

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química**



**FLAVONÓIDES DAS FOLHAS DE *Eugenia
jambolana* Lamark (MYRTACEAE) E SUAS
PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS**

**Aluna: Ana Karina Timbola
Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
Co-orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli
Florianópolis, Abril de 2002.**



03739572

ANA KARINA TIMBOLA

FLAVONÓIDES DAS FOLHAS DE *Eugenia jambolana* Lamark (MYRTACEAE) E SUAS PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina QMC 5231 – Estágio Supervisionado, do Curso de Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, desenvolvido no Semestre 2001.2.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti.

Co-orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

Florianópolis, Abril de 2002.

* Parte dos resultados aqui apresentados foram aceitos para publicação na *Periódico Fitoterapia*¹⁶.

*“O estudo foi para mim o remédio soberano
contra os desgostos da vida, não havendo nenhum
desgosto de que uma hora de leitura não me tenha
consolidado”. (Montesquieu)*

*Dedico este trabalho aos meus pais Genuino
e Eva, e ao meu irmão Robson .*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado em um ambiente multidisciplinar do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. A parte inicial foi feita no Laboratório de Química de Produtos Naturais (Laboratório 307), coordenado pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti. Os estudos eletroquímicos foram desenvolvidos no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA), situado no laboratório 310 do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Prof. Dr. Almir Spinelli.

A Deus.

Ao Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti por sua brilhante orientação, sua valiosa amizade, sua dedicação, seu respeito, e por se apresentar como uma grandiosa fonte de preciosos conselhos e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Almir Spinelli por sua amizade, seus ensinamentos e pela oportunidade em realizar as análises eletroquímicas no GEPEEA.

Ao Professor Dr. Franco Delle Monache da Università Cattolica Del Sacro Cuore de Roma pelas análises espectroscópicas e valiosas discussões que muito contribuíram na identificação do flavonóide glicosídico acetilado.

Ao Professor Dr. Alessandro Branco por sua amizade, seus conselhos, sua colaboração e incentivo.

Ao Professor Dr. Ademir Reis pela identificação botânica da espécie vegetal estudada.

Ao amigo Cristiano Giacomelli por seus conselhos, pela oportunidade e pela colaboração nas inúmeras discussões sobre os resultados, na elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais: Anildo, Gilberto, Rodrigo, Verdi, Wagner, Francisco, Eliandra, Ana Beatriz, Okima, Carina e Professora Inês.

Aos amigos do GEPEEA: Fernando, Rodolfo, Cristiano, Cristiane.

Aos meus ilustres amigos: Cristiano, Rodrigo, Fabio, Luciano, Adriana, Andreia, Janaína, Lilian e Bianca pelos inesquecíveis dias de nossa vida acadêmica.

A todos os amigos do Curso de Química da Universidade Federal de Santa Catarina que de alguma forma participaram desta importante etapa da minha vida.

A todos os Professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina que ao meu ver colaboraram na soma dos conhecimentos adquiridos durante esta jornada.

Ao Programa de Iniciação Científica da Universidade Federal de Santa Catarina, BIP/PIBIC/CNPq – UFSC, pela Bolsa de Iniciação Científica concedida.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	v
Índice de Espectros	vi
Abreviaturas	vii
Constituintes químicos isolados do extrato de acetato de etila das folhas de <i>Eugenia jambolana</i> Lamark (Myrtaceae)	viii
Esquema demonstrativo da obtenção dos extratos	ix
Esquema do F. C. do extrato de acetato de etila	x
Resumo	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A espécie <i>Eugenia jambolana</i> Lamark (Myrtaceae)	1
1.2. Considerações gerais sobre flavonóides	2
2. OBJETIVOS	6
3. PARTE EXPERIMENTAL	7
3.1. Coleta e identificação da espécie vegetal <i>Eugenia jambolana</i> Lamark (Myrtaceae)	7
3.2. Obtenção dos extratos	7
3.3. Métodos cromatográficos	7
3.4. Fracionamento cromatográfico do extrato de acetato de etila	8
3.5. Análises espectroscópicas	11
3.6. Análises eletroquímicas	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Compostos isolados do extrato de acetato de etila das folhas de <i>E. jambolana</i>	14
Identificação do flavonóide glicosídico acetilado miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4)	15
4.2. Propriedades eletroquímicas em meio hidroalcoólico	17
Influência do pH	19
Influência da velocidade de variação de potencial (v)	20
Influência de modificações no potencial de inversão anódico ($E_{\lambda,a}$)	22
Efeito da estrutura química sobre a reação química homogênea irreversível acoplada ao processo I	23
Mecanismo proposto para a eletro-oxidação da quercetina em meio hidro-alcoólico	24
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO I: ESPECTROS	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo fundamental de flavonóides.	2
Figura 2. Esquema da rota biossintética para flavonóides.	3
Figura 3. Estrutura química dos flavonóides estudados por métodos eletroquímicos	5
Figura 4. Voltamogramas cíclicos para os flavonóides 2-5 em solução hidro-alcoólica 50/50 (v/v) ($C_{\text{vítreo}}$, [flavonóides] = 0,8 mmol.dm ⁻³ , pH _{final} = 7,4; ν = 100 mV.s ⁻¹).	17
Figura 5. Voltamogramas cíclicos para a quercetina 0,8 mmol.dm ⁻³ e ν = 100 mV.s ⁻¹ em diferentes pH.	19
Figura 6. Variação de E_p^I e E_p^{II} em função do pH; [quercetina] = 0,8 mmol.dm ⁻³ e ν = 100 mV.s ⁻¹ .	20
Figura 7. Voltamogramas cíclicos para a quercetina 0,8 mmol.dm ⁻³ em pH = 7,4 para diferentes velocidades de variação de potencial.	21
Figura 8. Variação de E_p^I e i_p^I em função de log. ν ; dados extraídos da figura 7 ([quercetina] = 0,8 mmol.dm ⁻³ ; pH = 7,4).	21
Figura 9. Voltamogramas cíclicos para a quercetina 1,4 mmol.dm ⁻³ obtidos em pH (-) 1,5 e (-) 7,4 para ν = 50 e 250 mV.s ⁻¹ em meio hidro-alcoólico.	23
Figura 10. Voltamogramas cíclicos para o ácido cafeico 0,8 mmol.dm ⁻³ em pH 2,0 e 8,5; ν = 5 mV.s ⁻¹ ; eletrodo de C vítreo.	23
Figura 11. Variação da razão i_{pc}^I/i_{pa}^I em função da velocidade de variação de potencial para os compostos estudados.	24
Figura 12. Mecanismo preliminar proposto para a eletro-oxidação da quercetina em meio hidro-alcoólico sobre um eletrodo de carbono vítreo.	26

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Eluentes utilizados no F. C. do extrato de acetato de etila.	9
Tabela 2. Eluentes utilizados na Coluna A (Fração 62 a 66).	9
Tabela 3. Eluentes utilizados na Coluna B (Fração 13-A a 14-A).	10
Tabela 4. Eluentes utilizados na Coluna C (Fração 9-B a 20-B).	10
Tabela 5. Eluentes utilizados na Coluna D (Fração 3-C a 10-C).	11

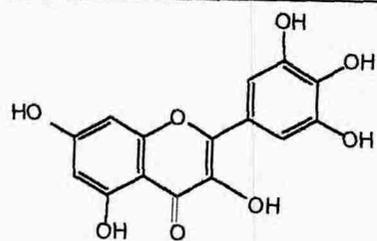
ÍNDICE DE ESPECTROS

- Espectro 1.** Espectro de IV da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4), em pastilha de KBr. 31
- Espectro 2.** Espectro de RMN¹H (200 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4). 32
- Espectro 3.** Espectro de RMN¹³C (50 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4). 33
- Espectro 4.** Espectro de DEPT (50 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4). 34
- Espectro 5.** Espectro de RMN¹H (300 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4), na região de 1 a 7 ppm. Nas figuras inseridas estão as ampliações. 35
- Espectro 6.** Espectro de RMN¹H (300 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4), na região de 3,4 a 5,4 ppm. Nas figuras inseridas estão as ampliações. 36
- Espectro 7.** Espectro de RMN¹³C/APT (75 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4), na região de 110 a 180 ppm. 37
- Espectro 8.** Espectro de RMN¹³C/APT (75 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4), na região de 10 a 100 ppm. 38
- Espectro 9.** Espectro de HETCOR (¹H - ¹³C) em Acetona deuterada da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4). 39
- Espectro 10.** Espectro de HETCOR LONG RANGE (¹H - ¹³C) em Acetona deuterada da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4). 40

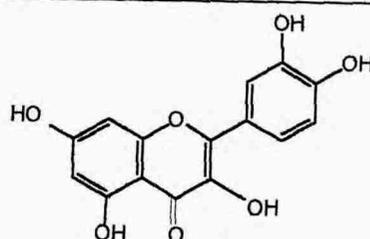
ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
n-BuOH	n-Butanol
EtOH	Etanol
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
MeOH	Metanol
<i>p. f.</i>	Ponto de Fusão
<i>F. C.</i>	Fracionamento Cromatográfico
<i>R. f.</i>	Índice de Retenção em TLC
TLC	Cromatografia de Camada Delgada
MHz	Megahertz
<i>s</i>	Singleto
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>t</i>	Triplete
<i>J</i>	Constante de acoplamento
TMS	Tetrametilsilano
δ	Deslocamento Químico
IV	Infravermelho
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
DEPT	“Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização”
APT	“Teste dos hidrogênios ligados”
HETCOR	“Correlação de Deslocamento Químico Heteronuclear”
EC _i	“Eletroquímico-químico Irreversível”
<i>E_p</i>	“Potencial de Pico”
<i>i_{pa}</i>	“Corrente de Pico Anódico”
<i>i_{pc}</i>	“Corrente de Pico Catódico”
VCs	“Voltamogramas Cíclicos”

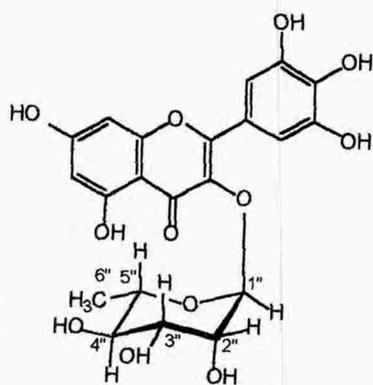
**CONSTITUENTES QUÍMICOS ISOLADOS DO EXTRATO
DE ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE
Eugenia jambolana Lamark (Myrtaceae)**



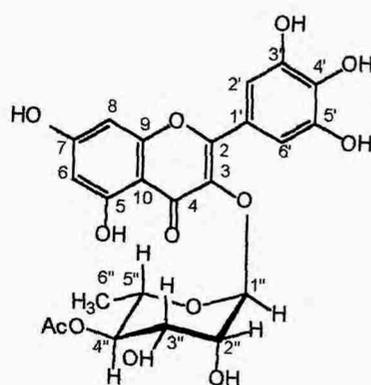
miricetina (1)



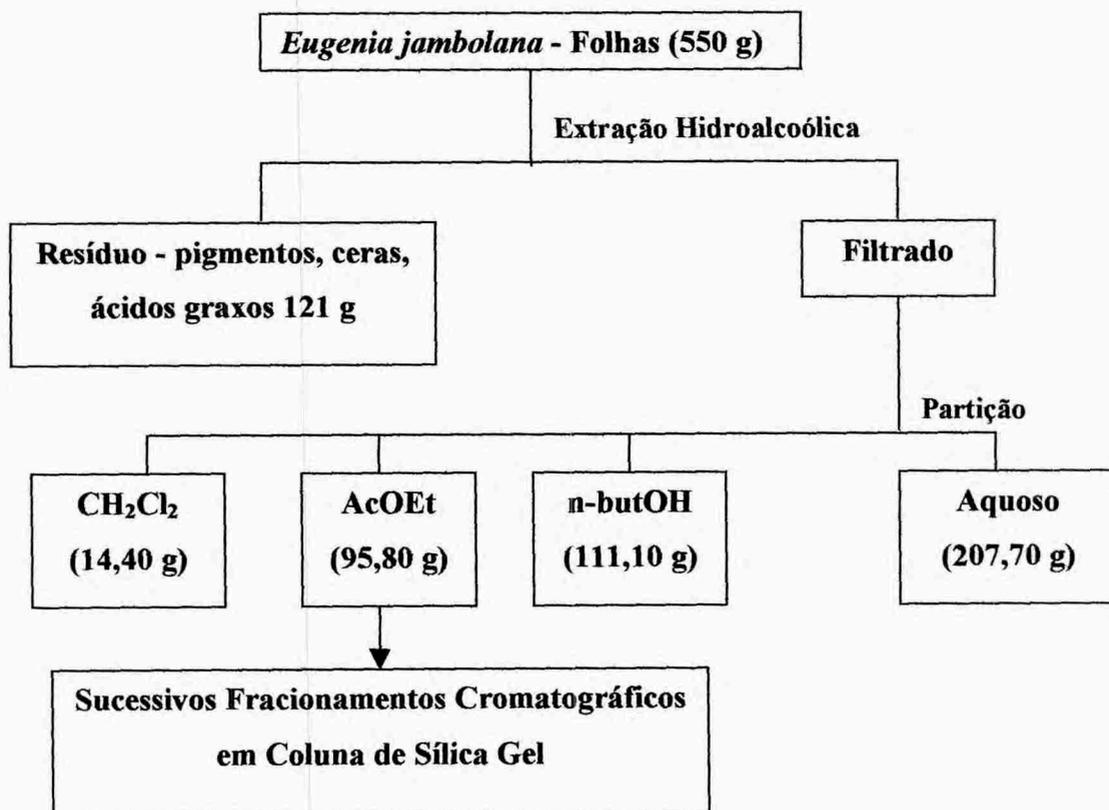
quercetina (2)

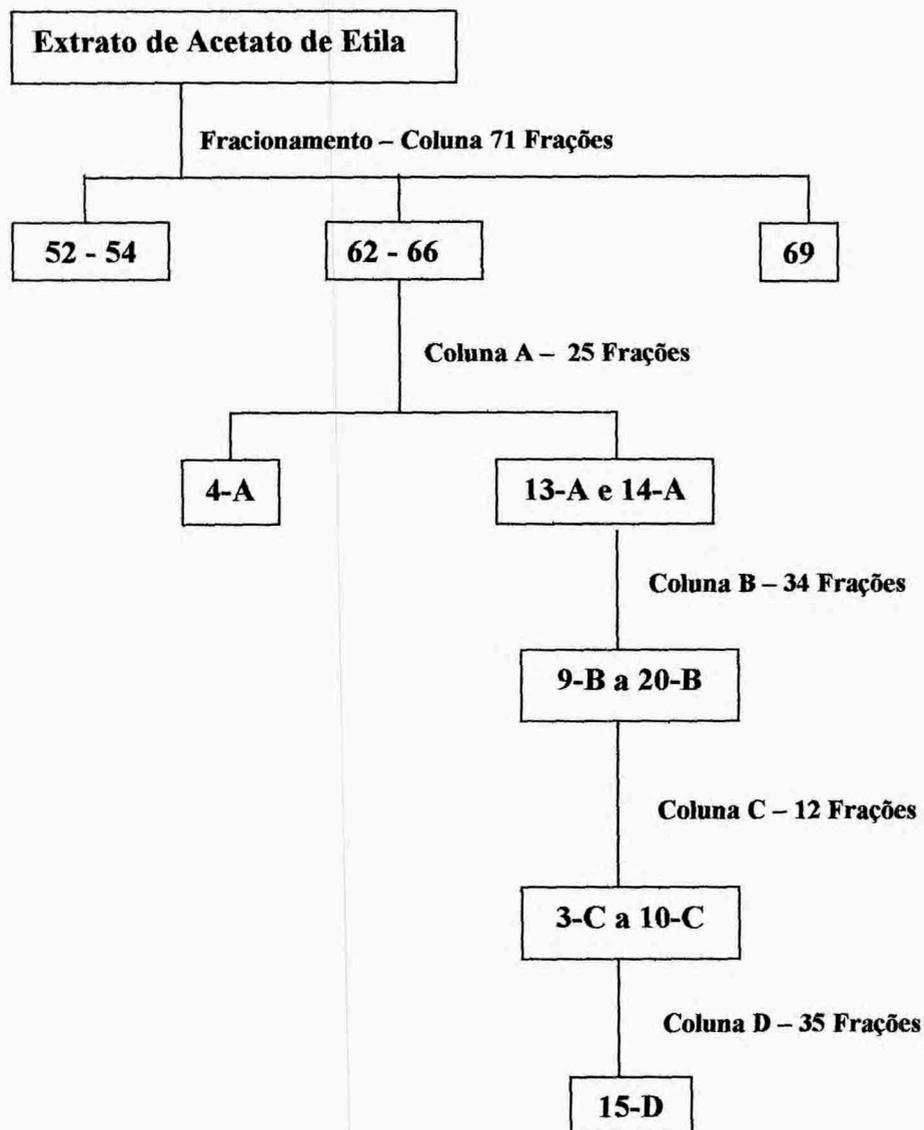


miricitrina (3)

miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4)

ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS



ESQUEMA DO F. C. DO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA

RESUMO

Este trabalho descreve o isolamento, a purificação e a caracterização de quatro constituintes químicos presentes no extrato acetato de etila das folhas de *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae). Esta espécie, comumente conhecida como “jambolão”, é uma árvore ornamental encontrada em regiões tropicais e subtropicais do continente americano. Apresenta destacada importância na medicina popular devido ao uso da polpa do fruto como adstringente, diurético, digestivo e antidiabético. Dentre os constituintes químicos anteriormente isolados desta espécie podemos citar flavonóides glicosilados e triterpenos nas folhas, antocianidinas nos frutos, ácido oleanólico nas flores e óleos essenciais nas folhas, sementes e frutos. Todos os compostos foram caracterizados por análises espectroscópicas de IV, RMN¹H, RMN¹³C, RMN¹³C/DEPT, RMN¹³C/APT, HETCOR e HETCOR LONG RANGE e por comparação com os dados noticiados pela literatura.

Em adição, descrever-se-á o comportamento eletroquímico preliminar de quatro flavonóides - quercetina (**2**), miricitrina (**3**) e miricetina 3-O-(4''-acetil) α -L-rhamnopiranosídeo (**4**) isolados e devidamente caracterizados e o padrão quercetina 3-O-glicosídeo (**5**) - em meio hidro-alcoólico, com ênfase para o efeito da estrutura química no perfil voltamétrico. Um mecanismo de eletro-oxidação é proposto para **2** com base no efeito substituinte em C-3 e nos dados cinéticos obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos. Destaque para **2** e **5**, cujos catecóis são oxidados em potenciais próximos a 0,15 V/ECS, originando as quinonas correspondentes. Em seguida há um rearranjo intramolecular devido ao ataque nucleofílico do oxigênio ligado em C-3 ao C-6', seguido por tautomerização ceto-enólica. Os flavonóides **3** e **4** seguem um mecanismo de oxidação semelhante.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se observado um aumento significativo na procura por tratamentos alternativos para diversas patologias. Dentre estes tratamentos pode-se destacar a utilização da Fitoterapia como complemento aos tratamentos convencionais ou até mesmo substituindo-os. Isto pode estar, ou não, associado a fatores sócio-econômicos e culturais¹. A biodiversidade do Reino Vegetal constitui um verdadeiro arsenal terapêutico, do qual já foram extraídos vários fármacos reconhecidamente eficazes e seguros. Ácido salicílico (analgésico), morfina (analgésico narcótico), efedrina (adrenomimético), ergotamina (contra enxaqueca), guaiacol (expectorante), quelina (antiasmático) e quinina (antimalárico) são alguns exemplos de maior sucesso da contribuição da Fitoterapia à qualidade de vida².

Apesar disso, existe na imensa flora brasileira, um número incontável de plantas que apresentam propriedades terapêuticas ainda não comprovadas cientificamente. Para que estas plantas possam ser utilizadas de forma racional, eficaz e segura é necessário o desenvolvimento de estudos nesta área. Muitas vezes, plantas medicinais consideradas benéficas e até mesmo "milagrosas" podem tornar-se motivo de sérias preocupações devido a seus efeitos adversos ou tóxicos, decorrentes de seu uso indiscriminado^{3,4}.

Portanto, o estudo das propriedades químicas, farmacológicas e da correlação estrutura-atividade dos princípios ativos oriundos de plantas medicinais é um fator indispensável para garantir sua eficácia bem como para comprovar seu potencial terapêutico⁵.

1.1. A Espécie *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae)

A família Myrtaceae abrange cerca de 75 gêneros com aproximadamente 3000 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. Dentre os gêneros desta família destaca-se o gênero *Eugenia* com cerca de 600 espécies, das quais aproximadamente 400 são encontradas em território brasileiro⁶. Algumas são utilizadas na medicina popular para diversas finalidades terapêuticas, apresentando propriedades tais como: antimicrobiana, anti-hipertensiva, antiinflamatória, anti-reumática, antifebril, antidiarréica, digestiva e diurética⁷. Investigações fitoquímicas destas espécies revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários, tais como flavonóides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, esteróis e taninos^{8,9}.

A espécie vegetal *Eugenia jambolana*, popularmente conhecida como jambolão, é uma árvore ornamental comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais do continente americano¹⁰. Tem destacada importância na medicina popular, devido ao uso da polpa dos frutos como adstringente, diurético, digestivo e antidiabético¹¹. Dentre os constituintes anteriormente isolados desta espécie podemos citar flavonóides glicosilados⁷ e triterpenos¹² nas folhas, antocianidinas nos frutos¹³, ácido oleanólico nas flores¹⁴ e óleos essenciais nas folhas, sementes e frutos¹⁵.

Até o presente trabalho a literatura não relatava a presença de flavonóides glicosídicos acetilados nas folhas de *Eugenia jambolana*^{16,17}, bem como o comportamento eletroquímico detalhado em meio “tipo-aquoso” de flavonóides¹⁸.

1.2. Considerações Gerais sobre Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante e diversificada classe de metabólitos secundários com vasta ocorrência na natureza. Apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$)². A figura 1 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e a numeração dos átomos de carbono com a denominação de cada anel.

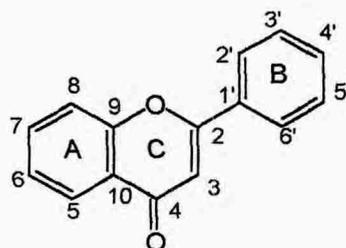


Figura 1. Núcleo fundamental dos flavonóides.

De um modo geral, estes compostos diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, além da presença ou não da dupla ligação e da carbonila no anel C. Além disso, podem ser encontrados derivados glicosilados, metilados, acetilados, prenilados ou sulfatados¹⁹.

Da biossíntese geral dos flavonóides participam como intermediários fundamentais, a *p*-cumaroil-CoA e três unidades de malonil-CoA para alongar a cadeia lateral da unidade fenilpropanoídica original. O fechamento do anel A produz a estrutura da chalcona e a reação

seguinte fecha o anel B²⁰. A figura 2 mostra um esquema da rota biossintética para flavonóides.

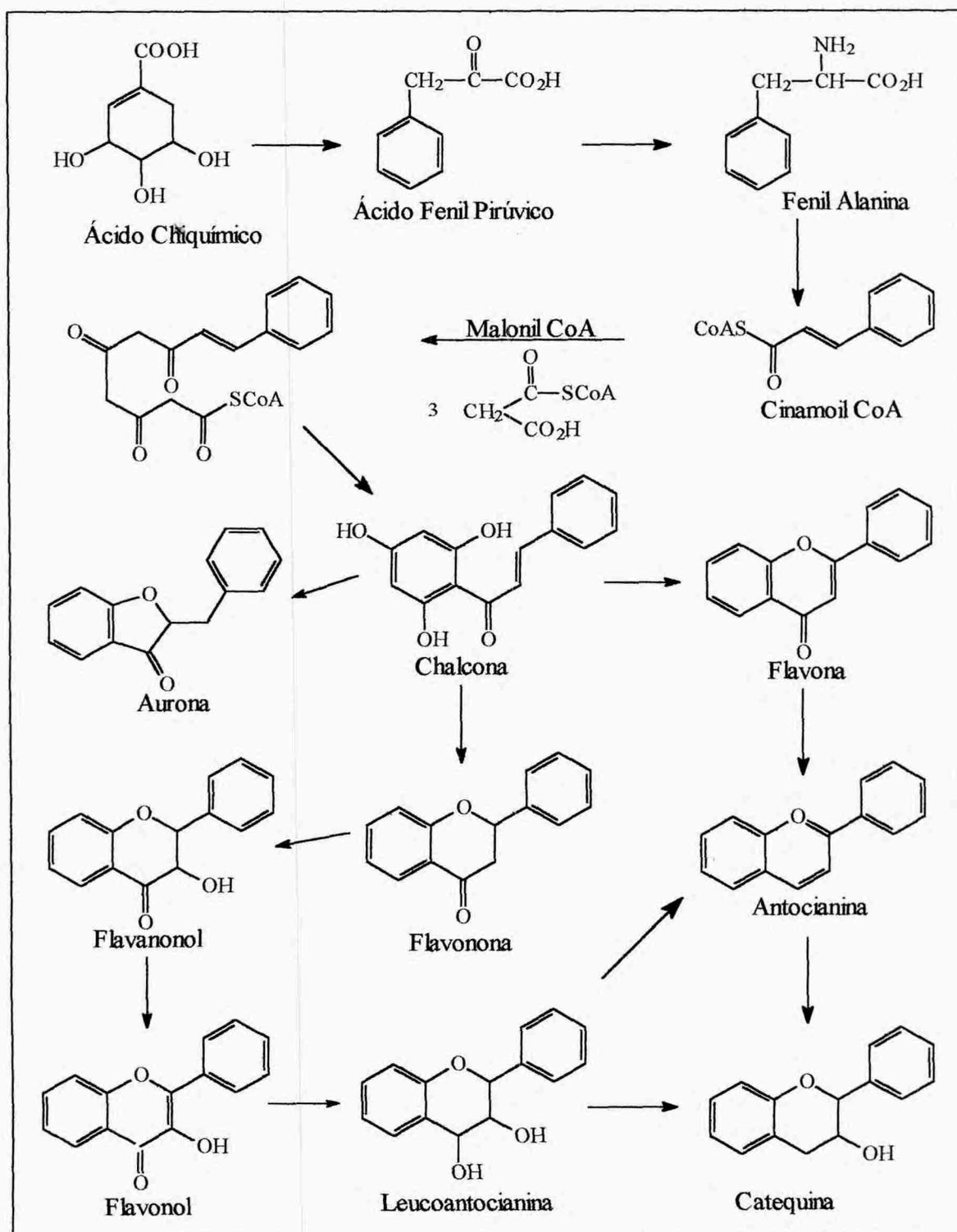


Figura 2. Esquema da rota biossintética para flavonóides.

Os flavonóides apresentam diversas atividades biológicas, sendo que a capacidade antioxidante é uma das principais. A atividade antiinflamatória, analgésica, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica são alguns exemplos da importância farmacológica destes metabólitos naturais²¹.

As propriedades antioxidantes estão associadas à capacidade de estabilização e/ou doação de elétrons e formação de quelatos com metais de transição (inibição da reação de Fenton)^{22, 23}. Desempenhando a função de antioxidante natural, os flavonóides sofrem reações que envolvem mecanismos de transferência de carga, possibilitando o estudo dessas reações através de métodos eletroquímicos, os quais têm sido pouco utilizados para esta finalidade²⁴. Assim, o estudo eletroquímico destes compostos é de fundamental importância para a compreensão do mecanismo de eletro-oxidação envolvido durante sua ação biológica e para a obtenção de uma correlação estrutura-atividade antioxidante^{25, 26}.

A avaliação do comportamento eletroquímico em meio hidroalcoólico dos flavonóides apresentados na figura 3 – quercetina (2), miricitrina (3), miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4) isolados das folhas da espécie *Eugenia jambolana* e devidamente caracterizados¹⁶, e um padrão do flavonóide quercetina 3-O-glucosídeo (5) – foi realizada através voltametria cíclica. Neste trabalho serão apresentados alguns resultados preliminares, principalmente em relação a 2. O estudo eletroquímico completo dos flavonóides constitui parte dos estudos a serem desenvolvidos durante o mestrado.

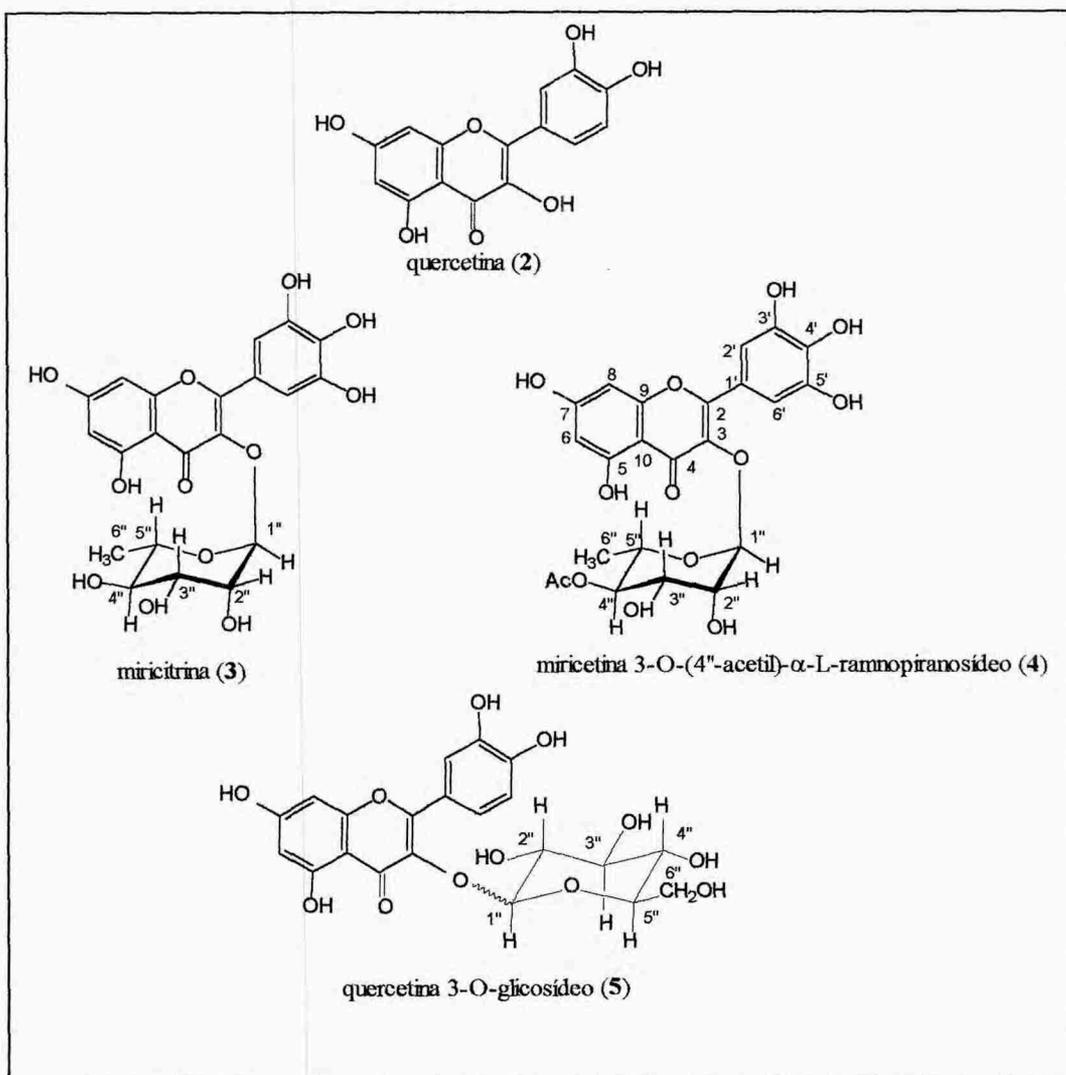


Figura 3. Estrutura química dos flavonóides estudados por métodos eletroquímicos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos o isolamento, a purificação e a identificação dos constituintes químicos presentes no extrato acetato de etila das folhas da espécie vegetal *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae). Em adição, far-se-á um estudo do comportamento eletroquímico em meio hidroalcoólico dos flavonóides isolados e devidamente caracterizados, com ênfase para o efeito estrutural no perfil voltamétrico.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Coleta e Identificação da Espécie Vegetal *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae)

A espécie vegetal *Eugenia jambolana* Lamark pertencente à família Myrtaceae foi coletada no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em dezembro de 1998 na cidade de Florianópolis - SC. Este espécime foi identificado no Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo Prof. Dr. Ademir Reis e depositada sob o número 31.270 no Herbário da UFSC.

3.2. Obtenção dos Extratos

Após a coleta e a identificação, as folhas de *Eugenia jambolana* foram lavadas e secas na sombra em temperatura ambiente com rendimento de 550 g de material desidratado. Posteriormente foram moídas e extraídas por maceração à temperatura ambiente com EtOH/H₂O (80:20) durante 15 dias. Depois da fase de maceração, o extrato bruto hidroalcoólico foi filtrado e posteriormente concentrado até 1/3 de seu volume inicial em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Este extrato foi então refrigerado a 10 °C por 24 horas e filtrado para a remoção das ceras e do material graxo. O extrato filtrado foi submetido à partição (extração líquido-líquido) com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol no modo gradiente, sendo que cada solvente foi destilado separadamente em evaporador rotatório à pressão reduzida e sob temperatura controlada. [Um esquema demonstrativo da obtenção dos extratos é apresentado na página ix].

3.3. Métodos Cromatográficos

Em geral, o fracionamento cromatográfico de extratos vegetais é feito através de sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel, onde o extrato em estudo é misturado com sílica gel (RS, $\varnothing \approx 0,05/0,20$ mm), na proporção de um para dois respectivamente para a obtenção da pastilha. Neste método utiliza-se uma coluna de vidro, cujas dimensões variam de acordo com a quantidade de pastilha a ser cromatografada, empacotada com sílica gel (RS,

$\varnothing \approx 0,05/0,20$ mm), na proporção de aproximadamente 2/3 de sílica para 1/3 de pastilha. Como fase móvel são utilizados os solventes hexano, hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/etanol, etanol e metanol, sempre em ordem crescente de polaridade. Então, coleta-se frações de mesmo volume, que são concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada, sendo posteriormente transferidas para frascos menores numerados de acordo com a ordem de eluição²⁷.

Com o intuito de obter uma análise prévia das frações coletadas no fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel utiliza-se a análise de cromatografia de camada delgada (TLC). Nesta análise, pontos pequenos das amostras são aplicados através de capilares em placas específicas para TLC, e eluídas em um solvente ou mistura de solventes que seja capaz de fornecer propriedades da amostra em questão. Posteriormente estas placas são reveladas em reveladores próprios para TLC de produtos naturais. As frações que apresentarem as mesmas características (mesmo valor de índice de retenção R_f) são reunidas e para purificá-las são recromatografadas²⁷.

Em todos os fracionamentos cromatográficos foram empregados solventes adquiridos de fontes comerciais, tais como: Merck, Nuclear, Grupo Química e Reagen. O acompanhamento por cromatografia de camada delgada (TLC) foi realizado utilizando-se como fases estacionárias folhas de sílica-gel de fabricação da Merck (PF₂₅₄) com espessuras de 0,5 mm e como fases móveis misturas de solventes com proporções definidas.

Além da luz de ultravioleta (comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm), na revelação das cromatoplas utilizou-se o vapor de iodo, a solução ácida de anisaldeído e a solução de cloreto férrico, sendo que estes reveladores⁴ fornecem diversas informações a respeito da amostra investigada e são muito utilizados em produtos naturais. Com este procedimento pode-se verificar o grau de pureza das frações coletadas.

3.4. Fracionamento Cromatográfico do Extrato de Acetato de Etila

Uma alíquota do extrato de acetato de etila foi submetida a sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel utilizando o sistema de eluentes hexano/acetato de etila e, acetato de etila/etanol ou acetato de etila/metanol no modo gradiente. [Um esquema do fracionamento cromatográfico do extrato de acetato de etila é apresentado na página x].

O fracionamento cromatográfico (F.C.) em coluna de sílica gel, de uma alíquota do extrato de acetato de etila, resultou na coleta de 71 frações. A tabela 1 mostra os eluentes

utilizados no fracionamento cromatográfico (F.C.) de uma alíquota do extrato de acetato de etila.

Este procedimento resultou após o monitoramento através das análises de TLC das frações coletadas, na obtenção de três frações para o presente estudo, as frações de 52 a 54 reunidas (52 - 54), as frações de 62 a 66 reunidas (62 - 66) e a fração 69 (69). A fração 52 - 54 e a fração 69 foram purificadas por técnicas de recristalização.

Tabela 1. *Eluentes utilizados no F.C. do extrato de acetato de etila.*

Frações	Eluentes
1 a 6	100% Hexano
7 a 15	90% Hexano / 10% Acetato de etila
16 a 20	80% Hexano / 20% Acetato de etila
21 a 32	70% Hexano / 30% Acetato de etila
33 a 47	60% Hexano / 40% Acetato de etila
48 a 56	50% Hexano / 50% Acetato de etila
57 a 63	30% Hexano / 70% Acetato de etila
64	15% Hexano / 85% Acetato de etila
64 a 69	10% Hexano / 90% Acetato de etila
70	100% Acetato de etila
71	50% Acetato de etila / 50% Etanol

A fração 62 - 66 foi recromatografada em coluna de sílica gel (Coluna A), onde foram coletadas 25 frações e após análises de TLC selecionadas duas frações para o presente estudo, a fração 4-A (4-A) e as frações reunidas 13-A e 14-A (13-A e 14-A). A tabela 2 mostra os eluentes utilizados na coluna A (Fração 62 - 66).

Tabela 2. *Eluentes utilizados na Coluna A (Fração 62 a 66).*

Frações	Eluentes
1-A e 2-A	50% Hexano / 50% Acetato de etila
3-A	45% Hexano / 55% Acetato de etila
4-A	35% Hexano / 65% Acetato de etila
5-A a 11-A	30% Hexano / 70% Acetato de etila
12-A a 18-A	20% Hexano / 80% Acetato de etila
19-A a 21-A	100% Acetato de etila
22-A a 25-A	50% Acetato de etila / 50% Etanol

A fração 4-A foi então purificada através de sucessivas recristalizações. A fração 13-A e 14-A foram reunidas e recromatografadas (Coluna B), onde foram coletadas 34 frações e após o monitoramento por TLC reunidas as frações de 9-B a 20-B (9-B a 20-B). A tabela 3 mostra os eluentes utilizados na coluna B (Fração 13-A e 14-A).

Tabela 3. *Eluentes utilizados na Coluna B (Fração 13-A a 14-A).*

Frações	Eluentes
1-B a 5-B	40% Hexano/ 60%Acetato de etila
6-B a 8-B	30% Hexano/ 70%Acetato de etila
9-B a 15-B	20% Hexano/ 80%Acetato de etila
16-B a 21-B	15% Hexano/ 85%Acetato de etila
22-B a 27-B	10% Hexano/ 90%Acetato de etila
28-B a 31-B	90% Acetato de etila/ 10%Etanol
32-B a 34-B	50%Acetato de etila/ 50% Etanol

A fração 9-B a 20-B foi submetida a outro fracionamento cromatográfico (Coluna C) que resultou em 12 frações sendo as frações de 3-C a 10-C (**3-C a 10-C**) reunidas após as análises de TLC. A tabela 4 mostra os eluentes utilizados na coluna C (Fração 9-B a 20-B).

Tabela 4. *Eluentes utilizados na Coluna C (Fração 9-B a 20-B).*

Frações	Eluentes
1-C a 4-C	40% Hexano / 60%Acetato de etila
5-C a 7-C	35% Hexano / 65%Acetato de etila
8-C a 10-C	20% Hexano / 80%Acetato de etila
11-C	100% Acetato de etila
12-C	90% Acetato de etila / 10% Etanol

No fracionamento cromatográfico (Coluna D) da fração 3-C a 10-C foram coletadas 35 frações. A tabela 5 mostra os eluentes utilizados na coluna D (Fração 3-C a 10-C).

Tabela 5. *Eluentes utilizados na Coluna D (Fração 3-C a 10-C).*

Frações	Eluentes
1-D e 2-D	60% Hexano / 40% Acetato de etila
3-D a 6-D	50% Hexano / 50% Acetato de etila
7-D a 9-D	45% Hexano / 55% Acetato de etila
10-D a 12-D	35% Hexano / 65% Acetato de etila
13-D a 15-D	30% Hexano / 70% Acetato de etila
16-D a 18-D	20% Hexano / 80% Acetato de etila
19-D a 21-D	10% Hexano / 90% Acetato de etila
22-D a 24-D	100% Acetato de etila
25-D a 29-D	90% Acetato de etila / 10% Etanol
30-D a 32-D	50% Acetato de etila / 50% Etanol
33-D a 35-D	100% Etanol

Neste procedimento foi selecionada a fração 15-D (15-D) para o presente estudo.

Os sucessivos fracionamentos cromatográficos resultaram na obtenção de quatro frações 52-54, 4-A, 69 e 15-D. Estas frações foram analisadas por TLC em diversos sistemas de eluentes, sendo coeluídas com padrões certificados de flavonóides. Todas as frações apresentaram uma única mancha nas cromatoplasmas, sendo este um dos critérios adotados quanto à pureza dos compostos.

As quatro frações 52-54, 4-A, 69 e 15-D foram mantidas separadamente no dessecador por 24 horas e em seguida determinou-se o rendimento e o ponto de fusão de cada composto.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Micro-Química modelo MQAPF-301 do Laboratório de Química Orgânica (Graduação), no Departamento de Química da UFSC.

3.5. Análises Espectroscópicas

As frações 52-54, 4-A, 69 e 15-D foram caracterizadas através de análises espectroscópicas de ^1H , ^{13}C , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, $^{13}\text{C}/\text{APT}$, HETCOR e HETCOR LONG RANGE e por comparação com os dados da literatura²⁹.

As análises por espectrometria no infravermelho, na região de 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , foram realizadas em pastilha compacta de brometo de potássio de grau espectroscópico e em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FT-IR 16 PC.

Os espectros de ^1H , ^{13}C e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ foram registrados em espectrofotômetros Bruker AC 200 MHz e Bruker AC 50 MHz, respectivamente, na Central

de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna e acetona deuterada como solvente, sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm).

Os espectros de RMN¹H (75 MHz), RMN¹³C/APT (300 MHz), HETCOR e HETCOR LONG RANGE foram obtidos em espectrofotômetros Varian Gemini VXR 300F, no Centro Chimica dei Reccettori, da Università Cattolica Del Sacro Cuore de Roma.

3.6. Análises Eletroquímicas

Os flavonóides isolados das folhas da espécie *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae) e devidamente caracterizados – quercetina (2), miricitrina (3), miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4) - e um padrão de quercetina 3-O-glucosídeo (5) foram submetidos a análises eletroquímicas de voltametria cíclica.

As condições experimentais foram determinadas a partir de um trabalho exploratório inicial até chegar em resultados que possibilitaram demonstrar a aplicação dos métodos eletroquímicos na avaliação da atividade antioxidante, bem como no estudo dos mecanismos eletro-oxidativos.

Utilizou-se um potenciostato/galvanostato EG & G PARC modelo 263A em conjunto com o logicitário M270 para obter os voltamogramas cíclicos. A célula eletroquímica compreendeu um sistema de três eletrodos: um disco de carbono vítreo de área 0,0314 cm² como eletrodo de trabalho, calomelano saturado como eletrodo de referência (os valores de potencial mencionados neste relatório são referentes a este eletrodo de referência) e como contra-eletrodo um cilindro de grafite espectroscópico. O eletrodo de trabalho foi cuidadosamente polido antes de cada experimento com uma pasta de alumina (0,05 μ m), disposto em um banho ultrassom para remoção da alumina remanescente e, em seguida, lavado com água desionizada. Empregou-se uma solução tampão de KH₂PO₄/K₂HPO₄ (ambos 0,05 mol.dm⁻³) e etanol (50/50) (v/v) como eletrólito suporte. O pH da parte aquosa foi ajustado com KOH ou H₃PO₄. A solução foi desoxigenada borbulhando-se nitrogênio através da solução durante 8 minutos. A substância teste foi adicionada em massa, após a obtenção de um voltamograma cíclico a partir da solução livre da mesma, tal que a concentração final para cada flavonóide fosse de 0,8 mmol.dm⁻³ ou 1,4 mmol.dm⁻³.

Todos os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho são de grau espectroscópico e adquiridos de fontes comerciais como Merck (H_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e KOH) e Grupo Química (Etanol). Água destilada e desionizada foram utilizadas na preparação de todas as soluções.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção do trabalho será subdividida em duas partes: inicialmente proceder-se-á a exposição dos resultados referentes ao isolamento, purificação e caracterização dos constituintes químicos das folhas da espécie *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae). Na segunda parte, os resultados preliminares dos estudos eletroquímicos dos compostos sob investigação serão apresentados.

4.1. Compostos Isolados do Extrato de Acetato de Etila das Folhas de *E. jambolana*

Os sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato de acetato de etila das folhas da espécie *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae), resultaram na obtenção de quatro frações: 52-54, 69, 4-A e 15-D. Estas frações foram analisadas por TLC em diversos sistemas de eluentes, sendo coeluídas com padrões certificados de flavonóides. Neste procedimento todas as frações apresentaram uma única mancha nas cromatoplasas. Este foi um dos critérios adotados quanto à pureza dos compostos. [As estruturas químicas dos flavonóides isolados, encontram-se na página v].

Nas análises de TLC as frações 52-54, 4-A e 69 apresentaram o mesmo valor de *R. f.* daqueles padrões certificados de flavonóides miricetina (1), quercetina (2) e miricitrina (3), respectivamente. Estas amostras foram coeluídas no mesmo sistema de solventes. Após três recristalizações em acetona, cada fração resultou em um sólido amarelado. Determinou-se o ponto de fusão de cada amostra após estarem secas.

Os espectros de IV, de RMN¹H, de RMN¹³C e de RMN¹³C/DEPT das frações 52-54, 69 e 4-A não serão apresentados neste relatório. A caracterização estrutural dos compostos 1-3 está noticiada na literatura²⁹, os dados obtidos experimentalmente concordam com os já descritos²⁹ e estes compostos são encontrados em diversas espécies de plantas.

O composto da fração 52-54 (rendimento de 0,023 %), apresentou ponto de fusão 350 – 353°C. Este valor está em concordância com o descrito pela literatura⁵ (*p. f.* = 355°C) para a miricetina (1). Em adição, as análises de TLC, dos espectros de IV, RMN¹H, RMN¹³C e RMN¹³C/DEPT, e a comparação com os dados espectrais descritos pela literatura²⁹ comprovaram que a fração 52-54 contém o flavonóide miricetina (1).

O composto da fração 4-A (rendimento de 0,0085 %), apresentou ponto de fusão 308 - 312°C o qual concorda com o valor do descrito⁵ (*p. f.* = 314°C) para a quercetina (2). As análises de TLC, dos espectros de IV, RMN¹H, RMN¹³C e RMN¹³C/DEPT, e a comparação com os dados descritos pela literatura²⁹ foi possível confirmar que a fração 4-A contém flavonóide quercetina (2).

O composto da fração 69 (rendimento de 0,009 %), apresentou ponto de fusão 155 - 159°C. Este fato é relevante, pois o valor do *p. f.* descrito pela literatura⁵ é de 163°C para miricitrina. Os resultados das análises de TLC e dos espectros de IV, RMN¹H, RMN¹³C e RMN¹³C/DEPT, e a comparação com os dados descritos pela literatura²⁹ foi possível comprovar que a fração 69 contém o flavonóide miricitrina (3).

Identificação do flavonóide glicosídico acetilado miricitina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4)

O composto da fração 15-D, após três recristalizações em acetona, resultou em cristais amarelos com rendimento de 0,059%. O ponto de fusão ocorre no intervalo de 174 - 176°C. Observou-se apenas uma mancha na revelação da placa de TLC para o eluente 40/60 (v/v) hexano/AcOEt e 10 gotas de Ácido acético, sendo que o valor de *R.f.* foi de 0,5 nestas condições. Neste mesmo eluente os flavonóides (2) e (3) apresentaram *R.f.* de 0,78 e de 0,30, respectivamente.

O espectro de IV (Espectro 1), mostrou intensa e larga absorção em 3480cm⁻¹ para o estiramento O—H sugerindo a presença de uma unidade glicosídica. Observou-se também a presença de absorções referentes a uma carbonila de éster em 1724 cm⁻¹ e para uma carbonila conjugada em 1650 cm⁻¹, além das absorções em 1608, 1502 e 1452 cm⁻¹ referentes ao estiramento C=C dos sistemas aromáticos. Com estas observações pode-se propor que o composto da fração 15-D se trata de um flavonóide glicosídico que apresenta em sua estrutura um grupo éster.

Nas análises dos espectros de RMN¹H (Espectros 2, 5 e 6), pode-se constatar a presença de dois sistemas de prótons aromáticos. O primeiro sistema atribuído ao anel "B" de um flavonóide, mostra um padrão de substituição 3', 4', 5' - trihidróxi em função da presença de um singleto em δ 6.90 ppm com integração para dois hidrogênios, atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'. O outro sistema de prótons aromáticos, representado por um par de dubletes

centrados em δ 6.21 e δ 6.37 ppm, com constantes de acoplamento J 2.1 Hz para hidrogênios meta relacionados e integração para um hidrogênio cada definem o padrão de substituição 5, 7 – dihidróxi do anel “A”. Estes sinais referem-se aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Estes dados estão de acordo com os já descritos²⁹ para a aglicona do flavonóide miricetina.

A presença de uma molécula de rhamnopiranosose pode ser observada através dos sinais em δ 5.46 ppm (1H, *d*, J 1.6 Hz) para o próton anomérico H-1” e em δ 4.82 ppm (1H, *t*, J 9.8Hz, H-4”), δ 4.21 ppm (1H, *dd*, J 3.4 Hz e 1.6 Hz, H-2”), δ 3.92 ppm (1H, *dd*, J 9.8 Hz e 3.4 Hz, H-3”), δ 3.36 ppm (1H, *dd*, J 9.8 Hz e 6.2 Hz, H-5”) e δ 0.80 ppm (3H, *d*, J 6.2Hz, H-6”) para o grupo metila. O singlete em δ 2.05 ppm com integração para três hidrogênios, juntamente com o estiramento C=O observado no espectro de IV em 1724 cm^{-1} indicam a presença de um grupo acetil na estrutura deste composto.

Nos espectros de RMN¹³C/APT (Espectros 3, 4, 7 e 8), pode-se confirmar a presença da aglicona do flavonóide miricetina, através da comparação com os dados descritos na literatura. O anel “A”, com um padrão de substituição 5, 7-dihidróxi pode ser confirmado pela presença dos sinais em δ 94.8 e δ 99.4 ppm correspondentes aos carbonos metínicos C-8 e C-6, respectivamente. O carbono C-10 pode ser observado em δ 105.9 ppm e os carbonos oxigenados C-5, C-7 e C-9 em δ 166.0, δ 163.2, δ 158.6 ppm, respectivamente. O anel “B”, com um padrão de substituição 3', 4', 5'-trihidróxi pode ser verificado pela presença do sinal em δ 99.8 ppm correspondente aos dois carbonos metínicos C-2' e C-6'. O sinal em δ 121.8 ppm foi atribuído ao carbono C-1' e os sinais para os carbonos oxigenados C-3' e C-5' foram observados em δ 147.0 ppm e para o carbono C-4' em δ 137.8 ppm. Nestes espectros pode ser comprovado o anel “C” da aglicona do flavonóide miricetina, através dos sinais em δ 179.5 ppm para a carbonila C-4 e em δ 159.8 e δ 135.5 ppm para os carbonos metínicos C-2 e C-3, respectivamente.

A presença de uma unidade de rhamnopiranosose pode ser observada através dos sinais em δ 102.5 ppm para o carbono anomérico C-1”, em δ 17.6 ppm indicando o substituinte metila do carbono C-6” e em δ 71.6, δ 70.1 e δ 69.6 ppm para os carbonos C-2”, C-3” e C-5”, respectivamente. A presença do grupo acetil foi confirmada através dos sinais em δ 21.0 ppm para uma metila e em δ 172.7 ppm para uma carbonila.

Em adição, a confirmação estrutural deste composto foi realizada através de intensos estudos dos espectros bidimensionais de curta e longa distância, HETCOR (Espectro 9) e HETCOR LONG RANGE (Espectro 10), onde a localização do açúcar no carbono C-3 foi estabelecida com base no deslocamento para campo baixo do carbono C-2 (+14.0 ppm) e do

carbono C-4 (+3.7 ppm) em relação ao flavonóide miricetina²⁹. A localização do grupo acetil no carbono C-4'' foi estabelecida avaliando-se o efeito anisotrópico do grupo acetil, onde observou-se um deslocamento para campo baixo do sinal referente ao carbono C-4'' (+2.0 ppm) e para campo alto dos sinais dos carbonos C-3'' (-1.8 ppm) e C-5'' (-2.0 ppm) em relação aos deslocamentos químicos dos carbonos da unidade de ramnopiranosose³⁰. Finalmente, através do experimento de INEPT-seletivo, foi possível observar que a irradiação do hidrogênio H-4'' (δ 4.82 ppm) intensificou o sinal δ 172.7 ppm referente a carbonila do grupo acetil, confirmando inequivocamente que o grupo acetil esta ligado ao carbono C-4'' da unidade de ramnopiranosose. Logo, a fração 15-D é o flavonóide glicosídico acetilado, miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4).

O isolamento e identificação deste flavonóide glicosídico acetilado, miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4) foi pela primeira vez descrito no Gênero *Eugenia*.

4.2. Propriedades Eletroquímicas em Meio Hidro-alcoólico

A figura 4 mostra os voltamogramas cíclicos (VC) obtidos com um eletrodo de carbono vítreo para os flavonóides 2, 3, 4 e 5 na concentração de $0,8 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ em meio de etanol/solução aquosa de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, (ambos $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 50/50 (v/v), com $\text{pH}_{\text{final}} = 7,4$, para velocidade de variação de potencial (ν) de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

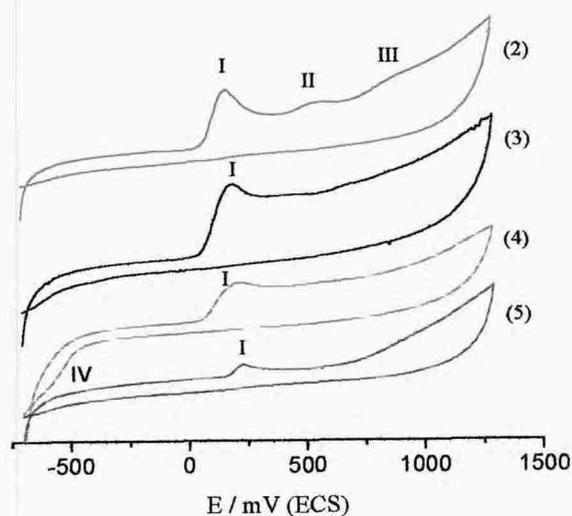


Figura 4. Voltamogramas cíclicos para os flavonóides 2-5 em solução hidro-alcoólica 50/50 (v/v) ($C_{\text{vítreo}}$, [flavonóides] = $0,8 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH}_{\text{final}} = 7,4$; $\nu = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$).

Nesta figura, observa-se uma reação de transferência de carga em $E_p^I = 180$ mV, comum a todos os compostos sob investigação. No caso da quercetina (**2**) são notados, adicionalmente, dois picos de oxidação: um em 570 mV (E_p^{II}) e outro em torno de 900 mV (E_p^{III}). No sentido inverso da variação do potencial, somente a miricitrina (**4**) exibe um pico redução para estas condições experimentais, como pode ser visto em potenciais em torno de -570 mV (E_p^{IV}).

O primeiro pico, pico I, corresponde a oxidação dos substituintes 3', 4'-dihidróxi do anel "B" destes compostos. A atribuição deste processo oxidativo a esta parte da molécula está fundamentada pela maior tendência à doação de elétrons das hidroxilas nas posições 3' e 4' do referido anel. A oxidação de grupos fenólicos que apresentam *orto*-hidroxilas tem sido escopo de vários estudos no GEPEEA^{26, 31}.

E_p^{II} (570 mV/ECS), observado apenas para o flavonóide **2**, corresponde a oxidação do grupo OH presente no carbono C-3. Esta reação não é observada para os demais flavonóides investigados pois nos outros casos o oxigênio ligado ao carbono C-3 encontra-se conjugado com uma molécula de açúcar.

O pico III ($E_p^{III} = 900$ mV/ECS), embora não esteja nítido na figura 4, existente para os quatro flavonóides (**2-5**) refere-se a oxidação dos grupos substituintes OH das posições 5 e 7 do anel "A".

Os produtos de oxidação/redução em cada pico não foram, até o momento, devidamente identificados. O estudo completo de cada flavonóide exige um bom tempo de equipamento e dedicação. Desse modo, nesta seção do trabalho apresentaremos apenas os resultados das propriedades eletroquímicas em meio hidroalcoólico para o flavonóide **2**, fazendo-se inferências sobre seu comportamento com base, apenas, nos resultados eletroquímicos e àqueles já noticiados pela literatura especializada.

Influência do pH

A figura 5 mostra os voltamogramas cíclicos para a quercetina (**2**) $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$ para $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ obtidos em diferentes condições de pH.

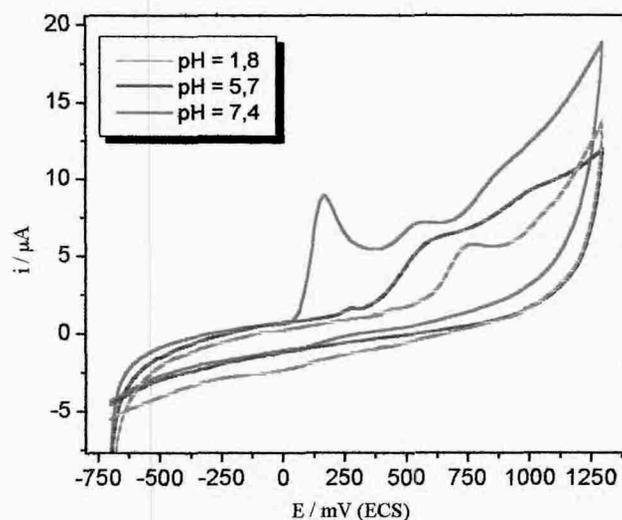


Figura 5. Voltamogramas cíclicos para a quercetina $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ em diferentes pH.

Nesta figura pode-se ver que a concentração do próton produz alterações bastante significativas no perfil voltamétrico de **2**. Isto indica uma participação efetiva do íon H^+ no mecanismo eletro-oxidativo em todas as etapas (picos I, II e III). De fato, a importância do pH para a atividade antioxidante é amplamente reconhecida^{26,31}. O aumento do pH provoca, em geral, um aumento na tendência à doação de elétrons da espécie, o que é refletido pelo deslocamento dos potenciais de pico para valores menos anódicos, resultando no aumento da atividade antioxidante. A figura 6 mostra a variação de E_p^I e E_p^{II} em função do pH. Em relação ao E_p^I , nota-se que quando o pH é aumentado há um decréscimo linear de E_p^I com uma inclinação de $-60,0 \text{ mV.pH}^{-1}$, a qual está de acordo com o esperado pela equação de Nernst ($-60,0 \text{ mV.pH}^{-1}$) para uma transferência eletrônica seguida de desprotonação envolvendo número iguais de elétrons (n) e prótons (m), sendo que $n=m=2$. A eletrólise completa da substância neste potencial está sendo conduzida atualmente no intuito de confirmar o valor de n e m , bem como medidas de cronoamperometria.

O pico II, por sua vez, apresenta $\delta E_p^{\text{II}}/\delta \text{pH} = -45 \text{ mV/pH}$. Este valor sugere que $n > m$.

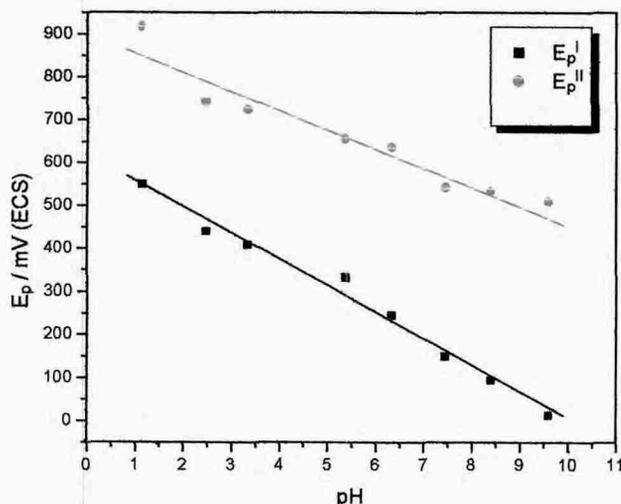


Figura 6. Variação de E_p^{I} e E_p^{II} em função do pH; [quercetina] = $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Influência da velocidade de variação de potencial (ν)

A figura 7 mostra a influência da velocidade de variação de potencial no perfil voltamétrico da quercetina, para concentração de $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e $\text{pH} = 7,4$. É possível notar que o aumento de ν provoca o deslocamento de E_p^{I} e E_p^{II} (para valores mais positivos). Em adição, há um aumento nos valores das respectivas densidades de corrente. A figura 8 mostra a variação de E_p^{I} e de i_p^{I} em função de $\log \nu$. Os valores de cada parâmetro foram extraídos da figura 7. Pode-se verificar que E_p^{I} praticamente independe de ν para $\nu \leq 25 \text{ mV.s}^{-1}$ (característico para sistemas reversíveis) ao passo que para $\nu \geq 25 \text{ mV.s}^{-1}$ E_p^{I} aumenta linearmente em relação à década de velocidade com $\delta E_p^{\text{I}}/\delta \log(\nu) = 61 \text{ mV.log(mV.s}^{-1})^{-1}$.

Em relação à corrente de pico, tem-se um comportamento com boa linearidade, sendo que $\delta \log(i_p^{\text{I}})/\delta \log(\nu) \cong 0,5$. Este valor é característico de processos controlados por difusão³². Os mesmo comentários são válidos para os demais pH e também para o pico II, tanto em relação ao potencial de pico quanto à corrente de pico.

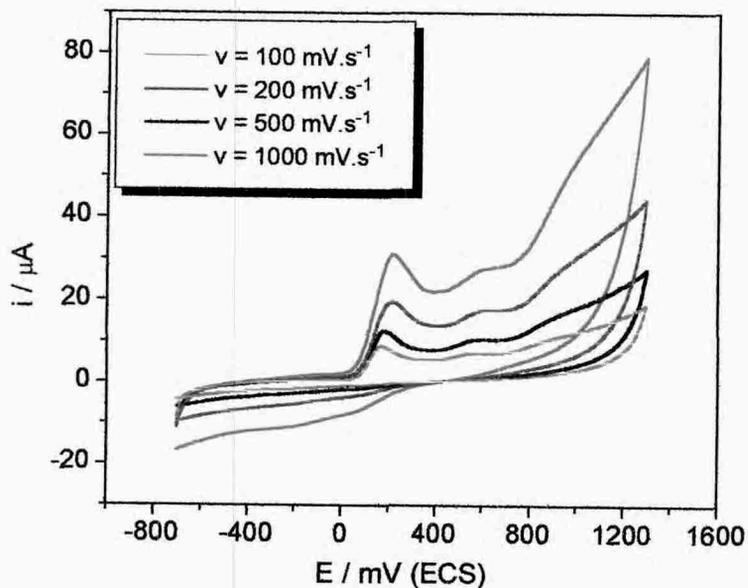


Figura 7. Voltamogramas cíclicos para a quercetina $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em pH 7,4 para diferentes velocidades de variação do potencial.

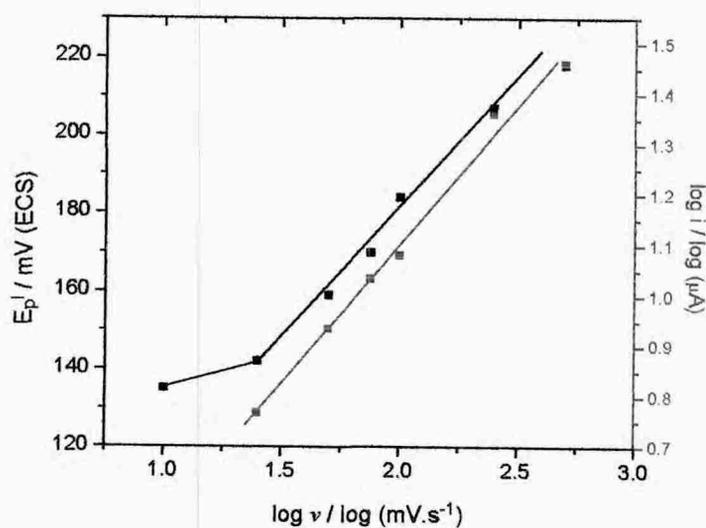


Figura 8. Variação de E_p^I e i_p^I em função de $\log(v)$; dados extraídos da figura 7 ([quercetina] = $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$, pH = 7,4).

É interessante atentar, ainda, para o efeito de ν no processo II. Conforme ν aumenta o pico II torna-se mais nítido (para $\nu = 5 \text{ mV.s}^{-1}$ - voltamograma não mostrado - E_p^{II} não aparece). Este comportamento sugere que o produto de oxidação formado no pico I (agora genericamente chamado de **A**) é eletroquimicamente ativo e instável, sofrendo, portanto, reações químicas homogêneas. As reações químicas homogêneas de **A** geram substâncias eletroquimicamente inativas. Assim sendo, para velocidades altas, atinge-se a região de potencial do pico II (onde **A** é oxidado) antes de **A** se decompor (em espécies eletroquimicamente inativas).

Influência de modificações no potencial de inversão anódico ($E_{\lambda,a}$)

Conforme apontado anteriormente, existe uma reação química homogênea subsequente à formação do produto de oxidação em I. A modificação do potencial de inversão anódico torna-se, em casos como este, um artifício plausível para um melhor entendimento do comportamento específico dos processos que ocorrem em um determinado pico. A figura 9 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para a quercetina com $E_{\lambda,a}$ imediatamente superior a E_p^{I} para concentração de $1,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $\nu = 50$ e 250 mV.s^{-1} para pH 1,5 e 7,4. Nesta figura, pode-se observar que é possível reduzir o produto de oxidação gerado no pico I (**A**) se a programação potencial/tempo for modificada, como mostrado. Neste caso, o sistema é descrito de acordo com o mecanismo do tipo EC_i , sendo a etapa eletroquímica reversível, dependente da velocidade de variação do potencial. Um comportamento muito semelhante a este é obtido para o ácido cafeico³¹.

A razão entre a corrente de pico catódica (i_{pc}) e a corrente de pico anódica (i_{pa}) ($i_{pc}^{\text{I}}/i_{pa}^{\text{I}}$) é menor para a velocidade de 50 mV.s^{-1} do que para 250 mV.s^{-1} . Isto caracteriza a instabilidade do produto formado no pico I; para velocidades rápidas, situação na qual a condição termodinâmica para redução é atingida num espaço de tempo menor, a quantidade de espécies reduzidas é maior. Através de voltamogramas como os mostrados na figura 9, é possível obter as constantes de velocidade para o desaparecimento do composto formado. O procedimento para obter tal parâmetro físico-químico envolve simulação de voltamogramas cíclicos, o que será feito em breve.

Há, contudo, uma peculiaridade a ser notada na figura 9: a estabilidade do produto é maior para o pH mais básico (observe a razão i_{pc}^1/i_{pa}^1) do que para o pH ácido. Este resultado é contrário àquele obtido para o ácido cafeico (figura 10), sendo que ambos consistem em um processo de transferência de dois elétrons e dois prótons, culminando na formação da quinona correspondente. Este resultado está sendo discutido visando obter uma explicação conceitual e quimicamente correta.

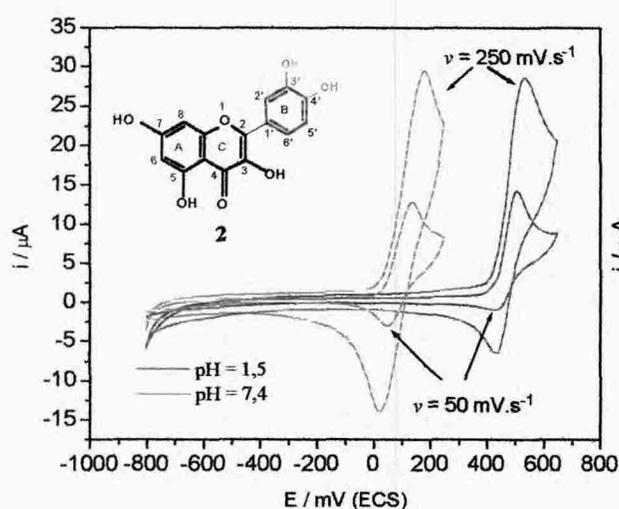


Figura 9. Voltamogramas cíclicos para a quercetina $1,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$ obtidos em pH (—)1,5 e (---)7,4 para $v = 50$ e 250 mV.s^{-1} em meio hidro-alcoólico.

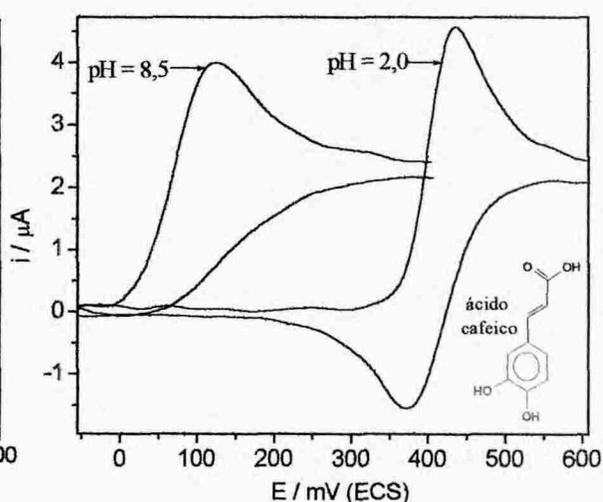


Figura 10. Voltamogramas cíclicos para o ácido cafeico $0,8 \text{ mmol. dm}^{-3}$ em pH 2,0 e 8,5; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$; eletrodo de C vítreo.

Efeito da estrutura química sobre a reação química homogênea irreversível acoplada do processo I

A figura 11 mostra a razão entre a corrente de pico catódica e a corrente de pico anódica para os compostos estudados em pH 7,4. Observa-se que para a quercetina (2) a razão i_{pc}^1/i_{pa}^1 atinge valores significativamente menores com o aumento da velocidade em comparação com os demais compostos. Isto sugere que o produto de oxidação de 2 é mais

instável do que o produto formado para os demais compostos. Analisando-se as estruturas correspondentes de **2** a **5** é possível atentar que a principal diferença é o substituinte em C-3. Somente para a quercetina há uma hidroxila, sendo que nos outros compostos este grupo é um éter. Dessa forma, evidencia-se que esta parte da molécula dos flavonóides estudados apresenta uma contribuição bastante acentuada para o destino do produto de oxidação formado no pico I, a *orto*-quinona correspondente.

Na seção seguinte, será proposto um mecanismo de oxidação para a quercetina, oportunidade em que estes resultados serão mais claramente interpretados.

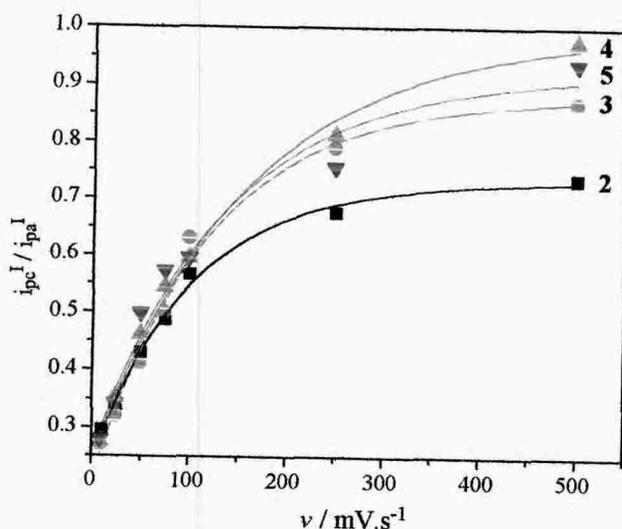


Figura 11. Variação da razão i_{pc}^I / i_{pa}^I em função da velocidade de variação do potencial para os compostos estudados. (Os dados foram extraídos de voltamogramas cíclicos obtidos com $E_{\lambda,a} = E_p^I + 0,1 \text{ V}$; pH = 7,4).

Mecanismo proposto para a eletro-oxidação da quercetina em meio hidro-alcoólico

O mecanismo eletro-oxidativo pode ser proposto com base no efeito substituinte em C-3, nos dados cinéticos obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos e, também, a partir da comparação com sistemas semelhantes estudados pelo GEPEEA e por outros grupos de pesquisa.

A oxidação inicial da quercetina sobre um eletrodo de carbono vítreo envolve a transferência de dois elétrons e de dois prótons, originando a *orto*-quinona correspondente (figura 12). Esta *orto*-quinona sofre, na seqüência, reações químicas homogêneas. Um dos principais caminhos de desaparecimento deste produto de oxidação consiste em um ataque

nucleofílico do substituinte hidroxila do carbono C-3 ao carbono C-6', o que origina um éter cíclico. Esta etapa acontece apenas para o composto **2**. Para os demais, cujo substituinte em C-3 corresponde a um oxigênio ligado à uma unidade açúcar, o ataque nucleofílico é inibido ou não favorável. Isto justifica os resultados representados na figura 11.

O segundo processo de oxidação (pico II) diz respeito à oxidação do grupo OH ligado à C-3. O pico II é observado somente para velocidades de variação do potencial elevadas, situação na qual o desaparecimento do reagente da reação é diminuído. A oxidação provavelmente pode ser di-eletrônica. Isto é sugerido pela curva E_p^{II} vs. pH, a qual apresenta uma inclinação de aproximadamente -45 mV.pH^{-1} . Este valor implica, necessariamente, que o número de elétrons (n) seja maior do que o número de prótons (m). Dessa forma, observando-se a estrutura e a parte da molécula em questão, é plausível considerar que n pode ser igual a dois e $m = 1$. Contudo, experimentos cronoamperométricos e de eletrólise total testarão a proposta.

O pico III, por sua vez, corresponde à oxidação envolvendo o anel A, com formação de quinonas. Estas quinonas também são instáveis, já que não se observa redução das mesmas para velocidades de variação de potencial moderadas.

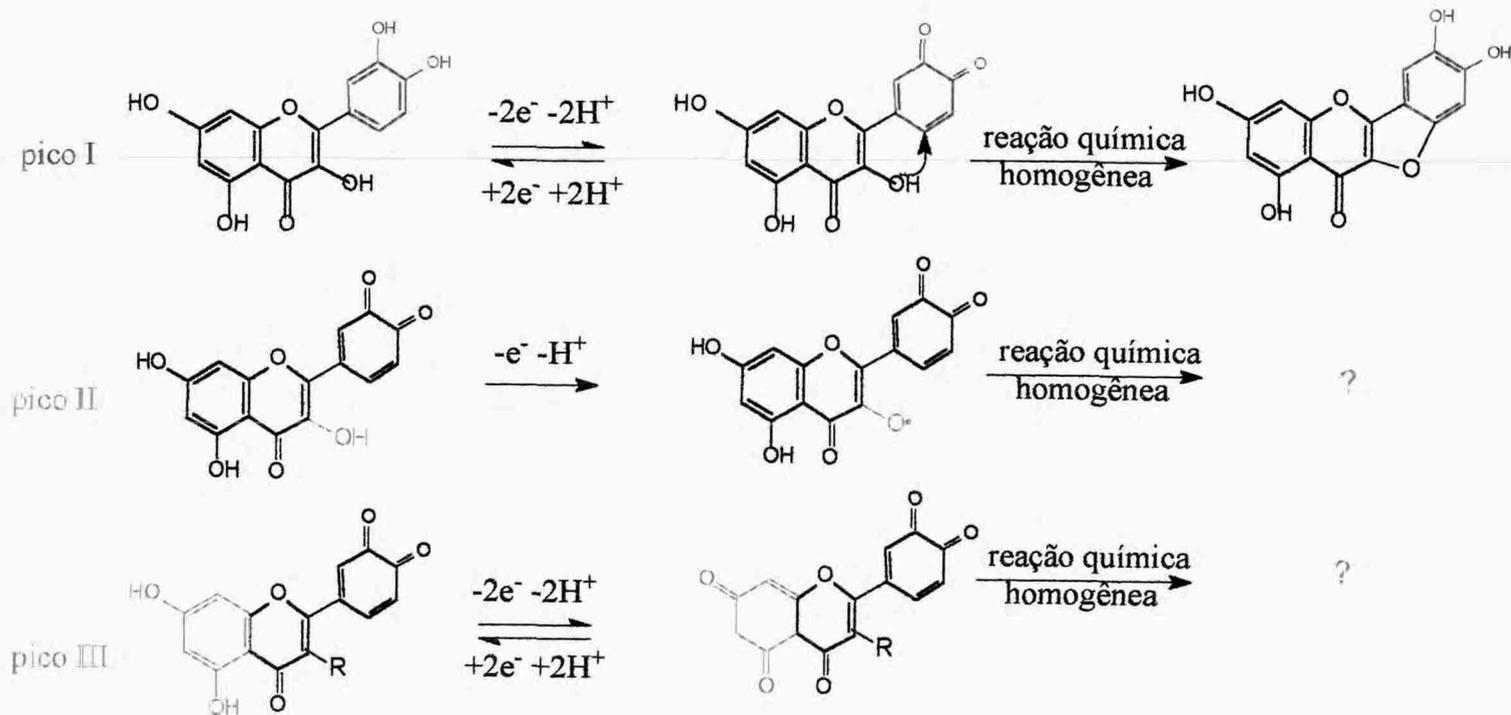


Figura 12. Mecanismo preliminar proposto para a eletro-oxidação da quercetina em meio hidro-alcoólico sobre um eletrodo de carbono vítreo.

5. CONCLUSÃO

Os sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato de acetato de etila das folhas da espécie *Eugenia jambolana* Lamark (Myrtaceae), resultaram no isolamento e identificação de quatro flavonóides: quercetina (1), miricetina (2), miricitrina (3) e miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4).

O isolamento e identificação do flavonóide glicosídico acetilado miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo foi pela primeira vez descrito no Gênero *Eugenia*.

Um mecanismo eletro-oxidativo (figura 12) pôde ser proposto com base no efeito substituinte em C-3 e nos dados cinéticos obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos. Destaque para o flavonóide quercetina (2), cuja elucidação do mecanismo está mais clara: o catecol é oxidado no pico I, dando origem à *orto*-quinona correspondente. Em seguida há um rearranjo intramolecular devido ao ataque nucleofílico do O ligado em C-3 ao C-6', seguido por tautomerização ceto-enólica. Este rearranjo deve ser o principal fator responsável pela instabilidade da quinona formada. Nos picos II e III ocorre a oxidação do substituinte hidroxila ligado à C-3 e do anel A, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

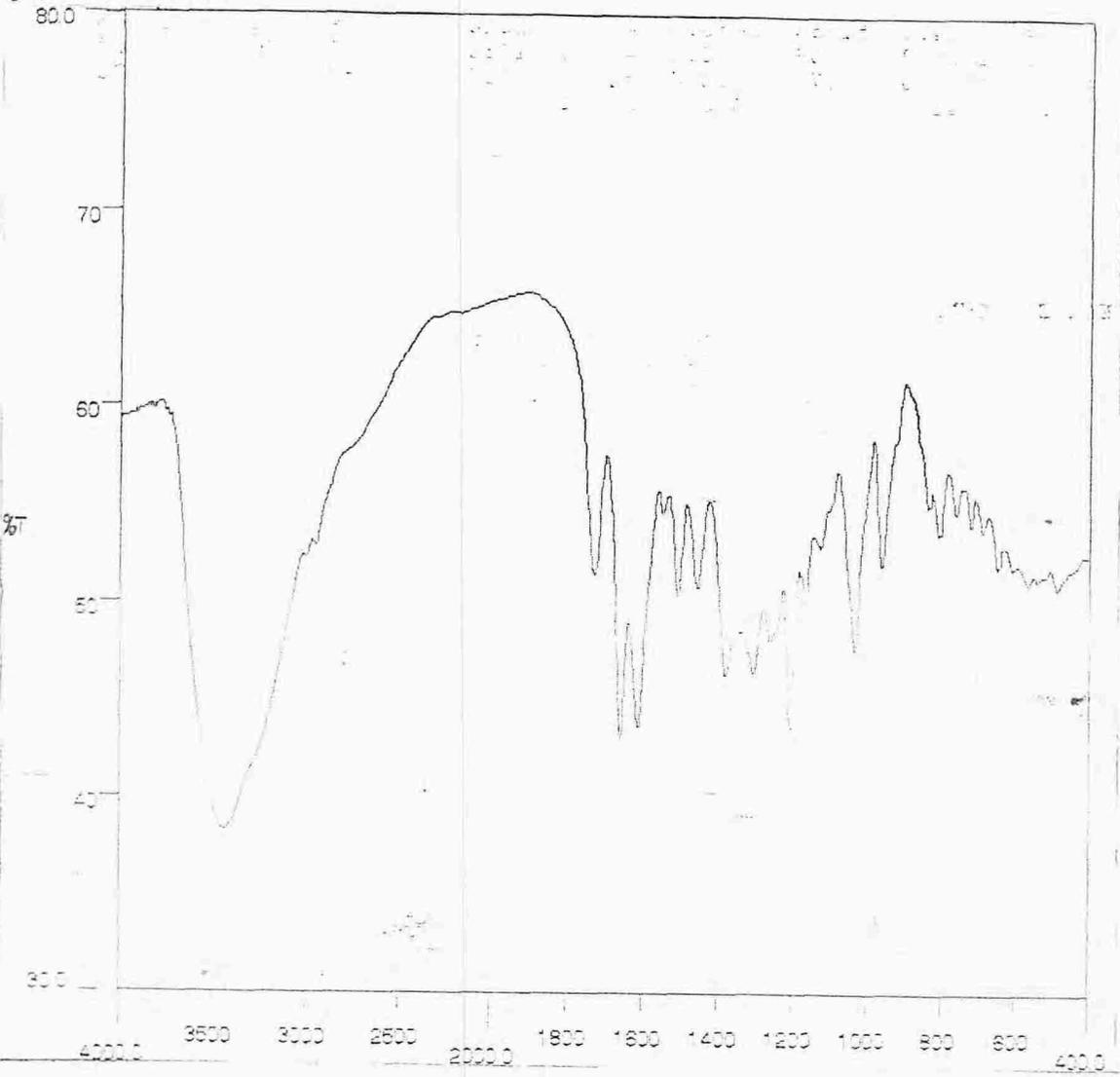
1. Montanari, C. A. *Química Nova*. **1995**, 18(1), 56.
2. Roberts, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, **1997**, 149.
3. Dominguez, X. A. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México, **1979**, 9.
4. Matos, F. J. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza, Brasil, **1988**, 7.
5. Lainetti, R.; Brito, N. R. *A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras*. Rio de Janeiro, **1979**.
6. Hutchinson, J. *The Families of Flowering Plants*. 2nd Edition. Clarendon, Oxford, **1960**, 302.
7. Slowing, K.; Sollhuber, M.; Carretero, E.; Villar, A. *Phytochemistry*. **1994**, 37(1), 255.
8. Park, M. K.; Park, J. H.; Shin, Y. G.; Shin, U. K.; Kim, K. H.; Yakhak, H. *Pharmaceutical Society of Korea* **1997**, 41, 149.
9. Son, K.; Kwon, S. Y.; Kim, H. P.; Chang, H. W.; Kang, S. S. *Nat. Prod. Sci.* **1998**, 4, 263.
10. Reitz, R.; Klein, R. M. *Flora Ilustrada Catrinense*. **1971**, 25, 835.
11. Grover, J.K.; Vats, V.; Rathi, S.S. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 73, 461.
12. Gupta, G. S.; Sharma, D. P. *Phytochemistry*. **1974**, 13, 2013.
13. Jain, M. C.; Seshadri, T. R. *Indin J. Chem.* **1975**, 13, 20.
14. Rajasekaran, M.; Bapna, J. S.; Lakshmanan, S.; Nair, A. G. R.; Veliath, A. J.; Panchanadam, M. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, 24, 115.
15. Craveiro, A. A.; Andrade, C. H. S.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Machado, M. I. L. *J. Nat. Prod.* **1983**, 46, 591.
16. Timbola, A. K.; Szpoganicz, B.; Branco, A.; Pizzolatti, M. G.; Monache, F. D. *Fitoterapia*. Available online 13 March **2002**, In Press, Uncorrected Proof.
17. Mahmoud, I. I.; Marzouk, M. S. A.; Moharram, F. A.; El-Gindi, M. R.; Hassan, A. M. K. *Phytochemistry*. **2001**, 58, 1239.
18. Timbola, A. K.; Giacomelli, C.; Spinelli, A.; Pizzolatti, M. G. *Flavonóides: Efeitos Estruturais no Comportamento Eletroquímico em Meio Hidroalcoólico*. Livro de Resumos, 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, MG, EQ 22, aceito, **2002**.

19. Simões, C. M. O. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 3^a Ed. Rev. Florianópolis, SC, **2001**, 499.
20. Geissman, T. A.; Crout, D. H. G. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. USA, **1969**, 212.
21. Korkina, L. G.; Afanas'ev, I. B. *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*. Série Advanced in Pharmacology. Sies, **1997**, 38, 152.
22. Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D.V. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 71.
23. Miller, N. J.; Castelluccio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C. *FEBS Letters*. **1996**, 392, 40.
24. Sacagami, H.; Satoh, K. *Anticancer research*. **1997**, 17, 221.
25. Hendrickson, H. P.; Kaufman, A.D.; Lunte, C. E. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. **1994**, 12(3), 325.
26. Galato, D.; Ckless, K.; Susin, M. F.; Giacomelli, C.; Ribeiro-do-Valle, R. M.; Spinelli, A. *Redox Report*, **2001**, 6, 243.
27. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 6^aed. Editora da Unicamp, Campinas, SP, **1995**.
28. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5rd ed., New York: John Wiley, **1991**.
29. Agrawal, P. K. *Studies in Organic Chemistry 39 "Carbono 13 NMR of Flavonoids"*. Elsevier, New York, **1989**.
30. Costa, S. S.; Jossang, A.; Bodo, B. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1503.
31. Giacomelli, C.; Ckless, K.; Galato, D.; Miranda, F. S.; Spinelli, A. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2002**, 13, No. 0,1-x.
32. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Inc: New York, 1980, p.142.

ANEXO I: ESPECTROS

ESPECTRO 1

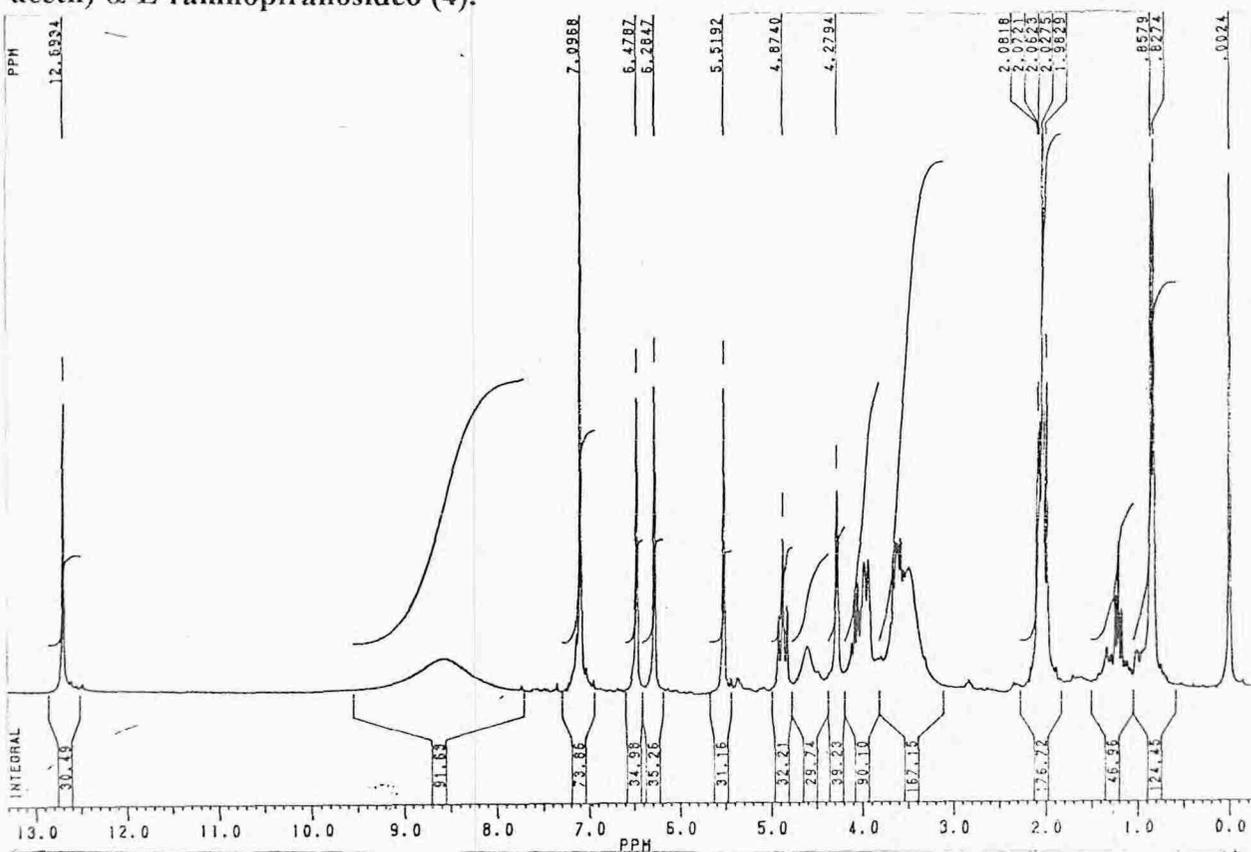
Espectro de IV da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4), em pastilha de KBr.



CV-1

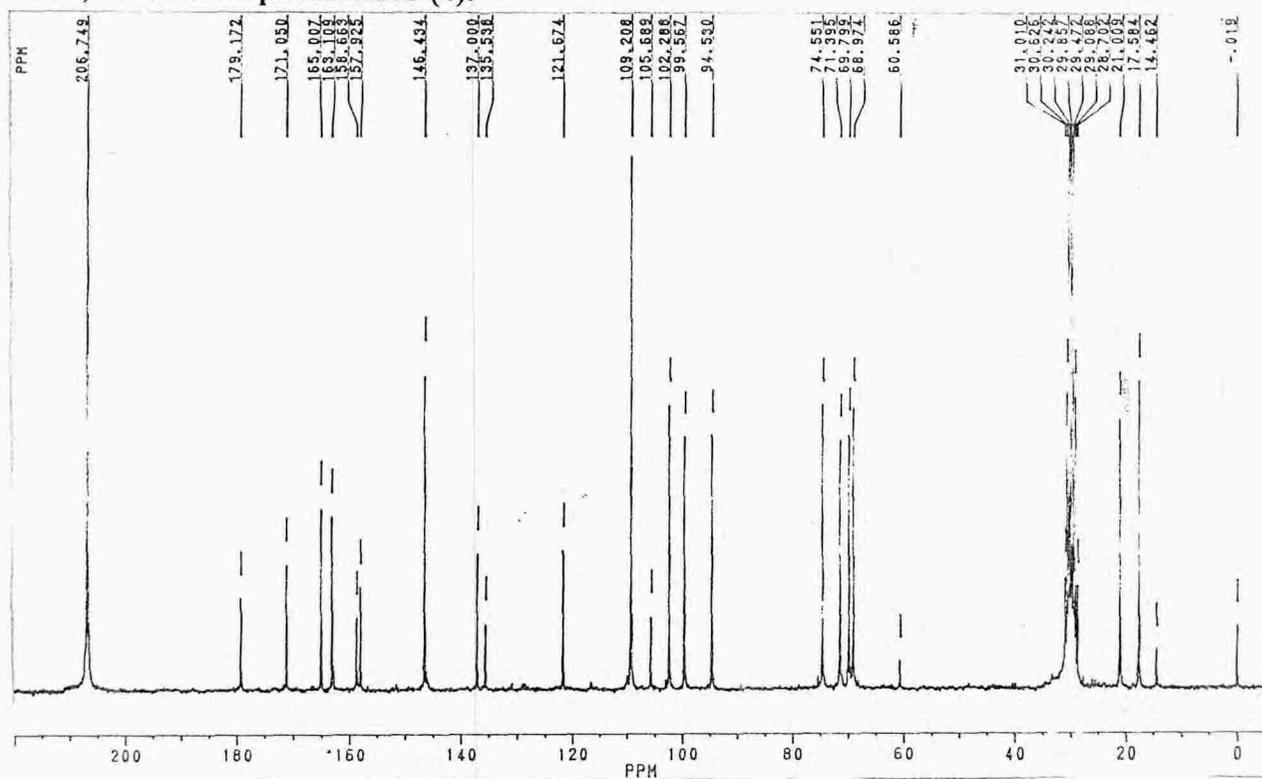
ESPECTRO 2

Espectro de RMN¹H (200 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4).



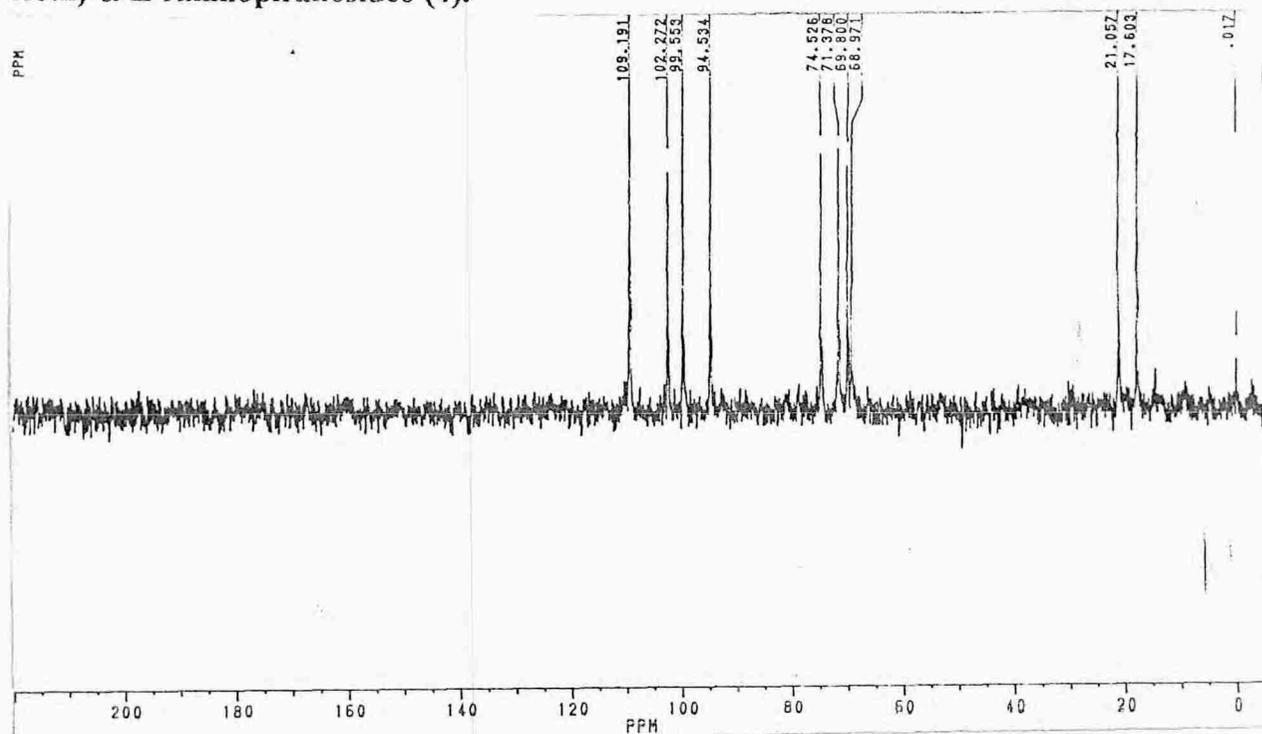
ESPECTRO 3

Espectro de RMN¹³C (50 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4).



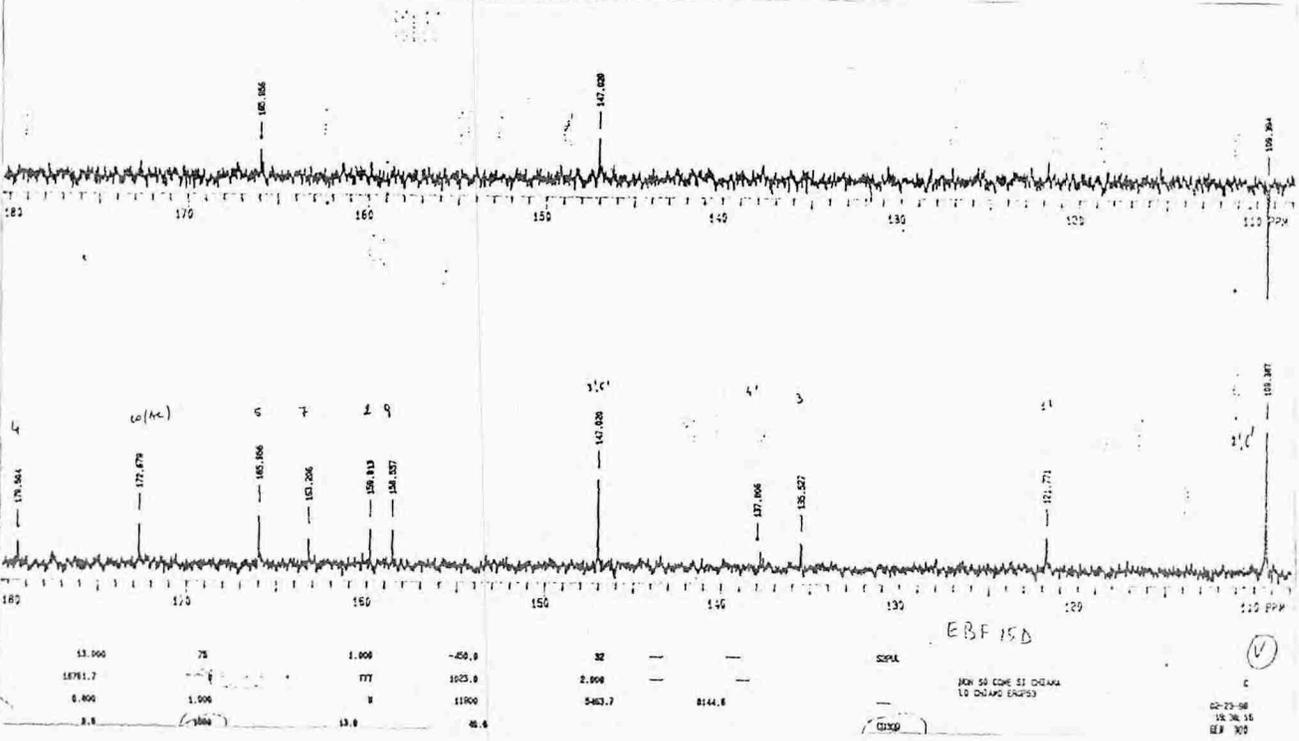
ESPECTRO 4

Espectro de DEPT (50 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4).



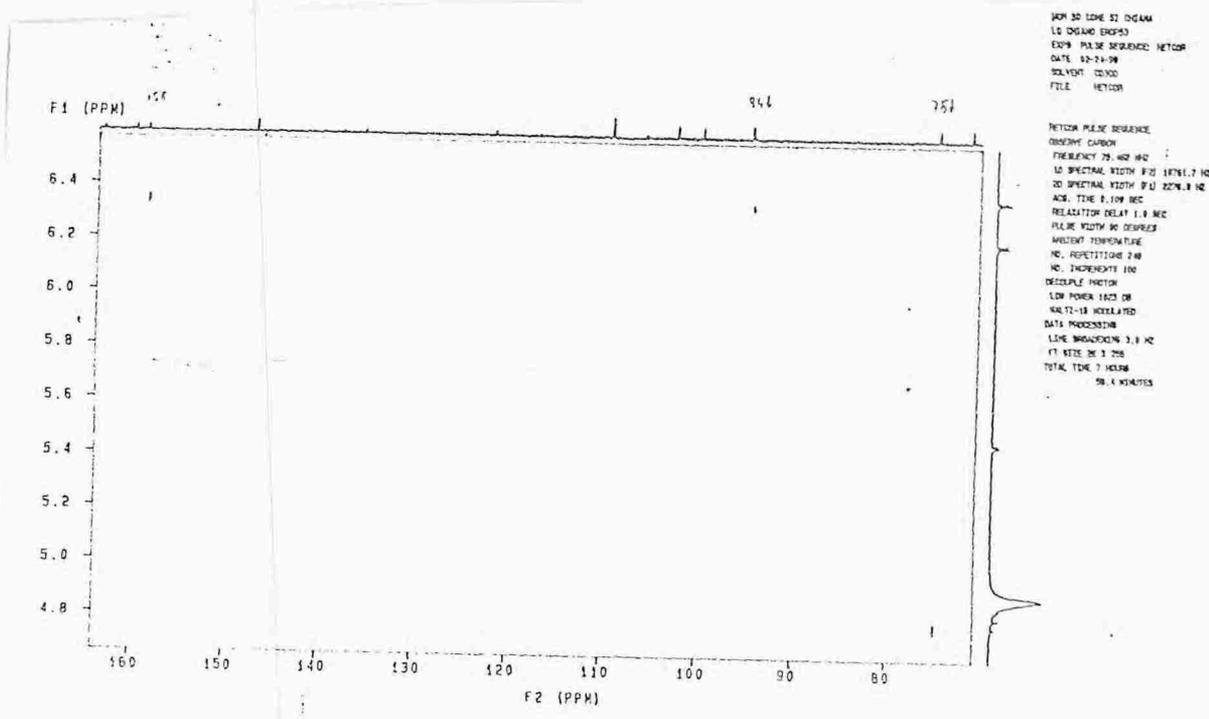
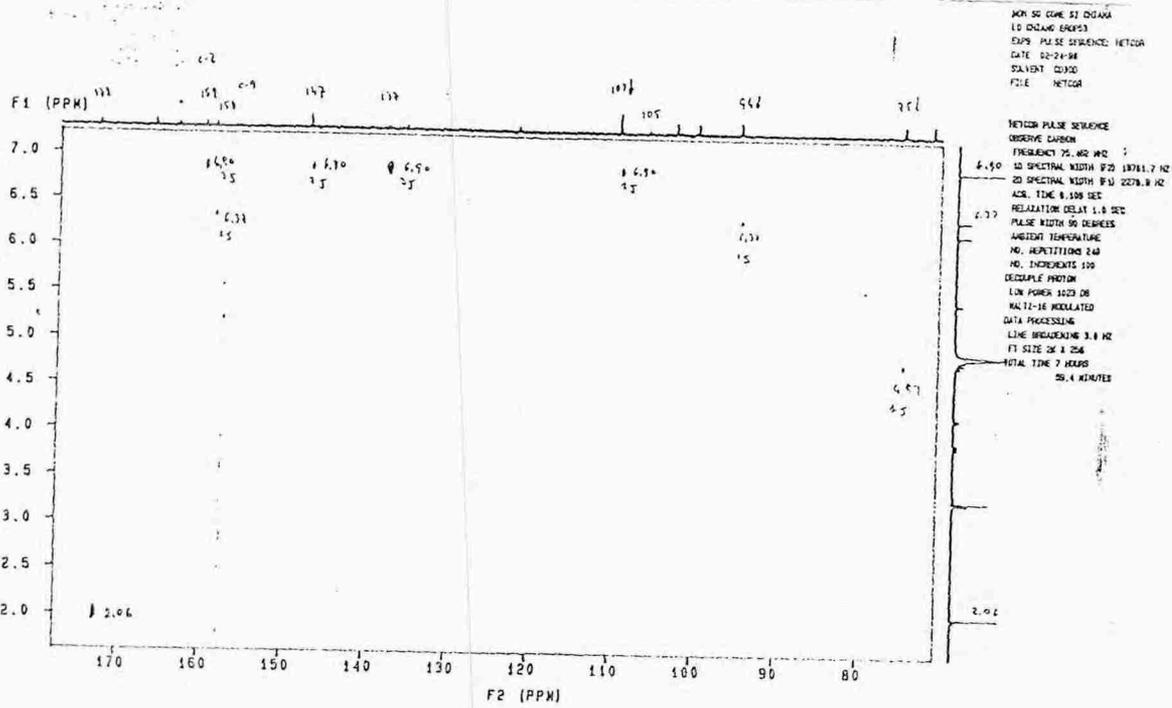
ESPECTRO 7

Espectro de RMN¹³C/APT (75 MHz) em Acetona deuterada, da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ranopiranosídeo (4), na região de 110 a 180 ppm.



ESPECTRO 9

Espectro de HETCOR ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) em Acetona deuterada da miricetina 3-O-(4"-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo (4).



ESPECTRO 10

Espectro de HETCOR LONG RANGE ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) em Acetona deuterada da miricetina 3-O-(4''-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo (4).

