

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. (Portulacaceae) E
Sphagneticola trilobata L. Pruski (Asteraceae)**

ANA PAULA DE OLIVEIRA AMORIM FRANCISCO

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
QUÍMICA ORGÂNICA**

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. (Portulacaceae) E *Sphagneticola
trilobata* L. Pruski (Asteraceae)**

ANA PAULA DE OLIVEIRA AMORIM FRANCISCO

Sob Orientação do professor
Dr. Mario Geraldo de Carvalho
Co-Orientação da professora
Dra. Marcia Cristina Campos de Oliveira

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciências**. Programa de Pós-Graduação
em Química, Área de Concentração
Química Orgânica.

Seropédica, Rio de Janeiro
Julho de 2014

547

A524e

T

Amorim, Ana Paula de Oliveira, 1974-
Estudo químico e atividades
biológicas de *Talinum triangulare*
(Jacq.) Willd. (Portulacaceae) e
Sphagneticola trilobata L. Pruski
(Asteraceae) / Ana Paula de Oliveira
Amorim Francisco. - 2014.
203 f.: il.

Orientador: Mario Geraldo de
Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Química,
2014.

Bibliografia: f. 173-181.

1. Química orgânica - Teses. 2.
Química vegetal - Teses. 3. Plantas -
Análise - Teses. 4. Plantas -
Composição - Teses. 5.
Análise cromatográfica - Teses. I.
Carvalho, Mario Geraldo de, 1952- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA PAULA DE OLIVEIRA AMORIM FRANCISCO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM 31/07/2014



Dr. Mario Geraldo de Carvalho (DEQUIM-UFRuralRJ)

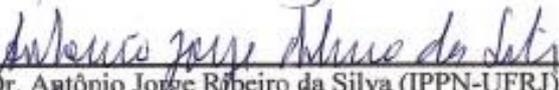
(Orientador)



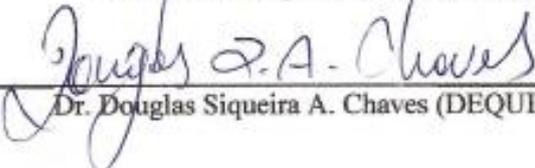
Dr. Josean Fachine Tavares (LTF- UFPB)



Dra. Beatriz Grosso Fleury (LEMB-IB-UERJ)



Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva (IPPN-UFRJ)



Dr. Douglas Siqueira A. Chaves (DEQUIM-UFRuralRJ)

Dra. Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRuralRJ)

“Assim como tu não sabes qual o caminho do vento, nem como se formam os ossos no ventre da mulher grávida, assim também não sabes as obras de Deus, que faz todas as coisas. No princípio criou Deus o céu e a terra. E disse Deus: Produza a terra erva verde, erva que dê semente, árvore frutífera que dê fruto segundo a sua espécie, cuja semente está nela sobre a terra; e assim foi. E a terra produziu erva, erva dando semente conforme a sua espécie, e a árvore frutífera, cuja semente está nela conforme a sua espécie. E disse Deus: eis que vos tenho dado toda erva que dê semente, que está sobre a face de toda a terra; e toda a árvore, em que há fruto que dê semente, ser-vos-á para mantimento. E viu Deus tudo quanto tinha feito, e eis que era muito bom”.

Eclesiastes 11:5 e Gênesis 1:1, 11-12, 29.

*Ao meu querido Deus pela força, cuidado, sustento, sabedoria e pela
oportunidade de aprender, descobrir e conhecer coisas, pessoas e lugares que
jamais sonhei ou imaginei.*

Obrigado pela vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

Aos meus pais Antônio Carlos e Creuzenir pelo incentivo, apoio e custeio de meus estudos.

Ao meu esposo Flavio pela paciência, carinho e compreensão, pelos bons e maus momentos;

A minha avó Gerci por palavras de incentivo e carinho;

A minha avó Maria pelo apoio;

Ao meu irmão Igor pelo estímulo e otimismo;

A UFRRJ por me dar a oportunidade de estudar em uma instituição que contribui com meu conhecimento e aprendizado científico, e por me proporcionar momentos que de descontração, alegria, tristeza, dificuldades superadas que jamais esquecerei.

Aos todos meus familiares que me apoiaram e torceram por mim;

Ao prof. Dr. Mario Geraldo pela orientação segura, atenção, paciência e conhecimentos transmitidos,

A prof.^a Dra. Marcia Cristina pela atenção, ajuda, e ensinamentos transmitidos;

A prof.^a Dra. Aurea Echevarria pelo ensinamentos, ajuda e incentivo;

A prof.^a Dra. Rosane Nora pela atenção, carinho, otimismo, dedicação e conhecimentos;

A todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais;

A todos os amigos do Programa de Pós-graduação da UFRRJ;

A prof.^a Dra. e amiga Andressa Esteves por ser um exemplo para mim;

Aos professores desta instituição pela formação e evolução profissional;

Aos técnicos e funcionários do ICE-UFRRJ, pela contribuição direta e indireta para a realização direta e indireta;

A amiga Henriqueta pelo apoio e análise de carotenoides no HPLC da EMBRAPA;

Ao prof. Dr. Norberto Peporine e o Técnico Tomaz da USP- Ribeirão Preto pela realização dos espectros de massas de alta resolução.

Ao prof. Dr. Antônio Jorge e Técnico e colega Ari da UFRJ, pela análise de espectros de massas de alta resolução.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro concedido e pelo auxílio através do intercambio UFRRJ (Brasil) - Universidad Rio Cuarto (Argentina);

ACEZO pelas palavras de consolo, força e incentivo;

A Todos que, de alguma maneira me ajudaram na realização deste trabalho, muito Obrigada.

SUMÁRIO

1.	Introdução Geral	1
2.	Objetivos	3
3.	Experimental Geral	3
3.1	Equipamentos e Reagentes	3
4.	Substâncias identificadas neste trabalho	6
CAPÍTULO I		8
ESTUDO QUIMICO DE <i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd		8
I.1 Introdução		9
I.1.1	Generalidades da Família <i>Portulacaceae</i>	9
I.1.2	Aspectos Gerais do Gênero <i>Talinum triangulare</i>	13
I.2 Material e Métodos		18
I.2.1	Material Vegetal	18
I.2.2	Preparação dos extratos de folha e caule de <i>Talinum triangulare</i>	18
I.2.3	Isolamento e Identificação de Constituintes Químicos de Folhas de <i>Talinum triangulare</i>	19
I.2.3.1	Estudo químico do extrato hexânico de <i>Talinum triangulare</i>	19
I.2.3.1.1	Processo de Saponificação, Extração e Identificação de Carotenóides do Extrato Hexânico de Folhas de <i>Talinum triangulare</i>	19
I.2.3.1.2	Identificação de Carotenoides através de UV	19
I.2.3.1.3	Identificação de Carotenoides através de análises através de CLAE	20
I.2.3.2	Estudo químico do extrato diclorometano de <i>Talinum triangulare</i> (TTFD)	21
I.2.3.3	Estudo químico do extrato acetato de etila das folhas de <i>Talinum triangulare</i> TTFAcet)	23
I.2.3.4	Estudo químico do extrato metanólico de <i>Talinum triangulare</i> (TTFM)	24
I.2.4	Isolamento e Purificação de Constituintes Químicos de Caule de <i>Talinum triangulare</i>	25
I.2.4.1	Estudo químico do extrato diclorometano de caule de <i>Talinum triangulare</i> (TTCD)	25
I.2.4.2	Estudo químico do extrato hidrometanólico de <i>Talinum triangulare</i> (TTCHM)	27
I.2.5	Identificação de porfirinas através de CLAE	29
I.3 Resultados e discussão		29
I.3.1	Substâncias Identificadas e Isoladas	29
I.3.2	Identificação das Substâncias Isoladas de Folhas de <i>Talinum triangulare</i>	30
I.3.2.1	Identificação das substâncias 1 e 2	30
I.3.2.1.1	Uso de Espectrofotometria no Ultravioleta	30
I.3.2.1.2	Uso de CLAE	32
I.3.2.2	Proposta Biosintética de Porphirinas	33
I.3.2.3	Identificação da substância 3	36
I.3.2.4	Identificação da substância 4	51
I.3.2.5	Identificação das substâncias 5 , 6 e 7	56
I.3.2.6	Identificação das substâncias 8 , 9 , 10 e 11	71
I.3.2.7	Identificação da substância 12	80
I.3.2.8	Identificação de porfirinas em algumas frações do extrato Acetato de Etila das de <i>Talinum triangulare</i>	86
I.3.2.9	Identificação da substância 13 e 14	96
I.3.2.10	Identificação da substância 15	99
I.3.3	Identificação das substâncias isoladas do caule de <i>Talinum triangulare</i>	101
I.3.3.1	Identificação das substâncias 16 , 17 , 18 e 19	101

I.3.3.2 Identificação da substância 20	105
I.3.3.3 Identificação da substância 21	111
I.3.3.4 Identificação da substância 22	115
CAPÍTULO II	118
ESTUDO DE DICROISMO CIRCULAR	118
II.1 Introdução	119
II.1.1 Revisão de Literatura	119
II.1.1.1 Dicroísmo Circular (DC)	119
II.1.1.2 Efeito Cotton	122
II.1.1.3 Aplicação da técnica de DC	122
II.1.1.4 A regra do quadrante	123
II.2 Metodologia	125
II.2.1 Preparação das amostras	125
II.3 Resultados	125
II.3.1 Definição da estereoquímica absoluta das substâncias 3, 5+6 +7 e 8+9+10+11	125
CAPÍTULO III	130
ESTUDO QUIMICO DE <i>Sphagneticola trilobata</i> L. Pruski	130
III.1 Revisão de Literatura	131
III.1.1 Generalidades da Família Asteraceae	131
III.1.1.1 Aspectos Gerais do gênero de <i>Sphagneticola trilobata</i> L. Pruski	131
III.1.1.2 Outros constituintes químicos isolados de <i>Sphagneticola trilobata</i>	136
III.2 Material e Métodos	137
III.2.1 Identificação da Espécie e Preparação dos Extratos de <i>Sphagneticola trilobata</i>	137
III.2.1.1 Identificação da espécie <i>Sphagneticola trilobata</i>	137
III.2.1.2 Preparação dos extratos de <i>Sphagneticola trilobata</i>	137
III.2.1.3 Processo de Saponificação e Extração de Carotenóides do Extrato Hexânico de <i>Sphagneticola trilobata</i>	137
III.2.1.3.1 Processo de saponificação do extrato hexânico <i>Sphagneticola trilobata</i>	137
III.2.1.3.2 Identificação de Carotenoides através de UV	138
III.2.1.3.3 Análises através de CLAE do Extrato e Fração Hexânica de <i>Sphagneticola trilobata</i>	138
III.2.1.4 Estudo químico do extrato metanólico de <i>Sphagneticola trilobata</i>	139
III.3 Resultados e Discussão	141
III.3.1 Substâncias Identificadas e Isoladas de <i>Sphagneticola trilobata</i>	141
III.3.1.1 Identificação de Carotenóides no extrato e fração hexânica de <i>Sphagneticola trilobata</i>	141
III.3.1.1.1 Análises Espectrofotométrica no Ultravioleta do Extrato hexânico de <i>Sphagneticola trilobata</i>	141
III.3.1.1.2 Análises através de CLAE do Extrato e fração hexânica de <i>Sphagneticola trilobata</i>	141
III.3.1.2 Identificação da substância 25	143
III.3.1.3 Identificação das substâncias 26 e 27	
III.3.1.4 Identificação da substância 28	148
CAPÍTULO IV	153
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	154
IV.1 Revisão de Literatura	155
IV.1.1 Atividade antibacteriana	155
IV.1.2 Atividade anticâncer	156
IV.1.3 Atividade contra as larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	158

IV.2 Metodologia	160
IV.2.1 Atividade antibacteriana	160
IV.2.1.1 Preparação da solução de PBS	160
IV.2.1.1.1 Preparação das amostras	160
IV.2.1.1.2 Microrganismos utilizados	161
IV.2.1.1.3 Meios de cultura utilizados	161
IV.2.1.1.4 Preparação dos inóculos de microrganismos utilizados nos ensaios	162
IV.2.1.1.5 Ensaio da atividade antibacteriana	162
IV.2.1.1.6 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)	162
IV.2.2 Ensaio de atividade anticâncer	162
IV.2.2.1 Linhagens celulares	162
IV.2.2.1.1 Ensaio de viabilidade celular – MTT	163
IV.2.3 Bioensaios com <i>Aedes aegypti</i>	163
IV.3 Resultados e Discussão	163
IV.3.1 Atividade antibacteriana	163
IV.3.2 Atividade contra o câncer	168
IV.3.3 Atividade contra as larvas <i>Aedes aegypti</i>	169
5. Conclusões	170
6. Perspectivas	172
7. Referências Bibliográficas	173
8. Artigo Publicado	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Talinum</i>	12
Tabela 2. Taxonomia de <i>Talinum triangulare</i>	14
Tabela 3. Informação nutricional da <i>Talinum triangulare</i>	15
Tabela 4. Variações de tempo e de gradiente utilizados nas análises de carotenoides de <i>Talinum triangulare</i>	20
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 1D e 2D da substância 3	43
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1D (500 MHz, 125 MHz, CDCl_3) da substância 4	53
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1D e 2D (500 MHz, 125 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	60
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1D e 2D (500 MHz, 125 MHz, CDCl_3) das substâncias 8, 9, 10 e 11	74
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 1D e 2D (500 MHz, 125 MHz, CDCl_3) da substância 12	82
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 13 e 14	97
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 15	99
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) das substâncias 16, 17, 18 e 19	102
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 1D e 2D da substância 20	106
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 21	112
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 22	116
Tabela 16. Taxonomia de <i>Sphagneticola trilobata</i> (<u>L.</u>) Pruski	132
Tabela 17. Variações de tempo e de gradiente utilizados nas análises de carotenoides de <i>Sphagneticola trilobata</i>	139
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 25	144
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 28	149
Tabela 20. Atividade antimicrobiana dos extratos polares de <i>Talinum triangulare</i> e <i>Sphagneticola trilobata</i> testadas em microrganismos de cocos de Gram positivo	167
Tabela 21. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos polares de <i>Talinum triangulare</i> e <i>Sphagneticola trilobata</i> sobre as espécies suscetíveis ao gênero <i>Staphylococcus</i>	167

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Cálculos para confirmação da FM com valores de massas de alta resolução da substância 3	38
Quadro 2: Correlação de valores de massas para as propostas de 5, 6 e 7	57
Quadro 3: Correlação de valores de massas para as propostas de 8, 9, 10 e 11	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Preparação dos extratos de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	18
Esquema 2: Preparação dos extratos de caule de <i>Talinum triangulare</i>	19
Esquema 3: Fracionamento do extrato diclorometano de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	22
Esquema 4: Fracionamento do extrato diclorometano de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	23
Esquema 5: Fracionamento do extrato acetato de etila de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	24
Esquema 6: Fracionamento do extrato metanólico de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	25
Esquema 7: Fracionamento do extrato diclorometano de caule de <i>Talinum triangulare</i>	26
Esquema 8: Fracionamento do extrato hidrometanólico de caule de <i>Talinum triangulare</i>	28
Esquema 9: Biossíntese do ácido 5-aminolevulinato	32
Esquema 10: Biossíntese do anel pirrólico	33
Esquema 11: Biossíntese da Protoporfirina IX	34
Esquema 12: Biossíntese do Monovinil clorofilídeo <i>a</i>	35
Esquema 13: Biossíntese da clorofila <i>a</i> e <i>b</i>	36
Esquema 14: Proposta de fragmentação do íon m/z 843 de 3	40
Esquema 15: Proposta de fragmentação do íon m/z 859 de 3	40
Esquema 16: Proposta de fragmentação para formação de íon compatível com m/z 565 do espectro de massa-massa de 3	42
Esquema 17: Proposta de fragmentação para formação de íon compatível com m/z 871 de 4	55
Esquema 18: Síntese da β -alanina	111
Esquema 19: Proposta biossintética da substância 20	111
Esquema 20: Fracionamento do extrato metanólico de <i>Sphagneticola trilobata</i>	140
Esquema 21: Proposta de fragmentação de massas da substância 25	147

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1: Equação de <i>Lambert-beer</i>	20
Equação 2: Diferença da absorção (A) e a luz circularmente polarizada a direita e a esquerda	119
Equação 3: Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada	119
Equação 4: Equação para determinar o coeficiente de extinção molar	120
Equação 5: Equação para determinar o dicroísmo circular molar	120
Equação 6: Equação para determinar a elipticidade	121
Equação 7: Equação para determinar a elipticidade molar	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie <i>Portulaca oleracea</i>	9
Figura 2: Compostos bioativos glicosilados isolados das partes aéreas de <i>Portulaca oleracea</i>	10
Figura 3: <i>Talinum patens</i>	11
Figura 4: Compostos isolados de folhas e caules de <i>Talinum patens</i> (L.) Wild	11
Figura 5: <i>Talinum triangulare</i>	15
Figura 6: Saponina extraída das raízes de <i>Talinum triangulare</i>	16
Figura 7: Substâncias isoladas do extrato metanólico de <i>Spinacea oleracea</i>	17
Figura 8: Compostos isolados do caule de <i>Talinum triangulare</i>	31
Figura 9: β -caroteno e luteína identificados no extrato e fração de <i>Talinum triangulare</i> através de CLAE	31
Figura 10: Curvas de UV- visível de β -caroteno de <i>Talinum triangulare</i>	31
Figura 11: Cromatograma do extrato hexânico de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	31
Figura 12: Cromatograma da fração hexânica de folhas de <i>Talinum triangulare</i>	32
Figura 13: Espectro de massas por eletrospray com detecção em modo positivo da substância 3	39
Figura 14: Espectro massa-massa do íon 843 de 3	39
Figura 15: Espectro de massas-massa do íon m/z 565 substância 3	41
Figura 16: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 3	44
Figura 17: Expansão da região de deslocamento químico de δ_{H} 2,5-0,5 ppm (400 MHz, CDCl_3) da substância 3	45
Figura 18: Expansão da região de deslocamento químico de δ_{H} 3,0-9,5ppm (400 MHz, CDCl_3) da substância 3	45
Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância 3	46
Figura 20: Expansão da região de deslocamento químico de δ_{C} 33 - 10 ppm do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância 3	46
Figura 21: Mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância 3	47
Figura 22: Expansão da região de 0,5-4,0 ppm do mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância 3	48
Figura 23: Mapa de contornos de HMBC (125 MHz, CDCl_3) da substância 3	49
Figura 24: Espectro de NOESY (125 MHz, CDCl_3) da substância 3	50
Figura 25: Cromatograma (CLAE-DAD) da substância 3	51
Figura 26: Curvas de UV da substância 3	54
Figura 27: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 4	54
Figura 28: Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) da substância 4	56
Figura 29: Espectro de massas da substância 4	61
Figura 30: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	61
Figura 31: Expansão nas regiões de δ_{H} 5,0 – 0,4 ppm do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	62
Figura 32: Expansão nas regiões de δ_{H} 10 – 5,0 ppm do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	62
Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	63
Figura 34: Expansão na região δ_{C} 195,0 - 115,0 ppm do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	63
Figura 35: Expansão na região δ_{C} 120 - 10,0 ppm do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	64
Figura 36: Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl_3) das substâncias 5, 6 e 7	65

Figura 37: Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias 5, 6 e 7	66
Figura 38: Expansão da região δ_H 6,0 - 1,5 ppm do mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias 5, 6 e 7	67
Figura 39: Espectro de Noesy das substâncias 5, 6 e 7	68
Figura 40: Expansão da região de 1,5-6,0 ppm do espectro de Noesy das substâncias 5, 6 e 7	69
Figura 41: Espectro de massas da fração contendo as substâncias 5, 6 e 7	70
Figura 42: Cromatograma da fração contendo das substâncias 5, 6 e 7	70
Figura 43: Curvas de UV da fração contendo das substâncias 5, 6 e 7	71
Figura 44: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) das substâncias 8, 9, 10, e 11	75
Figura 45: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias 8, 9, 10 e 11	76
Figura 46: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da região de deslocamentos químicos em δ_C 48 a 190 ppm da fração contendo 8, 9, 10, e 11	76
Figura 47: Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias 8, 9, 10, e 11	77
Figura 48: Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) da substância 8, 9, 10 e 11	78
Figura 49: Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração contendo as substâncias 8, 9, 10 e 11	79
Figura 50: Cromatograma das substâncias 8, 9, 10 e 11	79
Figura 51: Curvas de UV das substâncias 8, 9, 10 e 11	80
Figura 52: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 12	83
Figura 53: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 12	83
Figura 54: Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl ₃) da substância 12	84
Figura 55: Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) da substância 12 e expansão da região de deslocamentos químicos em δ_H 0,5 – 3,0 ppm	85
Figura 56: Espectro de massas da substância 12	86
Figura 57: Cromatograma da fração TAcet-15	87
Figura 58: Curvas de UV da fração TAcet-15	88
Figura 59: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração TAcet-15	88
Figura 60: Espectro de massas da fração TAcet-15	89
Figura 61: Cromatograma da fração TAcet-16	89
Figura 62: Curvas de UV da fração TAcet-16	90
Figura 63: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração TAcet-16	91
Figura 64: Espectro de massas da fração TAcet-16	91
Figura 65: Cromatograma da fração TAcet-17	92
Figura 66: Curvas de UV da fração TAcet-17	92
Figura 67: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração TAcet-17	93
Figura 68: Espectro de massas da fração TAcet-17	93
Figura 69: Cromatograma da fração TAcet-18-20	94
Figura 70: Curvas de UV da fração TAcet-18-20	94
Figura 71: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração TAcet-18-20	95
Figura 72: Espectro de massas da fração TAcet-18-20	95
Figura 73: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13 e 14	98
Figura 74: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13 e 14	98
Figura 75: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DEPT 135 °C, DMSO-d ₆) da substância 13 e 14	99
Figura 76: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 15	100
Figura 77: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 15	101
Figura 78: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 16, 17, 18 e 19	103
Figura 79: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 16, 17, 18 e 19	103
Figura 80: Cromatograma de CG (A) e espectros de massas (B), (C), (D) e (E)	

dos componentes identificados com os respectivos TR 19,51, 20,06, 20,31 e 21,41 min	104
Figura 81: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOD) da substância 20	106
Figura 82: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, MeOD) da substância 20	107
Figura 83: Espectro de Dept 135° (100 MHz, MeOD) da substância 20	107
Figura 84: Espectro de Homocosity da substância 20	108
Figura 85: Espectro de HSQC (100 MHz, MeOD) da substância 20	109
Figura 86: Espectro de HMBC (100 MHz, MeOD) da substância 20	109
Figura 87: Espectro de massas da substância 20	110
Figura 88: Espectro de IV (KBr) da substância 21	113
Figura 89: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 21	113
Figura 90: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 21	114
Figura 91: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DEPT 135 °C, DMSO-d ₆) da substância 21	114
Figura 92: Espectro de massas da substância 21	115
Figura 93: Espectro de IV (KBr) da substância 22	116
Figura 94: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOD) e expansão da região de δ _H 2,20- 3,00 ppm da substância 22	117
Figura 95: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, MeOD) da substância 22	117
Figura 96: Luz plano polarizada	121
Figura 97: somatória vetorial da luz polarizada absorvida a direita e a esquerda	121
Figura 98: A regra do quadrante para cromóforos aromáticos	123
Figura 99: Curva de DC dos diterpenos simirane A e simirane B	124
Figura 100: Projeções no modelo quadrante do anel aromático	124
Figura 101: Projeções no quadrante da substância 3 de acordo com o EC definido pela curva de DC	127
Figura 102: Projeções no quadrante da substância 3	128
Figura 103: Espectro de dicroísmo circular dos compostos 3 (0,991 mg/mL), 5 , 6 e 7 (0,156 mg/mL) e 8 , 9 , 10 e 11 (0,151 mg/mL) em MeOH	129
Figura 104: Curvas de UV dos compostos 3 (0,991 mg/mL), 5 , 6 e 7 (0,156 mg/mL) e 8 , 9 , 10 e 11 (0,151 mg/mL) em MeOH	129
Figura 105: Espécie <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski	132
Figura 106: Ácidos kaurenóicos, labdano e secokaurenolactona isolados de <i>Sphagneticola trilobata</i>	134
Figura 107: Lactonas sesquiterpênicas isolados de <i>Sphagneticola trilobata</i>	135
Figura 108: Kaurenos isolados de <i>Sphagneticola trilobata</i>	135
Figura 109: Kaurenos isolados de <i>Sphagneticola trilobata</i>	136
Figura 110: Análise do UV do extrato hexânico com λ _{max} de 413, 443 e 475 nm	142
Figura 111: Cromatograma do extrato hexânico de <i>Sphagneticola trilobata</i>	143
Figura 112: Cromatograma da fração hexânica de <i>Sphagneticola trilobata</i>	143
Figura 113: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 25	145
Figura 114: Espectro de expansão da faixa 2,5-0,5 do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 25	146

Figura 115: Espectro de DEPTQ (500 MHz, CDCl ₃) da substância 25	146
Figura 116: Espectro de CG-massas da substância 25	147
Figura 117: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 28	150
Figura 118: Expansão de deslocamento químico da região de δ _H 1- 4,5 ppm da substância 28	150
Figura 119: Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 28	151
Figura 120: Espectro de DEPTQ (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 28	151
Figura 121: Espectro de HSQC (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 28	152
Figura 122: Espectro de HMBC (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 28	153
Figura 123: Compostos isolados do gênero <i>Mikania</i> Willdenow e a espécie <i>Sphagneticola trilobata</i>	156
Figura 124: Taxol (1) obtido de <i>Taxus brevifolia</i> e alcalóides da vinca: vincristina (2) e vimblastina (3) isolados de <i>Catharanthus roseus</i>	157
Figura 125: Mapa de distribuição da dengue no mundo.	158
Figura 126: Mosquito transmissor da dengue <i>Aedes aegypti</i>	159
Figura 127: Ciclo de transmissão da dengue	160
Figura 128: Extrato 1 de <i>Talinum triangulare</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 4 para as concentrações de 20 e 10 mg/mL	164
Figura 129: Atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico de <i>Sphagneticola trilobata</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 4 (D) para uma concentração de 20 mg/mL	165
Figura 130: Atividade antibacteriana do extrato 6 sobre <i>S. aureus</i> 49 nas concentrações de 20, 10 e 5 mg/mL	165
Figura 131: Atividade antibacteriana do extrato 5 sobre <i>S. aureus</i> 5 na concentração de 20 mg/mL	166
Figura 132: Inibição formas de linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena e JUKART frente o extrato hidrometanólico da folha de <i>Talinum triangulare</i>	168
Figura 133: Resultados obtidos com análise das formas de linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena e JUKART utilizando como padrão celular-cisplatina (µg/mL)	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
ν	estiramento
λ	comprimento de onda (nm)
M^+	pico do íon molecular
Ac	acetato
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna aberta
CCPD	cromatografia em camada delgada preparativa
CCF	cromatografia em camada fina
CG-EM	cromatografia a gás acoplado a espectrometro de massas
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
COSY	C ORrelated S pectroscop Y
d	dubleto
dd	duplo dubleto
m	multiplete
s	singleto
sl	singleto largo
t	tripleto
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer
DEPTQ	D istorsionless E nhancement by P olarization T ransfer including the detection of Q uaternary nuclei
DMSO- D_6	dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
e.V	electron volt
HBBD(BBD)	H ydrogen B and B road D ecoupled
HMBC	H eteronuclear M ultiple- B ond C orrelation
HSQC	H eteronuclear S ingle Q uantum C oherence
Hz	Hertz (unidade de frequência)
IV	infra-vermelho
J	constante de acoplamento em Hertz
m/z	relação massa/carga
MeOH	metanol
MHz	mega-hertz
NOESY	N uclear O verhauser E ffect C orrelation S pectroscopy
P.F.	ponto de fusão
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
CLAE	C romatografia L íquida de A lta E ficiência
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography
LC-MS	L iquid C hromatography- M ass S pectrometry
UV	Ultra-violeta
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

RESUMO

AMORIM, Ana Paula de Oliveira. **Estudo químico e atividades biológicas de *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. (Portulacaceae) e *Sphagneticola trilobata* L. Pruski (Asteraceae)**. Seropédica: UFRRJ, 2014. 203 p. (Tese de Doutorado em Química).

O fracionamento cromatográfico de extratos de folhas e caule de *Talinum triangulare* (Portulacaceae) e dos extratos de *Sphagneticola trilobata* e análise das frações através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas conduziram ao isolamento e identificação de vinte oito constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais.

De folhas de *Talinum triangulare* foram identificados β -caroteno, luteína e porfirinas dentre elas: 18-purpurinato de fitila (**3**), feofitina a (**4**), 13²-hidroxi-feofitina a (**5**), 15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (**6**), 15¹-metilperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (**7**), 15¹-carboxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (ácido Ficuschlorinico D) (**8**), 15¹-hidroxi-15¹-acetil-13¹-carboxi-feofitina b (taliclorigina A) (**9**), 15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**10**), 15¹-hidroperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**11**) 15¹-acetil-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (**12**), dentre elas podemos destacar cinco novas, **7**, **9**, nomeada como taliclorigina A, **10**, **11** e **12**, pois estão sendo descritas pela primeira vez na literatura. Outros compostos tais como alantoina e a mistura de 3- β -O- β D-glicopiranosilestigmasterol e 3- β -O- β D-glicopiranosilsitosterol também foram identificados dos extratos de folhas desta planta.

Do caule *Talinum triangulare* foram isolados misturas de esteroides campesterol, escotanol, estigmasterol e silsitosterol, e a mistura dos glicosídeos 3- β -O- β D-glicopiranosilestigmasterol e 3- β -O- β D-glicopiranosilsitosterol, além de alantoina, ácido aspártico, asparagina e uma acrilamida, ácido 3-N-acriloil-N-pentadecanoil-propanóico (**20**), que estão sendo descrito pela primeira vez na literatura.

O estudo de dicroísmo circular permitiu definir a configuração absoluta de algumas porfirinas cujas estruturas foram definidas como: 17*R*,18*R*-18-purpurinato de fitila, 13²*R*,17*R*,18*R*-13²-hidroxifeofitina a (**5**), 17*R*,18*R*-15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (**6**), 17*R*,18*R*-15¹-metilperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (**7**), 17*R*,18*R*-5¹-carboxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**8**), 17*R*,18*R*-15¹-hidroxi-15¹-acetil-13¹-carboxi-feofitina b (**9**), 17*R*,18*R*-15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**10**), 17*R*,18*R*-15¹-hidroperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**11**). Partes desses resultados foram publicadas em *Food Chemistry*, *160*, 204-208 (2014).

O fracionamento cromatográfico dos extratos de *Sphagneticola trilobata* e análise das frações com técnicas cromatográficas e espectroscópicas conduziram ao isolamento e identificação de seis substâncias, os carotenoides β -caroteno e luteína, uma mistura de 3- β -O- β D-glicopiranosilestigmasterol e 3- β -O- β D-glicopiranosilsterol, um monoterpeneo 8, 9,10-trimetil-1,4-dihidroxi-biciclo[2,2,1]-heptano e um triterpeneo conhecido como fridelinol, que ainda não haviam sido isolados desta espécie.

Foi realizado teste com algumas bactérias de gram positivo e gram negativo com os extratos de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata*, apresentou resultados que confirmam as propriedades indicadas para estas espécies. A atividade citotóxica com diferentes linhagens tumorais realizadas como o extrato polar de *Talinum triangulare* apresentou uma inibição significativa frente à linhagem tumoral HL60. Por outro lado os testes realizados com as larvas do vetor *Aedes aegypti* com extratos das espécies *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata* não apresentaram resultados significativos.

Palavras-chave: *Talinum*, *Sphagneticola*, feofitina, acrilamida e dicroísmo circular.

ABSTRACT

AMORIM, Ana Paula de Oliveira. Phytochemical study and biological activities of *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. (Portulacaceae) and L. Pruski *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae). Seropedica: UFRRJ, 2014. 203 p. (Doctoral Thesis in Chemistry).

Chromatographic fractionation of extracts from the leaves and stem of *Talinum triangulare* (Portulacaceae) and extracts from *Sphagneticola trilobata* and the analysis of the fractions by chromatographic and spectroscopic techniques allowed to the isolation and identification of twenty eight constituents belongs to different classes of special metabolites.

From *the leaves of Talinum triangulare* were identified β -carotene, lutein, and porphyrins such as 18-purpurin phytol ester (**3**), phaeophytin a (**4**), 13²-hydroxy phaeophytin a (**5**), 15¹-hydroxy,15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin a lactone (**6**), 15¹-methylperoxide-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin a lactone (**7**), 15¹-carboxy-15¹-O-13¹-phaeophytin b lactone (ficuschlorinic D acid) (**8**), 15¹-hydroxy-15¹-acetyl-13¹-carboxy-phaeophytin b (taliclirin A) (**9**), 15¹-hydroxy-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin b lactone (**10**), 15¹-hydroperoxy-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin b lactone (**11**) and 15¹-acetyl-15¹-O-13¹-phaeophytin a lactone (**12**). Among them it can be highlight five news phaeophytins, **7**, **9** (named taliclirin A), **10**, **11** and **12**, that are being described for the first in the literature. Other compounds such as allantoin and a mixture of 3 β -O- β D-glicopiranosilestigmasterol and 3 β -O- β D-glicopiranosilsitosterol were also identified in the extracts from the leaves of this plant.

In the extracts from *Talinum triangulare* stem's a mixtures of steroids, campesterol, escotanol, stigmasterol and silsitosterol, and the mixture of glycosides were isolated 3 β -O- β D-glicopiranosilestigmasterol and 3 β -O- β D-glicopiranosilsitosterol, besides allantoin, aspartic acid, asparagine and a new acrylamide, 3-N-acryloyl-N-pentadecanoil-propanoic acid (**20**).

The study of circular dichroism made possible to define the absolute configuration of some porphyrins whose structures were defined as: 17*R*,18*R*-18-purpurin phytol ester, 13²*R*,17*R*,18*R*-13²-hidroxyphaeophytin (**5**), 17*R*,18*R*-15¹-hydroxy-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-lactone phaeophytin (**6**), 17*R*,18*R*-15¹metilperóxido-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin a lactone (**7**), 17*R*,18*R*-15¹-carboxy-15¹-O-13¹-phaeophytin b lactone (**8**), 17*R*,18*R*-15¹-hydroxy-15¹-acetyl-13¹-carboxy- phaeophytin b (**9**), 17*R*,18*R*-15¹-hydroxy-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin b lactone (**10**), 17*R*,18*R*-15¹-hydroperoxy-15¹-carbomethoxy-15¹-O-13¹-phaeophytin b lactone (**11**). Part of these results was published in

Food Chemistry, 160, 204-208 (2014).

Chromatographic fractionation of extracts from *Sphagneticola trilobata* and analysis of the fractions by chromatographic and spectroscopic techniques allowed to the isolation and identification of six substances, two carotenoids, β -carotene and lutein, a mixture of 3β -O- β D-glycopiranosylestigmasterol and 3β -O- β D-glycopiranosylsitosterol, a monoterpene identified as 8,9,10-trimethyl-1,4-dihydroxy-bicyclo[2.2.1]heptane and the triterpene known as fridelinol, which had not yet been isolated from this species.

Tests with some gram positive and gram negative bacteria were performed with extracts of *Talinum triangulare* and *Sphagneticola trilobata* and presented results that confirmed the cited properties of these species. The cytotoxic activity of different tumor cell lines performed with the polar extract of *Talinum triangulare* showed significant inhibition against the tumor cell line HL60. On the other hand, the test with the larvae of *Aedes aegypti* using extracts of *Talinum triangulare* and *Sphagneticola trilobata* species were not significant.

Keys words: *Talinum*, *Sphagneticola*, pheophytin, acrylamide e circular dicroism.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos Gerais de Plantas Invasoras

Planta invasora é qualquer espécie não natural introduzida a um ecossistema e que nele se naturaliza, dispersando e alterando o espaço das plantas nativas (ZILLER, 2000).

O conhecimento da flora invasora de uma cultura é de importância capital para o equacionamento das medidas de controle. Este conhecimento, porém, não deve se limitar à identificação das espécies, mas sim, abranger dados biológicos, assim como de distribuição geográfica e ecologia das invasoras (ARANHA *et al.*, 1988)

O potencial das espécies invasoras em alterar sistemas naturais é extremamente significativo em certos ambientes, parecem ser mais suscetíveis à invasão que outros. Alguns fatores são levados em consideração para explicar tal fato, tais como: quanto menor a diversidade e a riqueza natural de um ecossistema, mais suscetível à invasão ele seria, por apresentar funções ecológicas ainda não supridas, o que seria realizado pelas invasoras.

As espécies invasoras, livres dos competidores, predadores e parasitas de suas áreas de origem, teriam vantagens competitivas em relação às nativas. Quanto maior o grau de perturbação do ecossistema, mais fácil seria a dispersão e o estabelecimento de invasoras em especial quando há redução da diversidade natural pela extinção de espécies ou devido à exploração excessiva. Práticas erradas de manejo, como retirada de florestas, queimadas para preparo de terra, erosão e pastoreio excessivo contribuem para perda e fragilidade do meio a invasões. Ambientes abertos, como campos e cerrados, tendem a ser mais facilmente invadidos por espécies arbóreas que áreas florestais (<http://members.tripod.co.uk>).

Entre as características que ampliam o potencial de invasão de uma planta, estão à produção de sementes pequenas e em grande quantidade, com dispersão eficiente (em especial pelo vento) e alta longevidade do solo. Outros fatores favoráveis são: o crescimento rápido, maturação precoce, reprodução realizada também por brotação, floração e frutificação mais longas, adaptação a áreas degradadas, eficiência reprodutiva e liberação de toxinas capazes de impedir o crescimento de outras plantas nas imediações (alelopatia) (ZILLER, 2000).

O Brasil, com uma flora exuberante e muito rica, o conhecimento das plantas invasoras é muito restrito. Entre as espécies de árvores conhecidas como invasoras no Brasil, estão presentes alguns pinheiros (*Pinus elliotti* e *P. taeda*), a casuarina (*Casuarina equisetifolia*), o cinamomo (*Melia azedarach*), a uva-do-japão (*Hovenia dulcis*), o amarelinho (*Tecoma stans*), a vassoura vermelha (*Dodonaea viscosa*) e o alfeneiro (*Ligustrum japonicum*) (ZILLER, 2000).

No Brasil é fácil observar certa especificidade na composição florística de áreas utilizadas por anos seguidos com a mesma cultura. Um exemplo de especialidade de flora invasora ocorre na cultura cafeeira, onde as condições de meia-sombra existentes no interior da cultura favorecem grandemente a algumas espécies, tais como: *Amaranthus hybridus* L., *Portulaca oleracea* L. e *Tradescantia* spp, que são conhecidas por “trapoerabas” (ARANHA *et al.*, 1988).

Portulacaceae inclui cerca de 30 gêneros e 500 espécies, que se distribuem principalmente no Oeste da América do Norte, América do Sul e África, com alguns poucos representantes na Europa e Ásia. Os gêneros mais representativos são: *Portulaca* L. com cerca de 100 espécies, *Calandrinia* Kunth com cerca de 150 espécies e *Talinum* Adans com mais de 50 espécies Carolin (1993). Para o Brasil, Rohrbach (1872) na “Flora Brasiliensis” refere dez espécies em dois gêneros: *Talinum* e *Portulaca*, esse último com oito espécies (COELHO & GIULIETTI, 2010).

O gênero *Portulaca* inclui plantas herbáceas, carnosas, anuais ou perenes, sendo amplamente distribuído nos Neotrópicos (compreende a América Central, incluindo a parte sul do México e da península da Baixa Califórnia, o sul da Florida, todas as ilhas do Caribe e a América do Sul) e regiões tropicais e subtropicais da África, ocorrendo também algumas poucas espécies na Austrália. Poucos estudos referentes à família Portulacaceae e em especial ao gênero *Portulaca* têm sido feitos no Brasil. A base taxonômica para o gênero no país ainda é o tratamento realizado por Rohrbach (1872) para a Flora Brasiliensis. Posteriormente vários levantamentos regionais foram feitos podendo ser citados os trabalhos de Teixeira (1959) para a cidade do Rio de Janeiro; Mattos (1961) para o município de São Joaquim (RS); Lima & Lima (1968) para o estado de Pernambuco; Rodrigues & Furlan (2002) para o estado de São Paulo e Coelho & Giulietti (2006), para a Bahia. Coelho *et al.* como parte da revisão das espécies neotropicais do gênero *Portulaca* (COELHO & GIULIETTI, 2010).

A espécie *Portulaca oleracea*, conhecida popularmente como beldroega é uma planta invasora que contém fontes opcionais de vitaminas, sais minerais e amido, podendo ser incluídas em nossas mesas. Vivem sobre o solo e algumas se desenvolvem melhor sobre solo mais fértil, também são consideradas indicadoras de solo fértil, sendo que sua presença valoriza a terra (OLIVEIRA-JR *et al.*, 2011).

Segundo o artigo de PETENON & PIVELLO (2008) e o livro Plantas daninhas de Leonardo Bianco de Carvalho (2013), quando se discute o impacto que as plantas invasoras causam ao meio ambiente, um problema frequentemente encontrado diz respeito à definição

de uma planta invasora. Essa confusão decorre das diversas abordagens acerca das plantas que crescem e se reproduzem rápida e intensamente nas comunidades, dispersando-se a grandes distâncias. Para os agricultores, essas espécies são as “pragas” ou “ervas-daninhas” (visão antropocêntrica); numa abordagem ecológica, são tidas como “colonizadoras” ou “pioneiras”; adicionando-se a questão biogeográfica, temos que essas espécies podem ser nativas (originárias da comunidade) ou exóticas (introduzidas a partir de outro ambiente). (DALVA & PIVELLO, 2008 e CARVALHO, 2013).

Levando em conta a abordagem feita por Dalva e Carvalho bem como os outros autores citados anteriormente, nenhum relato significativo sobre estas duas espécies foram feitas em relação aos impactos danosos causados por estas duas espécies, contudo de acordo com as considerações apresentadas acima, a contribuição do estudo químico de diferentes espécies de plantas consideradas invasoras tem relevância no estudo químico não somente para detectar constituintes majoritários na espécie estudada, mas também para informar as classes de substâncias que permitam considerar a espécie como de importância farmacológica, e ainda gerar informações a serem utilizadas nas diversas áreas de conhecimentos.

2 OBJETIVOS

- Fracionar, isolar e/ou identificar metabólitos especiais de caule e folhas de *Talinum triangulare* e partes aéreas de *Sphagneticola trilobata* através de métodos cromatográficos, espectroscópicos, químicos;
- Elucidar os constituintes isolados e/ou identificados dos extratos de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata*;
- Avaliar as atividades antibacterianas, anticâncer e contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* de extratos de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata*;

3 PARTE EXPERIMENTAL GERAL

3.1 Equipamentos e Reagentes

Os espectros obtidos na região de infravermelho (IV) foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR, em filme ou pastilhas de KBr.

Para determinar os pontos de fusão foram utilizadas placas de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilares sem correção de valores.

Os espectros 1D e 2D de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker 400 e 500 MHz (^1H), 100 e 125 MHz (^{13}C). Como padrão interno para referência de deslocamento químico foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os solventes deuterados utilizados na obtenção dos espectros foram de marcas Merck e Aldrich.

Para o teste com a enzima tirosinase e identificação de carotenóides foram feitos através de espectros de absorção no ultravioleta (UV/visível) em aparelho Mini UV Shimadzu modelo 1240, utilizando células de quartzo com caminho ótico de 1 cm, 2 ou 4 faces polidas, em um comprimento de onda 200 a 600 nm, de específicos para cada análise.

Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafos com fase gasosa, HP-5880 A acoplado a espectrômetro de massas computadorizada HP-5897A com analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons a 70 e.V; CG/EM Varian Saturn 2000 e CG/MS- QP 2010 Plus Shimadzu.

Todas as análises citadas acima foram realizadas em aparelhos existentes na central analítica da UFRRJ.

Na identificação de porfirinas foi utilizado CLAE modelo Shimadzu- HPLC- LC20 AT/SPD-M20A-CTO-20A-CBM-20A, utilizando o método isocrático, com injeção de 20 μL de solventes ACN/ H_2O na fase móvel, em uma temperatura de 31°C, a pressão de 148Kgf/cm com fluxo de 1,0mL/min, 6AD e LC 10AD com detector de fotoiodo (PDA) UV/Vis. de 200 a 600 nm, UV 410 nm em coluna Betasil C18 (250 cm x 4,6 mm x 5 μm).

A curva de dicroísmo circular foi realizada em aparelho espectropolarímetro de J-180 PTC423S Jasco, com sistema de controle interno de temperatura circular (DC) com uma varredura de 190-500 nm, com velocidade de 200 nm/min em condições de temperatura fixa ($T= 25^\circ\text{C}$). Para a realização das análises foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 2 faces polidas. A linha base foi feita com solvente da utilizado na análise.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos na USP de Ribeirão Preto com aparelho de massas de ionização por eletrospray - ESI- MS Modo positivo e negativo de modelo micrOTOF II - ESI-TOF e ultrOTOF_Q - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA. Utilizando as condições de experimento: Bomba de Infusão, Fluxo 250 $\mu\text{l/h}$, fase móvel e para a solubilização amostras das amostras utilizou-se os solventes: $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ E MeOH . A condição de análises do aparelho utilizou os valores: End Plate: 500 Volts, Capillary: 4500 Volts, Capillary Exit: 70 Volts, Skimmer 1:50

Volts, Skimmer 2:25 Volts, Dry Gas Temp 200 C, Dry Gas Flow 4 L/min, Neb Gas Pressure 0,4 Bar, gás nitrogênio e bomba de infusão modelo: cole parmer. Os espectros de Massa-Massa com aparelho de massas modelo: ultrOTOFO_Q - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, nas condições do experimento: bomba de Infusão, fluxo 300µl/h, fase móvel com solvente ACN (100%) utilizando o modo de detecção positivo. As condições de análises do aparelho foram em: End Plate: 4000 Volts, Capillary Exit: 300 Volts, Skimmer 1: 55 Volts, Skimmer 2: 25 Volts, Transfer: 90µs, Collision Exit Gate: 80µs, Dry Gas Temp 160 C, Dry Gas Flow 4 L/min, Neb Gas Pressure 2 Bar, em gás nitrogênio, com bomba de infusão de modelo: cole parmer. Para a realização das análises dos espectros de massas de alta resolução foi necessário o a utilização de calibração interna, no qual se utilizou de uma solução de NA-TFA a 10mg/ml(TOF).

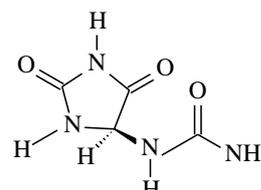
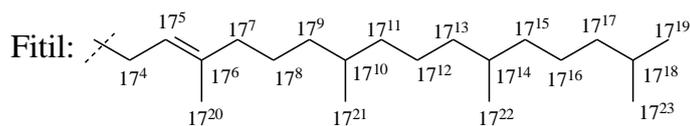
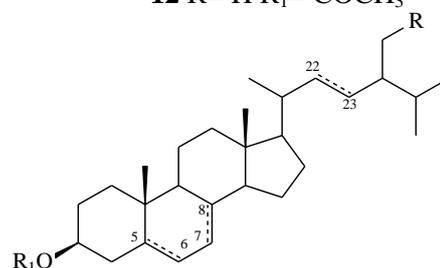
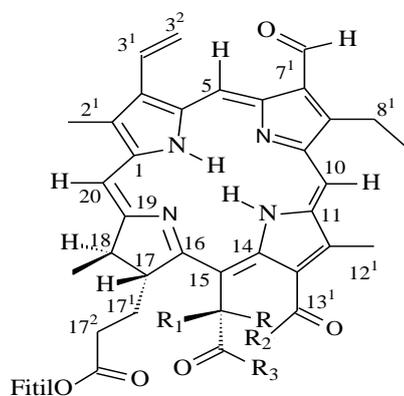
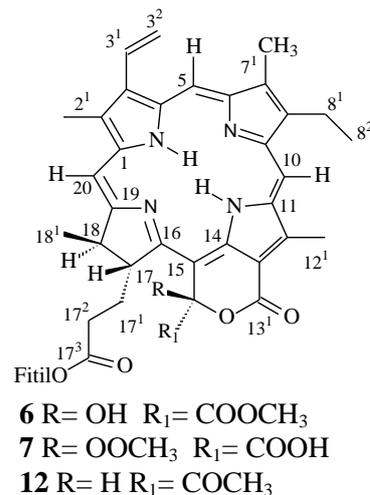
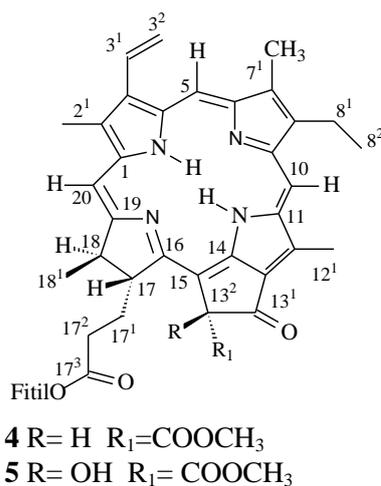
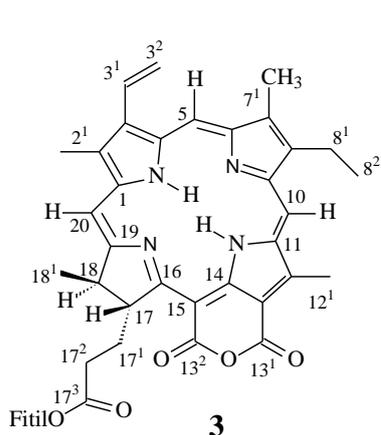
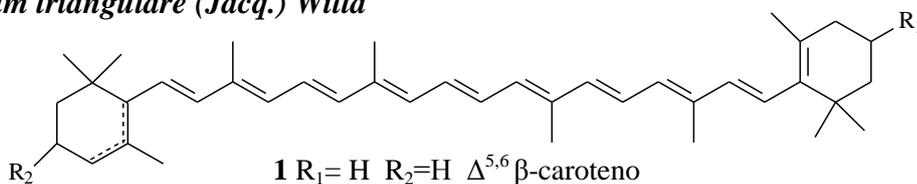
A análise de carotenóides foi feita através de CLAE, utilizando Cromatógrafo modular Waters: Bomba W600, Injetor Wisp 717 e detetor PDA 2996 com coluna C₃₀ YCM Carotenoid S-3 de 4,6 x 250 mm PN CT99S032546WT, acoplado ao Detetor de Rede de Fotodiodos UV/Vis. de 300 a 600 nm com configuração padrão existente na EMBRAPA.

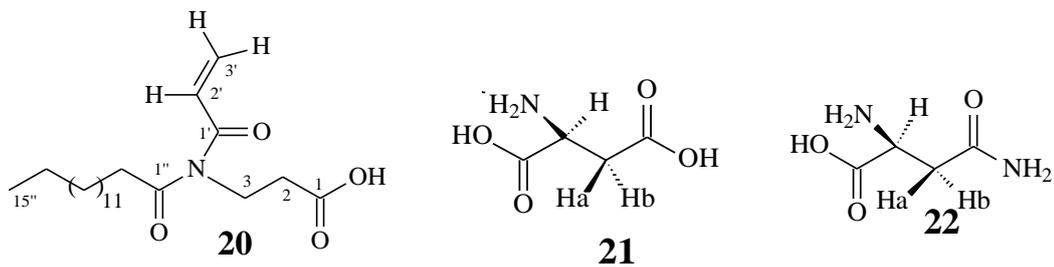
Para fracionar os extratos e purificar substâncias foram utilizadas colunas de vidro fabricadas na oficina de vidraria do Departamento de Química da UFRRJ. O gel de sílica 230 - 400 e 70 - 230 mesh (marca Merck e Sorbent), foi usado como fase estacionária, para a cromatografia em coluna. Foram usadas placas de gel de sílica em alumínio revestidas com sílica 60 PF₂₅₆ das marcas Sorbent. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia preparativa (CCDP) foram feitas em placas de gel de sílica 60 PF₂₅₆ das marcas Merck e Vetec sobre suporte de vidro e espessura de 1 mm e as substâncias detectadas através de irradiação ultravioleta em 254 e 365 nm. Foram usados vapores de iodo e reveladores como Vanilina, Dragendorff, Mayer, Nesler, AlCl₃+EtOH (1%).

Foram utilizadas também placas de gel de sílica 60 PF₂₅₄ da Merck, para análise em CCDA e com reveladores de iodo. Os solventes empregados durante todo o procedimento experimental foram de grau PA da Vetec.

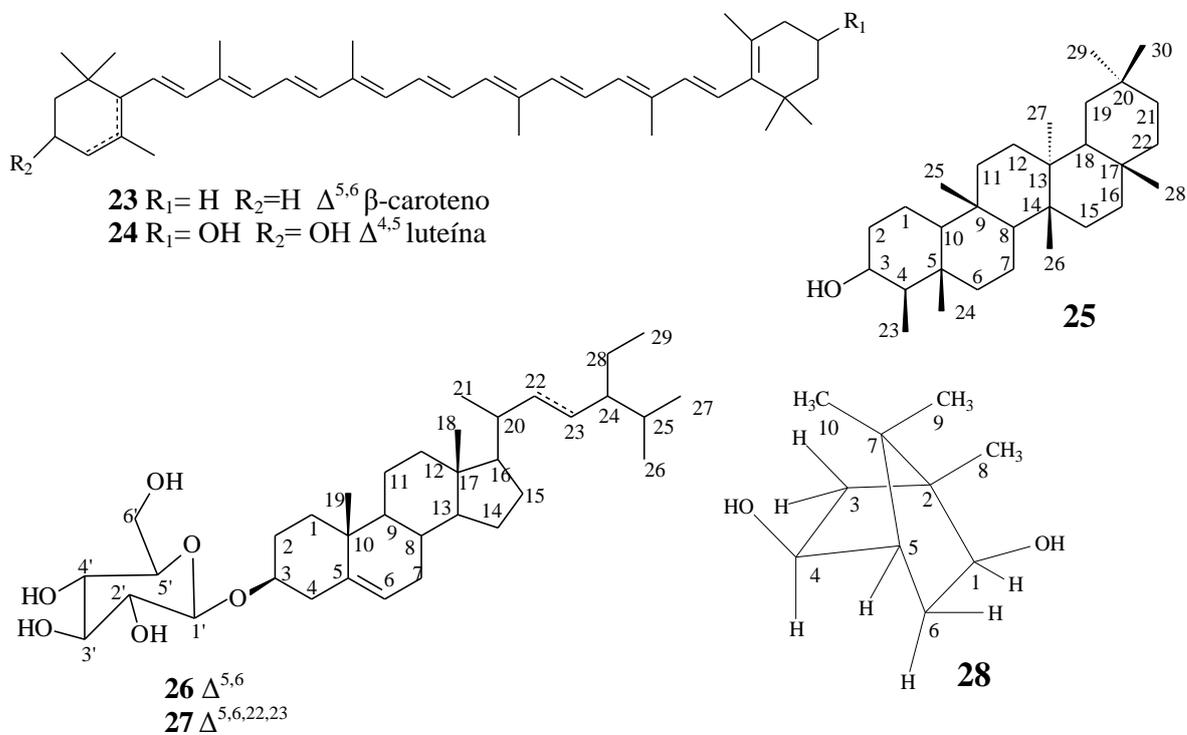
4 SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NESTE TRABALHO

4.1 *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd





4.2 *Sphagneticola trilobata* L. Pruski



CAPÍTULO I
ESTUDO QUIMICO DE *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd



I.1 Introdução

I.1.1 Considerações Gerais da Família *Portulacaceae*

A família *Portulacaceae* é constituída por ervas anuais e carnosas, possuindo aproximadamente 30 gêneros e cerca de quinhentas espécies, predominando em regiões tropicais e subtropicais, principalmente africanas e americanas, podendo ocasionalmente ser encontradas algumas espécies na Europa, Ásia e Oceania. O gênero *Portulaca* é um dos mais numerosos desta família, com cerca de 200 espécies de plantas rasteiras, suculentas anuais e bianuais, distribuídas nos trópicos e subtropicais, principalmente nas Américas, África e Austrália (RODRIGUES & FURLAN, 2003)

Portulaca oleracea Linne (**Figura 1**), conhecida como beldroega, é uma suculenta erva que habita diversas partes de regiões temperadas. Tem sido usada como vegetal, mas também na medicina popular tradicional para tratar mamilos doloridos, úlceras gástricas, amigdalite. Alguns estudiosos vêm investigando os extratos de *P. oleracea* em diversas bioatividades, tal como, hepatoprotetor, diurético, anti – inflamatória, atividades antimicrobial, e ainda como anti-câncer e úlcera-gástrica (SEO *et al.*, 2003).

Este gênero é conhecido, popularmente no Brasil, como beldroega-de-comer, beldroega-de-horta, beldroega-pequena, beldroega-vermelha, bredo, bredo de porco, caaponga, porcelana, salada de negro e verdolaca (www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm), (www.naturalnet.com.br/generos/Talinum.html), sendo as mais utilizadas na alimentação e na medicina popular, bem como uma das mais estudada e reportada na literatura.



Figura 1: Espécie *Portulaca oleracea* (<http://forum.funghiitaliani.it/indes>).

A beldroega foi uma das primeiras “verdura” utilizada pelo homem, tendo sido cultivada pelos antigos egípcios e também por milhares de anos na Índia e China. Na medicina popular, esta erva era usada por ingestão para disenteria, enterite aguda, apendicite, mastite, hemorróidas e sangramento pós-parto e uso tópico para queimaduras, picadas de serpente e insetos, e eczema (www.ceunossasenhoradaconceicao.com.br/plantas/planta.asp).

A *Portulaca oleracea* contém muitos compostos biologicamente ativos e é uma fonte de diversos nutrientes, sendo rica em proteínas, vitaminas A, B e C, cálcio, fósforo e ferro (www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm). A quantidade desses compostos pode variar com as especificidades do plantio (por exemplo, data do plantio, qualidade do solo e fertilização) e a idade da planta. Apresenta algumas substâncias, tais como: alanina, alcalóides, oxalato de cálcio, beta-cianina, ácido linoléico, ácido oléico, norepinefrina, valina, lisina, oxalatos, noradrenalina, flavonóides, glicosídeos da antraquinona, etc. (www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/poltula.html).

Estudo fitoquímico realizado recentemente com as partes aéreas dessa verdura, onde o extrato bruto foi submetido à cromatografia *flash* a vácuo e purificação por HPLC, possibilitou isolar novos monoterpenos bioativos glicosilados de origem natural [(3*S*)-3-O-(β-D-glicopiranosil)-3,7-dimetilocta-1,6-dieno] (1), [(3*S*)-3-O-(β-D-glicopiranosil)-3,7-dimetilocta-1,5-dien-7-ol] (2) e [(3*S*)-3-O-(β-D-glicopiranosil)-3,7-dimetilocta-7-hidroperoxi] (3) (Figura 2) (SEO *et al.*, 2003).

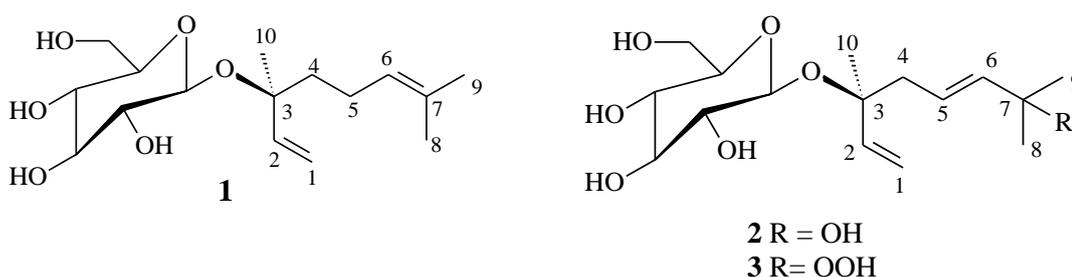


Figura 2: Compostos bioativos glicosilados isolados das partes aéreas de *Portulaca oleracea* (SEO *et al.*, 2003).

Outra espécie da família *Portulacaceae* e do gênero *Talinum* que apresenta importantes propriedades terapêuticas é a espécie *Talinum patens* (L.) (Figura 3), no qual podemos destacar o uso popular de suas folhas e sementes com indicativos no tratamento de

feridas e cortes como forma de cicatrização, também é indicada no combate a problemas gastrointestinais, urinas com mau cheiro, edemas, infecções intestinais, fraqueza em geral (fadigas, cansaço físico e mental), afecções da pele (coceiras, eczemas, erisipela), sendo suas raízes indicadas no combate ao escorbuto e em artrites, e as suas folhas são consideradas excelente verdura (www.zeus.qui.ufmg.br/~neplam/resumo10.html e RAMOS, 2003).



Figura 3: *Talinum patens* (www.database.prota.org).

Estudo fitoquímico de *Talinum patens* (L.) Wild dos extratos de folhas e caule realizado por Ramos em 2003 identificou alguns compostos com: um sal inorgânico (nitrato de potássio), uma amida (uréia) e um triterpeno (3-β-D-glicosil-β-sitosterol), o ácido eneicosanóico e o ácido 3-O-acetil-aleuritólico (**Figura 4**) (RAMOS, 2003).

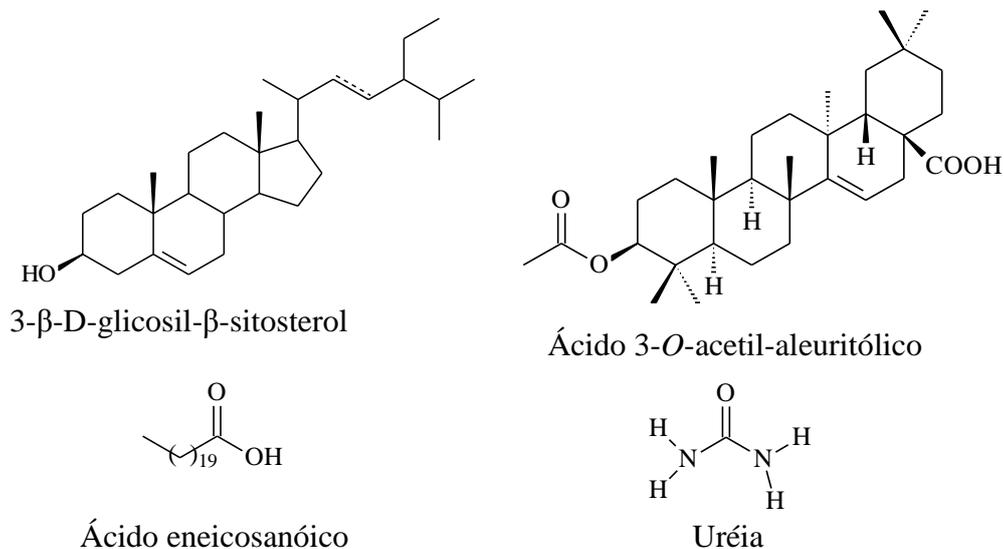


Figura 4: Compostos isolados de folhas e caules de *Talinum patens* (L.) Wild (RAMOS, 2003).

O gênero *Talinum triangulare* pertence à família *Portulacaceae*, à qual inclui cerca de cinquenta espécies distribuídas nos trópicos, subtropicos e regiões temperadas do mundo (www.plantamed.com.br/gen/talinum.htm). Algumas espécies deste gênero e o ano em que foram identificadas estão indicados na **Tabela 1**, destacando-se a espécie estudada neste trabalho a *T. triangulare*.

Tabela 1. Espécies do gênero *Talinum* (www.plantamed.com.br/gen/talinum.htm).

Espécie	Ano da Identificação
<i>Talinum album</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum andrewsii</i> Sweet.	1826
<i>Talinum angustissimum</i> (Engelm.) Wooton & Standl.	1913
<i>Talinum appalachianum</i> W. Wolf.	1939
<i>Talinum attenuatum</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum calcaricum</i> S. Ware.	1967
<i>Talinum chrysanthum</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum ciliatum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum denticulatum</i> Poelln.	1933
<i>Talinum dichotomum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum dinteri</i> von Poellnitz	-
<i>Talinum esculentum</i> (Dinter & Schellenberg) Hedw.	-
<i>Talinum fallax</i> Poelln.	1933
<i>Talinum fruticosum</i> Willd.	1800
<i>Talinum galapagosum</i> (H. St. John) Hershkovitz.	1991
<i>Talinum gracile</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum humile</i> Greene.	1881
<i>Talinum longipes</i> Wooton & Standl.	1913
<i>Talinum marginatum</i> Greene.	1912
<i>Talinum mengesii</i> W. Wolf.	1920
<i>Talinum monandrum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum moritziana</i> Kl. ex Rohrb. in Mart.	1872
<i>Talinum napiforme</i> DC.	1828
<i>Talinum nocturnum</i> Bacigalupo.	1993
<i>Talinum okanoganense</i> English.	1934
<i>Talinum palmeri</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	1791
<i>Talinum paraguayense</i> Speg.	1921
<i>Talinum parvulum</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum patens</i> (L.) Willd.	1799
<i>Talinum polygaloides</i> Gillies ex Arn.	1831

<i>Talinum portulacifolium</i> (Forssk.) Asch. ex Schweinf.	1896
<i>Talinum pulchellum</i> Wooton & Standl	1913
<i>Talinum pygmaeum</i> A. Gray.	1862
<i>Talinum racemosum</i> (L.) Rohrb.	1872
<i>Talinum revolutum</i> Kunth.	1823
<i>Talinum rosei</i> P. Wilson.	1932
<i>Talinum rugospermum</i> Holz.	1899
<i>Talinum sarmentosum</i> Engelm.	1850
<i>Talinum teretifolium</i> Pursh.	1814
<i>Talinum thompsonii</i> N.D. Atwood & S.L. Welsh.	1985
<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	1799
<i>Talinum trichotomum</i> Desf.	1804
<i>Talinum tuberosum</i> (Benth.) P. Wilson.	1932
<i>Talinum umbellatum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum validulum</i> Greene.	1912
<i>Talinum wayae</i> Eastw	1934
<i>Talinum whitei</i> I.M. Johnst.	1940

I.1.2 Considerações Gerais da espécie *Talinum triangulare*

A espécie *Talinum triangulare* tem como sinônimo *Talinum fruticosum* auct. non (L.) Juss. (**Figura 5**), e é conhecida popularmente no Brasil como João Gomes, língua de vaca, major gomes, manjogomes e caruru do Pará (www.saude.gov.br)



Figura 5: *Talinum triangulare* (www.biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/2/)

Talinum triangulare é uma espécie herbácea, ereta (80-100 cm de altura), caule suculento, obtuso, folhas alternadas, simples, suculentas, sem estípulas, flores bissexuadas, regulares, pedicelo longo, duas sépalas e cinco pétalas de cor rosa, ovário superior, frutos com

muitas sementes de cor preta brilhante (www.prota.org). A taxonomia apresentada pela *Talinum triangulare* está apresentada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Taxonomia de *Talinum triangulare*.

Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Caryophyllales
Família: Portulacaceae
Gênero: <i>Talinum</i>
Espécie: <i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd

Talinum triangulare é uma planta perene geralmente encontrada em ambientes tropicais, adaptando-se bem ao tempo quente e úmido local, assim como à baixa fertilidade do solo, o que faz do seu cultivo uma atividade econômica importante para pequenos produtores, já que não requer alto custo para sua produção (http://ibws.nexenservices.com/talinum_triangulare.htm).

A espécie *Talinum triangulare* é cultivada nas regiões tropicais da África Ocidental, na Ásia (Índia, Indonésia e Malásia) e na América do Sul (Peru) como importante vegetal cultivado para a alimentação, e cultivada com baixo custo e sem a utilização de fertilizantes, como em outros cultivos agrícolas. Além disso, muitos depósitos de lixo têm sido convertidos em jardins de cultivo para essa planta, especialmente em cidades onde a sua demanda é alta (ADENNIYI; 1996).

Na África ela é usada na medicina preventiva, como imunoestimulantes e também como anestésica. Na Província de Taiwan na República da China, as pessoas têm utilizado esta planta no tratamento preventivo e na medicina popular contra o câncer (LIANG et al., 2011). Na Indonésia tem sido utilizada na medicina tradicional como tônico fortificante. Das raízes desta planta foi isolada a saponina identificada como talinumosideo (**Figura 6**) (KOHDA et al.; 1992)

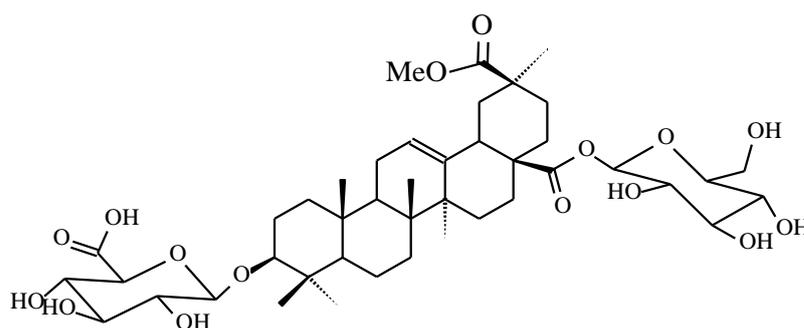


Figura 6: Saponina extraída das raízes de *Talinum triangulare* (KOHDA *et al.*, 1992).

Estudos preliminares de folhas de *Talinum triangulare* no sudeste da Nigéria revelou a presença dos constituintes químicos Omega-3, ácidos fortes e ainda importantes vitaminas (C, E e β -caroteno), alguns minerais (Mg, Ca e K) e fibras solúveis como pectina, todos estes componentes contribuem para uma elevada atividade antioxidante. Outros constituintes químicos apresentados foram saponinas, taninos e oxalatos (ADEFOLAJU *et al.*, 2009).

No Brasil esta planta é consumida, principalmente, na região norte, e em especial, nos estados do Amazonas e do Pará, devido ao seu alto teor nutritivo (**Tabela 3**), podendo ser utilizada na alimentação infantil como substituto do espinafre (*Spinacia oleracea*) (RODRIGUES & FURLAN, 2003). Estudos anteriores da espécie *Spinacia oleracea* mostraram semelhanças com a espécie *Talinum triangulare* nos aspectos nutricionais, dos quais foram comparados através de dados da literatura (RODRIGUES & FURLAN, 2003) que estão representados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Informação nutricional da *Talinum triangulare* (RODRIGUES & FURLAN, 2003 e www.prota.org).

Informação Nutricional	Quantidade por porção de 100 g de <i>Talinum triangulare</i>	Quantidade por porção de 100 g de <i>Spinacia oleracea</i>
Valor energético	25 Kcal	20 Kcal
Água	90,8 g	91,0 g
Proteína	2,4 g	2,3 g
Carboidrato	4,4 g	-
Fibra	1,0 g	-
Ca	121 mg	80 mg
P	67 mg	40 mg
Fe	5,0 mg	3,0 mg
Tiamina (Vitamina B1)	80 μ g	105 μ g
Riboflavina (Vitamina B2)	180 μ g	305 μ g
Ácido ascórbico (Vitamina C)	31 mg	15 mg
Retinol (Vitamina A)	9 mg	2,2 mg

Esta espécie apresentou semelhança a *Spinacea oleracea* também em alguns aspectos químicos, dos quais foram isolados do extrato MeOH:Acetona (7:3) após saponificação, uma mistura de carotenóides (β -caroteno 22%, zeaxantina 4%, luteína, 30%, violaxantina 22% e neoxantina 20%) sendo utilizando HPLC no isolamento e técnicas espectroscópicas na caracterização dos constituintes químicos (STRAND, *et al.*, 2000). Outros compostos da classe giberelinas foram encontrados no extrato metanólico (fração AcOEt/ButOH em pH 4), sendo eles: GA₉₇ (2 β -hidroxi-GA₅₃), GA₉₈ (2 β -hidroxi-GA₄₄), GA₉₉ (2 β -hidroxi-GA₁₉) (**Figura 7**) (MANDER *et al.*, 1996).

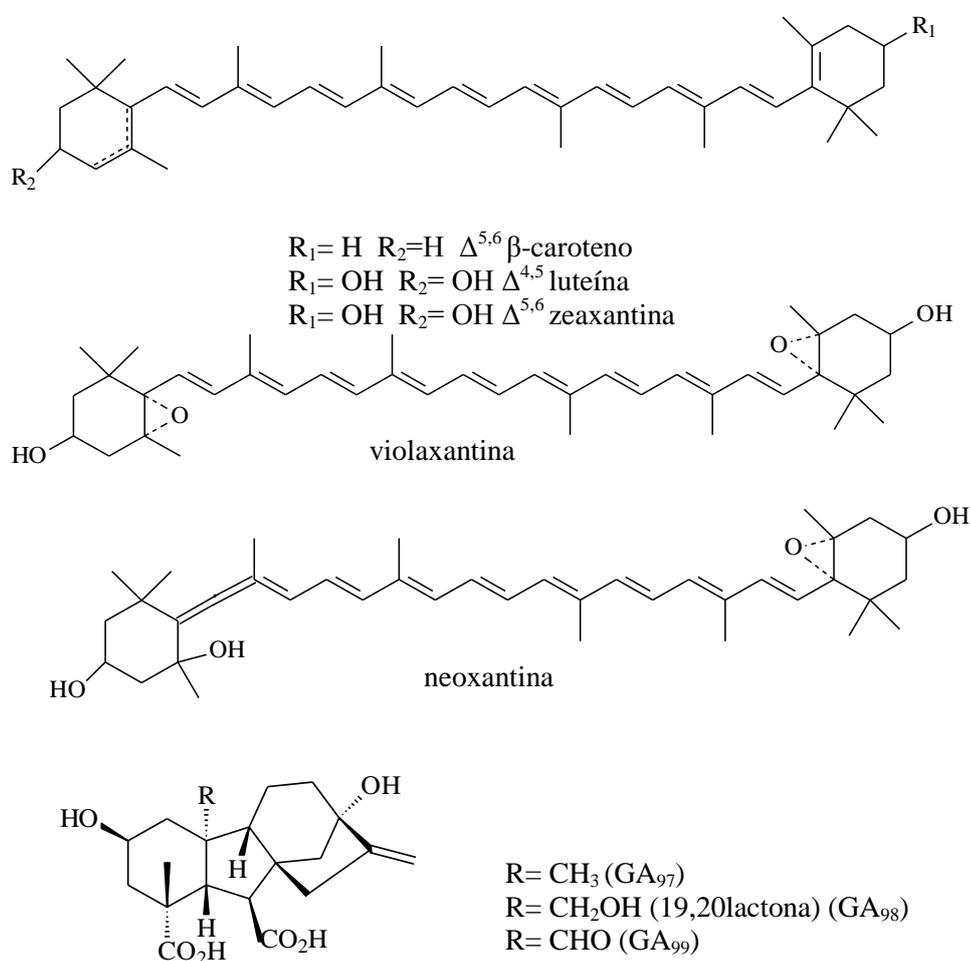


Figura 7: Substâncias isoladas do extrato metanólico de *Spinacia oleracea* (MANDER *et al.*, 1996).

Estudo realizado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, da fração clorofórmica do extrato hidrometanólico do caule de *Talinum triangulare*, conduziu ao isolamento e caracterização, através de dados espectroscópicos de RMN ¹H de ¹³C, IV e CG-massas de três substâncias: ácido (3E)-4-metil-3-[(octanoiloxi)acetiloxi]metileno-3-

heptenóico (**1**), o éster olean-9,12-dien-3-(β -D-glicopiranosil)-28,29-ato de metila (**2**) e ainda o éster octadecanoato de dimetila (**3**) (**Figura 8**) (AMORIM, 2007).

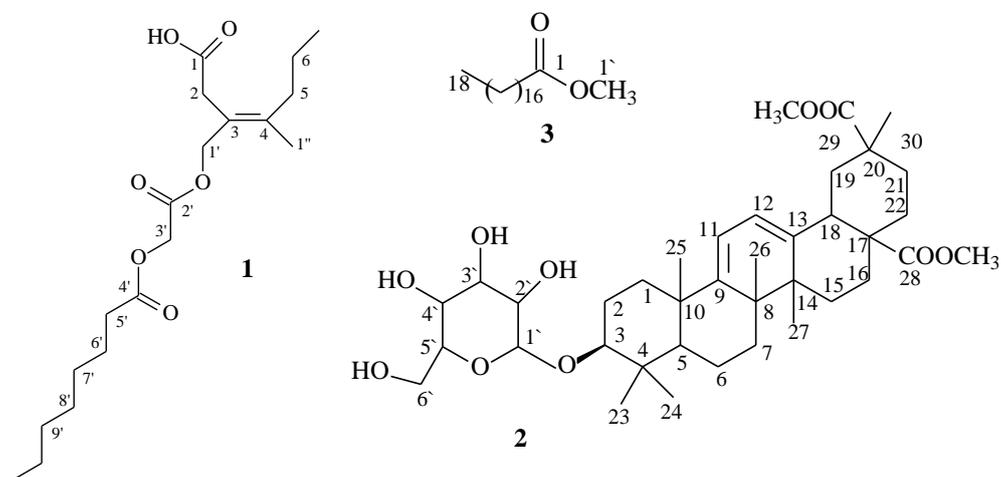


Figura 8: Compostos isolados do caule de *Talinum triangulare* (AMORIM, 2007).

Artigos de atividades farmacológicas e estudos preliminares fitoquímicos foram publicados revelando seu grande valor terapêutico na medicina tradicional (Andarwulan *et al*, 2010, Liang *et al.*, 2011, Ravindran *et al*, 2012, Swarna & Ravindhran, 2013). No entanto, por outro lado, algumas classes de metabólitos (flavonóides) indicadas como presente no extrato da planta (Swarna & Ravindhran, 2013) não foi encontrado neste estudo fitoquímico (Drogat *et al*, 2011 e Ocampo & Repeta, 1999).

Devido às propriedades relevantes encontradas em estudos anteriores (Amorim *et al*, 2013 e ALBUQUERQUE *et al*, 2013) e a carência de conhecimentos sobre a química desta planta, resolveu-se continuar o estudo desta espécie, sendo, portanto, este o primeiro estudo sobre o isolamento e identificação de metabólitos no extrato de caule e folha, que revelou a presença de compostos pertencentes às classes importantes de metabólitos como a acrilamidas e porfirinas (Amorim *et al*, 2014).

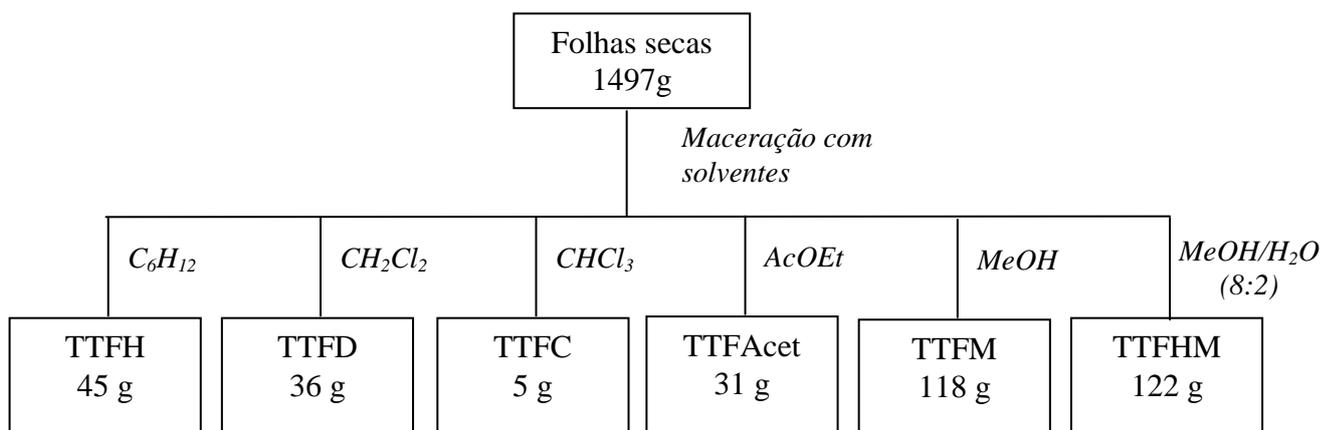
I.2 Material e Métodos

I.2.1 Material Vegetal

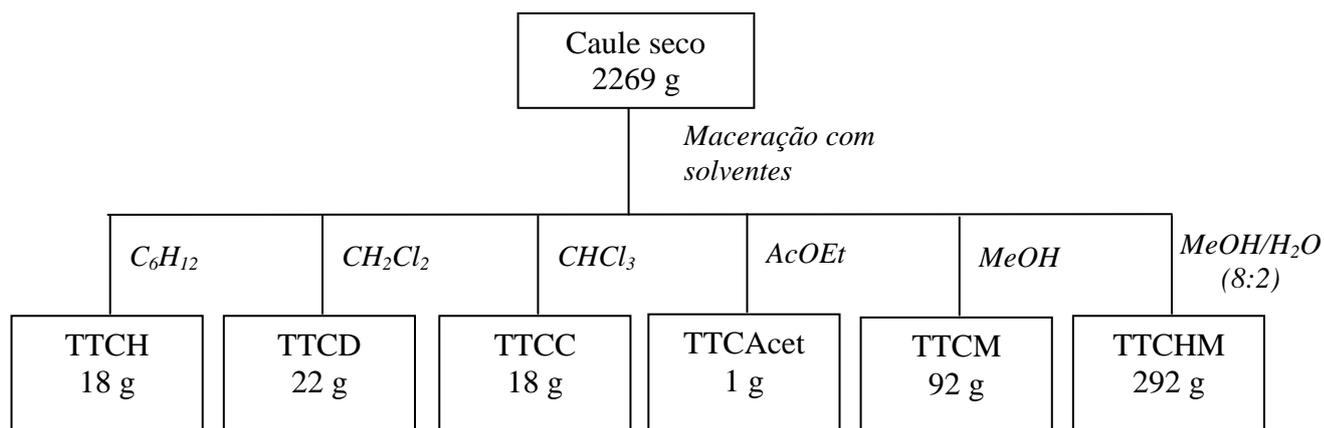
O material vegetal usado para estudo foi da espécie *Talinum triangulare*, coletado em Seropédica-RJ, em novembro e dezembro de 2007 e identificado pelo Professor Msc. Pedro Germano Filho e o mestrando Tiago Amorim ambos do Instituto de Biologia, Departamento de Botânica – UFRRJ. Uma exsicata desta espécie (SBR 26906) está depositada no Herbário RBR, IB-UFRRJ.

I.2.2 Preparação dos extratos de folhas e caule de *Talinum triangulare*

O material vegetal foi separado em folhas, de caule e raízes. As folhas foram secas, trituradas (1497 g) e submetidas à maceração com os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, e metanol:H₂O. Após a retirada do solvente através de destilação sob vácuo em rotavapor o concentrado foi submetido a corrente de ar natural para a obtenção dos resíduos sendo nomeados como TTFH (45 g), TTFD (36 g), clorofórmio TTFC (5 g), TTFacet (31 g), TTFM (118 g) e TTFHM (80:20) (291 g). O caule após seco, foi cortado em pequenos pedaços e moídos (2269 g), de pó foi extraído exhaustivamente com os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e metanol:H₂O (80:20) e após o procedimento semelhante descrito acima obtiveram-se os extratos TTCH (18 g), TTCD (22 g), TTCC (18 g), TTCacet (1 g), TTCM (92 g) e TTCHM (80:20) (122 g). Os esquemas 1 e 2 abaixo apresentam um resumo dos processamento para obtenção dos extratos descritos acima.



Esquema 1: Preparação dos extratos de folhas de *Talinum triangulare*.



Esquema 2: Preparação dos extratos de caule de *Talinum triangulare*.

I.2.3 Isolamento e Identificação de Constituintes Químicos de Folhas de *Talinum triangulare*

I.2.3.1 Estudo químico do extrato hexânico de *Talinum triangulare*

I.2.3.1.1 Processo de Saponificação, Extração e Identificação de Carotenóides do Extrato Hexânico das Folhas de *Talinum triangulare*

O processo de saponificação foi baseado no método RODRIGUEZ-AMAYA (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2004) com objetivo de promover a retirada de clorofila e outros interferentes. Para isso foram pesados 5 g do extrato hexânico seco de folhas de *T. triangulare* (TTFH) e logo após foram adicionados 90 mL de éter de petróleo e 10 mL de uma solução 40% de KOH em metanol, a temperatura ambiente. A solução ficou em repouso durante 24 h na ausência total de luz (INBARAJ *et al.*, 2008).

Após a saponificação a solução foi transferida para um funil de partição, na qual foram adicionados 100 mL de água. A solução de *Talinum triangulare* formou três fases: 1- fase aquosa (verde) e 2- fase com emulsão. Na fase com emulsão foram adicionados NaCl, que posteriormente formou-se uma fase etérea (fase 2) e outra salina (fase 3 + NaCl), no qual a fase etérea foi extraída com éter de petróleo até a diminuição da coloração amarela, e posteriormente submetida a análise de UV e CLAE. As fases 1 e 3 foram descartadas. O rendimento obtido no processo de saponificação foi de 60%.

I.2.3.1.2 Identificação de Carotenoides através de UV.

A análise no UV foi feita a partir de soluções do extrato e da fração hexânica das folhas de *Talinum triangulare*. Para preparação da solução pesou-se 10 mg das amostras e solubilizou-se em balão volumétrico de 10 mL contendo hexano (1mg/mL), e posteriormente foi submetida a análise no UV com uma varredura no comprimento de onda de 200 a 500 nm.

1.2.3.1.3 Identificação de Carotenoides através de análises através de CLAE

A análise cromatográfica foi feita com o extrato e a fração hexânica de folhas de *Talinum triangulare*, utilizando Cromatógrafo Líquido com forno para colunas e detector de rede fotodiodos UV/Vis de 300 a 600 nm, e Coluna Cromatográfica de fase reversa de modelo C₃₀ YMC Carotenoid S-3 de 4,6 x 250 mm.

Os padrões utilizados foram: α e β - Caroteno, violaxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, β -criptoxantina e licopeno. Para o cálculo da concentração da substância, utilizou-se a espectrofotometria (UV-1800, Shimadzu®) com a aplicação da lei de *Lambert-beer*. Para isso, a solução das substâncias isoladas teve o solvente removido, sob fluxo de nitrogênio, quando em se tratando apenas de solvente orgânico, ou por evaporação em evaporador rotativo (Büchi®) seguida de liofilização (L101, Liotop®) no caso da presença de água na composição. Após completa remoção do solvente, as amostras foram solubilizadas em gradiente de metanol e éter metil-terc-butílico, e posteriormente foram injetadas em volume de 25 μ L em tempo de retenção de 28 minutos a um fluxo de 0,8 mL/min (**Tabela 4**) para a determinação espectrofotométrica.

A **Tabela 4**. Variações de tempo e de gradiente (% A - Metanol e % D - Éter metil-terc-butílico) utilizados nas análises.

Nº de amostra	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Gradiente % A	Gradiente % D
1	0	0,80	80	20
2	5	0,80	80	20
3	20	0,80	15	85
4	25	0,80	15	85
5	25,01	0,80	80	20
6	30	0,80	80	20

A concentração das amostras foram calculadas através da equação de *Lambert-beer* (**Equação 1**), após leitura da absorção desta solução no comprimento de onda específico, utilizando os valores de sua absorvidade molar. Os valores de concentração obtidos foram então corrigidos de acordo com as purezas previamente determinadas.

Equação 1: Equação de *Lambert-beer*

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

A_{λ} = Absorvância da solução no comprimento de onda (λ) e solvente especificado

ϵ_{λ} = Absorvidade molar da substância no λ especificado

c = Concentração da solução (mol/L)

l = Caminho ótico da cubeta (1cm)

I.2.3.2 Estudo químico do extrato diclorometano de *Talinum triangulare* (TTFD)

O **TTFD** (5,5g) foi fracionado em coluna aberta de sílica gel (60 – 240 mesh) eluído com hexano, éter de petróleo, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol em polaridades crescentes até 100% metanol, obtendo-se um total de 75 frações recolhidas em erlemeyer de 500 mL, que posteriormente foram concentradas em rotavapor e analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico.

A fração 35-42 (diclorometano) foram reunidas e submetidas a CCDP (CHCl₃/MeOH, 9:1) fornecendo 7 frações, no qual a fração 1 (menos polar) foi novamente cromatografada em CCDP (hexano/acetato, 25:75), esta forneceu 4 novas frações. A fração 1 (menos polar) forneceu uma substância pastosa (8 mg) que foi identificada através de análise espectroscópica como substância **3**, feofitina (18-purpurinato de fitila).

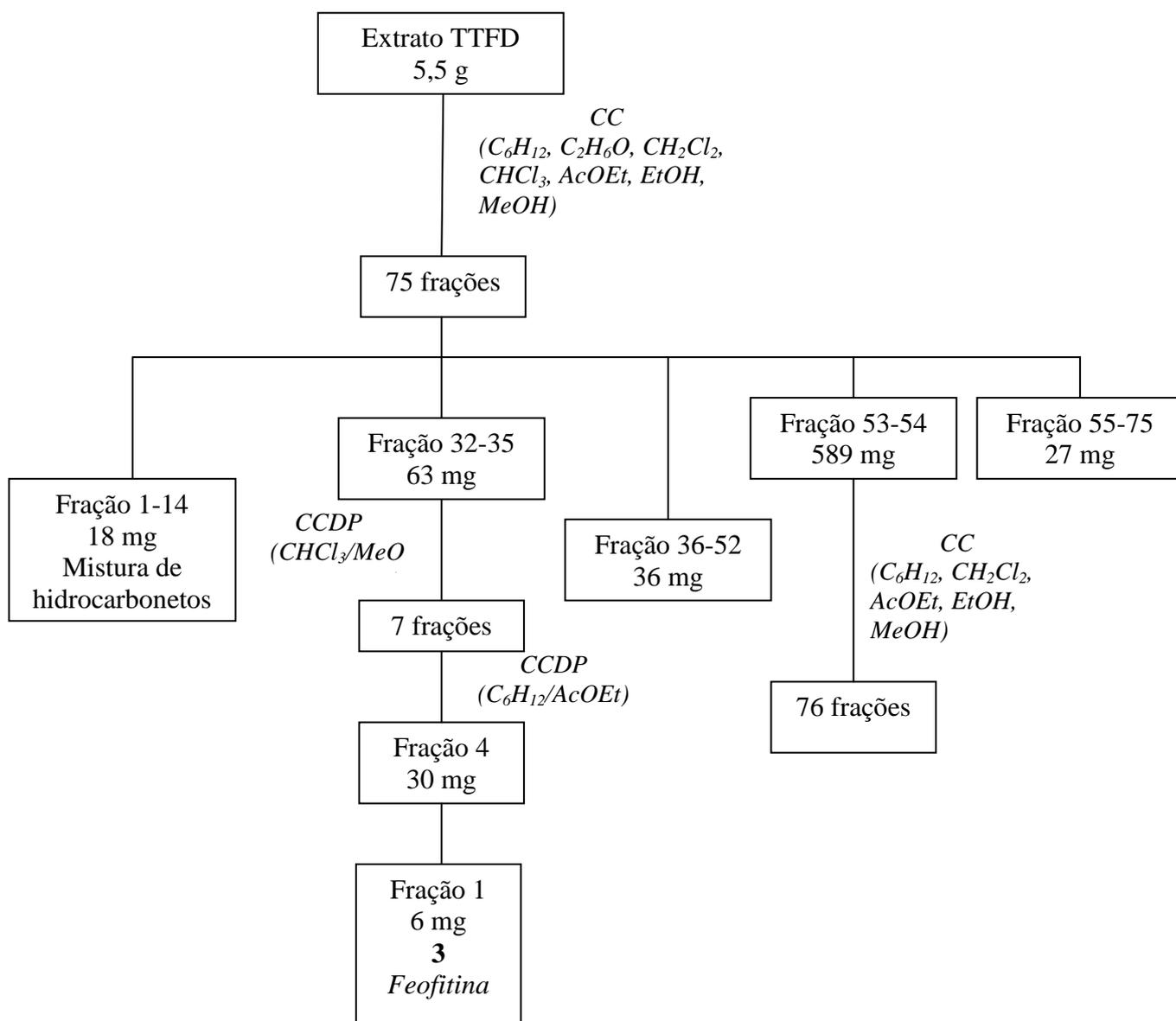
Foram reunidas ainda as frações 53-54 (168 mg) (acetato de etila) , no qual foi analisada através de CC eluído com vários solventes (hexano, éter de petróleo, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e até metanol 100%) fornecendo um total de 76 frações.

As frações 21-29 e 30-34 foram submetidas à análise de CC com diferentes gradientes (hexano, hexano/acetato, acetato, acetato/etanol, etanol e metanol) de acordo com ordem crescente de polaridade apresentaram compostos que foram identificadas como feofitinas. As frações 18 (4 mg), 23-25 (23 mg) e 26 (6 mg) da coluna 21-29 (215 mg) apresentaram substâncias sólidas amorfas de coloração verde-escuro, identificados com substância **4** (5 mg) (feofitina a), mistura das feofitinas **5** (13²-hidroxi-feofitina a), **6** (15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a) e **7** (15¹-metilperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina). A mistura de substâncias **8** (15¹-carboxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b ou ácido Ficusclorínico D), **9** (15¹-hidroxi-15¹-acetil-13¹-carboxi-feofitina b (Taliclorina A), **10** (15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b) e **11** (15¹-hidroperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b), foi detectada na fração 34 (15 mg) e apresentou aspecto de coloração marrom do qual foram definidas como feofitinas. A fração 8 da coluna 30-34 (153 mg) apresentou um composto sólido amorfo de cor vermelha, que foi identificado como feofitina **12** (15¹-acetil-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a) (10 mg).

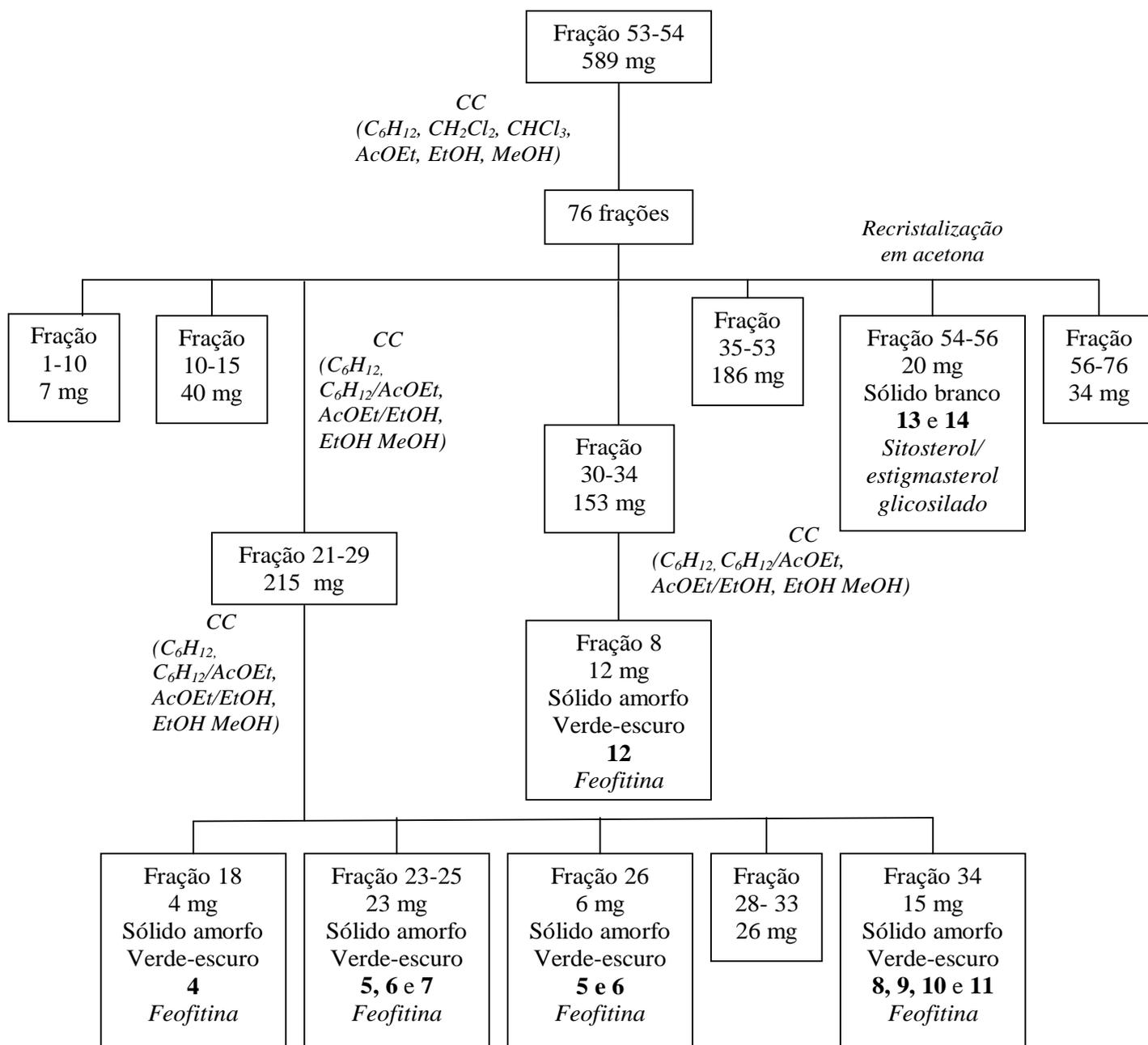
Na fração 54-56 (acetato de etila) apresentaram aspectos de cristais brancos (20 mg) que foram lavados várias vezes com acetona e identificado como mistura de glicosilados **13** +

14 estigmasterol e sitosterol glicosilados (3- β -O- β D-glicopiranosilestigmasterol e 3- β -O- β D-glicopiranosilsitosterol.).

As frações que estão representadas abaixo no fluxograma, após serem analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico, algumas frações apresentaram uma grande mistura de componentes em uma pequena quantidade de massa, não sendo possível obter substâncias puras, como por exemplo, as frações de 10-15, 35-53. Os esquemas **3** e **4** abaixo apresenta o resumo dos processamentos descrito acima.



Esquema 3: Fracionamento do extrato diclorometano de folhas de *Talinum triangulare*

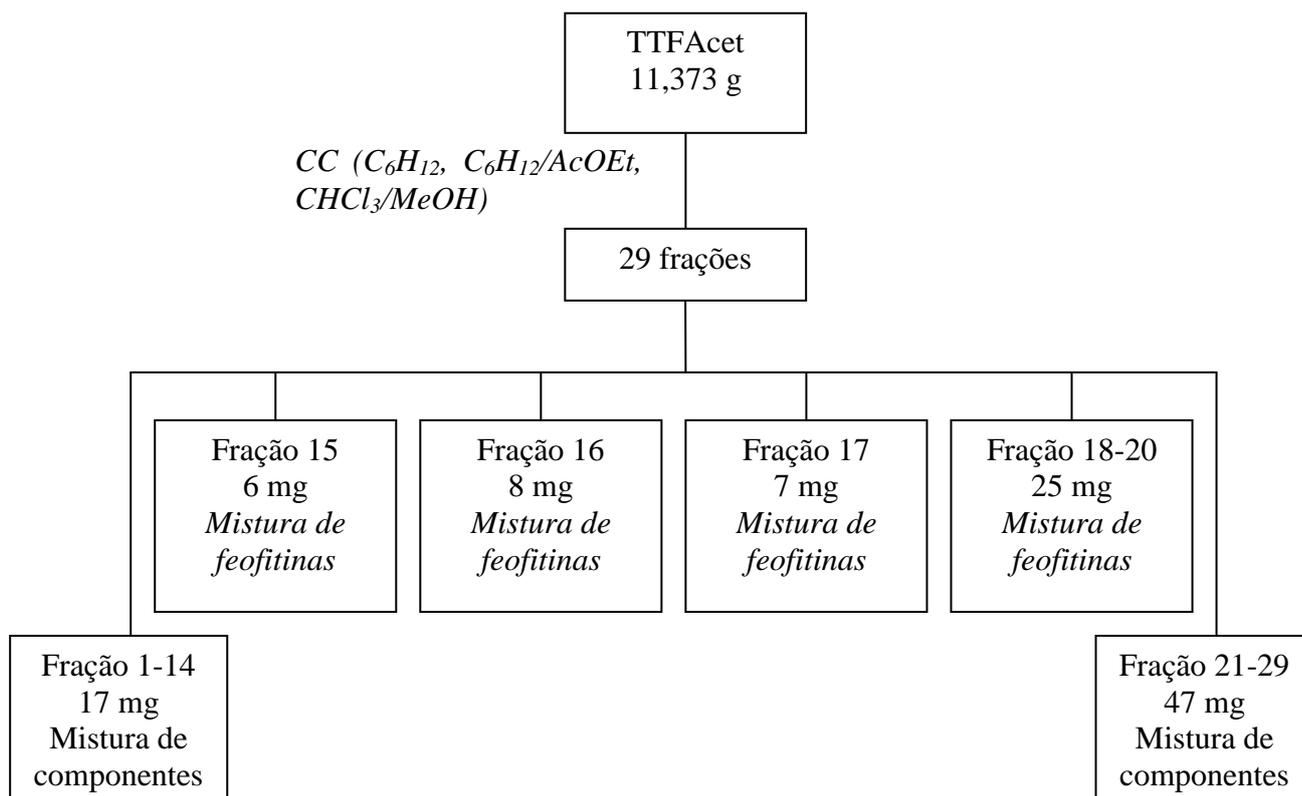


Esquema 4: Fracionamento do extrato diclorometano de folhas de *Talinum triangulare*.

I.2.3.3 Estudo químico do extrato acetato de etila de folhas de *Talinum triangulare* (TTFacet)

O TTFacet foi fracionado em coluna aberta de sílica gel (60 – 240 mesh) eluído com hexano, hexano/acetato de etila, corofórmio/metanol em polaridades crescentes até 100% metanol, obtendo-se um total de 29 frações recolhidas em erlemeyer de 250 mL que posteriormente foram concentradas em rotavapor e analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico.

As frações 15, 16, 17 e 18-20 apresentaram um perfil de vermelha a verde-escuro, dos quais foram submetidas à análise de HPLC e espectroscópica de RMN ¹H de 1D e LC-MS, onde foi possível identificar que estas frações são ricas em misturas de porfirinas. As demais frações, após serem analisadas através de CCDA foram reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico. O esquema 5 abaixo apresenta as frações do extrato acetato de etila que foram analisadas.



Esquema 5: Fracionamento do extrato acetato de etila de folhas de *Talinum triangulare*.

I.2.3.4 Estudo químico do extrato metanólico de *Talinum triangulare* (TTFM)

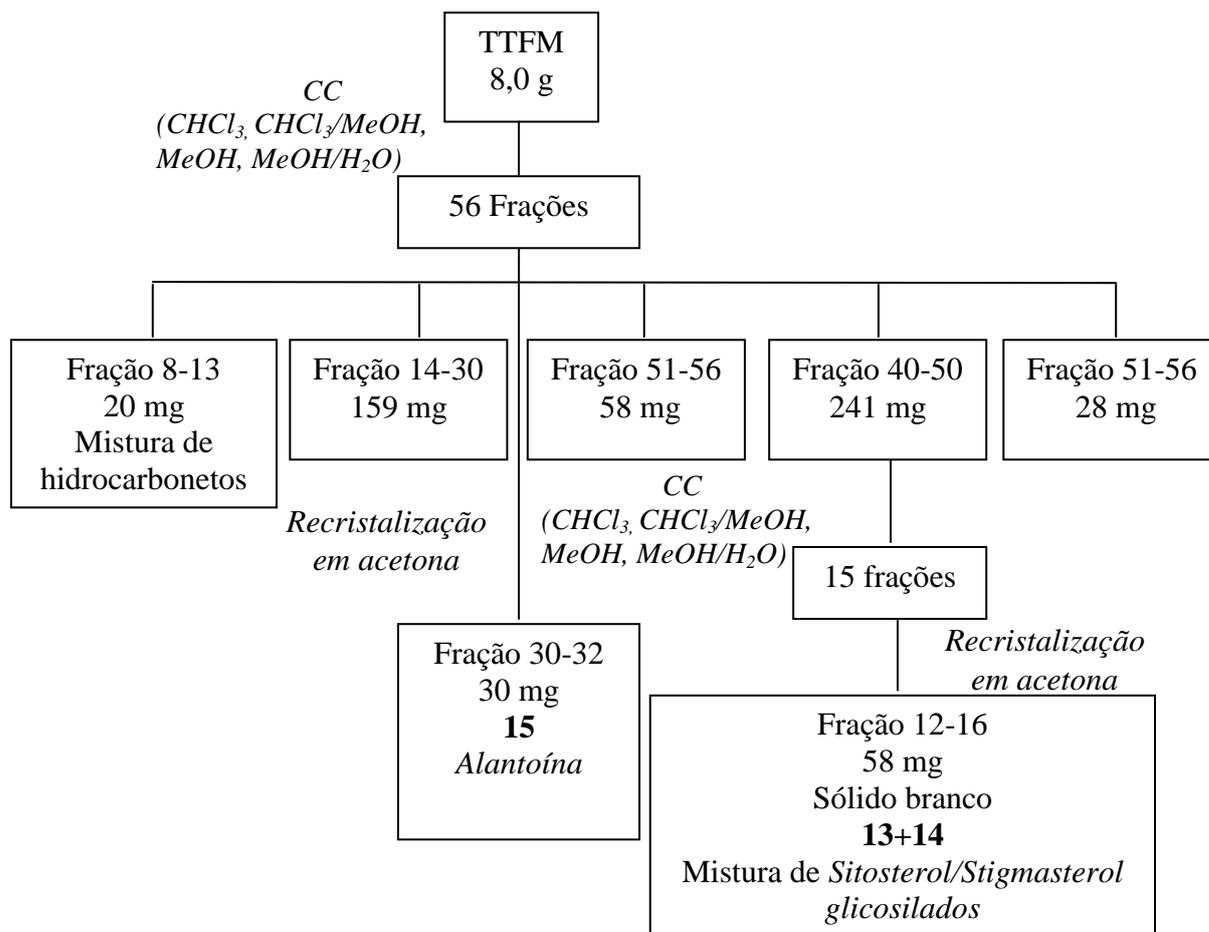
O extrato metanólico (8 g) de folhas de *Talinum triangulare* foi fracionado por cromatografia em coluna eluído com hexano, diclorometano, clorofórmio, etanol e metanol, fornecendo 56 frações.

Na fração 30-32 houve formação de um sólido branco, dos quais foram recristalizados em acetona, com P.F. 238-39°C, sendo identificado e caracterizado através de dados espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C como substância **15**, conhecida como alantoina (30 mg).

A fração 40-50 foi fracionada em clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol até chegar 100%, obtendo um total de 45 frações, no qual mostrou sólidos nas frações 12-16 que

foram identificados a partir das análises espectrais como uma mistura de sitosterol e estigmasterol glicosilados (58 mg).

As demais frações após serem analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico. A fração 8-13, que apresentou um mistura de hidrocarbonetos e a fração 51-56 que apresentou uma mistura de açúcares. O esquema 6 apresenta um resumo simplificado do estudo do extrato metanólico.



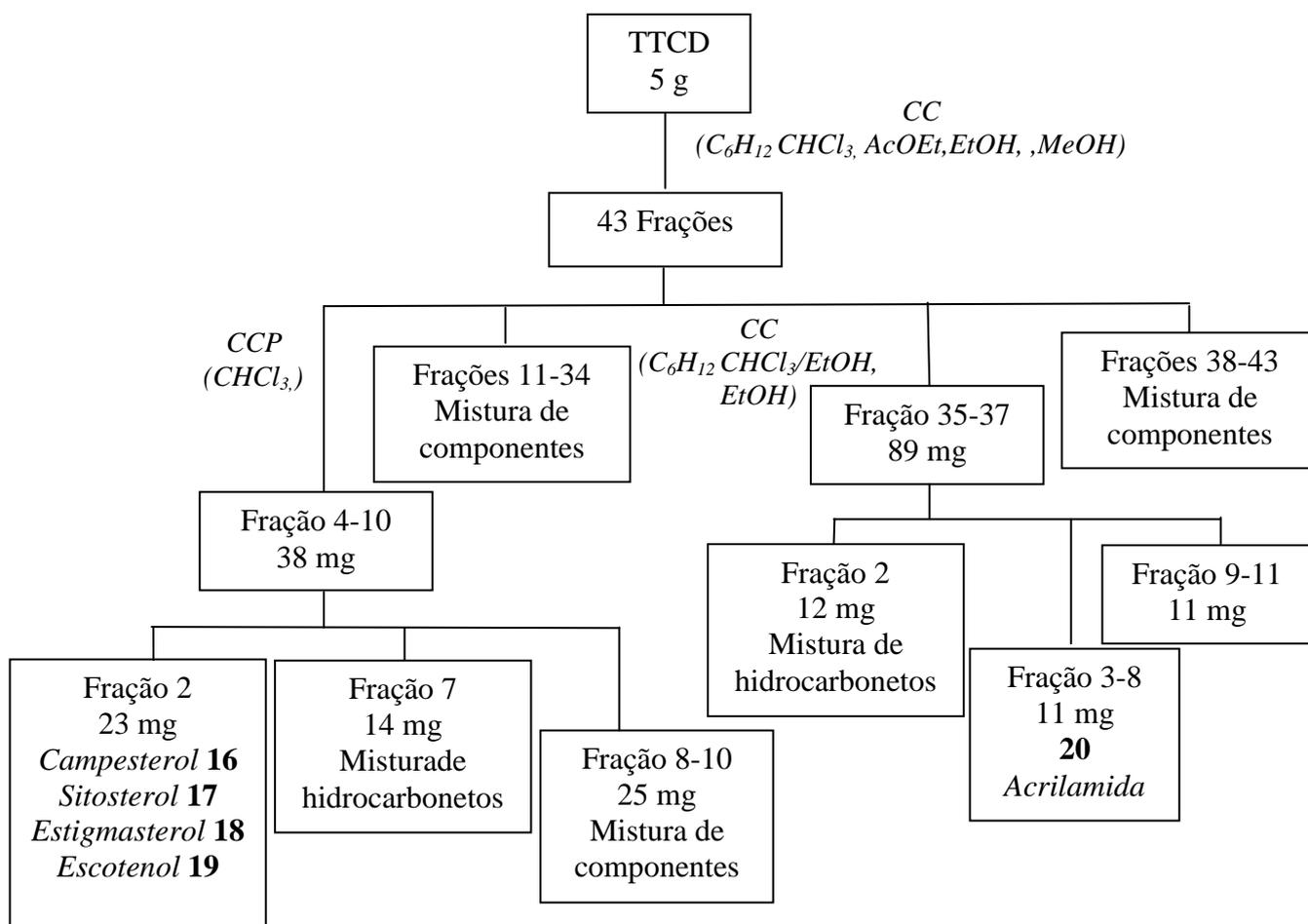
Esquema 6: Fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Talinum triangulare*;

I.2.4 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Caule de *Talinum triangulare*

I.2.4.1 Estudo químico do extrato diclorometano do caule de *Talinum triangulare* (TTCD)

O TTCD (5,0 g) foi submetido ao fracionamento em CC utilizando mistura de solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e methanol) de acordo com aumento de polaridade até 100% metanol, no qual forneceu um total de 43 frações.

A fração 4-10 foi fracionada através de CCP obtendo-se 11 novas frações. A fração 2 apresentou um sólido branco (23 mg) no qual foi lavado várias vezes com acetona, sendo caracterizado através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e CG-massas como uma mistura de campesterol (**16**), sitosterol (**17**), estigmasterol (**18**) e escotanol (**19**). Na fração 35-37 (89 mg) utilizou-se á análise de CC com solventes (hexano, clorofórmio, etanol) de acordo com aumento de polaridade até 100% etanol. A fração 3-8 foi reunida (11 mg) apresentando um sólido pastoso branco, sendo no qual foi identificado através de dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D, IV e CG-massas como substância **20** (11mg), chamado de ácido 3-N-acriloil-N-pentadecanoil-propanóico. O **esquema 7** abaixo apresenta um resumo dos componentes isolados neste extrato.



Esquema 7. Fracionamento do extrato diclorometano do caule de *Talinum triangulare*

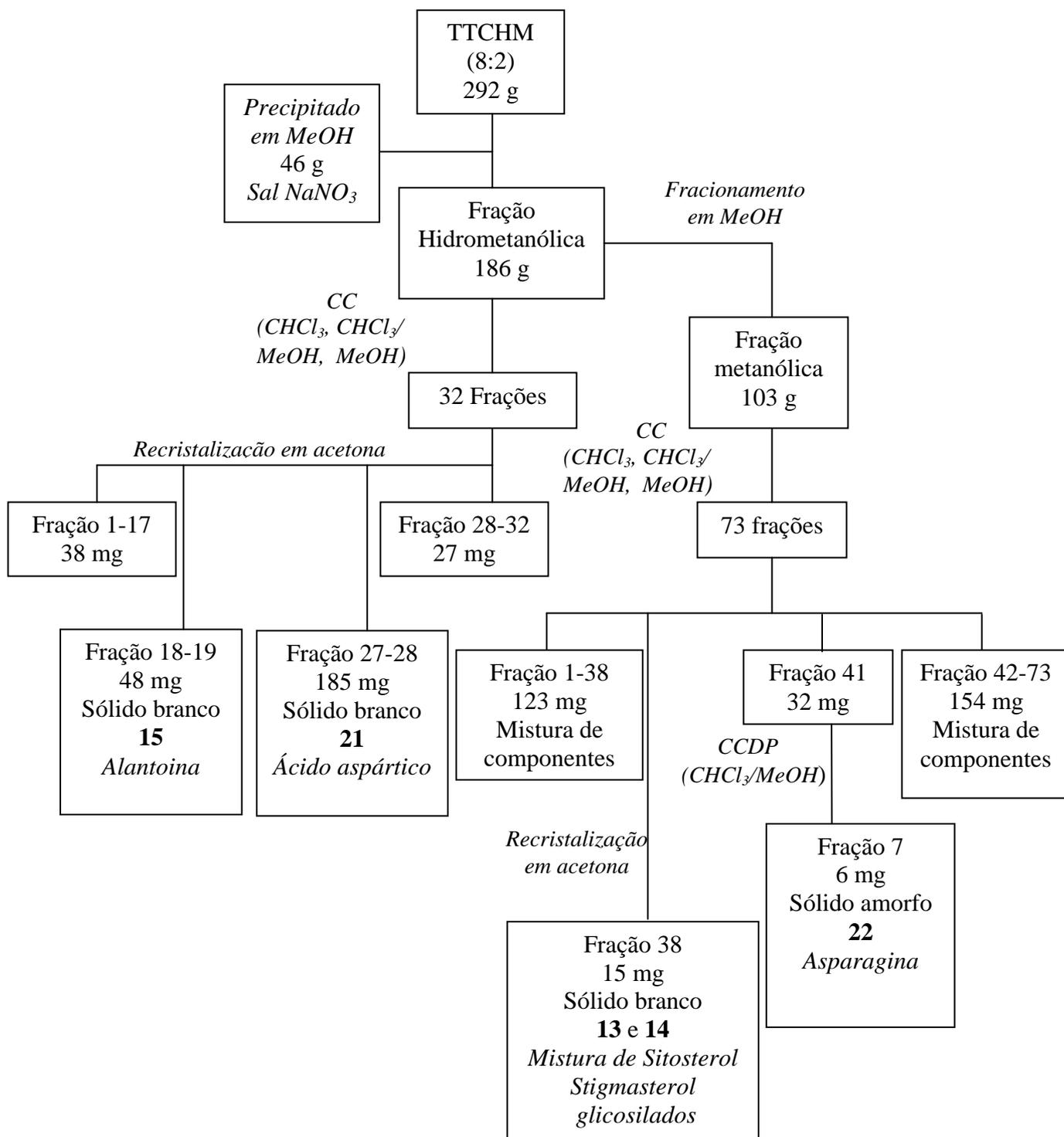
I.2.4.2 Estudo químico do extrato hidrometanólico de *Talinum triangulare* (TTCHM)

O **TTCHM** não secou completamente e apresentou um material cristalino em forma de agulhas. Este sólido insolúvel foi identificado e caracterizado através de testes analíticos como NaNO_3 (46 g). Posteriormente o extrato hidrometanólico (292 g) foi solubilizado em MeOH obtendo-se a fração metanólica (103g), e a fração hidrometanólica (186 g).

A fração hidrometanólica foi fracionada em coluna aberta de sílica gel (60 – 240 mesh) eluída com gradientes de clorofórmio/metanol e metanol/água em polaridades crescentes, obtendo-se um total de 32 frações recolhidas em erlemeyer de 500 mL, sendo posteriormente, concentradas em rotavapor e analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico.

As frações 18-19 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 1:1) e 27-28 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1) após recristalização em acetona forneceu um precipitado branco (48 mg, alantoína, PF 238-39° C) (**15**) (2,5-Dioxo-4-imidazolidinil) e cristais branco (15 mg) solúvel em DMSO com ponto de fusão 270-72 °C, que foi caracterizada como ácido aspártico (2-amino-butanodióico) (**21**).

A fração metanólica foi fracionada por CC de gel de sílica (60 – 240 mesh) com gradientes de dicloro/clorofórmio, clorofórmio/acetato, clorofórmio/metanol e metanol/água em polaridades crescentes até 100%, obtendo-se um total de 73. Foram analisadas as frações por CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico. A fração 38 apresentou um sólido branco que foi recristalizado em acetona, sendo identificado como uma mistura estigmasterol e sitosterol glicosilados (15 mg) (**13+14**). A fração 41 foi submetida a CCDA eluída com uma mistura $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5) sendo obtido 7 frações. Após ser adicionada acetona foi observada a presença de um precipitado na fração 1, no qual foi identificado como asparagina (6 mg) (**22**), ponto de fusão 215-17° C. O esquema **8** apresenta um resumo dos componentes isolados neste fracionamento.



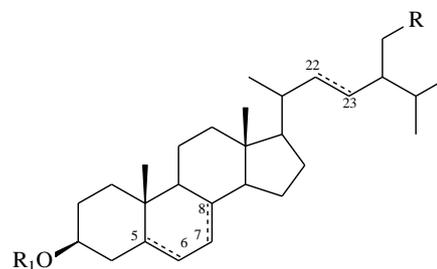
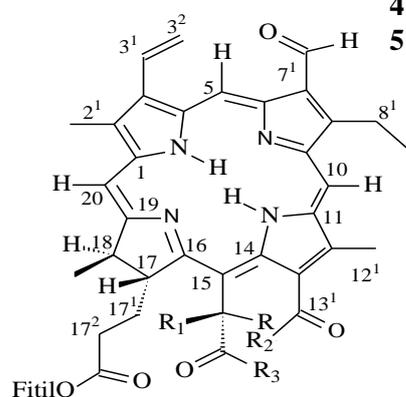
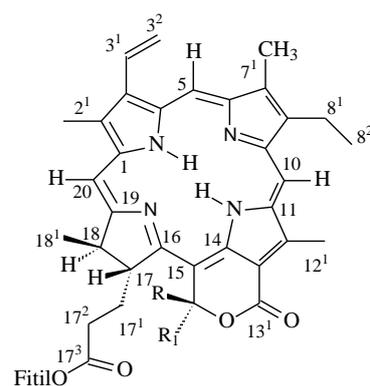
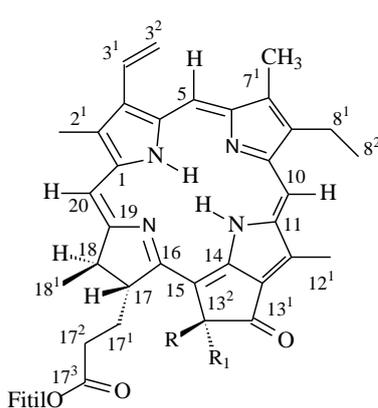
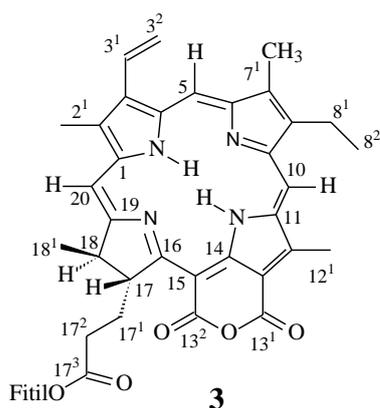
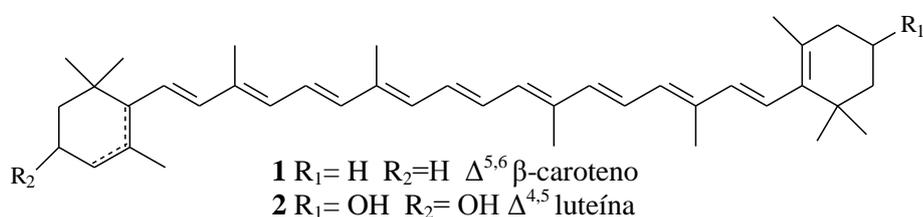
Esquema 8: Fracionamento do extrato hidrometanólico do caule de *Talinum triangulare* (TTCHM).

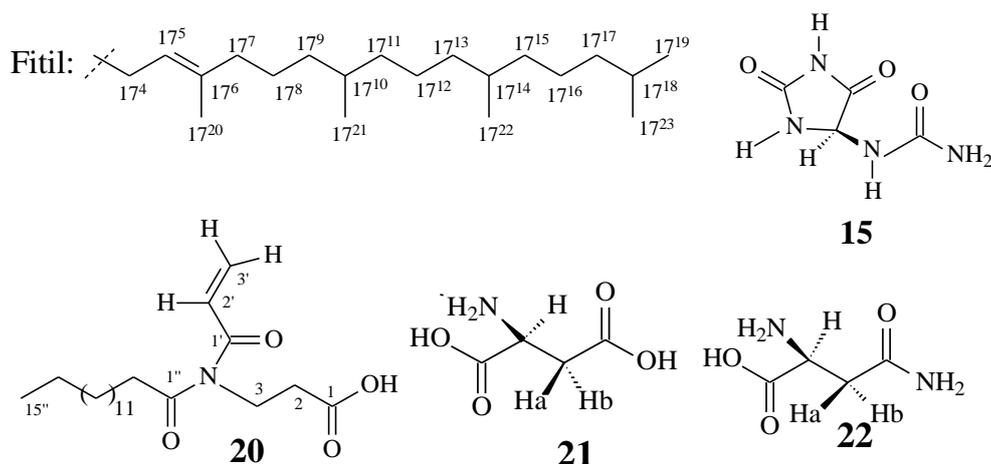
I.2.5 Identificação de porfirinas através de CLAE

Utilizou-se Cromatógrafo Líquido com detector de rede de fotiodos UV/Vis (PDA) de 200 a 600 nm (Shimadzu LC 6AD e LC 10AD), e Coluna Cromatográfica Betasil de fase reversa de modelo C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m). As frações dos extratos diclorometano e acetato de etila das folhas de *Talinum triangulare* foram solubilizadas em um gradiente de acetonitrila e água (85:15), e posteriormente com um fluxo de 1,0 mL/min a uma temperatura de 31°C e a uma pressão de 148 Kgf/cm.

I.3 Resultados e discussão

I.3.1 Substâncias Identificadas e Isoladas





I.3.2 Identificação das Substâncias Isoladas das Folhas de *Talinum triangulare*

I.3.2.1 Identificação das substâncias 1 e 2

I.3.2.1.1 Uso de Espectrofotometria no Ultravioleta

O teste no UV-visível (aparelho Shimadzu) foi realizado com extrato e fração hexânica das folhas *Talinum triangulare*, no qual se partiu do extrato seco e da fração após a saponificação em presença de hexano, onde se utilizou uma solução padrão de 1 mg/mL. A solução foi submetida à análise espectrofotométrica no UV-visível percorrendo uma faixa de 300 a 600 nm.

A análise no UV-visível (**Figura 10**) revelou sinais característicos de componentes do tipo carotenoides, na qual puderam ser confirmados através dos valores dos λ_{\max} que apresentaram valores em 410, 439 e 469 nm (**Figura 11**) para o extrato e para a fração λ_{\max} em 423, 444 e 475 nm (**Figura 12**), indicando a presença de β -caroteno apresentando-se como componente majoritário nas duas amostras.

I.3.2.1.2 Uso de CLAE

O extrato e a fração hexânica das folhas de *Talinum triangulare* após análise por CLAE em um comprimento de onda de 300 a 600 nm (**Figura 10**), obtiveram-se os cromatogramas da fração e do extrato hexânico, sendo comparados com valores padrões de análise, e posteriormente os teores de carotenoides foram quantificados utilizando a lei de *Lambert-beer*. Os valores dos cromatogramas, tanto do extrato quanto da fração, apresentaram teores de β -caroteno (**1**) e luteína (**2**), nos quais os tempos de retenção foram identificados em 16,8 e 7,3 min., respectivamente, sendo os carotenoides quantificados em

169,1 mg de β -caroteno e 73,179 mg de luteína para o extrato henânico e 165,1 mg de β -caroteno e 175,8 mg de luteína (**Figura 11 e 12**).

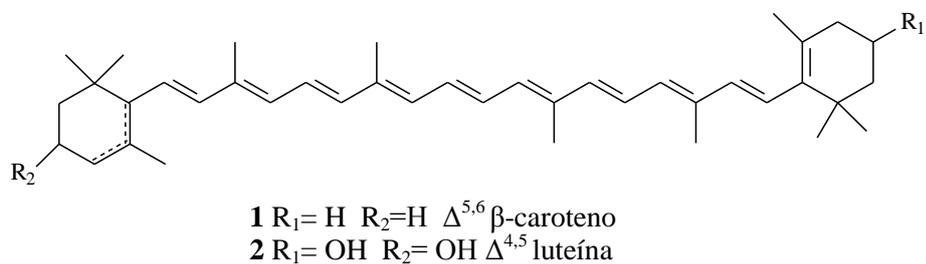


Figura 9: β -caroteno e luteína identificados no extrato e fração de *Talinum triangulare* através de CLAE.

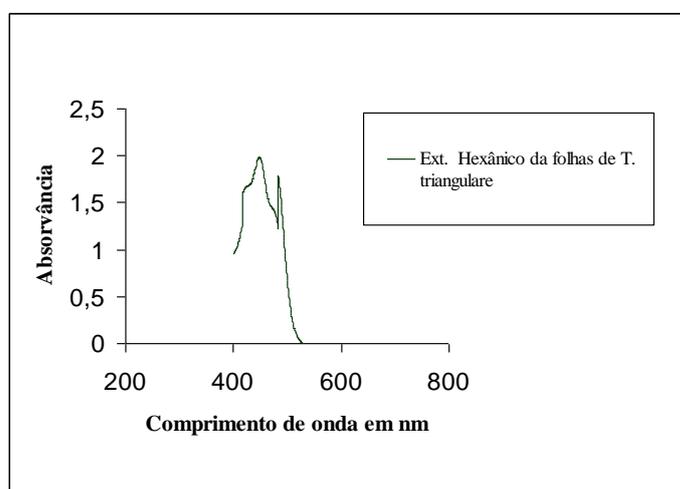


Figura 10: Curvas de UV- visível apresentando valores de λ_{max} em 423, 444 e 475 nm característicos de carotenoides de *Talinum triangulare*.

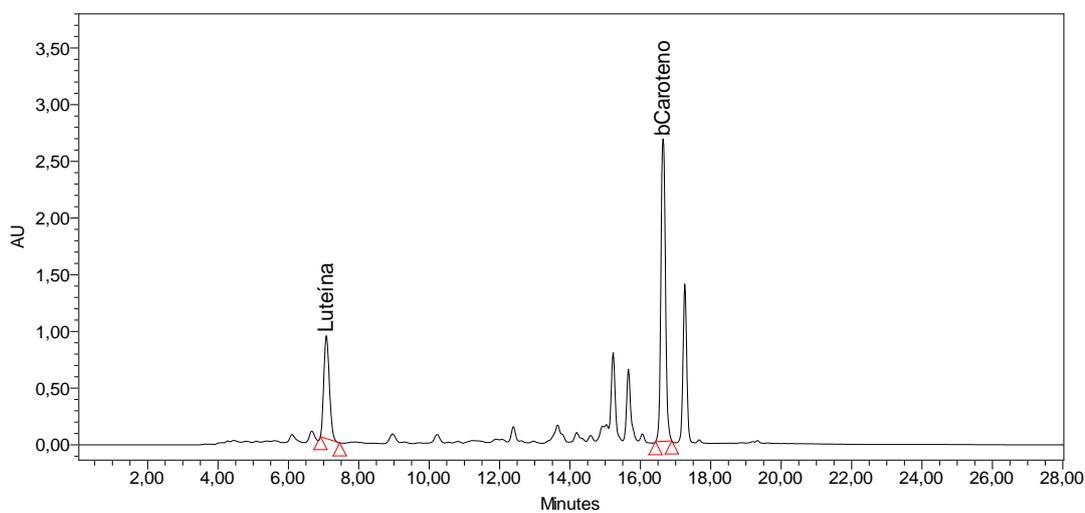


Figura 11: Cromatograma do extrato hexânico das folhas de *Talinum triangulare*.

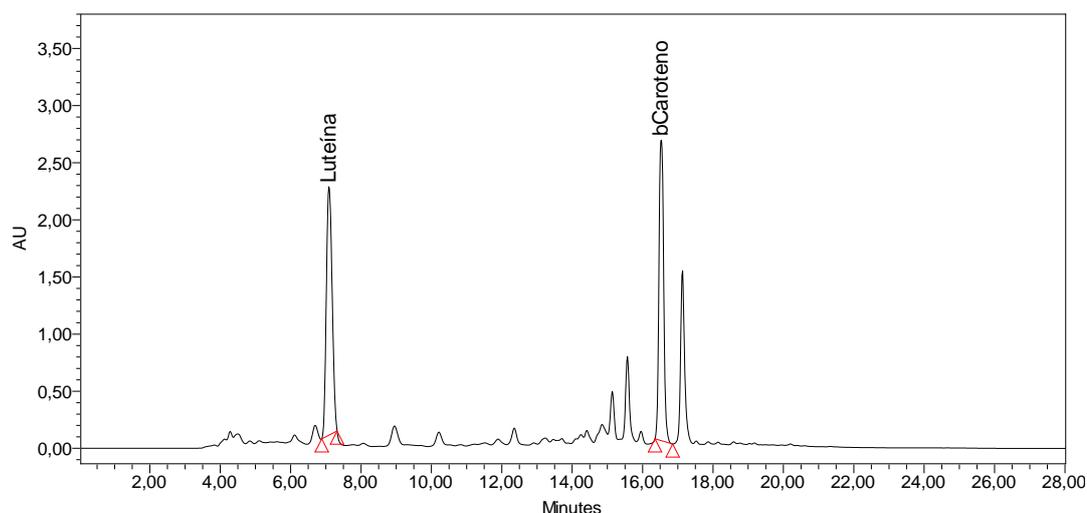
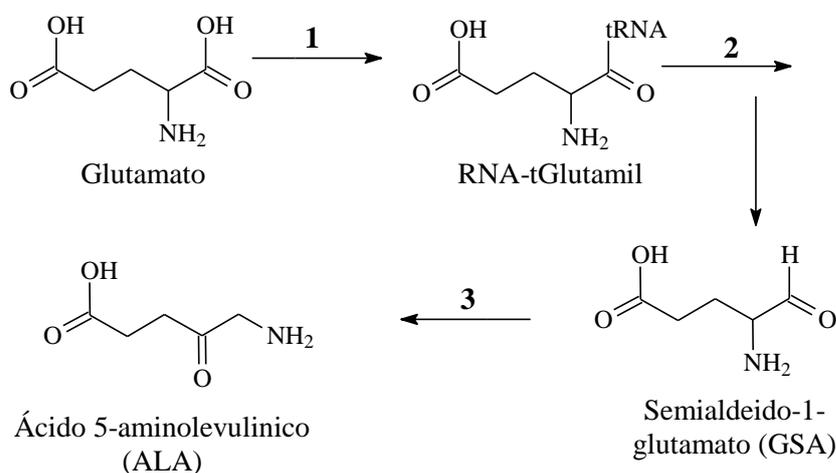


Figura 12: Cromatograma da fração hexânica das folhas de *Talinum triangulare*

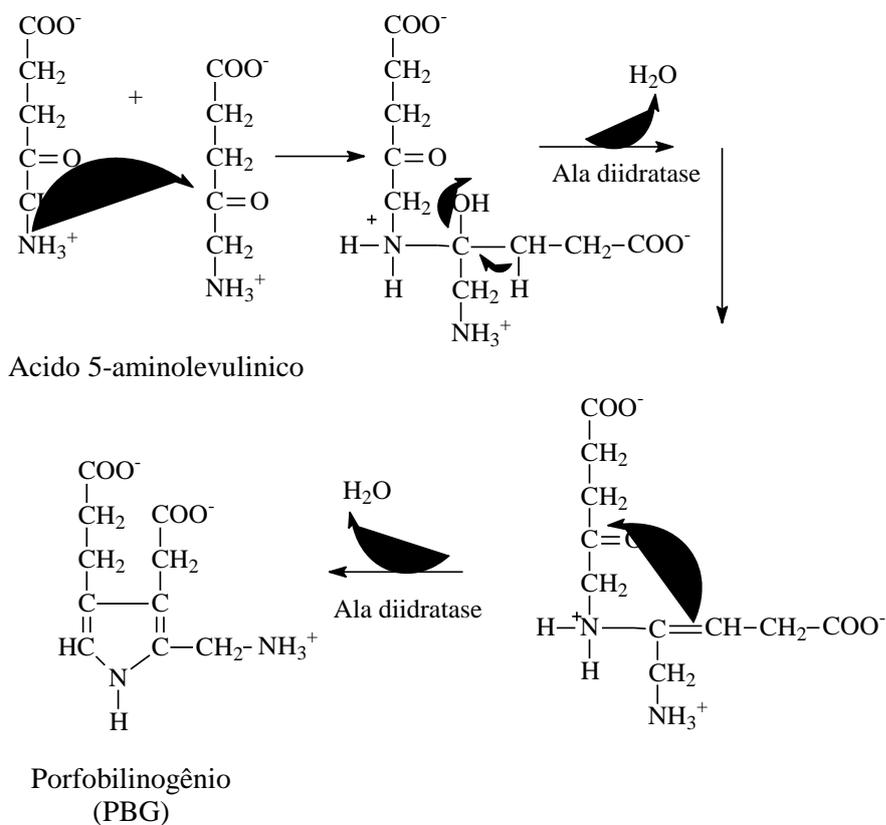
I.3.2.2 Proposta Biosintética de Porfirinas

A proposta para a biossíntese de porfirina segundo Tanaka & Tanaka e Wottestein e colaboradores, consiste em uma via comum que envolve nove passos enzimáticos (TANAKA & TANAKA, 2007 e WOTTESTEIN *et al*, 1995). A primeira etapa consiste na formação do ácido 5-aminolevulinato que tem como precursor o ácido glutâmico, que posteriormente é sintetizado pela enzima RNA-tglutamil- sintase (1) formando o RNA-tglutamil. A partir da enzima RNA-tglutamil- redutase (2, TRGlu) há uma reação de redução do grupo carboxílico produzindo semialdeído-1-glutamato (GSA). Na sequência uma reação intermolecular catalisada por GDS amino transferase (3, GSA-AT) converte o GSA em ácido 5-aminolevulinico (ALA) (Esquema 9).



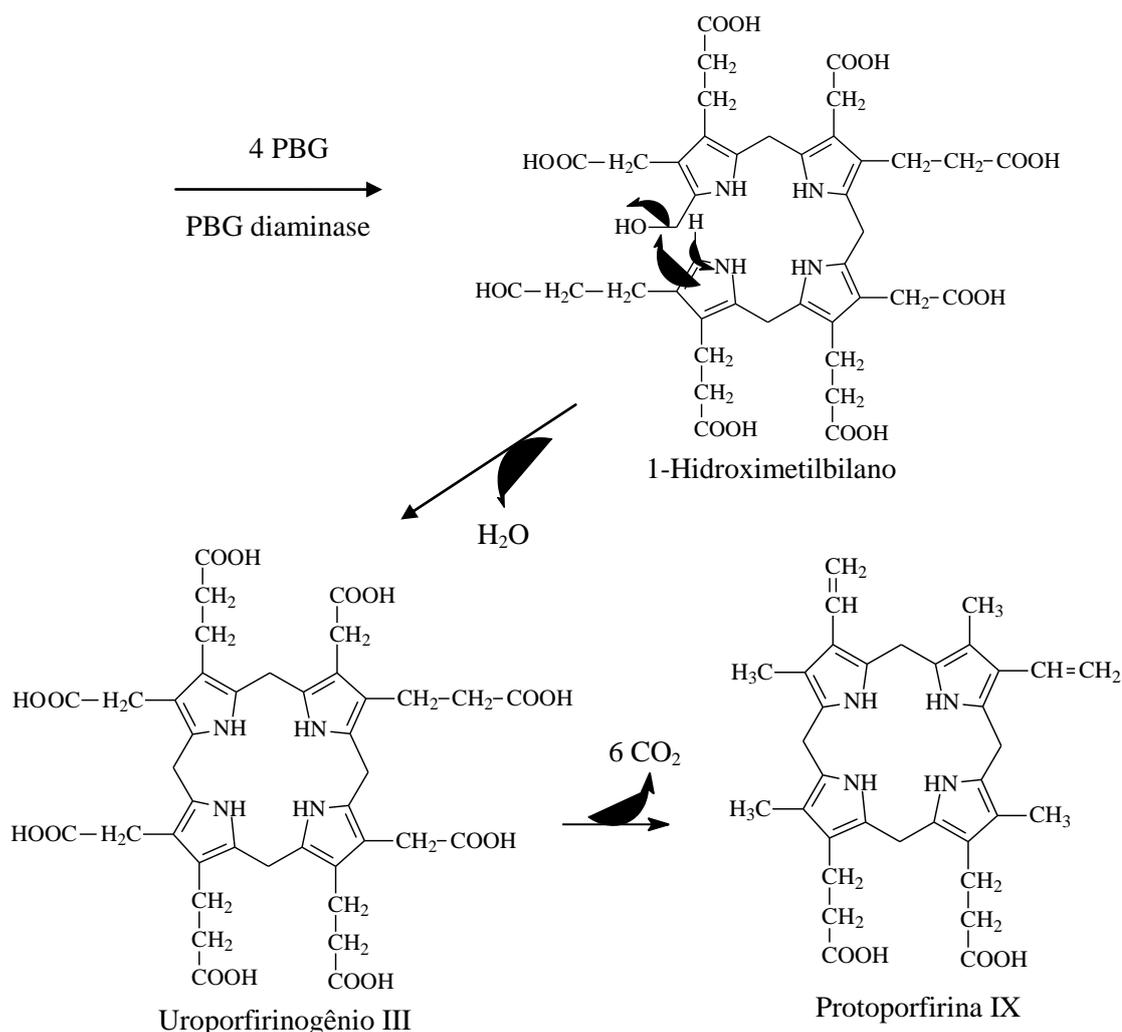
Esquema 9: Biossíntese do ácido 5-aminolevulinato.

Em plantas e cianobactérias, ALA é produzido de glutamato a partir de reações envolvendo RNAtGlu. Duas moléculas de ALA são então condensadas para formar porfobilinogênio (PBG) (**Esquema 10**), que forma o anel pirrólico na clorofila, posteriormente quatro moléculas de PBG se unem para formar porfobilinogenio (PBG). (TANAKA & TANAKA, 2006, TANAKA & TANAKA, 2007 e WOTTESTEIN *et al*, 1995, BUCHANAN *et al.*, 2000).



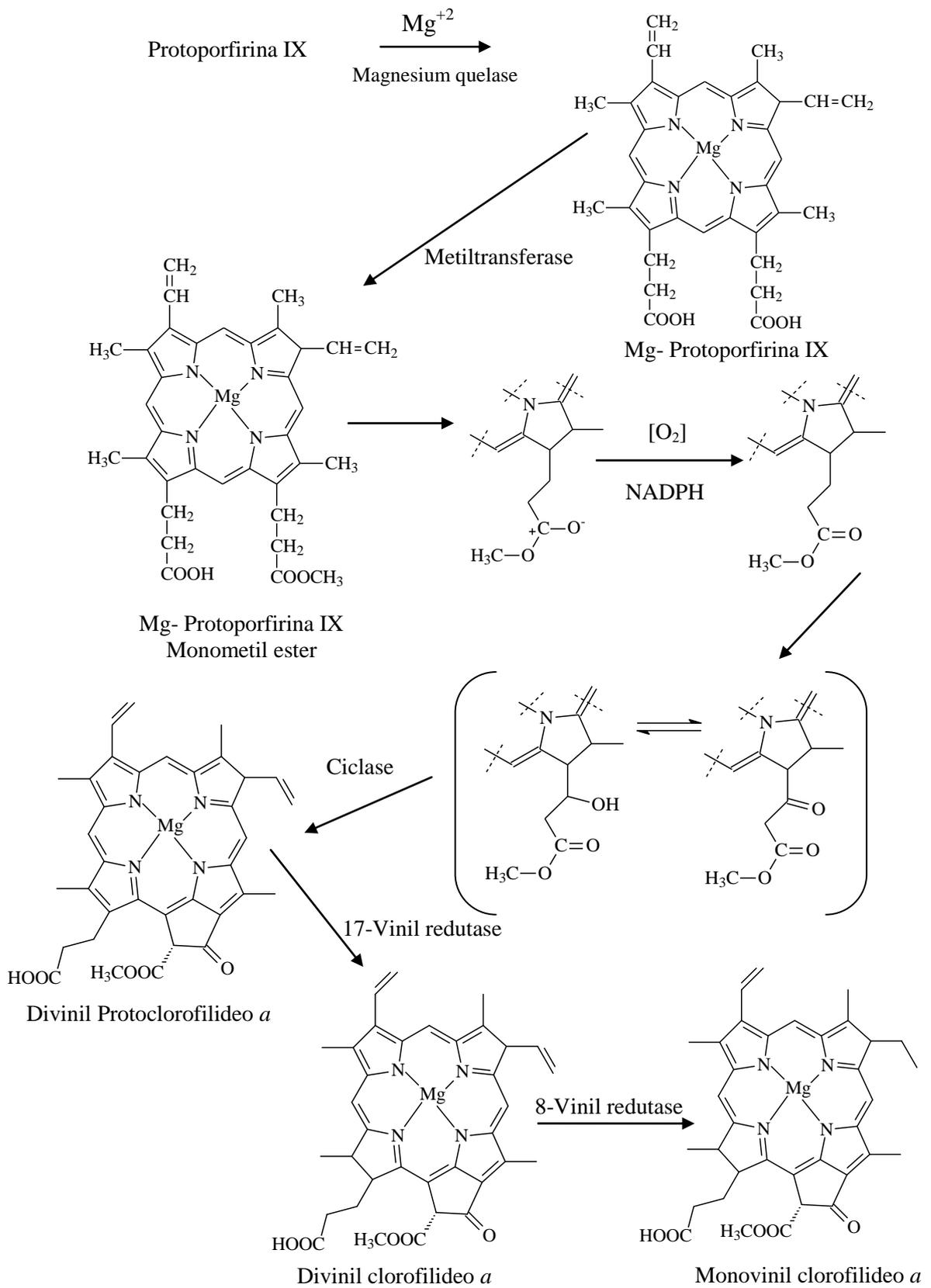
Esquema 10: Biossíntese do anel pirrólico.

A polimerização de quatro moléculas de PBG é feita através da PBG-diaminase, que atua na formação da 1-hidroximetilbilano, no qual posteriormente, com ação da uroporfirinogênio III- sintase e com a perda de uma molécula de água, resulta na formação do uroporfirinogênio III. A protoporfirina IX, mediado por seis passos enzimáticos de sucessivas descarboxilações tem a atuação da protoporfirina IX-oxidase (**Esquema 11**) (TANAKA & TANAKA, 2007).



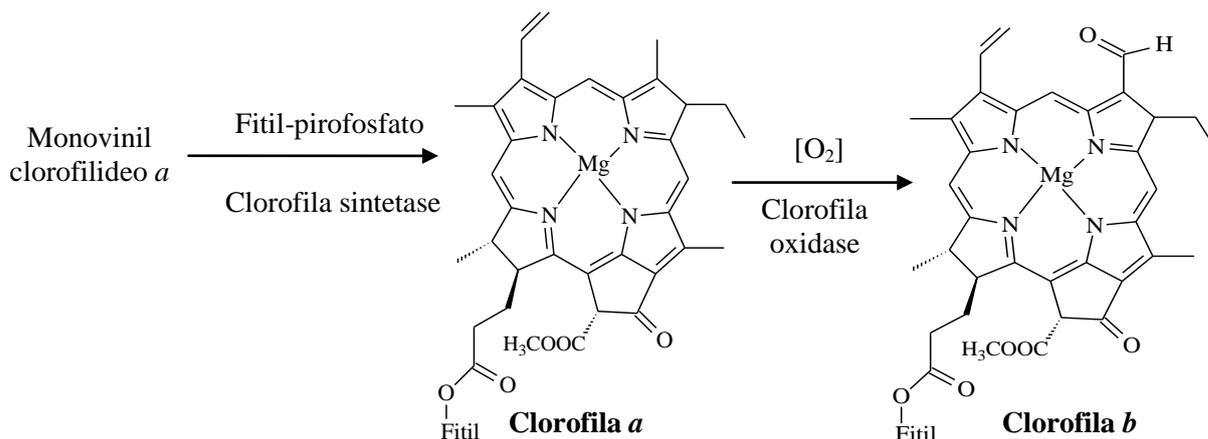
Esquema 11: Biossíntese da Protoporfirina IX.

Nos vegetais o primeiro passo da rota da clorofila é inserido um átomo de magnésio (Mg), formando Mg-protoporfirina IX. Em seguida, o quinto anel é formado pela ciclização da cadeia lateral de um dos ácidos propiônicos, formando o protoclorofilídeo. A conversão de protoporfirina IX em Mg-protoporfirina IX envolve em primeiro lugar, a esterificação do resíduo propiônico, na qual uma enzima metil transferase (Sadenosilmetionina), tendo como doador uma metila no grupo carboxílico de 13- propionato. Posteriormente, há o fechamento do anel começando a partir de Mg-2,4-divinilprotoporfirina IX metil éster, seguindo de Mg-protoporfirina monometil éster, posteriormente, duas reduções ocorrem através de uma redutase, formando Divinil Protoclorofilídeo *a* e monovinil Protoclorofilídeo *a* (**Esquema 12**)(TANAKA & TANAKA, 2007 e BUCHANAN *et al.*, 2000).



Esquema 12: Biossntese do Monovinil clorofilídeo *a*.

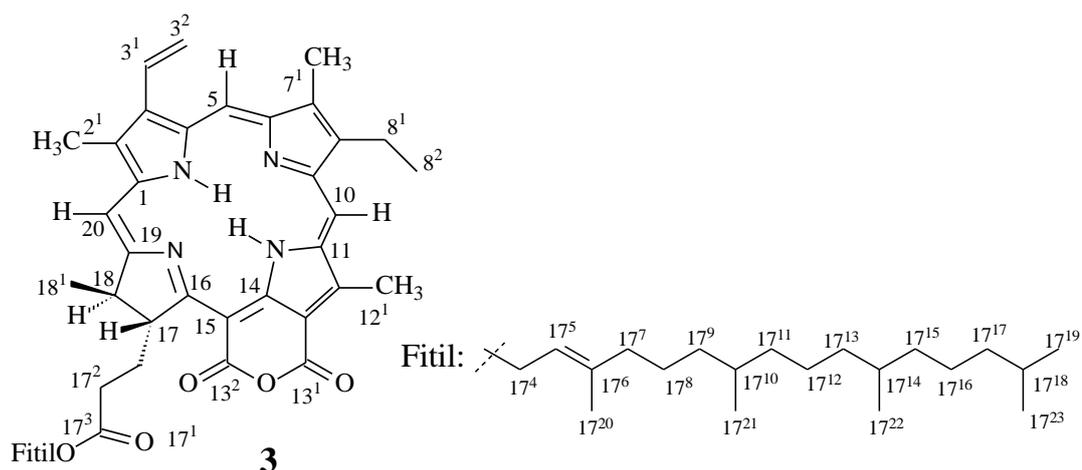
O passo final na síntese de clorofila **a** envolve esterificação do monovinil clorofilideo **a** da cadeia lateral do fitol hidrofóbico catalisada pela enzima clorofila sintetase. A clorofila **b** é sintetizada a partir da clorofila **a** através da ação de uma enzima clorofila oxidase que converte um grupo metil ligado ao anel II a aldeído (**Esquema 13**) (TANAKA & TANAKA, 2007 e BUCHANAN *et al.*, 2000). Para obtenção de outras porfirinas derivadas da clorofila **a** e **b** existe a ocorrência de sucessivas reações.



Esquema 13: Biossíntese da clorofila **a** e **b**.

I.3.2.3 Identificação da substância 3

O espectro de RMN de 1H do composto **3** (**Figuras 16-18**) apresentou singletos na região de frequência alta δ_H 8,55, 9,34 e 9,56 referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . A presença de sinais de metilas na região de δ_H 3,0-3,2 conduziu a conclusão de se tratar de uma porfirina. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-20, H-5 e H-10 de grupos metílicos com deslocamentos químicos em δ_H 3,14, 3,33, 3,76 e δ_H 1,65 ppm os quais foram correlacionados aos carbonos CH_3-7^1 , CH_3-2^1 , CH_3-12^1 , CH_3-18^2 . O duplete em δ_H 1,73 (8 Hz) e os sinais de um grupo vinila representado pelos δ_H em 7,84 (dd, 12 e 4 Hz), 6,31 (d, 12 e 8 Hz) e 6,19 (d, 12 e 4 Hz) permitiram propor o sistema heterocíclico de porfirinas semelhante ao divulgado em SILVA & CÂMARA (2010). O sistema vinílico correspondendo aos H-3¹ e H-3².



Os sinais em δ_H 5,18 (dl) e 1,73 (d, 4 Hz) foram associados aos hidrogênios H-17⁵ e H-18, respectivamente. O tripleto em δ_H 1,65 e o quarteto em δ_H 3,60 foram correlacionados ao grupo etila ligado no C- 8 (H-8¹ e H-8²). Os demais sinais identificados no espectro de RMN ¹H foram semelhantes aos apresentados por SILVA & CÂMARA (2010) e BREITMAIER & VOLTER (1978).

A análise do espectro de RMN ¹³C (Figura 19 e 20) aliado ao espectro de 2D permitiu identificar os sinais de carbonos quaternário e entre eles os δ_C 159,4 e 164,1, dos quais foram atribuídos ao C-13¹ e C-13² do anidrido cíclico. A carbonila de éster em δ_C 173,4 foi atribuída ao C-17³ ligado a um grupo alcoila. Os demais deslocamentos químicos de carbonos quaternários em δ_C 176,6, 177,6, 156,3, 150,1, 146,0, 144,1, 140,0, 139,1, 137,8, 136,7, 132,0, 131,6, 131,6, 123,7, 117,8, 111,7 e 93,2 estão de acordo com valores de sistema heterocíclicos de feofitinas e foram atribuídos aos carbonos C-19, C-16, C-6, C-9, C-8, C-1, C-14, C-12, C-3, C-7 e C-4, C-2, C-11, C-3¹, C-3², C-13 e C-15, respectivamente. Os deslocamentos de δ_H e δ_C de 17, 17¹, 17², 17³ e 18 foram também compatíveis com uma proposta de compostos porfirinicos. A Tabela 5 apresenta todos os valores de deslocamentos químicos de δ_H e δ_C do composto 3, dos quais podem ser observados e comparados valores descritos na literatura (SILVA & CÂMARA, 2010, LIN *et al*, 2011 e BREITMAIER & VOLTER,1978).

Os sinais remanescentes foram conclusivos para a confirmação do grupamento alcoila e fitila ligado à carboxila do anel porfirinico, do qual foi possível observar sinais na região δ_H 0,76 – 1,80 que confirmou a presença de metilas e metilenos presentes nesta unidade.

A confirmação adicional para proposta de 3 foi feita com análises de massas dos mapas de espectros de HSQC e HMBC (Figuras 21 e 23) permitiu detectar correlações diretas (¹J_{HC}) e a longa distância (^{2,3}J_{HC}) de todos os carbonos hidrogenados para o anel porfirinico: C-2¹ [δ_H/δ_C 3,3/11,9], C-3¹ [δ_H/δ_C 7,8/123,7] C-3² [δ_H/δ_C 6,3 e 6,1/117,8], C-5

$[\delta_H/\delta_C 9,3/103,3]$, C-7¹ $[\delta_H/\delta_C 3,1/11,0]$, C-8¹ $[\delta_H/\delta_C 3,6/19,3]$, C-8² $[\delta_H/\delta_C 1,6/17,4]$, C-10 $[\delta_H/\delta_C 9,5/107,7]$, C-12¹ $[\delta_H/\delta_C 3,7/12,4]$, C-17 $[\delta_H/\delta_C 4,4/55,0]$, C-17¹ $[\delta_H/\delta_C 2,4/29,7]$, C-17² $[\delta_H/\delta_C 2,7/31,8]$, C-18 $[\delta_H/\delta_C 4,3/49,2]$, C-18¹ $[\delta_H/\delta_C 1,7/23,8]$, C-20 $[\delta_H/\delta_C 8,5/95,0]$ e atribuir os valores dos deslocamentos químico dos carbonos quaternários (**Tabela 5**).

A substância **3** foi submetida a análise por CLAE que confirmou tratar-se de presença da porfirina através da observação do tempo de retenção em 13,929 min e dados da curva apresenta no UV. A curva de UV-visível apresentou λ_{\max} 408,09 nm entre outros sinais indicando absorções acima da escala impressa (**Figura 26**) revelando absorções compatíveis com porfirinas. Para a confirmação dos resultados obtidos no cromatograma do composto **3** (**Figura 25**) foi feita uma comparação dos seus tempo de retenção e das curvas de UV com dados obtidos na literatura (ECKARDT *et al.*, 1991).

O espectro de massas (**Figura 13**) com ionização por eletrospray com detecção em modo positivo, apresentou valores em m/z 859,5361, 843,5418 e 565,2438, que podem ser atribuídos aos íons $[M-H + H_2O]^+$, $[M+H]^+$ e $[M+H - \text{fitil}]^+$ dos quais os valores calculados para a estrutura proposta seriam, respectivamente, 859,5373, 843,5424 e 565,2451. O quadro abaixo apresenta esses valores e os cálculos necessários para verificar a validade da estrutura proposta. A diferença $M_{\text{calculada}} - M_{\text{observada}} = \Delta M$; fazendo $\Delta M / M_{\text{aproximada}} = \text{valor}$ que tomado em ppm representará a margem de erro da proposta, sendo que, para o caso de massa inferior a 1000 Da, deverá ser inferior a +/-5 ppm (SIUZDAK, 2006).

Quadro 1: Cálculos para confirmação da FM com valores de massas de alta resolução da substância **3**.

Ion	M_{obs}	FM _{proposta}	M_{calc}	DM	Erro $\times 10^{-6}$
$[M - H + H_2O]^+ (*)$	859,5361	$C_{53}H_{71}N_4O_6$	859,5373	0,0012	2,3
$[M + H]^+$	843,5418	$C_{53}H_{71}N_4O_5$	843,5424	0,0006	0,7
$[M + H - \text{fitil}]^+$	565,2438	$C_{33}H_{33}N_4O_5$	565,2451	0,0013	1,3

O espectro de massas com ionização por eletrospray do íon quase molecular de massa aproximada 843 (**Figura 13 e 14**) serviu para confirmar a proposta revelando o pico 565, entre outros, devido à perda da unidade fitila. Sobre a presença de outros picos nesse espectro (**Figura 13 e 14**) pode-se propor a formação de adição de H₂O (**Figura 13**) no anidrido e perda de H. O espectro massa-massa deste fragmento revela m/z 843 que dele há formação do pico 565,2451 da perda do fitila, como no pico anterior m/z 843 (**Figuras 13 e 14**), caso fosse

outra estrutura com incorporação de oxigênio não daria o pico da perda do fitila com valor 565 como representado no esquema abaixo (**Esquema 14 e 15**).

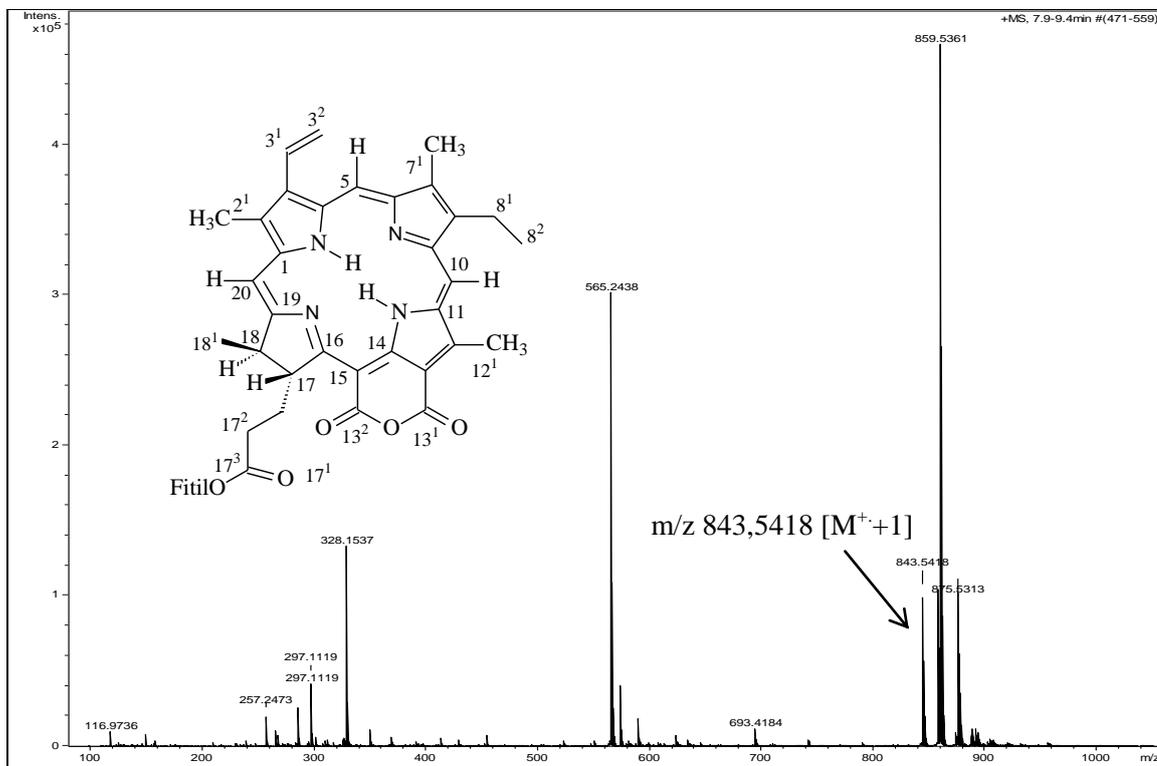


Figura 13: Espectro de massas por eletrospray com detecção em modo positivo da substância **3**.

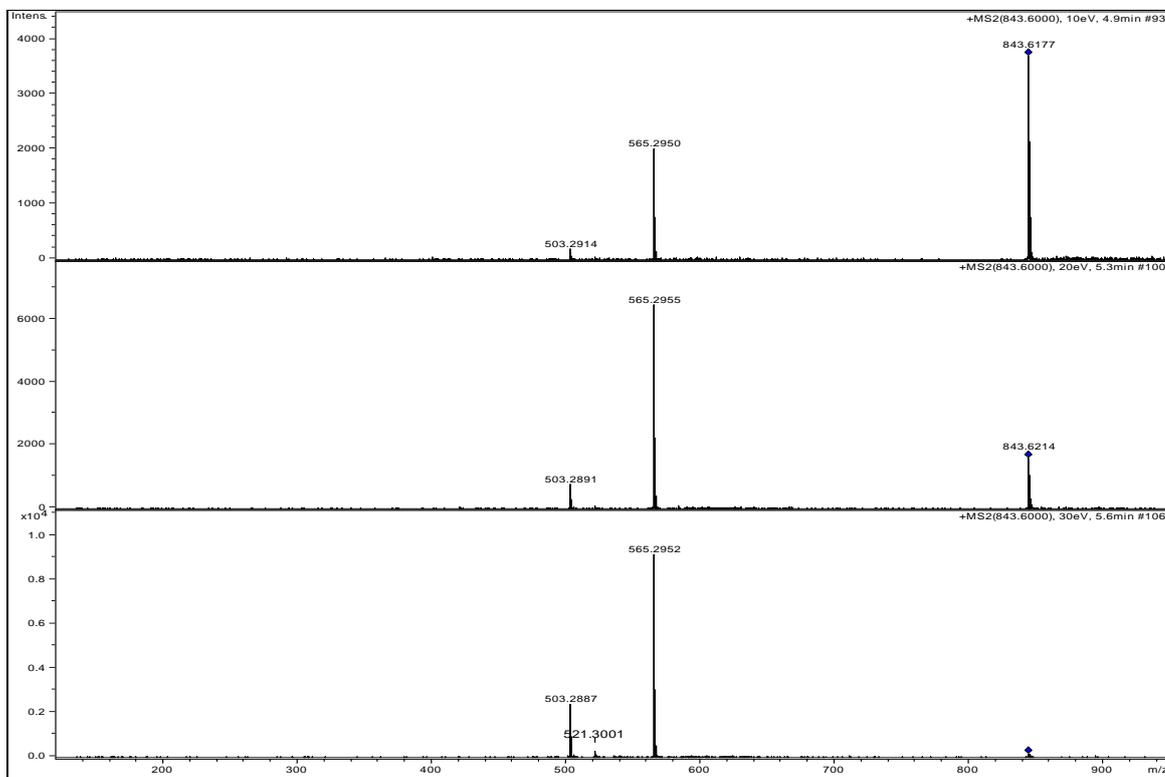
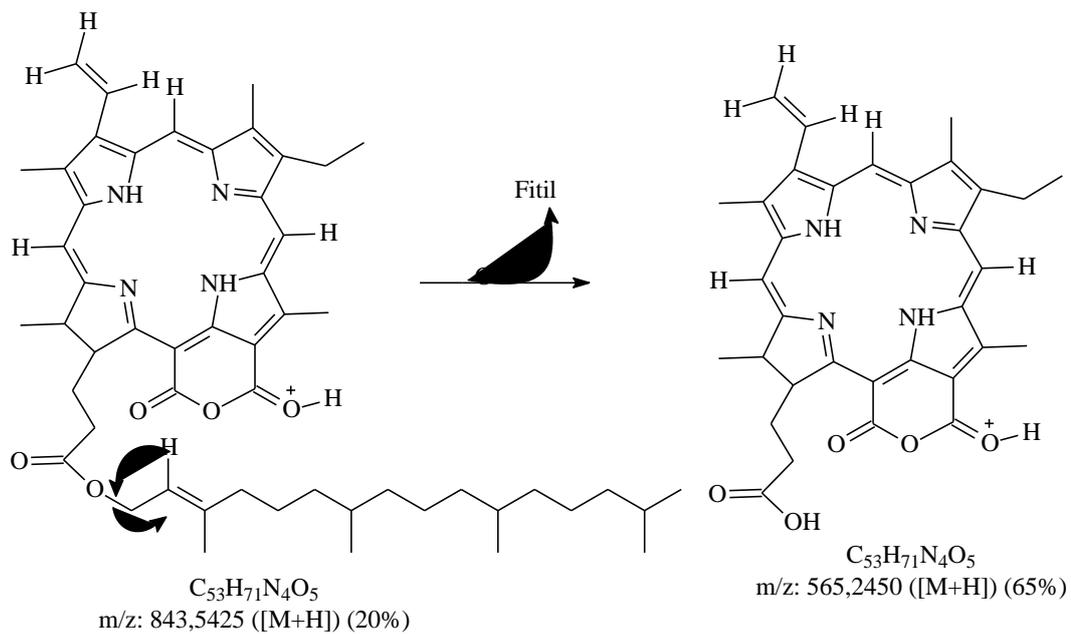
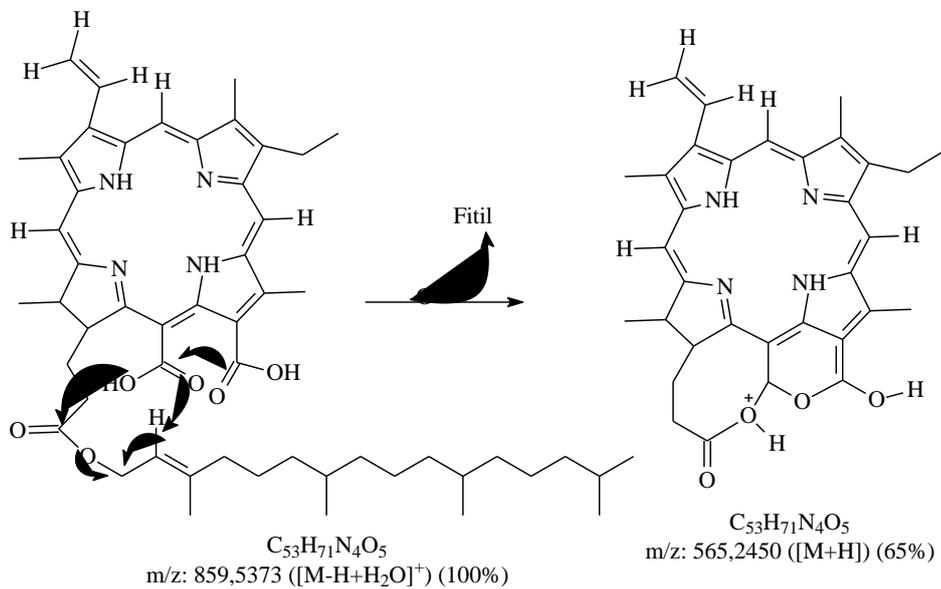


Figura 14: Espectro massa-massa do íon 843 de **3**.



Esquema 14: Proposta de fragmentação do íon m/z 843 de **3**.



Esquema 15. Proposta de fragmentação do íon m/z 859 de **3**.

O espectro massa-massa do íon de massa 565 (**Figura 15**) revela picos de outros fragmentos desta unidade (**Esquema 14**). Esses dados mostram que a FM proposta está correta para os valores de massas detectados no.

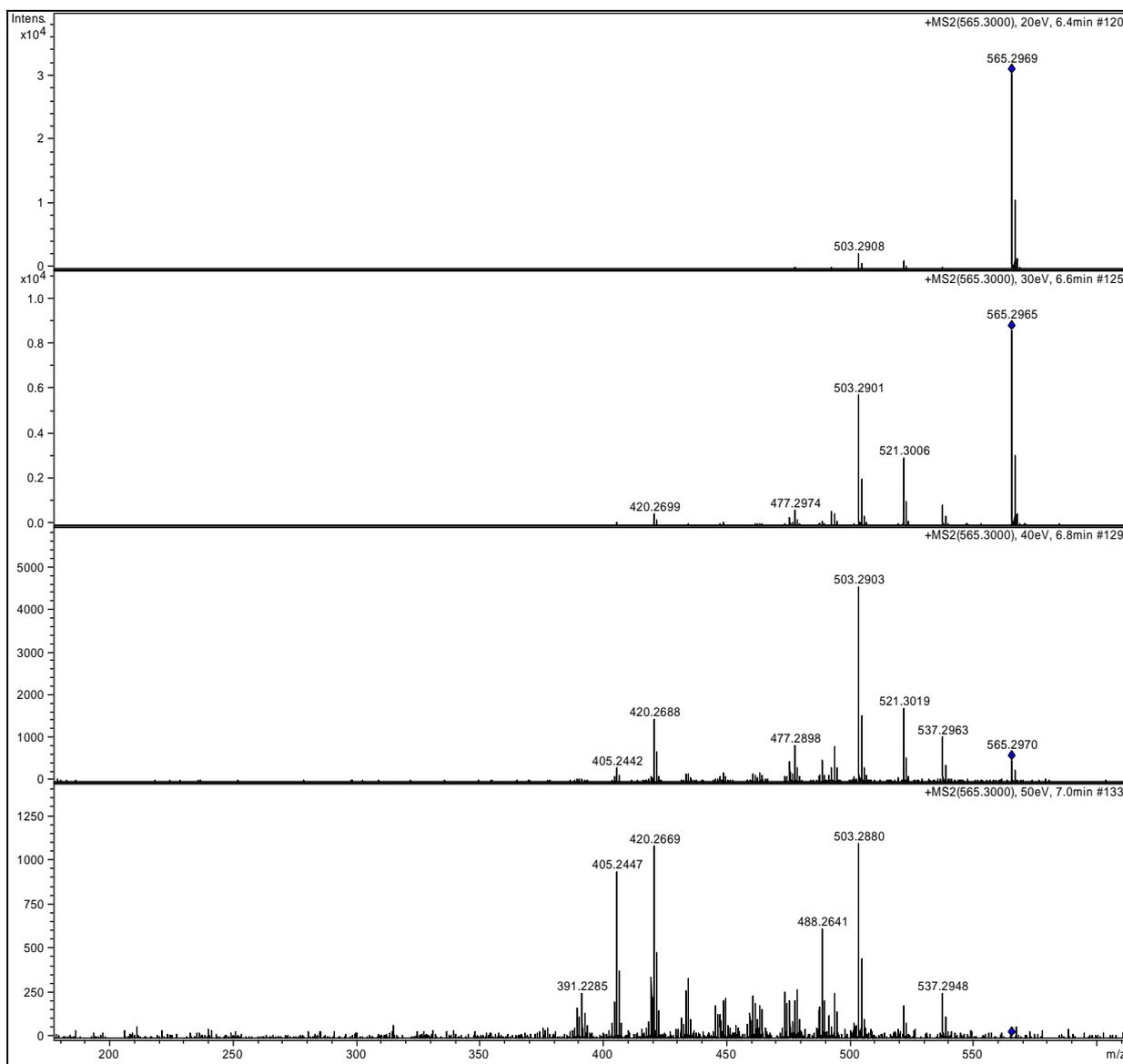
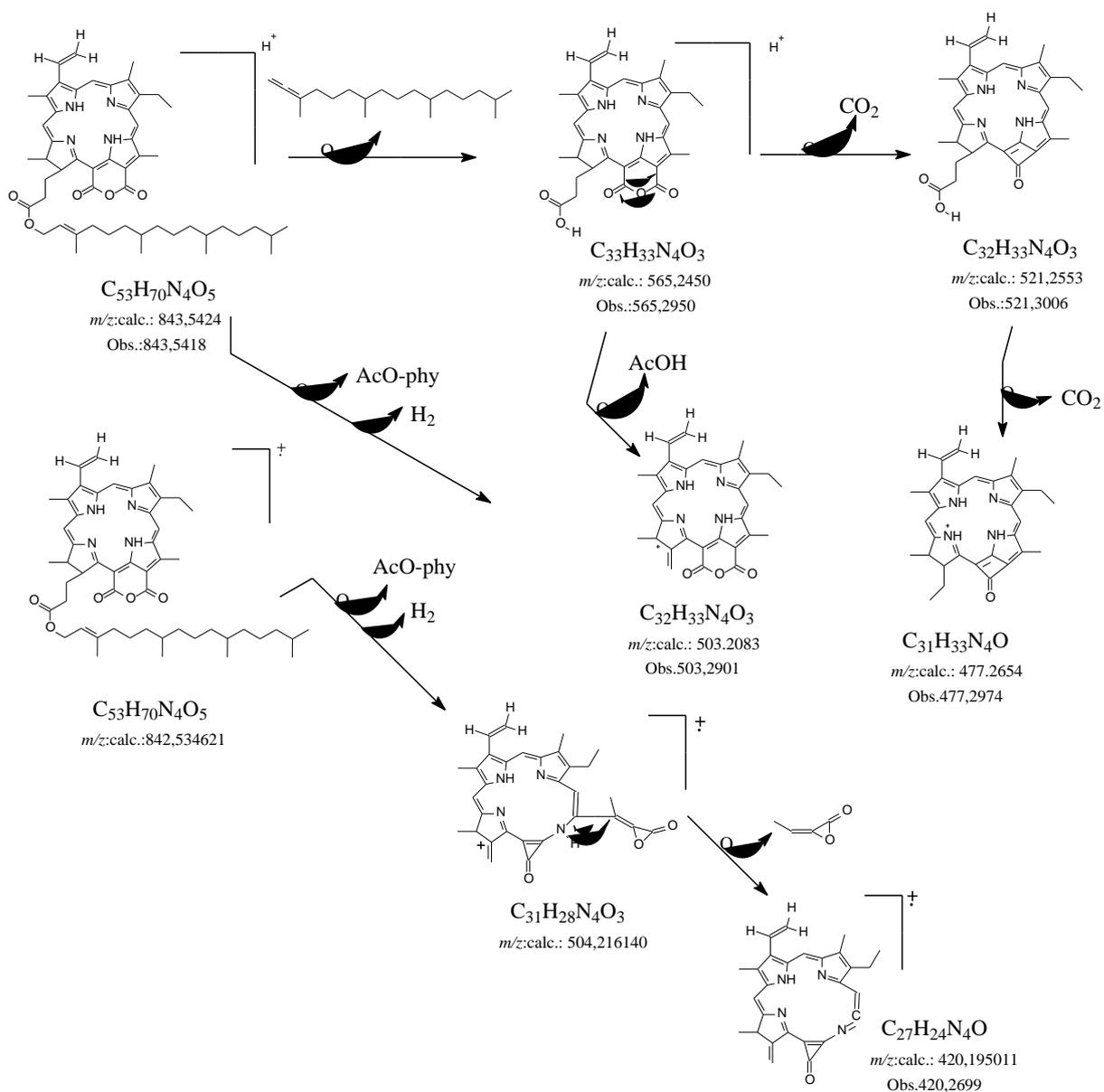


Figura 15: Espectro de massas-massa do íon m/z 565 substância 3.



Esquema 16: Proposta de fragmentação para formação de íon compatível com *m/z* 565 do espectro de massa-massa de **3**.

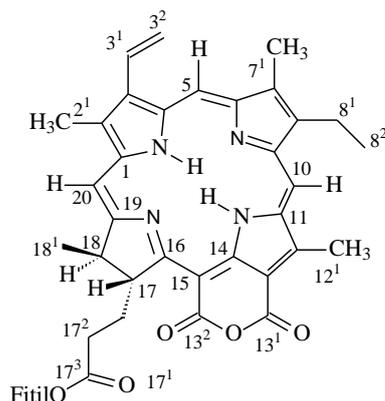
O espectro de 2D NOESY (**Figura 24**) mostrou interações espaciais entre H-17 e H-17¹ com H-18 e com H-17/ CH₃-18 e H-18/ H-18¹ permitindo propor a configuração relativa dos centros quirais como 17R,18R para a porfirina **3**. Foi possível definir a configuração absoluta desta porfirina que se encontra descrita no item II.3.1 do capítulo capítulo II. A porfirina etoxi-purpurin-18, semelhante à feofitina **3** foi isolada anteriormente por SILVA & CÂMARA (2010), porém este é o primeiro relato de dados espectroscópicos de RMN de ¹H e

^{13}C de 1D e 2D registrado na literatura. Outro dado relevante foi que esta substância esta sendo identificada pela primeira vez em Portulacaceae.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (400 e 500 MHz) e ^{13}C (100 e 125 MHz) de 1D e 2D da substância **3** em comparação com dados da literatura no qual as análises foram feitas em presença de clorofórmio (CDCl_3) (SILVA & CÂMARA, 2010, LIN *et al*, 2011 e BREITMAIER & VOLTER, 1978).

C	Composto 3			BREITMAIER & VOLTER, 1978	SILVA & CÂMARA, 2010 e LIN <i>et al</i> , 2011	
	HSQC ($^1J_{\text{HC}}$)		HMBC ($^{2,3}J$)		δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)				
1	144,1	-	$\text{CH}_3\text{-}2^1$	-	144,1	-
2	131,6	-	$\text{CH}_3\text{-}2^1$	-	131,8	-
2^1	11,9	3,33 (s)	-	-	11,9	3,32 (s)
3	137,8	-	$\text{H-}3^2, \text{H-}3^1, \text{CH}_3\text{-}2^1$	-	137,7	-
3^1	123,7	7,84 (dd, 18 e 12)	-	-	128,3	7,83 (dd, 18 e 11,6)
3^2	117,8	6,31 (d, 18 e 2) 6,19 (d, 12 e 2)	-	-	123,7	6,25 (dl, 18,0) 6,25 (dl, 11,6)
4	136,7	-	H-5	-	136,6	-
5	103,1	9,34 (s)	-	-	103,1	9,27 (s)
6	156,3	-	$\text{CH}_3\text{-}7^1$	-	156,3	-
7	136,7	-	$\text{CH}_3\text{-}7^1$	-	136,6	-
7^1	11,0	3,14 (s)	-	-	11,0	3,08 (s)
8	146,0	-	$\text{CH}_2\text{-}8^1, \text{CH}_3\text{-}8^2$	-	145,9	-
8^1	19,3	3,60 (q, 8)	$\text{CH}_3\text{-}8^2$	-	19,3	3,52 (m)
8^2	17,4	1,65 (t, 8)	$\text{CH}_2\text{-}8^1$	-	17,4	1,59 (t, 7,2)
9	150,1	-	-	-	150,1	-
10	107,7	9,56 (s)	-	-	107,6	9,44 (s)
11	131,6	-	$\text{CH}_3\text{-}12^1$	-	131,5	-
12	139,1	-	$\text{CH}_3\text{-}12^1$	-	139,1	-
12^1	12,4	3,76 (s)	-	-	12,3	3,68 (s)
13	111,7	-	$\text{CH}_3\text{-}12^1$	-	111,4	-
13^1	159,4	-	$\text{CH}_3\text{-}12^1$	-	159,4	-
13^2	164,1	-	-	-	164,8	-
14	140,0	-	-	-	139,9	-
15	93,2	-	-	-	92,6	-
16	177,6	-	-	-	177,6	-
17	55,0	4,43(dl)	$\text{CH}_3\text{-}18^1, \text{H-}17^1$	-	54,9	4,44 (dl)
17^1	29,7	2,43 (m)	H-18	-	30,6	2,43 (m)
17^2	31,8	2,70 (m)	H-17 1	-	30,8	2,66 (ddd, 15,3, 8,4, 5,8)
17^3	173,4	-	H-17 $^2, \text{H-}17^4$	-	172,0	-
17^4	61,5	4,49	H-17 5	-	61,0	-
17^5	117,8	5,18	-	118,0	-	5,20 (dl)
17^6	39,6	-	-	39,9	-	-
17^7	39,8	1,65 (t)	-	40,0	-	-

17 ⁸	25,0	1,24 (m)	-	25,0	-	-
17 ⁹	36,6	1,24 (m)	-	36,5	-	-
17 ¹⁰	32,7	1,24 (m)	-	32,5	-	-
17 ¹¹	37,4	1,24 (m)	-	37,0	-	-
17 ¹²	24,7	1,24 (m)	-	24,8	-	-
17 ¹³	37,3	1,24 (m)	-	37,2	-	-
17 ¹⁴	32,6	1,24 (m)	-	32,5	-	-
17 ¹⁵	37,6	1,24 (m)	-	37,0	-	-
17 ¹⁶	24,4	1,24 (m)	-	24,4	-	-
17 ¹⁷	39,1	1,24 (m)	-	39,5	-	-
17 ¹⁸	22,7	0,78 (s)	-	22,7	-	0,79 (s)
17 ¹⁹	27,9	0,84 (d, 8)	-	28,0	-	0,80 (d, 6,7)
17 ²⁰	16,3	1,60 (sl)	-	16,3	-	1,61 (sl)
17 ²¹	19,6	0,79 (d, 4)	-	19,7	-	0,77 (d, 6,7)
17 ²²	19,3	0,76 (d, 8)	-	19,6	-	0,77 (d, 6,7)
17 ²³	22,6	0,84 (d, 8)	-	22,8	-	0,80 (d, 6,7)
18	49,2	4,35 (dl)	CH ₃ -18 ¹	-	49,2	4,37 (dl)
18 ¹	23,8	1,73 (d, 8)	H-18	-	23,6	1,78 (d, 7,3)
19	176,6	-	CH ₃ -18 ¹	-	176,6	-
20	95,0	8,55 (s)	-	-	94,9	8,54 (s)



18 Mar 2010

Acquisition Time (sec)	7.9692	Comment	AMOSTRA: ED/C(35-43)P-1/P2-1 (PROTON)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Original Points Count	65536
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	65536
				Sweep Width (Hz)	8223.68

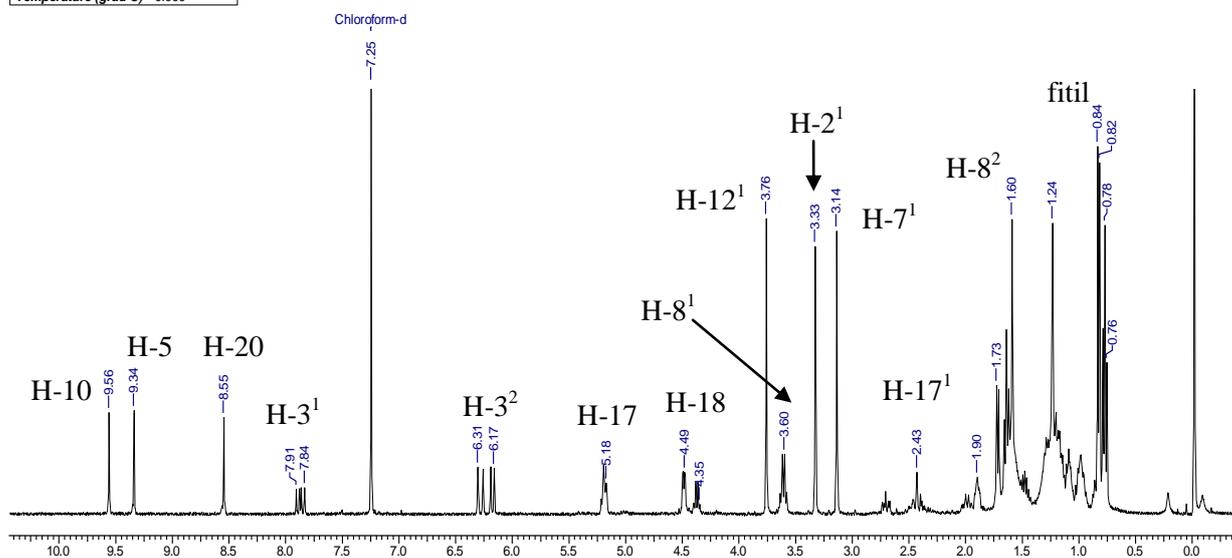


Figura 16: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **3**.

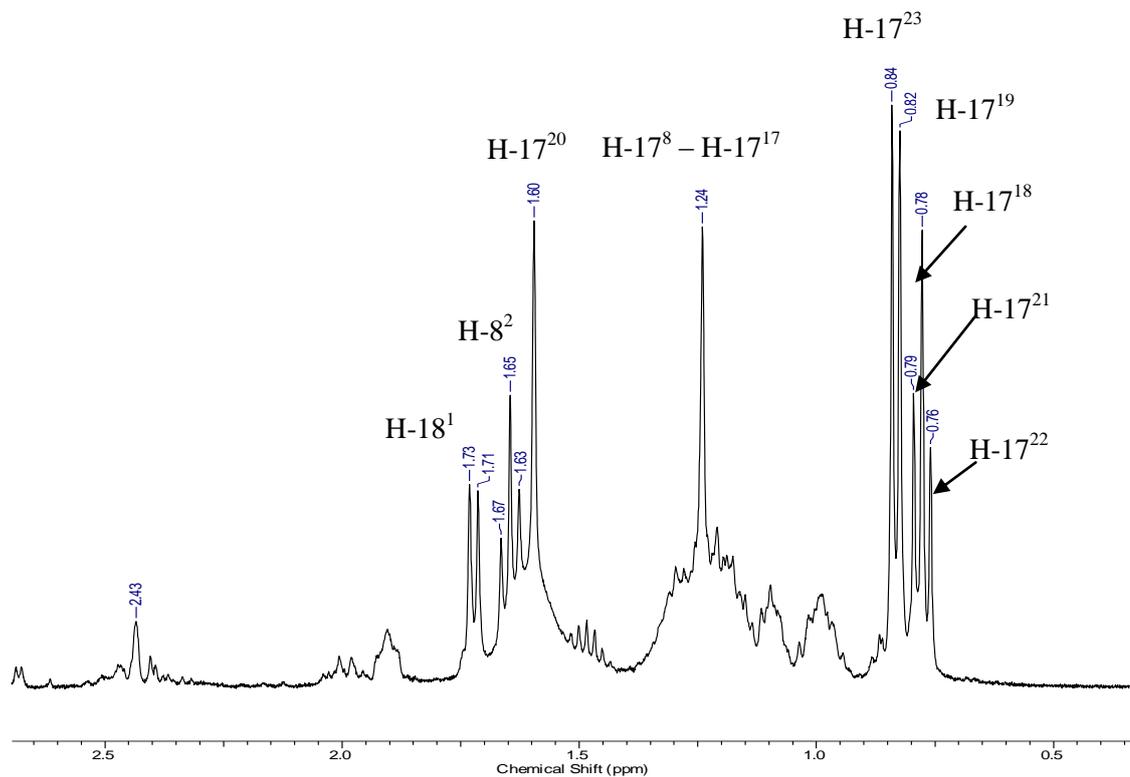


Figura 17: Expansão da região de deslocamento químico de δ_H 2,5-0,5 ppm (400 MHz, $CDCl_3$) da substância **3**.

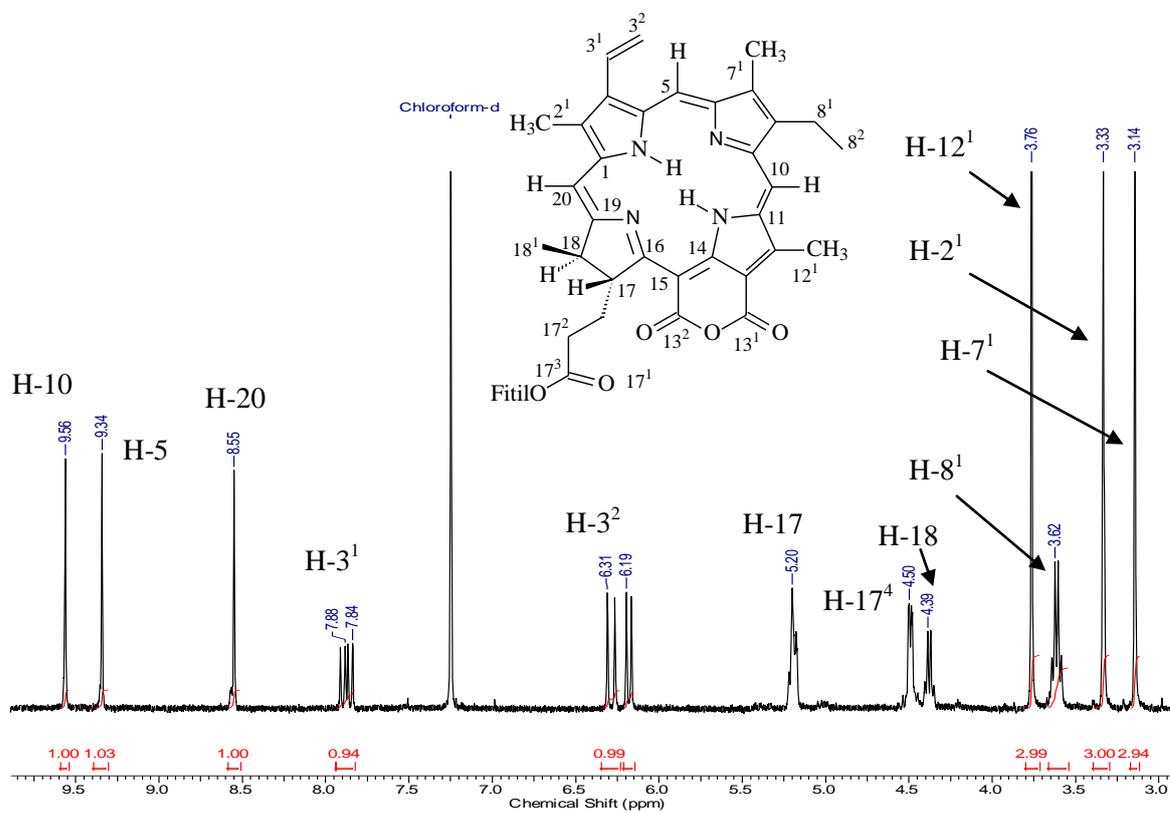


Figura 18: Expansão da região de deslocamento químico de δ_H 3,0-9,5ppm (400 MHz, $CDCl_3$) da substância **3**.

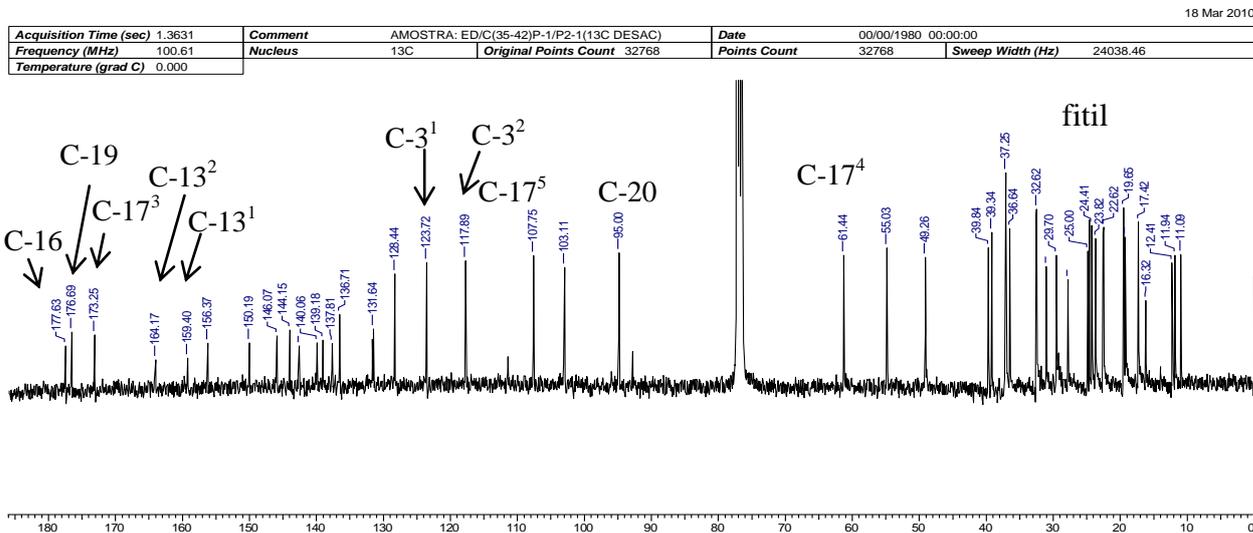


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da substância **3**.

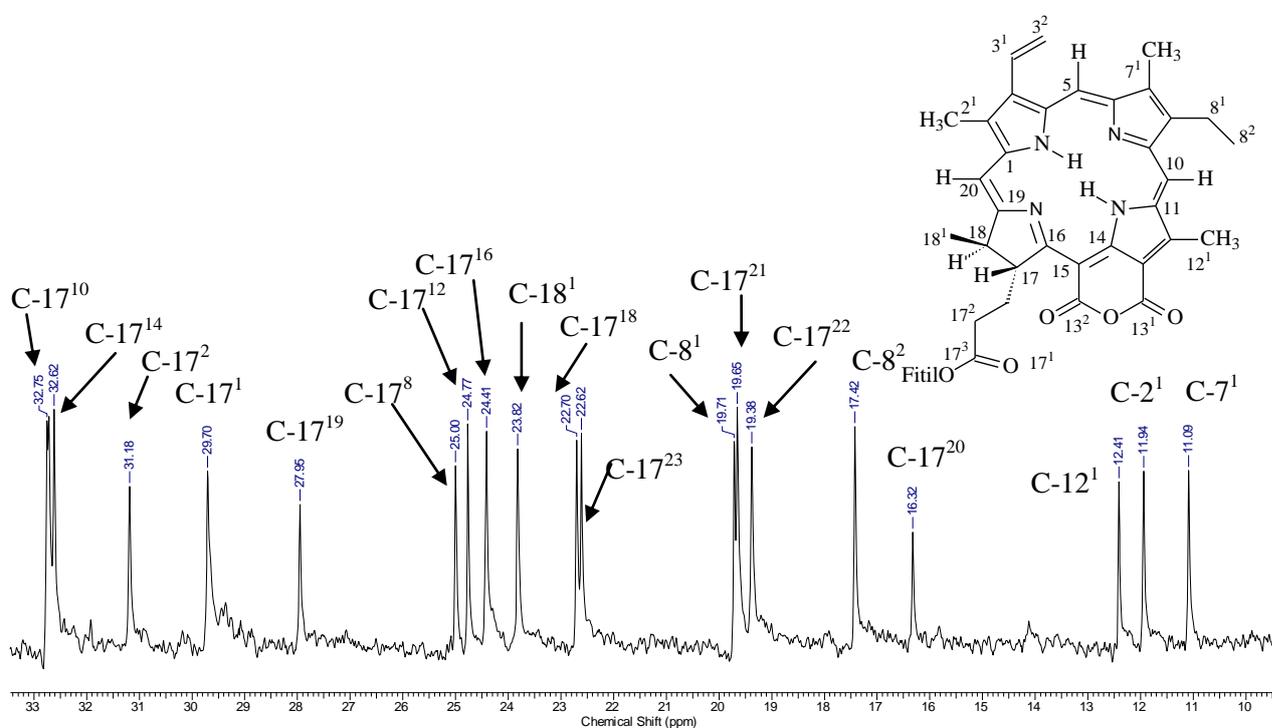


Figura 20: Expansão da região de deslocamento químico de δ_C 33 - 10 ppm do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da substância **3**.

Acquisition Time (sec)	(0.0614, 0.1917)	
Comment	AMOSTRA: ED/C(35-42)P-1/P2-1 (HSQC editado) OPERADOR: Vitor	
Date	10 Mar 2010 08:24:00	
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flavio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-400\173\pdata\1\2rr	
Frequency (MHz)	(100.61, 400.13)	Nucleus (13C, 1H)
Number of Transients	32	Original Points Count (1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence hsqcedetgp
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz) (16666.67, 5341.88)
Temperature (degree C)	27.000	

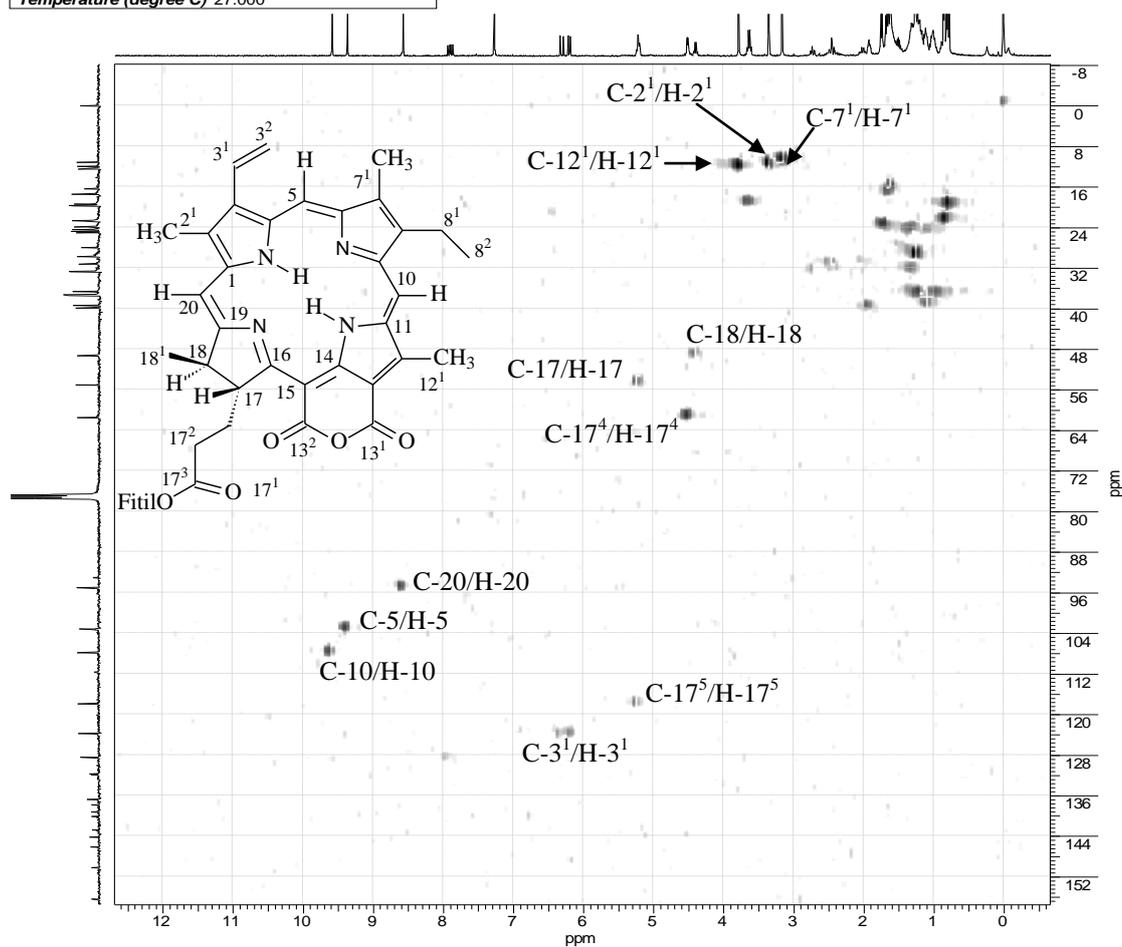


Figura 21: Mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl₃) da substância **3**.

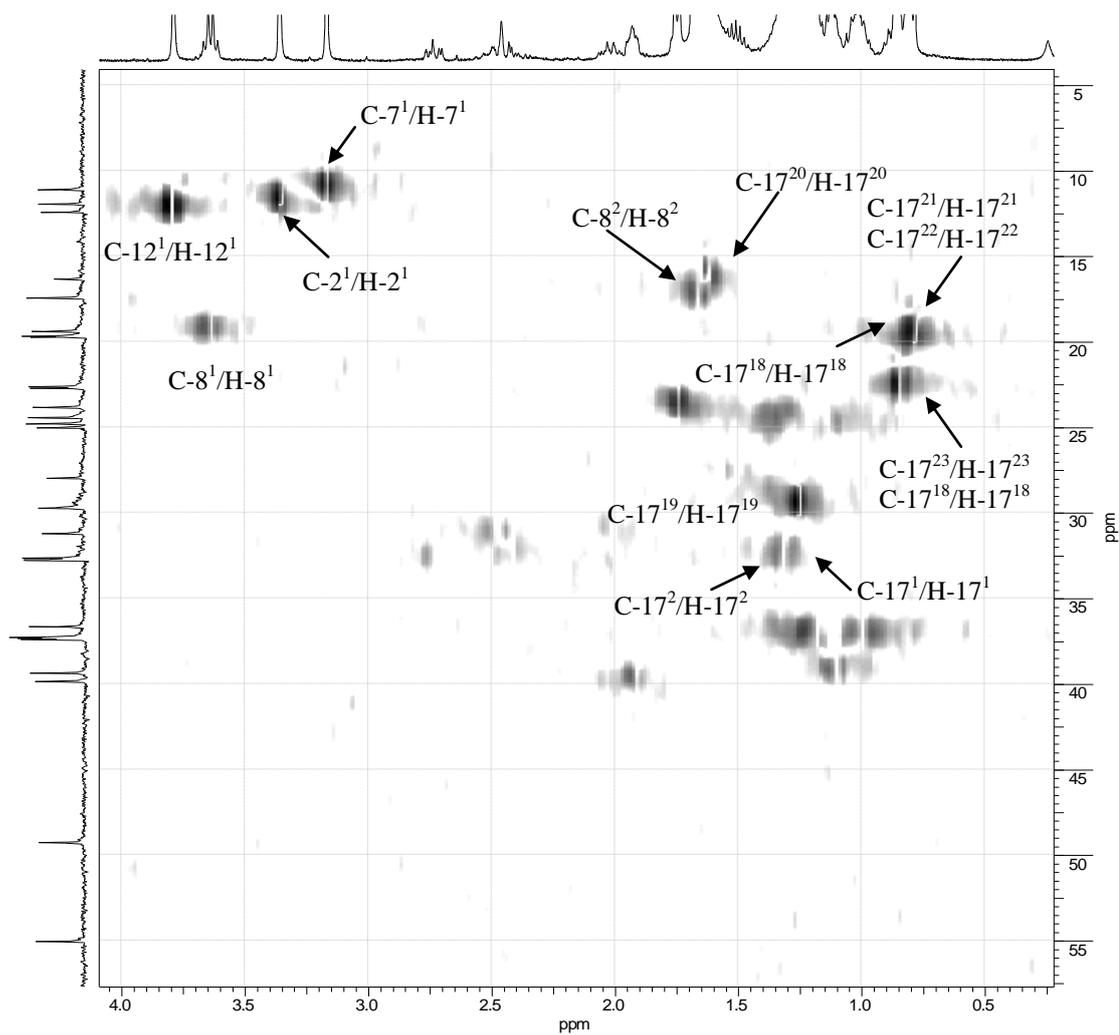
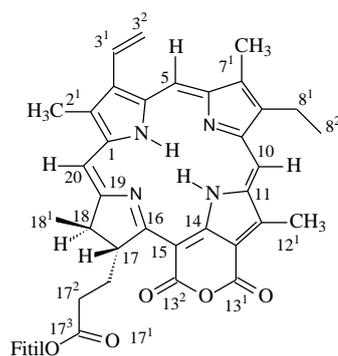


Figura 22: Expansão da região de 0,5-4,0 ppm do mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

Acquisition Time (sec)	(0.0442, 0.1704)	
Comment	AMOSTRA: ED/C(35-42)P-1/P2-1(HMBC com grad) OPERADOR: Vitor	
Date	10 Mar 2010 15:26:44	
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flavio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\RMNHC-400\184\data\12rr	
Frequency (MHz)	(100.61, 400.13)	Nucleus (13C, 1H)
Number of Transients	8	Original Points Count (1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence hmbcgpndqf
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz) (23143.48, 6009.62)
Temperature (degree C)	27.000	

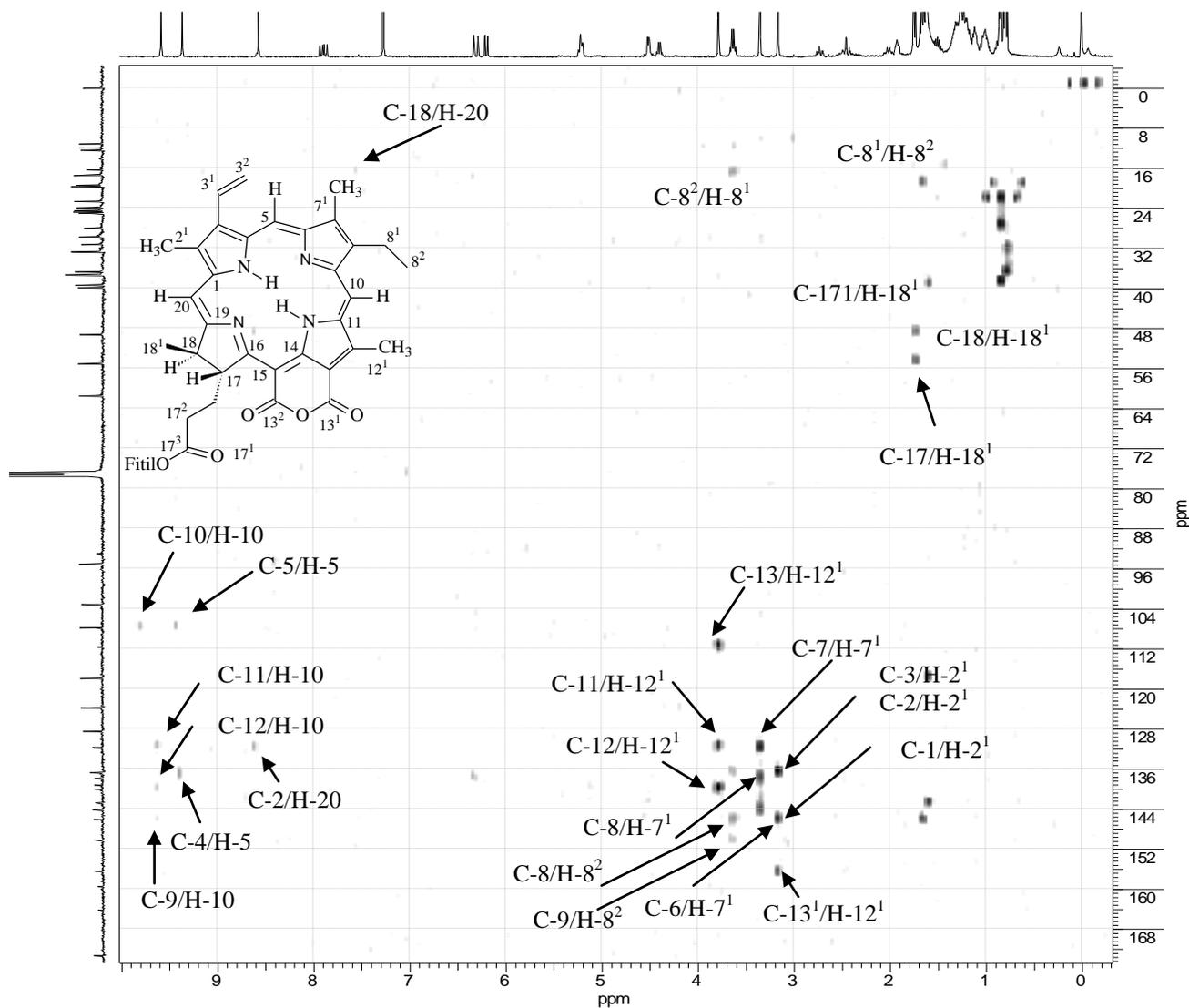
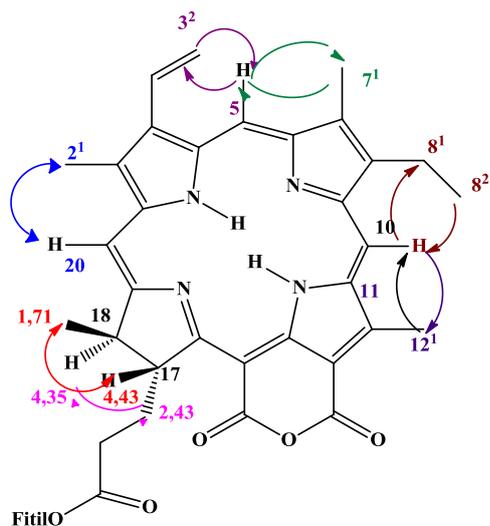


Figura 23: Mapa de contornos de HMBC (125 MHz, CDCl₃) da substância 3.



Acquisition Time (sec)	(0.1745, 0.1745)	Comment	amostra ED/C(35-42)P-1/P2-1 NOESY
Date	05 Apr 2011 18:37:18		
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500\90\pdata\1\2rr		
Frequency (MHz)	(500.13, 500.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	16	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	noesyph
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(5868.54, 5868.54)
Temperature (degree C)	24.960		

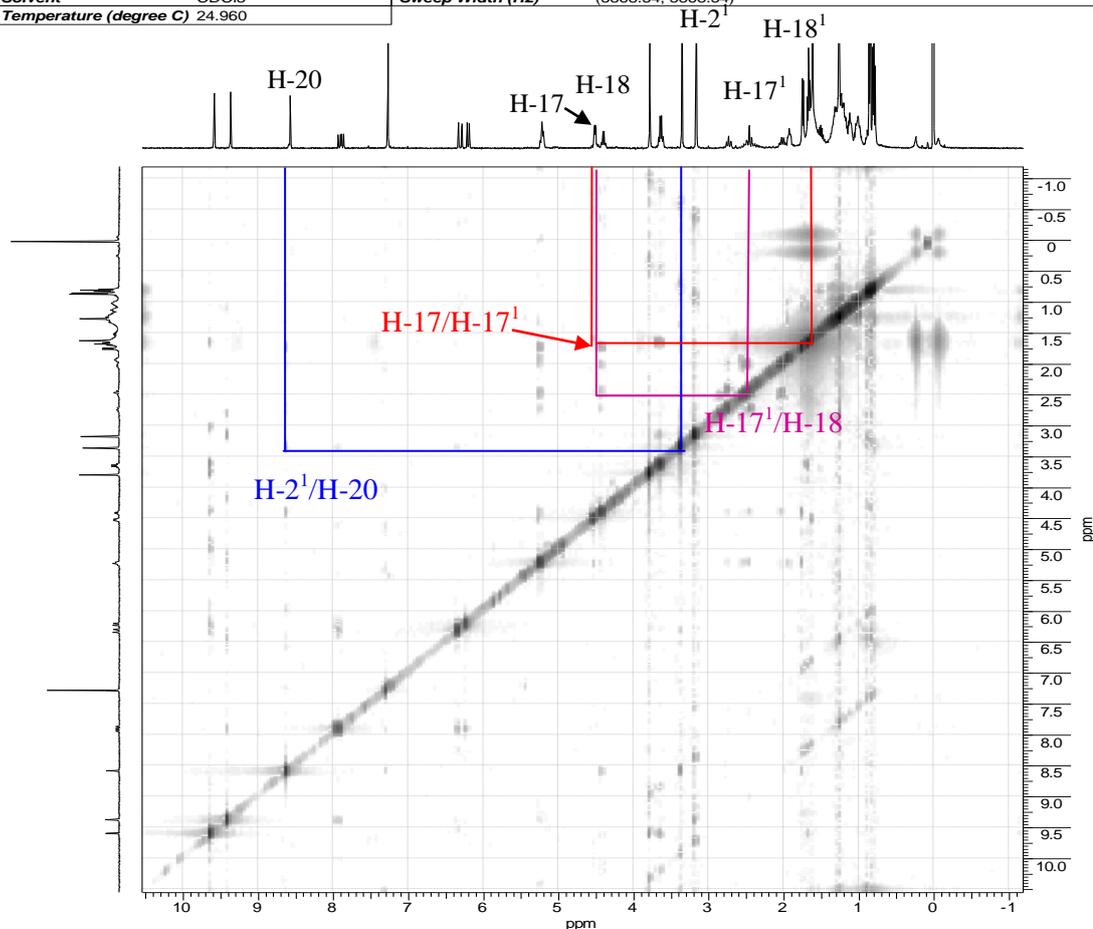


Figura 24: Espectro de NOESY (125 MHz, CDCl₃) da substância 3.

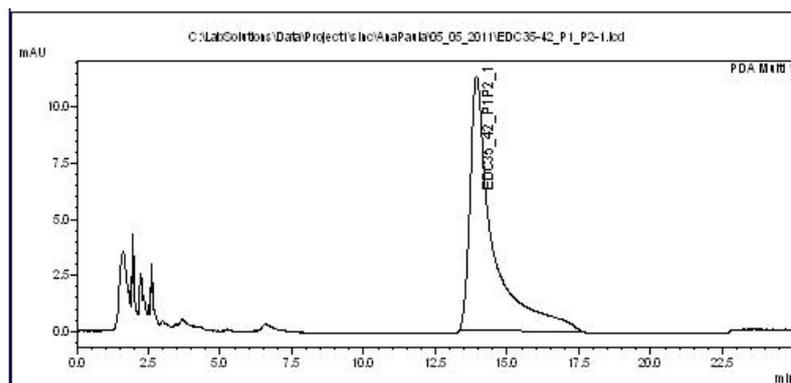


Figura 25: Cromatograma (CLAE-DAD) da substância **3**.

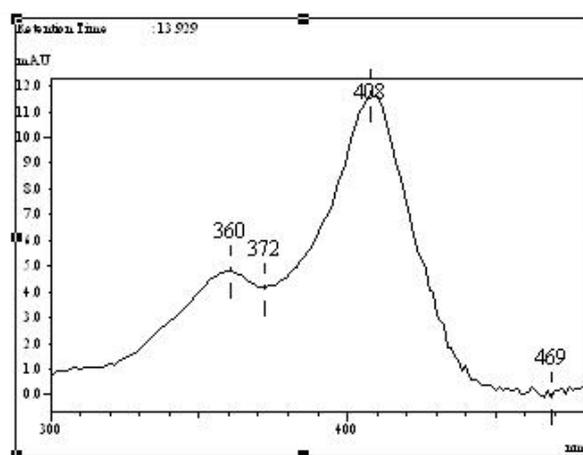


Figura 26: Curvas de UV da substância **3**.

I.3.2.4 Identificação da substância **4**

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da substância **4** (**Figuras 27 e 28**) mostrou sinais de deslocamentos químicos de hidrogênio e carbonos semelhantes aos observados para a feofitina **3**, 18-purpurinato de fitila. Havendo diferença nas absorções localizadas na região de frequência 3,14 – 5,30 no espectro de RMN ^1H , apresentando um singlete em δ_{H} 3,67 indicando um grupo metoxila de éster que pode ser localizado no C-13³ do anel pentacíclico, outro fator importante a ser considerado é deslocamento químico do hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel porfirínico em δ_{H} -1,65 ppm, este valor esta relacionado com um alto fator de proteção que o anel exerce sobre este hidrogênios no qual apresenta valores menores que zero na escala de deslocamento químico em ppm.

Esta proposta foi condizente com a presença de um carbono metínico com δ_{CH} em 64,7 e metílico em δ_{CH_3} 52,9 ppm, além de outros valores detectados no espectro de RMN ^{13}C

compatíveis com uma cetona pentacíclica, e um grupo carboximetílico [δ_c 189,6 (C=O), 172,9 (O-C=O), 64,7 (CH) e 52,9 (OCH₃)] representando, respectivamente, os carbonos C-13¹, C-13³, C-13², C-13⁴. A **Tabela 6** apresenta os deslocamentos químicos detalhados de RMN ¹H e de ¹³C semelhantes às propostas na literatura (MATSUO *et al.*, 1996, SILVA *et al.*, 2006 e TOMAZ *et al.*, 2007). Esta estrutura proposta para **4** corresponde a 17³-O-fítíl-13²-formiato de metila, conhecida como **feofitina a**, (ECKARDT *et al.*, 1991).

A análise desta amostra com espectrometria de massas de alta resolução permitiu confirmar a proposta do heterociclo e do tamanho da cadeia fitilica. Fez-se comparação dos dados com valores apresentados na literatura para esta substância (ECKARDT *et al.*, 1991). O espectro de massas (**Figura 29**) apresentou os picos com os valores compatíveis com a estrutura, além do íon molecular observado em m/z 871,5737 [M+H]⁺ (calc. 871,573747) referente a fórmula molecular C₅₅H₇₄N₄O₅ m/z 870,5659 [M⁺], para a estrutura **4**, chamada feofitina *a*. Assim como aconteceu com a substância 3, no espectro de massas apareceu o pico em 887,5684 que pode ser atribuído à perda de H e formação de aduto com H₂O (**Esquema 17**). Os mesmos cálculos feitos no caso de 3 serviram para confirmar a estrutura proposta para 4.

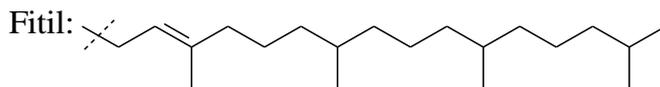
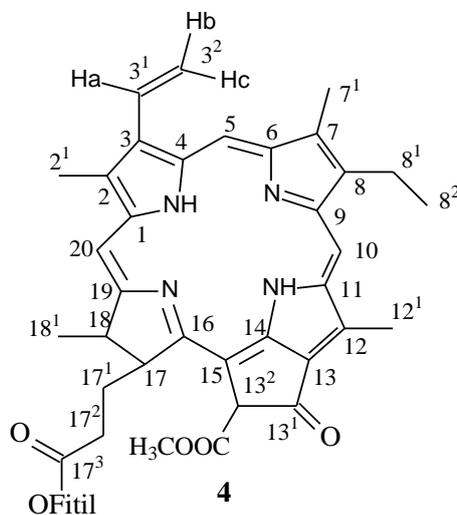


Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), da substância **4** em comparação com dados da literatura realizadas as análises em clorofórmio (CDCl_3) (MATSUO *et al.*, 1996, SILVA *et al.*, 2006, TOMAZ *et al.*, 2007).

C	Substância 4		TOMAZ <i>et al.</i> , 2007 SILVA <i>et al.</i> , 2006	
	HSQC ($^1J_{\text{HC}}$)		HSQC ($^1J_{\text{HC}}$)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)
1	142,1	-	142,3	-
2	132,0	-	131,1	-
2 ¹	12,1	3,39 (s)	12,2	3,37 (s)
3	136,4	-	136,8	-
3 ¹	129,0	7,96 (dd 18 e 12)	129,1	7,93 (dd, 17,8 e 11,6)
3 ²	123,0	6,15 (dd, 12 e 2) 6,26 (dd, 18 e 2)	123,1	6,14 (dd, 11,6 e 1,6) 6,24 (dd, 17,8 e 1,6)
4	136,6	-	136,5	-
5	97,5	9,49 (s)	97,6	9,35 (s)
6	155,5	-	155,5	-
7	136,4	-	136,1	-
7 ¹	11,2	3,20 (s)	11,3	3,19 (s)
8	145,1	-	145,2	-
8 ¹	19,4	3,66 (q, 8)	19,6	3,64 (m)
8 ²	17,4	1,81 (t, 8)	17,5	1,65 (t)
9	149,9	-	150,9	-
10	104,4	9,49 (s)	104,5	9,51 (s)
11	137,9	-	138,1	-
12	129,0	-	129,0	-
12 ¹	12,2	3,88 (s)	12,3	3,69 (s)
13	129,0	-	129,1	-
13 ¹	189,6	-	189,8	-
13 ²	64,7	6,26 (s)	64,9	6,30 (s)
13 ³	172,9	-	172,9	-
13 ⁴	52,9	3,67 (s)	52,8	3,87 (s)
14	149,1	-	149,5	-
15	104,9	-	105,1	-
16	161,1	-	161,1	-
17	51,2	4,21 (m)	51,0	4,19 (m)
17 ¹	29,7	-	29,8	-
17 ²	31,2	-	31,4	-
17 ³	172,4	-	172,1	-
17 ⁴	61,5	4,50 (m)	60,4	4,53 (d, 7,2)
17 ⁵	117,7	5,12 (m)	118,0	5,20 (t, 7,2)
18	50,2	4,44 (m)	50,3	4,34 (m)
18 ¹	22,7	1,68 (d, 8)	23,8	1,84 (d, 7,2)
19	169,5	-	169,6	-
20	97,5	8,54 (s)	93,7	8,63 (s)
NH	-	-1,65 (sl)	-	-

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: CD(21-29)18 (PROTON)	Date	08 Nov 2010 15:35:12
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\RMNHC-500_018001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.260

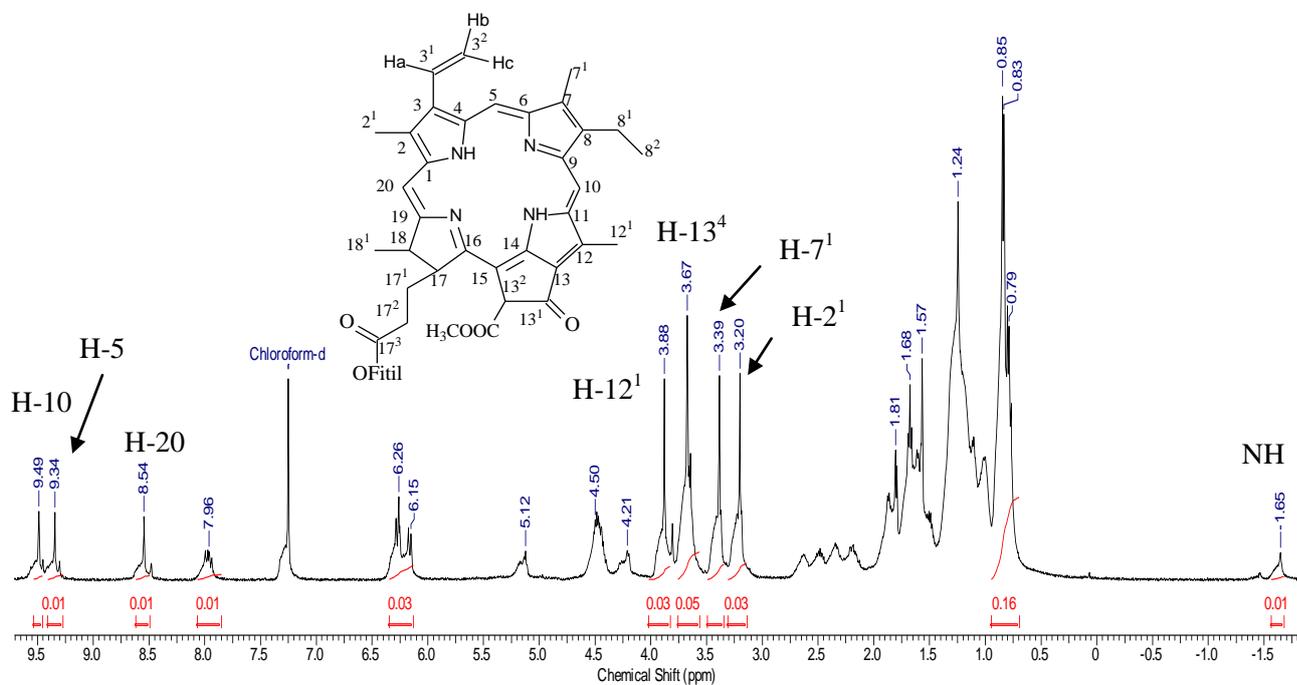


Figura 27: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 4.

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: cd(21-29)18 - DEPTQ - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	Date	06 May 2011 09:47:50
File Name	D:\Meus documentos\Ana Paula\UFRRJ\RMN500_103001r			Frequency (MHz)	125.76
Number of Transients	20480	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)	21.760
				Pulse Sequence	deptqgppsp

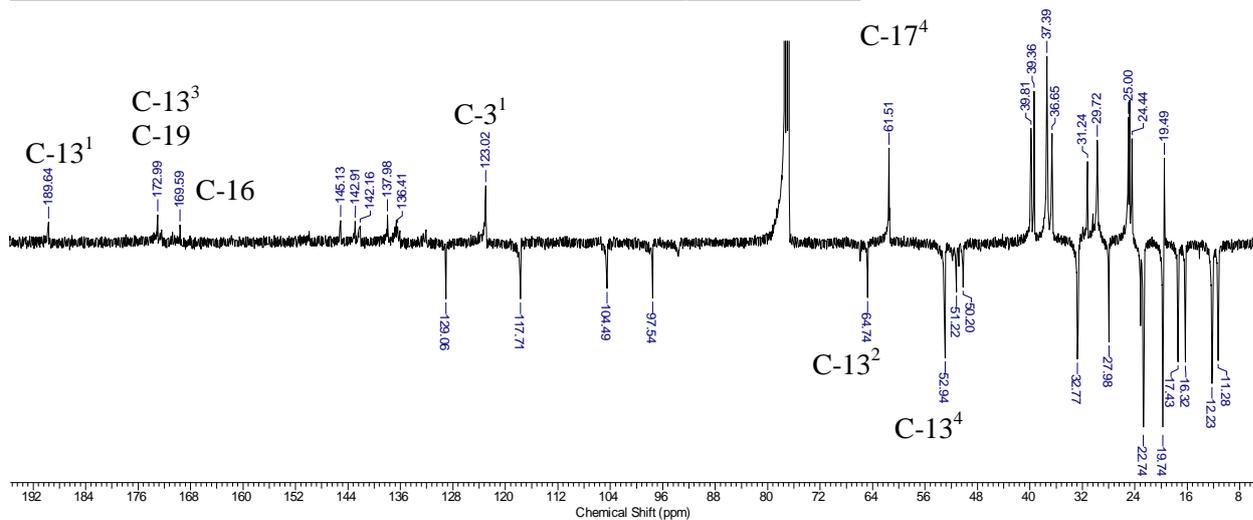
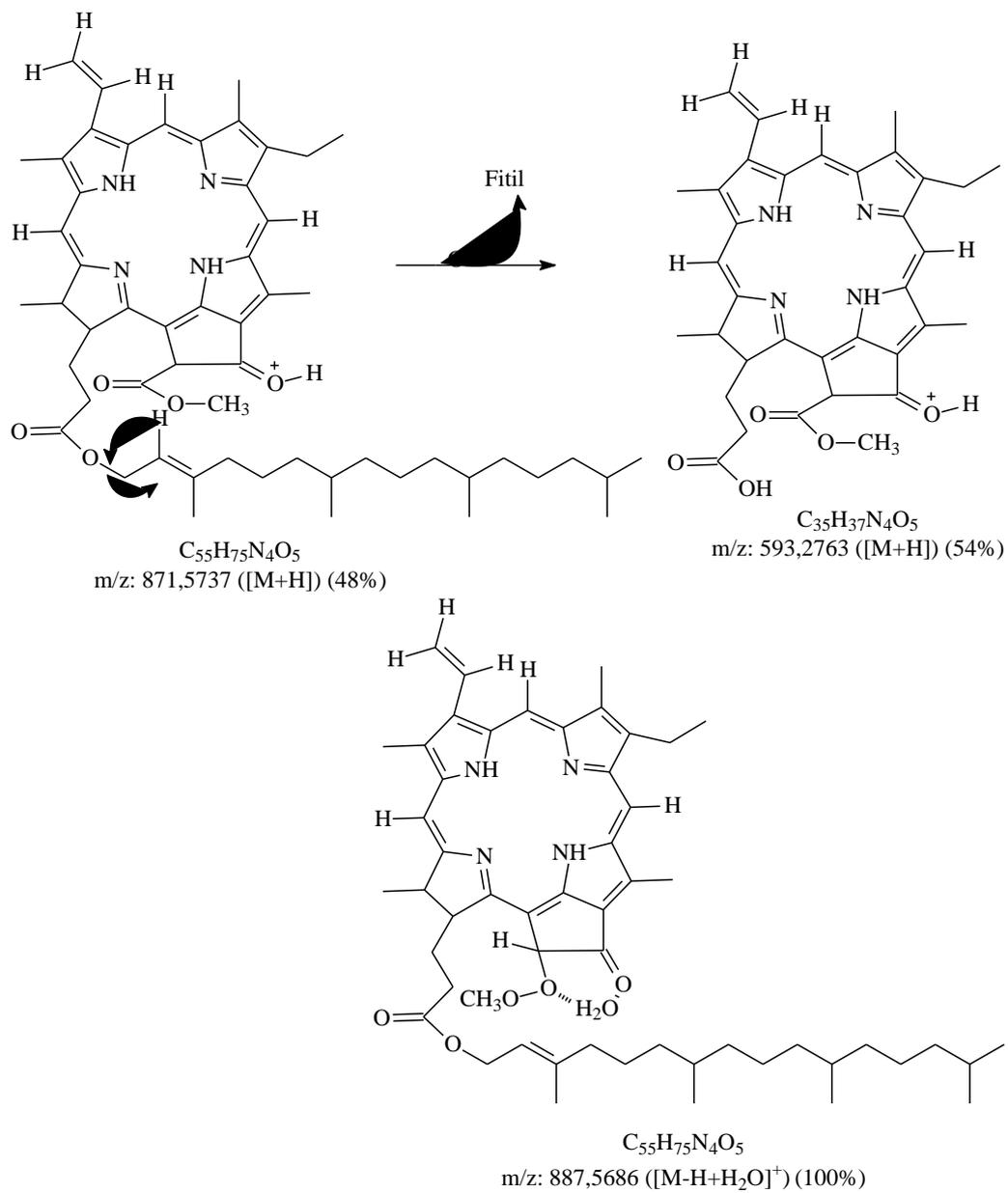


Figura 28: Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) da substância 4.



Esquema 17: Proposta de fragmentação para formação de íon compatível com m/z 871 de 4.

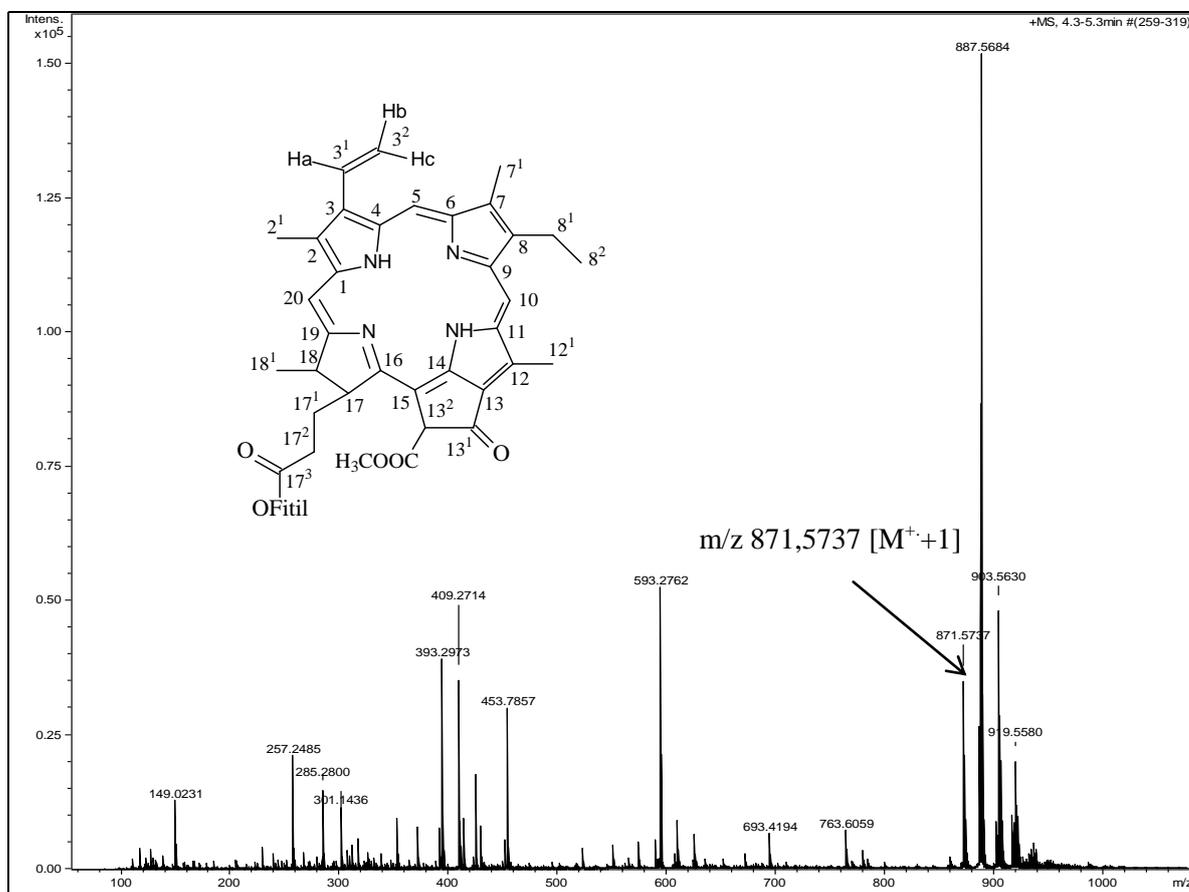


Figura 29: Espectro de massas da substância **4**.

I.3.2.5 Identificação das substâncias **5**, **6** e **7**.

As feofitinas **5**, **6** e **7** foram identificadas através da análise detalhada dos espectros de 1D e 2D de RMN de ¹H e ¹³C, aliadas aos dados detectados no espectro de massas da mistura e nos dados de e HPLC-UV. Os espectros de RMN apresentaram sinais compatíveis com mistura de feofitinas, não só pelos sinais das metilas, há vários sinais de hidrogênios do sistema heterocíclico desta classe de substâncias. Isto pode ser confirmado através de comparação com dados das feofitina **3** (18-purpurinato de fitila) e **4** (feofitina a). Esta dedução foi, também, confirmada com os picos detectados no espectro de massas (**Figura 42**) e ainda com os tempos de retenção obtidos na análise com CLAE que foram correlacionados a componentes identificados nas curvas de UV (**Figura 43**). Todas estas observações mostram dados compatíveis com feofitinas.

Para propor estruturas para essas porfirinas fizeram-se correlações dos valores de massas de íons quase moleculares com os valores de MM resultantes da incorporação de grupos funcionais detectados compatíveis com sinais observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e assim podendo chegar a valores calculados compatíveis com os respectivos valores dos m/z observados. O quadro abaixo mostra os valores observados e calculados e a margem de erro relativo (Δ ppm) das propostas, das quais estão dentro da faixa aceitável pelos editores de revistas científicas, como, por exemplo, pelo JACS esta faixa é +/- 5 ppm. Este valor é tirado da relação $\Delta M/M_{\text{aprox}}$, onde $\Delta M = m/z_{\text{calculado}} - m/z_{\text{observado}}$ e $M =$ massa de baixa resolução. Ex. para **5**: $887,5687 - 887,5675 = 0,0012$; $0,0012 / 887 = 1,35 \times 10^{-6}$, ou seja 1,35 ppm (SIUZDAK, 2006).

Quadro 2: Correlação de valores de massas para as propostas de **5**, **6** e **7**.

m/z Observado (estrutura)	FM do Íon proposto [M+H] ⁺	Grupos funcionais	MM Calculada	Erro relativo ppm
887,5675 (5)	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₆	HO/C=O/CO ₂ Me	887,5687	1,35
903,5679 (6)	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₇	HO/O-C=O/ CO ₂ Me	903,5636	1,88
919,5574 (7)	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₈	HOO/ O-C=O/ CO ₂ Me ou H ₃ COO/ O-C=O/ CO ₂ H	919,5585	1,19

As diferenças significativas entre as feofitinas identificadas neste trabalho estão diretamente relacionada aos centros envolvidos nos grupos funcionais identificados no carbono-7¹, podendo ainda existir mudanças no anel pentacíclico para anel hexacíclico, envolvendo grupos funcionais que podem estar diretamente ligadas ao anel V ou ainda estar envolvido na formação de anel hexacíclico. Estas mudanças podem ser observadas em várias feofitinas que estão descritas na literatura.

Para a identificação da substância **5** foram observados sinais característicos de um anel pentacíclico e de deslocamentos químicos de hidrogênio localizados na região de frequência 3,14 – 5,30 no espectro de RMN de ^1H e ainda sinais que revelou valores de cetona conjugada compatíveis com em anel de cinco membros dos quais puderam ser encontrados também no espectro de RMN de ^{13}C , confirmando através de comparação com dados da literatura de se tratar de um derivado de uma feofetina *a* (MATSUO *et al.*, 1996, JERZ *et al.*, 2007 e LIN *et al.*, 2011). No espectro de RMN de ^1H foi observado um singlete em δ_{H} 3,61, que justificou a presença de uma metila de um grupo carbometoxi ligado ao carbono C-13² do anel pentacíclico, um singlete largo em δ_{H} 5,55 ppm de uma hidroxila ligada ao carbono

quaternário C-13² e ainda outros valores em δ_H 3,22, 3,41 e 3,72 ppm e δ_H 8,63, 9,43 e 9,58 ppm que indicou um sistema compatível com feofinas.

O espectro de RMN de ¹³C mostrou sinais de deslocamentos químicos de cetona conjugada em anel de cinco membros em δ_C 192,2 ppm (C=O), uma carboxila δ_C 173,0 ppm (OC=O), uma metoxila em δ_{CH_3} 53,6 ppm (-CO₂-CH₃) e um carbono quaternário em δ_C 89,0 ppm (C13²-OH). Os valores atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-13¹, C-13³, C-13⁴, C-13² foram comparados com os da literatura (MATSUO *et al.*, 1996, SCHWIKKARD *et al.*, 1998, JERZ *et al.*, 2007 e LIN *et al.*, 2011)(**Tabela 7**), e permitiu identificar a estrutura de **5** como 13²-hidroxi-feofitina *a*.

De forma semelhante foram feitas as propostas para as substâncias **6** e **7**, no qual o espectro de RMN de ¹H apresentou para substância **6** singletos próximos ao deslocamento químico em δ_H 3,60, sendo um deles em δ_H 3,61 ppm que indicou ser uma carbometoxi ligada ao carbono C-15³ e ainda um singlete em δ_H 5,55 ppm correlacionado a hidroxila ligada ao carbono 15¹. A proposta foi confirmada pelos sinais apresentados no espectro de RMN ¹³C que se observou os deslocamentos químicos em δ_C 172,6 ppm para carbonila de éster C-15², um sinal de lactona conjugada em δ_C 162,7 ppm para C-13¹ e um carbono quaternário em δ_C 107,9 ppm para C-15¹. Para a substância **7** foi observado no espectro de RMN de ¹H um singlete largo em δ_H 4,15 (CH₃O₂) que foi representado com grupamento metilperóxido ligado ao carbono C-15¹ do anel porfirinico V e ainda deslocamentos químicos no espectro de RMN de ¹³C em δ_C 170,5 ppm para carbonila de ácido C-15², um sinal de lactona conjugada em δ_C 162,7 ppm para C-13¹ e um carbono quaternário δ_C 118,0 para C-15¹ justificando a proposta para as substâncias **6** e **7**, respectivamente, no qual cuja comparação com dados da literatura das análises espectroscópicas foram realizadas em clorofórmio (CDCl₃) (MATSUO *et al.*, 1996, SCHWIKKARD *et al.*, 1998, JERZ *et al.*, 2007 e LIN *et al.*, 2011) e permitiu identificar a estrutura **6** como 15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina *a* e a proposta para **7** corresponde a uma nova feofitina caracterizada como 15¹-metilperóxido-15¹-carbohidroxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina *a*.

A análise detalhada dos espectros de HSQC (**Figura 36**) e HMBC (**Figura 37 e 40**) permitiu fazer a completa atribuição dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio para a mistura dos constituintes **5**, **6** e **7** encontrados nesta fração (**Tabela 7**).

As diferenças de 16 u observadas nos espectros de massas (**Quadro 2, Figura 41**) justificam as propostas para **6** e **7** com os grupos ligados no C-15¹, sendo um formiato de

metila e um grupo hidroxila ligado no carbono C-15¹ para **6**, e o um formiato de metila e o grupo metilperóxido para **7**.

O espectro de 2D de NOESY (**Figuras 39 e 40**) revelou sinais de interação espacial entre os hidrogênios H-17/H-18 e H-17¹/H-18 para a mistura das substâncias **5**, **6** e **7**. Foi possível observar a ausência de sinal da hidroxila OH-13² com H-17² dos centros quirais para **5**, permitindo propor a configuração relativa sendo *Rel.* 17R,18R,13²R. As substâncias **6** e **7** não foram observados interações espacial da metoxila CH₃O-15⁴ e o metil peróxido CH₃OO-15⁴ sendo a configuração então para **6** e **7** a configuração *Rel.* 17R,18R,15¹R. Discussões adicionais sobre a estereoquímica absoluta dessas feofitinas estão descritas no II.3.1 do capítulo II.

Os picos representando os componentes na mistura na análise com CLAE com tempos de retenção 3,97, 4,32, 6,08 e 6,45 minutos (**Figura 42**) justificam as proposta para os valores de massas detectados no espectro, sendo que um não foi considerado na análise podendo ser um componente com m/z em 935 com um oxigênio a mais para o pico de menor intensidade em 4,327.

O espectro de UV-visível (**Figura 43**) mostrou λ_{max} 409, 410, 402 e 402 nm, para os respectivos tempos de retenção na ordem citada acima, valores que são compatíveis para as feofitinas propostas, conforme revelados pela literatura em análise realizada em clorofórmio (CDCl₃) (ECKARDT *et al.*, 1991).

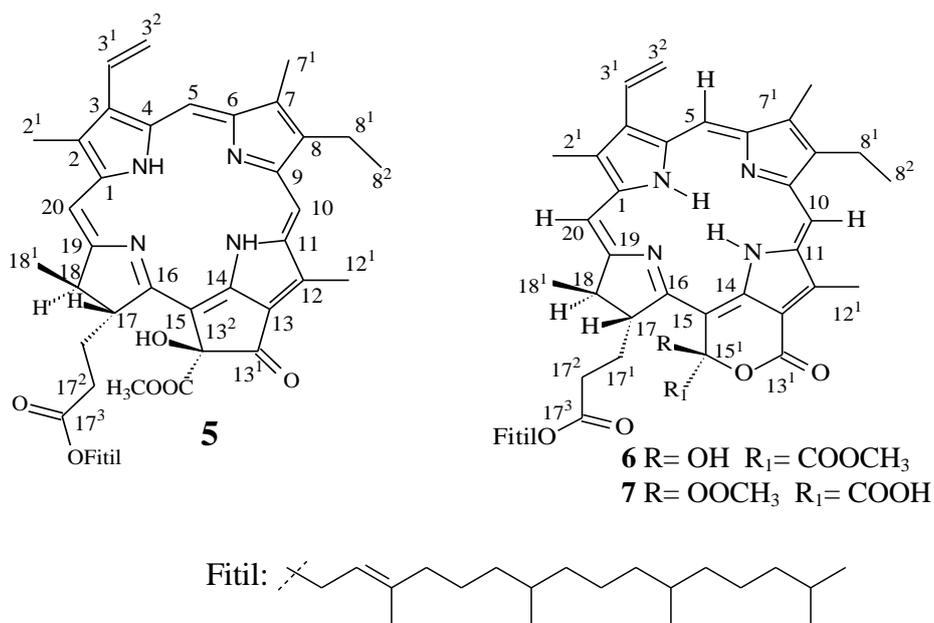
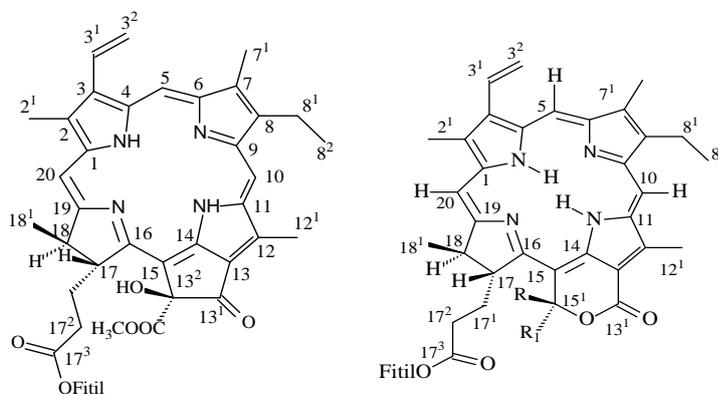


Tabela 7. Dados de RMN de ^1H 2D (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de 1D e 2D das substâncias **5, 6 e 7** em comparação com dados da literatura (MATSUO *et al.*, 1996, SCHWIKKARD *et al.*, 1998, JERZ *et al.*, 2007 e LIN *et al.*, 2011).

C	Compostos 5, 6 e 7			JERZ <i>et al.</i> , 2007 e LIN <i>et al.</i> , 2011 MATSUO <i>et al.</i> , 1996, SCHWIKKARD <i>et al.</i> , 1998	
	HSQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)			
1	142,2	-	$\text{CH}_3\text{-}2^1$	142,8/142,1	-
2	132,0	-	$\text{CH}_3\text{-}2^1$	132,6/131,6	-
2^1	12,5	3,41 (s)	-	12,4/12,0	3,45 (s)
3	136,7	-	$\text{H-}3^2$, $\text{H-}3^1$, $\text{CH}_3\text{-}2^1$	136,5/136,2	-
3^1	129,3	8,00 (dd 18 e 12)	-	129,1/128,9	8,01 (dd, 17,5 e 11,5)
3^2	123,1	6,19 (dd 12 e 2) 6,30 (dd, 18 e 2)	-	123,6/122,7	6,23 (dd, 11,5 e 1,0) 6,32 (dd, 17,5 e 1,0)
4	136,4	-	H-5	136,3/134,6	-
5	98,2	9,43 (s)	-	98,4/99,0	9,60 (s)
6	158,6	-	$\text{CH}_3\text{-}7^1$	155,4/155,9	-
7	136,7	-	$\text{CH}_3\text{-}7^1$	136,3/136,1	-
7^1	11,5	3,22 (s)	-	11,6/11,1	3,30 (s)
8	145,4	-	$\text{CH}_3\text{-}7^1$	145,3/145,5	-
8^1	19,9	3,66 (q)	$\text{CH}_3\text{-}2^1$	19,9/19,4	3,77 (q)
8^2	17,7	1,68 (t)	-	17,6/17,5	1,70 (t)
9	150,0	-	-	150,9/150,2	-
10	104,5	9,58 (s)	-	104,7	9,76 (s)
11	138,0	-	$\text{CH}_3\text{-}12^1$	138,4/138,1	-
12	129,3	-	$\text{CH}_3\text{-}12^1$	129,4/131,5	-
12^1	12,5	3,72 (s)	-	12,7/12,3	3,77 (s)
13	127,1	-	-	127,7/113,3	-
13^1	192,2/162,7/ 165,3	-	-	192,2/163,5	-
$13^2\text{OH}/$ 15^1OH	-	5,55 (sl) 5,55 (sl)	-	-	5,47(sl)
13^2	89,2	-	-	89,4	-
13^3CO	173,0	-	$\text{OH-}13^2$, $\text{OCH}_3\text{-}13^4$	173,3	-
13^4OCH_3	53,6	3,61 (s)	-	53,8	3,62 (s)
14	150,0	-	-	150,9/134,6	-
15	104,5/98,2	-	-	107,1/98,6	-
15^1	107,9/117,9	-	$\text{OH-}15^2$, $\text{OCH}_3\text{-}15^3$ $\text{OOCH}_3\text{-}15^3$	- - 119,3	-
$15^2\text{CO}/\text{CO}$	173,0/170,5	-	-	173,0/169,5	-
15^3OH	-	-	-	-	-

15^3CH_3	53,6	3,61 (s)	-	53,2	3,60 (s)
15^4OOCH_3	61,8	4,15 (sl)	-	53,3	4,14
16	162,7	-	-	164,0/162,5	-
17	50,5	4,17 (dl)	$\text{CH}_3\text{-}18^1$ $\text{H-}17^1$	52,6	4,17 (dl)
17^1	29,9	-	H-18	31,6/0,6	2,25 (m)
17^2	31,9	-	H- 17^1	32,0/30,8	2,55 (m)
17^3	173,8	-	H- 17^2 , H- 17^4	173,8/173,2	-
17^4	61,8	4,17 (m)	H- 17^5	61,0	3,99 (m)
17^5	118,0	1,01 (dl)	-	118,0	1,09 (dl)
18	50,5	4,56 (m)	$\text{CH}_3\text{-}18^1$	50,9/50,6	4,56 (m)
18^1	22,9	1,61 (d)	H-18	22,9/22,5	1,63 (d, 7)
19	173,8	-	$\text{CH}_3\text{-}18^1$	173,0/172,7	-
20	93,9	8,63 (s)	-	95,0/93,2	8,76 (s)
NH	-	-1,85 (sl)	-	-	-



6 R= OH R₁= COOCH₃
7 R= OCH₃ R₁= COOH

2 Oct 2014

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: CD(21-29)23-25 (PROTON)	Date	08 Nov 2010 15:47:58
File Name	C:\Users\Filvio\Documents\Filvio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRJ\1\RMN500_019001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Temperature (degree C)	21.160

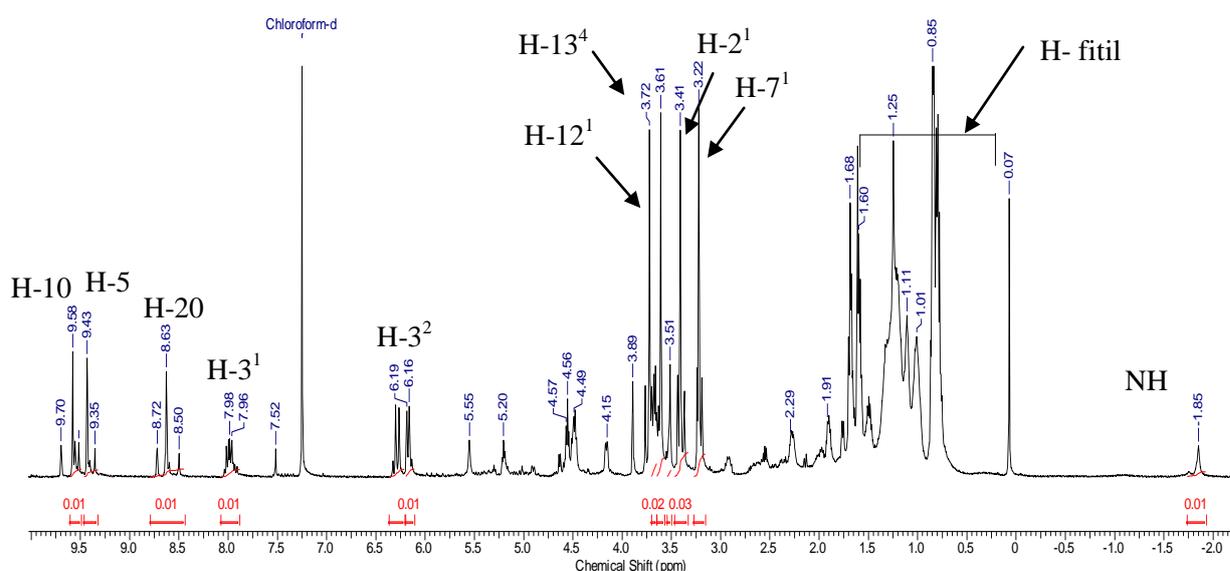


Figura 30: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) das substâncias 5, 6 e 7.

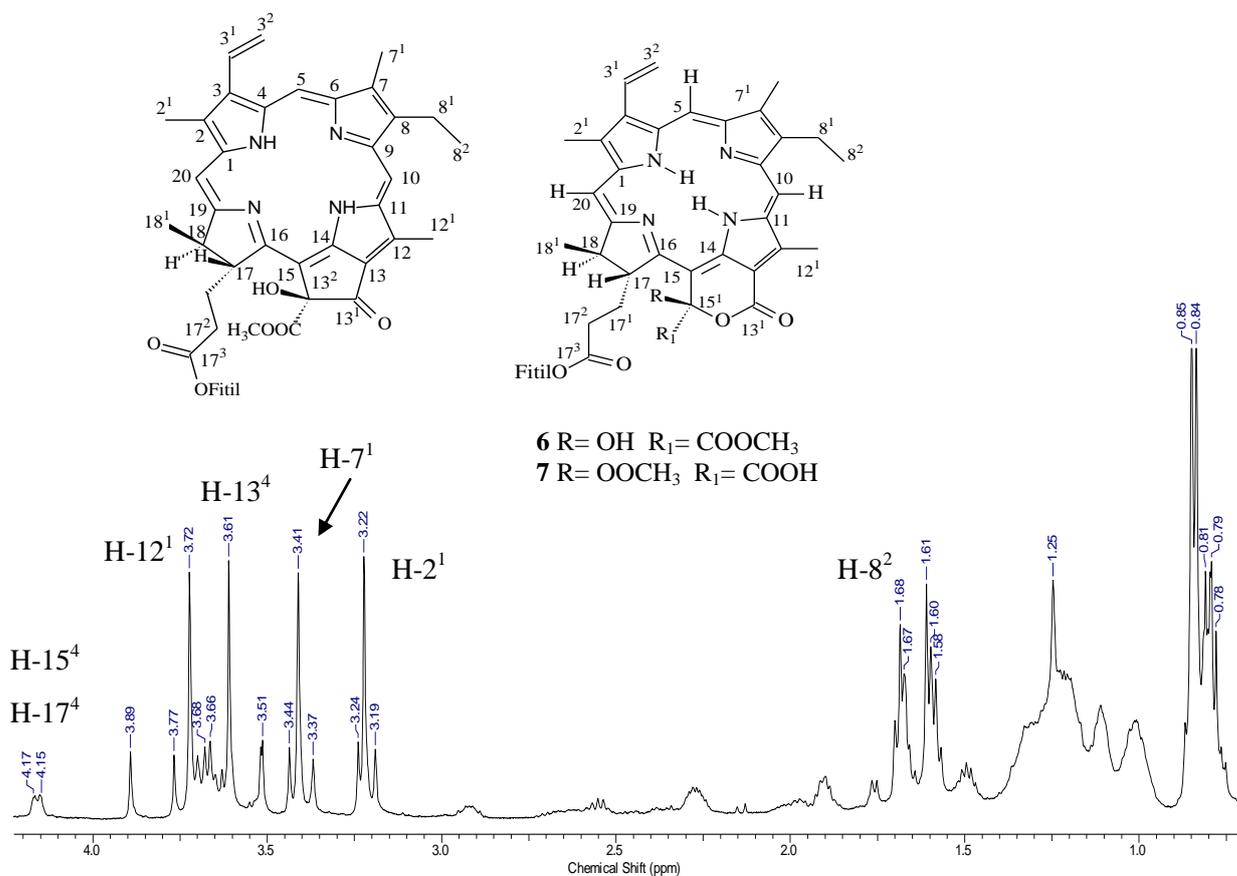


Figura 31: Expansão nas regiões de δ_{H} 5,0 – 0,4 ppm do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **5**, **6** e **7**.

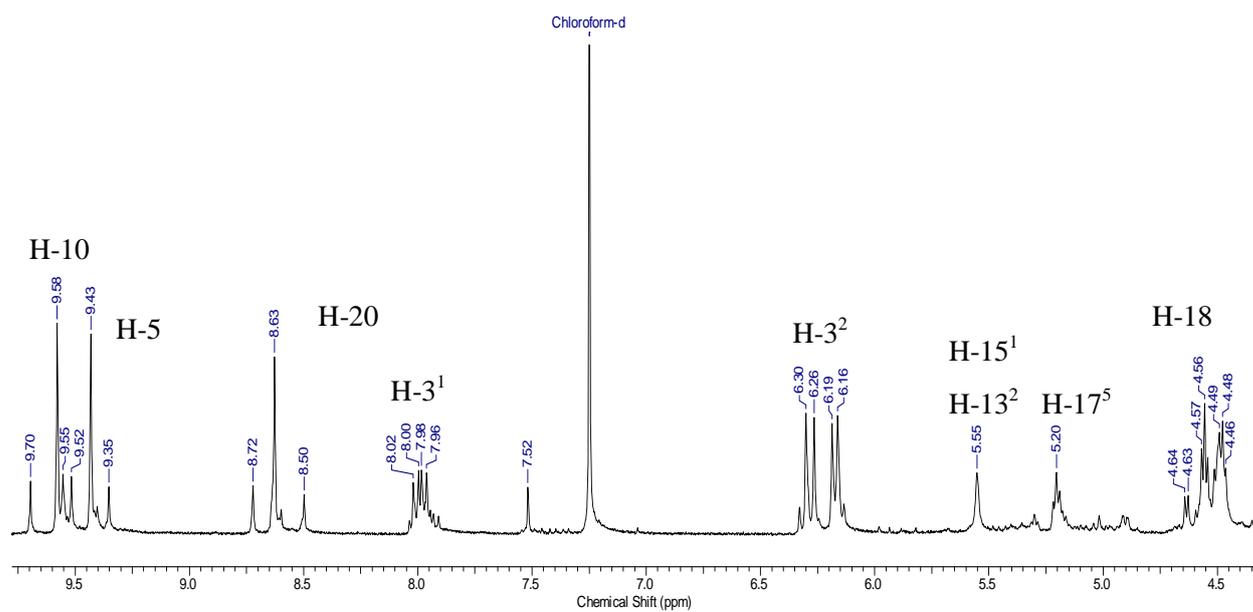
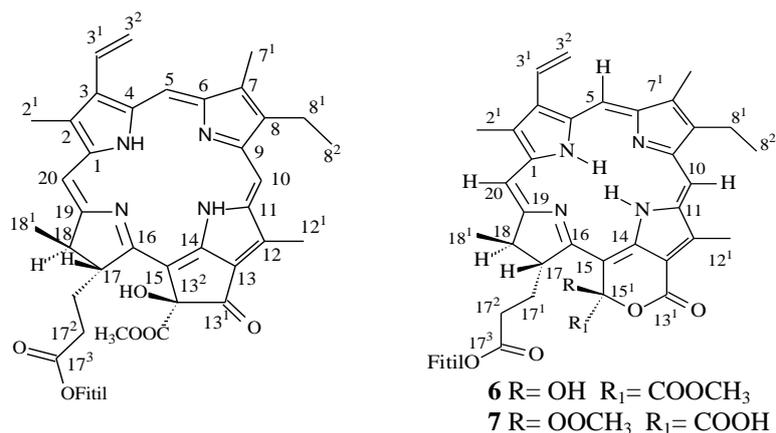


Figura 32: Expansão nas regiões de δ_{H} 10 – 5,0 ppm do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **5**, **6** e **7**.



2 Oct 2014

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: CD/(21-29)23-25 (13C_CPD) SOLVENTE: CDCl3	Date	27 Jan 2011 14:24:30
File Name	C:\Users\Filvio\Documents\Filvio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\RMNHC-500_080001r	Number of Transients	20480	Original Points Count	32768
Nucleus	13C	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90
Pulse Sequence	zgpg30			Temperature (degree C)	21.960

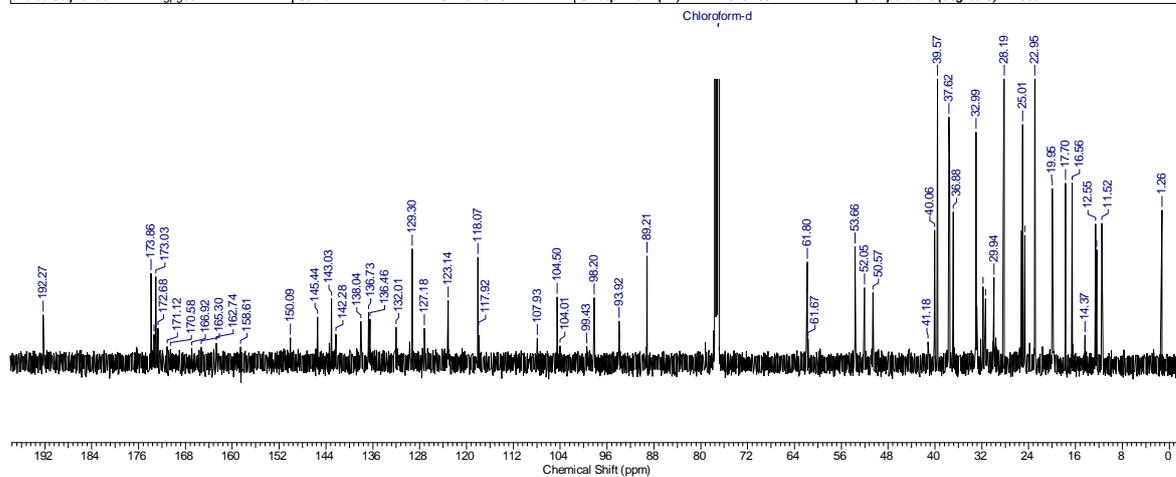


Figura 33: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **5**, **6** e **7**.

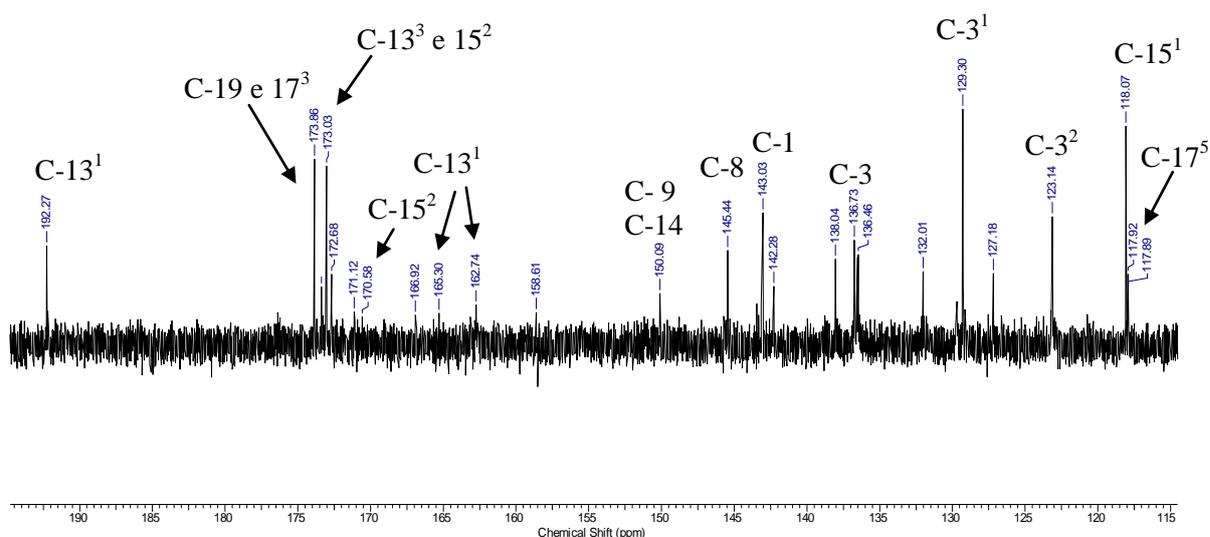


Figura 34: Expansão na região δ_C 195,0 - 115,0 ppm do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **5**, **6** e **7**

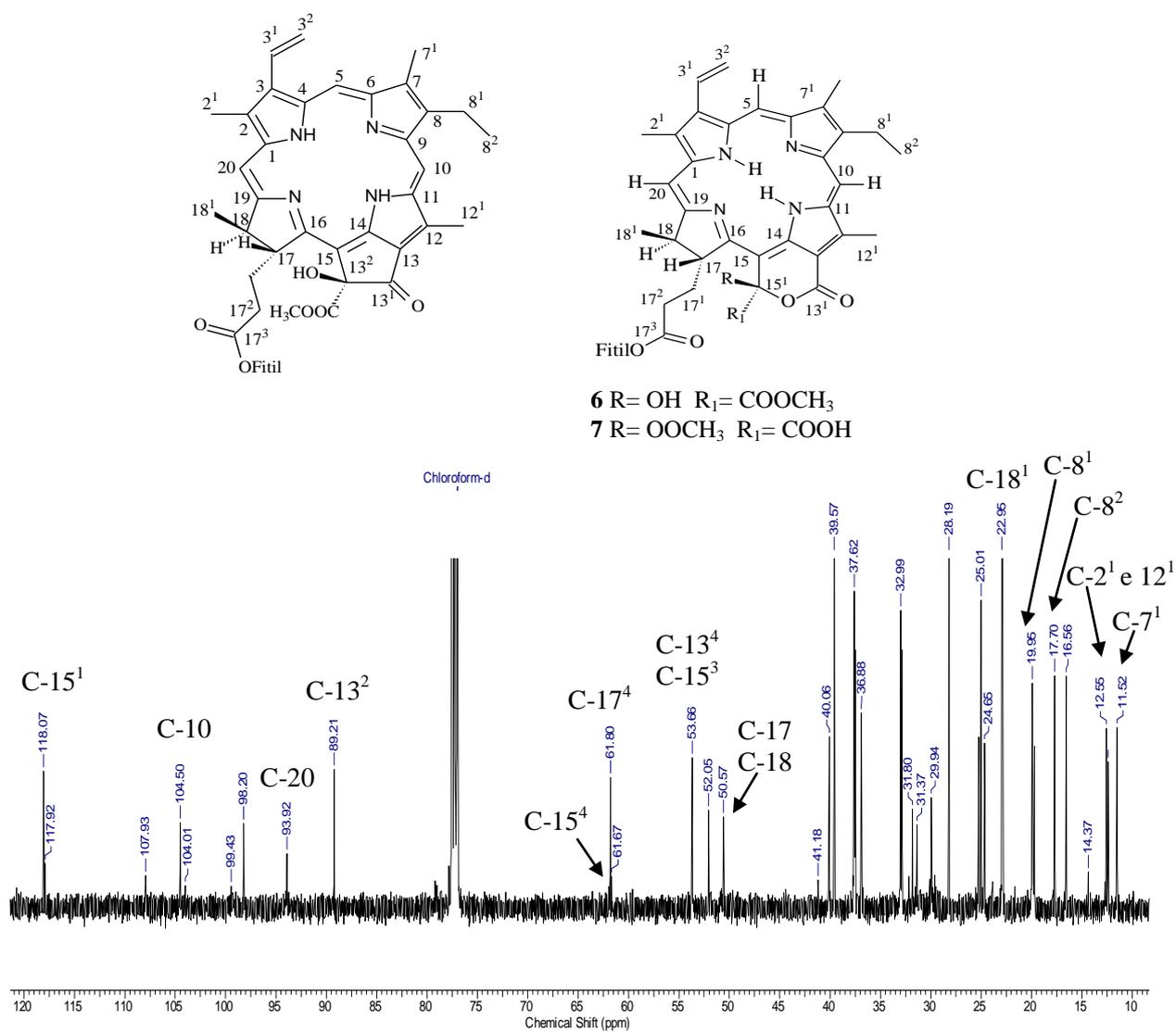
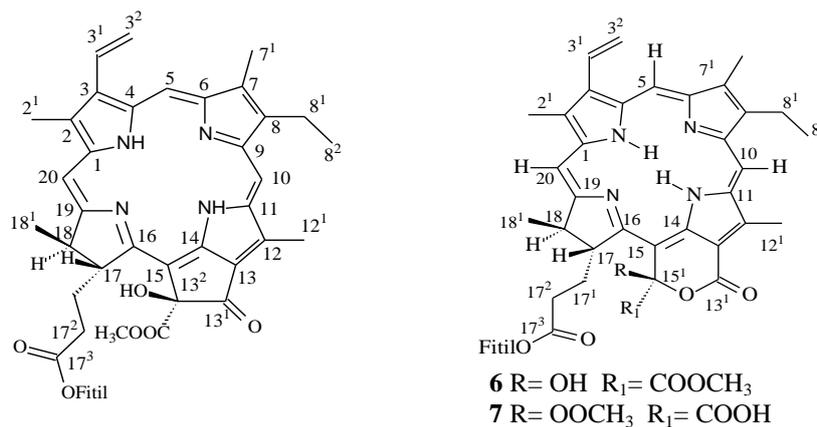


Figura 35: Expansão na região δ_{C} 120 - 10,0 ppm do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **5**, **6** e **7**.



8 Oct 2014
Flávio

Acquisition Time (sec)	(0.0492, 0.1978)	Comment	AMOSTRA: CD/(21-29)/23-25 (HSQC) SOLVENTE: CDCL ₃ OPERADOR: VITOR
Date	10 Jan 2011 09:58:00	File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flavio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500178\data\12rr
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus	(13C, 1H)
Original Points Count	(1024, 1024)	Points Count	(1024, 1024)
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(20831.98, 5175.98)
		Number of Transients	192
		Pulse Sequence	hsgcedetgp
		Temperature (degree C)	21.360

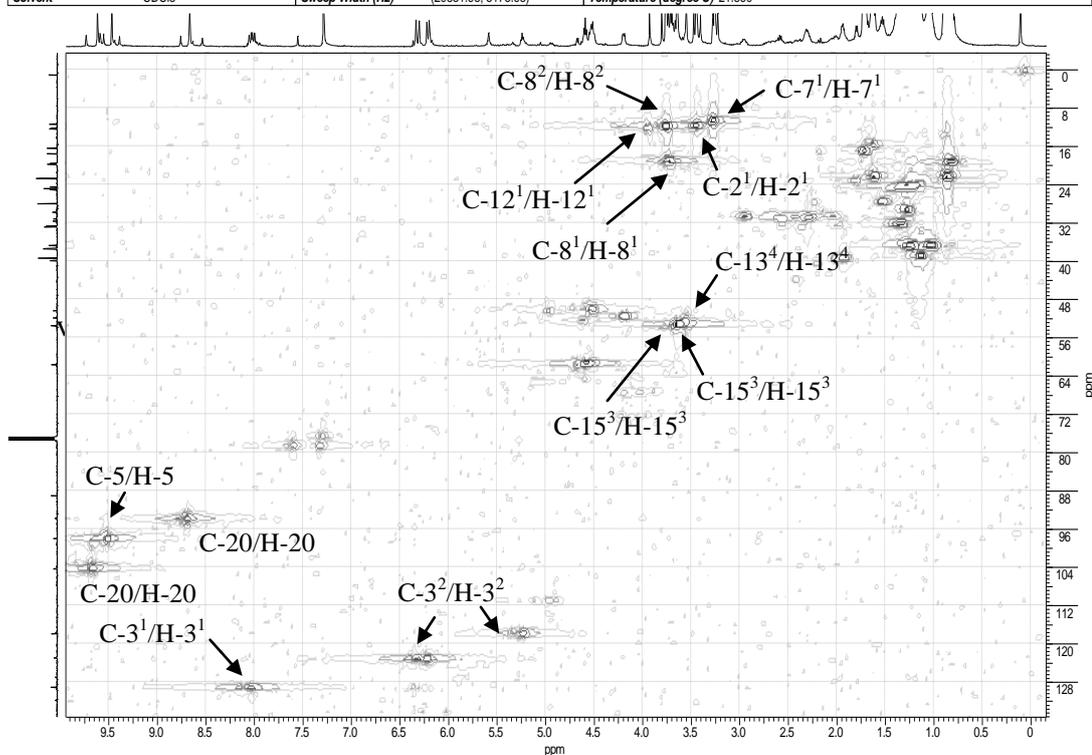
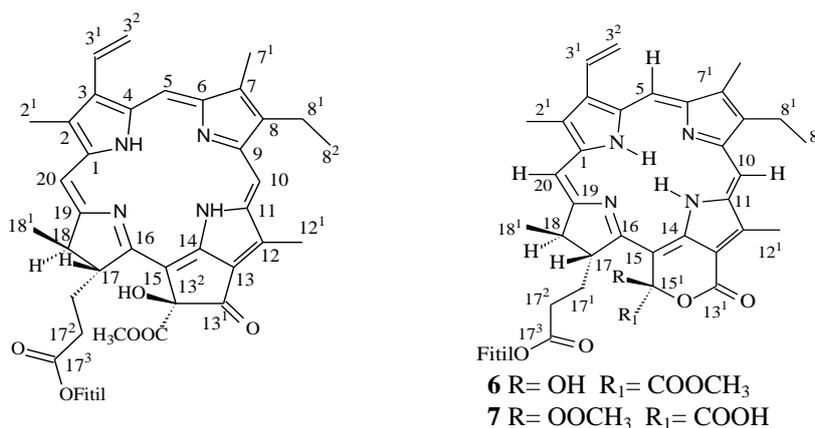


Figura 36: Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **5**, **6** e **7**.



8 Oct 2014
Flavio

Acquisition Time (sec)	(0.0367, 0.3957)	Comment	AMOSTRA: CD/(21-29)23-25 IMPACT-HMBC SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR: VITOR	
Date	10 Jan 2011 09:59:20	File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flavio Sant'ana Paula de Oliveira\UFRJ\1RMNHC-500\76\pdatal1\2rr	
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus	(13C, 1H)	Number of Transients 208
Original Points Count	(1024, 2048)	Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence impact-hmhc2d.cb
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(27932.97, 5175.98)	Temperature (degree C) 22.760

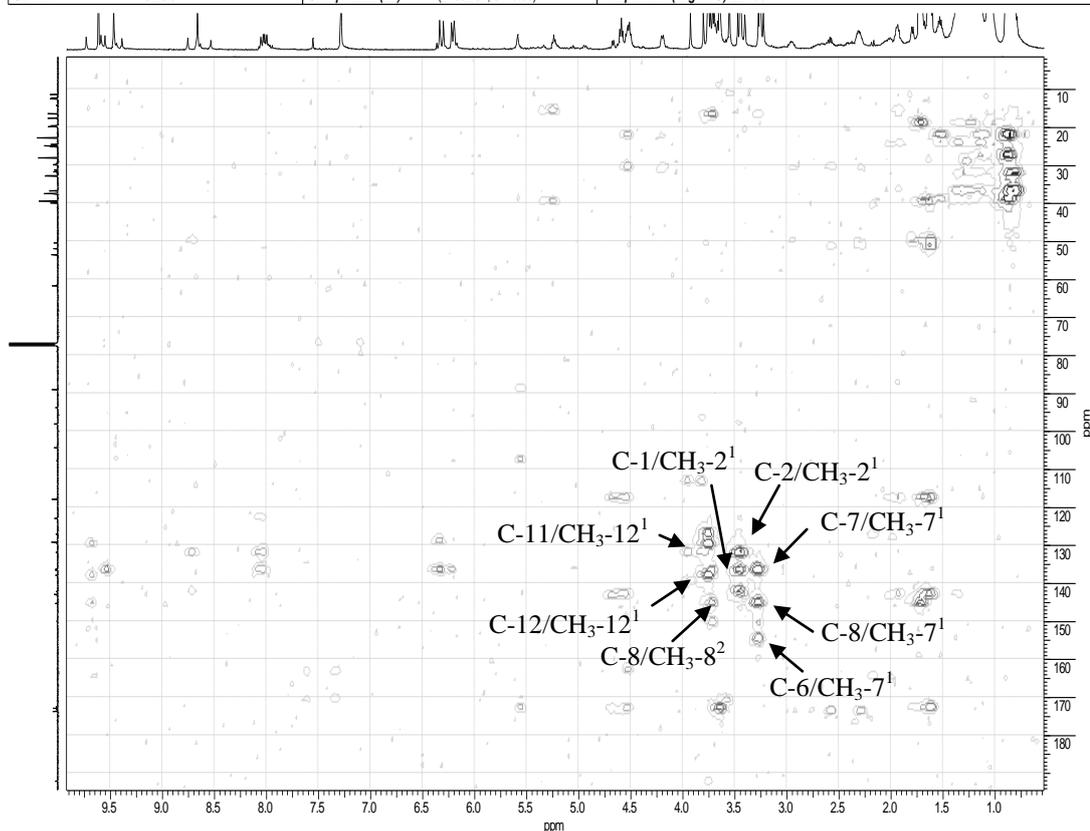


Figura 37: Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **5**, **6** e **7**.

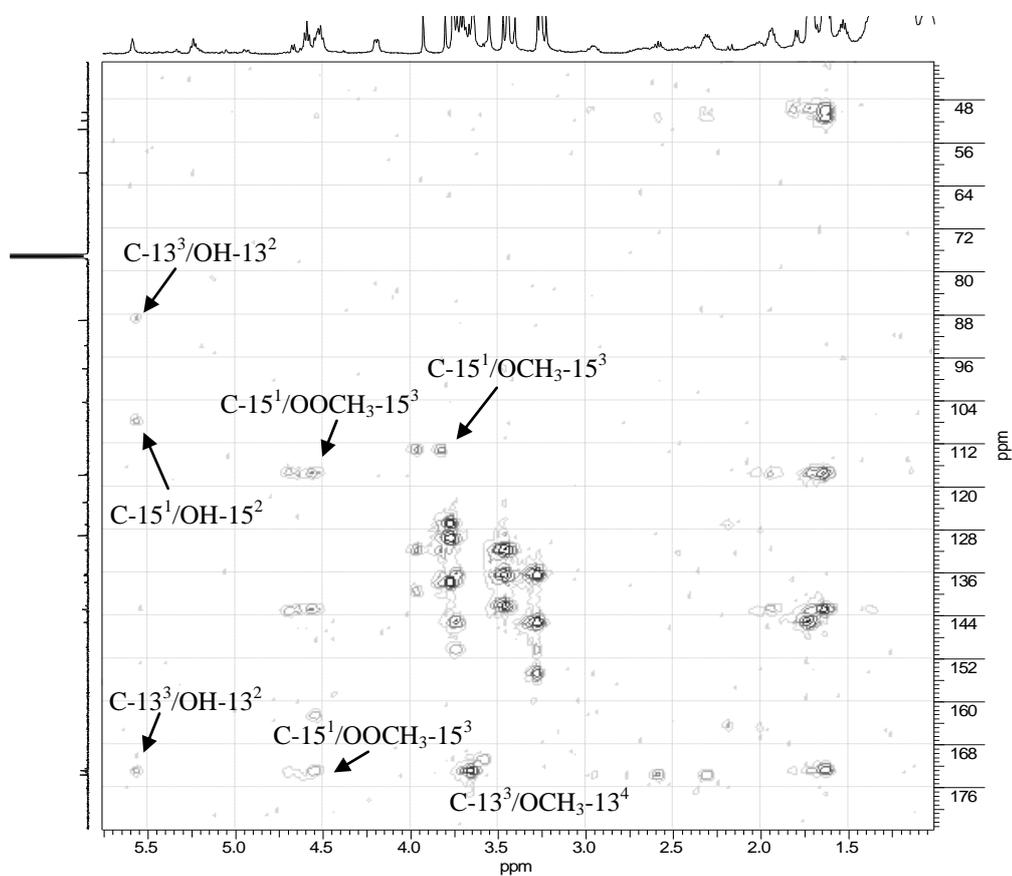
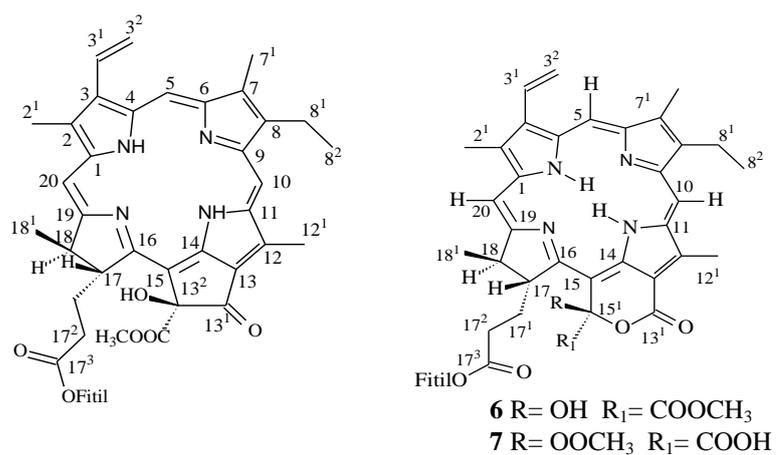


Figura 38: Expansão da região δ_H 6,0 - 1,5 ppm do mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **5**, **6** e **7**.

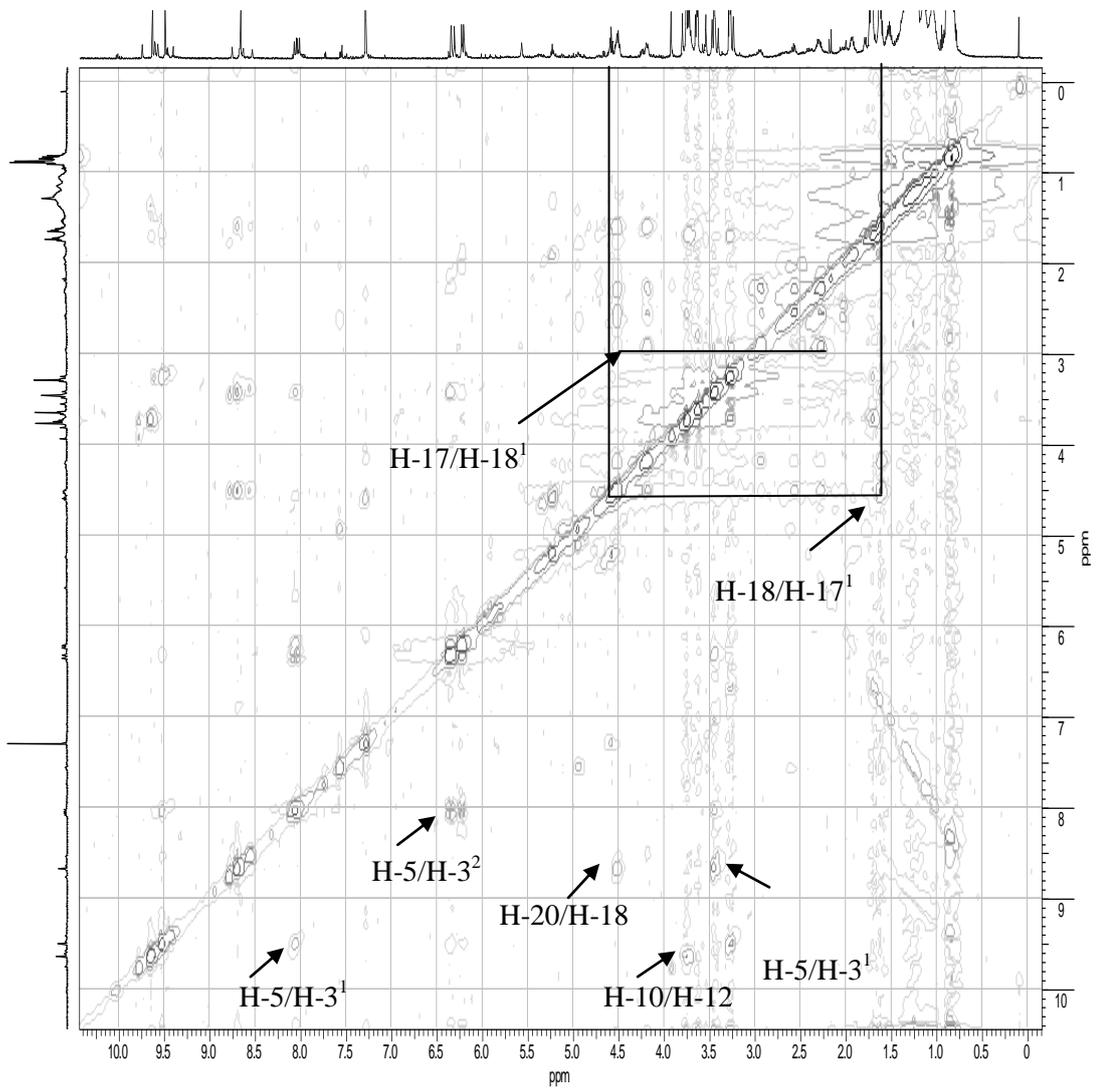
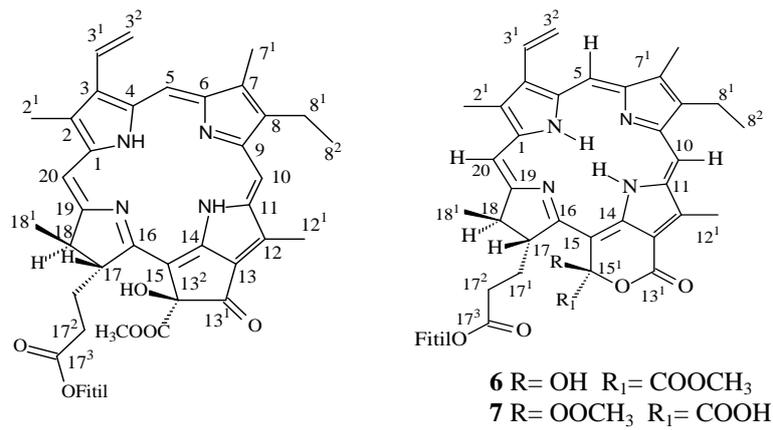
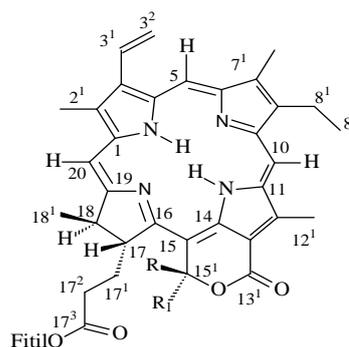
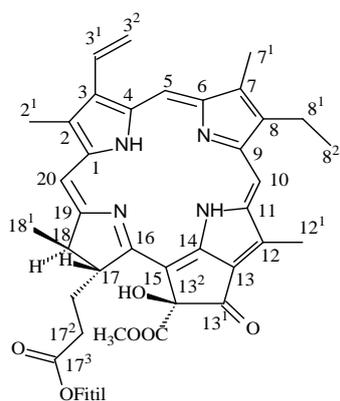


Figura 39: Espectro de Noesy das substâncias **5**, **6** e **7**.



6 R= OH R₁= COOCH₃
 7 R= OCH₃ R₁= COOH

10 Jul 2014
 Flavio

Acquisition Time (sec)	(0.1933, 0.1933)	Nucleus	(1H, 1H)
Comment	AMOSTRA: CD/ 30-34 (14-17) PROTON SOLVENTE: CDCL3 500 OPERADOR DO NMR - VITOR	Original Points Count	(1024, 1024)
Date	06 May 2011 10:15:52	Pulse Sequence	roesyph
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500\105\pdata\12rr	Sweep Width (Hz)	(5296.60, 5296.61)
Frequency (MHz)	(500.13, 500.13)		
Number of Transients	8		
Points Count	(1024, 1024)		
Solvent	CDCl3		
Temperature (degree C)	21.260		

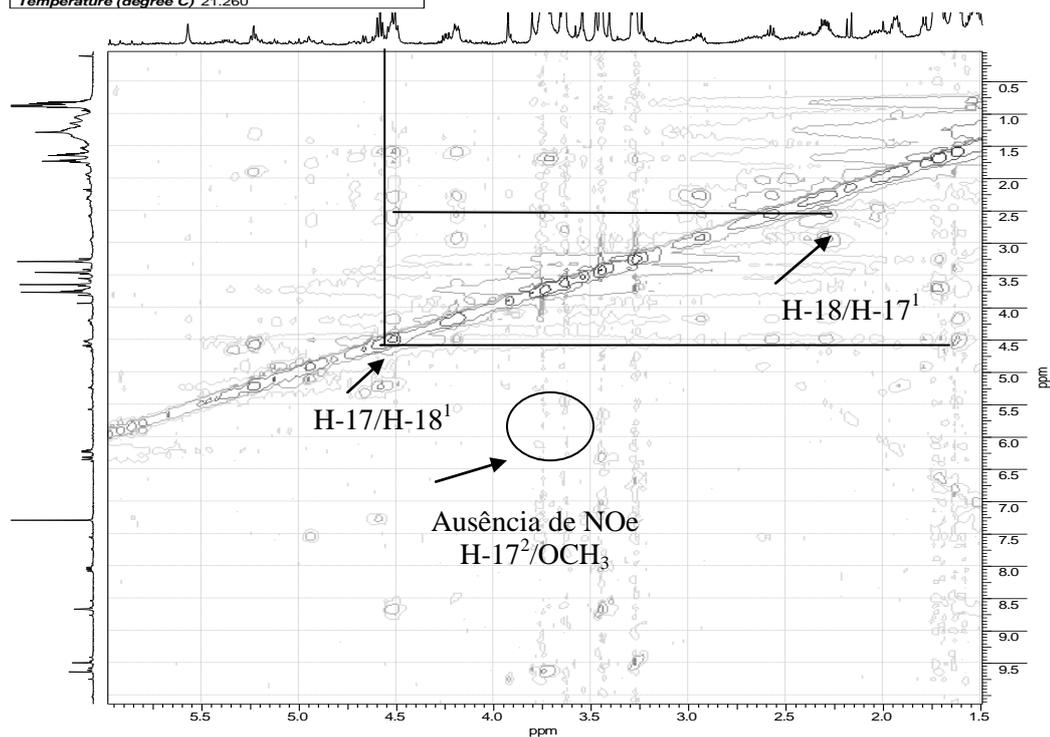


Figura 40: Expansão da região de 1,5-6,0 ppm do espectro de Noesy das substâncias 5, 6 e 7.

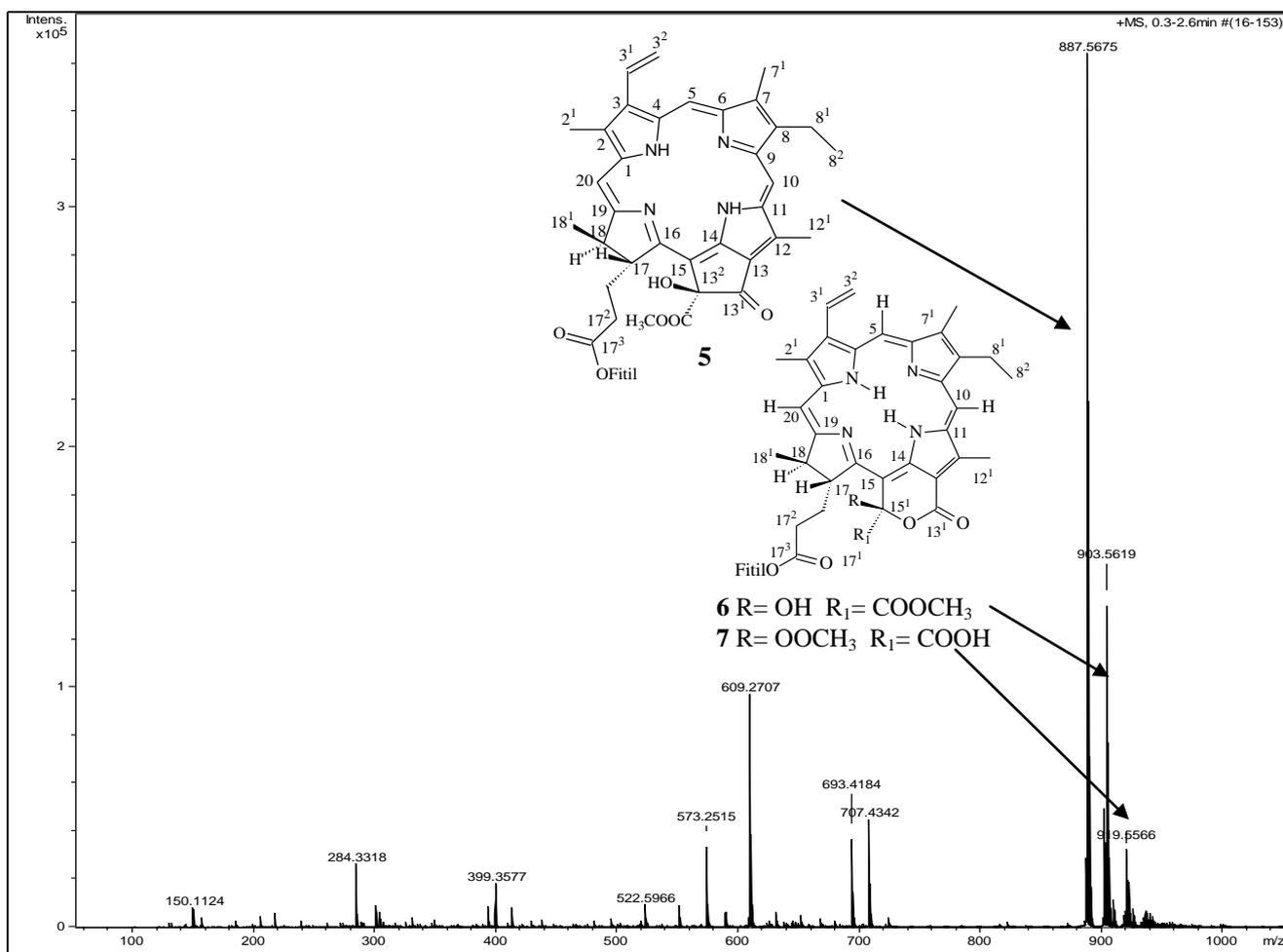


Figura 41: Espectro de massas da fração contendo as substâncias 5, 6 e 7.

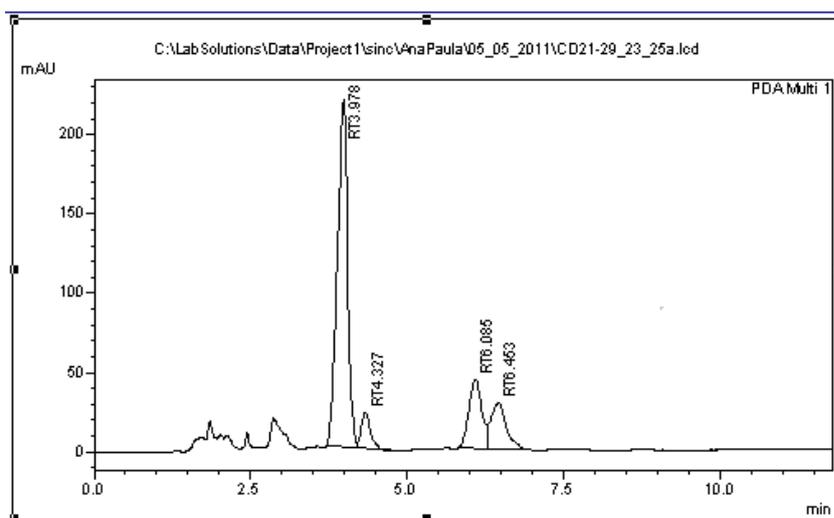


Figura 42: Cromatograma da fração contendo das substâncias 5, 6 e 7.

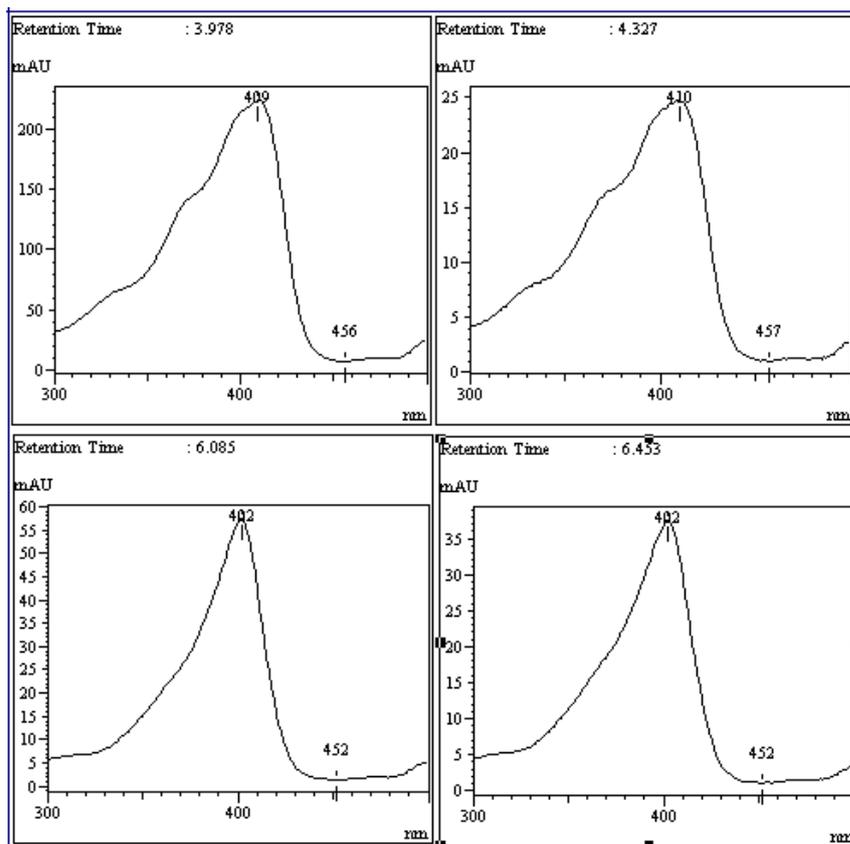


Figura 43: Curvas de U.V da fração contendo das substâncias **5**, **6** e **7**.

I.3.2.6 Identificação das substâncias **8**, **9**, **10** e **11**.

A fração foi analisada por CLAE e revelou a mistura de várias substâncias sendo os tempos de retenção em 4,457, 10,454 e 11,420 min. Apresentaram curvas no UV-visível, respectivamente, com λ_{max} 421, 421, 430 e 428 nm, (**Figuras 50 e 51**) que são compatíveis com absorções de anel porfirínico. A comparação com os t_R e as curvas de UV da literatura (ECKARDT *et al.*, 1991) confirmaram esta dedução representando-se as estruturas como **8**, **9**, **10** e **11**.

Fizeram-se análises de espectros de RMN ^1H e ^{13}C 1D e 2D, LC-MS e comparação de valores espectrométricos com dados da literatura (LIN *et al.*, 2011 e SCHWIKKARD *et al.*, 1998) para identificar esses constituintes.

O espectro de RMN ^1H da mistura (**Figura 44**) mostrou sinais de deslocamentos químico de hidrogênio semelhantes aos observados para as feofitinas **3** e **4**. As absorções localizadas na região de frequência 2,0 - 3,0 e 11,5 - 8,5 nos espectros de hidrogênio são compatíveis estruturas de feofitinas. O espectro apresentou um singlete em δ_{H} 2,13 referente a

uma metila e δ_H 3,54 de metoxila. Identificaram-se também sinais adicionais de singletos localizados em δ_H 11,09, indicando hidrogênios de grupamento aldeído localizado no C-7¹ e, bem como, a ausência do na faixa de deslocamento δ_H 3,23 referente à metila do CH₃-7¹.

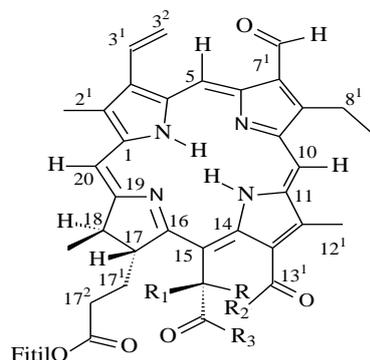
A análise dos espectros RMN ¹³C (**Figuras 45 e 46**) permitiu identificar sinais adicionais de δ_C em 207,1 (C=O de cetona), 178,8, 162,9, 159,7, 151,2, 148,5, 143,3 e 136,7, 111,3-111,5, sinais de δ_{CH} 187,8 - 187,9, 107,4, 106,2, 103,5, 93,9, 93,5, 78,7, 72,1 com aspecto de sinais de misturas, o sinal em 61,8 de CH₂, além de δ_{CH_3} em 52,9, 53,3, 27,8. Observamos a ausência do sinal δ_{CH} 99,9 (CH- 5). Além dos sinais de aldeído, perceberam-se os sinais do grupo vinil. Esses dados nos conduziram a sugerir derivados de feofitina *b* como as registradas na literatura (LIN *et al*, 2011 E SCHWIKKARD *et al*, 1998).

As análises de espectros RMN de HSQC (**Figura 47**) e HMBC (**Figura 48**), aliados aos dados citados acima permitiu fazer propostas para as porfirinas **8, 9, 10 e 11**. Os valores adicionais de δ_C e δ_H serviram para identificar grupos funcionais que acrescentados na estrutura básica das feofitinas para chegar aos valores de massas do íon quase molecular ([M+H]⁺) detectados (**Figura 49**), **Quadro 3**. Os valores de frequência de carbono e hidrogênios detectados nos espectros de RMN que serviram para deduzir as possíveis funções são: ¹J_{HC}: 187,7-187,9 /11,1-11,09 (aldeído, HC=O, CH-7¹), 78,8 e 79,2/7,52(-OCH-15¹ e (-OCH-13²), δ_C 207,0 com δ_{CH_3} 27,9/1,79 (^{1,2}J_{HC}, acetil), 162,9-163,1 (ácido carboxílico/lactona conjugados), 170,0-169,9 (éster metílicos)/52,9-53,3 (metoxilas, ^{1,3}J_{HC}) (foram utilizados para confirmar em os grupos funcionais presentes nas estruturas **8-11**, incluindo consultas na literatura (GANDUL-ROJAS *et al*, 1999) de estruturas que possuem esses grupos funcionais. A análise do espectro de massas permitiu identificar quatro valores de *m/z* que foram correlacionados aos íons quase moleculares dos componentes da mistura **8-11**. O quadro abaixo mostra os valores dos *m/z* observados dos íons [M + H]⁺ representados pelos picos (**Figura 49**) identificados para **8, 9, 10 e 11**, correspondentes às formulas moleculares e os valores de [M+H] calculados. Para cada caso, considerando os sinais de RMN foram incorporados os grupos funcionais para chegar às respectivas FM e fazer o calculo dos respectivos erros relativos. Esses valores estão na faixa aceitável por editores do JACS e JOC (SIUZDAK, 2006).

Quadro 3: Correlação de valores de massas para as propostas de **8, 9, 10 e 11**.

m/z Observado (estrutura)	FM do Íon proposto [M+H] ⁺	Grupos funcionais	MM Calculada [M+H]	Erro relativo δppm
887,5654 (8)	C ₅₄ H ₇₁ N ₄ O ₇	HC=O/CH/ -O=C-O-/CO ₂ H	887,5323	3,73
903,5578 (9)	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₇	HC=O/CH-OH/CO ₂ H/H ₃ C-CO	903,5636	-6,42
917,5417 (10)	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₈	HC=O/HO/-O=C-O-/CO ₂ Me	917,5428	-1,20
933,5332(11)	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₉	HC=O/HOO/ O-C=O/ CO ₂ Me	933,5377	-4,8

Desta forma as estruturas foram definidas como as representadas para **8, 9, 10 e 11** como, respectivamente, 15¹-carboxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (ácido Ficuschlorinico D) (**8**), 15¹-hidroxi-15¹-acetil-13¹-carboxi-feofitina b (taliclorigina A) (**9**), 15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**10**), 15¹-hidroperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (**11**). A **Tabela 8** apresenta os deslocamentos químicos compatíveis com as estruturas propostas para **8, 9, 10 e 11**, e comparação com dados da literatura (LIN *et al*, 2011 e SCHWIKKARD *et al*, 1998).



- 8** R₁= H; R₂ = O; R₃= OH
9 R₁=H; R=R₂= OH; R₃= CH₃
10 R₁= OH; R,R₂= O; R₃= OCH₃
11 R₁= OOH; R,R₂= O; R₃= OCH₃

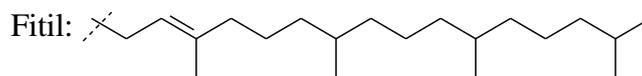
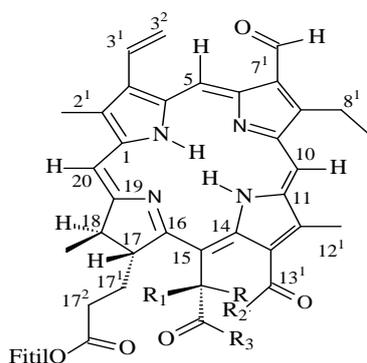


Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de 1D e 2D das substâncias **8, 9, 10 e 11** em comparação com dados da literatura (LIN et al, 2011 e SCHWIKKARD et al, 1998).

C	Substâncias 8, 9, 10 e 11			LIN et al., 2011 e SCHWIKKARD et al., 1998	
	HSQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}		
1	142,1-144,7	-	-	143,5	-
2	132,0-132,3/ 132,9	-	$\text{CH}_3\text{-}2^1$, H-20		-
2^1	12,1-11,9	3,54 (s)	-	12,1	3,35 (s)
3	136,8-136,9	8,65-8,45 (dd,18, 12)	H- 3^2 , $\text{CH}_3\text{-}2^1$, H-5	137,5	-
3^1	128,6-128,7	6,20 (dd,18, 1,5) 6,40 (dd, 12 e 1,5)	H- 3^2 , H-5	128,6	7,89 (dd,17,9 e 11,6)
3^2	123,9	6,40 (tl)	H- 3^1 , H-5	123,3	6,28
4	136,7-136,9	-	H-5	136,9	-
5	103,2-103,3	10,44-10,29 (s)	-	103,0	10,22 (s)
6	151,2-151,4	-	$\text{CH}_3\text{-}7^1$	151,5	-
7	132,8-132,9	-	-	132,4	-
7^1	187,7-187,9	11,09 (s)	H- 8^1 , H- 8^2	187,4	11,10
8	146,3-146,5	-	-	146,0	-
8^1	19,1-19,2	3,75(m)	H- 8^1 , $\text{CH}_3\text{-}7^1$		3,77 (q)
8^2	19,5-19,7	1,84 (t, 8)	-		1,76 (t)
9	159,5-159,7	-	-		-
10	106,2/106,7/ 107,3	-	H- 8^2		9,59 (s)
11	140,5/143,5	-	-	130,4	-
12	131,7 - 132,1	3,86 (s)	-	131,5	-
12^1	12,4-12,5	-	-	12,4	3,80 (s)
13	113,8-113,9	-	-	114,2	-
13^1	162,9-163,1	-	H- 13^1	162,9	-
13^2	79,0/78,7	7,92 (s)	-	-	-
13^3-CO	207,3/170,9	-	$\text{CH}_3\text{-}13^4$, $\text{OCH}_3\text{-}13^4$	-	-
13^4-CH_3	28,2/53,2	2,13/3,54 (s)	-	-	-
14	135,8-137,8	-	-	140,2	-
15	111,3/111,4	-	-	98,5	-
15^1	78,8/72,8/98,7/ 99,0	7,55 (s)	-	-	-
15^2-CO	170,1/207,0/ 170,3/169,9	-	-	-	-
15^3-CH_3	27,9	2,13 (s)	-	-	-
15^3OCH_3	52,9-53,3	3,54 (s)/3,54 (s)	-	-	-
16	163,3	-	-	162,9	-
17	50,6	4,46 (dl, 8)	H- 17^1	52,6	4,87 (dl)
17^1	29,8	1,9-2,0 (m)	-	29,8	-
17^2	31,9	1,90 (m)	-	31,2	-

17 ³	170,7	-	H-17 ¹	172,0	-
17 ⁴	62,0/61,7	-	H-17 ⁵ , H-17 ²¹	61,0	-
17 ⁵	117,8/117,6	5,30 (dl)	-	118,0	5,30 (dl)
18	49,3/52,7	4,46 (m)	H-20	49,5	4,69 (m)
18 ¹	22,8/22,8	1,60 (d, 7)	-	22,4	1,68 (d, 7,2)
19	174,2	-	18 ¹	174,3	-
20	94,1	8,65/8,45 (s)	-	93,9	8,64 (s)



- 8** R₁= H; R₂ = O; R₃= OH
9 R₁=H; R₂= OH; R₃= CH₃
10 R₁= OH; R₂= O; R₃= OCH₃
11 R₁= OOH; R₂= O; R₃= OCH₃

8 Oct 2014

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: CD(21-29)34(PROTON)	Date	08 Nov 2010 16:03:12
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1\RMNHC-500_022001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Temperature (degree C)	21.260

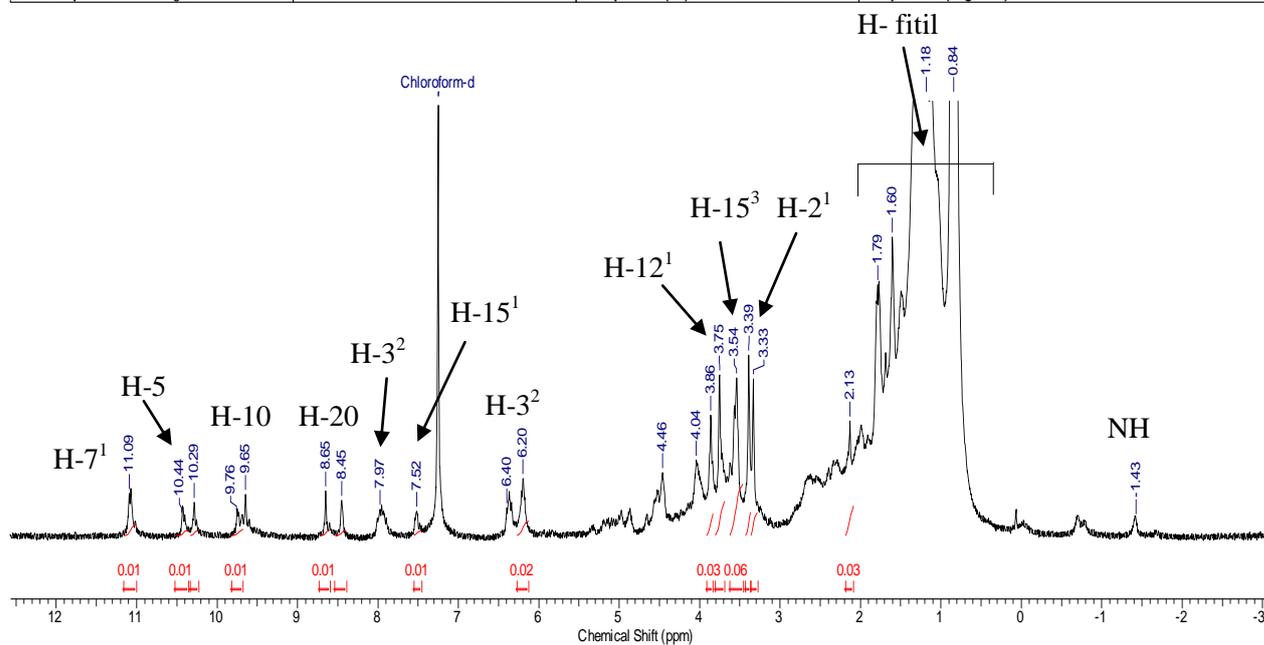
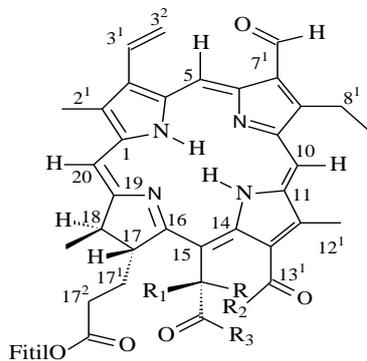


Figura 44: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) das substâncias **8**, **9**, **10**, e **11**.



- 8** $R_1 = H$; $R_2 = O$; $R_3 = OH$
9 $R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = CH_3$
10 $R_1 = OH$; $R_2 = O$; $R_3 = OCH_3$
11 $R_1 = OOH$; $R_2 = O$; $R_3 = OCH_3$

9 Oct 2014
Flávio

Acquisition Time (sec)	(0.0492, 0.1425)	Comment	AMOSTRA: CD/(21-29)34 13C_HSQCETGP 500 MHz SOLVENTE: CDCl3 OPERADOR: VITOR	
Date	12 Jul 2011 09:51:34	File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ1\RMNHC-500\115\data\12rr	
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus	(13C, 1H)	Number of Transients
Original Points Count	(1024, 1024)	Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(20831.98, 7183.91)	Temperature (degree C)
				20.160

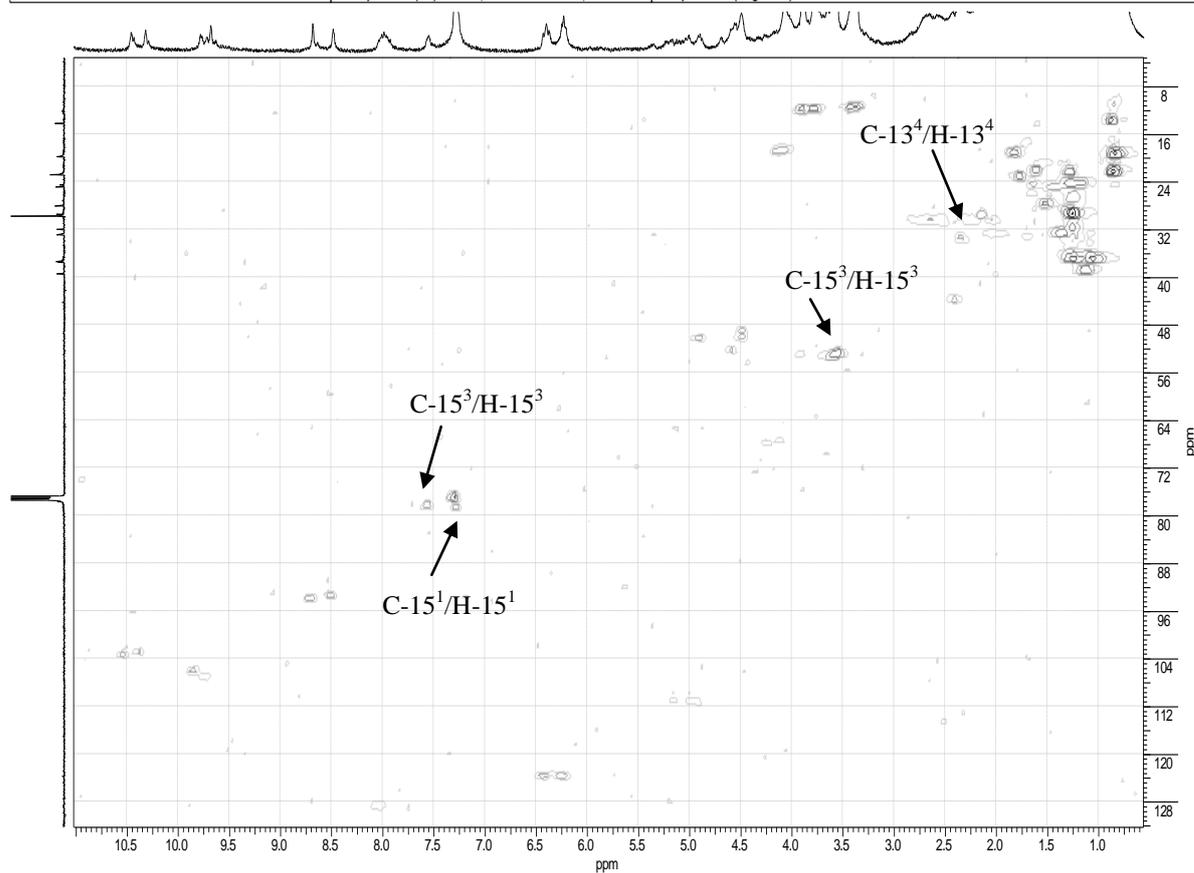
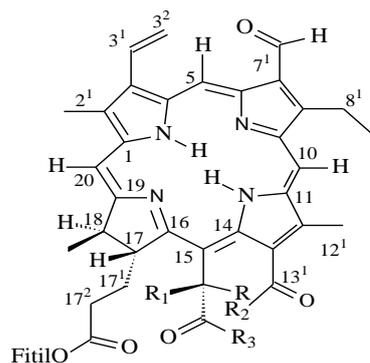


Figura 47: Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl₃) das substâncias **8**, **9**, **10**, e

11.



- 8** R₁= H; R₂ = O; R₃= OH
9 R₁=H; R₂= OH; R₃= CH₃
10 R₁= OH; R₂= O; R₃= OCH₃
11 R₁= OOH; R₂= O; R₃= OCH₃

9 Oct 2014
Flávio

Acquisition Time (sec)	(0.0367, 0.3072)	Comment	AMOSTRA: CD (21/29) - 34 (HMBCGP) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO	
Date	18 Jul 2011 12:21:34	File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500\126\pdata\12r	
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus	(13C, 1H)	Number of Transients 50
Original Points Count	(1024, 2048)	Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence hmbcgp1pndof
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(27932.97, 6666.67)	Temperature (degree C) 21.660

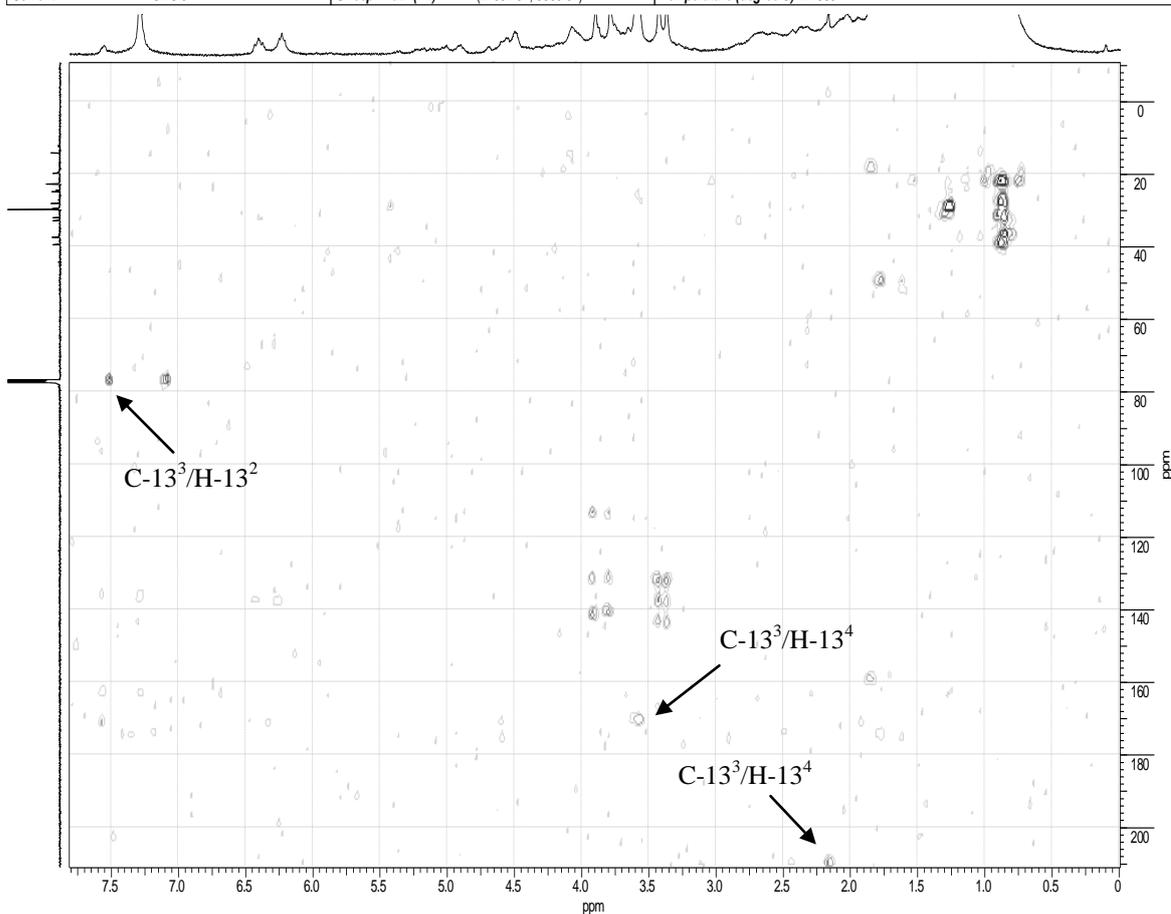


Figura 48: Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl₃) da substância **8**, **9**, **10** e **11**.

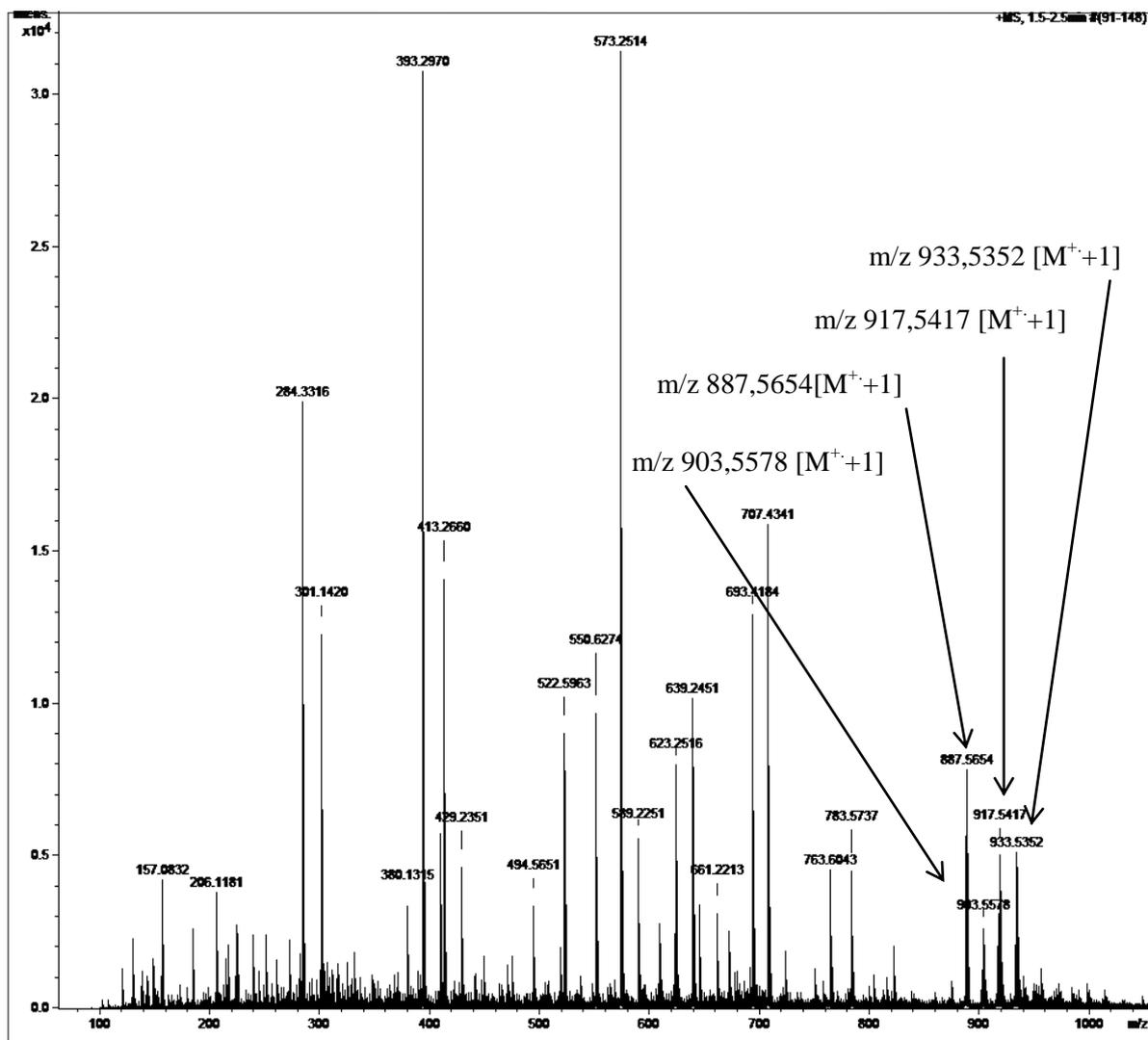


Figura 49: Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração contendo as substâncias **8, 9, 10 e 11**.

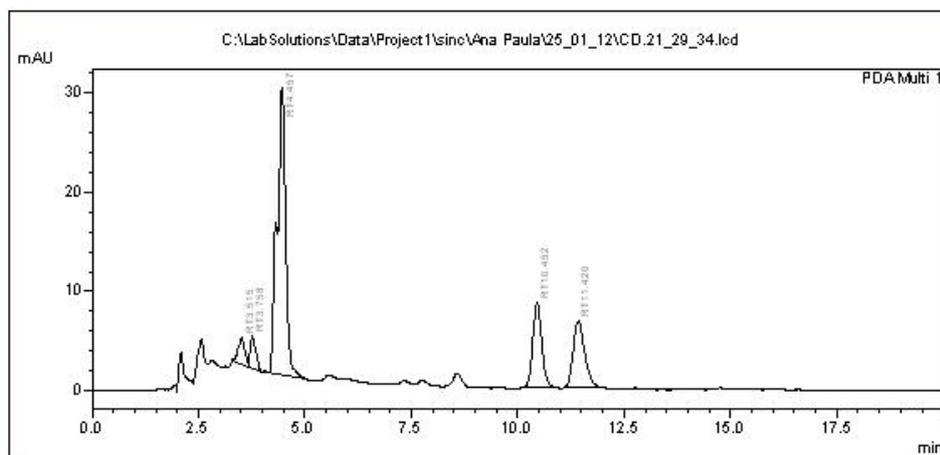


Figura 50: Cromatograma das substâncias **8, 9, 10 e 11**.

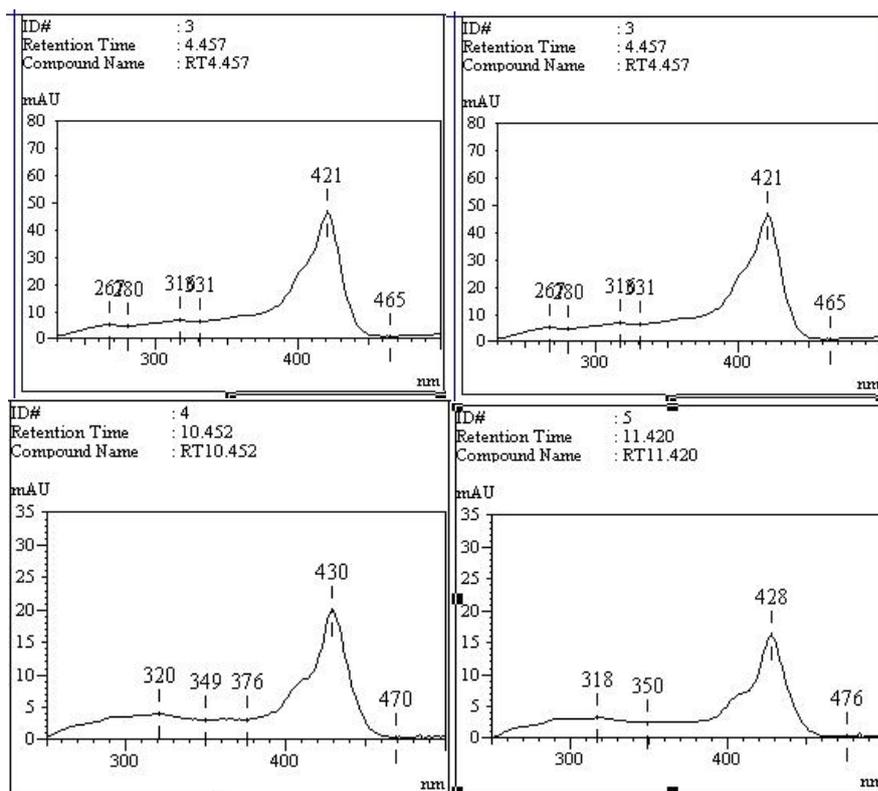


Figura 51: Curvas de U.V das substâncias **8, 9, 10** e **11**.

I.3.2.7 Identificação da substância **12**.

A substância **12** foi identificada através da análise de espectros de RMN ^1H e ^{13}C e espectro de massas (**Figuras 56- 56**), e comparação de dados com valores da literatura (LIN et al, 2011, SCHWIKKARD, *et al.*, 1998, MATSUO *et al.*, 1996). Além da busca por substituintes em feofitinas para chegar a uma fórmula molecular compatível ao íon molecular detectado no espectro de massas. Esta análise conduziu a dedução de grupos compatíveis com a fórmula molecular e com sinais presentes no espectro de RMN ^1H e ^{13}C que foi possível identificar além da feofetina **12** resíduos de outra feofetina nesta fração, que devido a quantidade da amostra não foi possível observar valores detectados no espectro que pudesse concluir ser uma nova feofetina.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 52**) da substância **12** exibiu sinais de deslocamentos de hidrogênio semelhantes aos observados para a feofetina **6** com um anel lactâmico e verificou-se sinais de um singlete δ_{H} 2,13 ppm indicando a presença de uma metila de acetila ($\text{C}-15^2$) e δ_{H} 5,19 (sl) ppm que foi relacionado ao hidrogênio ligado ao carbono $\text{C}-15^1$ do anel lactâmico. A integração deste espectro foi importante para observação de que havia outra feofetina nesta fração, no qual ao se integrar os valores deslocamentos químicos das metilas δ_{H} 3,76, 3,34 e 3,15 foram notórios uma relação de seis hidrogênios ($2\times\text{CH}_3$) e não de três

(CH₃) como se esperava, mostrando assim que são duas metilas para valor e não uma metila para cada deslocamento e ainda que o singlete δ_H 2,13 ppm tem uma relação três hidrogênios confirmando ser uma metila.

No espectro de RMN de ¹³C (**Figura 53 e 53**) observaram-se sinais compatíveis com os grupos propostos como em δ_{CH} 81,5, δ_C 200,9 (C=O de cetona) e δ_{CH₃} 27,9 (CH₃), correspondendo aos carbonos 15¹, 15² e 15³ respectivamente. O anel lactâmico ficou representado pelos sinais dos carbonos C-13¹ e C-15 em δ_C 164,2 (C=O) e δ_C 95,0. O espectro de massas apresentou sinal em m/z 870,5643 (M⁺) compatível com a FM C₅₅H₇₄N₄O₅ (calc. 870,5659) com um erro de 6,1.10⁻⁶, sendo um valor adequado para a massa exata detectada. Esses dados foram comparados aos de ECKARDT, *et al* (1991) e se apresentaram semelhantes.

A análise do espectro de HSQC (**Figura 54**) e HMBC (**Figura 55**) permitiu detectar correlação adicional devido a acoplamento a longa distância (^{2,3}J_{HC}) de H-15³/ C-15² [δ_H/δ_C 2,13/200,9] (**Tabela 9**). Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C foram comparados a valores de modelos da literatura (GANDUL-ROJAS *et al.*, 1998) e auxiliou na identificação de desta nova 15¹-acetil-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (**12**).

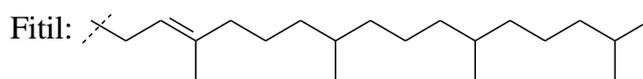
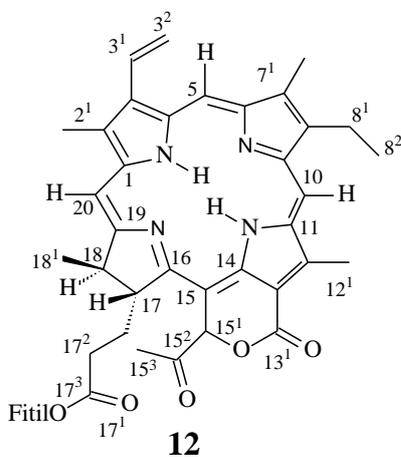


Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de 1D e 2D da substância **12** em comparação com dados da literatura (LIN *et al.*, 2011 e SCHWIKKARD *et al.*, 1998).

C	Composto 12			ECKARDT <i>et al.</i> , 1991 GANDUL-ROJAS <i>et al.</i> , 1998	
	HSQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)			
1	142,1	-	CH ₃ -2 ¹	142,9	-
2	131,6	-	CH ₃ -2 ¹	131,9	-
2 ¹	11,9	3,15 (s)		12,1	3,42 (s)
3	136,7	-	H-3 ² , CH ₃ -2 ¹ , H-3 ¹	136,5	-
3 ¹	128,3	8,58 (dd 12 e 4)	H-3 ² , H-5	129,1	8,01
3 ²	123,7	6,31 (dd 12 e 4) 6,20 (dd, 20 e 4)	-	122,9	6,30 6,20
4	136,6	-	H-5	136,4	-
5	103,1	9,35 (s)	-	97,9	9,46 (s)
6	156,3	-	CH ₃ -7 ¹	155,6	-
7	136,6	-	CH ₃ -7 ¹	136,3	-
7 ¹	11,0	3,34 (s)	-	11,3	3,25 (s)
8	144,1	-	CH ₃ -7 ¹	145,3	-
8 ¹	19,7	3,61 (q)	H-8 ¹ , CH ₃ -7 ¹	19,5	3,72 (q)
8 ²	17,4	1,74 (t)	CH ₃ -7 ¹	17,5	1,70 (t)
9	150,3	-	-	151,0	-
10	103,1	9,57 (s)	H-8 ²	104,2	9,58 (s)
11	136,7	-	CH ₃ -12 ¹	137,8	-
12	131,6	-	CH ₃ -12 ¹	129,3	-
12 ¹	11,9	3,76 (s)	-	12,2	3,72 (s)
13	131,6	-	-	126,3	-
13 ¹	164,2	-	-	162,9	-
14	146,0	-	-	150,0	-
15	95,0	-	-	98,5	-
15 ¹	86,4	4,51 (sl)	-	-	-
15 ²	200,9	-	H-15 ³ /H-15 ¹	-	-
15 ³	27,9	2,13 (s)	-	-	-
16	164,2	-	-	161,3	-
17	54,4	4,38 (dl)	H-17 ¹	51,1	4,48 (dl)
17 ¹	29,7	2,55 (m)	-	29,8	2,55 (m)
17 ²	31,9	2,55 (m)	-	31,2	2,55 (m)
17 ³	173,8	-	H-17 ¹	172,0	-
17 ⁴	61,4	4,51 (m)	H-17 ⁵ , H-17 ²¹	61,0	3,99 (m)
17 ⁵	117,9	1,05 (d)	-	118,0	1,09 (dl)
18	49,2	4,38 (m)	H-20	49,6	4,69 (m)
18 ¹	22,6	1,63 (d)	-	22,7	1,68 (d)
19	173,8	-	-	172,8	-
20	95,0	8,56 (s)	-	93,4	8,63

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: cd/(53-54) 30-34(8)C - PROTON - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	Date	09 Dec 2010 14:53:30
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500_072001r	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Nucleus	¹ H	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
Pulse Sequence	zg30			Temperature (degree C)	20.860

Chloroform-d

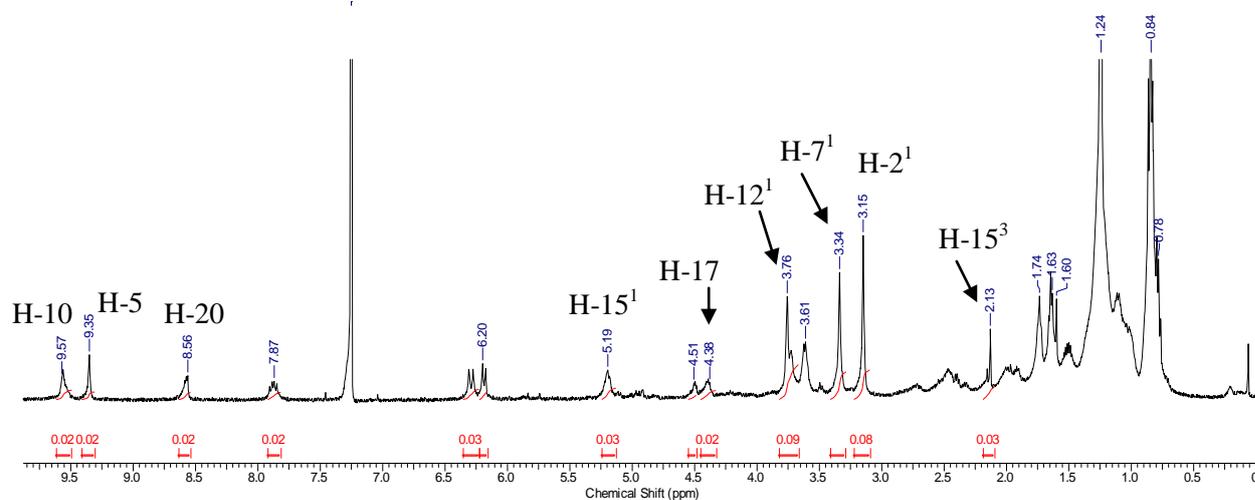
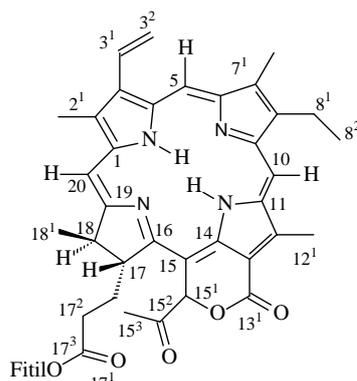


Figura 52: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 12.



4 Jun 2014

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: C/(53-54) 30-34(8) (DEPTQ) SOLVENTE: CDCl3	Date	29 Nov 2011 12:04:02
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500_173001r	Number of Transients	20005	Original Points Count	32768
Nucleus	¹³ C	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90
Pulse Sequence	deptqgqsp			Temperature (degree C)	25.160

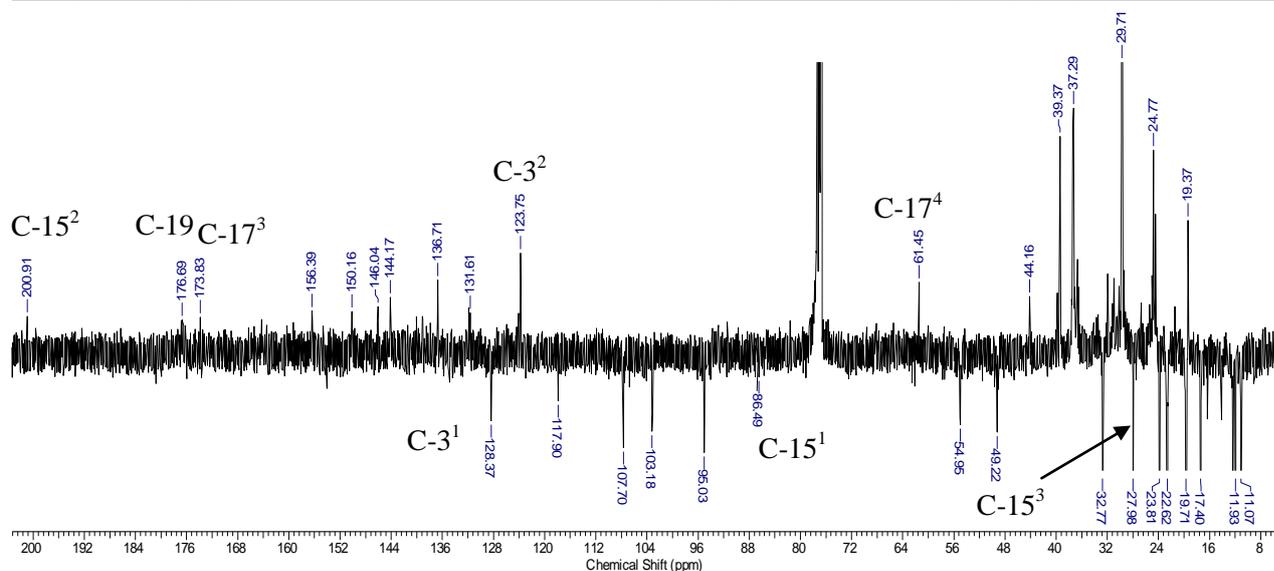


Figura 53: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da substância 12.

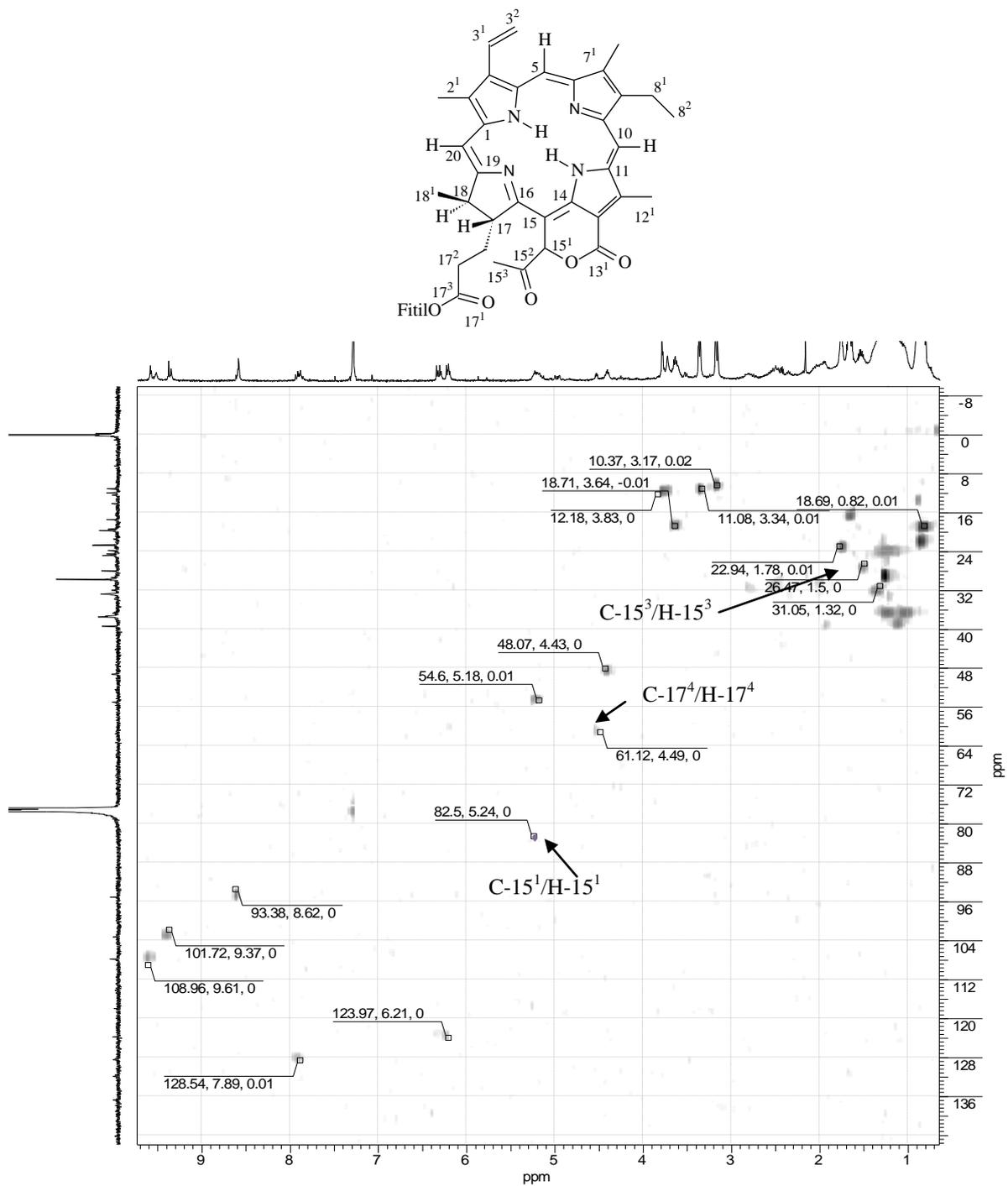


Figura 54: Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl₃) da substância 12

Acquisition Time (sec)	(0.0367, 0.3867)	Comment	AMOSTRA: C(53-54) 30-34(8) (IMPACT-HMBC) SOLVENTE: CDCl3 OPERADOR: VITOR
Date	21 Oct 2011 13:20:28	File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flavio Santana Ana Paula de Oliveira\UFRRJ1\RMNHC-500172\data112r
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus	(13C, 1H)
Original Points Count	(1024, 2048)	Points Count	(1024, 2048)
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz)	(27932.97, 5296.61)
		Number of Transients	16
		Pulse Sequence	impact-hmhc2d.cb
		Temperature (degree C)	20.160

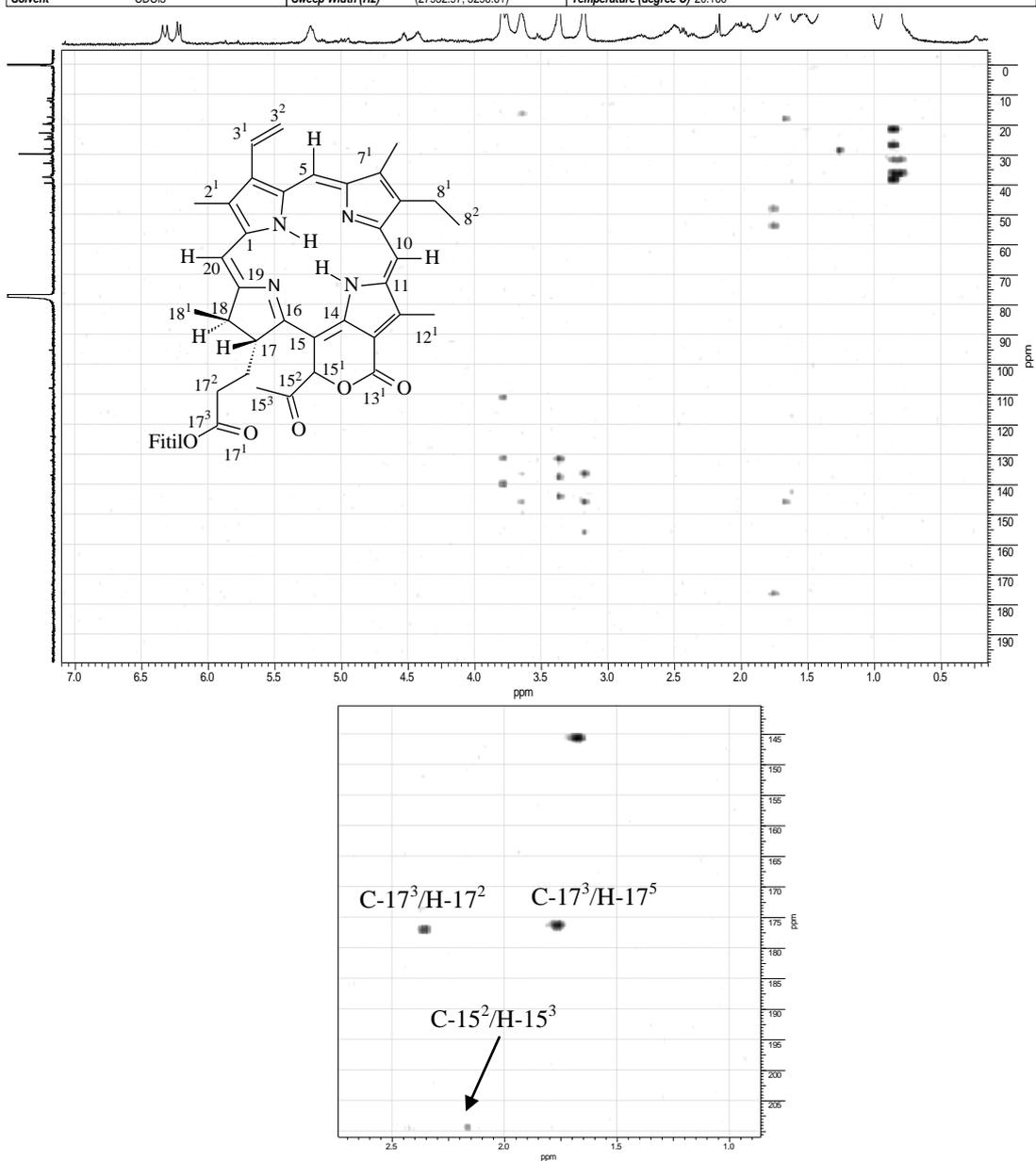


Figura 55: Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl₃) da substância **12** e expansão da região de deslocamentos químicos em δ_H 0,5 – 3,0 ppm.

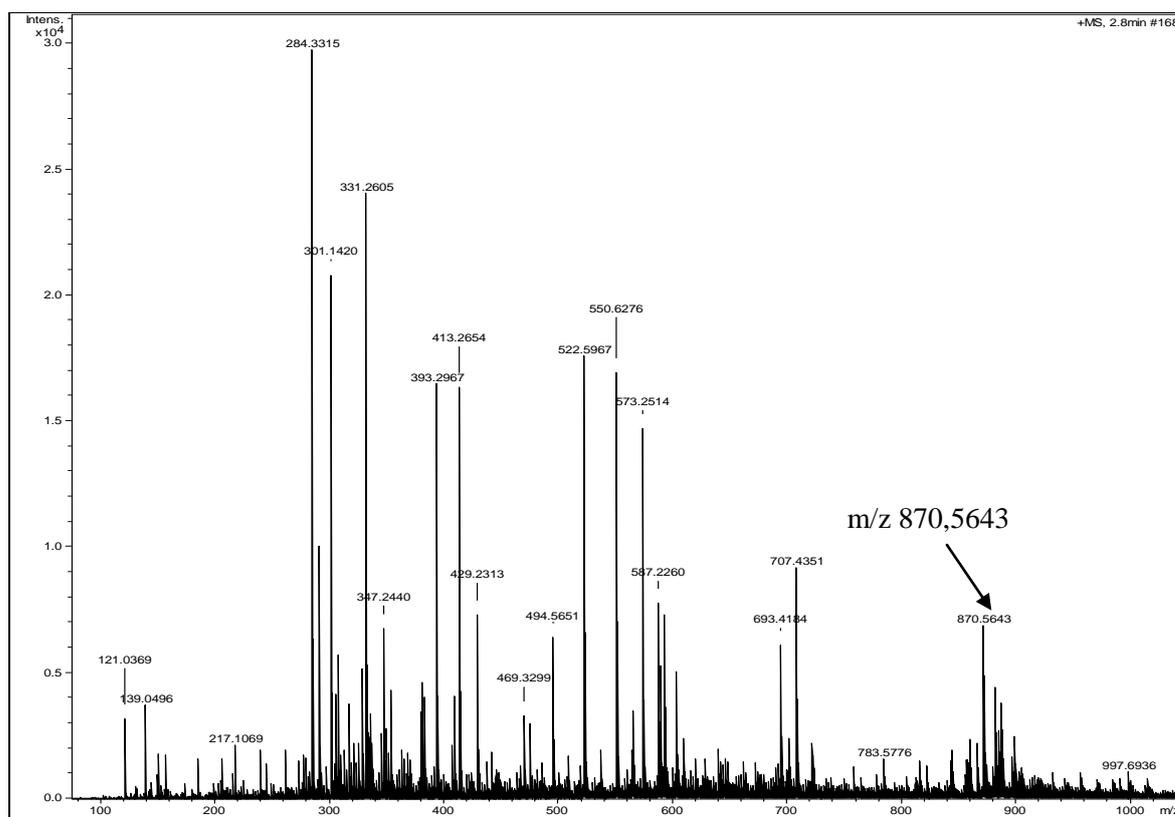


Figura 56: Espectro de LC-MS da substância 12.

I.3.2.8 Identificação de porfirinas em algumas frações do extrato Acetato de Etila das de *Talinum triangulare*

As frações **TAcet-15**, **TAcet-16**, **TAcet-17** e **TAcet-18-20** do extrato acetato de etila de folhas de *Talinum triangulare* foram analisadas por técnicas espectroscópicas de RMN ¹H, LC-MS e CLAE-UV. Os valores obtidos pelo espectro de RMN ¹H (**Figuras 59, 63, 67 e 71**) apresentou sinais de deslocamentos químicos característicos de feofitinas, pois foi possível observar singletos na região de frequência alta δ_H 8,55, 9,34 e 9,56 ppm referentes aos hidrogênios ligados a carbonos sp^2 e ainda sinais de metilas na região de δ_H 3,0 a 3,2 ppm. Apresentou ainda dubleto em δ_H 1,73 ppm e os sinais de grupos vinílicos em δ_H 7,91, 6,31, e 6,19 permitindo assim sugerir um sistema heterocíclico de porfirinas. Um tripleto em δ_H 1,65 e o quarteto em δ_H 3,60 foram correlacionados a grupo etila ligado ao anel porfirínico.

A análise de sinais remanescentes foi conclusiva para a confirmação do grupamento fitil, ligado ao anel porfirínico, no qual apareceram singletos na região δ_H 0,76 - 0,84 ppm confirmando a presença de metilas e um multipletto em δ_H 1,24 indicando grupos metilênicos. A comparação dos valores de δ_H com as feofitinas isoladas e identificadas neste trabalho e a

sinais de deslocamentos químicos encontrados na literatura permitiu confirmar que estas frações são ricas em porfirinas.

A análise de massas por eletrospray com detecção de modo positivo (**Figuras 60, 64, 68 e 72**) permitiu confirmar a presença de feofitinas, pois foram detectados valores de íon molecular $[M^+ + H]$ em (m/z): 803,5386, 813,5550, 819,5145, 831,5694, 871,5544, 887,5494, 903,5464, 945,6907 e 961,6834 que são compatíveis com sistemas encontrados em feofitinas. Alguns valores de íon molecular como os m/z 871,5544 $[M^+ + H]$, m/z 887,5494 $[M^+ + H]$, m/z 903,5464 $[M^+ + H]$ encontrados nos espectros de massas foram semelhantes às feofitinas **4, 5 e 6**, respectivamente.

Outra análise que ajudou na confirmação da presença de feofitinas nestas frações foi CLAE (**Figura 57, 61, 65 e 69**), que apresentou TR semelhantes aos encontrados em dados da literatura e ainda em feofitinas identificadas anteriormente. A mistura de feofitinas nas frações mostrou picos característicos representando os tempos de retenção (RT) 6,144, 8,969 e 9,194, 9,387, 12,450, 13,646, 14,634, 14,823, 15,729, 16,144 e 20,049 minutos. O espectro de UV-visível (**Figura 58, 62, 66 e 72**) mostrou λ_{\max} 406,88(ϵ), 407,0(ϵ), 407,3(ϵ), 408,12(ϵ) nm. Esses dados foram importantes para confirmar a proposta de feofitinas.

A fração TAcet-15 apresentou uma mistura de 3 fitinas identificadas com os espectros LC-MS e HPLC-UV. Os valores observados no espectro de LC-MS apresentaram íons moleculares em m/z 871,5544 $[M^+ + H]$, m/z 887,5494 $[M^+ + H]$, m/z 903,5464 $[M^+ + H]$ e os TR 9,387, 14,634 e 16,144 minutos, permitindo sugerir ser as fitinas **4, 5 e 6**. A fração TAcet-16 apresentou uma mistura de 5 fitinas que sugere ser 3 semelhantes às da fração TAcet-15 e mais duas com m/z 945,6907 e 961,6834 que ainda não foram identificadas. Na fração TAcet-18-20 foi possível visualizar 5 fitinas que apresentaram íons moleculares em m/z 803,5386, 819,5145, 831,5694, 871,5544, 903,5464. Valores esses diferentes dos anteriores sendo possível a sugestão de novas feofitinas.

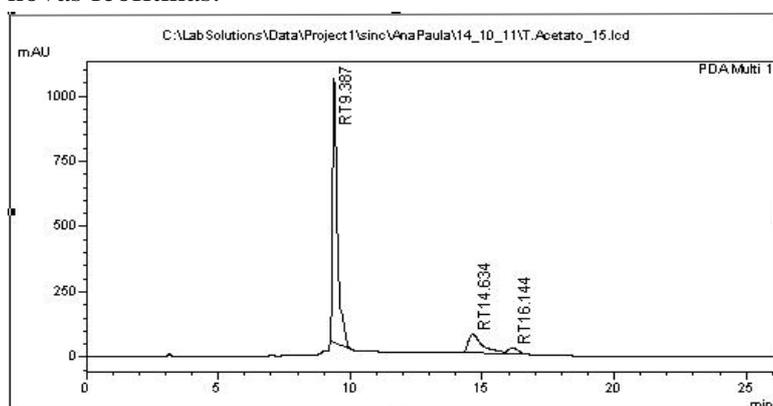


Figura 57: Cromatograma da fração TAcet-15.

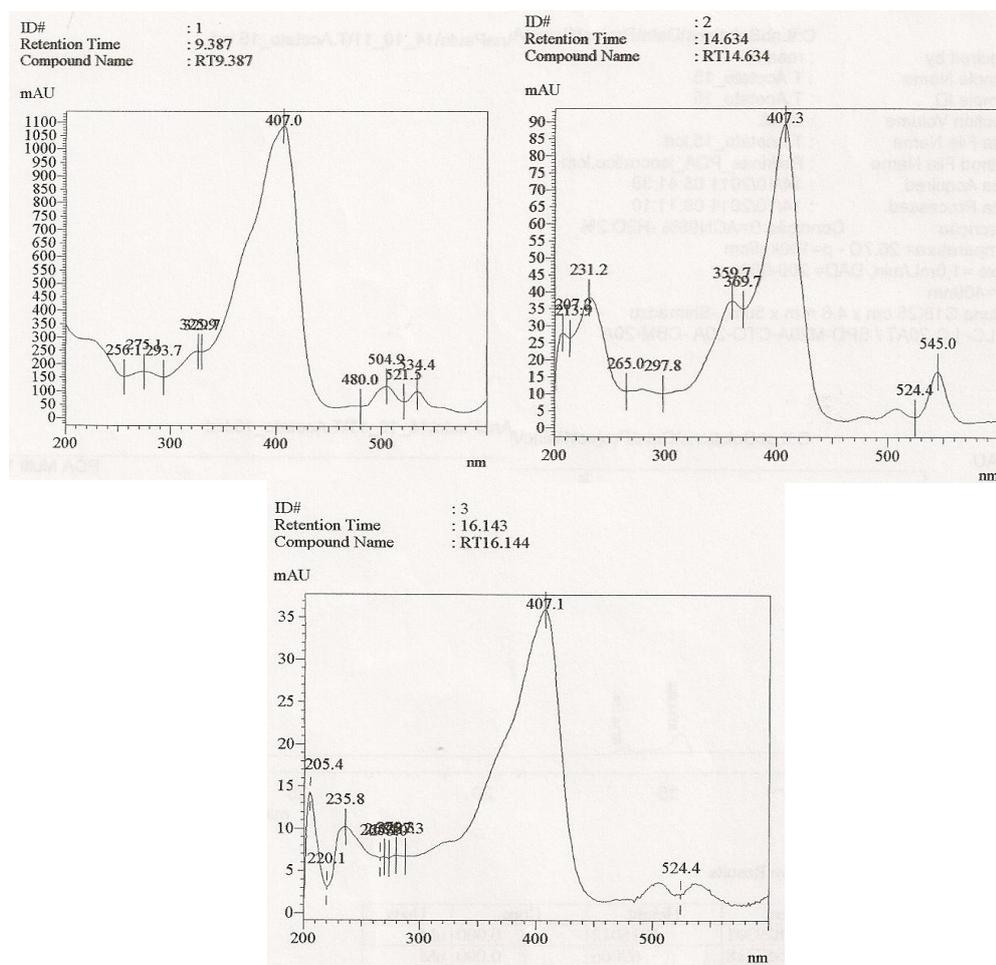


Figura 58: Curvas de UV da fração TAcet-15.

10 Aug 2011

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: T. acetato 15 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCl3		
Date	04 Aug 2011 10:12:36	File Name	E:\277\pdata\1\ 277001r		
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients	16
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	27.000		

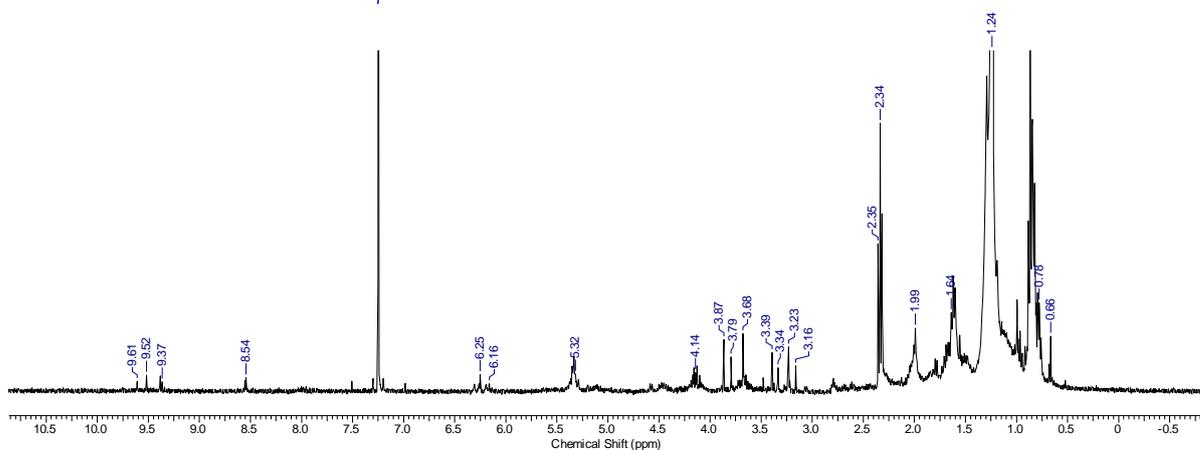


Figura 59: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração TAcet-15.

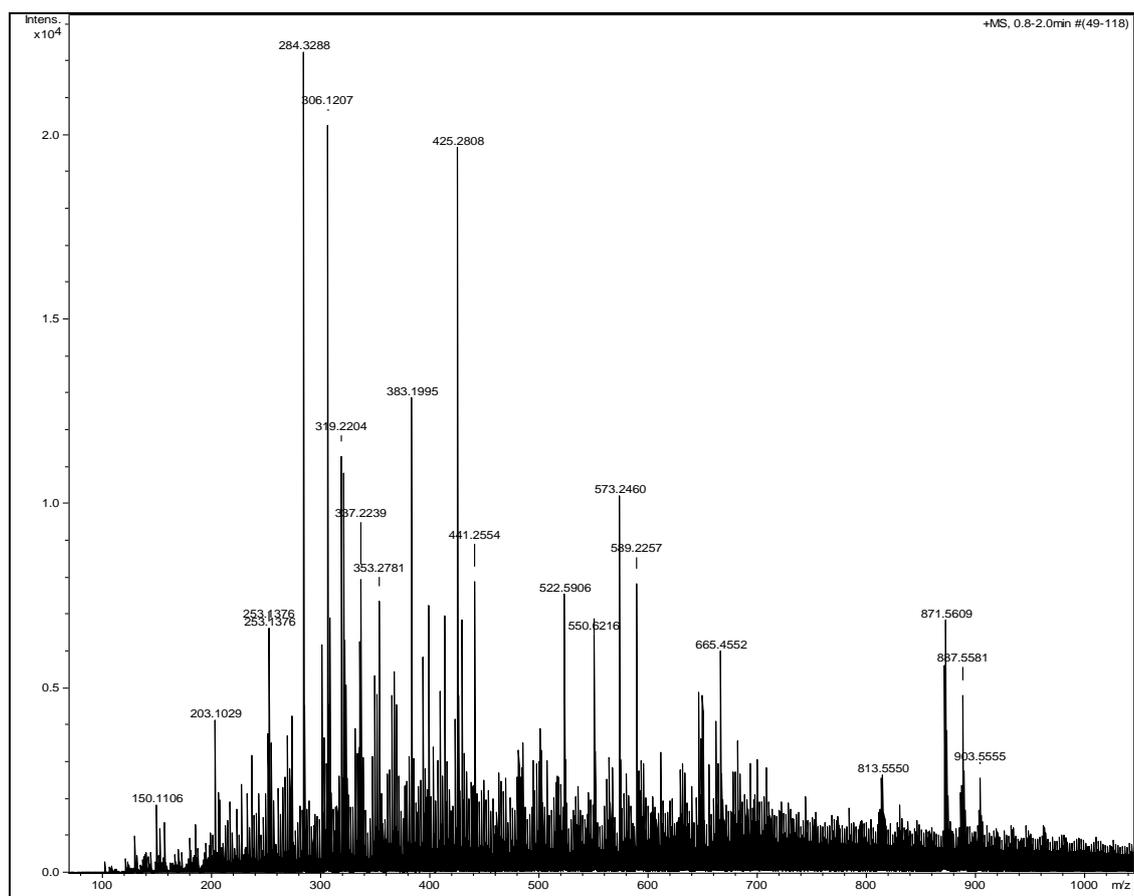


Figura 60: Espectro de massas da fração TAcet-15.

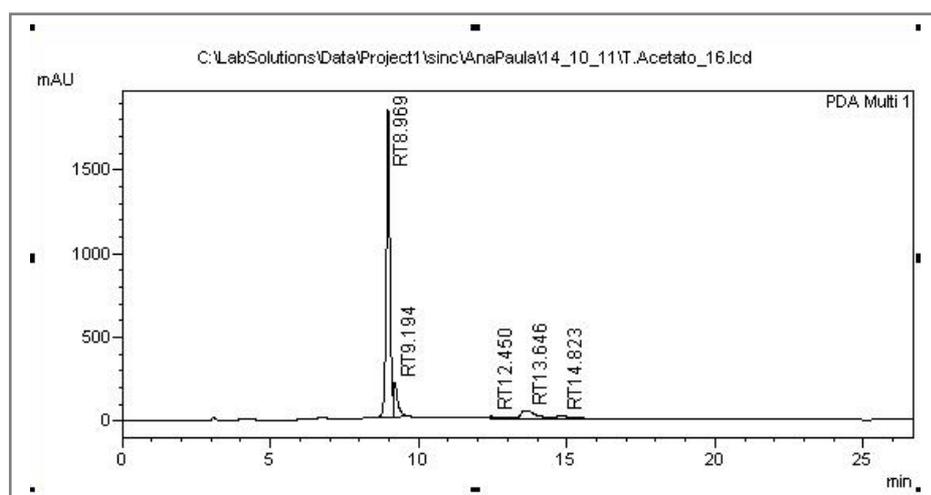


Figura 61: Cromatograma da fração TAcet-16.

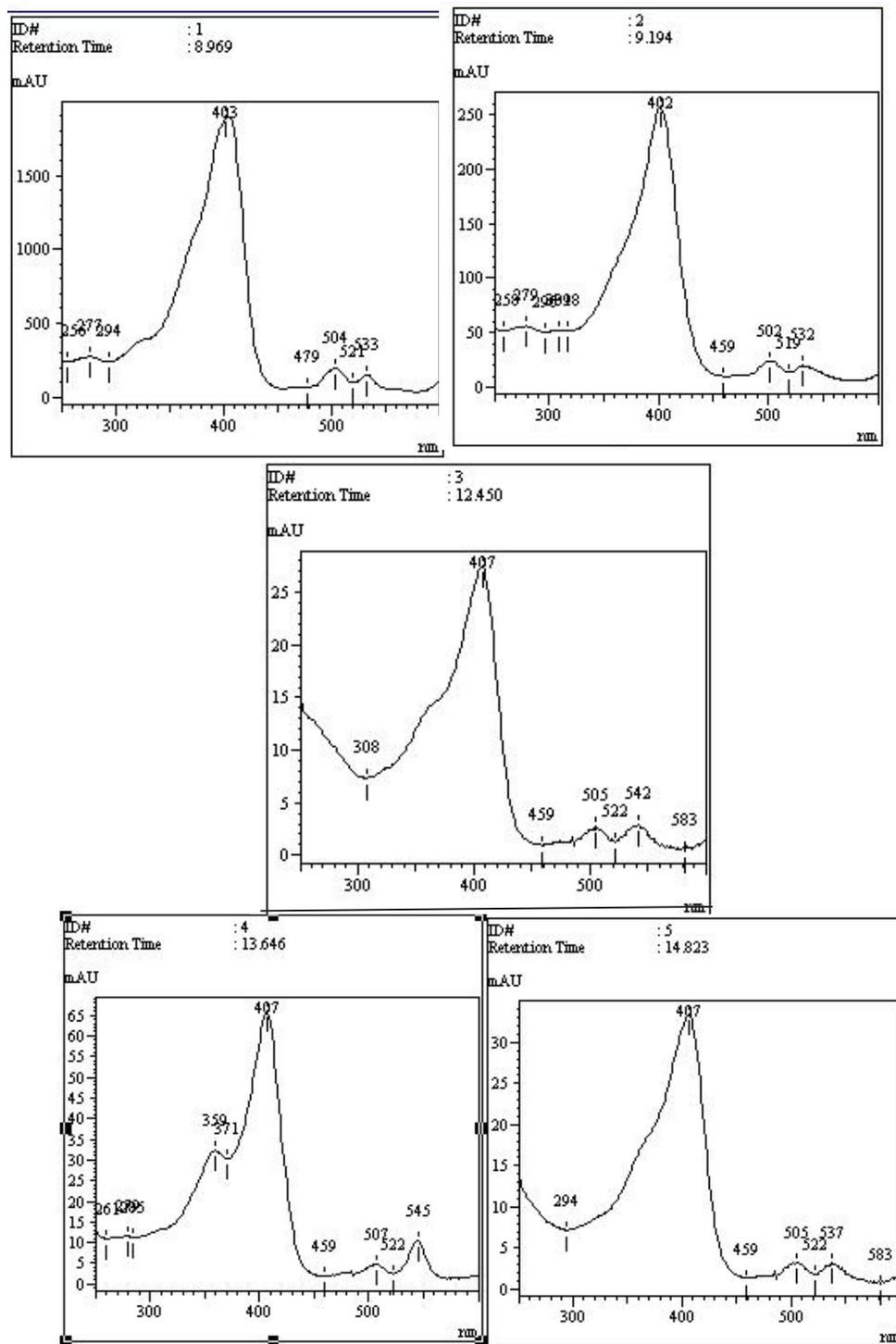


Figura 62: Curvas de UV da fração TAcet-16.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: T. acetato 16 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCl3		
Date	04 Aug 2011 10:20:20	File Name	E:\278\data\1_278001r		
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients	16
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	27.000	Original Points Count	32768

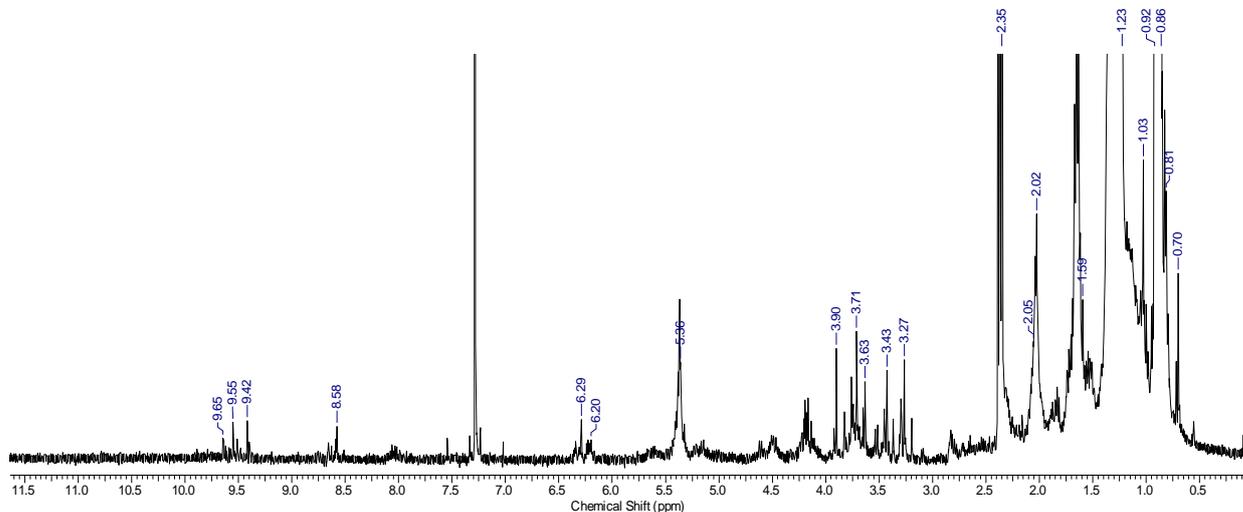


Figura 63: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração TAcet-16.

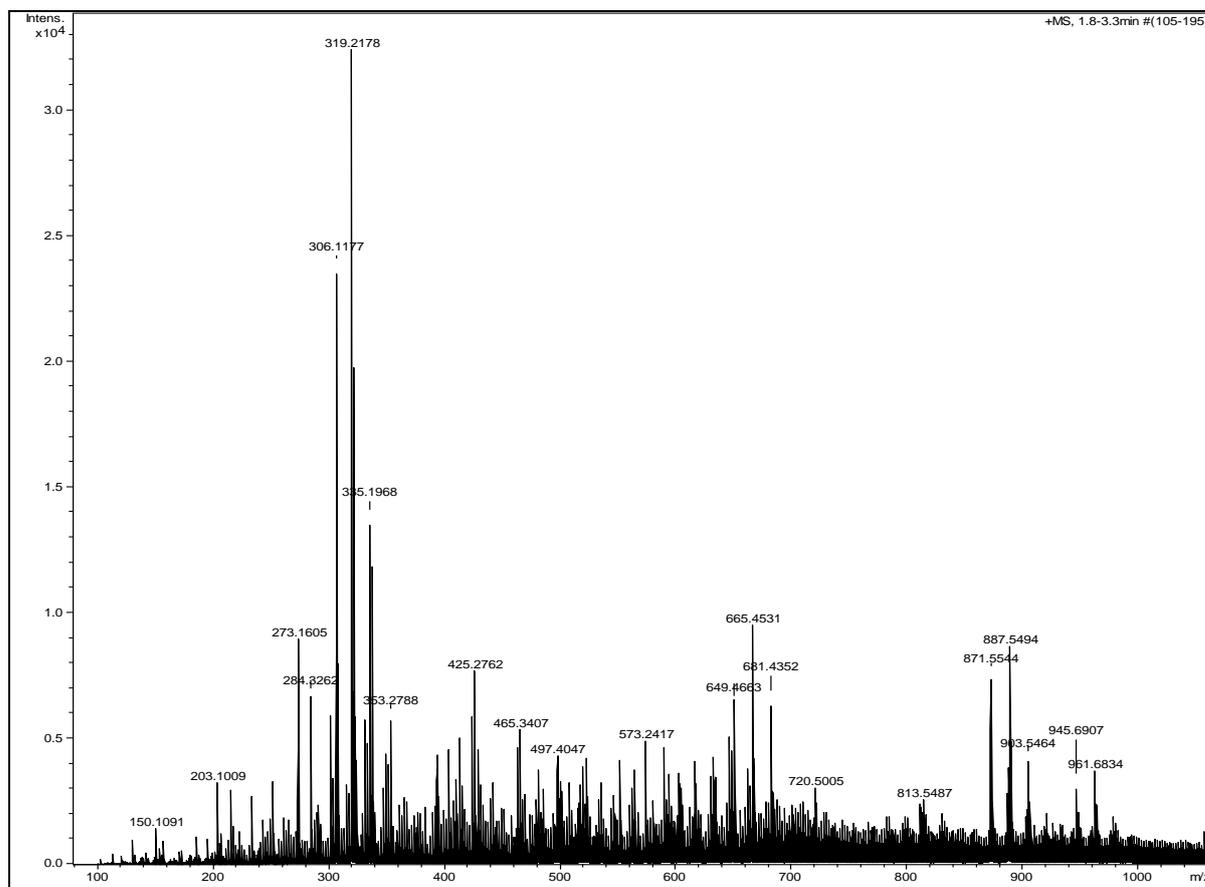


Figura 64: Espectro de massas da fração TAcet-16.

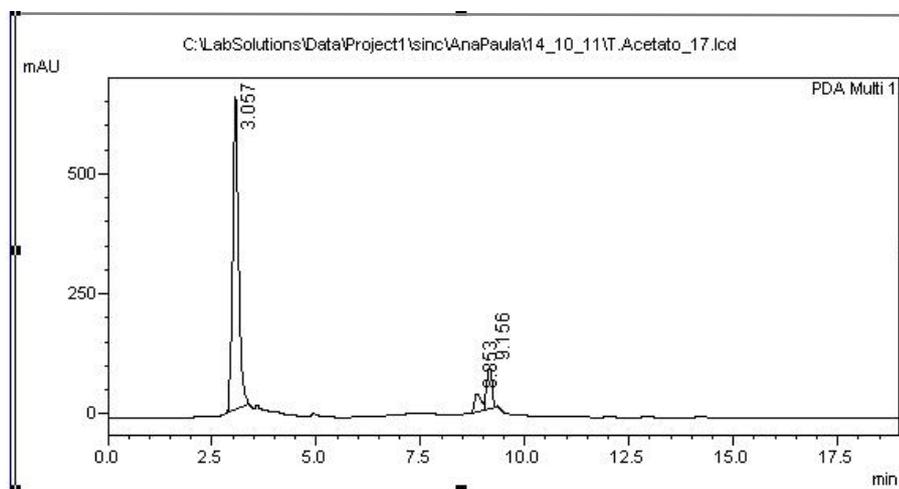


Figura 65: Cromatograma da fração TAcet-17.

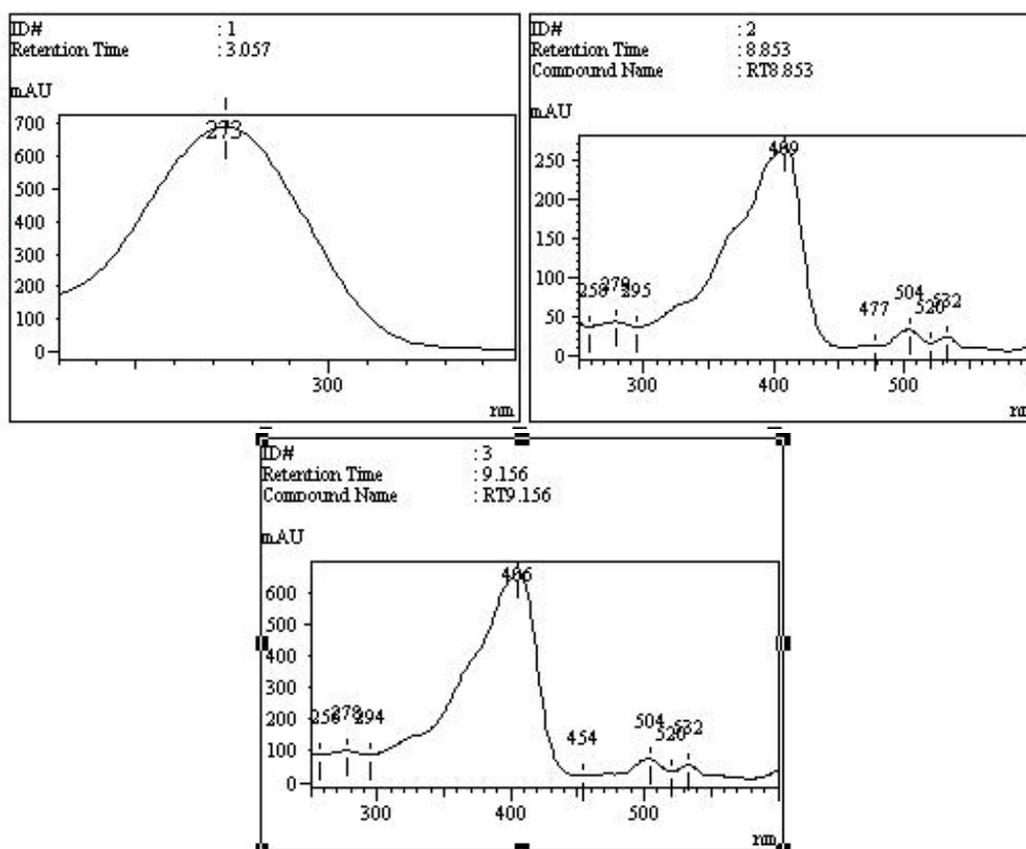


Figura 66: Curvas de UV da fração TAcet-17.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: T. acetato 17 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCl3	
Date	04 Aug 2011 10:26:14	File Name	E:\279\pdata\1\279001r	
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count
Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	27.000	Solvent
				CHLOROFORM-D

Chloroform-d

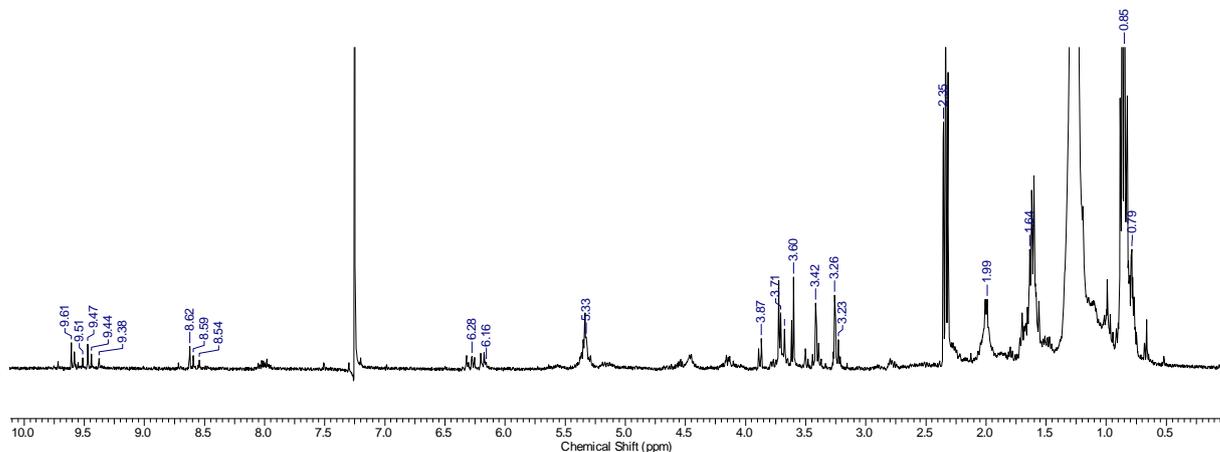


Figura 67: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração TAcet-17.

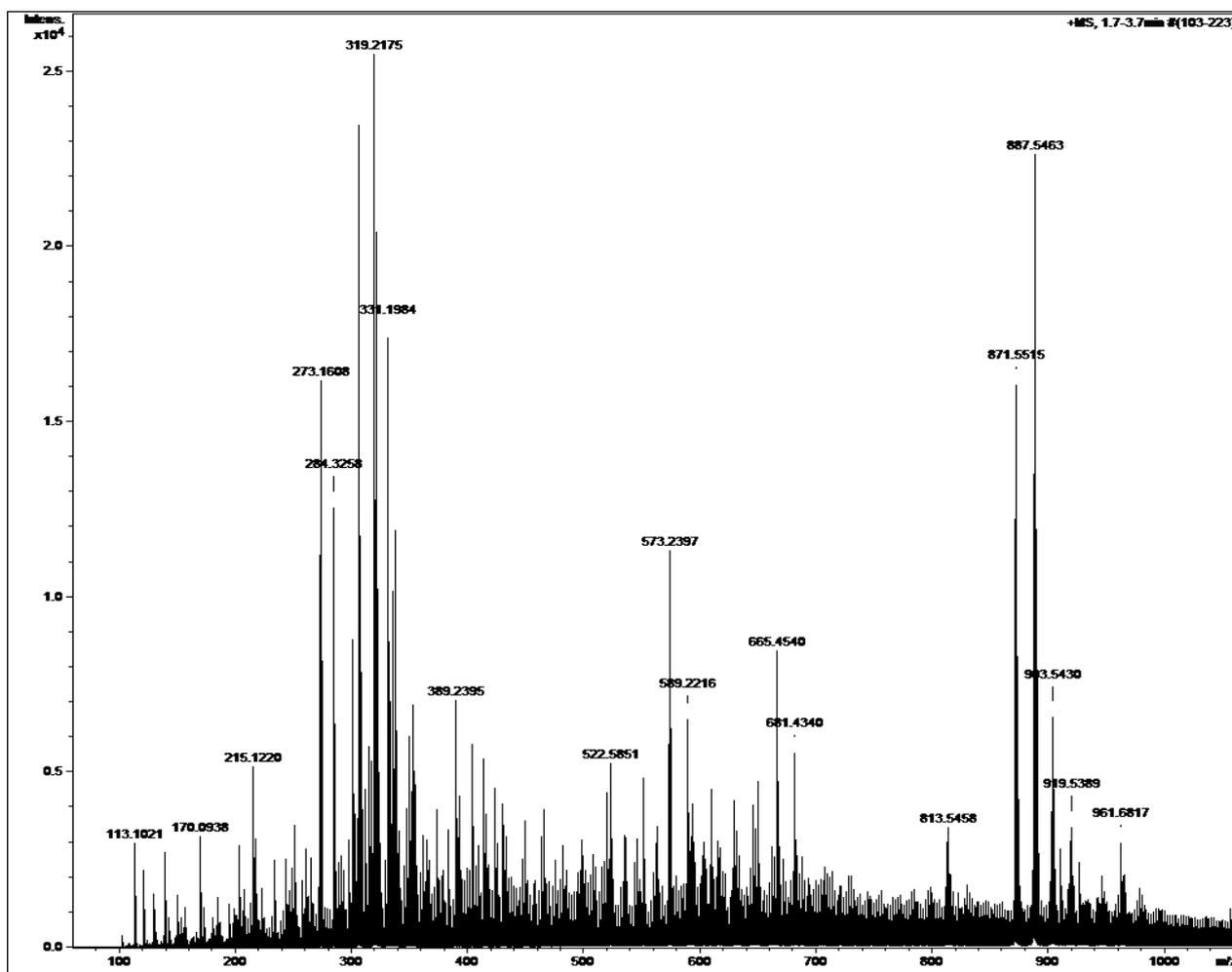


Figura 68: Espectro de massas da fração TAcet-17.

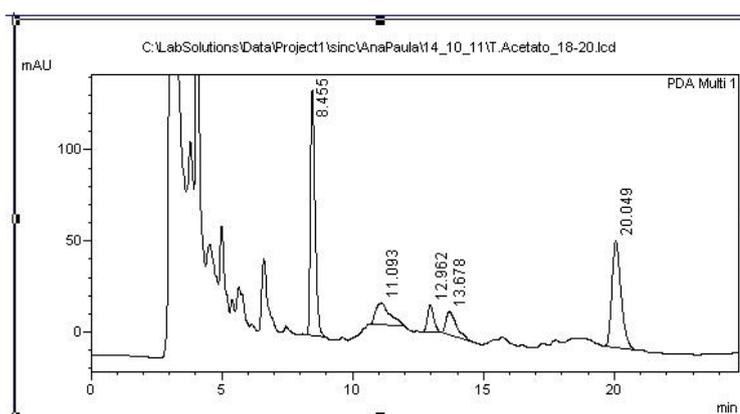


Figura 69: Cromatograma da fração TAcet-18-20.

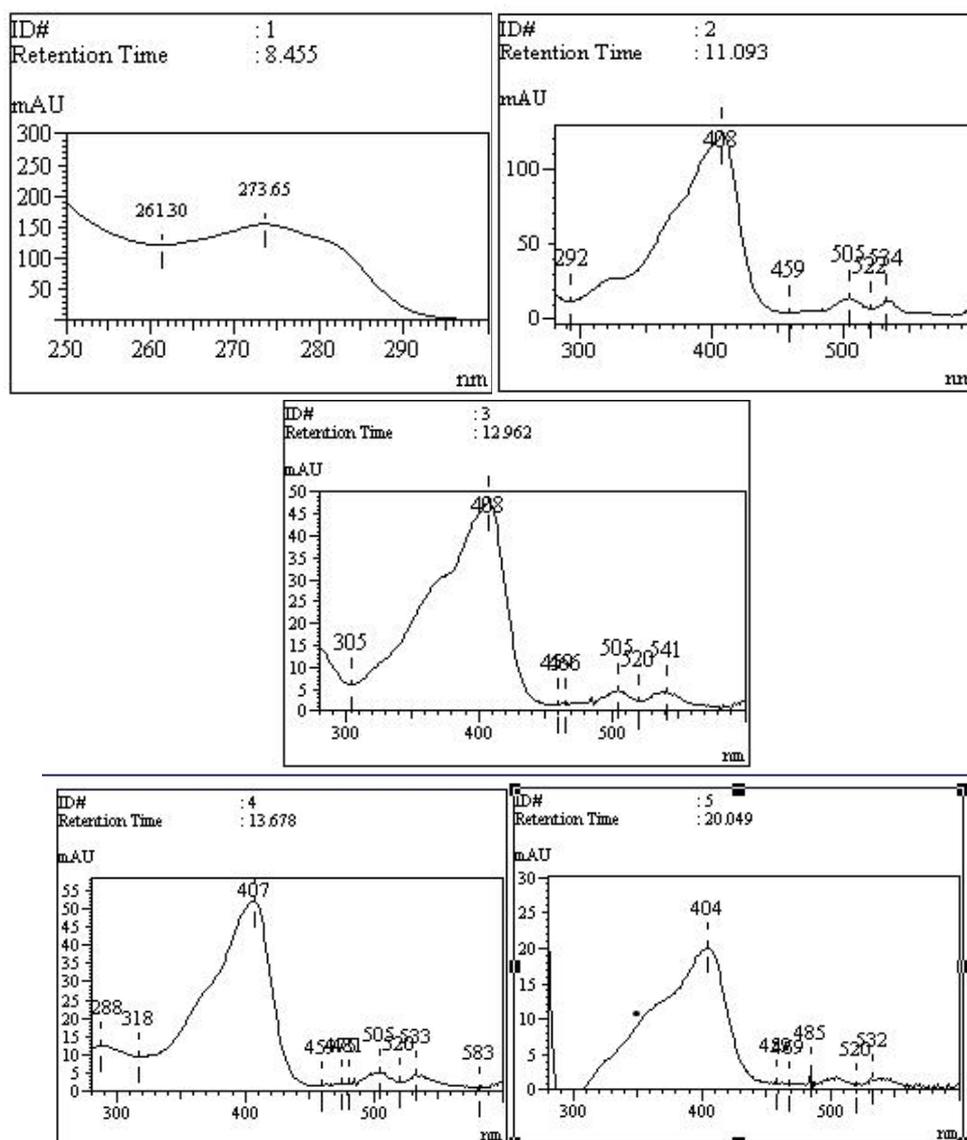


Figura 70: Curvas de UV da fração TAcet-18-20.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: T. acetato 18-20 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCl3		
Date	04 Aug 2011 10:33:18	File Name	E:\280\data\11_280001.r		
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients	16
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	27.000	Original Points Count	32768

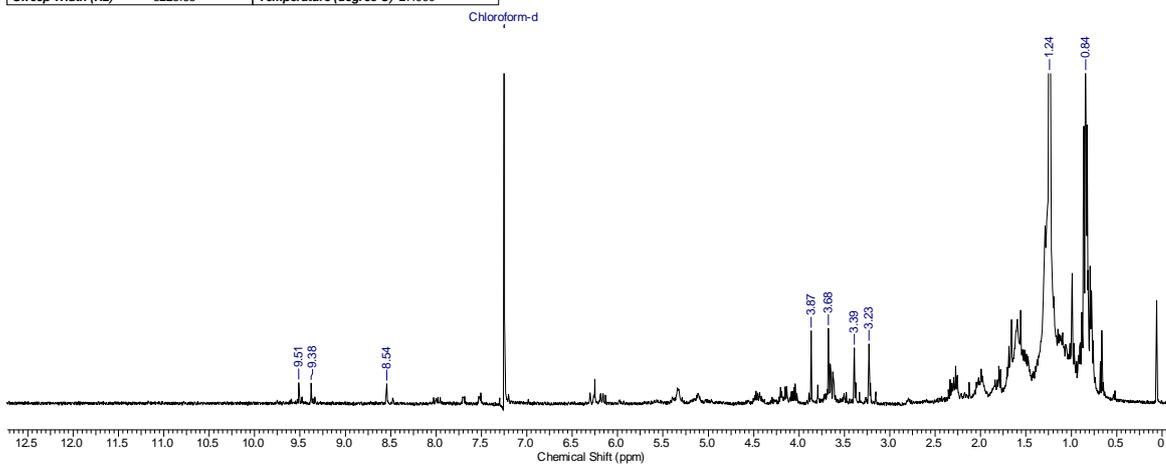


Figura 71: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração **TAcet-18-20**.

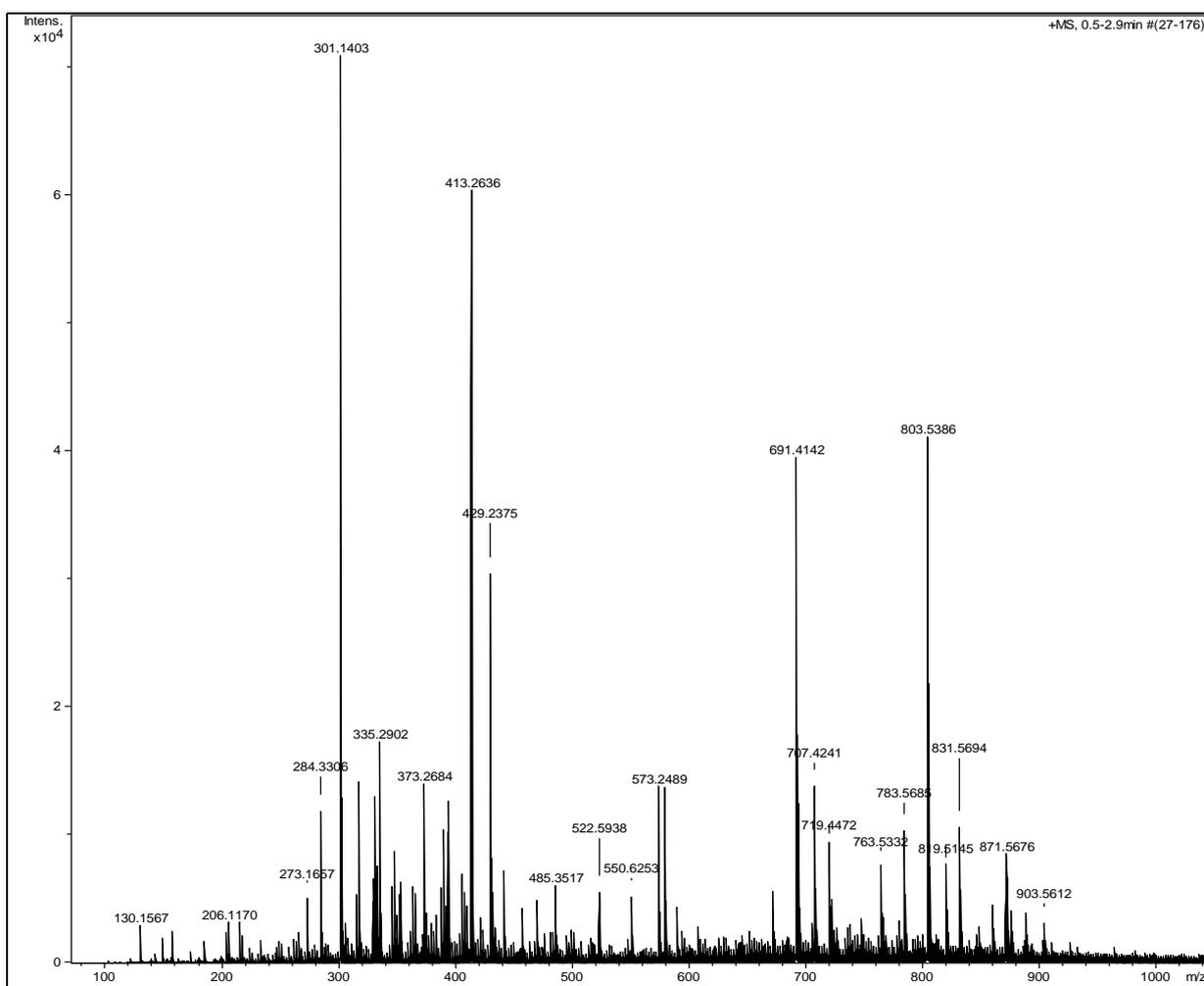


Figura 72: Espectro de massas da fração **TAcet-18-20**.

I.3.2.9 Identificação da substância 13 e 14.

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° das saponinas **13** e **14** foram comparados com dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990 e CARVALHO, 2001) e permitiriam confirmar a estrutura **13** sendo como o produto natural 3-O- β -D-glicopiranosilsterol e 3-O- β -D-glicopiranosilestigmasterol sendo o composto **14**.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 73**) apresentou valores de deslocamentos químicos referentes a metilas entre δ_{H} 0,64 – 0,94 ppm de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 5,31 (dl), típico de H-6 de fitosteróides. Além dos sinais da parte da aglicona que aparecerem em δ_{H} 3,61 (m, H-5'), 4,19 (d, H-1'), 4,44 (tl, H-2' e H-4') e 4,88 (tl, H-3'), que podem ser atribuídos aos hidrogênios da unidade de açúcar tanto para o composto **13** quanto para o composto **14**. A unidade de açúcar foi atribuída como β -D-glicopiranosila, devido a presença do dubleto em δ_{H} 4,19 (J=8 Hz) que representa o hidrogênio anomérico (H-1'). A substância **14** apresentou ainda sinais em δ_{H} 5,01 e 5,11 (d) indicando os H-22 e H-23.

O espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° (**Figuras 74 e 75**) mostrou sinais de carbono olefínico δ_{CH} 121,7 ppm atribuído ao carbono C-6, um carbono quaternário olefínico δ_{C} 140,7 ppm atribuídos ao C-5 e ainda um carbono carbinólico δ_{CH} 79,6 ppm referente ao C-3 comum aos dois esteróides. A saponina **14** apresentou também sinais de carbonos olefínicos δ_{CH} 129,2 e 138,3 ppm indicando os carbonos C-23 e C-22 do estigmasterol.

Os valores dos deslocamentos químicos atribuídos a unidade de açúcar ajudaram confirmar a proposta para as substâncias, pois apresentou sinal característico em δ_{CH} 101,2 para C-1', característico de carbono carbinólico da glicose, e os demais de deslocamentos químicos em δ_{CH} 70,5 (C-4'), 73,9 (2'), 77,2 (C-3' e C-5') e em δ_{CH_2} 61,4 (C-6'). Os valores dos deslocamentos químicos representados na **Tabela 10** foram confirmados através de comparação com dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990 e CARVALHO, 2001).

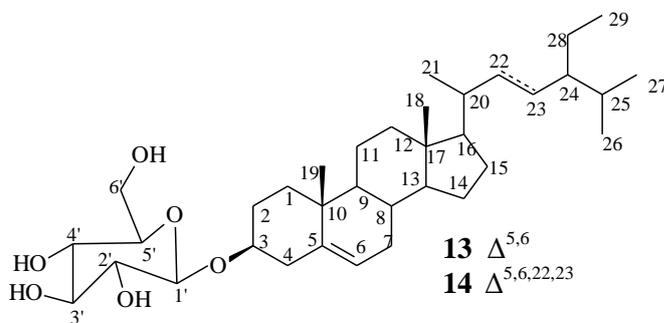


Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **13** e **14**.

C	Substâncias 13 e 14		KOJIMA <i>et al.</i> , 1990 Sitosterol e estigmasterol glicosilados	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,2	-	37,2	-
2	29,5	-	29,4	-
3	79,65	3,61(m)	71,8	3,59 (m)
4	42,3	-	42,8	-
5	140,9	-	140,8	-
6	121,6	5,31 (dl)	121,7	5,31 (dl)
7	31,8	-	32,0	-
8	31,8	1,40 (m)	32,0	1,55 (m)
9	50,2	1,80 (m)	50,2	-
10	36,6	-	36,6	-
11	21,0	-	21,3	-
12	38,7	-	39,8	-
13	42,3	-	42,3	-
14	56,6	0,94 (m)	56,9	-
15	23,0	-	24,4	-
16	29,1	-	28,9	-
17	55,8	-	56,1	-
18	12,2	0,64 (s)	12,2	0,65 (s)
19	19,3	0,94 (s)	19,4	0,80 (s)
20	35,9		40,4	
21	19,5		21,1	1,02 (d)
22	33,7/138,5	5,11 (d)	33,8 /138,6	-
23	25,8/129,2	5,01 (tl)	29,4/128,9	-
24	45,5	-	45,8	-
25	29,7	-	32,0	-
26	20,1	0,89 (d)	21,3	0,85 (d)
27	19,0	0,81 (d)	19,0	0,80 (d)
28	24,3	-	25,5	-
29	12,1	0,79 (d)	12,1	0,80 (t)
1'	101,2	4,19 (d)	99,7	4,60 (s)
2'	73,9	2,90 (m)	71,5	-
3'	77,2	3,50 (tl)	72,9	-
4'	70,5	-	68,5	-
5'	79,2	-	71,7	-
6'	61,4	-	62,1	-
OH	-	4,44 /4,48 (sl)	-	4,48 (sl)

Acquisition Time (sec)	7.9692	Comment	AMOSTRA: C3 (38) S (PROTON)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	¹ H	Original Points Count	65536
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	65536
				Sweep Width (Hz)	8223.68

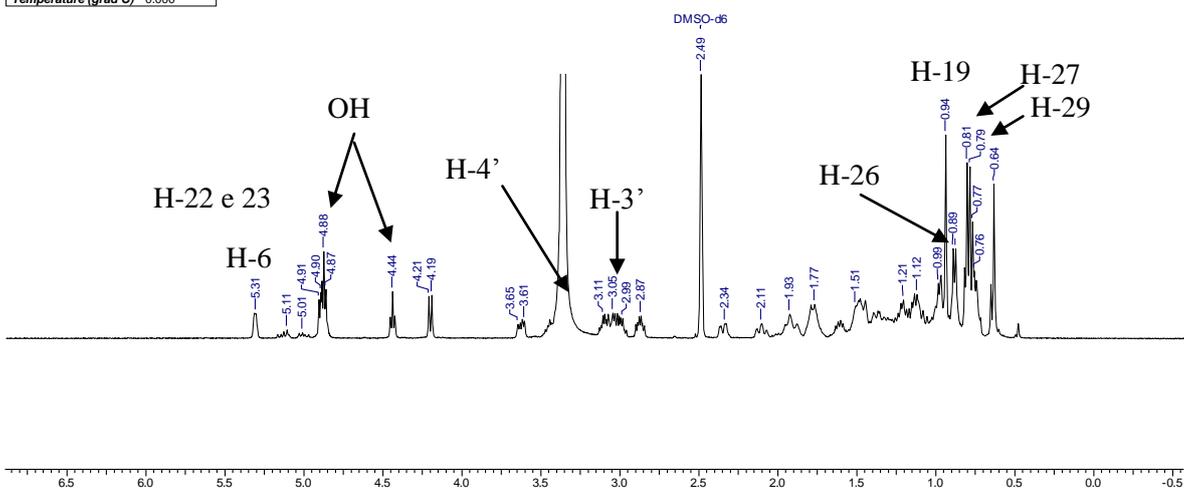
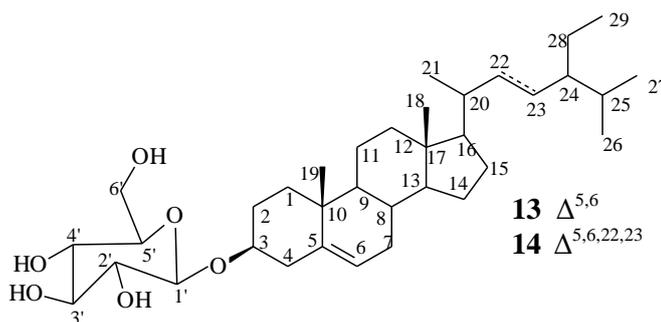


Figura 73: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da substância **13** e **14**.



Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment		Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	¹³ C	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	24038.46

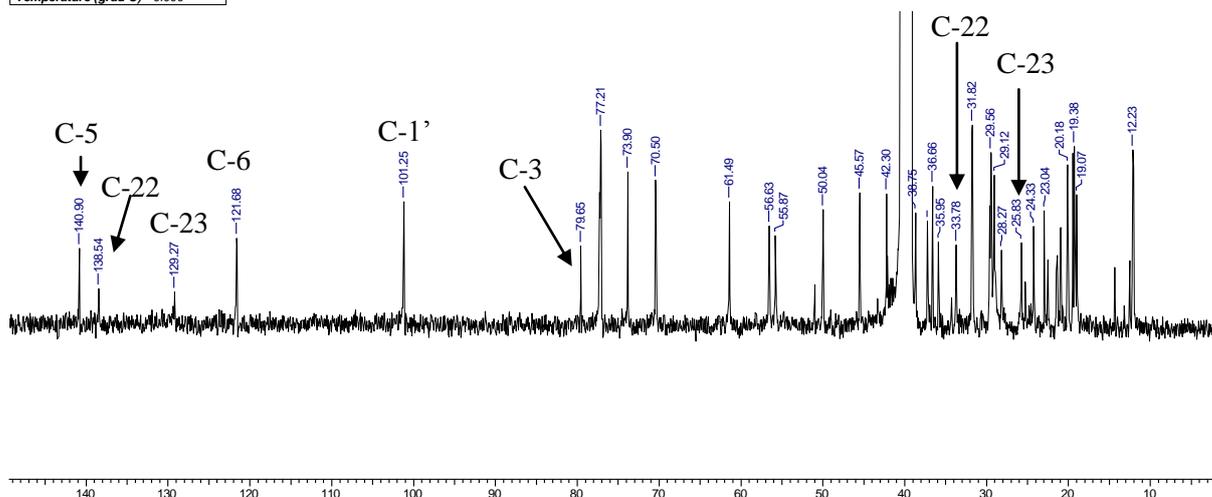


Figura 74: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) da substância **13** e **14**.

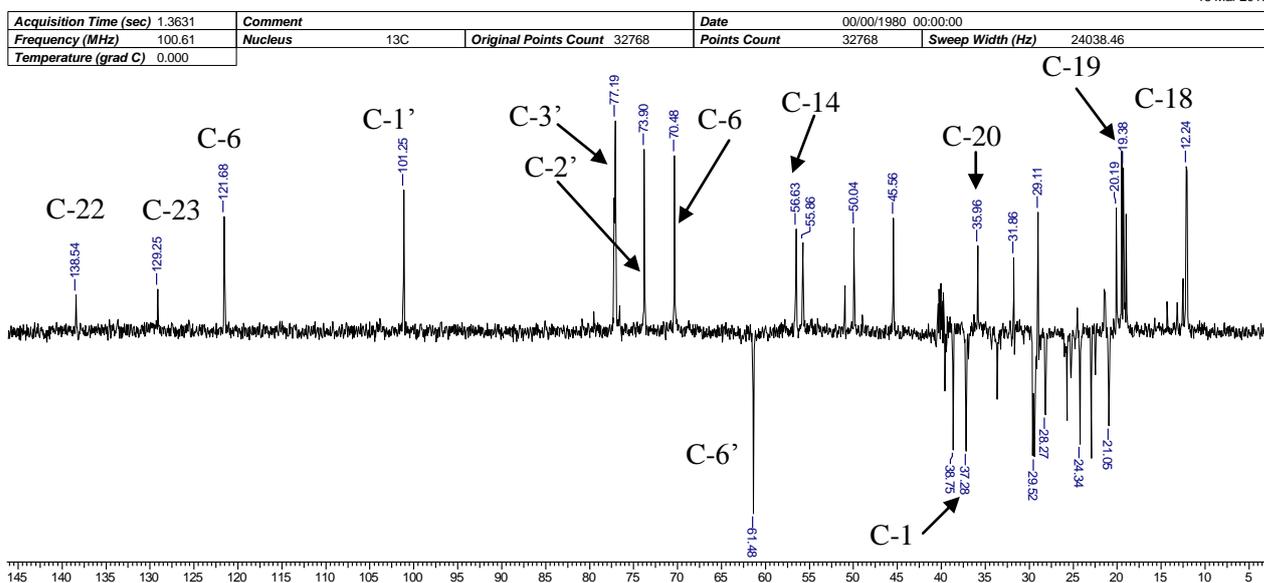


Figura 75: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, DEPT 135 °C, DMSO-d₆) da substância **13** e **14**.

I.3.2.10 Identificação da substância **15**

A análise dos espectros da substância **15** e comparação com espectros de substâncias isoladas de outras espécies estudadas no laboratório (V. C. da Silva, 2006) conduziu à identificação da alantoína. O espectro de RMN ¹H (**Figura 76**), da substância **15** apresentou sinais, na região de frequência alta, sendo sinais referentes a três singletos em δ_H 10,49 (HN-3), δ_H 8,07 (HN-1) e δ_H 5,81 (H₂N-8), um dubleto em δ_H 6,92 ($J = 8,0$ Hz, HN-6) atribuídos a cinco hidrogênio ligados a átomos de nitrogênio, além do dubleto em δ_H 5,25 ($J = 8,0$ Hz) referente ao hidrogênio metínico H-5.

O espectro de RMN ¹³C (**Figura 77**) apresentou sinais correspondentes a quatro átomos de carbono, sendo dois sinais em δ_C 174,04 (C-4) e 157,82 (C-2), atribuídos a dois átomos carboximídicos, e dois sinais em δ_C 157,22 (C-7) e 62,86 (C-5) referentes ao carbono carboxílico de amida e metínico, respectivamente. A comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C da substância **15** (**Tabela 11**) com os dados de literatura (FERREIRA *et al.*, 2000, POJE & SOKOLIC-MARAVIC, 1986) foi determinante para propor a estrutura da alantoína.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **15**.

C	Substância 15		FERREIRA <i>et al.</i> , 2000	POJE & SOKOLIC- MARAVIC, 1986
	δ_{H} (mult.; J Hz)	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	8,07 (sl)	-	8,05 (sl)	-
2	-	157,82	-	156,9
3	10,48 (sl)	-	10,54 (sl)	-
4	-	174,04	-	173,7
5	5,25 (dd; 8,0 e 1,0)	62,86	5,21 (d; 8,1)	62,5
6	6,91 (d; 8,0)	-	6,91 (d; 8,1)	-
7	-	157,22	-	157,5
8	5,80 (sl)	-	5,82 (sl)	-

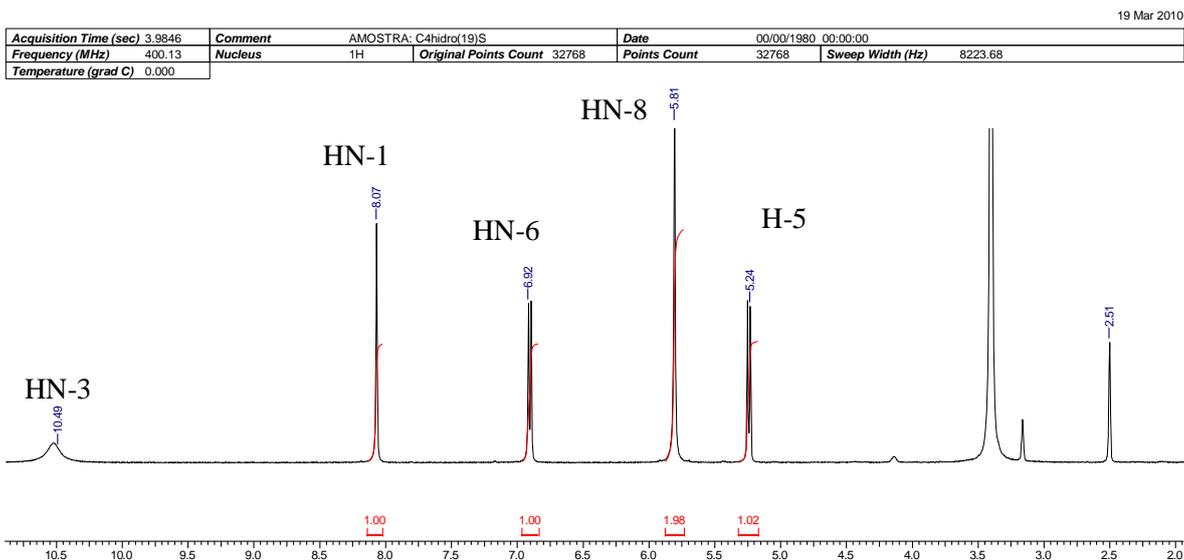
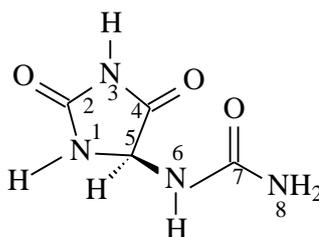


Figura 76: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de **15**.

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	C4hidro (19)S (13C DESAC)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	24038.46

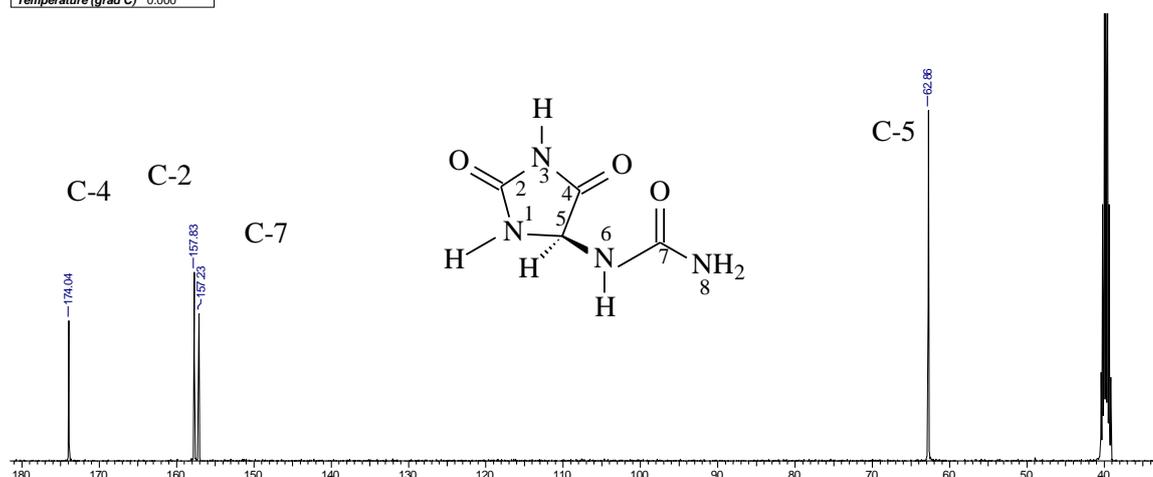


Figura 77: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da substância **15**.

I.3.3 Identificação das substâncias isoladas do caule de *Talinum triangulare*

I.3.3.1 Identificação das substâncias **16**, **17**, **18** e **19**.

Os esteroides **16**, **17**, **18**, **19** foram obtidos em mistura e identificados como campesterol (**16**), sitosterol (**17**), estigmasterol (**18**) e escotlenol (**19**) através da análise de espectros de RMN ^1H e ^{13}C e CG-massas, os valores espectroscópicos foram comparados com dados registrados na literatura (GOULART *et al.* 1993 e CARVALHO *et al.*, 2000).

O espectro de RMN ^1H (**Figura 78**) apresentou sinais de deslocamentos químicos na região de δ_{H} 0,8 – 1,0 correspondendo a metilas, e um multiplete em δ_{H} 3,61 referente ao hidrogênio carbinólico H-3, um singlete largo em δ_{H} 5,31 representando o hidrogênio olefínico H-6, e ainda os dubletos largos em δ_{H} 5,02 e 5,16 indicando os H-22 e H-23.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 79**) mostrou sinais de carbonos olefínicos em δ_{C} 140,3, 137,9, 128,9, 121,3 117,0 e 99,2 com intensidades diferentes, revelando se tratar ligações duplas em mistura de esteróides. Identificaram-se sinais de carbonos carbinólico δ_{CH} 71,0, 70,7 e 71,8 referente ao C-3 dos esteróides em mistura.

Os espectros de massas obtidos para os componentes separados pelo sistema de CG acoplado ao espectrômetro de massas (**Figura 80**) com maiores TR foram comparados aos da biblioteca do equipamento e foram idênticos aos representados pelas estruturas **16**, **17**, **18** e **19** de mistura de esteróides. Sendo o respectivo íon molecular e (M^+) de cada substância em m/z : 400, 412, 414, e 414, com tempos de retenção correspondentes em 19,51, 20,06, 20,31 e

21,41 minutos, respectivamente, para as substâncias **16**, **17**, **18** e **19**. Os demais valores dos deslocamentos químicos estão representados pela **Tabela 12** e foram comparados com dados da literatura (JAIN & BARI, 2010 e CARVALHO & CARVALHO, 2000) que serviram para confirmar as propostas provenientes das análises acima aliadas com CG-EM.

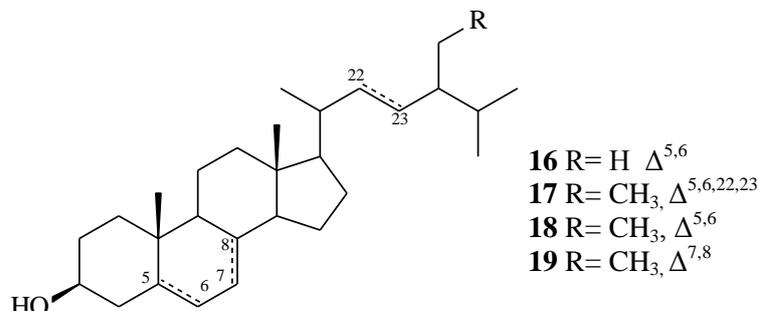


Tabela 12. Dados de RMN de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) das substâncias **16**, **17**, **18** e **19**.

C	Substâncias 16/17/18/19		CARVALHO & CARVALHO, 2000 e JAIN & BARI, 2010 16/17/18/19
	δ_C	δ_H	δ_C
1	37,2/36,4	-	37,4/37,2
2	29,7/29,4	-	31,7/31,6
3	71,0/71,8/70,7	3,68/3,51 (m)	71,6/71,7
4	42,3/41,0/37,4	-	42,2/37,9
5	140,7/142,8	-	140,7/145,8
6	121,3/32,0/27,9	5,31 (sl)	121,8/121,7/31,7/27,9
7	31,8/32,0/99,2/32,77	5,37 (sl)	42,3/42,8/101,0
8	31,7/32,0/117,0	1,40/1,55 (m)	31,9/117,4
9	50,2/54,3	1,8 (m)	50,1/55,0
10	36,6/35,4	-	36,5
11	21,0	-	21,1
12	38,7/39,8	-	39,7
13	42,3	-	42,2
14	56,6/56,9	0,90 (m)	56,8
15	23,0/24,4	-	24,4
16	29,1/28,9	-	28,9
17	56,1/55,8	-	55,9
18	12,2	0,69 (s)	12,0
19	19,0/19,4	0,96/0,82 (s)	19,4
20	37,2/40,4	-	36,1/40,5
21	19,3/21,1	1,02 (d)	18,8/21,2
22	33,7/137,9/	5,16 (d)	33,9/138,3
23	25,7/128,9/	5,02 (d)	26,1/130,9
24	45,5/45,8	-	45,0/51,2
25	29,7/32,0	-	31,9
26	18,9/21,3	0,85 (d)	21,1
27	18,8/19,0	0,80 (d)	19,0

28	24,3/25,5	-	25,4
29	11,8/12,1	0,80 (t)	12,3

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: HFP(2)S (PROTON)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	8223.68

18 Mar 2010

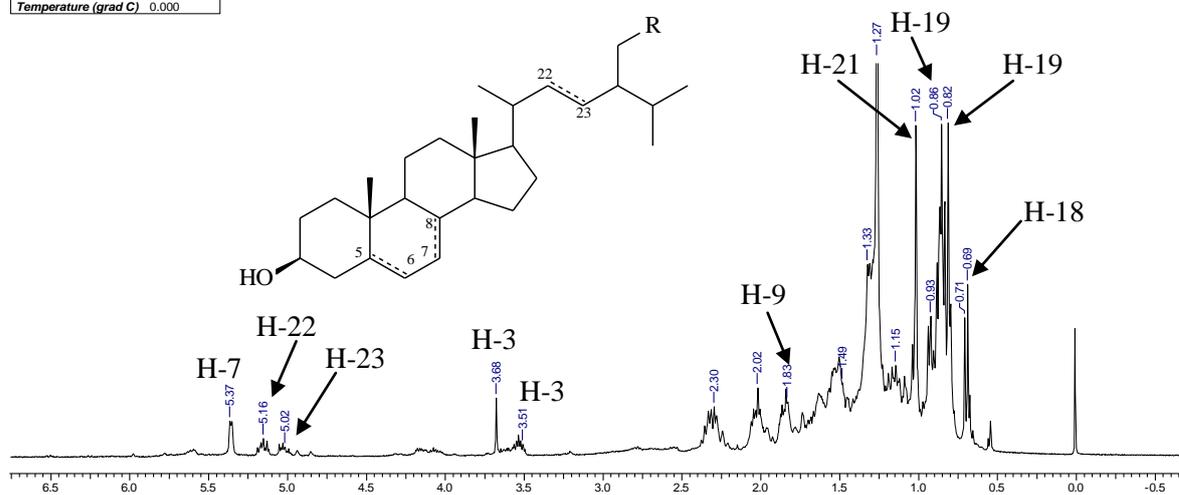


Figura 78: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias 16, 17, 18 e 19.

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA:HFP(2)S(13C DESAC)	Date	05 Mar 2010 16:18:36
File Name	E:\ana paula_165001r	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	^{13}C
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgdc
Sweep Width (Hz)	24038.46	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D
				Number of Transients	1192

3 Dec 2011

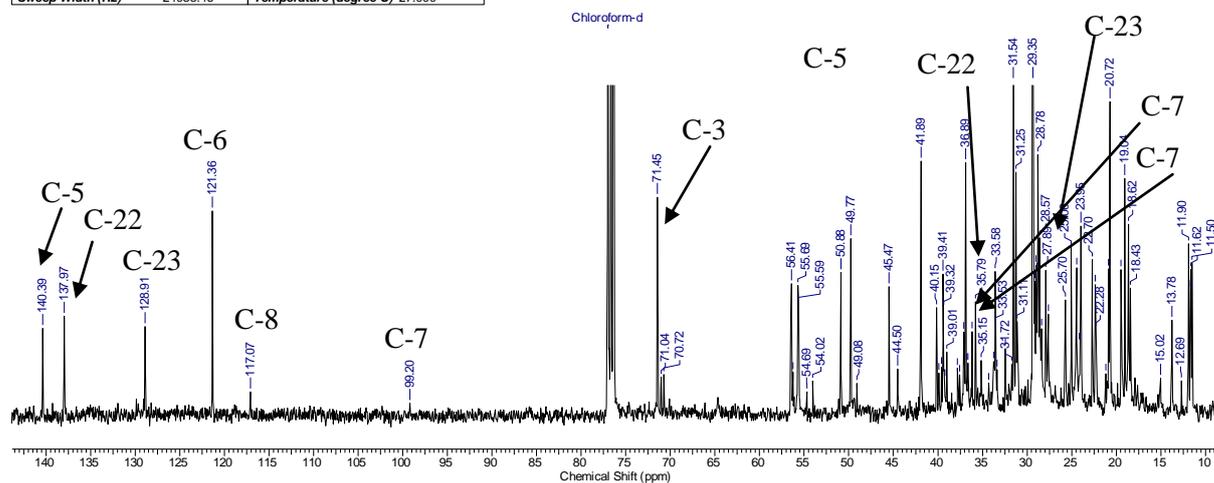


Figura 79: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias 16, 17, 18 e

19.

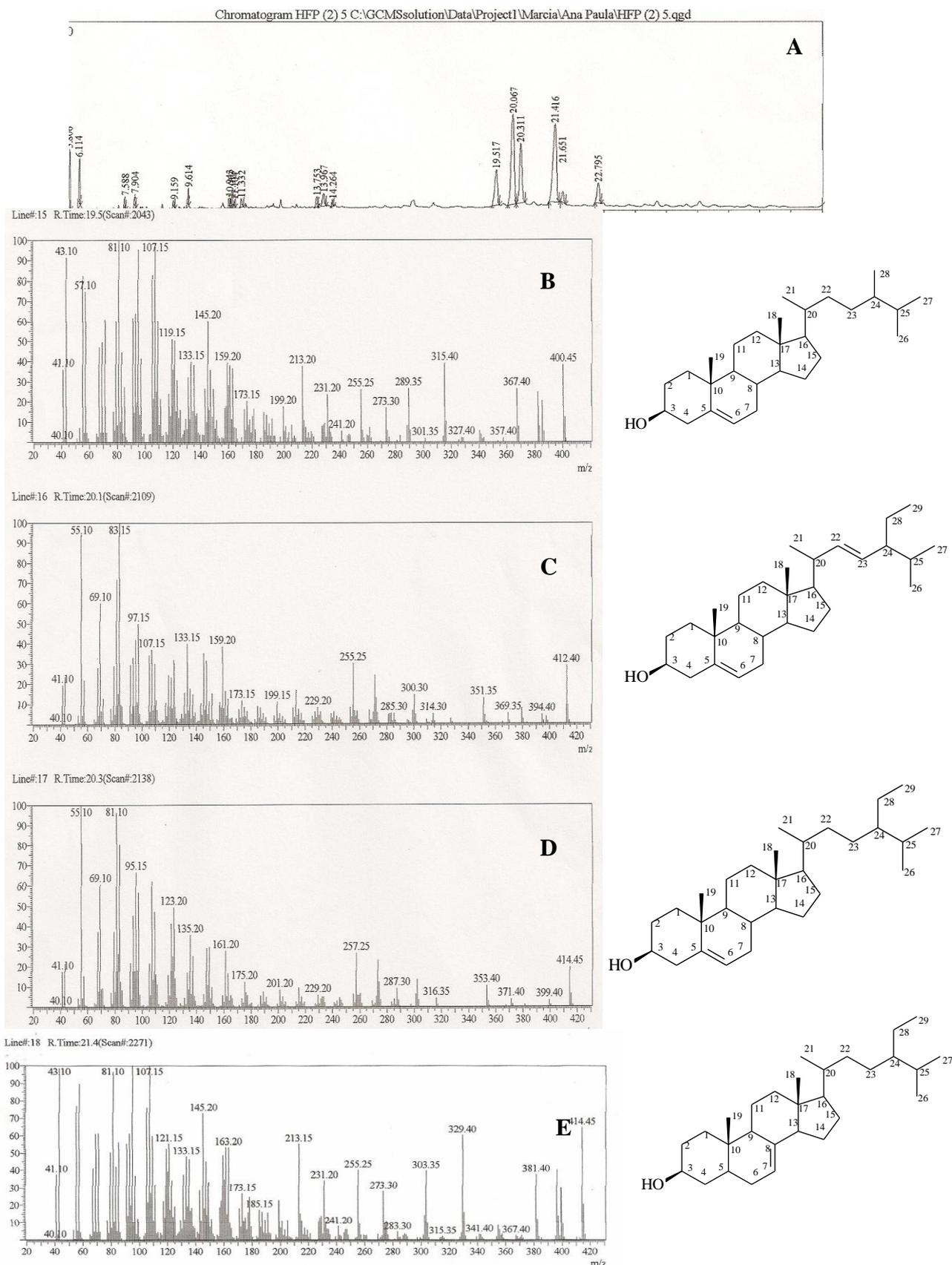


Figura 80: Cromatograma de CG (A) e espectros de massas (B), (C), (D) e (E) dos componentes identificados com os respectivos TR 19,51, 20,06, 20,31 e 21,41 min.

I.3.3.2 Identificação da substância 20.

O composto **20** foi isolado como um sólido amorfo branco. O espectro de RMN ^1H (1D e 2D) (**Figura 81**) apresentou sinais de sistema ABC de uma vinila com δ_{H} 6,13 (dd, $J = 12$ e 16 Hz, H - 2'), 6,03 (dd, $J = 8$ e 12 Hz, Ha - 3'), 5,47 (dd, $J = 8$ e 16 Hz, Hb - 3') e um sistema A_2B_2 com tripletos em δ_{H} 2,14 (2H) e 3,75 (t, $J = 8$, Hz, H- 3) alfa carboxila e a nitrogênio. Os valores de deslocamentos químicos na região de δ_{H} 1,27–1,69 correspondem a grupos metilênicos de cadeia longa, além de dois tripletos em δ_{H} 0,89 e 2,62 (t, $J = 8$ Hz) referentes aos grupos metilênicos H-15'' e H-2'', respectivamente e um singlete largo em δ_{H} 8,53 representando OH de ácido carboxílico.

O espectro de RMN ^{13}C (BBD e DEPT) (**Figuras 82 e 83**), HSQC (**Figura 85**) e HMBC (**Figura 86**) permitiu a identificação dos correspondentes átomos de carbono ligados aos prótons citados acima em δ_{C} : 135,2 (CH-2'), 123,7 (CH₂-3'), 59,1 (CH₂-3), 39,2 (CH₂-2) de um carbono de ácido carboxílico em δ_{C} 181,8 representando o C-1, e duas carboxilas amídicas em δ_{C} 179,8 atribuídos aos carbonos C- 1' e C-1'', respectivamente. Outros valores de deslocamentos químicos foram atribuídos para grupos metilênicos δ_{CH} 37,8, 59,1 39,2, 31,6 e 22,3 para os carbonos C-2 e C-3, C-2'', C-13'' e C-14'', respectivamente, e ainda valores na região δ_{CH} 29,3 referentes aos carbonos de C- 3''a 12'' e uma metila em δ_{CH} 13,0 para o C-15'' cadeia alifática indicando unidade acila (**Figuras 82-86**). O espectro de HMBC confirmou correlações a longa distância do C-1/H-2, C-3/H-2, C-1'/H-3, C-1''/H-2'', C-14''/H-15'' e C-15''/H-14''. A **Tabela 13** apresenta os valores dos deslocamentos químicos da estrutura proposta.

O espectro de massas obtido com o equipamento de massas de alta resolução por eletrospray de modo positivo (**Figura 87**) foi usado para definir a estrutura da acrilamida definindo a cadeia acílica como pentadecanoila e definindo-se a estrutura como ácido 3-N-acrilóil-N-pentadecanoil-propanóico. O valor do íon quase molecular no espectro de massas, detectado em modo positivo, em m/z 390,1517 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) (calc. 390,2620) correspondente a $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{Na}$, e 368,1709 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) sendo a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{NO}_4$ (calc. 368,2800).

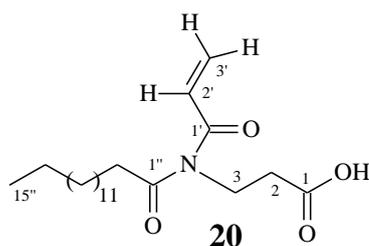


Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 1D e 2D da substância **20**.

C	Substância 20		
	HSQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)	
1	181,6	-	H-2
2	37,8	2,14 (dd, 12 e 16)	-
3	59,1	3,75 (t, 4)	H-2
1'	179,8	-	H-3
2'	135,2	6,13 (dd, 12 e 16)	-
3'	123,7	Há- 6,03 (dd, 8 e 12) Hb-5,47 (dd, 8 e 16)	-
1''	179,8	-	H-2''
2''	39,2	2,38 (t, 4)	-
3''	26,3	1,58 (sl)	-
4''-12''	29,3	1,27 (sl)	-
13''	31,6	1,27 (sl)	-
14''	22,3	1,27 (sl)	H-15''
15''	13,0	0,89 (t, 8)	H-14''
OH	-	8,53 (s)	-

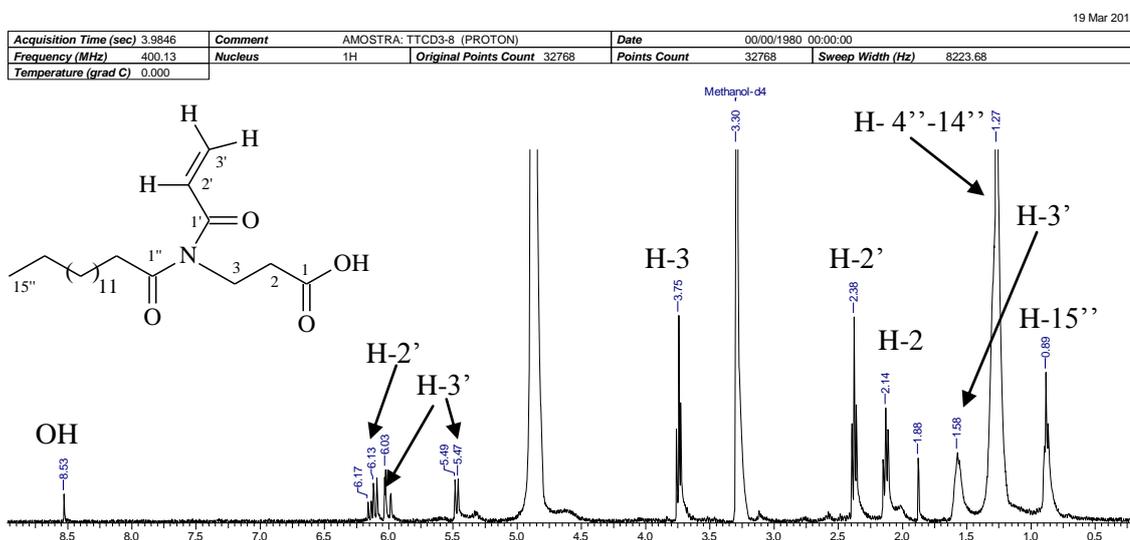


Figura 81: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) da substância **20**.

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: TTCD3-8 (C13 CPD)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	24038.46

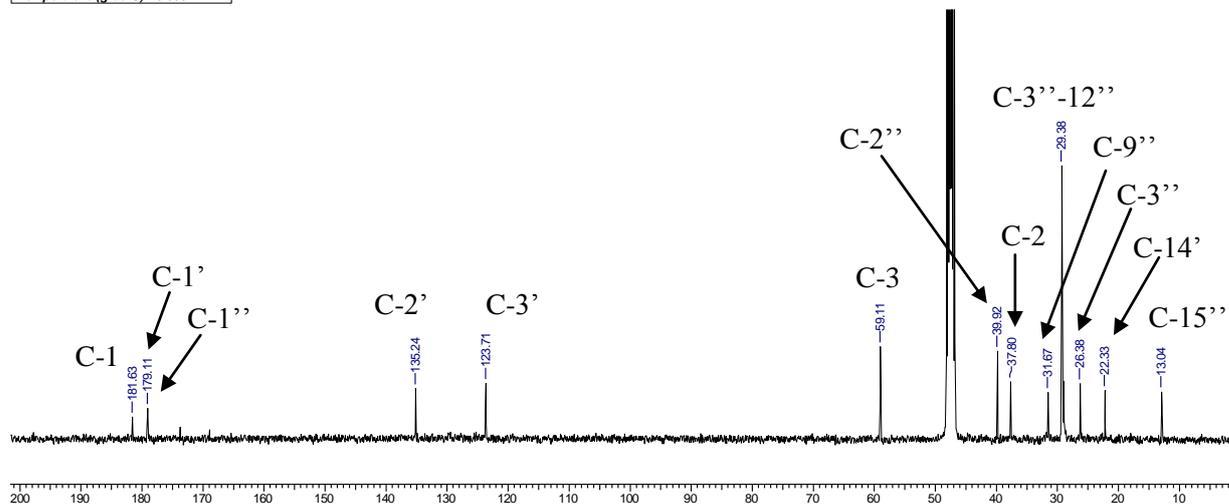
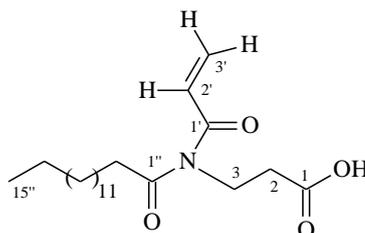


Figura 82: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) da substância 20.



6 Dec 2011

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: TTCD3-8 DEPTQ SOLVENTE: CDCL3 500	Date	16 May 2011 13:25:52
File Name	D:\Meus documentos\Ana Paula\JFRR\JRMN500_107001r	Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C
Number of Transients	8192	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)	21.460
				Pulse Sequence	deptqgppsp

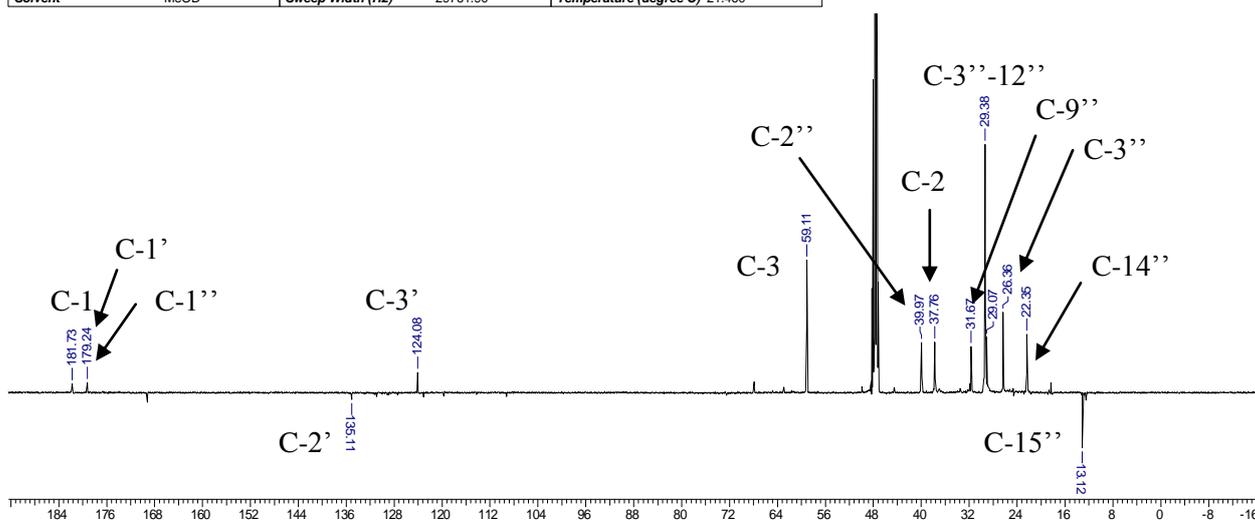


Figura 83: Espectro de Dept 135° (100 MHz, MeOD) da substância 20.

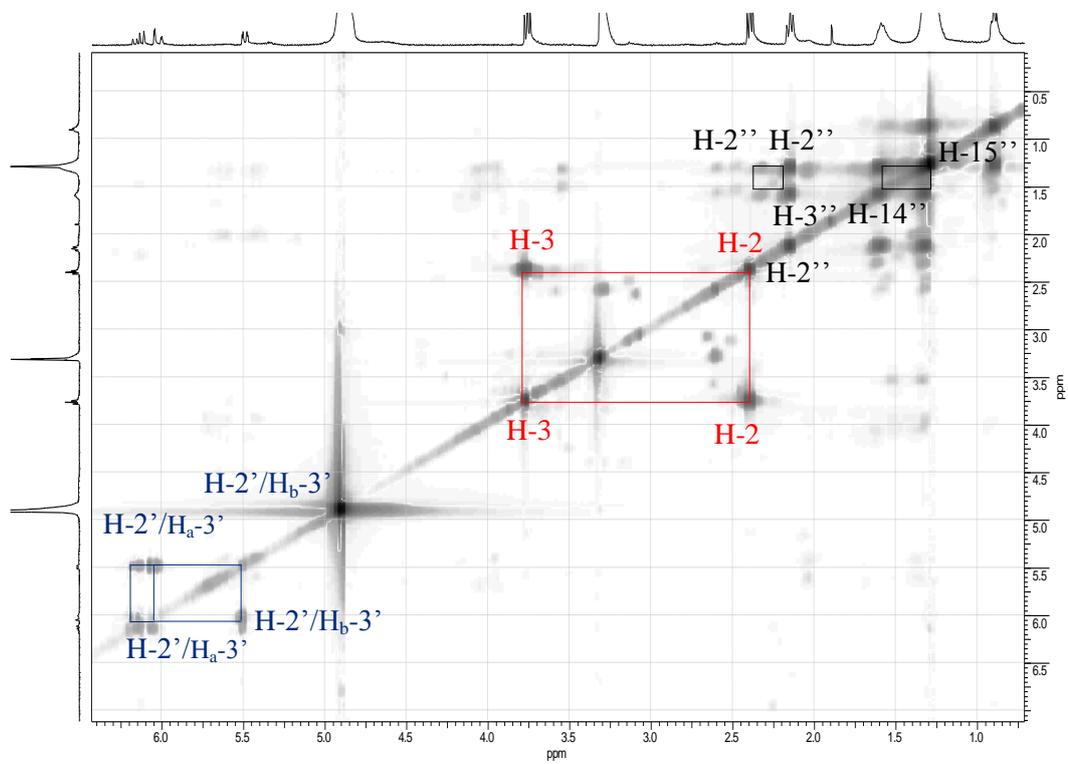
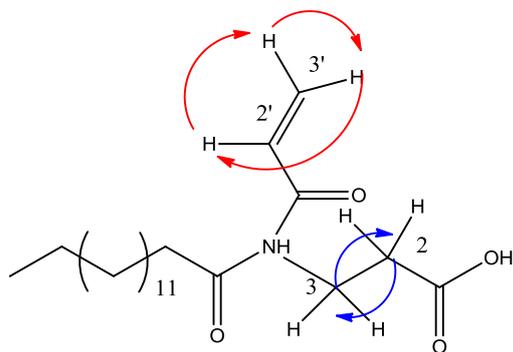


Figura 84: Espectro de Homocorrelação da substância 20.

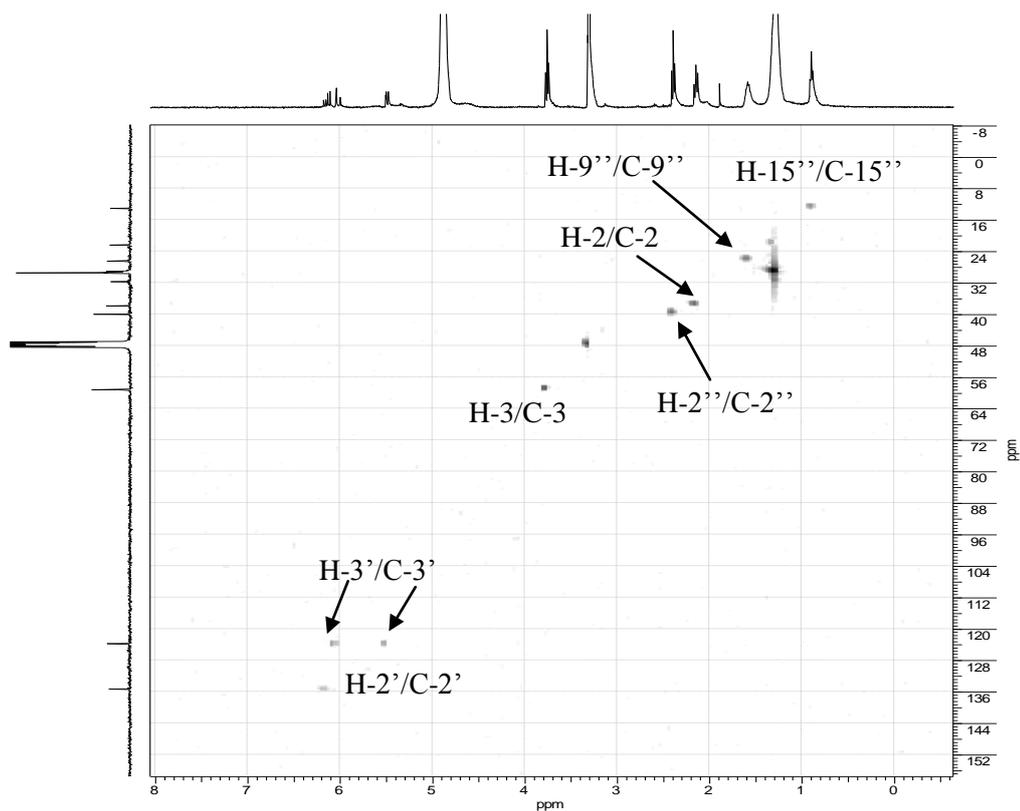


Figura 85: Espectro de HSQC (100 MHz, MeOD) da substância 20.

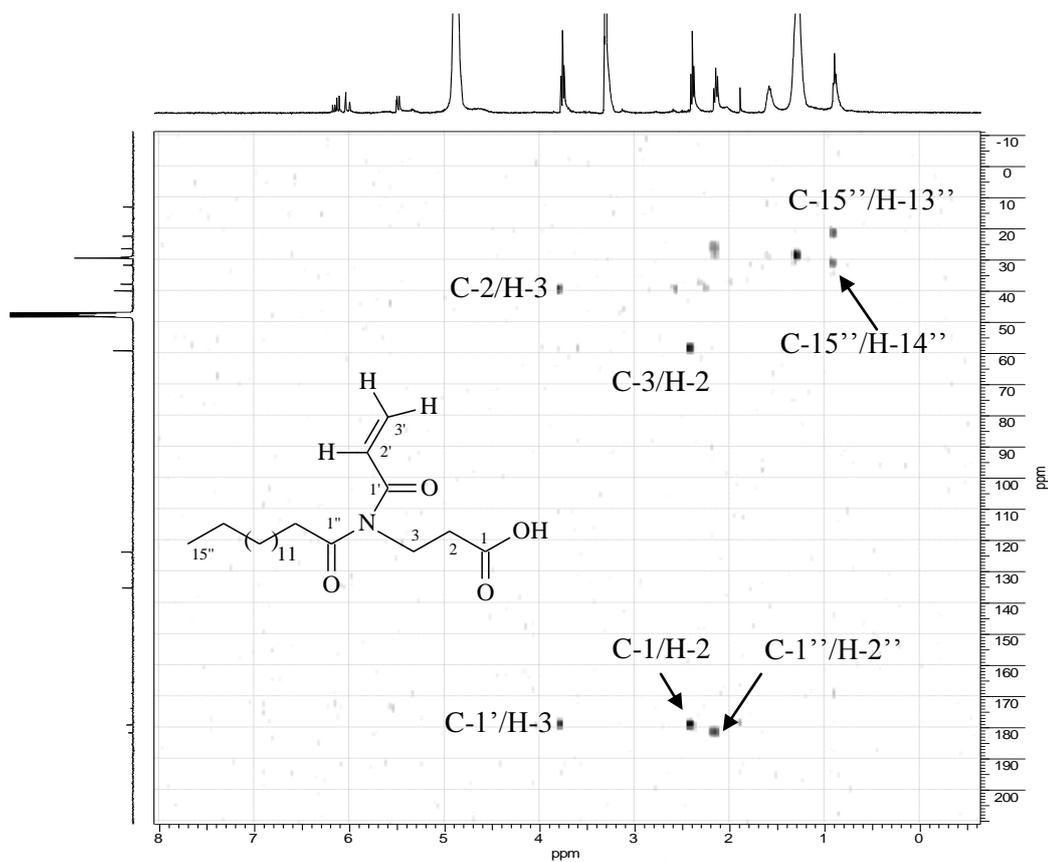


Figura 86: Espectro de HMBC (100 MHz, MeOD) da substância 20.

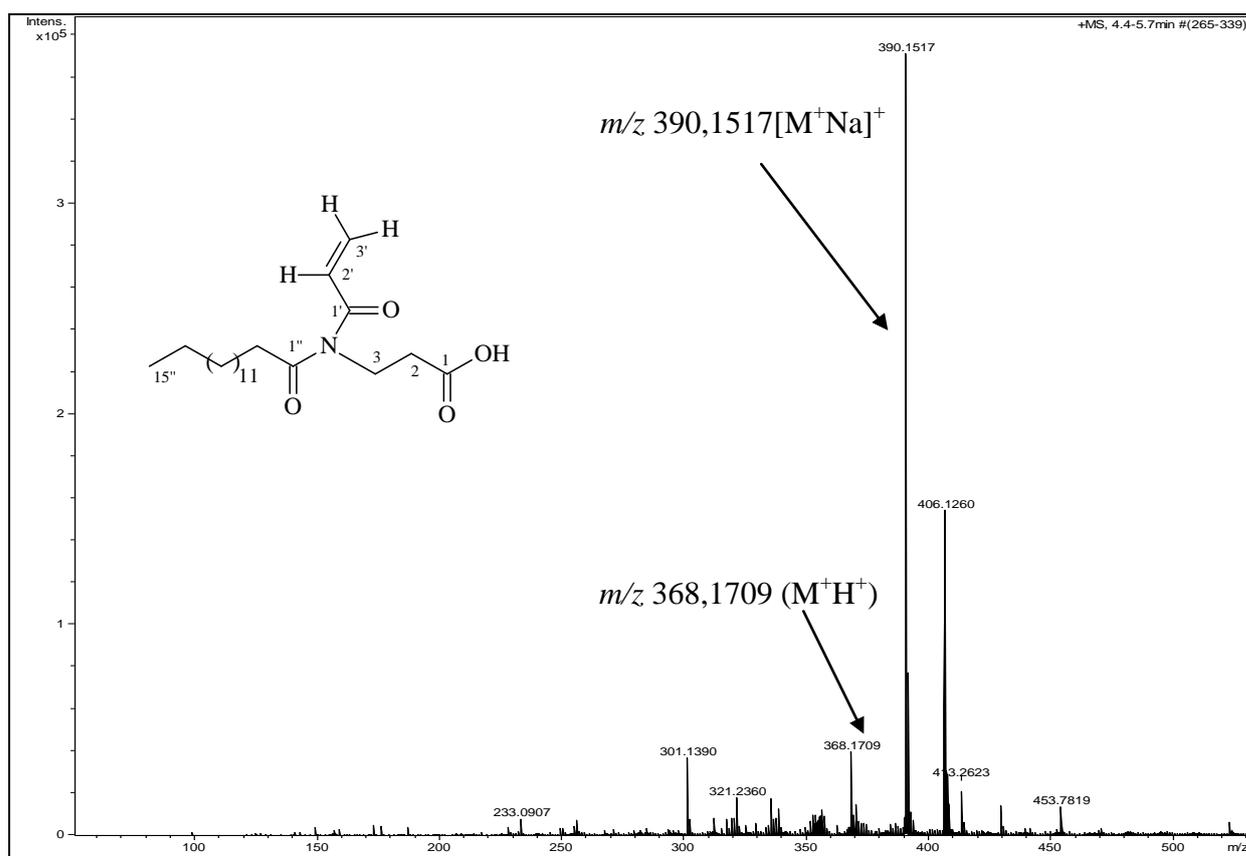
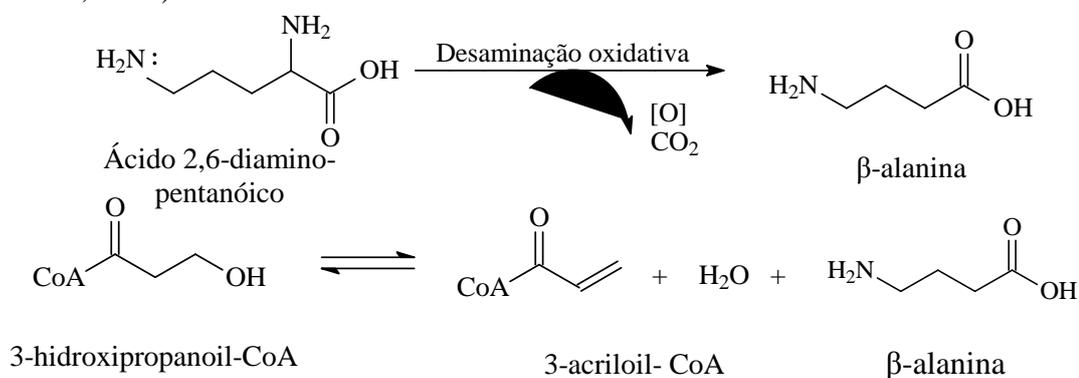
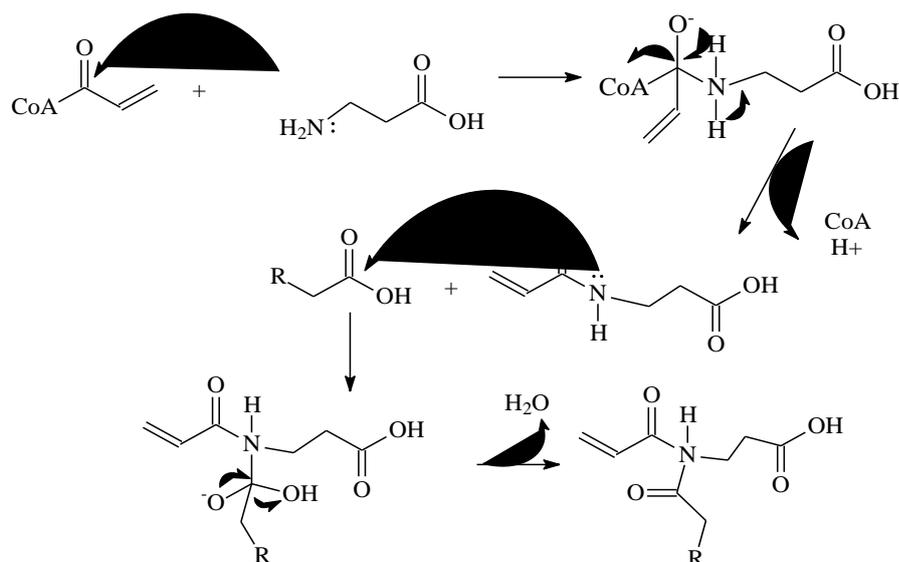


Figura 87: Espectro de massas da substância **20**.

A proposta Biosintética para a formação da acrilamida esta representada no **Esquema 18 e 19**, a partir do mecanismo que tem como ponto de partida o grupo 1,3-diamino propano que através da enzima diamino oxidase forma o 3- aminopropanal sendo e posteriormente convertida em β -alanina a partir da presença de NAD(P)^+ . A interação da β -alanina com um acrilóil-CoA produz a formação de um intermediário que após a liberação de CoA, H^+ , posteriormente, reage com um ácido graxo formando assim uma acrilamida (<http://biocyc.org> e DEWICK, 2002)



Esquema 18: Síntese da β -alanina



Esquema 19: Proposta biossintética da substância **20** (DEWICK, 2002).

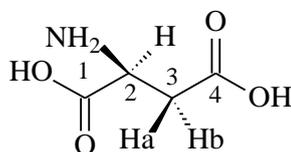
I.3.3.4 Identificação da substância **21**

A substância **21** apresentou valores no espectro de IV (**Figura 88**) de bandas de absorção em 3334 cm^{-1} (estiramento de OH de ácido), 1719 cm^{-1} (estiramento de C=O de ácido), 1617 cm^{-1} (estiramento de C=O ligado a um grupo amina (NH_2)), $1291\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ (estiramento de C-N), 1114 cm^{-1} (estiramento de C-O-C), 1061 cm^{-1} (estiramento de C-N de grupo amina) e 788 cm^{-1} (dobramento de C-N).

Os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H (**Figura 89**) foi observado em δ_{H} 2,56 ppm, singleto, indicando duas hidroxilas de ácido (OH), e um multipletto em δ_{H} 2,54 ppm representando um grupo amina (NH_2). Apresentou dois duplos dubletos em δ_{H} 2,53 (dd, $J = 4$ e 16 Hz, Ha-3) e 2,37 (dd, $J = 4$ e 12 Hz, Hb-3), além de outros duplo dubletto em δ_{H} 3,88 (dd, $J = 12$ e 16 Hz, H-3). O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 90 e 91**) apresentou sinais correspondentes a quatro átomos de carbono, sendo dois sinais em δ_{C} 177,3 e 172,7 atribuídos a carboxilas dos carbonos 4 e 1, respectivamente, e dois sinais adicionais, um em δ_{C} 66,1 de carbono contendo o grupo amina (C-2) e em δ_{CH_2} 42,5 atribuído ao carbono 3. A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (**Tabela 14**) da substância **21** com os dados de literatura (POUCHET & BEHNKE, 1993) foi determinante para identificá-la como o ácido 2-aminobutanodióico (ácido aspártico).

O espectro de massas obtido na análise com LC-MS (**Figura 92**) foi usado para a confirmação da estrutura proposta, pois o íon molecular foi identificado em m/z 133,0167 [M^+], sendo a fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ (cal. 133,0375). $\Delta_{\text{mass}} = 20,8$, apesar de

esse valor ser maior do indicado por editores de JOC ($\Delta_{\text{mass}} = -13$ millimass) o valor considerado a baixa resolução está adequado para a proposta. Certamente um equipamento com escala mais resolvida daria uma diferença na faixa adequada.



21

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **21**.

C	Substância 21		POUCHET & BEHNKE,1993	
	HSQC (1J)		HSQC (1J)	
	δ_{H} (mult.; Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; Hz)	δ_{C}
1	-	172,7	-	172,57
2	3,88 (dd, 12 e 16)	66,1	2,38 (t)	65,20
3	Ha- 2,53 (dd, 4 e 16) Hb- 2,37 (dd, 4 e 12)	42,5	2,31 (dd, 16 e 4) 2,38 (dd, 12 e 4)	39,10
4	-	177,3	-	177,59
NH₂	2,54 (m)	-	-	-
OH	2,56 (s)	-	2,59	-

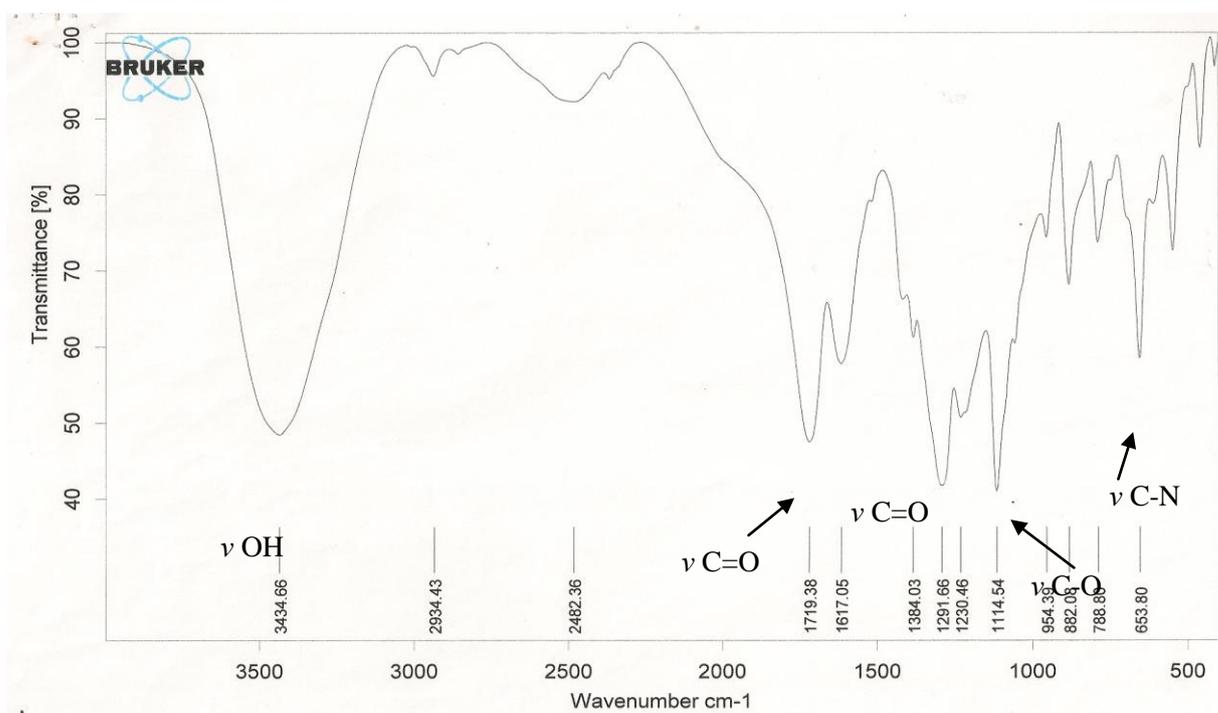


Figura 88: Espectro de IV (KBr) da substância **21**.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: C4hid (27)S (PROTON)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	8223.68

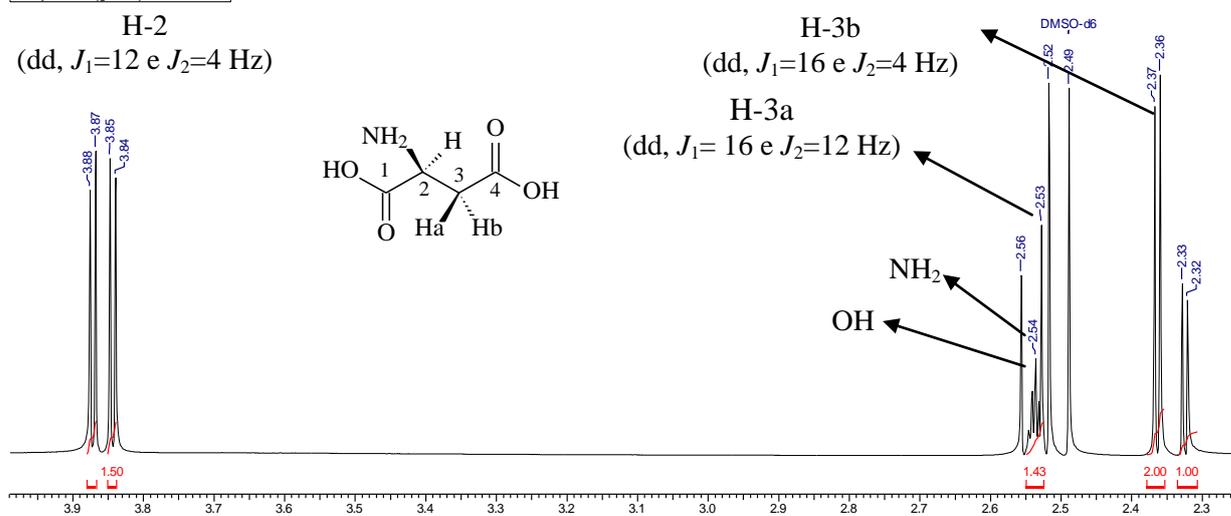


Figura 89: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: C4hidro.(27)S (13C DESAC)	Date	00/00/1980 00:00:00
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	24038.46

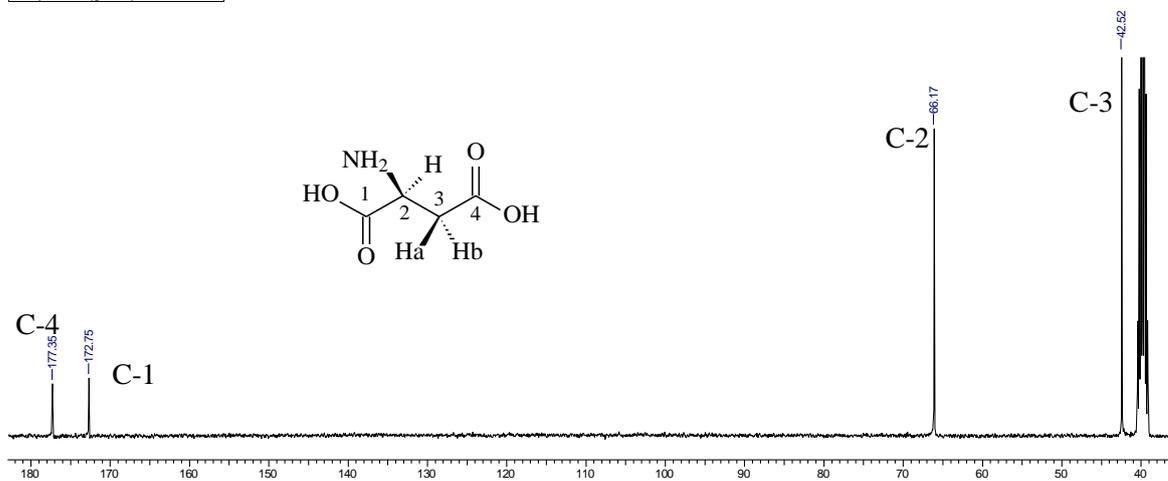


Figura 90: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

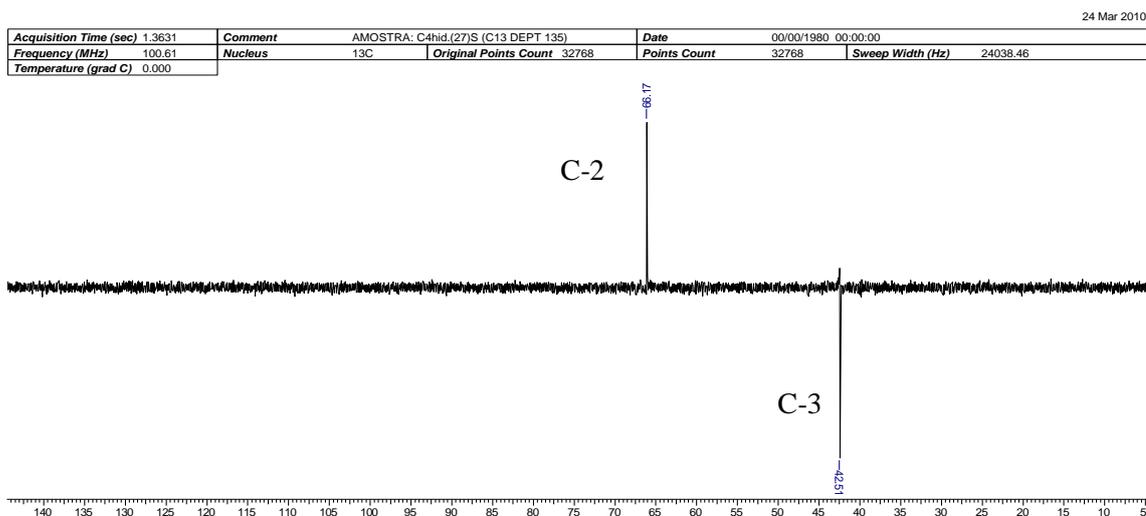


Figura 91: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DEPT 135 °C, DMSO-d_6) da substância **21**.

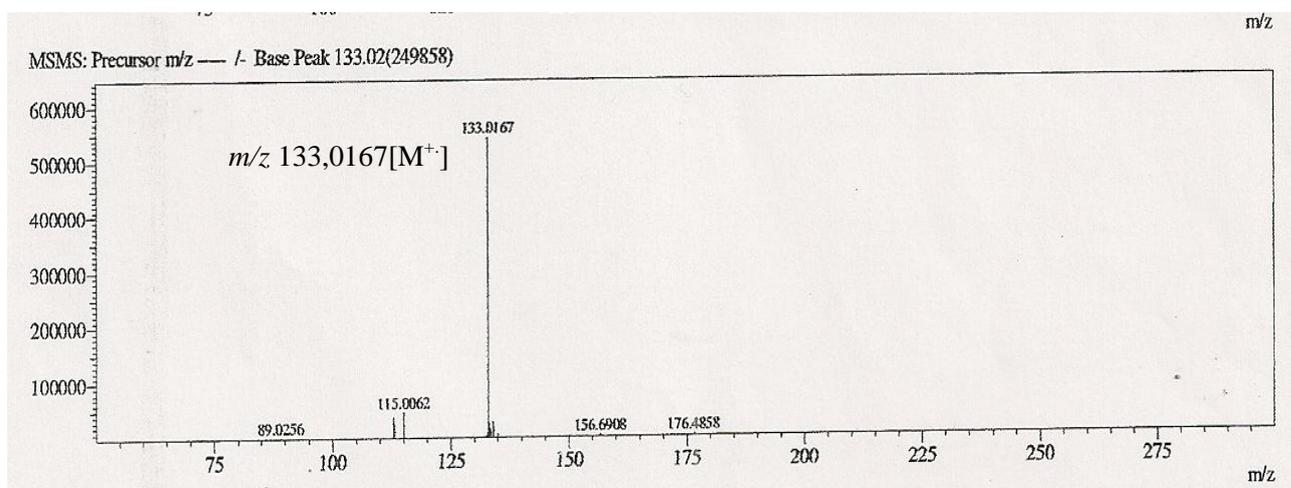


Figura 92: Espectro de massas da substância **21**.

I.3.3.3 Identificação da substância **22**.

A substância **22** revelou sinais no espectro de IV (**Figura 93**) em 3398 cm^{-1} (estiramento de OH de ácido), 1617 cm^{-1} e 1583 cm^{-1} (estiramento de ácido carboxílico e amida), 1404 cm^{-1} (estiramento de C-O) e ainda 1061 cm^{-1} (estiramento de C-N de grupo amida).

Apresentou sinais no espectro de RMN ^1H (**Figura 94**), dos quais os deslocamentos químicos apresentou duplos dubletos em δ_{H} 2,74 (dd, $J= 10$ e 20 Hz, H-2), δ_{H} 2,34 (dd, $J= 5$ e 20 Hz, H-3a) e δ_{H} 2,30 (dd, $J= 5$ e 10 Hz, H-3b), e ainda dois singletos largos em δ_{H} 7,69 (OH-1) e δ_{H} 7,01 (CO-NH₂-4), além de um singlete largo em δ_{H} 2,65 indicando os hidrogênios do grupo amina (NH₂) ligado ao carbono 2.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 95**) apresentou sinais correspondentes a quatro átomos de carbono, sendo dois valores em δ_{C} 177,5 e 167,4 atribuídos à carbonila do carbono 1 de ácido e 4 de amida, e dois sinais em δ_{C} 57,5 para o carbono contendo o grupo anímo (C-2) e δ_{C} 38,4 para o carbono 3. A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (**Tabela 15**) da substância **22** com os dados de literatura foi determinante para propor o ácido 2,4-diamino-4-oxibutanodióico (Asparagina) (POUCHET & BEHNKE, 1993).

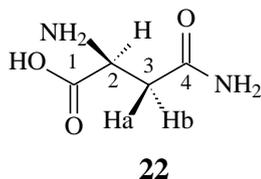


Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **22**.

C	Substância 22		POUCHET & BEHNKE, 1993
	HSQC (1J)		
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)	δ_{C}
1	177,5	-	177,7
2	57,5	2,74 (dd, 10 e 20)	58,20
3	38,4	Ha- 2,34 (dd, 5 e 20) Hb- 2,30 (dd, 5 e 10)	39,10
4	167,4	-	167,59
OH	-	7,69 (s)	-
2-NH₂	-	2,45 (sl)	-
5-NH₂	-	7,01 (sl)	-

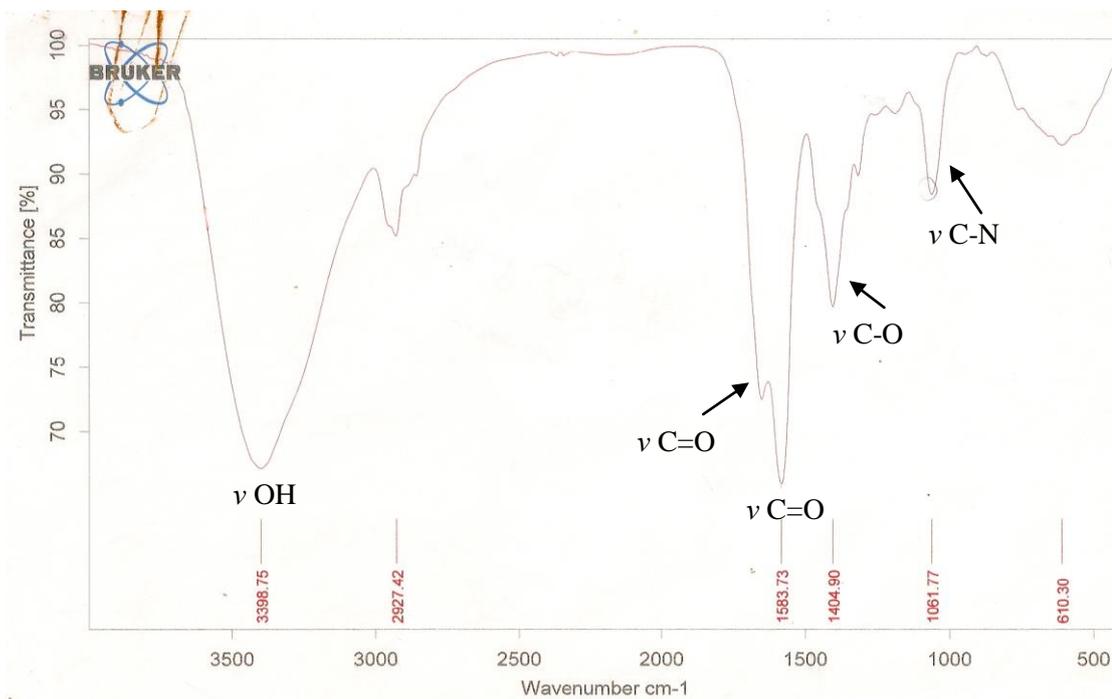


Figura 93: Espectro de IV (KBr) da substância **22**.

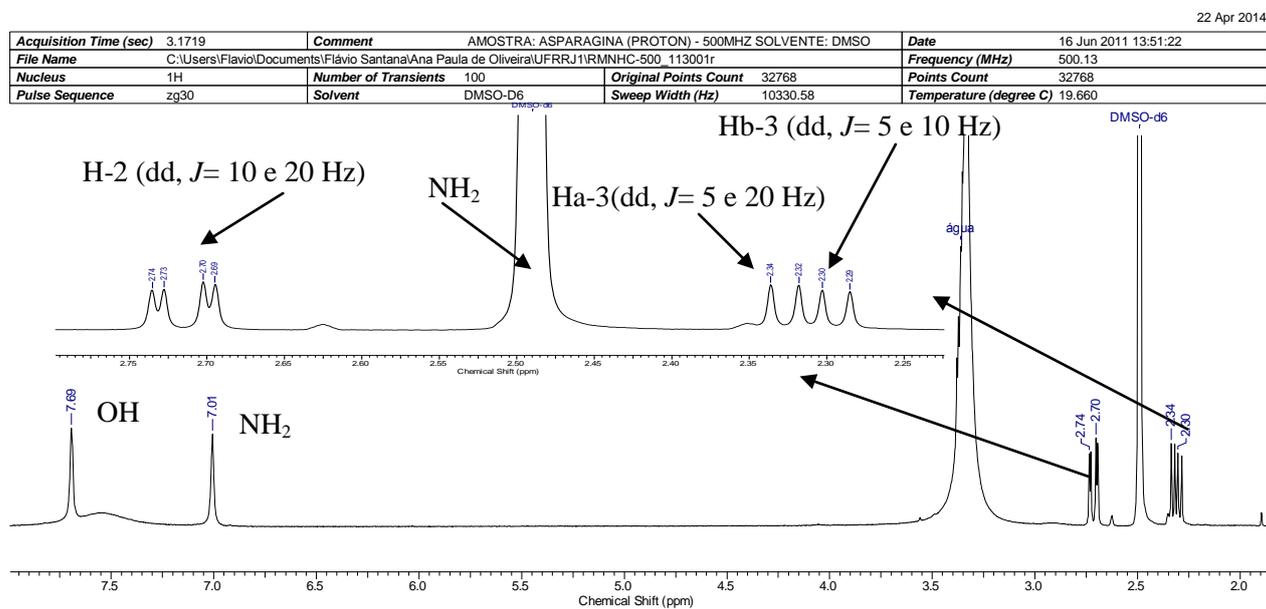


Figura 94: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, MeOD) e expansão da região de δ_H 2,20-3,00 ppm da substância **22**.

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: TTCHM 7 (3) (C13 CPD)	Date	00/00/1980 00:00:00				
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	¹³ C	Original Points Count	32768	Points Count	32768	Sweep Width (Hz)	24038.46
Temperature (grad C)	0.000								

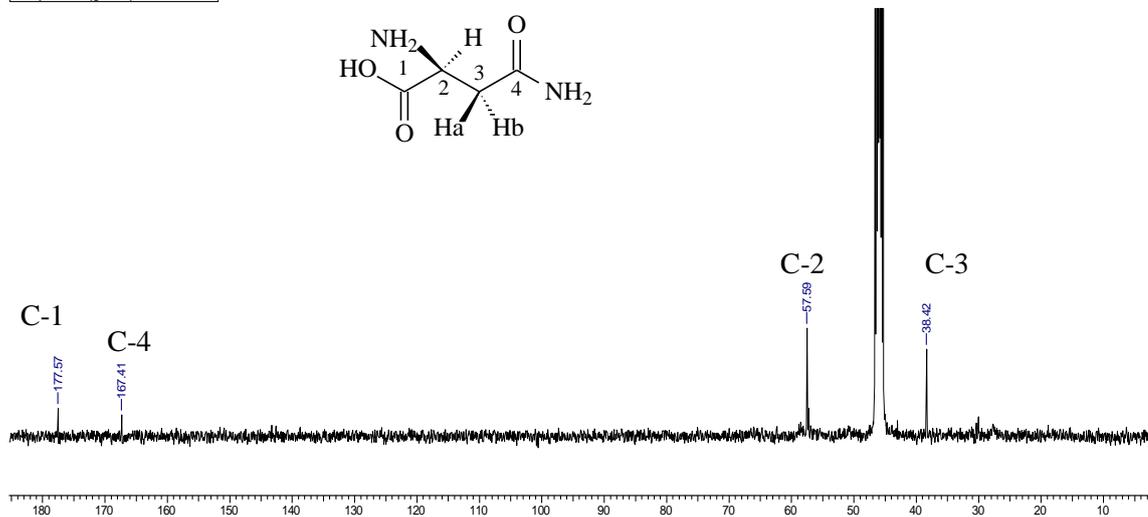
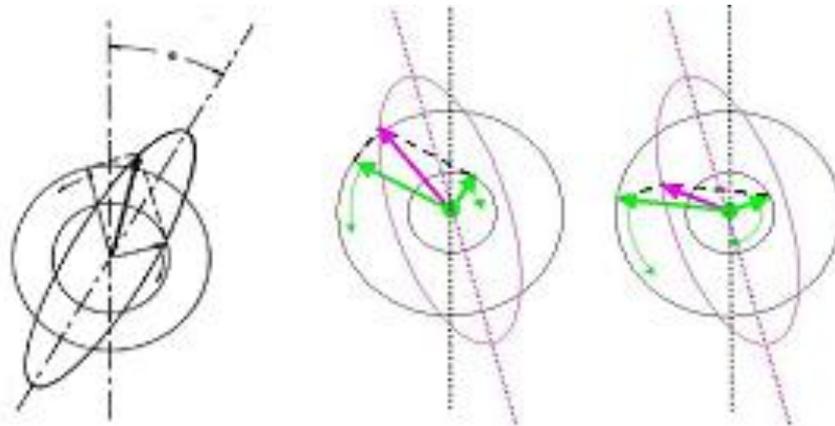


Figura 95: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) da substância 22.

CAPÍTULO II
ESTUDO DE DICROISMO CIRCULAR



II.1 Introdução

II.1.1 Revisão de Literatura

II.1.1.1 Dicroísmo Circular (DC)

Dicroísmo circular (DC) é uma técnica usada para monitorar mudanças conformacionais (YUE *et al*, 2008), sendo particularmente útil para estudo de moléculas quirais, incluindo as proteínas, carboidratos tem sido muito usada em estudo de interações entre substâncias, especialmente aquirais e estruturas maiores que possuem unidades opticamente ativas, além de ser usada para detectar mudanças conformacionais de macromoléculas e a composição de misturas quirais.

O DC é uma forma de espectroscopia que faz uso de luz UV polarizada. Neste caso mede a absorção de componentes e a diferença da luz polarizada no sentido horário ou sentido anti-horário, sendo a diferença da absorção (A) da luz circularmente polarizada a direita e a esquerda (**Equação 1**). Quando determinadas moléculas opticamente ativas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nos componentes da luz incidente (WOODY, 1995 e FASMAM, 1996).

$$DC = A_E - A_D$$

Equação 2: Diferença da absorção (A) e a luz circularmente polarizada a direita e a esquerda.

Este fenômeno detecta exatamente a alteração através da medida da diferença da adsorção dos componentes da luz circular polarizada a direita e a esquerda, após a luz passar pela a amostra (FASMAM, 1996 e WOODY, 1995).

A luz linearmente polarizada é composta de dois componentes circularmente polarizados de mesma intensidade. Em cada uma dessas componentes o vetor eletromagnético gira na direção de propagação. Observando-se perpendicularmente a variação no vetor elétrico com o tempo, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, rodando no sentido horário para a luz polarizada circularmente (para direita) e anti-horário (para esquerda). A absorção de luz não polarizada é descrita pela absorbância (A) e é definida pela **Equação 3** (WOODY, 1995 e FASMAM, 1996).

$$A = \log(I_0/I)$$

Equação 3: Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.

Onde: A = absorbância;

I_0 = intensidade da luz incidente;

I = intensidade após a luz percorrer uma distancia 1 no meio.

Segundo a lei de *Lambert-Beer* (**Equação 1**), pode-se determinar o coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita ou para esquerda, ϵ_D e ϵ_E , respectivamente. O dicroísmo circular molar ($\Delta\epsilon$) (**Equação 4**), é definido como a diferença entre os coeficientes de extinção entre as duas componentes de luz polarizada (o coeficiente de extinção molar para a luz polarizada é simplesmente a média aritmética entre ϵ_D e ϵ_E) (WOODY, 1995, FASMAM, 1996 e HECHT, 1998).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Equação 4: Equação para determinar o coeficiente de extinção molar

Onde: A = absorvância;

c = concentração da espécie que absorve a luz (mol/L);

ϵ = coeficiente de extinção molar (L/cm.mol);

l = distância que a luz percorre no meio (cm).

Quando é usada a luz polarizada a curva de UV de um cromóforo quirál ou vizinho a centro assimétrico há anomalia na curva, devido alteração no índice de refração dos compostos (Δi) e desta forma ocorre à diferença na absorção ($\Delta\epsilon$) de cada componente. O Δi pode ser analisado pela avaliação da anomalia na curva (DOR). Quando é medida a diferença de absorção da componente ($\Delta\epsilon$) é chamada de absorção dicaótica diferencial que é medida pelo dicroísmo circular (DC).

Todos os instrumentos comerciais de DC medem esta variação de absorvância (ΔA) ($\Delta A = A_E - A_D = (\epsilon_E - \epsilon_D) \cdot c \cdot l$) (**Equação 3**). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para medir elipticidade (θ) (**Equação 4**) Para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade (θ) é expressa na forma de elipticidade molar ((θ_m) , (**Equação 5**), que também é representada por MRE (elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual). Dessa forma, o DC gera luz elipticamente polarizada (**Figuras 96 e 97**) (WOODY, 1995, FASMAM, 1996 e HECHT, 1998).

$$\Delta\epsilon = \epsilon_E - \epsilon_D = (A_E - A_D) / c \cdot l$$

Equação 5: Equação para determinar o dicroísmo circular molar

Onde: $\Delta\epsilon$ = absorção dicaótica diferencial (L/cm.mol);

ϵ_E = coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (L/cm.mol);

ϵ_D = coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita (L/cm.mol);

ΔA_E = absorvância para a luz circularmente polarizada para a esquerda

ΔA_D = absorvância para a luz circularmente polarizada para a direita
 c = concentração da espécie que absorve a luz (mol/L);
 l = distância que a luz percorre no meio (cm).

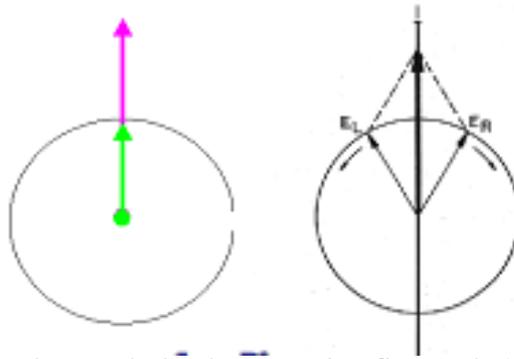


Figura 96: Luz plano polarizada (www.ioc.fiocruz.br)

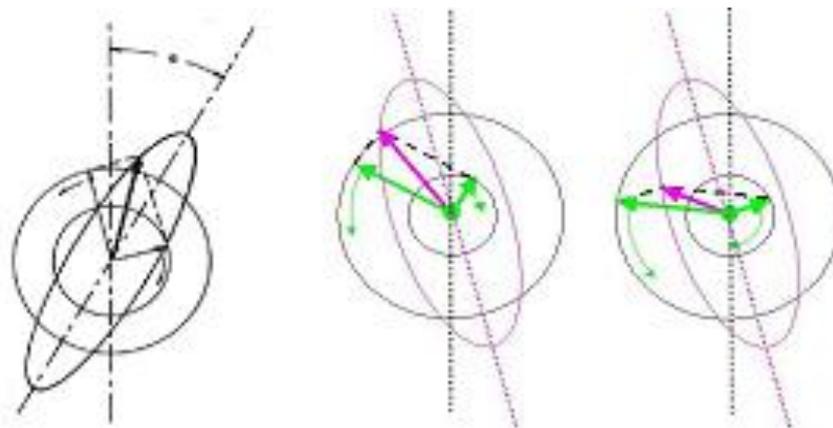


Figura 97: somatória vetorial da luz polarizada absorvida a direita e a esquerda (www.ioc.fiocruz.br).

$$\theta \text{ (deg)} = 180 \cdot \ln 10 \cdot \Delta A / 4\pi = 32,98A\Delta$$

Equação 6: Equação para determinar a elipticidade (WOODY, 1995, FASMAM, 1996 e HECHT, 1998).

Onde: θ = elipticidade (deg (graus));

ΔA = variação da absorvância

$$\theta_m = 1000/c \cdot l = 3298\Delta\epsilon$$

Equação 7: Equação para determinar a elipticidade molar (WOODY, 1995, FASMAM, 1996 e HECHT, 1998).

Onde: θ_m = elipticidade molar (deg.cm²/dmol);

θ = elipticidade (deg (graus));

c = concentração da espécie que absorve a luz (mol/L);

l = distância que a luz percorre no meio (cm).

$\Delta\varepsilon$ = dicroísmo circular molar (L/cm.mol);

O espectropolarímetro mede a atividade óptica (α) em função de comprimento de onda (λ), sendo neste caso uma curva de dispersão óptica rotatória, que pode ser (+) ou (-) (CRABBÉ, 1974).

II.1.1.2 Efeito Cotton

É a combinação dos fenômenos que diferencia a absorção (dicroísmo circular) e as velocidades de propagação da luz polarizada circular direita e esquerda, na região de máximos de absorção em que o composto opticamente ativo apresenta uma banda de absorção. Esses dois efeitos podem ocorrer neste máximo de absorção, uma anomalia na curva que é chamada de efeito cotton (CRABBÉ, 1974).

O efeito cotton é observado através da amplitude desta anomalia (DOR) ou pelos máximos na curva. Os espectros são algo semelhante ao UV, na qual apresenta natureza + ou - e quando muda a Δi (diferença de configuração) temos as curvas de dispersão óptica rotatória e quando mede a intensidade de absorção dos componentes ($\Delta\varepsilon$) temos as curvas de dicroísmo circular. Ambas são associadas à presença de um cromóforo na molécula quiral (sendo que os cromóforos podem ser ou não quirais). A observação do efeito cotton leva em conta a intensidade e o sinal dos pontos e efeitos no comprimento de onda opticamente ativo no UV (CRABBÉ, 1974).

II.1.1.3 Aplicação da técnica de DC

O dicroísmo circular pode ser utilizado para (GREENFIELD & FASMAN, 2004):

- Determinação da configuração absoluta (quiralidade) de compostos quando as estruturas e configuração relativa são conhecidas;
- Definir qual o produto determinante de uma reação;
- Como auxílio para o estudo de aspecto conformacional mais preciso, quando se tem uma série de compostos com configuração absoluta definida;
- Estudos mais especializados sobre técnicas quirópticas;
- São aplicáveis em determinados cromóforos como carbonilas saturadas, carbonilas insaturadas, lactonas, lactamas, ésteres, aromáticos.

- A definição de configuração absoluta pode ser definida apenas pela comparação com a curva do composto com a de um produto semelhante, ou usar regras empíricas para estabelecer as posições dos grupos criando uma “coerência” com esta “regra”. Estas regras são estabelecidas apenas para determinados cromóforos.

II.1.1.4 A regra do quadrante

No caso de estruturas cujo cromóforo tem um plano com centro assimétrico vizinho pode ser aplicar a regra definida como a “regra do quadrante” para aromático, como apresentada abaixo (**Figura 98**). Várias substâncias aromáticas com estruturas rígidas, que contem um centro assimétrico adjacente a um anel aromático têm sido chamadas de a regra do quadrante, das quais permite definir a configuração absoluta destes compostos. (CRABBÉ, 1974).

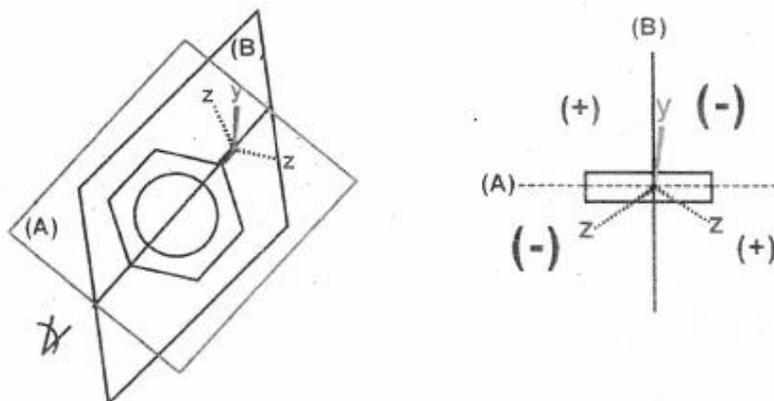


Figura 98: A regra do quadrante para cromóforos aromáticos (CRABBÉ, 1974).

Para os casos que não há modelo com propriedades quiróticas, definidas com curvas de UV polarizadas, a solução é adaptar a uma regra empírica adequada para fazer a primeira definição desta propriedade.

Um exemplo deste caso foi a análise do DC de dois novos diterpenos isolados da casca da planta da espécie *Simira eliezeriana* Peixoto (Rubiaceae) (ARAUJO, *et al.*, 2011), que após, definir configuração relativa e absoluta das estruturas, simirano A [(5R, 6R, 8R 9R, 10S, 11S, 13S)-6 β , 11 β -di-hidroxi-2, 4 (18),15-eritroxilatrien-1-ona] (**1**) e simirano B [(5S, 8R, 9R, 10S, 11S, 13S)-11 β -hidroxi-2, 4 (18),15-eritroxilatrien-1-ona] (**2**) usando a regra do quadrante (**Figura 100**) para uma enona que forma um sistema plano adjacente. A **Figura 99**

apresenta a curva de dicroísmo circular dos diterpenos simirano A e simirano B (ARAÚJO, *et al.*, 2011).

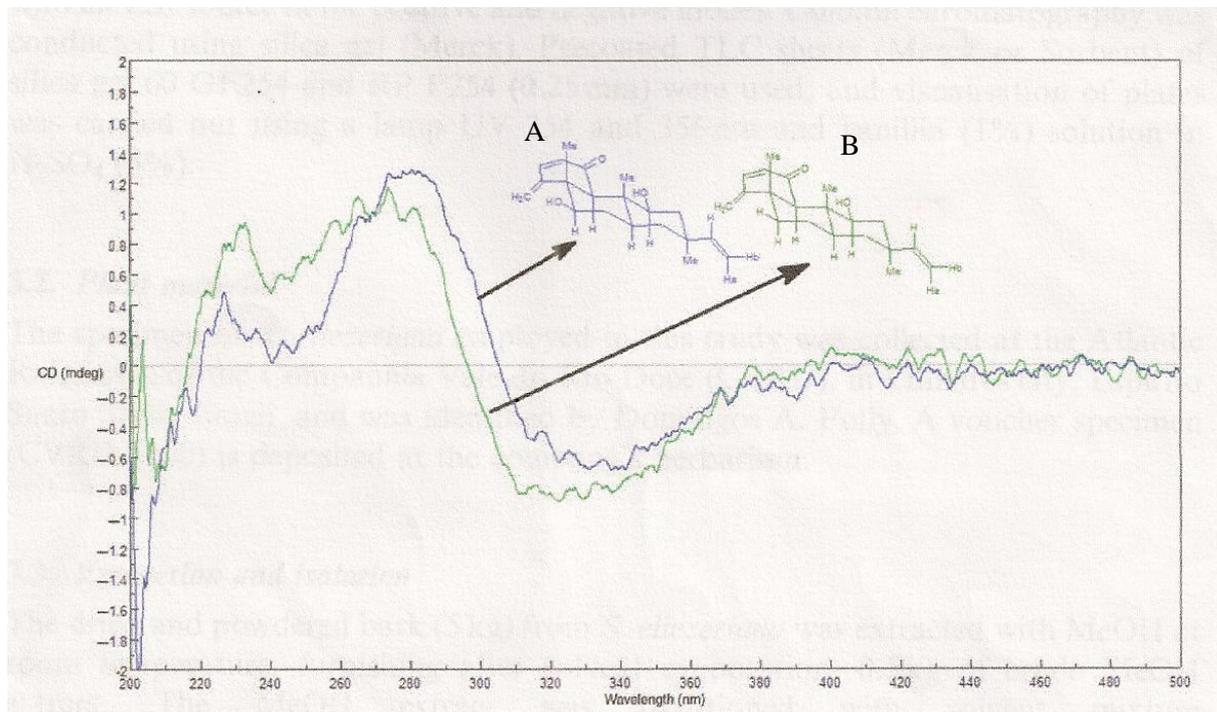


Figura 99: Curvas de DC dos diterpenos, simirane A e simirane B isolados da casca da espécie *Simira eliezeriana* (ARAÚJO *et al.*, 2011).

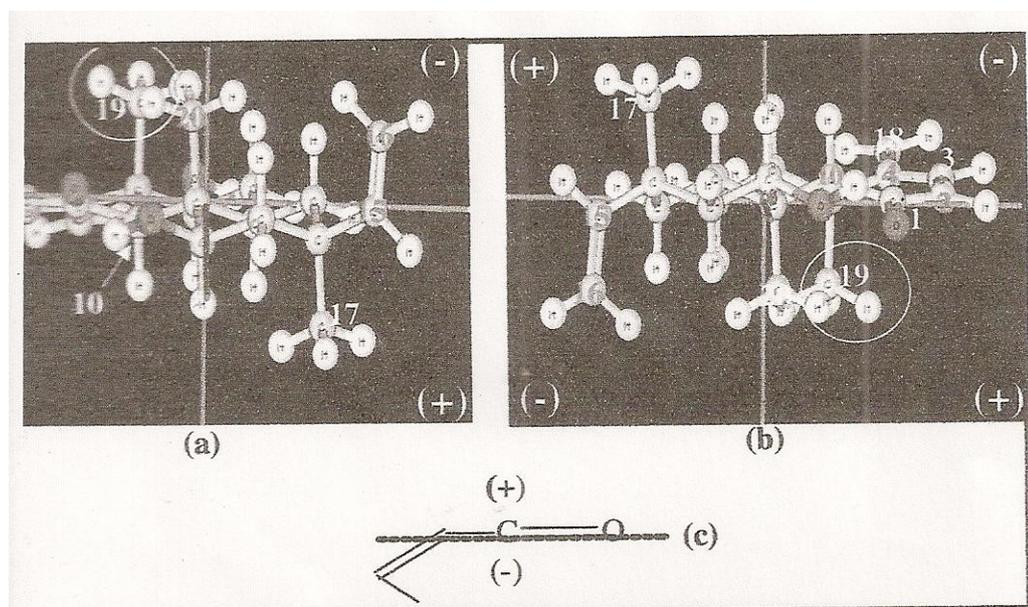


Figura 100: a,b) Projeções no modelo quadrante do anel aromático. c) Projeção da carbonila dos diterpenos simirano A e B (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Da mesma maneira usamos esta metodologia para definir a configuração absoluta das porfirinas, uma vez que elas possuem um sistema eletrônico plano com centro assimétrico vizinho (AMORIM *et al*, 2014), conforme discussão abaixo.

II.2 Metodologia

II.2.1 Preparação das amostras

Foram preparadas soluções com a substância **3**, e a mistura dos compostos, **5+6+7** e **8+9+10+11** isolados e caracterizados do extrato diclorometano das folhas de *T. triangulare*. Estes foram submetidos à análise de dicroísmo circular com intuito de definir a estereoquímica absoluta, visto que apresentaram em sua estrutura carbonos quirais vizinhos ao sistema plano do anel tetrapirrol. As amostras foram pesadas e solubilizadas em metanol, obtendo-se as concentrações para compostos **3** (0,991 mg/mL), **5+6+7** (0,156 mg/mL), **8+9+10+11** (0,151 mg/mL), posteriormente pegou-se uma alíquota (C= 1g/mL) e colocou-se em uma cubeta de quartzo de 1 mL e realizou-se o experimento no espectropolarímetro J-180, obtendo assim a curva de dicroísmo circular para os compostos.

II.3 Resultados

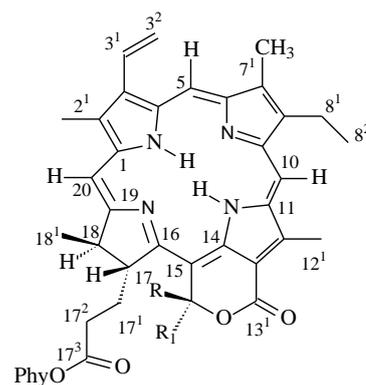
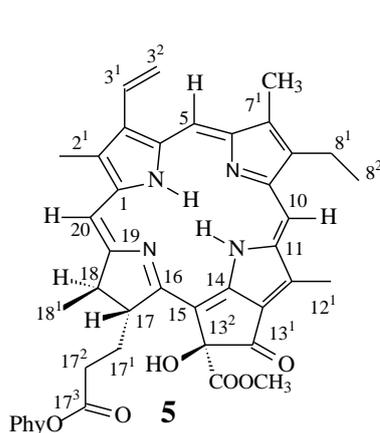
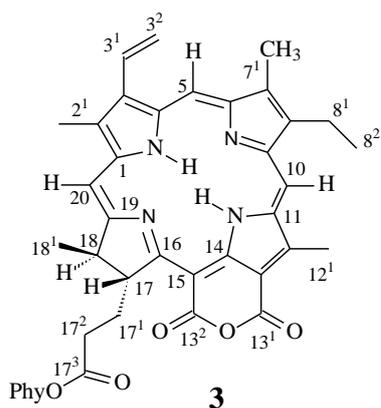
II.3.1 Definição da estereoquímica absoluta das substâncias **3**, **5+6+7** e **8+9+10+11**.

A curva de UV (**Figura 104**) e de dicroísmo circular (**Figura 103**) registradas para **3** e para as misturas de **5+6+7** e de **8+9+10+11** forneceram informações que foram utilizadas para definir a estereoquímica absolutas das feofitinas constituintes das frações. Todas apresentaram como principal máximo de absorção próximo a 410-420 nm (**Figura 103**). Nesses máximos detectaram-se os valores de EC + em: λ_{\max} nm (ψ_{obs} mdeg) (MeOH, 1,0 mg/mL): 412 (+ 6,0) para **3**, 409 nm (ψ_{obs} + 6,3) para a mistura **5+6+7** e 429 nm (ψ_{obs} + 3,0) para a mistura de **8+9+10+11**. No caso de **11** os valores de λ_{\max} 430 nm e o feito Cotton positivo em 429 nm (ψ_{obs} + 3,0 mdeg), detectado no espectros de UV e DC, respectivamente, estão de acordo com o efeito da deslocalização de π -elétrons de 7-formil observado por Lin (2011).

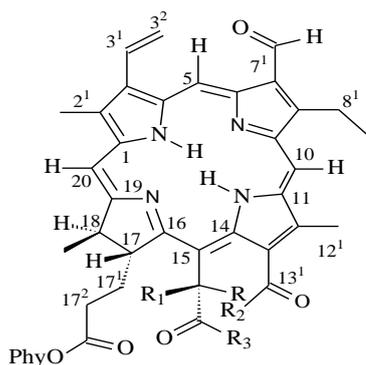
Considerando não haver registro na literatura de curvas de DC de fitinas, utilizaram-se regras empíricas para definir a configuração das mesmas. As fitinas possuem um sistema conjugado plano compatível para a aplicação da regra do quadrante nesta análise. Esta regra consiste na projeção de um sistema cromofórico plano com uma definição de disposição de grupos vizinhos em carbono benzílico ou vizinho ao sistema conjugado, com a possibilidade

de dispor um grupo sobre o plano vertical definindo a posição dos grupos vizinhos de acordo com a estereoquímica relativa (CRABBÉ, 1974).

Estas projeções podem correlacionar as posições de grupos dos centros quirais rígidos vizinhos a este sistema conjugado plano e correlacionar com Efeito Cotton no máximo de absorção detectado (**Figura 101**). A regra do quadrante foi aplicada para as profirinas como apresentado na **Figura 102** (CRABBÉ, 1974). A projeção planar de anel tetrapirrol em relação ao plano horizontal, usando as regras do quadrante de sistemas aromáticos (CRABBÉ, 1974). Neste caso, o metil (C-18) ou metileno (C-17) foram localizados no plano vertical de quadrante para cada centro assimétrico, e a contribuição positiva de metileno ou o grupo metilo, respectivamente, foi observado. Definindo a estereoquímica relativa em *trans* e dispendo a metila no plano vertical, verifica-se que os grupos metilênicos da cadeia do ácido carboxílico esta localizado no quadrante positivo de acordo com o sinal do EC + na região de maior absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ próximo 414 nm. Desta forma ficam definidas as configurações dos centros assimétricos como 17*R* e 18*R* para **3**. Da mesma forma o sinal positivo do efeito Cotton foi utilizado para atribuir a configuração dos componentes **5**, **6** e **7** (13²*R*, 17*R*, 18*R*). A feofitina **5** já foi isolada a partir do extrato n-hexano de folhas e caules de *Amaranthus tricolor* (JERZ *et al*, 2007), mas a estereoquímica absoluta não havia sido definida. No caso da mistura de **8**, **9**, **10** e **11** a estereoquímica absoluta dos centros C-15¹/18/C-17 foram propostas como 15¹*R*, 17*R*, 18*R* com o sinal positivo do efeito Cotton (**Figura 101**).



6 R= OH R₁= COOCH₃ (15¹*R*, 17*R*, 18*R*)
7 R= OCH₃ R₁= COOCH₃ (15¹*R*, 17*R*, 18*R*)



8 R₁= H; R, R₂ = O; R₃= OH (15¹*R*, 17*R*, 18*R*)
9 R₁=H; R=R₂= OH; R₃= CH₃ (17*R*,18*R*)
10 R₁= OH; R,R₂= O; R₃= OCH₃ (15¹*R*, 17*R*, 18*R*)
11 R₁= OOH; R,R₂= O; R= OCH₃ (15¹*R*, 17*R*, 18*R*)

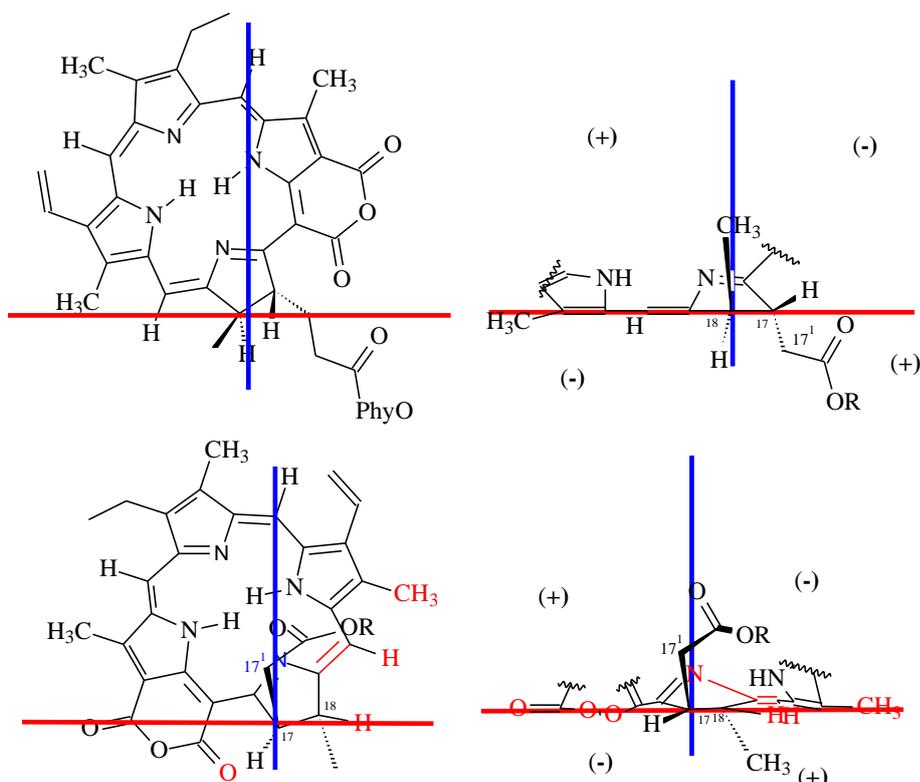
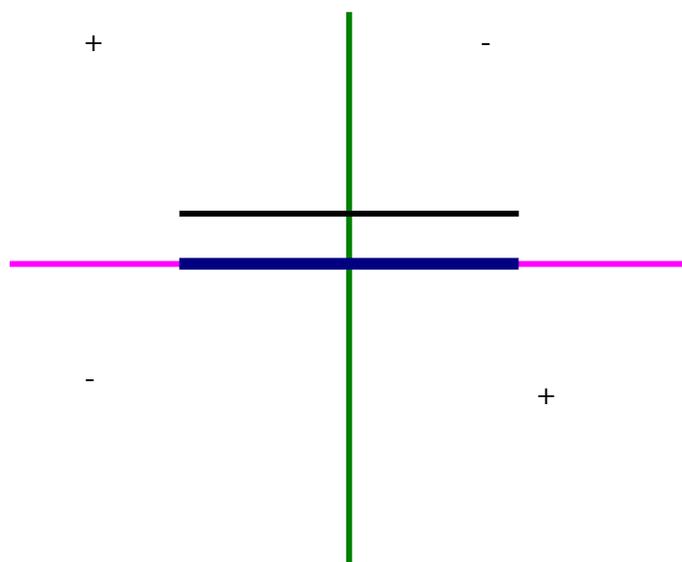


Figura 101: Projeções no quadrante da substância 3 de acordo com o EC definido pela curva de DC.



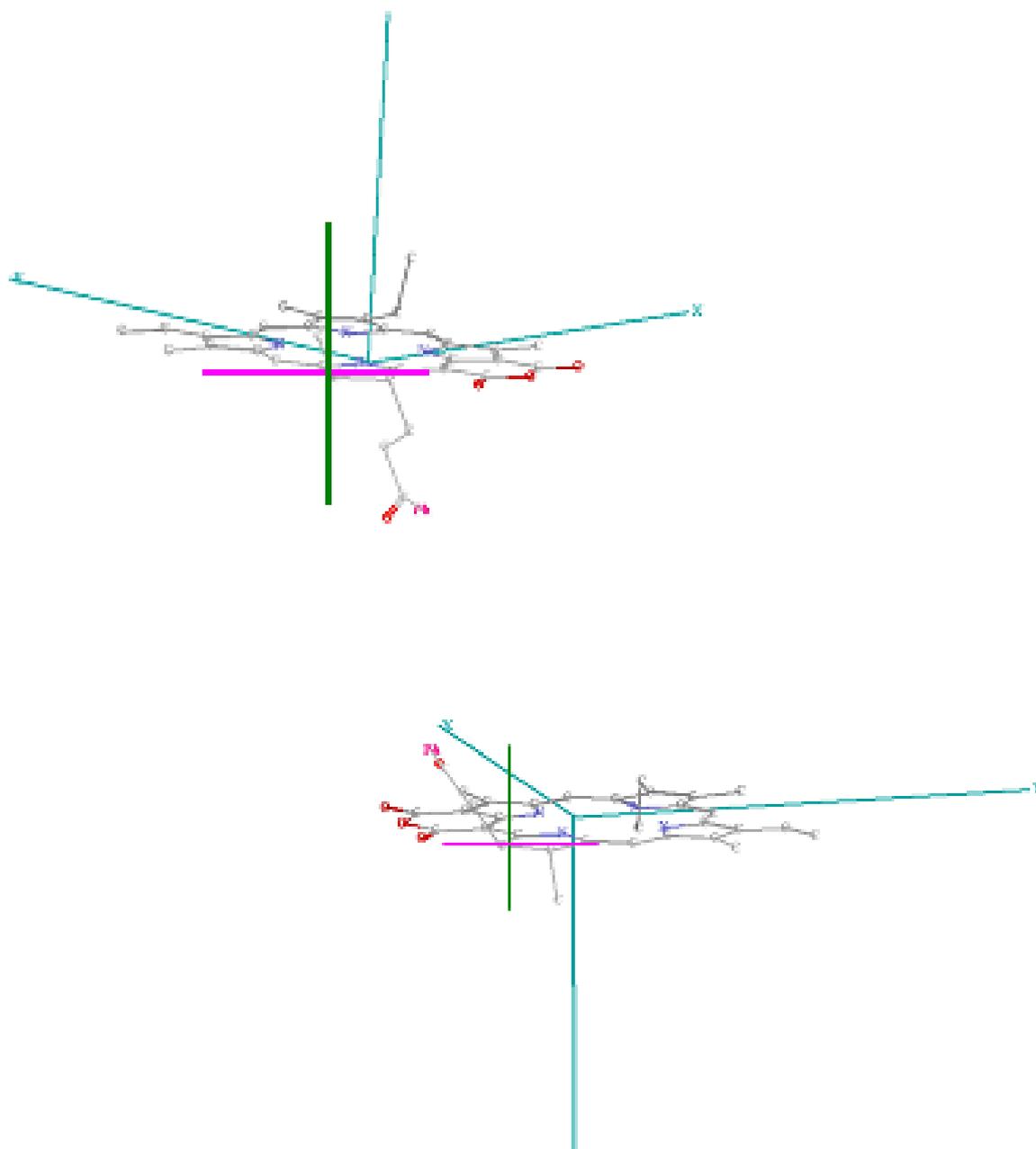


Figura 102: Projeções no quadrante da substância **3**

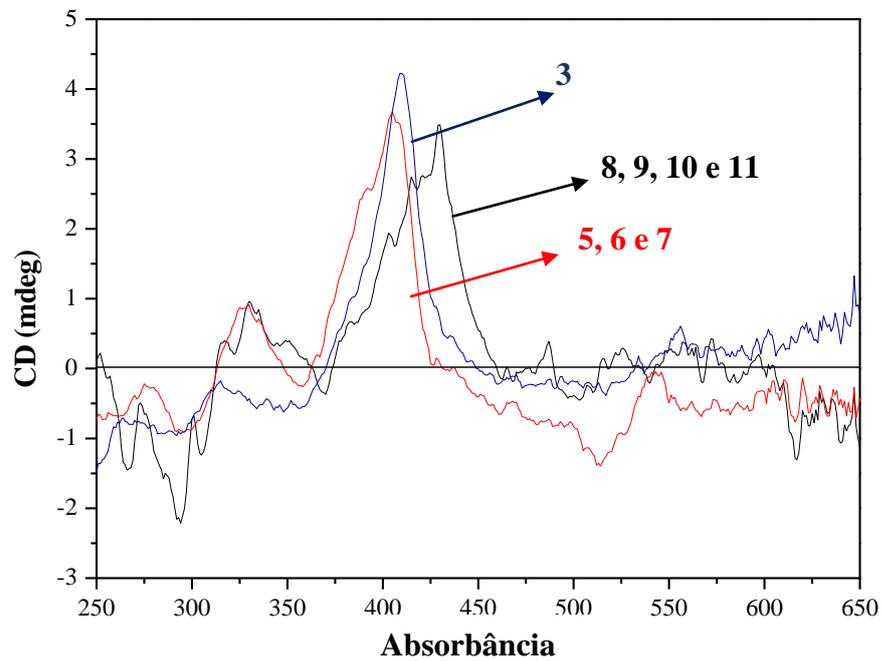


Figura 103: Espectro de dicroísmo circular dos compostos **3** (0,991 mg/mL), **5, 6 e 7** (0,156 mg/mL) e **8, 9, 10 e 11** (0,151 mg/mL) em MeOH.

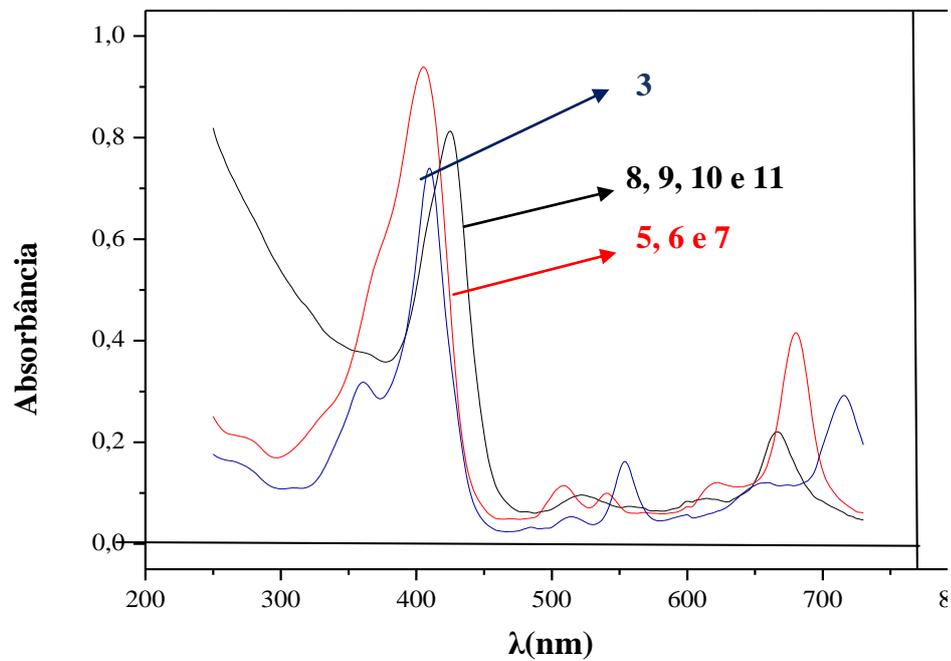


Figura 104: Curvas de UV dos compostos **3** (0,991 mg/mL), **5, 6 e 7** (0,156 mg/mL) e **8, 9, 10 e 11** (0,151 mg/mL) em MeOH.

CAPÍTULO III
ESTUDO QUIMICO DE *Sphagneticola trilobata* L. Pruski



III.1 Revisão de Literatura

III.1.1 Generalidades da Família Asteraceae

A família Asteraceae compreende cerca de 1.100 gêneros com aproximadamente 25.000 espécies em uma ampla distribuição geográfica, sendo representadas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas no qual pode ser encontradas tanto nas localidades próximas do nível do mar quanto nas mais altas montanhas (MILES *et al.*, 1990).

No Brasil esta família representa aproximadamente 180 gêneros (BARROSO, 1986). Esta planta pode ser encontrada na região que abrange do Rio de Janeiro e vão até a região sul do país sendo frequentemente encontrada nas praias, lugares sombrios, úmidos e terrenos baldios (CORREA, 1984).

Na grande maioria as Asteraceae estão representadas por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarborescentes ou arbustivas e, só raramente, por espécies arbóreas (MILES *et al.*, 1990).

III.1.1.1 Aspectos Gerais de *Sphagneticola trilobata* L. Pruski

O interesse pelo estudo químico do gênero *Sphagneticola* tem sido despertado devido às diversas atividades farmacológicas reveladas pelos extratos ou substâncias isoladas de algumas espécies, nos quais podem destacar as atividades contra enxaqueca, febre, infecções generalizadas e doenças respiratórias (BLOCK *et al.*, 1998 & CARVALHO *et al.*, 2001).

A *Sphagneticola trilobata* é uma “margaridinha”, nativa do litoral brasileiro, muito vistosa e rústica. No Brasil é conhecida popularmente como vedélia, picão-da-praia, mal-me-quer (<http://www.comfsm.fm/~dleeling/invasive/wedelia.html>), podendo ser cultivadas a pleno sol ou meia-sombra, e ainda são utilizadas como forração em bosques e revestimentos de talude e barrancos, pois é bastante rústica, resistente e floresce o ano todo (www.floresecesta.com.br).

É uma planta que apresenta caule castanho-avermelhado, as folhas são opostas, curtopecioladas, membranáceas, pilosas de duas faces com 6 cm de comprimento e 3 cm de largura, pecíolo semicilíndrico, ciliado, com 4 mm de comprimento, flores amarelas, as marginais cerca 13 mm, com corola linguada, trilobada no ápice, com 8 mm de comprimento, hermafroditas, com corola tubulosa, estilete da flor feminina com os ramos glabros, carnosos (CORREA, 1984). A taxonomia apresentada pela *Sphagneticola trilobata* L. Pruski esta representada pela **Tabela 16**.

Tabela 16. Taxonomia de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (<http://www.comfsm.fm/~dleeling/invasive/wedelia.html>).

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Gênero: *Sphagneticola*

Espécie: *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

A espécie *Wedelia paludosa* D. C. passou a ser chamar *Sphagneticola trilobata* (L.) (Figura 105) devido algumas considerações relevantes quanto às suas propriedades etnobotânica.



Figura 105: Espécie *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (<http://www.comfsm.fm/~dleeling/invasive/wedelia.html>).

A espécie *Sphagneticola trilobata* (L.), Pruski tem como sinónima *Acmella brasiliensis* Spreng, *Acmella spilanthoides* Cass., *Bupthalmum repens* Lam., *Bupthalmum strigosum* Spreng., *Complaya trilobata* (L.) Strother, *Polymnia carnosae* Poir., *Polymnia carnosae* Var. *aspera* (Rich.) Poir., *Polymnia carnosae* Poir. Var. *glabella* (Rich.) Poir., *Polymnia carnosae* Poir. Var. *trilobata* (Rich.) Poir., *Seruneum paludosum* (DC.) Kuntze, *Seruneum trilobatum* (L.) Kuntze, *Silphium trilobatum* L, *Sphagneticola ulei* O.Hoffm, *Stemmodontia trilobata* (L.) Small, *Thelechitonia trilobata* (L.) H. Rob & Cuatrec., *Verbesiana carnosae* M. Gómez, *Verbesiana carnosae* M. Gómez var. *aspera* (Rich.) M. Gómez, *Verbesiana carnosae* M. Gómez var. *trilobata* (Rich.) M. Gómez, *Wedelia brasiliensis* S. F. Blake, *Wedelia carnea* Rich., *Wedelia carnosae* Rich. Ex Spreng., *Wedelia carnosae* Rich. var. *aspera* Rich., *Wedelia carnosae* Rich. var. *glabella* Rich., *Wedelia carnosae* Rich. var. *trilobata* Rich. *Wedelia crenata* Rich., *Wedelia paludicola* Poepp. & Endl., *Wedelia paludosa* D. C., *Wedelia trilobata* (Rich.) Bello, *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. (MILES *et al.*, 1990).

Devido ao seu comportamento estolonífero e rasteiro a *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski é muito utilizada na forração de relvados, para proteger taludes e barrancos, e ainda também pode embelezar canteiros e bordaduras, assim como vasos e jardineiras. (<http://www.comfsm.fm/~dleeling/invasive/wedelia.html>) e (CORREA, 1984).

A espécie *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski possui atividade anticonvulsiva e antiexpectorante além de possuir atividade contra a osteoporose (BARDÓN *et al.*, 2007 & ANNIE *et al.*, 2004).

Esta espécie foi estudada anteriormente em 1987, onde foi revelada a presença de substâncias com atividade antibiótica. O estudo químico desta espécie conduziu a identificação de ácidos kaurenóicos, um labdano, e ainda uma secokaurenolactona (**Figura 106**), além de outros constituintes (ROQUE *et al.*, 1987).

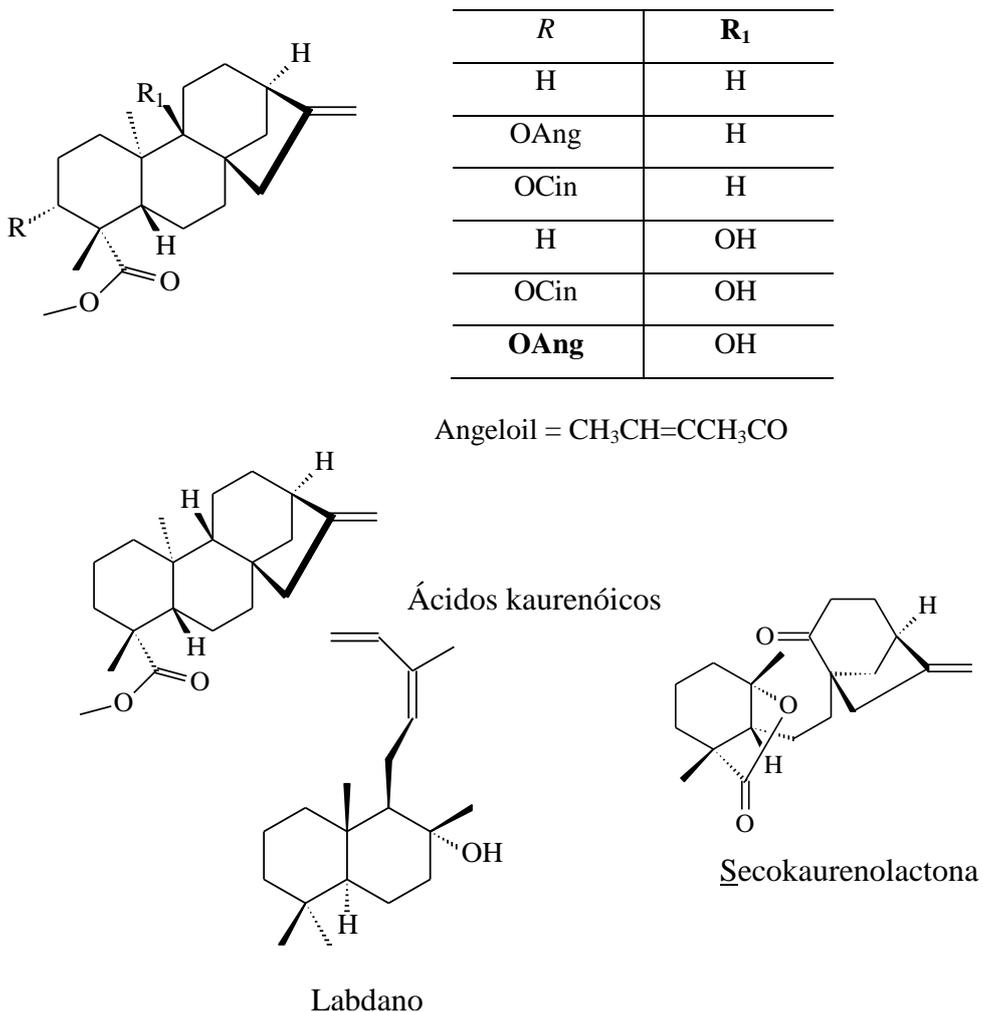


Figura 106: Ácidos kaurenóicos, labdano e secokaurenolactona isolados de *Sphagneticola trilobata* (ROQUE *et al.*, 1987).

Outro estudo realizado por professores da Universidade Estadual de Londrina e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em 1994, constatou a presença de duas novas lactonas sesquiterpênicas, além de triterpeno, esteróides glicosilados (**Figura 107**) (FERREIRA *et al.*, 1994).

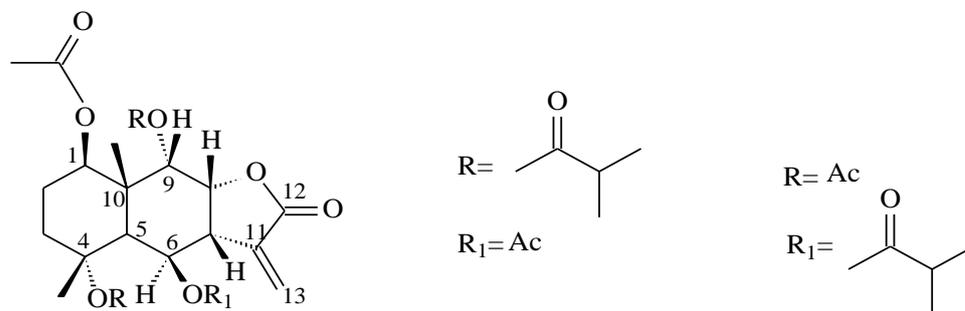


Figura 107: Lactonas sesquiterpênicas isolados de *Sphagneticola trilobata* (FERREIRA *et al.*, 1994).

Estudo adicional por pesquisadores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro apresentou três novas substâncias isoladas das flores de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, o ácido caurenólico, ácido oleanólico e estigmasterol glicosilado (**Figura 108**) (CARVALHO *et al.*, 2001).

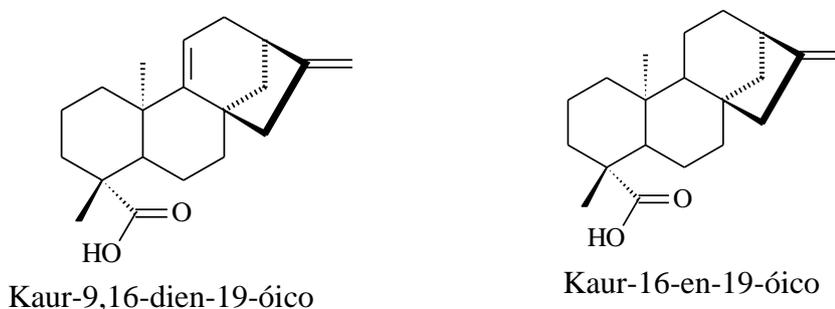


Figura 108: Kaurenos isolados de *Sphagneticola trilobata* (CARVALHO *et al.*, 2001).

Outra informação importante quanto esta espécie foi apresentada por um estudo realizado por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais que revelou novos kaurenos (**Figura 109**) isolados do extrato metanólico das partes aéreas da planta (VIEIRA *et al.*, 2001).

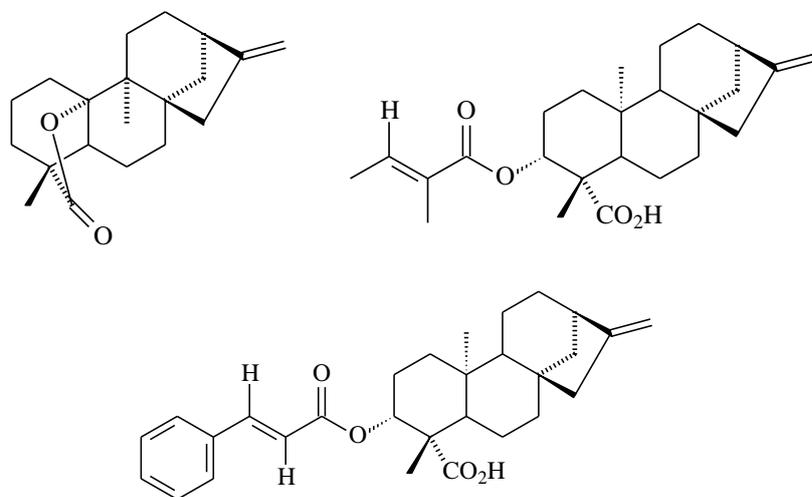
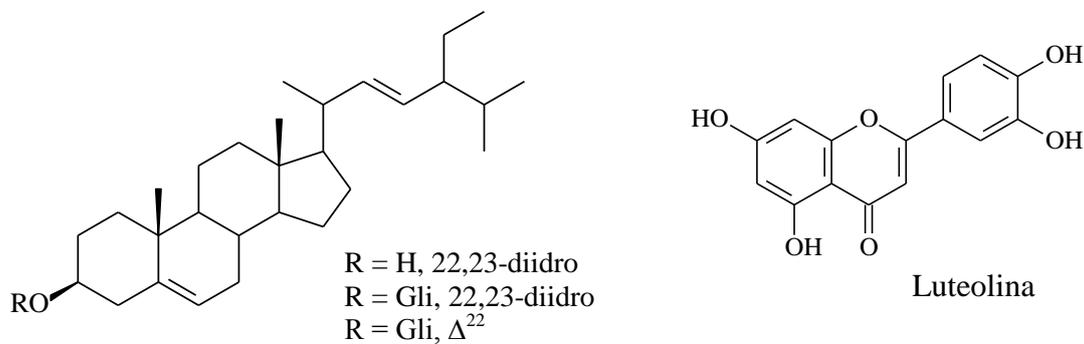
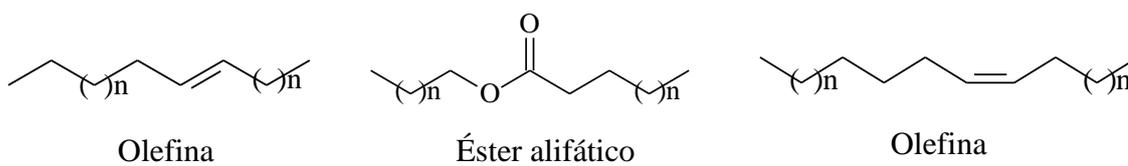


Figura 109: Kaurenos isolados de *Sphagneticola trilobata* (VIEIRA *et al.*, 2001).

III.1.1.2 Outros constituintes químicos isolados de *Sphagneticola trilobata* L. Pruski (VIEIRA *et al.*, 2001 e CARVALHO *et al.*, 2001).



III.2 Material e Métodos

III.2.1 Identificação da Espécie e Preparação dos Extratos de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

III.2.1.1 Identificação da espécie *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

O material vegetal para estudo da espécie *Sphagneticola trilobata* foi coletada em Seropédica-RJ nos meses de novembro, dezembro e fevereiro de 2007 e foi identificado pelo mestrando Thiago Amorim (Instituto de Biologia, Departamento de Botânica – UFRRJ), no qual uma exsicata desta espécie (RBR 34800) está depositada no Herbário RBR, IB-UFRRJ.

III.2.1.2 Preparação dos extratos de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

Todo material vegetal (1142 g) foi submetido à maceração em hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e metanol:H₂O (8:2) à temperatura ambiente. As soluções dos extratos foram concentradas em rotavapor sob uma pressão reduzida fornecendo os extratos hexânico (33 g) (STH), em diclorometano (16 g) (STD), clorofórmico (3 g) (STC), em acetato de etila (1 g) (STAcet), metanólico (41 g) (STM) e metanol/água (13 g) (STHM).

III.2.1.3 Processo de Saponificação e Extração de Carotenóides do Extrato Hexânico de *Sphagneticola trilobata*

III.2.1.3.1 Processo de saponificação do extrato hexânico *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

O processo de saponificação foi baseado no método RODRIGUEZ-AMAYA (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2004) com objetivo de promover a retirada de clorofila e outros interferentes, no qual foram pesados 5 g do extrato hexânico seco de *Sphagneticola trilobata*, e logo após foram adicionados 90 mL de éter de petróleo e 10 mL de uma solução 40% de KOH em metanol, a temperatura ambiente. A solução ficou em repouso durante 24 h na ausência total de luz (INBARAJ *et al.*, 2008).

Após a saponificação a solução foi transferida para um funil de partição, na qual foram adicionados 100 mL de água. A solução de *Sphagneticola trilobata* formou duas fases após serem adicionados 100 mL de água. A fase aquosa (verde) foi descartada e a fase etérea (amarela) foi extraída com éter de petróleo até a perda da coloração amarela. O rendimento obtido no processo de saponificação foi de 60%.

III.2.1.3.2 Identificação de Carotenoides através de UV.

A análise no UV foi feita a partir de soluções do extrato e da fração hexânica de *Sphagneticola trilobata*. Para preparação da solução pesou-se 10 mg das amostras e solubilizou-se em balão volumétrico de 10 mL contendo hexano (1 mg/mL), e posteriormente foi submetida a análise no UV com uma varredura no comprimento de onda de 200 a 500 nm.

Foram preparadas soluções padrão do extrato e fração hexânica de *Sphagneticola trilobata*, no qual se pesou 10 mg da amostra em 10 mL de hexano, que posteriormente foram submetidas a análise no UV-Vis. (Shimadzu), fazendo-se uma varredura com de 300 nm a 500 nm no intuito de detectar a presença de carotenóides.

III.2.1.3.3 Análises através de CLAE do Extrato e Fração Hexânica de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

A análise cromatográfica foi feita com o extrato e a fração hexânica de *Sphagneticola trilobata*, utilizando Cromatógrafo Líquido com forno para colunas e detector de rede fotodiodos UV/Vis de 300 a 600 nm, e Coluna Cromatográfica de fase reversa de modelo C₃₀ YMC Carotenoid S-3 de 4,6 x 250 mm.

Os padrões utilizados foram: α e β - Caroteno, violaxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, β -criptoxantina e licopeno. Para o cálculo da concentração da substância, utilizou-se a espectrofotometria (UV-1800, Shimadzu®) com a aplicação da lei de *Lambert-beer*. Para isso, a solução das substâncias isoladas teve o solvente removido sob fluxo de nitrogênio, quando em se tratando apenas de solvente orgânico, ou por evaporação em evaporador rotativo (Büchi®) seguida de liofilização (L101, Liotop®) no caso da presença de água na composição. Após completa remoção do solvente, as amostras foram solubilizadas em gradiente de metanol e éter metil-terc-butílico, e posteriormente foram injetadas em volume de 25 μ L em tempo de retenção de 28 minutos a um fluxo de 0,8 mL/min (**Tabela 17**) para a determinação espectrofotométrica.

A **Tabela 17**. Variações de tempo e de gradiente (% A - Metanol e % D - Éter metil-terc-butílico) utilizados nas análises.

Nº de amostra	Tempo (min)	Fluxo mL/min	Gradiente % A	Gradiente % D
1	0	0,80	80	20
2	5	0,80	80	20
3	20	0,80	15	85
4	25	0,80	15	85
5	25,01	0,80	80	20
6	30	0,80	80	20

A concentração das amostras foram calculadas através da equação de *Lambert-beer* (**Equação 1**) após leitura da absorção desta solução no comprimento de onda específico, utilizando os valores de sua absorvidade molar. Os valores de concentração obtidos foram então corrigidos de acordo com as purezas previamente determinadas.

Equação 1: Equação de *Lambert-beer* $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$

A_{λ} = Absorvância da solução no comprimento de onda (λ) e solvente especificado

ϵ_{λ} = Absorvidade molar da substância no λ especificado

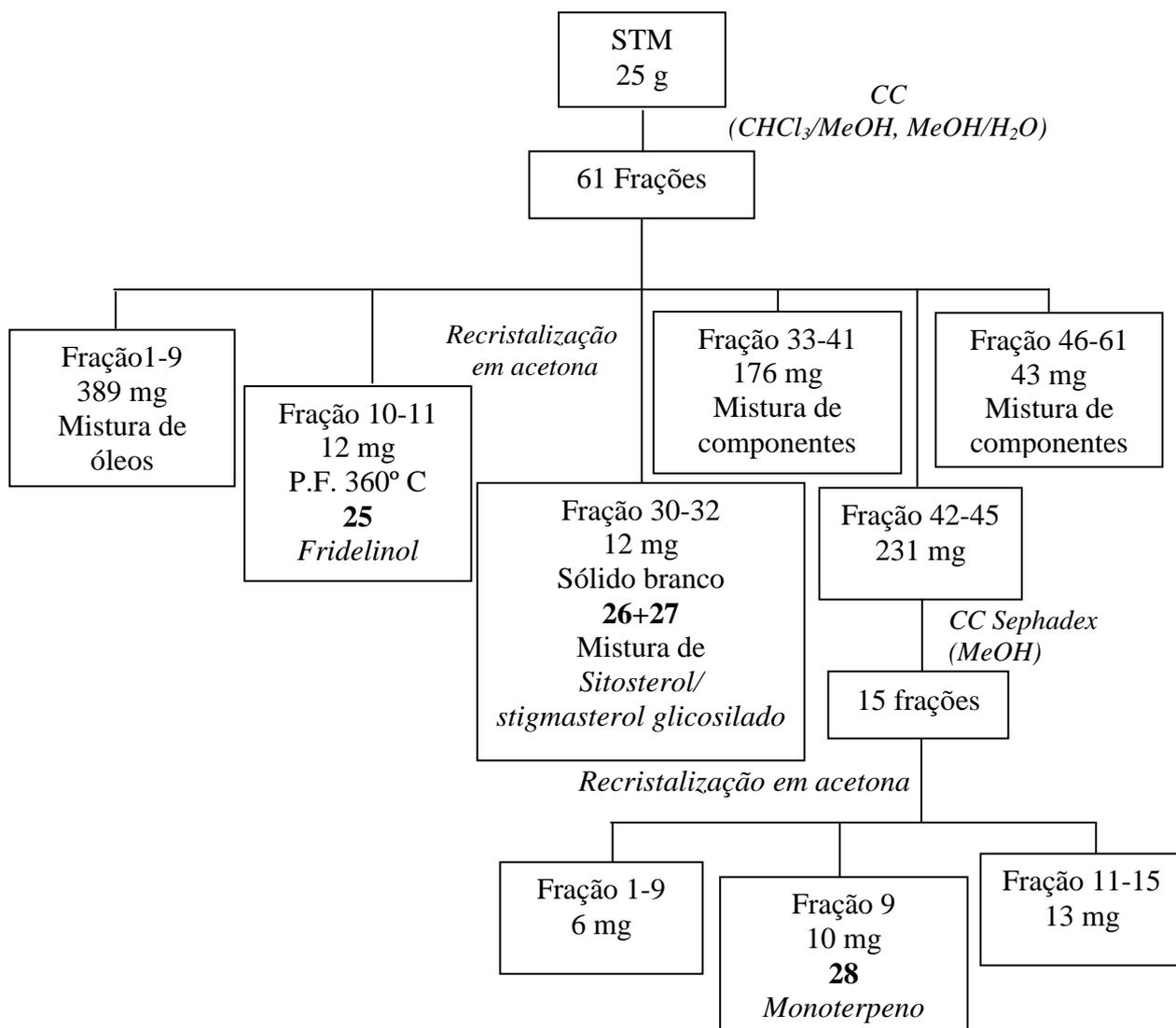
c = Concentração da solução (mol/L)

l = Caminho ótico da cubeta (1cm)

III.2.1.4 Estudo químico do extrato metanólico de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

O extrato metanólico de *Sphagneticola trilobata* foi fracionado em coluna aberta de sílica gel (70 – 230 mesh) eluído com diclometano, clorofórmio, clorofórmio/metanol, metanol e metanol/H₂O (8:2) em polaridades crescentes, obtendo-se um total de 61 frações recolhidas em erlemeyer de 250 mL, que posteriormente foram concentradas em rotavapor e analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com semelhanças no perfil cromatográfico.

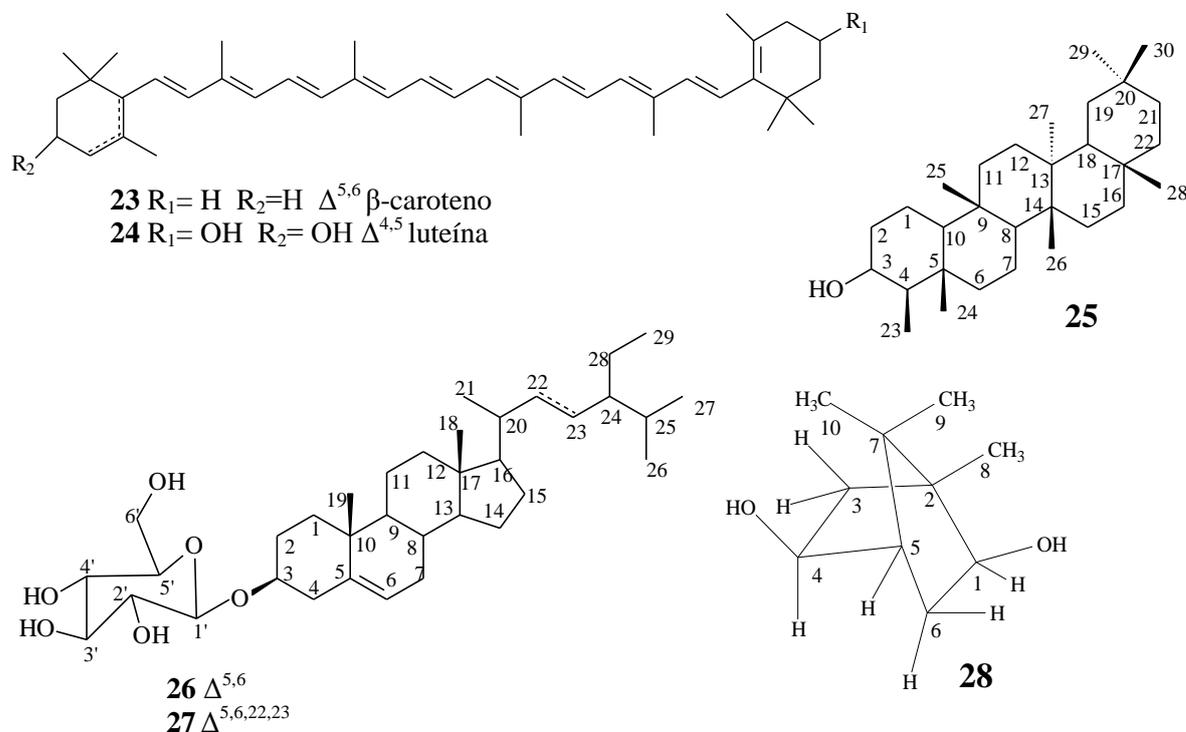
Nas frações 10-11 houve a formação de sólidos brancos, os quais foram recristalizados em acetona e submetidos à análise espectroscópica sendo identificado como substância **25**, chamado fridelinol (12 mg), e as frações 30-32 apresentou uma mistura de sitosterol e estigmasterol glicosilados (15 mg) (**26+27**). A fração 42-45 foi submetida à cromatografia em coluna Sephadex eluída com MeOH, fornecendo um total de 15 frações, do qual a fração 9 apresentou um sólido branco que foi identificado como um monoterpene (10 mg) (**28**). O fluxograma apresenta um resumo do estudo do extrato metanólico.



Esquema 20: Fracionamento do extrato metanólico de *Sphagneticola trilobata*.

III.3 Resultados e Discussão

III.3.1 Substâncias Identificadas e Isoladas de *Sphagneticola trilobata* L. Pruski



III.3.1.1 Identificação de Carotenóides no extrato e fração hexânica de *Sphagneticola trilobata*.

III.3.1.1.1 Análises Espectrofotométrica no Ultravioleta do Extrato hexânico de *Sphagneticola trilobata*

O teste no UV-visível foi realizado também com extrato e fração hexânica de *Sphagneticola trilobata* qual foi utilizado uma solução padrão de 1 mg/mL. A solução foi submetida à análise espectrofotométrica no UV-visível percorrendo uma faixa de 300 a 600 nm.

A análise no UV-visível revelou sinais característicos de componentes do tipo carotenóides, na qual puderam ser confirmados através dos valores dos λ_{max} que apresentaram valores em 413, 443 e 475 nm para o extrato (**Figura 110**), que foi possível identificar como carotenoide.

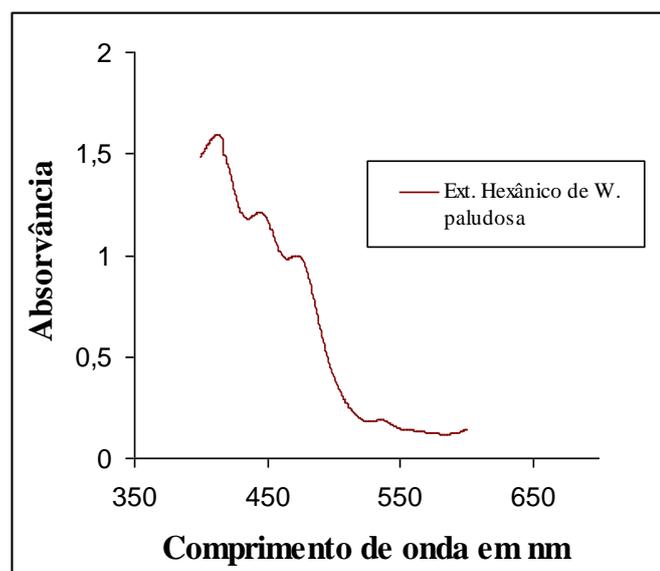
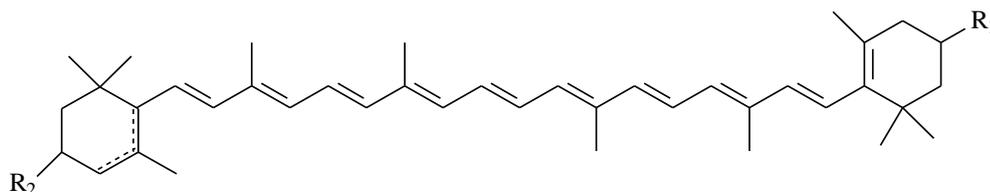


Figura 110: Análise do UV do extrato hexânico com λ_{\max} de 413, 443 e 475 nm característicos de carotenoides.

III.3.1.1.2 Análises através de CLAE do Extrato e fração hexânica de *Sphagneticola trilobata*.

O extrato e a fração hexânica de *Sphagneticola trilobata* após análise por CLAE em um comprimento de onda de 300 a 600 nm, obtiveram-se os cromatogramas da fração e do extrato hexânico, sendo comparados com valores padrões de análise e os posteriormente os teores de carotenoides foram quantificados utilizando a lei de *Lambert-beer*. Os valores dos cromatogramas, tanto do extrato quanto da fração, apresentaram teores de β -caroteno (**23**) e luteína (**24**), nos quais os tempos de retenção foram identificados em 16,7 e 7,4 min., respectivamente, sendo os carotenoides quantificados em quantificados em 70,8 mg de β -caroteno e 13,9 mg de luteína para o extrato hexânico e 78,6 mg de β -caroteno e 32,1 mg de luteína para fração hexânica (**Figuras 111 e 112**).



23 $R_1 = H$ $R_2 = H$ $\Delta^{5,6}$ β -caroteno

24 $R_1 = OH$ $R_2 = OH$ $\Delta^{4,5}$ luteína

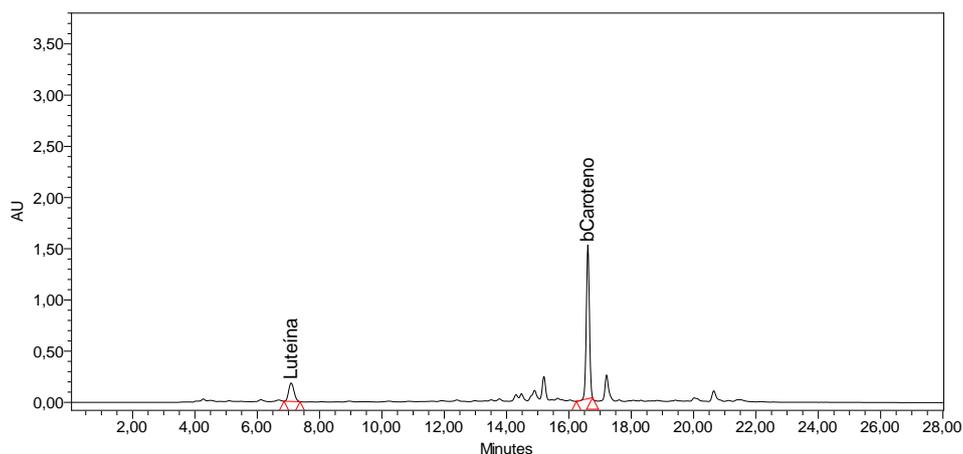


Figura 111: Cromatograma do extrato hexânico de *Sphagneticola trilobata*.

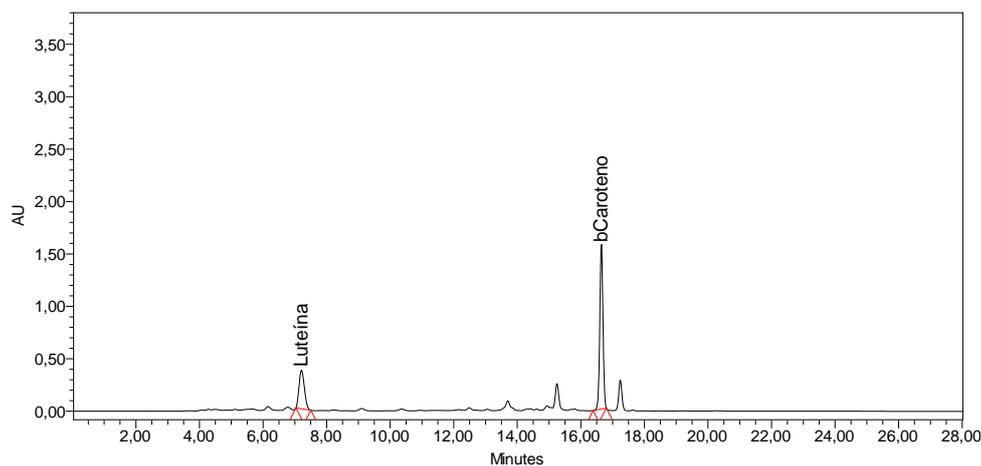


Figura 112: Cromatograma da fração hexânica de *Sphagneticola trilobata*.

III.3.1.2 Identificação da substância 25

A substância **25** foi isolada como um sólido cristalino com PF 360-63°C compatível com o friedelinol. O espectro de RMN ^1H (**Figura 113**) apresentou valores de deslocamentos químicos na região de δ_{H} 0,90 – 1,14 correspondendo a metilas, um multipletto em δ_{H} 3,76 referente ao hidrogênio do carbono carbinólico, um dubleto em δ_{H} 0,93 (d, $J=7$ Hz) indicando uma metila ligada a carbono CH_3 -23 e ainda multipletos em δ_{H} 1,71 e 1,88, 1,37, 1,54, 2,09 referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos C-1, C-8, C-10 e 18, C-2.

Através do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 114 e 115**) foi possível ver sinais de carbono carbinólico δ_{CH} 72,7 referente ao C-3, além dos sinais de carbonos referentes a metilas δ_{C} 11,6, 16,3, 17,5, 18,6, 20,1, 31,7, 32,0, 35,0 indicando, respectivamente, as metilas

referentes aos carbonos C-23, C-24, C-25, C-27, C-26, C-30, C-28, C-29 do triterpeno pentacíclico. O valor do C-3 em δ 72,8 ppm está de acordo com HO-3 α para triterpenos do tipo friedelano e, por isso, pode-se propor a OH ligada ao carbono 3 em equatorial, além do efeito de desproteção β da metila em 4, há efeito de proteção γ da metila em 5. O sinal no RMN ^1H representado como um singlete largo justifica a proposta do OH em axial. Os valores dos deslocamentos químicos (CDCl_3) representados pela **Tabela 18** abaixo são comparados com dados da literatura (CARVALHO *et al.*, 1998) e serviu para confirmar a estrutura proposta.

Como outro parâmetro de confirmar a proposta da estrutural, fez-se análise com CG-massa (**Figura 119**), da qual se obteve o espectro de massas (**Figura 116**), que apresentou um pico compatível para o íon molecular em m/z 413 correspondente ao $[\text{M}-15]^+$ da FM $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$ ($428 - 15 = 413$) (**Esquema 21**).

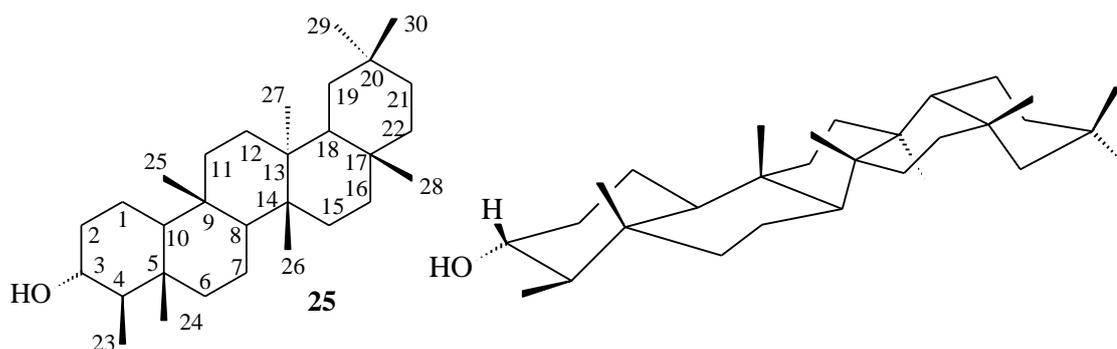


Tabela 18: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **25**.

C	Substância 25		Fridelinol (CARVALHO <i>et al.</i> , 1998)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)	δ_{C} (CDCl_3)	δ_{H} (CDCl_3)
1	15,7	1,88 e 1,71 (m)	15,5	1,92 e 1,61 (m)
2	32,3	2,09 (m)	32,0	2,33 (m)
3	72,7	3,76 (m)	72,1	3,75 (m)
4	49,1	-	48,9	-
5	36,0	-	37,6	-
6	41,7	-	41,5	-
7	17,5	-	17,8	-
8	53,2	1,37 (m)	52,9	1,39 (m)
9	32,3	-	33,4	-
10	61,3	1,54 (m)	61,1	1,55 (m)
11	35,3	-	35,2	-
12	29,7	-	29,8	-
13	39,2	-	38,0	-

14	39,2	-	39,3	-
15	30,6	-	30,6	-
16	35,5	-	35,7	-
17	30,6	-	30,1	-
18	42,8	1,54 (m)	42,5	1,57 (m)
19	35,1	-	35,0	-
20	29,7	-	30,3	-
21	32,3	-	32,5	-
22	36,7	-	38,9	-
23	11,6	0,93 (d, 7)	11,3	0,89 (d,7)
24	16,4	0,84 (s)	16,1	0,74 (s)
25	18,2	0,92 (s)	17,9	0,89 (s)
26	18,6	0,95 (s)	18,3	1,03 (s)
27	20,2	0,99 (s)	19,7	1,07 (s)
28	32,0	1,16 (s)	31,7	1,20 (s)
29	35,0	0,98 (s)	34,7	0,97 (s)
30	31,7	0,98 (s)	31,4	1,02 (s)

28 Feb 2012

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: WD11 - PROTON - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	Date	22 Nov 2010 15:57:48
File Name	D:\Meus documentos\Ana Paula\UFRRJ\RMN500_046001r	Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)	20.760
				Pulse Sequence	zg30

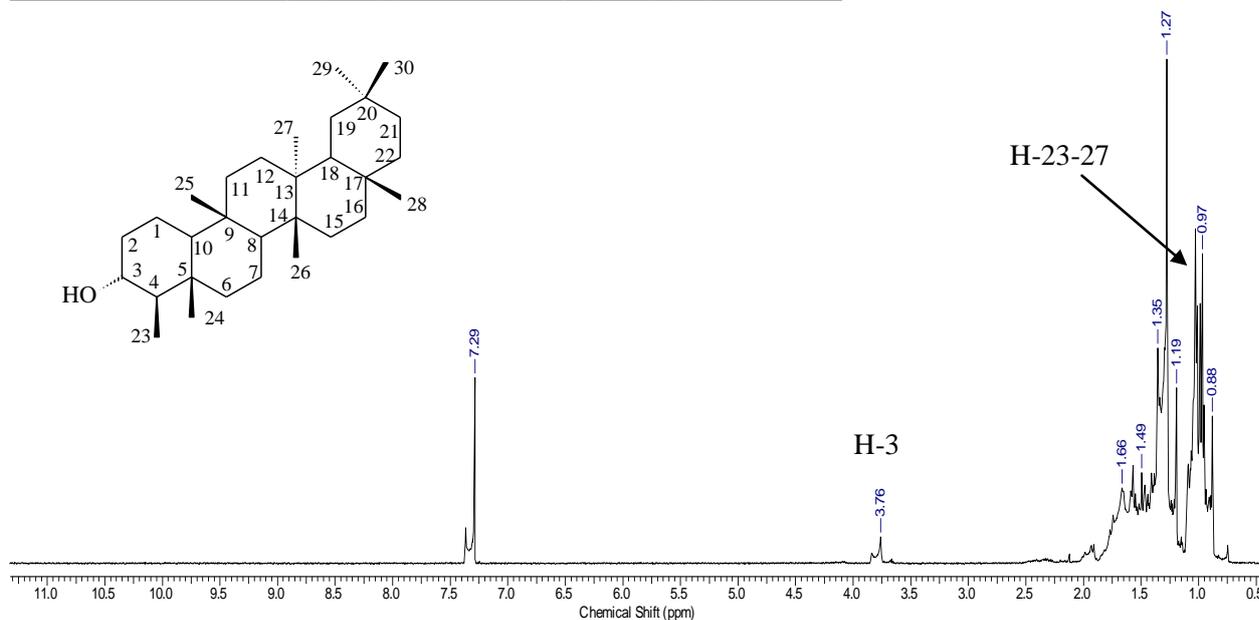


Figura 113: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 25.

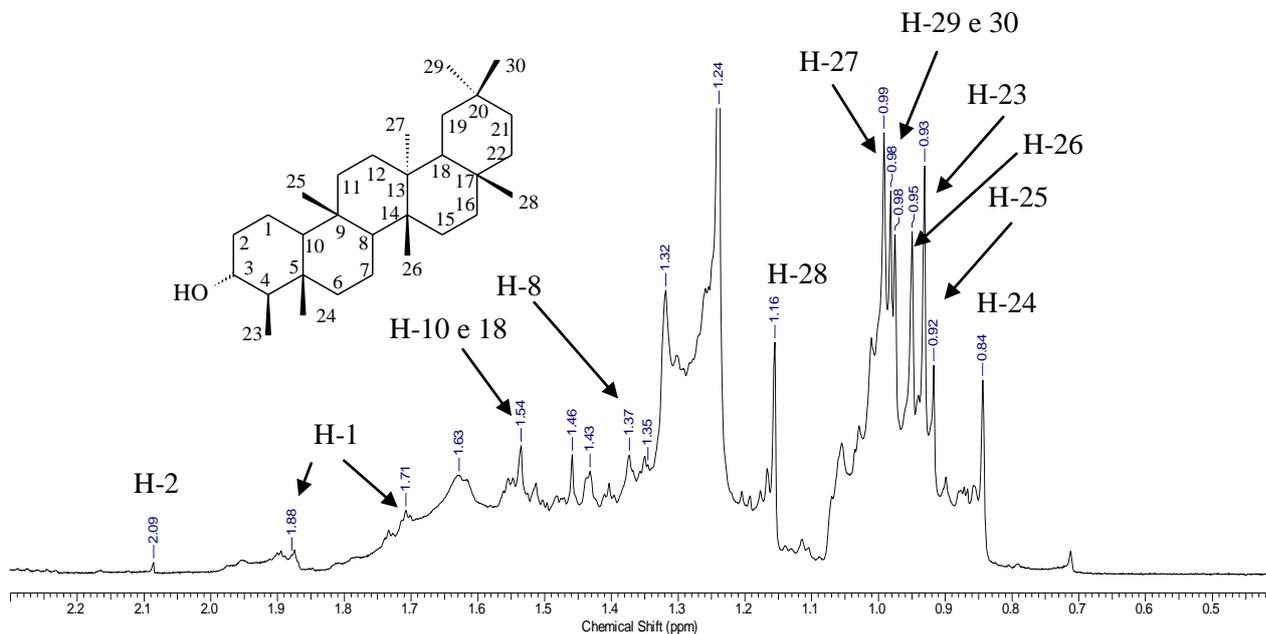


Figura 114: Espectro de expansão da faixa 2,5-0,5 ppm do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **25**.

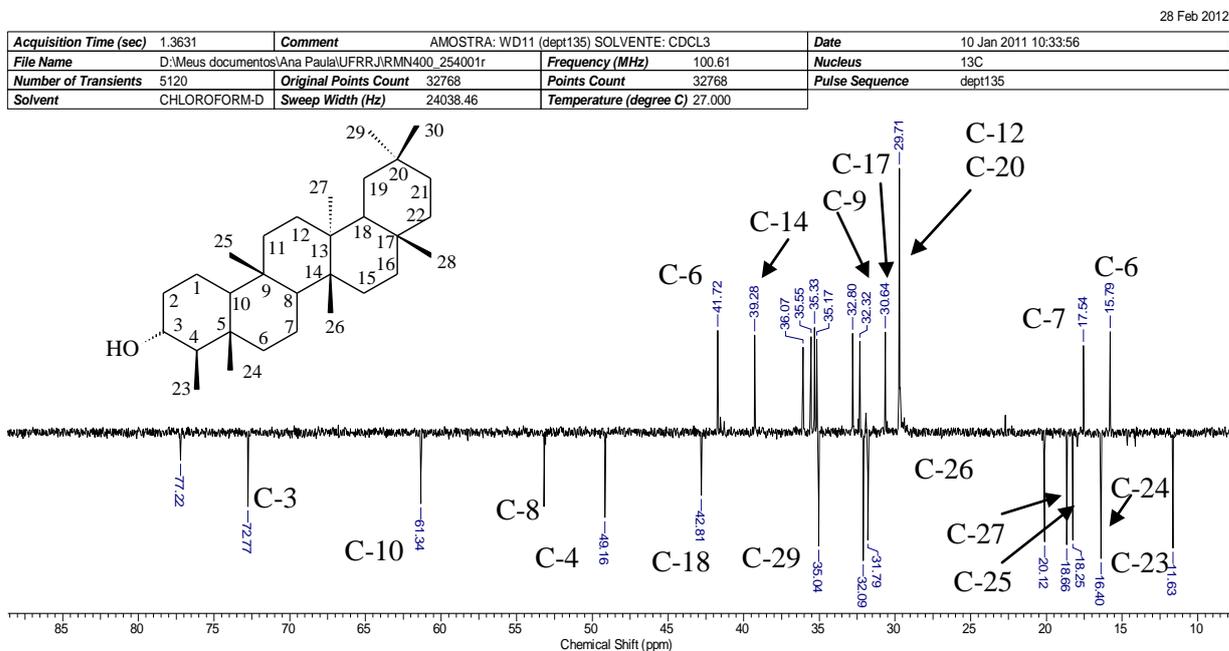


Figura 115: Espectro de DEPTQ (500 MHz, CDCl_3) da substância **25**.

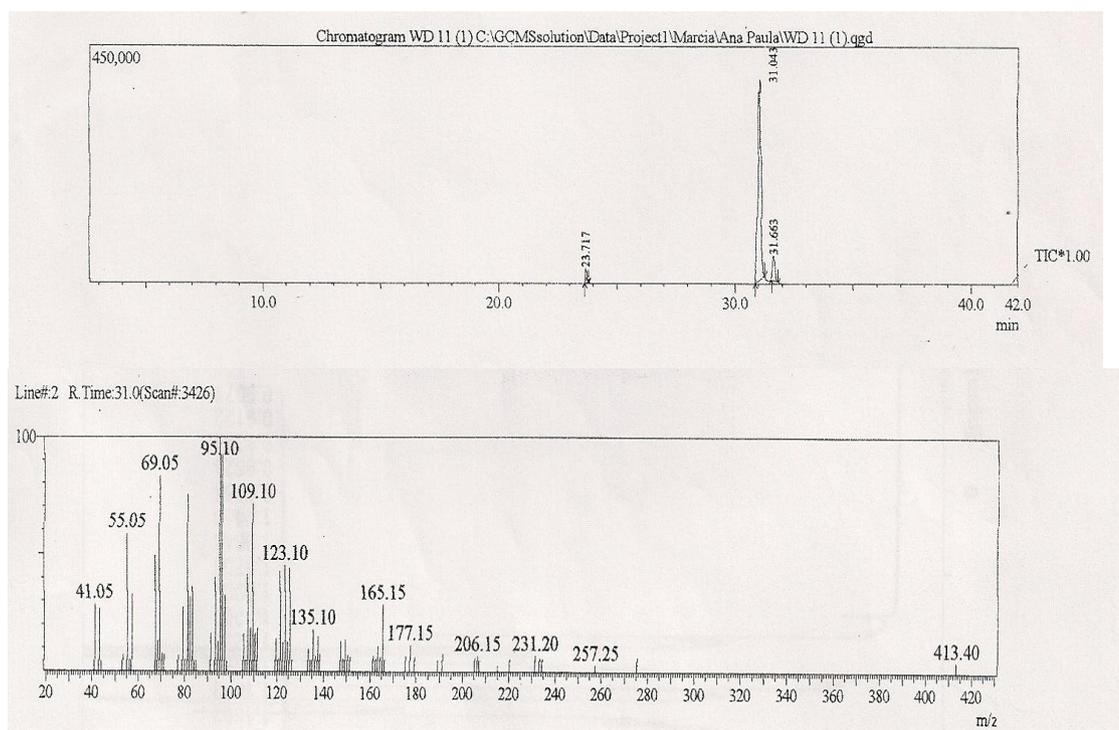
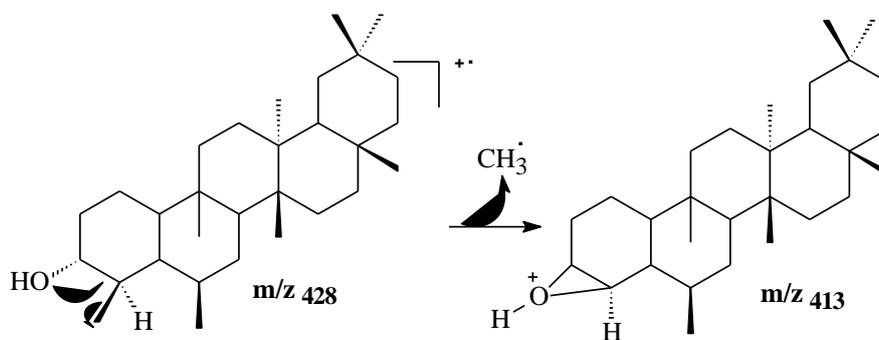


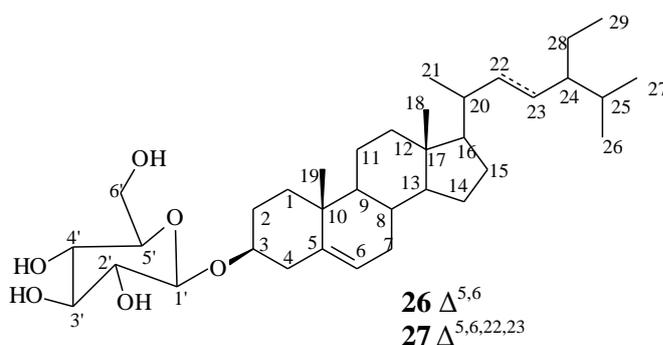
Figura 116: Espectro de CG-massas da substância **25**.



Esquema 21: Proposta de fragmentação de massas da substância **25**.

III.3.1.3 Identificação das substâncias 26 e 27

A identificação das substâncias **26** e **27** foi feita através de dados dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C das saponinas em comparação com dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990 e CARVALHO, 2000) ainda em comparação com as estruturas **13** e **14** do extrato metanólico das folhas de *Talinum triangulare*, sendo como um produto natural 3-O- β -D-glicopiranosilsterol, **26** e 3-O- β -D-glicopiranosilestigmasterol sendo o composto **27**.



III.3.1.4 Identificação da substância 28

A substância **28** foi determinada a partir da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (BBD e DEPTQ). No espectro de RMN ^1H (**Figura 117** e **118**) observaram-se singletos na região de δ_{H} 0,78, 0,80 e 0,95 ppm correspondendo a tres metilas e sinais de hidrogênios em carbonos carbinólicos.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 119** e **120**) permitiu confirmar as três metilas, identificar dois carbonos metilênicos, três carbonos metínicos e dois carbonos quaternários. Com isso pode-se propor a fórmula molecular parcial $(\text{CH}_3)_3(\text{CH}_2)_2(\text{CH})_1(\text{CH-O})_2\text{C}_2$, correspondente a $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ da estrutura de um monoterpene. A procura por dados de RMN ^{13}C de monoterpene e comparação de valores permitiu propor a estrutura do biciclo conforme representado a seguir. Os sinais de hidrogênio e carbonos metílicos foram atribuídos a CH_3 -8, CH_3 -9 e CH_3 -10, respectivamente. Os duplos dubletos em δ_{H} 4,17 (dd, $J_1=4$ e $J_2=12$ Hz), δ_{H} 4,08 (dd, $J_1=2$ e $J_2=12$ Hz) e δ_{H} 1,92 (d, $J_1=4$ Hz) foram correlacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos carbinólicos CH-4 e CH-1 e ao hidrogênio ligado a carbono metínico CH-5. Os valores de δ_{H} 1,41 (dd, $J_1=2$ e $J_2=12$ Hz, Ha) e δ_{H} 2,09 (dd, $J_1=4$ e $J_2=12$ Hz, Hb), e outros valores em δ_{H} 1,42 (dd, $J_1=0,8$ e $J_2=12$ Hz, Ha) e 2,09 (dd, $J_1=4$ e $J_2=12$ Hz, Hb) são referentes aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos CH_2 -6 e CH_2 -3. Outro deslocamento químico importante foi em δ_{H} 3,14 referente a hidroxila (OH) dos carbonos carbinólicos C-1 e C-4.

Os demais sinais detectados no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 120**) foram os carbonos carbinólicos em δ_{CH} 78,9 e 79,4 referente aos C-1 e C-4. Os carbonos metilênicos em δ_{CH_2} 37,7 e 34,6 ppm foram correlacionados aos carbonos CH_2 -3 e CH_2 -6. Os dois sinais de carbonos quaternários δ_{C} 47,0 (C-7) e 49,9 (C-2) e um carbono metínico em δ_{CH} 49,5 (C-5) ppm completam as atribuições à estrutura do monotерpeno. A análise do mapa de contornos de HSQC e HMBC (**Figuras 121 e 122**) permitiu detectar correlações adicionais a uma ligação ($^1J_{\text{HC}}$) e a longa distancia longa distância ($^{2,3}J_{\text{HC}}$) que podem ser vista na **Tabela 19**, dados esses que confirmam a proposta, 8,9,10-trimetil-1,4-diol,biciclo[2,2,1]heptano. A base para esta proposta foi à comparação dos dados de RMN com os apresentados na literatura (MAHMOUD & AHMED, 2006).

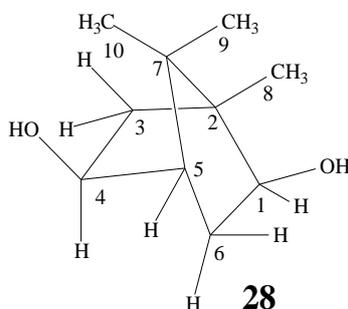


Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **28**.

C	Substância 28			MAHMOUD & AHMED, 2006
	HSQC ($^1J_{\text{HC}}$)		HMBC ($^{2,3}J_{\text{HC}}$)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)		
1	78,9	4,08 (dd, 2 e 12)	H-6/H-2/H-8	73,7
2	49,9	-	OH-1/H-3	48,5
3	37,7	Ha-1,41 (dd, 0,8 e 12) Hb-2,09 (dd, 4 e 12)	OH-4/H-2/H-8	36,6
4	79,4	4,17 (dd, 4 e 12)	H-3/H-5	78,2
5	49,5	1,92 (d, 4)	OH-4/H-6/H-9/H-10	48,2
6	34,6	Ha-1,04 (dd, 2 e 12) Hb- 2,12 (dd, 4 e 12)	OH-1/H-5	33,3
7	47,0	-	H-5/H-8/H-9/H-10	46,3
8	13,1	0,78 (s)	OH-1/H-3	13,4
9	19,9	0,80 (s)	-	19,5
10	21,9	0,95 (s)	-	22,9
OH	-	3,14 (s)	-	-

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: W.(42-45)9 (PROTON)	Date	25 Oct 2010 15:43:24
File Name	D:\Meus documentos\Ana Paula\UFRRJ\RMN400_233001r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	¹ H
Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	27.000
				Pulse Sequence	zg30

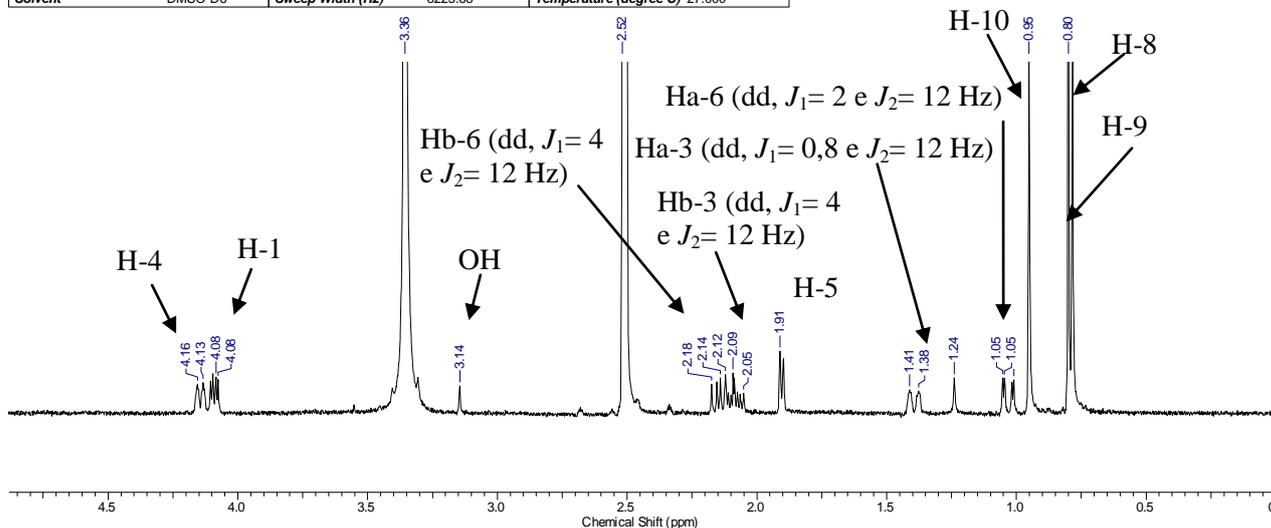


Figura 117: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da substância **28**.

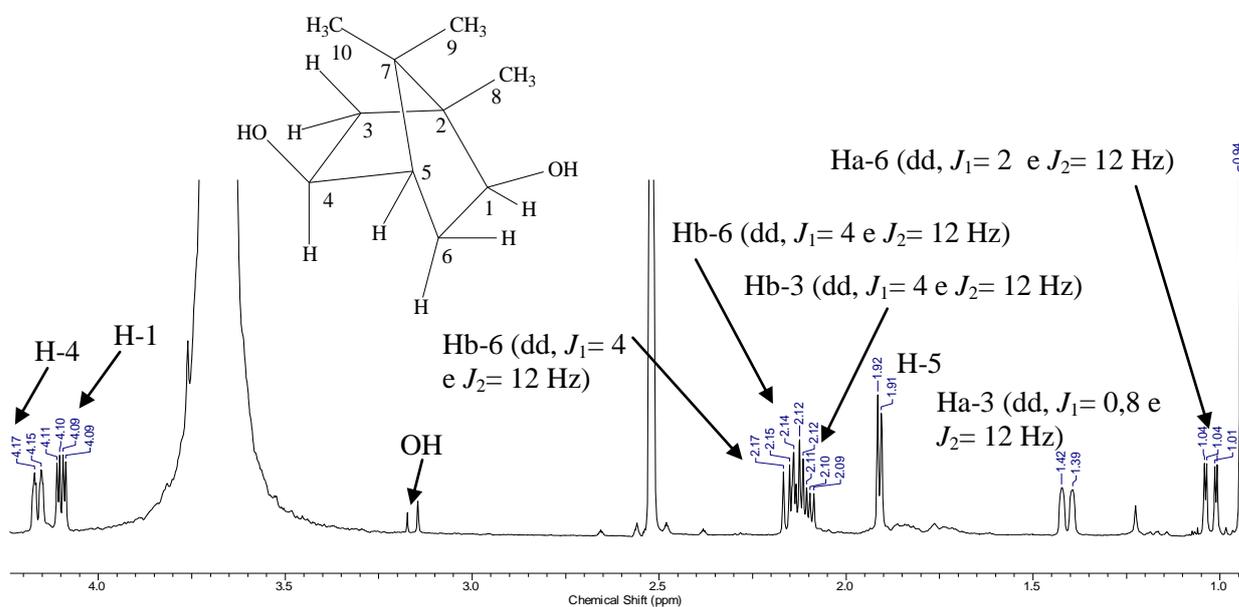


Figura 118: Expansão de deslocamento químico da região de δ_H 1- 4,5 ppm da substância **28**.

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: W(42-45)10 (13C_CPD)	Date	13 Jan 2011 09:30:28
File Name	D:\Meus documentos\Ana Paula\UFRRJ\RMN400_260001r	Original Points Count	32768	Frequency (MHz)	100.61
Number of Transients	21504	Sweep Width (Hz)	24038.46	Points Count	32768
Solvent	DMSO-D6	Temperature (degree C)	27.000	Pulse Sequence	zgpg30

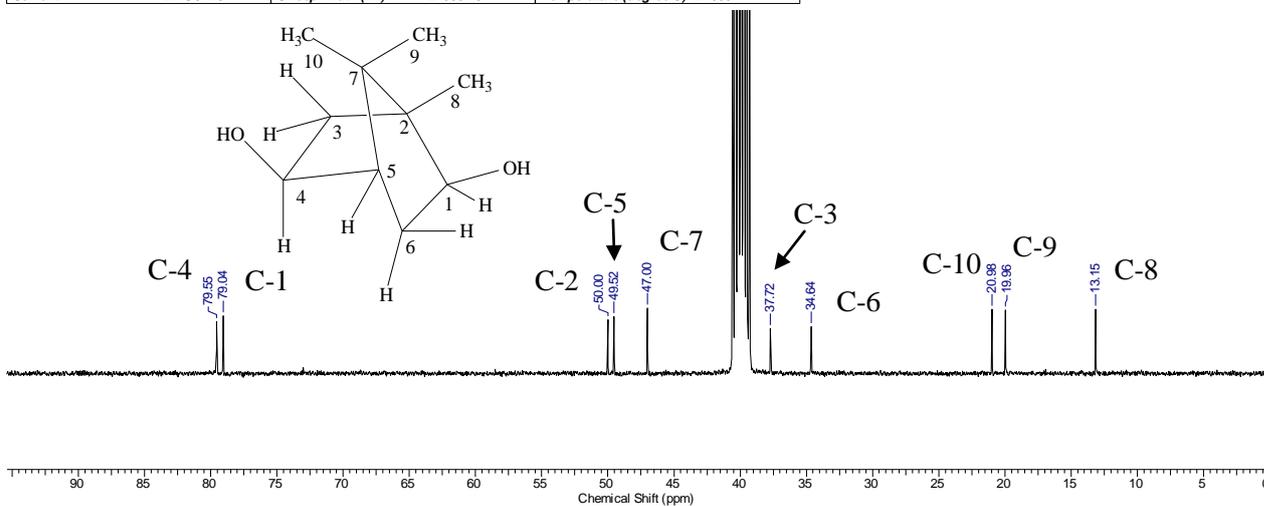


Figura 119: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 28.

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: W(42-45)10 (DEPTQ) SOLVENTE: DMSO	Date	20 Jul 2011 15:04:12
File Name	D:\Meus documentos\Ana Paula\UFRRJ\RMN500_120001r	Original Points Count	32768	Frequency (MHz)	125.76
Number of Transients	21716	Sweep Width (Hz)	29761.90	Points Count	32768
Solvent	DMSO-D6	Temperature (degree C)	21.960	Pulse Sequence	deptqgsp

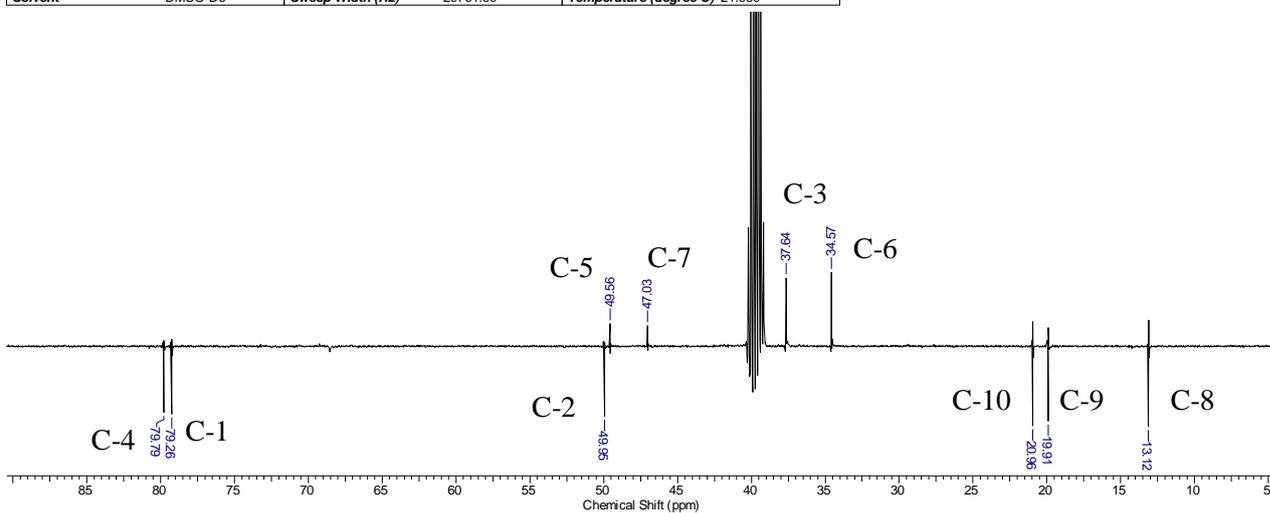


Figura 120: Espectro de DEPTQ (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 28.

Acquisition Time (sec)	(0.0492, 0.2122)	
Comment	AMOSTRA: W(42-45)10 (HSQCETGP) OPERADOR DO NMR - VITOR	
Date	09 Nov 2010 08:48:48	
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flavio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ\1RMNHC-500\28\pdata\1\2rr	
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus (13C, 1H)
Number of Transients	20	Original Points Count (1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence hsqcetgp
Solvent	DMSO	Sweep Width (Hz) (20831.98, 4826.25)
Temperature (degree C)	21.660	

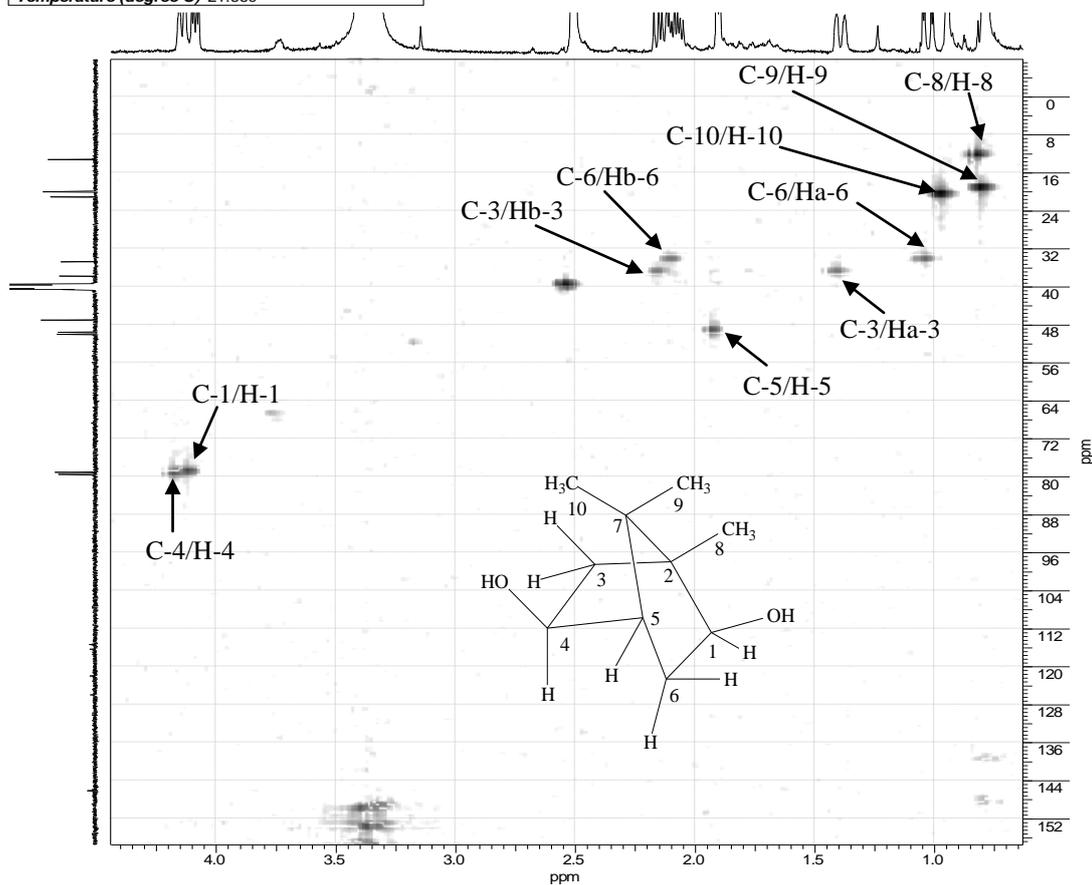


Figura 121: Espectro de HSQC (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 28.

Acquisition Time (sec)	(0.0367, 0.4243)		
Comment	AMOSTRA: W(42-45)10 (HMBCGP) OPERADOR DO NMR - VITOR		
Date	09 Nov 2010 09:22:28		
File Name	C:\Users\Flavio\Documents\Flávio Santana\Ana Paula de Oliveira\UFRRJ1\RMNHC-500\29\pdata\1\2rr		
Frequency (MHz)	(125.76, 500.13)	Nucleus	(13C, 1H)
Number of Transients	48	Original Points Count	(1024, 2048)
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	hmbcgp1pndqf
Solvent	DMSO	Sweep Width (Hz)	(27932.97, 4826.25)
Temperature (degree C)	21.660		

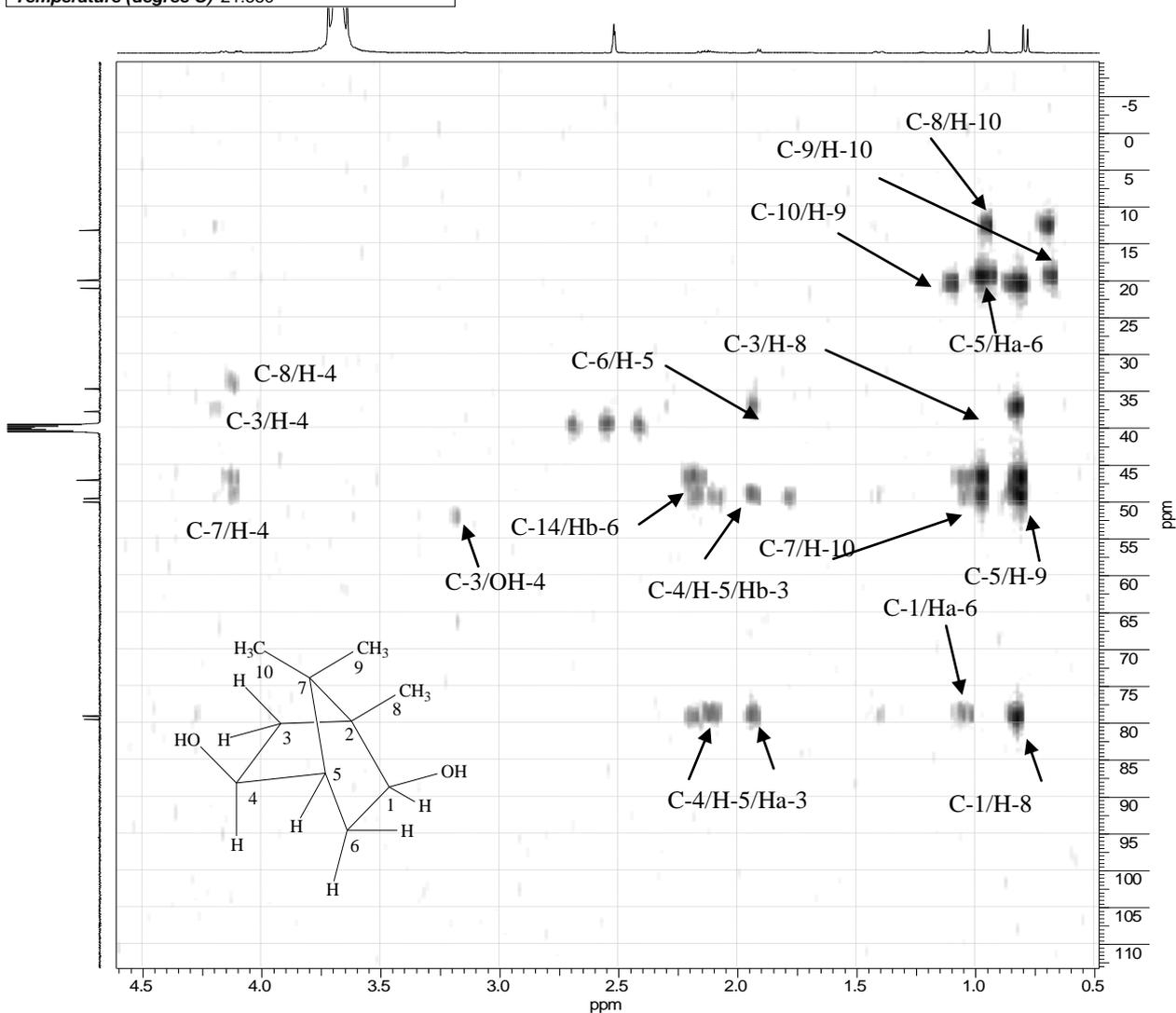
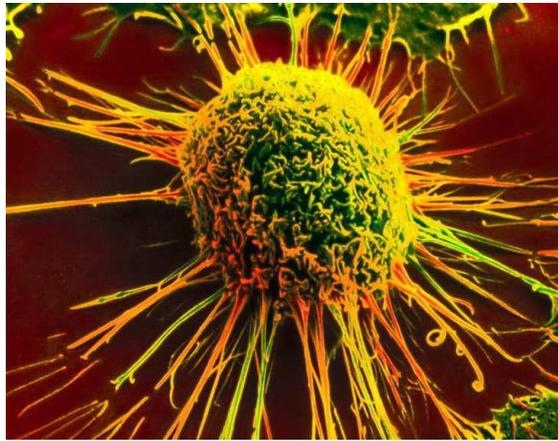


Figura 122: Espectro de HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) da substância **28**.

CAPÍTULO IV
ATIVIDADES BIOLÓGICAS



IV.1 Revisão de Literatura

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al*, 2002)

IV.1.1 Atividade antibacteriana

Um dos maiores problemas de Saúde Pública, enfrentados nas últimas décadas, foi agravamento da resistência antimicrobiana em cepas bacterianas, principalmente, de origem hospitalar. Atualmente, registra-se um aumento significativo na frequência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis aos fármacos de rotina usados na clínica, mas que se apresentam agora resistentes a quase todos os fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com várias bactérias multirresistentes (DUTRA *et. al.*, 2008).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL *et. al.*, 2002).

Óleos essenciais de plantas apresentam uma atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON *et al*, 1995 e CARSON & RILEY, 1995). Eles podem apresentar atividades

contra bactérias de gram-positivo quanto de gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos (PRASHAR *et al.*, 2003).

A família Asteraceae possui cerca de 300 espécies das quais 152 ocorrem no Brasil e apresenta diversos constituintes químicos que podem ser encontrados nas plantas como: poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, alcaloides, óleos essenciais, antocianinas, flavonoides e diterpenos. O gênero *Mikania* Willdenow e a espécie *Sphagneticola trilobata* (*Wedelia paludosa* ou *Acmela brasiliensis*) pertencem a esta família. Assim como as *Mikantias* produzem com frequência resinas, que apresentam altas concentrações de diterpenos, principalmente os derivados do esqueleto kaureno, pimarano e lábdano, também podemos afirmar a presença de kaurenos e ainda de flavonoide (luteolina) na espécie *Sphagneticola trilobata*. Muitas espécies de *Mikantias* têm demonstrado efeito antimicrobiano contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (SILVA, 2006, CARVALHO, & CARVALHO, 2000).

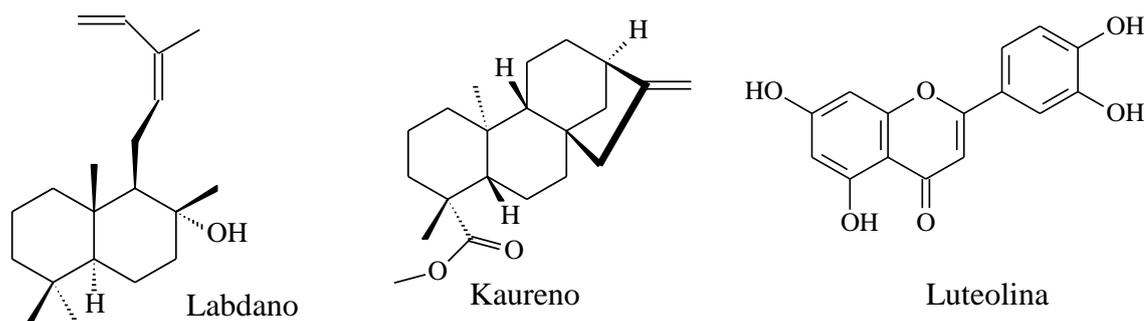


Figura 123: Compostos isolados do gênero *Mikania* Willdenow e a espécie *Sphagneticola trilobata*.

Ainda que as indústrias farmacêuticas venham produzir um número de novos antibióticos as últimas três décadas passadas houve um aumento a resistência de microrganismos para essas drogas (BERTININI *et al.*, 2005). As infecções bacterianas estão sendo disseminadas pelo mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos (EXTANISLAU *et al.*, 2001). Diante disto os estudos sobre atividade antimicrobiana de plantas representam um grande desafio para a descoberta e a identificação de novos fármacos.

IV.1.2 Atividade anticâncer

A vida depende de reações bioquímicas para a manutenção do crescimento e da divisão celular. Porém, em algumas células podem ocorrer alterações do controle do

crescimento, levando ao aparecimento de tumores. O câncer afeta, praticamente, todos os organismos multicelulares, sejam animais ou vegetais e, o estudo das alterações específicas da célula cancerosa em relação à normal pode contribuir para o melhor conhecimento sobre a doença. Assim nasceu a oncologia, que é o estudo de tumores ou neoplasias (COTRAN *et al*, 2000).

O câncer envolve a perda do controle de vários processos, sobretudo o descontrole da multiplicação das células. A rápida divisão celular ocorre normalmente nas células tronco que são responsáveis pela produção das células sanguíneas na medula óssea e que dão origem às células reprodutivas. A multiplicação das células ocorre através de pequenos números de divisões necessárias para repor as células mortas, porém, conservam a habilidade de se multiplicar rapidamente quando recebem um sinal químico de que células adicionais são necessárias para o organismo (ELLIOTT & ELLIOTT, 2001).

De maneira geral, as drogas anticâncer foram descobertas a partir da técnica de triagem em larga escala de produtos químicos sintéticos e naturais, contra tumores animais, inicialmente leucemias em camundongos. Os primeiros agentes quimioterápicos descobertos nas décadas entre 1950-1970 interagiam com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese de novo material genético ou causando danos irreparáveis no DNA. Mais recentemente, a descoberta de novas substâncias tem se estendido a produtos naturais como taxol (**1**) obtido de *Taxus brevifolia* (GOODMAN & GILMAN, 2003, WANI *et al*, 1971, PARC *et al*, 2002), os alcalóides da vinca, vincristina (**2**) e vimblastina (**3**) isolados de *Catharanthus roseus* (SIMÕES *et al*, 2003).

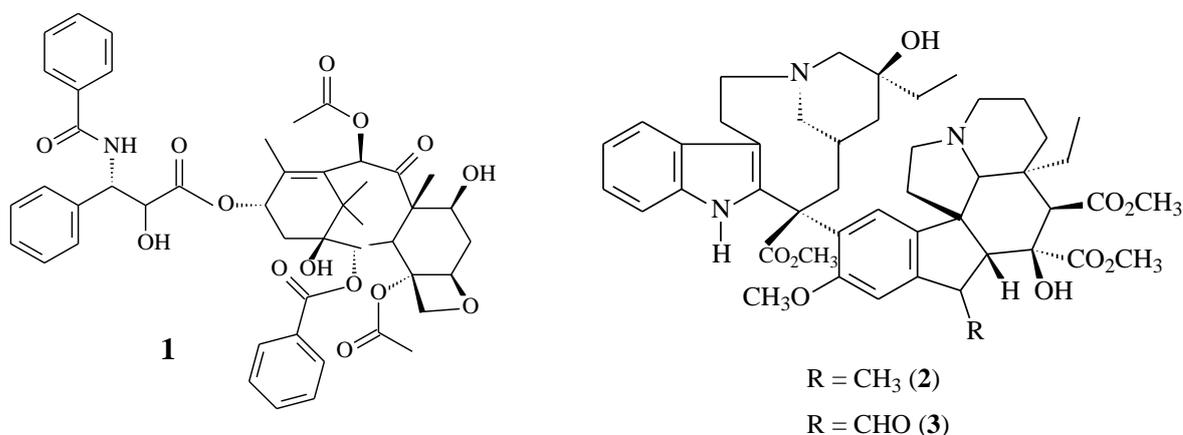


Figura 124: Taxol (**1**) obtido de *Taxus brevifolia* e alcalóides da vinca: vincristina (**2**) e vimblastina (**3**) isolados de *Catharanthus roseus* (SIMÕES *et al*, 2003).

Além dos diversos produtos sintéticos com reconhecida atividade anticâncer, os produtos naturais podem ser considerados a fonte mais abundante e acessível de substâncias com eficiência antitumoral. A maioria (60%) das drogas antineoplásicas identificadas e aprovadas na década de 90 possuem origem natural, como por exemplo, os alcalóides da vinca, isolados *Catharanthus roseus*, a etoposida isolada *Podophyllum peltatum* e o taxol de *Taxus brevifolia* (DE VITTA *et al*, 1993).

IV.1.3 Atividade contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*

A dengue é uma doença bastante antiga sendo reconhecida em textos médicos asiáticos da antiguidade (LUPI *et al.*, 2007). Atualmente, considera-se a dengue doença endêmica em mais de 100 países nas Américas, na África, no sudeste da Ásia, no leste do Mediterrâneo e no oeste do Pacífico (World Health Organization, 2010). A **Figura 125** mostra a distribuição da dengue no mundo.

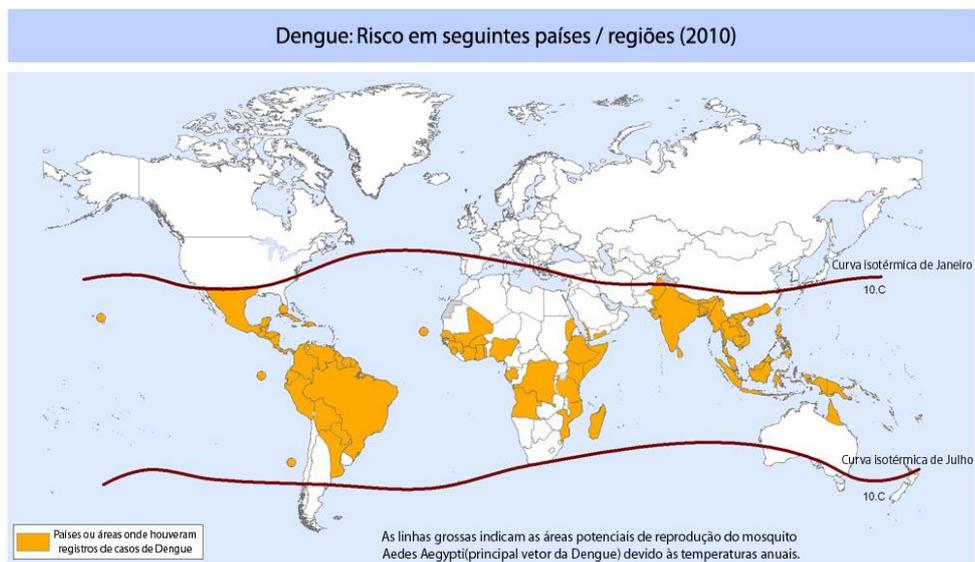


Figura 125: Mapa de distribuição da dengue no mundo (<http://consultaviajanteufp.blogspot.com.br>).

A dengue é causada por vírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*; esse gênero é composto por vírus de RNA transmitidos, na maioria das vezes, por um inseto, podendo causar doença em humanos (TSAI *et al.*, 2005). É transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* (**Figura 126**), cuja distribuição e adaptação em

ambientes urbanos e peridomiciliares explica a predominância da dengue em cidades. (World Health Organization, 2010).



Figura 126: Mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti* (<http://museudoamanha.org.br>)

A dengue clássica consiste em doença febril que apresenta início abrupto, mal-estar geral e dor muscular, dor nos membros, olhos e dorso, seu diagnóstico é dificultado, pois se assemelha a outras viroses, como a gripe. A doença tem duração de cinco a sete dias e pode ocorrer em todas as idades. Cefaleia, náuseas, vômitos e manifestações cutâneas são achados comuns. O período de incubação é em geral de cinco a sete dias. Manifestações hemorrágicas não são exclusivas da dengue hemorrágica, podendo ser observadas também na dengue clássica (HARN, 1989).

Em geral, o vírus é adquirido pelo mosquito quando este se alimenta do sangue de uma pessoa infectada (PESARO *et al.*, 2007). Dentro do intestino do vetor artrópode ocorre replicação do vírus que pode ser encontrado em grande quantidade nas glândulas salivares do mosquito. A fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, que é considerado o vetor principal nas Américas vive cerca 30 dias (TSAI *et al.*, 2005). O mosquito costuma depositar seus ovos em reservatórios artificiais que acumulam água, sendo a dengue, portanto, doença geralmente adquirida em zonas urbanas. Depois que o vírus é ingerido pelo vetor, pode replicar-se durante oito a 12 dias. Após ser infectado pelo vírus e decorrido o período de incubação viral, o mosquito é capaz de transmitir a infecção durante todo o resto de sua vida (PESARO *et al.*, 2007). Após infectar-se, um indivíduo pode ser fonte de vírus da dengue para os vetores durante seis dias. **A Figura 127** esquematiza o ciclo de transmissão da dengue.



Figura 127: Ciclo de transmissão da dengue(<http://cjjijoca.blogspot.com.br>).

Atualmente, a maneira eficaz de controlar ou prevenir a dengue é pelo combate ao vetor artrópode. O método mais importante para áreas infestadas com o mosquito *A. aegypti* é pela eliminação dos locais em que o mosquito deposita os ovos. O uso de inseticidas em reservatórios de água com acúmulo de larvas evita o crescimento do mosquito por muitas semanas, com repetições periódicas. Porém, o uso constante de inseticidas tem levado ao desenvolvimento de mosquitos resistentes (LUPI *et al.*, 2007).

IV.2 Metodologia

IV.2.1 Atividade antibacteriana

IV.2.1.1 Preparação da solução de PBS

Foram pesados 0,736 g de NaCl, 0,313g de KH_2PO_4 e 0,465 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ diluídos em 100 mL de água destilada obtendo-se um pH = 6.

IV.2.1.1.1 Preparação das amostras

Foram pesados 40 mg dos extratos metanólico e hidrometanólico da folha e caule de *Talinum triangulare* e de *Sphagneticola trilobata*, obtendo-se um total de 6 amostras, das quais foram numeradas com extrato:

- 1- hidrometanólico folha (*Talinum triangulare*),
- 2- metanólico folha (*Talinum triangulare*),
- 3- hidrometanólico caule (*Talinum triangulare*),
- 4- metanólico caule (*Talinum triangulare*),
- 5- metanólico (*Sphagneticola trilobata*)
- 6- hidrometanólico (*Sphagneticola trilobata*).

Todos os extratos foram diluídos em 2 mL PBS, obtendo-se uma solução estoque de concentração de 20,0 mg/mL. Partindo da solução estoque 20,0 mg/mL, contendo os extratos metanólico e hidrometanólicos, respectivamente, foram feitas cinco diluições 10,0, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625 mg/mL. Este método foi utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

IV.2.1.1.2 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas 7 cepas de cocos de Gram positivo, entre elas: *Staphylococcus aureus* 1, *S. aureus* 2, *S. aureus* 3, *S. aureus* 4, *S. aureus* 5, *S. intermedius* 1 e *S. intermedius* 2 . E ainda 4 espécies de enterobacterias das quais são: *Escherichia coli* ATCC (25218), *E. coli* ATCC (25922), *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 3, *E. coli* 4, *Klebsiella pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*. Utilizou-se também 4 espécies de *Pseudomona* entre elas podemos citar: *Pseudomona putida* (66), *P. fluorescens* cepas 1 e 2, *P. didentrificans* cepas 1 e 2, *P. aeruginosa* cepas 1, 2, 3, 4 e 5.

IV.2.1.1.3 Meios de cultura utilizados

Para o crescimento e manutenção das culturas bacterianas empregou-se o Caldo de Tripteina Soja (C.T.S) (BRODO-CASO) e para o meio de cultivo e na preparação das placas para os ensaios de difusão em Agar foi utilizado uma mistura de Caldo de Tripteina Soja (BRODO-CASO) e Agar (1,2 %), para posterior utilização de extratos das plantas com diferentes concentrações.

IV.2.1.1.4 Preparação dos inóculos de microrganismos utilizados nos ensaios

Os inóculos dos microrganismos foram preparados a uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), quando foram comparados ao tubo 0,5 da escala padrão de Mac Farland.

IV.2.1.1.5 Ensaio da atividade antibacteriana

O C.T.S + Agar (1,2 %) fundido foi colocado em uma placa de Petri estéril de 90 mm; após a solidificação fez-se o ensopo do microrganismo. Logo após foram feitos poços na placa para posterior aplicação dos extratos. Posteriormente, foram colocados 100 μ L das amostras (20mg/mL) em cada um dos poços. As placas foram incubadas em condições aeróbicas a uma temperatura de 37° C em um período de 18-24 horas. O diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano foram medidas e expressadas em mm.

IV.2.1.1.6 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

A concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos foi avaliada por diluição dos compostos em meio de ágar (TSA). As avaliações da possível atividade bactericida frente às bactérias de gram-positivo e gram-negativo foram em meio de TSB (solução tampão) e a medição do halo de inibição foi feita a partir do crescimento da cultura durante 24 horas após o teste. Os experimentos foram realizados em triplicata e utilizou-se como controle gentamicina, e os compostos analisados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO).

IV.2.2 Ensaio de atividade anticâncer

IV.2.2.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena (K562 resistente à vincristina) e JUKART obtidas do American Type Cell Collection (ATCC) e a linhagem de células de pulmão H460. As linhagens foram mantidas em meio contendo RPMI 1640 ou DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, em presença dos antibióticos: estreptomicina (10 mg/L) e penicilina (100 U). As culturas de células foram mantidas sob atmosfera de 5 % de CO₂ a 37°C. As substâncias a foram testadas e dissolvidas em DMSO dos quais foram diluídas em meio de cultura para uso.

IV.2.2.1.1 Ensaio de viabilidade celular – MTT

A inibição da viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, que é um ensaio colorimétrico baseado na reação de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil-tetrazólio) pelas desidrogenases das células viáveis a uma formazana.

O ensaio foi realizado em triplicata, através da incubação de 180 µL de uma suspensão de células (10^4 cels/poço) em placa de 96 poços, sendo incubada em estufa de CO₂ por 24 horas. Após este tempo, a cada poço foi adicionados 20 µML de RPMI (controle), os compostos foram testados em DMSO e novamente a placa foi incubada por mais 48 horas a 37 °C e sob atmosfera de 5% CO₂. Então, uma solução recém-preparada de MTT (5 mg/mL) foi adicionada em cada poço da microplaca e a incubação seguiu por mais 4 horas. Após centrifugação, os cristais da formazana serão dissolvidos em DMSO (150 µL/poço) e a leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas Elisa a 570 nm, e os valores de IC₅₀ serão calculados a partir destes dados utilizando o método estatístico adequado.

IV.2.3 Bioensaios com *Aedes aegypti*

Os bioensaios foram realizados utilizando soluções com extratos polares (MEOH e MeOH/H₂O; 8:2) do caule e folha de *Talinum triangulare* e extrato metanólico de *Sphagneticola trilobata*. As soluções padronizadas foram utilizadas para os testes com *Aedes aegypti*, sendo feita quatro repetições com larvas em estágio L₃ distribuídas em número de 10 por recipiente de 50 mL. Cada grupamento testado teve um ou dois grupos controle, um contendo o diluente usado nos extratos, e outro contendo apenas água pura. Os resultados foram avaliados periodicamente, obedecendo, os procedimentos da OMS. As leituras dos resultados sobre a mortalidade das larvas foram feitas a partir de 15 minutos e em contagens sucessivas de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 24 horas durante 7 dias. Para a análise da eficácia foi utilizada a seguinte fórmula: Número de larvas do grupo controle – Número de larvas do grupo tratado / Número de larvas do grupo controle.

IV.3 Resultados e Discussão

IV.3.1 Atividade antibacteriana

Os testes antibacterianos foram realizados com 6 extratos polares, sendo 4 de *Talinum triangulare*, e 2 de *Sphagneticola trilobata*, frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 1, 2, 3, 4 e 5, e ainda com a *S. intermedius* 1 e 2. Estas análises realizadas foram importantes porque apresentaram resultados significativos e promissores, no qual podem ser comparados

com resultados apresentados em outros artigos publicados (GISLENE *et. al*, 2000 e RAUHA, *et. al*, 2000).

O extrato 1 (hidrometanólico da folha de *Talinum triangulare*) foi submetido ao teste antibacteriano com as 7 cepas de cocos de Gram positivo, em uma concentração de 20 mg/ml, no qual apresentou um resultado significativo de 100% de inibição diante das cepas testadas, sendo possível medir os halos de inibição apresentados nas placas que continham *Staphylococcus aureus* 1, 2, 3, 4 e 5, e ainda com a *S. intermedius* 1 e 2, dos quais podemos citar respectivamente os halos: 12, 14, 11, 17 e 13 mm, e para *S. intermedius* 1 e 2 os valores 17 e 14 mm.

Posteriormente as 7 cepas foram testadas com extrato 1 em diversas concentrações de 20,0, 10,0, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625 mg/mL, sendo o resultado expressivo somente na placa que continha a cepa 4 (*S. aureus* 4), que apresentou um halo de inibição de 14 mm com uma concentração mínima inibitória (CIM) de 10 mg/mL.

A **Figura 128** mostra a atividade antibacteriana do extrato 1 (hidrometanólico da folha de *Talinum triangulare*) frente a *S. aureus* 4 com um halo de inibição de 17 e 14 mm nas concentrações de 20 e 10 mg/mL.



Figura 128: Extrato 1 de *Talinum triangulare* frente a *Staphylococcus aureus* 4 para as concentrações de 20 e 10 mg/mL.

O extrato 6 (hidrometanólico de *Sphagneticola trilobata*) foi o mais expressivo diante das análises realizadas, pois em uma concentração de 20 mg/ml apresentou um 100% de inibição diante das cepas testadas, sendo os halos de inibição apresentados nas placas com *S. aureus* 1, 2, 3, 4 e 5, os valores para de 14, 14, 17, 21, 16 mm, e ainda com a *S. intermedius* 1 e 2, os valores de 18 e 16 mm. A **Figura 129** apresenta a atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico de *Sphagneticola trilobata* frente a *S. aureus* 4 (D).



Figura 129: Atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico de *Sphagneticola trilobata* frente a *Staphylococcus aureus* 4 (D) para uma concentração de 20 mg/mL.

Foram feitas análises com o extrato 6 nas concentrações de 20,0, 10,0, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625 mg/mL, sendo obtido resultados nas placas que continham as cepas *S. aureus* 4 e 5. A *S. aureus* 4, que apresentou um halo de inibição de 21,16 e 14 mm para uma CIM de 20, 10 e 5 mg/mL, respectivamente. Já a cepa de *S. aureus* 5 apresentou um halo de 16 e 15 mm frente a uma concentração de 20 e 10 mg/mL. A **Figura 130** apresenta uma mínima concentração inibitória para as diversas concentrações frente a *S. aureus* 4.

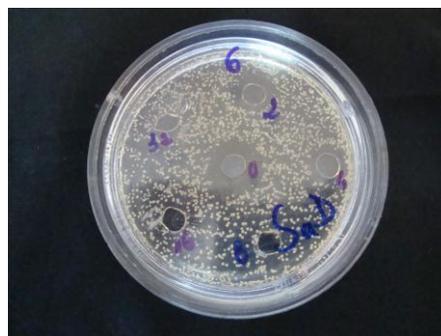


Figura 130: Atividade antibacteriana do extrato 6 sobre *S. aureus* 4 nas concentrações de 20, 10 e 5 mg/mL.

O extrato 5 (metanólico de *Sphagneticola trilobata*) apresentou, para uma concentração de 20 mg/mL, uma atividade de 86 % frente as cepas analisadas, podendo-se medir os halos de inibição nas placas com *S. aureus* 1, 3, 4 e 5, nos os valores de 16, 14, 16, 16 mm, e ainda com a *S. intermedius* 1 e 2, os valores de 16 e 14 mm. A **Figura 131** apresenta atividade antibacteriana frente a *S. aureus* 5.

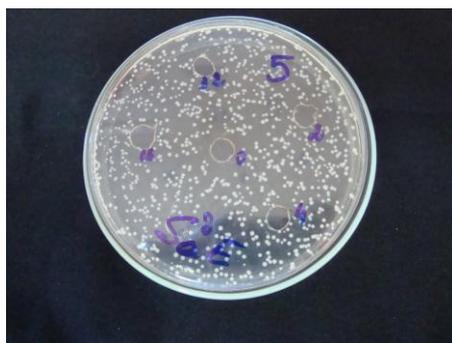


Figura 131: Atividade antibacteriana do extrato 5 sobre *S. aureus* 5 na concentração de 20 mg/mL.

O extrato 4 (metanólico do caule de *Talinum triangulare*) apresentou, para uma concentração de 20 mg/mL, uma atividade de 43 % frente as cepas analisadas, podendo-se medir os halos de inibição nas placas com *S. aureus* 4 e 5, nos os valores de 12 e 14 mm, e *S. intermedius* 1 o valor de 16 mm.

Os extratos 2 (metanólico da folha de *Talinum triangulare*) e 4 (hidrometanólico do caule de *Talinum triangulare*) apresentaram uma atividade inibitória de 28 % para uma concentração de 20 mg/mL. O extrato 2 mostrou-se sensível quando foram utilizadas as cepas com *S. aureus* 2 e 3 onde mediu-se o halo de inibição 13 e 14 mm, respectivamente. O extrato 3 quando submetido ao teste com as cepas *S. aureus* 1 e 3, observou-se a presença dos halos de 13 e 12 mm.

Foram realizados também com os 6 extratos polares, análises bacteriana com 4 espécies de enterobacterias , *Escherichia coli* ATCC (25218), *E. coli* ATCC (25922), *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 3, *E. coli* 4, *Klebsiella pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e ainda com 4 espécies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas putida* (66), *P. fluorescens* cepas 1 e 2, *P. didentificans* cepas 1 e 2, *P. aeruginosa* cepas 1, 2, 3, 4 e 5, não obtendo resultados, provavelmente porque os extratos utilizados continham uma concentração de somente 20 mg/mL.

A **Tabela 20** e **21** apresentam os resultados significativos obtidos nos testes realizados com bactérias e os extratos polares de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata*

Tabela 20. Atividade antimicrobiana dos extratos polares de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata* testadas em microrganismos de cocos de Gram positivo.

Microorganismos	Cepas Provadas	Extratos polares					
		1*	2*	3*	4*	5**	6**
Cocos Gram positivo							
<i>S. aureus</i>	1	+	-	+	-	+	+
	2	+	+	-	-	-	+
	3	+	+	+	-	+	+
	4	+	-	-	+	+	+
	5	+	-	-	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	1	+	-	-	+	+	+
	2	+	-	-	-	+	+

* 1 – 4: extratos polares de *Talinum triangulare*

** 5 e 6: extratos polares de *Sphagneticola trilobata*

Tabela 21. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos polares de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata* sobre as espécies suscetíveis ao gênero *Staphylococcus*.

Extratos	CIM em mg/mL	Diâmetro de inibição do crescimento bacteriano (mm)						
		<i>S. aureus</i>					<i>S. intermedius</i>	
		1	2	3	4	5	1	2
1	20,0	12	14	11	17	13	17	14
	10,0	-	-	-	14	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
	2,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,625	-	-	-	-	-	-	-
5	20,0	16	-	14	16	16	16	14
	10,0	-	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-	-
	2,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,625	-	-	-	-	-	-	-
6	20,0	14	14	17	21	16	18	16
	10,0	-	-	-	16	15	-	-
	5,0	-	-	-	14	-	-	-
	2,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,625	-	-	-	-	-	-	-
(Controle) Gentamicina	20,0	21	23	22	26	25	21	22
	10,0	20	23	20	25	21	18	20
	5,0	16	11	12	22	18	14	16
	2,5	-	-	-	18	14	-	-
	1,25	-	-	-	14	-	-	-

IV.3.2 Atividade contra o câncer

O teste realizado com as formas de linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena (K562 resistente à vincristina), H460 e JUKART utilizando o extrato hidrometanólico das folhas de *Talinum triangulare* apresentaram resultados significativos que foram observados no gráfico de inibição da viabilidade celular (Figura 135), no qual os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da viabilidade celular, observando uma inibição de 60% para a maior concentração utilizada (1 mg/mL) nas células de HL 60, com $IC_{50} = 0,43$ mg/mL. Contra as outras linhagens celulares o extrato inibiu de 30% à 40% da viabilidade na maior dose. Para as demais concentrações utilizadas (0,125, 0,25 e 0,5 mg/mL) a melhor inibição continuou sendo para HL 60 (30 à 50%) para as outras células de 5% a 20%. Outro resultado interessante foi à inibição de 40% da viabilidade celular de linhagem H460, um tipo de tumor de pulmão altamente agressivo e com pouca resposta a quimioterápicos. Em comparação ao controle positivo as concentrações ativas do extrato estão na casa de 20 vezes a mais, mas para um extrato vegetal estas concentrações são satisfatórias para os resultados obtidos.

O gráfico (**Figura 132**) abaixo apresenta os testes realizados com as formas de linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena e JUKART utilizando o extrato hidrometanólico das folhas de *Talinum triangulare*.

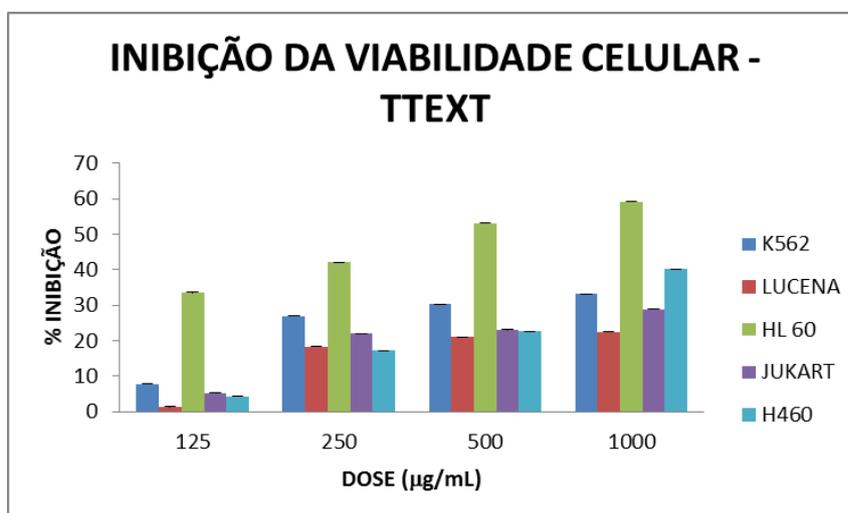


Figura 132: Gráfico de % de inibição da viabilidade celular das formas de linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena e JUKART frente o extrato hidrometanólico da folha de *Talinum triangulare*.

Todas as análises foram feitas em comparação com o padrão celular-cisplatina (**Figura 133**) que tem um potencial de inibição de 50 µg/mL de quase 98% para a célula HL 60 e para as outras células uma inibição variando de 75 – 90%.

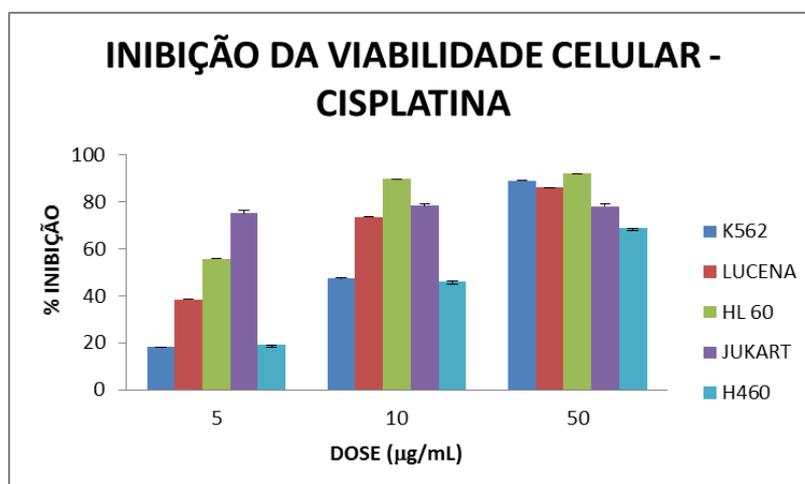


Figura 133: Gráfico de % de inibição da viabilidade celular das formas de linhagens leucêmicas HL-60, K562, Lucena e JUKART utilizando o padrão celular cisplatina (µg/mL).

Diante da observação comparativa com da Inibição da viabilidade celular do extrato de *Talinum triangulare* com o padrão celular-cisplatina é possível afirmar que posteriormente pode ser feito um estudo mais elaborado com este extrato e com possíveis estruturas isolados. Pois apesar de ter sido um teste preliminar foi possível afirmar que o extrato tem um grande potencial inibitório frente às linhagens leucêmicas testadas, principalmente nas células HL 60 e H460.

IV.3.3 Atividade contra as larvas *Aedes aegypti*

Os testes contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* realizados com os extratos polares do caule e folha de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata* foram repetidos três vezes na concentração máxima, e em todas as análises que foram testadas os extratos polares das duas espécies não foram observados resultados significativos.

5 CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo fitoquímico da espécie *Talinum triangulare* que gerou informações importantes quanto à classe de constituintes químicos presentes, sendo possível observar que a esta espécie é bioprodutora de pigmentos da classe dos carotenoides, porfirinas, esteróides, amidas, aminoácidos e acrilamida.

O estudo químico das folhas de *Talinum triangulare* permitiu identificar e isolar quinze constituintes químicos que dentre eles podemos citar: dois carotenoides, dois esteroides glicosilados, uma amida e dez feofitinas, do qual se destacam quatro novas feofitinas que estão sendo descritas pela primeira vez na literatura, 15¹-metilperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (7), 15¹-hidroxi-15¹-acetil-13¹-carboxi-feofitina b (Taliclorina A) (9), 15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (10), 15¹-hiperoxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (11) e 15¹-acetil-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a 12.

No extrato Acetato de etila das folhas de *Talinum triangulare* observou-se algumas frações ricas em porfirinas e que através de dados espectroscópicos comparativos com os da literatura possibilitou propor a identificação de porfirinas já isoladas anteriormente e outras ainda não isoladas e identificadas na literatura.

O estudo químico do caule de *Talinum triangulare* permitiu identificar e isolar dez constituintes químicos podendo destacar quatro esteroides, dois esteroides glicosilados, três amidas e uma acrilamida ácido 3-N-acriloil-N-pentadecanoil-propanóico (20) nunca descrita anteriormente na literatura.

O estudo da estereoquímica de algumas porfirinas isoladas no extrato diclorometano de da espécie *Talinum triangulare* permitiu definir a configuração absoluta de algumas porfirinas em: 17R, 18R-18-purpurinato de fitila, 13²R,17R,18R-13²-hidroxifeofitina a (5), 17R,18R-15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (6), 17R,18R-15¹-metilperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina a (7), 17R,18R-5¹-carboxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (8), 17R,18R-15¹-hidroxi-15¹-acetil-13¹-carboxi-feofitina b (9), 17R,18R-15¹-hidroxi-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (10), 17R,18R-15¹-hidroperóxido-15¹-carbometoxi-15¹-O-13¹-lactona-feofitina b (11).

Não é o primeiro estudo fitoquímico de *Sphagneticola trilobata*, mas gerou novas informações permitindo identificar e isolar sete constituintes químicos: dois carotenóides, dois esteroides glicosilados, um monoterpeno e um triterpeno, todos já descritos anteriormente na literatura, porem nesta espécie foi à primeira vez o relato dos carotenoides

β -caroteno (**23**) e luteína (**24**), do terpeno fridelinol (**25**), e do monoterpene 8,9,10-trimetil-1,4-diol-biciclo[2,2,1]-heptano (**28**) e um triterpeno conhecido como fridelinol.

A avaliação de testes farmacológicos dos extratos polares de *Talinum triangulare* e *Sphagneticola trilobata* mostrou resultados promissores para utilização destas plantas como fonte de fármacos que possam ser usadas na terapêutica como no combate ao câncer e antibiótico.

6 PERPECTIVAS

O estudo fitoquímico da espécie *Talinum triangulare* merece atenção especial, pois a continuidade deste permitirá a obtenção de dados que possa resultar na identificação e isolamento de outras classes de metabolitos especiais, dos quais poderão ser utilizados como marcadores químicos desta espécie, e que ainda possa contribuir com informações importantes na identificação e isolamentos de substancias que nunca foram descritas na literatura anteriormente.

Definir a estereoquímica absoluta das feofitinas que já foram isoladas e de outras feofitinas e metabolitos especiais que poderão ser isolados na continuidade do estudo químico da espécie *Talinum triangulare*.

As espécies de *Sphagneticola trilobata* e *Talinum triangulare* merecem estudos biológicos mais aprofundados com extratos apolares, pois foram realizadas atividades inibitória frente tripanosomatídeos e *Leishmania (L.) amazonensis* com extratos apolares (hexano, dicloro e acetato de etila), dos quais os valores apresentados foram significativos, porem o estudo não foi concluído. Outros testes complementares poderão ser feitos com a espécie *Talinum triangulare* frente às cepas bacterianas de gram positivo e negativo, e células tumorais com os extratos polares e/ou metabolitos especais isolados.

Poderão ainda ser feitos sínteses com os constituintes químicos isolados das espécies *Sphagneticola trilobata* e *Talinum triangulare* como proposta de potencializar atividade biológica que possam levar a resultados que tenham ação farmacológica eficaz.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENNIYI, A. A. Determination of cadmium, cooper, iron, lead, manganese, and zinc in water leaf (*Talinum triangulare*) in dumpsites. *Niger*, 22 (2), 259-262, **1996**.

ADEFOLAJU, G. A., AJAO, M. S., OLATUNJI, L. A., ENAIBE, B. U., MUSA M. G. Hepatoprotective Effect of Aqueous Extract of Water Leaf (*Talinum Triangulare*) on Carbon tetrachloride (CCl₄) Induced Liver Damage in Wistar Rats. *The Internet Journal of Pathology*, 8 (1), 1528-8307, **2009**.

ALBUQUERQUE, M. A., GOULART, C. M., AMORIM, A. P. O., OLIVEIRA, M. C. C., ECHEVARRIA, A. Novas Formulações de Tiossemicarbazonas e Extrato Vegetal de *Talinum triangulare* com Potencial Atividade Anticorrosão. *Revista Virtual de Química*, 5 (4), 734-745, **2013**.

AMORIM, A. P. O. Estudo fitoquímico do caule de *Talinum triangulare* (Portulacaceae) e propriedades antioxidantes, quelante, e de inibição da enzima tirosinase. *Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, Dissertação*, **2007**.

AMORIM, A. P. O., AMORIM, T. A. OLIVEIRA, M. C. C., ECHEVARRIA A. Antioxidant, Iron Chelating and Tyrosinase Inhibitory Activities of Extracts from *Talinum triangulare* Leach Stem. *Antioxidants*, 2, 90-99, **2013**.

AMORIM, A. P. O., CARVALHO-JR, A. R., CASTRO, R. N., LOPES, N. P., OLIVEIRA, M. C. C., CARVALHO, M. G. Chemical compounds isolated from *Talinum triangulare* (Portulacaceae). *Food Chemistry*, 160, 204–208, **2014**.

ANDARWULAN, N., BATARI, R., SANDRASARI, D. A., BOLLING, B. & WIJAYA, H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 121, 1231-1235, **2010**.

ANNIE, S., PRABHU, R. G., MALINI, S. Activity of *Wedelia calendulaceae* Less. in post-menopausal osteoporosis. *Phytomedicine* 13, 23-48, **2006**.

ARANHA, C.; LEITÃO, H. F. F. E YAHN, C. A. Sistemática de Plantas Invasoras. *Instituto Campineiro de Ensino Agrícola*, 1ª Ed., **1988**.

ARAÚJO, M. F., VIEIRA I. J. C., BRAZ-FILHO, R., CARVALHO, M. G. Simiranes A and B: erythroxylenes diterpenes and other compounds from *Simira eliezeriana* (Rubiaceae). *Natural Product Research*, [25\(18\)](#), 1-7, **2011**.

BREEMEN, R. B. V. Fast atom bombardment tandem Mass Spectrometry of Carotenoids. *Journal Agriculture Food Chemical*, 43, 384-389, **1995**.

BARDÓN, A., BORKOSKY, S., YBARRA, M. I., MONTANARO, S. CARTAGENA, E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. *Fitoterapia* 78, 227-231, **2007**.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiosperma do Brasil 2, Ed. UFV-MG, **1986**.

BLOCK, L. C., SANTOS, A. R. S., SOUZA, M. M., SCHEIDT, C., YUNES, R. A., SANTOS, M. A., MONACHE, F. D., CECHINEL, V. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 85-89, **1998**.

BERTININI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. L. L., MENEZES, E. A., MORAIS, S. M., CUNHA, F. A. e CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Informa*, 17(3/4), 80-83, **2005**.

BREITMAIER, E. & VOLTER, W. ¹³C NMR Spectroscopy - Methods and Applications in Organic Chemistry. 2nd Ed., New York, 124, **1978**.

BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R.L., Biochemistry and molecular biology of plants. *Rockville American Society of Plant Physiologists*, 1367, **2000**.

CARVALHO, L. B. Plantas daninhas. 1^a Ed. Lages, Santa Catarina, **2013**.

CARVALHO, G. J. A. & CARVALHO, M. G. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. *Química Nova* 24 (1), 24-26, **2001**.

CARVALHO, G. J. A., VELANDIA, J. R., OLIVEIRA, L. F. E BEZERRA F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae). *Química Nova*, 21 (6), 740-743, **1998**.

CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D. e RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil from *Melaleuca alternifolia*. *Journal Antimicrobiology Chemother*, 35, 421-424, **1995**.

CARSON, C. F. & RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal Bacteriology*, 78, 264-269, **1995**.

COELHO, A. A. O. P. & GIULIETTI, A. M. O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, 24(3), 655-670, **2010**.

CORREA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional. Ministério da Agricultura-Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal V, **1984**.

COTRAN, R.S.; KUMAR V.; COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª edição, Editora Guanabara Koogan, **2000**.

CRABBÉ, P. Actividad optic, dispersion rotatoria optica y dicroismo circular en química orgânica. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México y Unirvisité Scientifique et Médicale Grenoble, *France*, 41-45, **1974**.

DANIEL, J. F. DE S. Metabólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (*Ochnacea*), *Dipladenia martiana* (*Apocynacea*) e de *Caesalpinia peltophoroides* (*Leguminosae*). Tese de Doutorado, *UFRRJ*, 293-294, **2004**.

DE VITTA, V.T.J.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology* J.B. Lippincott Company, 4th edition, v.1, *Philadelphia*, **1993**.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2nd Edition, v.1 School of Pharmaceutical Sciences, University of Nottingham, *UK*, 34-51, **2002**.

DIAS, L. C., DESSOY, M. A. SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA G., ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, 32(9), 2444-2457, **2009**.

DROGAT, N., BARRIÈRE, M., GRANET, R., VINCET, S. & KRAUSZ, P. High yield preparation of purpurin-18 from *Spirulina maxima*. *Dyes and pigments*, 88, 125-127, **2011**.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D. e BARBOSA, N. R. Atividade antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterdon emarginatus* Vogel. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (2), 429-435, **2008**.

ECKARDT, C. B., KEELY, B. J., MAXWELL, J. R. Identification of chlorophyll transformation products in a lake sediment by combined liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 55 (7), 271-288, **1991**.

ELLIOTT, W. H. & ELLIOTT, D. C. *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, 2nd edition, **2001**.

EXTANISLAU, A. A., BARROS, F. A. S., PEÑA, A. P., FERRI, P. H. e PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11 (2), 95-100, **2001**.

FASMAN, G. D. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. *Journal American Chemical Society*, 118 (50), 12871-12871, **1996**.

FERREIRA, D. T., LEOVORATO, A. R., FARIA, T. J., CARVALHO, M. G., BRAZ, R. Eudesmanolide lactones from *Wedelia paludosa*. *Natural Products Letters* 4 (1) 1-7, **1994**.

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

FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 51, 4504-4526, **2003**.

GANDUL-ROJAS, B. B., GALLARDO-GUERRERO, L., MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. Identification of oxidized chlorophylls and metallochlorophyllic complexes of copper in table olives (cv. Gordal) with green staining alteration. *Journal of Food Protection*, 62(10), 1172-1177, **1999**.

GOODMAN, L. S., GILMAN, A., HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G., LIMBIRD, L. E. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10^a edição , McGraw-Hill, New York, **2003**.

GREENFIELD, N. J. & FASMAN, G. D. Optical activity of simple cyclic amides in solution. *Biopolymers*, [7\(4\)](#), 595–610, **2004**.

HARN M. R. Clinical study on dengue fever during 1987-1988 epidemics at Kaohsiung City, Southern Taiwan. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*, 5, 65, **1989**.

HECHT, E. Optics. 3rd. Ed., Addison-Wesley Longman, Massachusetts, **1998**.

<http://www.naturalnet.com.br/generos/Talinum.html> acessado em 12/10/2009

<http://www.saude.gov.br> acessado em 23/11/2009.

<http://members.tripod.co.uk> acessado em 23/11/2009.

<http://www.ceunossasenhoradaconceicao.com.br/plantas/planta> acessado em 19/01/2009

<http://www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/poltula.html> acessado em 19/01/2009.

<http://www.database.prota.org> acessado em 19/01/2009.

<http://www.plantamed.com.br/gen/Talinum.htm> acessado em 22/01/2009.

<http://www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm> acessado em 20/02/2009.

<http://www.prota.org> acessado em 03/03/2009.

http://ibws.nexenservices.com/talinum_triangulare.html acessado em 19/01/2009.

<http://forum.funghiitaliani.it/indes> acessado em 20/02/2009.

<http://members.tripod.co.uk> acessado em 25/07/2010.

<http://www.pt.wikipedia.org/wiki/espinafre> acessado em 11/10/2010.

<http://www.biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/2/> acessado em 11/07/2010..

<http://www.floresecesta.com.br> acessado em 20/02/2010

<http://www.pt.wikipedia.org> acessado em 21/02/2010.

<http://www.comfsm.fm/~dleeling/invasive/wedelia.html> acessado em 21/02/2010.

<http://www.floresecesta.com.br> acessado em 21/02/2010.

<http://www.ioc.fiocruz.br/gpesb/aulas.../Aula5> acessado em 21/03/2014.

<http://www.efisica.if.usp.br> acessado em 21/03/2014.

<http://www.recurstostic.educacion.es> acessado em 21/03/2014.

<http://biocyc.org> acessado em 07/07/2014.

<http://museudoamanha.org.br> acessado em 16/10/2014.

<http://cjjjoca.blogspot.com.br> acessado em 16/10/2014.

<http://consultaviajanteufp.blogspot.com.br> acessado em 16/10/2014.

INBARAJ, B. S. HUNG, C. L., WU, W. B., LIN, C. L., CHEN, B. H. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum Linnaeus* by HPLC-DAD-APCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 812-818, **2008**.

JAIN, P. S. & BARI, S. B. Isolation of lupeol, stigmasterol and campesterol from petroleum ether extract of woody of *Wrightia tinctoria*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9 (3), 163-167, **2010**.

JERZ, G., ARREY, T. N., WRAY, V., DU, Q., WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 413-418, **2007**.

LIANG, D., ZHOU, Q., WANG, W. Y., NIE, Z., HE, H., LI, J. T., WU, J., WU, C., ZHANG, J. Studies on the antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Talinum triangulare*. *Journal of Ethnopharmacology*, 136, 316-321, **2011**.

LIN, H., CHIU, H., LAN, Y., TZENG, C., LEE, T., LEE, C., SHAO, Y., CHEN, C., KUO, Y. Ficuschlorins A-D, Lactone Chlorins from the leaves of *Ficus microcarpa*. *Chemistry & biodiversity*, 8, 1701-1707, **2011**.

LUPI, O., CARNEIRO, C. G. e COELHO, I. C. B. Manifestações mucocutâneas da dengue. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82, 291, **2007**.

KOJIMA, H., SATO, N., HATANO, A., OGURA, H. Constituents of the *Labiatae* plants. 5. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29 (7), 2351-2355, **1990**.

KOHDA, H., YAMOAKA, Y., MORINAGA, S., ISHAK, M., DARISE, M. Saponins from *Talinum triangulare*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40 (9), 2557-2558, **1992**.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR., V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25(3), 429-438, **2002**.

MAHMOUD, A. A. & AHMED, A. A. α -Pinene-type monoterpenes and others constituents from *Artemisia suksdorfii*. *Phytochemistry* 67, 2103-2109, **2006**.

MANDER, L. N., OWEN, D. J., CROKER, S. J., GASKIN, P., HEDDEN, P., LEWIS, M. J., TALON, M., GAGE, D. A., ZEEVAART, J. A. D., BRENNER, M. L., SNENG, C. Identification of three C₂₀- Gibberellins: GA₉₇(2 β -hydroxy-GA₅₃), GA₉₈(2 β -hydroxyGA₄₄) and GA₉₉(2 β -hydroxyGA₁₉). *Phytochemistry*, 43, 23-28, **1996**.

MATOS, F. J. & ABREU. Introdução à Fitoquímica Experimental, 2^a Ed., Fortaleza: Edições UFC, **1997**.

MATSUO, A. & ONO, K., NOZARI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Phytochemistry* 47 (2), 427-430, **1996**.

MILES, D. H., CHITTAWONG, V., PAYNE, A. M. Cotton boll weevil antioxidant activity and antifungal activity (*Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*) of extracts of the stems of *Wedelia biflora*. *Journal Agriculture Food Chemical* 38, 1591-1594, **1990**.

PRASHAR, A.; HIU, P.; VENESS, R.G.; EVANS, C.S.; Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 63, 567-575, **2003**.

OCAMPO, R. & REPETA, D. J. Structural determination of purpurin-18 (as methyl ester) from sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry*, 30, 189-193, **1999**.

OLIVEIRA-JR, R. S., CONSTANATIN, J. e INOUE, M. H. Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, Editora Omnipax, Curitiba, PR, 1-11, 2011.

PARC, G., CANAGUIER, A., LANDRÉ, P., HOCQUEMELLER, R., CHRIQUI, D., MEYER, M. Production of Taxoids with Biological Activity by Plants and Callus Culture from *Taxus* genotypes. *Phytochemistry* 59:725-730, **2002**.

PETENON, D. & PIVELLO, V. R. Plantas invasoras: representatividade da pesquisados países tropicais no contexto mundial. *Artigos Técnico-Científicos, Natureza & Conservação*, 6 (1), 65-77, **2008**.

PESARO, A.E., AMICO, E.D. e ARANHA, L.F.C. Dengue: manifestações cardíacas e implicações na terapêutica antitrombótica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 89, 12, **2007**.

POJE, M. & SOKOLIC-MARAVIC, L. The mechanism for the conversion of uric acid into allantoin and dehydro-allantoin. *Tetrahedron*, 42,141-151, **1981**.

POUCHET, C.I & BEHNKE, J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FTNMR Spectra* 1, 881, **1993**.

RAVINDRAN BABU, P., RAMA RAO, D., PRASADA RAO, M., KRISHNA KANTH, J. V., SRINIVASULU, M. & HEREEESH, V. Hypoglycaemic activity of methanolic extract of *Talinum triangulare* leaves in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(05), 197-201, **2012**.

RAMAOS, M. P. O. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Talinum patens* e avaliação das atividades antinoceptiva e antiinflamatória dos extratos hexânico e acetato-etílico das folhas. *Instituto de Ciências Exatas, UFMG*, Dissertação, **2003**.

RODRIGUES, M. I. A. & FURLAN, A., Livro de resumos do 54º Congresso Nacional de Botânica 3ª Reunião Amazônica de Botânica Local do Evento: Universidade da Amazônia - UNAMA , R0165-1, **2003**.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & KIMURA, M. Harvest Plus Handbook for Carotenoid Analysis, **2004**.

ROQUE, N. F. GIANNELLA, T. L., GIESBRECHT, A. M., BARBOSA, R. C. C. B. C. Kaurene diterpenes from *Wedlia paludosa*. *Revista Latinoamericana Quimica*18 (3-4), 110-111, **1987**.

SCHWIKKARD, S., MULHOLLAND, D. A., HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fischeri*. *Phytochemistry* 49 (8), 2391-2394, **1998**.

SEO, Y., SHIN, J., LEE, B., LEE, D. S. Two Biophenolic Glycosides from *Portulaca oleracea*. *Journal of the Korean Chemical Society*, 47 (1), 43-46, **2003**.

SILVA, D. A, SILVA, T. M. S., LINS, A. C. S., COSTA, D. A., CAVALCANTE, J. M. S., MATIAS, W. N., Maria, F. V. e BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR (MALVACEAE). *Química Nova*, 29 (6), 1250-1254, **2006**.

SILVA, T. M. & CÂMARA, C. A. Feoforbídeo (etoxi-purpurina-18) isolado de *Gossypium mustelinum* (Malvaceae). *Química Nova* 3 (3), 571-573, **2010**.

SILVA, V. C. Metabólitos especiais das raízes de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr., *Andira fraxinifolia* Benth. (Leguminosae) e das folhas de *Palicourea coriácea* (Cham.) K. Schum. (Rubiaceae). *Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ*, Tese , **2006**.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento* Ed.UFSC, 5ª edição, Santa Catarina, **2003**.

SIUZDAK, G. *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2nd. Ed. MCC Press, San Diego, 236-243, **2006**.

STRAND, A., KVERNBERG, K., KARLSEN, H. M., LIAAEN-JENSEN, S. Geometrical E/Z isomers of (6R)- and (6S)- neoxanthin and biological implications. *Biochemical Systematics and Ecological* 28, 443-455, **2000**.

SWARNA, J. & RAVINDHRAN, R. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 249-256, **2013**.

TANAKA, A. & TANAKA, R. Chlorophyll metabolism. *Plant Biology*, 9, 248-255, **2006**.

TANAKA, R. & TANAKA, A. Annual Review: Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Plant Biology*, 58, 321-345, **2007**.

TOMAZ, A. C. A., NOGUEIRA, R. B. S. S., PINTO, D. S., AGRA, M. F., SOUZA, M. F. V. S., LEITÃO DA-CUNHA, E. V. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Chm. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(1), 47-52, **2007**.

TSAI, T. F., VAUGHN, D.W. e SOLOMON, T. *Flaviviruses, principles and practice of infectious diseases*. 6ª edição. Philadelphia, Elsevier, **2005**.

VIEIRA, H. S., TAKAHASHI, J. A., BAOAVENTURA, M. A. D. Constituents from aerial parts of *Wedelia paludosa*. *Fitoterapia* 72, 854-856, **2001**.

WANI, M.C.; TAYLOR, M.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; McPHAIL, A.T. Plant Antitumor Agents VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93:2325-2327, **1971**.

WETTSTEIN, D. V., GOUGH S., KANNANGARA, C. G. Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1039-1057. **1995**.

World Health Organization - <http://www.who.int> – acessado em 19/05/2012

WOODY, [R. W & SREERAMA](#), N. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 252–260, **2000**.

YEPEZ, C. C. B., LIMA, G. P. P., CORRÊA, L. C., TEJADA, E. S. Carotenóides totais em *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. cultivadas in vitro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 10 (2), 89-93, **2008**.

YUE, Y., ZHANG, Y., QIN, J., CHEN, X. Study of the interaction between esculetin and human serum albumin by multi-spectroscopic method and molecular modeling. *Journal of Molecular Structure*, 888, 25–32, **2008**.

ZYZAK, D. V., SANDERS, R. A., STOJANOVIC, M., TALLMADGE, D. H., EBERHART, B. L., EWALD, D., GRUBER, D. C., MORSCH, T. R., STROTHERS, M. A., RIZZI, G.P., VILLAGRAN, M. D. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 51, 4782-4787, **2003**.

ZILLER, S. R. Plantas exóticas invasoras: a ameaça de contaminação biológica. *Revista Ciência Hoje*, 30 (178), 77-79, **2000**.

8 ARTIGO PUBLICADO

Food Chemistry 160 (2014) 204–208



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Chemical compounds isolated from *Talinum triangulare* (Portulacaceae)



Ana Paula de Oliveira Amorim^{a,*}, Almir Ribeiro de Carvalho Jr.^a, Norberto Peporine Lopes^b,
Rosane Nora Castro^a, Marcia Cristina Campos de Oliveira^{a,*}, Mário Geraldo de Carvalho^{a,*}

^a Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 KM 07, 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

^b Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2013

Received in revised form 10 January 2014

Accepted 29 January 2014

Available online 7 February 2014

Keywords:

Portulacaceae

Talinum triangulare

Phaeophytin

Acrylamide

Ficuschlorin

Talichlorin A

ABSTRACT

This first phytochemical study of *Talinum triangulare* Leach (Portulacaceae), also known as 'cariú', which is a commonly consumed food in Northern Brazil, allowed the isolation and structural determination of four new compounds: one acrylamide, 3-N-(acryloyl, N-pentadecanoyl) propanoic acid (**5**), and three new phaeophytins named (15¹S, 17R, 18R)-Ficuschlorin D acid (3¹,3²-didehydro-7-oxo-17³-O-phytyl-rhodochlorin-15-acetic acid), (**13**), Talichlorin A (17R, 18R)-phaeophytin b-15¹-hidroxy, 15²,15³-acetyl-13¹-carboxylic acid (**14**), and (15¹S, 17R, 18R)-phaeophytin b peroxylactone or (15¹S, 17R, 18R)-hydroperoxy-ficuschlorin D (**16**), together with twelve known compounds, including four phaeophytins (**11**, **12**, **15** and **17**). The structures of the compounds were established on the basis of 1D and 2D NMR, IR, HRESI-MS spectra, including GC-MS, and HPLC-UV analysis, as well as comparisons with the literature data. The CD spectra data analysis were used to define the absolute configuration of phaeophytins **12** (13²R, 17R, 18R)-13²-hydroxyphaeophytin a, **13** and **16**, **15** (15¹S, 17R, 18R)-3¹,3²-didehydro-15¹-hydroxyrhodochlorin-15-acetic acid δ-lactone-15²-methyl-17³-phytyl ester and **17** (17R, 18R)-purpurin 18-phytyl ester.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.