

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos utilizados

Todos os solventes utilizados nas extrações e nas eluições de colunas e placas cromatográficas foram devidamente tratados e destilados, segundo os procedimentos usuais (ASSUMPÇÃO e MORITA, 1968).

As soluções foram concentradas em evaporador rotatório da Buchler sob pressão reduzida.

A cromatografia em camada delgada analítica foi realizada em cromatoplasas de sílica sobre suporte de alumínio da Merck. As placas preparativas utilizadas foram preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (5 - 40 µm) da Merck. Estas placas foram preparadas dispersando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro de 20 x 20 cm, utilizando-se o espalhador da "Quickfit". A espessura das placas de sílica gel foi de 1,00 mm. Essas cromatoplasas foram preparadas usando 50 g de sílica gel e 150ml de água destilada. Para as colunas cromatográficas foi utilizado como suporte sílica gel 60 (60 -200 µm) da Merck.

As revelações dos cromatogramas analíticos foram efetuadas com irradiação no ultravioleta (254 e 356 nm) e nebulização com solução de ácido sulfúrico 25 %, seguido de aquecimento.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C foram registrados em espectrômetro Bruker AC-200, Varian Gemini 200, operando a 200 e 50,3 MHz, (4,69 T) e Varian INOVA DPX-300, operando a 300 e 75 MHz (7,05 T). De acordo com a solubilidade das amostras, os espectros foram obtidos em clorofórmio, metanol ou piridina deuterados, produzidos pela Aldrich.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafo da Hewlett Packard mod. 5890 series II e integrador HP 3396A. Utilizou-se coluna capilar (0,25 mm) de 30 m, contendo fenil-silicone (5%) e metil-silicone (95%) como fase estacionária. As condições empregadas nos experimentos foram: bloco injetor: 250°C, detector de ionização de chama: 310°C, gás de arraste: He; vazão: 6 mL / min (30°C); temperaturas da coluna: 120°C durante 2 min com gradiente de 2°C / min até 280°C e mantido por 15 min nesta temperatura final.

O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar à temperatura de 40-45°C.

As plantas foram trituradas em moinho de facas da marca THOMAS.

Usou-se liofilizador da marca EDWARDS, modelo E2M5.

3.2 Coleta do material vegetal

Em setembro de 2002, oito espécies de aráceas foram coletadas na reserva de Picinguaba, litoral de São Paulo, e no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Todas as espécies foram identificadas pelo Dr. Eduardo Gonçalves, e as respectivas exsiccatas se encontram depositadas no Herbário do Instituto Botânico de São Paulo.

Na Tabela 3.1 se encontram as espécies coletadas para a realização deste estudo, bem como o local da coleta.

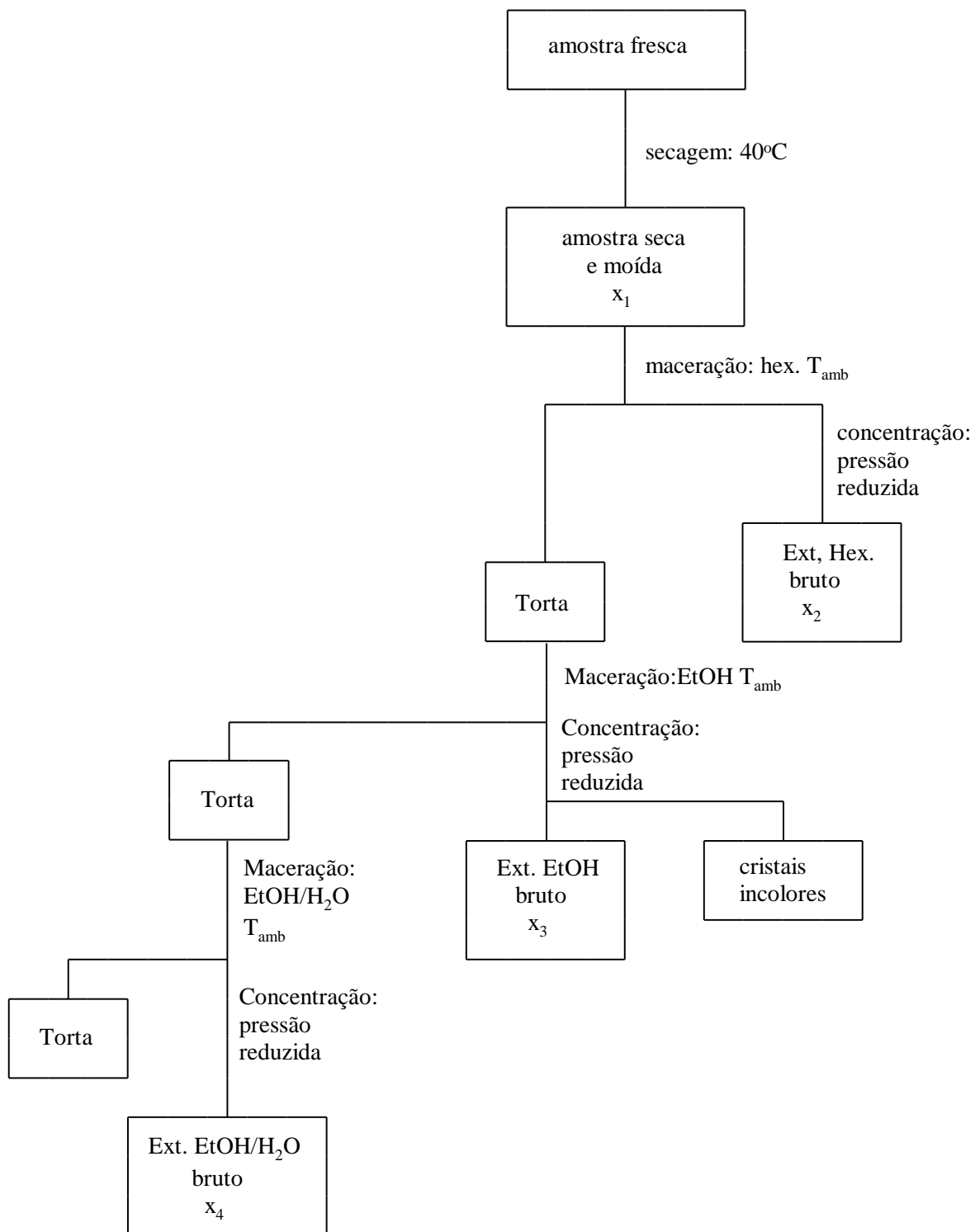
Tabela 3.1 – Espécies de aráceas coletadas.

Espécie	Sigla	Local
<i>Monstera adamsonii</i> Schott	Ma	reserva
<i>Anthurium sellowianum</i> Kunth	As	“
<i>Philodendron appendiculatum</i> Nadruz & Mayo vel aff	Pa	“
<i>Philodendron cordatum</i> Kunth	Pc	“
<i>Philodendron aff loefgrenii</i> Eng	Pl	“
<i>Philodendron</i> sp	Psp	“
<i>Xanthosoma maximilianii</i> Schott	Xm	“
<i>Caladium bicolor</i> (Aiton) Vent	Cb	“
<i>Pistia stratiotes</i> L	Ps	IQ / USP

3.3 Obtenção dos extratos

O material vegetal coletado foi separado em folha, raiz, pecíolo e flor. Em seguida cada uma dessas partes foi secada em estufa a 40-45°C e moída. As serragens resultantes foram maceradas com hexano, subseqüentemente com etanol e finalmente com mistura de etanol:água 1:1 (Esquema 1). Os filtrados hexânicos e etanólicos foram totalmente concentrados em evaporador rotatório à pressão reduzida, obtendo-se os respectivos extratos.

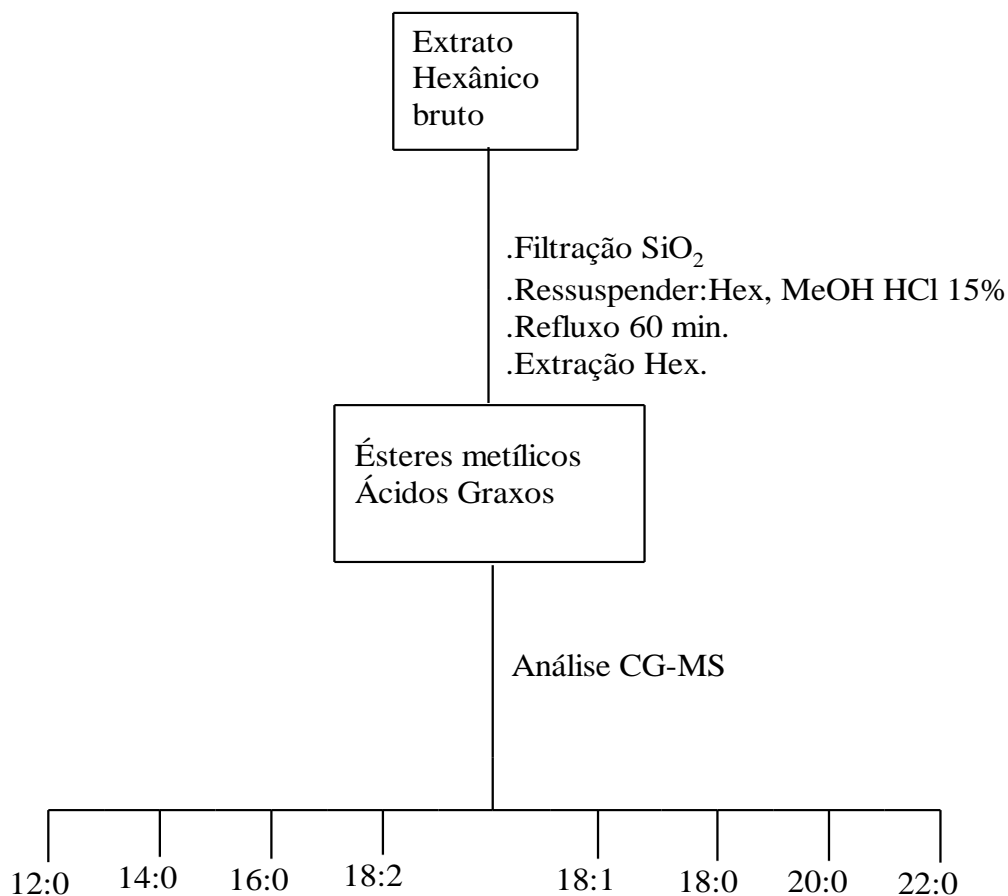
Os filtrados hidroalcoólicos foram concentrados em evaporador rotatório seguido de liofilização. A quantidade de material vegetal utilizado, bem como a dos respectivos extratos pode ser verificada na Tabela 4.1.



Esquema 1. Obtenção de extratos brutos, x_n ($n=1,2,3$ e 4) são as massas de cada extrato.

3.4 Transesterificação dos ácidos graxos

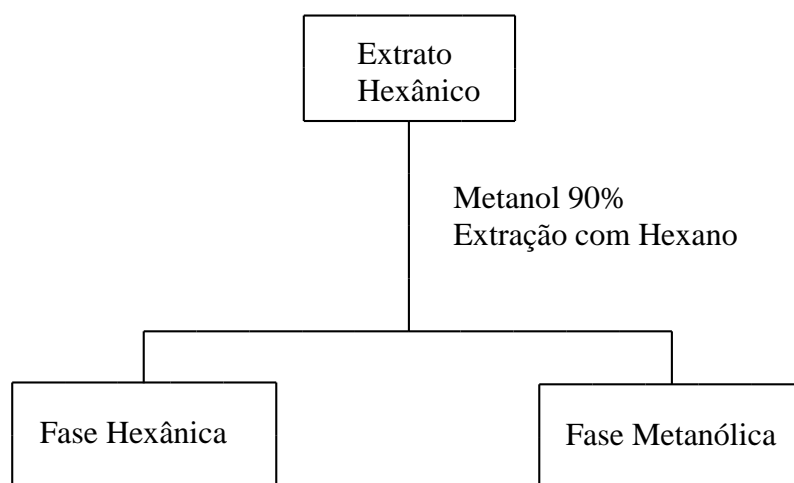
Com o objetivo de verificar a relação de ácidos graxos presentes entre as espécies em estudo, se procedeu a transesterificação dos extratos hexânicos obtidos, de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Para isso, 25 mg de cada um desses extratos foram separadamente misturados com 3 mL de n-hexano e 15 mL de solução de ácido sulfúrico a 2% em metanol. Aqueceu-se a mistura em refluxo durante uma hora e em seguida, a mistura foi resfriada. Adicionou-se 40mL de solução saturada de cloreto de sódio até a fase hexânica atingir um nível pré-estabelecido em um balão volumétrico. Os ésteres metílicos formados se dispersam na fase hexânica, que foi separada, concentrada e analisada por CG-MS



Esquema 2. Obtenção dos ácidos graxos metilados.

3.5 Partição do extrato hexânico

Os extratos hexânicos das folhas e raízes de cada espécie em estudo foram ressuspensos em metanol 90% e então extraídos por três vezes com hexano. As fases hexânicas e metanólicas resultantes foram concentradas em evaporador rotatório (Esquema 3), obtendo-se os resíduos respectivos (Tabela 4.2).



Esquema 3. Partição do extrato hexânico.

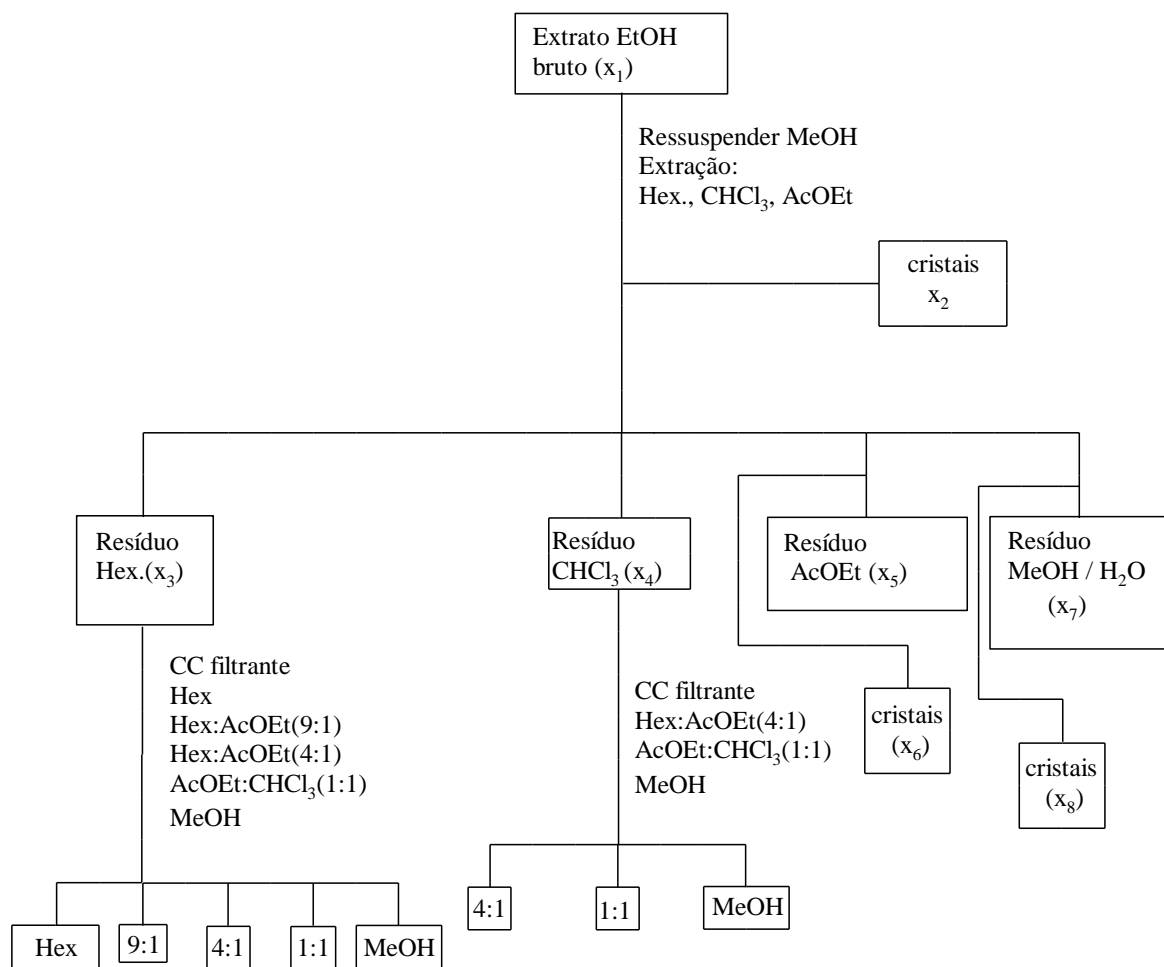
Os resíduos hexânicos e metanólicos foram analisados por cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e RMN de ^1H e de ^{13}C . Como foi observada a presença majoritária dos esteróides sitosterol e estigmasterol nessas frações, essas não foram submetidas a fracionamento cromatográfico.

3.6 Partição do extrato etanólico

Todos os extratos etanólicos das folhas e raízes foram separadamente ressuspensos em metanol 90% e, então, extraiu-se sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila, por três vezes com cada solvente. As fases resultantes foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se os respectivos resíduos os quais foram submetidos à CC visando a obtenção de novas frações de diferentes polaridades (Esquema 4). Vale ressaltar que durante o processo de partição

de alguns extratos etanólicos observou-se a formação de cristais insolúveis em solvente orgânico, sugerindo que se tratavam de oxalato de cálcio, muito comum na família Araceae.

Na Tabela 4.3 é possível observar as massas dos respectivos resíduos, bem como a quantidade de cristais formados.



Esquema 4. Partição do extrato etanólico, x_n ($n=1,2,3,4,5,6,7$ e 8) correspondem às massas de cada extrato e dos cristais.

3.7 Análise dos resíduos obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C

Todos os resíduos obtidos pela partição dos extratos hexânicos e etanólicos foram submetidos à análise por RMN de ^1H e ^{13}C , com o objetivo de auxiliar na seleção das espécies

que seriam posteriormente fracionadas para a obtenção de substâncias puras. Estas substâncias, além de servirem para identificar as principais classes de compostos presentes nestas espécies, serviram de padrões para identificação das classes de metabólitos das demais espécies não fracionadas. O fator que foi levado em consideração nesta etapa foi principalmente a riqueza de sinais no espectro e a quantidade de amostra.

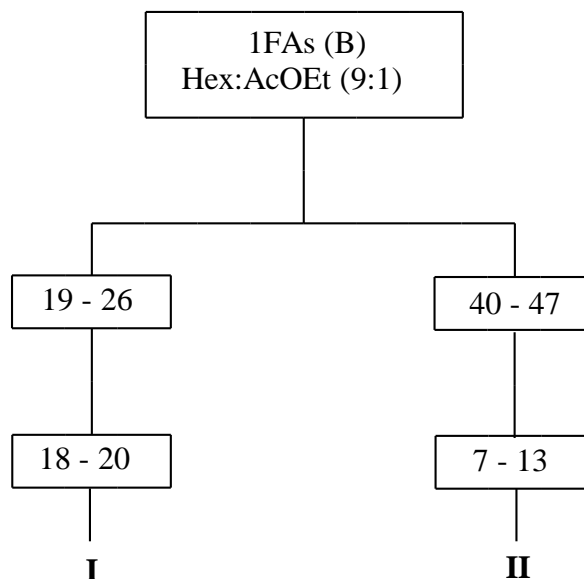
3.8 Fracionamento dos resíduos e isolamento das substâncias

3.8.1 Fracionamento dos resíduos hexânicos e clorofórmicos do extrato etanólico das folhas e raízes de *Anthurium sellowianum*

Os resíduos hexânicos e clorofórmicos obtidos através da partição do extrato etanólico tanto das folhas, quanto das raízes de *A. sellowianum* foram separadamente submetidos à CC sob pressão. Utilizou-se sílica gel 60-200 μm como fase estacionária e o sistema de solventes hexano, hexano:AcOEt 9:1, hexano:AcOEt 8:2, clorofórmio:AcOEt 1:1 e metanol 100% como fase móvel (Esquema 5), obtendo-se cinco frações de polaridades diferentes (frações A, B, C, D, E), as quais foram submetidas a análise por RMN.

A análise por RMN de ^1H da fração A (hexano 100%), de ambas partes vegetais, mostrou sinais característicos de triglicerídeos: 5,25 (1H) ppm (CHOCOR) e dois dubletos (4 H) em 4,12 e 4,28 ppm (CH_2OCOR), e por este motivo estas frações não foram trabalhadas.

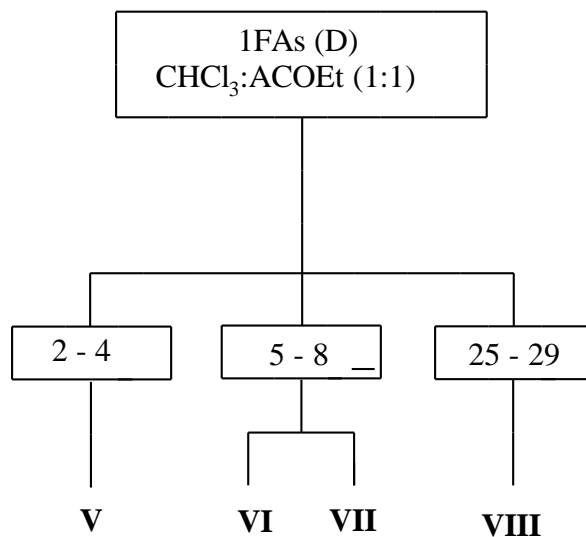
O espectro de RMN ^1H da fração B (Hex:AcOEt 9:1) das folhas, além dos sinais de triglicerídeos, apresentou um dubleto intenso entre 4 - 5 ppm, enquanto que o espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais de fitol e por tal motivo, esta fração foi submetida a fracionamento por CC, utilizando-se sílica gel 60-200 μm como fase estacionária e misturas de hexano:AcOEt 9:1 e 8:2 como fase móvel. Foram obtidas 50 frações, que resultaram no isolamento das substâncias **I** e **II** (Esquema 5).



Esquema 5. Fracionamento da fração B (Hex:AcOEt 9:1) das folhas de *A. sellowianum* e obtenção de substâncias puras.

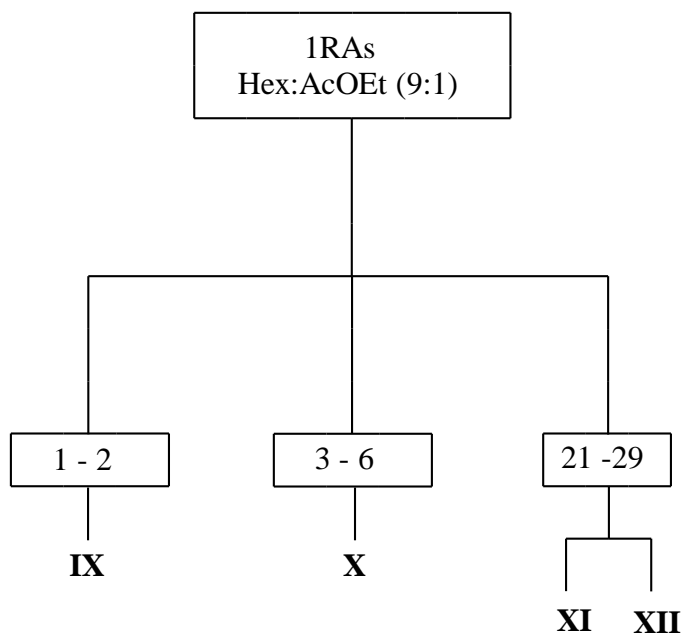
Os espectros de RMN de ^{13}C da fração C (Hex:AcOEt 8:2) ainda das folhas apresentaram sinais indicativos da presença de sitosterol e estigmasterol. Como esta fração tinha muita clorofila, ela foi submetida a filtração em CC, utilizando sílica gel 60-200 μm como fase estacionária e o sistema de solventes hexano:AcOEt 9:1 como fase móvel. Foram obtidos 142 mg de cristais da mistura dos esteróides (substâncias **III** e **IV**).

A fração D (CHCl_3 :AcOEt 1:1) das folhas também foi analisada por RMN de ^1H e foi observada a presença de sinais na faixa de 6,5 - 8 ppm. Por esse motivo esta fração foi submetida a novo fracionamento em coluna de sílica gel e hexano:AcOEt 2:1, seguido de CHCl_3 :AcOEt 1:1 como fase móvel, obtendo-se 35 frações, das quais foram isoladas as substâncias **V**, **VI** e **VII** (Esquema 6).



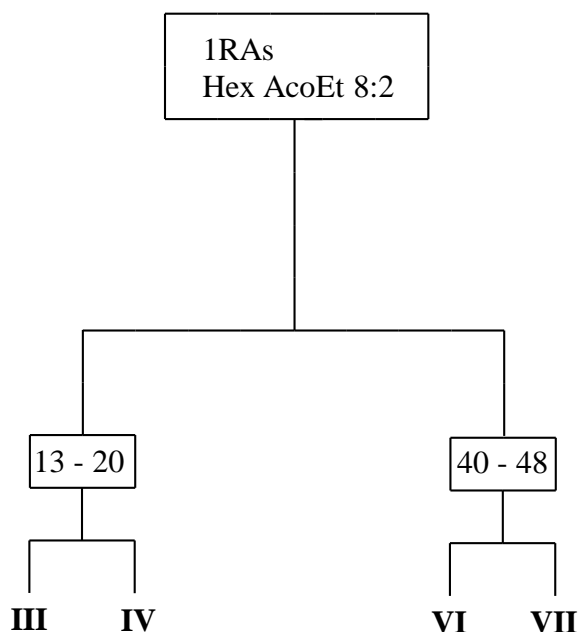
Esquema 6. Fracionamento de fr. CHCl₃:AcOEt 1:1 das folhas de *A. sellowianum*.

O espectro de RMN ¹³C da fração Hex:AcOEt (9:1) (B) das raízes apresentou sinais em 142,5 e 118,3 ppm, característicos de fitil, o que motivou o fracionamento desta por tal motivo esta fração foi submetida a CC, em sílica gel 60-200 μm como fase estacionária e o sistema de solventes hexano:AcOEt 9,5:0,5 e 9:1 como fase móvel. Foram obtidas 25 frações das quais foram isoladas as substâncias **IX**, **X**, **XI** e **XII** (Esquema 7).



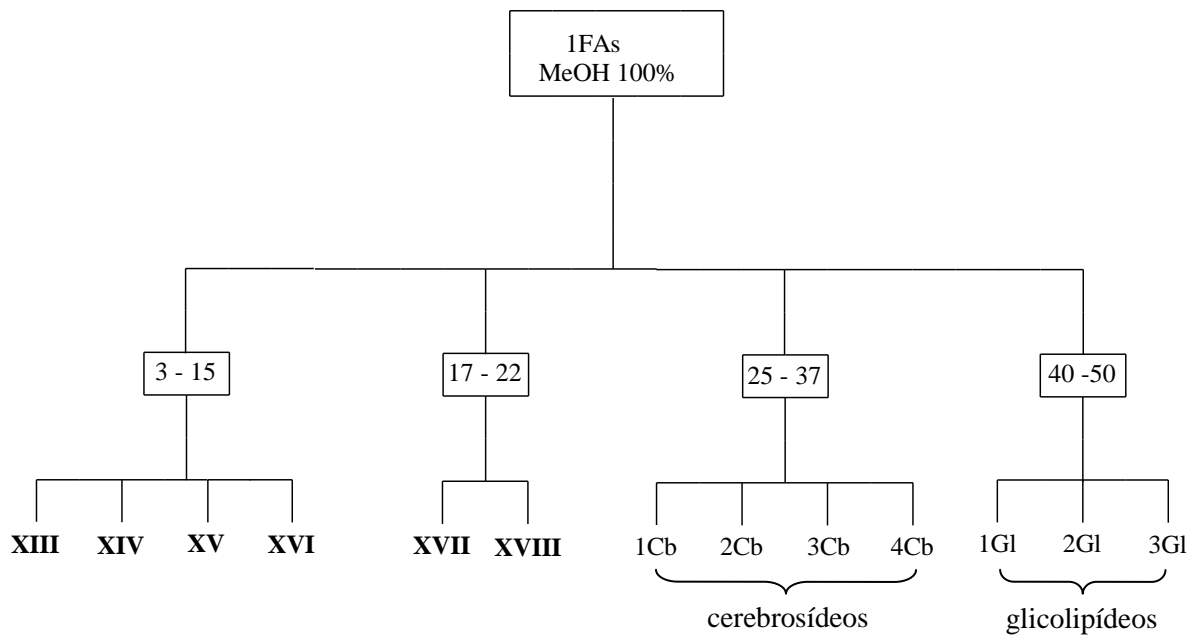
Esquema 7. Fracionamento de fr. Hex.:AcOEt 9:1 das raízes de *A. sellowianum*.

A fração C (Hex:AcOEt 8:2) das raízes foi analisado por RMN ^{13}C e apresentou sinais indicativos da presença de sitosterol e estigmasterol, como compostos majoritários. Também foram observados sinais em 202, 165,11 e 126,11 ppm, referentes a outro esteróide, isso fez com que esta fração fosse submetida à filtração em CC, utilizando-se sílica gel 60-200 μm como fase estacionária e o sistema de solventes hexano:AcOEt 9:1. Foram obtidos 20 mg de cristais correspondentes à mistura dos esteróides **III** e **IV** e das substâncias **VI** e **VII** (Esquema 8).

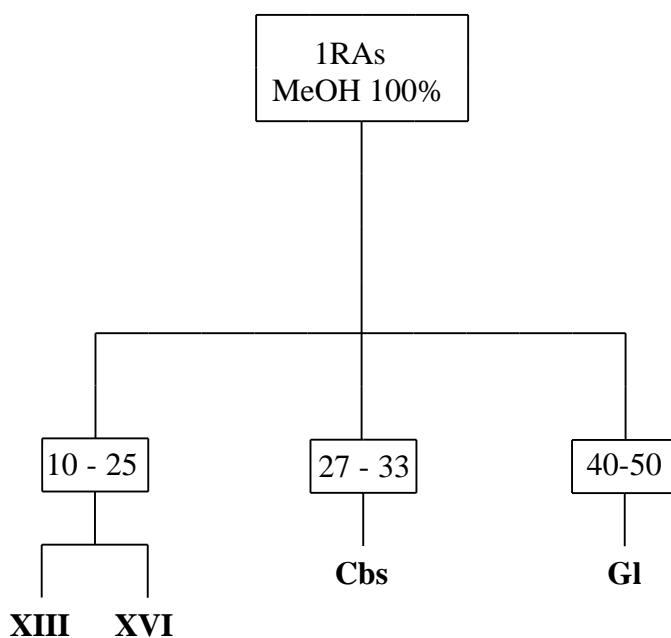


Esquema 8. Fracionamento de fr. Hex:AcOEt 8:2 das raízes de *A. sellowianum*.

As frações E (MeOH 100%) tanto das folhas, quanto das raízes foram analisadas por RMN de ^{13}C e apresentaram sinais característicos de açúcares e esteróides. Estas frações foram submetidas a novo fracionamento com CHCl_3 :AcOEt:MeOH (2:2:0,1), variando-se a porcentagem de MeOH e mantendo-se constante a proporção de CHCl_3 :AcOEt (1:1). Das raízes foram isoladas as substâncias **XIII**, **XVI**, **Cb** (mistura de cerebrosídeos) e **G1** (mistura de glicolipídeos), enquanto que das folhas, além de **XII** e **XVI**, foram obtidas as substâncias **XIV**, **XV**, **XVII**, **XVIII**, **1Cb**, **2Cb**, **3Cb**, **4Cb** (cerebrosídeos), **1G1**, **2G1** e **3G1** (glicolipídeos) (Esquemas 9 e 10).



Esquema 9. Fracionamento da fração E (MeOH 100%) das folhas de *A. sellowianum*.



Esquema 10. Fracionamento da fração E (MeOH 100%) das raízes de *A. sellowianum*.

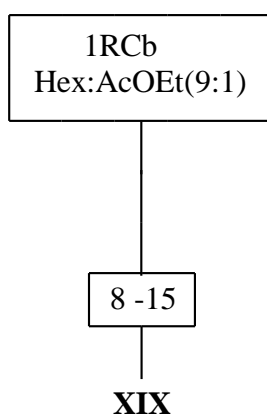
3.8.2 Fracionamento dos resíduos hexânicos do extrato etanólico das folhas e do rizoma de *Caladium bicolor*

O resíduo hexânico do extrato etanólico das folhas de *C. bicolor* foi submetido à CC sob pressão, usando sílica gel 60-200 μm como fase estacionária e o sistema de solventes hexano, hexano:AcOEt 9:1, hexano:AcOEt 8:2, clorofórmio:AcOEt 1:1 e metanol 100% como fase móvel. Este fracionamento gerou cinco frações de diferentes polaridades (frações A, B, C, D, E) que, em seguida foram analisadas por RMN.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração B (Hex:AcOEt 9:1) apresentou sinais característicos de triglicerídeos e de hexadecanoato de fitila. A análise da fração C (Hex:AcOEt 8:2) revelou a presença dos esteróides sitosterol (**III**) e estigmasterol (**IV**) e ainda das substâncias **VI** e **VII**.

Através dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração D (CHCl_3 :AcOEt 1:1), foi detectada a presença da substância **V**, enquanto que a análise de RMN da fração E (MeOH 100%), revelou a presença da substância **XIII** e das misturas de cerebrosídeos e glicolipídeos.

O mesmo processo de fracionamento descrito acima para as folhas, foi também realizado com o extrato hexânico do extrato etanólico do rizoma. A análise das subfrações obtidas revelou semelhança de composição química entre folhas e rizoma, diferindo apenas na fração B (Hex:AcOEt 9:1), cujo fracionamento conduziu ao isolamento da substância **XIX**, que não foi detectada nas folhas dessa mesma espécie.



Esquema 11. Fracionamento da fração B (Hex:AcOEt 8:2) do rizoma de *C. bicolor*.

3.8.3 Fracionamento dos resíduos hexânicos do extrato etanólico das folhas e do rizoma de *Xanthosoma maximilliani*

Os resíduos hexânicos provenientes do extrato etanólico tanto das folhas, quanto do rizoma de *X. maximilliani* foram submetidos a fracionamento cromatográfico seguindo a mesma metodologia descrita nas seções anteriores. Na fração C (Hex:AcOEt 8:2) das folhas foram detectadas as substâncias **I**, **III** e **IV**. Enquanto que no rizoma foi observada a presença das substâncias **XIX** (fração B – Hex:AcOEt 9:1), **III**, **IV**, **VI** e **VII** (fração C – Hex:AcOEt 8:2) e ainda do composto **V** (fração D - CHCl₃:AcOEt 1:1). Vale ressaltar que a substância **XIX** foi isolada/detectada somente no rizoma das espécies que o apresentam.