

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Metabólitos Especiais Isolados de Raízes e Folhas de *Brachiaria humidicola*

Débora Ramos de Oliveira

2015



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

“Metabólitos Especiais Isolados de Raízes e Folhas de *Brachiaria humidicola*”

DÉBORA RAMOS DE OLIVEIRA

Sob a orientação do Professor
Dr. Mario Geraldo de Carvalho

e Co-orientação do Professor
Dr. Raimundo Braz Filho

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestrado em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em química, Área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

Seropédica-RJ

Abril de 2015

Aos meus pais Antonio e Édila

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter nascido em um lar amoroso e por ter me dado pais que sempre me incentivaram a estudar e ir além de suas próprias conquistas.

Agradeço a oportunidade que o prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho e o prof. Dr. Raimundo Braz Filho me deram de aprender sobre a química dos produtos naturais, por sua paciência e dedicação no ensino e o apoio nos momentos difíceis.

À professora Dra. Rosane Nora Castro, que colaborou nas análises de CLAE além do carinho e disponibilidade.

Ao professor Dr. Norberto Peporini da Faculdade de Farmácia da USP- Ribeirão Preto por possibilitar a realização de análises CL-EM-IES e EM-EM.

Ao professor Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva do Centro de Ciências da Saúde-UFRJ, que colaborou com algumas análises de CL-EM.

Aos técnicos do ICE-UFRRJ, Maurício, Carlão, Francis, Fábio e Vitor que com sua dedicação contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório (Tereza, Eduardo, Queli, Mirza, Marcelo, Ana Paula, Renata, Carlos Henrique, Jonas, Kamilla, Ilzenayde, Ilna, Viviana, Vinícius, Juliana, Ana Lúcia, Lisieux, Carolina e Alan) que tornaram cada dia de trabalho mais divertido por suas companhias e auxílio sempre que possível.

Ao Dr. Delci de Deus Nepomuceno pela orientação Zootécnica.

À aluna de iniciação científica do LQPN Ana Lúcia que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos familiares e amigos que entenderam que em alguns momentos ausentes foram necessários para hoje ver concluído esse trabalho.

OLIVEIRA, Débora Ramos. **Metabólitos Especiais Isolados de Raízes e Folhas de *Brachiaria humidicola***. 2015. 108p. Dissertação (Mestrado em Química, Química de Produtos Naturais). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

As espécies do gênero *Brachiaria* são oriundas da África, são plantas típicas de clima tropical que tiveram excelente adaptação em diferentes solos do Brasil. Apresentam grande importância na agropecuária do país por serem utilizadas na produção extensiva de gado de corte ou leite. As espécies do gênero *Brachiaria* são conhecidas pelo seu alto efeito alelopático, atribuído a derivados do ácido cinâmico, e por produzirem saponinas esteroidais que causam fotossensibilização hepatotóxica em ruminantes. Este trabalho teve como objetivo identificar metabólitos especiais produzidos pelas folhas e raízes da espécie *B. humidicola*, através de análise dos extratos obtidos através de extração com maceração à temperatura ambiente e fracionamento dos extratos através de partição com solventes e uso de técnicas cromatográficas, incluindo colunas abertas de adsorção e exclusão, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia a gás. A identificação das substâncias foi feita com análises de espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas e comparação com dados da literatura. Do extrato de folhas de *B. humidicola* foram identificados os ácidos 2-hidroxi-3-metoxibenzoico, ácido *trans*-4-hidroxicinâmico e ácido *para*-hidroxibenzoico, 2,3-diidrobenzofurano e os flavonoides isorhamnetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-glicuronato de metila, quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e tricina (5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-flavona). Do extrato de raízes foram isoladas duas saponinas esteroidais, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(4'-1'')-*O*- α -L-ramnopiranosil-(2'-1''')-*O*- α -L-ramnopiranosil-25(*S*)-espirosta-5-eno e penogenina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(2'-1'')-*O*- α -L-ramnopiranosil-(4'-1''')-*O*- α -L-ramnopiranosídeo; e um flavanol identificado como catequina-7-*O*- β -D-glicopiranosídeo. Esses ácidos e saponinas esteroidais pertencem a classes de metabólitos especiais já identificados em espécies de *Brachiaria*. Entretanto os flavonoides, diidrobenzofurano e a saponina do tipo penogenina estão sendo relatadas pela primeira vez neste gênero.

Palavras-chave: *Brachiaria humidicola*, saponina esteroidais, penogeninas, flavonoides.

OLIVEIRA, Débora Ramos. **Special Metabolites Isolated from the leaves and Roots of *Brachiaria humidicola***. 2015. 108p. Dissertation (Magister in Chemistry, Chemistry of Natural Products). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Rural, Seropédica, RJ, 2015.

The species of *Brachiaria* genus are originally from Africa, they are typically of tropical climate that had excellent adaptation in different kinds of Brazilian soil. They have great importance in the country for agricultural use in the extensive production of cattle cutting or milk. The species of the genus *Brachiaria* are known for their high allelopathic effect owing to the presence of cinnamic acid derivatives, and the production of steroidal saponins that cause photosensitivity hepatotoxic in ruminant. This study aimed to identify special metabolites produced by the leaves and roots of *B. humidicola*. It was made by the analysis of extracts obtained by maceration at room temperature, and fractionation by solvent partition and chromatographic techniques including open column of adsorption and exclusion, high-performance liquid chromatography, and gas chromatography. The identification of compounds was done by ^1H and ^{13}C NMR, and mass spectrometry and comparison with literature data. From the leaves extracts of *B. humidicola* were identified 2-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid, *trans*-4-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, 2,3-dihydrobenzofurane, besides the flavonoids isorhamnetin-3-*O*- β -D-glucoside, quercetin-3-*O*- β -D-glucuronic acid methyl ester, quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside and tricetin (5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy flavone). From the extract from the roots were isolated two steroidal saponins, 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(4'-1'')- α -L-rhamnopyranosyl-(2'-1''')- β -D-glucopyranosyl-25(S)-spirost-5-en and penogenin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosil (4'-1'')- α -L-rhamnopyranosil-(2'-1''')- β -D-glucopyranoside, and the flavanol 7-*O*- β -D-glucopyranosil-catechin. The identified compounds, such as acids and steroidal saponins, belong to special metabolites classes that have been identified in *Brachiaria* genus, however flavonoids and saponin type penogenin are being reported for the first time in this genus.

Keywords: *Brachiaria humidicola*, saponin, penogenin, flavonoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias identificadas e/ou com atividade presentes nas espécies de <i>Brachiaria</i>	7
Figura 2: Estruturas das saponinas protodioscina.	10
Figura 3: Cromatograma da fração BHRMA 120-124 (4).....	19
Figura 4: Cromatograma da fração BHRMA 12-14.	21
Figura 5: Substâncias isoladas de folhas e raízes de <i>Brachiaria humidicola</i>	23
Figura 6: Estrutura das substâncias 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (1), ácido trans-4-hidroxicinâmico (2), ácido 4-hidroxi-benzóico (3) e 2,3-diidrobenzofurano (4).	24
Figura 7: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 1 , 2 , 3 e 4	26
Figura 8: Expansão do espectro RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 1, 2, 3 e 4, de 6,1 a 8,0 ppm.	26
Figura 9: Espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 1, 2, 3 e 4.	26
Figura 10: Mapa de contorno de COSY (500MHz, DMSO-d ₆) da substância 1, 2, 3 e 4.	27
Figura 11: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500 / 125MHz, DMSO-d ₆) da substâncias 1, 2, 3 e 4 de 6,25 a 8,0ppm.	28
Figura 12: Expansão mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substâncias 1, 2, 3 e 4, de 6,0 a 7,1ppm.	29
Figura 13: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substâncias 1, 2, 3 e 4, de 7,35 a 7,85ppm.	30
Figura 14: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substâncias 1, 2, 3 e 4, de 3,5 a 8,0ppm.	31
Figura 15: Cromatograma da fração que contém as substâncias 1, 2, 3 e 4.....	31
Figura 16: Espectro de massas do sinal com Tr: 15.758 min e a comparação com a literatura, substância 1.	32
Figura 17: Espectro de massas do sinal com Tr: 8.729 min e a comparação com a literatura, 4.	33
Figura 18: Isorhamnetina 3- <i>O</i> - β-D-glicosídeo (5) e Quercetina 3- <i>O</i> -β-D- glucuronato de metila (6).	34
Figura 19: Expansão do espectro RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 5 e 6.....	36
Figura 20: Expansão do espectro RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 5 e 6, de 6,2 a 7,95 ppm.	36
Figura 21: Expansão do espectro RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 5 e 6, de 3,0 a 5,55 ppm.	36
Figura 22: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 5 e 6, de 144 a 178ppm.	37

Figura 23: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 5 e 6, de 94 a 133 ppm.....	37
Figura 24: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 5 e 6, de 52 a 78 ppm.....	37
Figura 25: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e 6 , de 3,1 a 4,0 ppm.	38
Figura 26: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e 6 , de 5,0 a 8,5 ppm.	38
Figura 27: Mapa de contorno RMN- COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e 6.	39
Figura 28: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e 6 , de 6,0 a 13,0ppm.	40
Figura 29: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e 6 , de 2,75 a 6,0 ppm.	41
Figura 30: Estrutura do 3,7-di- <i>O</i> - α -L- ramnopiranosilcanferol (7).....	42
Figura 31. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 7.....	44
Figura 32: Expansão do espectro DEPTQ (100 MHz, CD ₃ OD) da substância 7, de 16 a 176 ppm. ...	44
Figura 33: Mapa de contorno RMN- COSY (400 MHz, CD ₃ OD) da substância 7.	45
Figura 34: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (400/ 100 MHz, CD ₃ OD) da substância 7, de 5,25 a 8,0ppm.	46
Figura 35: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (400/ 100 MHz, CD ₃ OD) da substância 7, de 1,0 a 4,5ppm.	46
Figura 36: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (400/ 100MHz, CD ₃ OD) da substância 7, de 6,25 a 8,0ppm.	47
Figura 37: Expansão do espectro RMN- HMBC (400/ 100MHz, CD ₃ OD) da substância 7, de 1,0 a 6,0ppm.....	48
Figura 38: Espectro de massas de alta resolução da substância 7.....	49
Figura 39: Estrutura do 5,7,3',4'-tretrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona (8).....	50
Figura 40. Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, CD ₃ OD) da substância 8, de 8 à 152 ppm.	52
Figura 41: Expansão do espectro RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 8, de 0,5 a 7,6 ppm...	52
Figura 42: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 8.	53
Figura 43: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD ₃ OD) da substância 8, de 1,0 a 4,5 ppm.	53
Figura 44: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, MeOD ₃) da substância 8, de 6,5 a 8,0 ppm.	54
Figura 45: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, CD ₃ OD) da substância 8, de 5,1 a 6,7ppm.....	55

Figura 46: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, CD ₃ OD) da substância 8, de 0,95 a 5,5ppm.	56
Figura 47: Estrutura da Tricina (9).	57
Figura 48: Expansão do espectro de RMN ¹ H (500MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 9, de 0,0 a 13,0ppm.	58
Figura 49: Expansão do espectro de DEPTQ (125MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 9, de 54 a 175ppm.	58
Figura 50: Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz. CD ₃ COCD ₃) da substância 9, de 4,0 a 7,5ppm.	59
Figura 51: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 9, de 3,5 a 13,5ppm.	59
Figura 52: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (125 e 500MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 9, de 5,5 a 7,8ppm.	60
Figura 53: Mapa de contorno NOESY (500 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 9.	61
Figura 54: Estrutura da saponina 3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-[(4-1)- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosil-(2-1)- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosil]-25(<i>R</i>)- espirosta-5-eno (10).	63
Figura 55: Expansão do espectro RMN ¹ H (500MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 2.0 a 7,0 ppm.	65
Figura 56: Expansão do espectro RMN ¹ H (500MHz, piridina-d ₅) da substância 10 , de 0,0 a 3,5 ppm.	65
Figura 57: Expansão do espectro DEPTQ (125MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 10,0 a 150,0ppm.	65
Figura 58: Expansão do mapa de contorno RMN-COSY (500 MHz) da substância 10, de 0,8 a 7,0 ppm.	66
Figura 59: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500 / 125MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 0 a 2,5ppm.	67
Figura 60: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500 / 125MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 3,5 a 6,5ppm.	68
Figura 61: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500 / 125MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 2.5 a 4.75ppm.	69
Figura 62: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC(500/ 125MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 4,75 a 7,25ppm.	70
Figura 63: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 0,9 a 2,2ppm.	71
Figura 64: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, piridina-d ₅) da substância 10, de 0,25 a 1,5ppm.	72
Figura 65: Espectro de massas de alta resolução da substância 10.	73

Figura 66: Estrutura da Penogenina-3 β - O- β -D-glicopiranosil-[(2-1)-O- α -L-ramnopiranosil-(4- 1)-O- α -L-ramnopiranosil (11).....	75
Figura 67: Expansão do espectro RMN1H (125Hz, piridina-d ₅) da substância 11, de 3,5 a 6,5ppm. .	77
Figura 68: Expansão do espectro RMN1H (125Hz, piridina-d ₅) da substância 11, de 0,6 a 2,8ppm. .	78
Figura 69: Expansão do espectro DEPTQ (125Hz, piridina-d ₅) da substância 11, de 10 a 140ppm. .	78
Figura 70: Expansão do mapa de contorno RMN-COSY (500 MHz) da substância 11, de 0,8 a 7,0 ppm.....	79
Figura 71: Expansão do espectro RMN-HSQC (500/125 MHz, piridina-d ₅) da substância 11, de 3,5 a 6,5 ppm.....	80
Figura 72: Expansão do espectro RMN-HSQC (500/125 MHz, piridina-d ₅) da substância 11, de 0,5 a 3,0 ppm.....	81
Figura 73: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (125 e 500MHz, piridina-d ₅) da substância 11, de 0,5 a 2,0ppm.	82
Figura 74: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, piridina-d ₅) da substância 11, de 2,0 a 4,1ppm.	83
Figura 75: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, piridina-d ₅) da substância 11, de 4,0 a 5,5ppm.	84
Figura 76: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, piridina-d ₅) da substância 11, de 5,5 a 6,8ppm.	85
Figura 77: Espectro de massas de alta resolução da substância 11.....	86
Figura 78: Catechin-7-O- β -D-glucoopyranosideo (12).	88
Figura 79: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 12.....	89
Figura 80: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 12, de 112 a 160 ppm.	90
Figura 81: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 12, de 25 a 102,5ppm.	90
Figura 82: Mapa de contorno de COSY (500MHz, DMSO-d ₆) da substância 12.	91
Figura 83: Expansão do mapa de contorno RMN-HSQC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substância 11, de 2,4 a 4,2ppm.	92
Figura 84: Expansão do mapa de contorno RMN-HSQC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substância 11, de 4,25 a 7,75ppm.	93
Figura 85: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substância 11, de 3,25 a 5,5ppm.	94
Figura 86: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125MHz, DMSO-d ₆) da substância 12, de 5,2 a 7,75ppm.	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Produção da filoeitrina.....	10
Esquema 2: Partição do extrato BHFM.....	14
Esquema 3: Partição do extrato BHRM.....	15
Esquema 4: Partição do extrato BHFMH ₂ O.....	15
Esquema 5: Fracionamento do extrato BHFMH ₂ OA.....	17
Esquema 6: Fracionamento do extrato BHFM.....	18
Esquema 7: Fracionamento do extrato BHRMA.....	20
Esquema 8: Fracionamento da segunda porção do extrato BHRMA.....	22
Esquema 9: Proposta de fragmentação da substância 1.....	32
Esquema 10: Proposta de fragmentação de massas da substância 7.....	49
Esquema 11: Proposta de fragmentação justificando as perdas das unidades de açúcar da substância 10.....	74
Esquema 12: Proposta de fragmentação justificando as perdas das unidades de açúcar da substância 11.....	87
Esquema 13: Rota biossintética para flavonoides e estilbenos (DEWIC, 1998).....	105
Esquema 14: Rota biossintética para ácidos cinâmicos (DEWIC, 1998).....	106
Esquema 15: Rota biossintética para triterpenos do tipo saponinas , diosgenina , yamogenina e protodioscina (DEWICK, 1998).....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistema de eluição empregado na análise da fração BHRMA 12-14.....	21
Tabela 2: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 1 e comparação com valores da literatura.....	24
Tabela 3: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 2 e comparação com valores da literatura.....	25
Tabela 4: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 3 e comparação com valores da literatura.....	25
Tabela 5: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da substância 5 em comparação com dados da literatura.....	34
Tabela 6: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da substância 6 em comparação com dados da literatura.....	35
Tabela 7: Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da substância 7 em comparação com dados da literatura.....	43
Tabela 8: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C químicos da substância 8 e comparação com os dados da literatura.....	51
Tabela 9: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 9 e comparação com os dados da literatura.....	57
Tabela 10: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 10 e comparação com os valores da literatura.....	63
Tabela 11: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 11 e comparação com os valores da literatura.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D-	Unidimensional;
2D-	Bidimensional;
δ_{H} -	Deslocamento químico de hidrogênio (ppm);
δ_{C} -	Deslocamento químico de carbono (ppm);
λ -	Comprimento de onda;
AcOEt-	Acetato de Etila;
BHFH-	<i>Brachiaria humidicola</i> folha hexano;
BHFM.	<i>B. humidicola</i> folha metanol;
BHFMH-	<i>B. humidicola</i> folha metanol hexano;
BHFMD-	<i>B. humidicola</i> folha metanol diclorometano;
BHFMA-	<i>B. humidicola</i> folha metanol acetato de etila;
BHFMB-	<i>B. humidicola</i> folha metanol butanol;
BHFMH ₂ O-	<i>B. humidicola</i> folha metanol/ água;
BHRH-	<i>B. humidicola</i> raiz hexano;
BHRM-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol;
BHRMH-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol hexano;
BHRMD-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol diclorometano;
BHRMA-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol acetato de etila;
BHRMB-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol butanol;
BHRMH ₂ O-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol/ água;
BHRMH ₂ OH-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol/ água hexano;
BHRMH ₂ OD-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol/ água diclorometano;
BHRMH ₂ OA-	<i>B. humidicola</i> raiz metanol/ água acetato de etila;
BHRMH ₂ OB	<i>B. humidicola</i> raiz metanol/ água butanol;
CCD-	Cromatografia em camada delgada;
CCDA-	Cromatografia em camada delgada analítica;
CG-	Cromatografia gasosa;
CGAR-	Cromatografia gasosa de alta resolução;
CG-EM-	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas;

CLC-	Cromatografia líquida clássica;
CLAE-	Cromatografia líquida de alta eficiência;
CLAE-DAD-	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos;
CL-EM-IES-	Cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas com ionização por elétron spray;
COSY-	Correlation spectroscopy;
<i>d</i> -	Dupleto/ dubleto
<i>dd</i> -	Duplo dupleto/ duplo dubleto
D ₃ CCOCD ₃ -	Acetona deuterada;
DMSO- <i>d</i> ₆ -	Dimetilsulfóxido deuterado;
EM-	Espectrometria de massa;
FE-	Fase estacionária.
FM-	Fase móvel.
HMBC-	Heteronuclear multiple-bond correlation;
HSQC-	Heteronuclear single-quantum coherence;
Hz-	Hertz;
IV-	Infravermelho.
<i>J</i> -	Constante de acoplamento em Hertz;
<i>m</i> -	Multipleteo;
M ⁺ -	Íon Molecular;
MeOH-	Metanol;
Me-	Metila;
<i>m/z</i> -	Razão massa/ carga;
NOESY-	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
RMN ¹ H-	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
RMN ¹³ C-	Ressonância magnética nuclear de carbono.
<i>s</i> -	Singleto/ simpleto;
<i>sl</i> -	Singleto largo;
Tr-	Tempo de retenção;
TMS-	Tetrametilsilano
UV-	Ultravioleta.

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

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ESQUEMAS.....	v
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. Ordem Poaceae.....	3
3. 2. Gênero <i>Brachiaria</i> e o Consorciamento.....	4
3. 3 Química do gênero <i>Brachiaria</i>	5
3.4 Alelopatia	7
3.5 Fotossensibilização	9
4. PARTE EXPERIMENTAL	11
4.1 Equipamentos.....	11
4.2 Métodos cromatográficos utilizados em CLAE	11
4.3 Reveladores	11
4.4 Solventes	12
4.5 Adsorventes.....	12
4.6 Coleta do material vegetal.....	12
4.7 Preparação dos extratos.....	13
4.8 Partição líquido-líquido.....	13
4.9 Isolamento e Purificação dos Metabólitos Especiais dos Extratos das Folhas.....	16
4.9.1 Fracionamento cromatográfico de BHF ₂ MH ₂ OA.....	16
4.9.2 Fracionamento cromatográfico de BHFMA.....	17
4.10 Isolamento e Purificação dos Metabólitos Especiais dos Extratos das Raízes.....	18
4.10.1 Purificação da fração BHRMA	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Identificação das substâncias 1, 2, 3 e 4 isoladas de BHF ₂ MH ₂ OA	23
5.2. Identificação das substâncias 5 e 6 isoladas de BHF ₂ MH ₂ OA	33
5.3. Identificação da substância 7 isolada de BHF ₂ MH ₂ OA	42
5.4. Identificação da substância 8 isolada de BHFMA	50
5.5 Identificação da substância 9 isolada de BHFMA	57

5.6. Identificação das substâncias obtidas de BHRMA.....	61
5.6.1 Identificação da substância com TR: 5,801 (substância 10)	62
5.6.3 Identificação da substância com Tr: 3,064 (substância 11).....	74
5.7 Identificação da substância 12.....	87
7. CONCLUSÃO.....	96
8. BIBLIOGRAFIA	97
9. ANEXO.....	105

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma área de mais de 220 milhões de hectares de pastagens, e um rebanho bovino de aproximadamente 195 milhões de cabeças. Da área total de pastagens, cerca de 100 milhões de hectares correspondem a espécies cultivadas na sua região tropical, formadas principalmente por espécies do gênero *Brachiaria* (MACEDO, 2005).

De modo geral, se devidamente manejadas e adubadas, essas pastagens podem apresentar boa persistência e inclusive elevar o seu nível de produtividade, permanecendo sustentáveis por muitos anos (ZIMMER & CORREIA, 1999). Entretanto, o que tem sido observado com maior frequência, é que, após poucos anos de uso, as pastagens sofrem um declínio em produtividade, seguido por uma invasão de plantas daninhas, surgimento de áreas descobertas e encrostamento do solo (MACEDO, 2005). Esse processo, indicativo de um estado de não sustentabilidade, é conhecido como degradação das pastagens. Estimativas recentes indicam que os processos de degradação afetem mais de 60% das pastagens cultivadas do país (IBGE, 2003), causando elevadas perdas econômicas à produção pecuária nacional (OLIVEIRA, 2000).

De acordo com ZIMMER & CORRÊA, 1999, a degradação é consequência da má formação da pastagem, de práticas de manejo inadequadas e também da não adoção de práticas de adubação de manutenção e conservação do solo. Pesquisas têm mostrado que os baixos níveis de nutrientes disponíveis nos solos tropicais contribuem para o agravamento do problema. O nitrogênio (N) representa um papel relevante nesse aspecto, pois é considerado o principal nutriente para a manutenção da produtividade das gramíneas forrageiras, sendo que a maioria dos solos tropicais possui quantidades insuficientes deste nutriente (SÁNCHEZ, 1976; WENZL et al., 2003). Sendo assim, a reversão da degradação das pastagens implica, entre outras medidas, no estabelecimento de estratégias de reposição dos nutrientes em deficiência. Sabe-se que o aumento da disponibilidade de nitrogênio nos ecossistemas pastoris, pode ser obtido pela aplicação de fertilizantes nitrogenados, ou pela consorciação das gramíneas com leguminosas forrageiras, dada a capacidade dessas plantas para fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico. Todavia, os altos requerimentos desse nutriente por parte das gramíneas forrageiras, aliado à enorme área cultivada, são fatores que inviabilizam, economicamente, uma estratégia de recuperação baseada exclusivamente no uso de adubação de origem industrial. Já o uso de pastagens consorciadas, entre gramíneas e leguminosas, supõe uma via biológica de introdução de nitrogênio no sistema produtivo, através dos mecanismos de transferência do N₂ atmosférico via bactérias do gênero *Rhizobium*.

Todavia, todos esses benefícios, que apontam na direção do aumento da rentabilidade e da sustentabilidade das pastagens consorciadas, poucas vezes são efetivamente realizados, uma vez que a utilização de leguminosas nas pastagens brasileiras continua insignificante. Várias razões podem justificar esse fato, incluindo as tentativas fracassadas no passado, mas atualmente, a visão predominante é que a não adoção dessa tecnologia é devida, principalmente, à baixa persistência das leguminosas tropicais nas pastagens. Tal fato, realmente pode vir a desencorajar até a continuidade das pesquisas necessárias ao lançamento de novos materiais, conforme observação de PEREIRA, 2002.

O consórcio entre gramíneas e leguminosas envolve duas espécies com características morfofisiológicas distintas (ZIMMER, 1987), com taxas diferenciadas de crescimento. Como é usual no caso onde duas ou mais espécies são cultivadas num mesmo agrossistema, relações de competição por fatores de crescimento, se estabelecerão entre elas, em um prazo mais ou menos curto, cujo resultado dependerá da habilidade competitiva de cada uma (MATTOS & PEDREIRA, 1984).

Até recentemente, a instabilidade verificada nos ecossistemas de pastagens cultivadas era atribuída à competição por água, luz e nutrientes; às diferenças morfológicas e as dificuldades de se manejar grupos de plantas fisiologicamente diferentes. Entretanto, atualmente, existe a concepção de que uma planta pode interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento de outras em seu entorno, através de produção de substâncias que são liberados para o meio ambiente, fenômeno esse que Molish, em 1937, denominou alelopatia. Por definição, o termo, em si, engloba tanto os efeitos detrimenais como os estimulatórios e leva em conta a participação dos micro-organismos do solo (RICE, 1984). Nesse contexto, essas informações indicam que forrageiras do gênero *Brachiaria* possuem atividade alelopática potencial, resultando na inibição da germinação de sementes e alongamento da radícula em diferentes espécies (REZENDE et al., 2003). Essas informações sugerem também que algumas espécies possuem uma maior habilidade competitiva em condições de pastagens consorciadas, provavelmente devido às suas potencialidades alelopática (STANIZIO et al., 1991).

Esta hipótese está fundamentada na existência de mecanismos usados por algumas espécies vegetais, liberando ao ambiente, substâncias de diferentes classes de metabólitos especiais, denominadas genericamente aleloquímicos ou metabólicos secundários, gerando alguma interação com outras espécies da sua vizinhança. A capacidade de produzir e utilizar tais substâncias, geralmente outorga às espécies doadoras, vantagens na obtenção de fatores abióticos de crescimento, como luz, nutrientes e água (RICE, 1984).

Dentro deste contexto os zootecnistas e demais profissionais da agropecuária carecem de conhecimentos sobre a química das espécies que utilizam como pastagem, no caso informações sobre espécies do gênero *Brachiaria* assim como citadas acima, são muito usadas no país como pastagem. Estas questões têm aproximado esses profissionais à química de produtos naturais, por isso, além das expectativas de descobrir as razões das espécies de *Brachiaria* dominarem o meio onde são cultivadas, inibindo o desenvolvimento de outras espécies e, inclusive, dificultando o consorciamento, há necessidade do conhecimento da química destas gramíneas em termos dos metabólitos especiais. Os fatores relatados acima justificam a proposta deste trabalho cuja etapa inicial é conhecer os metabólitos secundários presentes nas espécies de *Brachiaria*, e neste caso o estudo fitoquímico de *B. humidicola*.

2. OBJETIVOS

Isolar metabólitos especiais das folhas e raízes de *Brachiaria humidicola* através da purificação de extratos obtidos por maceração a frio, fracionando-os com o uso de técnicas cromatográficas clássicas e de alta eficiência. Caracterizar as substâncias isoladas por técnicas espectroscópicas como RMN ^1H e ^{13}C e EM.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Ordem Poaceae

Poaceae (Gramineae), pertencente à ordem Poales, que está dividida em 12 subfamílias: Anomochlooideae, Pharoideae, Puelioideae, Bambusoideae, Ehrhartoideae, Pooideae, Aristidoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Centothecoideae, Panicoideae e Danthonioideae (VIANA & LOMBARDI, 2007).

As gramíneas representam o componente básico de diversos ecossistemas terrestres, desempenhando papéis ecológicos diversos e contribuindo significativamente com a biodiversidade local. Ecossistemas savânicos tropicais, como o Cerrado brasileiro e a savana africana, caracterizam-se pelo extrato herbáceo composto por um tapete graminoso, que ocupa biomassa expressiva, base da cadeia alimentar (JACOBS et al., 1999; SHAW, 2000). Nesses ecossistemas verificasse altíssima diversidade de espécies de Poaceae que se destaca como uma das mais importantes famílias na sua composição florística (HAASE & BECK, 1989; DAVIS et al., 1994; MENDONÇA et al., 1998).

Estudo sobre a diversidade agrostológica brasileira, BURMAN (1985) citou 1368 espécies de gramíneas para o Brasil. Este estudo seminal precisa ser atualizado, uma vez que

nos últimos 20 anos, táxons novos foram descritos e diversas novas citações foram registradas para o Brasil. Grande parte da diversidade de gramíneas no Brasil concentra-se nos domínios fitogeográficos do Cerrado, Pampa e Mata Atlântica (BURMAN, 1985). A Amazônia e a Caatinga carecem de inventários significativos com enfoque à família Poaceae para que se tenha uma noção mais concreta da sua diversidade agrostológica.

3. 2. Gênero *Brachiaria* e o Consorciamento

O gênero *Brachiaria* tem fornecido importantes espécies de forrageiras para as regiões tropicais tanto na África e Austrália, e, mais recentemente na América do Sul. Nestas áreas, espécies de *Brachiaria*, formam pastagens que se adaptam às mais variadas condições de solos, desenvolvendo-se desde solos úmidos e férteis, como a *B. purpurascens*, até os solos pobres de Cerrado sujeitos a secas estacionais, como a *B. decumbens*.

Dentro do gênero *Brachiaria*, sete espécies são bastantes empregadas como recurso forrageiro na América Tropical (KELLER-GREIN et al., 1996; VALLE et al., 2010); são elas *B. arrecta* (Hack.) Stent, *B. bizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, *B. decubens* Stapf, *B. dictyoneura* Stapf, *B. humidicola* (Rendie) Schweickhardt, *B. mutica* (Forsk) Stapf e *B. ruziziensis* R Germ. & Evard. Dentre estas as mais utilizadas no Brasil são a *B. decubens*, *B. bizantha* e *B. humidicola*; cada uma delas com exigências nutricionais diferenciadas, não somente devido aos fatores genotípicos e de fenologia, mas pela interação destes com fatores do solo, clima e sistema de manejo adotado (FERRAZ, 2003; PERON & EVANGELISTA, 2004). Apesar de boa adaptabilidade mostrada por este gênero evidenciada pelo elevado vigor e alta produtividade de fitomassa nos primeiros anos de implantação observam-se, com o passar dos anos, um processo de declínio de produtividade vegetal. Esse declínio é chamado de degradação de pastagem e as suas causas podem estar associadas ao manejo inadequado, superlotação e a não adoção de práticas conservacionistas da sustentabilidade das pastagens, especialmente a não reposição dos nutrientes extraídos do sistema (BODDEY et al., 1993; ZIMMER & CORREA, 1999).

Para evitar essa degradação natural uma das ferramentas é a incorporação de nitrogênio no solo que pode ser feito por adubação ou por um processo biológico. A principal fonte biológica é a consorciação de espécies leguminosas, que conseguem transferir N₂ atmosférico via bactérias do gênero *Rizobium*. Com a inclusão de uma leguminosa em um campo de gramínea pura, ocorre uma melhor distribuição da produção anual de forragem em oferta, devido

a maior tolerância à seca que mostram algumas espécies de leguminosas usadas em consórcio, em relação às gramíneas forrageiras (KLUSMANN, 1988).

Há muito tempo sabe-se que as famílias *Fabaceae* e *Poaceae* possuem características morfológicas, anatômicas e fisiológicas distintas que tornam difícil o seu desenvolvimento em conjunto. Uma diferença básica está na eficiência fotossintética, uma vez que as leguminosas possuem a via C3 (ciclo fotossintético de fixação de carbono) enquanto que as gramíneas tropicais são do tipo C4, o que determina maiores taxas de crescimento nas monocotiledôneas (LACHER, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2009). Da mesma forma, a pesquisa tem identificado e contrastado diferenças, entre as interações (interferências) por fatos abiótico (competição) ou bióticos (interação entre plantas) (FERREIRA & BORGHETTI, 2004). A interferência biótica é aquela onde a planta (doadora) produz metabólitos que podem provocar efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial, na germinação e crescimento de outras plantas adjacente (receptoras) (RICE, 1984; DEUBER, 1992; KOBAYASHI, 2004; LARA-NUNEZ et al., 2009).

3.3 Química do gênero *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* tem sido bastante estudado em função de sua alta empregabilidade no campo na alimentação animal. A maioria dos trabalhos realizados são em relação ao seu valor nutricional, composição de minerais (Ca, Mg, P, K), teor de fibras e proteína. Em função das propriedades alelopáticas apresentadas por seus extratos e casos de fotossensibilização hepatotóxica causados em ruminantes que consomem estas gramíneas, o estudo dos metabólitos secundários produzidos por essas plantas têm aumentado. As espécies *B. decumbens* e *B. bizantha* são mais estudadas em função de seu maior uso na pecuária.

Em relação ao estudo fitoquímico das espécies de *Brachiaria* a maioria está voltada para a identificação de saponinas esteroidais e triterpênicas que são responsáveis pela intoxicação dos animais que as consomem.

Os estudos realizados por PIRES et al., 2002 com as folhas de *B. decumbens* identificaram a presença de saponinas esteroidais e saponinas na partição butanólica do extrato metanólico. No trabalho foram identificadas as seguintes saponinas 3- β -metóxi-lanost-9(11)-eno, diosgenina, yamogenina, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-24(*S*)-etil-22*E*-deidrocolesterol, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-24(*R*)-etil-22*E*-deidrocolesterol, protodioscina e 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil-(1-4)-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)]- α -D-glicopiranosil}-25(*S*)-espirost-5-eno.

Em um trabalho apresentado na 34ª RA SBQ (FREITAS et. al., 2011) apresentou a seguinte composição para a partição n-butanol do extrato hidrometanólico das folhas de *Brachiaria humidicola*, identificaram a presença de quatro saponinas com esqueleto furostânico, a protodioscina e a metilprotodioscina, pela primeira vez identificadas nas folhas da espécie além de duas outras, o costusosideo-I e costusosídeo-J.

BRUM et al., 2009 quantificaram saponinas do tipo protodioscina nas folhas das espécies de *B. decumbens* e *B. bizantha* por espectrofotometria, a partir do extrato etanólico das folhas, a partição butanólica foi submetida a cromatografia em camada fina eluída em clorofórmio: metanol: água (16:9:2) e revelada com ácido sulfúrico 10% e reagente de Ehrlich, a determinação do percentual de saponina foi feito em comparação com o padrão previamente isolado a protodioscina. Neste trabalho conclui-se que o período de maior concentração de saponinas nas folhas ocorre quando a planta está no período de liberação de sementes, o estágio maduro da planta seria o período de maior intoxicação nos ruminantes.

Um estudo com interesse de identificar os compostos liberados no solo foi feito avaliando os exsudatos das raízes de *B. ruziziensis* e *B. decumbens*, os extratos metanólicos obtidos de cada uma das espécies foram analisados por HPLC e neles foram identificados dois ácidos o ácido 1,3-di-O-trans-ferrulínico e sua versão sem uma metoxila, não especificada pelos autores, as plantas foram submetidas a condições de cultivo diferenciadas, em solo de alta e baixa fertilidade. O presente estudo determinou a quantidade de compostos fenólicos produzidos pelas plantas em função das mesmas condições do solo, a espécie *B. ruziziensis* apresentou maior produtividade tanto nos compostos fenólicos quanto dos ácidos identificados, a produção desses metabólitos foi maior quando a planta era cultivada em solo pobre do que em solo adubado (WENZL et al., 2003).

Em trabalhos de avaliação do potencial de aleloquímicos produzidos pelas raízes de *B. humidicola* sobre possível inibição de nitrificação no solo, ou seja, a ação de determinados compostos sobre bactérias que fazem a conversão de compostos como amônia e outras fontes de nitrogênio, disponibilizado através da adubação química, em nitrato que é absorvido pela *Brachiaria* e por outras espécies. As raízes de *B. humidicola*, submetidas às condições controladas de cultivo, foram submetidas à extração com solução metanólica 70%, e então uma partição líquido-líquido com acetato de etila, a fração apolar foi analisada por HPLC, nesta foi identificado os seguintes ésteres graxos: p-cumarato de metila e ferrulato de metila, os que apresentaram maior atividade inibitória da nitrificação, além de etil-p-coumarato, p-cumarato de propila, p-cumarato de butila, ácido ferrulico, ferrulato de etila, ferrulato de propila e ferrulato de butila que também foram ativos. (GOPALAKRISHMAN et al., 2007)

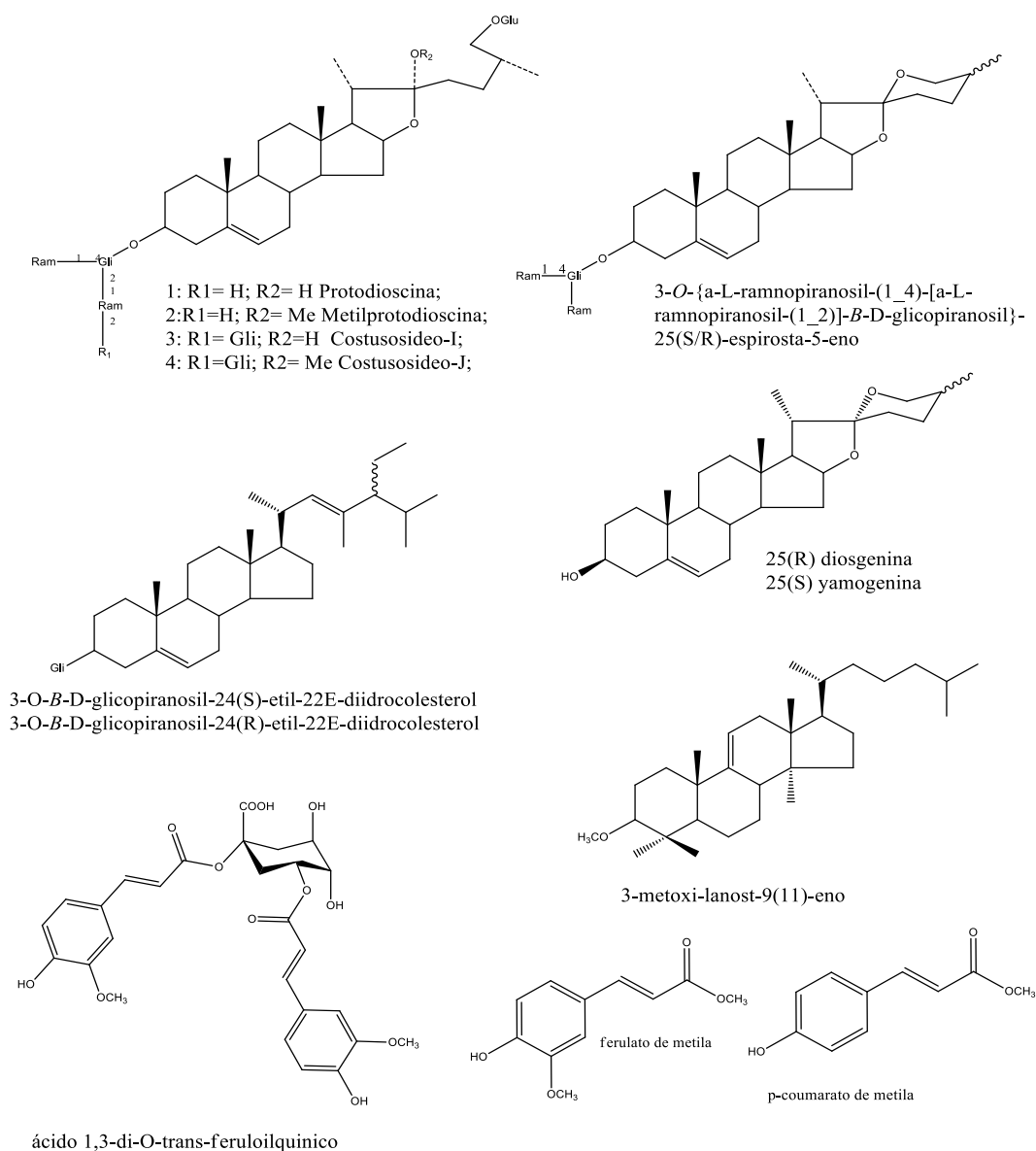


Figura 1: Substâncias identificadas e/ou com atividade presentes nas espécies de *Brachiaria*.

3.4 Alelopatia

Do ponto de vista etimológico do termo alelopatia significa prejuízo mútuo, um termo composto de duas palavras, "Allelon" ("um do outro") e "pathos" ("sofrimento") (MOLISH, 1937). A definição tradicional do fenômeno da alelopatia é descrito como "qualquer efeito direto ou indireto causado por uma planta (incluindo microrganismos) a outro por meio da produção de substâncias químicas que escapam para o meio ambiente". (RICE, 1984)

No espírito de muitas outras interações abrangem uma definição mais ampla é que desenvolvido pela Sociedade Internacional de alelopatia em 1996, definindo-o como "qualquer processo que envolve metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fun-

gos que, afetam o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas”. As plantas apesar de autotróficas são imóveis, não podendo por isso escapar dos ataques de inimigos. Por este motivo, a principal função dos aleloquímicos nas plantas é a proteção ou defesa contra o ataque de fitopatógenos e pragas ou invasão de outras plantas (WHITTAKER, 1970).

Os efeitos alelopáticos desenvolvidos pelas plantas estão diretamente ligados às formas de liberação de seus metabólitos no ambiente, sendo assim é possível classificar quatro possíveis técnicas, volatilização, lixiviação, decomposição e exsudação. Segundo RICE, 1984, a liberação de substâncias voláteis a partir de folhas afetam outras espécies presentes no ecossistema, a caracterização destes metabólitos voláteis se torna complexa pelo fato de se difundirem facilmente na atmosfera. O processo de lixiviação tem como veículo a água das chuvas e orvalho que ao percorrer folhas, galhos e caule levam consigo metabólitos solúveis que se encontram na superfície das mesmas, atingindo assim o solo e provocando o efeito alelopático (RICE, 1984). A decomposição do material orgânico por ação de micro-organismos leva também a liberação de substâncias no solo, tanto pela simples incorporação como pela modificação das substâncias pela transformação metabólica de micro-organismos. O Processo de exsudação consiste na liberação de metabólitos pela raiz, esse método de liberação é caracterizado como o mais potente em efeitos de inibição de desenvolvimento de outras espécies (ALMEIDA, 1998; MALHEIROS & PERES, 2001).

Em agrossistemas aleloquímicos têm efeito prejudicial sobre o crescimento da cultura de associados ou de culturas de próxima temporada (RICE, 1984). As ervas daninha também podem apresentar efeitos sobre a cultura e atrapalhar seu desenvolvimento (SINGH et al., 2001). Além de efeitos sobre outras plantas, os aleloquímicos produzidos por plantas invasoras também podem contribuir no controle de pragas e resistência a doenças, e posteriormente, conferir uma vantagem competitiva para o invasor (HARIBAL et al., 1998)

De acordo com as diferentes estruturas e propriedades os aleloquímicos podem ser classificados nas seguintes categorias: ácidos orgânicos solúveis em água, alcoóis de cadeia linear, aldeídos alifáticos e cetonas (RICE, 1984), lactonas insaturadas simples (WESTON, L.A. et al., 2003), ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos (ZENG et al., 2008); quinonas e benzoquinonas, antraquinonas (MOLISCH, 1937); fenólicos (SINGH et al., 2001); ácido cinâmico e seus derivados (CALLAWAY, 2002), cumarinas (RIDENOUR et al., 2001), flavonoides, taninos, esteroides e terpenoides (HARIBAL et al., 1998).

Cereais pertencentes à família *Poaceae* (gramíneas syn.) incluem importantes espécies para alimentação humana e animal, tais como trigo, cevada, aveia, arroz, milho, centeio ou

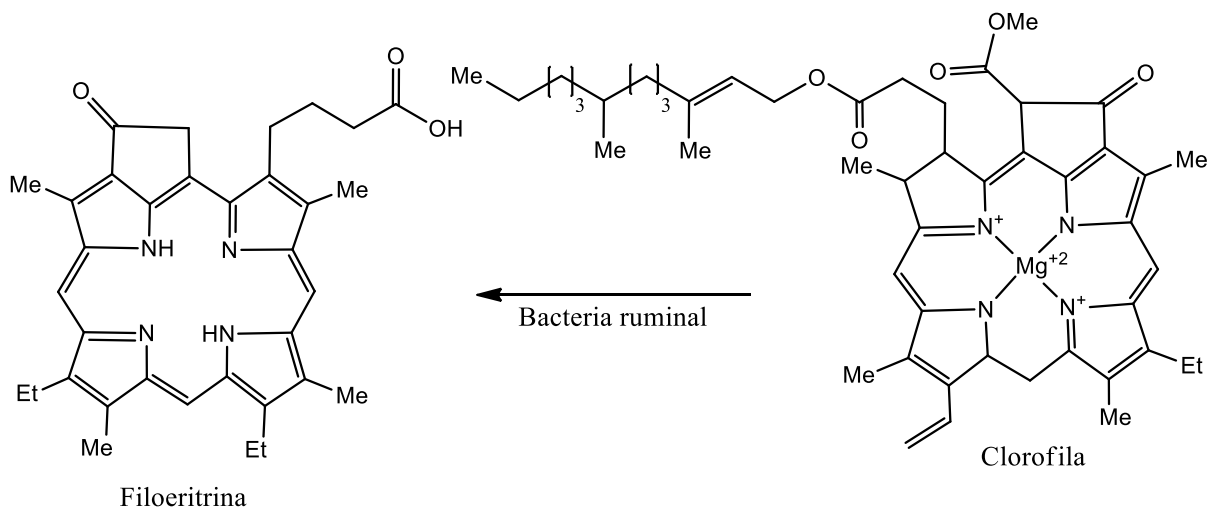
sorgo, entre outros. São conhecidos para estas espécies seus efeitos alelopáticos que poder ser explorados contra ervas daninha durante o manejo (WU et al., 1999). Cereais são fontes de aleloquímicos, como ácidos hidroxâmico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferrulico, ácido benzoico, L-triptofano, graminha e escopoletina. Eles decompõem a benzoxazolinona, que é conhecida por interferir na germinação e no desenvolvimento inicial de várias hortaliças, induzindo a mudanças bioquímicas, como a diminuição da atividade de amilases, interferindo no metabolismo vital (FERNANDEZ-APARICIO et al., 2013).

3.5 Fotossensibilização

A fotossensibilização caracteriza-se por uma sensibilidade exagerada do animal aos raios solares, e aos comprimentos das ondas que causam as lesões, em geral situados dentro da faixa do visível, é determinado pelo agente fotossensibilizador, na maioria das vezes, um pigmento fluorescente (TOKARNIA et al., 2012).

Existem dois tipos de fotossensibilização: a primária e a secundária ou hepatógena. Em ambos os casos a doença é causada pela presença de um agente sensibilizador na corrente sanguínea. A fotossensibilização primária é caracterizada pelo consumo da planta que contem o agente fotossensibilizante e esse é absorvido diretamente no intestino do animal. A fotossensibilização secundária ocorre quando a planta ingerida possui uma substância que provoca alterações no parênquima hepático ou nos ductos biliares com perturbações da eliminação da filoeiritrina (TOKARNIA et al., 2012).

A filoeiritrina é subproduto da degradação da celulose pela ação de protozoários que se encontram dentro do estômago dos ruminantes ou equinos, **esquema 1, pág. 10**. A filoeiritrina é então absorvida na mucosa do intestino e em um animal saldável ela é eliminada pela ação da bile no trato intestinal. A dificuldade em eliminar essa substância leva à sua absorção no intestino e conseqüentemente acúmulo no sangue e quando, sob influência dos raios solares, provocam as feridas na pele.



Esquema 1: Produção da filoeritrina.

As gramíneas do gênero *Brachiaria* produzem metabólitos secundários que desenvolvem a fotossensibilização em ruminantes e equinos, as substâncias responsabilizadas são as saponinas esteroidais. Esse fenômeno é atribuído especialmente às saponinas do tipo protodioscina, **figura 2**, (BRUM et al., 2009), entretanto sabe-se que estas espécies produzem outros tipos de saponinas. Estas substâncias formam cristais com sais biliares que se acumulam no fígado, onde são produzidos, e na vesícula biliar.

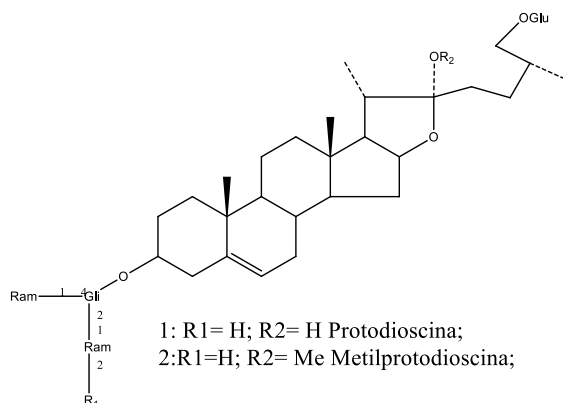


Figura 2: Estruturas das saponinas protodioscina.

Diversos casos de fotossensibilização por ingestão de *Brachiarias* são descritos, a espécie que apresenta maior quantidade de casos é a *B. decumbens*, porém ocorrem também em menor número com outras espécies, por exemplo, são conhecidos casos de intoxicação por *B. humidicola* em equinos no Pará (BARBOSA et al., 2006), em ovelhas que ingeriram *B. brizantha* também no Pará (FREITAS et al., 2009) além de outros casos devidos ao consumo das espécies de *Brachiaria* e outras gramíneas que produzem saponinas esteroideais (RIET-CORREA et al., 2011).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

Utilizou-se evaporador rotativo Fisaton 801 para concentração dos extratos brutos e frações.

Os espectros 1D e 2D de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker [400 e 500MHz (^1H), 100 e 125MHz (^{13}C)] da UFRRJ. Como padrão interno para referência de deslocamento químico foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os cromatogramas e os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa, HP-5880 acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV, CG/EM Varian Saturn 2000 da UFRRJ. O Espectrômetro de Massas de Alta Resolução microTOF Bruker, Faculdade de Farmácia, USP- Ribeirão Preto, pela colaboração do Prof. Dr. Norberto Peporine e do técnico José Carlos Tomaz. O Espectrômetro de Massas de Alta Resolução Bruker Daltonics microTOF, Centro de Ciências da Saúde-Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração do Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva.

As análises de CLAE foram feitas no equipamento HPLC Shimadzu LC-20AT, CBM-20A, ICE-UFRRJ, pela colaboração da Prof. ^a Dr.^a Rosane Nora Castro.

4.2 Métodos cromatográficos utilizados em CLAE

O método de análise para saponinas ocorreu sob as seguintes condições: coluna analítica LiChroCART-Merck RP18e (25cm x 4,0mm x 5 μ m); fase móvel B: acetonitrila (60%)-A:H₂O (40%), a eluição ocorreu em gradiente [7min 65%B, 12min 70%B e 15 60%B]; Fluxo 1,0mL/min- volume 20UI; pressão 109kgf/c.

4.3 Reveladores

As substâncias foram visualizadas através da irradiação com lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 254nm e 365nm e/ou reveladas com os reagentes:

- AlCl_3 (2% m/v) em etanol;
- Vanilina sulfúrica (100ml de metanol, 0,5g vanilina, 5ml ácido sulfúrico 6M);
- Vapores de iodo;

4.4 Solventes

Nos processamento cromatográfico foram utilizados solventes orgânicos como hexano; diclorometano; clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e água. Para as análises de RMN¹H e ¹³C foram utilizados solventes deuterados como, clorofórmio, metanol, água, piridina e DMSO. Nas análises por CLAE foram usados os solventes acetonitrila, metanol e água, próprios para uso em CLAE.

4.5 Adsorventes

Para o fracionamento cromatográfico em coluna de vidro foi utilizado gel de sílica 230 - 400 e 70 - 230 mesh e peneira molecular do tipo sephadex LH-20 como fase estacionária. A cromatografia CCDA foi feita em cromatoplasmas de gel de sílica 60 PF₂₅₆ sobre alumínio das marcas Silicicle e Sorbent. A CCDP foi realizada em placas de gel de sílica 60 PF₂₅₆ das marcas Merck e Vetec sobre suporte de vidro.

4.6 Coleta do material vegetal

Local da colheita Setor de Caprinocultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no município de Seropédica, RJ (latitude: 22°44'38" S; longitude: 43°42'27" W; altitude: 26m), A cidade possui um clima classificado como Aw, esse tipo de clima apresenta-se com inverno seco, estação chuvosa no verão, de novembro a abril, e nítida estação seca no inverno, de maio a outubro (julho é o mês mais seco). A temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C. As precipitações são superiores a 750 mm anuais, atingindo 1800 mm. Em Seropédica observam-se chuvas concentradas no período de novembro a março, precipitação anual média de 1.213mm e temperatura média anual de 24,5°C. A coleta das folhas e raízes de *Brachiaria humidicola*, foi feitas no campus da UFRRJ, área integrada ao instituto de Zootecnia, no dia 25 de maio de 2013, sob a colaboração de Delci de Deus Nepomuceno, Doutor em Ciência Animal e Pastagem pela Universidade de São Paulo e atualmente colaborador do Instituto de Zootecnia de nossa Instituição.

O material botânico foi seco a temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar. Obtivemos 2,1Kg de folhas e 1,81Kg de raízes, os diferentes materiais foram triturados em um moinho de facas no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia- UFRRJ.

4.7 Preparação dos extratos

Em frascos de vidro com capacidade para 3L o material foi distribuído de forma que em cada frasco não excedesse 450g de folhas e os frasco contendo raízes a massa aproximadamente 620g, o controle da massa foi feito para que os frascos atingissem até metade de seu volume e assim fosse mais fácil extrair o solvente. O volume de solvente necessário em cada extração foi de aproximadamente 1,5L.

Todos os extratos foram obtidos por maceração a frio, utilizando três solventes diferentes, em ordem crescente de polaridade, hexano, metanol e a mistura metanol (80%) e água (20%), cada extração teve intervalo de sete dias e o líquido extraído foi concentrado em evaporador rotatório. As extrações foram realizadas de forma exaustiva em todos os sistemas. Os extratos obtidos através da retirada dos solventes da solução com destilação por evaporador rotatório sob vácuo. Após totalmente secos foram armazenados em frascos de vidro e permaneceram refrigerados. Os extratos foram nomeados da seguinte forma: primeiramente nome da espécie, *Brachiaria humidicola* (BH), em segundo parte da planta, folhas (F) ou raiz (R), em terceiro solvente extrator, hexano (H), metanol (M) e hidrometanólico (MH₂O).

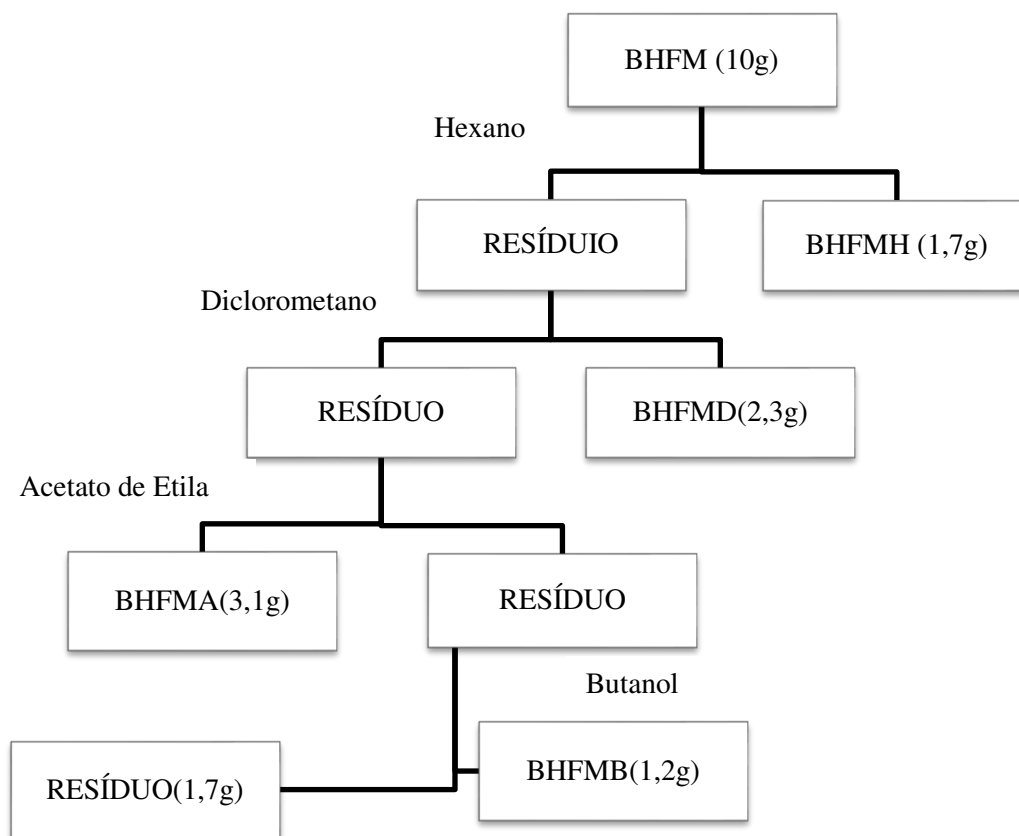
4.8 Partição líquido-líquido

A partição foi realizada nos extratos metanólicos e hidrometanólico das folhas e raízes. Cada extrato isoladamente foi solubilizado em solução de MeOH: H₂O (8:2), após solubilização a mistura foi transferida para um funil de separação de 1 L e submetida a extração com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório.

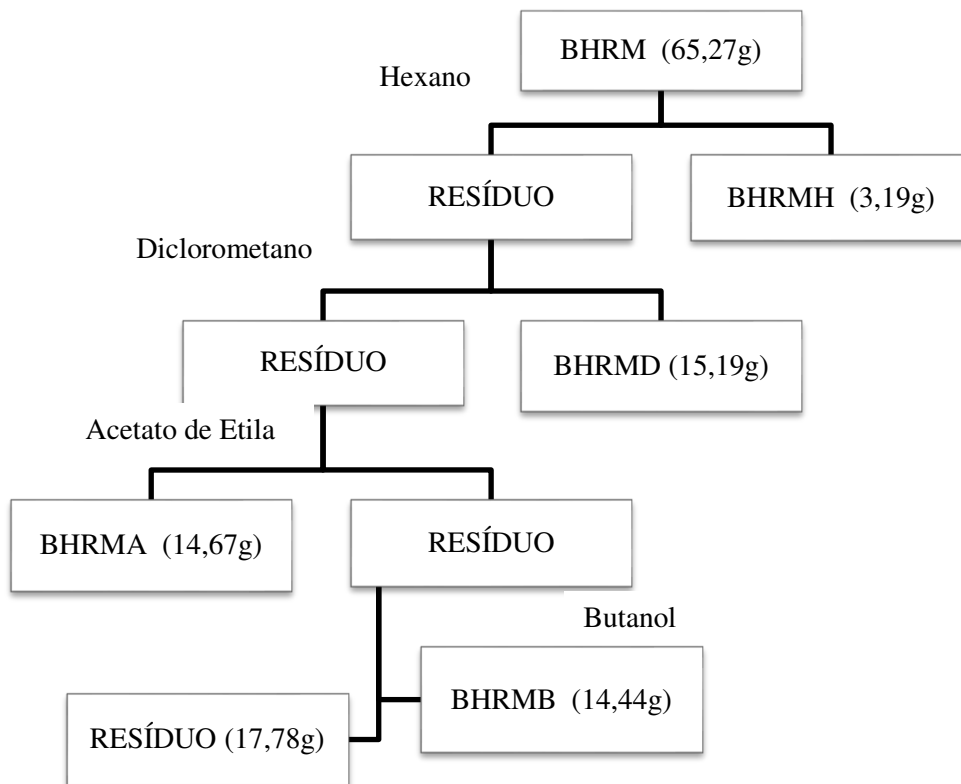
A partir de 10 g (dez gramas) do extrato metanólico de folhas, foi submetido ao processo de partição descrito acima, obtiveram-se as seguintes rendimentos: 1,7g do extrato hexânico (**BHFMH**), 2,3g do extrato diclorometano (**BHFMD**), 3,1 do extrato com acetato de etila (**BHFMA**) e 1,2g do extrato butanólico (**BRFHM**) e o resíduo final com 1,7g. A esquematização dessa partição está descrito no **esquema 2, pág. 14**.

O extrato metanólico de raízes com 65,27g, foi submetido ao processo de partição sob as condições já mencionadas, obtiveram-se os seguintes resultados: 3,19g do extrato hexânico (**BHRMH**), 15,19g do extrato diclorometano (**BHRMD**), 14,67g do extrato com acetato de etila (**BHRMA**) e 14,44g do extrato butanólico (**BHRMB**) e o resíduo final com 17,78g. A esquematização dessa partição está descrito no **esquema 3, pág. 15**.

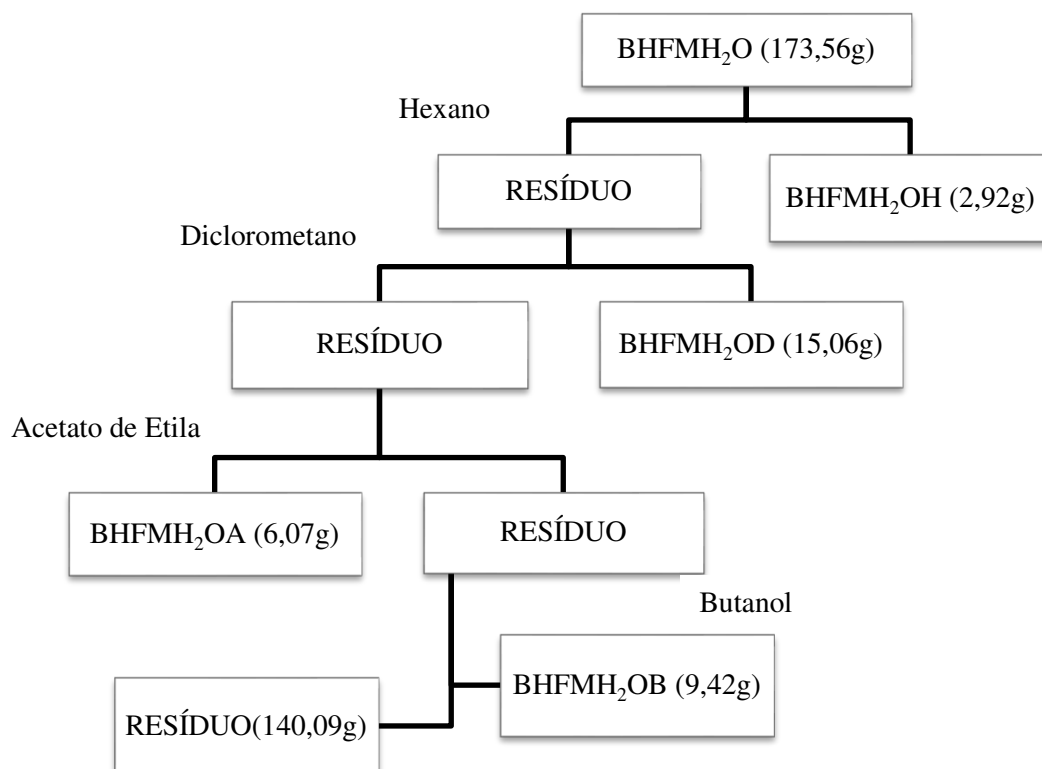
O extrato hidrometanólico das folhas (173,56g), foi submetido às mesmas condições de extração descrita anteriormente, obtiveram-se as seguintes frações **BHFMH₂OH** (2,92g), **BHFMH₂OD** (15,06g), **BHFMH₂OA** (6,07g), **BHFMH₂OB**(9,42g) e o resíduo final **BHRMH₂OR** (140,09g). A esquematização dessa partição está descrito no **esquema 4, pág. 15**.



Esquema 2: Partição do extrato BHFME.



Esquema 3: Partição do extrato BHRM.



Esquema 4: Partição do extrato BFMH₂O.

4.9 Isolamento e Purificação dos Metabólitos Especiais dos Extratos das Folhas

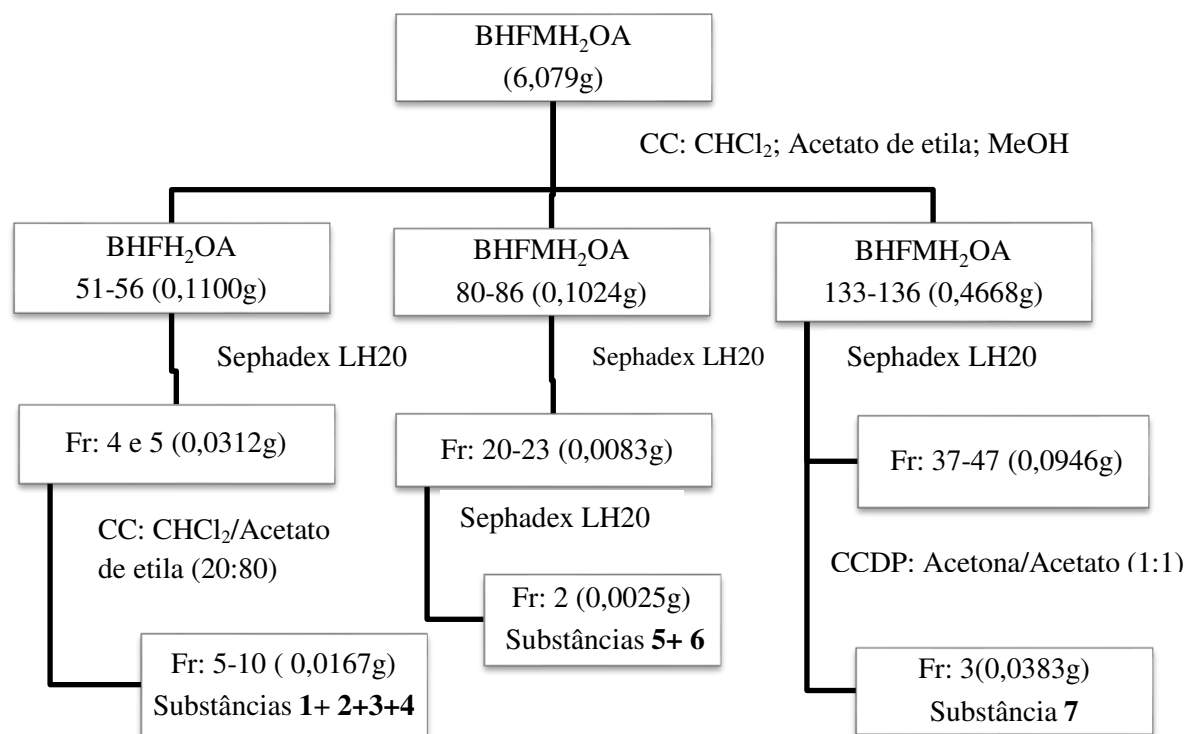
4.9.1 Fracionamento cromatográfico de BHRMH₂OA

Preparou-se uma coluna cromatográfica de gel de sílica para o fracionamento do extrato BHRMH₂OA (6,079g). O extrato foi solubilizado em metanol e adicionado a 4,30g de gel sílica 60 (70-230mesh) para adicionar à coluna. A coluna foi eluída com solventes diclorometano, acetato de etila e metanol, na forma individual e/ou em misturas binárias com polaridade crescente. Para o preparo da coluna foi utilizado 24g de sílica e o volume de solvente utilizado foi de 32L, distribuídos em 320 frações de 100 ml cada. Essas foram analisadas por CCDA e reunidas conforme seu perfil cromatográfico.

As frações de 51 a 56 (0,1342g) foram reunidas e submetidas a fracionamento em sephadex LH20, eluída com metanol 100%, produzindo 38 frações das quais 4 e 5 (0,0312g) foram submetidas novamente a fracionamento em coluna de sílica 200-400 mesh e eluente foi diclorometano 80%: acetato de etila 20%. A fração 21-26 (0,0167g) possibilitou a identificação em mistura das substâncias **1, 2, 3 e 4 (fig. 6, pág. 24)**, que puderam ser determinadas pela análise via RMN ¹H e ¹³C e CG-EM.

As frações de 80 a 86 (0,1024g) foram reunidas por similaridade observada por CCDA, sistema de eluição diclorometano: acetato de etila (3:2), e então submetida à cromatografia em sephadex LH20, usou-se como fase móvel utilizada foi metanol 100%. Este processamento gerou 26 frações. As frações 20-23 (0,0083g) foram novamente submetidas ao fracionamento em sephadex LH20, o eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila/ acetona/ água (1,5: 1,5: 0,5). A fração 22 (0,0025g) foi selecionada e analisada por RMN ¹H e CLAE-DAD, nela foram identificadas as substâncias **5 e 6 (fig. 18, pág.34)**.

As frações de 133 a 136 (0,4668g) foram reunidas por similaridade observada pela de análise por CCDA e, em seguida, foi novamente cromatografada utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e metanol como fase móvel, desse fracionamento produzindo 53 frações de volume aproximado 1,5mL, das quais as frações 37-47(0,0946g) foram submetidas a purificação por CCDP utilizando o sistema acetona: acetato de etila (1:1), a faixa de número 3(0,0383g) este processamento está resumido no **esquema 5 (pág. 17)** e forneceu a substância **7 (fig. 29, pág.41)**, identificada por análises de RMN ¹H e ¹³C.



Esquema 5: Fracionamento do extrato BHFMH₂OA.

4.9.2 Fracionamento cromatográfico de BHFMA

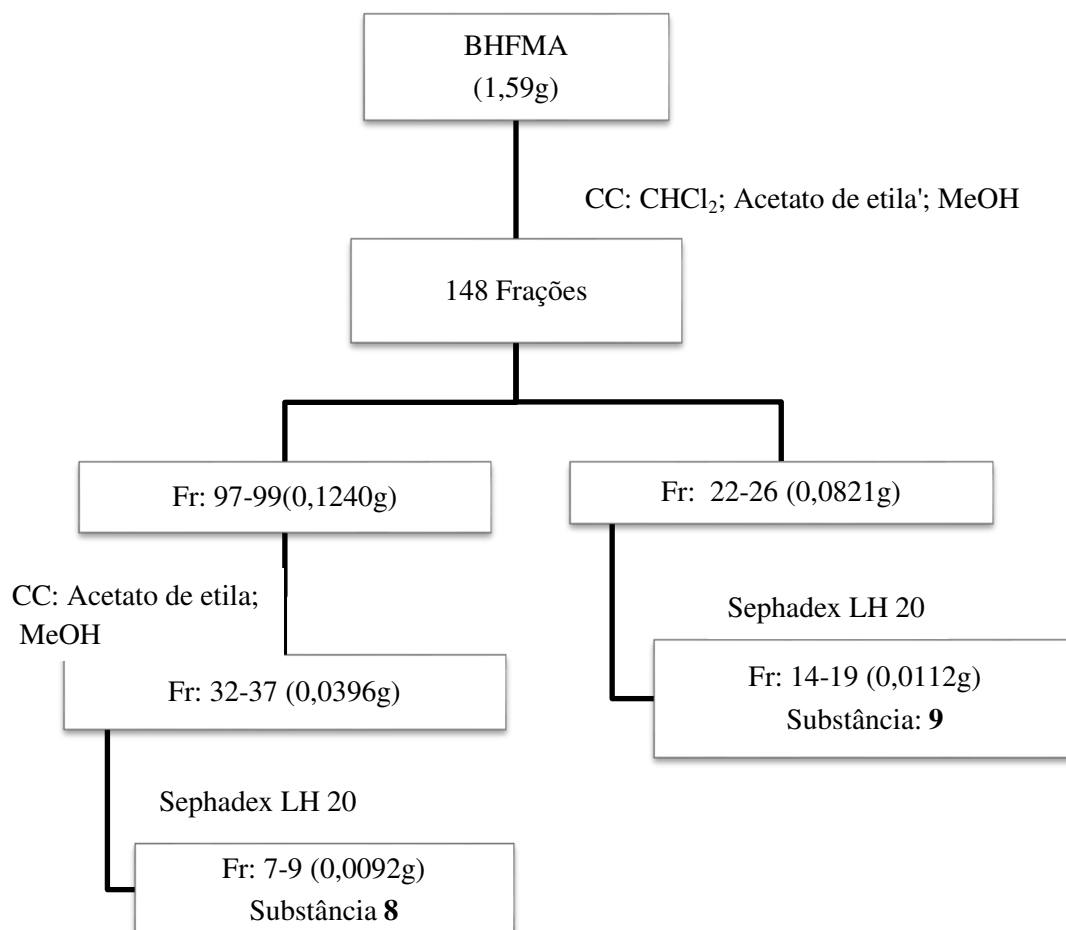
O extrato BHFMA (1,59g) foi cromatografado em coluna de gel de sílica (70-230 mesh), eluída inicialmente com diclorometano (100%), elevando-se gradativamente a polaridade com acetato de etila e metanol. No preparo da coluna foi utilizado 15 g de gel de sílica I e 7,4L de fase móvel. A purificação gerou 148 frações de 50 mL que foram concentradas em evaporador rotatório individualmente. As frações foram acompanhadas por CCDA, utilizando os solventes diclorometano, acetato de etila e metanol, reveladas em UV, vanilina sulfúrica e cloreto de alumínio. As frações similares foram reunidas em grupos.

As frações de 97 a 99 (0,1240g) foram reunidas e fracionadas em colunas de gel de sílica (70-230 mesh), que produziram 60 subfrações, as doze primeiras frações foram descartadas, as de número 32-37 (0,0396g) foram reunidas, fracionadas em coluna de peneira molecular (sephadex LH-20). Das 12 frações produzidas as de número 7-9 (0,0092g) foram reunidas e analisadas por RMN e outros experimentos como DEPTQ, HMBC e HSQC. Esta análise conduziu à identificação de um flavonoide glicosilado, substância **8** (fig. 38, pág.50) em mistura com algumas impurezas.

As frações de 22 a 26, obtidas do fracionamento do extrato BHFMA, foram reunidas de acordo com sua similaridade observada em CCDA, totalizando 0,0821g. A amostra foi

submetida à filtração em coluna de sephadex LH-20, produziu 25 frações dentre as quais o grupo de frações de número 14-19 foi analisado por RMN e forneceu a substância **9** (fig. 46, pág.58).

As etapas envolvidas no fracionamento do extrato BHFMA estão descritas de forma resumida no esquema abaixo.



Esquema 6: Fracionamento do extrato BHFMA.

4.10 Isolamento e Purificação dos Metabólitos Especiais dos Extratos das Raízes

4.10.1 Purificação da fração BHRMA

O extrato BHRMA (5,74g) foi submetido a fracionamento em coluna de gel de sílica 60 (70-230 mesh), eluída inicialmente com acetato de etila (100%), aumentando a polaridade gradativamente com a adição de metanol, até que sua concentração chegasse a 100%. Foram coletadas 175 pequenas frações de 50ml cada, as quais foram concentradas em evaporador rotatório sob vácuo. A comparação das frações eluídas foi feito através de CCDA (cromato-

grafia em camada delgada analítica), observadas através de UV, vanilina sulfúrica ou com vapores iodo, desta forma foram reunidas em grupos com características similares.

As frações de números 120 a 124 (0,3082g) foram reunidas, pois apresentaram similaridade quando eluídas e observadas em CCDA, foram então submetida ao fracionamento em peneira molecular do tipo sephadex LH-20, produziu 15 frações, das quais a de número 4 foi separada. A fração (4) foi submetida ao fracionamento em CLAE-DAD, as condições da análise estão detalhadas no item **4.2 pág.11**. As substâncias apresentaram baixo valor de absorção no UV, entre 200 e 205nm, com isso confirmamos ser uma mistura de saponinas.

O sistema que apresentou melhor eficiência na separação produziu o cromatograma apresentado na **figura 3**, a amostra então foi submetida ao fracionamento em CLAE semipreparativa nas mesmas condições de fracionamento já relatadas, o processo permitiu isolar as substâncias com Tr:5.801, substância **10** (**fig. 53, pág.64**) e com Tr: 3,064, substância **11** (**fig. 65, pág.76**). Elas foram selecionadas para análises RMN e EM.

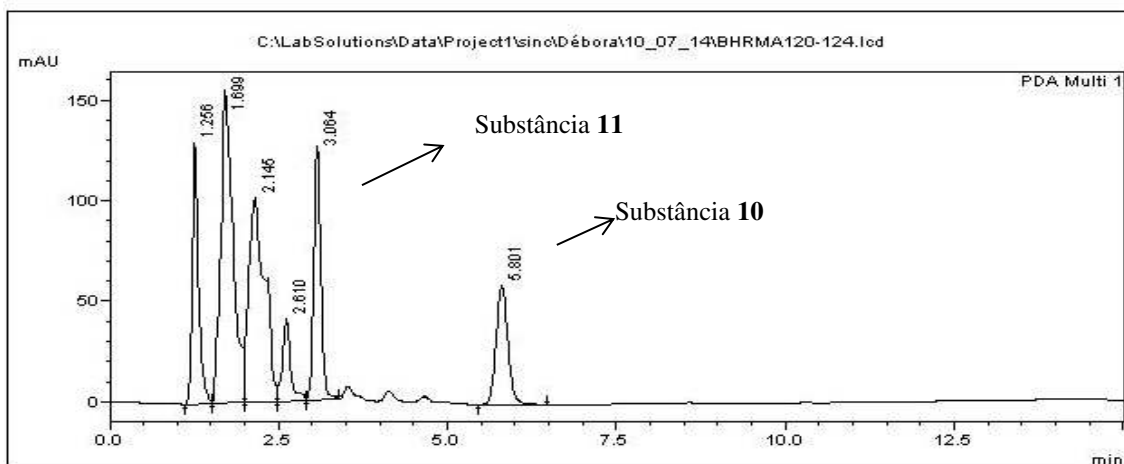
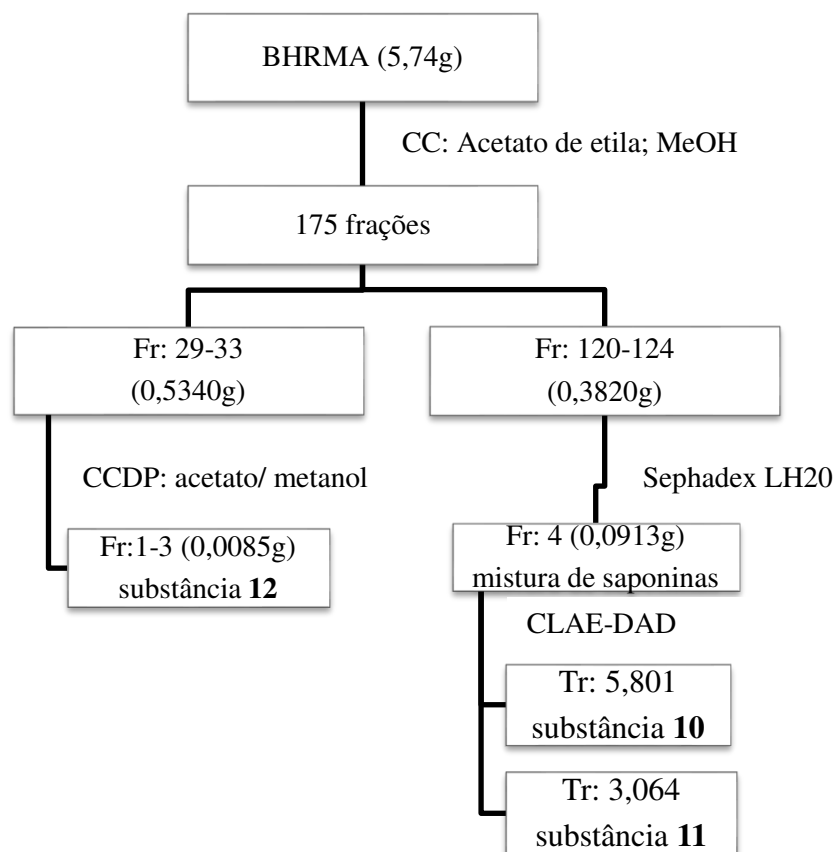


Figura 3: Cromatograma da fração BHRMA 120-124 (4).

As frações de 29-33 (0,5340g), obtidas do fracionamento do extrato BHRMA, foram fracionadas em peneira molecular do tipo sephadex LH20, produzindo 47 frações. As frações de número 56 a 60 (0,0197) foram filtradas em coluna de sílica flash com sistema de eluição acetato de etila: metanol (8:2), cujas análises de RMN das frações 1-3(0,025g) possibilitaram identificar a substância **12** em mistura (**fig. 77, pág. 89**).

O resumo do fracionamento do extrato BHRMA está descrito no esquema abaixo.



Esquema 7: Fracionamento do extrato BHRMA.

O restante do extrato (8,93g) foi purificado em coluna filtrante, com FE composta por uma mistura de sílica e celulose (1:1), a fase móvel utilizada foi acetato de etila: acetona: água (1,5:1,5:0,25). O fracionamento produziu 57 frações de 200mL que foram concentradas em rota-evaporador. O objetivo dessa purificação foi obter menor quantidade de frações e que as iniciais fossem ricas em saponinas facilitando assim o processo de identificação das mesmas. Por comparação das amostras em placas permitiu reunir as similares. As de número 12 a 14 (0,785g) apresentaram manchas de coloração verde escura quando reveladas, características de saponinas, em vanilina sulfúrica assim sendo selecionadas para purificação em IsoleraTM. A fração **BHRMA 12-14 (0,785g)** foi cromatografada sob as seguintes condições, utilizando o equipamento IsoleraTM, coluna fase normal SNAP 10g, fluxo 12ml/min, detecção UV de 254nm a 365nm, fase móvel B:metanol, A: acetato de etila. A eluição ocorreu em gradiente, de acordo com a tabela 1. No cromatograma obtido observa-se a presença de outras substâncias que apresentam absorção de luz UV na faixa 230 a 400nm, as frações com substâncias que absorvem no mesmo comprimento de onda são representadas pela mesma coloração. Toda a corrida consumiu 450ml, cada volume de coluna correspondendo a 15 ml, mesmo as frações que não tiveram absorção no UV foram recolhidas, sabendo-se que as saponinas esteroidais absorvem de 200 a 205 nm. As frações resultantes foram avaliadas por CCDA e reunidas

de acordo com a similaridade de Rf e as características de coloração quando reveladas com vanilina sulfúrica.

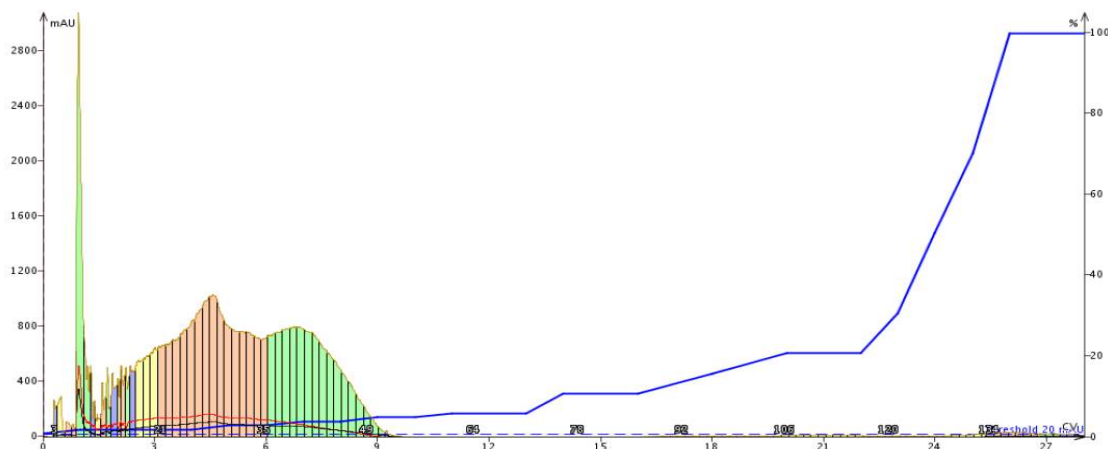


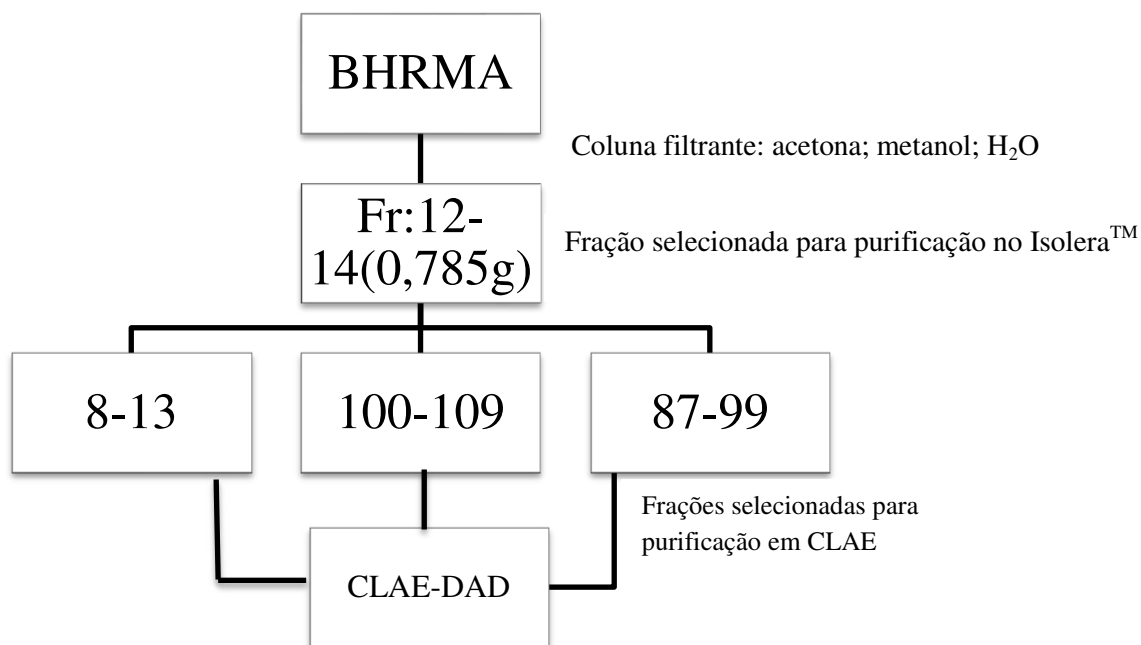
Figura 4: Cromatograma da fração BHRMA 12-14.

Tabela 1: Sistema de eluição empregado na análise da fração BHRMA 12-14.

	Solvente	Mistura (%)	Volume de Coluna
Equil.	A/B	0	3,0
1	A/B	0-1	1,0
2	A/B	1	30
3	A/B	1-2	1,0
4	A/B	2	1,0
5	A/B	2-3	1,0
6	A/B	3	1,0
7	A/B	3-4	1,0
8	A/B	4	1,0
9	A/B	4-5	1,0
10	A/B	5	2,0
11	A/B	5-10	1,0
12	A/B	10	2,0
13	A/B	10-15	2,0
14	A/B	15-20	2,0
15	A/B	20	2,0
16	A/B	20-30	1,0
17	A/B	30-50	1,0
18	A/B	50-70	1,0
19	A/B	70-100	1,0
20	A/B	100	2,0

As análises por CCD permitiram selecionar três grupos de frações, 8 a 13 (0,035g), 87-99 (0,013g) e 100-109 (0,024g) que apresentavam três manchas características de saponinas quando reveladas com vanilina sulfúrica e, por isso, foram selecionadas para purificação

em CLAE-DAD em escala preparativa. O esquema abaixo resume as etapas deste fracionamento.



Esquema 8: Fracionamento da segunda porção do extrato BHRMA.

As análises ocorreram sob as mesmas condições descritas para a análise de saponinas, item **4.2 (pág. 11)** os cromatogramas apresentaram picos com tempo de retenção semelhante à amostra BHRMA 120-124(4), por isso, até o momento só as substâncias com tempo de retenção 5,801 e 3,064 foram analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processamento cromatográfico dos extratos de raiz e folhas de *B. humidicola* resultou no isolamento e identificação de doze substâncias apresentadas na **figura 5, pág. 23**. A elucidação das mesmas foi realizada através de análises espectrais e por comparações com dados da literatura. O detalhamento do procedimento de elucidação será descrito nos próximos tópicos.

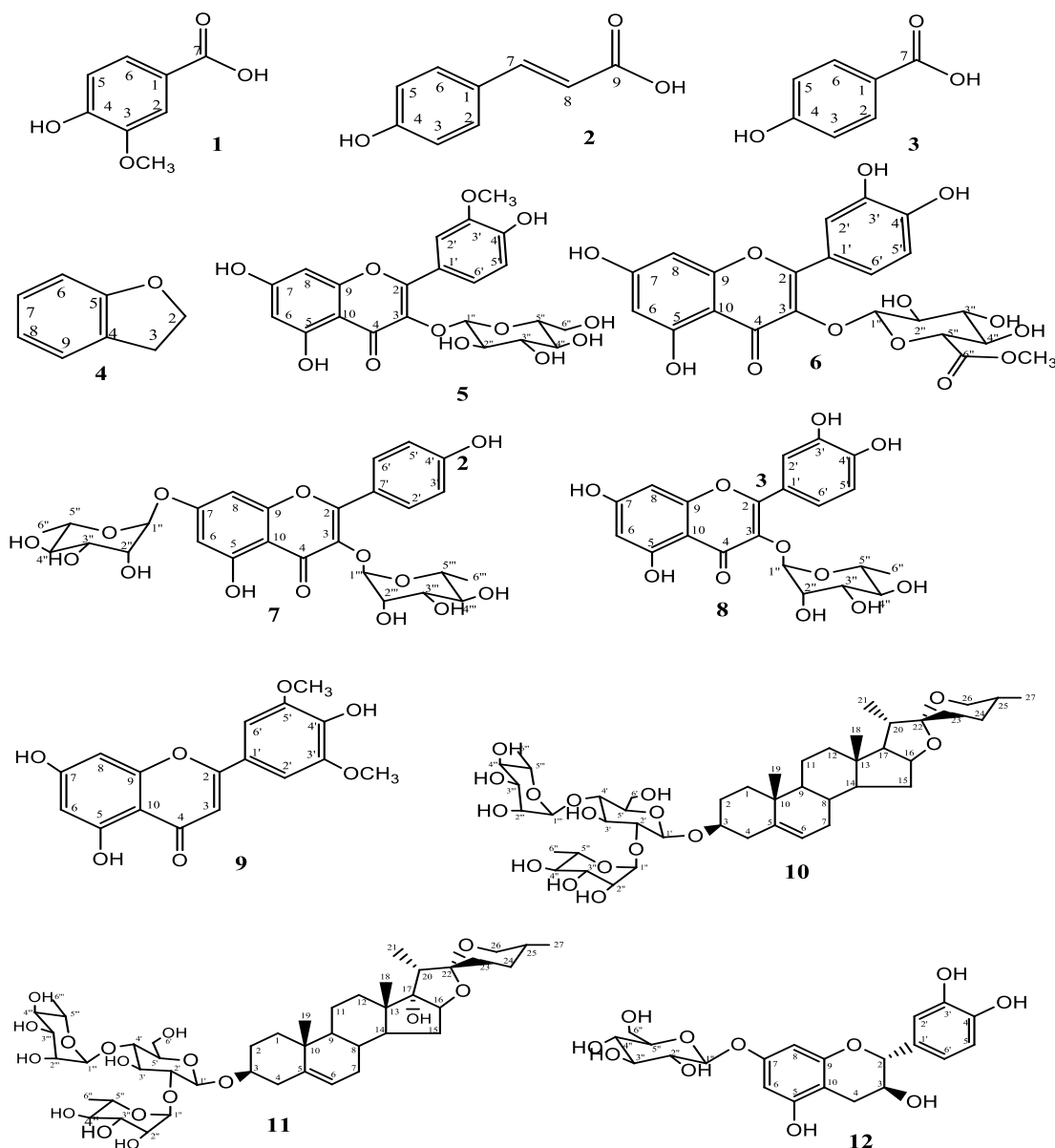


Figura 5: Substâncias isoladas de folhas e raízes de *Brachiaria humidicola*.

5.1 Identificação das substâncias 1, 2, 3 e 4 isoladas de BHFMH₂OA

A identificação das substâncias 1, 2 e 3, em mistura, foram realizadas por interpretações de espectros de RMN¹H e ¹³C, experimentos bidimensionais HSQC, HMBC e COSY. Os dupletos de 16 Hz, δ_H 7,48 e 6,31 correspondem a ligação dupla em trans, hidrogênios 7 e 8, respectivamente, da substância 2. Os dupletos com 8,5 Hz, δ_H 7,52 e 6,80 foram atribuídos aos hidrogênios 2,6 e 3,5 da substância 2 e 3, as interações homonucleares entre esses hidrogênios são observadas no experimento COSY (fig.10, pág.27). A identificação da substância 1 foi feita com identificação do sinal δ_H 7,43 referente ao hidrogênio 2, além dos dois dupletos de

8,5Hz referentes ao hidrogênios 5 e 6. O espectro de HSQC revela as interações de carbonos diferentes com sinais de hidrogênios que se sobrepõem (**fig.11, pág.28**). Mesmo com padrão de substituição diferentes nos respectivos anéis aromáticos há valores de deslocamento químico de hidrogênios muito próximos os fatores que contribuem para a adequada atribuição e correlação são as constantes de acoplamento entre os sinais e a interação observada no espectro de COSY (**fig.10, pág.27**). A análise por CG-EM produziu um cromatograma que apresentou três substâncias sendo uma delas a substância **1** (**fig. 15, pág. 31**). O resultado das análises de RMN ^1H e ^{13}C puderam confirmar a existência da 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (**1**), do ácido trans-4-hidroxicinâmico (**2**), ácido p-hidroxi-benzóico (**3**) comparada com os valores da literatura propostos por WANG et al., 2001(**2**) e POUCHERT & BEHNKE, 1993 (**1 e 3**) e 2,3-diidrobenzofurano(**4**) identificada por CG-EM.

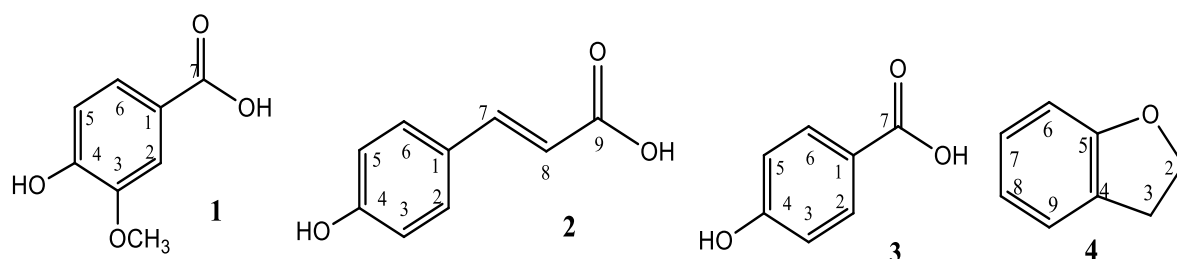


Figura 6: Estrutura das substâncias 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (**1**), ácido trans-4-hidroxicinâmico (**2**), ácido 4-hidroxi-benzóico (**3**) e 2,3-diidrobenzofurano (**4**).

Tabela 2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **1** e comparação com valores da literatura.

	Substância 1 (DMSO- d_6)				Ácido 3-hidroxi-4-metoxi- benzóico (DMSO- d_6)
	δ_C	δ_H (mult. J)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_C
1	121,87	-			121,74
2	113,09	7,43(s)		C-7	112,62
3	147,64	-			147,02
4	151,48	-			150,95
5	115,84	6,85 (d, 8,5Hz)	C-4	C-3; C-7; C-1	114,84
6	123,90	7,80(d, 8,5Hz)	C-5		123,56
7	167,69	-			167,46
OCH ₃	55,95	3,81(s)			55,55

Tabela 3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **2** e comparação com valores da literatura.

	Substancia 2 (DMSO- d_6)				Ácido trans-4- hidroxicinâmico (DMSO- d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)
1	125,71	-			125,18	-
2;6	130,57	7,52 (<i>d</i> , 8,45Hz)	C-1; C-3,5	C-7	129,96	7,44 (<i>d</i> ; 8,6Hz)
3;5	115,28	6,80 (<i>d</i> , 8,5Hz)	C-2, 6; C-4	C-1	115,66	6,80 (<i>d</i> ; 8,6Hz)
4	160,03	-			159,47	-
7	144,59	7,48 (<i>d</i> , 16Hz)	C-1; C-8	C-9; C-3,5	144,07	7,59 (<i>d</i> ; 16Hz)
8	115,29	6,31 (<i>d</i> , 16Hz)	C-9	C-1	115,24	6,27 (<i>d</i> ; 16Hz)
9	168,48	-			167,86	-

Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **3** e comparação com valores da literatura.

	Substância 3 (DMSO- d_6)				Ácido p-hidrox- benzoico (CDCl_3 + DMSO- d_6)
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
1	122,15	-			121,40
2; 6	131,99	7,51(<i>d</i> , 8.5Hz)	C-1	C-4	131,46
3;5	115,57	6,78(<i>d</i> , 8.5Hz)	C-4	C-1	114,96
4	162,03	-			161,55
7	167,69	-			167,49

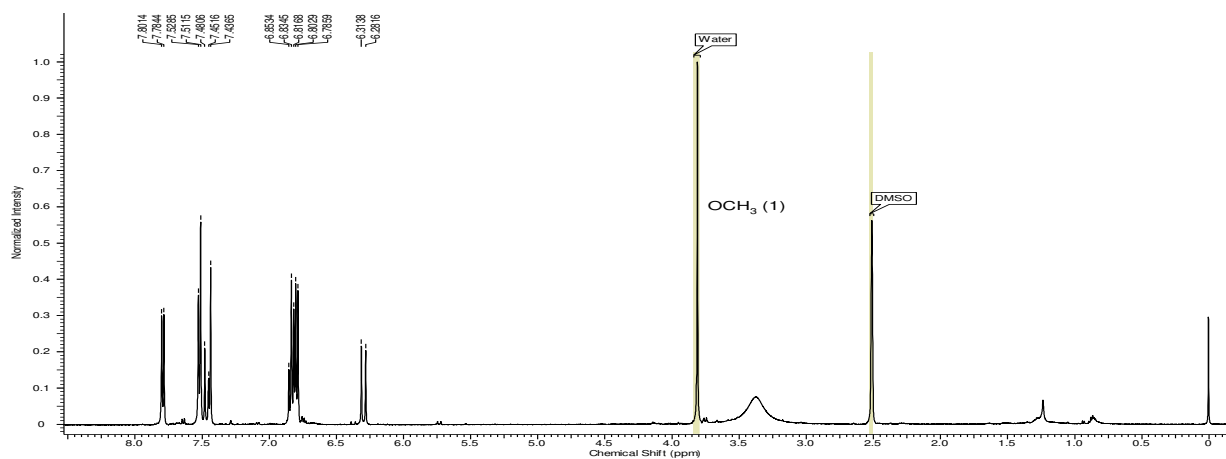


Figura 7: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 1, 2, 3 e 4.

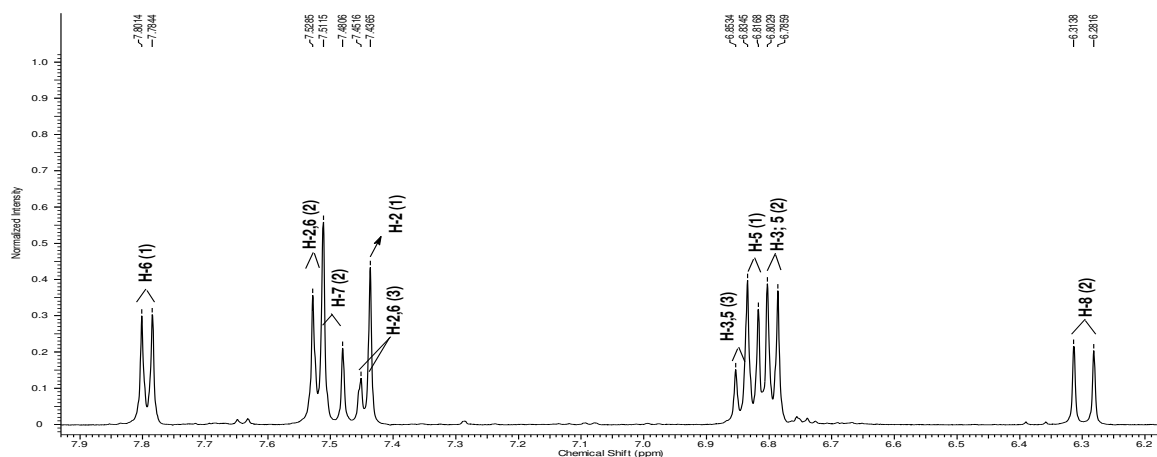


Figura 8: Expansão do espectro RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 1, 2, 3 e 4, de 6,1 a 8,0 ppm.

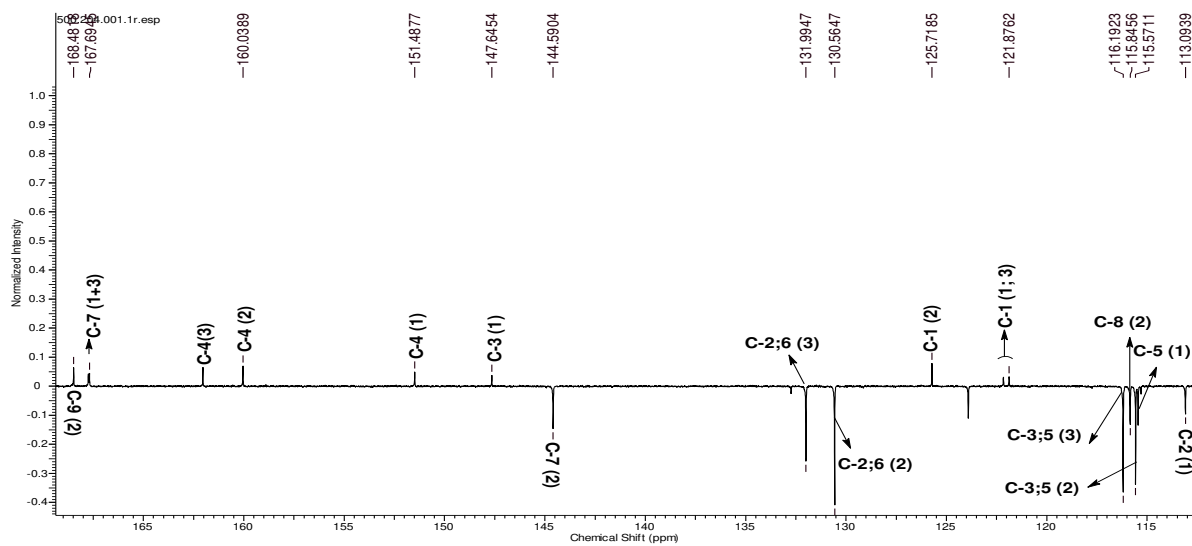


Figura 9: Espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 1, 2, 3 e 4.

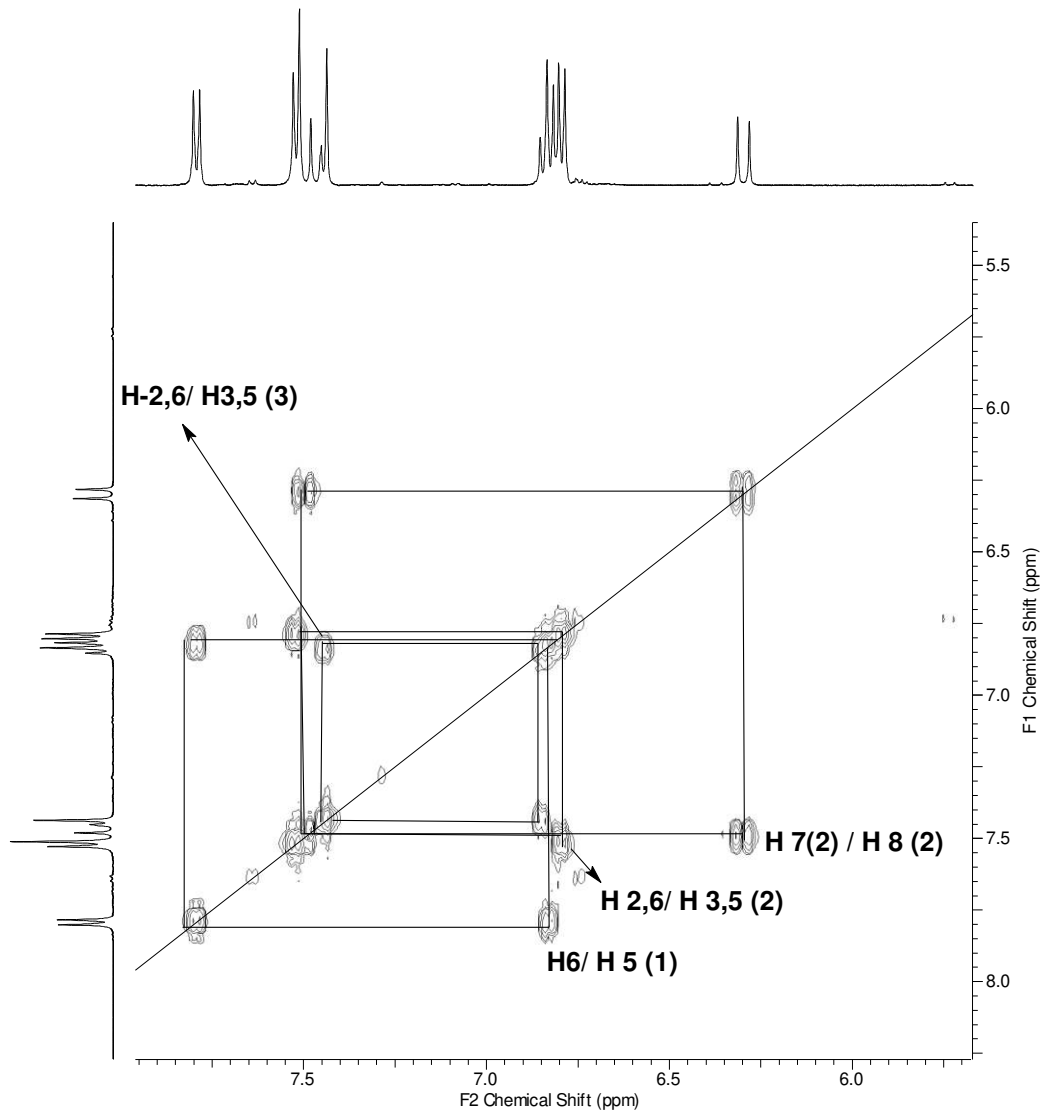
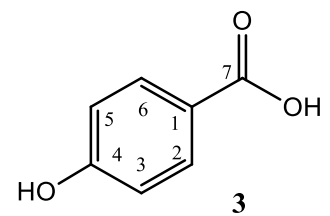
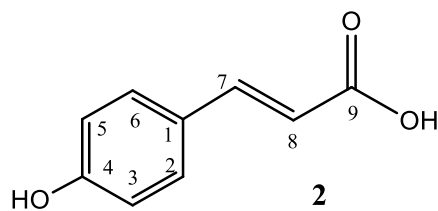
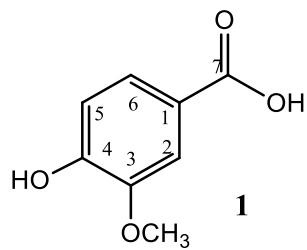


Figura 10: Mapa de contorno de COSY (500MHz, DMSO-d₆) da substância 1, 2, 3 e 4.



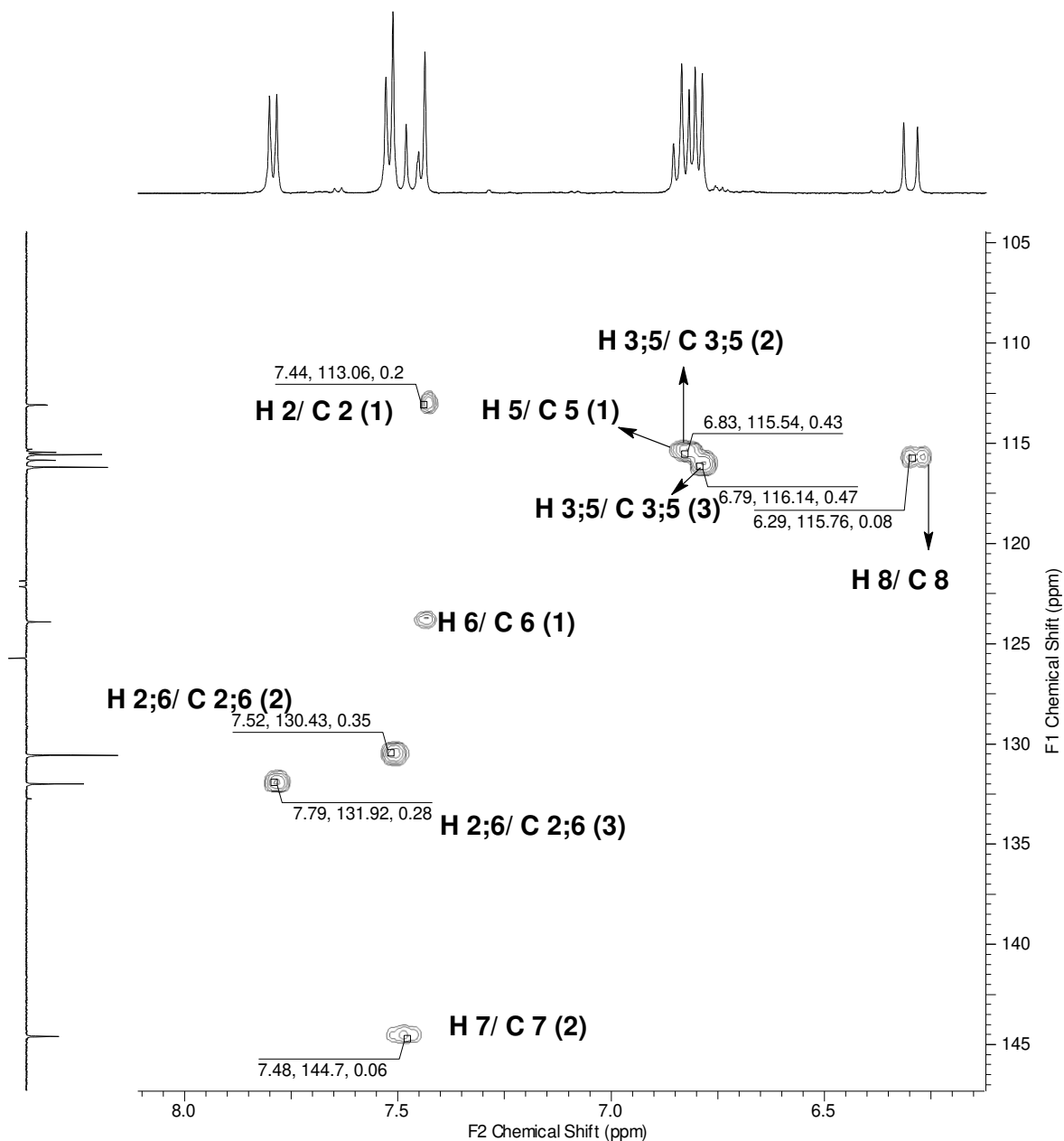
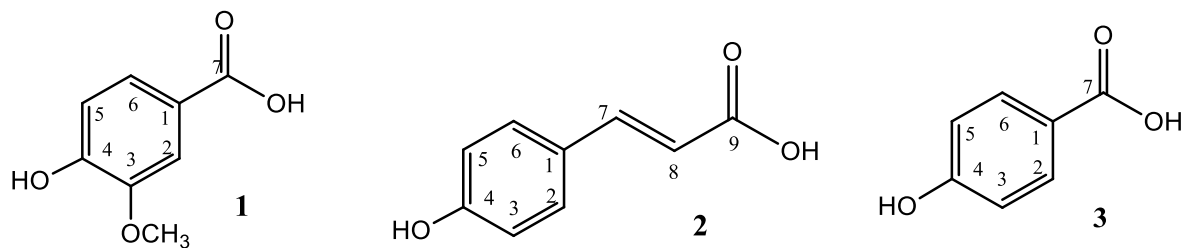


Figura 11: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500 / 125MHz, DMSO- d_6) da substâncias **1**, **2**, **3** e **4** de 6,25 a 8,0ppm.



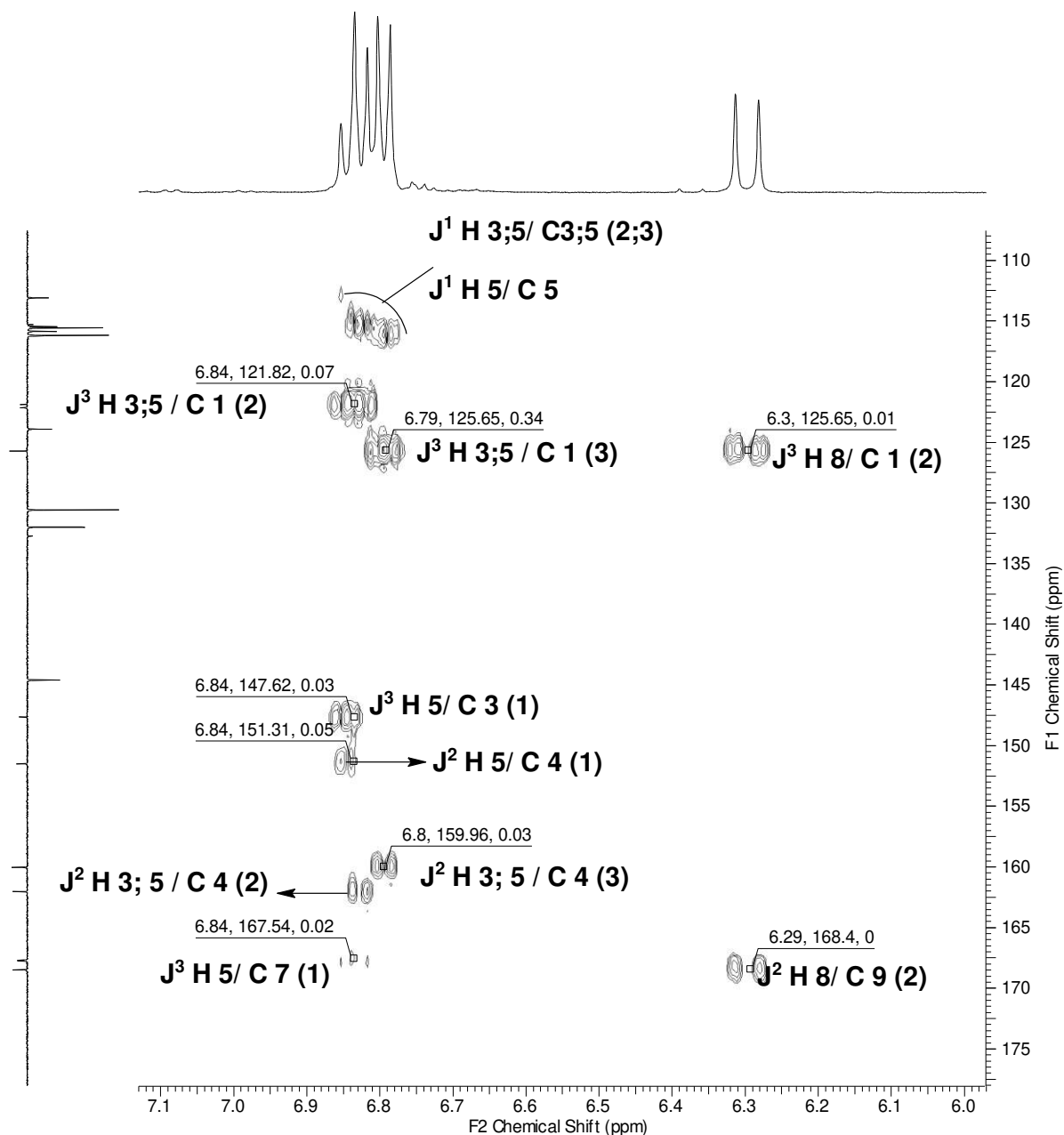
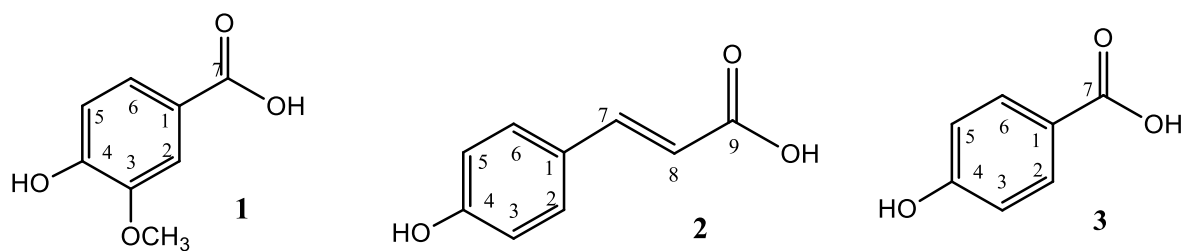


Figura 12: Expansão mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, DMSO- d_6) da substâncias **1**, **2**, **3** e **4**, de 6,0 a 7,1ppm.



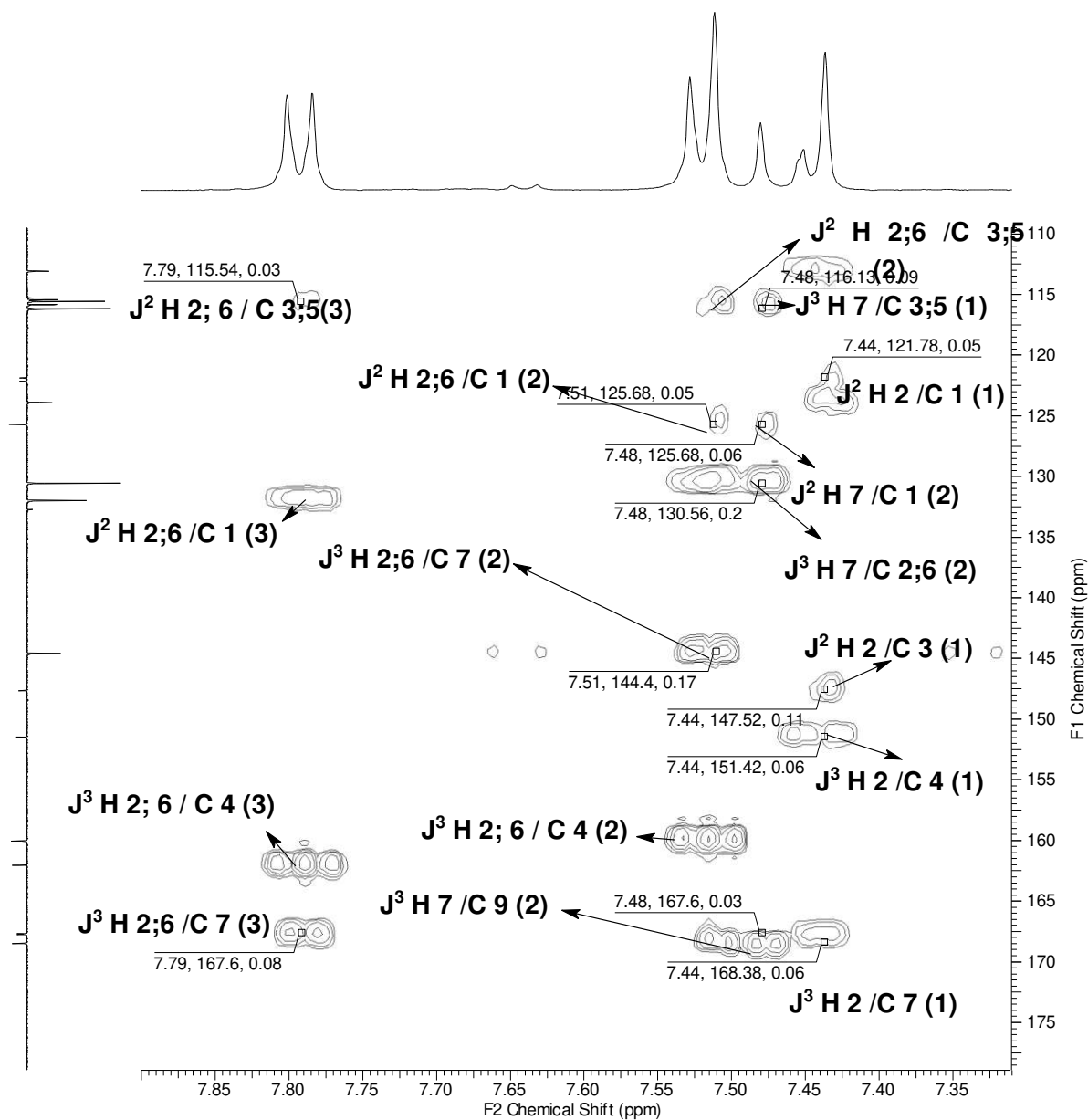
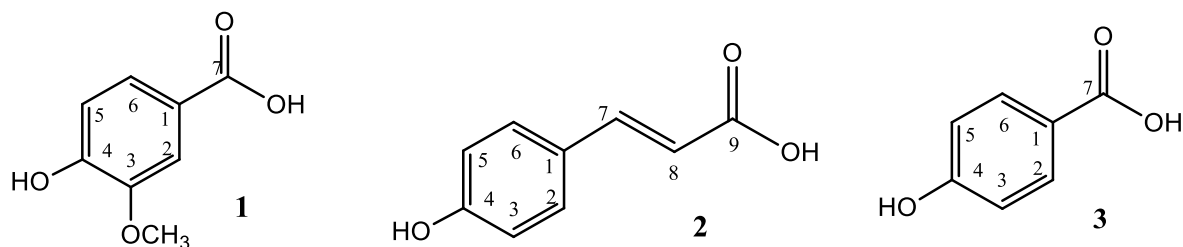


Figura 13: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, DMSO- d_6) da substâncias **1**, **2**, **3** e **4**, de 7,35 a 7,85ppm.



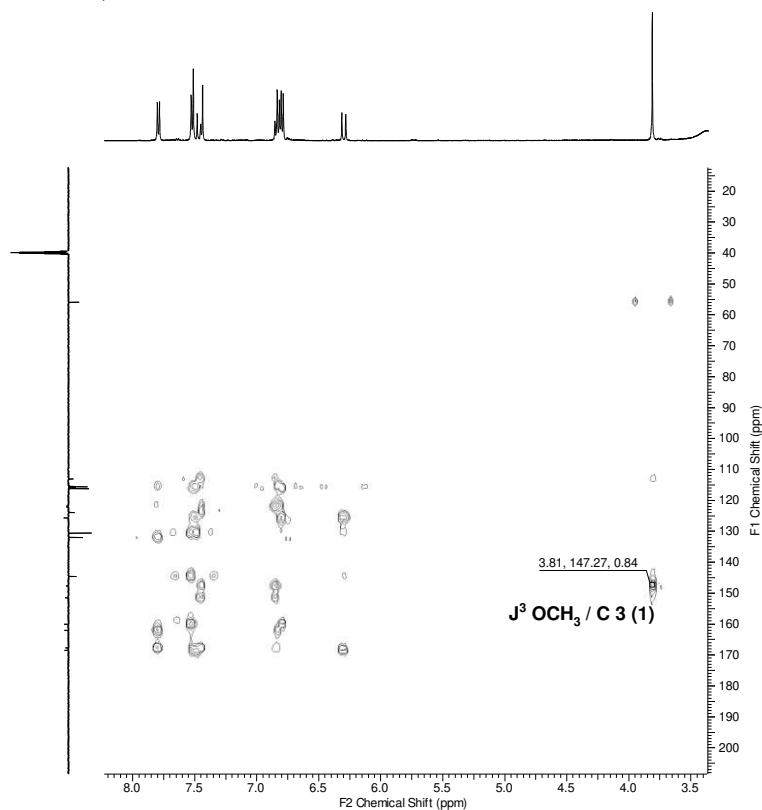


Figura 14: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, DMSO- d_6) da substâncias **1**, **2**, **3** e **4**, de 3,5 a 8,0ppm.

A análise da fração da qual foram identificadas as substâncias **1** e **2** por CG-EM levaram a confirmação da proposta para a substância **1** e à identificação de um outro componente não identificação por RMN por ser insolúvel em DMSO.

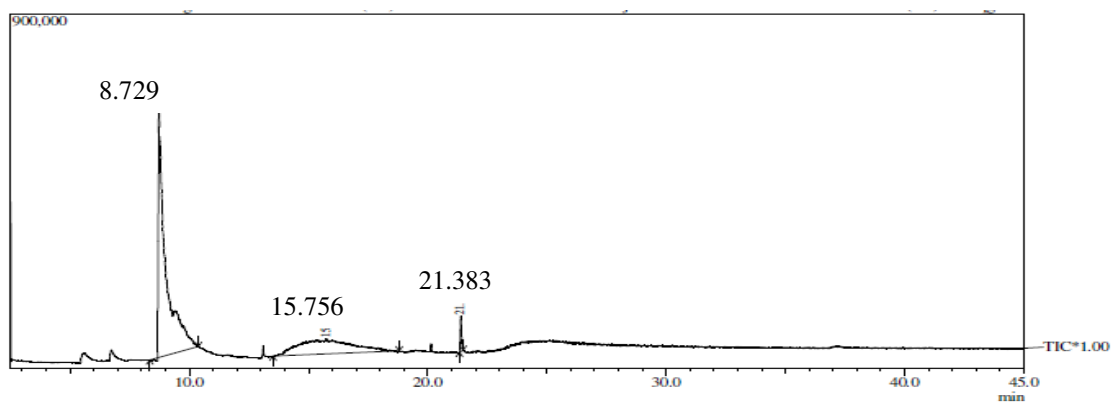


Figura 15: Cromatograma da fração que contém as substâncias **1**, **2**, **3** e **4**.

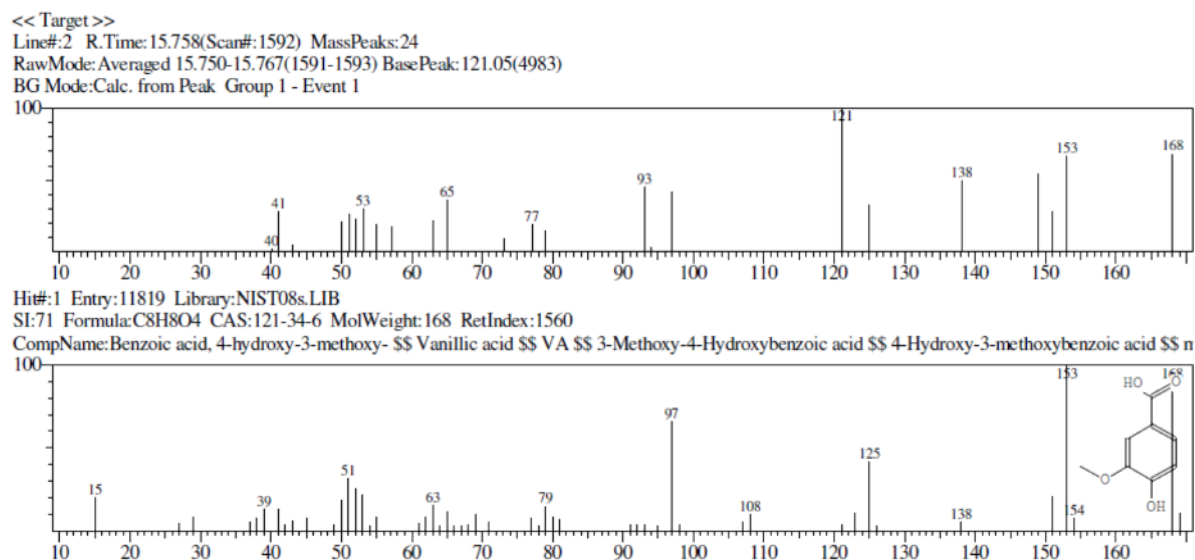
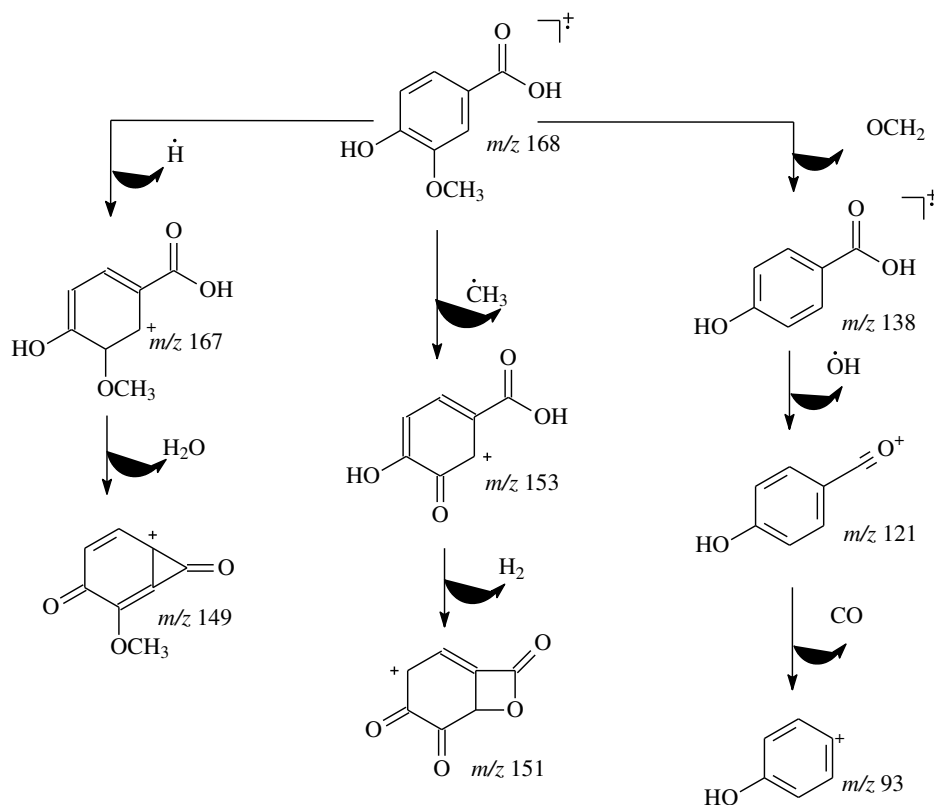


Figura 16: Espectro de massas do sinal com Tr: 15.758 min e a comparação com a literatura, substância 1.



Esquema 9: Proposta de fragmentação da substância 1.

A substância com Tr:8.729min apresentou espectro de massas idêntico ao da biblioteca do 2,3-diidrobenzofurano com SI=93, significando alta confiança na identidade entre os fragmentogramas. Considerando que as análises por RMN foram feitas em DMSO apenas as substâncias 1-3 foram solúveis. Neste cromatograma observou-se um sinal largo em que um espectro de massas foi compatível com a substância 1. O pico em 25min pode ser da substân-

cia 2. Assim como os espectros de RMN, o cromatograma apresenta outros sinais de outros componentes em pequena quantidade que não foram analisados.

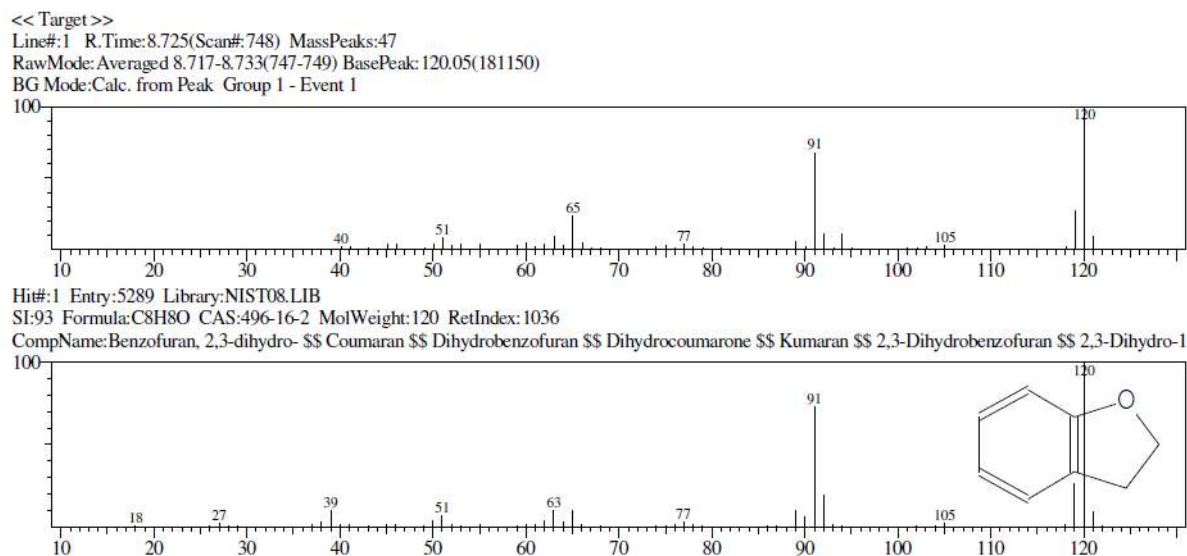


Figura 17: Espectro de massas do sinal com Tr: 8.729 min e a comparação com a literatura, 4.

5.2. Identificação das substâncias 5 e 6 isoladas de BHF₂OA

A identificação das substâncias 5 e 6 foi realizada por interpretação de espectros de RMN¹H, ¹³C e análise de experimentos bidimensionais. O experimento de RMN ¹H apresentou sinais compatíveis com esqueleto molecular de flavona. No espectro de RMN ¹H (fig. 19, 20 e 21, pág. 36) foram observados sinais em δ_H 7, 51(d; 2,2Hz) pertencente aos H-2', δ_H 7,57 e 7,59 (d; 2,2Hz e 8,5 Hz) correspondente aos H-6' e δ_H 6,85 (d, 8,5 Hz) referente a H-5' no anel B da substância 5, o anel B da substância 6 apresenta mesmo padrão de substituição, sendo os sinais 7,52 (d), 6,93 (d, 8,5 Hz) 7,59, 7,57 (dd, 8,0 e 2,0 Hz), atribuídos aos H-2, H-5 e H-6 respectivamente. O acoplamento entre os hidrogênios vizinhos foi observado no experimento COSY (fig.27, pág.39), confirmando o padrão de substituição da flavona.

Os sinais δ_H 6,21(d; 1,85Hz) correspondente ao H-6 (substâncias 5 e 6), e δ_H 6,42(d; 2,2Hz, substância 6) e δ_H 6,45 (d; 2,2Hz, substância 5) correspondente ao H-8, os hidrogênios 6 e 8 mantêm entre si relação *meta* no anel A do flavonoide. No espectro são observados dois dupletos em δ_H 5,59 (d, 7,25 Hz) e 5,49 (d, 7,25 Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios dos carbonos anoméricos da unidade de glicose e do éster, respectivamente, que estão ligados ao C-3, acoplamento observado no espectro de HMBC (fig.28 e 29, pág.40 e 41), no experimento de HSQC (fig. 25 e 26, pág. 38) é possível identificar que esses hidrogênios es-

tão ligados aos carbonos anoméricos, com deslocamentos químicos 103,93 ppm e 104,09 ppm. As relações entre hidrogênios e carbonos na molécula foram observadas no experimento bidimensional HBMC (fig. 28, pág.40). Os valores estão de acordo com os dados da **Isorhamnetina 3-O- β-D-glicosídeo** isolada de *Commelina communis* (YUAN et. al., 2013), tabela 5 e **Quercetina 3- O-β-D- glucuronato de metila** isolada de *Vitis* (HILBERT et. al., 2015) tabela 6, pág. 35.

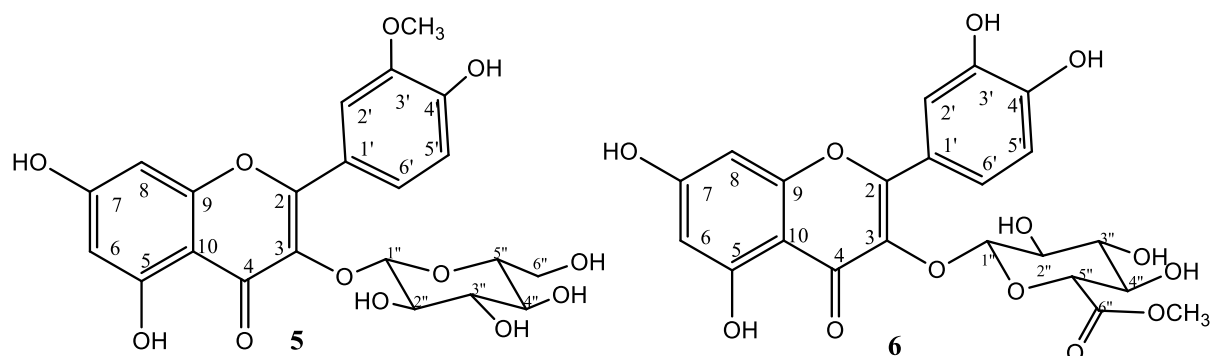


Figura 18. Isorhamnetina 3-O- β-D-glicosídeo (**5**) e Quercetina 3- O-β-D- glucuronato de metila (**6**).

Tabela 5: Dados de RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (100 MHz) da substância **5** em comparação com dados da literatura.

	Substância 5 (DMSO-d ₆)				Isorhamnetina 3-O- glicosídeo (CD ₃ OD)	
	δ _C	δ _H	² J _{HC}	³ J _{HC}	δ _C	δ _H
2	156,46	-			158,6	-
3	132,98	-			136,3	-
4	177,47	-			179,7	-
5	161,28	-			163,3	-
6	98,79	6,07(sl)	C-10	C-8	100,0	6,19 (d, 1,8Hz)
7	164,26	-			166,3	-
8	93,78	6,42 (d, 1,85)	C-7; C-9	C-6; C-10	95,0	6,38 (d, 1,8Hz)
9	156,48	-			160,0	-
10	103,93	-			105,5	-
1'	121,12	-			123,9	-
2'	113,50	7,94 (d, 2,2Hz)		C-2; C-4'	114,4	7,91 (d, 1,8Hz)
3'	146,93	-			145,8	-
4'	148,71	-			148,5	-
5'	115,27	6,93 (d, 8,5Hz)		C-1', C-3'	116,1	6,89 (d, 8,4Hz)

6'	122,08	7,50; 7,48 (dd, 2.2; 8.5Hz)		123,9	7.58 (d, 8,4Hz e 1,8Hz)	
OCH ₃	55,71	3,84 (s)		C-3'	56,9	3,94 (s)
1''	101,32	5,59 (d, 7.25Hz)		C-3	103,9	5,36 (d, 7,2Hz)
2''	77,51	3,1- 3,6	C-1''		76,0	
3''	74,39				78,2	
		(m, H-2''a H5'')				
4''	69,84				71,6	
5''	75,60				78,6	
6''	60,61	3,6; 3,4 (dd)			62,6	

Tabela 6: Dados de RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C (100 MHz) da substância **6** em comparação com dados da literatura.

Substância 6 (DMSO-d ₆)				Quercetina 3- O-β-D- glucuronato de metila (CD ₃ OD; 500 MHz)		
	δ _C	δ _H	² J _{HC}	³ J _{HC}	δ _C	δ _H
2	156,38	-			158,6	-
3	133,12	-			132,4	-
4	177,17	-			179,4	-
5	161,24	-			163,2	-
6	98,86	6,21	C-10	C-8	100,1	6,21(s)
7	164,36	-			166,2	-
8	93,68	6,45 (d, 2,4Hz)	C-7; C-8	C-6; C-10	94,9	6,41(s)
9	156,33	-			159,6	-
10	104,09	-			105,8	-
1'	120,90	-			123,6	-
2'	116,10	7,52 (d)	C-1'	C-4'	116,0	-
3'	144,98	-			146,1	7,63 (s,)
4'	148,71	-			150,0	-
5'	115,21	6,93 (d, 8,5Hz)			116,2	6,85 (d, 9Hz)
6'	121,74	7,59; 7,57 (dd, 8,0 e 2,0Hz)			123,0	7,58 (d, 9Hz)
1''	100,79	5,49 (d, 7,25Hz)		C-3	104,9	5,23 (d, 7,5Hz)
2''	76,44	3,1- 3,6		4'	75,5	3,75-3,45
3''	73,78	(m, H-2''a H4'')		3'	77,3	(m, H2'' e H5'')
4''	71,46				72,9	
5''	75,60	3,72(dd)	C-6''; C-4''		75,5	
6''	169,44	-			170,8	-
OCH ₃	51,96	3,56 (s)	C-6''		53,0	3,66

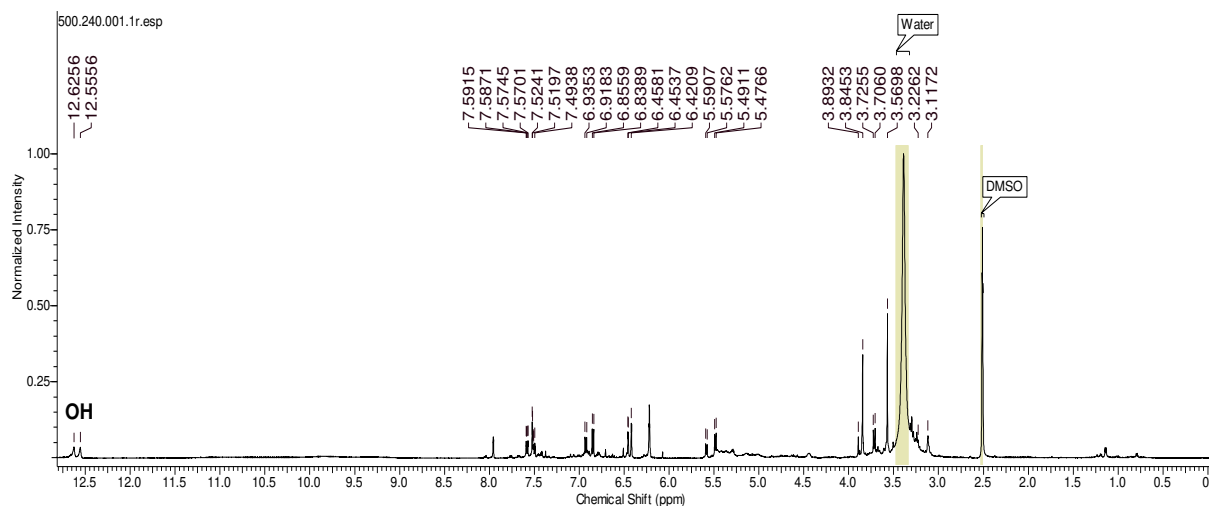


Figura 19: Expansão do espectro RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) das substâncias **5** e **6**.

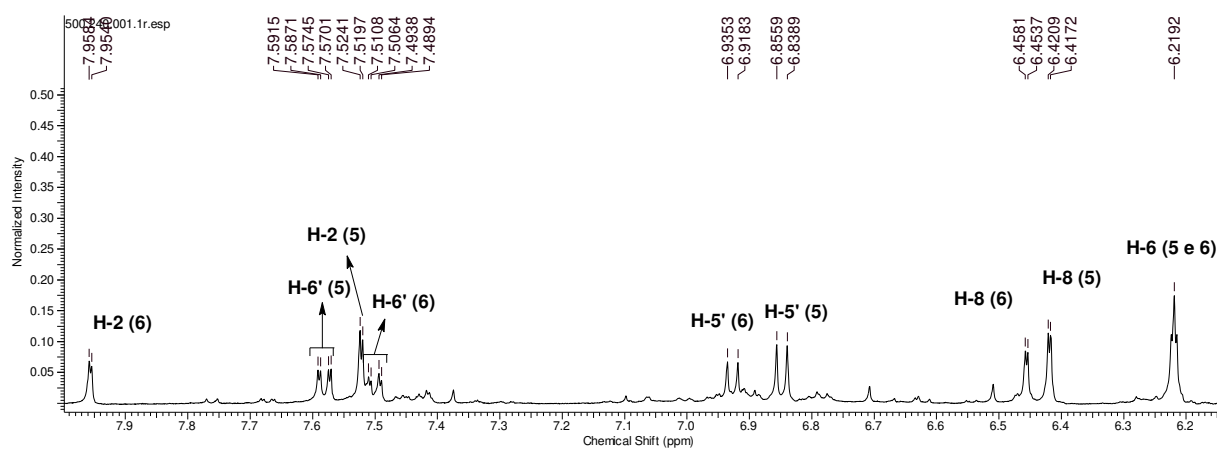


Figura 20: Expansão do espectro RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) das substâncias **5** e **6**, de 6,2 a 7,95 ppm.

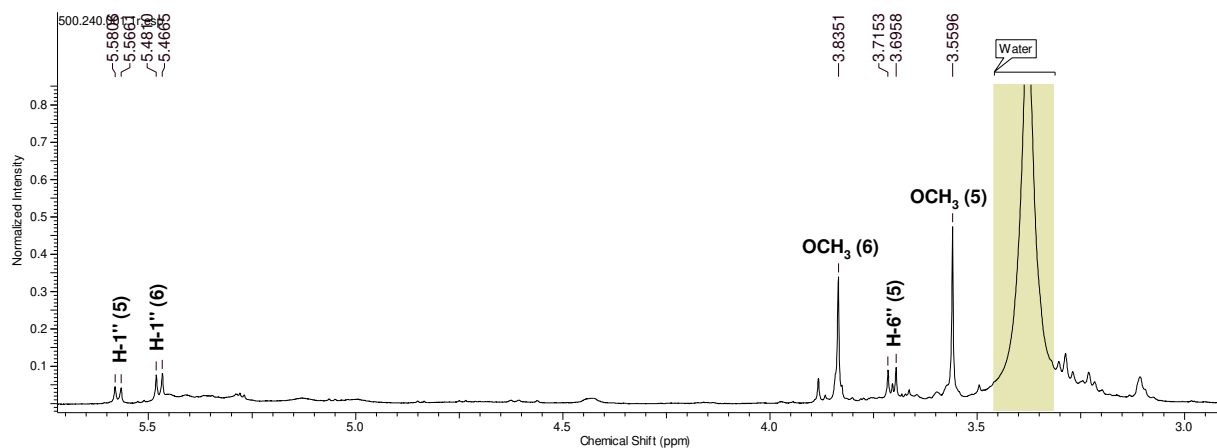


Figura 21: Expansão do espectro RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) das substâncias **5** e **6**, de 3,0 a 5,55 ppm.

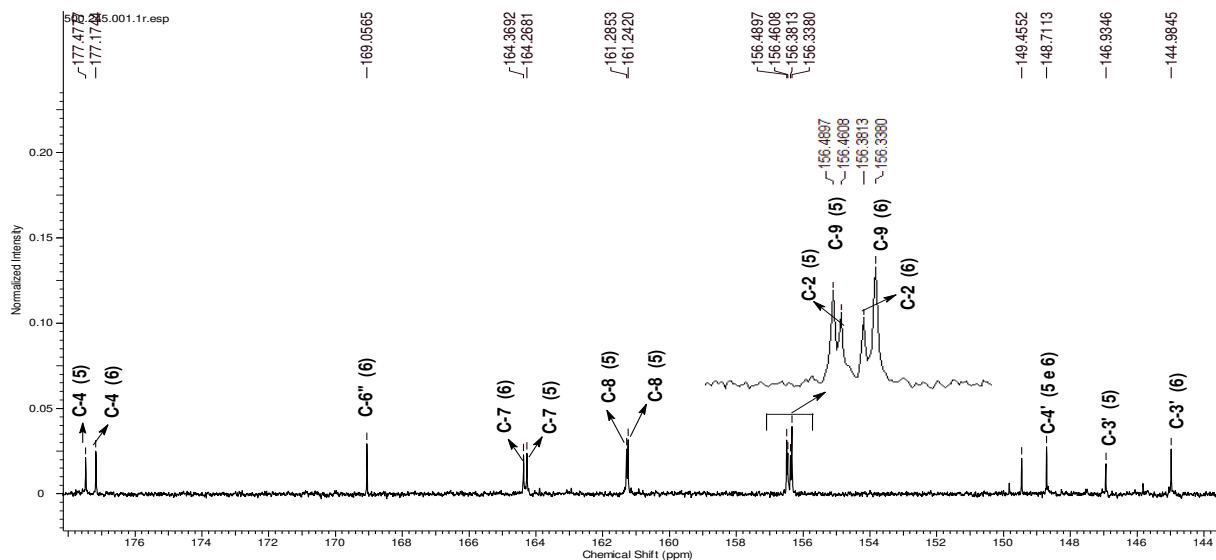


Figura 22: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) das substâncias **5** e **6**, de 144 a 178 ppm.

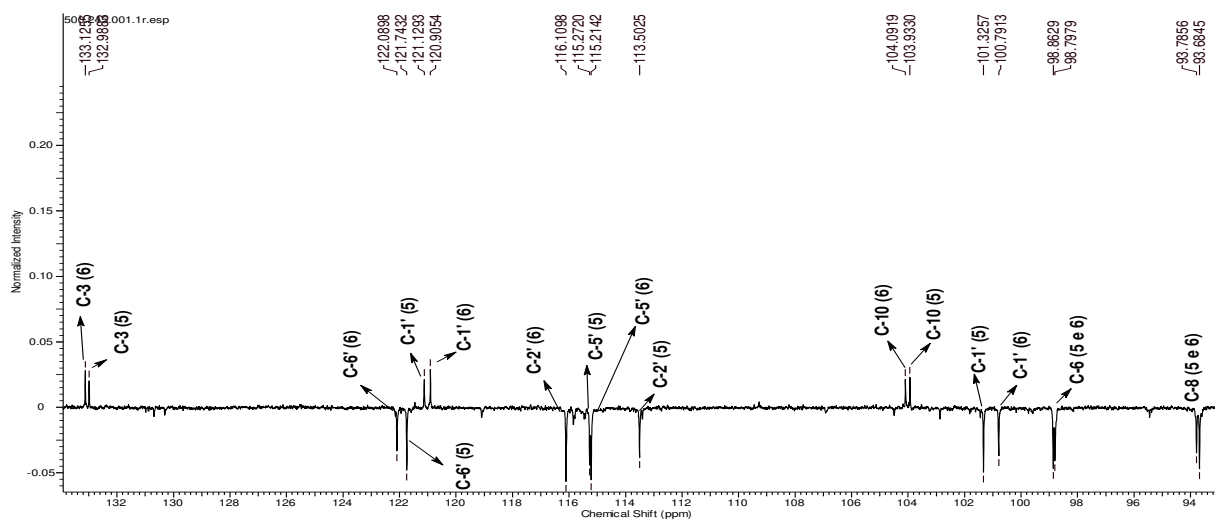


Figura 23: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) das substâncias **5** e **6**, de 94 a 133 ppm.

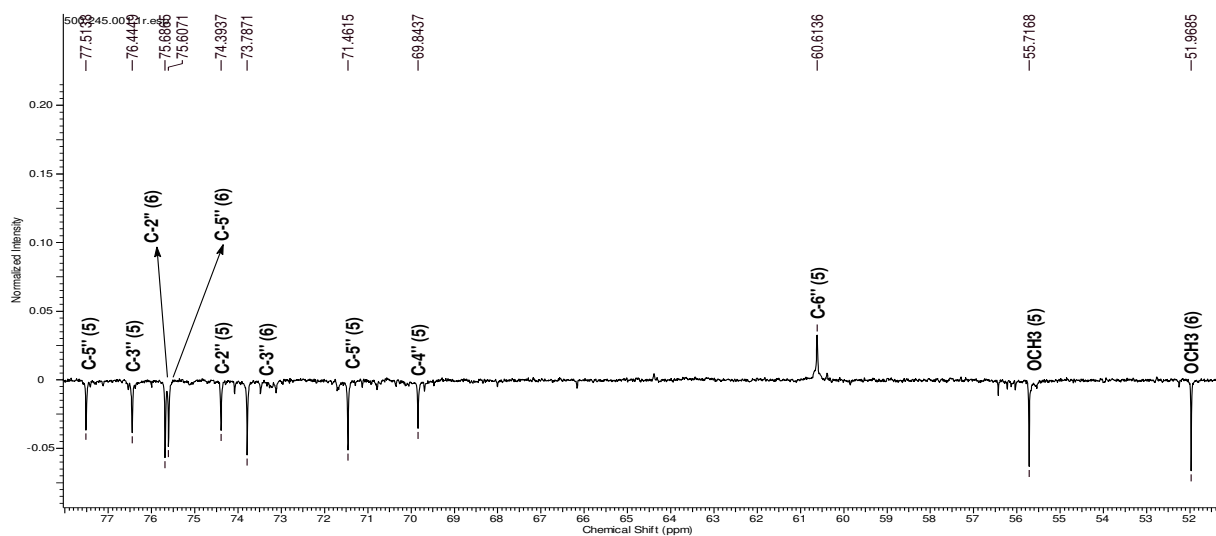


Figura 24: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) das substâncias **5** e **6**, de 52 a 78 ppm.

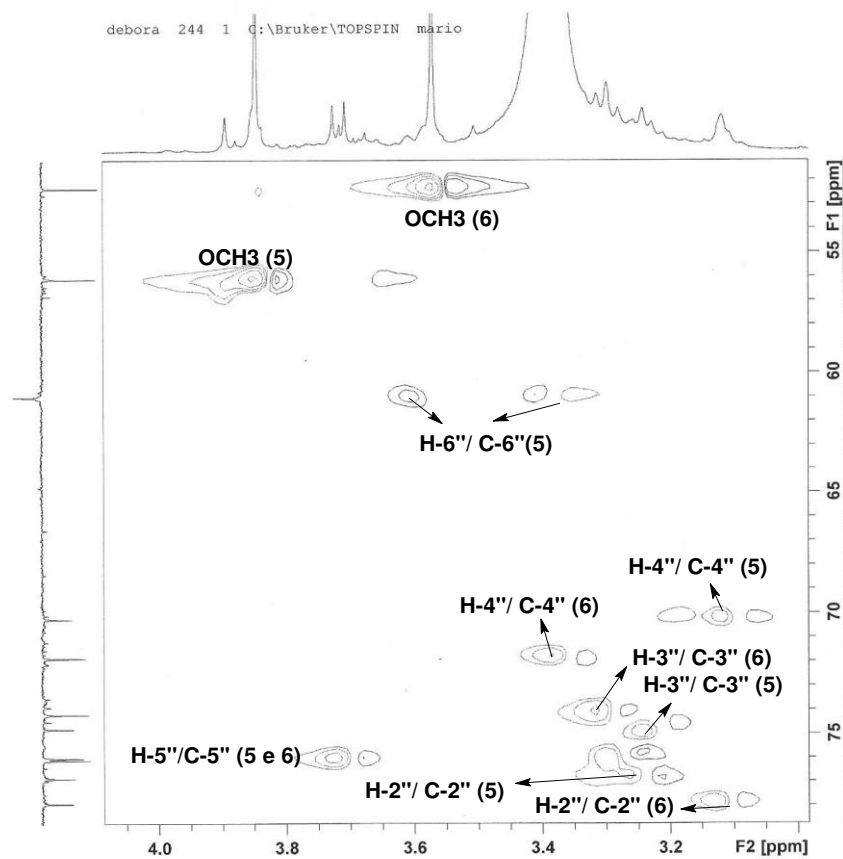


Figura 25: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD₃OD) da substância **5 e 6** , de 3,1 a 4,0 ppm.

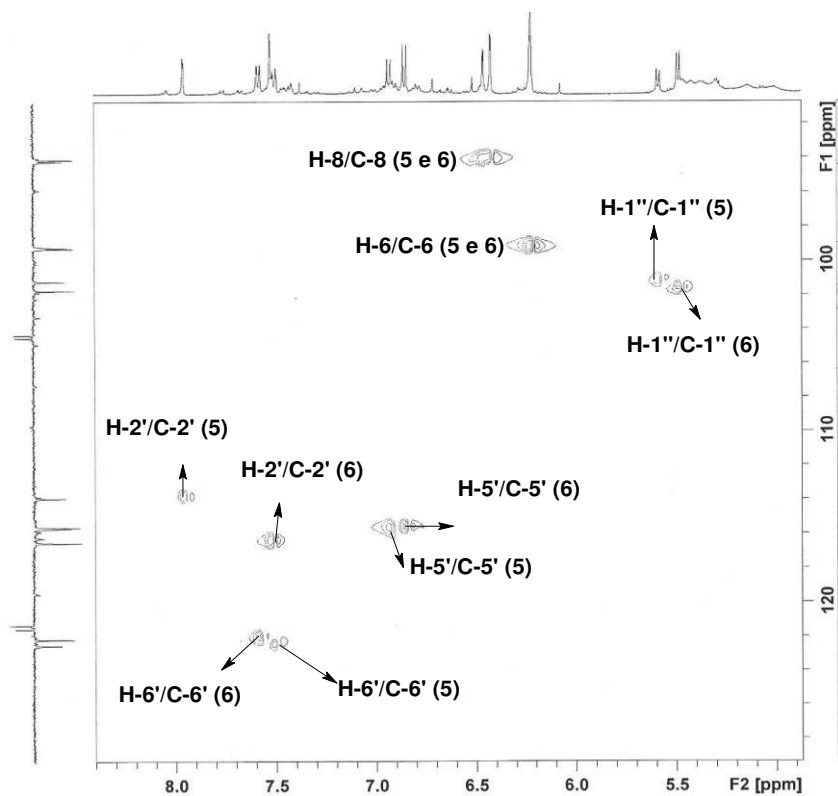


Figura 26: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD₃OD) da substância **5 e 6** , de 5,0 a 8,5 ppm.

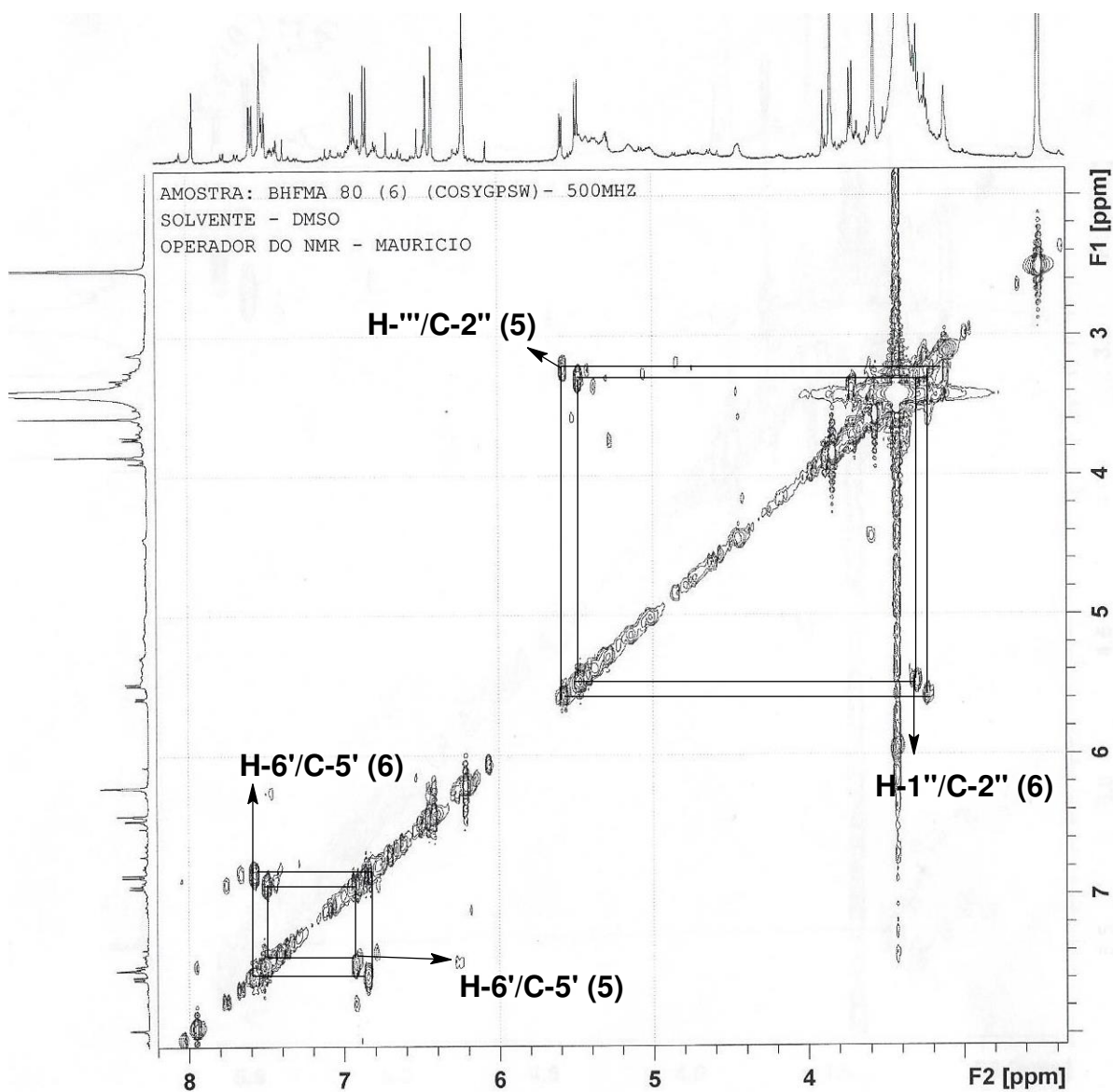
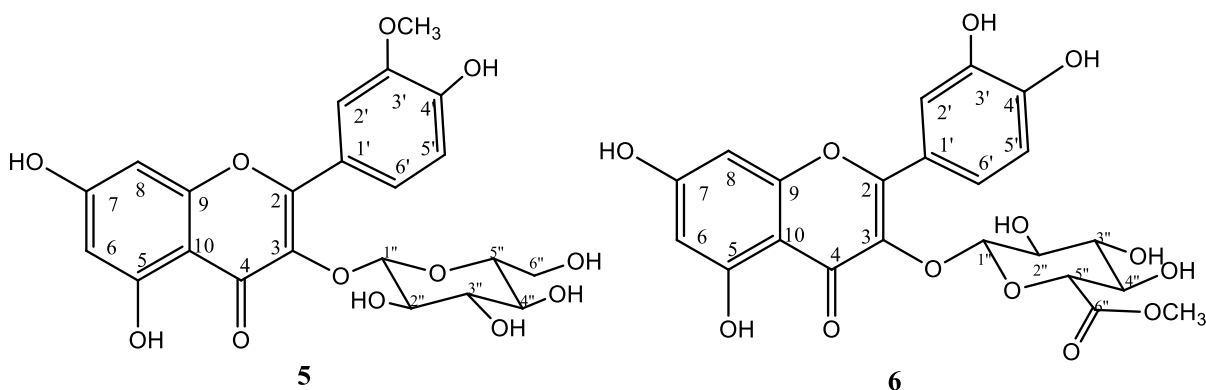


Figura 27: Mapa de contorno RMN- COSY (500 MHz, CD₃OD) da substância 5 e 6.



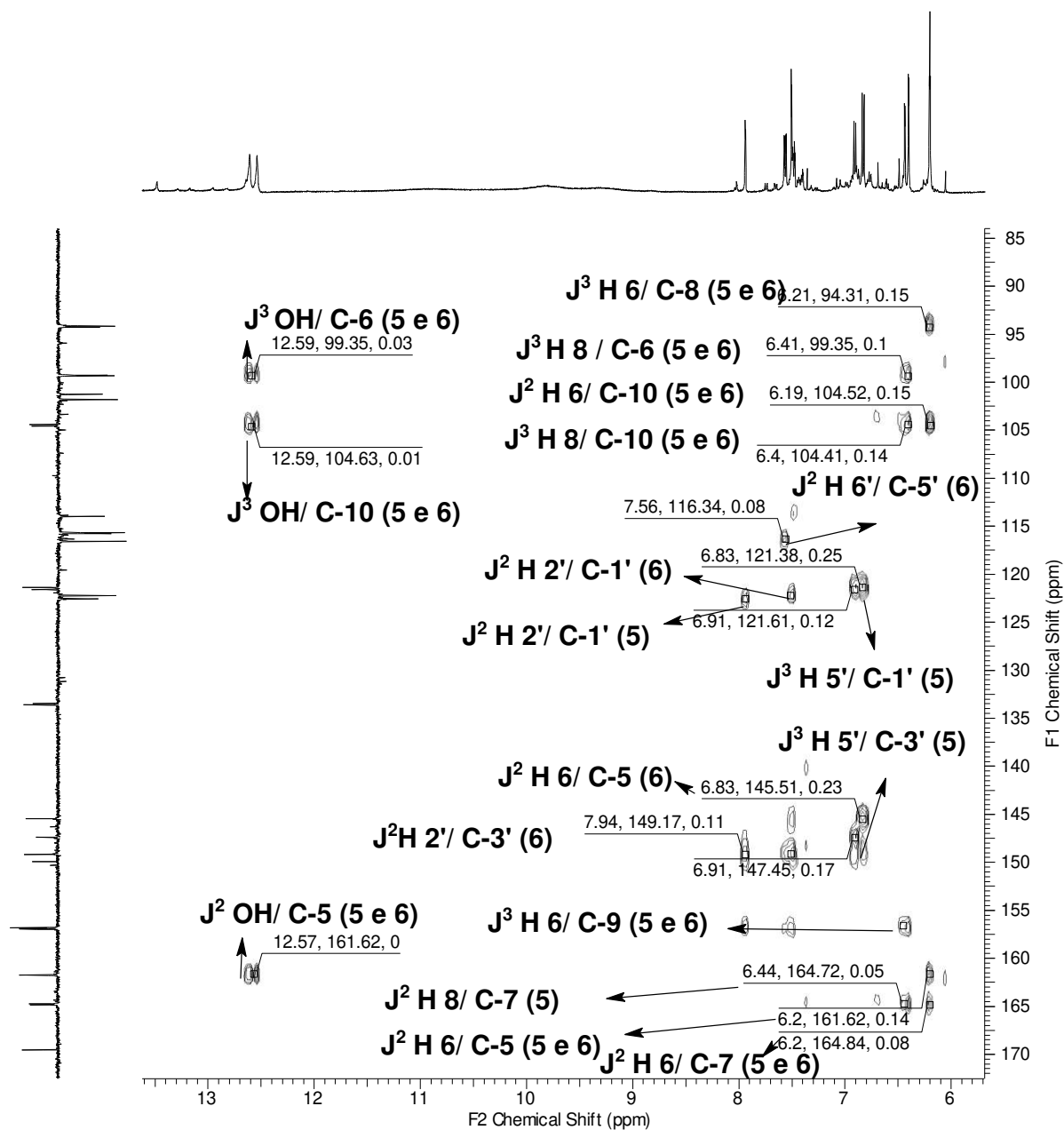
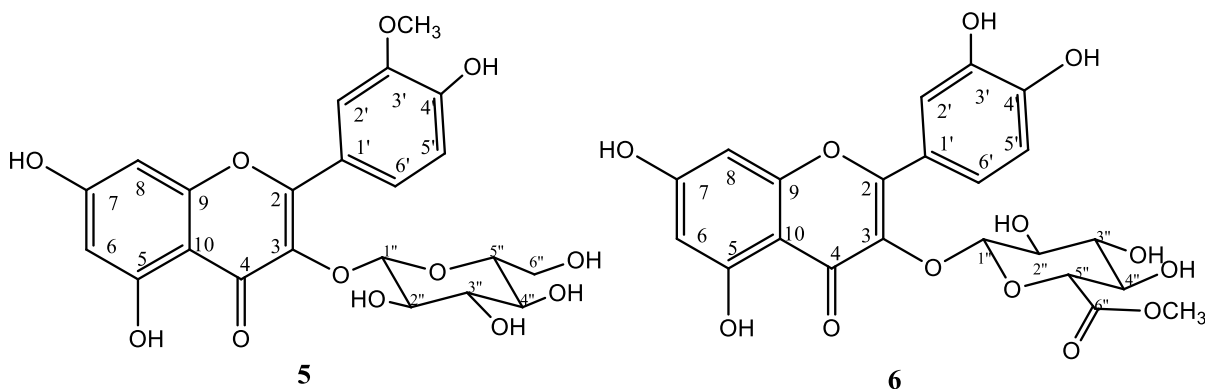


Figura 28: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125 MHz, CD_3OD) da substância **5 e 6**, de 6,0 a 13,0 ppm.



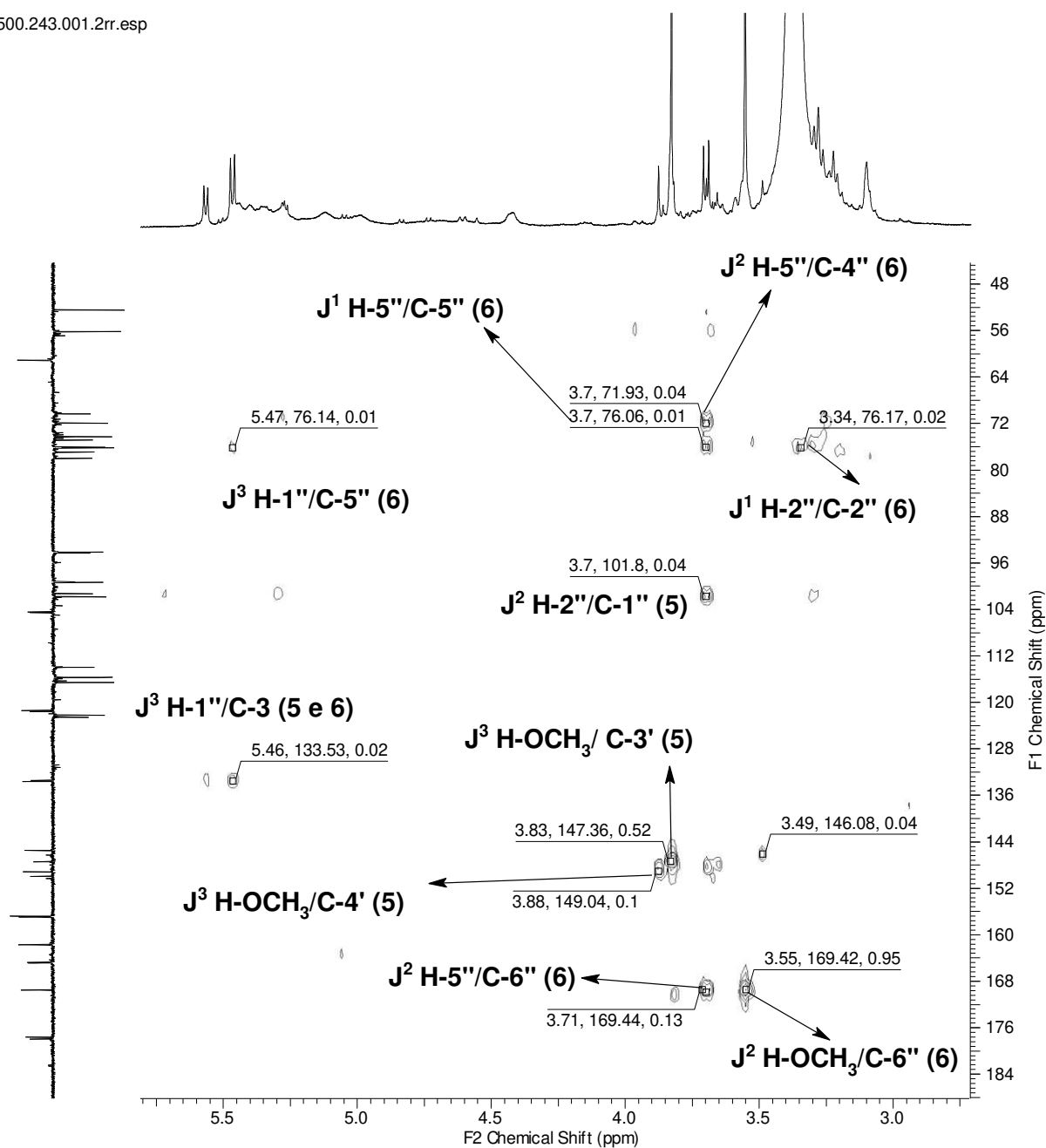
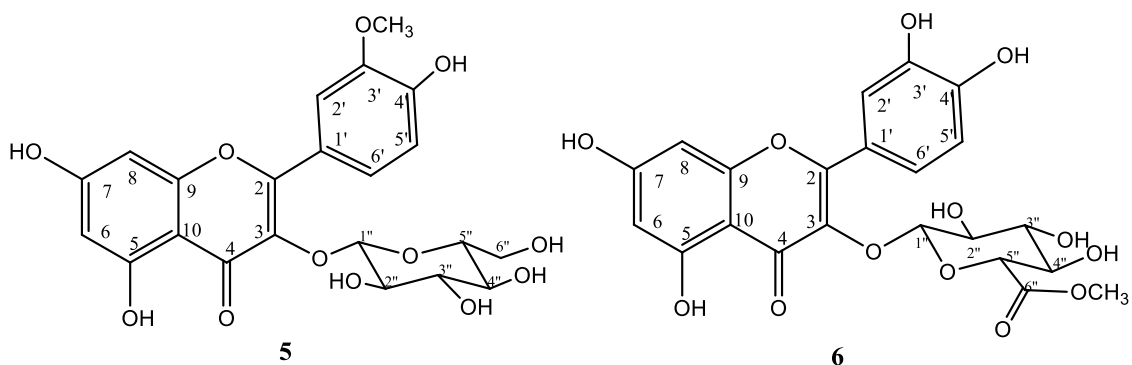


Figura 29: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125 MHz, CD_3OD) da substância **5 e 6**, de 2,75 a 6,0 ppm.



5.3. Identificação da substância 7 isolada de BHF₂OA

A identificação da substância **7** foi realizada por interpretação de espectros de RMN¹H, ¹³C e análise de experimentos bidimensionais. O experimento de RMN ¹H apresentou sinais compatíveis com esqueleto molecular de uma flavona. No espectro de RMN ¹H (**fig.31, pág. 44**) foram observados sinais em δ_H 7,85(d; 8,5 Hz) pertencente aos H-2' e 6', e δ_H 6,95 (d; 8,5 Hz) correspondente aos H-5' e 3', que confirmam o padrão de substituição do anel B como AA'BB'. Os sinais δ_H 6,47(d; 1,85 Hz) correspondente ao H-6, e δ_H 6,72(d; 1,85 Hz) correspondente ao H-8 ambos hidrogênios mantêm entre si relação *meta* no anel A do flavonoide. A presença das unidades de açúcar foram confirmadas pelos dois simpletes largos em δ_H 5,58 (*s*) e δ_H 5,40 (*s*) característicos do hidrogênio do carbono anomérico de ramnose, no experimento bidimensional HSQC (**fig. 34 e 35, pág. 46**) é possível identificar que esses hidrogênios estão ligados aos carbonos anoméricos, com deslocamentos químicos 98,07 e 102,02 ppm, outros sinais nos levaram a identificar as raminoses, como a presença de dois dupletos em 1,29 ppm e 0,96 ppm, deslocamentos típicos do H-6. As relações entre hidrogênios e carbonos na molécula foram observadas no experimento bidimensional HBMC (**fig. 36 e 37, pág.47 e 48**). Esses valores estão de acordo com os dados da **3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol** isolada de *Bauhinia forficata* (Leguminosae) (PIZZOLATTI et al., 2003), **tabela 4**. Os espectros de massas de alta resolução com ionização por eletro spray, feito em modo negativo (**fig. 38, pág. 49**), apresentou sinal com valor $m/z= 577,15[M-H]^-$ compatível com a fórmula molecular C₂₇H₂₉O₁₄, outros valores de m/z , 431,09[(M-H)-146]⁻ e 285,03 [(M-H)-146-146]⁻, são compatíveis com a proposta de fragmentação apresentada no **esquema 10, pág. 49**.

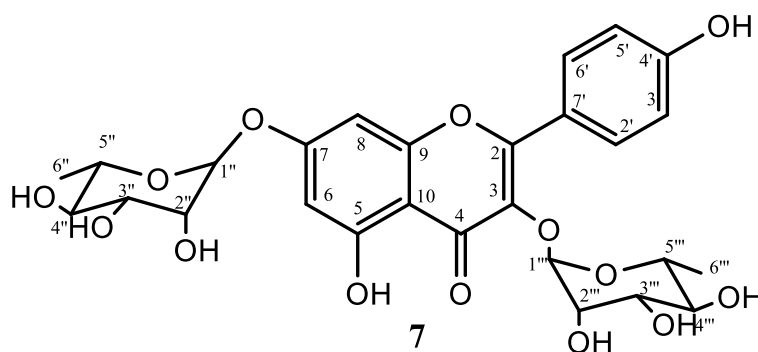


Figura 30: Estrutura do 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol (**7**).

Tabela 7: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **7** em comparação com dados da literatura.

	Substancia 7 (CD_3OD)				3,7-di- <i>O</i> - α -L- ramnopiranosilkanferol (DMSO-d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)
2	156,62	-			157,77	-
3	135,47	-			134,55	-
4	178,8	-			177,92	-
5	161,62	-			160,93	-
6	98,81	6,46(<i>d</i> , 1.85Hz)	C-5	C-8; C-10	99,44	6,44 (<i>d</i> , 2,2Hz)
7	162,58	-			161,70	-
8	93,87	6,72(<i>d</i> , 1,85Hz)	C-7; C-9	C-6; C-10	94,59	6,77 (<i>d</i> , 2,2Hz)
9	158,47	-			156,09	-
10	106,51	-			105,79	-
1'	120,38	-			120,36	-
2' e 6'	130,9	7,80 (<i>d</i> , 8,5 Hz)		C-4'	130,68	7,88 (<i>d</i> , 8,8Hz)
3' e 5'	114,86	6,96 (<i>d</i> , 8,5Hz)	C-4'	C-1'	115,42	6,91 (<i>d</i> , 8,8Hz)
4'	160,62	-			160,14	-
1''	98,07	5,58 (<i>s</i>)	C-2''	C-7;C-5''	98,5	5,54(<i>d</i> , 1.8)
2''	70,26	4,06(<i>sl</i>)			70,26	3,83 (<i>sl</i>)
3''	70,68	3,76(<i>m</i>)			69,80	3,63 <i>dd</i> ,(3.1; 9.2)
4''	72,16	3,51(<i>m</i>)	C-3''	C-5''	71,61	3,29(<i>t</i> 9.2)
5''	69,86	3,62(<i>m</i>)	C-4''		70,06	3,44(<i>m</i>)
6''	16,69	1,28(<i>d</i> , 5,95Hz)	C-5''	C-4''	17,94	1,2 (<i>d</i> , 6.2)
1'''	102,02	5,40(<i>s</i>)	C-2''';	C-3	101,91	5,29(<i>sl</i>)
2'''	70,62	4,25(<i>sl</i>)			70,35	3,97(<i>sl</i>)
3'''	70,50	3,87(<i>m</i>)			70,64	3,48 (<i>m</i>)
4'''	71,77	3,36(<i>m</i>)	C-3'''		72,39	3,13(<i>m</i>)
5'''	70,62	3,39(<i>m</i>)			70,06	3,44(<i>m</i>)
6'''	16,28	0,95(<i>d</i> , 5,65Hz)	C-5'''	C-4'''	17,45	0,79(<i>d</i> , 6.2)

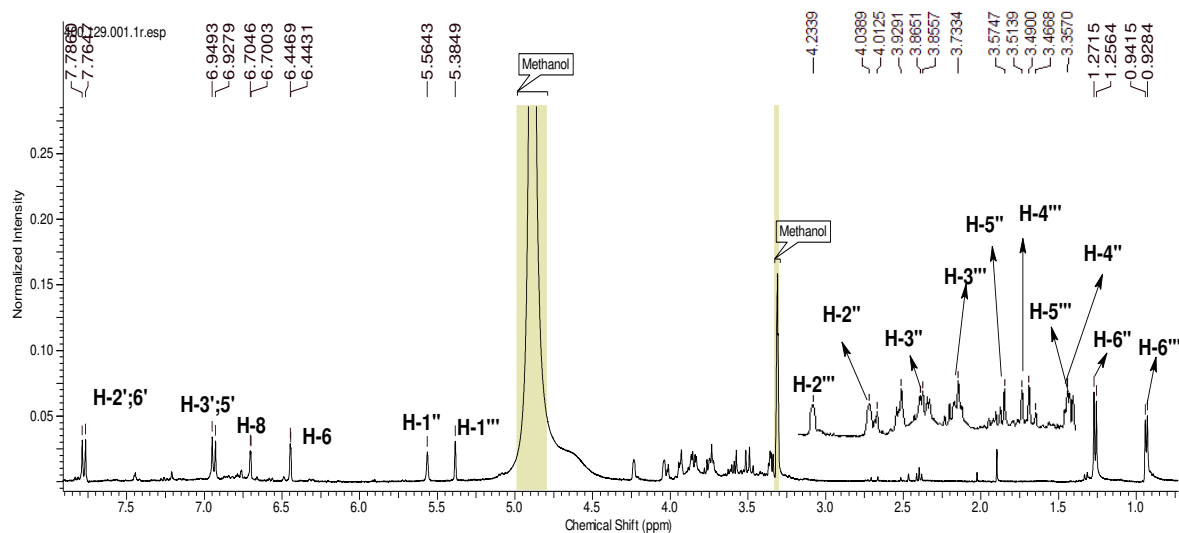


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 7.

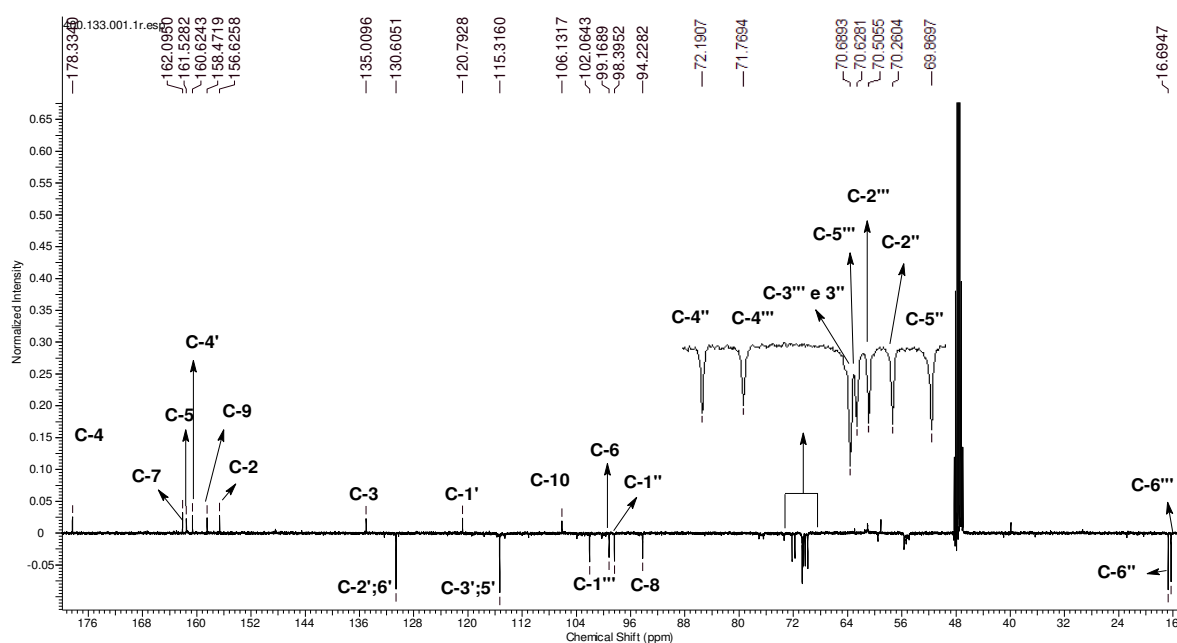


Figura 32: Expansão do espectro DEPTQ (100 MHz, CD_3OD) da substância 7, de 16 a 176 ppm.

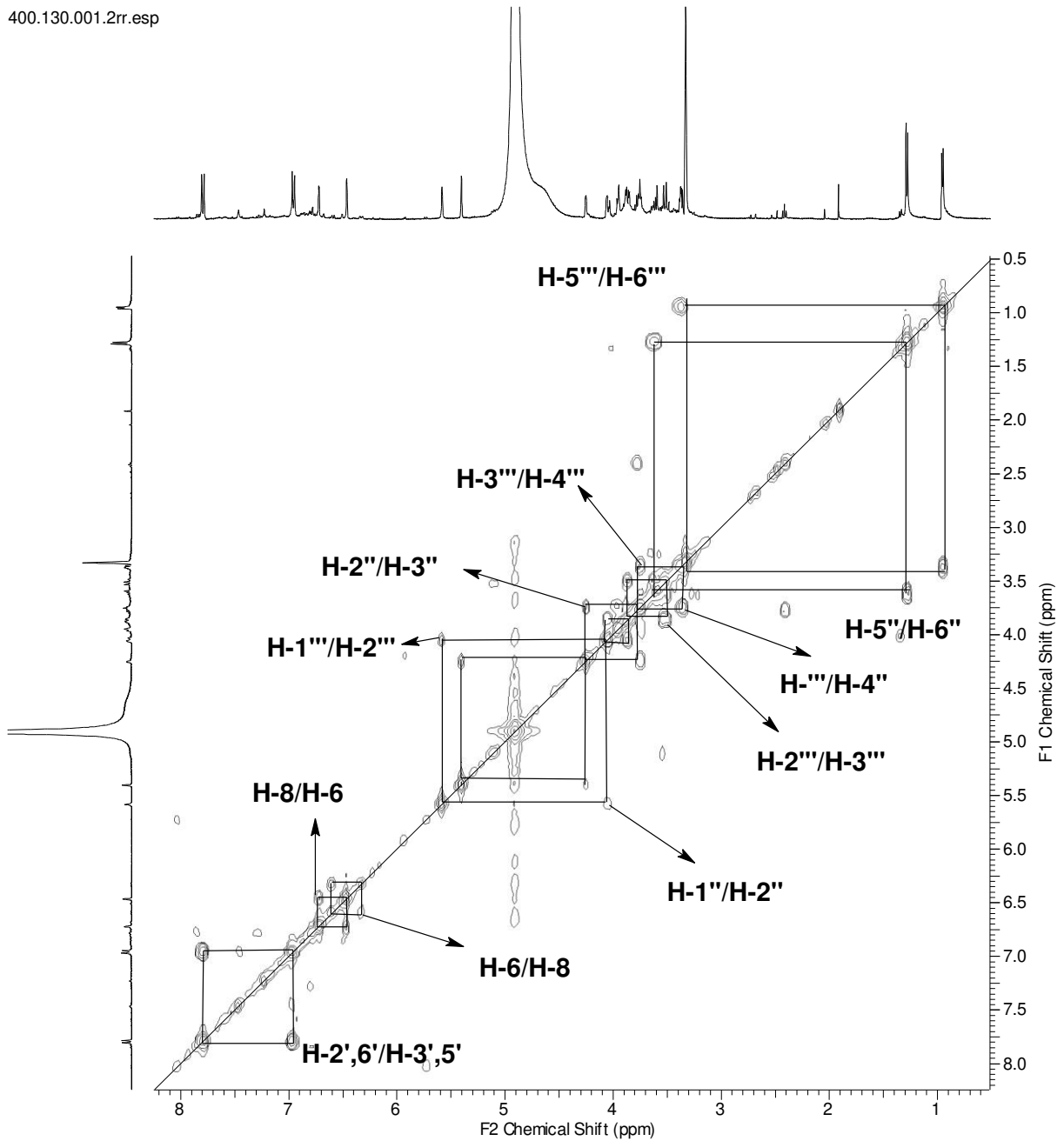
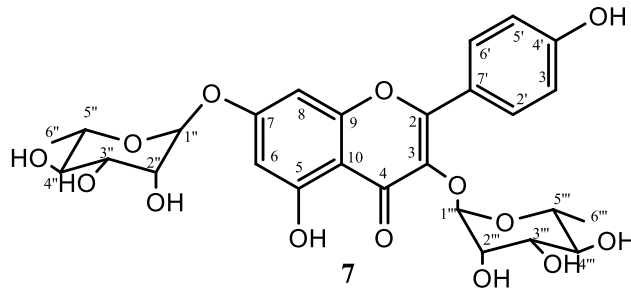


Figura 33: Mapa de contorno RMN- COSY (400 MHz, CD₃OD) da substância 7.



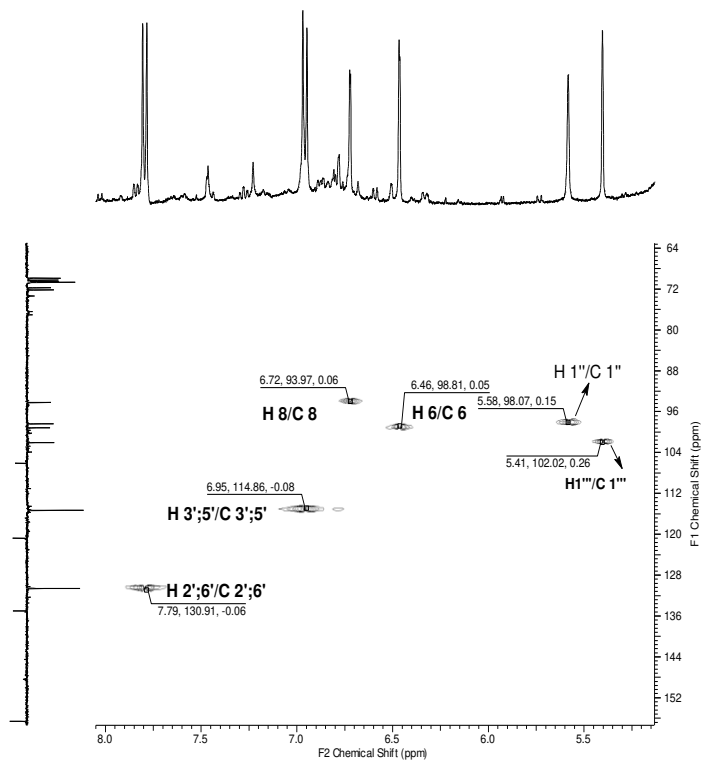


Figura 34: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (400/ 100 MHz, CD₃OD) da substância 7, de 5,25 a 8,0ppm.

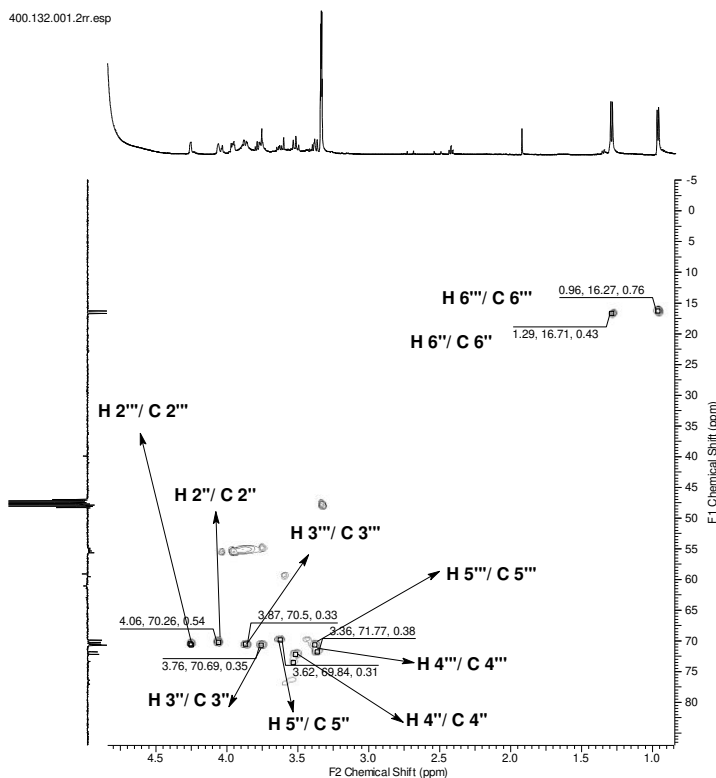


Figura 35: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (400/ 100 MHz, CD₃OD) da substância 7, de 1,0 a 4,5 ppm.

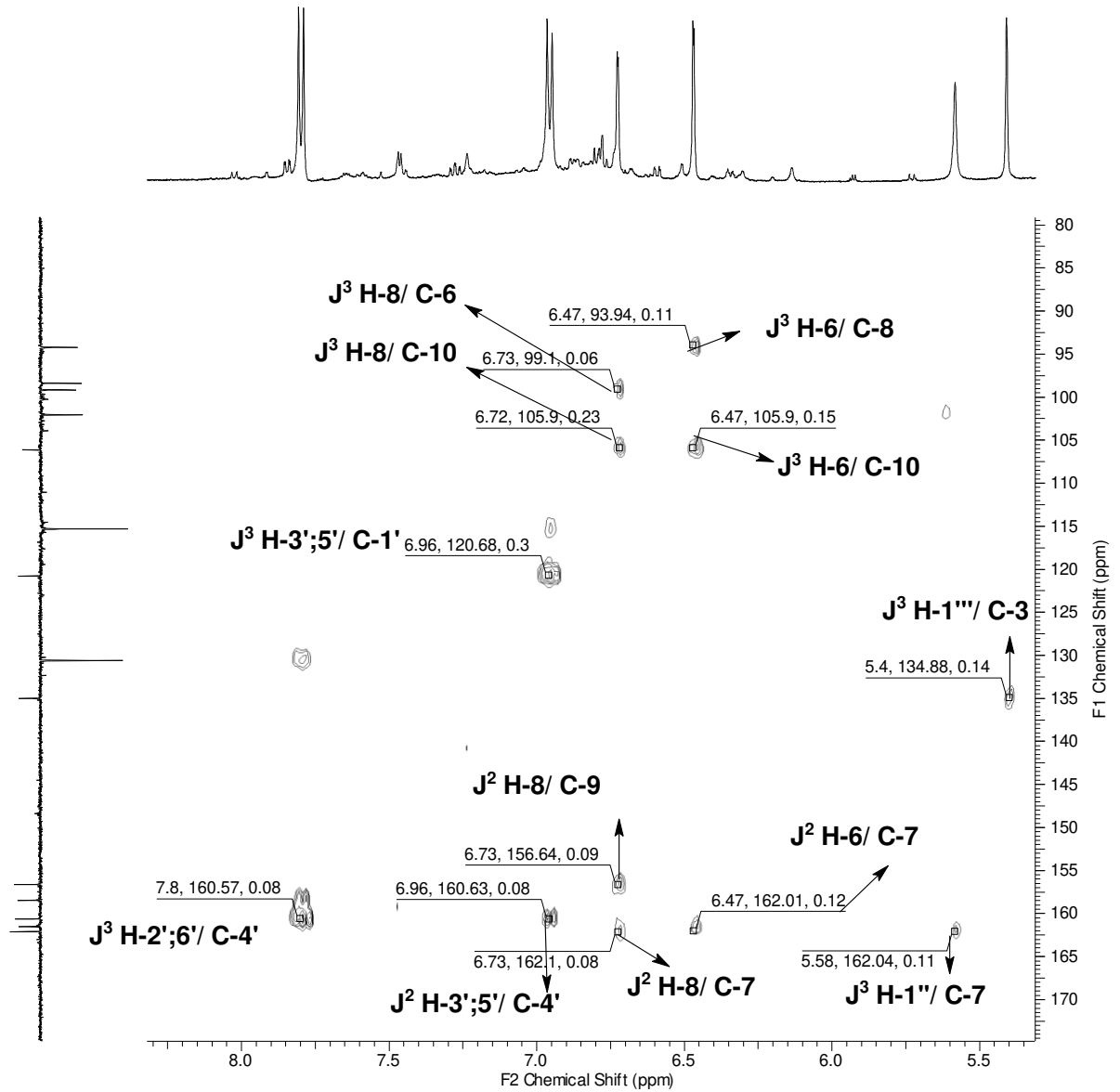
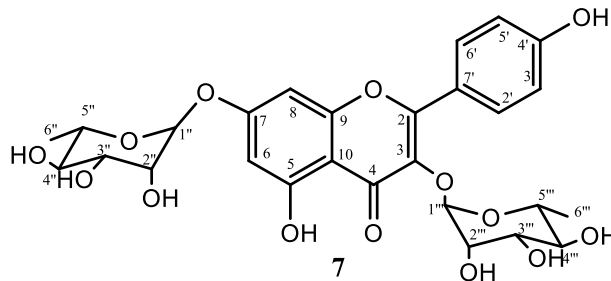


Figura 36: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (400/ 100 MHz, CD₃OD) da substância **7**, de 6,25 a 8,0 ppm.



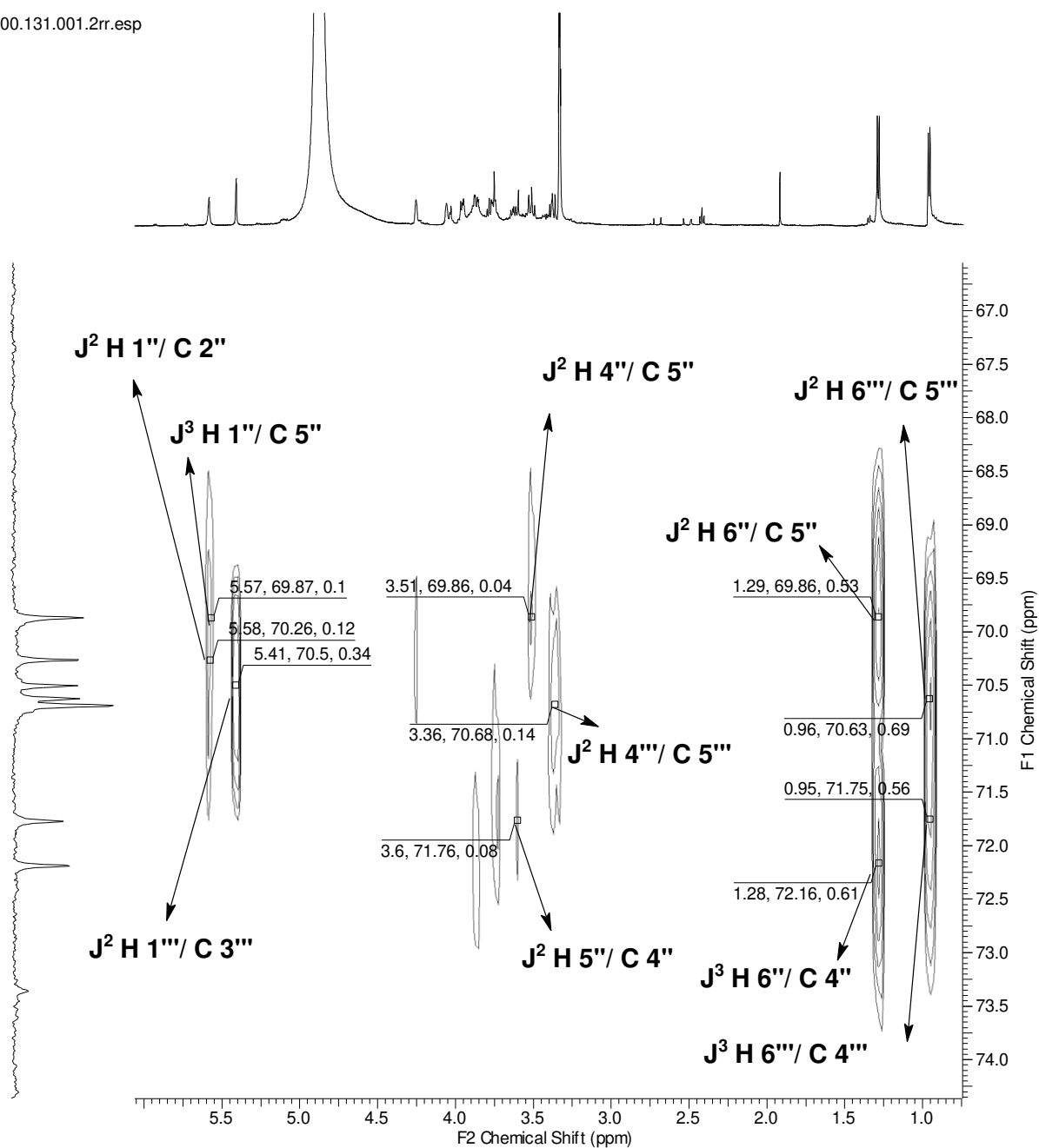
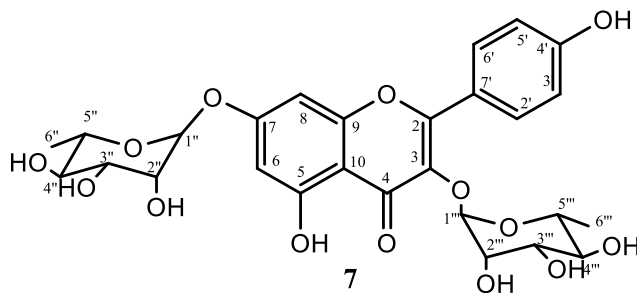


Figura 37: Expansão do espectro RMN- HMBC (400/ 100 MHz, CD₃OD) da substância 7, de 1,0 a 6,0 ppm.



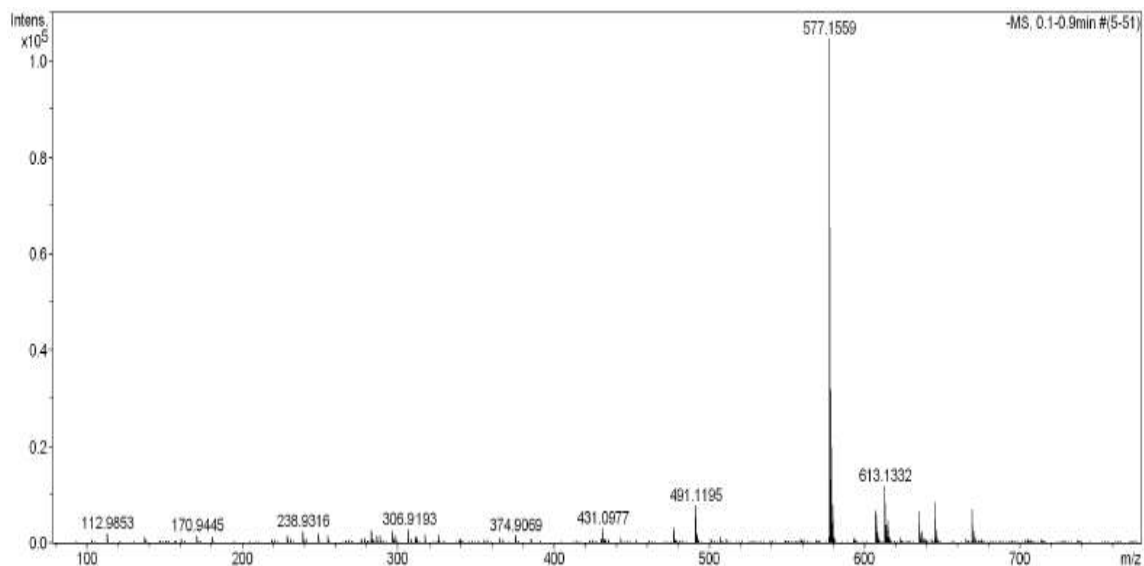
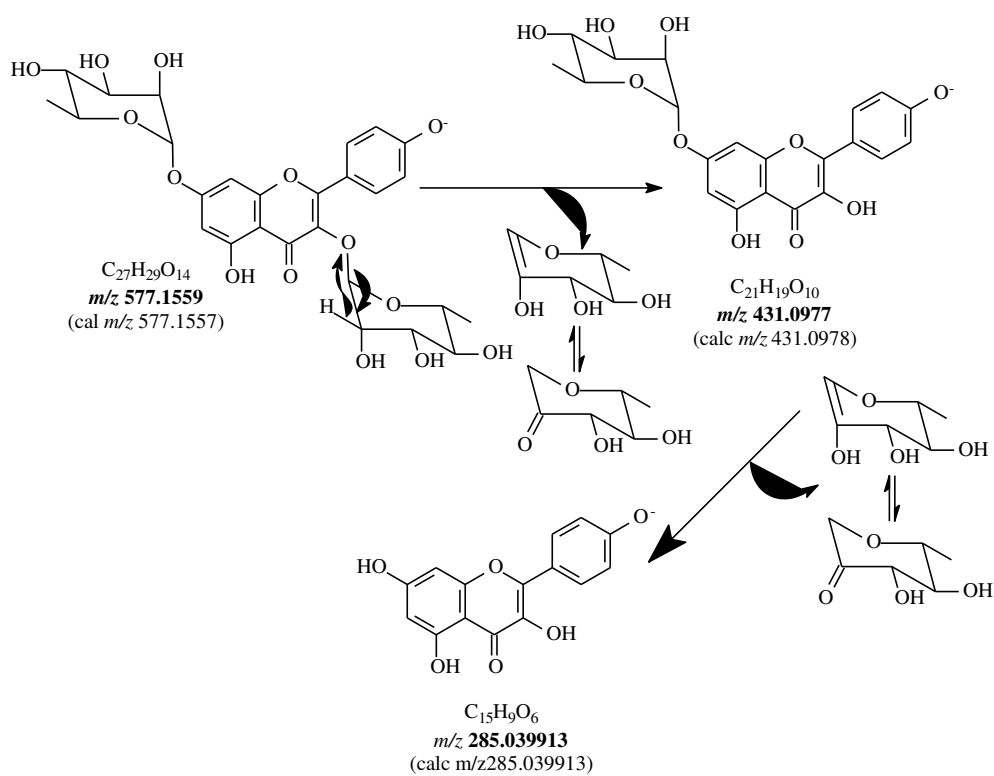


Figura 38: Espectro de massas de alta resolução da substância 7.



Esquema 10: Proposta de fragmentação de massas da substância 7.

5.4. Identificação da substância 8 isolada de BHFMA

A identificação deste flavonoide foi realizada por interpretação de espectro de RMN¹H e ¹³C. No espectro de RMN ¹H (**fig.41, pág. 52**) observaram-se os sinais entre δ_H 8,0 e δ_H 6,0 pertencem à região característica de hidrogênio de sistema aromático de flavonoides. Os sinais δ_H 7,32 (H-6', dd), δ_H 7,36 (H-2', d, 1,85 Hz) e δ_H 6,93 (H-5', d, 8,5 Hz) caracterizam o padrão de substituição do anel B, sinais em 6,39(d, 2,2 Hz) e 6,39 (2,2 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8 respectivamente. As demais observações no espectro de RMN¹H na faixa entre δ_H 3,25 e δ_H 4,5 referentes aos hidrogênios de uma unidade de ramnose, e o duplete em 5,37(1,25 Hz) é referente ao hidrogênio 1''. A posição em que a ramnose se encontra foi concluída através da análise bidimensional HMBC (**fig. 46, pág. 56**) que mostra o acoplamento entre o H-1'' e o C-3. Outras informações foram obtidas dos espectros bidimensionais, HSQC (**fig.42 e 43, pág. 53**) e HMBC (**fig.44 a 46, pág. 54 a 56**), que auxiliaram na correta determinação dos sinais de carbono do açúcar bem como determinar quem são os carbonos quaternários. Esses valores estão de acordo com os dados da **quercetina 3-O- α -L-ramnosídeo**, isolada da folha de *Sonchus erzincanicus* (Asteraceae), a análise por ressonância magnética nuclear (400 MHz) do flavonoide foi registrado em CD₃OD (OZGEM et al., 2010), os dados da substância 7 e da literatura encontram-se na **tabela 8 (pág. 51)**.

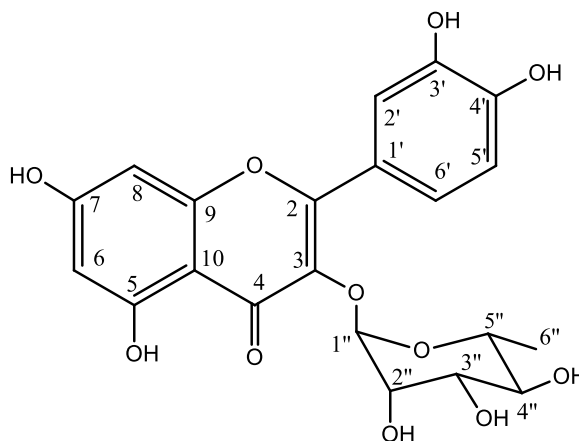


Figura 39: Estrutura do 5,7,3',4'-tetrahydroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona (8).

Tabela 8: Dados de RMN¹H e ¹³C químicos da substância **8** e comparação com os dados da literatura.

Substância 8 (CD ₃ OD)					quercetina 3-O- α -L- ramnosídeo (CD ₃ OD)	
	δ_C	δ_H (mult. J)	² J _{HC}	³ J _{HC}	δ_C	δ_H
2	157,91	-			157,6	-
3	134,82	-			134,4	-
4	178,24	-			178,1	-
5	161,83	-			161,8	-
6	98,40	6,22 (<i>d</i> ; 2,2Hz)	C-5	C-8; C-10	99,2	6,17
7	164,52	-			166,2	-
8	93,29	6,39 (<i>d</i> ; 2,2Hz)	C-7; C-C-9	C-6; C-10	93,8	6,36
9	157,12	-			157,4	-
10	104,47	-			104,1	-
1'	121,53	-			122,0	-
2'	115,49	7,36(<i>d</i> ; 1.85Hz)	C-1'; C-3'	C-2; C-4'	114,8	7,70
3'	145,03	-			144,7	-
4'	148,41	-			148,7	-
5'	114,95	6,93 (<i>d</i> ; 8,5Hz)	C-4'	C-3'; C-1'	116,3	6,86
6'	121,33	7,32(<i>dd</i>)	C-5'	C-2; C-4'	121,9	7,58(<i>dd</i> , 8,5Hz)
1''	102,14	5,37 (<i>s</i>)	C-3; C-2''		103,2	5.22
2''	70,49	4,24(<i>sl</i>)		C-4''	74,5	
3''	70,68	3,76 (<i>dd</i> , 3,45Hz e	C4''		76,9	3.85-3.30
4''	71,82	9,45Hz)	C-3'', C-5''		70,0	(4H, sugar protons)
5''	70,63	3,36(<i>m</i>) 3,44(<i>m</i>)			77,2	
6''	16,26	0,97(<i>d</i> , 6,0Hz)	C-5''	C-4''	16,4	

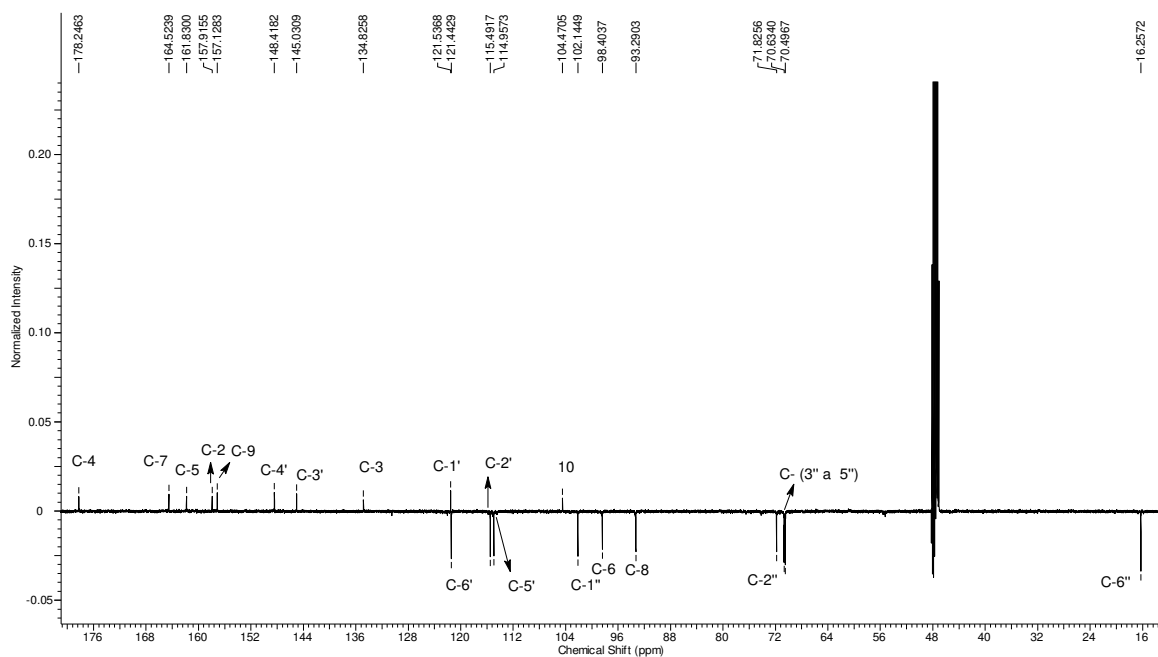


Figura 40. Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, CD₃OD) da substância **8**, de 8 à 152 ppm.

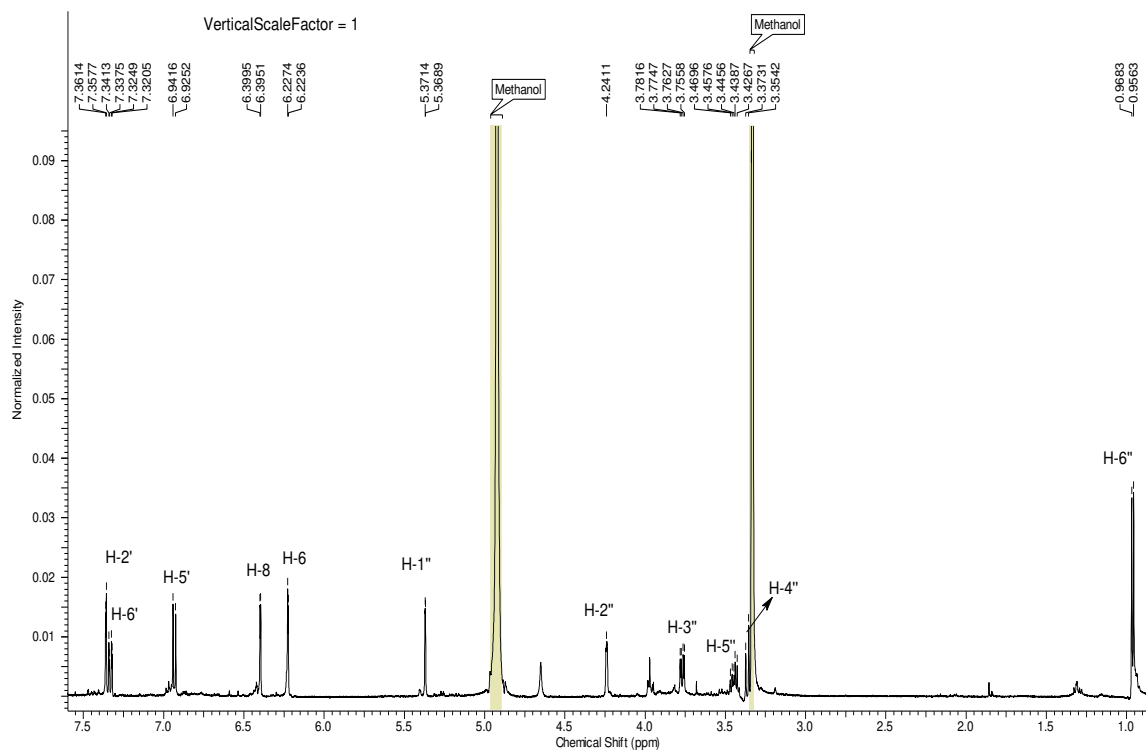


Figura 41. Expansão do espectro RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) da substância **8**, de 0,5 a 7,6 ppm.

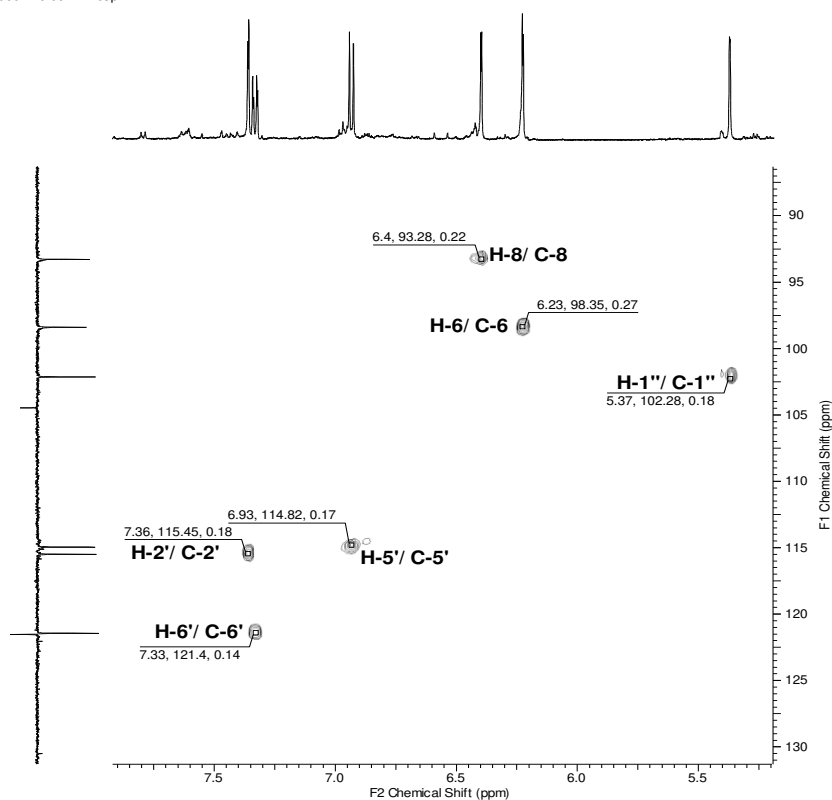


Figura 42: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD_3OD) da substância **8**.

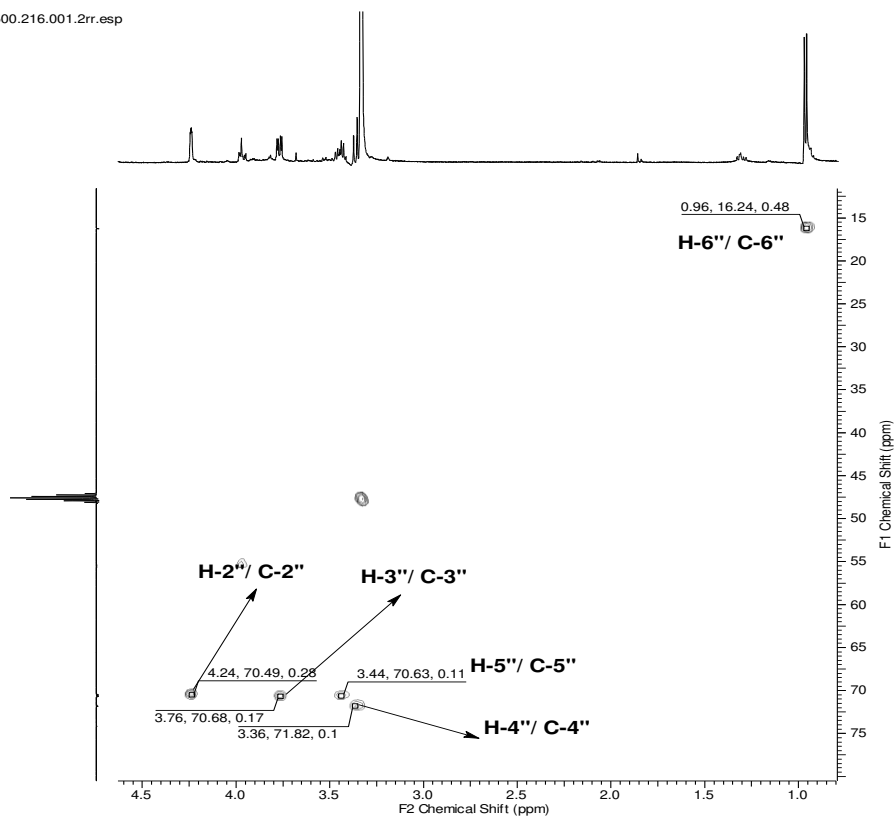


Figura 43: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500/ 125 MHz, CD_3OD) da substância **8**, de 1,0 a 4,5 ppm.

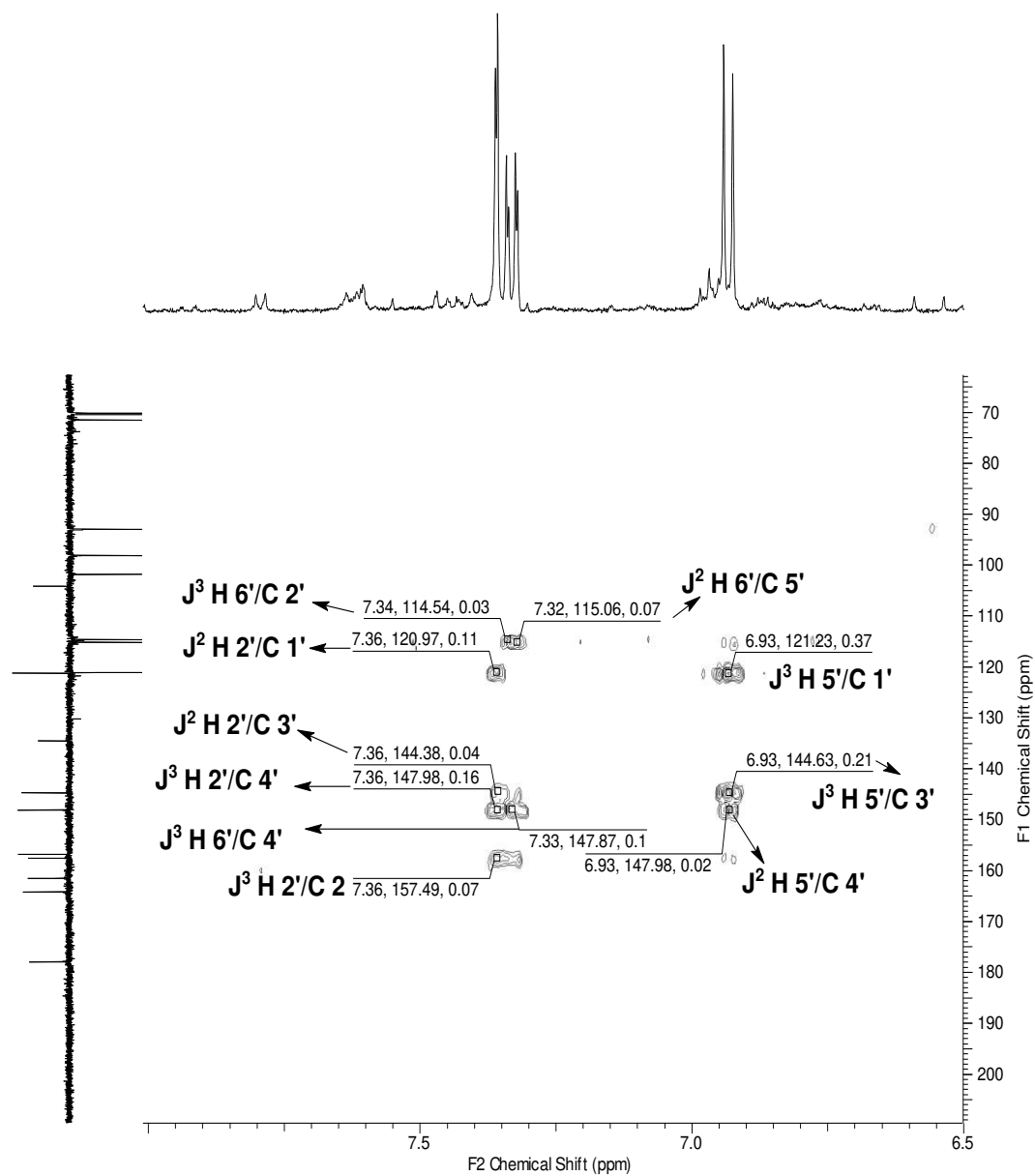
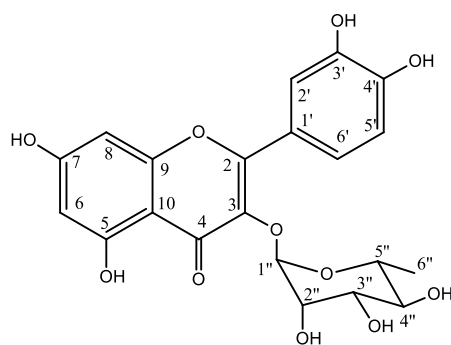


Figura 44: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, MeOD₃) da substância **8**, de 6,5 a 8,0 ppm.



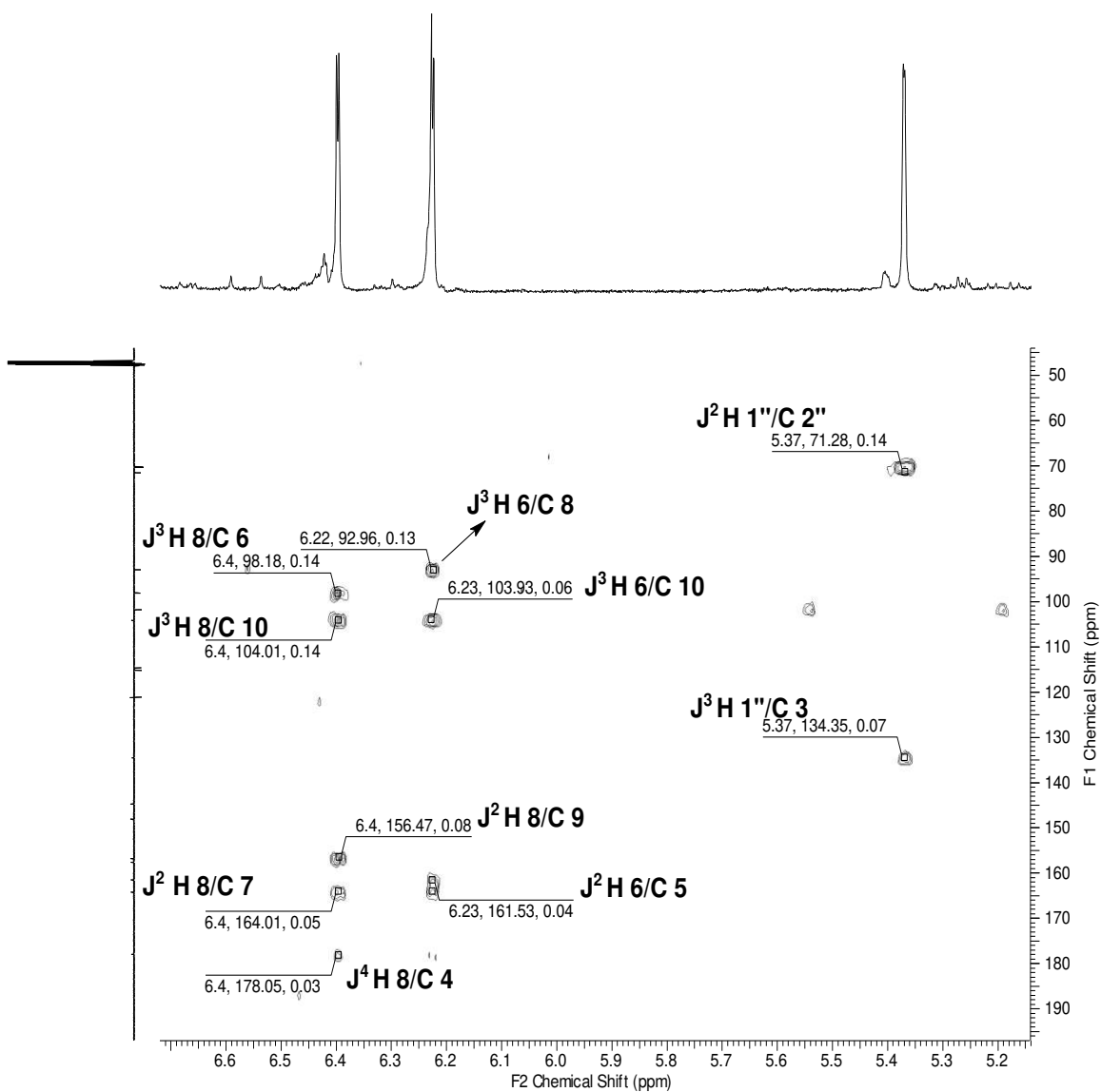
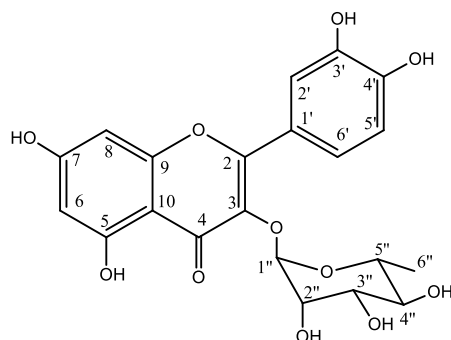


Figura 45: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, CD₃OD) da substância **8**, de 5,1 a 6,7 ppm.



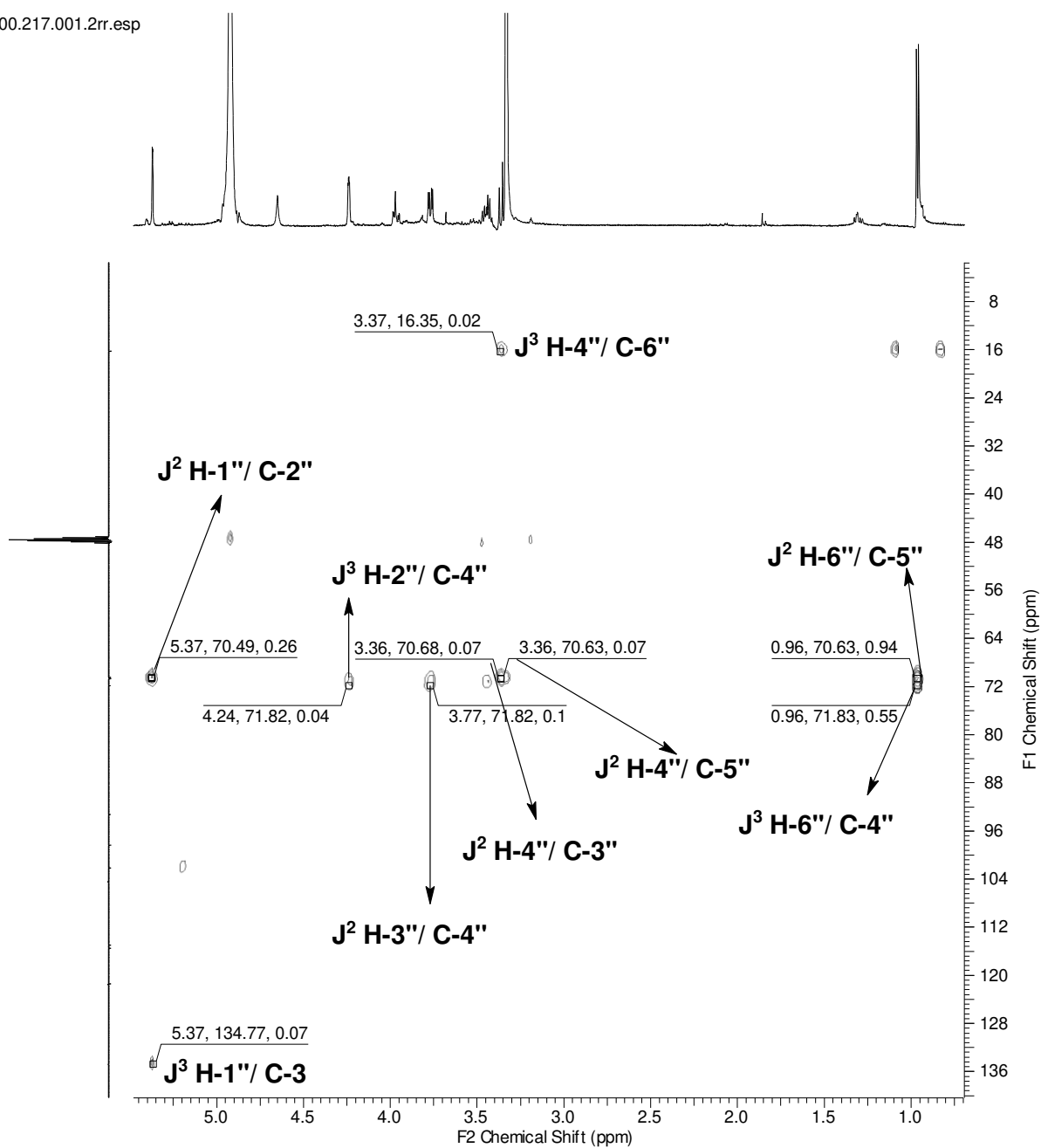
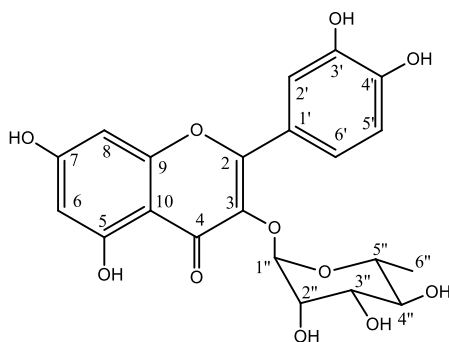


Figura 46: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, CD₃OD) da substância **8**, de 0,95 a 5,5 ppm.



5.5 Identificação da substância 9 isolada de BHFMA

A identificação da substância foi realizada por interpretação de espectro de RMN¹H e ¹³C. No espectro de RMN ¹H (fig.48, pág. 58) observaram-se os sinais na região δ_H 8,0 e 6,0 valores característicos de hidrogênio de sistema aromático. Os sinais em δ_H 7,40 (*s*, 2H) referentes aos hidrogênios 2' e 6', os sinais revelam a simetria entre os substituintes do anel B pois não houve acoplamento entre os estes hidrogênios, sinais em δ_H 6,27 (*d*, 2,2Hz) e 6,57ppm (*d*, 2,2Hz) foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8, respectivamente, o valor da constante de acoplamento revela o acoplamento meta desses hidrogênios, o singlete δ_H 6,75 foi atribuído ao H-3. O singlete em δ_H 3,98 referente às metoxilas que estão ligadas a C3' e 5', as interações foram observadas no experimento de HMBC(fig.51 e 52, pág. 59 e 60) e no experimento NOESY(fig. 53, pág.61) em que se observa a interação espacial dos hidrogênios da metoxila com H-2' e 6' confirmam suas posições. Esses valores obtidos nos espectros da substância 9 estão apresentados na tabela 9 e a comparação com os dados obtidos da tricina (ZIELINSKA et al., 2008).

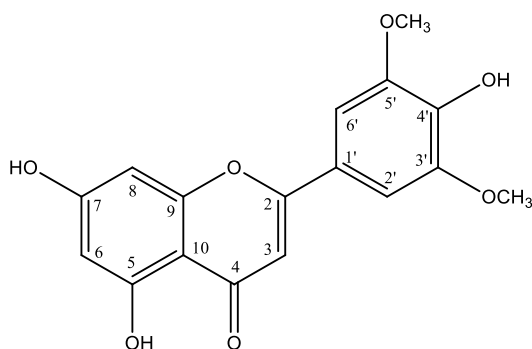


Figura 47: Estrutura da Tricina (9).

Tabela 9: Dados de RMN¹H e ¹³C da substância 9 e comparação com os dados da literatura.

	Substância 9 (D ₃ CCOCD ₃)			Tricina (piridina-d ₅)	
	δ_C	$\delta_H(\text{mult. } J)$	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$	δ_C
2	164,19	-			164,07
3	103,73	6,75(<i>s</i>)	C-2; C-1'	C-2',C-6'	103,56
4	182,19	-			181,74
5	162,42	-			157,30

6	98,83	6,27(s)	C-5; C-7	C-8; C-10	98,79
7	164,12	-			163,61
8	94,00	6,57(s)	C-7;C-9	C-6; C-10	94,14
9	157,90	-			161,37
10	104,23	-			103,72
1'	121,42	-			120,41
2'	104,23	7,40(s)	C-1'; C-3', C-5'	C-2; C-4'	104,42
3'	148,20	-			148,18
4'	139,98	-			139,88
5'	148,20	-			148,18
6'	104,23	7,40(s)			104,42
OCH ₃	56,00	3,98(s)		C-3',C-5'	56,36

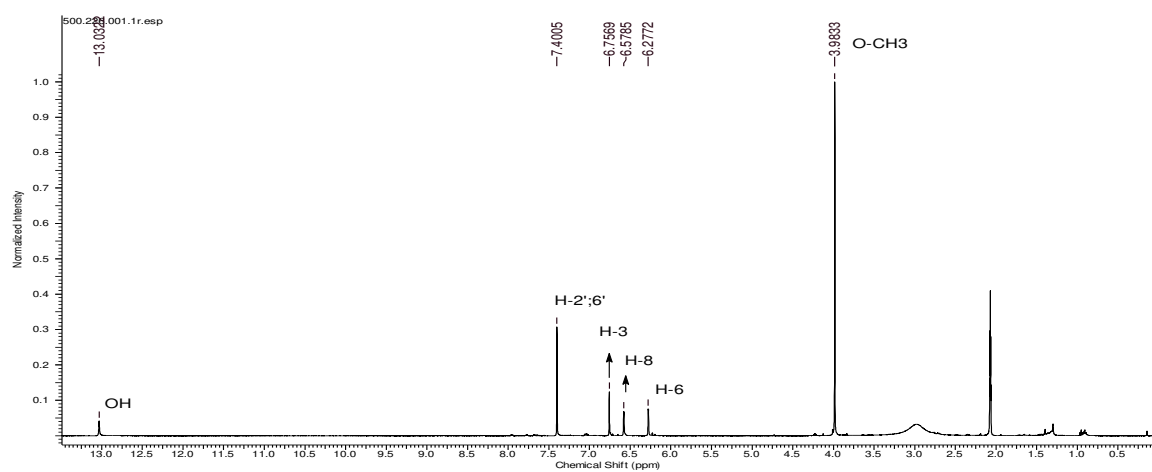


Figura 48: Expansão do espectro de RMN¹H (500 MHz, D₃CCOCD₃) da substância **9**, de 0,0 a 13,0 ppm.

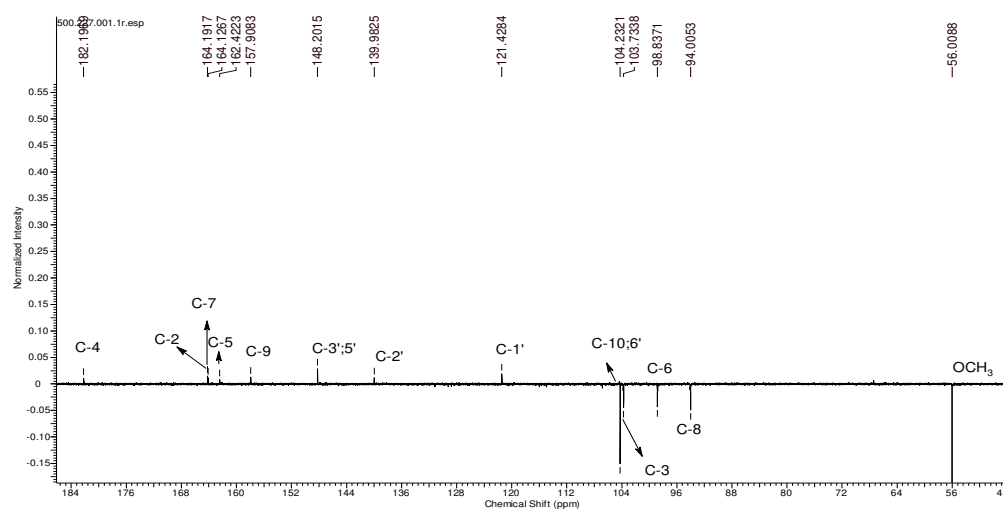


Figura 49: Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, D₃CCOCD₃) da substância **9**, de 54 a 175 ppm.

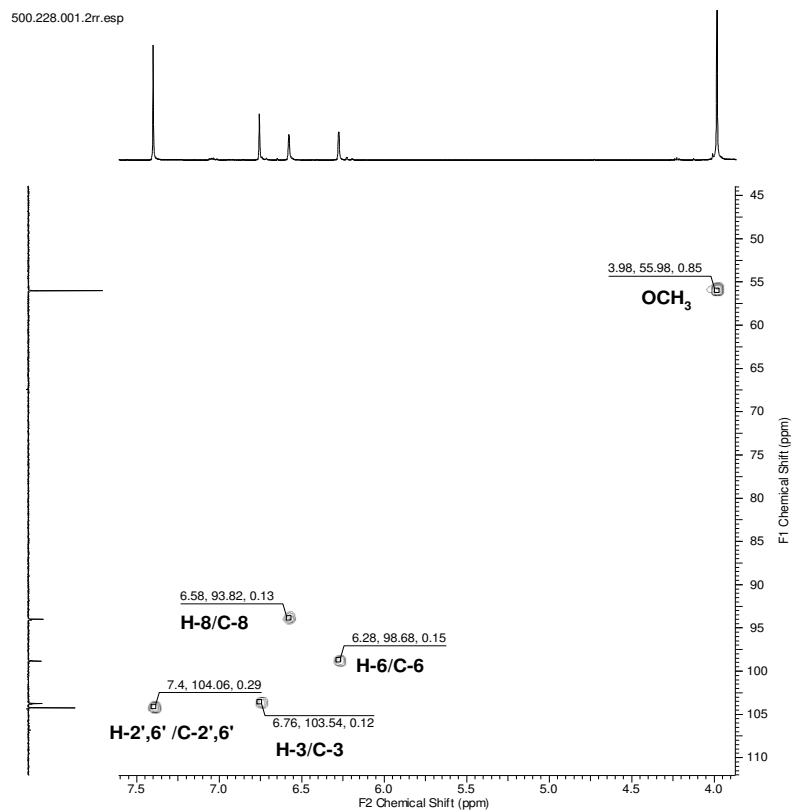


Figura 50: Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz. CD_3COCD_3) da substância **9**, de 4,0 a 7,5 ppm.

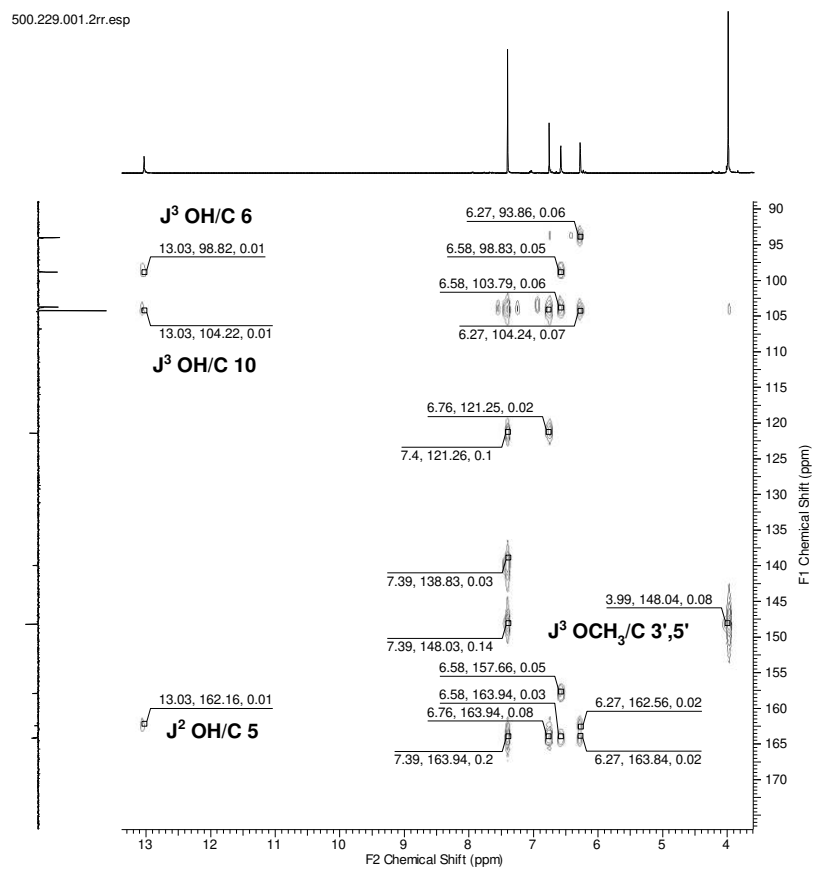


Figura 51: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **9**, de 3,5 a 13,5 ppm.

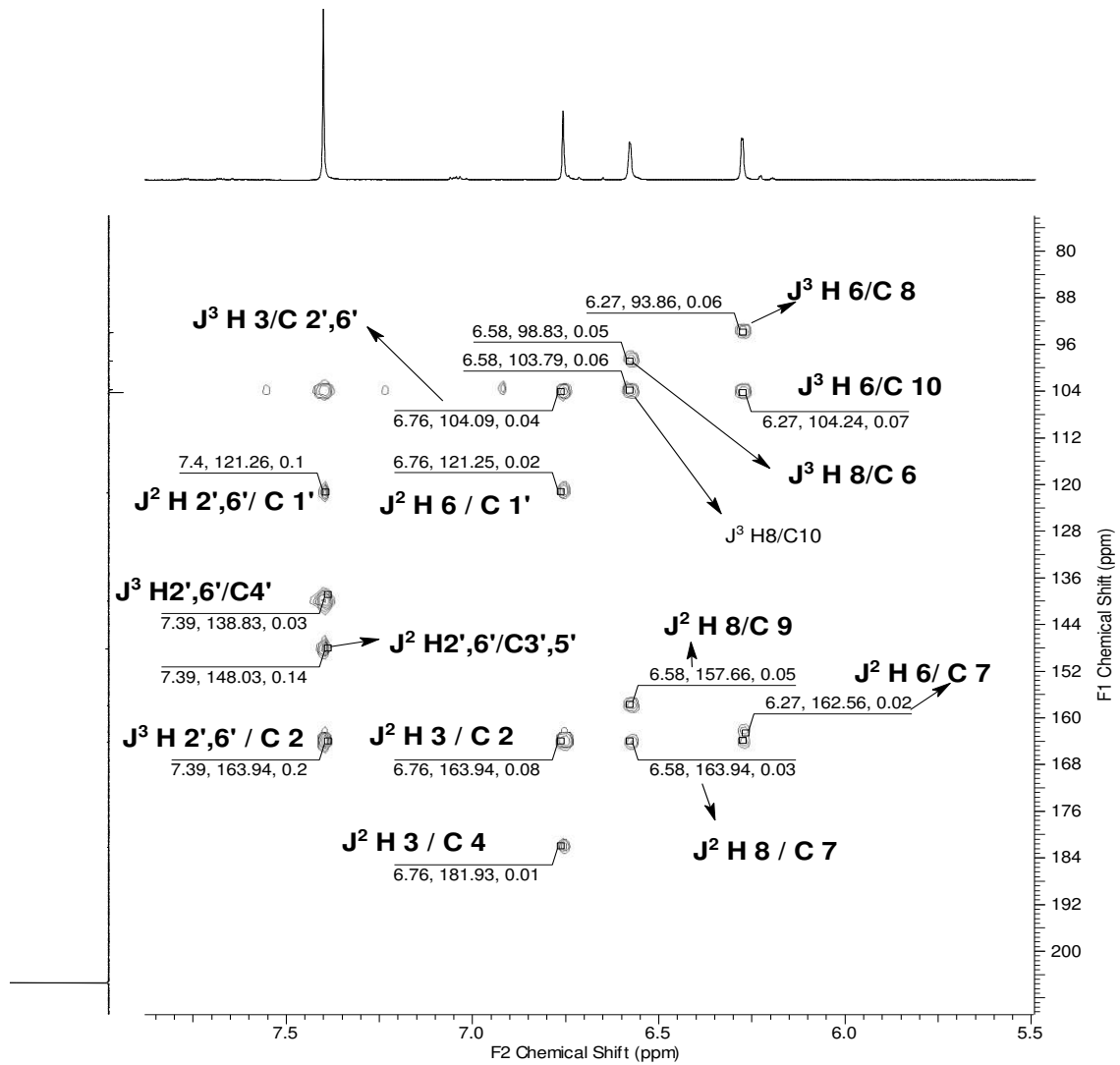
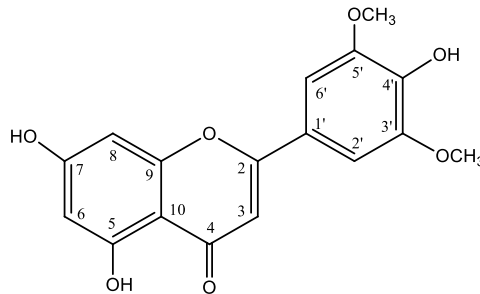


Figura 52: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (125 e 500 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **9**, de 5,5 a 7,8 ppm.



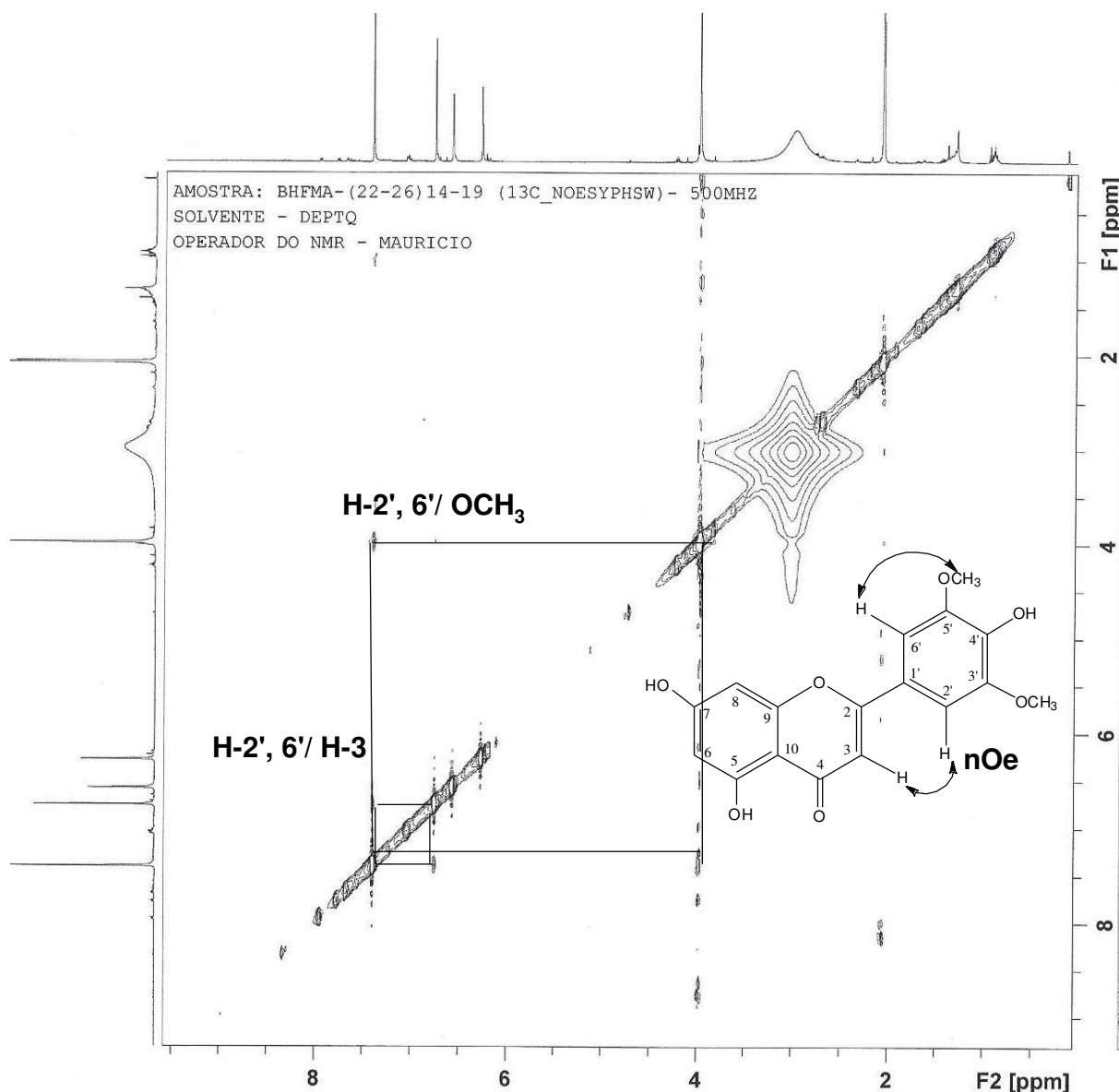


Figura 53: Mapa de contorno NOESY (500 MHz, D₃CCOCD₃) da substância **9**.

5.6. Identificação das substâncias obtidas de BHRMA

Analisando os espectros de UV (λ_{\max} 200 a 205nm) de cada sinal presente no cromatograma da fração foi possível perceber que são substâncias de cromóforos fracos sem sistema conjugado podendo ser saponinas. Observou-se que alguns tempos de retenção se repetiram nas amostras e através da análise por RMN ¹H confirmou serem as mesmas substâncias, sendo assim as substâncias com Tr: 3,064 e Tr: 5,801 por apresentarem maior facilidade na separação na coluna semipreparativa foram as selecionadas para as etapas posteriores de elucidção.

5.6.1 Identificação da substância com TR: 5,801 (substância 10)

Em comparação com dados da literatura a substância que apresentou tempo de retenção igual a 5,801min, possui sinais semelhantes a saponina furostânica, como o C-22, quaternário duplamente oxigenado, com deslocamento químico 109ppm, caracterizando o sistema espiro com os anéis furano e pirano na estrutura. A aglicona poderia ser classificada como diosgenina(25-R) ou yamogenina(25-S), a definição depende da posição da metila 27, equatorial (25-R) ou axial (25-S), seu deslocamento químico apresenta valores próximos, uma diferença de 2ppm. A definição da estereoquímica do centro quiral C-25 é determinável pela observação do comportamento do C-23, o efeito gama de proteção que a metila 27 exerce sobre o carbono 23 faz com que o seu deslocamento químico seja observado em campo mais alto do que quando a metila está em equatorial. A definição da saponina foi feita por comparação com as duas possibilidades, encontradas nas referências PIRES et al., 2002 e ESPEJO et al., 1982, assim a aglicona foi definida como diosgenina.

Outra informação importante extraída do espectro de carbono é existência de três unidades de açúcar, pela presença de três carbonos anoméricos com deslocamento químico em 101.17, 102.84 e 103.65ppm. Sua disposição na molécula foi confirmada através da análise dos espectros bidimensionais, o padrão de substituição da unidade de açúcar é justificada pela presença de quatro carbonos metínicos com deslocamento próximo a 78ppm os quais pertencem à glicose. Sem a substituição a glicose apresentaria dois carbonos com deslocamentos δ_{CH} 78,8 (C-3) e δ_{CH} 78,7 (C-5). Quando substituídos por ramoses os valores dos carbonos 2 e 4 deslocam-se para maiores valores de deslocamento químico variando de δ_{CH} 75,5 para δ_{CH} 77,86 (C-2) e δ_{CH} 71,8 para δ_{CH} 79,36 (C-4). Esses dados justificam a substituição em C-2 e C-4. A interpretação de RMN¹H e ¹³C (**fig. 55-57, pág.65**) e 2D-HMBC (**fig.61 a 64, pág.69-72**) permitiram fazer a completa atribuição dos valores de RMN¹H e ¹³C da substância **10** apresentados na **tabela 10 (pág. 63)**.

O espectro de massas de alta resolução da substância **10 (fig.65, pág.73)**, feito em modo positivo, apresenta picos em m/z 869,4893 [M+H]⁺, 891,4695[M+Na]⁺, 723,4309[(M+H)-146]⁺, 577,3731 [(M+H)-146-146]⁺, 415,3181[(M+H)-146-146-162]⁺. O pico em m/z 869,4893 [M+H]⁺ é compatível com a fórmula molecular C₄₅H₇₃O₁₆ (cal. 869,4898), Δm 0,005. Os demais valores de m/z justificam a presença das três unidades de açúcar, **esquema 11 (pág. 74)**.

Os resultados obtidos levaram a confirmação de que a saponina em questão corresponde a de 3-O- β -D-glicopiranosil-[(4'-1''')-O- α -L-ramnopiranosil-(2'-1'')-O- α -L-

ramnopiranosil]-25(*R*)- espirosta-5-eno. Essa saponina já foi encontrada na *Brachiaria decumbens* por PIRES et al., 2002.

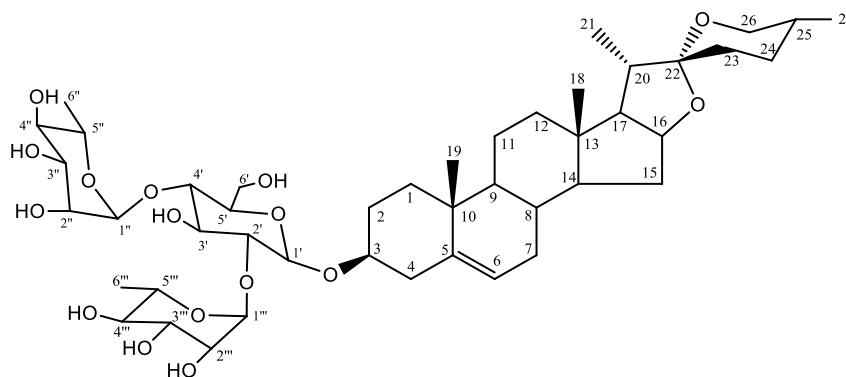


Figura 54: Estrutura da saponina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4-1)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(2-1)-*O*- α -L-ramnopiranosil]-25(*R*)- espirosta-5-eno (**10**).

Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **10** e comparação com os valores da literatura.

	Substância 10 (piridina-d ₅)				PIRES et al., 2002 (piridina-d ₅)	ESPEJO et al., 1982 (piridina-d ₅)
	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}	δ_{C}
1	38,38	1.76; 1.70		C-19	37,6	37,4
2	30,16	1.58(<i>m</i>)			30,3	32,2
3	78,86	3.90		C-1'	78,1	78,4
4	39,87	2.77 (dd)	C-3; C-5	C-2; C-6; C-10	39,1	38,5
5	141,65	-			140,9	140,4
6	122,72	5.32	C-7	C-8; C-10; C-4	121,9	122,5
7	32,57	1,51			32,4	32,2
8	32,57	1,51			31,8	31,7
9	51,16	0.92			50,4	50,3
10	37,96	-			37,2	37,1
11	21,99				21,2	21,5
12	4073	1.73			39,9	39,9
13	41,35	-			40,5	40,5
14	57,51				56,7	56,6
15	32,72	1,73			32,3	31,7
16	81,8	4.56			81,2	81,1
17	63,76	1.18			63,0	62,9

18	18,24	0.83	C-13	C-17; C-3; C-12	16,4	16,4
19	19,43	1.06	C-10	C-5; C-1	19,5	19,4
20	42,86	1.96(<i>t</i>)	C-17; C-21; C-22	C-13	42,5	42,0
21	15,96	1.15; 1.14	C-20	C-17; C-22	15,0	15,0
22	110,17	-			109,4	109,3
23	31,06	2,06			26,5	29,9
24	30,16	1,65(<i>sl</i>)	C-25		26,3	29,3
25	31,49	1,66			27,6	30,6
26	67,75	3.59; 3.51		C-24; C-22	65,2	66,9
27	18,24	0,69(<i>d</i> , 5,05Hz)		C-24; C-26	15,2	17,3
Gli						
1'	101,17	5.01 (<i>d</i>)	C-2'	C-5'; C-3; C-3'	100,4	102,9
2'	78,66	4,22 (<i>m</i>)			77,9	78,8
3'	78,87	4,22			78,2	76,9
4'	79,32	4,44(<i>m</i>)		C-1''	78,6	78,1
5'	77,87	3.67(<i>d</i>)			77,0	77,9
6'	62,14	4.2(<i>d</i>)		C-4'	61,3	61,3
RamI						
1''	103,65	5.91(<i>s</i>)	C-2''	C-4'; C-5''	102,1	100,3
2''	73,49	4.87 (<i>s</i>)		C-4'''	72,6	72,5
3''	73,66	4.37 (<i>m</i>)			72,7	72,7
4''	75,03	4.40 (<i>m</i>)		C-6''; C-1''	74,2	73,9
5''	71,39	4.95			69,6	69,6
6''	19,43	1.80 (<i>d</i> , 5Hz)	C-5''	C-4'''	18,8	18,5
RamII						
1'''	102,84	6.45(<i>s</i>)	C-2'''	C-2'; C-5'''	103	102,0
2'''	73,46	4.72 (<i>s</i>)			72,9	74,1
3'''	73,74	4.37 (<i>m</i>)			72,8	72,8
4'''	74,84	4,4		C-6'''	74,0	73,7
5'''	70,46	4,95			70,5	70,4
6'''	19,57	1.67 (<i>d</i> , 5Hz)	C-5'''	C-4'''	18,6	18,6

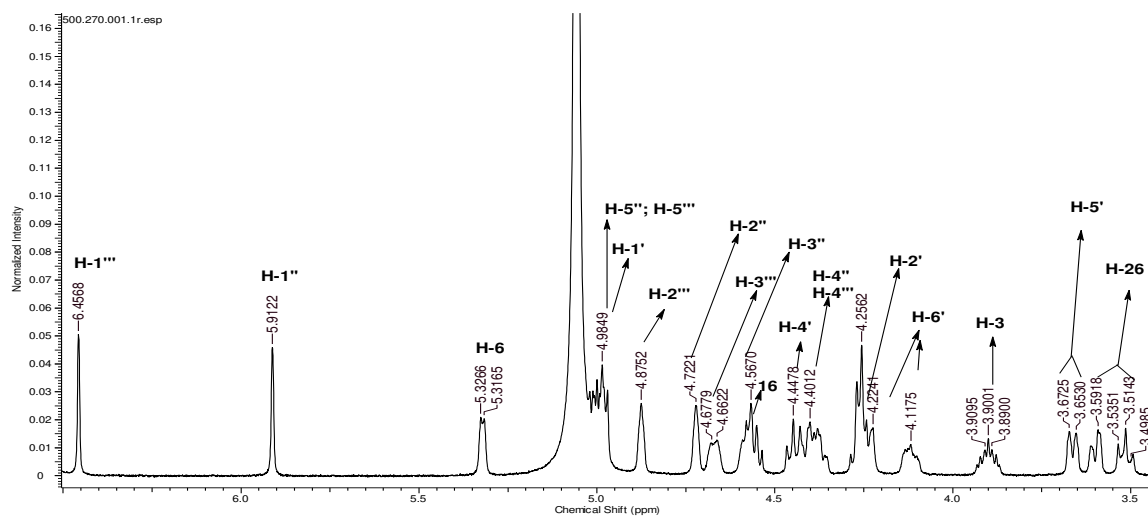


Figura 55: Expansão do espectro RMN¹H (500 MHz, piridina-d₅) da substância 10, de 2,0 a 7,0 ppm.

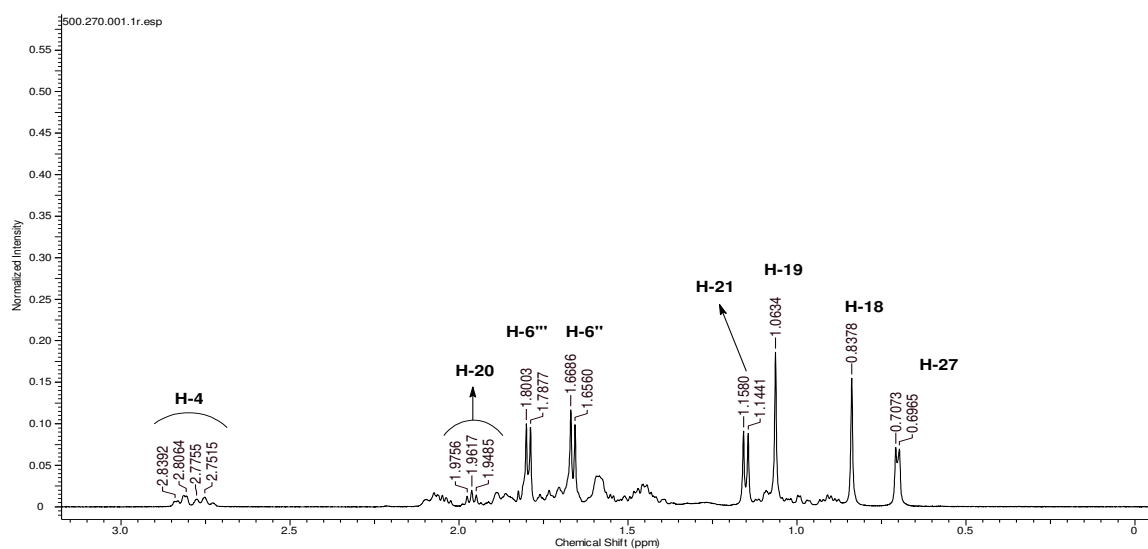


Figura 56: Expansão do espectro RMN¹H (500 MHz, piridina-d₅) da substância 10, de 0,0 a 3,5 ppm.

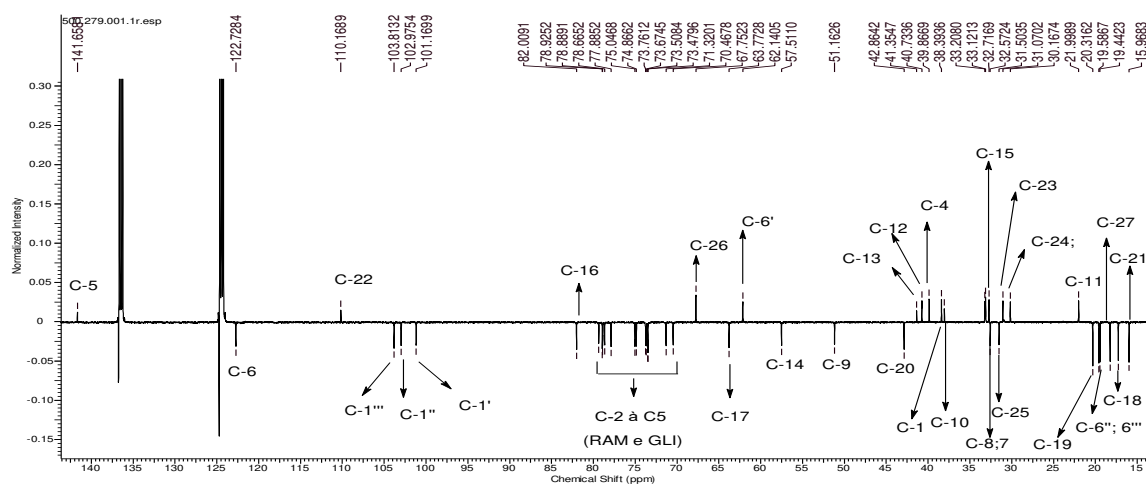


Figura 57: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, piridina-d₅) da substância 10, de 10,0 a 150,0 ppm.

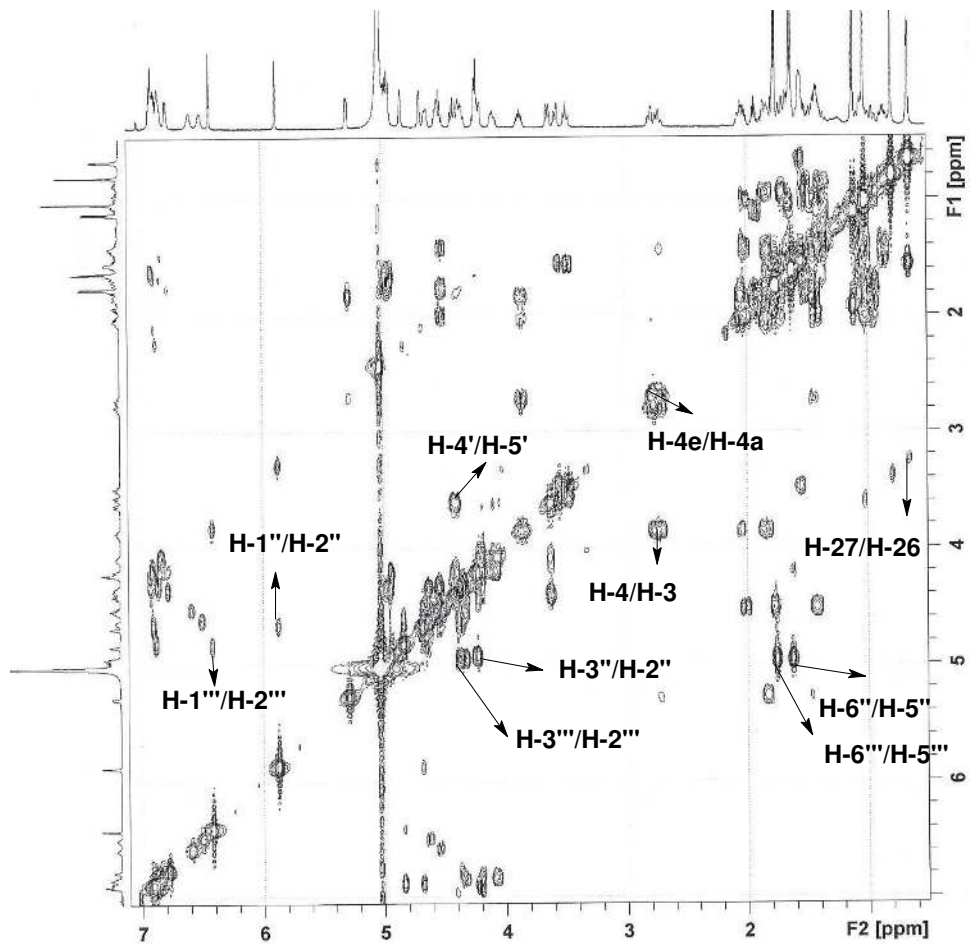
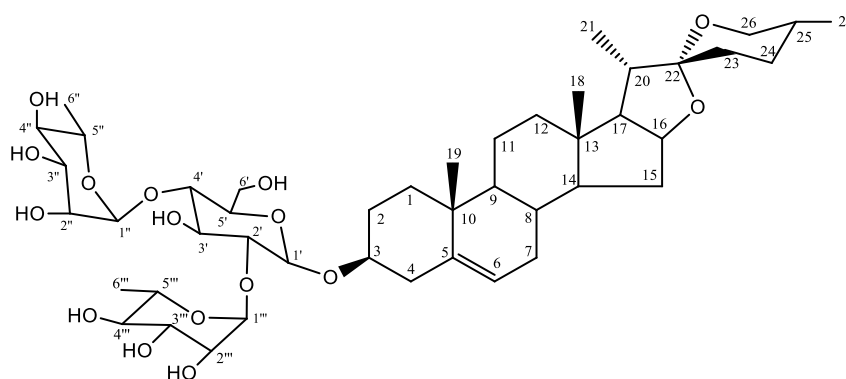


Figura 58: Expansão do mapa de contorno RMN-COSY (500 MHz) da substância **10**, de 0,8 a 7,0 ppm.



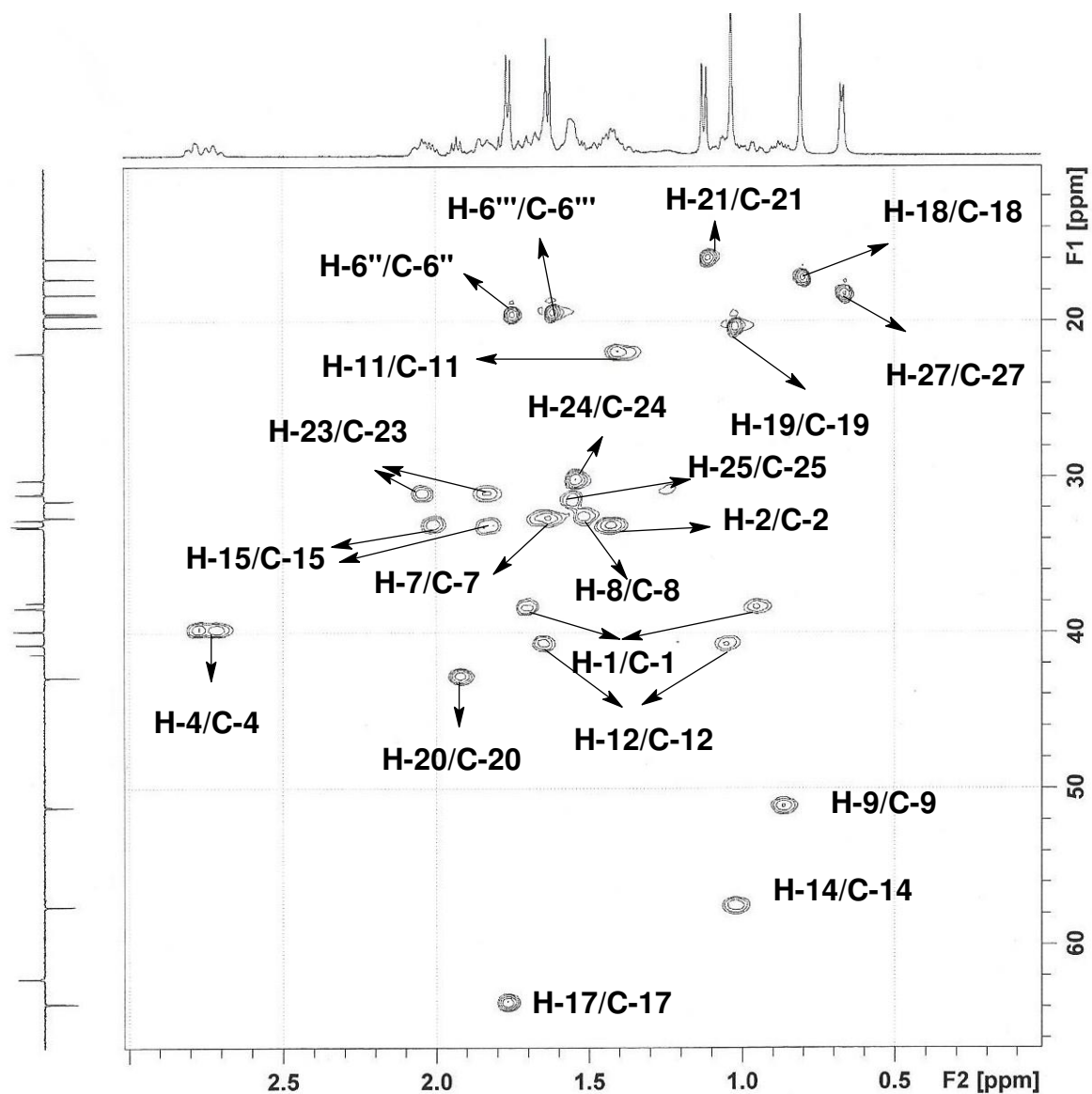
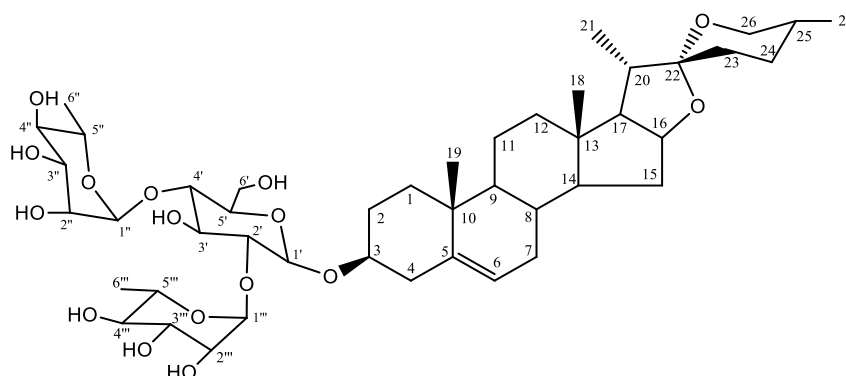


Figura 59: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500 / 125 MHz, piridina- d_5) da substância **10**, de 0 a 2,5 ppm.



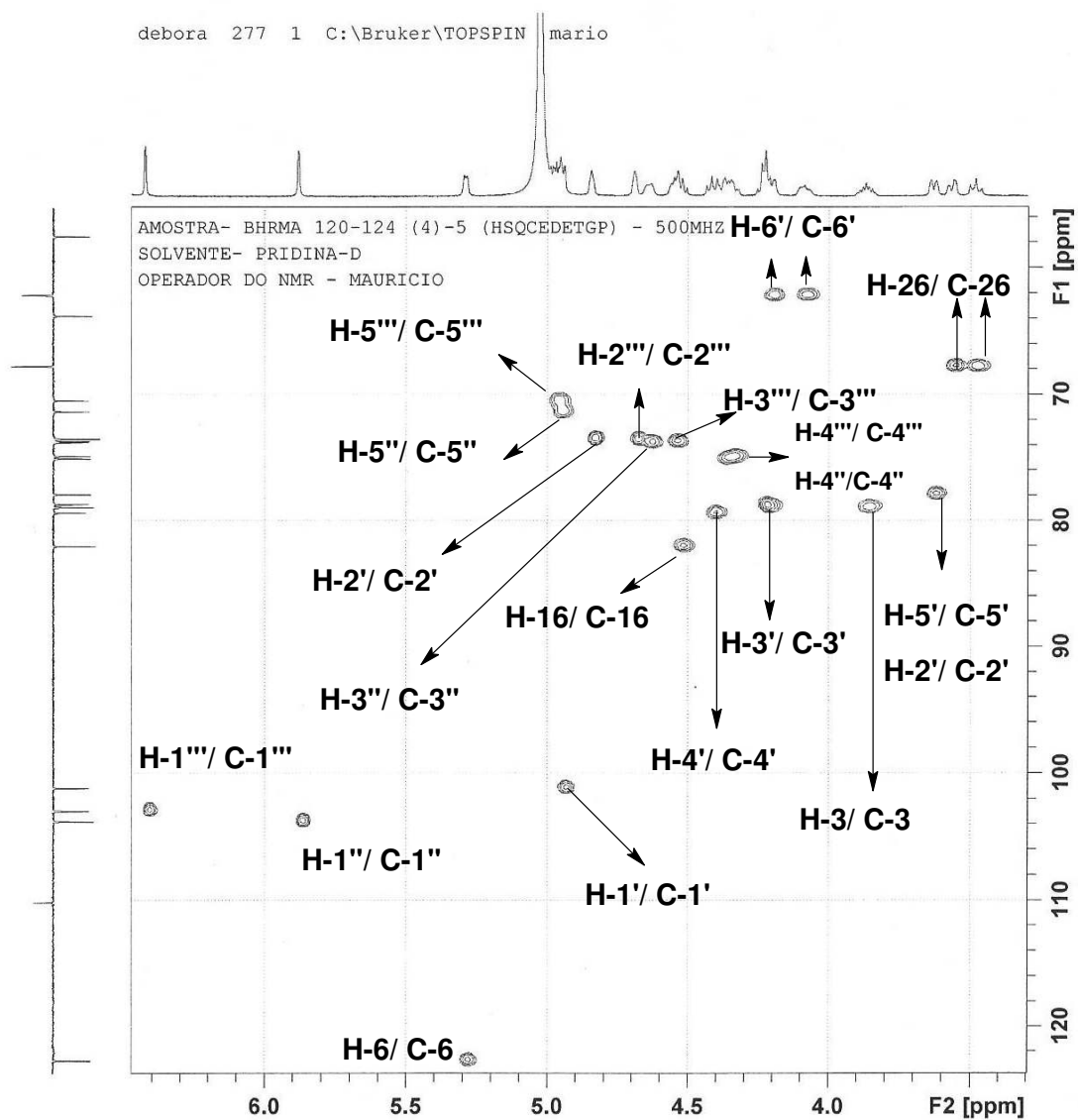
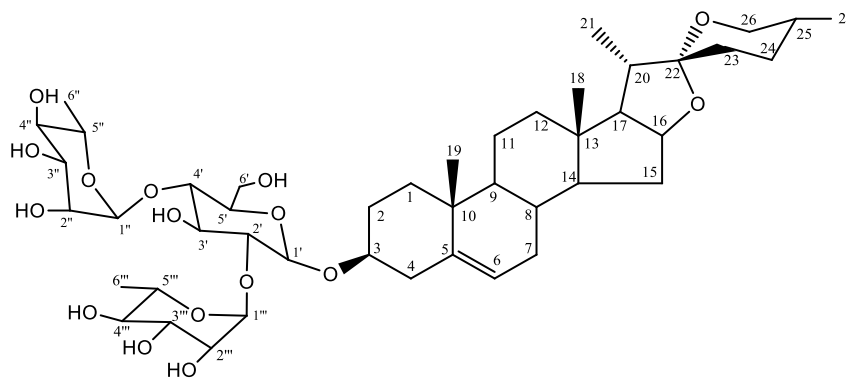


Figura 60: Expansão do mapa de contorno RMN- HSQC (500 / 125 MHz, piridina-d₅) da substância **10**, de 3,5 a 6,5 ppm.



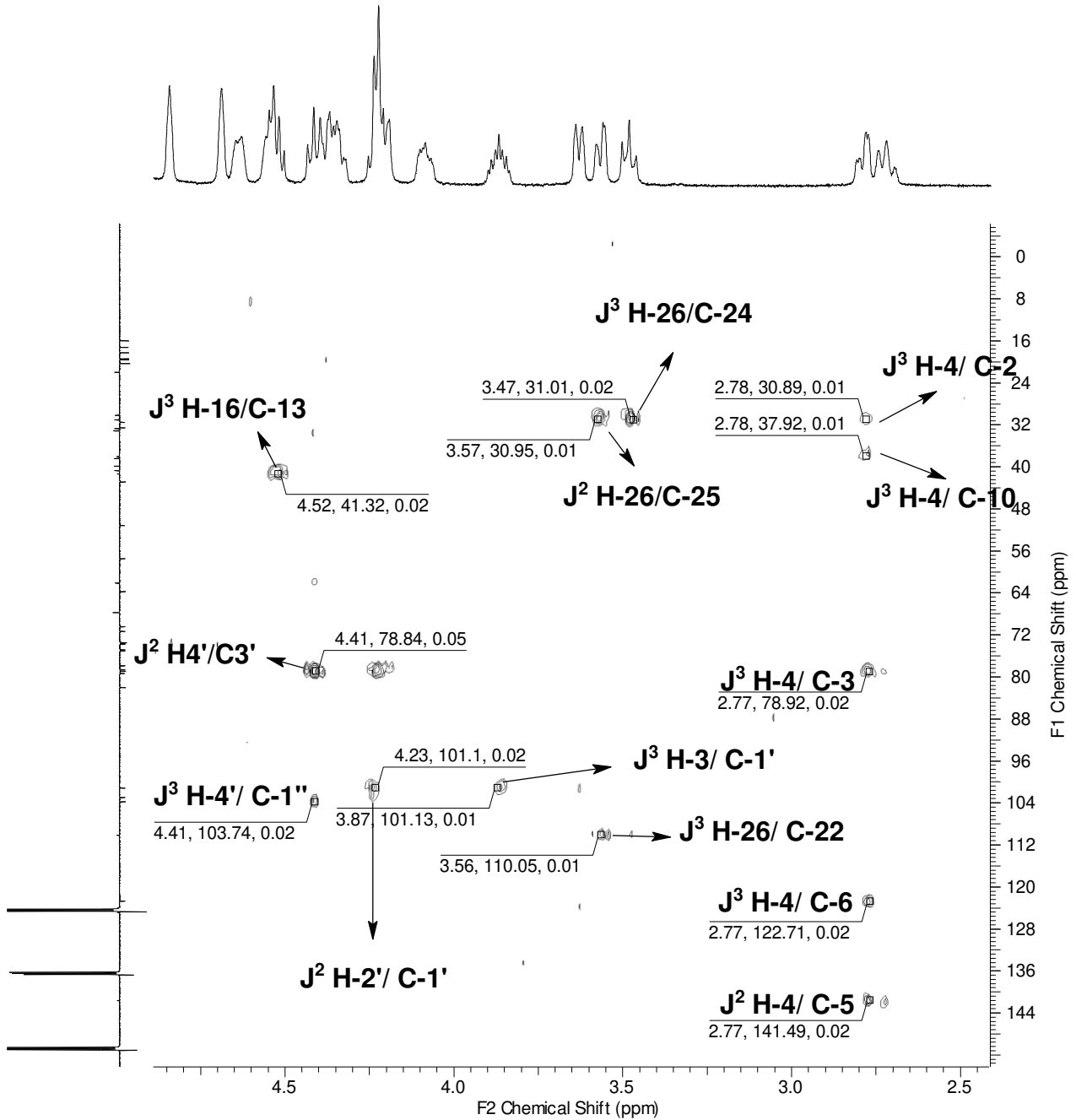
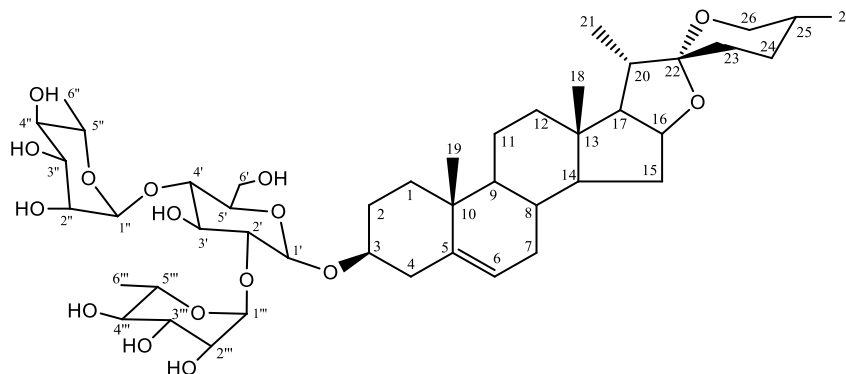


Figura 61: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500 / 125MHz, piridina-d₅) da substância **10**, de 2.5 a 4.75ppm.



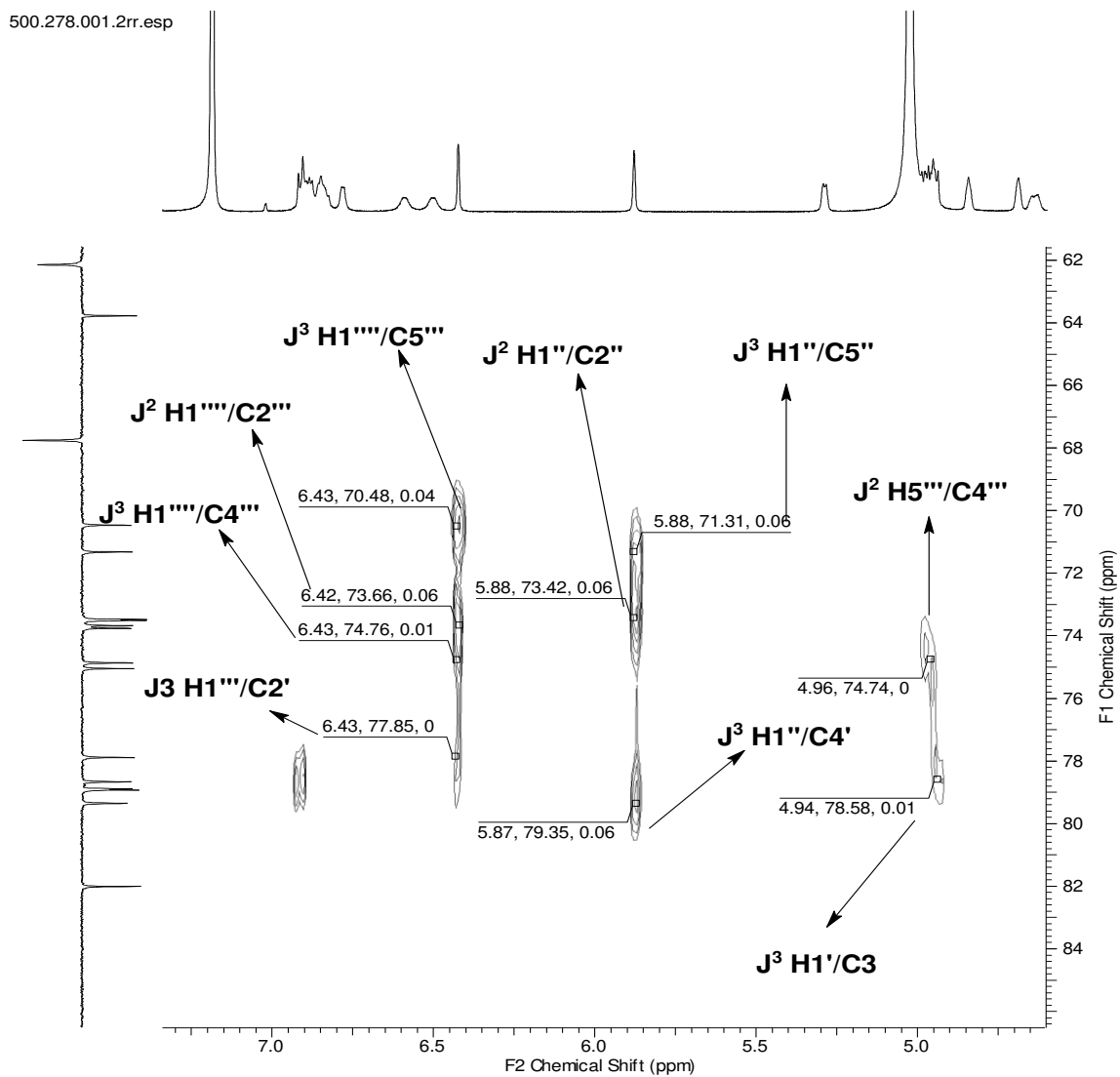
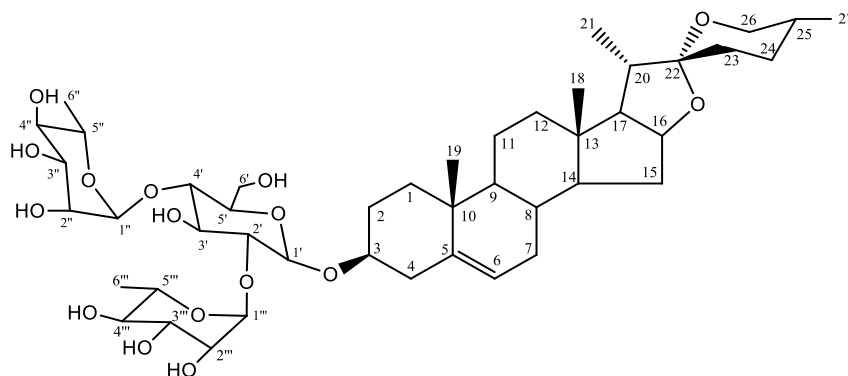


Figura 62: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC(500/ 125 MHz, piridina-d₅) da substância **10**, de 4,75 a 7,25 ppm.



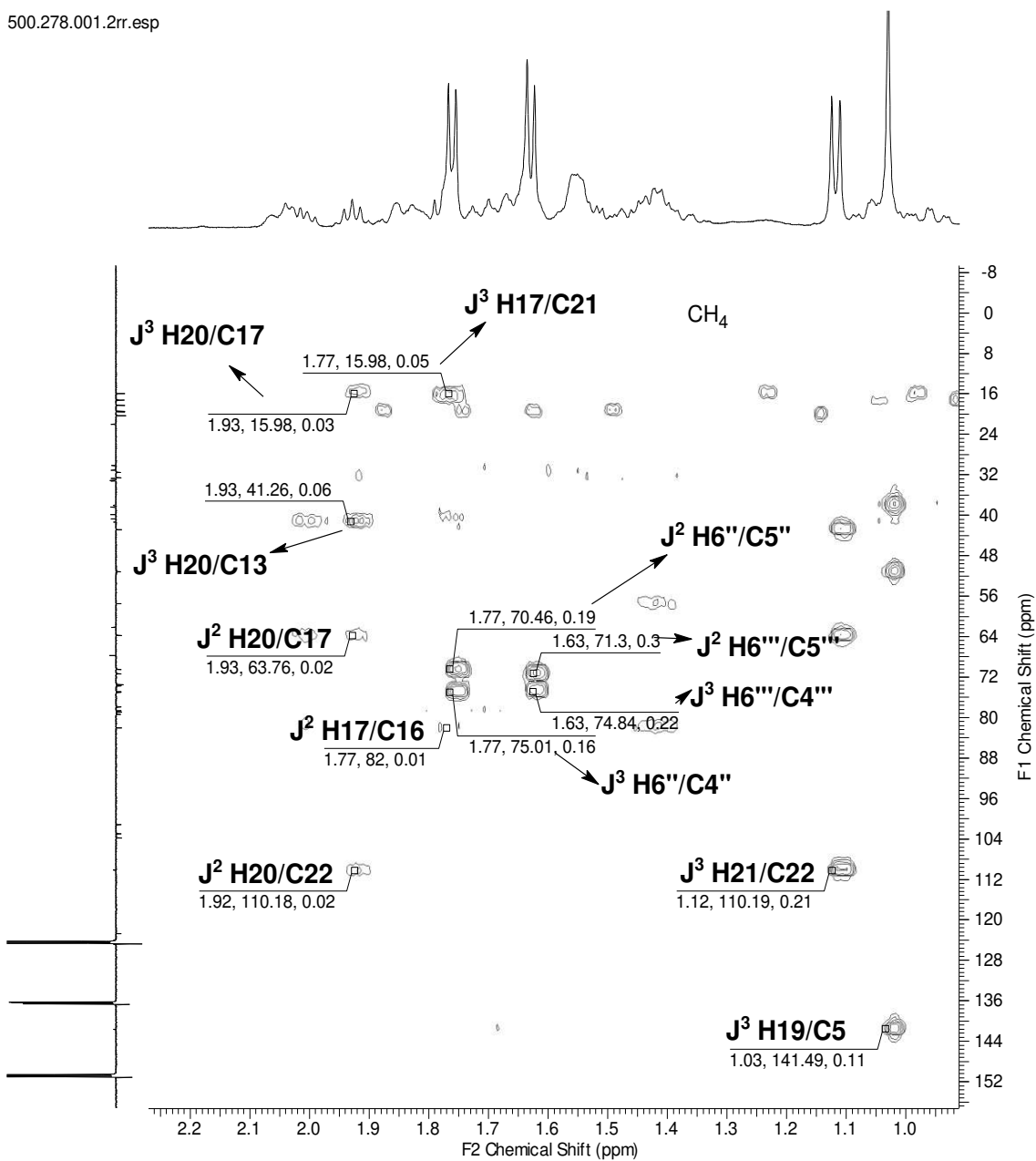
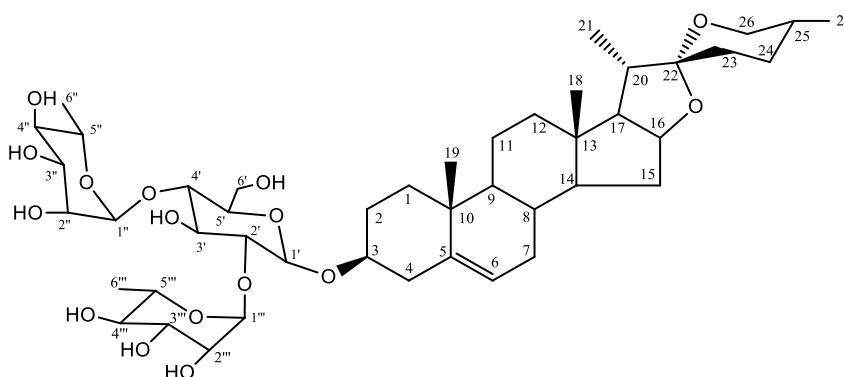


Figura 63: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, piridina-d₅) da substância **10**, de 0,9 a 2,2 ppm.



500.278.001.2rr.esp

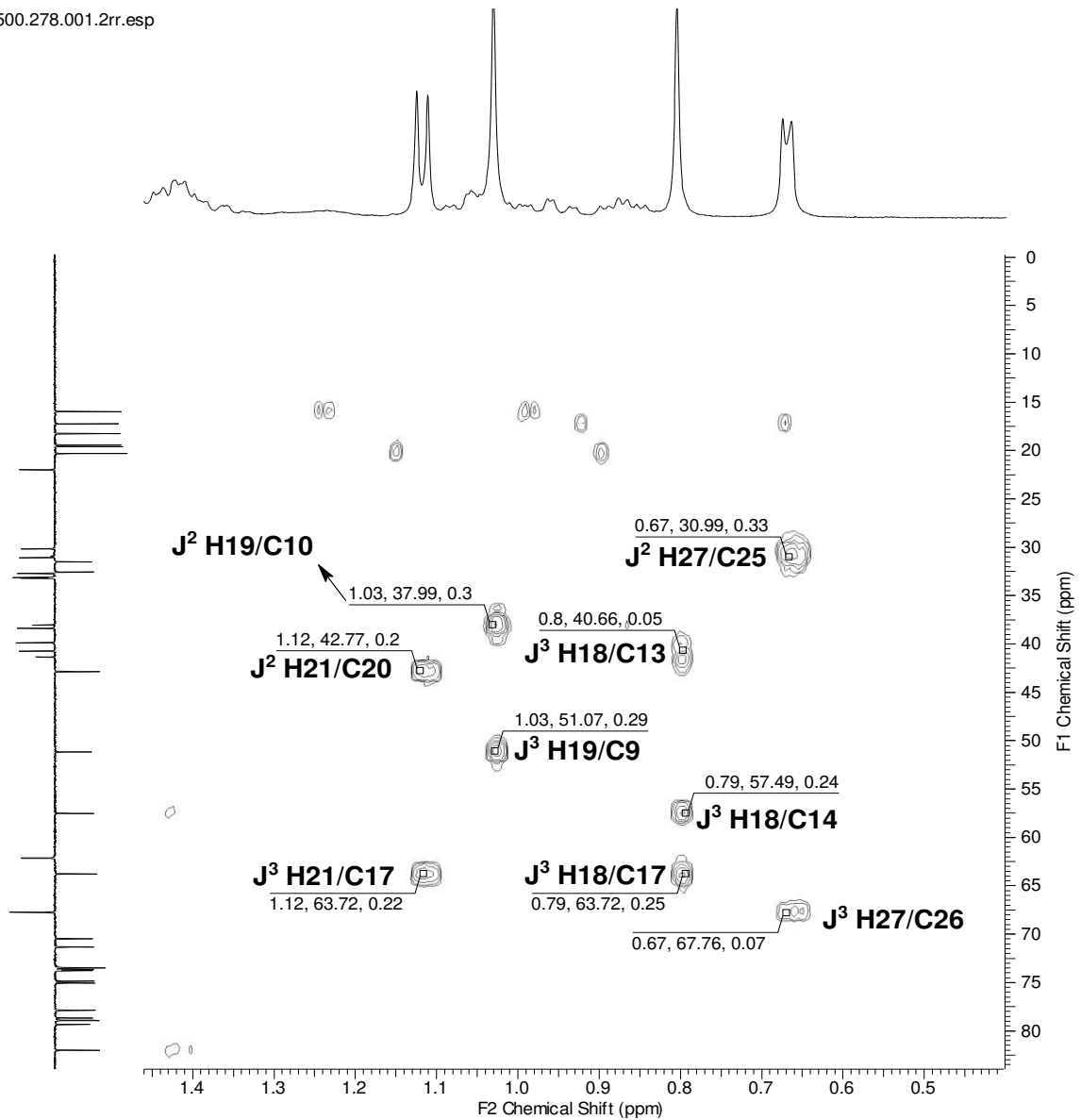
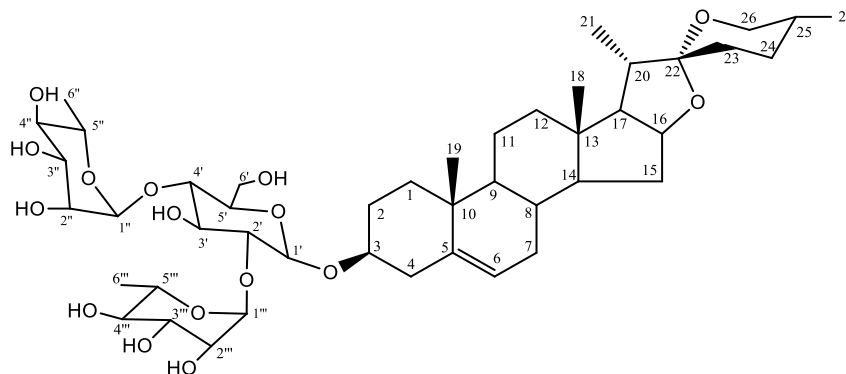


Figura 64: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, piridina-d₅) da substância **10**, de 0,25 a 1,5 ppm.



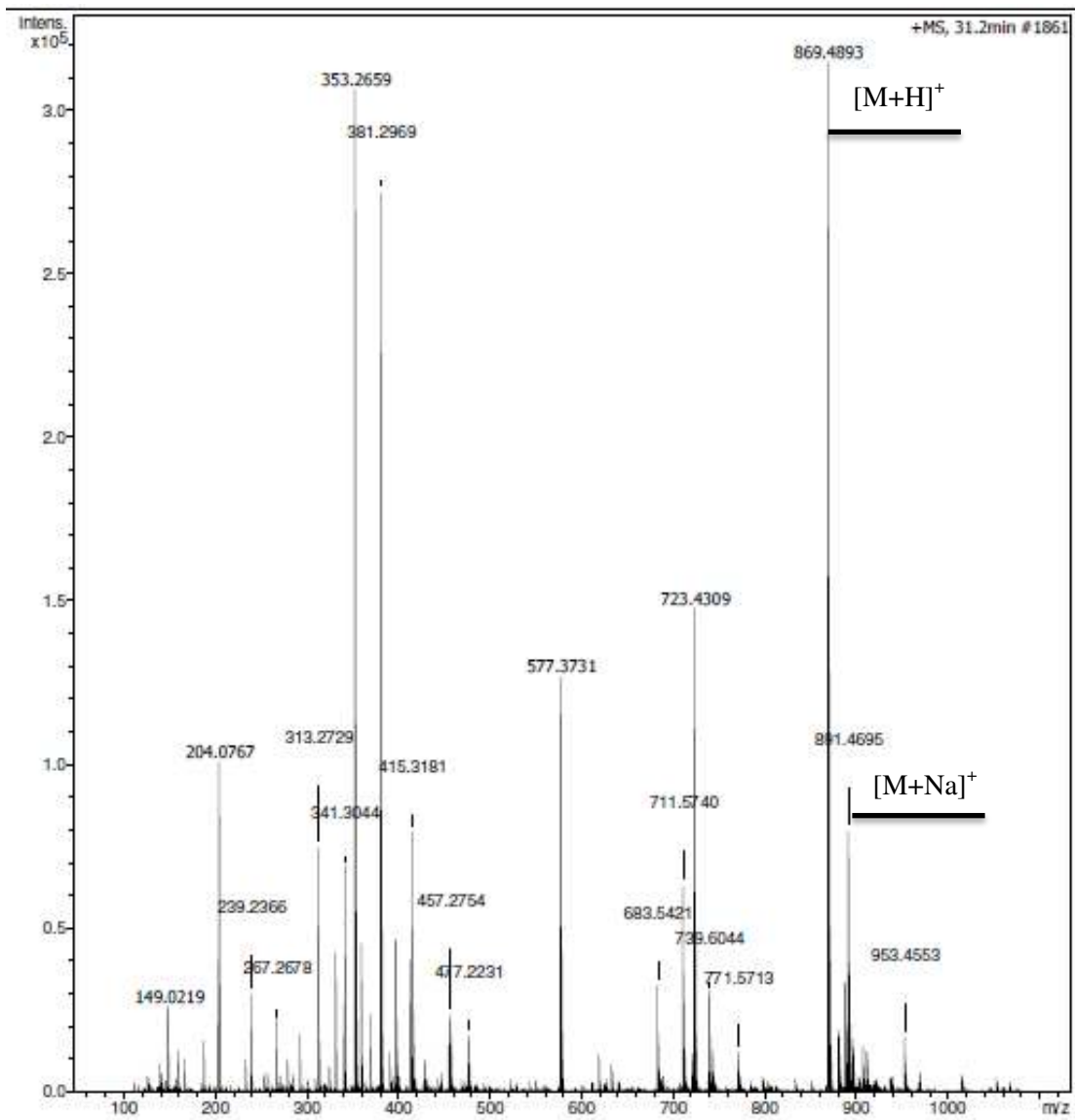
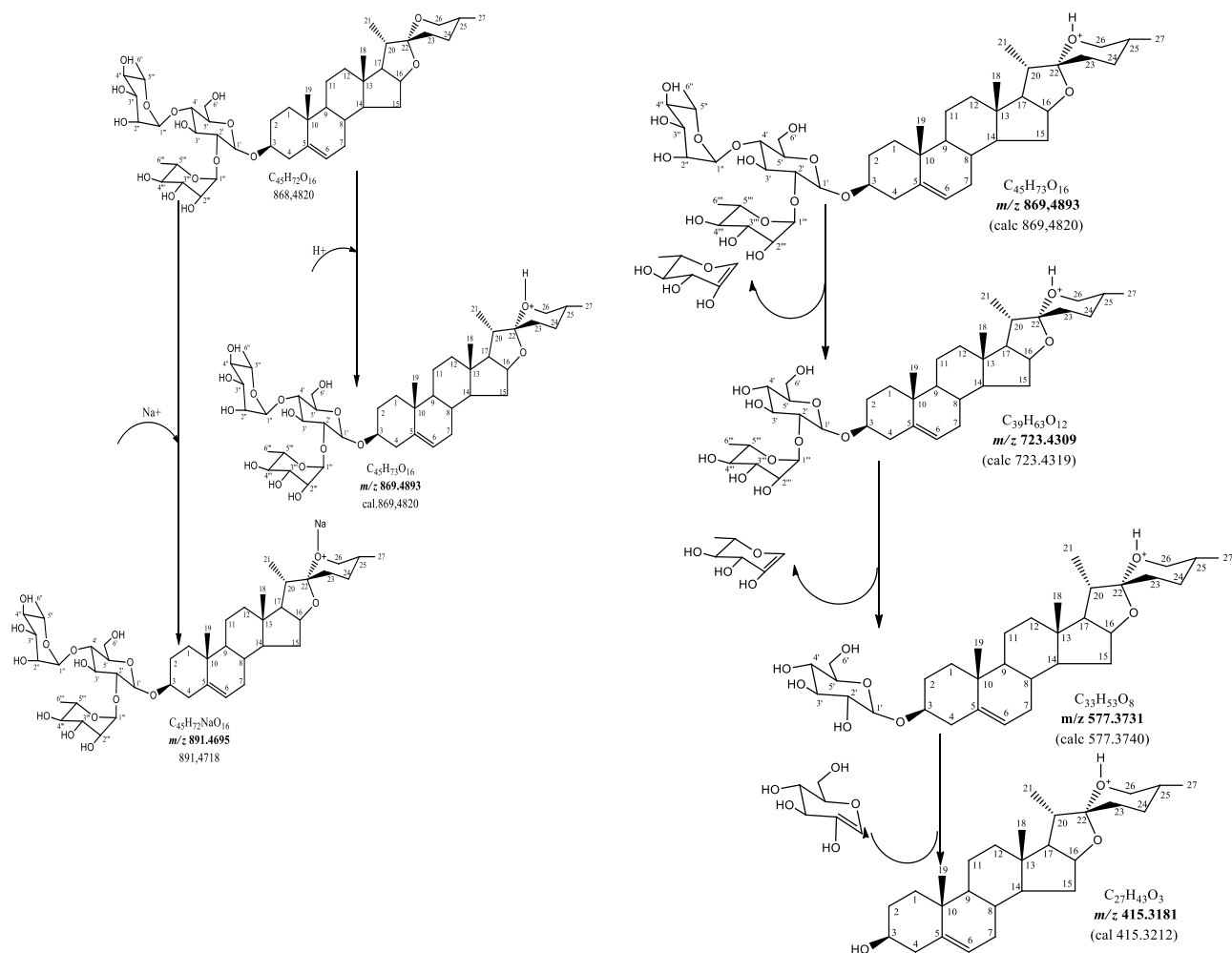


Figura 65: Espectro de massas de alta resolução da substância 10.



Esquema 11: Proposta de fragmentação justificando as perdas das unidades de açúcar da substância **10**.

5.6.3 Identificação da substância com Tr: 3,064 (substância 11)

A comparação dos deslocamentos químicos de carbono-13 observado no espectro DEPTQ (**fig. 69, pág. 78**) com dados da literatura a conclui-se que a substância 11 se tratava de uma penogenina, a substância anterior com hidroxila em C-17. A hidroxila no carbono 17 promove variações nos deslocamentos químicos dos carbonos vizinhos. Sem a hidroxila no carbono 17 o valor do deslocamento químico deste carbono é 63,0 ppm e C-16 absorve em δ_C 81,2. Este grupo funcional em C-17 causa efeito beta no carbono 16, observa-se então os deslocamentos químicos 89,74 e 89,71 ppm, para C-16 e C-17 respectivamente. Outros carbonos também sentem os efeitos causados pela presença da hidroxila, desproteção em C-20 e efeito gama de proteção em C-21, **tabela 11 (pág. 76)**.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C permitiu perceber os três δ_{CH} que justificam as três unidades de açúcar presentes na estrutura (**fig. 69, pág. 78**). Os dubletos em δ_H 1,65 (3H)

e δ_H 1,80 (3H) (**fig.68, pág.78**) assim como os singletos em δ_H 5,91(1H) e δ_H 6,45 (1H), conduziram à proposta de duas unidades de ramosa, o dubleto em δ_{CH} 4,96(1H) e o duplo dubleto em 4,23 e 4,21 (ligados ao carbono 62,12) justificam uma unidade de glicose (**fig.67, pág.77**). A disposição dos açúcares na molécula e o padrão de substituição das unidades foram justificadas pela presença de carbonos metínicos em δ_{CH} 78 e 79ppm, δ_{CH} 78,89 (C-4 e C-5) e δ_{CH} 79,34 (C-2) que pertencem à glicose. Sem a substituição a glicose apresentaria dois carbonos δ_{CH} 78,8 (C-3) e δ_{CH} 78,7 (-C5), quando substituídos por ramosas o valores de δ_{CH} dos carbonos 2 e 4 deslocam-se para campo mais baixo variando de δ_{CH} 75,5 para δ_{CH} 79,34 (C-2) e δ_{CH} 71,8 para δ_{CH} 78,89(C-4), esses dados justificam a substituição em C-2 e C-4 da glicose. Esta proposta foi confirmada através da análise dos espectros bidimensionais HMBC (**fig.73-76, pág. 82-85**) e HSQC (**fig.71 e 72, pág. 80 e 81**), que mostra sinais de conexão entre hidrogênio e carbono-13 ($^1J_{HC}$). O H-1'' (δ_H 5,91 s) acoplado com C-2'(glic), C-2'' e C-5'', o H-1''' (δ_H 6,45 s) acoplado com C-2'', C-5'' e C-4'(gli) (**fig.76, pág. 85**). A **tabela 11** mostram os valores da substância **11** em comparação com os valores da Penogenina-3 β -O- β -D-glicopiranosil-[(2-1)-O- α -L-ramnopiranosil-(4-1)-O- α -L-ramnopiranosil (FENG et al., 2007).

A análise da substância por espectrometria de massas (EM-IES), feito em modo positivo, permitiu observar picos em m/z 885,4843 $[M+H]^+$, 739,6032 $[(M+H)-146]^+$, 593,3676 $[(M+H)-146-146]^+$, 431,3143 $[(M+H)-146-146-162]^+$. Esses valores justificam a fórmula molecular $C_{45}H_{72}O_{17}$ (cal. 885,4848 $[M+H]^+$), as demais unidades de açúcar e a aglicona, **esquema 12, pág. 87**.

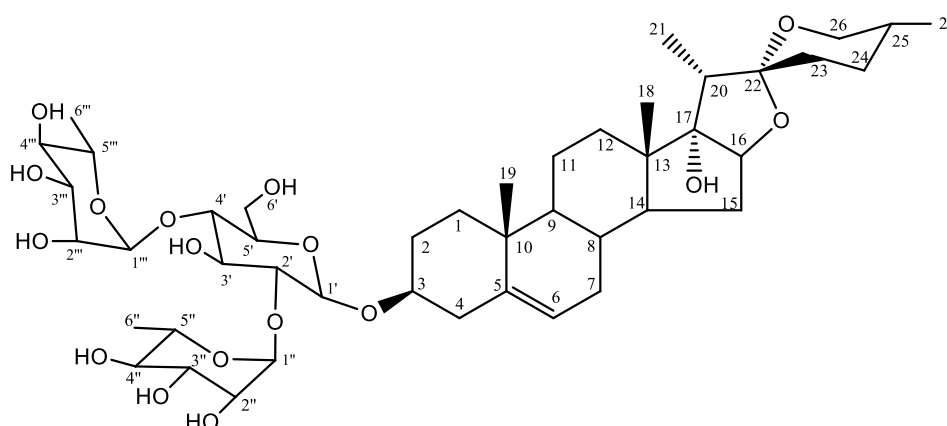


Figura 66: Estrutura da Penogenina-3 β -O- β -D-glicopiranosil-[(2-1)-O- α -L-ramnopiranosil-(4-1)-O- α -L-ramnopiranosil (**11**).

Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **11** e comparação com os valores da literatura.

	Substância 11 (piridina- d_5)				Penogenina-3 β -O- β -D- glicopiranosil-[(2-1)-O- α -L- ramnopiranosil-(4-1)-O- α -L- ramnopiranosil (piridina- d_5)
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
1	38,45	0,98; 1,78 (<i>m</i>)			37.6
2	32,74	2,26			30.1
3	78,85	3,85(<i>m</i>)		C-1'	77.8
4	39,85	2,77(<i>m</i>)	C-5; C- 3		39.0
5	141,64	-			140.8
6	122,76	5,30 (<i>d</i> ; 4,1Hz)		C-10	121.8
7	33,00	1,72 (<i>m</i>)			32.3
8	33,27	1,64 (<i>m</i>)		C-8	31.8
9	51,13	0,97 (<i>m</i>)			50.3
10	38,06	-			37.1
11	21,85	1,61; 1,52 (<i>m</i>)			20.9
12	33,35	1,92 (<i>m</i>)			32.4
13	46,06	-			45.1
14	53,93	2,12 (<i>m</i>)			53.0
15	32,99	1,72 (<i>m</i>)			32.1
16	90,90	4,5 (<i>t</i> ; 6,95Hz)	C-17	C-13	90.1
17	91,06	-			90.1
18	18,23	0,97(<i>s</i>)	C-13	C-14;C- 17	17.1
19	20,36	1,10(<i>s</i>)	10	C-5; C-9	19.4
20	45,67	2,29 (<i>d</i> ; 7,25Hz)	C-17; C-21	C-13;C-22	44.8
21	10,75	1,26 (<i>d</i> ; 7,25Hz)			9.6
22	110,72	-			109.8
23	31,06	2,07; 1,88			32.1
24	29,71	1,60 (<i>m</i>)			28.8
25	31,34	1,60 (<i>m</i>)			30.4
26	67,59	3,51 (<i>d</i> ; 7.25Hz)		C-22;C-24	66.7
27	18,06	0,79 (<i>d</i> ; 5,55Hz)	C-25	C-24; C-26	17.3

OH	-	5,13 (s)	C-12	C-13	
Gli					
1'	101,01	4,96(d)		C-3	100.2
2'	78,64	4,24	C-1'		78.8
3'	77,86	4,22			76.8
4'	79,31	4,43		1''	78.1
5'	78,89	4,24			77.9
6'	62,12	4,23; 4,21(dd)		C-4'	61.3
RamI					
1''	102,96	5,91 (s)	C-2''	C-5''; C-4'	101.9
2''	73,50	4,71			72.4
3''	73,67	4,54			72.6
4''	75,02	4,37			73.8
5''	70,46	4,97			69.4
6''	19,44	1,66 (d; 6,0Hz)	C-5''	C-4''	18.6
RamII					
1'''	103,81	6,45(s)	C-2'''	C-5''' ; C-2'	102.9
2'''	73,48	4,86			72.4
3'''	73,75	4,44			72.8
4'''	74,87	4.39(m)			74.1
5'''	71,33	4,97			70.4
6'''	19,54	1,79 (d; 6,3Hz)	C-5''	C-4'''	18.4

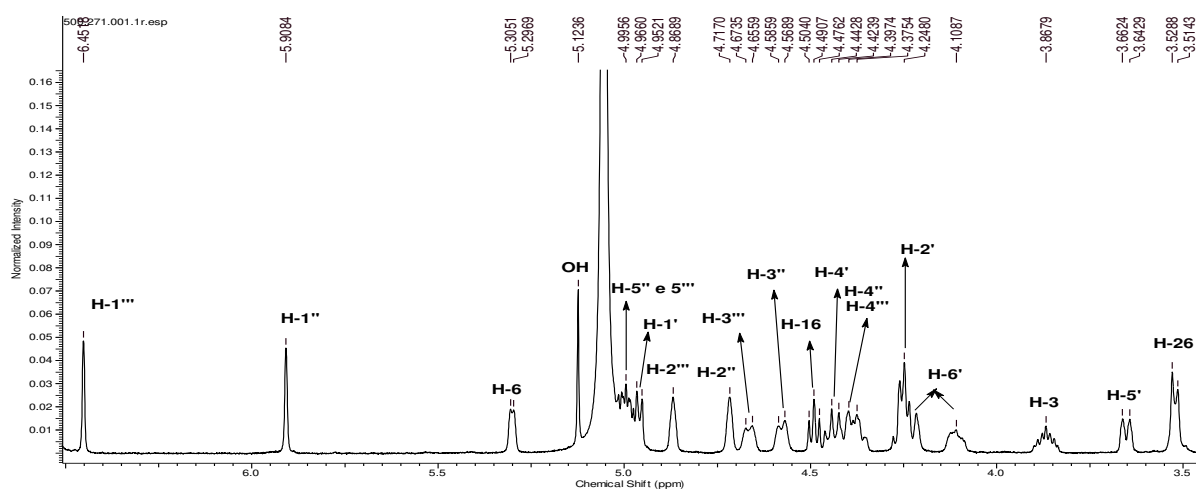


Figura 67: Expansão do espectro RMN1H (125 MHz, piridina- d_5) da substância **11**, de 3,5 a 6,5 ppm.

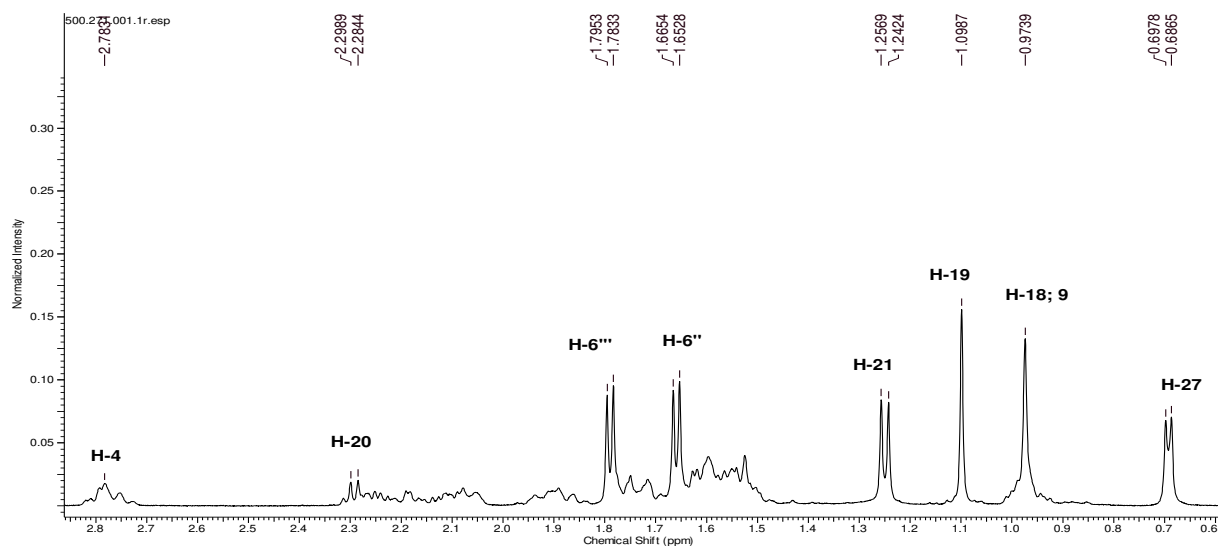


Figura 68: Expansão do espectro RMN1H (125 MHz, piridina-d₅) da substância **11**, de 0,6 a 2,8ppm.

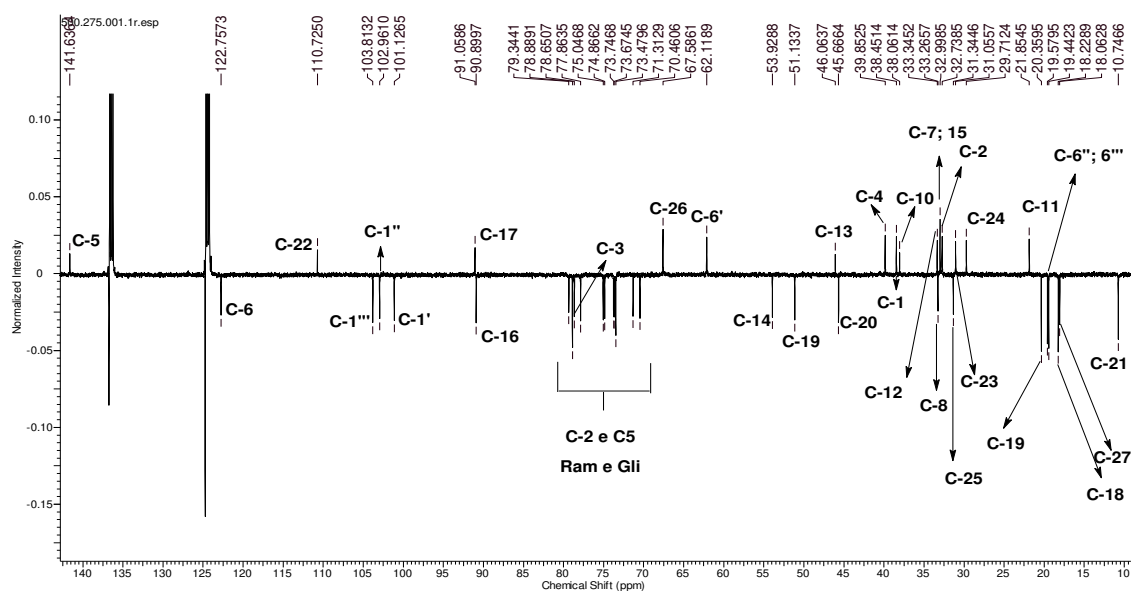
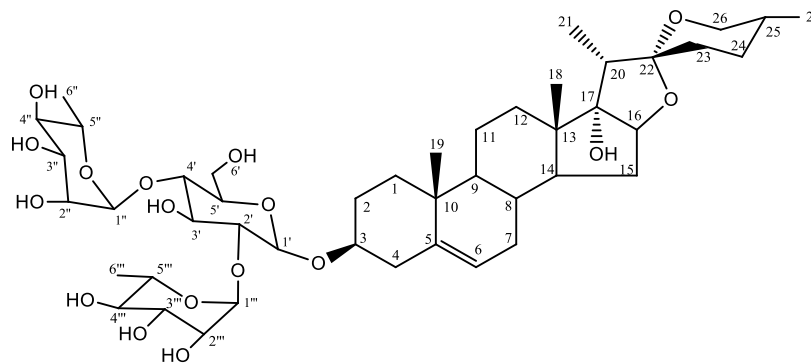


Figura 69: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, piridina-d₅) da substância **11**, de 10 a 140 ppm.



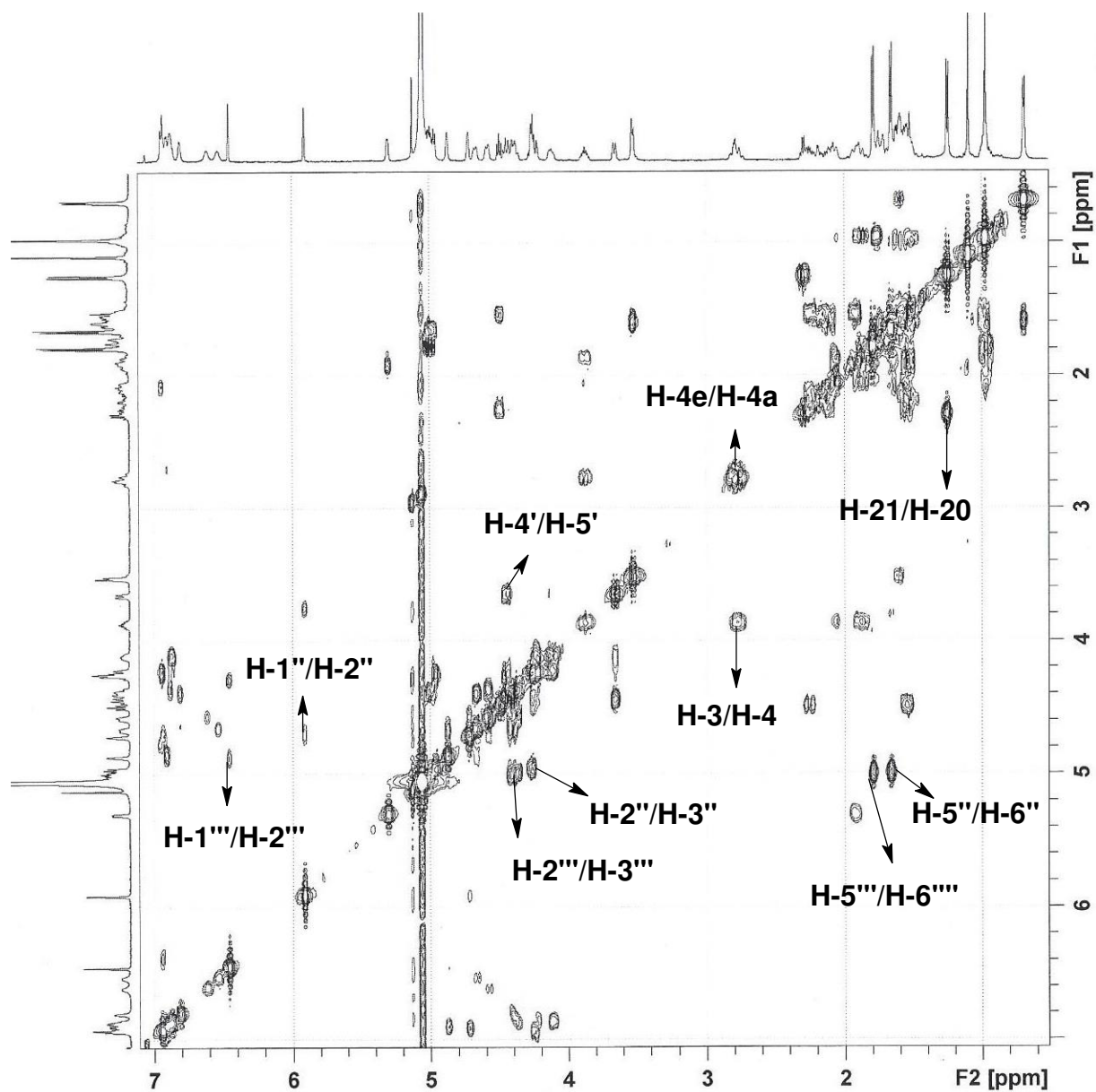
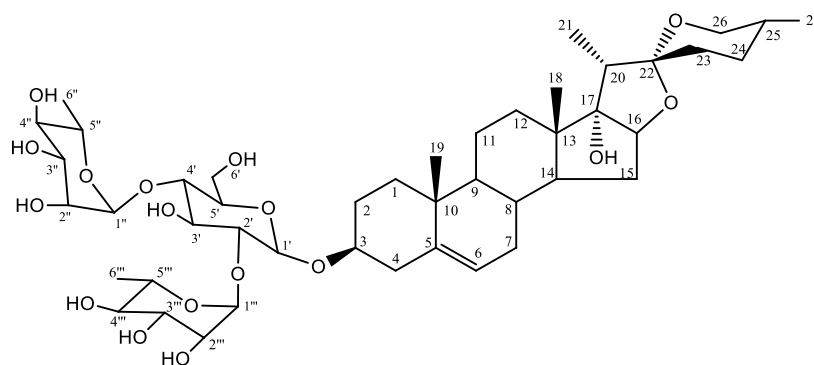


Figura 70: Expansão do mapa de contorno RMN-COSY (500 MHz) da substância **11**, de 0,8 a 7,0 ppm.



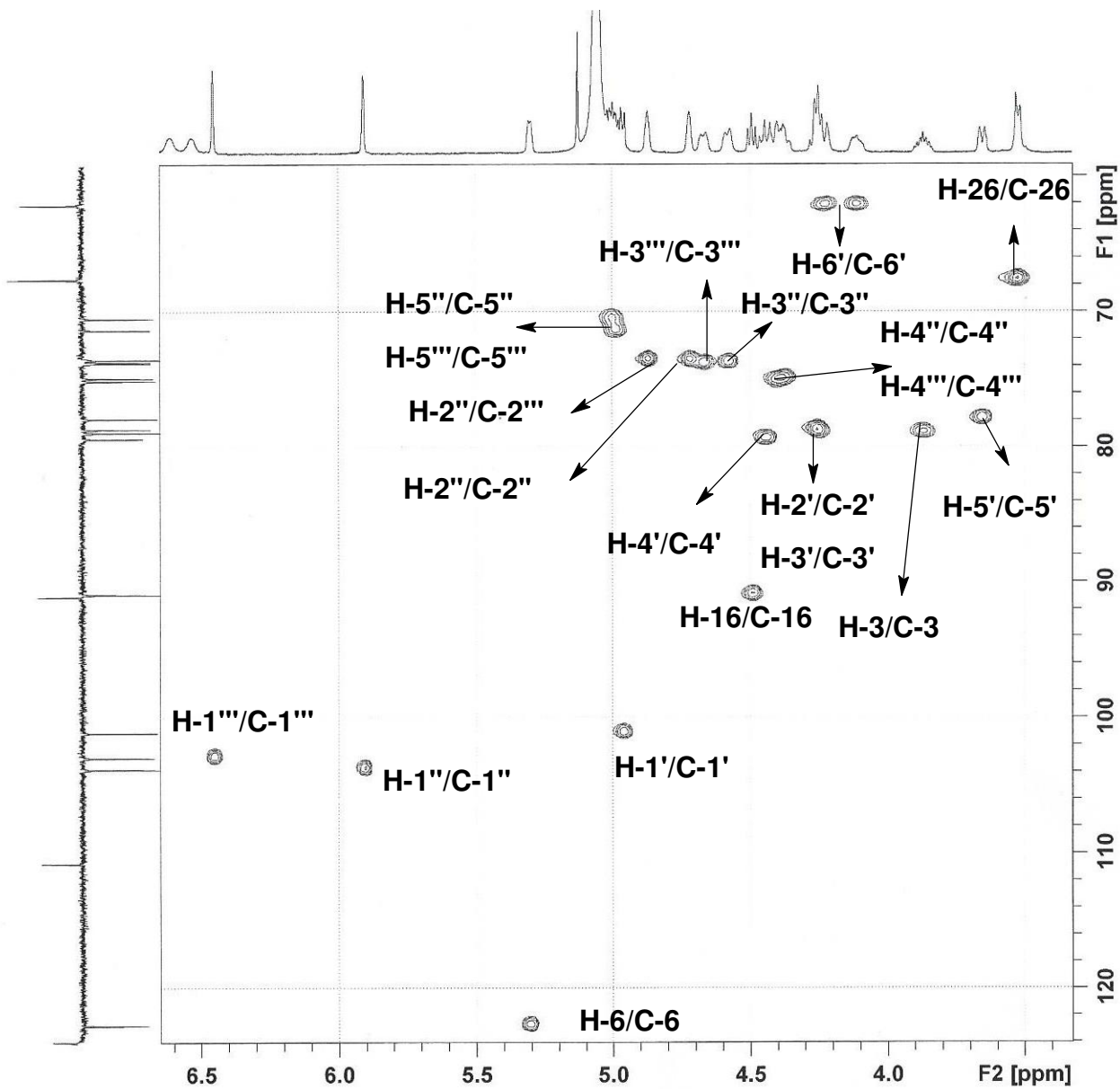
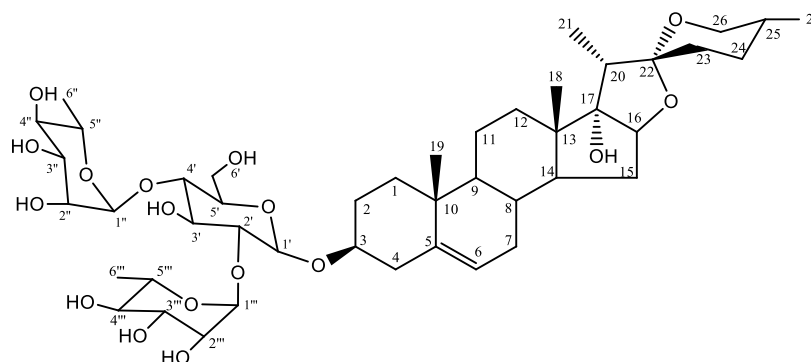


Figura 71: Expansão do espectro RMN-HSQC (500/125 MHz, piridina-d₅) da substância **11**, de 3,5 a 6,5 ppm.



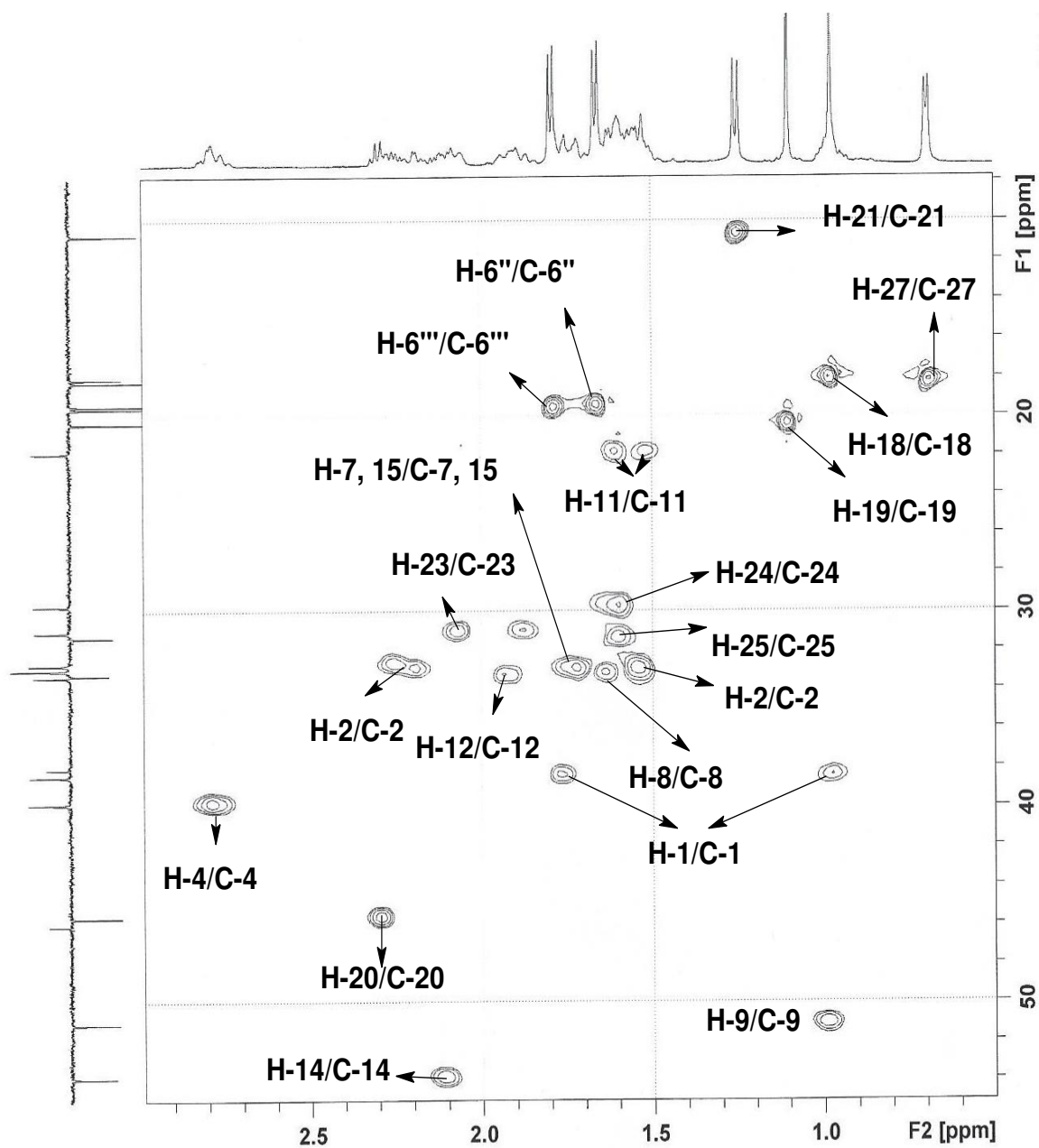
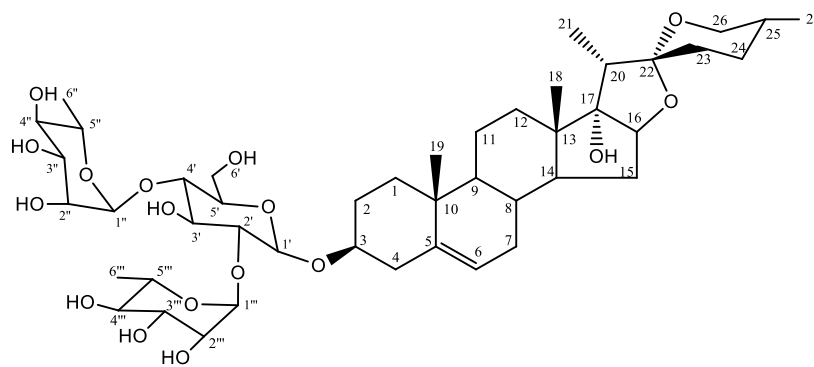


Figura 72: Expansão do espectro RMN-HSQC (500/125 MHz, piridina-d₅) da substância **11**, de 0,5 a 3,0 ppm.



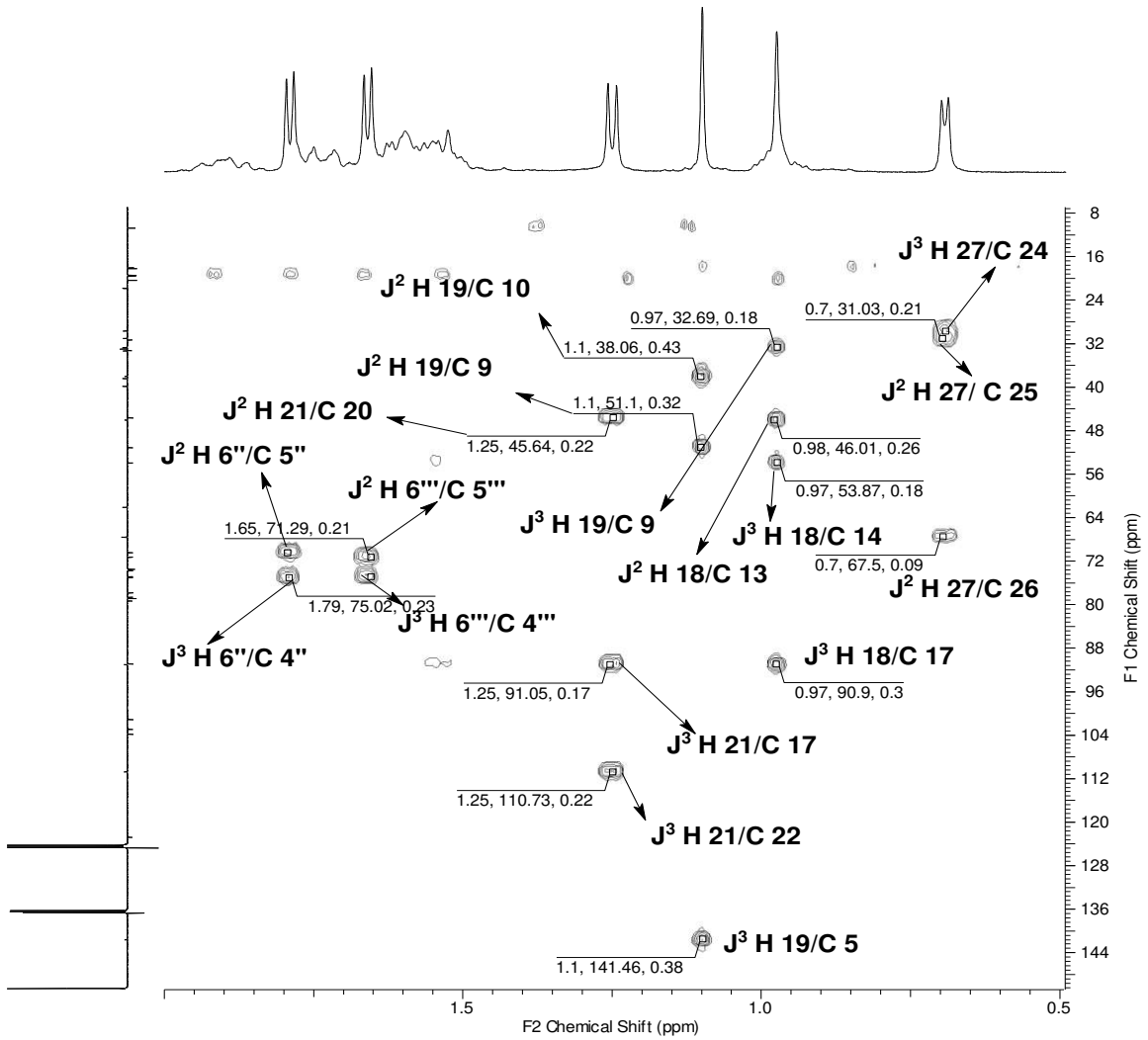
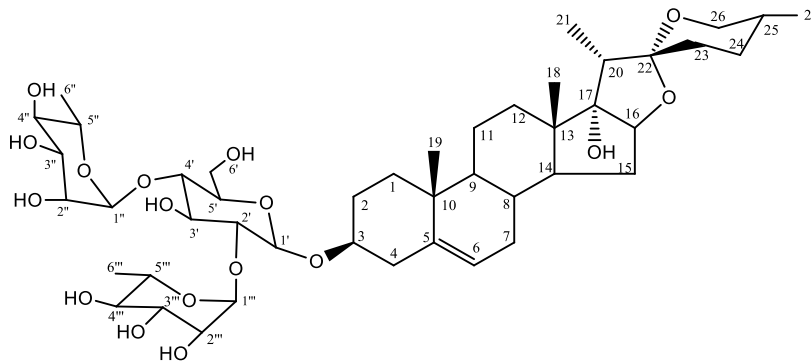


Figura 73: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (125 e 500 MHz, piridina- d_5) da substância **11**, de 0,5 a 2,0 ppm.



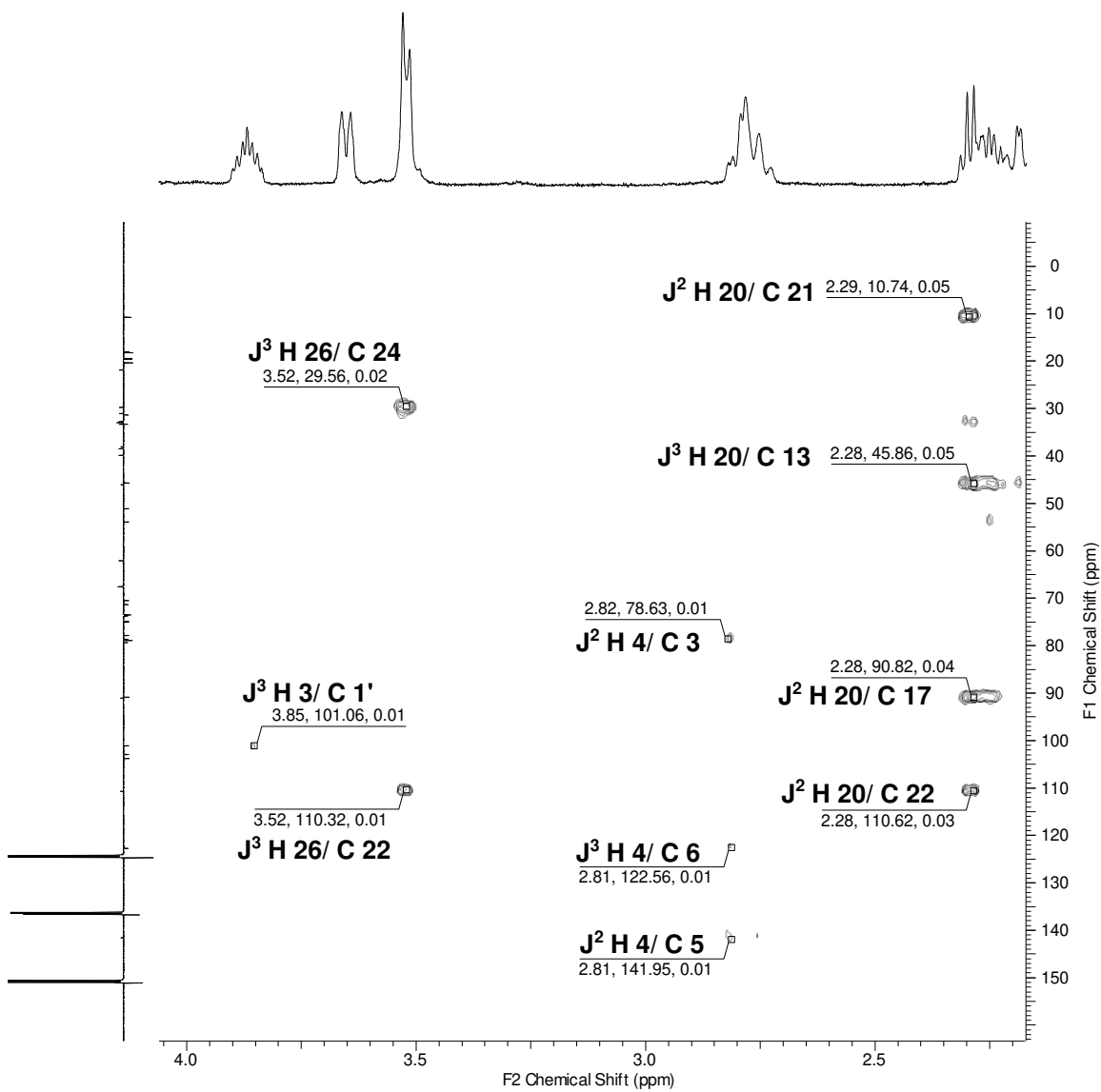
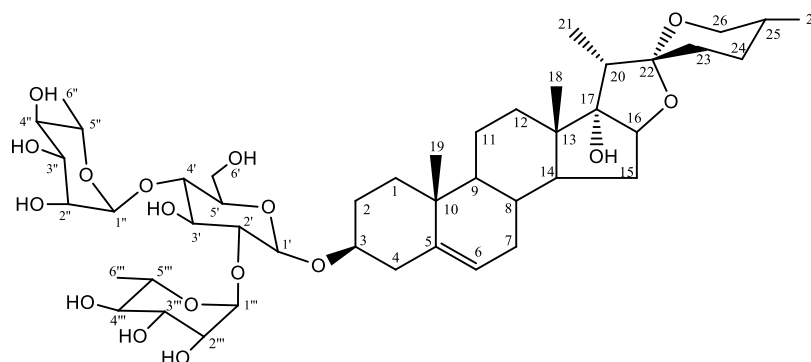


Figura 74: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, piridina- d_5) da substância **11**, de 2,0 a 4,1 ppm.



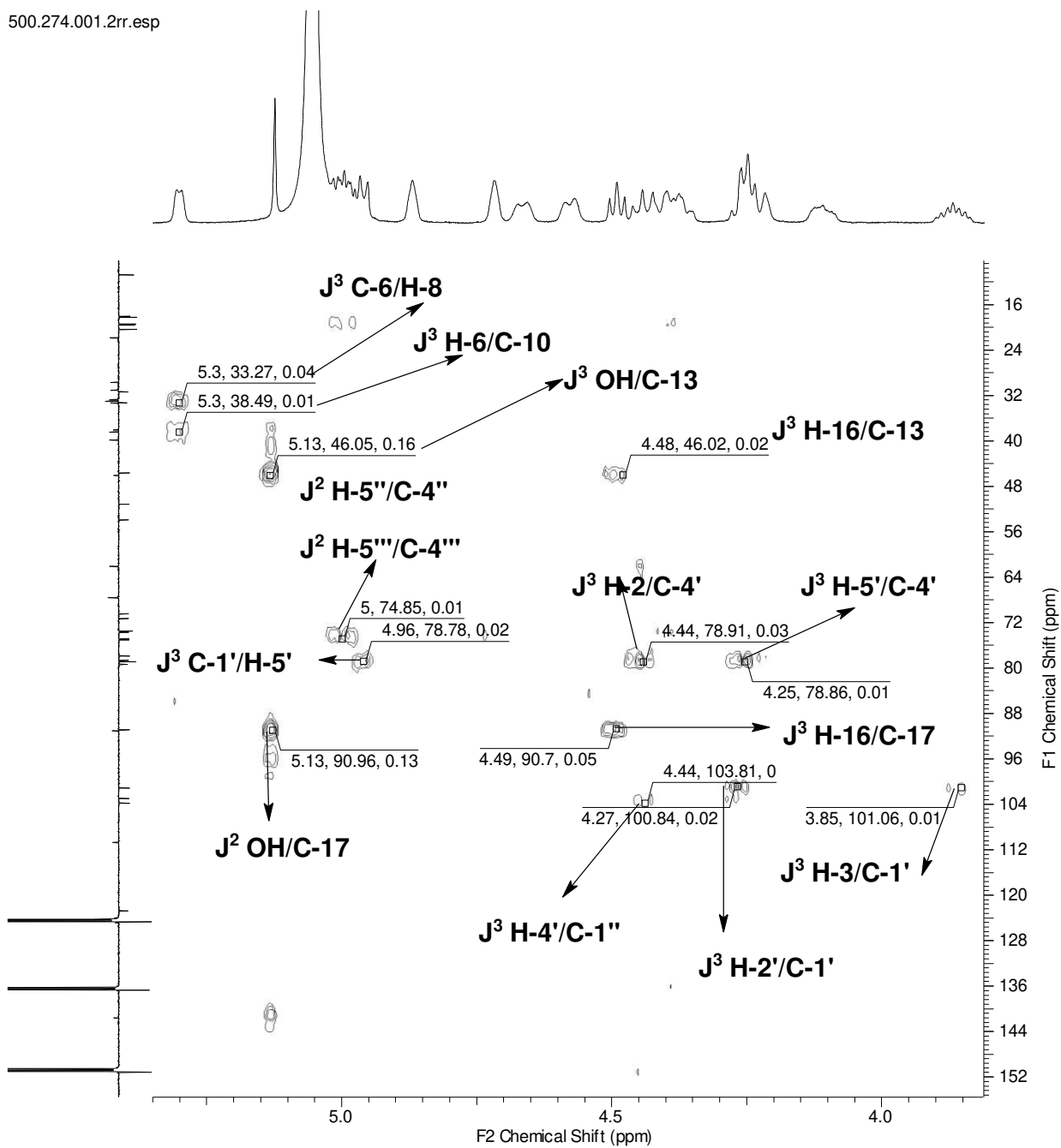
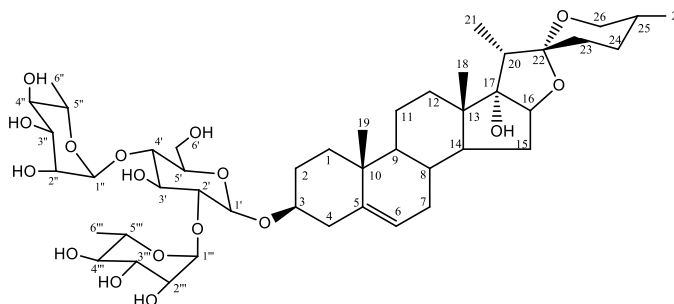


Figura 75: Expansão do mapa de contorno RMN- HMBC (500/ 125MHz, piridina-d₅) da substância **11**, de 4,0 a 5,5 ppm.



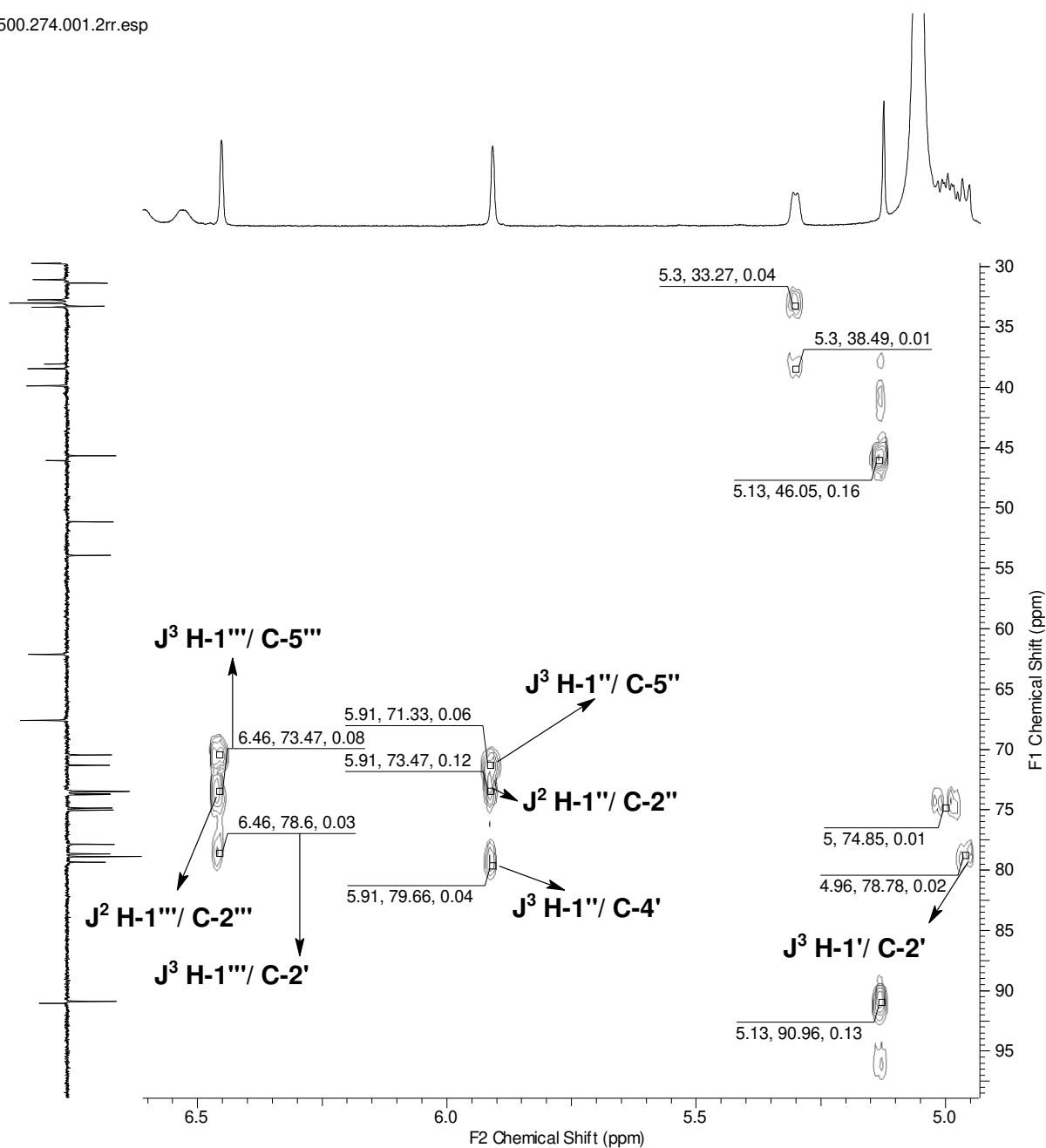
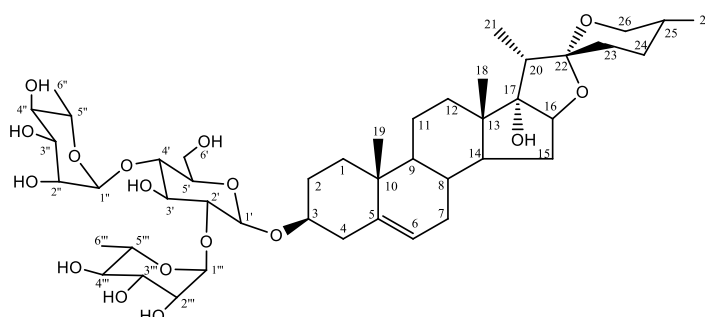


Figura 76: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, piridina-d₅) da substância **11**, de 5,5 a 6,8 ppm.



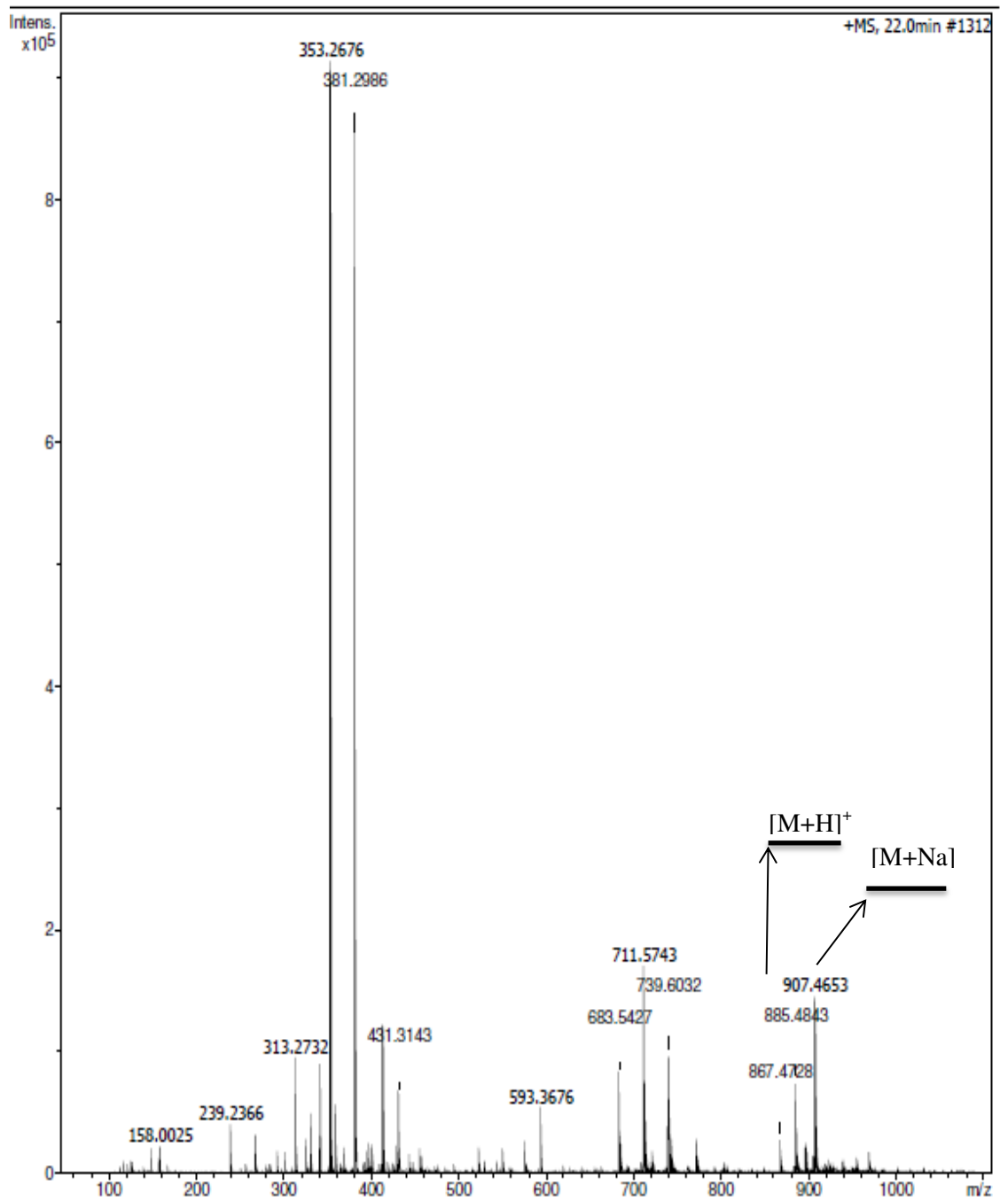
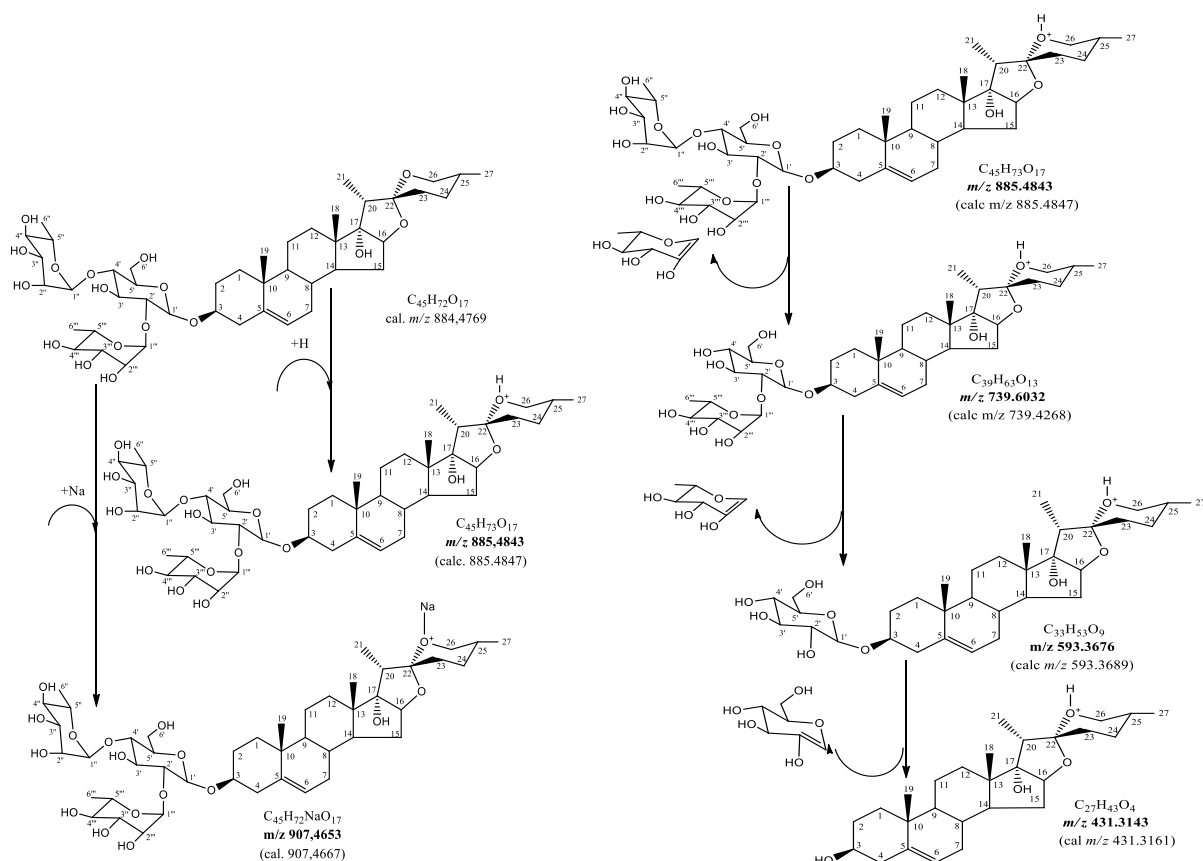


Figura 77: Espectro de massas de alta resolução da substância 11.



Esquema 12: Proposta de fragmentação justificando as perdas das unidades de açúcar da substância **11**.

5.7 Identificação da substância **12**

A identificação da substância **12** foi realizada por interpretação de espectros de RMN ^1H e ^{13}C e experimentos bidimensionais HSQC, HMBC e COSY e revelação em CCDA, utilizando solução de cloreto de alumínio, que indicou presença de flavonoides.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**fig.79 a 81, pág. 89 e 90**) apresentaram sinais compatíveis a sistema saturado no anel C do flavonoide, esta relação também pôde ser observada no experimento de COSY (**fig.82, pág.91**) que apresenta o acoplamento entre os hidrogênios 2 e 3. O espectro de RMN ^{13}C apresenta dois sinais de CH_2 em δ_{C} 28,4 (C-4) e δ_{C} 60,99 (C-6''); doze sinais de δ_{CH} , dentre eles temos os carbonos metínicos do anel B δ_{CH} 65,23 (C-3) e 78,59 (C-2), os carbonos metínicos do açúcar 101,16 (C-1'')/ 77,38(C-5'')/ 77,10 (C-3'')/ 73,75 (C-4'')/ 69,95(C-2''), os carbonos do anel C δ_{CH} 118,43 (C-6')/ 115,31 (C-2')/ 115,23 (C-5'), e por último os carbonos metínicos do anel A os δ_{C} 96,82 (C-6) e 96,48(C-8); seis sinais de carbonos metilênicos 157,06(C-7)/ 156,89(C-9)/ 155,72(C-5)/ 144,95 (C-3')/ 144,93 (C-4')/ 130,77 (C-1') O espectro de HSQC (**fig.81 e 82 pág.91 e 92**) apresentou os acoplamentos $^1J_{\text{HC}}$ que permitiram atribuir os valores de deslocamentos de hidrogênio dos respectivos car-

bonos citados anteriormente. O espectro de HMBC (**fig.85, pág.94**) apresenta um sinal de acoplamento a longa distância entre o H-1'' (4,75d) com o C-7 (δ_C 157,06) justificando a localização do carboidrato nesse carbono.

As informações obtidas foram comparadas com os valores da literatura e permitiu definir a estrutura da substância **12** como a **7-O- β -D-glicopiranosil-catequina**. Esta substância isolada do extrato metanólico do caule de *Jatropha macrantha* (Euphorbiaceae), sua identificação foi feita através dos resultados de RMN 1H , registrado em CD_3OD utilizando o equipamento que opera a 600 MHz (Bruker DRX-600), e dados obtidos em CLAE/ESI/EM/EM (BENAVIDES et al., 2005). Os valores de referência do carbono estão de acordo com AGRAWAL, 1989. Há outros componentes na mistura que não foram identificados.

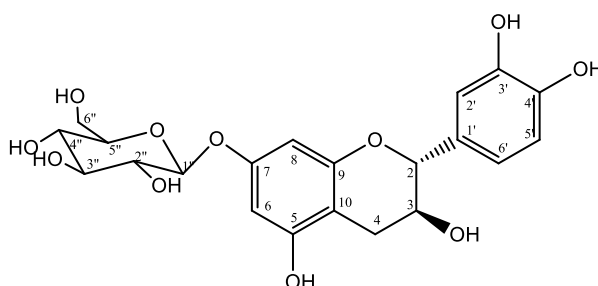


Figura 78: 7-O- β -D-glicopiranosil-catequina (**12**).

Tabela 12: Dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **12** e comparação com os valores da literatura.

Substância 12 (DMSO- d_6)					Catechin-7-O- β -D-glicopiranosideo (CD_3OD)	
	δ_H (mult. J)	δ_C	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$	δ_H (mult. J)	δ_C
2	4,78(<i>sl</i>)	78,59	C-3; C-1	C-2'; C-6'	4,61 (<i>d</i> ; J= 7.5Hz)	81,39
3	4,03(<i>sl</i>)	65,23			4,01 (<i>m</i>)	68,2
4	1,24/2,80 (<i>dd</i> , 15.85Hz)	28,41			2,56/2,88(<i>dd</i>)	28,5
5		156,72			-	157,3
6	5,92(<i>s</i>)	96,82	C-5	C-8; C-10	6,17(<i>d</i> ; J=2.2Hz)	97,3
7	-	157,06			-	158,4
8	6,12(<i>s</i>)	95,48	C-9	C-6; C-10	6,17 (<i>d</i> ; J= 2.2Hz)	98,0
9	-	156,89			-	156,7
10	-	101,18			-	104,1

1'	-	130,77			-	132,0
2'	6,88(s)	115,23	C-3'	C-2; C-6'	6.85 (d; J=2,0Hz)	116,0
3'	-	144,95			-	146,0
4'	-	144,93			-	146,0
5'	6,66(s)	115,31			6.78 (d; J=8,1Hz)	116,9
6'	6,66(s)	118,43			6.73 (dd; J _{5',6'} =8,1Hz J _{2',6'} =2.0Hz)	120,6
1''	4,75(d, 7,25Hz)	100,79	C-7		4.83 (d; J _{1'',2''} = 7,7Hz)	102
2''	3,22(m)	73,75			3.42 (dd; J _{1'',2''} =7,7Hz J _{2'',3''} = 9.0Hz)	74,5
3''	3,26(m)	77,10			3,46 (dd; J _{2'',3''} =9.0Hz; J _{3'',4''} = 9.0Hz)	77,6
4''	3,21(d, 5,35Hz)	69,95			3,40 (dd; J _{3'',4''} =9,0Hz; J _{4'',5''} =9.0Hz)	71,1
5''	3,26 (m)	77,38			3,39 (m)	77,5
6''	3,67/ 3.51(dd)	60,99			3,90 (dd; J _{5'',6''} =1.5Hz; J _{6'',6''} =11,8Hz)	62,5
OH-5	9,21		C-5	C-6		

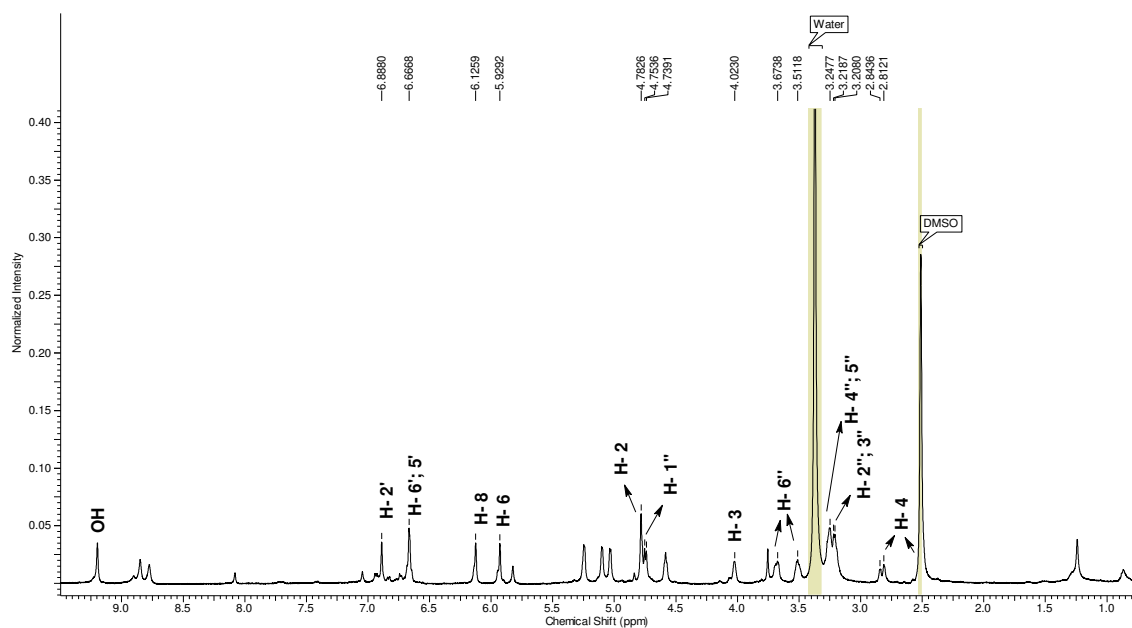


Figura 79: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 12.

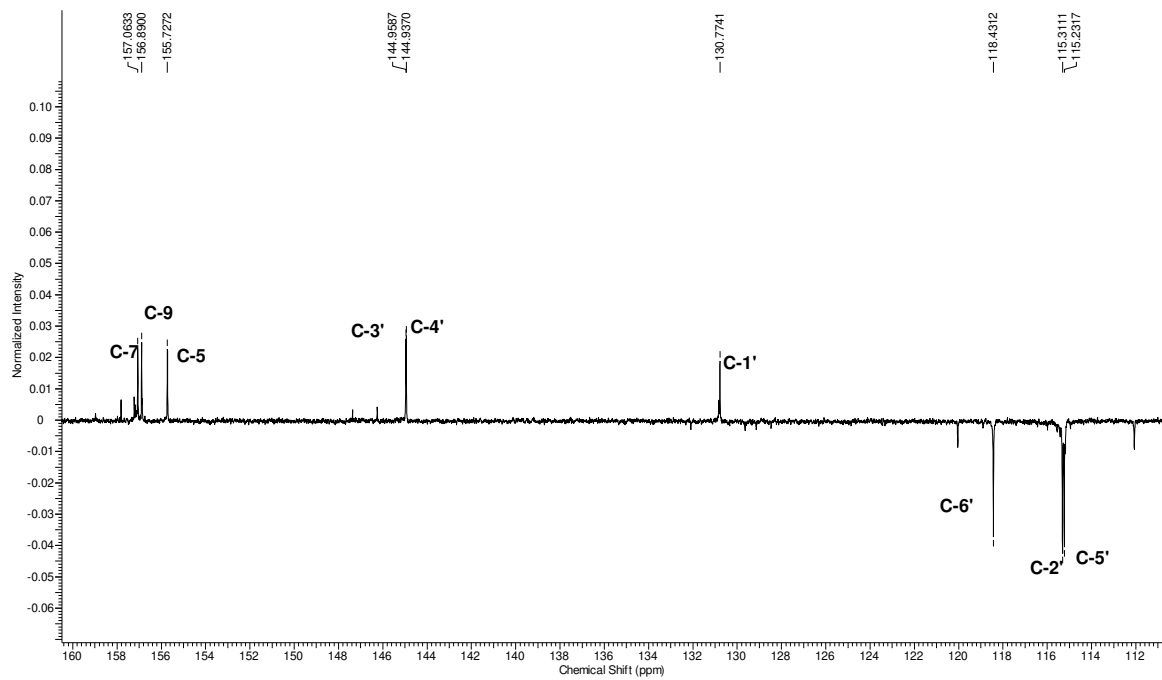


Figura 80: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) da substância **12**, de 112 a 160 ppm.

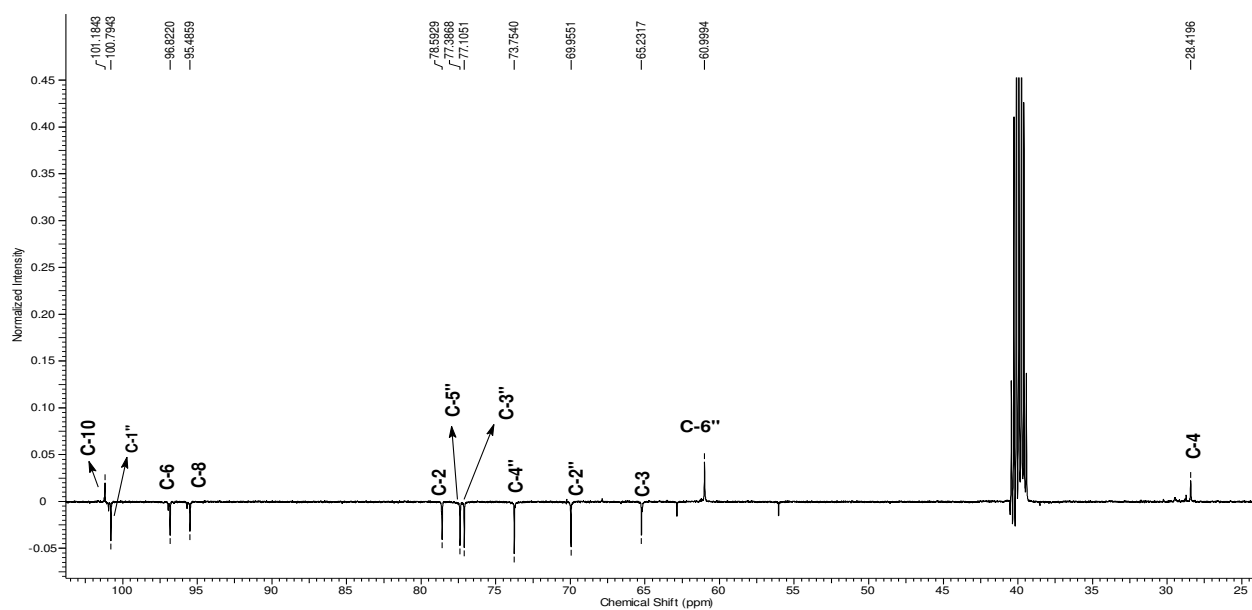


Figura 81: Expansão do espectro DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) da substância **12**, de 25 a 102,5 ppm.

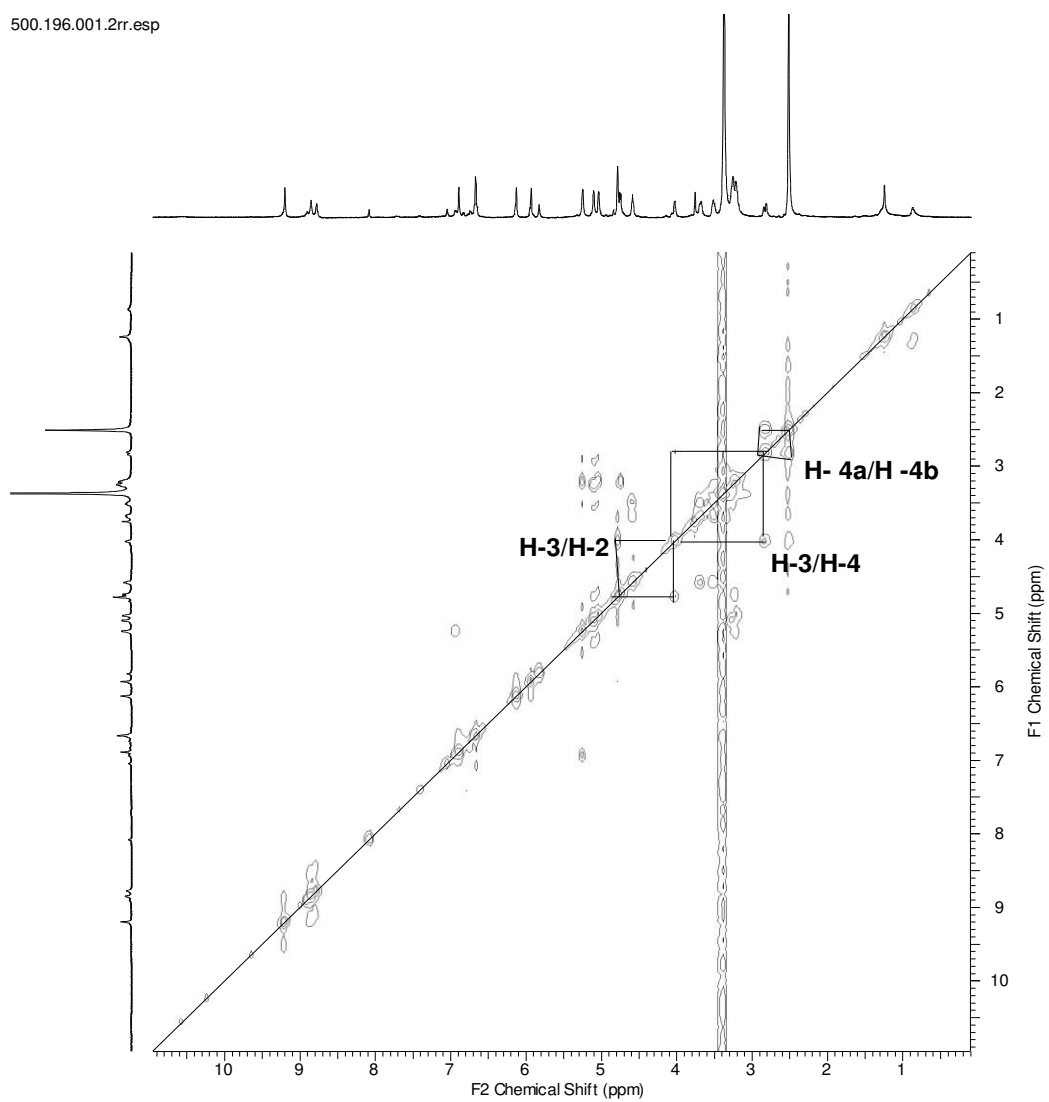
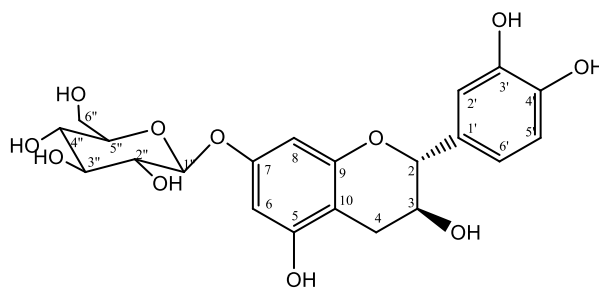


Figura 82: Mapa de contorno de COSY (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **12**.



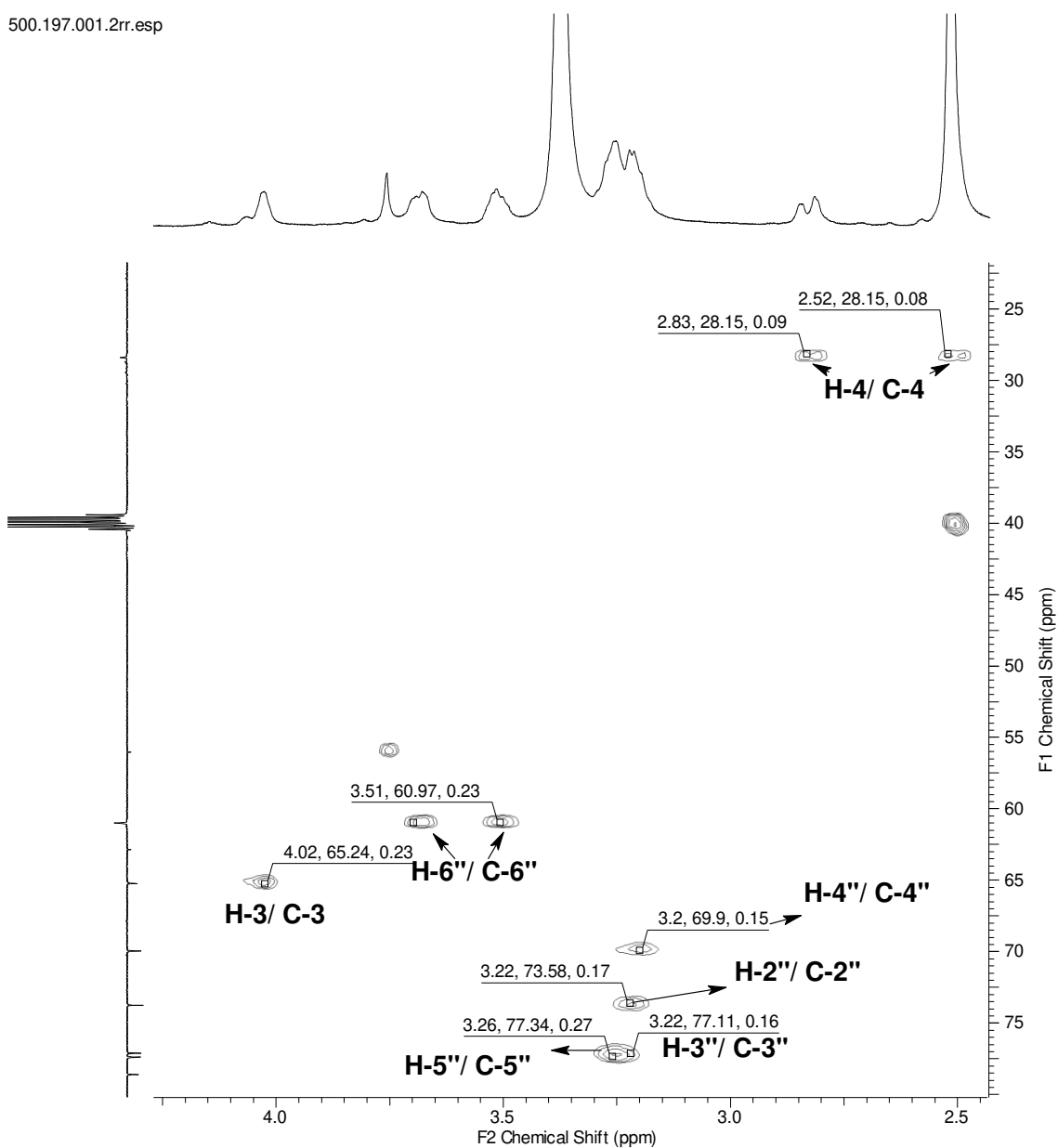
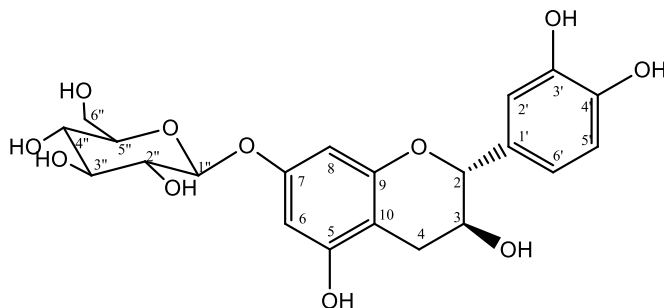


Figura 83: Expansão do mapa de contorno RMN-HSQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **11**, de 2,4 a 4,2 ppm.



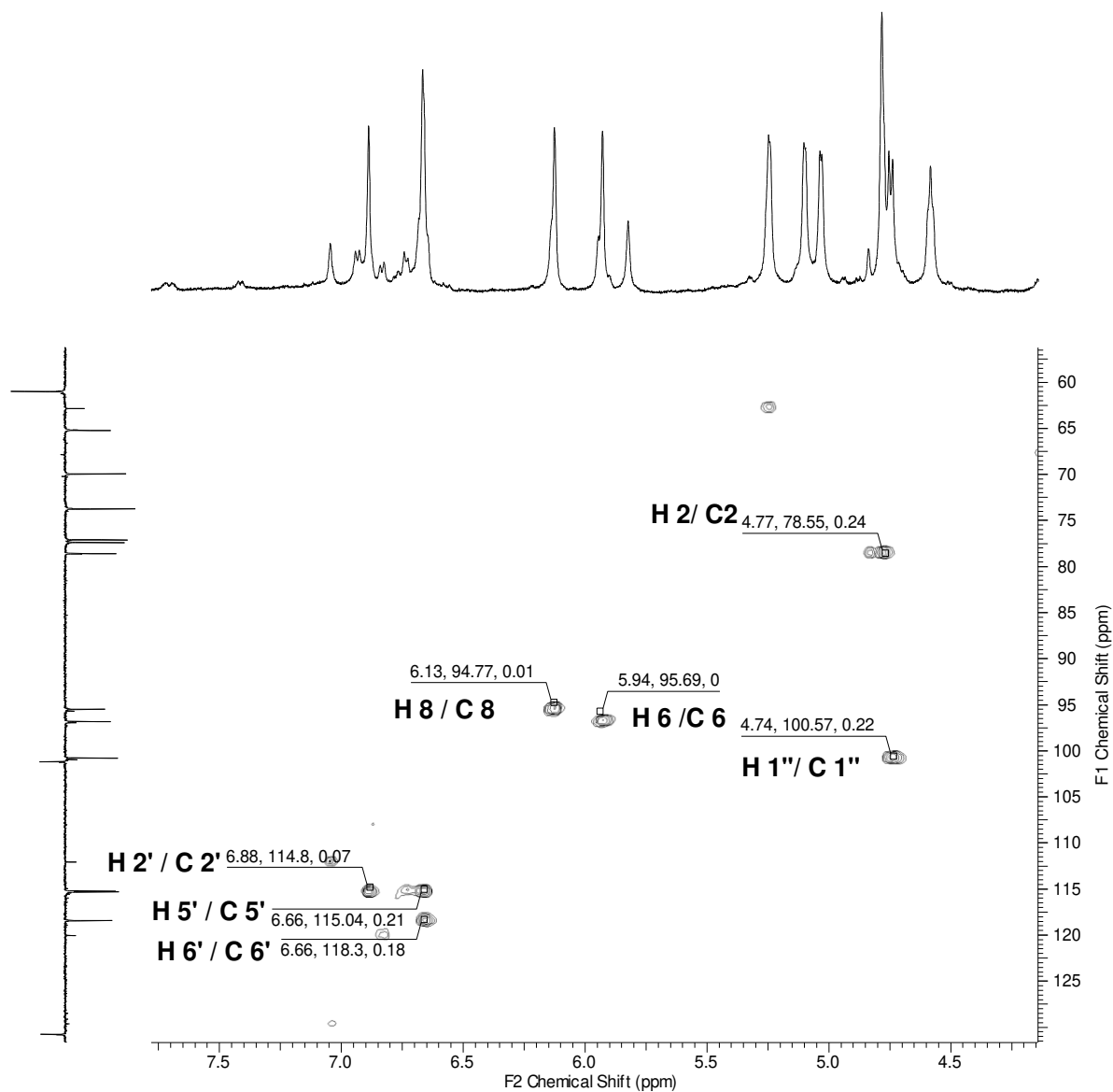
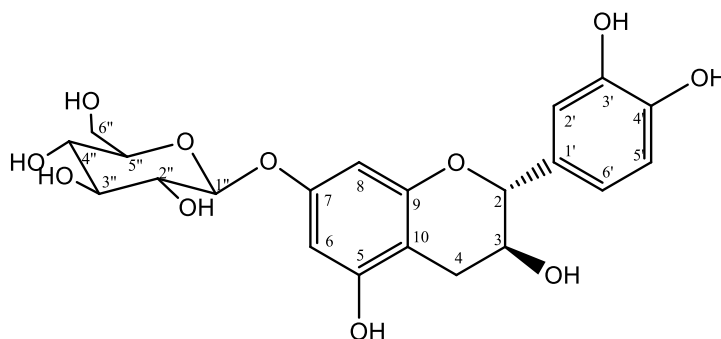


Figura 84: Expansão do mapa de contorno RMN-HSQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **11**, de 4,25 a 7,75 ppm.



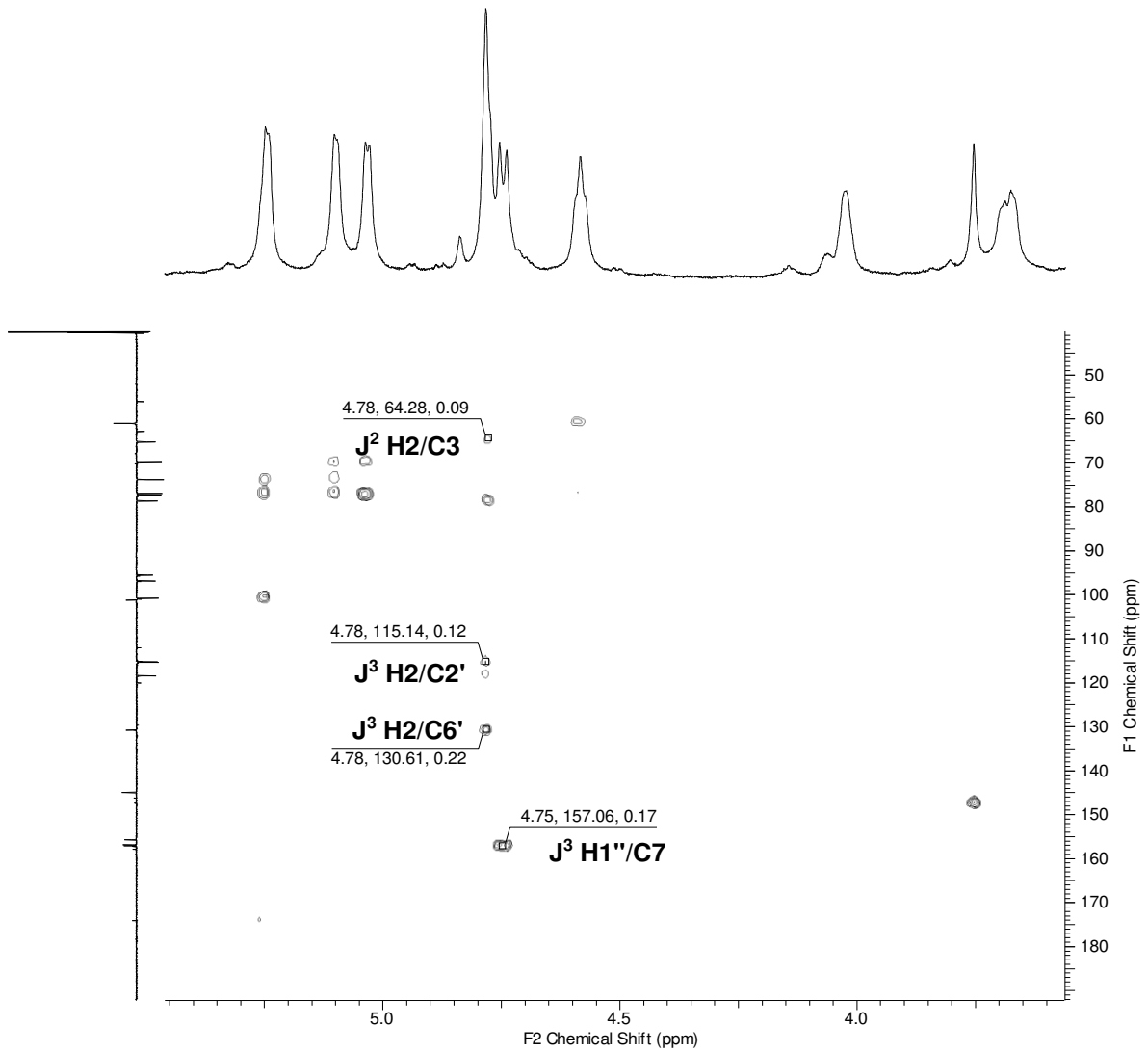
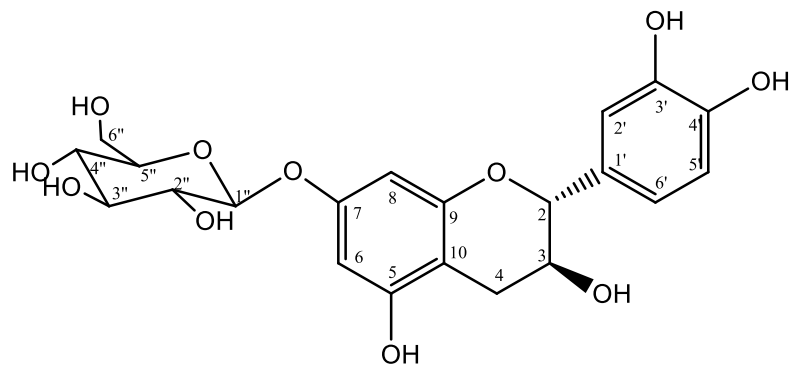


Figura 85: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, DMSO-d₆) da substância **11**, de 3,25 a 5,5 ppm.



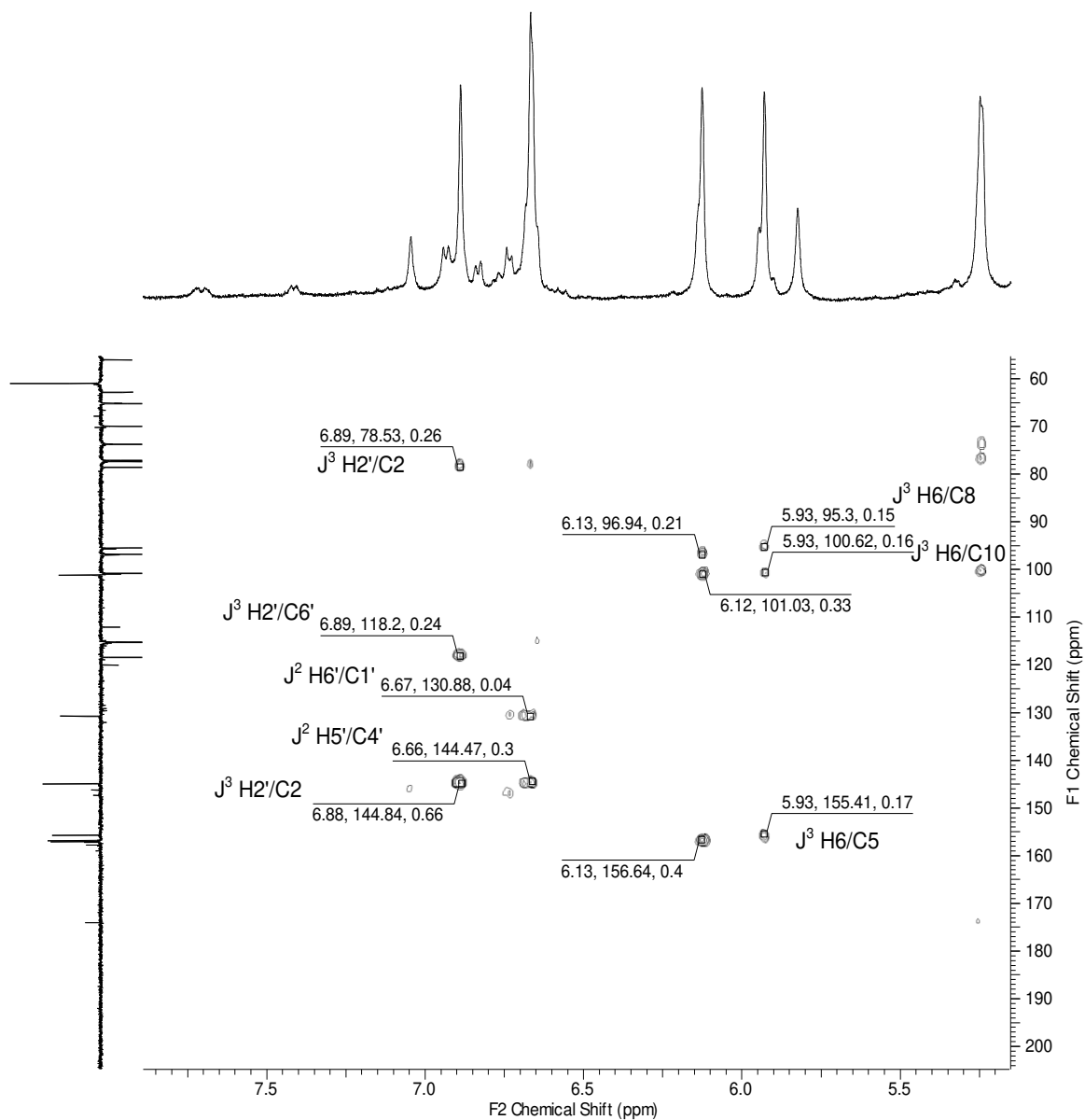
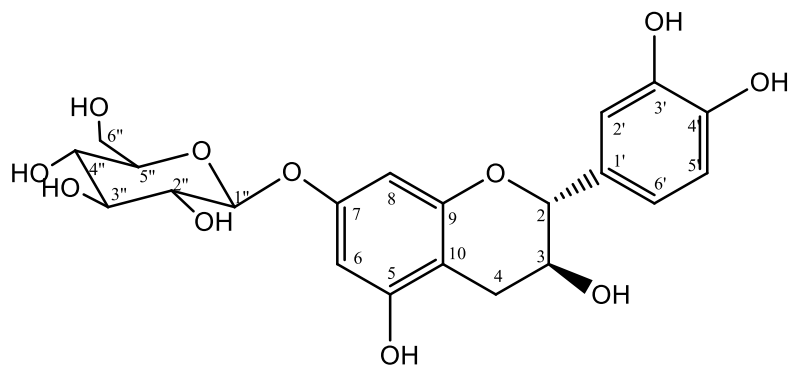


Figura 86: Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **12**, de 5,2 a 7,75 ppm.



7. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu identificar doze substâncias em *Brachiaria humidicola*.

A saponina do tipo penogenina está sendo relatada pela primeira vez no gênero e a do tipo diosgenina já foi isolada em *B. decumbens*, entretanto este é o primeiro relato em *B. humidicola*.

Das folhas foram identificados três flavonas e dois flavonóis além de três ácidos orgânicos, nas raízes as saponinas e uma catequina em mistura com outros componentes.

As análises por CLAE revelaram a presença de outras saponinas presentes no extrato obtido por partição com acetato de etila, entretanto a pouca massa obtida e a falta de padrões não permitiram a identificação das mesmas.

A planta sintetiza compostos com unidades de açúcar e com frequência eles são do tipo ramnose e glicose.

Esse trabalho contribuiu para o conhecimento químico do gênero *Brachiaria*.

Dentre as substâncias identificadas foram encontrados ácidos que são mencionados na literatura como responsáveis pelo efeito alelopático deste gênero, entretanto acreditamos que este efeito também pode ser atribuído às outras classes de substâncias identificadas.

A literatura atribui às saponinas do tipo protodioscina como agente causador da fotossensibilização nos ruminantes que consomem as gramíneas do gênero *Brachiaria*. Entretanto nas frações analisadas não foram identificadas saponinas com esta aglicona até o momento, sendo isto possível devido à baixa concentração ou a inexistência deste tipo de saponina no material analisado. Isso pode justificar a menor toxicidade da espécie *B. humidicola*.

8. BIBLIOGRAFIA

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 MNR of Flavonoids. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, India. Elsevier. p474- 478. 1989.

ALMEIDA, F. S. Alelopatia e as plantas. Circular 53, Instituto Agronômico do Paraná, Lndrina, PR, 60p. 1988.

BENAVIDES, A.; MONTORO, P.; BASSARELLO, C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; Cathecin derivaties in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, 639-647, 2006.

BODDER, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C.P.; CANTARUTTI, R.B.; PEREIRA, J.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the processo f pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & environment**, v.103, n.2, p.389-403, 2004.

BRUM, K.B.;HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M.B.; NÓBREGA, F.N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M.C.S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. **Cienc. Rural**, vol. 39, n.1, 2009.

BURMAN, A.G.; Nature & composition of the grass flora of Brazil. *Willdenowia* 15: 211-133. 1985.

CALLAWAY, R.M. The detection of neighbors by plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.17, p. 104-105, 2002.

CHO J-Y, YOON I, JUNG D-H., HYUN S. H., LEE K-H., MOON J-H., PARK K-H. Jaboticabin and Flavonoids from the Ripened Fruit of Black Raspberry (*Rubus coreanum*). **Food Sci. Biotechnol.** 21(4): 1081-1086. 2012.

DAVIS, S.D.; V.H. Heywood, O.H. MacBryde, J. Villa-Lobos & A.C. Hamilton. Centers of plant diversity: a guide & strategy for their conservation. Vol 3. **The Americas IUCN Publications**, Cambridge, Inglaterra. 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**, 2nd edition, Jonh Wiley & Sons. 1998.

ESPEJO, O.; LLAVOT, J. C.; JUNG, H.; GIRAL, F. Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea compósita* tubers. **Phytochemistry**, vol.21, No. 2, pp. 413-416, 1982.

FERNANDEZ-APARICIO, M.; CIMMINO, A.; EVIDENTE, A.; RUBIALES, D.; Inhibition of *Orobanche crenata* seed germination and radicle growth by allelochemicals identified in cereals. **J. of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 61, issue 41, 9797-9803, 2013.

FERRAZ, F.M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE I.J. (Ed.). **Anualpec- Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. p.55-56, 2003.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente de ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (Edição especial), p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A.G.; BOGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. **Porto Alegre: Art-med**, p. 323, 2004.

FREITAS, L.G. L.; ARAUJO, A. L. L.; WYSOCKI JUNIOR, H. L.; ALBERNAZ, T.; BARBOSA, J.D.; HARAGUCHI, M. Análise quantitativa das saponinas por HPLC/ELSD das pastagens de *Brachiaria brizantha* com caso de fotossensibilização em ovinos no Estado do Pará. **I. Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.19-51, 2009.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R.; *Acta Physiol. Plantarum*, vol. 27, p. 395, 2005.

GOPALAKRISHNAN S.; SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification Inhibitors from the Root Tissues of *Brachiaria humidicola*, a Tropical Grass. **J. Agric. Food Chem.** 55, 1385-1388, 2007.

HAASE, R. & S. BECK. Structure & composition of savanna vegetation in northern Bolivia: a preliminary report. **Brittonia** 41: 80-100. 1989.

HARIBAL, M.; FEENY, P.; LESTER, C. C.; A caffeoylcyclohexane-1-carboxylic acid derivative from *Asimina triloba*. **Phytochemistry**, vol. 49, issue 1, 103-108, 1998.

HILBERT, G.; TEMSAMANI, H.; BORDENAVE, L.; PEDROT, E.; CLUZET, S.; DE-LAUNAY, J-C.; OLLAT, N.; DELROT, S.; MERILLON, J-M.; GOMES, E.; RICHARD, T.; Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. **Food Chemistry**, 169, 49-58, 2015.

HOSNY, M.; DHAR, K.; ROSAZZA J. P. N. Hydroxylations and Methylations of Quercetin, Fisetin, and Catechin by *Streptomyces griseus*. **J. Nat. Prod.**, vol.64, p. 462-465, 2001.

INDERJIT, D. S.; **Planta**, vol. 217, p.529, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, **IBGE**, Rio de Janeiro. 2003.

JACOBS, B.F., J.D. Kingston & L.L. Jacobs. The origin of grass dominated ecosystems. **Annals of Missouri Botanical Gardens** 86: 590-643. 1999.

JUDD, W.F.; KELLOGG, E.A.; STEVENS P.F. & DONOGHUE M.J., Plant Systematics: a Phylogenetic Approach, Second Edition. **Sinauer Associates**, Massachusetts, Estados Unidos. 2002.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in Brachiaria and existing germoplasma collections. In: MILLES, J.W.; MASS, B.L.;VALLE, C.B., ed. Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement. Cali: CIAT/Brasília: **EMBRAPA-CNPGC**, p. 16-42, 1996.

KOBAYASHI, C. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v.4, p.1-7, 2004.

KOUGAN, G., MIYAMOTO,T.; TANAKA, C.; PAULULAT,T.; MIRJOLET, J.; DUCHAMP,O.; SONDEGAM, B. L.; LACAILLE-DUBOIS, M.-A.; **J. Nat. Prod.** , vol. 73, p.1266–1270, 2010.

KUBO, S.; Mimaki, Y.; Terao, M.; Sashida, Y.; Nikaido, T.; Ohmoto, T. **Phytochemistry**, vol.31|11 p. 3969-3973, 1992.

LACHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Editora, p. 531,2000.

MACEDO, M.C.M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 42, Goiânia. Anais. Goiânia: SBZ/UFG, p. 56-84. 2005.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: Yunes RA, Calixto JB. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 503-523, 2001.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MATTOS, H. B.; PEDREIRA, J. V. S. Crescimento estacional de oito leguminosas forrageiras de clima tropical. **Boletim da Indústria Animal**, v. 41, p. 145-157, 1984.

MEIRELES, N. M. F. Degradação de pastagens: critérios de avaliação. **In: Anais do Encontro sobre Recuperação de pastagens**. V. T. Paulino e L. G. Ferreira, Eds.). Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, SP. 2. ed. revisada. p. 15-22, 1999.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; JUNIOR, M.C. S.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; **Flora Vascular do Cerrado**. In: S.M. Sano, & S.P. Almeida (eds). 1998.

MOLISH, H.; *Die Einfluss seiner Pflanze auf die andere-Allelopathie*, Gustav Fischer: Jena, 1937.

MORAIS, S. M., BRAZ-FILHO, R. **Produtos naturais: estudos químicos e biológicos**. 1ª Ed. Fortaleza: EdUECE, 2007.

OLIVEIRA, O. C. **Parâmetros químicos e biológicos relacionados com a degradação de pastagens de *Brachiaria* spp. no Cerrado brasileiro**. 243 p. (Tese de Doutorado). Seropédica. UFRRJ, 2000.

OLIVEROS-BATISTA A. J. Francisco A. Macías, Ceferino Carrera Fernández, David Marín y José M. G. **Molinillo Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas.** Departamento de Química-Grupo de Química Ecológica, Facultad de Ciencias,

OZGEM, U.; SEVINDIK, H.; KAZAZ, C.; YIGIT, D.; KANDEMIR, A.; SECEN, H.; CALLIS, I. A new sulfated α -ionone glycoside from *Sonchus erzinicanicus*. **Molecules**, 15, 2593-2599; doi:10.3390, 2010.

PIZZOLATTI, M. G.; JUNIOR, A. C.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia fortificata* (Leguminosae). **Química Nova**, Vol. 26, No. 4, 466-469, 2003.

PEREIRA, J. M. Leguminosas forrageiras em sistemas de produção de ruminantes: Onde estamos? Para onde vamos? **In: Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem**, Viçosa, MG: UFV, Anais. p. 109-148. 2002.

PERON, A. J.; EVANGELISTA, A.R. Degradação de pastagens em regiões de cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.655-661, 2004.

PIRES, S. V.; TAKETA, A. T. C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Saponins and Saponinins from *Brachiaria decumbens* Stapf. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 13, No. 2, 135-139, 2002.

POUCHERT, C. J. & BEHNKE, J. The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR spectra. 1993.

REZENDE, C.P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R. et al. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim Agropecuário**, v. 54, p. 1-55, 2003.

RICE, E.; Allelopathy, 2nd ed., Academic Press: Orlando, **1984**.

RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, n.3, p.183-192, 2011.

SÁNCHEZ, P. A. **Properties and management of soils in the tropics**. New York: John Wiley & Sons: 618 p. 1976.

SHAW, R.B. **Tropical grasslands & savannas**. In: S.W.L.J. Everett (ed). *Grasses: systematics & evolution*. pp 351-355. CSIRO, Melbourne, Austrália. 2000.

SINGH, M. et al. HPLC identification of allelopathic compounds from *Lantana camara*. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n.1, p.81-89, 1989.

STANIZIO, R. M.; LEITE, G. G.; VILELA, L. Efeito alelopático de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sobre o crescimento de plantas de quatro leguminosas forrageiras. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, XXVIII**. João Pessoa: SBZ, Anais...p. 95.1991.

SUBBAN, R.; VEERAKUMAR, A.; MANIMARAM, R.; HASHIM, K. M.; BALACHANDRAN, I. Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.). **Natural Resource Letter**. 62; 369-373. DOI 10.1007/s 1418-0080229-0. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2009.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DOBEREINER, J.; **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2º Ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p, 2012

VALLE, C.B.D.; MACEDO, M.; EUCLIDES, V.P.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. gênero *Brachiaria*. In: FONSECA, D.M.; MASTUSCELLO, J.A. (Org.). **Plantas Forrageiras**. Viçosa: Editora UFV, cap. 2, p.30-77, 2010.

VIANA, P.L. & J.A. Lombardi. **Florística e caracterização dos campos rupestre sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil**. *Rodriguésia* 58: 159-177. 2007.

WALL, M.E.; GARVIN, J.W. WILLAMAN, J.J.; SCHUBERT, B.G. Steroides saponins VII- Survery of plants for steroidal sapogenins and another constituents. **J. Amer. Pharm. Ass.** 43, 1954.

WANG, XIAO-X.; HE, JIU-M.; WANG, CHUN-L.; ZHANG, RUI-P.; HE, WEN-Y.; GUO, SHUN-X.; SUN, RUI-X.; ABLIZ, Z. Simultaneous Structural Identification of Natural Products in Fractions of Crude Extract of the Rare Endangered Plant *Anoectochilus roxburghii* Using ¹H NMR/RRLC-MS Parallel Dynamic Spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**. vol.12, 2556-2571, 2011.

WESTON, L.A.; RYAN, P.R.; WATT, M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, vol.63, n.9, pp. 3445-3454, 2012.

WENZL, P.; MANCILLA, L.I.; MAYER, J.E.; ALBERT, R.; RAO, I.M. Simulating infertile acid soils with nutrient solutions: the effects on *Brachiaria* species. **Soil Sci. Soc Am. I**. 67:1457-1469, 2003.

WHITTAKER, R. H. **Communities and Ecosystems**. Macmillan, London: Collier Macmillan, 1970.

YUAN, H.; ZHOU X.; MENG, L.; QUIN, F.; ZHOU G.; Chemical constituents from *Commelina communis*. **China Journal of Chinese Materia Medica**. Vol. 38, Issue 19, outubro de 2013.

ZIELINSKA, A.; PARADOWSKA, K.; JAKOWSKI, J.; WAWER, I. “¹³C CP MAS NMR and GIAO-CHF/DFT calculation of flavonoids: Morin, kaempferol, tricetin, genistein, formononetin and 3,7-dihydroxyflavone”. **Journal of Molecular Structure**, 873, p. 109-116, 2008.

ZIMMER, A. H. Consorciação com Leguminosas e Bancos de Proteínas para Pastagem de capins do Gênero *Brachiaria*. **In: Encontro sobre Capins do Gênero *Brachiaria***, Nova Odessa: IZ, Anais...p. 197-234. 1987.

ZIMMER, A. H.; CORREA, E. S. A pecuária nacional, uma pecuária de pasto? **In: Anais do Encontro sobre Recuperação de pastagens**. (V. T. PAULINO e L. G. FERREIRA, Eds.). Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, SP. 2. ed. revisada. p. 3-13. 1999.

<http://www-ias.uca.es/bylaws.htm#CONSTI>, accesada en Febrero **2008**.

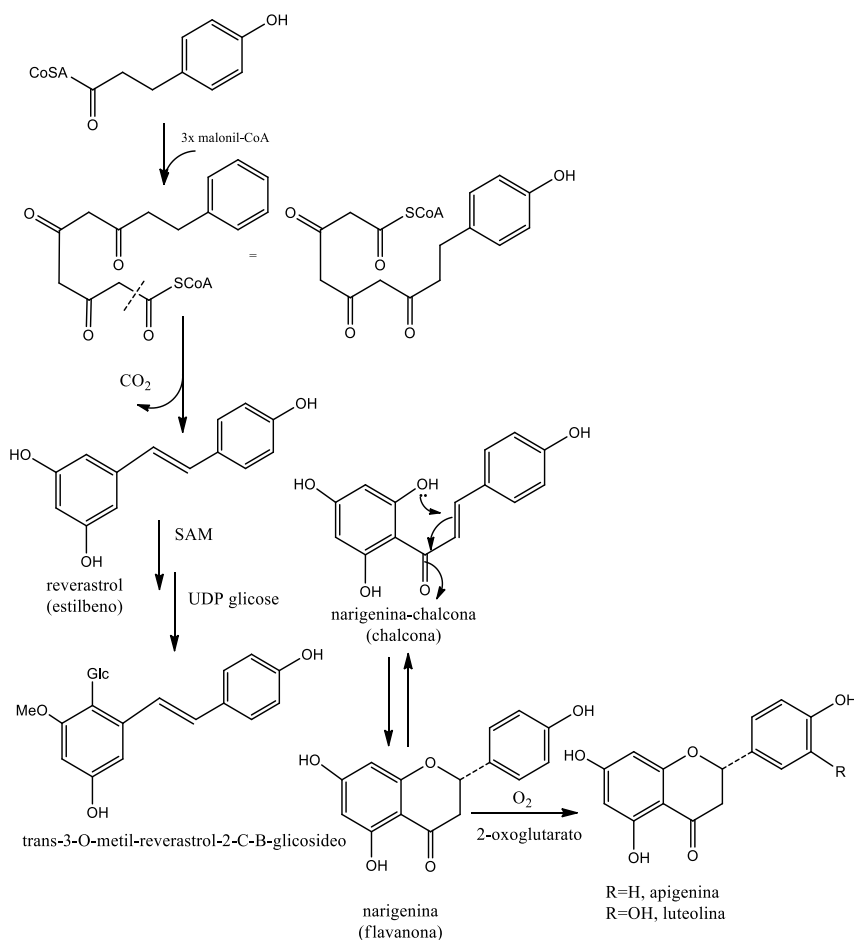
<http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/clima.htm>

9. ANEXO

Considerações biogénicas sobre os constituintes isolados de *Brachiaria humidicola*

- **Biossíntese de Flavonoides**

A biossíntese de flavonoides se dá através da via do chiquimato e a do acetato. A formação ocorre através da união de três unidades de malonil-CoA e uma de cumaroil-CoA, a união ocorre por condensação de Claisen e conduz a formação de chalconas (narigenina) já a condensação aldólica produz estilbenos (resveratrol), a formação de cada uma depende da natureza da enzima que catalisa a reação, chalcona sintase ou estilbeno sintase, respectivamente. Ocorre uma substituição nucleofílica à carbonila na unidade p-cumaril CoA que promove a formação do anel A, gerando a sub-classe flavonoides. A adição de Michael 1,4 ao carbono do sistema α, β insaturado forma o anel C, outra sub-classe as flavanonas. A partir desses flavonoides, podem ocorrer outras modificações produzindo outros representantes pertencentes à mesma classe de metabólitos. As modificações que geralmente ocorrem são hidroxilações, metilações, isoprenilações e glicosilações (DEWICK, 2002).

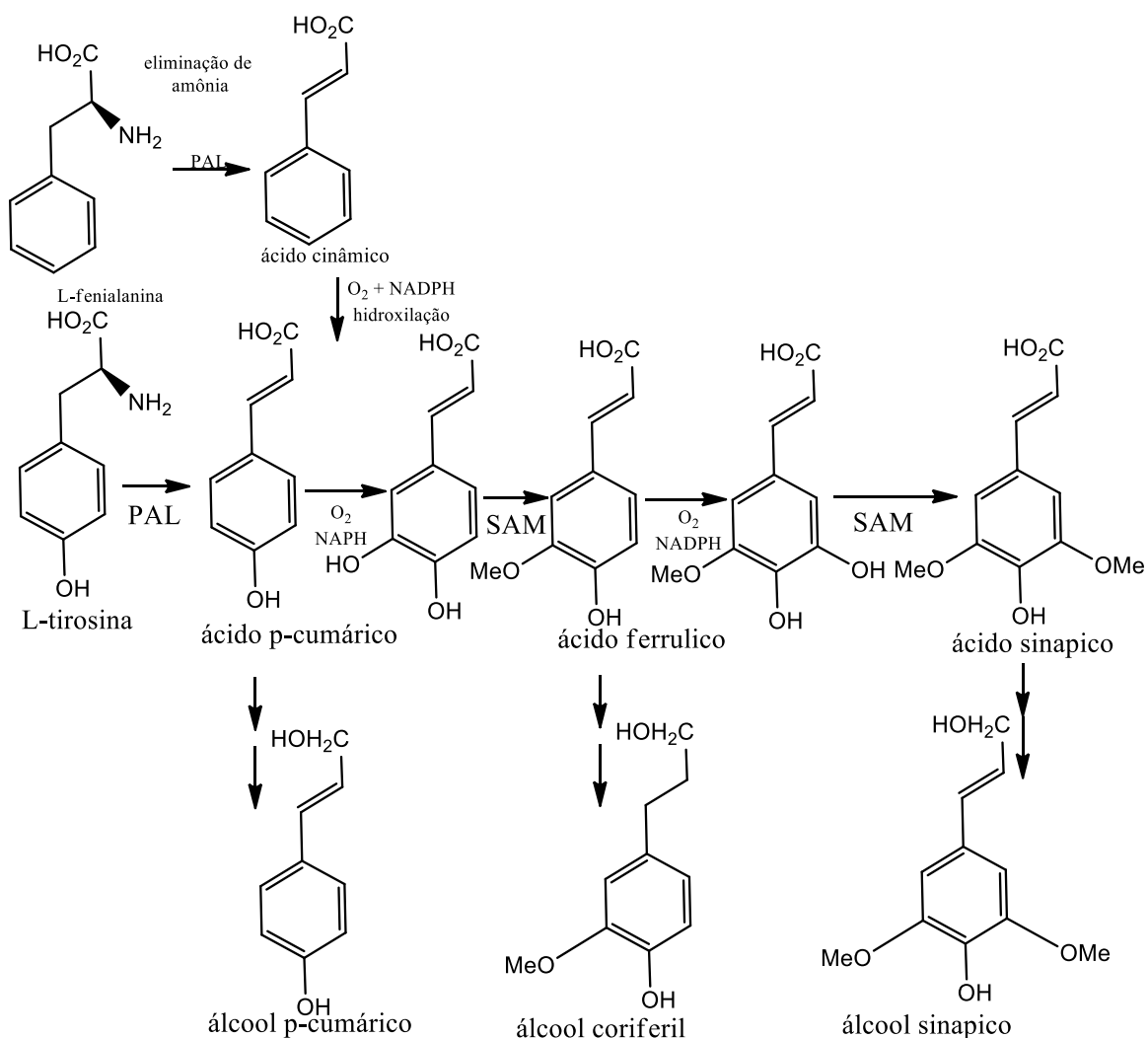


Esquema 13: Rota biossintética para flavonoides e estilbenos (DEWICK, 1998).

- **Biossíntese de Ácidos Cinâmicos**

A L-fenilalanina e a L-tirosina, constroem blocos C₆C₃, são precursores dos ácidos cinâmicos. O primeiro passo é a eliminação de amoníaco a partir da cadeia lateral para produzir o ácido (E) trans cinâmico. A fenilalanina, no caso, produziria o ácido p-cumárico. A desaminação ocorre através da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), a transformação correspondente a tirosina é mais restrita, sendo limitada principalmente aos membros da família das gramíneas (Graminae / Poaceae). Essa família pode apresentar uma enzima específica para a tirosina (TAL) ou a (PAL) apresenta maior campo de atuação (DEWICK, 2002).

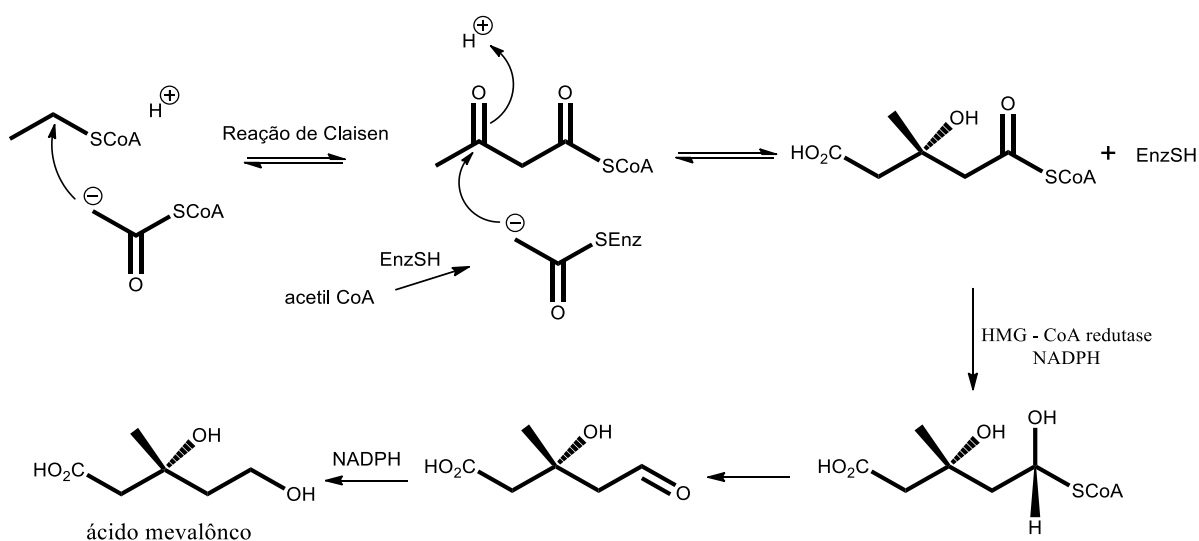
Outros ácidos cinâmicos são obtidos por reação de hidroxilação ou metilação, com construção de padrões de substituição típicas de metabólitos da via do chiquimato, ou seja, padrão orto de oxigenação.



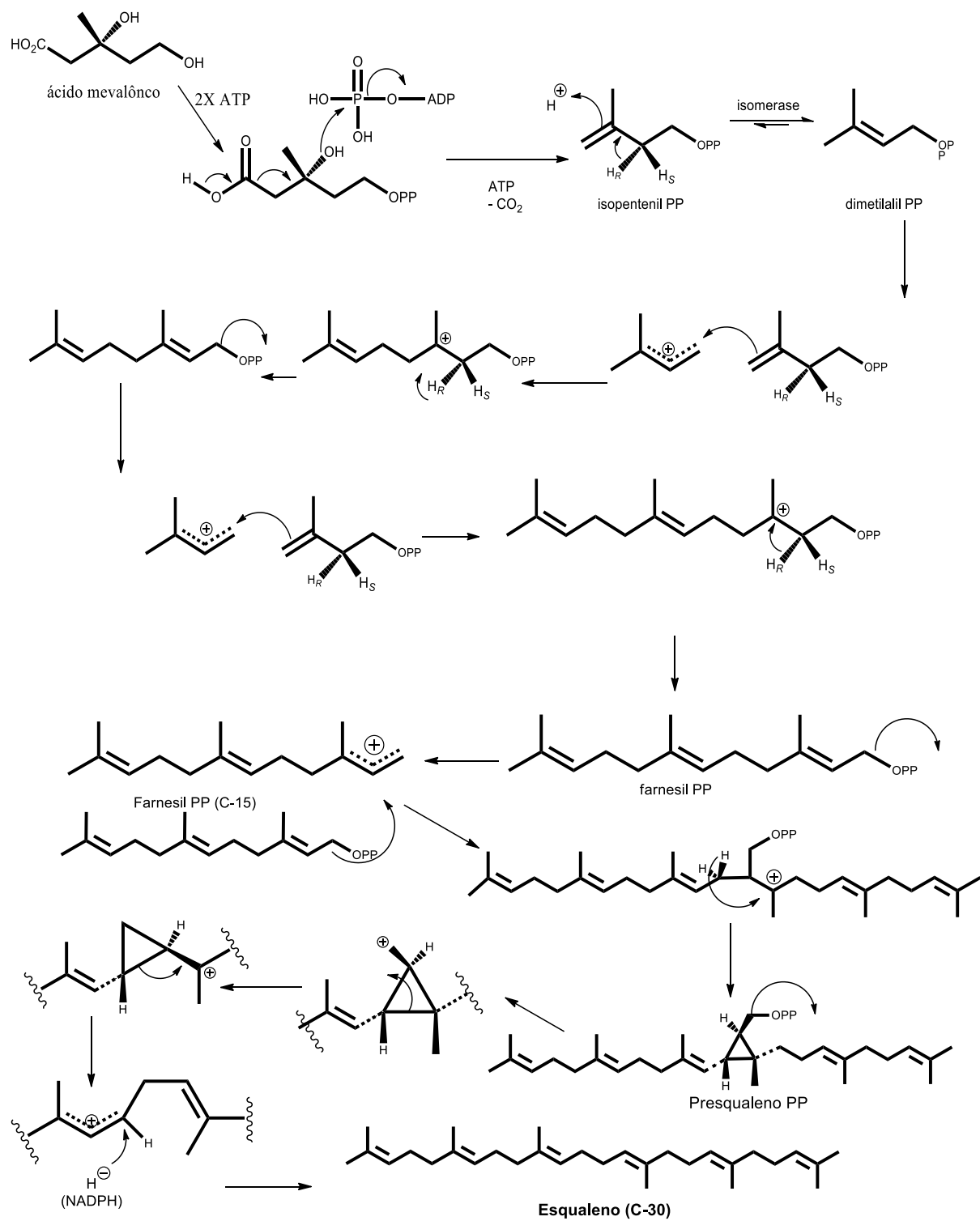
Esquema 14: Rota biossintética para ácidos cinâmicos (DEWICK, 1998).

- **Biossíntese de triterpenos do tipo saponinas**

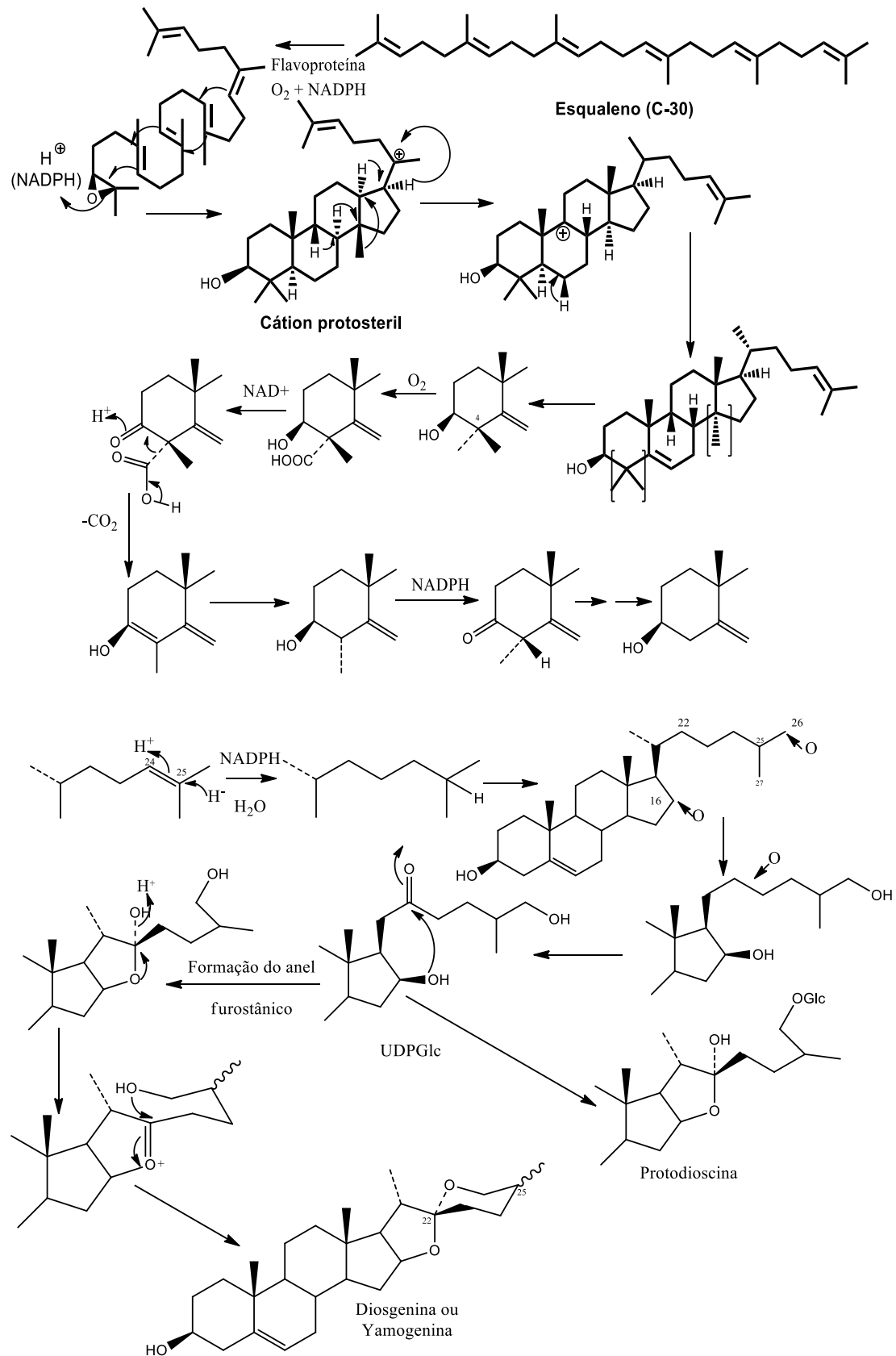
A biossíntese das saponinas ocorre pela via do mevalonato, tendo como precursor o esqualeno que é formado por um acoplamento cauda-cauda de duas unidades de farnesil pirofosfato (C-15). O acoplamento (**esquema 15**) ocorre através de uma adição eletrofílica, produzindo um carbocátion terciário que é estabilizado pela perda de um próton do carbono 1 estabilizando a carga e formando um ciclopropano (pré-esqualeno). A saída do grupo pirofosfato gera um carbocátion primário, muito instável, que é estabilizado pela troca 1,3 do grupo alquil formando um carbocátion terciário mais estável. O rompimento da ligação entre o carbono 1 e 2 produz um alceno e um cátion alílico bem estável. A reação termina com um ataque de um hidreto (proveniente do NADPH) ao carbono 1 formando assim o esqualeno (DEWICK, 2002). A oxidação do esqualeno em presença de flavoproteína (via $O_2 + NADPH$) gera o óxido esqualeno que sofre diversas ciclizações sucessivas, produzindo o cátion protosteril. Um rearranjo de metila e também de hidrogênios levam a formação do cátion terciário, que por rearranjo de hidrogênio a carga positiva se posiciona no carbono 9, mais um rearranjo de hidrogênio e temos a formação da dupla ligação no carbono 5 e a molécula é estabilizada. Há em seguida as eliminações das metilas ligadas ao carbono 4 pela ação de $O_2 + NAD^+$ seguida de eliminações de CO_2 . A função espirocetálica é derivado do colesterol cadeia lateral por uma série de reações de oxigenação, hidroxilação de C-16 e um das metilas terminais, e, em seguida, produzindo uma função cetona em C-22. Esta proposta é transformado no intermediário hemicetal e, em seguida, o espirocetal. A quiralidade na posição C-22 é fixado pela estereo especificidade na formação do cetal enquanto as estereoquímicas possíveis diferentes em C-25 são ditados pelo fato de C-26 ou C-27 serem hidroxiladas na etapa anterior (DEWICK, 2002).



(Continuação)



(Continuação)



Esquema 15: Rota biossintética para triterpenos do tipo saponinas , diosgenina , yamogenina e protodioscina (DEWICK, 1998).