obtidos para a *Trichogonia menthaefolia*, objeto deste estudo, podemos concluir:

Dentre as espécies estudadas e já relatadas na literatura todas apresentaram lactonas sesquiterpênicas, sendo que neste trabalho nenhuma lactona sesquiterpênica foi encontrada, isto não quer dizer que a *Trichogonia menthaefolia* não tenha lactonas sesquiterpênicas, uma maneira de confirmar se a planta tem esta classe química é fazer uma percolação com diclorometano das folhas e realizar um estudo deste extrato, o que facilitaria o isolamento das mesmas uma vez que as lactonas sesquiterpênicas estarão presentes em maior quantidade no

extrato, sendo que este procedimento não foi realizado no presente trabalho por falta de material vegetal.

Os triterpenos, os esteróides e os sesquiterpenos são comuns nas espécies de *Trichogonia* e em membros da família Asteraceae, devendo ser destacado que:

Os triterpenos taraxasterol, acetato de taraxasterol e acetato de lupeol já foram identificados na *T. prancii* por sua vez o acetato de taraxasterol se mostrou bem comum no gênero sendo identificado também nas espécies *T. scottmorii*, *T. salviaefolia* e *T. villosa* (Bohlmann *et al.*, 1981a). Os triterpenos pseudotaraxasterol, lupeol, 3 β -hidroxi-olean-12-eno e 3 α -hidroxi-olean-12-eno foram identificados pela primeira vez no gênero.

A presença de sesquiterpenos são comuns nas espécies de *Trichogonia*, mas o 6 α -angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno é o primeiro sesquiterpeno com esqueleto do tipo eudesmano a ser relatado no gênero.

Os esteróides β -sitosterol e estigmasterol já foram encontrados em *T. hirtifolia* e o estigmasterol na *T. santosii* (Bohlmann *et al.*, 1984), sendo que os esteróides campesterol, estigmast-7-em-3 β -ol e espinasterol estão sendo identificados pela primeira vez no gênero.

A presença de flavonóides, glicosilados ou não, ainda não havia sido relatada em *Trichogonia* provavelmente em virtude dos estudos químicos, presentes na literatura, terem sido realizados somente com extratos de baixa polaridade. O estudo das últimas frações da CLV do extrato diclorometânico e do extrato metanólico permitiu a identificação dos flavonóides ramnocitrina e ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo respectivamente.

7. Referências bibliográficas

Agrawal, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier, p. 152, 1989.

Barberá, O.; Sanz, J. F.; Sánchez-Parareda, J.; Marco J. A. Further Flavonol Glycosides from *Anthyllis Onobrychioides*. **Phytochemistry**, v.25, p.2361-2365, 1986

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Araújo Jr, J. X. O uso de matérias-primas vegetais para síntese de fármacos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 4ª. edição, Editora da UFSC, 149-164. 1999.

Baruah, N. R.; Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Robison, H. Some Sesqui- and Diterpenes from the Tribe Eupatorieae. **Phytochemistry**, v.24, p.2641-2644, 1985.

Bohlmann, F.; Zdero, C.; Pickard, J.; Robinson, H.; King, R. M. New Types of Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from *Trichogonia* Species. **Phytochemistry**, v. 20, p.1323-1333, 1981a.

Bohlmann, F.; Ahmed, M.; King, R. M., Robinson, H. Labdane and Eudesmane Derivates from *Ageratum Fastigiatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1434-1435, 1981b.

Bohlmann, F.; Zdero, C.; Jakupovic, J.; Gerke, T.; Wallmeyer, M.; King, R. M.; Robinson, H. Neue Sesquiterpenlactone und Rosan-Derivate aus *Trichogonia*-Arten. **Liebigs Ann. Chem**, v.1, p.162-185, 1984.

Bremer, K. **Asteraceae & Classification**. Timber Press, p.13, 40, 1994.

Cordell, A. G. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. **Phytochemistry**, v.40, p. 1585-1612, 1995.

Cordell, A. G. Biodiversity and Drug Discovery – A Symbiotic Relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 462-480, 2000.

Filho, V. C. & Yunes, R. A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica. Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. In: Yunes, R. A & Calixto, J. B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal** Argos - Editoras Universitárias, p. 18-42, 2001.

Harborne J. B. **The Flavonoids**. Chapman & Hall, p. 453, 1995.

King, R. M & Robinson, H. **The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. 21. Monographs in Systematic Botany, p.1-30, 84-136, 1987.

Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A. Sterol Glucosides from *Prunella Vulgaris* **Phytochemistry**, v.29, p. 2351-2355, 1990.

Mahato, S. B. & Kundu, A. P. ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids—A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v.37, p.1517-1575, 1994.

March, R. E. & Miao, Xiu-Sheng. A Fragmentation Study of Kaempferol Using Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry at High Mass Resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**. v.231, p. 157-167, 2004.

March, R. E.; Lewars, E. G.; Stacey, C. J.; Miao Xiu-Sheng; Zhao, X.; Metcalfe, C. D. A Comparison of Flavonoid Glycosides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.248, p.61–85, 2006.

Olea, R. S. G. & Roque, F. N. Análise de Misturas de Triterpenos por RMN de ^{13}C , **Química Nova**, v.13, p. 278-281, 1990.

Phillipson, J. D. Phytochemistry and Medical Plants. **Phytochemistry**. v.56, p. 237-243, 2001

Vichnewski, W.; Kulanthaivel, P.; Goedken, V. L.; Herz, W. Two Sesquiterpene Lactones from *Trichogonia Gardneri*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 291-296, 1985.

Viegas, C. Jr.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v.28, p.326-337, 2006.

Anexo 01: Figuras 06, 07, 08, 09, 10, 11 e 12

Figura 06: Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 400MHz) do sesquiterpeno 6α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (**1**)

Figura 07: Expansões de parte do espectro presente na figura 06

Figura 08: Expansões de parte do espectro presente na figura 06

Figura 09: Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do sesquiterpeno 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (**1**)

Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do sesquiterpeno 6 α -Angeloiloxi-eudesm-4(15)-eno (**1**)

Figura 11: Mapas de contorno do HMQC

Anexo 02: Figuras 13, 14, 15, 16 e 17

Figura 13: Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 400MHz) do triterpene 3 α -hidroxi-olean-eno (2)

Figura 14: Expansões de parte do espectro presente na figura 13

Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-eno (**2**)

Figura 16: Expansões de parte do espectro presente na figura 15

Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) do triterpeno 3 α -hidroxi-olean-eno (**2**)

Anexo 03: Figuras 18, 19, 20, 21 e 22

Figura 18: Cromatograma obtido por CG da mistura de triterpenos: A- padrão de referência, B- β-sitosterol (7), C- β-amirina (3), D- lupeol (4), E- pseudotaraxasterol (6) e F- taraxasterol (5) (coluna HP-1)

Figura 19: Cromatograma obtido por CG da mistura de triterpenos: A- padrão de referência, B- β -sitosterol (7), C- β -amirina (3), D- lupeol (4), E- pseudotaraxasterol (6) e F- taraxasterol (5) (coluna HP-50)

Figura 20: Espectro de RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 400MHz) da mistura dos triterpenos (**3**, **4**, **5** e **6**)

Figura 21: Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz), da mistura dos triterpenos (3, 4, 5 e 6)

Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135 $^{\circ}$, δ em ppm; CDCl₃, 100MHz) da mistura dos triterpenos (3, 4, 5 e 6)

Anexo 04: Figuras 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31

Figura 23: Cromatograma dos padrões dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-50)

Figura 24: Cromatograma dos padrões dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-1)

Figura 25: Análise por CG da mistura dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-50)

Figura 26: Análise por CG da mistura dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (9), C- estigmasterol (8), D- β -sitosterol (7), E- estigmast-7-em 3β -ol (10) e F- espinasterol (11) (coluna HP-1)

Figura 27: Enriquecimento com padrões na mistura dos esteróides: A- padrão de referência, B- campesterol (**9**), C- estigmasterol (**8**), D- β -sitosterol (**7**), E- estigmast-7-em 3β -ol (**10**) e F- espinasterol (**11**) (coluna HP-50)

Figura 28: Espectro de RMN ^1H (δ em ppm; CDCl_3 , 400MHz) da mistura dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11)

Figura 29: Expansões de parte do espectro presente na figura 28

Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) da mistura dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11)

Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135 $^{\circ}$, δ em ppm; CDCl_3 , 100MHz) da mistura dos esteróides (7, 8, 9, 10 e 11)

Anexo 05: Figuras de 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38

Figura 32: Espectro de RMN ^1H (δ em ppm; DMSO-d_6 , 400MHz) do flavonóide ramnocitrina (**12**)

Figura 33: Expansões de parte do espectro presente na figura 32

Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C (PND, δ em ppm; DMSO- d_6 , 100MHz) do flavonóide ramnocitrina (**12**)

Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C (DEPT⁰ 135°, δ em ppm; DMSO-d_6 , 100MHz) do flavonóide ramnocitrina (**12**)

Figura 36: EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina (**12**)

Figura 37: EM-EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina (**12**)

Figura 38: EM-EM no modo positivo do flavonóide ramnocitrina (12)

Anexo 06: Figuras 39, 40, 41 e 42

Figura 39: Espectro de RMN de ^1H do flavonóide ramnocitrina 3-O- β -galactopiranosídeo (13) (δ em ppm, DMSO- d_6 , 400MHz)

Figura 40: Expansão de parte do espectro presente na figura 39

Figura 41: EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina 3-*O*-β- galactopiranosídeo (**13**)

Figura 42: EM-EM no modo negativo do flavonóide ramnocitrina 3-*O*- β -galactopiranosídeo (13)