

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS**

**CINTHIA SILVEIRA QUEIROGA**

**NOVAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Evolvulus linarioides* Meisn.  
(CONVOLVULACEAE)**

**João Pessoa – PB**

**2012**

**CINTHIA SILVEIRA QUEIROGA**

**Novas substâncias isoladas de *Evolvulus linarioides* Meisn.  
(CONVOLVULACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacoquímica.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva**

**SEGUNDO ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares**

**João Pessoa – PB**

**2012**

Q3n      *Queiroga, Cinthia Silveira.*  
              *Novas substâncias isoladas de Evolvulus linarioides*  
              *Meisn. (Convolvulaceae) / Cinthia Silveira Queiroga.--*  
              *João Pessoa, 2012.*  
              *87f. : il.*  
              *Orientadores: Marcelo Sobral da Silva, Josean*  
              *Fechine Tavares*  
              *Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS*  
              *1. Produtos Naturais. 2. Farmacoquímica. 3.*  
              *Evolvulus linarioides. 4. Convolvulaceae. 5. Cromona. 6.*  
              *Sesquiterpeno.*

*UFPB/BC*

*CDU: 547.9(043)*

**CINTHIA SILVEIRA QUEIROGA**

**NOVAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Evolvulus linarioides* Meisn.  
(CONVOLVULACEAE)**

Dissertação aprovada em 25 de Abril de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva**

Universidade Federal da Paraíba

**(Orientador)**

---

**Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha**

Universidade Federal da Paraíba

**(Examinador Interno)**

---

**Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho**

Universidade Federal da Paraíba

**(Examinador Externo)**

*Dedico este trabalho a toda minha família por todo apoio e carinho, sobretudo aos meus pais, Joaquim e Joana, pelo amor incondicional e por sempre investirem em minha formação.*

# AGRADECIMENTOS

Com imensa gratidão, venho registrar meus sinceros agradecimentos:

A todos os cidadãos brasileiros que viabilizam a pesquisa científica em nosso país através do pagamento de seus impostos;

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte técnico, estrutural e financeiro;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pelo exemplo de seriedade, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade cultivada, pela paciência e por todo apoio;

Ao Msc. Vicente Carlos de Oliveira Costa, pela parceria desenvolvida durante minha iniciação científica, por todos os conhecimentos compartilhados e pela amizade;

À Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco, pelo “pontapé inicial” que abriu caminhos para a realização desse trabalho;

A todos os professores que passaram em minha vida e contribuíram significativamente para minha formação;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pelas contribuições prestadas;

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, apesar de extinto, por ter sido o palco principal dessa jornada;

Aos técnicos de laboratório: Alexsandro Fernandes Marinho, Sócrates Golzio dos Santos, Vicente Carlos de Oliveira Costa e Wellington de Lima Navarro, pela obtenção dos espectros e pela boa convivência. Aos demais funcionários, pela ajuda sempre necessária, em especial, a Raimundo Nonato da Silva Filho e Ataíde Matias de Oliveira por serem sempre tão atenciosos;

A todos os colegas pós-graduandos do PgPNSB, principalmente os das turmas de 2010 e 2011, pela agradável convivência e pela amizade que foi sendo cultivada ao longo desses anos;

A todos que fazem parte da equipe Sobral, pelo companheirismo, pelas risadas constantes e pelos laços de amizade estabelecidos;

Aos amigos Alquimistas, pelos momentos de diversão e de desabafo tão necessários durante essa caminhada;

Aos amigos da graduação por todo o aprendizado compartilhado, pela amizade e pela alegria e, sobretudo pela força de vontade que me inspiravam;

À amiga Tainá Souza, presente em minha vida desde a graduação, a quem agradeço pela amizade, pela sinceridade e espontaneidade de sempre, pelo apoio constante, pelas confidências compartilhadas e pelos conselhos;

Aos excepcionais Fábio Tenório e Sócrates Golzio, amigos que tanto admiro pelo exemplo de força e determinação, por serem tão altruístas, além do carinho, dos incentivos, dos conselhos sempre valiosos e da alegria contagiante.

À amiga Paula Salgado, que em tão pouco tempo tornou-se tão especial, sempre me incentivando e me fazendo sorrir. Agradeço pela cumplicidade, pelo carinho, pela preocupação e por saber que posso contar sempre com sua ajuda;

À amiga Hellane Fabricia, por seu exemplo de dedicação, pela ajuda prestada nas mais variadas ocasiões, pela disponibilidade, carinho e amizade, além das risadas diárias;

Ao meu pequeno príncipe, Sandro Leal, que me conquistou com seu jeitinho gaiato de ser, tornando os meus dias mais alegres. Agradeço por todo carinho e apoio, imprescindíveis a mim, além da cumplicidade, paciência e do seu imenso amor;

A todos os meus familiares, pelo apoio incondicional; sobretudo aos meus pais e às minhas irmãs, que são o alicerce da minha vida, pelos esforços, incentivos, cobranças e preocupações diárias, além do imenso amor, carinho e compreensão. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui.

À Deus, pelo seu infinito Amor e pelas maravilhas que realiza em minha vida, e à Maria Santíssima, por todas as graças recebidas através da sua intercessão;

A todos que se fizeram presentes, se preocuparam, torceram por mim e cativaram esse sentimento de eterna gratidão e que, embora não citados nesse curto espaço de papel, permanecerão para sempre guardados em meu coração.

*Muito obrigada!*

*O mais importante de tudo é nunca deixar de perguntar.*

*A curiosidade tem sua própria razão de existir”*

*(Albert Einstein)*



## RESUMO

QUEIROGA, C. S. **Novas substâncias isoladas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae)** 2012. 87p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2012.

A Caatinga representa um complexo bastante rico em biomoléculas de origem vegetal. Na Paraíba, o Parque Estadual do Pico do Jabre é a maior unidade de conservação de proteção integral inserida nesse bioma, onde é possível encontrar a espécie *Evolvulus linarioides* Meisn., uma pequena erva com flores azuladas, distribuída nos menores níveis de altitude e afloramentos rochosos. O presente trabalho descreve os resultados obtidos no estudo fitoquímico de *E. linarioides*. O material vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração e técnicas cromatográficas para isolamento de alguns dos seus constituintes químicos. A identificação estrutural desses constituintes foi realizada pela análise dos dados espectrais no Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, Espectrometria de Massas, além de comparações com dados da literatura. Da fase diclorometano foi obtido um novo sesquiterpeno, o 5 $\alpha$ -hidroximetil-cariofil-3(4)-en-8 $\beta$ -5 $\alpha$ -diol, ao qual foi atribuído o nome de linariofileno. Da fase acetato de etila foram isoladas duas cromonas: 5,7-diidroxi-2-hidroximetil-4*H*-1-benzopiran-4-ona, mais conhecida como cnidimol C, e 5,7-diidroxi-2-hidroximetil-4*H*-1-benzopiran-4-ona-9-*O*- $\beta$ -glicosídeo, sendo este também relatado pela primeira vez na literatura, ao qual foi atribuído o nome de cnidimol C glicosilado. Os resultados obtidos com o estudo fitoquímico de *E. linarioides* ressaltam a sua importante contribuição para um maior conhecimento do perfil de metabólitos secundários de origem vegetal do bioma Caatinga. Além disso, esse trabalho avança na perspectiva futura de estudos interdisciplinares através da avaliação das propriedades biológicas das novas moléculas isoladas e identificadas da família Convolvulaceae.

**Palavras-chave:** *Evolvulus linarioides*, Convolvulaceae, cromona, sesquiterpeno.

## ABSTRACT

QUEIROGA, C. S. **New chemical constituents from *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae)** 2012. 87p. Dissertation (Master in Natural and Bioactive Synthetic Products) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2012.

The Caatinga biome is a promising source of biomolecules of plant origin. In Paraíba, Northern Brazil, the “Pico do Jabre” state park is the largest area of total protection and conservation included in this biome, where is possible to find the species *Evolvulus linarioides* Meisn, a small blue-flowered herb, distributed at lower altitudes and rocky outcrops. This work describes the results obtained in the phytochemical study of *E. linarioides*. The dried and pulverized plant material was subjected to extraction and chromatographic techniques in order to isolate some chemical constituents. The structural identification of these constituents was performed by spectroscopic methods, such as Infrared (IR),  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (uni and bidimensional), mass spectrometry and comparisons with literature data. A novel sesquiterpene, 5 $\alpha$ -hydroxymethyl-cariophyl-3(4)-en-8 $\beta$ -5 $\alpha$ -diol, to which the name linariofileno was assigned, was obtained from the dichloromethane extract; from the ethyl acetate extract, two chromones were isolated: cnidimol C and 5,7-dihydroxy-2-hydroxymethyl-4*H*-1-benzopiran-4-one-9-*O*- $\beta$ -glucoside, being reported for the first time in literature and assigned the name cnidimol C glucoside. These results emphasize the importance of this work to a better knowledge of the secondary metabolites's profile of plant origin in the Caatinga biome. Furthermore, it advances in the future perspective of interdisciplinary studies through the evaluation of biological properties of these novel molecules isolated and identified from the Convolvulaceae family.

**Keywords:** *Evolvulus linarioides*, Convolvulaceae, chromone, sesquiterpene.

## LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>APT</b>	Attached Proton Test
<b>CC</b>	Cromatografia em Coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Metanol Deuterado
<b>C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N</b>	Piridina Deuterada
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b><i>d</i></b>	Dupleto
<b><i>dd</i></b>	Duplodupleto
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMAPP</b>	Pirofosfato de dimetilalila
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>EMB</b>	Extrato Metanólico Bruto
<b>ESI</b>	Eletrospray
<b>FPP</b>	Pirofosfato de farnesila
<b>GPP</b>	Pirofosfato de geranila
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HMQC</b>	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IPP</b>	Pirofosfato de isopentinilalila
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>IP</b>	Isopreno
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b>LTF</b>	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
<b><i>m</i></b>	Multiplete
<b>MeOD</b>	Metanol Deuterado
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>n-BuOH</b>	n-Butanol

<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
<b>pág.</b>	Página
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>PKS</b>	Policetideo sintase
<b><i>q</i></b>	Quarteto
<b>RMN de <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<b>RMN de <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
<b><i>s</i></b>	Simpleto
<b><i>t</i></b>	Tripleto
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>δ</b>	Deslocamento químico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Parque Estadual do Pico do Jabre .....	20
<b>Figura 2</b> - Mapa com a localização geográfica do Pico do Jabre .....	21
<b>Figura 3</b> – Distribuição geográfica do gênero <i>Evolvulus</i> no mundo.....	23
<b>Figura 4</b> - <i>Evolvulus linarioides</i> Meisn. ....	24
<b>Figura 5</b> - Distribuição geográfica da espécie <i>Evolvulus linarioides</i> no Brasil .....	25
<b>Figura 6</b> - Alguns metabólitos secundários isolados em Convolvulaceae .....	26
<b>Figura 7</b> - Estrutura base de cromonas e cumarinas.....	27
<b>Figura 8</b> - Rota biossintética das cromonas .....	27
<b>Figura 9</b> - Estrutura química do ácido cromoglicóico.....	28
<b>Figura 10</b> - Rota biossintética dos sesquiterpenos .....	30
<b>Figura 11</b> - Principais tipos de sesquiterpenos.....	31
<b>Figura 12</b> - Esquema simplificado de uma análise por Espectrometria de Massas..	35
<b>Figura 13</b> - Estrutura química dos metabólitos secundários isolados das partes aéreas de <i>E. linarioides</i> .....	50
<b>Figura 14</b> - Espectro de Infravermelho (pastilhas de KBr) de Ev-1.....	51
<b>Figura 15</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de Ev-1 .....	52
<b>Figura 16</b> - Cromona 5,7-dissubstituída .....	52
<b>Figura 17</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Ev-1 .....	53
<b>Figura 18</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Ev-1 na região de 6,5 a 6,0 ppm .....	54
<b>Figura 19</b> - Expansão do espectro HMQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-1 .....	55
<b>Figura 20</b> - Expansão do espectro HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-1 .....	55
<b>Figura 21</b> - Estrutura química do cnidimol C.....	56
<b>Figura 22</b> - Espectro de Infravermelho (pastilhas de KBr) de Ev-2.....	58
<b>Figura 23</b> - Espectro de Massas ( $\text{ESI}^+$ ) de Ev-2.....	59
<b>Figura 24</b> - Espectro de $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Ev-2 .....	60
<b>Figura 25</b> - Expansão do espectro de $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Ev-2 na região de 190 a 155 ppm .....	61
<b>Figura 26</b> - Expansão do espectro de $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Ev-2 na região de 110 a 60 ppm .....	61
<b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2.....	62

<b>Figura 28</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2 na região de 7,0 a 6,0 ppm .....	63
<b>Figura 29</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2 na região de 5,0 a 3,9 ppm .....	63
<b>Figura 30</b> - Expansão do espectro HMQC ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-2 .....	64
<b>Figura 31</b> - Expansão do espectro HMBC ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-2 .....	65
<b>Figura 32</b> - Expansão do espectro COSY ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2 .....	65
<b>Figura 33</b> - Estrutura química do cnidimol C glicosilado .....	67
<b>Figura 34</b> - Espectro de Infravermelho de Ev-3 (pastilhas de KBr) .....	68
<b>Figura 35</b> - Espectro de massas ( $\text{ESI}^+$ ) de Ev-3 .....	69
<b>Figura 36</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Ev-3 .....	70
<b>Figura 37</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 .....	71
<b>Figura 38</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 na região de 6,0 a 3,0 ppm .....	71
<b>Figura 39</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 na região de 2,2 a 0,8 ppm .....	72
<b>Figura 40</b> - Espectro HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 .....	73
<b>Figura 41</b> - Expansão do espectro HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 5,5 a 3,0 ppm .....	73
<b>Figura 42</b> - Expansão do espectro HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 2,2 a 0,8 ppm .....	74
<b>Figura 43</b> - Espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 .....	74
<b>Figura 44</b> - Expansão do espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 5,5 a 3,0 ppm .....	75
<b>Figura 45</b> - Expansão do espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 2,8 a 0,6 ppm .....	75
<b>Figura 46</b> - Espectro COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 .....	77
<b>Figura 47</b> - Expansão do espectro COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 na região de 6,0 a 1,0 ppm .....	78
<b>Figura 48</b> - Expansão do espectro NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 .....	78
<b>Figura 49</b> - Estrutura química do linariofileno .....	79

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Origem biossintética dos precursores dos terpenoides.....	29
<b>Esquema 2</b> - Etapas envolvidas no processamento do material botânico.....	40
<b>Esquema 3</b> - Etapas envolvidas no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>E. linarioides</i> .....	43
<b>Esquema 4</b> - Etapas envolvidas no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>E.linarioides</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Técnicas de ionização para análises de Espectrometria de Massas .....	36
<b>Tabela 2</b> - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>E. linarioides</i> com suas respectivas frações obtidas .....	42
<b>Tabela 3</b> - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>E. linarioides</i> com suas respectivas frações obtidas .....	44
<b>Tabela 4</b> - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fração 122-128 da fase diclorometano de <i>E. linarioides</i> com suas respectivas frações obtidas .....	45
<b>Tabela 5</b> - Correlações heteronucleares observadas por HMBC para Ev-1 .....	56
<b>Tabela 6</b> - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Ev-1, verificados nos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente) e comparação com os dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 e 75 MHz, respectivamente) da literatura (BABA et al., 1992) .....	57
<b>Tabela 7</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de Ev-2 e correlações obtidas em HMQC e HMBC, registrados em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz) .....	66
<b>Tabela 8</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de Ev-3 e correlações obtidas em HMQC e HMBC, registradas em $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz) .....	76
<b>Tabela 9</b> - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 e comparação com os dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) da literatura (COLLADO et al., 1998), com $\delta$ em ppm e $J$ em Hz .....	80



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Importância da química de produtos naturais na descoberta de moléculas bioativas .....	15
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>20</b>
3.1 O Pico do Jabre.....	20
3.2 A família Convolvulaceae Juss.....	22
3.3 O gênero <i>Evolvulus</i> L. e a espécie <i>Evolvulus linarioides</i> Meisn. ....	23
3.4 Metabólitos secundários em espécies de Convolvulaceae .....	25
3.4.1 <i>Cromonas</i> .....	27
3.4.2 <i>Terpenoides</i> .....	28
3.4.2.1 Sesquiterpenos .....	30
3.5 Técnicas analíticas.....	32
3.5.1 <i>Métodos Cromatográficos</i> .....	32
3.5.1.1 Cromatografia em Coluna.....	32
3.5.1.2 Cromatografia em Camada Delgada .....	33
3.5.2 <i>Métodos Espectroscópicos e Espectrométrico</i> .....	33
3.5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho .....	33
3.5.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	34
3.5.2.3 Espectrometria de Massas.....	35
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>38</b>
4.1 Coleta e identificação do material botânico .....	38
4.2 Obtenção e Particionamento do Extrato Metanólico Bruto (EMB) .....	38
4.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos .....	41
4.3.1 <i>Métodos cromatográficos</i> .....	41
4.3.1.1 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila.....	42
4.3.1.2 Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano .....	43
4.4 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados .....	47
4.4.1 <i>Espectroscopia no Infravermelho (IV)</i> .....	47
4.4.2 <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	47
4.4.3 <i>Espectrometria de Massas</i> .....	47
4.4.4 <i>Determinação dos Pontos de fusão</i> .....	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
5.1 Determinação estrutural de Ev-1 .....	51
5.2 Determinação estrutural de Ev-2 .....	58

5.3 Determinação estrutural de Ev-3 .....	68
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

# *INTRODUÇÃO*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância da química de produtos naturais na descoberta de moléculas bioativas

O surgimento da química de produtos naturais como ciência remete ao início do século XIX, quando o farmacêutico alemão, Friedrich Sertürner, isolou o primeiro composto puro farmacologicamente ativo de uma planta: a morfina, do ópio produzido pelos frutos da espécie *Papaver somniferum*. Isto iniciou uma era em que drogas obtidas de produtos naturais puderam ser purificadas, estudadas e utilizadas como medicamentos. (WANG et al., 2011).

Com a descoberta dos “princípios ativos” de plantas e animais, a pesquisa em química de produtos naturais desenvolveu-se e foi ganhando cada vez mais espaço. No entanto, desde a antiguidade existem evidências da utilização de plantas, animais, insetos e fungos, para os mais variados fins, sendo a busca por alívio e cura de doenças, possivelmente, uma das suas primeiras formas de utilização. (VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006)

Diante disso, os produtos naturais inspiraram um grande desenvolvimento na química orgânica (NEWMAN, 2008; WILSON; DANISHEFSKY, 2006), levando a avanços nas metodologias sintéticas e possibilidades de análogos do composto original com melhoria nas propriedades farmacológicas (SUNAZUKA; HIROSE; OMURA, 2008). Atualmente, cerca de 40% dos fármacos disponíveis no mercado correspondem a produtos naturais e seus derivados, sendo os 60% restantes de origem sintética (BADE; CHAN; REYNISSON, 2010).

A relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável e a vasta diversidade estrutural de constituintes químicos permitem diagnosticar as plantas brasileiras como a principal fonte renovável para obtenção de novos fármacos, além de outros produtos que podem ser utilizados para finalidades adicionais. Nesse contexto, ressalta-se a importância da química de produtos naturais de origem vegetal, ou fitoquímica, como é concebida atualmente, a qual se dedica principalmente à caracterização estrutural,

avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de plantas (BRAZ-FILHO, 2010)

No entanto, durante muito tempo, a identificação dos metabólitos das plantas era considerada um enorme desafio por exigir um contínuo aprimoramento. Todavia, com o surgimento das técnicas de espectroscopia no Infravermelho (IV), da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uni e bidimensionais, e, posteriormente, da Espectrometria de Massas (EM), a elucidação estrutural desses metabólitos ganhou um enorme impulso. Nesse sentido, tais técnicas tem desempenhado um importante papel no isolamento e determinação estrutural de moléculas bioativas de origem vegetal. Apesar disso, a análise estrutural de produtos naturais está longe de ser trivial e a correta interpretação de dados espectroscópicos é uma tarefa que exige bastante cautela para que eventuais enganos não sejam cometidos.

Assim, percebendo o potencial químico e farmacológico da família Convolvulaceae e reconhecendo o pouco conhecimento sobre o gênero *Evolvulus*, o presente trabalho apresenta um estudo sobre *Evolvulus linarioides* Meisn., espécie de ocorrência na Caatinga paraibana, com o intuito de contribuir para o isolamento e caracterização de metabólitos secundários de espécies desse bioma.

# *OBJETIVOS*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da família Convolvulaceae, bem como do gênero *Evolvulus*, através do estudo da espécie *Evolvulus linarioides* Meisn., enfatizando seus aspectos fitoquímicos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fitoquimicamente as partes aéreas de *E. linarioides* através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos;
- Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos desta espécie, através de técnicas de Espectroscopia no Infravermelho (IV), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais, além de Espectrometria de Massas;
- Contribuir com a quimiotaxonomia da família Convolvulaceae e do gênero *Evolvulus*;
- Disponibilizar seus extratos, fases e/ou substâncias isoladas para posterior avaliação da atividade biológica.

# *FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA*



### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 O Pico do Jabre

O bioma Caatinga constitui-se um complexo bastante rico em espécies lenhosas, caducifólias e herbáceas anuais. Sua flora demorou milênios de anos de evolução para atingir o estado atual de adaptação às adversidades climáticas. Portanto, garantir a sobrevivência da Caatinga nativa significa preservar um inestimável patrimônio de recursos naturais (ANDRADE et al., 2009)

Na Paraíba, o Parque Estadual do Pico do Jabre (Figura 1, pág. 20) é a maior unidade de conservação de proteção integral inserida no bioma da Caatinga, criada pelo Decreto 23.060 de 19/10/2002, possuindo uma extensão de 851,7677 hectares (SUDEMA, 2012).

**Figura 1** - Parque Estadual do Pico do Jabre



Fotos: Josean Fachine Tavares, 2009.

Localizado a noroeste do município de Matureia, entre os meridianos 37°20' e 37°22' de longitude oeste de Greenwich e entre os paralelos de 7°12' e 7°15' de latitude sul (Figura 2, pág. 21), o Pico do Jabre é considerado o ponto culminante do Estado da Paraíba e o segundo ponto mais alto do Nordeste, atingindo uma altitude de 1.197 metros (SUDEMA, 2012).

**Figura 2** - Mapa com a localização geográfica do Pico do Jabre



Fonte: <http://fazendoturismoufpe.blogspot.com/2010/10/pico-do-jabre-ponto-mais-alto-da.html>

O clima apresenta fortes modificações em relação ao semi-árido, devido à sua geomorfologia que imprime disposição perpendicular às correntes aéreas dominantes. De acordo com a classificação de Köppen, a Serra de Teixeira enquadra-se no tipo AW'- quente e semi-úmido, com chuvas de verão até o outono. A estação seca varia de cinco a sete meses, de maio a dezembro, atingindo uma precipitação de 1% do total, de agosto a outubro. As maiores precipitações ocorrem de janeiro a maio, período que corresponde a quase 70% do total anual. A área apresenta baixos índices pluviométricos, com uma média anual variando entre 800 e 1.000 mm. A temperatura média anual é superior a 20°C e a umidade relativa do ar média é de aproximadamente 65% (AGRA; BARBOSA; STEVENS, 2004).

A vegetação apresenta mosaicos de fisionomias distintas, que são o resultado da variação topográfica, da declividade, do substrato e do microclima. Nos maiores

níveis de altitude, com solos mais profundos, observa-se o predomínio da floresta estacional semidecídua, enquanto que nos menores níveis e afloramentos rochosos, encontra-se uma vegetação característica da Caatinga, dominada por ervas, arbustos e arvoretas comuns ao semi-árido (AGRA; BARBOSA; STEVENS, 2004).

### 3.2 A família Convolvulaceae Juss.

A família Convolvulaceae, descrita por Antonie Laurent de Jussieu, compreende aproximadamente 1930 espécies, distribuídas em 55 gêneros de ocorrência em regiões tropicais e de clima temperado, possuindo distribuição cosmopolita (JUDD et al., 1999)

Seu nome deriva do latim *convolvo*, que significa entrelaçar-se, e de modo geral, refere-se ao tipo do crescimento de suas espécies, tendo em vista que grande parte destas são trepadeiras volúveis, as quais crescem enroscadas em um suporte (PEREDA-MIRANDA; TAKETA; VILLATORO-VERA, 2007). No entanto, também podem ocorrer ervas, arbustos, subarbustos e, mais raramente, árvores (JUNQUEIRA, 2004).

Seus representantes podem ser encontrados em diversos tipos de vegetação, mas predominam em áreas abertas, como na Caatinga e no Cerrado. Além disso, a família Convolvulaceae foi destacada por apresentar espécies endêmicas para a Caatinga e considerada uma das mais importantes e comuns neste bioma. (JOLY, 1970 *apud* JUNQUEIRA, 2004; SIMÃO-BIANCHINI, 2002).

Do ponto de vista econômico, muitas espécies de Convolvulaceae são cultivadas como alimentares, ornamentais e medicinais. Para a alimentação, a espécie mais importante é a *Ipomoea batatas*, mais conhecida como batata-doce, sendo utilizada como alimento. Os gêneros *Convolvulus*, *Ipomoea* e *Evolvulus* são amplamente conhecidos devido ao uso ornamental de suas espécies, tais como *Ipomoea purpurea*, popularmente conhecida como glória-da-manhã (HEYWOOD, 1993). Na medicina popular, destacam-se as raízes de *Convolvulus scammonia* e *Ipomoea purga*, que apresentam propriedades catárticas, além da própria *Ipomoea batatas*, que é usada como cicatrizante e anti-reumática (DI STASI, 1996).

### 3.3 O gênero *Evolvulus* L. e a espécie *Evolvulus linarioides* Meisn.

O gênero *Evolvulus* pertence à família Convolvulaceae, e inclui cerca de 100 espécies, estando amplamente distribuído no continente americano (Figura 3, pág. 23), com apenas duas espécies de distribuição cosmopolita: *E. nummularius* e *E. alsinoides*, as quais foram originadas na América e depois introduzidas no “velho mundo” devido às suas propriedades medicinais (van OOSTSTROOM, 1934 *apud* AUSTIN, 2008).

**Figura 3** – Distribuição geográfica do gênero *Evolvulus* no mundo



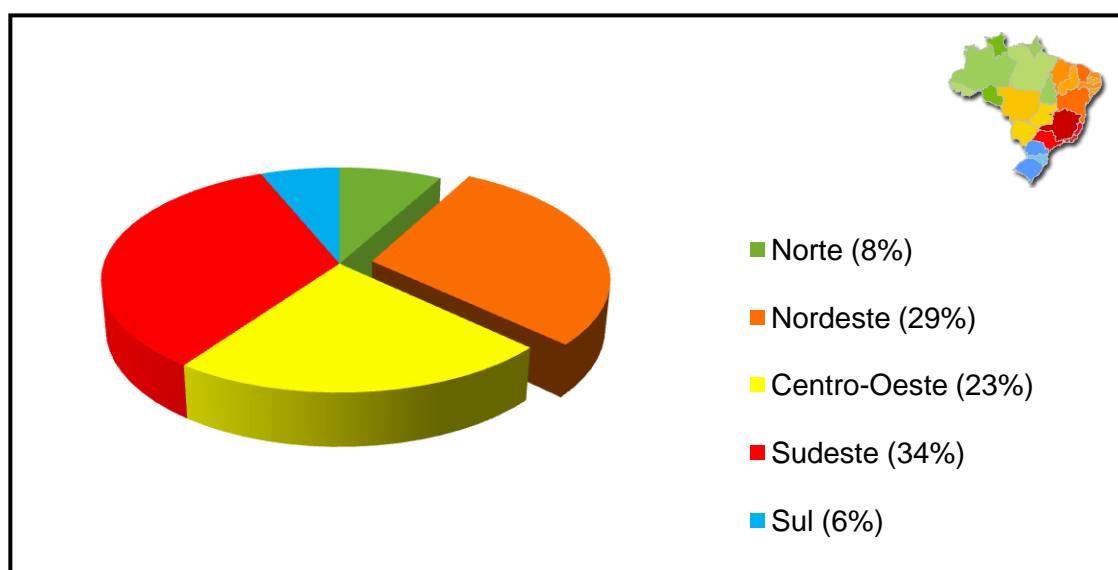
Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/40007885?tab=maps>

Trata-se de um gênero cujas espécies não apresentam caules volúveis. Por esse motivo, o termo *Evolvulus* (do latim *evolvo*), que significa aquele que não se enrola, foi escolhido para sua denominação. Seus representantes caracterizam-se principalmente pela presença de dois estiletos livres ou unidos na base, cada qual com dois estigmas filiformes ou subclavados, além de tricomas malpighiáceos e sementes glabras. Dentre os gêneros semelhantes, destacam-se *Jacquemontia* e *Convolvulus*, os quais se distinguem de *Evolvulus* por possuírem apenas um estilete com dois estigmas ovais ou elipsoidais, além de *Bonamia* que possui estigmas globosos. (JUNQUEIRA; SIMÃO-BIANCHINI, 2006).



O elevado potencial ornamental de seus representantes advém da ampla diversidade de formas e cores de flores, com destaque para as variações de azul, branco e lilás. De acordo com van Ooststroom, este gênero apresenta sua maior diversidade no Brasil (AUSTIN, 2008), onde suas espécies encontram-se distribuídas principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste (Gráfico 1, pág. 24) e entre as quais destaca-se *Evolvulus linarioides*.

**Gráfico 1** – Distribuição regional do gênero *Evolvulus* no Brasil



Adaptado de: BIANCHINI; FERREIRA, 2012a.

A espécie *E. linarioides* apresenta-se como uma pequena erva de flores azuis (Figura 4, pág.24), ocorrendo nos estados de Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e Paraná (Figura 5, pág. 25). Apesar disso, em levantamento bibliográfico realizado nos principais bancos de dados, nenhum estudo fitoquímico envolvendo esta espécie encontra-se relatado na literatura.

**Figura 4** - *Evolvulus linarioides* Meisn.



Fotos: Josean Fachine Tavares, 2009; BURIL; GARCÍA-GONZÁLES; ALVES, 2011

**Figura 5** - Distribuição geográfica da espécie *Evolvulus linarioides* no Brasil

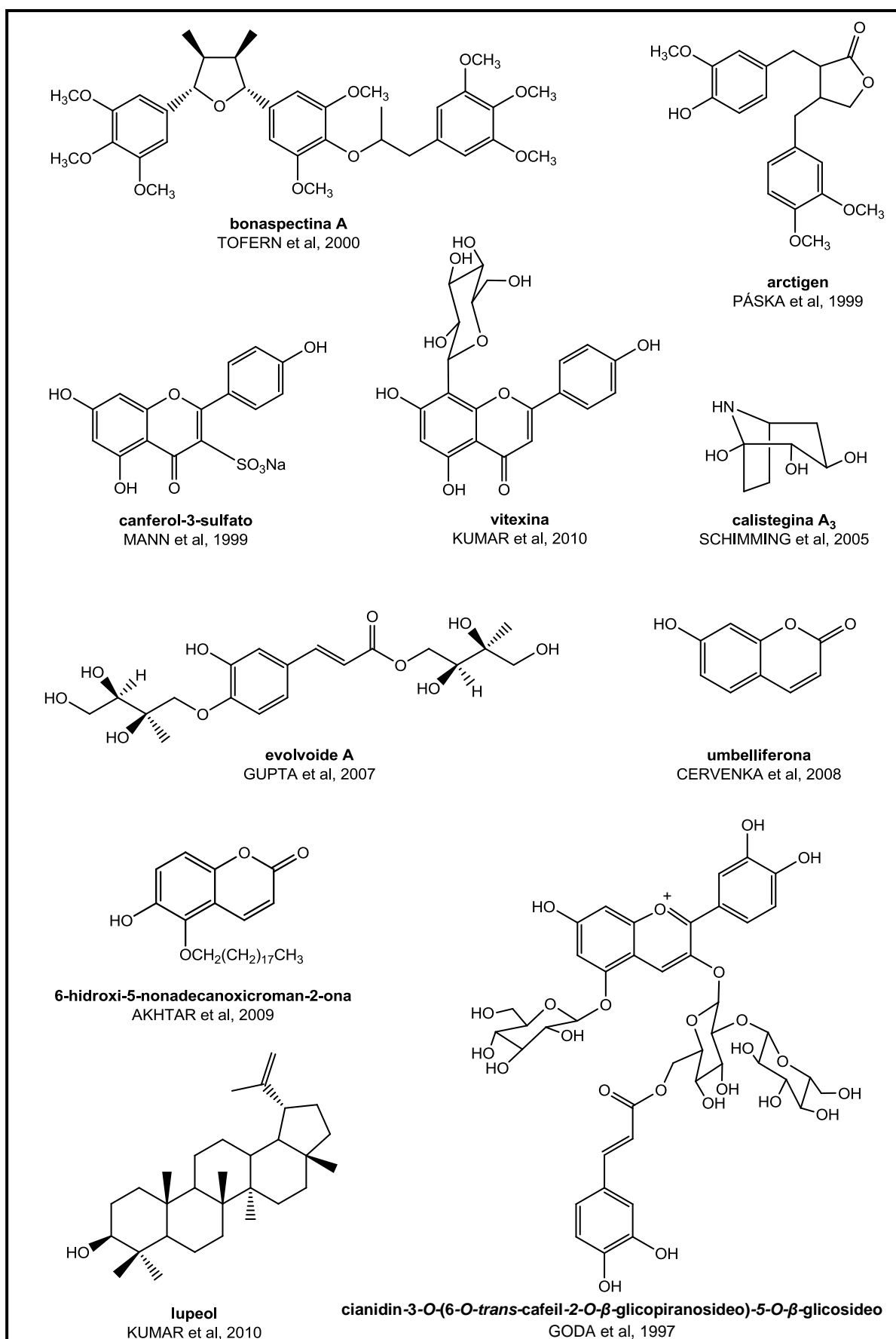
Adaptado de: BIANCHINI; FERREIRA, 2012b.

### 3.4 Metabólitos secundários em espécies de Convolvulaceae

Uma das características mais marcantes nas espécies de Convolvulaceae é a presença de células secretoras de resinas glicosídicas em tecidos foliares, e especialmente nas raízes. Estas resinas constituem uma característica quimiotaxonômica da família, apresentando propriedades purgantes, que caracterizam o emprego na medicina tradicional dos gêneros *Convolvulus*, *Exogonium*, *Ipomoea*, *Merremia* e *Operculina* (ARGÁEZ; PÉREZ-AMADOR, 1997; PEREDA-MIRANDA et al, 2003).

Além das glicoresinas, uma grande variedade de metabólitos secundários encontra-se relatada, tais como: amidas (TOFERN et al., 1999), antocianidinas (GODA et al., 1997; PALE et al., 1998; TERAHARA et al., 2000; MORI et al, 2006), cianidinas (SAITO et al., 1995), cumarinas (GUPTA et al, 2007; CERVENKA et al, 2008; KUMAR et al, 2010), flavonoides (MANN et al., 1999; GUPTA et al, 2007; KUMAR et al, 2010), esteroides (AKHTAR et al., 2009), terpenoides (KUMAR et al, 2010) e lignanas (PÁSKA et al., 1999; TOFERN et al., 2000). Dentre os alcaloides, destacam-se calisteginas, as quais também são consideradas marcadores para a família, e ainda os tropânicos, indolizidínicos, pirrolidínicos, pirrolizidínicos e ergolínicos. (SCHIMMING et al., 1998; SCHIMMING et al., 2005). Alguns exemplos de metabólitos isolados de espécies de Convolvulaceae encontram-se representados na Figura 6 (pág. 26).

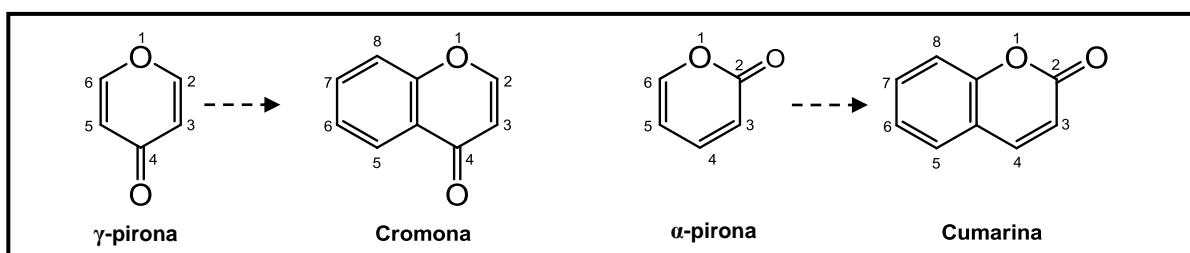
**Figura 6** - Alguns metabólitos secundários isolados em Convolvulaceae



### 3.4.1 Cromonas

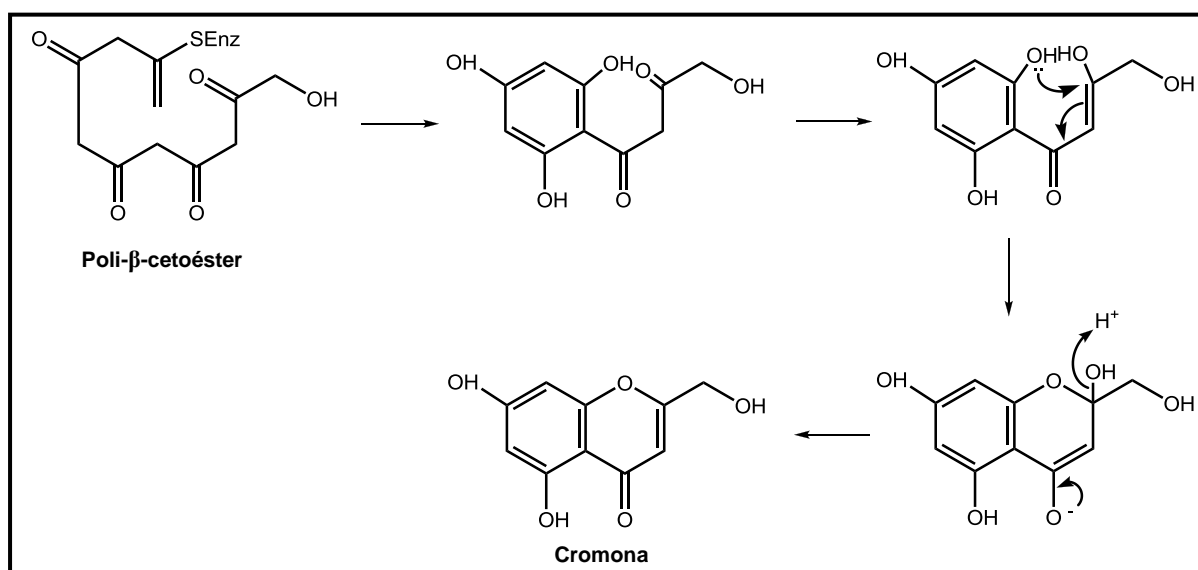
As cromonas são compostos derivados da pirona, classificados como benzo- $\gamma$ -pironas, que representam um grupo bem pequeno de substâncias, de ocorrência natural ou sintética, as quais são isômeros de posição das cumarinas (Figura 7, pág. 27), (KUSTER; ROCHA, 2007). No entanto, ao contrário destas, as cromonas não são derivadas da fenilalanina, mas o mecanismo biossintético pelo qual elas são sintetizadas é um dos mais utilizados na natureza. Esse mecanismo trata-se da via dos policetídeos, os quais são formados através reações de condensação, catalizadas por enzimas denominadas policetideo sintases (PKS), resultando em uma cadeia com vários grupos carbonila (CSEKE et al., 2006).

**Figura 7** - Estrutura base de cromonas e cumarinas



Sendo assim, a etapa inicial consiste na aromatização do poli- $\beta$ -cetoéster através de condensação. Em seguida ocorre a formação do anel heterocíclico por meio de ataque nucleofílico, culminando com o estabelecimento do equilíbrio ceto-enólico, como observado na figura abaixo (DEWICK, 2009).

**Figura 8** - Rota biossintética das cromonas



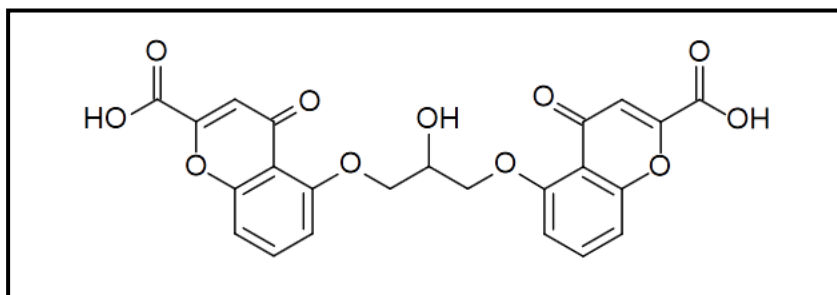
Adaptado de: DEWICK, 2009.



A procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse em cromonas e cumarinas, pelo fato dessas substâncias mostrarem potentes e relevantes atividades farmacológicas, além de apresentarem, de modo geral, baixa toxicidade para mamíferos (KUSTER, ROCHA, 2007).

Do ponto de vista medicinal, as furanocromonas encontradas nos frutos de *Ammi visnaga* (Apiaceae), planta bastante comum nos países do Mediterrâneo, são as mais conhecidas por possuírem ação vasodilatadora e broncodilatadora, sendo a quelina e a visnagina seus principais representantes. Estas cromonas fazem parte da composição de alguns medicamentos comercializados em países europeus, indicados para o tratamento de angina pectoris e asma brônquica (KUSTER, ROCHA, 2007; DEWICK, 2009). Além disso, as propriedades da quelina foram exploradas de modo a desenvolver um análogo sintético mais polar, dando origem ao ácido cromoglicóico (Figura 9, pág. 28). Atualmente, o cromoglicato dissódico é bastante utilizado na terapêutica para o tratamento da asma e rinites alérgicas (DEWICK, 2009).

**Figura 9** - Estrutura química do ácido cromoglicóico



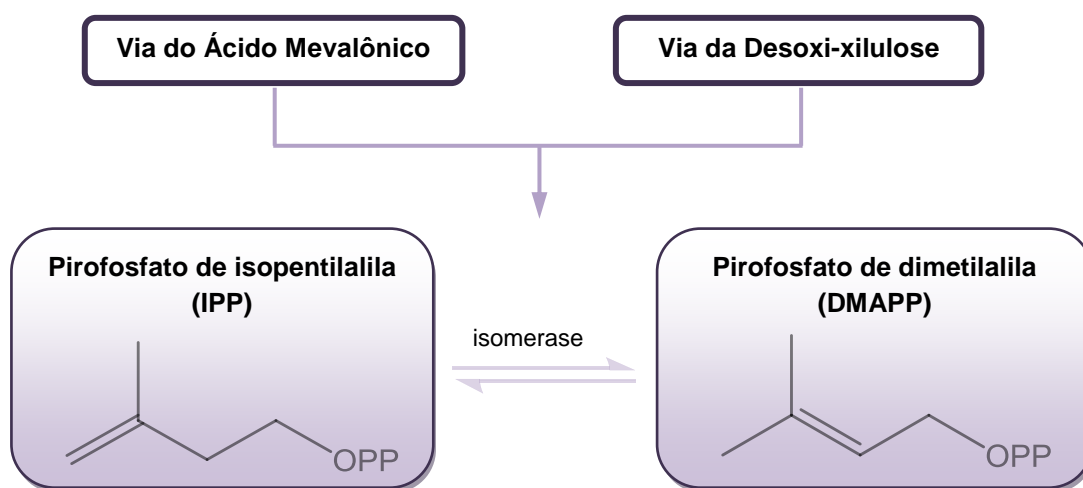
### 3.4.2 Terpenoides

Os terpenoides compreendem o maior grupo de produtos naturais conhecido, sendo uma classe com grande diversidade estrutural (DEWICK, 2009). Tais compostos são sintetizados por reações de condensação, tendo como base unidades isoprênicas ( $C_5$ ) orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda). A variação do número de repetições dessas unidades e as reações de ciclização, além dos rearranjos, são responsáveis pela incrível diversidade de terpenos observados na natureza, bem como sua classificação que varia em: hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ),

triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ), de acordo com o esqueleto carbônico apresentado (WANG; TANG; BIDIGARE, 2005; DEWICK, 2009).

Na realidade, o isopreno (IP) é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades isoprênicas bioquimicamente ativas são o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e o pirofosfato de isopentenila (IPP), que por sua vez podem ser formados a partir de duas rotas: a via do ácido mevalônico e a via da desoxi-xilulose, (Esquema 1, pág. 29), (EISENREICH et al., 2004; NIERO; MALHEIROS, 2007; DEWICK, 2009).

**Esquema 1** - Origem biossintética dos precursores dos terpenoides

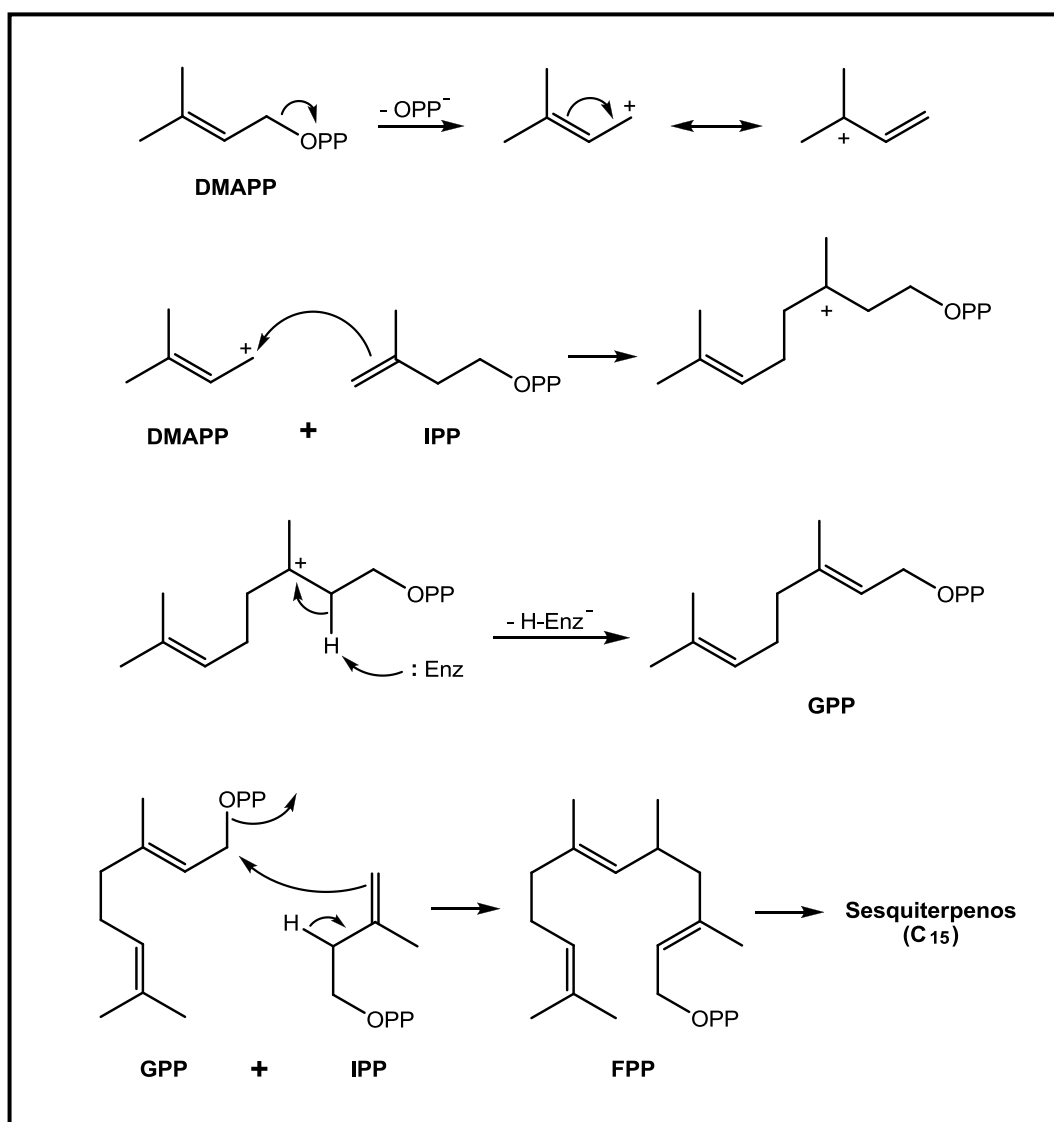


Os terpenoides apresentam funções variadas nos vegetais e, de modo geral, possuem diversas atividades biológicas, sendo bastante utilizados na área farmacêutica (NIERO; MALHEIROS, 2007; DEWICK, 2009). Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis, importantes comercialmente na produção de sabões, detergentes, cosméticos e perfumaria, além de serem atrativos dos polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenos dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Alguns triterpenos e seus derivados esteroidais são antimitóticos, outros atuam na germinação das sementes, na inibição do crescimento da raiz ou na proteção contra herbívoros entre outras ações (NIERO; MALHEIROS, 2007).

### 3.4.2.1 Sesquiterpenos

A biossíntese dos sesquiterpenos começa com a formação da ligação carbono-carbono que envolve a ionização do DMAPP transformando-o em cátion que é adicionado sobre a ligação dupla do IPP. Um carbocátion terciário é gerado, o qual perde um próton formando uma dupla ligação. Neste caso, o composto formado é o pirofosfato de geranila (GPP), o qual, ao sofrer nova condensação com o IPP, forma o pirofosfato de farnesila (FPP), sendo este o precursor imediato dos sesquiterpenos, (Figura 10, pág. 30).

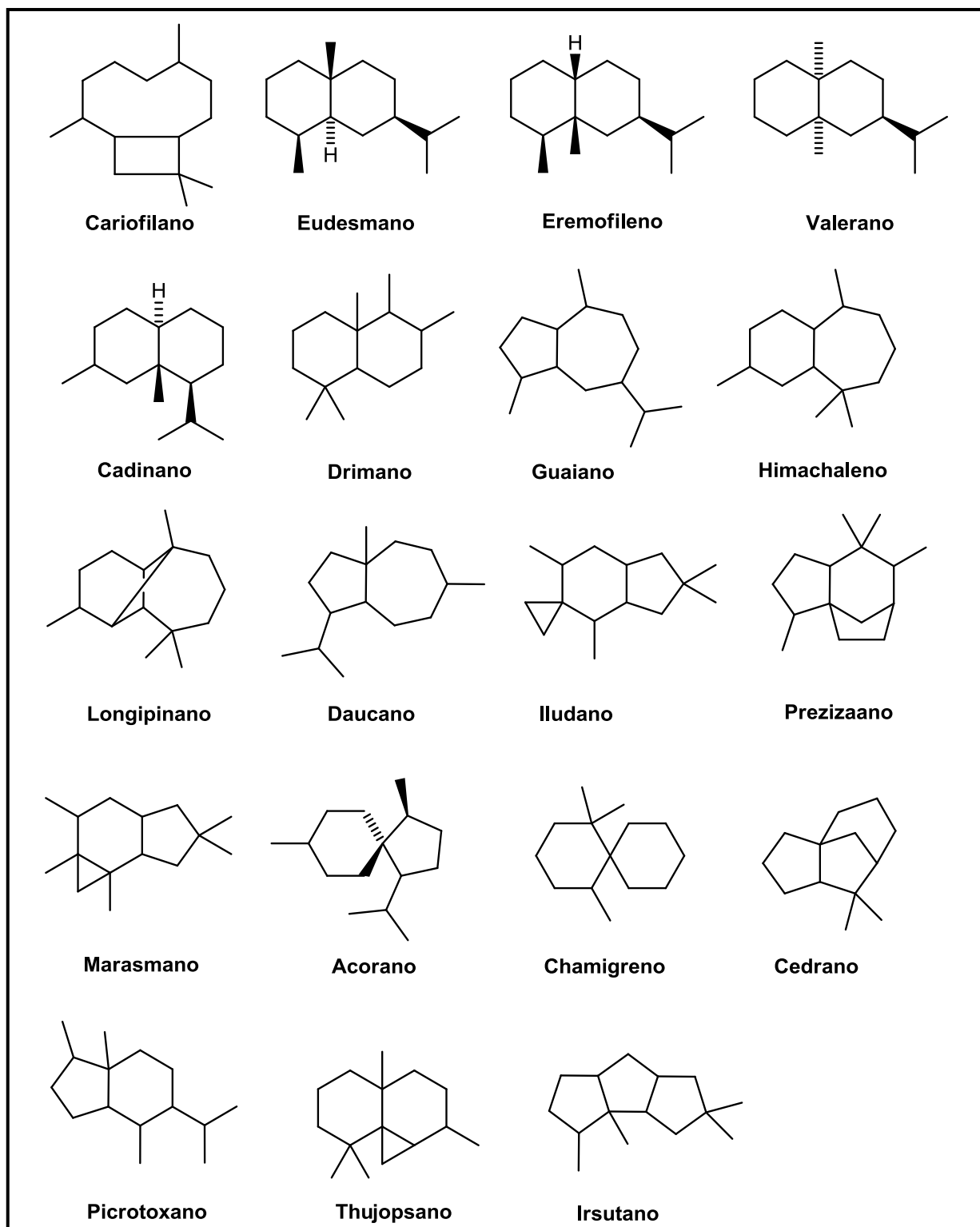
**Figura 10** - Rota biossintética dos sesquiterpenos



Adaptado de: NICARETA, 2006.

É importante destacar que os sesquiterpenos apresentam uma grande variedade estrutural. Dessa forma, eles podem ser agrupados de acordo com seus núcleos básicos em diferentes tipos, como representado na figura abaixo.

**Figura 11** - Principais tipos de sesquiterpenos



Fonte: NICARETA, 2006.

### 3.5 Técnicas analíticas

#### 3.5.1 Métodos Cromatográficos

A Cromatografia é um processo físico de separação no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: uma estacionária e outra móvel. De modo geral, a técnica se baseia no princípio da adsorção seletiva, onde a fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, também conhecida como eluente, pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico que, ao migrar sobre a fase estacionária, traz consigo diversos componentes da amostra. As diferenças no gradiente de migração dependerão das características físico-químicas da fase móvel, da fase estacionária e dos analitos (PERES, 2002).

Dentre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. Além disso, a grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Atualmente, os principais tipos de cromatografia são: Cromatografia em Papel (CP), Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A seleção do método adequado depende das características da amostra e da finalidade do seu uso. Neste estudo, fez-se uso da Cromatografia em Coluna e da Cromatografia em Camada Delgada.

##### 3.5.1.1 Cromatografia em Coluna

A Cromatografia em Coluna apresenta-se como uma eficiente técnica de separação e de isolamento dos constituintes de misturas complexas, fazendo uso de uma coluna de vidro presa no sentido vertical, onde a fase estacionária é sedimentada e compactada. Nela a eluição ocorre a favor da gravidade e pode-se variar continuamente a fase móvel, interferindo na sua polaridade que poderá ser gradativamente aumentada ou diminuída (CALDERARI, 2002)

A amostra é adicionada no topo da coluna e uma solução contendo o composto que se deseja purificar é aplicada na superfície superior da fase

estacionária. Após eluição, coletam-se frações com volumes predeterminados, as quais muito provavelmente conterão os componentes da mistura separados.

#### **3.5.1.2 Cromatografia em Camada Delgada**

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica bastante utilizada para fins de análise devido à sua simplicidade, rapidez de análise e baixo custo, além de requerer reduzida quantidade de amostra. Podem-se usar vários tipos de fases estacionárias e móveis, além do auxílio do uso de reveladores próprios para determinar grupamentos químicos específicos. Alternativamente, para a caracterização qualitativa da amostra, poderão ser empregadas substâncias padrões. Quanto à fase móvel, pode-se fazer uso de solventes ou misturas de solventes com diferentes afinidades pelas substâncias a serem separadas (CALDERARI, 2002 e COLLINS, 1997).

### **3.5.2 Métodos Espectroscópicos e Espectrométrico**

#### **3.5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho**

A espectroscopia na região do infravermelho fornece informações sobre os prováveis grupos funcionais presentes nas moléculas e, em alguns casos, da maneira como eles encontram-se arranjados (PAVIA et al., 2010).

As substâncias são identificadas pela comparação de seus espectros com um banco de dados. Vários esforços foram realizados para desenvolver sistemas de regras para interpretação dos dados espectroscópicos (RICARD et al., 1993). De modo que para os espectros de IV, essas regras podem ser inclusivas ou exclusivas, ou seja, a presença de um sinal indica a existência de um determinado fragmento e a ausência do sinal, consequentemente, indica a ausência do fragmento (COSTA; SCOTTI, 2011).

Assim, mesmo quando a identificação não é concluída, ainda é possível extrair características estruturais importantes dos espectros de IV, principalmente na região entre 3600 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Essas informações são combinadas com as provenientes de outros métodos espectroscópicos para permitir a elucidação estrutural (COSTA; SCOTTI, 2011).

### **3.5.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

A RMN é uma das ferramentas mais poderosas para determinação e elucidação estrutural, contribuindo significativamente para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção dos espectros de RMN, a amostra é submetida a um campo magnético externo, de modo que determinados núcleos que apresentam um momento magnético nuclear, como  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , podem entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características conforme sua vizinhança química (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  são os mais utilizados e seus vários métodos disponíveis oferecem diferentes informações sobre a estrutura molecular, permitindo caracterizar o número e os tipos de átomos de hidrogênio e de carbono em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007). Por exemplo, fornece o estado de hibridização de núcleos, o número e a natureza de seus vizinhos, as informações sobre acoplamento entre núcleos vicinais, a quantas ligações, um dado par de núcleos está acoplado e até como interagem no espaço.

Uma vantagem inestimável da RMN frente às demais técnicas, especialmente frente à Espectrometria de Massas, é que o deslocamento químico de um átomo independe do tipo de equipamento e da potência do campo utilizados. Esse fato é ainda mais pronunciado para RMN de  $^{13}\text{C}$ , pois nesse caso a multiplicidade de sinais não é envolvida, diferentemente da RMN de  $^1\text{H}$  que ainda inclui as constantes de acoplamento (COSTA; SCOTTI, 2011).

Neste trabalho, os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais de COSY, NOESY, HMQC e HMBC. As técnicas homonucleares de COSY e NOESY possibilitam as correlações entre hidrogênios responsáveis pelo desdobramento do sinal entre si e entre hidrogênios próximos espacialmente, respectivamente. As técnicas heteronucleares de HMQC e de HMBC estabelecem correlações entre hidrogênios e seus respectivos carbonos e entre hidrogênios e carbonos a duas ( $^2J$ ) e três ( $^3J$ ) ligações, respectivamente.

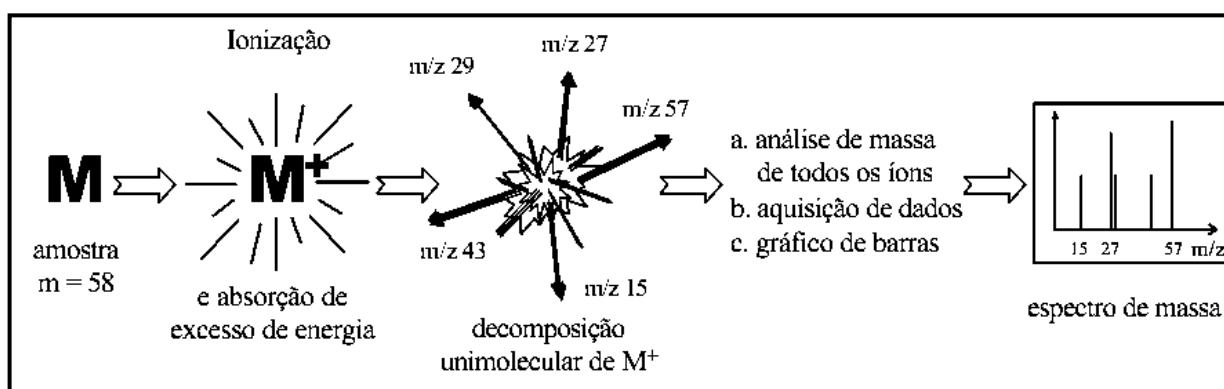
### 3.5.2.3 Espectrometria de Massas

A Espectrometria de Massas é uma ferramenta analítica utilizada para obtenção do peso molecular e de características estruturais da amostra, fornecendo informações necessárias para identificar compostos desconhecidos, quantificar e elucidar misturas complexas (KAZAKEVICH; LoBRUTTO, 2007). Na área de produtos naturais ela é bastante empregada, pois é de primordial importância obter a massa molecular de uma substância para confirmar sua estrutura em combinação com dados obtidos de outras técnicas espectroscópicas (COSTA; SCOTTI, 2011).

O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa (RODRIGUEZ, 2003). No processo de ionização, a molécula adquire uma carga elétrica resultante, ficando com “energia em excesso”, o que leva a uma série de fragmentações iônicas. Diante disso, o método se fundamenta basicamente na separação dos íons produzidos, classificando-os de acordo com sua relação massa-carga ( $m/z$ ), (Figura 12, pág. 35).

A aparência do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado. (RODRIGUEZ, 2003) Nas últimas décadas, foram desenvolvidas várias técnicas de ionização que permitiram a análise de substâncias termicamente lábeis e com baixa pressão de vapor, além do interfaceamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas. (MURGO, 1998).

**Figura 12** - Esquema simplificado de uma análise por Espectrometria de Massas



Fonte: RODRIGUEZ, 2003

Atualmente, os agentes ionizantes empregados em espectrometria de massa são distribuídos em duas categorias: os que requerem a amostra em fase gasosa e



os que provocam dessorção em amostras sólidas ou líquidas (RODRIGUEZ, 2003) (Tabela 1, pág. 36); considerando que a dessorção trata-se de um processo de transferência de átomos, moléculas ou agregados de um sólido para a fase gasosa.

**Tabela 1** - Técnicas de ionização para análises de Espectrometria de Massas

TIPO DE FONTE DE ÍONS	TÉCNICA	AGENTE IONIZANTE
Fase gasosa	Impacto de elétrons (EI)	Elétrons energéticos
	Ionização química (CI)	Íons de um gás inerte
	Ionização por campo elétrico (FI)	Eletrodo em potencial elétrico alto
	Luz sincrotron	Fótons
Dessorção	Dessorção por campo elétrico (FD)	Eletrodo em potencial elétrico alto
	Ionização por <i>Eletrospray</i> (ESI)	Campo elétrico intenso
	Ionização /dessorção por laser assistido por uma matriz (MALDI)	Feixe de laser UV
	Dessorção de plasma (PDMS)	Fragmentos de fissão do $^{252}\text{Cf}$ (MeV)
	Bombardeamento por átomos rápidos (FAB)	Feixe de átomos energéticos ( $\approx 5\text{KeV}$ )
	Emissão de íons secundários (SIMS)	Feixe de íons energéticos (5-15 KeV)
	Ionização térmica ou <i>Thermospray</i> (TS)	Temperatura alta
	Impacto de íons pesados (HIMS)	Feixe de íons aceleradores (MeV)

Adaptado de: RODRIGUEZ, 2003.

Neste trabalho foi utilizada a técnica de ionização por *Eletrospray* (ESI) que difere da maioria das outras pelo fato de ser realizada à pressão atmosférica, onde os íons são direcionados à região de alto vácuo e analisados. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e capacidade de produzir íons moleculares, detectando desde compostos de baixo peso molecular até biopolímeros e permitindo que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa (THOMPSON, 1998). De modo geral, um espectro de massas obtido por ESI apresenta os picos do íon molecular e seus adutos ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ) como principais sinais. Dessa forma, permite o conhecimento do peso molecular da substância, mas não fornece muita informação estrutural devido à ausência de fragmentação (MURGO, 1998).

# *PARTE EXPERIMENTAL*

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Coleta e identificação do material botânico

As partes aéreas de *Evolvulus linarioides* foram coletadas em 19 de junho de 2009, no Parque Estadual do Pico do Jabre, o qual encontra-se situado no município de Matureia, no Estado da Paraíba.

A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Fátima Agra do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e uma exsicata referente a esta coleta encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), sob o registro AGRA et al. 6970.

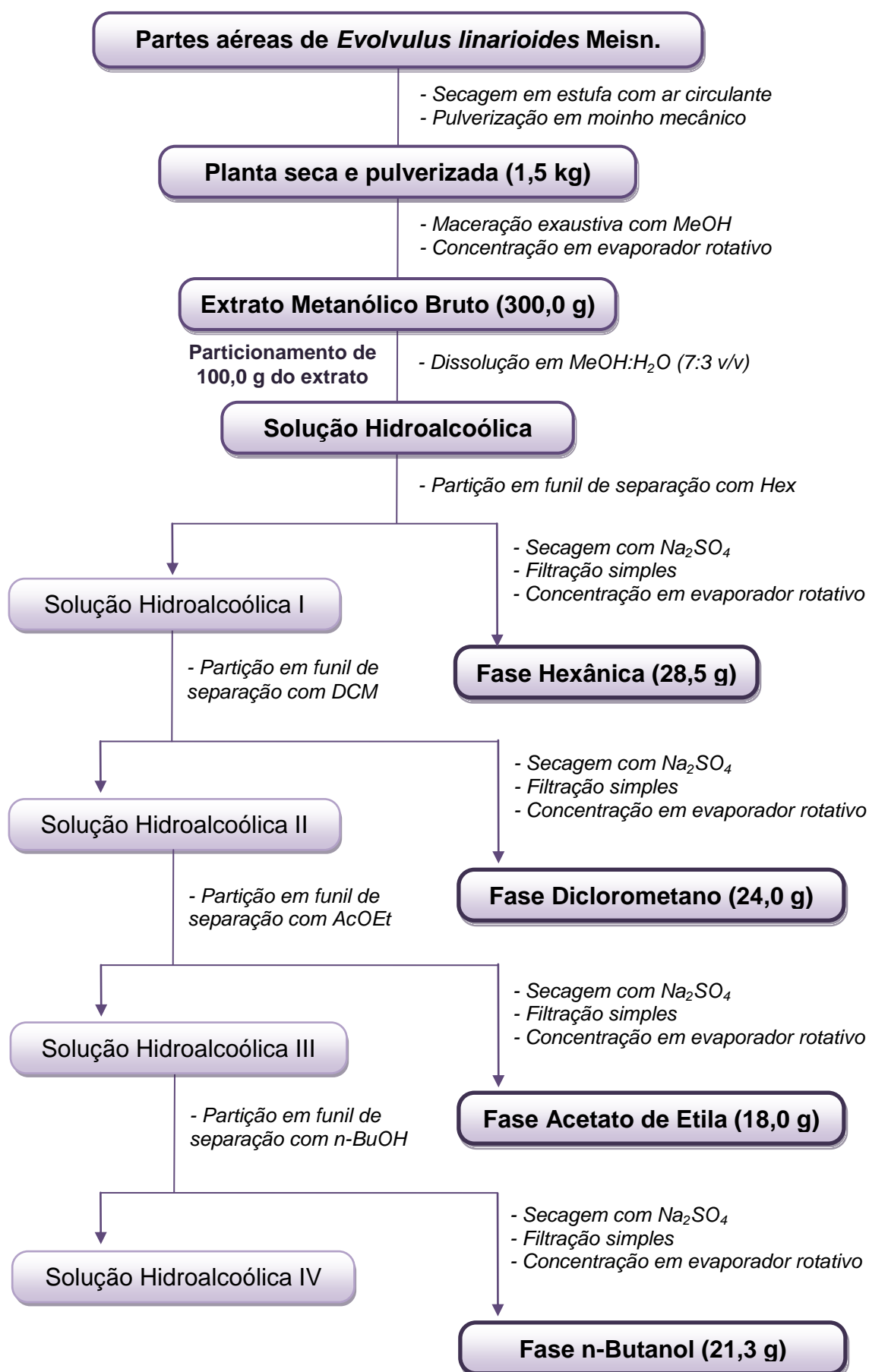
### 4.2 Obtenção e Particionamento do Extrato Metanólico Bruto (EMB)

As partes aéreas de *E. linarioides* foram desidratadas em estufa com ar circulante à temperatura média de 40,0 °C durante 72 horas. Após secagem, o material botânico foi reduzido a pó em moinho mecânico do tipo Harley, fornecendo 1,5 kg do pó seco.

Posteriormente, as partes aéreas secas e pulverizadas de *E. linarioides* foram submetidas à maceração com metanol por 72 horas em recipiente de aço inoxidável, sendo este processo repetido por três vezes. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura média de 35 °C fornecendo 300 g do extrato metanólico bruto (EMB), com rendimento de 20% em relação ao peso seco da planta

Deste extrato, uma alíquota de 100,0 g foi suspendida em 200 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3 v/v), resultando em uma solução hidroalcoólica, a qual foi particionada separadamente e consecutivamente com 4000 mL de hexano (Hex), 4000 mL de diclorometano (DCM), 4000 mL de acetato de etila (AcOEt) e 2000 mL de n-butanol (n-BuOH), em funil de separação.

As soluções obtidas nesta partição foram tratadas com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), submetidas à filtração simples e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura média de 35,0 °C, fornecendo 28,5 g da fase hexânica, 24,0 g da fase diclorometano, 18,0 g da fase acetato de etila e 21,3 g da fase n-butanol, (Esquema 2, pág. 40).

**Esquema 2** - Etapas envolvidas no processamento do material botânico

### 4.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

#### 4.3.1 Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos utilizados para o isolamento e purificação dos constituintes químicos das partes aéreas de *E. linarioides* foram a Cromatografia em Coluna (CC) e a Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).

As colunas cromatográficas foram realizadas em recipientes cilíndricos de vidro com vazão regulável, utilizando como fase estacionária sílica gel 60, 0,063 - 0,200 mm (Artigo 7734, Merck). Dessa forma, as amostras eram acondicionadas no topo da coluna e a eluição realizada com solventes comerciais destilados no próprio laboratório, a saber: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostra e de fase estacionária a serem utilizadas.

Todas as frações obtidas em CC foram monitoradas em CCDA. Para tanto, foram utilizadas cromatoplasas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Artigo 1.05554.0001, Merck) ou placas de vidro preparadas com uma suspensão de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Artigo 7749, Merck) em água destilada (1:2 m/v), distribuída sobre as placas de vidro por meio de um cursor tipo “*quick fit*”, na espessura de 0,25 e 1,0 mm, respectivamente, conforme técnica descrita por Matos (2009). Após o preparo das placas, as mesmas foram secas ao ar livre e ativadas a 100,0 °C em estufa durante cinco horas.

A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada por meio da exposição das mesmas à lâmpada de irradiação ultravioleta (UV) com os comprimentos de onda de 254 e 365 nm, em aparelho Tecnal (modelo TE-540), além da exposição em câmara saturada com vapores de iodo.

As frações semelhantes foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico observados em CCDA. Além disso, o critério de pureza adotado baseou-se na visualização de apenas uma mancha após revelação da placa, no ponto de fusão e, posteriormente, na análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C das referidas substâncias.

#### 4.3.1.1 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila

Uma alíquota de 2,5 g da fase acetato de etila foi submetida a CC utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60, 0,063 - 0,200 mm (Artigo 7734, Merck) e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias com grau crescente de polaridade. Neste fracionamento, foram coletadas 50 frações de 125 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotativo a temperatura média de 35 °C, (Tabela 2, pág. 42).

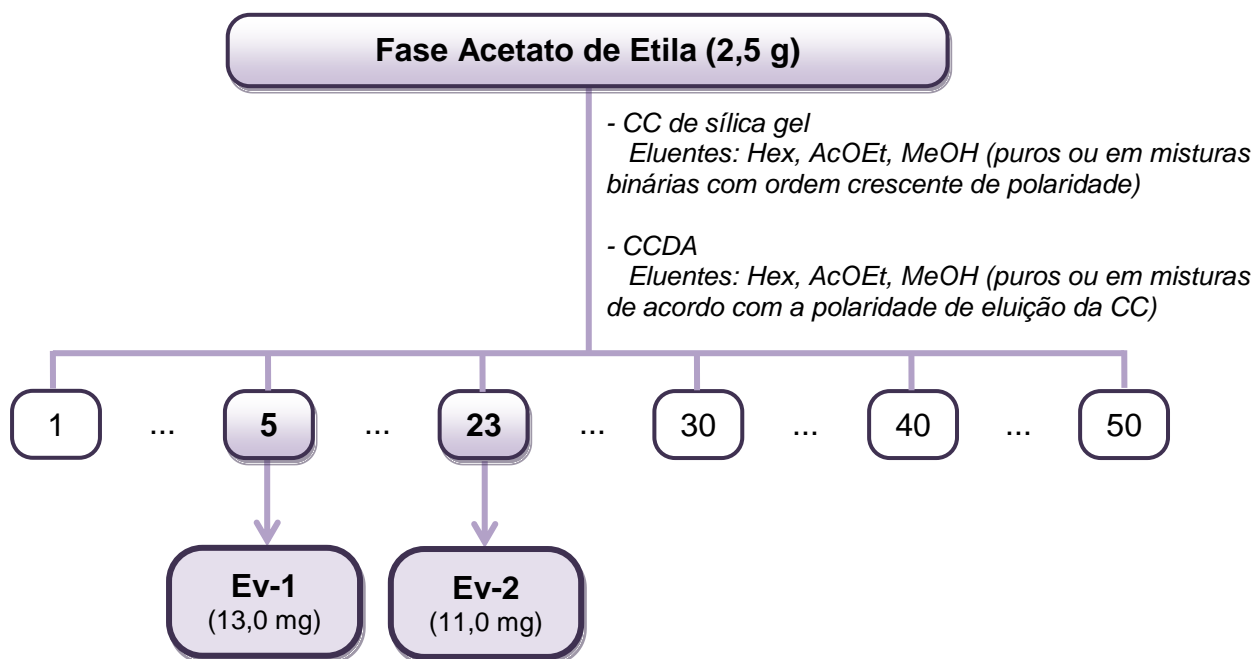
**Tabela 2** - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *E. linarioides* com suas respectivas frações obtidas

Eluentes (v/v)	Frações coletadas
Hexano:AcOEt (8:2)	1
Hexano:AcOEt (7:3)	2 e 3
Hexano:AcOEt (1:1)	4
AcOEt	5 a 13
AcOEt:MeOH (99:1)	14 a 25
AcOEt:MeOH (98:2)	26 e 27
AcOEt:MeOH (95:5)	28 a 31
AcOEt:MeOH (93:7)	32 a 35
AcOEt:MeOH (9:1)	36 a 40
AcOEt:MeOH (85:15)	41 a 44
AcOEt:MeOH (8:2)	45 a 47
AcOEt:MeOH (7:3)	48 a 50

As frações obtidas foram analisadas comparativamente por meio de CCDA com diferentes sistemas de eluição e posteriormente reunidas em 15 grupos, de acordo com seus perfis cromatográficos.

As frações 5 e 23 apresentaram-se como sólidos amorfos de coloração amarelo-alaranjada, sendo codificadas como Ev-1 (13,0 mg) e Ev-2 (11,0 mg), respectivamente, e encaminhadas para a análise espectroscópica. Para uma melhor visualização, as etapas envolvidas no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila encontram-se demonstradas no Esquema 3 (pág. 43)

**Esquema 3** - Etapas envolvidas no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *E. linarioides*



#### 4.3.1.2 Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano

Uma alíquota de 5,0 g da fase diclorometano foi submetida a CC utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60, 0,063 - 0,200 mm (Artigo 7734, Merck) e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias com grau crescente de polaridade. Neste fracionamento, foram coletadas 200 frações de 125 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotativo a temperatura média de 35°C, (Tabela 3, pág. 44).

As frações obtidas foram analisadas comparativamente por meio de CCDA com diferentes sistemas de eluição e posteriormente reunidas em 22 grupos de acordo com o perfil cromatográfico observado em análise à luz UV e exposição aos vapores de iodo.



**Tabela 3** - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *E. linarioides* com suas respectivas frações obtidas

Eluentes (v/v)	Frações coletadas	Grupos após CCDA
Hexano:AcOEt (9:1)	1 a 45	1-8; 9-11; 12-19
Hexano:AcOEt (8:2)	46 a 57	-
Hexano: AcOEt (75:25)	58 a 65	58-65
Hexano:AcOEt (7:3)	66 a 100	68-76; 78-83;
Hexano:AcOEt (6:4)	101 a 107	100-107
Hexano:AcOEt (1:1)	108 a 118	113-115; 116-118
Hexano:AcOEt (4:6)	119 a 130	119-121; <b>122-128</b>
Hexano:AcOEt (3:7)	131 a 140	130-135; 136-146
Hexano:AcOEt (2:8)	141 a 150	147-150
Hexano:AcOEt (1:9)	151 a 160	
AcOEt	161 a 167	160-166
AcOEt:MeOH (99:1)	168 a 170	167-171
AcOEt:MeOH (95:5)	171 a 185	174-175; 176-178;183-184
AcOEt:MeOH (9:1)	186 a 191	185-187; 190-194
AcOEt:MeOH (85:15)	192 a 194	
AcOEt:MeOH (8:2)	195 a 200	195-198

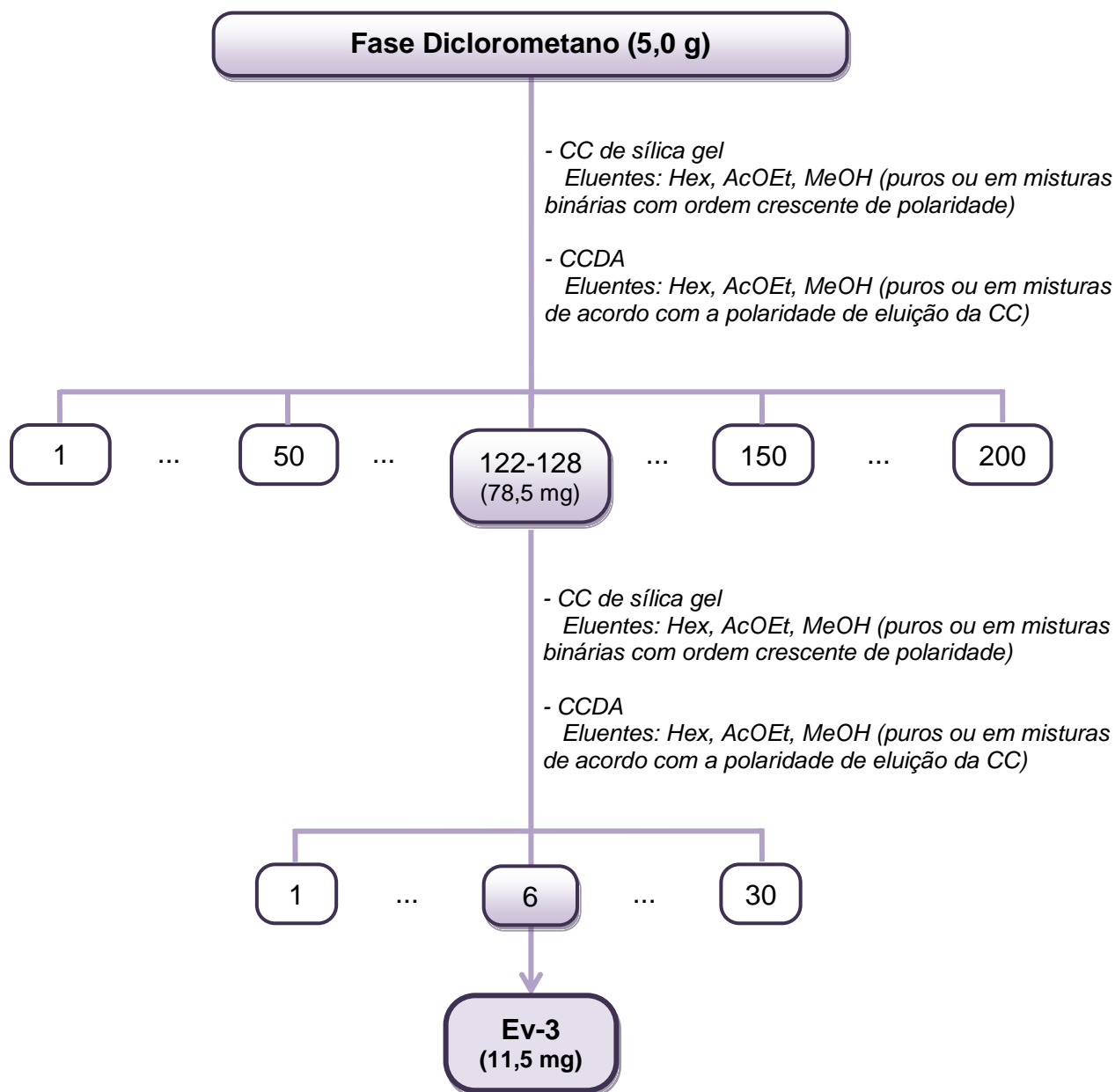
A fração 122-128 também foi submetida à CC em coluna preenchida com sílica gel 60, 0,063 - 0,200 mm (Artigo 7734, Merck) e eluída com hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias seguindo grau crescente de polaridade, obtendo-se 30 subfrações de 25 mL (Tabela 4, pág. 45)

A subfração 6 da fração122-128 apresentou-se como um sólido branco após a evaporação do solvente e a análise em CCDA revelou a presença de apenas uma mancha. Essa subfração foi codificada como Ev-3 (11,5 mg) e encaminhada para análise espectroscópica (Esquema 4, pág. 46).

**Tabela 4** - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fração 122-128 da fase diclorometano de *E. linarioides* com suas respectivas frações obtidas

Eluentes (v/v)	Frações coletadas
Hexano:AcOEt (6:4)	1 e 2
Hexano:AcOEt (1:1)	<b>3 a 9</b>
Hexano:AcOEt (4:6)	10 a 14
Hexano:AcOEt (3:7)	15 a 20
Hexano:AcOEt (2:8)	21
Hexano:AcOEt (1:9)	22 e 23
AcOEt	24 e 25
AcOEt:MeOH (99:1)	26
AcOEt:MeOH (95:5)	27
AcOEt:MeOH (9:1)	28
AcOEt:MeOH (85:15)	29
AcOEt:MeOH (8:2)	30

**Esquema 4** - Etapas envolvidas no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *E.linarioides*



## 4.4 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

### 4.4.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os dados espectrais na região do infravermelho foram obtidos em aparelho SHIMADZU, modelo IR-Prestige-21, utilizando-se cerca de 1,0 mg de amostra em pastilhas de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetros VARIAN, modelo Varian-NMR-System 500 MHz, operando a 500 MHz para hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz para carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ). Os solventes utilizados no preparo das amostras foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), todos da Cambridge Isotope Laboratories.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) expressas em Hz foram referenciados para RMN de  $^1\text{H}$  pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos seguintes solventes: clorofórmio ( $\delta_{\text{H}}$  7,24), metanol ( $\delta_{\text{H}}$  3,30) e piridina ( $\delta_{\text{H}}$  7,55). Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , estes mesmos parâmetros foram utilizados com: clorofórmio ( $\delta_{\text{C}}$  77,0), metanol ( $\delta_{\text{C}}$  49,00) e piridina ( $\delta_{\text{C}}$  135,5).

As multiplicidades dos sinais em RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as seguintes convenções: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *ddd* (duplo duplete dobrado), *t* (tripleto), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando-se a técnica de APT convencionando-se os sinais de carbonos não-hidrogenados (C) e metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) acima da linha base e os sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos ( $\text{CH}_3$ ) abaixo da referida linha.

### 4.4.3 Espectrometria de Massas

Para a obtenção dos espectros de massas foram utilizadas concentrações de 1ng/ $\mu\text{L}$  das amostras preparadas em solução aquosa de acetonitrila (MeCN) na

proporção de 1:1 (v/v) acidificada com 0,1% de ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) ou basificada com 0,1% de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas da Bruker Daltonics, modelo micrOTOF, com fonte ESI, utilizando os modos de detecção positivo e negativo. Os parâmetros de análise foram: end plate de -500 V, capilar a 3000 V, gás de dessolvatação a 180 °C com fluxo de 4 L/min, pressão do gás de nebulização de 0,4 Bar e gás nitrogênio, com aquisição de 50 a 1000 *m/z*.

#### **4.4.4 Determinação dos Pontos de fusão**

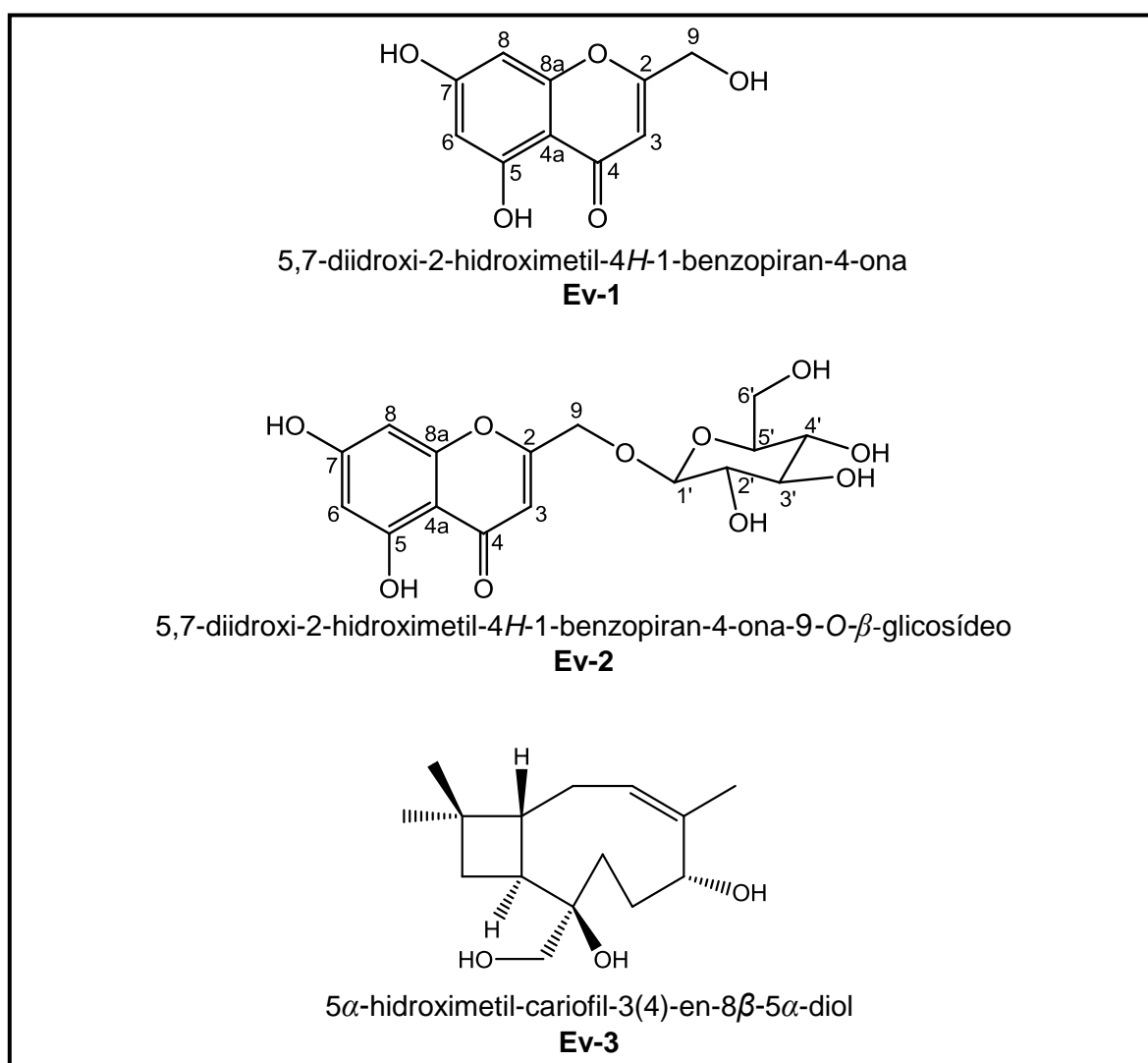
Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão Microquímica, modelo MQAPF-302, com temperatura variável de 0-350 °C.

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. resultou no isolamento de três substâncias, sendo duas inéditas na literatura: 5,7-diidroxi-2-hidroximetil-4*H*-1-benzopiran-4-ona-9-*O*- $\beta$ -glicosídeo (cnidimol C glicosilado) e 5 $\alpha$ -hidroximetil-cariofil-3(4)-en-8 $\beta$ -5 $\alpha$ -diol (linariofileno), além de uma conhecida, 5,7-diidroxi-2-hidroximetil-4*H*-1-benzopiran-4-ona (cnidimol C), apresentadas na figura abaixo. Na caracterização dessas substâncias foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de Infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais, além da Espectrometria de Massas e comparação com dados da literatura.

**Figura 13** - Estruturas químicas dos metabólitos secundários isolados das partes aéreas de *E. linarioides*

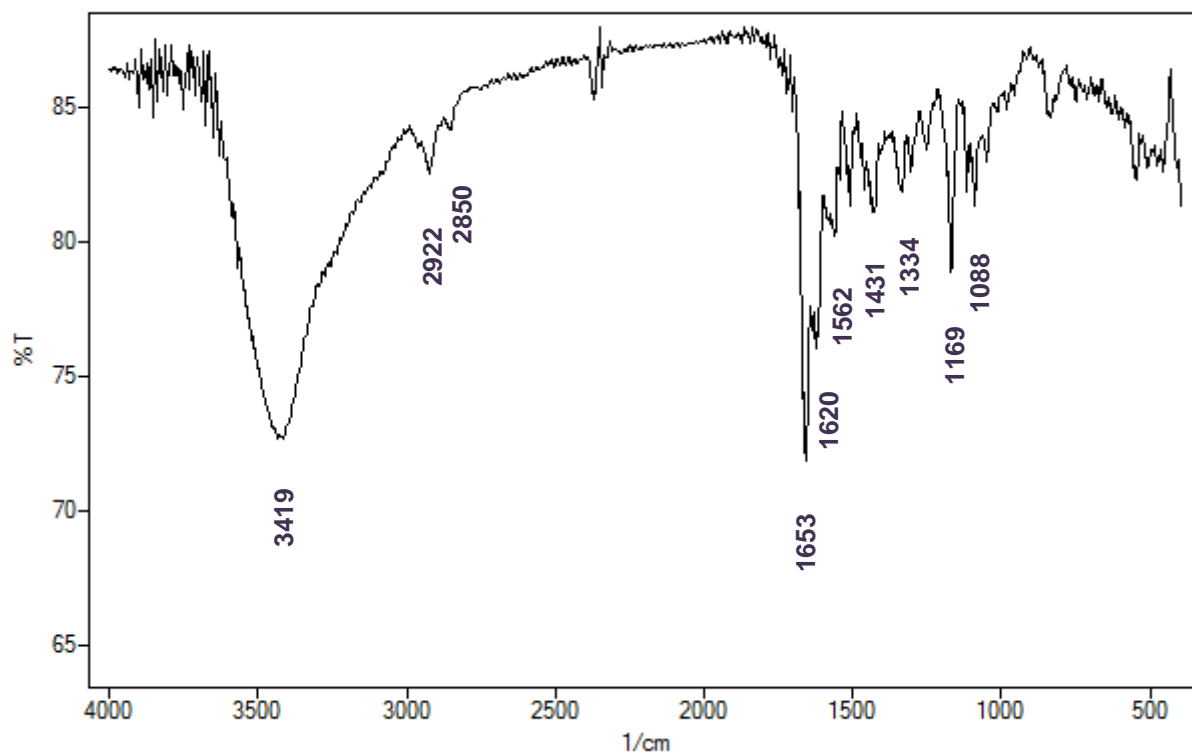


## 5.1 Determinação estrutural de Ev-1

A substância codificada como Ev-1 (13,0 mg) foi isolada na forma de um pó com coloração castanho-amarelada.

O espectro de IV obtido em pastilhas de KBr (Figura 14, pág. 51) mostrou uma banda larga e intensa em  $3419\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento O–H de fenóis em ligação de hidrogênio, e absorções de fraca intensidade em  $2922$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , referentes aos estiramentos C–H de carbonos  $sp^3$  ( $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ ). A presença de uma absorção intensa em  $1653\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento C=O, juntamente com a banda em  $1620\text{ cm}^{-1}$ , referente a estiramento C=C de alcenos conjugados, permitiu sugerir a existência de carbonila de cetona conjugada na molécula. No mesmo espectro, foi possível observar absorções entre  $1575$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , referentes a estiramento de ligações C=C aromáticas e na região de  $1440$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$ , condizentes com estiramentos C–O, tanto para fenóis quanto para éteres alquil-arílicos (PAVIA et al., 2010).

**Figura 14** - Espectro de Infravermelho (pastilhas de KBr) de Ev-1

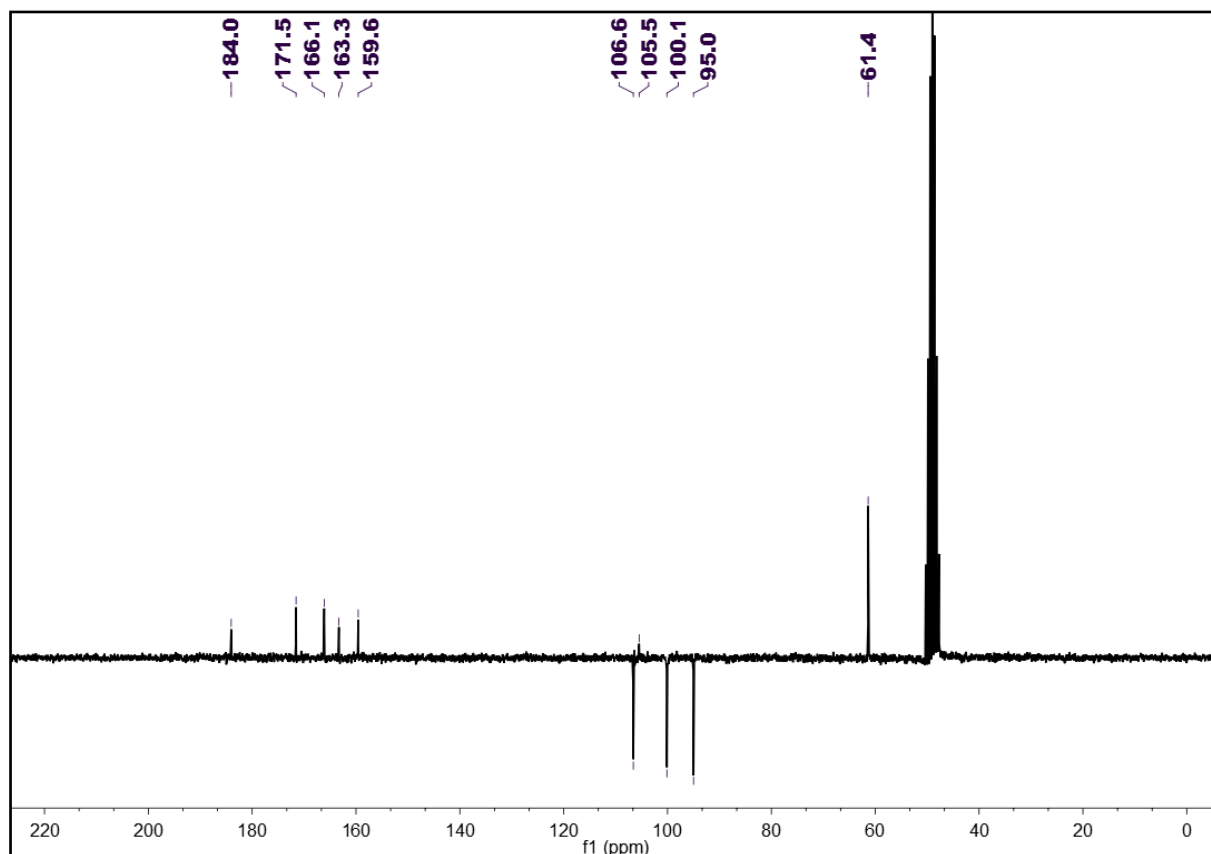


O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , obtido em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 125 MHz, utilizando a técnica APT (Figura 15, pág. 52), mostrou a presença de 10 sinais. Destes, seis foram



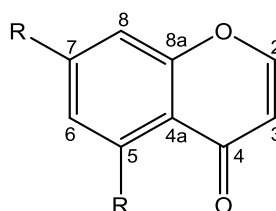
atribuídos a carbonos não-hidrogenados, três a carbonos metínicos e um a carbono metilênico.

**Figura 15** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de Ev-1



Entre os carbonos não hidrogenados, o deslocamento em  $\delta_{\text{C}}$  184,0 foi compatível com carbonila conjugada. Além disso, os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  166,1; 163,3; 159,6; 105,5; 100,1 e 95,0 foram sugestivos de núcleo benzo- $\gamma$ -pirano de cromona 5,7-dissubstituída (BABA et al., 1992; SUN et al., 2012), (Figura 16, pág. 52).

**Figura 16** - Cromona 5,7-dissubstituída



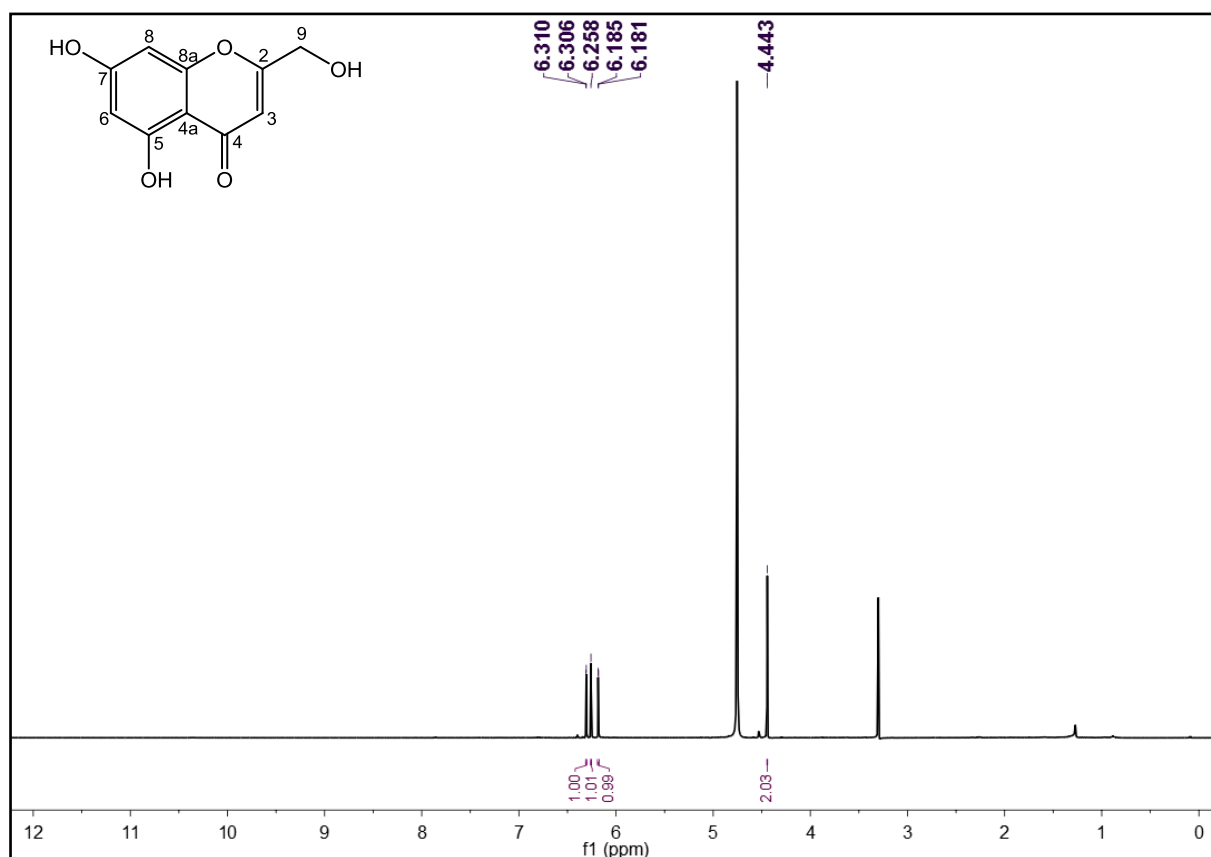
Diante disso, as evidências apontadas no espectro de IV sustentaram a possibilidade desses substituintes serem hidroxilas, o que foi confirmado pelos

dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para C-5 e C-7, observados em  $\delta_{\text{C}}$  166,1 e 163,3, respectivamente (SUN et al., 2012).

Entre os carbonos metínicos, os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  100,1 e 95,0 foram característicos de carbonos aromáticos e apenas o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  106,6 mostrou-se compatível com carbono olefínico (PAVIA et al., 2010), o que levou a sugerir a presença de substituinte em C-2 ou C-3.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , obtido em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz (Figura 17, pág. 53), exibiu deslocamentos químicos que corroboraram com a presença do núcleo de cromonas.

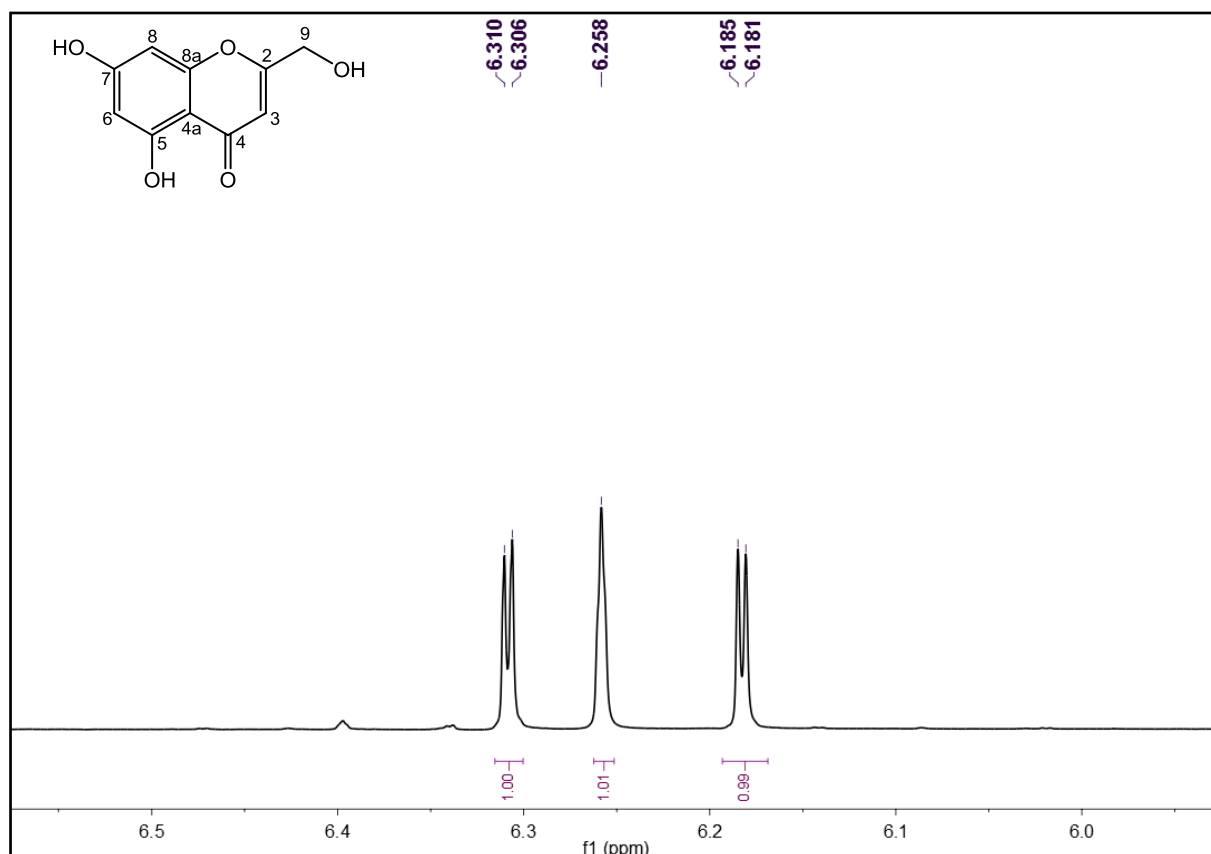
**Figura 17** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Ev-1



A expansão desse espectro (Figura 18, pág. 54) destaca a presença de um par de dupletos acoplando *meta* em  $\delta_{\text{H}}$  6,310 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,185 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz), corroborando com a proposta de cromona 5,7-disubstituída. Além disso, observou-se um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,258 compatível com hidrogênio olefínico de carbono metínico (BABA et al., 1992; SUN et al., 2012), o que reforçou a presença

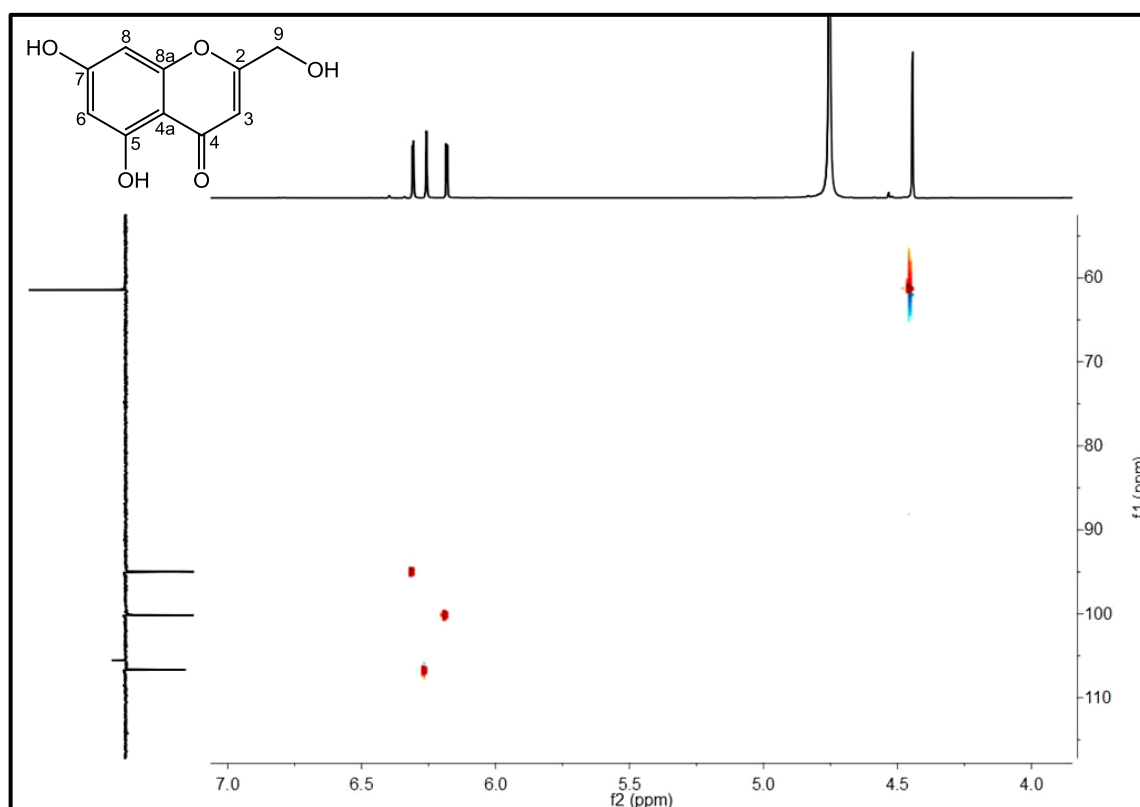
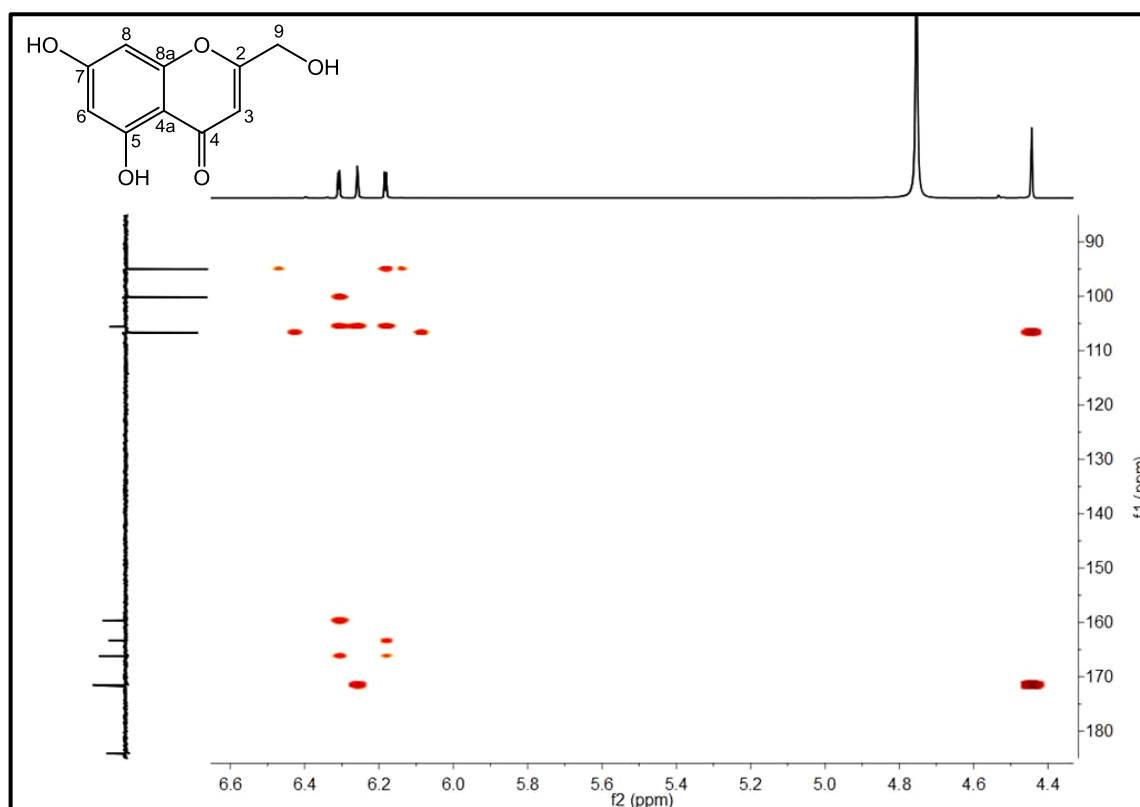
de carbonila de cetona conjugada e confirmou a proposta de substituição na posição 2 ou 3. A presença do duplete para dois hidrogênios em  $\delta_H$  4,443 ( $J = 1,0$  Hz) fez sugerir que o substituinte tratava-se de um grupo metilênico ligado à hidroxila.

**Figura 18** - Expansão do espectro de RMN de  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz) de Ev-1 na região de 6,5 a 6,0 ppm

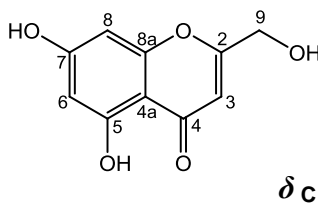


Na expansão do espectro de correlação heteronuclear direta HMQC (Figura 19, pág. 55) foram visualizadas as correlações entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos, confirmando as atribuições feitas a C-3 ( $\delta_C$  106,6), C-6 ( $\delta_C$  100,1) e C-8 ( $\delta_C$  95,0) do núcleo benzo- $\gamma$ -pirano da cromona.

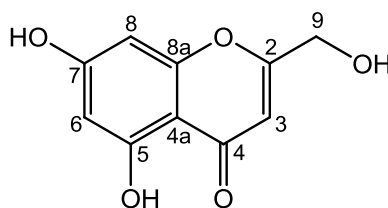
A expansão do espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 20, pág. 55) confirmou as atribuições feitas para o núcleo de cromona 5,7-dissubstituída ao mostrar as correlações do hidrogênio H-8 a  $^3J$  com C-6 e a  $^2J$  com C-8a, bem como do hidrogênio H-6 a  $^3J$  com C-8 e a  $^2J$  com C-5 (Tabela 5, pág. 56). Também foi observada uma correlação de H-3 ( $\delta_H$  6,258) com o carbono metilênico em  $\delta_C$  61,4, confirmando a localização do substituinte hidroximetil em C-2.

**Figura 19** - Expansão do espectro HMQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-1**Figura 20** - Expansão do espectro HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-1

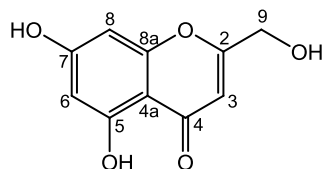
**Tabela 5** - Correlações heteronucleares observadas por HMBC para Ev-1

$\delta_H$		
	$(^3J)$	$(^2J)$
6,258 (H-3)	61,4 (C-9) 105,5 (C-4a)	171,5 (C-2)
6,185 e 6,181 (H-6)	95,0 (C-8) 105,5 (C-4a)	166,1 (C-7) 163,3 (C-5)
6,310 e 6,306 (H-8)	100,1 (C-6) 105,5 (C-4a)	166,1 (C-7) 159,6 (C-8a)
4,443 (H-9)	106,6 (C-3)	171,5 (C-2)

Dessa forma, após a análise dos dados espectrais e comparação com a literatura (Tabela 6, pág. 57), foi possível determinar a estrutura para Ev-1 como sendo a 5,7-di-hidroxi-2-hidroximetil-4*H*-1-benzopiran-4-ona, conhecida como cnidimol C, isolada anteriormente na espécie *Cnidium monnieri* (BABA et al., 1992).

**Figura 21** - Estrutura química do cnidimol C

**Tabela 6** - Deslocamentos químicos verificados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz) de Ev-1 e comparação com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 e 75 MHz) da literatura (BABA et al., 1992)



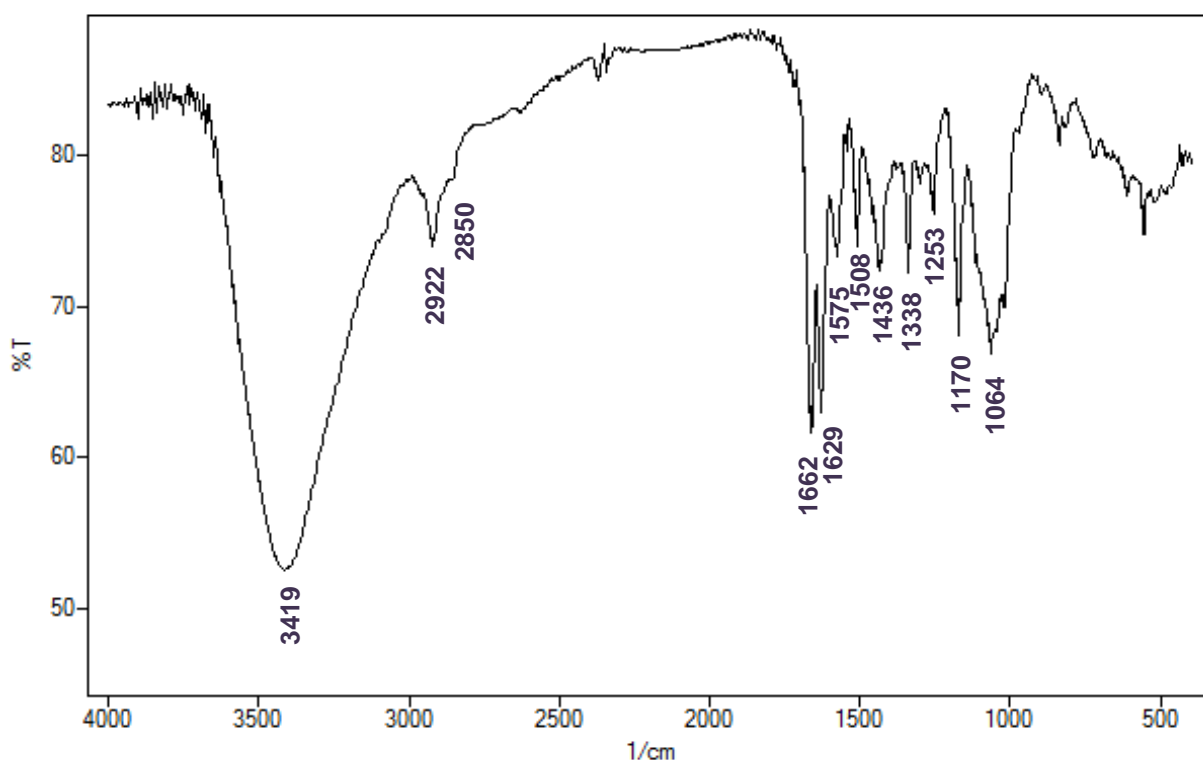
Ev-1			Cnidimol C	
(CD <sub>3</sub> OD)			(CDCl <sub>3</sub> )	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	171,5	--	171,0	--
3	106,6	6,258 (s)	105,7	6,23 (s)
4	184,0	--	182,2	--
4a	105,5	--	104,1	--
5	163,3	--	162,0	--
6	100,1	6,185 e 6,180 (d, J = 2,0 Hz)	99,1	6,19 (d, J = 2,0 Hz)
7	166,1	--	164,8	--
8	95,0	6,310 e 6,306 (d, J = 2,0 Hz)	94,0	6,33 (d, J = 2,0 Hz)
8a	159,6	--	157,9	--
9	61,4	4,443 (d, J = 1,0 Hz)	60,0	4,39 (d, J = 6,1 Hz)
OH				
OH-5	--	ND	--	12,78 (s)
OH-7	--	ND	--	10,84 (s)
OH-9	--	ND	--	5,80 (t)

## 5.2 Determinação estrutural de Ev-2

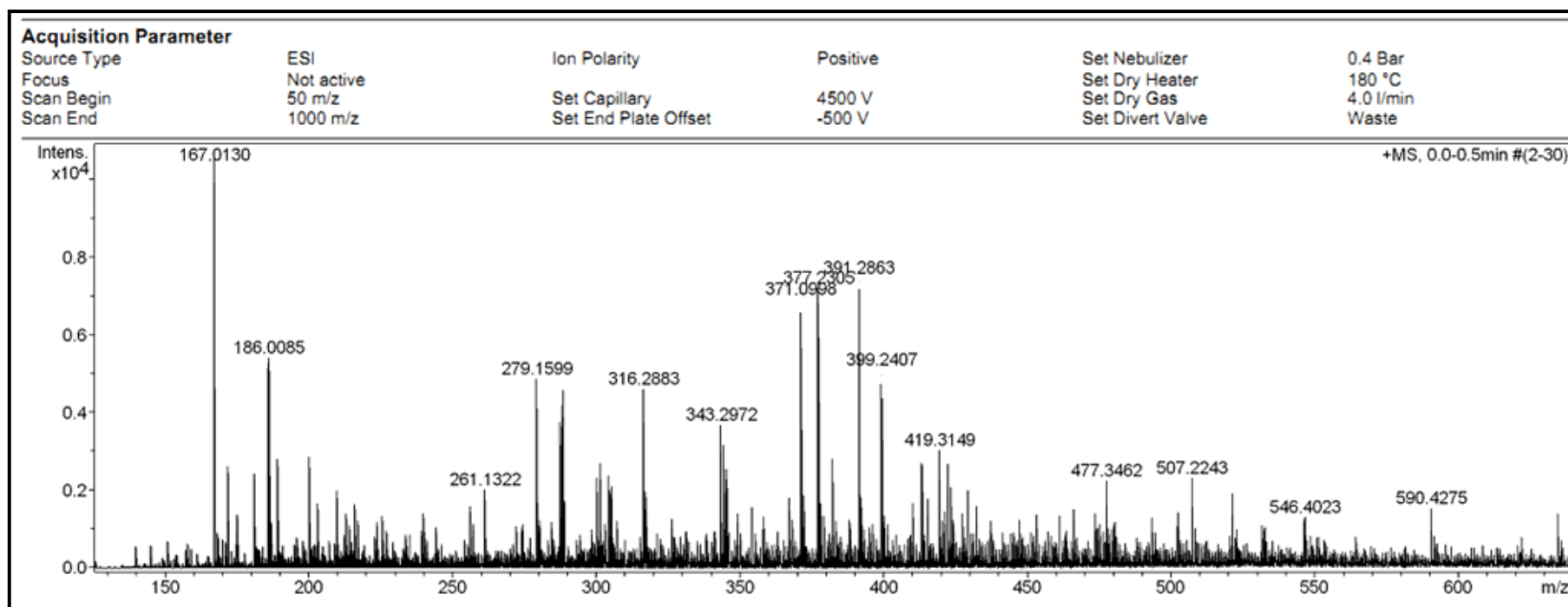
A substância codificada como Ev-2 (11,0 mg) apresentou-se como um pó de coloração amarelada, com ponto de fusão entre 133 e 135 °C.

O espectro de IV obtido em pastilhas de KBr (Figura 22, pág. 58) apresentou-se bastante semelhante ao da substância codificada como Ev-1, com banda larga de estiramento de O–H de fenóis em  $3419\text{ cm}^{-1}$  e bandas fracas de estiramentos C–H de carbonos  $\text{sp}^3$  em  $2922$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ . Tal espectro diferiu basicamente na região entre  $1440$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ , onde foi possível verificar, além das absorções compatíveis com estiramento C–O de fenóis, a presença de bandas de média intensidade sugestivas de estiramento C–O de acetais e cetais (PAVIA et al., 2010).

**Figura 22** - Espectro de Infravermelho (pastilhas de KBr) de Ev-2



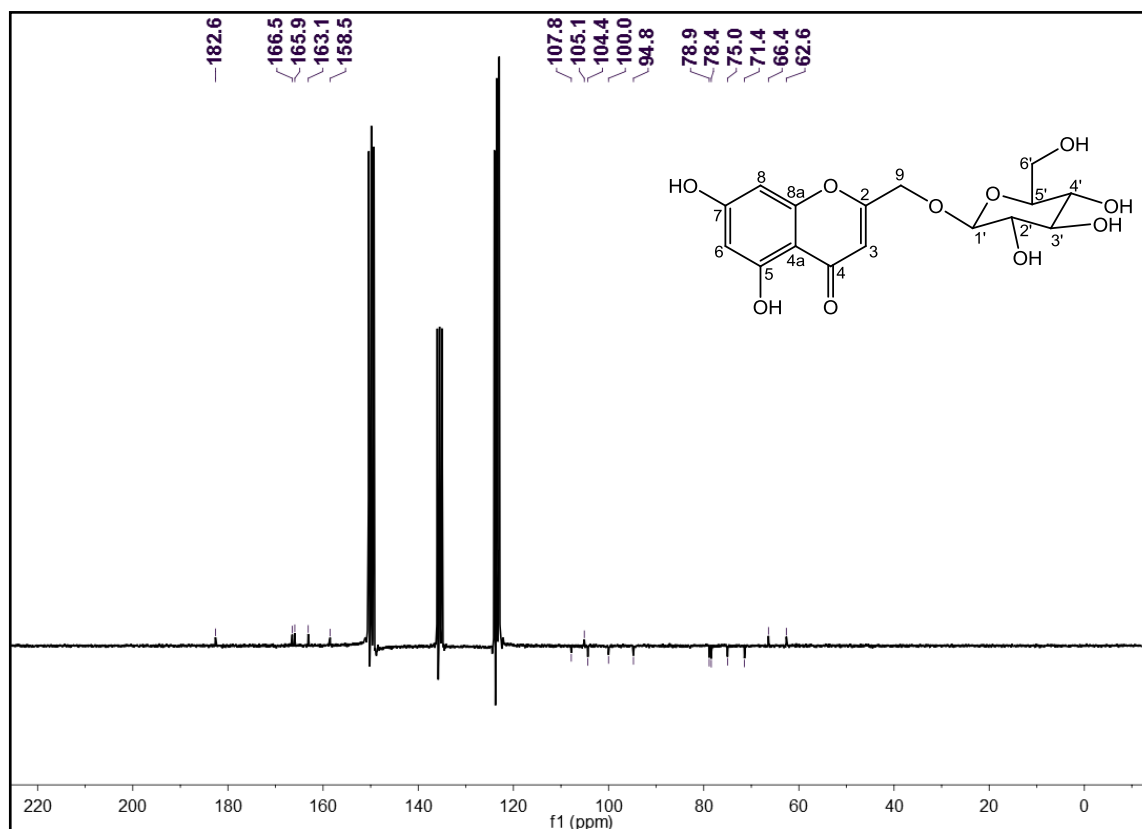
O espectro de massas de alta resolução obtido pela técnica de ionização por *eletrospray* no modo positivo (Figura 23, pág. 59) mostrou o pico do íon molecular em  $m/z\ 371,0998\ [\text{M}+\text{H}]^+$ , compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ .

**Figura 23** - Espectro de Massas (ESI<sup>+</sup>) de Ev-2



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Ev-2, obtido em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  a 125 MHz, utilizando a técnica APT (Figura 24, pág. 60), foi verificada a presença de 16 sinais, dos quais seis foram atribuídos a carbonos não-hidrogenados, oito a carbonos metínicos e dois a carbonos metilênicos.

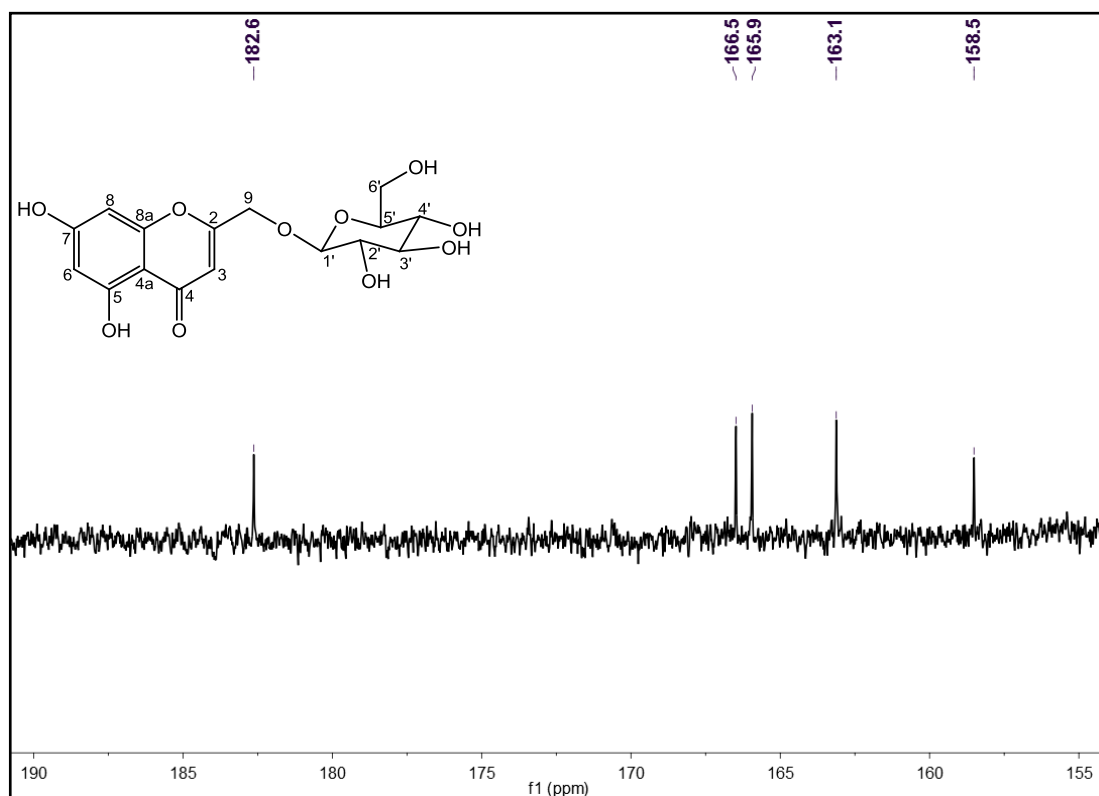
**Figura 24** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Ev-2



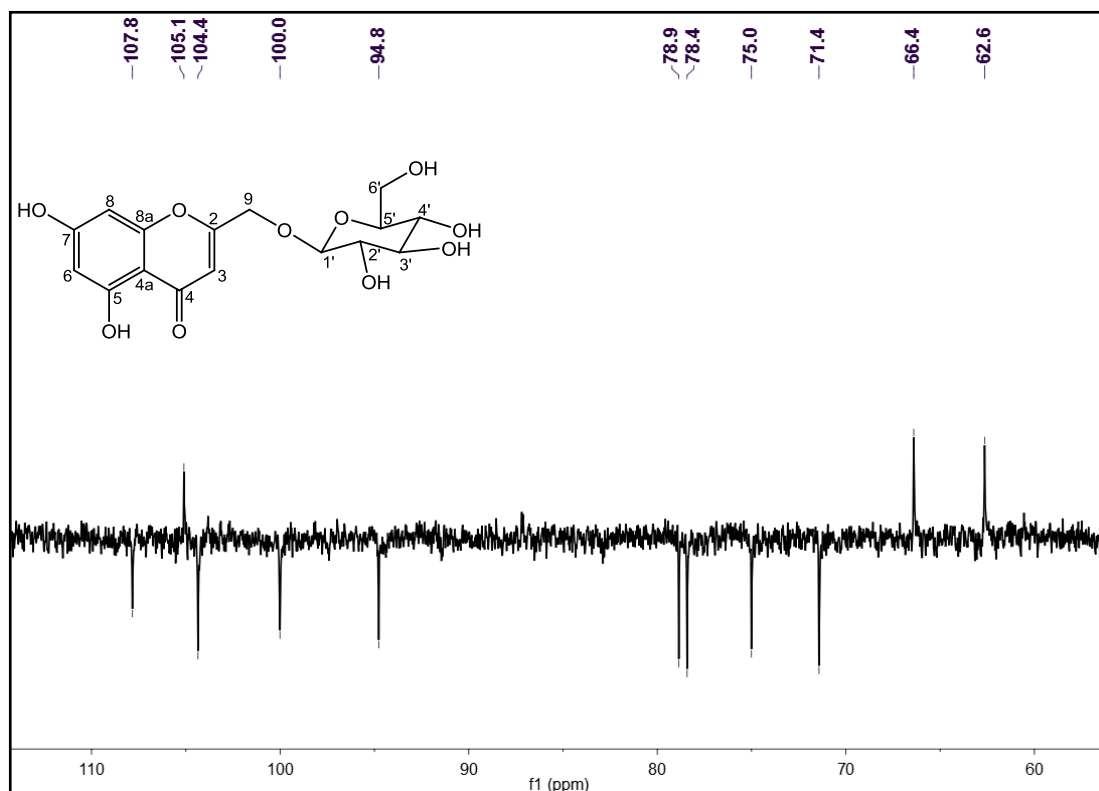
De modo semelhante a Ev-1, os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  182,6; 166,5; 163,1; 158,5; 105,1; 100,0 e 94,8 foram sugestivos de núcleo benzo- $\gamma$ -pirano de cromona 5,7-dissubstituída (Figuras 25 e 26, pág. 61), sendo os sinais para C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  166,5) e C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  163,1) indicativos de que estes sustentavam hidroxilas (SUN et al., 2012). Além disso, o deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  107,8 também se mostrou compatível com um carbono olefínico metínico (PAVIA et al., 2010), levando a sugerir a presença de substituinte em C-2 ou C-3.

Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  104,4; 75,0; 78,9; 71,4. 78,4 e 62,6 (Figura 25, pág. 61) indicaram a presença de uma unidade osídica na molécula. Sendo o sinal em 62,64 referente a carbono metilênico oxigenado, o que confirmou que a unidade osídica tratava-se da glicose.

**Figura 25** - Expansão do espectro de  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Ev-2 na região de 190 a 155 ppm

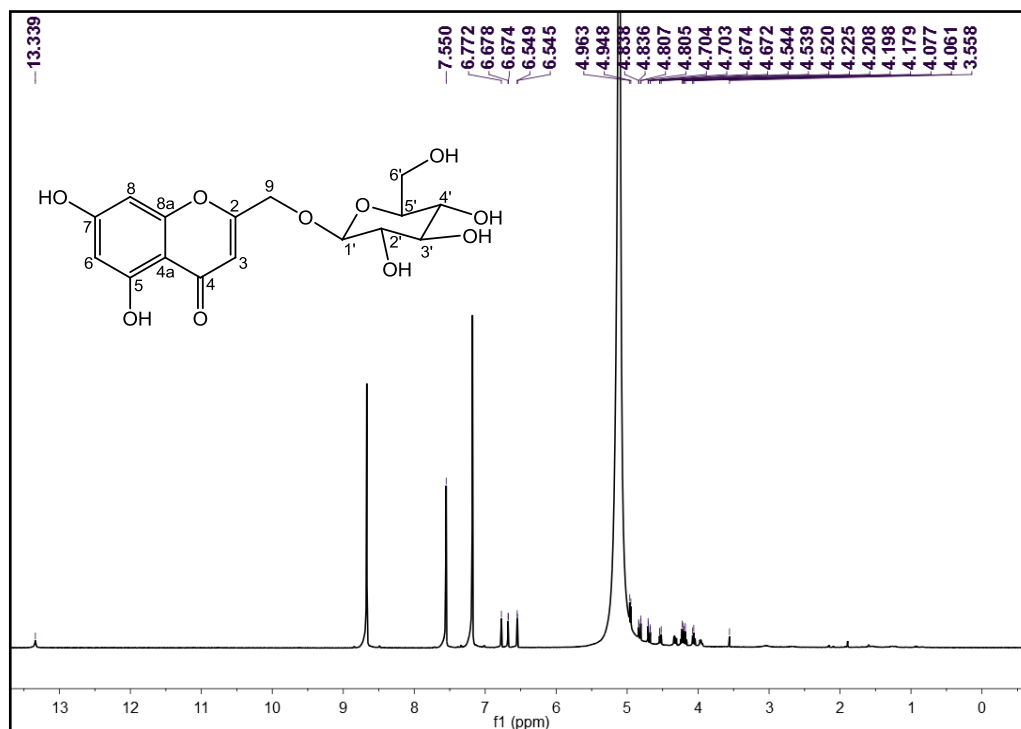


**Figura 26** - Expansão do espectro de  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Ev-2 na região de 110 a 60 ppm



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , obtido em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  a 500 MHz (Figura 27, pág. 62), também exibiu deslocamentos químicos característicos do núcleo benzo- $\gamma$ -pirano de cromonas.

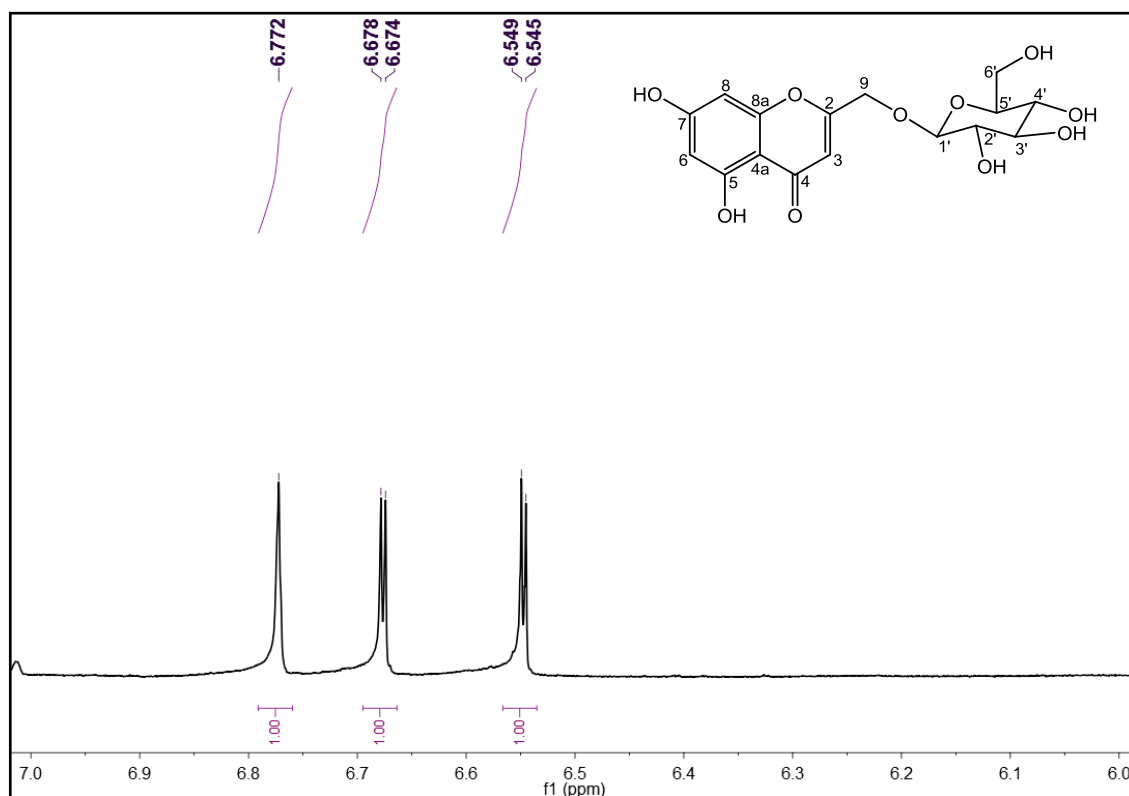
**Figura 27** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2



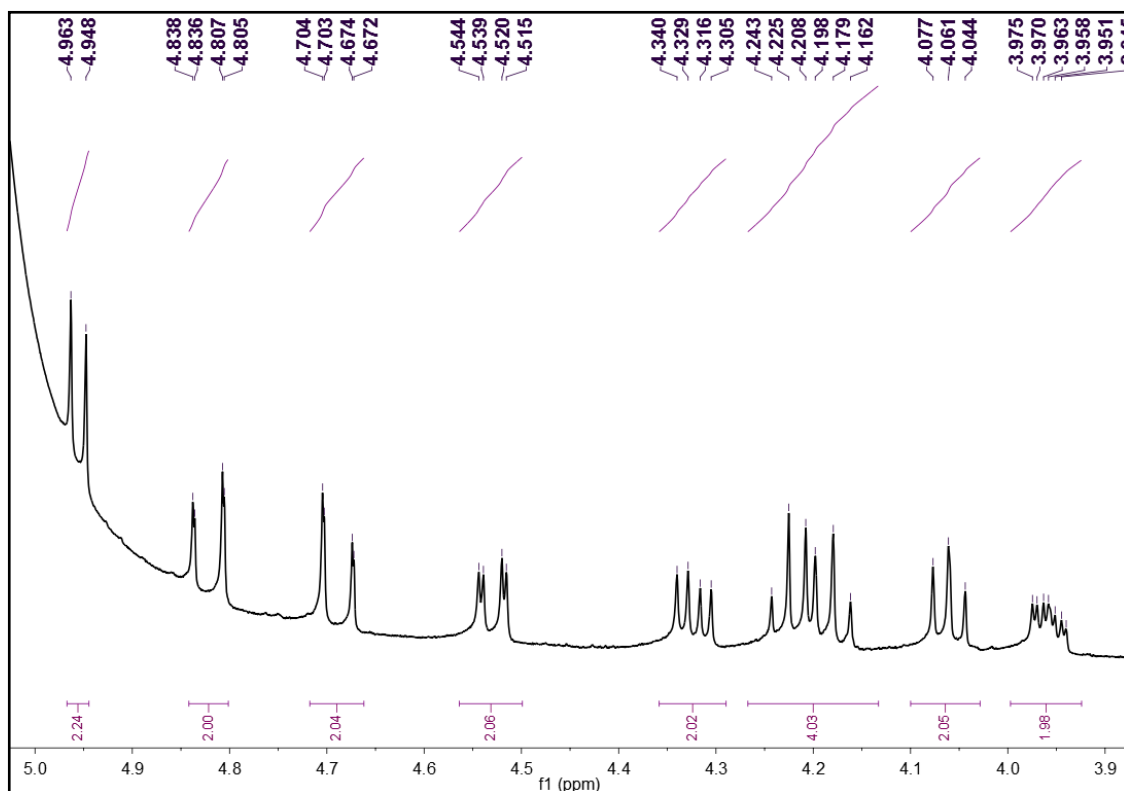
Semelhantemente a Ev-1, foi observada a presença de um par de dupletos acoplando *meta* em  $\delta_{\text{H}}$  6,678 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,549 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz), além do simpleto compatível com hidrogênio olefínico de carbono metínico em  $\delta_{\text{H}}$  6,26 (Figura 28, pág. 63). Por outro lado, verificou-se a presença do deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  13,34, característico de hidroxila quelada. Além disso, a presença de dois duplos dupletos com integral para um hidrogênio cada em  $\delta_{\text{H}}$  4,8 e 4,7, apresentando acoplamentos alílico e geminal, fez sugerir que o substituinte na posição 2 ou 3 tratava-se de um grupo metilênico oxigenado, no qual estaria inserida a unidade osídica, o que foi corroborado pelo conjunto de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  5,000 - 3,900, onde se destaca o deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  4,963, atribuído ao hidrogênio anomérico (Figura 29, pág. 63).

A fim de definir a configuração da unidade osídica, observou-se o valor da constante de acoplamento para o hidrogênio do carbono anomérico do açúcar, que foi de  $J = 7,5$  Hz, compatível com uma stereoquímica  $\beta$ -D-glicose (SILVA et al., 2005).

**Figura 28** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2 na região de 7,0 a 6,0 ppm

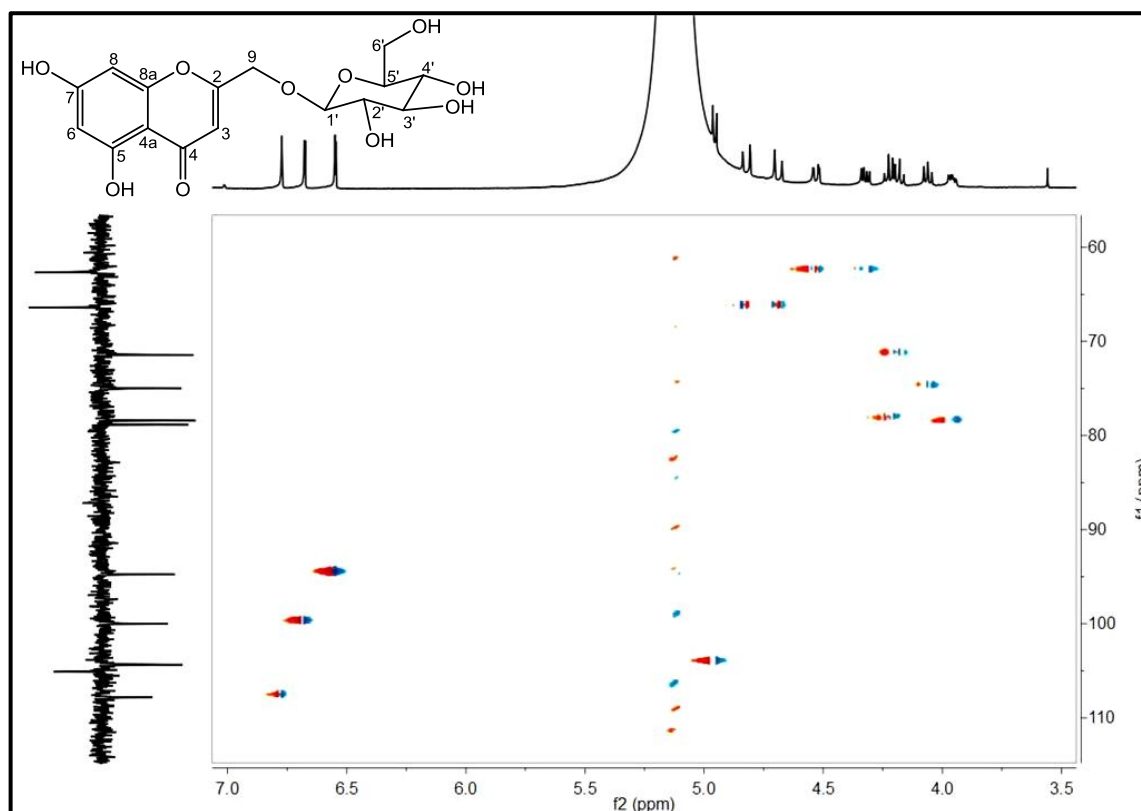


**Figura 29** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Ev-2 na região de 5,0 a 3,9 ppm



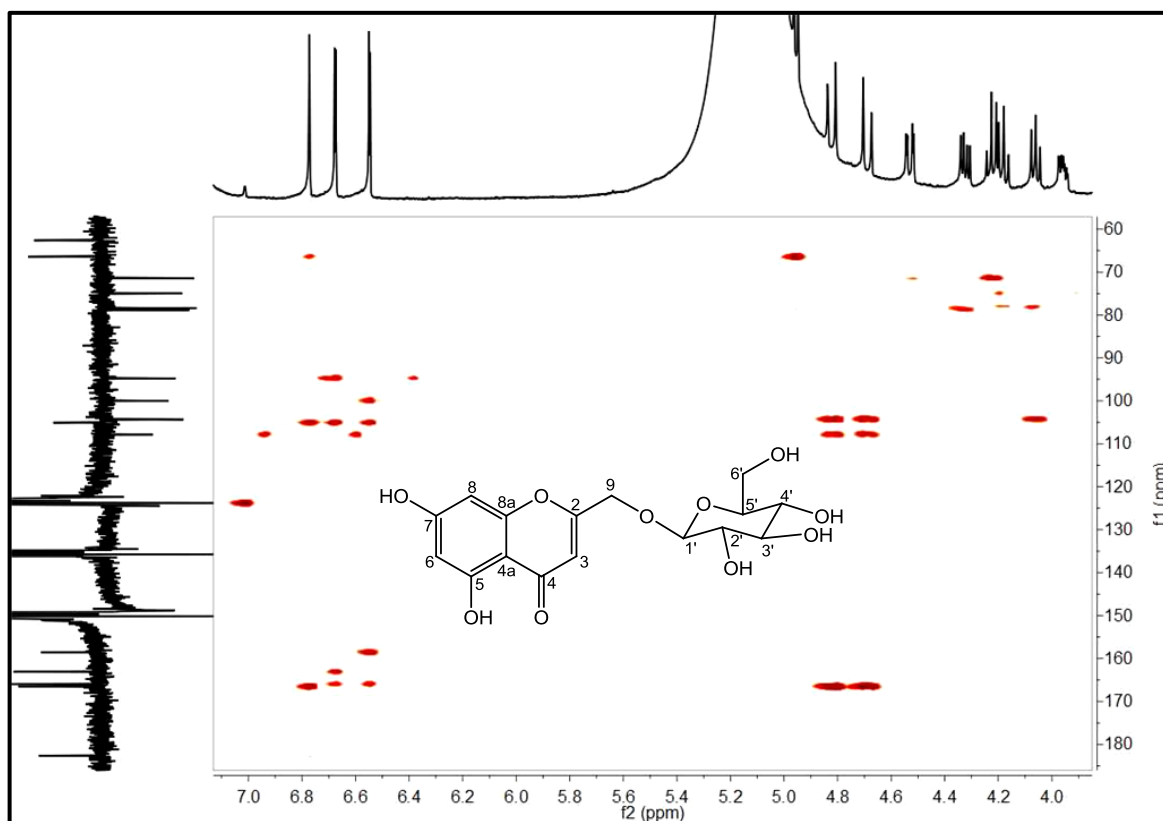
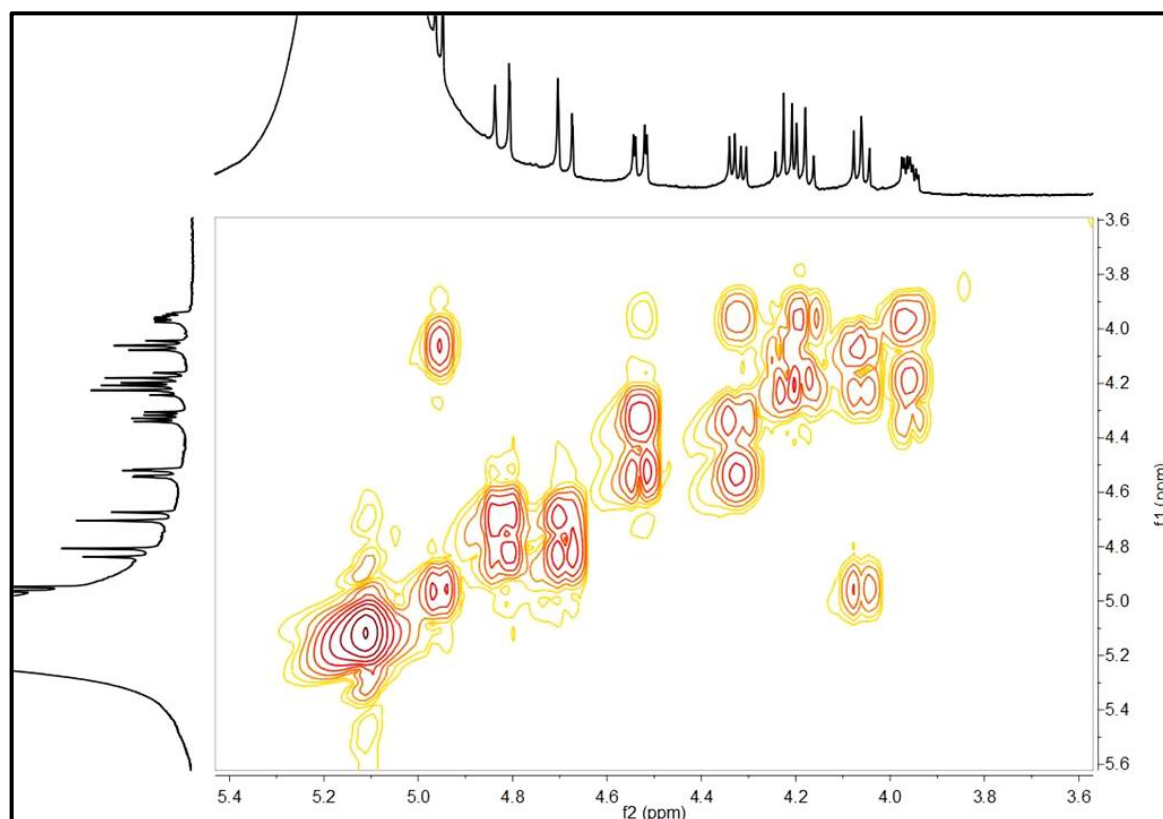
A expansão do espectro de correlação heteronuclear direta, HMQC (Figura 30, pág. 64), permitiu assinalar o hidrogênio e o carbono anomérico ao mostrar correlações entre os deslocamentos em  $\delta_H$  4,963 e  $\delta_C$  104,4. Além disso, confirmou as atribuições feitas aos outros hidrogênios e carbonos da unidade osídica, bem como aos do núcleo benzo- $\gamma$ -pirano de cromona.

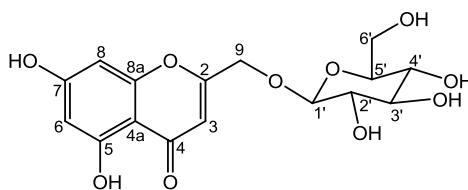
**Figura 30** - Expansão do espectro HMQC ( $C_5D_5N$ , 500 e 125 MHz) de Ev-2



Na análise da expansão do espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 31, pág. 65), verificou-se a correlação de H-3 ( $\delta_H$  6,772) a  $^3J$  com o C-9 em  $\delta_C$  66,4, confirmando a localização de carbono oximetilênico em C-2. Ainda nesse espectro, a correlação do hidrogênio anomérico ( $\delta_H$  4,963) a  $^3J$  com o C-9 ( $\delta_C$  66,4), confirmou a inserção do açúcar neste carbono, visto o efeito de desproteção observado para o mesmo. As demais correlações encontram-se descritas na Tabela 8, pág. 66.

No espectro de correlação homonuclear COSY (Figura 32, pág. 65), observaram-se correlações entre  $\delta_H$  4,838 (H-9a) e  $\delta_H$  4,704 (H-9b), bem como entre  $\delta_H$  4,544 (H-6'a) e  $\delta_H$  4,340 (H-6'b), confirmando as atribuições realizadas para estes hidrogênios.

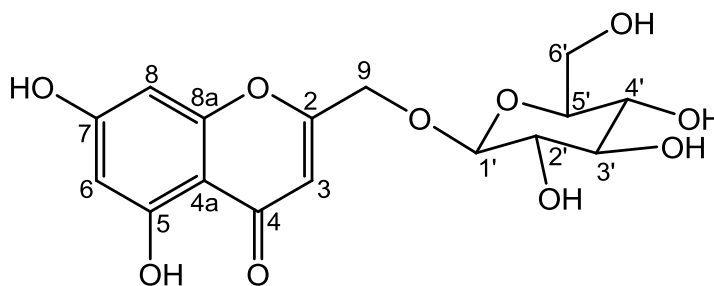
**Figura 31** - Expansão do espectro HMBC ( $C_5D_5N$ , 500 e 125 MHz) de Ev-2**Figura 32** - Expansão do espectro COSY ( $C_5D_5N$ , 500 MHz) de Ev-2

**Tabela 7** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de Ev-2 e correlações obtidas em HMQC e HMBC, registrados em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz)

	HMQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	( $^2J$ )	( $^3J$ )
<b>C</b>				
2	166,5	----	----	----
4	182,6	----	----	----
5	163,1	----	----	----
7	165,9	----	----	----
4 <sup>a</sup>	105,1	----	----	----
8 <sup>a</sup>	158,5	----	----	----
<b>CH</b>				
3	107,8	6,772 (s)	C-2	C-4a/C-9
6	100,0	6,549 e 6,545 (d, $J = 2,0$ )	C-5/C-7	C-4a/C-8
8	94,8	6,678 e 6,674 (d, $J = 2,0$ )	C-7/C-8a	C-4a/C-6
<b>CH<sub>2</sub></b>				
9	66,4	4,838 (dd, $J = 15,5; 0,5$ ) 4,704 (dd, $J = 15,5; 1,0$ )	C-2	C-3/C-1'
<b>Gli</b>				
1'	104,4	4,963 (d, $J = 7,5$ )		
2'	75,0	4,061 (t)	C-1'	
3'	78,9	3,975 – 3,951 (m)		
4'	71,4	4,243 – 4,162 (m)		
5'	78,4	4,243 – 4,162 (m)		
6'	62,6	4,544 (dd, $J = 12,0; 2,5$ ) 4,340 (dd, $J = 12,0; 5,5$ )	C-5'	

Dessa forma, após a análise dos dados espectrais e comparação da estrutura proposta com Ev-1 (cnidimol C), ficou estabelecido que Ev-2 tratava-se de uma nova cromona, a 5,7-diidroxi-4*H*-1-benzopirano-4-ona-2-hidroximetil-*O*- $\beta$ -*D*-glicosídeo, a qual foi atribuído o nome de cnidimol C glicosilado (Figura 33, pág. 67).

**Figura 33** - Estrutura química do cnidimol C glicosilado



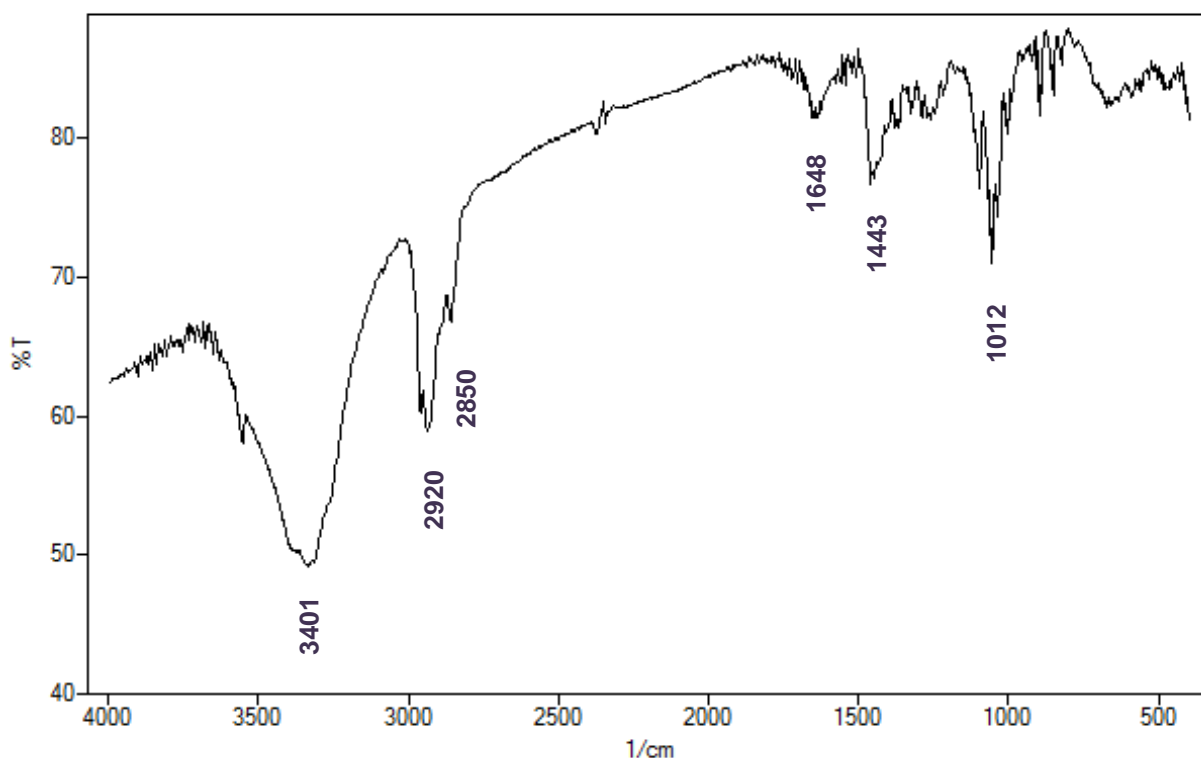


### 5.3 Determinação estrutural de Ev-3

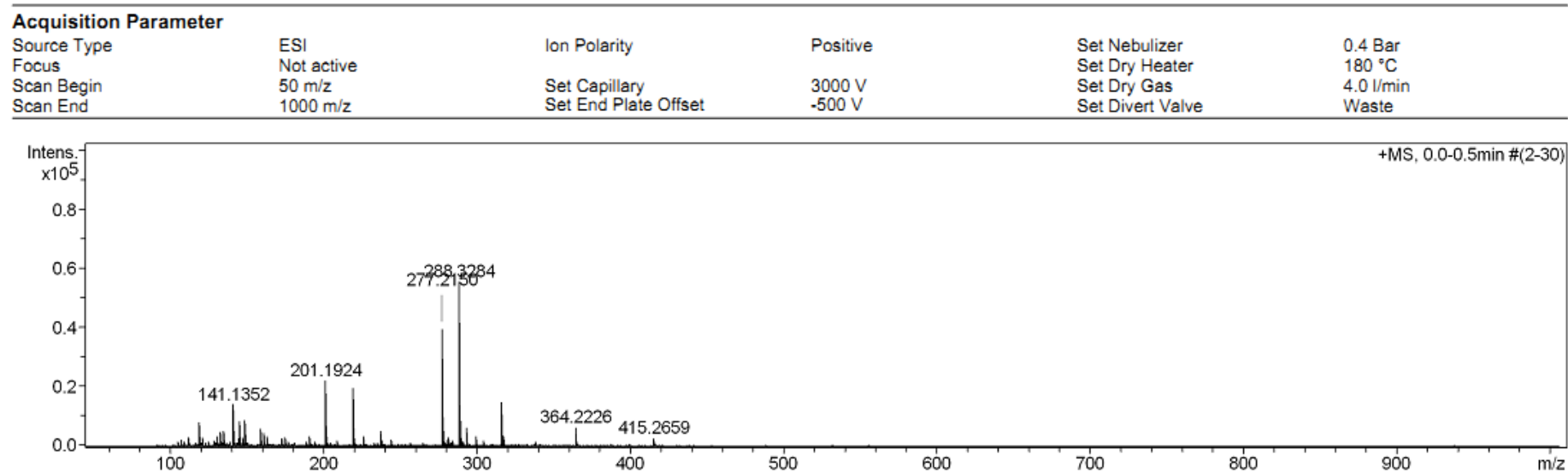
A substância codificada como Ev-3 (11,5 mg) foi isolada na forma de um pó branco apresentando ponto de fusão entre 123 a 126° C.

O espectro de IV obtido em pastilhas de KBr (Figura 34, pág. 68) apresentou uma banda larga e intensa em 3401  $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento O–H, além de absorções em 2920 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , referentes aos estiramento C–H de carbonos  $\text{sp}^3$ . A presença de uma banda fraca em 1648  $\text{cm}^{-1}$  mostrou-se compatível com estiramento C=C de alcenos e as bandas na região entre 1440 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ , com estiramentos C–O (PAVIA et al., 2010).

**Figura 34** - Espectro de Infravermelho de Ev-3 (pastilhas de KBr)



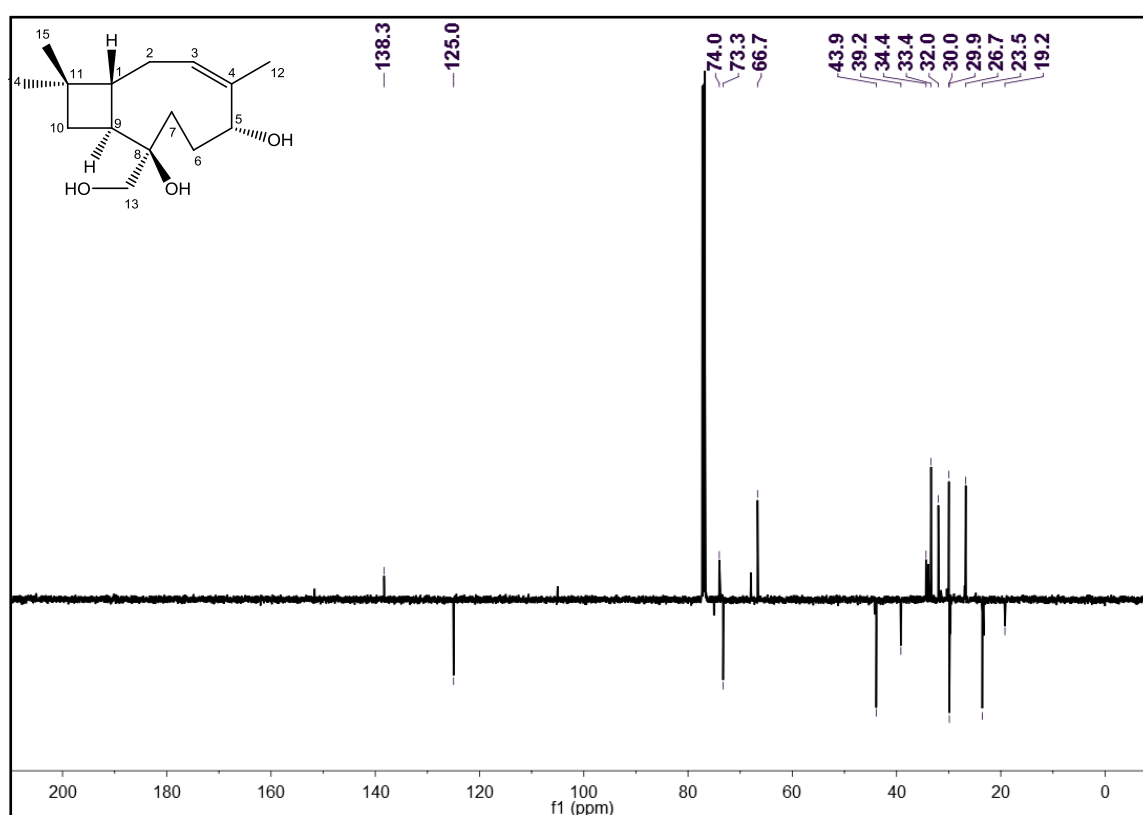
O espectro de massas obtido em alta resolução pela técnica de ionização por *eletrospray* no modo positivo (Figura 35, pág. 69) evidenciou o íon em  $m/z$  277,2150  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  sendo, portanto, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ .

**Figura 35** - Espectro de massas (ESI<sup>+</sup>) de Ev-3

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Ev-3, obtido em  $\text{CDCl}_3$  a 125 MHz, utilizando a técnica APT (Figura 36, pág. 70) evidenciou a presença de 15 sinais majoritários. Destes, três foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, quatro a carbonos metínicos, cinco a carbonos metilênicos e três a carbonos metílicos.

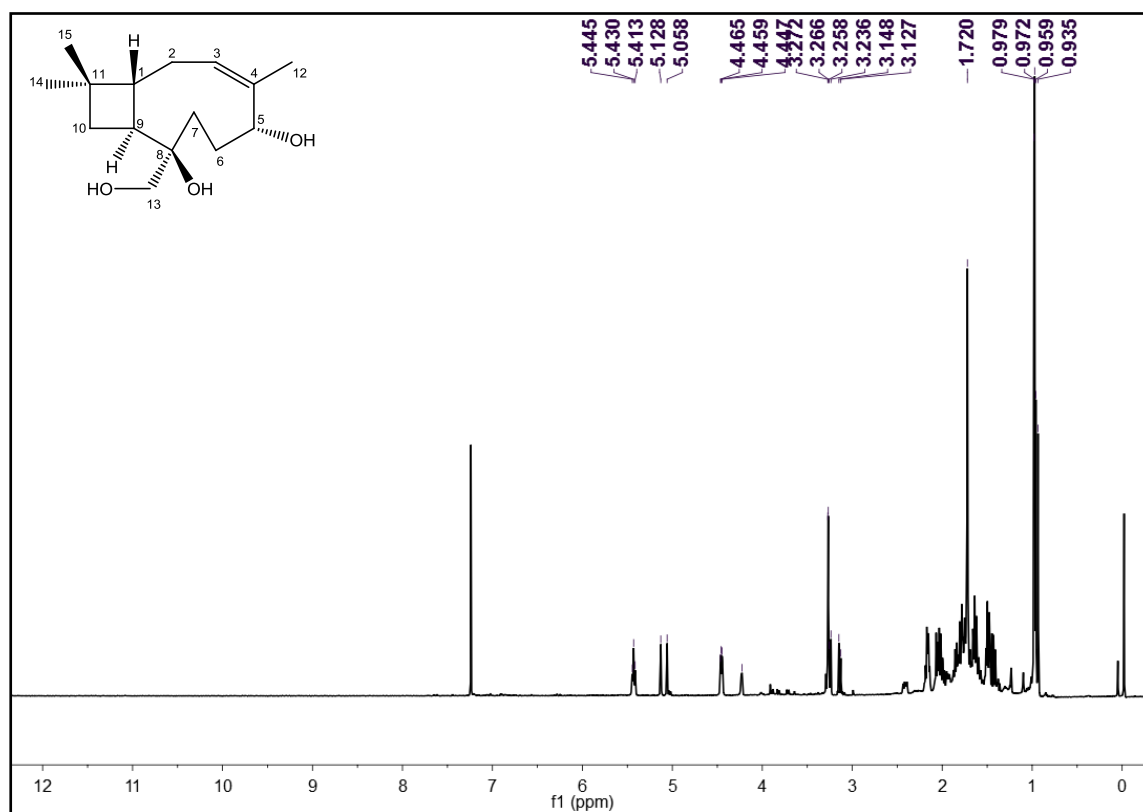
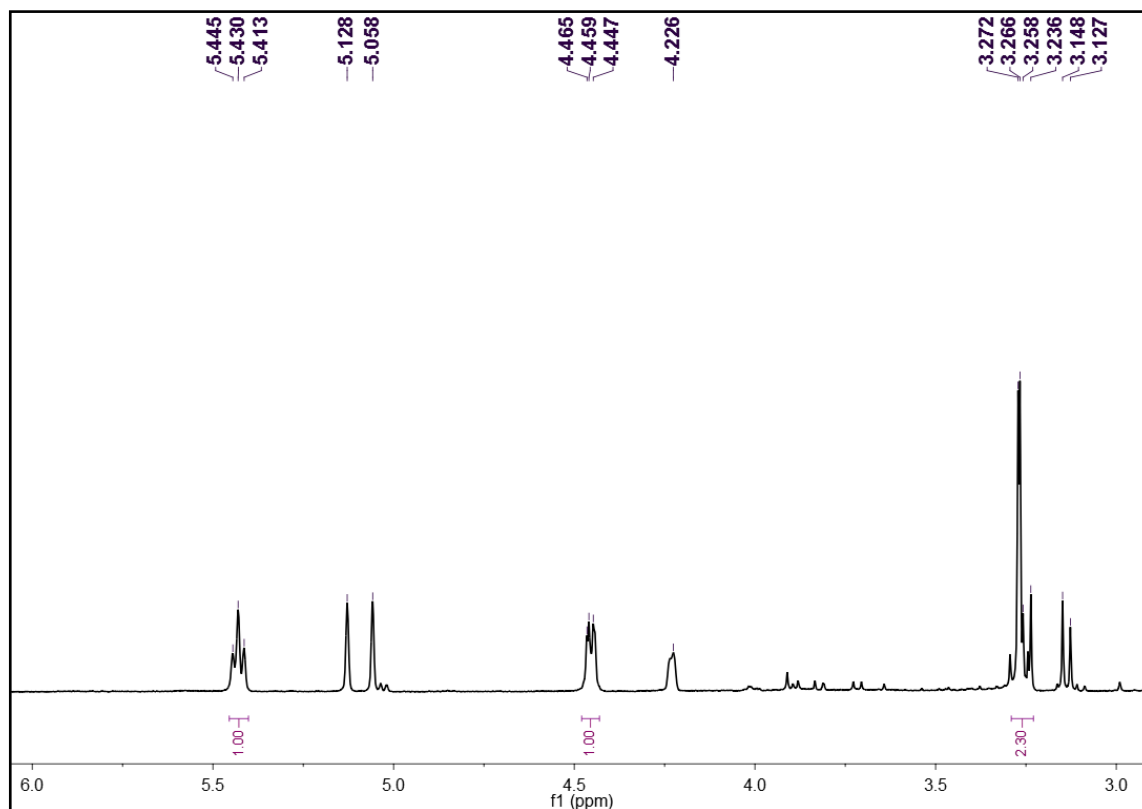
Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  43,9, 39,2 e 34,4, atribuídos a C-1, C-9 e C-11, respectivamente, indicaram a presença de núcleo básico de sesquiterpeno do tipo cariofilano para a estrutura (DURÁN-PATRÓN et al., 2000).

**Figura 36** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Ev-3

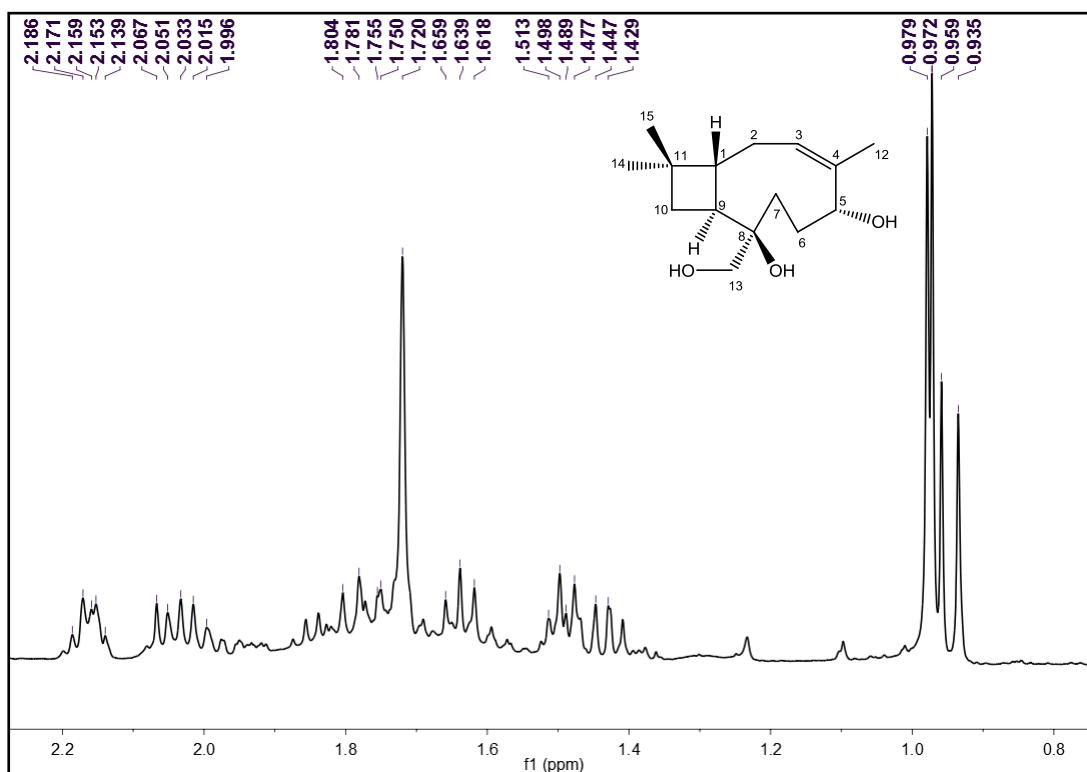


No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , obtido em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz (Figura 36, pág. 71), foi possível observar um conjunto de multipletos na região de 2,5 a 0,9 ppm, que corroboraram com a proposta de sesquiterpeno para Ev-3.

As expansões desse espectro (Figuras 37 e 38, pág. 72 e 73) destacaram a presença de um tripleto integrando para um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,430, compatível com hidrogênio olefínico. Também foi observado um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,465 e um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,272, atribuídos a hidrogênios ligados a carbono oxigenado, além dos sinais característicos de hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,720, 0,979 e 0,972 (PAVIA et al., 2010).

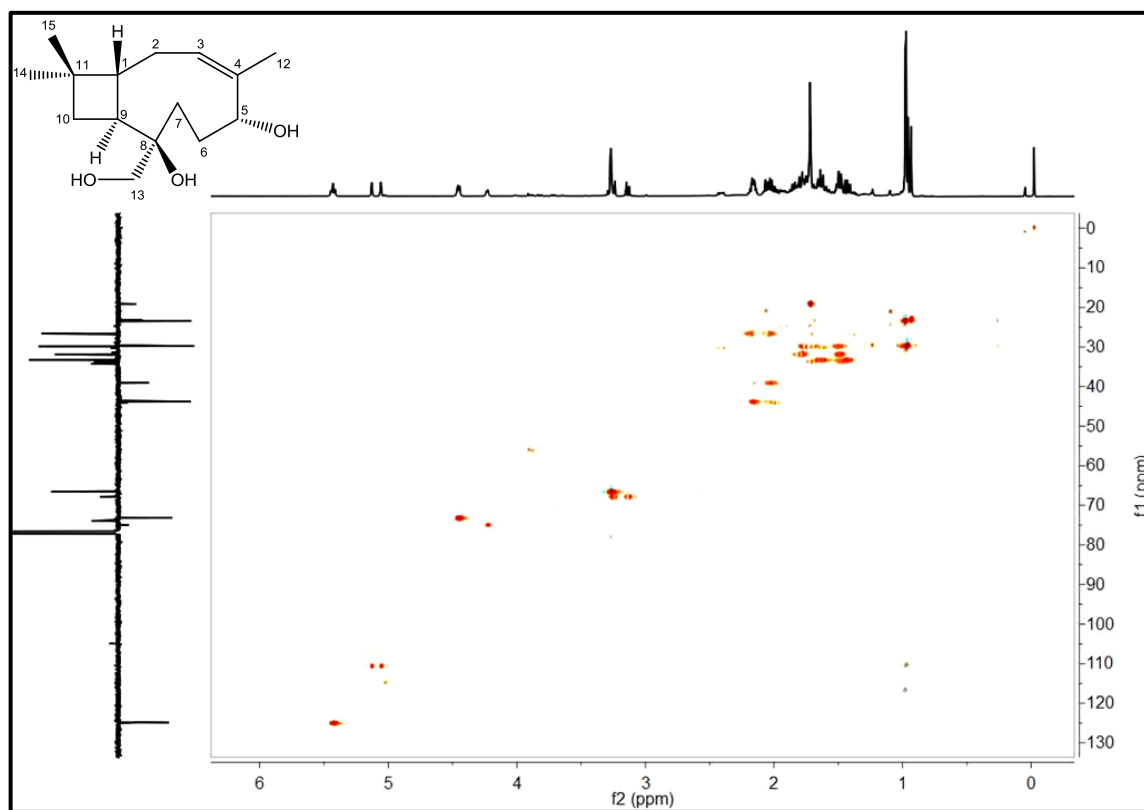
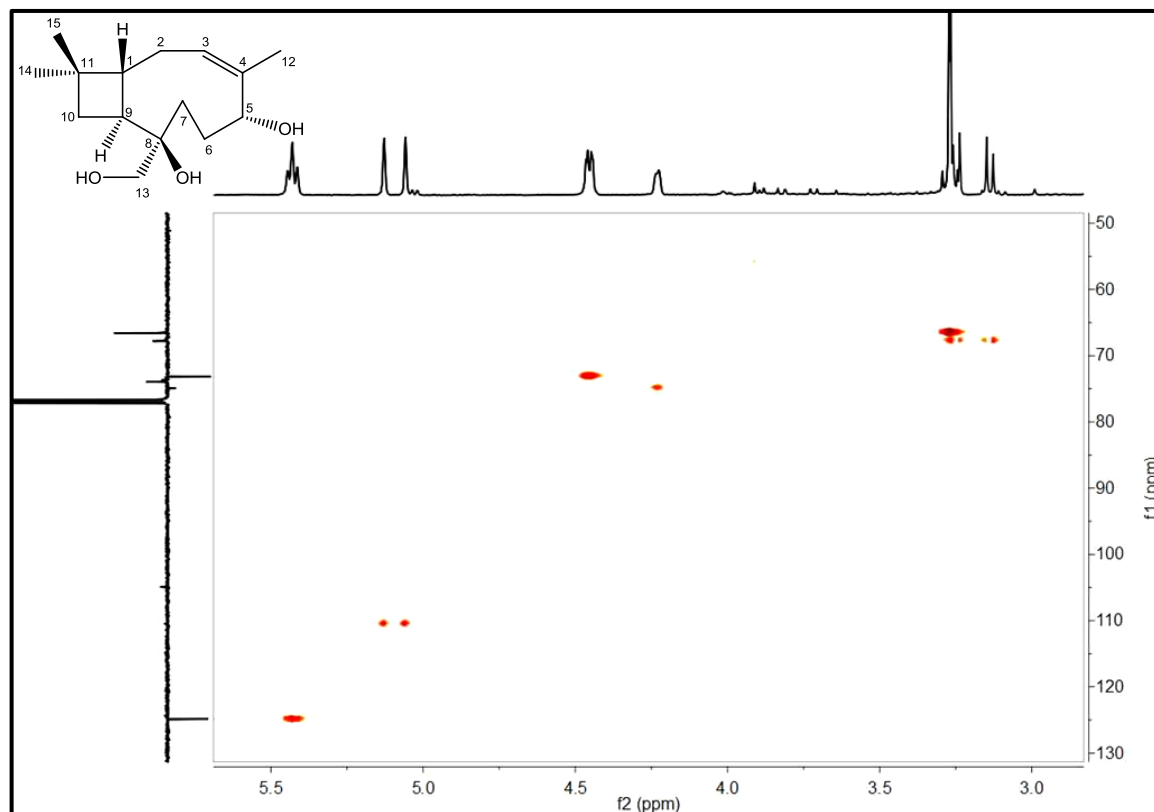
**Figura 37** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3**Figura 38** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 na região de 6,0 a 3,0 ppm

**Figura 39** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 na região de 2,2 a 0,8 ppm

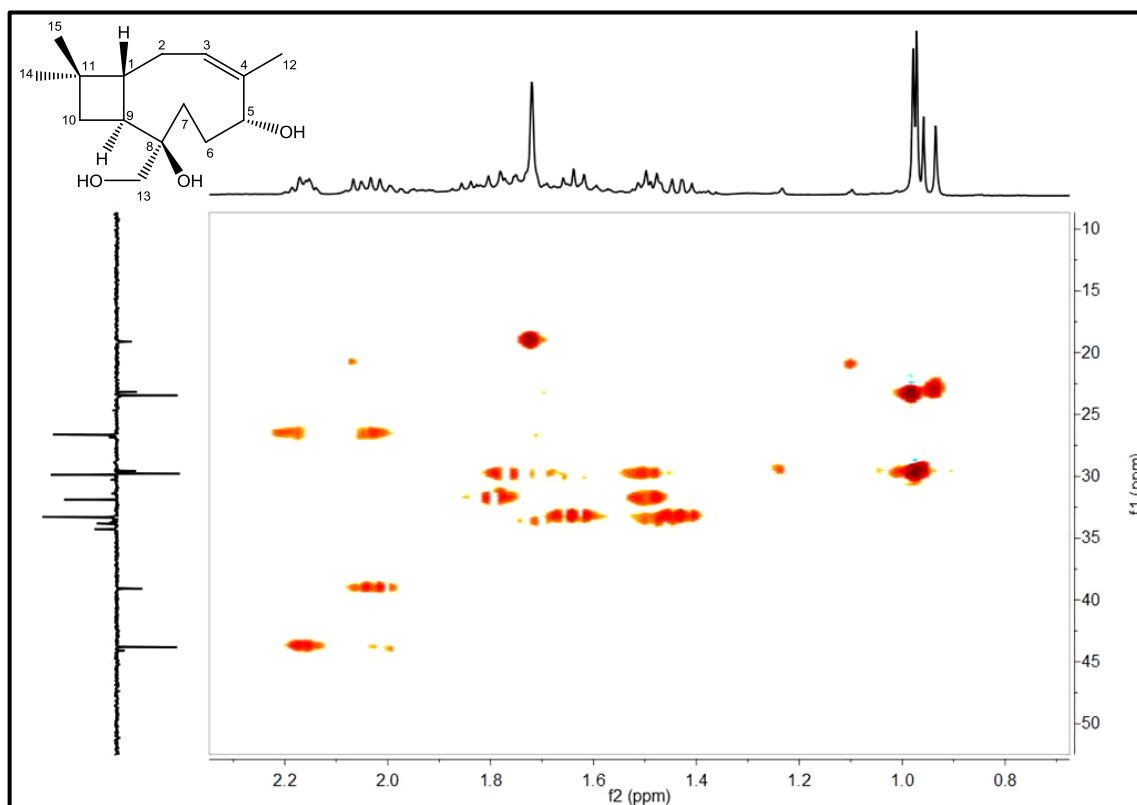


O espectro de correlação heteronuclear HMQC e suas expansões (Figuras 40 e 41, pág. 73 e Figura 42, pág. 74) confirmaram a presença de metila ligada a carbono olefínico ao mostrar correlações entre os deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  1,720 e  $\delta_{\text{C}}$  19,2. As demais correlações sustentaram a proposta de sesquiterpeno do tipo cariofilano e encontram-se dispostas na Tabela 8 (pág. 76).

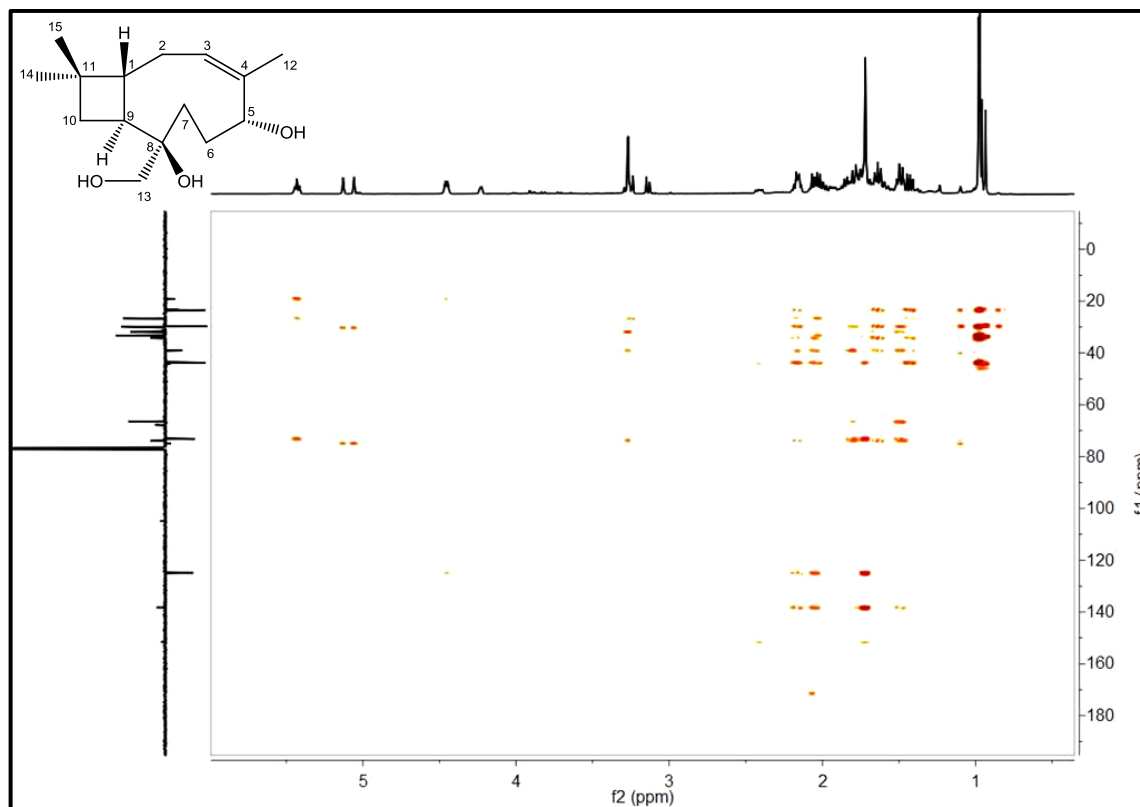
No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 43, pág. 74 e Figuras 44 e 45, pág. 75) destacaram-se as correlações entre os deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  2,159 e  $\delta_{\text{C}}$  29,9 e 23,5, confirmando a existência das metilas C-14 e C-15. Os hidrogênios destas metilas também se correlacionaram com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  43,9, validando a atribuição feita para C-1. Os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,272 exibiram correlação com o deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  31,98, permitindo sua atribuição para C-7. Também foram observadas correlações dos deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  1,720, 4,465 e 2,159 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  125,0, corroborando com a presença de dupla ligação entre C-3 e C-4, além de uma importante correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,720 com o deslocamento em  $\delta_{\text{C}}$  138,3 confirmando a ligação entre a metila C-12 com o carbono olefínico C-4. As demais correlações encontram-se compiladas na Tabela 8 (pág. 76).

**Figura 40** - Espectro HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3**Figura 41** - Expansão do espectro HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 5,5 a 3,0 ppm

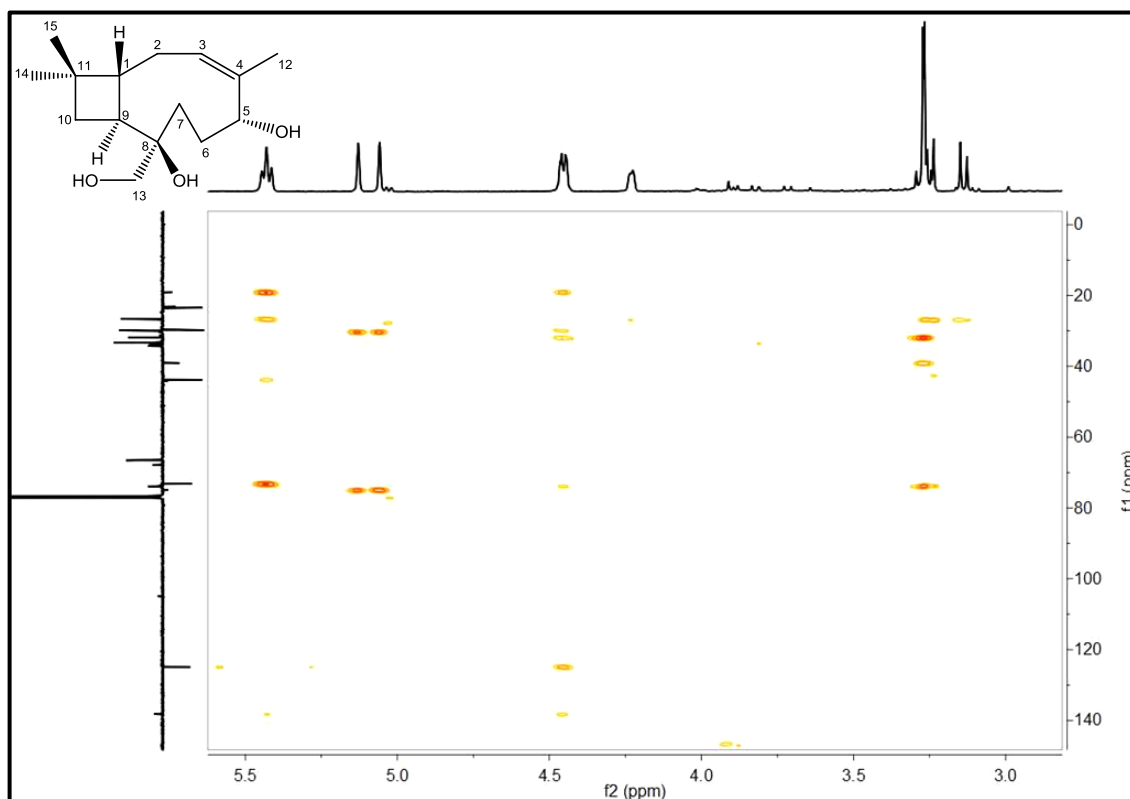
**Figura 42** - Expansão do espectro HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 2,2 a 0,8 ppm



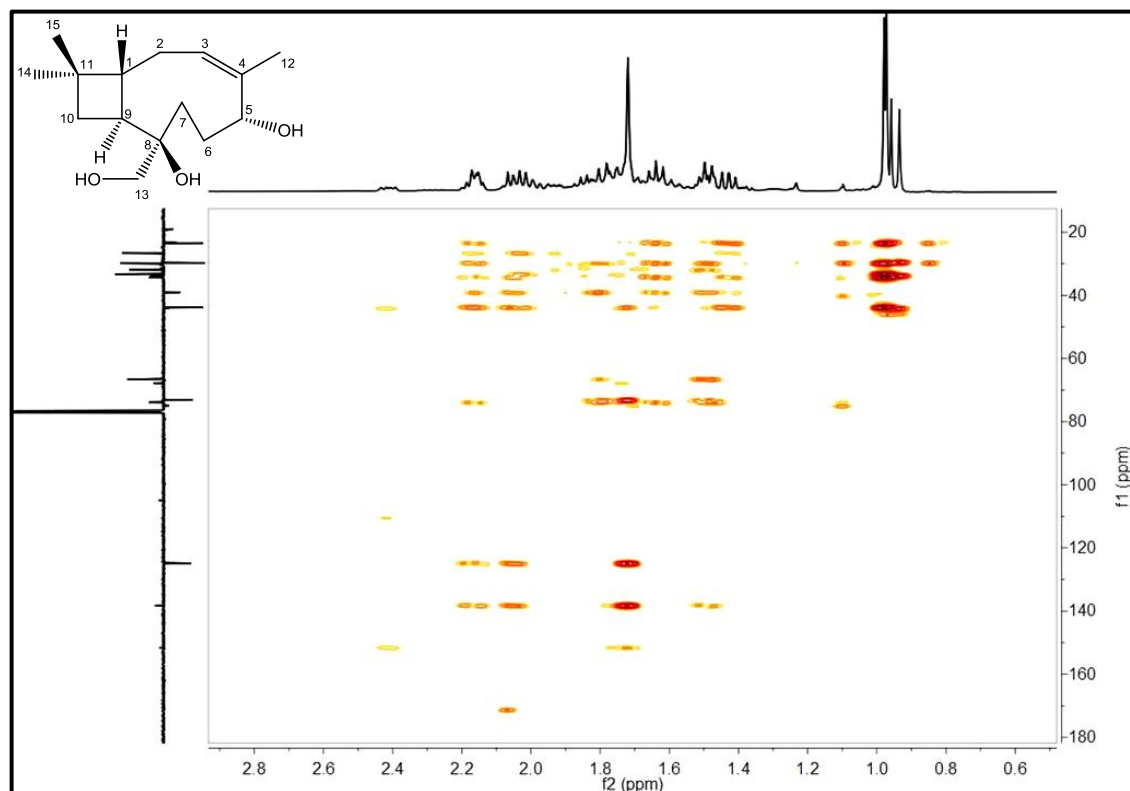
**Figura 43** - Espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3



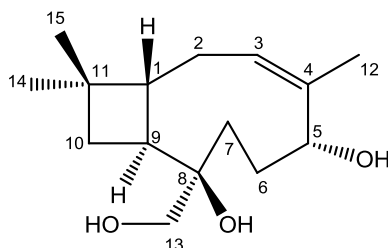
**Figura 44** - Expansão do espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 5,5 a 3,0 ppm



**Figura 45** - Expansão do espectro HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 na região de 2,8 a 0,6 ppm





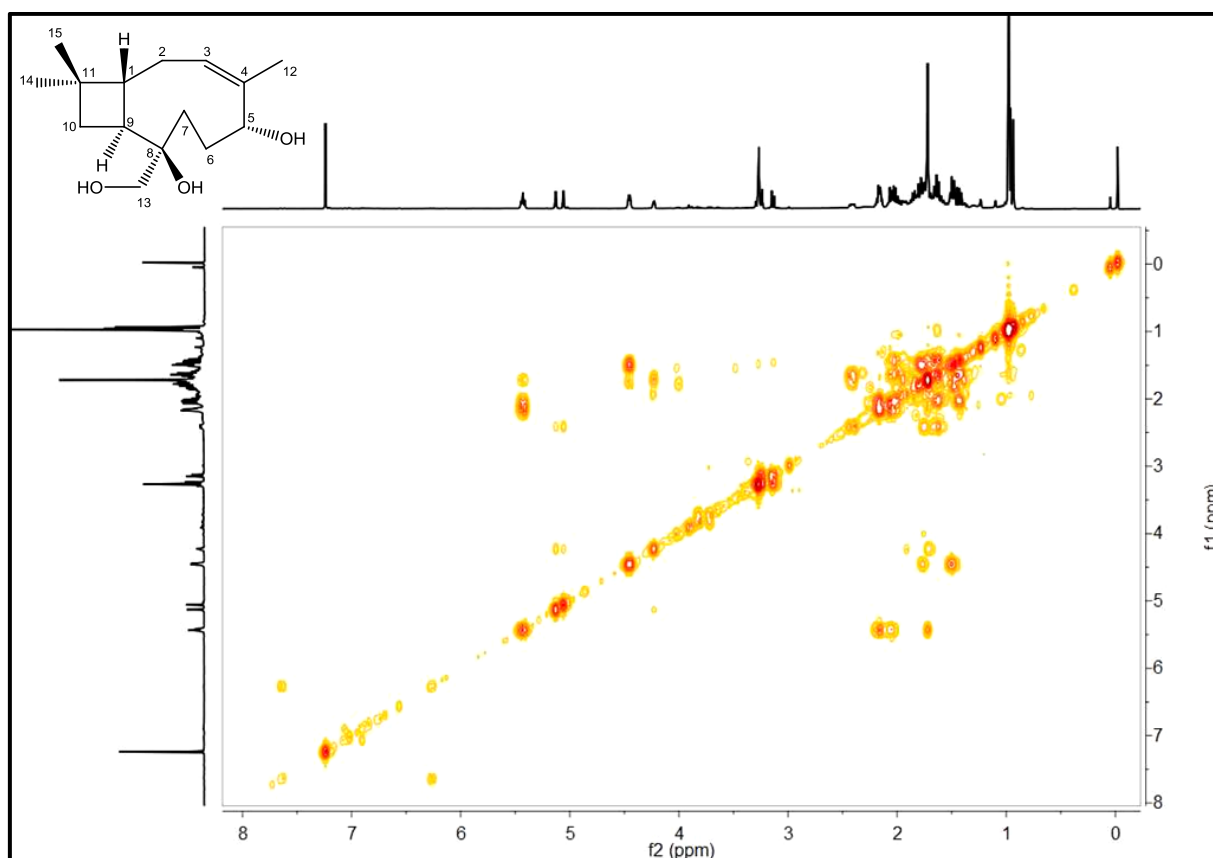
**Tabela 8** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de Ev-3 e correlações obtidas em HMQC e HMBC, registradas em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz)

	HMQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$(^2J)$	$(^3J)$
<b>C</b>				
4	138,3	-----	-----	-----
8	74,0	-----	-----	-----
11	34,4	-----	-----	-----
<b>CH</b>				
1	43,9	2,153 ( <i>m</i> )	C-2/C-9	C-3/C-8/C-11 C-14/C-15
3	125,0	5,430 ( <i>t</i> )	C-2	C-5/C-12
5	73,3	4,465 ( <i>dd</i> , $J = 3,0; 9,0$ )		C-3/C-7/C-12
9	39,2	2,015		
<b>CH<sub>2</sub></b>				
2	26,7	2,186; 2,051	C-1/C-3	C-4/C-9/C-11
6	29,9	1,781; 1,498	C-5	C-8
7	32,0	1,498	C-6	C-5/C-9
10	33,4	1,639; 1,429	C-9	C-5
13	66,7	3,272	C-8	C-7/C-9
<b>CH<sub>3</sub></b>				
12	19,2	1,720	C-4	C-3/C-5
14	29,9	0,972	C-11	C-1/C-10
15	23,5	0,979	C-11	C-1/C-10

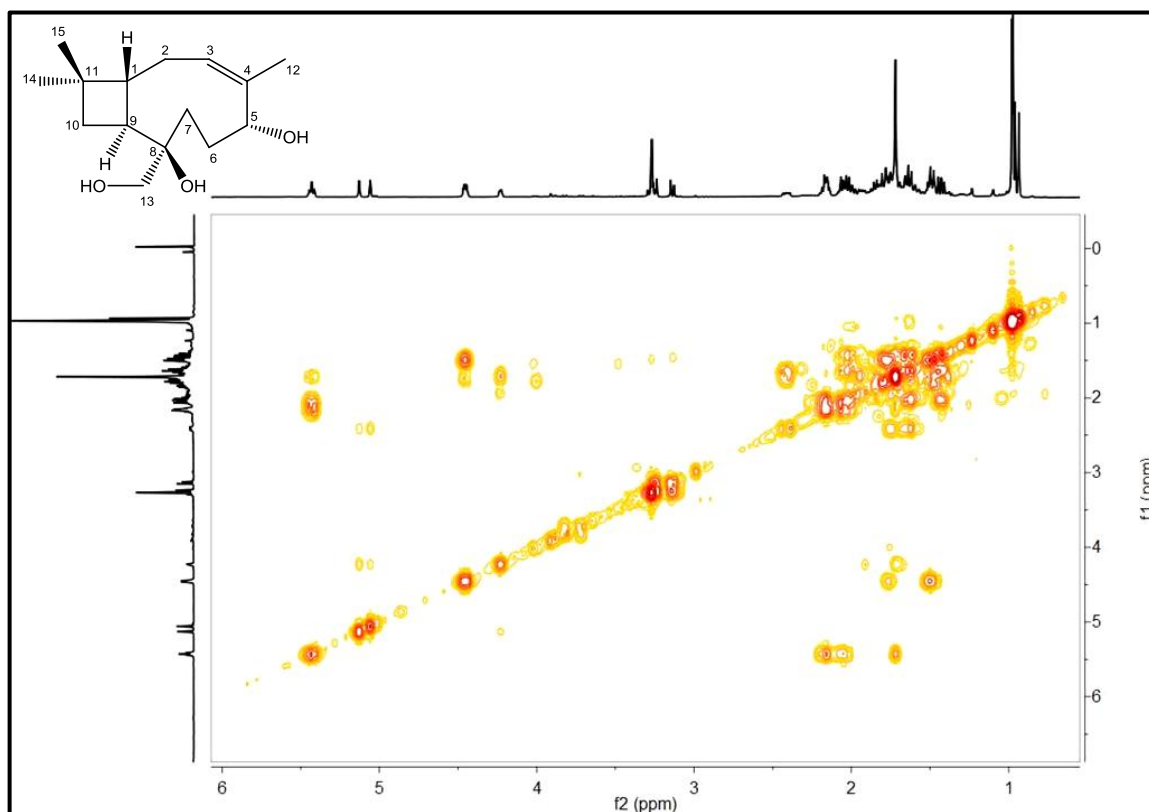
O espectro de correlação homonuclear COSY (Figura 46, p. 77) e sua expansão (Figuras 47, p. 78) confirmaram as atribuições para os hidrogênios alílicos (H-2) ao mostrar correlações dos deslocamentos químicos em  $\delta_H$  2,186 e 2,051 com o hidrogênio olefínico em  $\delta_H$  5,430. Também foi verificada a correlação do hidrogênio oximetínico ( $\delta_H$  4,46) com o sinal em  $\delta_H$  1,498, confirmando as atribuições feitas para H-6. Além disso, verificou-se a correlação entre H-9 ( $\delta_H$  2,015) e sinal para hidrogênio metilênico em  $\delta_H$  1,429, característica para sesquiterpenos do tipo cariofilano (DURÁN-PATRÓN et al., 2000).

A análise do espectro de correlação homonuclear NOESY (Figura 49, p. 80) confirmou a estereoquímica da estrutura ao mostrar correlações dos hidrogênios oximetilênicos ( $\delta_H$  3,27) com as metilas das posições 12 e 14 ( $\delta_H$  0,959 e 1,750, respectivamente), além do hidrogênio H-1 ( $\delta_H$  2,153) com a metila da posição 15 ( $\delta_H$  0,979) (COLLADO et al., 1998).

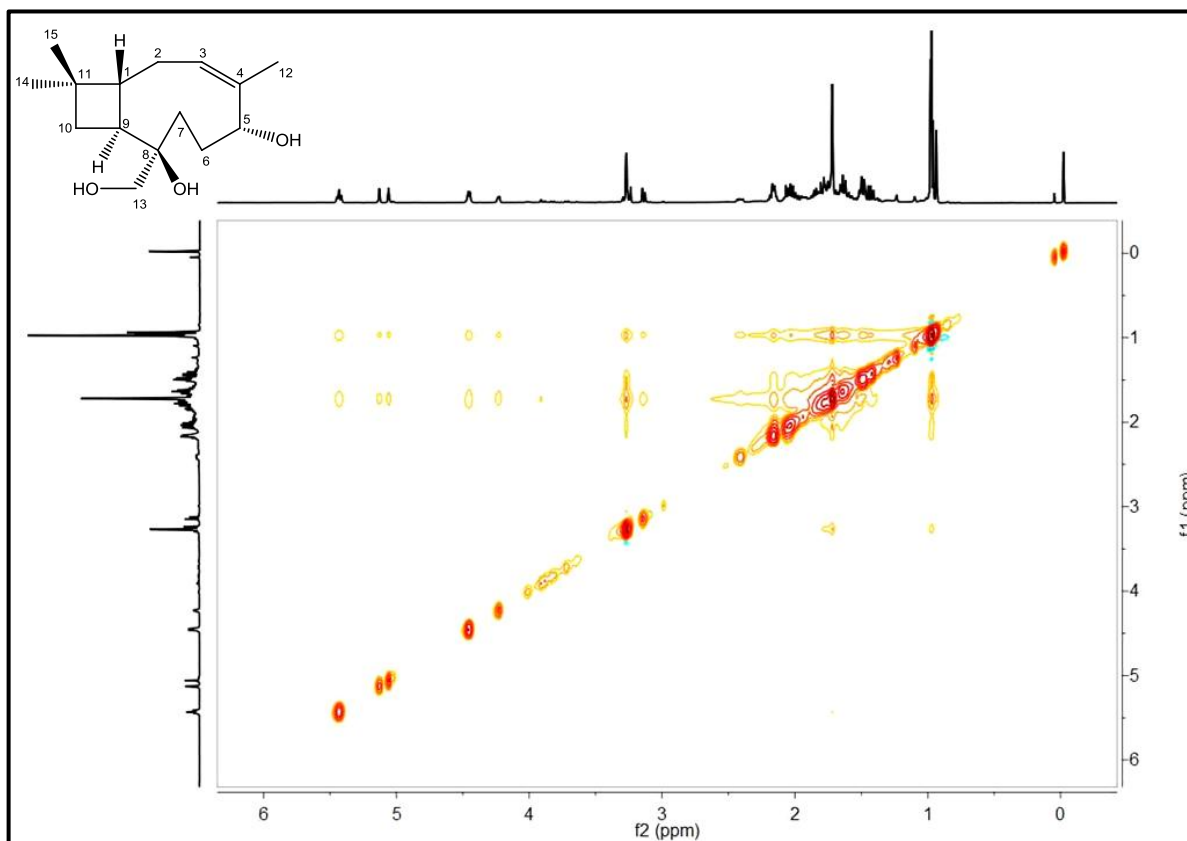
**Figura 46** - Espectro COSY ( $CDCl_3$ , 500 MHz) de Ev-3



**Figura 47** - Expansão do espectro COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3 na região de 6,0 a 1,0 ppm



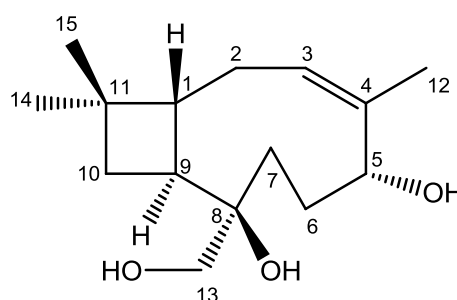
**Figura 48** - Expansão do espectro NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Ev-3



Após total análise espectroscópica, foi possível evidenciar o efeito protetor exercido pelas hidroxilas inseridas em C-8 e C-13, justificando os deslocamentos químicos observados para C-1 e C-9, respectivamente.

Diante do exposto, a análise comparativa dos espectros obtidos com a literatura (Tabela 9, p. 80) permitiu identificar Ev-3 como sendo um novo sesquiterpeno, o 5 $\alpha$ -hidroximetil-cariofil-3(4)-en-8 $\beta$ -5 $\alpha$ -diol.

**Figura 49** - Estrutura química do linariofileno



**Tabela 9** - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 e 125 MHz) de Ev-3 e comparação com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100 MHz) da literatura (COLLADO et al., 1998), com  $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz

	Ev-3		8 $\beta$ -metoxi-5 $\alpha$ -hidroxycariofil-3(4)-eno	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>				
4	138,3	-----	*	-----
8	74,0	-----	*	-----
11	34,4	-----	34,0	-----
<b>CH</b>				
1	43,9	2,153 ( <i>m</i> )	40,4	1,76 ( <i>m</i> )
3	125,0	5,430 ( <i>t</i> )	126,6	5,40 ( <i>dd</i> , $J = 3,0; 9,0$ )
5	73,3	4,465 ( <i>dd</i> , $J = 3,0; 9,0$ )	74,3	4,32 ( <i>d</i> , $J = 7,5$ )
9	39,2	2,015	40,4	2,30 ( <i>ddd</i> , $J = 9,9; 9,3$ )
<b>CH<sub>2</sub></b>				
2	26,7	2,186; 2,051	26,3	2,15 ( <i>m</i> ); 2,03 ( <i>m</i> )
6	29,9	1,781; 1,498	34,9	1,90 ( <i>m</i> )
7	32,0	1,498	29,7	1,33 ( <i>ddd</i> , $J = 3,2; 5,7; 15,1$ ) 1,97 ( <i>t</i> )
10	33,4	1,639; 1,429	*	1,56 ( <i>d</i> , $J = 9,3$ )
13	66,7	3,272	30,3	0,98 ( <i>s</i> )
<b>CH<sub>3</sub></b>				
12	19,2	1,720	19,2	1,78 ( <i>s</i> )
14	29,9	0,972	19,6	1,02 ( <i>s</i> )
15	23,5	0,979	23,9	1,11 ( <i>s</i> )

\* valor não mencionado pelo autor

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que o presente trabalho cumpriu seu objetivo principal de ampliar o conhecimento quimiotaxonômico da família Convolvulaceae e do gênero *Evolvulus* através do estudo fitoquímico das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn.

Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional e de Espectrometria de Massas, foi possível isolar e identificar duas cromonas, o cnidimol c e o cnidimol c glicosilado, além de um sesquiterpeno, o linariofileno.

Todas as substâncias apresentadas estão sendo isoladas pela primeira vez na família Convolvulaceae, apesar de já existirem relatos de compostos das mesmas classes químicas para esta família. Após levantamento bibliográfico nos principais bancos de dados, constatou-se que o cnidimol c glicosilado e o linariofileno estão sendo identificados pela primeira vez na literatura.

O isolamento de duas substâncias inéditas de *E. linarioides* destaca a relevância da química de produtos naturais, especialmente da fitoquímica, como chave para a descoberta de novas moléculas, as quais muitas vezes exercem atividades biológicas, podendo chegar a protótipos de fármacos. Além disso, demonstra nitidamente a importância das atividades de isolamento e elucidação de metabólitos secundários de espécies vegetais.

Diante disso, os resultados foram considerados satisfatórios, cabendo agora tomar providências para a realização dos ensaios farmacológicos a fim de se evidenciar possíveis atividades biológicas para as substâncias obtidas.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; STEVENS, W. D. **Levantamento florístico preliminar do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil**. In: PORTO, K. C.; CABRAL, J. J. P.; TABARELLI, M. Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. (Série Biodiversidade, cap. 9). Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. p. 123-138.
- AKHTAR, M. S.; KASKOOS, R. A.; MIR, S. R.; ALI, M. New chromone derivative from *Evolvulus alsinoides* Linn. aerial parts. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 191–194, 2009.
- ANDRADE, M. V. M., ANDRADE, A. P.; SILVA, D. S.; BRUNO, R. L. A.; GUEDES, D. S. Levantamento florístico e estrutura fitossociológica do estrato herbáceo e subarbustivo em áreas de Caatinga no cariri paraibano. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 229-237, 2009.
- ARGÁEZ, A. G.; PÉREZ-AMADOR, M. C. Distribution in the plant of glycoresins and ergoline alkaloids in three species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). **Phyton - Revista Internacional de Botânica Experimental**, v. 60, n. 1-2, p. 73-76, 1997.
- AUSTIN, D. F. *Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae): an American herb in the Old World. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 2, p. 185-198, 2008.
- BABA, K.; KAWANISHI, H.; TANIGUCHI, M. KOZAWA, M. **Chromones from *Cnidium monniere***. *Phytochemistry*, v. 31, n. 4, p. 1367-1370, 1992.
- BADE, R.; CHAN, H.; REYNISSON, J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5646-5652, 2010.
- BIANCHINI, R. S., FERREIRA, P. P. A. **Convolvulaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB006990>>. Acesso em: 17 fev 2012.
- BIANCHINI, R. S., FERREIRA, P. P. A. **Convolvulaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB007005>>. Acesso em: 18 fev 2012.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BURIL, M. T.; GARCÍA-GONZÁLES, J. D.; ALVES, M. **Convolvulaceae of Northeast Brazil**, 2011. Disponível em:

<[http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/guide\\_pdfs/293%20CONVOLV%20NE%20Brasil%2002.pdf](http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/guide_pdfs/293%20CONVOLV%20NE%20Brasil%2002.pdf)> Acesso em: 19 fev. 2012.

CALDERARI, M. T. **Estudo dos óleos essenciais de Piperaceae do Vale do Itajaí em Santa Catarina**. 2002. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

CERVENKA, F.; KOLECKAR, V.; REHAKOVA, Z.; JAHODAR, L.; KUNES, J.; OPLETAL, L.; HYSPLER, R.; JUN, D.; KUKA, K. Evaluation of natural substances from *Evolvulus alsinoides* L. with the purpose of determining their antioxidant potency. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 574-578, 2008.

COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia**. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. (cap. 1). Campinas: Editora da UNICAMP, 2006, p. 17-44.

COLLADO, I. G.; HANSON, J. R.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. HITCHCOCK, P. B.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A.; RACERO, J. C. Stereochemistry of a rearrangement of B and C rings in clovane skeleton. **Tetrahedron**, v. 54, n. 8, p. 1615-1626, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

COSTA, F. B.; SCOTI, M. T. **Métodos *in silico* para elucidação estrutural de substâncias: fundamentos, metodologias e aplicações em produtos naturais e metabolômica**. In: Gustavo Henrique Bianco de Souza; João Carlos Palazzo de Mello; Norberto Peporine Lopes. Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais. 1. ed. (cap. 3). Ouro Preto: Editora da UFOP, 2011. p. 73-115

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. Natural products from plants. 2. ed. Florida: CRC Press, 2006. 551p.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 550p.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed Unesp, 1996, 230p.

DURÁN-PATRÓN, R.; ALEU, J.; HERMÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Biotransformation of (4E,8R)-caryophyll-4(5)-en-8-ol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 1, p. 44-47, 2000.



EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 12, p.1401-1426, 2004.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6.ed. (Cap. 10) Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 229-244.

GODA, Y.; SHIMIZU, T.; KATO, Y.; NAKAMURA, M.; MAITANI, T.; YAMADA, T.; TERAHARA, N.; YAMAGUCHI, M. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 183-186, 1997.

GUPTA, P.; AKANKSHA; SIRIPURAPU, K. B.; AHMAD, A.; PALIT, G.; ARORA, A.; MAURYA, R. Anti-stress constituents of *Evolvulus alsinoides*: an ayurvedic crude drug. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 771-775, 2007.

HENDRIKS, G. Theoretical models in LC based bioanalytical method development. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 1-10, 2009.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 229-230.

JOLY, A. B. Conheça a vegetação brasileira. São Paulo: EDUSP e Polígono. 1970. 170p.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematic: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999, 464p.

JUNQUEIRA, M. E. R. **O gênero *Evolvulus* L. (Convolvulaceae) no município de Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**. 2004. 91p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2004.

JUNQUEIRA, M. E. R.; SIMÃO-BIANCHINI, R. O gênero *Evolvulus* L. (Convolvulaceae) no município de Morro do Chapéu, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 157-172, 2006

KAZAKEVICH, Y.; LoBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 1104p.

KUMAR, M.; AHMAD, A.; RAWAT, P.; KHAN, M. F.; RASHEED, N.; GUPTA, P.; SATHIAMOORTHY, B.; BHATIA, G.; PALIT, G.; MAURYA, R. Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p. 234-242, 2010.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. **Cumarinas, cromonas e xantonas**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6. ed. (cap. 21) Porto Alegre : Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 537-551.

MANN, P.; TOFERN, B.; KALOGA, M.; EICH, E. Flavonoid sulfates from the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 267-271, 1999.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150p.

MORI, M.; KONDO, T.; TOKI, K.; YOSHIDA, K. Structure of anthocyanin from the blue petals of *Phacelia campanularia* and its blue flower color development. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 622-629, 2006.

MURGO, M. **Estudo de metodologias analíticas para quassinóides**: espectrometria de massas e cromatografia. 1998. 131p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 1999.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

NICARETA, C. **Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros**. 2006. 92p. Dissertação. (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais **Aspectos Químicos e Biológicos de Terpenos**. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia. Itajaí: Univali, 2007. p. 239-257.

PALE, E.; MOUHOSSINE, N.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; OTTINGER, R. Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomoea asarifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1433-1437, 1998.

PÁSKA, C.; INNOCENTI, G.; KUNVÁRI, M.; LÁSZLÓ, M.; SZILÁGYI, L. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. **Phytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 879-883, 1999.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª ed. Norte-Americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.

PEREDA-MIRANDA, R.; TAKETA, A. T. C.; VILLATORO-VERA, R. A. **Alucinógenos naturais**: etnobotânica e psicofarmacologia. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.

R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6. ed. (Cap. 36) Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 938-940

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **O Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

RODRIGUEZ, R. M. **Estudo da emissão de íons estáveis e metaestáveis (LiF)<sub>n</sub>Li<sup>+</sup> induzida por fragmentos de fissão do <sup>252</sup>Cf**. 2003. 140p. Dissertação (Mestrado em Física). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.

SAITO, N.; TATSUZAWA, F.; YODA, K.; YOKOL, M.; KASAHARA, K.; IIDA, S.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. Acylated cyanidin glycosides in the violet-blue flowers of *Ipomoea purpurea*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1283-1289, 1995.

SCHIMMING, T.; JENETT-SIEMS, K.; MANN, P.; TOFERN, B.; MILSON, J.; JOHNSON, R. W.; DEROIN, T.; AUSTIN, D. F.; EICH, E. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 66, n. 2, p. 469-480, 2005.

SCHIMMING, T.; TOFERN, B.; MANN, P.; RICHTER, A.; JENETT-SIEMS, K.; DRAGER, B.; ASANO, N.; GUPTA, M.P.; CORREA, M.D.; EICH, E. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 1989-1995, 1998.

SIMÃO-BIANCHINI, R. **Distribuição das espécies de Convolvulaceae na Caatinga**. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. Vegetação e flora da Caatinga. Recife: APNE e CNIP, 2002, p. 133-136.

SUDEMA - 2012. Disponível em:

<[http://www.sudema.pb.gov.br/index.php?view=category&catid=7&option=com\\_joomgallery&Itemid=100034](http://www.sudema.pb.gov.br/index.php?view=category&catid=7&option=com_joomgallery&Itemid=100034)> Acesso em: 21 jan. 2012.

SUN, Y.; LIU, G.; HUANG, H.; YU, P. Chromone derivatives from *Halenia elliptica* and their anti-HBV activities. **Phytochemistry**, v. 75, n. 3, p. 169-176, 2012.

SUNAZUKA, T.; HIROSE, T.; OMURA, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 2, p. 302-314, 2008.

TERAHARA, N.; KONCZAK-ISLAM, I.; NAKATANI, M.; YAMAKAWA, O.; GODA, Y.; HONDA, T. Anthocyanins in callus induced from purple storage root of *Ipomoea batatas* L. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 919-922, 2000.

THOMPSON, B. A. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography/mass spectrometry together at last. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, n. 3, p. 187-193, 1998.

TOFERN, B.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; EICH, E. Bonaspectins and neobonaspectins, first sesquilignans and sesquieolignans from a convolvulaceous species. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 119-128, 2000.

TOFERN, B.; MANN, P.; KALOGA, M.; JENETT-SIEMS, K.; WITTE, L. Aliphatic pyrrolidine amides from two tropical convolvulaceous species. **Phytochemistry**, v.52, n.8, p.1437-1441, 1999.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VON-POSER, G. L.; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6. ed. (cap. 4) Porto Alegre : Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 75-89.

WANG, B.; DENG, J.; GAO, Y.; ZHU, L.; HE, R.; XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1141-1151, 2011.

WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARI, R. R. **Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents**. In: ZHANG, L.; DEMAINE, A. L. Natural Products: drug discovery and therapeutic medicine. (cap. 9) Totowa: Humana Press. 2005. p. 197-227.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 22, p. 8329-8351, 2006.