

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

"ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS DE *Leonotis nepetaefolia* R. Br. (LABIATAE)".

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS.

JOÃO FRANCISCO GOMES CORREIA

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
JULHO - 1994.

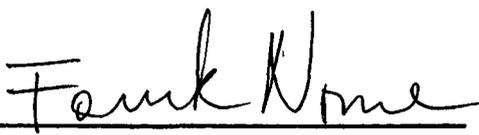
"ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Leonotis
nepetaefolia* R. Br. (LABIATAE)"

JOÃO FRANCISCO GOMES CORREIA

ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO
ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA.



Prof. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES
ORIENTADOR

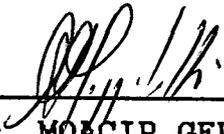


Prof. Dr. FARUK NOME AGUILERA
COORDENADOR

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES



Prof. Dr. MOACIR GERALDO PIZZOLATTI



Prof. Dr. MIGUEL BALPARDA CARO

Aos meus Pais e Irmãos;
à minha Esposa e Filhas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Dr. Franco Delle Monache da Universidade Sacro Cuore
(Roma), por nos ter possibilitado a obtenção de espectros;

Ao Dr. Ladislau S. Skorupa, da EMBRAPA-Cenargen, pelo envio
dos lotes da planta;

Ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pela orientação, incentivo
e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Moacir Pizzolatti, pelo incentivo durante a fase experimental;

Ao Prof. Dr. Miguel Balparda Caro pela gentileza de realizar alguns experimentos de ressonância magnética nuclear;

Aos colegas do curso Valdir Cechinel, Niero, Obdúlio, Lucimara, Tânia, Edésio, Clóvis, Jacir, Inês, Bocão e Evandro pelo companheirismo;

Aos colegas de carreira Gelso, Ângelo, Vanilde, Marta, os técnicos vidreiros Dagoberto e Luiz Carlos e os secretários Graça e Jadir pelo apoio e colaboração;

Aos demais professores do Departamento de Química, colegas e amigos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste projeto;

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

RECONHECIMENTO

Ao Departamento de Química, por incentivar a conclusão de mais esta etapa de minha formação;

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio.

ABREVIATURAS:

fig(s): figura(s)

nº: número

eV: elétrons-volt

H₂: gás hidrogênio

ppm: partes por milhão da frequência aplicada

TMS: tetrametilsilano

UV/Vis.: ultra-violeta/ visível

RMN: ressonância magnética nuclear

J: constante de acoplamento

λ: comprimento de onda

ε: absorvidade molar

δ: deslocamento químico

MeOH: metanol

H₂O: água

HOAc: ácido acético glacial

EtOH: etanol

CCl₄: tetracloreto de carbono

CDCl₃: clorofórmio deuterado

(CH₃)₂CO: acetona

CH₂Cl₂: diclorometano

CHCl₃: clorofórmio

C₆H₆: benzeno

di: diâmetro interno

comp.: comprimento

APT: Attached Proton Test

HETCOR: Heteronuclear Chemical Shift Correlation

m: metros

nm: nanômetros

mm: milímetros

cm: centímetros

min.: minutos

µl: microlitros

ml: mililitros

kg: quilogramas

°C: graus centígrados

Rf: retention factor

I. V.: infravermelho

E. M.: espectrometria de massas

CGAR: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

ccd: cromatografia analítica em camada delgada

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography

DIC: Detector de Ionização de chama

T.i.: temperatura inicial

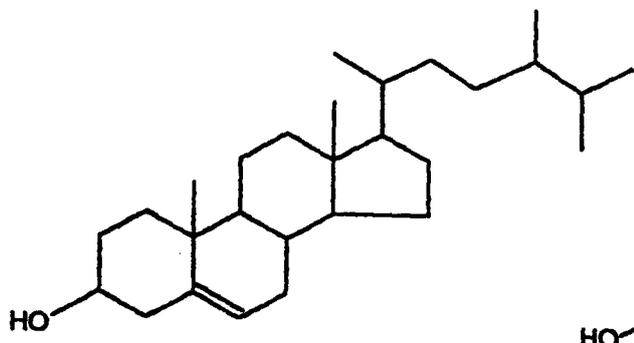
T.f.: temperatura final

P.F.: Ponto de Fusão

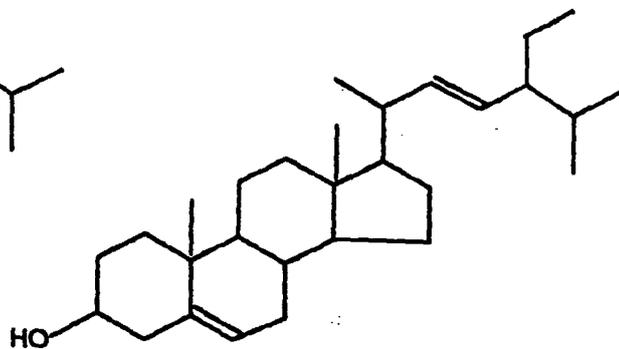
Ph: grupo fenila

DMSO-d₆: dimetil sulfóxido deuterado

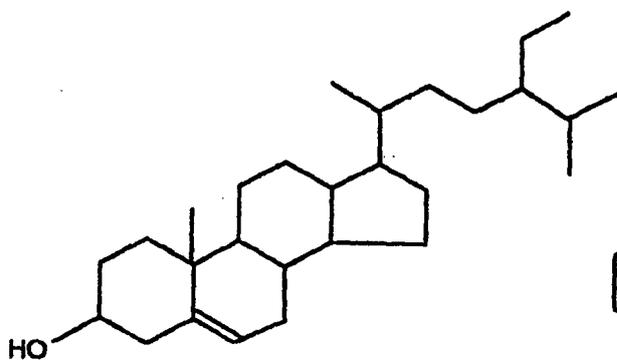
t_R: tempo de retenção



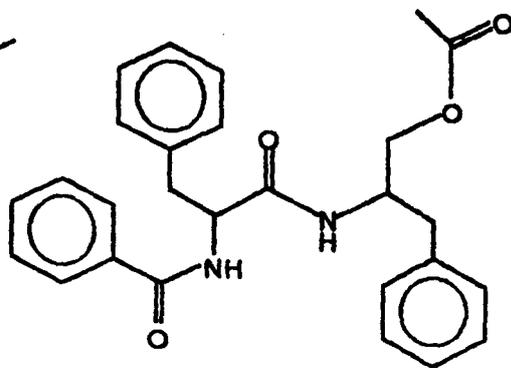
1



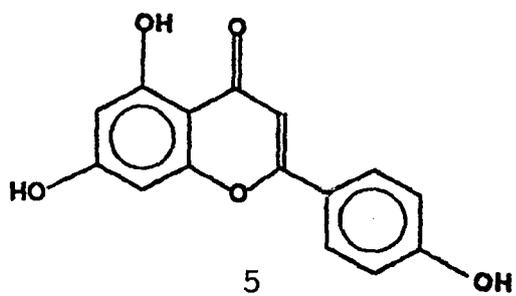
2



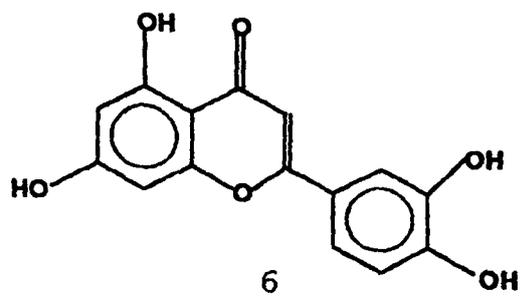
3



4



5



6

Fig.11: espectro de RMN ^1H do composto isolado da fração LN - 9 com ampliação da região de absorção de prótons de fenilas, obtido em um campo de 300 MHz e solvente CDCl_3	46
Fig.12: RMN ^1H a 300 MHz mostrando a região de $\delta=6,9-2,6$, com ampliação dos sinais centrados a 2,75; 4,34; 4,76 ppm do composto isolado da fração LN - 9, usando como solvente CDCl_3	47
Fig.13: espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) mostrando a troca com deutério quando adiciona-se uma pequena quantidade de D_2O à amostra analisada: a)espectro total; b)espectro obtido após adicionar D_2O . O sinal em torno de 4,76 ppm(hachurado) refere-se à <u>H</u> OD. Singletes a 2,18 e 2,37 ppm são contaminantes.....	48
Fig.14: espectro na modalidade APT obtido do composto isolado da fração LN - 9, realizado a 75 MHz usando CDCl_3 como solvente..	49
Fig.15a: espectro de RMN ^1H a 300 MHz usando como solvente CDCl_3 : a) espectro total; b) irradiação a $\delta=6,759$ ppm, alterando a multiplicidade a $\delta=4,767$ ppm; c) irradiação a $\delta=5,96$ ppm, alterando o sinal a $\delta=4,345$ ppm.....	50
Fig.15b: espectro de desacoplamento de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): a) espectro total; b) irradiação a 4,76 ppm, afetando os sinais a 3,05, 3,23 e 6,76 ppm.....	51

Fig.15c: espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):	
a) espectro total;	
b) irradiação a 4,345 ppm, alterando a multiplicidade dos sinais a 5,96, 3,8, 3,93 e 2,75 ppm.....	52
Fig.15d: espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):	
a) espectro total;	
b) espectro irradiado em 3,87 ppm;	
c) espectro irradiado em 3,93 ppm;	
d) espectro irradiado em 3,8 ppm.....	53
Fig.15e.: espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):	
a) espectro total;	
b) espectro irradiado em 3,12 ppm;	
c) espectro irradiado em 3,23 ppm;	
d) espectro irradiado em 3,05 ppm;....	54
Fig.15f.: espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):	
a) espectro total;	
b) espectro irradiado em 2,75 ppm.....	55
Fig.16: espectro no modo HETCOR(300 MHz, CDCl_3) mostrando a associação de carbonos de fenil com prótons aromáticos do composto isolado da fração LN - 9. Notar que os sinais em 5,92 e 6,75 ppm não cruzam com sinais de carbono.....	56
Fig.17: espectro bidimensional HETCOR(300 MHz, CDCl_3) mostrando a associação de prótons alifáticos com seus respectivos carbonos.	57

- Fig.18: espectro no modo HETCOR Long Range (300 MHz, CDCl₃)mostrando o acoplamento até três ligações do metileno com sinal a 3,23 e 3,05 ppm com um carbono de carbonila (170,15) ppm e até duas ligações com carbono a 54,95 ppm do metino em 4,76 ppm. Percebe-se acoplamento a três ligações de próton de fenil (7,72 ppm) com C de carbonila(167,05ppm)..... 58
- Fig.19: espectro no modo HETCOR Long Range (300 MHz, CDCl₃)mostrando o acoplamento até duas ligações do sinal 3,13 ppm com C de carbonila (170,156 ppm), assim como um próton de fenila acoplando com um C de carbonila(167,053 ppm) indicando a existência de unidade benzoílica. O singlete em 2,02 ppm com C de carbonila (170,787 ppm) revela um grupo acetil..... 59
- Fig.20: rota de fragmentação proposta para explicar sequência de picos que aparecem a $m/z=353$, $m/z=293$, $m/z=252$, $m/z=224$, $m/z=105$ e $m/z=91$, respectivamente..... 62
- Fig.21: fragmentação sugerida para explicar a presença do íon a $m/z=311$ 62
- Fig.22: estrutura do composto isolado da fração LN - 9, denominado N-benzoyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol Acetate..... 63
- Fig.23: espectro de infravermelho obtido da fração LN-Hol 5..... 67
- Fig.24: espectro de RMN ¹H(300 MHz, acetona deuterada) dos constituintes da fração LN - Hol 5. Em 13,03 ppm aparece sinal de próton -OH formando ponte., ombro da linha base em torno de 9 ppm refere-se a prótons -OH fenólicos livres..... 68

Fig.25: a) estrutura molecular de uma flavona, mostrando os anéis A, B e C; b) prótons do anel <u>B</u> 4'-oxigenado; c) prótons do anel <u>B</u> 3',4'-oxigenado; d) prótons do anel <u>A</u> 5,7-di-hidróxi-substituído.....	70
Fig.26: espectro em APT (300 MHz, acetona deutera- rada) da mistura de flavonóides.....	72
Fig.27: estruturas moleculares em projeção no plano dos flavonóides Apigenin 5 e Lu- teolin 6 ^(32,33)	74
Fig.28: cromatogramas obtidos por HPTLC da fra- ção LN Hol-5: a) amostra; b) luteolin; c) apigenin; d) amostra + luteolin; e) amostra + apigenin.	76
Fig.29: cromatograma obtido por HPLC resultante da eluição da amostra da fração LN Hol - 5, dadas as seguintes condições: MeOH-H ₂ O(7:3); detector: UV 254 nm e 345 nm; coluna ODS.....	77
Fig.30: compostos identificados a par- tir do extrato de <i>Leonotis</i> <i>nepetaefolia</i>	79

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Pág.

Esquema 1: obtenção de Extratos do vegetal *Leonotis nepetaefolia*.....

16

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: fracionamento do Extrato acetato de etila-hexânico.....	18
Tabela 2: Fracionamento do Extrato hidroalcoólico.....	24
Tabela 3: dados de RMN ^1H e ^{13}C a partir do composto Anomalamide.....	64
Tabela 4: deslocamento químico dos carbonos para a mistura de flavonóides Luteolin e Apigenin . A estrutura acima mostra a posição dos carbonos relacionados na tabela.....	73

1.	RESUMO	
2.	ABSTRACT	
3.	ÍNDICE	Pág.
I.	INTRODUÇÃO.....	1
1.	Considerações Sobre a Espécie em Estudo...	4
2.	USOS NA MEDICINA POPULAR.....	7
II.	OBJETIVOS.....	8
III.	PARTE EXPERIMENTAL.....	9
1.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.	COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	13
3.	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS (Esquema 1).	14
4.	PROCEDIMENTO GERAL UTILIZADO PARA ISOLA- MENTO E PURIFICAÇÃO.....	15
5.	ESTUDO DOS EXTRATOS OBTIDOS DE <i>Leonotis nepetaefolia</i>	17
5.1.	Fracionamento por Cromatografia Prepara- tiva em Coluna do Extrato Seco Aceta- to de Etila - Hexânico.....	17
5.1.1.	Metodologia.....	17
5.1.2.	Obtenção dos Principais Constituintes da Fração LN - 4 e Seus Dados Físico-quími- cos.....	19
5.1.3.	Obtenção dos Principais Constituintes da Fração LN - 9 e Seus Dados Físico-Quími- cos.....	21

	(Pág.)
5.2. Fracionamento por Cromatografia Prepara- tiva em Coluna do Extrato Hidroal- cólico Seco.....	23
5.2.1. Metodologia.....	23
5.2.2. Obtenção dos Principais Constituintes da da fração LN Hol - 5 e Seus Dados Físico- Químicos.....	25
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
1. IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Leonotis nepetaefolia</i>	26
1.1. A PARTIR DO EXTRATO ACETATO DE ETILA-HEXÂNI- CO.....	27
1.1.1. Identificação dos Principais Constituintes Químicos da Fração LN - 4.....	29
1.1.2. Identificação e Determinação Estrutural do Principal Constituinte da Fração LN - 9.....	37
1.2. A PARTIR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO.....	65
1.2.1. Identificação dos Constituintes da Fração LN - Hol 5.....	66
V. CONCLUSÃO.....	78
VI. BIBLIOGRAFIA.....	80

RESUMO

Este trabalho divide-se em:

A- Estudo do extrato acetato de etila-hexânico de *Leonotis nepetaefolia*;

B- Estudo do extrato hidroalcoólico de *Leonotis nepetaefolia*.

Do primeiro, isolou-se uma mistura de três esteróis, posteriormente identificados como campesterol 1, stigmasterol 2 e β -sitosterol 3. Também isolou-se uma amida derivada da fenilalanina, identificada como anomalamida 4, inédita na família.

A determinação estrutural da amida foi realizada por análises de espectros, empregando-se técnicas de APT, HETCOR e espectrometria de massas. Os esteróis foram identificados por CGAR através de coinjeções com padrões.

Do extrato hidroalcoólico, isolou-se uma mistura de flavonóides posteriormente identificados como Apigenin 5 e Luteolin 6, cuja determinação estrutural foi realizada por métodos espectroscópicos e por comparação com padrões por HPTLC.

ABSTRACT

This work is subdivided into two parts:

A- Study of the Ethyl acetate-hexane extract of *Leonotis nepetaefolia*;

B- Study of the Hydroalcoholic extract of *Leonotis nepetaefolia*.

A mixture of three sterols was isolated from the Ethyl acetate-hexane extract. They were identified as campesterol 1, stigmasterol 2 and β -sitosterol 3. An amide derivated from phenylalanine was also isolated, being identified as anomalamide 4, it is an unpublished compound in the family.

The amide structural elucidation was performed by spectral analysis, using APT, HETCOR and mass espectrumetry technics. The sterols were identified by CGAR, through coinjections with authentic sample.

From the Hydroalcoholic extract, a mixture of flavonoids was isolated. They were identified as Apigenin 5 and Luteolin 6, by spectroscopic methods and by comparison with authentic samples for co-HPTLC.

I. INTRODUÇÃO

É notório o interesse de setores da comunidade científica sobre o estudo de substâncias isoladas de vegetais e sua aplicação como fonte de matéria-prima na obtenção de resinas, alimentos, fibras, corantes, essências, remédios e outros.

A investigação fitoquímica emprega uma ampla variedade de técnicas e procedimentos para elucidar questões à seu respeito tais como: compreensão do metabolismo, similaridades químicas entre espécies em uma família (quimiotaxonomia), a influência no meio ambiente, sua composição química, etc. Para isto conta com vários métodos cromatográficos para isolamento e identificação dos metabólitos secundários de plantas, enquanto que para a determinação de estruturas moleculares são utilizadas diversos recursos espectrométricos, por exemplo: espectrofotometria de U.V./VIS. e I.V., espectroscopia de RMN, espectroscopia de raios-X, espectrometria de massas, além de determinação do ponto de fusão, rotação ótica, etc.

A família *Labiatae* é composta de cerca de 3300 espécies agrupadas em torno de 200 gêneros e estão distribuídas em várias regiões do planeta. Seus membros têm sido empregados como agentes flavorizantes, condimentos, na manufatura de perfumes, tratamento de doenças neoplásicas e em práticas medicinais primitivas^(1,2,3).

O estudo fitoquímico da família *Labiatae* remonta do século passado sendo descrito o isolamento e identificação de óleos essenciais (mono- e sesquiterpenos como cymeno e carvacrol)⁽¹⁾, diterpenos como trachinol⁽⁴⁾, vários triterpenóides esteroideais como α - e β -amyrin, ácido ursólico⁽¹⁾, flavonóides⁽⁵⁾ como as flavonas scutellarein e apigenin, flavonóis (glicosídeos do quecetin, kaemp-

ferol,..) e flavanonas: isoacuranetin, hesperidin, a cumarina 4,6,7-trimetóxi-5-metilcromen-2-ona⁽⁷⁾, taninos⁽⁶⁾ entre outros, obtidos de várias partes da planta (sementes, folhas, raízes,...).

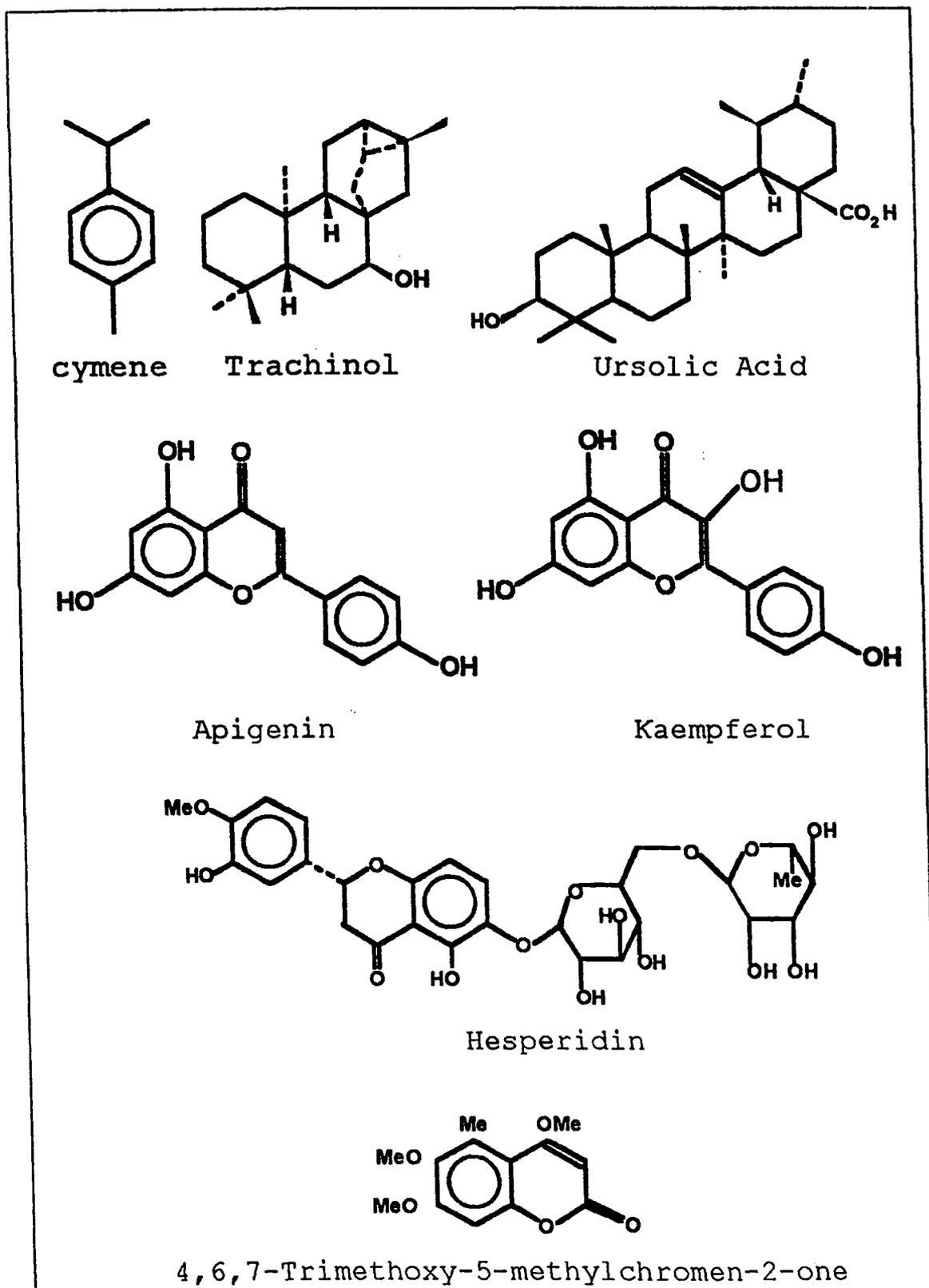


Fig.1: alguns compostos já isolados da família Labiatae(12).

1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE EM ESTUDO

O vegetal *Leonotis nepetaefolia* R. Br., da família Labiatae, é conhecida pela população como Cordão de Frade, Pau de Praga ou Rubim.

Erva anual, sublenhosa, de caule quadrangular aveludado-pubescente, até dois metros de altura, simples ou ramificado; folhas opostas, ovadas até ovado-deltóides, cunhadas ou subcordiformes na base, finamente crenadas, de 4-12 cm. de comprimento; flores pediceladas, de 25 mm, cálice pulverulento e corola bi-labiada, vermelha, roxa ou laranja-amarelo, manchada, dispostas em racimos densos, verticilados, de 4-6 cm de diâmetro, formando capítulos globosos separados (ver fig. 2). Planta bastante comum em todo o Brasil; tem a singularidade de acompanhar o homem: só existe onde o homem está morando ou já morou⁽⁸⁾. Comum em outras regiões do planeta, como na América Central (Porto Rico, Trinidad), sudeste asiático (Índia) e no hemisfério norte (Canadá).

Pesquisa de substâncias químicas a partir de extratos secos da planta em vários países resultaram na identificação de muitos compostos tais como a cumarina 4,6,7-trimethoxy-5-methyl-chromen-2-one⁽⁷⁾, diterpenos labdânicos como nepetaefolinol^(3,9), leonotinin⁽⁹⁾, nepetaefuranol⁽¹⁰⁾, nepetaefuran⁽¹⁰⁾, leonotin⁽²³⁾, isolados da variedade indiana; nepetaefolin^(2,10), methoxynepetaefolin^(3,11), isolados da variedade obtida da América Central (Trinidad e Puerto Rico).

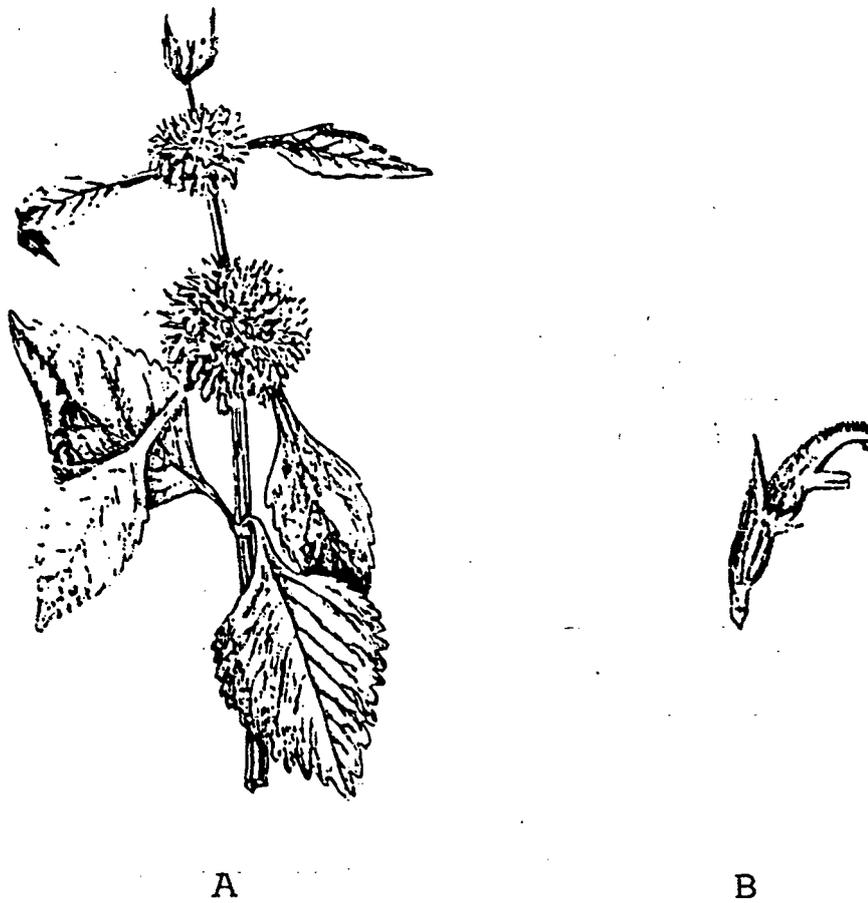


Fig.2: *Leonotis nepetaefolia*: A) Aspecto geral.
B) Flor isolada.

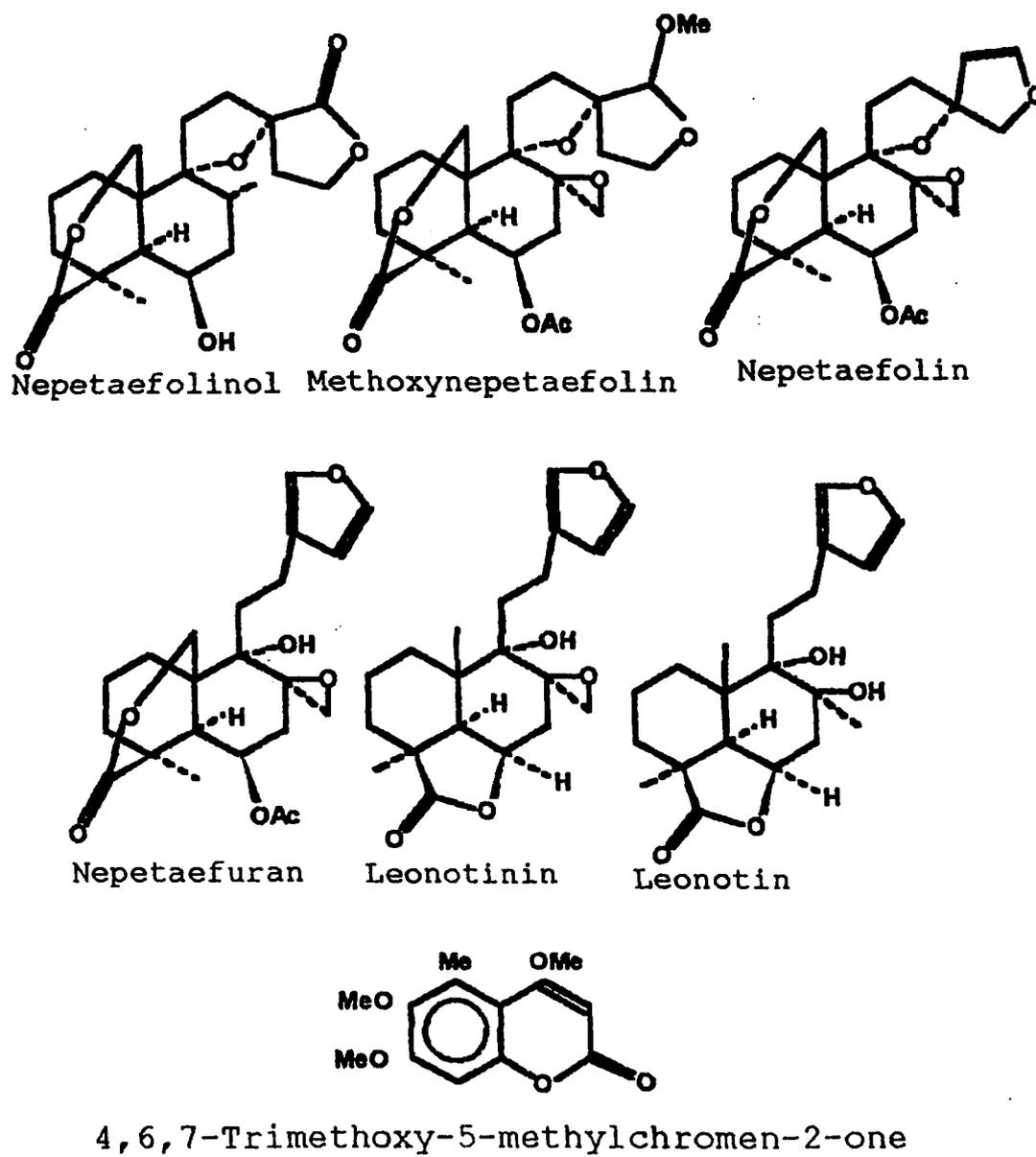


Fig. 3: constituintes químicos já isolados de *Leonotis nepetaefolia*⁽³²⁾.

2. USOS NA MEDICINA POPULAR

A espécie vegetal *Leonotis nepetaefolia*, vulgarmente conhecida como "Cordão de Frade" é usada na medicina popular como cicatrizante e em dores de contusão. Considerada útil para combater úlceras malignas, a elefantíase incipiente, hemorragias uterinas, como anti-espasmódica, anti-reumática, febrífuga e diurética⁽⁸⁾.

Resultados de testes farmacológicos apontaram o extrato hidroalcoólico da planta coletada na Índia e em Porto Rico como antitumoral^(2,3), enquanto que o extrato da variedade brasileira mostrou atividade anti-espasmódica sobre a musculatura lisa, aumentaram o inotropismo cardíaco "in vitro"⁽¹²⁾ e causaram relaxamento dose-dependente em preparação uterina⁽¹³⁾.

II. OBJETIVOS

Considerando-se os importantes efeitos farmacológicos mostrados pelo extrato hidroalcoólico da *Leonotis nepetaefolia* que são similares àqueles produzidos pelo "Forskolin", realizou-se um estudo dos constituintes do vegetal com dois objetivos fundamentais:

1. Isolar os compostos ativos da planta;
2. Comparar a composição desta planta coletada em Brasília (DF) com a da mesma espécie já estudada.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho APF-301 Microquímica e não sofreram correções.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos num equipamento Perkin-Elmer, modelo 781, preparando as amostras em pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro (KBr). Os comprimentos de onda das absorções foram medidos em centímetros recíprocos (cm^{-1}) e os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0,5 mm de espessura em 2851, 1601, 1028 cm^{-1} .

Os espectros de absorção na região do ultravioleta/visível foram obtidos num espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8450 A, utilizando metanol grau espectroscópico como solvente para preparação de soluções.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos à frequência de 300 MHz com um equipamento Varian Gemini 300 e à frequência de 200 MHz em equipamento Bruker modelo AC 200 F, usando solventes deutерados, de acordo com a solubilidade da amostra. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm), usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interno (0 ppm), e as constantes de acoplamento (J) medidas em unidade hertz (Hz); as áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singlete), m (multiplete), d(duplete),

t(triplete), dd (duplo duplete), td (triplete de dupletes), sl (sinal largo).

Os espectros de ressonância magnética de ^{13}C foram obtidos a 50 MHz em aparelho Bruker modelo AC 200 F. As modalidades de espectros APT, HETCOR e acoplamento a longa distância (long-range) foram obtidos através do equipamento Varian Gemini 300 a uma frequência de 75 MHz, usando TMS como referência interna e com os deslocamentos medidos em δ (ppm). Solventes utilizados são idênticos aos empregados em RMN ^1H e ^{13}C citados anteriormente.

O espectro de massas foi obtido em espectrômetro de massas V.G. Micromass, sob impacto de feixe eletrônico a 70 eV.

A análise elementar foi feita em um analisador de C, H, N Perkin-Elmer, modelo 2400.

A análise por cromatografia gasosa foi efetuada em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-14 A, equipado com injetor split ajustado para 1:20, detector de ionização de chama de hidrogênio/ar, com coluna capilar de sílica fundida, 25 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e com um filme de 0,25 μm da fase estacionária OV-1. O gás carreador usado foi hidrogênio (H_2) a uma velocidade linear de 31,25 cm/s, o que corresponde a um tempo de metano $t_m = 80$ s; as temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 310 °C e 320°C, respectivamente. Programação linear da temperatura do forno foi a indicada em cada análise, assim como as quantidades injetadas.

As análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi efetuada em cromatógrafo líquido Beckman, modelo 110 B, equipado com detector UV/Vis; coluna de fase reversa RP-18 (ODS), 25 cm de comp., 4,6 mm d.i.; as eluições foram feitas no modo gradiente com mistura de solventes à base de MeOH- H_2O ; as quantidades injetadas foram indicadas em cada experimento.

Cromatografias preparativa em coluna foram realizadas usando gel de sílica 60 (0,04-0,063 mm) Merck como fase estacionária (suporte). O pastilhamento das amostras a serem cromatografadas foi feita com a mesma sílica.

Toda a sílica empregada foi recuperada da seguinte maneira:

1) lavagem com solução a 2% de bicarbonato de sódio, para neutralizar eventuais resíduos de eluente de caráter ácido;

2) lavar abundantemente com água;

3) imersão por cerca de 72 horas em solução a 1,5% de peróxido de hidrogênio a pH~2 e com eventuais homogeneizações;

4) lavar exaustivamente com água até pH neutro;

5) secar em estufa a 70°C;

6) completar a secagem em mufla até 500°C, a seguir esfriar a temperatura ambiente, estando pronta para ser reutilizada.

Para cromatografia em camada delgada analítica, foi usada gel de sílica Merck do tipo GF254 depositando-a, na forma de suspensão com água, em placas de vidro limpas e desengorduradas com solução alcoólica de hidróxido de sódio.

As placas para cromatografia analítica de alta resolução em camada delgada (HPTLC) encontram-se disponíveis comercialmente. Escolheu-se, então as cromatofolhas de sílicagel 60 F254 Merck, depositada em placas de alumínio, e os eluentes foram indicados em cada experimento.

Os solventes empregados nas técnicas de cromatografia analítica ou preparativa eram de grau de pureza p.a. e encontram-se disponíveis comercialmente. Padrões de substâncias utilizadas em cromatografia analítica para comparação foram obtidos comercialmente.

Os reveladores empregados para visualizar compostos químicos na placa foram os descritos a seguir:

1. Câmara de luz ultra-violeta Mineralight $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm: após desenvolvida, submeteu-se a placa à ação da luz, com aquecimento ou não. Se a fase estacionária for fluorescente para aqueles λ , resultará em manchas escuras ou fluorescentes.

2. Solução de anisaldeído-ácido sulfúrico^(14,15): borrifar em placa desenvolvida uma mistura de 0,5 ml de anisaldeído (4-metoxibenzaldeído), 9 ml de etanol p.a. e 0,1 ml de HOAc glacial. A seguir, aquecer a 90-100°C durante 5-10 min. As manchas de interesse aparecerão com coloração rosa ou parda, para esteróis.

3. Solução de Liebermann-Burchard (reativo para esteróis)^(16,17): preparar uma solução de pulverização misturando com cuidado 5 ml de anidrido acético p.a. e 5ml de ácido sulfúrico (conc.). Adicionar esta mistura, lentamente e resfriando, a 50 ml de etanol. Preparar antes de usar. A seguir, aquecer a cromatoplaça a 110 °C. Revela manchas fluorescentes de esteróis a luz UV de onda larga;

4. Solução de hexacianoferrato (III) de potássio-cloreto de ferro (III)^(18,19): pulverizar uma mistura recém preparada de iguais quantidades de solução "a" e solução "b" (estão descritas a seguir):

Solução "a": solução 1% em água de hexacianoferrato (III) de potássio;

Solução "b": solução 2% em água de cloreto de ferro (III).

Se há presença de flavonóides, surgirão manchas verde-escuras;

5. Iodo como reativo universal de detecção^(20,21): o cromatograma é submetido à ação de vapores de iodo no interior de uma cuba. Grande quantidade de substâncias orgânicas aparecem como manchas pardas;

Os solventes empregados para extrações foram purificados por processo de destilação fracionada, enquanto que a água foi obtida por destilação simples.

A concentração dos licores resultantes do processo de extração por maceração, bem como frações provenientes das cromatografias preparativas em coluna, foram efetuadas sob pressão reduzida a temperatura controlada em evaporadores rotativos Büchi.

Os critérios de pureza adotados foram: obtenção da faixa de ponto de fusão de $\pm 1^\circ\text{C}$, obtenção de uma única mancha em cromatografia em camada delgada analítica, aplicando amostras de elevada concentração, usando-se diferentes sistemas de solventes de desenvolvimento e reveladores.

2. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

A planta *Leonotis nepetaefolia* (Labiatae) foi cultivada pela EMBRAPA-Cenargen (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia) em Brasília (DF) e colhida no mês de junho de 1990; tratamento de secagem durante 15 dias, após foi moída. Esta fase do trabalho assim como o envio dos lotes da erva ficou sob coordenação do Dr. Ladislau S. Skorupa, a quem devemos enorme gratidão.

3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS (esquema 1)

O material botânico (ramos, folhas e flores) após seco a temperatura ambiente, foi finamente moído. Quantidade definida (3,25 kg) do farelo obtido foi submetido a maceração com uma mistura de EtOH-H₂O (2:1) durante 21 dias com repetidas reposições do solvente puro. O licor resultante foi concentrado sob pressão reduzida a temperatura de 60°C resultando numa pasta marrom (rendimento: 7,85 g; 0,24% do peso da planta macerada). Outra parte do material moído (1 kg) foi posto em maceração durante 1 semana numa mistura de partes iguais de hexano e acetato de etila, com repetidas reposições de solventes puros, então concentrado sob pressão reduzida a temperatura entre 45-55°C, proporcionando, assim um resíduo pastoso de cor verde (rendimento: 10 g; 1% do peso do material vegetal).

4. PROCEDIMENTO GERAL UTILIZADO PARA I-SOLAMENTO E PURIFICAÇÃO

Os extratos obtidos foram fracionados através de técnica de cromatografia preparativa em coluna (ver esquema 1). As frações cromatográficas resultantes foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica e as que apresentaram o mesmo perfil foram reunidas. Estas permaneceram em repouso para favorecer o aparecimento de algum sólido. A seguir, esgotou-se a água-mãe através da uma pipeta Pasteur. Dissolveu-se o material sólido com um mínimo de solvente apropriado, submetendo a solução resultante a um leve aquecimento, seguido de resfriamento lento para favorecer o fenômeno de cristalização. Repetiu-se o procedimento de modo a purificar cristais por recristalização. Se os procedimentos de recristalização não foram satisfatórios, realizou-se técnicas de cromatografia preparativa em coluna ou cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa para obter compostos viáveis de identificá-los por métodos espectroanalíticos.

EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO

Porção eluída com gradiente de polaridade crescente com n-hexano/acetato de etila em coluna de sílica. Monitoramento por ccd de sílica. Frações idênticas são reunidas. Aquelas reunidas entre 20-30 % de acetato de etila em n-hexano apresentaram-se adequadas para um estudo fitoquímico.

Novo extrato obtido da maceração com n-hexano/acetato de etila (1:1).

Cromatografa-se em coluna de sílica com hexano-acetona em misturas de polaridade crescente.

Cromatografia em papel usando MeOH/H₂O 1:1 como eluente; revelado com reativo para compostos fenólicos. Resulta em teste positivo:

Obter novo extrato hidroalcoólico para isolar os constituintes em quantidade suficiente e efetuar as análises necessárias à identificação.

Esquema 1: obtenção de Extratos do vegetal
Leonotis nepetaefolia.

5. ESTUDO DOS EXTRATOS OBTIDOS DE *Leonotis nepetaefolia*

5.1. Fracionamento por Cromatografia Preparativa em Coluna do Extrato Seco Acetato de Etila-hexânico

5.1.1. Metodologia

Do resíduo obtido da concentração do extrato da planta macerada em mistura de solventes n-hexano e acetato de etila (1:1), preparou-se uma pastilha misturando o mesmo com gel de sílica. Posteriormente, aplicou-se a pastilha no topo de uma coluna de vidro contendo sílicagel 60 empacotada com n-hexano p.a., cuja altura foi cerca de seis vezes maior que a altura da referida pastilha. Logo a seguir, a amostra foi eluída com hexano seguido de gradiente de polaridade crescente usando-se misturas de n-hexano p.a./acetona p.a., acetona p.a., finalmente MeOH p.a. e HOAc glacial, recolhendo frações em porções de 20 ml, as quais foram comparadas por cromatografia em camada delgada analítica, usando como reveladores câmara de iôdo, câmara de luz UV, pulverização com reativo de Liebermann-Burchard, solução de anisal-deído-ácido sulfúrico. Aquelas que apresentaram-se cromatograficamente idênticas, foram reunidas (ver tabela 1), o que resultou em duas frações principais para serem investigadas, principalmente porque houve formação de cristais: a primeira, eluída a cerca de 10% de acetona em n-hexano foi codificada como LN-4.

A outra, eluída em 18% de acetona em n-hexano foi codificada como LN-9, com formação de cristais ao permanecer em repouso.

Eluente	%	Frações Recolhidas	Frações Agrupadas	Código
Hexano	100	1	1	LN-1
	1	2	2-3	LN-2
	2	3		
	4	4-5	4-7	LN-3
	6	6-7		
Hexano-	8	8-10	8-12	LN-4*
Acetona	10	11-14	13-14	LN-5
	12	15-19	15-17	LN-6
	14	20-22	18-20	LN-7
	16	23-25	21-24	LN-8
	18	26-28	25-30	LN-9*
	20	29-30	31-34	LN-10
	25	31-35	35-38	LN-11
	30	36-39	39-43	LN-12
Acetona	100	40-43	44-47	LN-13
MeOH	100	44-52	48-53	LN-14
HOAc	100	53-57	54-57	LN-15

*Frações estudadas

Tabela 1: fracionamento do Extrato acetato de etila-hexânico.

5.1.2. Obtenção dos Principais Constituintes da Fração LN - 4 e Seus Dados Físico-Químicos

Mantendo em repouso esta fração obteve-se um precipitado que, após a recristalização, formaram-se cristais incolores os quais foram submetidos a análise por cromatografia analítica em camada delgada de sílica, usando uma mistura dos solventes acetato de etila n-hexano (2:8) como eluente. Os cromatogramas resultantes foram revelados com reativo de Liebermann-Burchard(L.-B.), em câmara de iôdo e solução de anisaldeído-sulfúrico. Observou-se uma única mancha com Rf 0,27.

Dados espectrais:

I.V. $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$, cm^{-1} : 3440, 2930, 1640, 1450, 1375 e 1040.

δ RMN ^1H (200 MHz, $\text{CCl}_4 + \text{CDCl}_3$): 0,68 (s); 0,70 (s); 0,92 (d, $J=6,2$ Hz); 1,01 (s); 1,17 (s); 1,20 (m); 1,5 (m); 3,45 a 3,60 (m); 5,06 (qd), $J=15,3$ e 8 Hz); 5,30 (d, $J=6$ Hz).

δ RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{CCl}_4 + \text{CDCl}_3$): 12,17; 12,34; 12,52; 19,07; 19,28; 19,62; 20,13; 21,38; 23,29; 24,54; 25,62; 26,35; 28,49; 29,14; 29,37; 31,93; 33,14; 36,39; 36,69; 37,49; 42,62; 46,07; 50,34; 51,45; 56,23; 57,06; 71,68; 76,37; 77,01; 77,64; 96,37; 121,73; 129,47; 138,48; 140,85.

Intervalo de fusão determinado: 153-160°C.

Rendimento: 238 mg (cerca de 2,4% em peso do extrato bruto).

Análise por cromatografia gasosa - condições de operação: coluna capilar de fase OV-1 (comp.: 25 m; di:0,25 mm); programação linear de temperatura:15°C/min., T.i.=80°C, T.f.=280°C; fluxo do gás carreador (H₂): 31,25 cm/s; temperatura do injetor: 310°C, temperatura do detector: 320°C; volume injetado de amostra: 0,8 µl. As coinjeções com padrões certificados foram efetuadas nas mesmas condições anteriores.

5.1.3. Obtenção dos Principais Constituintes da Fração LN - 9 e Seus Dados Físico-Químicos

Resultante da reunião de frações de cor verde a partir da cromatografia em coluna do extrato acetato de etila-hexânico (ver tabela 1), esta fração, ao permanecer em repouso, proporciona o aparecimento de cristais esbranquiçados. Após a separação da água-mãe e sucessivas recristalizações com misturas de hexano p.a. e uma mínima quantidade de acetona p.a., obtém-se cristais incolores com ponto de fusão 185-186°C; Rf=0,55 em ccd de sílica, usando sistema de solvente hexano p.a.-acetato de etila p.a. (6:4) para desenvolvimento do cromatograma. Rendimento: 5,3 mg (0,053% do peso do extrato seco).

Dados espectrais:

I.V. $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$, cm⁻¹: 3420-3310, 3050-3000, 2960-2880, 1740, 1670, 1640, 1540, 1260, 750 e 700.

Análise de C, H, N: C=72,5 %; H=6,3 %; N=6,3 %.

δ RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 2,03 (3H, s); 2,75 (2H, dd, J=10,38 e 5,3 Hz); 3,05 (H, dd, J=8,37 e 13,77 Hz); 3,23 (H, dd, J=5,88 e 13,9 Hz); 3,80 (H, dd, J=4,15 e 10 Hz); 3,93 (H, dd, J=8,6 e 10,88 Hz); 4,345 (H, m); 4,76 (H, td, J=5,97 e 8,09 Hz); 5,96 (NH, d, J=8,58 Hz), 6,76 (NH, d, J=7,44 Hz), 7,05-7,32 (m, 10 H), 7,44 (2H, t, J=7,4 Hz), 7,53 (H, t, J=7,28 Hz) e 7,719 (2H, d, J=7.11 Hz).

δ APT(23) (75 MHz, CDCl₃): 20,820 (CH₃); 37,390 (CH₂); 38,420 (CH₂); 49,378 (CH); 54,950 (CH); 64,534 (CH₂); 126,730 (CH); 127,014 (CH); 127,127 (CH); 128,562 (CH); 128,625 (CH); 128,741 (CH); 129,097 (CH);

129,255 (CH); 131,920 (CH); 133,585 (C); 136,562 (C);
136,636 (C); 167,051 (C), 170,154 (C); 170,785 (C).

E.M. m/z (%): [M⁺·]: 444 (1); 384 (3,8); 353
(1,5); 311 (2); 293 (6); 252 (31); 224 (24); 105
(100); 91 (17); 77 (32).

5.2. Fracionamento por Cromatografia Preparativa em Coluna do Extrato Hidroalcoólico seco

2.2.1. Metodologia

Amostra deste extrato foi submetida a análise preliminar por cromatografia em papel usando MeOH-H₂O (1:1) como sistema de desenvolvimento. O cromatograma resultante foi revelado com hexacianoferrato (III) de potássio-cloreto férrico (III) aparecendo, então, mancha verde-escura.

7 g do extrato foi misturado com gel de sílica resultando em uma pastilha a qual foi aplicada no topo de uma coluna de vidro empacotada com gel de sílica em CH₂Cl₂ p.a., com altura equivalente a seis vezes o tamanho resultante da pastilha. A seguir, eluída com gradiente de polaridade crescente usando-se misturas de CH₂Cl₂ p.a.-(CH₃)₂CO p.a., finalmente H₂O, recolhendo o eluato em porções de 20 ml. As frações assim obtidas foram comparadas por ccd analítica, desenvolvida com mistura de CH₂Cl₂-acetato de etila (1:1) e revelado com reativo solução de hexacianoferrato (III) de potássio - cloreto férrico (III). As frações idênticas foram reunidas (ver tabela 2), e a que foi estudada codificou-se como LN-Hol 5.

Eluente	%	Frações recolhidas	Frações agrupadas	código
CH_2Cl_2	100	1 - 3	1 - 4	LN Hol 1
	1	4	5 - 11	LN Hol-2
	2	5	12 - 16	LN Hol-3
	3	6 - 11	17 - 19	LN Hol-4
	4	12 - 14		
CH_2Cl_2	5	15 - 18		
+	6	19 - 21		
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	8	22 - 27		
	10	28 - 33	20 - 43	LN Hol-5*
	12	34 - 37		
	15	38 - 40		
	20	41 - 44		
	25	45 - 47	44 - 52	LN Hol-6
	50	48 - 50		
	75	51 - 54	53 - 57	LN Hol-7
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	100	55 - 57		
H_2O	100	58 - 62	58 - 62	LN Hol-8

*Fração estudada

Tabela 2: Fracionamento do Extrato hidroalcoólico.

5.2.2. Obtenção dos Principais Constituintes da fração LN Hol - 5 e Seus Dados Físico-Químicos

Esta fração, após seca foi redissolvida em MeOH e reprecipitada com adição de H₂O, posteriormente filtrada. O sólido resultante foi solubilizado em acetona p.a.. Após evaporação da acetona, resultou num sólido marrom que pesou 21,7 mg. Ponto de fusão: acima de 300°C. Para os testes por ccd analítica e HPTLC foram usados os seguintes sistemas de solventes como eluente: CH₂Cl₂-acetato de etila (1:1); C₆H₆-Acetato de etila (6:4) eluída duas vezes e CHCl₃-MeOH (8:2). Análise por HPLC foi feita usando coluna RP-18 (ODS) em fase reversa, detector UV/Vis, sistema de solvente H₂O-MeOH (3:7), a um fluxo de 0,7 ml/min.; injetado 10 µl da amostra dissolvida em MeOH p.a..

Dados espectrais da fração LN Hol-5:

I.V. $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400; 1650; 1600; 1500; 1455; 1360 e 1255.

U.V. $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 255; 268; 349.

δ RMN ¹H (300 MHz; acetona deuterada): 6,2534; 6,2598; 6,5269; 6,5337; 6,5914; 6,6469; 6,9941; 7,0165; 7,0220; 7,0459; 7,4591; 7,4664; 7,4867; 7,4938; 7,5078; 7,5149; 7,9307; 7,9603; 8,5 - 9,5; 13,0307.

δ RMN APT (75 MHz; acetona deuterada): 94,6314, 94,6718, 99,639, 104,094 (CH); 105,239 (C); 114,040, 116,560, 116,786, 120,059 (CH); 123,634 (C); 129,187 (CH); 146,411, 150,036, 158,683, 163,266, 164,821, 165,040, 182,963 (C).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Leonotis nepetaefolia*

Foram utilizados vários recursos espectroanalíticos para identificar os componentes principais das frações obtidas, envolvendo desde técnicas de espectrofotometria no infravermelho, UV/Vis., espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , modalidades de análise por ressonância magnética nuclear como APT, que é uma das técnicas baseada na modulação do J dos spins "echo", permitindo determinar o nº de prótons ligados diretamente ao núcleo carbono^(23,24); HETCOR e HETCOR long-range, onde produz-se espectros de duas dimensões cruzando os deslocamentos químicos de prótons com aqueles dos carbonos, indicando que aquele próton não está ligado ao carbono (próton heteroátomo) ou está ligado diretamente ou até a duas ligações ao carbono ao qual está cruzando (correlação a longa distância); técnicas de desacoplamento, onde determina-se a vizinhança do núcleo irradiado em função da mudança da multiplicidade dos sinais, que se observa por comparação com o espectro total de prótons e, finalmente, a espectrometria de massas que fornece o peso molecular e fragmentos de interesse da molécula para a determinação estrutural, além da comparação com padrões através de técnicas por CGAR e HPTLC.

1.1. A PARTIR DO EXTRATO ACETATO DE ETILA-HEXÂNICO

Fazendo o fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica do extrato hidroalcoólico bruto dos ramos, flores e folhas previamente secos e moídos da variedade cultivada em Brasília (DF) da planta *Leonotis nepetaefolia*, verificou-se a viabilidade da fração eluída até 30% de acetato de etila p.a. em n-hexano p.a. ser submetida à estudos fitoquímicos. Macerou-se uma nova porção da planta com uma mistura 1:1 de acetato de etila/hexano, a fim de aumentar o rendimento dos constituintes detectados naquela fração hidroalcoólica para isolá-los em quantidade suficiente e assim fazer as análises espectrais necessárias à identificação dos compostos, além de proporcionar um extrato seco mais "limpo", ou seja, com menor teor de resinas ou óleos que, porventura viriam a prejudicar a purificação das substâncias à medida que fossem isoladas (ver esquema 1).

A goma obtida por concentração do extrato acetato de etila-hexânico foi cromatografada em gel de sílica proporcionando duas frações principais: a primeira eluída a 8% de acetona em n-hexano e codificada como LN - 4.

A outra fração oriunda da eluição do extrato seco acetato de etila-hexânico obtida a um gradiente de polaridade de 16-20% de acetona p.a. em n-hexano p.a., codificada como LN - 9, sendo seu componente principal obtido por recristalização de solução de coloração verde, na forma de cristais aciculares, com ponto de fusão 185-186 °C. Este composto apresentou inércia química frente aos reveladores anisaldeído-

sulfúrico e Liebermann-Burchard, no entanto foi revelado em câmara de iôdo como uma mancha marrom e sob luz UV a $\lambda=254$ nm como uma mancha escura contra o fundo verde da sílica com indicador de fluorescência. A ccd deste composto foi desenvolvida três vezes com sistema de solventes n-hexano/acetato de etila p.a. (6:4), mostrando $R_f=0,55$.

1.1.1 Identificação dos Principais Constituintes Químicos da Fração LN - 4

A goma obtida por concentração do extrato acetato de etila-hexânico foi cromatografada em gel de sílica proporcionando duas frações que produziram cristais: a primeira eluída a 8% de acetona em n-hexano, codificada como LN - 4, cuja análise por ccd de sílica usando revelador o reativo de Liebermann-Burchard, apontou a presença de esteróis nesta fração. Após recristalização, obteve-se um rendimento 238 mg (cerca de 2,4% em peso do extrato concentrado). Estes cristais fundiram no intervalo de fusão entre 153-160°C, sugerindo tratar-se de mistura.

Análise por ccd de sílica mostrou $R_f=0,277$ com solução de 20% de acetato de etila em n-hexano usando reativo de Liebermann-Burchard, apontou a presença de esteróis nesta fração. Vapor de Iôdo apontou uma mancha de mesmo R_f .

O espectro de infravermelho mostrou as bandas de absorção dos grupos funcionais álcool ($\nu_{O-H}=3440 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{C-O}=1040 \text{ cm}^{-1}$), ligação C-H ($\nu_{CH}=2930 \text{ cm}^{-1}$, $\delta_{CH}=1460, 1450 \text{ e } 1375 \text{ cm}^{-1}$), olefina isolada ($\nu_{C=C}=1640 \text{ cm}^{-1}$, pouca intensidade) ⁽²⁶⁾ (ver fig.4).

O espectro de RMN 1H mostrou, uma grande quantidade de sinais complexos em região de blindagem (δ entre 0,5 e 2,3 ppm), indicando a presença de prótons de hidrocarboneto bastante ramificado, lembrando anéis condensados de hidrocarbonetos do tipo per-hidro-ciclopentano fenantreno, com sinais de prótons de metila conferindo estrutura do tipo colestano; um multiplete na região de absorção de prótons carbinólicos ($\delta=3,45 \text{ a } 3,6 \text{ ppm}$), dois duplos

dupletos centrados em 5,1 ppm e 5,2 ppm (dd, $J=15,3$ e 8Hz), referentes a uma dupla ligação trans- dissubstituída e dois singletos largos na região compreendida entre $\delta=5,29$ e 5,31 para prótons em duplas trissubstituídas⁽²⁵⁾, indicando a presença de, pelo menos dois triterpenos de núcleo esteroidal (Ver fig. 5).

O espectro de RMN ^{13}C (ver fig. 6) apontou a existência de um grande número de carbonos no espectro com δ s muito próximos, indicando, possivelmente, ser mistura de compostos com acentuada semelhança. Sinais na região compreendida entre 11 e 58 ppm referem-se a moléculas volumosas com grande número de ligações C-C e C-H, típico de cadeia cíclica condensada. Aparece com deslocamentos químicos para carbonos de olefina do anel (140,85 ppm e 121,73 ppm), carbonos de dupla da cadeia lateral alicíclica (138,48 e 129,47 ppm), vindo de encontro com a avaliação feita a partir dos dados levantados do espectro de prótons.

Em função de ser determinado uma faixa de fusão larga, e avaliações do espectro de RMN de prótons e o RMN de carbonos que mostra C com absorções muito próximos, o que indicava tratar-se de mistura, optou-se pela análise com coinjeções de padrões por cromatografia gasosa de alta resolução (ver figs. 7 e 8) usando um injetor capilar no modo split (1:20), coluna capilar de sílica fundida com um filme de 0,25 μ m da fase estacionária OV-1, gás carreador H_2 a uma velocidade de 31,25 cm/s, programação linear de temperatura do forno: 15°C/min, T.i.:80°C; T.f.:280°C, respectivamente. Temperatura do injetor: 310°C; temperatura do detector: 320°C, detector: DIC com chama de hidrogênio-ar. Volume de amostra injetada: 0,8 μ l. Cromatograma mostrou a presença de três picos na "faixa de eluição de esteróis"⁽²⁵⁾. A escolha de padrões foi feita levando em consideração a abundância dos esteróis nos vegetais e a comparação dos dados

espectrais de IV e RMN ^{13}C e ^1H disponíveis na literatura. Procedeu-se, então a coinjeção com padrões em cromatografia gasosa de alta resolução, nas mesmas condições de operação anteriormente citadas, evidenciando a presença de campesterol **1**, stigmasterol **2** e β -sitosterol **3**, segundo a ordem de eluição (ver fig. 8). Análises posteriores indicaram a proporção destes compostos na amostra da fração LN - 4 como 13,56% de **1**, 49,9% de **2** e 36,54% de **3**, respectivamente.

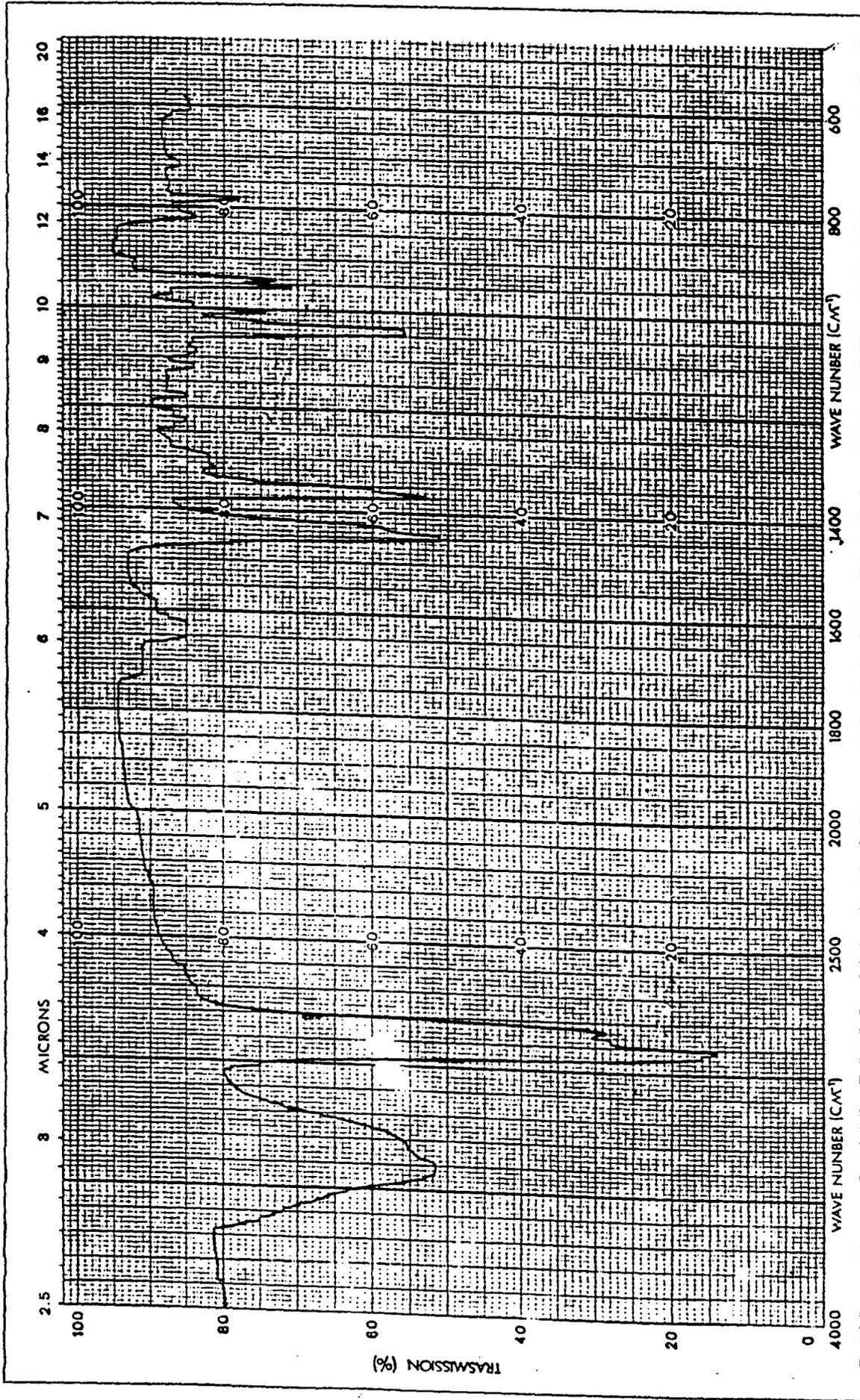


Fig. 4: espectro de infravermelho da fração LN - 4.

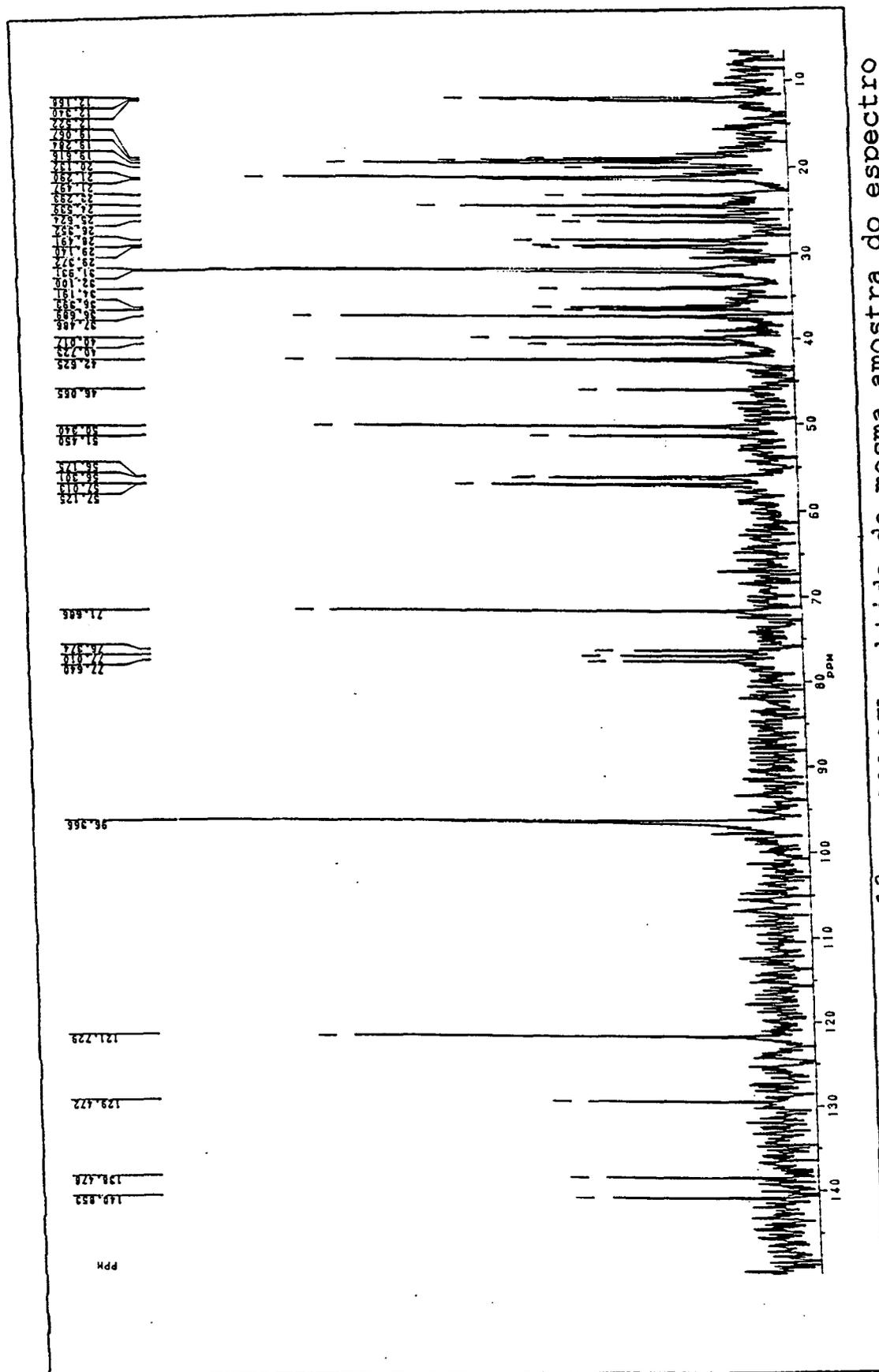


Fig. 6: espectro de RMN ^{13}C a 200 MHz obtido da mesma amostra do espectro anterior, usando $\text{CCl}_4 + \text{CDCl}_3$ como solvente. O sinal a 96,36 ppm é do CCl_4 , enquanto que os sinais centrados em 77 ppm são de CDCl_3 .

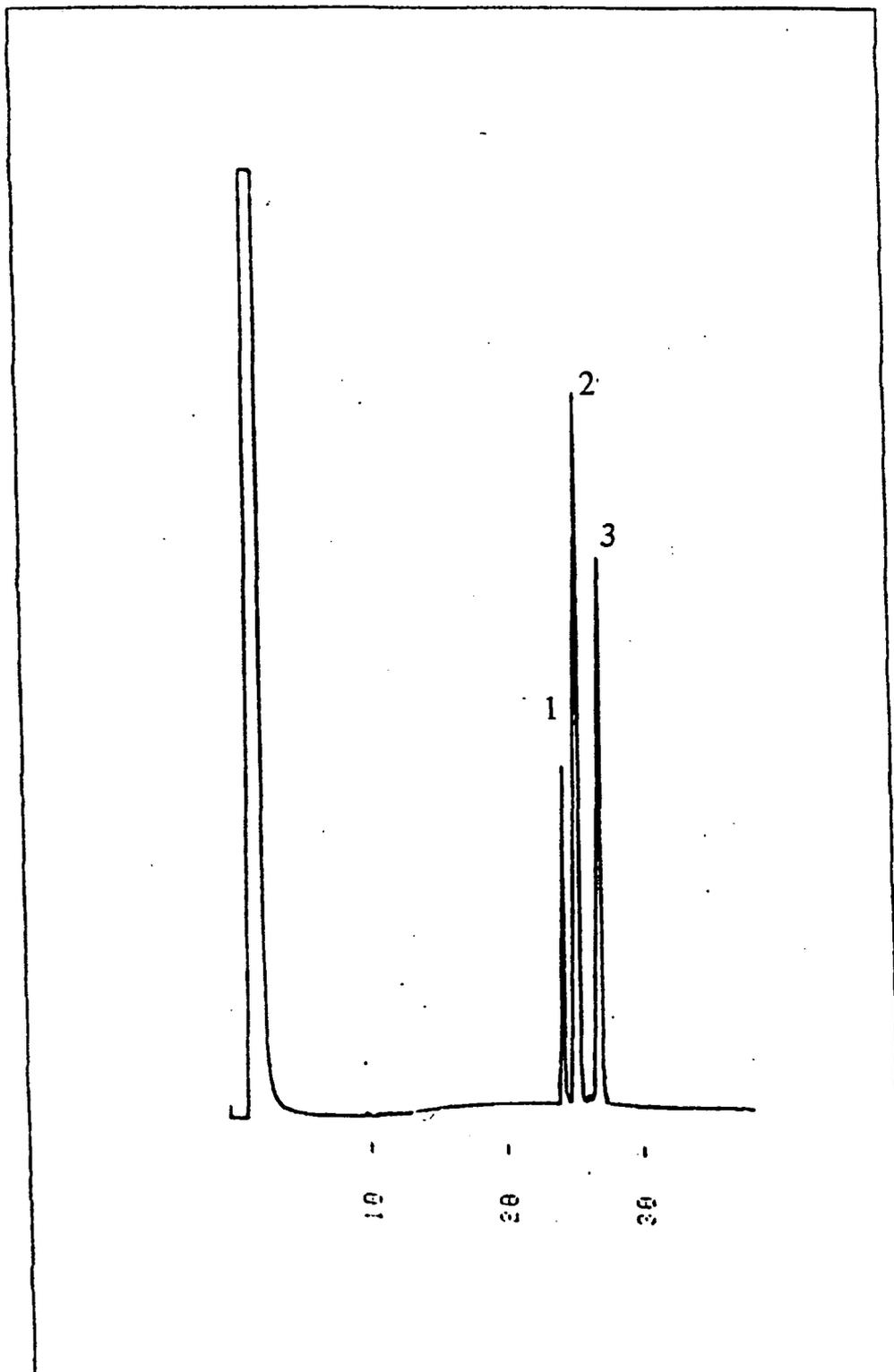


Fig.7: cromatograma de análise por CGAR. Solvente: acetona; campesterol 1(13,56%); stigmasterol 2 (49,9%); β -sitosterol 3(36,54%). Condições estão indicadas na parte experimental.

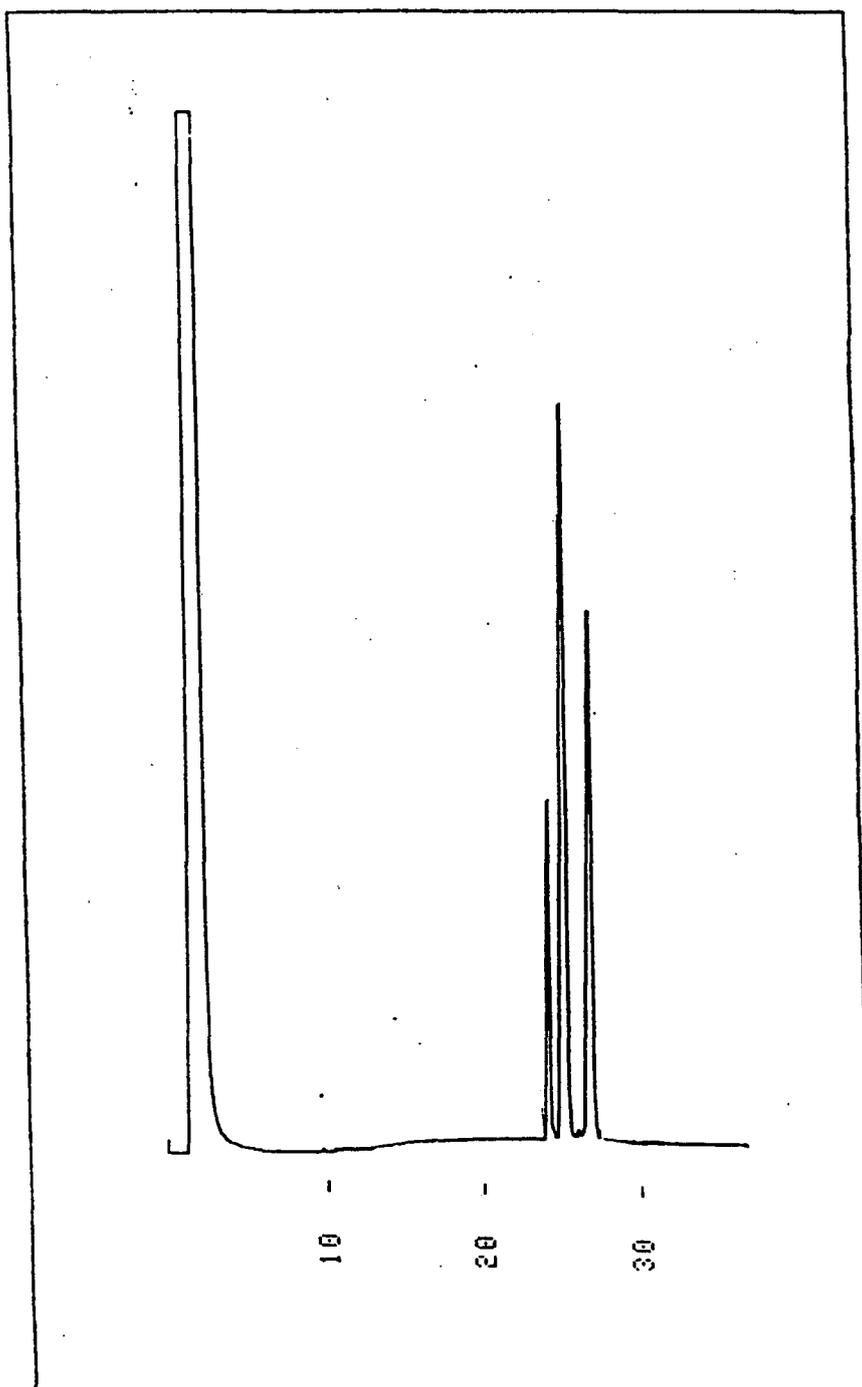


Fig.8: cromatograma obtido das coinjeções de padrões certificados de campesterol, stigmasterol e β -sitosterol com a fração LN - 4, nas mesmas condições experimentais dadas anteriormente.

1.1.2. Identificação e Determinação Estrutural do Principal Constituinte da Fração LN - 9

O material sólido obtido da fração LN-9 do fracionamento do extrato Acetato de Etila-Hexano foi purificado por recristalizações sucessivas em Hexano-Acetona até obtenção de ponto de fusão constante P.F.:185-186°C cuja variação foi de 1°C. A pureza deste composto foi confirmada pela análise por cromatografia em camada fina e como pôde também ser observada nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de infravermelho (ver fig. 9) sugeriu a presença de grupos funcionais formados por ligações OH ou NH (ν_{OH} ou $\nu_{\text{NH}}=3420-3310\text{cm}^{-1}$), CH de insaturação ($\nu=3050-3000\text{cm}^{-1}$) e CH alifático ($\nu=2960-2880\text{cm}^{-1}$) com intensidades de absorção semelhantes, provavelmente por tratar-se de uma molécula que contém poucas ligações C-H alifática em comparação com CH olefínico, prevendo-se um razoável grau de insaturação. Banda de carbonila a $\nu=1740\text{cm}^{-1}$, banda "I" $\nu_{\text{C=O}}=1670\text{cm}^{-1}$, banda "II" ($\delta_{\text{NH}}=1640\text{cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{C-N}} + \delta_{\text{NH}}=1540\text{cm}^{-1}$) e banda "III" ($\nu_{\text{C-N}} + \delta_{\text{NH}}=1260\text{cm}^{-1}$) características de grupo funcional amida. Detectou-se, também, bandas que podem ser de deformação fora do plano de anéis benzênicos, bastante proeminentes ($\delta_{\text{pH}}=750$ e 700cm^{-1}) (26).

O espectro de massas de baixa resolução apresentou o íon molecular M^+ 444 (2%) (ver fig. 10). Este dado juntamente com o número de átomos de carbono e de hidrogênio obtidos dos espectros de carbono e próton e da análise elementar CHN (C=72,5%; H=6,3% e N=6,3%) obteve-se a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$. Da relação entre o número de átomos de hidrogênio, nitrogênio e carbono deduziu-se a existência de quinze insaturações na molécula.

Na análise do espectro de RMN de próton (ver fig.11), observou-se uma grande quantidade de prótons que absorvem na região de aromáticos compreendida entre 7,05 e 7,75 ppm com integração para 15 prótons sugerindo a presença de três anéis aromáticos monossustituídos. O sinal centrado em δ 7,2 com integração de 10 prótons mostrou um padrão de absorção típico de prótons de anel benzila (PhCH_2). O sinal centrado em 7,44 ppm e 7,53 ppm com feição de tripletes referem-se a hidrogênios meta- e para- a um grupo funcional de fenil monossustituído, respectivamente. O próton para- está mais desblindado que os prótons meta- devido a presença do grupo funcional que atua diretamente desprotegendo tal próton. Finalmente, o sinal duplete mais desblindado desta região representando a absorção de dois hidrogênios, os quais estão em posição orto- em relação ao grupo funcional.

Na região de prótons alifáticos (ver fig.12), além da metila singlete em 2,03 ppm (3H), entre 2,6 a 4,0 ppm observou-se uma série de sinais muito bem definidos com aparência de duplos dupletes. Um duplo duplete centrado em 2,72 ppm e outro muito próximo em 2,77 ppm, com constantes de acoplamento $J=10,38$ e $5,38$ Hz, cuja integração destes dois sinais resulta em dois hidrogênios. Duplos dupletes centrados em 3,05 ppm (integração para 1 H) e 3,23 ppm (1 H) com constantes de acoplamento geminal $J=13,8$ Hz e vicinal $J=6$ Hz. Duplo dupletes centrados em 3,80 e 3,93 ppm também com constantes de acoplamento geminal $J=10$ Hz e vicinal $J=6$ Hz e integração para dois hidrogênios, como no caso anterior. Estes sinais sugerem a presença de três grupos $-\text{CH}_2-$.

Dois outros prótons mais desblindados são observados em 4,34 ppm na forma de um multiplete com integração para um hidrogênio e um duplo triplete centrado em 4,76 ppm também com integração para um

hidrogênio. Estes sinais sugerem a presença de dois grupos CH (metino).

Na região de prótons entre 6,8 - 5,5 ppm, observa-se dois dupletos com constantes de acoplamento relativamente intensas, um mais blindado, centrado em 5,96 ppm ($J=7,44$ Hz) e o outro em 6,76 ppm com $J=8,58$ ppm, ambos com integração para um hidrogênio. A adição de uma gota de água deuterada mostrou a troca com deutério, observando-se desaparecimento destes dois sinais, indicando tratar-se de prótons ligados a um heteroátomo, como o NH (fig. 13).

Dados do espectro de HETCOR (fig.16) mostraram a ausência de cruzamento dos prótons centrados em 5,96 ppm e 6,76 ppm com qualquer um dos núcleos de carbonos detectados no espectro de RMN de ^{13}C , sugerindo que estes prótons estão ligados diretamente a um heteroátomo, o que está de acordo com a troca por deutério mencionada anteriormente.

O espectro de RMN ^{13}C juntamente com o espectro de RMN ^{13}C na modalidade APT⁽²³⁾ (técnica baseada na modulação J dos spins echo, permitindo determinar o número de prótons ligados diretamente ao núcleo carbono) mostrou carbonos metilênicos e quaternários originando sinais para cima, perpendiculares à linha base, enquanto que carbonos de metilas ou metínicos originando sinais invertidos (ver fig. 14). Assim, foram observados três sinais referentes a grupo carbonila em 170,8 ppm; 170,1 ppm e 167,1 ppm.

Na região do espectro de RMN ^{13}C de absorção de carbonos fenílicos compreendida entre 120 e 137 ppm são observados uma série de sinais para CH e a presença de três carbonos quaternários em 133,58 ppm, 136,56 ppm e 136,64 ppm. Estes dados reforçaram a tese formulada com base nos dados de RMN ^1H da existência de três grupos fenilas monossustituídos na molécula. Convém considerar aqui o

grau de insaturação, quinze, podendo ser a soma das três carbonilas citadas com estes três anéis fenila.

Ainda no espectro de RMN ^{13}C - APT são observados sinais para uma metila (20,82 ppm), para um CH_2 ligado a um heteroátomo eletronegativo (64,53 ppm), dois CH_2 benzílicos (38,42 ppm e 37,39 ppm) e dois CH ligados a heteroátomos eletronegativos (49,38 ppm e 38,42 ppm).

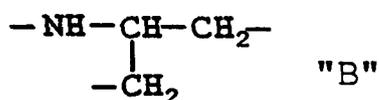
Através de experimentos em RMN ^1H com técnicas de desacoplamento⁽²⁴⁾ obteve-se os seguintes resultados, os quais foram fundamentais na montagem de partes da estrutura:

Irradiando o sinal em 6,76 ppm (fig. 15a.) observou-se mudança apenas em 4,76 ppm; permanecendo inalterado o sinal em 5,96 ppm. Irradiando o sinal em 5,96 ppm (fig. 15a.) observou-se mudança apenas em 4,35 ppm. Estes dados indicam que os prótons dos heteroátomos não estão acoplados entre si, como já se tinha observado em RMN ^1H pelas diferentes constantes de acoplamento apresentadas por estes sinais. Além disso ficou claro que cada um destes heteroátomos estão ligados diretamente a um CH, o que foi confirmado ao se irradiar os sinais em 4,76 ppm e 4,35 ppm.

Irradiando o sinal 4,76 ppm (fig.15b.) observou-se um singleto em 6,76 ppm e dois dupletes em 3,05 ppm e 3,22 ppm com constantes de acoplamento geminal. Por outro lado, ao irradiar separadamente os sinais centrados em 3,05 ppm e 3,23 ppm (fig.15c.), observou-se mudança apenas no sinal centrado em 4,76 ppm. Estes dados permitem propor a estrutura parcial "A"

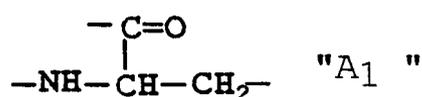


Irradiando o sinal centrado em 4,35 ppm (fig.15d.), observou-se um singlete em 5,96 ppm, dois dupletes centrados em 3,80 e 3,93 ppm com constantes de acoplamento geminal e um singlete largo em 2,75 ppm. Por outro lado irradiando separadamente os dupletes centrados em 3,80 e 3,93 ppm (fig.15e.) observou-se modificação apenas no sinal centrado em 4,35 ppm. Também ao irradiar o duplete centrado em 2,75 ppm (fig.15f.), a única modificação no espectro de próton foi no sinal em 4,35 ppm. Estes dados indicaram que o CH responsável pelo sinal em 4,35 ppm está ligado a um heteroátomo e a dois $-CH_2-$, permitindo propor a estrutura parcial "B":



O espectro HETCOR (fig.16) confirmou os carbonos fenílicos quartenários em 133,58; 136,56 e 136,54 ppm pela ausência de cruzamento com núcleos de hidrogênio do espectro de prótons. Nos demais sinais na região de aromáticos foram observados os cruzamentos confirmando os CH dos radicais fenila. Na região de prótons e carbonos alifáticos (fig.17) foram observados as correlações carbono-hidrogênio, permitindo assim o assinalamento dos carbonos e hidrogênios, já mostrada nas estruturas parciais "A" e "B".

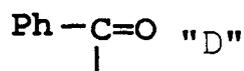
O espectro de HETCOR-long range (fig.18) mostrou a interação do hidrogênio centrado em 3,05 ppm com os carbonos em 54,95 ppm e com o carbono carbonílico em 170,1 ppm, permitindo estender a estrutura "A" para "A₁":



Também foram observadas no espectro de HETCOR-long range (fig.19) interações dos prótons em 2,02 ppm, correspondente a metila 20,82 ppm, com a carbonila 170,7 ppm que juntamente com a observação de um fragmento de massa [M-60] (=293 m/z) do espectro de massas, permitiu escrever a estrutura parcial "C", um grupo acetil:

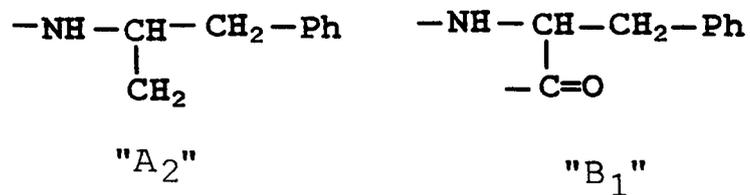


As interações do próton aromático centrado em 7,7 ppm com o carbono aromático em 131,9 ppm e com a carbonila em 167,0 ppm juntamente com o fragmento de massa 105 m/z (100%) do espectro de massas, permitiu escrever a estrutura parcial "D".



A análise do espectro de massas (fig. 10) mostrou o íon m/z $[M^+ - 60] = 384$ (5%) correspondendo à perda de uma molécula de ácido acético, confirmando a estrutura parcial "C". O íon m/z 353 (2,5%) $[M^+ - 91]$ juntamente com o íon m/z 91 (17%) sugerem a presença de uma benzila na molécula. Considerando os deslocamentos químicos dos carbonos CH_2 em 37,4 e 38,42 ppm com os sinais para seus respectivos hidrogênios centrados em 2,74 ppm e em 3,05 e 3,22 ppm, compatíveis com carbonos e prótons benzílicos, as estruturas "A₁" e "B" foram ampliadas para

"A₂" e "B₁", esta última lembrando o α-aminoácido fenilalanina.



Unindo as porções "C", "D", "A₂" e "B₁" chega-se preferencialmente a algumas estruturas, contudo a literatura (27,28,33) aponta para um composto obtido pela associação da fenilalanina com sua forma reduzida, o fenilalaninol.

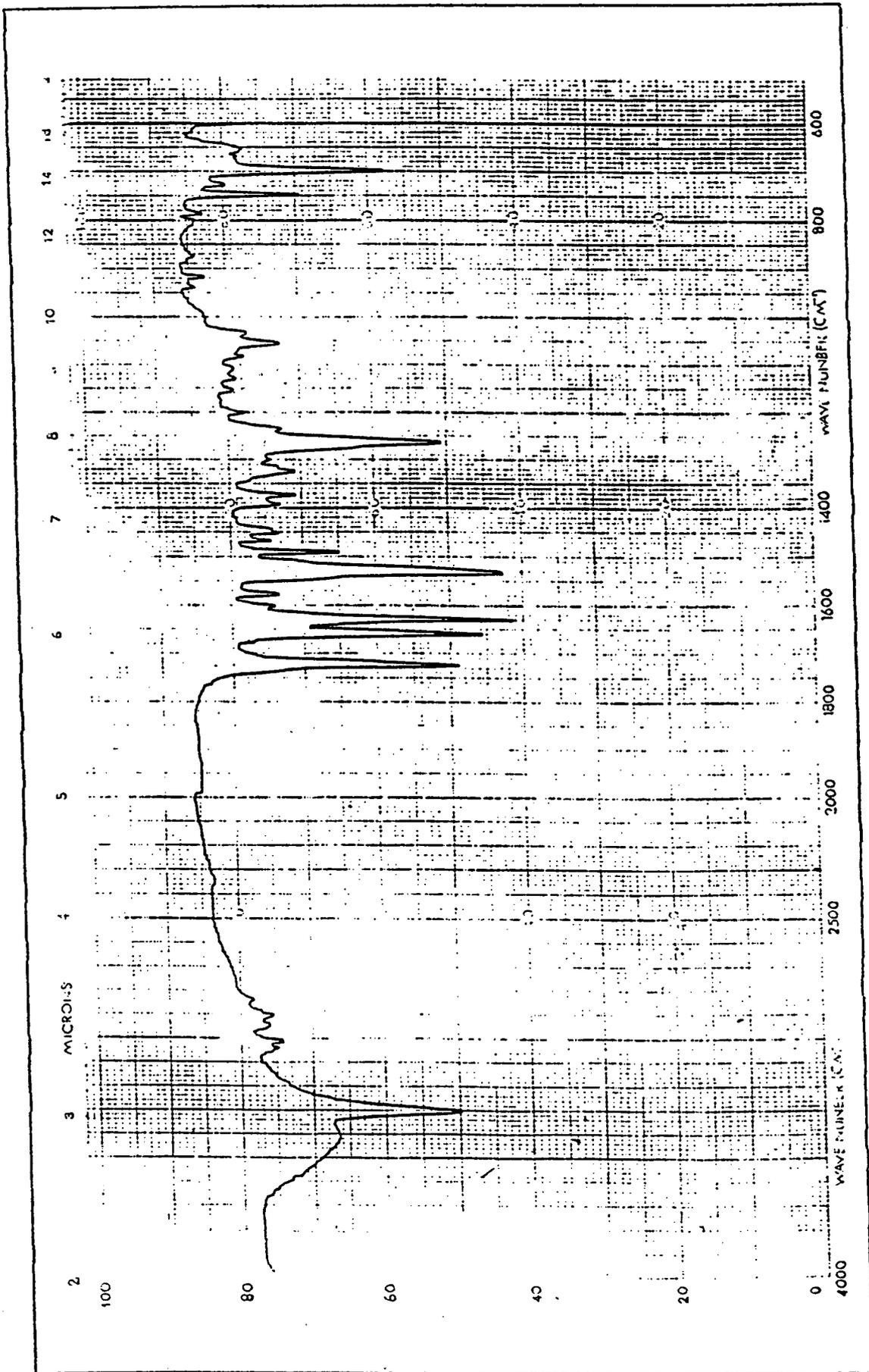


Fig. 9: espectro de infravermelho do composto isolado da fração LN - 9.

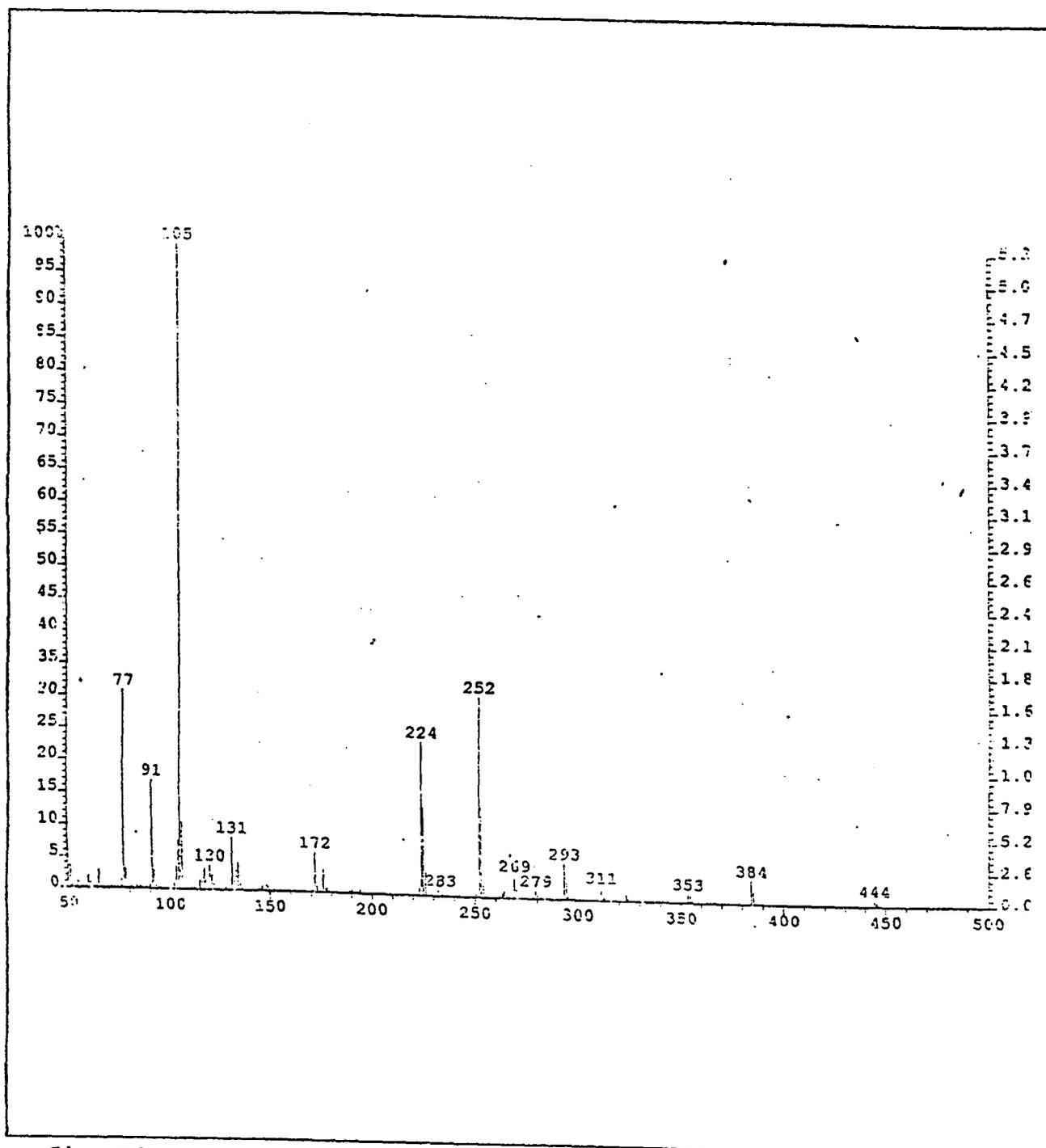


fig.10: espectro de massas moleculares obtidos de uma amostra do composto isolado da fração LN - 9.

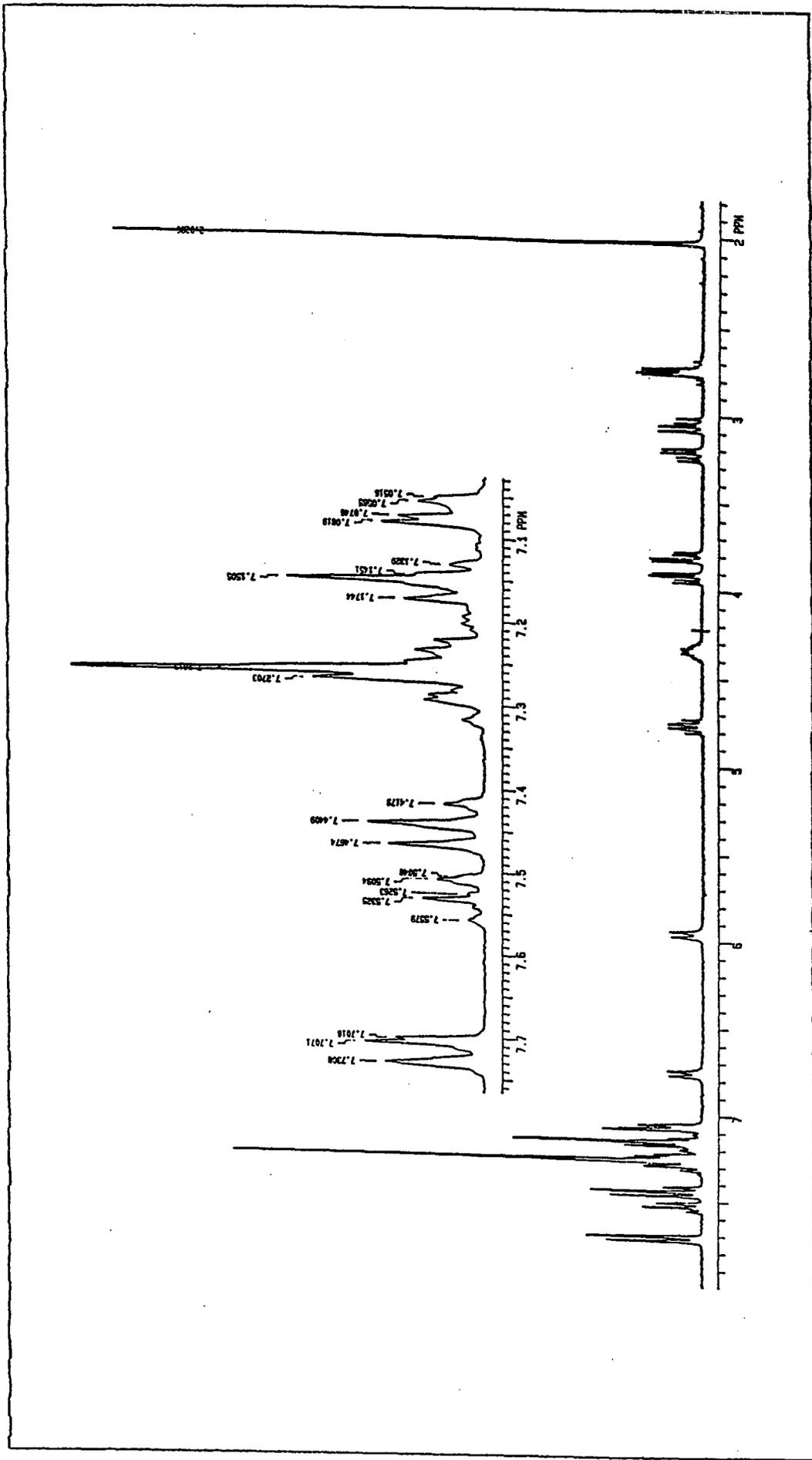
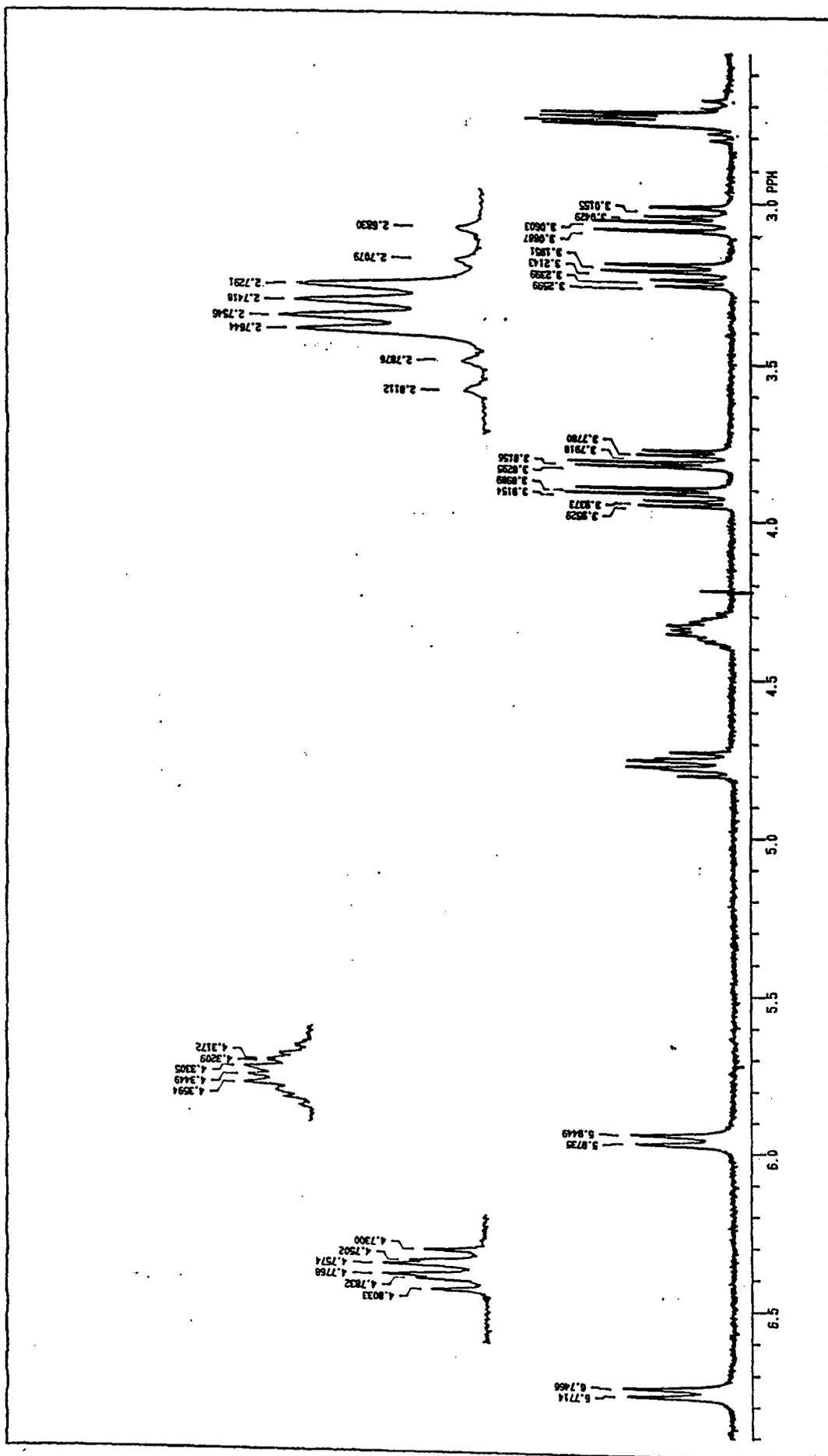


Fig.11: espectro de RMN ¹H do composto isolado da fração LN - 9 com ampliação da região de absorção de prótons de fenilas, obtido em um campo de 300 MHz e solvente CDCl₃.



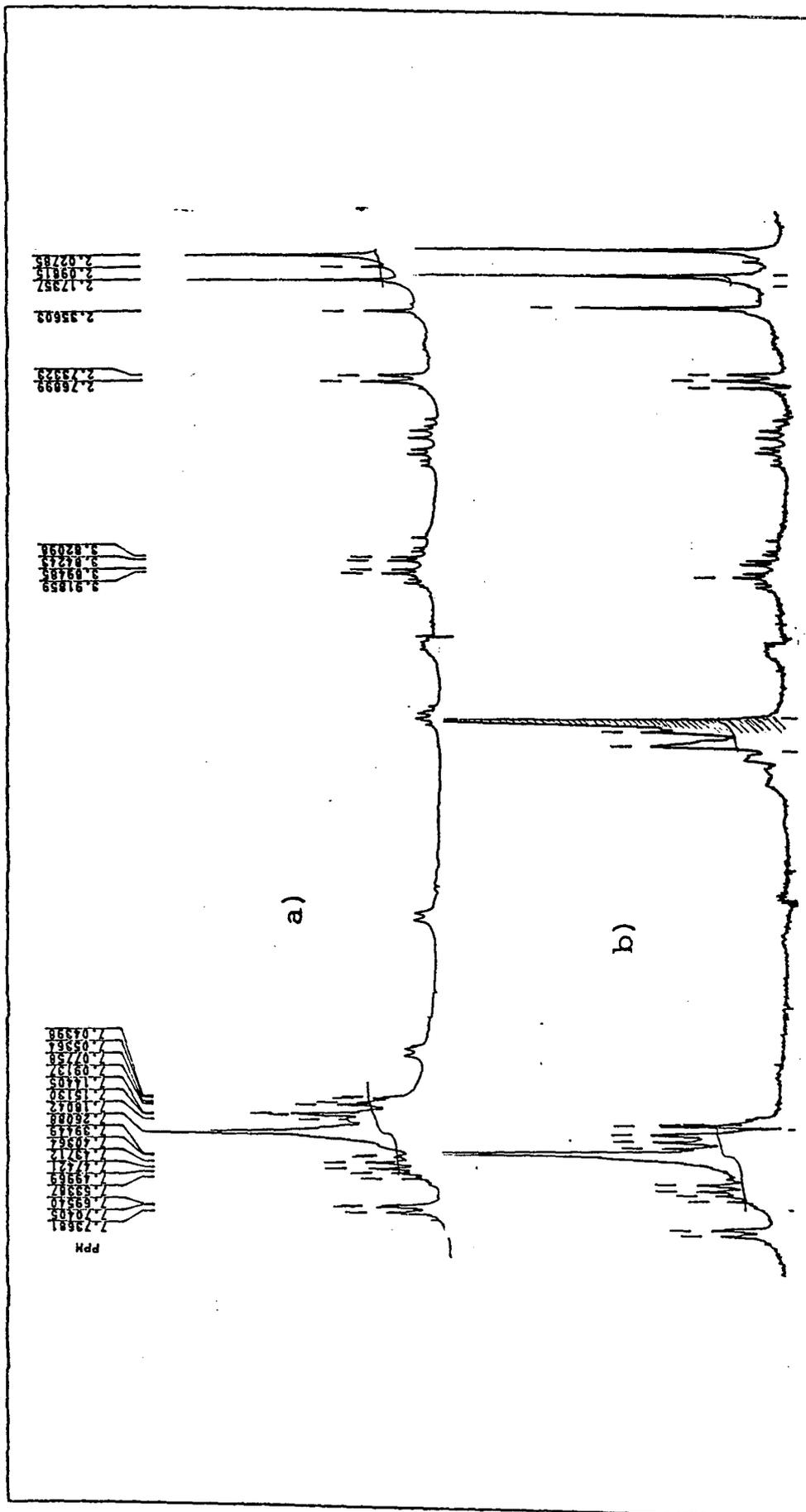


Fig. 13: espectro de RMN ¹H(200 MHz, CDCl₃) mostrando a troca com deutério quando adiciona-se uma pequena quantidade de D₂O à amostra analisada.

a)espectro total;

b)espectro obtido após adicionar D₂O. O sinal em torno de 4,76 ppm (hachurado) refere-se à HOD. Singletes 2,17 e 2,35 ppm são contaminantes.

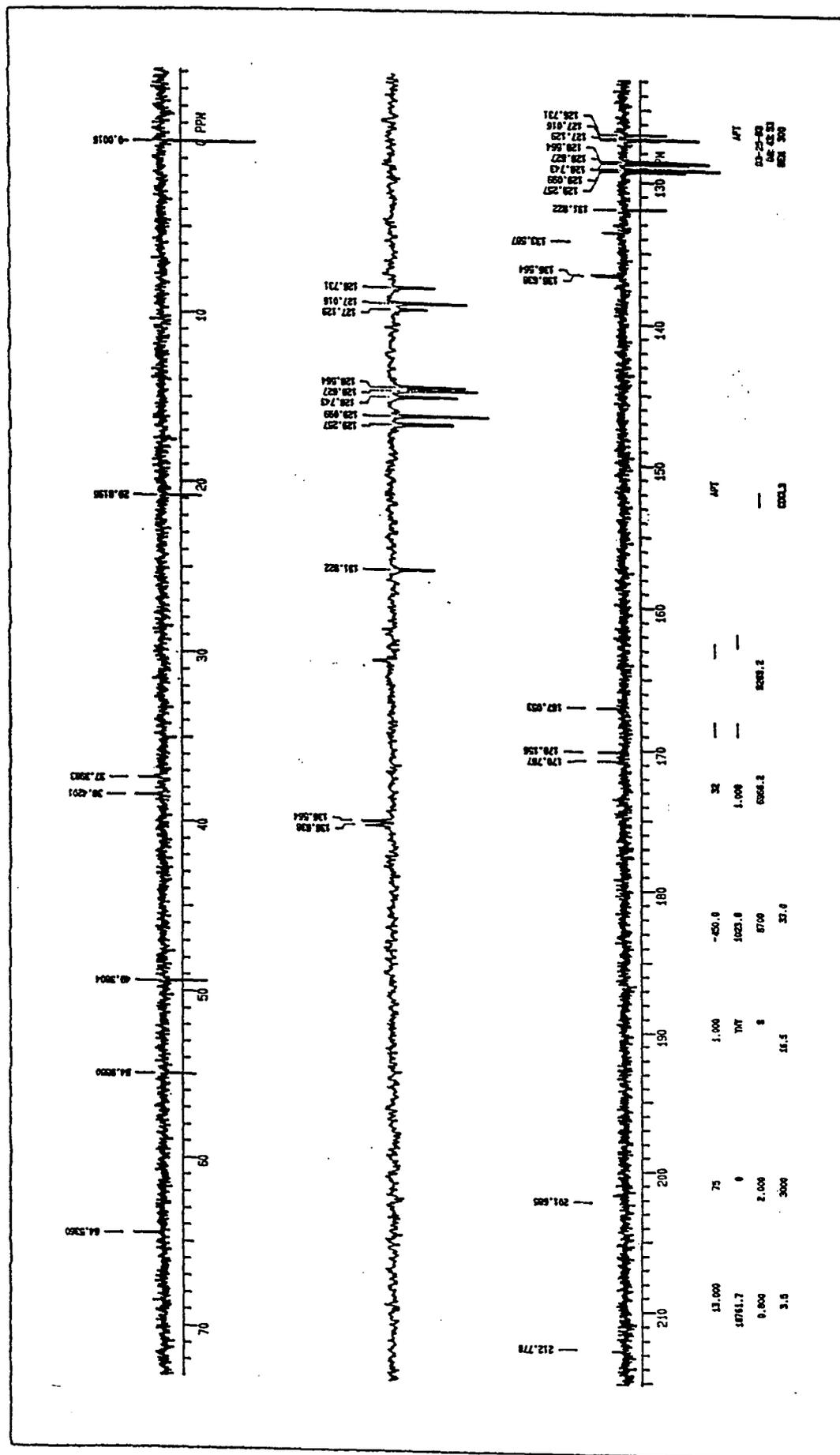


Fig.14: espectro na modalidade APT obtido do composto isolado da fração LN - 9, realizado a 300 MHz usando CDCl₃ como solvente.

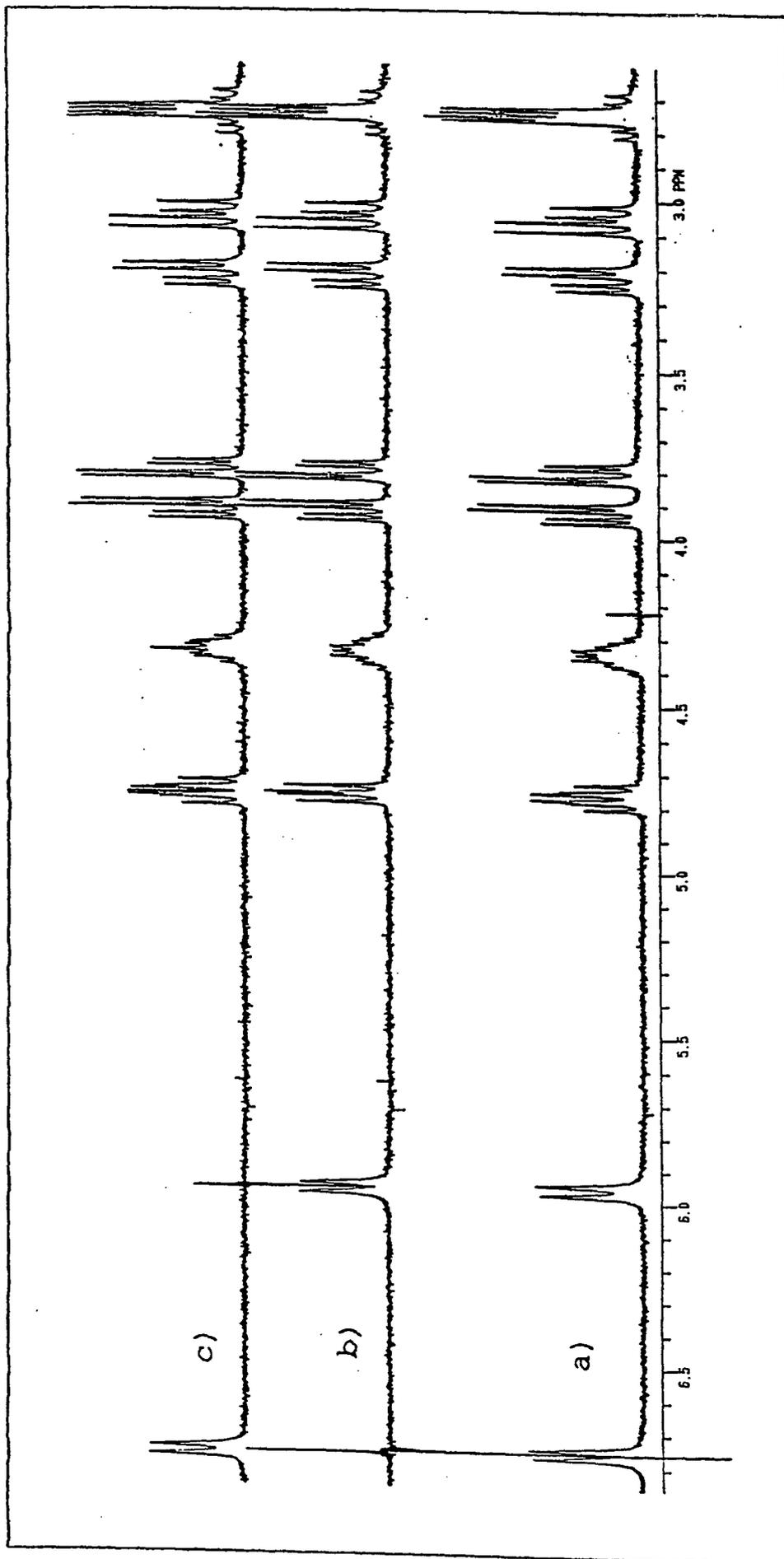


Fig.15a.: espectro de RMN ^1H a 300 MHz usando como solvente CDCl_3 :

a) espectro total;

b) irradiação a $\delta = 6,759$ ppm, alterando a multiplicidade a $\delta = 4,767$ ppm;

c) irradiação a $\delta = 5,96$ ppm, alterando o sinal a $\delta = 4,345$ ppm.

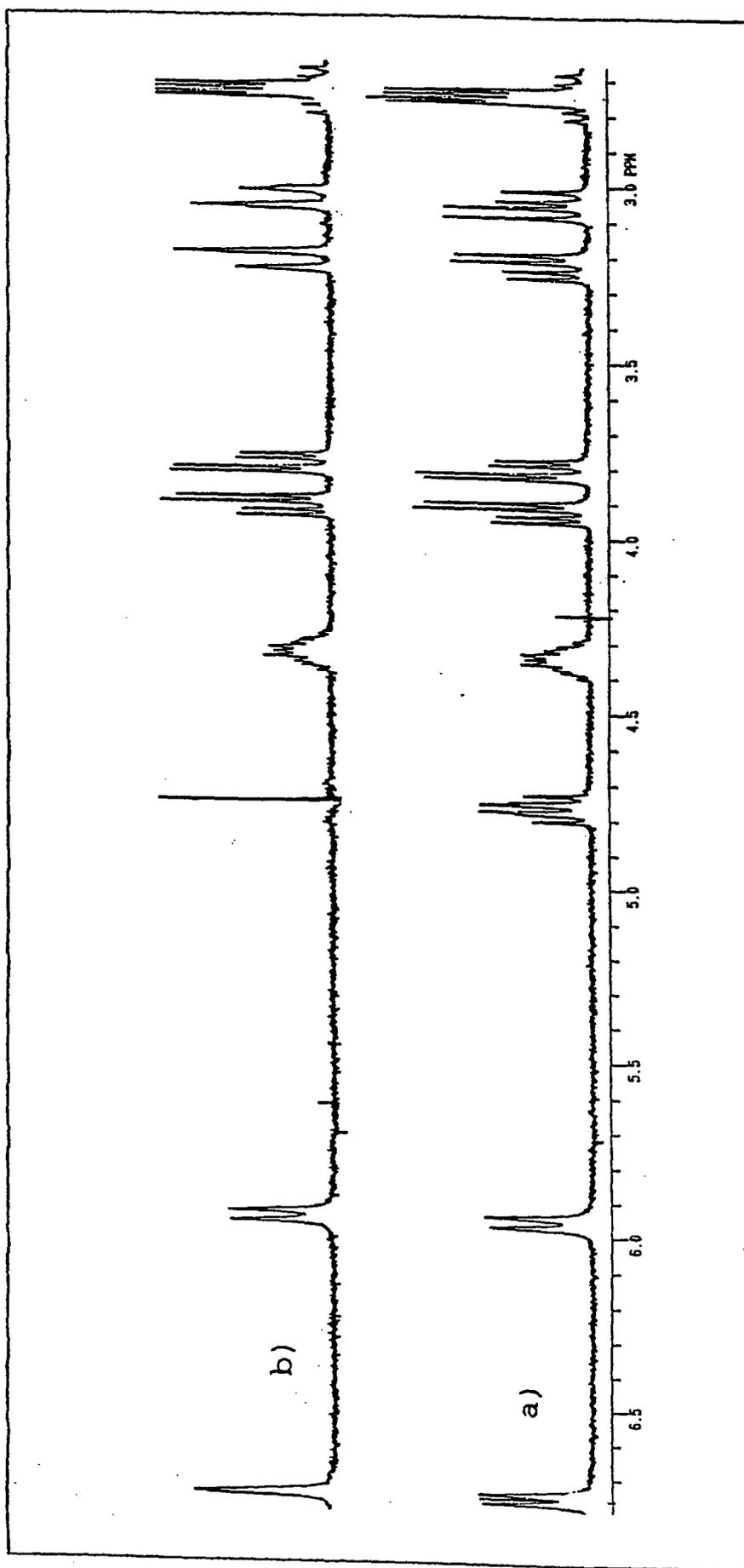


Fig.15b.: espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):

a) espectro total;

b) irradiação a 4,767 ppm afetando os sinais em 3,05, 3,23 e 6,759 ppm.

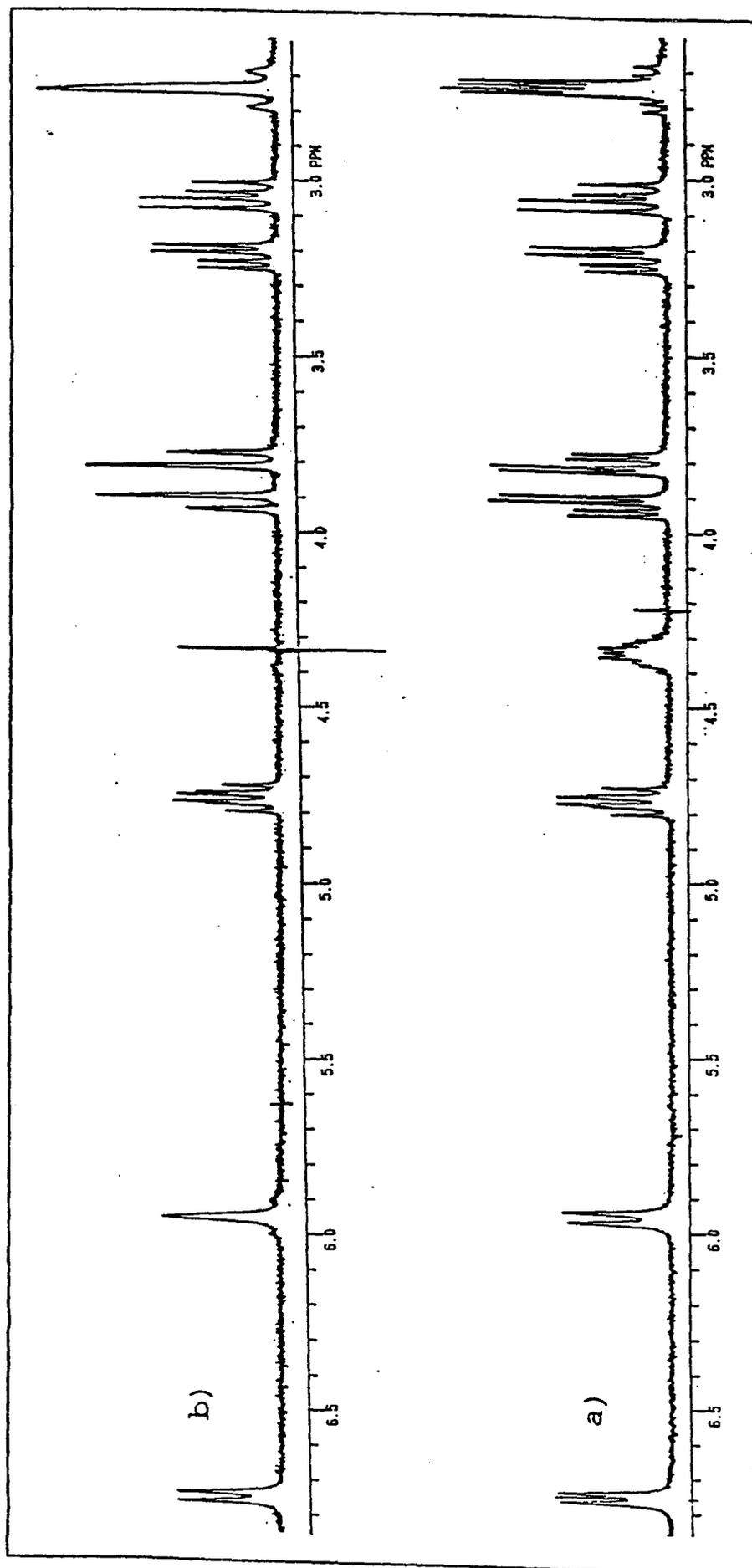


Fig.15c.: espectro de RMN ¹H(300 MHz, CDCl₃):

a) espectro total;

b) irradiação a 4,345 ppm, alterando a multiplicidade dos sinais a 5,96, 3,8, 3,93 e 2,75 ppm.

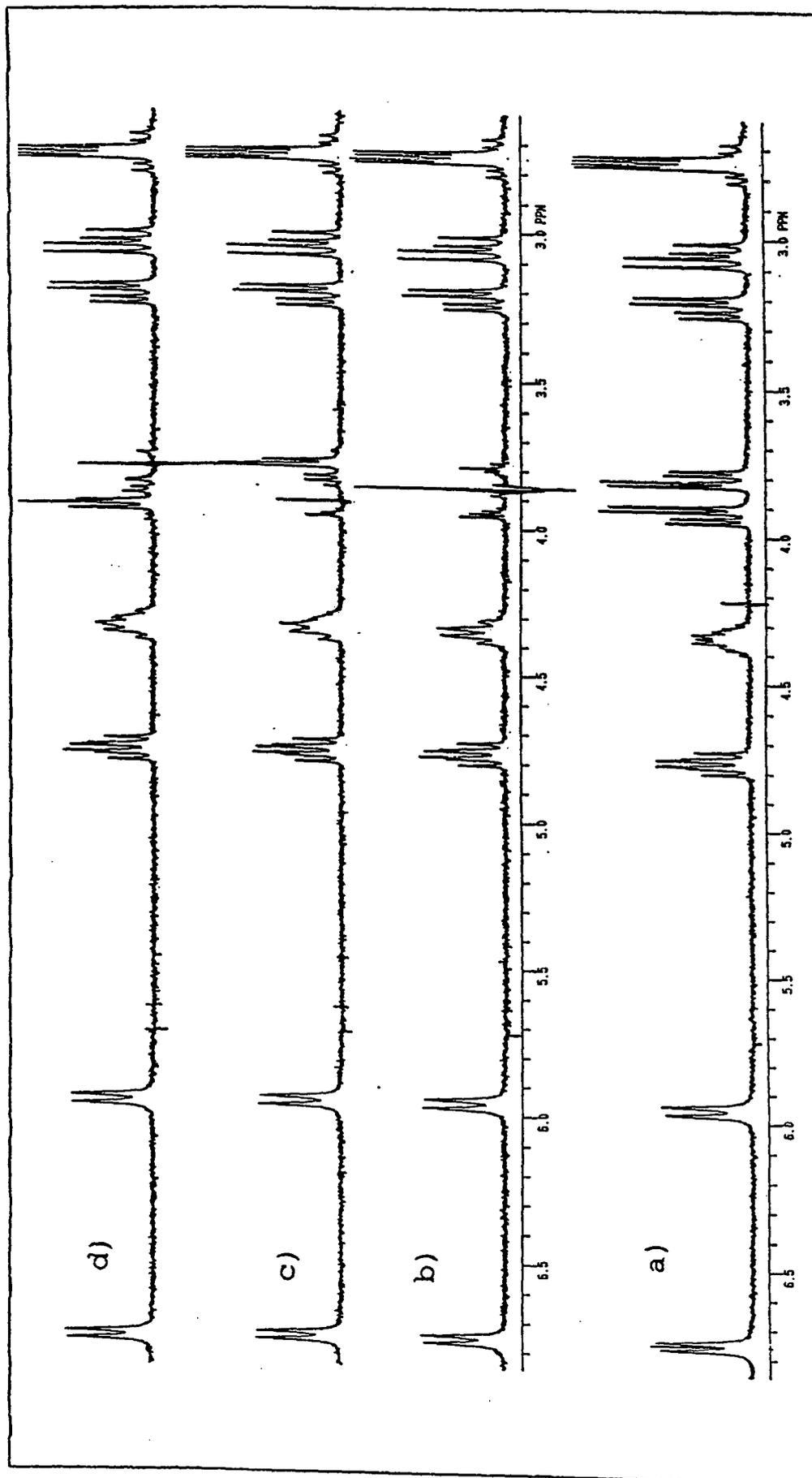


Fig.15d.: espectro RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):

- a) espectro total;
- b) espectro irradiado em 3,87 ppm
- c) espectro irradiado em 3,93 ppm;
- d) espectro irradiado em 3,8 ppm.

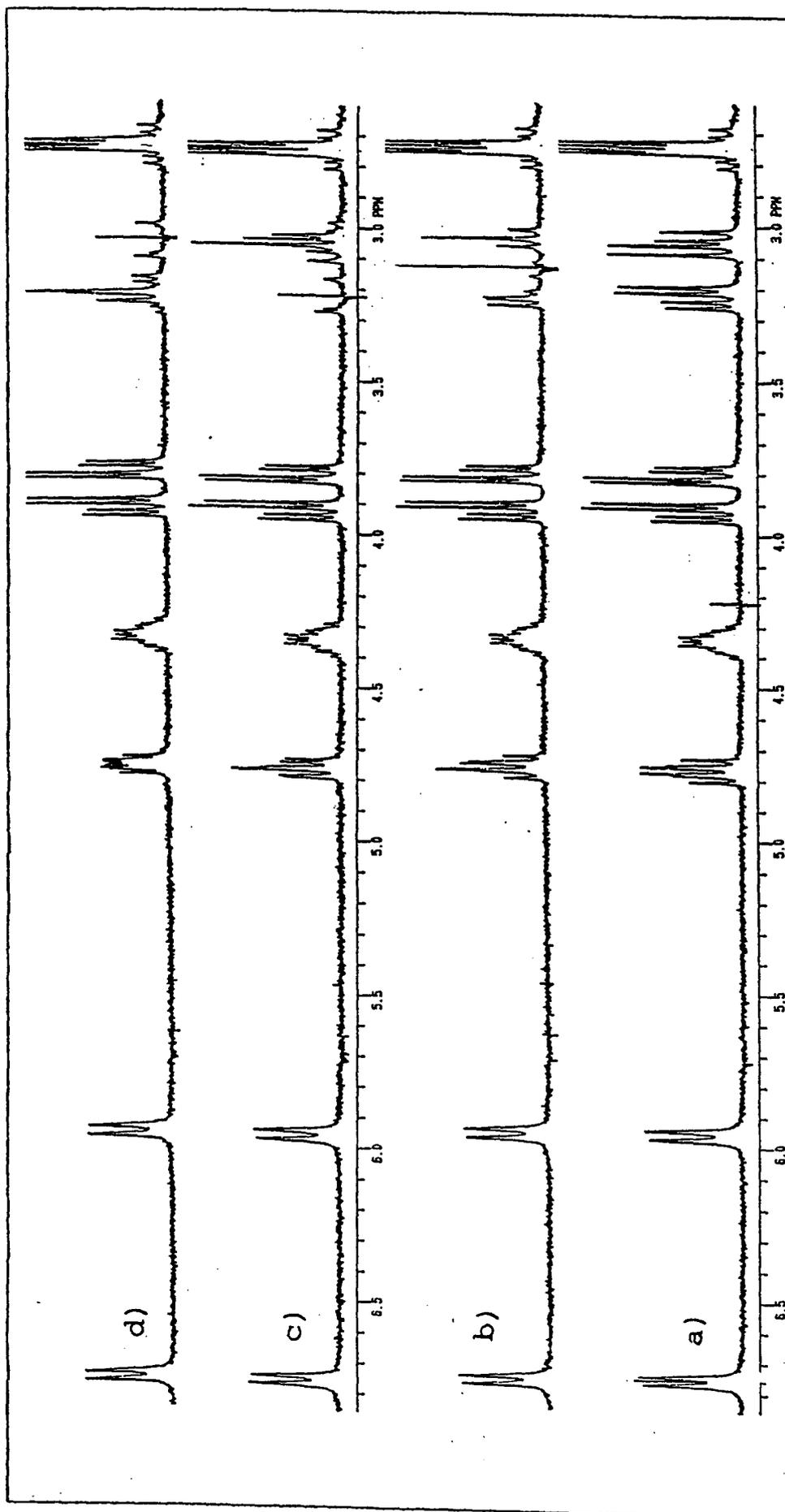


Fig.15e.: espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):

- a) espectro total;
- b) espectro irradiado em 3,12 ppm;
- c) espectro irradiado em 3,23 ppm;
- d) espectro irradiado em 3,05 ppm;

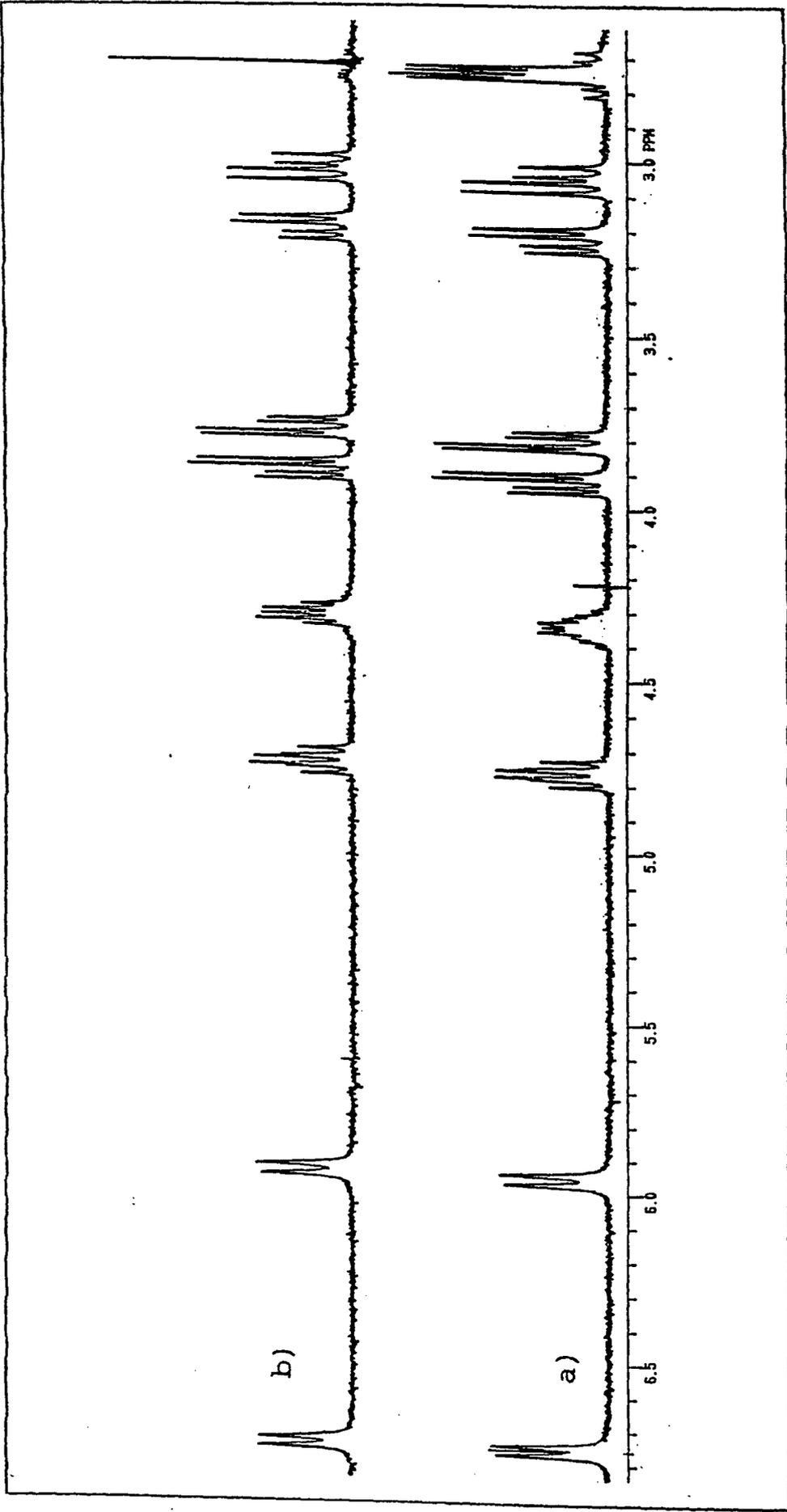


Fig.15f.: espectro RMN 1H (300 MHz, CDCl₃):
a)espectro total;
b)espectro irradiado em 2,75 ppm.

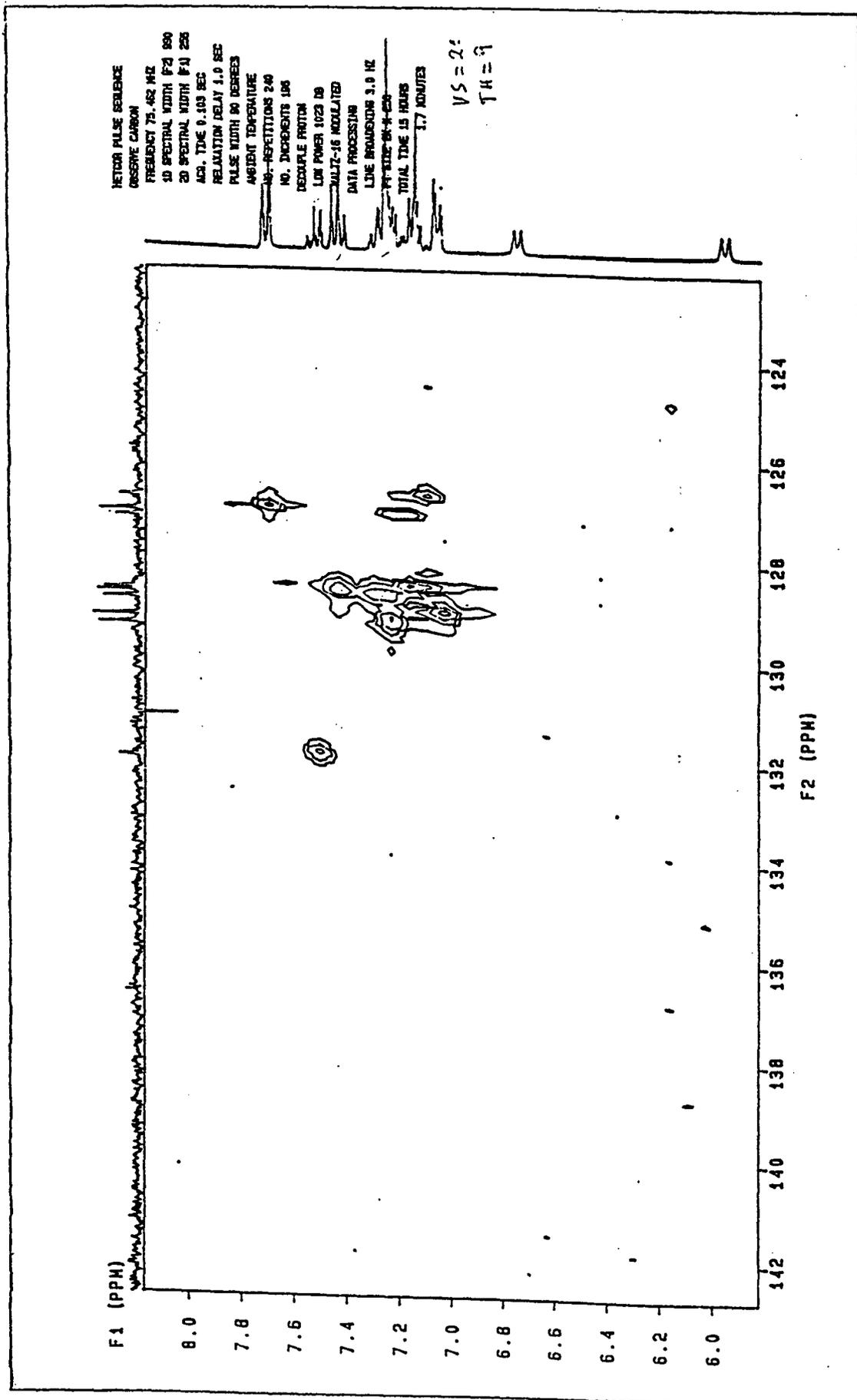


Fig.16: espectro no modo HETCOR (300 MHz, CDCl₃) mostrando a associação de carbonos de fenil com prótons aromáticos do composto isolado da fração LN - 9. Notar que os sinais em 5,92 e 6,75 ppm não cruzam com sinais de carbono.

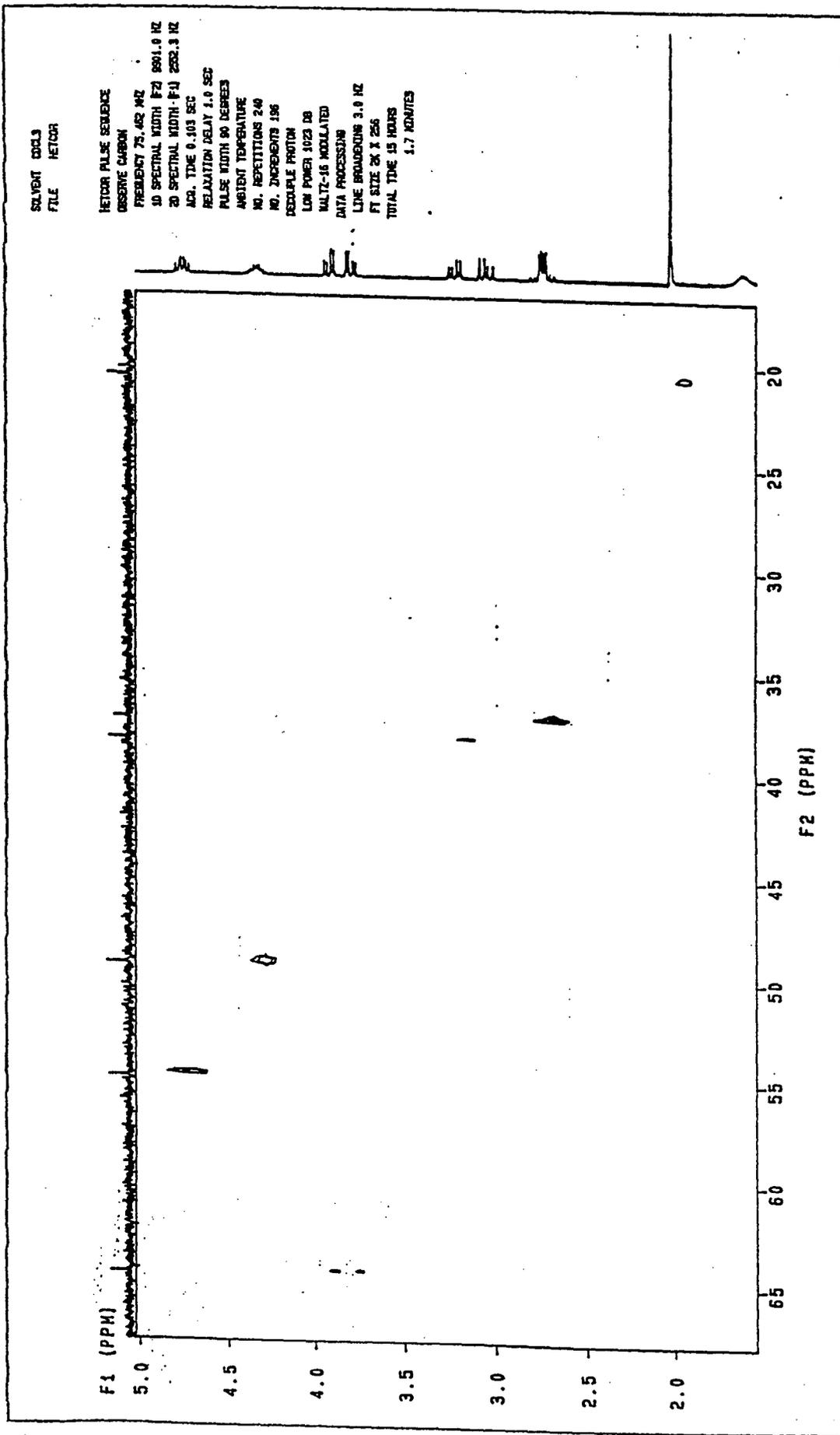


Fig. 17: espectro bidimensional HETCOR(300 MHz, CDCl3) mostrando a associação de prótons alifáticos com seus respectivos carbonos.

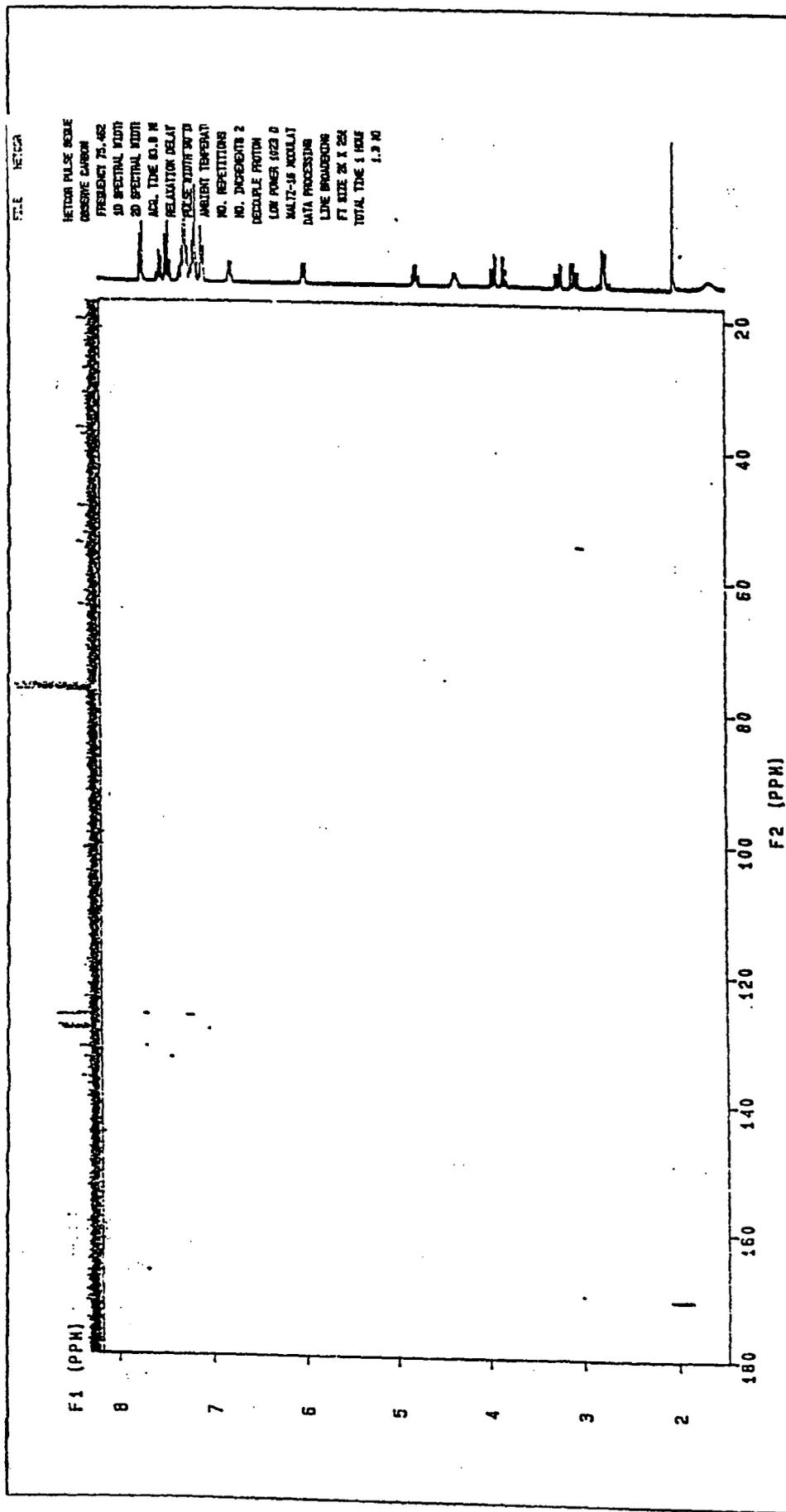


Fig.18: espectro no modo HETCOR Long Range (300 MHz, CDCl_3) mostrando o acoplamento até três ligações do metileno com sinal a $\delta=3,23$ e $3,05$ ppm com um carbono no de carbonila ($\delta=170,156$ ppm) e até duas ligações com carbono ($\delta=54,95$ ppm) do metino a $\delta=4,76$ ppm. Percebe-se acoplamento a três ligações de próton de fenil ($\delta=7,72$ ppm) com carbono de carbonila ($\delta=167,053$ ppm).

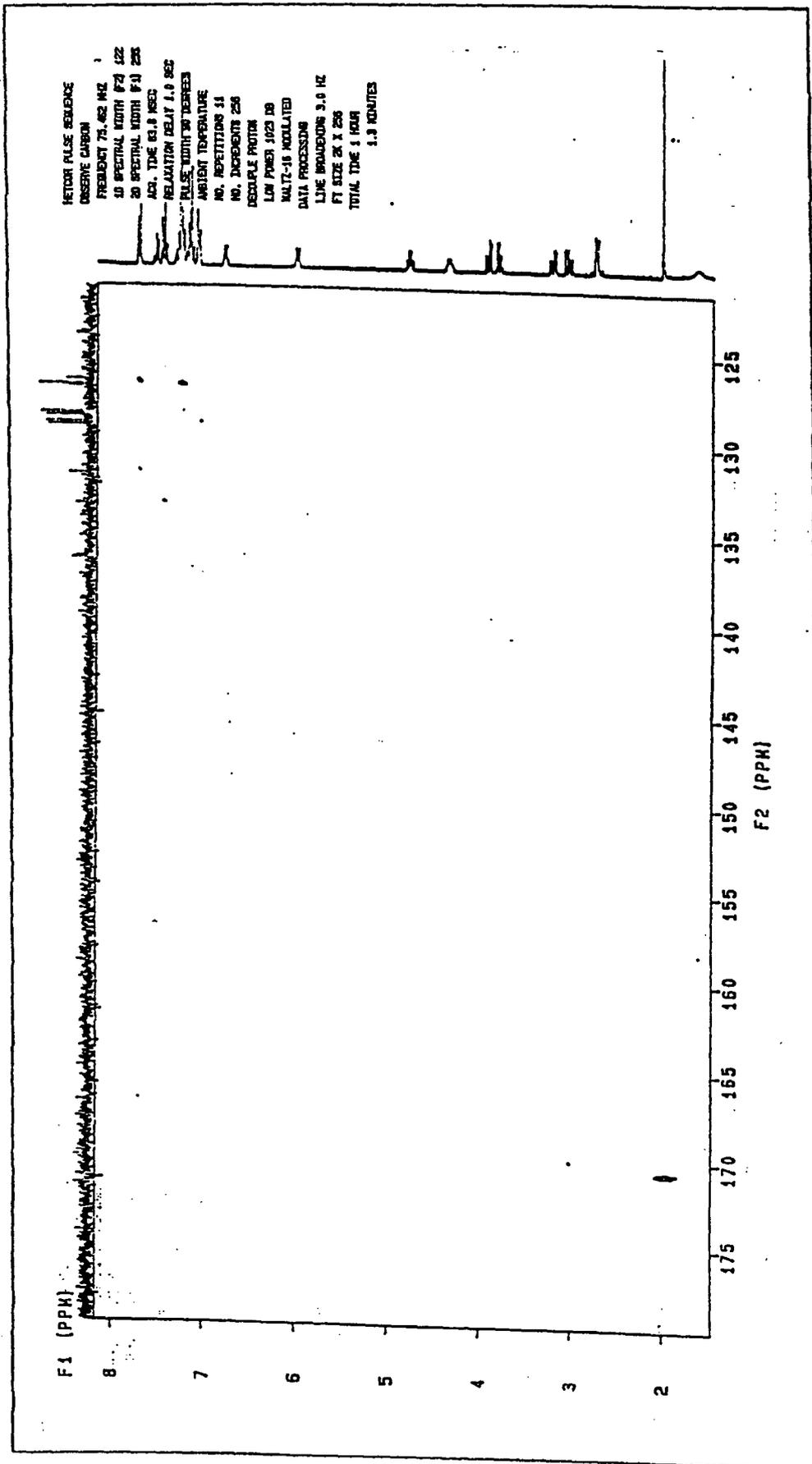
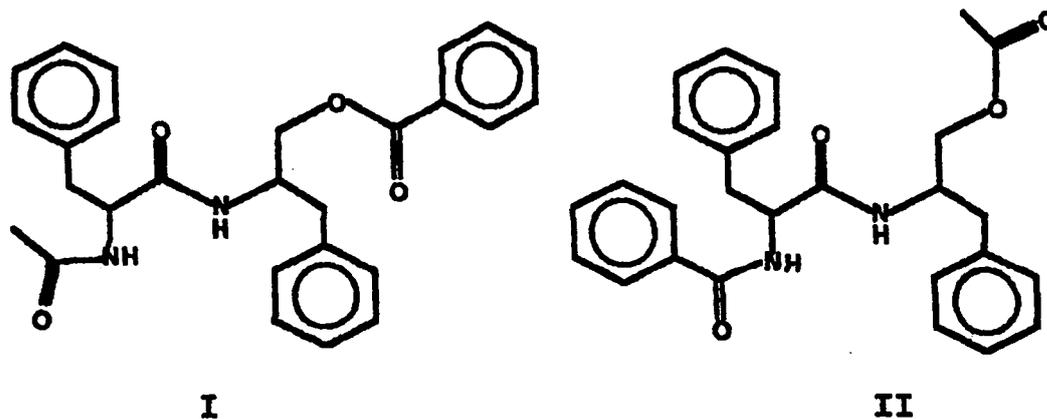


Fig.19: espectro no modo HETCOR Long Range (300 MHz, CDCl₃) mostrando o acoplamento até duas ligações do sinal a $\delta=3,13$ ppm com carbono de carbonila (170,156 ppm), assim como um próton de fenila acoplado com um carbono de carbonila ($\delta=167,053$ ppm) indicando a existência de uma unidade benzofílica. O single-
 te a $\delta=2,02$ ppm com carbono de carbonila ($\delta=170,787$ ppm) revela um grupo
 acetil.

Com os dados espectroscópicos apresentados até o momento, a fórmula molecular e o grau de insaturação, podemos propor duas estruturas para o sólido obtido da fração LN-9, apresentadas abaixo como **I** e **II**:



Uma análise mais detalhada do espectro de massas elimina a possibilidade da estrutura **I** e confirma a estrutura proposta **II** como mostrado a seguir:

1. íon $m/z=384(3,8)$ a partir do íon molecular $[(M^+ \cdot) - 60 = 384]$, provavelmente atribuído à perda de ácido acético;
2. íon $m/z=353(1,5)$ decorrente da eliminação de fragmento $\cdot C_7H_7$ $[(M^+ \cdot) - 91 = 353]$ (ver fig.20);
3. íon $m/z=311(2)$ detectado a partir de um possível rearranjo envolvendo o grupo acetil, resultando na eliminação do fragmento $(PhCH_2CHCH_2O) \cdot$ a partir do íon molecular (ver fig.21);
4. uma sequência de eliminação (ver fig.20), a partir de $m/z=353$, originando o íon $m/z=293(6)$, pela perda de $m/z=60$ provavelmente ácido acético, $m/z=252(31)$, decorrente da eliminação do fragmento H_2C_2NH . a partir de $m/z=293$ e, por último $m/z=$

224(24) pela eliminação de CO ($m/z=28$) a partir de $m/z=252$;

5. $m/z=105$, o pico base, refere-se à detecção do íon benzoil $[\text{PhCO}]^+$;

6. $m/z=91(17)$, íon tropílio $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$, e

7. $m/z=77(32)$, provavelmente oriundo da degradação do íon benzoil.

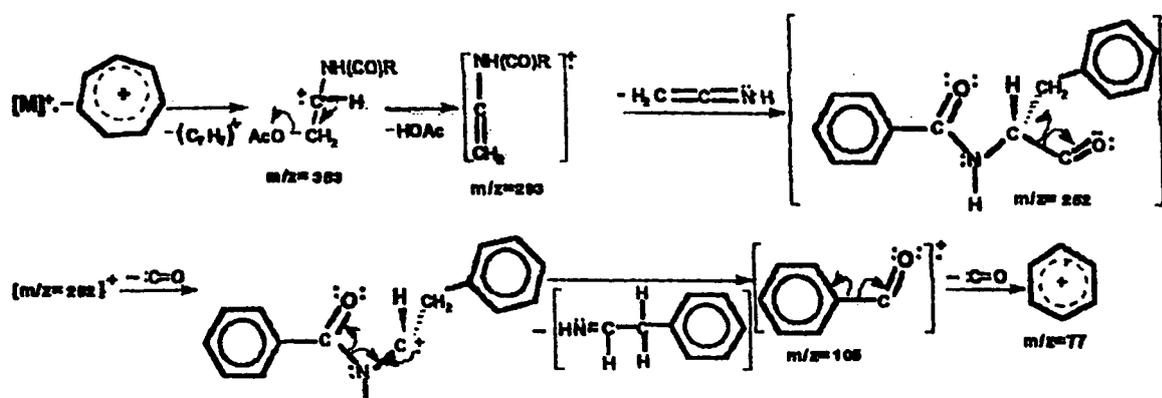


Fig.20: rota de fragmentação proposta para explicar sequência de picos que aparecem a $m/z=353$, $m/z=293$, $m/z=252$, $m/z=224$, $m/z=105$ e $m/z=91$, respectivamente.

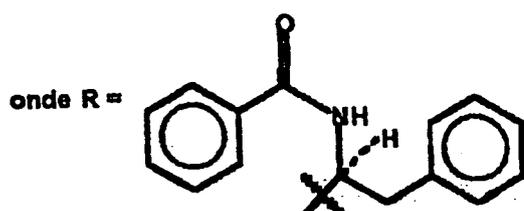
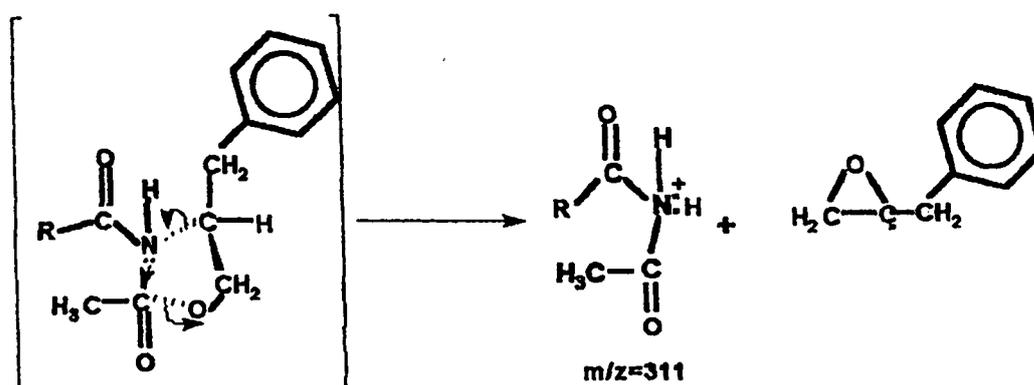


Fig. 21: fragmentação sugerida para explicar a presença do íon a $m/z=311$.

Dados espectrais obtidos por I.R., RMN ^1H e ^{13}C , além de E.M., coincidiram com aqueles descritos na literatura^(27,28) para o composto denominado *N*-benzoyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol Acetate, conhecido como anomalamide⁽²⁷⁾ isolado da *Artemisia anomala*, membro da família de vegetais conhecida como Compositae ou asperglaucide⁽²⁸⁾, isolado do fungo *Aspergillus glaucus*, sendo a sua estrutura abaixo definida, e, na página seguinte, uma tabela formada a partir dos dados de RMN do composto em estudo:

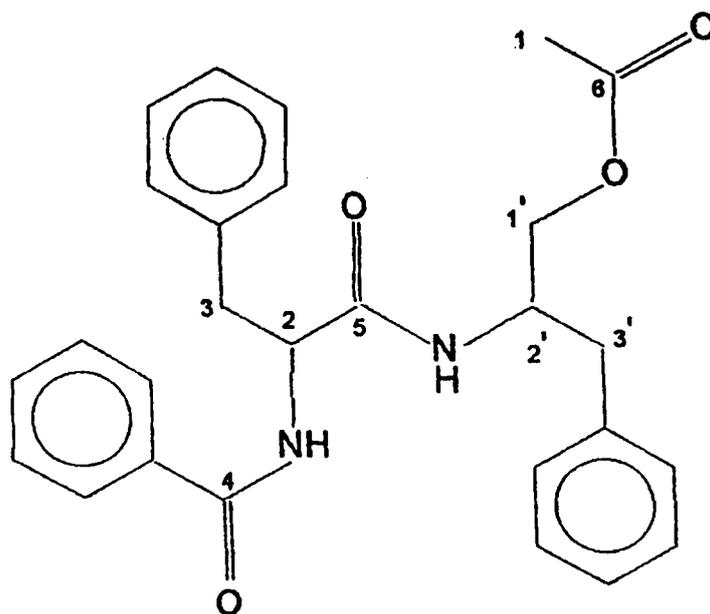


Fig.22: estrutura do composto isolado da fração LN - 9, denominado *N*-benzoyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol Acetate.

RMN ^1H RMN ^{13}C

C	δ_{obs} (ppm)	$\delta_{\text{lit.}}^*$ (ppm) (27)	δ_{obs} (ppm)	$\delta_{\text{lit.}}^{**}$ (ppm) (28)
NH	6,76	6,75		
NH	5,96	5,92		
1	2,03 (s, 3H)		20,82	20,7
2	4,76 (td, 1H)	4,77 (ddd, 1H)	54,95	55
3	3,05 (dd, 1H)	3,06 (dd, 1H)	38,42	38,5
3	3,23 (dd, 1H)	3,23 (dd, 1H)		
1'	3,80 (dd, 1H)	3,81 (dd, 1H)	64,53	64,6
1'	3,93 (dd, 1H)	3,93 (dd, 1H)		
2'	4,34 (m, 1H)	4,34 (m, 1H)	49,38	49,5
3'	2,71 (dd, 1H)	2,73 (dd, 1H)	37,39	37,4
3'	2,79 (dd, 1H)	2,77 (dd, 1H)		
ϕ	7 - 8	7,15-7,72 (15H)	126-137	126,5-136,7
4			167,05	167,0
5			170,15	170,5
6			170,78	170,5

* Obtido em campo de 400 MHz;

** Obtido em campo de 100 MHz.

Tabela 3: dados de RMN ^1H e ^{13}C a partir do composto Anomalamide.

1.2. A PARTIR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

Análise preliminar para detecção de derivados de catecóis como os flavonóides, foi efetuada por técnica de cromatografia em papel, usando como eluente uma mistura de MeOH/H₂O (1:1) e como revelador a solução de hexacianoferrato (III) de potássio-cloreto de ferro (III). O teste evidenciou a presença de flavonóides pois surgiu manchas castanho-esverdeadas ao borrifar o reativo descrito acima no cromatograma obtido. A seguir, fez-se uma ccd analítica de sílica para otimizar as condições de separação dos componentes, o que resultou na escolha dos solventes diclorometano e acetona como eluentes, sendo usado gel de sílica como suporte. Procedeu-se, então, à técnica de cromatografia preparativa em coluna no modo gradiente de polaridade crescente. Obteve-se, na faixa de eluição entre 6-20% de (CH₃)₂CO em CH₂Cl₂ uma mistura de dois compostos principais determinados por ccd analítica em sílica. Tal fração foi codificada como LN Hol - 5.

1.2.1. Identificação dos Constituintes da Fração LN Hol - 5

Após purificado, o espectro de infravermelho obtido (fig.23) mostra bandas características de compostos fenólicos livres, sendo citadas as bandas de estiramento de ligações OH a cerca de 3.400 cm^{-1} (banda larga), estiramento de carbonila associada como ponte de hidrogênio⁽²⁶⁾ a cerca de 1.660 cm^{-1} , estiramento C=C do anel de fenol a cerca de 1.600 , 1.500 e 1.455 cm^{-1} deformação no plano de ligação OH a 1.360 cm^{-1} e, em 1.255 cm^{-1} temos estiramento de ligação σ_{CO} .

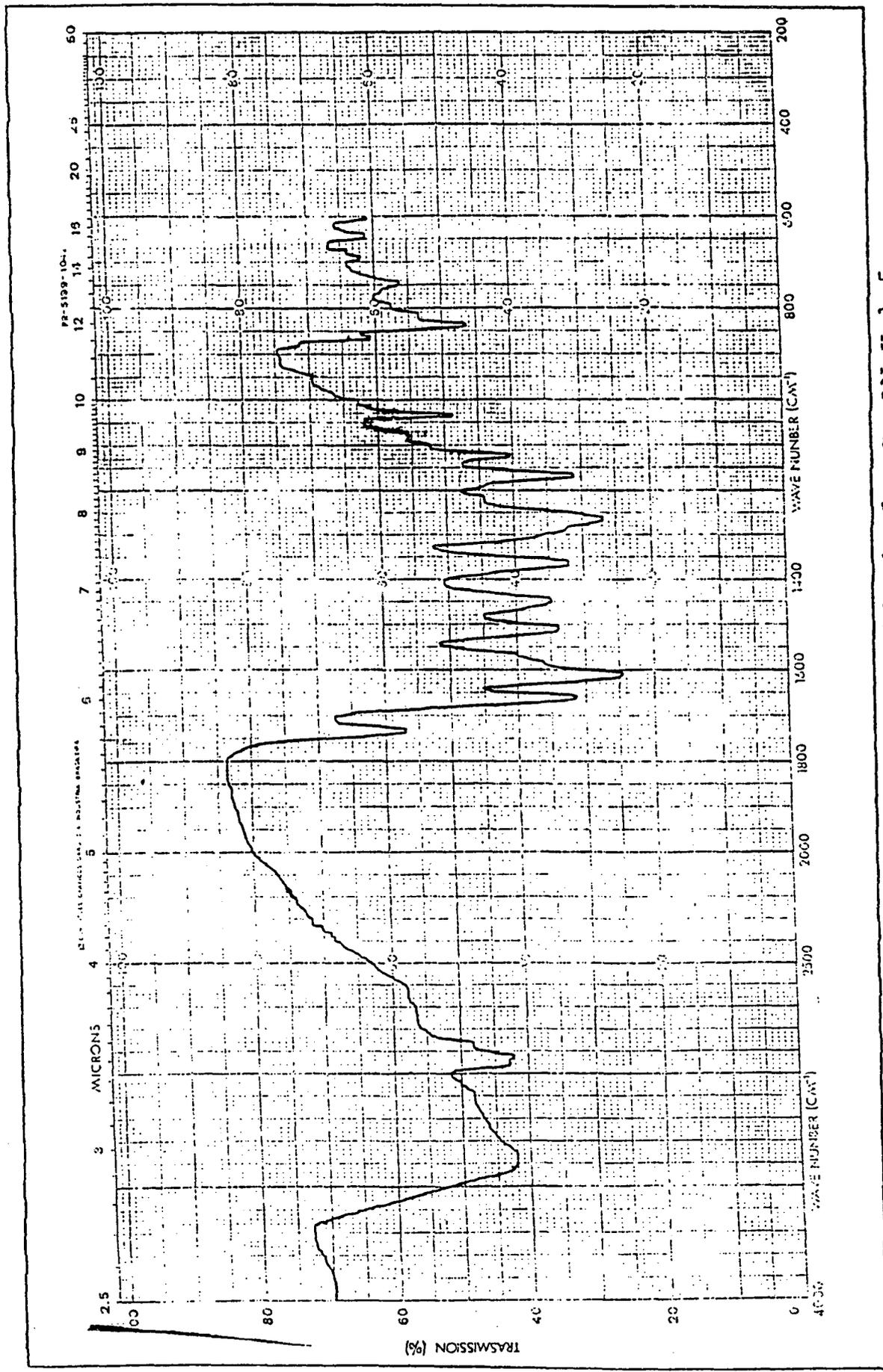


Fig.23: espectro de infravermelho obtido da fração IN-Hol 5.

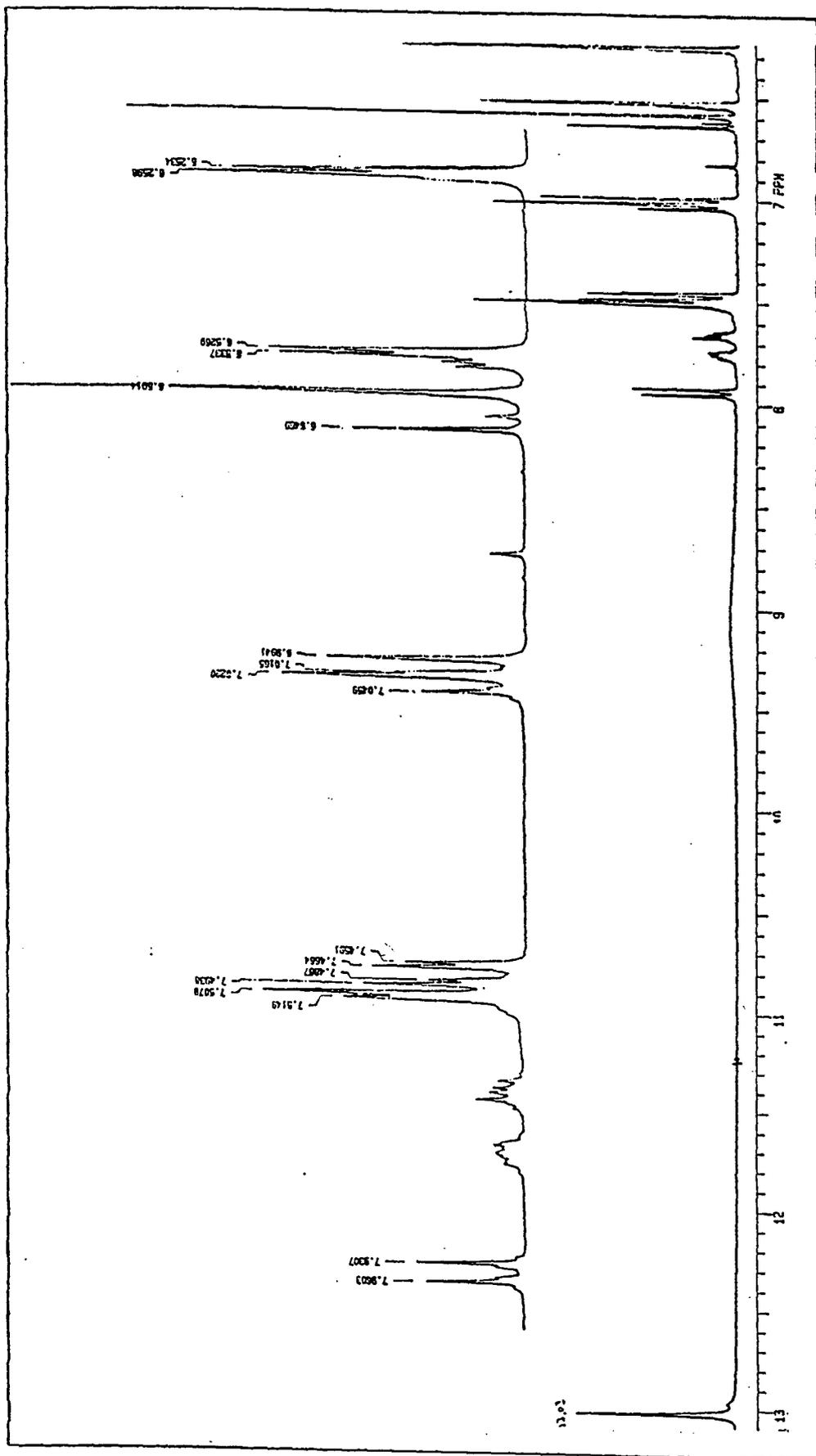


Fig.24: espectro de RMN ^1H (300 MHz, acetona deuterada) dos constituintes da

fração LN-Hol 5. Em 13,03 ppm aparece sinal de próton -OH formando pontes de hidrogênio. Em torno de 7,0 ppm referem-se a prótons OH fenólicos livres.

Inspecionando o espectro de RMN ^1H , (fig.24) verificou-se a presença de um padrão típico de absorção de prótons fenólicos (ombro na linha base entre 8,5 e 9,5 ppm), além de um próton OH de fenol ($\delta = 13,03$ ppm, s) formando ponte de hidrogênio intramolecular, o sinal centrado a 7,945 ppm (d, $J_{\text{calc}} = 8,8$ Hz) devido à absorção dos hidrogênios H-2' e H-6' de anel B do tipo 4'-oxigenado (ver fig.25b). Por outro lado, o duplo duplete ($J_{\text{calc}} = 6,33$ Hz e 2,83 Hz) que surge centrado a 7,5 ppm lembra H-6' de anel B do tipo 3',4'-oxigenado, assim como o sinal a 7,463 ppm (d, $J_{\text{calc}} = 2,1$ Hz), típico de H-2' (ver fig.25c); sinal a 7,03 ppm (d, $J_{\text{calc}} = 8,8$ Hz) foi reportado como sendo dos prótons H-3' e H-5' de anel B 4'-oxigenado (ver fig. 25b), enquanto que 7,00 ppm (d, $J = 8,33$ Hz) refere-se ao H-5' de anel 3',4'-oxigenado. Na região entre 6,65-6,58 ppm temos absorção do próton do anel C na forma de singlete (ver fig.25a), cujos sinais a 6,6469 ppm (s) e 6,5914 ppm (s), provaram a existência de mistura de compostos análogos. Os dois dubletes seguintes, o primeiro centrado a 6,5303 ppm e o outro a 6,2566 ppm referem-se aos H-8 e H-6 de anel fenólico do tipo A (ver fig.25d). Também percebeu-se a inexistência de prótons de metóxi-aril, somente prótons de OH-fenólicos.

Diante desta avaliação, obteve-se dados importantes, a saber:

a) trata-se de uma mistura de flavonóides com anel A 5,7-di-hidróxi-substituído;

b) é uma mistura de duas flavonas, em função de diferentes δ na região de absorção de próton do anel C, e

c) trata-se de mistura de 5,7-di-hidróxiflavonas com anel B 4'-hidróxi e 3',4'-di-hidróxi;

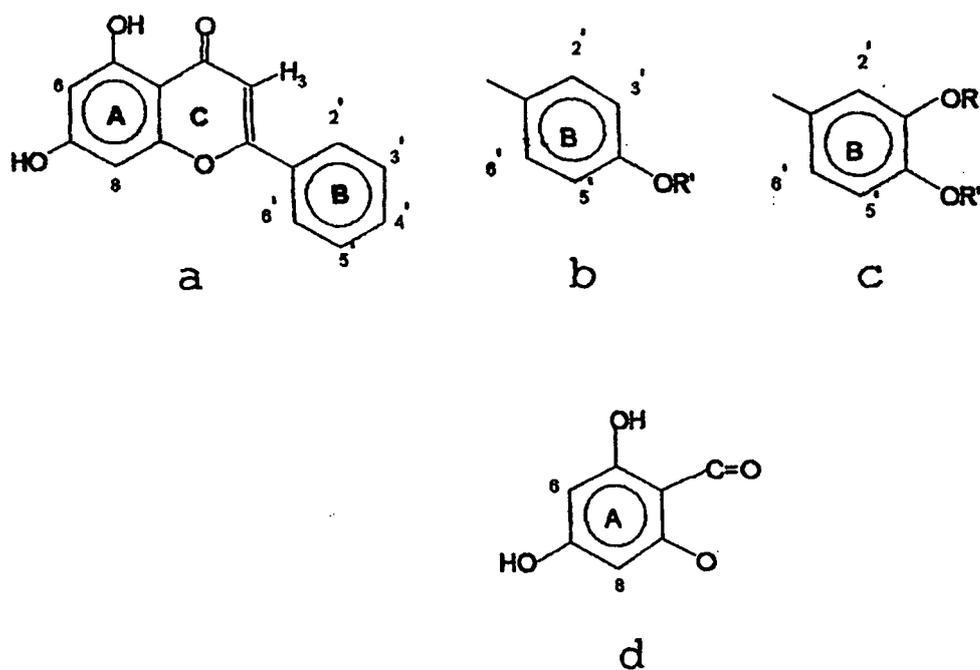


Fig.25: a) estrutura molecular de uma flavona, mostrando os anéis A, B e C;
 b) prótons do anel B 4'-oxigenado;
 c) prótons do anel B 3',4'-oxigenado;
 d) prótons do anel A 5,7-di-hidróxi-substituído.

Para confirmar as estruturas, obtém-se um espectro de RMN de ^{13}C , no modo APT (ver fig.26), segundo comparações com dados da literatura⁽³⁰⁾ (ver tabela 4) levam a conclusão que os flavonóides são **Apigenin 5** e o **Luteolin 6** (fig.27).

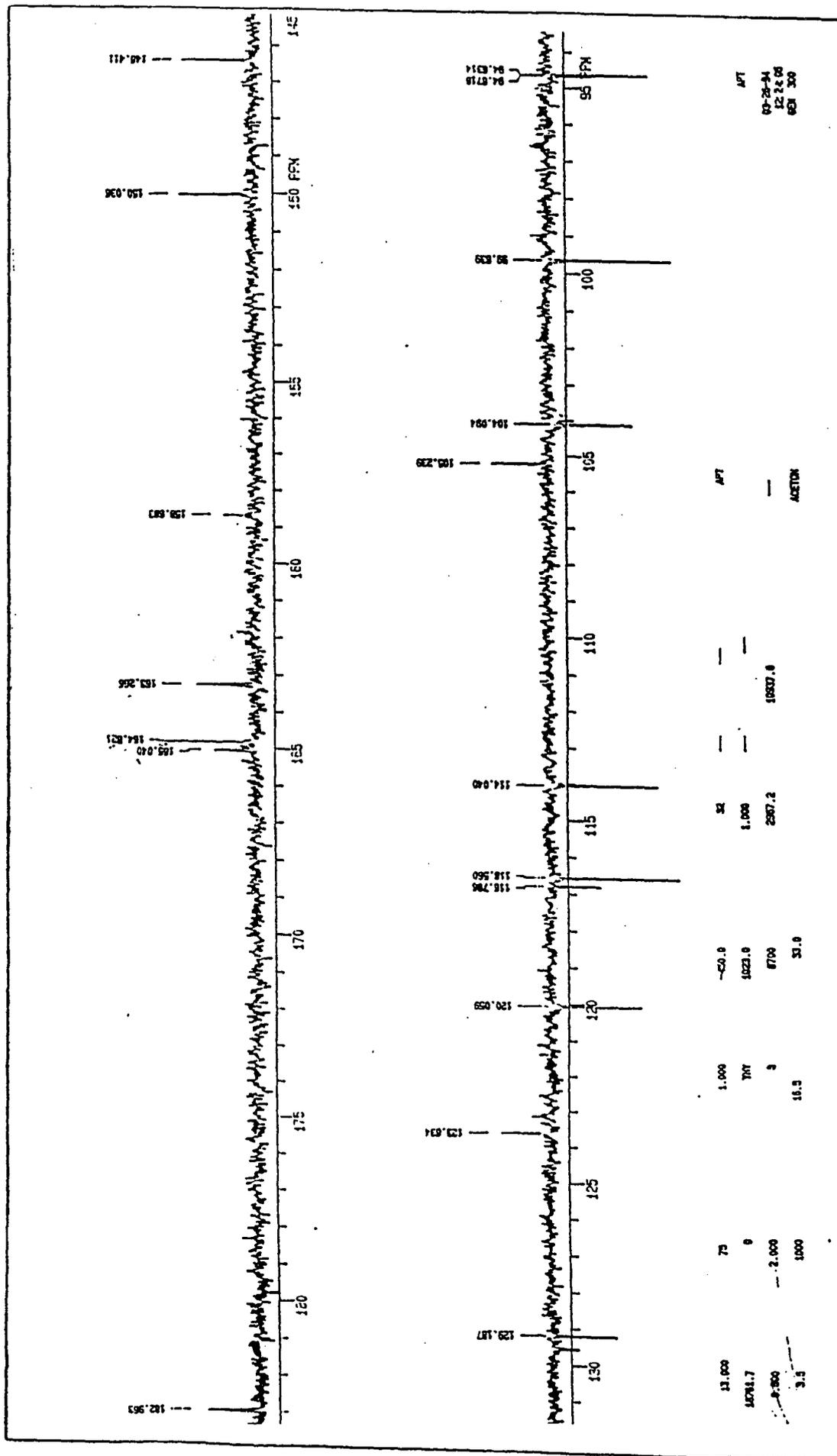
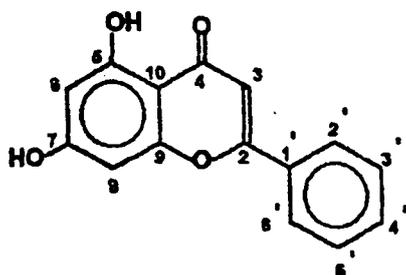


Fig. 26: espectro em APT(300 MHz, acetona deuterada) da mistura de flavonóides. 72



substituente-	OH
apigenin	4'
luteolin	3', 4'

carbono	δ_{obs} (ppm)		δ_{ref} (ppm) * (30)	
	luteolin	apigenin	luteolin	apigenin
C2	165,04	165,04	164,5	164,1
C3	104,09	104,09	103,3	102,8
C4	182,96	182,96	182,2	181,8
C5	158,68	158,68	157,9	157,3
C6	99,64	99,64	99,2	98,8
C7	164,82	163,26	164,7	163,7
C8	94,67	94,63	94,2	94,0
C9			162,10	161,50
C10	105,24	105,24	104,2	103,7
C1'	123,60	123,60	119,3	121,3
C2'	114,00	129,40	113,8	128,4
C3'	146,40	116,78	146,2	116,0
C4'	150,06		150,1	161,1
C5'	116,56	116,78	116,4	116,0
C6'	120,06	129,40	122,1	128,4

* δ (ppm) de ^{13}C obtido em equipamento Bruker WX-90 FT em DMSO- d_6 .

Tabela 4: deslocamento químico dos carbonos para a mistura de flavonóides **Luteolin** e **Apigenin**.

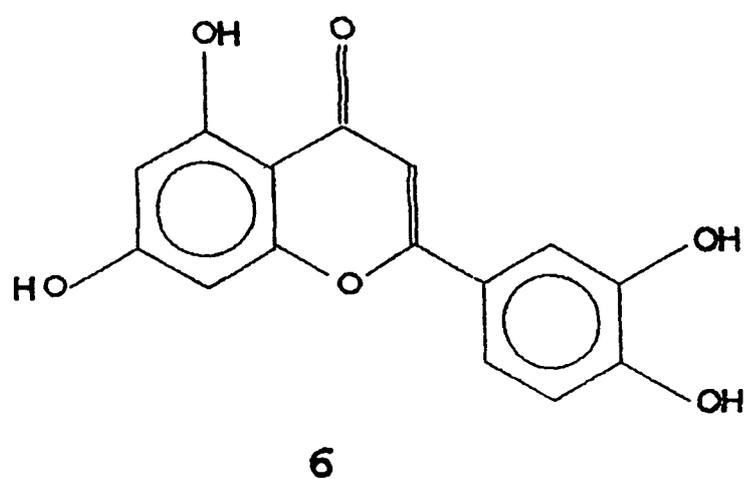
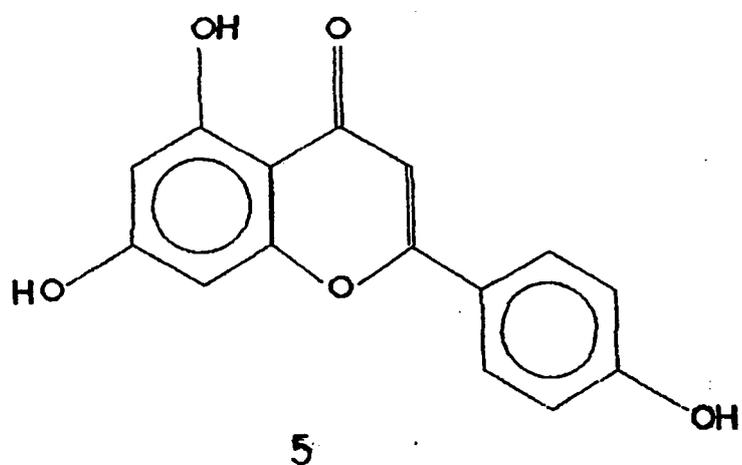


Fig.27: estruturas moleculares em projeção no plano dos flavonóides Apigenin 5 e Luteolin 6(32,33).

Através de análises por HPTLC usando padrões de flavonóides para comparação, e usando os sistemas de solventes C_6H_6 -Acetato de etila (6:4) eluída duas vezes e $CHCl_3$ -MeOH (8:2) (ver fig.28), confirmou-se a presença das flavonas **Apigenin** [5,7-dihidroxy-2-(4-hidroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one] **5** e **Luteolin** [2-(3,4-dihidroxyphenyl)-5,7-dihidroxy-4H-1-benzopyran-4-one] **6**. Para verificar a proporção de cada um na amostra, foi efetuada análise por HPLC usando coluna RP-18 (ODS) em fase reversa, detector UV/Vis, sistema de solvente H_2O -MeOH (3:7), a um fluxo de 0,7 ml/min.; injetado 10 μ l da amostra dissolvida em MeOH p.a.. Chegou-se a seguinte composição para a fração LN Hol-5: Apigenin **5**: 24,3%; Luteolin **6**: 75,6% (ver fig.29), na fração, o que resulta em 7,0 mg de **5** para 21,7 mg de **6**.

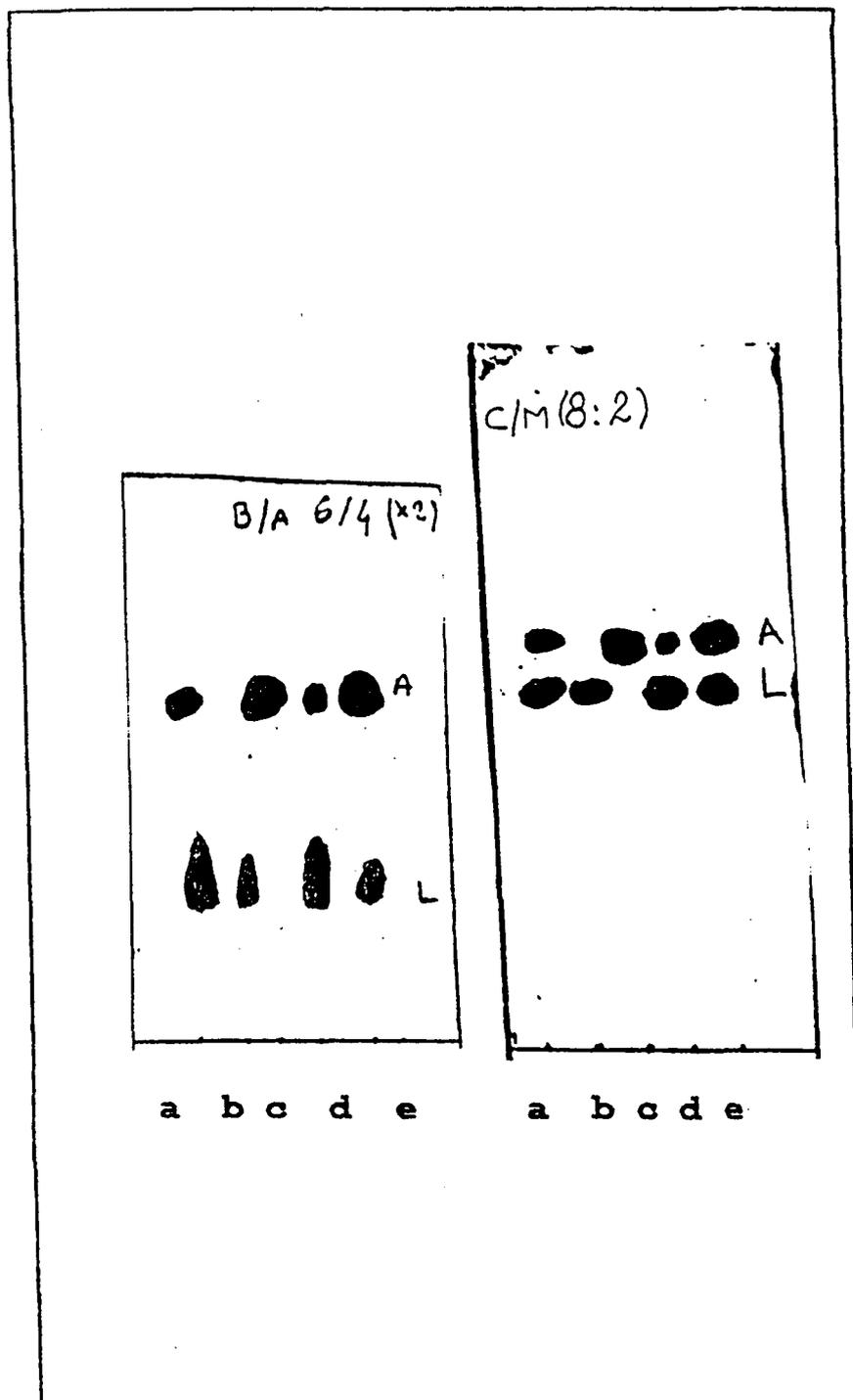


Fig.28:cromatogramas obtidos por HPTLC da fração LN Hol-5: a) amostra; b) luteolin; c) apigenin; d) amostra + luteolin; e) amostra + apigenin. Acima está designado B/A para sistema de solventes benzeno-acetato de etila (6:4), eluída duas vezes e C/M para clorofórmio/metanol (8:2). O revelador usado foi Hexacianoferrato de potássio-cloreto férrico.

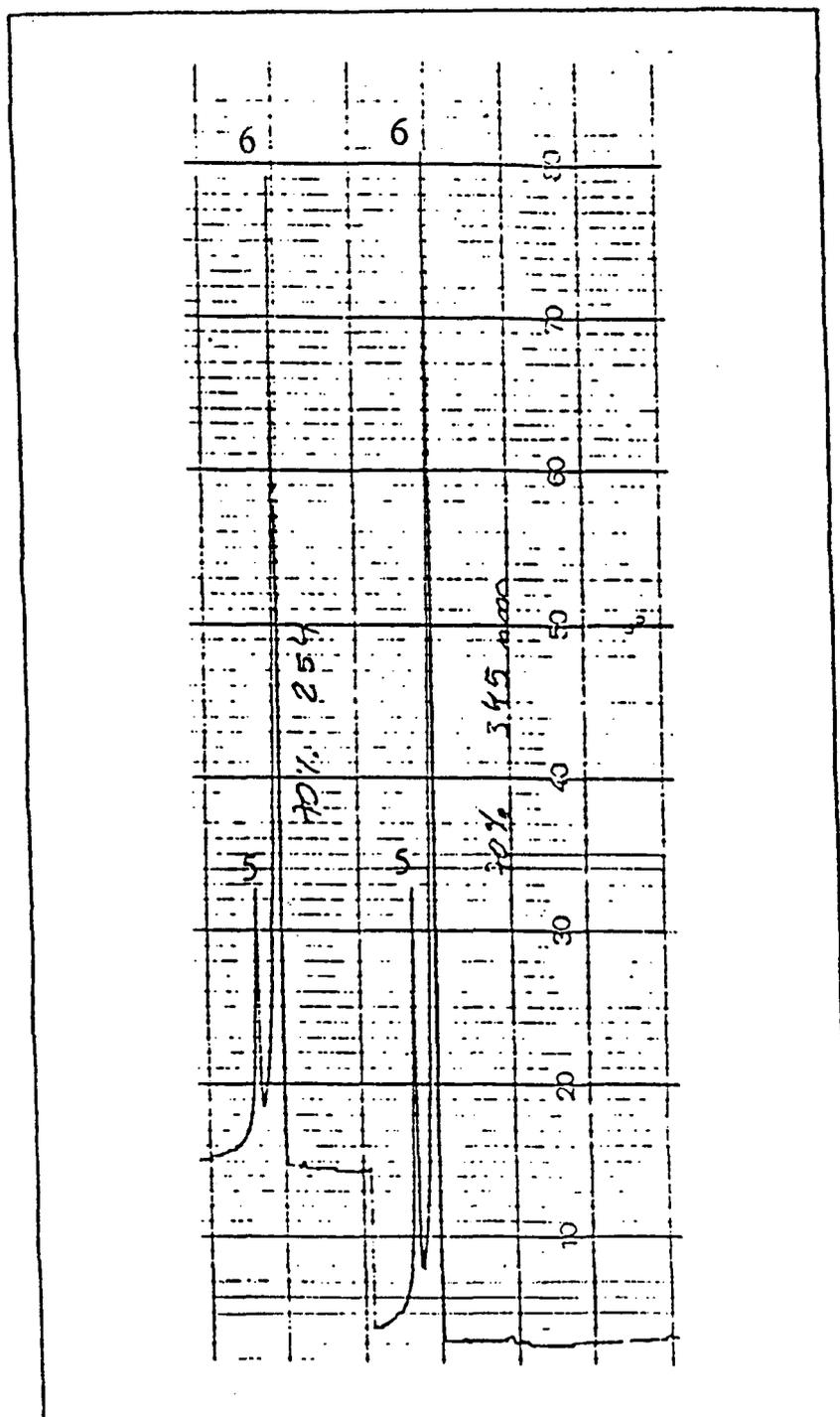


Fig.29: Cromatograma obtido por HPLC resultante da eluição da amostra da fração LN.Hol - 5, dadas as seguintes condições: MeOH-H₂O (7:3); fluxo: 0,7 ml/min.; detector: lâmpada UV a $\lambda=254$ nm e $\lambda=345$ nm; coluna ODS (fase reversa). Pela ordem de eluição temos: **apigenin 5** e **luteolin 6**.

VI. CONCLUSÃO

Considerando os resultados experimentais do presente trabalho, podemos concluir:

Os extratos acetato de etila-hexânico e hidroalcoólico do ramo, folhas e flores de *Leonotis nepetaefolia* apresentaram um bom perfil para estudos fitoquímicos, não sendo necessário técnicas mais refinadas para alcançar os resultados ora apresentados.

O extrato acetato de etila-hexânico foi cromatografado em coluna preparativa de sílica-gel, rendendo várias frações. Foi analisado os constituintes em duas delas: de uma fração foi identificada por CGAR uma mistura dos esteróis **campesterol** (24 α -Methyl-5-cholesten-3 β -ol) **1**, **stigmasterol** (stigmasta-5,22-dien-3 β -ol) **2** e **β -sitosterol** (5-stigmasten-3 β -ol) **3** (fig.30), na proporção de 13,56% de **1**; 49,9% de **2** e 36,54% de **3** cujo rendimento da mistura é cerca de 0,02% do peso da planta. Da outra fração foi identificada uma amida não muito comum e inédita na família derivada da fenilalanina, denominada **Anomalamida** (N-benzoyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol Acetate) **4** (fig.30), identificada por técnicas de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , além de espectrometria de massas.

Do extrato hidroalcoólico foram isolados por cromatografia em coluna e identificados por IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e HPTLC por comparação com padrões os flavonóides **Apigenin** ([5,-dihidroxy-2-(4-hidroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one]) **5** e **Luteolin** ([2-(3,4-dihidroxyphenyl)-5,7-dihidroxy-4H-1-benzopyran-4-one]) **6** (fig. 30), cuja composição na fração foi determinada por HPLC e resultou na proporção de

24,3% de 5 para 75,7% de 6. Tais flavonóides não foram ainda relacionados como constituintes deste vegetal.

Além da atividade antiviral do Luteolin, a atividade anti-histamínica e antitumoral do Apigenin⁽³⁰⁾ e a comprovada atividade analgésica do stigmasterol⁽³¹⁾, tais compostos isolados poderão ser analisados farmacologicamente através de outros "screening", vindo ao encontro do que se refere quanto ao uso popular de *L. nepetaefolia* como um agente fitoterápico.

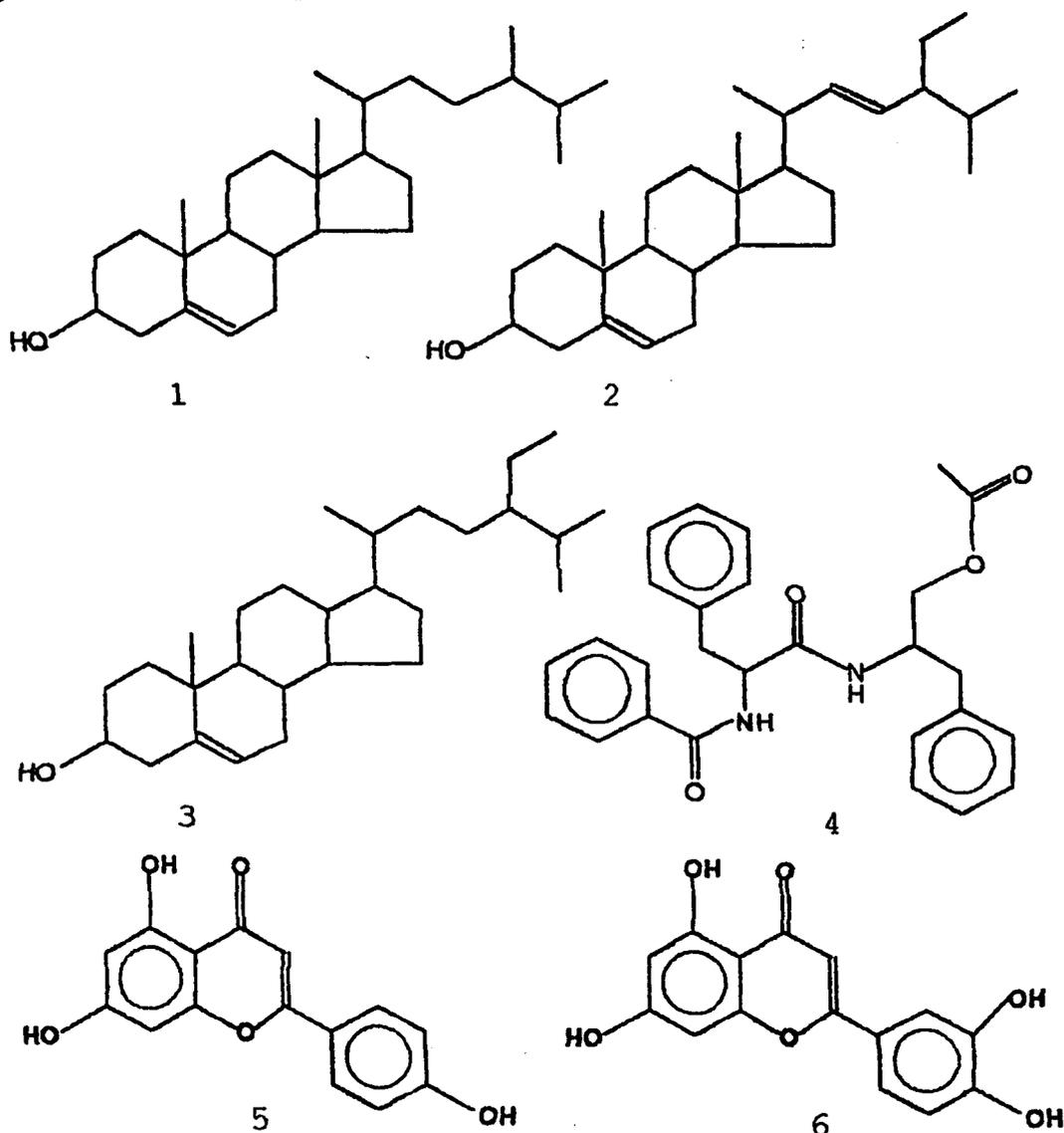


Fig. 30: compostos identificados a partir de extra_{tos} de *leonotis nepetaefolia*.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Petit, G. R.; Klinger, H. N-O.; Jorgensen, N. e Occolowitz, J.. Phytochemistry, **5**, 301 (1966);
2. Von Dreele, R. B.; Pettit, G. R.; Ode, R. H.; Perdue Jr., R. E.; White, J. D. e Manchand, P. S.; J. American Chem. Soc., **97**, 6236 (1975);
3. Blount, J. F. e Manchand, P. S.; J. C. S. Perkin I, 264 (1980);
4. Gonzalez, A. G.; Breton, J. L.; Fraga, B. M. e Luis, J. G.; Tetrahedron Letters, **33**, 3097 (1971);
5. Zinchenko, T. V. e Bandyukova, V. A.; Farm. Zh., **24**(1), 49 (1969);
6. Volmer, H.; Arch. Exptl. Path. Pharmacol., **176**, 207 (1934);
7. Purushothaman, K. K.; Vasanth, S.; Conolly, J. D. e Labbé, C.. J. C. S. Perkin I, 2594 (1976);
8. Corrêa, M. P.. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal; 1984, Vol. III, p. 405.;
9. Purushothaman, K. K.; Vasanth, S. e Connolly, J. D.. J. C. S. Perkin I, 2661 (1974);
10. White, J. D. e Manchand, P. S.. J. Org. Chem., **38**, 720 (1973);
11. Manchand, P. S.; Tetrahedron Letters, **21**, 1907 (1973);
12. Calixto, J. B. et alii; Anais da 40ª Reunião Anual da SBPC. 873 (1988);
13. Rae, G. A. et alii; Anais do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. **6/9**, 41 (1988);
14. Stahl, E. e Kaltenbach, U.; J. Chromatog., **5**, 351 (1961);
15. Lisboa, B. P.; J. Chromatog., **16**, 136(1964);

16. Takeda, K.; Hara, S.; Wada, A. e Matsumoto, N.. J. Chromatog., **11**, 562 (1963);
17. Tschesche, R.; J. Chromatog., **5**, 217 (1961);
18. Barton, G. M.; Evans, R. S. e Gardner, J. A. F.; Nature, **170**, 249 (1952);
19. Gillio-Tos, M.; Previtera, J. A. e Vimercati, A.; J. Chromatog., **13**, 571 (1964);
20. Brante, G.; Nature, **163**, 651 (1949);
21. Barret, G. C.; nature, **194**, 1171 (1962);
22. White, J. D. e Manchand, P. S.; J. C. S. Chemical Communications, 1315 (1969);
23. Patt, S. L. e Shoolery, J. N.; J. Magn. Resson., **46**, 353 (1982).
24. A.-U.-Rahman. "Nuclear Magnetic Ressonance-Basic Principles". Springer-Verlag New York Inc., New York (1986).
25. Pizzolatti, M. G.. "Constituintes Químicos de Velósias Brasileiras e Reatividade Química de Diterpenos". Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, UFRJ, IQ; 1992.
26. Nakanishi, K.. "Infrared Absortion Spectroscopy". 2ed.; Holden-Day, Inc.; San Francisco (1977).
27. Jakupovic, J.; Chen, Z.-L. e Bohlmann, F.; Phytochemistry, **26**, 2777 (1987).
28. Cox, K. E.; Chexal, K. K. e Holker, J. S. E.; J. Chem. Soc. Perkin I", 578 (1976).
29. Wagner, H. e Chari, V. M.; Tetrahedron Letters, **21**, 1799 (1976).
30. Carneiro, E.. "Identificação de Glicosídeos na Hymenaea martiana, Hayne, Arzeik. Estruturas e Atividade Farmacológica". Tese de Mestrado. UFSC, Santa Catarina (1986).
31. Niero, R. et alii. Livro de Resumos da 17ª Reunião Anual da SBQ. SA - 16 (1994).
32. Buckingham, J.. Dictionary of Organic Coumpounds. 5 ed., Chapman and Hall. New York. 607 (1987). Quinto Suplemento.