



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Vanessa Amaral Carneiro

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de *Plumbago scandens***

Rio de Janeiro

2017

Vanessa Amaral Carneiro

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de *Plumbago scandens***



como requisito  
para o título de Mestre,  
Graduação em  
Farmácia do Estado do  
Rio de Janeiro  
concentração:

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

C289 Carneiro, Vanessa Amaral  
Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de  
*Plumbago scandens*. / Vanessa Amaral Carneiro. – 2017.  
112 f.

Orientador: Aleksandro Araújo da Silva  
Co-orientador: Carlos Alberto da Silva Riehl

Dissertação (Mestre) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Instituto de Química.

1. Plantas medicinais – Teses. 2. *Plumbago scandens* -  
Teses 3. Fitoquímico. - Teses I. Silva, Aleksandro Araújo da. –  
Teses. II. Riehl, Carlos Alberto da Silva III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 633.88

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial  
desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Vanessa Amaral Carneiro

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de *Plumbago scandens***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovado em 24 de abril de 2017.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Alexsandro Araujo da Silva (Orientador)  
Instituto de Química – UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Riehl (Coorientador)  
Escola de Química – UFRJ

---

Profa. Dra. Monica Regina da Costa Marques  
Instituto de Química – UERJ

---

Prof. Dr. Alcino Palermo de Aguiar  
Instituto Militar de Engenharia

---

Profa. Dra. Monica Costa Padilha  
Instituto de Química – UFRJ

---

Prof. Dr. Jorge Luiz de Oliveira Domingos  
Instituto de Química – UERJ

Rio de Janeiro

2017

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Carlos Gomes Carneiro (*in memoriam*),  
que sempre foi o meu maior incentivador.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar força, sabedoria, saúde e proteção para trilhar este caminho cheio de obstáculos a serem vencidos.

A minha mãe, Cássia Regina Carneiro, por todo incentivo e compreensão nesses anos de estudo. Devo tudo o que sou e ainda o que serei a você. Obrigada pelo amor, pelas palavras de sabedoria e por todos os ensinamentos de vida.

Ao meu marido e grande amor, Celso Leonardo Cianci Pacheco, pelo amor, pela paciência, pelo incentivo e correção gramatical. Obrigada por estar comigo durante os momentos mais difíceis desta jornada, por torcer por mim e se preocupar comigo a todo instante. A ele que me “aturou” nos momentos de nervosismo, que enxugou diversas lágrimas.

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pela excelência de ensino concedida. A todo corpo docente que atuou em minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. Alexsandro Araujoda Silva pela orientação no desenvolvimento desta dissertação. Agradeço pela confiança depositada, pela compreensão nos momentos difíceis e por todo o suporte para que eu pudesse caminhar em direção à finalização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto da Silva Riehl pela orientação no desenvolvimento desta dissertação. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos tarde da noite e por ter me cedido um espaço em seu laboratório.

Aos meus familiares, principalmente aos da família Cianci e família Amaral. Agradeço por todo carinho e torcida que foram imprescindíveis para conquista de mais uma vitória.

A colega Erika Muñoz pela parceria no laboratório, por todas as ajuda e palavras de incentivo.

A amiga Giovana Rossini por me fazer companhia na UFRJ em algumas noites e me ajudar nos processos complexos de paginação da dissertação.

Ao amigo Carlos Bizarri que sempre me aconselhou, me abasteceu de inúmeros livros e sempre trocou muitas ideias durante essa jornada.

Aos amigos Felipe Duarte e Ellis Macedo por sempre se preocuparem comigo no dia a dia e principalmente nos episódios dramáticos da UFRJ.

Aos colegas do *Juice Quality Center* da Coca-Cola Brasil por todo o incentivo e compreensão nesses anos de estudo.

Aos amigos, TODOS, companheiros desta longa jornada chamada vida, a eles que são apoio e incentivo para todo o sempre. Amigos de toda uma vida, todos aqueles que de perto ou à distância são o meu refúgio para qualquer momento.

## RESUMO

CARNEIRO, Vanessa Amaral. *Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de *Plumbago scandens**. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A espécie vegetal *Plumbago scandens* presente na restinga da Marambaia na cidade do Rio de Janeiro é utilizada na medicina popular, porém sua composição química e atividade antioxidante não é amplamente conhecida. Para este trabalho, folhas e caules da espécie *Plumbago scandens* foram extraídos com solventes orgânicos de diferentes polaridades, via soxhlet. Em seguida, os extratos foram quantificados e foi realizada a avaliação de sua atividade antioxidante utilizando-se método de determinação de conteúdo de fenóis totais (CFT), teor de flavonóides totais (TFT) e atividade antioxidante pelo método do DPPH. O resultado obtido para o conteúdo de fenóis totais para o extrato hexânico de *P. scandens* foi 44,82 EAG/g e para o extrato acetato de etila 140,72 EAG/g, o teor de flavonóides totais para o extrato hexânico foi de 44,99 mg EQC/g e para o extrato acetato de etila 73,52 mg EQC/g. A atividade antioxidante pelo método do DPPH apresentou um valor de  $EC_{50}$  100  $\mu$ g/mL para o extrato hexânico e 35  $\mu$ g/mL para o extrato acetato de etila. No estudo fitoquímico do extrato hexânico de *Plumbago scandens* seguintes compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e confirmados via comparação com padrões de referência ou espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ : Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), composto presente nas espécies do gênero *Plumbago*, já detectada na espécie estudada; Três compostos ainda não relatados na literatura para a espécie *Plumbago scandens*: Tocoferol (Vitamina E) e os triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina.

Palavras-chave: *Plumbago scandens*.  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. Plumbagina. Tocoferol. DPPH.

## ABSTRACT

CARNEIRO, Vanessa Amaral. *Phytochemistry study and antioxidant activity evaluation of Plumbago scandens*. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The plant species *Plumbago scandens* present in the Marambaia sandbank in the city of Rio de Janeiro is used in popular medicine, but its chemical composition and antioxidant activity is not widely known. *Plumbago scandens* leaves and stems were extracted using organic solvents with different polarities, via soxhlet. Then, the extracts were quantified and their antioxidant activity was evaluated using total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity by the method of capture free radicals DPPH. The result obtained for the total phenol content for *P. scandens* hexane extract was 44.82 EGA/g and for the ethyl acetate extract 140.72 EGA /g, the total flavonoid content for the hexanic extract was 44.99 mg EQC/g and for the extract ethyl acetate 73.52 mg EQC/g. The results of antioxidant activity by the DPPH method was EC<sub>50</sub> 100 µg/mL for the hexane extract and 35 µg / mL for the ethyl acetate extract. In the phytochemical study of the *Plumbago scandens* hexane extract, the following compounds were identified via gas chromatography coupled to mass spectrometry and confirmed by comparison with reference standards or <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Plumbagine (5-hydroxy-2-methyl-1, 4 naphthoquinone), a compound present in *Plumbago* species, already detected in the species studied; Three compounds not previously found in *Plumbago scandens*: Tocopherol (Vitamin E) and the α- and β-amyrin triterpenes

Keywords: *Plumbago scandens*. α- e β- amyrin. Plumbagin. Tocopherol. DPPH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Plumbago scandens</i> .....	17
Figura 2-	Molécula da Plumbagina.....	19
Figura 3-	Naftoquinonas encontradas no gênero <i>Plumbago</i> : Chitranona (1), Droserona (2), Isoshinanolona (3) e Plumbazeylanona (4)....	22
Figura 4-	3,8-diidroxi-6-metoxi-2-isopropil-1,4-naftoquinona e 5,7-diidroxi-8-metoxi-2-metil-1,4-naftoquinona isoladas por Gupta et al.....	23
Figura 5-	2-metil-5-(3'-metil-but-2'eniloxi)-[1,4] naftoquinona extraída por Kishore.....	23
Figura 6-	3,3' Biplumbagina e Eliptinona isoladas por Kaewbumrung e Panichayupakaranant, 2013.....	24
Figura 7-	Alcalóides derivados da Guaridina.....	24
Figura 8-	Naftoquinona e terpenóide isolados a partir da espécie <i>Plumbago zeylanica</i> , respectivamente.....	25
Figura 9-	Epiisoshinanolona isolada e caracterizada por Bhattacharyya e Carvalho em 1986.....	26
Figura 10-	Fórmula estrutural do DPPH.....	28
Figura 11-	Reações referentes ao ensaio de determinação da capacidade antioxidante por DPPH. Redução pela presença dos compostos antioxidantes (AH.) ou radicais livres (R.).....	29
Figura 12-	Esqueleto básico dos flavonoides.....	29
Figura 13-	Fórmula estrutural da Quercetina.....	30
Figura 14-	Fórmula estrutural do Ácido Gálico.....	30
Figura 15-	Moinho de facas tipo Willey.....	32
Figura 16-	Fluxograma de extração da planta <i>Plumbago scandens</i> .....	33
Figura 17-	Diagrama de blocos do ensaio de teor de flavonóides totais.....	34
Figura 18-	Diagrama de blocos do ensaio de teor de fenóis totais .....	35
Figura 19-	Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (AA) – ensaio de DPPH.....	36

Figura 20-	Cromatografia em coluna aberta do extrato hexânico.....	53
Figura 21-	Cromatografia em camada delgada das frações 22, 23, 24 e 25 do extrato acetato de etila.....	54
Figura 22-	Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 20...	56
Figura 23-	Espectro de massas do pico majoritário da fração 2PSEH 20, em comparação ao espectro de massas da Plumbagina (5-hidroxi-2metil-1,4 naftoquinona) (NIST).....	56
Figura 24-	Proposta de fragmentação para a molécula Plumbagina.....	57
Figura 25-	Cromatografia preparativa em camada delgada da fração 2PSEH 20.....	58
Figura 26-	Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 20 Rf5.....	59
Figura 27-	Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 20 Rf5 AIF6.....	60
Figura 28-	Molécula da Plumbagina numerada.....	61
Figura 29-	Espectro de correlação C-H, HSQC aproximado.....	64
Figura 30-	Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH21..	65
Figura 31-	Espectro de massas do pico majoritário da fração 2PSEH 21, em comparação ao espectro de massas do $\alpha$ -Tocoferol (NIST)...	66
Figura 32-	Cromatograma de corrente de íons totais do padrão de $\alpha$ -Tocoferol.....	66
Figura 33-	Espectro de massas do pico em 57,79 min do padrão analítico $\alpha$ -Tocoferol e sua fragmentação.....	67
Figura 34-	Proposta de fragmentação do $\alpha$ -Tocoferol.....	68
Figura 35-	Cromatograma de corrente de íons totais do padrão de $\alpha$ -Tocoferol coinjetado com a amostra 2PSEH 21.....	69
Figura 36-	Cromatograma de corrente de íons totais do padrão de $\alpha$ -Tocoferol coinjetado com a amostra 2PSEH 21 em comparação com a amostra original 2PSEH 21.....	69
Figura 37-	Cromatograma de corrente de íons totais do padrão de $\alpha$ -Tocoferol coinjetado com a amostra 2PSEH 21 em comparação com a amostra original 2PSEH 21, expandido no tempo de retenção 57,70 min.....	70

Figura 38-	Cromatograma de corrente de íons totais da fração 3PSEH 26...	71
Figura 39-	Espectro de massas do pico em 60,87 min da fração 3PSEH 26, em comparação ao espectro da beta- amirina e do pico em 61,58 min em comparação ao espectro da alfa-amirina.....	72
Figura 40-	Cromatograma de monitoramento de íon selecionado em <i>m/z</i> 218 da fração 3PSEH 26.....	73
Figura 41-	Cromatograma de corrente de íons totais da mistura $\alpha$ , $\beta$ – amirina extraído de resinas de plantas amazônicas.....	74
Figura 42-	Espectro de massas do pico da $\alpha$ -, $\beta$ -Amirina da Resina Amirínica.....	74
Figura 43-	Fragmentação da $\alpha$ -Amirina.....	75
Figura 44-	Coinjeção da Resina Amirínica e a fração 3PSEH 26.....	78
Figura 45-	Cromatograma dos triterpenos encontrados no tomate.....	79
Figura 46-	Espectro de massas do pico em 60,87min da fração 3PSEH 26..	80
Figura 47-	Espectro de massas do pico em 60,83min da fração 3PSEH 26..	80
Figura 48-	Cromatograma dos triterpenos encontrados no tomate após tentativa de isolamento do composto 13 com o perfil de fragmentação dos íons mais abundantes do composto 2 – $\delta$ -Amirina.....	81
Figura 49-	Reação de amirinas com o reagente Dicromato de Piridina(PDC).....	82
Figura 50-	Cromatograma de corrente de íons totais do padrão de amirinas oxidado.....	83
Figura 51-	Cromatograma da amostra 3PSEH 26 após o processo de oxidação.....	84
Figura 52-	Cromatograma da amostra 3PSEH 26 oxidada coinjetada com o padrão $\alpha$ -, $\beta$ -Amirina da Resina Amirínica oxidados.....	85
Figura 53-	Espectros de massas da $\alpha$ -Amirina oxidada no padrão (a) e na amostra (b).....	86
Figura 54-	Espectros de massas da $\beta$ -Amirina oxidada no padrão (a) e na amostra (b).....	87
Figura 55-	Reação de amirinas com anidrido acético e DMAP.....	88

Figura 56-	Cromatograma da Resina Amirínica após a reação de acetilação.....	89
Figura 57-	Cromatograma da amostra 3PSEH 26 após a reação de acetilação.....	90
Figura 58-	Cromatograma da amostra 3PSEH 26 acetilada coinjetada com o padrão $\alpha$ -, $\beta$ -Amirina acetilados.....	91
Figura 59-	Comparação dos espectros da $\alpha$ -Amirina acetilada no padrão e na amostra.....	92
Figura 60-	Comparação dos espectros da $\beta$ -Amirina acetilada no padrão e na amostra.....	93
Figura 61-	Cromatograma da fração PSEH 26.....	94
Figura 62-	Espectro de massas do pico majoritário (60,67 min) da fração PSEH 26, em comparação ao espectro do gamma-Sitosterol (NIST).....	95
Figura 63-	Espectro de massas do composto com Tr: 59,1 min, da fração PSEH 26, em comparação ao espectro do Campesterol (NIST)..	95
Figura 64-	Espectro de massas do composto com Tr: 59,5 min, da fração PSEH 26, em comparação ao espectro do Stigmasterol (NIST)...	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Esquema de fracionamento em sílica gel dos extratos em hexano e em acetato de etila de <i>Plumbago scandens</i> .....	37
Tabela 2-	Rendimento médio de extração por Soxhlet nos diferentes solventes.....	42
Tabela 3-	TFT: Valores de concentração dos padrões de Quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) e suas respectivas absorvâncias.....	43
Tabela 4-	Ensaio de TFT: Resultados de absorvância das amostras e respectivas concentrações.....	44
Tabela 5-	Ensaio de TFT: Resultados de concentração das amostras em miligrama de EQC por grama de peso seco.....	44
Tabela 6-	CTF: Valores de concentração dos padrões de Ácido Gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ) e suas respectivas absorvâncias.....	45
Tabela 7-	Ensaio de CFT: Resultados de absorvância das amostras e respectivas concentrações.....	46
Tabela 8-	Ensaio de CFT: Resultados de concentração das amostras em miligrama de EAG por grama de peso seco.....	47
Tabela 9-	Ensaio de DPPH: Valores de concentração das amostras do extrato hexânico de <i>Plumbago scandens</i> diluídas e suas respectivas absorvâncias.....	48
Tabela 10-	Ensaio de DPPH: Valores de concentração das amostras do extrato acetato de etila de <i>Plumbago scandens</i> diluídas e suas respectivas absorvâncias.....	48
Tabela 11-	Ensaio de DPPH: Valores de concentração das amostras do extrato hexânico e acetato de etila da <i>Plumbago scandens</i> e suas porcentagens de atividade antioxidante.....	49
Tabela 12-	Resultados do ensaio de DPPH para <i>Plumbago scandens</i> .....	51
Tabela 13-	Resultados de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante – DPPH para <i>Plumbago scandens</i> e outras três espécies de plantas.....	52
Tabela 14-	Dados obtidos dos espectros de RMN 1H para	

	Plumbaginaversus encontrados na literatura.....	61
Tabela 15-	Dados obtidos dos espectros de RMN 13C para Plumbagina versus encontrados na literatura.....	61
Tabela 16-	Dados de correlações C-H obtidos do espectro HSQC.....	62
Tabela 17-	Dados obtidos dos espectros de RMN 13C para a mistura de $\alpha$ -, $\beta$ - amirina versus encontrado na literatura.....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Curva analítica do ensaio de TFT, padrão Quercetina.....	43
Gráfico 2-	Curva analítica do ensaio de CFT, padrão Ácido Gálico.....	46
Gráfico 3-	Curva analítica do ensaio de DPPH para <i>Plumbago scandens</i> – Extrato Hexânico.....	50
Gráfico 4-	Curva analítica do ensaio de DPPH para <i>Plumbago scandens</i> – Extrato Acetato de etila.....	50

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>OBJETIVO</b> .....	18
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	<i>Plumbago scandens</i> .....	26
2.2	<b>Ação antioxidante</b> .....	27
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	<b>Materiais</b> .....	31
3.2	<b>Equipamentos</b> .....	31
3.3	<b>Metodologia experimental</b> .....	32
3.3.1	<u>Extração por Soxhlet</u> .....	33
3.3.2	<u>Teor de Flavonóides Totais (TFT)</u> .....	33
3.3.3	<u>Conteúdo de Fenóis Totais (CFT)</u> .....	34
3.3.4	<u>Teste de DPPH (DPPH)</u> .....	36
3.3.5	<u>Fracionamento dos extratos – cromatografia em coluna aberta preparativa</u> .....	36
3.3.6	<u>Cromatografia em camada delgada</u> .....	37
3.3.7	<u>Avaliação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas</u> .....	38
3.3.8	<u>Caracterização da molécula através de análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C)</u> .....	39
3.3.9	<u>Confirmação da presença de α-, β- amirina por reações químicas</u> .....	39
3.3.9.1	Reações de oxidação.....	40
3.3.9.2	Reações de acetilação.....	40
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	42
4.1	<b>Extração da <i>Plumbago scandens</i> por Soxhlet</b> .....	42
4.2	<b>Determinação do teor de Flavonoides Totais (TFT)</b> .....	42
4.3	<b>Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais (CFT)</b> .....	45
4.4	<b>Capacidade antioxidante – Ensaio de DPPH</b> .....	47
4.5	<b>Cromatografia em coluna aberta e em camada delgada</b> .....	52

4.6	<b>Análise cromatográfica</b> .....	54
4.6.1	<u>Fração número 20 do extrato hexânico 2PSEH 20</u> .....	55
4.6.2	<u>Fração número 21 do extrato hexânico 2PSEH 21</u> .....	65
4.6.3	<u>Fração número 26 do extrato hexânico 3PSEH 26</u> .....	71
4.6.4	<u>Fração número 26 do extrato hexânico 3PSEH 26</u> .....	94
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	97
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99
	<b>APÊNDICE A</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C obtido da fração PSEH 20 AIF3.....	106
	<b>APÊNDICE B</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H expandido A obtido da fração PSEH 20 AIF3.....	107
	<b>APÊNDICE C</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H expandido B obtido da fração PSEH 20 AIF3.....	108
	<b>APÊNDICE D</b> – HSQC da fração PSEH 20 AIF3 purificada.....	109
	<b>APÊNDICE E</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C obtido da Resina Amirínica.....	110
	<b>APÊNDICE F</b> – Cromatograma e espectro de massas da fração PSEA 35.....	111

## INTRODUÇÃO

Restingas são de acordo com a resolução nº 07, de 23 de Julho de 1996 do CONAMA: “conjunto de comunidades vegetais, fisionomicamente distintas, sob influência marinha e fluvio-marinha. Estas comunidades, distribuídas em mosaico, ocorrem em áreas de grande diversidade ecológica sendo consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do solo do que do clima”.

As restingas estão presentes em quase todo o território brasileiro, se concentrando no litoral de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Bahia. Com essa grande extensão em área territorial, as restingas concentram uma das mais ricas floras com espécies vegetais pouco estudadas e que, desta maneira, compõem ampla biodiversidade (Wikipédia, 2016).

A restinga da Marambaia situada no estado do Rio de Janeiro, possui uma extensão de aproximadamente 42 km, é separada do continente pelo Canal do Bacalhau, na Barra de Guaratiba (Rio de Janeiro). A região é administrada pela Marinha Brasileira, sendo utilizada para exercícios militares e experimentos de armamentos (Corpo de Fuzileiros Navais, 2015).

Sua vegetação reúne uma das últimas reservas de Mata Atlântica do sudeste brasileiro dentre elas a *Plumbago scandens* (Figura 1, pág. 21), uma espécie tropical presente tipicamente ao longo da costa do Brasil. A *Plumbago scandens* é uma espécie endêmica de restinga, de solo arenoso com restrição de água e é caracterizada pela alta intensidade luminosa (PAIVA, et. al. 2011), é uma planta sub-arbustiva ascendente, de 0,5 a 1,5m de altura. Sua disseminação é realizada por animais e seu ciclo é perene, apresentando flor e fruto em grande parte do ano. Essa espécie também é conhecida como “louco”, “caataia”, “caapomonga”, “folha-de-louro” e “erva do diabo”.

A espécie vegetal *Plumbago scandens* pertence ao gênero *Plumbago*, a família da *Plumbaginaceae*, ordem *Plumbaginales*, superordem *Malviflorae*. Essa família compreende cerca de 20 gêneros e aproximadamente 500 espécies, apresentando uma ampla distribuição geográfica (PAIVA, 2002).

As plantas do gênero *Plumbago* têm sido utilizadas na medicina popular como anti-reumático, anti-parkinson, purgativo, contra sífilis e dores de dente entre outras aplicações.

Figura 1: *Plumbago Scandens*



Fonte: RIET-CORREA, 2011

Essa planta já desapareceu em vários lugares em função da atividade humana e um exemplo disso ocorre com a exploração imobiliária que acontece na região da zona oeste do Rio de Janeiro, onde muitas áreas de restingas ainda estão sendo destruídas para criações de condomínios e shoppings, impactando diretamente a flora da região. Esta espécie também é encontrada na América do Norte (Sul da Flórida e México, principalmente) América Central e América do Sul (PAIVA, et. al. 2011).

De uma maneira geral, as plantas são capazes de sintetizar diversas substâncias, sendo ricas fontes naturais de pesquisa em fitoquímicos para obtenção de novos fármacos, que podem contribuir para novos medicamentos terapêuticos.

Diversos trabalhos vêm sendo publicados principalmente sobre a espécie *Plumbago zeylanica*. Desde aplicações fitoterápicas e estudos medicinais à caracterização e determinação dos compostos ativos presentes no caule, folhas e raízes. Esta espécie é amplamente utilizada na cultura oriental e na medicina Ayurvedica e sua aplicação é altamente difundida. Também foram publicados trabalhos referentes a espécie *Plumbago rosea* L. (SILJA et al, 2015; NAIR et al, 2016), *Plumbago indica* L. (DINDA et al, 1994; PAVELA et al, 2013) e *Plumbago Auriculata* (PAIVA et al, 2005).

Entretanto, existem poucos relatos na literatura a respeito do estudo fitoquímico e da atividade antioxidante da espécie *Plumbago scandens*.

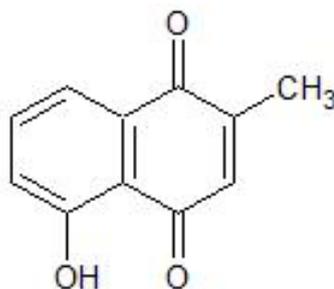
## 1. OBJETIVO

Como existem poucos estudos na literatura a respeito da *Plumbago scandens*, o objetivo deste projeto é contribuir para o estudo fitoquímico e avaliar o potencial antioxidante da espécie vegetal *Plumbago scandens* presente na restinga da Marambaia na cidade do Rio de Janeiro.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Plumbago* apresenta diversas espécies mapeadas de plantas floridas nativas das regiões tropicais mais quentes do mundo. O gênero vem sendo amplamente estudado nos últimos anos, dentre eles, pode se destacar os relacionados ao isolamento da naftoquinona plumbagina (5-hidroxi-2metil-1,4 naftoquinona), (Figura 2) e sua atividade biológica.

Figura 2: Molécula da Plumbagina



Fonte: JAIN, 2014

A plumbagina é atribuída à atividade biológica e antioxidante do gênero, tais como: anticâncer, antileishmaniose, antifúngico, anticoagulante, bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (JAIN, 2014)

A plumbagina vem sendo muito estudada a partir do extrato proveniente da espécie *Plumbago zeylanica* L. Essa espécie é comumente encontrada e utilizada em fitoterápicos no oriente, sendo arbustos distribuídos em matagais e pastagens de baixas altitudes em Taiwan (JAIN, 2014). Também é utilizada na medicina Ayurveda na Índia onde suas raízes e/ou folhas são utilizadas no tratamento de bronquite, desordem no fígado, leucoderma entre outras enfermidades (PRAVIN, 2013). Além desses, essa espécie ainda é cultivada na China, Bangladesh, Sri-Lank, Austrália e África (JAIN, 2014).

Nairet *al.*(2016)obtiveram resultado satisfatório no estudoda potencialidade antimicrobiana da plumbagina, obtida da espécie *Plumbago rósea* no combate a doenças causadas pelos microrganismos *Staphylococcus aureuseCandida albicans*.

No combate ao câncer, a Plumbagina é um inibidor ao crescimento do câncer de próstata, câncer de mama, de pâncreas e também atua como antioxidante, antimicrobiano e antifúngico (JAIN, 2014).

Em 2010, Nile e Khobragade estudaram o poder antioxidante dos flavonóides extraídos da espécie *Plumbago zeylanica*, que demonstraram ter significativa atividade em comparação com o flavonoide padrão: quercetina. O poder antioxidante da Plumbagina também foi estudado por Tanet.*al.* (2011). Neste último trabalho, os autores extraíram das raízes da *Plumbago zeylanica* e observaram a capacidade da Plumbagina de inibir o radical livre DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazila) como metodologia de medição da capacidade antioxidante, entre outros métodos. Em 2014, o poder antioxidante dos compostos extraídos da espécie *Plumbago zeylanica* foram estudados também por Nile e Park . Os resultados desse trabalho sucederam na indicação de estudos futuros para o desenvolvimento de novas drogas para o combate a doenças relacionadas a stress oxidativo einflamação.

Estudo inédito com ratos foi realizado por Sunil *et al.* (2012) para aplicação da Plumbagina extraída das raízes da espécie *Plumbago Zeylanica* no combate a Diabetes Mellitus. O resultado do trabalho demonstrou eficácia no tratamento em ratos, indicando a possibilidade do desenvolvimento de novas drogas para humanos e corroborando a eficácia do tratamento já difundido pela cultura popular oriental.

Estudos relacionados ao uso da Plumbagina no combate ao câncer de mama foram realizados por Dandawate *et al.* (2014), a pesquisa foi feita a partir da síntese de uma série de análogos de Hidrazonas derivadas da Plumbagina.Este estudo demonstrou a potencialização da atividade anticâncer da Plumbagina contendo sítios hidrazínicos.

Segundo Nayak *et al.* (2015), devido às diversas aplicações da Plumbagina especialmente no combate ao câncer, a demanda da indústria farmacêutica cresce a cada a ano. Entretanto, existe uma quantidade insuficiente de fontes naturais para abastecer essa indústria. Em função dessa demanda, Nayaket *al.* 2015 propõem a biossíntese desse ativo através do uso das raízes da *Plumbago zeylanica*.

Em 1993, Gupta desenvolveu metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de ultravioleta para determinação

da Plumbagina e do 2,2-dimetil-5-hidroxi-6-acetilcromeno. A extração foi realizada em hexano, esse extrato foi concentrado e ressolubilizado em clorofórmio para posterior análise cromatográfica.

A Plumbagina foi extraída e identificada por espectrometria de massas em 2005 por Hsieh *et al.* Nesse estudo, a extração da Plumbagina nas raízes da *Plumbago zeylanica* foi realizada utilizando diferentes proporções de metanol e água. A análise e quantificação via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série, com ionização pela técnica Eletrospray em modo negativo, forneceu um limite de detecção de 1 ng/mL com desvios padrões relativos baixos para o estudo da precisão. Este método foi desenvolvido com o objetivo de quantificar a Plumbagina e foi capaz de obter uma boa resolução em relação aos outros compostos extraídos.

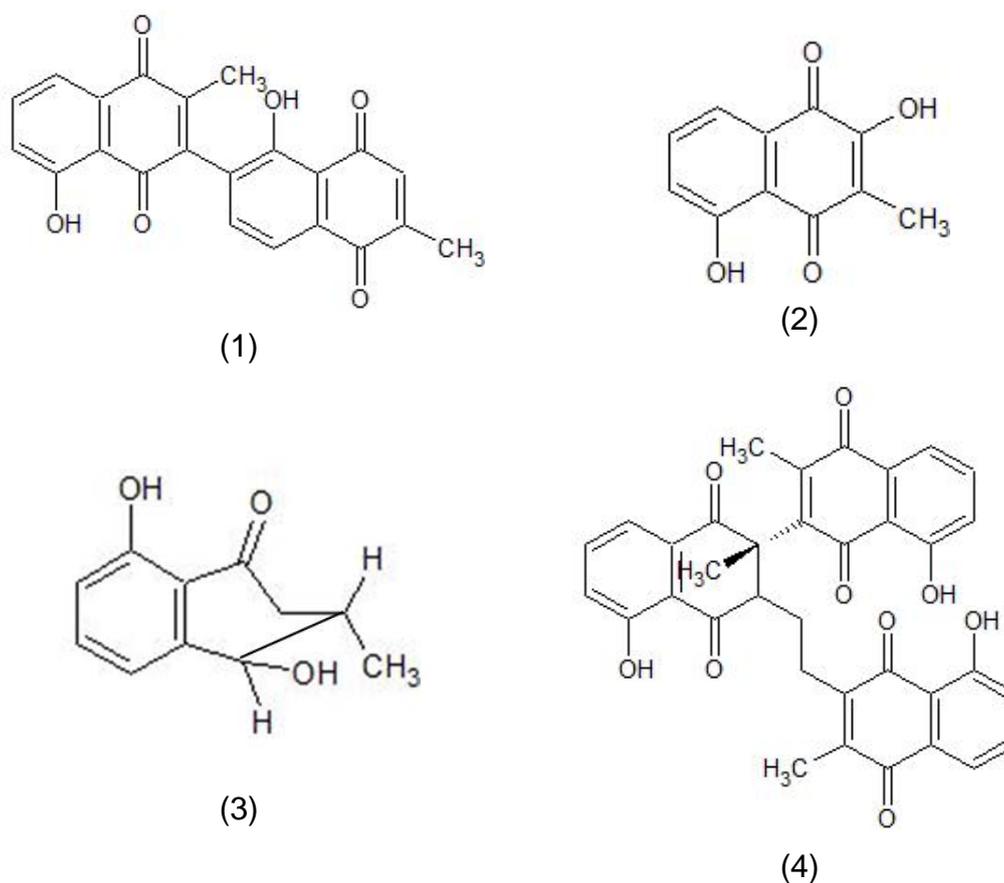
Em 2010, Israni, *et al.* propuseram uma metodologia para determinação e quantificação da Plumbagina por espectrofotometria de Ultravioleta / Visível. A Plumbagina foi extraída das espécies *Plumbago zeylanica*, *Plumbago rósea*, *Plumbago capensis* e *Plumbago capensis var. alba*. Os resultados obtidos da validação da análise demonstraram que o método de quantificação proposto foi eficiente e que a espécie *Plumbago rósea* apresenta maior percentual de Plumbagina em comparação as outras espécies estudadas.

Em 2014, Jain *et al.* propuseram uma metodologia para determinação da Plumbagina utilizando a técnica de cromatografia de camada fina de alta performance. As amostras da espécie *Plumbago zeylanica* foram extraídas em metanol com auxílio do ultrassom. A proposta de Jain *et al.* (2014) foi desenvolver uma metodologia capaz de ser utilizada em rotinas de controles de qualidade de extratos de raízes de *Plumbago*.

Não somente a Plumbagina é encontrada em plantas do gênero *Plumbago*. Em 1975, Sankaram e colaboradores isolaram a binaftoquinona, a Chitranona (1), um sólido cristalino laranja obtido das raízes da *Plumbago zeylanica* (Figura 3, pág 26). Estudos realizados por Gunaherath *et al.* (1983), propõem o isolamento não somente da Plumbagina, como também do Droserona (2) e Isoshinanolona (3), extraídos das raízes da *Plumbago zeylanica* (Figura 3, pág 26). Em 1986, Gunaherath *et al.* propõem o isolamento da Plumbazeylanona (4), um trímico da Plumbagina extraído das raízes da espécie *Plumbago zeylanica* (Figura 3, pág 26). Para todos os casos, os compostos isolados foram confirmados via Espectrometria

de Massas, Ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13.

Figura 3: Naftoquinonas encontradas no gênero *Plumbago*



Legenda: (1) Chitranona, (2) Droserona, (3) Isoshinanolona e (4) Plumbazeylanona

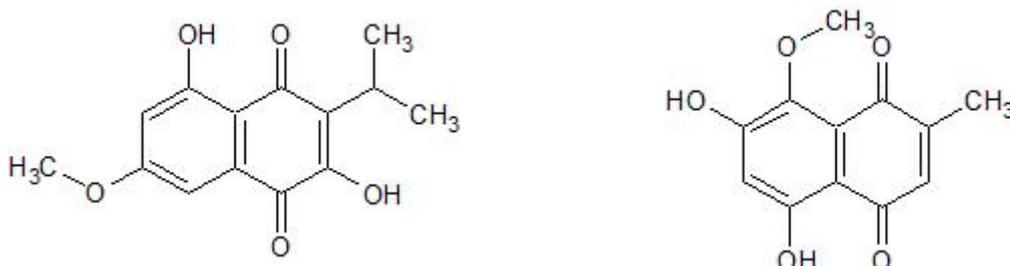
Fonte: SANKARAM, 1975; GUNATHERATH, 1983

Em 1992, Dinda e CHEL propuseram a extração do 6-hidroxiplumbagina das partes aéreas da espécie *Plumbago indica*, espécie encontrada na Índia e utilizada também como planta ornamental.

Gupta *et al.* (1999) isolaram duas naftoquinonas: 3,8-diidroxi-6-metoxi-2-isopropil-1,4-naftoquinona e 5,7-diidroxi-8-metoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (Figura 4,

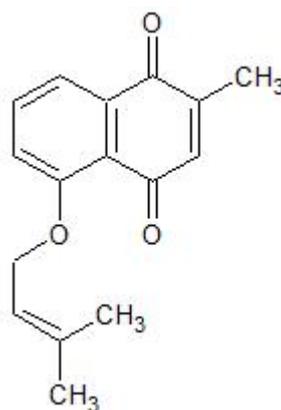
pág. 27). Raízes secas da espécie *Plumbago zeylanica* foram extraídas com etanol em ebulição para obtenção dessas naftoquinonas.

Figura 4: 3,8-diidroxi-6-metoxi-2-isopropil-1,4-naftoquinona e 5,7-diidroxi-8-metoxi-2-metil-1,4-naftoquinona isoladas por Gupta *et al.*



Em 2010, Kishore *et al.* extraíram, identificaram e caracterizaram a naftoquinona: 2-metil-5-(3'-metil-but-2'ênioxi)-[1,4] naftoquinona (Figura 5) além da Plumbagina das raízes da *Plumbago zeylanica*.

Figura 5: 2-metil-5-(3'-metil-but-2'ênioxi)-[1,4] naftoquinona extraída por Kishore

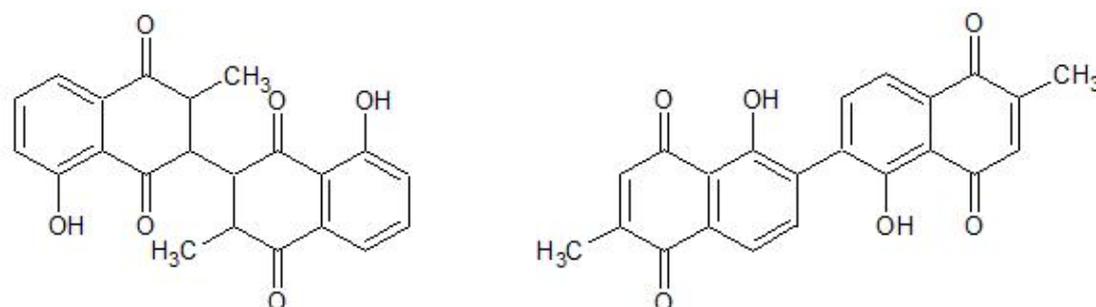


A caracterização das estruturas isoladas realizadas nos trabalhos de Dinda (1992), Gupta (1999) e Kishre (2010) foi realizada através da associação das técnicas: Ultravioleta, Infravermelho, Ressonância Magnética de Carbono 13 e Hidrogênio e Espectrometria de Massas

Em 2013, Kaewbumrung e Panichayupakaranant isolaram três naftoquinonas extraídas das raízes da espécie *Plumbago indica* e desenvolveram uma metodologia

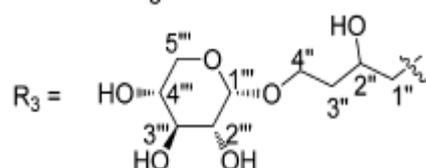
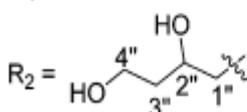
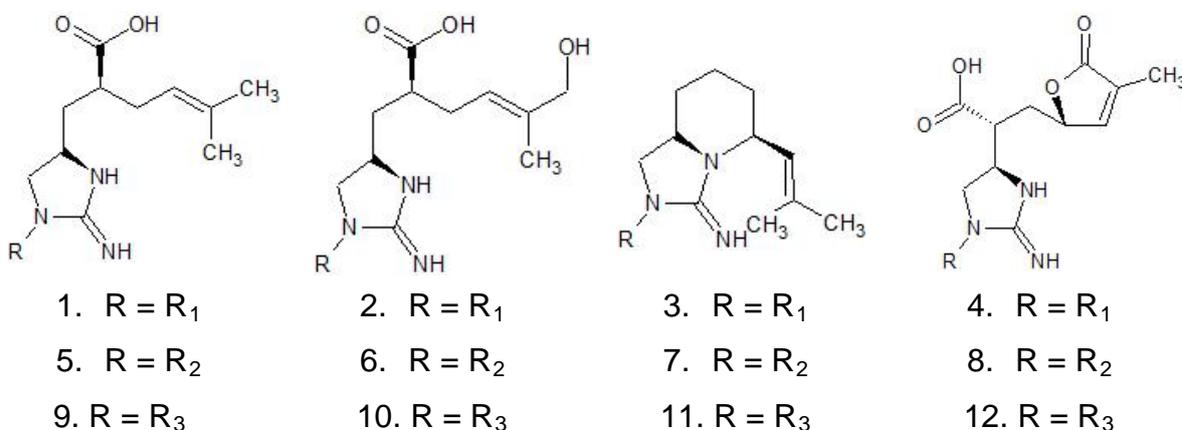
para determinação simultânea das naftoquinonas: Plumbagina, 3,3' Biplumbagina e Eliptinona (Figura 6, pág. 28) via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de Ultravioleta.

Figura 6: 3,3' Biplumbagina e Eliptinona isoladas por Kaewbumrung e Panichayupakaranant, 2013.



Também em 2013, Congratulou no isolamento de doze alcalóides derivados da Guaridina (Figura 7) das partes aéreas da espécie *Plumbago zeylanica*. Todas as estruturas foram caracterizadas utilizando Infravermelho, Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono.

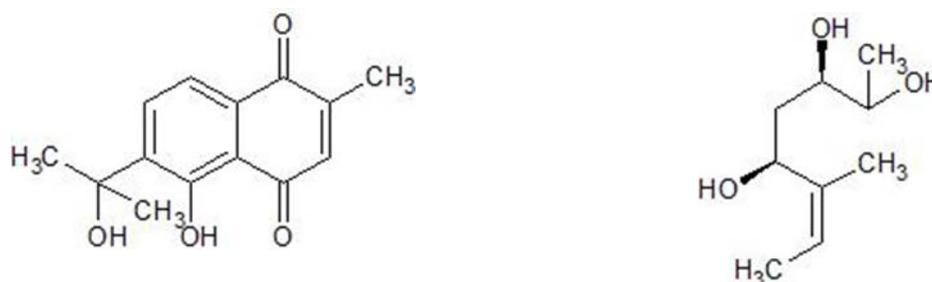
Figura 7: Alcalóides derivados da Guaridina



Fonte: CONG et. al. (2013)

Em 2014, Ohiraet *al.* isolaram uma nova naftoquinona e um terpenóide (Figura 8) a partir da espécie *Plumbago zeylanica*.

Figura 8: Naftoquinona e terpenóide isolados a partir da espécie *Plumbago zeylanica*, respectivamente



Fonte: OHIRA, S. *et. al.*, 2014

Novas aplicações para Plumbagina vêm sendo estudadas nos últimos anos, por exemplo, o trabalho realizado por Choi *et al.* (2012) demonstrou bons resultados para aplicação da Plumbagina isolada das folhas da espécie *Plumbago auriculata* como herbicida natural. Os autores compararam o desempenho da Plumbagina ao desempenho de defensivos agrícolas de referência para combater as pragas presentes na cultura do pepino.

Pavela (2013) estudou a aplicação de 7 diferentes naftoquinonas como inseticida no combate à mosca doméstica, *Musca domestica L.*, e os estudos realizados demonstraram que somente a Plumbagina foi capaz de causar a morte de 100% das moscas domésticas adultas utilizadas no estudo.

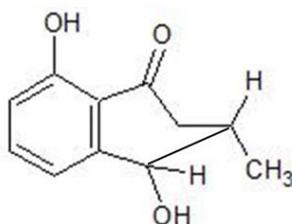
Em 2016, Pradeepa et al. investigaram a possibilidade de utilização da Plumbagina extraída da *Plumbago zeylanica* como repelente de mosquitos transmissores da Malária, *Anopheles stephensi*. Resultados desse estudo demonstraram um potencial uso desse composto no combate ao mosquito vetor da Malária, sendo uma opção menos tóxica e melhor para o meio ambiente.

## 2.1 *Plumbago scandens*

Existem poucos estudos na literatura a respeito da composição química da espécie *Plumbago scandens*. Entretanto, existem indicações da presença de naftoquinonas, esteróides e flavonóides (BHATTACHARYYA E CARVALHO, 1986 e PAIVA *et al.*, 2002 e 2004)

O composto Epiisoshinanolona (Figura 9) foi isolado e caracterizado por Bhattacharyya e Carvalho em 1986. A extração da espécie *Plumbago scandens* foi realizada em meio alcoólico e a caracterização da molécula foi determinada via espectroscopia por ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Figura 9: Epiisoshinanolona isolada e caracterizada por Bhattacharyya e Carvalho em 1986



Paiva *et al.* (2004) estudaram as diferentes formas de extração da Plumbagina das raízes da espécie *Plumbago scandens*. Eles avaliaram a extração usando maceração estática por 24h, maceração dinâmica por 10 horas +14 horas de dinâmica, extração com auxílio de ultrassom por 2 horas e extração via soxhlet em diferentes tempos 2, 5 e 10 horas. Este estudo demonstrou uma maior eficiência de extração da Plumbagina utilizando soxhlet por 5 horas, com rendimento de 57% aproximadamente.

Em 2002, Paiva *et al.* estudaram o perfil cromatográfico das espécies *Plumbago scandens* e *Plumbago auriculata* LAM. Nesse trabalho, folhas, caules e raízes das espécies foram extraídas com clorofórmio e o perfil dos extratos, de ambas

as espécies, foram avaliados cromatograficamente através da comparação de seus tempos de retenção via técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta. O resultado deste trabalho evidenciou similaridade cromatográfica entre as espécies estudadas.

Em 2006, Rodrigues *et al.* estudaram a extração da Plumbagina via fluido supercrítico CO<sub>2</sub>. Uma massa conhecida da espécie *Plumbago scandens* foi submetida a pressurização com CO<sub>2</sub>. Após a pressurização, o processo de extração foi acompanhado pela observação do comprimento de onda máximo característico da Plumbagina via espectrofotômetro de ultravioleta / visível. Os resultados encontrados foram equivalentes aos tradicionais solventes e processos de extração do composto.

Em 2011, Paiva *et al.* estudaram as mudanças micromoleculares que ocorreram em raízes da *Plumbago scandens* durante o desenvolvimento da flora. O objetivo desse trabalho foi relacionar os estágios fisiológicos do vegetal com a produção química da espécie. O trabalho foi realizado através do monitoramento dos compostos: Plumbagina, Epiisoshinanolona, Ácido Palmítico e Sitosterol via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Em 2004, estudos *in vivo* com macacos foram realizados por Moraes *et al.*, e estes estudos demonstraram resultados satisfatórios para o tratamento dos tremores ocasionados pela doença de Parkinson, que promove desordem no sistema nervoso central.

## **2.2 Atividade Antioxidante**

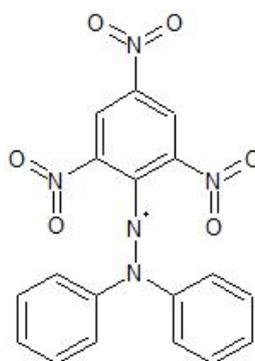
A atividade antioxidante é evidenciada através de ensaios de determinação de teor de flavonóides totais, conteúdo de fenóis totais e ensaio de atividade antioxidante com DPPH.

Antioxidantes são substâncias que na presença de pequenas quantidades em relação ao substrato oxidável retarda ou previne a oxidação desse substrato (FOGARASI *et al.*, 2015). E eles agem de diversas formas, como na decomposição dos peróxidos e na eliminação de radicais livres. Todos esses efeitos dependem da estrutura química e da concentração do antioxidante. Antioxidantes naturais podem proteger o DNA, proteínas e membranas lipídicas de oxidações perigosas ao sistema biológico (FOGARASI *et. al.*, 2015).

A atividade antioxidante a ser determinada será a que envolve um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) um dos mais utilizados (ARNAO *et al.*, 2000).

O ensaio de capacidade antioxidante por DPPH é baseado no método de Brand-Williams (BRAND-WILLIAMS, 1995), onde os compostos antioxidantes reduzem o radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Figura 10).

Figura 10: Fórmula estrutural do radical DPPH

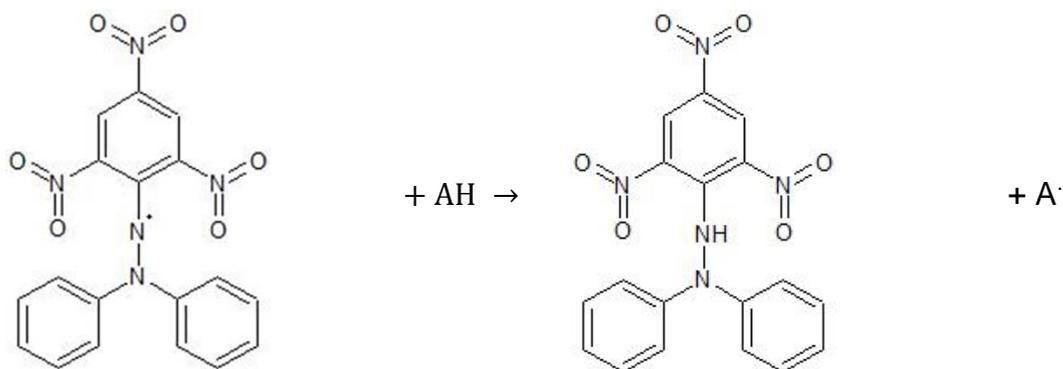


Fonte: BRAND-WILLIAMS, 1995

O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm. Em meio etanólico, ele apresenta coloração violeta intensa (ARNAO *et al.*, 2000). À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, podendo ser medida no espectrofotômetro.

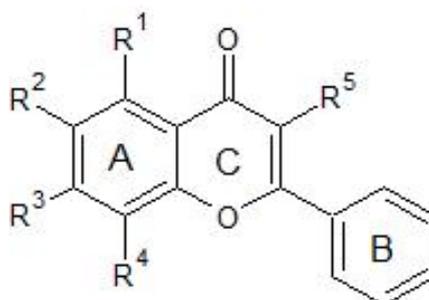
As reações relatadas durante o ensaio são descritas na figura 11, sendo AH, o composto antioxidante e R•, o radical livre. (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Figura 11: Reação referente ao ensaio de determinação da capacidade antioxidante por DPPH. Redução de DPPH pela presença dos compostos antioxidantes (AH) ou radicais livres (R•)



O ensaio de teor de flavonóides totais é baseado no método de determinação colorimétrica com Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Este composto é utilizado como reativo para evitar interferências de outros compostos fenólicos (BURIOL et al. 2009), ele forma complexos estáveis com os grupos cetona C-4, além de grupos hidroxila C-3 e C-5 das flavonas e dos flavonóis. Também forma complexos ácidos lábeis nos anéis A e B, com os grupos orto-di-hidroxil. Na figura 11 pode-se verificar a estrutura básica dos flavonóides.

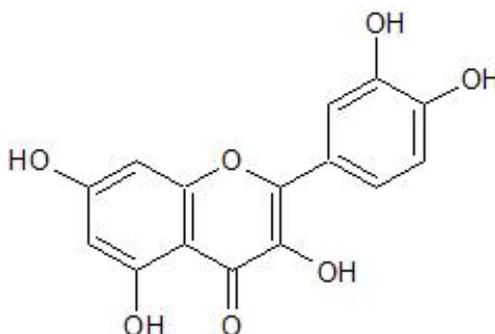
Figura 12: Esqueleto básico dos flavonóides



Fonte: G.C BAG *et al.*, 2015.

Para essa metodologia, a Quercetina (Figura 12) é o composto utilizado como padrão para construção da curva analítica para o ensaio de teor de flavonóides totais (BAG *et al.*, 2015). E desta forma, os resultados da determinação serão expressos em massa equivalente de Quercetina por massa de amostra.

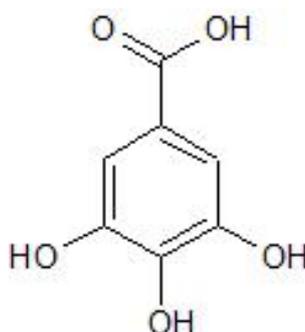
Figura 13: Fórmula estrutural da Quercetina.



Fonte: BAG *et al.*, 2015

O conteúdo de fenóis totais é baseado no método de determinação colorimétrica pelo reagente de Folin-Ciocalteu (mistura de Fosfomolibdato e Fosfotungstato). A reação forma um cromóforo azul proveniente da redução do ácido fosfomolibdico-fosfotungstínico pelas hidroxilas fenólicas (Ângelo e Jorge, 2007). O padrão utilizado para a determinação de fenóis é o ácido gálico, demonstrado na figura 13.

Figura 14: Fórmula estrutural do Ácido Gálico.



FONTE: Ângelo e Jorge, 2007

Com base nessas informações, a ação antioxidante da *Plumbago scandens* neste trabalho será analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes nos extratos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais:

Os reagentes (grau PA) utilizados nesse estudo foram:

Hexano, Acetato de Etila, Metanol, Etanol, Cloreto de Alumínio, Acetato de Potássio, reagente de Folin-Ciocalteu (FC), Carbonato de Sódio, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), Sílica Gel (Silica-flash G60, 70-230 mesh), Sílica Gel tipo GF 254, Sulfato de Cério (IV), Sulfato de Sódio, DMAP (N,N Dimetil Amino Piridina), Anidrido Acético, Diclorometano, PDC (Dicromato de Piridina) sintetizado e Alumina (Óxido de alumínio 150-235 mesh).

Os padrões utilizados nesse trabalho foram:

Quercetina, Ácido Gálico, alfa-Tocoferol. Todos os padrões utilizados nesse estudo são da Sigma-Aldrich com grau de pureza  $\geq 95\%$ .

### 3.2 Equipamentos:

Os equipamentos utilizados nesse estudo foram:

- Moinho de facas tipo Willey;
- Balança analítica (Mettler Toledo, modelo AB-265-S);
- Evaporador rotativo (Buchi, modelo Waterbath B481);
- Espectrofotômetro de ultravioleta-visível (Varian, modelo Cary 100);
- Cromatógrafo gasoso (456-GC, Bruker Daltonic.) acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar (Scion-TQMS, Bruker Daltonics.);
- RMN 500/54 Premium shielded (Agilent Technologies);

### 3.3 Metodologia Experimental:

Para este estudo foi coletada, na Restinga da Marambaia no Estado do Rio de Janeiro, uma espécie da família *Plumbago scandens*. A identificação do material

foi realizada pelo Prof. Luiz Roberto Zamith Coelho Leal, do Departamento de Ecologia do Instituto e Biologia da Universidade Federal Fluminense.

As folhas e caules da espécie *Plumbago scandens* foram secas naturalmente através do espalhamento em local fechado.

A moagem tem por finalidade reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões aumentando a eficiência da extração. Esse processo de moagem ocorreu no Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, através do uso do Moinho de facas tipo Willey (Figura 14).

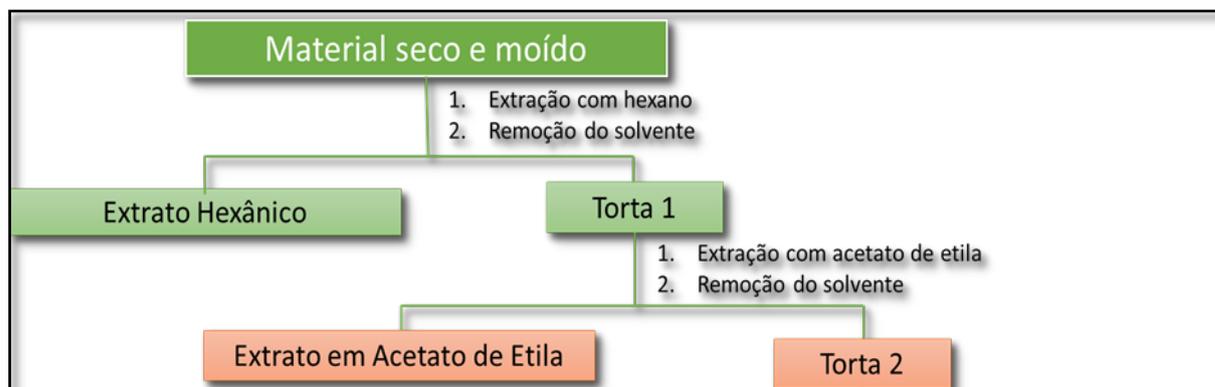
Figura 15: Moinho de facas tipo Willey



### 3.3.1. Extração por Soxhlet

A amostra moída foi pesada em balança analítica, entre 100 e 150g para cada batelada de extração, e transferida para o extrator Soxhlet com capacidade para 1 litro de solvente. A extração foi realizada de forma exaustiva (quando o solvente ficava incolor, era mantida a extração por mais 2 horas) a partir de solventes com polaridade crescente: hexano e acetato de etila (Figura 15):

Figura 16: Fluxograma de extração da planta *Plumbago Scandens*

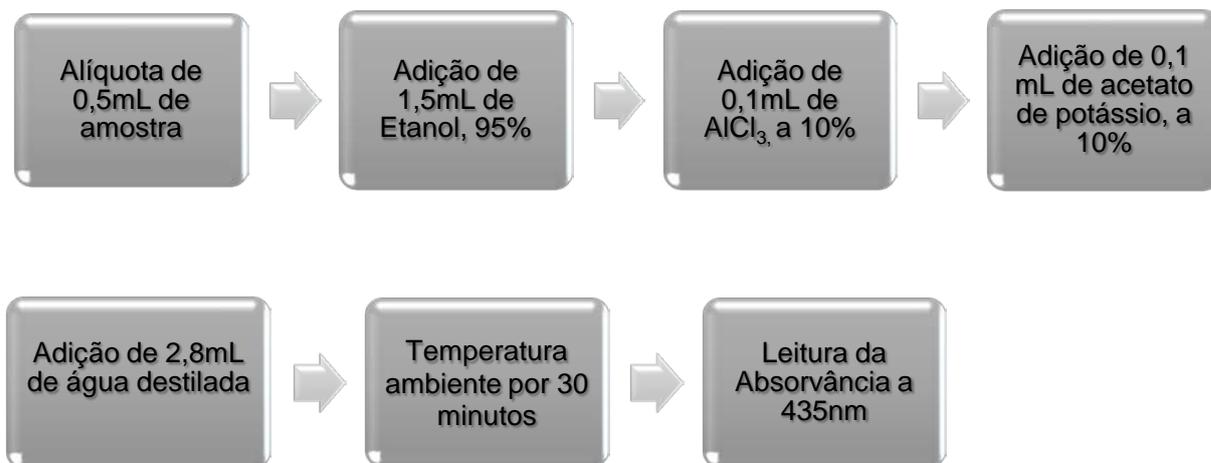


O material extraído foi quantificado em balança analítica após remoção do solvente, em evaporador rotativo sob vácuo à temperatura próxima do ponto de ebulição do solvente.

### 3.3.2. Teor de Flavonóides Totais (TFT)

A metodologia de ensaio para determinação dos flavonóides totais foi baseada no método de Al-Owaisi, 2014, acrescido por otimizações feitas no método de análise de acordo com o trabalho de Paiva, 2016 (Figura 16, pág 38). Inicialmente, 0,5 mL da amostra de *Plumbago scandens* foram adicionados 1,5 mL de Etanol 95%. Posteriormente, 0,1 mL de Cloreto de Alumínio a 10%, 0,1 mL de Acetato de Potássio 10% e 2,8 mL de água destilada. Essa mistura final foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final do processo, as absorvâncias das amostras, branco e padrões foram lidas em espectrofotômetro a 435nm.

Figura 17: Diagrama de blocos do ensaio de teor de flavonoides totais



Fonte: Paiva, 2016.

As amostras e os padrões da curva analítica com a Quercetina foram submetidos ao ensaio de acordo com a Figura 16. A curva analítica foi construída através da correspondência das absorvâncias dos padrões e suas respectivas concentrações. Partindo-se de uma solução estoque de 1000 µg/mL de Quercetina foram realizadas diluições com etanol a 80% de forma a obter os padrões com as seguintes concentrações: 20,0 µg/mL, 40,0 µg/mL, 60,0 µg/mL, 80,0 µg/mL e 100,0 µg/mL.

A partir da regressão linear da curva, foi possível obter a equação da reta para obtenção do teor de flavonoides totais presentes nos extratos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

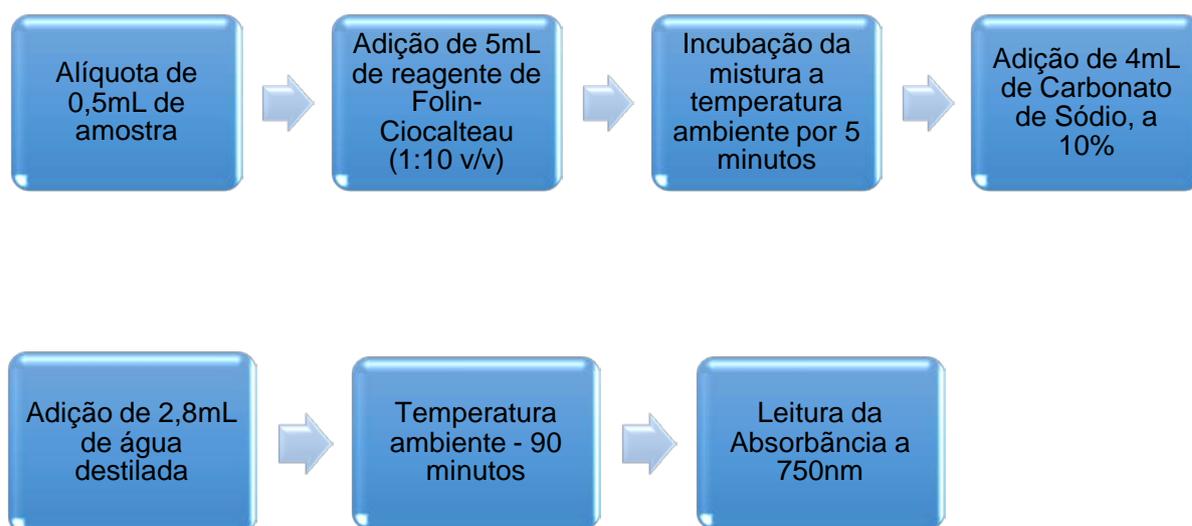
### 3.3.3. Conteúdo de Fenóis Totais (CFT)

A metodologia de ensaio para determinação do conteúdo de fenóis totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (FC).

Para a realização do ensaio, escolheu-se a metodologia publicada por Abdennacer em 2015 e otimizada por Paiva, 2016 (Figura 17). Para isso, 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) foi adicionada a uma alíquota de 0,5 mL da amostra de *Plumbago scandens*, sendo misturados em seguida. A mistura foi deixada em

repouso por 5 minutos e posteriormente foi adicionado 4 mL de Carbonato de Sódio 10% e misturados sob agitação vigorosa. Foi adicionado 2,8 mL de água destilada. A solução final foi deixada em temperatura ambiente por 90 minutos. Ao final do processo, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 750 nm.

Figura 18: Diagrama de blocos do ensaio para determinação do conteúdo de fenóis totais.



Fonte: Paiva, 2016.

As amostras e os padrões da curva de calibração com o Ácido Gálico foram submetidos ao ensaio de acordo com a Figura 17. A curva analítica foi construída através da correspondência das absorvâncias dos padrões e suas respectivas concentrações. Partindo-se de uma solução estoque de 1800 µg/mL de Ácido Gálico, foram realizadas diluições com água destilada de forma a obter padrões com as seguintes concentrações: 18,0 µg/mL, 36,0 µg/mL, 72,0 µg/mL, 108,0 µg/mL, 144,0 µg/mL e 180,0 µg/mL. A partir da regressão linear da curva, foi possível obter a equação da reta para obtenção do teor de fenóis totais presentes nos extratos.

O teor de compostos fenóis totais foi expresso de mg de equivalentes de Ácido Gálico por grama de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 3.3.4. Teste de DPPH (DPPH)

O método de análise para o ensaio de DPPH foi realizado de acordo com o descrito por Mensor, *et al*/2001. 10mg da espécie *Plumbago scandens* (foi solubilizada) em Etanol com uma concentração de 1,0 mg/mL. A partir dessa solução, as amostras foram diluídas nas concentrações de 5 µg/ mL, 10 µg/ mL, 25 µg/ mL, 50 µg/ mL, 125 µg/ mL e 250 µg/ mL, utilizando etanol como diluente. Um mililitro de uma solução etanólica de DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazila) com concentração 0,3mM foi adicionado a 2,5mL das soluções nas dos extratos nas diferentes concentrações e mantida a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Após esse período, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 518 nm.

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação abaixo (Figura 19)

Figura 19: Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (AA) - ensaio de DPPH

$$\%AA = \{1 - (Abs_{amostra}) / Abs_{controle}\} \times 100$$

onde,  $Abs_{controle}$  é a absorvância inicial da solução etanólica de DPPH e  $Abs_{amostra}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra).

A quantidade de extrato de planta testada necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, é chamada de  $EC_{50}$ , esse valor é calculado por extrapolação da concentração do extrato da planta *versus* os resultados porcentagem de atividade antioxidante (AA).

### 3.3.5 Fracionamento dos extratos – cromatografia em coluna aberta preparativa

Com intuito de avaliar melhor a composição dos extratos obtidos na extração, com solventes de diferentes polaridades, estes foram concentrados e submetidos a um fracionamento por coluna de sílica gel (Silica-flash G60, 70-230 mesh).

Os extratos hexânicos e de acetato de etila foram aplicados na coluna de sílica gel previamente empacotada com auxílio de hexano. Para melhor uniformidade, tanto

para aplicação do extrato no topo da fase estacionária, quanto ao processo de eluição da mesma, os extratos foram adsorvidos em uma pequena quantidade de sílica gel com auxílio de diclorometano como solvente, evaporado e posteriormente aplicado na coluna sob a forma de pastilha, seguida da eluição com hexano-acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Esquema de fracionamento em sílica gel dos extratos em hexano e em acetato de etila da *Plumbago scandens*

<b>Frações (50mL):</b>	<b>Eluente:</b>
1-5	Hexano (100%)
6-9	Hexano / Acetato de etila (1%)
10-13	Hexano / Acetato de etila (2%)
14-17	Hexano / Acetato de etila (3%)
18-21	Hexano / Acetato de etila (5%)
22-25	Hexano / Acetato de etila (10%)
26-29	Hexano / Acetato de etila (15%)
30-33	Hexano / Acetato de etila (20%)
34-37	Hexano / Acetato de etila (25%)
38-41	Hexano / Acetato de etila (30%)
42-45	Hexano / Acetato de etila (40%)
46-49	Hexano / Acetato de etila (50%)
50-53	Hexano / Acetato de etila (70%)
54-57	Acetato de Etila (100%)
58-61	Metanol (100%)

Após o fracionamento, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e a uma temperatura controlada em evaporador rotatório.

### 3.3.6. Cromatografia em camada delgada

As frações obtidas da coluna cromatográfica foram concentradas através da evaporação do solvente, ressolubilizadas em diclorometano e aplicadas em placas cromatográficas de sílica.

As placas cromatográficas de sílica foram preparadas através da aplicação de mistura de sílica gel tipo GF 254 e água em lâminas de vidro. A ativação das placas foi realizada através do aquecimento em estufa a 110° C por 2 horas.

As amostras foram aplicadas na placa cromatográfica através do uso de capilares de vidro, evitando-se que os pontos de aplicação ficassem mergulhados na fase móvel, quando colocadas na cuba cromatográfica contendo o eluente. A fase móvel utilizada para eluição dos compostos foi hexano-acetato de etila, em proporções variadas, começando pela mais apolar até mais polar, conforme acompanhamento da separação dos compostos observados após eluição e revelação. Para isto, a cada etapa da eluição, as placas foram secas e reveladas para tornarem visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. A revelação ocorreu por meio de visualização através da luz ultravioleta e através do borrifamento de Sulfato de Cério (IV), com posterior aquecimento.

Desta forma, foram observadas as características das frações na cromatografia em camada fina sendo que, aquelas que apresentaram comportamentos semelhantes, foram reunidas.

### 3.3.7. Avaliação por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM)

As frações obtidas e avaliadas por cromatografia em camada delgada foram analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM). Para a análise por CGAR-EM, as amostras foram solubilizadas em diclorometano, em seguida a solução diluída foi injetada no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar, disponível na Central Analítica Fernanda Coutinho da UERJ.

As condições utilizadas nas injeções foram:

CGAR; Coluna: fase fenil (5%) metil polisiloxano (95%), coluna Bruker BR-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m); Modo de injeção: Divisão de fluxo; razão de divisão: 1:10; temperatura do injetor: 280 °C; gás de arraste: Hélio, fluxo constante (1,0 mL/min); volume injetado: 2,0  $\mu$ L; temperatura do forno: 60°C (2.0 min), rampa de temperatura de 4°C por min até 300°C, ficando nessa temperatura por 20 minutos, totalizando assim um tempo de corrida de 82 minutos;

Espectrômetro de massas: temperatura da fonte: 220°C; temperatura da interface: 250 °C; temperatura do quadrupólo: 40°C; faixa de massa 40 – 650 m/z

Para análise e identificação dos picos nos cromatogramas foi utilizado o software MS Workstation da Bruker (MSWS 8: System Control – Bruker).

### 3.3.8 Caracterização molecular através de análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )

Após a avaliação dos espectros de massas dos compostos nas frações analisadas, aquelas que mostraram a presença de compostos característicos do gênero *Plumbago* e compostos ainda não identificados na espécie, ou seja, não antes publicados/encontrados na *Plumbago scandens*, foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando sequências de pulso padronizadas nas frequências de 500 MHz e 125 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. O espectro de HSQC foi obtido através da correlação j1xh com aquisição 1D com janela de aquisição 8012,8 e tempo de aquisição 0,150; para aquisição 2D com janela de aquisição 25133,5 e tempo de aquisição 128.

Clorofórmio deuterado foi utilizado como solvente para a amostra e trimetilsilano (TMS) como padrão de referência para as análises.

### 3.3.9. Confirmação da presença de $\alpha$ , $\beta$ - Amirina por reações químicas

Com o objetivo de confirmar a presença dos compostos  $\alpha$ ,  $\beta$ - Amirina na espécie *Plumbago Scandens*, a fração do extrato que apresentou a indicação da presença desses compostos foi submetida a duas reações químicas: oxidação e acetilação. A  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina purificada, obtida a partir da resina referência contendo também a mistura de compostos, foi submetida ao mesmo processo.

O produto dessas reações realizadas na amostra e no padrão foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas para avaliação/ comparação do perfil cromatográfico e de fragmentação dos compostos formados para confirmação da presença de  $\alpha$  e  $\beta$ - Amirina na espécie estudada.

#### 3.3.9.1 Reação de Oxidação

A metodologia aplicada para oxidação da hidroxila presente na molécula dos compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina utiliza o reagente Dicromato de Piridina – PDC como agente oxidante, já previamente sintetizado e disponível no LEMA-IQ-UFRJ seguindo o trabalho de COREY, E.J. e SCHIMIDT, G. de 1979.

O procedimento experimental para oxidar as moléculas usou aproximadamente 10mg do extrato dissolvidos em 5mL de Diclorometano, em seguida a solução foi colocada num balão de reação com capacidade de 10mL, foi adicionada 50 mg do reagente PDC, essa mistura foi submetida a agitação com auxílio do agitador magnético por 1 hora e 30 minutos. O produto da reação foi passado por uma coluna de sílica para purificação, o eluato da coluna foi rotaveaporado e ressolubilizado em diclorometano para posterior injeção no CGAR-EM.

#### 3.3.9.2 Reação de Acetilação

A amostra e padrão de  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina foram submetidos a reação de acetilação com Anidrido Acético utilizando o reagente DMAP (N,N – Dimetil Amino Piridina) como catalisador nucleofílico da reação.

O procedimento experimental para acetilar as moléculas usou aproximadamente 10mg de amostra pesados em um balão de reação, 10mL de

Anidrido Acético e uma pequena quantidade de DMAP foram adicionados ao balão de reação, essa mistura foi submetida a agitação com auxílio do agitador magnético por 1 hora e 30 minutos (Esse tempo de reação foi obtido experimentalmente baseado no acompanhamento da reação através de cromatografia em camada delgada). Finalizada a reação, a mistura reacional foi transferida para um ampola de decantação e adicionada água destilada, 5mL de diclorometano e foi realizada a extração líquido-líquido; esse procedimento foi repetido mais duas vezes e as frações orgânicas foram recolhidas no mesmo recipiente, foi adicionado sulfato de sódio a fração orgânica para eliminação de qualquer resíduo de água no meio, o produto da extração seco foi rotaveaporado e ressolubilizado em diclorometano para posterior injeção no CG-EM.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração da *Plumbago scandens* por Soxhlet

As amostras foram submetidas a extrações exaustivas com hexano, acetato de etila e metanol respectivamente, até que fosse observado um solvente límpido de extração, permanecendo assim por mais 2 horas. Após extração, o solvente foi removido e o material residual foi quantificado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento da extração por Soxhlet nos diferentes solventes

<b>Massa de <i>P. scandens</i></b>	<b>Extrato</b>	<b>Massa de Extrato</b>	<b>% Extraído</b>
789,74 g	<b>Hexano</b>	21,49g	2,72
	<b>Acetato de Etila</b>	26,23g	3,32

Devido ao baixo rendimento da extração, extrações sucessivas foram necessárias para obtenção de massa suficiente para a realização dos processos analíticos posteriores.

### 4.2 Determinação do Teor de flavonóides totais (TFT)

Soluções padrão de Quercetina foram preparadas para a obtenção da curva analítica para determinação do teor de flavonóides totais dos extratos hexânico e acetato de etila da espécie *Plumbago scandens*.

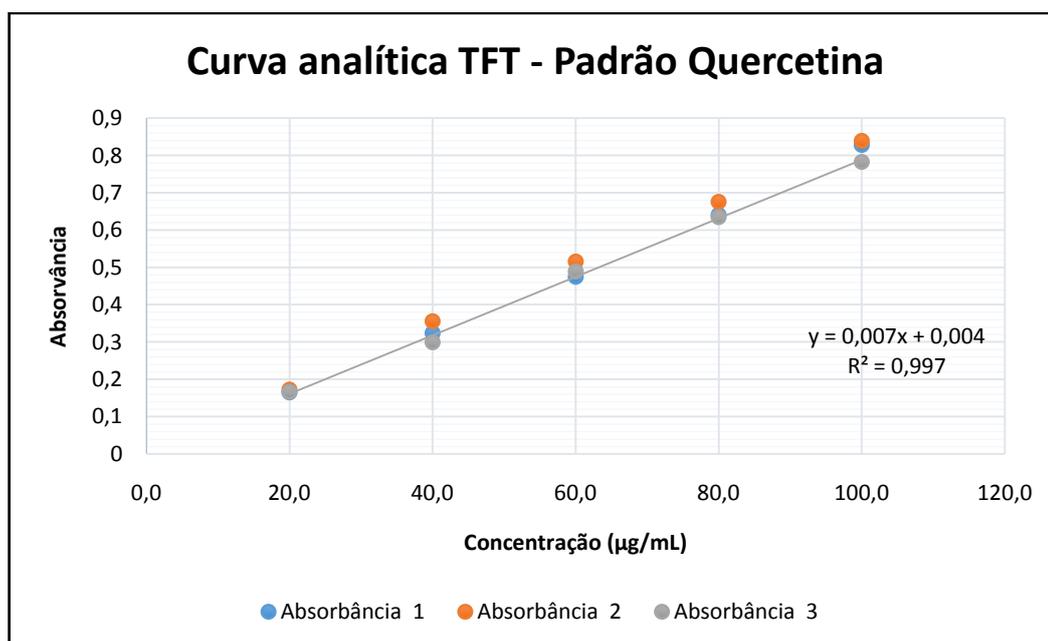
Os padrões de Quercetina e as amostras foram submetidas a extração e lidos no espectrofotômetro de UV-Visível, no comprimento de onda 435nm. Os valores de Absorvância obtidos após leitura em triplicata dos padrões seguem na tabela 3.

Tabela 3: TFT: Valores de concentração dos padrões de Quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) e suas respectivas absorvâncias

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3
20,0	0,1653	0,1733	0,1669
40,0	0,3245	0,3565	0,2998
60,0	0,4753	0,5159	0,4897
80,0	0,6411	0,6760	0,6349
100,0	0,8281	0,8392	0,7830

A partir dos dados de absorvância, foi possível obter a equação da curva analítica e avaliar a linearidade da curva através do coeficiente de correlação (Gráfico 1).

Gráfico 1: Curva analítica do ensaio de TFT, padrão Quercetina



As amostras foram submetidas ao procedimento de TFT e analisadas em triplicata. As absorvâncias foram obtidas e, a partir de sua média, as concentrações foram determinadas a partir da equação da reta  $A = 0,0078x + 0,0047$ , sendo A, o valor de absorvância e C, a concentração em  $\mu\text{g/mL}$ . (Tabela 4, pág 48).

Tabela 4: Ensaio de TFT: Resultados de absorvância das amostras e respectivas concentrações

Amostra	Absorvância1	Absorvância2	Absorvância3	Absorvância Média	Desvio Padrão	Concentração (µg/mL)
Extrato Hexânico	-	0,2237	0,2244	0,2241	0,0005	28,12
Extrato Acetato de Etila	0,3420	0,3641	0,3402	0,3488	0,0133	44,11

O resultado da absorvância 1 do extrato hexânico apresentou resultado discrepante dos demais (0,1303) e, portanto, não foi considerado para o cálculo da concentração.

A partir da massa inicial das amostras e do volume utilizado na solubilização das mesmas, foi possível correlacionar a concentração obtida em µg/mL para a medida em miligramas equivalentes de Quercetina por grama de matéria seca (mg EQC/g matéria seca). Os cálculos de conversão de concentração para o extrato hexânico seguem descritos abaixo. O mesmo cálculo foi aplicado para o extrato em acetato de etila.

**Concentração obtida para a amostra extrato hexânico:** 28,12µg em 1 mL

**Massa em 0,5 mL (Alíquota inicial do teste):**0,0140 mg

**Massa de amostra (peso seco):** 0,0003 g (massa por volume de alíquota)

**Concentração:**44,99 mg EQC/ g peso seco

As amostras apresentaram-se nas referidas concentrações em mg EQC/g de matéria seca, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Ensaio de TFT: Resultados de concentração das amostras em miligrama de EQC por grama de peso seco

Amostra	Concentração (µg/mL)	Massa EQC na alíquota (mg)	Massa de amostra por volume de alíquota (g)	Concentração (mg EQC/ g peso seco)
Extrato Hexânico	28,12	0,0141	0,0003	44,99
Extrato Acetato de Etila	44,11	0,0221	0,0003	73,52

O teor de flavonóides totais obtido nos diferentes extratos da espécie *Plumbago scandens* indica a presença de flavonóides nos extratos. Porém, a capacidade de extração dos flavonóides pelo acetato de etila, 73,52 mgEQC/g de peso seco é bem maior daquela obtida pelo Hexano: 44.99 mg EQC/g de peso seco.

#### 4.3 Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais (CFT)

Soluções padrão de ácido gálico foram preparadas para a obtenção da curva analítica para determinar o conteúdo de fenóis totais dos extratos hexânico e acetato de etila da espécie *Plumbago scandens*.

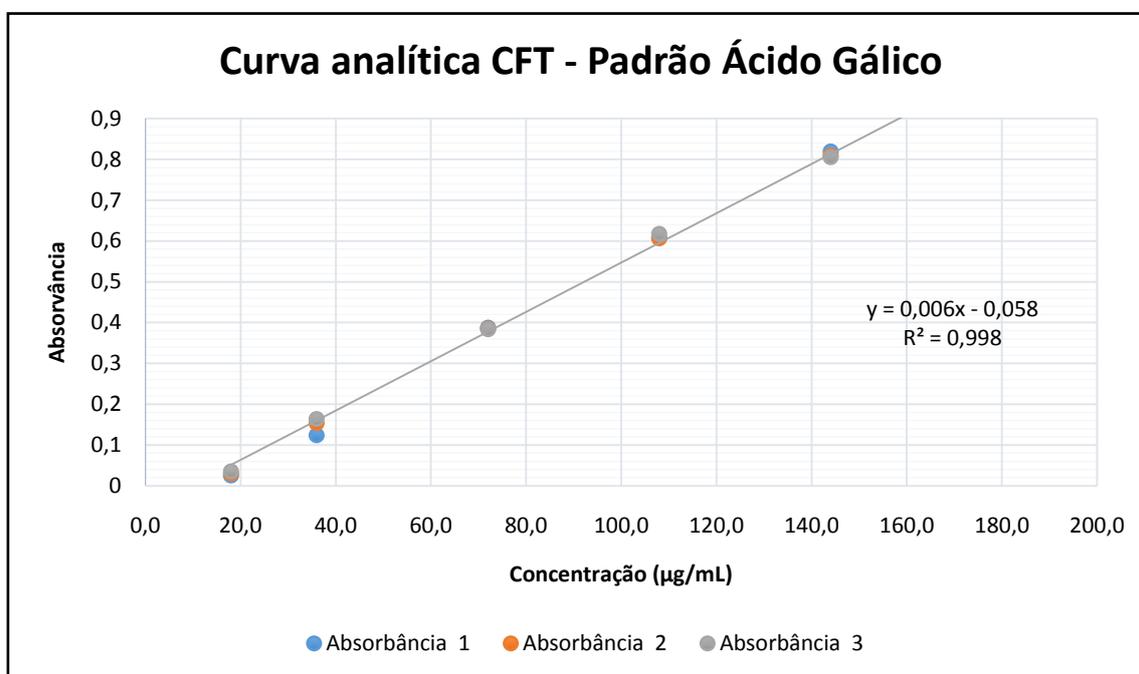
Os padrões de Ácido Gálico, o branco e as amostras foram analisados e lidos no espectrofotômetro de UV-Visível, no comprimento de onda 750nm. Os valores de Absorvância obtidos após leitura em triplicata dos padrões seguem na Tabela 6.

Tabela 6: CFT: Valores de concentração dos padrões de Ácido Gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ) e suas respectivas absorvâncias

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3
18,0	0,0254	0,0301	0,0354
36,0	0,1238	0,1539	0,1637
72,0	0,3878	0,3851	0,3838
108,0	0,6073	0,6068	0,6175
144,0	0,8195	0,8098	0,8060
180,0	0,9828	1,0224	1,0224

A partir dos dados de absorvância, foi possível obter a equação da curva analítica e avaliar a linearidade da curva através do coeficiente de correlação (Gráfico 2):

Gráfico 2: Curva analítica do ensaio de CFT, padrão Ácido Gálico



As amostras foram submetidas ao procedimento padronizado de CFT e analisadas em triplicata. A partir das absorvâncias obtidas, as médias foram calculadas e as concentrações determinadas utilizando a equação da reta  $A = 0.0061 \times C - 0.058$ , sendo A, o valor de absorvância e C, a concentração em  $\mu\text{g/mL}$ . (Tabela 7).

Tabela 7: Ensaio de CFT: Resultados de absorvância das amostras e respectivas concentrações

Amostra	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Absorvância Média	Desvio Padrão	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extrato Hexânico	0,2196	0,2140	0,2124	0,2153	0,0038	44,81
Extrato Acetato de Etila	-	0,7969	0,8039	0,8004	0,0049	140,72

O resultado da absorvância 1 (0,6704) do extrato acetato de etila apresentou resultado discrepante dos demais e portanto não foi considerado para o cálculo da concentração.

A partir da massa inicial das amostras e do volume utilizado na solubilização das mesmas, foi possível correlacionar a concentração obtida em  $\mu\text{g/mL}$  para a medida em massa equivalente de Ácido Gálico por grama de matéria seca (mg EAG/g matéria seca). Os cálculos de conversão de concentração para o extrato hexânico seguem descritos abaixo. O mesmo cálculo foi aplicado para o extrato em acetato de etila:

**Concentração obtida para amostra extrato hexânico:** 44,81  $\mu\text{g}$  em 1 mL

**Massa em 0,5 mL (Alíquota inicial do teste):** 0,0224mg

**Massa de amostra (peso seco):** 0,0005 g (massa por volume de alíquota)

**Concentração:** 44,81 mg EAG/ g peso seco

O resumo dos resultados das amostras em mg EAG/g de matéria seca, conforme Tabela 8.

Tabela 8: Ensaio de CFT: Resultados de concentração das amostras em miligrama de EAG por grama de peso seco

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa EAG na alíquota (mg)	Massa de amostra por volume de alíquota (g)	Concentração (mg EAG/ g peso seco)
Extrato Hexânico	44,81	0,02240	0,0005	44,81
Extrato Acetato de Etila	140,72	0,07036	0,0005	140,72

O teor de fenóis totais obtido nos diferentes extratos da espécie *Plumbago scandens* indica a presença de fenóis nos extratos. Porém, a capacidade de extração dos fenóis pelo acetato de etila, 140,72 EAG/g de peso seco é bem maior daquela obtida pelo Hexano: 44,81 EAG/g de peso seco.

#### 4.4 Capacidade antioxidante – Ensaio de DPPH

O resultado da capacidade de sequestro de radical livre – DPPH para o extrato hexânico e acetato de etila da espécie *Plumbago scandens* foi expresso através das médias das concentrações que representa a quantidade de amostra necessária para sequestrar 50% do radical livre DPPH ( $EC_{50}$ )

As amostras da espécie *Plumbago scandens* diluídas nas concentrações de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram submetidas a rota analítica em triplicata e as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 518 nm (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Ensaio de DPPH: Valores de concentração das amostras do extrato hexânico da *Plumbago scandens* diluídas e suas respectivas absorvâncias

Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
5	0,2755	0,2743	0,2721	0,2740	0,0017
10	0,4006	0,3990	0,3992	0,3996	0,0009
25	0,4557	0,4551	0,4522	0,4543	0,0019
50	0,5019	0,5038	0,5047	0,5035	0,0014
125	0,5351	0,5330	0,5330	0,5337	0,0012
250	0,5301	0,5309	0,5328	0,5313	0,0014

Tabela 10: Ensaio de DPPH: Valores de concentração das amostras do extrato acetato de etila da *Plumbago scandens* diluídas e suas respectivas absorvâncias

Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
5	0,0817	0,0888	0,0879	0,0861	0,0039
10	0,1275	0,1528	0,1400	0,1401	0,0127
25	0,3061	0,3148	0,2990	0,3066	0,0079
50	0,5719	0,5677	0,5701	0,5699	0,0021
125	0,9122	0,9103	0,9145	0,9123	0,0021
250	0,9156	0,9050	0,9226	0,9144	0,0089

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA) (Tabela 11)

Tabela 11: Ensaio de DPPH: Valores de concentração das amostras do extrato hexânico e acetato de etila da *Plumbago scandense* suas porcentagens de atividade antioxidante (AA)

Extrato Hexânico			Extrato Acetato de Etila		
Concentração (µg/mL)	AA(%)	AAmédio (%)	Concentração (µg/mL)	AA(%)	AAmédio (%)
200	66,31	66,50	201	90,01	89,47
	66,46			89,14	
	66,73			89,25	
100	51,01	51,14	100	85,82	84,42
	51,21			83,00	
	51,19			84,43	
50	44,28	44,44	50	67,66	67,60
	44,35			66,74	
	44,71			68,41	
25	38,63	38,44	25	40,92	41,13
	38,40			41,35	
	38,29			41,11	
10	34,57	34,74	10	7,61	7,59
	34,83			7,80	
	34,83			7,37	
5	35,18	35,04	5	7,32	7,44
	35,08			8,39	
	34,85			6,61	

A partir dos dados de porcentagens de atividade antioxidante (AA), foi possível obter as curvas analítica (Gráficos 3 e 4, pág. 54).

Gráfico 3: Curva analítica do ensaio de DPPH para *Plumbago scandens* – Extrato hexânico

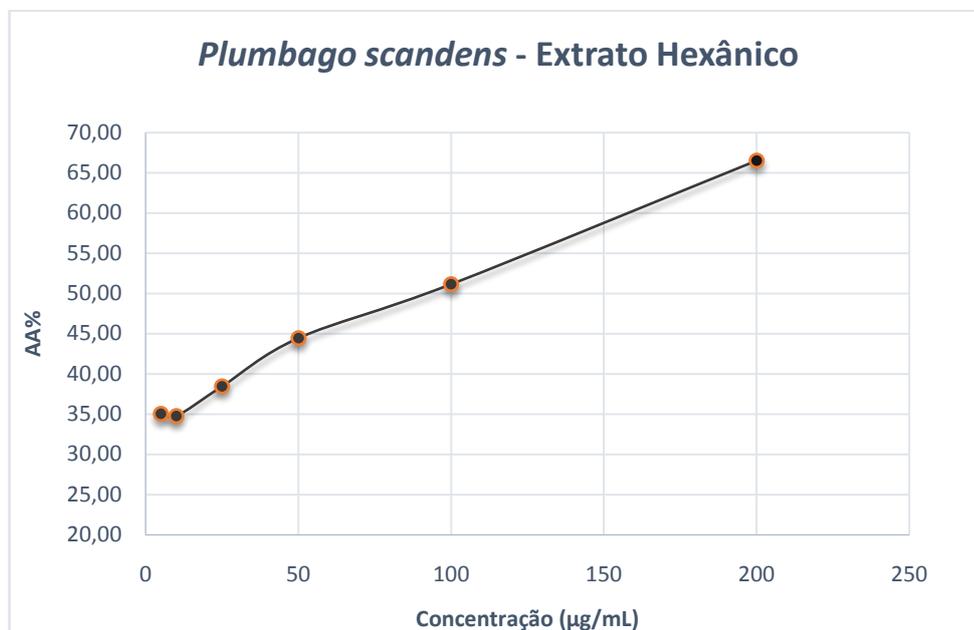
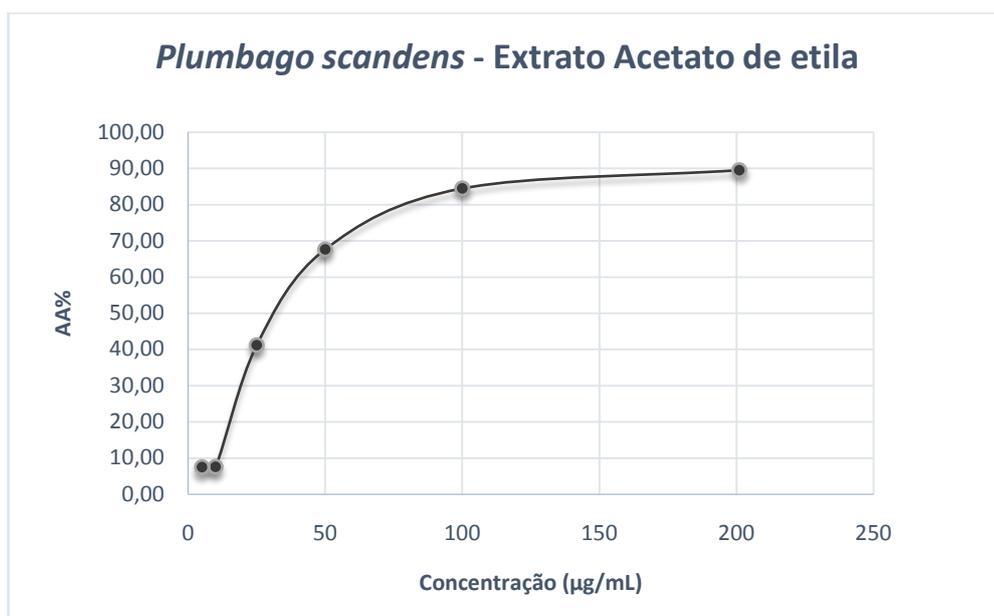


Gráfico 4: Curva analítica do ensaio de DPPH para *Plumbago scandens* – Extrato acetato de etila



A quantidade de extrato de planta testada necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $EC_{50}$ ) foi calculada pela interpolação da curva analítica da concentração do extrato da planta versus os resultados porcentagem de atividade antioxidante (AA) de cada extrato (hexânico e acetato de etila). Os resultados obtidos desta extrapolação estão descritos na tabela 12.

Tabela 12: Resultados do ensaio de DPPH para *Plumbago scandens*

Amostras	DPPH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) $EC_{50}$
<i>Plumbago scandens</i> (Ext. Hexânico)	100
<i>Plumbago scandens</i> (Ext. Acetato de Etila)	35

Os resultados obtidos para o ensaio antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH nas amostras indicam um alto poder antioxidante do extrato acetato de etila ( $EC_{50}=35$ ) em comparação ao extrato hexânico  $EC_{50} = 100\mu\text{g}/\text{mL}$ .

O extrato acetato de etila também apresentou teores maiores de flavonóides e fenóis em comparação ao extrato hexânico, demonstrando que possivelmente a contribuição da atividade antioxidante do extrato acetato de etila seja proveniente da presença de fenóis e flavonoides neste extrato.

Os teores de fenóis totais, flavonoides totais e ensaio antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH encontrados na espécie *Plumbago scandens* nos diferentes extratos, foram comparados com três diferentes plantas medicinais (Tabela 13).

Tabela 13: Resultado de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante – DPPH para *Plumbago scandens* e outras três espécies de plantas

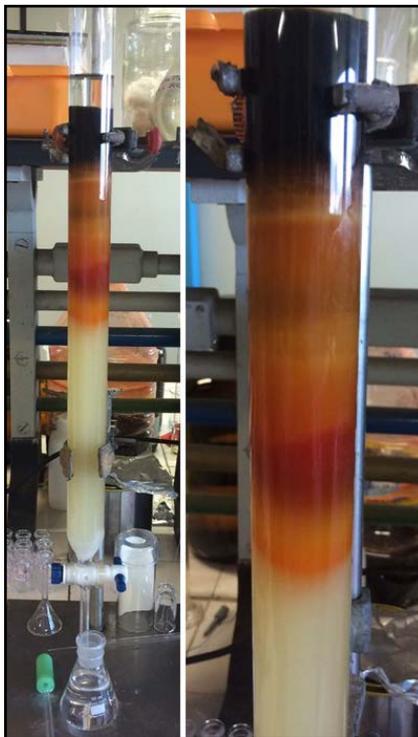
Amostras	Fenóis Totais	Flavonóides Totais	Capacidade antioxidante	Referências
	mg EAG/ g peso seco	mg EQC/ g peso seco	DPPH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) $\text{EC}_{50}$	
<i>Plumbago scandens</i> (Ext. Hexânico)	44,81	44,99	100	-
<i>Plumbago scandens</i> (Ext. Acetato de Etila)	140,72	73,52	35	-
<i>Plumbago zeylanica</i> (Ext. Etanólico)	260	45,5	96,0	Nile <i>et al</i> , 2010
<i>Euphorbia tirucalli</i> <i>linneau</i> (Ext. Etanólico)	96,18	63,57	16,98	Orland <i>et al</i> , 2015
<i>Diospyros hispida</i> (Ext. Etanólico)	161,78	42,0	11,8	Campos <i>et al</i> , 2015

Através da comparação dos resultados obtidos, não há como fazer uma correlação entre os valores de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. Porém, é possível observar que o extrato hexânico da *Plumbago scandens* tem uma capacidade antioxidante equivalente ao extrato etanólico da *Plumbago zeylanica* mesmo contendo uma quantidade menor de fenóis totais, demonstrando assim que a capacidade antioxidante do extrato hexânico não seja proveniente dos possíveis compostos fenólicos que podem ser encontrados na espécie *Plumbago scandens*, e desta forma, sugere que algum outro constituinte químico contribui efetivamente para ação sequestradora de radicais livres.

#### 4.5 Cromatografia em coluna aberta e camada delgada

Após os extratos hexânico e de acetato de etila passarem pela coluna de fracionamento (Figura 18, pág. 57), resultando um total de 61 frações cada, foram levados a secar para eliminação do solvente de eluição e, em seguida, ressolubilizadas em diclorometano para aplicação em placas cromatográficas de sílica.

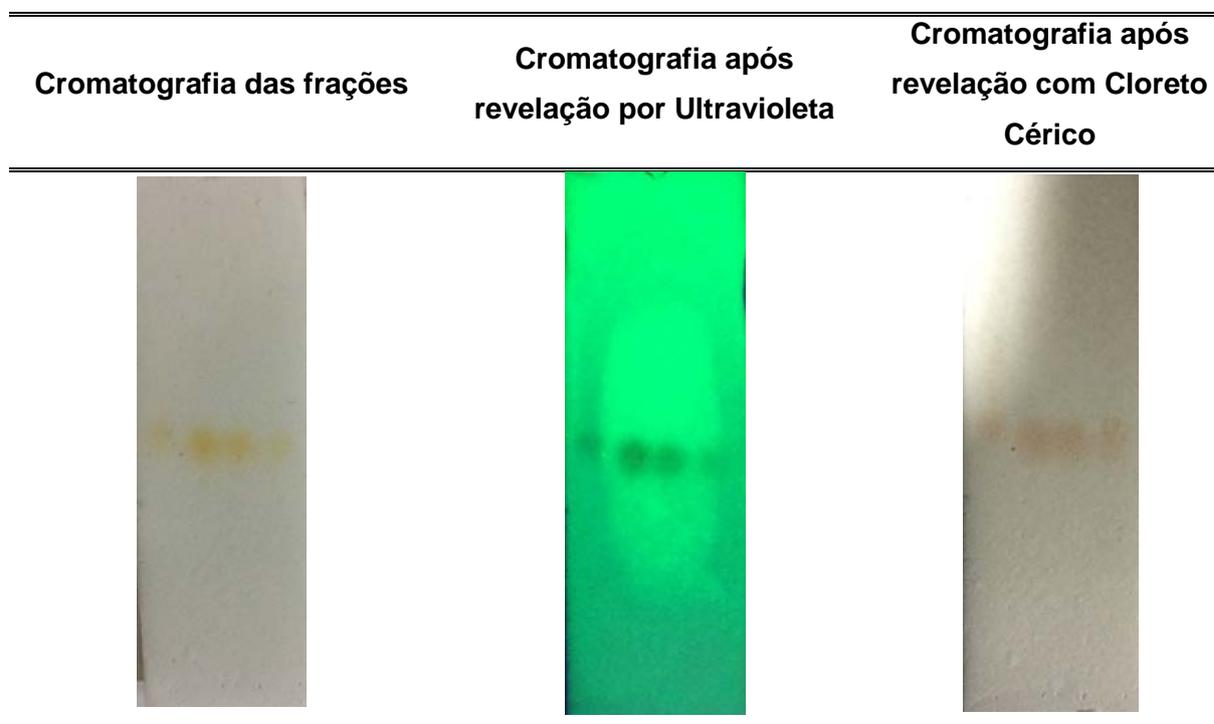
Figura 20: Cromatografia em camada aberta do extrato hexânico



Quatro amostras foram aplicadas em cada placa de forma que fosse possível a observação das características das frações e aquelas com comportamentos semelhantes, ou seja, que apresentaram mesmo fator de retenção ( $R_f$ ) para os compostos presentes, foram reunidas, para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Outra observação possível de ser feita, foi a aparente pureza da fração, isto é, quantidade de manchas presentes na placa, podendo ser visível ou após revelação, indicando ou não a presença de mais de um composto por fração (Figura 19, pág. 58).

Figura 21: Cromatografia em camada delgada das frações 22, 23, 24 e 25 do extrato acetato de etila



No exemplo da Figura 19, é possível ver a similaridade entre o fator de retenção dos compostos presentes nas frações, sendo observado somente uma mancha para cada ponto de aplicação indicando a possível presença de uma única substância ou uma substância majoritária em relação a outros compostos que possam estar presentes e que possuam a mesma característica de eluição. Desta forma, as frações foram reunidas de acordo com seus Rf's em 24 (extrato hexânico) e 12 (extrato Acetato de Etila) frações principais, respectivamente.

#### 4.6 Análise cromatográfica

As frações obtidas da cromatografia em coluna foram resolubilizadas em diclorometano e analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM).

Para injeção cromatográfica, as amostras foram codificadas de forma que fosse possível a rastreabilidade das informações:

- Frações obtidas do extrato hexânico: PSEH (*Plumbago scandens* extrato hexânico) e respectivo número da fração, conforme ordem de eluição explicada na tabela 1 (página 23);
- Frações obtidas do extrato acetato de etila: PSEA (*Plumbago scandens* extrato acetato de etila) e respectivo número da fração, conforme ordem de eluição explicada na tabela 1 (página 23);

Como foi necessário o fracionamento mais de uma vez do extrato hexânico, foi adicionado o número referente ao fracionamento antes do código: exemplo a fração proveniente do segundo fracionamento recebe sempre um 2 na frente: 2PSEHxx, o terceiro fracionamento um 3 e assim, sucessivamente.

Os cromatogramas foram avaliados pico a pico, e aquelas frações, que apresentaram indicação de compostos característicos da espécie *Plumbago scandens* ou/e apresentaram indicação de compostos não antes encontrados em literatura para essa espécie ou espécies do mesmo gênero, foram destacadas a seguir:

#### 4.6.1 Fração número 20 do extrato hexânico \_2PSEH 20

O cromatograma proveniente da fração número 20 (Figura 20, pág 60) do extrato hexânico apresentou um pico majoritário no tempo de retenção de 25,9 min, e um espectro de massas característico de uma naftoquinona, (Figura 21, pág. 60) quando comparado ao espectro de massas da *NIST* (National Institute of Standard and Technology).

Outros dois picos significativos estão presentes no cromatograma proveniente da fração número 20, o primeiro deles em 47,5 min apresenta um espectro de massas característico de ftalato e o outro que elui em 57,8 min corresponde ao composto Tocoferol quando comparado ao espectro de massas da *NIST*.

Figura 22: Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 20

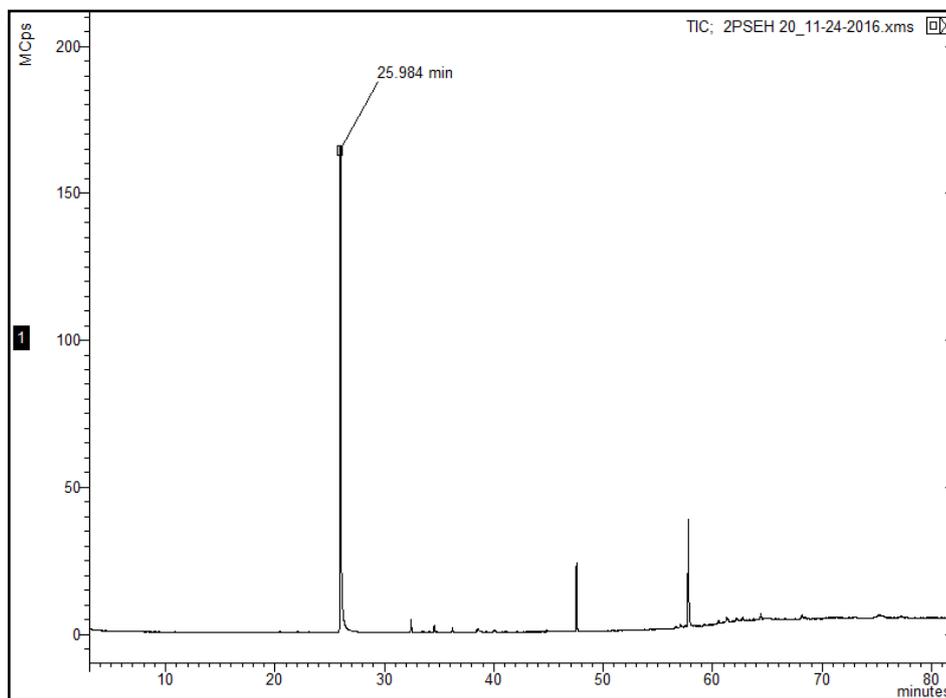
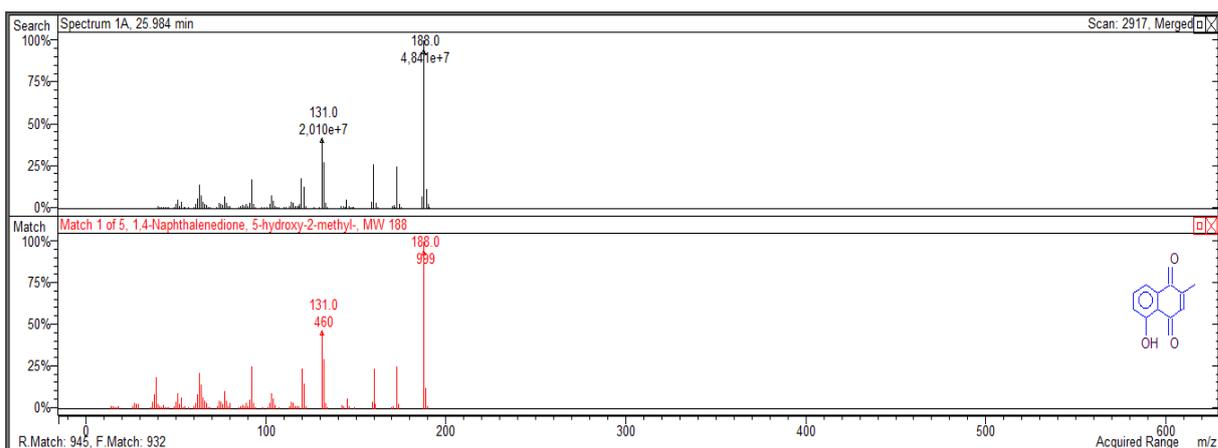
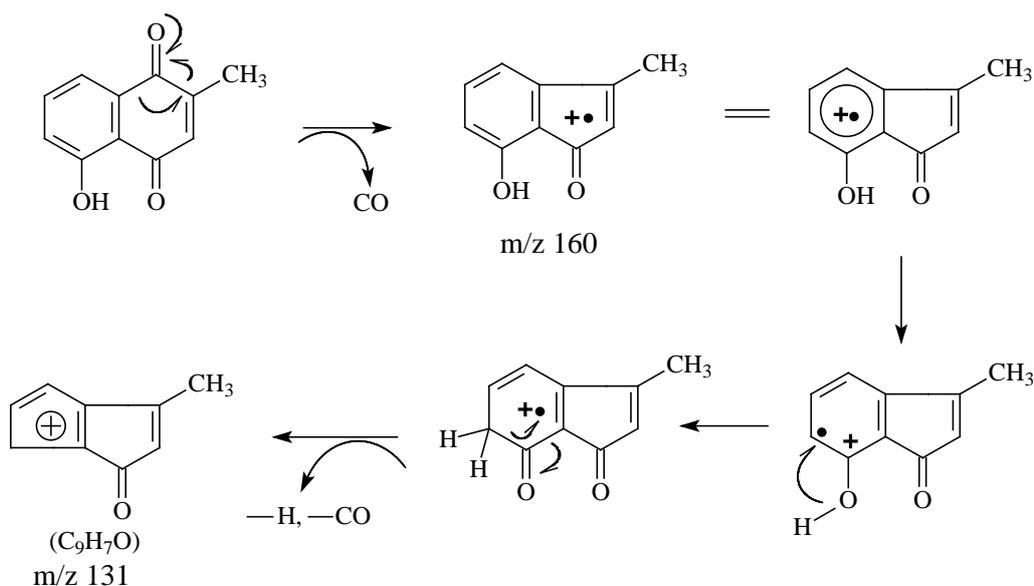


Figura 23: Espectro de massas do pico majoritário da fração 2PSEH 20, em comparação ao espectro de massas da Plumbagina (5-hidroxi-2metil-1,4 naftoquinona) (NIST)



No espectro de massas (Fig. 21, pág 60) pode-se observar o pico correspondente ao íon molecular  $[M]^+$  em  $m/z$  188 Da (100%) conferindo com a fórmula molecular  $C_{11}H_8O_3$ . A relação entre o número de átomos de carbono e hidrogênio indicou a presença de 8 insaturações na molécula. Os picos em  $m/z$  173 Da (25%) e em  $m/z$  160 Da (26%) correspondem respectivamente a fragmentos iônicos resultantes da perda de radical metila  $[M-CH_3]^+$  e monóxido de carbono  $[M-CO]^+$  diretamente do íon molecular. Já o pico em  $m/z$  131 Da (50%) corresponde a fragmento iônico resultante da perda de 1 molécula CO e um átomo de H a partir do fragmento iônico em  $m/z$  160 Da (Figura 22).

Figura 24: Proposta de fragmentação para a molécula Plumbagina

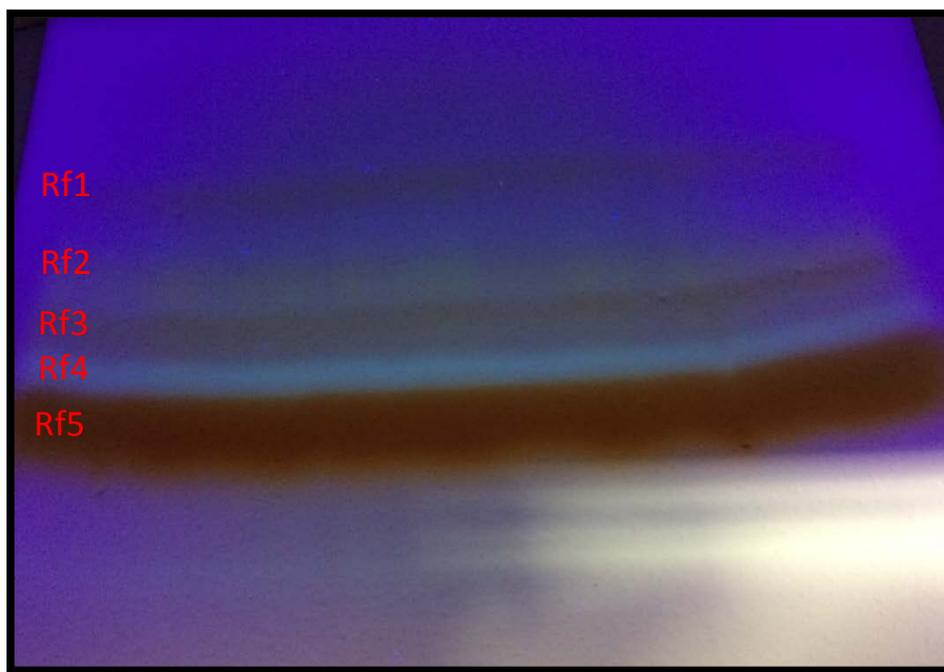


Frente a essas informações experimentais, o composto com tempo de retenção de 25,9 min teve sua estrutura proposta como sendo a Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-naftaleno-1,4-diona), uma vez que é o principal componente com atividade biológica nas diversas espécies do gênero.

Para que fosse possível confirmar a estrutura proposta, sucessivos fracionamentos cromatográficos, sob sílica gel, da fração 2PSEH 20 foram realizados. Nesta etapa, o fracionamento inicial por cromatografia preparativa em

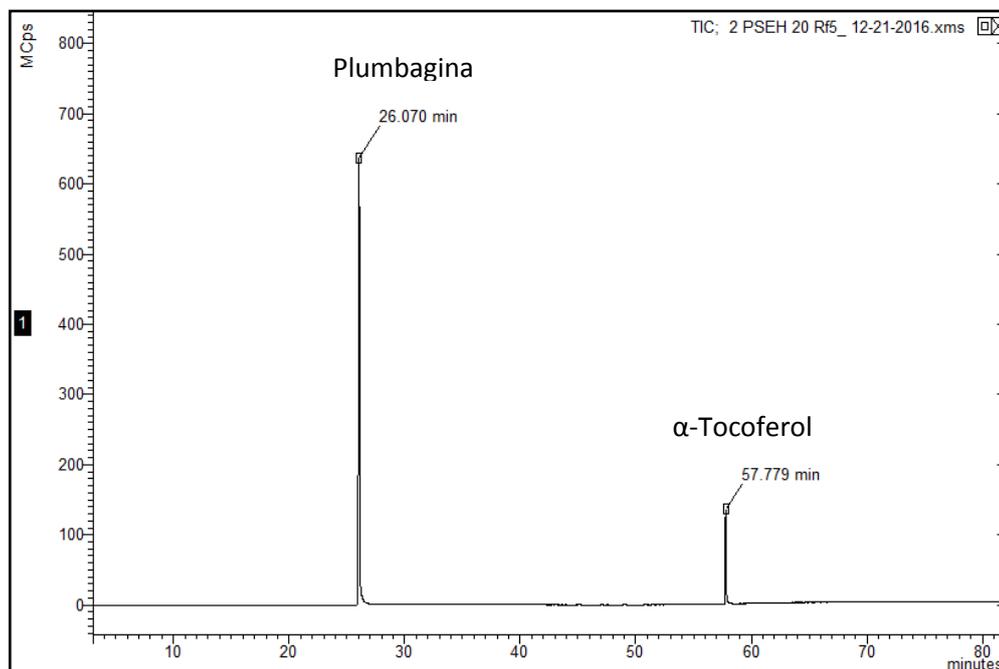
camada delgada, apresentou após revelação com luz de ultravioleta, 5 frações com diferentes fatores de retenção denominadas Rf1, Rf2, Rf3, Rf4 e Rf5. (Figura 23).

Figura 25: Cromatografia preparativa em camada delgada da fração 2PSEH 20.



A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de todas as frações descritas, mostrou a presença da naftoquinona (plumbagina) somente na fração Rf5, porém um composto em 57.7 min, ainda se mostrava presente na fração e quando comparado seu espectro de massas com os da biblioteca NIST, indicava como sendo  $\alpha$ -Tocoferol (Figura 26).

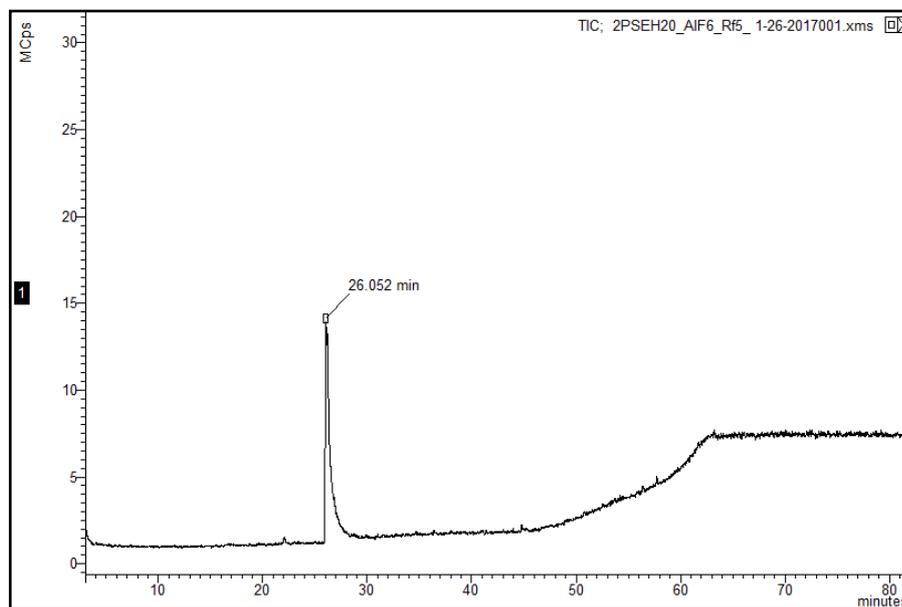
Figura 26: Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 20 Rf5



Desta forma uma nova etapa de fracionamento foi necessária para obtenção da naftoquinona isolada. Sendo assim, a fração Rf5 da amostra 2PSEH 20, foi submetida a fracionamento por coluna aberta utilizando alumina como fase estacionária, onde foram obtidas 6 frações caracterizadas como 2PSEH 20 Rf5 Alx (onde x = 1 a 6).

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de todas as frações descritas, mostrou a presença da Plumbagina isolada somente na fração Al6 (Figura 27).

Figura 27: Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 20 Rf5 AIF6

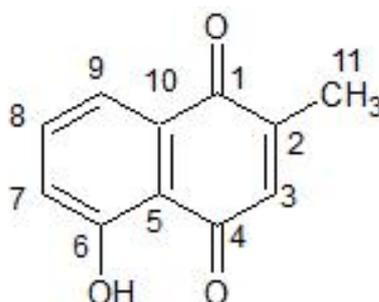


A partir da avaliação cromatográfica, é possível concluir que o composto de interesse, a naftoquinona, foi isolada do composto  $\alpha$ -Tocoferol com sucesso.

Para confirmação, iniciamos o processo de caracterização da plumbagina através da ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (Apêndice B e C, páginas 107 e 108) e Carbono (Apêndice A, pág.106) para completa caracterização e confirmação do principal marcador para o gênero *Plumbago*.

Para o espectro de Hidrogênio, foram observados sinais correspondentes aos Hidrogênios ligados ao anel aromático, com deslocamentos químicos altos ( $\delta_H$  6,00 a 8,00ppm) e um sinal único em  $\delta_H$  2,19ppm sugerindo a presença do grupamento metílico ligado ao Carbono  $sp^2$  do anel. Os deslocamentos químicos encontrados foram atribuídos a Plumbagina e comparados com os dados descritos por Bothiraja et al. (2011) (Tabela 15).

Figura 28: Molécula da Plumbagina numerada

Tabela15: Dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  para a Plumbagina versus encontrado na literatura

Carbono	Plumbagina	Plumbagina (BOTHIRAJA <i>et al</i> , 2011)
1	-	-
2	-	-
3	6,81	6,81
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	7,26	7,26
8	7,64	7,62
9	7,62	7,62
10	-	-
11	2,19	2,19

Para os deslocamentos químicos atribuídos ao Hidrogênio, não houve completa similaridade pois BOTHIRAJA *et al* (2011) atribui o deslocamento 7,62 para os hidrogênios 8 e 9 da molécula e afirma que é um multiplete. O que não procede pois os hidrogênios não são iguais, eles estão sendo influenciados por diferentes átomos vizinhos, o hidrogênio 9 é influenciado pela carbonila próxima (hidrogênios mais desblindados, menor deslocamento químico) e o nosso resultado demonstrou isso, o deslocamento químico de 9 é menor do que o da posição 8.

Além disso, temos deslocamentos químicos significativos que não são atribuídos a molécula:  $\delta_H$  1,73ppm,  $\delta_H$  1,57ppm,  $\delta_H$  1,25 ppm (Apêndice B e C, pág. 107 e 108).

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 forneceu sinais para 27 carbonos, e que puderam ser atribuídos a molécula com auxílio das informações providenciadas pelo artigo de Bothiraja *et al.* (2011) (Tabela 15).

Foram observados dois carbonos carbonílicos ( $\delta_c$  184,8 e 190,3ppm), um carbono  $sp^2$  oxigenado ( $\delta_c$  161,2ppm), oito carbonos  $sp^2$  ( $\delta_c$  149,6, 137,2, 136,1, 135,5, 124,2, 119,9, 119,3, 115,1ppm), um sinal em  $\delta_c$  61,4ppm que é provavelmente proveniente de um carbono  $sp^3$  que pode estar sendo influenciado por algum átomo eletronegativo e outros 14 sinais de carbonos  $sp^3$  sem elementos eletronegativos ( $\delta_c$  39,4, 37,4, 37,3, 32,7, 31,9, 29,7, 28,0, 24,8, 22,7, 22,6, 19,7, 16,6, 14,6 ppm).

Tabela 16: Dados obtidos dos espectros de RMN  $^{13}C$  para a Plumbagina versus encontrado na literatura

Carbono	Plumbagina	Plumbagina (BOTHIRAJA <i>et al.</i> , 2011)
1	184.8	184.6
2	149.6	149.5
3	135.5	135.3
4	190.3	190.1
5	115.1	114.9
6	161.2	161.0
7	124.2	124.0
8	136.1	135.9
9	119.3	119.1
10	132	131.8
11	16.6	16.4

Todos os deslocamentos químicos esperados para a Plumbagina, segundo BOTHIRAJA *et al.*, 2011, foram encontrados, demonstrando que a Plumbagina está presente nessa fração. Porém outros deslocamentos químicos que não foram atribuídos aos carbonos da Plumbagina foram encontrados. (Apêndice A, pág. 106).

Para confrontar com os dados da literatura, e acompanhar a correlação C-H a curta distância de todos os deslocamentos obtidos, avaliamos o espectro HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*) (Apêndice D, pág 109).

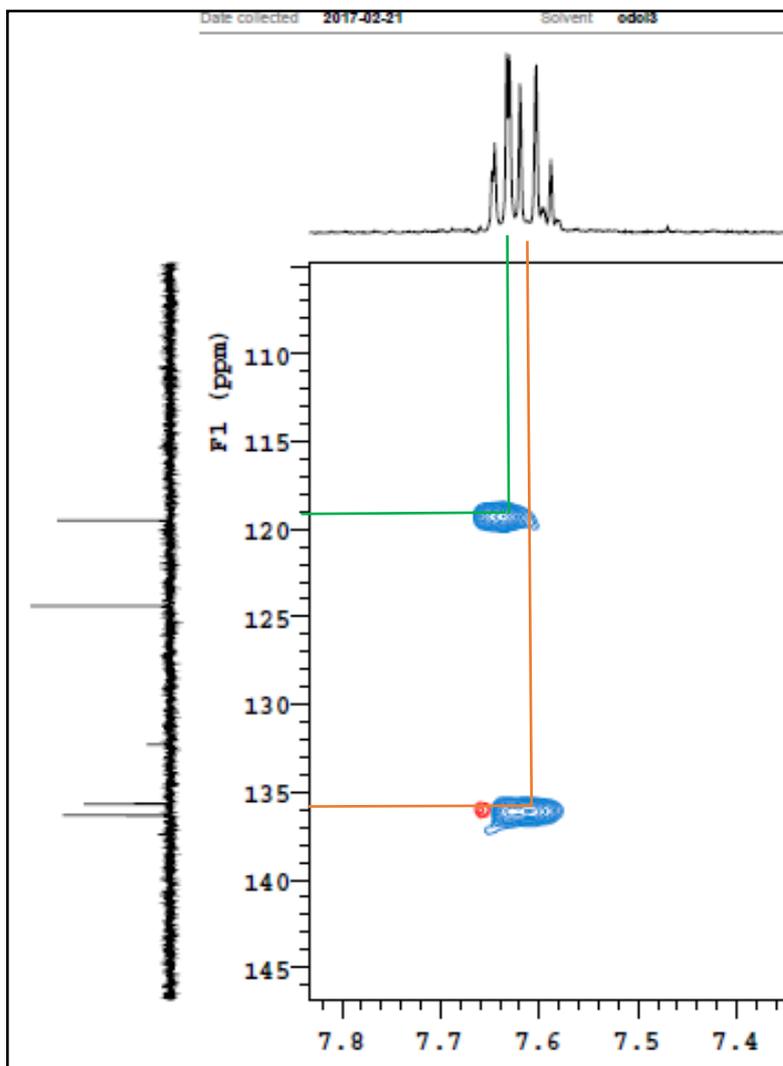
Através do cruzamento dos deslocamentos químicos podemos atribuir os hidrogênios aos Carbonos correspondentes na estrutura (Tabela 16).

Tabela 17: Dados de correlações obtidos do espectro HSQC

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Correlação <math>^1J_{C-H}</math> HSQC</b>
1	184,8	-
2	149,6	-
3	135,5	6,81
4	190,3	-
5	115,1	-
6	161,2	-
7	124,2	7,26
8	136,1	7,62
9	119,3	7,64
10	132,0	-
11	184,8	-
12	16,4	2,19

Através dos dados de correlação, poderemos propor a estrutura da Naftoquinona Plumbagina, mas os deslocamentos iguais propostos BOTHIRAJA *et al* (2011) para os hidrogênios não foram confirmados, haja vista o Carbono com deslocamento químico 136,1 está ligado ao Hidrogênio com deslocamento químico 7,62. E o Carbono com deslocamento 119,3 ligado ao 7,64 (Figura 29), confirmando a premissa que esses Carbonos não poderiam ser iguais por estarem influenciados por diferentes átomos vizinhos.

Figura 29: Espectro de correlação C-H, HSQC aproximado



As constantes de acoplamento (J) para os hidrogênios a e b não foram possíveis de serem calculadas pois os deslocamentos químicos para esses hidrogênios se sobrepõem formando um multiplete. Esse resultado corrobora os resultados publicados por BOTHIRAJA *et al* (2011), que indica a presença de multiplete para os hidrogênios a e b da molécula da Plumbagina.

Estudos futuros merecem ser realizados para obtenção do isolamento da molécula Plumbagina utilizando uma metodologia otimizada para extração e purificação dos extratos provenientes da *Plumbago scandens*.

#### 4.6.2 Fração número 21 do extrato hexânico 2PSEH 21

O cromatograma de corrente de íon totais (Figura 30) proveniente da fração número 21 do extrato hexânico apresentou um espectro de massas (Figura 31) interessante para o composto com tempo de retenção em 57,7 min, sendo observado uma possível indicação do composto  $\alpha$ -Tocoferol pela comparação com o espectro de massas da biblioteca *NIST* (National Institute of Standard and Technology).

Figura 30: Cromatograma de corrente de íons totais da fração 2PSEH 21

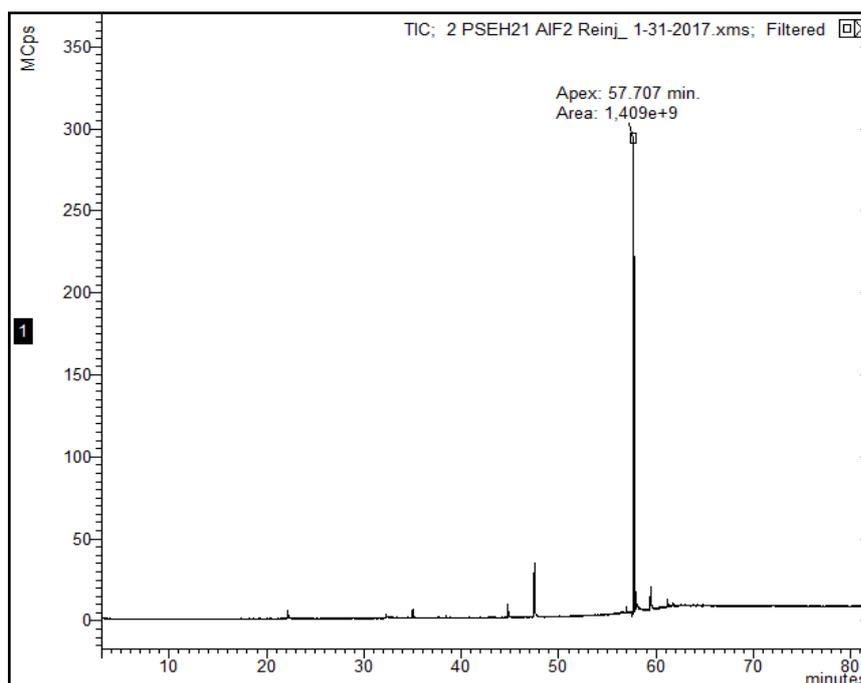
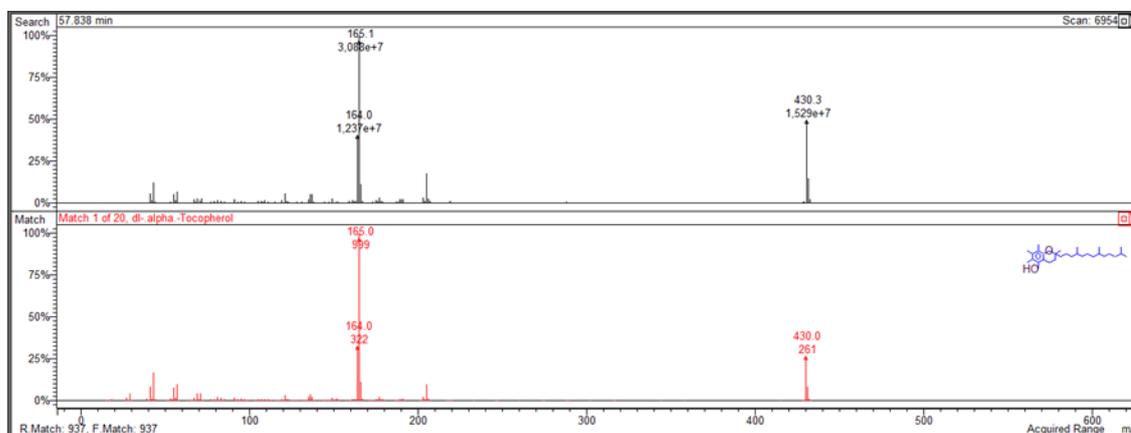


Figura 31: Espectro de massas do pico majoritário da fração 2PSEH 21, em comparação ao espectro de massas do  $\alpha$ -Tocoferol (NIST)



O espectro de massas indica a presença da  $\alpha$ -Tocoferol nessa fração. Com objetivo de confirmar a presença deste composto, comparamos o tempo de retenção e o espectro de massas provenientes da amostra 2PSEH21 com o padrão de referência do  $\alpha$ -Tocoferol (Figuras 32 e 33).

Figura 32: Cromatograma de corrente de íons totais do padrão  $\alpha$ -Tocoferol.

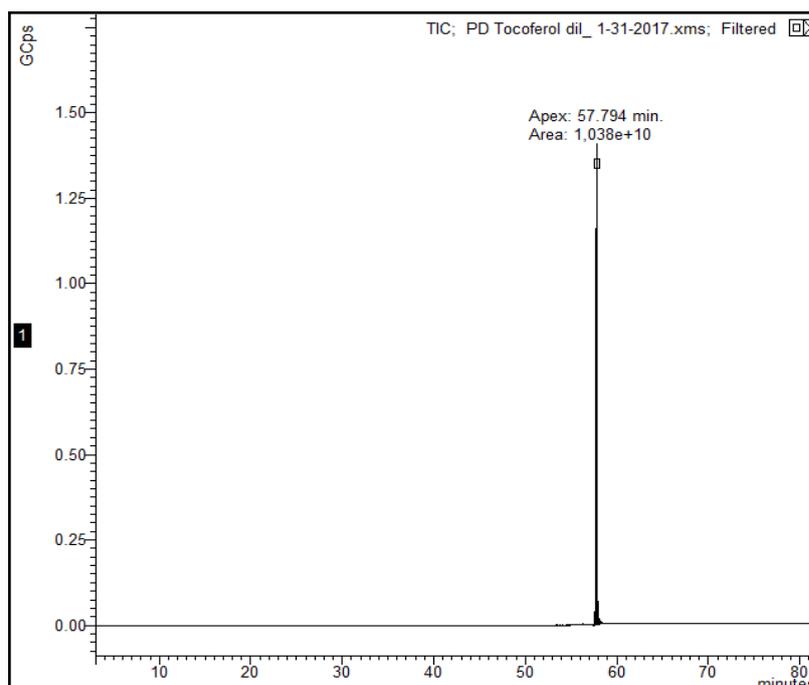
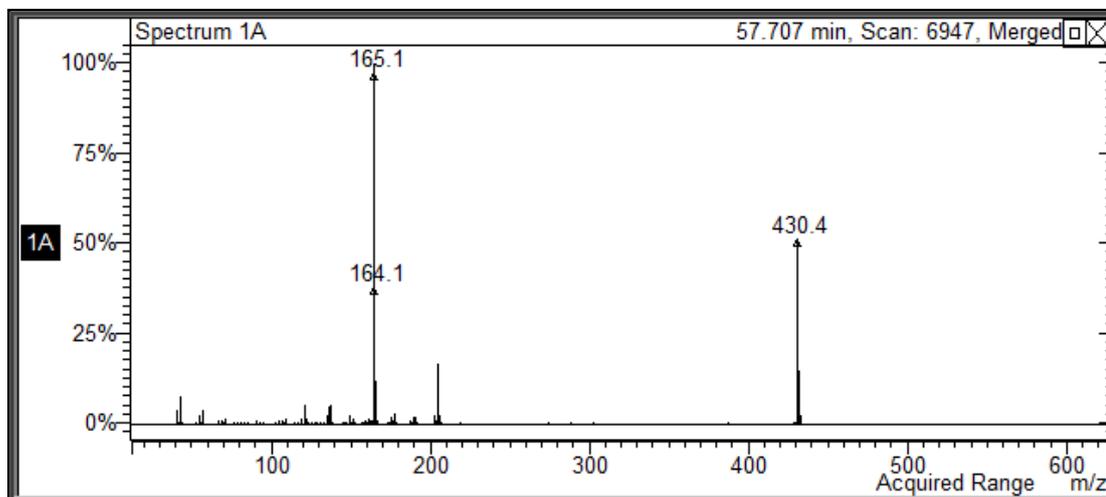
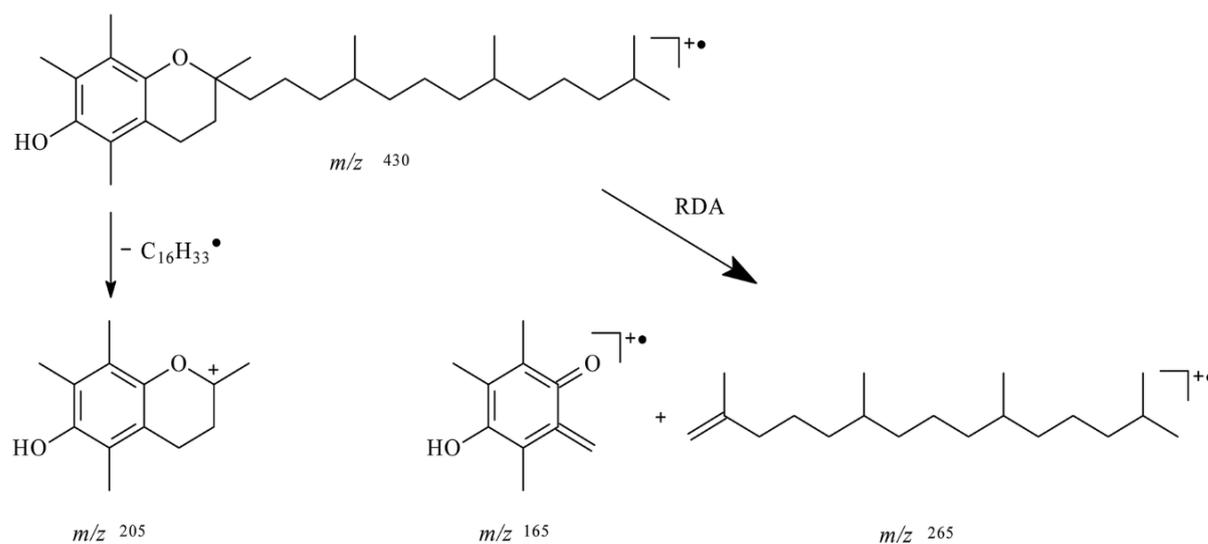


Figura 33: Espectro de massas do pico em 57,794 min do padrão analítico  $\alpha$ -Tocoferol e sua fragmentação.



O espectro de massas do padrão (Figura 31) e amostra (Figura 29) demonstram ter o mesmo perfil de fragmentação, pode-se observar o pico correspondente ao íon molecular  $[M]^+$  em  $m/z$  430 Da conferindo com a fórmula molecular do composto  $C_{29}H_{50}O_2$ . Os picos em  $m/z$  164,  $m/z$  165 e  $m/z$  205 são formados pela quebra da parte não aromática da molécula com ou sem transferência de Hidrogênio ( $m/z$  164 e 165) e pela perda da cadeia isoprênica ( $m/z$  265) (Figura 34).

Figura 34: Proposta de fragmentação da molécula  $\alpha$ -Tocoferol

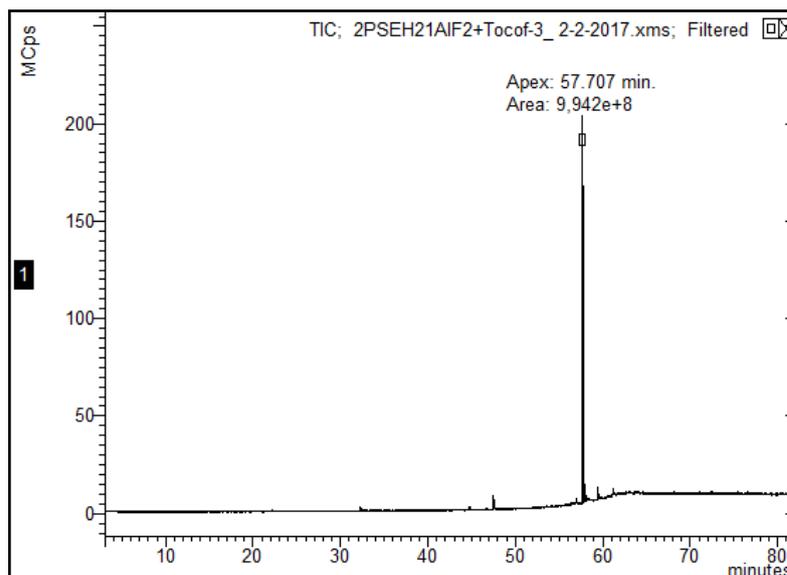


Fonte: Zhang *et al*, 2016

Frente a essas informações experimentais, o composto com tempo de retenção de 57,7 min teve sua estrutura proposta como sendo o  $\alpha$ -Tocoferol.

Foi possível também observar a similaridade entre os cromatogramas através de comparação dos tempos de retenção. Uma coinjeção da amostra 2PSEH21 e o padrão  $\alpha$ -Tocoferol foi realizada para avaliação do tempo de retenção (Figuras 35 e 36)

Figura 35: Cromatograma de corrente de íons totais do padrão  $\alpha$ -Tocoferol coinjetado com a amostra 2PSEH 21.



Como observado, não houve mudança na retenção, demonstrando que os compostos eluem com o mesmo tempo de retenção no sistema cromatográfico (Figura 34).

Figura 36: Cromatogramas de corrente de íons totais do padrão  $\alpha$ -Tocoferol coinjectado com a amostra 2PSEH 21 em comparação a amostra original 2PSEH21

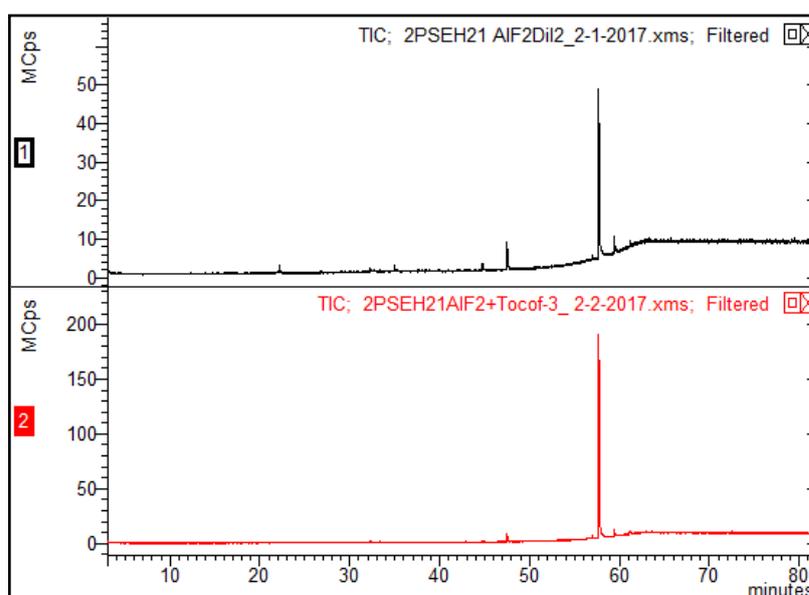
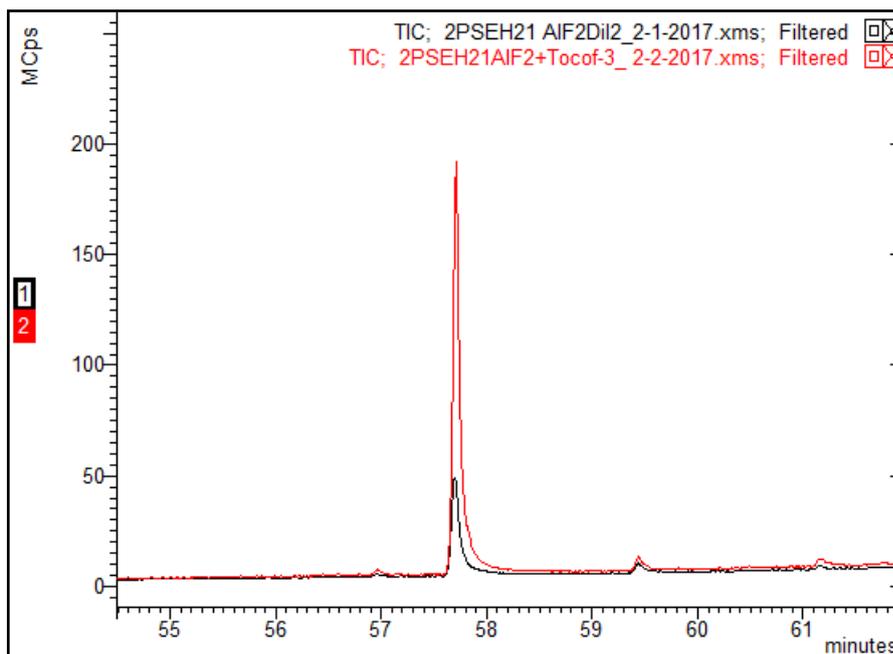


Figura 37: Cromatograma de corrente de íons totais do padrão  $\alpha$ -Tocoferol coinjectado com a amostra 2PSEH 21 expandido no tempo de retenção 57,707 min



Através das análises dos cromatogramas e espectros de massas realizados com a fração da 2PSEH21 da espécie *Plumbago scandens*, podemos afirmar que o composto  $\alpha$ -Tocoferol está presente na sua composição química.

Não há estudos publicados associando a presença  $\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E) na espécie estudada, sendo esse resultado de extrema importância haja vista que o alfa-tocoferol é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, assim, atua na proteção contra a lipoperoxidação (Kay *et.al*, 1986).

Os tocoferóis são encontrados em diversas plantas em proporções variadas, sendo as principais fontes os óleos vegetais, vegetais verde escuro e produtos de origem animal como fígado e ovos (Guinazi *et.al.*, 2009). Os tocoferóis podem se apresentar nas formas de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$  (alfa, beta, gama e delta), sendo o isômero alfa o mais abundante e o mais potente antioxidante nesses alimentos e principal fonte de vitamina E.(Guinazi *et.al.*, 2009).

#### 4.6.3 Fração número 26 do extrato hexânico 3PSEH 26

O cromatograma de corrente de íon totais (Figura 38) proveniente da fração número 26 do extrato hexânico apresentou um espectro de massas (Figura 39) interessante para os compostos com tempo de retenção em 60,88 min e 61,58 min, sendo observado uma possível similaridade com os triterpenos pentacíclicos alfa e beta-Amirina pela comparação de seus respectivos espectros de massas com os espectros de massas da biblioteca *NIST* (National Institute of Standard and Technology).

Figura 38: Cromatograma de corrente de íons totais da fração 3PSEH 26

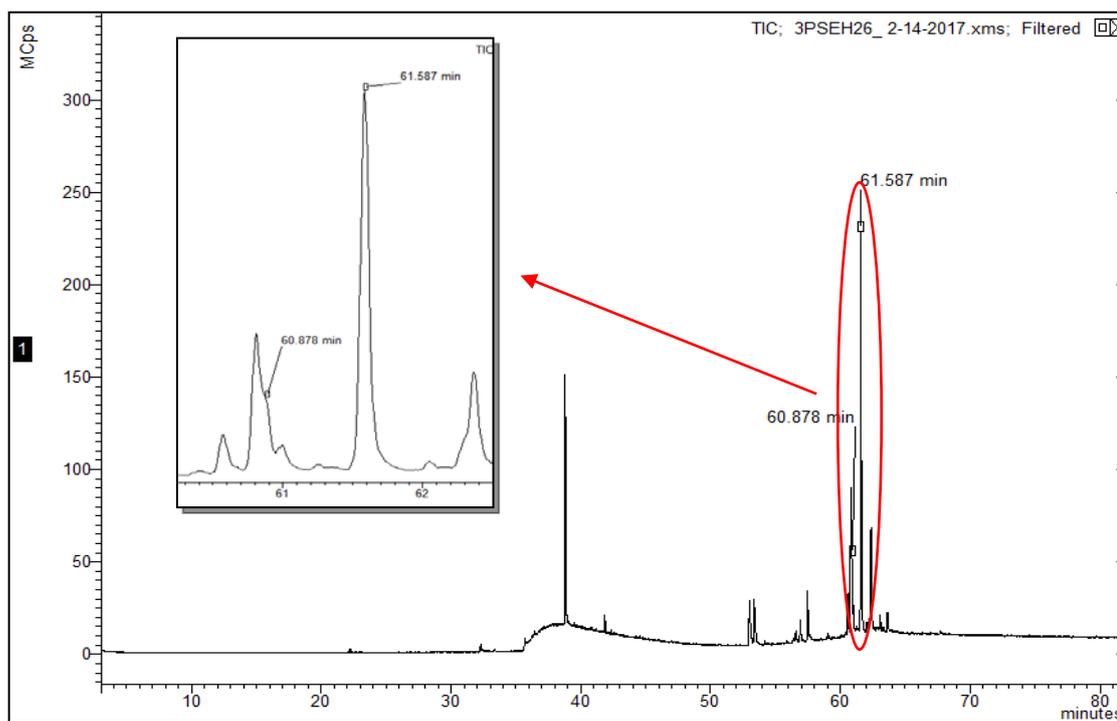
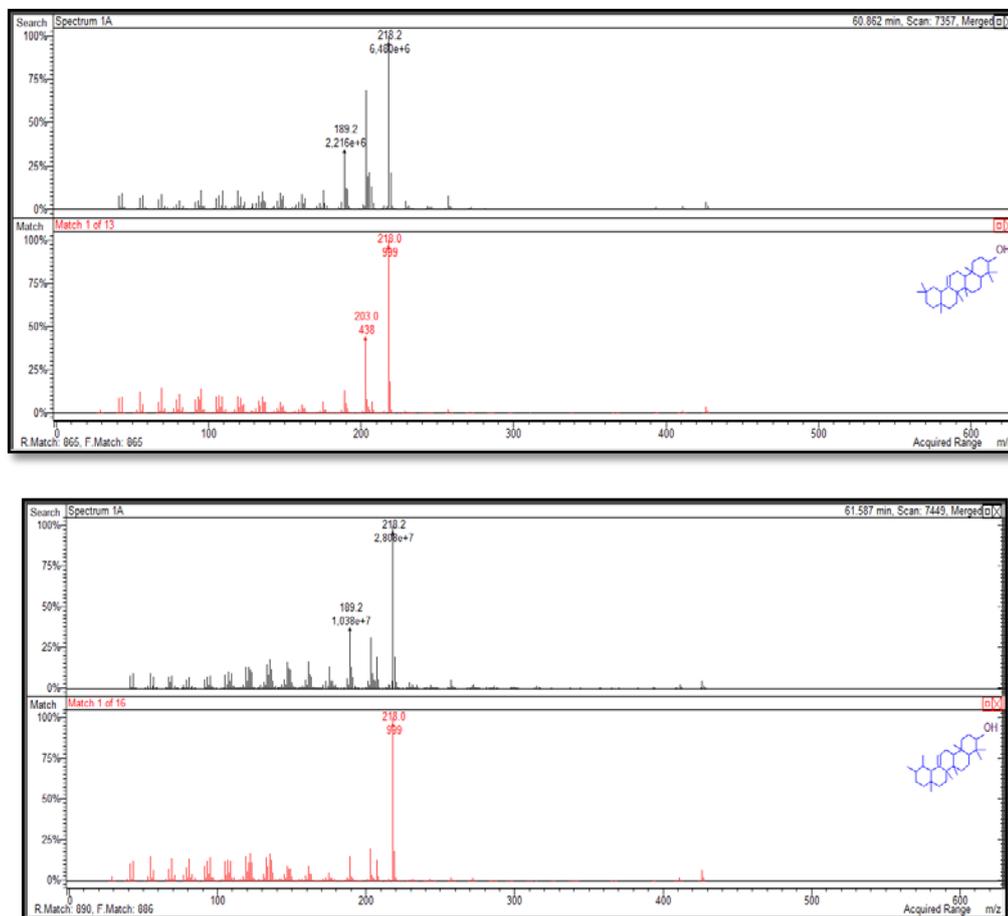
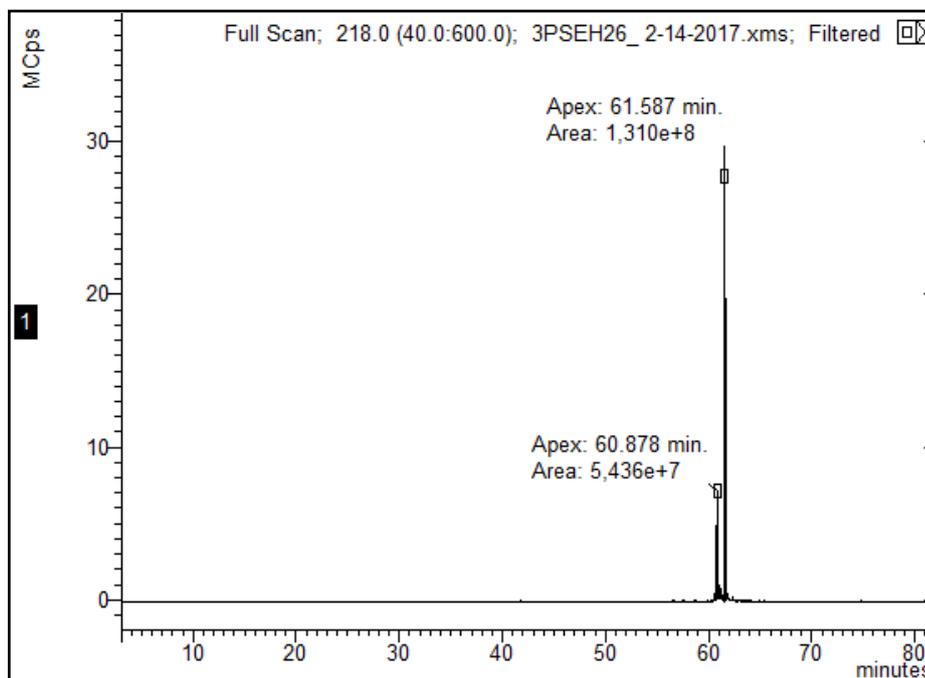


Figura 39: Espectro de massas do pico 60,87min, em comparação ao espectro do beta-Amirinae do pico 61,58min, em comparação ao espectro do alfa-Amirina



Como a fragmentação da amirina apresenta íon-base em  $m/z$  218 Da (pico base) e baixa intensidade para o íon molecular, o cromatograma de monitoramento de íon selecionado em  $m/z$  218 Da sugere a presença de dois compostos com o mesmo padrão de fragmentação, bem como, mesmo íon-base. (Figura 40)

Figura 40: Cromatograma do íon selecionado em  $m/z$  218 Da da fração 3PSEH 26

Os espectros de massas, quando comparado ao NIST, indicam a presença de  $\alpha$  e  $\beta$ - Amirina nessa fração. E para confirmação, foi utilizada como padrão de referência, uma mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina proveniente de resinas de plantas amazônicas ricas nestes compostos, da qual foi extraída, purificada e caracterizada por RMN. Esta mistura foi disponibilizada pelo LEMA/IQ/UFRJ – Laboratório de Análises e Metodologias Aplicadas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina foi purificada e caracterizada por CGAR-EM (Figuras 41 e 42) e RMN  $^{13}\text{C}$  (Apêndice E, pág 110).

Figura 41: Cromatograma de corrente de íons totais da mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Amirina extraída da Resina de plantas amazônicas

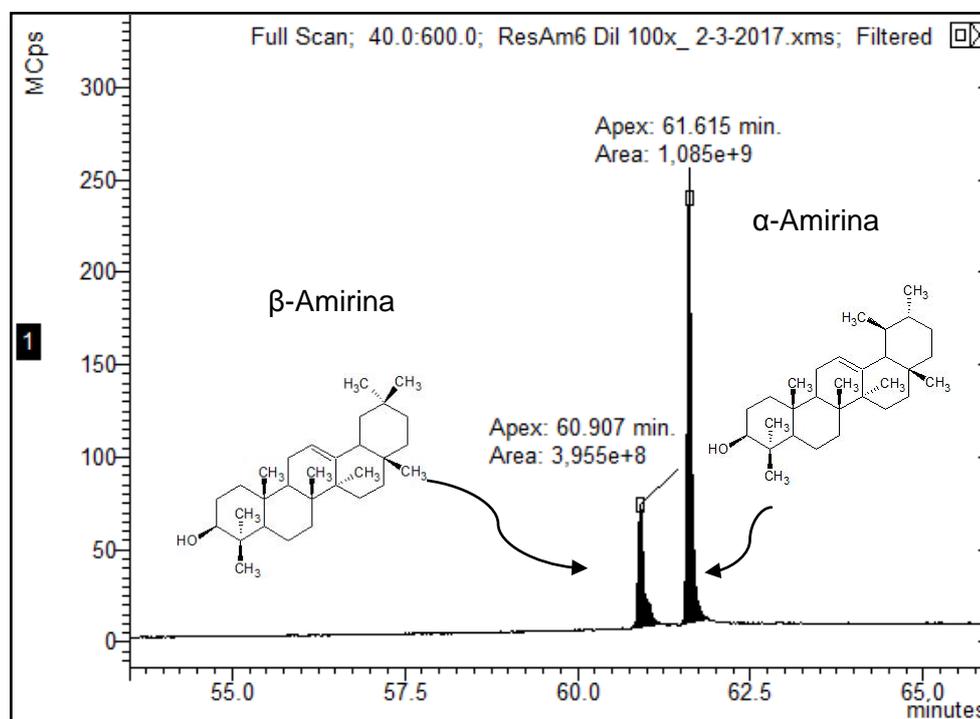
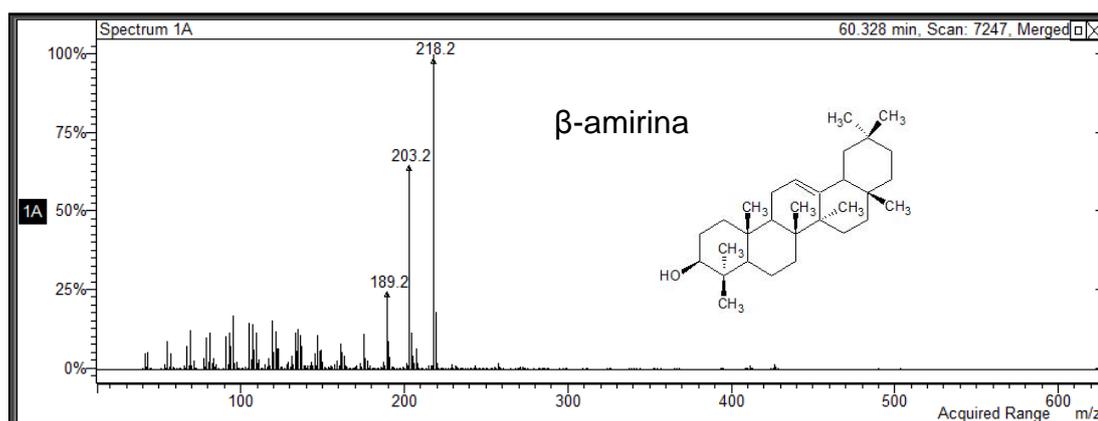
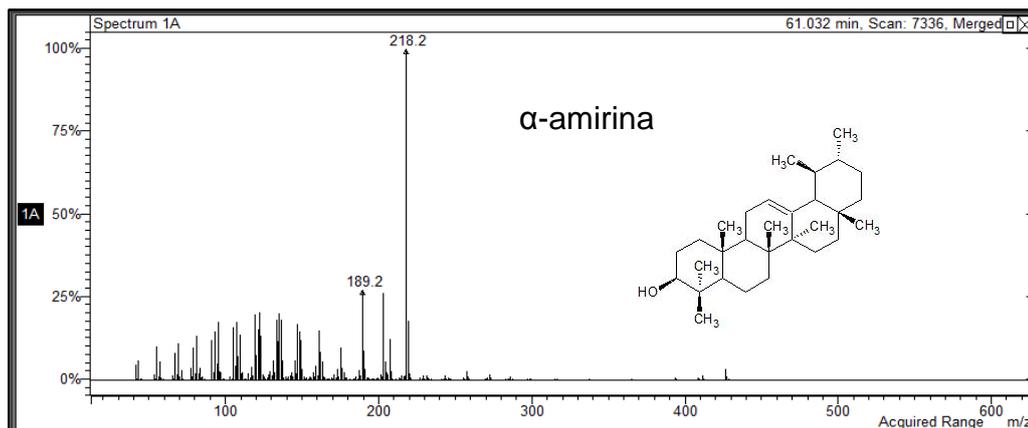


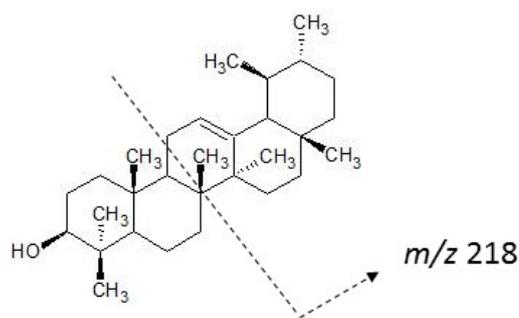
Figura 42: Espectros de massas da  $\alpha$  e  $\beta$ - Amirina da Resina Amirínica





No espectro de massas da  $\alpha$  e  $\beta$ - Amirina (Fig. 42) pode-se observar o pico correspondente ao íon base  $[M]^+$  em  $m/z$  218 Da (100%) proveniente de um processo de fragmentação do tipo Retro Diels-Alder (RDA). O pico com  $m/z$  203Da corresponde ao fragmento iônico resultante da perda de radical metila  $[M-CH_3]^+$  a partir do fragmento iônico em  $m/z$  218 Da. O pico em  $m/z$  189Da corresponde a fragmento iônico resultante da perda de 1 molécula de água a partir do fragmento iônico em  $m/z$  207 Da. (Figura 43).

Figura 43: Fragmentação da  $\alpha$ - Amirina



$M^+ m/z$  425

$$m/z 203 = 218 - CH_3$$

$$m/z 189 = 207 - H_2O$$

O espectro de RMN<sup>13</sup>C (Apêndice D, pág. 109) confirmou a presença de 60 átomos de Carbono ( $\alpha$  +  $\beta$  amirina), dos quais 54 apresentam hibridização de

carbonos  $sp^3$  entre 15 e 60ppm, quatro carbonos com hibridização  $sp^2$  com deslocamentos químicos entre 120 e 150 ppm e dois deslocamentos em torno de 79ppm provenientes do Carbono ligado ao Oxigênio.

A confirmação estrutural dos compostos amirínicos provenientes da resina foi realizada pela comparação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN  $^{13}C$  para os compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina publicados na literatura (Dias *et al*, 2011). (Tabela 17).

Tabela 17: Dados obtidos dos espectros de RMN  $^{13}C$  para a mistura  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina versus encontrado na literatura

$\alpha$ - e $\beta$ -amirina	$\alpha$ -amirina (DIAS <i>et al</i> , 2011)	$\beta$ -amirina (DIAS <i>et al</i> , 2011)
15,5		15,4
15,6		15,4
15,6	15,6	
15,7	15,6	
16,8	16,8	
16,8		16,8
17,5	17,4	
18,4	18,4	
18,4		18,6
21,4	21,4	
23,3	23,2	
23,4	23,3	
23,6		23,6
23,7		23,7
26		25,9
26		26,1
26,2		26,2
26,6	26,6	
27		27,2
27,3	27,2	
28,1		28,0
28,1	28,1	
28,2	28,1	
28,4		28,4
28,8	28,7	

31,1		31,0
31,3	31,2	
32,5	32,2	
32,6		32,4
32,9		32,6
33,4	33,7	
33,8		33,8
34,8		34,7
36,9	36,9	
37		36,9
37,2		37,1
38,6		38,5
38,6	38,7	
38,8		38,7
38,8	38,7	
39,6	39,6	
39,7	39,6	
39,8		39,8
40	40,0	
41,6	41,5	
41,7		41,7
42,1	42,0	
46,9		46,8
47,3		47,2
47,7		47,6
47,7	47,7	
55,2		55,1
55,2	55,1	
59,1	59,0	
79,1	79,6	
79,1		79,3
121,7		121,7
124,4	124,4	
139,6	139,5	
145,2		145,2

---

---

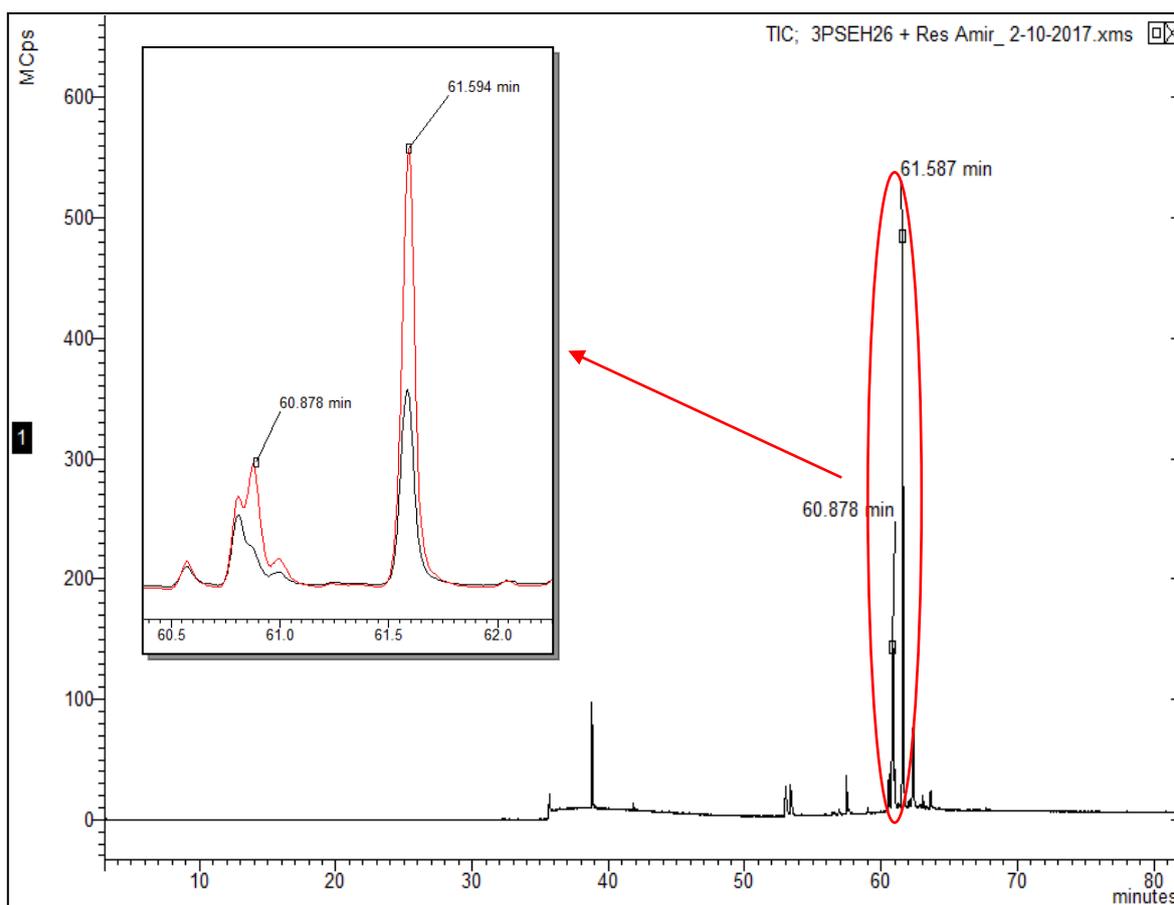
Através da comparação realizada dos deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$ , pode-se concluir que os compostos purificados da resina apresentam os mesmos

deslocamentos químicos da  $\alpha$ - e  $\beta$ -Amirina relatados na literatura, confirmando assim sua estrutura química, podendo ser usada como parâmetro de confirmação da presença desses compostos na fração 3PSEH 26 da espécie *Plumbago scandens*.

Através da comparação dos espectros de massas há a confirmação da presença da Amirina na fração da *Plumbago scandens* estudada. Pois elas apresentam tempo de retenção e perfil de fragmentação similares aos apresentados pela pelo padrão de mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ - Amirina.

A partir dessa conclusão, foi realizada uma coinjeção do padrão com a fração 3PSEH 26 para avaliação/comparação dos tempos de retenção dos compostos de interesse. (Figura 44).

Figura 44: Coinjeção do padrão de amirina e a fração 3PSEH 26

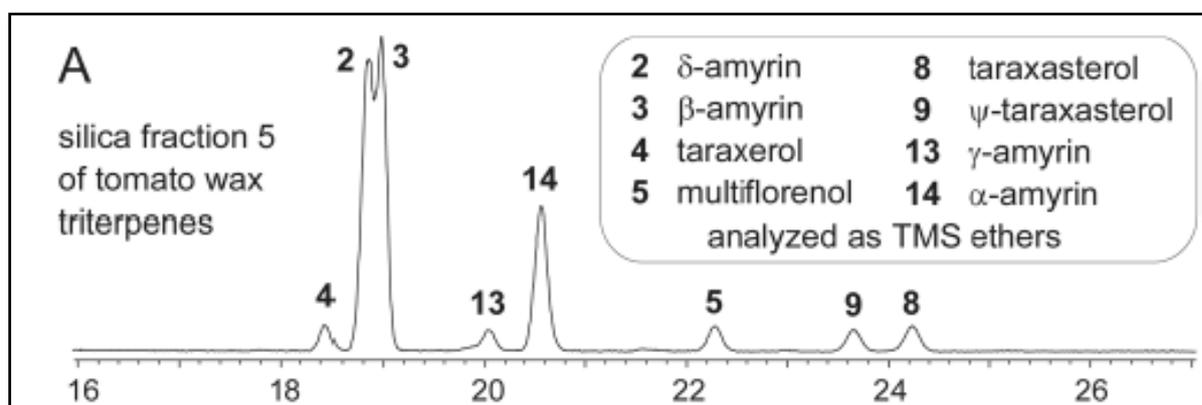


O perfil cromatográfico produto da coinjeção da resina das amirinas padrão e a amostra 3PSEH26 confirma a presença dos compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ - amirina. Porém, há uma coeluição de outro composto ocorrendo com a  $\beta$ - amirina no tempo de 60,81 min e que apresenta o mesmo fragmento iônico em  $m/z$  218 Da como íon base.

Essa coeluição já pode ser vista antes mesmo da coinjeção com o padrão. (Figura 38, pág. 75).

O perfil cromatográfico e de fragmentação (por ter os mesmos íons base e molecular e íons característicos dos compostos amirínicos) do composto que coeluiu com a  $\beta$ - amirina sugere ser  $\delta$ -amirina. Essa conclusão foi baseada no estudo realizado por SHAN.*et al*(2015). Neste estudo, ele pesquisou sobre os triterpenos incluindo  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -e  $\delta$ -amirina. E o perfil cromatográfico apresentado por esse trabalho (Figura 45)apresenta similaridade ao que foi obtido na amostra 3PSEH26, indicando a possibilidade da coeluição citada.

Figura 45: Cromatograma dos triterpenos encontrados no tomate



Fonte: SHAN. *et al*, 2015

A diferença entre  $\beta$ - amirinae  $\delta$ -amirina é apenas a posição de uma dupla ligação o que impossibilita a separação cromatográfica não importando o gradiente de temperatura utilizado para análise.

A fragmentação dos compostos que coeluem na amostra 3 PSEH26confirma a possibilidade afirmada, o espectro de massas do pico que sai em 60,88 min possui a fragmentação comparável a $\beta$ - amirina, apresentando o fragmento iônico com  $m/z$  203Da maior do queo fragmento iônico com  $m/z$ 189 Da. Já no composto com tempo

de retenção anterior (60,81min) ele apresenta um padrão de fragmentação diferente com os íons fragmentos em  $m/z$  203 Da e 205 Da com maior intensidade quando comparados ao espectro da  $\beta$ -Amirina (Figuras 46 e 47).

Figura 46: Espectro de massas do pico em 60,88min da fração 3PSEH 26

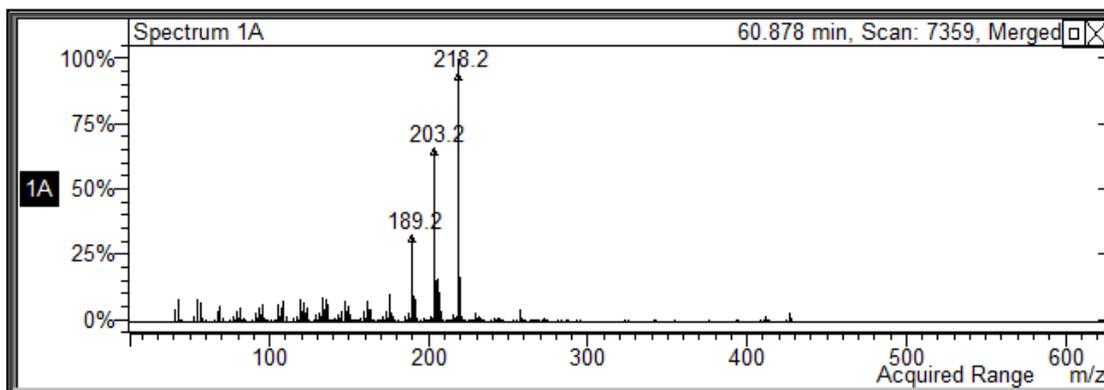
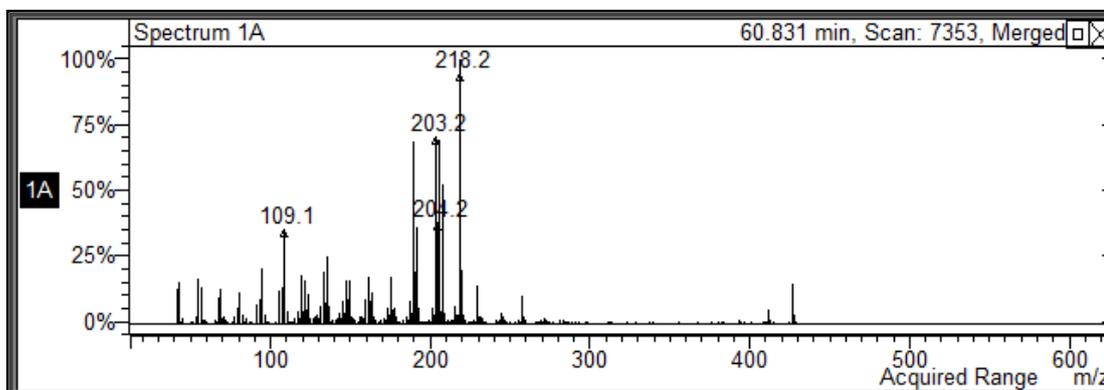
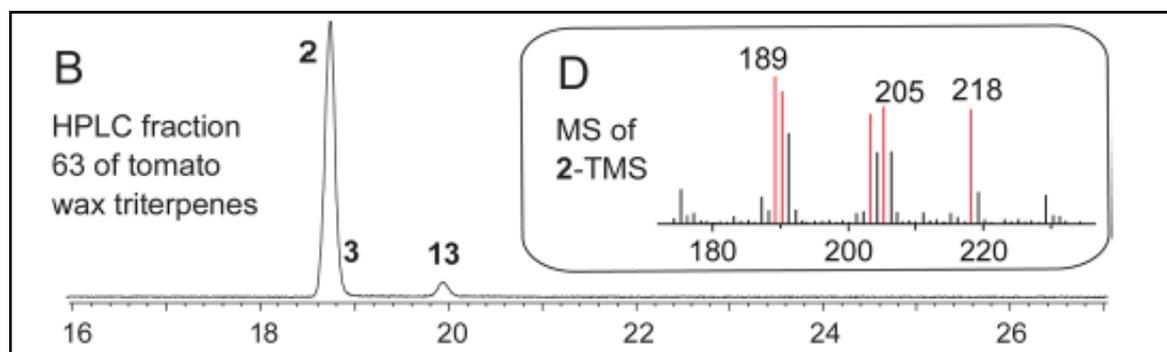


Figura 47: Espectro de massas do pico em 60,831min da fração 3PSEH 26



O perfil de fragmentação no estudo realizado por SHAN. *et al*(2015) para a  $\delta$ -amirina indica um perfil similar do pico com tempo de retenção 60,81 min com o aumento dos fragmentos iônicos com  $m/z$  203/205 Da. (Figura 48)

Figura 48: Cromatograma dos triterpenos encontrados no tomate após tentativa de isolamento do composto 13 com o perfil de fragmentação dos íons mais abundantes do composto 2 -  $\delta$ -amirina



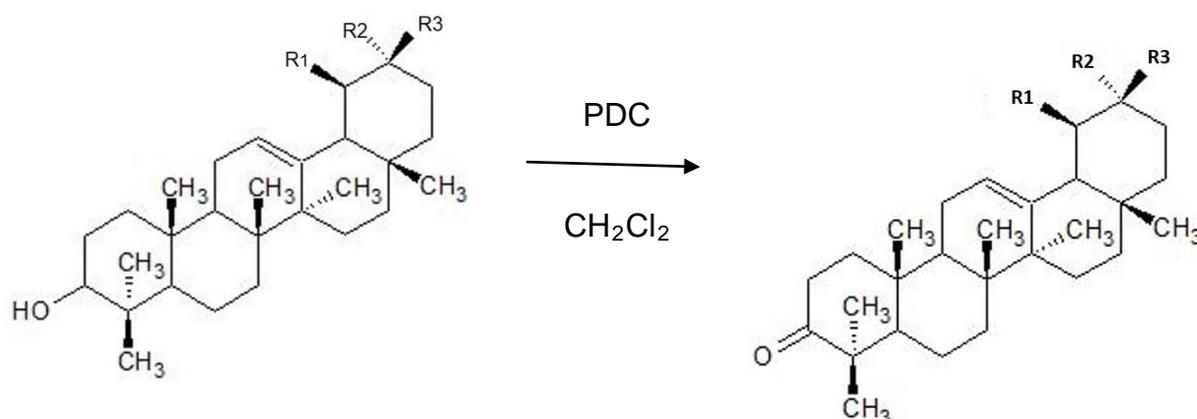
Fonte: SHAN *et al*, 2015

Para a confirmação da presença de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Amirina no extrato de *Plumbago scandens* foram realizadas reações químicas de oxidação e acetilação tanto na fração 3PSEH 26 quanto na mistura padrão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Amirina de modo o perfil cromatográfico e de fragmentação pudessem ser comparados.

A fração 3PSEH 26 e a mistura de amirinas foram oxidadas utilizando o reagente Dicromato Piridina (PDC) como agente antioxidante.

O processo de oxidação utilizando o reagente Dicromato de Piridina (PDC) como agente oxidante leva a oxidação do álcool presente nas amirinas a uma cetona conforme ilustram as reações abaixo.

Figura 49: Reação da  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina com o reagente Dicromato de Piridina – PDC

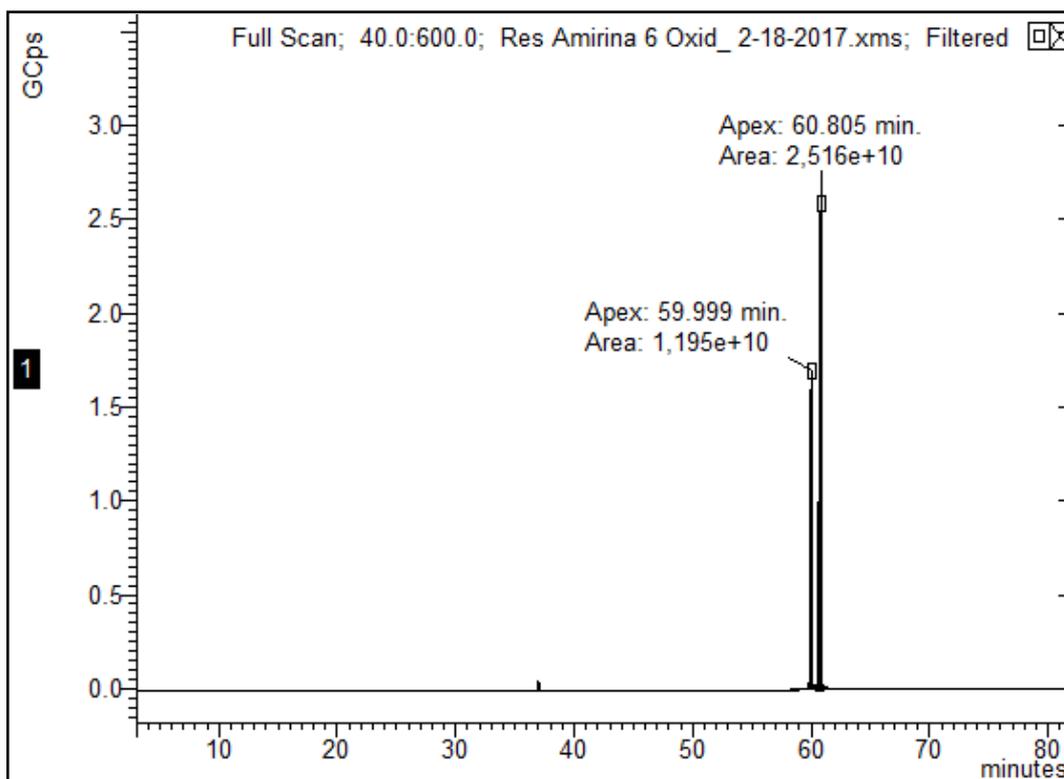


$\alpha$ -amirina: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H

$\beta$ -amirina: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>

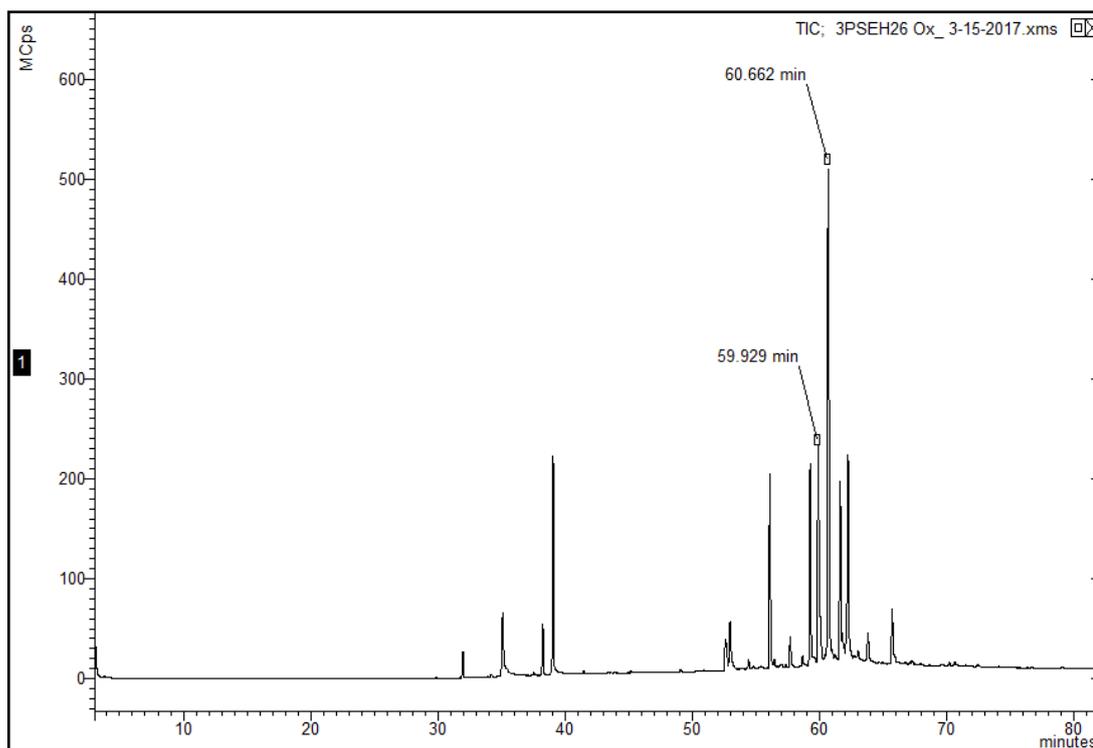
Com a formação do grupo carbonílico nos compostos amirínicos através da reação de oxidação, há uma mudança no tempo de retenção quando analisado por cromatografia. Por utilizar uma coluna DB-5 (baixa polaridade) na análise cromatográfica, o que comanda a retenção de compostos com pressão de vapor próximos é a massa molar da molécula. Logo, como diminuimos a massa molar da molécula com a saída de dois Hidrogênios, temos uma pequena diminuição do tempo de retenção como ilustra o cromatograma do padrão de compostos amirínicos oxidado (Figura 50).

Figura 50: Cromatograma do padrão de amirinas oxidado.



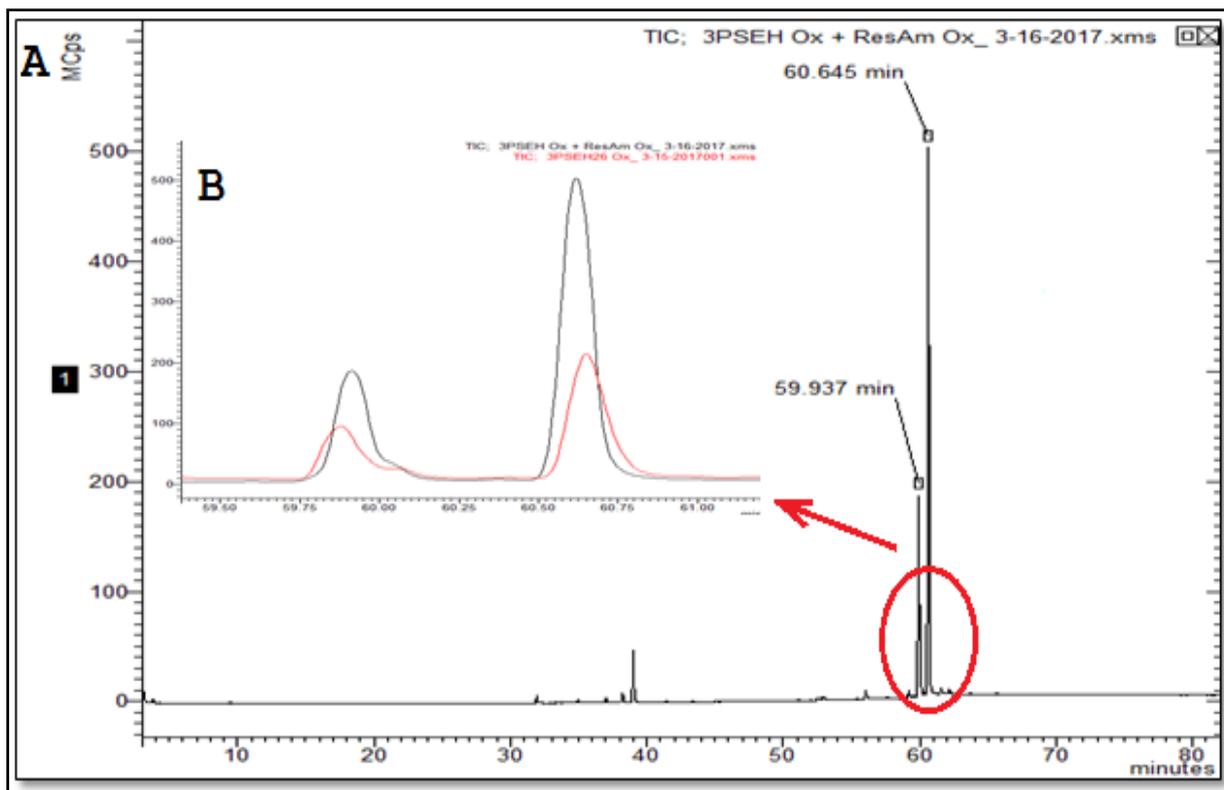
Essa mesma mudança no tempo de retenção pôde ser confirmada no cromatograma da amostra submetida a mesma reação de oxidação com o PDC (Figura 51). Antes a  $\beta$ -amirina, eluia no tempo de retenção de 60,88 min e agora a  $\beta$ -amirina oxidada elui com tempo de retenção de 59,92min; para  $\alpha$ -amirina a mesma mudança aconteceu, antes eluia com 61,58min e depois da oxidação eluiu com 60,66 min.

Figura 51: Cromatograma da amostra 3PSEH26 após o processo de Oxidação



Uma confirmação das mudanças nos tempos de retenção foi realizada através da coinjeção da amostra com a mistura dos padrões oxidados (Figura 52).

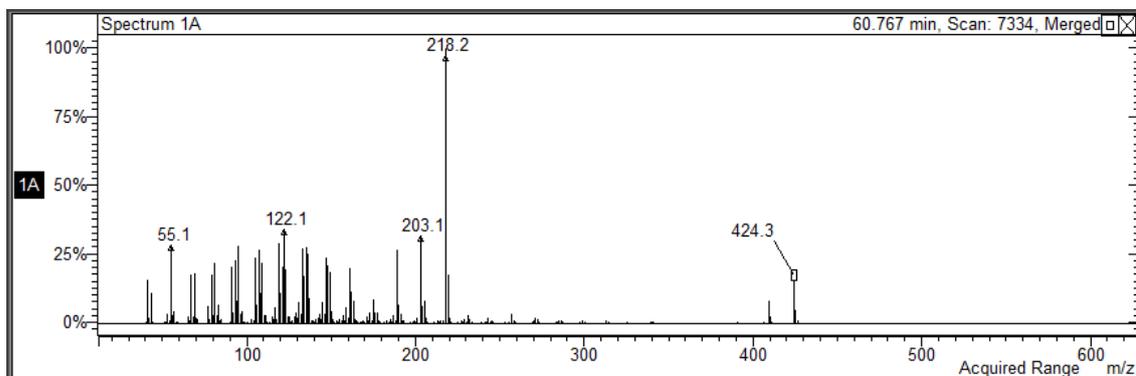
Figura 52: Cromatograma da amostra 3PSEH26 oxidada coinjetada com o padrão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Amirina Oxidados



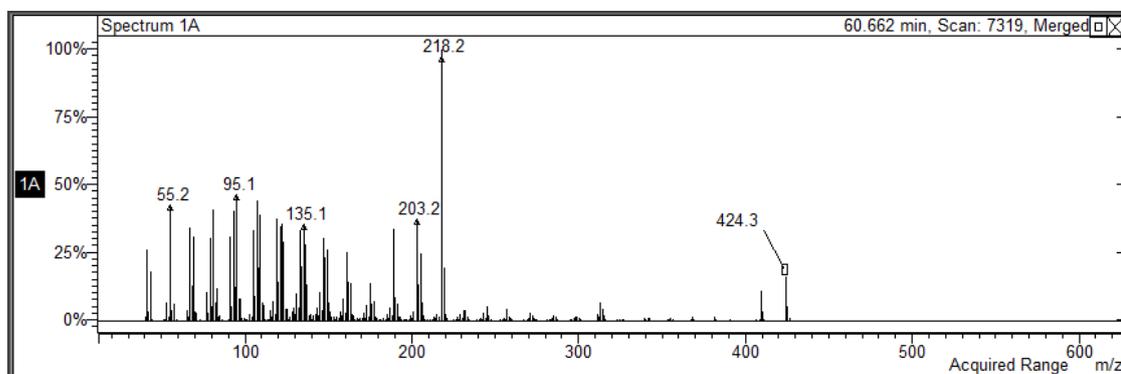
Como pode ser observado, não houve mudança na retenção, demonstrando que os compostos eluem com o mesmo tempo de retenção no sistema cromatográfico.

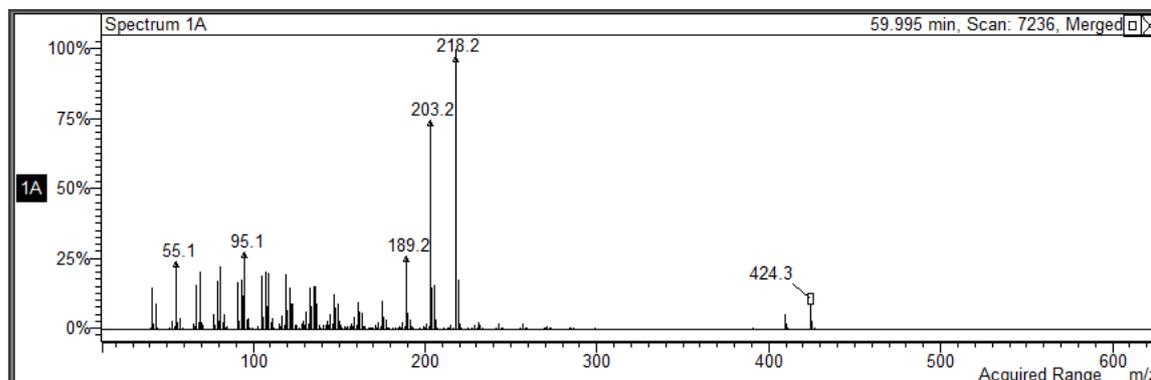
Com a reação de oxidação do grupo hidroxila na  $\alpha$ -,  $\beta$ - amirina, foi possível observar os perfis dos espectros de massas de ambos os compostos foram modificados, apresentando um íon molecular com 2 unidades a menos de massa molar ( $M^+$  424 Da) proveniente da perda de dois hidrogênios. A partir destes dados, uma comparação dos espectros de massas entre o padrão e amostra (3PSEH 26) evidencia que a reação de oxidação ocorreu em ambos compostos amirínicos presente nesta fração confirmando assim, sua presença (Figura 52 e 53).

Figura 53: Espectros de massas da  $\alpha$ -amirina oxidada no padrão (a) e na amostra (b)

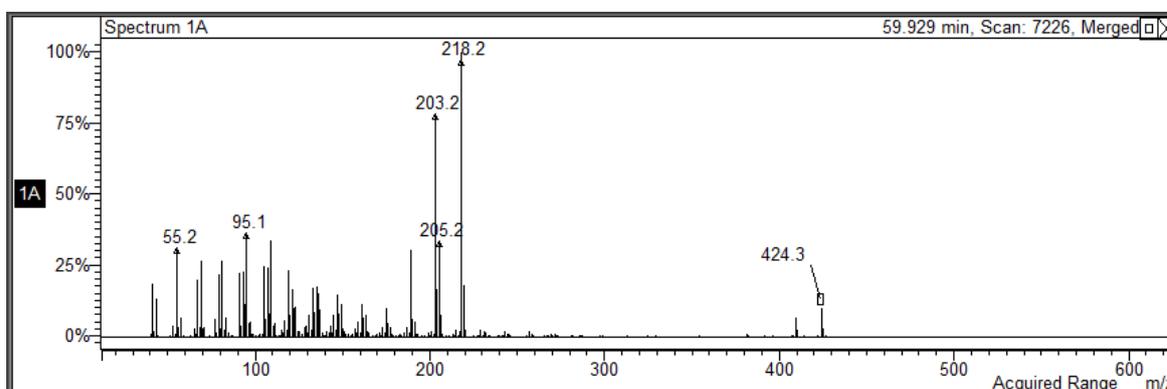
(a) Espectro de Massas do padrão  $\alpha$ -amirina oxidado

(b) Espectro de Massas da amostra oxidada

Figura 54: Espectros de massas da  $\beta$ -amirina oxidada no padrão (a) e na amostra (b)

(a) Espectro de Massas do padrão  $\beta$ -amirina oxidado

(b) Espectro de Massas da amostra oxidada

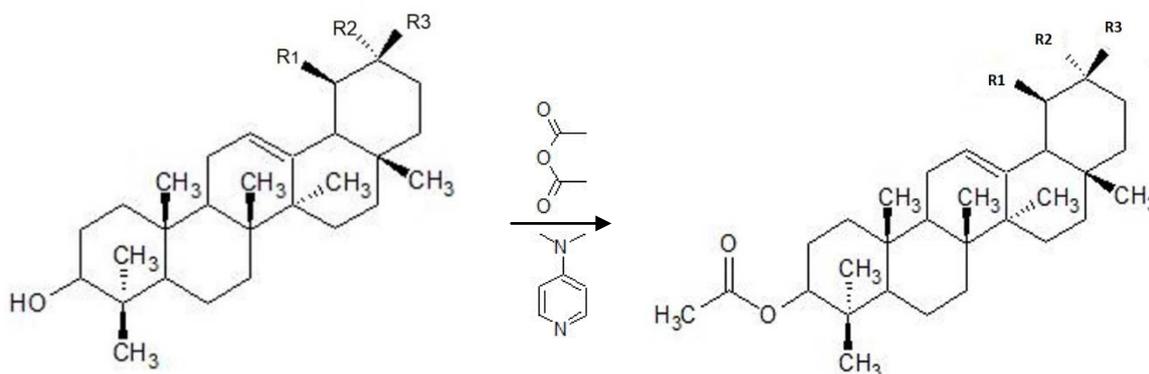


O íon molecular dos compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina quando oxidadas, muda igualmente nos padrões e na amostra evidenciando o comportamento similar das moléculas quando submetidas as mesmas condições, corroborando assim com mais uma evidencia na confirmação da presença destes compostos na espécie *Plumbago scandens*.

Uma outra reação química foi realizada para confirmação da presença dos compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina. A fração 3PSEH 26 e o padrão foram acetilados utilizando anidrido acético e DMAP (N,N – Dimetil Amino Piridina) como catalisador nucleofílico da reação.

O processo de acetilação utilizando anidrido acético e o reagente DMAP (N,N – Dimetil Amino Piridina) leva a acetilação da hidroxila presente nas amirinas conforme ilustra a reação abaixo (Figura 55).

Figura 55: Reação da Amirina com anidrido acético e DMAP

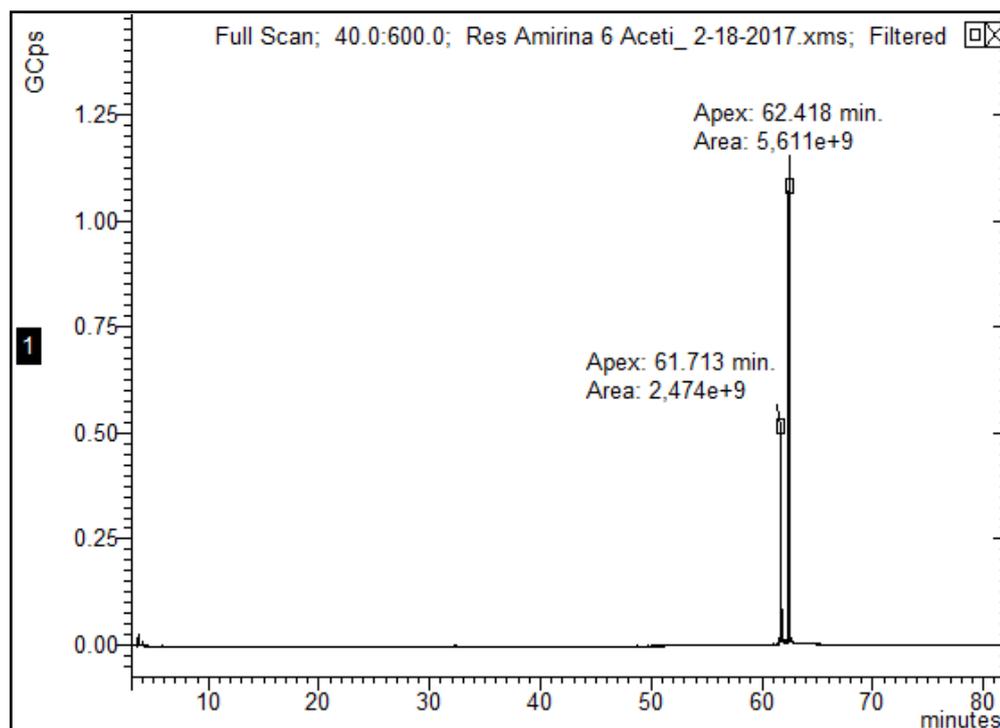


$\alpha$ -amirina:  $R_1, R_3 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$

$\beta$ -amirina:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2, R_3 = \text{CH}_3$

A análise por CGAR-EM do produto reacional foi utilizada para verificar se houve a inserção do grupo acetil no oxigênio da hidroxila através do monitoramento da mudança de tempo de retenção (Figura 56) e aumento de massa molar ( $M=468$  Da) no espectro de massas.

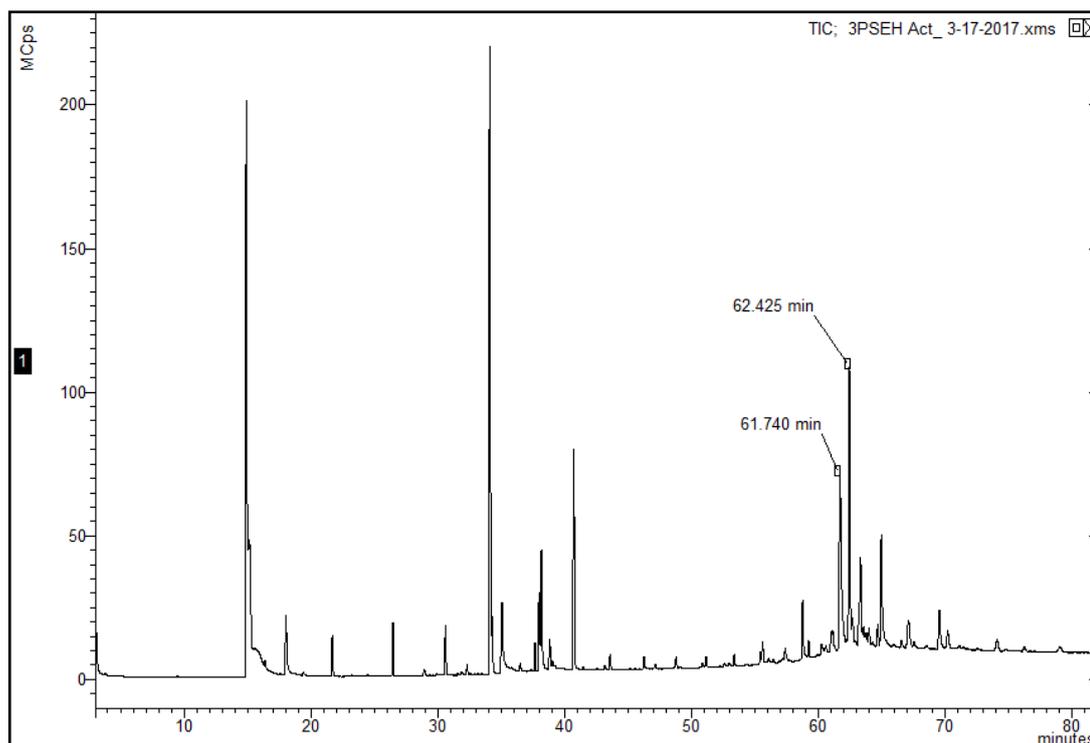
Figura 56: Cromatograma da Resina Amirínica após a reação de Acetilação



Com a inserção do grupo acetil nos compostos amirínicos através da reação de acetilação, há uma mudança no tempo de retenção quando analisado por cromatografia. Isso se dá devido ao aumento na massa molar do composto e a característica da fase estacionária da coluna, já mencionada anteriormente. Desta forma, a  $\beta$ -amirina, eluía no tempo de retenção de 60,87 min, após acetilada passou a eluir em 61,74min; ocorrendo a mesma mudança para  $\alpha$ - amirina que eluía em 61,58min e após acetilada passou a eluir em 62,42 min.

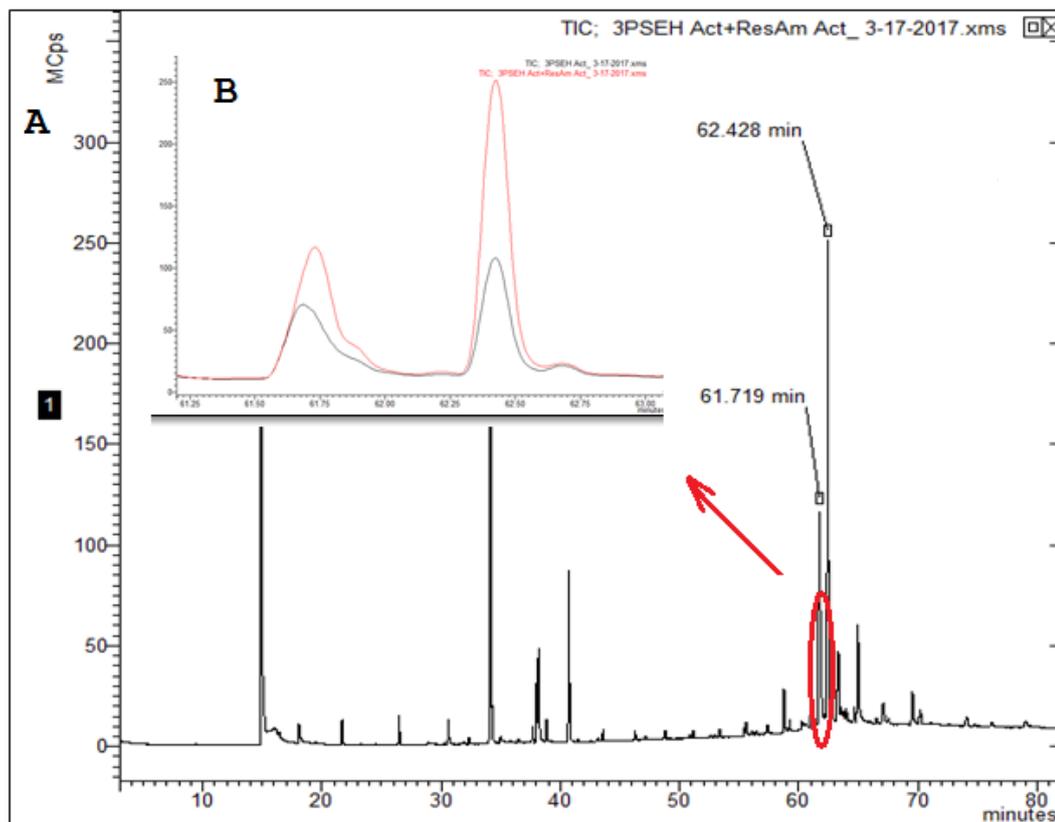
Essa mesma mudança no tempo de retenção pôde ser evidenciada no perfil cromatográfico da amostra 3PSEH26 após sersubmetida a mesma reação de acetilação (Figura 57).

Figura 57: Cromatograma da amostra 3PSEH26 após a reação de Acetilação



Para confirmar a acetilação das amirinas presentes na amostra, bem como a mudança nos tempos de retenção\_ foi realizada coinjeção da amostra e padrões acetilados (Figura 58).

Figura 58: Cromatograma da amostra 3PSEH26 após o processo de Acetilação coinjetada com o padrão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Amirina Acetilados

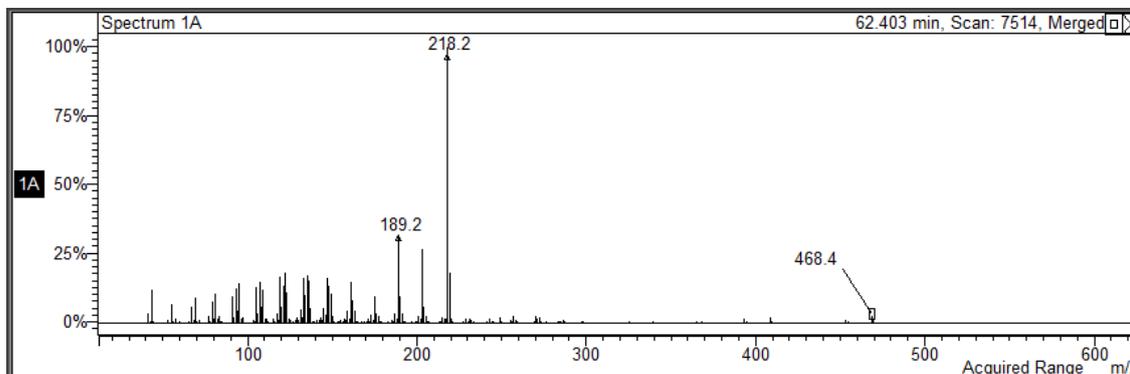


Como pode ser observado, a coeluição total das amirinas padrão acetiladas com as que estão presentes na amostra acetilada, demonstra que ambas eluem com o mesmo tempo de retenção no sistema cromatográfico.

Com a reação de acetilação do grupo hidroxila na  $\alpha$ -,  $\beta$ - amirina, foi possível observar que os perfis dos espectros de massas de ambos compostos foram modificados, apresentando um íon molecular com massa molar ( $M^+$ : 468 Da) proveniente da inserção de um grupo acetil e perda de um hidrogênio. A partir destes dados, uma comparação dos espectros de massas entre o padrão e amostra (3 PSEH 26) evidencia que a reação de acetilação ocorreu em ambos compostos amirínicos presente nesta fração confirmando assim, sua presença (Figura 59e 60).

Figura 59: Comparação dos espectros da  $\alpha$ -amirina acetilada no padrão e na amostra

(a) Espectro de Massas do padrão  $\alpha$ -amirina acetilada



Espectro de Massas da amostra acetilada do tempo de retenção 62.425 min

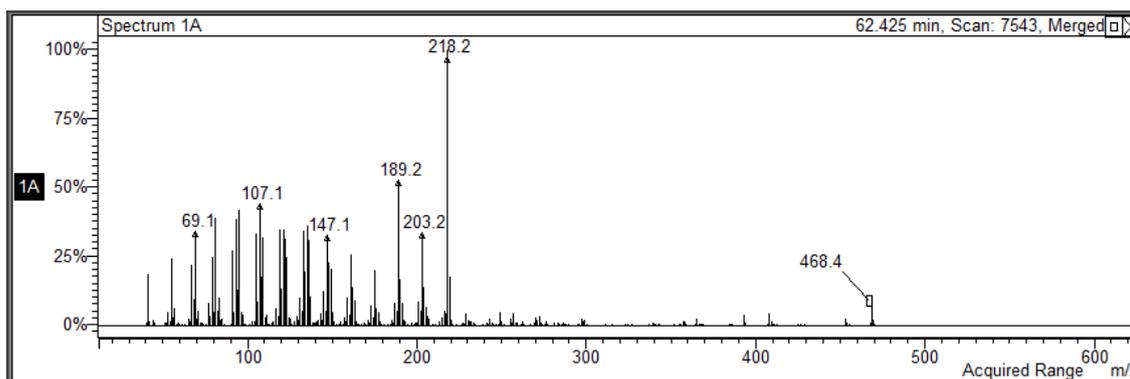
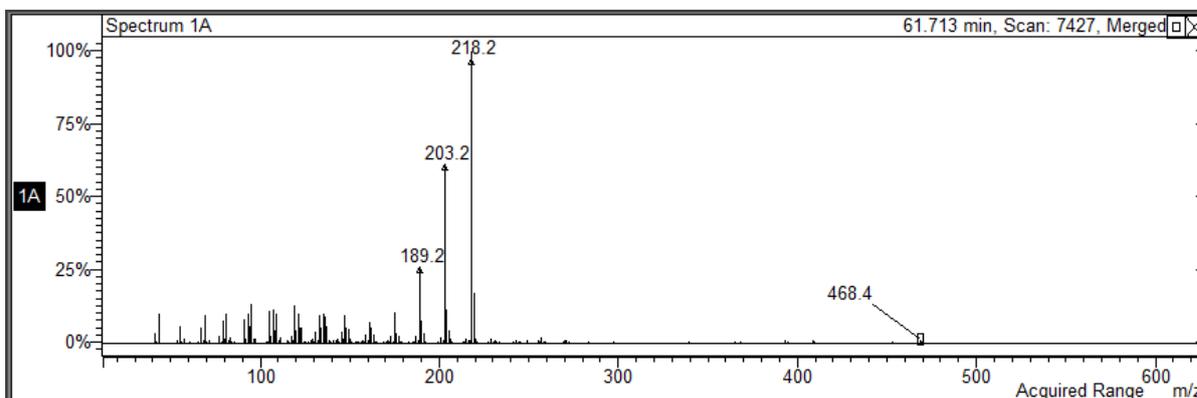
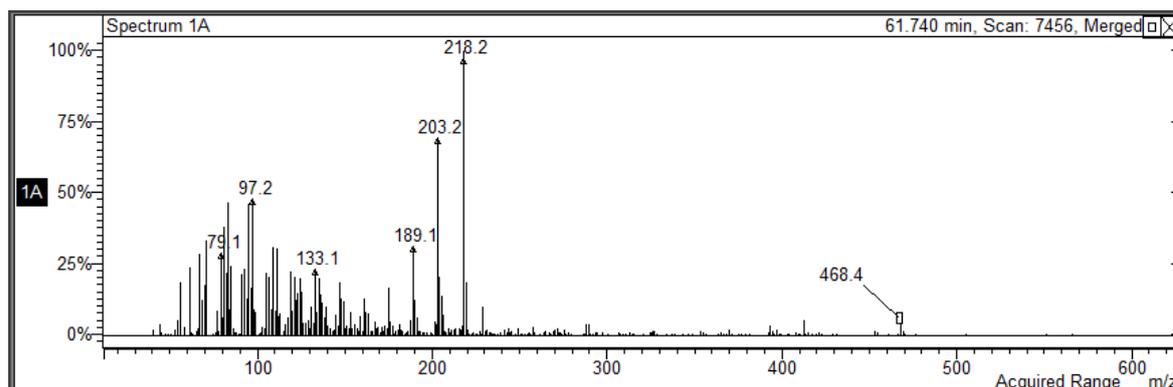


Figura 60: Comparação dos espectros da  $\beta$ -amirina acetilada no padrão e na amostra

### Espectro de Massas do padrão $\beta$ -amirina acetilada



### Espectro de Massas da amostra acetilada no tempo de retenção 61,740min



O íon molecular dos compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amirina quando acetilado, muda igualmente nos padrões e na amostra evidenciando o comportamento similar das moléculas submetidas as mesmas condições, corroborando assim com mais de uma evidência na confirmação da presença destes compostos na espécie *Plumbago scandens*.

Após confirmação utilizando a comparação dos tempos de retenção com padrão de  $\alpha$ -,  $\beta$  amirina, comparação dos espectros de massas e duas diferentes reações químicas, podemos afirmar que a espécie *Plumbago scandens* apresenta os triterpenos  $\alpha$ -,  $\beta$  amirina na sua composição química, ainda não encontrado em nenhum relato da literatura para a espécie *Plumbago scandens* como possível fonte desses triterpenos.

A presença dos triterpenos  $\alpha$ -,  $\beta$  amirina é uma descoberta interessantes pois esses compostos são encontrados em plantas medicinais e diversos estudos demonstram sua atividade biológica e potencial farmacológico. Investigações demonstram a aplicação da mistura  $\alpha$ ,  $\beta$  amirina como anti-inflamatório, como protetor gástrico, no tratamento de doenças hepáticas e anti tumoral. (BANDEIRA *et al*, 2007; VÁSQUES *et al*, 2012). Apesar de existirem 4 formas:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$  (alfa, beta, gama e delta) (Shan *et.al.*, 2015),  $\alpha$ - e  $\beta$ - amirina são as mais estudadas com diversas publicações demonstrando sua existência e potencial farmacológico.

#### 4.6.4 Fração número 26 do extrato hexânico PSEH 26

O cromatograma de corrente de íons totais proveniente da fração número 26 do extrato hexânico apresentou um pico majoritário no tempo de retenção 60,67 min, e um espectro característico de compostos da classe dos esteróis, em especial Sitosterol (Figuras 61 e 62) pela comparação com o espectro de massas da biblioteca *NIST* (National Institute of Standard and Technology). Existem estudos associados a presença do Sitosterol na espécie *Plumbago scandens* (PAIVA *et al*, 2011).

Figura 61: Cromatograma da fração PSEH 26

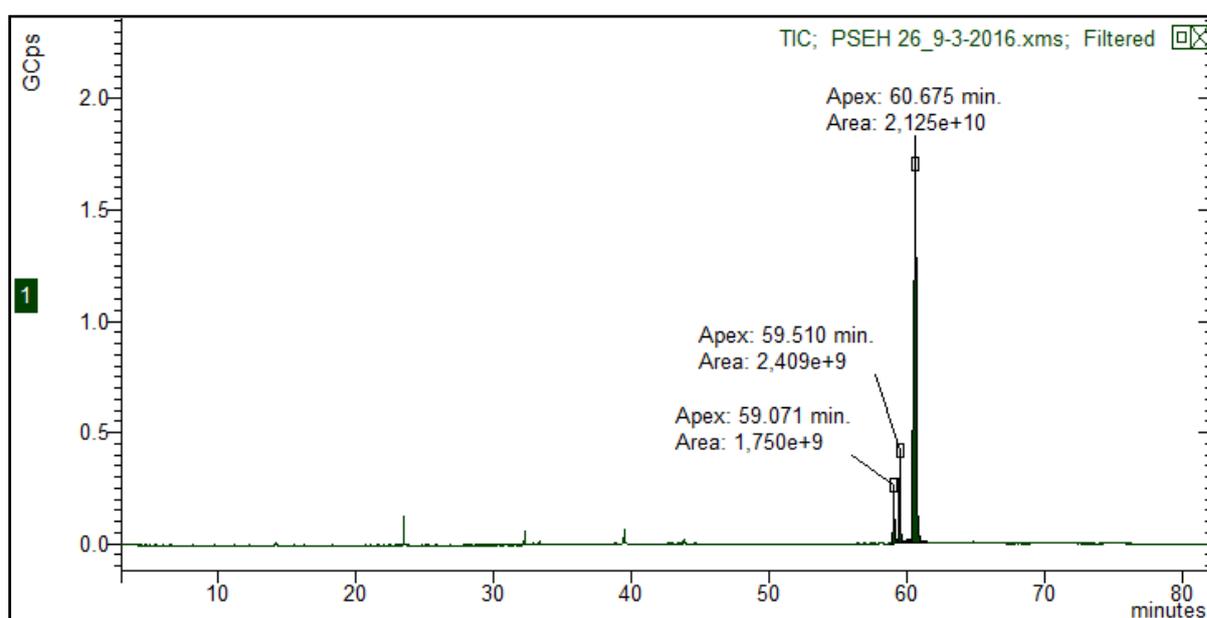
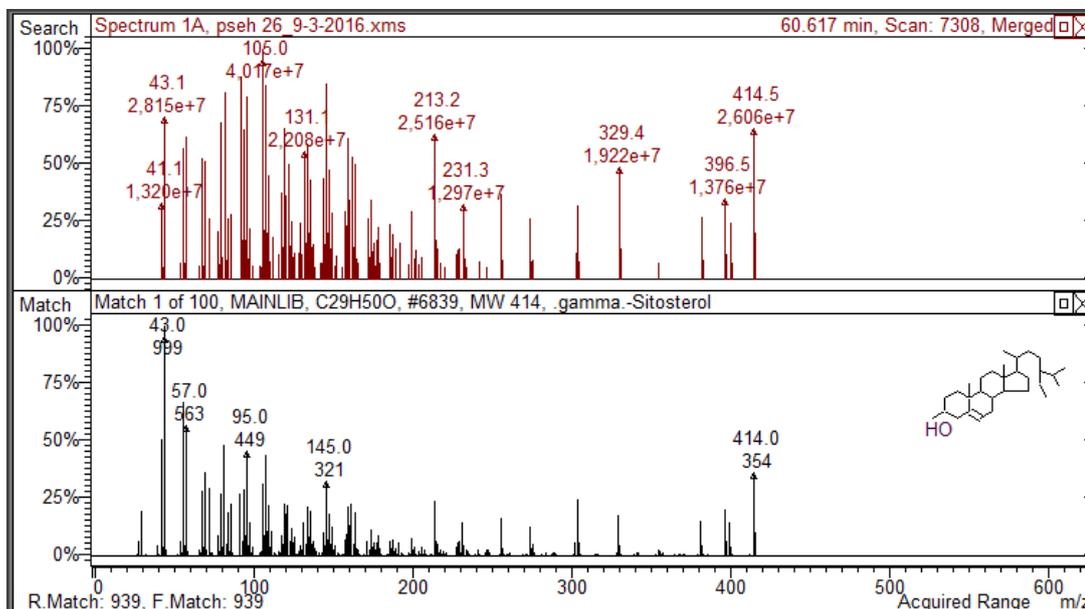


Figura 62: Espectro de massas do pico majoritário (60,67 min) da fração PSEH 26, em comparação ao espectro do gamma-Sitosterol (*NIST*)



Outros dois compostos presentes na fração 26, em menor quantidade, quando comparados seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca *NIST*, apresentam similaridade com os espectros do Campesterol (composto Tr: 59,07; Figura 61) e do Stigmasterol (composto Tr: 59,51; Figura 61)

Figura 63: Espectro de massas do composto com Tr: 59,07 min, da fração PSEH 26, em comparação ao espectro do Campesterol (*NIST*)

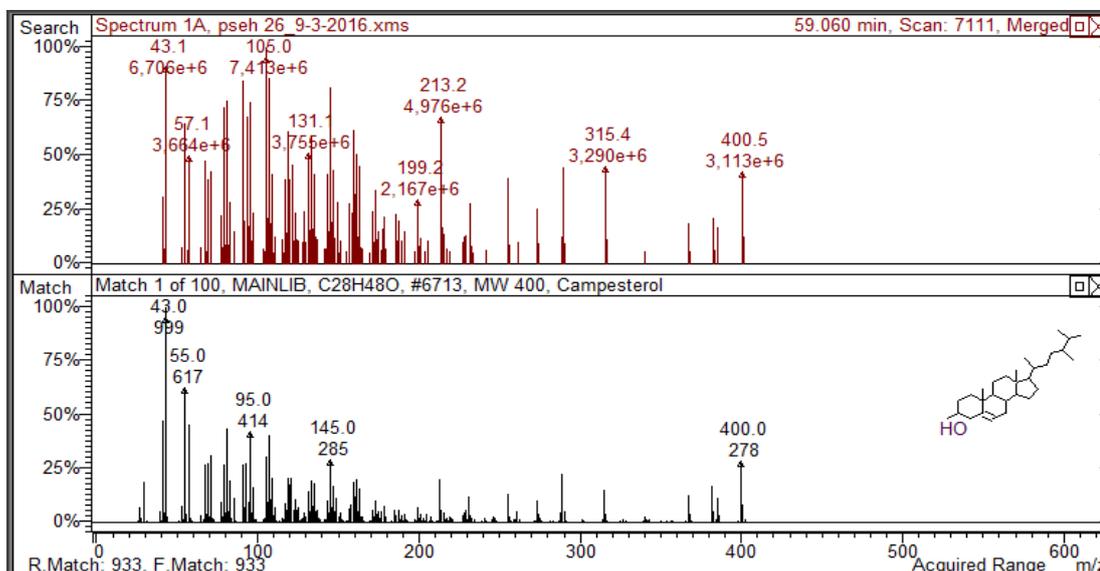
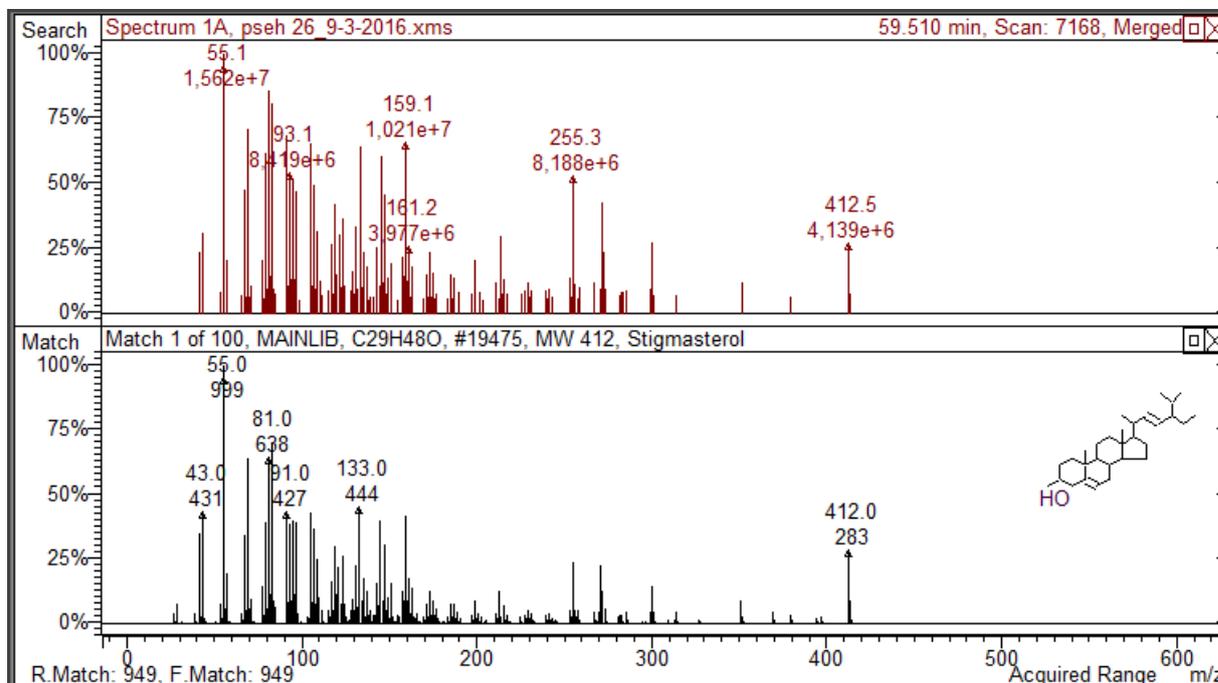


Figura 64: Espectro de massas do composto com Tr: 59,51 min, da fração PSEH 26, em comparação ao espectro do Stigmasterol (NIST)



A comparação dos espectros de massas indica a presença de 3 compostos esteróis nessa fração, sendo eles: Campesterol, Stigmasterol e Sitosterol. A presença desses esteróis em extratos de plantas é muito comum, uma vez que estes compostos estão presentes nas membranas celulares de espécies vegetais superiores, assumindo uma grande variedade de atividades biológicas específicas, em adição ao seus papéis como constituintes na bicamada lipídica (OLIVEIRA, 2007).

As propriedades biológicas dos fitosteróis, especialmente sua capacidade de reduzir o colesterol no sangue, são as principais razões para o uso destes compostos como ingredientes em alimentos (KOZLOWSKA et al., 2016). Além dessa aplicação, especialmente o  $\beta$ -sitosterol tem efeitos protetivos contra o câncer de mama, próstata e cólon (GONZALEZ LARENA et al., 2012)

## CONCLUSÕES

Ao final do estudo fitoquímico e da capacidade antioxidante da espécie *Plumbago scandens* chegou-se as seguintes conclusões:

- ✓ No estudo químico do extrato hexânico de *Plumbago scandens* seguintes compostos foram identificados e confirmados: Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), composto presente nas espécies do gênero *Plumbago*, já detectada na espécie estudada; Três compostos inéditos na espécie *Plumbago scandens*: Tocoferol (Vitamina E) e os triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ - amirina.
  
- ✓ Para o estudo da capacidade antioxidante da espécie *Plumbago scandens* no extrato acetato de etila, os teores encontrados de fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante foram superiores aos encontrados no extrato hexânico,

Além disso, esses teores também foram superiores aos relatados para espécie do mesmo gênero, *Plumbago zeylanica*. Para o extrato hexânico, concluiu-se que o ensaio de capacidade de sequestro do radical livre DPPH não é proporcional ao conteúdo fenólico e teor de flavonoides totais e que essa capacidade é proveniente dos compostos encontrados na fração hexânica, principalmente o Tocoferol, que é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares (Kay *et.al*, 1986). E desta forma pode-se concluir que a espécie *Plumbago scandens* pode ser considerada como fonte de antioxidantes naturais.

✓ Este estudo contribuiu para um maior conhecimento da espécie *Plumbago scandens*, tanto do ponto de vista químico quanto do potencial antioxidante da planta.

## FUTUROS TRABALHOS

Alguns resultados encontrados durante a pesquisa da composição química da espécie *Plumbago scandens* e que não foram possíveis serem amplamente estudados durante essa dissertação, merecem ser estudados em futuros trabalhos para confirmação da premissa apresentada nesse estudo.

O cromatograma de corrente de íons totais proveniente da fração número 35 do extrato de acetato de etila apresentou um composto com espectro de massas interessante no tempo de retenção 23,5 min, e foi identificado uma possível similaridade com uma benzofuranona (Apêndice F, pág. 111).

As benzofuranonas são pouco estudadas mas existem publicações apontando potenciais biológicos para essa molécula (GU *et al.*, 2007). Nenhuma

publicação o estudo demonstrou encontrar derivados de Benzofuranonas na espécie *Plumbago scandens*.

Na fração 3PSEH26, onde encontramos e confirmamos a presença dos compostos  $\alpha$ -,  $\beta$ - amirina, há a indicação de outro composto que não foi confirmado durante esse estudo e merece ser esclarecido. Nos cromatogramas e espectros de massas há a indicação da presença do composto  $\delta$ -amirina. Não há muitos estudos publicados sobre essa molécula (SHAN et al, 2015) e não há nenhuma publicação associando a presença desse composto na espécie *Plumbago scandens*.

## REFERÊNCIAS

<http://www.mar.mil.br/cgcfm/marambaia/>. Marambaia Corpo de Fuzileiros Navais. Visitado em 14 de novembro de 2015.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Restinga> Wikipédia. Visitado em 15 de setembro de 2016.

ABDENNACER, B.; KARIM, M.; YASSINE, M.; NESSINE, R.; MOUNA, D.; MOHAMED, B. *Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian Lycium intricatum*. Food Chemistry, v.174, p. 577-584, 2015.

AL-OWASI, M.; AL-HADIWI, N.; KHAN, S.A. *GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extract of Moringa peregrine Fiori leaves*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Oman, v.12, p. 964-970, 2014.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. *Compostos Fenólicos em alimentos: uma breve revisão*. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, v.66, n.1, p.01-09, 2007.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. *A method to measure antioxidant activity in organic media: application of lipophilic vitamins*. Redox Report, v. 5, nº 6, p. 365-370, 2000.

BAGG.C.; DEVI, P.G.; BHAIGYABATI, T. *Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of Manipur valley*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v.30, p. 154-159, 2015.

BANDEIRA, P; LEMOS, T; COSTA, S.; SANTOS, H. *Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina*. Revista Brasileira de Farmacognosia, V.17, p. 204-208, 2007.

BHATTACHARYYA, J.; CARVALHO, V.R. *Epi-Isoshinanolone from Plumbago Scandens*. Phytochemistry, v. 25, nº3, p. 764-765, 1986.

BOTHIRAJA, C.; JOSHI, P.P.; DAMA, G.Y.; PAWAR, A.P. *Rapid method for isolation of plumbagin, an alternative medicine from roots of Plumbago zeylanica*. European Journal of Integrative Medicine, nº3, p. 39-42, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food Science and Technology. v.18, p. 25-30, 1995.

BURIOL, L. et al. *Composição química e atividade biológica do extrato oleoso de Própolis: uma alternativa ao extrato etanólico*. Química Nova, v.32, n.2, p.296-302, 2009.

CHOI, J.; PARK, N.; LIM, H.; KO, Y.; KIM, Y.; RYU, S.; HWANG, I. *Plumbagin as a new natural herbicide candidate for *Sicyon angulatus* control agent with the target 8-amino-7-oxononanoate synthase*. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 103, p. 166-172, 2012.

CONG, H-J.; ZHANG S-W.; SHEN, Y.; ZHENG, Y.; HUANG, Y-J; WANG, W-Q; LENG, Y.; XUAN, L-J. *Guanidine Alkaloids from *Plumbago Zeylanica**. Journal of Natural Products, v. 76, p. 1351-1357, 2013.

COREY. E.J.; SCHIMIDT, G. *Useful procedures for the oxidation of alcohols involving Pyridinium Dichromate in aprotic media*. Tetrahedron Letters, n°5, p. 399-402, 1979.

DANDAWATE, P.; et al. *Anticancer phytochemical analysis 37: Synthesis, characterization molecular docking and cytotoxicity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells*. Bioinorganic & Medicinal chemistry letters, v. 24, p. 2900-2904, 2014.

DIAS, M.J.; HAMERSKI, L.; PINTO, A.C. *Separação semipreparativa de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência*. Química Nova, v. 34, n°4, 2011.

DINDA, B.; CHEL, G. *6-Hydroxiplumbagin, a naphthoquinone from *Plumbago indica**. Phytochemistry, v.31, n°10, p. 3652-3653, 1994.

FOGARASI, A.L.; KUN, S.; TANKÓ, G.; BÁNYIA, E.S.; VECSERY, B. *H.A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts*. Food Chemistry, v. 167, p. 1-6, 2015.

GONZALEZ-LARENA, M.; CILLA, A.; GUADALUPE, G-L.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M.J.; *Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.60, p. 4725-4734, 2012.

GU, Q; WANG, R.; ZHANG, X.; WANG, Y.; ZHENG, X.; ZHOU, J.; CHEN, J. *A New Benzofuranone and Anti-HIV Constituents from the Stems of Rhus chinensis* *Planta Med*; v. 73, p 279-282, 2007.

GUINAZI, M.; MILAGRES, R.C.R.M; SHAPIRO, S.S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. *Tocoferóis e Tocotrienóis em óleos vegetais e ovos*. *Química Nova*, v.32, n°8, p 2098-2103, 2009.

GUNATHERATH, G.M.K.B.; GUNATILAKA, A.A.L.; SULTANBAWA, M.U.S; BALASUBRAMANIAM, S. *1,2(3) Tetrahydro-3,3'-Plumbagin: A naphthalenone and other constituents from Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry*, v.22, n°25, p.1245-1247, 1983.

GUNATHERATH, G.M.K.B.; GUNATILAKA, A.A.L. *Structure of Plumbazeylanone: a novel trimer of Plumbagin from Plumbago zeylanica*. *Tetrahedron Letters*, v.25, n°42, p.4801-4804, 1986.

GUPTA, M.M.; VERMA, R.K., UNIYAL, G.C.; JAIN, S.P. *Determination of Plumbagin by normal-phase high performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography*, v. 637, p. 209-212, 1993.

GUPTA, A; GUPTA, A.; SINGH, J. *New Naphtoquinones from Plumbago zeylanica*. *Pharmaceutical Biology*, v.37, n°4, p. 321-323, 1999.

HSIEH, Y-J.; LIN, L-C.; TSAI, T-H. *Determination and identification of plumbagin from the roots of Plumbago zeylanica L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, v. 1083, p. 141-145, 2005.

ISRANI, S.A.; KAPADIA, N.S.; LAHIRI, S.K.; YADAV, G.K., SHAH, M.B. *An UV-Visible Spectrophotometric Method for the Estimation of Plumbagin*. *International Journal of ChemTech Research*, v. 2, n°2, p. 856-859, 2010.

JAIN, A.P.; et. al. *Quantification and Isolation of Plumbagin (Plumbago zeylanica Linn.) by High-Performance Thin-Layer Chromatography*. *Journal of Planar Chromatography*, v.27, n°3, p. 181-185, 2014.

JOSE B., SILJA P. K, DHANYA B. PILLAI, SATHREESHKUMAR K. *In vitro cultivation of hairy roots of Plumbago rosea L. in a customized Reaction kettle for the production of plumbagin—an anticancer compound*. *Industrial Crops and Products*, v.87, p.89-95, 2016.

KAEWBUMRUNG, S.; PANICHAYUPAKARANT, P. *Isolation of three antibacterial naphthoquinones from Plumbago indica roots and development of a validated quantitative HPLC analytical method.* Natural Product Research, v. 26, n°21, p. 2020 – 2023, 2012.

KAY, M.M.B; BOSMAN, G.J.C.G.M.; SHAPIRO, S.S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. *Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes.* Proceedings of the National Academy of Sciences, v.83, p.2463-2467, 1986.

KISHORE, N.; MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K.; TRIPATHI, V. *A novel Naphthoquinone from Plumbago zeylanica roots.* Chemistry of Natural Compounds, v.46, n°4, p. 517-519, 2010.

KOZLOWSKA, M.; GRUCZYNSKA, E.; SCIBISZ, I.; RUDZINSKA, M. *Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds.* Food Chemistry, v.213, p. 450-456. 2016.

LUGO, Y.O. *Estudo da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e proantocianidinas do extrato etanólico e composição química do óleo essencial de Diospyros hispida A. DC.* 61f, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2015.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. *Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.* Phytoterapy Research, v. 15, p.127-130, 2001.

MORAIS, L.C.S.L.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; FRANCO, C.I.F.; ALEMIDA, J.R.G.S.; ALMEIDA, R.N. *Antiparkinsonian-like effects of Plumbago scandens on tremorine-induced tremors methodology.* Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 79, p. 745-749, 2004.

NAIR, S.V.; BARANWAL, G.; CHATTERJE, M.; SACHU, A.; VASUDEVAN, A.K.; BOSE, C.; BANERJI, A.; BISWAS, R. *Antimicrobial activity of plumbagim, a naturally occurring naphthoquinone from Plumbago rosea, against Staphylococcus aureus and Candida albicans,* v. 306, p. 237-248, 2016.

NAYAK, P; SHARMA, M.; BEHERA, S.N.; THIRUNAVOUKKARASU, M.; CHAND, P.K. *High Performance Liquid Chromatographic quantification of Plumbagim from Transformed Rhizoclones of Plumbago zeylanica L.: Inter-Clonal Variation in*

*Biomass Growth and Plumbagin Production. Applied Biochemical Biotechnology*, v. 175, 1745-1770, 2015.

NILE, S.H.; KHOBRAGADE, C.N. *Antioxidant activity and flavonoids derivatives of Plumbago zeylanica*. *Journal of Natural Products*, v.3, p. 130-133, 2010.

NILE, S.H.; PARK, S.H. (2014) *Biologically active compounds from Plumbago Zeylanica. Chemistry of Natural Compounds*, v. 50, n° 5, 2014.

OHIRA, S.; YOKOGAWA, Y.; TSUJI, S.; MITSUI, T.; FUKUKAWA, T.; HAYASHI, K-I; KUBOKI, A.; MATSUURA, N.; LINUMA, M.; NOZAKI, H. *New Naphthoquinone and Monoterpenoid from Plumbago zeylanica*. *Tetrahedron Letters*, v. 55, p. 6554-6556, 2014.

OLIVEIRA, A.; *Microencapsulamento de Estigmasterol proveniente de Musa paradisiaca L., Musaceae*. 132f, Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2007.

ORLANDA, J.; VALE, V. *Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de Euphorbia tirucalli Linneau (Euphorbiaceae)*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, n.4, p.730-736, 2015.

PAIVA, S.R.; FONTOURA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R.; MAZZEI, J.L.; KAPLAN, M.A.C. *Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: Plumbago scandens L. e Plumbago auriculata LAM.* *Química Nova*, v. 25, n°5, p. 717-721, 2002.

PAIVA, S.R.; LIMA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. *Plumbagin quantification in roots of Plumbago scandens L. obtained by different extraction techniques*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.76, n°3, p. 499-504, 2004.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. *Estudo fitoquímico de Plumbago auriculata Lam.* *Revista Fitos*, v.1, n°2, 2005.

PAIVA, S.R.; LIMA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. (2011) *Chemical composition fluctuations in roots of Plumbago scandens L. in relation to floral development*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.83, n°4, p. 1165-1170, 2011.

PAIVA, T.L. *Otimização de procedimentos analíticos para avaliação de atividade antioxidante de extratos vegetais*, 50f, Projeto final de curso, Bacharel em Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

PAVELA, R. *Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, Muscadomestica L.* Industrial Crops and Products, v.43, p. 745-750, 2013.

PHILLIPS, D.R.; RASBERY, J.M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S.P.T. *Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization.* Current Opinion in Plant Biology, v.9, p. 304-314, 2006.

PRADEEPA, V.; SENTHIL-NATHAN, S.; NARAYANAN, S.; SELIN-RANI, S.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; THAGINGAIVEL, A.; PONSANKAR, A.; EDWIN, E.; SAKTHI-BAGAVATHY, M.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K.; DURAI PANDIYAN, V.; AL-DHABI, N. *Potential mode of action of a novel plumbagin as a mosquito repellent against the malarial vector Anopheles stephensi, (Culicidae: Diptera).* Pesticide Biochemistry and Physiology, Article in press, 2016.

PRAVIN, B.; TUSHAR, D.; VIJAY, P.; KISHANCHAD, K. *Review of Plumbagin Obtained from Plumbago zeylanica Linn.* International of Journal of Pharmaceutical Sciences and Review, v.18, n°16, p-116-120, 2013.

RIET-CORREA, F; BEZERRA, C.W.C; MEDEIROS, R.M.T. *Plantas Tóxicas do Nordeste*. Paraíba: Sociedade Vicente Palotti Editora, 2011.

RODRIGUES, I.V. *Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinético de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e seus metabólitos in vivo*, 122f, Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014.

RODRIGUES, S.V.; VIANA, L.M.; BAUMANN, W. *UV/VIS Spectra and solubility of some naphthoquinones, and the extraction behavior of plumbagin from Plumbago scandens roots in supercritical CO<sub>2</sub>.* Analytical Bioanalytical Chemistry, v. 385, p. 895-900, 2006.

SÁ, P.; GUIMARÃES, A.; OLIVEIRA, A.; FILHO, J.; FONTANA, A.; DAMASCENO, P.; BRANCO, C.; ALMEIDA, J. *Fenóis totais, flavonóides totais e atividade antioxidante de Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae).* Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada, v. 33, p. 561-566, 2012.

SANKARAM, A.V.B.; SRINIVASARAO, A.; SIDHU, G.S. Chitranone: a new binaphthoquinone from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry*, v. 15, p. 237-238, 1975.

SHAN, H.; WILSON, W.K; CASTILLO, D.A.; MATSUDA, S.P.T. *Are Isoursenol and  $\gamma$ -Amirin rare triterpenes in nature or simply overlooked by usual analytical methods?* *Organic Letters*, v.17, p. 3986-3989, 2015.

SILJA, P.K.; SATHEESHKUMAR, K. *Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Plumbago rosea* and enhanced plumbagin production through elicitation.* *Industrial Crops and Products*, V. 76, p. 479-486, 2015.

SOUSA, C.; SILVA, H.; VIEIRA-Jr, G.; AYRES, M.; COSTA, C.; ARAÚJO, D.; CAVALCANTE, L.; BARROS, E.; ARAUJO, P.; BRANDÃO, M.; CHAVES, M. *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.* *Química Nova*, V. 30, No. 2, p. 351-355, 2007.

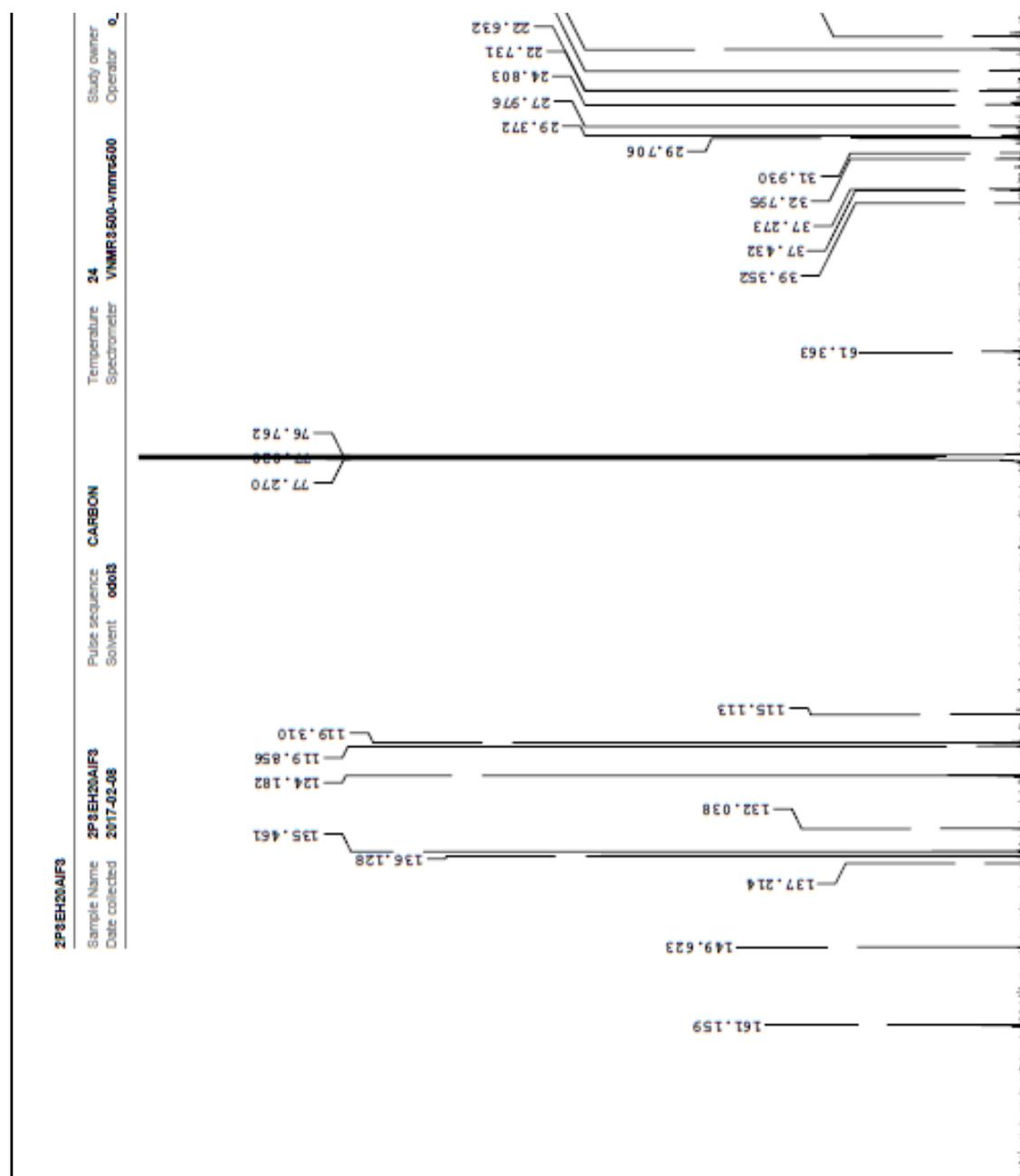
SUNIL, C; DURAI PANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. *Antidiabetic effect of plumbagin isolated from *Plumbago zeylanica* L. root and its effect on GLUT4 translocation in streptozotocin-induced diabetic rats.* *Food and Chemical Toxicology*, V. 50, P. 4356-4363, 2012.

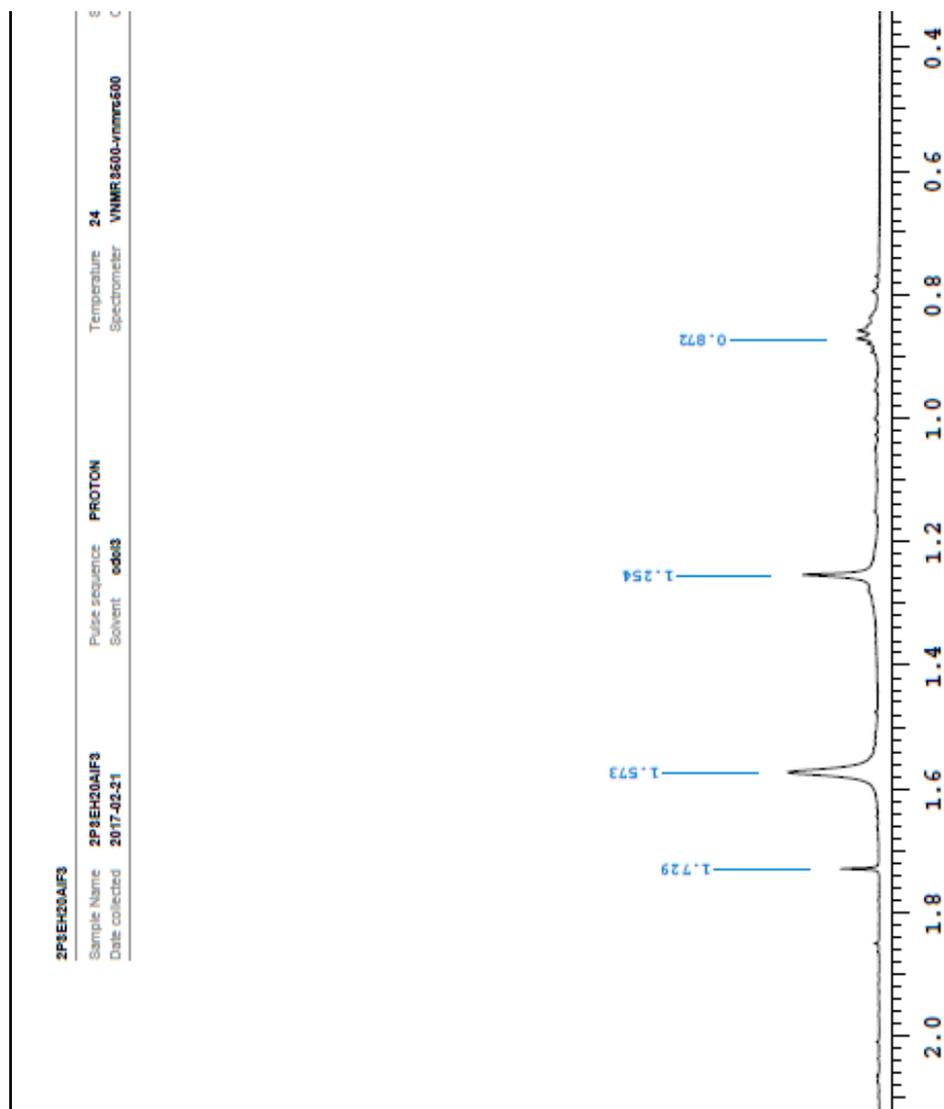
TAN, M.; LIU, Y.; LUO, X.; CHEN, Z.; LIANG, H. *Antioxidant activities of Plumbagin and its Cu (II) complex.* *Bioinorganic Chemistry and Application*, v.2011, 2011.

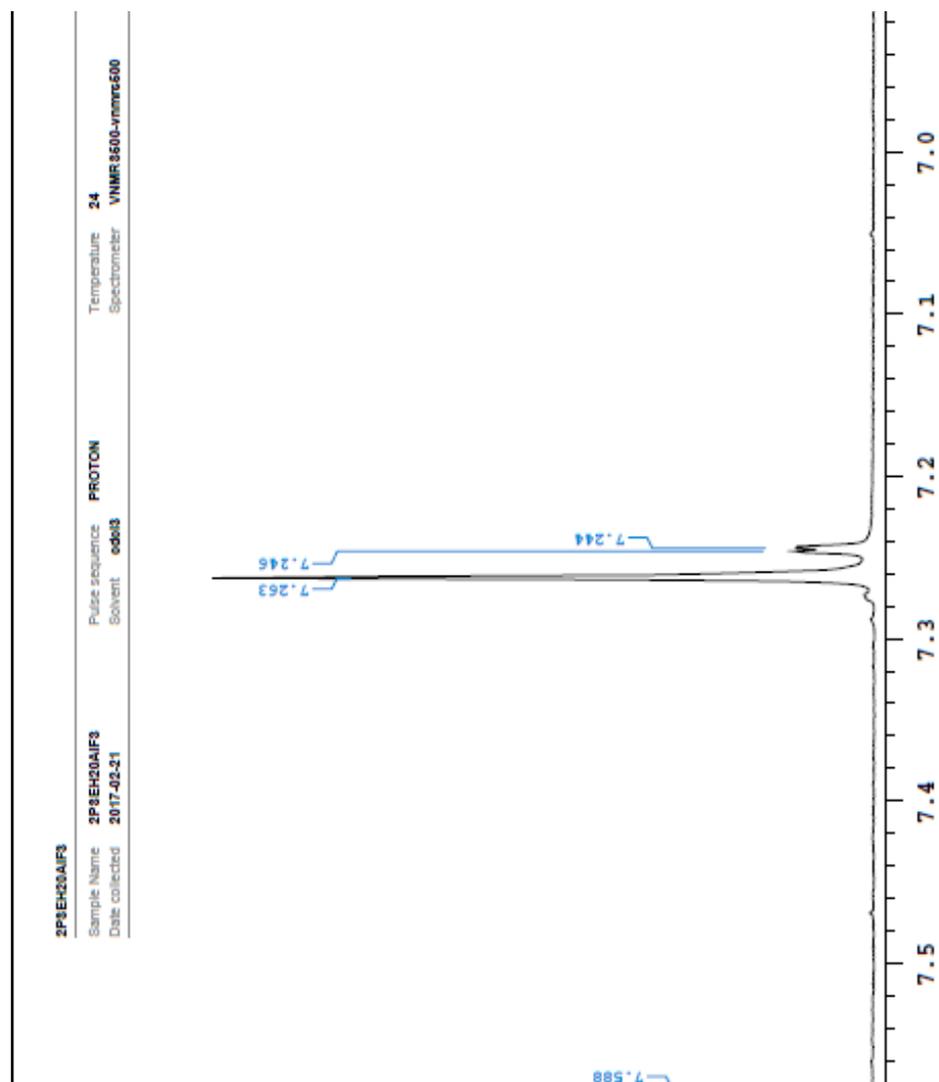
VÁSQUEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. *The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities.* *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-pentacyclic-triterpenes-amyryns-a-review-of-sources-and-biological-activities>, 2012.

ZHANG, R.; SHEN, W.; WEI, X.; ZHANG, F.; SHEN, C.; WU, B; ZHAO, Z.; LIU, H.; DENG, X. *Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by GC-MS.* *Analytical Methods*, Issue 40, 2016.

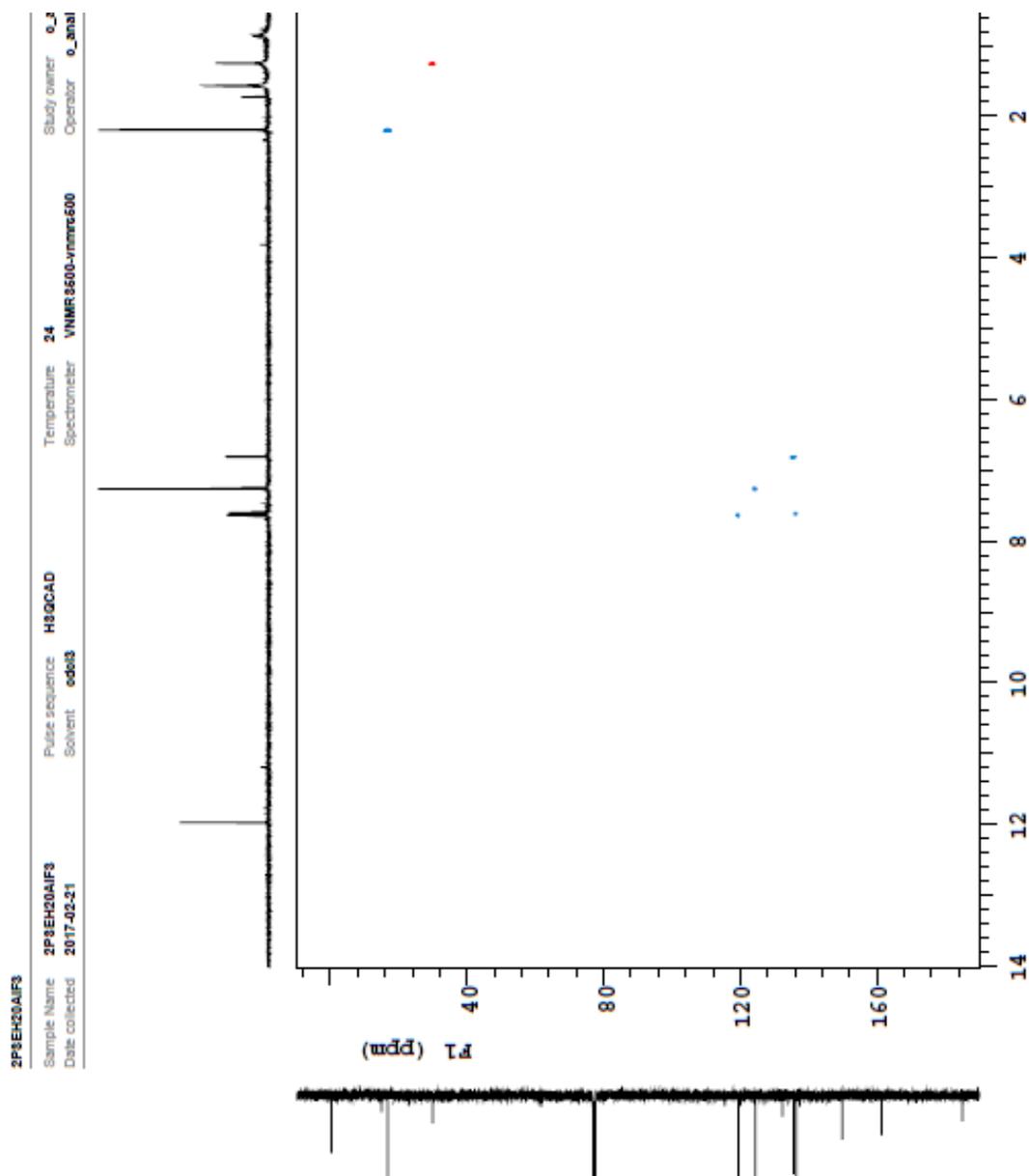
APÊNDICE A -Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  obtido da fração PSEH 20 AIF3

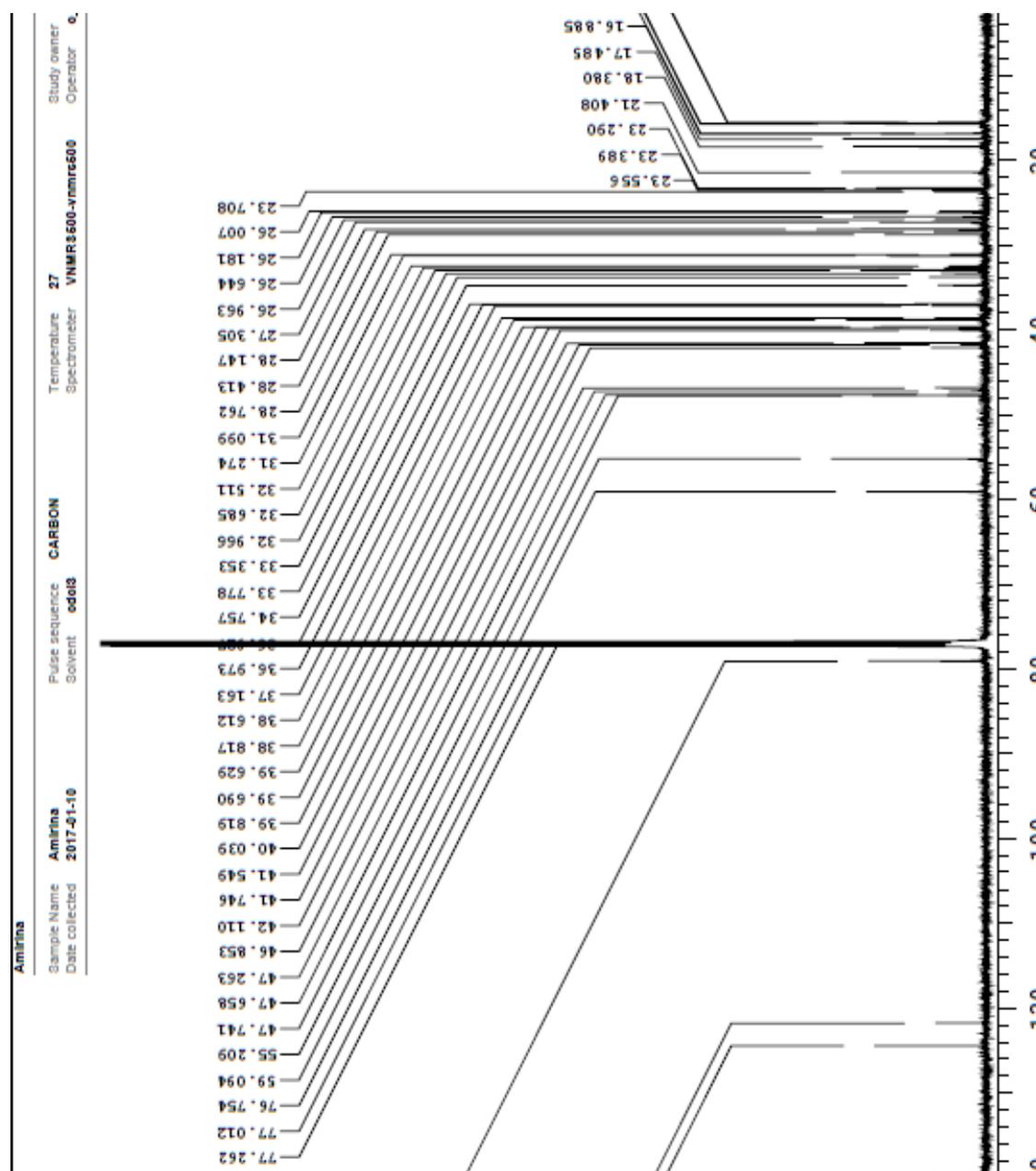


APÊNDICE B- Espectro RMN  $^1\text{H}$  expandido A obtido da fração PSEH 20 AIF3

APÊNDICE C- Espectro RMN <sup>1</sup>H expandido B obtido da fração PSEH 20 AIF3

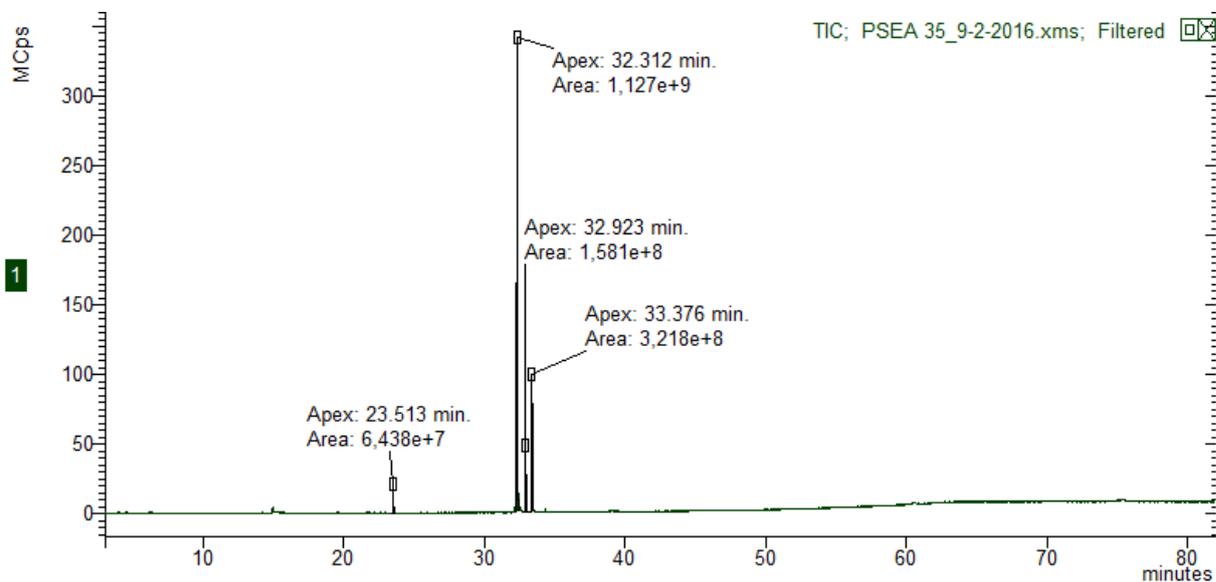
## APÊNDICE D –HSQC da fração 3PSEH 20 AIF3 purificada



APÊNDICE E –Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  obtido da resina Amirínica

## APÊNDICE F - Cromatograma e espectro de massas da fração PSEA 35

- Cromatograma de corrente de íons totais da fração PSEA 35



- Espectro de massas do composto Tr 23,5min da fração PSEA 35, em comparação ao espectro de um derivado de benzofuranona (*NIST*).

