

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Picramnia ramiflora*  
(PICRAMNIACEAE)

**MARINA MEIRELLES PAES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO - 2012

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Picramnia ramiflora*  
(PICRAMNIACEAE)

**MARINA MEIRELLES PAES**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira  
Coorientadores: Prof. Dra. Maria Raquel Garcia Vega,  
Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO - 2012

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Picramnia ramiflora*  
(PICRAMNIACEAE)

**MARINA MEIRELLES PAES**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 2 de março de 2012

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Maria Raquel G. Vega (D. Sc. Química Orgânica) – UENF

---

Prof<sup>o</sup> Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D. Sc., Química Orgânica) – UENF

---

Prof<sup>a</sup> Cecília Silva Monnerat (D. Sc., Ciências Naturais) – IFF

---

Prof<sup>o</sup> Ivo José Curcino Vieira (D. Sc., Química Orgânica) – UENF  
(Orientador)

**FICHA CATALOGRÁFICA**Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 000/2012

Paes, Marina Meirelles

Constituintes químicos de *Picramnia ramiflora* (PICRAMNIACEAE) /  
Marina Meirelles Paes. – 2012.

120 f. : il.

Orientador: Ivo José Curcino.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 115 – 120.

1. Picramniaceae 2. *Picramnia ramiflora* 3. Antraquinona I.  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de  
Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 583.77

Dedico este trabalho à minha família, em especial meus pais Alba e Moacyr, e meus irmãos Bruno e Liana pelo apoio e incentivo;  
À VIDA, por me mostrar o quanto é importante o conhecimento, a amizade e a perseverança.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e sabedoria para vencer mais uma etapa da minha formação;

Ao professor orientador Ivo Curcino e aos professores coorientadores Maria Raquel e Raimundo Braz-Filho pela confiança, ensinamentos, dedicação e estímulo;

Ao professor Rodrigo Rodrigues por sua colaboração;

A UENF que possibilitou a realização deste trabalho;

Aos professores e funcionários do CCT e CCTA;

Aos meus grandes amigos da faculdade, os farmacêuticos Bruna e Matheus, que sempre me apoiaram neste seguimento;

Aos mestres do curso de farmácia da Faculdade de Medicina de Campos: Cristiane Crespo, Sílvia Menezes e Cecília Monnerat, que acreditaram e incentivaram os primeiros passos após minha formação;

Aos meus colegas de laboratório: Jéssica, Jucimar, Milena, Michelle, Amanda, Elaine, Moema, Hádria, Cecília, Wagner, Otoniel, Vinícius e Marcelo; Em especial às “Best friends” Lara, Helô e Virgínia. Aos companheiros: Diego, Fernanda e Adriana. A todos vocês, AGRADEÇO pelo companheirismo, grandes ensinamentos, conversas e boas risadas.

*“Tudo que é ruim de passar, é bom de contar”*

Ariano Suassuna

## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras</b>	x
<b>Lista de esquemas</b>	xiv
<b>Lista de tabelas</b>	xvi
<b>Lista de fluxogramas</b>	xviii
<b>Lista de gráficos</b>	xix
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b>	xx
<b>Resumo</b>	xxii
<b>Abstract</b>	xxiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	5
3.1 Simaroubaceae <i>versus</i> Picramniaceae	5
3.2 A Família Picramniaceae	6
3.3 O Gênero <i>Picramnia</i>	7
3.4 A espécie <i>Picramnia ramiflora</i>	17
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	18
4.1 Escolha da planta	18
4.2 Coleta da planta	18
4.3 Secagem e moagem	18



4.4	Preparação dos extratos	19
4.5	Análises cromatográficas	19
4.5.1	Separações por CCCAP	19
4.5.2	Separações por CLMP	20
4.6	Análises espectrométricas	20
<b>5.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>21</b>
5.1	A extração dos constituintes químicos do material botânico	21
5.2	Partição do extrato metanólico do caule	21
5.3	Partição do extrato metanólico das folhas	22
5.4	Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos	23
5.4.1	Análise das frações obtidas do extrato do caule de <i>Picramnia ramiflora</i>	23
5.4.1.1	Análise da fração em diclorometano (24,1 g) (PGD)	23
5.4.1.2	Análise da fração em acetato de etila (PGA)	29
5.4.1.2.1	Escolha do sistema de solvente	29
5.4.1.2.2	Procedimento CCCAE	30
5.4.2	Análise das frações obtidas do extrato das folhas de <i>Picramnia ramiflora</i>	31
5.4.2.1	Análise da fração em diclorometano (515,5 mg) (PFD)	31
5.4.2.2	Análise da fração em acetato de etila (495,2 mg) (PFA)	32
5.4.2.3	Análise do extrato metanólico (2,8 g) (PFMb)	32
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>34</b>
6.1	Substâncias identificadas de <i>Picramnia ramiflora</i>	34
6.1.1	Esteroides isolados	34
6.1.2	Antraquinonas isoladas	35
6.2	Determinação estrutural dos esteroides	36
6.2.1	Identificação da mistura das substâncias <b>3</b> , <b>63</b> , <b>78</b>	36
6.2.2	Identificação da mistura das substâncias <b>75</b> e <b>79</b>	48
6.3	Determinação estrutural das antraquinonas	55
6.3.1	Identificação da substância <b>5</b>	55
6.3.2	Identificação da substância <b>42</b>	69
6.3.3	Identificação da substância <b>74</b>	82
6.3.4	Identificação da substância <b>76</b>	90
6.3.5	Identificação da substância <b>77</b>	103
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>115</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Exemplos de quassinoides.	6
<b>Figura 2:</b> Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Picramnia</i> .	12
<b>Figura 3:</b> Quantificação do perfil químico dos metabólitos secundários isolados do gênero <i>Picramnia</i> .	15
<b>Figura 4:</b> Sumário da diversidade de esqueletos básicos de antraquinonas e abundância relativa.	16
<b>Figura 5:</b> Fracionamento do extrato de folhas.	22
<b>Figura 6:</b> Cromatograma da mistura de esteroides <b>3</b> , <b>63</b> e <b>78</b> .	39
<b>Figura 7:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do esteroide <b>3</b> .	41
<b>Figura 8:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 7,5 a 3,5 do esteroide <b>3</b> .	42
<b>Figura 9:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 1,4 a 0,7 do esteroide <b>3</b> .	43
<b>Figura 10:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do esteroide <b>3</b> .	44
<b>Figura 11:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 57 a 30 do esteroide <b>3</b> .	45
<b>Figura 12:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 57 a 10 do esteroide <b>3</b> .	46

<b>Figura 13:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 34 a 11 do esteroide <b>3</b> .	47
<b>Figura 14:</b> Cromatograma da mistura de esteroides <b>75</b> e <b>79</b> .	50
<b>Figura 15:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do esteroide <b>75</b> .	52
<b>Figura 16:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do esteroide <b>75</b> .	53
<b>Figura 17:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 60 a 10 do esteroide <b>75</b> .	54
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da antraquinona <b>5</b> .	59
<b>Figura 19:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 12,5 a 6,5 da antraquinona <b>5</b> .	60
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da antraquinona <b>5</b> .	61
<b>Figura 21:</b> Mapa de correlação heteronuclear HSQC em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> da antraquinona <b>5</b> .	62
<b>Figura 22:</b> Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> da antraquinona <b>5</b> .	63
<b>Figura 23:</b> Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> da antraquinona <b>5</b> .	64
<b>Figura 24:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> da antraquinona <b>5</b> .	65
<b>Figura 25:</b> Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> da antraquinona <b>5</b> .	66
<b>Figura 26:</b> Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> da antraquinona <b>5</b> .	67
<b>Figura 27:</b> Espectro de massas da antraquinona <b>5</b> .	68
<b>Figura 28:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da antraquinona <b>42</b> .	72
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 7,70 a 6,65 da antraquinona <b>42</b> .	73
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da antraquinona <b>42</b> .	74
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 190 a 100 da antraquinona <b>42</b> .	75
<b>Figura 32:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl <sub>3</sub> da	76

antraquinona <b>42</b> .	
<b>Figura 33:</b> Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>42</b> .	77
<b>Figura 34:</b> Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>42</b> .	78
<b>Figura 35:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>42</b> .	79
<b>Figura 36:</b> Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>42</b> .	80
<b>Figura 37:</b> Espectro de massas da antraquinona <b>42</b> .	81
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da antraquinona <b>74</b> .	85
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) com ampliação da região $\delta_H$ 8,2 a 7,0 da antraquinona <b>74</b> .	86
<b>Figura 40:</b> Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>74</b> .	87
<b>Figura 41:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>74</b> .	88
<b>Figura 42:</b> Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl <sub>3</sub> da antraquinona <b>74</b> .	89
<b>Figura 43:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOH) da antraquinona <b>76</b> .	94
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOH) com ampliação da região $\delta_H$ 8,0 a 6,5 da antraquinona <b>76</b> .	95
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, MeOH) da antraquinona <b>76</b> .	96
<b>Figura 46:</b> Mapa de correlação heteronuclear HSQC em MeOD da antraquinona <b>76</b> .	97
<b>Figura 47:</b> Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em MeOD da antraquinona <b>76</b> .	98
<b>Figura 48:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona <b>76</b> .	99
<b>Figura 49:</b> Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona <b>76</b> .	100
<b>Figura 50:</b> Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona <b>76</b> .	101

- Figura 51:** Espectro de massas da antraquinona **76**. 102
- Figura 52:** Efeito mesomérico retirador de elétrons exercido pelo grupo sulfato em substância flavonoídica. 104
- Figura 53:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) da antraquinona **77**. 107
- Figura 54:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) com ampliação da região  $\delta_H$  8,5 a 6,5 da antraquinona **77**. 108
- Figura 55:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, MeOH) da antraquinona **77**. 109
- Figura 56:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, MeOD) com ampliação da região  $\delta_C$  190 a 100 da antraquinona **77**. 110
- Figura 57:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC em MeOD da antraquinona **77**. 111
- Figura 58:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona **77**. 112
- Figura 59:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona **77**. 113

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da $\beta$ -sitosterol ( <b>3</b> ); Tempo de retenção 32,4 (28,8 %).	39
<b>Esquema 2:</b> Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campesterol ( <b>78</b> ); Tempo de retenção 29,9 (23,0%).	40
<b>Esquema 3:</b> Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do estigmasterol ( <b>63</b> ); Tempo de retenção 30,3 (2,6%).	40
<b>Esquema 4:</b> Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas da sitostenona ( <b>75</b> ); Tempo de retenção 36,1 (76,2 %).	50
<b>Esquema 5:</b> Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campestenona ( <b>79</b> ); Tempo de retenção 32,8 (22,6%).	51
<b>Esquema 6:</b> Proposta mecanística para os principais fragmentos apresentados no espectro de massas de baixa resolução (70 eV) para a antraquinona ( <b>5</b> ).	57

**Esquema 7:** Proposta mecanística para os principais fragmentos apresentados no espectro de massas de baixa resolução (70 eV) para a antraquinona (**76**). 92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diversidade química de espécies do gênero <i>Picramnia</i> (1912-2010).	8
<b>Tabela 2:</b> Quantidades dos extratos brutos obtidos.	21
<b>Tabela 3:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD.	24
<b>Tabela 4:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD2.	24
<b>Tabela 5:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD2.8.	25
<b>Tabela 6:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD2.8.8.	26
<b>Tabela 7:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD2.8.8.5.	26
<b>Tabela 8:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD2.14.	27
<b>Tabela 9:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD3.	28
<b>Tabela 10:</b> Estudo cromatográfico da fração PGD3.2.	28
<b>Tabela 11:</b> Estudo cromatográfico da fração PFD.	32
<b>Tabela 12:</b> Estudo cromatográfico da fração PFA.	32
<b>Tabela 13:</b> Estudo cromatográfico da fração PFMb.	33
<b>Tabela 14:</b> Estudo cromatográfico da fração PFMb4.	33
<b>Tabela 15:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz) do esteroide <b>3</b> e as	38



comparações com valores da literatura para a substâncias  $\beta$ -sitosterol, em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão em ppm.

**Tabela 16:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) do esteroide **75** e as comparações com valores da literatura para a substância sitostenona, em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão em ppm. 49

**Tabela 17:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HSQC e HMBC da antraquinona (**5**), em acetona- $d_6$ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento ( $J$  entre parêntesis) estão em Hz. 58

**Tabela 18:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HMQC e HMBC da antraquinona (**42**), em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento ( $J$  entre parêntesis) estão em Hz. 71

**Tabela 19:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HSQC e HMBC da antraquinona (**74**), em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento ( $J$  entre parêntesis) estão em Hz. 84

**Tabela 20:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HSQC e HMBC da antraquinona (**76**), em MeOD. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento ( $J$  entre parêntesis) estão em Hz. 93

**Tabela 21:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (125 MHz) observados nos mapas de correlação heteronucleares HMQC e HMBC da antraquinona (**77**), em MeOD. Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$  entre parêntesis) estão em Hz. 106

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1:</b> Partição do extrato metanólico do caule.	22
<b>Fluxograma 2:</b> Análise cromatográfica da fração PGD.	23
<b>Fluxograma 3:</b> Análise cromatográfica das frações do extrato de folhas.	31

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Distribuição de antraquinonas nas espécies de <i>Picramnia</i> .	16
<b>Gráfico 2:</b> Cromatograma.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AcOEt Acetato de etila
- APT Attached Proton Test
- CC Cromatografia em Coluna
- CCC Cromatografia Contracorrente
- CCCAE Cromatografia Contracorrente de Alta Eficiência
- CCDP Cromatografia em Camada Delgada em escala Preparativa
- $\text{CDCl}_3$  Clorofórmio deuterado
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  Diclorometano
- CLMP Cromatografia Líquida a Média Pressão
- COSY Correlation Spectroscopy
- $\delta$  Deslocamento químico em parte por milhão
- d Dupleto
- DEPTQ Distortionless Enhancement by Polarization Transfer including the detection of quaternary nuclei
- EM Espectro de Massa
- g grama
- Hex Hexano
- HMBC Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
- HMQC Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence  
Hz Hertz  
IV Infravermelho  
*J* Constante de acoplamento medida em Hertz  
m Multipleteo  
mg miligrama  
MeOD metanol deuterado  
MeOH Metanol  
MHz Megahertz  
MS Mass Spectrometry  
*m/z* Relação massa/carga  
RMN <sup>1</sup>H Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio  
RMN <sup>13</sup>C Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13  
s Simpleto  
sl Simpleto largo  
t Tripleto

## RESUMO

PAES, Marina Meirelles. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2012. Constituintes Químicos de *Picramnia ramiflora* (PICRAMNIACEAE). Prof. orientador: Ivo José Curcino Vieira. Prof. coorientadores: Profa. Maria Raquel Garcia Vega e Prof. Raimundo Braz-Filho.

A família Picramniaceae, constituída dos gêneros *Picramnia* Sw. e *Alvaradoa* Liebm, gêneros estes anteriormente pertencentes à família Simaroubaceae, foi criada em 1995, após vários dados botânicos e químicos divergentes da família Simaroubaceae. A espécie estudada foi *Picramnia ramiflora*, endêmica do Brasil, com distribuição geográfica em todo território nacional. Estudos anteriores de *Picramnia ramiflora* mostram a ocorrência de antraquinonas, triterpenos e esteroides. O presente estudo descreve o isolamento e purificação de 10 substâncias bioproduzidas por esta espécie. Foram identificados cinco esteróides, sitosterol (**3**), estigmasterol (**63**) e campesterol (**78**), sitostenona (**75**) e campestetona (**79**), cinco antraquinonas, emodina (**5**), paristina (**42**), 1,5 dihidroxi-3-metil-antraquinona (**74**), hidroxiemodina (**76**) e uma nova antraquinona sulfatada (**77**). O isolamento destas substâncias foi realizado através de técnicas clássicas de cromatografia, além do uso da cromatografia contracorrente de alta eficiência.

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi feita com base nos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimentos bidimensionais ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC e HMBC), espectrometria de massas e comparação com dados de literatura. Os dados químicos obtidos neste trabalho fornecem ferramentas necessárias para a confirmação do novo posicionamento taxonômico deste gênero na nova família Picramniaceae.

## ABSTRACT

PAES, Marina Meirelles. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2012. Chemical Constituents from *Picramnia ramiflora* (PICRAMNIACEAE). Prof. Advisors: Ivo Jose Curcino Vieira, Prof. Co-advisors: Profa. Maria Raquel Garcia Vega and Prof. Raimundo Braz-Filho.

Picramniaceae family, consisting of the genera *Alvaradoa* Liebm. and *Picramnia* Sw., these genera previously owned the Simaroubaceae family, was established in 1995, after several botanical data and chemical divergent Simaroubaceae family. The species has been studied *Picramnia ramiflora*, endemic to Brazil, geographic distribution throughout the country. Previous studies of *Picramnia ramiflora* show the occurrence of anthraquinones, triterpenes and steroids. The present study describes the isolation and purification of 10 substances bioproduced by this species. Identified five steroids, sitosterol (**3**), stigmasterol (**63**), campesterol (**78**), sitostenone (**75**) and campestenone (**79**), five anthraquinones, emodin (**5**), paristin (**42**), 1,5-hydroxy-3-methylanthraquinone (**74**), hydroxyemodin (**76**) and a new sulfated anthraquinone (**77**). The isolation of these compounds was performed by classical techniques of chromatography and



the use of high-speed counter-current chromatography (HSCCC). Structure determination of isolated compounds was based on spectroscopic data of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, including bidimensional ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC and HMBC), mass spectrometry and comparison with literature data. The chemical data obtained in this work provide tools necessary for confirmation of the new taxonomic position of this genus in the new family Picramniaceae.

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade descreve a riqueza e a variedade do mundo natural, desde a morfologia à genética em um determinado espaço territorial. O Brasil, considerado pelo Fundo Mundial para Natureza como detentor de megabiodiversidade, possui o maior número de espécies vegetais catalogadas no planeta, com mais de 55 mil espécies de plantas superiores. Sendo, a maior parte da flora brasileira encontrada na Mata Atlântica e na floresta amazônica. A cada ano, cientistas adicionam dezenas de novas espécies a essa lista (Wilson, 1997).

Com essa enorme variedade de espécies vegetais e a inimaginável riqueza de substâncias orgânicas praticamente desconhecidas, a química de produtos naturais explora o repertório químico oferecido pela natureza, catalogando as substâncias bioproduzidas.

Uma abordagem preliminar no estudo de produtos naturais é a sistemática vegetal, que por muito tempo baseou-se em classificar as plantas com base em suas características morfológicas (principalmente externas) e reprodutivas (Pirani et al., 2000). Entretanto, ao longo do tempo, foram surgindo outros sistemas de classificação que consistiam em reunir por conjunto de unidades taxonômicas. Por exemplo, Karl Von Linné, conhecido como Lineu, propôs o primeiro sistema de classificação das espécies vegetais baseado na

morfologia dos vegetais, além de adotar a nomenclatura binomial em latim para identificar as espécies de modo válido em todo o mundo, atribuindo-lhes um primeiro nome, correspondente ao gênero, e um segundo, indicando a espécie (Souza e Lorenzi, 2005).

Outro sistema de classificação usa as características químicas do metabolismo secundário das espécies vegetais como a sistemática. Trata-se da quimiosistemática, que se tem mostrado como um método eficiente e coerente em relação a outros sistemas de classificação. O paralelismo encontrado entre os resultados quimiosistemáticos e a classificação morfológica é explicado pelo fato de que ambos lidam com caracteres filogenéticos. Como é esperado de plantas genotipicamente relacionadas, espécies de um mesmo grupo genético deverão produzir metabólitos estruturalmente análogos porque uma espécie não é formada por indivíduos geneticamente definíveis com precisão, mas inclui quase espécies geneticamente maleáveis de acordo com a evolução molecular (Gottlieb et al., 1996; Rodrigues Filho, 1989).

Assim, substâncias resultantes do metabolismo das plantas podem ser separadas em produtos do metabolismo primário e secundário. As substâncias envolvidas no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos glicídios, aminoácidos e lipídios. Em contrapartida, os metabólitos secundários ou micromoléculas, são substâncias que agem como mediadoras de interações entre planta e biota relacionada e, apresentam grande variabilidade estrutural e, que são utilizados em estudos da quimiosistemática. Alguns exemplos clássicos são os alcaloides, antraquinonas, flavonoides, terpenos, etc.

Devido ao arsenal químico de metabólitos secundários ter mostrado grande importância na investigação do posicionamento de grupos taxonômicos já determinados através dos dados fitoquímicos e, da importância destas substâncias no melhoramento da qualidade de vida do homem através dos produtos naturais ou seus derivados como fármacos, inseticidas, alimentos, fragrâncias e etc., fica clara a relevância de pesquisas visando o mapeamento dos metabólitos especiais vegetais.

Assim, este trabalho tem como objetivo contribuir para o estudo quimiosistemático da família Picramniaceae, desmembrada da família Simaroubaceae, baseado nos indícios quimiosistemáticos, obtidos com os

estudos químicos dos gêneros *Picramnia* e *Alvaradoa*. Esta contribuição far-se-á com estudo fitoquímico da espécie *Picramnia ramiflora*.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GERAIS

O trabalho proposto tem por objetivo contribuir para o conhecimento da química do gênero *Picramnia*, através do estudo da espécie *Picramnia ramiflora*, fornecendo desta maneira dados químicos para uma maior compreensão da quimiotaxonomia deste gênero.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aprendizado de técnicas de extração e isolamento de substâncias orgânicas, tais como: cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada preparativa e analítica para purificação de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de espécies vegetais.

Aprendizado de técnicas espectroscópicas, tais como, infravermelho, ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Simaroubaceae versus Picramniaceae

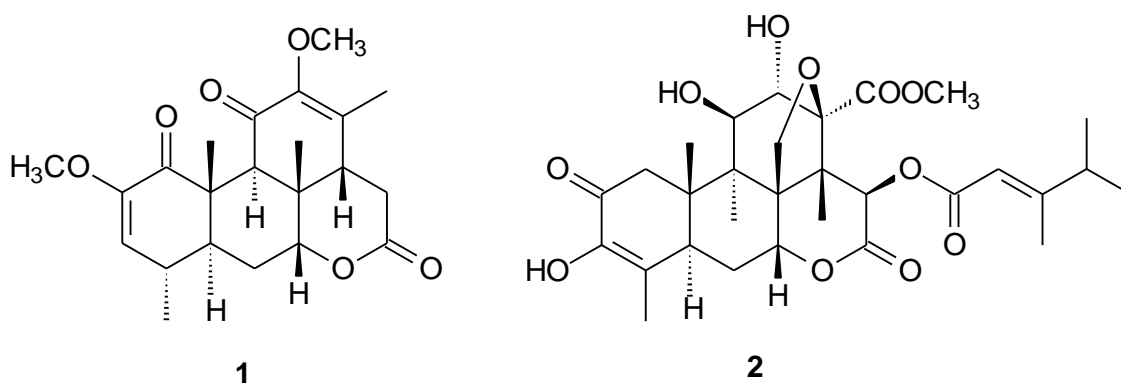
A família Simaroubaceae, concentrada nas Américas e África Oriental é composta por 200 espécies, distribuídas em aproximadamente 33 gêneros (Biaggio, 1988).

Muitas espécies dessa família são conhecidas por conter substâncias amargas, denominadas "quassina" (1) (**Figura 1, pág. 6**), nome este emprestado a toda classe de substâncias estruturalmente relacionadas, denominadas de quassinoides, considerados marcadores taxonômicos desta família. Ensaio biológicos com quassinoides revelaram uma acentuada atividade antileucêmica, o que permitiu o uso do quassinóide bruceantina (2) (**Figura 1, pág. 6**) na quimioterapia da leucemia. Esse fato incentivou inúmeras pesquisas nas áreas de química e farmacologia com plantas da família Simaroubaceae, levando à descoberta de vários outros quassinoides bioativos, contribuindo para a ampliação do conhecimento dessas substâncias e, conseqüentemente, da química de produtos naturais (Almeida et al., 2007).

Estudos comparativos da anatomia da madeira e pericarpo, morfologia do pólen e fitoquímico forneceram evidências heterogêneas do gênero *Picramnia*,

pertencente à família Simaroubaceae, e à subfamília Picramnioideae (Fernando e Quinn, 1995).

Baseado em dados quimiotaxonômicos da família Simaroubaceae, a qual é caracterizada pela bioprodução de quassinoides e alcaloides cantinônicos, a presença ou ausência destas classes de substâncias levou a dois gêneros a ser excluídos da família, sendo este um importante parâmetro de classificação taxonômica de Simaroubaceae. Como exemplo, o gênero *Picramnia* foi excluído das Simaroubaceae em 1995, e incluído em uma nova família chamada Picramniaceae, após estudos fitoquímicos (Almeida et al., 2007).



**Figura 1:** Exemplos de quassinoides.

### 3.2 A Família Picramniaceae

A família Picramniaceae está taxonomicamente classificada, segundo Fernando & Quinn (1995) no Reino Plantae, Classe Equisetopsida, Subclasse Magnoliidae, Ordem Picramniales (Tropicos, 2011). Apresenta aproximadamente 96 espécies, se constitui somente dos gêneros *Picramnia* Sw. e *Alvaradoa* Liebm., e foi consagrada após estudos fitoquímicos. *Picramnia* e *Alvaradoa* constituíam anteriormente as subfamílias Picramnioideae e Alvaradoideae, respectivamente, na família Simaroubaceae (Fernando e Quinn, 1995).

Geralmente, espécies da família Picramniaceae são árvores ou arbustos pequenos. O número de folhetos varia de mais ou menos 33 em *Picramnia*, e mais de 50 em *Alvaradoa* (Kubitzki, 2007).

A base de dados de compostos secundários da família Picramniaceae ainda é reduzida. Mas, a química dos dois gêneros é bastante similar e alguns

aspectos são únicos na família. Isto confirma as conclusões da análise dos dados do DNA que não suportaram as delimitações originais (as subfamílias Picramniodeae e Alvaradoideae) (Jacobs, 2003).

Um estudo feito por Jacobs (2003) mostra que espécies de *Picramnia* e *Alvaradoa* têm a presença de ácidos graxos com 18 átomos de carbono e destes, o ácido 6-octadecenoico é o mais abundante. Substâncias como antraquinonas e antracenos C-glicosiladas, também são comuns em ambos os gêneros.

### 3.3 O Gênero *Picramnia*

Como já foi descrito anteriormente, o gênero *Picramnia* pertencente à família Picramniaceae contém aproximadamente 89 espécies presentes na América tropical (Jacobs, 2003). No Brasil foram registradas 22 espécies (Pirani, 2010).

É importante ressaltar a existência de relatos do emprego de *Picramnia* na medicina popular no combate à febre (*Picramnia pentandra*) (Herz et al., 1972), como laxante, purgativo, emético e abortivo (*Picramnia parvifolia*) (Popinigis et al., 1980).

Na **Tabela 1 (pág. 8)** encontram-se sumarizados os constituintes químicos de dezesseis espécies de *Picramnia* já estudadas até 2011, onde são encontrados 13 triterpenos, 32 antraquinonas, 5 esteroides, 8 ácidos graxos e 7 cumarinas. Além da compilação de dados sobre atividades biológicas encontradas para extratos e/ou substâncias de espécies deste gênero. Na **Figura 2 (pág. 12)** encontram-se as estruturas citadas nesta tabela.



**Tabela 1:** Diversidade química de espécies do gênero *Picramnia* (1912-2010).

<b>Espécie</b>	<b>Órgão vegetal</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Bioatividade</b>	<b>Referências</b>
<i>P. antidesma</i>	Folhas Raízes Caule	$\beta$ -sitosterol (3) <sup>1,2</sup>	Antiprotozoária <sup>4</sup>	<sup>1</sup> Hernández-Mendel et al., 1998. <sup>2</sup> Hernández-Mendel et al., 1999 <sup>3</sup> Solis et al., 1995. <sup>4</sup> Camacho et al., 2003.
		crisofanol (4) <sup>1,2</sup>		
		emodina (5) <sup>1</sup>		
		7-hidroxicumarina (6) <sup>1,2</sup>		
		uveosídeo (7) <sup>1</sup>		
		aloe-emodina (8) <sup>2,3</sup>		
		$\beta$ -sitosterol glucosídeo (9) <sup>2</sup>		
		mayosídeo (10) <sup>2</sup>		
		sarosídeo (11) <sup>2</sup>		
		aloe-emodina antrona (12) <sup>3</sup>		
		picramniosídeo A (13) <sup>3</sup>		
		picramniosídeo B (14) <sup>3</sup>		
picramniosídeo C (15) <sup>3</sup>				
<i>P. bahiense</i>	Folhas Caule Frutos	$\beta$ -sitosterol (3) <sup>5</sup>		<sup>5</sup> Rodrigues Filho, 1989.
		ácido 3- <i>epi</i> -betulínico (16) <sup>5</sup>		
		crisofanol (4) <sup>5</sup>		
		aloe-emodina (8) <sup>5</sup>		
		ácido betulínico (17) <sup>5</sup>		
		antraquinona (18) <sup>5</sup>		
		ácido 3-hidroxi-4-metóxi-cinâmico (19) <sup>5</sup>		
		7-hidroxicumarina (6) <sup>5</sup>		
7-metóxicumarina (20) <sup>5</sup>				
<i>bis</i> -fenilpropanóide (21) <sup>5</sup>				
<i>P. excelsa</i>	Folhas Caule	<i>epi</i> -betulinato de eicosila (22) <sup>6</sup>		<sup>6</sup> Biaggio, 1988.
		ácido <i>epi</i> -betulínico (16) <sup>6</sup>		
		2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracos-2,7,10,14,18,22-hexaen-6-ol (23) <sup>6</sup>		
		estigmast-8(14)en-3-ol (24) <sup>6</sup>		
		$\beta$ -sitosterol (3) <sup>6</sup>		
<i>P. glazioviana</i>	Caule Casca do caule Folhas	$\beta$ -sitosterol (3) <sup>7</sup>		<sup>7</sup> Vieira, 1995.
		estigmasterol (63) <sup>7</sup>		
		7-hidroxicumarina (6) <sup>7</sup>		
		7-hidroxi-6-metóxicumarina (35) <sup>7</sup>		
		aloe-emodina (8) <sup>7</sup>		
		crisofanol (4) <sup>7</sup>		
		pulmatina (34) <sup>7</sup>		
		crisofaneína (32) <sup>7</sup>		
		7-hidroxi-6,8-dimetóxicumarina (65) <sup>7</sup>		
		aldeído ferrúlico (66) <sup>7</sup>		
		6,7-dimetóxicumarina (67) <sup>7</sup>		

		7-hidroxi-8-metóxicumarina ( <b>68</b> ) <sup>7</sup>		
		6,7,8-trimetóxicumarina ( <b>69</b> ) <sup>7</sup>		
		álcool-4-hidroxi-3,5-dimetóxi- $\alpha,\beta$ -diidro- $\alpha$ -oxo-cinâmílico ( <b>70</b> ) <sup>7</sup>		
<i>P. hirsuta</i>	Raíces	$\beta$ - sitosterol ( <b>3</b> ) <sup>8</sup>		<sup>8</sup> Hernández – Mendel et al., 1996.
		crisofanol ( <b>4</b> ) <sup>8</sup>		
		emodina ( <b>5</b> ) <sup>8</sup>		
		7- hidroxycumarina ( <b>6</b> ) <sup>8</sup>		
		mayosideo ( <b>10</b> ) <sup>8</sup>		
<i>P. latifolia</i>	Raíces	picramniosideo G ( <b>25</b> ) <sup>9</sup>		<sup>9</sup> Diaz et al., 2004.
		picramniosideo H ( <b>26</b> ) <sup>9</sup>		
		mayosideo D ( <b>27</b> ) <sup>9</sup>		
		mayosideo E ( <b>28</b> ) <sup>9</sup>		
		6,8-dihidroxi-10-metil-7H-benz[de]antracén-7-ona ( <b>29</b> ) <sup>9</sup>		
		6,8-dihidroxi-4-metil-7H-benz[de]antracén-7-ona ( <b>30</b> ) <sup>9</sup>		
		nataloe-emodina ( <b>31</b> ) <sup>9</sup>		
		crisofaneína ( <b>32</b> ) <sup>9</sup>		
		crisofanol ( <b>4</b> ) <sup>9</sup>		
		1,5 dihidroxi-7metóxi-3-metilantraquinona ( <b>33</b> ) <sup>9</sup>		
		pulmatina ( <b>34</b> ) <sup>9</sup>		
		7-hidroxycumarina ( <b>6</b> ) <sup>9</sup>		
		7-hidroxi-6 metóxicumarina ( <b>35</b> ) <sup>9</sup>		
		$\beta$ - sitosterol ( <b>3</b> ) <sup>9</sup>		
$\beta$ - sitosterol glucosídeo ( <b>9</b> ) <sup>9</sup>				
<i>P. lindeniana</i>		ácido palmítico ( <b>36</b> ) <sup>10</sup>		<sup>10</sup> Grimme, 1912.
		ácido esteárico ( <b>37</b> ) <sup>10</sup>		
		ácido mirístico ( <b>38</b> ) <sup>10</sup>		
		ácido tarírico ( <b>39</b> ) <sup>10</sup>		
		ácido oléico ( <b>40</b> ) <sup>10</sup>		
		ácido linolênico ( <b>41</b> ) <sup>10</sup>		
		$\beta$ - sitosterol ( <b>3</b> ) <sup>10</sup>		
<i>P. macrostachys</i>		crisofanol ( <b>4</b> ) <sup>11</sup>		<sup>11</sup> Avana et al., 1986.
		paristina ( <b>42</b> ) <sup>11</sup>		
<i>P. monochlamydea</i>		ácido 3-epi-betulínico ( <b>16</b> ) <sup>5</sup>		<sup>5</sup> Rodrigues Filho, 1989.
		$\beta$ - sitosterol ( <b>3</b> ) <sup>5</sup>		
		crisofanol ( <b>4</b> ) <sup>5</sup>		
		aloe-emodina ( <b>8</b> ) <sup>5</sup>		
		crisofanol ( <b>4</b> ) <sup>12</sup>		
		emodina ( <b>5</b> ) <sup>12</sup>		

<i>P. parvifolia</i>	Folhas Caule Casca	aloe-emodina (8) <sup>12</sup>		<sup>12</sup> Popinigis et al., 1980. <sup>6</sup> Biaggio, 1988.
		paristina (42) <sup>12</sup>		
		reína (43) <sup>12</sup>		
		$\beta$ -Sitosterol (3) <sup>6,12</sup>		
<i>P. pentandra</i>		ácido 3- <i>epi</i> -betulínico (16) <sup>13</sup>		<sup>13</sup> Herz et al., 1972.
		crisofanol (4) <sup>13</sup>		
		ácido tarírico (39) <sup>13</sup>		
<i>P. polyantha</i>	Frutos	$\beta$ - sitosterol (3) <sup>14</sup>		<sup>14</sup> Hernández-Mendel et al., 2009.
		ácido tarírico(39) <sup>14</sup>		
		ácido mirístico(38) <sup>14</sup>		
		ácido palmítico(36) <sup>14</sup>		
		ácido esteárico(37) <sup>14</sup>		
		ácido palmitoléico(73) <sup>14</sup>		
		aloe-emodina (8) <sup>14</sup>		
ácido petroselínico(72) <sup>14</sup>				
<i>P. riedeli</i>	Folhas Caule	$\beta$ - sitosterol (3) <sup>5</sup>		<sup>5</sup> Rodrigues Filho, 1989.
		crisofanol (4) <sup>5</sup>		
		aloe-emodina (8) <sup>5</sup>		
		ácido betulínico (17) <sup>5</sup>		
		antraquinona (44) <sup>5</sup>		
<i>P. sellowii</i>	Folhas Parte aérea Casca	nataloe-emodina (31) <sup>15</sup>		<sup>15</sup> Aponte et al., 2008. <sup>16</sup> Balderrama et al., 2001. <sup>17</sup> Cam, 1975.
		crisofanol (4) <sup>15,16</sup>		
		$\beta$ - sitosterol (3) <sup>16</sup>		
		colesterol (45) <sup>16</sup>		
		picramniosideo A (13) <sup>16</sup>		
		picramniosideo C (15) <sup>16</sup>		
		ácido oleanóico 28-O- $\beta$ -D- glucopiranosila éster (46) <sup>16</sup>		
		ácido pomólico 28-O- $\beta$ -D-glucopiranosil éster (47) <sup>16</sup>		
		ácido equinocístico (48) <sup>16</sup>		
		ácido pomólico (49) <sup>16</sup>		
		ácido ursólico (50) <sup>16</sup>		
		ácido oleanóico (51) <sup>16</sup>		
emodina (5) <sup>17</sup>				

		paristina <b>(42)</b> <sup>17</sup>		
		ácido benzóico <b>(52)</b> <sup>17</sup>		
		ácido 3- <i>epi</i> -betulínico <b>(16)</b> <sup>16</sup>		
<i>P. sow</i>	Sementes	ácido tarírico <b>(39)</b> <sup>18</sup>		<sup>18</sup> Steger, 1933.
<i>P. teapensis</i>	Cascas do Caule	picramniosideo D <b>(53)</b> <sup>19</sup>	Antifúngico <sup>20</sup>	<sup>19</sup> Rodríguez-Gamboa et al., 1999. <sup>20</sup> Rodríguez-Gamboa et al., 2000. <sup>21</sup> Rodríguez-Gamboa et al., 2001.
		picramniosideo E <b>(54)</b> <sup>19</sup>		
		mayosideo B <b>(55)</b> <sup>19</sup>		
		oxantrona <b>(71)</b> <sup>19</sup>		
		picramniosideo F <b>(56)</b> <sup>20</sup>		
		mayosideo C <b>(57)</b> <sup>20</sup>		
		1-O-β-D-glucopiranosilemodina <b>(58)</b> <sup>20</sup>		
		8-O-β-D-glucopiranosilemodina <b>(59)</b> <sup>20</sup>		
		3α,7β-dibenzoato do ácido lup-20(29)-en-28-óico <b>(60)</b> <sup>21</sup>		
		7β-benzoato do ácido 3α-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico <b>(61)</b> <sup>21</sup>		
		lupeol <b>(62)</b> <sup>21</sup>		
		β-sitosterol <b>(3)</b> <sup>21</sup>		
		estigmasterol <b>(63)</b> <sup>21</sup>		
<i>epi</i> -lupeol <b>(64)</b> <sup>21</sup>				

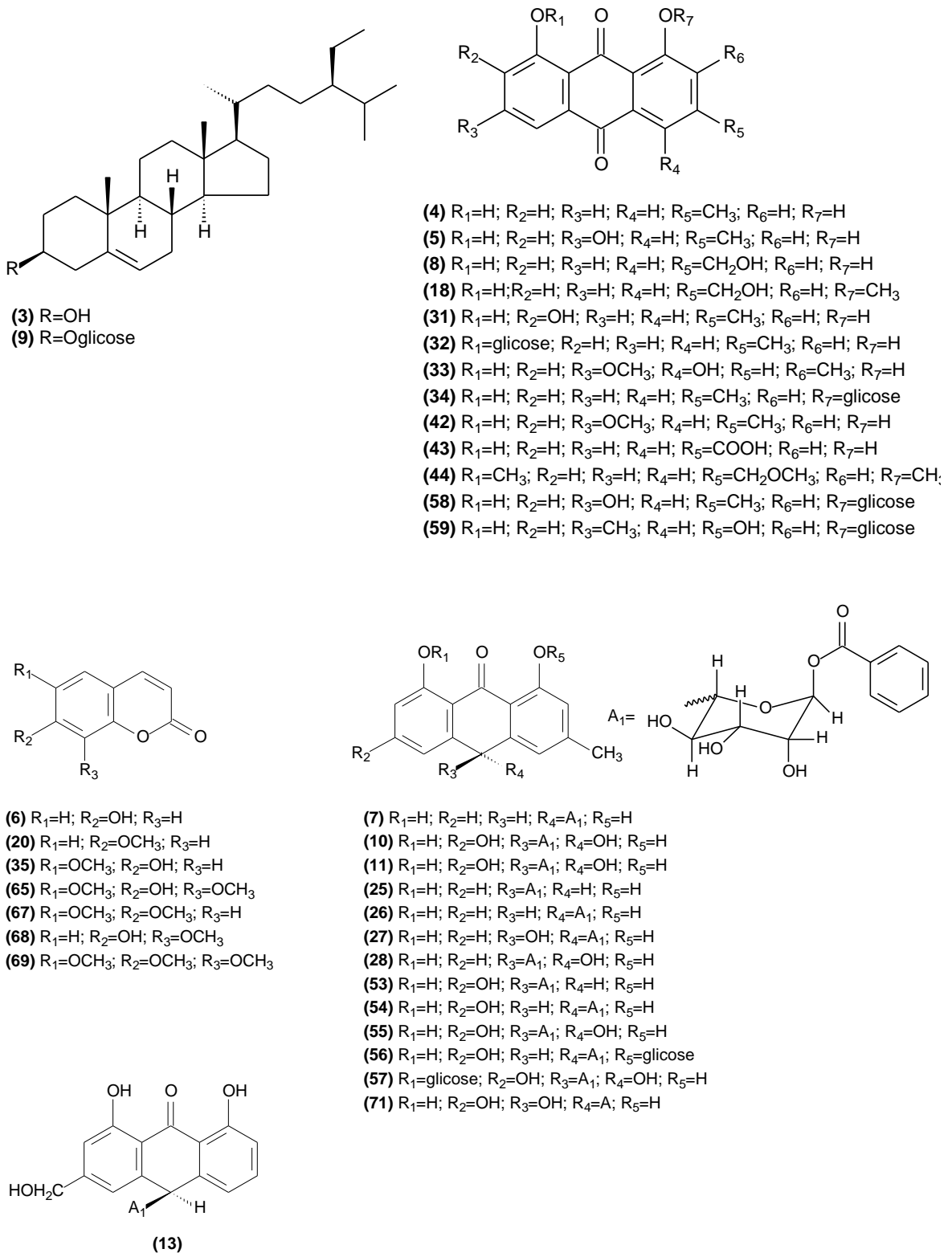
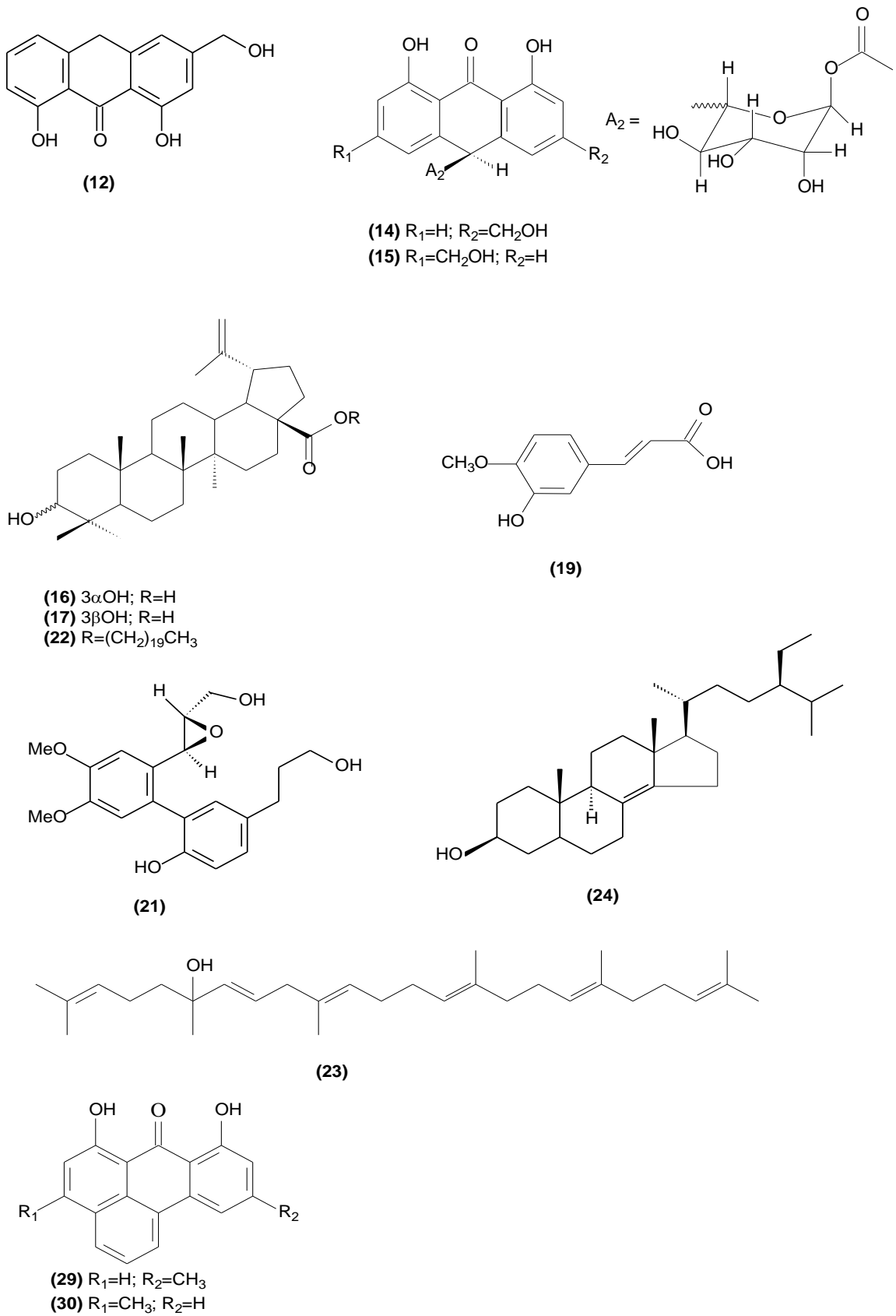
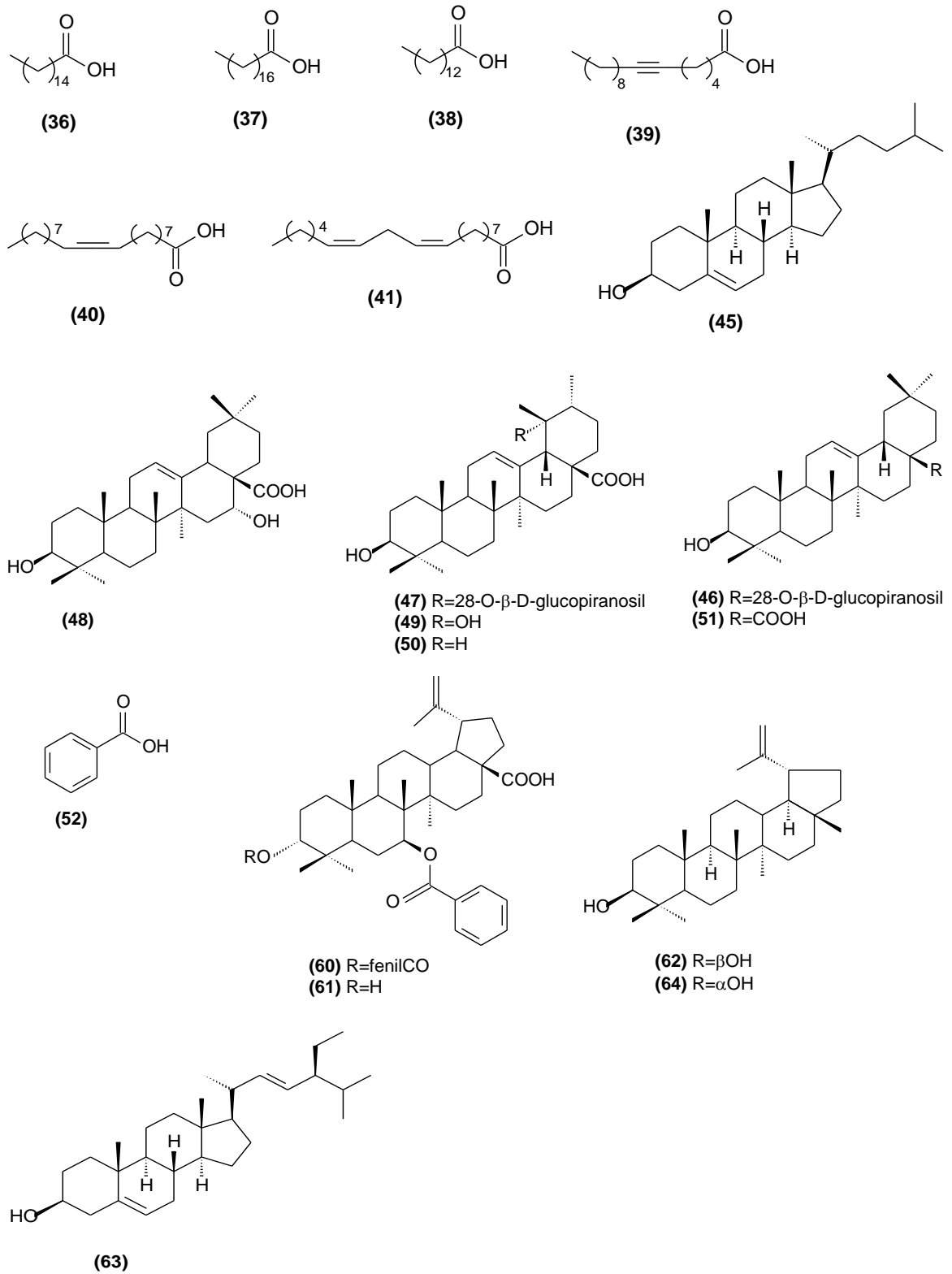


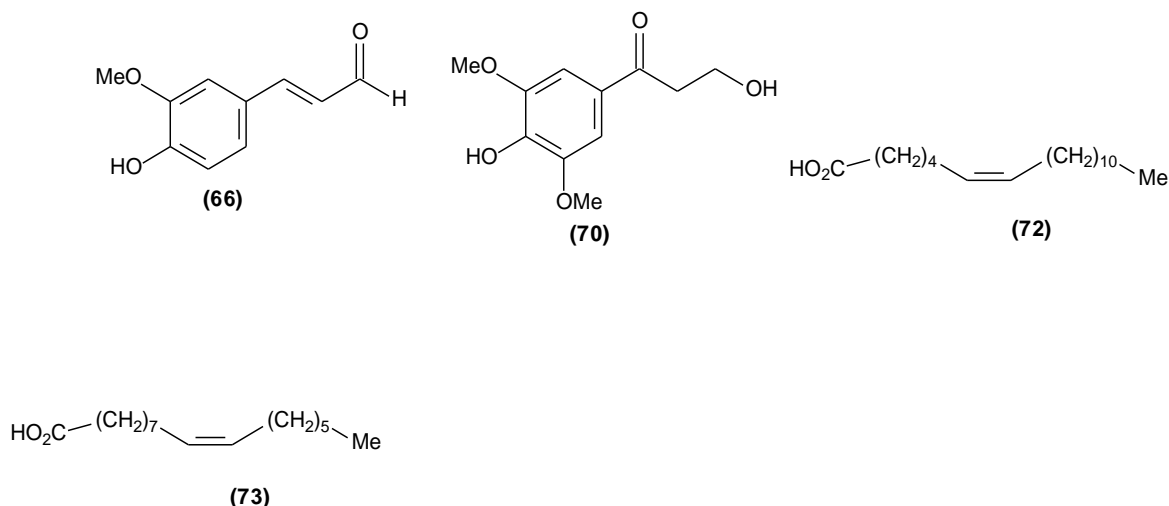
Figura 2: Metabólitos secundários isolados do gênero *Picramnia*.



**Figura 2:** Metabólitos secundários isolados do gênero *Picramnia*. (Cont.)

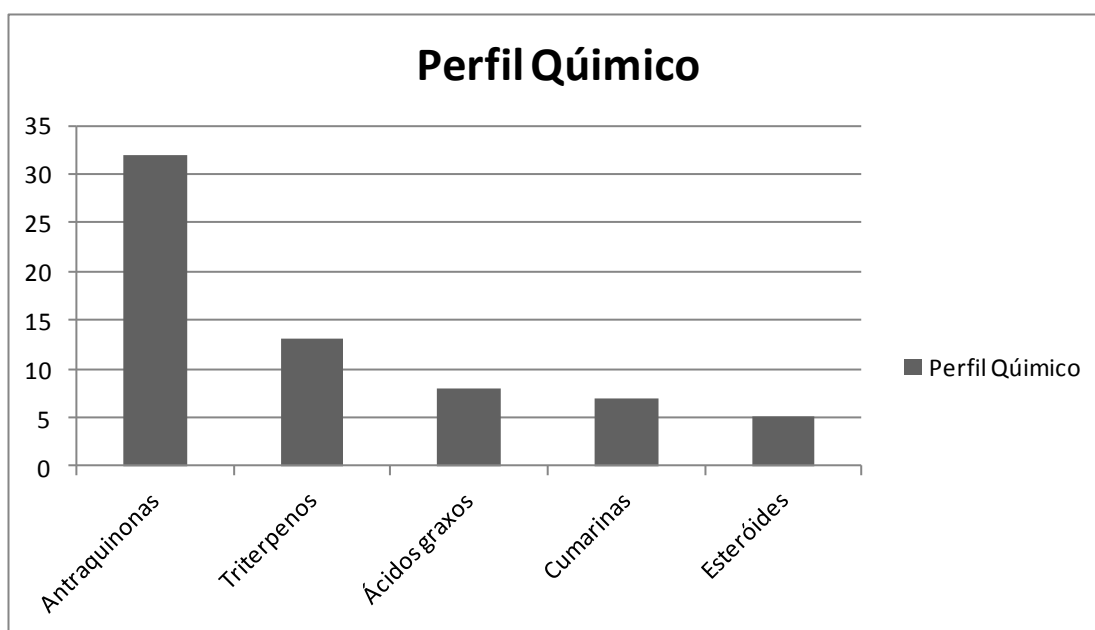


**Figura 2:** Metabólitos secundários isolados do gênero *Picramnia*. (Cont.)



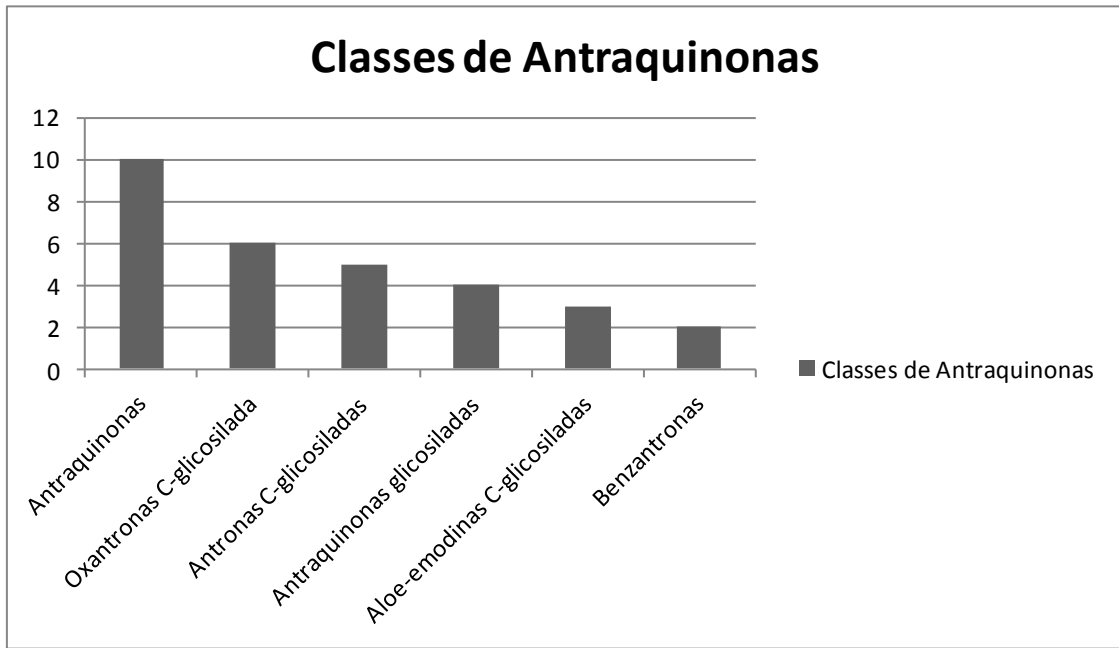
**Figura 2:** Metabólitos secundários isolados do gênero *Picramnia*. (Cont.)

Uma análise dos dados obtidos neste levantamento bibliográfico dos constituintes químicos das espécies de *Picramnia* permite constatar a predominância de antraquinonas, perfazendo um total de 32 substâncias que representa quase 50% do total de substâncias isoladas até hoje (**Figura 3, pág. 15**). Na **Figura 4 (pág. 16)** as antraquinonas foram agrupadas levando em consideração seus respectivos esqueletos básicos.



**Figura 3:** Quantificação do perfil químico dos metabólitos secundários isolados do gênero *Picramnia*.





**Figura 4:** Sumário da diversidade de esqueletos básicos de antraquinonas e suas abundâncias relativas.

Vale destacar, que das 16 espécies de *Picramnia* estudadas até o momento, somente em 3 delas não foi detectada a presença de antraquinonas (*Picramnia lindeniana*, *Picramnia sow* e *Picramnia excelsa*) (**Gráfico 1**). Porém, os estudos referentes às espécies *Picramnia lindeniana*, *Picramnia sow* foram específicos em isolamento de ácidos graxos. Estes dados que mostram a diversidade de antraquinonas isoladas, propõem esta classe de compostos como marcador taxonômico para o gênero *Picramnia*.



**Gráfico 1:** Distribuição de antraquinonas nas espécies de *Picramnia*.

### 3.4 A espécie *Picramnia ramiflora*

A espécie *Picramnia ramiflora* é popularmente conhecida como cedrinho (Bianchini et al., 2003), camboatã e camboitã (Pirani, 2010), tendo como sinônimas *Picramnia camboita* Engl., *Picramnia monochlamydea* Occhioni & Rizzini e *Picramnia warmingiana* Engl. (Pirani, 2010).

É uma espécie endêmica do Brasil com distribuição geográfica no norte (Acre), nordeste (Ceará, Pernambuco, Bahia, Alagoas), centro-oeste (Mato Grosso do Sul), sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e sul do país (Paraná e Santa Catarina) (Pirani, 2010).

Na literatura encontra-se um estudo fitoquímico desta espécie, relatado com a sinonímia *Picramnia monochlamydea*, que mostrou a presença das substâncias ácido 3-*epi*-betulínico (**16**),  $\beta$ -sitosterol (**3**), e as antraquinonas crisofanol (**4**) e aloe-emodina (**8**) (Rodrigues Filho, 1989).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Escolha da planta

A espécie *Picramnia ramiflora* foi escolhida por pertencer ao gênero *Picramnia*, o qual foi retirado da família Simaroubaceae após fortes indícios quimiossistemáticos, aliado ao fato deste gênero ser rico em antraquinonas.

### 4.2 Coleta da planta

O material vegetal, que é constituído por caule e folhas da espécie *Picramnia ramiflora*, foi coletado por G. S. Siqueira na Reserva Florestal da Companhia Vale do Rio Doce, no município de Linhares – ES, em abril de 2010. Sua exsicata encontra-se depositada no herbário da Companhia sob o código CVRD 8993. A espécie foi identificada pelo Prof. José Rubens Pirani.

### 4.3 Secagem e moagem

Inicialmente, o material vegetal foi seco ao ar livre após a coleta e, posteriormente, após a secagem, o material vegetal foi moído em moinhos de martelos.

#### 4.4 Preparo dos extratos

A extração dos constituintes químicos foi realizada por maceração, à temperatura ambiente, utilizando metanol como solvente.

As soluções obtidas foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo (FISATOM 802) fornecendo os extratos brutos como mostra a **Tabela 2** na **página 21**.

#### 4.5 Análises cromatográficas

As separações por cromatografia de adsorção em coluna aberta foram realizadas em gel de sílica 60G (0,063-0,200) e sílica flash.

As análises comparativas, para determinar a composição de cada fração, foram feitas em cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando cromatofolha de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>, que foram reveladas através da irradiação de luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 365 nm e/ou com reveladores cromogênicos:

- KOH (solução de KOH em metanol 10%);
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc./Vanilina, seguido de aquecimento: Foram solubilizados 3 g de vanilina em uma solução contendo 135 mL de H<sub>2</sub>O destilada e 135 mL de álcool etílico e 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (conc.). Esta solução foi estocada em frasco âmbar.

As análises em cromatografia em camada delgada, em escala preparativa (placa de 1 mm de espessura), foram realizadas utilizando-se placas de vidros com gel de sílica 60 GF<sub>254</sub>. Para obtenção dessas placas, diluiu-se 20 g de gel de sílica em 70 mL de água, e essa suspensão foi distribuída manualmente em placas de vidro 20 x 20 cm.

##### 4.5.1 Separações por CCCAE

A separação por Cromatografia Contracorrente de Alta Eficiência (CCCAE) foi realizada no Cromatógrafo Dynamic Extractions acoplado a duas unidades de bombas Pump 100, Smartline; UV Detector 2500, Smartline, Coletor de frações da marca Büchi.

#### **4.5.2 Separações por CLMP (Cromatografia Líquida a Média Pressão)**

A separação por Cromatografia Líquida a Média Pressão (CLMP) foi realizada no Cromatógrafo Büchi Control UNIT C-620, Coletor de frações da marca Büchi Fraction Collector C-660.

#### **4.6 Análises espectrométricas**

As análises espectrométricas foram realizadas em aparelhos dos Laboratórios de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e DEQUIM – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros BRUKER, modelo DPX-500 ( $^1\text{H}$ -500 MHz e  $^{13}\text{C}$ -125 MHz) e em espectrômetro JEOL, modelo ECLIPSE ( $^1\text{H}$ -400 MHz e  $^{13}\text{C}$ -100 MHz), utilizando TMS como padrão interno.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas, aparelho SHIMADZU QP-5050, operando em 70 eV.

Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho tipo Kofler marca Microquímica, modelo MQRPF-301.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados no espectrofotômetro Infravermelho, modelo IR Affinity, marca SHIMADZU, utilizando pastilha de KBr.

A análise por espectrometria de emissão atômica foi realizada no espectrômetro modelo AAS4, marca ZEISS, com chama de acetileno.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 A extração dos constituintes químicos do material botânico

A extração dos constituintes químicos foi realizada por maceração utilizando metanol como solvente. As soluções obtidas foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo os extratos brutos como mostra a **Tabela 2**.

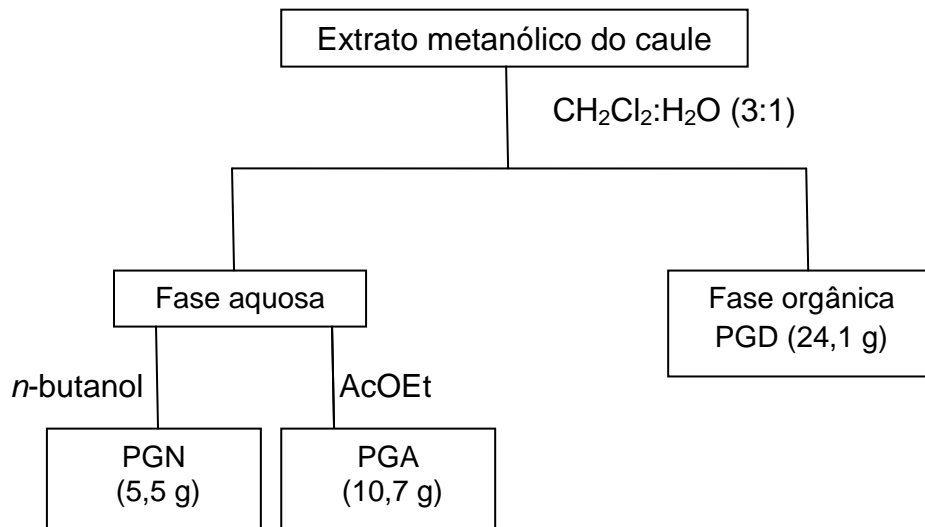
**Tabela 2:** Quantidades dos extratos brutos obtidos.

<b>Espécie Botânica</b>	<b>Parte Botânica</b>	<b>Peso do Material</b>	<b>Solvente</b>	<b>Peso dos extratos</b>
<i>Picramnia ramiflora</i>	caule	3,07 Kg	metanol	42,9 g
	folhas	646,8 g	metanol	84,1 g

### 5.2 Partição do extrato metanólico do caule

O extrato metanólico do caule foi submetido a uma partição líquido-líquido com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , resultando em uma fase orgânica codificada de PGD e uma

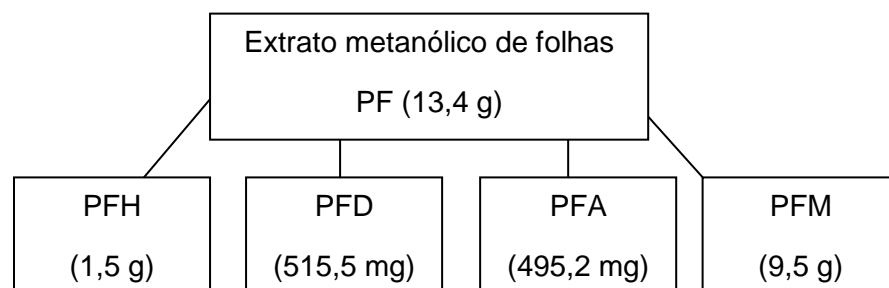
fase aquosa que posteriormente, foi extraída com AcOEt resultando na fração codificada de PGA e, em seguida com *n*-butanol resultando na fração codificada de PGN, como mostra o **Fluxograma 1**.



**Fluxograma 1:** Partição do extrato metanólico do caule.

### 5.3 Fracionamento do extrato metanólico das folhas

Uma parte do extrato metanólico das folhas foi submetido a um fracionamento colocando a amostra em pastilha com gel de sílica 60 em um funil de Buchner, com sistema de filtração a vácuo, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) (**Figura 5**).



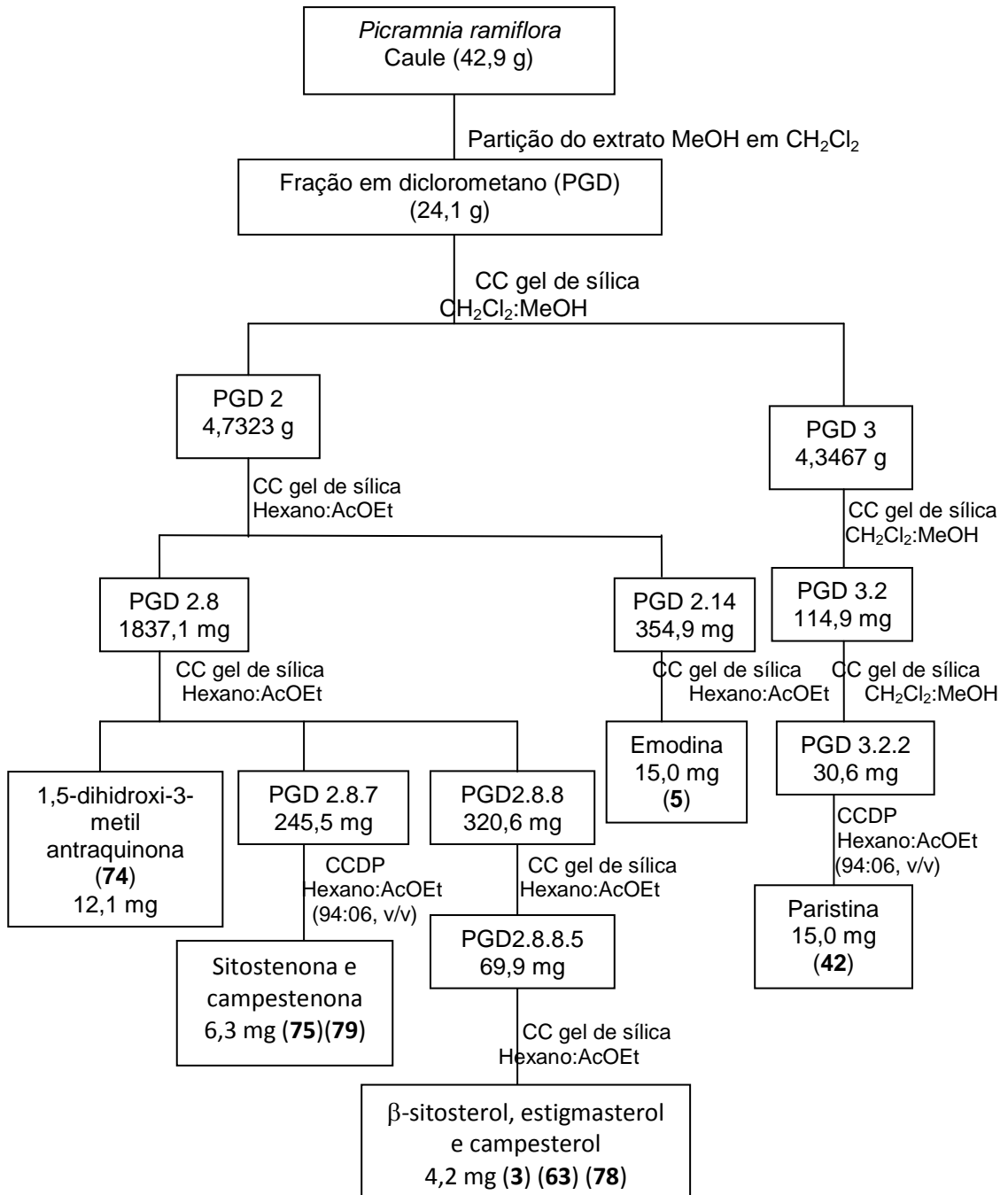
**Figura 5:** Fracionamento do extrato de folhas.

## 5.4 Descrição experimental do isolamento dos constituintes químicos

### 5.4.1 Análise das frações obtidas do extrato do caule de *Picramnia ramiflora*

#### 5.4.1.1 Análise da fração em diclorometano (24,1 g) (PGD)

#### Resumo dos constituintes isolados da fração em diclorometano do caule de *Picramnia ramiflora*



**Fluxograma 2:** Análise cromatográfica da fração PGD.



Inicialmente a fração em diclorometano foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de metanol, sendo coletadas 12 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Estudo cromatográfico da fração PGD.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade de (g)	Observação
1	PGD1	0,7	**
2-3	PGD2	4,7323	
4-5	PGD3	4,3467	
6	PGD4	1,1840	
7-8	PGD5	1,9559	*
9-10	PGD6	2,3370	*
11-12	PGD7	1,3549	*

\* frações não trabalhadas por serem misturas complexas

\*\* fração não trabalhada por não apresentar antraquinonas

#### **Análise da fração PGD2 (4,7323 g)**

A fração PGD2 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 135 frações, que posteriormente foram reunidas em 14 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Estudo cromatográfico da fração PGD2.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação
1-9	PGD2.1	42,2	*
10-13	PGD2.2	21,1	*
14-16	PGD2.3	7,1	*
17-32	PGD2.4	277,7	*
33-44	PGD2.5	543,9	*
45-56	PGD2.6	422,5	*
57-65	PGD2.7	289,5	*
66-87	PGD2.8	1837,1	
88-96	PGD2.9	159,8	*
97-110	PGD2.11	232,5	*
111-120	PGD2.12	150,3	*

121-125	PGD2.13	153,6	*
126-132	PGD2.14	354,9	
133-135	PGD2.15	32,3	*

\* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações  
Obs.: a fração PGD2.10 foi reunida à fração PGD2.11

### Análise da fração PGD2.8 (1837,1 mg)

A fração PGD2.8 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 100 frações, que posteriormente foram reunidas em 10 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a antraquinona 1,5 dihidroxi-3-metilantraquinona (**74**) na fração PGD2.8.2. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Estudo cromatográfico da fração PGD2.8.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação	Substância
0-12	PGD2.8.1	41,9	*	
13-16	PGD2.8.2	12,1		<b>74</b>
17-24	PGD2.8.3	17,6	*	
25-49	PGD2.8.4	218,9	*	
50-59	PGD2.8.5	32,2	*	
60-69	PGD2.8.6	48,9	*	
70-93	PGD2.8.7	245,5		
94	PGD2.8.8	320,6		
95-99	PGD2.8.9	390,6	*	
100	PGD2.8.10	271,8	*	

\* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

### Análise da fração PGD2.8.7 (245,5 mg)

A fração 2.8.7 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (placa de 1 mm de espessura), sendo usado como eluente hexano:acetato de etila (94:06, v/v), onde a fração PGD2.8.7.2 (6,3 mg) apresentou a mistura de esteroides contendo sitostenona (**75**) e campestenona (**79**).

### Análise da fração PGD2.8.8 (320,6 mg)

A fração PGD2.8.8 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 72 frações, que posteriormente foram reunidas em 8 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Estudo cromatográfico da fração PGD2.8.8.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação
0-12	PGD2.8.8.1	50,1	*
13-15	PGD2.8.8.2	10,9	**
16-20	PGD2.8.8.3	16,7	**
21-23	PGD2.8.8.4	6,2	**
24-34	PGD2.8.8.5	69,9	
35-48	PGD2.8.8.6	75,7	***
49-54	PGD2.8.8.7	14,8	***
55-72	PGD2.8.8.8	60,6	***

\* frações não trabalhadas por serem misturas complexas

\*\* frações não trabalhadas por apresentarem pouca quantidade de massa

\*\*\* frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

### Análise da fração PGD2.8.8.5 (69,9 mg)

A fração PGD2.8.8.5 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 25 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolado a mistura de esteroides  $\beta$ -sitosterol (**3**), estigmasterol (**63**) e campesterol (**78**) na fração PGD2.8.8.5.3. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Estudo cromatográfico da fração PGD2.8.8.5.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação	Substâncias
0-4	PGD2.8.8.5.1	6,1	*	
5-11	PGD2.8.8.5.2	33,1	*	

12-14	PGD2.8.8.5.3	4,2		3+63+78
15-25	PGD2.8.8.5.4	5,0	*	

\* frações não trabalhadas por não apresentarem massa o suficiente

### Análise da fração PGD2.14 (354,9 mg)

A fração PGD2.14 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 55 frações, que posteriormente foram reunidas em 13 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a antraquinona emodina (**5**) na fração PGD2.14.10. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Estudo cromatográfico da fração PGD2.14.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação	Substância
1-4	PGD2.14.1	11,3	*	
5	PGD2.14.2	2,0	*	
6-7	PGD2.14.3	7,0	*	
8-13	PGD2.14.4	70,1	**	
14-16	PGD2.14.5	20,0	*	
17-24	PGD2.14.6	77,3	**	
25-26	PGD2.14.7	18,4	**	
27-32	PGD2.14.8	20,3	*	
33-36	PGD2.14.9	19,0	*	
37-40	PGD2.14.10	15,0		<b>5</b>
41-42	PGD2.14.11	2,0	*	
43-46	PGD2.14.12	44,8	**	
47-55	PGD2.14.13	42,0	**	

\* frações não trabalhadas por apresentarem pouca quantidade de massa

\*\*frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

### Análise da fração PGD3 (4,3467 g)

A fração PGD3 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 22 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 9**.

**Tabela 9:** Estudo cromatográfico da fração PGD3.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação
0	PGD3.1	10,3	*
1-8	PGD3.2	114,9	
9	PGD3.3	7,9	*
10-13	PGD3.4	2833,3	**
14-19	PGD3.5	417,7	**
20-22	PGD3.6	90,7	**

\* frações não trabalhadas por apresentarem pouca quantidade de massa

\*\*frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

### **Análise da fração PGD3.2 (114,9 mg)**

A fração PGD3.2 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de metanol, sendo coletadas 37 frações, que posteriormente foram reunidas em 4 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Estudo cromatográfico da fração PGD3.2.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação
1-3	PGD3.2.1	9,0	*
4-11	PGD3.2.2	30,6	
12-26	PGD3.2.3	3,8	*
27-37	PGD3.2.4	15,8	*

\* frações não trabalhadas por apresentarem pouca quantidade de massa.

### **Análise da fração PGD3.2.2 (30,6 mg)**

A fração 3.2.2 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (placa de 1 mm de espessura), sendo usado como eluente hexano:acetato de etila (94:06, v/v), onde obteve-se a fração PGD3.2.2.3 contendo 15 mg da antraquinona paristina (**42**).

#### **5.4.1.2 Análise da fração em acetato de etila (PGA)**

Foi realizada uma partição líquido-líquido de 1,1 g da fração em acetato de etila com o seguinte sistema de solventes: clorofórmio:acetato de etila:metanol:água (7:3:5:7). A fase orgânica foi separada da fase aquosa, resultando em 149,7 mg de fase orgânica e 790,1 mg de fase aquosa. Posteriormente, a fase orgânica da fração em acetato de etila foi submetida à cromatografia contracorrente de alta eficiência (CCCAE).

A Cromatografia contracorrente (CCC) destaca-se por ser um método moderno e uma excelente técnica de separação. Em análises de produtos naturais, a CCC pode ser usada para fracionar extratos brutos. Além do fato de ser eficiente na separação de substâncias muito polares.

Este método é baseado no uso de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma das fases é a estacionária e a outra é a móvel, onde a fase estacionária é retida no aparelho sem o uso de uma matriz sólida adsortiva (Ito, 1991).

As vantagens atribuídas a essa técnica de separação são: a amostra pode ser totalmente recuperada após a análise; a ampla variação de polaridade; o baixo consumo de solvente; o baixo custo econômico e a possibilidade de separação de grande quantidade de amostra (Marston e Hostettmann, 2006).

##### **5.4.1.2.1 Escolha do sistema de solvente**

A escolha correta do sistema de solvente é parte fundamental para se obter o sucesso na separação. Foram testados vários sistemas de solventes pelo método de agitação em tubo de ensaio (Berthod & Carda-Broch, 2004). Estes sistemas de solventes foram retirados da literatura, onde apresentaram bons resultados em separações para substâncias polares e em antraquinonas.

Dessa forma, foi solubilizada uma pequena quantidade de amostra (1 mg da fração em acetato de etila) em 1 mL de cada fase do sistema em análise e, em seguida, submeteu-se à agitação. Para o restabelecimento das fases, posteriormente o sistema foi mantido em repouso.

Na sequência, foi retirada uma alíquota de cada fase, na mesma proporção, em que foram submetidas à análise por cromatografia em camada

delgada. A visualização foi obtida após a revelação da placa com vanilina sulfúrica após o aquecimento a 100 °C.

Finalmente, a escolha do sistema de solvente está atrelada à comparação da concentração dos componentes da amostra na fase superior e na fase inferior do sistema de solventes. Um sistema de solvente que apresenta a concentração igual nas duas fases, consequentemente possui o coeficiente de partição próximo ou igual a 1, logo o sistema de solvente escolhido tem uma boa interação com as substâncias contidas na amostra e consequentemente uma boa separação quando submetidos à análise por CCCAE (Sousa, 2011).

Após as análises, o sistema de solvente escolhido foi hexano:acetato de etila:metanol:água (1:2:2:1), o qual apresentou melhor solubilidade dos componentes da amostra em ambas as fases.

#### **5.4.1.2.2 Procedimento da CCCAE**

Primeiramente, foram preparados 1.800 mL do sistema bifásico de solventes escolhidos e, foram submetidos à agitação. Em seguida, foi colocado por 30 minutos no ultrassom.

A fração em acetato de etila (73 mg) foi solubilizada em 5 mL da fase aquosa.

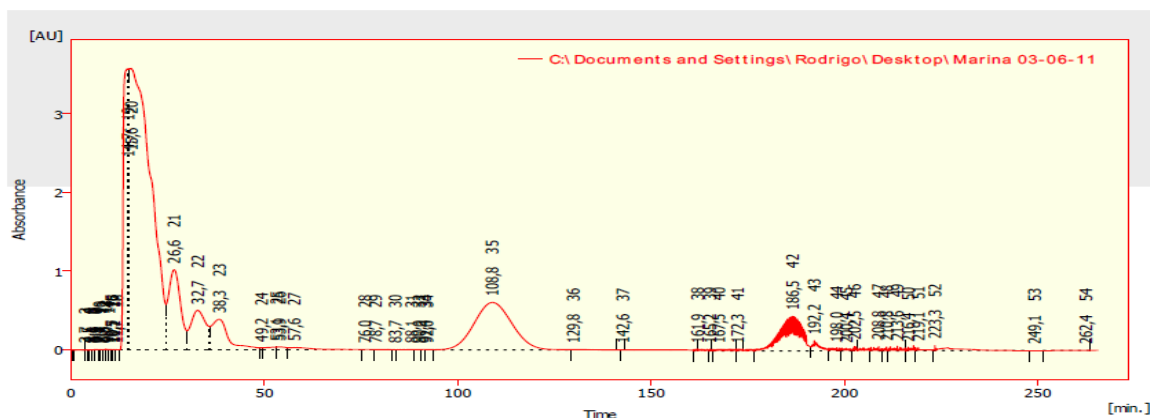
O aparelho de CCCAE foi preenchido com a fase estacionária (fase orgânica), no fluxo contínuo de 2,0 mL.min<sup>-1</sup> até sua capacidade máxima (142 mL), após o total enchimento a rotação foi iniciada (1200 rpm) e a fase aquosa deste sistema de solvente (fase móvel) foi bombeada para a coluna. Quando o sistema entrou em equilíbrio, verificou-se o "sangramento" de 36 mL, o que corresponde à retenção de 74,64% da fase estacionária. Em seguida, 5 mL da solução da amostra contendo 73 mg da fração acetato de etila foi injetada no aparelho. Na eluição da fase móvel foram coletadas frações de 4 mL monitoradas com um detector de UV-Knauer em 280 nm.

Após a execução de 240 min, 480 mL da fase móvel foram coletadas em 120 frações. A rotação foi desligada e iniciou-se o processo de limpeza da coluna utilizando como solvente o metanol.

As frações obtidas na CCCAE foram analisadas por CCDA, visualizadas sob irradiação de luz na região do UV de 254 nm e reveladas com vanilina

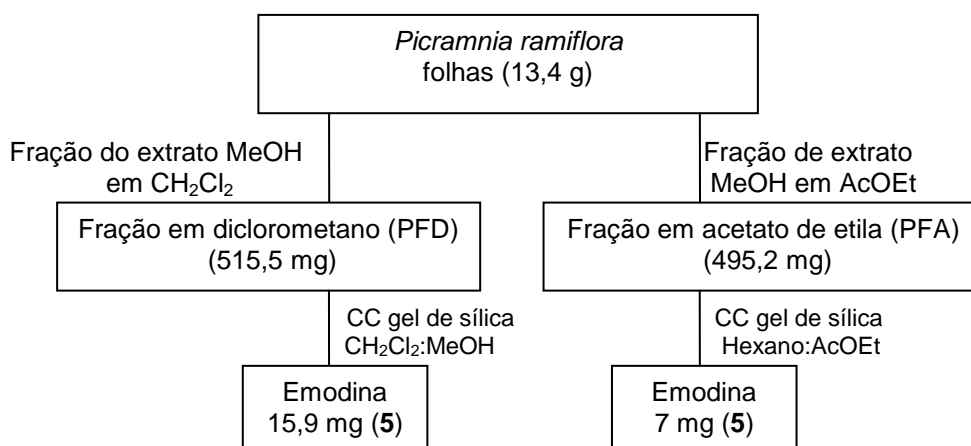
sulfúrica. Também foram reveladas em solução de KOH em metanol 10%, um revelador específico de antraquinonas.

Após as análises, observou-se que foram purificadas três antraquinonas, nas frações: PGA 8 (t=15,6 min.) apresentou 5 mg da hidroximodina (**76**), PGA 11 (t=26,6 min.) apresentou 6 mg da antraquinona sulfatada (**77**), e PGA 45 (t=108,8 min.) apresentou 5,4 mg da emodina (**5**). Além, da mistura das antraquinonas paristina (**42**) e 1,5 dihidroxi-3-metilantraquinona (**74**) na fração PGA 81 (t=186,5 min.) como mostra no **Gráfico 2**.



**Gráfico 2:** Cromatograma.

#### 5.4.2 Análise das frações obtidas do extrato das folhas de *Picramnia ramiflora*



**Fluxograma 3:** Análise cromatográfica das frações do extrato de folhas.

##### 5.4.2.1 Análise da fração em diclorometano (515,5 mg) (PFD)

Inicialmente a fração em diclorometano foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v)



de metanol, sendo coletadas 45 frações, que posteriormente foram reunidas em 8 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo, isolada a antraquinona emodina (**5**) na fração PFD7. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Estudo cromatográfico da fração PFD.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação	Substância
1	PFD1	45,8	*	
2-5	PFD2	33,1	*	
6-9	PFD3	91,1	*	
10-11	PFD4	15,3	*	
12-16	PFD5	6,7	*	
17-21	PFD6	4,7	*	
22-32	PFD7	15,9		<b>5</b>
33-45	PFD8	281,6	*	

\*frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

#### 5.4.2.2 Análise da fração em acetato de etila (495,2 mg) (PFA)

Inicialmente a fração em acetato de etila foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes hexano:acetato de etila em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de acetato de etila, sendo coletadas 100 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo isolada a antraquinona emodina (**5**) na fração PFA5. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Estudo cromatográfico da fração PFA.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação	Substância
1-12	PFA1	40,4	*	
13-19	PFA2	45,0	*	
20-39	PFA3	50,3	*	
40-49	PFA4	2,8	*	
50-68	PFA5	7,0		<b>5</b>
69-100	PFA6	225,4	*	

\*frações não trabalhadas por serem misturas complexas semelhantes a outras frações

#### 5.4.2.3 Análise do extrato metanólico (2,8 g) (PFMb)

O extrato metanólico das folhas foi submetido a uma Cromatografia Líquida a Média Pressão (CLMP). Neste procedimento foram usados como eluentes os solventes diclorometano e metanol. De acordo com o comportamento

do extrato metanólico na análise por CCDA, o método de separação foi programado da seguinte forma: Inicialmente, a coluna de 26mmx230 mm empacotada com gel de sílica flash foi eluída com diclorometano 100% durante 30 minutos com fluxo de 23 mL/min.. Em seguida a eluição foi feita em ordem crescente de polaridade com diclorometano:metanol durante 120 minutos, seguido de 15 minutos de eluição com metanol 100%. Foram coletadas 177 frações com volume de 10 mL, que posteriormente foram reunidas em 8 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 13**.

**Tabela 13:** Estudo cromatográfico da fração PFMb.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação
1-20	PFMb1	160,6	*
21-40	PFMb2	105,7	*
41-55	PFMb3	290,3	*
56-77	PFMb4	172,7	
78-89	PFMb5	236,4	*
90-127	PFMb6	349,7	*
128-143	PFMb7	432,2	*
143-177	PFMb8	515,7	*

\* frações não trabalhadas por serem misturas complexas

#### **Análise da fração PFMb4 (172,7 mg)**

A fração PFMb4 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando como eluentes diclorometano:metanol em concentração crescente de polaridade até 100% (v/v) de metanol, sendo coletadas 62 frações, que posteriormente foram reunidas em 6 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. Sendo isolada a antraquinona emodina (**5**) na fração PFMb4.2. O estudo cromatográfico das frações está descrito na **Tabela 14**.

**Tabela 14:** Estudo cromatográfico da fração PFMb4.

Frações Reunidas	Códigos	Quantidade (mg)	Observação	Substância
1-6	PFMb4.1	4,7	*	
7-15	PFMb4.2	27,9		<b>5</b>
16-28	PFMb4.3	25,2	*	
29-34	PFMb4.4	3,4	*	
35-54	PFMb4.5	28,1	*	
55-62	PFMb4.6	35,7	*	

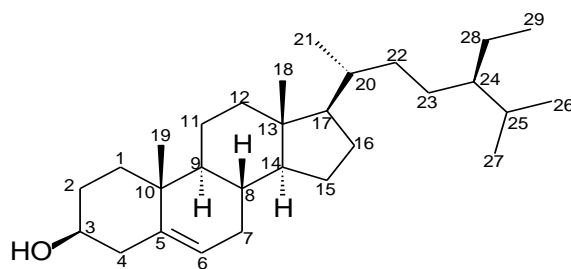
\* frações não trabalhadas por apresentarem pouca quantidade de massa.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

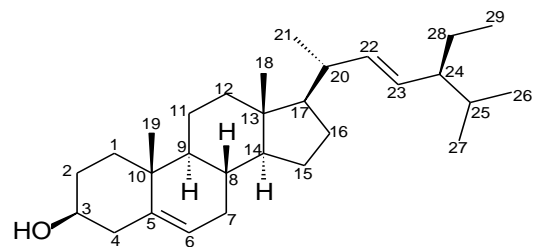
### 6.1 Substâncias identificadas de *Picramnia ramiflora*

O estudo fitoquímico *Picramnia ramiflora* permitiu o isolamento e a identificação de 10 substâncias: 05 esteroides, 05 antraquinonas.

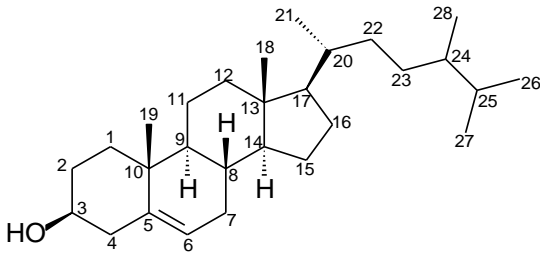
#### 6.1.1 Esteroides isolados



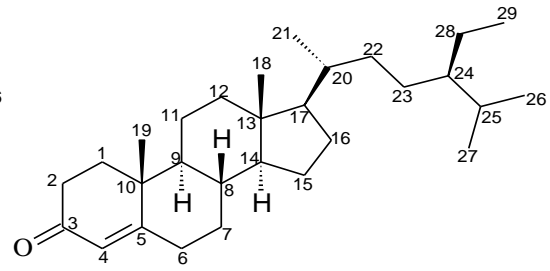
$\beta$ -Sitosterol (3)



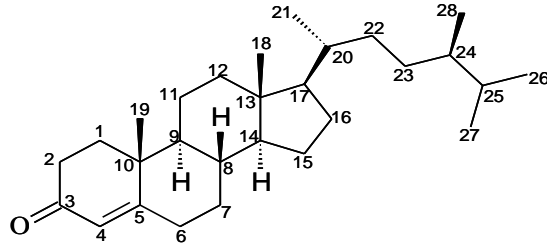
Estigmasterol (63)



Campesterol (78)

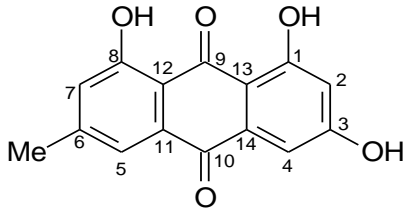


Sitostenona (75)

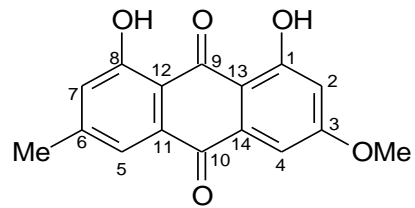


Campestenona (79)

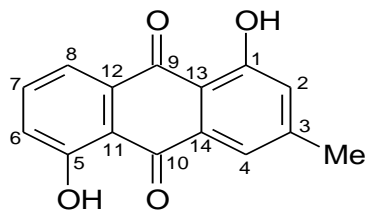
### 6.1.2 Antraquinonas isoladas



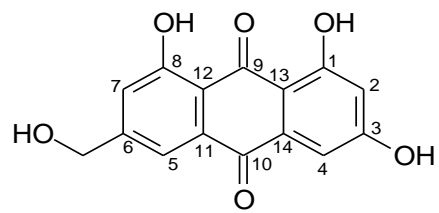
Emodina (5)



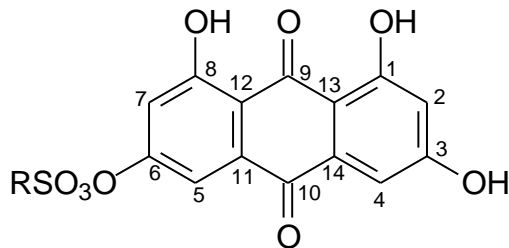
Paristina (42)



1,5-dihidroxi-3-metil-antraquinona (74)



Hidroxiemodina (76)



R= K ou Na

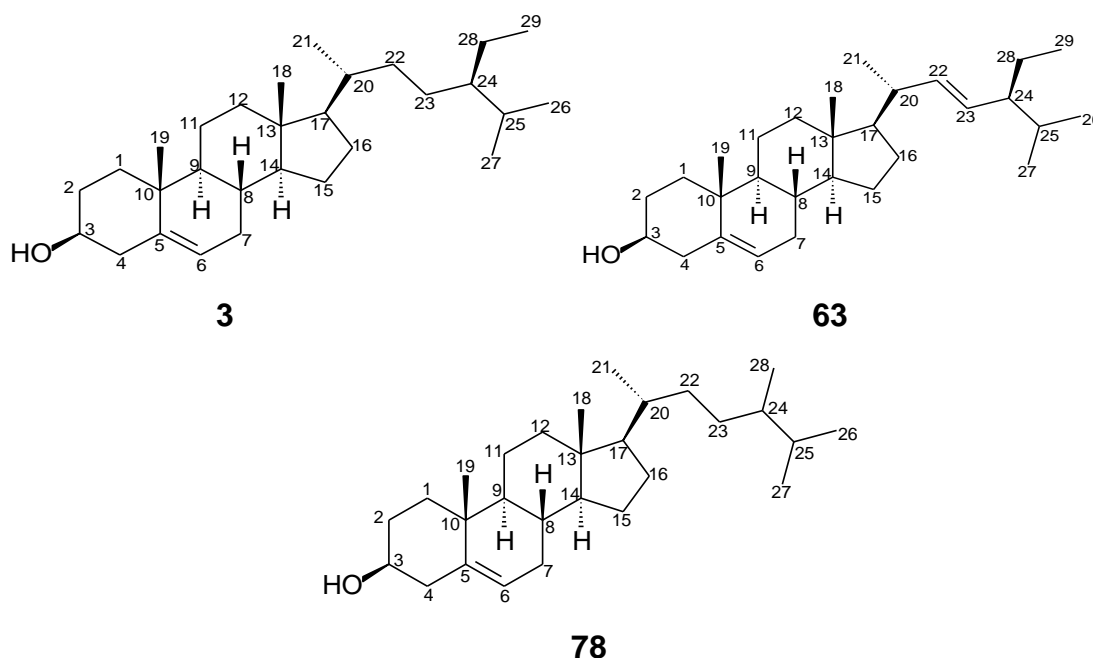
Antraquinona sulfatada (77)

## 6.2 Determinação estrutural dos esteroides

Os fitosteróis são frequentemente encontrados no reino vegetal, sendo que o mais comum desta classe de substâncias é o  $\beta$ -sitosterol (**3**) (Morais, 2007).

No entanto, quase sempre estas substâncias ocorrem em misturas devido às suas semelhanças estruturais dificultando suas separações, por isso na maioria das vezes, suas identificações são feitas em misturas, através de CG/EM e dados de RMC  $^{13}\text{C}$  (Vieira, 1995).

### 6.2.1 Identificação da mistura das substâncias **3**, **63** e **78**



A mistura contendo a substância **3** apresentou-se como um sólido cristalino em forma de agulhas, onde a análise de CCDA mostrou uma mancha com coloração roxa após ser revelado com a vanilina sulfúrica, sugerindo ser um esteroide ou uma mistura de esteroides.

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 7 e 8, págs. 41 e 42**) da amostra **3** apresentou um grande acúmulo de sinais intensos na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,70 a 2,31, relativo aos vários grupos contendo átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e metínicos compatíveis com um esqueleto esteroideal do tipo  $\beta$ -sitosterol. Observa-se um septeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,57 característico de um átomo de

hidrogênio H-3 oxigenado, e um duplete largo em  $\delta_H$  5,37 relativo a um hidrogênio olefínico H-6.

O espectro de RMN  $^{13}C$  da substância **3** (**Figura 10, pág. 44**), apresentou sinais em  $\delta_C$  140,8 e  $\delta_C$  121,7 característicos de uma dupla ligação entre C-5 e CH-6, bem como a presença de um sinal em  $\delta_C$  71,4 atribuído a um carbono carbinólico CH-3 comum na estrutura do esteroide  $\beta$ -sitosterol.

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  (**Figuras 7-13, págs. 41-47**) junto com dados da literatura (Moreira, 2009), permitiram uma completa atribuição dos sinais do esteroide  $\beta$ -sitosterol com bastante coerência.

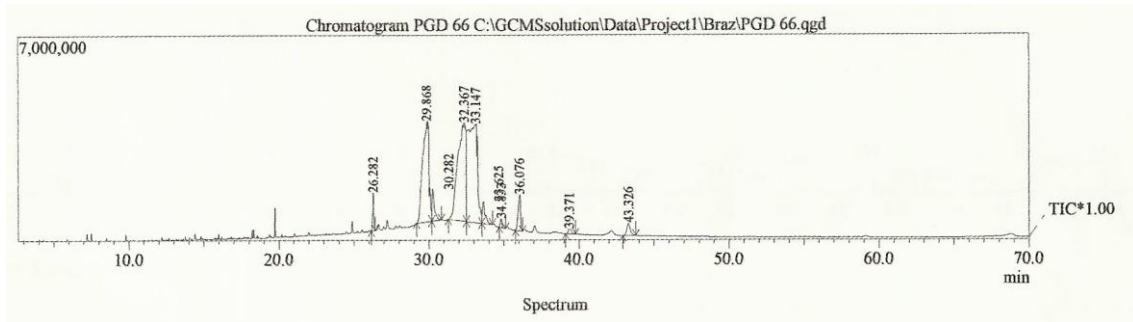
A confirmação final da presença de uma mistura de três esteroides foi feita através da análise de CG/EM (**Esquemas 1, 2 e 3, pág. 39 e 40, Figura 6, pág. 39**).

O pico em  $m/z = 414$  Dalton no espectro de massas (**Esquemas 1, 2 e 3, págs. 39 e 40**), compatível com a fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O$ , confirmou a identificação do esteroide **3**, o sitosterol, o pico em  $m/z = 412$  Dalton indicou a ocorrência da estigmasterol (**63**) e presença do pico em  $m/z = 400$  Dalton indicou a ocorrência do esteroide campesterol (**78**), apesar de ambos campesterol e estigmasterol, não serem detectados nos espectros de RMN.

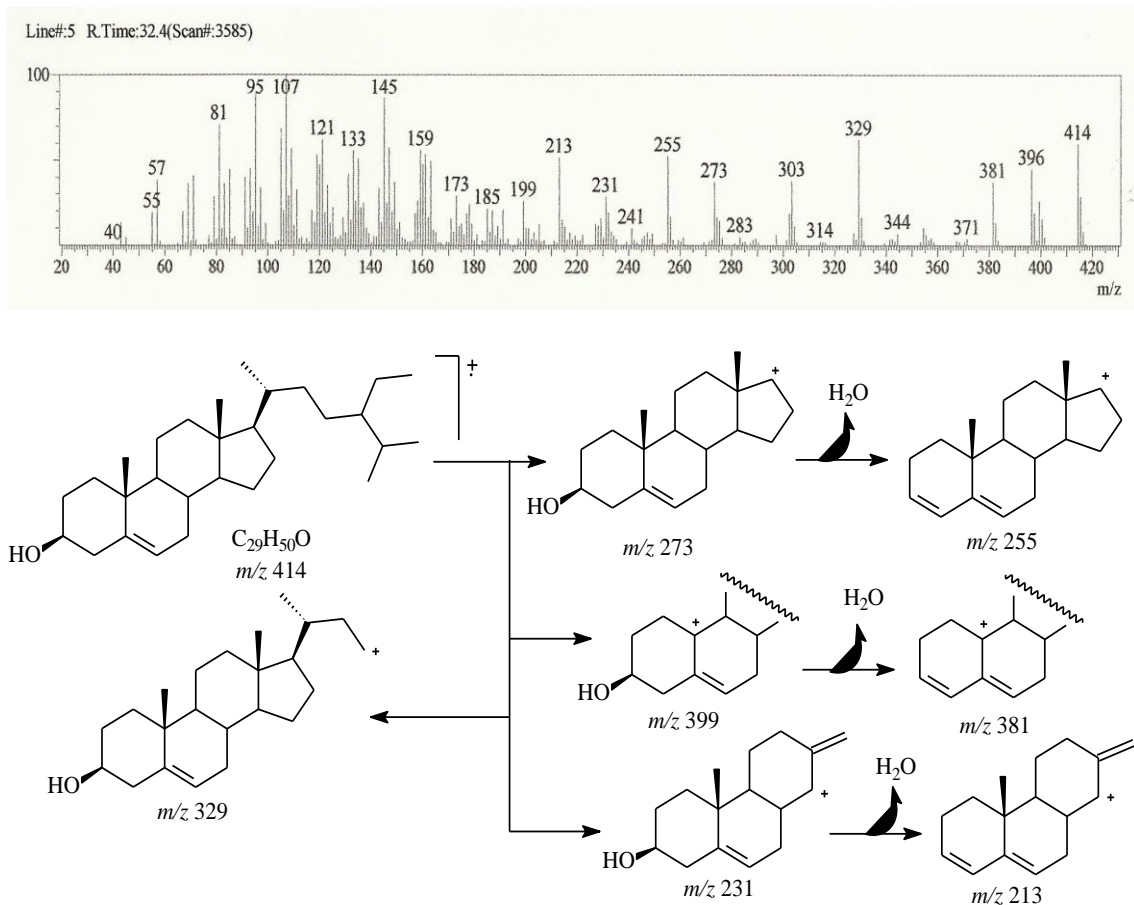
Os dados descritos acima e presentes na **Tabela 15, p. 38** quando comparados com dados existentes na literatura (Moreira, 1995) confirmam a presença da estrutura proposta.

**Tabela 15:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) do esteroide **3** e as comparações com valores da literatura para a substância  $\beta$ -sitosterol, em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão em ppm.

	esteroide ( <b>3</b> )	$\beta$ -sitosterol
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>		
5	140,8	140,7
10	36,5	36,1
13	42,3	42,3
<b>CH</b>		
3	71,4	71,8
6	121,7	121,7
8	31,9	31,9
9	50,1	50,1
14	56,8	56,8
17	56,0	56,0
20	36,2	39,8
24	45,8	45,8
25	29,1	29,0
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	37,3	37,3
2	31,6	31,9
4	42,3	42,2
7	33,9	33,9
11	21,1	21,1
12	39,8	39,8
15	24,3	24,3
16	28,3	28,9
22	31,9	32,0
23	26,0	26,0
28	23,1	23,0
<b>CH<sub>3</sub></b>		
18	12,0	12,3
19	19,0	19,4
21	18,8	18,8
26	19,4	19,8
27	19,8	19,8
29	11,9	11,8

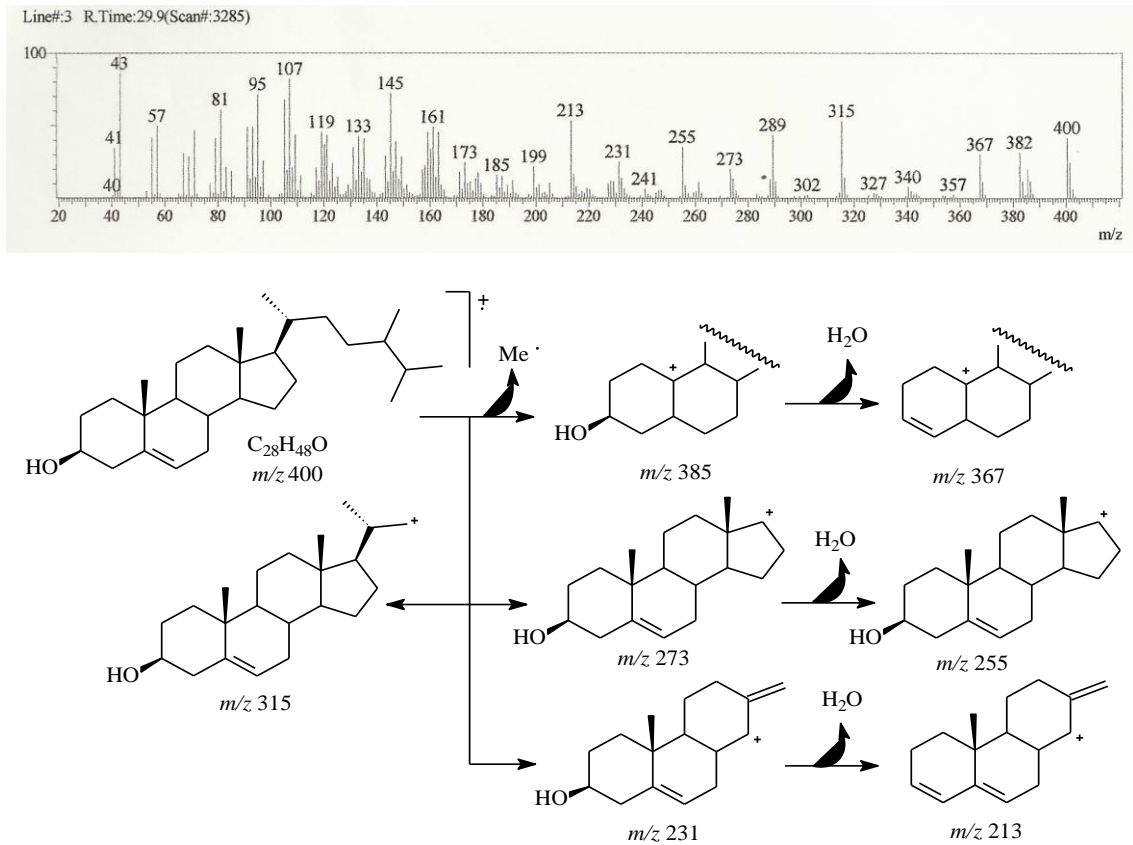


**Figura 6:** Cromatograma da mistura de esteroides **3**, **63** e **78**.

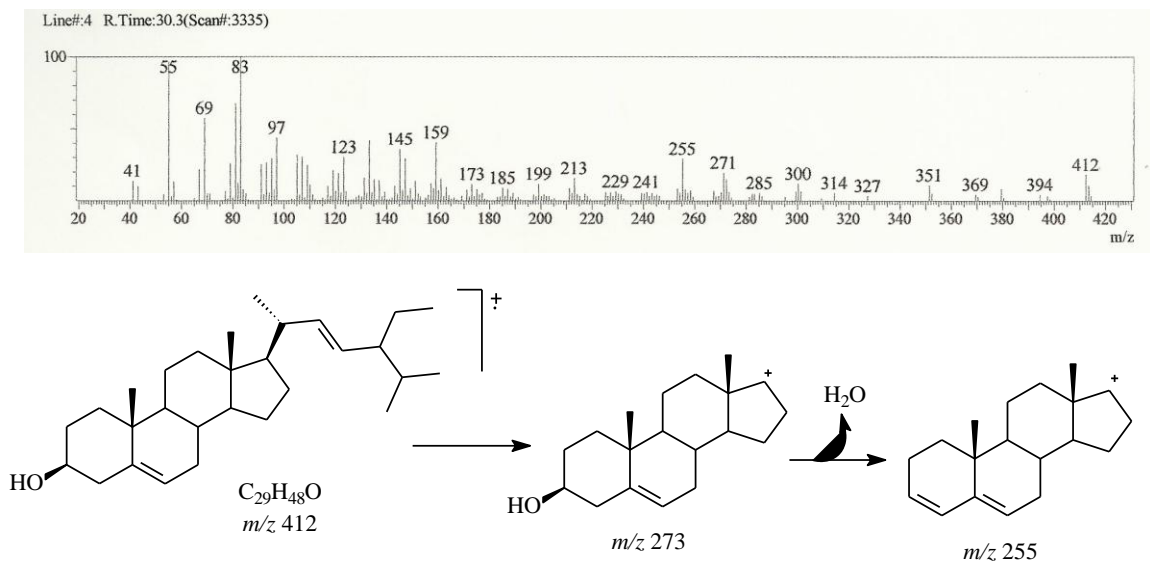


**Esquema 1:** Interpretação mecânica dos principais fragmentos no espectro de massas da  $\beta$ -sitosterol (**3**); Tempo de retenção 32,4 (28,8 %).





**Esquema 2:** Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do campesterol (**78**); Tempo de retenção 29,9 (23,0%).



**Esquema 3:** Interpretação mecanística dos principais fragmentos no espectro de massas do estigmasterol (**63**); Tempo de retenção 30,3 (2,6%).

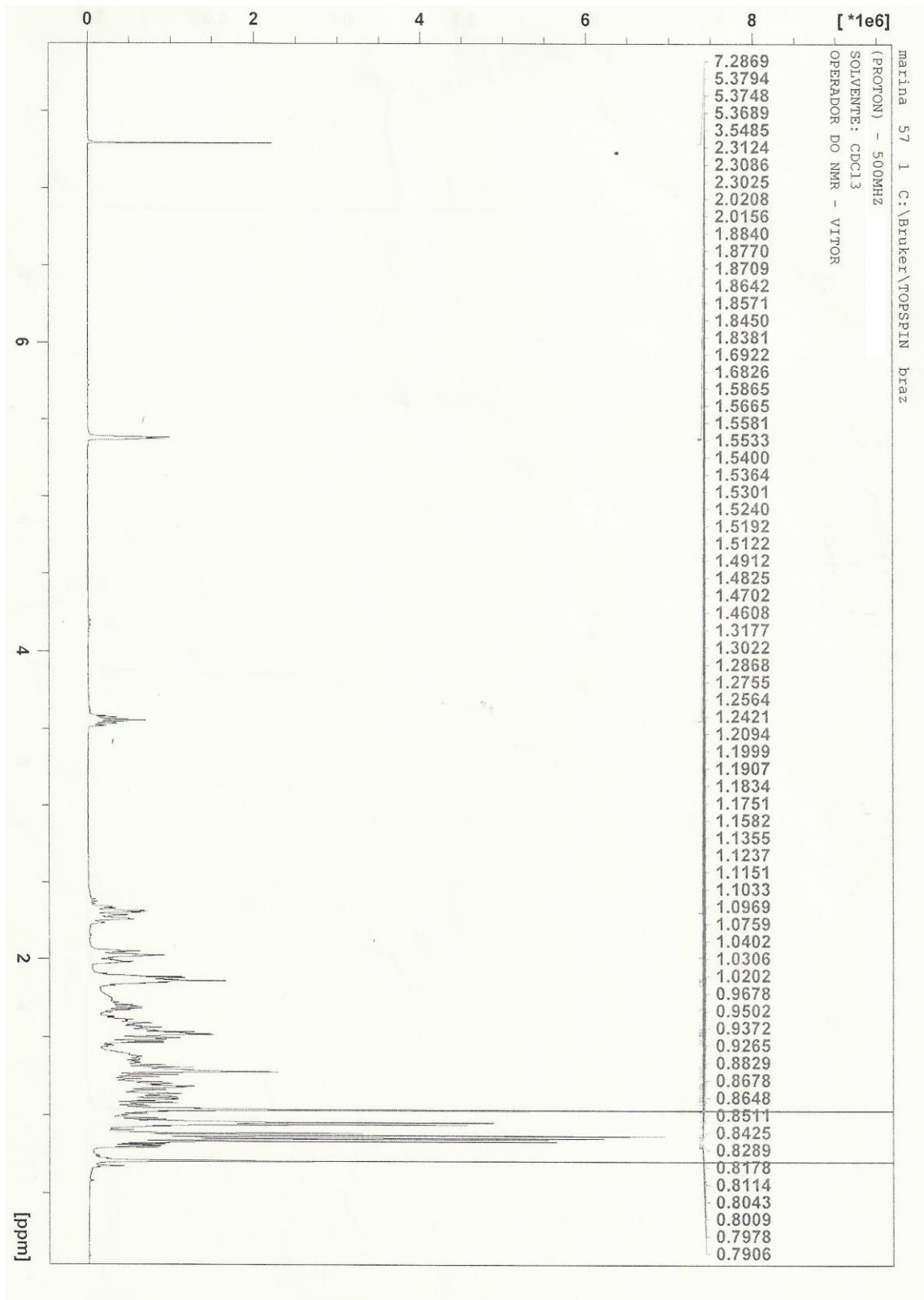
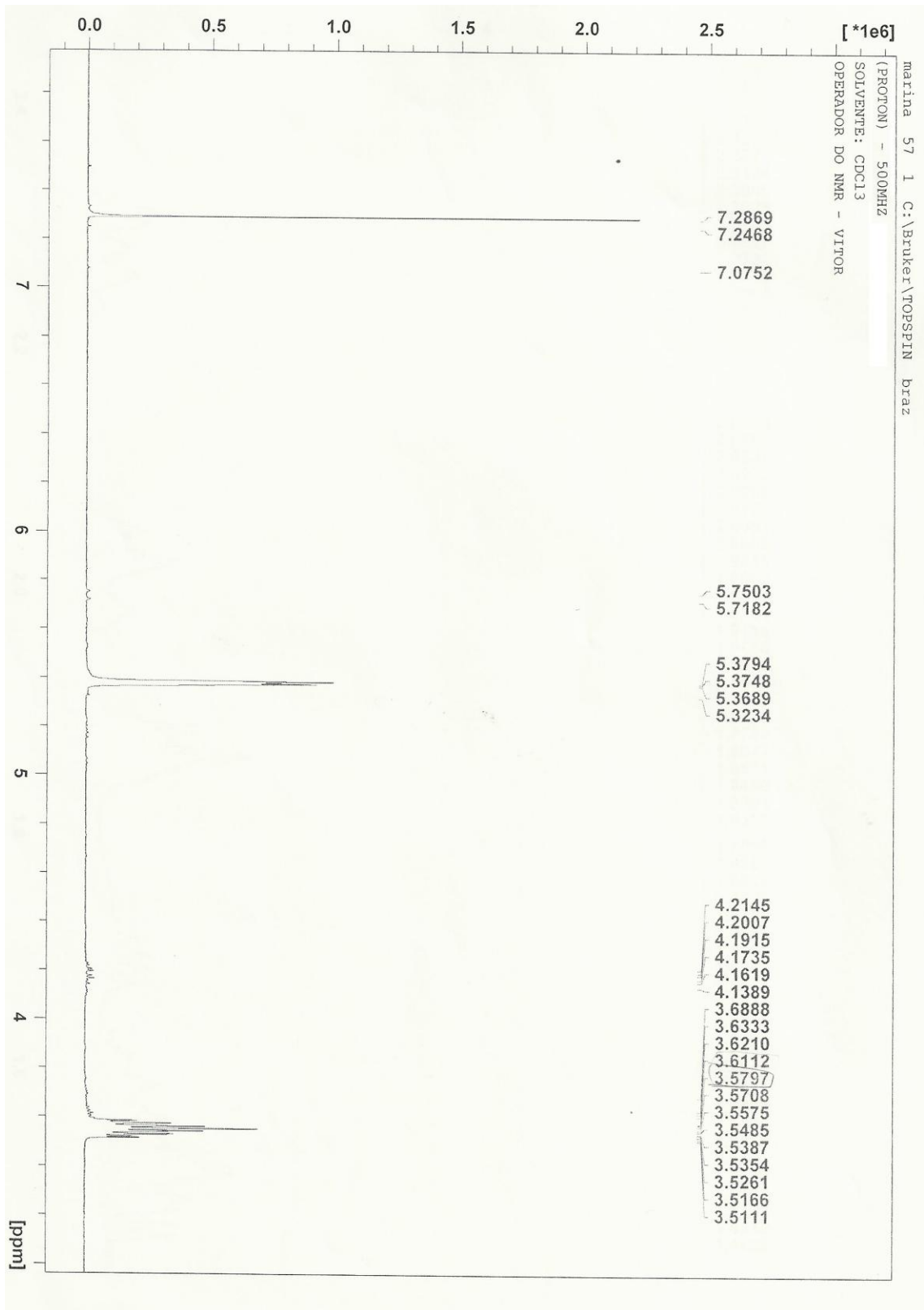
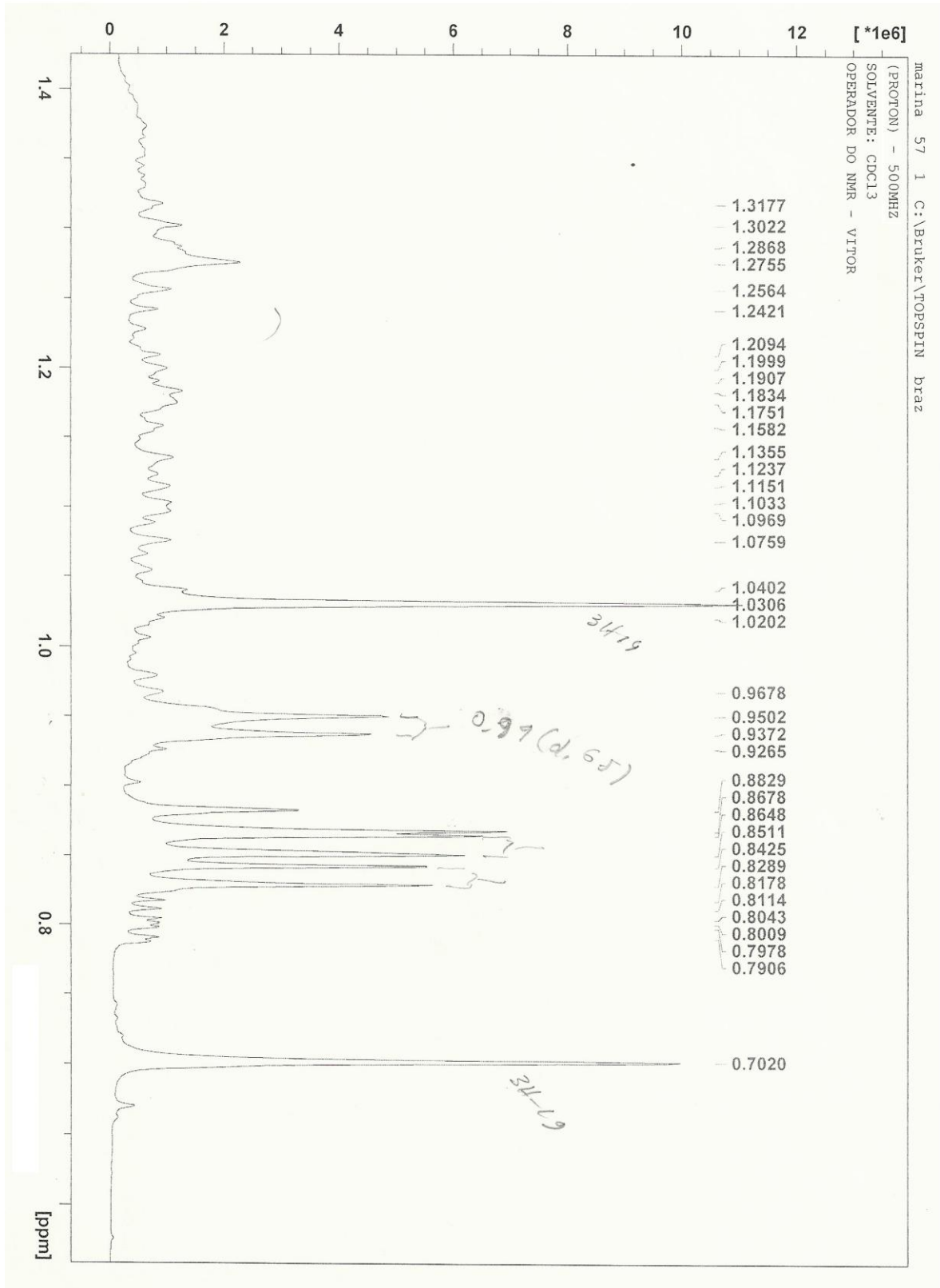


Figura 7: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do esteroide **3**.



**Figura 8:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  7,5 a 3,5 do esteroide **3**.



**Figura 9:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  1,4 a 0,7 do esteroide **3**.

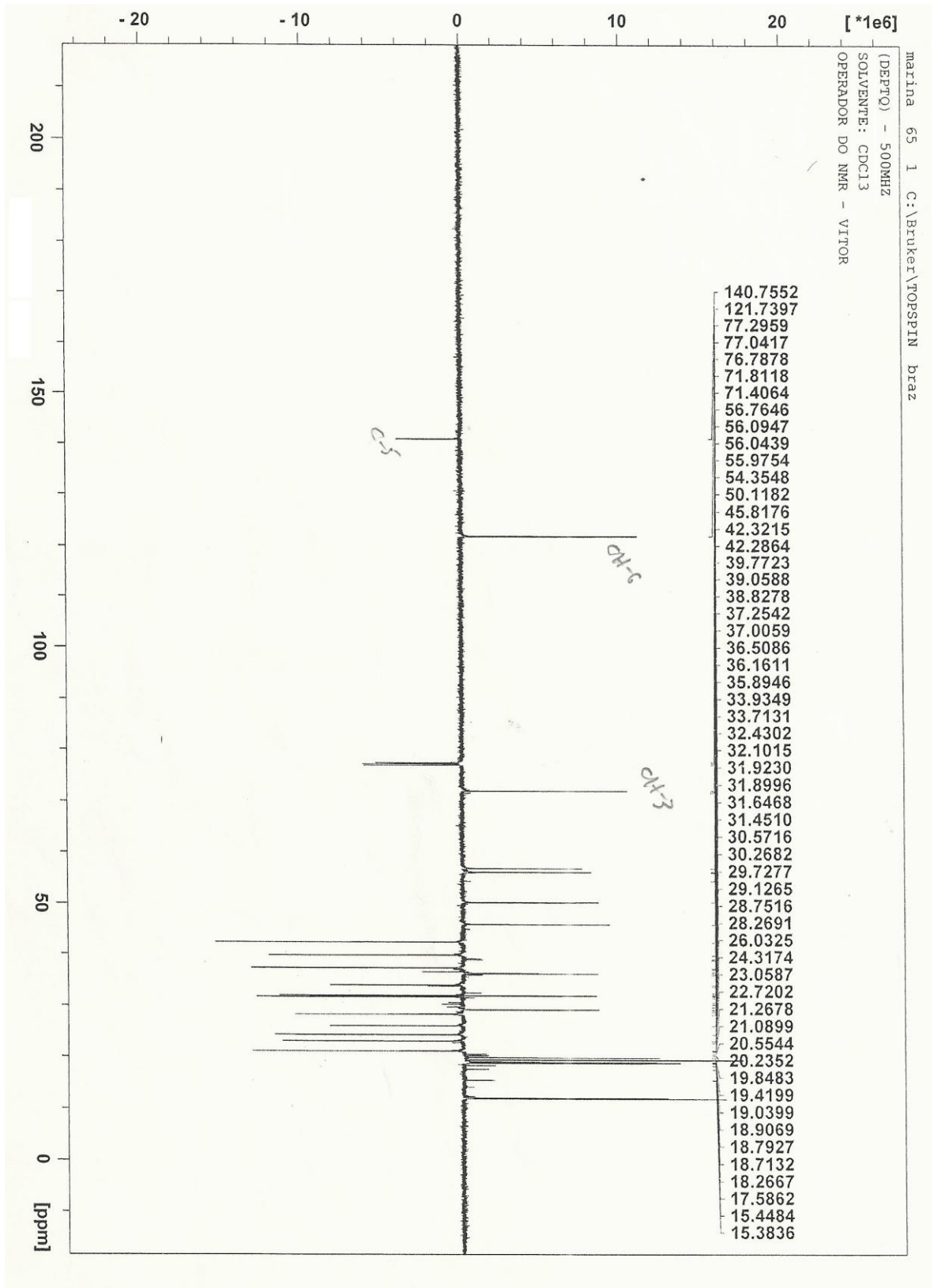
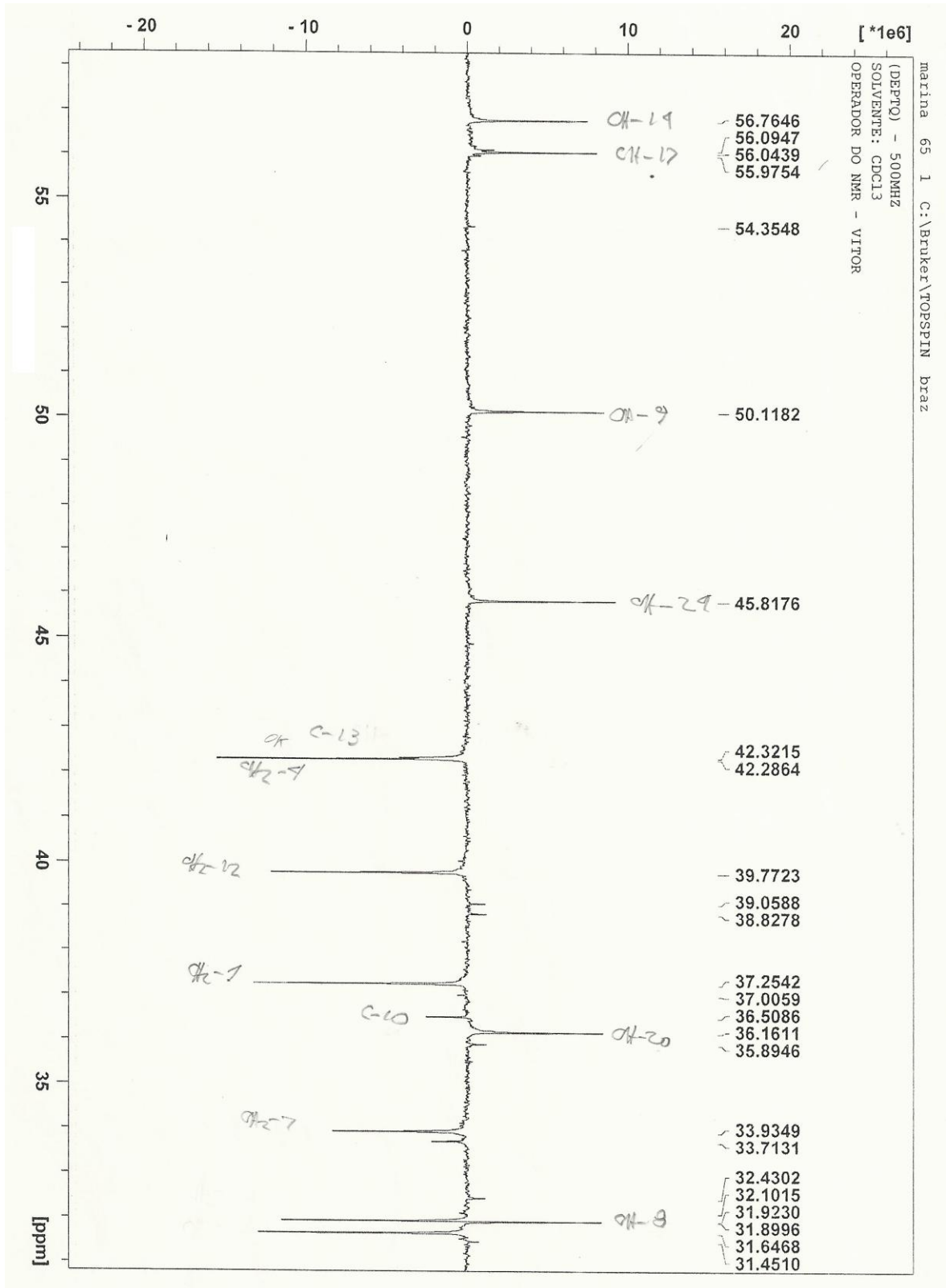
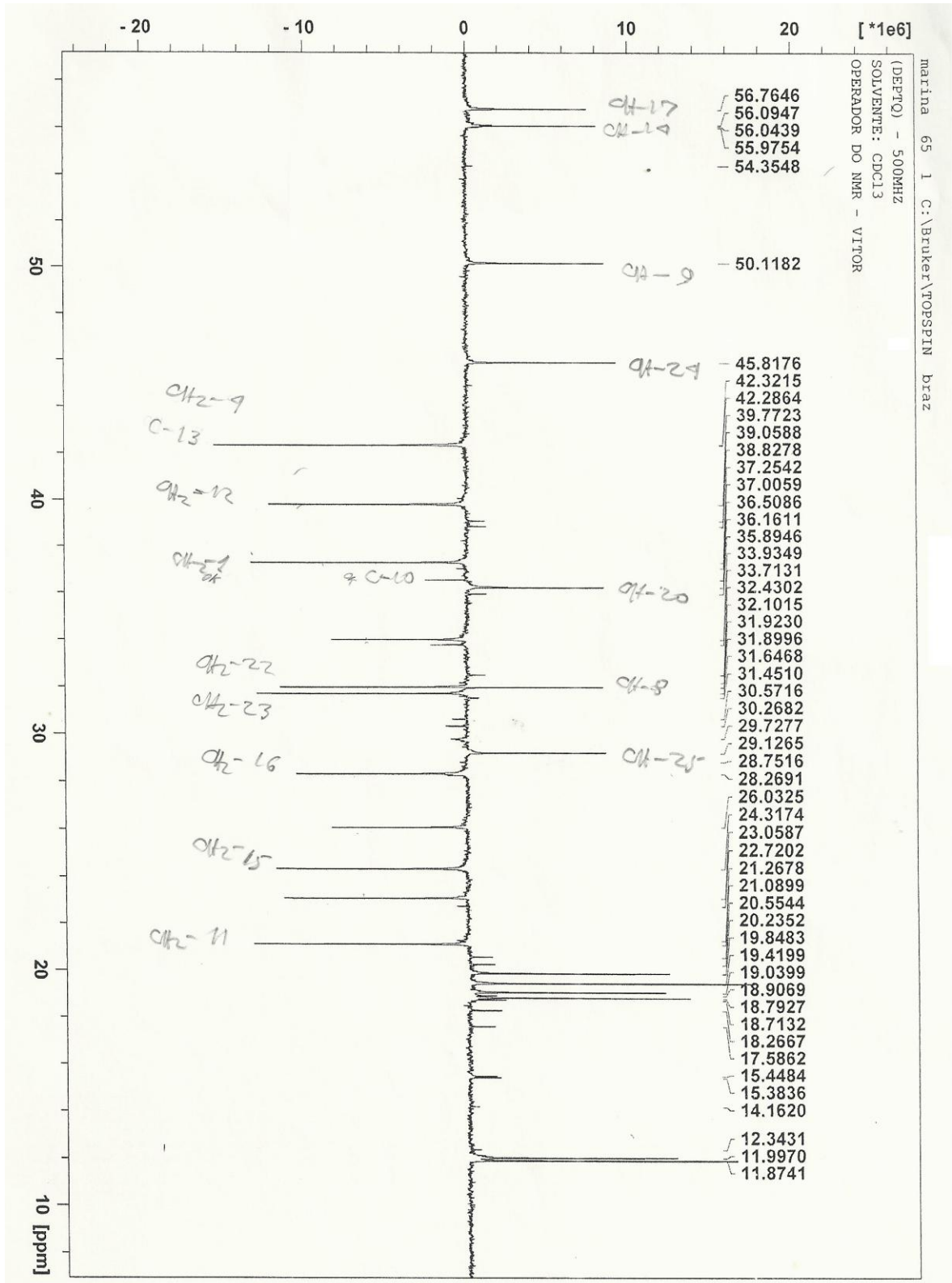


Figura 10: Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do esteroide **3**.

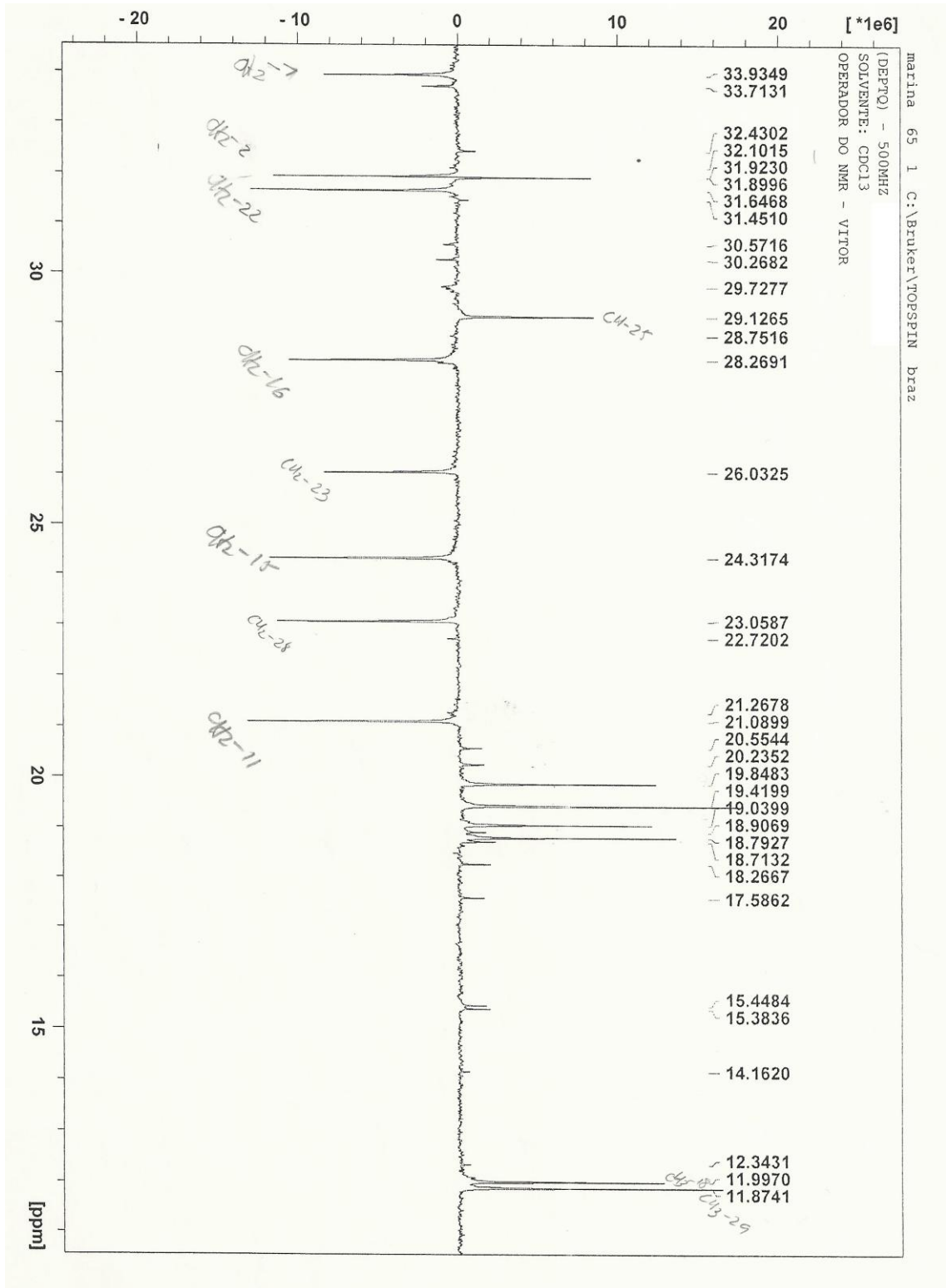


**Figura 11:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  57 a 30 do esteroide **3**.





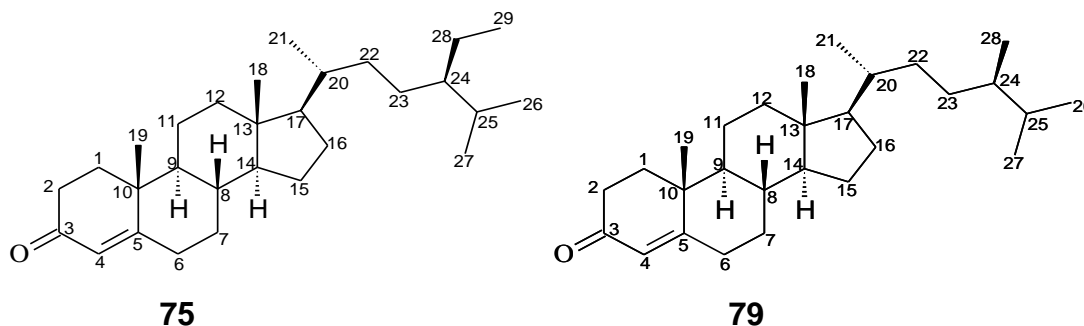
**Figura 12:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  57 a 10 do esteroide **3**.



**Figura 13:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  34 a 11 do esteroide **3**.



## 6.2.2 Identificação da mistura das substâncias 75 e 79



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 15, pág. 52**) apresenta um conjunto de sinais na região mais protegida do espectro, em  $\delta_{\text{H}}$  2,41- 0,77, definindo o núcleo esteroidal. Também é observado um sinal simples integrando para um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,74 atribuído ao hidrogênio H-4, o qual confirma a presença de uma ligação dupla nessa posição. Entretanto não foi observado um multiplete na região de  $\delta_{\text{H}}$  3,50 relativo ao H-3, sugerindo que esta posição não seria hidrogenada e, portanto, estaria substituída por um grupo carbonila, caracterizando o esteroide sitostenona (**75**).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 16, pág. 53**) pode-se observar um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  200,0 referente a um carbono carbonílico C-3. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  124,1 e  $\delta_{\text{C}}$  171,7 característicos de carbonos com dupla ligação podem ser atribuídos aos carbonos CH-4 e C-5 respectivamente, comprovando então a existência de um sistema enônico.

O pico em  $m/z = 412$  Dalton apresentado no espectro de massas (**Esquemas 4 e 5, pág. 50 e 51, Figura 14, pág. 50**), compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ , confirmou a identificação do esteroide **75**, juntamente com a presença do pico em  $m/z = 398$  Dalton massas, indicou também a ocorrência do esteroide campestenona (**79**) em mistura com a sitostenona (**75**).

Os dados descritos acima e presentes na **Tabela 16, p. 49** quando comparados com dados existentes na literatura (Vieira, 1995; Breitmaier e Voelter, 1987) confirmam a presença da estrutura proposta.

**Tabela 16:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) do esteroide **75** e as comparações com valores da literatura para a substância sitostenona, em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão em ppm (Vieira, 1995).

	esteroide ( <b>75</b> )	sitostenona
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>		
3	200,0	200,1
5	171,7	172,5
10	35,7	36,1
13	42,4	42,7
<b>CH</b>		
4	124,1	123,8
8	35,6	35,8
9	53,8	54,0
14	55,9	55,9
17	56,0	56,1
20	36,1	36,3
24	45,9	45,9
25	29,2	29,3
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	38,6	38,8
2	34,0	34,1
6	33,0	32,1
7	32,1	32,0
11	21,0	21,2
12	39,6	39,8
15	24,2	24,3
16	28,2	29,3
22	34,0	34,0
23	26,1	26,2
28	23,1	23,3
<b>CH<sub>3</sub></b>		
18	-	12,2
19	17,4	17,5
21	18,7	18,9
26	19,8	19,2
27	19,0	18,6
29	12,0	12,2

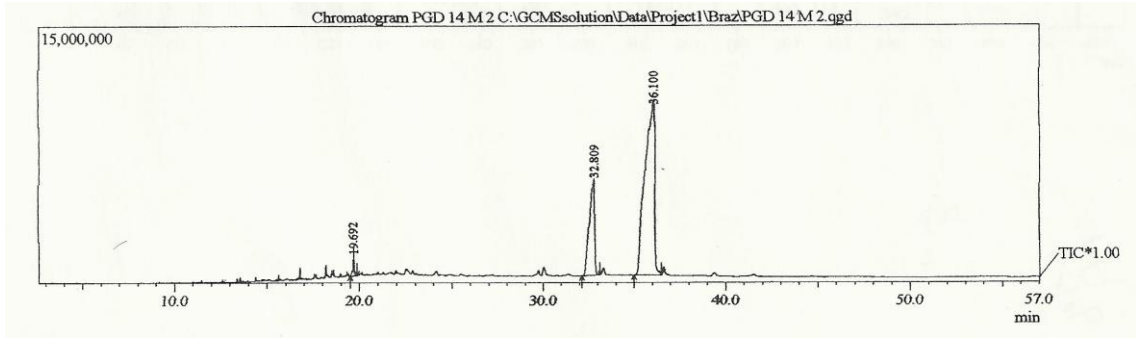
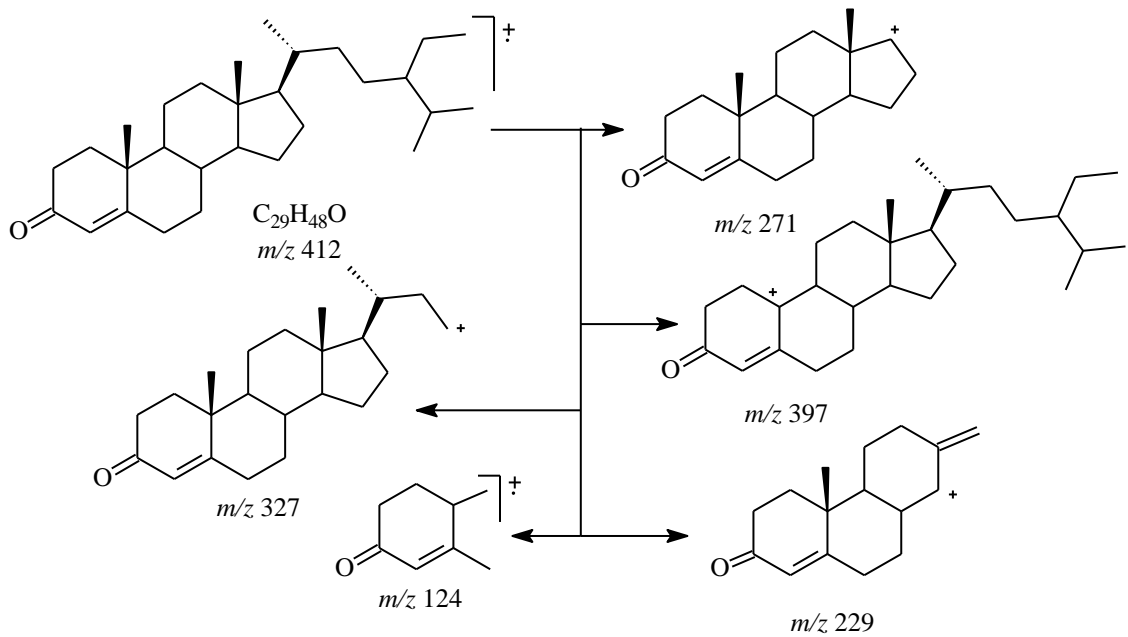
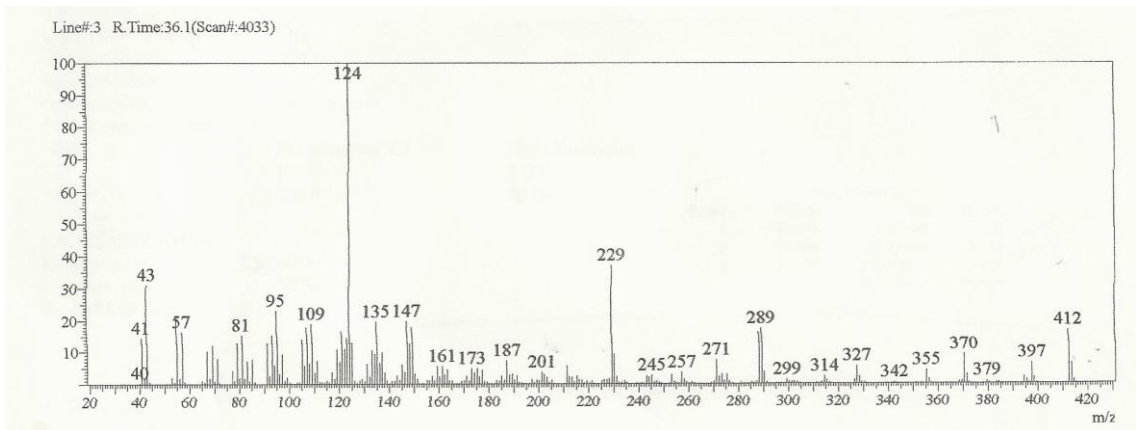
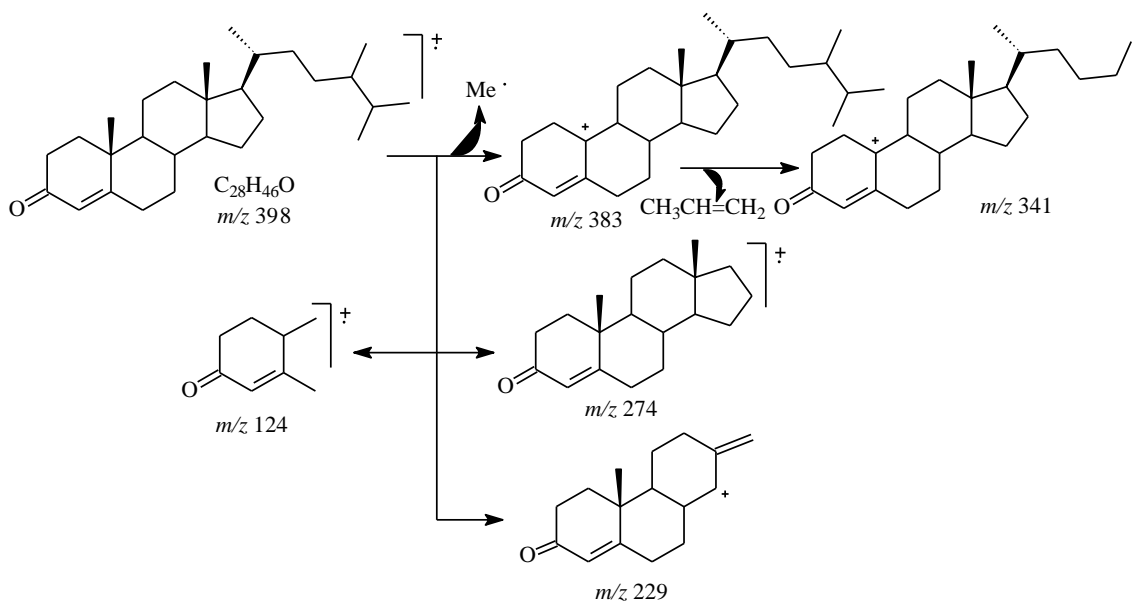
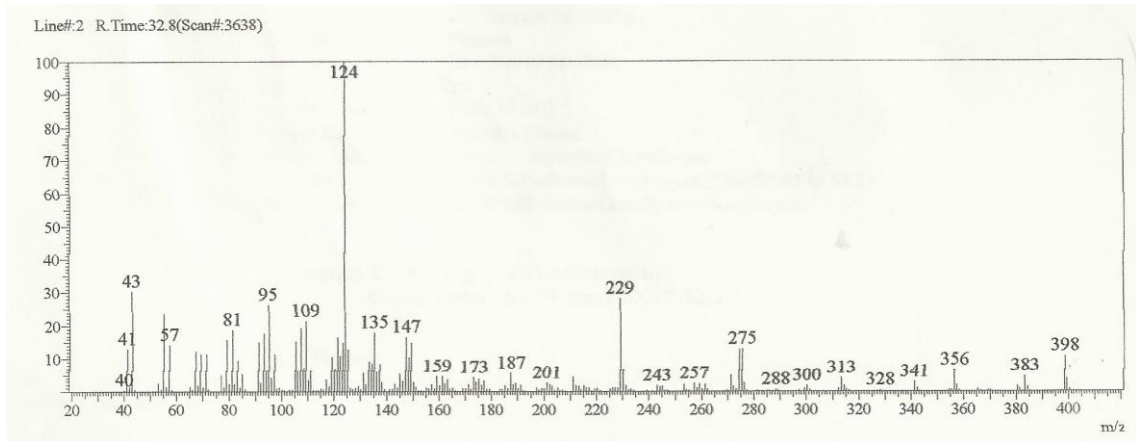


Figura 14: Cromatograma da mistura de esteroides 75 e 79.



Esquema 4: Interpretação mecânica dos principais fragmentos no espectro de massas da sitostenona (75); Tempo de retenção 36,1 (76,2 %).



**Esquema 5:** Interpretação mecânica dos principais fragmentos no espectro de massas do campestenona (**79**); Tempo de retenção 32,8 (22,6%).

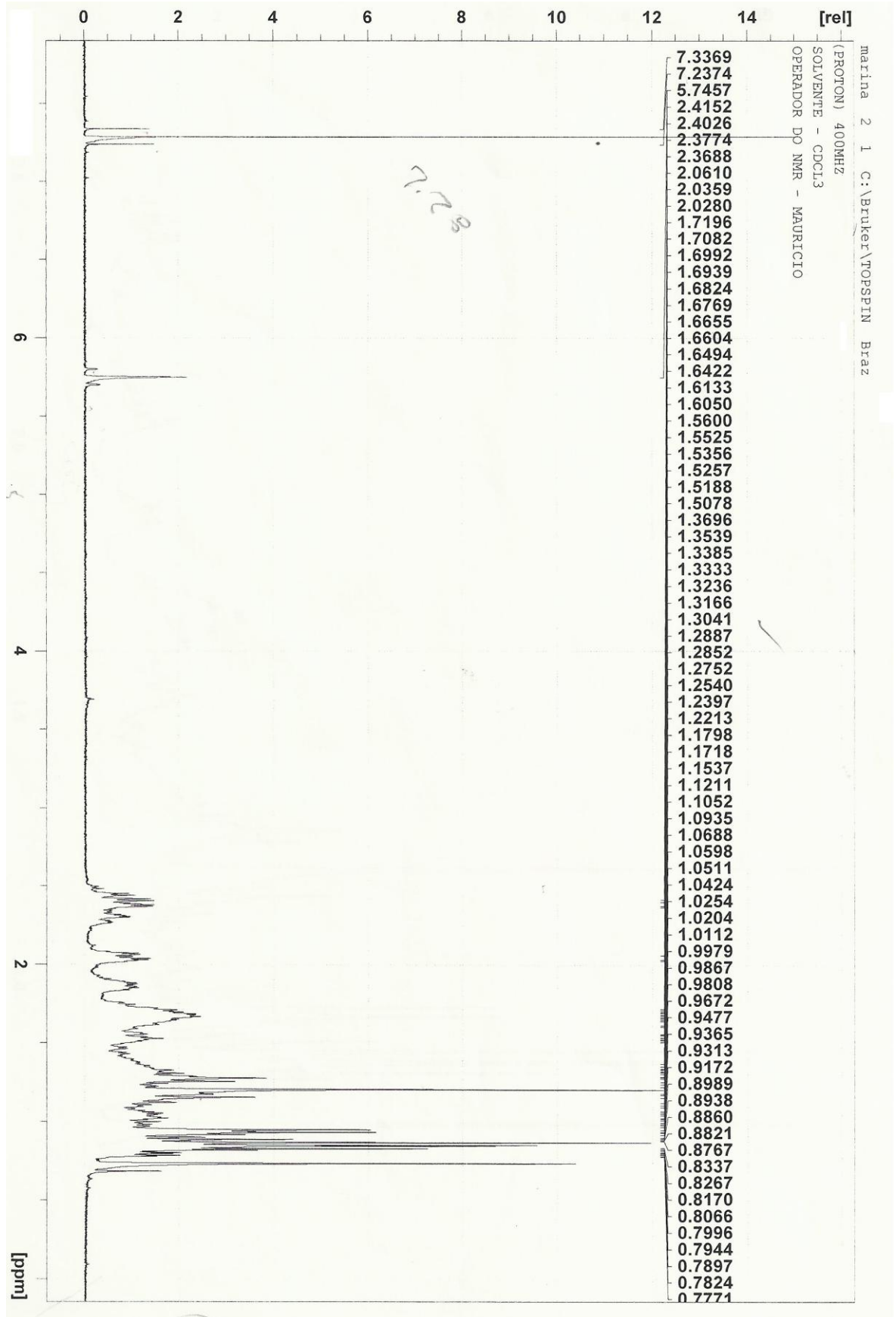
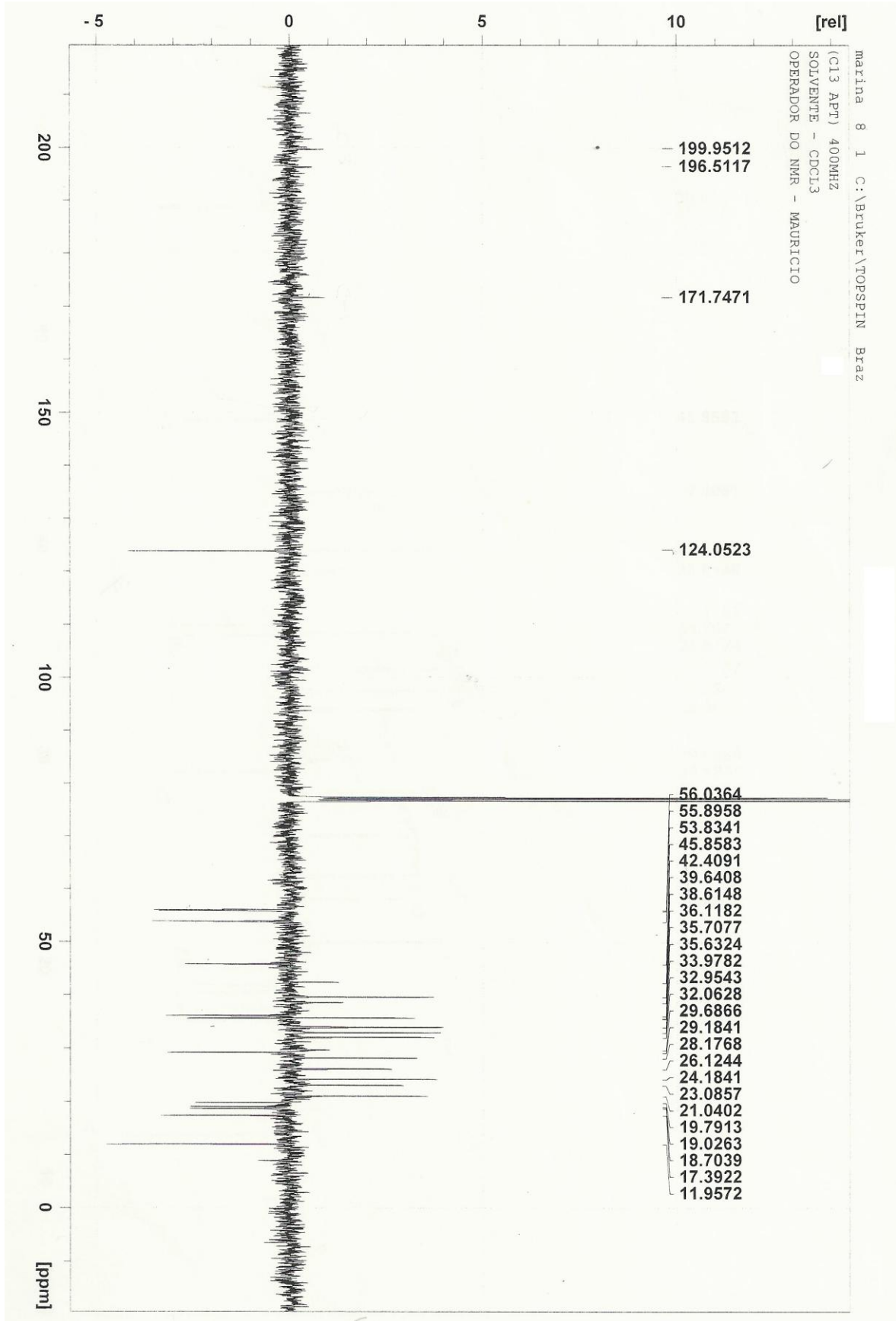
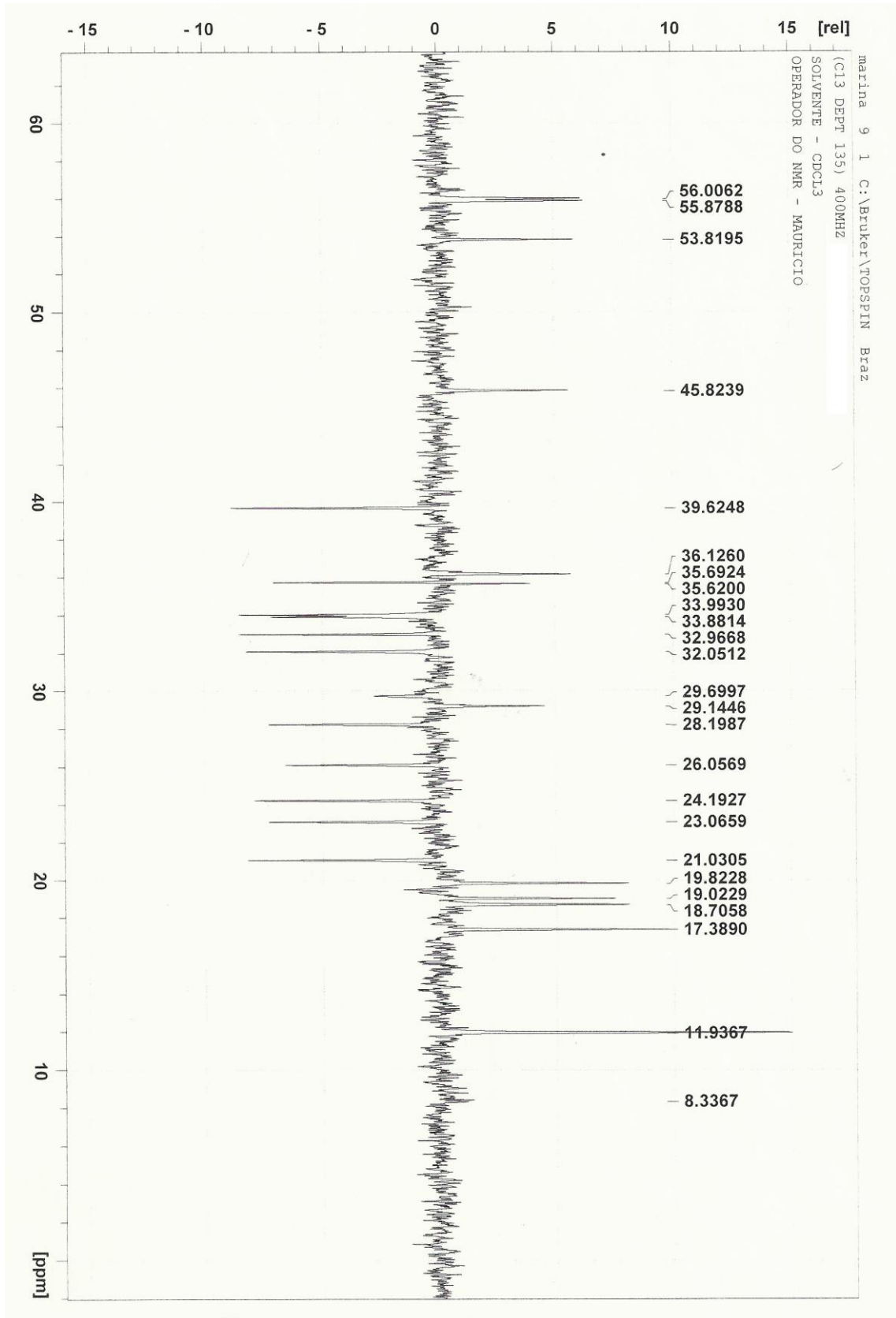


Figura 15: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do esteroide **75**.



**Figura 16:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do esteroide **75**.



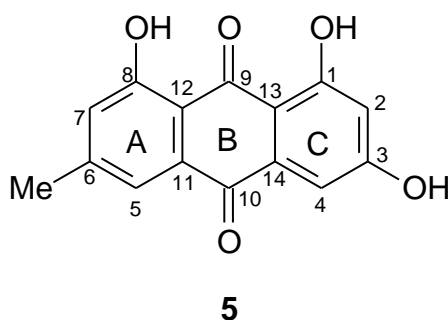
**Figura 17:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  60 a 10 do esteroide **75**.

### 6.3 Determinação estrutural das antraquinonas

As antraquinonas constituem o grupo mais numeroso das quinonas naturais, são estáveis e geralmente formadas a partir de antronas livres por auto-oxidação ou pela ação de enzimas próprias das plantas (peroxidases ou oxidases). Além disso, apresentam significativas atividades biológicas (Simões, 2007).

Vale ressaltar, que as antraquinonas geralmente se apresentam como substâncias cristalinas de cor amarela, vermelha ou laranja e estão distribuídas largamente no reino vegetal, desde plantas superiores até fungos e líquens (Santos, 2008).

#### 6.3.1 Identificação da substância 5



A substância **5** presente em várias frações de *Picramnia ramiflora*, foi caracterizada como um sólido cristalino alaranjado apresentando ponto de fusão de 162°C. Apresentou teste positivo para antraquinonas (coloração rosa em solução de KOH em metanol 10%).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da antraquinona **5** (Figuras 18 e 19, págs. 59 e 60), apresenta sinais característicos de dois hidrogênios hidroxílicos quelados em  $\delta_{\text{H}}$  12,19 e 12,09, ligados aos átomos de carbono 1 e 8, respectivamente, e um sinal integrando para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,48, atribuído a um grupo metílico, e ainda quatro sinais referentes a hidrogênios aromáticos (Silverstein et al., 2007).

A localização dos dois grupos hidroxila quelados ligados aos átomos de carbono 1 e 8 foi confirmada através das correlações heteronucleares  $^2J$  entre os átomos de carbono C-1 em  $\delta_{\text{C}}$  165,4 com o hidrogênio hidroxílico em  $\delta_{\text{H}}$  12,19 (HO-1), e C-8 em  $\delta_{\text{C}}$  162,4 com o hidrogênio hidroxílico (HO-8) em  $\delta_{\text{H}}$  12,09,



ambas apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figuras 24 e 25, págs. 65 e 66; Tabela 17, pág. 58**).

A localização dos dois grupos hidroxila quelados ligados aos átomos de carbono 1 e 8 foi corroborada ainda pelas correlações  $^3J$  entre os átomos de carbono C-13 em  $\delta_C$  109,5 com o hidrogênio hidroxílico (HO-1) em  $\delta_H$  12,19, e entre C-12 em  $\delta_C$  113,6 e CH-7 em  $\delta_C$  124,1, ambos com o hidrogênio hidroxílico (HO-8) em  $\delta_H$  12,09, apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figuras 24 e 25, págs. 65 e 66; Tabela 17, pág. 58**).

A presença do sinal integrando para três hidrogênios em  $\delta_H$  2,48, atribuído a um grupo metílico ligado ao átomo de carbono 6 no anel A do esqueleto antracênico foi confirmada pela correlação heteronuclear  $^2J$  entre o átomo de carbono quaternário C-6 em  $\delta_C$  148,7 com os hidrogênios do grupo em metila em  $\delta_H$  2,48, corroboradas ainda pelas correlações  $^3J$  entre os átomos de carbono CH-5 em  $\delta_C$  120,6 e CH-7 em  $\delta_C$  124,1 com os hidrogênios do grupo em metila em  $\delta_H$  2,48, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 24 e 25, págs. 65 e 66; Tabela 17, p. 58**).

O modelo padrão de substituição no esqueleto antracênico da antraquinona **5** foi definido pelos deslocamentos químicos, e as multiplicidades dos hidrogênios aromáticos. No anel C do esqueleto antracênico, dois sinais duplos em  $\delta_H$  6,67 (d,  $J= 2,0$  Hz, H-2), 7,25 (d,  $J= 2,0$  Hz, H-4 *peri* carbonílico) foram atribuídos ao hidrogênios aromáticos H-2 e H-4, respectivamente. Já no anel A do esqueleto antracênico, os sinais dos hidrogênios aromáticos aparecem como sinais simples integrando para um hidrogênio cada em  $\delta_H$  7,56 referente ao hidrogênio H-5 *peri* carbonílico, e em  $\delta_H$  7,14 referente ao hidrogênio H-7, ambos apresentados no espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 19, pág. 60; Tabela 17, pág. 58**).

Este padrão de substituição do anel antracênico foi confirmado através das correlações  $^3J$  entre o átomo de carbono carbonílico C-10 em  $\delta_C$  181,3 com os hidrogênios H-4 em  $\delta_H$  7,25 e com hidrogênio H-5 em  $\delta_H$  7,56; e dos carbonos quaternários C-13 em  $\delta_C$  109,5 com o hidrogênio H-2 em  $\delta_H$  6,67, e C-12 em  $\delta_C$  113,6 com o hidrogênio H-7 em  $\delta_H$  7,14, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figura 24 e 25, págs. 65 e 66; Tabela 17, pág. 58**). As demais correlações encontram-se sumarizadas na **Tabela 17, página 58**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 21-23, págs. 62-64**). A

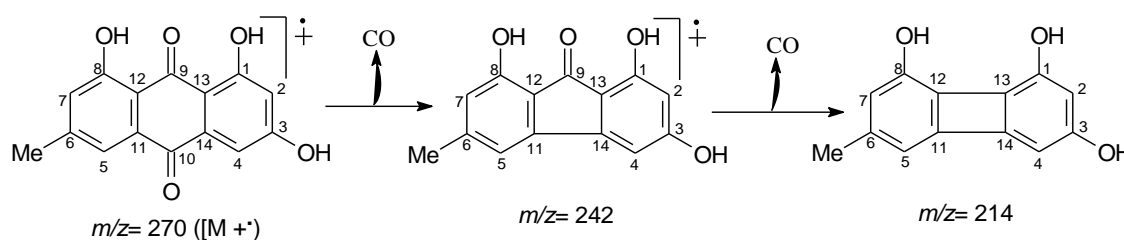
análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Figura 20, pág. 61**) da antraquinona **5** mostrou sinais em  $\delta_{\text{C}}$  190,8 e 181,3, correspondentes aos carbonos carbonílicos C-9 e C-10, confirmados anteriormente no mapa de correlação HMBC (**Figuras 24 e 25, págs. 65 e 66**).

A presença de um grupo hidroxila HO-3 ligado ao átomo de carbono 3 foi observada pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  165,6 apresentado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Figura 20, pág. 61**), característico de carbono aromático substituído por grupo hidroxila (Silverstein et al., 2007).

Os deslocamentos químicos para os dois carbonos carbonílicos de antraquinonas estão em torno de  $\delta_{\text{C}}$  183,0, já quando há ligação de hidrogênio intramolecular há uma desproteção de aproximadamente 5,0 ppm, sendo que na presença de dois grupos hidroxilas quelados o deslocamento químico fica em torno de  $\delta_{\text{C}}$  190,0 (Vieira, 1995).

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 27, pág. 68**) da antraquinona (**5**) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z= 270$  Dalton, confirmando a proposta estrutural para uma antraquinona trihidroxilada. A proposta mecanística para os principais fragmentos da antraquinona (**5**) encontra-se no **Esquema 6, pág. 57**.

A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que antraquinona (**5**) trata-se da antraquinona 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona, conhecida como emodina (Santos et al., 2008).



**Esquema 6:** Proposta mecanística para os principais fragmentos apresentados no espectro de massas de baixa resolução (70 eV) para a antraquinona (**5**).

**Tabela 17:** Dados de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C-DEPTQ (125 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HSQC e HMBC da antraquinona (**5**), em acetona-*d*<sub>6</sub>. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (*J* entre parêntesis) estão em Hz.

Emodina ( <b>5</b> )				
	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	165,4	-	HO-1	
3	165,6	-		
6	148,7	-	Me-6	
8	162,4	-	HO-8	
9	190,8	-		
10	181,3	-		H-4; H-5
11	133,3	-		
12	113,6	-		H-5; H-7; HO-8
13	109,5	-		H-2; H-4; HO-1
14	135,7	-		
<b>CH</b>				
2	108,0	6,67 (d, 2,0)		
4	108,8	7,25 (d, 2,0)		
5	120,6	7,56 (s)		H-7; Me-6
7	124,1	7,14 (s)		H-5; Me-6; HO-8
<b>CH<sub>3</sub></b>				
Me-6	21,1	2,48 (s)		H-5; H-7
<b>HO</b>				
1	-	12,19 (s)		
8	-	12,09 (s)		

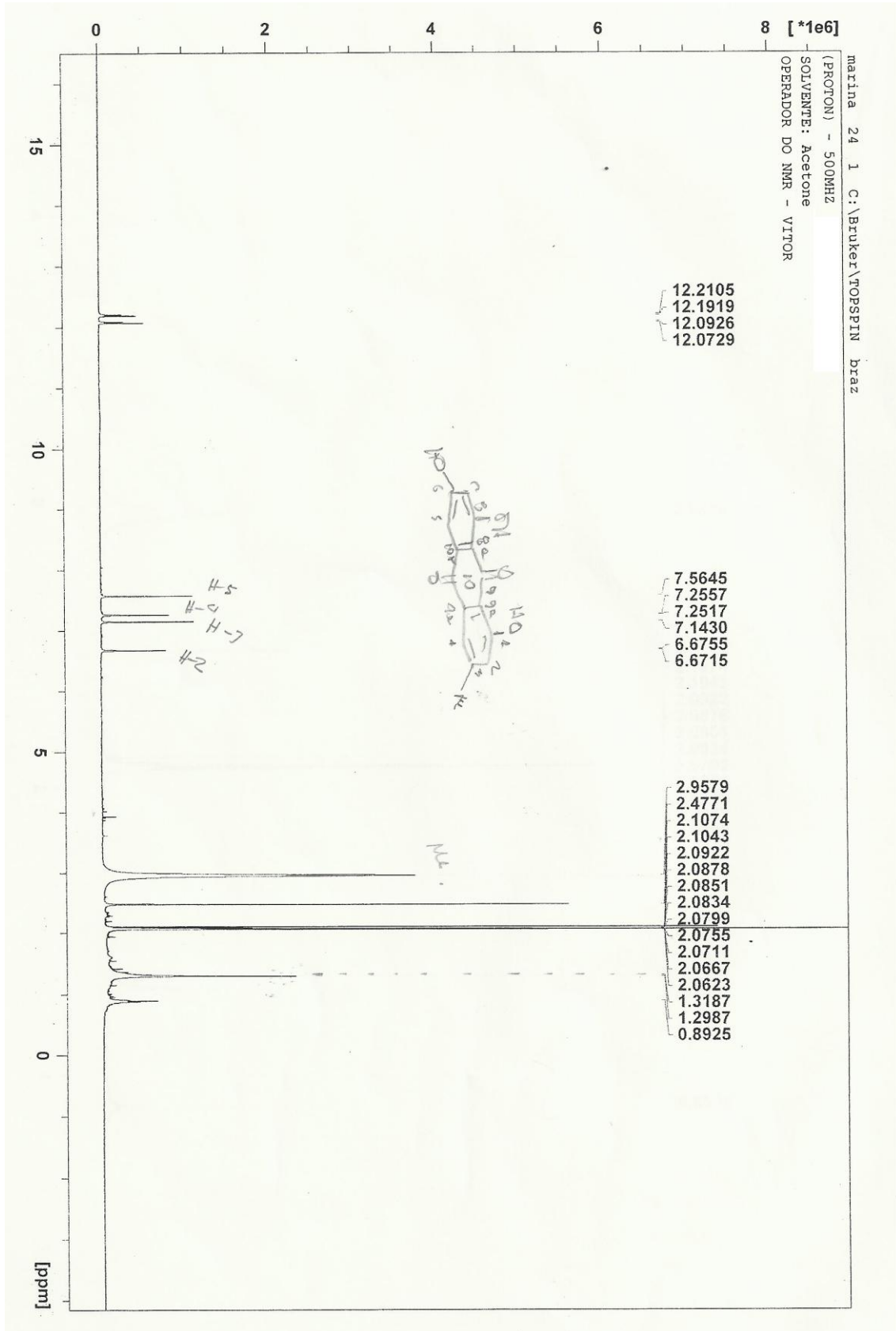
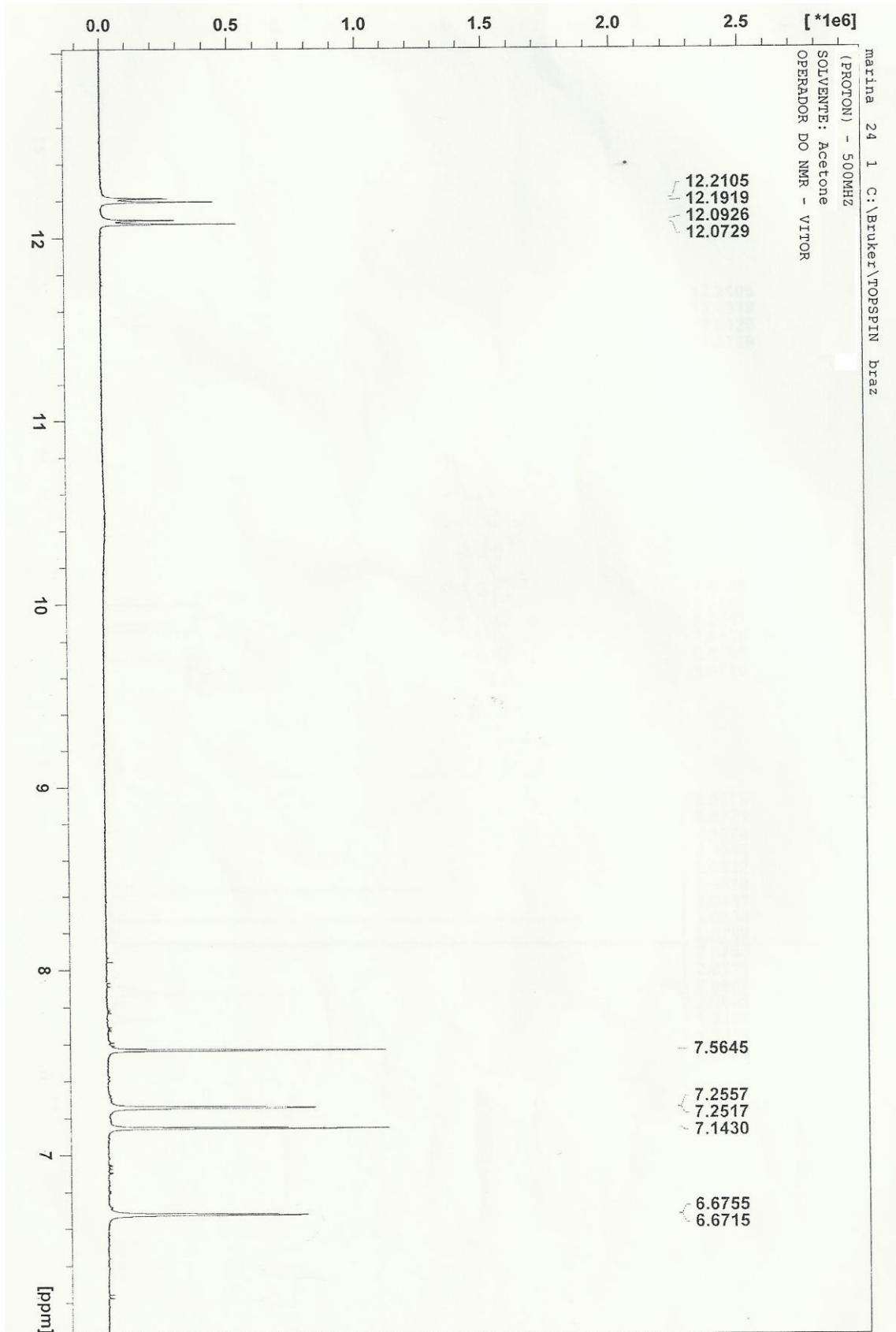


Figura 18: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) da antraquinona **5**.



**Figura 19:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>) com ampliação da região  $\delta_{\text{H}}$  12,5 a 6,5 da antraquinona **5**.

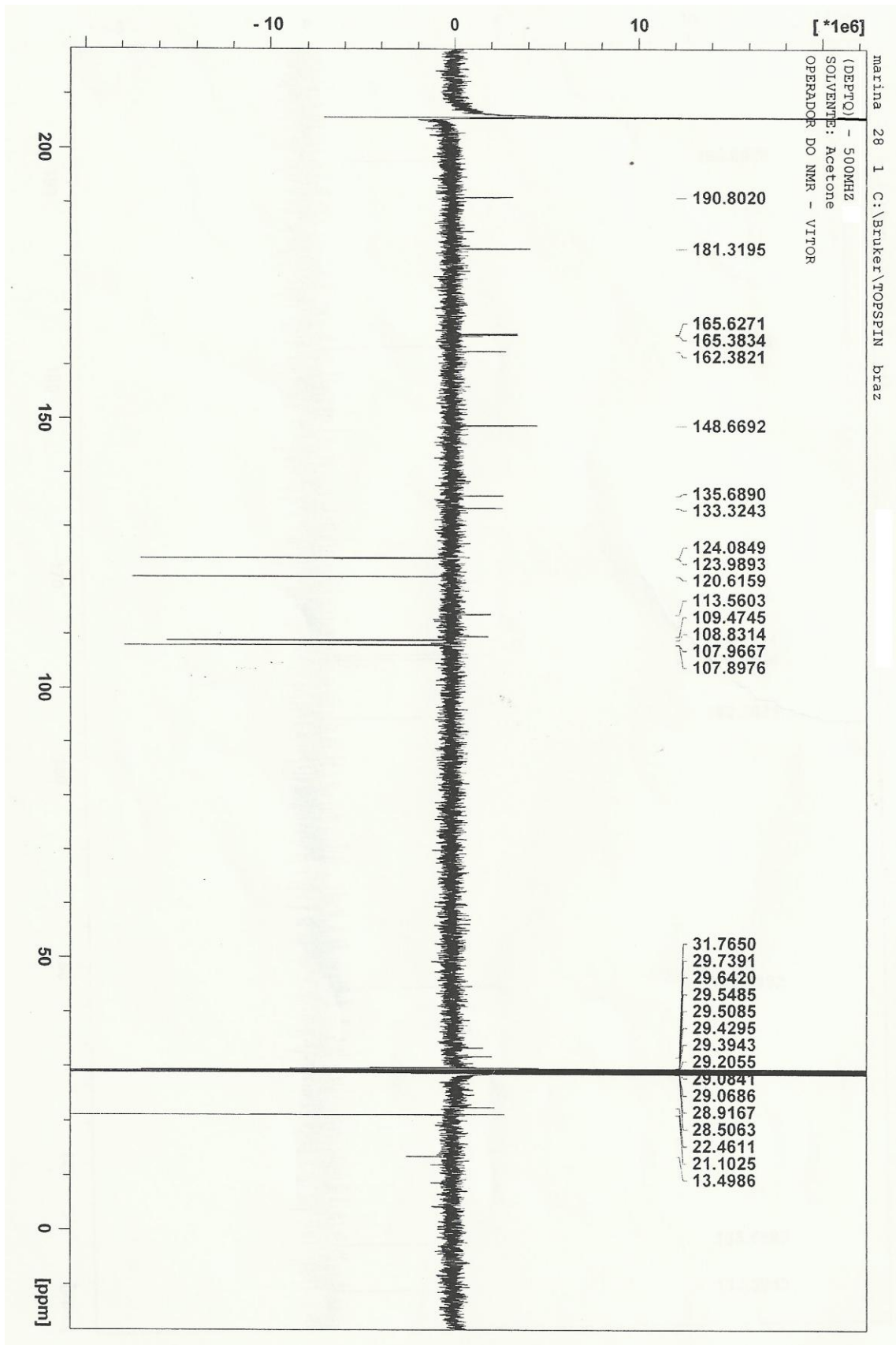
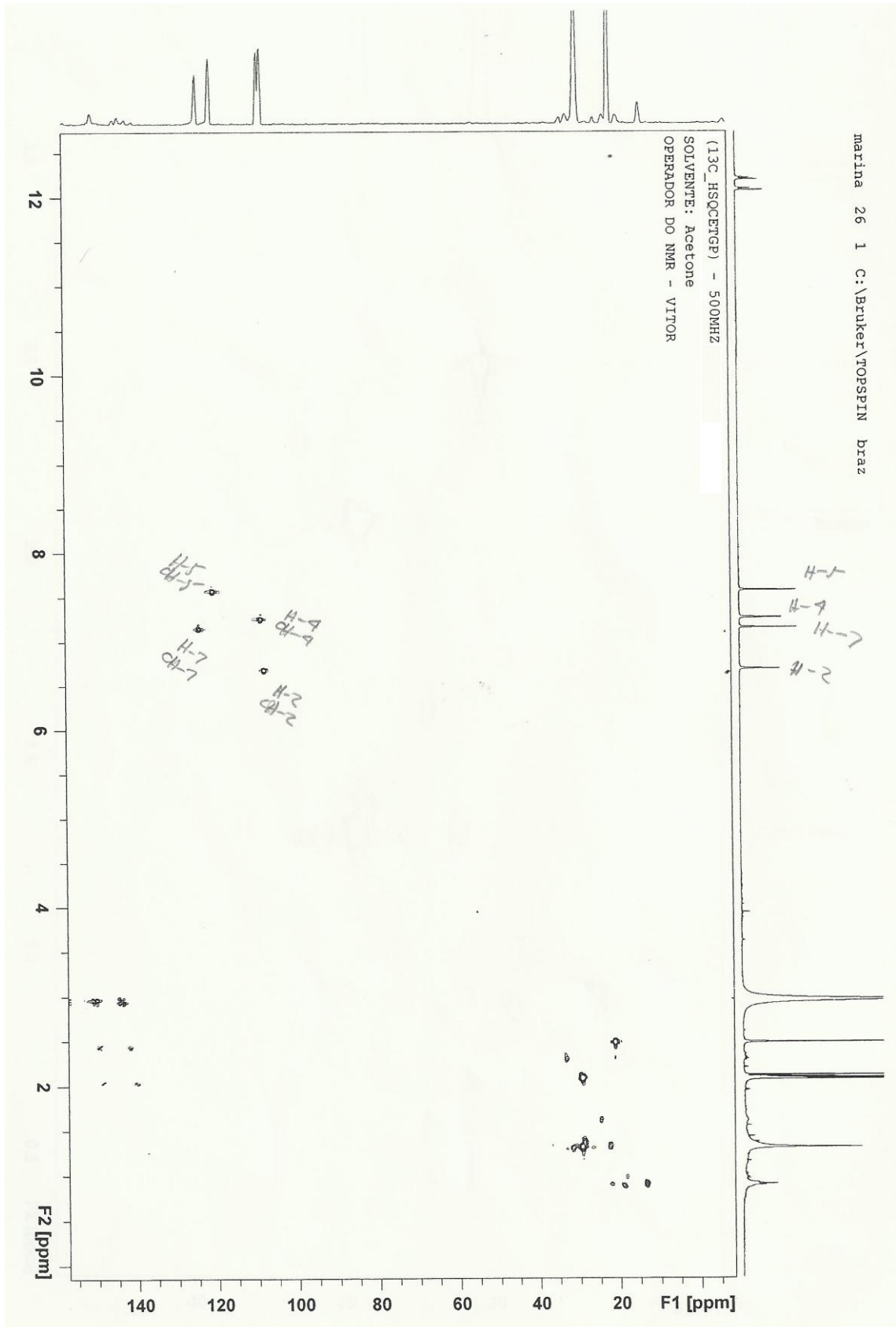
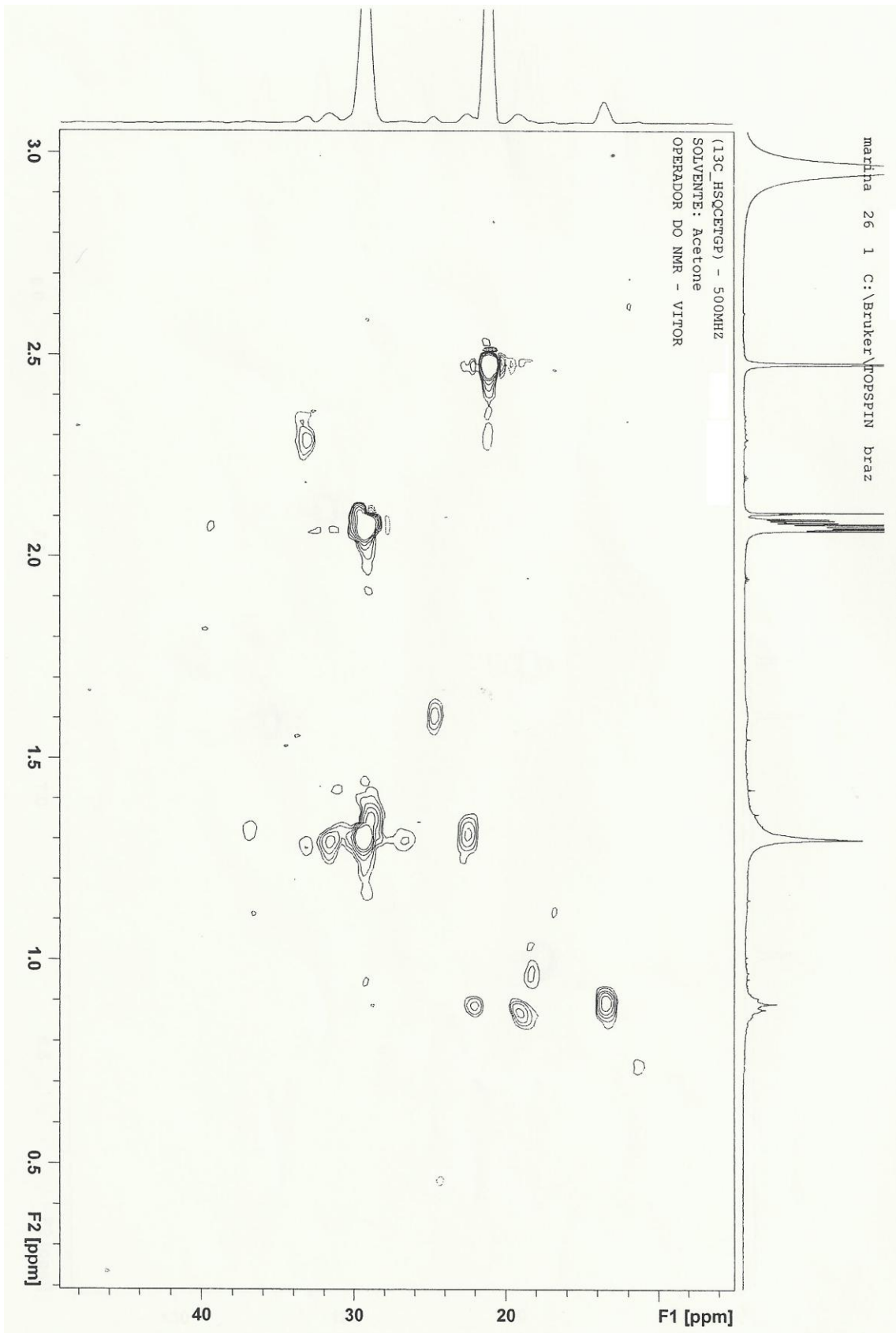


Figura 20: Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) da antraquinona 5.

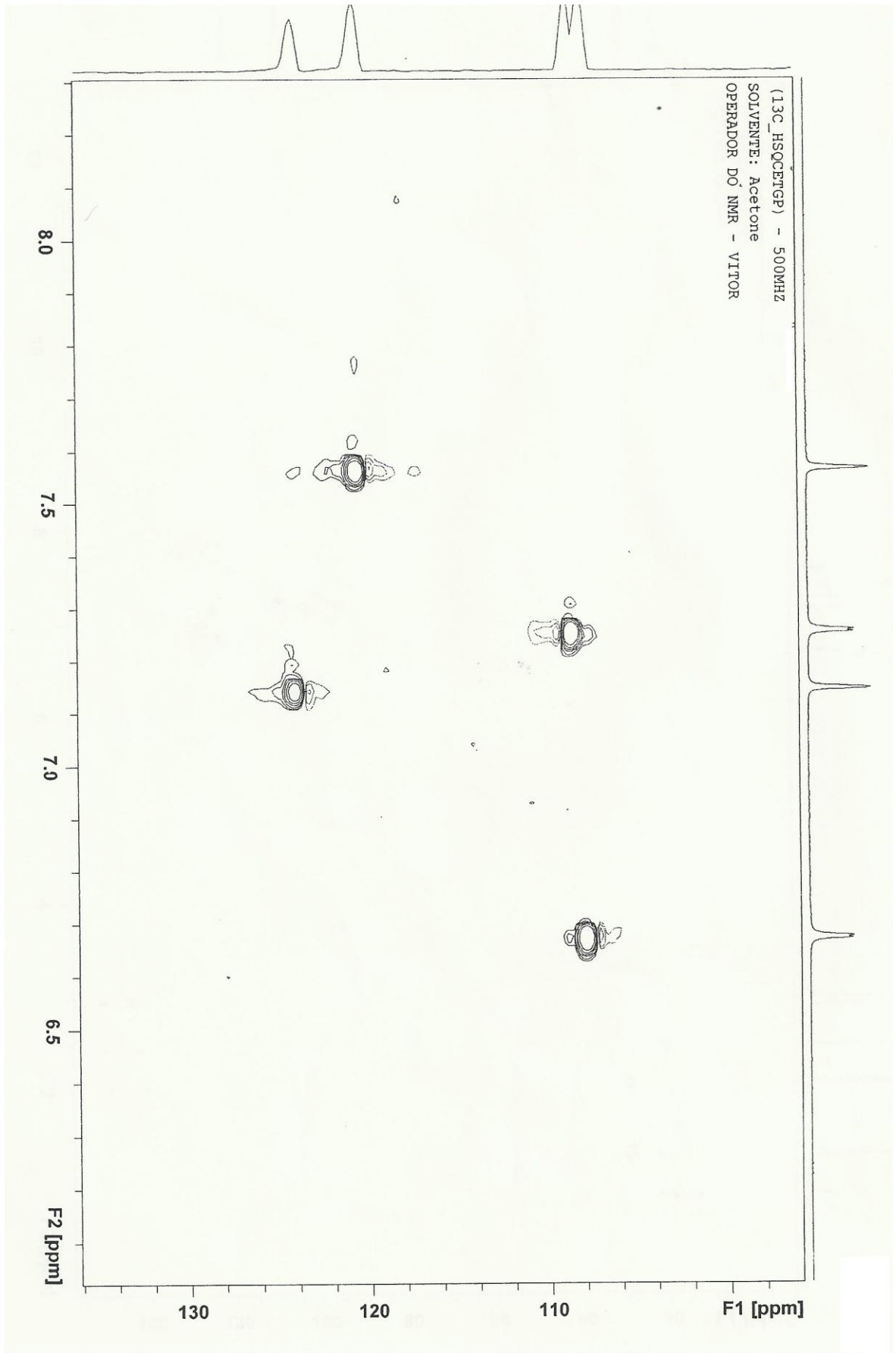


**Figura 21:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC em acetona- $d_6$  da antraquinona **5**.

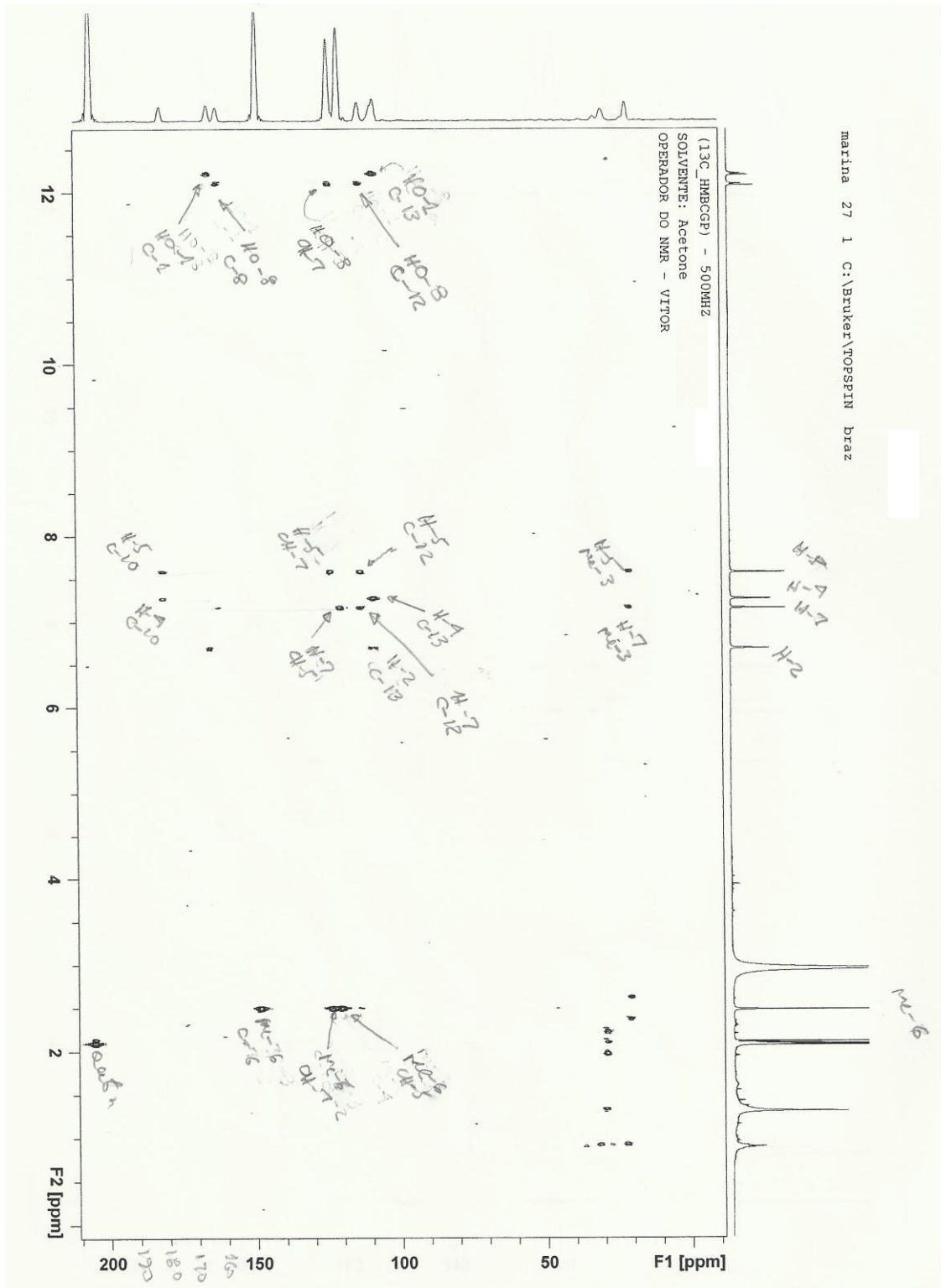


**Figura 22:** Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em acetona- $d_6$  da antraquinona **5**.

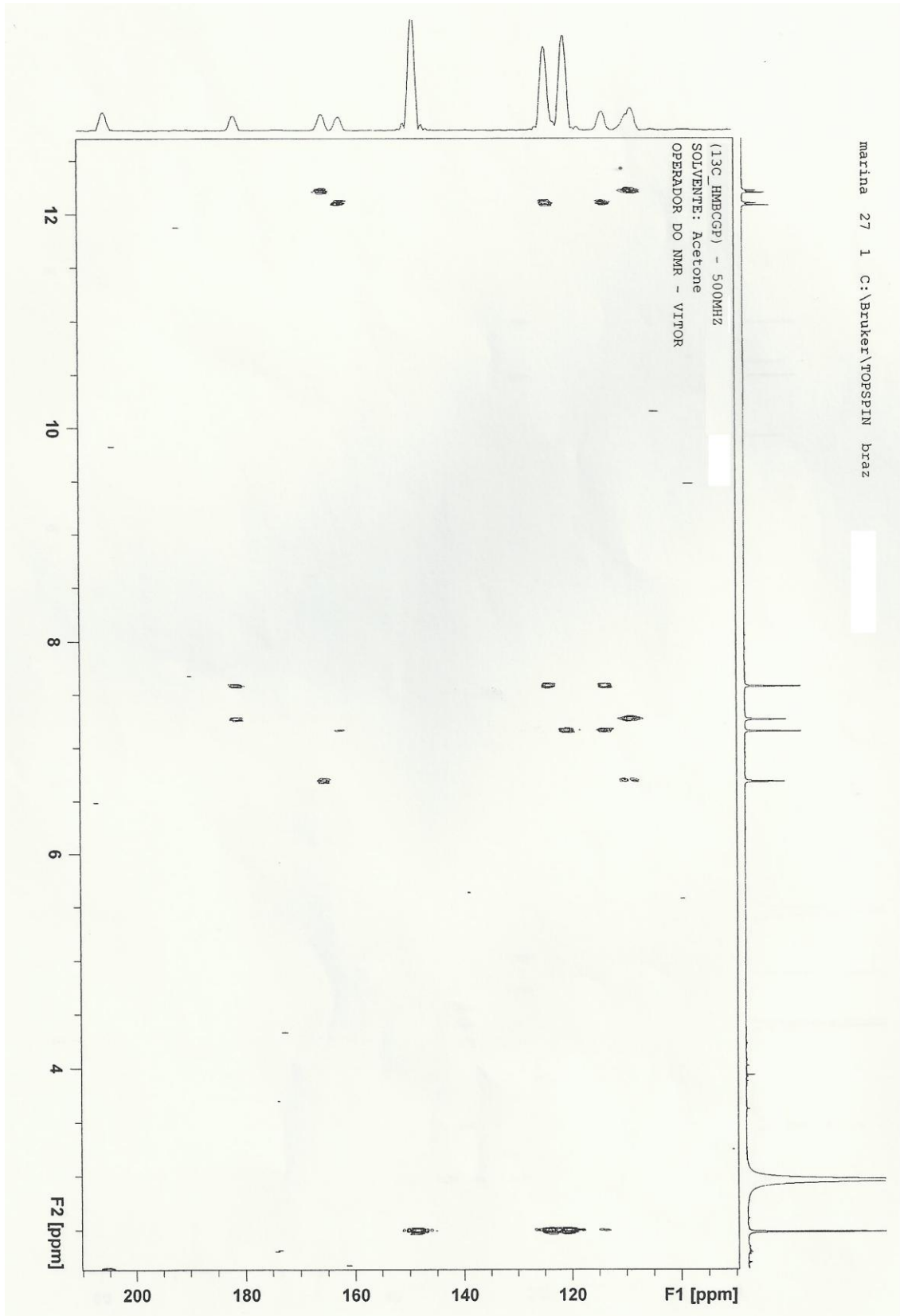




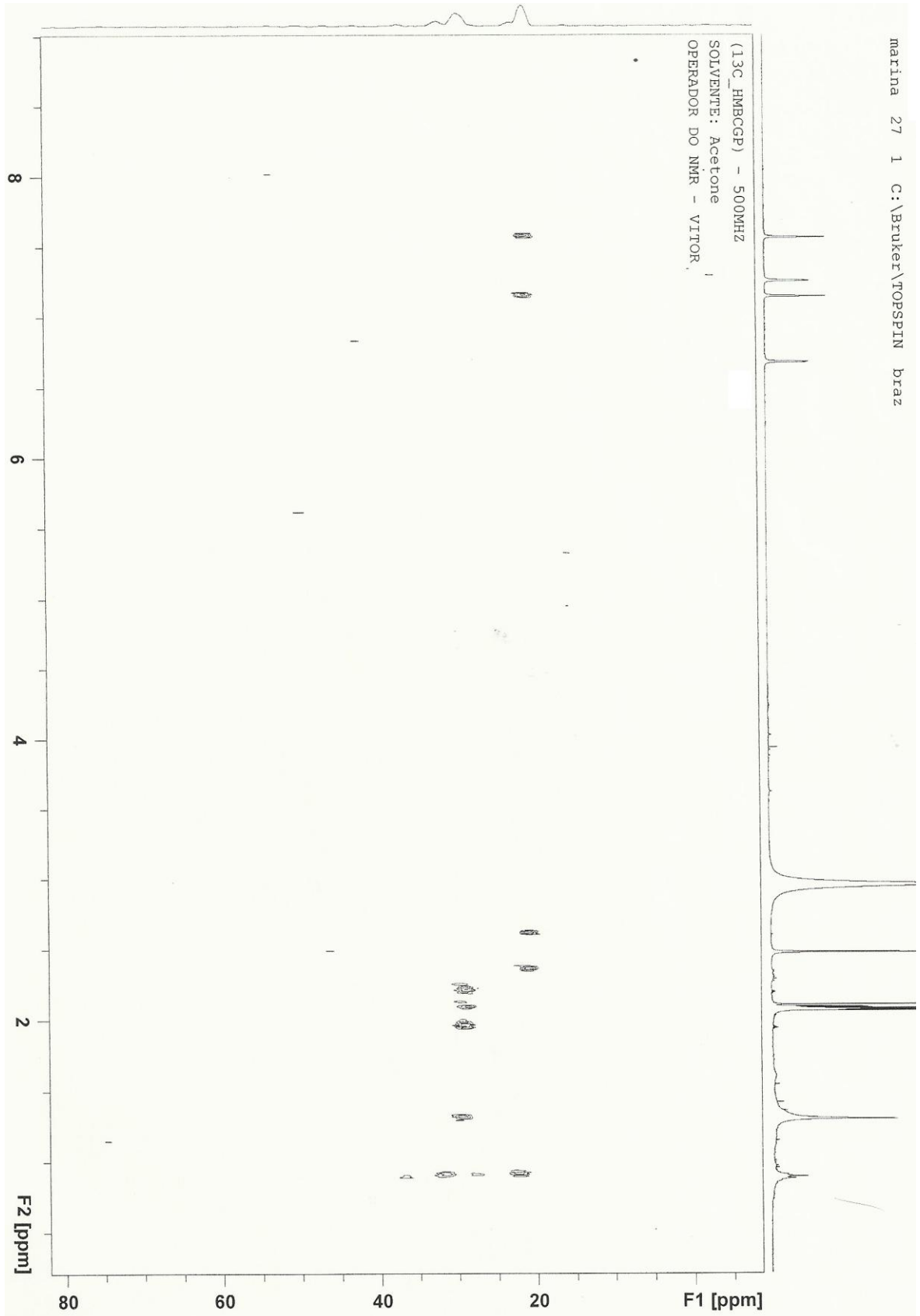
**Figura 23:** Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em acetona- $d_6$  da antraquinona **5**.



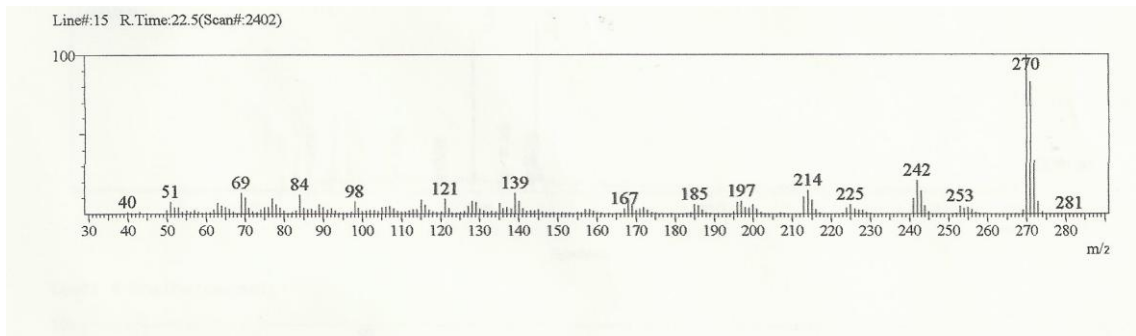
**Figura 24:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC em acetona- $d_6$  da antraquinona **5**.



**Figura 25:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em acetona- $d_6$  da antraquinona 5.

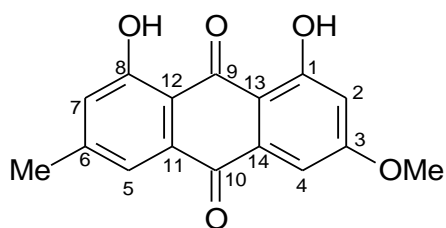


**Figura 26:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em acetona- $d_6$  da antraquinona **5**.



**Figura 27:** Espectro de massas da antraquinona 5.

### 6.3.2 Identificação da substância 42



**42**

A substância **42** foi caracterizada como um sólido cristalino alaranjado apresentando ponto de fusão de 207°C. Apresentou teste positivo para antraquinonas (coloração rosa em solução de KOH em metanol 10%).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da antraquinona **42** (**Figuras 28 e 29, págs. 72 e 73**), apresenta sinais característicos de dois hidrogênios hidroxílicos quelados em  $\delta_{\text{H}}$  12,30 e 12,11, ligados aos átomos de carbono 1 e 8, respectivamente, e um sinal integrando para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,44, atribuído a um grupo metílico ligado a anel aromático, um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,93, referente aos três hidrogênios de uma metoxila também ligado a anel aromático e ainda quatro sinais referentes a hidrogênios aromáticos, semelhante a antraquinona (**5**) (Silverstein et al., 2007).

A localização dos dois grupos hidroxila quelados ligados aos átomos de carbono 1 e 8 foi confirmada através das correlações heteronucleares  $^2J$  entre os átomos de carbono C-1 em  $\delta_{\text{C}}$  165,3 com o hidrogênio hidroxílico em  $\delta_{\text{H}}$  12,30 (HO-1), e C-8 em  $\delta_{\text{C}}$  162,5 com o hidrogênio hidroxílico (HO-8) em  $\delta_{\text{H}}$  12,11, apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figuras 35 e 36, págs. 79 e 80; Tabela 18, pág. 71**).

A localização dos dois grupos hidroxila quelados ligados aos átomos de carbono 1 e 8 foi corroborada ainda pelas  $^3J$  entre os átomos de carbono C-13 em  $\delta_{\text{C}}$  110,3 e CH-2 em  $\delta_{\text{C}}$  106,8, ambos com o hidrogênio hidroxílico (HO-1) em  $\delta_{\text{H}}$  12,30, e entre C-12 em  $\delta_{\text{C}}$  113,7 e CH-7  $\delta_{\text{C}}$  124,5, ambos com o hidrogênio hidroxílico (HO-8) em  $\delta_{\text{H}}$  12,11, apresentados no mapa de correlação HMBC (**Figuras 35 e 36, págs. 79 e 80; Tabela 18, pág. 71**).

A presença do sinal integrando para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,44, atribuído a um grupo metílico ligado ao átomo de carbono C-6 no anel A do esqueleto antracênico foi confirmada pela correlação heteronuclear  $^2J$  entre o átomo de carbono

quaternário C-6 em  $\delta_C$  148,4 com os hidrogênios do grupo em metila em  $\delta_H$  2,44, corroborado pelas correlações  $^3J$  entre os átomos de carbono CH-5 em  $\delta_C$  121,3 e CH-7 em  $\delta_C$  124,5 com os hidrogênios do grupo em metila em  $\delta_H$  2,44 apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 35 e 36, págs. 79 e 80; Tabela 18, pág. 71**).

O modelo padrão de substituição no esqueleto antracênico da antraquinona **42** foi definido pelos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos hidrogênios aromáticos. No anel C do esqueleto antracênico, dois sinais duplos em  $\delta_H$  6,67 (d,  $J=2,4$  Hz, H-2), 7,35 (d,  $J=2,4$  Hz, H-4 *peri* carbonílico) foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-4, respectivamente. Já no anel A do esqueleto antracênico, os sinais dos hidrogênios aromáticos aparecem como simpletos largos integrando para um hidrogênio cada em  $\delta_H$  7,62 referente ao hidrogênio H-5 *peri* carbonílico, e em  $\delta_H$  7,07 referente ao hidrogênio H-7, ambos apresentados no espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 29, pág. 73; Tabela 18, pág. 71**).

O modo de substituição do anel antracênico foi confirmado através das correlações  $^3J$  entre o átomo de carbono carbonílico C-10 em  $\delta_C$  182,0 com o hidrogênio H-5 em  $\delta_H$  7,62; e do carbono quaternário C-12 em  $\delta_C$  113,7 com os hidrogênios H-5 em  $\delta_H$  7,62 e H-7 em  $\delta_H$  7,07, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 35 e 36, págs. 79 e 80; Tabela 18, pág. 71**). As demais correlações encontram-se sumarizadas na **Tabela 18, página 71**, e confirmadas pelo mapa de correlação HMQC (**Figuras 32-34, págs. 76-78**). A análise do espectro de RMN  $^{13}C$ - (**Figuras 30 e 31, págs. 74 e 75**) da antraquinona **42** mostrou sinais em  $\delta_C$  190,8 e 182,0, correspondentes aos carbonos carbonílicos C-9 e C-10, confirmados anteriormente no mapa de correlação HMBC (**Figuras 35 e 36, págs. 79 e 80; Tabela 18, pág. 71**).

O espectro de RMN  $^{13}C$  (**Figuras 30 e 31, págs. 74 e 75**) apresenta um sinal em  $\delta_C$  56,1, atribuído ao grupo metoxila ligado ao átomo de carbono C-3. O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 37, pág. 81**) da antraquinona (**42**) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z=284$  Dalton, confirmando a proposta estrutural.

A comparação dos dados de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que antraquinona (**42**) trata-se da antraquinona paristina (Santos et al., 2008).

**Tabela 18:** Dados de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz), <sup>13</sup>C (100 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HMQC e HMBC da antraquinona (**42**), em CDCl<sub>3</sub>. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (*J* entre parêntesis) estão em Hz.

Paristina ( <b>42</b> )				
	HMQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	165,3	-	HO-1	
3	166,5	-		
6	148,4	-	Me-6	
8	162,5	-	HO-8	
9	190,8	-		
10	182,0	-		H-5
11	133,2 <sup>a</sup>	-		
12	113,7	-		H-5; H-7; HO-8
13	110,3	-		HO-1
14	135,2 <sup>a</sup>	-		
<b>CH</b>				
2	106,8	6,67 (d, 2,4)		HO-1
4	108,2	7,35 (d, 2,4)		
5	121,3	7,62 (sl)		Me-6; H-7
7	124,5	7,07 (sl)		H-5; Me-6; HO-8
<b>CH<sub>3</sub></b>				
Me-6	22,1	2,44 (sl)		
MeO-3	56,1	3,93 (s)		
<b>HO</b>				
1	-	12,30 (s)		
8	-	12,11 (s)		



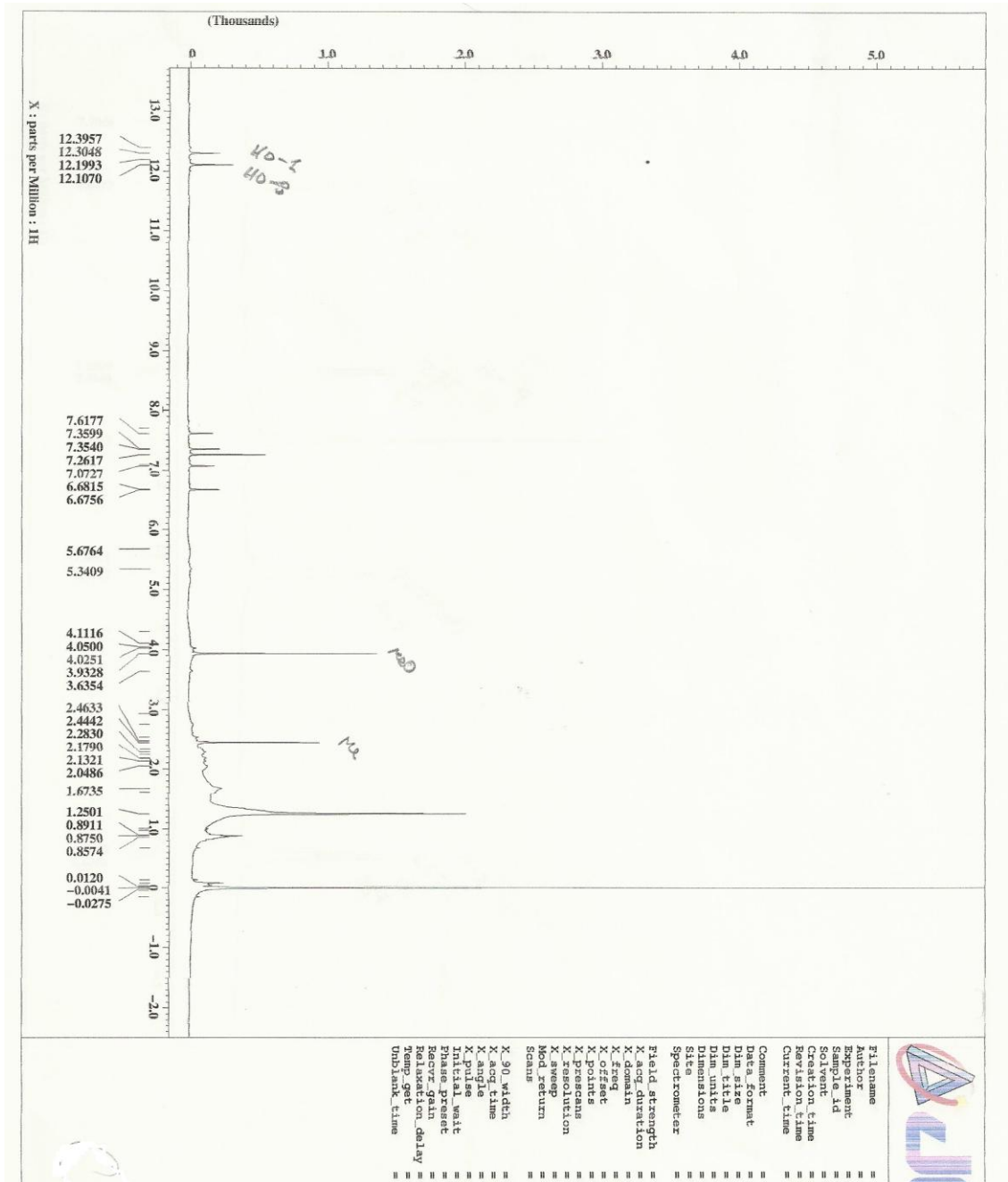
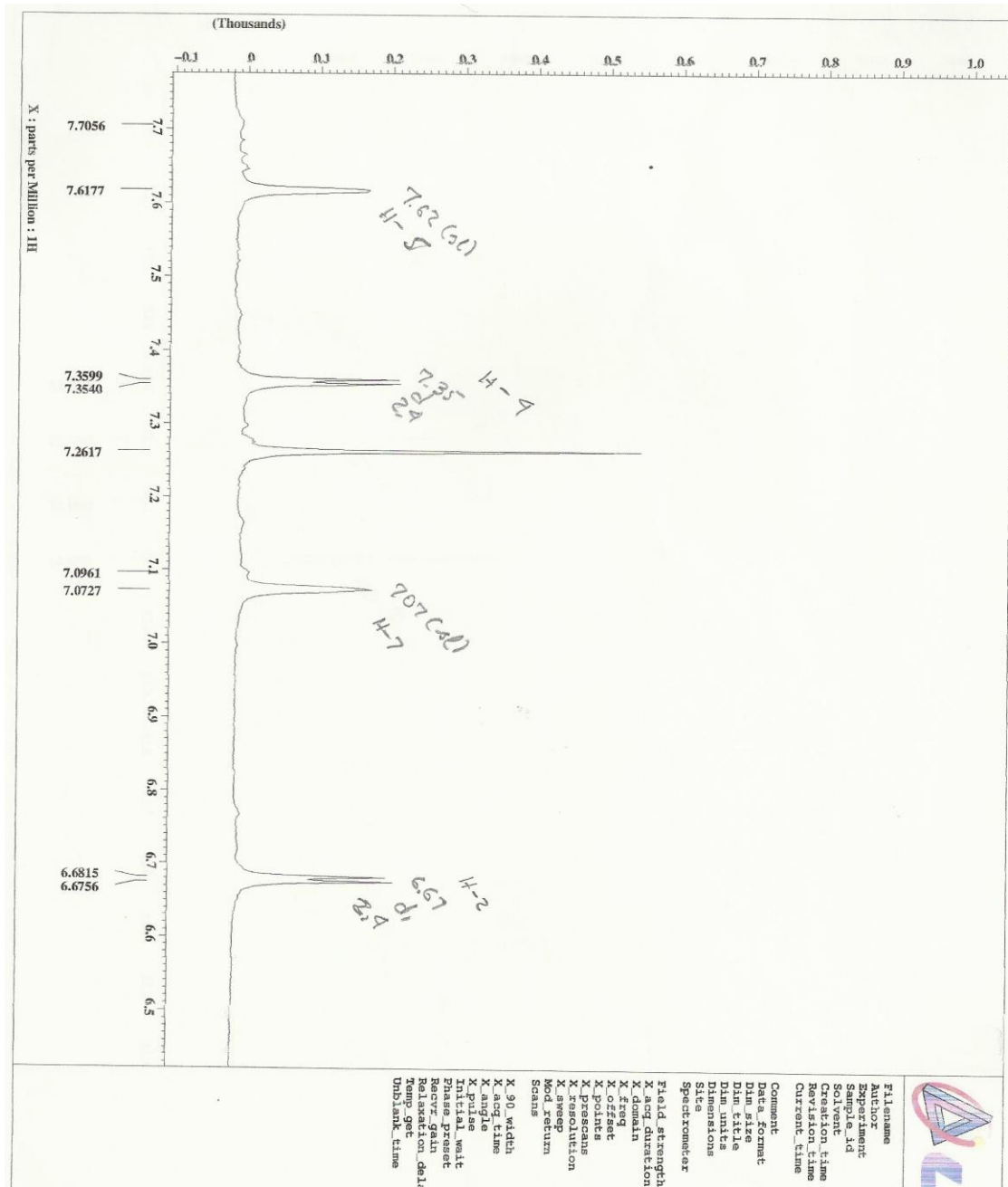
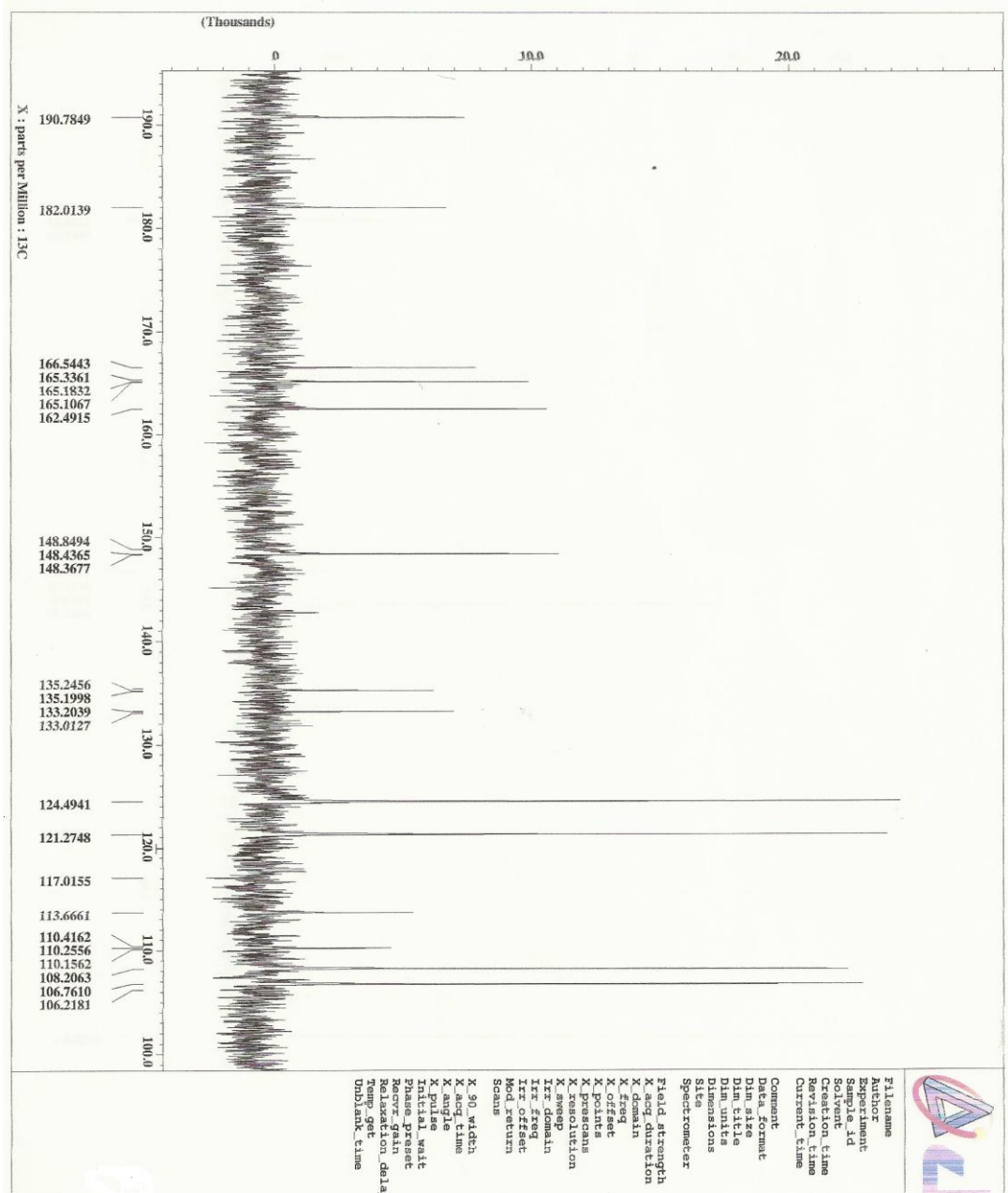


Figura 28: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da antraquinona 42.



**Figura 29:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  7,70 a 6,65 da antraquinona **42**.





**Figura 31:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  190 a 100 da antraquinona **42**.

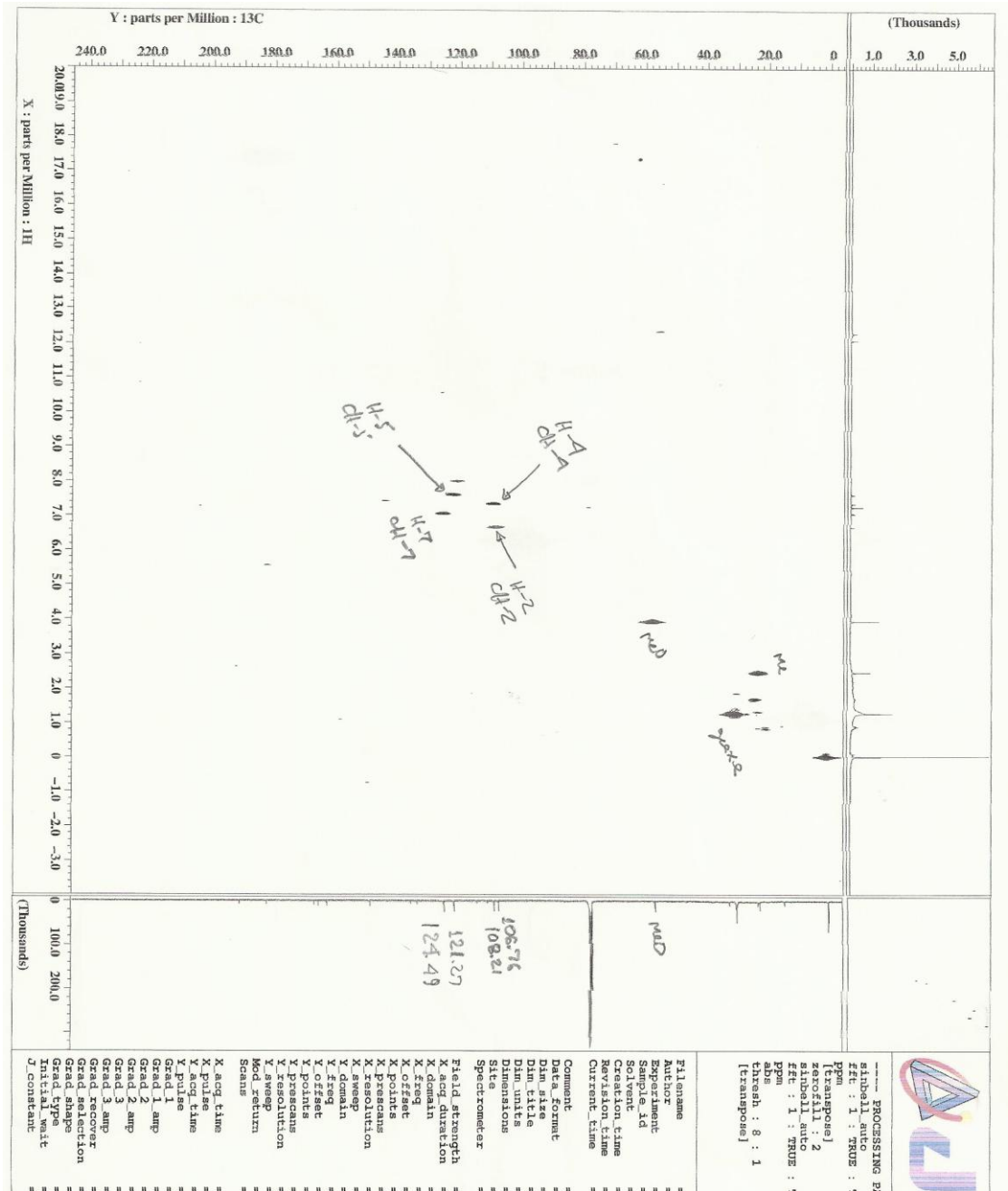
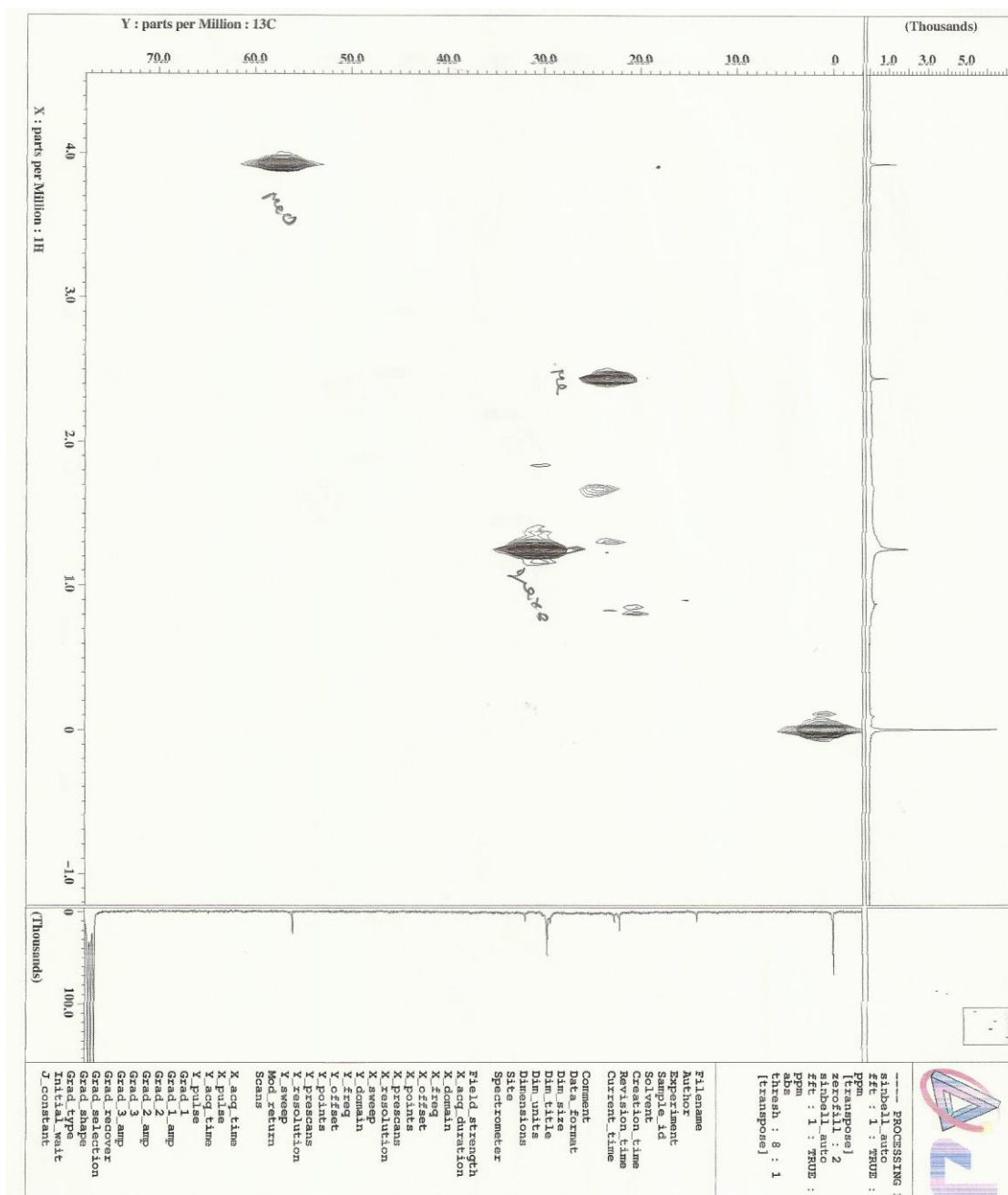
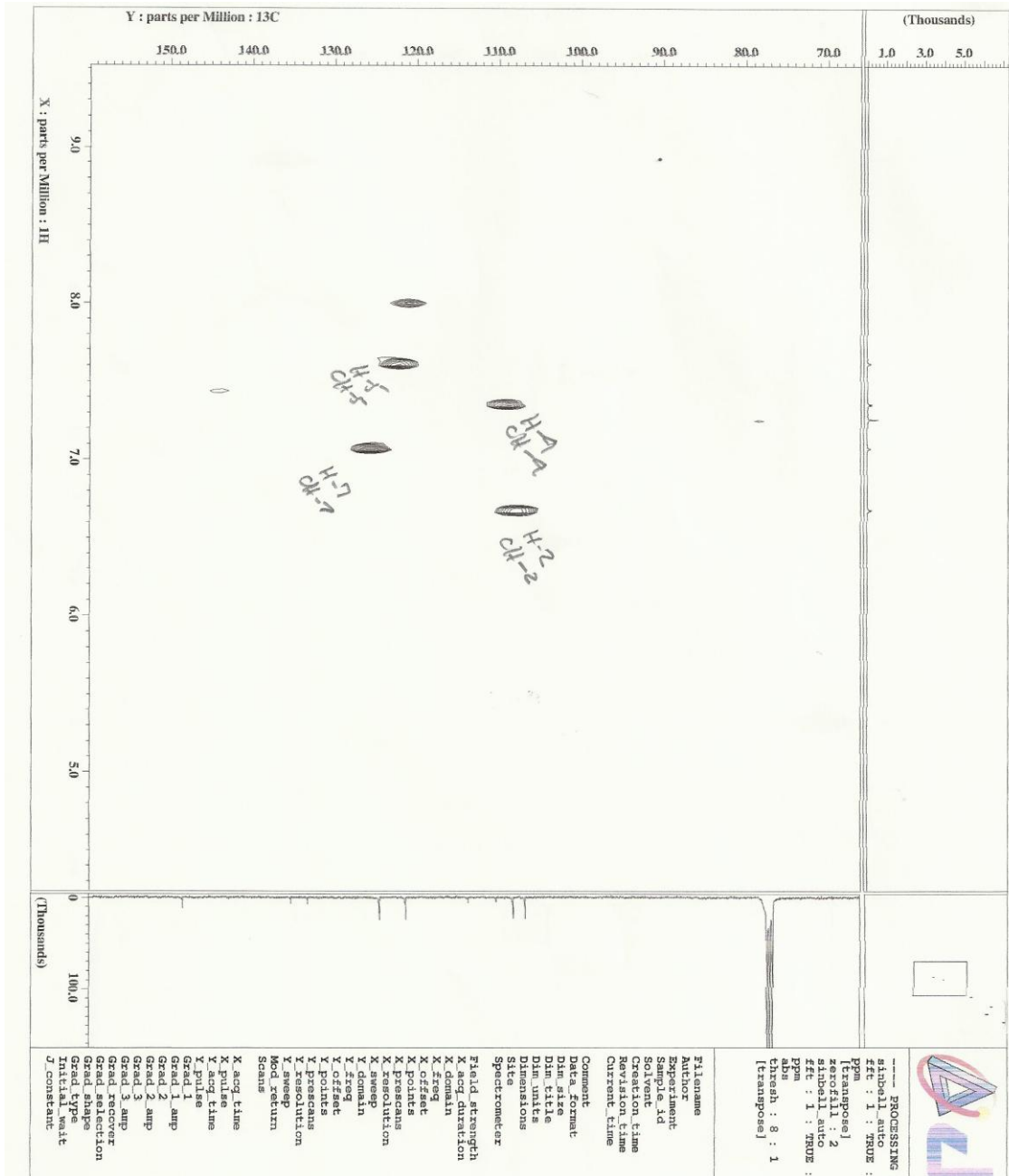


Figura 32: Mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl<sub>3</sub> da antraquinona 42.



**Figura 33:** Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em  $\text{CDCl}_3$  da antraquinona **42**.

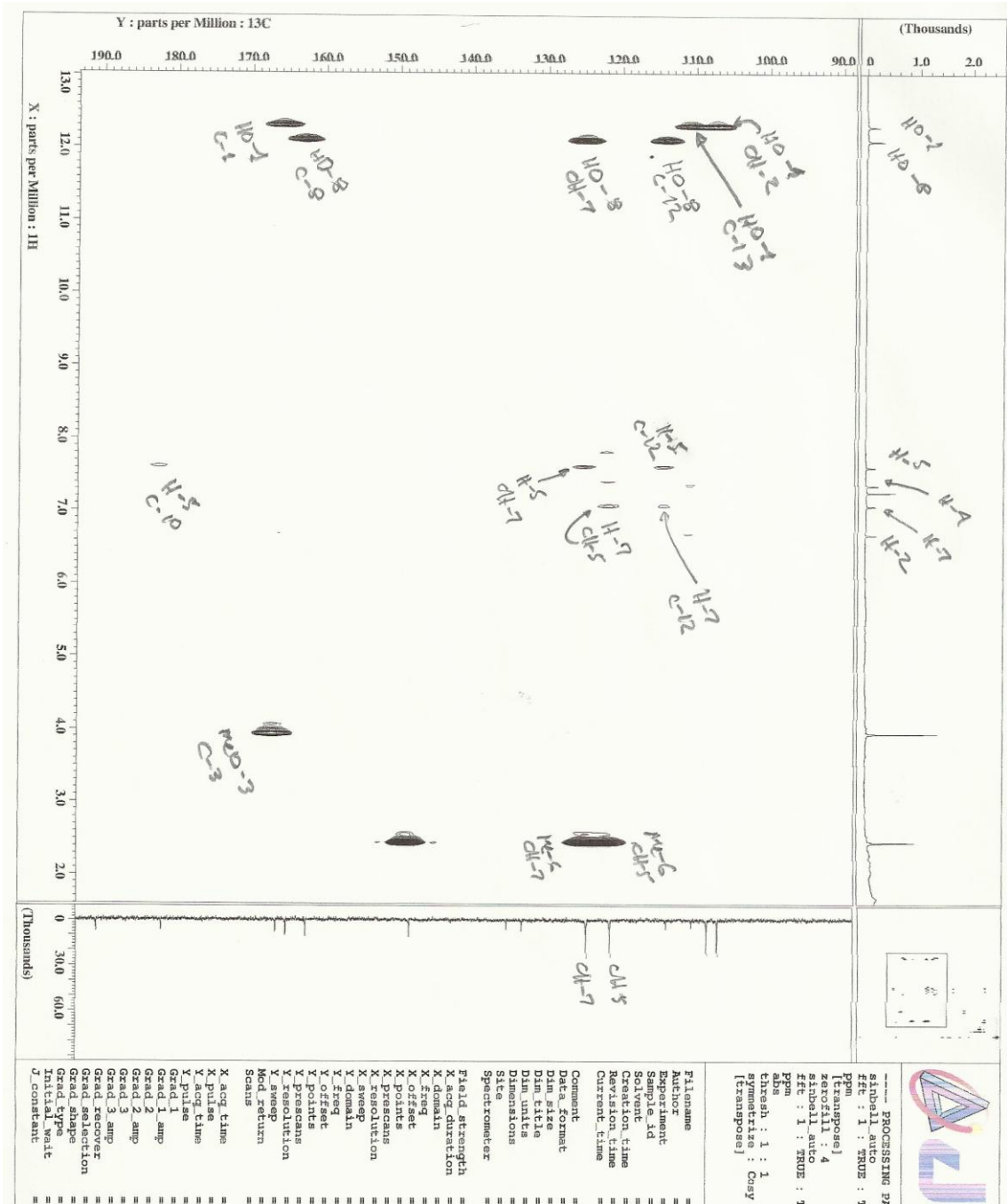


**Figura 34:** Ampliação do mapa de correlação do espectro de HMQC em  $CDCl_3$  da antraquinona **42**.

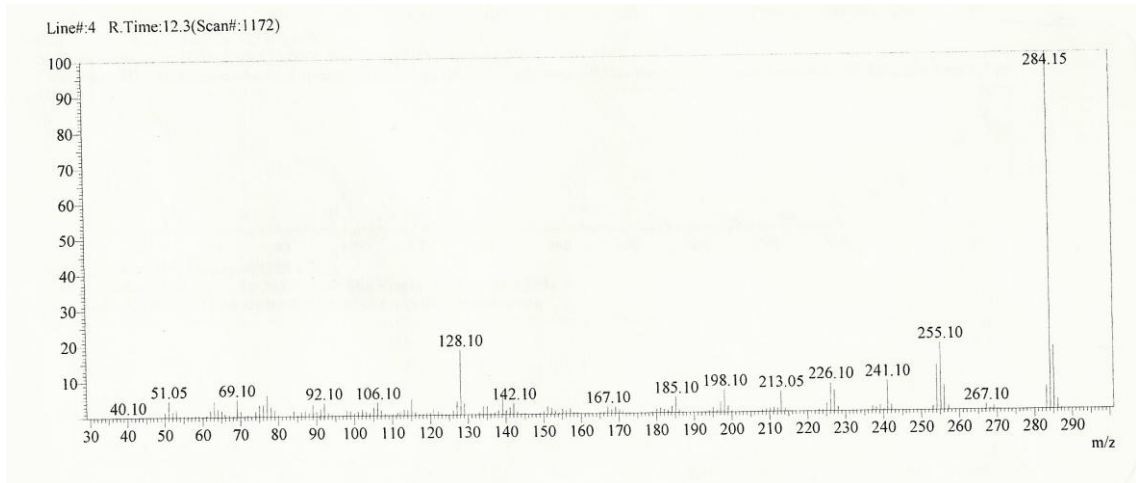






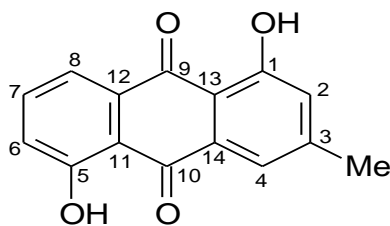


**Figura 36:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em  $CDCl_3$  da antraquinona **42**.



**Figura 37:** Espectro de massas da antraquinona **42**.

### 6.3.3 Identificação da substância 74



**74**

A substância **74** foi isolada como um sólido amorfo alaranjado apresentando teste positivo para antraquinonas (cor rosa em solução de KOH em metanol 10%).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da antraquinona **74** (**Figura 38, pág. 85**), apresenta sinais característicos de dois hidrogênios hidroxílicos quelados em  $\delta_{\text{H}}$  12,06 e 12,17.

A localização dos dois grupos hidroxilas ligados ao átomo de carbono C-1 e C-5 foi confirmada através das correlações heteronucleares  $^2J$  entre os átomos de carbono C-1 em  $\delta_{\text{C}}$  163 com o hidrogênio hidroxílico em  $\delta_{\text{H}}$  12,06 (HO-1), e C-5 em  $\delta_{\text{C}}$  162 com o hidrogênio hidroxílico (HO-5) em  $\delta_{\text{H}}$  12,17, apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figura 41, pág. 88; Tabela 19, pág. 84**).

A localização dos dois grupos hidroxila quelados ligados aos átomos de carbono C-1 e C-5 foi corroborada ainda pelas  $^3J$  entre os átomos de carbono CH-2 em  $\delta_{\text{C}}$  125,1 com o hidrogênio hidroxílico (HO-1) em  $\delta_{\text{H}}$  12,06, e entre C-11 em  $\delta_{\text{C}}$  117 e CH-6  $\delta_{\text{C}}$  125, ambos com o hidrogênio hidroxílico (HO-5) em  $\delta_{\text{H}}$  12,17, apresentadas no mapa de correlação HMBC (**Figuras 41 e 42, págs. 88 e 89; Tabela 19, pág. 84**).

A presença do sinal integrando para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,34, atribuído a um grupo metila ligado ao átomo de carbono C-3 no anel C do esqueleto antracênico foi confirmada pela correlação heteronuclear  $^2J$  entre o átomo de carbono quaternário C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  150 com os hidrogênios do grupo em metila em  $\delta_{\text{H}}$  2,34, corroboradas pelas correlações  $^3J$  entre os átomos de carbono CH-2 em  $\delta_{\text{C}}$  125,1 e CH-4 em  $\delta_{\text{C}}$  121,9 com os hidrogênios do grupo em metila em  $\delta_{\text{H}}$  2,34, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 41 e 42, págs.88 e 89; Tabela 19, pág. 84**).

O modo de substituição no esqueleto antracênico da antraquinona **42** foi definido pelos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos hidrogênios aromáticos. No anel C do esqueleto antracênico, dois simpletos largos em  $\delta_H$  7,14 e 7,69 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-4, respectivamente. Já no anel A do esqueleto antracênico, os sinais dos hidrogênios aromáticos aparecem como dois sinais duplos em  $\delta_H$  7,32 (d,  $J = 8,4$  Hz, H-6),  $\delta_H$  7,86 (d,  $J = 8,4$  Hz, H-8 *peri* carbonílico) que foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-6 e H-8, respectivamente. E um sinal triplo 7,70 (t,  $J = 8,4$  Hz, H-7) referente ao hidrogênio H-7, apresentado no espectro de RMN  $^1H$  (**Figuras 38 e 39, págs. 85 e 86; Tabela 19, pág. 84**).

O modo de substituição do anel antracênico foi confirmado através das correlações  $^2J$  entre os átomos de carbonos quaternários C-1 em  $\delta_C$  163 com o hidrogênio H-2 em  $\delta_H$  7,14, do átomo de carbono C-13 em  $\delta_C$  115 com o hidrogênio H-4 em  $\delta_H$  7,69, e do átomo de carbono C-5 em  $\delta_C$  162 com o hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  7,32.

O modo de substituição foi corroborado pelas correlações  $^3J$  entre os átomos de carbono carbonílico C-10 em  $\delta_C$  182,0 com o hidrogênio H-4 em  $\delta_H$  7,69 e C-9 em  $\delta_C$  183 com o hidrogênio H-8 em  $\delta_H$  7,86; dos átomos de carbonos quaternário C-5 em  $\delta_C$  162 com o hidrogênio H-7 em  $\delta_H$  7,70, C-11 em  $\delta_C$  117 com o hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  7,32 e H-8 em  $\delta_H$  7,86 e C-12 em  $\delta_C$  132 com o hidrogênio H-7 em  $\delta_H$  7,70; e dos átomos de carbono CH-8 em  $\delta_C$  120,5 com o hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  7,32 e CH-6 em  $\delta_C$  125,1 com o hidrogênio H-8 em  $\delta_H$  7,86, todas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 41 e 42, págs. 88 e 89; Tabela 19, pág. 84**). Todas as correlações encontram-se sumarizadas na **Tabela 19, página 84**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figura 40, pág. 87**).

A maioria dos dados de  $^{13}C$  foram extraídos do mapa de correlação HMBC (**Tabela 19, pág. 84**), devido à pequena quantidade de amostra isolada da antraquinona (**74**) não foi possível obter um espectro de  $^{13}C$ , sendo a maioria dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários aproximados. Os dados observados nos mapas de correlação HSQC e HMBC confirmam a estrutura proposta para a antraquinona 1,5 dihidroxi-3-metil-antraquinona (**74**) já descrita na literatura (Kazmi et al., 2006).

**Tabela 19:** Dados de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HSQC e HMBC da antraquinona (**74**), em CDCl<sub>3</sub>. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (*J* entre parêntesis) estão em Hz.

antraquinona (**74**)

	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	163	-	HO-1; H-2	
3	150	-	3H-15	
5	162	-	HO-5; H-6	H-7
9	183	-		H-8
10	182	-		H-4
11	117	-		HO-5; H-6; H-8
12	132	-		H-7
13	115	-	H-4	
14	135	-		
<b>CH</b>				
2	125,1	7,14 (sl)		HO-1; H-4; 3H-15
4	121,9	7,69 (sl)		3H-15
6	125,1	7,32 (d, 8,4)		HO-5; H-8
7	130,8	7,70 (t, 8,4)		
8	120,5	7,86 (d, 8,4)		H-6
<b>CH<sub>3</sub></b>				
15	19,8	2,34 (s)		
<b>HO</b>				
1	-	12,06 (s)		
5	-	12,17 (s)		

Os  $\delta_C$  sem valores decimais foram deduzidos com base no espectro HMBC e, conseqüentemente, representam dados aproximados.

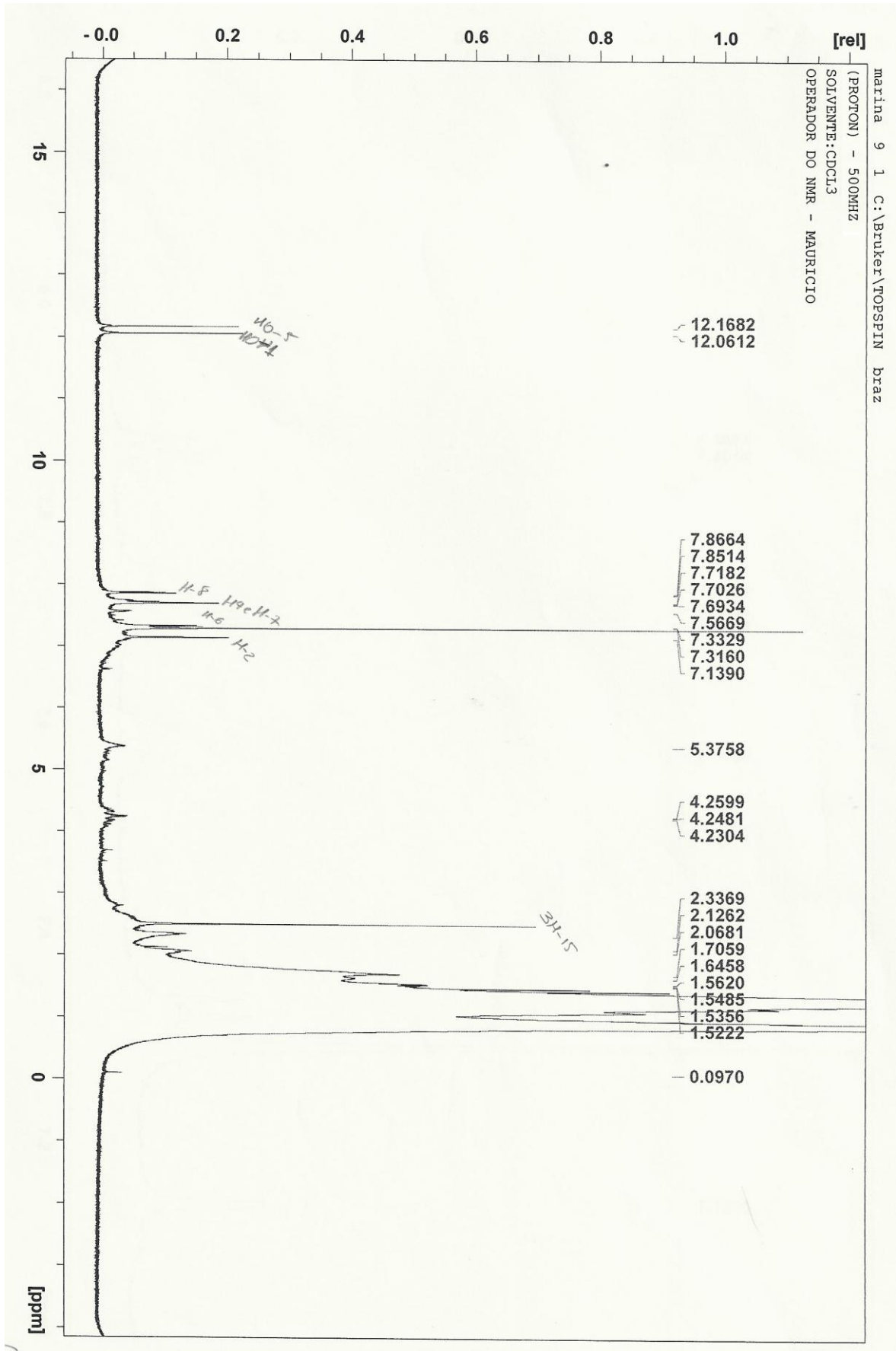
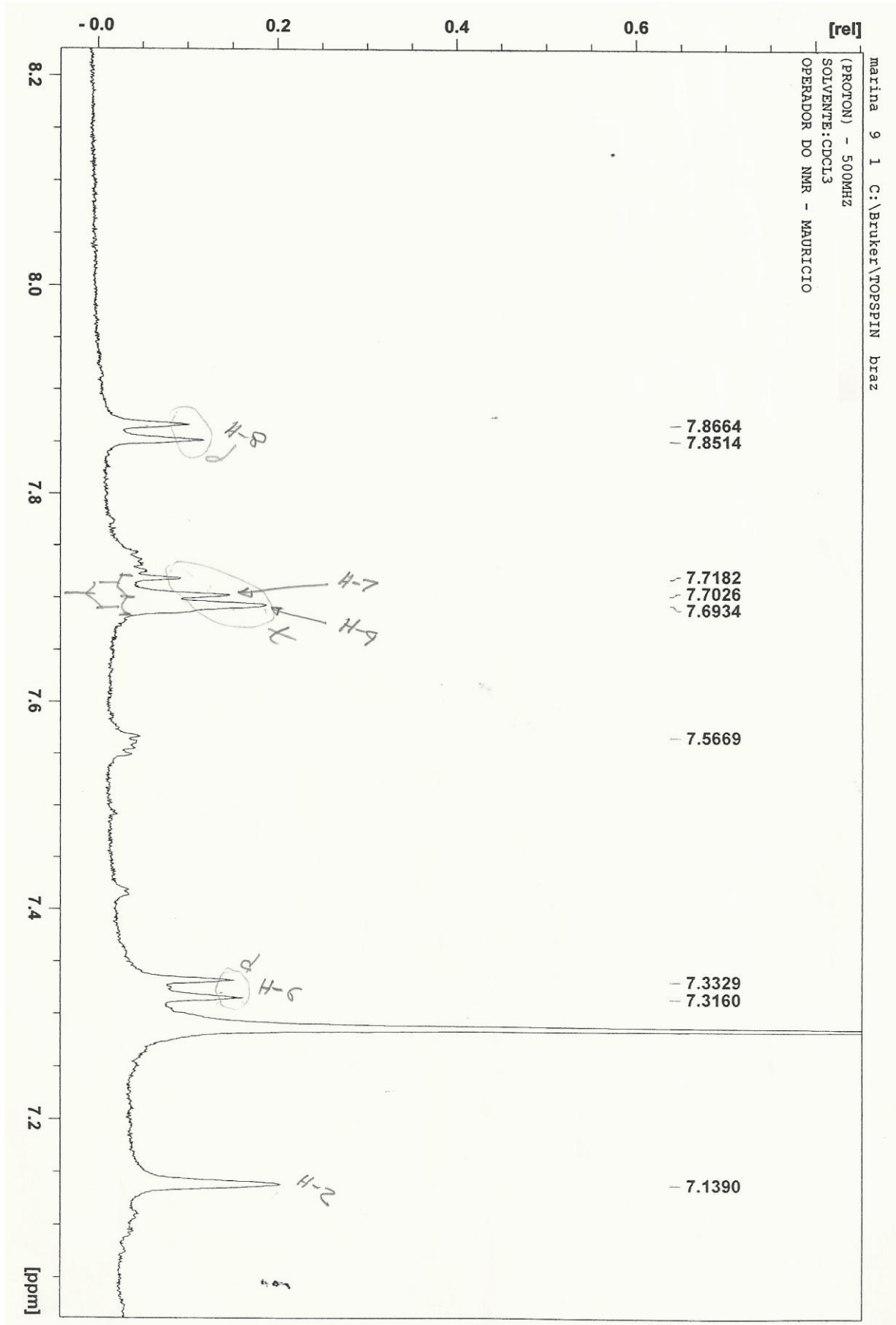
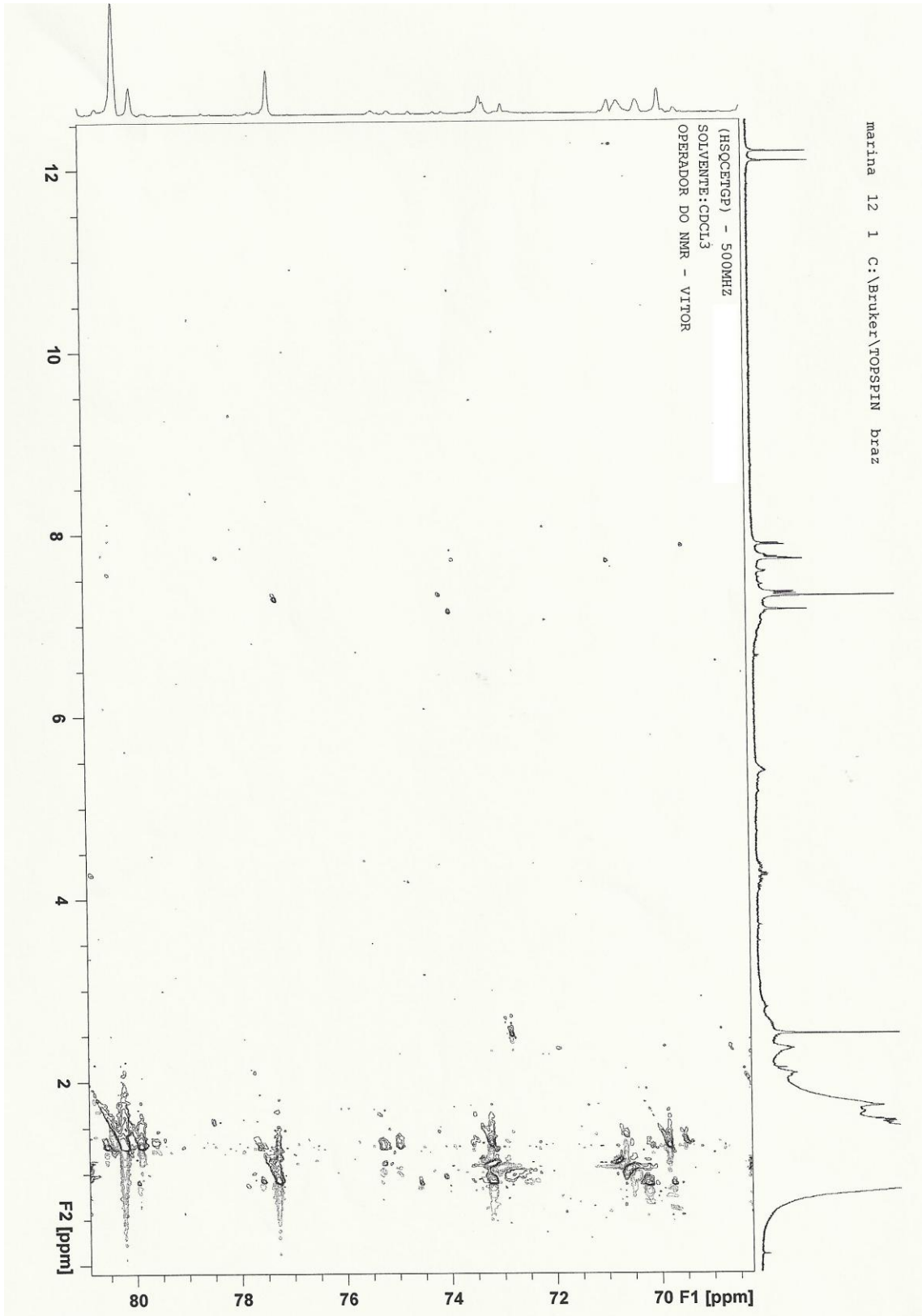


Figura 38: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da antraquinona 74.

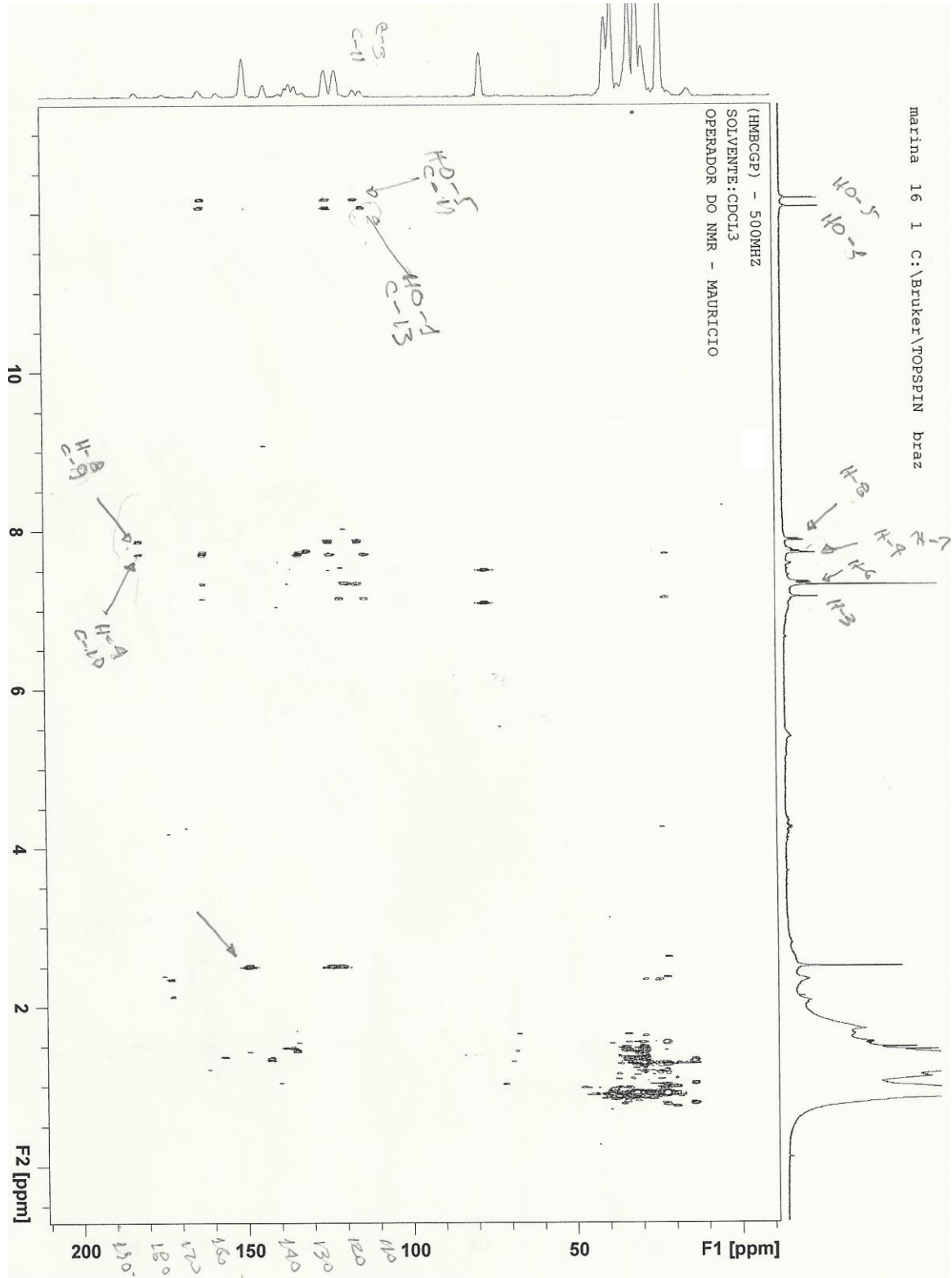


**Figura 39:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) com ampliação da região  $\delta_H$  8,2 a 7,0 da antraquinona **74**.

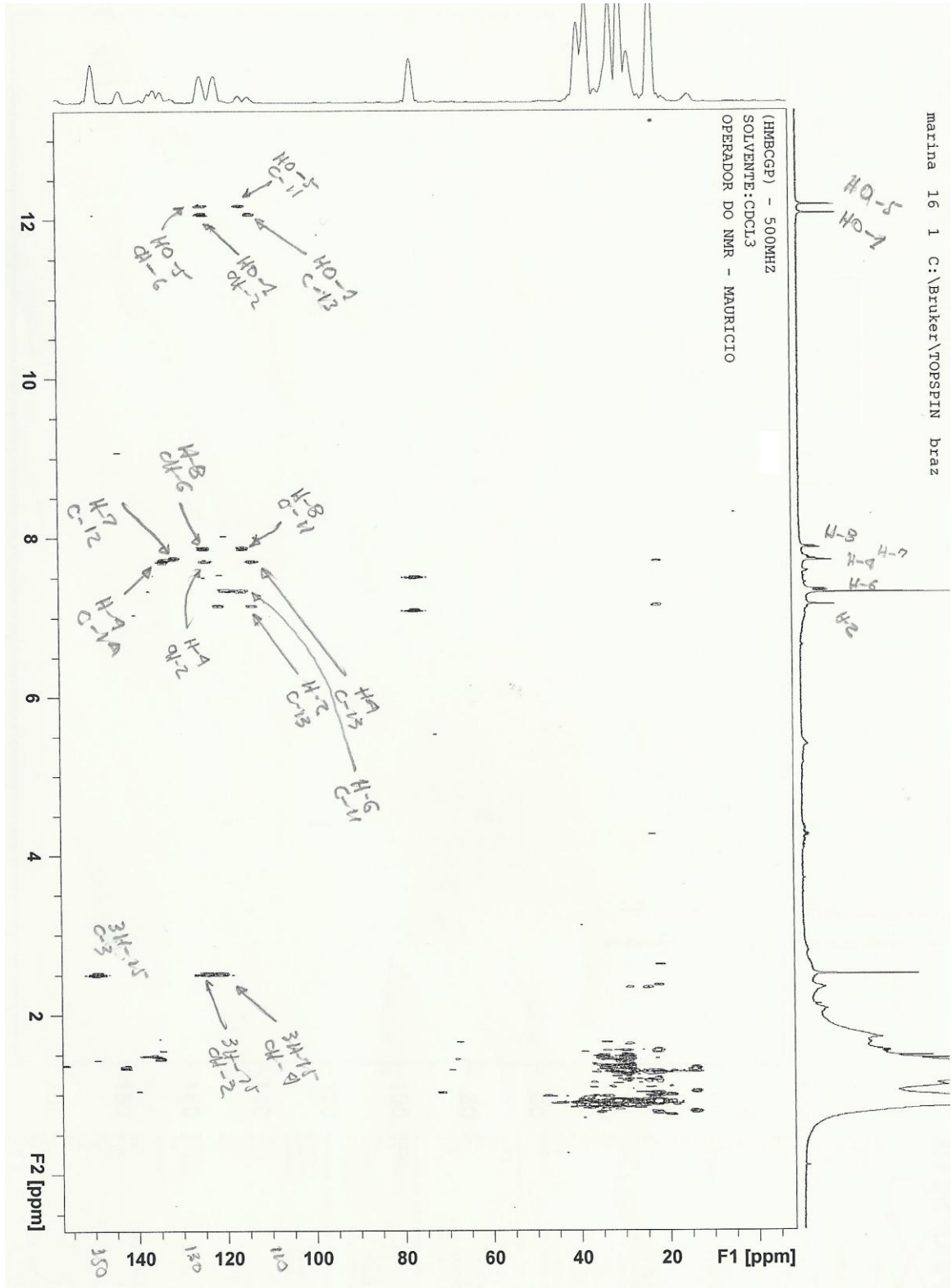


**Figura 40:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC em  $\text{CDCl}_3$  da antraquinona 74.



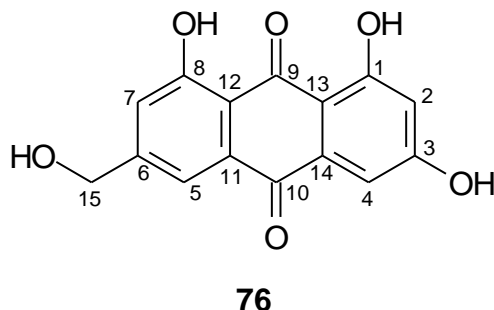


**Figura 41:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC em  $CDCl_3$  da antraquinona 74.



**Figura 42:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBGPF em  $\text{CDCl}_3$  da antraquinona **74**.

### 6.3.4 Identificação da substância 76



A substância **76** foi isolada como um sólido amorfo alaranjado, apresentando teste positivo para antraquinonas (cor rosa em solução de KOH em metanol 10%).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da antraquinona **76** (**Figura 43, pág. 94**), não apresentou sinais característicos de dois hidrogênios hidroxílicos quelados na região de  $\delta_{\text{H}}$  12,0, ligados aos átomos de carbono 1 e 8. Esses valores não aparecem no espectro devido à troca química do hidrogênio da hidroxila com água do solvente MeOD.

A presença dos dois grupos hidroxila ligados aos átomos de carbono C-1 e C-8 pode ser observada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ, através dos sinais dos átomos de carbono C-1 em  $\delta_{\text{C}}$  165,0 e C-8 em  $\delta_{\text{C}}$  162,3 (**Figura 45, pág. 96; Tabela 20, pág. 93**).

A presença de um sinal simples integrando para dois hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,71 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 43, pág. 94; Tabela 20, pág. 93**) sugere a presença de um grupo hidroximetilênico, o qual foi confirmado pela correlação heteronuclear  $^2J$  entre o átomo de carbono quaternário C-6 em  $\delta_{\text{C}}$  151,8 com os hidrogênios do grupo hidroximetilênico em  $\delta_{\text{H}}$  4,71, corroborada ainda pelas correlações  $^3J$  entre os átomos de carbono CH-5 em  $\delta_{\text{C}}$  117,1 e CH-7 em  $\delta_{\text{C}}$  120,8 com os hidrogênios do grupo hidroximetilênico em  $\delta_{\text{H}}$  4,71, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 48-50, págs. 99-101; Tabela 20, pág. 93**).

O modo de substituição no esqueleto antracênico da antraquinona **76** foi definido pelos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos hidrogênios aromáticos. No anel C do esqueleto antracênico, dois simpletos largos em  $\delta_H$  6,59 e 7,22 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-4, respectivamente. Já no anel A do esqueleto antracênico, os sinais dos hidrogênios aromáticos aparecem como um simpleto largo integrando para um hidrogênio cada em  $\delta_H$  7,76 referente ao hidrogênio H-5 *peri* carbonílico, e um sinal simples em  $\delta_H$  7,29 referente ao hidrogênio H-7, ambos apresentados no espectro de RMN  $^1H$  (**Figuras 43 e 44, págs. 94 e 95; Tabela 20, pág. 93**).

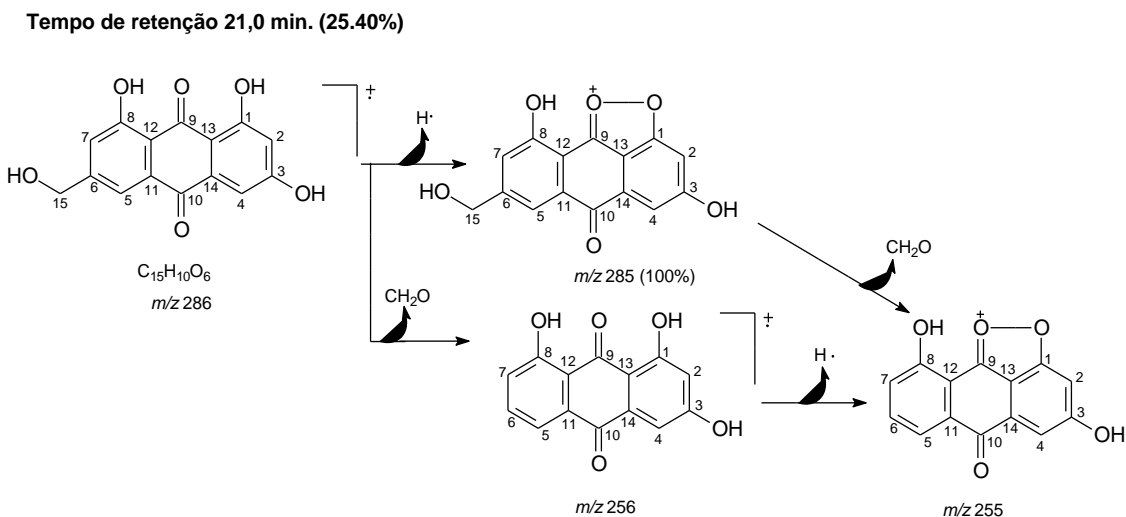
O modo de substituição do anel antracênico foi confirmado através das correlações  $^3J$  entre o átomo de carbono carbonílico C-10 em  $\delta_C$  181,7 com os átomos de hidrogênios H-4 em  $\delta_H$  7,22 e com H-5 em  $\delta_H$  7,76; e dos carbonos quaternários C-13 em  $\delta_C$  ~110,0 com os hidrogênios H-2 em  $\delta_H$  6,59 e H-4 em  $\delta_H$  7,22, e C-12 em  $\delta_C$  ~115,0 com os hidrogênios H-5 em  $\delta_H$  7,76 e H-7 em  $\delta_H$  7,29, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 48-50, págs. 99-101; Tabela 20, pág. 93**). As demais correlações encontram-se sumarizadas na **Tabela 20, página 93**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figuras 46-47, págs. 97 e 98**). A análise do espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ (**Figura 45, pág. 96**) da antraquinona **76** mostrou sinais em  $\delta_C$  190,6 e 181,7, correspondentes aos carbonos carbonílicos C-9 e C-10, confirmados anteriormente no mapa de correlação HMBC (**Figuras 48-50, págs. 99-101**).

A presença de um grupo hidroxila HO-3 ligado ao átomo de carbono C-3 foi observada pelo sinal em  $\delta_C$  165,9, apresentado no espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ (**Figura 45, pág. 96**), característico de carbono aromático substituído por grupo hidroxila (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ (**Figura 45, pág. 96**) apresenta agora um sinal em  $\delta_C$  62,7, referente a um carbono carbinólico em CH<sub>2</sub>-15 ligado ao anel aromático.

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 51, pág. 102**) da antraquinona (**76**) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z=$  286 Dalton, confirmando a proposta estrutural para uma antraquinona com a presença de um grupo hidroximetilênico. A proposta mecanística para os principais fragmentos da antraquinona (**76**) encontra-se no **Esquema 7, página 92**.

A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  com dados de literatura confirmou de forma inequívoca que antraquinona (**76**) trata-se da antraquinona conhecida como hidroximodina (Kim et al., 2008).



**Esquema 7:** Proposta mecanística para os principais fragmentos apresentados no espectro de massas de baixa resolução (70 eV) para a antraquinona (**76**).

**Tabela 20:** Dados de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C-DEPTQ (125 MHz) e as correlações observadas nos mapas de correlação heteronucleares HSQC e HMBC da antraquinona (**76**), em MeOD. Os deslocamentos químicos estão em ppm, e as constantes de acoplamento (*J* entre parêntesis) estão em Hz.

Hidroxiemodina (**76**)

	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	~165	-		H-2
3	165,9	-		H-2
6	151,8	-	2H-15	
8	162,3			
9	190,6	-		
10	181,7	-		H-4; H-5
11	133,5	-		
12	~115	-		H-5; H-7
13	~110	-		H-2; H-4
14	135,5	-		
<b>CH</b>				
2	107,7	6,59 (sl)		H-4
4	108,8	7,22 (sl)		H-2
5	117,1	7,76 (sl)		H-7; 2H-15
7	120,8	7,29 (s)		H-5; 2H-15
<b>CH<sub>2</sub></b>				
15	62,7	4,71 (s)		H-5; H-7
<b>HO</b>				
1	-	*		
8	-	*		
3		*		
15		*		

\* Valores não aparecem no espectro devido a troca química do hidrogênio da hidroxila com água do solvente metanol deuterado.

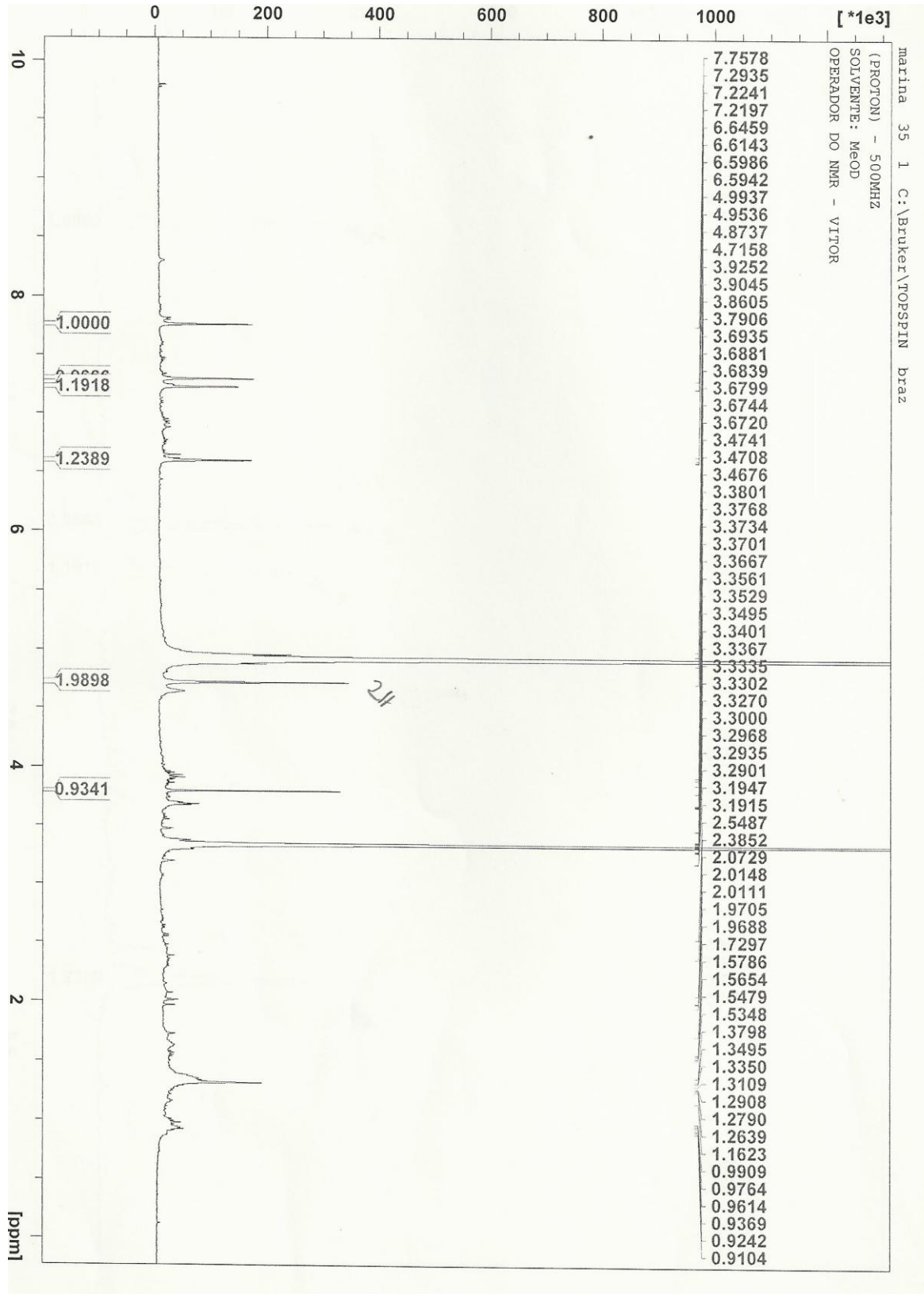
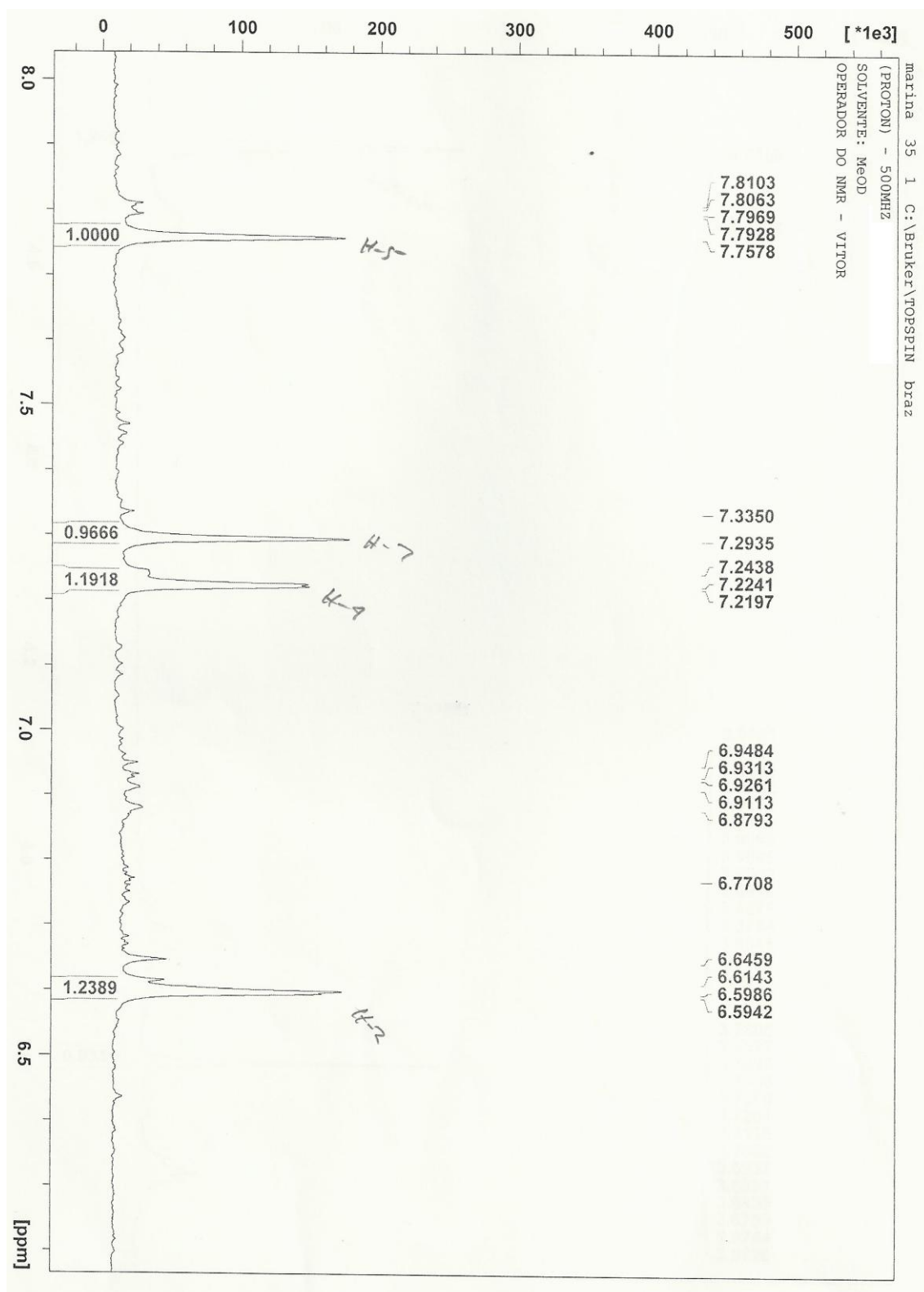


Figura 43: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOH) da antraquinona 76.



**Figura 44:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOH) com ampliação da região  $\delta_H$  8,0 a 6,5 da antraquinona **76**.



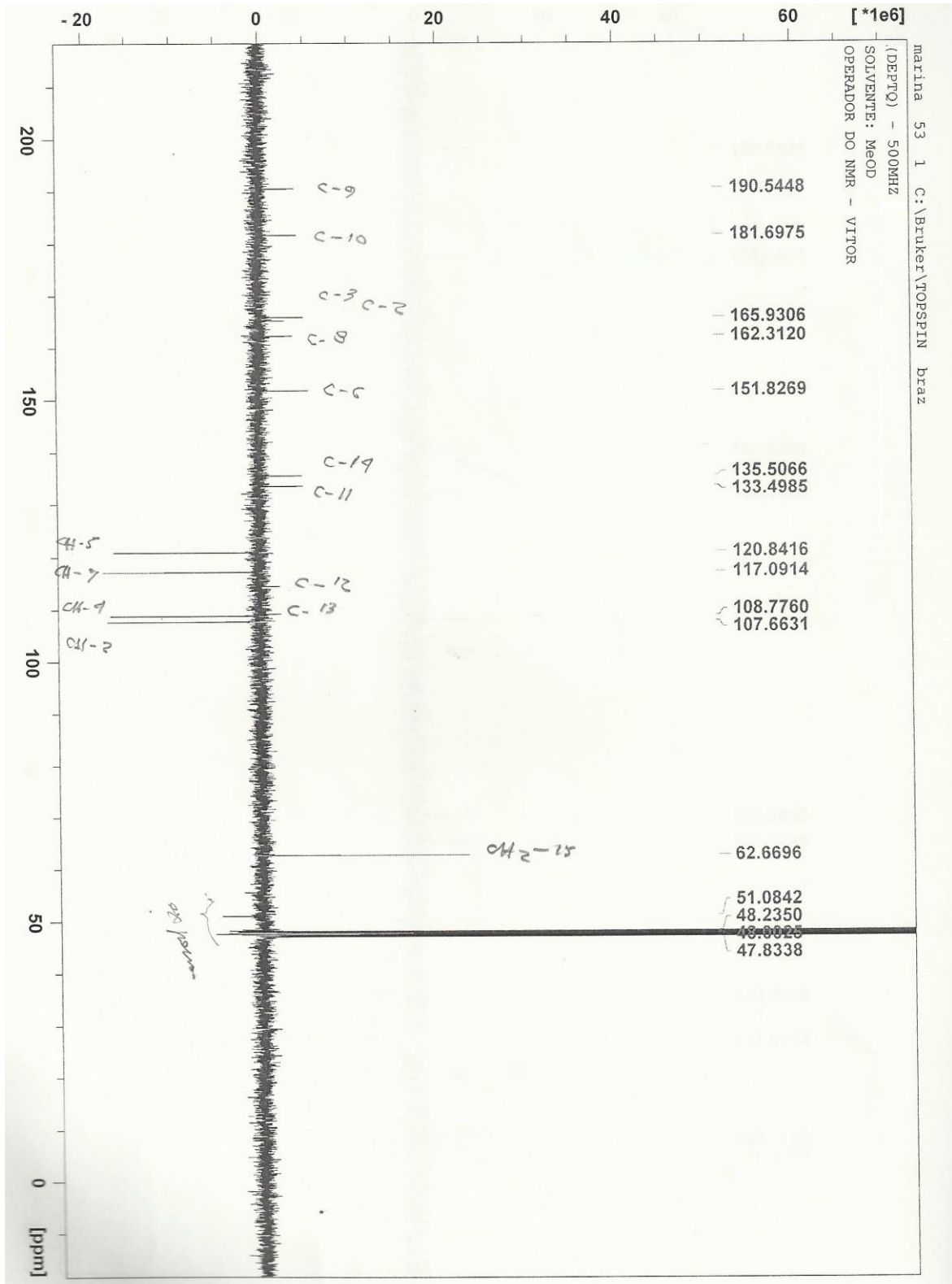
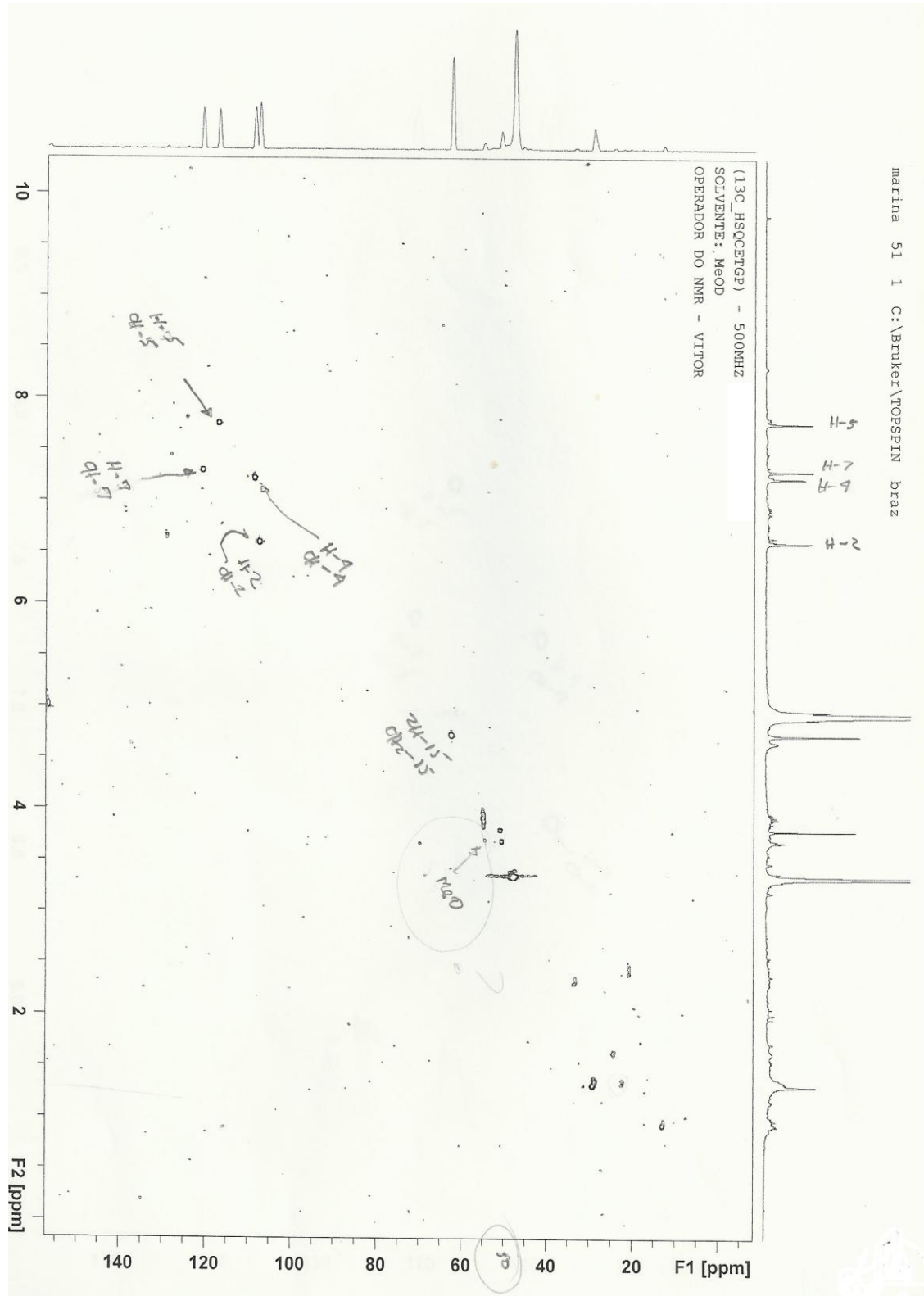
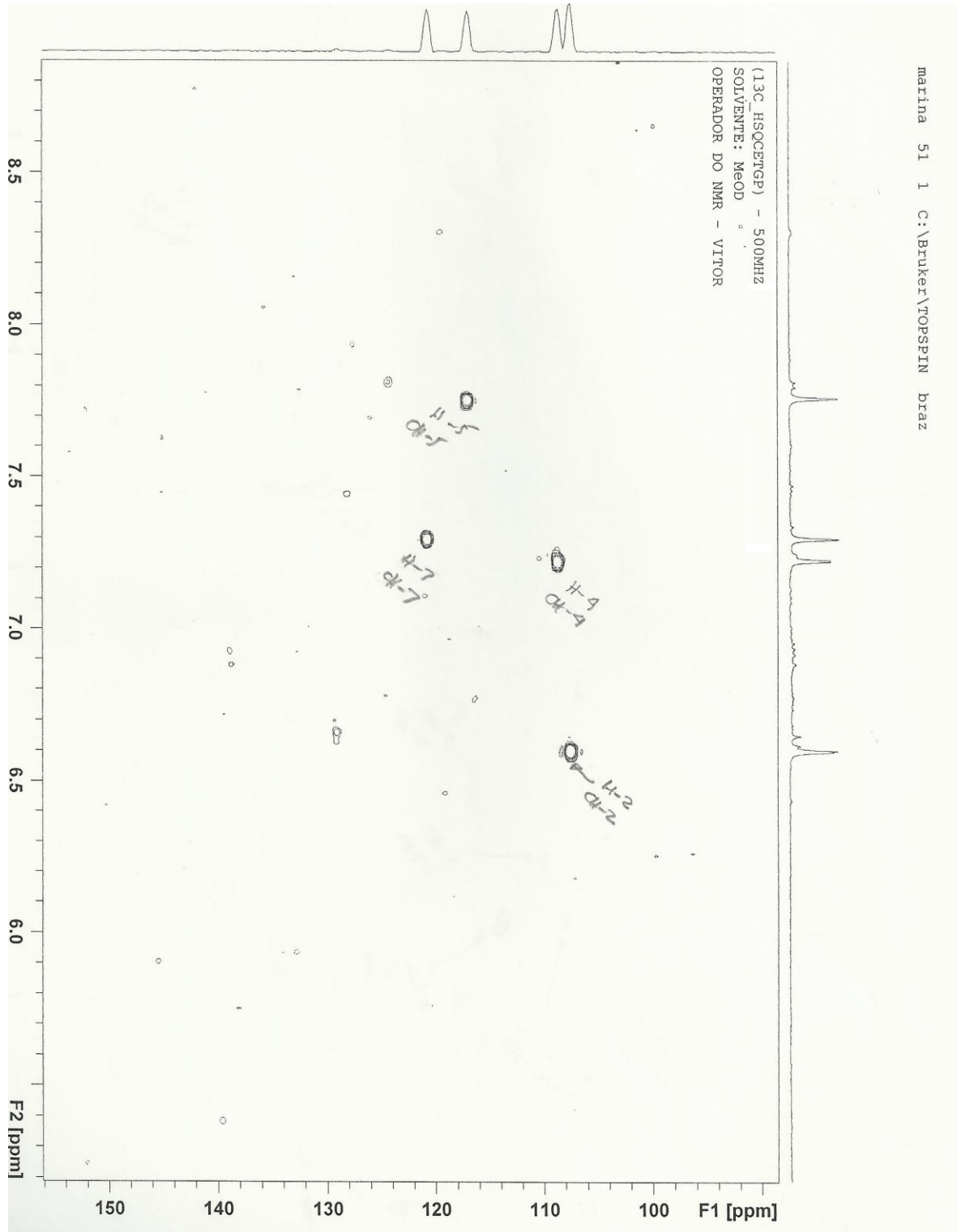


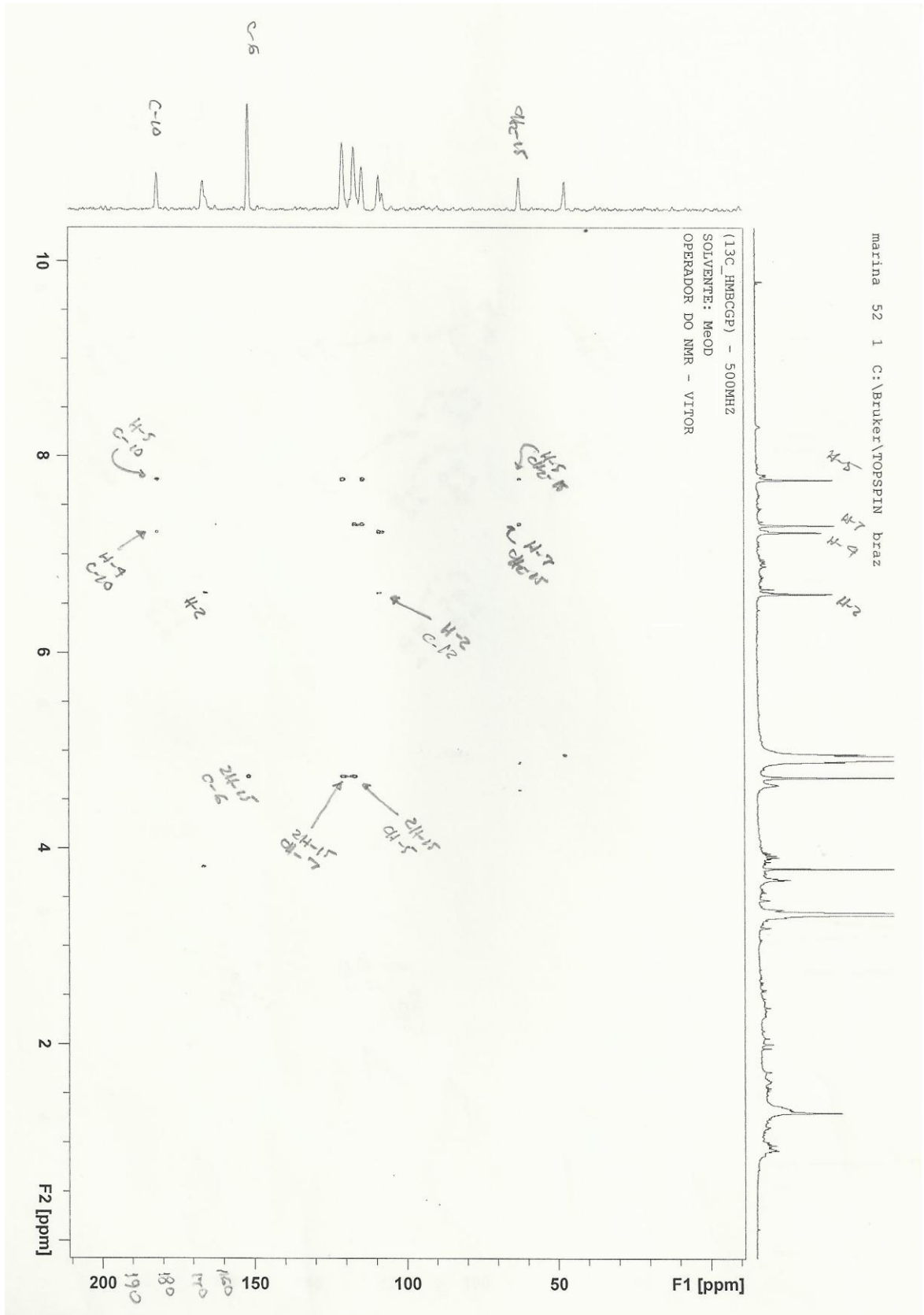
Figura 45: Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, MeOH) da antraquinona **76**.



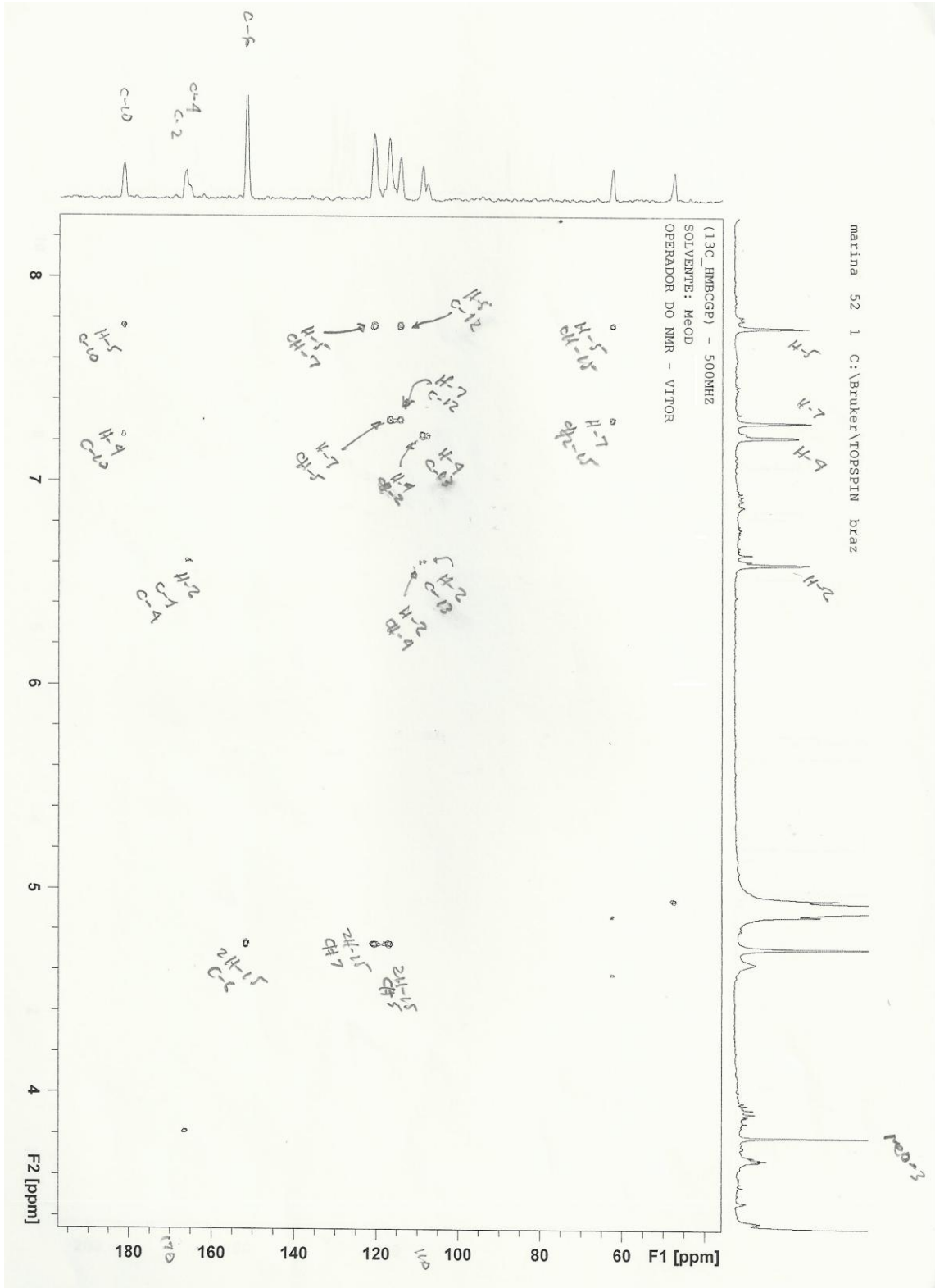
**Figura 46:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC em MeOD da antraquinona 76.



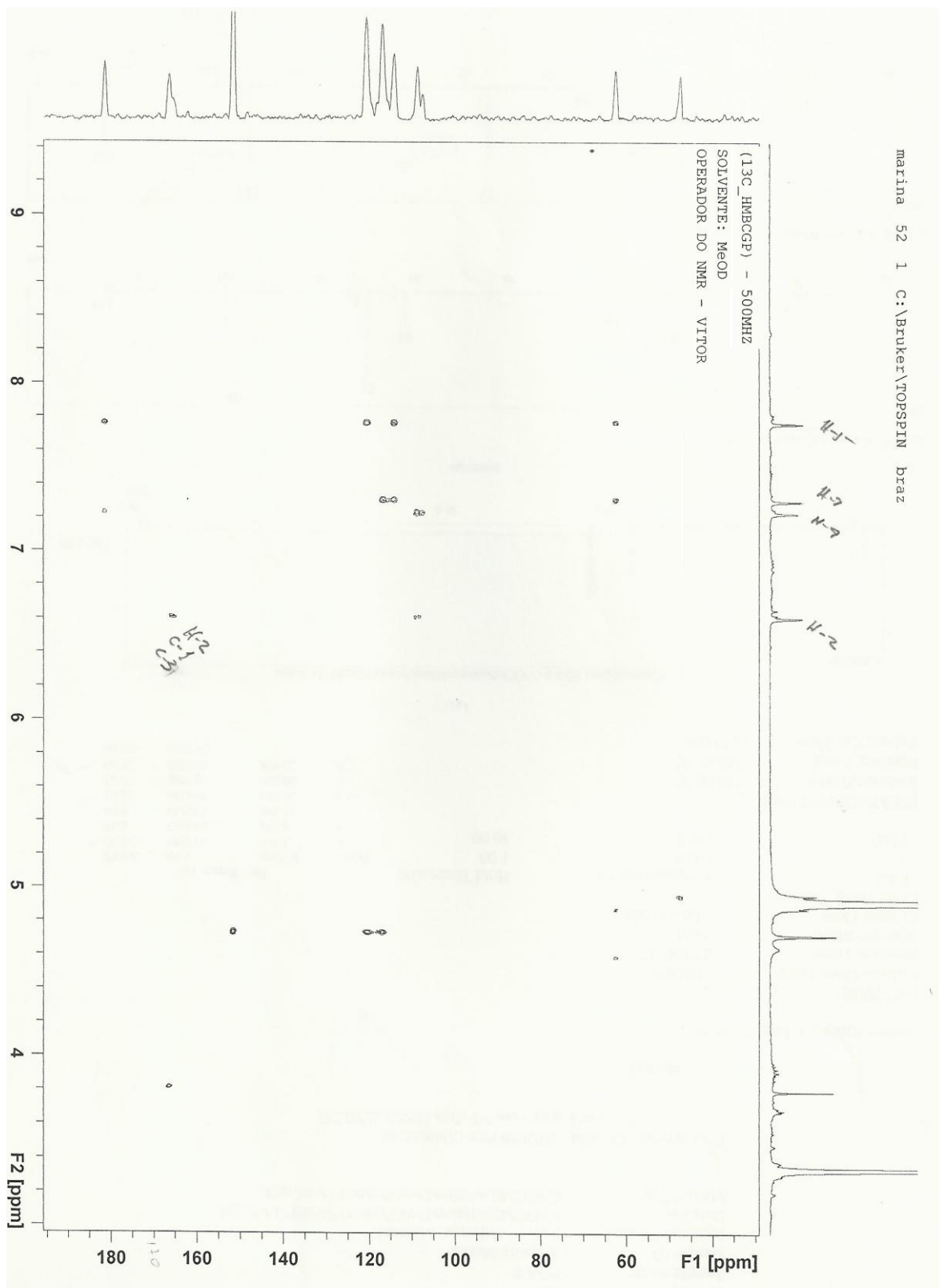
**Figura 47:** Ampliação do mapa de correlação do espectro de HSQC em MeOD da antraquinona **76**.



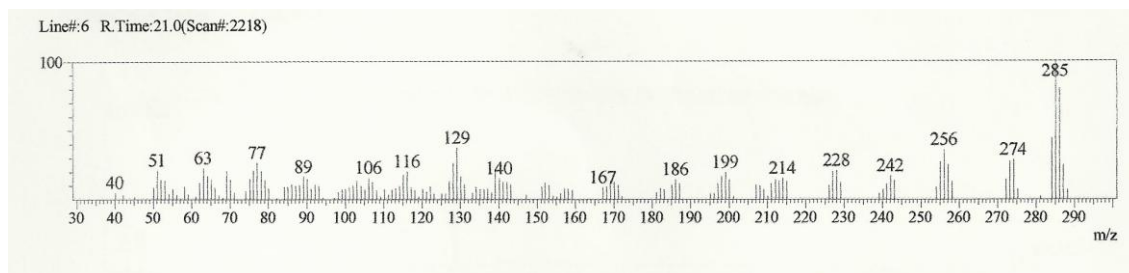
**Figura 48:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona 76.



**Figura 49:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona **76**.

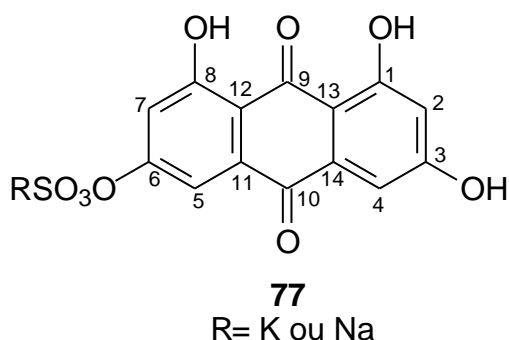


**Figura 50:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona **76**.



**Figura 51:** Espectro de massas da antraquinona **76**.

### 6.3.5 Identificação da substância 77



A substância **77** foi isolada como um sólido amorfo alaranjado, apresentando teste positivo para antraquinonas (cor rosa em solução de KOH em metanol 10%).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da antraquinona **77** (**Figura 53, pág. 107**), não apresenta sinais característicos de dois hidrogênios hidroxílicos quelados na região de  $\delta_{\text{H}}$  12,0, ligados aos átomos de carbono C-1 e C-8. Esses valores não aparecem no espectro devido à troca química dos hidrogênios dos grupos hidroxila com água do solvente MeOD.

A presença dos dois grupos hidroxila ligados aos átomos de carbono C-1 e C-8 pode ser observada através dos sinais relativos aos átomos de carbono C-1 em  $\delta_{\text{C}}$  165,5 e C-8 em  $\delta_{\text{C}}$  161,9 apresentados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Figuras 55 e 56, págs. 109 e 110; Tabela 21, pág. 106**).

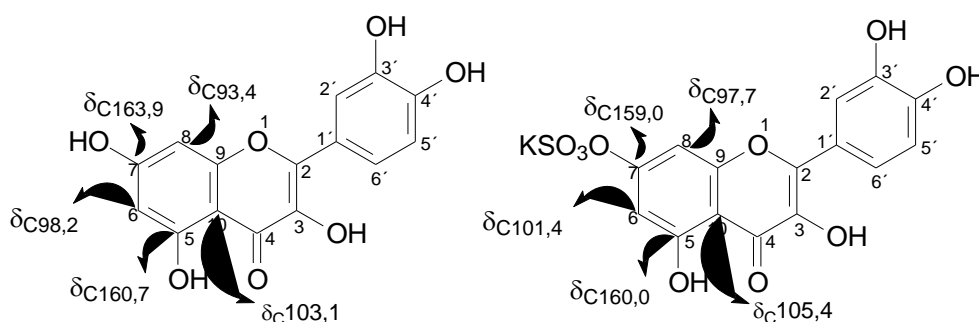
O modo de substituição no esqueleto antracênico da antraquinona **77** foi definido pelos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos hidrogênios aromáticos. No anel C do esqueleto antracênico, dois sinais duplos em  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (d,  $J= 2,4$  Hz, H-2), 7,24 (d,  $J= 2,4$  Hz, H-4 *peri* carbonílico) foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-4, respectivamente. Já no anel A do esqueleto antracênico, os sinais dos hidrogênios aromáticos aparecem como simpletos largos integrando para um hidrogênio cada em  $\delta_{\text{H}}$  8,30 referente ao hidrogênio H-5 *peri* carbonílico, e em  $\delta_{\text{H}}$  7,81 referente ao hidrogênio H-7, ambos apresentados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 53 e 54, págs. 107 e 108; Tabela 21, pág. 106**).

O modo de substituição do anel antracênico foi confirmado através das correlações  $^3J$  entre o átomo de carbono carbonílico C-10 em  $\delta_{\text{C}}$  181,3 com os



hidrogênios H-4 em  $\delta_H$  7,24 e com H-5 em  $\delta_H$  8,30; e dos átomos de carbono quaternários C-13 em  $\delta_C$  109,0 com o hidrogênio H-4 em  $\delta_H$  7,24, e do átomo de carbono C-12 em  $\delta_C$  117,5 com os hidrogênios H-5 em  $\delta_H$  8,30 e com H-7 em  $\delta_H$  7,81, ambas apresentadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 58 e 59, págs. 112 e 113; Tabela 21, pág. 106**). As demais correlações encontram-se sumarizadas na **Tabela 21, página 106**, e confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (**Figura 57, pág. 111**). A análise do espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ (**Figuras 55 e 56, págs. 109 e 110**) da antraquinona **77** mostrou sinais em  $\delta_C$  190,5 e 181,3, correspondentes aos carbonos carbonílicos C-9 e C-10, confirmados anteriormente no mapa de correlação HMBC (**Figura 58 e 59, págs. 112 e 113**). A presença de um grupo hidroxila HO-3 ligado ao átomo de carbono 3 foi observada pela presença do sinal em  $\delta_C$  166,2 apresentado no espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ (**Figuras 55 e 56, págs. 109 e 110**), característico de carbono aromático substituído por grupo hidroxila (Silverstein et al., 2007).

A proposta de um grupo sulfato ligado ao átomo de carbono C-6 foi baseada em modelos de literatura com substâncias flavonóidicas substituídas com grupo sulfato (Barron e Ibrahim, 1987) principalmente no efeito mesomérico retirador de elétrons exercido sobre os átomos de carbono pelo grupo sulfato nas posições *orto* e *para* (**Figura 52**).



**Figura 52:** Efeito mesomérico retirador de elétrons exercido pelo grupo sulfato em substância flavonóidica.

Observa-se um efeito de desproteção sobre os átomos de carbono na posição *orto* em relação ao grupo sulfato, CH-5 ( $\delta_C$  119,6) e CH-7 ( $\delta_C$  124,3) em relação aos átomos de carbono CH-2 ( $\delta_C$  107,7) e CH-4 ( $\delta_C$  109,0), na posição *para* observa-se o mesmo efeito de desproteção para os átomos de carbono C-12

( $\delta_C$  117,5) em relação ao átomo de carbono C-13 ( $\delta_C$  109,0), ambos observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Figuras 55 e 56, págs. 109 e 110**).

O mesmo efeito de desproteção acontece para os átomos hidrogênio H-5 e H-7 *orto* posicionados ao grupo sulfato no anel A do esqueleto antracênico, em relação aos átomos hidrogênios *orto* posicionados ao grupo hidroxila no anel C, ambos observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 53 e 54, págs. 107 e 108**).

Quanto ao contraíon ligado ao grupo sulfato fez-se uma análise por absorção atômica com objetivo de detectar a presença de potássio ou sódio, átomos mais comumente ligados ao grupo sulfato. Detectou-se em pequena quantidade 0,22% de potássio e 0,27% de sódio, levando a sugerir uma mistura com presença dos dois átomos, apesar da pequena quantidade detectada. O que pode ter levado a pequena quantidade detectada foi também a pequena quantidade de amostra isolada, levando assim a pequena detecção.

Experimentos futuros com espectrometria de massas (FAB ou ES) serão realizados para a completa e inequívoca atribuição da antraquinona **77**.

Então, pelo melhor do conhecimento a proposta estrutural para a antraquinona **77** encontra-se inédita na literatura até o presente momento.

**Tabela 21:** Dados de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C-DEPTQ (125 MHz) observados nos mapas de correlação heteronucleares HMQC e HMBC da antraquinona (**77**), em MeOD. Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento (*J* entre parêntesis) estão em Hz.

Antraquinona **77**

	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	165,5	-	H-2	
3	166,2	-	H-2	
6	**	-		
8	161,9			
9	190,5	-		
10	181,3	-		H-4; H-5
11	133,6	-		
12	117,5	-		H-5; H-7
13	109,0	-		H-4
14	135,6	-		
<b>CH</b>				
2	107,7	6,80 (d, 2,4)		H-4
4	109,0	7,24 (d, 2,4)		
5	119,6	8,30 (sl)		H-7
7	124,3	7,81 (sl)		H-5
<b>HO</b>				
1		*		
8		*		
3		*		

\* Valores não aparecem no espectro devido a troca química do hidrogênio da hidroxila com água do solvente metanol deuterado.

\*\* Valor não detectado no espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPTQ

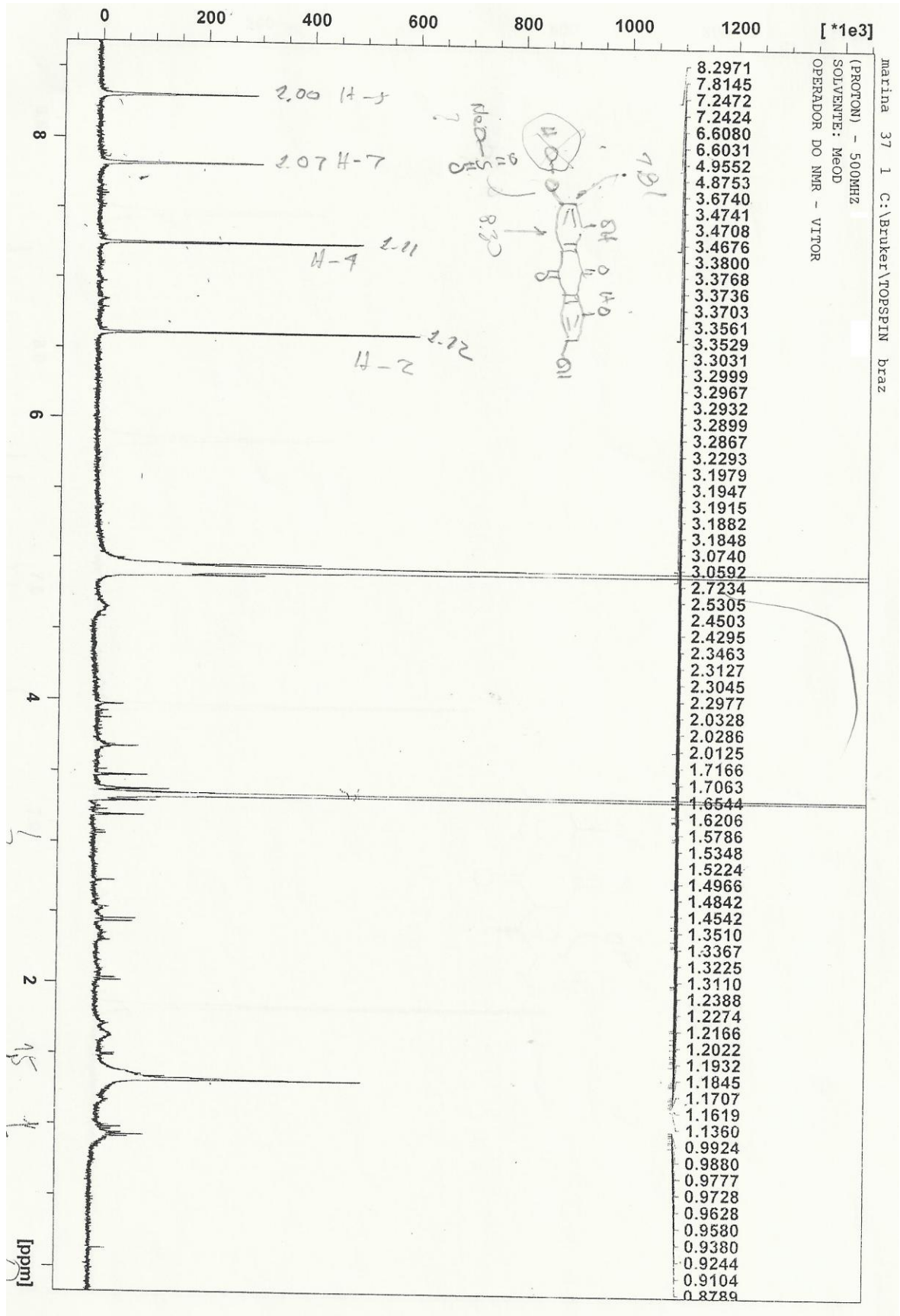
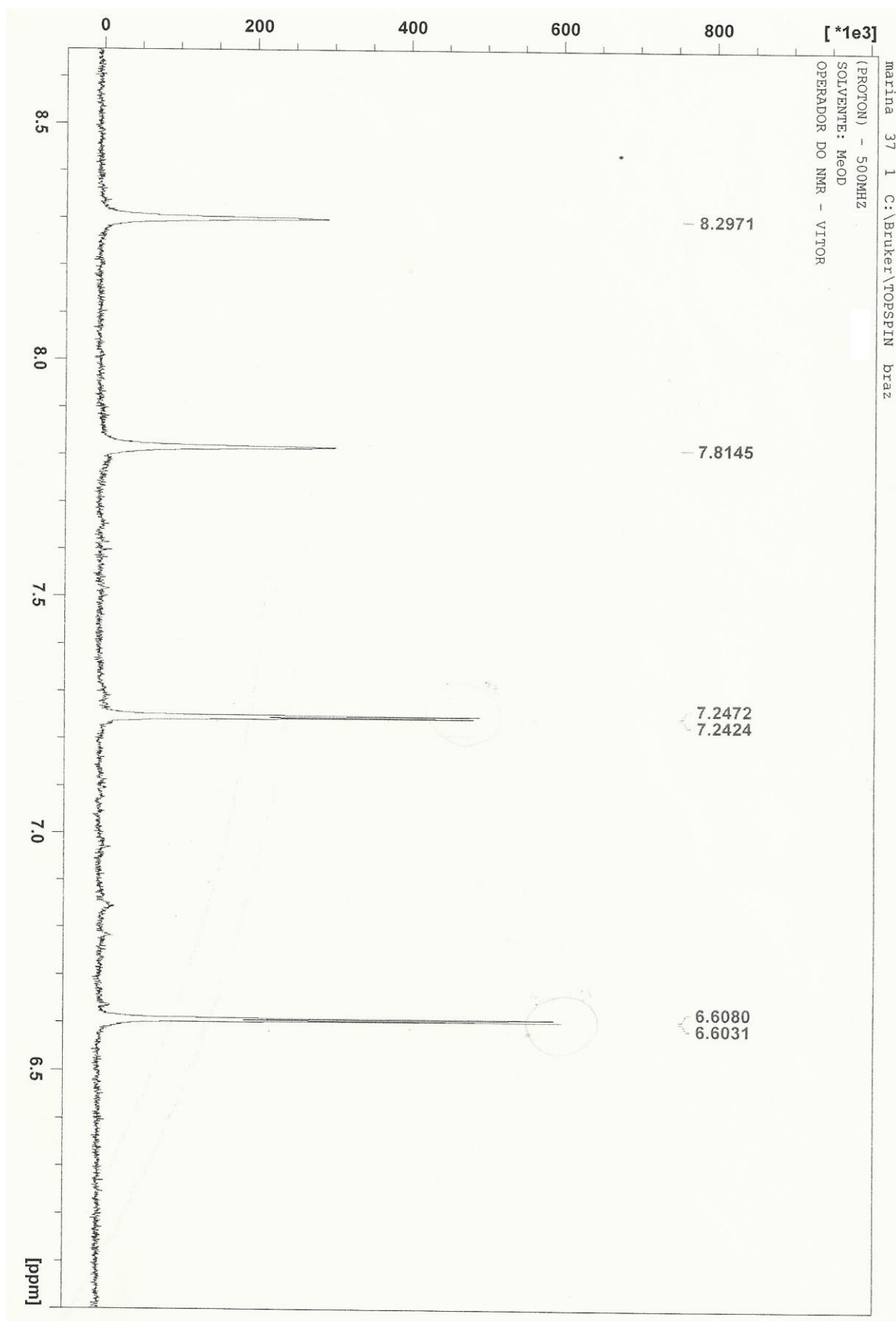


Figura 53: Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) da antraquinona 77.



**Figura 54:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) com ampliação da região  $\delta_H$  8,5 a 6,5 da antraquinona **77**.

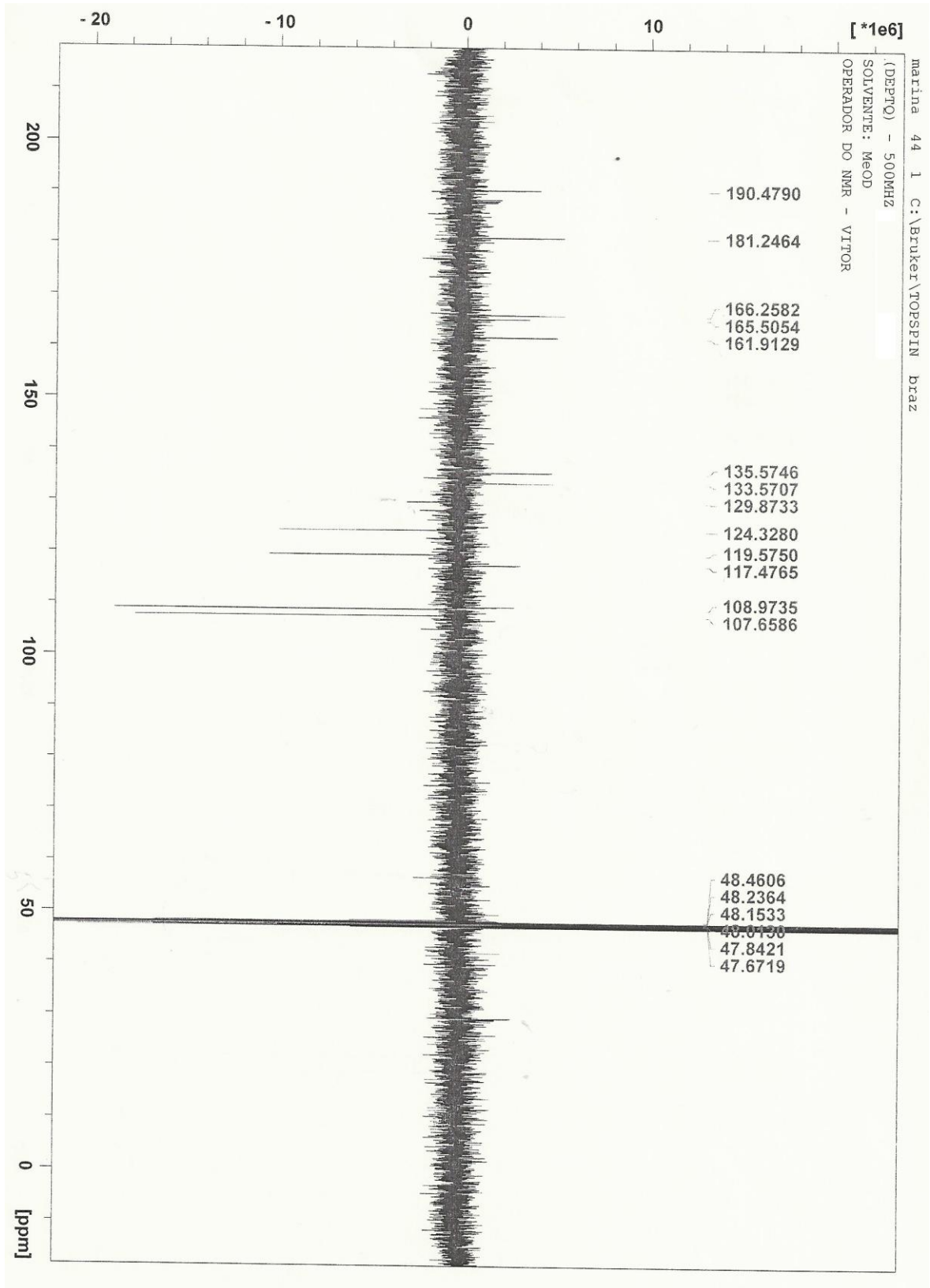
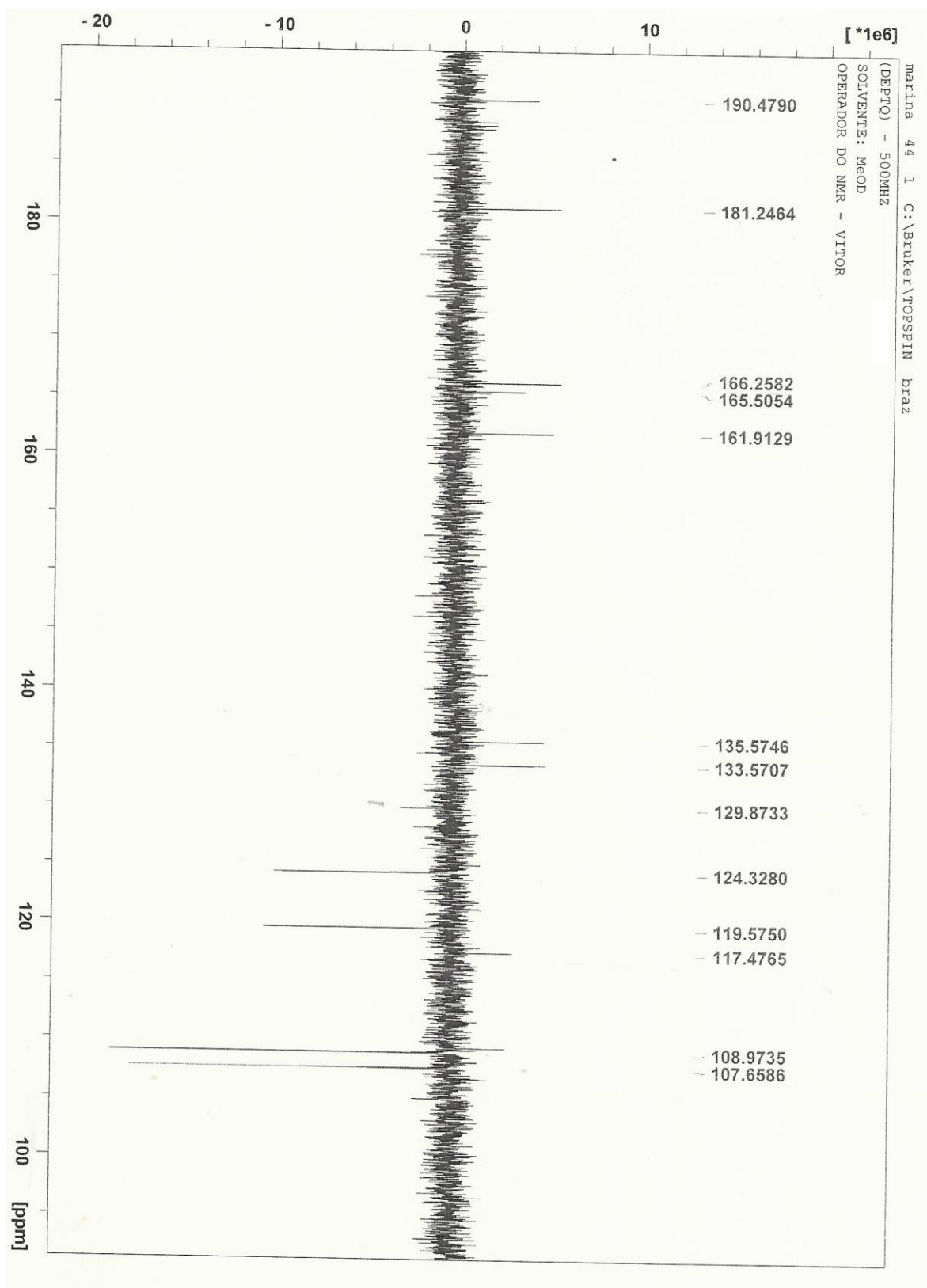
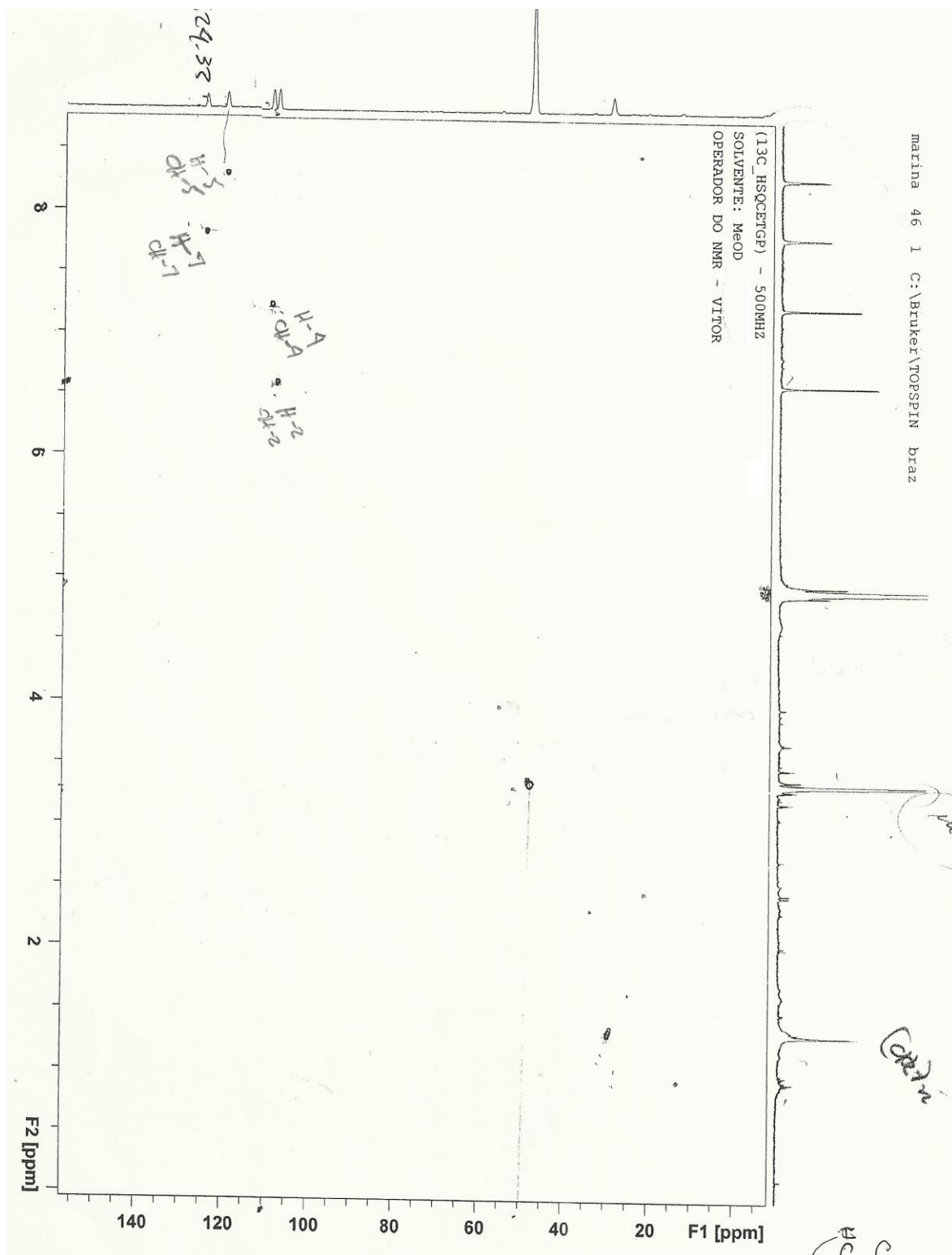


Figura 55: Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, MeOH) da antraquinona 77.

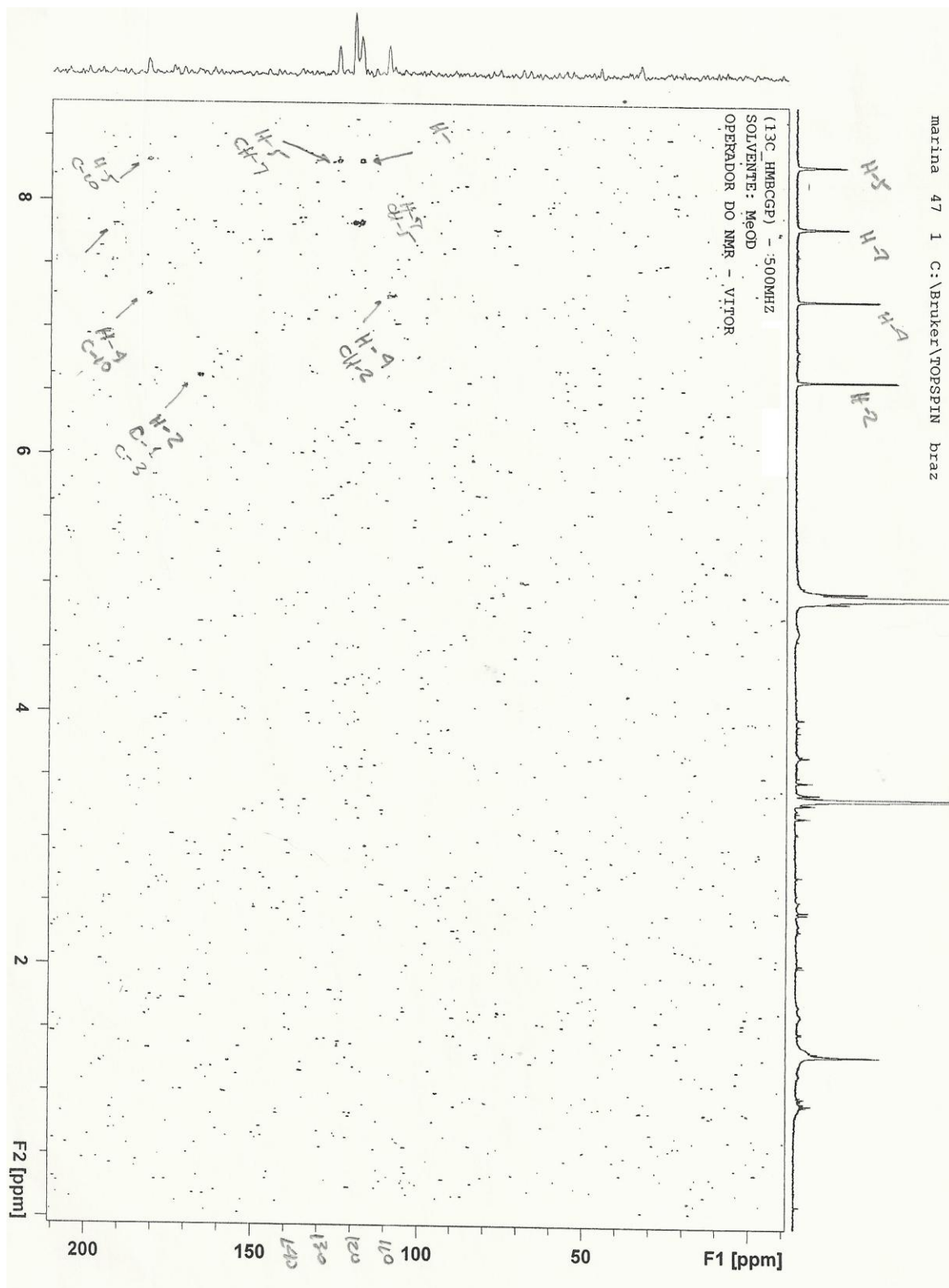


**Figura 56:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, MeOD) com ampliação da região  $\delta_{\text{H}}$  190 a 100 da antraquinona **77**.

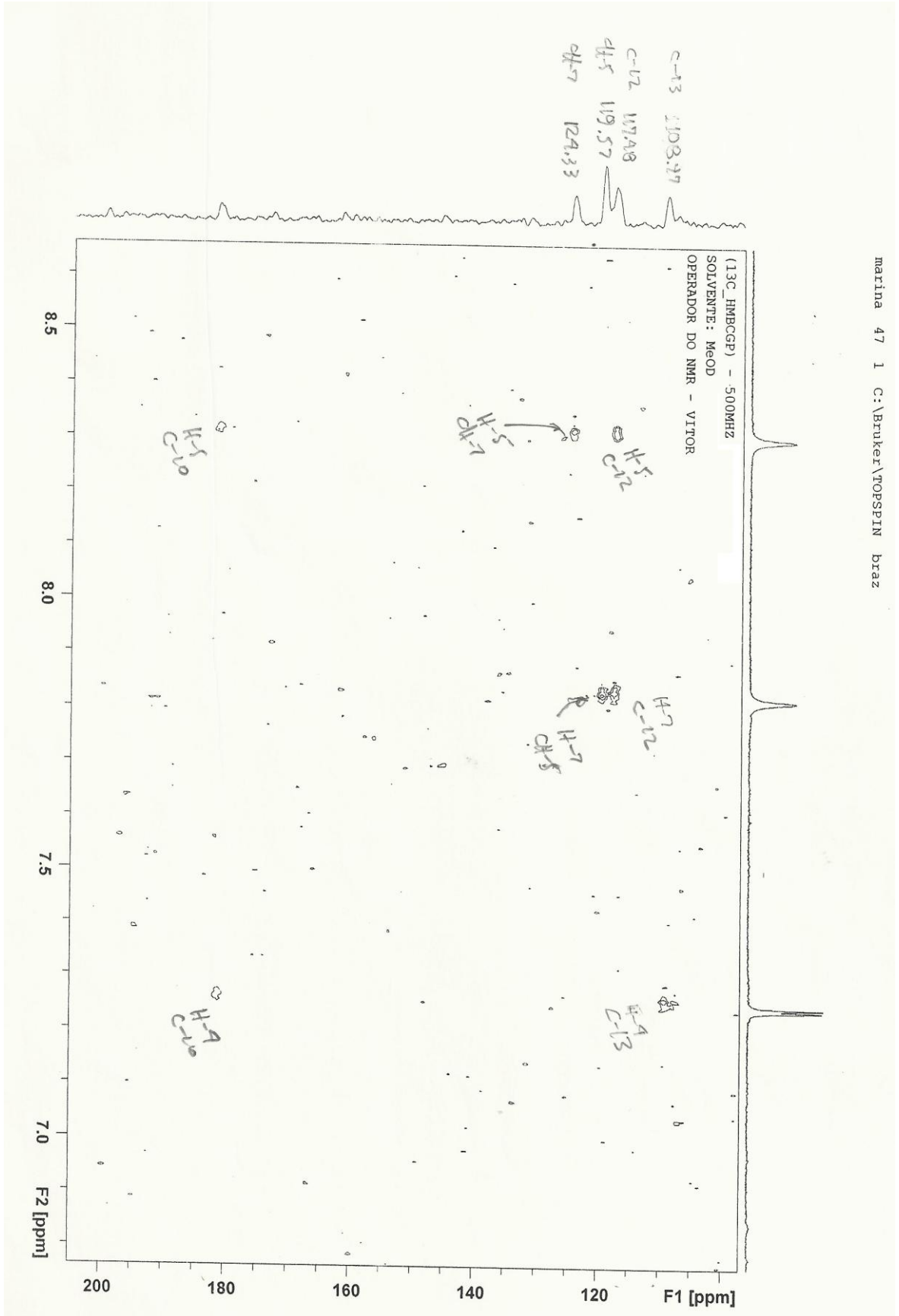


**Figura 57:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC em MeOD da antraquinona 77.





**Figura 58:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona 77.



**Figura 59:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em MeOD da antraquinona **77**.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *Picramnia ramiflora* permitiu o isolamento e identificação de 10 substâncias. Foram isolados e identificados 05 esteroides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, sitostenona e campestetona) e 03 antraquinonas (emodina, paristina e 1,5-dihidroxi-3-metil-antraquinona) do extrato em diclorometano do caule; 03 antraquinonas (hidroxiemodina, emodina e antraquinona sulfatada) do extrato em acetato de etila do caule; 01 antraquinona (emodina) dos extratos em diclorometano, acetato de etila e metanólico das folhas. Vale destacar, que as antraquinonas hidroxiemodina e 1,5-dihidroxi-3-metil-antraquinona são inéditas no gênero *Picramnia* e, pelo conhecimento a antraquinona sulfatada encontra-se inédita na literatura.

O isolamento e a identificação das 10 substâncias de *Picramnia ramiflora*, onde houve a predominância das antraquinonas, vêm confirmar e corroborar com o posicionamento taxonômico do gênero *Picramnia* dentro da família Picramniaceae, contribuindo para a quimiotaxonomia desta nova família. Destacando-se também, a proposta desta classe como marcador taxonômico do gênero com base nas evidências.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.M.B., Arriga, A.M.C., Santos, A.K.L., Lemos, T.L.G., Braz Filho, R., Vieira, I.J.C. (2007) Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. *Quim. Nova*, 30 (4):935-951.

Apoente, J.C., Vaisberg, A.J., Rojas, R., Caviedes, L., Lewis, W.H., Lamas, G., Sarasara, C., Gilman, R.H., Hammond, G.B. (2008) Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian Amazonian medicinal plants. *J. Nat. Prod.*, 71:102-105.

Avana, A., Julca, T. (1986) *Picramnia macrostachys* Ami (Simaroubaceae). *Rev. Peru Biochem.* 8 (2):16-19.

Balderrama, L., Braca, A., Garcia, E., Melgarejo, M., Pizza, C., De Tommasi, N. (2001) Triterpenes and anthraquinones from *Picramnia sellowii* Planchon in Hook (Simaroubaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 29:331-333.

Barron, D., Ibrahim, R. K. (1987) Synthesis of flavonoids sulfates: I. Stepwise sulfation of positions 2, 7, and 4 using *N,N*-dicyclohex-ylcarbodiimide and tetrabutylammonium hydrogen sulfate. *Tetrahedron*, 43:5197-5202.

Berthod, A., Carda-Broch, S. (2004) Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods *J. Chromatogr. A.* 1037 (1-2):3-14.

Biaggio, R.M.T.T. (1988) *Contribuição a quimiosistemática de Simaroubaceae; espectroscopia de alcalóides – carbolínicos e cantinônicos e estudo fitoquímico de Picramnia*. Tese (Mestrado em Química) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 172p.

Bianchini, E., Popolo, R.S., Dias, M.C., Pimenta, J.A. (2003) Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, sul do Brasil. *Acta bot. Bras.* 17 (3):405-419.

Breitmaier, E., Voelter, W. (1987) *Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry* (3rd ed) VCH, Weinheim.

Cam, J.J.L. (1975) Triterpenoides y derivados antraquinonicos obtenidos de *Picramnia sellowii* (Simaroubaceae). *Bol. Soc. Quim. Peru.* 41:14-30.

Camacho, M.R., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Solis, P.N., Marshall, S.J., Ghazanfar, S.A. (2003) Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J. Ethnopharmacol.* 89:185-191.

Diaz, F., Chai, H.B., Mi, Q., Su, B.N., Vigo, J.S., Graham, J.G., Cabieses, F., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D. (2004) Anthrone and oxanthrone C- glycosides from *Picramnia latifolia* collected in Peru. *J. Nat. Prod.* 67 (3):352-356.

Fernando, E.S., Quinn, C.J. (1995) Picramniaceae, a new family, and recircumscription of Simaroubaceae. *Taxon*, 44:177-181.

Kazmi, M. H., Zehra, A., Khan, S., Siddique, F., Hameed, S. (2006) Phytochemistry and bioactivity of *Cassia italica*. *J. Biol. Biotechnol.* 3(3):587-590.

- Kim, J. M., Jang, D. S., Lee, Y. M., Lee, G. Y., Kim, J. S. (2008) Constituents of the fruits of *Rumex japonicus* with inhibitory activity on aldose reductase. *J. Appl. Biochem.* 51 (1):13-16.
- Kubitzki, K. The Families and Genera of Vascular Plants: <http://www.springerlink.com/content/k4v1373420m2k644/> em 02/10/10.
- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C., Borin, M.R.M.B. (1996) *Biodiversidade: um enfoque biológico*. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 267p.
- Grimme, C. (1912) Fat from *Picramnia lindeniana*. *Chem. Rev. Fett. Harz. Ind.* 19:51-55.
- Hernández-Mendel, M.D.R., Garcia-Salmones, I., Santillan, R., Trigos, A. (1998) An anthrone from *Picramnia antidesma*. *Phytochemistry*, 49 (8):2599-2601.
- Hernández-Mendel, M.D.R., López-Marquez, O., Santillan, R., Trigos, A. (1996) Mayoside, an oxanthrone from *Picramnia hirsuta*. *Phytochemistry*, 43:279-281.
- Hernández-Mendel, M.D.R., Méndez-Olivares, R., Sólis-Fuentes, J.A., Méndez-Ventura, L.M. (2009) Characterization and biological activity of fatty acids from *Picramnia polyantha* fruits. *Rev. Latinoamer. Quim.* 37 (3):262-268.
- Hernández-Mendel, M.D.R., Ramirez-Corzas, C.O., Riviera-Dominguez, M.N., Ramirez-Mendez, J., Santillan, R., Rojas-Lima, S. (1999) Diastereomeric C-glycosyloxanthenes from *Picramnia antidesma*. *Phytochemistry*, 50:1379-1383.
- Herz, W., Santhanam, P.S., Wahlberg, I. (1972) 3-epi-Betulinic acid, a new triterpenoid from *Picramnia pentandra*. *Phytochemistry*, 11:3061-3063.
- Ito, Y. (1991) Recent advances in countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A.* 538:3-25.

Jacobs, H. (2003) Comparative phytochemistry of *Picramnia* and *Alvaradoa*, genera of the newly established family Picramniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 31:773-783.

Marston A., Hostettmann, K. (2006) Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *J. Chromatogr. A.* 1112:181-194.

Morais, S.M., Braz-Filho, R. (2007) *Produtos naturais*. Fortaleza: Editora da Universidade Estadual do Ceará, 240p.

Moreira, V.F. (2009) Constituintes químicos de *Borreria verticillata* (RUBIACEAE). Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 192p.

Pirani, J.R. Picramniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/index?mode=4&tid=12601&slink=> em 02/10/10.

Pirani, J.R., Mello-Silva, R., Sano, P.T. (2000) *Apostila avulsa da disciplina Taxonomia de Fanerógamas*. São Paulo.

Popinigis, I., Moreira, E.A., Nakashima, T., Krambeck, R., Miguel, O.G. (1980) Pharmacognostic study of *Picramnia parvifolia*. Engler. Simaroubaceae. *Trib. Farm.* 48:24-43.

Rodrigues Filho, E. (1989) *Estudo fitoquímico de Picramnia riedeli e Picramnia bahiense: uma contribuição quimiosistemática da família Simaroubaceae*. Tese (Mestrado em Química) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 131p.

Rodríguez-Gamboa, T., Fernandes, J.B., Rodrigues Filho, E., Silva, M.F.G., Vieira, P.C., Barros, M., Castro, O., Victor, S.R., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A. (2001) Triterpene benzoate from the bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (3):386-390.

Rodríguez-Gamboa, T., Fernandes, J.B., Rodrigues Filho, E., Silva, M.F.G., Vieira, P.C., Castro, O. (1999) Two anthrones and one oxanthrone from *Picramnia teapensis*. *Phytochemistry*, 51:583-586.

Rodríguez-Gamboa, T., Victor, S.R., Fernandes, J.B., Rodrigues Filho, E., Silva, M.F.G., Vieira, P.C., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., CASTRO, O. (2000) Anthrone and oxanthrone C,O-diglycosides from *Picramnia teapensis*. *Phytochemistry*, 55:837-841.

Santos, R.N., Silva, M.G.V., Braz-Filho, R. (2008) Constituintes químicos do caule se *Senna reticulata* Willd. (LEGUMINOSEAE). *Quim. Nova*, 31 (8): 1979-1981.

Simões, C.M.O. (2007) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Santa Catarina: Editora UFSC, 1104p.

Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2007) *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: Editora LTC, 490p.

Solis, P.N., Ravelo, A.G., Gonzáles, A.G., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. (1995) Bioactive anthraquinone glycosides from *Picramnia antidesma* ssp. *Fessonia*. *Phytochemistry*, 38 (2):477- 480.

Sousa, A.L. (2011) *Estudo químico de Cuscuta racemosa (Convolvulaceae)* Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 233p.

Souza, V.C., Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa.

Steger, A. (1933) Fat of the seed of *Picramnia sow*. *Rec. Trav. Chem.* 52:593-600.

Site da TROPICOS: <http://www.tropicos.org/Name/50318896> em 12/12/2010.



Vieira, I.J.C. (1995) *Uma contribuição à química da família Simaroubaceae*. Tese (Doutorado em Química) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 318p.

Wilson, E.O. (1997) *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 657p.