



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BRUNO DE ARAÚJO GOMES

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS
DO NORDESTE: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae)**

FORTALEZA

2012

BRUNO DE ARAÚJO GOMES

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS
DO NORDESTE: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte


FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- G612c Gomes, Bruno de Araújo.
 Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae) /
 Bruno de Araújo Gomes – 2012.
 113 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de
 Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2012.
 Área de Concentração: Química Orgânica.
 Orientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.
1. Insulina. 2. Acetilcolinesterase. 3. *Cissus*. I. Título.


Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.




Bruno de Araújo Gomes

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 07/08/2012

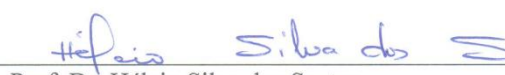
EXAMINADORES:



Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças, paciência, sabedoria e, além disso, colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, permitindo que esse trabalho pudesse ser possível.

Aos meus pais Inês de Araújo Cavalcante Gomes e Wallace Gomes da Silva que sempre me apoiaram e deram liberdade e autonomia para seguir em buscas de meus sonhos e objetivos.

Ao meu irmão Felipe de Araújo Gomes que nunca me abandonou e sempre foi um ídolo para mim.

À minha confidente e companheira Ana Lídia Martins Magalhães por sua cumplicidade e que por muitas vezes suportou-me sempre com muito amor e carinho.

Ao meu orientador prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte que me deu a oportunidade de entrar no universo da pesquisa acadêmica e sempre se colocou a disposição para ajudar no que fosse necessário independente de ser relacionado ao trabalho ou não.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelas experiências de vida e conhecimentos a mim fornecidos.

Ao meu mestre e amigo prof. Francisco Belmino Romero que com sua vida dedicada aos estudos me estimula e impulsiona a sempre buscar novos conhecimentos e desafios.

A todos meus amigos e colegas de curso e trabalho que estiveram comigo nos mais diversos momentos da caminhada acadêmica (Cléia Rocha, Daniele, Edilane, Robério, Wildson Max, Francisco das Chagas “Chaguinha”, Honório, Ana Caroline, Patrícia, Daniely, Isabel Victorino, Ceiza Menezes, Hosana Patrícia, Thiciana Sousa, Ana Karine, Pedro Henrique). E em especial Francisco Carlos de Oliveira pelo indiscutível apoio e dedicação, além de sua grande amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais, Lana e Raimunda “Mundinha” pelos serviços e dedicação prestados, além de suas amizades.

A Universidade Federal do Ceará por ser um lugar tão aconchegante que sempre me fez sentir em casa.

Ao Cnpq, Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo da espécie botânica *Cissus verticillata* (Vitaceae) conhecida como “insulina vegetal” que é utilizada popularmente como anti-diabética. Através de cromatografia gravitacional utilizando gel de sílica como fase estacionária foi isolado um constituinte esteróidal, β -Sitosterol a partir do extrato hexânico dos talos e do extrato hexânico das folhas foi isolado um álcool primário conhecido como n-tetracosanol e um triterpeno chamado 3β -taraxerol. Em adição, foram efetuadas algumas reações clássicas para obtenção de derivados, inclusive com o objetivo de comparar a atividade biológica desses derivados com a do constituinte original. Assim, foram realizados testes de atividade anticolinesterásica do constituinte original e dos produtos das reações de acetilação, formilação e oxidação. O estudo do extrato hexânico dos talos e das folhas de *C. verticillata* L. após saponificação com KOH/MeOH seguida de metilação, forneceu uma mistura de ésteres metílicos que foram identificados por CG/EM. Os principais componentes foram o ácido hexadecanóico, ácido 9,12 octadecadienóico, ácido octadecanóico, ácido eicosanóico, ácido docosanóico. Na caracterização dos metabólitos secundários isolados, assim como, de seus produtos reacionais, foram empregadas técnicas espectrométricas de análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM).

Palavras-chave: insulina, *Cissus*, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

The present work describes the results of chemical study of *Cissus verticillata* (Vitaceae), a plant known as insulin and commonly used as anti-diabetic. Using column chromatography on silica gel from the hexane extract of the stems, a steroid (β -sitosterol) was isolated, while the hexane extract of leaves provided an alcohol (tetracosanol) and a pentacyclic triterpene (3β -taraxerol). In addition, from the original constituents, using classical chemical reactions (acetylation, oxidation and formulation), derivatives were prepared in order to compare the original constituents with the derivatives with respect to anticholinesterase activity. We also studied the composition of fatty acids present in the hexane extract of the stems through the process of saponification followed by methylation and analysed using gas chromatography coupled to mass spectrometry. All compounds (original constituents and derivatives) were characterized by spectrometric methods, nuclear magnetic resonance (NMR) ^1H and ^{13}C , infra-red and mass spectroscopic.

Keywords: insulin, *Cissus*, acetylcholinesterase.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

APT	Attached Proton Test
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
KBr	Brometo de potássio
CV	<i>Cissus verticillata</i> L.
CPD	Composite Pulse Decoupling
J	Constante de acoplamento
PCC	Clorocromato de piridina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
δ	Deslocamento químico
Φ	Diâmetro
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d	Dupleto
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
EM	Espectrometria de Massa
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
EHCV	Extrato hexânico de <i>Cissus verticillata</i> L.
EHFCV	Extrato hexânico das folhas de <i>Cissus verticillata</i> L.
EHTCV	Extrato hexânico dos talos de <i>Cissus verticillata</i> L.
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Multiple Band Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
KOH	Hidróxido de Potássio
ACTI	Iodeto de acetilcolina
MeOH	Metanol

m	Multipeto
OEHFV	Óleo do extrato hexânico das folhas de <i>Cissus verticillata</i> L.
OEHTV	Óleo do extrato hexânico dos talos de <i>Cissus verticillata</i> L.
p.f	Ponto de fusão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos metabólitos secundários isolados de <i>C. verticillata</i> L.....	3
Figura 2. Estruturas dos principais ésteres metílicos dos ácidos graxos identificados.....	4
Figura 3. Espécie <i>Cissus verticillata</i> L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. ...	7
Figura 4. Cromatograma de OEHTCV.....	20
Figura 5. Espectro de massa do éster metílico do ácido tetradecanóico.....	20
Figura 6. Espectro de massa do éster metílico do ácido pentadecanóico.....	20
Figura 7. Espectro de massa do éster metílico do ácido hexadecanóico.	21
Figura 8. Espectro de massa do éster metílico do ácido heptadecanóico.....	21
Figura 9. Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,12 octadecadienóico.	21
Figura 10. Espectro de massa do éster metílico do ácido 9-octadecenóico.....	21
Figura 11. Espectro de massa do éster metílico do ácido octadecanóico.	22
Figura 12. Espectro de massa do éster metílico do ácido eicosanóico.	22
Figura 13. Espectro de massa do éster metílico do ácido docosanóico.	22
Figura 14. Espectro de massa do éster metílico do ácido tricosanóico.	22
Figura 15. Espectro de massa do éster metílico do ácido tetracosanóico.....	23
Figura 16. Cromatograma de OEHFCV.	23
Figura 19. Espectro de massa do éster metílico do ácido nonadecanóico.....	24
Figura 31. Estrutura do β -sitosterol.	26
Figura 32. Espectro de absorção na região do infravermelho(cm^{-1} , KBr) de CV-1.....	28
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C - CPD de CV-1 (CDCl_3 , 75 MHz).	28
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de CV-1 (CDCl_3 , 75 MHz).....	29
Figura 35. Espectro de RMN ^1H de CV-1 (CDCl_3 , 300 MHz).	29
Figura 36. Espectro expandido de RMN ^1H de CV-1 (CDCl_3 , 300 MHz).....	30
Figura 37. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-2.	32
Figura 38. Espectro de RMN ^1H de CV-2 (CDCl_3 , 500 MHz).	32
Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-2 na região (0,9 à 3,65 ppm).	33
Figura 40. Espectro de massa (IE 70 eV) de CV-2.	33
Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 125 MHz) de CV-2.	34
Figura 42. Estrutura do 3β -taraxerol.	36
Figura 43. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-3.....	38
Figura 44. Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3.	38
Figura 45. Espectro expandido de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3 região (1,2 à 5,7 ppm).....	39
Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C - CPD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3.	39
Figura 47. Espectro expandido de RMN ^{13}C -CPD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3 na região (10 à 85 ppm).....	40
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C - APT de CV-3.....	40
Figura 49. Espectro bidimensional de correlação homonuclear (^1H x ^1H - COSY) de CV-3.	41

Figura 50. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}} - \text{HSQC}$) de CV-3.	41
Figura 51. Expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}} - \text{HSQC}$) de CV-3.	42
Figura 52. Expansão 2 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}} - \text{HSQC}$) de CV-3.	42
Figura 53. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de CV-3.	43
Figura 54. Expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de CV-3.	43
Figura 55. Expansão 2 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de CV-3.	44
Figura 56. Acetilação do β -sitosterol.	46
Figura 57. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1 (AC).	47
Figura 58. Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{CPD}$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (AC).	47
Figura 59. Espectro de RMN $^{13}\text{C} \text{ DEPT } 135^\circ$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (AC).	48
Figura 60. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-1 (AC).	48
Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-1 (AC).	49
Figura 62. Formilação do β -sitosterol.	50
Figura 63. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1 (FOR).	51
Figura 64. Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{CPD}$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (FOR).	51
Figura 65. Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{CPD}$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (FOR).	52
Figura 66. Espectro de RMN $^{13}\text{C} \text{ DEPT } 135^\circ$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (FOR).	52
Figura 67. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-1 (FOR).	53
Figura 68. Oxidação do β -sitosterol.	54
Figura 69. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1 (OXI).	54
Figura 70. Acetilação do n-tetracosanol.	55
Figura 71. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-2 (AC).	56
Figura 72. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-2 (AC).	56
Figura 73. Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{CPD}$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-2 (AC).	57
Figura 74. Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{DEPT } 135^\circ$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-2 (AC).	57
Figura 75. Oxidação do 3β -taraxerol.	58
Figura 76. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-3 (OXI).	59
Figura 77. Espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{CPD}$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-3 (OXI).	59
Figura 78. Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C} - \text{BB}$ (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-3 (OXI).	60
Figura 79. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-3 (OXI).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esteróides, triterpenos e terpenóides isolados de espécies do gênero <i>Cissus</i> .	12
Tabela 2. Ácidos graxos livres identificados no óleo fixo de EHTCV.	18
Tabela 3. Ácidos graxos livres identificados no óleo fixo de EHFCV.....	19
Tabela 4. Dados comparativos de RMN ¹³ C de CV-1 (CDCl ₃ , 300 MHz) com os descritos na literatura para beta-sitosterol (MACARI, 1990).....	26
Tabela 5. Análise comparativa dos dados de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 500 MHz) de CV-3 com os registros na literatura (ANDRADE-NETO, 1997).....	37
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de CV-1 e seus derivados reacionais CV-1 (AC) e CV-1 (FOR).	58
Tabela 7. Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHTV.	67
Tabela 8. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHTV-9.	67
Tabela 9. Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHTV-9.....	68
Tabela 10. Dados relativos ao tratamento cromatográfico de EHFV.	70
Tabela 11. Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EHFV-D.....	70
Tabela 12. Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHFV-D.....	71
Tabela 13. Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EHFV-A.....	71
Tabela 14. Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHFV-A.....	72
Tabela 15. Dados referentes ao tratamento cromatográfico dos ésteres metílicos de EHTV.	76
Tabela 16. Dados referentes ao tratamento cromatográfico dos ésteres metílicos de EHTV.	77
Tabela 17. Resultado do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	82

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico dos talos da espécie <i>C. verticillata</i>	66
Fluxograma 2. Isolamento de CV-1 a partir de EHTV.....	68
Fluxograma 3. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas da espécie <i>C. verticillata</i>	69
Fluxograma 4. Isolamento de CV-2 e CV-3 a partir de EHFV.	73
Fluxograma 5. Obtenção dos ácidos graxos livres de EHTV, metilação dos ácidos graxos livres e identificação de OEHTV e OEHFV.....	79
Fluxograma 6. Procedimento para a realização do teste de Ellman.	82

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

1	INTRODUÇÃO	1
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	6
2.1	Considerações Botânicas sobre a Família Vitaceae	6
2.2	Considerações Botânicas sobre o Gênero <i>Cissus</i>	6
2.3	Considerações Botânicas sobre a espécie <i>Cissus verticillata</i> L.	7
3	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	9
3.1	Terpenóides	9
3.1.1	Triterpenos	9
3.2	Esteróis	10
3.3	Trabalhos publicados sobre o uso medicinal de <i>Cissus verticillata</i> L.....	11
4	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	18
4.1	Determinação estrutural da composição de ácidos graxos no óleo fixo de EHTCV	18
4.2	Determinação estrutural da composição de ácidos graxos no óleo fixo de EHFCV	19
4.3	Determinação estrutural de CV-1	25
4.4	Determinação estrutural de CV-2	31
4.5	Determinação estrutural de CV-3	35
5.	OBTENÇÃO DE DERIVADOS	46
5.1	Acetilação do β -sitosterol	46
5.2	Formilação do β -sitosterol	50
5.3	Oxidação do β -sitosterol	54
5.4	Acetilação do n-tetracosanol	55
5.5	Oxidação do 3- β taraxerol	58
6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	63
6.1	Material Botânico	63
6.2	Métodos Cromatográficos	63

6.2.1	Cromatografia de Adsorção.....	63
6.3	Métodos Físicos	64
6.3.1	Ponto de Fusão	64
6.4	Métodos Espectrométricos	64
6.4.1	Espectroscopia na região do Infravermelho	64
6.4.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	64
6.5	Estudo dos Constituintes não voláteis de <i>C.verticillata</i>	65
6.5.1	Preparação dos extratos dos talos de <i>C.verticillata</i>	65
6.5.2	Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos talos de <i>C.Verticillata</i> (EHTV)	66
6.5.3	Preparação dos extratos das folhas de <i>C.verticillata</i>	69
6.6	Obtenção dos derivados do β -sitosterol	74
6.6.1	Acetilação.....	74
6.6.2	Formilação.....	74
6.6.3	Oxidação	74
6.7	Obtenção do derivado do n-tetracosanol.....	75
6.7.1	Acetilação.....	75
6.8	Obtenção do derivado do 3β -taraxerol.....	75
6.8.1	Oxidação	75
6.9	Estudo do óleo fixo de EHV	76
6.9.1	Saponificação e obtenção dos ácido graxos de EHTV	76
6.9.2	Obtenção dos ésteres metílicos de EHTV	76
6.9.3	Saponificação e obtenção dos ácido graxos de EHFV	77
6.9.4	Obtenção dos ésteres metílicos de EHFV	77
7	ATIVIDADE BIOLÓGICA	81
7.1	Teste de atividade frente à enzima acetilcolinesterase	81
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
9	CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS	86
9.1	Constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas.....	86
9.1.1	CV-1	86
9.1.2	CV-2.....	87
9.1.3	CV-3.....	88
9.2	Constantes físicas e dados espectrométricos dos derivados de CV-1, CV-2 e CV-3.....	89
9.2.1	CV-1 (AC).....	89
9.2.2	CV-1 (FOR).....	90
9.2.3	CV-1 (OXI)	91

9.2.4 CV-2 (AC).....	92
9.2.5 CV-3 (OXI)	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Dentro de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento de doenças começaram com o uso de plantas medicinais. Relatos de métodos empregando formulações obtidas a partir de fontes vegetais, por povos da região do Mediterrâneo e do Oriente, são encontrados no primeiro compêndio de plantas medicinais europeu, escrito pelo médico grego Pedânios Dioscórides no século I d.C (SCHULZ, 2002).

As plantas, como resultado do metabolismo secundário, constituem uma fonte abundante de substâncias com potencial farmacológico e/ou biológico. Assim, uma parcela significativa de todos os medicamentos utilizados atualmente é derivada, direta ou indiretamente, de princípios ativos isolados de plantas (SCHULZ, 2002). Portanto, estudos de prospecção fitoquímica são de fundamental importância para identificação de plantas com potencial medicinal através do isolamento de micromoléculas por elas produzidas.

Esses metabólitos pertencem a diversas classes, com destaque para os terpenos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, esteróides e vários outros. Os metabólitos secundários são estudados no âmbito que se convencionou denominar química de produtos naturais, tendo como objetivo imediato o registro dos constituintes químicos das espécies. Este registro consiste numa sequência de trabalhos que implicam o isolamento, purificação e caracterização estrutural, assim como, na obtenção de eventuais derivados com vistas à confirmação estrutural e verificação de possível modificação de atividade biológica. (MATOS, 1997).

Neste contexto, os constituintes secundários vegetais apresentam um grande valor do ponto de vista social e econômico. Como exemplos, na década de 80 foram identificados 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies, e são usualmente empregados na terapêutica em países ocidentais. Além disso, do total de medicamentos aprovados nos últimos 20 anos, 6% são obtidos diretamente de espécies vegetais, denominados, especificamente, de fitoterápicos e, de modo geral, de produtos naturais; 24% são compostos derivados desses produtos naturais e 9% foram desenvolvidos a partir de compostos vegetais cuja estrutura molecular serviu como unidade precursora em processos de síntese. Anualmente, 4000 novos compostos de

origem vegetal têm sido relatados, observando-se ainda, uma tendência de crescimento para este valor. (MARASCHIN E VERPOORTE, 1999).

Segundo a literatura, inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) são utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, procedimento baseado na hipótese colinérgica. Essa linha de análise tem como base a hipótese de que, após o aumento da inibição da enzima, existiria um aumento na concentração de acetilcolina no processo de sinapse, diminuindo, dessa forma, a progressão dos sintomas da doença (DOOLEY E LAMB, 2000).

Segundo Howes 2003, as atividades correlatas podem ser usadas como guia, como por exemplo, as atividades antiinflamatória e antioxidante no que diz respeito a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase. Como o item 3.3 página 12 menciona, a espécie *Cissus verticillata* L. apresenta atividade antiinflamatória o que despertou o interesse em investigar a inibição da enzima acetilcolinesterase.

Um estudo com outra espécie do gênero *Cissus*, a *C. pallida* permitiu o isolamento do metabólito do pallidol que por sua vez apresentou atividade antifúngica (KHAN *et al*, 1986).

O objetivo primordial deste trabalho foi realizar um estudo fitoquímico da espécie *Cissus verticillata* L, tendo em vista o isolamento e caracterização estrutural de alguns metabólitos secundários. Vale ainda ressaltar que trata-se de uma espécie de fácil cultivo na região Nordeste do Brasil.

A prospecção química da espécie *Cissus verticillata* L. teve como resultado o isolamento de três metabólitos secundários, o β -sitosterol, o n-tetracosanol e o 3 β -taraxerol apresentados na figura 1, página 3.

A obtenção dos derivados teve como objetivos principais além de comprovação estrutural, avaliar a possível potencialização do metabólito isolado frente a inibição da enzima acetilcolinesterase.

Foi realizado também o estudo dos ácidos graxos livres presentes no óleo dos extratos hexânicos das folhas e dos talos de *C. verticillata* L. empregando a Cromatografia de Gás Acoplado a Espectrometria de Massa (CG-EM) a partir dos ésteres metílicos provenientes de esterificação desses ácidos graxos figura 2, página 4.

Na caracterização das estruturas químicas dos compostos isolados foram utilizados os métodos espectrométricos de análise como Espectroscopia na Região do Infra-Vermelho (IV), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (^1H e ^{13}C) envolvendo técnicas bidimensionais como HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$), HSQC ($^1J_{\text{CH}}$) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY.

Figura 1. Estruturas dos metabólitos secundários isolados de *C. verticillata* L.

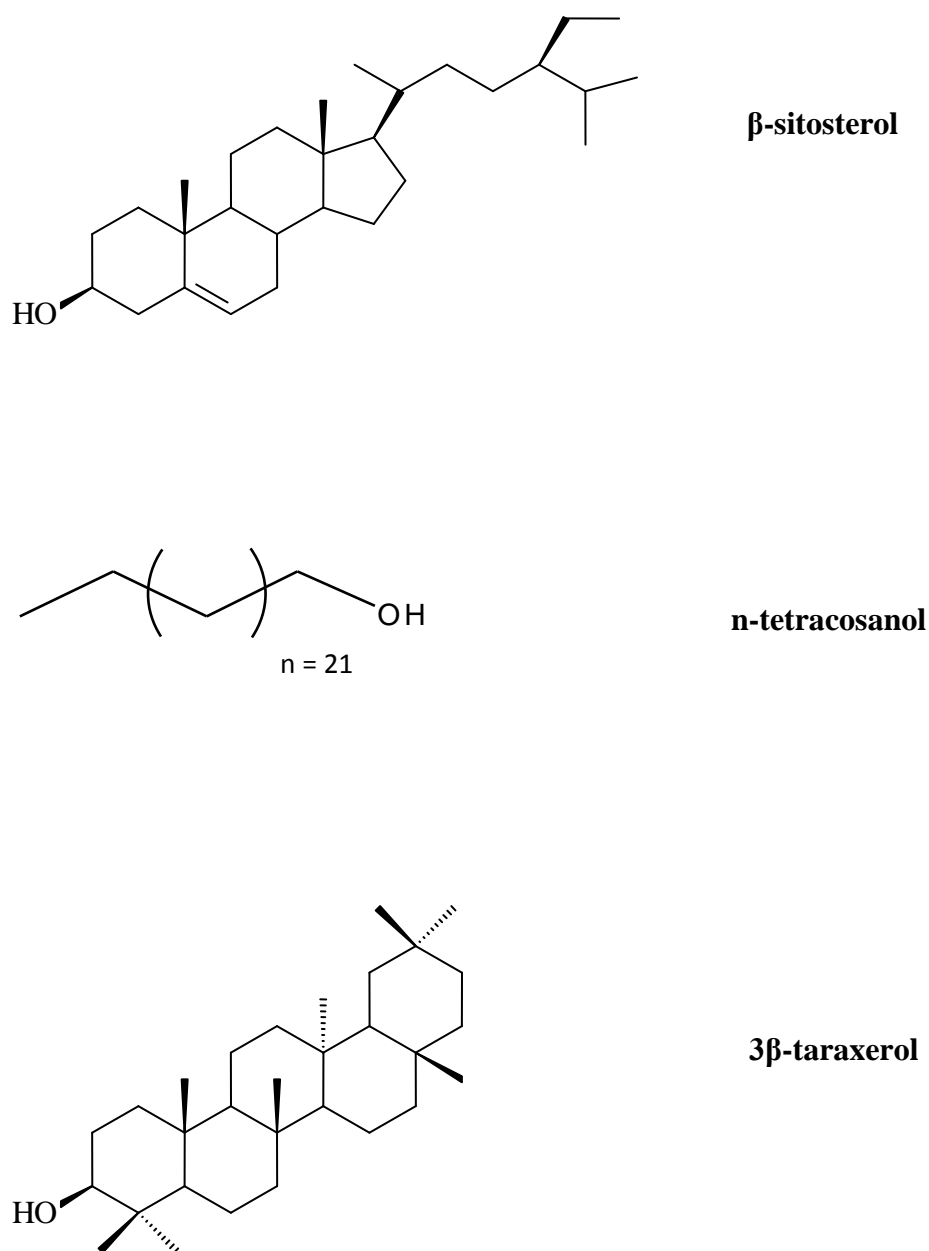
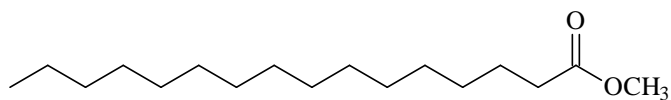
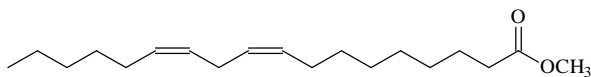


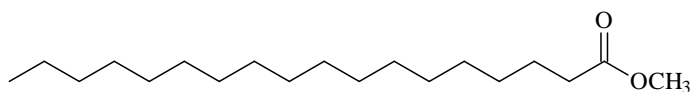
Figura 2. Estruturas dos principais ésteres metílicos dos ácidos graxos identificados.



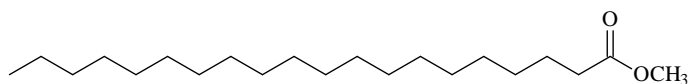
Éster metílico do ácido hexadecanóico



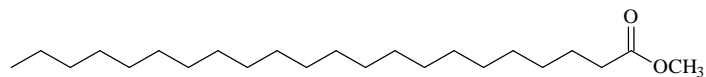
Éster metílico do ácido 9,12 octadecadienóico



Éster metílico do ácido octadecanoico



Éster metílico do ácido eicosanoico



Éster metílico do ácido docosanoico

CAPÍTULO 2
CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Considerações Botânicas sobre a Família Vitaceae

A família Vitaceae é composta por 13 gêneros e cerca de 800 espécies, distribuídos em regiões tropicais e temperadas. As características das espécies desta família são lianas herbáceas e sublenhosas, que apresentam gavinhas opostas às folhas e em nós distintos e apresentam na base do pecíolo, geralmente decíduas. Possuem margem foliar com apículos provindos das nervuras secundárias ou terciárias e ápice mucronado. (RIBEIRO *et al*, 1999).

A espécie *Vitis vinífera* apresentam frutos que são as uvas, sendo essa espécie muito importante em termos econômicos já que seus frutos são bastante utilizados pela sociedade (RIBEIRO *et al*, 1999).

Apresentam flores pequenas em inflorescências paniculadas, às vezes de colorido vivo (certas espécies de *Vitis* dos cerrados), cíclicas, tetrâmeras ou pentâmeras, de simetria radial, hermafroditas ou de sexo separado. Cálice pequeno. Pétalas às vezes se desprendendo em conjunto (certas espécies de *Vitis*). Androceu isômero. Ovário súpero, bicarpelar e bilocular, cada lóculo com até 2 óvulos. Possuem frutos do tipo baga (JOLY, 1998).

2.2 Considerações Botânicas sobre o Gênero *Cissus*

O gênero *Cissus* L. é representado por arbustos sarmentosos, nodosos, com râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (BERG, 1993). Este gênero é o mais vasto da família Vitaceae, é constituído de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical (CORRÊA, 1978).

Há relatos na literatura de alcalóides quinolizidínicos isolados dos pigmentos dos frutos de *Cissus rheifolia* e uma mistura de esteróides e flavonóides das folhas e raízes (SAIFAH *et al*, 1983), enquanto que da *Cissus pallidal* foi isolado o pallidol, que apresentou atividade antifúngica (KHAN *et al* 1986), das partes aéreas da *Cissus quadrangularis* foram isolados triterpenoídes (BHUTANI, *et al*, 1984).

2.3 Considerações Botânicas sobre a espécie *Cissus verticillata* L.

A espécie *Cissus verticillata* L. Nicolson C.E. Jarvis, possui varias sinonímias, como por exemplo *C. puncticulosa* Rich., *C. latifolia*, *C. sicyoides* L., Descourt., *C. tinctoria* M., *Vitis sicyoides* Baker, *Vitis vitiginea* Ktze. Var. *repens* Ktze., *C umbrosa* H. B. K., *C canescens* Lam. e *C. compressicaulis* (CORRÊA, 1978; BERG, 1993).

Cissus verticillata é conhecida popularmente no Brasil como anil-trepador, cipó-puçá, cipó-puci, puçá, insulina vegetal, uva-brava, tinta-dos-gentios e achite (CORRÊA, 1978; BERG, 1993) representada na figura 3.

Trepadeira herbácea, estendendo-se através de gavinhas, atingindo até 10 m de comprimento. Caule carnosos, com abundante látex aquoso, cilíndrico quando jovem, aplainado quando maduro, atingindo até 5 cm de diâmetro, com nós inchados (CORRÊA, 1978; BERG, 1993).

Figura 3. Espécie *Cissus verticillata* L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: (próprio autor).

CAPÍTULO 3
LEVANTAMIENTO
BIBLIOGRÁFICO

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Terpenoides

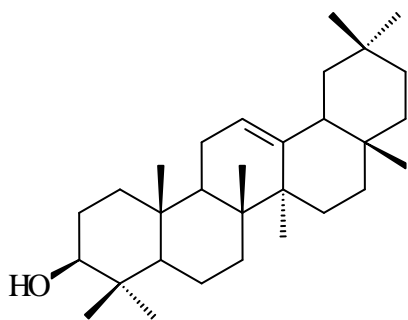
Os terpenóides constituem uma classe de metabólitos secundários com uma imensa variedade de tipos estruturais derivados do isopreno (existem alguns que são resultados de rearranjos durante o processo de biossíntese). Os terpenóides são formados pelo encadeamento linear de unidades de isopreno seguido de várias ciclizações e rearranjos do esqueleto carbônico. Os tipos de terpenoides formados podem ser modificados biogeneticamente pela perda ou adição de átomos de carbono originando, conseqüentemente outros diferentes tipos (MENEZES, 2005).

Conforme o número de carbonos, ou seja, o número de unidades isoprênicas que compõem os esqueletos carbônicos, os terpenos se classificam em; monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) e triterpenos (C_{30}).

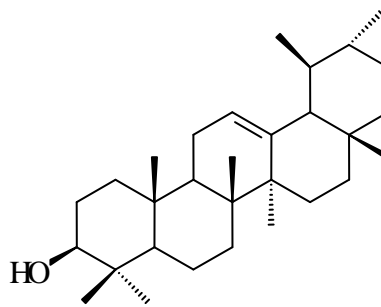
3.1.1 Triterpenos

Triterpenos são metabólitos secundários presentes na flora terrestre e aquática, assim como na fauna, que ocorrem na forma livre, bem como nas formas de éster, éter e glicosilada. Como o nome implica, triterpenos são compostos de 30 átomos de carbono e podem ser de esqueleto carbônico na forma acíclica, mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacíclica. Os triterpenos pentacíclicos são distribuídos por todo o reino vegetal e pode se apresentar na forma livre, como agliconas, ou formas combinadas, e têm se conhecido um grande número de efeitos biológicos (MAHATO e KUNDU, 1994).

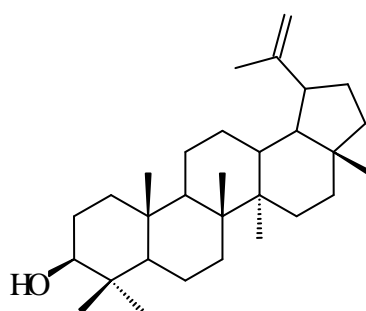
Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em três grupos principais segundo o esqueleto carbônico: a) β -amirina, b) α -amirina e c) lupeol. Os representantes do tipo β -amirina conhecidos como oleananos (1) apresentam dois grupos metila no átomo de carbono C-20, enquanto, aqueles do tipo α -amirina (2) ou ursano, apresentam um grupo metila no átomo de carbono C-19 e outro no carbono C-20. No grupo lupeol (3), o quinto anel (anel E), diferentemente, é formado por cinco átomos de carbono.



(1)



(2)



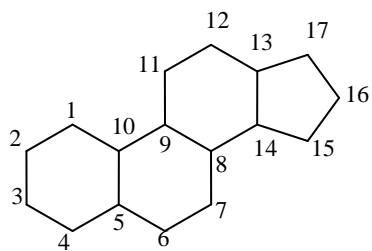
(3)

3.2 Esteróis

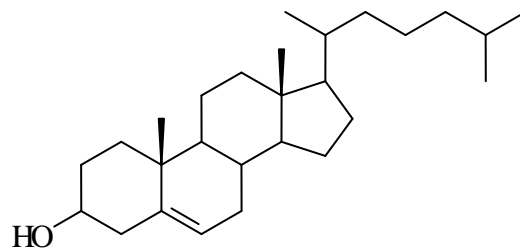
Esteróis são substâncias orgânicas encontradas abundantemente na natureza, usualmente em frações não saponificáveis de gorduras de animais e plantas. Todos possuem o esqueleto básico peridrociclopentanofenantreno (4).

Os esteróis mais comuns encontrados são o colesterol (5), β -sitosterol (6), estigmasterol (7) (encontrados em óleos vegetais) e ergosterol (8) (encontrado em leveduras e outras fontes microbiológicas), diferem entre si principalmente quanto a natureza da cadeia lateral ligada ao Carbono 17.

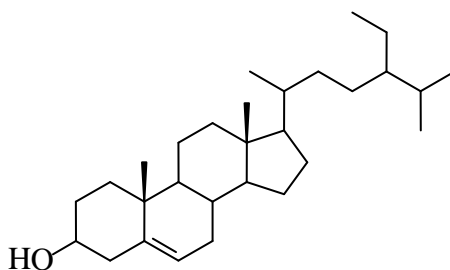
Esteroides, tais como os esteróis, são substâncias orgânicas que também possuem um núcleo peridrociclopentanofenantreno. Eles diferem dos esteróis, por possuírem uma menor ou nenhuma cadeia lateral no carbono 17, e por possuírem um ou mais grupos carbonílicos ligados aos anéis do esqueleto esteroidal. São compostos de grande importância médica e usados na terapêutica anti-inflamatória e anti-concepcional, entre outras (OLIVEIRA e BUENO, 1996).



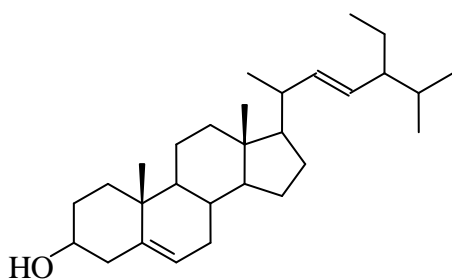
(4)



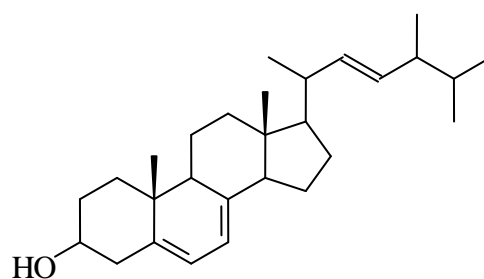
(5)



(6)



(7)



(8)

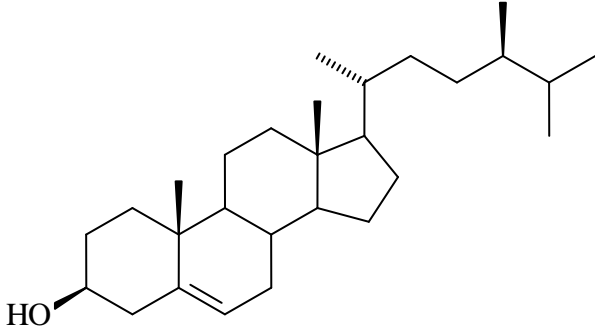
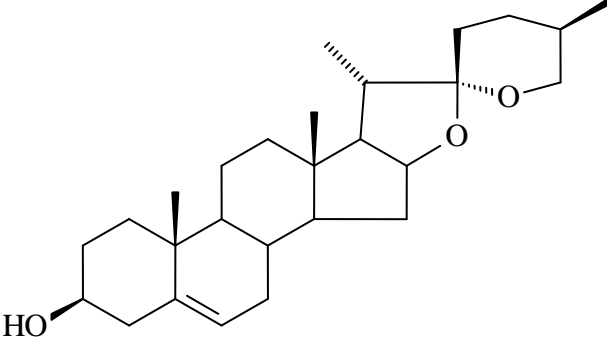
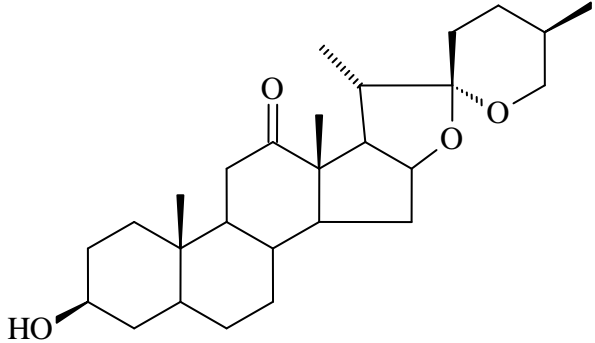
3.3 Trabalhos publicados sobre o uso medicinal de *Cissus verticillata* L.

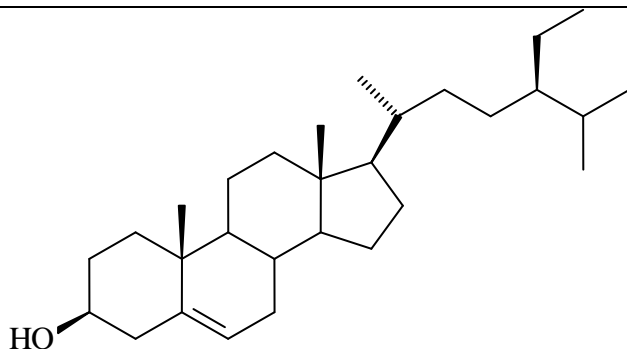
Artigos publicados na literatura relacionados com a espécie *C. verticillata* L. investigam as atividades, antibacteriana, citotóxica, antitumoral, toxicológica (pré-clínica), anti-inflamatória, diurética, antifúngica, antidiabética e efeito hipoglicemiante

(fase clínica) (BELTRAME *et al*, 2001; 2002a; 2002b; SANTOS *et al*, 2008; LUCENA *et al*, 2010; VASCONCELOS *et al*, 2007; CARVAJAL *et al*, 1983; GARCIA *et al*, 2000; CANO e VOLPATO, 2004; BOLSONI *et al*, 2008; SILVA *et al*, 2007).

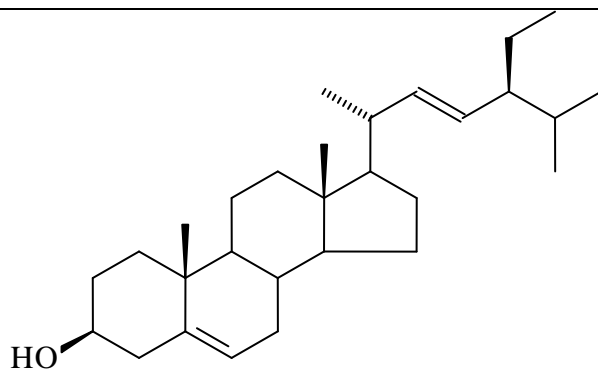
A tabela 1, apresenta os esteroides, triterpenos e terpenóides isolados de espécies do gênero *Cissus*, dando destaque a espécie, estrutura, nome, parte da planta na qual foi isolada e sua devida referência.

Tabela 1. Esteróides, triterpenos e terpenóides isolados de espécies do gênero *Cissus*.

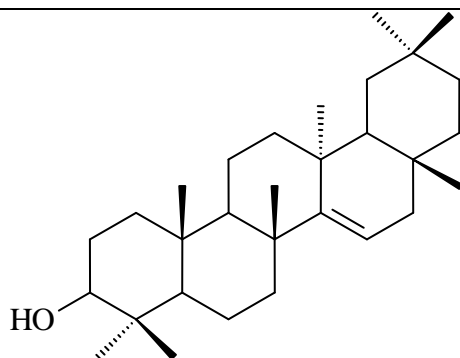
Estrutura	Nome / Classe
/Espécie/Parte/Referência	
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Campesterol ➤ Esteróide ➤ <i>C. rheifolia</i> ➤ Raízes ➤ SAIFAH <i>et al</i>, 1987
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Diosgenina ➤ Esteróide ➤ <i>C. sicyoides</i> ➤ Frutos (TOLEDO <i>et al</i>, 1983) ➤ Partes Aéreas (QUÍLEZ <i>et al</i>, 2004)
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hecogenina ➤ Esteróide ➤ <i>C. sicyoides</i> ➤ Frutos (TOLEDO <i>et al</i>, 1983) ➤ Partes Aéreas (QUÍLEZ <i>et al</i>, 2004)



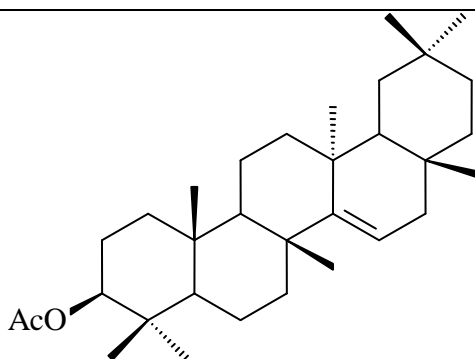
- β -Sitosterol
- Esteroide
- *C. sicyoides* / *C. quadrangularis* / *C. rheifolia*.
- Partes aéreas (BELTRAME *et al*, 2002), (GUPTA; VERMA, 1991)



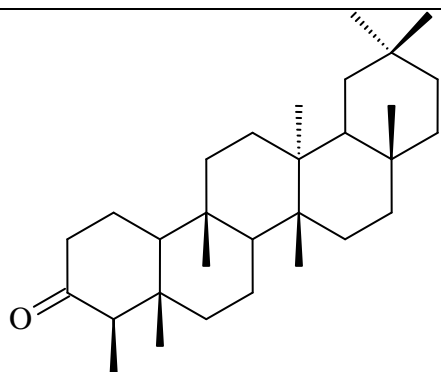
- Stigmasterol
- Esteroide
- *C. Rheifolia*
- Raíces
- SAIFAH *et al*, 1987



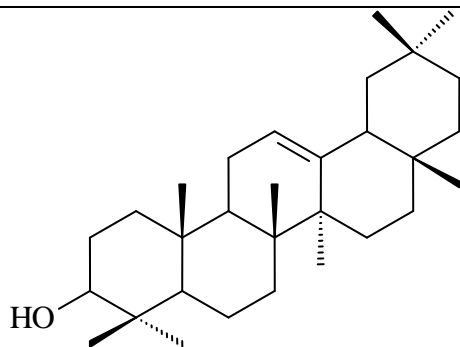
- Taraxerol
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes Aéreas
- GUPTA; VERMA, 1991



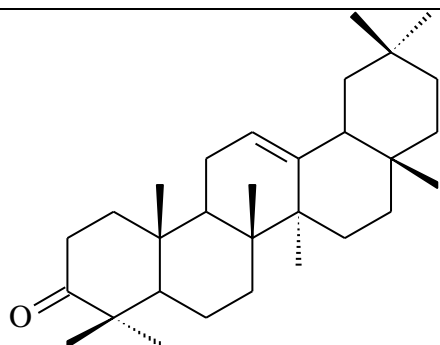
- Acetato de Taraxeril
 - Triterpeno
 - *C. quadrangularis*
 - Partes aéreas
 - GUPTA; VERMA, 1991
-



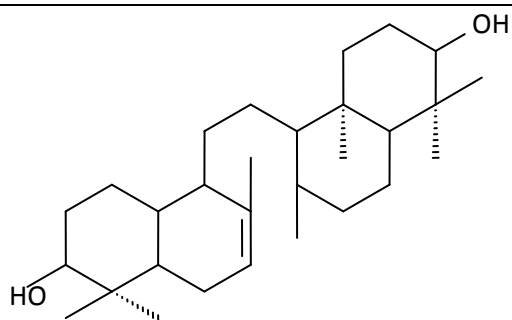
- Friedelan-3-ona
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA; VERMA, 1991



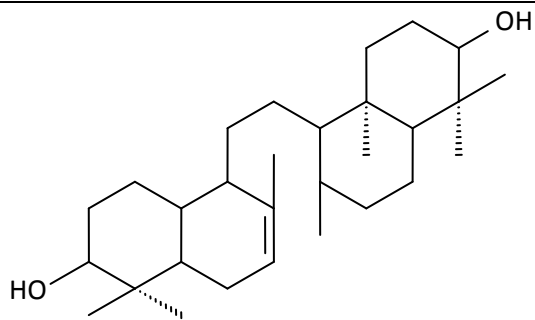
- β -amirina
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas (BHUTANI *et al*, 1984)
- Raíces (MENTHA *et al*, 2001)



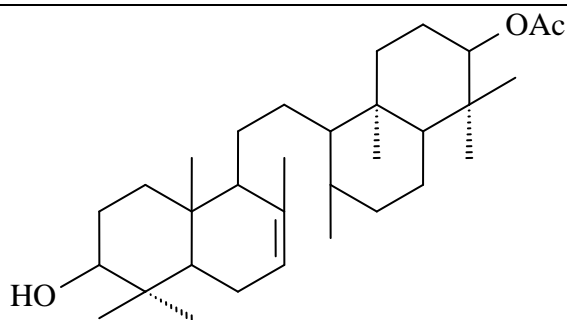
- β -amirona
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas (BHUTANI *et al*, 1984)
- Raíces (MENTHA *et al*, 2001)



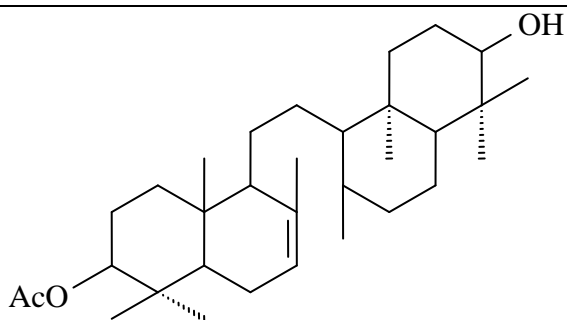
- Onocer-7-eno-3 α ,21 β -diol
 - Triterpeno
 - *C. quadrangularis*
 - Partes aéreas (BHUTANI *et al*, 1984)
 - Raíces (MENTHA *et al*, 2001)
-



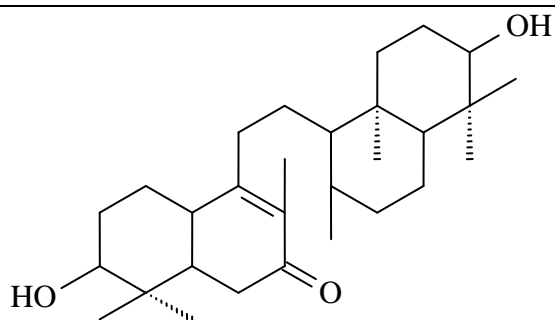
- Onocer-7-eno-3 β ,21 α -diol
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas (BHUTANI *et al*, 1984)
- Raíces (MENTHA *et al*, 2001)



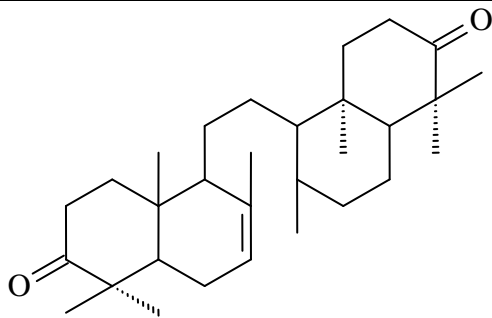
- Onocer-7-eno-3 α -21 β -diol-3-acetato
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas
- BHUTANI *et al*, 1984



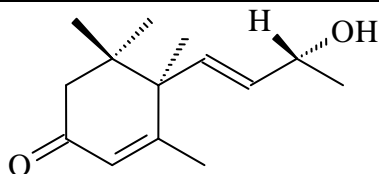
- Onocer-7-eno-3 β -21 α -diol-3-acetato
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas
- BHUTANI *et al*, 1984



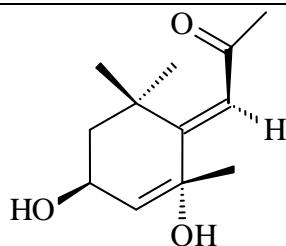
- 7-oxo-onocer-8-eno-3 β -21 α -diol
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes Aéreas (GUPTA *et al*, 1990)
- Raíces (MENTHA *et al*, 2001)



- Onocer-7-eno-3,21-diona
- Triterpeno
- *C. quadrangularis*
- Partes aéreas
- BHUTANI *et al*, 1984



- Vomifoliol
- Terpenóide
- *C. rheifolia*
- Folhas
- SAIFAH *et al*, 1983



- Romalea aleno
- Terpenóide
- *C. rheifolia*
- Folhas
- SAIFAH *et al*, 1983

Através dos dados descritos na literatura, pode se observar a ocorrência de esteroides (5), triterpenos (11) e terpenóides (2) isolados de espécies de plantas do Gênero *Cissus*.

As partes mais utilizadas nos estudos fitoquímico do gênero *Cissus* são as partes aéreas que envolvem tanto as folhas como os caules, já que por serem do tipo trepadeira, apresentam grande abundância destes além do fato de que são estas partes que são usadas pela população no que diz respeito à administração de chás para o tratamento de certos males. Podendo então atribuir a estas partes a responsabilidade pelas suas atividades biológicas e farmacológicas.

CAPÍTULO 4
DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL

4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1 Determinação da composição de ácidos graxos no óleo fixo de EHTCV

O óleo fixo obtido a partir do extrato hexânico dos talos de *Cissus verticillata* (EHTCV) foi submetido ao processo de saponificação para obtenção dos sais dos ácidos graxos seguindo técnica usual (Item 6.9.1, pág.78) conforme fluxograma 5, página 81. Os sais dos ácidos graxos resultantes de saponificação foram submetidos a reação de metilação obtendo-se os respectivos ésteres metílicos. Foi utilizada para a purificação dos ésteres metílicos cromatografia em gel de sílica (Tabela 15, pág. 78), resultando em um óleo amarelado denominado OEHTCV. A análise de OEHTCV por Cromatografia Gás-Líquido acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM), forneceu um cromatograma observado na figura 4, página 20 e os espectros de massa apresentados nas figuras 5 à 15, páginas 20 à 23.

A análise comparativa dos espectros de massa correspondentes aos picos observados no cromatograma (Figura 4, pág.20), com os espectros de massa contidos no banco de dados, permitiu a identificação de 11 ácidos graxos livres do óleo fixo de EHTCV através de seus ésteres metílicos, conforme tabela 2.

Tabela 2. Ácidos graxos livres identificados no óleo fixo de EHTCV através de seus ésteres metílicos.

Substância	T.R.(min)	Teor (%)	P.M.	F.M.
Ácido tetradecanóico	19,5	1,1	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido pentadecanoico	21,4	1,32	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
Ácido hexadecanóico	23,0	31,5	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido heptadecanóico	24,2	3,4	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Ácido 9,12 octadecadienóico	25,0	11,15	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Ácido 9-octadecenóico	25,1	1,39	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ácido octadecanóico	25,4	11,4	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido eicosanóico	27,3	5,5	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Ácido docosanóico	29,0	5,0	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Ácido tricosanóico	29,8	1,4	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂
Ácido tetracosanóico	30,5	2,44	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Total	-	75,6	-	-

T.R. – Tempo de retenção; P.M.- Peso Molecular; F.M. – Fórmula Molecular

4.2 Determinação da composição de ácidos graxos no óleo fixo de EHFCV

O extrato hexânico das folhas de *Cissus verticillata* (EHFCV) foi submetido a saponificação para obtenção dos sais de ácidos graxos (Item 6.9.3, pág. 79) conforme fluxograma 5, página 81. Os produtos resultantes do processo de saponificação foram metilados obtendo-se seus respectivos ésteres metílicos. Uma coluna cromatográfica em gel de sílica (Tabela 16, pág. 79) foi utilizada para a purificação dos ésteres metílicos, obtendo-se um óleo amarelado denominado OEHFCV. Em seguida OEHFCV foi analisado por Cromatografia Gás-Líquido acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM), fornecendo um cromatograma visto na figura 16 da página 23 e os espectros de massa observados nas figuras 17 a 20, páginas 23 e 24.

Análise comparativa dos espectros de massa correspondentes aos picos observados no cromatograma (Figura 16, pág. 23), com os espectros de massa contidos em banco de dados, permitiu a identificação de 14 ácidos graxos livres do óleo fixo de EHFCV através de seus ésteres metílicos, conforme tabela 3.

Tabela 3. Ácidos graxos livres identificados no óleo fixo de EHFCV através de seus ésteres metílicos.

Substância	T.R.(min)	Teor (%)	P.M.	F.M.
Ácido tetradecanóico	19,5	4,0	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido pentadecanoico	21,4	1,1	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
Ácido 9-hexadecenóico	22,6	1,8	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido hexadecanóico	23,0	26,3	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido heptadecanóico	24,3	2,1	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Ácido 9,12 octadecadienóico	25,0	15	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Ácido 9,12,15 octadecatrienóico	25,1	23,8	278	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Ácido octadecanóico	25,4	8,8	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido nonadecanóico	26,4	0,4	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
Ácido eicosanóico	27,3	4,2	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Ácido heneicosanóico	28,2	0,4	326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂
Ácido docosanóico	29,0	1,4	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Ácido tricosanóico	29,8	0,5	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂
Ácido tetracosanóico	30,5	0,7	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂

T.R. – Tempo de retenção; P.M.- Peso Molecular; F.M. – Fórmula Molecular

Figura 4. Cromatograma de OEHTCV.

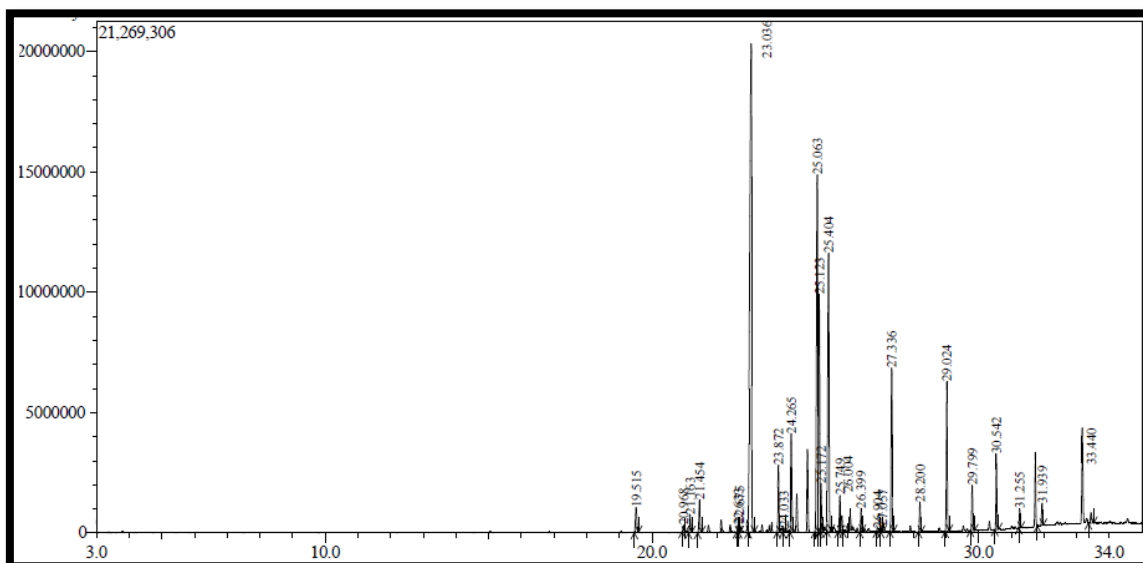


Figura 5. Espectro de massa do éster metílico do ácido tetradecanóico.

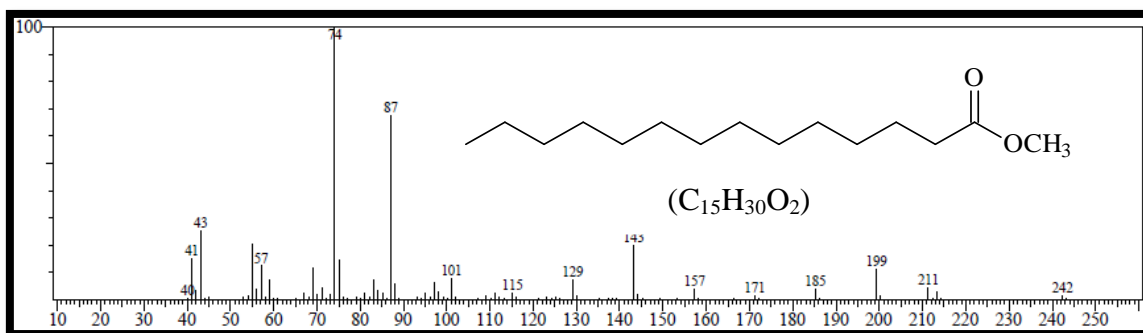


Figura 6. Espectro de massa do éster metílico do ácido pentadecanóico.

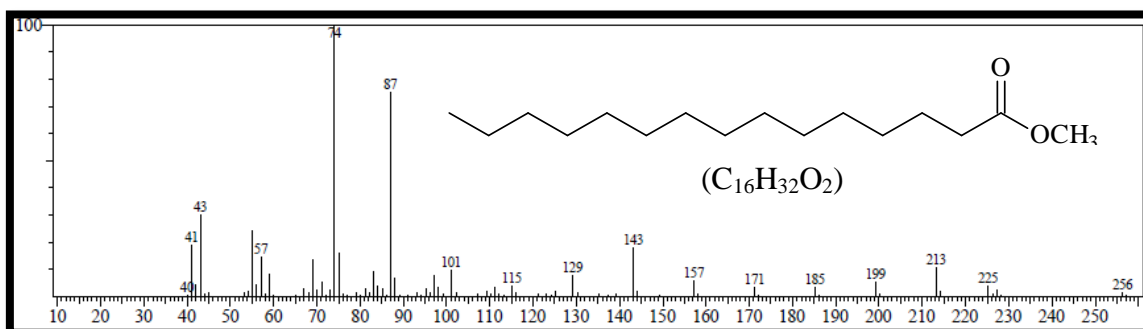


Figura 7. Espectro de massa do éster metílico do ácido hexadecanóico.

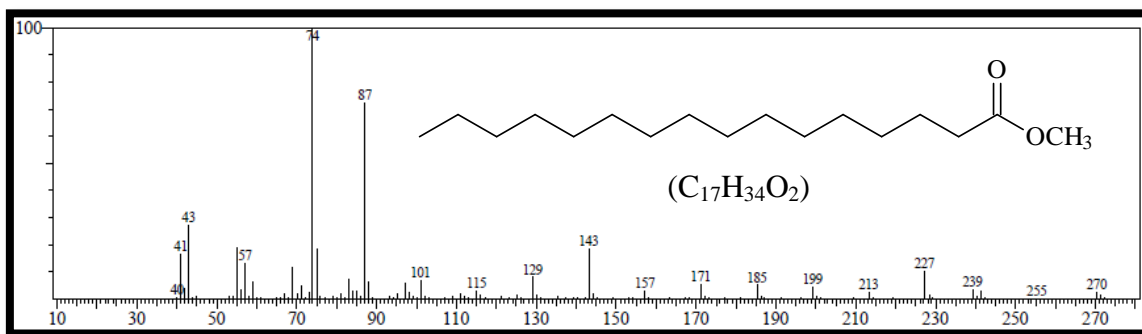


Figura 8. Espectro de massa do éster metílico do ácido heptadecanóico.

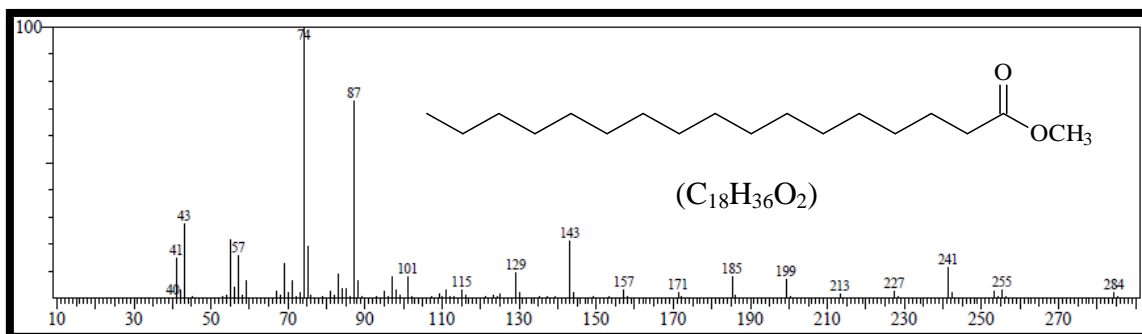


Figura 9. Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,12 octadecadienóico.

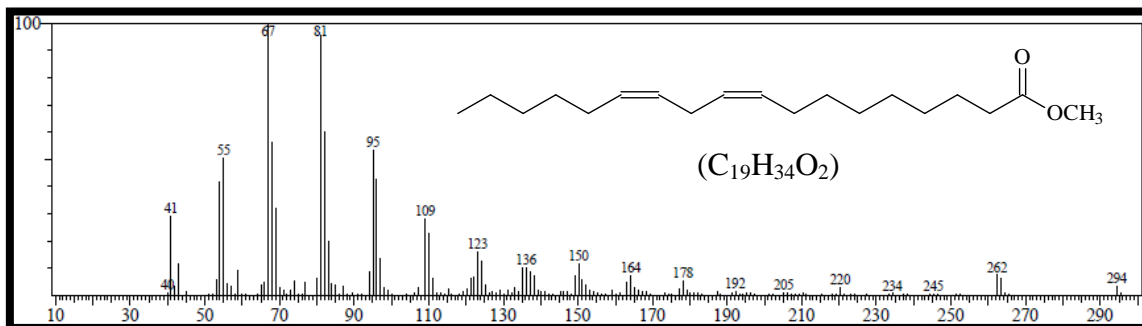


Figura 10. Espectro de massa do éster metílico do ácido 9-octadecenóico.

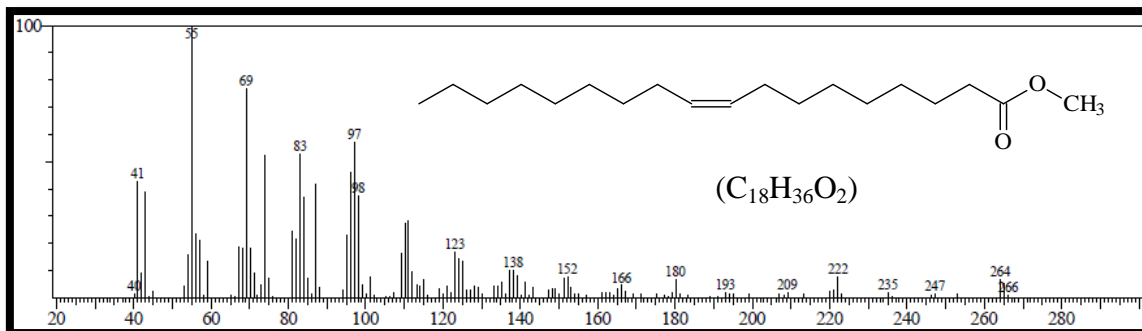


Figura 11. Espectro de massa do éster metílico do ácido octadecanóico.

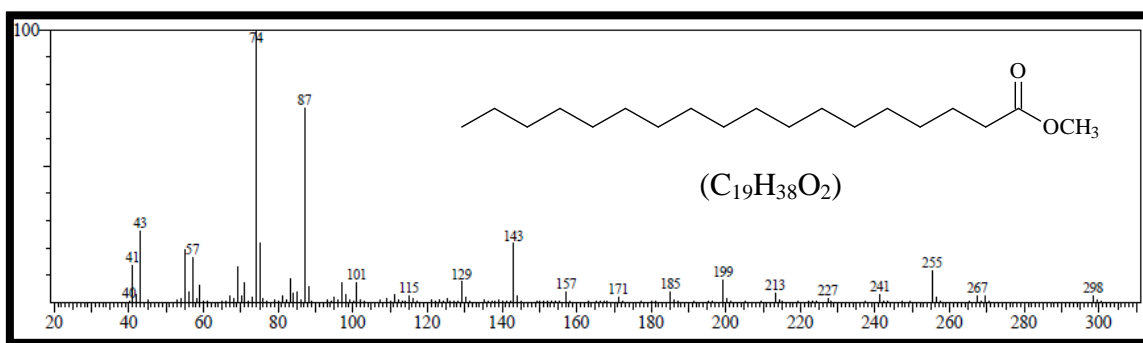


Figura 12. Espectro de massa do éster metílico do ácido eicosanóico.

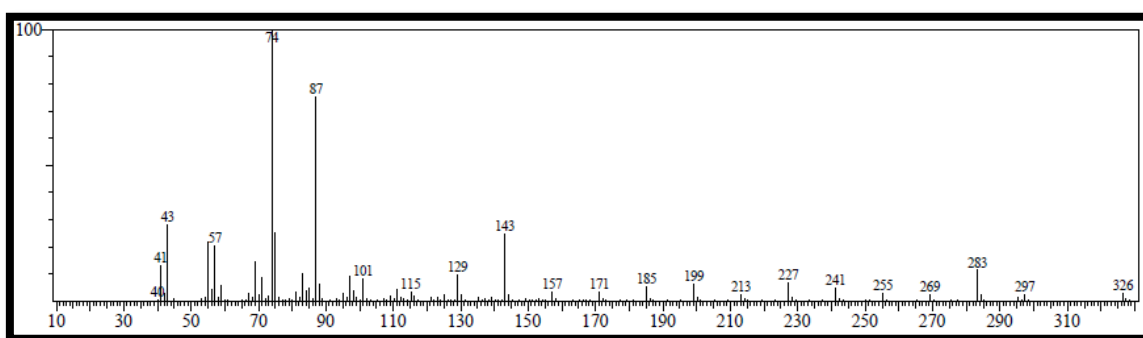


Figura 13. Espectro de massa do éster metílico do ácido docosanóico.

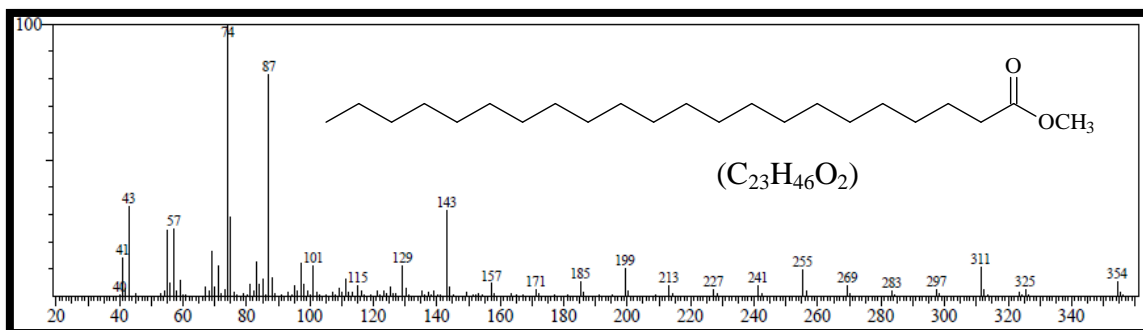


Figura 14. Espectro de massa do éster metílico do ácido tricosanóico.

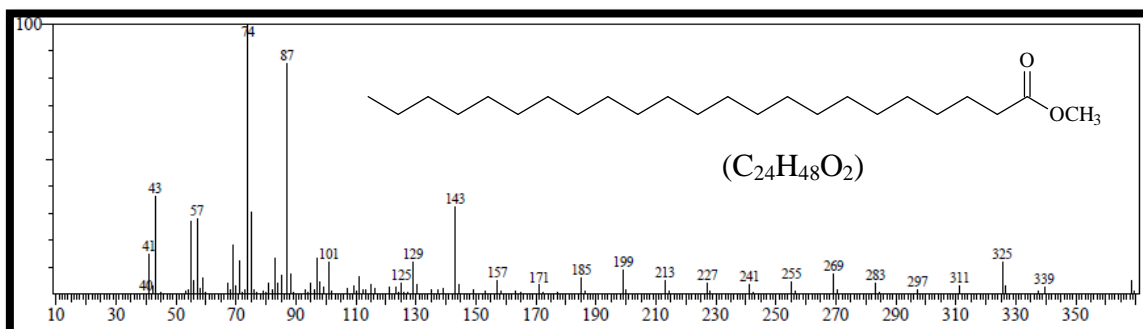


Figura 15. Espectro de massa do éster metílico do ácido tetracosanóico.

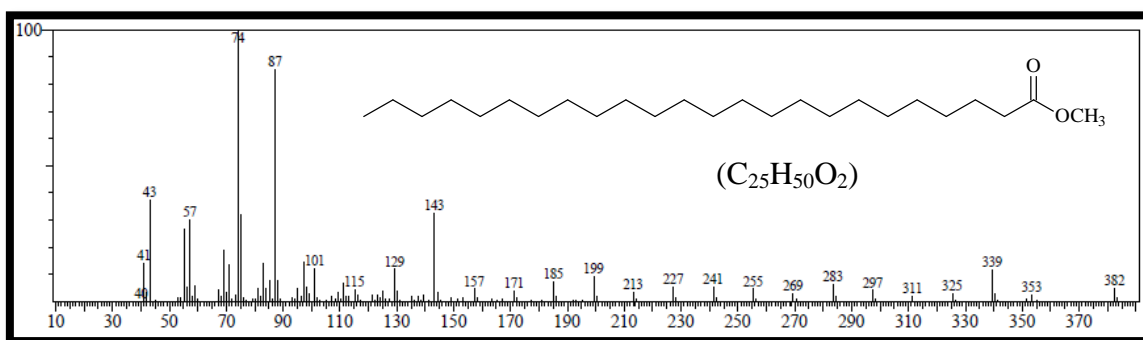


Figura 16. Cromatograma de OEHFCV.

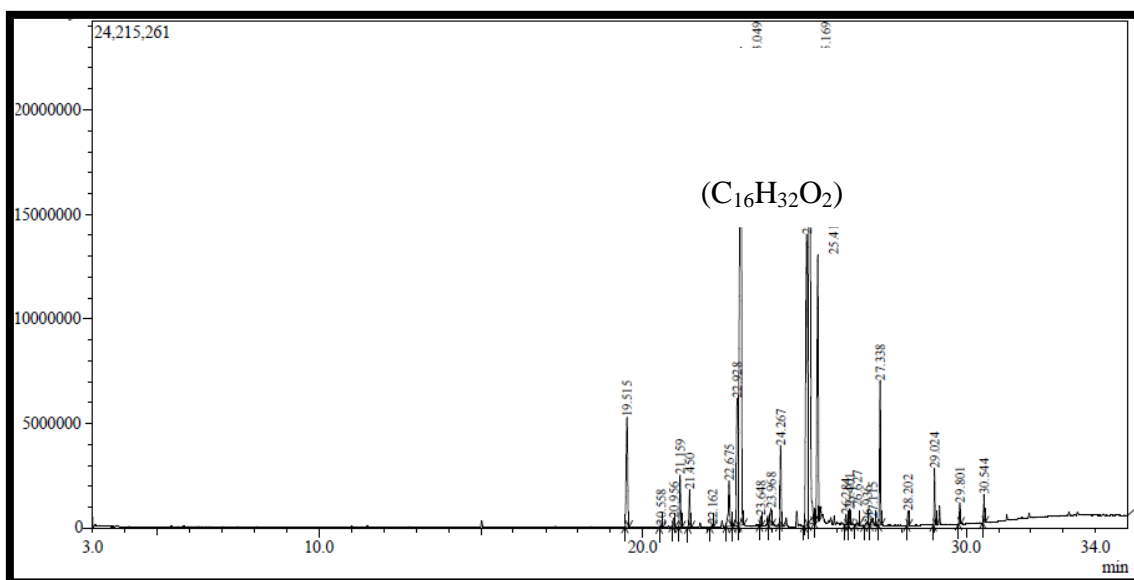


Figura 17. Espectro de massa do éster metílico do ácido 9-hexadecenóico.

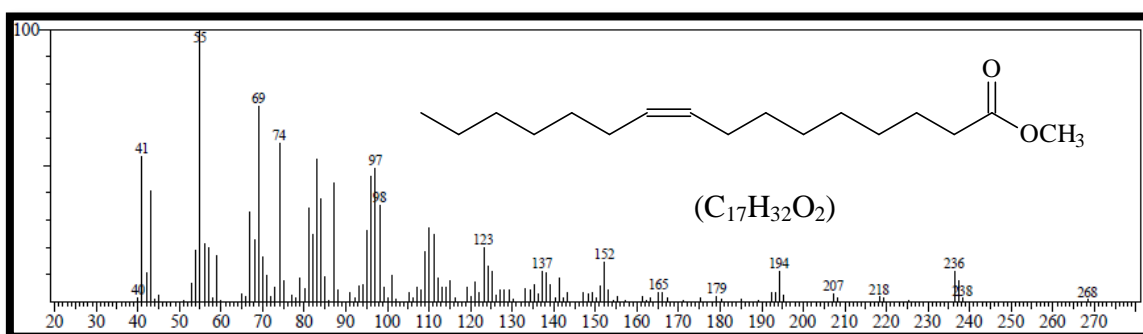


Figura 18. Espectro de massa do éster metílico do ácido 9,12,15 octadecatrienóico.

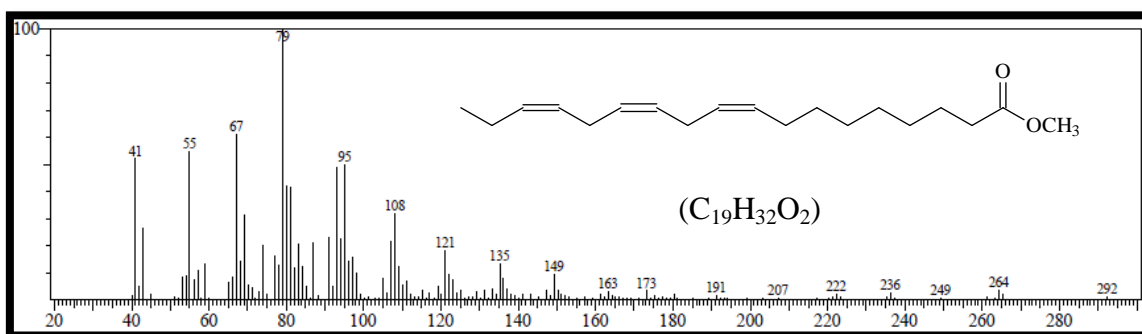


Figura 1917. Espectro de massa do éster metílico do ácido nonadecanóico.

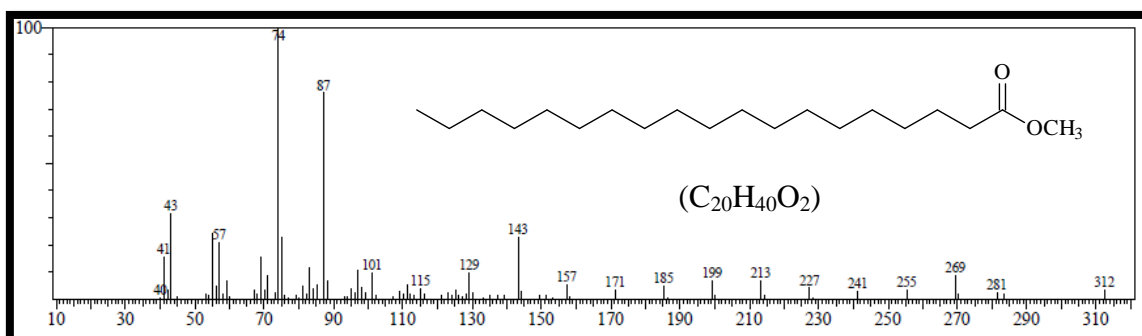
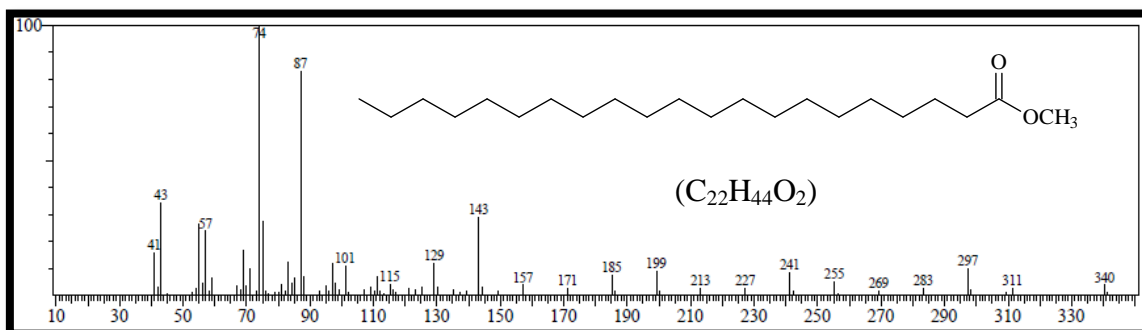


Figura 20. Espectro de massa do éster metílico do ácido heneicosanóico.



4.3 Determinação estrutural de CV-1

O extrato hexânico dos talos de *Cissus verticillata* (EHTV) foi cromatografado em gel de sílica e resultou na fração C1-9 (1550 mg). Cromatografia da fração C1-9 em gel de sílica originou a fração de C2-9 (306 mg) (Fluxograma 2, pág 71) como um sólido branco amorfo, ponto de fusão de 116-119 °C, denominado **CV-1**.

O espectro de absorção na região do IV de CV-1 (Figura 32, pág 31), exibiu bandas compatíveis com a presença de grupos hidroxila (ν_{OH} 3419 cm^{-1}), metil e metileno (ν_{C-H} 2934 cm^{-1} e δ_{CH_2/CH_3} 1463 e 1376 cm^{-1}), ligação olefínica ($\nu_{C=C}$ 1643 cm^{-1}) e banda de deformação axial da ligação C-O de alcoóis/éteres (ν_{CO} 1051 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de CV-1 (Figura 33, pág.31), exibiu 28 sinais sendo dois devidos a carbonos olefínicos [δ 141,0 (C) e 122,0 (CH)], um a carbono sp^3 oxigenado (δ_C 72,0) e os demais referentes a carbonos saturados devidos a esqueletos oriundos do encadeamento de unidades de isopreno.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 32, pág. 32), possibilitou determinar a presença de 6 sinais de carbono metílicos (δ 20,1; 19,6; 19,3; 19,0; 12,2; 12,1), 10 carbonos metilênicos (δ 42,6; 40,0; 37,5; 34,2; 31,9; 28,5; 26,4; 24,5; 23,3; 21,3), 9 carbonos metínicos (δ 122,0; 72,1; 57,0; 56,3; 50,4; 46,1; 36,4; 32,2; 29,4) e 3 carbonos não hidrogenados (δ 141,0, 43,5 e 36,8). Assim os vinte e oito sinais indicaram a existência de um componente de natureza esteroidal. Os deslocamentos químicos em δ 141,0 (C) e 122,0 (CH) confirmaram a presença de uma ligação dupla (C = C) trissubstituída.

O espectro de RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) (Figura 35, pág. 32) [expansão na região de δ 0,5 a 2,45, (Figura 36, pág. 33)], apresentou um duplete em δ 5,36 (1H, d, J = 7,1 Hz) correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico; um sinal múltiplo em δ 3,53 correspondente a um átomo de hidrogênio que, juntamente com o sinal em δ 72,1 de carbono metínico no espectro de RMN ^{13}C , revelou um grupo hidroxila a um carbono secundário; o espectro registrou também, entre outros, sinais para 18 hidrogênios metílicos [δ 1,04 (s, 3H), 0,93 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 0,92 a 0,81 (m, 9H), 0,69 (s, 3H)];

Os dados espectroscópicos obtidos para CV-1 e a comparação com dados registrados na literatura (Tabela 4, pág. 29) indicaram que CV-1 trata-se do β -sitosterol, cuja estrutura é vista abaixo (Figura 31, pág 29).

Figura 18. Estrutura do β -sitosterol.

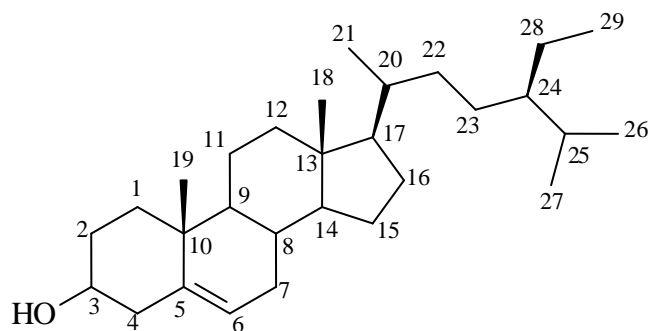


Tabela 4. Dados comparativos de RMN ^{13}C de CV-1 (CDCl_3 , 300 MHz) com os descritos na literatura para beta-sitosterol (MACARI, 1990).

C	CV-1	β -sitosterol
1	37,5	37,2
2	29,9	31,6
3	72,0	71,7
4	42,6	42,3
5	141,0	140,7
6	121,9	121,6
7	31,9	31,8
8	32,2	31,8
9	50,4	50,1
10	36,7	36,4
11	21,3	21,1
12	40,0	39,7
13	43,5	42,3
14	57,0	56,7
15	24,5	24,2
16	28,5	28,1
17	56,3	56,1
18	12,2	11,9
19	19,6	19,3

20	36,4	36,0
21	19,0	18,7
22	34,2	33,9
23	26,4	26,1
24	46,1	45,8
25	29,4	29,1
26	20,0	19,6
27	19,3	18,9
28	23,3	23,0
29	12,1	11,9

Figura 19. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1.

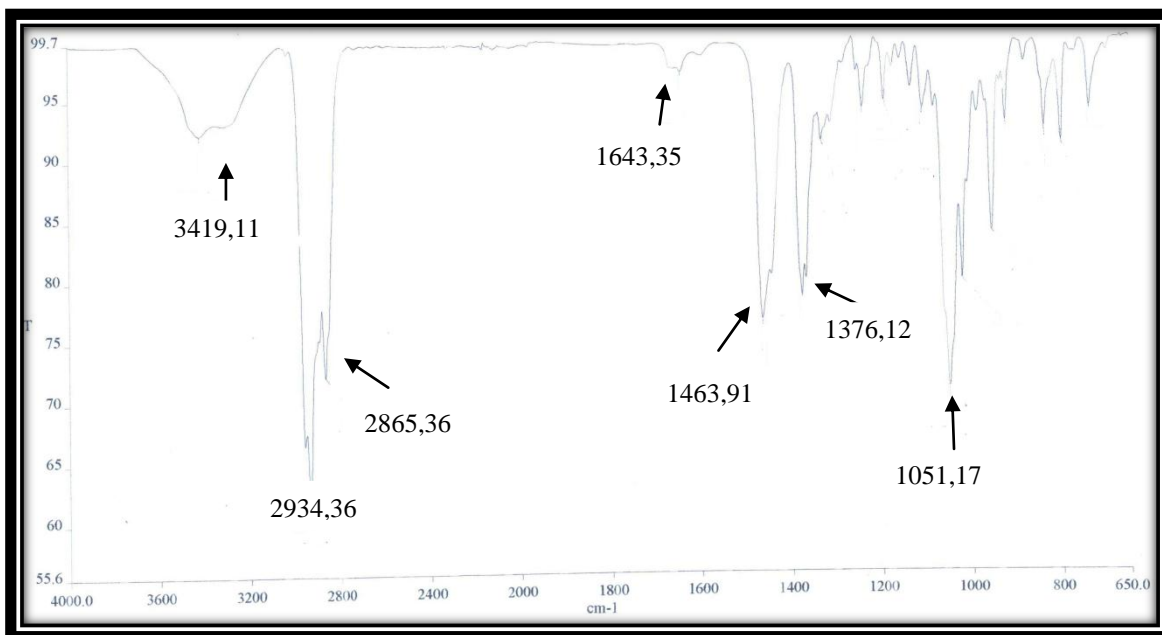


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C - CPD de CV-1 (CDCl_3 , 75 MHz).

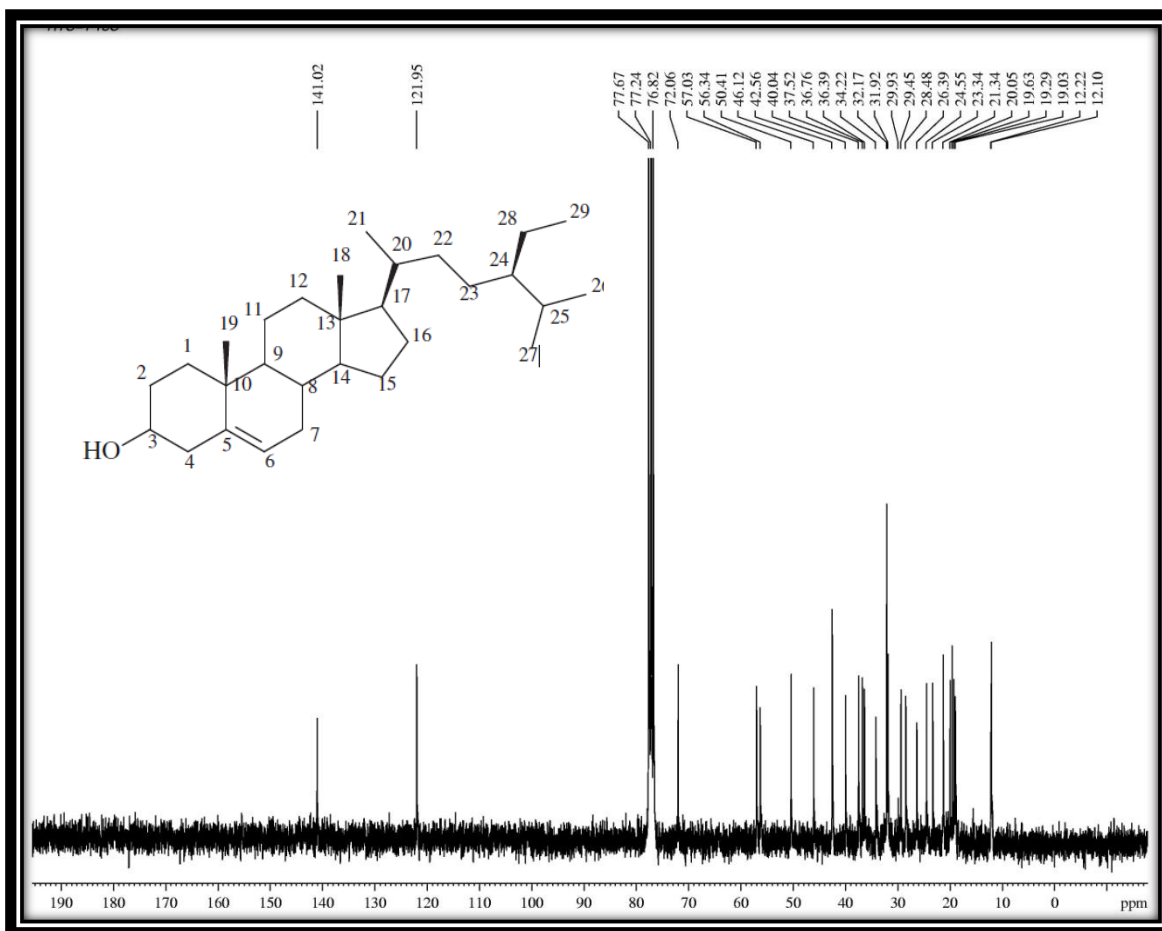
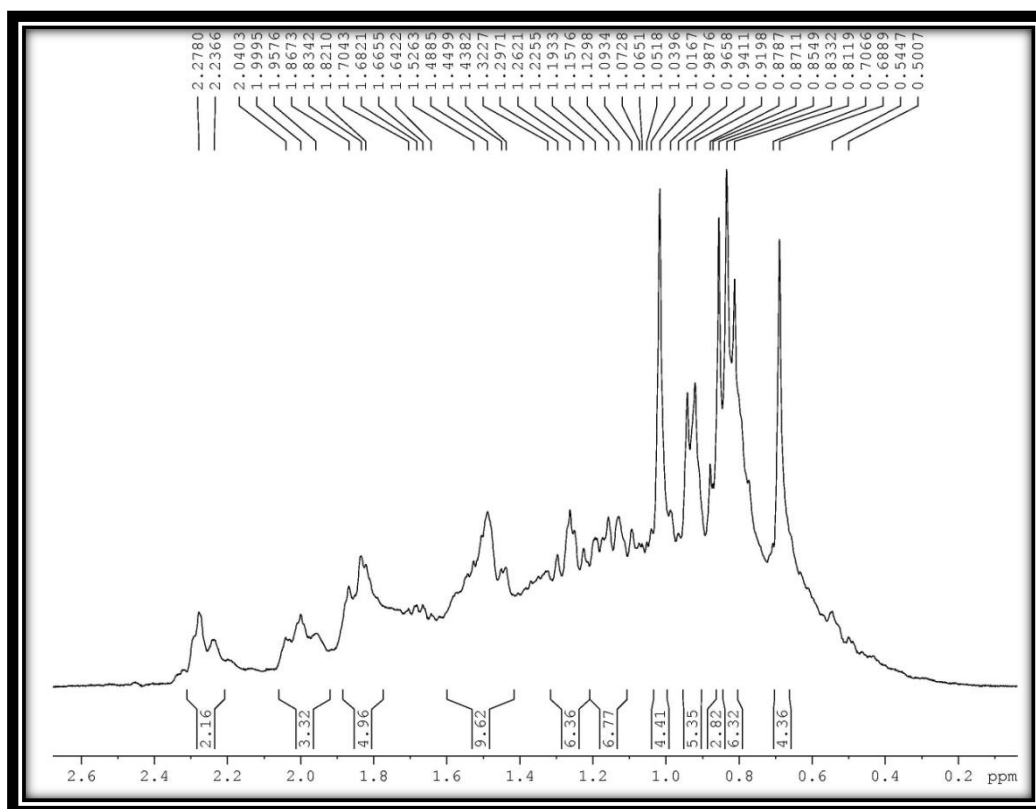


Figura 23. Espectro expandido de RMN ^1H de CV-1 (CDCl_3 , 300 MHz).



4.4 Determinação estrutural de CV-2

O extrato hexânico das folhas de *Cissus verticillata* (EHFV) foi cromatografado em gel de sílica e originou a fração C1-4 (1500 mg). Cromatografia em gel de sílica de C1-4 originou, por sua vez, a fração de C2-8 (44,0 mg) como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão de 88,0-88,9 °C, denominado **CV-2** (Fluxograma 4, pág. 75)

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (Figura 37, pág. 35) de **CV-2** mostrou uma banda larga em 3282 cm^{-1} característica de deformação axial de grupo O–H; bandas intensas em 2916 e 2848 cm^{-1} relacionadas à deformação axial da ligação C–H de carbono sp^3 ; absorção em 1462 cm^{-1} devida a deformação angular de grupos metileno, além de absorção em 1061 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação C–O de alcoóis/éteres.

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz), (Figura 38, pág. 35) apresentou apenas 4 sinais, sendo um tripleto em δ 0,89 (3H, t, $J = 6,5\text{Hz}$) correspondente a hidrogênios metílicos ligados a hidrogênios de um grupo CH_2 ; um simpleto largo de alta intensidade em δ 1,27 característico de hidrogênios metilênicos (CH_2) em carbonos saturados; um outro tripleto em δ 3,65 (2H, t, $J = 6,5\text{Hz}$) relativo a hidrogênios metilênicos ligado a carbono sp^3 oxigenado e, um multiplete centrado em 1,57 ppm atribuído a um grupo CH_2 ligado a metila terminal..

O espectro de RMN ^{13}C – CPD (Figura 41, Pág. 37) registrou como destaque um sinal em δ 29,85 de alta intensidade atribuído a vários carbonos não funcionalizados, característico de uma cadeia longa de carbonos CH_2 (em conformidade com o sinal em δ 1,27 no espectro de RMN ^1H). Vale ainda destacar os sinais em δ 63,57 e 14,29 correlacionados a carbonos de um grupo CH_2 oxigenado e de um grupo CH_3 , respectivamente.

Um pico com maior massa em m/z 354 (detectado em m/z 355) (Figura 40, pág. 36) e picos em m/z 43, 57, 83, 97, 111, 125, 139, 153 e 167, isto é, com padrão de fragmentação típico de uma cadeia alcânica linear longa, permitiu deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{O}$ e identificar **CV-2** como o álcool de cadeia longa tetracosanol. Apresentando índice deficiência de hidrogênio igual à zero.



n-Tetracosanol

Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-2.

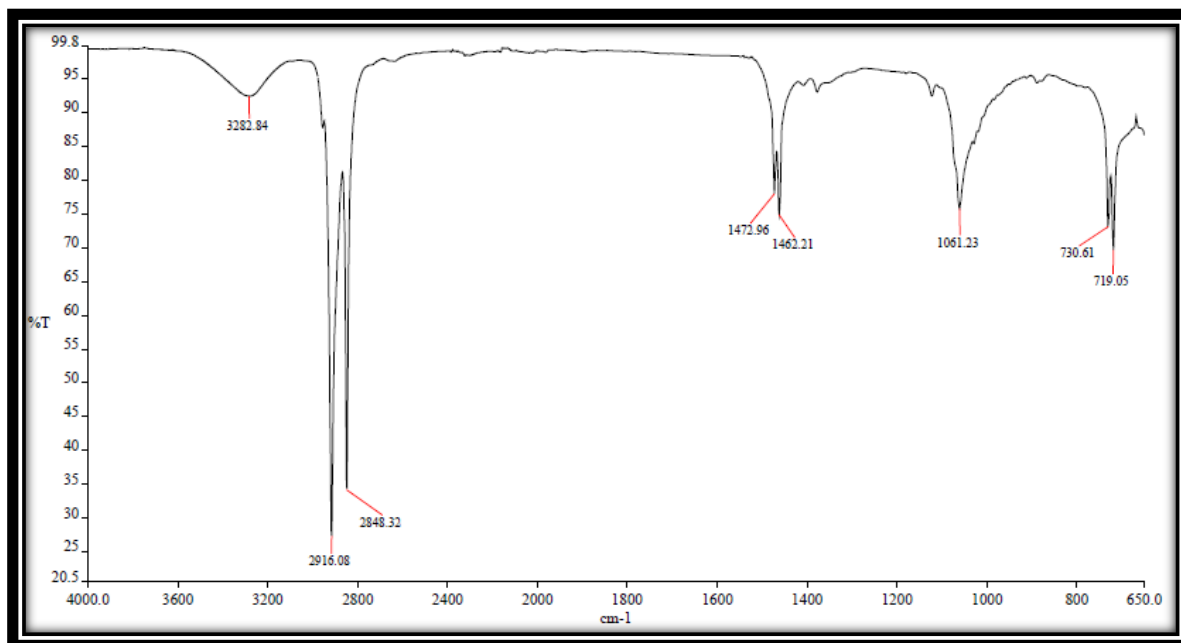


Figura 25. Espectro de RMN ^1H de CV-2 (CDCl_3 , 500 MHz).

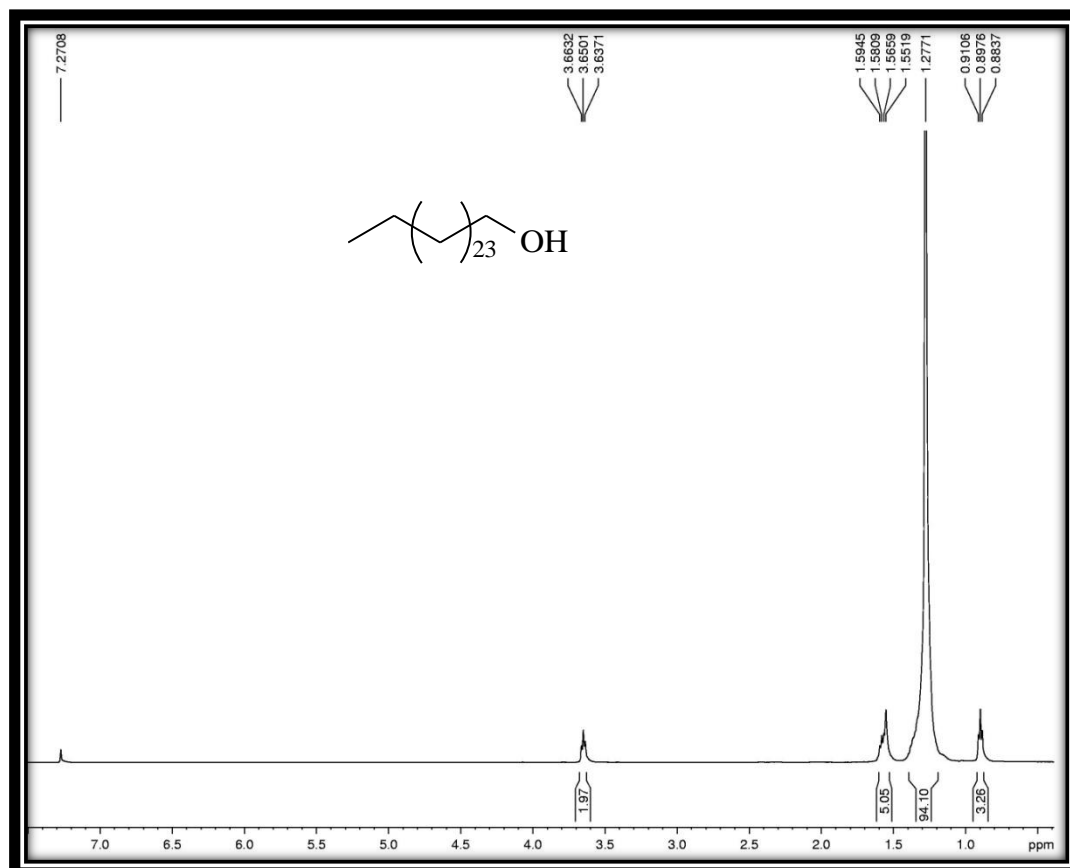


Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-2 na região (0,9 à 3,65 ppm).

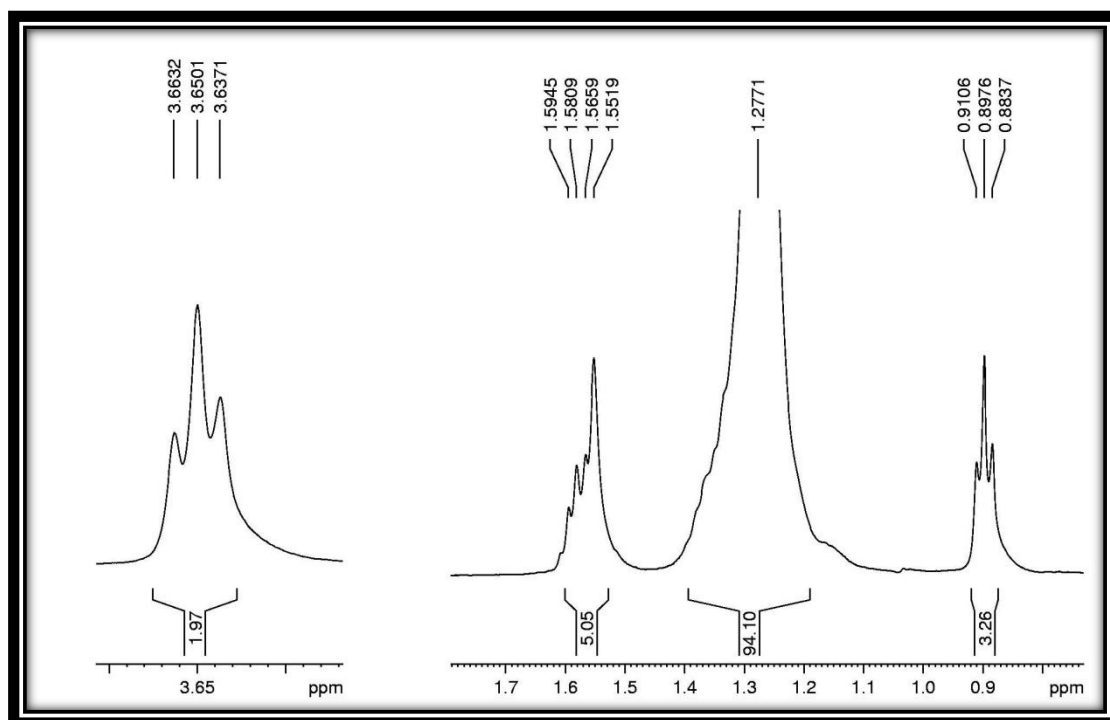


Figura 27. Espectro de massa (I.E 70 eV) de CV-2.

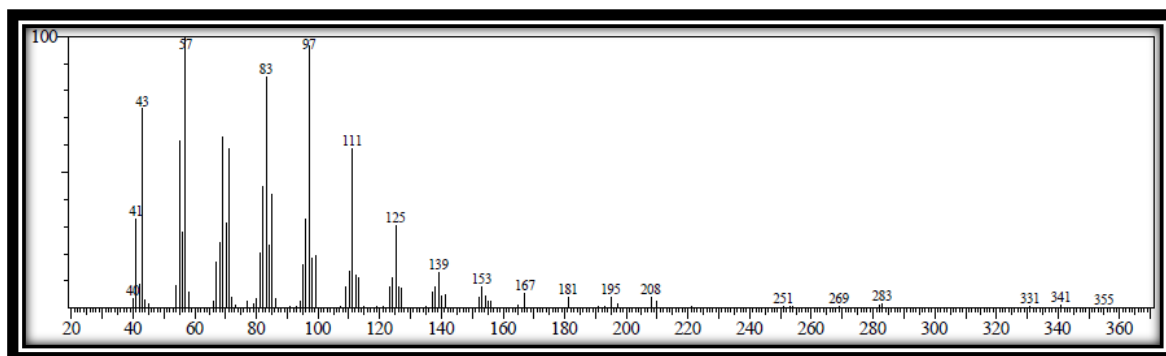
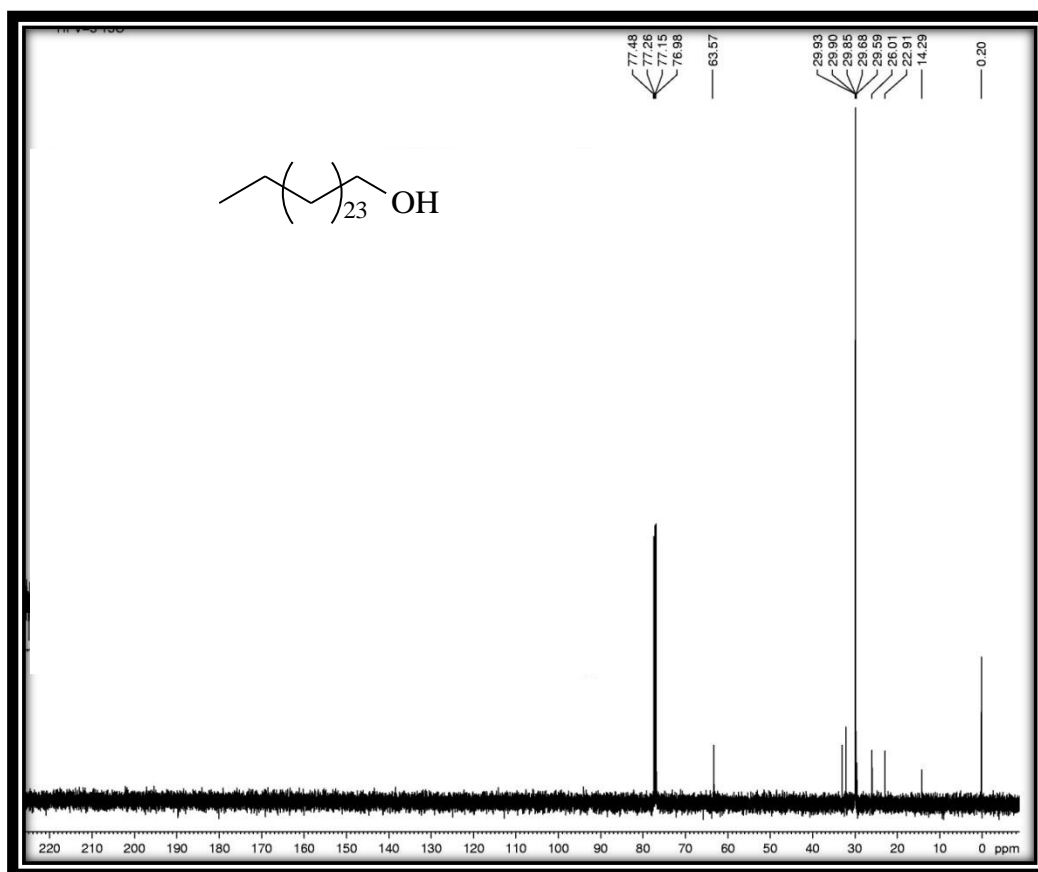


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 125 MHz) de CV-2.



4.5 Determinação estrutural de CV-3

O extrato hexânico das folhas de *Cissus verticillata* (EHFV) foi cromatografado em gel de sílica e forneceu a fração C1-5 (833,0 mg). Cromatografia de C1-5 em gel de sílica originou a fração C2-2 (24,1 mg) como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão de 280,9-283,4 °C, denominado **CV-3**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (Figura 43, pág. 41) de **CV-3** mostrou uma banda larga em 3487 cm^{-1} característica de deformação axial de grupo O–H; bandas intensas em 2917 e 2850 cm^{-1} relacionadas à deformação axial da ligação C–H de carbono sp^3 , assim como, bandas fracas em 1461 e 1384 cm^{-1} de deformação angular de grupos CH_2/CH_3 ; uma absorção fraca em 1641 cm^{-1} compatível com deformação axial de ligação C=C, e ainda, absorções em 1131 e 1036 cm^{-1} de deformação axial de ligação C–O.

O espectro de RMN ^{13}C - CPD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de **CV-3** (Figura 46, pág. 42), em combinação com o espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 48, pág. 43), além de um grande número de sinais na região de carbonos sp^3 , revelou um par de sinais para carbonos olefínicos em δ 158,3 (C) e 117,1 (CH) (Tabela 5, pág. 40) e um sinal referente a carbono sp^3 oxigenado em δ 78,9 (CH). Por fim apresentou 30 linhas espectrais, caracterizando uma substância com esqueleto triterpênico.

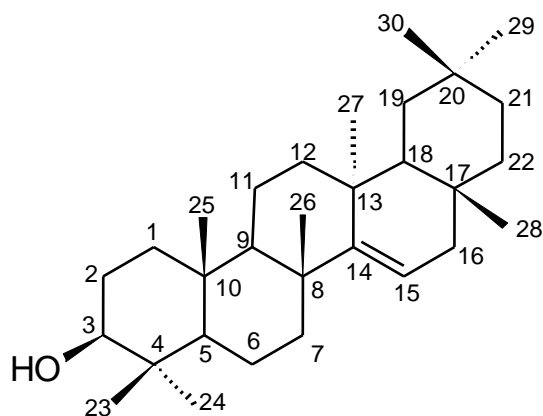
O espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de **CV-3** (Figura 44, pág. 41), exibiu como destaque, oito sinais simples em δ 0,93; 0,98; 1,02; 1,03; 1,10; 1,15; 1,27 e 1,34, devidos a oito grupos metilas ligados a carbonos terciários e assim, compatível com um triterpeno do tipo oleanano. Ainda, como destaque, um sinal duplete de duplete ($J = 6,3$ e $3,3$ Hz) em 3,48 (1H) foi atribuído a um hidrogênio carbinólico, em concordância com o carbono metínico oxigenado (δ 78,6) detectado no espectro de RMN ^{13}C . Assim, o grupo hidroxila indicado pelo espectro no IV foi localizado no átomo de carbono C-3 por tratar-se de caso comum em triterpenos desta natureza e também, por comparação com valores registrados na literatura (TAMAI *et al*, 1989). Esta situação foi confirmada no espectro de HMBC (Figura 53, pág. 46) através das correlações dos sinais em δ 0,98 e 1,03 dos hidrogênios metílicos CH_3 -23/ CH_3 -24 com o sinal em δ 78,9 do carbono C-3. O sinal em δ 5,65 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,5$ Hz) foi claramente correlacionado ao hidrogênio olefínico (δ_{C} 117,1).

Finalmente, a ligação dupla foi posicionada entre os carbonos C₁₄ e C₁₅ (ANDRADE-NETO, 1997) tendo em vista que, no espectro HMBC, o sinal em δ_C 158,3 devido ao carbono olefínico não hidrogenado (C-14) estabeleceu, simultaneamente, correlações com os sinais em δ_H 1,01 e 1,14 de dois grupos metila, no caso, CH₃-27/CH₃-26.

A atribuição dos deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e carbono pode ser comprovada através dos espectros 2D, HMBC (Figuras 53 à 55, pág 46 e 47.), HSQC (Figuras 50 à 52, pág.44 e 45) e COSY (Figura 49, pág. 44).

Desse modo, considerando a discussão acima e a comparação com dados de RMN ¹³C descrito na literatura, **CV-3** foi identificado como o triterpeno pentacíclico conhecido como 3 β -taraxerol, possuindo um índice de deficiência de hidrogênio igual a 6 devido o cinco ciclos e uma dupla.

Figura 29. Estrutura do 3 β -taraxerol.



3 β -taraxerol

Tabela 5. Análise comparativa dos dados de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3 com os registros na literatura (ANDRADE-NETO, 1997).

C	Literatura δ_c (ppm) (CDCl_3)	CV-3 δ_c (ppm)
1	38,2	38,6
2	27,3	28,8
3	79,2	78,9
4	39,2	40,1
5	55,7	56,7
6	19,0	19,9
7	35,3	36,1
8	39,0	40,1
9	48,9	49,9
10	37,9	39,0
11	17,7	18,5
12	36,0	36,7
13	37,8	39,0
14	158,3	159,2
15	117,1	117,8
16	37,0	37,6
17	38,0	38,5
18	49,5	50,3
19	41,5	42,4
20	29,0	29,7
21	34,0	34,7
22	33,3	34,1
23	28,2	29,4
24	15,6	17,2
25	15,6	16,4
26	30,1	30,8
27	26,1	26,6
28	30,0	30,7
29	33,5	34,1
30	21,5	22,2

Figura 30. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-3.

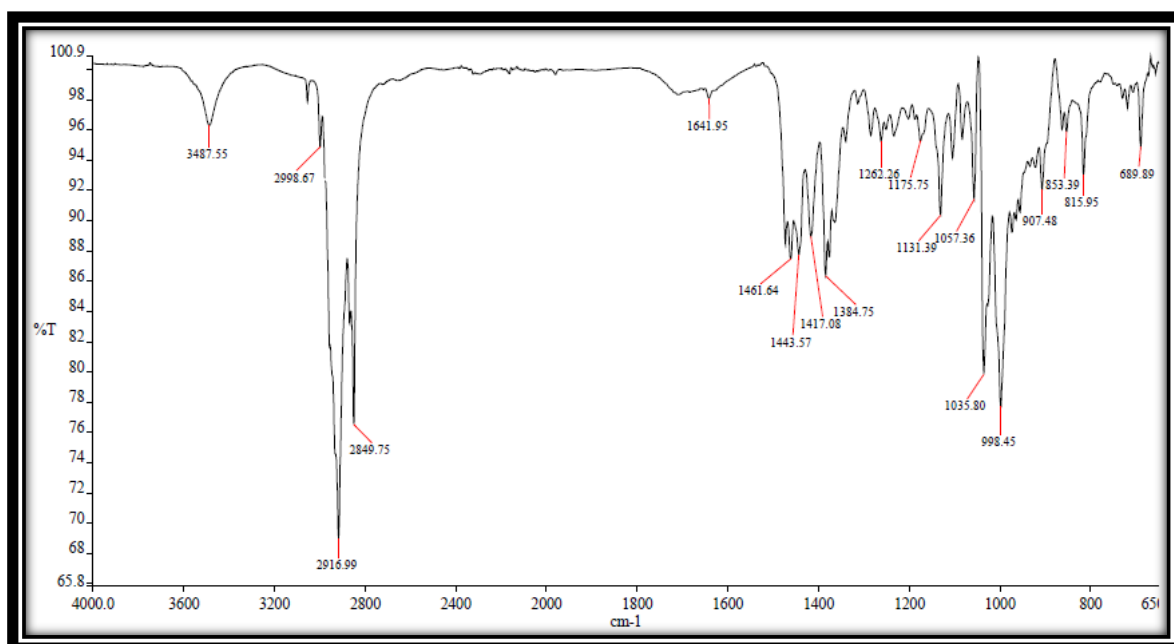


Figura 31. Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3.

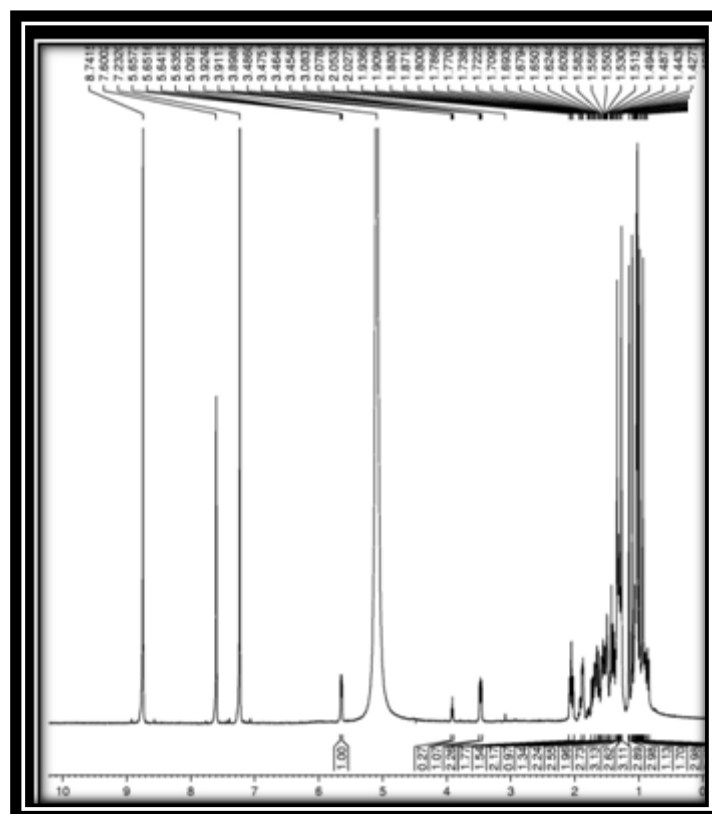


Figura 32. Espectro expandido de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3 região (1,2 à 5,7 ppm).

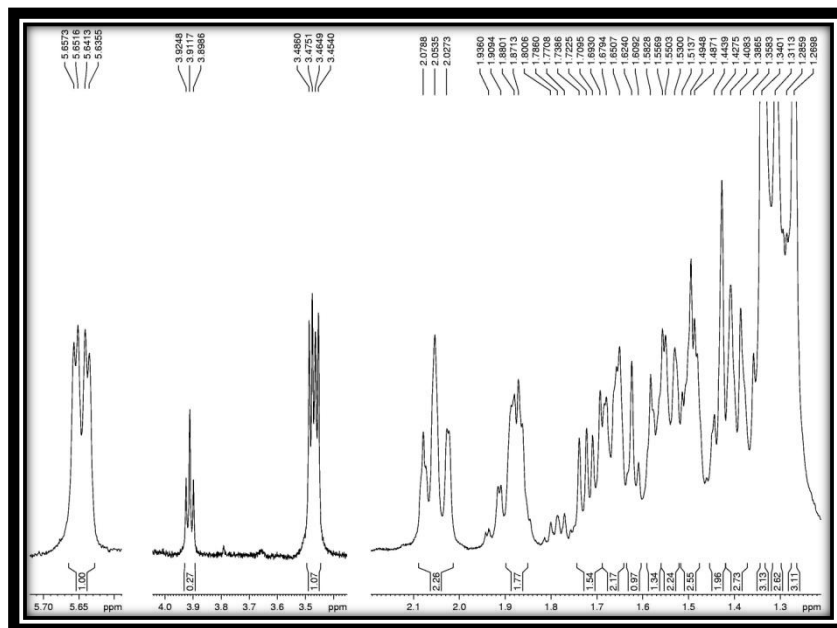


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C - CPD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3.

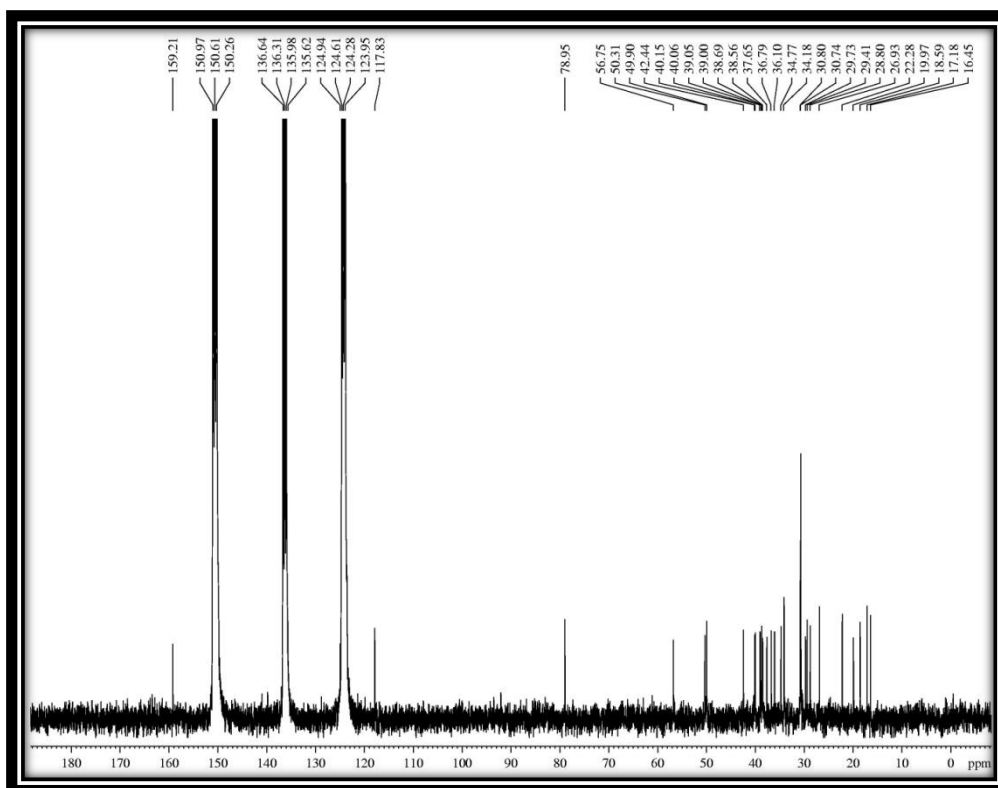


Figura 34. Espectro expandido de RMN ^{13}C -CPD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de CV-3 na região (10 à 85 ppm).

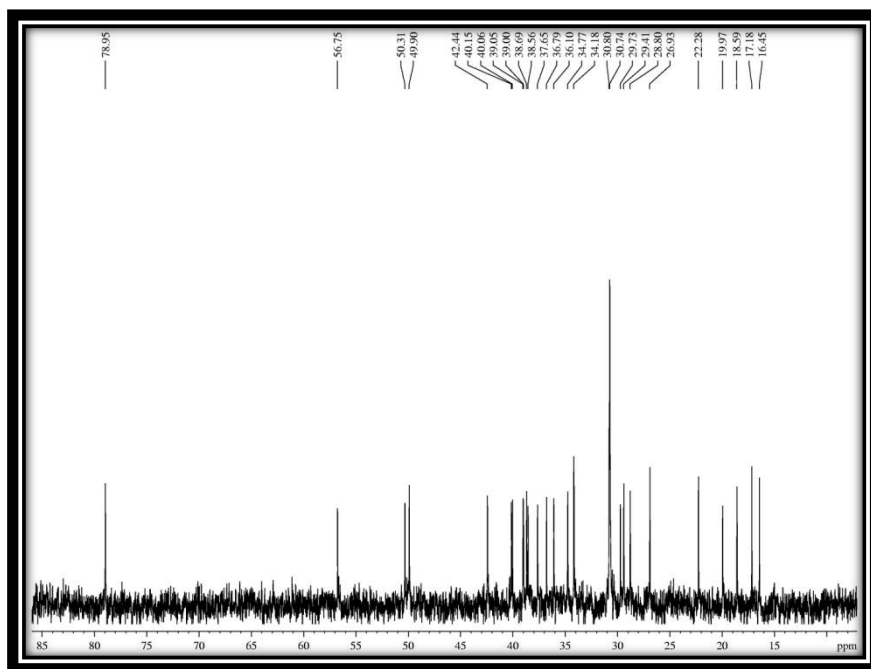


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C - APT de CV-3.

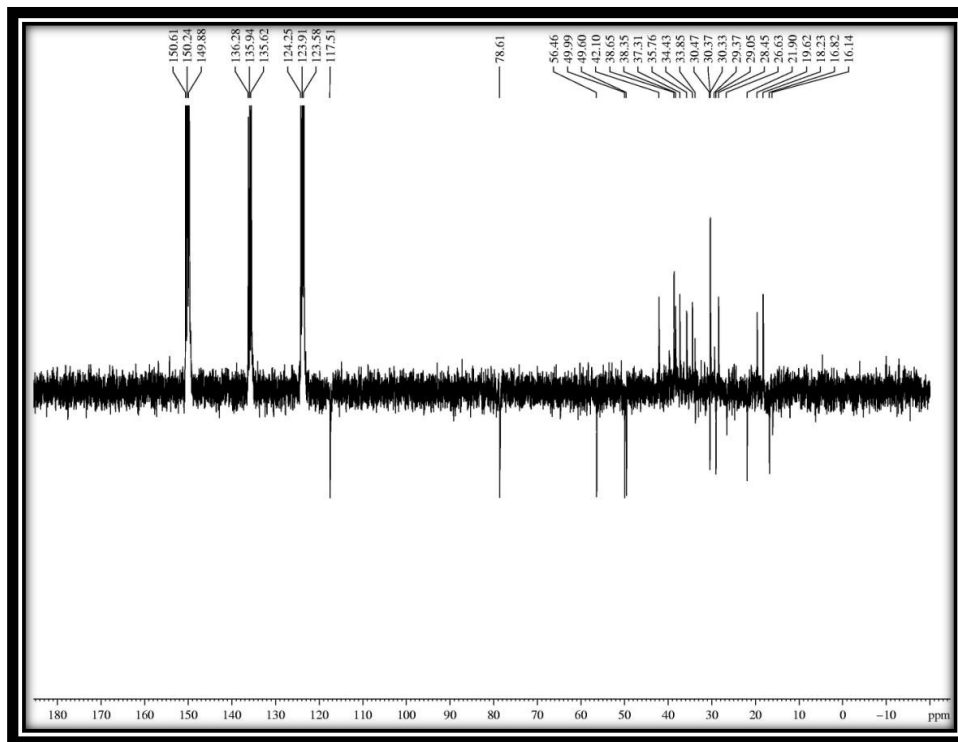


Figura 36. Espectro bidimensional de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) de CV-3.

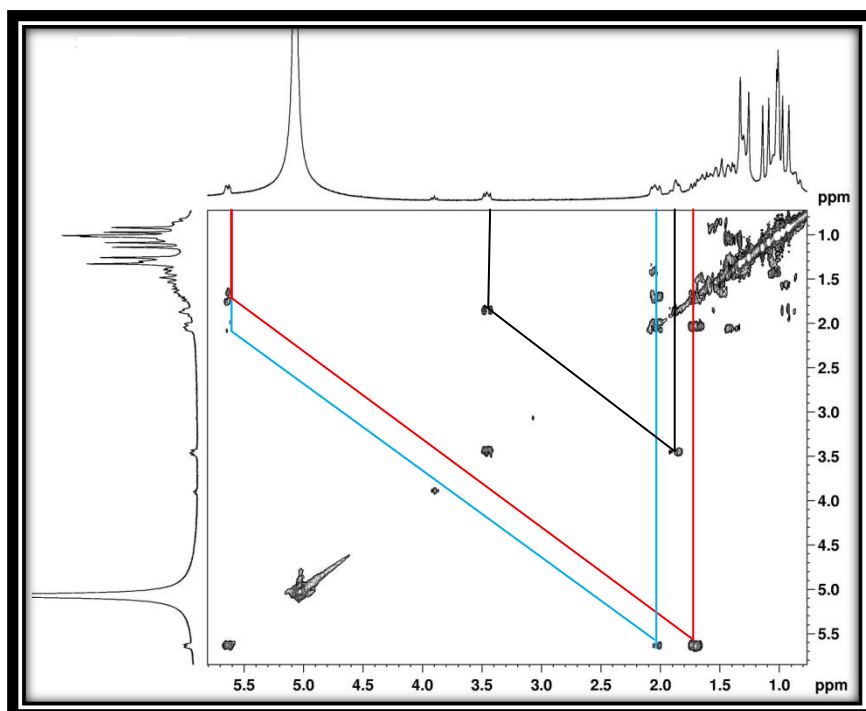


Figura 37. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1J_{\text{CH}}$ - HSQC) de CV-3.

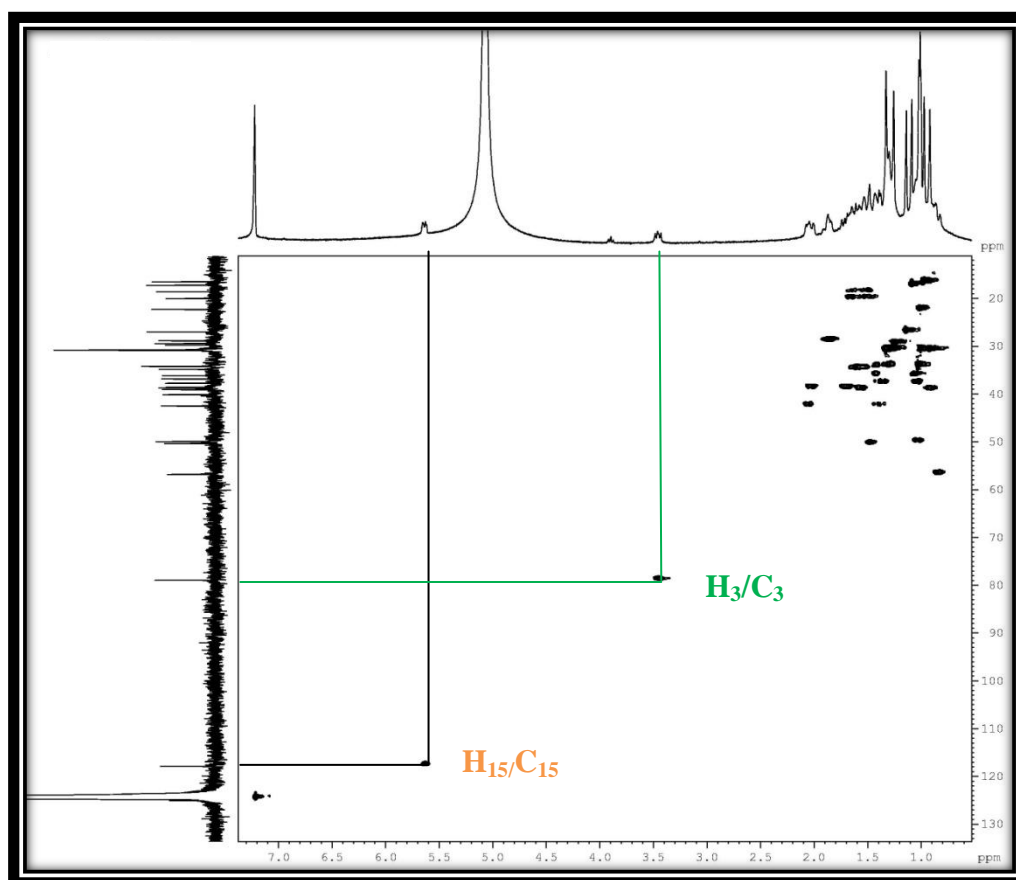


Figura 38. Expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}} - \text{HSQC}$) de CV-3.

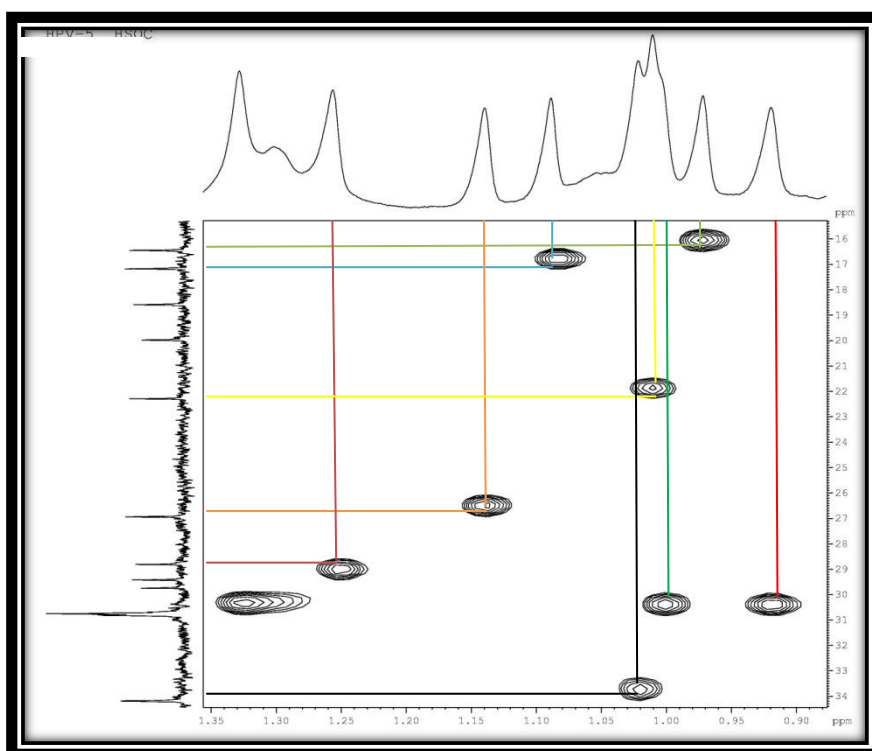


Figura 39. Expansão 2 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1J_{\text{CH}} - \text{HSQC}$) de CV-3.

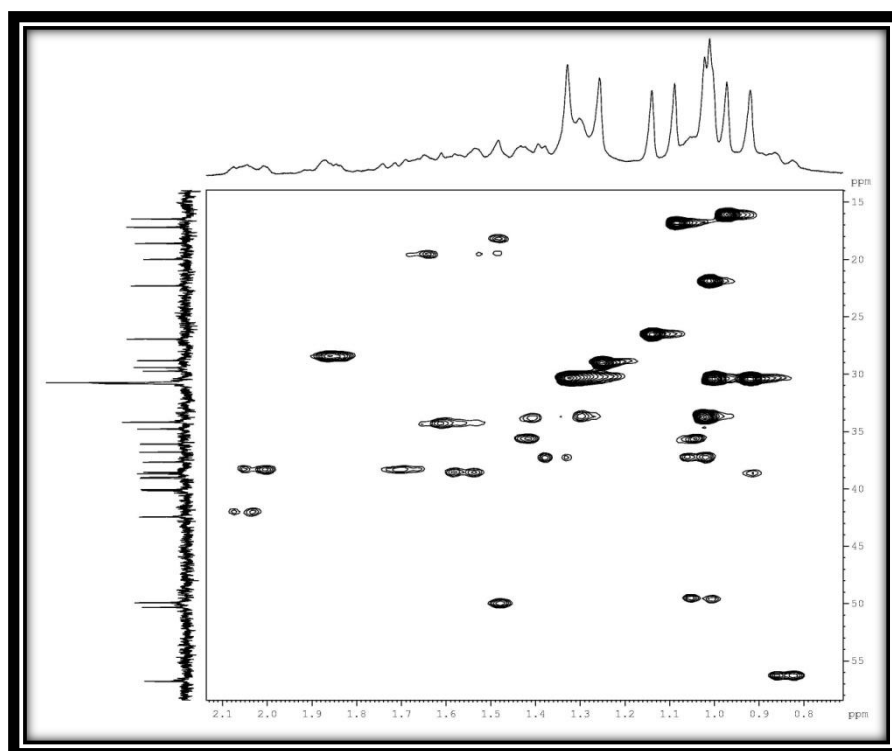


Figura 40. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de CV-3.

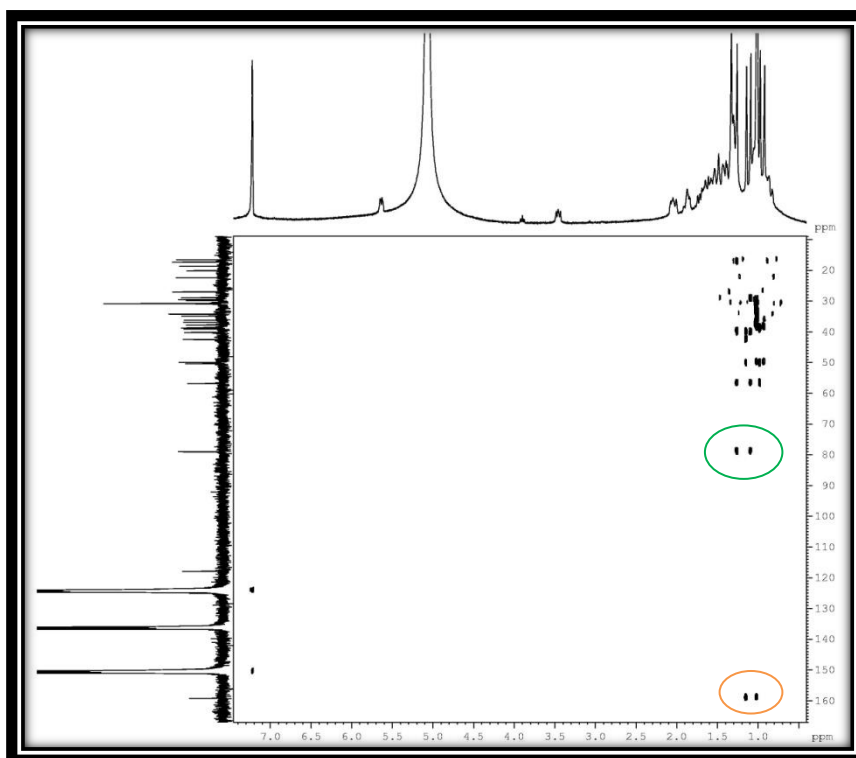


Figura 41. Expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de CV-3.

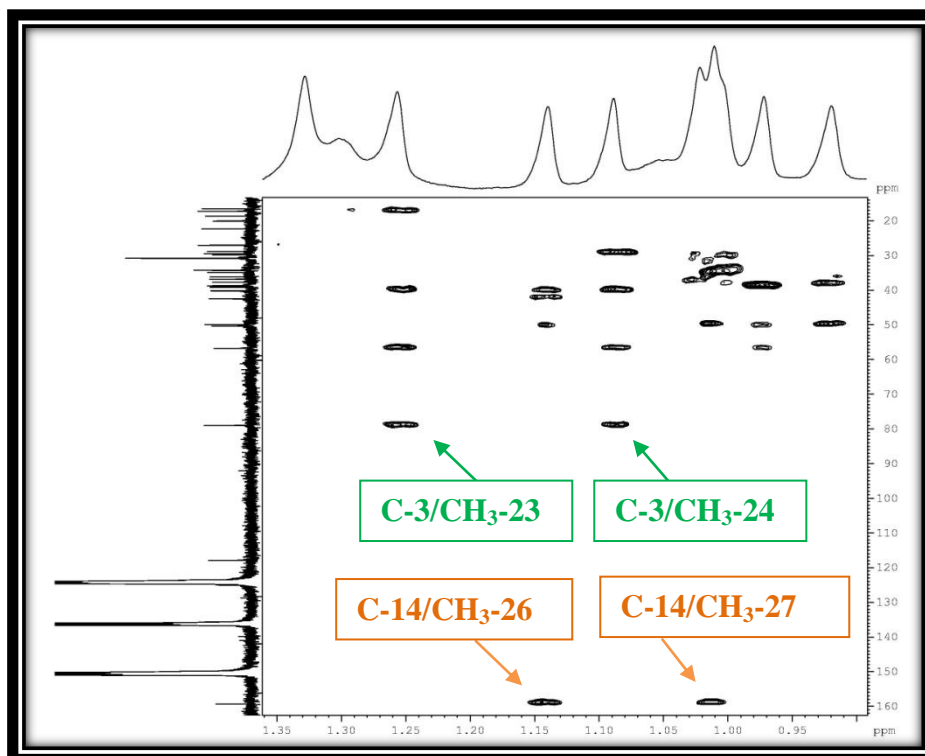
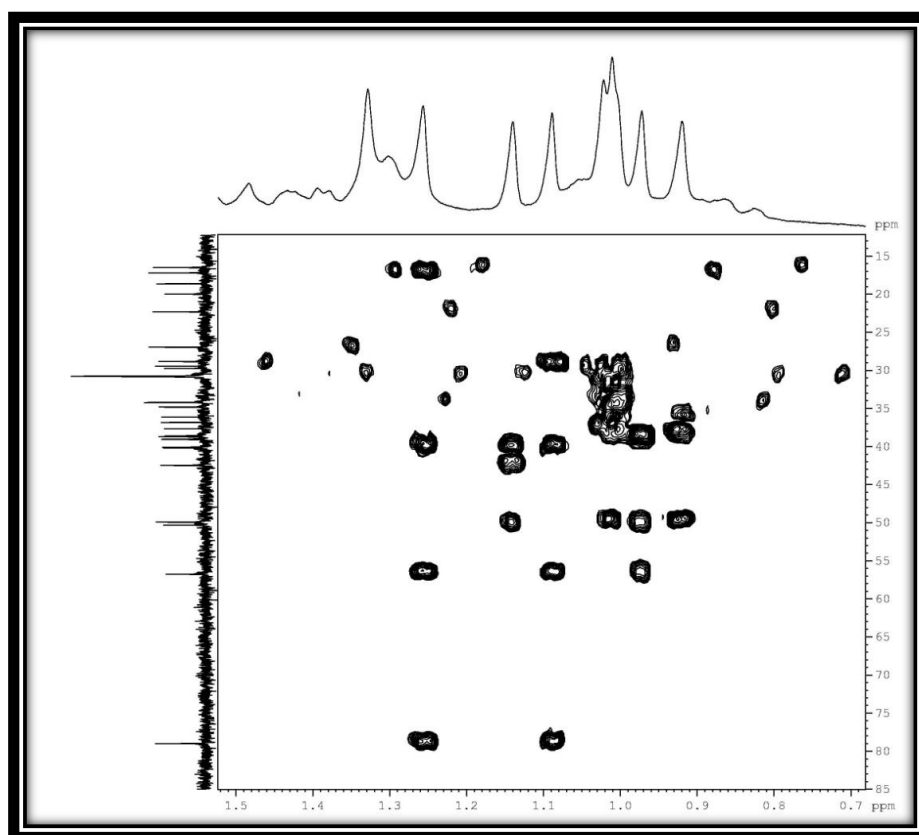


Figura 42. Expansão 2 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^{2,3}J_{\text{CH}} - \text{HMBC}$) de CV-3.



CAPÍTULO 5
OBTENÇÃO DOS DERIVADOS

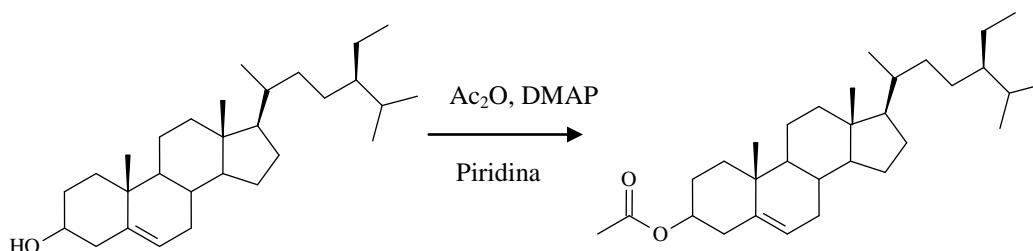
5. OBTENÇÃO DE DERIVADOS

Os compostos isolados a partir da planta em estudo foram submetidos a reações químicas relativamente simples para a obtenção de derivados tendo como objetivos principais avaliar a influência da modificação estrutural no potencial frente a certas atividades biológicas e treinamento no tocante a utilização de reagentes, vidraria e aparelhagem utilizados em laboratório. No presente caso, foi levado em consideração que os constituintes químicos (β -sitosterol, n-tetracosanol e 3β -taraxerol) de *Cissus verticillata* foram isolados em concentrações relativamente altas e possuem em suas estruturas grupos funcionais (hidroxila e ligação dupla) bastante reativos. Para tal, procurou-se obter tais derivados fazendo uso de reagentes químicos acessíveis (Anidrido acético, piridina, dimetilaminopiridina, acetato de etila, sulfato de cobre, ácido perclórico, ácido fórmico, clorocromato de piridina) através de reações clássicas (acetilação, formilação e oxidação).

5.1 Acetilação do β -sitosterol

O β -sitosterol em contato com a mistura anidrido acético e piridina em presença de 4-(N,N-dimetilamino)piridina durante 24 horas (Item 6.6.1, pág 76) forneceu um sólido amorfo de aspecto branco **CV-1(AC)** com ponto de fusão 123-126°C e rendimento de 92%.

Figura 43. Acetilação do β -sitosterol.



O espectro na região do infravermelho (Figura 57, pág 50) de **CV-1(AC)** apresentou como destaques uma intensa banda em 1730 cm⁻¹ da função éster, assim como, a ausência da banda em 3419 cm⁻¹ da função álcool, conforme esperado para a transformação da função álcool em éster. O espectro de RMN ¹³C – CPD (Figura 58, pág 50) exibiu um sinal em δ_C 170,7 característico do carbono carbonílico do grupo

acetoxila. O espectro de RMN ^1H (Figura 60, pág 51), por sua vez, corroborou esta observação através do sinal intenso em δ 2,0 (s) devido aos hidrogênios metílicos do grupo acetoxila, como também, mostrou o sinal do hidrogênio H-3 em com maior deslocamento químico [δ 4,6 (m)] em relação ao correspondente hidrogênio carbinólico na substancia original [H-3, δ 3,5 (m)], como esperado.

Figura 44. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1 (AC).

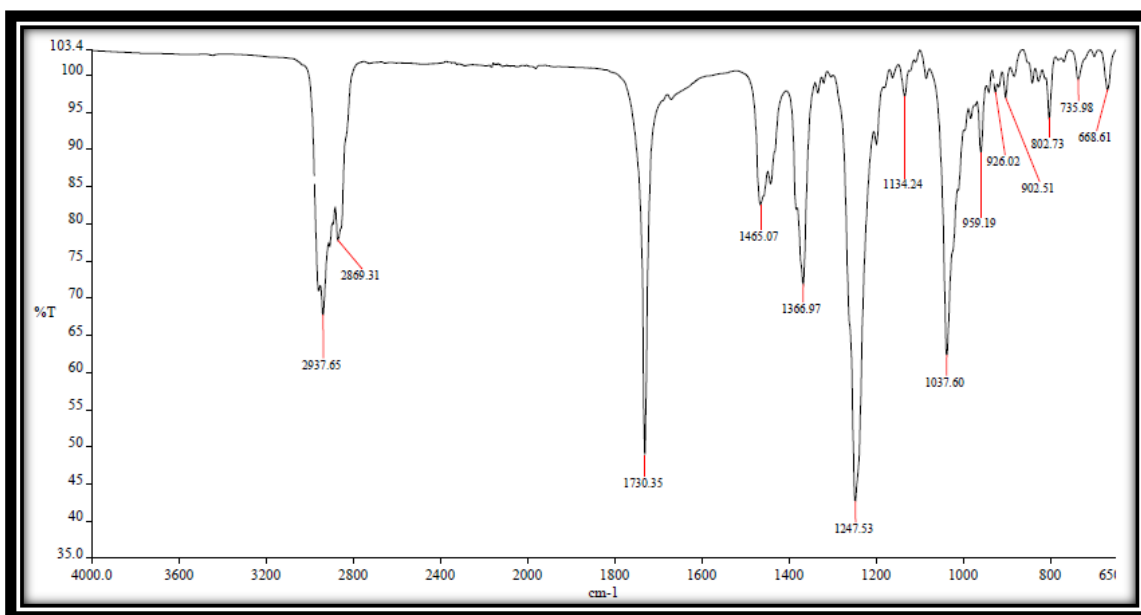


Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (AC).

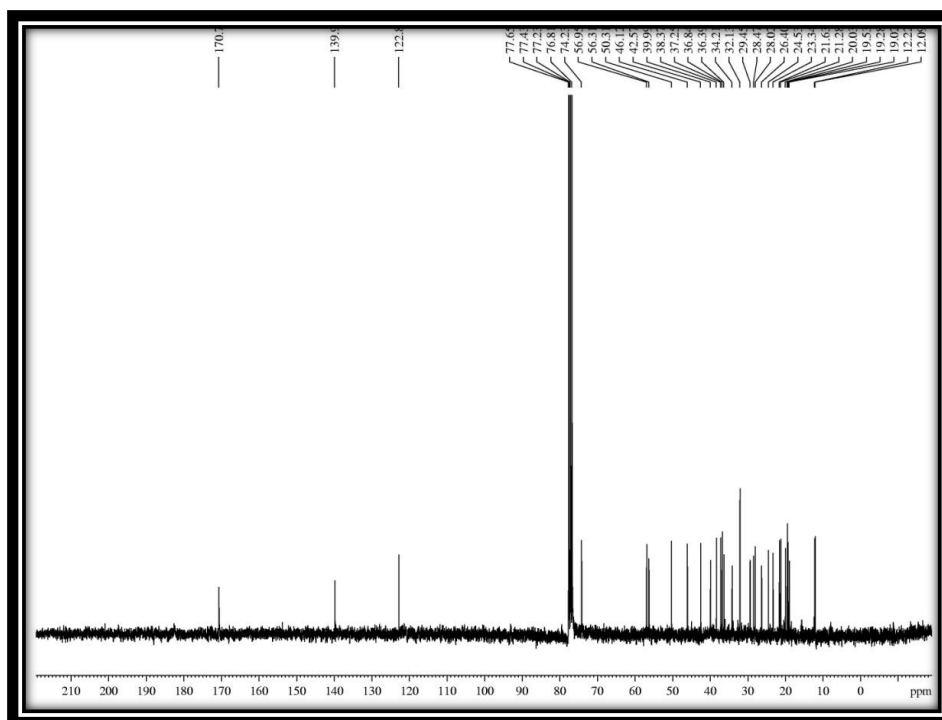


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (AC).

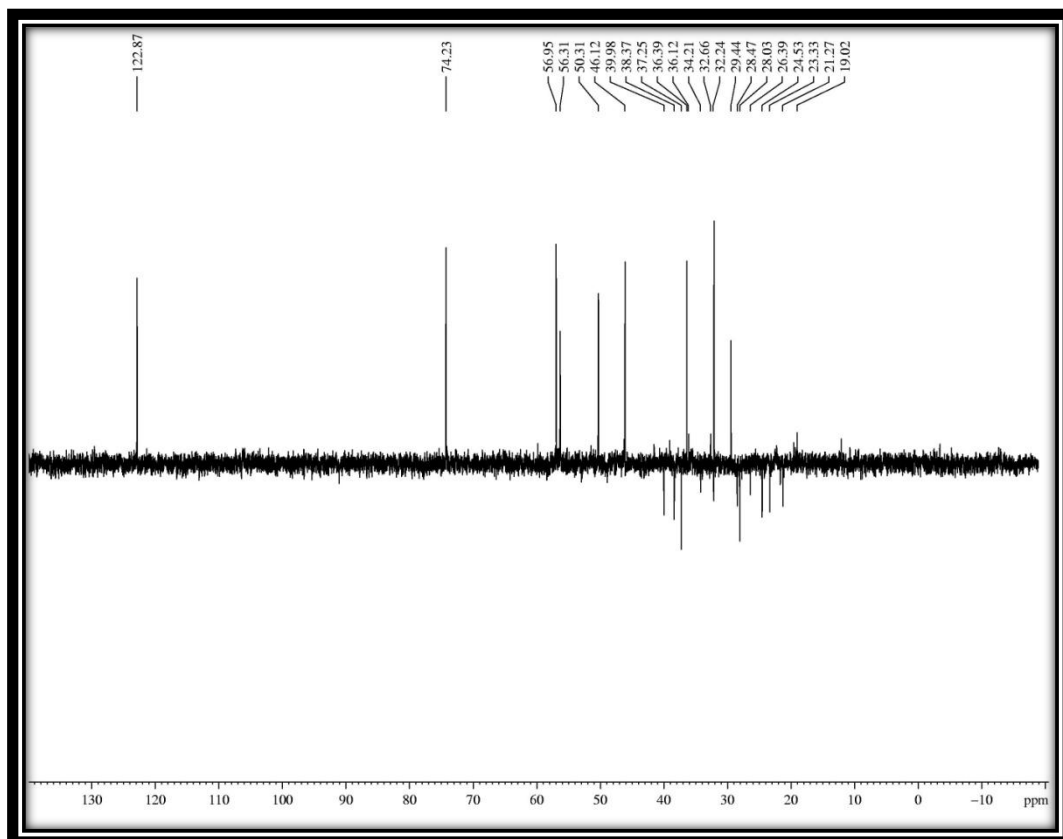


Figura 47. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-1 (AC).

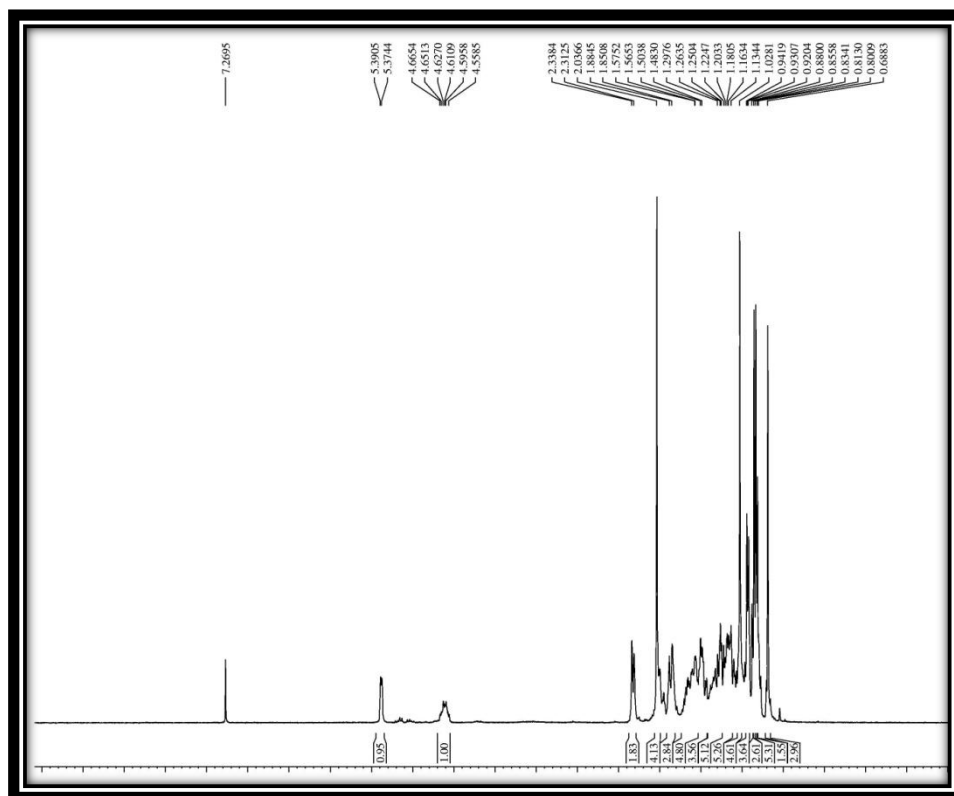
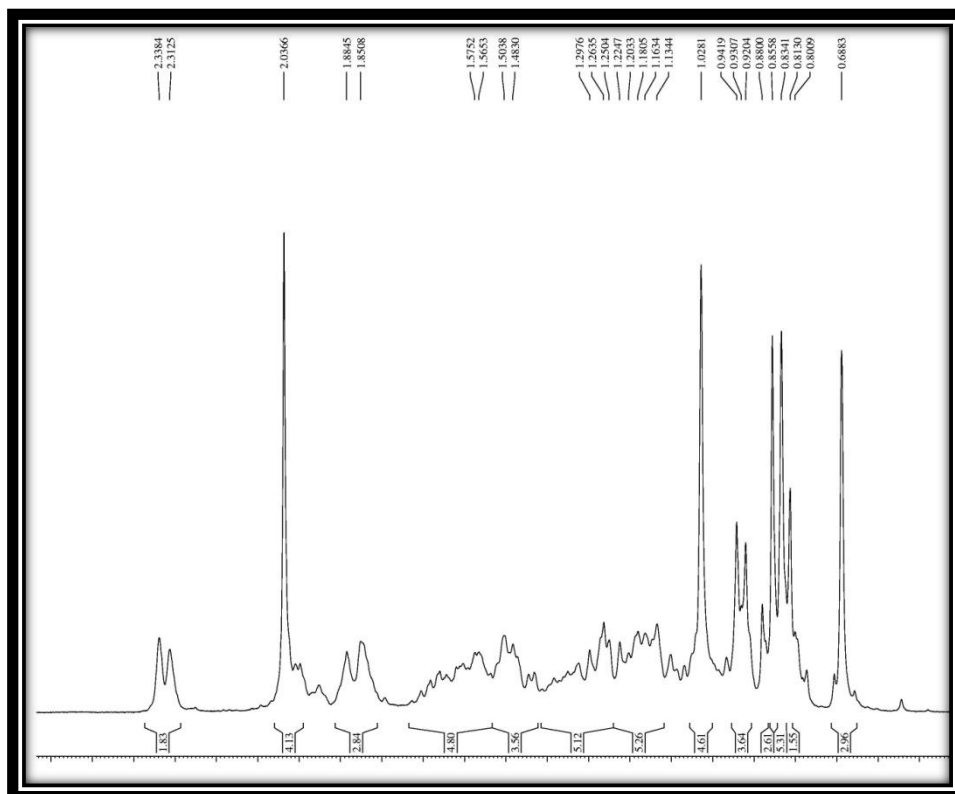


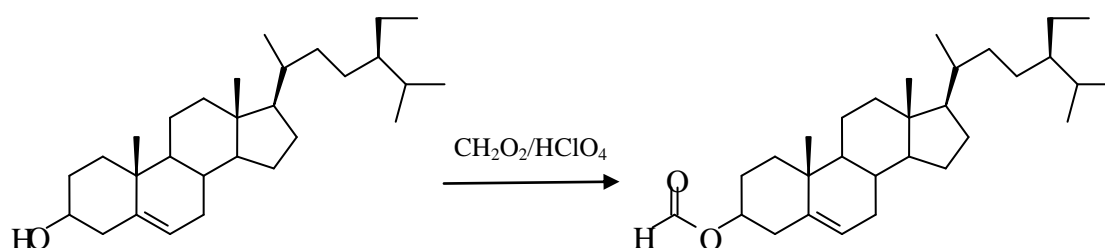
Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-1 (AC).



5.2 Formilação do β -sitosterol

Uma solução do β -sitosterol em uma mistura de ácido fórmico/ácido perclórico foi refluxada durante 4 horas. A mistura de reação foi tratada com anidrido acético e lavada com água (Item 6.6.2, pág 76) fornecendo um sólido amorfo amarelado, denominado **CV-1(FOR)**, com ponto de fusão 102-104°C e rendimento 93,5%.

Figura 49. Formilação do β -sitosterol.



O espectro no infravermelho (Figura 63, pág 54) de **CV-1(FOR)** registrou uma intensa banda de absorção em 1713 cm^{-1} devida a vibração de estiramento da carbonila, assim como, a ausência da banda de absorção em 3419 cm^{-1} , conforme esperado para a transformação da função álcool em éster. O espectro de RMN ^{13}C – CPD (Figura 64, pág 54) confirmou a transformação exibindo um sinal δ_{C} 160,8 correspondente ao carbono carbonílico de éster fórmico.

Em adição, o espectro de RMN ^1H (Figura 56, pág 56) de **CV-1(FOR)** apresentou um singleto em δ_{H} 8,0 característico do átomo de hidrogênio do grupo formila e um sinal múltiplo em δ 4,7 para o hidrogênio H-3, ou seja, com maior deslocamento químico em relação ao correspondente hidrogênio no composto de origem.

Figura 50. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1 (FOR).

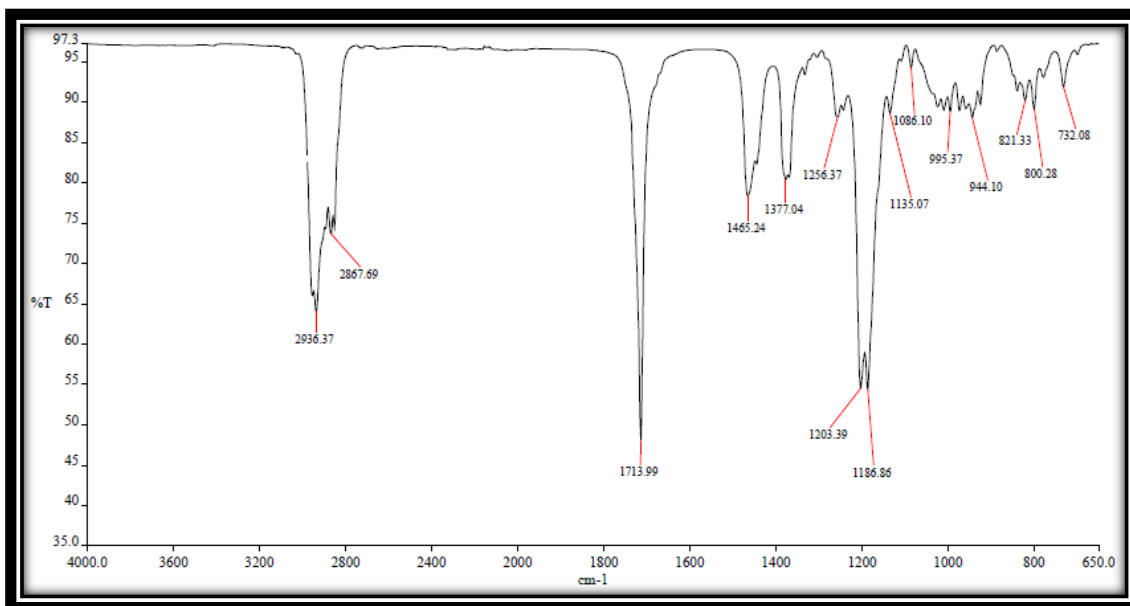


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (FOR).

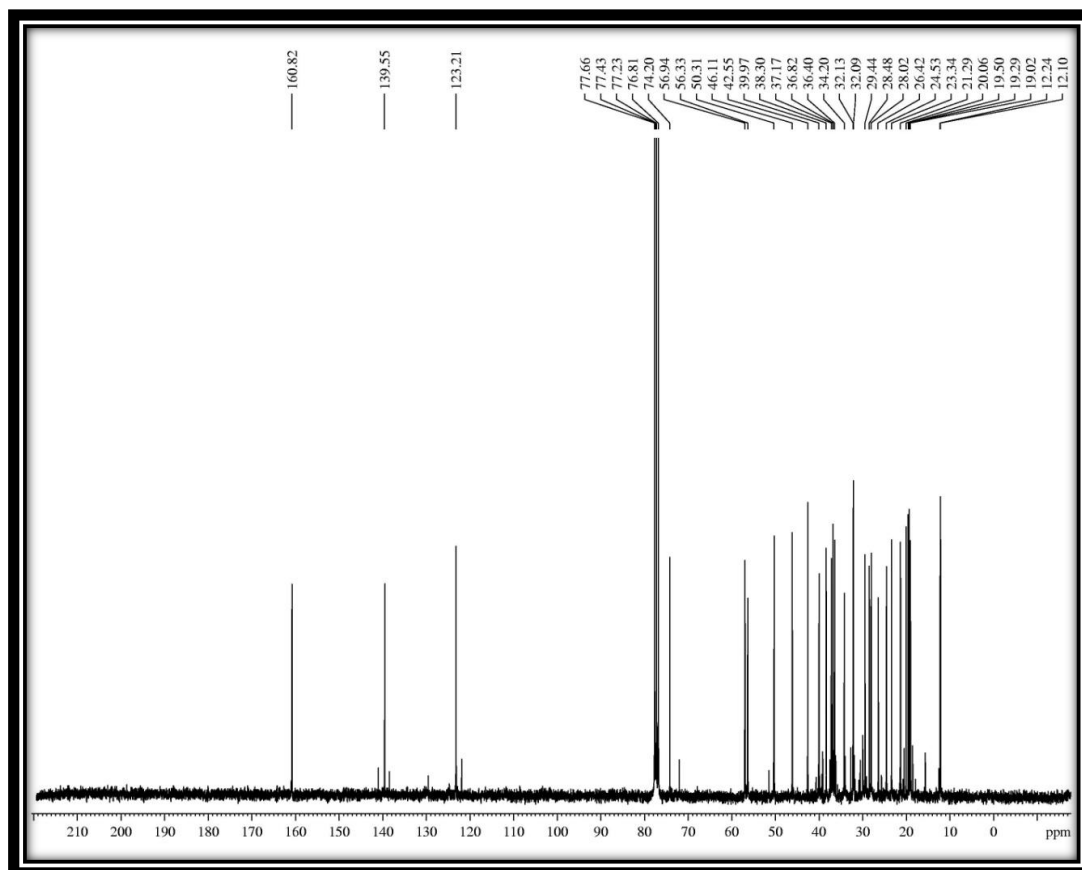


Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (FOR).

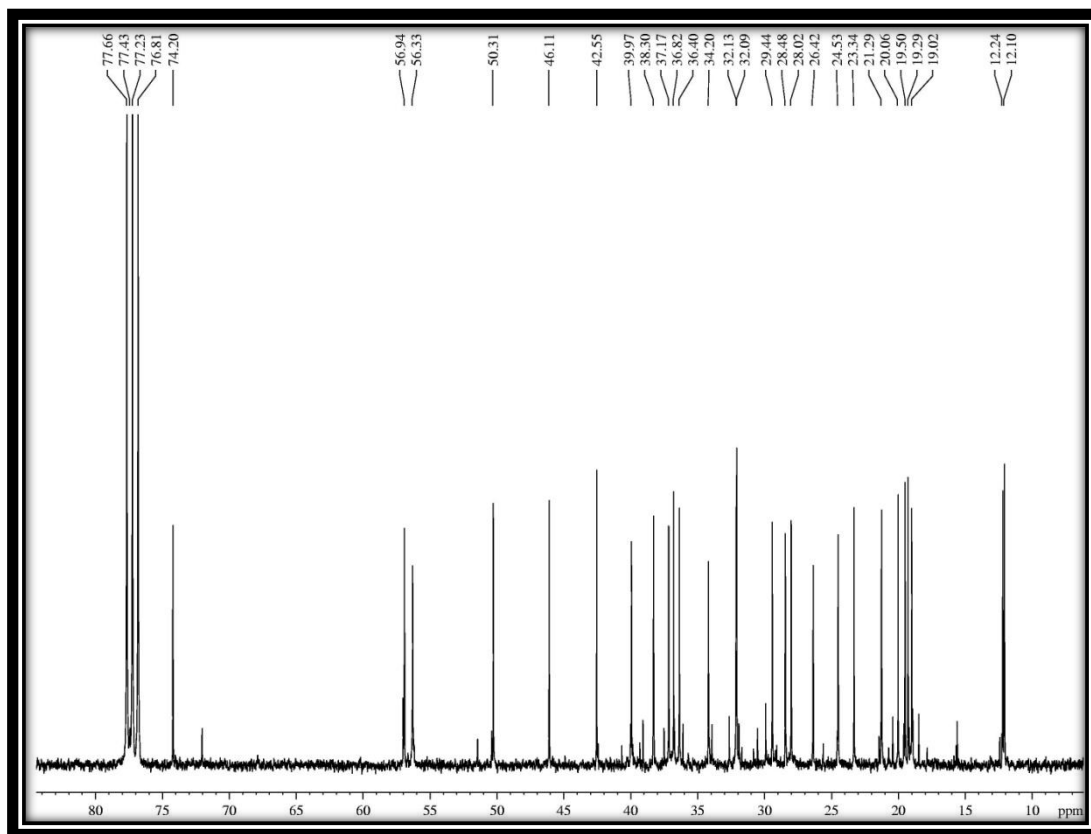


Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-1 (FOR).

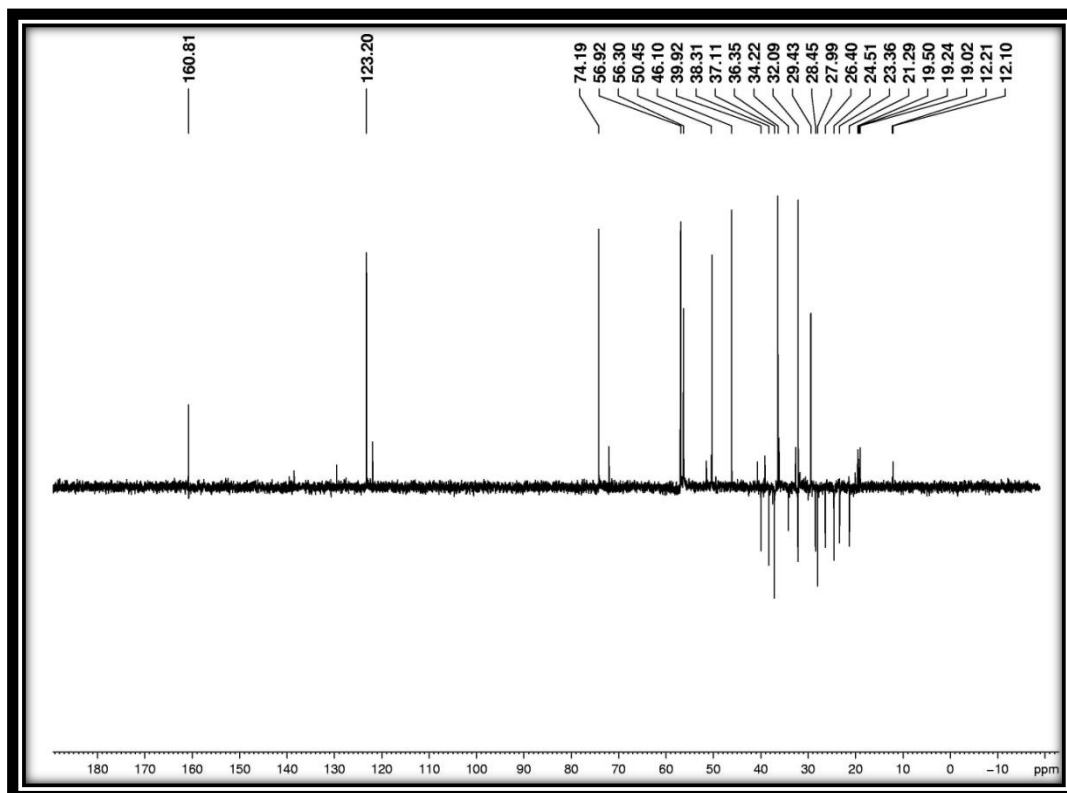
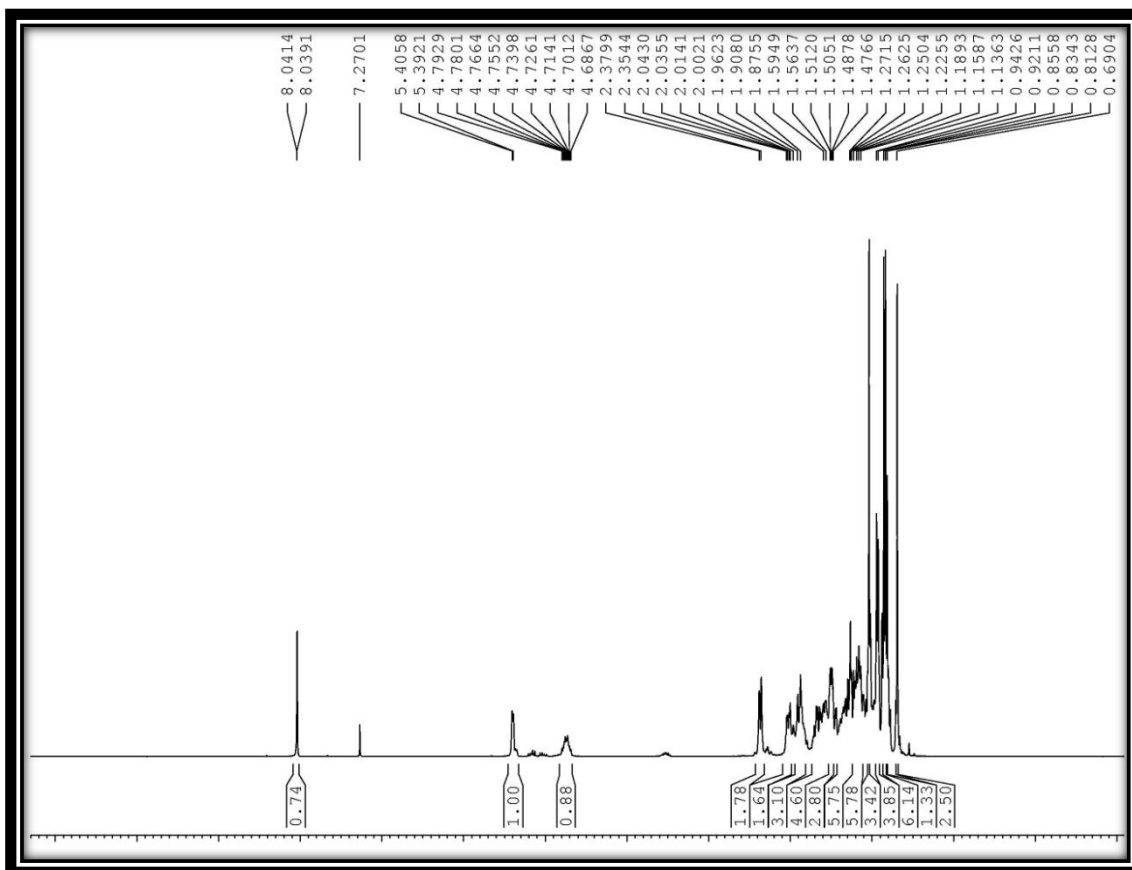


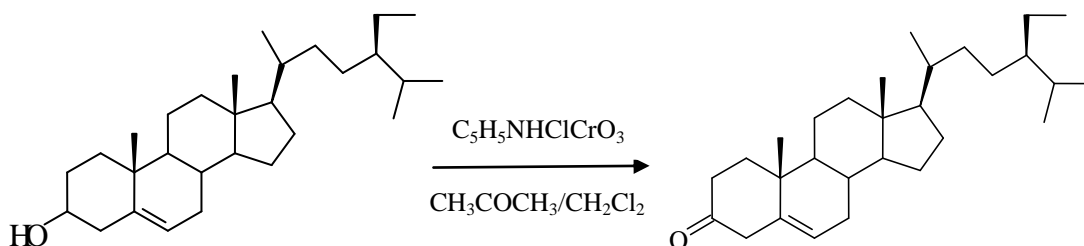
Figura 54. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-1 (FOR).



5.3 Oxidação do β -sitosterol

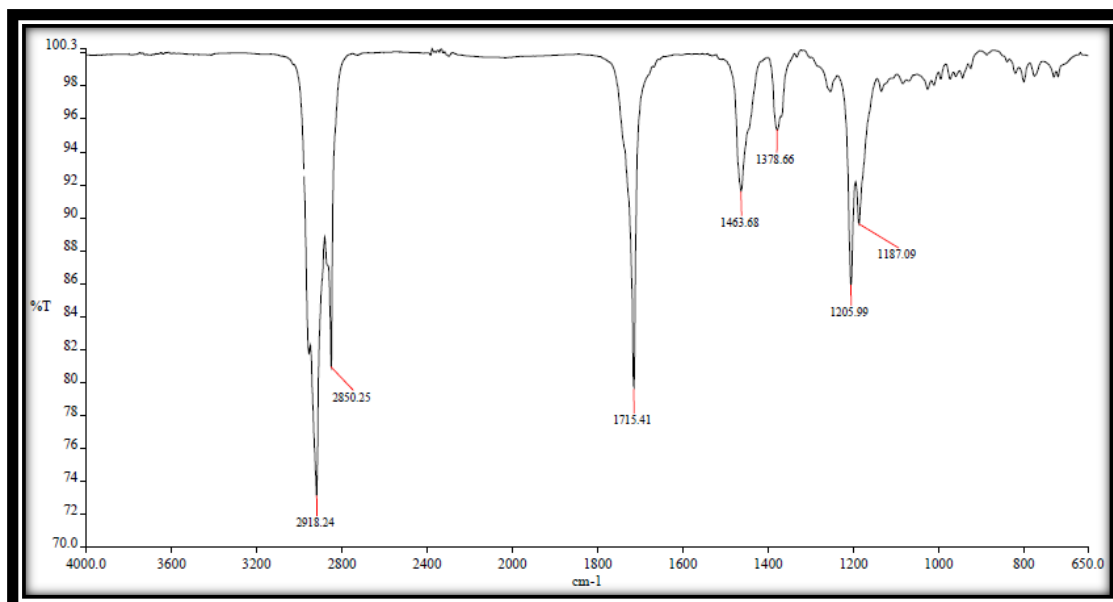
O β -sitosterol foi submetido a reação de oxidação por ação de (PCC) clorocromato de piridina (Item 6.6.3, pág 76) e originou um produto sólido branco, com ponto de fusão 85,3-86,7 °C e rendimento de 10%.

Figura 55. Oxidação do β -sitosterol.



No espectro na região do infravermelho (Figura 69, pág 57) do produto de oxidação denominado **CV-1 (OXI)**, foi observado a ausência da banda de absorção em 3419 cm^{-1} do grupo hidroxila e a presença da banda em 1713 cm^{-1} compatível com absorção de estiramento de grupo carbonila de cetona em hexanel, não conjugada.

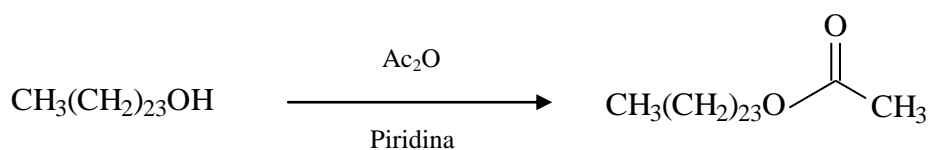
Figura 56. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-1 (OXI).



5.4 Acetilação do n-tetracosanol

Uma solução de n-tetracosanol foi colocada em uma mistura de anidrido acético e piridina deixada em repouso a temperatura ambiente durante 24 horas (Item 6.7.1, pág. 77). Após procedimento usual, forneceu um sólido branco amorfo (**C-2 (AC)**) com ponto de fusão de 96,3-98,7 °C e rendimento de 91%.

Figura 57. Acetilação do n-tetracosanol.



O espectro na região do infravermelho (Figura 71, pág 59) de **CV-1 (AC)** apresentou uma intensa banda em 1738 cm^{-1} da função éster e a ausência da banda de absorção em 3419 cm^{-1} (grupo hidroxila) conforme esperado para a transformação da função álcool em éster. Por sua vez, o espectro de RMN ^1H (Figura 72, pág, 59) do derivado em comparação ao correspondente espectro do substrato exibiu o sinal triplete dos hidrogênios oximetilênicos ($\text{CH}_2\text{-O-COCH}_3$) em δ 4,05 com deslocamento químico maior em relação aos correspondentes hidrogênios [$\text{CH}_2\text{-OH}$, t, δ (3,6)] no composto de partida. Em adição, um sinal simples e intenso em δ 2,0 correspondente a hidrogênios metílicos do grupo acetoxila. Já o espectro de RMN ^{13}C – CPD (Figura 73, pág 60) mostrou como característica fundamental, a presença do sinal em δ_{C} 171,43 de carbono carbonílico de éster, assim como, o sinal em δ_{C} 21,2 correspondente ao carbono metílico do grupo acetoxila.

Figura 58. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-2 (AC).

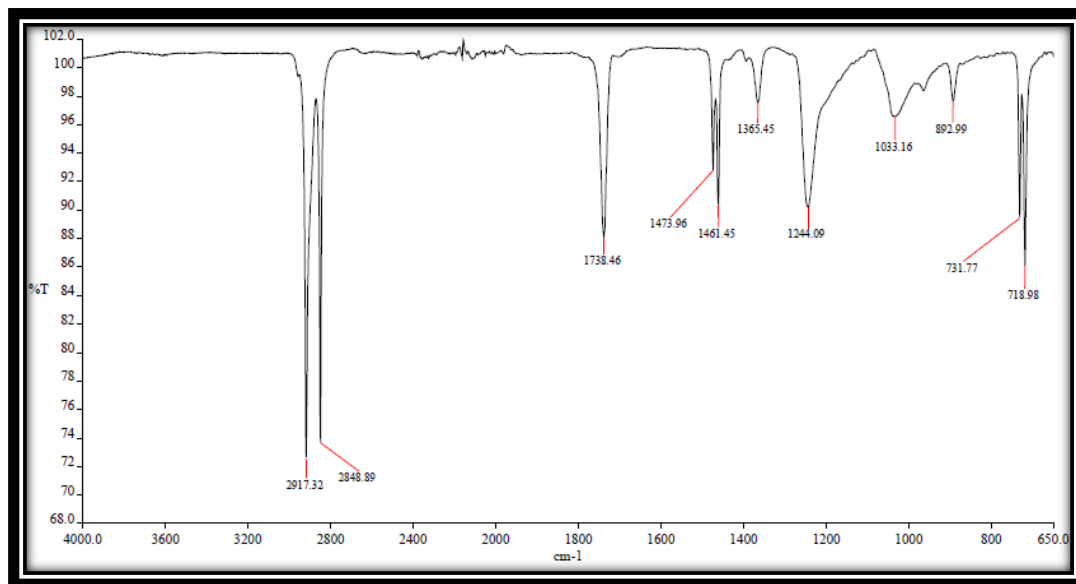


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-2 (AC).

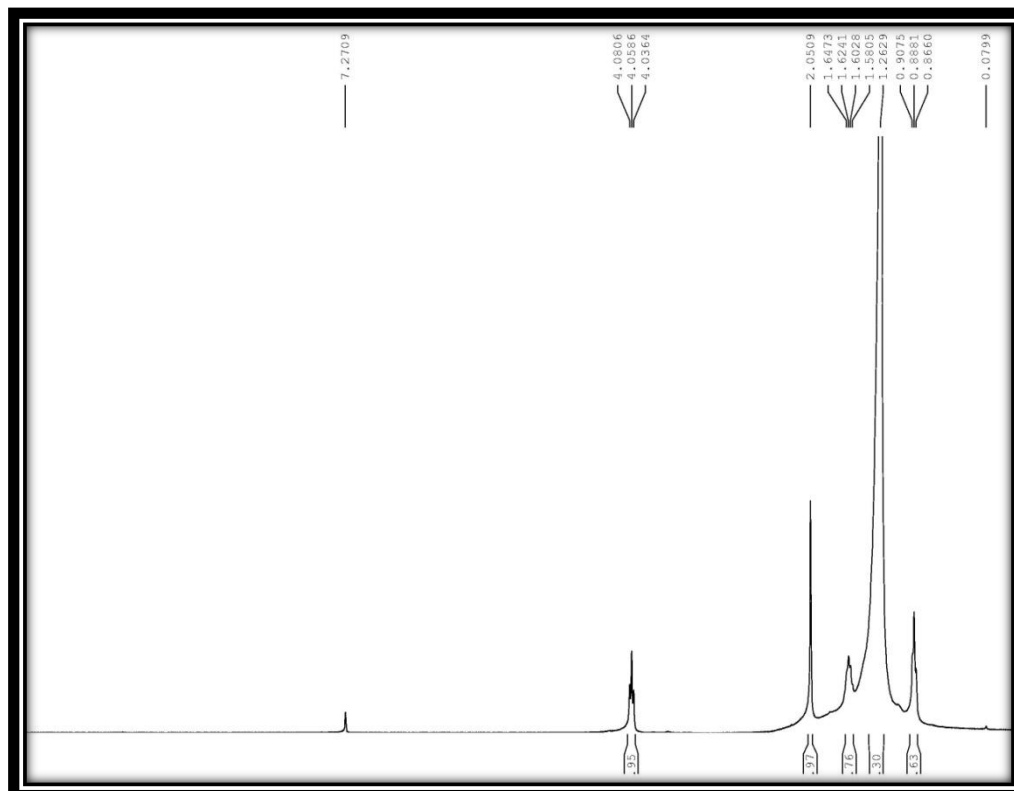


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-2 (AC).

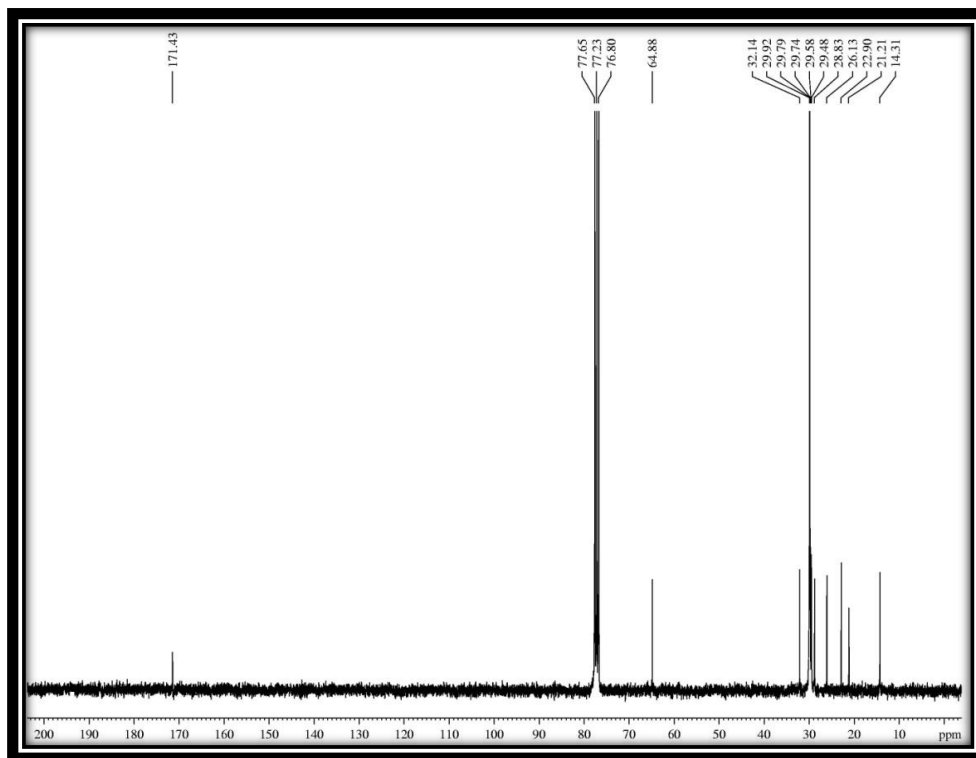
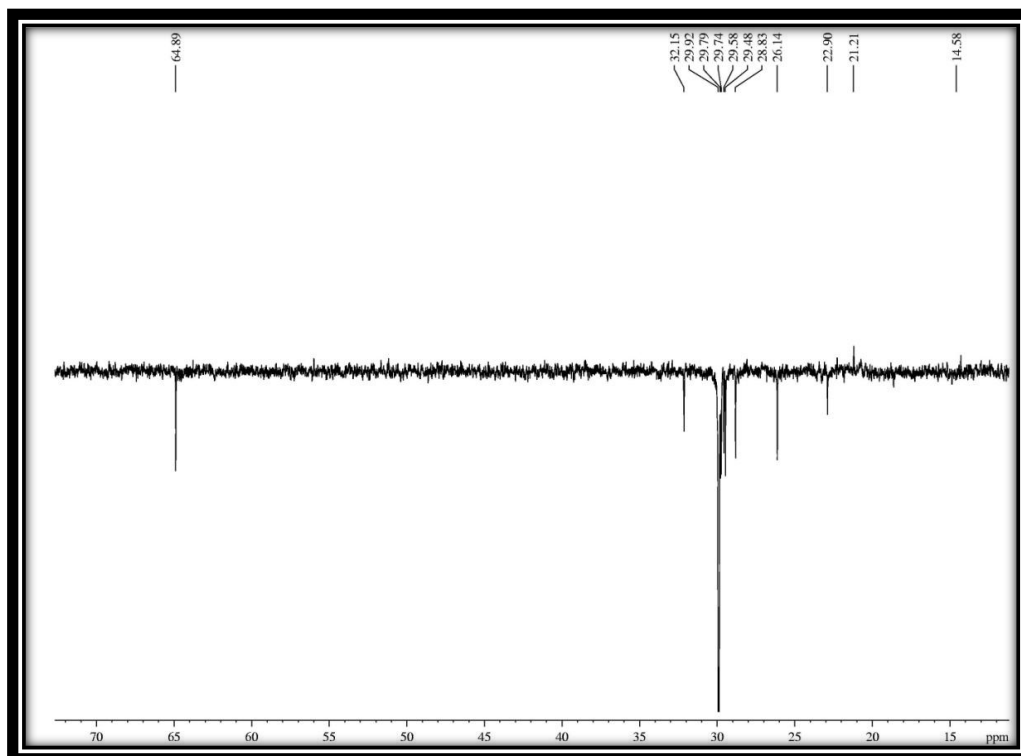


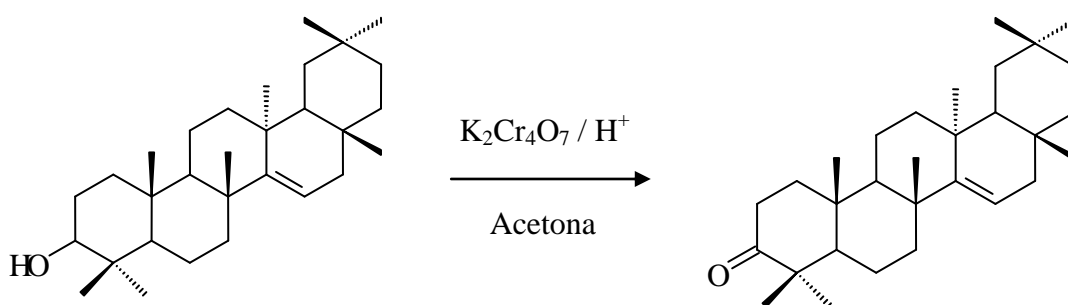
Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-2 (AC).



5.5 Oxidação do 3- β taraxerol

O 3- β taraxerol foi dissolvido em acetona e submetido a reação com dicromato de potássio em meio ácido por cerca de 10 minutos a temperatura ambiente (Item 6.8.1, pág. 77), fornecendo um sólido amarelado **CV-3 (OXI)** com faixa de fusão 275,7-276,9 °C e rendimento de 92%.

Figura 62. Oxidação do 3 β -taraxerol.



No espectro na região do infravermelho (Figura 76, pág 62) do produto de oxidação denominado **CV-3 (OXI)**, observa-se a ausência da banda de absorção em 3487 cm^{-1} (ν_{OH}) e o aparecimento da banda em 1707 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$) relacionada a absorção de estiramento de grupo carbonila de função cetona. Como característica fundamental, o espectro de RMN ^{13}C - CPD (Figura 77, pág. 62) do produto revelou um sinal em δ_C 217,84 confirmando a função cetona. Os demais sinais no espectro permaneceram praticamente inalterados.

Figura 63. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1} , KBr) de CV-3 (OXI).

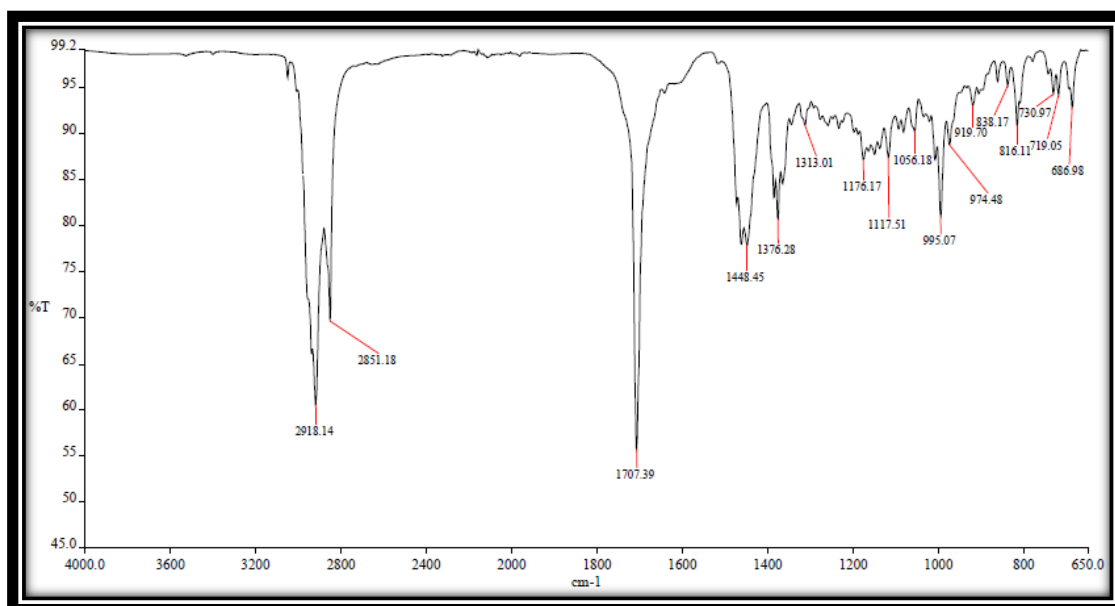


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C - CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-3 (OXI).

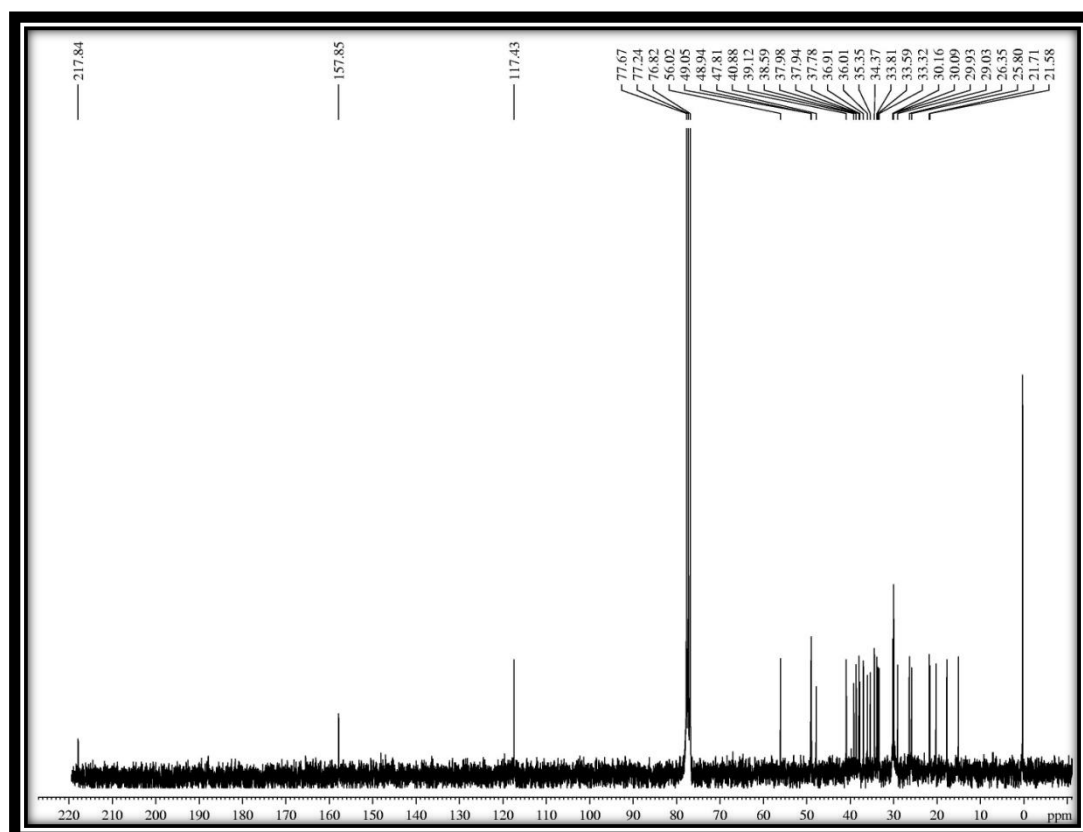


Figura 65. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - BB (CDCl_3 , 75 MHz) de CV-3 (OXI).

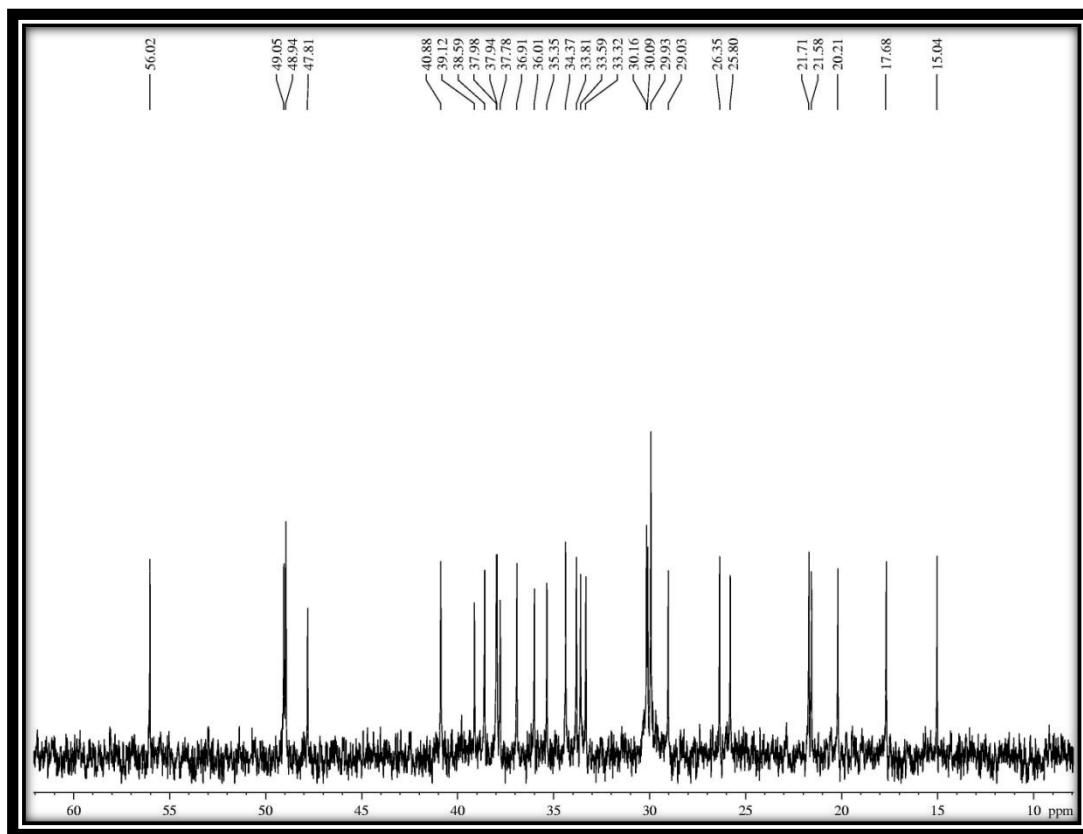


Figura 66. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de CV-3 (OXI).

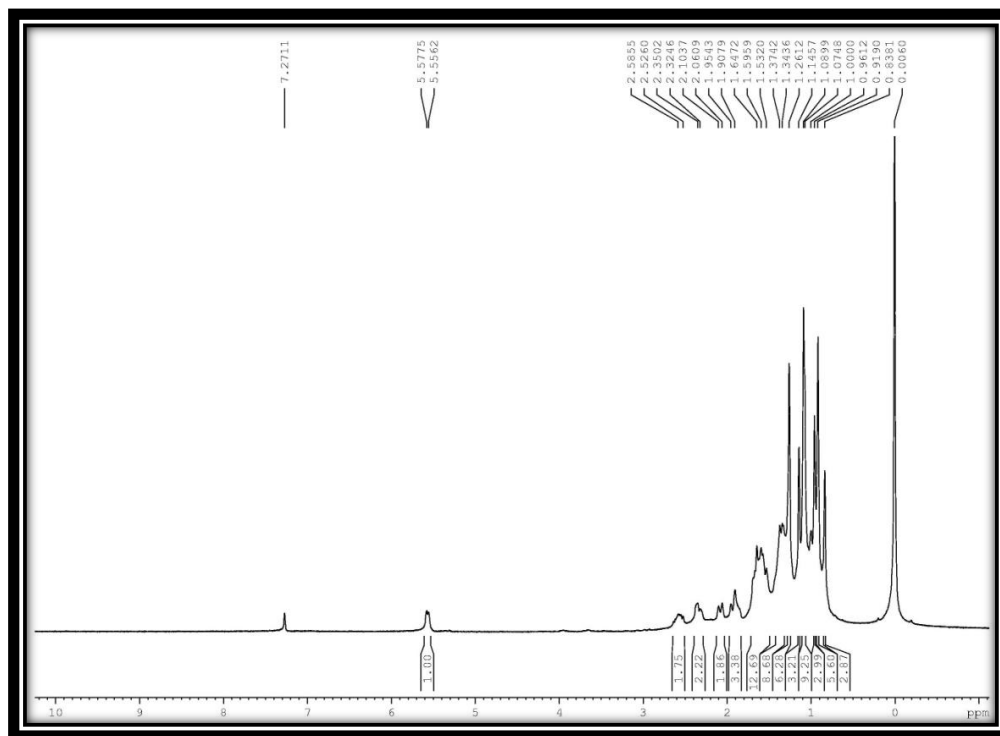


Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de CV-1 e seus derivados reacionais CV-1 (AC) e CV-1 (FOR).

C	CV-1	CV-1 (AC)	CV-1 (FOR)
1	37,5	38,3	38,3
2	29,9	28,4	28,4
3	72,0	74,2	74,2
4	42,6	42,6	42,5
5	141,0	139,9	139,5
6	121,9	122,8	123,2
7	31,9	34,2	34,2
8	32,2	32,1	32,1
9	50,4	50,3	50,2
10	36,7	36,8	36,4
11	21,3	21,6	21,3
12	40,0	39,9	40,0
13	43,5	44,9	44,9
14	57,0	56,9	56,9
15	24,5	24,5	24,5
16	28,5	28,0	28,0
17	56,3	56,3	56,3
18	12,2	12,0	12,1
19	19,6	19,5	19,5
20	36,4	36,4	36,4
21	19,0	19,0	19,0
22	34,2	37,2	37,1
23	26,4	26,4	26,4
24	46,1	46,1	46,1
25	29,4	29,5	29,4
26	20,0	20,0	20,0
27	19,3	19,3	19,3
28	23,3	23,3	23,3
29	12,1	12,2	12,2
30	-	170,7	160,8
31	-	21,3	-

CAPÍTULO 6
PROCEDIMIENTO
EXPERIMENTAL

6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1 Material Botânico

O material vegetal (folhas e talos de *C. Verticillata* L.) foi coletado no horto de plantas medicinais localizado no campus do Pici no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, altitude -3.745052311734928 e longitude -38.57728955557253 em agosto de 2011.

A identificação botânica foi realizada pelo Professor José Edson Pereira Nunes e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra localizado no Departamento de Biologia, bloco 906, campus do pici, na Universidade Federal do Ceará, sob o número 49000.

6.2 Métodos Cromatográficos

6.2.1 Cromatografia de Adsorção

A cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC) foi utilizada para realização do fracionamento dos extratos brutos e frações, bem como, na separação e purificação de substâncias, sendo utilizado como fase estacionária gel de sílica 60 (70-230 mesh) e tipo “flash” (230-400 mesh). Os eluentes utilizados nos fracionamentos foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, n-Butanol, metanol nas formas puras ou em misturas binárias. Os solventes orgânicos foram todos da marca Synth.

Para cromatografia de adsorção em coluna sob pressão “flash” foi utilizado sílica gel 60 (0,040 – 0,0063 mm; 230 – 400 mesh) da marca MERCK. Conforme as quantidades de amostras e valores de RF o diâmetro e comprimento das colunas eram variados. Para realizar a eluição foi utilizado um sistema adaptado com bomba compressora do fabricante NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda, referência R-60.

A cromatografia em camada delgada (CCD) (gel de sílica 60 $F_{254} = 0,2$ mm) em folhas de alumínio da marca Merck foi utilizada para o monitoramento das frações obtidas após os fracionamentos cromatográficos. Como reveladores a radiação

ultravioleta nos comprimentos de onda em 254 nm e 365 nm e solução de vanilina/ácido perclórico. As amostras foram aplicadas nas placas de CCD por meio de tubo capilar a uma altura de 1,0 cm do inferior da placa e em média a uma distância de 0,2 cm uma das outras e eluidas em uma cubeta.

6.3 Métodos Físicos

Os espectros foram registrados nos equipamentos localizados na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

6.3.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias obtidas foram determinados em equipamento MARCONI modelo MA381 com central de processamento NOVUS N480D. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2°C/min, os valores de ponto de fusão não foram corrigidos.

6.4 Métodos Espectrométricos

6.4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros na região de absorção do infravermelho, obtidos numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} foram registrados em espectrômetro um Perkin-Elmer, modelo SPECTRUM 100 FT-IR usando o aparelho UATR (Universal Attenuated Total Reflectance), ambos pertencentes à central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

6.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C), foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Advance DRX-500, operando na frequência de 300 e

500 MHz para o hidrogênio e na frequência de 75 e 125 MHz para o carbono, pertencente ao Centro de Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

As amostras foram dissolvidas em solventes deuterados: clorofórmio (CDCl_3) e Piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) comercializados pela empresa Cambridge Isotope Laboratories.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados pelo pico do hidrogênio residual do solvente deuterado CDCl_3 (δ 7,27) e pelo pico do ^{13}C do solvente CDCl_3 (δ 77,23) já para o solvente $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (δ 7,23; 7,60; 8,75) e (δ 124,45; 136,14; 150,61) para RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente.

A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto), *m* (multiplete).

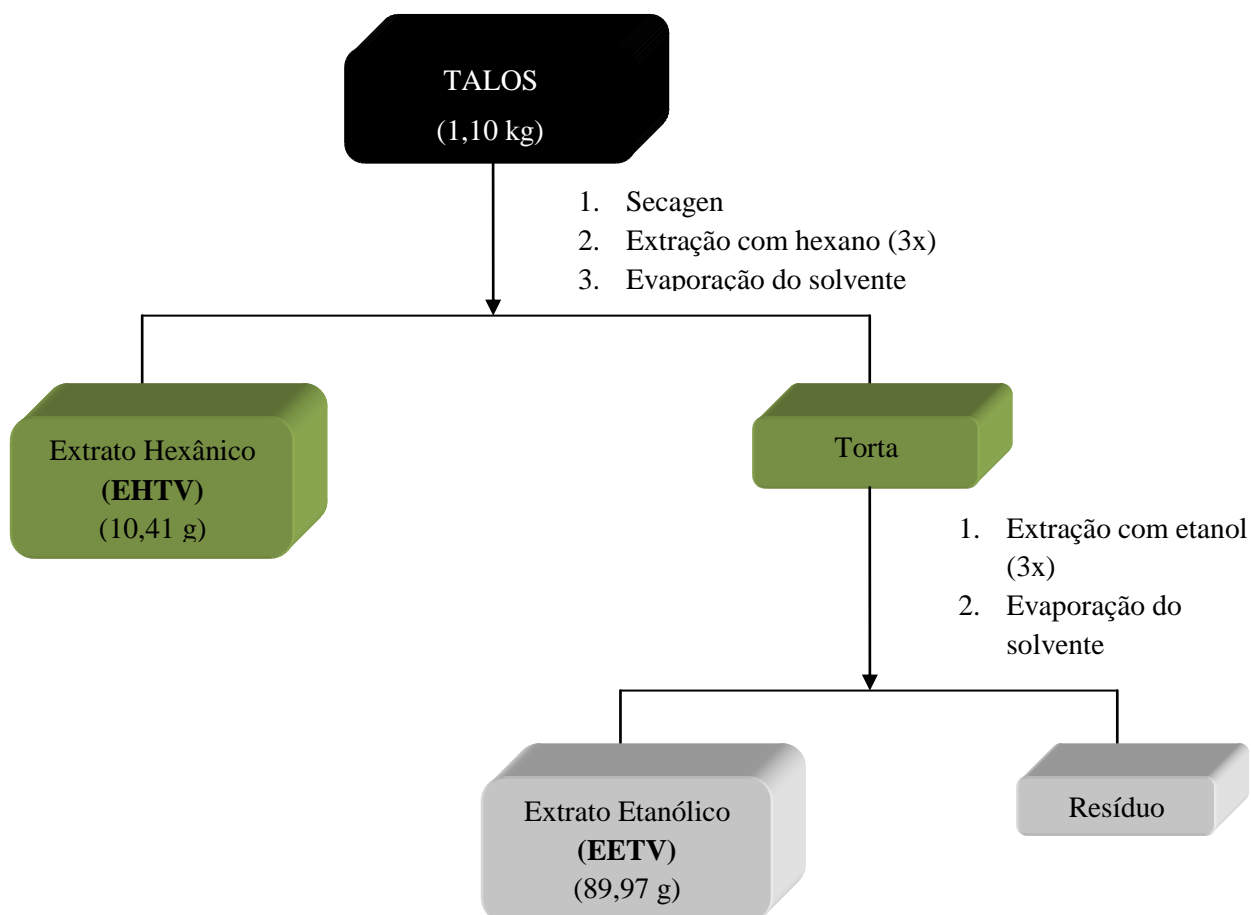
O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado utilizando-se as técnicas APT (Attached Proton Test) DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) variando o ângulo de nutação (FLIP ANGLE) de 135° (CH e CH_3 com amplitudes em oposição do CH_2) e foi descrito segundo convenção: C (carbono não hidrogenado); CH (carbono metínico); CH_2 (carbono metilênico); CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados através da subtração dos sinais nos espectros RMN ^{13}C DEPT 135° e RMN ^{13}C – CPD (Composite Pulse Decoupling).

6.5 Estudo dos Constituintes não voláteis de *C.verticillata*

6.5.1 Preparação dos extratos dos talos de *C.verticillata*.

Os talos (1,1 kg) secos à temperatura ambiente e trituradas foram submetidos à extração com hexano durante cinco dias. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, foi obtido o extrato hexânico (EHTV; 10,41g). A torta resultante foi submetida a extração com etanol por cinco dias (Fluxograma 1) e o solvente evaporado sob pressão reduzida fornecendo o extrato etanólico (EETV; 89,97 g).

Fluxograma 1. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico dos talos da espécie *C. verticillata*.



6.5.2 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos talos de *C. verticillata* (EHTV)

Uma parte (8,5 g) do extrato EHTV foi adsorvido em 20,0 g de gel de sílica e pulverizada em gral de porcelana, sendo acondicionada em coluna cromatográfica de 7,5 cm de diâmetro munida de 71,64 g de gel de sílica. A coluna foi eluída utilizando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros e em misturas binárias seguindo uma ordem crescente de polaridade. Este procedimento resultou em 41 frações que após análise em CCD permitiu a reunião em 15 subfrações de acordo com suas semelhanças de R_f (Tabela 7, pág 70).

Tabela 7. Frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHTV.

Fração	Massa (mg)	Denominação
1	864,28	EHTV-1
2	947,10	EHTV-2
3-4	28,8	EHTV-3
5	6,9	EHTV-4
6-8	1.890	EHTV-5
9-10	207,5	EHTV-6
11-14	420	EHTV-7
15-17	311,1	EHTV-8
18-20	1.550	EHTV-9
21-25	349,0	EHTV-10
26-29	96,9	EHTV-11
30-31	443,9	EHTV-12
32-34	376,7	EHTV-13
35-40	145,0	EHTV-14
41	653,3	EHTV-15

6.5.2.1 Tratamento cromatográfico de EHTV-9 e isolamento de CV-1

A fração denominada EHTV-9 (1,55 g) foi adsorvida em 3,0 g de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 72,40 g em coluna cromatográfica de 2,4 cm de diâmetro. Os solventes utilizados no processo de eluição foram diclorometano, acetato de etila em misturas binárias e metanol puro, em ordem crescente de polaridade mostrado na tabela 8.

Tabela 8. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHTV-9.

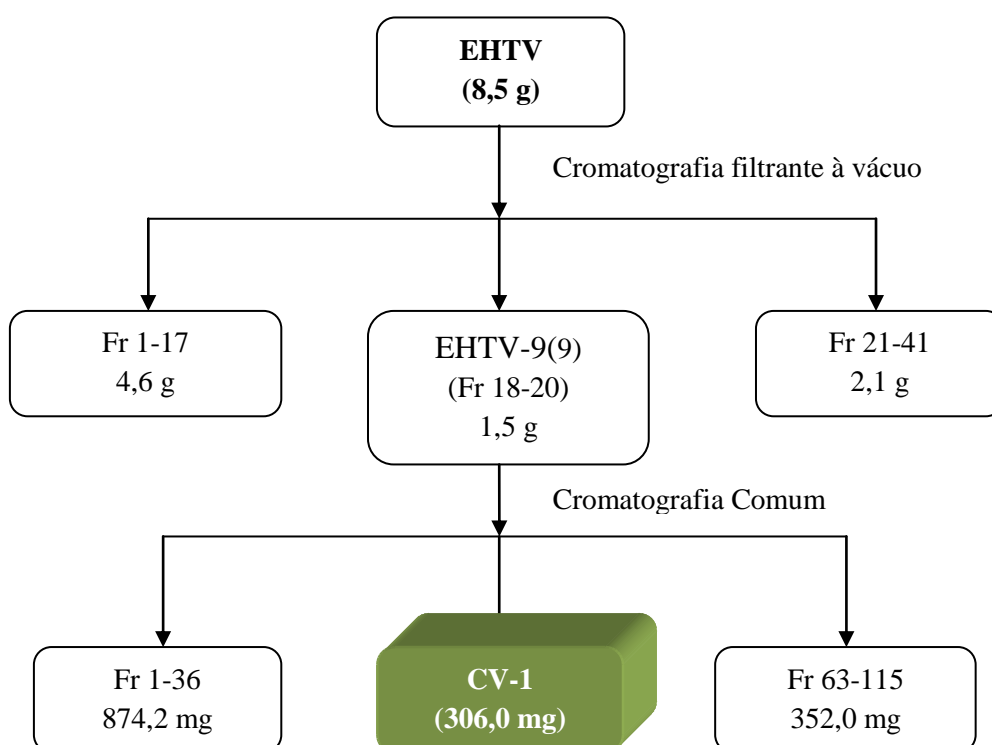
Eluente	Fração	Volume (mL)	Massa(g)
Diclorometano/Acetato de etila 5%	1-44	400	0,39
Diclorometano/Acetato de etila 15%	45-68	300	0,59
Diclorometano/Acetato de etila 30%	69-79	200	0,13
Diclorometano/Acetato de etila 60%	80-102	200	0,07
Acetato de etila 100%	103-11	200	0,04
CH ₃ OH 100%	112-115	100	0,12

Após análise em cromatografia em camada delgada (CCD) obteve-se um conjunto com 12 novas frações (Tabela 9, pág. 71).

Tabela 9. Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHTV-9.

Frações	Denominação	Massa (mg)
1-5	EHTV-9(1)	14,2
6-9	EHTV-9(2)	34,1
10-16	EHTV-9(3)	54,1
17-18	EHTV-9(4)	37,2
19-23	EHTV-9(5)	105,0
24-26	EHTV-9(6)	100,9
27-32	EHTV-9(7)	241,6
33-36	EHTV-9(8)	137,1
37-62	EHTV-9(9)	306,0
63-82	EHTV-9(10)	82,7
83-92	EHTV-9(11)	38,5
93-115	EHTV-9(12)	230,3

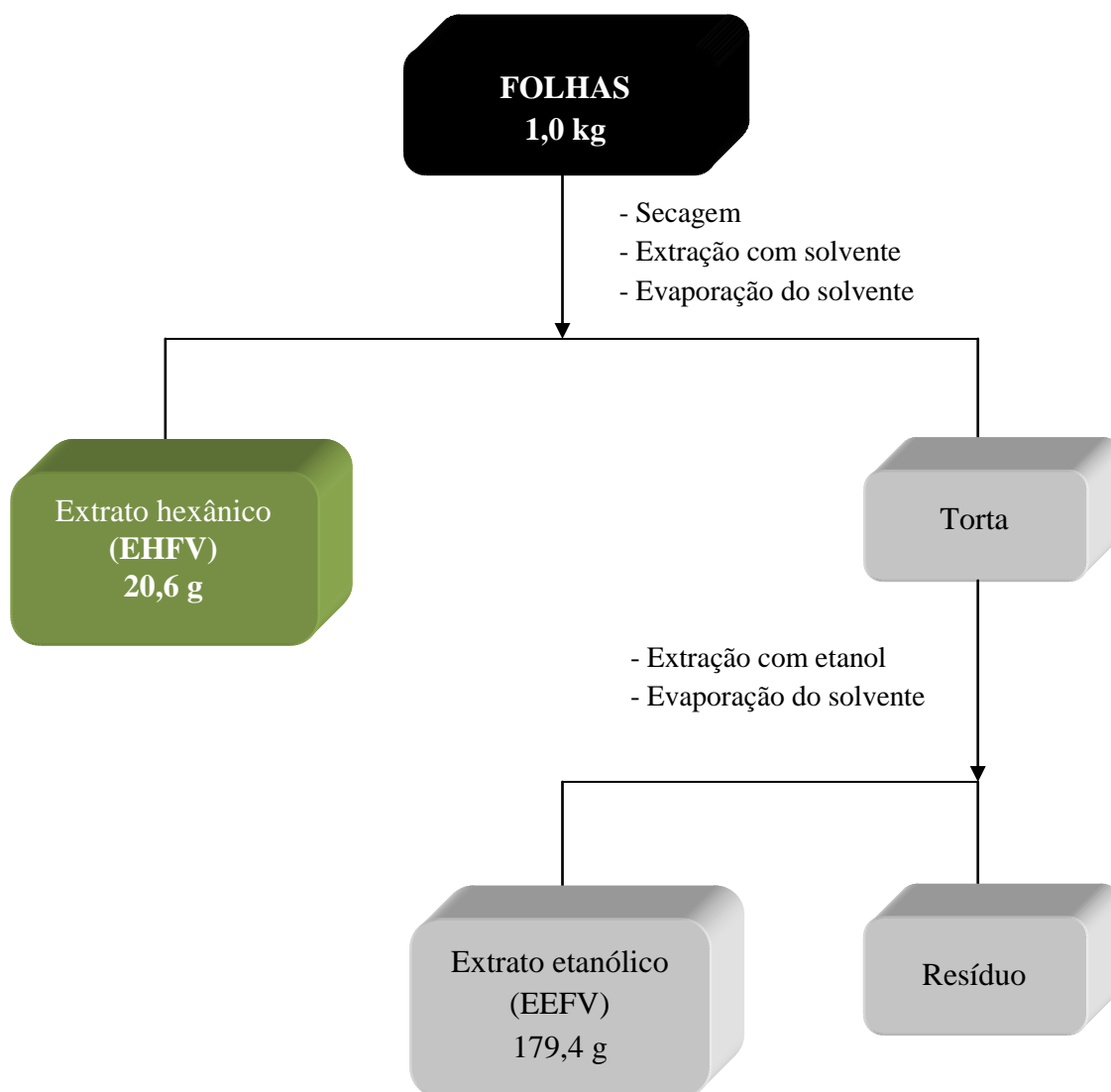
A fração denominada EHTV-9(9) apresentou-se como um sólido brando amorfo em CCD que foi denominada de **CV-1**. A análise por RMN ^1H e ^{13}C e infravermelho e a subsequente comparação com dados da literatura, foi possível caracterizar como sendo o esterol β -sitosterol.

Fluxograma 2. Isolamento de CV-1 a partir de EHTV.

6.5.3 Preparação dos extratos das folhas de *C.verticillata*.

As folhas (1,0 kg) de *C.verticillata* secas à temperatura ambiente e trituradas, foram submetidos à extração com hexano seguido de etanol (Fluxograma 3, pág. 72). As soluções resultantes das extrações foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo, resultando nos extratos hexânico e etanólico.

Fluxograma 3. Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas da espécie *C. verticillata*.



6.5.3.1 Tratamento cromatográfico de EHFV

Uma parte (11,5 g) de EHFV foi adsorvido em 30,1 g de gel de sílica e pulverizado em gral de porcelana. O material resultante foi submetido a cromatografia à vácuo utilizando funil de Büchner, efetuando eluições sucessivas com os seguintes eluentes; hexano, hexano/acetato de etila 50%, diclorometano, acetato de etila e metanol (Tabela 10).

Tabela 10. Dados relativos ao tratamento cromatográfico de EHFV.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa (g)
Hexano 100%	700	EHFV-H	3,63
Hexano/Diclorometano 50%	500	EHFV-HD	1,72
Diclorometano 100%	500	EHFV-D	1,50
Acetato de Etila 100%	500	EHFV-A	0,92
Metanol 100%	300	EHFV-M	1,60

6.5.3.2 Tratamento cromatográfico de EHFV-D e isolamento de CV-2.

EHFV-D (1,50 g) foi adicionado a 2,15 g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e acondicionada sobre 58,9 g de gel de sílica em coluna cromatográfica (L= 10 cm, Φ = 2,4 cm). A eluição foi realizada com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade (Tabela 11).

Tabela 11. Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EHFV-D.

Eluente	Frações	Volume (mL)
Hexano/Diclorometano 50%	1-20	300
Hexano/Diclorometano 60%	21-39	300
Hexano/Diclorometano 80%	49-63	300
Diclorometano 100%	64-87	300
Diclorometano/ Acetato de etila 10%	88-94	200
Acetato de etila 100%	95-102	100
Metanol 100%	103-116	100

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) as frações obtidas deram origem a 7 novas frações (Tabela 12, pág. 73).

Tabela 12. Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHFV-D.

Frações	Denominação	Massa (mg)
1-14	EHFV-D1	65,4
15-32	EHFV-D2	181,9
33-47	EHFV-D3	44,0
48-61	EHFV-D4	112,4
62-89	EHFV-D5	247,5
90-105	EHFV-D6	58,2
106-116	EHFV-D7	369,1

Após análise em (CCD) verificou-se que a fração EHFV-D3 (44,0 mg) se apresentava como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão de 88,0-88,9 °C, denominado **CV-2**.

6.5.3.3 Tratamento cromatográfico de EHFV-A e isolamento de CV-3

Cerca de (0,8 g) de EHFV-A foi adicionada a 1,76 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 128,0 g de gel de sílica em coluna cromatográfica (L= 6,8 cm e Φ = 2,5 cm). A eluição foi realizada com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias obedecendo ordem crescente de polaridade (Tabela 13).

Tabela 13. Dados referentes ao tratamento cromatográfico de EHFV-A.

Eluente	Frações	Volume (mL)
Hexano/Diclorometano 50%	1-26	400
Hexano/Diclorometano 70%	27-52	400
Hexano/Diclorometano 80%	52-78	400
Diclorometano 100%	79-94	400
Diclorometano/Acetato de etila 20%	95-119	400
Acetato de etila 100%	120-131	200
Metanol 100%	132-140	100

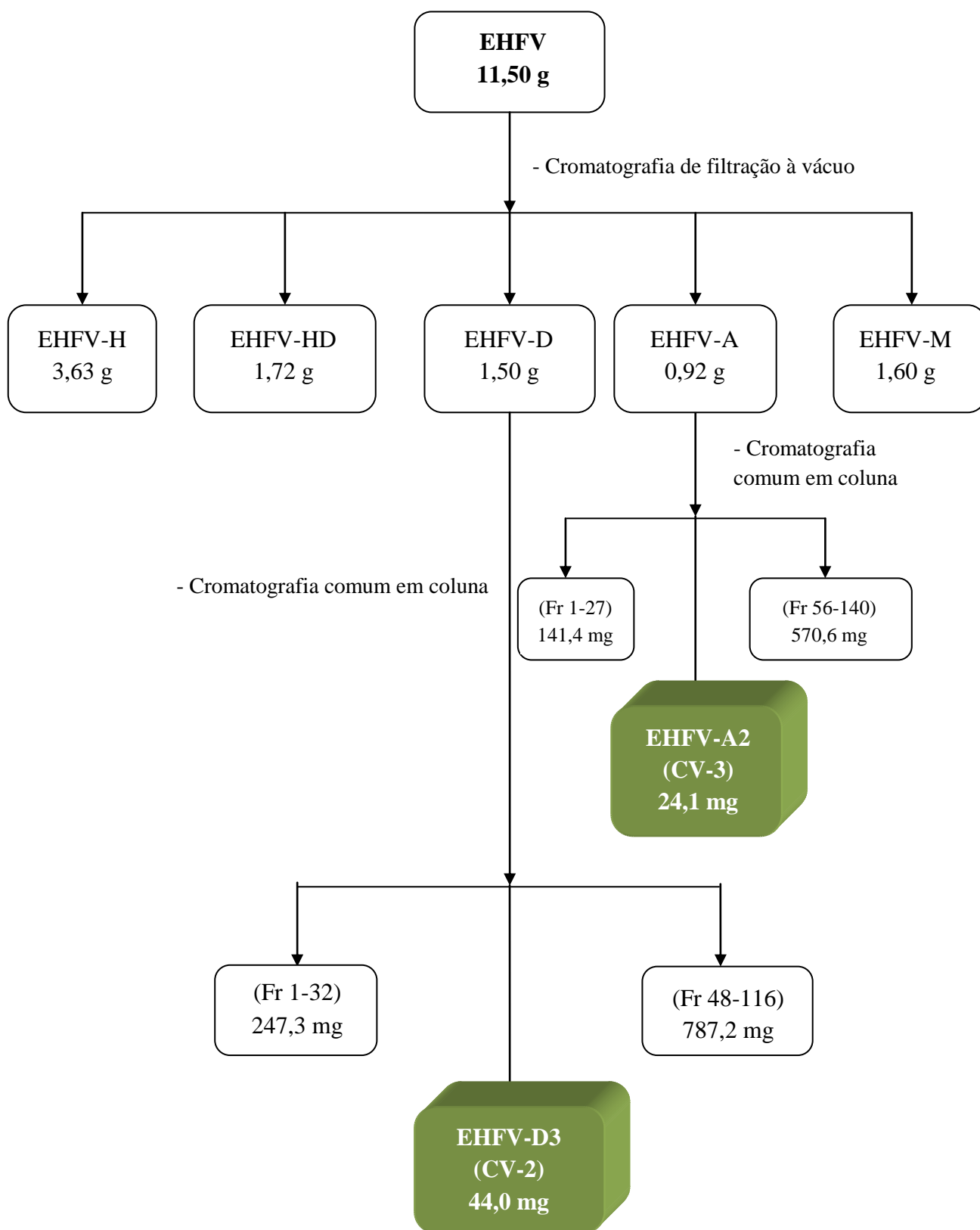
Fazendo uso de (CCD) pode-se reunir estas frações em um novo conjunto de 6 frações (Tabela 14, pág. 74).

Tabela 14. Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EHFV-A.

Frações	Denominações	Massa (mg)
1-27	EHFV-A1	141,4
28-55	EHFV-A2	24,1
56-79	EHFV-A3	81,9
80-112	EHFV-A4	245,6
113-127	EHFV-A5	65,8
128-140	EHFV-A6	177,3

A fração EHFV-A2 (24,1 mg) após análise em CCD mostrou-se como um sólido amarelado, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão de 280,9-283,4 °C denominado **CV-3**.

Fluxograma 4. Isolamento de CV-2 e CV-3 a partir de EHFV.



6.6 Obtenção dos derivados do β -sitosterol

6.6.1 Acetilação

Em um balão de 50 mL o β -sitosterol (50 mg) foi submetido a reação com anidrido acético (1mL) e piridina (1mL) em presença de gotas de dimetilaminopiridina sob agitação constante por 24 horas. Em seguida a mistura reacional foi dissolvida em acetato de etila, seguida de adição de uma solução saturada de sulfato de cobre para a remoção da piridina. A solução foi submetida a uma extração com AcOEt e a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotativo. O produto, na forma de um sólido branco amorfo [**CV-1(AC)**] (46 mg) foi purificado em coluna cromatográfica em gel de sílica, utilizando com eluente o CH_2Cl_2 . Após análise em CCD verificou-se apenas um spot de material puro (37 mg) que foi caracterizado por técnicas espectroscópicas.

6.6.2 Formilação

Em um balão de 50 mL o β -sitosterol (200 mg) foi misturado com 2,0 mL de ácido fórmico e 1 mL de ácido perclórico. A mistura foi mantida em banho-maria a 60 °C e agitação magnética durante 4 horas. O produto foi resfriado em banho de gelo sob agitação. Em seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e pequena quantidade de água destilada, obtendo-se um precipitado **CV-1 (FOR)** que foi lavado com água. Após 12 horas em dessecador, o material denominado (187 mg) foi analisado em CCD e mostrou-se impuro, sendo então, submetido à cromatografia em coluna em gel de sílica, utilizando como eluentes hexano, hexano/diclorometano (1:1), diclorometano, Acetato de etila e metanol, resultando em 42 frações. A análise em CCD possibilitou a reunião das frações 09-27, correspondente ao produto formilado (98 mg) catalogado como **CV-1 (FOR)** e caracterizado por métodos espectroscópicos.

6.6.3 Oxidação

Em um balão de 50 mL o β -sitosterol (30 mg) foi submetido a reação com 70 mg de clorocromato de piridina (PCC), dissolvidos em 3,0 mL de acetona e 2,0 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação durante por 24 horas a

temperatura ambiente. O solvente foi eliminado sob pressão reduzida com temperatura do banho-maria em torno de 40 °C. O sólido resultante (147 mg) foi analisado em CCD revelando-se impuro, sendo constatado ainda a presença de β -sitosterol. O material foi então submetido a uma cromatografia em coluna em gel de sílica utilizando o diclorometano como eluente, originando o produto de oxidação [CV-1 (OXI) (3,0 mg)], como um sólido amorfo de cor branca.

6.7 Obtenção do derivado do n-tetracosanol

6.7.1 Acetilação

Em um balão de 50 mL o n-tetracosanol (15 mg) foi submetido a reação com anidrido acético (1mL) e piridina (1mL sob agitação constante por 24 horas. Em seguida a mistura reacional foi dissolvida em acetato de etila, seguida de adição de uma solução saturada de sulfato de cobre para remoção da piridina. A solução foi submetida a extração com acetato de etila e a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotativo. O produto mostrou-se como um sólido branco amorfo [CV-2 (AC) (13,6 mg)], com rendimento de 91%.

6.8 Obtenção do derivado do 3 β -taraxerol

6.8.1 Oxidação de Jones

Em um balão de 50 mL o 3 β -taraxerol (15mg) foi dissolvido em acetona (75 mL). Em um processo à parte foi preparado o reagente de Jones: dicromato de potássio (7,5 g) foram dissolvidos em 13,0 mL de água destilada e em seguida foram adicionados 6 mL de ácido sulfúrico e o volume da solução completado para 25 mL. O reagente foi (5,0 mL) foi então adicionado gota a gota por 10 minutos sob agitação, sendo o final da reação indicado pela cor amarela persistente no líquido sobrenadante. Em seguida o solvente foi removido por destilação sob vácuo, o concentrado diluído com água (50 mL) e submetido a uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila (5 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada novamente com água (2 x 25 mL) e seco com sulfato de sódio anidro. O solvente orgânico foi removido por destilação sob vácuo, fornecendo um sólido amarelado [CV-3 (OXI) (13,7 mg)], com um rendimento de 92%.

6.9 Estudo do óleo fixo de EHV

6.9.1 Saponificação e obtenção dos ácidos graxos de EHTV

4,26 g de EHTV foram dissolvidos em 70 mL de metanol em um balão de 125 mL de fundo redondo e adicionado 4,32g de KOH. A mistura reacional, sob ação de uma manta aquecedora, foi mantida em refluxo por 4 horas. Após o resfriamento do sistema foram adicionados 50 mL de água destilada. A solução hidroalcoólica alcalina foi acidulada com 20 ml de uma solução de HCl 20% e submetida a extração com diclorometano (3 x 25 mL). As alíquotas orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e o diclorometano evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 965,4 mg de um óleo escuro (ácidos graxos livres).

6.9.2 Obtenção dos ésteres metílicos de EHTV

O material saponificável obtido (965,4 mg), foi submetido a refluxo durante 3 horas com 70 mL de metanol e 5 mL de HCl concentrado. Após resfriamento, à temperatura ambiente, o produto bruto foi lavado com 30 mL de água destilada e extraído com diclorometano (3x 30 mL), seco com sulfato de sódio anidro e concentrado a pressão reduzida, fornecendo 737,8 mg de produto metilado (EHTV-Met).

A purificação dos ésteres metílicos foi realizada através de coluna cromatográfica, em gel de sílica, utilizando como eluentes; hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias seguindo a ordem crescente de polaridade (Tabela 15).

Tabela 15. Dados referentes ao tratamento cromatográfico dos ésteres metílicos de EHTV.

Eluente	Volume (mL)	Frações
Hexano/diclorometano 50%	300	1-25
Metanol 100%	100	26

A análise através de CCD permitiu reunir as frações eluídas com hexano/clorofórmio como se segue: 1-2, 3-5, 6-16, 17-25. As frações 3-5 revelaram um

só spot em CCD e foi denominada EHTV-Met(3-5), um óleo amarelado com massa igual a 418,3 mg.

A determinação da constituição química de EHTV-Met(3-5), foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

6.9.3 Saponificação e obtenção dos ácidos graxos de EHFV

2,57 g de EHFV foram dissolvidos em 70 mL de metanol em um balão de 125 mL de fundo redondo e adicionado 2,51g de KOH. A mistura reacional sob ação de uma manta aquecedora, foi mantida em refluxo por 4 horas. Após o resfriamento do sistema foram adicionados 50 mL de água destilada. A solução hidroalcoólica alcalina foi acidulada com cerca 20 mL de uma solução de HCl 20% e submetida a extração com diclorometano (3 x 30 mL). As alíquotas orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e o diclorometano evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 520,2 mg de um óleo escuro (ácidos graxos livres).

6.9.4 Obtenção dos ésteres metílicos de EHFV

O material saponificável obtido (520,2 mg), foi submetido a refluxo durante 2 horas com 50 mL de metanol e 5 mL de HCl concentrado. Após resfriamento, à temperatura, o produto foi lavado com 30 mL de água destilada e extraído com diclorometano (3x 30 mL), seco com sulfato de sódio anidro e concentrado a pressão reduzida, fornecendo 307,9 mg de produto metilado (EHTV-Met).

A purificação dos ésteres metílicos foi realizada através de coluna cromatográfica, em gel de sílica, utilizando como eluentes; hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias seguindo a ordem crescente de polaridade (Tabela 16).

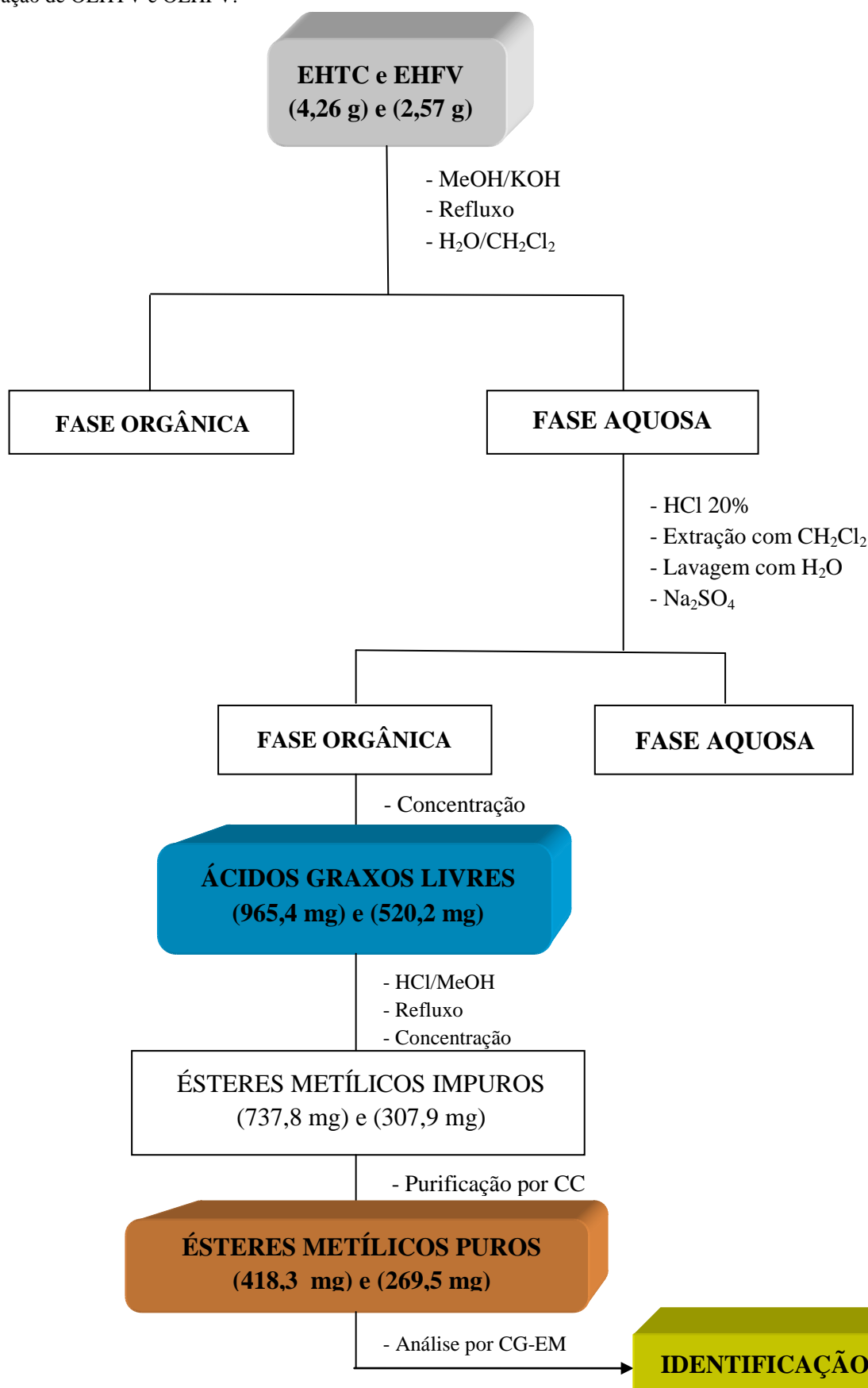
Tabela 16. Dados referentes ao tratamento cromatográfico dos ésteres metílicos de EHFV.

Eluente	Volume (mL)	Frações
Hexano/diclorometano 50%	200	1-17
Metanol 100%	100	18

A análise através de CCD, permitiu reunir as frações eluídas com hexano/diclorometano como se segue: 1-2, 3-4, 5-6, 7-16. A fração 3-4 revelou um só spot quando analisadas por CCD e foi denominada EHTV-Met(3-4), um óleo amarelado com massa igual a 269,5 mg.

A determinação da constituição química de EHTV-Met(3-4), foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).

Fluxograma 5. Obtenção dos ácidos graxos livres de EHTV, metilação dos ácidos graxos livres e identificação de OEHTV e OEHFV.



CAPÍTULO 7
ATIVIDADE BIOLÓGICA

7 ATIVIDADE BIOLÓGICA

7.1 Teste de atividade frente à enzima acetilcolinesterase

Os testes de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foram feitos no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Estadual do Ceará, sob a orientação da Prof^a Selene Maia de Moraes.

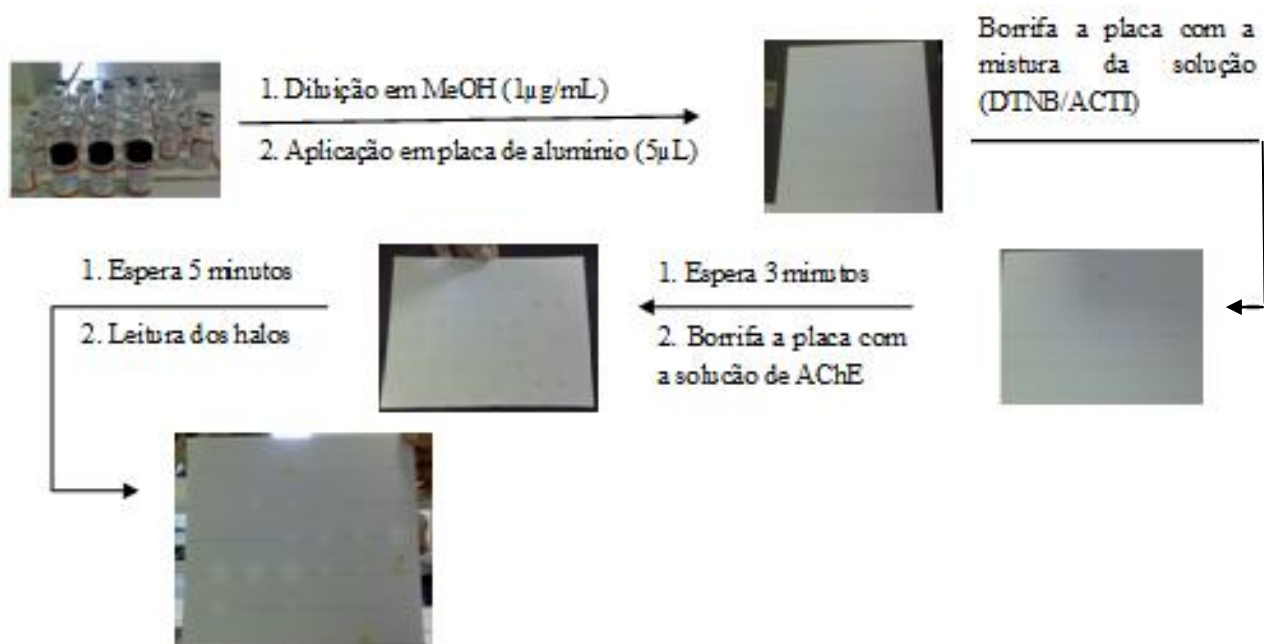
A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), foi realizada através do método de Ellman (1961), modificado por Rhee e colaboradores (2001). O objetivo desse bioensaio é encontrar substâncias que apresentam a propriedade de inibir a enzima acetilcolinesterase, inibição essa que está diretamente ligada ao tratamento da doença de Alzheimer (RHEE *et al.*, 2001). Este bioensaio consiste na aplicação das amostras em CCD, seguida da pulverização da placa com uma solução contendo o reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]) e uma solução de ATCI (iodeto de acetiltiocolina) em tampão apropriado. É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa (no caso desse trabalho, foi utilizado apenas o modo qualitativo). É um método rápido e sensível para a pré-seleção de amostras com ação anticolinesterásica. O método de Ellman é um procedimento para atividade da acetilcolinesterase e pode ser rotineiramente empregado para avaliar a atividade inibitória de constituintes químicos.

Para o referido teste, utilizou-se uma alíquota de 5 μ L das amostras a serem testadas na concentração de 2 mg/mL dissolvidas em metanol e aplicadas em uma cromatoplaça. Após a evaporação dos solventes, pulverizou-se uma mistura (1:1) de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) 1 mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis-[2-nitrobenzóico], DTNB, 1 mmol.L⁻¹), deixando em repouso por 3 min para a secagem da placa. Após completa secagem das soluções, pulverizou-se a placa com a enzima acetilcolinesterase 3 U/mL. Após um período de 5 minutos, observou-se o surgimento de uma coloração amarela na placa e o aparecimento de halos brancos em torno das amostras que apresentaram atividade, em contraste com a coloração amarela da placa, cujos diâmetros foram imediatamente medidos. Neste experimento, a fisostignina dissolvida em clorofórmio (2 mg/mL) foi utilizada como controle positivo. No fluxograma 6 na página 84 estão apresentados as etapas desse método. O resultado deste bioensaio encontra-se descrito na tabela 17 página 84.

Tabela 17. Resultado do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Amostra	Halos de inibição (mm)
CV-1	7,0
CV-1 (FOR)	Negativo
CV-1 (AC)	9,0
CV-1 (OXI)	8,0
CV-2	8,0
CV-2 (AC)	7,0
CV-3	7,0
CV-3 (OXI)	6,0
Padrão- fisostignina	9,0

* Concentração da amostra e padrão = 2mg/mL

Fluxograma 6. Procedimento para a realização do teste de Ellman.

DTNB: Reagente de Ellman (ác. 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]; ACTI: iodeto de acetilcolina

Conforme os resultados da tabela 17, foi constatado, de modo geral, bons resultados com relação a ação inibitória da acetilcolinesterase pelas substâncias isoladas. Assim, **CV-2** mostrou halo de inibição (8,0 mm) próximo ao do padrão fisostigmina (9,0 mm). Por outro lado, vale destacar a ação inibitória do derivado reacional **CV-1(AC)** (9,0 mm), ou seja, com maior ação inibitória que a substância original e com a mesma ação (9,0 mm) da substância padrão (9,0 mm).

CAPÍTULO 8

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho relatou o estudo fitoquímico da espécie botânica *Cissus verticillata*, uma planta comum do nordeste brasileiro. Através de uma pesquisa literária realizada nos sites de busca especializados foram encontrados poucos artigos relacionados ao estudo fitoquímico, porém alguns resultados remetem as suas atividades farmacológicas, entre elas, antioxidante e hipoglicemiante.

O presente trabalho permitiu o isolamento e caracterização do esteróide β -sitosterol (CV-1), o álcool n-tetracosanol (CV-2) o triterpeno pentacíclico 3β -taraxerol e a obtenção de alguns derivados reacionais como os produtos acetilados CV-1 (AC) e CV-2 (AC), formilado CV-1(FOR) e oxidados como CV-1(OXI) e CV-3 (OXI). Além disso, pode-se identificar os ácidos graxos das folhas e dos talos da espécie *C.verticillata* através dos seus ésteres metílicos correspondentes.

O teste de inibição da acetilcolinesterase realizado com estas substâncias revelaram resultados animadores, mostrando a importância de um estudo mais detalhado no que diz respeito à estrutura das substâncias e os grupos presentes que são responsáveis pelo melhoramento da atividade biológica em questão, ou seja, um estudo mais aprofundado no tocante a relação estrutura x atividade biológica.

A partir dos resultados (Tabela 17, pág. 84) obtidos em relação à atividade anticolinesterase, pode-se destacar ainda o forte efeito inibitório (9,0 mm) da enzima pelo derivado acetilado do β -sitosterol além do bom resultado para o seu derivado oxidado (8,0 mm) e do álcool n-tetracosanol (8,0 mm) em comparação ao padrão fisostignina (9,0 mm).

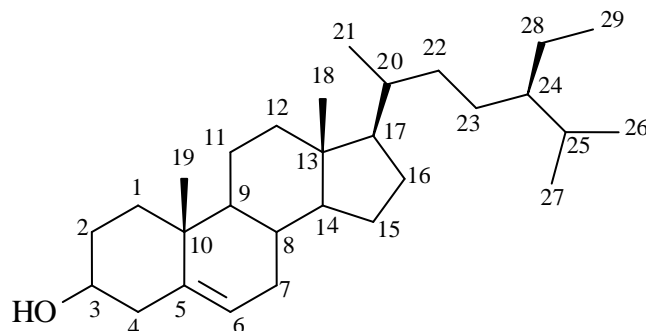
Além dos derivados reacionais obtidos nesse trabalho, outros produtos (haletos, diois, oximas, etc) poderiam ser obtidos utilizando reagentes convencionais, tendo em vista os grupos funcionais clássicos presentes nos compostos originais e que poderiam também ser estudados frente a esta atividade biológica proposta.

CAPÍTULO 9
CONSTANTES FÍSICAS E DADOS
ESPECTROSCÓPICOS

9 CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

9.1 Constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas

9.1.1 CV-1



β -sitosterol

F.M.: C₂₉H₅₀O

P.M.: 414,0 u.m.a

P.F.: 116-119 °C

Aspecto: Sólido branco amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

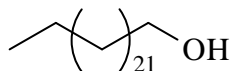
3419, 2934, 2865, 1643, 1463, 1376, 1051

Espectroscopia de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):

0,68 (3H, s); 0,83-0,87 (m); 0,93 (d, $J=6,39$ Hz); 1,05 (s); 1,12 (m); 1,52 (m); 1,86 (m); 2,04 (m), 2,27 (m); 3,53 (m); 5,36 (1H, d, $J=7,1$ Hz).

Espectroscopia de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):

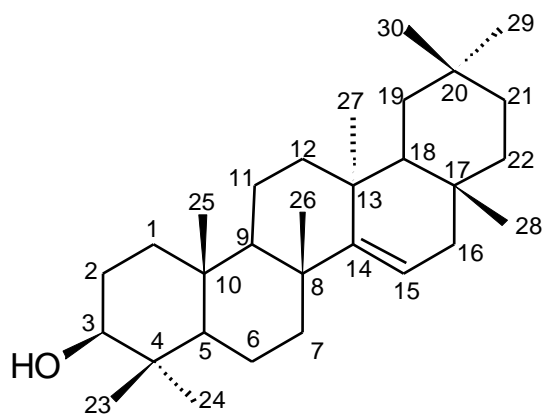
12,1 (CH₃, C-29); 12,2 (CH₃, C-18); 19,0 (CH₃, C-21); 19,3 (CH₃, C-27); 19,6 (CH₃, C-19); 20,0 (CH₃, C-26); 21,3 (CH₂, C-11); 23,3 (CH₂, C-28); 24,5 (CH₂, C-15); 26,4 (CH₂, C-23); 28,5 (CH₂, C-16); 29,4 (CH, C-25); 29,9 (CH₂, C-2); 31,9 (CH₂, C-7); 32,2 (CH₂, C-8); 34,2 (CJ₂, C-22); 36,4 (CH, C-20), 36,8 (C, C-10); 37,5 (CH₂, C-1); 40,0 (CH₂, C-12); 42,6 (CH₂, C-4); 43,5 (C, C-13); 46,1 (CH, C-24); 50,4 (CH, C-9); 56,3 (CH, C-17); 57,0 (CH, C-14); 72,0 (CH, C-3); 121,9 (CH, C-6); 141,0 (C, C-5).

9.1.2 CV-2**n-Tetracosanol****F.M.:** C₂₄H₅₀O**P.M.:** 354,0 u.m.a**P.F.:** 88,0-88,9 °C**Aspecto:** Sólido branco amorfo**Solubilidade:** Clorofórmio**Espectroscopia na região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:**

3282, 2916, 2834, 1472, 1462, 1061

Espectrometria de massa de baixa resolução: m/z 354**Espectroscopia de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):**0,89 (3H, t, *J*= 6,5 Hz); 1,30 (s); 1,58 (m); 3,65 (2H, t, *J*= 6,5 Hz).**Espectroscopia de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):**14,29 (CH₃); 22,91 (CH₂); 26,01 (CH₂); 29,59 (CH₂); 29,68 (CH₂); 29,85 (CH₂); 29,90 (CH₂), 29,93 (CH₂); 63,57 (CH₂).

9.1.3 CV-3



3β-taraxerol

F.M.: C₃₀H₅₀O

P.M.: 426,72 u.m.a

P.F.: 280,9-283,4 °C

Aspecto: Sólido amarelado amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

3487, 2917, 1641, 1131 e 1036

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):

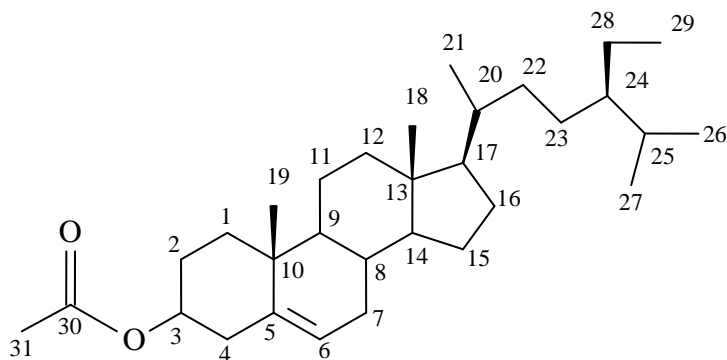
0,80-2,10 (m); 0,93 (s); 0,98 (s); 1,02 (s); 1,03 (s); 1,10 (s); 1,15 (s); 1,27 (s); 1,34 (s); 3,48 (1H, dd, *J* = 6,3 e 3,3 Hz); 5,65 (1 Hz, dd, *J* = 8,0 e 2,5 Hz).

Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):

Tabela 5, página 40.

9.2 Constantes físicas e dados espectrométricos dos derivados de CV-1, CV-2 e CV-3.

9.2.1 CV-1 (AC)



Acetato de β -sitosterol

F.M.: $C_{31}H_{52}O_2$

P.M.: 456,75 u.m.a

P.F.: 123-126 °C

Aspecto: Sólido branco amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm^{-1} :

2937, 2869, 1730, 1465, 11465, 1366, 1247, 1037

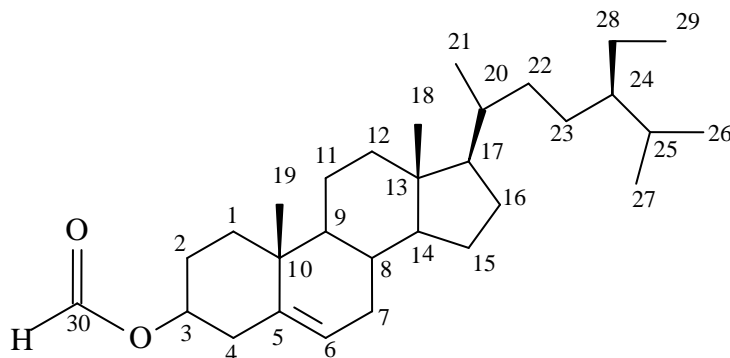
Espectroscopia de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):

0,69 (s); 0,80 (s); 0,86 (s); 0,88 (s); 0,92 (s); 0,94 (s), 1,07 (s), 1,1-1,9 (m); 2,09 (s); 2,32 (2H, d, $J = 9,0$ Hz); 4,6 (m); 5,38 (1H, d, $J = 6,0$ Hz).

Espectroscopia de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):

Tabela 6, página 64.

9.2.2 CV-1 (FOR)



Formato de β -sitosterol

F.M.: $C_{30}H_{50}O_2$

P.M.: 442,72 u.m.a

P.F.: 108-109,3 °C

Aspecto: Sólido branco amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm^{-1} :

2936, 2867, 1713, 1465, 1377, 1203, 1186

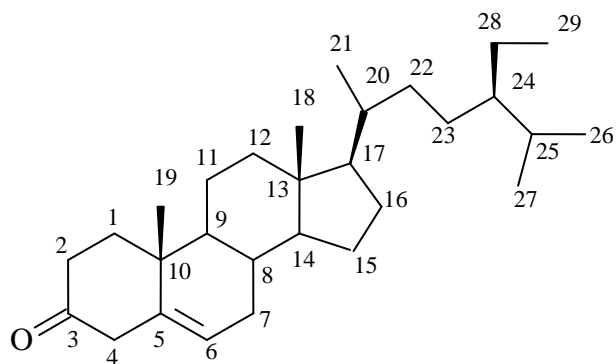
Espectroscopia de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):

0,69 (s); 0,81 (s); 0,83 (s); 0,85 (s); 0,92 (s); 0,94 (s); 1,0 (s); 2,36 (2H, d, $J = 7,6$ Hz); 4,75 (m); 5,40 (1H, d, $J = 4,5$ Hz); 8,0 (s).

Espectroscopia de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):

Tabela 6, página 64.

9.2.3 CV-1 (OXI)



β -sitosterona

F.M.: C₂₉H₄₈O

P.M.: 412,70 u.m.a

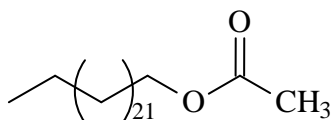
P.F.: 85,3-86,7 °C

Aspecto: Sólido branco amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

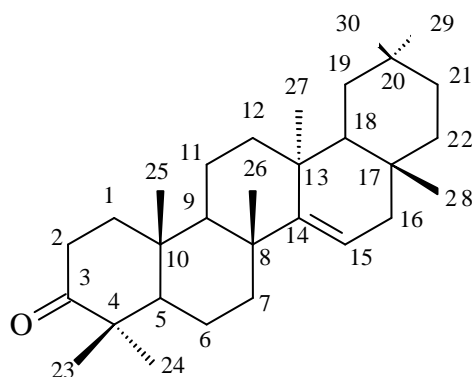
2918, 2850, 1715, 1463, 1378, 1205, 1187

9.2.4 CV-2 (AC)**Acetato de tetracosanol****F.M.:** C₂₆H₅₂O₂**P.M.:** 396,0 u.m.a**P.F.:** 82,3-83,7 °C**Aspecto:** Sólido branco amorfo**Solubilidade:** Clorofórmio e Diclorometano**Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:**

2917, 2848, 1738, 1473, 1461, 1365, 1244

Espectroscopia de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):0,88 (3H, t, *J* = 5,8 Hz), 1,26 (s); 1,60 (m); 2,05 (s); 4,05 (2H, t, *J* = 6,6 Hz).**Espectroscopia de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):**14,31 (CH₃); 21,21 (CH₃); 22,90 (CH₂); 26,14 (CH₂); 28,83 (CH₂), 29,48 (CH₂); 29,58 (CH₂); 29,74 (CH₂); 29,79 (CH₂); 29,92 (CH₂); 32,14 (CH₂), 64,88 (CH₂); 171,43 (C).

9.2.5 CV-3 (OXI)



Taraxerona

F.M.: C₃₀H₄₈O

P.M.: 424,0

P.F.: 275,7-276,9 °C

Aspecto: Sólido amarelado amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectroscopia na Região do infravermelho (IV); KBr, cm⁻¹:

2918, 2851, 1707, 1448, 1376, 1117, 995

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):

0,83 (s); 0,91 (s); 0,96 (s); 1,08 (s); 1,14 (s); 1,26 (s); 1,34 -2,58 (m); 5,56 (1H, d, *J* = 6,4 Hz).

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTRAMI, F.L. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus Sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova*. v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.
- BELTRAMI, F.L.; FERREIRA, A.G.; CORTEZ, D.A.G. Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. *Natural Product Letters*. v. 16, n. 4, p. 213-216, 2002a.
- BELTRAMI, F.L. *et al.* Evaluation of the Antidiabetic and Antibacterial Activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 45, n. 1, p. 21-25, March, 2002b.
- BERG, M. E. V.D. **Plantas medicinais da Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2ª Ed, p. 207, 1993.
- BHUTANI, K. K.; KAPOOR, R.; ATAL, C. K. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. *Phytochemistry*. v. 23, n. 2, p. 407-410, 1984.
- BOLSONI, A.K.H. *et al.* The use of plant species as hypoglycemiant phytotherapics. *Natureza on line*. v. 6, p. 19-23, 2008.
- CANO, J.H; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J Ethnopharmacol*. v. 90, p. 293-316, 2004.
- CARVAJAL, D. *et al.* Pharmacological screening of plant detections commonly used in cuban folk medicine. *J Ethnopharmacol*. v. 33, p. 21-24, 1983.
- CORRÊA, M. P.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**; Imprensa Nacional; Rio de Janeiro, p 130-131, 1978.
- DOOLEY, M; LAMB, H.M. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs & aging*, v. 16, n. 3, p. 199-226, 2000.
- ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-90, 1961.
- GARCÍA, M.D. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. v. 71, p. 395-400, 2000.
- GUPTA, M.M.; VERMA, R.K. Unsymmetric tetracyclic triterpenoid from *Cissus quadrangularis*. *Phytochemistry*. v. 29, n. 1, p. 336-337, 1990.
- GUPTA, M.M.; VERMA, R.K. Lipid constituents of *Cissus quadrangularis*. *Phytochemistry*. v. 30, n. 3, p. 875-878, 1991.

HOWES, M.J.R. *et al.* Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy research*. v. 17, p. 1-18, 2003.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. Nacional, p. 777, 1998.

KATO M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. *Phytochemistry*, v. 57, p. 621-23, 2001.

KHAN, M. A.; NABI, S. G.; PRAKASH, S. and ZAMAN, A. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. *Phytochemistry*, v. 25, p. 1945-1948, 1986.

LUCENA, F.R.S. *et al.* Cytotoxic, antitumor and leukocyte migration activities of resveratrol and sitosterol present in the hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 20, n. 5, p. 729-733, out/nov. 2010.

MACARI, P.A.T, EMERENCIANO, V.P, FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação de triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análise por microcomputador. *Química Nova*. V. 13, p. 260-262, 1990.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclitriterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. v. 37, n. 6, p.1517-1575, 1994.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário: Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, p. 24-28, 1999.

MATOS, F.J; **Introdução à fitoquímica experimental**, 2ª edição, Fortaleza, edições UFC, 1997.

MENEZES, J.E.S.A.; “**Contribuição ao estudo químico de plantas do nordeste do Brasil: *Cordia trichotoma* Vell. E *Cordia globulosa* Jack (Kunth)**” 2005, Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2005.

MENTHA, M.; KAUR, N.; BHUTANI, K.K. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. And their quantitation by HPTLC and HPLC. *Phytochemical Analysis*, v. 12, n. 2, p. 91-95, 2001.

OLIVEIRA, B.H; BUENO, D.D. Biotransformação de esteróis. *Química Nova*. v. 19, n. 3, p. 233-236, 1996.

QUILEZ, A.M. *et al.* Phytochemical analysis and anti-allergic study of Agave intermixta Trel. And *Cissus sicyoides* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 9, p. 1185-1189, 2004.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer

chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal Chromatography A.*, v. 915, p. 217-223, 2001.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazonia Central.** Manaus: Inpa, p. 816, 1999.

SAIFAH, E. *et al.* Constituents of the roots of *Cissus rheifolia*. *Journal Natural Products.* v. 50, n. 2, p. 328, 1987.

SAIFAH, E.; KELLEY, C. J.; LEARY, J. D. Constituents of the leaves of *Cissus rheifolia*. *Journal Natural Products*, v. 46, p. 353-358, 1983.

SANTOS, H.B. *et al.* Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v. 18, n. 1, p. 70-76, jan/mar. 2008.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde.** SOUZA, G. M. (Tradutora). 4. ed. São Paulo: Ed. Manole, p. 386, 2002.

SILVA, L. *et al.* Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v. 17, n. 3, p. 361-367, jul/set. 2007.

TAMAI, W. *et al.* Newhepaptotective triterpenes from *Canarium album*. *Planta medica*, v. 55, p. 44-47, 1989.

TOLEDO, M.C.F. *et al.* Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides*, Linn.). *Journal of Food Science.* v. 48, n. 4, p. 1368-1369, 1983.

VASCONCELOS, T.H.C. *et al.* Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v. 17, n. 4, p. 583-591, out/dez. 2007.