

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Química

Fenilpropanoides de *Paspalum atratum*

Luciano da Silva Pinto

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Xavier Lopes
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Isabele Rodrigues Nascimento

Araraquara
2015

LUCIANO DA SILVA PINTO

Fenilpropanoides de *Paspalum atratum*

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Xavier Lopes
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Isabele Rodrigues Nascimento

FICHA CATALOGRÁFICA

P659f	Pinto, Luciano da Silva Fenilpropanoides de <i>Paspalum atratum</i> / Luciano da Silva Pinto. – Araraquara : [s.n], 2015 84 f. : il.
Paulista,	Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Instituto de Química Orientador: Lucia Maria Xavier Lopes Coorientador: Isabele Rodrigues Nascimento
	1. Gramínea. 2. Ressonância magnética nuclear. 3. Análise de variância. 4. Pastagens. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Fenilalanina. I.Título

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

LUCIANO DA SILVA PINTO

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

Araraquara, 24 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. LUCIA MARIA XAVIER LOPES - (Orientadora)
Instituto de Química /UNESP/ Araraquara - SP



Profª. Drª. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Instituto de Química /UNESP/ Araraquara - SP



Prof. Dr. ANTONIO LAVERDE JUNIOR
Universidade Tecnológica Federal do Paraná /UTFPR/ Londrina – PR

1. Dados pessoais

1.1 Nascimento: 01/03/1991

1.2 Nacionalidade: Brasileira

1.3 Naturalidade: Icaraíma – PR

1.4 Estado Civil: Solteiro

1.5 Filiação: Pai: Laerte de Oliveira Pinto

Mãe: Alzira Marques da Silva Pinto

1.6 Profissão: Químico

1.7 Documento de Identidade (RG): 11.038.284-7 (SSP-PR)

1.8 Cadastro de Pessoa Física (CPF): 062.403.449-66

1.9 Endereço: Av. Alberto Toloi, nº 185, apto 21, bloco 02, Jardim Quitandinha. 14.800-105 Araraquara – SP

1.10 Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara – Unesp, Departamento de Química Orgânica, C.P. 355, CEP: 14.801-970 Araraquara – SP

2. Formação Acadêmica

2.1 Graduação: Licenciatura em Química

2.2 Data de Conclusão: 08/12/2012

2.3 Instituição: UNIPAR – Universidade Paranaense

3. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS

3.1 11º Fórum de Iniciação Científica e 11º Fórum de Pesquisa da UNIPAR

“Avaliação do Potencial Anticolinesterásico do Extrato Bruto de *Piper amalago* L. (PIPERACEAE)”

2011, Umuarama – PR.

3.2 10º Fórum de Iniciação Científica e 10º Fórum de Pesquisa da UNIPAR

“Estudo dos Metabólitos Secundários de *Croton floribundus* spreng. (EUPHORBIACEAE)

2010, Umuarama – PR.

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais Alzira e Laerte,
aos meus irmãos Paulo Henrique e Anderson,
ao meu tio Helio e a um grande amigo Ricardo.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Xavier Lopes e à Prof.^a Dr.^a Isabele Rodrigues Nascimento pela orientação, ensinamento, atenção, profissionalismo, amizade e confiança depositada.

Ao Dr. Nivaldo Boralle e à Dr.^a Lucinéia Vizzotto Marconcini pela realização dos experimentos de RMN e pela amizade.

À Dr.^a Bianca Ferreira da Silva pela realização dos experimentos de CLAE-EM, além das conversas agradáveis em momentos descontraídos.

Ao Dr. Francisco Humberto Dübbern de Souza pelo fornecimento da espécie vegetal deste estudo, além das conversas que ajudaram a enriquecer este trabalho.

Aos meus pais pelo incentivo, apoio, amor incondicional sentido muitas vezes em demoradas conversas por telefone.

Aos meus irmãos Anderson e Paulo Henrique, os quais sempre me incentivaram, ajudaram e foram muito importantes mesmo em pequenos gestos.

À Gislaine pelo auxílio, pelas conversas, momentos descontraídos e pela amizade construída.

Ao Marcos Donizete, pela ajuda, paciência e companheirismo que me auxiliaram neste período de constante crescimento e conseqüente amadurecimento.

Ao Claudio pela amizade, ajuda e indagações, companheirismo, amizade e incentivo que auxiliaram em meu crescimento pessoal e científico.

Aos alunos de iniciação científica, José Rodolfo, Matheus, Cauê, Lucas, Alfredo, Vitória, Ana Carolina, Ana Tereza na colaboração com o trabalho, e a todos meus amigos em geral (Antônio, Pedro, Marcos, Marco Antônio, Leopoldo, Afif, Amauri, Bruno, Karina, Fabiano, Roger, Fabio) pelo companheirismo.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista UNESP Araraquara.

E por fim, mas não menos importante à agência de fomento CAPES, pela bolsa concedida, FAPESP, CNPq e CAPES pelos auxílios financeiros.

Às vezes uma história acaba mais cedo para uns do que para outros. Mas quando o fim chega, e acredite, ele sempre chega, a gente o abraça forte como se fosse um velho amigo. E antes mesmo de soltar, já temos em nossos braços um novo começo.

(Luan Emílio Faustino)

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AcOH	Ácido Acético Glacial
ANOVA	Análise de Variância
APT	<i>Attached Proton Test</i>
AR	Ácido Rosmarínico
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQA	Coulmaroilquinic acid
CV	Coefficiente de Variação
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Diode Array Detector
DC	Dicroísmo circular
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilssulfóxido
EM	Espectro de massas
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
<i>g</i> COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
<i>g</i> DOSY	<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>
<i>g</i> HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>g</i> HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
gl	Graus de Liberdade
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol

min	Minuto(s)
MQ	Média dos Quadrados
PAE	Extrato etanólico de <i>Paspalum atratum</i>
PAH	Extrato hexânico de <i>Paspalum atratum</i>
r^2	Coefficiente de Determinação
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SQ	Soma dos Quadrados
t	Tripleto
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
Vm	Volume Morto

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAH, com destaque para os sinais característicos de clorofila.....	67
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAE.....	67
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 7,0 T) de PAE.....	68
Espectro 4 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAE-1.....	68
Espectro 5 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAE-2.....	69
Espectro 6 - Espectro de RMN de APT ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) de 1	69
Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) de 1	70
Espectro 8 - Espectro de RMN de $g\text{COSY}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) de 1	70
Espectro 9 - Espectro de RMN de $g\text{HSQC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) de 1	71
Espectro 10 - Espectro de RMN de $g\text{HMBC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) de 1	71
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	72
Espectro 12 - Ampliação da região de δ 7,70 a 6,40 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	72
Espectro 13 - Ampliação da região de δ 4,25 a 3,05 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	73
Espectro 14 - Ampliação da região de δ 2,34 a 1,82 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	73
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	74
Espectro 16 - Espectro de RMN de $g\text{DOSY}$ (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	74
Espectro 17 - Espectro de RMN de $g\text{COSY}$ (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	75
Espectro 18 - Espectro de RMN de $g\text{HSQC}$ (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	75
Espectro 19 - Espectro de RMN de $g\text{HMBC}$ (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3	76
Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	76
Espectro 21 - Ampliação da região de δ 7,90 a 5,10 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	77
Espectro 22 - Ampliação da região de δ 4,40 a 1,60 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	77
Espectro 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	78
Espectro 24 - Espectro de RMN de TOCSY-1D (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	78
Espectro 25 - Espectro de RMN de $g\text{COSY}$ (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	79
Espectro 26 - Espectro de RMN de $g\text{HSQC}$ (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	79
Espectro 27 - Espectro de RMN de $g\text{HMBC}$ (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5	80
Espectro 28 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 7,0 T) de 6	80
Espectro 29 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 7,0 T) de 6	81
Espectro 30 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 7	81
Espectro 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de 7	82
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 8	82
Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de 8	83
Espectro 34 - Espectro de massas de 1	83
Espectro 35 - Espectro de DC de 1	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias isoladas do gênero <i>Paspalum</i>	20
Figura 2 – Fotos de <i>Paspalum atratum</i>	21
Figura 3 - Substâncias identificadas em <i>P. atratum</i>	22
Figura 4 - Estrutura do (<i>R</i>)-ácido rosmarínico (1).	33
Figura 5 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos <i>g</i> COSY (\leftrightarrow) e <i>g</i> HMBC (\rightarrow) de 1	35
Figura 6 - Estruturas do Ácido 3-O-cafeoilquínico 2 e Fenilalanina 3	36
Figura 7 - Comparação dos δ de RMN de ^{13}C dos isômeros de ácido clorogênico e análise das constantes de acoplamento.	36
Figura 8 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos <i>g</i> COSY (\leftrightarrow) e <i>g</i> HMBC (\rightarrow) de 2	38
Figura 9 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos <i>g</i> COSY (\leftrightarrow) e <i>g</i> HMBC (\rightarrow) de 3	41
Figura 10 – Estruturas do ácido 3-O- <i>cis</i> -coumaroilquínico (4) e ácido 3-O- <i>trans</i> -coumaroilquínico (5).	42
Figura 11 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos <i>g</i> COSY (\leftrightarrow) e <i>g</i> HMBC (\rightarrow) de 4 e 5	44
Figura 12 - Ácido 5-O-cafeoilquínico (6).	46
Figura 13 - Ácido 4-O-cafeoilquínico (7).	47
Figura 14 - Ácido cafeico (8).	48
Figura 15 - Curva analítica do padrão AR (C18, $\lambda = 330$ nm) nas concentrações 20,0, 35,0, 50,0, 70,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$	50
Figura 16 - Cromatograma de PAE.*	51
Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para as análises intradia do AR.*	54
Figura 18 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para as análises interdía do AR.*	54
Figura 19 - Cromatograma do extrato PAE utilizado no estudo de quantificação de AR.*	56
Figura 20 - Biogênese das substâncias identificadas em <i>P. atratum</i> . Adaptação de Petersen e colaboradores (2009) [38].	57

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Preparação dos extratos e fracionamento de PAE.....	26
Esquema 2 - Fracionamento de PAE-2.2.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento dos extratos obtidos de <i>P. atratum</i>	25
Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1 (DMSO- d_6 , 14,1 T).....	34
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 2 (14,1 T).....	39
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 3 (D_2O , 14,1 T).....	41
Tabela 5 - Dados de RMN de ^{13}C de 4 e 5 (D_2O , 14,1 T).....	44
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H de 4 e 5 (D_2O , 14,1 T).....	45
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 6 (D_2O , 7,0 T).....	47
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 7 (D_2O , 14,1 T).....	48
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 8 (D_2O , 14,1 T).....	49
Tabela 10 - Análise de variância das injeções intradia do AR.....	53
Tabela 11 - Análise de variância nas injeções interdía do AR.....	53

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato etanólico de *Paspalum atratum* Swalen (Poaceae). O gênero *Paspalum* é o mais importante das gramíneas no Brasil e possui características compatíveis com a utilização no pastejo. Fenilpropanoides foram isolados por métodos cromatográficos (CC, CLAE) pela primeira vez neste gênero. Estes fenilpropanoides foram identificados como: (*R*)-ácido rosmarínico, (AR, **1**), ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**2**), fenilalanina (**3**), ácidos *cis*- e *trans*-coumaroilquínico (**4** e **5**), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**6**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**7**) e ácido cafeico (**8**) pela análise de seus dados de EM, RMN de ¹H e de ¹³C, incluindo COSY, HMBC, HSQC, TOCSY-1D e DOSY, e pela comparação destes dados com aqueles descritos na literatura para estas substâncias. A substância majoritária no extrato etanólico foi o AR (4,4%). Esta foi usada como padrão em análises qualitativas e quantitativas do extrato. Um método eficiente em CLAE-DAD para determinação de AR no extrato foi estabelecido ($r^2 = 0,9979$). O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram 4,00 e 12,13 µg/mL respectivamente, e a faixa de linearidade foi 12,1-100,0 µg/mL. As precisões intradia e interdia do método foram avaliadas pela análise das soluções de padrão AR. O desvio padrão da área do pico do analito foi utilizado como parâmetro de avaliação da precisão intradia, compreendendo o intervalo de 1,57-2,06%. A precisão interdia (7 dias) do método compreendeu o intervalo de 0,54-1,69%. A recuperação, avaliada pela adição do padrão AR, foi satisfatória (75-78%).

Palavras-chave: Poaceae, *Paspalum atratum*, fenilpropanoides, ácido rosmarínico, ácido cafeoilquínico, ácido coumaroilquínico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ácido neoclorogênico e fenilalanina

ABSTRACT

This work describes the phytochemical study on ethanol extract from aerial parts of *Paspalum atratum* Swalen (Poaceae). The *Paspalum* genus is one of the most important grasses in Brazil and has characteristics compatible with its utilization in pastures for cattle. Phenylpropanoids were isolated by chromatographic methods (CC and HPLC) for the first time in this genus. These phenylpropanoids were identified as (*R*)-rosmarinic acid (RA, **1**), 3-*O*-caffeoylquinic acid (**2**), phenylalanine (**3**), *cis*- and *trans*-3-*O*-coumaroylquinic acids (**4** and **5**), 5-*O*-caffeoylquinic acid (**6**, chlorogenic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid (**7**), and caffeic acid (**8**) by analyses of their MS, ¹H and ¹³C NMR data, including COSY, HMBC, HSQC and DOSY, and comparison of these data with those reported in the literature for these type of compounds. The major compound isolated from the ethanol extract was RA (4.4%). It was used as standard for qualitative and quantitative analyses of extract. An efficient HPLC-DAD method for determination of RA in extract was established ($r^2 = 0.9979$). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 4.00 and 12.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the validated range was 12.1-100.0 $\mu\text{g/mL}$. The intra-day and inter-day precisions of the method were evaluated by analyzing the blank solution spiked by RA. The standard deviation (SD) as evaluation parameter for the intra-day precision of peak area of target analyte was in the range of 1.57-2.06%. The inter-day precision (7 days) of the method was in the range of 0.54-1.69%. Satisfactory recovery (75-78%), evaluated by standard additions method, was achieved.

Keywords: Poaceae, *Paspalum atratum*, phenylpropanoids, rosmarinic acid, caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid, neochlorogenic acid, coumaroylquinic acid, phenylalanine

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	23
3. EXPERIMENTAL	23
3.1. Materiais e Equipamentos	23
3.2. Coleta e identificação da espécie vegetal	24
3.3. Preparação dos extratos hexânico e etanólicos de <i>P. atratum</i>	24
3.4. Análise dos extratos por CCDC e por RMN de ¹ H.....	25
3.5. Fracionamento do extrato etanólico de <i>P. atratum</i>	25
3.5.1. Partição de PAE e Fracionamento de PAE-2	25
3.5.2. Fracionamento de PAE-2.2.....	27
3.6. Purificação do ácido rosmarínico (AR)	28
3.7. Preparo das soluções padrões de AR	29
3.8. Validação do método analítico usando CLAE	29
3.8.1. Curva analítica e linearidade.....	29
3.8.2. Limite de detecção e de quantificação.....	30
3.8.3. Precisão.....	30
3.8.4. Recuperação	30
3.8.5. Quantificação.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Considerações preliminares	32
4.2. Caracterização estrutural das substâncias 1-8.....	32
4.2.1. (<i>R</i>)-Ácido Rosmarínico (1).....	32
4.2.2. Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (2) e Fenilalanina (3).....	35
4.2.3. Ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> 3- <i>O</i> -Coumaroilquínico (4) e (5).....	41
4.2.4. Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico (6).....	46
4.2.5. Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquínico (7).....	47
4.2.6. Ácido Cafeico (8)	48
4.3. Determinação da concentração de ácido rosmarínico no extrato.....	50
4.3.1. Curva analítica e linearidade.....	50
4.3.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	51
4.3.3. Precisão intermediária e Repetibilidade	52
4.3.4. Preparação da amostra e recuperação	55
4.3.5. Quantificação.....	55
4.4. Biogênese dos compostos isolados de <i>P. atratum</i>	56
4.5. Atividades biológicas descritas para as substâncias 1-8.....	58
5. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61

DADOS FÍSICOS E ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS	65
ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

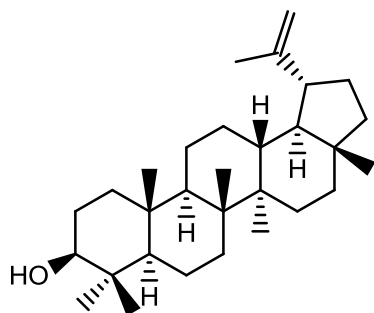
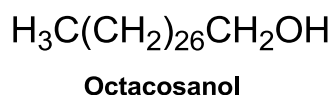
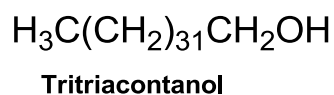
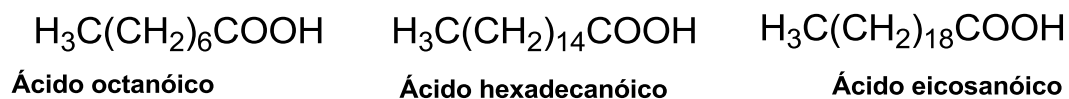
Poales é uma ordem bem representada no Brasil, sendo uma das principais componentes de nossa flora. Das dezoito famílias pertencentes a esta ordem, dez ocorrem no Brasil, entre elas a Poaceae. Esta possui uma distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e 9000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem cerca de 180 gêneros e 1500 espécies. Estas espécies, conhecidas por gramíneas, apresentam importância mundial, uma vez que contribuem para as formações campestres em todo o mundo, e destacam-se pela utilização na alimentação (por exemplo: cana-de-açúcar, milho, aveia, arroz e trigo) de diversos povos. A família apresenta também importância ornamental, como a espécie *Paspalum notatum*, conhecida como grama batatal, que é a principal componente de pastagens. Espécies como *Cymbopogon citratus* (capim limão) e *Cymbopogon martinii* (citronela) são bastante empregadas como repelentes de insetos [1].

O gênero *Paspalum* é o mais importante das gramíneas do Brasil e possui características morfológicas compatíveis com a utilização no pastejo, além de nutrientes adequados à produção de ruminantes. Apresenta grande resistência ao pisoteio e a cortes frequentes, bom desenvolvimento em solos poucos férteis e boa tolerância às secas [2]. Este gênero destaca-se entre as gramíneas nativas em pastagens cultivadas resistentes às cigarrinhas (*Deois flavopicta* - Homoptera; Cercopidae) [3].

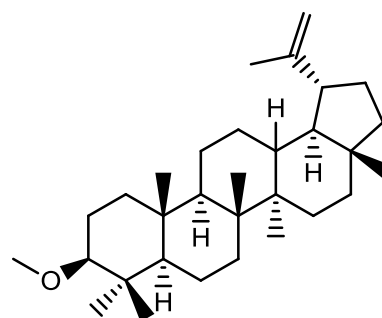
O levantamento bibliográfico realizado nas bases de dados SciFinder, *Web of Science* e *Dictionary of Natural Products* aponta que triterpenos, alcaloides e flavonoides estão entre as principais classes de constituintes químicos que ocorrem em gramíneas. Com relação ao gênero *Paspalum*, somente três das 330 espécies apresentam estudos fitoquímicos descritos na literatura. A espécie *Paspalum scrobiculatum*, conhecida como capim-arroz, capim-vaca, coroa-indiana, capim pojuca, grama-coroa-indiana e milheto-de-vala, foi a mais estudada. Das sementes desta espécie foram isolados álcoois saturados de cadeia longa (tritriacontanol, octacosanol), além de ácidos graxos e esteroides (sitosterol, campesterol e sitosterol-O-glucosídeo) [4-8]. Outras espécies estudadas foram *P. dilatatum* e *P. conjugatum* (capim-forquilha) que forneceram um derivado metilado do lupeol e a flavona luteolina, respectivamente (Figura 1, p. 20) [9,10].

Dissertação de Mestrado

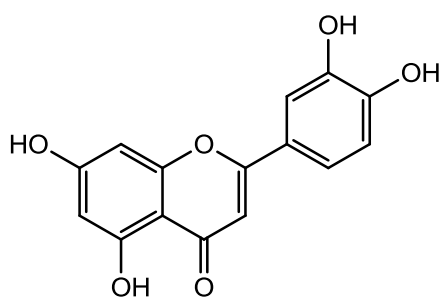
Figura 1 - Substâncias isoladas do gênero *Paspalum*.



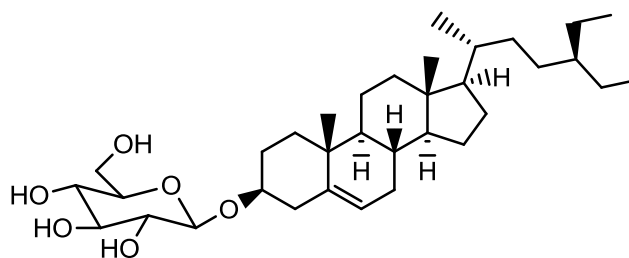
Lupeol



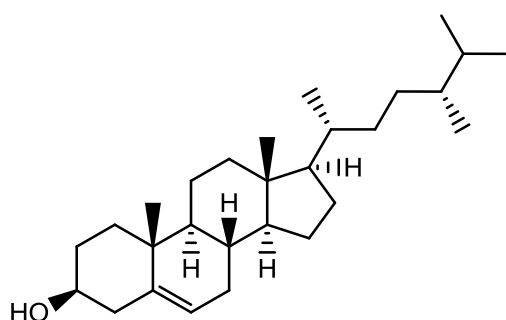
Lupeol metil eter



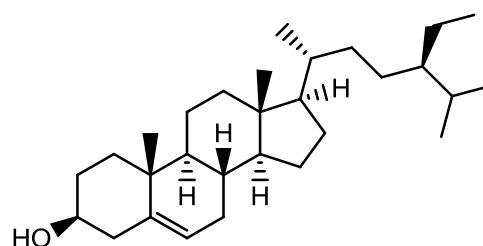
Luteolina



Sitosterol-O-glucosídeo



Campesterol



Sitosterol

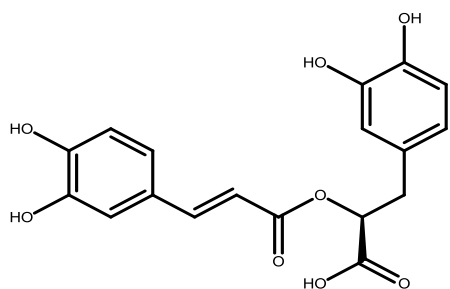
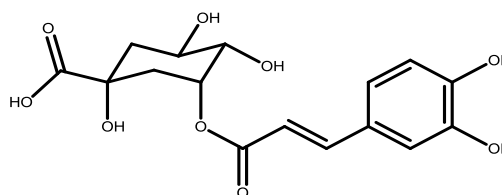
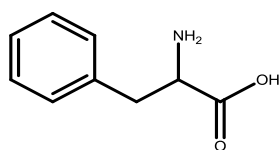
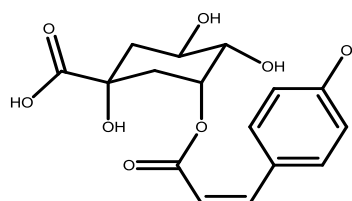
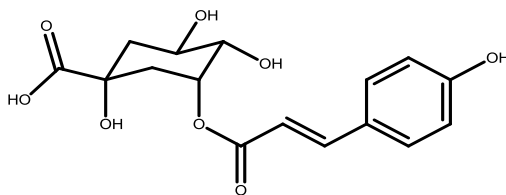
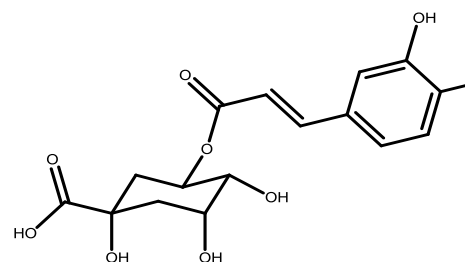
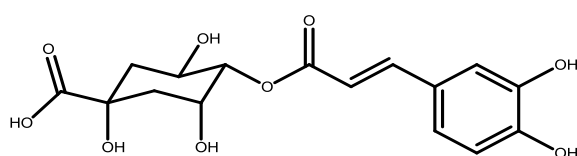
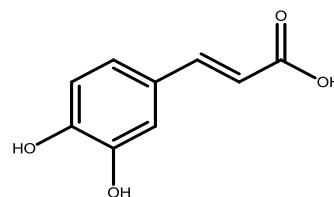
A espécie selecionada para este estudo foi *P. atratum* (Figura 2, p. 21), por não conter na literatura artigos sobre estudos fitoquímicos e por esta espécie estar no rol de espécies de grande interesse agrônomo pela Embrapa Pecuária Sudeste.

Figura 2 – Fotos de *Paspalum atratum*.

Fonte: http://www.agropecuariavilaverde.com.br/site/sementes/product_images/tbqnsqntgijnwcd.jpg;
http://www.sementesfertil.com.br/imagens/capim_pojuca_foto.gif

Estudos sobre a dinâmica de perfilhamento e alongação de folhas *P. atratum*, submetido ao pastejo rotacionado, indicaram o potencial de pastagem desta espécie [11]. Adaptada a solos maldrenados, esta forrageira desperta interesse para o estabelecimento via sementes em solos úmidos, resultando em mais uma alternativa de alimento para os rebanhos, tornando a atividade pecuária mais produtiva e lucrativa [12]. Estudos sobre fitorremediação indicaram que *P. atratum* pode extrair Cd^{2+} de solos contaminados, embora apresente uma significativa redução de sua biomassa em solos contaminados com Zn^{2+} [13].

Neste trabalho é descrito a determinação estrutural de oito fenilpropanoides isolados de *P. atratum* (Figura 3, p. 22).

Figura 3 - Substâncias identificadas em *P. atratum*.**(R)-Ácido rosmarínico (1)****Ácido 3-O-caffeoilquínico (2)****Fenilalanina (3)****Ácido 3-O-cis-coumaroilquínico (4)****Ácido 3-O-trans-coumaroilquínico (5)****Ácido 5-O-caffeoilquínico (6)****Ácido 4-O-caffeoilquínico (7)****Ácido cafeico (8)**

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos o isolamento e a elucidação estrutural dos constituintes químicos do extrato etanólico de *Paspalum atratum*.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados foram:

- Balança analítica Denver Instrument APX-200;
- Banho ultrassônico Unique USC750;
- Moinho de Facas Tecnal;
- Bomba de vácuo Buchi B-169;
- Os espectros de RMN foram adquiridos em espectrômetros Varian INOVA 300 (7,0 T), Bruker - 300 Fourier Dual (7,0 T) e Bruker Avance III 600 (14,1 T) com criosonda, utilizando tubos de 5 e 3 mm. Solventes deuterados: clorofórmio deuterado (CDCl₃), água deuterada (D₂O) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories foram empregados. Como referência interna, foram utilizados os sinais relativos a hidrogênios ou carbonos do solvente residual e para os espectros de RMN de ¹³C em D₂O, foi utilizado o método de calibração externa;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Jasco (controlador LC-Net II/ADC, bomba PU-2086 Plus, detector MD-2018 Plus), equipado com coluna Varian Ominispher (ODS 250 × 4,6 mm, 5 μm);
- A análise por CLAE-EM foi conduzida num espectrômetro de massas LCQ Fleet LC/MS (HPLC-ESI/APCI-IT-MSⁿ, Thermo Analítica®) equipado com um dispositivo de inserção direta de amostra via análise por injeção em fluxo contínuo. Operou-se no modo negativo de ionização por *electrospray* (ESI), e as fragmentações MS¹ foram realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). A separação cromatográfica foi efetuada em cromatógrafo *Accela* equipado com quatro bombas, detector de arranjo de diodos e injetor automático.

Dissertação de Mestrado

- A curva de dicroísmo circular eletrônico (DCE) foi obtida em um espectropolarímetro dicrógrafo da Jasco j-815. Para a medida, utilizou-se uma cubeta de 0,2 mm, e a varredura foi efetuada de 190 a 400 nm. A amostra foi solubilizada em CH₃OH, e a solução foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL.
- Comatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu TM (bomba isocrática SPD-10AVvp, controlador SCL-10Avp), detector UV-Vis SPD-10AVvp equipado com coluna semipreparativa SHIMPACK (ODS, 250 x 20 mm, 10 μm);
- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): Fase estacionária: sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck [®]). As revelações foram efetuadas com solução de vanilina sulfúrica, iodo-cloroplatinato de potássio, solução de Dragendorff, em cuba com vapores de iodo e radiações UV em 254 e 365 nm;
- Filtro PVDF 0,20 μm Hexis;
- Solventes: Metanol 99,9% J.T. Baker[®] Analyzed HPLC reagent; ácido acético glacial 99,9% J.T. Baker[®] Analyzed HPLC reagent; acetonitrila 99,9% Tedia HPLC e água deionizada em Sistema Purificador de Água Millipore Synergy UV.

3.2. Coleta e identificação da espécie vegetal

Licença para estudos com a espécie *P. atratum* Swalen foi adquirida pela EMBRAPA junto ao IBAMA-CGEN com o número BRA 009610. Esta espécie foi cultivada na Embrapa-São Carlos e a coleta foi efetuada em fevereiro de 2013 pelo Dr. Francisco Humberto Dübbern de Souza (Embrapa-São Carlos).

Após a coleta das partes aéreas de *P. atratum*, o material vegetal foi seco ao ar e, posteriormente, em estufa climatizada à uma temperatura média de 50 °C. O material vegetal, após seco, foi moído por processo mecânico utilizando um moinho de facas.

3.3. Preparação dos extratos hexânico e etanólicos de *P. atratum*

Para a preparação dos extratos de *P. atratum*, partiu-se de 1,3 kg de material vegetal seco e moído. O procedimento de preparação do extrato hexânico por maceração foi realizado deixando o material vegetal em contato com o solvente durante um dia e realizando três extrações sucessivas em três dias consecutivos. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção do extrato etanólico. A torta resultante foi

Dissertação de Mestrado

extraída em aparelho soxhlet (extraída de pacotes de papel filtro contendo o material vegetal durante 8 horas), Esquema 1 (p. 25).

O extrato hexânico foi seco em rotaevaporador à pressão reduzida e à temperatura de 30 °C, enquanto que o extrato etanólico e etanólico proveniente da extração usando aparelho soxhlet foi concentrado à temperatura de 45 °C. Posteriormente, os extratos foram mantidos em capela de exaustão até eliminação do solvente. As massas obtidas dos extratos estão apresentadas na (Tabela 1, p. 25).

Tabela 1 - Rendimento dos extratos obtidos de *P. atratum*.

Extrato	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
Extrato hexânico	PAH	8,7	0,70
Extrato etanólico maceração	PAE	29,3	2,30
Extrato etanólico soxhlet	PAE-Sox	58,3	4,56

3.4. Análise dos extratos por CCDC e por RMN de ¹H

Os extratos PAH e PAE foram analisados por CCDC em diferentes fases móveis: hexanos-AcOEt (3:2 e 4:1), CHCl₃-MeOH (19:1), hexanos-AcOEt-MeOH (7:2:1 e 5:3:2). As cromatoplasmas foram reveladas utilizando lâmpada de luz ultravioleta (λ de 254 e 366 nm), vapores de iodo, soluções de vanilina sulfúrica, iodocloroplatinato de potássio e reagente de Dragendorff [14].

Os extratos obtidos foram também analisados por RMN de ¹H, utilizando CDCl₃ como solvente para PAH, e CDCl₃ e DMSO-*d*₆ para PAE e PAE-Sox.

3.5. Fracionamento do extrato etanólico de *P. atratum*

3.5.1. Partição de PAE e Fracionamento de PAE-2

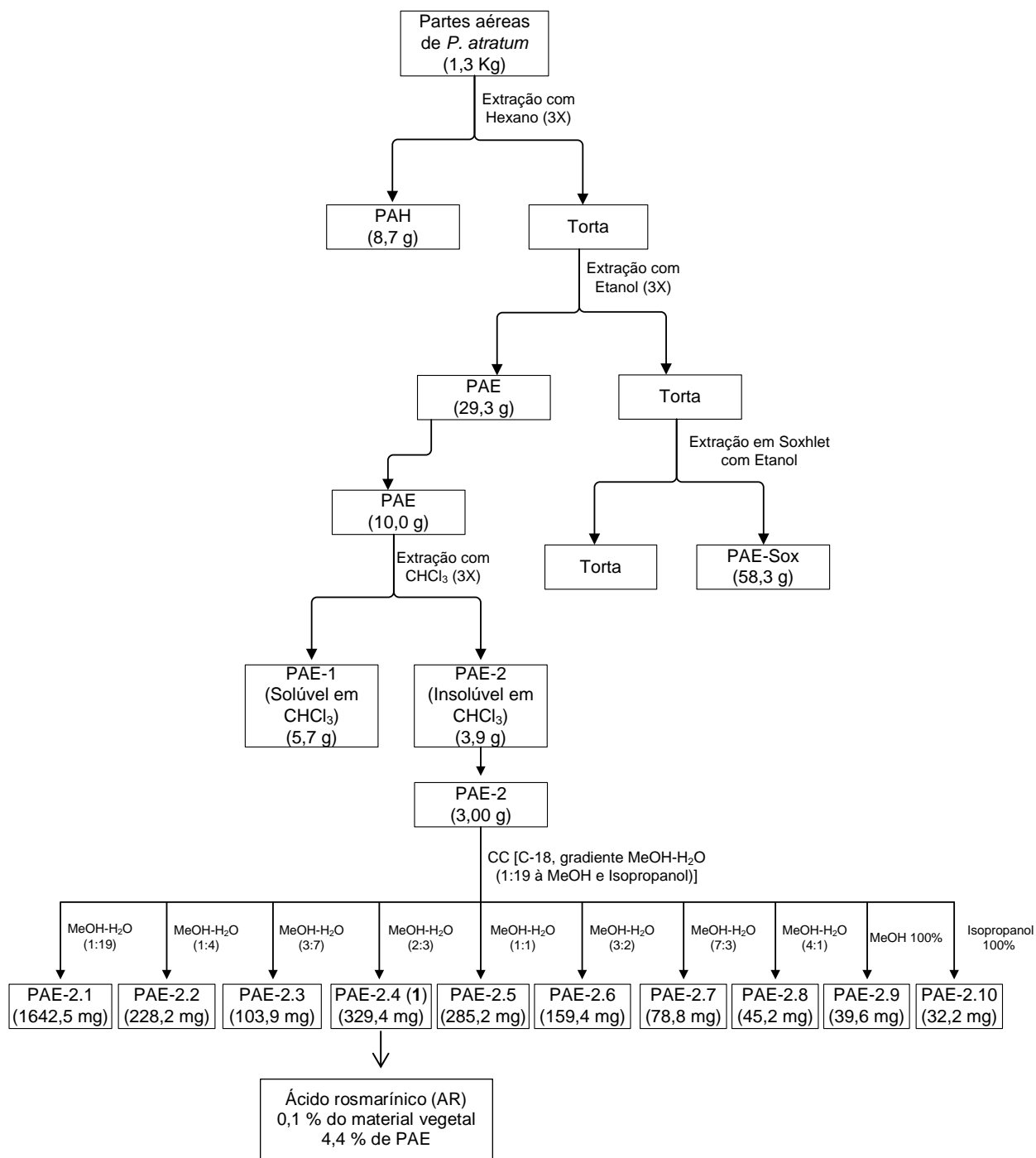
Uma porção de 10,0 g de PAE foi parcialmente solubilizada com CHCl₃, utilizando volumes sucessivos de 50, 30 e 10 mL, obtendo-se 5,7 g de fração solúvel (PAE-1) e 3,9 g de fração insolúvel (PAE-2). As frações obtidas foram analisadas por RMN de ¹H.

Parte da fração PAE-2 (3,00 g) foi submetida à extração em fase sólida, utilizando-se sílica gel de fase reversa C-18 de 40 a 63 μ m (Φ = 2,8 cm; h = 18,5 cm; m

Dissertação de Mestrado

= 50,0 g). Um total de dez frações (PAE-2.1 a PAE-2.10) de 220 mL (~ 3 x V_m) foi obtido (Esquema 1).

Esquema 1 - Preparação dos extratos e fracionamento de PAE.



Todas as frações foram analisadas por CLAE-DAD. O gradiente utilizado nas análises consistiu em uma rampa linear, partindo-se de MeOH-H₂O 1:19 para MeOH 100% em 30 min. A condição MeOH 100% foi mantida por 15 min. Então, houve outra

mudança na composição da fase móvel, passando-se para MeOH-H₂O 1:19 em 5 min. Esta condição foi mantida por mais 10 min. As análises foram conduzidas à temperatura de 25 °C e vazão de 1,0 mL/min, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C-18. As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL, e então filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20 µm. O volume de injeção foi padronizado em 20 µL.

Todas as frações obtidas por CC de PAE-2 também foram analisadas por RMN de ¹H. A fração PAE-2.4 foi submetida aos experimentos de RMN de ¹³C, gHMBC, gHSQC e gCOSY, o que levou a caracterização de **1**. Esta substância representou 0,1% do material vegetal seco e 4,4% do extrato etanólico de *P. atratum*.

3.5.2. Fracionamento de PAE-2.2

O perfil cromatográfico de PAE-2.2, quando comparado ao das outras frações, foi o que apresentou a melhor separação dos constituintes químicos na análise comparativa em modo gradiente exploratório (item 3.5.1, p. 25). Assim, foi realizada a otimização da condição cromatográfica por CLAE-DAD no modo isocrático para a purificação dos constituintes químicos. As análises foram conduzidas à temperatura de 25 °C e vazão de 1,0 mL/min, utilizando coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, microsorb, 250 x 4,6 mm, 5 µm). As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL, e então filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 20 µm. O volume de injeção foi padronizado para 20 µL. A melhor condição estabelecida para a separação dos constituintes químicos de PAE-2.2 foi MeOH-H₂O (4:21) com 0,5% v/v de ácido acético glacial (AcOH).

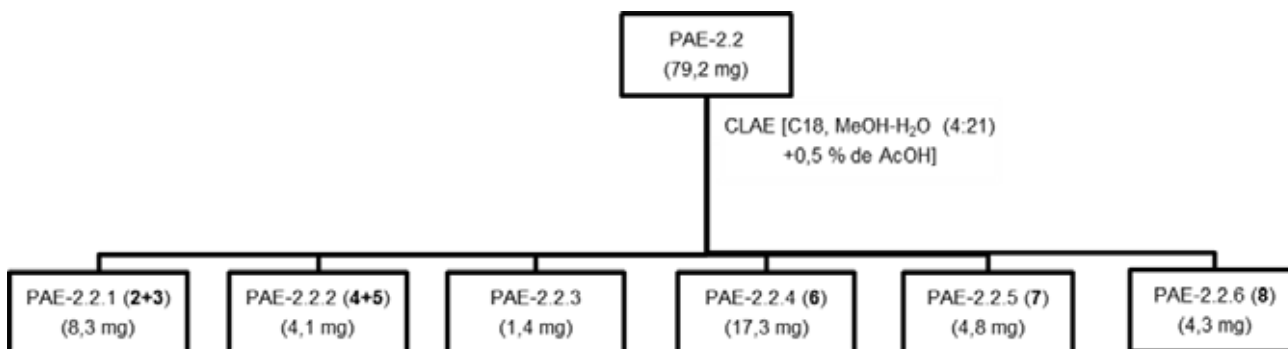
Na sequência, o método acima foi convertido [14] para a escala semipreparativa e utilizado na separação dos constituintes por CLAE-UV. As análises foram realizadas utilizando coluna semipreparativa de fase reversa C-18 (Varian, microsorb, 250 x 20 mm, 5 µm) a uma vazão de 10,0 mL/min. A amostra PAE-2.2 foi preparada na concentração de 10,0 mg/mL, e então filtrada através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20 µm. O volume de injeção foi padronizado em 1,0 mL.

Foram coletadas seis frações (PAE-2.2.1 a PAE-2.2.6). Todas as frações foram secas em rotaevaporador à pressão reduzida e à temperatura de 45 °C.

Dissertação de Mestrado

Posteriormente, as frações foram mantidas em capela de exaustão até eliminação do solvente. As massas obtidas estão apresentadas no (Esquema 2, p. 28).

Esquema 2 - Fracionamento de PAE-2.2.



Todas as frações obtidas da separação de PAE-2.2 foram analisadas por RMN de ^1H . As frações PAE-2.2.1, PAE-2.2.2 e PAE-2.2.4 foram submetidas a experimentos de RMN de ^{13}C , $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$. As frações PAE-2.2.5 e PAE-2.2.6 foram submetidas apenas a experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C . Adicionalmente, a fração PAE-2.2.1 foi submetida a experimentos de $g\text{DOSY}$ e a PAE-2.2.2 ao experimento de TOCSY-1D .

3.6. Purificação do ácido rosmarínico (AR)

Visando a quantificação de ácido rosmarínico (AR) a substância isolada do extrato PAE conforme descrito no item 3.5.1 (p. 25) foi purificada. Para tal, foram realizadas otimizações de condições cromatográficas em CLAE-DAD. As análises foram conduzidas à temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ e vazão de $1,0\text{ mL/min}$, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, $250 \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$). As amostras foram preparadas na concentração de $1,0\text{ mg/mL}$, e então filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de $0,20\text{ }\mu\text{m}$. O volume de injeção foi padronizado em $20\text{ }\mu\text{L}$. A condição utilizada para a transferência do método para a escala semipreparativa foi $\text{ACN-H}_2\text{O}$ (1:3) com $0,5\%$ de ácido acético glacial.

Na sequência, o método acima foi convertido [14] para a escala semipreparativa e utilizado na separação dos constituintes por CLAE-UV. As análises foram realizadas utilizando coluna semipreparativa de fase reversa C-18 (Varian, microsorb, 250×20

Dissertação de Mestrado

mm, 10 μm) a uma vazão de 10,0 mL/min. As amostras foram preparadas na concentração de 10,0 mg/mL, e então filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20 μm . O volume de injeção foi de 1,0 mL.

3.7. Preparo das soluções padrões de AR

O ácido rosmarínico foi isolado em nosso laboratório a partir da PAE-2.4 item 3.5.1 (p. 25) e purificado (item 3.6). A pureza deste ácido mediante análise por CLAE-DAD foi de 95%, enquanto que, pela análise do espectro de RMN de ^1H , foi de ~98%.

A solução estoque de AR foi preparada em ACN- H_2O (11:39) na concentração de 500,0 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, por diluições sucessivas, foram obtidas soluções de trabalho nas concentrações de 20,0, 35,0, 50,0, 75,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo adicionado a essas soluções 1% (v/v) de ácido acético glacial. Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração.

3.8. Validação do método analítico usando CLAE

Para a validação do método analítico foram utilizados os seguintes parâmetros: calibração, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e quantificação.

3.8.1. Curva analítica e linearidade

A otimização das condições cromatográficas para a construção da curva analítica considerou as seguintes variáveis: solvente orgânico (ACN e MeOH) e quantidade de modificador ácido (AcOH) adicionado à fase aquosa (0,5 e 1,0%). A melhor condição cromatográfica consistiu na mistura de ACN- H_2O (23:77) com 1% de AcOH. Para as análises em CLAE-DAD foi utilizado temperatura de 25 $^\circ\text{C}$, vazão de 1,0 mL/min, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C-18 e volume de injeção de 20 μL e 330 nm.

Para a construção da curva analítica, soluções de AR em cinco concentrações (20,0 35,0 50,0 75,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas e injetadas no cromatógrafo em triplicata.

A linearidade do método foi realizada a partir dos dados apresentados na curva analítica, compreendendo o intervalo de 12,1-100,0 µg/mL. A linearidade foi avaliada pela análise do coeficiente de determinação da curva de calibração (r^2).

3.8.2. Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com o método baseado na curva analítica [15].

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a seguinte fórmula:

$$LD = 3,3(b/a) \quad \text{Equação 1}$$

Para o cálculo do limite de quantificação foi utilizada a fórmula:

$$LQ = 10(b/a) \quad \text{Equação 2}$$

onde a é o coeficiente angular e b é o coeficiente linear da curva analítica.

3.8.3. Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada em ensaios de repetitividade (intradia) e precisão intermediária (interdia). Para estes ensaios foram avaliados três níveis de concentração do padrão AR (20,0 35,0 e 50,0 µg/mL) e um total de dez injeções (20 µL cada) num período de 24 horas para as análises intradia e um total de 10 injeções para as análises interdia num período de sete dias.

A precisão foi avaliada mediante análise do desvio padrão entre as injeções (σ) e do coeficiente de variação (CV) das áreas das bandas cromatográficas e a média (média das áreas das bandas cromatográficas do pico de AR).

$$CV = \sigma / \text{Média} \quad \text{Equação 3}$$

3.8.4. Recuperação

Ribani e colaboradores (2004) [15] recomendam que as porcentagens de adição de padrão externo sejam 25, 50 e 100% da concentração estimada do analítico na matriz a ser quantificado. Para o ensaio de recuperação foram utilizados 32, 63 e 126% de ácido rosmarínico.

Dissertação de Mestrado

Partiu-se de 10 mg de PAE para cada nível de fortificação. Estimando-se que a concentração de AR em PAE era de 32 µg/mg, utilizou-se para a fortificação 50,6, 60,8 e 81 µg de AR, as quais correspondem às três porcentagens de AR em ordem crescente (32, 63 e 126%).

As amostras fortificadas foram submetidas à SPE utilizando cartucho com fase estacionária C18. Estes foram equilibrados com 5 mL de MeOH. O analito foi dissolvido em 1 mL de MeOH, aplicado no cartucho e eluído com 4 mL de MeOH para garantir que todo o analito fosse eluído.

Os eluatos foram submetidos à capela de exaustão para eliminação do solvente, o que resultou nas massas 9,2, 9,1 e 8,7 mg. Soluções destas amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em uma mistura de solventes, ACN-H₂O (23:77) com 1% (v:v) de AcOH. Todas as amostras foram analisadas em CLAE-DAD, em 330 nm e volume de injeção de 20 µL, conforme descrito no item 3.8.1 (p. 29).

A porcentagem de recuperação foi calculada seguindo a equação:

$$\%R = 100 (C_f - C_{nf})/C_{pd}$$

onde %R = porcentagem do padrão recuperado,

C_f = concentração do analito na amostra fortificada,

C_{nf} = concentração do analito na amostra não fortificada,

C_{pd} = concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

3.8.5. Quantificação

O método analítico desenvolvido item 3.8.1 (p. 29) foi aplicado para a quantificação de AR no extrato de PAE. Na quantificação do AR foi utilizado o método de calibração externa, o qual compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas a partir de um padrão [15].

A condição cromatográfica utilizada para a quantificação por CLAE-DAD foi aquela descrita no item 3.8.1 (p. 29).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Considerações preliminares

O espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico (Espectro 1, p. 66) apresentou sinais característicos de clorofila (δ 9,76, 9,52, 9,39, 8,55, 3,91, 3,42, dentre outros), inclusive de hidrogênios alifáticos característicos da parte terpênica.

As revelações das cromatoplasmas com solução de reagente de Dragendorff e com iodocloroplatinato de potássio não forneceram o aparecimento de manchas indicativas de amins. No entanto, a análise utilizando solução de vanilina sulfúrica apresentou manchas de cor roxo acinzentada, indicando a possível presença de terpenoides e/ou fenilpropanoides.

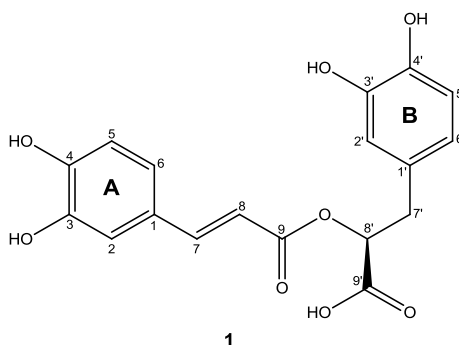
A análise preliminar dos espectros das frações do extrato etanólico solúvel (Espectro 2, p. 66) e insolúvel em CHCl_3 (Espectro 3, p. 67) evidenciou que a insolúvel apresentou ausência de clorofila e de substâncias de origem alifática, sendo uma indicação que o procedimento de lavagem poderia ser uma alternativa para o fracionamento do extrato.

Assim, uma partição de PAE com clorofórmio gerou duas frações PAE-1 e PAE-2 que, quando analisadas por RMN de ^1H (Espectros 4 e 5, p. 67-68), mostrou que o procedimento foi eficiente, uma vez que foi possível retirar grande quantidade de clorofila e de substâncias de origem alifática (graxa) pela solubilização destas em CHCl_3 .

4.2. Caracterização estrutural das substâncias 1-8

4.2.1. (*R*)-Ácido Rosmarínico (1)

A identificação da substância 1 como sendo ácido rosmarínico (AR) (Figura 4, p. 33) foi feita principalmente pela análise dos dados de EM, RMN de ^1H , APT, $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$, bem como a partir da comparação desses dados com os da literatura [16,17].

Figura 4 - Estrutura do (*R*)-ácido rosmarínico (**1**).

O espectro de massas de **1** (Espectro 34, p. 82), apresentou íon desprotonado $[M-H]^-$ com m/z 359. Pelo experimento de RMN de APT (Espectro 6, p. 68) e EM de **1** foi possível atribuir a fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$. Observou-se 18 sinais de carbonos, dos quais doze foram atribuídos a carbonos aromáticos, sendo quatro deles carbonos oxigenados (δ 145,8, 148,9, 145,1 e 144,2) e dois carbonos aromáticos não hidrogenados (δ 125,6 e 127,7). Além destes, observou-se dois carbonos acílicos (δ 171,2 e 166,3), dois carbonos olefínicos (δ 146,2 e 113,5), um carbono benzílico (δ 36,4) e um carbono metínico oxigenado (δ 73,2) (Tabela 2, p. 34).

Os hidrogênios olefínicos observados no espectro de RMN de 1H (Espectro 7, p. 69) são referentes a um sistema de configuração *trans* H-7 (δ 7,45, *d*, $J = 15,8$ Hz) e H-8 (δ 6,24, *d*, $J = 15,8$ Hz). O sistema de hidrogênios aromáticos, diretamente ligado ao sistema olefínico, apresenta padrões de acoplamentos *orto* (δ 6,77, *d*, $J = 8,1$ Hz, H-5), *orto / meta* (δ 6,99, *dd*, $J = 2,0$ e 8,1 Hz, H-6) e *meta* (δ 7,05, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2), enquanto que o outro sistema aromático apresenta acoplamentos *orto* (δ 6,63, *d*, $J = 8,1$ Hz, H-5'), *orto / meta* (δ 6,52, *dd*, $J = 2,0$ e 8,1 Hz, H-6') e *meta* (δ 6,67, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'). O espectro de RMN de 1H apresenta também os hidrogênios metilênicos H-7'a (δ 2,89, *dd*, $J = 4,1$ e 14,4 Hz) e H-7'b (δ 2,98, *dd*, $J = 8,5$ e 14,4 Hz), como dois duplos dubletos, pelo fato de não serem magneticamente equivalentes e de serem vizinhos a um centro estereogênico (δ 5,02, *dd*, $J = 4,1$ e 8,5 Hz, H-8'). Observou-se ainda sinais referentes a quatro grupos hidroxílicos (δ 9,72, 9,33, 8,87 e 8,25) (Tabela 2, p. 34).

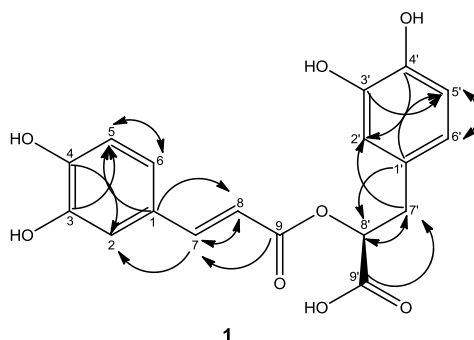
Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1** (DMSO- d_6 , 14,1 T).

Posição	δ_{C} de 1	δ_{C} de AR [16]	δ_{H} de 1	δ_{H} de AR [16]
1	125,6	125,9	-	-
2	114,9	115,4	7,05 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	7,03 (<i>s</i>)
3	145,8	144,5	-	-
4	148,9	145,4	-	-
5	116,0	116,3	6,77 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	6,73 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
6	122,0	122,1	6,99 (<i>dd</i> , $J = 2,0; 8,1$ Hz)	6,96 (<i>dl</i> , $J = 8,5$ Hz)
7	146,2	146,3	7,45 (<i>d</i> , $J = 15,8$ Hz)	7,41 (<i>d</i> , $J = 16,1$ Hz)
8	113,5	113,9	6,24 (<i>d</i> , $J = 15,8$ Hz)	6,20 (<i>d</i> , $J = 16,1$ Hz)
9	166,3	166,5	-	-
1'	127,7	128,1	-	-
2'	116,9	117,2	6,67 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,64 (<i>s</i>)
3'	145,1	146,4	-	-
4'	144,2	149,1	-	-
5'	115,6	115,9	6,63 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	6,60 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)
6'	120,3	120,5	6,52 (<i>dd</i> , $J = 2,0; 8,1$ Hz)	6,48 (<i>dl</i> , $J = 8,4$ Hz)
7'a	36,4	36,8	2,89 (<i>dd</i> , $J = 8,5; 14,4$ Hz)	2,90 (<i>dd</i> , $J = 8,4; 13,2$ Hz)
7'b			2,98 (<i>dd</i> , $J = 4,1; 14,4$ Hz)	2,99 (<i>dd</i> , $J = 3,8; 13,2$ Hz)
8'	73,2	73,7	5,02 (<i>dd</i> , $J = 4,1; 8,5$ Hz)	4,96 (<i>dd</i> , $J = 3,8; 8,4$ Hz)
9'	171,2	171,7	-	-

No mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de **1** (Espectro 10, p. 70), observou-se a correlação de H-8 (δ 6,24) com o carbono em δ 125,6 (C-1) e, diante desta informação, foi possível confirmar a ligação do sistema olefínico ao anel aromático A. Observou-se que H-7'a (δ 2,89) apresenta correlação com os carbonos C-9', C-2' e C-6' (δ 171,2, 116,9 e 120,3) e com C-8' (δ 73,2) a J_2 , enquanto que H-7'b (δ 2,98) apresentou correlações com os carbonos C-2' e C-6' (δ 116,9 e 120,3), confirmando a ligação deste sistema ao anel aromático B. No mapa de contornos do experimento $g\text{COSY}$ (Espectro 8, p. 69), foram observadas as interações entre os sinais de H-7'a e H-7'b com H-8', entre H-5 e H-6 como também entre H-5' e H-6'. As principais correlações observadas nos mapas de contornos $g\text{COSY}$ e $g\text{HMBC}$ de **1** estão apresentadas na (Figura 5, p. 35).

A atribuição dos δ dos hidrogênios e dos carbonos de **1** (Tabela 2, p. 34) foi também auxiliada pelas correlações observadas no mapa de contornos $g\text{HSQC}$ (Espectro 9, p. 70).

Figura 5 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos *g*COSY (\leftrightarrow) e *g*HMBC (\rightarrow) de **1**.



O dados de elipticidade molar da curva de Dicroísmo Circular (DC) de **1** (Espectro 35) estão de acordo com aqueles da literatura [18] para configuração (*R*)

O levantamento bibliográfico sobre o (*R*)-ácido rosmarínico (**1**) mostrou que este tem grande valor agregado, uma vez que tem aplicações como anti-inflamatório, antioxidante, antimutagênico, antibacteriano e antivirótico, dentre outras [17, 19].

4.2.2. Ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**2**) e Fenilalanina (**3**)

A identificação das substâncias **2** e **3** como sendo ácido 3-*O*-cafeoilquínico e fenilalanina, respectivamente (Figura 7, p. 36), foi realizada principalmente pela análise dos dados de RMN de ^1H , de ^{13}C , *g*COSY, *g*HSQC, *g*HMBC e *g*DOSY da mistura (Espectros 11-19), bem como a partir da comparação desses dados com os da literatura [20-23].

Os derivados de ácidos clorogênicos e ácido cafeico são encontrados geralmente em extratos de grãos de café [20]. Estes ácidos clorogênicos são formados pela transesterificação de uma unidade de ácido quínico e 4-coumaroil-CoA, e por um processo oxidativo na posição 3' do anel aromático (Figura 6, p. 36).

Por alguns anos, houve muita confusão em como realizar a numeração das posições da unidade de ácido quínico nos derivados de ácidos clorogênicos. Assim, foi estabelecida pela IUPAC a recomendação de que a posição C1 é aquela em que está ligado ao grupo hidroxílico em axial e um carboxílico em equatorial, e que a posição C3 é aquela que possui um grupo hidroxílico na posição axial [24].

No trabalho de Wei e colaboradores (2010), foi possível diferenciar os isômeros de CQA's de acordo com os δ de RMN de ^{13}C das posições 3, 4 e 5 da unidade de ácido quínico [20]. Para o isômero 3-CQA, os δ destas posições foram 73,8, 74,6 e 67,9

ppm, para 4-CQA os δ foram 69,1, 78,7 e 65,9 e para o isômero 5-CQA os δ destas posições são acima de 70 ppm (Figura 7, p. 36).

Figura 6 - Estruturas do Ácido 3-O-cafeoilquínico **2** e Fenilalanina **3**.

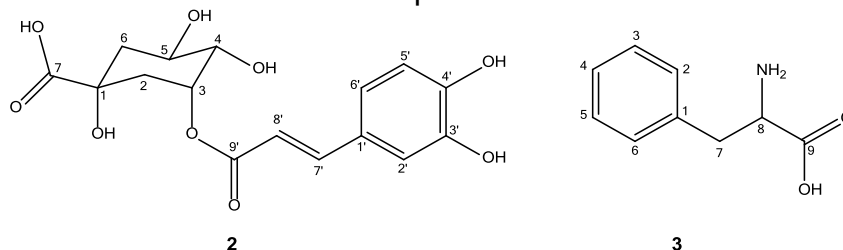
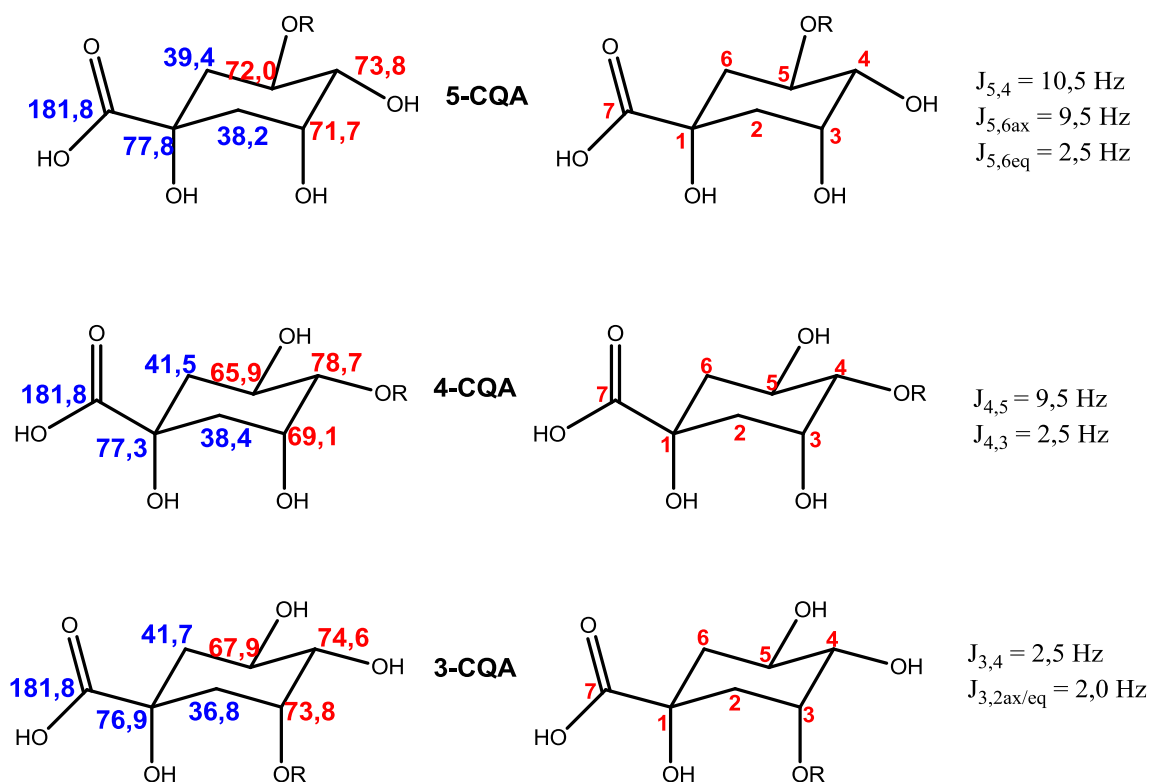


Figura 7 - Comparação dos δ de RMN de ^{13}C dos isômeros de ácido clorogênico e análise das constantes de acoplamento.



Pela análise das integrais do espectro de RMN de ^1H e do espectro de RMN de ^{13}C da fração PAE-2.2.1 (Espectros 11-14, p. 71-72) evidenciou-se a presença de uma mistura de substâncias em proporção 2:1. Em vista disto, foi realizado um experimento de espectroscopia de coeficiente de difusão ordenada (*gDOSY*) para verificar quais sinais no espectro de RMN de ^1H correspondem ao composto de mesmo coeficiente de difusão.

Dissertação de Mestrado

Foi possível observar dois coeficientes de difusão distintos (Espectro 16, p. 73), revelando que um dos compostos ocupa um volume molecular em solução consideravelmente maior do que o outro, o que lhe confere um coeficiente de difusão menor. A substância **2** apresentou coeficiente de difusão $-9,34 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, enquanto que a substância **3** apresentou coeficiente de $-9,17 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

Com o auxílio de experimentos de RMN de ^1H , de ^{13}C , *g*COSY, *g*HMBC e *g*HSQC ambas as substâncias foram identificadas **2+3** (Espectros 11-19). Para **2** (Espectro 11, p. 71), foram observados sinais de hidrogênios pertencentes a um sistema aromático trissubstituído em δ 7,22 (*sl*, H-2'), 6,96 (*d*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-5') e 7,15 (*dl*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-6'). Os sinais em δ 7,66 (*d*, $J = 16,0 \text{ Hz}$, H-7') e 6,45 (*d*, $J = 16,0 \text{ Hz}$, H-8') apresentam deslocamentos químicos e constantes de acoplamento característicos de um sistema olefínico conjugado de configuração *trans*.

No mapa de contornos *g*HMBC de **2** (Espectro 19, p. 75), observou-se a correlação entre H-8' (δ 6,45) com o carbono em δ 127,7 (C-1'), confirmando a ligação do sistema olefínico ao anel aromático. Observou-se que H-7' (δ 7,66) apresentou correlação com os carbonos C-9' e C-6' (δ 169,8 e 123,3). Observou-se ainda a correlação entre H-6' (δ 7,15) e C-4' (δ 147,7), entre H-5' (δ 6,96) e C-3' (δ 144,9), e entre H-3 (δ 5,40) e C-1 e C-5 (δ 76,5 e 67,6). No mapa de contornos do experimento *g*COSY (Espectro 17, p. 74) foram observadas as interações entre H-7' (δ 7,66) e H-8' (δ 6,45), e entre H-5' (δ 6,96) e H-6' (δ 7,15).

A presença de hidrogênio oximetínico em δ 4,18 (H-5) com constantes de acoplamento de 10,1 Hz ($^3J_{5ax,6ax}$ e $^3J_{5ax,4ax}$) e 3,8 Hz ($^3J_{5ax,6eq}$) sugere que H-5 está na posição axial. Analogamente, o sinal em δ 3,77 (H-4) com constantes de acoplamento de 9,4 Hz ($^3J_{4ax,5ax}$) e 3,1 Hz ($^3J_{4ax,3eq}$) também deve ocupar uma posição axial. Ainda, o sinal em δ 5,40 (H-3) exibiu constante de acoplamento de 2,5 Hz ($^3J_{3eq,2eq}$), sugerindo assim que H-3 esteja na posição equatorial. Na região de absorção de hidrogênios metilênicos, foi observado um dubleto largo em δ 2,24, cujo hidrogênio (H-2) exibiu uma constante de acoplamento de 14,3 Hz sugerindo um acoplamento geminal.

As principais correlações observadas nos mapas de contornos *g*COSY e *g*HMBC de **2** estão representadas na (Figura 8, p. 38). A comparação destes dados com os dados da literatura confirmou a ligação da unidade cafeoila com a unidade de ácido quínico [20].

Dissertação de Mestrado

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **2 (14,1 T).**

Posição	δ_{H} de 2^*	δ_{H} de Ácido Neoclorogênico [21]**	δ_{C} de 2^*	δ_{C} de Ácido Neoclorogênico [20]*
1	-	-	76,5	76,9
2 _{ax}	2,11 (m)	2,20 (dd, J = 4,0 e 15,0 Hz)	36,4	36,8
2 _{eq}	2,24 (dl, J = 14,3 Hz)	2,13 (m)		
3	5,40 (dl, J = 2,5 Hz)	5,34 (ddd, J = 3,0; 3,0 e 4,0 Hz)	73,6	73,8
4	3,77 (dd, J = 3,1 e 9,4 Hz)	3,63 (dd, J = 3,0 e 9,0 Hz)	74,3	74,6
5	4,18 (dddd, J = 3,8; 10,1 e 10,1 Hz)	4,14 (ddd, J = 3,0; 9,0 e 9,0 Hz)	67,6	68,0
6 _{eq}	2,11 (m)	2,13 (m)	41,4	41,7
6 _{ax}	1,94 (m)	1,95 (dd, J = 9,0 e 14,0 Hz)		
7	-	-	181,8	181,8
1'	-	-	127,7	127,5
2'	7,22 (sl)	7,04 (d, J = 2,0 Hz)	115,8	115,4
3'	-	-	144,9	145,1
4'	-	-	147,7	147,9
5'	6,96 (d, J = 8,0 Hz)	6,76 (d, J = 8,0 Hz)	116,9	116,7
6'	7,15 (dl, J = 8,0 Hz)	6,93 (ddd, J = 2,0 e 8,0 Hz)	123,3	123,3
7'	7,66 (d, J = 16,0 Hz)	7,58 (d, J = 16,0 Hz)	146,7	147,1
8'	6,45 (d, J = 16,0 Hz)	6,30 (d, J = 16,0 Hz)	115,6	115,0
9'	-	-	169,8	170,0

*Experimento realizado em D₂O.

**Experimento realizado em CD₃OD.

O levantamento bibliográfico sobre as atividades biológicas do ácido 3-O-cafeoilquínico, também conhecido como ácido neoclorogênico, revelou que esta substância apresenta atividade antioxidante, citotóxica, antialimentar, inibidora do crescimento de *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae), dentre outras [25-28].

Os sinais remanescentes nos espectros de RMN foram então atribuídos à substância **3**. Assim, no espectro de RMN de ^1H (Espectro 11, p. 71), foram observados sinais de hidrogênios que absorveram na região típica de hidrogênios aromáticos em δ 7,42 (*t*, $J_{ap} = 7,2$ Hz), 7,37 (*d*, $J_{ap} = 7,2$ Hz) e 7,31 (*d*, $J_{ap} = 7,2$ Hz), característicos de um anel aromático monossustituído. Na região de hidrogênios alifáticos, observou-se sinal em δ 4,00 (*dd*, $J = 5,3$ e 8,0 Hz), referente a um sinal de hidrogênio *N*-metínico α -carboxílico, em δ 3,30 (*dd*, $J = 5,3$ e 14,5 Hz) e 3,13 (*dd*, $J = 8,0$ e 14,5 Hz) referentes a hidrogênios metilênicos benzílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C para a substância **3** (Espectro 15, p. 73) apresentou sinais referentes a carbonos que absorveram na região dos carbonos aromático em δ 129,9, 129,7 e 128,3. A intensidade duplicada dos sinais em δ 129,9 e 129,7 quando comparada a do sinal em δ 128,3, sugere que existam carbonos magneticamente equivalentes nesta região.

No mapa de contornos *g*COSY (Espectro 17, p. 74), foram observados sinais das interações entre os hidrogênios que absorvem na região aromática em δ 7,37 (H-4) com δ 7,41 (H-3 e H-5), e também deste último com o hidrogênio em 7,31 (H-2 e H-6). Foi observada também sinais das interações entre hidrogênios que absorvem na região alifática em δ 4,00 (H-8) com δ 3,30 e 3,13 (H-7a e H-7b).

No mapa de contornos *g*HMBC (Espectro 19, p. 75) foi observado correlação do sinal em δ 36,9 (C-7) com δ 7,31 (H-2 e H-6), o que confirma a ligação do sistema alifático com o anel aromático. Foi observada ainda correlações entre o carbono em δ 174,4 (C-9) e os hidrogênios benzílicos em δ 3,13 e 3,30 (H-7b e H-7a, respectivamente), evidenciando a presença de um carbono acila a 3J . Ainda observou-se uma correlação importante entre δ 135,7 (C-1) com os hidrogênios em δ 4,00 (H-8) e 7,41 (H-3 e H-5). As principais correlações observadas nos mapas de contornos *g*COSY e *g*HMBC de **3** estão representadas na (Figura 9, p. 41).

Dissertação de Mestrado

As atribuições dos δ dos hidrogênios e dos carbonos de **3** (Tabela 4, p. 41) foram também confirmadas pelas correlações observadas no mapa de contornos *g*HSQC (Espectro 18, p. 74). Portanto, **3** foi identificado como sendo fenilalanina [22,23].

Figura 9 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos *g*COSY (\leftrightarrow) e *g*HMBC (\rightarrow) de **3**.

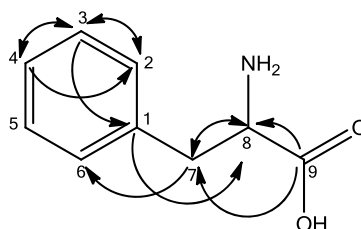


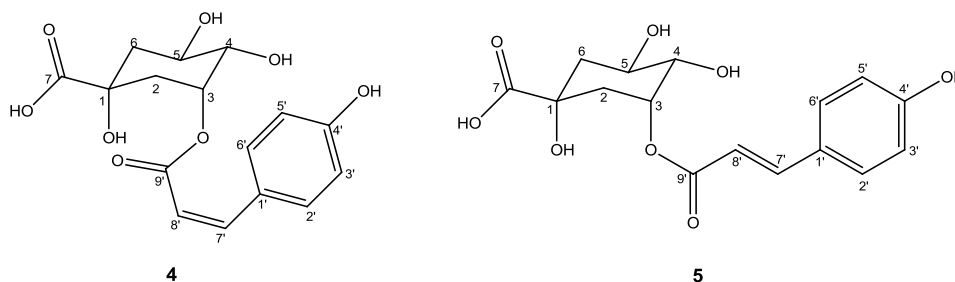
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **3** (D_2O , 14,1 T).

Posição	δ_{H} de 3	δ_{H} de Fenilalanina [22]	δ_{C} de 3	δ_{C} de Fenilalanina [23]
1	-	-	135,7	135,1
2 e 6	7,31 (<i>d</i> , $J_{ap} = 7,2$ Hz)	7,2-7,4 (<i>m</i>)	129,9	129,4
3 e 5	7,42 (<i>t</i> , $J_{ap} = 7,2$ Hz)	7,2-7,4 (<i>m</i>)	129,7	129,1
4	7,37 (<i>d</i> , $J_{ap} = 7,2$ Hz)	7,2-7,4 (<i>m</i>)	128,3	127,7
7a	3,30 (<i>dd</i> , $J = 5,3$ e 14,5 Hz)	3,2 (<i>dd</i> , $J = 5,2$ e 14,5 Hz)	36,9	36,4
7b	3,13 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 14,5 Hz)	3,0 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 14,5 Hz)		
8	4,00 (<i>dd</i> , $J = 5,3$ e 8,0 Hz)	3,9 (<i>dd</i> , $J = 5,2$ e 7,9 Hz)	56,7	56,1
9	-	-	174,4	173,9

4.2.3. Ácidos *cis* e *trans* 3-*O*-Coumaroilquínico (**4**) e (**5**)

A identificação das substâncias **4** e **5** como sendo os ácidos 3-*O-cis*-coumaroilquínico e 3-*O-trans*-coumaroilquínico, respectivamente (Figura 10, p. 42), foi realizada principalmente pela análise de seus dados de RMN de ^1H , de ^{13}C , TOCSY-1D, *g*COSY, *g*HSQC, *g*HMBC (Espectros 20-27), bem como a partir da comparação desses dados com os da literatura [29] e de **2**.

Figura 10 – Estruturas do ácido 3-*O*-*cis*-coumaroilquínico (**4**) e ácido 3-*O*-*trans*-coumaroilquínico (**5**).



No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 23 **Espectro 23**, p. 77), foram observados 21 sinais de carbonos, dos quais dois são carbonos acílicos (δ 168,6 e 168,3), doze estão na região de absorção de carbonos aromáticos e/ou olefínicos (δ 158,3, 156,7, 146,1, 144,3, 131,6, 130,4, 126,9, 126,8, 116,9, 115,9, 115,0 e 114,9), cinco são carbonos carbinólicos (δ 77,7, 76,6, 73,4, 72,9 e 66,9), e dois são carbonos metilênicos (δ 40,6 e 35,6).

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 20, p. 75) apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos, além de hidrogênios carbinólicos e metilênicos. Na região de absorção de hidrogênios aromáticos observou-se sinais em δ 7,61 (*d*, $J = 8,2$ Hz), 7,52 (*d*, $J = 8,3$ Hz), 6,96 (*d*, $J = 8,2$ Hz) e 6,90 (*d*, $J = 8,3$ Hz). Ainda neste espectro, foram observados sinais em δ 7,73 (*d*, $J = 16,0$ Hz) e δ 6,49 (*d*, $J = 16,0$ Hz) característicos de um sistema olefínico com configuração *trans*, enquanto que em δ 7,08 (*d*, $J = 12,3$ Hz) e 6,00 (*d*, $J = 12,3$ Hz) foram observados sinais característicos de um sistema olefínico com configuração *cis*. Foram observados ainda hidrogênios oximetínicos em δ 5,41 (*dl*, $J = 2,3$ Hz) e 5,35 (*dl*, $J = 2,8$ Hz), 3,78-3,71 (*m*), 4,18 (*dt*, $J = 3,9$ e 9,3 Hz), 4,08 (*dt*, $J = 4,2$ e 10,1 Hz) e hidrogênios metilênicos δ 2,25-1,90 (*m*).

A análise das constantes de acoplamento entre os hidrogênios e das integrais no espectro de RMN de ^1H (Espectro 20, p. 75) das substâncias **4** e **5** foi um fator determinante para a atribuição, tanto do padrão de substituição no sistema aromático, quanto da configuração relativa da unidade de ácido quínico. A análise das integrais referentes aos hidrogênios olefínicos revelou a presença de uma mistura de isômeros *cis-trans* na proporção 2:3.

No experimento de irradiação seletiva TOSCY-1D (Espectro 24, p. 77), observou-se as interações do hidrogênio em δ 5,41 (H-3) com δ 4,18, 3,77-3,71, 2,25-2,05, 2,13-2,05 e 1,93 para um sistema, e as interações do hidrogênio em δ 5,35 com δ 4,08, 3,77-3,71, 3,71, 2,25-2,05, 2,13-2,05 e 1,93 para o outro sistema.

Dissertação de Mestrado

No mapa de contornos *g*HMBC (Espectro 27, p. 79), foram observadas diferentes correlações para as substâncias de configuração *cis* (**4**) e *trans* (**5**). Para **5**, foram observadas correlações entre C-1' (δ 126,8) com os hidrogênios H-5' e H-8' (δ 6,96 e 7,73), entre C-4' (δ 158,3) e o H-6' (δ 7,61) e entre C-9' (δ 168,6) e o H-7' (δ 7,73). Enquanto que para **4** foram observadas as correlações entre C-1' (δ 126,9) e os hidrogênios H-5' e H-8' (δ 6,90 e 6,00), entre C-4' (δ 156,7) e o H-6' (δ 7,52) e entre C-9' (δ 168,3) e H-7' (δ 7,08).

No mapa de contornos *g*COSY (Espectro 25, p. 78) foram observadas as interações para a substância **4** entre H-6' (δ 7,52) e H-5' (δ 6,90), entre H-7' (δ 7,08) e H-8' (δ 6,00), entre H-5 (δ 4,08) com H-4 e H-6 (δ 3,78-3,71, 2,13-2,05 e 1,93), entre H-4 (δ 3,78-3,71) com H-3 e H-5 (δ 5,35 e 4,08) e entre H-3 (δ 5,35) e H-2 (δ 2,25-2,18). Enquanto que, para a substância **5**, foram observadas as interações entre H-6' (δ 7,61) e H-5' (δ 6,96), entre H-7' (δ 7,73) e H-8' (δ 6,49), entre H-5 (δ 4,18) com H-4 e H-6 (δ 3,78-3,71, 2,13-2,05 e 1,93), entre H-4 (δ 3,78-3,71) com H-3 e H-5 (δ 5,41 e 4,18) e entre H-3 (δ 5,41) e H-2 (δ 2,25-2,18). Comparando os dados de RMN de **4** e **5** com os de **2**, observou-se que eles diferem apenas quanto aos deslocamentos químicos e multiplicidades relativos ao anel A. As substâncias **4** e **5** diferem de **2** pela ausência de um grupo hidroxílico no C-3'.

O mapa de contornos *g*HMBC (Espectro 27, p. 79) apresentou também correlações em comum para as substâncias **4** e **5**, como a interação entre C-4 (δ 73,4) e os hidrogênios H-6_{ax} e H-6_{eq} (δ 2,13-2,05 e 1,93). Este conjunto de dados e a comparação dos deslocamentos químicos de **4** e **5** com aqueles descritos na literatura confirmaram a ligação da unidade coumaroila com a unidade de ácido quínico [29].

As principais correlações e interações que foram observadas nos mapas de contorno bidimensionais *g*HMBC e *g*COSY estão descritas na (Figura 11, p. 44).

Nas Tabelas 5 e 6 (p. 44 e 45, respectivamente) estão apresentados os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **4** e **5**.

Dissertação de Mestrado

Figura 11 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos *g*COSY (\leftrightarrow) e *g*HMBC (\rightarrow) de **4** e **5**.

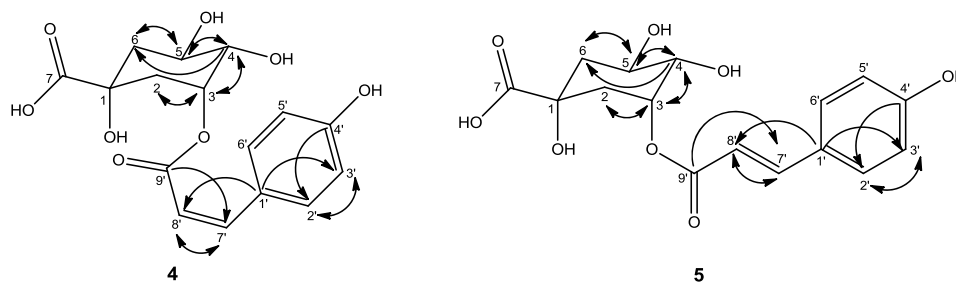


Tabela 5 - Dados de RMN de ^{13}C de **4** e **5** (D_2O , 14,1 T).

Posição	4	5
1	77,7	76,6
2	35,6	35,6
3	72,9	72,9
4	73,4	73,4
5	66,9	66,9
6	40,6	40,6
7	*	*
1'	126,9	126,8
2' e 6'	131,6	130,4
3' e 5'	115,0	115,9
4'	156,7	158,3
7'	144,3	146,1
8'	116,9	114,9
9'	168,3	168,6

* sinal não observado

Dissertação de Mestrado

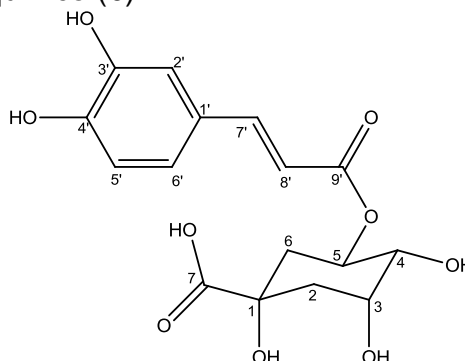
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H de **4** e **5** (D_2O , 14,1 T).

Posição	4	Ácido 3-<i>p</i>-cis-coumaroilquinico [29]	5	Ácido 3-<i>p</i>-trans-coumaroilquinico [29]
2	2,25-2,18 (m)	1,99-2,33 (m)	2,25-2,18 (m)	2,01-2,29 (m)
3	5,35 (dl, J = 2,8 Hz)	5,37 (s)	5,41 (dl, J = 2,3 Hz)	5,33 (m)
4	3,78-3,71 (m)	3,73 (m)	3,78-3,71 (m)	3,77 (dd, J = 8,6 e 3,0 Hz)
5	4,08 (dt, J = 4,2 e 10,1)	4,27 (s)	4,18 (dt, J = 3,9 e 9,3 Hz)	3,90 (d, J = 3,1 Hz)
6	2,13-1,93 (m)	1,99-2,33 (m)	2,13-1,93 (m)	2,01-2,29 (m)
2' e 6'	7,52 (d, J = 8,3 Hz)	7,63 (d, J = 8,2 Hz)	7,61 (d, J = 8,2 Hz)	7,48 (d, J = 8,6 Hz)
3' e 5'	6,90 (d, J = 8,3 Hz)	6,76 (d, J = 8,2 Hz)	6,96 (d, J = 8,2 Hz)	6,84 (d, J = 8,6 Hz)
7'	7,08 (d, J = 12,3 Hz)	6,83 (d, J = 12,7 Hz)	7,73 (d, J = 16,0 Hz)	7,65 (d, J = 16,0 Hz)
8'	6,00 (d, J = 12,3 Hz)	5,79 (d, J = 12,7 Hz)	6,49 (d, J = 16,0 Hz)	6,34 (d, J = 16,0 Hz)

4.2.4. Ácido 5-O-Cafeoilquínico (6)

A identificação da substância **6** como sendo, ácido 5-O-cafeoilquínico (Figura 12, p. 46) foi devida principalmente a análise dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C desta substância.

Figura 12 - Ácido 5-O-cafeoilquínico (**6**).



Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Espectros 28 e 29, p. 79 e 80) são muito semelhantes aos de **2**. Diferenciam basicamente quanto aos deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios, carbonos e também pelas constantes de acoplamento destes hidrogênios relativos à unidade de ácido quínico.

Como foi discutido anteriormente, a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos referentes às unidades de ácido quínico permite a diferenciação entre os isômeros de ácidos clorogênicos (Figura 7, p. 36). Como os δ de C-3, C-4 e C-5 (δ 72,2, 74,3 e 73,1 ppm, respectivamente) de **6** absorvem acima de 70 ppm, conclui-se que **6** trata-se do ácido 5-O-cafeoilquínico.

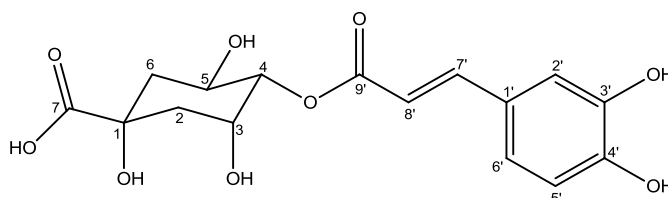
A análise dos δ de RMN de ^1H de **6** e a comparação dos dados deste com os de **2**, confirmam esta identificação (Tabela 7, p. 47) [20].

O levantamento bibliográfico sobre as atividades biológicas do ácido 5-O-cafeoilquínico, também conhecido como ácido clorogênico, revelou que esta substância apresenta atividade citotóxica, antioxidante, antimutagênica, antifúngica, antibacteriana, dentre outras [26, 30-32].

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** (D_2O , 7,0 T)

Posição	δ_{H} de 6	δ_{H} Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico [33]	δ_{C} de 6	δ_{C} Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico [20]
1	-	-	77,9	77,8
2ax	2,3-1,9 (<i>m</i>)	2,15-1,90 (<i>m</i>)	39,1	38,2
2eq	2,3-1,9 (<i>m</i>)	2,15-1,90 (<i>m</i>)		
3	4,22 (<i>sl</i>)	4,21 (<i>m</i>)	72,2	71,7
4	3,83 (<i>sl</i>)	3,73 (<i>dl</i> , $J = 7,0$ Hz)	74,3	73,8
5	5,25 (<i>sl</i>)	5,35 (<i>m</i>)	73,1	72,0
6ax	2,18-2,07 (<i>m</i>)	2,04-2,10 (<i>m</i>)	39,7	39,4
6eq	2,18-2,07 (<i>m</i>)	2,20-2,25 (<i>m</i>)		
7	-	-	180,7	182,1
1'	-	-	129,2	127,5
2'	7,04 (<i>m</i>)	7,03 (<i>d</i> , $J = 1,4$ Hz)	117,3	115,4
3'	-	-	146,5	145,1
4'	-	-	149,4	147,9
5'	6,84 (<i>m</i>)	6,76 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)	118,4	116,7
6'	6,98 (<i>m</i>)	6,92 (<i>dl</i> , $J = 8,3$ Hz)	125,0	123,3
7'	7,49 (<i>d</i> , $J = 13,4$ Hz)	7,55 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz)	148,5	146,7
8'	6,24 (<i>d</i> , $J = 13,4$ Hz)	6,26 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz)	116,6	115,2
9'	-	-	171,2	169,9

4.2.5. Ácido 4-*O*-Cafeoilquínico (**7**)

Figura 13 - Ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**7**).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **7** (Espectros 30 e 31, p. 80 e 81) também são muito semelhantes aos de **2**. Diferenciam basicamente pelos deslocamentos químicos de C3, C-4 e C-5 e multiplicidade dos hidrogênios referentes à unidade de ácido quínico. Os deslocamentos químicos observados para estes carbonos (δ 70,4, 79,9 e 67,0) estão em conformidade com a identificação de **7** com o ácido 4-*O*-cafeoilquínico (Figura 13, p. 47). Esta identificação foi confirmada pela comparação destes dados com aqueles descritos na literatura [20] para esta substância (Tabela 8, p. 48).

Dissertação de Mestrado

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **7** (D_2O , 14,1 T)

Posição	δ_{H} de 7 **	δ_{H} Ácido 4-O-cafeoilquínico [33]*	δ_{C} de 7 **	δ_{C} Ácido 4-O-cafeoilquínico [20]*
1	-	-	78,4	77,30
2ax	2,20-2,0 (<i>m</i>)	2,17 (<i>dd</i> , $J = 4$ e 14 Hz)	39,6	38,44
2eq	2,20-2,0 (<i>m</i>)	2,06 (<i>ddd</i> , $J = 3,4$ e 14 Hz)		
3	4,32 (<i>m</i>)	4,28 (<i>ddd</i> , $J = 3,3$ e 4 Hz)	70,4	69,12
4	4,89 (<i>m</i>)	4,79 (<i>dd</i> , $J = 3$ e 9 Hz)	79,9	78,67
5	4,30 (<i>m</i>)	4,27 (<i>ddd</i> , $J = 4, 9$ e 11 Hz)	67,0	65,86
6ax	2,20-2,0 (<i>m</i>)	2,00 (<i>dd</i> , $J = 11$ e 13 Hz)	42,7	41,49
6eq	2,20-2,0 (<i>m</i>)	2,20 (<i>ddd</i> , $J = 3,5$ e 13 Hz)		
7	-	-	***	181,83
1'	-	-	129,3	127,49
2'	7,13 (<i>s</i>)	7,06 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz)	117,5	115,42
3'	-	-	148,8	145,07
4'	-	-	149,7	147,89
5'	6,89 (<i>d</i> , $J_{\text{ap}} = 6,5$ Hz)	6,77 (<i>d</i> , $J = 8$ Hz)	118,5	116,73
6'	7,06 (<i>d</i> , $J_{\text{ap}} = 6,5$ Hz)	6,96 (<i>dd</i> , $J = 2$ e 8 Hz)	125,1	123,29
7'	7,62 (<i>d</i> , $J = 15,5$ Hz)	7,65 (<i>d</i> , $J = 16$ Hz)	146,6	146,79
8'	6,38 (<i>d</i> , $J = 15,5$ Hz)	6,37 (<i>d</i> , $J = 16$ Hz)	116,6	114,95
9'	-	-	171,3	169,73

* Experimento em CD_3OD

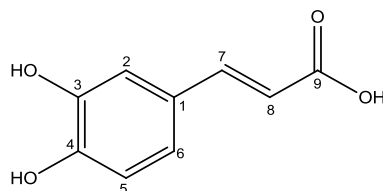
** Experimento em D_2O

*** Sinal não observado

4.2.6. Ácido Cafeico (8)

A identificação da substância **8** como sendo o ácido cafeico (Figura 14, p. 48) foi feita principalmente pela análise dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C (Espectros 32 e 33, p. 81 e 82) de **8**.

Figura 14 - Ácido cafeico (**8**).



O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 33, p. 82) apresenta sinal de carbono acílico (δ 174,5) e de carbonos aromáticos e/ou olefínicos (δ 146,1, 144,1, 142,6, 127,7, 121,9, 116,2 e 114,7).

Dissertação de Mestrado

O espectro de RMN de ^1H de **8** (Espectro 32, p. 81) apresenta sinais na região de hidrogênios aromáticos e/ou olefínicos (δ 6,31, *d*, $J = 15,6$ Hz; δ 6,89, *d*, $J = 7,8$ Hz; δ 7,05, *d*, $J = 7,8$ Hz; δ 7,12, *s* e δ 7,35, *d*, $J = 15,6$ Hz).

A análise da multiplicidade dos sinais de RMN de ^1H e a comparação dos dados de **8** com os descritos na literatura [34], permitiram a identificação de **8** como sendo o ácido cafeico (Tabela 9, p. 49) .

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **8** (D_2O , 14,1 T).

Posição	δ_{H} de 8 **	δ_{H} Ácido cafeico*[34]	δ_{C} de 8 **	δ_{C} Ácido cafeico*[34]
1	-	-	127,7	127,8
2	7,12 (<i>s</i>)	7,03 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	114,7	115,1
3	-	-	142,6	146,8
4	-	-	144,1	149,4
5	6,89 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)	6,77 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	114,7	116,5
6	7,05 (<i>dl</i> , $J = 7,8$ Hz)	6,92 (<i>dd</i> , $J = 2,0$ e $8,0$ Hz)	121,9	122,8
7	7,35 (<i>d</i> , $J = 15,6$ Hz)	7,52 (<i>d</i> , $J = 15,5$ Hz)	146,1	147,0
8	6,31 (<i>d</i> , $J = 15,6$ Hz)	6,21 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz)	116,2	115,5
9	-	-	174,5	171,1

* Experimento em CD_3OD

** Experimento em D_2O

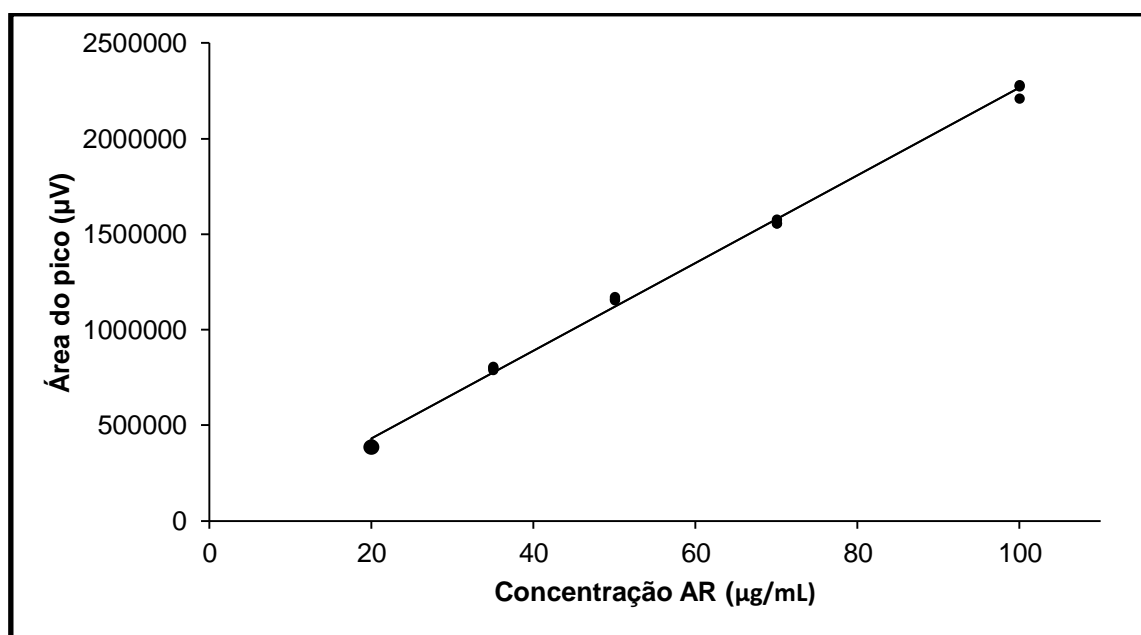
4.3. Determinação da concentração de ácido rosmarínico no extrato

Tendo em vista as atividades biológicas do AR, o isolamento deste em alta concentração no extrato etanólico (~4,4%) e o potencial emprego de *P. atratum* como fonte natural desta substância, a concentração deste ácido no extrato foi também determinada por métodos analíticos quantitativos.

4.3.1. Curva analítica e linearidade

O padrão de AR com grau de pureza de 95% quando analisado por CLAE-DAD e de 98% por RMN de ^1H , foi utilizado para a construção da curva analítica com as concentrações de 20,0, 35,0, 50,0, 70,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Estas amostras foram analisadas por CLAE-DAD, injetadas em triplicata no cromatógrafo, e os valores das áreas das bandas cromatográficas (y) foram plotados em relação à concentração (x, $\mu\text{g/mL}$) utilizando regressão linear ($y = 22933x - 27819$) (Figura 15, p. 50) [15]. A curva apresentou uma boa linearidade tendo $r^2 = 0,9979$, uma vez que, quanto mais próximo de 1 o fator de correlação estiver, maior será a capacidade do método de gerar resultados proporcionais à concentração do composto dentro de uma faixa analítica [35].

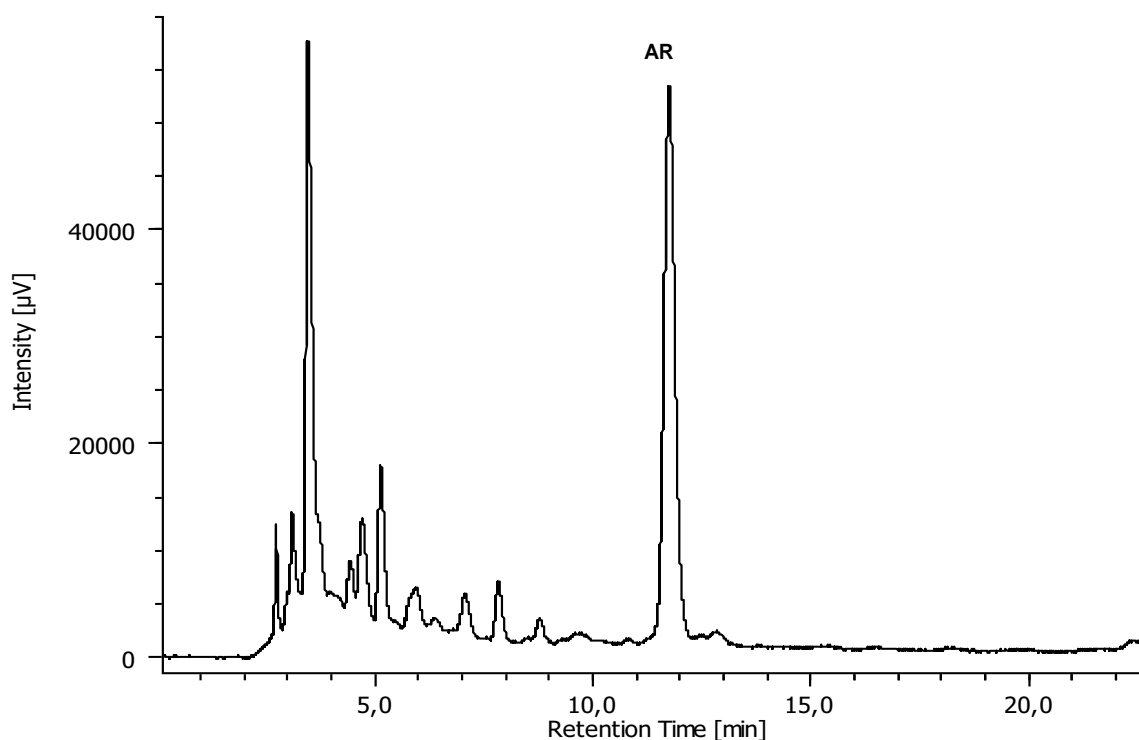
Figura 15 - Curva analítica do padrão AR (C18, $\lambda = 330 \text{ nm}$) nas concentrações 20,0, 35,0, 50,0, 70,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$.



Dissertação de Mestrado

O desenvolvimento do método cromatográfico para as análises da concentração de AR no extrato compreendeu a utilização das variáveis: tipos de solventes orgânicos, e quantidade de modificador ácido adicionado conforme descrito no (item 3.8.1, p. 29). Verificou-se que o emprego de ACN como solvente orgânico e adição de 1% de modificador ácido (AcOH) levou a uma boa resolução e simetria do pico do cromatograma e menor tempo de análise (Figura 16, p. 51).

Figura 16 - Cromatograma de PAE.*



*Condições cromatográficas: Modo de eluição isocrático [Coluna Varian Ominispher, sistema de solventes ACN-H₂O (23:77) com 1% de AcOH, temperatura de 25°C, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 330 nm].

4.3.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental, enquanto que o limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada utilizando um determinado método experimental [15].

Neste trabalho, os limites de detecção (LD = 4,00 µg/mL) e de quantificação (LQ = 12,13 µg/mL) foram calculados baseando-se em parâmetros da curva analítica (item 3.8.2, p. 28) com base nas Equações 1 e 2 (p, 30).

4.3.3. Precisão intermediária e Repetibilidade

Precisão intermediária é uma medida que avalia os efeitos das variações dentro do laboratório devido a efeitos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores [15].

A medida de repetibilidade avalia a relação entre os resultados a partir de sucessivas medições realizadas em um curto período de tempo, utilizando o mesmo método, sob as mesmas condições de medição e mesmo equipamento [15].

As análises de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) foram realizadas avaliando o tempo de retenção e a área dos picos das soluções de ácido rosmarínico em três níveis de concentração 20,0, 35,0, e 50,0 µg/mL. Os coeficientes de variação (CV) foram 1,57-2,06% para as análises intradia e 0,54-1,69% para as análises interdia (Equação 3, p. 30), caracterizando que o método apresenta boa precisão visto que os CV são menores do que 5% [36].

A análise de variância (ANOVA) das análises intradia e interdia (Tabelas 10 e 11) indicou bons resultados, visto que o *F crítico*, que significa o nível de confiança do dado tabelado em relação ao dado calculado em uma análise estatística, foi de 3,354131, o que indica que o valor de *p*, que é o índice de confiabilidade do método estatístico aplicado, é inferior a 0,05. Desse conjunto de resultados infere-se que o método aplicado apresenta mais de 95% de chances do resultado estimado representar o verdadeiro [37].

Dissertação de Mestrado**Tabela 10** - Análise de variância das injeções intradia do AR.

RESUMO						
Concentrações	Número de Análises	Soma das Áreas	Média das Áreas	Variância		
[AR] = 20 µg/mL	10	3846775	384677,5	60889803		
[AR] = 35 µg/mL	10	8057815	805781,5	152833789		
[AR] = 50 µg/mL	10	11710952	1171095,2	361000919		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,09745E+12	2	1,54873E+12	8084,1817	3,13788E-38	3,354131
Dentro dos grupos	5172520607	27	191574837,3			
Total	3,10262E+12	29				

SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = média dos quadrados

Tabela 11 - Análise de variância nas injeções interdía do AR.

RESUMO						
Concentrações	Número de Análises	Soma das Áreas	Média das Áreas	Variância		
[AR] = 20 µg/mL	10	3633998	363399,8	37777710		
[AR] = 35 µg/mL	10	7523897	752389,7	86947000		
[AR] = 50 µg/mL	10	11859136	1185914	41706931		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,38595E+12	2	1,69E+12	30516,59	5,2E-46	3,354131
Dentro dos grupos	1497884770	27	55477214			
Total	3,38745E+12	29				

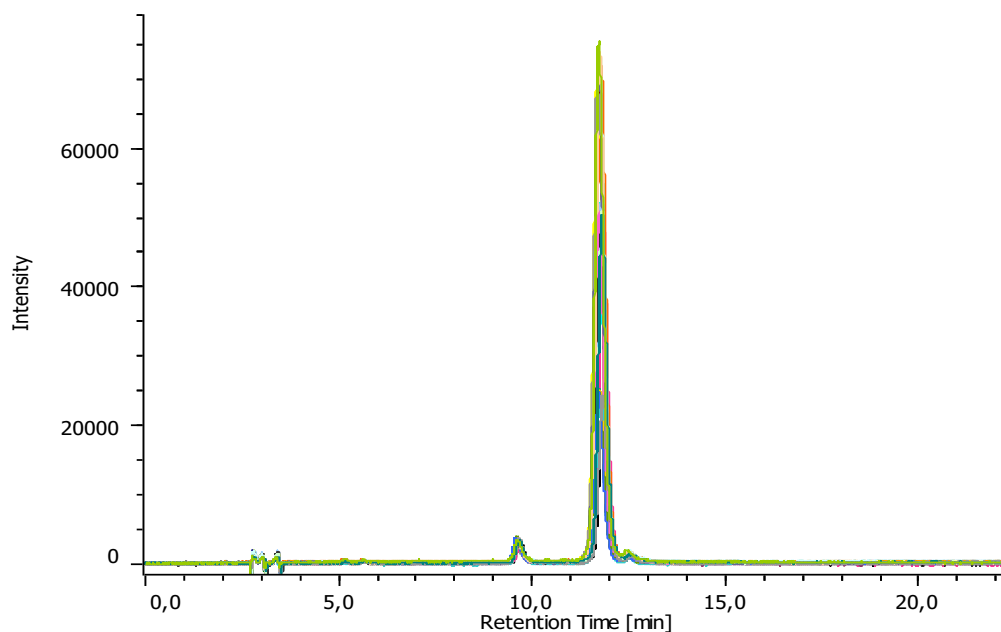
SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = média dos quadrados

Nas Figuras 15 e 16 estão apresentadas as sobreposições dos cromatogramas das análises intradia e interdía respectivamente. É possível observar que a variação no tempo de retenção nas análises interdía foi levemente maior do que nas análises

Dissertação de Mestrado

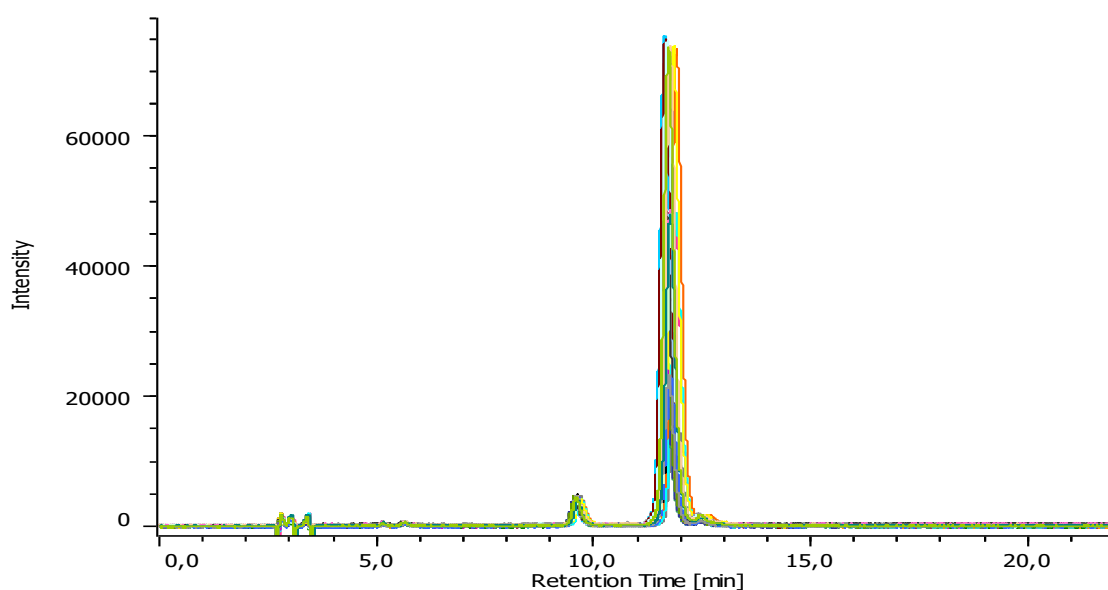
intradia, o que é justificado pelas análises representarem os fatores externos em uma sequência de sete dias de análises. Contudo, esta variação do tempo de retenção do AR ($t_R = 11,7$ min) não comprometeu as análises visto que, as variações compreenderam $\pm 0,09$ minutos dos picos nas análises interdía.

Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para as análises intradía do AR.*



*Condições cromatográficas: Modo de eluição isocrático [Coluna Varian Ominispher, sistema de solventes ACN-H₂O (23:77) com 1% de AcOH, temperatura de 25°C, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L e comprimento de onda de 330 nm].

Figura 18 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para as análises interdía do AR.*



*Condições cromatográficas: Modo de eluição isocrático [Coluna Varian Ominispher, sistema de solventes ACN-H₂O (23:77) com 1% de AcOH, temperatura de 25°C, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L e comprimento de onda de 330 nm].

Em vista dos resultados estatísticos terem sido ótimos, este método foi aplicado nas análises quantitativas de ácido rosmarínico no extrato etanólico de *P. atratum*.

4.3.4. Preparação da amostra e recuperação

As amostras de PAE foram submetidas a *clean-up*, proporcionando uma análise com menos interferentes. A realização do *clean-up* é fundamental para eliminar aqueles compostos que fazem parte da constituição da matriz e que ficariam retidos na coluna cromatográfica podendo interferir drasticamente no método analítico a ser executado. Para o *clean-up* foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida – SPE. A SPE é a forma mais simples e conhecida de eliminação de interferentes de matrizes, onde se emprega o princípio de uma cromatografia líquida em uma pequena coluna aberta, que usualmente é denominada cartucho de extração [35]. Esta técnica de eliminação de interferentes foi escolhida porque usa pequenas quantidades de solventes, elimina problemas de emulsão de matrizes de extrato vegetal, além de ser robusta e reproduzível a que lhe confere características fundamentais para ser empregada em outros laboratórios [35].

Após as análises das frações de PAE que foram submetidas à SPE, foi realizada a integração das áreas dos picos de AR ($t_R = 11,7$ min), e foi calculada a recuperação pelo procedimento de fortificação com padrão externo.

A recuperação neste procedimento foi de 75-78% e está dentro do intervalo aceitável (70-120%, [15]).

4.3.5. Quantificação

O método analítico desenvolvido foi utilizado para quantificar ácido rosmarínico no extrato etanólico de *P. atratum*.

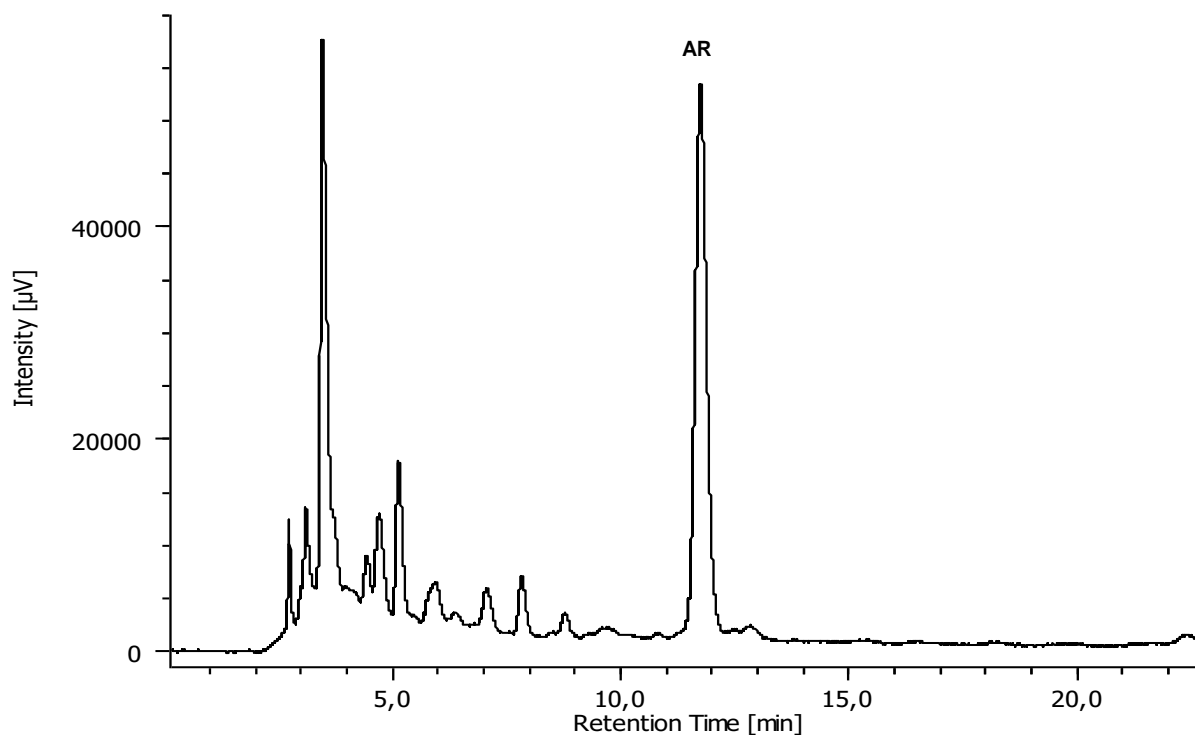
Nos cromatogramas obtidos do extrato PAE, após a etapa de *clean-up*, a banda referente ao ácido rosmarínico ($t_R = 11,7$) apresentou maior área que dos demais componentes do extrato (Figura 19, p. 56).

Assim, a média dos valores das áreas correspondentes a essa banda cromatográfica foi de 902194 μ V. Utilizando-se a equação da curva analítica $y=22933x-27819$, a concentração de AR em PAE corresponde a 0,032 mg/g ou 3,2%

Dissertação de Mestrado

Portanto, a porcentagem calculada de AR no extrato pela curva analítica, 3,2%, é inferior a porcentagem de AR isolado do extrato, 4,4%. Isto indica que a filtração por SPE retém AR e que as condições de “*clean-up*” empregadas devem ser futuramente otimizadas.

Figura 19 - Cromatograma do extrato PAE utilizado no estudo de quantificação de AR.*

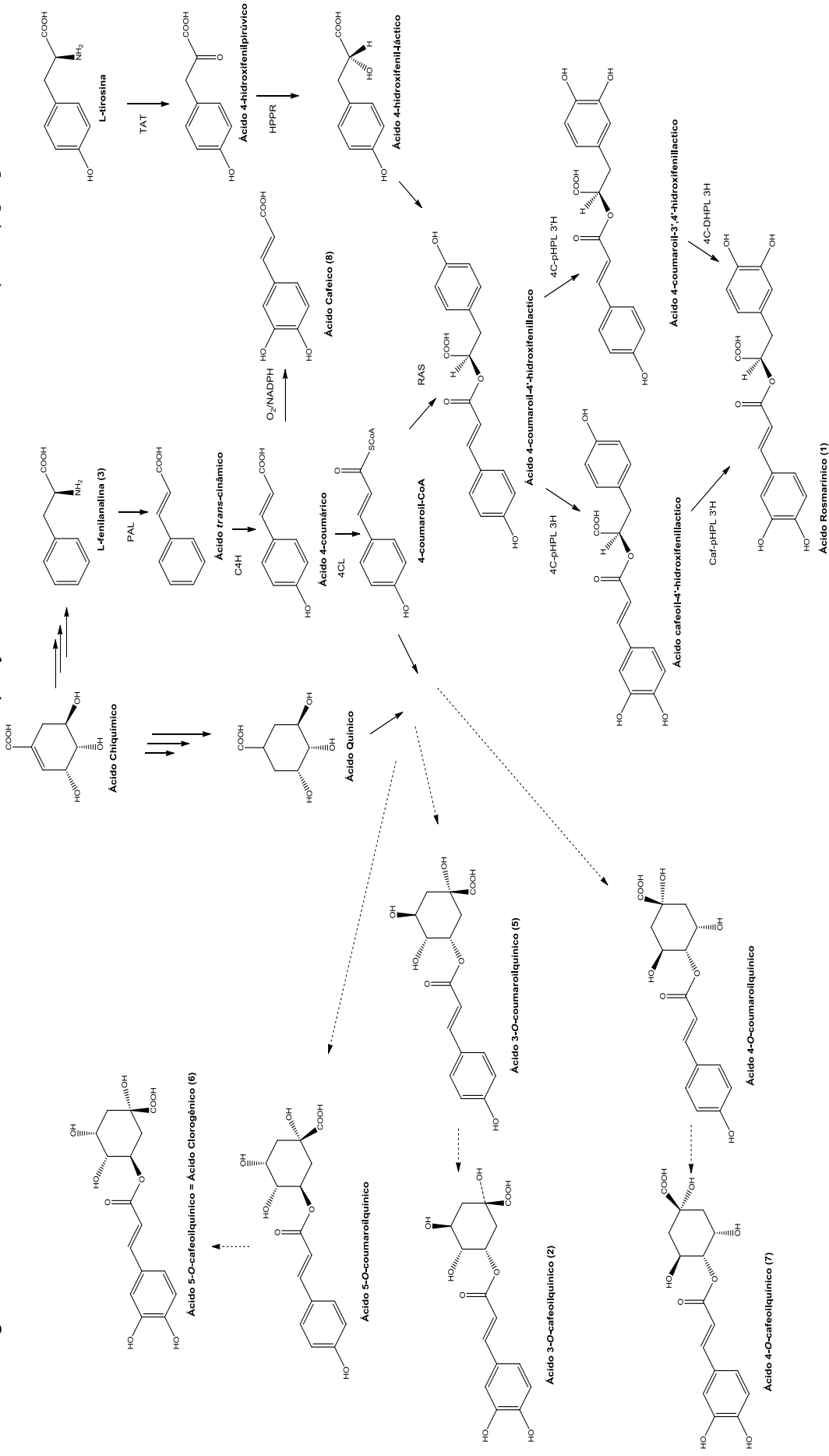


*Condições cromatográficas: Modo de eluição isocrático [Coluna Varian Ominispher, sistema de solventes ACN-H₂O (23:77) com 1% de AcOH, temperatura de 25°C, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 330 nm].

4.4. Biogênese dos compostos isolados de *P. atratum*

A biossíntese de fenilpropanoides tem como precursor a fenilalanina. Esta substância proveniente da via do chiquimato, na presença de enzimas específicas, leva à produção de flavonoides, tocoferóis, lignanas, coumarinas, entre outros tipos de metabólicos secundários [38].

Figura 20 - Biogênese das substâncias identificadas em *P. atratum*. Adaptação de Petersen e colaboradores (2009) [38].



PAL = fenilalanina amonilíase; TAT = tirosina amonilíase; C4H = ácido cinâmico 4-hidroxiase; 4CL = ácido 4-coumárico CoA-ligase; HPPR = hidroxi-fenilpiruvato redutase; RAS = "ácido rosmarínico sintase", hidroxi-cinamoil-CoA: hidroxi-fenil-lactato hidroxi-cinamoil-transferase; 4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 3H = 4-coumaroil-4-hidroxi-fenil-lactato 3/3 hidroxi-líase; Cat-pHPL 3H = cafeoil-4-hidroxi-fenil-lactato 3-hidroxi-líase; 4C-DHPL 3H = 4-coumaroil-3,4-di-hidroxi-fenil-lactato 3-hidroxi-líase

De acordo com o artigo de Petersen e colaboradores (2009), a biossíntese do ácido rosmarínico e dos derivados do ácido clorogênico inicia-se com os aminoácidos aromáticos *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, que são independentemente transformados nos precursores intermediários 4-coumaroil-CoA e ácido 4-hidroxifenil-láctico (Figura 20, p. 57). A transformação da fenilalanina é catalisada pelas enzimas gerais da via dos fenilpropanoides, fenilalanina amonialiase (PAL), ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) e ácido 4-coumárico CoA-ligase (4CL). Enquanto a tirosina é transformada pela enzima tirosina amoniatransferase (TAT) para o ácido 4-hidroxifenilpirúvico (pHPP), o qual é reduzido para o ácido 4-hidroxifenil-láctico pela hidroxifenilpiruvato redutase (HPPR). [38].

Para a formação do ácido rosmarínico em *P. atratum* verificou-se que, os dois precursores intermediários (4-coumaroil-CoA e ácido 4-hidroxifenil-láctico) são ligados pela formação do éster, com a liberação da coenzima A e a formação do ácido 4-coumaroil-4'-hidroxifenil-láctico. A reação é catalisada pela enzima ácido rosmarínico sintase (RAS). Os grupos 3 e 3'-hidroxílicos são finalmente introduzidos por reações mono-oxigenase citocromo P450-dependente. Para a formação dos derivados do ácido clorogênico, o precursor 4-coumaroil-CoA é esterificado com ácido quínico em diferentes posições. Com base nestes dados, de acordo com Petersen e colaboradores (2009) [38], propõe-se uma sequência biogenética para os compostos identificados em *P. atratum*, conforme apresentado na Figura 20 (p. 57).

4.5. Atividades biológicas descritas para as substâncias 1-8

O primeiro protocolo de síntese do ácido rosmarínico foi descrito em 1991 [17]. Esta substância, bem como seus derivados, tem apresentado várias atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica, antibacteriana e antivirótica, dentre outras [17,19]. Existe grande interesse econômico por esta substância. Ela é produzida por cerca de 70 indústrias no mundo inteiro e é cotada pela Sigma-Aldrich a R\$ 180,00 para cada 10 mg com pureza acima de 98%. Portanto, fontes naturais ricas em ácido rosmarínico são muito promissoras como novas alternativas de obtenção desta substância.

Os derivados de ácidos clorogênicos, ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**2**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**7**) e ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**6**) foram descritos pela primeira vez no

gênero *Paspalum*. O levantamento bibliográfico sobre estes derivados relevou atividades citotóxica, antioxidante, antimutagênica, antifúngica, antibacteriana, antialimentar, inibidora do crescimento de *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) [25-28,30-32].

O ácido rosmarínico (**1**), ácido cafeico e a fenilalanina (**3**) foram identificadas no extrato etanólico (PAE), sendo descritas pela primeira vez no gênero *Paspalum*. O levantamento bibliográfico destas substâncias revelou as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica, antibacteriana, antivirótica, dentre outras [17,19].

5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das partes aéreas de *Paspalum atratum* Swalen mostrou a presença de oito derivados de fenilpropanoides: (*R*)-ácido rosmarínico (**1**), ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**2**), fenilalanina (**3**), ácido 3-*O*-*cis*-coumaroilquínico (**4**), ácido 3-*O*-*trans*-coumaroilquínico (**5**), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**6**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**7**) e ácido cafeico (**8**). A substância **1** foi a que apresentou maior concentração (> 4,4%) no extrato etanólico (PAE).

Considerando a alta concentração de **1** no extrato, desenvolveu-se um método analítico para quantificá-lo no extrato. O método otimizado compreendeu um sistema CLAE-DAD empregando-se as seguintes condições cromatográficas: coluna Varian Ominispher, sistema de solventes ACN-H₂O (23:77) com 1% de AcOH, temperatura de 25°C, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 330 nm. O coeficiente de correlação linear obtido pelo método desenvolvido ($r^2 = 0,9979$) indicou que este é um bom método para um ensaio semiquantitativo.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), calculados a partir da curva analítica, foram de 4,00 e 12,13 µg/mL, respectivamente, e a faixa de linearidade foi o intervalo entre 12,1-100,0 µg/mL. Estes valores são satisfatórios para a concentração encontrada no extrato (PAE).

Os coeficientes de variação (CV) dos ensaios intradia compreenderam o intervalo de 1,57-2,06% e para os ensaios interdia compreenderam o intervalo de 0,54-1,69%. Estes intervalos estão dentro da margem de erro aceitável, visto que o recomendado é < 5%. A análise de variância (ANOVA) destes ensaios confirmou que o método apresentou pouca variação (< 5%), uma vez que o valor de *F crítico* foi de 3,354 e $p < 0,05$.

A recuperação, avaliada pela adição de padrão externo, compreendeu o intervalo de 75-78% em PAE, resultado que está dentro do recomendado, uma vez que é indicado que este intervalo seja de 70-120%.

Contudo, o ensaio de “*clean-up*” deve ser otimizado, pois a concentração de ácido rosmarínico na matriz (3,2%), calculada pelo método analítico (CLAE-DAD), é inferior àquela esperada (4,4%).

REFERÊNCIAS

- 1 SOUZA, V. C. L. H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- 2 SCHEFFER-BASSO, S. M.; GALLO, M. M. Aspectos morfofisiológicos e bromatológicos de *Paspalum plicatulum*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1758-1762, out. 2008.
- 3 OLIVEIRA, M. C. M. et al. Avaliação de danos causados por adultos da cigarrinha-das-pastagens *Deois flavopicta* (Stål, 1854) (HOMOPTERA: CERCOPIDAE) na gramínea forrageira *Paspalum atratum*. In: SCHENK, M. A. M. et al. **Despertando vocações**: a Embrapa Gado de Corte pesquisando com o estudante. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. (Documentos, 107). Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc107/006.html>>. Acesso em: 14 ago. 2014.
- 4 MISHRA, M.; SHUKLA, Y. N.; KUMAR, S. Chemistry and biological activity of *Paspalum scrobiculatum* - a review. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22, n. 2/3, p. 288-292, 2000.
- 5 MISRA, L.; SIDDIQUI, S. A. *n*-Alkanes and α -Palmitin from *Paspalum scrobiculatum* seeds. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C: A Journal of Biosciences**, v. 55, n. 7/8, p. 500-502, 2000.
- 6 SHUKLA, Y. N. et al. An unsaturated hydrocarbon and alcohols from *Paspalum scrobiculatum*. **Indian Drugs**, v. 37, p. 158-159, 2000.
- 7 SHARMA, S. C.; SHUKLA, Y. N.; TANDON, J. S. Constituents of *Colocasia formicata*, *Sagittaria sagittiflora*, *Arnebia nobilis*, *Ipomoea paniculata*, *Rhododendron niveum*, *Paspalum scrobiculatum*, *Mundulea sericea*, and *Duabanga sonneratiodes*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 8, p. 2621-2623, Aug. 1972.
- 8 GUPTA, S.; SHRIVASTAVA, S. K.; SHRIVASTAVA, M. Fatty acid composition of new hybrid varieties of minor millets seed. **The IIOAB Journal**, v. 5, n. 1, p. 15-18, Jan. 2014.
- 9 OHMOTO, T.; IKUSE, M.; NATORI, S. Triterpenoids of the gramineae. **Phytochemistry**, v. 9, n. 10, p. 2137-2148, Oct. 1970.
- 10 LI, X. C. et al. Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p. 1909-1914, Nov. 2002.
- 11 CUNHA, M. A. D. D. et al. Morphological characteristics of *Paspalum atratum* cv. Pojuca submitted to rotational grazing. Tiller dynamics and leaf elongation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 935-940, maio/jun. 2001.

Dissertação de Mestrado

- 12 ELYAS, A. C. W. et al. Nitrogen and base saturation in the performance of pojuca grass (*Paspalum atratum* swalen cv. Pojuca) grown in pots. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 554-561, maio/jun. 2006.
- 13 ZHANG, X. F. et al. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 2063-2066, Mar. 2010.
- 14 WAGNER, H.; BRADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. New York: Springer, 2009.
- 15 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introductions to modern liquid chromatography**. New York: Wiley, 2010.
- 16 RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.
- 17 MOHARRAM, F. A. et al. Polyphenolic profile and biological activity of *Salvia splendens* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1678-1687, Nov. 2012.
- 18 PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-125, Jan. 2003.
- 19 MURATA, T. et al. Matrix metalloproteinase-2 inhibitors from *Clinopodium chinese* var. *parviflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1379-1384, Aug. 2009.
- 20 PETERSEN, M. Rosmarinic acid: new aspects. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 207-227, Mar. 2013.
- 21 WEI, F. et al. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 857-865, Nov. 2010.
- 22 NAKATANI, N. et al. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5512-5516, Oct. 2000.
- 23 YASUKAWA, K.; ASANO, Y. Enzymatic synthesis of chiral phenylalanine derivatives by a dynamic kinetic resolution of corresponding amide and nitrile substrates with a multi-enzyme system. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 354, n. 17, p. 3327-3332, Nov. 2012.
- 24 WANG, B. et al. Efficient kinetic resolution of amino acids catalyzed by lipase as 'Amano' via cleavage of an amide bond. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 18/19, p. 1338-1342, Oct. 2012.
- 25 IUPAC COMMISSION ON THE NOMENCLATURE OF ORGANIC CHEMISTRY (CNOC) AND IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE (CBN). Nomenclature of cyclitols. Recommendations, 1973. **Biochemical Journal**, v. 153, p. 23-31, 1976.

Dissertação de Mestrado

- 26 OLSZEWSKA, M. A.; MICHEL, P. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from various leaf extracts of *Sorbus aria* (L.) Crantz. **Natural Product Research**, v. 26, n. 3, p. 243-254, Aug. 2011.
- 27 PAPAJEWSKI, S. et al. Isolation from *Cussonia barteri* of 1'-O-chlorogenoylchlorogenic acid and 1'-O-chlorogenoylneochlorogenic acid, a new type of quinic acid esters. **Planta Medica**, v. 67, n. 8, p. 732-736, Nov. 2001.
- 28 SIMMONDS, M. S. J.; STEVENSON, P. C. Effects of isoflavonoids from Cicer on larvae of *Helicoverpa armigera*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 5, p. 965-977, May 2001.
- 29 RUUHOLA, T.; TIKKANEN, O. P.; TAHVANAINEN, J. Differences in host use efficiency of larvae of a generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 8, p. 1595-1615, Aug. 2014.
- 30 LU, Y. et al. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 67-75, Sept. 2000.
- 31 ALKHATIB, R. et al. Activity of elaeochytrin a from *Ferula elaeochytris* on leukemia cell lines. **Phytochemistry**, v. 69, n. 17, p. 2979-2983, Dec. 2008.
- 32 JING, P. et al. Quantitative studies on structure-DPPH• scavenging activity relationships of food phenolic acids. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12910-12924, Nov. 2012.
- 33 SUN, M. et al. Dietary antioxidants fail in protection against oxidative genetic damage in *in vitro* evaluation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2395-2401, Nov. 2000.
- 34 DAHMANI-HAMZAOU, N. et al. On-line radical scavenging detection and characterization of antioxidants from *Artemisia herba-alba*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 95, p. 564-576, Apr. 2012.
- 35 XU, S. et al. Chemical constituents from the rhizomes of *Smilax glabra* and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 18, p. 5265-5287, Apr. 2013.
- 36 CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2001.
- 37 WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chemistry**, v. 87, p. 307-311, Sept. 2004.
- 38 BURKE, S. Understanding the structure of scientific data. **LC-GC Europe Online Supplement**, p. 3-8, 2001. Disponível em: <<https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/sauves/MonDepotPublic/CHM%203103/LCGC%20Eur%20Burke%202001%20-%201%20de%204.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

39 PETERSEN, M. et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15/16, p. 1663-1679, Oct./Nov. 2009.

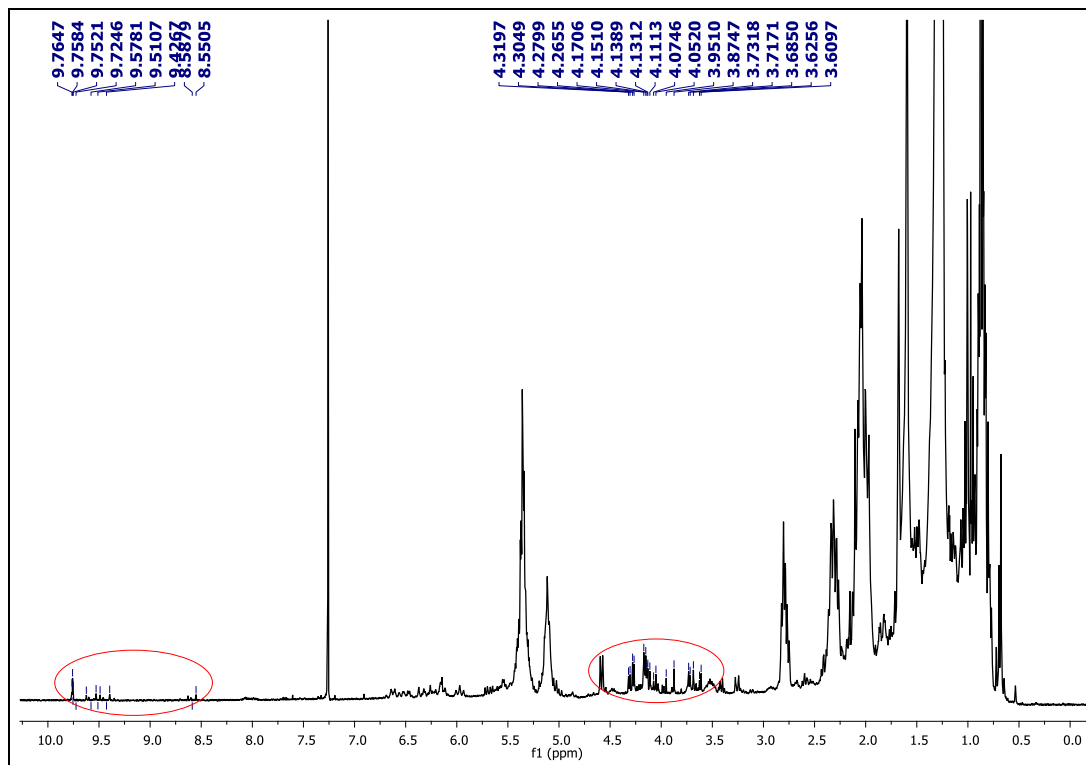
DADOS FÍSICOS E ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS

- Ácido rosmarínico (1). EM-IES (Espectro 34) 381 [M-H-Na]⁻, 359 [M-H]⁻, 341 [M-H-H₂O]⁻. Espectro de DC (Espectro 35) [c = 0,5 mg/mL, MeOH, 232 (-1,08x10⁴), 280 (-0,18x10⁴), 298 (+1,26x10⁴) e 320 (+1,60x10⁴)]. Sólido amarelo; RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 2).
- Ácido 3-O-cafeoilquínico (2). Sólido amorfo; RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 3).
- Fenilalanina (3). Sólido amorfo; RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 4).
- Ácido *cis* 3-O-coumaroilquínico (4). Sólido amarelo; RMN de ¹H (Tabela 6) e de ¹³C (Tabela 5).
- Ácido *trans* 3-O-coumaroilquínico (5). Sólido amarelo; RMN de ¹H (Tabela 6) e de ¹³C (Tabela 5).
- Ácido 5-O-cafeoilquínico (6). Sólido amorfo. RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 7).
- Ácido 4-O-cafeoilquínico (7). Sólido incolor. RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 8).
- Ácido cafeico (8). Sólido amarelo. RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 9).

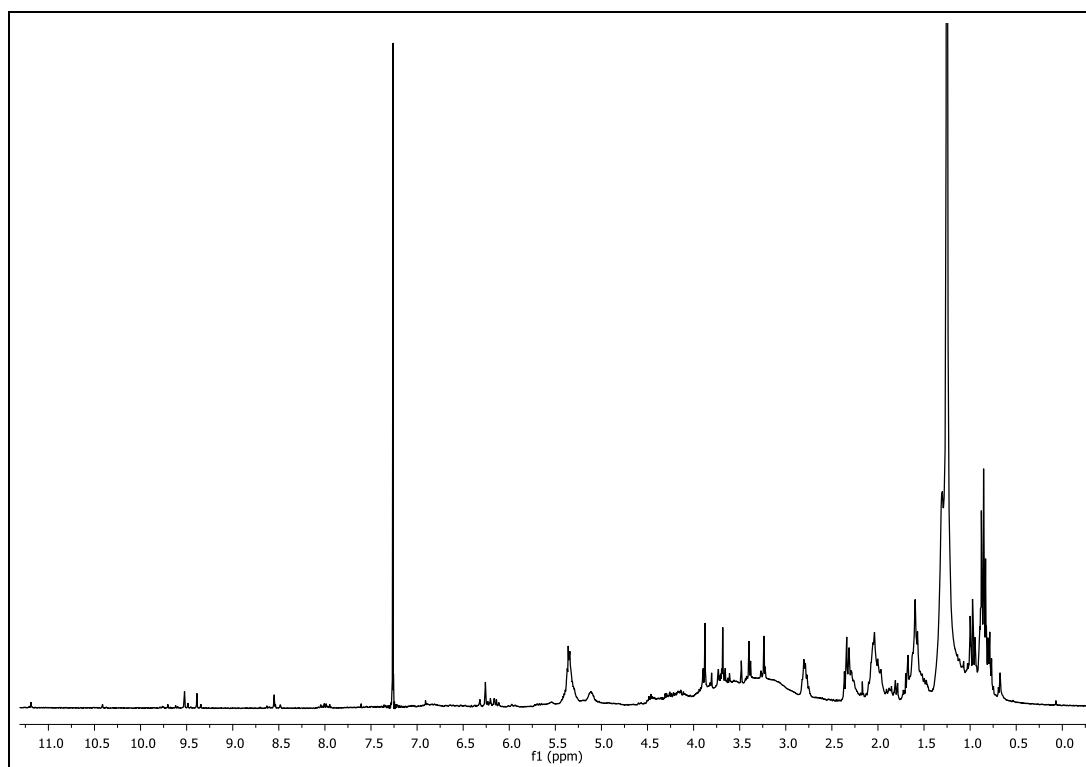
ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

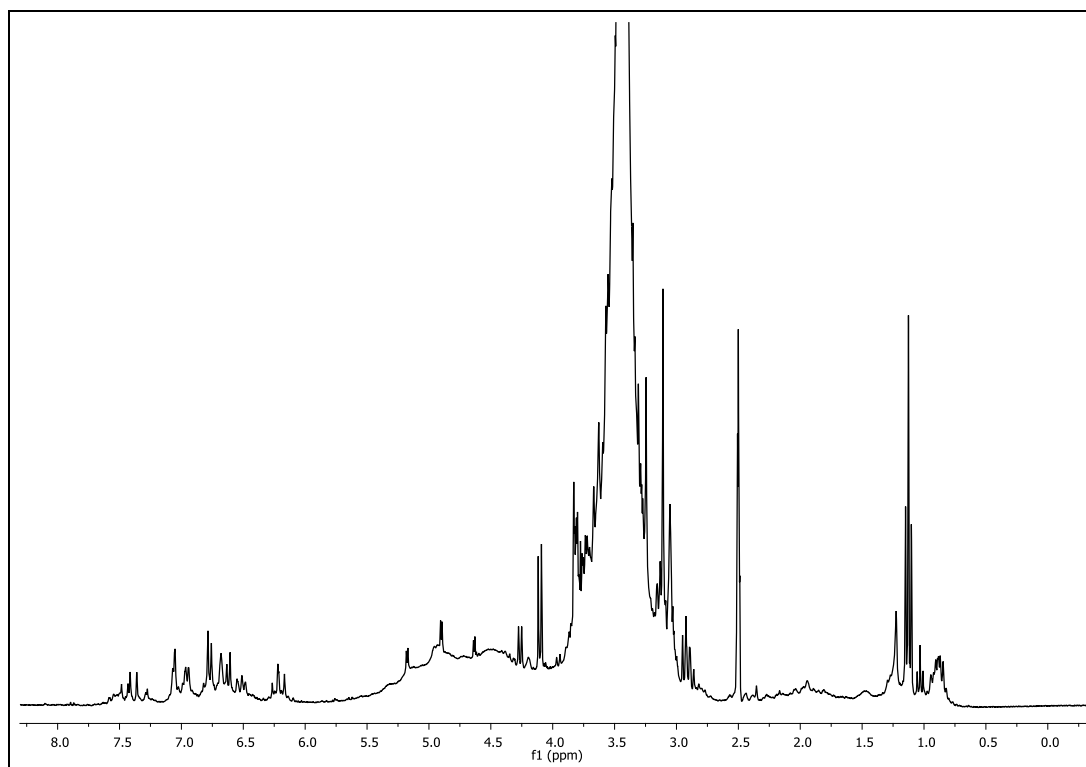
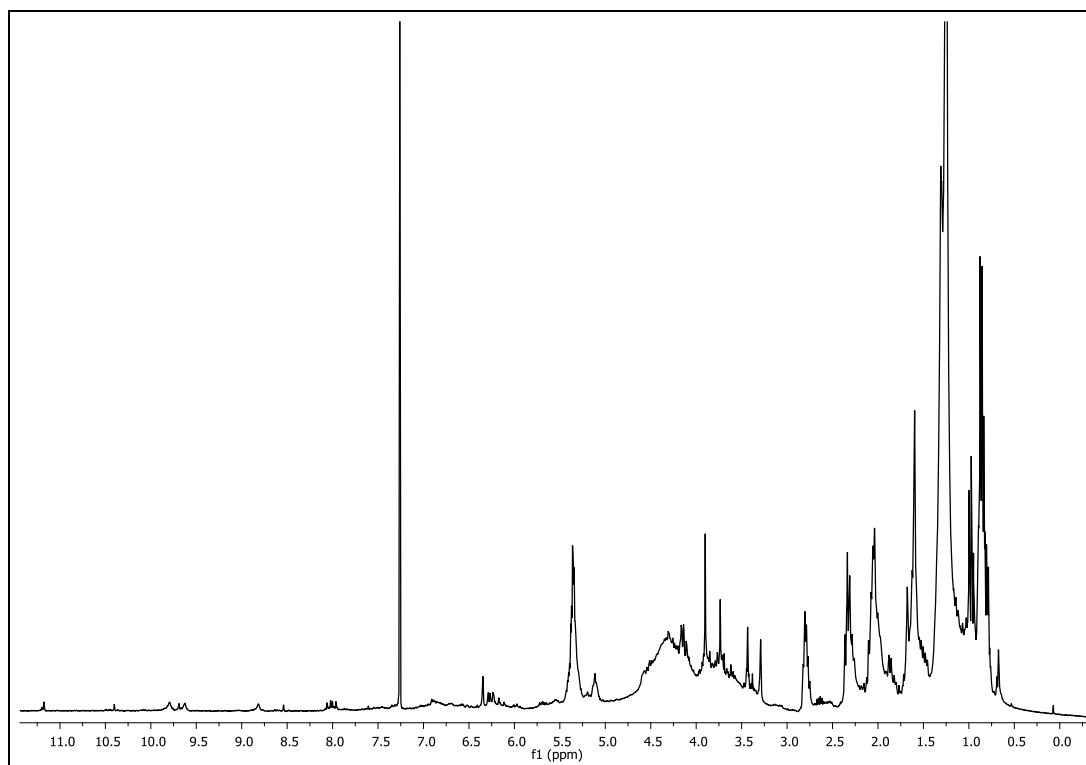
Dissertação de Mestrado

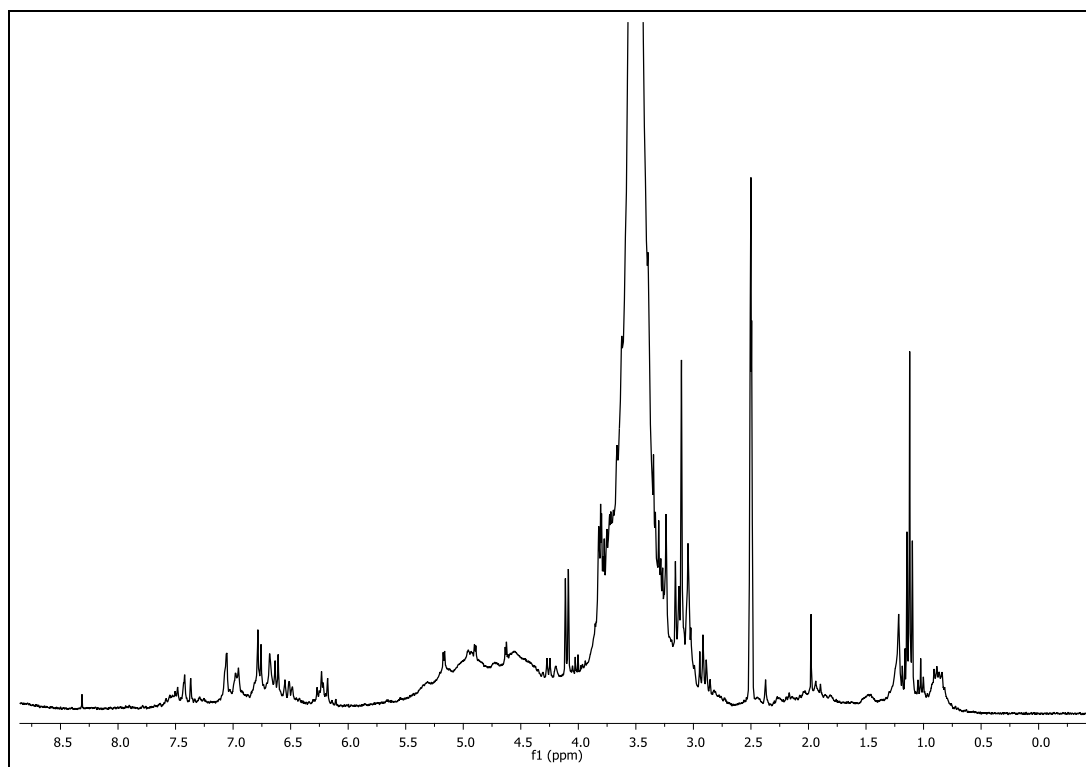
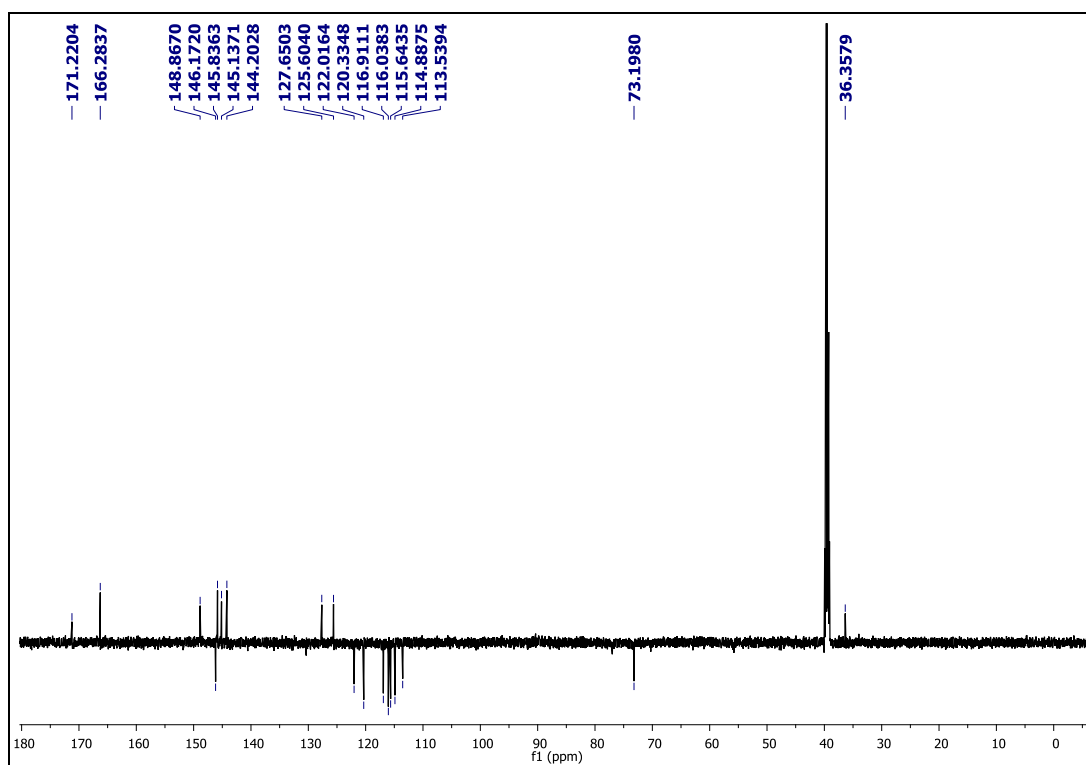
Espectro 1 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAH, com destaque para os sinais característicos de clorofila.

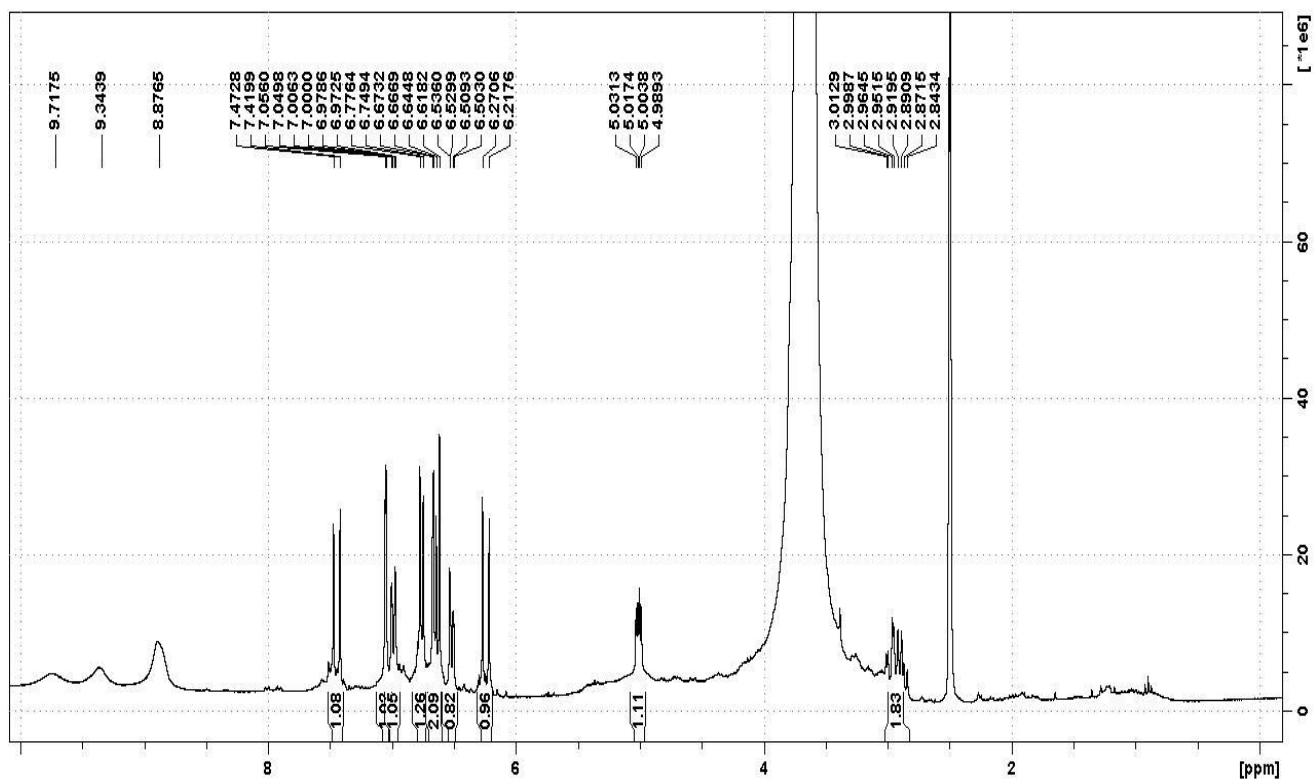
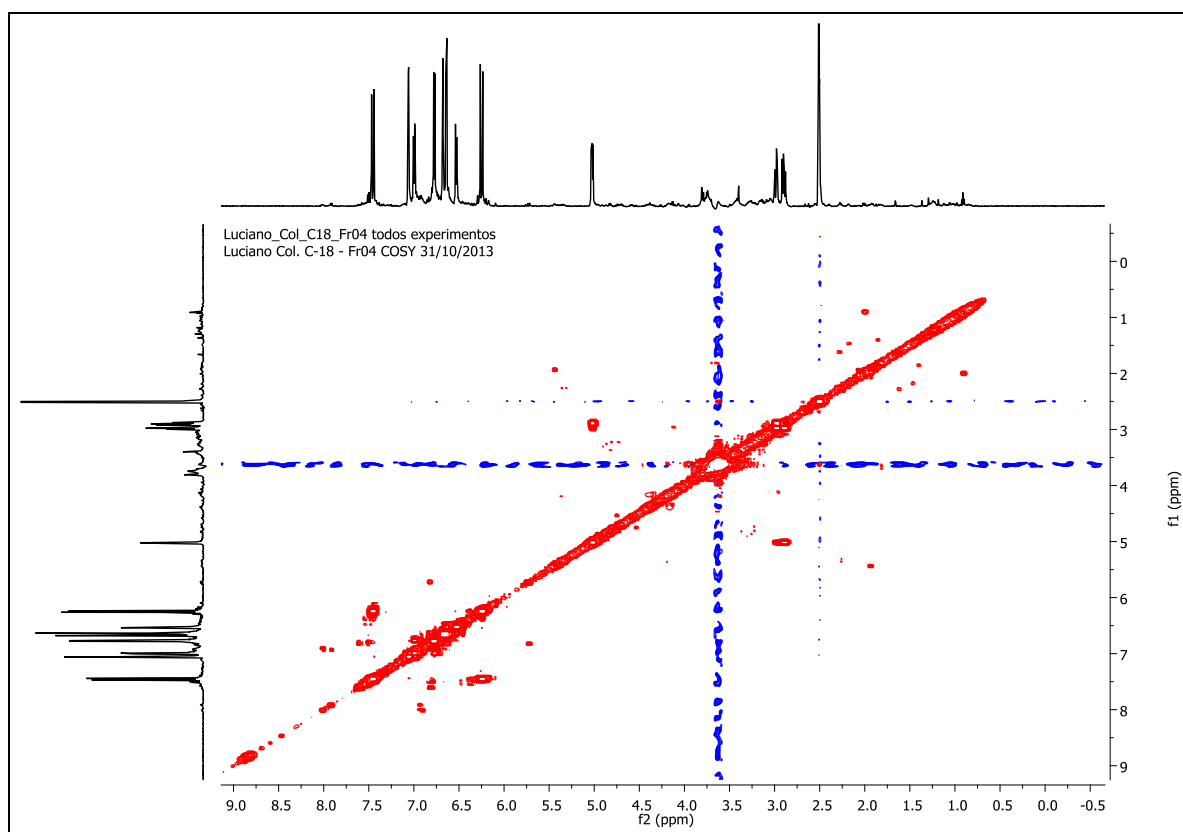


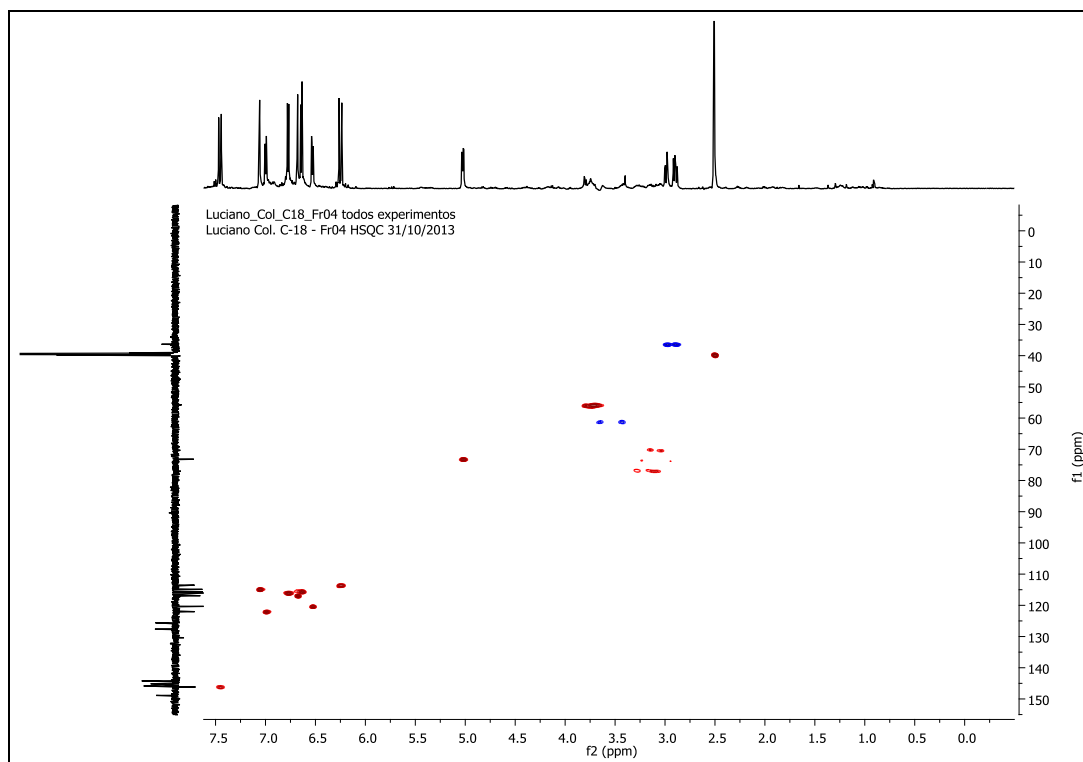
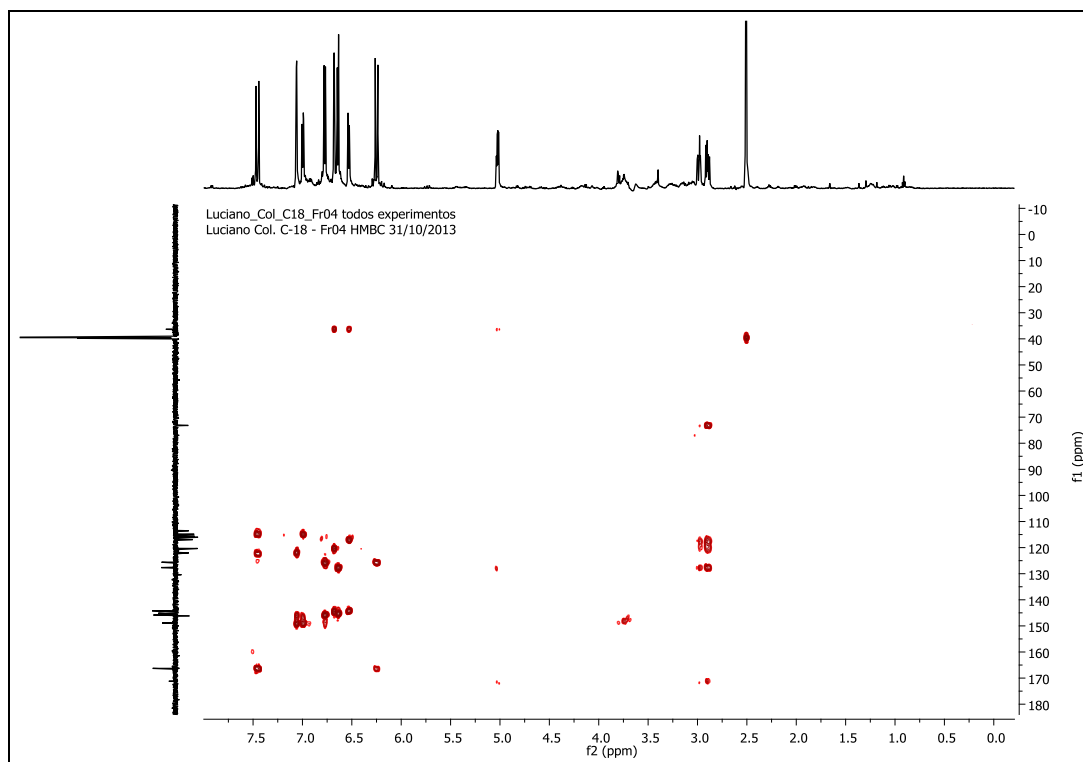
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAE.

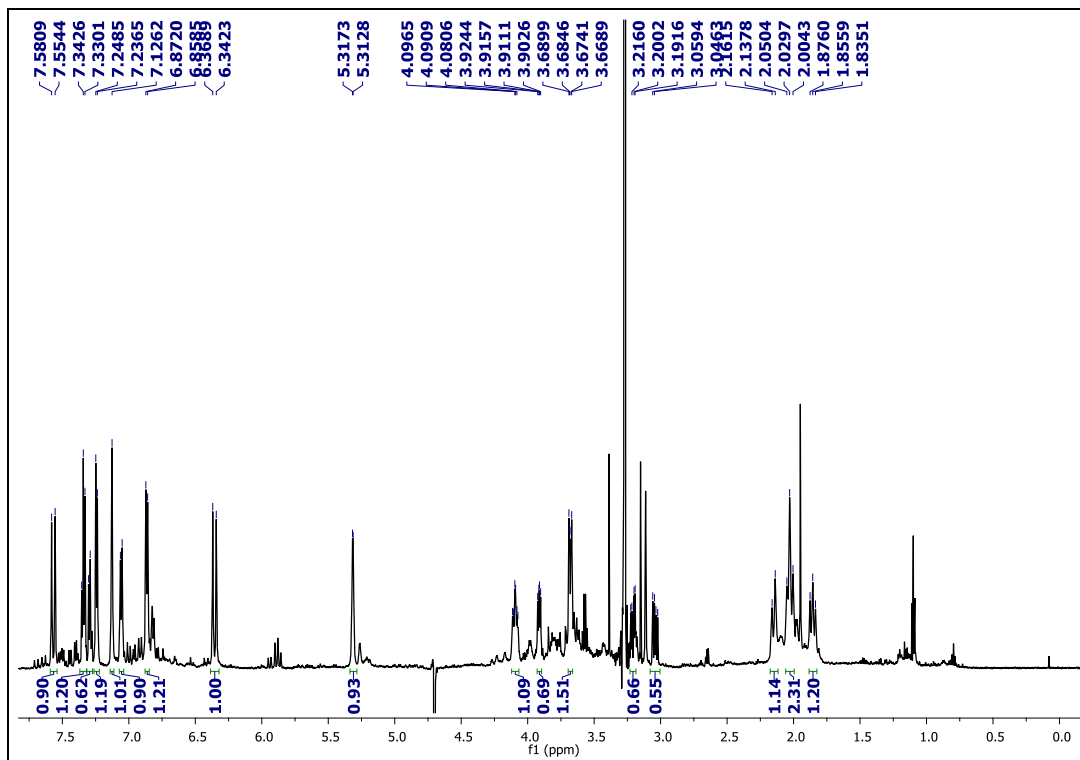
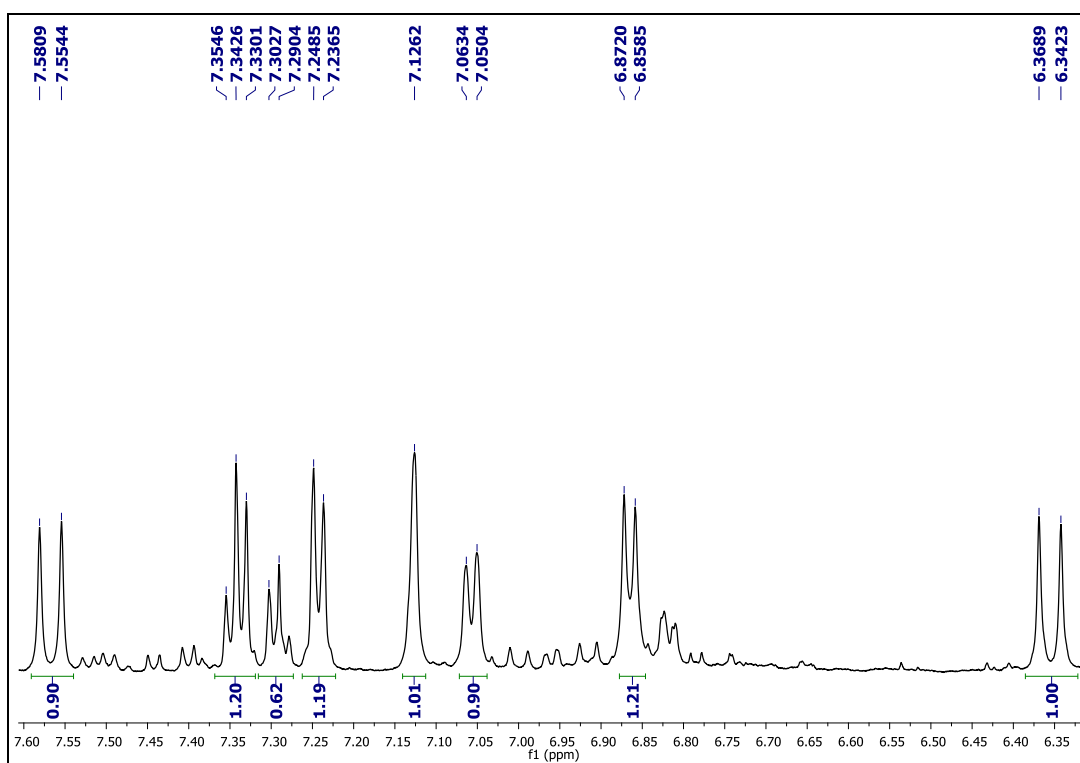


Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 7,0 T) de PAE.**Espectro 4** - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAE-1.

Espectro 5 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 7,0 T) de PAE-2.**Espectro 6** - Espectro de RMN de APT ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) de 1.

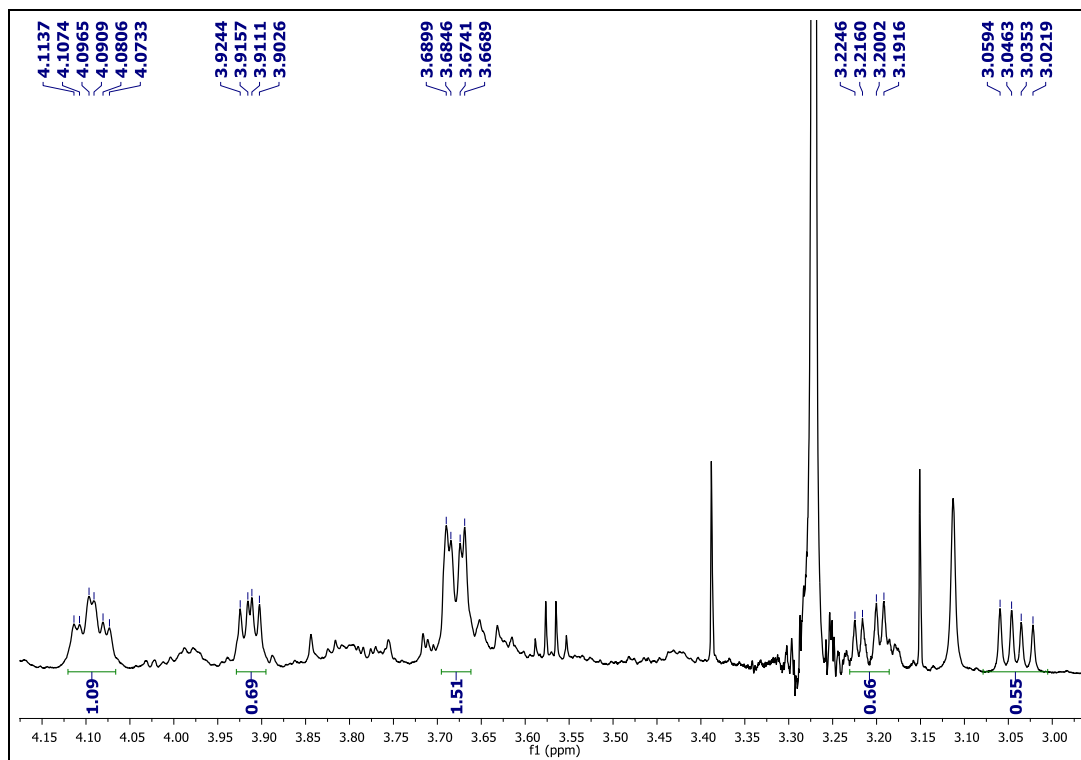
Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 14,1 T) de 1.Espectro 8 - Espectro de RMN de gCOSY (DMSO- d_6 , 14,1 T) de 1.

Espectro 9 - Espectro de RMN de *g*HSQC (DMSO-*d*₆, 14,1 T) de **1**.**Espectro 10** - Espectro de RMN de *g*HMBC (DMSO-*d*₆, 14,1 T) de **1**.

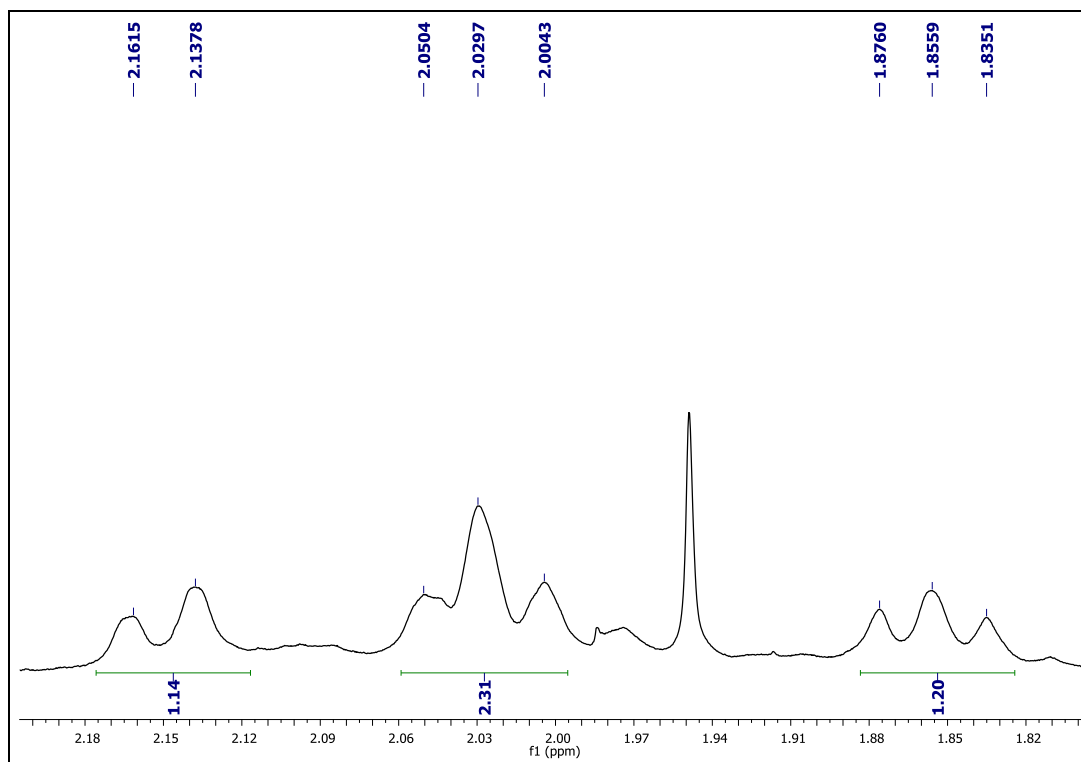
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3.Espectro 12 - Ampliação da região de δ 7,70 a 6,40 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3.

Dissertação de Mestrado

Espectro 13 - Ampliação da região de δ 4,25 a 3,05 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de **2** e **3**.

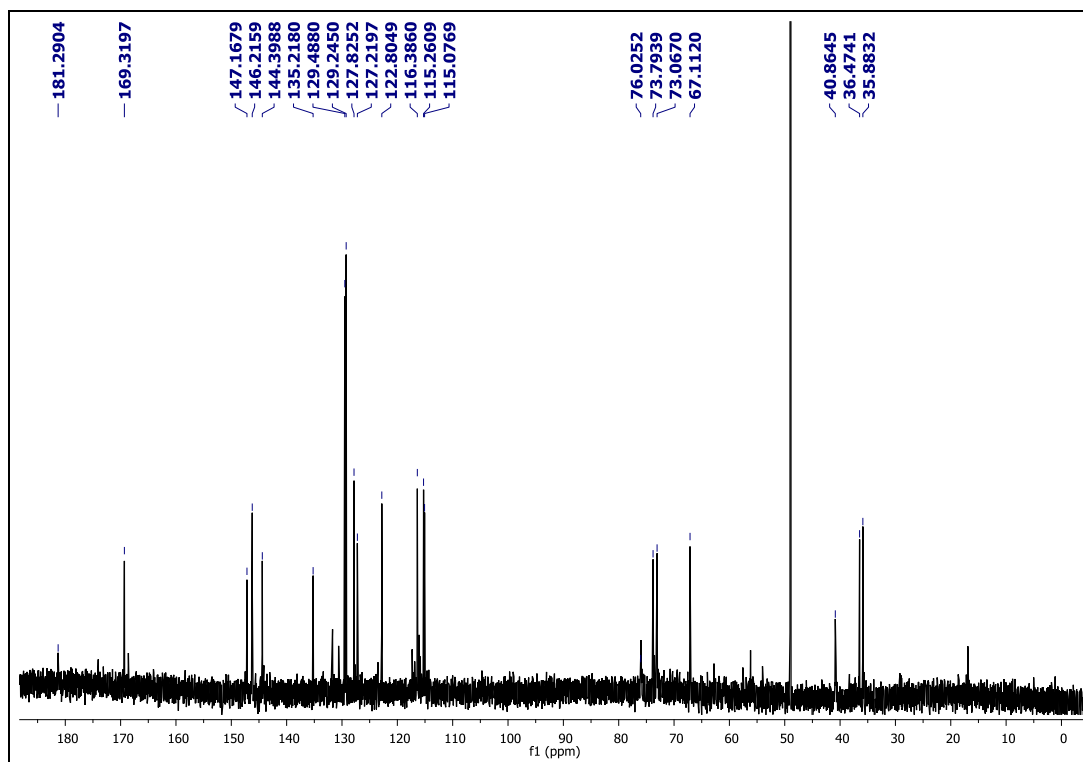


Espectro 14 - Ampliação da região de δ 2,34 a 1,82 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de **2** e **3**.

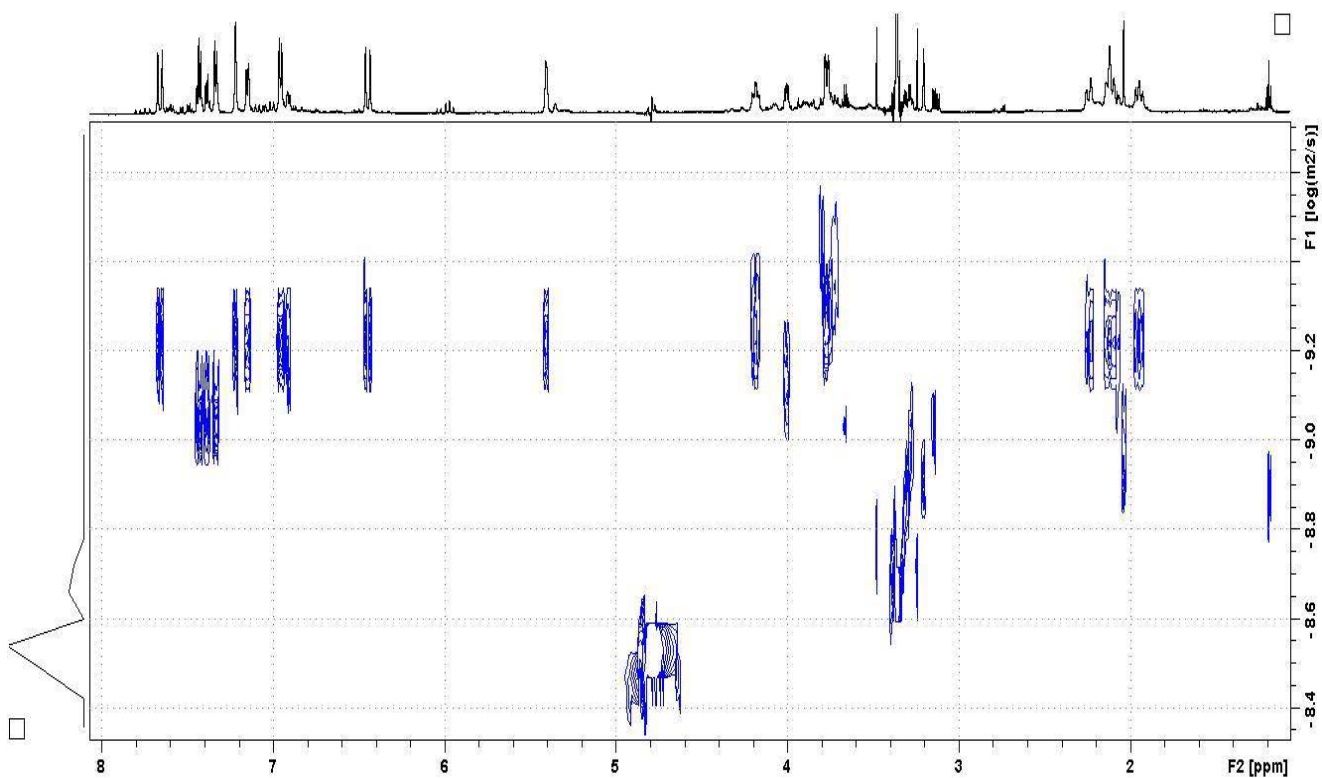


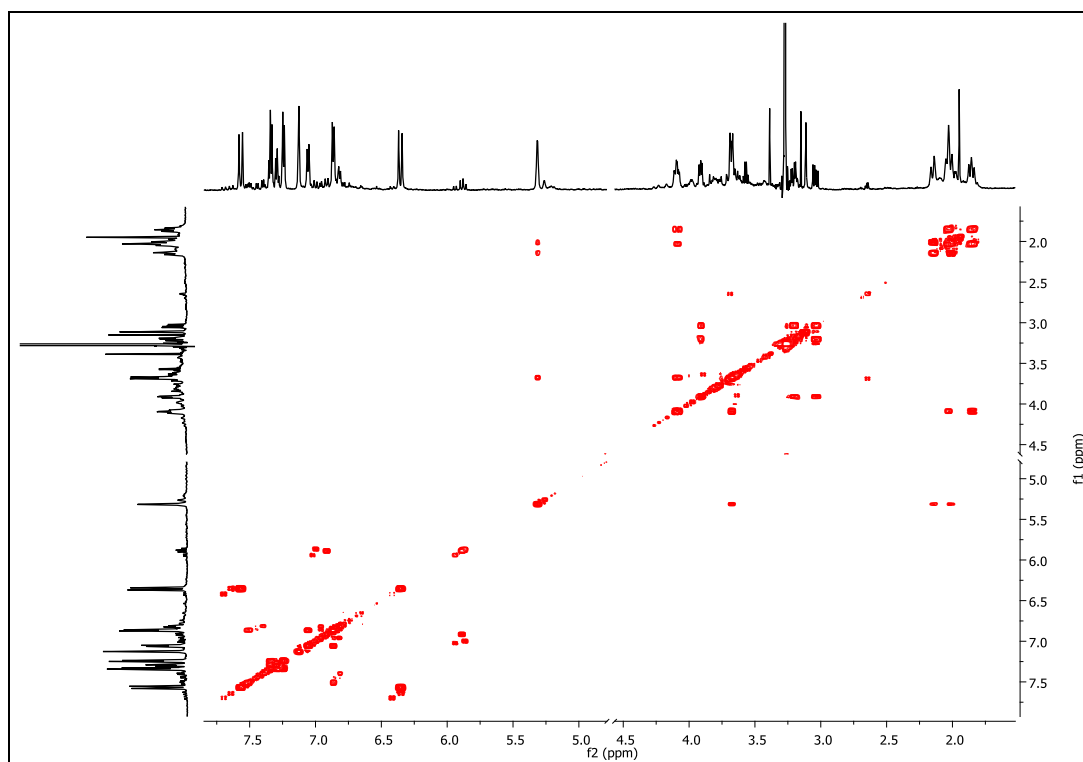
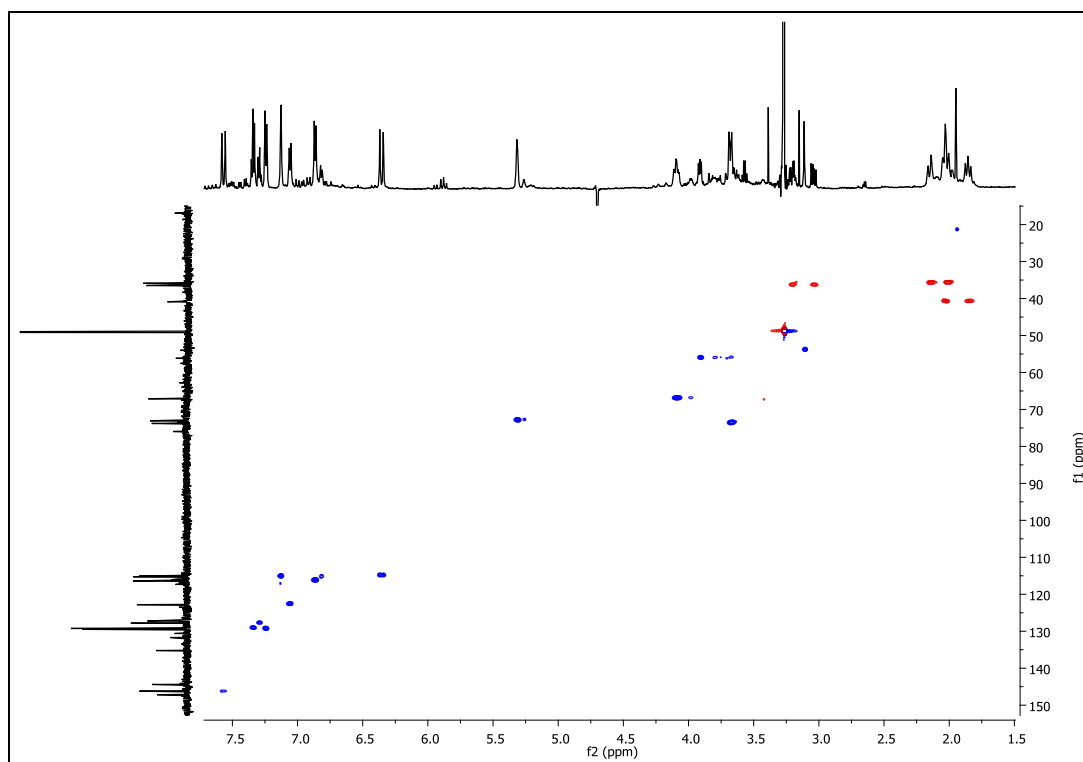
Dissertação de Mestrado

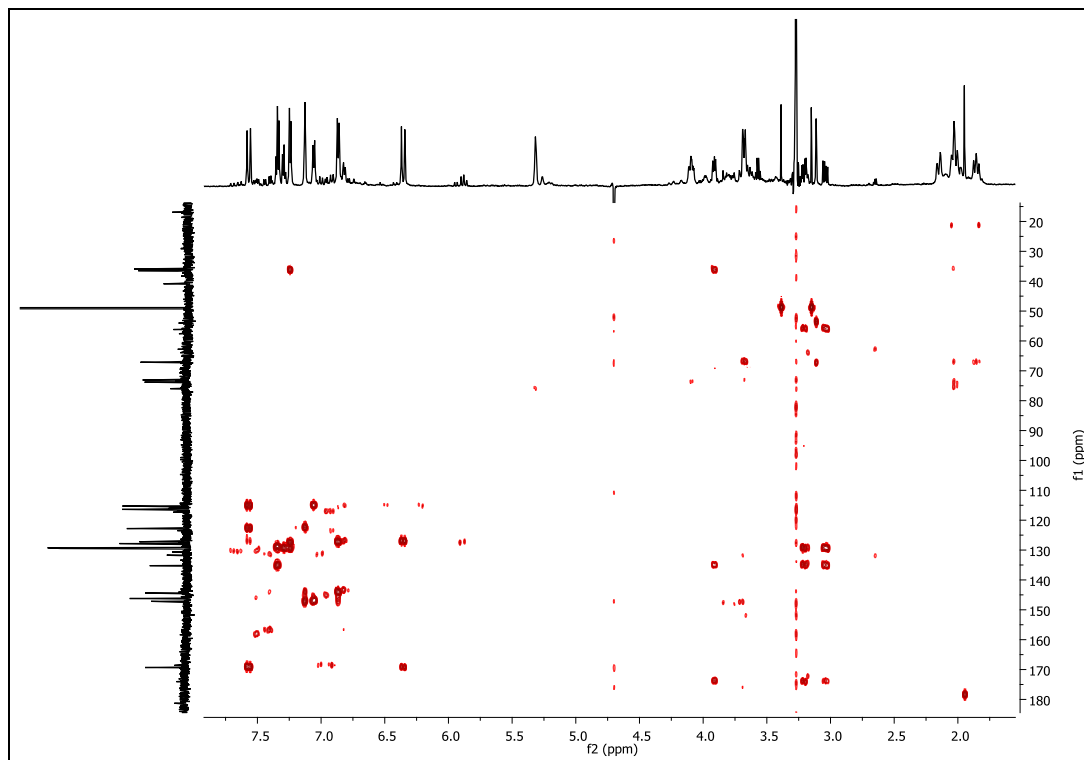
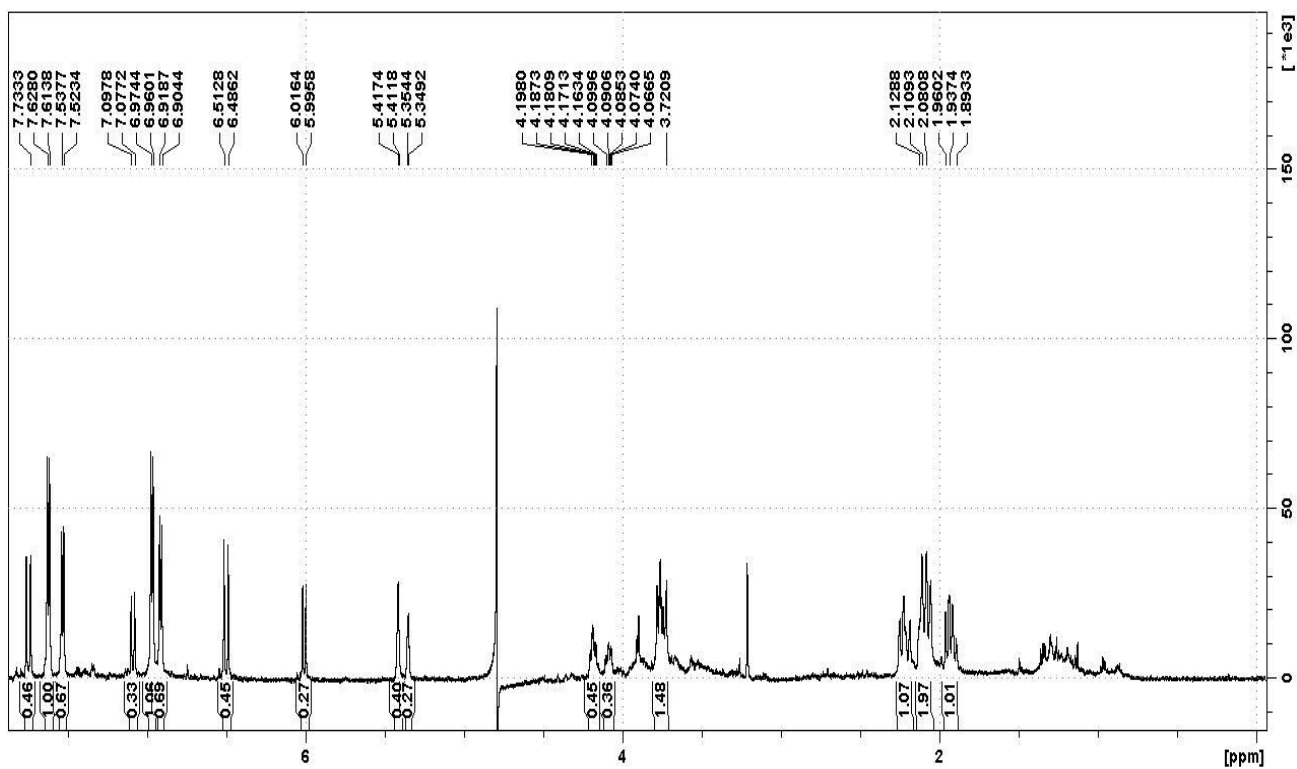
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3.



Espectro 16 - Espectro de RMN de gDOSY (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3.

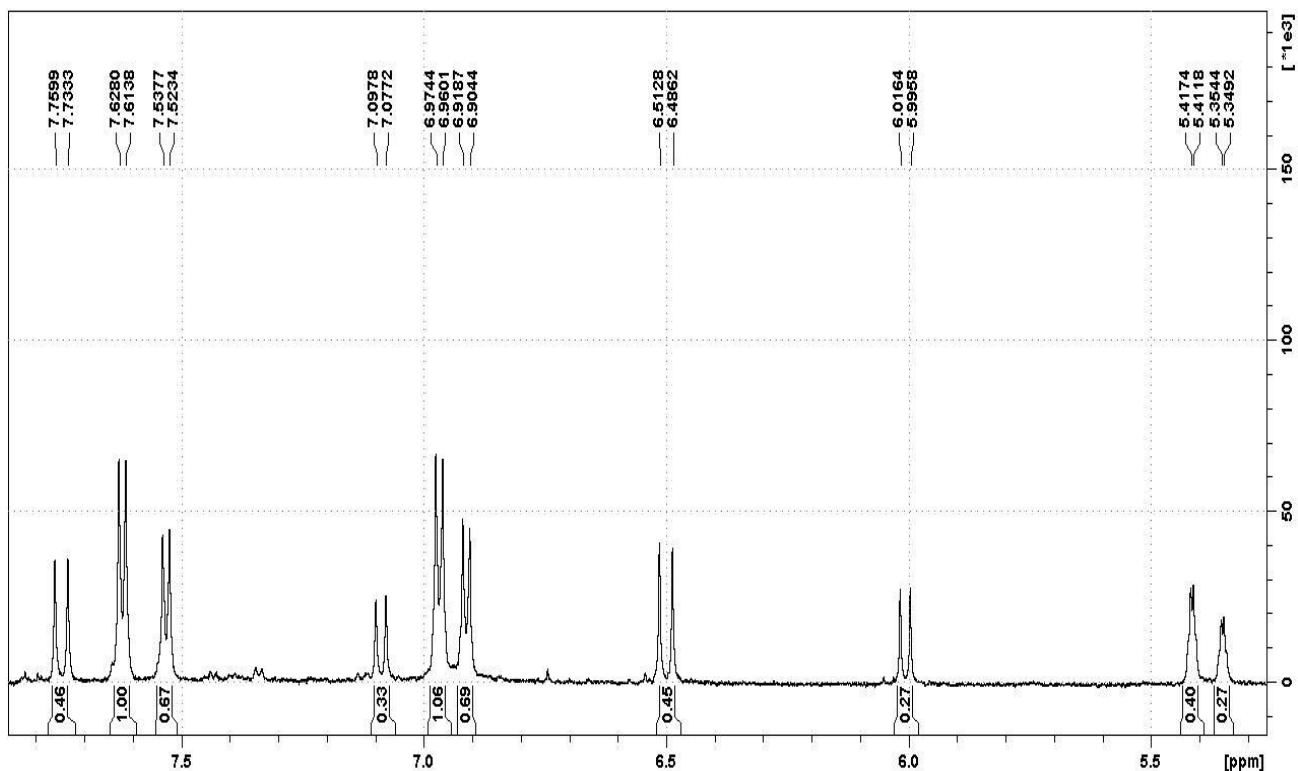


Espectro 17 - Espectro de RMN de gCOSY (D₂O, 14,1 T) de 2 e 3.**Espectro 18 - Espectro de RMN de gHSQC (D₂O, 14,1 T) de 2 e 3.**

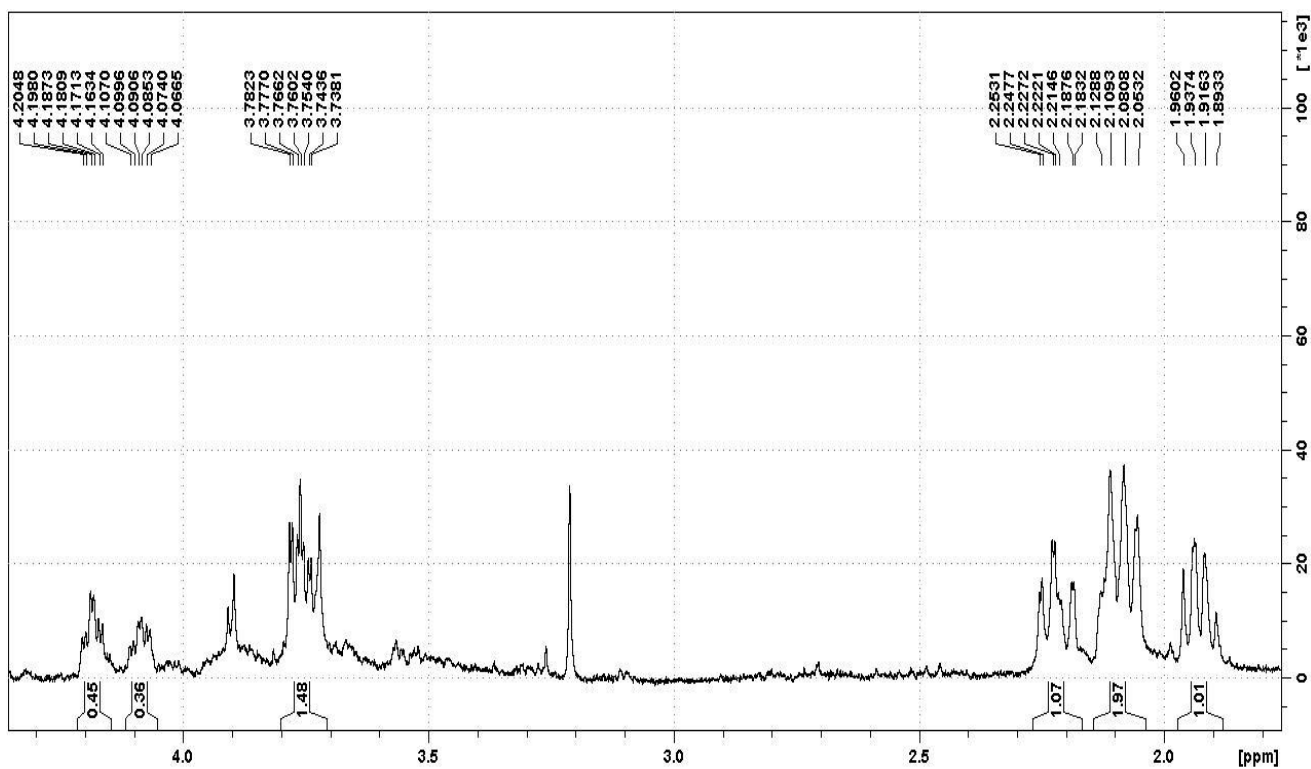
Espectro 19 - Espectro de RMN de gHMBC (D_2O , 14,1 T) de 2 e 3.Espectro 20 - Espectro de RMN de 1H (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5.

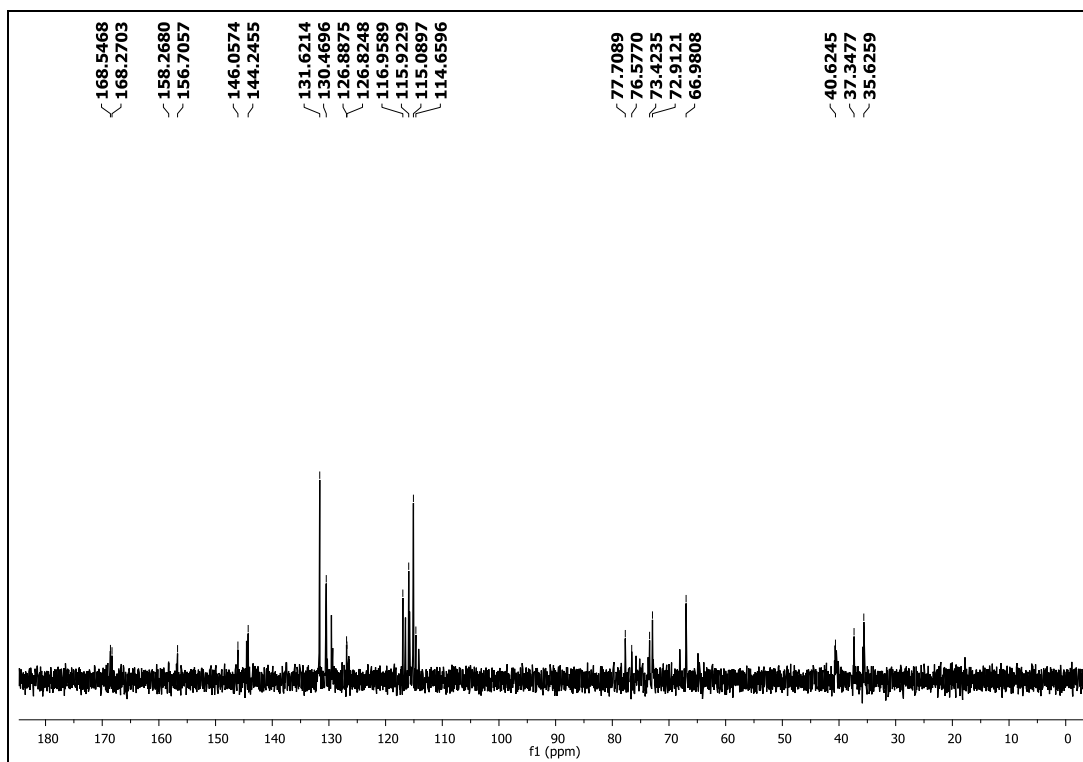
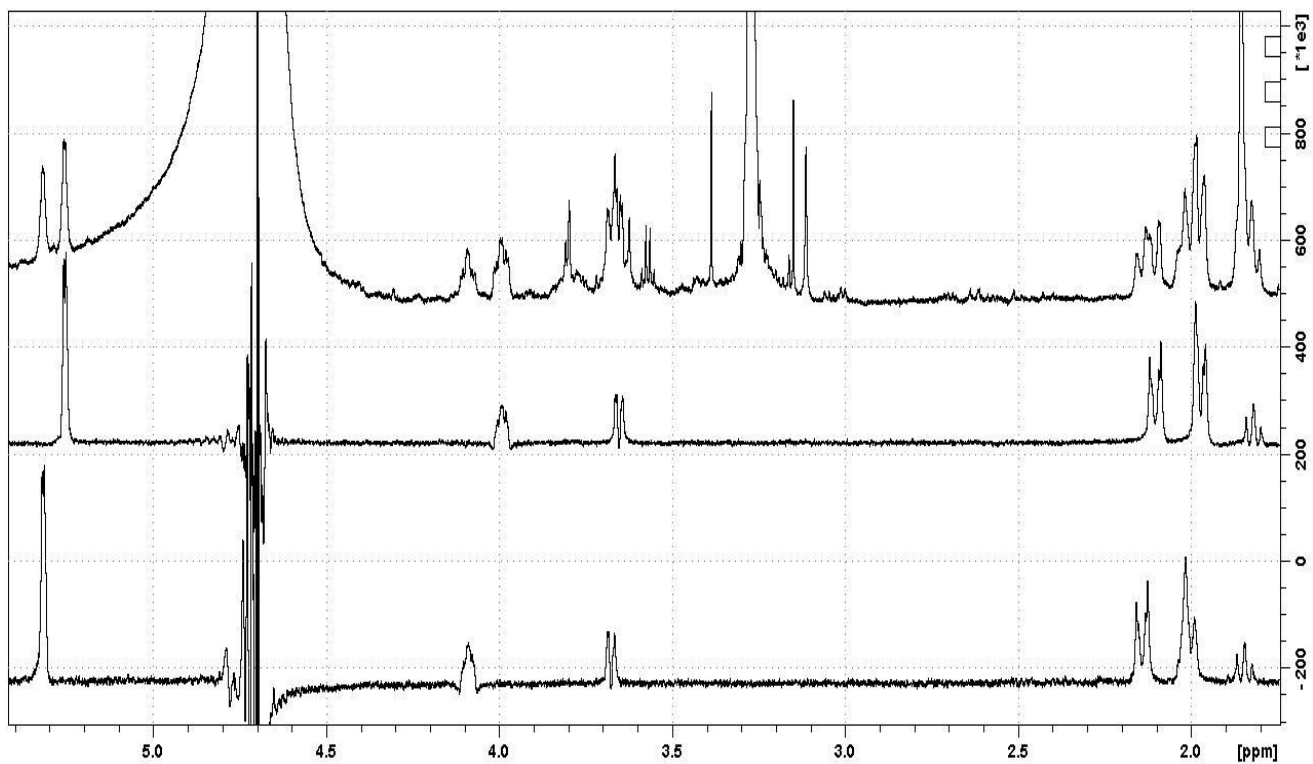
Dissertação de Mestrado

Espectro 21 - Ampliação da região de δ 7,90 a 5,10 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de **4** e **5**.



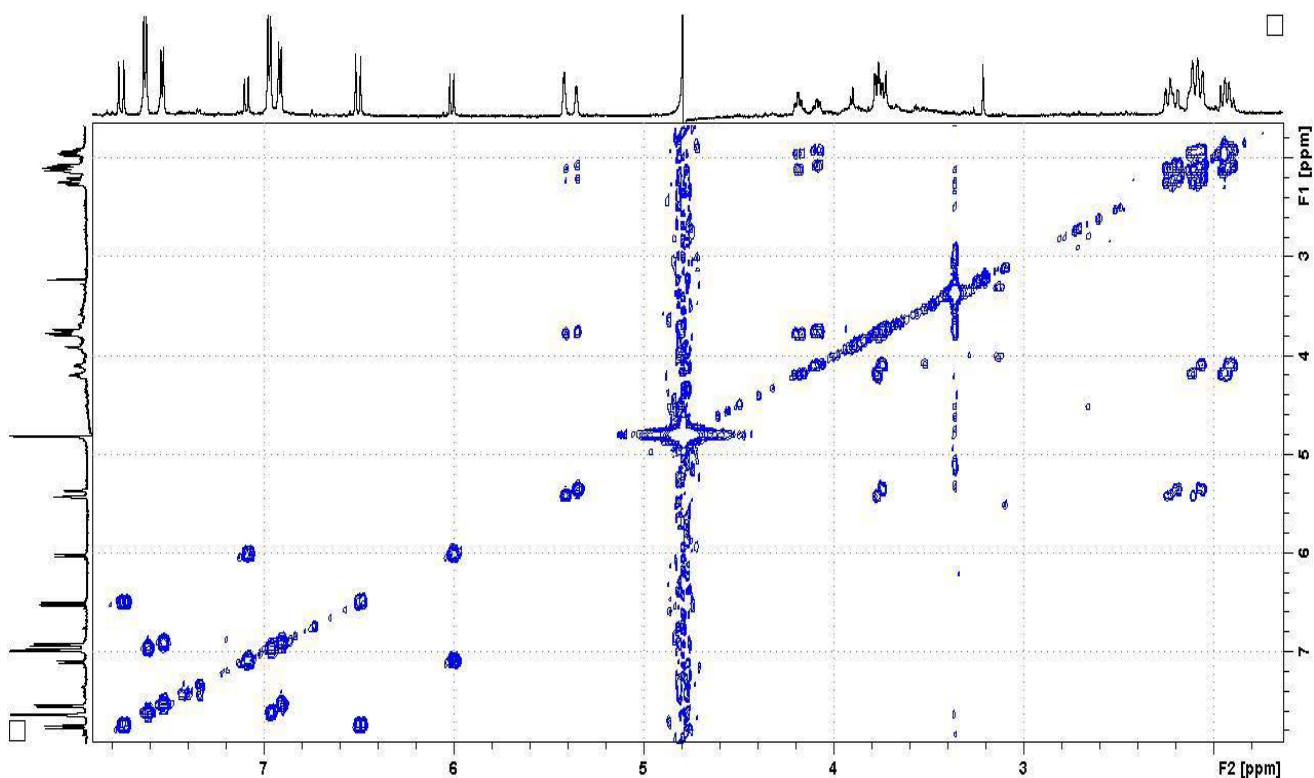
Espectro 22 - Ampliação da região de δ 4,40 a 1,60 do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de **4** e **5**.



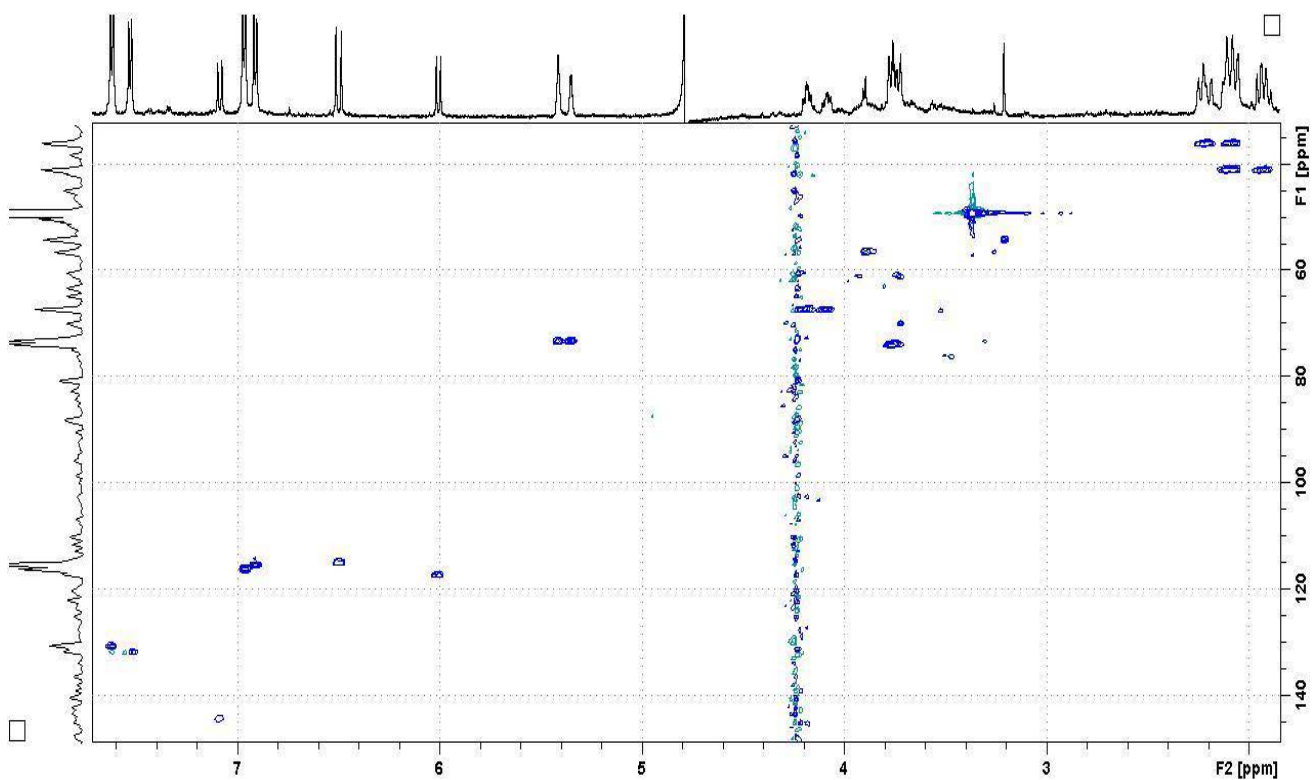
Espectro 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de **4** e **5**.**Espectro 24** - Espectro de RMN de TOCSY-1D (D_2O , 14,1 T) de **4** e **5**.

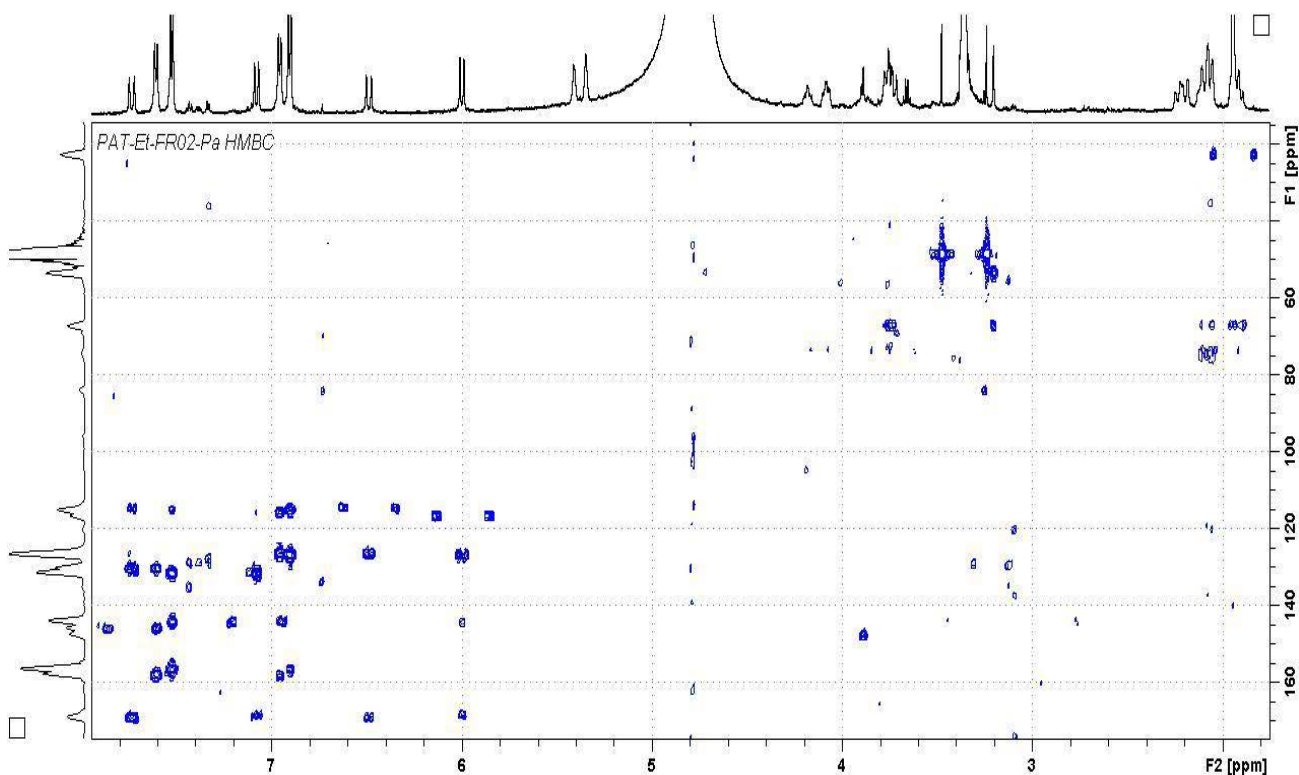
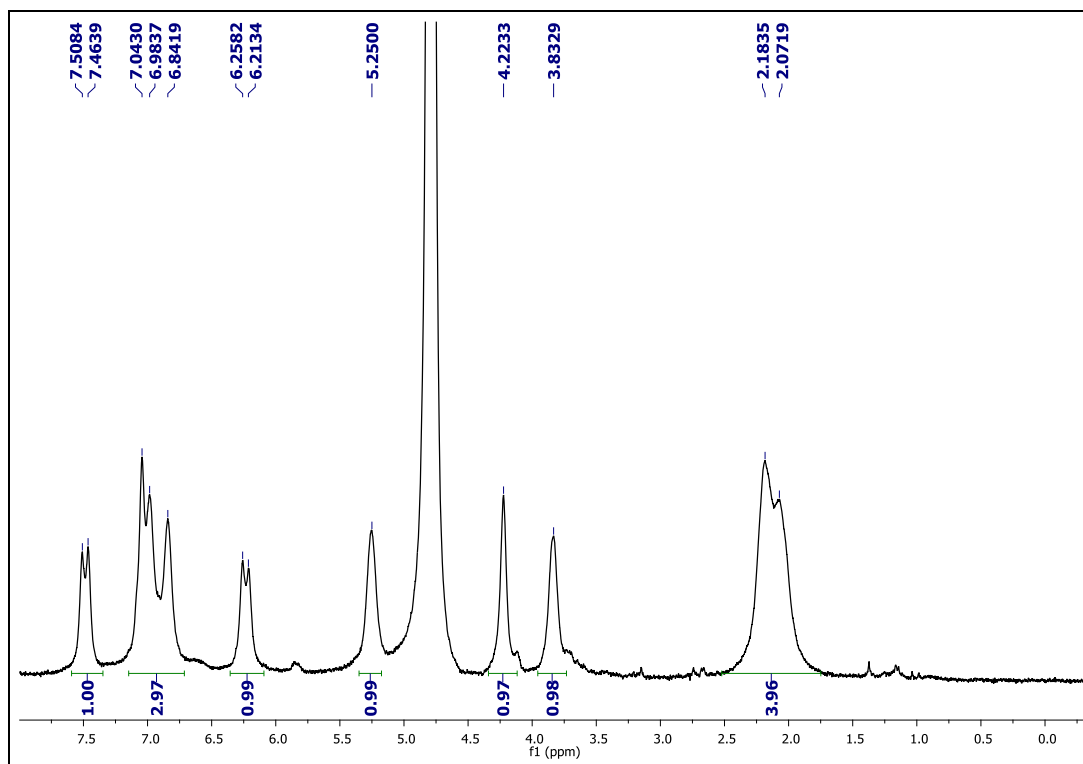
Dissertação de Mestrado

Espectro 25 - Espectro de RMN de gCOSY (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5.



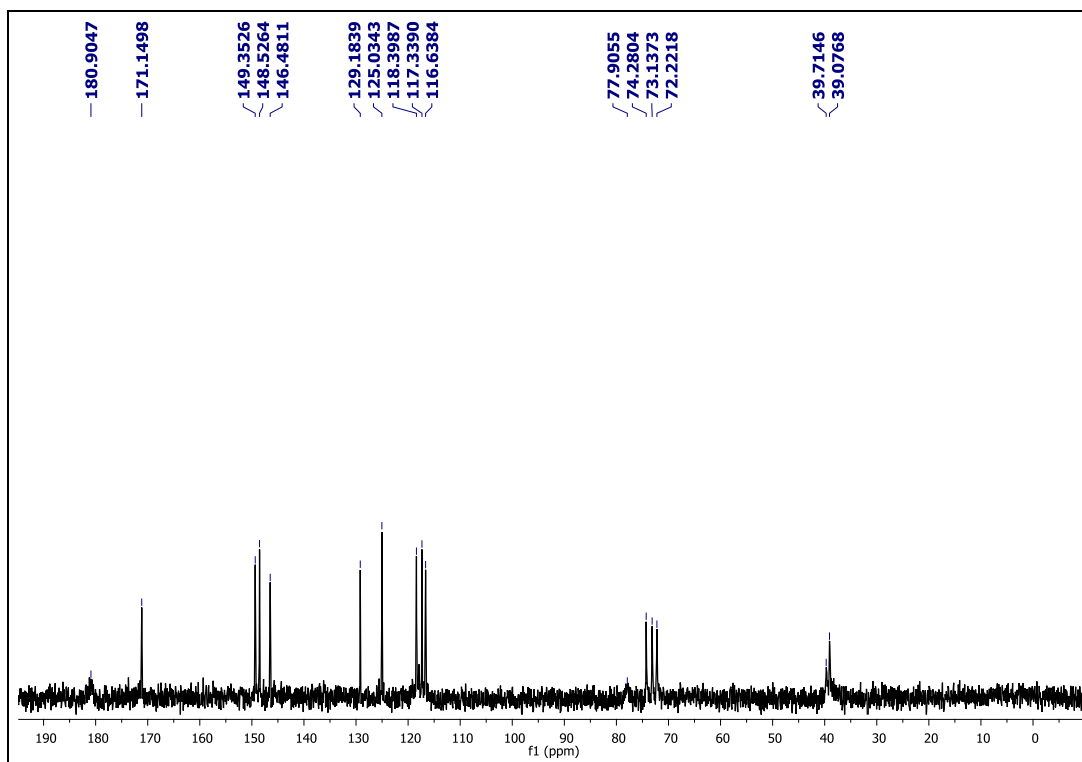
Espectro 26 - Espectro de RMN de gHSQC (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5.



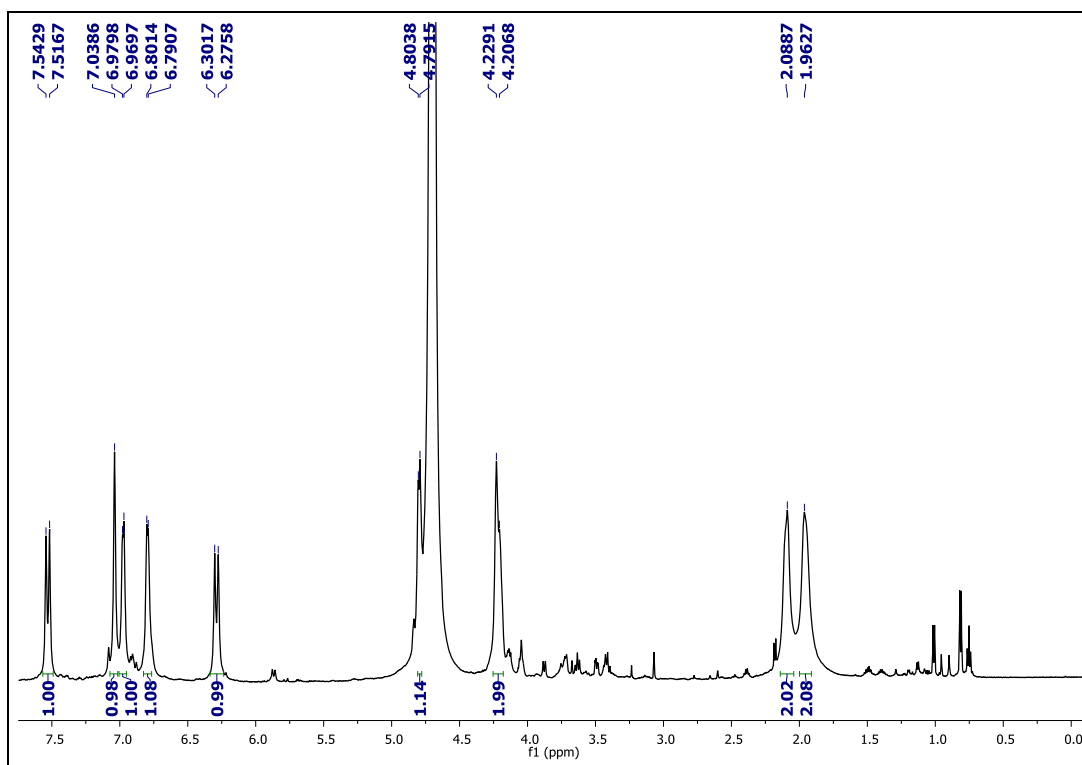
Espectro 27 - Espectro de RMN de gHMBC (D_2O , 14,1 T) de 4 e 5.Espectro 28 - Espectro de RMN de 1H (D_2O , 7,0 T) de 6.

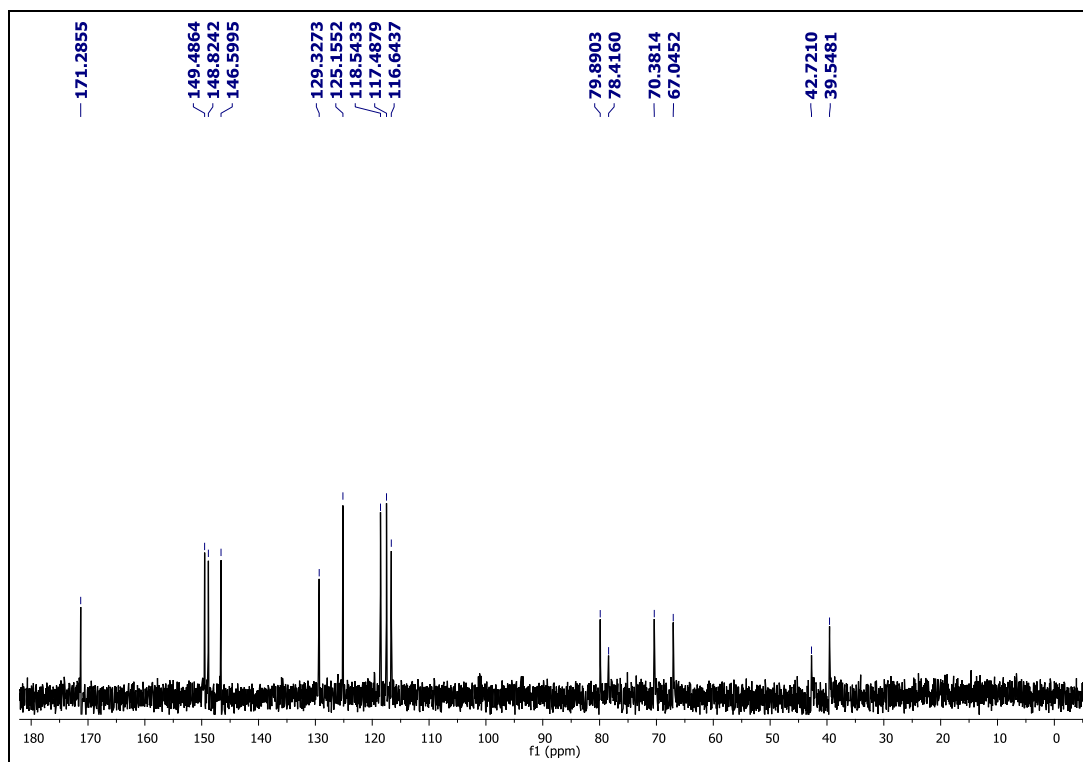
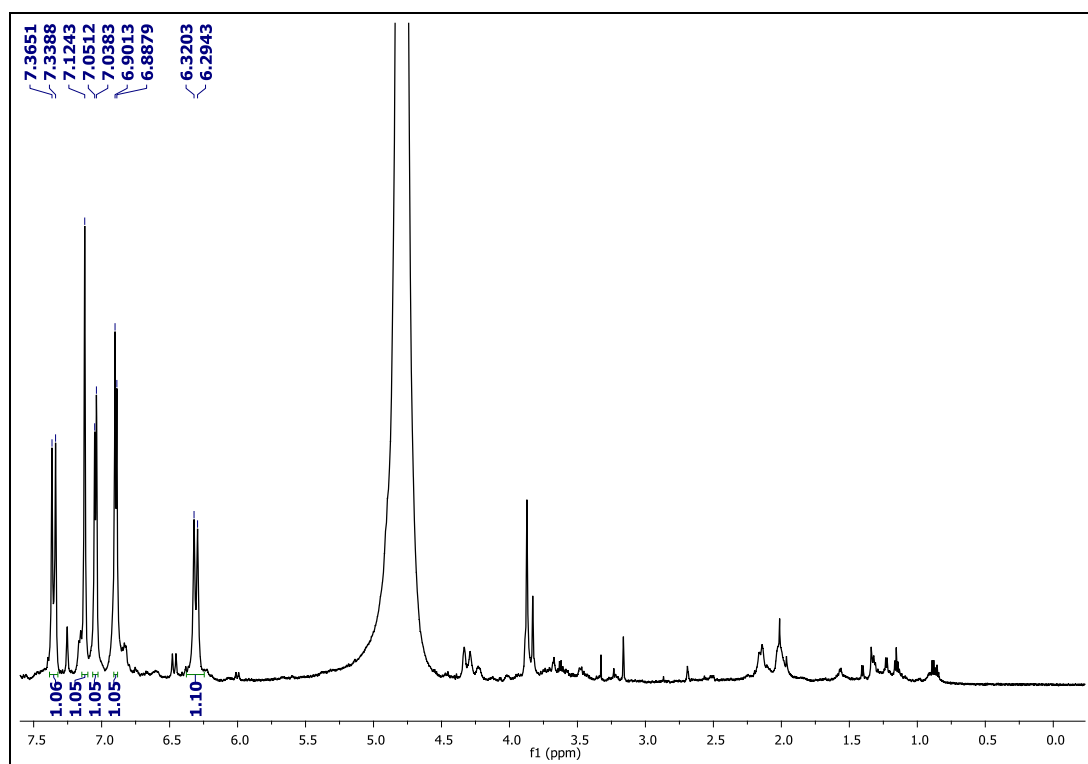
Dissertação de Mestrado

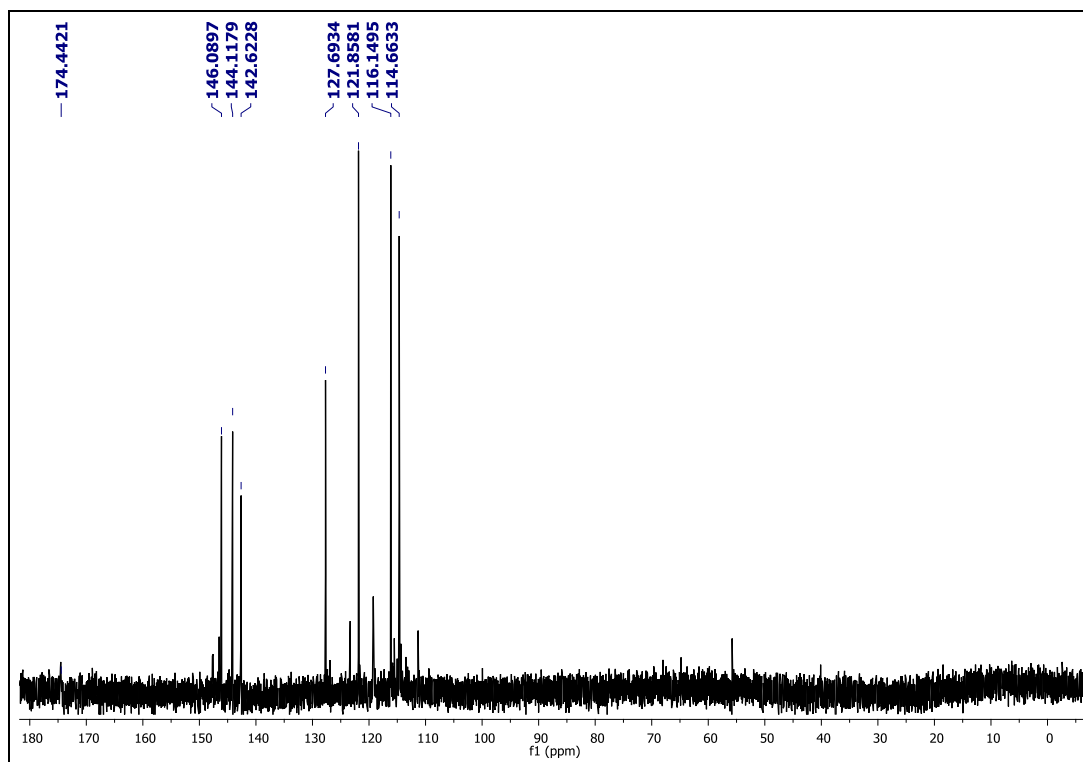
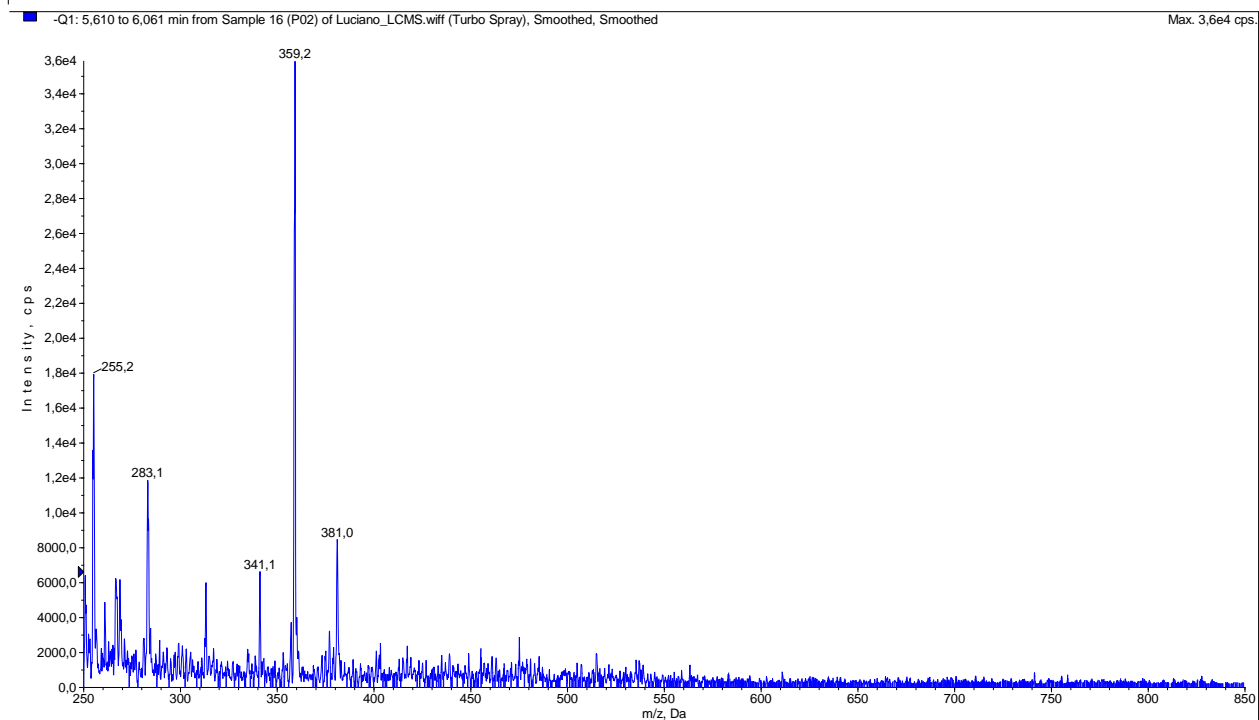
Espectro 29 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 7,0 T) de 6.



Espectro 30 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de 7.



Espectro 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de **7**.**Espectro 32** - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 14,1 T) de **8**.

Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 14,1 T) de 8.**Espectro 34 - Espectro de massas de 1.**

Espectro 35 - Espectro de DC de 1.