UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Métodos de Obtenção de Lignanas de *Holostylis reniformis* Provenientes de Duas Regiões Brasileiras

Gislaine Felippe Martins

Prof[a]. Dr[a]. Lucia Maria Xavier Lopes
Orientadora

Araraquara
2012

Gislaine Felippe Martins

Métodos de Obtenção de Lignanas de *Holostylis reniformis* Provenientes de Duas Regiões Brasileiras

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Prof[a]. Dr[a]. Lucia Maria Xavier Lopes

Orientadora

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

M386m

Martins, Gislaine Felippe
Métodos de obtenção de lignanas de H*olostylis reniformis* provenientes de duas regiões brasileiras / Gislaine Felippe Martins. – Araraquara : [s.n], 2012
82 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Lucia Maria Xavier Lopes

1. Produtos naturais. 2. Aristolochiaceae. 3. Lignanas Ariltetralônicas. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

GISLAINE FELIPPE MARTINS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 28 de maio de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Lucia Maria Xavier Lopes (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira Rosa
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

Prof. Dr. Eduardo René Perez Gonzáles
Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNESP, Presidente Prudente

Dados Curriculares

Gislaine Felippe Martins

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 18/09/1984
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: Presidente Prudente - SP
Profissão: Química
Endereço Profissional: Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara - Unesp, C. P. 355, CEP 14801-970, Araraquara - SP.
Endereço eletrônico: gigifemar@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Licenciatura em Química
Instituição: Universidade Estadual Paulista Campus de Presidente Prudente (FCT/Unesp)
Bolsista CNPq (2005 a 2007) e FAPESP (2007 a 2008)
Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica
Instituição: Universidade Estadual Paulista – Unesp
Instituto de Química de Araraquara
Dissertação: Métodos de Obtenção de Lignanas de *Holostylis reniformis* Provenientes de duas Regiões Brasileiras
Orientadora: Profª. Drª. Lucia Maria Xavier Lopes
Bolsa: Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq
Período: março/2010 a fevereiro/2012

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

Artigos completos publicados em periódicos

1. Martins, G. F., Pereira, A. A., Straccalano, B., Antunes, P. A., Pasquini, D., Curvelo, A.A.S., Ferreira M., Riul Jr, A., Constantino, C. J. L.; Ultrathin Films of Lignins as a Potential Transducer in Sensing Applications Involving Heavy Metal Ions. Sensors and Actuators. B, Chemical. , v.B 129, p.525 - 530, 2008.
2. Pereira, A. A., Martins, G. F., Antunes, P. A., Conrrado, R., Pasquini, D., Job, A. E., Curvelo, A.A.S., Ferreira M., Riul Jr, A., Constantino, C. J. L.; Lignin from sugar cane bagasse: Extraction, fabrication of nanostructured films, and application. Langmuir. , v.23, p.6652 - 6659, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Martins, G. F., Pereira, A. A., Riul Jr, A., Constantino, C. J. L., Antunes, P. A.; Estudo da Interação Lignina/Metais Pesados via FTIR e Espectroscopia de Impedância. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2005, Presidente Prudente, XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2005.
2. Pereira, A. A., Antunes, P. A., Martins, G. F., Conrrado, R., Riul Jr, A., Constantino, C. J. L.; Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of Lignins Extracted from Sugar Cane Bagasse: Characterization at Molecular Level and

Sensor Application; IV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (IV SBPMat), 2005, Recife.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Moris, C. H. A. A.; Martins, G. F.; Lopes, L. M. X.; Nascimento, I. R.; Extratos Vegetais para Estudos Fitoquímicos; CIC IQ/Unesp Pibit/Ensino Médio, Araraquara – SP, 2011.
2. Martins, G. F.; Silva, T.; Barbosa, F. P.; Rosa, P. T. V.; Lopes, L. M. X.; Supercritical Fluid and Maceration of Aryltetralone Lignans of Holostylis reniformis from two Different Brazilian Regions; 3rd Brazilian Conference on Natural Products, Ouro Preto – MG, 2011.
3. Martins, G. F., Constantino, C. J. L.; Detecção de Íons Metálicos em Água via Sensores Utilizando Filmes Ultrafinos de Ligninas Extraídas de Cana de Açúcar; XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente.
4. Martins, G. F., Constantino, C. J. L.; Estudo Via Filmes Ultrafinos de Ligninas Extraídas do Bagaço de Cana-de-Açúcar; XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru - SP.
5. Martins, G. F., Constantino, C. J. L., Ferreira M., Riul Jr, A., Pereira, A. A., Antunes, P. A.; Filmes Ultrafinos de Ligninas Extraídas do Bagaço de Cana de Açúcar aplicados em Sensores de Metais Pesados; ENAPI, 2006, Presidente Prudente - SP.
6. Martins, G. F., Pereira, A. A., Straccalano, B., Antunes, P. A., Curvelo, A.A.S., Pasquini, D., Riul Jr, A., Constantino, C. J. L.; Langmuir Films of Lignins Extracted from Sugar Cane Bagasse Through Organosolv-CO_2 Supercritical Pulping Process; V Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (V SBPMat)/5th Brazil-MRS Meeting, 2006, Florianópolis-SC.

Apresentação de Trabalho

1. Martins, G. F., Pereira, A. A., Antunes, P. A., Riul Jr, A., Ferreira M., Constantino, C. J. L.; Detecção de Metais Pesados via Sensores Utilizando Filmes LB de Ligninas Extraídas do Bagaço da Cana-de-Açúcar., 2007. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) VIII Simpósio de Iniciação Científica (SIC); Instituição promotora/financiadora: Faculdade de Ciências, Letras e Educação de Pres. Prudente (FACLEPP)
2. Constantino, C. J. L., Pandur, F. A., Bergamo, B. B., Dantas, C. A., Silva, B. A., Martins, G. F., Garcia, M. P., W.M.D.M.F. Steluti, Ferreira M., Antunes, P. A., Giacometti, J. A., Pasquini, D., R.F. Aroca, Riul Jr, A., Curvelo, A.A.S.; Nanostructured Films in Technological Applications Involving Sensing Devices, 2007. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) São Carlos -SP; 2nd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures (ISAMN)

Primeiramente a Deus, aos meus pais
Bernardino e Iolanda, às minhas irmãs,
e ao meu hoje marido Diogo pelo
amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e força nos momentos mais difíceis.

À Profª. Drª. Lucia M. X. Lopes, pela orientação, apoio, profissionalismo e paciência que teve comigo durante a realização deste trabalho.

À Profª. Drª. Isabele R. Nascimento, por sempre estar disposta a me ajudar, aconselhar e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Tito da Silva pelo envio do material vegetal oriundo de Imperatriz – MA.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade e pelos momentos de descontração no café e também pela realização dos espectros de RMN de ^{1}H.

Ao Dr. Alberto C. Alécio, pelos momentos de descontração e pela obtenção dos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa e a doutoranda Fernanda Barbosa pelo auxílio e obtenção dos extratos empregando fluídos supercríticos.

À Gisele e ao Alexandre pela obtenção dos espectros de CG-EM.

Aos meus pais, que estiveram presentes em todos os momentos e que me incentivaram e contribuíram para a realização desta etapa em minha vida.

Ao meu marido Diogo, por sempre estar ao meu lado até quando eu não estava, pelo apoio incondicional, paciência e carinho.

Às minhas irmãs, pelas conversas, risadas, por serem minhas melhores amigas, e principalmente por serem verdadeiras nas horas em que eu mais precisei.

Aos colegas do IQ, em especial para Cláudio, Ivan, Andresa, Priscila, Carlos Henrique, Luís Henrique, Nathalie, Camila e Matheus.

Ao Doni pela amizade e paciência, as quais quero levar por toda a vida.

A todas as pessoas que contribuíram de forma positiva para a construção deste trabalho.

E às agências de fomento CNPq, pela bolsa, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.”

(Chico Xavier)

Resumo

Holostylis reniformis Duch. (Aristolochiaceae) tem sido utilizada na medicina tradicional brasileira como anti-reumático, digestivo e depurativo. Estudos prévios dos extratos desta espécie demonstram que estes apresentam atividades antimaláricas. Lignanas ariltetralônicas e furânicas são os principais constituíntes químicos dos extratos mais ativos, desde então pesquisas têm se concentrado em sua caracterização química, biossíntese e transformações microbianas. Este trabalho descreve um estudo comparativo entre dois métodos para a obtenção de extratos ricos em lignanas ariltetralônicas de *H. reniformis* coletadas em duas regiões brasileiras diferentes. Raízes, folhas e caules da planta foram coletados em Imperatriz (MA) e Ituiutaba (MG), depois de secos e moídos, os extratos foram preparados por extração com fluído supercrítico (SFE-CO_2) e pelo método clássico de maceração (extração com hexano, acetona e etanol, sucessivamente). Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas das lignanas ariltetralônicas presentes nos extratos por meio das técnicas de RMN de ^{1}H, CLAE-EM-IES, CLAE-DAD, e CG-EM. Para otimizar as condições experimentais (EM-EM, CG, e os parâmetros de CL) e para as quantificações, foram utilizados (–)-8'-*epi*-aristoligona (T-15) e (–)-aristotetralona (T-11) como padrões de referência. Como resultado dessas análises, pôde-se inferir que a quantidade de lignanas ariltetralônicas nos extratos de folhas e caules não é significativa. No entanto, o extrato hexânico e os extratos obtidos por fluído supercrítico de raízes têm composição química semelhante e possuem a maior concentração desta classe de substâncias, sendo a (–)-8'-*epi*-aristoligona (T-15) o constituinte majoritário destes extratos. Além disso, uma avaliação comparativa dos perfis químicos dos extratos de *H. reniformis*, obtidos por maceração e por fluido supercrítico, evidenciou que, embora extrações com SFE-CO_2 resultaram em menor rendimento de lignanas (19,8%) em comparação com extrações por maceração (23,5%) nos extratos de Ituiutaba (MG), a SFE-CO_2 é um procedimento mais rápido e mais “limpo” do que a extração por maceração para a recuperação de lignanas.

Palavras-chave: Lignanas Ariltetralônicas. Arislolochiaceae. *H. reniformis*.

Abstract

Holostylis reniformis Duch. (Aristolochiaceae) has been used in traditional Brazilian medicine as an antirheumatic, stomachic, and depurative. Previous studies on extracts from this species have shown that they have exhibited antimalarial activities. Since aryltetralone and furan lignans are the main chemical constituents of the most active extracts, research has been concentrated on their chemical characterization, biosyntheses, and microbial transformations. This work describes a comparative study on two methods for obtaining extracts rich in aryltetralone lignans from *H. reniformis* collected in two different Brazilian regions. Extracts of dried roots, leaves, and stems from plants collected in Imperatriz (MA) and Ituiutaba (MG) were prepared by supercritical fluid extractions (SFE-CO_2) and by a classical method using macerations (extraction with hexane, acetone, and ethanol, successively). Qualitative and quantitative analyses of aryltetralone lignans in the extracts were performed by using ^{1}H NMR, LC-ESI-MS, LC-PDA, and GC-MS techniques. To optimize the experimental conditions (MS-MS, GC, and LC parameters) and quantifications, (–)-8'-*epi*-aristoligone (T-15) and (–)-aristotetralone (T-11) were used as reference standards. As results of these analyses, it can be inferred that the amount of aryltetralone lignans in extracts of the leaves and stems is not significant. However, the hexane and the supercritical extracts of roots have similar chemical composition and contain the highest concentration of this class of compounds, being (–)-8'-*epi*-aristoligone (T-15) the major constituent of these extracts. In addition, a comparative evaluation of the chemical profiles of *H. reniformis* extracts, obtained by maceration and supercritical fluid extraction, evidenced that, although SFE-CO_2 extractions resulted in lower yield of lignans (19.8%) compared to maceration extractions (23.5%) in those extracts from Ituiutaba (MG), SFE-CO_2 is a faster and "cleaner" procedure than maceration extraction for the recovery of lignans.

Keywords: Aryltetralone Lignans. Aristolochiaceae. *H. reniformis*.

Lista de Figuras

Figura 1. Fotos de diferentes partes de *Holostylis reniformis*.....**17**
Figura 2. Estrutura química das lignanas ariltetralônicas isoladas de *H. reniformis* que foram enviadas para testes de atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum*. Sendo T9: (+)-8,8'-*epi*-aristoligona; T11: (–)-aristotetralona; T12: (–)-aristoligona; T14: (–)-4'-*O*-Metilenshicina; e T15: (–)-8'-*epi*-aristoligona.....**18**
Figura 3. Espectros de RMN de ^{1}H dos extratos de raízes: (a) hexânico – MG; (b) hexânico – MA; (c) fluído supercrítico – MG; e (d) fluído supercrítico – MA (11,7 T; $CDCl_3$).....**26**
Figura 4. Espectros de RMN de ^{1}H dos extratos acetônicos de raízes provenientes de: (a) MG; e (b) MA (11,7 T; $CDCl_3$).....**27**
Figura 5. Espectros de RMN de ^{1}H dos extratos de caules e de caules + raízes: (a) hexânico – MG; (b) hexânico – MA; (c) fluído supercrítico – MG; e (d) fluído supercrítico – MA (11,7 T; $CDCl_3$).....**28**
Figura 6. Espectro de RMN de ^{1}H da substância pura (7'*R*,8*S*,8'*S*)-8,8'-dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7',-ciclolignan-7-ona, nomeada (–)-8'-*epi*-aristoligona, T15, (11,7 T; $CDCl_3$).....**30**
Figura 7. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG.....**31**
Figura 8. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba - MG.....**31**
Figura 9. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de folhas de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG.....**32**
Figura 10. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA.....**32**
Figura 11. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA.....**33**
Figura 12. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de folhas de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA.....**33**
Figura 13. Cromatograma do padrão isolado e purificado em nosso laboratório, identificada como (–)-8'-*epi*-aristoligona (T15) concentração de 1 mg/mL.....**34**
Figura 14. (a) Cromatograma; e (b) espectro de massas do padrão isolado e purificado, a lignana ariltetralônica T15, na concentração de 1 mg/mL.....**35**
Figura 15. Cromatogramas dos extratos obtidos pelos métodos de maceração e por fluído supercrítico de (a) raízes e (b) caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA.....**36**
Figura 16. Curva analítica da substância padrão T15 obtida com as seguintes concentrações: 0,005; 0,1; 0,2; 0,3; 0,45; 0,6 e 0,8 mg/mL.....**37**

Figura 17. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Ituiutaba - MG.....**41**
Figura 18. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba - MG.....**42**
Figura 19. . Cromatograma do padrão isolado em nosso laboratório, identificada como sendo a (–)-aristotetralona (T11), concentração de 1 mg/mL.....**43**
Figura 20 Espectro de RMN de ^{1}H da substância padrão denominada (–)-aristotetralona, T11 (11,7 T; $CDCl_3$).....**44**
Figura 21. (a) Cromatograma; e (b) espectro de massas do padrão isolado, a lignana ariltetralônica T11, concentração de 1 mg/mL.....**45**
Figura 22. Curva analítica da substância padrão T11 obtida com as seguintes concentrações: 0,044; 0,078; 0,098; 0,132; e 0,176 mg/mL.....**47**
Figura 23. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, obtidos por maceração; e (c) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Ituiutaba - MG.....**51**
Figura 24. Cromatogramas e espectro de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, obtidos por maceração; e (c) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba - MG.....**52**
Figura 25. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, obtidos por maceração; e (c) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Imperatriz - MA.....**53**
Figura 26. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, obtido por maceração; e (b) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA.....**54**
Figura 27. Espectros de CG-EM e respectivas fragmentações típicos de lignanas: (a) ariltetralônica com grupos piperonila e veratrila – Pi Ve; (b) ariltetralônica com quatro grupos metoxílicos – 4 OMe; e (c) furânica com grupos piperonila e veratrila – Pi Ve.....**58**

Lista de Esquemas e Tabelas

Esquema 1. Preparação dos extratos de *H. reniformis* por maceração.....**21**

Esquema 2. Adaptação do esquema referente ao sistema de extração supercrítica.....**22**

Tabela1. Dados dos extratos obtidos por maceração de *H. reniformis* de Ituiutaba - MG.....**23**

Tabela 2. Dados dos extratos obtidos por maceração de *H. reniformis* de Imperatriz - MA.....**23**

Tabela 3. Dados dos extratos obtidos por fluído supercrítico de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA.....**23**

Tabela 4. Dados referentes a curva analítica da substância padrão T15.....**37**

Tabela 5. Concentração da substância T15 presente nos extratos de raízes e caules obtidos a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta.....**39**

Tabela 6. Cálculo da massa da substância padrão, T15, contida nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG.....**40**

Tabela 7. Dados referentes a curva analítica da substância padrão T11.....**47**

Tabela 8. Concentração da substância T11 presente nos extratos de raízes e caules oriundos de Ituiutaba – MG.....**48**

Tabela 9. Concentração da substância T11 presente nos extratos de raízes e de caules + raízes oriundos de Imperatriz – MA.....**49**

Tabela 10. Cálculo da massa da substância padrão, T11, contida nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG.....**50**

Tabela 11. Cálculo da massa da substância padrão, T11, contida nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz - MA.....**50**

Tabela 12. Constituintes químicos presente nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes provenientes de MG e MA.....**56**

Tabela 13. Constituintes químicos presentes nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de caules e de caules + raízes provenientes de MG e MA.....**57**

Índice Geral

1.Introdução.....15
1.1 A Família Aristolochiaceae.....15
1.2 A espécie Holostylis reniformis Duch.....16
1.3 Extração por Fluído Supercrítico.....18
1.4 Análise Quantitativa.....19
2. Objetivos.....19
2.1 Objetivos específicos.....19
3. Procedimentos experimentais.....20
3.1 Coleta do material vegetal.....20
3.2 Preparação dos extratos.....20
3.2.1 Extração por maceração.....20
3.2.2 Extração por fluído supercrítico.....21
3.2.3 Massa dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico.....23
3.3 Obtenção dos espectros de RMN de ^{1}H.....23
3.4 Análises cromatográficas.....24
4. Resultados e discussão.....25
4.1 Análise dos espectros de RMN de ^{1}H dos extratos.....25
4.2 Cromatogramas dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de MG e MA.....31
4.3 Análise quantitativa dos extratos.....34
4.3.1 Substância padrão T15.....34
4.3.1.1 Análise por CLAE-EM dos extratos quantificados com T15.....40
4.3.2 Substância padrão T11.....43
4.3.2.1 Análise por CLAE-EM dos extratos quantificados com T11.....51
4.4 Análise dos extratos quantificados por CG-EM.....54
5. Considerações finais.....59
Referências.....61
Anexos.....64

1. Introdução

1.1 A Família Aristolochiaceae

O grande interesse pelo estudo fitoquímico da família Aristolochiaceae decorre da grande variedade de constituintes químicos presentes nas espécies, e das diversas atividades biológicas atribuídas a estas, bem como sua utilização na medicina tradicional e homeopática [1-5].

Segundo Huber, Aristolochiaceae é constituída por duas subfamílias, duas tribos, duas subtribos e doze gêneros. Nesta classificação os gêneros *Aristolochia*, *Euglypha* e *Holostylis* são considerados semelhantes e foram agrupados na mesma subtribo [6]. No decorrer de mais de um século, a classificação de Aristolochiaceae ainda gera controvérsia entre os taxonomistas, devido à complexidade do perianto irregular apresentado por suas espécies [2, 7-9]. Em 1999, González [9] propôs uma classificação alternativa para esta família baseada na análise dos caracteres morfológicos: folha, inflorescência, frutos, semente, órgãos de reprodução e pólen. Segundo González, a família Aristolochiaceae é constituída por 544 espécies divididas em duas tribos, quatro gêneros e três subgêneros, distribuídos predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do globo [7, 10]. Os gêneros monotípicos *Holostylis* e *Euglypha* foram extintos e suas espécies foram incluídas no gênero *Aristolochia* como *Aristolochia reniformis* e *A. rosajiana*, respectivamente, pois apresentam forte relação morfológica e filogenética com as demais espécies do gênero *Aristolochia* [2,8].

A família Aristolochiaceae possui uma composição química de metabólitos secundários diversificados (ácidos graxos, terpenoides, lignóides, flavonoides e alcaloides) [11]. O trabalho de revisão bibliográfica realizado pelo nosso grupo de pesquisa compreendendo as décadas de 80 e 90 (1980-2000) mostra que até então foram isoladas nesta família cerca de 670 substâncias de 192 espécies, e atualmente, pode-se estimar mais de 700 substâncias isoladas, dentre as quais se destacam os ácidos aristolóquicos esterificados por diterpenos, as cubebinas e tetraflavonóides por seus esqueletos carbônicos inéditos[11].

Dentre as substâncias isoladas de espécies de *Aristolochia* que possuem atividades biológicas comprovadas, destacam-se os ácidos

aristolóquicos presentes em 60 espécies [11]. Estes ácidos aristolóquicos apresentam atividade esterilizante e antifágica em insetos, alguns exibem ação contraceptiva, de indução do estimulo gástrico, de redução do edema induzido por veneno de cobra, anti-inflamatória, antialérgica entre outras [12]. Este tipo de compostos nitrofenantrênicos apresentam ocorrência restrita na natureza em espécies pertencentes aos gêneros, *Aristolochia* e *Asarum*, e insetos que se alimentam destas plantas [7].

É interessante destacar que, até o momento ainda não foram isolados ácidos aristolóquicos de *H. reniformis*, o que comprovaria a proposta de inclusão desta espécie ao gênero *Aristolochia*, conforme a classificação de González [7].

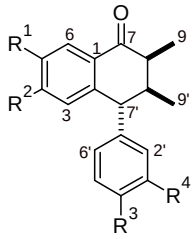
1.2 A espécie Holostylis reniformis Duch.

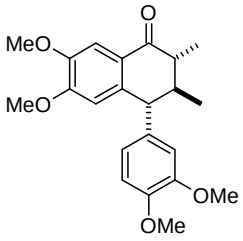
A espécie *H. reniformis*, é popularmente conhecida por “flor de sapo“ e “capeba do Maranhão” [7, 9]. Suas características botânicas revelam tratar-se de um subarbusto perene, cespitoso e vivaz de rizoma horizontal ramosíssimo e numeroso, raízes simples; caules eretos ligeiramente prostrados ou trepadores, sendo os estéreis mais curtos que os floríferos, e tendo folhas maiores e alternas, pecioladas, reniformis de 15 a 25 cm de comprimento e 18-30 cm de largura; flores zigomorfas, de perianto campanulado, castanho; fruto em forma de cápsula ovóide, rugosa e deiscente; sementes obcordadas, planas e lisas na parte inferior e côncava na superior (Figura 1, p. 17) [2, 7, 13]. *Holostylis reniformis* é uma espécie endêmica da região central da América do Sul, encontrada em terrenos humosos, sombrios e levemente úmidos das bordas das matas ou barrancas dos rios da Argentina, Bolívia, Brasil (Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Tocantins) e Paraguai [2].

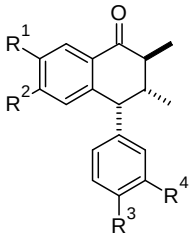
Suas raízes e rizomas são utilizados como antirreumático, estomáquico, sudorífero e depurativo [7]. Apesar dos efeitos benéficos de suas raízes e rizomas, suas folhas desprendem um forte odor e por isso são evitadas pelos animais que as reconhecem no campo ou pasto [2].

Figura 1. Fotos de diferentes partes de *Holostylis reniformis*.

O estudo fitoquímico previamente realizado com *H. reniformis* demonstrou que esta espécie apresenta variadas classes de substâncias, sendo relatado o isolamento de 41 substâncias das quais 67% eram de lignanas. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com a FIOCRUZ/MG evidenciaram que extratos apolares, hexânico e acetônico desta espécie reduzem os níveis de parasitemia em teste *in vivo* (empregando-se *Plasmodium berghei*). Além disto, lignanas isoladas destes extratos apresentaram potencial atividade antiplasmódica (empregando-se *Plasmodium falciparum*) em teste *in vitro* [2, 8] (Figura 2, p. 18).







	R^1	R^2	R^3	R^4
T 14	OCH_2O		OMe	OMe
T 15	OMe	OMe	OMe	OMe

	R^1	R^2	R^3	R^4
T 9				

	R^1	R^2	R^3	R^4
T12	OMe	OMe	OMe	OMe
T11	OMe	OMe	OCH_2O	

Figura 2. Estrutura química das lignanas ariltetralônicas isoladas de *H. reniformis* que foram enviadas para testes de atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum*. Sendo T9: (+)-8,8'-*epi*-aristoligona; T11: (–)-aristotetralona; T12: (–)-aristoligona; T14: (–)-4'-*O*-Metilenshicina; e T15: (–)-8'-*epi*-aristoligona.

1.3 Extração por Fluído Supercrítico

Segundo Justo *et. al.* [14], "as questões relacionadas ao desenvolvimento econômico e industrial pelo uso de técnicas que evitem ou minimizem os danos ao meio ambiente têm sido bastante discutidas nos últimos anos. Processos que empregam gases a altas pressões (sendo o dióxido de carbono o exemplo mais importante) como solvente de extração ou fluídos pressurizados (como a água, utilizada em reações de hidrólise) são genericamente denominados de tecnologia supercrítica, e classificados como processos tecnológicos mais limpos" [14].

A utilização de uma metodologia de extração empregando-se fluídos supercríticos se torna cada vez mais atrativa com relação às metodologias tradicionais devido as altas solubilidades, taxas de transferência de massa e seletividade, apresentadas. Porém, a seletividade do processo de extração depende principalmente da densidade do solvente supercrítico, a qual pode ser alterada pela variação das condições do processo. Além do mais, o baixo calor latente de evaporação no processo e a alta volatilidade dos solventes permitem obter extratos ativos isentos de resíduos tóxicos e com uma qualidade final elevada quando comparados aos produtos obtidos por técnicas convencionais. Além disto, a extração realizada a baixas temperaturas preserva os produtos termicamente degradáveis [14, 15].

Trabalhos recentes demonstraram que a extração com fluídos supercríticos de matrizes vegetais é mais seletiva do que as técnicas usuais de

extração, principalmente quando o objetivo é extrair compostos de baixa polaridade. Entretanto, co-solventes podem ser adicionados em quantidades baixas, tais como água e etanol, para alterar a polaridade do dióxido de carbono [16, 17].

1.4 Análise Quantitativa

Técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) vêm se destacando na química analítica por propiciarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos [18]. No presente estudo aplicaremos técnicas cromatográficas às matrizes vegetais.

A aplicabilidade de uma análise quantitativa compreende a identificação dos analitos de interesse, livres de compostos interferentes, e propicia a determinação da concentração destes, presentes em uma amostra. Para isto, esta análise pode ser baseada em estabelecer o valor da área da banda cromatográfica registrada como um pico, que idealmente deve ter um formato gaussiano, com resposta linear na faixa do detector empregado e tendo pleno conhecimento das limitações do método adotado [19].

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral conhecer a constituição química dos extratos de raízes, caules e folhas de *H. reniformis* preparados por diferentes metodologias de extração visando a determinação dos melhores métodos para a obtenção de lignanas ariltetralônicas, coletadas em duas regiões geográficas distintas.

2.1 Objetivos específicos

- Otimizar metodologias de extração por maceração e desenvolver metodologia empregando fluídos supercríticos para obtenção de lignanas;

- Identificar e quantificar o maior número de compostos, em especial lignanas, empregando-se técnicas como CLAE-UV, CLAE-EM, e CG-EM, sem o isolamento dos constituintes químicos dos extratos;
- Comparar a composição química das diferentes partes das plantas;
- Comparar a composição química de plantas provenientes de regiões geograficamente distintas.

3. Procedimentos experimentais

3.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi coletado em: Ituiutaba - MG (Fev/2008) por membros do nosso grupo de pesquisa, e em Imperatriz - MA (Fev/2010) pelo Prof. Dr. Tito da Silva. A espécie foi identificada como sendo *H. reniformis* pelo Dr. Lindolpho Capellari Júnior da Escola Superior de Agricultura de Queiroz (ESALQ) de Piracicaba - SP, tendo como números de exsicatas ESA 88282/2008 e ESA 110744/2010, respectivamente.

3.2 Preparação dos extratos

Diferentes partes do material vegetal coletado (raízes, caules, caules + raízes, e folhas) foram secas ao ar, e em seguida, em estufa a 40^{o}C. Posteriormente, foram trituradas por processo mecânico obtendo-se as massas vegetais, que foram extraídas por dois métodos: maceração com solventes de polaridade crescente, e por fluído supercrítico.

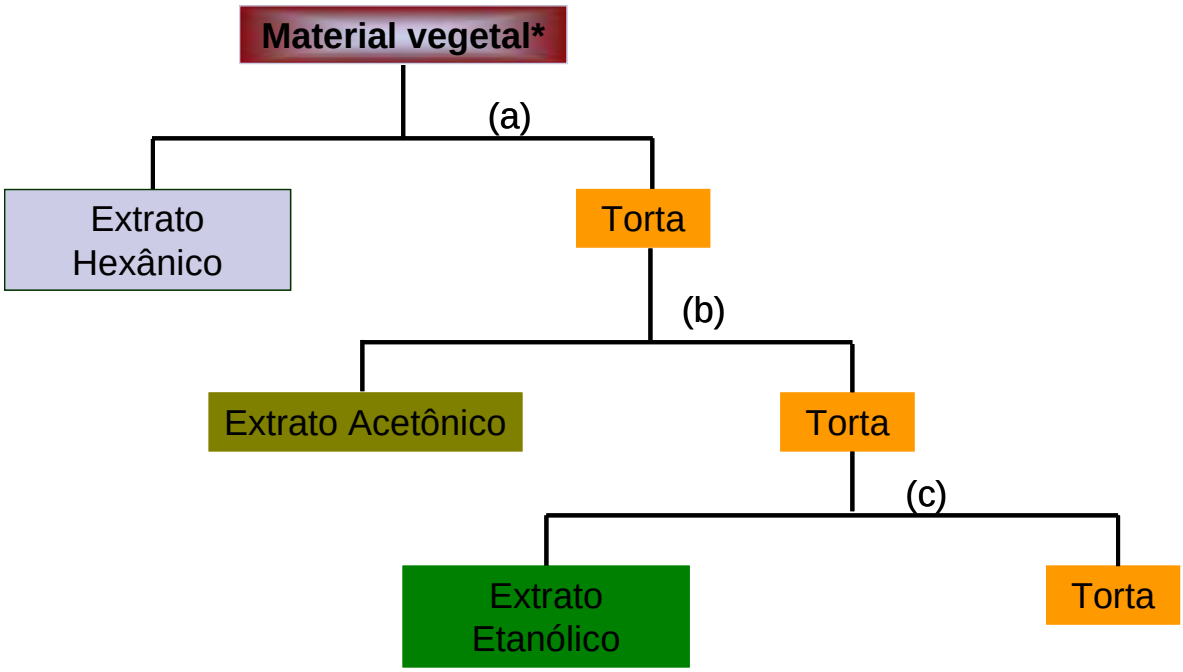
3.2.1 Extração por maceração

Os extratos de *H. reniformis* foram preparados a partir das diferentes partes estruturais da planta (raízes, caules, caules + raízes e folhas), secas e moídas. Uma das técnicas utilizadas para extração foi a de maceração, utilizando como parâmetro a extração dos compostos pela diferença de polaridade dos solventes, em ordem crescente de polaridade (hexano, acetona e etanol).

O volume aproximado de solventes utilizados para cada extração foi três vezes o volume do material vegetal ocupado no recipiente. Os recipientes com

as respectivas soluções de extratos foram agitados diariamente durante 1 minuto e a solução extratora separada a cada 48 horas.

As respectivas soluções foram filtradas com o auxílio de gase e papel de filtro, sucessivamente, concentradas à pressão reduzida em um rota evaporador da marca Büchi modelo 461 (Pressão 200 bar) e secas à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases, para a eliminação dos solventes, esse procedimento foi adotado por três vezes para cada solvente resultando, respectivamente, nos extratos hexânicos, acetônicos e etanólicos, como representado no Esquema 1 (p. 21).



* Raizes, caules + raízes, caules e folhas.

(a) Três extrações simples com hexano;

(b) Três extrações simples com acetona; e

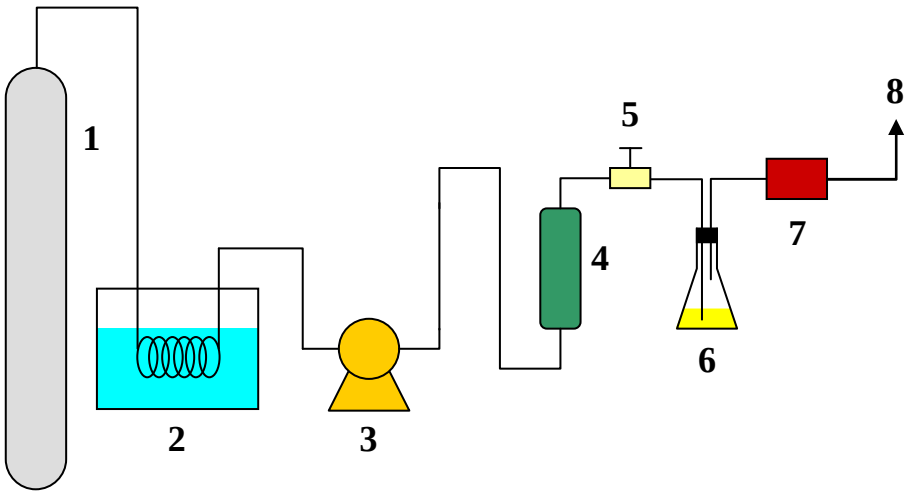
(c) Três extrações simples com etanol.

Esquema 1. Preparação dos extratos por maceração de *H. reniformis*.

3.2.2 Extração por fluído supercrítico

Para os extratos obtidos por fluído supercrítico de *H. reniformis* foi utilizado um equipamento de extração supercrítica montado no Laboratório de Tecnologias Supercríticas do Instituto de Química da UNICAMP em colaboração com o Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa.

O Esquema 2 (p. 22) apresenta uma ilustração do aparato experimental. O CO_2 presente no cilindro (1) é resfriado em um banho termostático (2) para garantir que o fluido esteja líquido na bomba (3). O fluido pressurizado flui para a coluna de extração (4) na qual está presente o material vegetal. Passando pela coluna de extração, a pressão é reduzida em uma válvula micrométrica (5), resultando na obtenção do extrato que é coletado em um frasco (6). O CO_2 gasoso escoa pelo medidor de vazão de CO_2 (7) para medição da vazão volumétrica e então é descartado para o ambiente via uma capela de exaustão. Neste experimento, empregou-se materiais vegetais secos e moídos, oriundos de Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA (aproximadamente 20 g de raízes, caules, caules + raízes e folhas), os quais foram colocados individualmente no interior da coluna de extração (2 cm de diâmetro × 25 cm de altura) e o CO_2 na temperatura de 50ºC e pressão de 270 bar fluiu pela coluna por aproximadamente 50 minutos para obtenção do extrato, o volume de CO_2 utilizado para cada extração foi de 200 L. Após cada extração foi realizada uma lavagem com etanol nas tubulações para remoção de material que ficou retido no equipamento (regiões 5 e 6 do Esquema 2) [20].



Esquema 2. Adaptação do esquema referente ao sistema de extração supercrítica [20].

Todos os extratos obtidos, seja por maceração seja por fluído supercrítico, foram analisados por RMN de ^1H, para possibilitar um direcionamento aos melhores extratos a serem trabalhados, visando a determinação das substâncias ariltetralônicas presentes nos extratos.

3.2.3 Massa dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico

Nas Tabelas 1 a 3 (p. 23) estão relacionadas as massas dos materiais vegetais utilizadas para cada tipo de extração de *H. reniformis*, seja por maceração seja por fluído supercrítico, oriundas das regiões de Ituiutaba - MG e Imperatriz - MA e a massa dos respectivos extratos obtidos.

Tabela1. Dados dos extratos obtidos por maceração de *H. reniformis* de Ituiutaba - MG.

Material Vegetal (g)	**Extrato Hexânico (g)**	**Extrato Acetônico (g)**	**Extrato Etanólico (g)**
Raízes (100,88)	3,73 (3,70 %)	3,75 (3,72 %)	5,97 (5,92 %)
Caules (1000,0)	3,55 (0,36 %)	8,3 (0,83 %)	21,33 (2,13 %)
Folhas (756,0)	33,38 (4,42 %)	22,22 (2,94 %)	58,12 (7,69 %)

Tabela 2. Dados dos extratos obtidos por maceração de *H. reniformis* de Imperatriz - MA.

Material Vegetal (g)	**Extrato Hexânico (g)**	**Extrato Acetônico (g)**	**Extrato Etanólico (g)**
Raízes (50,02)	1,46 (2,92 %)	1,26 (2,52 %)	3,10 (6,20%)
Caules + raízes (150,33)	2,06 (1,37 %)	1,61 (1,07%)	5,41 (3,60 %)
Folhas (150,82)	6,60 (4,38 %)	6,90 (4,57 %)	5,15 (3,41 %)

Tabela 3. Dados dos extratos obtidos por fluído supercrítico de *H. reniformis* de Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA.

Ituiutaba - MG		**Imperatriz - MA**	
Material Vegetal (20,0 g)	**Extrato obtido (g)**	**Material Vegetal (20,0 g)**	**Extrato obtido (g)**
Raízes	0,741 (3,71 %)	*Raízes*	0,261 (1,31 %)
Caules	0,072 (0,36 %)	*Caules + raízes*	0,177 (0,89 %)
Folhas	0,263 (1,32 %)	*Folhas*	0,326 (1,63 %)

3.3 Obtenção dos espectros de RMN de ^1H

As seções que se seguem apresentam os espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico, de duas localidades, Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, os espectros de RMN de ^1H (500 MHz e 300 MHz) foram adquiridos em espectrômetros Varian INOVA 500 (11,7 T) e Varian INOVA 300 (7,0 T). Para tal análise foi utilizado 30,0 mg de extrato bruto

dissolvidos em aproximadamente 1 mL de $CDCl_3$ (para os extratos hexânico e acetônico e por fluído supercrítico) e em 0,7 mL de DMSO (para os extratos etanólicos) ambos os solventes são da Sigma-Aldrich ™ com pureza maior ou igual a 99,8% para D. Visto que foram obtidos mais de 20 extratos, selecionamos os espectros mais representativos, ou seja, aqueles que apresentaram sinais referentes as lignanas de interesse, em quantidades relevantes como os da (–)-aristotetralona (T11) e da (–)-8'-*epi*-aristoligona (T15). Todos os espectros encontram-se na seção de Anexos (p. 64).

3.4 Análises cromatográficas

Alíquotas dos extratos de *H. reniformis*, obtidos tanto pelos métodos de maceração quanto por fluído supercrítico, oriundos de Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, foram pesados e solubilizados em metanol resultando em uma solução com concentração de 1 mg/mL e filtrados em membrana de PVDF de 0,45 µm. Em seguida, estes foram analisados por CLAE-analítico (Cromatógrafo *Jasco)*, para obter os respectivos perfis cromatográficos. A coluna utilizada para este propósito foi a Chrompack Varian ODS® (C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm). Foi utilizado como sistema eluente MeOH/H_2O na proporção 7:3 com vazão de 0,8 mL/min e detector UV em 254 nm, conforme descrito na literatura [21], o volume de injeção foi de 20 µL e o tempo de eluição para cada análise foi de 60 min.

Para a análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE–EM/IES), foi utilizado um equipamento *LCQ Fleet – Thermo Scientific*. As condições experimentais para esta análise foram as mesmas descritas para o CLAE-analítico.

Os solventes orgânicos empregados nos processos cromatográficos descritos acima foram de grau cromatográfico, a água foi destilada e deionizada (resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm a 25ºC).

O sistema para obter as análises por CG-EM foi GC-2010 Shimadzu com detector GCMS-QP2010 Plus, programa GCMS Real Time Analyses EI (70 eV) equipado com um injetor split/splitless (220ºC) com uma razão de 1/10, usando uma coluna capilar VF-1MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm). Hélio foi usado como gás de arraste (0,8 ml/min), Kits de padrões Aldrich foram utilizados nas análises (24 alcanos C_6-C_{30} de cadeia linear, 19 ácidos graxos

C_5-C_{24} de cadeia linear, e 19 ésteres metílicos C_5-C_{24} de ácidos graxos de cadeia linear). As amostras foram preparadas com *n*-hexano de pureza analítica (99%) na concentração de 1 mg/mL do extrato bruto e o volume de injeção foi de 2 µL [22].

O tratamento estatístico dos dados para a obtenção da curva analítica envolveu a determinação da equação da reta de regressão linear e do coeficiente de correlação utilizando o software ORIGIN 5.0, 1997.

4. Resultados e discussão

4.1 Análise dos espectros de RMN de ^{1}H dos extratos

A Figura 3 (p. 26) apresenta os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos de raízes de Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, obtidos por maceração (extrato hexânico) e por fluído supercrítico, a Figura 4 (p. 27) apresenta os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos acetônicos de raízes de MG e MA, e a Figura 5 (p. 28) apresenta os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos hexânico obtidos por maceração de caules e de caules + raízes e por fluído supercrítico, oriundos de Ituiutaba - MG e Imperatriz – MA, respectivamente.

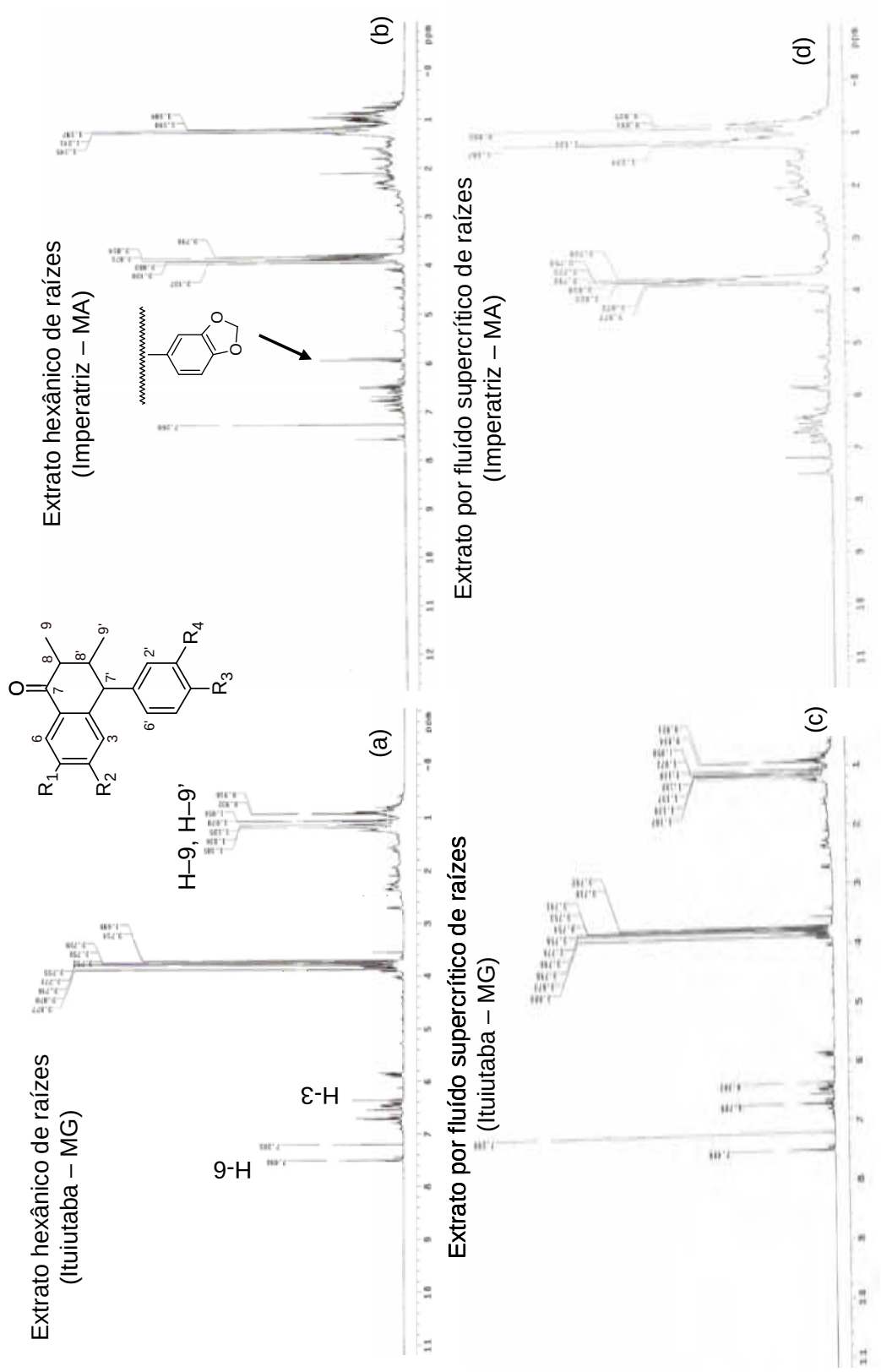


Figura 3. Espectros de RMN de ^{1}H dos extratos de raízes: (a) hexânico – MG; (b) hexânico – MA; (c) fluído supercrítico – MG; e (d) fluído supercrítico – MA (11,7 T; $CDCl_3$).

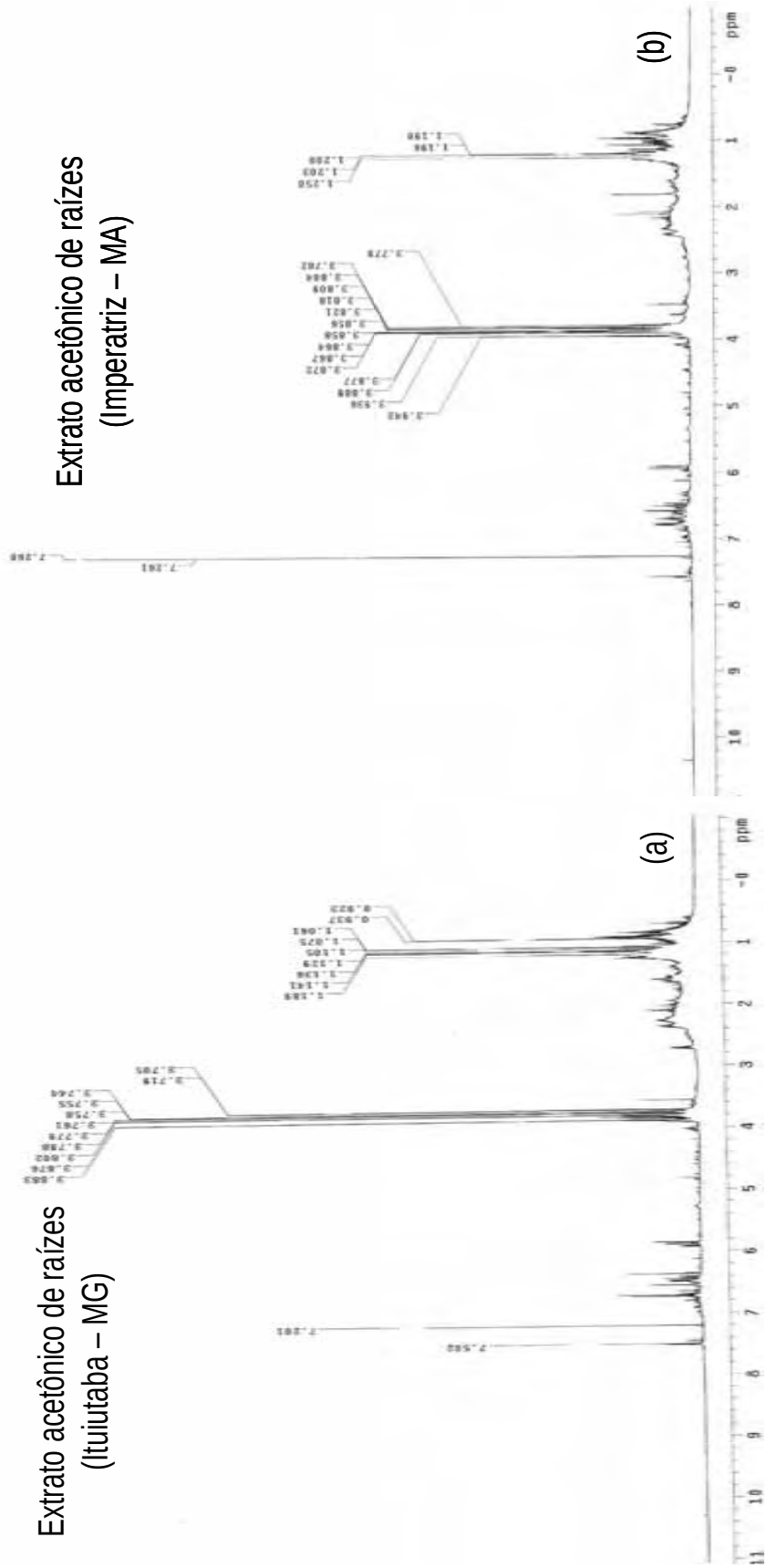


Figura 4. Espectros de RMN de ^{1}H dos extratos acetônicos de raízes provenientes de: (a) MG; e (b) MA (11,7 T; $CDCl_3$).

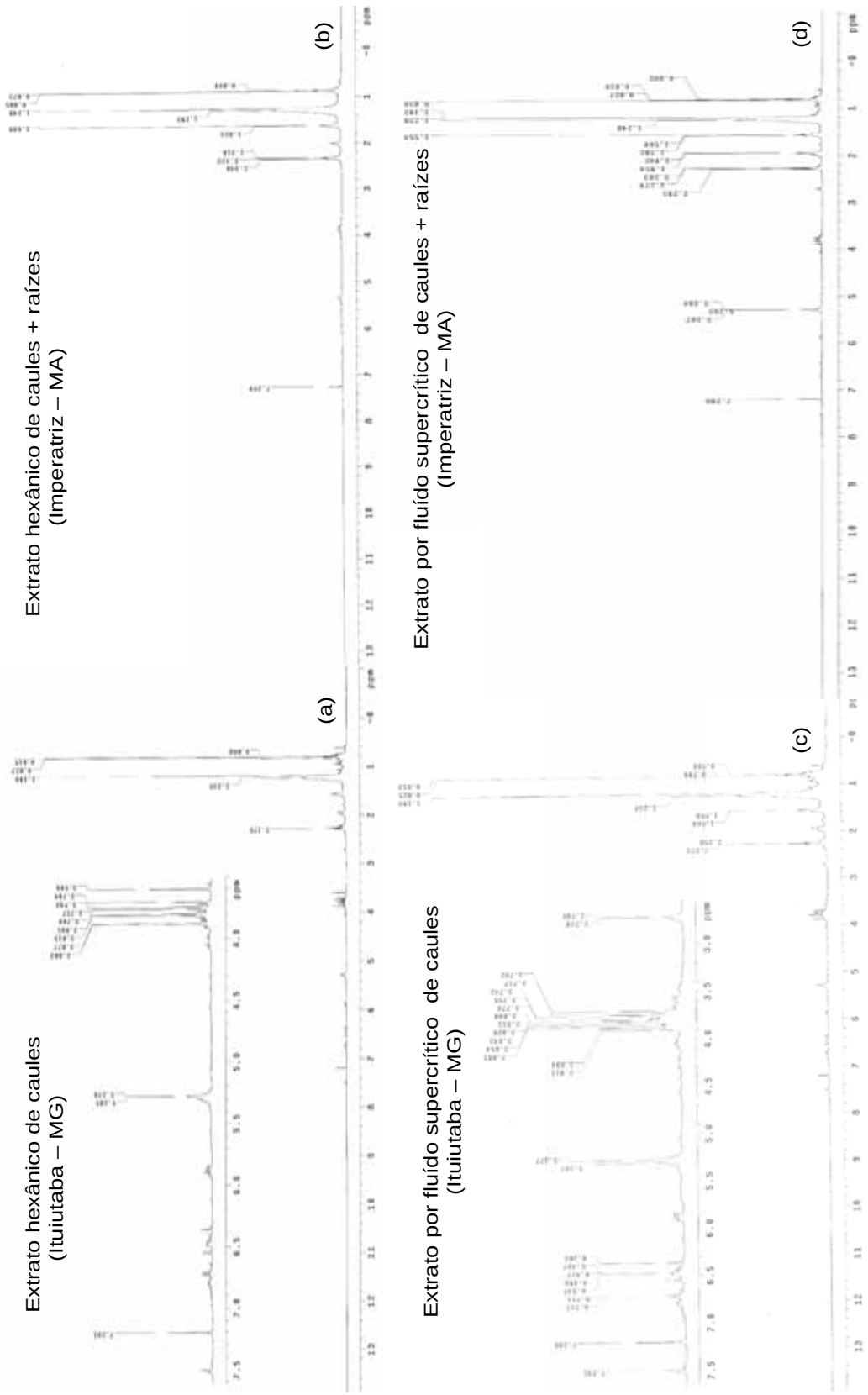


Figura 5. Espectros de RMN de ^{1}H dos extratos de caule e de caule + raízes: (a) hexânico – MG; (b) hexânico – MA; (c) fluído supercrítico – MG; e (d) fluído supercrítico – MA (11,7 T; $CDCl_3$).

Os espectros de RMN ^{1}H dos extratos hexânico e acetônico obtidos por maceração e obtidos por fluído supercrítico (Figuras 3 e 4) de raízes apresentam sinais muito semelhantes, tanto daqueles obtidos do material vegetal coletado em Ituiutaba – MG como os de Imperatriz – MA. Os sinais observados evidenciam a presença de grupos metílicos com deslocamento químicos entre δ 0,9 a δ 1,2; além de sinais característicos de hidrogênios aromáticos em δ 6,3 a 7,0 e em aproximadamente δ 7,5 (H–6), destacando o deslocamento químico em aproximadamente δ 7,5 por ser característico de hidrogênio desprotegido pelo grupo carbonílico em lignanas ariltetralônicas, em δ~3,8 de hidrogênios metoxílicos aromáticos e em δ~5,9 de hidrogênios metilenodioxílicos. Os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos hexânico e por fluído supercrítico de caules e caules + raízes (Figura 5), também possuem similaridades e apresentam sinais referentes a hidrogênios alifáticos. Porém em menor intensidade que no conjunto de extratos provenientes de raízes de ambas as regiões.

Devido a boa resolução dos espectros de raízes é possível identificar sinais correspondentes aos hidrogênios da lignana (7'*R*,8*S*,8'*S*)-8,8'-dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7',-ciclolignan-7-ona, denominada (–)-8'-*epi*-aristoligona (T15) [6, 12], pela comparação destes espectros com o espectro da amostra autêntica (Figura 6, p. 30).

Os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos acetônicos e etanólicos de raízes, caules e de caules + raízes oriundos de Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, respectivamente, encontram-se na seção de anexos bem como todos os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos de folhas oriundas de ambas as regiões e obtidos tanto pelo método de maceração como por fluído supercrítico.

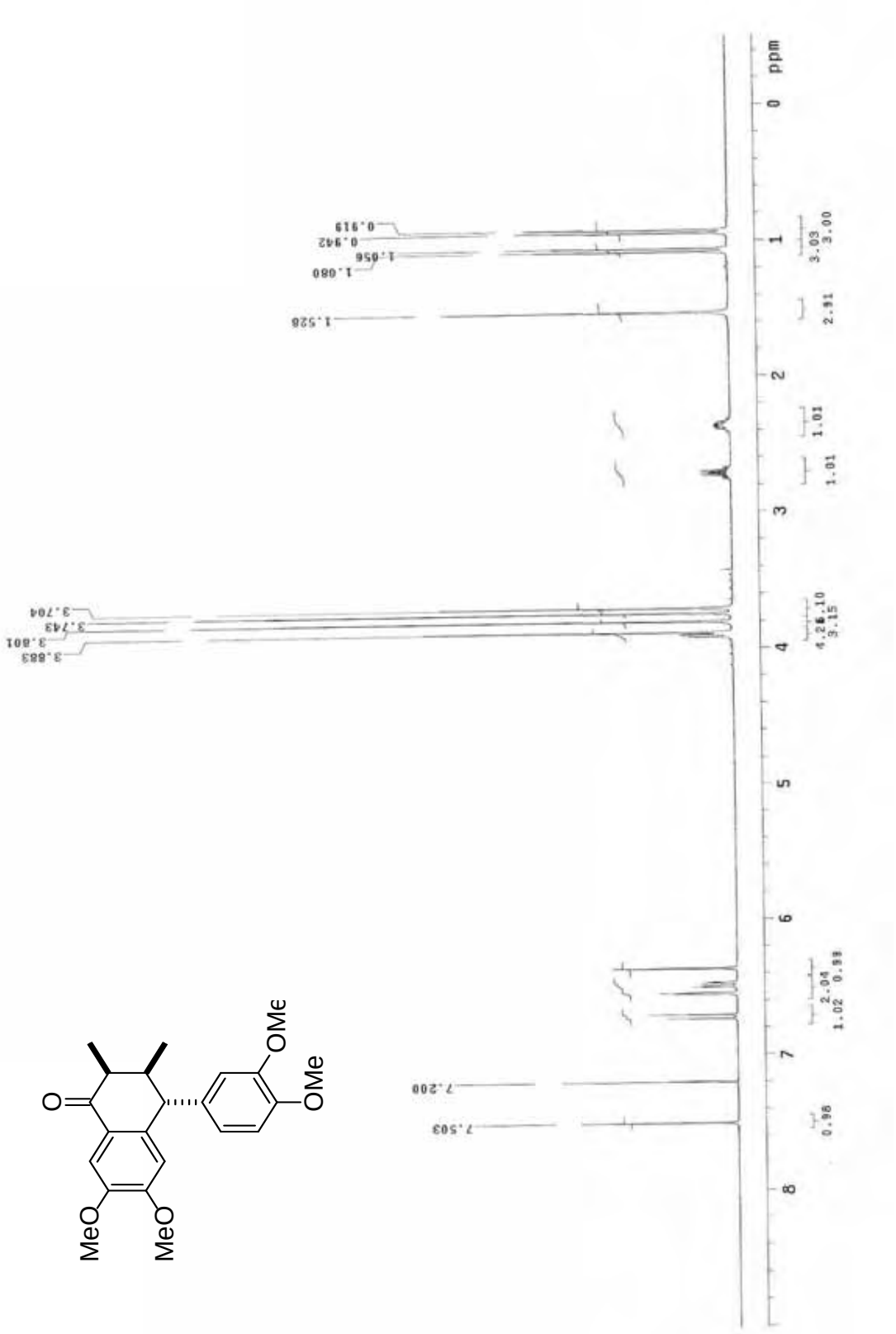


Figura 6. Espectro de RMN de ^{1}H da substância pura (7'*R*,8*S*,8'*S*)-8,8'-dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7',-ciclolignan-7-ona, nomeada (–)-8'-*epi*-aristoligona ou T15 (11,7 T; $CDCl_3$).

4.2 Cromatogramas dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de MG e MA

Nas Figuras 7 a 9 (p. 31 e 32) estão os cromatogramas dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes, caules e folhas oriundos de Ituiutaba – MG, e nas Figuras 10 a 12 (p. 32 e 33) estão os cromatogramas dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes, caules + raízes; e folhas oriundos de Imperatriz – MA, respectivamente.

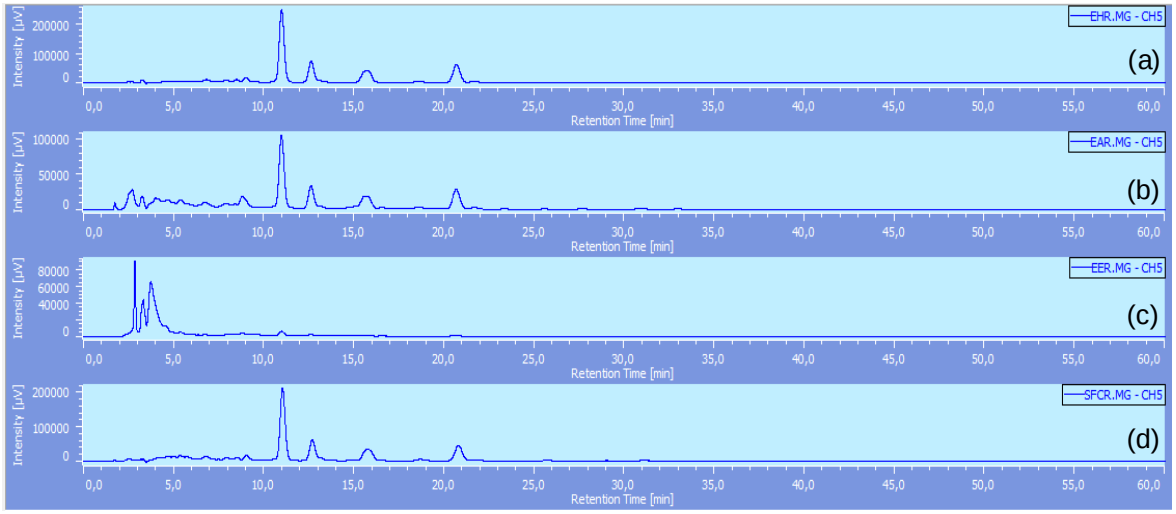


Figura 7. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Ituiutaba - MG. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

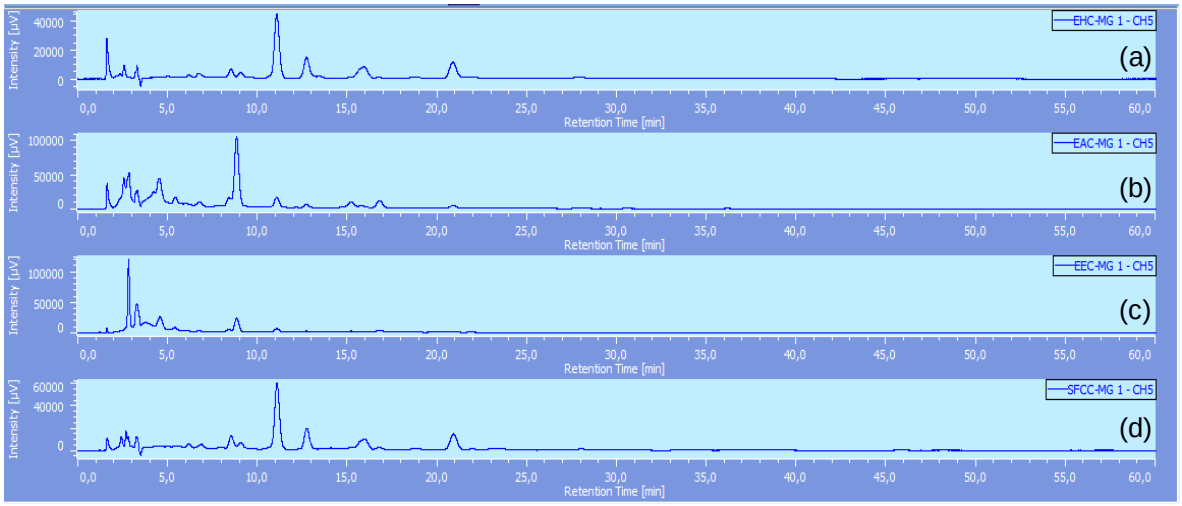


Figura 8. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba - MG. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

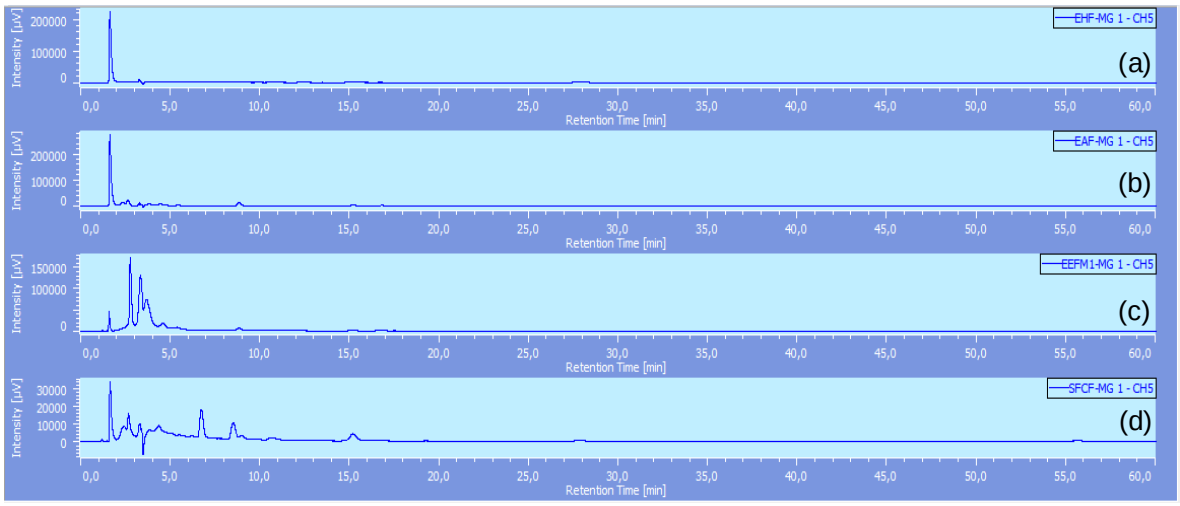


Figura 9. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de folhas de *H. reniformis* oriundas de Ituiutaba – MG. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

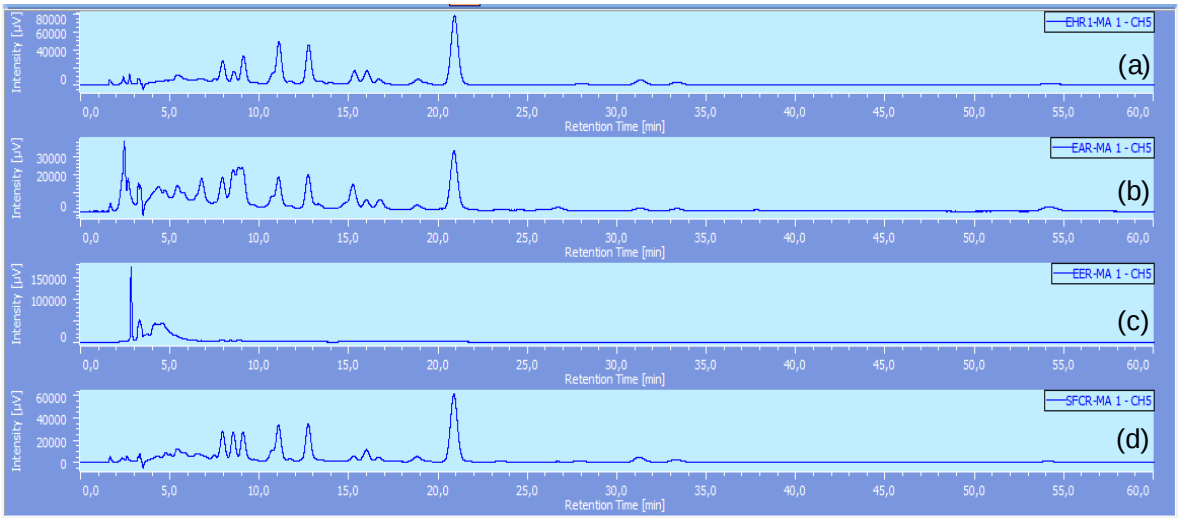


Figura 10. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Imperatriz – MA. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

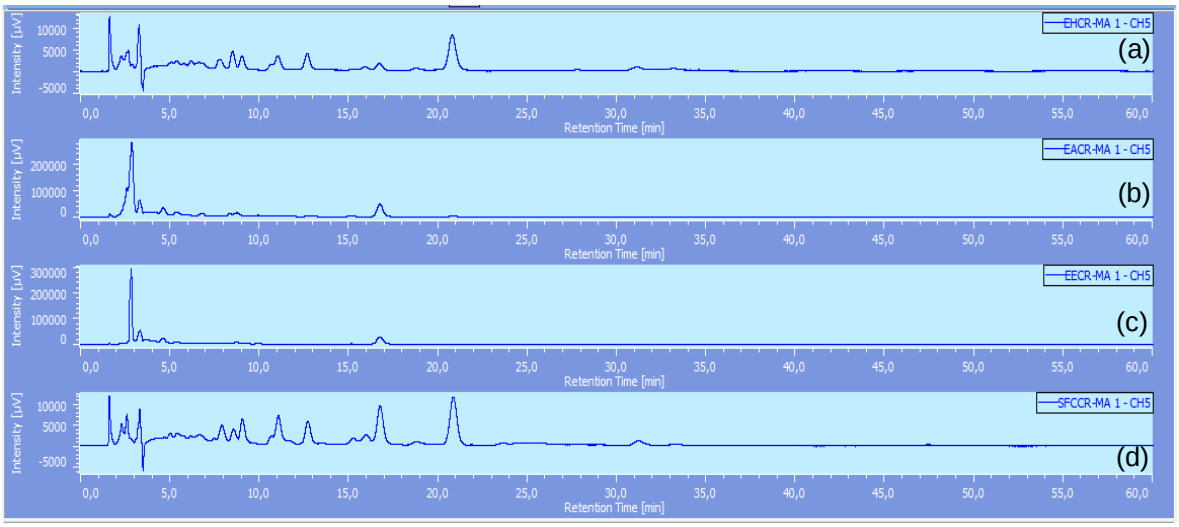


Figura 11. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

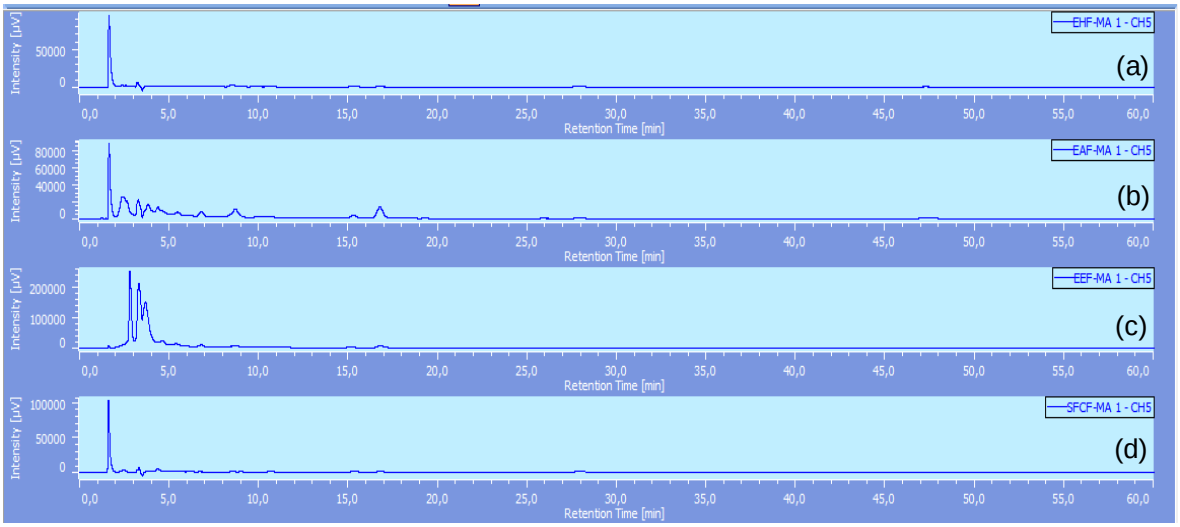


Figura 12. Cromatogramas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de folhas de *H. reniformis* oriundas de Imperatriz – MA. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Por uma análise preliminar qualitativa e quantitativa dos cromatogramas dos extratos obtidos pelos métodos de maceração, em particular o hexânico, e por fluído supercrítico, verifica-se que estes são muito parecidos, tanto em relação aos tempos de retenção dos compostos como também com relação a intensidade dos picos, ressaltando que os cromatogramas de raízes obtidos são compatíveis com aqueles descritos na literatura [21].

4.3 Análise quantitativa dos extratos

Com o propósito de realizar uma análise quantitativa, utilizamos duas substâncias padrão, T15 e T11, que foram previamente isoladas e purificadas por membros do nosso grupo de pesquisa e que estão presentes nestes extratos. As seções subsequentes apresentam estas análises.

4.3.1 Substância padrão T15

Para a utilização da substância T15 como padrão analisamos seu espectro de RMN de ^{1}H, (Figura 6, p. 30), e injetamos esta substância no CLAE – analítico sob a forma de solução na concentração de 1 mg/mL para identificarmos no cromatograma gerado o tempo de retenção em que esta substância elui (Figura 13, p. 34).

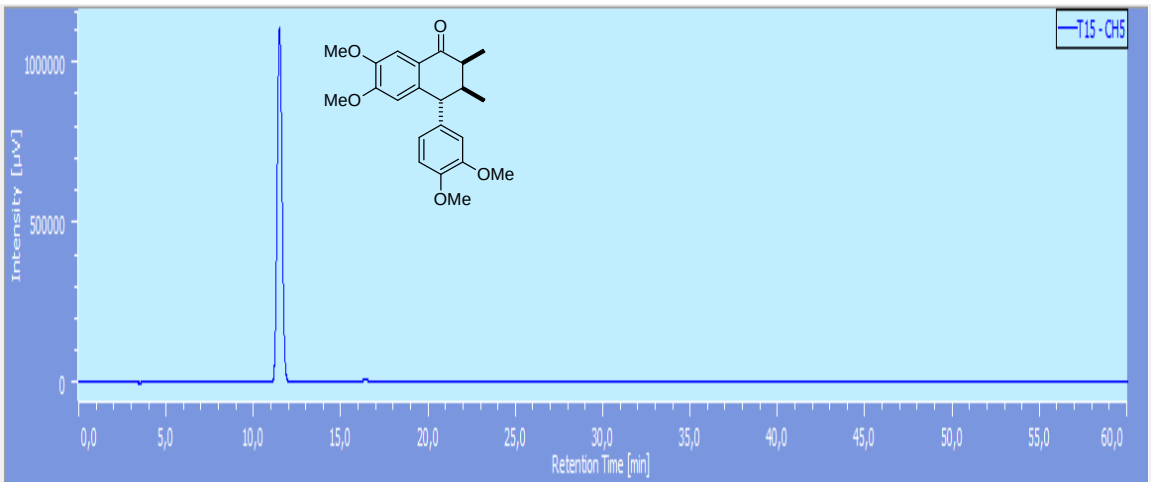


Figura 13. Cromatograma do padrão isolado e purificado em nosso laboratório, (7'*R*,8*S*,8'*S*)-8,8'-dimetil-3',4',4,5-tetrametoxi-2,7',-ciclolignan-7-ona, identificada como (–)-8'-*epi*-aristoligona (T15) [10], concentração de 1 mg/mL. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Além do cromatograma da lignana ariltetralônica, T15, na Figura 14(a) consta o cromatograma e na Figura 14(b) o espectro de massas da substância padrão (p. 35).

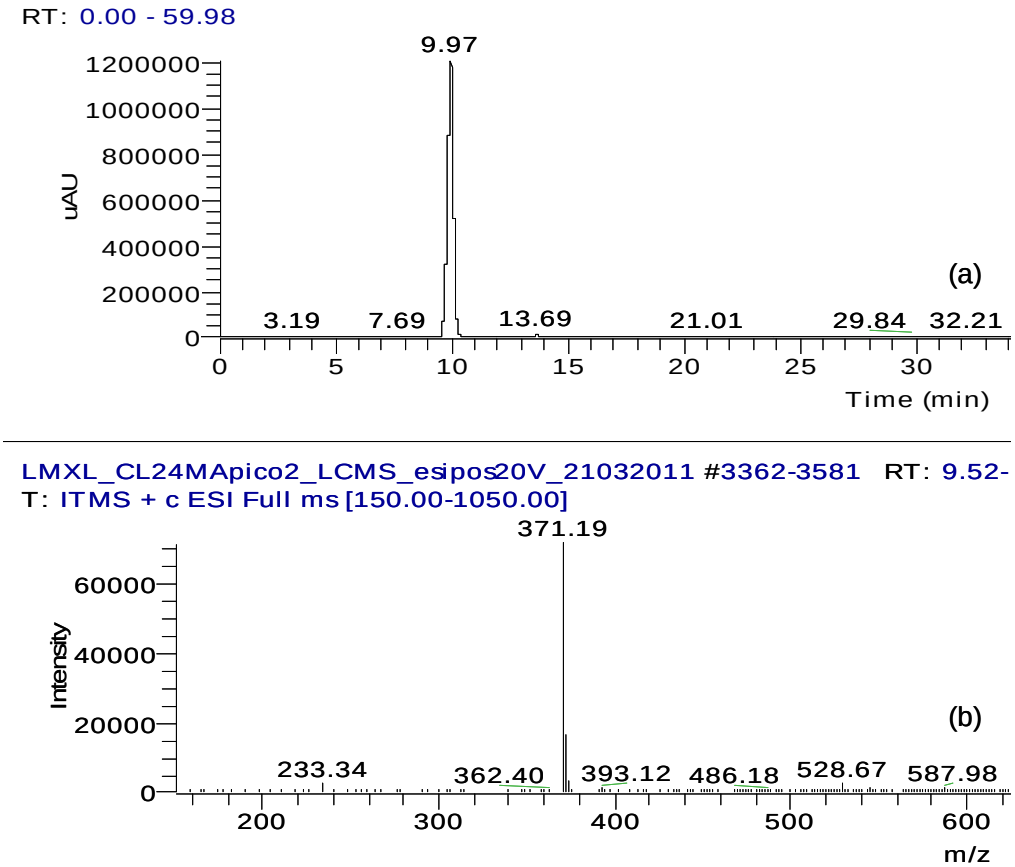


Figura 14. (a) Cromatograma; e (b) espectro de massas do padrão isolado e purificado, a lignana ariltetralônica T15, na concentração de 1 mg/mL. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Pode-se observar que o espectro de massas da substância padrão T15, Figura 14(b), apresenta o íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ com *m/z* 371, e que pelo cromatograma não se observa sinais referentes a substâncias interferentes e/ou contaminantes. É importante ressaltar que a pureza desta substância padrão apenas foi averiguada por essas técnicas.

A partir destes resultados, iniciou-se a quantificação dos extratos utilizando a substância padrão, T15. Para tal, selecionou-se os cromatogramas que apresentaram melhor resolução de picos na mesma faixa de tempo de retenção em que a substância padrão eluia. Foram quantificados os extratos dos materiais vegetais de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG, em especial os de raízes e caules (obtidos pelos métodos de maceração, os extratos: hexânico, acetônico e etanólico; e por fluído supercrítico), os quais apresentaram picos bem resolvidos referentes à lignana padrão. Os extratos dos materiais vegetais oriundos de Imperatriz – MA não foram quantificados,

pois, há sobreposição de picos com mesmo tempo de retenção que o padrão (Figura 15, p. 36), impossibilitando a quantificação via T15. Nos cromatogramas dos extratos de folhas o pico referente a tal substância não aparece. Para melhorar a resolução/separação dos picos destes extratos oriundos de Imperatriz – MA, foram obtidos cromatogramas utilizando sistemas de eluentes diversos em proporções e fluxos variáveis. Mas, mas não foi possível a adequação da metodologia empregando estes extratos com o propósito da quantificação com esta substância padrão.

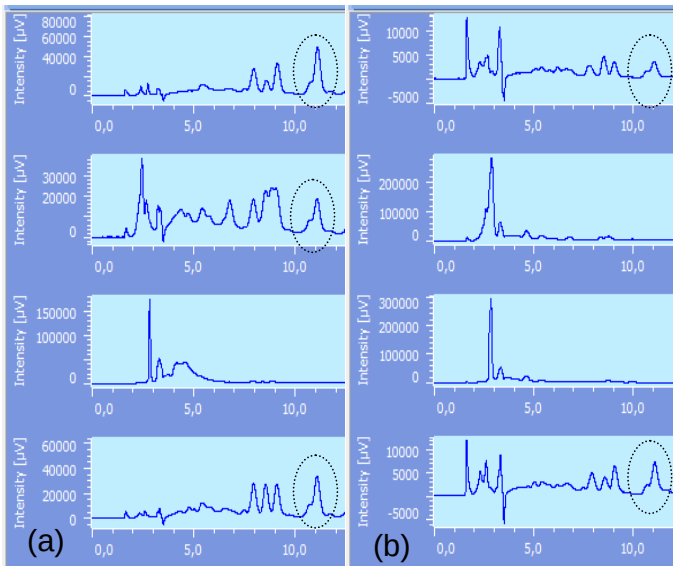


Figura 15. Cromatogramas dos extratos obtidos pelos métodos de maceração e por fluído supercrítico de (a) raízes e (b) caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz – MA.

Para a análise quantitativa foi feita uma solução estoque da substância padrão, T15, na concentração de 1 mg/mL, e a partir desta solução estoque, diluições sucessivas foram feitas para preparar as soluções nas concentrações necessárias para a construção da curva analítica pelo método do padrão externo [18]. As concentrações utilizadas para obter a curva analítica foram determinadas com base nos perfis cromatográficos obtidos anteriormente onde é possível relacionar o valor da área do pico que o padrão gerou na concentração de 1 mg/mL com o valor da área do pico que o extrato mais rico nesta substância apresentava. A partir deste valor estipulado encontrou-se o ponto médio da curva analítica, e, portanto aos pontos abaixo e acima deste ponto médio que seriam entre 0,2 a 0,3 mg/mL, ou seja, aproximadamente ¼

da concentração da solução estoque. Logo, as concentrações para as quais foi obtida esta curva foram: 0,005; 0,1; 0,2; 0,3; 0,45; 0,6 e 0,8 mg/mL; as soluções foram injetadas em triplicatas, com volume de injeção de 20 µL cada, e com tempo de aquisição de dados de 60 min. Posteriormente, também as soluções dos extratos, numa concentração de 1 mg/mL, foram reinjetadas em triplicatas empregando-se a mesma metodologia. Assim, obteve-se a curva analítica (Figura 16 e Tabela 4, p. 37).

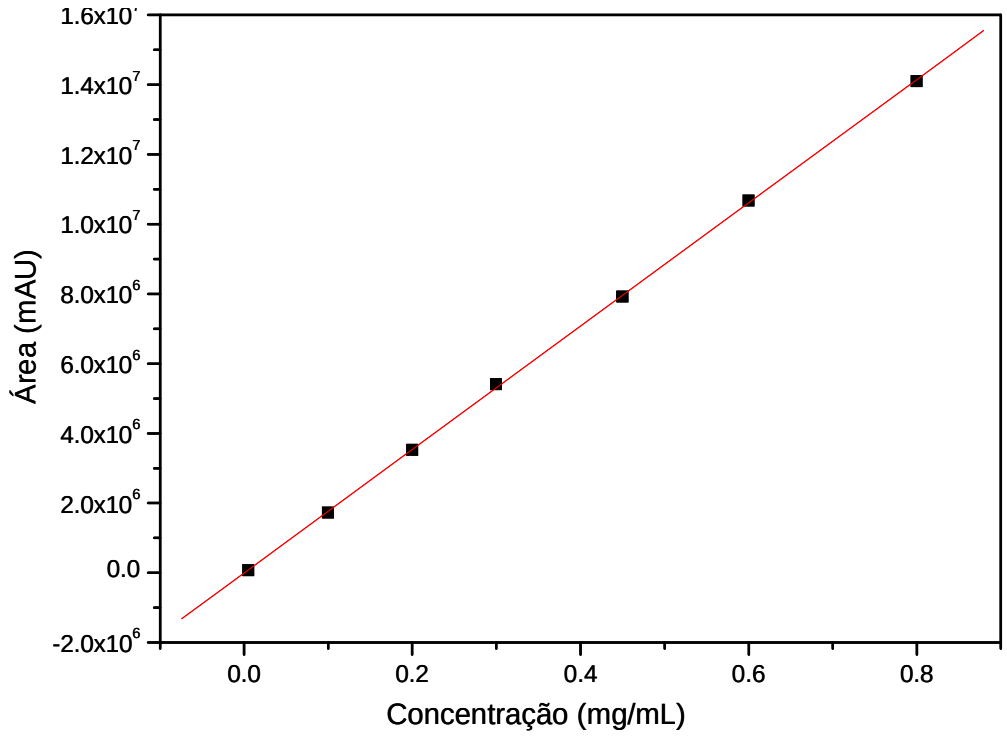


Figura 16. Curva analítica da substância padrão T15 obtida com as seguintes concentrações: 0,005; 0,1; 0,2; 0,3; 0,45; 0,6 e 0,8 mg/mL.

Tabela 4. Dados referentes a curva analítica da substância padrão T15.

Dados da Curva Analítica			
Parâmetro	**Valor**	**Erro**	**Regressão Linear: Y = A + B * X**
A	-1800,40818	40941,97053	
B	1,76912 × 10^7	93488,15102	
Coeficiente de Regressão Linear	**Desvio Padrão**	**Número de pontos**	**Imprecisão**
0,99993	64873,05944	7	<0,0001

A curva analítica construída a partir das injeções das soluções em diferentes concentrações da substância padrão T15 apresentou bons resultados com relação ao coeficiente de regressão linear da reta, 0,99993, indicando que é linear entre as concentrações de 0,005 a 0,8 mg/mL. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) foram calculados matematicamente pela relação entre o desvio padrão da curva analítica e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela literatura [18], resultando nos valores de 0,0121 e 0,0367 mg/mL, respectivamente.

Com base nos valores dos parâmetros obtidos pela equação de regressão linear da reta (Y = A + B * X) foi possível realizar o cálculo das respectivas concentrações pelas áreas produzidas por cada injeção dos extratos de raízes e caules obtidos tanto pelo método de maceração como por fluído supercrítico oriundos de Ituiutaba – MG, (Tabela 5, p. 39).

Tabela 5. Concentração da substância T15 presente nos extratos de raízes e caules obtidos a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta.

Material vegetal	***Método de extração***		***Número da injeção***	***Àrea do pico***	***Concentração (mg/mL)***
Raízes	**Maceração**	*Hexânico*	1	4189347	0,2369
			2	4235352	0,2395
			3	4298856	0,2431
		Acetônico	1	1864143	0,1055
			2	1854300	0,1049
			3	1855641	0,1050
		Etanólico	1	76387	$4{,}4196 \times 10^{-3}$ *
			2	73378	$4{,}2495 \times 10^{-3}$ *
			3	73104	$4{,}2340 \times 10^{-3}$ *
	Fluído supercrítico		1	3818305	0,2159
			2	3883087	0,2196
			3	3881723	0,2195
Caules	**Maceração**	*Hexânico*	1	837846	0,0475
			2	848562	0,0481
			3	840043	0,0476
		Acetônico	1	244834	0,0139 #
			2	245996	0,0140 #
			3	248710	0,0142 #
		Etanólico	1	93774	$5{,}4024 \times 10^{-3}$ *
			2	93042	$5{,}3610 \times 10^{-3}$ *
			3	93090	$5{,}3637 \times 10^{-3}$ *
	Fluído supercrítico		1	1107052	0,0627
			2	1145254	0,0648
			3	1167898	0,0661

* Valores calculados abaixo do limite de detecção da curva analítica; e
# Valores calculados abaixo do limite de quantificação da curva analítica.

A partir da média das concentrações da substância T15, encontrada nas injeções em triplicatas dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico das raízes e caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG, foi possível calcular a quantidade presente desta substância nestes extratos (Tabela 6, p. 40).

Tabela 6. Cálculo da massa da substância padrão, T15, contida nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG.

Material vegetal	***Método de extração***		***Concentração média da T15 (mg/mL)***	***Massa de T15 calculada no extrato (g)***	***% de T15 calculada no extrato***
Raízes	**Maceração**	*Hexânico*	0,2398	0.8711	23,5089
		Acetônico	0,1051	0,3756	10,1052
		Etanólico	$4{,}3010 \times 10^{-3}$	0,0254	0,4258 *
	Fluído Supercrítico		0,2183	0,1291	19,8455
Caules	**Maceração**	*Hexânico*	0,0477	0,1555	4,4167
		Acetônico	0,0140	0,1073	1,2963 #
		Etanólico	$5{,}3757 \times 10^{-3}$	0,1145	0,5376 *
	Fluído Supercrítico		0,0645	$3{,}2426 \times 10^{-3}$	5,8636

***** Valores calculados abaixo do limite de detecção da curva analítica; e
[#] Valores calculados abaixo do limite de quantificação da curva analítica.

A massa de partida do material vegetal e a massa dos extratos produzidos pelos métodos de maceração e por fluido supercrítico de raízes e de caules, estão descritas nas Tabelas 1 e 3 da subseção 3.2.3 (p. 23), estudos fitoquímicos prévios em nosso laboratório já evidenciavam que esta substância, T15, representava aproximadamente 20% da massa dos extratos de raízes [6], a partir dos dados contidos nas Tabelas 5 e 6 podemos afirmar que a quantidade calculada de T15 é de 23,5% do extrato hexânico de raízes de Ituiutaba - MG. Embora o extrato obtido por fluído supercrítico de raízes apresentou uma menor quantidade de T15 quando comparado com o extrato hexânico obtido por maceração, verifica-se o oposto com relação aos extratos de caules, ou seja, o extrato obtido por fluído supercrítico apresentou-se mais rico em T15 quando comparado ao extrato hexânico obtido por maceração.

4.3.1.1 Análise por CLAE-EM dos extratos quantificados com T15

Para verificar e confirmar que a substância padrão T15 está presente nos extratos quantificados foram realizadas análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE–EM/IES). Nas Figuras 17 e 18 (p. 41 e 42), constam os cromatogramas e

respectivos espectros de massas obtidos dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e de caules oriundos de Ituiutaba – MG.

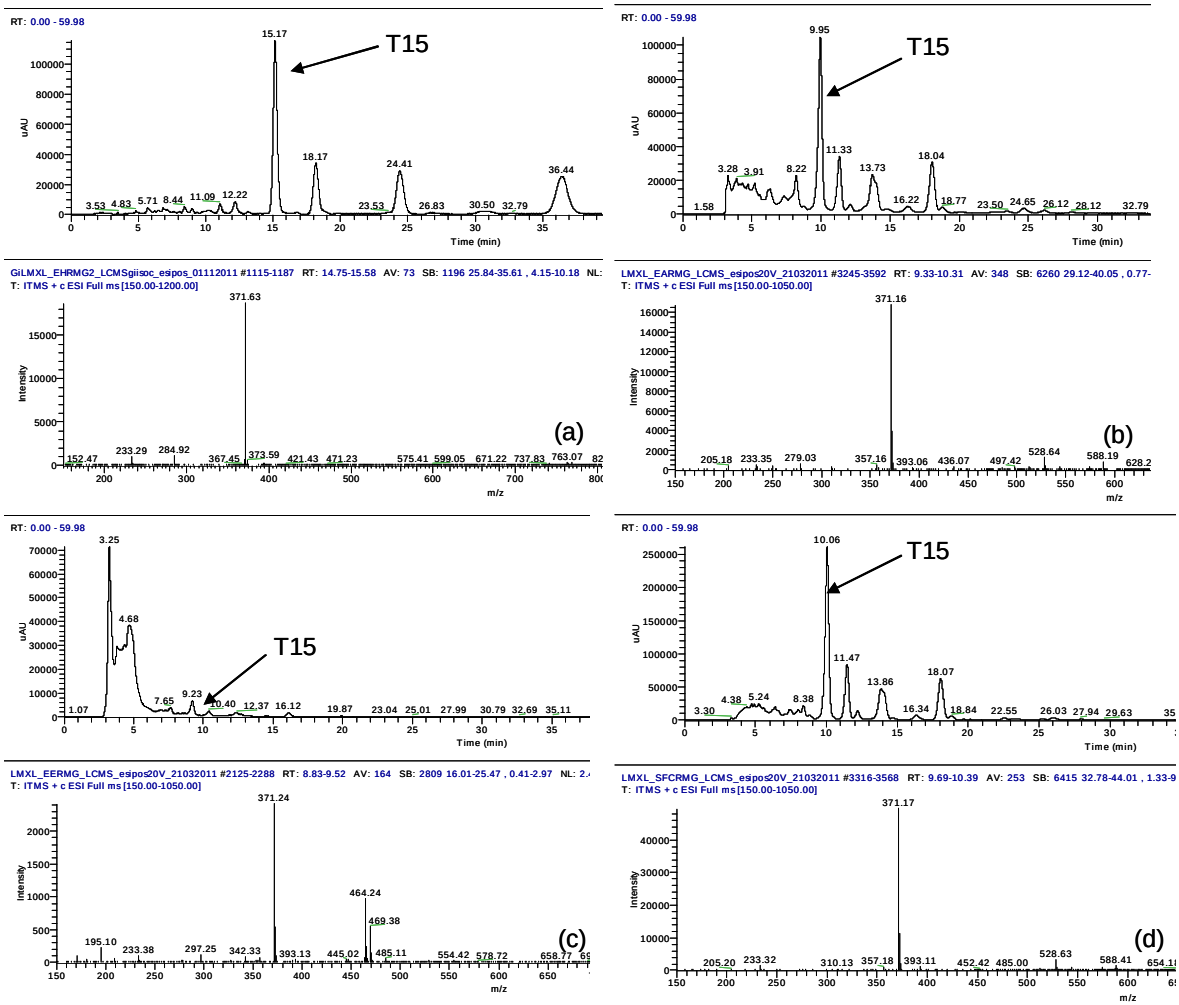


Figura 17. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Ituiutaba - MG. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

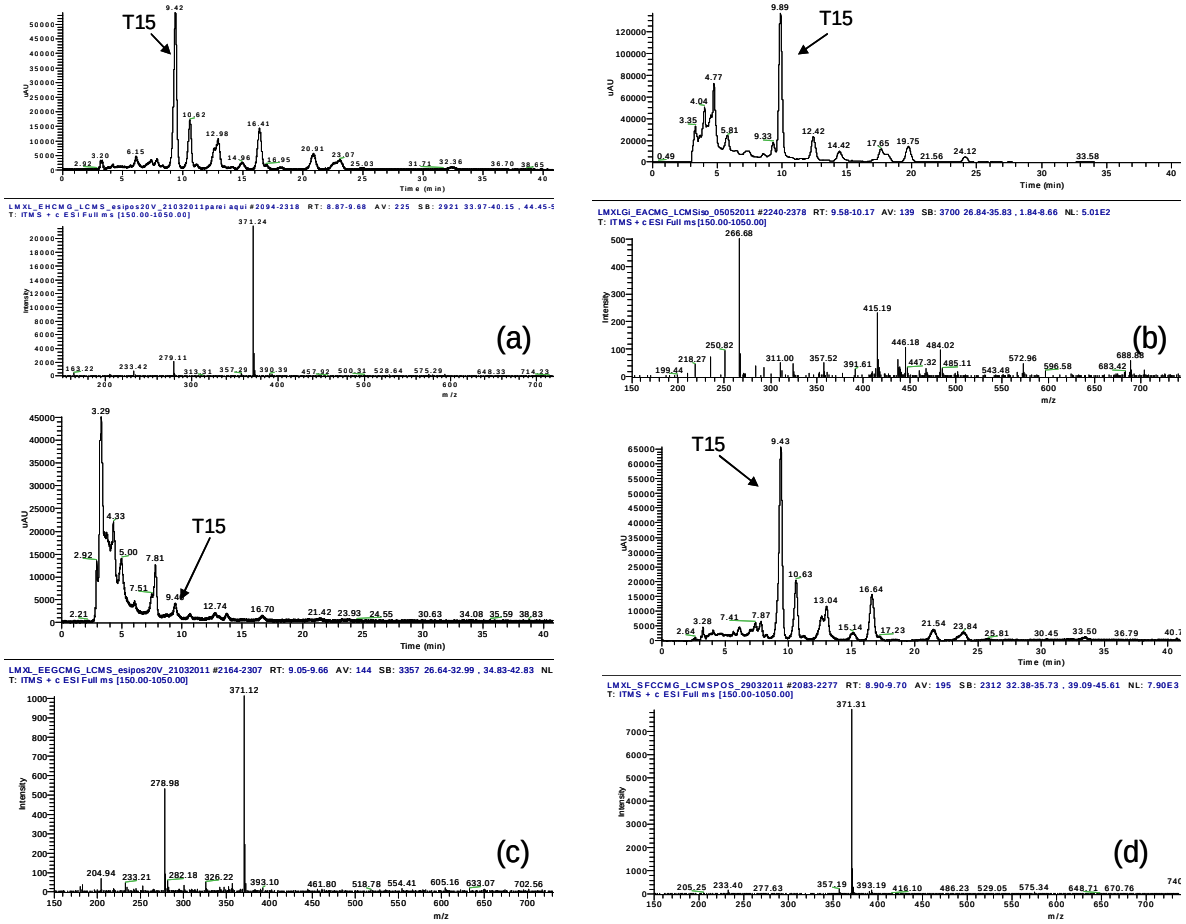


Figura 18. Cromatogramas e espectros de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico e (c) etanólico obtidos por maceração; e (d) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba - MG. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Nas Figuras 17 e 18, observa-se que no tempo de retenção em que se encontra a substância padrão T15 (aproximadamente 9,97 min), o íon *quasi*-molecular obtido para os extratos quantificados de raízes e caules, obtidos por maceração e por fluído supercrítico oriundos de Ituiutaba – MG é o mesmo obtido para a substância pura, ou seja, o íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ com *m/z* 371, com exceção para o extrato acetônico de caules. A partir destes resultados podemos afirmar que a substância quantificada foi a T15, como apresentado na literatura [21].

4.3.2 Substância padrão T11

As mesmas análises realizadas para utilização da lignana ariltetralônica T15 como substância padrão, também foram realizadas para a lignana ariltetralônica T11, (7'*R*,8*S*,8'*R*)-8,8'-Dimetil-4,5-dimetoxi-3',4′metilenodioxi-2,7',-ciclolignan-7-ona, denominada (–)-aristotetralona [6,12]. Nas Figuras 19 e 20 (p. 43 e 44) que seguem, está o cromatograma e o espectro de RMN de ^{1}H obtido nas mesmas condições utilizadas para a substância padrão T15.

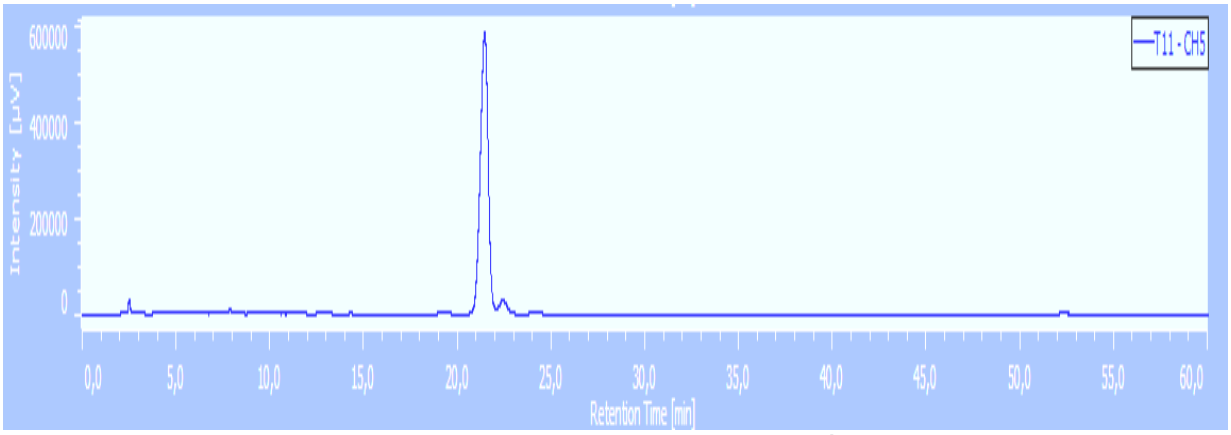


Figura 19. Cromatograma do padrão isolado em nosso laboratório, identificada como sendo a (–)-aristotetralona (T11), concentração de 1 mg/mL. Condições do CLAE: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Além da obtenção do espectro de RMN de ^{1}H e do cromatograma da lignana ariltetralônica T11, assim como realizado para a substância T15, realizamos uma análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE–EM/IES). Na Figura 21(a) consta o cromatograma e na Figura 21(b), p. 45, o espectro de massas da substância padrão T11.

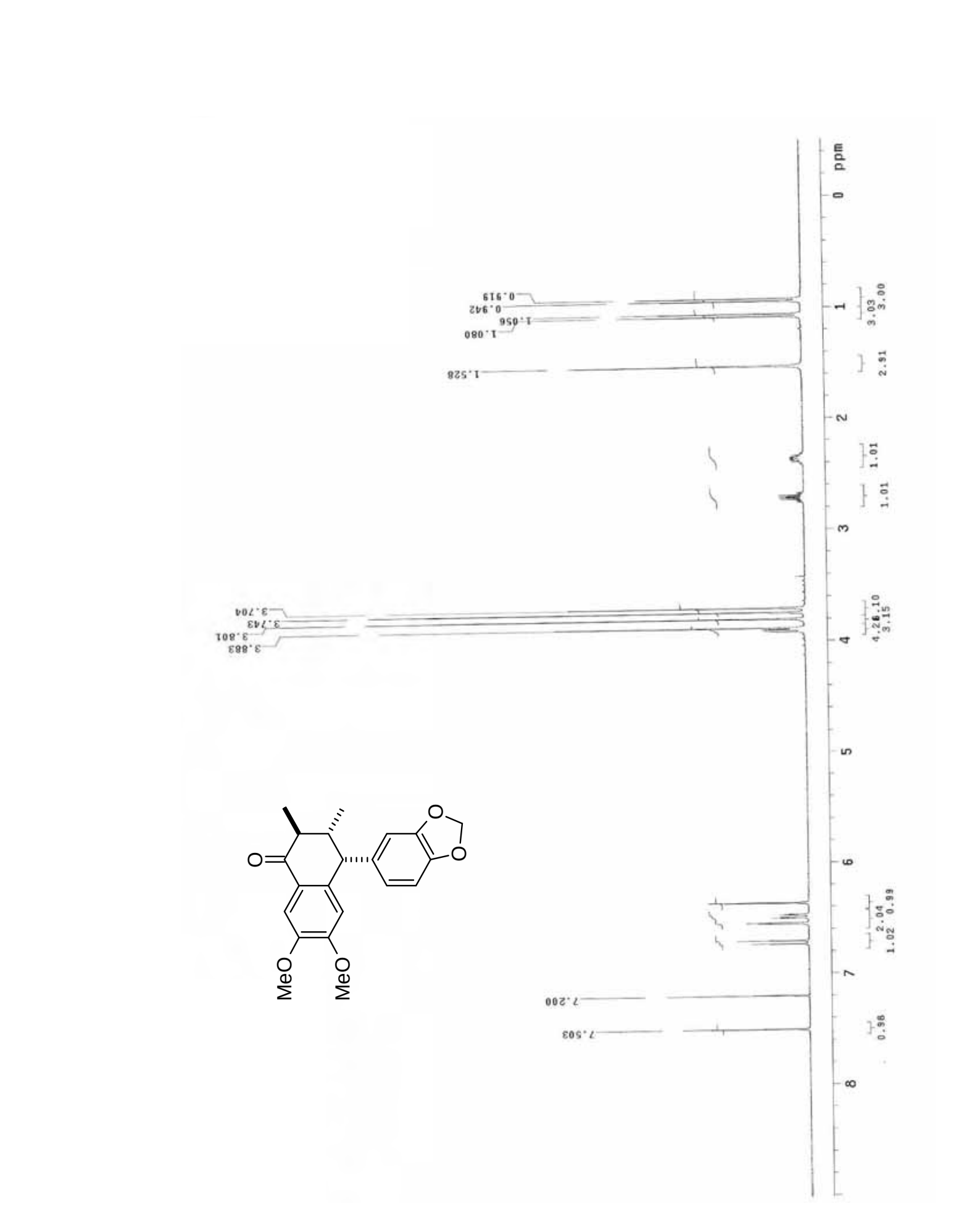


Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H da substância padrão denominada (–)-aristotetralona, T11 (11,7 T; $CDCl_3$).

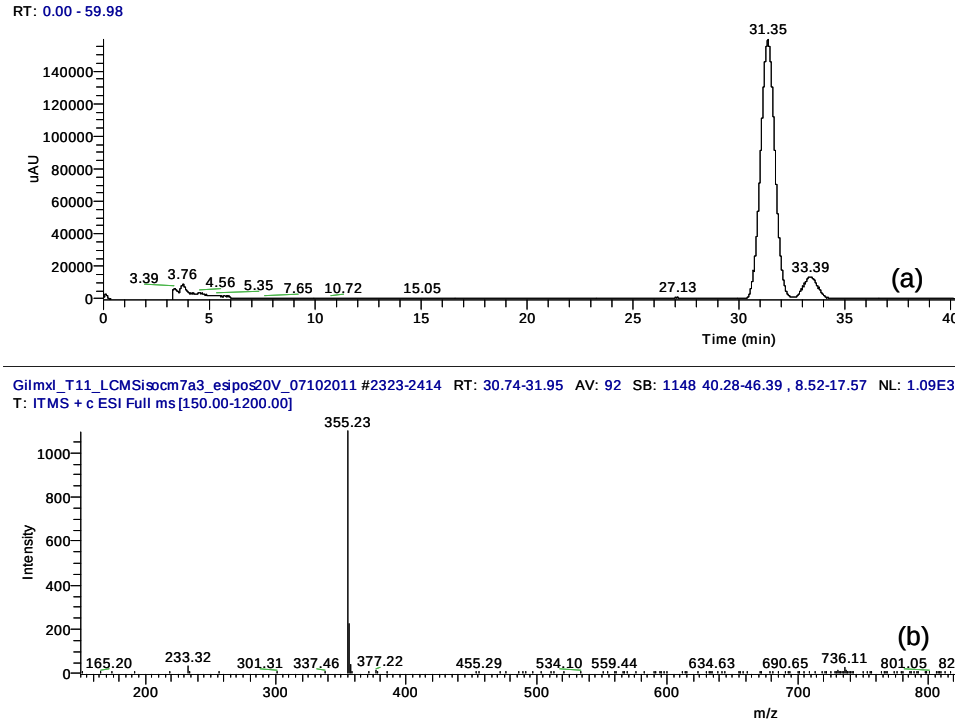


Figura 21. (a) Cromatograma; e (b) espectro de massas do padrão isolado, a lignana ariltetralônica T11, concentração de 1 mg/mL. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Pode-se observar que o espectro de massas da substância padrão T11, Figura 21(b), apresenta o íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ com *m/z* 355 e, como mencionado anteriormente, no seu cromatograma observa-se um pequeno sinal referente à substâncias interferentes e/ou contaminantes.

Pelo espectro de RMN de ^1H, Figura 20, e pelos cromatogramas obtidos, Figura 19 e 21, é possível observar que a lignana ariltetralônica T11 não está isenta de substâncias interferentes, para isto integramos seu espectro de RMN de ^1H e seu cromatograma obtido por CLAE-EM e constatamos que o seu grau de pureza é de 91 %. Apesar de todas as análises realizadas, é importante ressaltar que a pureza desta substância padrão apenas foi averiguada por essas técnicas, e para a realização dos cálculos das análises quantitativas subsequentes adotou-se como sendo 100 %.

A partir destes resultados, iniciou-se a quantificação dos extratos utilizando a substância padrão, T11. Para tal, selecionou-se os cromatogramas que apresentaram melhor resolução de picos na mesma faixa de tempo de retenção em que a substância padrão eluia. Foram quantificados os extratos dos materiais vegetais de *H. reniformis*, raízes (tanto de MG como do MA), e

caules oriundos de Ituiutaba – MG (obtidos pelos métodos de maceração, os extratos: hexânico e acetônico; e por fluído supercrítico), e os extratos de caules + raízes oriundos de Imperatriz – MA (obtidos pelos métodos de maceração, apenas o hexânico, e por fluído supercrítico) os quais apresentaram picos bem resolvidos referentes à lignana padrão. No cromatograma do extrato acetônico de caules + raízes e nos cromatogramas de todos os extratos etanólicos obtidos por maceração e todos os extratos de folhas (obtidos por maceração e por fluído supercrítico), o pico referente a tal substância não foi identificado.

Para a análise quantitativa via T11, foi feita uma solução estoque desta substância padrão, na concentração de 1 mg/mL, e adotada a mesma metodologia para a construção da curva analítica da substância padrão T15. O valor encontrado como ponto médio da curva analítica, está entre 0,078 a 0,098 mg/mL. Logo, as concentrações para as quais foi obtida esta curva foram: 0,044; 0,078; 0,098; 0,132; e 0,176 mg/mL; também fizemos soluções com concentrações de: 0,0005 e 0,001 mg/mL, mas não foram detectadas pelo equipamento. As soluções foram injetadas em triplicatas, com volume de injeção de 20 µL cada, e com tempo de aquisição de dados de 60 min, assim obteve-se, a curva analítica (Figura 22 e Tabela 7, p. 47).

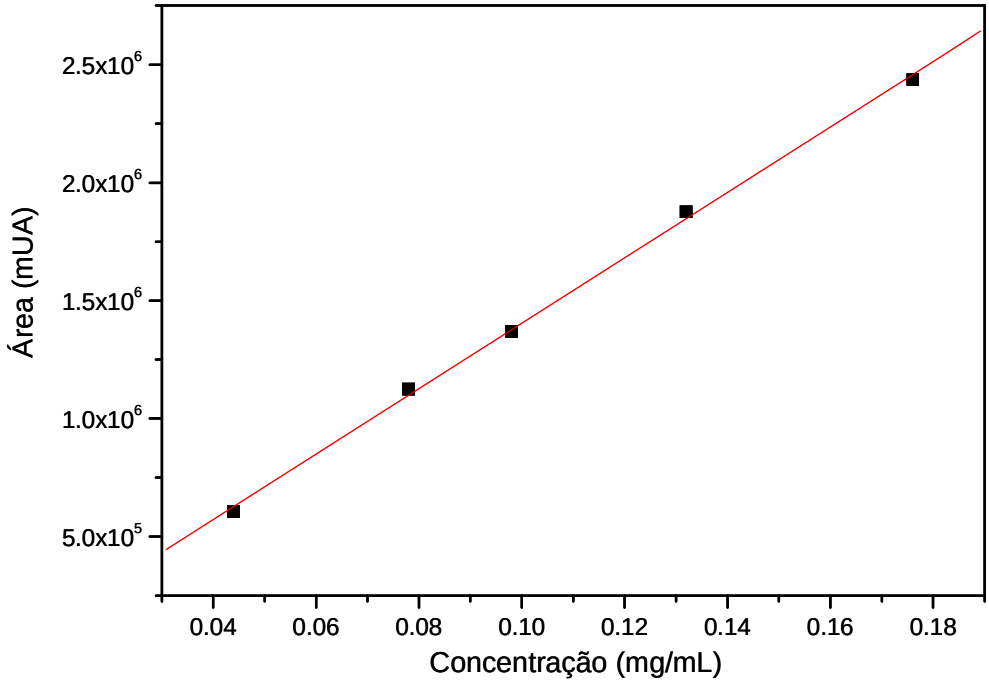


Figura 22. Curva analítica da substância padrão T11 obtida com as seguintes concentrações: 0,044; 0,078; 0,098; 0,132; e 0,176 mg/mL.

Tabela 7. Dados referentes a curva analítica da substância padrão T11.

Dados da Curva Analítica			
Parâmetro	**Valor**	**Erro**	**Regressão Linear: Y = A + B * X**
A	17518,5208	32254,12744	
B	1,38655 × 10^7	280685,11598	
Coeficiente de Regressão Linear	**Desvio Padrão**	**Número de pontos**	**Imprecisão**
0,99939	28441,03486	5	<0,0001

A curva analítica resultante das injeções das soluções em diferentes concentrações da substância padrão T11 não apresentou tão bons resultados quando comparados com a curva analítica da substância padrão T15. Os coeficientes de regressão linear da reta foram 0,99939 e 0,99993, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) calculados resultou nos valores de 6,7689 × 10^{-3} e 0,0205 mg/mL, respectivamente.

Como discutido anteriormente, a partir dos valores obtidos pela equação de regressão linear da reta (Y = A + B * X) foi possível realizar o cálculo das respectivas concentrações pelas áreas produzidas por cada injeção dos

extratos de raízes, caules e caules + raízes obtidos tanto pelo método de maceração como por fluído supercrítico oriundos de Ituiutaba – MG e Imperatriz - MA (Tabelas 8 e 9, p. 48 e 49, respectivamente).

Tabela 8. Concentração da substância T11 presente nos extratos de raízes e caules oriundos de Ituiutaba – MG, obtidos a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta.

Material vegetal	***Método de extração***		***Número da injeção***	***Àrea do pico***	***Concentração (mg/mL)***
Raízes	**Maceração**	*Hexânico*	1	1586025	0,1156
			2	1589766	0,1159
			3	1593967	0,1162
		Acetônico	1	714769	0,0528
			2	700775	0,0518
			3	713196	0,0527
	Fluído supercrítico		1	1190517	0,0871
			2	1199509	0,0878
			3	1207027	0,0883
Caules	**Maceração**	*Hexânico*	1	265836	0,0204 #
			2	265684	0,0204 #
			3	263320	0,0203 #
		Acetônico	1	70145	$6{,}3224 \times 10^{-3}$ *
			2	70141	$6{,}3221 \times 10^{-3}$ *
			3	69512	$6{,}2768 \times 10^{-3}$ *
	Fluído supercrítico		1	361299	0,0273
			2	374047	0,0282
			3	375526	0,0283

* Valores calculados abaixo do limite de detecção da curva analítica; e
# Valores calculados abaixo do limite de quantificação da curva analítica.

Tabela 9. Concentração da substância T11 presente nos extratos de raízes e caules + raízes oriundos de Imperatriz – MA, obtidos a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta.

Material vegetal	***Método de extração***		***Número da injeção***	***Àrea do pico***	***Concentração (mg/mL)***
Raízes	**Maceração**	*Hexânico*	1	2113718	0,1537
			2	2149047	0,1562
			3	2134160	0,1552
		Acetônico	1	847659	0,0624
			2	813350	0,0599
			3	850848	0,0626
	Fluído supercrítico		1	1638815	0,1195
			2	1692954	0,1234
			3	1691892	0,1233
Caules + raízes	**Maceração**	*Hexânico*	1	214807	0,0168 #
			2	213303	0,0166 #
			3	215379	0,0168 #
	Fluído supercrítico		1	292875	0,0224
			2	294958	0,0225
			3	295145	0,0225

Valores calculados abaixo do limite de quantificação da curva analítica.

A partir da média das concentrações da substância T11, encontrada nas injeções em triplicatas dos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes, caules e caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG e de Imperatriz - MA, foi possível calcular a quantidade presente desta substância nestes extratos (Tabelas 10 e 11, p. 50).

Tabela 10. Cálculo da massa da substância padrão, T11, contida nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba – MG.

Material vegetal	***Método de extração***		***Concentração média da T11 (mg/mL)***	***Massa de T11 calculada no extrato (g)***	***% de T11 calculada no extrato***
Raízes	**Maceração**	*Hexânico*	0,1159	0,4212	11,3667
		Acetônico	0,0524	0,1873	5,0385
	Fluído Supercrítico		0,0877	0,0519	7,9727
Caules	**Maceração**	*Hexânico*	0,0204	0,0665	1,8889 #
		Acetônico	$6,307 \times 10^{-3}$	0,0483	0,5840 *
	Fluído Supercrítico		0,0279	$1,4026 \times 10^{-3}$	2,5364

* Valores calculados abaixo do limite de detecção da curva analítica; e
# Valores calculados abaixo do limite de quantificação da curva analítica.

Tabela 11. Cálculo da massa da substância padrão, T11, contida nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes e caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz - MA.

Material vegetal	***Método de extração***		***Concentração média da T11 (mg/mL)***	***Massa de T11 calculada no extrato (g)***	***% de T11 calculada no extrato***
Raízes	**Maceração**	*Hexânico*	0,1551	0,2133	14,9135
		Acetônico	0,0616	0,0689	5,6000
	Fluído Supercrítico		0,1221	0,0278	11,7404
Caules + raízes	**Maceração**	*Hexânico*	0,0167	0,0335	1,6535 #
	Fluído Supercrítico		0,0225	3,0310	2,1635

Valor calculado abaixo do limite de quantificação da curva analítica.

Com relação a quantificação via T11, podemos observar que houve o mesmo comportamento quando comparado a quantificação via T15, ou seja, os extratos hexânicos obtidos por maceração de raízes de ambas as regiões, Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, são mais ricos em T11 do que seus respectivos extratos obtidos por fluído supercrítico. E como relatado anteriormente, o extrato obtido por fluído supercrítico de caules apresentou-se mais rico em T11 quando comparado ao extrato hexânico obtido por maceração, isto indica que a extração por fluído supercrítico é mais seletiva para a obtenção de lignanas para este tipo de material vegetal.

4.3.2.1 Análise por CLAE-EM dos extratos quantificados com T11

Nas Figuras 23 a 26 (p. 51 a 54) estão as análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE–EM/IES), dos extratos quantificados com a substância T11 nas mesmas condições utilizadas para a substância padrão T15.

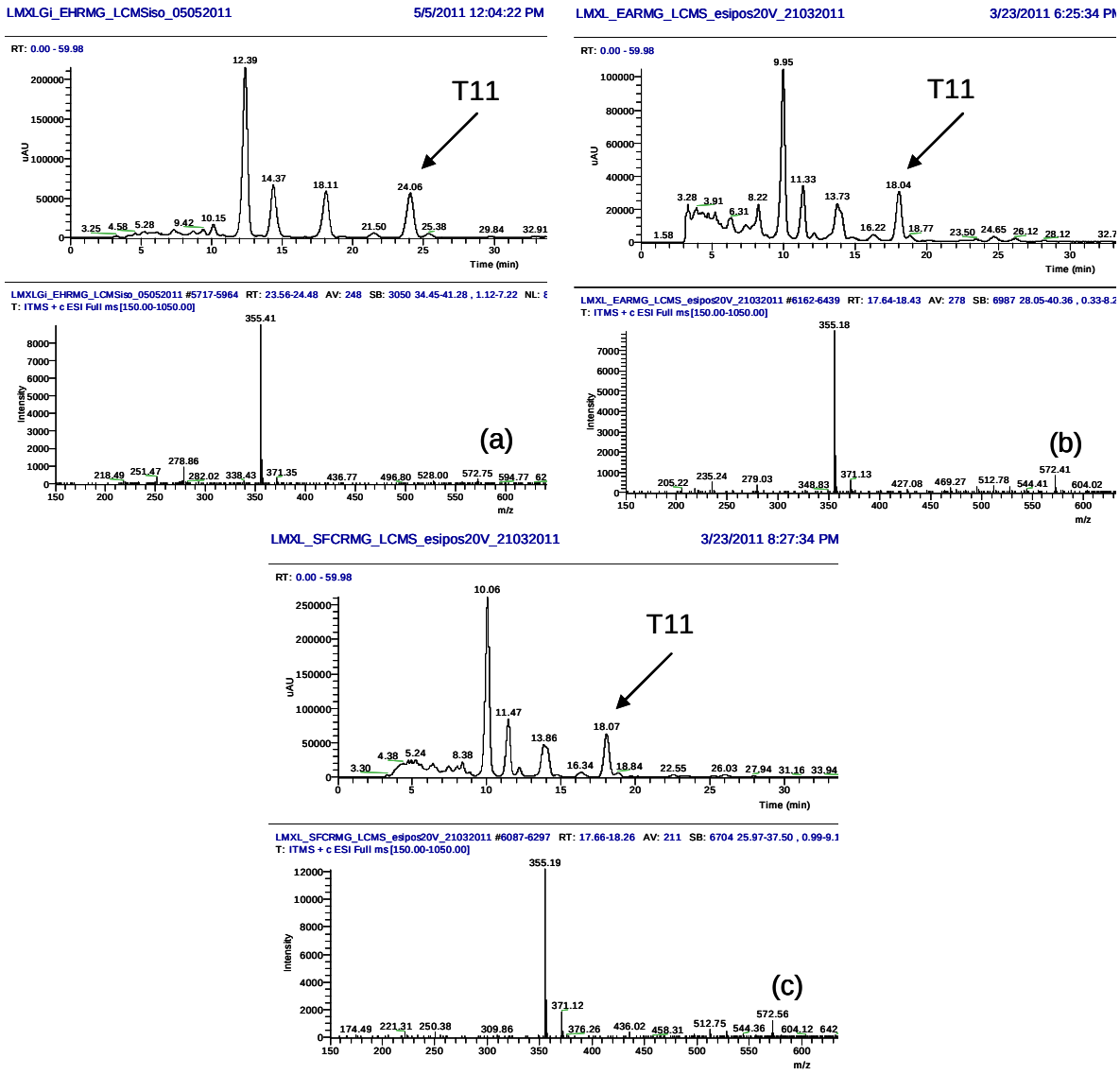


Figura 23. Cromatograma e espectro de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, obtidos por maceração; e (c) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Ituiutaba - MG. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

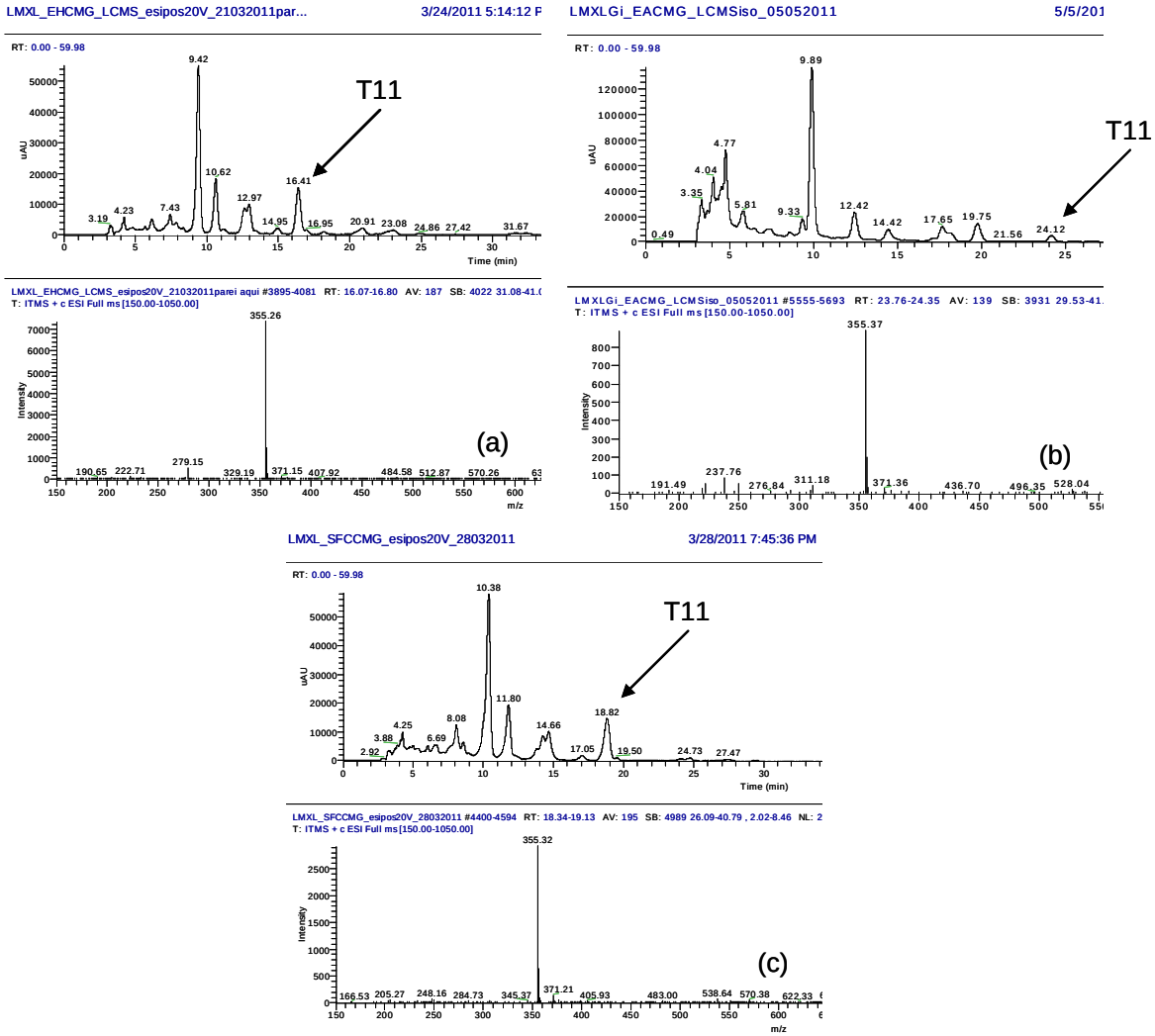


Figura 24. Cromatograma e espectro de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, obtidos por maceração; e (c) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules de *H. reniformis* oriundos de Ituiutaba - MG. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

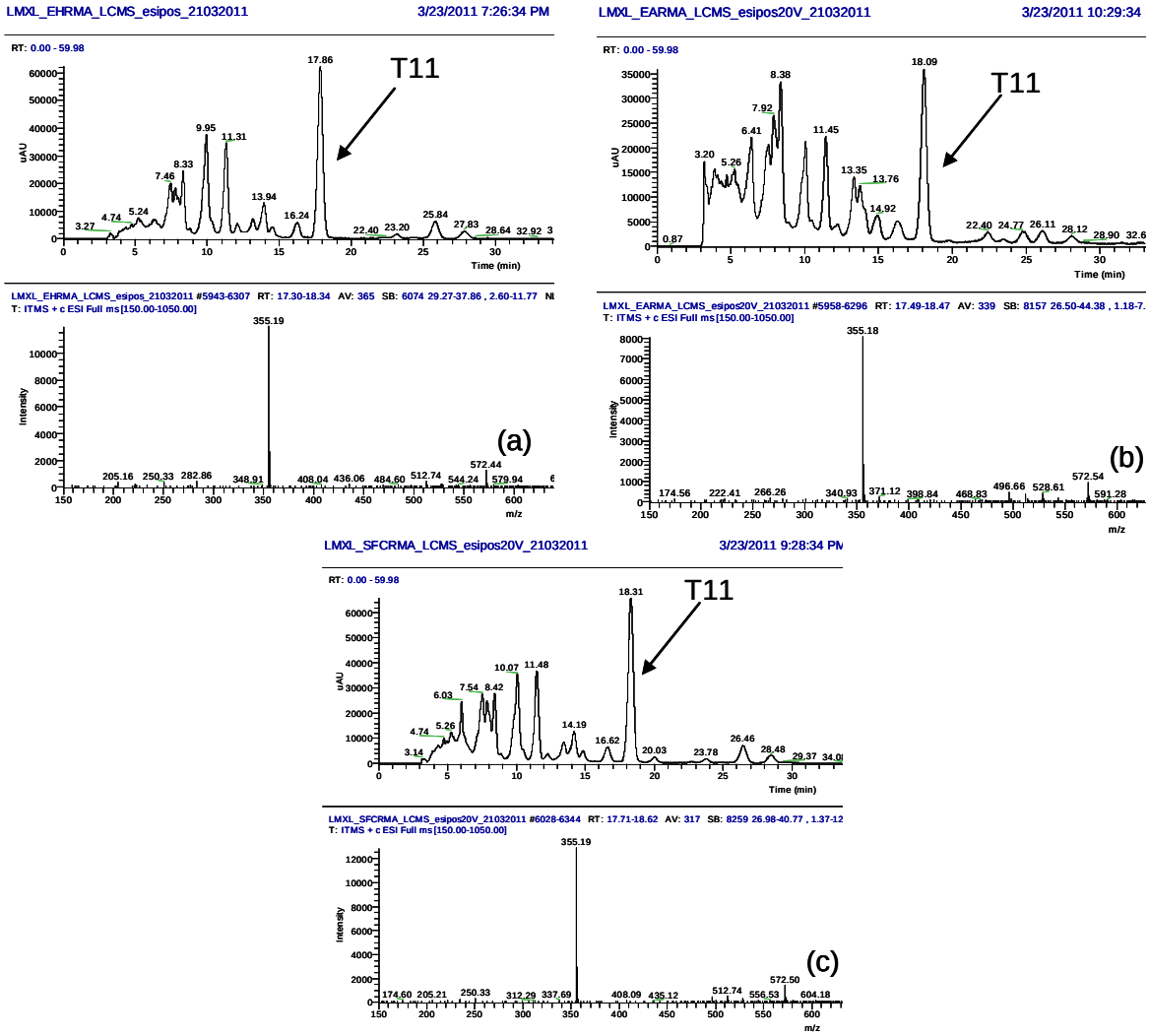


Figura 25. Cromatograma e espectro de massas dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, obtidos por maceração; e (c) extrato obtido por fluído supercrítico, de raízes de *H. reniformis* oriundas de Imperatriz - MA. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

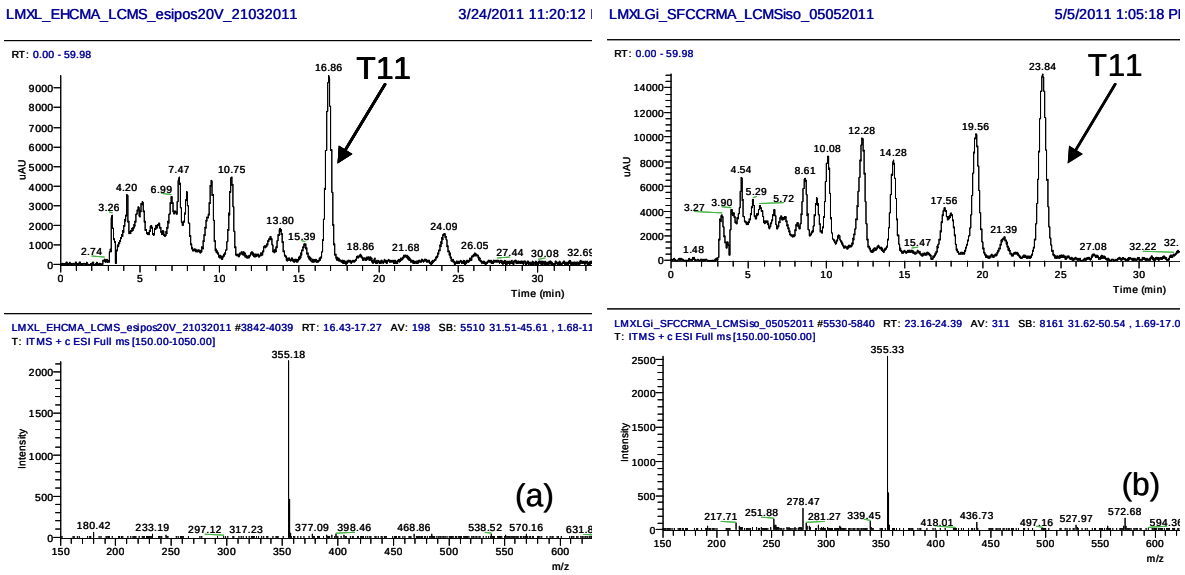


Figura 26. Cromatograma e espectro de massas dos extratos: (a) hexânico, obtido por maceração; e (b) extrato obtido por fluído supercrítico, de caules + raízes de *H. reniformis* oriundos de Imperatriz - MA. Condições do CLAE–EM: coluna C-18, 5 µm, fase móvel MeOH:H_2O 7:3, vazão 0,8 mL/min, detector UV: 254 nm.

Nas Figuras 23 a 26, observa-se que no tempo de retenção em que se encontra a substância padrão T11 (em torno de 18 a 21 min), o íon *quasi*-molecular obtido para os extratos quantificados de raízes, caules e caules + raízes obtidos por maceração e por fluído supercrítico oriundos de Ituiutaba – MG e de Imperatriz – MA, foi o mesmo obtido para a substância pura, ou seja, o íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ com *m/z* 355, confirmando a presença que a substância quantificada foi a T11, como apresentado na literatura [21].

4.4 Análise dos extratos quantificados por CG-EM

Em complemento às análises realizadas anteriormente e para maior esclarecimento sobre a composição das substâncias presentes nos extratos quantificados com as lignanas T15 e T11, foram realizadas análises por CG-EM, nas Tabelas 12 e 13 (p. 56 e 57) é dada a identificação dos constituintes químicos que foi realizada com base no índice de retenção linear (índice de Kovats, *I*) [22, 23] calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos utilizando a equação:

$$I = n + 100\,[(\log TR_{(c)} - \log TR_{(a)}) / (\log TR_{(p)} - \log TR_{(a)})]$$

onde:

n= 100 x o número de carbonos do padrão anterior;

$TR_{(c)}$= tempo de retenção ajustado para o composto;

$TR_{(a)}$= tempo de retenção ajustado para o padrão anterior;

$TR_{(p)}$= tempo de retenção ajustado para o padrão posterior.

e por comparação dos espectros de massas com os espectros obtidos de amostras autênticas, com dados disponíveis em bibliotecas como NIST/EPA/NIH Mass Espectral DataBase (NIST08) [24], bem como os dados publicados por Adams (2009) [25]. A análise semiquantitativa foi feita pela medida da área dos picos (fornecida automaticamente pelo equipamento).

Tabela 12. Constituintes químicos presentes nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de raízes provenientes de MG e MA.

I	***Composto***	***EHR (MG)***	***SFE R (MG)***	***EAR (MG)***	***EHR (MA)***	***SFE R (MA)***	***EAR (MA)***
1652	*Davanol*	2,33	2,96				
1659	*Bulnesol*			**42,85**			
1912	*Èster metílico do ácido palmítico*						
1950	*Ácido palmítico*						
1981	*Éster etílico do ácido palmítico*				5,88		
2076	*Èster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico*						
2084	*Èster metílico do ácido 9-octadecenóico*						
2125	*Ácido oléico*						
2152	*Éster etílico do ácido oléico*						
2500	*Pentacosano*						
2600	*Hexacosano*					4,19	
2651	*Hidrocarboneto alifático do Hexacosano*						
2692	*Lignana furânica (Pi Ve)*						
2700	*Heptacosano*					10,48	
2709	*Lignana ariltetralônica (Pi Ve)*	7,01	5,92				
2713	*Lignana ariltetralônica (4 OMe)*	**44,43**	**45,92**	**57,14**	5,88	7,69	
2721	*Lignana furânica (Pi Ve)*	4,67	5,92		11,76	9,79	
2748	*Lignana ariltetralônica (4 OMe)*	14,03	13,33		11,76	4,93	14,28
2762	*Lignana ariltetralônica (4 OMe)*		5,18				
2766	*Lignana ariltetralônica (Pi Ve)*	27,48	20,73		**64,70**	18,88	**85,71**
2800	*Octacosano*					18,18	
2900	*Nonacosano*					16,78	
3012	*Triacontano*					9,79	
3148	*Hentriacontano*						
3349	*Sitosterol*						
Total		99,95	99,96	99,99	99,98	100,71	99,99

Sendo: **EHR** – Extrato Hexânico de Raízes; **EAR** – Extrato Acetônico de Raízes; **SFE R** – Extrato por Fluído Supercrítico de Raízes; **MG** – Minas Gerais; e **MA** – Maranhão.

Tabela 13. Constituintes químicos presentes nos extratos obtidos por maceração e por fluído supercrítico de caules e de caules + raízes provenientes de MG e MA.

I	***Composto***	***EHC (MG)***	***SFE C (MG)***	***EAC (MG)***	***EHC + R (MA)***	***SFE C + R (MA)***
1652	*Davanol*					
1659	*Bulnesol*					
1912	*Èster metílico do ácido palmítico*	11,76				
1950	*Ácido palmítico*		5,59		22,02	8,86
1981	*Éster etílico do ácido palmítico*	1,96				
2076	*Èster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico*	2,94				
2084	*Èster metílico do ácido 9-octadecenóico*	9,31				
2125	*Ácido oléico*	2,45			16,01	**44,31**
2152	*Éster etílico do ácido oléico*					17,73
2500	*Pentacosano*		0,98			
2600	*Hexacosano*		1,64			
2651	*Hidrocarboneto alifático do Hexacosano*		3,61	7,14		
2692	*Lignana furânica (Pi Ve)*	5,88	1,64			
2700	*Heptacosano*	4,41	7,89	8,92		
2709	*Lignana ariltetralônica (Pi Ve)*	18,62	2,96			
2713	*Lignana ariltetralônica (4 OMe)*	4,41	18,41	8,92		
2721	*Lignana furânica (Pi Ve)*	8,82	1,64		19,99	8,86
2748	*Lignana ariltetralônica (4 OMe)*		6,24		3,89	
2762	*Lignana ariltetralônica (4 OMe)*	17,15				
2766	*Lignana ariltetralônica (Pi Ve)*		12,16		37,99	20,26
2800	*Octacosano*		13,81	30,35		
2900	*Nonacosano*			28,57		
3012	*Triacontano*		11,84	16,07		
3148	*Hentriacontano*		8,22			
3349	*Sitosterol*	12,25	3,89			
Total		99,96	100,52	99,97	99,99	100,02

Sendo: **EHC** – Extrato Hexânico de Caules; **EAC** – Extrato Acetônico de Caules; **SFE C** – Extrato por Fluído Supercrítico de Caules; **C +R** – Caules + raízes; e **MG** – Minas Gerais; e **MA** – Maranhão.

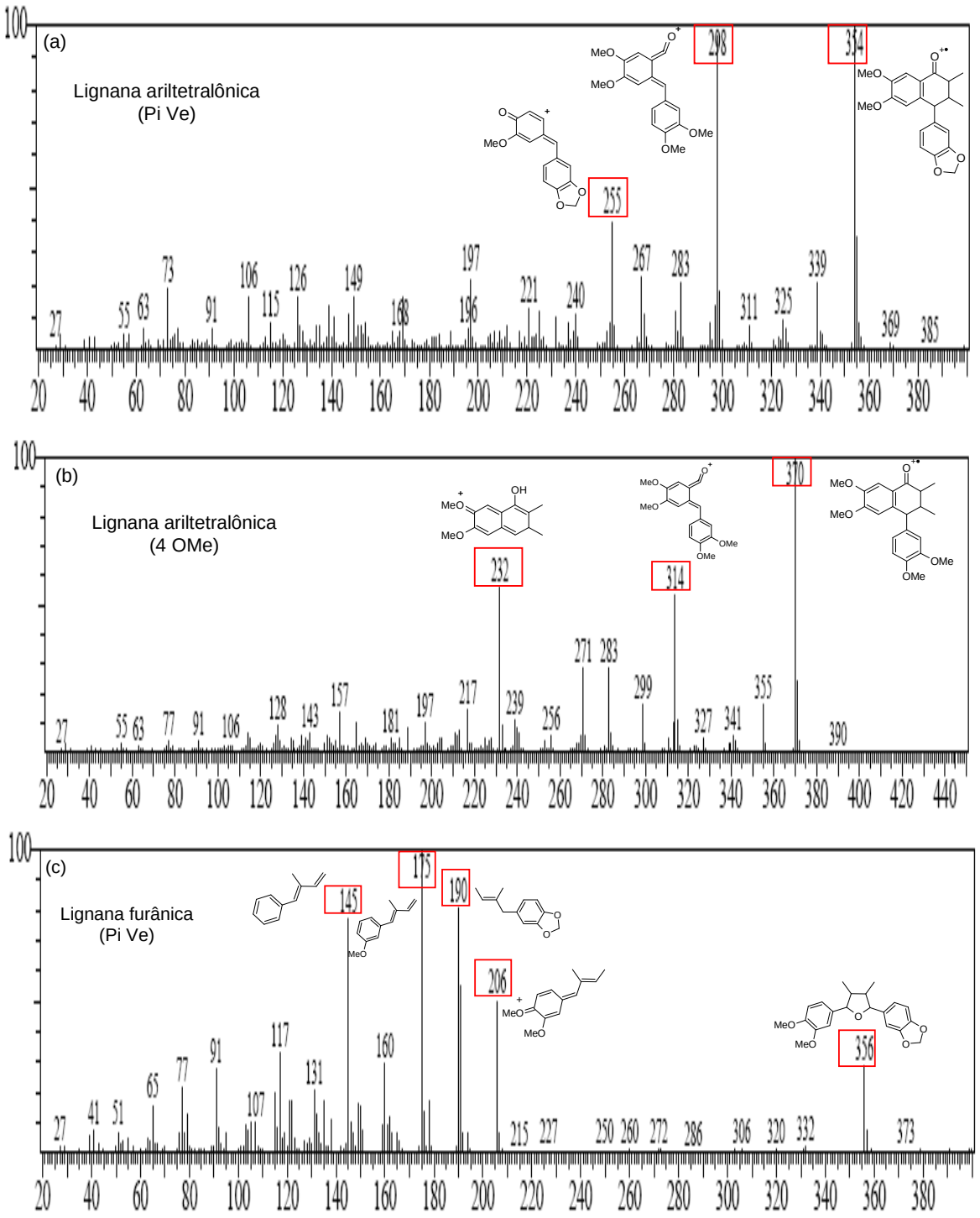


Figura 27. Espectros de CG-EM e respectivas fragmentações típicos de lignanas: (a) ariltetralônica com grupos piperonila e veratrila – Pi Ve; (b) ariltetralônica com quatro grupos metoxílicos – 4 OMe; e (c) furânica com grupos piperonila e veratrila – Pi Ve.

As análises por CG-EM confirmaram a presença das lignanas e também a quantidades em que estas estão presentes em relação a outras substâncias/compostos presentes nos extratos, sendo importante destacar que os extratos de raízes provenientes de ambas as regiões apresentaram uma

maior quantidade de lignanas. Uma análise complementar as das lignanas quantificadas (T15 e T11) podemos estipular que a lignana T15 em maior quantidade nos extratos hexânico e por fluído supercrítico de raízes provenientes de Minas Gerais é a lignana ariltetralônica com quatro grupos metoxílicos e *I* = 2713 s; e nos extratos de raízes provenientes do Maranhão a lignana T11, como sendo a lignana ariltetralônica com grupos piperonila e veratrila e *I* = 2766 s (Figura 27, p. 59). Além das lignanas presentes em grande quantidade nestes extratos, outros compostos que merecem atenção são o Bulnesol, que representa 42,85% no extrato acetônico de raízes oriundas de MG, e o ácido oléico com 44,31% no extrato obtido por fluído supercrítico de caules + raízes oriundos do MA.

5. Considerações Finais

O estudo fitoquímico dos extratos de *Holostylis reniformis* Duch provenientes de ambas as regiões de coleta, Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, obtidos tanto por maceração quanto por fluído supercrítico, evidenciou (pelos espectros de RMN de ^{1}H) a presença de substâncias de interesse para o desenvolvimento deste trabalho, ou seja, as lignanas ariltetralônicas.

A partir das análises cromatográficas verificou-se que os cromatogramas dos extratos dos materiais vegetais provenientes de ambas as regiões de coleta, Ituiutaba – MG e Imperatriz – MA, se assemelham muito em relação à presença de compostos químicos, mas diferem em relação à concentração destes.

Os extratos de raízes obtidos por fluído supercrítico assemelham-se muito aos extratos hexânicos obtidos por maceração, como pôde ser observado tanto pelos seus cromatogramas quanto pelos espectros de RMN de ^{1}H e CLAE-EM. Com relação aos valores das concentrações calculadas na Tabela 6, 10 e 11; estes diferiram muito pouco (cerca de 3 a 4 %). Assim, podemos afirmar que esta metodologia de extração com fluído supercrítico é muito eficiente para o propósito deste trabalho em se tratando de uma metodologia “limpa” para a obtenção de lignanas visando uma futura produção de fitoterápicos. Esta poderá ser adaptada para a obtenção de lignanas utilizando-as em larga escala no futuro.

A quantificação dos extratos a partir das substâncias padrão T15 e T11 foram de suma importância para determinar a concentração destas substâncias nos extratos, assim como poderá ser utilizada posteriormente para quantificar outras lignanas presentes e que possuam as mesmas absorções na região do ultravioleta.

As análises realizadas por CLAE-EM e CG-EM contribuíram tanto para a identificação das lignanas nestes extratos bem como para determinar a quantidade relativa destas substâncias, sendo importante ressaltar que as análises por CG-EM possibilitaram também a identificação da presença de substâncias que não possuem grupos cromóforos, mas que estão presentes nestes.

Os extratos de *H. reniformis* obtidos tanto pelo método de maceração quanto por fluído supercrítico, provenientes tanto de Ituiutaba – MG como de Imperatriz – MA, foram enviados a laboratórios especializados visando a realização de testes biológicos para avaliação das atividades antiplasmódicas.

Referências

1 LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.

2 HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. Rio de Janeiro: Graphicards, 1939. p.105-108.

3 HOEHNE, F. C. **Aristolochiaceae**: flora brasílica s/n. São Paulo: Graphicards, 1942. v. 17.

4 LOPES, L. M. X.; MARTINS, J. A.; PIASENTIN, R. M. Constituintes polares de Aristolochiaceae. **Eclética Química**, v. 16, p. 63-80, 1991.

5 HUBER, H. Aristolochiaceae. In: KUBITZKI, K. The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer, 1993. v. 2, p. 129-137.

6 SILVA, T. **Lignanas ariltetralônicas de *Holostylis reniformis* Duch**: isolamento, síntese biossíntese e avaliação biológica. 2006. 257 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

7 GONZÁLEZ, F. Hacia una filogenia de *Aristolochia* y sus congere neotropicales. **Caldasia**, v. 19, n. 1/2, p. 115-130, 1997.

8 GONZÁLEZ, F. Inflorence morphology and the systematics of Aristolochiaceae. **Systematics and Geography of Plants**, v. 1, p. 639-719, 1999.

9 IWASHINA, T.; KITAJIMA, J.; SHIUCHI, T.; ITOU, Y. Chalcones and other flavonoids from *Asarum sensu lato (Aristolochiaceae*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 571-584, 2004.

10 SILVA, T.; LOPES, L. M. X. Ariltetralone and 7,8-seco-lignans from *Holostylis renifomis*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 751-759, 2004.

11 SINGH, P.; PHILIP, T. A review on the genus *Aristolochia*. **Cromap**, v. 2, p. 208-213,1980.

12 LOPES, M. L. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. 1;11-Diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 751-755, 1982.

13 SILVA, T. **Ligananas ariltetralônicas de *Holostylis reniformis* Duch.(*Aristolochiaceae*)**. 2001. 158 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

14 JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; ROSA, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

15 BALACHANDRAN, S.; KENTISH, S. E.; MAWSON, R. The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 2, p. 94-105, 2006.

16 SIQUEIRA, S.; FALCÃO-SILVA, V. S.; AGRA, M. F.; DARIVA, C.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; FONSECA, M. J. V. Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. Extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 391-397, 2011.

17 COMIN, L. M.; TEMELLI, F.; SALDAÑA, M. A. Supercritical CO_2 extraction of flax lignans. **Journal Americal Oil Chemical Society**, v. 88, p. 707-715, 2011.

18 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

19 NASSER, A. L. M. **Identificação de oligômeros presentes em garrafas PET destinadas ao acondicionamento de água mineral e de suco de fruta**: **desenvolvimento e validação de método analítico**. 2003. 118 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

20 EGYDIO, J. A.; MORAES, A. M.; ROSA, P. T. V. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato juice and characterization of its antioxidation activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 159-164, 2010.

21 MESSIANO, G. B.; SILVA, T.; NASCIMENTO, I. R. ; LOPES, L. M. X. Biosynthesis of antimalarial lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 590-596, 2009.

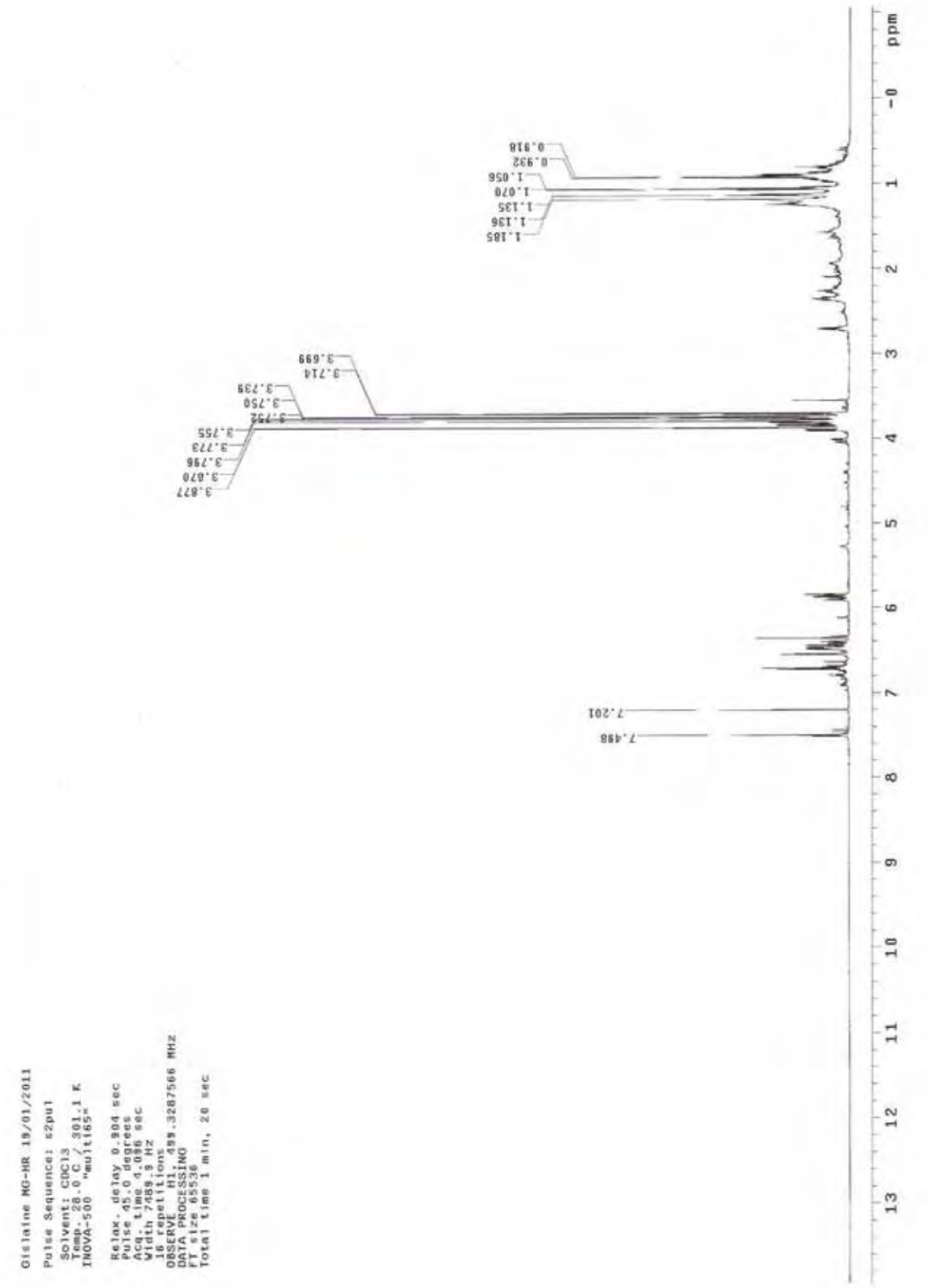
22 VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

23 FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E.; CAPELLARI JUNIOR, L. Classification of *Aristolochia* species base don GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 168-175, 2008.

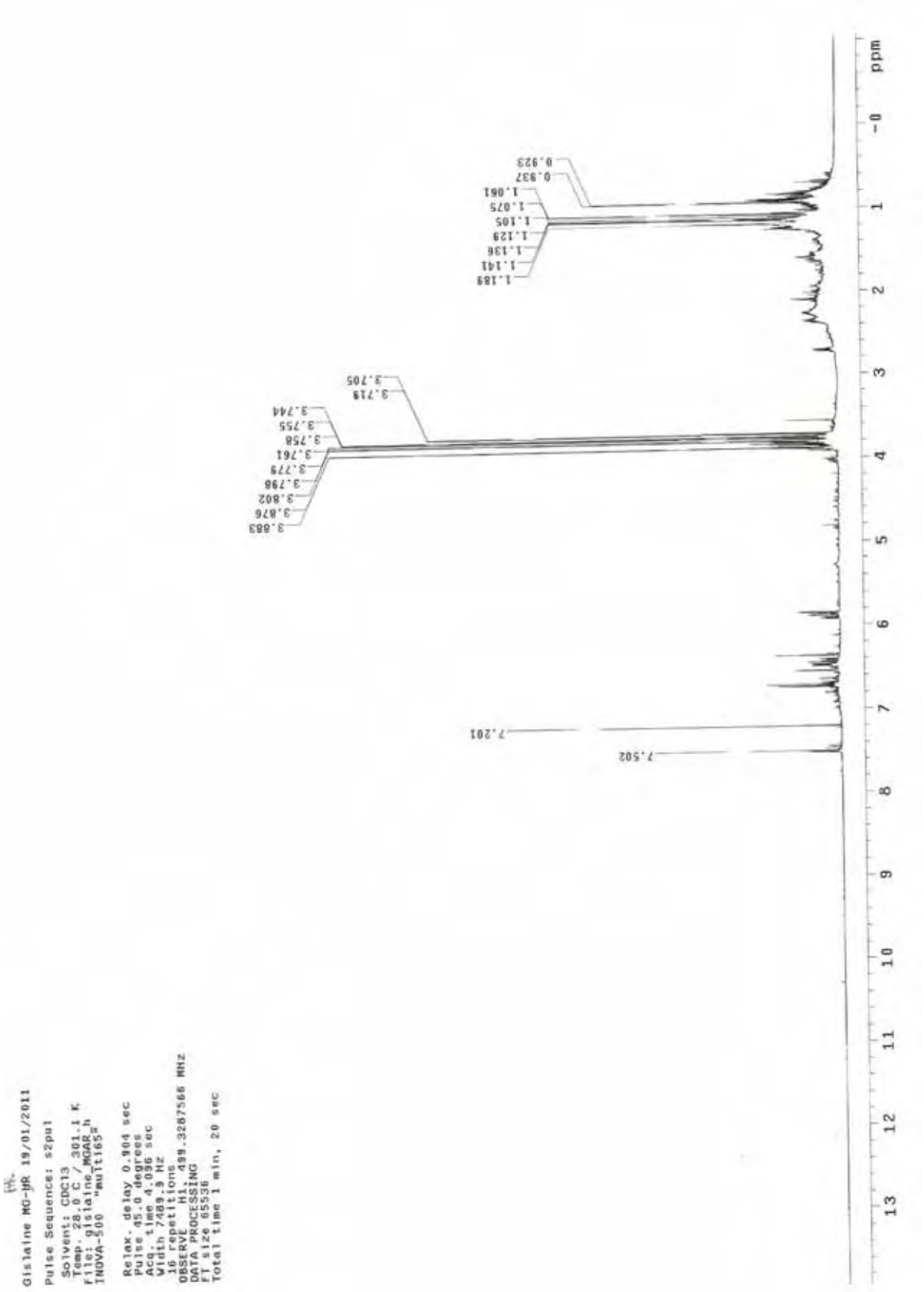
24 MASSADA, Y. **Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, 1976. p. 334.

25 ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Alluredbooks, 2009. p. 469.

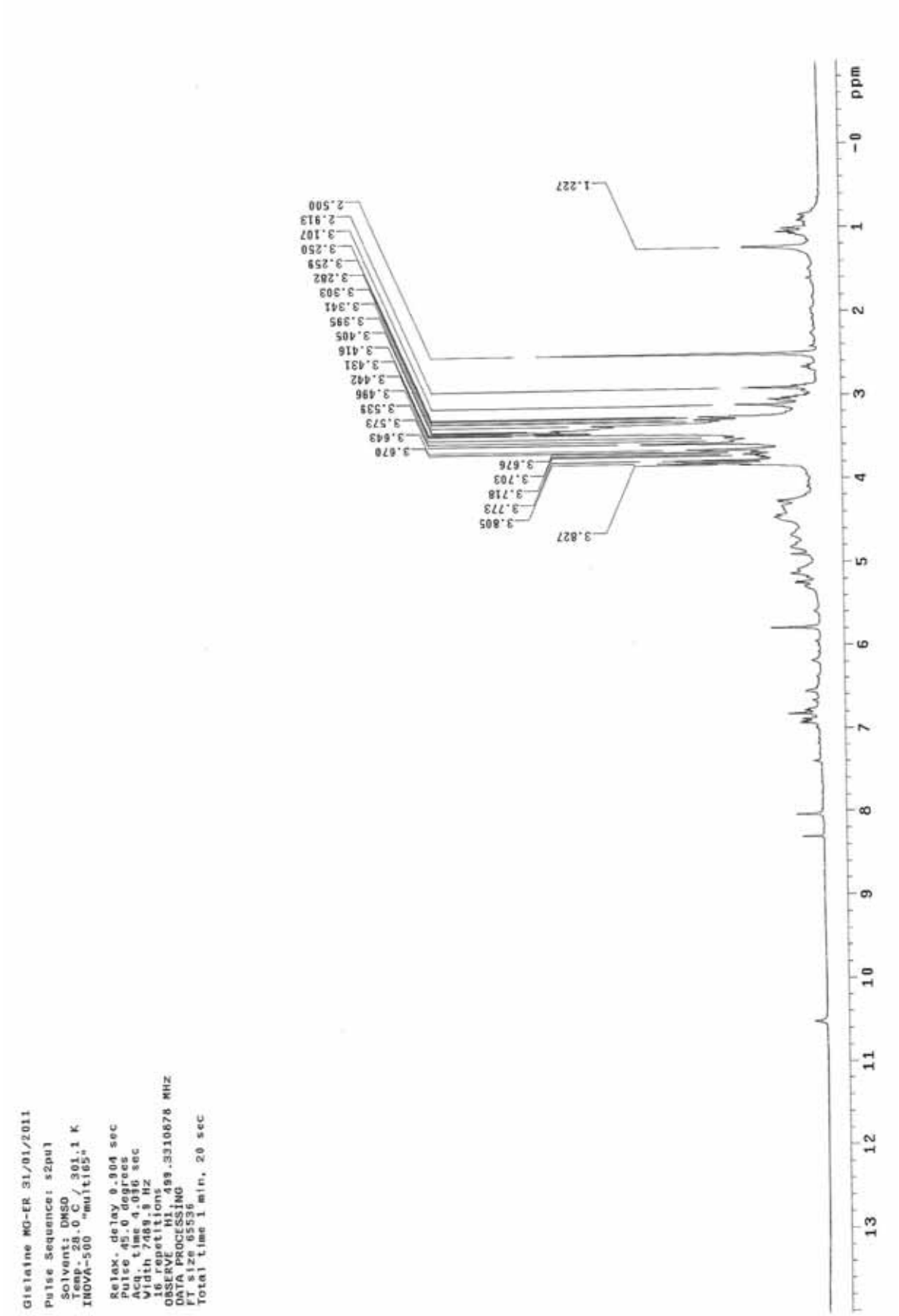
Anexos



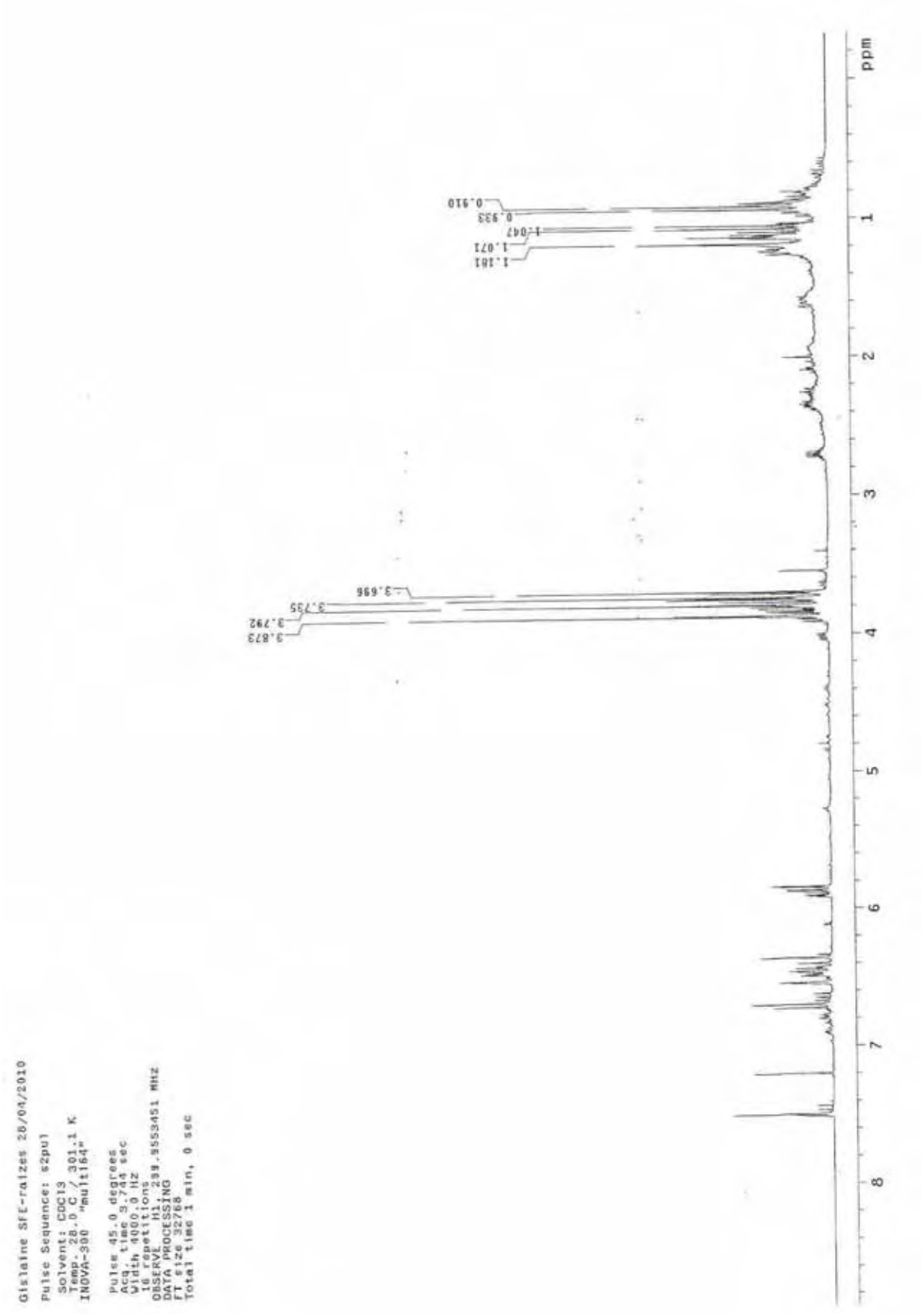
Anexo 1. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato hexânico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



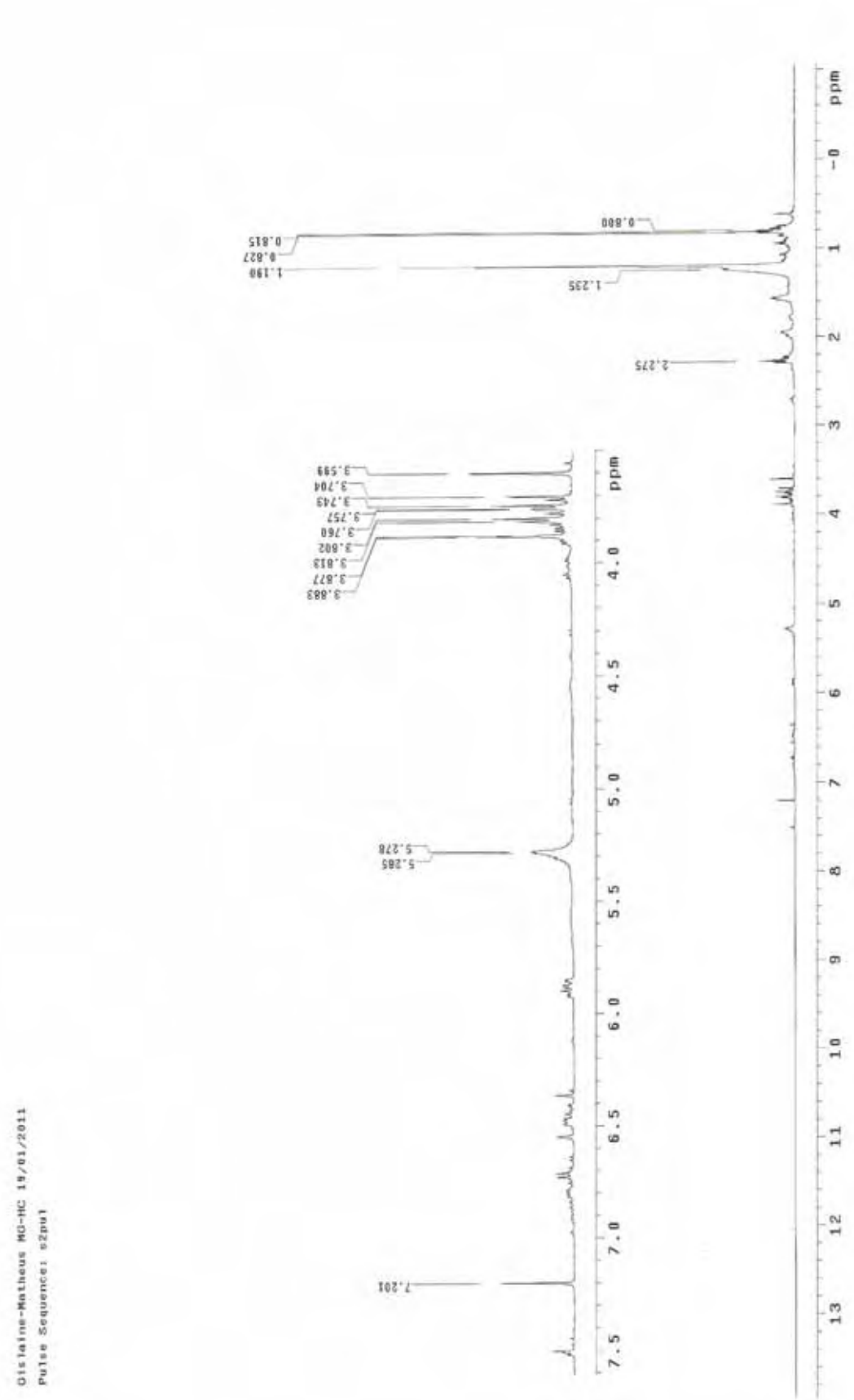
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato acetônico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



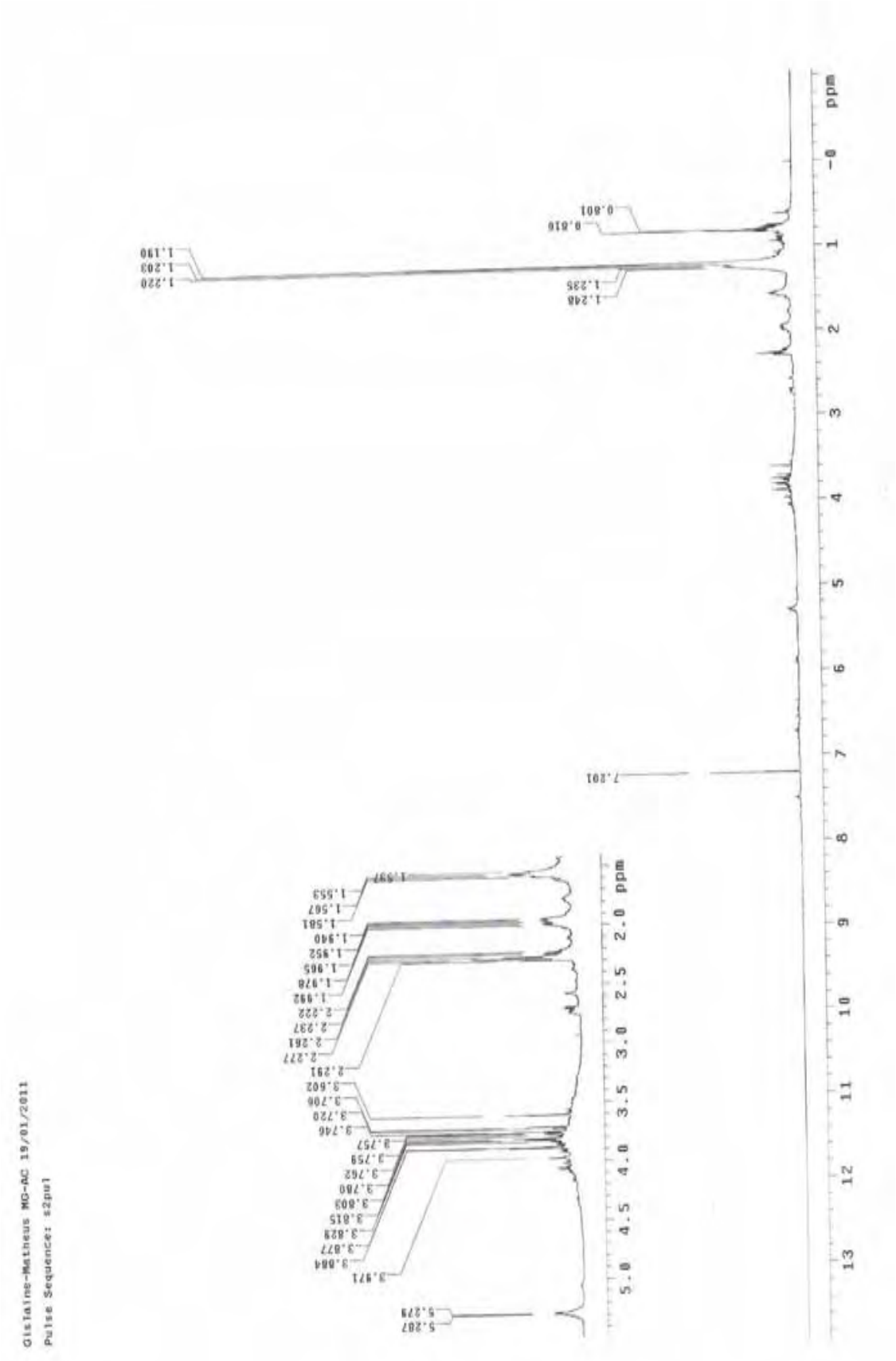
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; DMSO).



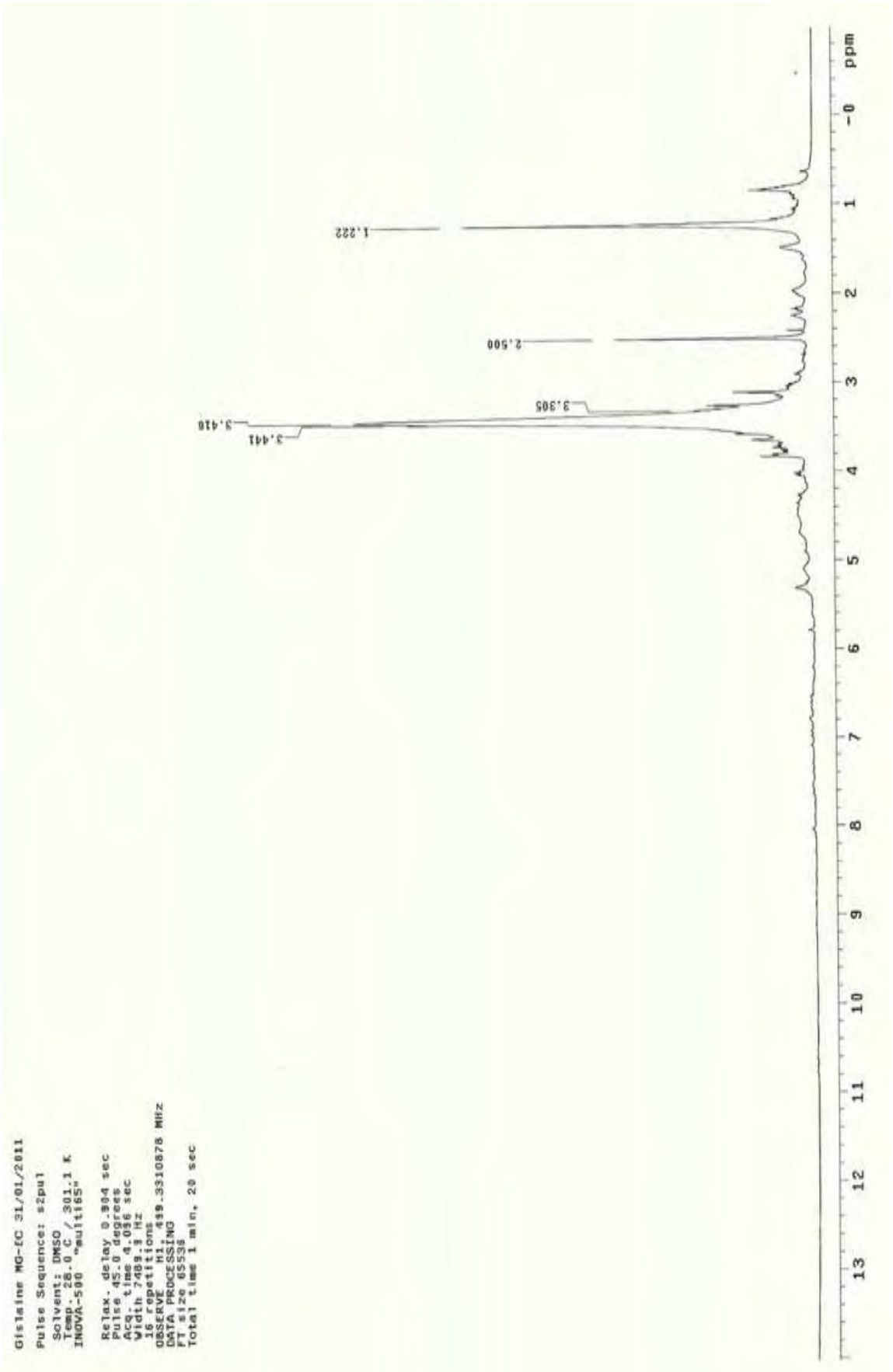
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato obtido por fluído supercrítico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



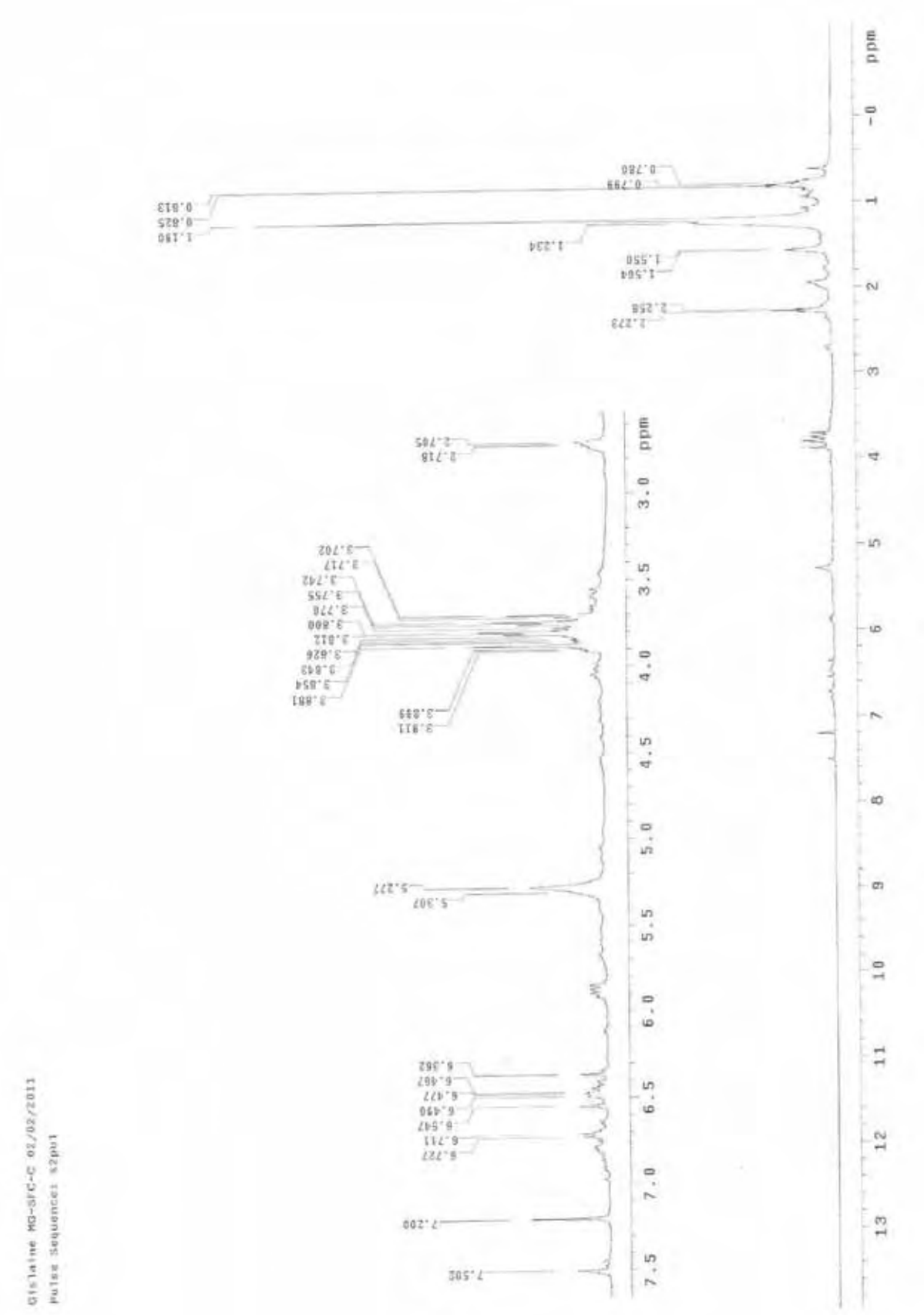
Anexo 5. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato hexânico de caules de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



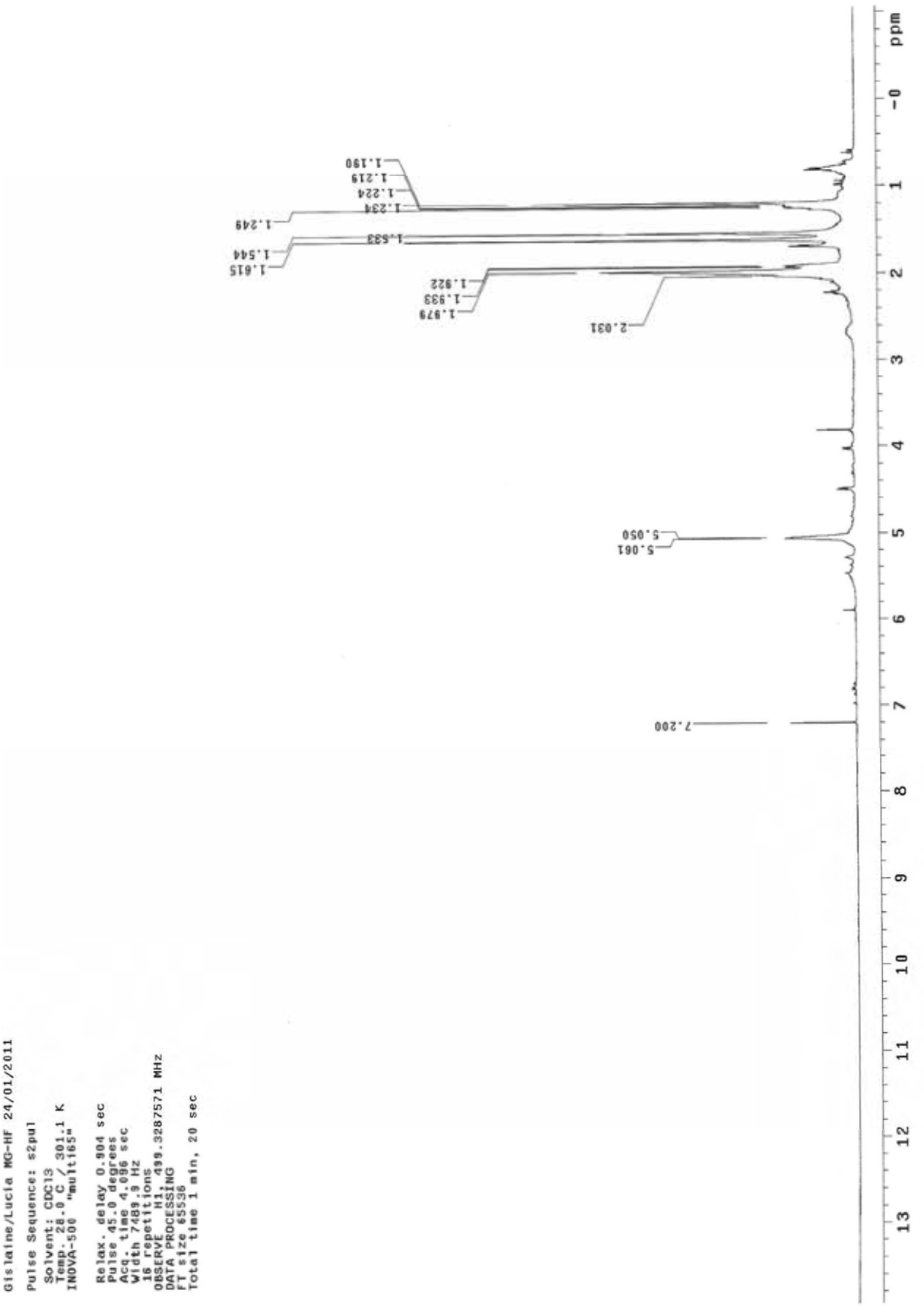
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato acetônico de caules de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



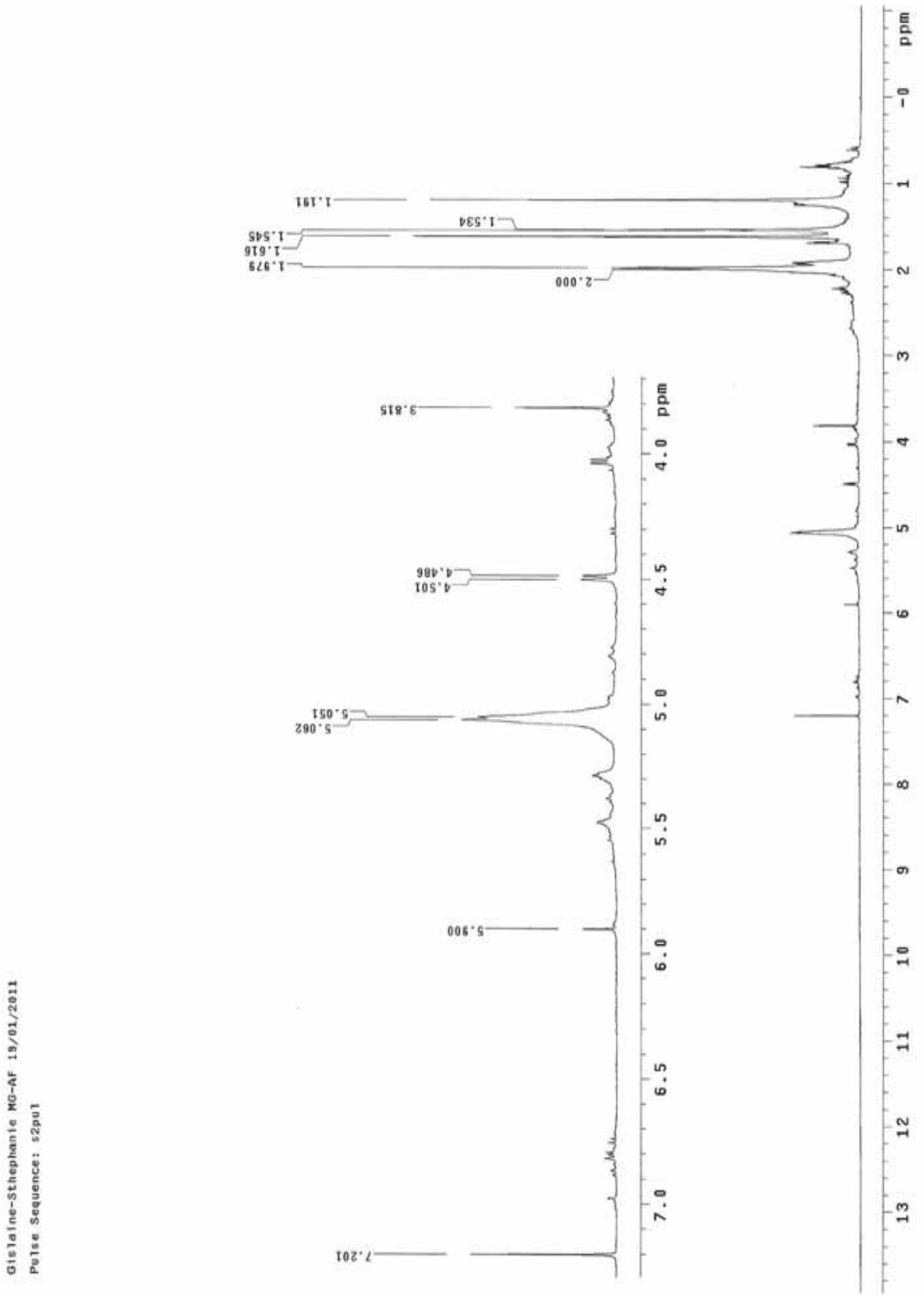
Anexo 7. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de caules de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; DMSO).



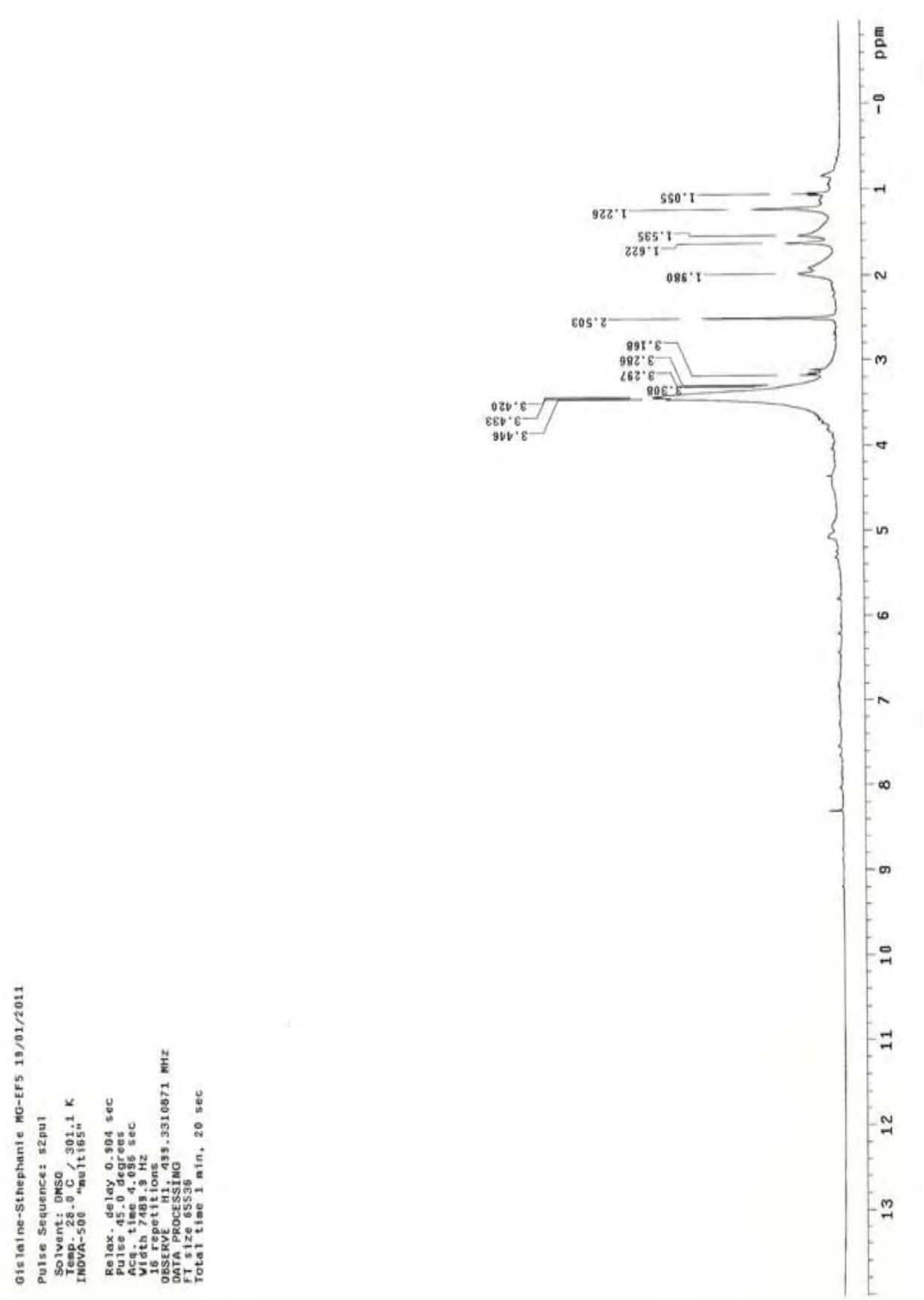
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato obtido por fluído supercrítico de caules de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



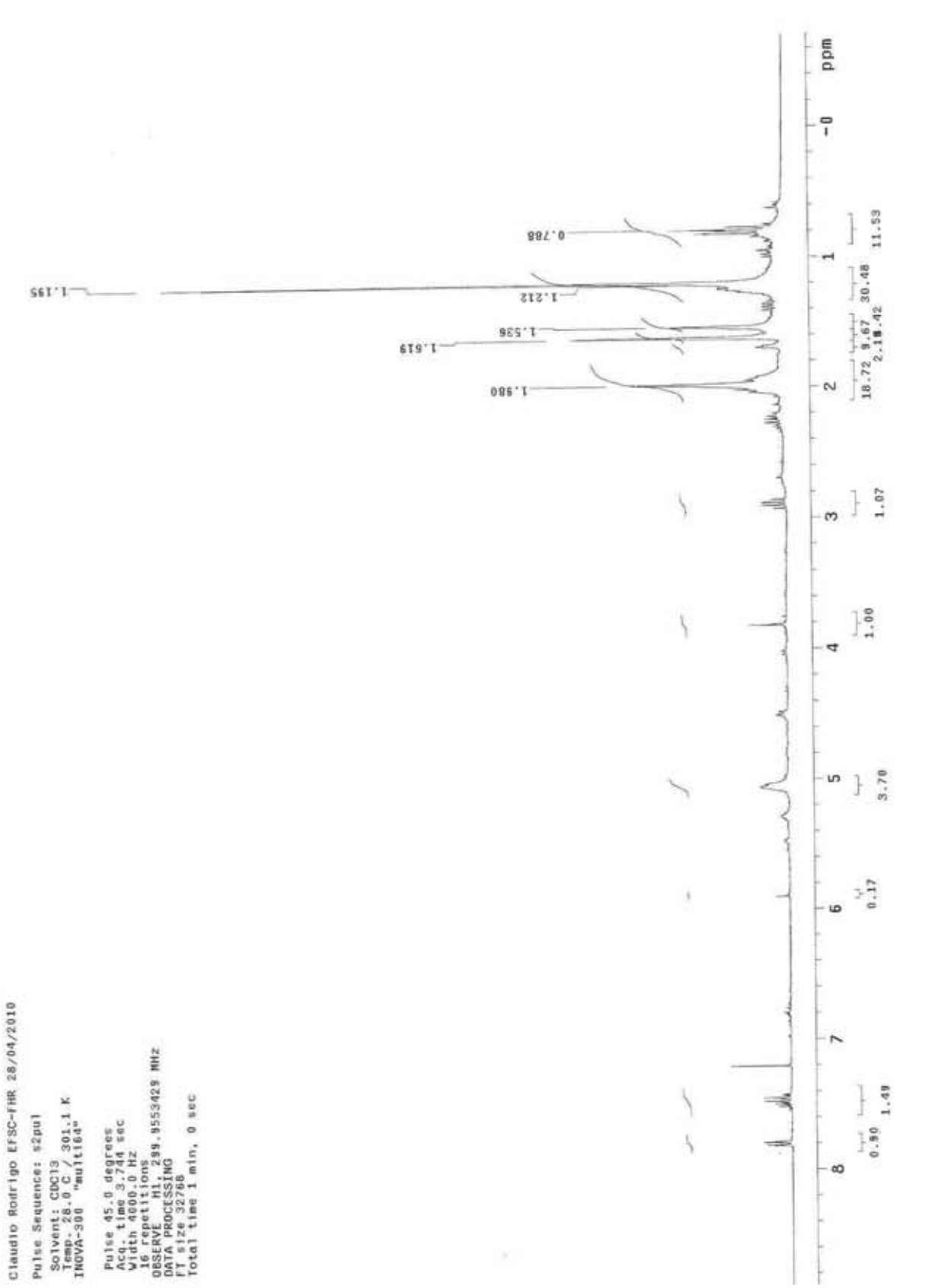
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato hexânico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



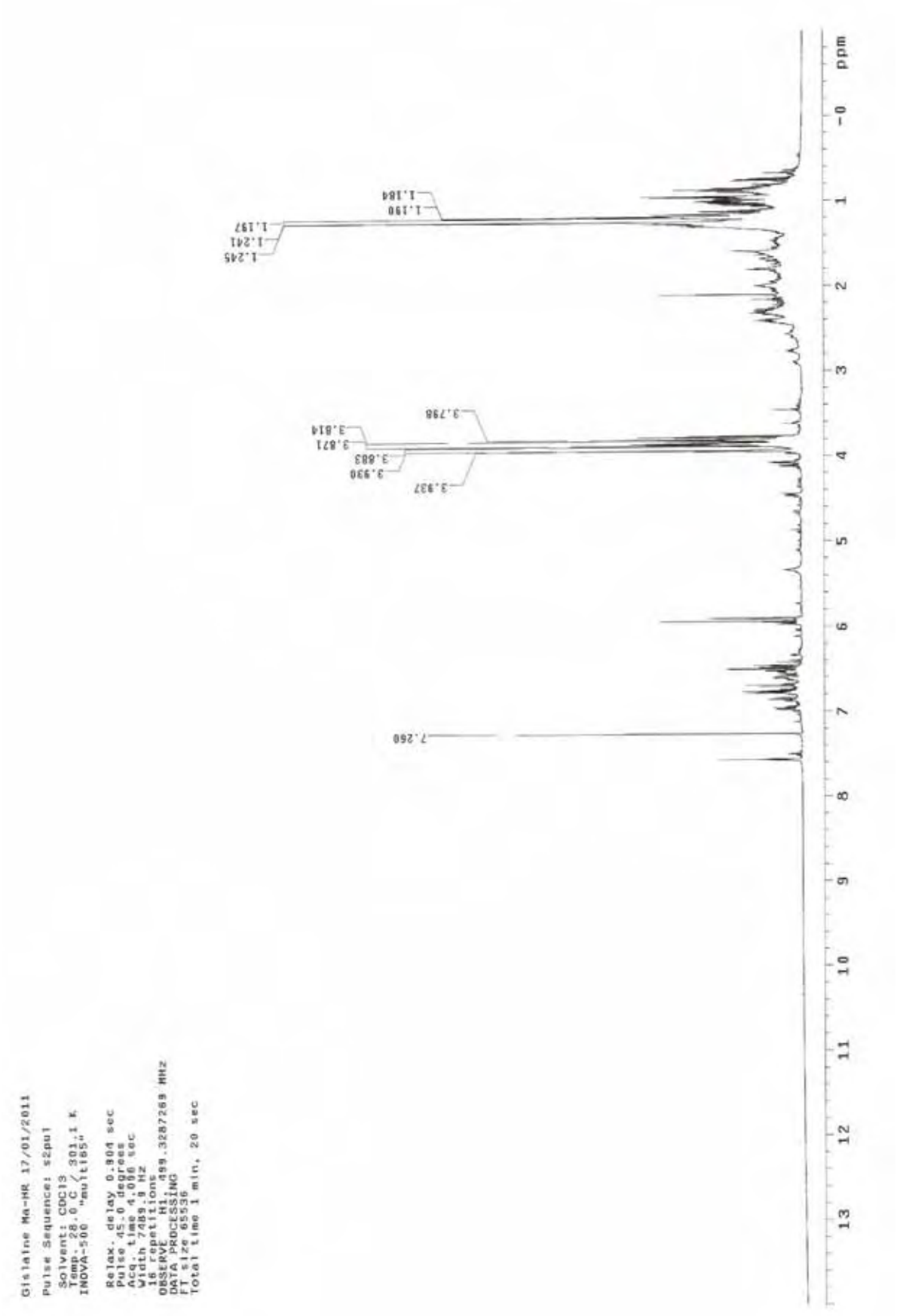
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato acetônico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; $CDCl_3$).



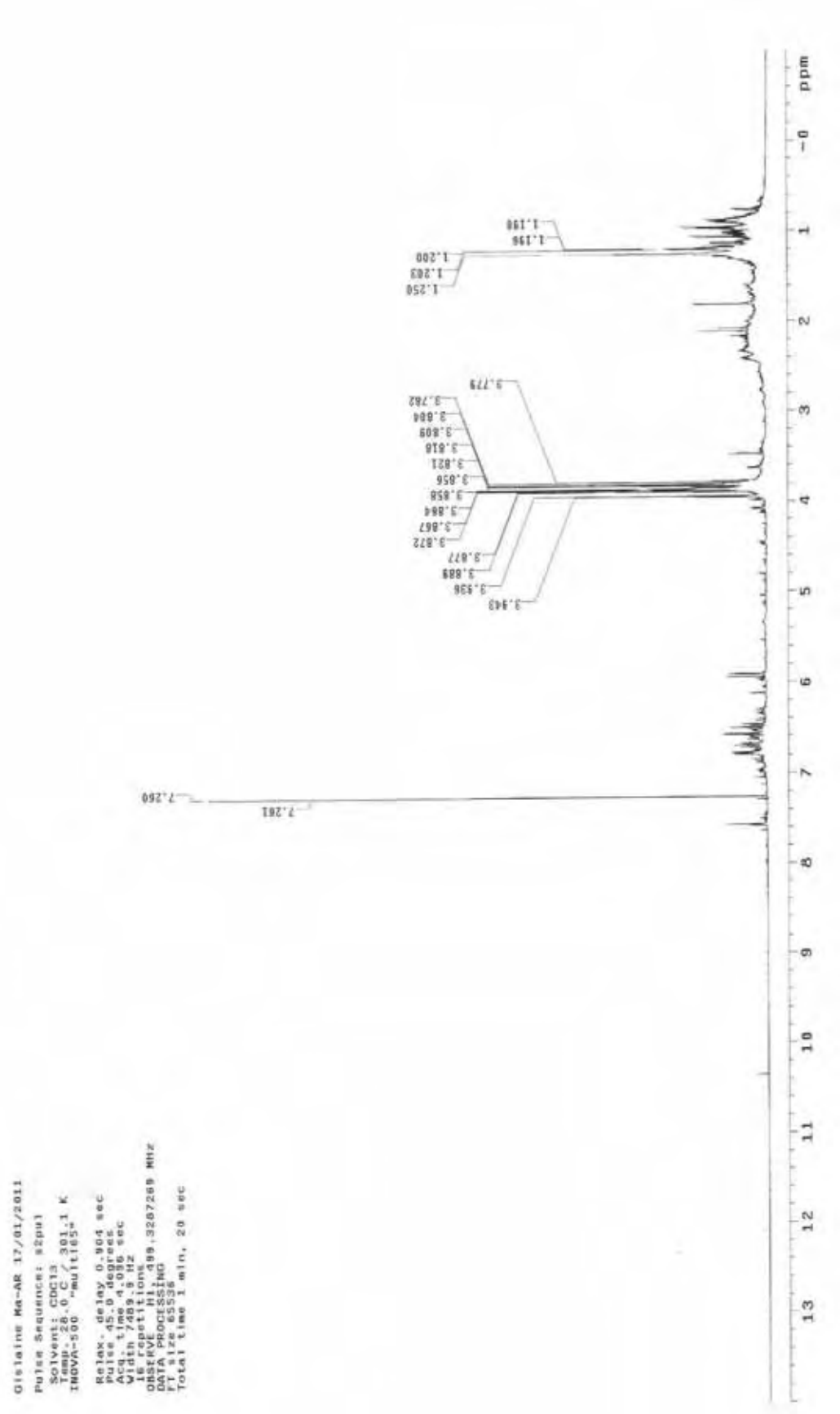
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (11,7 T; DMSO).



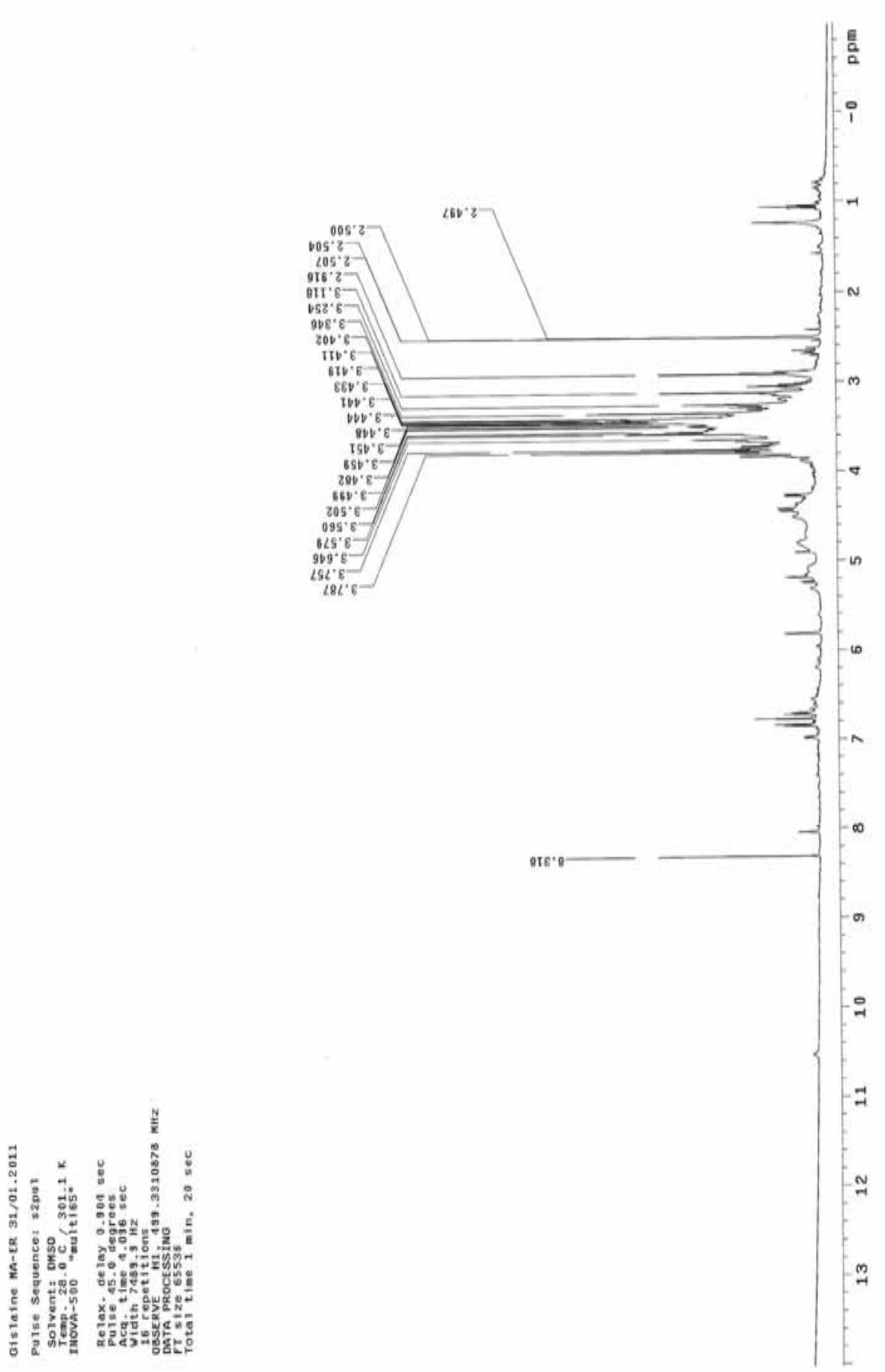
Anexo 12. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato obtido por fluído supercrítico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Ituiutaba – MG (7,0 T; $CDCl_3$).



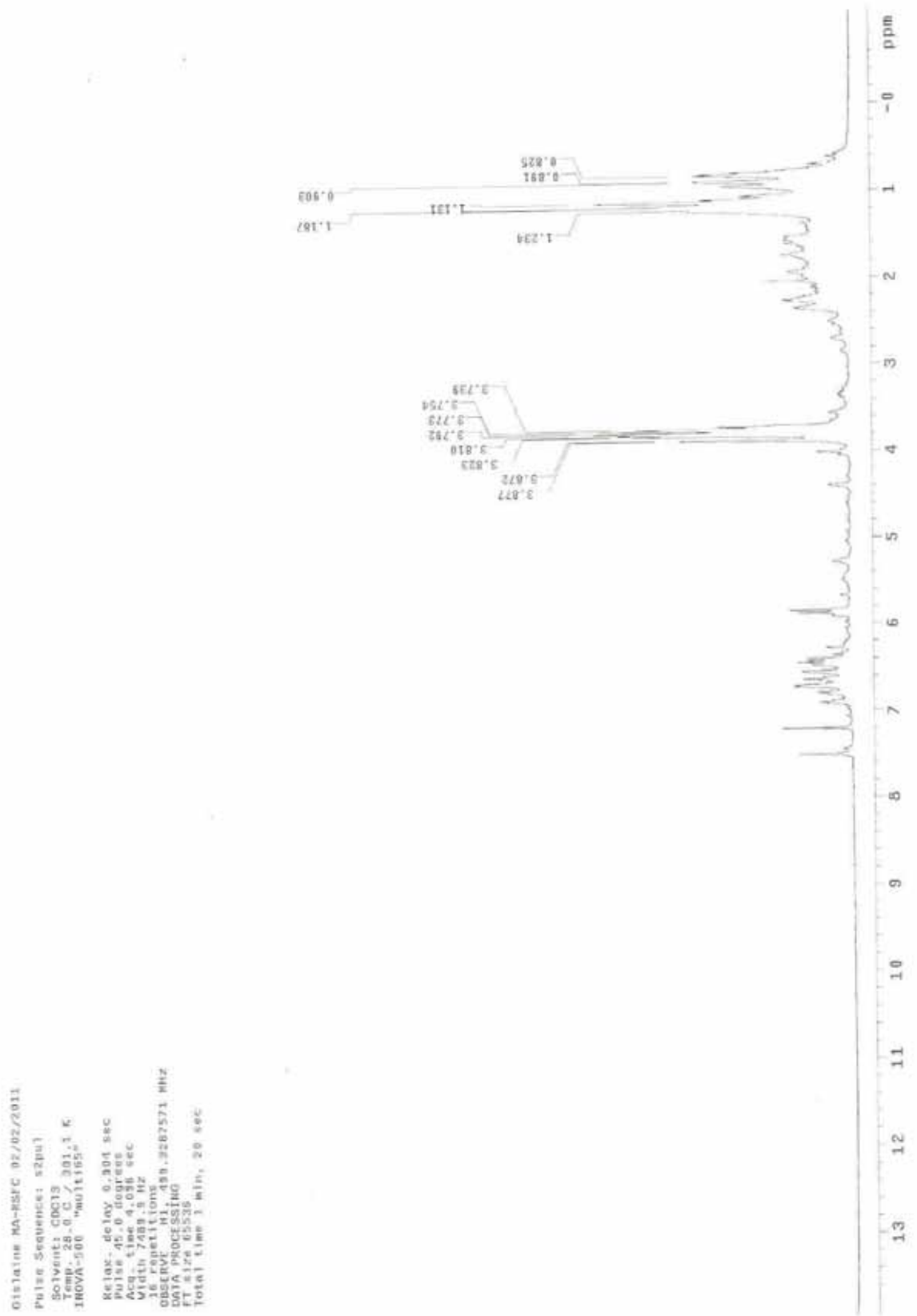
Anexo 13. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato hexânico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



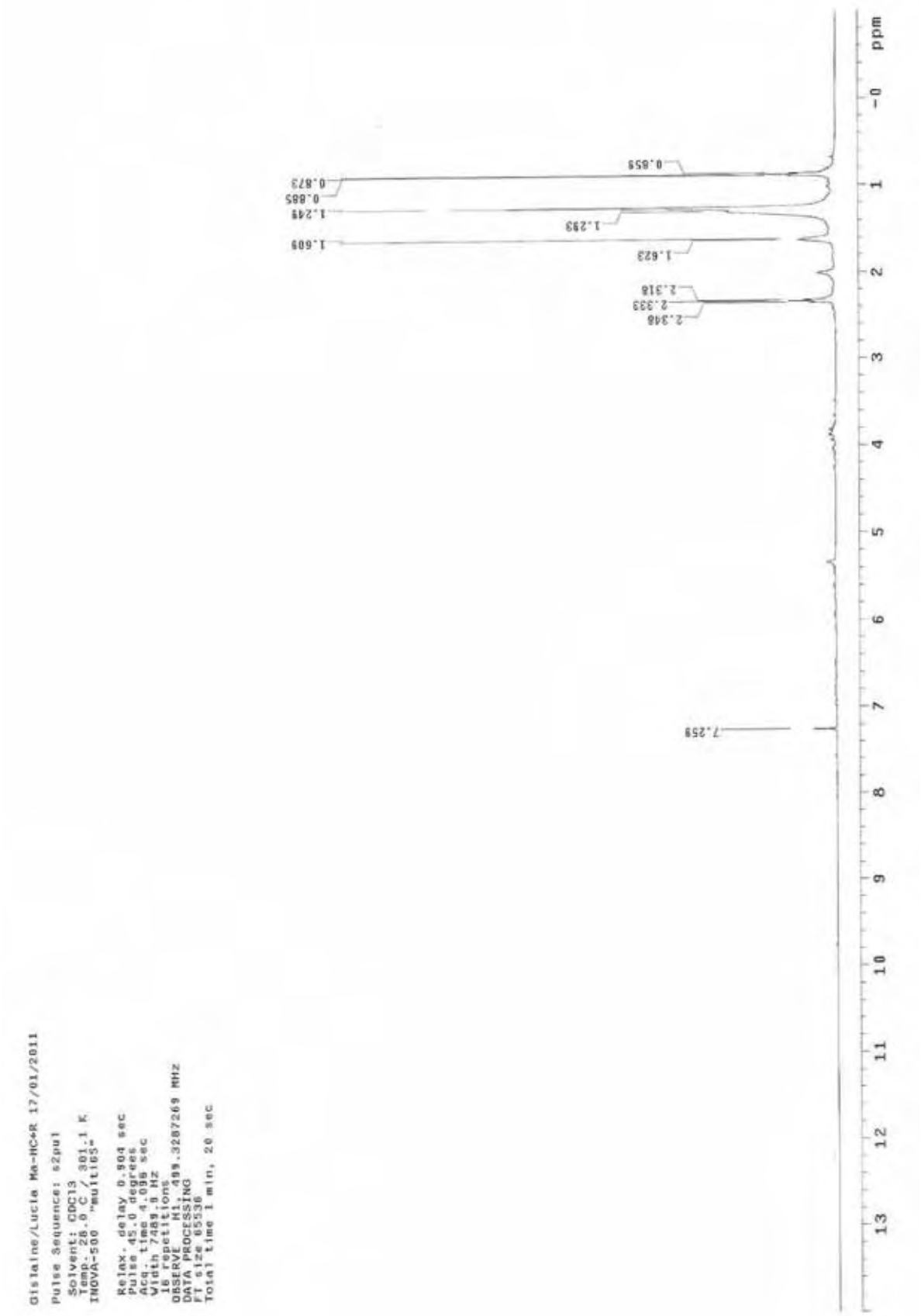
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato acetônico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



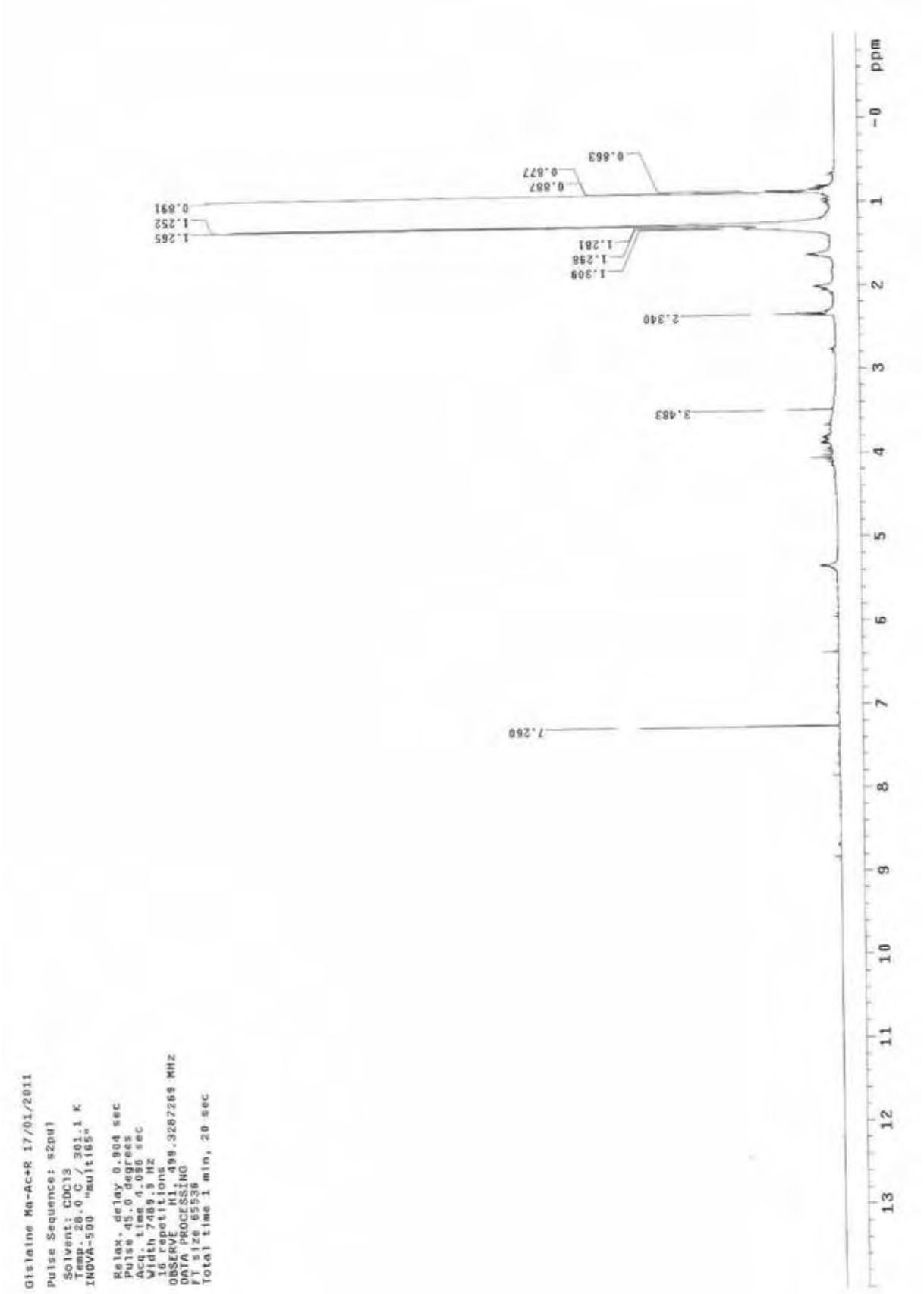
Anexo 15. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; DMSO).



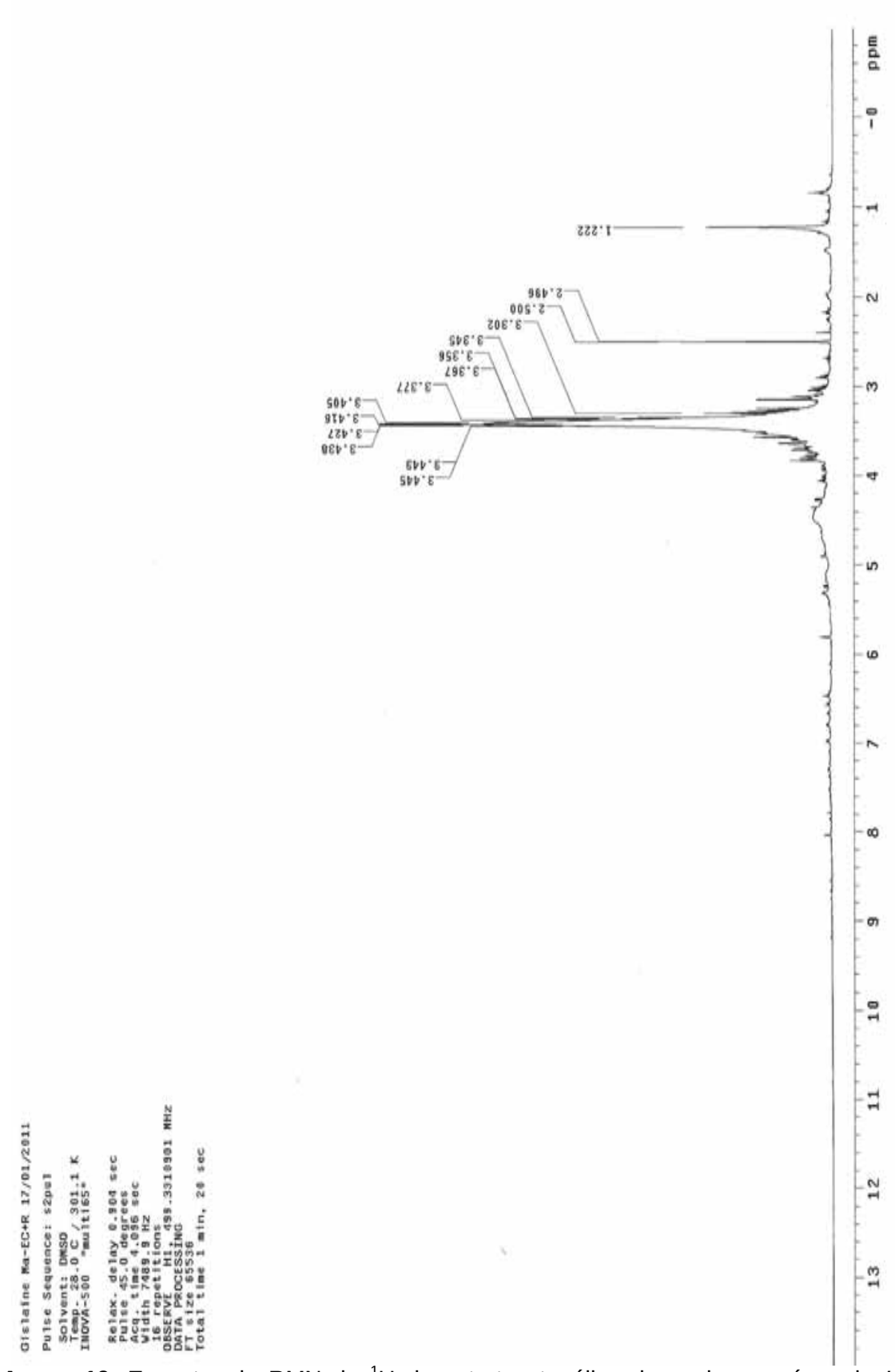
Anexo 16. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato obtido por fluído supercrítico de raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



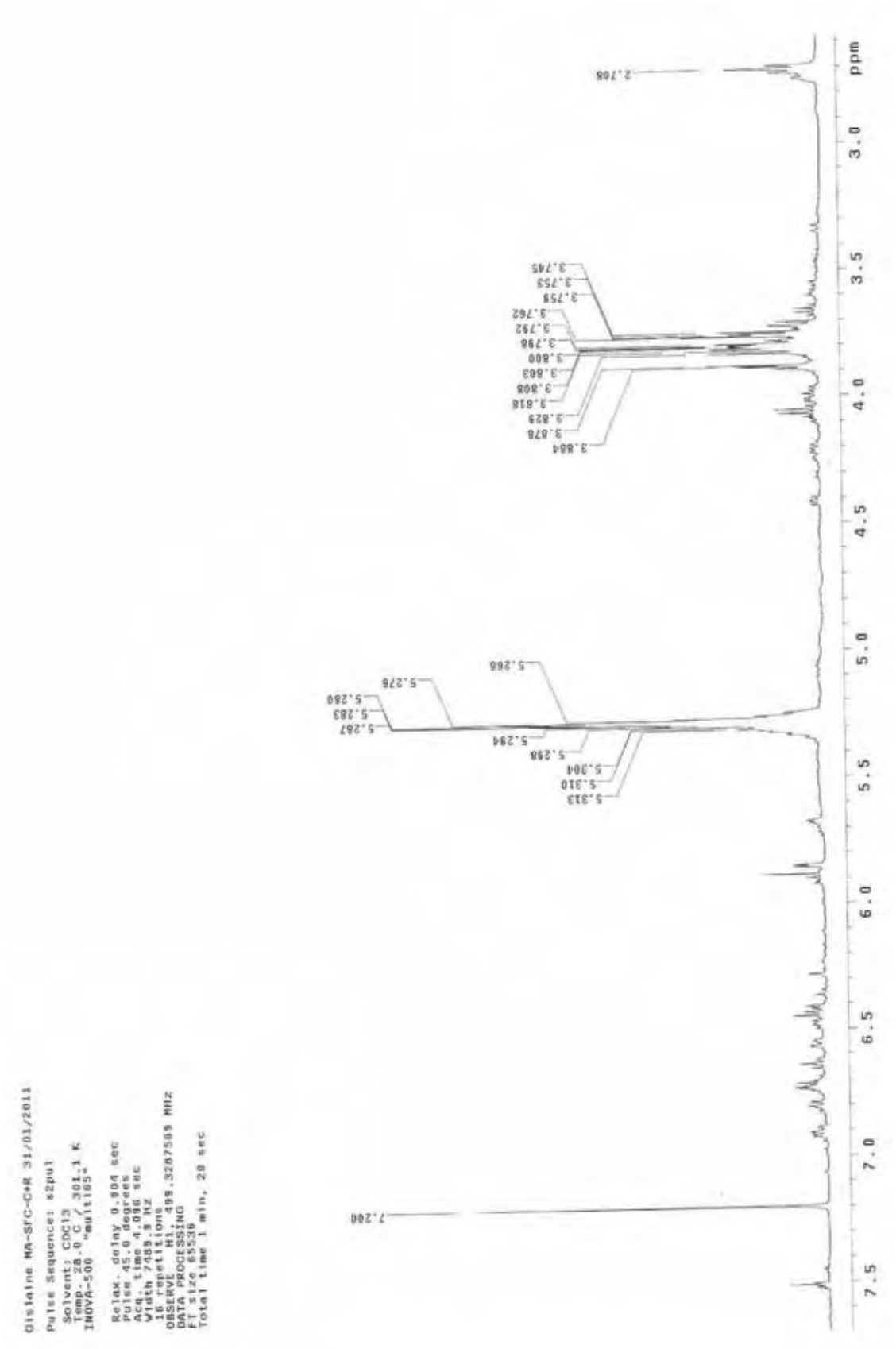
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato hexânico de caules + raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



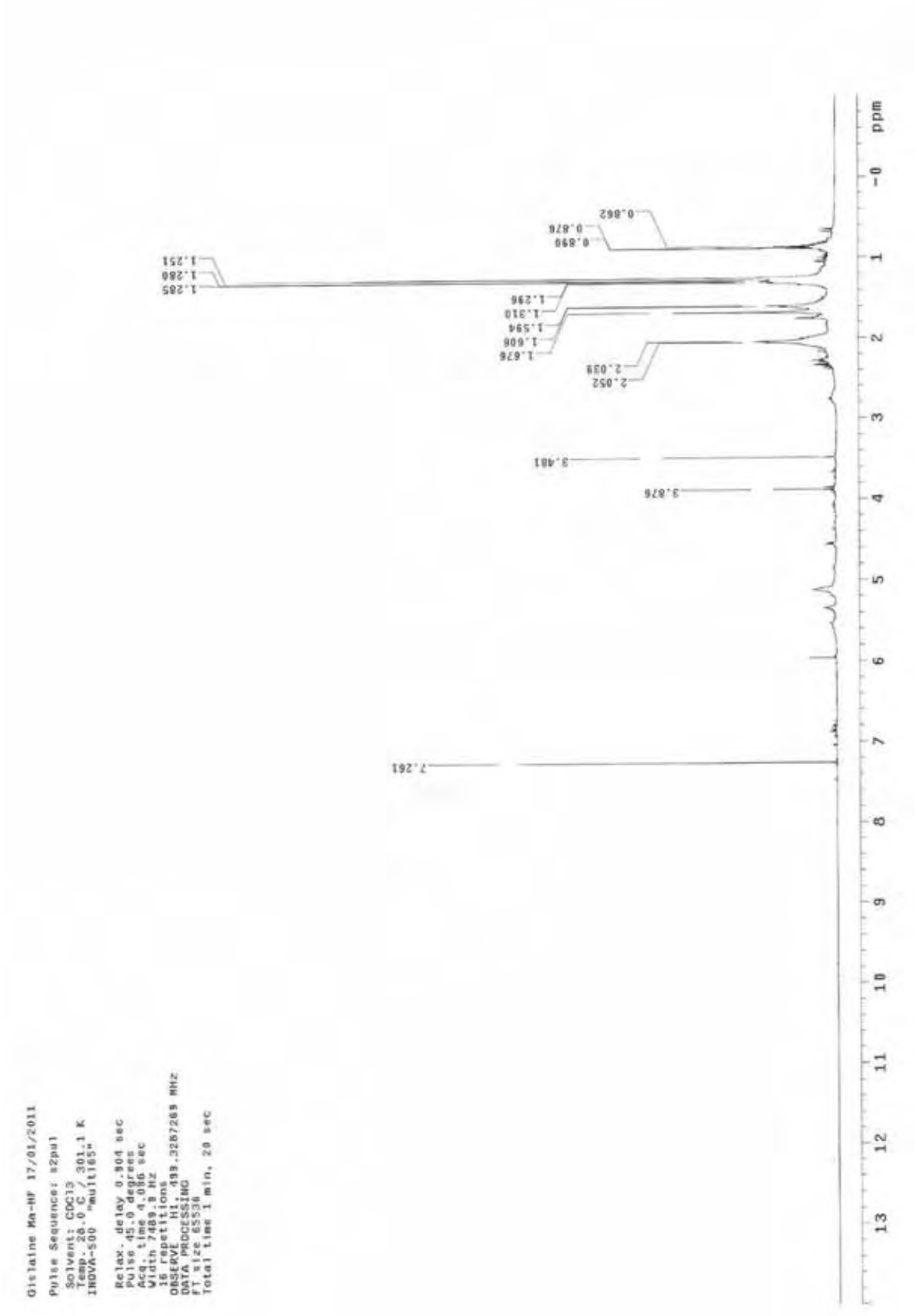
Anexo 18. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato acetônico de caules + raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



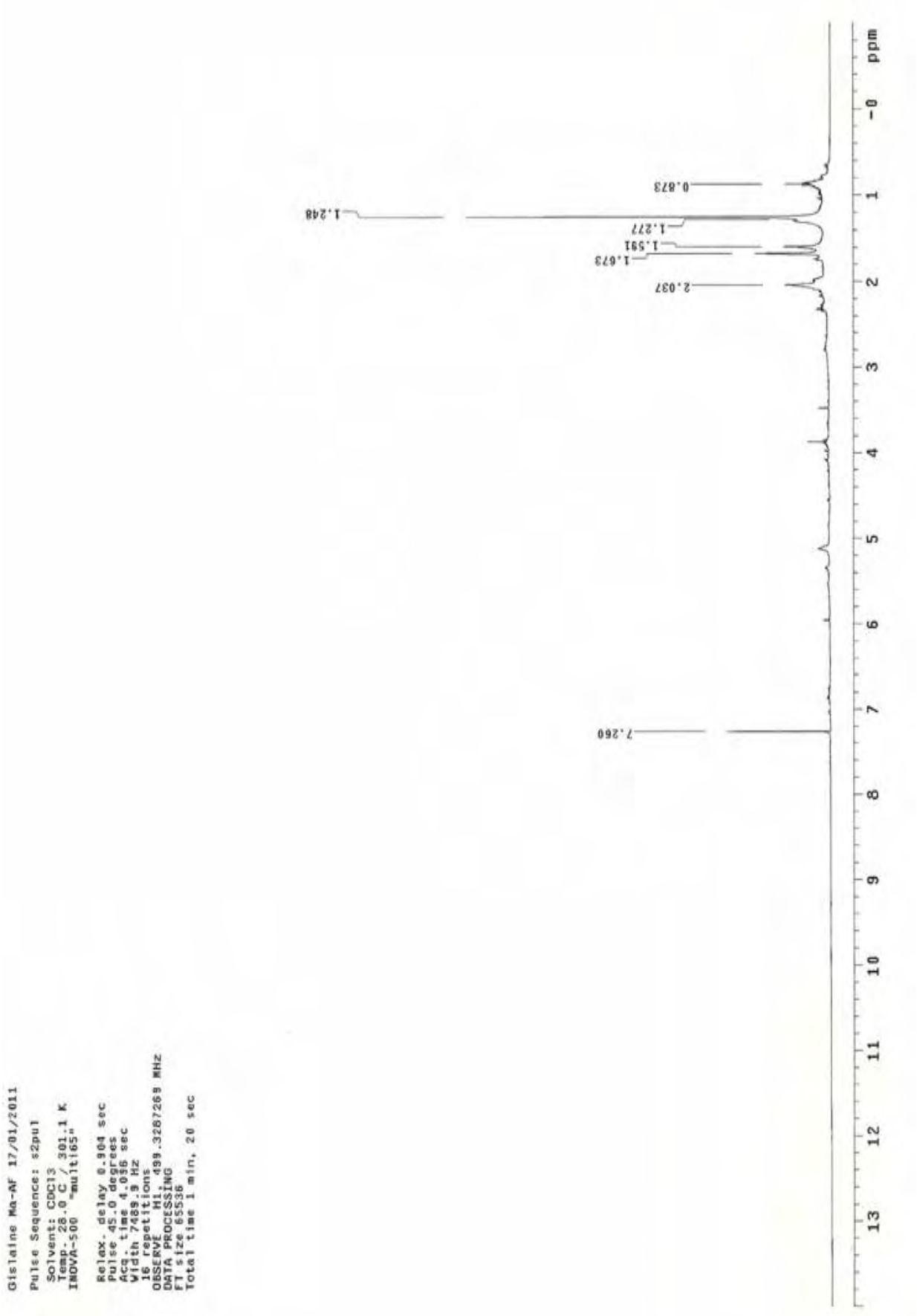
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de caules + raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; DMSO).



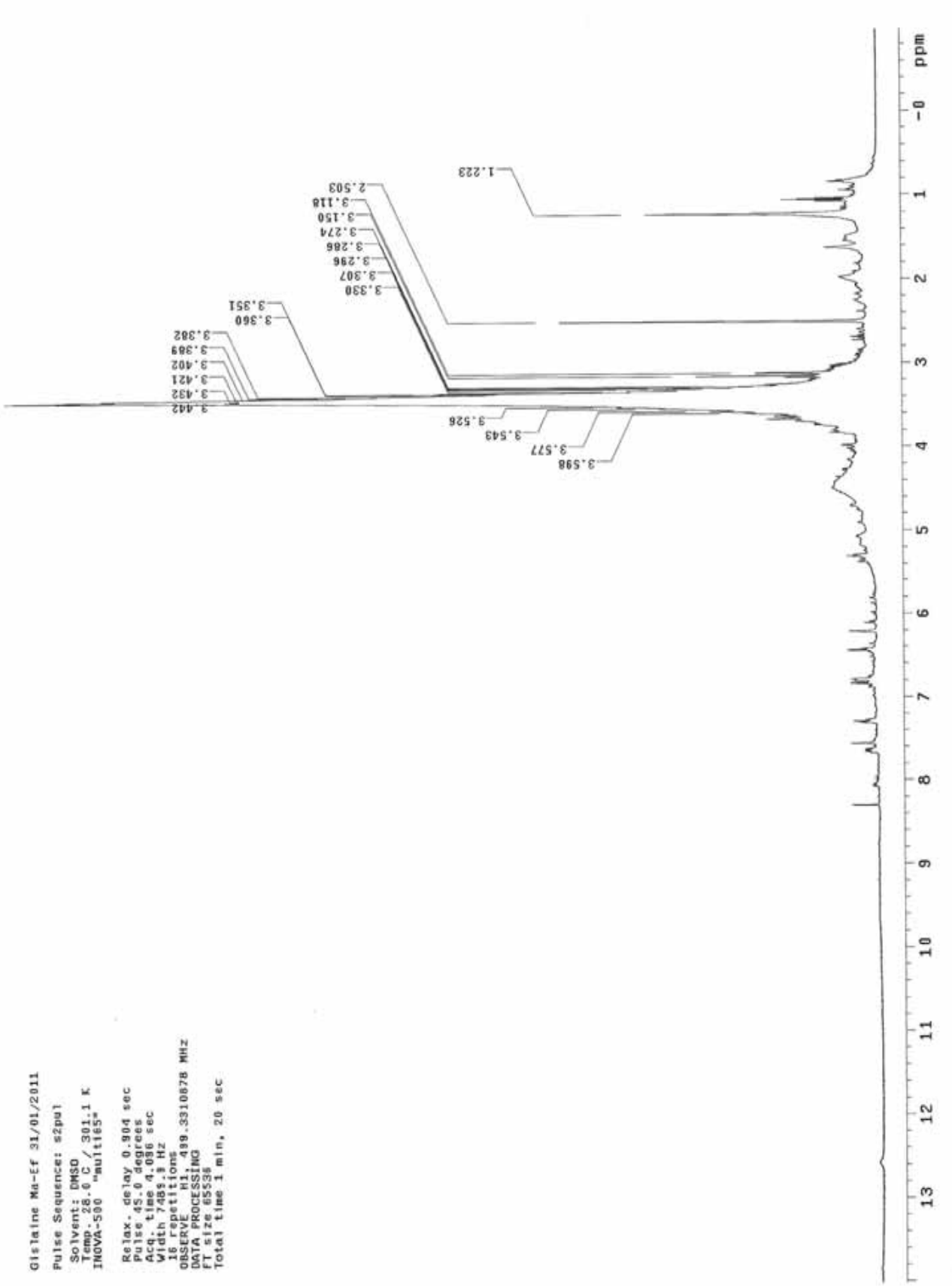
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato obtido por fluído supercrítico de caules + raízes de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



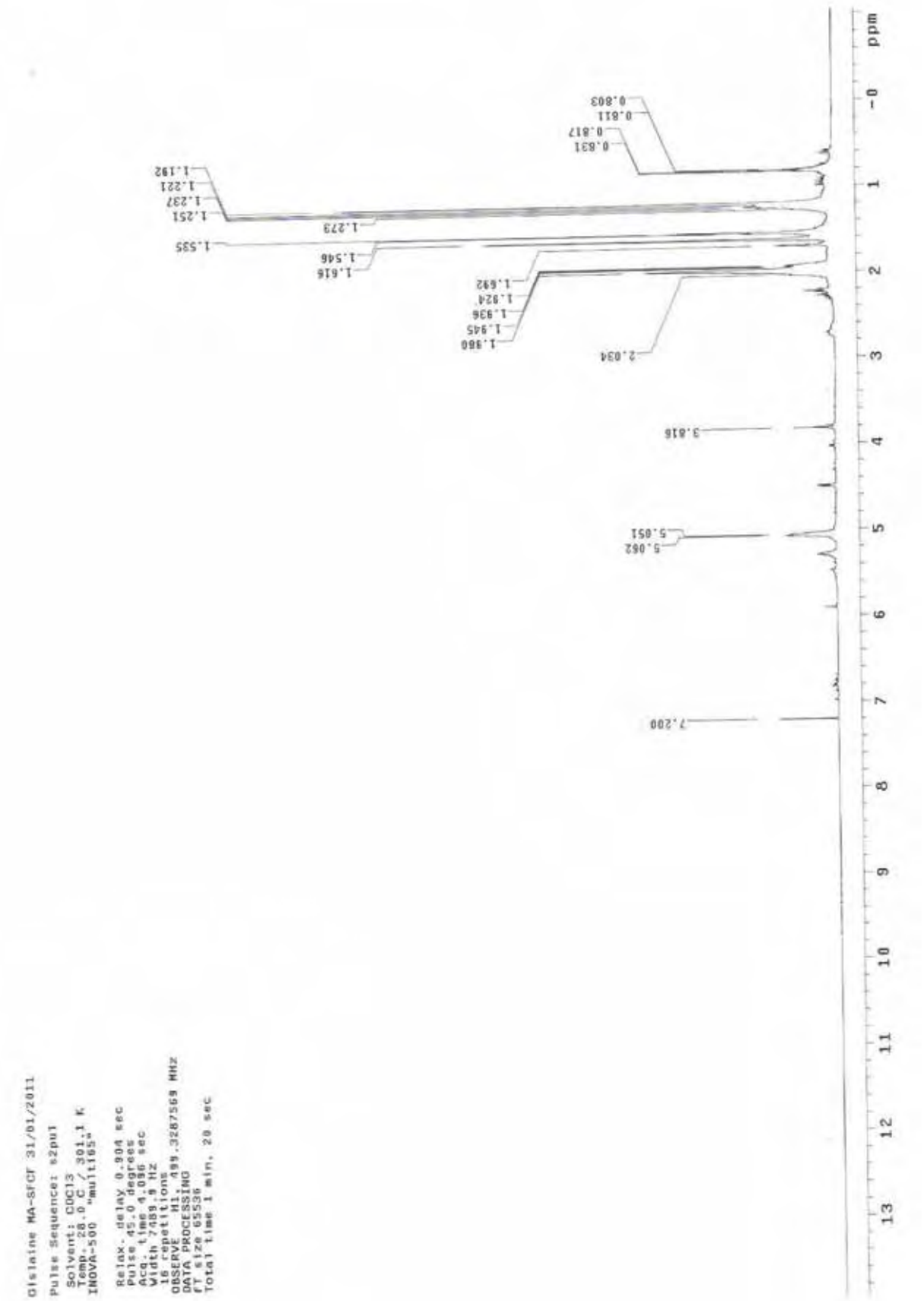
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato hexânico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



Anexo 22. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato acetônico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).



Anexo 23. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato etanólico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; DMSO).



Anexo 24. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato obtido por fluído supercrítico de folhas de *H. reniformis* provenientes de Imperatriz – MA (11,7 T; $CDCl_3$).