



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQUFBA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Estudo químico das raízes de *Bowdichia virgilioides* (FABACEAE)

KLAUBER VIANA CARDOSO

SALVADOR - BA
Agosto, 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQUFBA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Estudo químico das raízes de *Bowdichia virgilioides* (FABACEAE)

KLAUBER VIANA CARDOSO

Dissertação submetida ao colegiado do programa de Pós-graduação em Química da UFBA para obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientador: Jorge Mauricio David

SALVADOR – BA

Agosto, 2015

Aos meus pais, Eivaldo Leite
Cardoso e Jussara Viana Cardoso
e família com carinho.

“Não há nada bom nem mau a não ser estas duas coisas: a sabedoria que é um bem e a ignorância que é um mal”. (PLATÃO)

Agradecimentos

Deposito aqui meus sinceros agradecimentos a Deus, inspiração para toda e qualquer construção em que empenhei esforços; meus queridos pai e mãe, Erivaldo Leite Cardoso e Jussara Viana Cardoso, pelo incansável apoio e compreensão sobre a necessidade e sacrifícios para alcançar este objetivo; a minhas irmãs, que desde cedo me incentivam a continuar meu crescimento humano na vida acadêmica e minha parceira, amiga e namorada Tamires pelo incentivo e toda compreensão.

Aproveito o espaço também para agradecer memoravelmente ao orientador deste projeto – professor Dr. Jorge Maurício David -, que sabiamente amparou minha empreitada com este trabalho e destina há tempos esforços para pesquisa em produtos naturais. Do mesmo modo, sou grato ao CNPq e CAPES como órgãos fomentadores e fontes de recursos para bolsas de estudos de pós-graduação.

Agradeço aos professores da pós-graduação: Drs. Juceni David, Silvio Cunha, Maurício Victor, Valéria R. e Jailson B. pelos esclarecimentos, compreensão e atenção ao longo das disciplinas e projeto como um todo.

Nesse sentido, lembro também de amigos e colegas de trabalho: professor Dr. José Cândido Selva, pela atenção, companheirismo e esclarecimento; professores Drs. Bruno Moreira, Clayton Queiroz, Jeferson, Darlan Coutinho, Larissa Rezende, Angélica e Mes. Eliezer, Larissa e Patrícia Assis, pelo companheirismo, amizade e amparo no decurso do trabalho. Parafraseando Ayrton Senna, “faço parte de uma equipe. Então, quando finalizo um trabalho, não sou eu apenas quem chega ao objetivo. De certa forma termino o trabalho de um grupo de pessoas. ”

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 Justificativa | 21 |
| 1.2 Levantamento Botânico | 28 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos | 31 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL | 32 |
| 3.1 Coleta..... | 32 |
| 3.2 Procedimentos laboratoriais..... | 32 |
| 3.3. Preparação dos extratos..... | 34 |
| 3.4 Procedimentos iniciais de análise das fases orgânicas polares | 35 |
| 3.5 Fracionamento da fase MeOH das raízes | 36 |
| 3.5.1 Purificação da fração EMBV D – obtenção de BV-1 (cordoína) e BV-2 (isocordoína) | 38 |
| 3.5.2 Purificação da fração EMBV E – Obtenção de BV-3 (lupeol) e BV-4 (lupenona) | 38 |
| 3.5.3 Purificação da fração EMBV G - isolamento de BV-5, BV-6, BV-7 E BV-8 | 39 |
| 3.5.4 Purificação da fração EMBV-B - Obtenção de BV-9 – mistura de ésteres metílicos. | 42 |
| 3.6 Fracionamento da fase Hex das raízes..... | 42 |
| 3.7 Teste de atividade antioxidante das fases polares orgânicas das raízes..... | 43 |
| 3.7.1 Inibição da co-oxidação do β -caroteno/ácido linolênico – Procedimento para fase MeOH | 44 |
| 3.7.2 Sequestro do radical livre DPPH • | 45 |
| 3.8 Teste de atividade tóxica da fase MeOH | 47 |
| 3.8.1 Mortalidade das larvas de <i>A. salina sp.</i> | 47 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 4.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas. | 50 |
| 4.1.1 Chalconas | 50 |
| 4.1.2 Elucidação estrutural de BV-2 | 51 |
| 4.1.3 Elucidação estrutural da BV-1 | 65 |

| | |
|--|-----|
| 4.2 Elucidação estrutural dos Triterpenos | 84 |
| 4.2.1 Elucidação estrutural de BV-3 – Lupeol..... | 85 |
| 4.2.2 Elucidação estrutural de BV-4 – Lupenona..... | 92 |
| 4.2.3 Elucidação estrutural de BV-5 (β -sitosterol) e BV-6 (estigmasterol)..... | 96 |
| 4.2.4 Elucidação estrutural de BV-7 – Sitostenona..... | 101 |
| 4.3 Elucidação estrutural de BV-8 – Mistura de ácidos graxos livres | 104 |
| 4.4 Elucidação estrutural da BV-9 – Ésteres metílicos..... | 114 |
| 5. TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 120 |
| 5.1 Análise quantitativa da atividade antioxidante | 121 |
| 5.1.1 Atividade sequestrante de radicais livres de DPPH' | 121 |
| 5.1.2 Atividade antioxidante na reação β -caroteno/ácido linolênico | 122 |
| 6. TESTE DE TOXICIDADE FRENTE LARVAS DE ARTEMIA..... | 124 |
| 7. CONCLUSÃO | 126 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 128 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Imagem da planta da qual foi coletada amostra das raízes – arredores do Instituto de Física da UFBA - IFUBA..... | 28 |
| Figura 2 - Descrição botânica da espécie <i>B. virgilioides</i> | 29 |
| Figura 3 - Distribuição geográfica da espécie na Bahia..... | 30 |
| Figura 4 - Procedimento laboratorial inicial para obtenção do extrato bruto e fases orgânicas da <i>B. virgilioides</i> | 35 |
| Figura 5 - Estrutura molecular da Isocordoína - BV-2 | 51 |
| Figura 6 - Espectro de IV – infravermelho – [pastilha de KBr] de BV-2..... | 52 |
| Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H de BV-2..... | 53 |
| Figura 8 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] da BV-2 – Região de anel aromático e alcenos..... | 54 |
| Figura 9 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] da BV-2 – Região de substituinte alifático..... | 54 |
| Figura 10 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] – Singletos metilínicos | 55 |
| Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] de BV-2 | 55 |
| Figura 12 - Correlações de H metilênico C1'' e de -OH (hidroxila) C2' no anel A..... | 57 |
| Figura 13 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC | 57 |
| Figura 14 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC. Correlação para "H"- hidrogênio de -(OH) | 58 |
| Figura 15 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC. Correlações em região de anel aromático..... | 58 |
| Figura 16 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC. Correlações para substituintes alifático..... | 59 |
| Figura 17 - Correlações importantes de H de $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}$ e $-\text{CH}_2$ | 59 |
| Figura 18 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (300MHz)] – HMQC | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 - Correlações de H do anel B monossustituído [m 7,65(3H); m 7,43(2H)]; dubleto de H alfa [d 7,88(J=15Hz,1H)] e beta [d 7,60(J=15Hz,1H)] e H6'[d 7,74(J= 5Hz,1H)] | 60 |
| Figura 20 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl ₃ (300MHz)] – HMQC – Correlações de –(CH)..... | 61 |
| Figura 21 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl ₃ (300MHz)] – HMQC – Correlações de –CH em anel e substituinte alifático | 61 |
| Figura 22 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl ₃ (300MHz)] – HMQC – Correlações de –(CH ₂) e –(CH ₃) | 62 |
| Figura 23 - Estruturas moleculares de A e B | 63 |
| Figura 24 - Estrutura molecular da 2',4-dimetoxi-6'-hidroxilonchocarpina | 64 |
| Figura 25 - Estrutura molecular de BV-1 - 1-[2'-hidroxi-4'-(3''-metil-but-2''-eniloxi)-fenil]-3- fenil-propenona | 65 |
| Figura 26 - Espectro de massa ESI(-) em alta resolução da fração EMBV-D f1 | 66 |
| Figura 27 - Espectro de massa ESI- em alta resolução da EMBV-D f1 – Ampliação | 66 |
| Figura 28 - Espectro de massa ESI(-) em alta resolução da EMBV-D f1 - Ampliação em região de maior relação m/z | 67 |
| Figura 29 - Espectro de IV- infravermelho - [KBr] de BV-1..... | 68 |
| Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³ C [CDCl ₃ (300MHz)] de BV-1 | 68 |
| Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³ C [DEPT135 (500MHz)] da BV-1 | 69 |
| Figura 32 - Espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (300MHz)] da mistura BV-1 | 70 |
| Figura 33 - Ampliação de espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- região de aromático | 71 |
| Figura 34 - Ampliação de espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- região de substituinte alifático..... | 71 |
| Figura 35 - Ampliação de espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- região de – CH ₃ | 72 |
| Figura 36 - Experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC..... | 73 |
| Figura 37 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC. Correlação para região de hidrogênio de –(OH) | 73 |
| Figura 38 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC.. | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 39 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC. Correlação para região de carbono oxigenado e de anel aromático | 75 |
| Figura 40 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC. Correlação para região de anel aromático | 75 |
| Figura 41 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1 – HMBC. Correlação para sinais do substituinte alifático | 76 |
| Figura 42 - Estruturas moleculares de B e C | 77 |
| Figura 43 - Correlações de H metilênico -(CH ₂) no isoprenil aos carbonos C1" e C4' | 79 |
| Figura 44 - Experimento bidimensional de BV-1[CDCl ₃ (300MHz)] – HMQC | 80 |
| Figura 45 - Correlações de H alfa e beta e H6' | 80 |
| Figura 46 - Experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – Ampliação em região de anel aromático..... | 81 |
| Figura 47 - Experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – Correlações para -(CH ₃) e -(CH)..... | 81 |
| Figura 48 - Experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – correlações de -(CH ₃) e -(CH ₂)..... | 82 |
| Figura 49 - Experimento bidimensional [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – Correlações para -(CH)..... | 83 |
| Figura 50 - Estrutura planar do Lupeol - BV-3..... | 85 |
| Figura 51 - Espectro de IV- infravermelho – [pastilhas de KBr] de BV-3 | 86 |
| Figura 52 - Espectro de RMN de ¹ H[CDCl ₃ (500MHz)] de BV-3..... | 87 |
| Figura 53 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (500MHz)] de BV-3..... | 87 |
| Figura 54 - Espectro de RMN de ¹³ C [CDCl ₃ (500MHz)] do BV-3..... | 89 |
| Figura 55 - Ampliações no espectro de RMN de ¹³ C [CDCl ₃ (500MHz)] do BV-3 | 90 |
| Figura 56 - Estrutura planar da Lupenona - BV-4 | 92 |
| Figura 57 - Espectro de RMN de ¹³ C [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-4 | 93 |
| Figura 58 - Espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (300MHz)] do BV-4..... | 94 |
| Figura 59 - Estrutura de β-sitosterol e estigmasterol - BV-5 e BV-6 | 96 |

| | |
|---|-----|
| Figura 60 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] da mistura que contém BV-5 e BV-6 | 97 |
| Figura 61 - Ampliações em espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] de BV-5 e BV-6 – Região de carbonos mais protegidos..... | 98 |
| Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] do BV-5 e BV-6 | 99 |
| Figura 63 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] de BV-5 e BV-6..... | 99 |
| Figura 64 - Estrutura molecular da sitostenona - BV-7 | 101 |
| Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] de BV-7..... | 102 |
| Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] BV-7 – Região de carbono protegido | 102 |
| Figura 67 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] de BV-7 | 103 |
| Figura 68 - Estrutura básica de cadeia de ácidos graxos - mistura complexa BV-8..... | 105 |
| Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] da mistura BV-8 | 107 |
| Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] de BV-8 | 107 |
| Figura 71 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução de BV-8..... | 108 |
| Figura 72 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução da BV-8 – Ampliação | 108 |
| Figura 73 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução de BV-8 – Ampliação em faixa de m/z 290-370..... | 109 |
| Figura 74 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução da BV-8 – Ampliação em faixa de m/z 470-760..... | 109 |
| Figura 75 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução da BV-8 – Ampliação em faixa de m/z 720-995..... | 110 |
| Figura 76 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8 - Modo negativo. Faixa de m/z 270-650..... | 110 |
| Figura 77 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de m/z 250-370 | 111 |
| Figura 78 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de m/z 260-300 | 111 |
| Figura 79 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de 500-675m/z | 112 |

| | |
|---|-----|
| Figura 80 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de m/z 530-596 | 112 |
| Figura 81 - Estruturas dos principais ésteres metílicos em mistura - BV-9 | 114 |
| Figura 82 - Espectro de RMN de ¹³ C [CDCl ₃ (500MHz)] da fração EMBV B da fase MeOH | 115 |
| Figura 83 - Espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ (500MHz)] da amostra EMBV B da fase MeOH | 115 |
| Figura 84 - Cromatograma da mistura de ésteres metílicos - BV-9..... | 116 |
| Figura 85 - BV-9 A. EM do decanoato de metila - cadeia do ácido de origem (C10:0) | 117 |
| Figura 86 - BV-9 B. EM do heptadecanoato de metila – cadeia do ácido de origem (C17:0) | 118 |
| Figura 87 - BV-9 C. EM do heptadecenoato de metila – cadeia do ácido de origem (C17:1) | 118 |
| Figura 88 - BV-9 D. EM do octadecenoato de metila – cadeia do ácido de origem (C18:1) | 119 |
| Figura 89 - BV-9 E. EM do octadecanoato de metila – cadeia do ácido de origem (C18:0) | 119 |
| Figura 90 - BV-9 F. EM do docosenoato de metila – cadeia do ácido de origem (C22:5) ... | 120 |
| Figura 91 - Dados de AA% das fases frente aos padrões. Observam-se os gráficos individuais para cada padrão confrontado. Concentrações utilizadas de 50-500ppm..... | 123 |
| Figura 92 - Dados obtidos da fórmula AA% – Reação de co-oxidação de β-caroteno/ácido linolênico | 124 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Relação de fases obtidas do extrato bruto da raiz de <i>Bowdichia virgilioides</i> | 34 |
| Tabela 2 - Pesquisa preliminar de compostos nas fases orgânicas particionadas | 36 |
| Tabela 3 - Frações obtidas e agrupamentos da purificação da fase MeOH..... | 37 |
| Tabela 4 - Procedimento de purificação da fração EMBV D da fase MeOH | 38 |
| Tabela 5 - Purificação da amostra EMBV E - Obtenção da subfração EMBV E f2 | 39 |
| Tabela 6 - Purificação da amostra EMBV E-f4 – Obtenção de BV-4..... | 39 |
| Tabela 7 - Purificação da fração EMBV G – Fase MeOH..... | 40 |
| Tabela 8 - Fracionamento da EMBV G-2 | 40 |
| Tabela 9 - Agrupamento após purificação da fração EMBV G-4..... | 41 |
| Tabela 10 - Purificação de EMBV G-4D | 41 |
| Tabela 11 - Frações obtidas da fase Hex (hexânica)..... | 42 |
| Tabela 12 - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^{13}C da Isocordoína e derivados encontrados na literatura..... | 62 |
| Tabela 13 - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^1H da Isocordoína e compostos encontrados na literatura..... | 64 |
| Tabela 14 - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^{13}C do ligante isoprenil na literatura e deste ligante em BV-2..... | 65 |
| Tabela 15 - Valores de deslocamentos químicos para espectros de RMN de ^{13}C de BV-1 e compostos semelhantes encontrados na literatura..... | 76 |
| Tabela 16 - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^1H da cordoína, isocordoína e compostos encontrados na literatura | 77 |
| Tabela 17 - Valores de deslocamentos químicos para RMN de ^{13}C do ligante isoprenil na literatura, de BV-2 e BV-1 | 78 |
| Tabela 18 - Relação de deslocamentos químicos em espectros de RMN de ^1H do BV-3 comparados aos deslocamentos encontrados na literatura | 87 |
| Tabela 19 - Deslocamentos químicos em espectro de RMN de ^{13}C do BV-3 comparados aos deslocamentos encontrados na literatura..... | 90 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 20 - Deslocamentos RMN de ^{13}C do BV-4 comparados aos deslocamentos encontrados na literatura..... | 94 |
| Tabela 21 - Valores de deslocamentos químicos de BV-5 e BV-6 e respectivos dados da literatura | 100 |
| Tabela 22 - Valores de deslocamentos químicos de BV-7 frente aos dados de RMN ^{13}C da Sitostenona na literatura | 103 |
| Tabela 23 - Picos registrados em EM. Para o modo negativo são relacionadas a segunda coluna com a terceira. Modo negativo relaciona quinta e sexta colunas | 113 |
| Tabela 24 - Relação de picos identificados no Cromatograma dos ésteres metílicos | 117 |
| Tabela 25 - Resultado da exposição das larvas de artemia salina à fase MeOH frente à diferentes concentrações | 124 |

Lista de esquemas

| | |
|---|----|
| Esquema 1- Equação da reação do radical DPPH com a substância antioxidante. O produto da reação redox gera um composto incolor ou amarelado | 46 |
|---|----|

Lista de quadros

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Classes de substâncias isoladas da <i>B. virgilioides</i> | 24 |
| Quadro 2 - Substâncias identificadas..... | 48 |

Lista de abreviaturas e símbolos

| | |
|----------|---|
| AA | Atividade antioxidante |
| AcOEt | Acetato de etila |
| APCI | Ionização química a pressão atmosférica |
| ButOH | Butanol |
| CC | Cromatografia em coluna |
| CCDC | Cromatografia em camada delgada comparativa |
| CG | Cromatografia gasosa |
| d | Dubleto |
| dd | Duplo dubleto |
| δ | Deslocamento químico |
| DEPT | <i>Distortionless enhancement polarization transference</i> |
| EM | Espectrometria de massas |
| Hex | Hexano |
| HMQC | <i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i> |
| HMBC | <i>Heteronuclear multi bond correlation</i> |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| λ | Comprimento de onda |
| LPPN | Laboratório de pesquisa de produtos naturais |
| <i>m</i> | Multiplete |
| MeOH | Metanol |
| MHz | Megahertz |
| m/z | Relação massa/carga |
| ppm | Partes por milhão |

RMN de H^1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de C^{13} Ressonância magnética nuclear de carbono

s Singleto

UFBA Universidade Federal da Bahia

RESUMO

Bowdichia virgiliodes Kunt. é uma árvore de médio porte, conhecida popularmente por sucupira, pertencente à família Leguminosae, subfamília das Papilionoideae. Está dispersa entre as florestas tropicais da América do Sul. Com predomínio na Bahia é encontrada em quase todo território brasileiro, sendo muito utilizada como ornamentação, construção civil e confecção de móveis e também no tratamento de doenças. Na medicina tradicional é usada como tônico, antidiarreica, antiulcerativa, no tratamento do diabetes, reumatismo (cascas do caule) e no controle de afecções de pele (cascas do caule e sementes). Estudos fitoquímicos e biológicos anteriores impulsionaram a continuidade das pesquisas com a planta. Este trabalho propôs o estudo fitoquímico do extrato metanólico de *B. virgiliodes* e avaliação de atividade biológica das fases orgânicas polares oriundas desse extrato. As substâncias foram isoladas através do emprego de técnicas usuais de cromatografia (CC, CCDC e Sephadex LH20). As fases orgânicas obtidas da raiz da planta foram submetidas a testes de atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Neste estudo, apenas a fase MeOH foi submetida à avaliação da atividade antioxidante em reação de co-oxidação com β -caroteno e avaliação de atividade tóxica, utilizando teste de exposição de larvas de *A. salina* sp. Oriundos da fase MeOH e Hex foram evidenciadas duas chalconas, a cordoína BV-1 e isocordoína BV-2. Na fase MeOH, foram propostos o lupeol BV-3 e, em mistura, a lupenona BV-4; esteroides que incluem β -sitosterol BV-5, estigmasterol BV-6 e sitostenona BV-7, além de ácidos graxos raros e triglicerídeos, cuja constituição foi identificada a partir dos ésteres metílicos oriundos de reação de transesterificação. A determinação estrutural das substâncias foi realizada a partir da análise dos dados de EM, CG-EM RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT. Também foram usadas técnicas de análise bidimensional de RMN (HMBC e HMQC). A avaliação dos testes de atividade antioxidante, *in vitro*, demonstrou que as fases MeOH e AcOEt exibiram atividade moderada frente aos padrões. Os testes de atividade antioxidante, *in vitro*, utilizando método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linolênico, feitos para fase MeOH, demonstraram grau de atividade moderada. Os testes de atividade citotóxica, *in vivo*, usando método de exposição de larvas de *Artemia salina*, feitos apenas para fase MeOH, mostraram alto grau de toxicidade.

Palavras-chave: *Bowdichia virgiliodes*, antioxidantes, triterpenos, chalconas.

ABSTRACT

Bowdichia virgilioides Kunt. is a medium sized tree, popularly known as sucupira. Its belongs to the family Leguminosae (subfamily Papilionoideae). It is distributed over the tropical forests of South America. With predominance in Bahia is found in almost all Brazilian territory, so much used ornamentation, construction and manufacture of furniture and treatment diseases as all. In traditional medicine is used as a tonic, anti-diarrheal, anti- ulcerative, in the treatment of diabetes, anti- rheumatic (stem bark) and control skin disorders (stem bark and seeds). Previous phytochemical and biological studies promoted the continuity of research with the plant. This paper proposed the phytochemical study of MeOH extract of *B. virgilioides* and evaluation of biological activity of the polar organic phases resulting from this extract. The compounds were isolated from usual techniques of chromatography (CC, CCDC and Sephadex LH20). The organic phases obtained from the plant root were subjected to antioxidant activity against the DPPH test. In this study, only the phase MeOH was subjected to evaluation of antioxidant activity in the co-oxidation reaction of β -carotene/ linolenic acid and evaluation of toxic activity and the brine shrimp test (*A. salina*). Coming from MeOH and Hex phase were shown two chalcones , the BV-1 cordoin and isocordoin BV-2 . The MeOH phase have been proposed BV-3 lupeol and in admixture , BV-4 lupenona ; steroids including BV-5 β -sitosterol , BV-6 stigmasterol and BV-7 sitostenone, and rare fatty acids and triglycerides, the formation of which was identified as the methyl esters derived from transesterification reaction. The structural determination of compounds required the analysis of data obtained through experiments in MS, GC-MS and NMR ^1H and ^{13}C and DEPT. They were also used for two-dimensional analysis techniques NMR (HSMC and HMBC). For evaluation of the antioxidant activity tests *in vitro* showed that the MeOH and EtOAc phases exhibited moderate activity compared with the standards. The tests for antioxidant activity *in vitro* using the method of the co-oxidation of β -carotene/Linolenic acid phase made of MeOH, demonstrated a moderate degree of activity. Cytotoxicity tests, *in vivo*, using brine shrimp test showed high degree of toxicity of MeOH.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*, antioxidants, triterpenes, chalcones.



1. INTRODUÇÃO

O território brasileiro abriga uma das maiores biodiversidades da flora mundial. Por sua dimensão, heterogeneidade, seu patrimônio genético e a grande diversidade endêmica, a existência de seus biomas exerce forte influência na manutenção da biodiversidade mundial (APG II 2003; AMAZONIA, 2004; SOUZA & LORENZI, 2008).

Com cerca de 55 mil espécies de plantas já catalogadas, o Brasil se apresenta como um dos territórios mais valiosos no que se refere ao seu potencial para desenvolvimento de novas terapias medicamentosas. Em contraponto, apesar da imensa diversidade da flora brasileira, poucas espécies já tiveram seu metabolismo secundário investigado e, ainda assim, contribuíram para o conhecimento da química medicinal (LEWIS, 1987).

A família Leguminosae se distribui por todo o mundo e, em especial, reserva a maioria de suas espécies nas regiões tropicais, incluindo o território brasileiro (LEWIS, 1987). No Brasil, são estimados aproximadamente 200 gêneros e 2.100 espécies (Lima, 2000; SOUZA & LORENZI, 2008).

Dentre as dicotiledôneas, a família Leguminosae é a terceira maior, com cerca de 19.325 espécies e 727 gêneros, sendo superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e é a maior família dentro da ordem Rosales. Estudos botânicos anteriores sugerem três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae. Esta última é considerada mais diversa, com maior número de representantes (cerca de 13.800), o que remete monofiletismo junto à Leguminosae (LEWIS, 1987; POLHILL et al., 1981; APG II 2003). A produção de metabólitos secundários oriundos da família é bastante estudada. Estudos apontam a subfamília Mimosoideae rica em catequinas, leucoantocianidinas e outros taninos. A Caesalpinioideae tem elagitânicos (em *Caesalpinia*) enquanto que Papilionoideae caracteriza-se por ter isoflavonas e rotenóides, mas também são ricas em antocianinas e flavonóis glicosilados (HARBORNE, 1967).



Estudos botânicos recentes, contudo, apontam para um monofiletismo da Leguminosae, sendo contida no grupo das Fabales e em conjunto com Polygalaceae, Quillajaceae e Surianaceae. Nesse sentido, atualmente, considera-se Leguminosae e Fabaceae como uma única família, evitando-se designações das subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae como famílias distintas (APG II 2003).

Bowdichia virgilioides Kunt. (Leguminosae) é uma árvore de tamanho médio encontrada nas florestas tropicais da América do Sul. No Nordeste do Brasil é popularmente conhecida como "sucupira". Sua casca é usada para a cura de feridas, como anti-ulcerativa e como anti-diabético (BACCHI, 1986; Oliveira & Saito, 1987-1989; Macedo & Ferreira, 2004), enquanto as sementes são utilizadas no tratamento de reumatismo, artrite e doenças de pele (CRUZ, 1965). Diversos outros trabalhos indicam a importância deste vegetal para o conhecimento em química farmacêutica e medicinal. Por exemplo, o isolamento de compostos com atividade experimentalmente evidenciada como óleo essencial e flavonoides (ARRIAGA et al., 1998.); triterpenos e alcaloides (TORRENEGRA et al, 1985; MARINHO et al, 1994) e um constituinte dihidrobenzofurano (MELO et al, 2001).

Pesquisas anteriores apontam a utilização de chás e macerados em uso diário – 1 litro de água para um punhado de folhas e cascas do caule - para o tratamento de doenças do trato gastrointestinal e de pele (BRANDÃO et al., 2006). O uso de derivados de droga vegetal, oriundos da *B. virgilioides*, como anti-inflamatórios levou a estudos que atribuem a atividade biológica evidenciada para isoflavonoides glicosilados como a odorantina (VELOZO et al., 1999).

Estudos menos recentes revelaram atividade hipoglicêmica do extrato da casca, comparando ratos normais e ratos diabéticos. Além disso, os resultados frente a testes de atividade antimalárica *in vitro* (IC 50 = 1 ug/mL) e *in vivo* (51 % a 100 mg/kg) foram satisfatórios (LEÔNCIO et al., 1994). Em outro estudo, o extrato etanólico da casca do caule demonstrou atividade anti-inflamatória satisfatória, quando testado em doses orais de 100mg/ml, em modelo utilizando ratos e camundongos. Para o primeiro grupo, observou-se redução de edema de pata



induzido por carregenina e, para o segundo, redução de contorções abdominais induzidas por ácido acético; além de outras conclusões que validaram a crença popular (BARROS, et al., 2010). Pelo potencial terapêutico e importância que apresenta, a espécie foi incluída na primeira Farmacopéia Brasileira (BRANDÃO et al., 2006).

Somados ao conteúdo de plantas nativas, microorganismos e minerais; os povos nativos, indígenas e pessoas de comunidades, detentores de conhecimento tradicional sobre o uso de diversos exemplares de plantas, formam um conjunto complexo de experiências de grande valor para pesquisas fitoquímicas (FUNARI, 2005). O debruçar sobre estas riquezas materiais e humanas diminui o tempo para as pesquisas em desenvolvimento de fármacos chegarem até um produto a ser consumido pela sociedade, uma vez que a indicação de uso do vegetal compreende um largo passo dado dentro da investigação fitoquímica do vegetal (AMAZONIA, 2004).

1.1 Justificativa

A utilização de plantas medicinais como alternativa para prevenção, tratamento ou até mesmo a cura de determinadas enfermidades é de fato uma prática bastante antiga e que se estende até os dias atuais. Estima-se que 2/3 da população mundial faz uso de medicamentos a base de plantas para fins terapêuticos (CALIXTO, 2000).

Diversos países no mundo vêm adotando a crença de que produtos terapêuticos de origem natural têm menor potencial de rejeição ou tóxico, o que tem propiciado maior consumo e mais atenção para eficácia destes produtos (RATES, 2001; CHOI et al., 2002; JUNIOR & PINTO, 2005). Admite-se que o aumento no uso de produtos derivados de plantas em países desenvolvidos cresceu muito e que ¼ dos fármacos comercializados tem origem vegetal (YUNES & CALIXTO, 2001).



O mercado farmacêutico movimenta cerca de 320 bilhões de dólares/ano (SIMÕES et al., 1999). O crescimento deste mercado nos EUA e Europa foram alucinantes na década de 1990 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Em países em desenvolvimento, em que o acesso aos medicamentos alopáticos é mais restrito que em países desenvolvidos, a grande maioria da população depende das plantas medicinais para cuidados simples (CALIXTO, 2000). Segundo a OMS, cerca de 2/3 da população mundial fazem uso de plantas como primeira escolha no tratamento. Os fitoterápicos já movimentam o mercado mundial de medicamentos de maneira expressiva, cerca de US\$ 22 bilhões de ano. De 2000 a 2010, EUA e Europa atingiram cerca de US\$ 15 bilhões juntos. No Brasil, o comércio de fitoterápicos corresponde a aproximadamente 5% do mercado total de medicamentos, mais de US\$ 400 milhões (OPAS, 2004).

Ao longo do território brasileiro há o comércio de plantas e derivados de droga vegetal em feiras livres (SILVA, 2001). São raízes, caules, extratos, etc. Toda essa matéria é vendida livremente por sua popularidade. Além disso, o perfil do vendedor é em sua maioria de uma pessoa que desconhece os riscos e/ou não podem atestar fielmente os benefícios de uso destes produtos (ARAUJO et al., 2009). De fato, a população em geral utiliza de algum modo os produtos naturais para melhora do bem estar. No entanto, a prática ainda é feita de maneira empírica, por conta própria e sem orientação (JUNIOR & PINTO, 2005). Há um desconhecimento da composição química responsável do efeito desejado, do efeito esperado ou indesejado.

Os óleos essenciais, classe de metabólitos de origem vegetal, possuem dentre outras atividades a capacidade de serem anti-inflamatórios e antimicrobianos. Estudos apontam que óleos essenciais de frutos de *Bowdichia virgilioides* contendo farnesol, geraniol e cariofileno apresentaram atividade antimicrobiana (JORGE-NETO, 1970). Em outros trabalhos, foi relatado presença de constituintes voláteis em raízes (ARRIAGA et al., 1998) e, em sementes, foi registrada atividade do óleo essencial contra espécies de *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. vulgaris*, *Enterococcus faecalis* Gram - positivas e *Staphylococcus aureus*; porém com baixa atividade frente



organismos Gram – negativos como *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* e *E. coli* (FEITOSA et al., 2004).

Dentre as diversas classes de compostos bioativos oriundos de vegetais, os flavonoides compreendem um grupo de substâncias com 15 átomos de carbono compondo o esqueleto principal, distribuídos em fórmulas estruturais bastante variadas (MIDDLETON et al., 2000). Estes compostos tem elevado potencial farmacológico visto suas propriedades já relatadas na literatura; tem potencial anticarcinogênico e também antinociceptivo, além de propriedades antimicrobianas. São encontrados facilmente em frutas cítricas, folhas, flores e fazem parte do consumo humano diariamente (JUCK et al., 2004; ALCARAZ & CARVALHO, 2004).

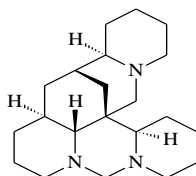
Os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal, principalmente no grupo de vegetais superiores. Por fazer parte da dieta humana em grande escala e por seu potencial farmacológico, esta classe de metabólitos secundários tem atraído a atenção de pesquisadores que procuram elucidar os diferentes mecanismos que envolvem as atividades biológicas já evidenciadas no meio científico. No que tange a manutenção do equilíbrio energético e respiratório do vegetal, os flavonoides atuam como reguladores de canais de ferro, catalisadores e/ou antioxidantes, visto que participam de reações enzimáticas importantes na fotofosforilação. Sua estrutura química permite também a função de absorção da radiação solar, em especial a banda UV-B (280-315 nm) protegendo o vegetal de danos celulares causados pelo estresse hídrico (ALVES et al., 2007).

Diversos constituintes químicos de várias classes de metabólitos já foram encontrados na espécie *Bowdichia virgilioides*. Alcaloides, benzenoide, esteroides, triterpenos, isoflavonoides (TORRENEGRA et al., 1989; MARINHO et al., 1994; BARBOSA-FILHO et al., 2004), flavonoides, óleos essenciais (JUCK et al., 2006; VELOZO et al., 1999; ARRIAGA et al., 2000), e um composto benzofurânico, (MELO et al., 2001). Abaixo, no Quadro 1, esqueletos orgânicos já elucidados, isolados da *B. virgilioides*.

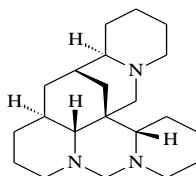


Quadro 1 - Classes de substâncias isoladas da *B. virgilioides*

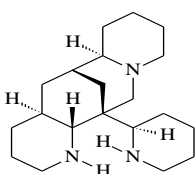
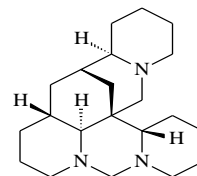
Alcaloides



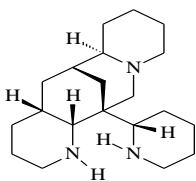
Homoormosanina
(TORRENEGRA et al., 1985)



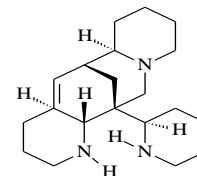
Homo-18-epiormosanina e Homopiptantina
(TORRENEGRA et al., 1989)



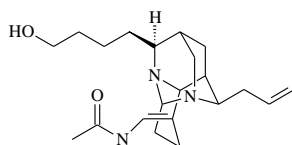
Ormosanina
(BARBOSA-FILHO et al., 2004)



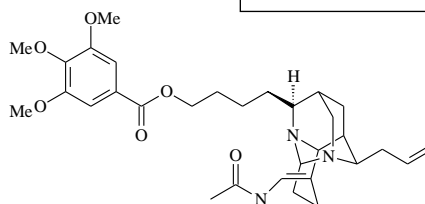
Piptantina (MARINHO et al., 1994)



Bowdichina, BARBOSA-FILHO et al., 2004)

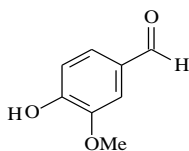


Acosmina (BARBOSA-FILHO et al., 2004)



Podopetalina (BARBOSA-FILHO et al., 2004)

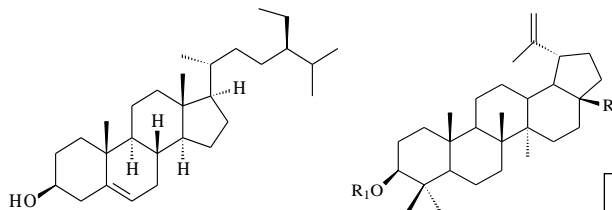
Benzenoide



4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído
(MARINHO et al., 1994)



Triterpeno e esteroides

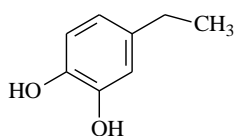


β -sitosterol (MARINHO et al., 1994)

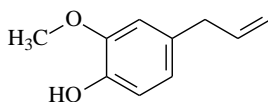
R₁= H R₂= CH₃ Lupeol
Ac CH₃ Acetato de lupeol
H COOH Ácido betulínico
H CH₂OH Betulinol

(MARINHO et al., 1994; TORRENEGRA et al., 1989; ARRIAGA et al., 2000; NAVARRO et al., 1999; GOMES, 1997).

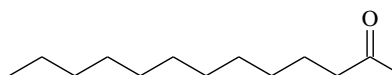
Constituintes do óleo essencial (ARRIAGA et al, 1998)



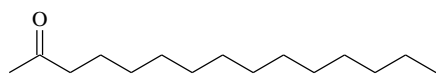
4-etilfenol



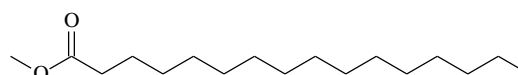
4-etil-2-metoxi-fenol



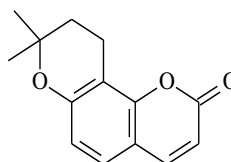
2-tridecanona



2-pentadecanona



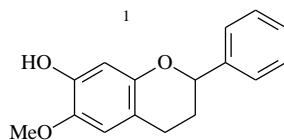
Hexadecanoato de metila



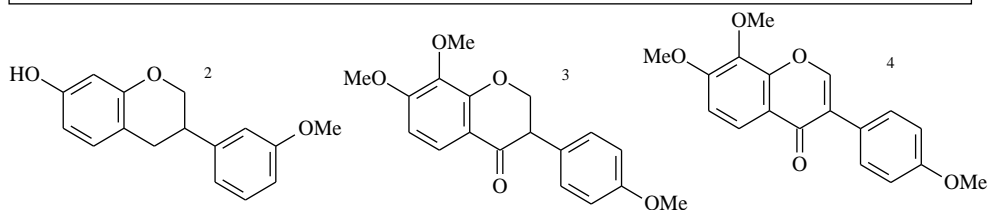
Seselina



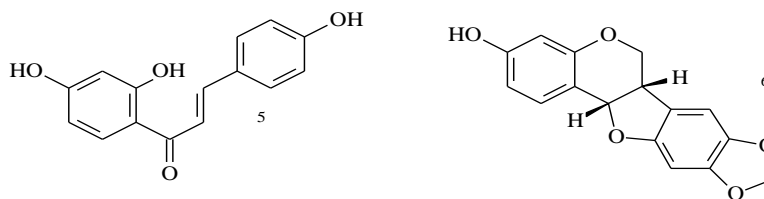
Flavonoides



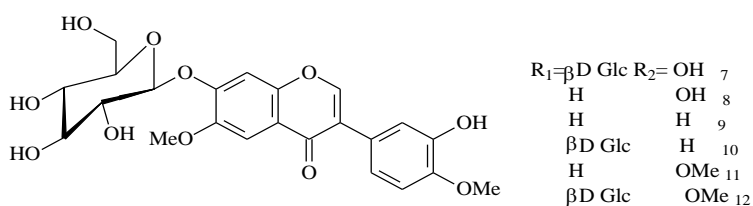
7-hidroxi-6-metoxiflavona (1)



7,-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona (2) ;7,8,4'-trimetoxiisoflavona (3) e 7,8,4'-trimetoxi-isoflavanona (4) (JUCK et al., 2006)



isoliquiritigenina (5) e (-)-maackiaína (6) (JUCK et al., 2006)

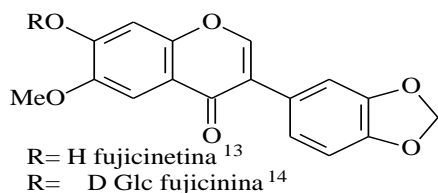


$R_1 = \beta$ D Glc $R_2 =$ OH 7
H OH 8
H H 9
 β D Glc H 10
H OMe 11
 β D Glc OMe 12

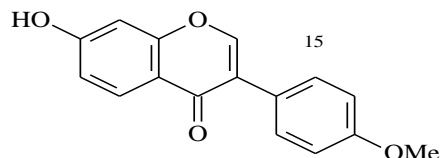
odorantina-7-O- β -D-glucopiranosídeo (7); odorantina (8); afromosina (9); wistina (10); cladrastina (11); cladrastina-7-O- β -D-glucopiranosídeo (12) (VELOZO et al., 1999)



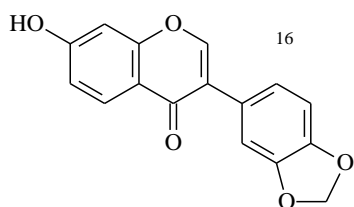
Outros - flavonoides



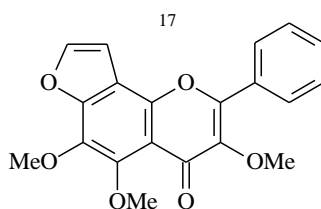
Fujicetina (13) e fujicinina (14) (VELOZO et al., 1999)



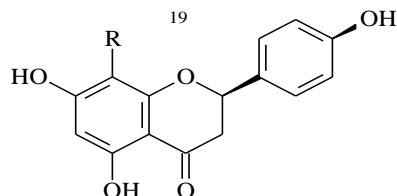
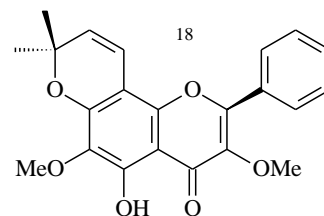
Formononetina (15) (VELOZO et al., 1999)



Pseudobaptigenina (16) (GOULART, et al. 2011)



3,5,6-trimetoxifurano-(7,8,2'',3'')-flavona (17) 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetilcromeno(7,8,2'',3'')-flavona (18) (ARRIAGA et al., 2000)



Isohemifloína VELOZO et al., 1999

Um estudo investigativo, capaz de traçar um perfil químico dos derivados da flora brasileira, é de grande importância para o futuro da medicina popular e também tradicional, pois asseguraria o(a) paciente e o(a) prescritor(a) do potencial curativo ou de tratamento do derivado vegetal que está se utilizando. Além disso, o isolamento e a compreensão da atividade de tais compostos, diante do grande potencial agregado na biodiversidade, pode ser uma alternativa para a indústria de desenvolvimento de fármacos e para agricultura (YUNES & FILHO, 2001). Visando encontrar novos compostos, que possam contribuir para o conhecimento fitoquímico já debruçado sobre a espécie *Bowdichia virgilioides* Kunt., faz-se necessário a continuidade das observações sobre os produtos do seu metabolismo secundário.



1.2 Levantamento Botânico

A *Bowdichia virgilioides*, da família Leguminosae - Papilionoideas são árvores de porte variável, mediano (entre 8 e 16 m de altura quando adulta), segundo a natureza do terreno, com tronco reto ou contorcido, coberto de casca grossa, rugosa, áspera, fendilhada e cinzenta (Figuras 1 e 2, págs.28 e 29). Possuem frutos do tipo legumes indeiscentes abrigam sementes vermelho-alaranjadas, com 3 a 5 mm. As folhas são pinadas, folíolos pubescentes e as flores de 2-3 cm de comprimento, azul-escuras, dispostas em panículas do tipo papilionoides; cálice zigomorfo, turbinadocampanulado, hipanto curvado, carnoso, os dois vexilares parcialmente unidos; pétalas cinco, lilás. Por fim, as vagens possuem 5 cm de comprimento, polispérmicas (RIZZINI, 1990; BRAGA, 1953).

Figura 1 - Imagem da planta da qual foi coletada amostra das raízes – arredores do Instituto de Física da UFBA - IFUFBA



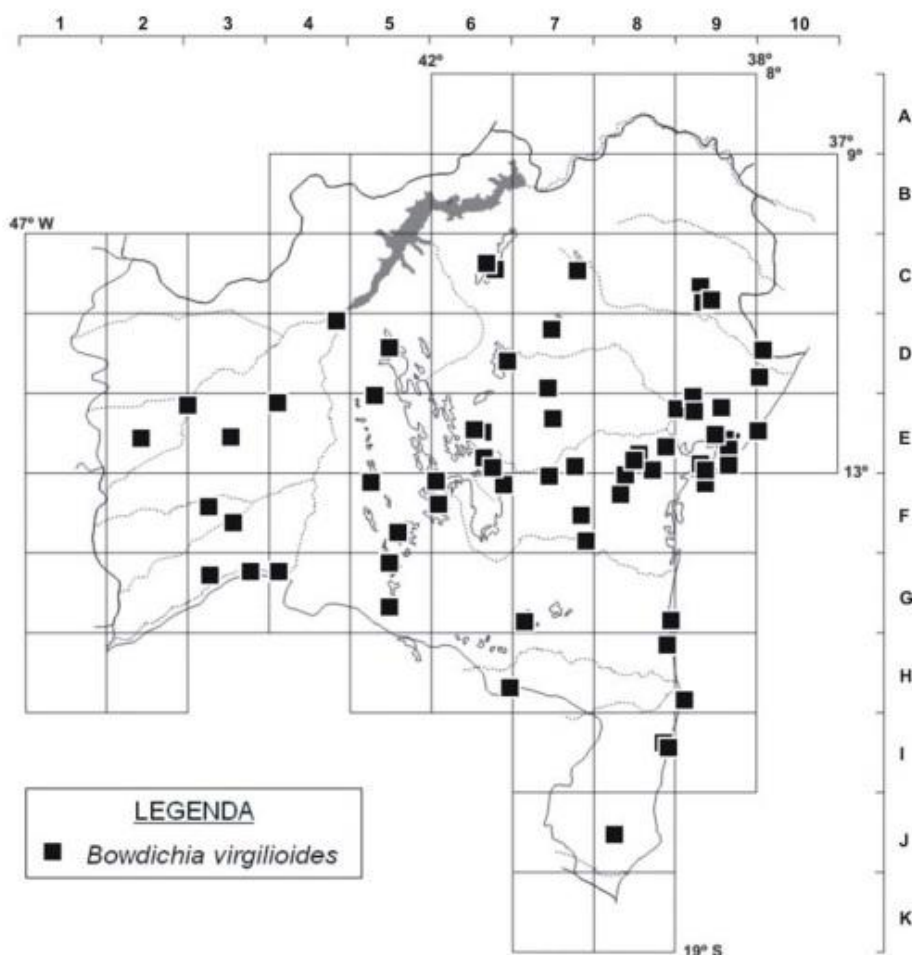
Figura 2 - Descrição botânica da espécie *B. virgilioides*

Cardoso, D. B. O. S. *Taxonomia da tribo Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae) na Bahia, Brasil*. Diss. MS Thesis, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brazil, 2008.

O gênero *Bowdichia* se apresenta em duas espécies, ambas dispersas no Brasil (PENNINGTON et al., 2005). A espécie *B. virgilioides* é encontrada facilmente na Bahia e em biomas descritos como: caatinga, cerrado, floresta atlântica costeira, floresta ombrófila montana, floresta de restinga, floresta semidecidual e mata ciliar (Figura 3, pág.30). Estudos toxonômicos que utilizaram parâmetros moleculares categorizaram *Bowdichia* no clado genistoide, tendo como gêneros mais próximos *Acosmium* e *Diploptropis* (PENNINGTON et al., 2001).



Figura 3 - Distribuição geográfica da espécie na Bahia



Cardoso, D. B. O. S. *Taxonomia da tribo Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae) na Bahia, Brasil*. Diss. MS Thesis, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brazil, 2008.

Amplamente dispersa pelo Brasil, *B. virgilioides*, também conhecida vulgarmente como sucupira-preta tem bastante utilidade na construção civil e confecção de móveis, devido sua madeira ser bastante resistente. A espécie é de grande importância econômica e biológica, pois além do seu potencial paisagístico, também faz parte de programas de reflorestamento, uma vez que sua copa é abrigo de diversas aves e seus frutos fazem parte do cardápio desses animais. (DA SILVA et al., 2011; LORENZI, 1992). É uma espécie arbórea e facilmente adaptada a áreas de clima seco e terrenos pobres (BRANDÃO & FERREIRA, 1991). Encontrada na



Venezuela, Guianas, Amazônia, Centro do Brasil até São Paulo e na região Nordeste. Adquire diversas denominações de acordo com o lugar onde ocorre, como cutiúba, cutiubeira, sapupira-do-campo no Pará e sucupira-branca, sucupira-do-campo, sepifirme, em Minas Gerais (CORREIA, 1984).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O trabalho se propõe à pesquisa fitoquímica da espécie *Bowdichia virgilioides* Kunt., através do isolamento de novos esqueletos orgânicos oriundos das raízes deste vegetal encontrado no território baiano.

2.2 Objetivos específicos

- Contribuir para o conhecimento taxonômico e químico dos metabólitos secundários produzidos pela espécie *B. virgilioides*;
- Isolar novos compostos químicos oriundos do metabolismo secundário das raízes da *B. virgilioides*, utilizando métodos físicos cromatográficos usuais de extração e isolamento;
- Avaliar o potencial biológico dos extratos, através de testes de atividade antioxidante *in vitro*: DPPH e reação de co-oxidação β -caroteno/ácido linolênico mais teste de letalidade *in vivo*: teste de exposição da *A. salina*;
- Determinação estrutural de esqueletos orgânicos protótipos para pesquisa de novos fármacos, através de espectroscopia (RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT), assim como análise por HMBC e HMQC, EM e dados comparados na literatura;



3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Coleta

As raízes de um exemplar da espécie *B. virgilioides*, foram coletadas no próprio campus da Universidade Federal da Bahia, em junho de 2012, aos arredores do Instituto de Física. A identificação da amostra foi feita no departamento de Botânica do Instituto de Biologia - IBIO-UFBA, pela Profa. Maria Lenise S. Guedes.

3.2 Procedimentos laboratoriais

O coletado das raízes foi seco em temperatura ambiente e livre de umidade. A moagem foi realizada utilizando moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4. Os solventes empregados na separação e preparo das fases orgânicas, bem como nas eluições das cromatografias em placa e coluna (hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano) foram de grau analítico da marca Quimex. Nos processos de separação por CC os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60(63-200) Acros, com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm; Sephadex LH-20 da Pharmacia para permeação e sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm da Acros.

Para CCDC foram utilizadas placas preparadas com gel de sílica 60 PF 254+366 20x20 da Altech, que foram ativadas em estufa a 100 °C por 1 h. Utilizaram-se como reveladores para as placas CCDC irradiação com luz UV (254 e 366 nm) em cabine Spectroline CM-10 que utiliza lâmpada própria Enf-260, vapores de iodo e outros reveladores químicos como reagente de Liebermann-Burchard, soluções de $AlCl_3$ ou $FeCl_3$, e reagente de Dragendorff.



As soluções reagentes foram preparadas no próprio LPPN. O reagente de Liebermann- Burchard foi preparado usando 10ml de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) concentrado e 10ml de $(CH_3CO)_2O$ (anidrido acético). A essa mistura foram adicionados 50ml de etanol (C_2H_6O) resfriado em banho de gelo; as soluções de $AlCl_3$ ou $FeCl_3$ foram preparadas utilizando 1,6g de $FeCl_3$ ou $AlCl_3$ para 1L de solução de HCl 0,001M. Já para o reagente de Dragendorf foram usados 10g de subnitrato de bismuto [$Bi_5O(OH)_9(NO_3)_4$] dissolvidos em 20ml de ácido nítrico diluído a 30% v/v. A parte, preparou-se solução saturada de iodeto de potássio (KI). Ver-teu-se a primeira solução à segunda e a mistura originou o referido reagente.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando-se rotaevaporadores das marcas BUCHI modelo 461, e IKA LABORTECHNIK modelo HB4 basic, com temperatura em geral entre 35 e 50 °C.

Em reação de derivatização, foi proposta transesterificação que ocorreu por catálise básica com a hidrólise dos triacilglicerídeos, utilizando-se solução de EtOH/KOH (3mg/ml) e submetendo 20mg a refluxo por 2 horas. Após o solvente ser evaporado, a mistura foi particionada usando $CHCl_3$ para remoção de compostos insaponificáveis. A fase alcalina foi tratada com HCl concentrado e, posteriormente, foram feitas novas partições para obtenção dos ácidos graxos livres. A massa de ácidos graxos livres foi dissolvida em MeOH e sofreu adição de H_2SO_4 concentrado para então ser refluxada por 1hora. Após resfriamento, foram adicionados 20ml de solução de NaCl e, em seguida, a mistura passou por extração com CH_2Cl_2 para obtenção dos ésteres metílicos.

Os espectros de massa foram obtidos em detector de massas da Amazon Speed ETD – Bruker Daltonics, requisitados à Central Analítica da Universidade de São Paulo - USP. A amostra de ácidos graxos livres – AGL foi inserida diretamente utilizando técnica ESI(-) e, por conseguinte, usando ESI(+). Já a amostra de ésteres metílicos passou por CG-MS, gerando cromatograma em alta resolução e, em sequência espectros de massa, que foram comparados com banco de dados do equipamento para então designação dos compostos em mistura. Os espectros de



RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, HMBC e HMQC foram registrados em espectrômetro da Bruker modelo AC300 ou AC500 operando a 300 MHz ou 500MHz, utilizando-se CDCl_3 como solvente.

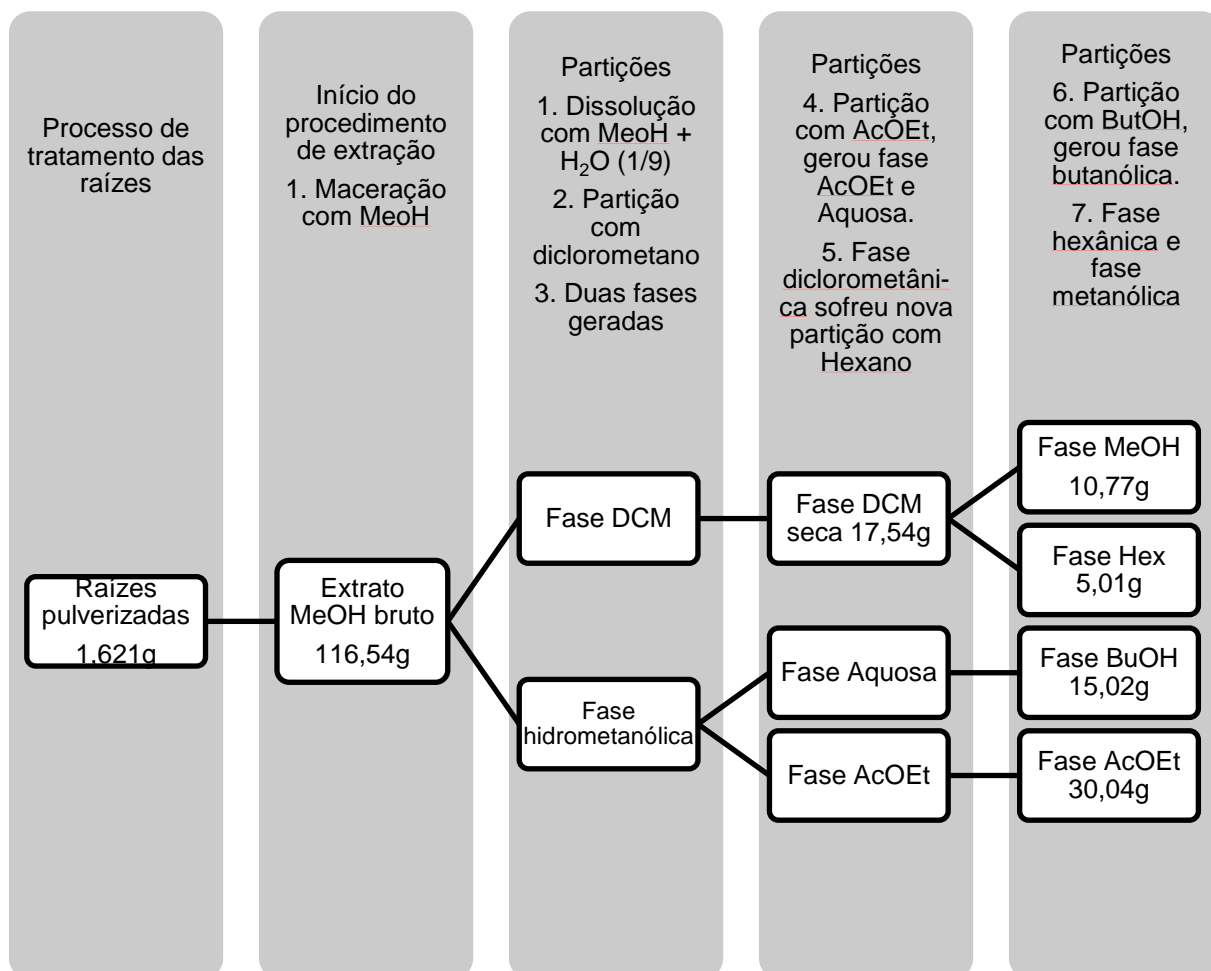
3.3. Preparação dos extratos

As raízes foram submetidas à moagem após secagem. O material pulverizado (1,621kg) foi então submetido à maceração em MeOH, por quatro extrações (3000ml) consecutivas, com cerca de 48 horas cada, e o filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado sob pressão reduzida, originando o extrato metanólico bruto das raízes (116,54g). Este, por sua vez, foi diluído em MeOH/ H_2O (9/1) e particionado com diclorometano, dando origem a duas fases, a diclorometânica(DCM) e a hidrometanólica. A fase hidrometanólica do extrato bruto foi particionada com acetato de etila, originando as fases AcOEt e aquosa. Esta última foi posteriormente particionada com butanol, formando a fase BuOH (não trabalhada) e a fase aquosa foi descartada conforme esquema proposto na Figura 4, pág.35. As fases obtidas foram concentradas, pesadas e rotuladas, conforme demonstrado na Tabela 1.

A fase DCM, previamente concentrada em rotaevaporador, foi novamente solubilizada em metanol, particionada usando hexano e, por conseguinte, originou as fases Hex e MeOH.

Tabela 1 - Relação de fases obtidas do extrato bruto da raiz de *Bowdichia virgilioides*

| Fases após partição | Massa em gramas dos extratos |
|---------------------|------------------------------|
| Fase AcOEt | 30,01 |
| Fase BuOH | 15,02 |
| Fase MeOH | 10,77 |
| Fase Hex | 5,02 |

Figura 4 - Procedimento laboratorial inicial para obtenção do extrato bruto e fases orgânicas da *B. virgilioides*

3.4 Procedimentos iniciais de análise das fases orgânicas polares

Ao término das partições, as fases orgânicas polares foram submetidas a testes presuntivos de determinadas classes de compostos. Foram preparadas CCDC dos extratos obtidos, eluídas com CHCl₃:MeOH (99:1). Também foi utilizado eluente Hex:AcOEt (99:1) como forma de avaliar a melhor solução para eluição. As placas foram reveladas usando UV e iodo. Além destes reveladores, as placas referidas foram pulverizadas com soluções preparadas dos reagentes de Liebermann-Burchard; teste com AlCl₃; FeCl₃ e Dragendorff, avaliando a presença de triterpenos e esteroides, compostos fenólicos e alcaloides, respectivamente. O



aparecimento de coloração roxa na placa CCDC sugere teste positivo para Liebermann-Burchard; amarelo-esverdeado positivo para $AlCl_3$; vermelho tijolo positivo para $FeCl_3$ e para o teste usando o reagente de Dragendorff é possível ver as cores amarelo, laranja ou marrom. A Tabela 2 revela o perfil apresentado pelas fases orgânicas.

Tabela 2 - Pesquisa preliminar de compostos nas fases orgânicas particionadas

| Fases / Testes | Liebermann-Burchard | $AlCl_3$ | $FeCl_3$ | Dragendorff |
|----------------|---------------------|----------|----------|-------------|
| Hex | + | + | + | + |
| AcOEt | - | - | + | + |
| MeOH | + | + | + | + |

Ao final do procedimento acima, as fases orgânicas particionadas do extrato bruto seguiram para avaliação de atividade antioxidante *in vitro*. A massa obtida da fase MeOH, somado aos resultados dos testes de atividade antioxidante, usando metodologia do sequestro do radical estável DPPH, guiaram a pesquisa para o fracionamento da mesma e, por conseguinte, o fracionamento da fase Hex. Testes posteriores, feitos com a fase MeOH, usando método da reação de co-oxidação β -caroteno/ácido linolênico para AA (atividade antioxidante) e atividade tóxica, pela exposição de larvas de *Artemia*, colaboraram para o estudo fitoquímico da planta.

3.5 Fracionamento da fase MeOH das raízes

A fase MeOH (10,77g) foi submetida CC, empregando-se sílica gel 60 como suporte e como fase móvel uma mistura de $CHCl_3$:MeOH em grau crescente de polaridade. Desta coluna inicial foram recolhidas 75 frações de 50 mL, que foram reunidas posteriormente em 12 subfrações (Tabela 3, p.37) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo.

**Tabela 3** - Frações obtidas e agrupamentos da purificação da fase MeOH

| Frações agrupadas | Códigos | Massa total | Compostos e misturas |
|---------------------------------|---------|---------------|-------------------------------|
| f1 + f2 | EMBV A | 52mg | |
| f3 + f4 | EMBV B | 362mg | BV-9 |
| f5 – f8 | EMBV C | 253mg | |
| f9 – f15 | EMBV D | 710mg | BV-1 e BV-2 |
| f16 – f25; f26 (precipitado) | EMBV E | 69mg 110mg | BV-3, BV-4 |
| f27 – f35 | EMBV F | 397mg | |
| f36 – f42 | EMBV G | 1207mg | BV-5, BV-6, BV-7, BV-8 |
| f44 – f46 | EMBV H | 284mg | |
| f47 – f50 | EMBV I | 483mg | |
| f51 – f60 | EMBV J | 923mg | |
| f61 – f68 | EMBV K | 860mg | |
| f69 – f75 | EMBV L | 848mg | |

No curso do processo de purificação através de CC, algumas frações apresentaram formação de corpo de fundo e/ou pequenos cristais pré-formados. Tais frações foram separadas e purificadas utilizando lavagem com solventes seguido de filtração ou coluna Sephadex LH20. As seguintes frações EMBV B; EMBV D e a fração f26 foram separadas para análises de elucidação estrutural, com exceção da EMBV43, que não foi trabalhada. A fração EMBV B apresentou aspecto oleaginoso, foi filtrada e, após análise de RMN de ^1H e ^{13}C , chegou-se à mistura **BV-9**. Já a EMBV26 foi lavada com metanol PA e, seguindo os resultados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , chegou-se à proposta do composto **BV-3**. A EMBV D apresentou cristais pontiagudos e cor amarelo-brilhante, que após purificação deu origem aos compostos propostos **BV-1 e BV-2**. As propostas para as misturas **BV-4, BV-5, BV-6, BV-7 e BV-8** desenvolveram-se ao longo do isolamento por CC de frações subsequentes.



3.5.1 Purificação da fração EMBV D – obtenção de BV-1 (cordoína) e BV-2 (isocordoína)

A fração EMBV D foi submetida à coluna sephadex LH20, utilizando a mistura DCM:MeOH (1:1) como eluente. Foram coletadas cinco subfrações: f1, f2, f3, f4 e f5. Seguindo as observações em CCDC reveladas em iodo, separaram-se as frações f1 e f3. A f2, que apresentava aparentemente uma mistura, passou por nova Sephadex LH20, separando, por conseguinte, os componentes da f1 e f3 como descrito na Tabela 4. As frações f4 e f5 não foram trabalhadas, pois em CCDC revelada em iodo demonstraram se tratar de mistura complexa.

Tabela 4 - Procedimento de purificação da fração EMBV D da fase MeOH

| Códigos | Frações | Massa (mg) |
|---------|---------|------------|
| EMBV D | f1 | 90mg |
| EMBV D | f2 | 174mg |
| EMBV D | f3 | 7mg |
| EMBV D | f4 | 100 mg |
| EMBV D | f5 | 50mg |

Análises de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, juntamente com IV, além de observações das correlações em HMBC e HMQC, permitiram identificar a subfração f1 como **BV-1** e f3 como **BV-2**.

3.5.2 Purificação da fração EMBV E – Obtenção de BV-3 (lupeol) e BV-4 (lupenona)

A fração EMBV E foi submetida à coluna sephadex LH20, utilizando a mistura DCM:MeOH (1:1) como eluente. Foram coletadas 4 subfrações, identificadas pela série f1 – f4, das quais a penúltima e última foram reunidas na subfração f4. Foram utilizadas padrões de lupeol e sitosterol que, aplicadas juntamente às subfrações em análise por CCDC, permitiram a separação preliminar da subfração f2, que apresentou mesmo R_f (padrão de eluição) e foi revelado em iodo (Tabela 5, p.39).



Tabela 5 - Purificação da amostra EMBV E - Obtenção da subfração EMBV E f2

| Códigos | Frações | Massa (mg) |
|---------|---------|------------|
| EMBV E | f1 | 12,7mg |
| EMBV E | f2 | 24mg |
| EMBV E | f4 | 35,9mg |

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da subfração f2 mais a CCDC e a observação dos dados de infra-vermelho - IV comprovaram ser o **BV-3**.

Após análise comparativa de CCDC e RMN de ^1H e ^{13}C , a **EMBV26 (69mg)** foi confirmada como também sendo a substância **BV-3 - lupeol**.

A subfração f1 não foi trabalhada e a subfração f4, que demonstrou padrão de eluição Rf distinto das anteriores, foi novamente purificada em Sephadex LH20 (Tabela 6).

Tabela 6 - Purificação da amostra EMBV E-f4 – Obtenção de BV-4

| Códigos | Frações | Massa (mg) |
|------------|---------|------------|
| EMBV E- f4 | f1' | 3mg |
| EMBV E- f4 | f2' | 12mg |
| EMBV E- f4 | f3' | 20mg |

O fracionamento da EMBV E-f4 levou à separação da subfração EMBV E f4-f2'. Após análise de RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com análises das CCDC reveladas em Liebermann-Burchard, propôs-se o composto **BV-4 - lupenona** em mistura.

3.5.3 Purificação da fração EMBV G - isolamento de BV-5, BV-6, BV-7 E BV-8

A fração EMBV G foi submetida à coluna cromatográfica em sílica gel 60, interagindo com eluente ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) sob gradiente crescente de polaridade. Foram separadas 11 subfrações (Tabela 7, pág.40), que após análise de CCDC,



foram reunidas em 4 frações residuais EMBV G-1, EMBV G-2 (G-3 reunida à G-2), EMBV G-4 e EMBV G-5. Destas, apenas EMBV G-2 e EMBV G-4 seguiram novas purificações.

Tabela 7 - Purificação da fração EMBV G – Fase MeOH

| Códigos | Frações | Massa (mg) | Sistema(CHCl₃:MeOH) |
|----------------|----------------|-------------------|---------------------------------------|
| EMBV G | 1 | 130mg | (100:0) |
| EMBV G | 2 | 486mg | (99:1) |
| EMBV G | 3 | 78mg | (99:1) |
| EMBV G | 4 | 128,0mg | (98:2) |
| EMBV G | 5 | 203mg | (98:2) |
| EMBV G | 6 | 50,4mg | (95:5) |
| EMBV G | 7 | 10mg | (95:5) |
| EMBV G | 8 | 23mg | (95:5) |
| EMBV G | 9 | 8mg | (95:5) |
| EMBV G | 10 | 13mg | (60:40) |
| EMBV G | 11 | 7mg | (50:50) |

A subfração EMBV G-2 foi submetida à nova purificação em coluna flash, usando CHCl₃:MeOH como eluente, sob gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 6 novas frações identificadas de f1-f6. Tais subfrações foram reorganizadas em 3 subfrações remanescentes f1,f2 e f3 (Tabela 8), após análise de CCDC.

Tabela 8 - Fracionamento da EMBV G-2

| Códigos | Frações | Massa (mg) | Sistema (CHCl₃:MeOH) |
|----------------|----------------|-------------------|--|
| EMBVG-2 | f1 | 83mg | 100 |
| EMBVG-2 | f2 | 88mg | 99:1 |



| | | | |
|-----------------|-----------|--------------|-------------|
| EMBV G-2 | f3 | 278mg | 97:3 |
|-----------------|-----------|--------------|-------------|

A subfração EMBV G-2-f2 gerou **BV-5** (β -sitosterol) e **BV-6** (estigmasterol) em mistura, identificadas após análise RMN de ^1H e ^{13}C .

A subfração EMBV G-2-f3 (Tabela 8, p.41) originou uma mistura complexa ácidos graxos livres (AGL's), posteriormente caracterizada como **BV-8**.

Pra obtenção da **BV-7**, a subfração EMBV G-4, relacionada na Tabela 9, foi submetida à sucessivas purificações. Primeiramente uma CC, usando sílica gel 60 como suporte e a solução $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ como eluente, sob gradiente crescente de polaridade. Das 9 frações coletadas, foram reunidas 3 subfrações remanescentes: EMBV G-4-1, EMBV G-4-2 (reunindo f2, f3 e f4) e EMBV G-4-5 (juntando f5 até f9) como resultado das análises de CCDC reveladas em ultravioleta e Iodo.

Tabela 9 - Agrupamento após purificação da fração EMBV G-4

| Códigos | Frações reunidas | Massa (mg) | Sistema($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$) |
|-------------------|-------------------------|-------------------|--|
| EMBV G-4-1 | f1 | 100mg | - |
| EMBV G-4-2 | f2-f4 | 146,0mg | (98:2) |
| EMBV G-4-5 | f5-f9 | 137,3mg | (95:5) |

A subfração EMBV G-4-2 foi submetida à coluna cromatográfica em sílica flash, utilizando como fase móvel o sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, sob gradiente crescente de polaridade. Esta CC originou 4 novas frações f1, f2, f3 e f4 (Tabela 10). Destas, apenas a f1 foi trabalhada. Após lavagem com solvente MeOH, análise de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e em comparativo com dados encontrados na literatura, foi possível sugerir a sitostenona – **BV-7**.

Tabela 10 - Purificação de EMBV G-4D

| Códigos | Frações | Massa (mg) | Sistema ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$) |
|-------------------|----------------|-------------------|---|
| EMBV G-4-2 | f1 | 35mg | 100 |



| | | | |
|-------------------|-----------|---------------|---------------|
| EMBV G-4-2 | f2 | 82,MG | (99:1) |
| EMBV G-4-2 | f3 | 3,40mg | (98:2) |
| EMBV G-4-2 | f4 | 2,2mg | (95:5) |

3.5.4 Purificação da fração EMBV-B - Obtenção de BV-9 – mistura de ésteres metílicos

Nas primeiras frações obtidas do fracionamento da fase MeOH, oriunda do extrato bruto, foi possível verificar amostra oleosa (Tabela 3) na fração EMBV B. Recolhida para análise de RMN de ^1H e ^{13}C , os sinais revelaram se tratar de uma mistura de ácidos graxos mais triglicerídios. Após processo de derivatização e, avaliando-se os cromatogramas e espectros de massa obtidos, foi proposto isolamento, em mistura, os ésteres metílicos de **BV-9**.

3.6 Fracionamento da fase Hex das raízes

O procedimento para fracionamento da fase hexânica (Hex – 5,01g) oriunda do extrato DCM seguiu o mesmo adotado para a fase MeOH. A fase Hex foi fracionada em CC, empregando-se sílica gel 60 como suporte e como fase móvel uma mistura de CHCl_3 :MeOH em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 9 frações de 50 mL, que foram reunidas posteriormente em 6 subfrações (Tabela 11) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo. Frações 1-2 em destaque devido obtenção dos mesmos compostos **BV-1** - cordoína e **BV-2** - isocordoína, propostos na fase MeOH descrita anteriormente.

Tabela 11 - Frações obtidas da fase Hex (hexânica)

| Códigos | Agrupamentos | Massa total | Compostos isolados |
|----------------|---------------------|--------------------|---------------------------|
| EHBV-1 | | 365mg | BV-1 |
| EHBV-2 | | 633mg | BV-2 |



| | | | |
|---------------|------------|--------|---|
| EHBV-3 | | 40mg | - |
| EHBV-4 | | 335mg | - |
| EHBV-5 | | 1,784g | - |
| EHBV-6 | EHBV 6 a 9 | 266mg | - |
| EHBV-7 | | 60mg | - |
| EHBV-8 | | 200mg | - |
| EHBV-9 | | 358mg | - |

As frações EHBV 1 e 2 se mostraram semelhantes à outras frações encontradas na fase MeOH descrita acima como EMBV D (Tabela 3). Após secagem, houve formação de um sólido cristalino. EHBV 1 mostrou cristais pontiagudos bastante característicos e EHBV 2 apresentou-se como sólido amarelo amorfo.

As placas CCDC, eluídas com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99:1), revelaram o mesmo fator de retenção R_f e o mesmo padrão de revelação verificados frente ao iodo e UV quando comparados à BV-1 e 2. Análises de RMN de ^1H e o IV permitiram propor que as amostras EHBV 1 e 2 da fase Hex correspondiam aos mesmos compostos propostos para a fase metanólica, **BV-1 e BV-2**.

3.7 Teste de atividade antioxidante das fases polares orgânicas das raízes

Os extratos obtidos foram submetidos a testes de atividade antioxidante *in vitro*, utilizando as metodologias de inibição da co-oxidação do β -caroteno propagada pela adição de ácido linolênico e do seqüestro do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), que foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais no Instituto de Química.

Compostos que possuem a habilidade de inibir e/ou prevenir, em baixas concentrações, processos oxidativos são chamados de antioxidantes (HALLIWEL et al., 1995). As reações oxidativas têm um papel importantíssimo para fisiologia humana, porém a formação em excesso de radicais peróxidos pode desencadear processos patológicos e danos celulares (HALLIWEL et al., 1995; HUANG et al.,



2005). Os antioxidantes retardam os processos oxidativos, em mecanismos distintos, que incluem diminuição do teor de oxigênio, inibindo a etapa de iniciação ou propagação e, ainda, destruindo compostos e subprodutos não-radicalares (SHAHIDI, 1996).

Nos vegetais, os compostos antioxidantes possuem diversas funções, como determinação da cor dos frutos, textura, proteção e mesmo a atividade antioxidante, que os mantém perenes durante a maturação. Entre os antioxidantes naturais incluem os tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos. As moléculas típicas de antioxidantes tem em seu esqueleto os isômeros de compostos fenólicos (PRADO, 2009).

Entre os antioxidantes sintéticos mais usados, hidroxitolueno de butila (BHT) e o hidroxianisol de butila (BHA) são muito utilizados em alimentos. Recentemente, tem-se utilizado o Trolox, este sendo também um composto sintético análogo da vitamina E. Estes antioxidantes servem também de padrão positivo em testes de amostras ricas em lipídeos, como o β -caroteno frente ao ácido linolênico (LIMA, A., 2008). Para os testes feitos neste trabalho foram utilizados padrões de substâncias com elevado potencial antioxidante já evidenciado na literatura: quercetina, ácido gálico, BHT e Trolox, frente as fases MeOH, AcOEt e Hex.

3.7.1 Inibição da co-oxidação do β -caroteno/ácido linolênico – Procedimento para fase MeOH

As fases orgânicas obtidas após maceração e processo de partição foram submetidos ao teste de atividade antioxidante *in vitro*, determinado através do método da inibição da reação de co-oxidação do β -caroteno frente a adição de ácido linolênico, desenvolvido por MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971). Este sistema foi constituído por 1,0 mL de solução de β -caroteno (0,2 mg/mL em CHCl_3); 20 mg ácido linoléico e 200 mg de Tween 60. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio e então foram adicionados 90 mL de água destilada, agitando-se vigorosamente para promover aeração. A fase MeOH obtida foi diluída de modo a obter concentrações de 100,150, 200 e 250 μg . Cada



diluição foi adicionada às cubetas contendo a emulsão do sistema β -caroteno/ácido linolênico, sendo a reação acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda = 470$ nm, com leitura imediata e nos intervalos de 30 min, durante 1,0h, em espectrofotômetro incubando a 50°C. As análises foram realizadas em triplicata, empregando-se quercetina como referencial acompanhada por controle. A capacidade antioxidante foi expressa em percentual de inibição da oxidação através do decaimento da absorbância, medido em relação ao padrão positivo.

Fórmula para cálculo de Atividade Antioxidante:

➤ $AA = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$, Onde:

- A_0 = Absorbância inicial da amostra
- A_t = Absorbância final da amostra
- A_0^0 = Absorbância inicial do branco
- A_t^0 = Absorbância final do branco

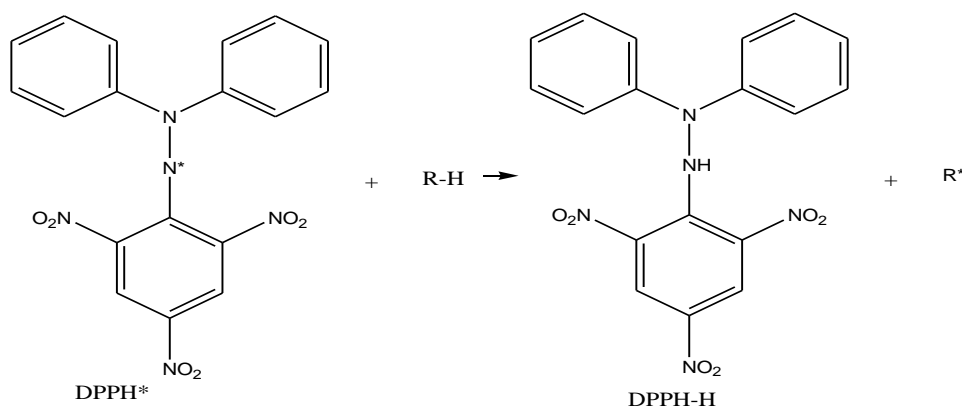
3.7.2 Sequestro do radical livre DPPH •

Consiste em método indireto para avaliar a atividade antioxidante de extratos ou substâncias isoladas. A habilidade sequestrante da amostra define o grau de atividade antioxidante da mesma (SOUSA et al., 2007).

Com o sequestro do radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Esquema 1), ocorre descoloramento da solução composta pelo radical estável, passando do violeta para o amarelo-alaranjado, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio [BRAND-WILLIAMS et al. , 1995].



Esquema 1- Equação da reação do radical DPPH com a substância antioxidante. O produto da reação redox gera um composto incolor ou amarelado



Para o preparo utilizou-se solução metanólica de DPPH• (40µg/mL) e soluções estoque com as amostras e padrões. O ensaio ocorreu em duas análises simultâneas de análise. Na primeira, utilizou-se 4 diluições diferentes (50, 150, 250, 500) para coleta de dados dos padrões antioxidantes quercetina, BHT e ácido gálico e o Trolox. Já na segunda, dividiu-se para 4 diluições das fases orgânicas MeOH, AcOEt e Hex (50, 150, 250, 500).

As determinações foram realizadas no sistema contendo 2,7 mL da solução de DPPH• e 0,3ml de metanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções de padrão e amostras. As leituras das absorbâncias em 517 nm foram realizadas no t=0 e imediatamente após 30 min de incubação da reação à temperatura ambiente, protegida de luz, em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicatas. A evidência da reação ocorre pelo descoramento da solução contendo DPPH e amostra. A solução contendo apenas radical livre tem coloração roxa, o que permite afirmar que a transição eletrônica requer maior energia para o salto quântico e o radical absorva comprimentos de onda menores. Após sequestro do hidrogênio, a solução assume cor amarela, sugerindo que para transição eletrônica é necessário menor energia e a absorção ocorra em maiores comprimentos de onda.

As equações abaixo 1 e 2 mostram a reação do radical livre DPPH com um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R•)(MILARDOVIC, 2005):

- $DPPH + AH \rightarrow DPPH - H + A\cdot$ (1)
- $DPPH + R \rightarrow DPPH - R$ (2)



3.8 Teste de atividade tóxica da fase MeOH

A fase MeOH da raiz de *B. virgilioides* foi submetido a teste de letalidade frente à *Artemia salina*, seguindo metodologia de (MEYER et al.,1982) com algumas modificações.

A fase MeOH foi diluída em solvente (MeOH) a fim de se obter uma concentração final de 10.000 ppm. Utilizou-se como meio para o cultivo das larvas de *A. salina* água salinizada (19g de sal marinho/L de água) em aquário. As larvas foram utilizadas nos ensaios 48h após a eclosão dos cistos, em fase náuplio. Cerca de 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para frascos contendo 1mL de água salgada e a fase MeOH testada, em cinco diferentes concentrações (50, 100,150,200 e 250 ppm). A análise foi feita em triplicata de cada diluição e a contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h. A DL₅₀ foi obtida através do gráfico da % de larvas sobreviventes em função do logaritmo da dose testada, com um intervalo de confiança de 95%.

3.8.1 Mortalidade das larvas de *A. salina* sp.

O teste de letalidade usando *Artemia salina* sp. em seus estágios de vida iniciais é uma técnica amplamente utilizada em pesquisa de atividade tóxica (BAIG et al., 2006; MOHAMED et al., 2006). O procedimento serve de guia para estudos posteriores envolvendo extratos ou mesmo compostos isolados (LUNA et al., 2005).

Segundo o método (MEYER et al.,1982), partindo-se do pressuposto que a amostra possui atividade tóxica, o período de exposição (24horas) das larvas em diferentes concentrações, registrando a tolerabilidade das mesmas, é suficiente para pressupor o patamar de atividade tóxica do extrato, incluindo atividade larvicida ou mesmo inseticida (MCLAUGHLIN et al., 1991). São considerados ativos os extratos ou frações que apresentam valores da DL₅₀ de até 1000 microgramas/mL.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo estão representadas as substâncias propostas oriundas da purificação da fase MeOH das raízes de *Bowdichia virgilioides*. A análise de caracteres espectrais como espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT 135, infravermelho – IV e massas de cada amostra traz adiante maiores detalhes para elucidação estrutural da série **BV-1** até **BV-9**.

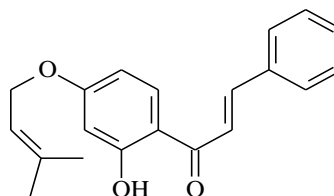
Quadro 2 - Substâncias identificadas

Compostos identificados (MeOH)

Estruturas moleculares

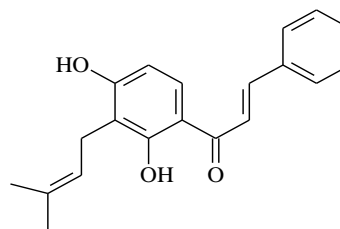
BV-1: cordoína - 1-[2-hidroxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)-fenil]-3-fenil-propenona

Sólido amarelo



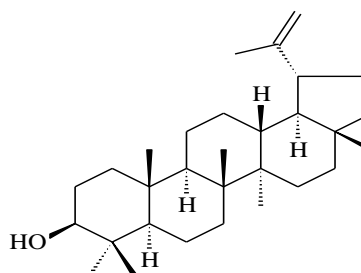
BV-2: isocordoína - 1-[2',4'-dihidroxi-3'-(3-metil-but-2-enil)-fenil]-3-propenona

Sólido amarelo



BV-3: lupeol - lup-20(29)-en-3-β-ol

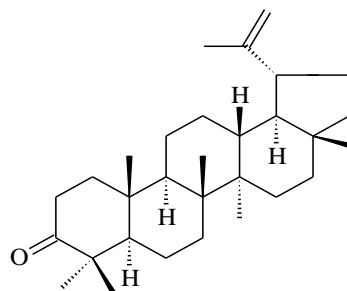
Sólido - Pf 165-170 °C





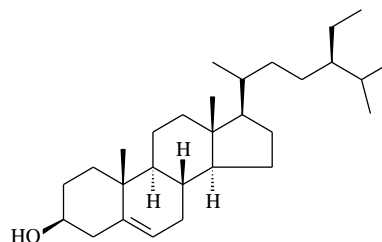
BV-4: lupenona - 3-oxolup-20(29)-eno

Sólido



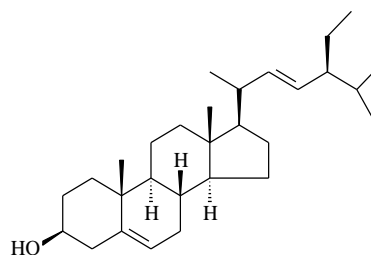
BV-5: β -sitosterol - 24-etilcolestan-5-eno-3- β -ol

Sólido



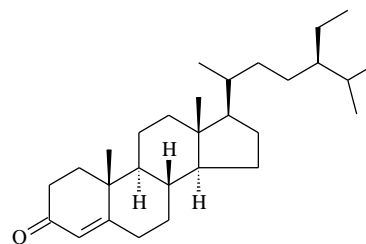
BV-6: estigmasterol - 24-etilcolestan-5,22-dieno-3- β -ol

Sólido



BV-7: sitostenona - estigmas-4-en-3-ona

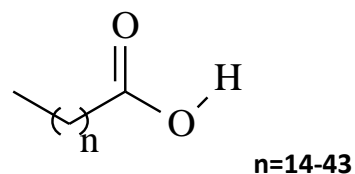
Sólido



BV-8: mistura de ácidos graxos

Óleo

Série de 16 a 45 carbonos;

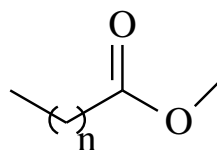




BV-9: mistura de ésteres metílicos;

Massa pastosa;

Série de seis ésteres



A- n= 8; C 10:0

B- n= 15; C 17:0

C- n= 15; C 17:1

D- n= 16; C 18:1

E- n= 16; C 18:0

F- n= 20; C 22:5

4.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.

4.1.1 Chalconas

As chalconas ou 1,3-diaril-2-propen-1-ones são compostos contendo esqueleto principal C₆C₃C₆ [Ph-C(=O)-C-Ph], onde ocorre a presença de dupla conjugada com um grupo carbonil(a) na porção C₃. Assim como os diversos tipos de flavonoides, podem ocorrer naturalmente como dímeros compostos prenilados ou glicosilados (AGRAWAL et al., 1981).

Diversos estudos já demonstraram a imensa variedade de estruturas dos flavonoides. O Quadro 1 aponta para diversidade de compostos desta classe já encontrados, especialmente, nas raízes e caules da espécie *B. virgilioides*. Em geral, os flavonoides estão relacionados como flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonois, antocianidinas e chalconas (GONZALES & RODRIGUES, 2011). As diferenças no grau de oxigenação, metilação, glicosilação ou mesmo a estrutura do anel heterocíclico definem a subclasse pertencente de cada composto (HARBONE, 1973).

Estudos de atividade farmacológica e atividade citotóxica tem revelado um potencial espectro de atividade terapêutica da classe de chalconas. Acredita-se que

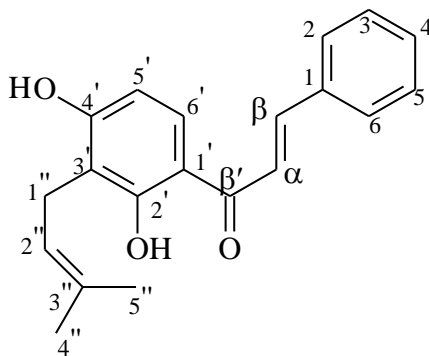


além do efeito antioxidativo celular; efeitos como anti-fúngico, anti-microbiano, anti-inflamatório, anti-tumoral e protetor cardiovascular possam estar associados a estes compostos. Tais flavonoides vem sendo testados em modelos laboratoriais e tem demonstrado eficácia frente à parasitas no tratamento de afecções (BORGES et al., 2009).

Em estudo realizado com isocordoína e di-hidrospinochalcona-A foi revelado efeito vasodilatador endotélio-independente para o primeiro composto (menos eficiente e potente) e endotélio-dependente (mais eficiente e potente) para o segundo frente à Carbachol e Nifedipino, controles já usados como vasodilatadores. Neste estudo, a di-hidrospinochalcona-A demonstrou ser eficiente, induzindo efeito vasodilatador através de sua atuação no sistema regulador de biodisponibilidade de NO (NO/sCG/PKG e canais de potássio) no endotélio vascular (AVILA-VILLARREAL, 2013).

4.1.2 Elucidação estrutural de BV-2

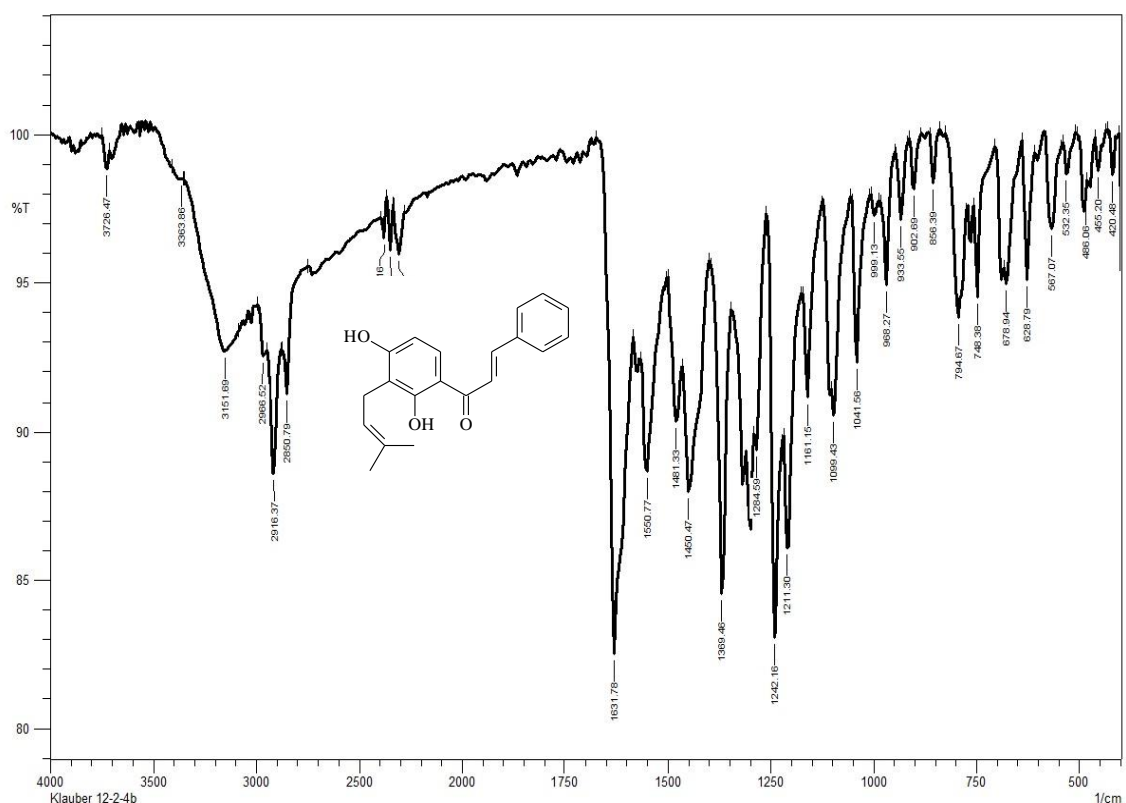
Figura 5 - Estrutura molecular da Isocordoína - BV-2



A elucidação estrutural dos compostos **BV-1** e **BV-2** se iniciou a partir do isolamento de **BV-2** oriunda da fração EMBV D f3. A amostra EMBV D f1, obtida em mistura, foi posteriormente analisada até chegar à proposta de **BV-1** (Figura 25, pág.66). Dessa forma, assim como evidenciado no ensaio preliminar da fase MeOH com FeCl₃, revelando presença de substâncias fenólicas, o teste com CCDC eluída em CHCl₃ : MeOH (99/1) agora de EMBV D f3, mostrou-se positivo.

Após análise do IV (infravermelho) foi possível visualizar a presença de grupos importantes como a banda de C=O em 1631 cm^{-1} intensa, o que pressupõe sobreposição de picos; banda de O-H em 3151 cm^{-1} estendendo-se até 3363 cm^{-1} , o que sugere efeito da carbonila próxima e também estiramento de ligação C=C de anéis aromáticos na faixa de $1450\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$. A presença de estiramento $\text{Csp}^2\text{-H}$ na região de 700 e 750 cm^{-1} revela existência de anel monossustituído e na região de 856 cm^{-1} demonstra anel tetrassustituído (Figura 6).

Figura 6 - Espectro de IV – infravermelho – [pastilha de KBr] de BV-2



Os espectros de RMN de ^1H (Figuras 7-10, págs. 53-55), RMN de ^{13}C e DEPT (Figuras 11 e 12, págs. 55 e 56) demonstraram sinais bastante evidentes de esqueletos de chalconas. Os dupletos em δ 7,88 ($J=15\text{ Hz}$) e 7,60 ($J=15\text{ Hz}$) apontam para o fragmento alfa/beta-insaturado e um duplete em 7,74 (J 9 Hz) sugeriu H6' do



anel A. Outros dois sinais, um multipeto em δ 7,65(m, 2H) e outro em δ 7,43(m, 3H) sugeriram efeito retirador da dupla ligação próxima ao anel monossustituído B.

A presença de um sinal em δ 144,1C β e um sinal em δ 192,1C β' , em RMN de ^{13}C , corroboram com dados contidos na literatura (Tabelas 12, 13 e 14, págs.60, 61 e 62). A ausência do sinal próximo a δ 65, relativo ao fragmento (-CH₂-O-) e outros sinais sobrepostos, vistos em **BV-1**, descartou a possibilidade de se tratar da mesma substância. Os sinais de benzeno monossustituído em δ 134,7 129,0 e 128,7; mais os dois sinais em δ 164,3(C2') e 162,4(C4') e os dados confrontados na literatura, direcionaram para proposta molecular da isocordoína para **BV-2**

Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H de BV-2

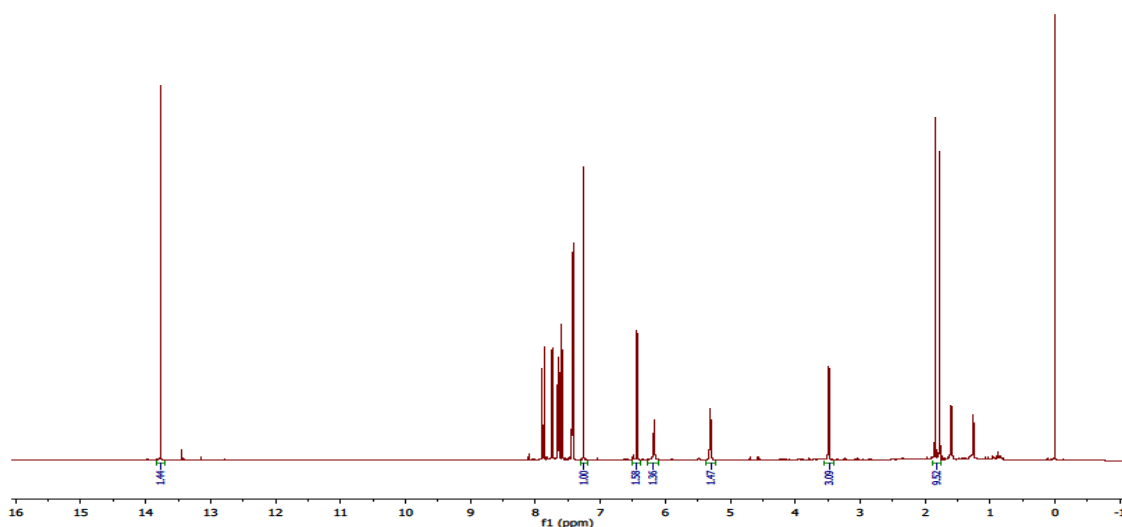




Figura 8 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] da BV-2 – Região de anel aromático e alcenos

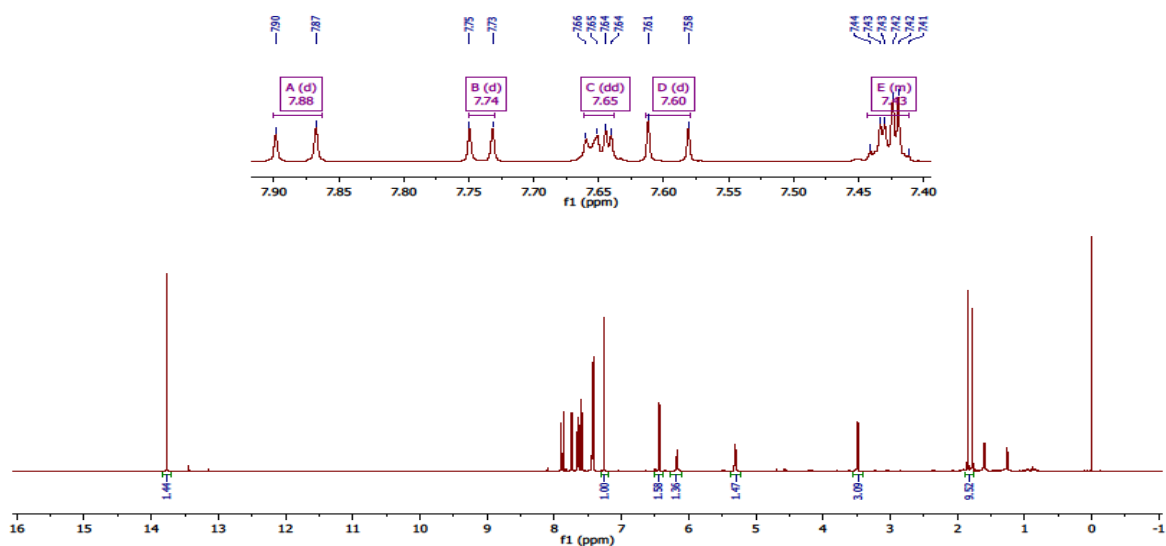


Figura 9 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] da BV-2 – Região de substituinte alifático

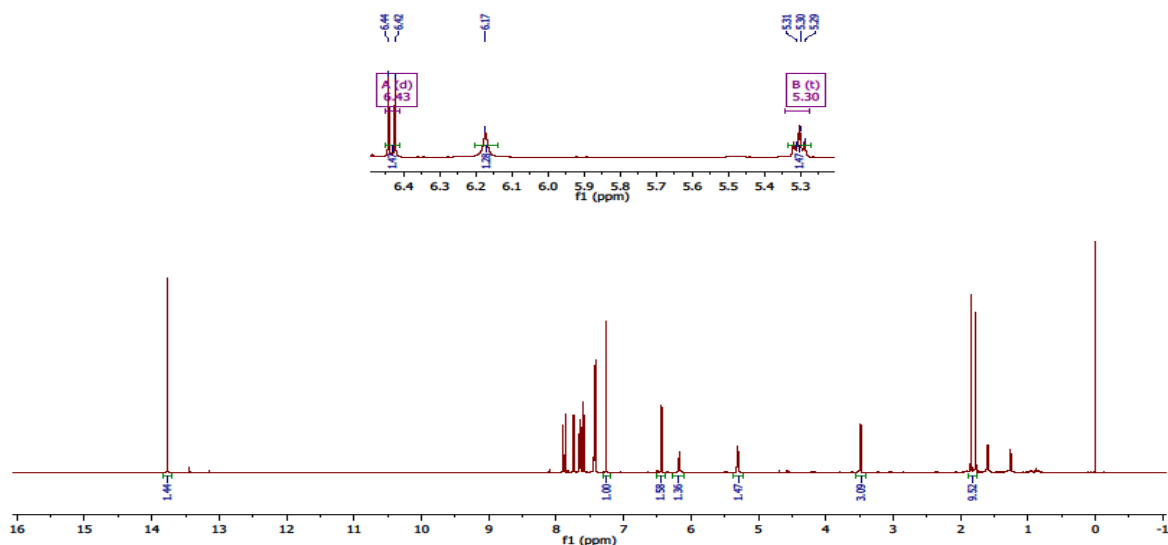




Figura 10 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] – Singletos metilínicos

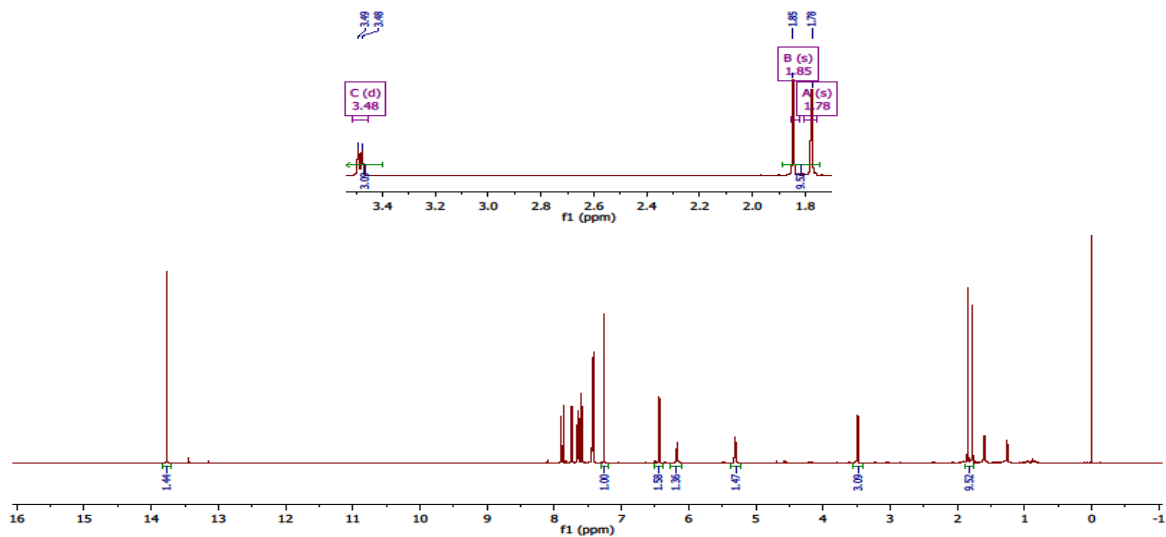


Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] de BV-2

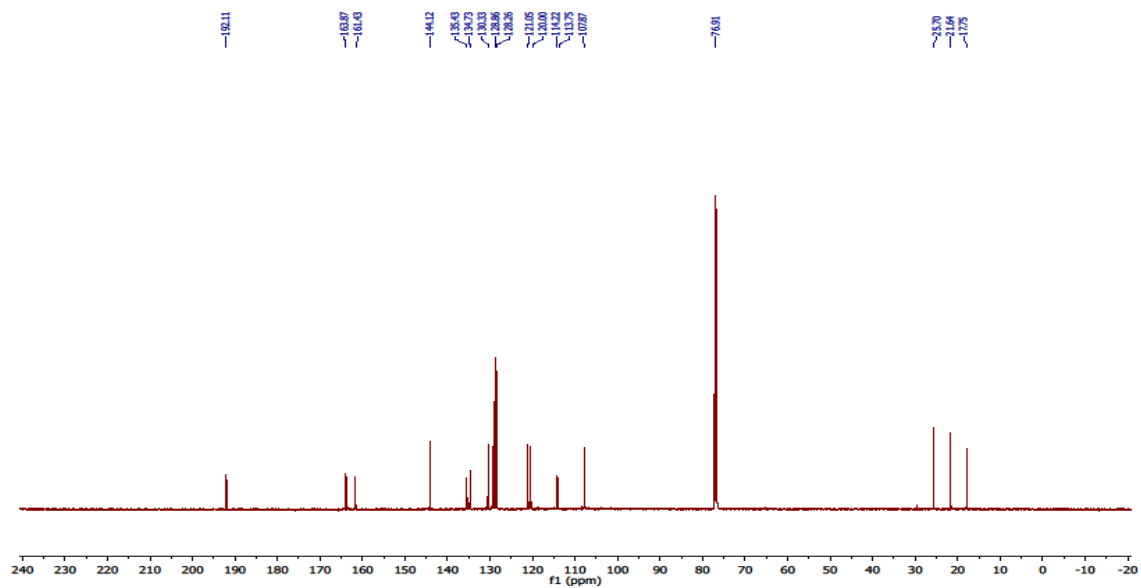
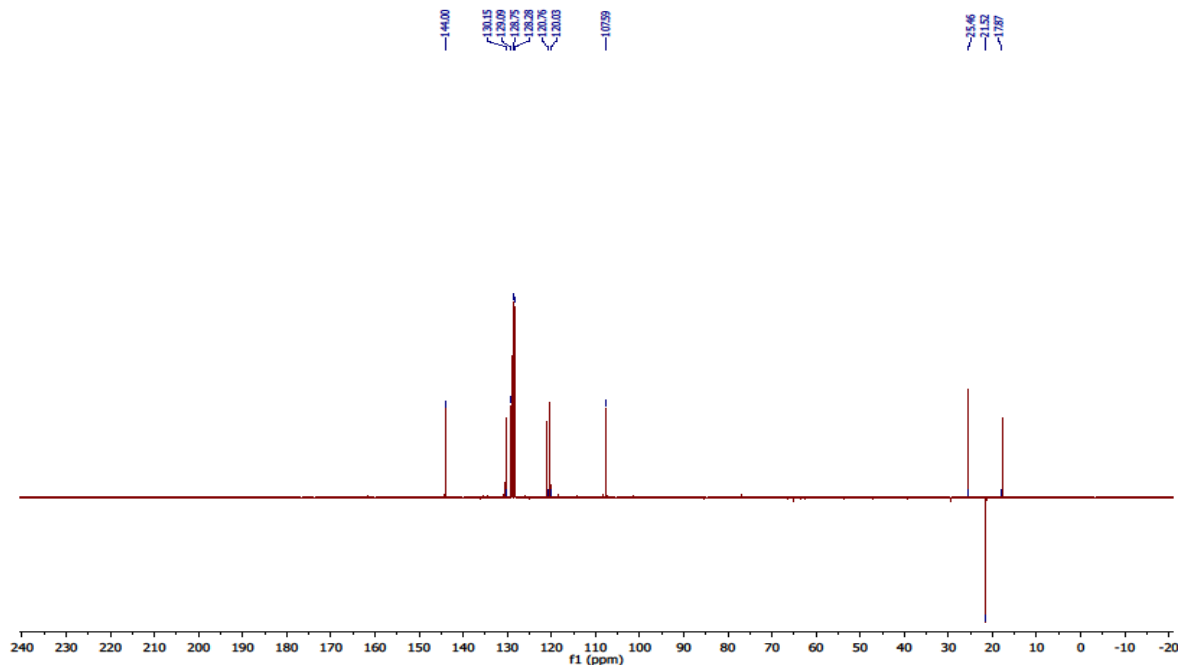




Figura 12 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C [DEPT135 (300MHz)] de BV-2



A verificação dos experimentos bidimensionais de HMBC de **BV-2** (Figuras 13–17, págs.57-59) indicaram correlações importantes. Um sinal em δ 13,75 (Figura 15, pág.58) de H de hidroxila quelada a oxigênio de grupo cetona próxima é confrontado com sinais em δ 192,1 ($\text{C}\beta'$); δ 162,4 ($\text{C}4'$) e 164,8 ($\text{C}2'$) mais um sinal em δ 114,2 $\text{C}1'$. Estes dados permitiram confirmar o padrão de oxigenação em anel A da referida proposta **BV-2**.

Da mesma forma, foi possível atribuir as correlações entre os hidrogênios da isoprenil(a) de $\text{C}1''$ com os carbonos no anel A da chalcona (Figuras 13 e 14, pág 57). No espectro de HMBC (Figura 16, pág.58) o δ dos hidrogênios em δ 3,48 de $\text{C}1''$ do isopreno apresenta correlação com os δ ($\text{C}2'$) 164,8; ($\text{C}3'$) 114 e ($\text{C}4'$) 162,4; um tripleto próximo a δ 5,34 atribuído ao hidrogênio em $\text{C}2''$ e dois singletos δ 1,78 (3H) e 1,85 (3H), confrontados aos ($\text{C}3''$) 135,4; ($\text{C}4''$)26,0 (mais deslocado devido efeito anisotrópico da dupla) e $\text{C}5''$ 17,8 confirmam a posição do isoprenil no $\text{C}3'$ do referido anel A.

Um dubleto mais deslocado na região de aromático em δ 7,74 ($J=5\text{Hz}$) foi atribuído ao $\text{H}6'$ e $\text{H}5'$ aparece como dubleto mais protegido em δ 6,43ppm($J=5\text{Hz}$)



(Figuras 7-9, págs.53 e 54). O singlete em δ 6,17 foi atribuído ao sinal da $-(OH)$ fenólica em C4'.

Figura 13 - Correlações de H metilênico C1'' e de $-OH$ (hidroxila) C2' no anel A

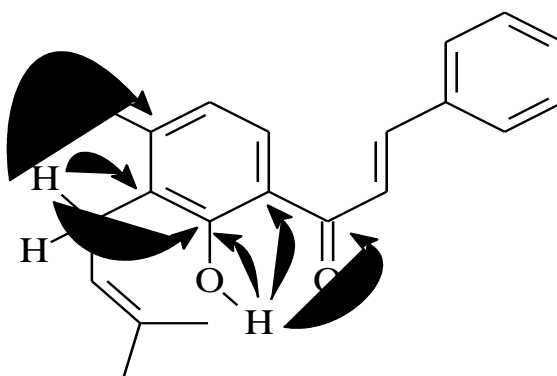


Figura 12 - Experimento bidimensional do BV-2 [$CDCl_3(500MHz)$] – HMBC

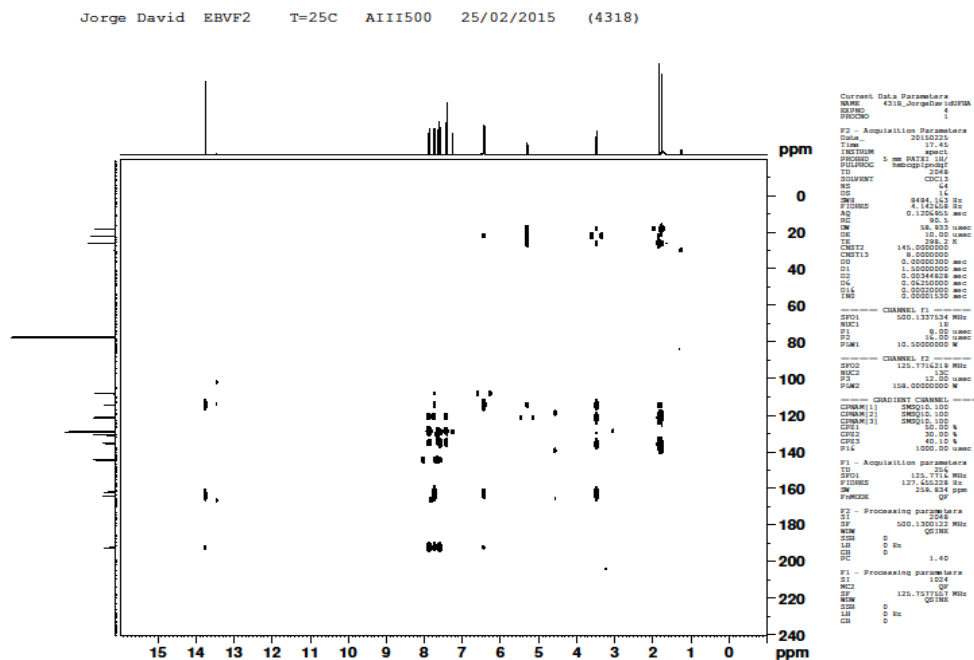




Figura 13 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC. Correlação para “H”- hidrogênio de $-(\text{OH})$

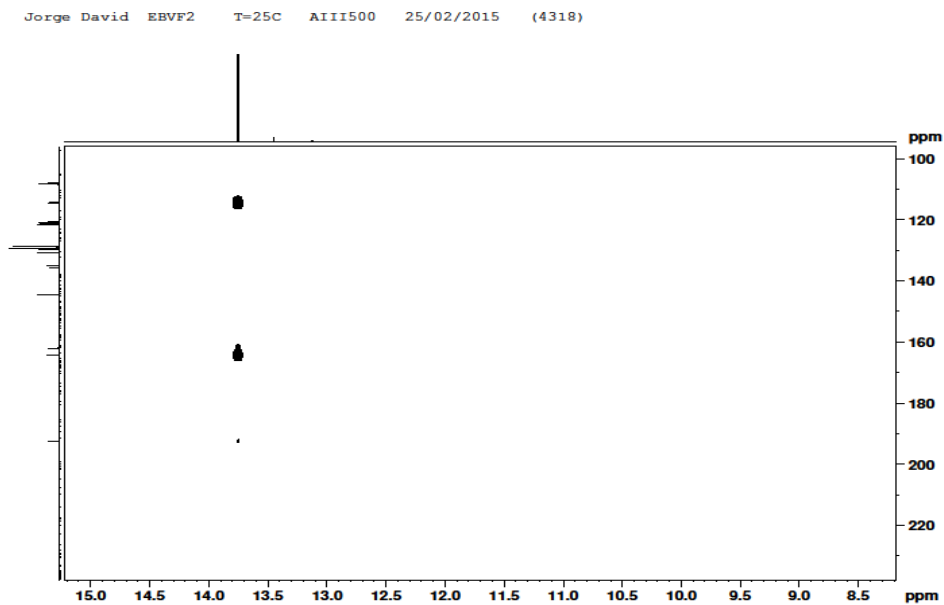


Figura 14 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC. Correlações em região de anel aromático

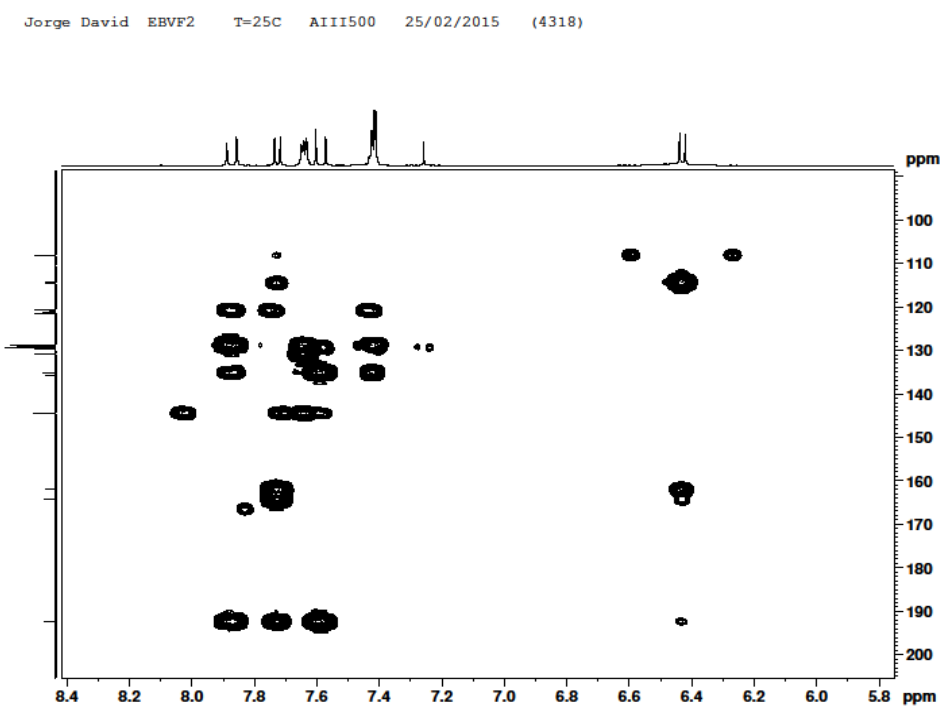
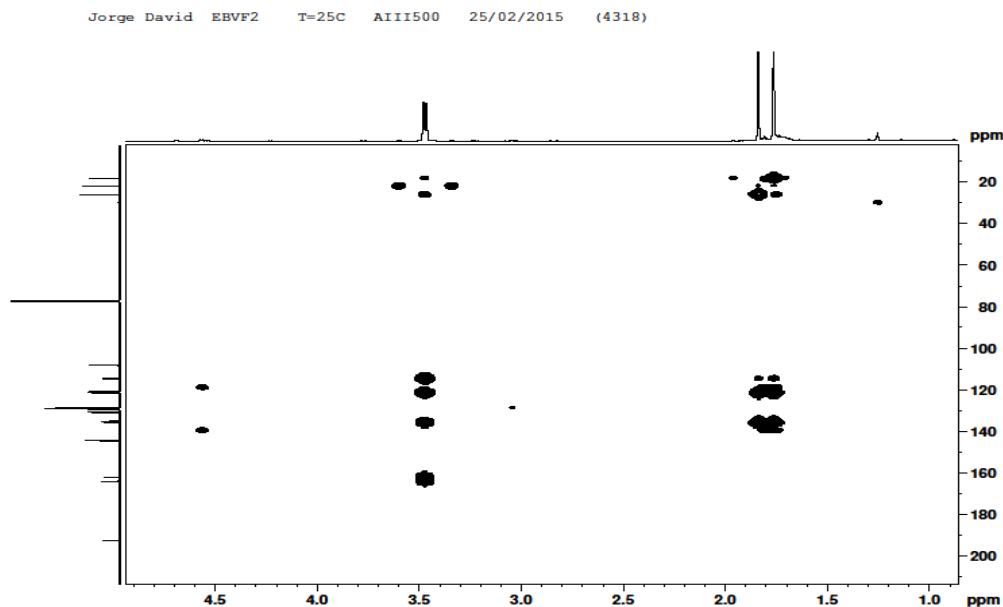




Figura 15 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (500MHz)] – HMBC. Correlações para substituintes alifático



A análise posterior dos experimentos bidimensionais em HMQC (Figuras 19,20-23, págs. 60; 61 e 62) aliado aos dados fornecidos pela literatura e agrupados nas Tabelas 12, 13 e 14, págs.62, 64 e 65; forneceram subsídios para confirmação da posição do grupo isoprenil(a) na posição C3' do anel A. Além disso, as correlações dos multipletos em δ 7,65 (2H) e 7,43 (3H) com sinais de carbonos em δ 134,7 129,0 e 128,7, permitiram ratificar o anel B monossubstituído à estrutura, confirmando a estrutura da isocordoína **BV-2**.

Figura 16 - Correlações importantes de H de $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}$ e $-\text{CH}_2$

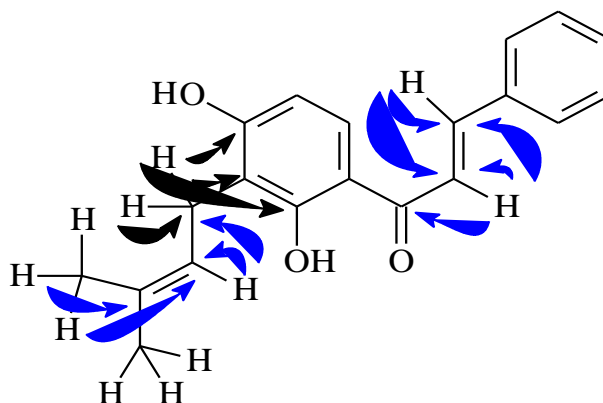




Figura 19 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl₃(300MHz)] – HMQC

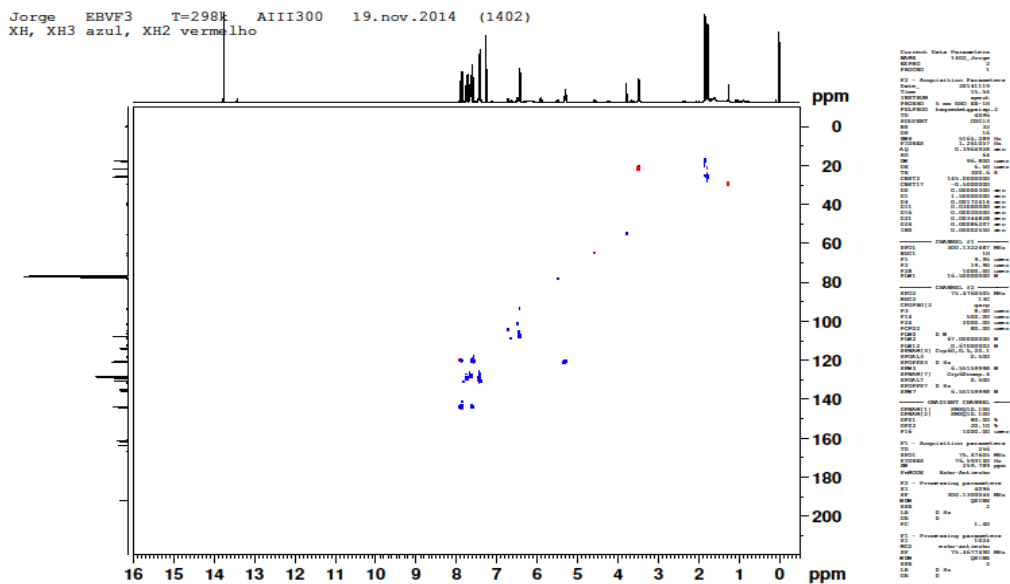


Figura 20 - Correlações de H do anel B monossustituído [m 7,65(3H); m 7,43(2H)]; dubletos de H alfa [d 7,88($J=15\text{Hz}$, 1H)] e beta [d 7,60($J=15\text{Hz}$, 1H)] e H6'[d 7,74($J=5\text{Hz}$, 1H)]

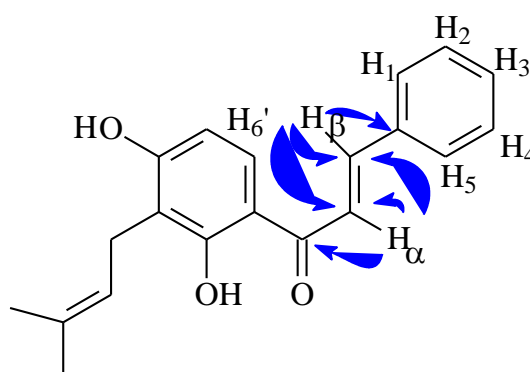




Figura 21 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (300MHz)] – HMQC – Correlações de $-(\text{CH})$

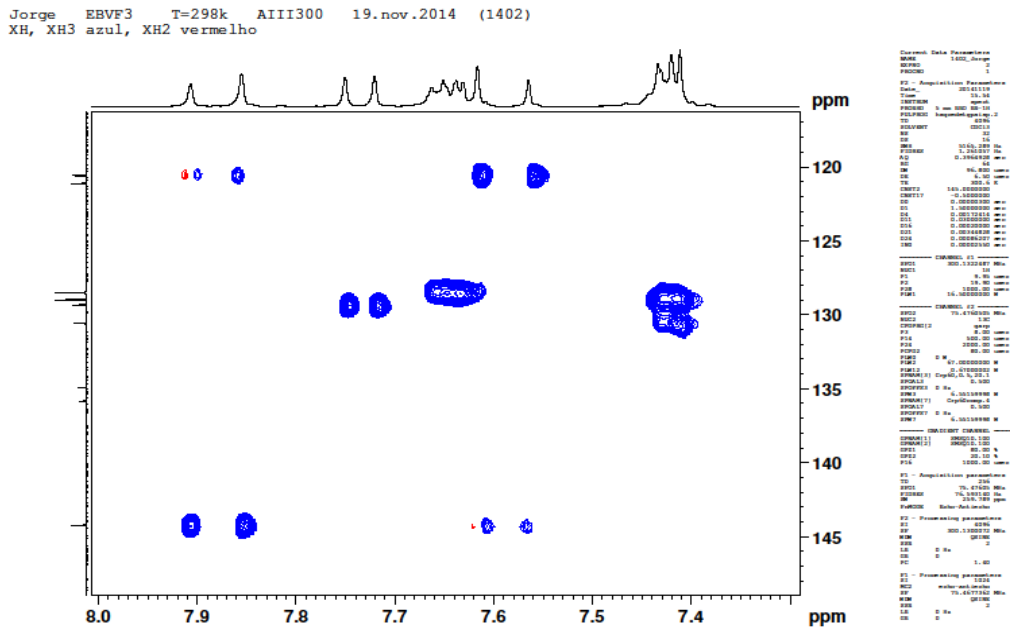


Figura 17 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl_3 (300MHz)] – HMQC – Correlações de $-(\text{CH})$ em anel e substituinte alifático

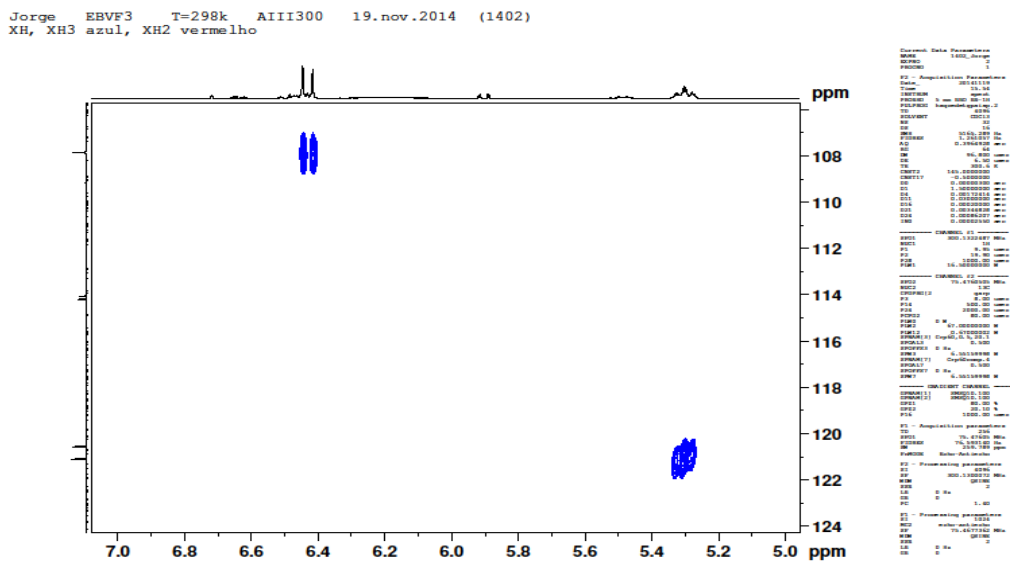




Figura 18 - Experimento bidimensional do BV-2 [CDCl₃(300MHz)] – HMQC – Correlações de –(CH₂) e –(CH₃)

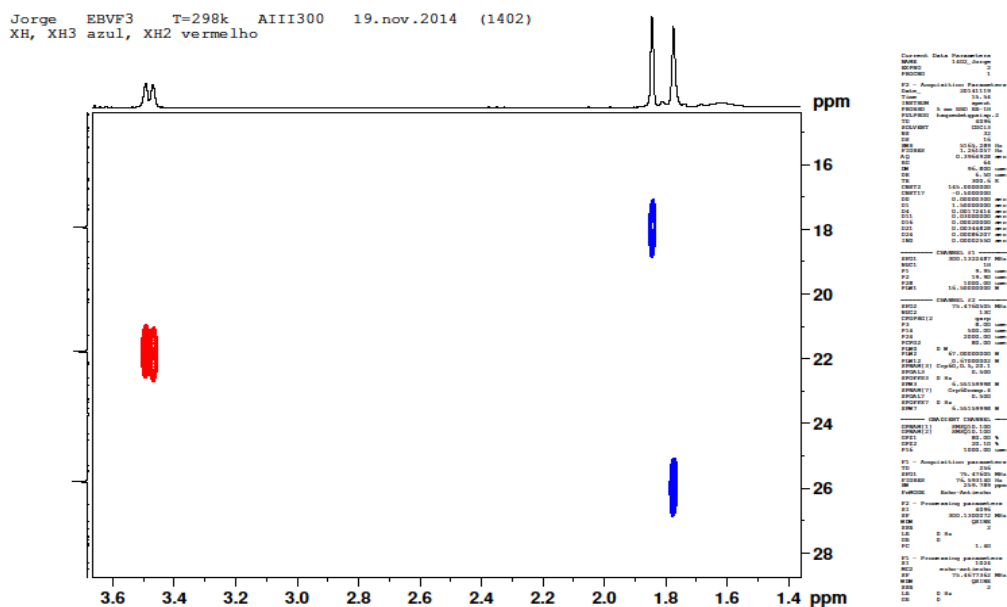


Tabela 12 - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ¹³C da Isocordoína e derivados encontrados na literatura

| C | isocordoína (PARMAR et al., 1992) | isocordoína (LIMA et al., 1973) (125MHz, CDCl ₃) | A (CDCl ₃) (PARMAR et al., 1992) | B (CDCl ₃) (PARMAR et al., 1992) | BV-2 (CDCl ₃) |
|-------|---|--|--|--|---------------------------|
| 1 | 129,33 | 135,1 | 129,14 | 130,27 | 134,7 |
| 2 | 128,99 | 128,7 | 128,37 | 128,74 | 128,8 |
| 3 | 128,51 | 129,2 | 128,87 | 128,25 | 128,8 |
| 4 | 129,58 | 130,8 | 129,14 | 128,62 | 128,2 |
| 5 | 122,51 | 129,2 | 128,87 | 128,25 | 121,0 |
| 6 | 128,99 | 128,7 | 128,37 | 128,74 | 128,2 |
| BETA' | 192,5 | 192,3 | 192,47 | 191,74 | 192,1 |
| BETA | 144,0 | 144,5 | 144,0 | 143,67 | 144,1 |

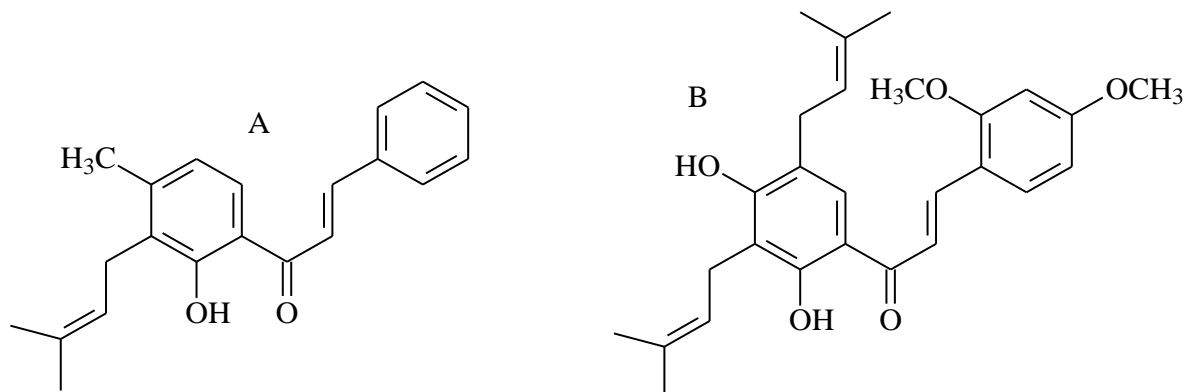


| | | | | | |
|-------------|--------|-------|--------|--------|--------------|
| ALFA | 121,10 | 120,8 | 122,00 | 118,73 | 120,0 |
| 1' | 114,23 | 114,3 | 114,82 | 114,33 | 113,7 |
| 2' | 164,00 | 164,2 | 163,78 | 162,36 | 163,8 |
| 3' | 114,98 | 114,4 | 114,82 | 113,45 | 114,1 |
| 4' | 161,90 | 162,0 | 160,80 | 160,08 | 161,4 |
| 5' | 107,86 | 108,1 | 102,25 | 118,73 | 107,8 |
| 6' | 130,59 | 129,6 | 129,40 | 127,11 | 130,3 |

A - 2'-hidroxi-4'-metoxi-3'-(3-metilbut-2-enil)chalcona (PARMAR et al., 1992)

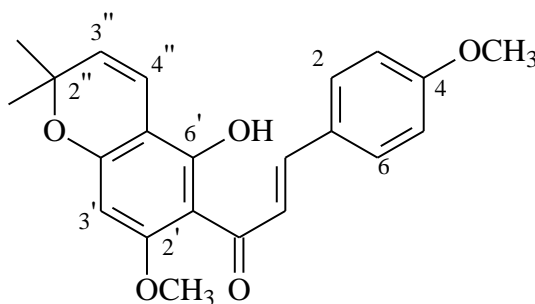
B - 2,4-dimetoxi-2',4'-diidroxi-3',5'-(3-metilbut-2-enil)chalcona (PARMAR et al., 1992)

Figura 19 - Estruturas moleculares de A e B



**Tabela 13** - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^1H da Isocordoína e compostos encontrados na literatura

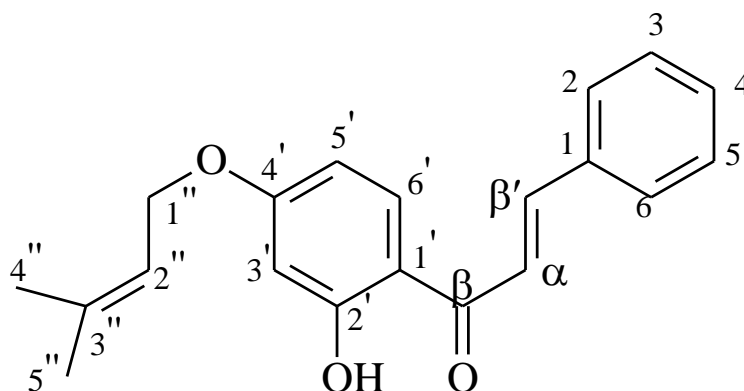
| H | Isocordoína (LIMA et al., 1973) (500MHz, CDCl_3) | 2',4-dimetoxi-6'-hidroxilonchocarpina (BORGES et al., 2002) (500MHz, CDCl_3) | BV-2 (CDCl_3) |
|------|--|--|----------------------------|
| 2/6 | 7,43(m, anel B) | 7,57(d, $J=8,5\text{Hz}$) | 7,65(m) |
| 3/5 | 7,43(m, anel B) | 6,95(d, $J=8,5\text{Hz}$) | 7,43(m) |
| Beta | 7,89(d, $J=15,4\text{Hz}$) | 7,79(d, $J=15,6\text{Hz}$) | 7,88(d, $J=15\text{Hz}$) |
| Alfa | 7,60(d, $J=15,4\text{Hz}$) | 8,04(d, $J=15,6\text{Hz}$) | 7,60(d, $J=15\text{Hz}$) |
| 3'' | 1,78(s) | 5,46(d, $J=9,9\text{Hz}$) | 1,78(s) |
| 4'' | 1,85(s) | 6,60(d, $J=9,9\text{ Hz}$) | 1,85(s) |
| 2'' | 5,31(t, $J=7,0\text{Hz}$) | 1,56(s, -Me ₂) | 5,31(t, $J=7,0\text{Hz}$) |
| 1'' | 3,49(d, $J=7,0\text{Hz}$) | - | 3,49(d, $J=7,0\text{Hz}$) |
| 2' | 13,76(s, -OH) | 3,86(s, -Ome) | 13,75(s, -OH) |
| 3' | - | 6,07(s) | - |
| 5' | 6,44(d, $J=8,9\text{Hz}$) | - | 6,44(d, $J=9\text{Hz}$) |
| 6' | 7,74(d, $J=8,9\text{Hz}$) | - | 7,74(d, $J=9\text{Hz}$) |

Figura 20 - Estrutura molecular da 2',4-dimetoxi-6'-hidroxilonchocarpina

**Tabela 14** - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^{13}C do ligante isoprenil na literatura e deste ligante em BV-2

| C | isocordoína (PARMAR et al., 1992) | B (CDCl_3) (PARMAR et al., 1992) | C (CDCl_3) (PARMAR et al., 1992) | isocordoína (LIMA et al., 1973) (125MHz, CDCl_3) | BV-2 (CDCl_3) |
|-----|---|---|---|--|-----------------------------|
| 1'' | 21,69-21,85 | 21,69-21,85 | 21,69-21,85 | 22,0 | 21,6 |
| 2'' | 120,54- 122,38 | 120,54- 122,38 | 120,54- 122,38 | 121,3 | 120,0 |
| 3'' | 131,11- 135,60 | 131,11- 135,60 | 131,11- 135,60 | 136,1 | 135,4 |
| 4'' | 19,64-19,89 | 19,64-19,89 | 19,64-19,89 | 18,2 | 18,1 |
| 5'' | 25,58-25,83 | 25,58-25,83 | 25,58-25,83 | 26,0 | 26,0 |

4.1.3 Elucidação estrutural da BV-1

Figura 21 - Estrutura molecular de **BV-1** - 1-[2'-hidroxi-4'-(3''-metil-but-2''-eniloxi)-fenil]-3-fenil-propenona

Da fase MeOH, particionada do extrato bruto, após separação em CC, foi evidenciada em mistura a **BV-1** oriunda da fração EMBV D f1 (Tabela 3). Cristais bem formados sugeriram a separação de substâncias aparentemente semelhantes. As placas CCDC feitas com a fração analisada, empregando-se $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99:1)



ou Hex:AcOEt (98:2), apontavam padrão de eluição (R_f) pouco distintos. O uso de FeCl_3 indicou presença de substâncias fenólicas para amostra testada EMBV D f1. A análise do EM de alta resolução por ESI(-) revelou pico em m/z $[\text{M-H}]^-$ 307,1343 e a presença da contribuição isotópica de M+1 e do M+2 (Figuras 27 e 28, pág.66). A fórmula molecular sugerida para o composto é dada por $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_3$ e requer m/z 308,3708.

Figura 22 - Espectro de massa ESI(-) em alta resolução da fração EMBV-D f1

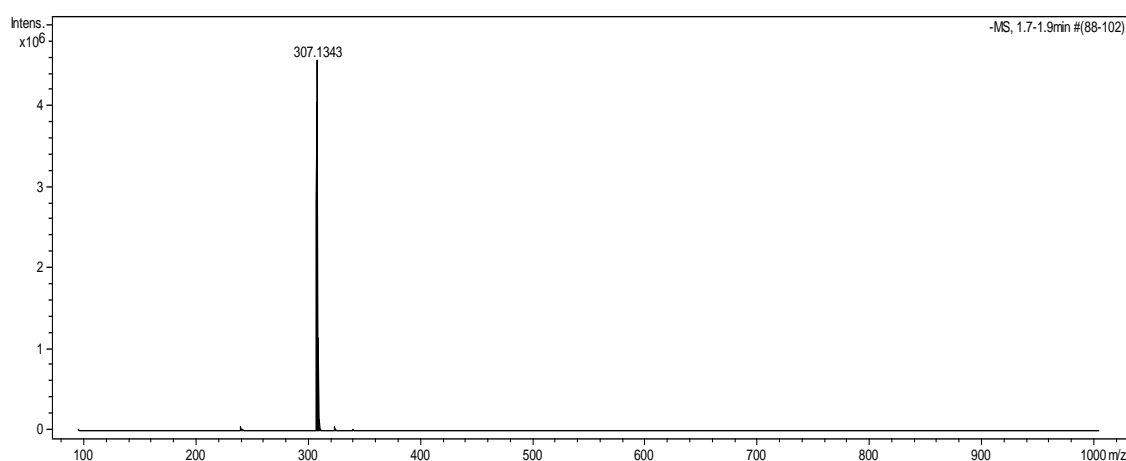
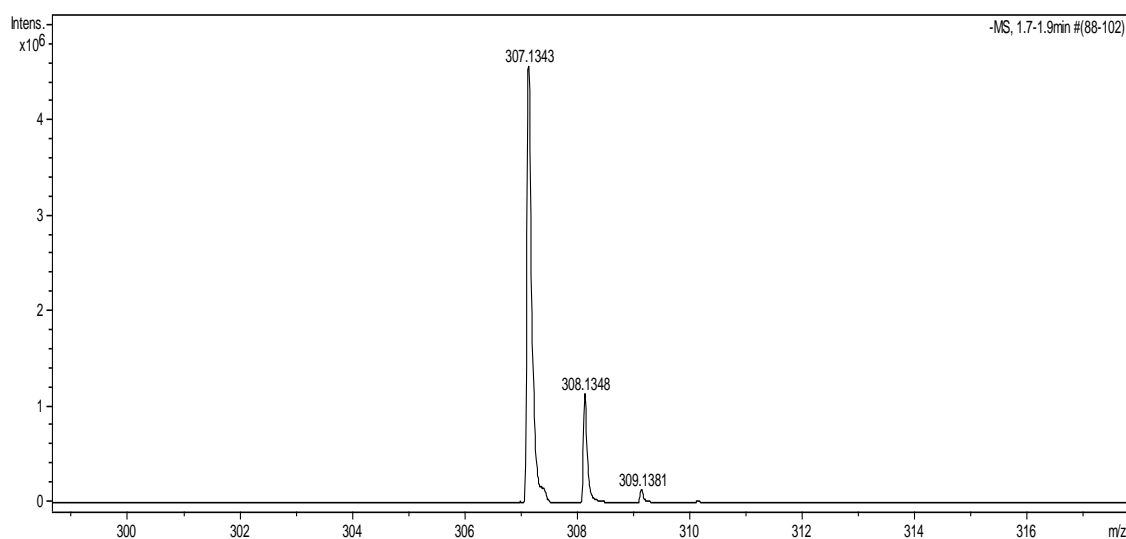


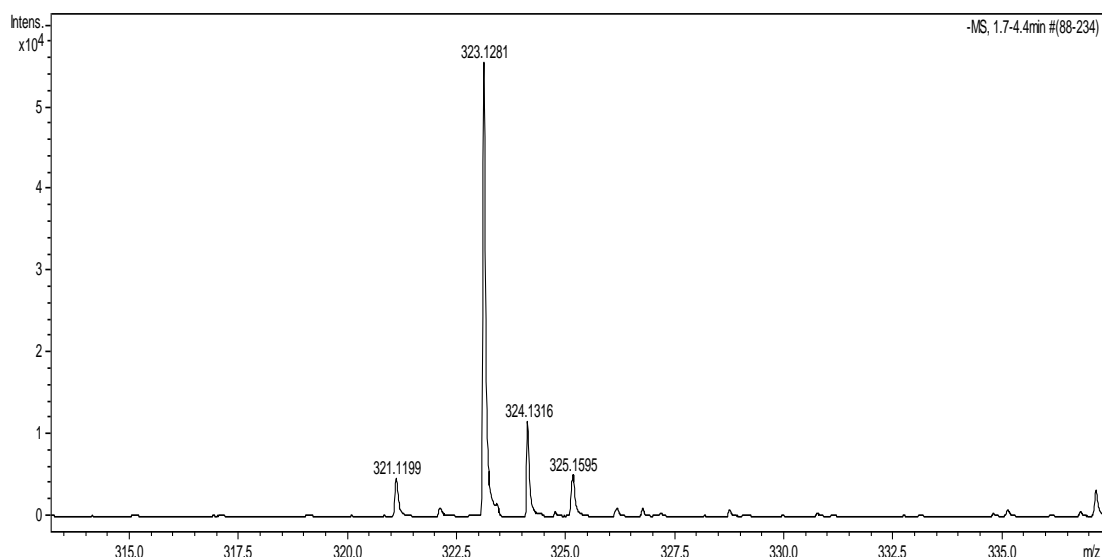
Figura 23 - Espectro de massa ESI- em alta resolução da EMBV-D f1 – Ampliação





Em ampliação do espectro de massa (Figura 29), é possível supor a presença, em menor proporção, de mais um composto na mistura **BV-1**. É visto como majoritário um sinal em $[M-H]^-$ m/z 307,1343 e um sinal em $[M-H]^-$ m/z 323,1281 sugere acréscimo do padrão de oxigenação do composto em maior concentração, como mostram as figuras 8 e 9. O pico de massa m/z 323,1281 do composto pressupõe existência de mais um oxigênio ($C_{20}H_{20}O_4$) na molécula sugerida para BV-1. No entanto, não foi possível comprovar a presença de mais um composto com massa 324,3648 devido não haverem mais evidências em outras análises, como RMN e IV.

Figura 24 - Espectro de massa ESI(-) em alta resolução da EMBV-D f1 - Ampliação em região de maior relação m/z



No IV, sinais como a banda de O-H e o pico de $Csp^2=O$ foram evidentes em $3448,72cm^{-1}$ e $1743,65cm^{-1}$, respectivamente. Estiramento de Csp^3-H são claramente vistos na região entre $2840-3000cm^{-1}$ (Figura 30, pág.68). Apresenta também duas bandas mais intensas relativas a estiramento C=C ($1631,78$ e $1612,49cm^{-1}$) das quatro bandas que comumente surgem entre $1500-1600cm^{-1}$ quando da existência de anéis aromáticos e alcenos. Sinais em $879,54cm^{-1}$ e próximo a $810cm^{-1}$ sugerem padrão de substituição 1,2,4 em anel aromático (Pavia, 2012).



Figura 30 - Espectro de IV- infravermelho - [KBr] de BV-1

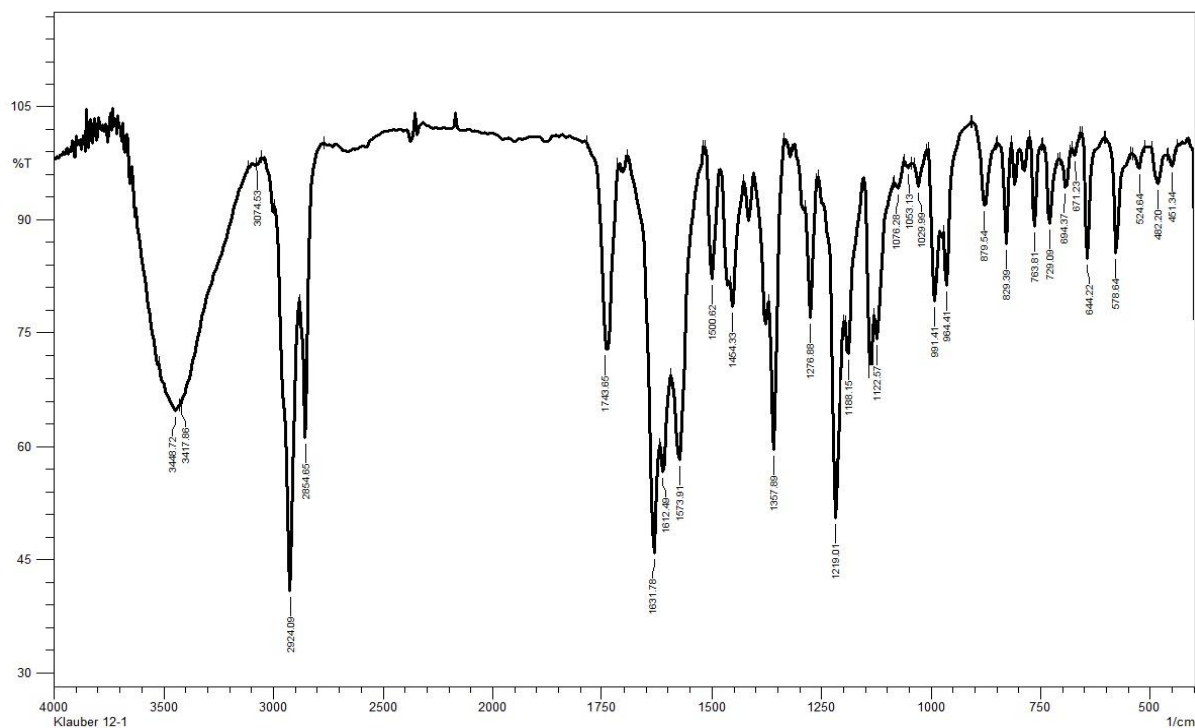
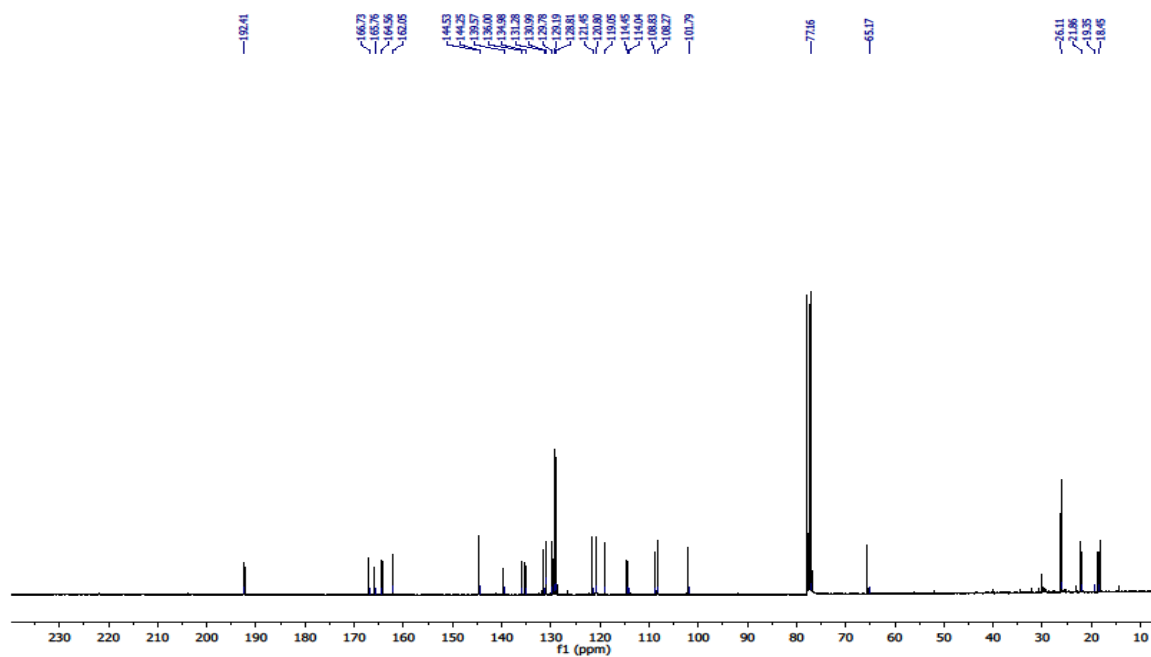


Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] de BV-1

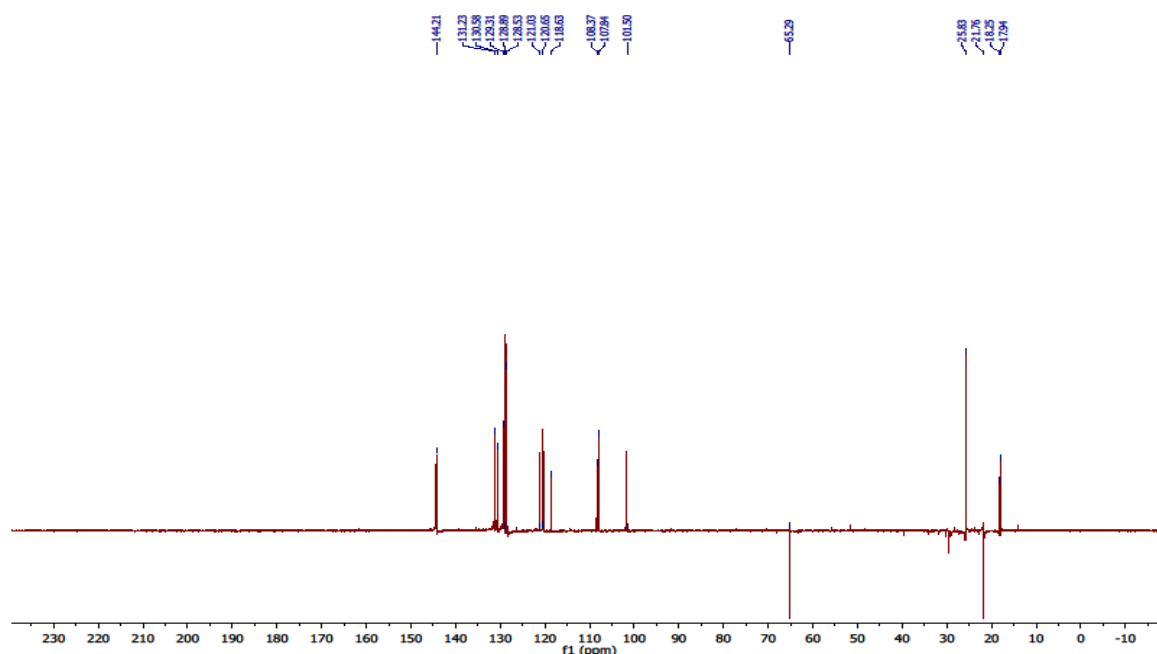




A análise do RMN de ^{13}C (Figura 31, pág.68) sugere um esqueleto de 25 carbonos para o composto. São também visíveis sinais sobrepostos que sustentam a possibilidade de mistura. Por outro lado, chamam a atenção os sinais: δ 166,4 e 165,3 para carbonos aromáticos ligados a oxigênio; δ 135,5; 134,7; 139,0 e 130,7 para Csp^2 desprotegidos; um sinal em δ 118,2 indicativo de carbono de alceno e um sinal em δ 101,3 relativo a carbono de aromático relativamente mais protegido, que sugeriu efeito de ligantes vicinais no anel e um sinal em δ 65, que indicou um fragmento $-(\text{CH}_2)\text{-O-}$.

A verificação de dois carbonos $-\text{CH}_2$, com auxílio do DEPT135, em regiões bem distintas (δ 65,3 e 21,4 aproximadamente), ratifica o pressuposto de um fragmento $-(\text{CH}_2)\text{-O-}$ e pressupõe um $-\text{CH}_2$ de um ligante alquil(a), respectivamente (Figura 32).

Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C [DEPT135 (500MHz)] da BV-1



No espectro de RMN ^1H (Figuras 33 a 36, págs.70 a 72), nitidamente se observam os singletos das metilas relativas ao grupo isopreno (δ 1,70; 1,83 e 1,80), que sugere três metilas ou uma mistura de compostos; um d desprotegido sustenta



a proposta do fragmento citado acima ($-\text{CH}_2\text{-O}$) em δ 4,47 e um t em δ 5,47 ratifica a presença do fragmento $[(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2]-$ do isopreno. Também se observa um singlete de H3' em δ 6,51 e duplete de H5' em aromáticos em δ 6,50, que sugeriu um anel di ou trissubstituído. Da mesma forma, em região de aromático, verificaram-se dubletos sobrepostos próximos a δ 7,91 e 7,61 representativos dos hidrogênios alfa/beta-insaturados, assim como os multipletos em δ 7,64 e 7,43, que sugeriram acoplamentos de H do anel monossubstituído.

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] da mistura BV-1

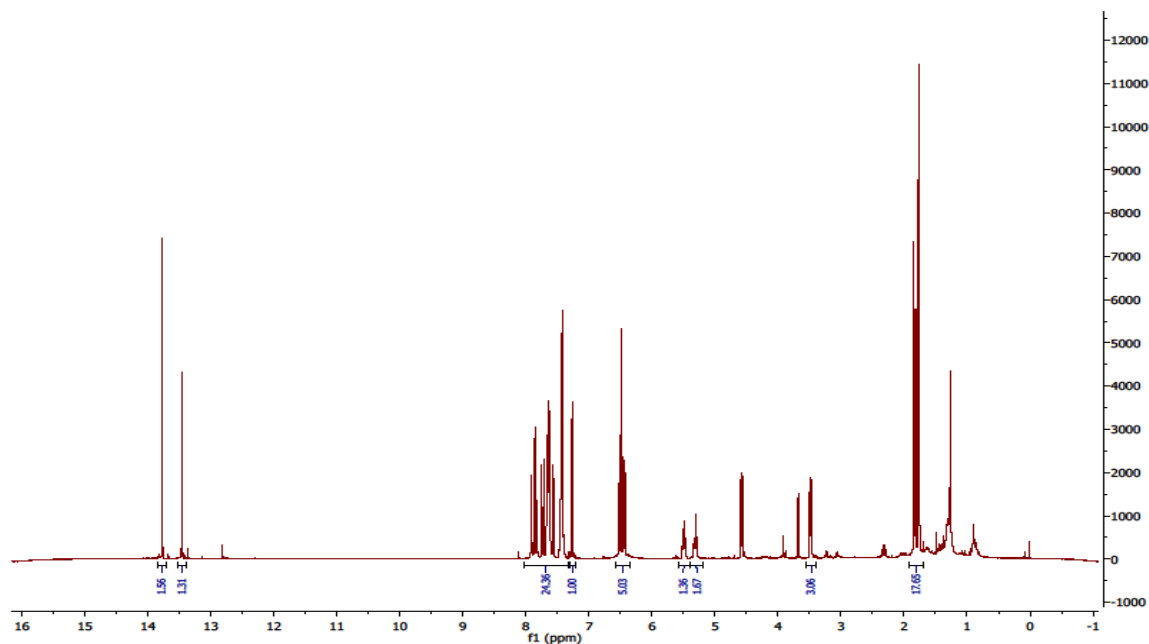




Figura 34 - Ampliação de espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] do BV-1- região de aromático

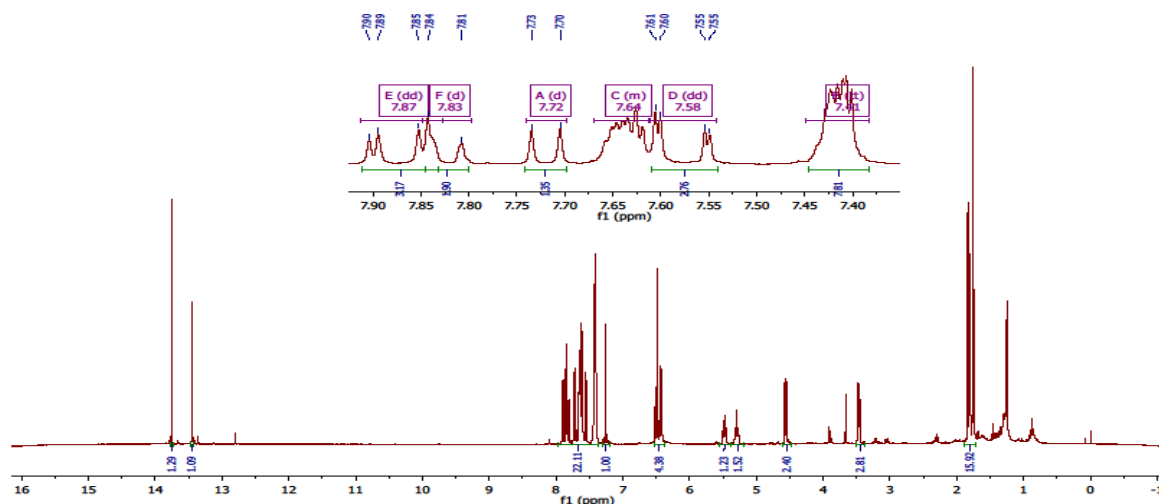


Figura 28 - Ampliação de espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] do BV-1- região de substituinte alifático

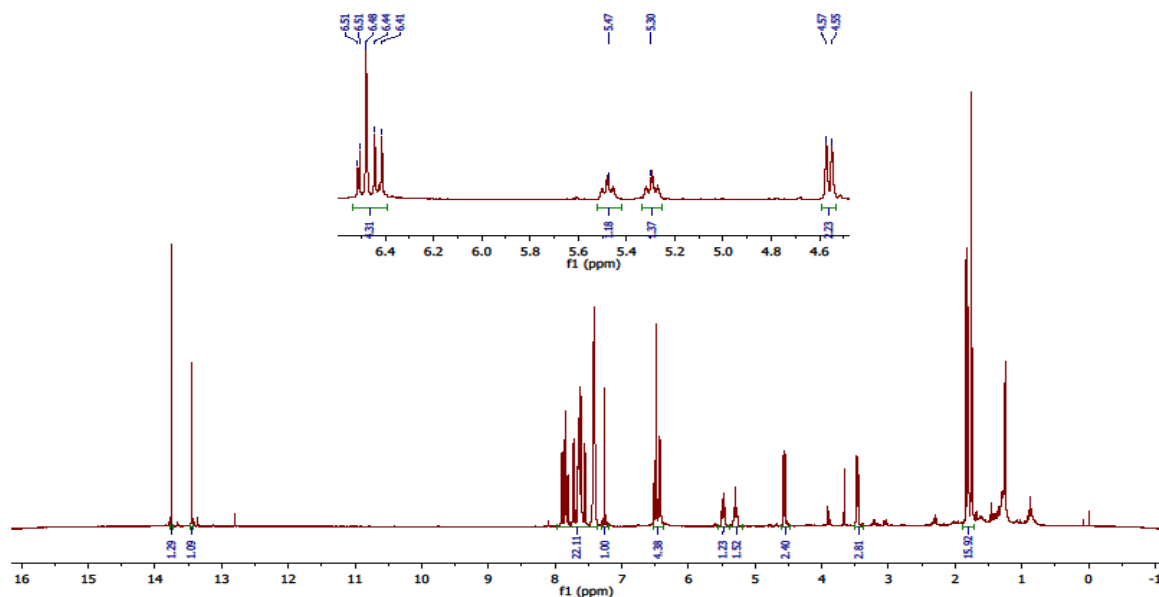
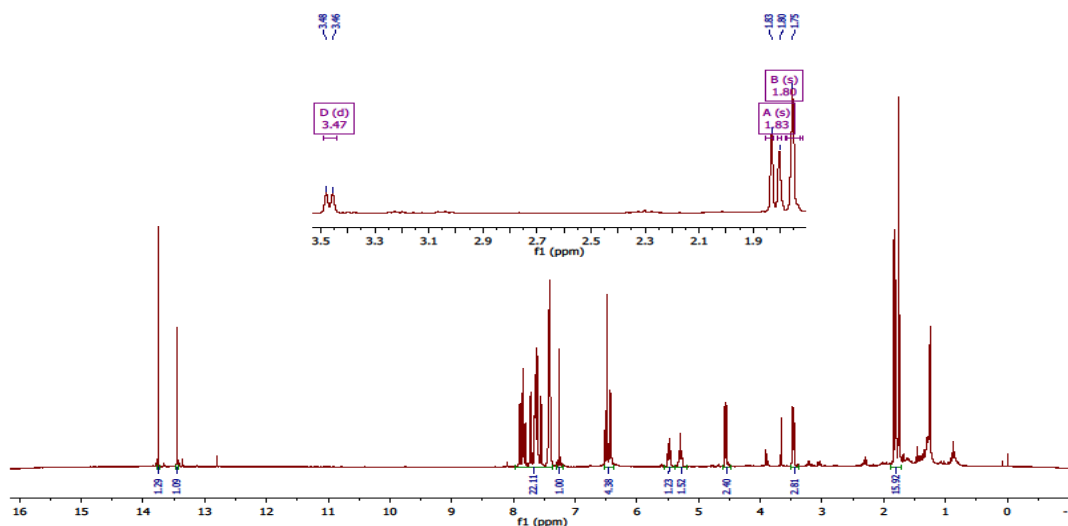




Figura 29 - Ampliação de espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] do BV-1- região de $-\text{CH}_3$



O experimento bidimensional HMBC (Figura 37, pág. 73) e ampliações (Figuras 38-42, págs.73-76) permitiram verificar correlações importantes de hidrogênios com os respectivos carbonos a duas e três ligações. Os espectros abaixo apontam correlações entre H e C à longa distância. Sinais verificados nos espectros de RMN de ^1H em δ 13,45 e 13,75 sugeriram presença de dois grupos hidroxílicos quelados. Uma correlação do hidrogênio de $-\text{OH}$ com sinal em δ 192,4 confirma a presença de grupo cetona próxima à hidroxila na molécula. Quatro sinais na região entre δ 160 – 166, assim com um sinal em δ 101,7 e outro em δ 108,2 apontam dois distintos padrões de oxigenação no anel A sugerido. Devido hipótese de mistura, a análise dos grupos de sinais foi feita separadamente. Para elucidação de **BV-1**, foi considerado o hidrogênio quelado com deslocamento δ 13,45 de menor intensidade. O comparativo de dados espectrais encontrados na literatura e relacionados nas Tabelas 15 e 16, págs.76 e 77 direcionou as análises para proposta da BV-1 em mistura.



Figura 30 - Experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC

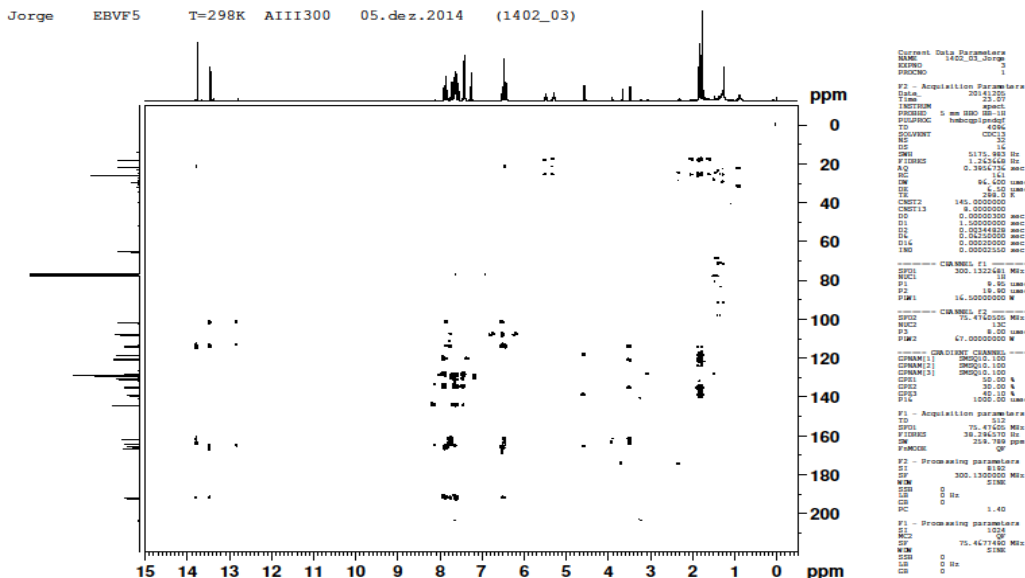
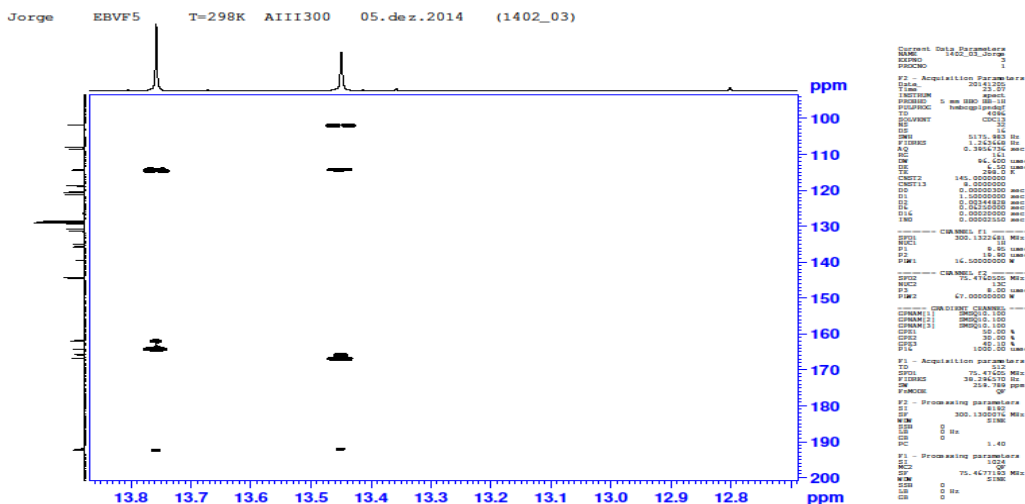


Figura 31 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1- HMBC. Correlação para região de hidrogênio de -(OH)

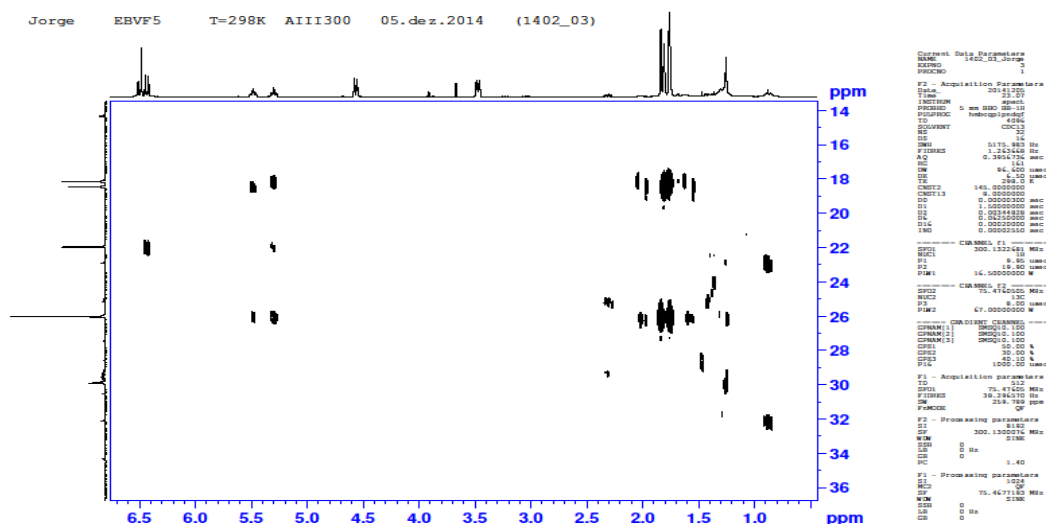


A ampliação do espectro HMBC (Figura 39, pág.75) aponta para as correlações existentes entre hidrogênios de metilas e carbonos do isoprenil ligado à estrutura de **BV-1**. Sinais de H em δ 1,80 e 1,83 ratificam ligação com carbonos em



δ 18,4 e 26,1. Um singlete sobreposto próximo a δ 6,51 sustenta a ligação de um isopreno ligado a oxigênio em carbono do anel A.

Figura 32 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1-HMBC



Sinais em região entre δ 160,0-166,0 e 192,4 de carbono oxigenado e as correlações visualizadas para H em região de aromático entre δ 7,40–7,90; permitiram sustentar a presença de duas chalconas semelhantes quimicamente em **BV-1** (Figuras 40 e 42, págs.75 e 77).



Figura 33 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1-HMBC. Correlação para região de carbono oxigenado e de anel aromático

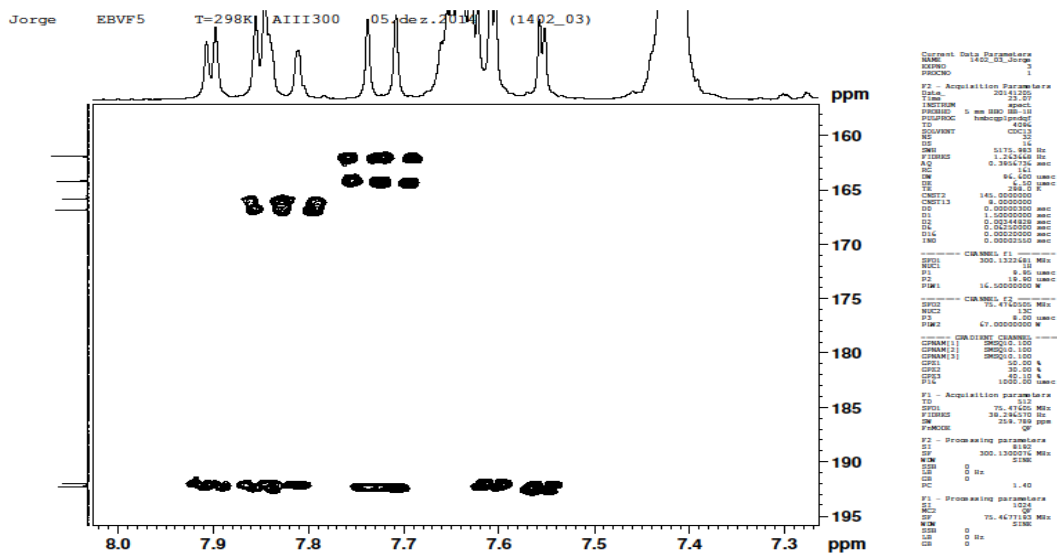


Figura 34 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1-HMBC. Correlação para região de anel aromático

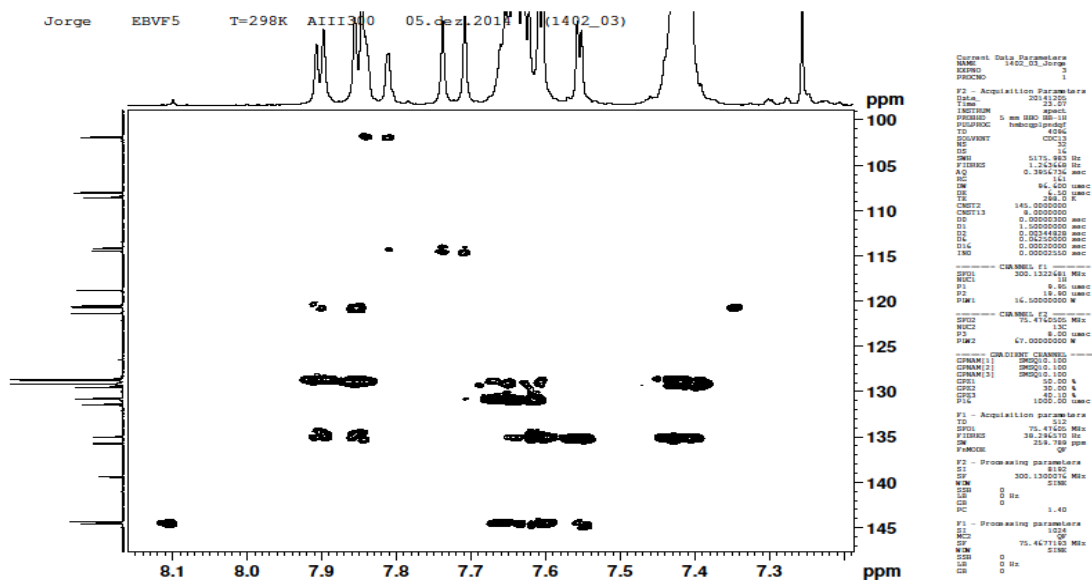




Figura 35 - Ampliação do experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1 – HMBC. Correlação para sinais do substituinte alifático

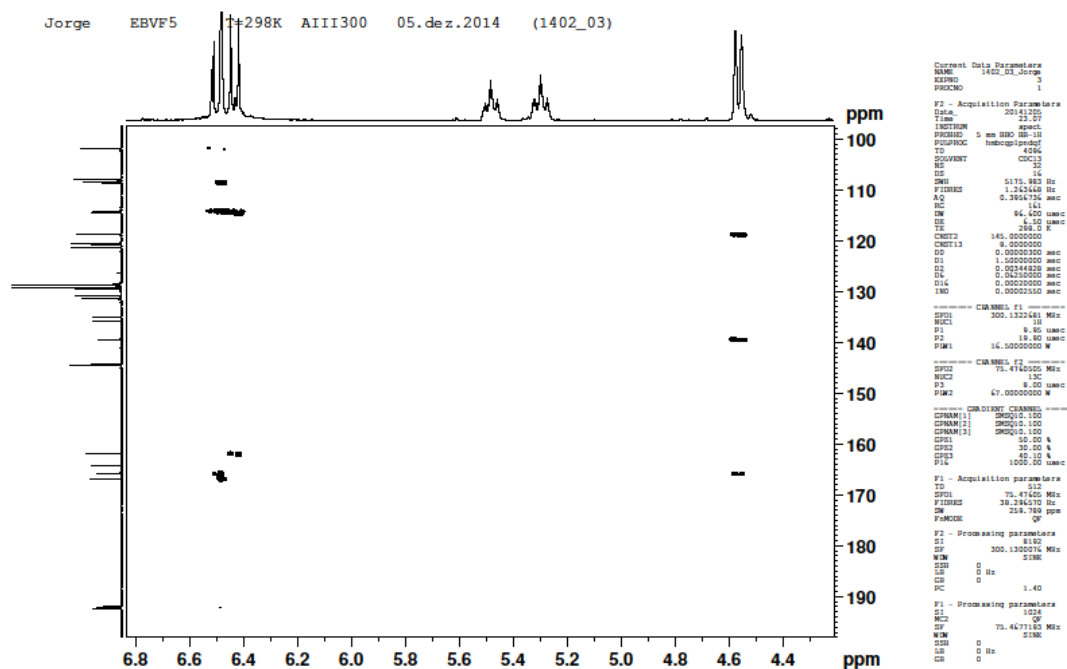


Tabela 15 - Valores de deslocamentos químicos para espectros de RMN de ¹³C de BV-1 e compostos semelhantes encontrados na literatura

| C | Isocordoína (CDCl₃) (PARMAR et al, 1992) | B (CDCl₃) (PARMAR et al, 1992) | C (CDCl₃) (PARMAR et al, 1992) | BV-1 (CDCl₃) |
|--------------|--|--|--|------------------------------------|
| 1 | 129,33 | 117,04 | 130,27 | 134,9 |
| 2 | 128,99 | 161,16 | 128,74 | 129,7 |
| 3 | 128,51 | 98,39 | 128,25 | 128,1 |
| 4 | 129,58 | 160,42 | 128,62 | 131,2 |
| 5 | 122,51 | 105,39 | 128,25 | 128,1 |
| 6 | 128,99 | 129,12 | 128,74 | 129,7 |
| BETA' | 192,5 | 192,70 | 191,74 | 192,4 |
| BETA | 144,0 | 139,93 | 143,67 | 144,5 |
| ALFA | 121,10 | 118,44 | 118,73 | 120,1 |



| | | | | |
|-----------|--------|--------|--------|--------------|
| 1' | 114,23 | 114,16 | 114,33 | 114,0 |
| 2' | 164,00 | 163,72 | 162,36 | 166,7 |
| 3' | 114,98 | 113,90 | 113,45 | 101,7 |
| 4' | 161,90 | 163,05 | 160,08 | 165,7 |
| 5' | 107,86 | 107,43 | 118,73 | 108,8 |
| 6' | 130,59 | 131,10 | 127,11 | 131,2 |

A- 2,4- Dimetoxi-2',4'-diidroxil-3'-(3- metilbut-2-enil) chalcona (PARMAR et al, 1992)

B- 4-ethoximethoxi-4'-metoxi-2'-hidroxil-5'-(3- metilbut-2-enil) chalcona (PARMAR et al, 1992)

Figura 36 - Estruturas moleculares de B e C

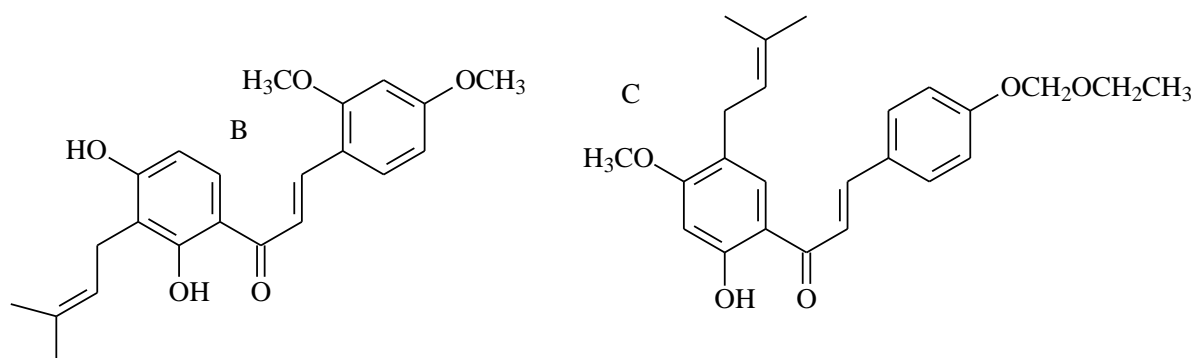


Tabela 16 - Valores de deslocamentos químicos para espectro de RMN de ^1H da cordoína, isocordoína e compostos encontrados na literatura

| H | Isocordoína (LIMA et al., 1973) (500MHz, CDCl_3) | 2',4-dimetoxi-6'-hidroxilchocarpina (BORGES et al., 2002) (500MHz, CDCl_3) | BV-2 (CDCl_3) | BV-1 (CDCl_3) |
|-------------|--|--|---------------------------|---------------------------|
| 2/6 | 7,43(m, anel B) | 7,57(d, $J=8,5\text{Hz}$) | 7,65(m) | 7,64(m) |
| 3/5 | 7,43(m, anel B) | 6,95(d, $J=8,5\text{Hz}$) | 7,43(m) | 7,41(m) |
| Beta | 7,89(d, $J=15,4\text{Hz}$) | 7,79(d, $J=15,6\text{Hz}$) | 7,88(d, $J=15\text{Hz}$) | 7,90(d, $J=15\text{Hz}$) |
| Alfa | 7,60(d, $J=15,4\text{Hz}$) | 8,04(d, $J=15,6\text{Hz}$) | 7,60(d) | 7,60(d) |



| | | | | |
|------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | | $J=15\text{Hz}$ | $J=15\text{Hz}$ |
| 3'' | 1,78(s) | 5,46(d, $J=9,9\text{Hz}$) | 1,78(s) | 1,80(s) |
| 4'' | 1,85(s) | 6,60(d, $J=9,9\text{ Hz}$) | 1,85(s) | 1,83(s) |
| 2'' | 5,31(t, $J=7,0\text{Hz}$) | 1,56(s, -Me ₂) | 5,31(t, $J=7,0\text{Hz}$) | 5,47(t, $J=7,0\text{Hz}$) |
| 1'' | 3,49(d, $J=7,0\text{Hz}$) | - | 3,49(d, $J=7,0\text{Hz}$) | 4,47(d, $J=7,0\text{Hz}$) |
| 2' | 13,76(s, -OH) | 3,86(s, -Ome) | 13,75(s, -OH) | 13,45(s, -OH) |
| 3' | - | 6,07(s) | - | - |
| 5' | 6,44(d, $J=8,9\text{Hz}$) | - | 6,44(d, $J=9\text{Hz}$) | 6,51(d, $J=9\text{Hz}$) |
| 6' | 7,74(d, $J=8,9\text{Hz}$) | - | 7,74(d, $J=9\text{Hz}$) | 7,72(d, $J=9\text{Hz}$) |

Os valores dos deslocamentos para os carbonos do isopreno (C1''- C5'') podem variar. São citados na literatura podendo aparecer também dentro de intervalos de deslocamento como visualizado na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores de deslocamentos químicos para RMN de ¹³C do ligante isoprenil na literatura, de BV-2 e BV-1

| C | isocordoína (PARMAR et al., 1992) | B (CDCl₃) (PARMAR et al., 1992) | C (CDCl₃) (PARMAR et al., 1992) | isocordoína (LIMA et al., 1973) (125MHz, CDCl₃) | BV-2 (CDCl₃) | BV-1 (CDCl₃) |
|------------|--|---|---|---|--------------------------------|--------------------------------|
| 1'' | 21,69-21,85 | 21,69-21,85 | 21,69-21,85 | 22,0 | 21,9 | 21,8 |
| 2'' | 120,54-122,38 | 120,54-122,38 | 120,54-122,38 | 121,3 | 120,7 | 121,4 |
| 3'' | 131,11- | 131,11- | 131,11- | 136,1 | 135,0 | 136,0 |



| | | | | | | |
|------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | 135,60 | 135,60 | 135,60 | | | |
| 4'' | 19,64-19,89 | 19,64- 19,89 | 19,64- 19,89 | 18,2 | 18,1 | 18,4 |
| 5'' | 25,58-25,83 | 25,58- 25,83 | 25,58- 25,83 | 26,0 | 26,0 | 26,1 |

Os experimentos bidimensionais abaixo (Figuras 45, 46-49; págs.80 e 81-83) aliados às informações da literatura, contidas nas Tabela 15 e 16, permitiram a confirmação da posição do grupo isoprenil no oxigênio ligado a C4' da estrutura de **BV-1**, uma vez que o sinal dos H do metileno no referido ligante alquil aparece mais deslocado (δ 4,57) e sua correlação com o C4' (δ 165,7) pôde ser vista, ratificando a ligação do radical ao oxigênio.

Figura 37 - Correlações de H metilênico -(CH₂) no isoprenil aos carbonos C1'' e C4'

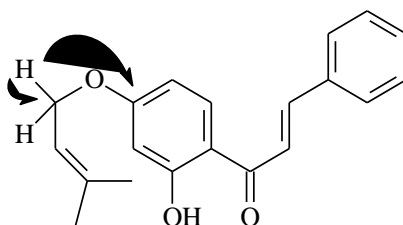




Figura 38 - Experimento bidimensional de BV-1[CDCl_3 (300MHz)] – HMQC

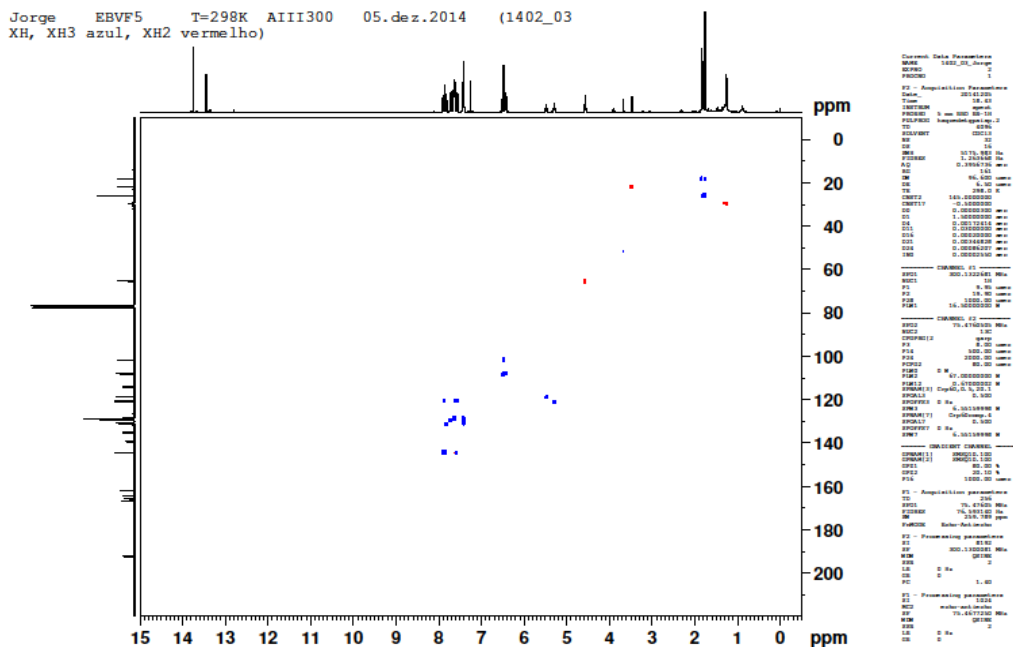


Figura 39 - Correlações de H alfa e beta e H6'

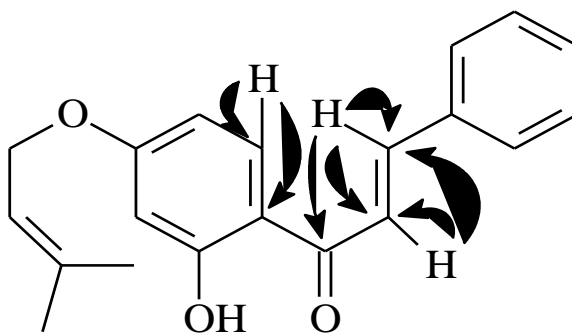




Figura 40 - Experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – Ampliação em região de anel aromático

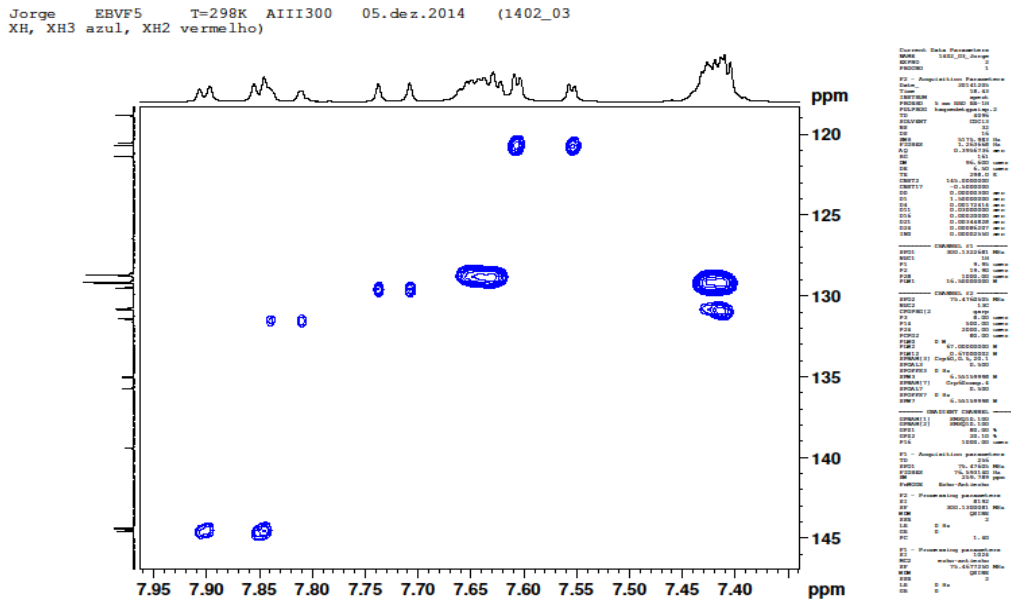


Figura 41 - Experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – Correlações para –(CH₃) e –(CH)

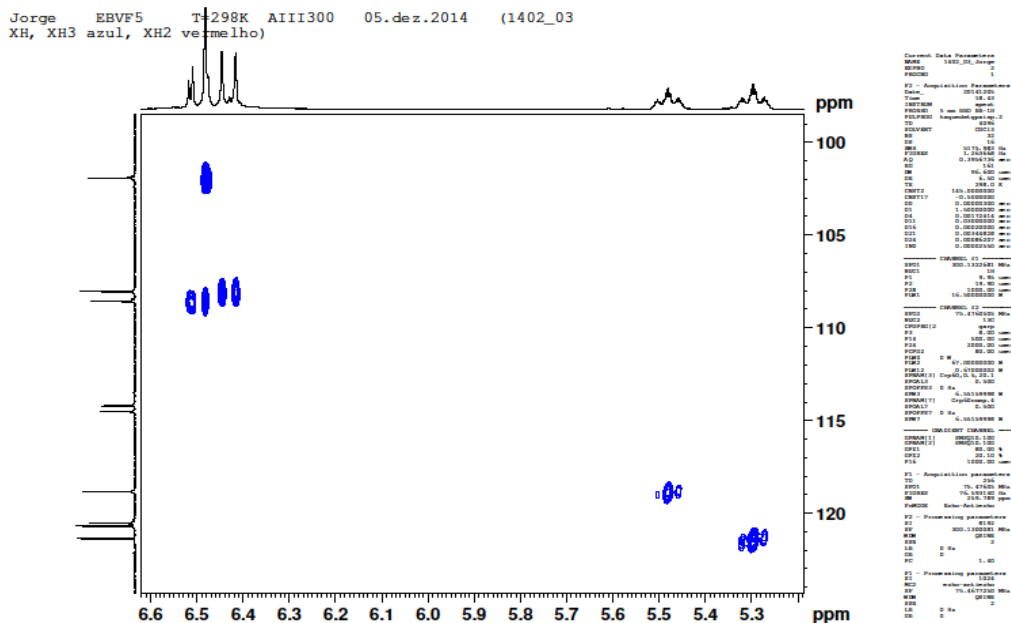




Figura 42 - Experimento bidimensional [CDCl_3 (300MHz)] do BV-1 – HMQC – correlações de $-(\text{CH}_3)$ e $-(\text{CH}_2)$

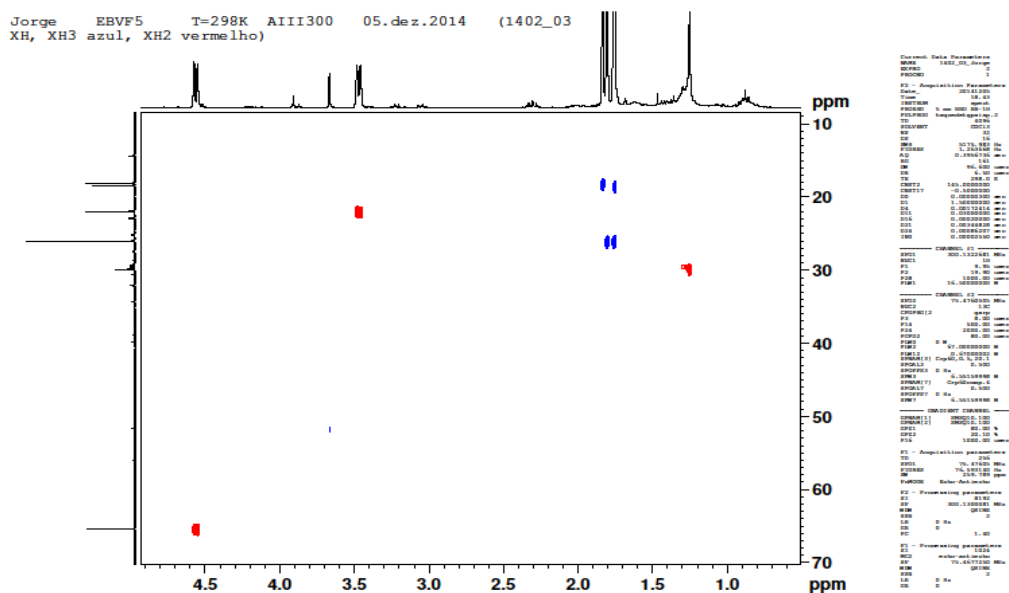
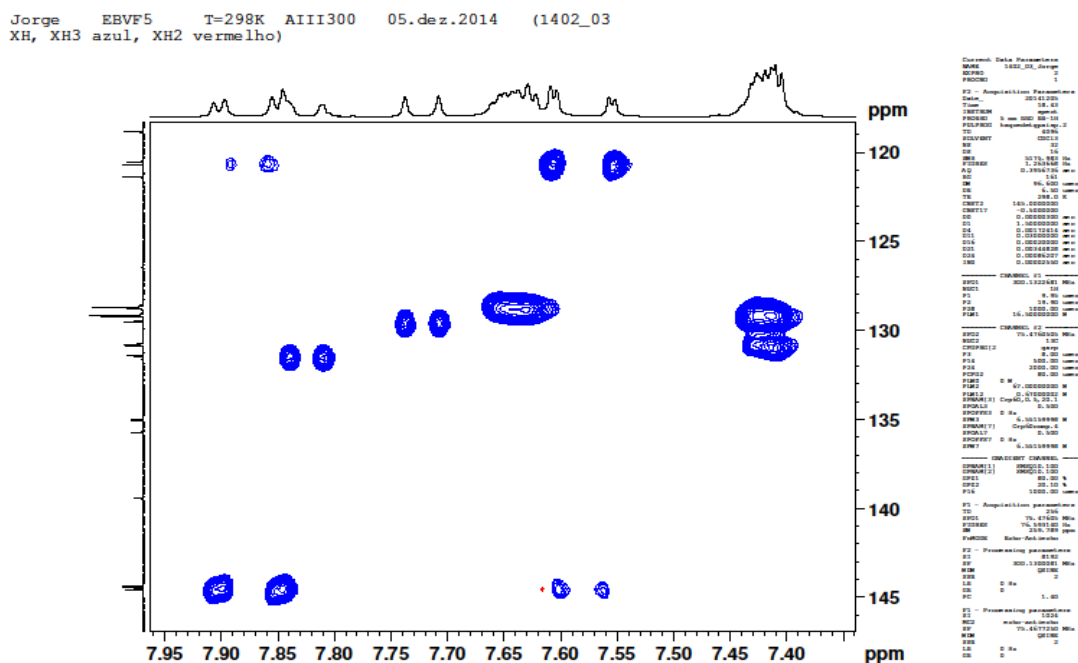




Figura 43 - Experimento bidimensional [CDCl₃ (300MHz)] do BV-1 – HMQC – Correlações para –(CH)



Os sinais que aparecem no espectro de RMN de ¹H e ¹³C ou mesmo nos experimentos bidimensionais não foram suficientes para designar um terceiro padrão de substituição, como observado no EM referido na Figura 28, pág.68. No entanto, visivelmente se pôde atestar a presença de mais uma substância devido o aparecimento de sinais sobrepostos nos espectro de RMN. A comprovação da presença de **BV-2** (isocordoína) na mistura **BV-1** ocorreu após a elucidação da própria BV-2 isolada em outra fração e por comparação de dados espectrais.



4.2 Elucidação estrutural dos Triterpenos

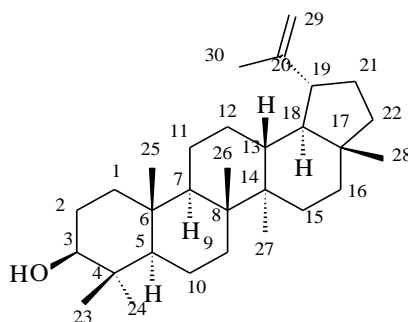
Triterpenos são metabólitos secundários não esteroides de origem vegetal e animal. Consistem num grupo de substâncias muito diverso estruturalmente e desempenham funções importantes nos organismos vegetais e também na saúde humana (ROBERTS, 2007). Acredita-se que estabilizam a estrutura de membranas celulares vegetais, mas ainda não se tem um completo conhecimento do desempenho destes compostos nesses organismos (SALEEM, 2009).

Os triterpenos podem ser isolados na forma livre, glicosilados ou esterificados. Embora alguns estudos apontem uma limitação no uso medicinal deste compostos, estudos recentes tem demonstrado um crescente potencial de atividade biológica, além de indicar grande valor na formulação de medicamentos. Foi demonstrado atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética da friedelina (Antonisamy; Duraipandiyar e Ignacimuthu; 2011).

Outro estudo apontou que o extrato de bétula - Betual®, rico em betulina, apresentou atividade hepatoprotetora. Em pesquisa alemã, foi sugerido que triterpenos (betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico, lupeol, e eritrodio), principais constituintes de pomadas analisadas, são responsáveis por efeitos benéficos no tratamento de queratose acnítica (Huyke et al, 2006). Além destas evidências, estudos mais recentes tem demonstrado avanços no tratamento de câncer em cães (Willmann et al, 2009) e no bloqueio da fase de maturação HIV (Dang et al, 2013).

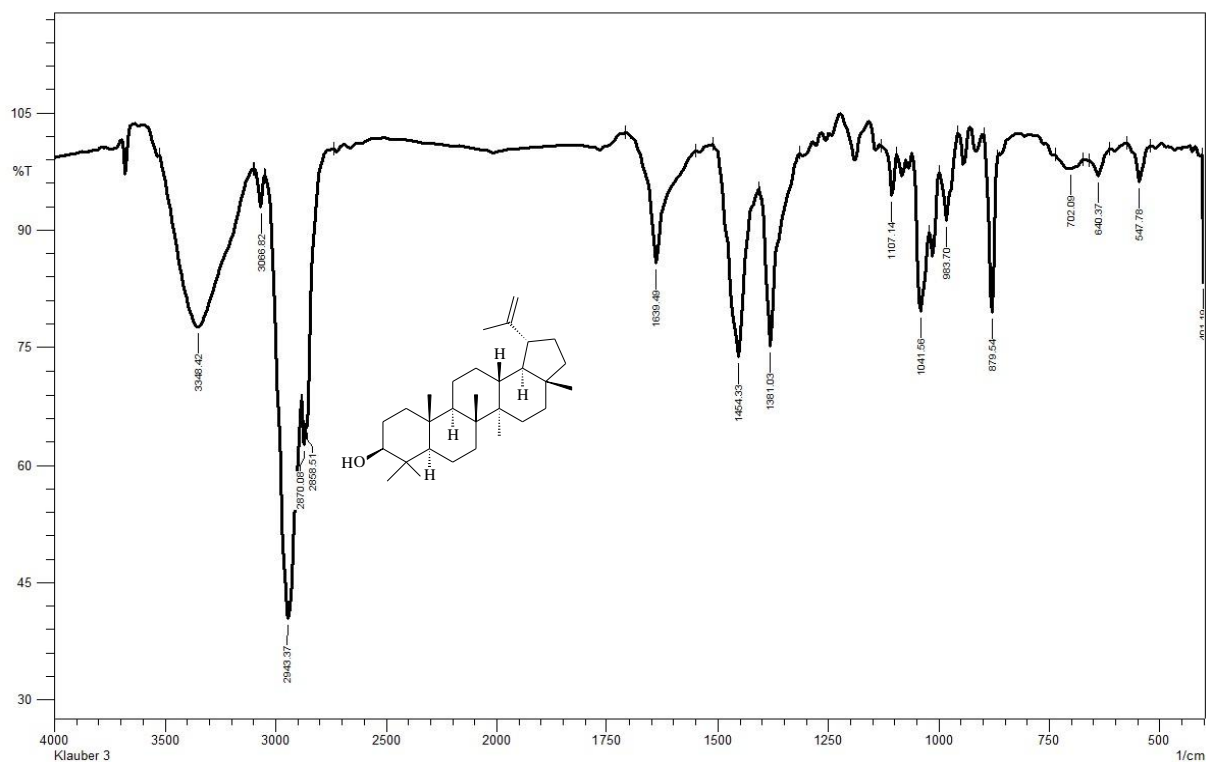
4.2.1 Elucidação estrutural de BV-3 – Lupeol

Figura 44 - Estrutura planar do Lupeol - BV-3



Para identificação de **BV-3**, partindo-se da fase MeOH das raízes da planta foi possível isolar 69mg de um sólido branco amorfo oriundo da fração EMBV F26* (Tabela 3, pág.37). Após CCDC eluída em CHCl_3 : MeOH (99/1) a placa foi revelada em UV, Iodo e reagente de Liebermann-Burchard, apontando uma única mancha de cor violácea. A mesma amostra ainda foi submetida ao infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C e DEPT135.

A análise, primeiramente do infravermelho, revelou um pico de deformação axial de $-(\text{OH})$ na região de 3300cm^{-1} ; ainda apresentou pico representativo de estiramento $\text{C}=\text{C}$ de alceno em 3060cm^{-1} ; em 2943 e 2872cm^{-1} vê-se estiramento de $\text{Csp}^3\text{-H}$; dois picos característicos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ em 1465 e 1375cm^{-1} , respectivamente; uma banda em 1650cm^{-1} relativa à deformação axial de ligação $-\text{C}=\text{C}-$; um pico intenso em 1050cm^{-1} característico de $-(\text{CO})$ de álcoois e um desdobramento fora do plano de radical vinil em 880cm^{-1} (PAVIA, 2012).

Figura 45 - Espectro de IV- infravermelho – [pastilhas de KBr] de BV-3

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C revelaram sinais bastante semelhantes aos dados encontrados na literatura (Tabelas 18 e 19, págs.87 e 90). Análises pelo RMN de ^1H (Figura 52, pág.87) apontam dois singletos em 4,71 e 4,59 de hidrogênios em Csp^2 , que sugerem o C29. O efeito de desblindagem da dupla ligação faz com que os sinais apareçam deslocados em campo menos intenso. Estes sinais aliados ao singlete da metila em δ 1,68 sugerem um substituinte isoprenil. Um dd próximo a δ 3,19 aponta para hidrogênio alfa (SOUZA et al., 2001) em C3, acoplado com os hidrogênios vizinhos em C2. Estando a hidroxila $-(\text{OH})$ em beta, um dos hidrogênios mais próximo sofre o efeito de desblindagem eletrônica, deslocando um dubleto para uma região de campo mais baixo, ficando um dubleto em campo mais baixo δ 3,21 e outro em δ 3,19. Outros sinais também importantes são os singletos de sete metilas em regiões distintas: δ 0,97 (H23); δ 0,85 (H24); δ 0,80 (H25); δ 1,05 (H26); δ 0,99 (H27); δ 0,78 (H28); δ 1,68 (H30). Um multipletto em δ 1,9 caracteriza um dos hidrogênios de H21, o outro multipletto aparece em δ 1,40 junto a sinais de metilenos (JIANG et al, 2009).



Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] de BV-3

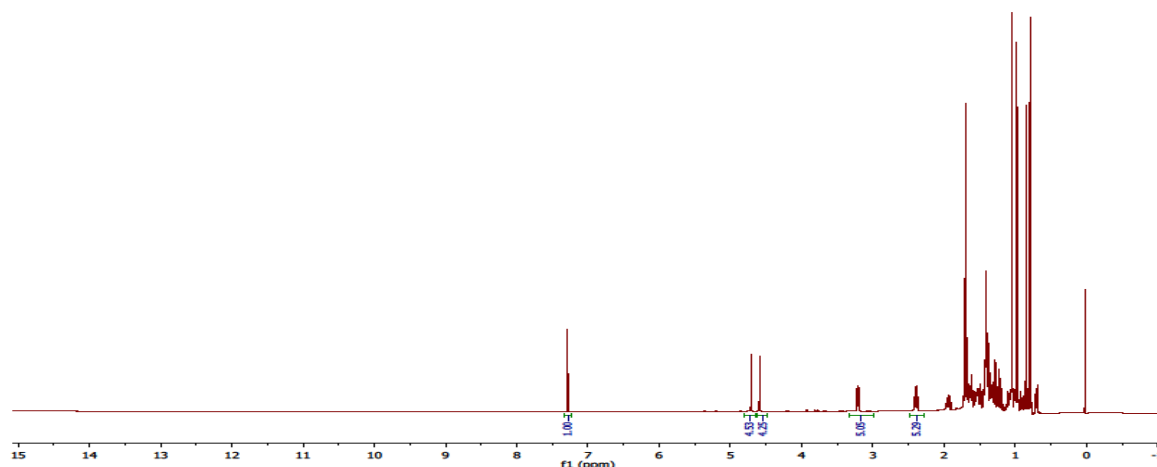


Figura 47 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] de BV-3

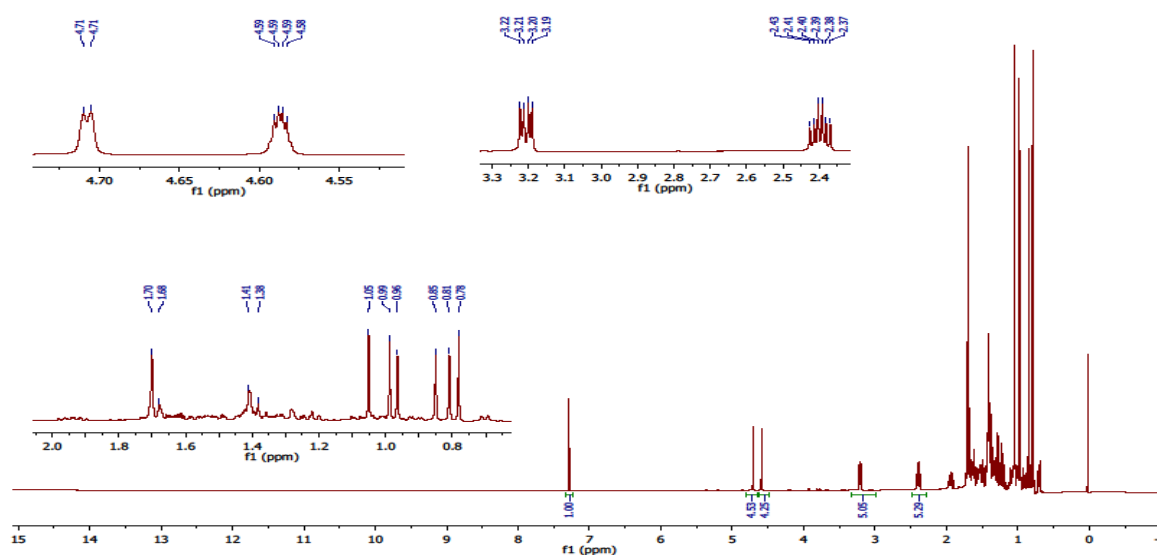


Tabela 18 - Relação de deslocamentos químicos em espectros de RMN de ^1H do BV-3 comparados aos deslocamentos encontrados na literatura

| H | A | CDCl_3 | B | CDCl_3 | BV-3 | CDCl_3 | C | CDCl_3 |
|---|----------|-----------------|----------|-----------------|--------------------------|-----------------|----------|-----------------|
| | (400MHz) | | (400MHz) | | (500MHz) | | (400MHz) | |
| 3 | 3,40m | | 3,40m | | 3,19dd(J=11,57 e 5,45Hz) | | 3,18dd | |



| | | | | |
|-------------|--------------|-------------|--|--------------|
| 19 | 2,38m | 2,38m | 2,39m | 2,39m |
| 21' | - | - | 1,94m | 1,93m |
| 21'' | - | - | * | 1,33m |
| 23 | - | - | 0,99s | 0,98s |
| 24 | - | - | 0,78s | 0,77s |
| 25 | - | - | 0,85s | 0,84s |
| 26 | 1,03s | 1,03s | 1,05s | 1,04s |
| 27 | - | - | 0,97s | 0,97s |
| 28 | 0,79s | 0,79s | 0,78s | 0,79s |
| 29 | 4,77s; 4,69s | 4,77; 4,69s | 4,71 d(J=2,4Hz); 4,59m(J=2,4 e 1,5Hz) | 4,56m; 4,69m |
| 30 | 1,68s | 1,68s | * | 1,69s |

- A- 3-alfa-hidroxi-Lupeol (SOUZA et al., 2001)
B- 3-beta-hidroxi-Lupeol (SOUZA et al., 2001)
C- 3-beta-OH- Lupeol (REYNOLDS et al., 1986)
(-) sinal não fornecido
(*) sinal não identificável no espectro

Quanto ao espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54, pág.89), algumas observações são bastante pertinentes acerca da estrutura. Os sinais em δ 109,88 (C29) e δ 151,52 (C20) sugerem ser de dupla ligação de esqueletos derivados do lupano. Tais sinais somados ao deslocamento específico em δ 19,62 (C30), do grupo isoprenil, corroboram com dados da literatura (Tabela 19, pág.90) (ALMEIDA et al., 2003; AGUIAR et al., 2005). Um sinal em δ 79,41 evidencia presença de carbono ligado a oxigênio em estereoquímica beta (HANSEL, 1999; HARTMANN, 1998; JIANG et al, 1995; MEBE et al, 1998). Caso a posição relativa da hidroxila fosse alfa, o valor encontrado estaria próximo de δ 75, em campo mais intenso (SOUZA et al, 2001; CARVALHO et al, 1998). Com a -(OH) em beta, ocorre alinhamento dos carbonos C1 e C5 no mesmo plano, esta posição favorece o efeito



de desblindagem do oxigênio em relação a estes carbonos, deslocando sinais para campo menos intensos (CARVALHO et al., 1998).

Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] do BV-3

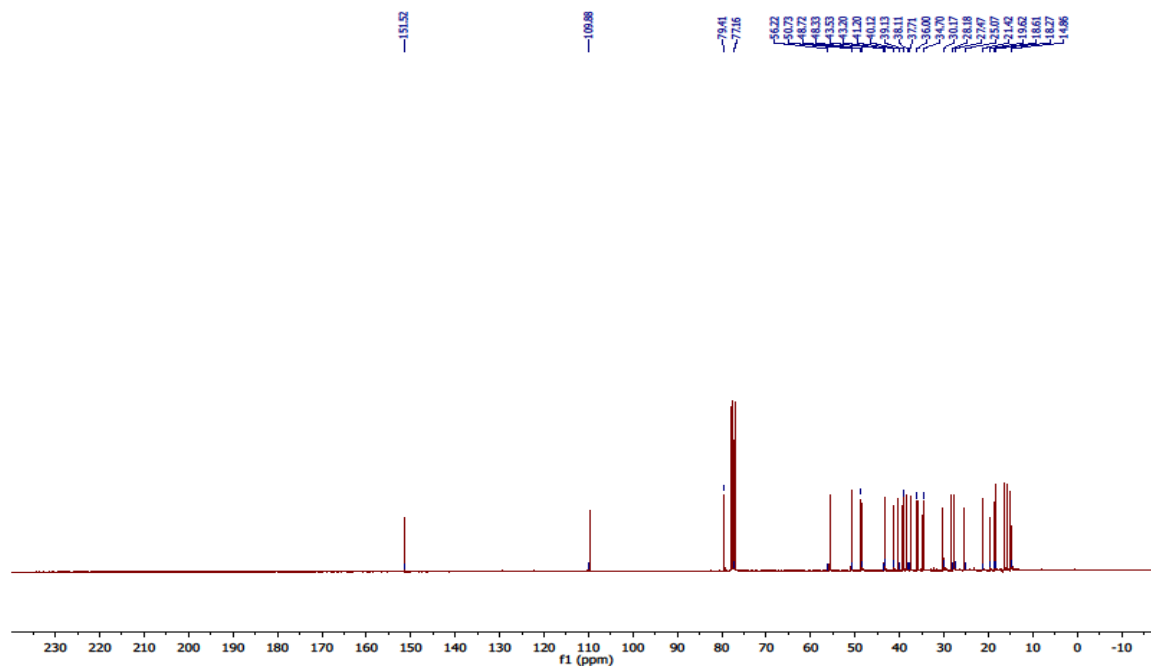




Figura 49 - Ampliações no espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] do BV-3

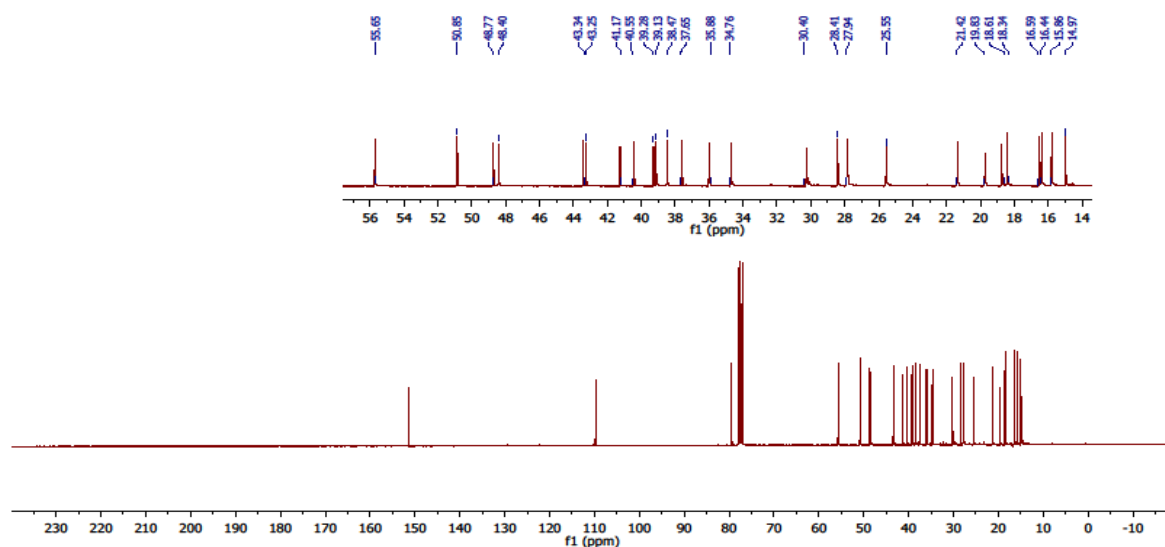


Tabela 19 - Deslocamentos químicos em espectro de RMN de ^{13}C do BV-3 comparados aos deslocamentos encontrados na literatura

| C | A (CDCl_3) | B (CDCl_3) | BV-3 CDCl_3 (500MHz) | C (CDCl_3) | D (piridina) |
|----|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------|
| 1 | 32,5 | 38,7 | 38,4 | 38,4 | 41,6 |
| 2 | 25,3 | 27,4 | 27,4 | 23,6 | 28,6 |
| 3 | 76,4 | 78,9 | 79,6 | 80,9 | 78,6 |
| 4 | 37,6 | 38,8 | 39,2 | 37,6 | 40,4 |
| 5 | 48,2 | 55,3 | 55,2 | 55,3 | 55,4 |
| 6 | 18,4 | 18,3 | 18,3 | 18,0 | 73,1 |
| 7 | 34,4 | 34,2 | 34,7 | 34,3 | 74,3 |
| 8 | 41,1 | 40,8 | 40,5 | 40,9 | 46,6 |
| 9 | 50,5 | 50,4 | 50,8 | 50,3 | 51,5 |
| 10 | 37,3 | 37,1 | 37,6 | 37,1 | 37,4 |
| 11 | 21,2 | 20,9 | 21,4 | 20,9 | 21,4 |



| | | | | | |
|-----------|-------|-------|--------------|-------|-------|
| 12 | 25,3 | 25,1 | 25,5 | 25,0 | 26,1 |
| 13 | 38,0 | 38,0 | 39,1 | 38,0 | 38,4 |
| 14 | 43,0 | 42,8 | 41,1 | 42,9 | 44,7 |
| 15 | 27,6 | 27,4 | 27,9 | 27,5 | 31,6 |
| 16 | 35,8 | 35,5 | 35,8 | 35,5 | 36,5 |
| 17 | 43,2 | 43,0 | 43,2 | 43,0 | 43,1 |
| 18 | 48,2 | 48,2 | 48,7 | 48,2 | 48,8 |
| 19 | 48,2 | 47,9 | 48,4 | 48,0 | 48,5 |
| 20 | 151,2 | 150,9 | 151,5 | 150,9 | 151,3 |
| 21 | 29,9 | 29,8 | 28,4 | 29,8 | 30,3 |
| 22 | 40,2 | 40,0 | 40,5 | 40,0 | 40,4 |
| 23 | 28,2 | 28,0 | 27,9 | 28,0 | 28,1 |
| 24 | 22,4 | 15,4 | 15,8 | 16,5 | 18,24 |
| 25 | 16,4 | 16,1 | 16,4 | 16,1 | 17,9 |
| 26 | 16,2 | 15,9 | 16,5 | 16,0 | 11,1 |
| 27 | 14,7 | 14,5 | 14,9 | 14,4 | 15,5 |
| 28 | 18,2 | 18,0 | 18,0 | 18,1 | 18,19 |
| 29 | 109,6 | 109,3 | 109,8 | 109,3 | 109,8 |
| 30 | 19,5 | 19,3 | 19,6 | 19,2 | 19,6 |

A- 3-alfa-hidroxi-Lupeol (SOUZA et al., 2001)

B- 3-beta-hidroxi-Lupeol (SOUZA et al., 2001)

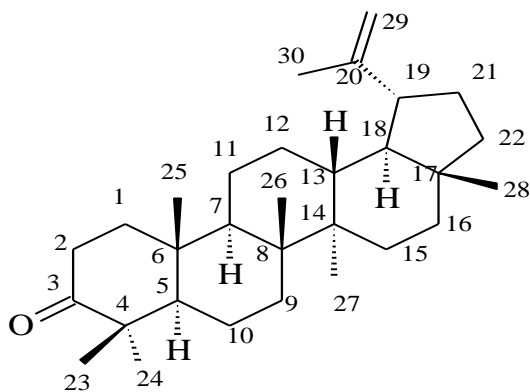
C- Acetato de Lupeol (PERFEITO et al., 2005)

D- 3-beta,6-beta,7-beta-trihidroxi-20(29) lupeno (JIANG et al., 1995)



4.2.2 Elucidação estrutural de BV-4 – Lupenona

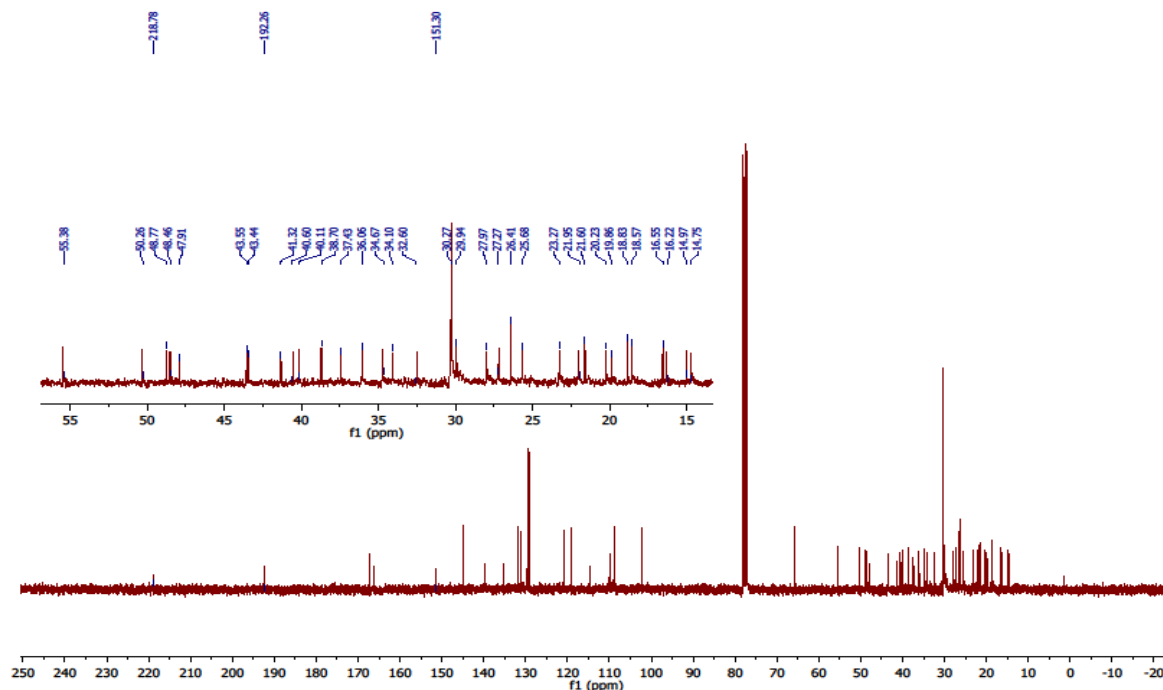
Figura 50 - Estrutura planar da Lupenona - BV-4



Em continuidade ao processo de separação e isolamento de substâncias da fase MeOH, a purificação da fração EMBV E conduziu as análises para uma proposta de lupenona (**BV-4**) em mistura. Utilizando placa CCDC, eluída em CHCl_3 : MeOH (99/1) e revelada em Liebermann – Burchard, obteve-se resultado positivo, afirmando presença de triterpenos ou esteroides. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57, pág. 93), um sinal em aproximadamente δ 218,7 sugeriu presença de grupo cetona na estrutura. Sinais em δ 150 mais os sinais em δ 109,3 e δ 19,8 demonstraram presença do grupo isoprenil(a). Todos os sinais correspondentes à região de campo mais intenso, agrupados na Tabela 20, pág.95; corroboram com os dados descritos na literatura para proposta da lupenona. (LUZ et al., 2010).



Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] do BV-4



Alguns sinais sobrepostos aparecem na mistura, porém a investigação dos espectros de RMN de ^1H (Figura 58, pág.94) revelou presença de sinais em campo menos intenso diferentes dos sinais encontrados nos mesmos espectros de RMN de ^1H do **Lupeol**. Não são vistos os duplos dubletos referentes ao H3 característicos, mas são vistos os dubletos em aproximadamente δ 4,60 e 4,70 para os hidrogênios geminados em C29. A comparação dos valores de deslocamento da literatura permitiu identificar BV-4 como Lupenona (Tabela 20, pág.94).



Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (300MHz)] do BV-4

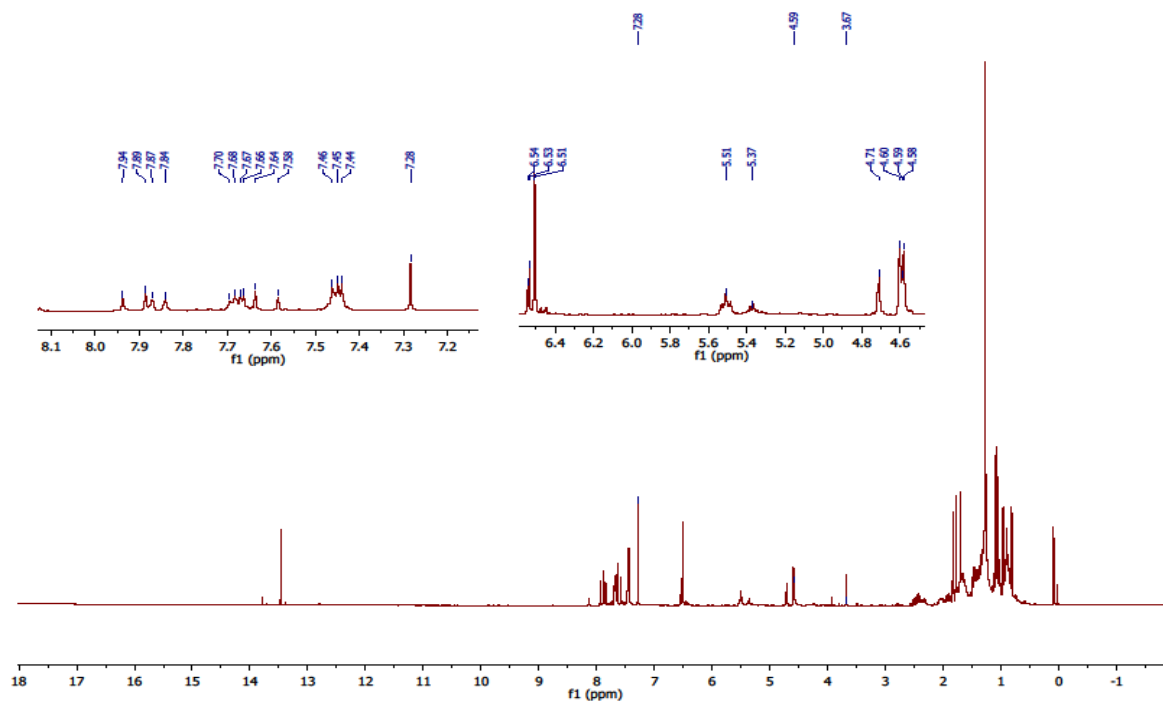


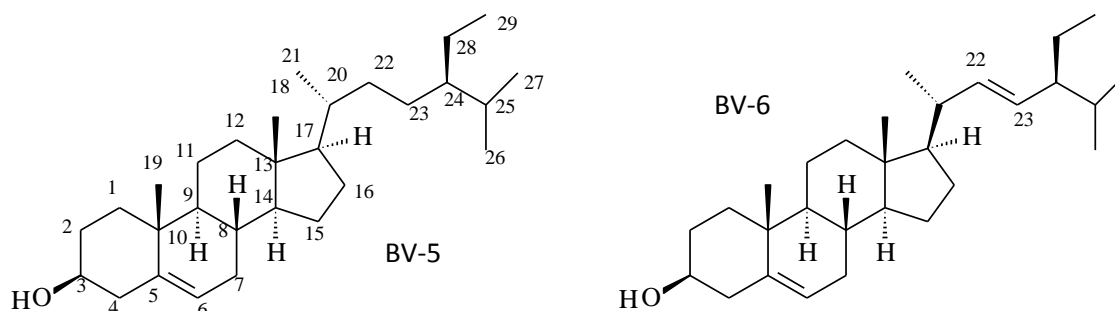
Tabela 20 - Deslocamentos RMN de ^{13}C do BV-4 comparados aos deslocamentos encontrados na literatura

| C | A-Lupenona (CDCl_3, 300 MHz) | BV-4 (CDCl_3, 300MHz) |
|-----------|---|--|
| 1 | 39,5 | 39,5 |
| 2 | 34,1 | 34,1 |
| 3 | 218,5 | 218,2 |
| 4 | 47,3 | 47,3 |
| 5 | 54,8 | 54,8 |
| 6 | 19,6 | 19,7 |
| 7 | 33,5 | 33,5 |
| 8 | 40,7 | 40,7 |
| 9 | 49,7 | 49,7 |
| 10 | 36,8 | 36,9 |
| 11 | 21,4 | 21,4 |



| | | |
|-----------|-------|--------------|
| 12 | 25,1 | 25,1 |
| 13 | 38,1 | 38,1 |
| 14 | 42,9 | 42,8 |
| 15 | 27,4 | 27,4 |
| 16 | 35,4 | 35,5 |
| 17 | 42,9 | 42,9 |
| 18 | 48,2 | 48,2 |
| 19 | 47,9 | 47,9 |
| 20 | 150,8 | 151,0 |
| 21 | 29,8 | 29,7 |
| 22 | 39,9 | 39,9 |
| 23 | 26,6 | 26,6 |
| 24 | 21,0 | 21,0 |
| 25 | 15,7 | 15,7 |
| 26 | 15,9 | 15,9 |
| 27 | 14,4 | 14,4 |
| 28 | 17,9 | 17,9 |
| 29 | 109,3 | 109,3 |
| 30 | 19,3 | 19,3 |

A- Lupenona - 3-oxolup-20(29)- eno - (LUZ et al, 2010)

Figura 53 - Estrutura de β -sitosterol e estigmasterol - BV-5 e BV-6

4.2.3 Elucidação estrutural de BV-5 (β -sitosterol) e BV-6 (estigmasterol)

A partir da fase MeOH ainda foi possível identificar em mistura o β -sitosterol e estigmasterol. Após placa CCDC, eluída em CHCl_3 : MeOH (99/1) e revelada em UV, iodo e Liebermann-Burchard, foi apontado presença de esteroides na fração testada. Este teste processa-se por reação de desidratação do anel ciclopentanoperidrofenantreno. Em sequência ocorre oxidação do anel. A adição de anidrido acético, ácido acético e gotas de ácido sulfúrico gera coloração azul-esverdeado e evidencia teste positivo (BURKE, 1974; XIONG, 2007).

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C revelaram sinais muito característicos de triterpenos. Como o núcleo esteróide basicamente é o mesmo para maioria dos triterpenos, os sinais do C3, C5 e C6 são mais destacados. Para fração EMBV G-2-f2 (BV-5 e BV-6), o espectro RMN de ^{13}C revelou dois sinais em δ 140,6 e δ 121,6; corroborando com os dados da literatura para deslocamento dos carbonos de dupla ligação entre C5 e C6 em triterpenos (Tabela 21, pág. 100). Além destes, o sinal de carbono carbinólico em δ 71,3 evidenciou oxigênio ligado a C3 de triterpenos. A presença da $-(\text{OH})$ em C3 exerce efeitos nos carbonos vizinhos, deixando mais protegidos os carbonos beta e menos protegidos os carbonos gama. Estes efeitos beta e gama provém da interação gauche vicinal em que há interação estérica oferecida quando hidroxila assume a posição beta (SILVERSTEIN, 2000). Para



metilas angulares em C18 e C19, são atribuídos dois sinais no espectro, respectivamente, δ 12,0 e 19,1.

Em adição, outros dois sinais em campo menos intenso aparecem no espectro experimental: δ 138,2 e 129,7. Tais sinais são atribuídos aos C22 e C23 de dupla ligação em estigmasterol ou derivados triterpenos em que o radical alquil possua instauração (Figura 60-61, págs. 97 e 98).

Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] da mistura que contém BV-5 e BV-6

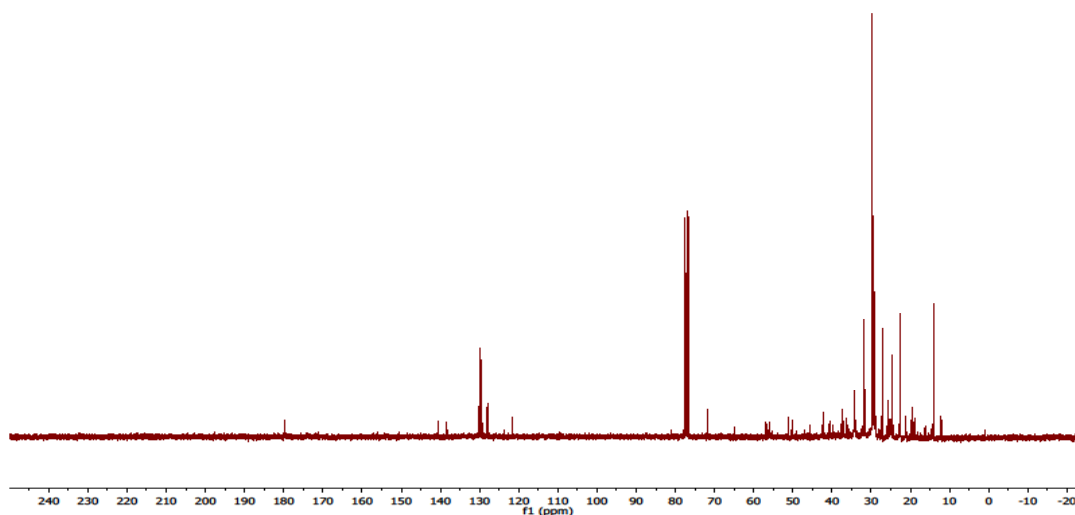
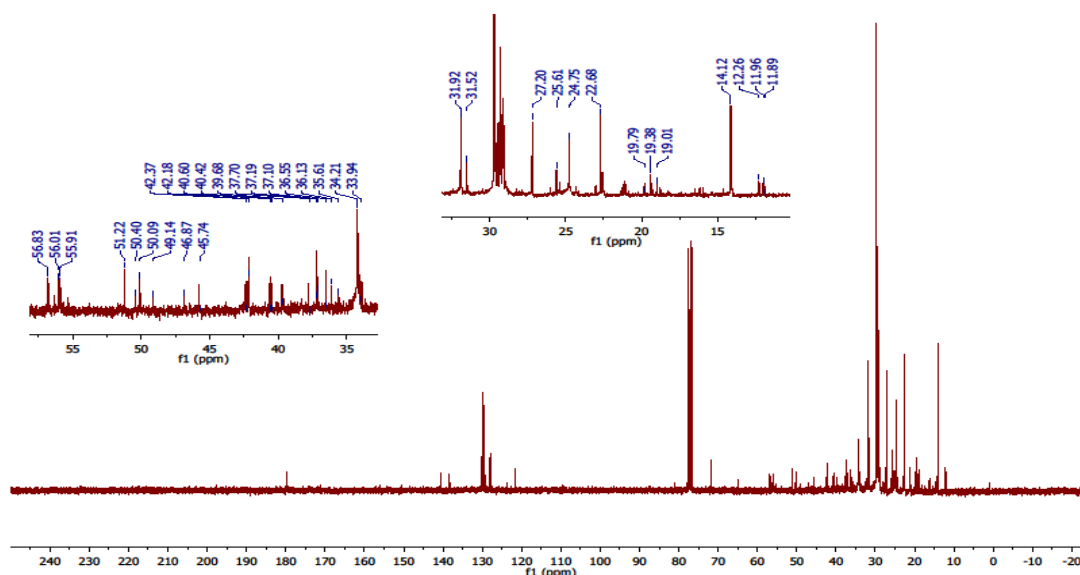


Figura 55 - Ampliações em espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (300MHz)] de BV-5 e BV-6 – Região de carbonos mais protegidos



Para os sinais de RMN de ^1H foi revelado um multipletto em δ 3,66 relativo ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (C3). Isso ocorre devido às posições relativas dos hidrogênios de C2 e C4 (Figura 62 e 63, págs. 99 e 100). Como a –(OH) está mais próxima de um dos hidrogênios de cada carbono (H2a e H2b; H4a e H4b), então estes se comportam de forma diferente, formando um multipletto (PAVIA, 2012).

No RMN ^1H a maioria dos sinais estão em campo mais alto e correspondem aos hidrogênios do núcleo comum aos dois compostos, β -sitosterol e estigmasterol. No entanto, este mesmo espectro revela alguns sinais em campo mais baixo que caracteriza muito bem essas substâncias: Um sinal próximo a δ 3,66 já citado de H3; um singletto em δ 5,36 foi atribuído ao hidrogênio em C6 e os duplos dupletos em δ 5,15 (8,52 e 15,15Hz) e em δ 5,01 (8,6 e 16Hz) sugeriram os carbonos C23 e C22 do estigmasterol, respectivamente (CARVALHO et al., 1998; FORGO & KOVER, 2004).



Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] do BV-5 e BV-6

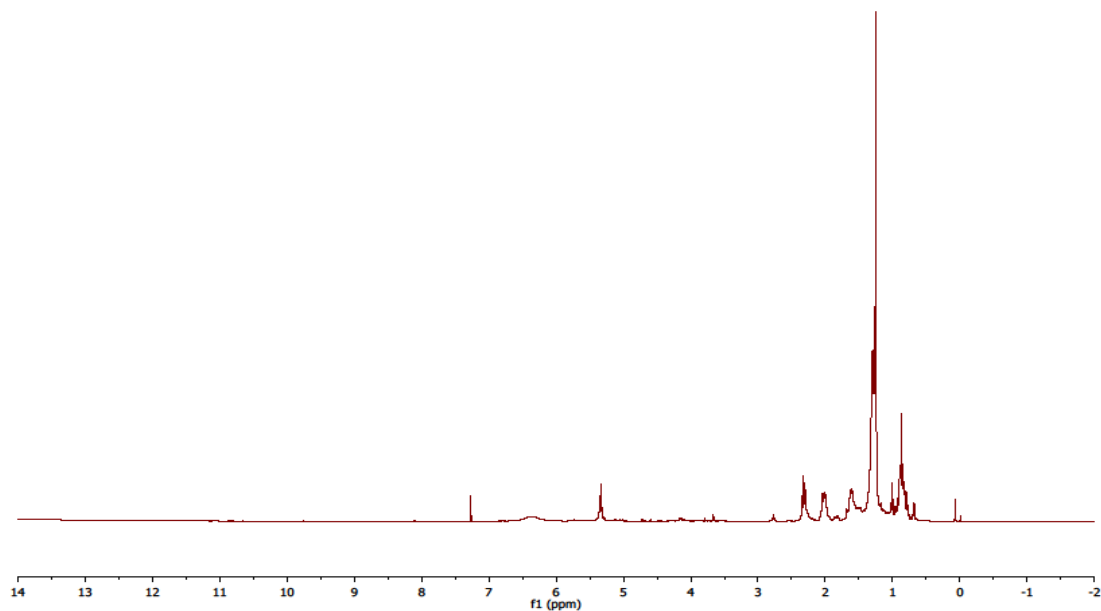
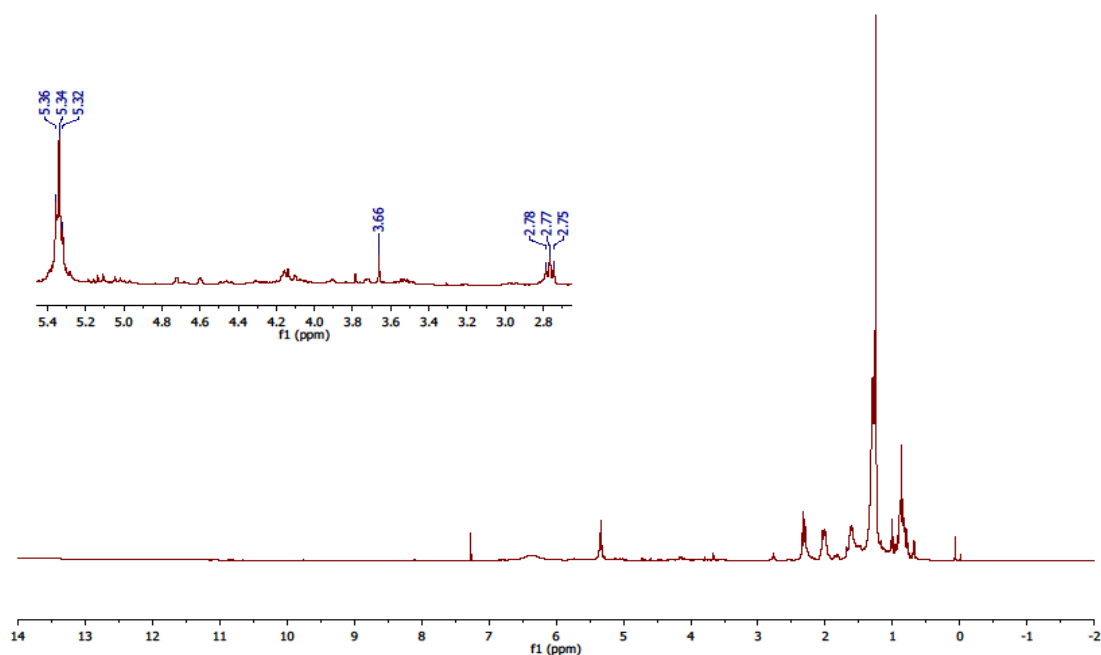


Figura 57 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] de BV-5 e BV-6



A Tabela 21 revela os valores de deslocamentos químicos em espectro de RMN de ^{13}C para visualizados e compara com dados encontrados na literatura.

**Tabela 21** - Valores de deslocamentos químicos de BV-5 e BV-6 e respectivos dados da literatura

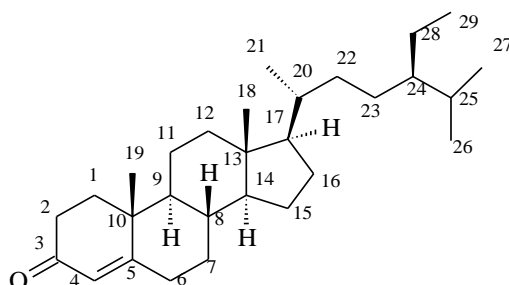
| C | BV-5 CDCl₃ (500MHz) | β-sitosterol (DE-EKNAMKULL & POTNUANG, 2003) (500MHz – CDCl₃) | BV-6 CDCl₃ (500MHz) | estigmasterol (DE-EKNAMKULL & POTNUANG, 2003) (500MHz - CDCl₃) |
|----------|---|--|---|--|
| 1 | 37,2 | 37,22 | 37,2 | 37,22 |
| 2 | 31,6 | 31,63 | 31,6 | 31,63 |
| 3 | 71,3 | 70,80 | 71,3 | 70,81 |
| 4 | 42,3 | 42,19 | 42,3 | 42,23 |
| 5 | 140,6 | 140,72 | 140,6 | 140,72 |
| 6 | 121,6 | 121,71 | 121,6 | 121,71 |
| 7 | 31,9 | 31,87 | 31,9 | 31,87 |
| 8 | 31,9 | 31,87 | 31,9 | 31,87 |
| 9 | 50,1 | 51,10 | 50,1 | 51,10 |
| 10 | 37,2 | 36,48 | 37,2 | 36,48 |
| 11 | 21,0 | 21,07 | 21,0 | 21,07 |
| 12 | 39,7 | 39,74 | 39,8 | 39,66 |
| 13 | 42,2 | 42,26 | 42,2 | 42,26 |
| 14 | 56,7 | 56,73 | 56,8 | 56,85 |
| 15 | 24,3 | 24,29 | 24,3 | 24,34 |
| 16 | 28,8 | 28,22 | 28,8 | 28,91 |
| 17 | 56,0 | 56,02 | 55,9 | 55,93 |
| 18 | 11,8 | 11,84 | 12,0 | 12,03 |
| 19 | 19,3 | 19,39 | 18,3 | 19,39 |
| 20 | 36,1 | 36,12 | 40,4 | 40,48 |
| 21 | 18,7 | 18,76 | 21,0 | 21,07 |
| 22 | 33,9 | 33,91 | 138,2 | 138,31 |
| 23 | 26,1 | 26,02 | 129,3 | 129,25 |
| 24 | 45,8 | 45,81 | 51,2 | 51,22 |
| 25 | 29,6 | 29,11 | 31,8 | 31,87 |
| 26 | 18,9 | 18,80 | 21,2 | 21,20 |



| | | | | |
|----|------|-------|------|-------|
| 27 | 19,1 | 19,01 | 19,1 | 18,96 |
| 28 | 23,0 | 23,07 | 25,3 | 25,39 |
| 29 | 12,0 | 11,97 | 12,2 | 12,21 |

4.2.4 Elucidação estrutural de BV-7 – Sitostenona

Figura 58 - Estrutura molecular da sitostenona - BV-7



Com a purificação da fração EMBV G4-2-f1 (**BV-7**) foi identificada em mistura. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 65, pág.102) e RMN de ^{13}C (Figuras 66 e 67, págs. 102 e 103) juntamente com os dados da literatura, permitiram propor a estrutura de um triterpeno em mistura. Um sinal em δ 199,6 sugeriu carbono C3 de carbonila α,β -insaturada; outros sinais em δ 171,7 e δ 123,6 sugeriram dupla ligação, que após comparação com dados da literatura, foram atribuídos aos carbonos C5 e C4, respectivamente (Tabela 22, pág.104). Outros sinais remanescentes do espectro compreendem os deslocamentos acima citados na mistura de β -sitosterol/estigmasterol - **BV-5 e BV-6** (Tabela 20, pág.94), comuns em esqueletos triterpênicos (CARVALHO et al., 1998; BANDEIRA et al., 2007; PRACHAYASITTIKUL et al., 2009). No espectro de RMN de ^1H , o sinal em δ 4,68 permitiu identificação de hidrogênio vinílico, sustentando a proposta de uma dupla ligação no esqueleto proposto. A compreensão das análises sugeriu a identificação de **BV-7** como a Sitostenona em mistura.



Figura 59 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] de BV-7

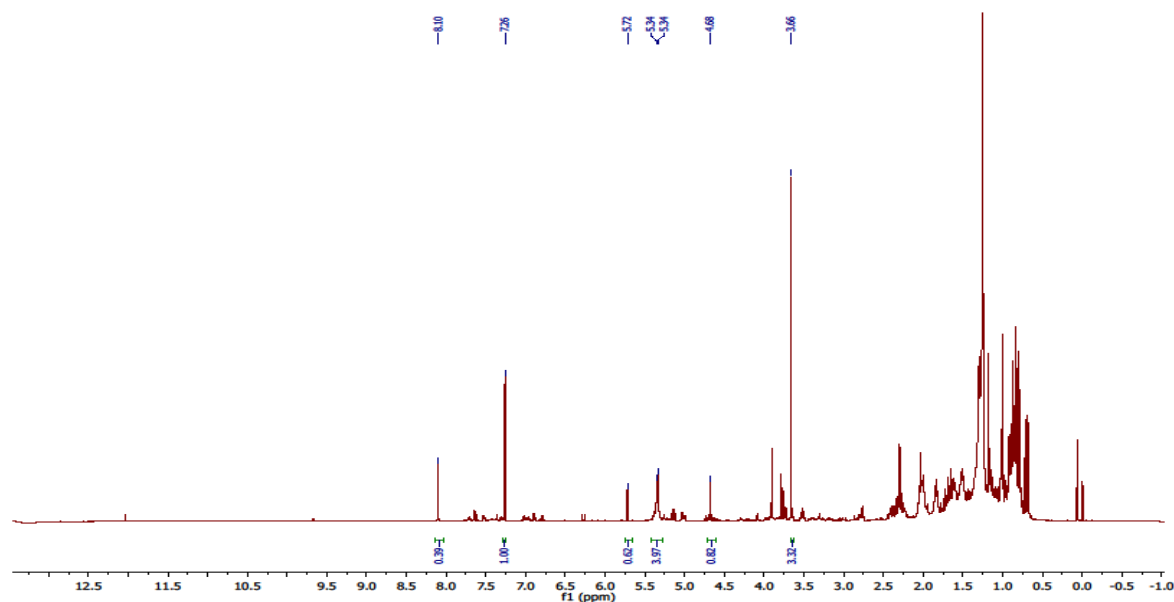


Figura 60 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] BV-7 – Região de carbono protegido

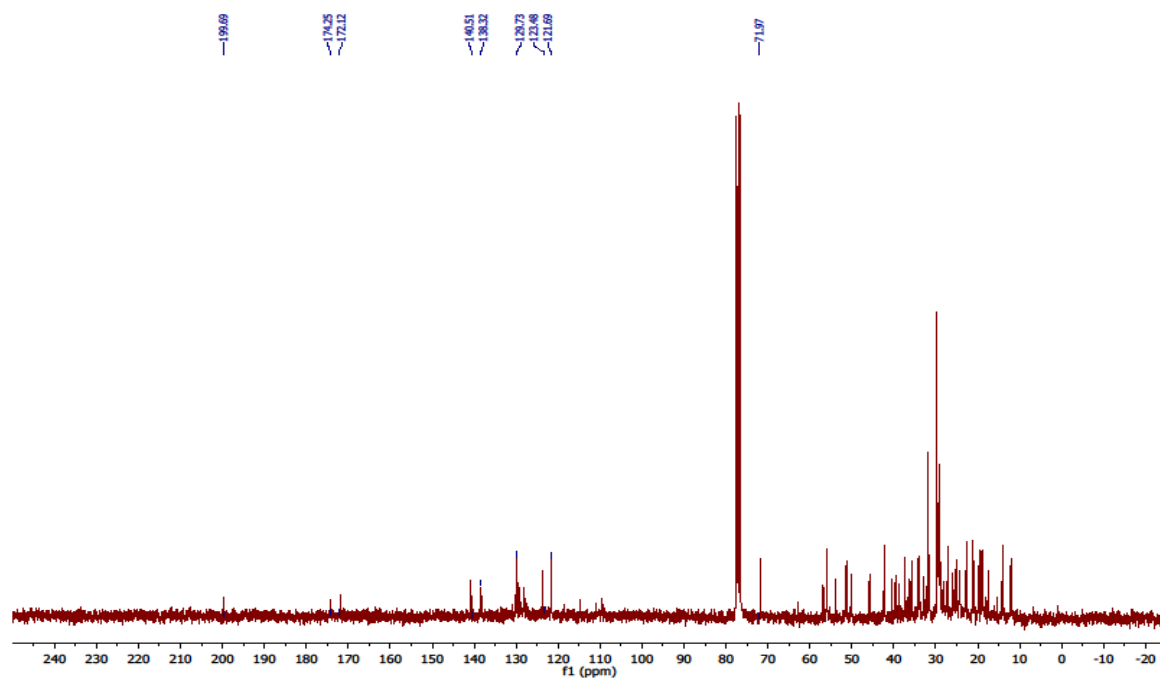




Figura 61 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] de BV-7

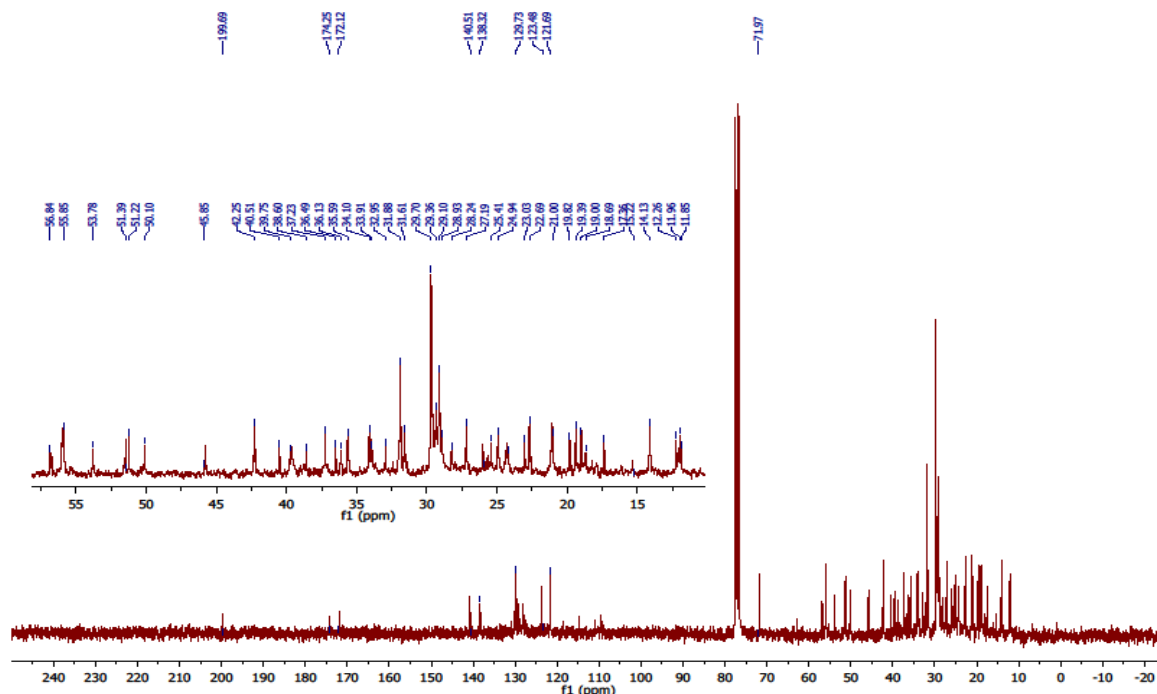


Tabela 22 - Valores de deslocamentos químicos de BV-7 frente aos dados de RMN ^{13}C da Sitostenona na literatura

| C | BV-7 | Sitostenona (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009) |
|----------|-------------|--|
| 1 | 36,1 | 36,1 |
| 2 | 33,9 | 33,9 |
| 3 | 199,6 | 199,6 |
| 4 | 123,6 | 123,7 |
| 5 | 171,7 | 171,6 |
| 6 | 33,8 | 33,8 |
| 7 | 32,8 | 32,9 |
| 8 | 35,6 | 35,6 |
| 9 | 53,8 | 53,8 |
| 10 | 39,6 | 39,6 |
| 11 | 21,1 | 21,1 |
| 12 | 38,6 | 38,6 |



| | | |
|----|------|------|
| 13 | 42,2 | 42,3 |
| 14 | 55,9 | 55,8 |
| 15 | 24,7 | 24,1 |
| 16 | 28,1 | 28,1 |
| 17 | 55,9 | 55,9 |
| 18 | 11,9 | 11,9 |
| 19 | 18,6 | 18,6 |
| 20 | 36,0 | 36,0 |
| 21 | 18,9 | 18,9 |
| 22 | 35,6 | 35,6 |
| 23 | 26,1 | 26,1 |
| 24 | 45,7 | 45,8 |
| 25 | 29,6 | 29,6 |
| 26 | 20,9 | 20,9 |
| 27 | 19,7 | 19,7 |
| 28 | 23,0 | 23,0 |
| 29 | 11,1 | 11,1 |

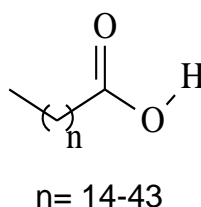
4.3 Elucidação estrutural de BV-8 – Mistura de ácidos graxos livres

Os ácidos graxos são moléculas formadas de uma porção polar (carboxila) e uma porção apolar composta de cadeia alifática. Os mais comuns possuem cadeia alifática com 12, 14, 16 e 18 carbonos, mas podem ser encontrados em cadeias mais longas; saturadas, insaturadas (em sistema 1,4-diênico) ou mesmo oxidadas por grupamento álcool (BAUMANN et al., 1988). Podem ser encontrados na forma livre ou esterificados com moléculas de glicerol, formando os triglicerídeos. A diversidade de cadeias alifáticas ligadas à molécula do glicerol permite aos triglicerídeos propriedades físico-químicas bem definidas. Estas características individuais sugeriram a classificação dos ácidos graxos em óleos e gorduras (VIANNI; BHATTACHARYA, 1975).



Os ácidos graxos desempenham diversas atividades biológicas nos organismos vivos. Servem de reguladores térmicos, atuam no transporte de componentes metabólicos e isolantes mecânicos, protegendo o compartimento intracelular. Na indústria, podem ser convertidos em sabões e detergentes, assim como, atuar como combustíveis, em combinação ou substituição aos combustíveis fósseis (SHAY, 1993).

Figura 62 - Estrutura básica de cadeia de ácidos graxos - mistura complexa BV-8



Em continuação à separação de substâncias da fase MeOH das raízes de *B. virgilioides*, foi possível o isolamento da fração EMBV G-2-f3 (**BV-8**). Após análise de CCDC, eluídas em CHCl_3 : MeOH (99/1) e reveladas em UV 254nm e/ou iodo, aliado aos dados da literatura e dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 69 e 70, pág.107), foi sugerida mistura de ácidos graxos livres sinalizados na série arbitrária de A-P (Tabela 23, pág.113).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 69, pág. 107) apontou sinais característicos de ácidos graxos e traços de éster metílico em mistura. Dentre estes destacam-se, o grupo de sinais sobrepostos em δ 5,35 sugere H de dupla ligação de cadeia carbônica alifática e dois singletos em δ 3,67 e 3,69 apontam traços de H de metilas de ésteres residuais, oriundos do processo de extração. Outros seis grupos de sinais mais protegidos: δ 2,80; 2,35; 2,06; 1,63; 1,45 e 0,80 foram atribuídos a hidrogênios metilênicos ao longo da cadeia alifática dos ácidos correspondentes na mistura. Não se observa dois multipletos próximos a δ 4,1 e 4,2 (hidrogênios de $-\text{CH}_2$ do glicerol) no espectro de ^1H , o que seria indicativo da presença de triglicerídeos.



O RMN de ^{13}C (Figura 70, pág.107) permitiu sustentar a proposta de uma mistura de ácidos graxos com traços de ésteres metílicos derivados atribuídos ao procedimentos de extração; devido à presença de um sinal em δ 51,35, que sugere um fragmento oximetínico $-(\text{CH}_3\text{-O})-$ de éster. Um sinal em δ 180,0 atribuído ao carbono carbonílico; um grupo de sinais sobrepostos entre δ 128,0-130,0 sugestivo de Csp^2 de dupla e um grupo de sinais em campo mais intenso de carbonos metilênicos permitiram confirmar a mistura de ácidos graxos na fração **BV-8**.

Para determinação da composição da mistura em **BV-8** foram realizados EM (Figuras 71-80, págs.108-113). A verificação dos picos dos íons gerados (modo positivo) tomou como base o pico em m/z 303^{+1} $[\text{M}+\text{H}]$, o pico do íon molecular e átomo de hidrogênio (Figura 71). Foi verificada presença de ácido octenóico ligado aos íons Na^{+1} e K^{+1} . Estes íons são oriundos da composição de materiais utilizados durante os procedimentos, como vidro. A rota biossintética do acetato propõe a origem e formação dos ácidos graxos em vegetais (Curi et al., 2001). Nesse sentido, acredita-se que a adição de unidades de $-(\text{C}_2\text{H}_4)$ promova a formação de ácidos graxos com cadeias alifáticas mais longas. A verificação da fragmentação das cadeias carbônicas e o grau de saturação das mesmas permitiram atribuir os ácidos graxos elencados na Tabela 22, pág.103.

A análise dos EM (Figuras 76-80, págs.110-112) no modo negativo orientou a confirmação das propostas sugeridas. O pico em m/z 281^{-1} $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ (Figura 76), registrado no modo negativo, pode ser atribuído ao ácido octadecenóico. A massa molecular exata sugere a fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$. Utilizando-se o mesmo método de análise de formação dos ácidos graxos, a partir da rota do acetato, foi possível chegar aos demais compostos elencados na Tabela 23, pág.113.



Figura 63 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] da mistura BV-8

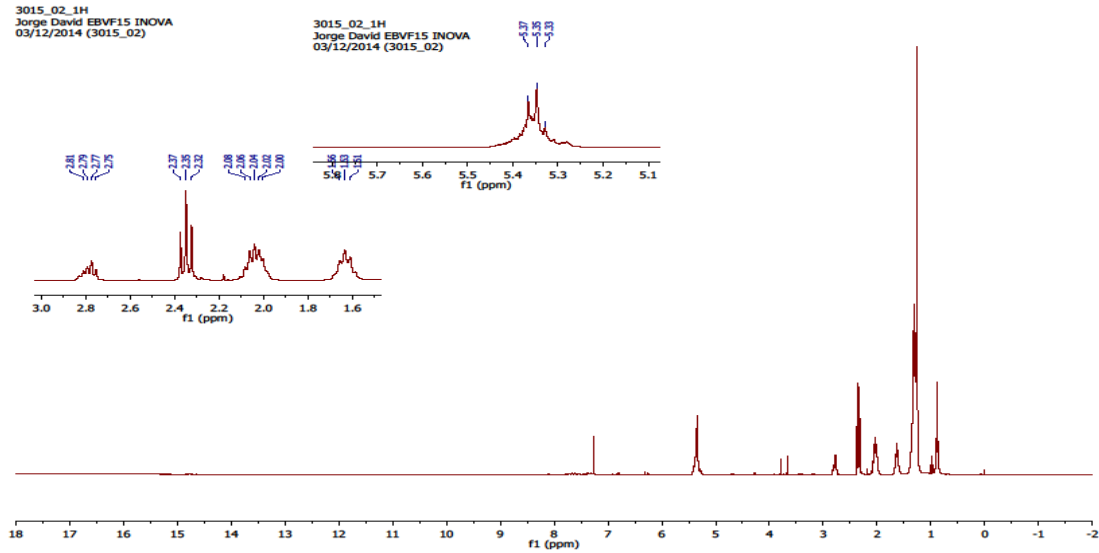


Figura 64 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] de BV-8

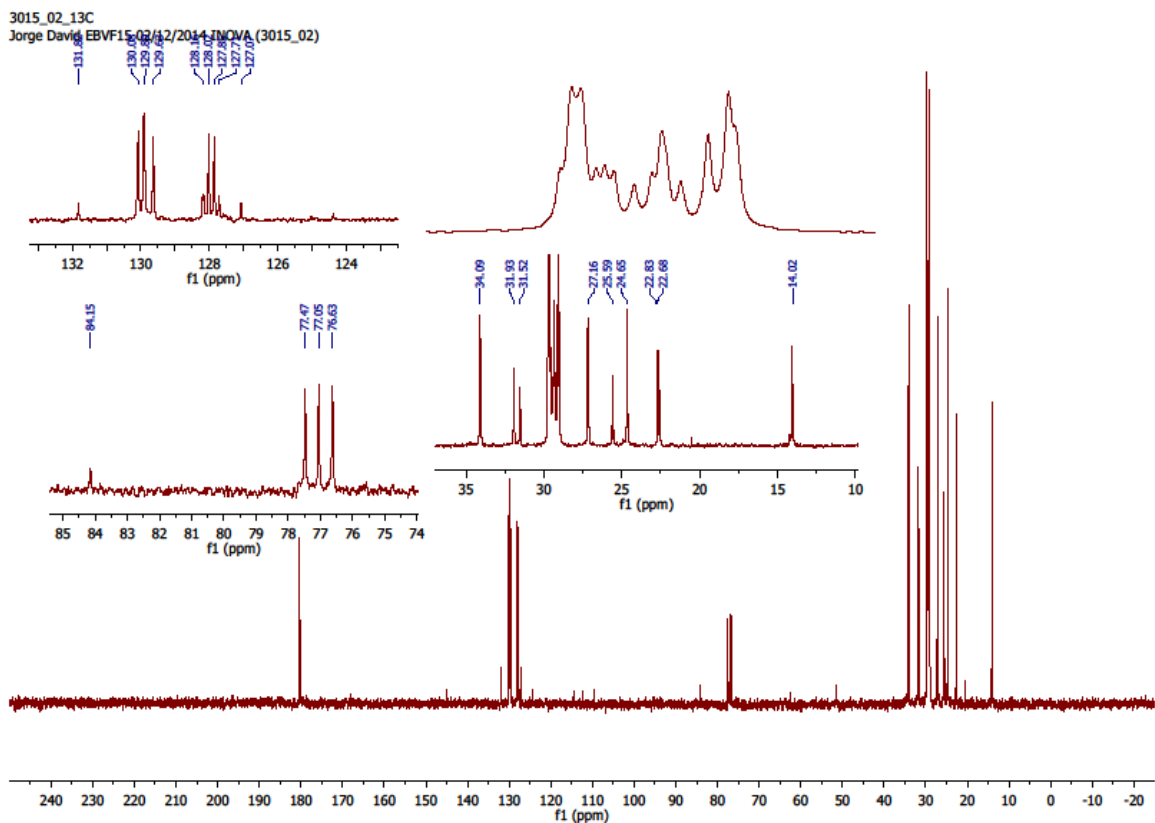




Figura 65 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução de BV-8

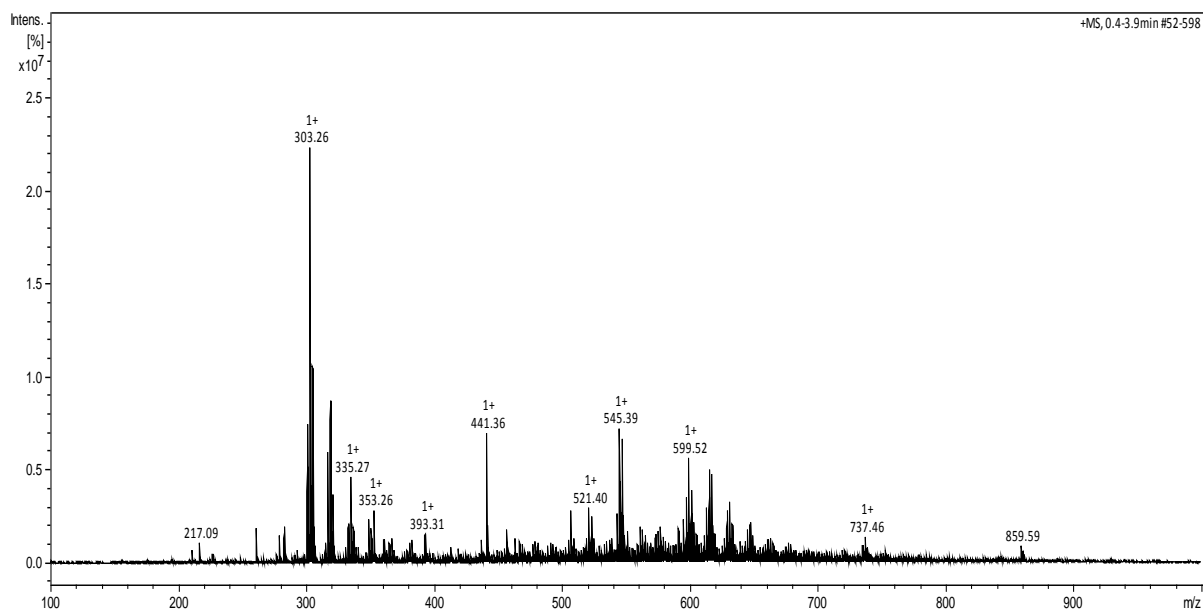


Figura 66 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução da BV-8 – Ampliação

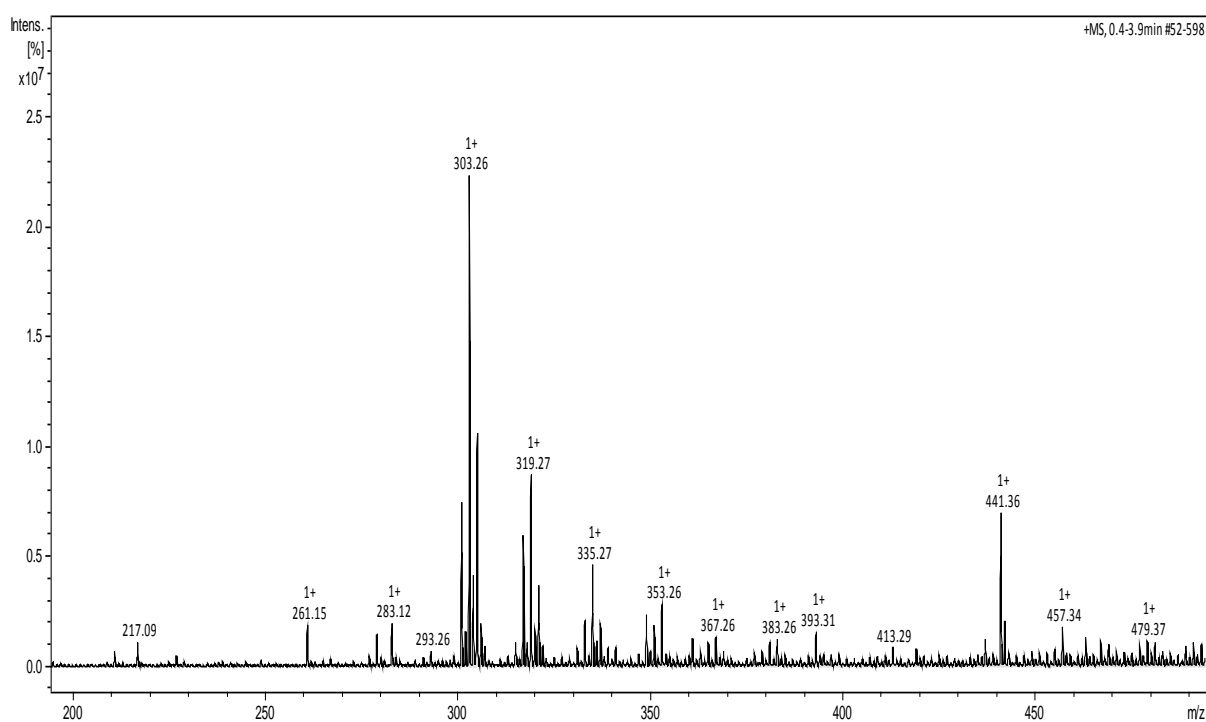




Figura 67 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução de BV-8 – Ampliação em faixa de m/z 290-370

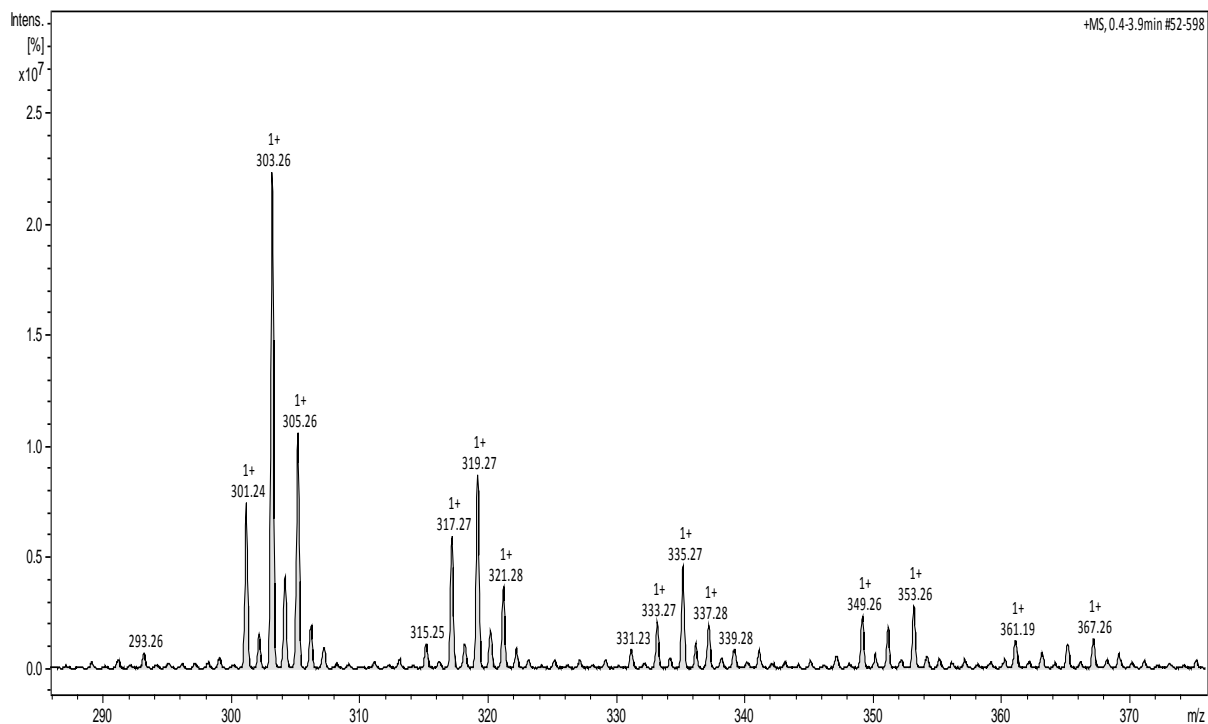


Figura 68 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução da BV-8 – Ampliação em faixa de m/z 470-760

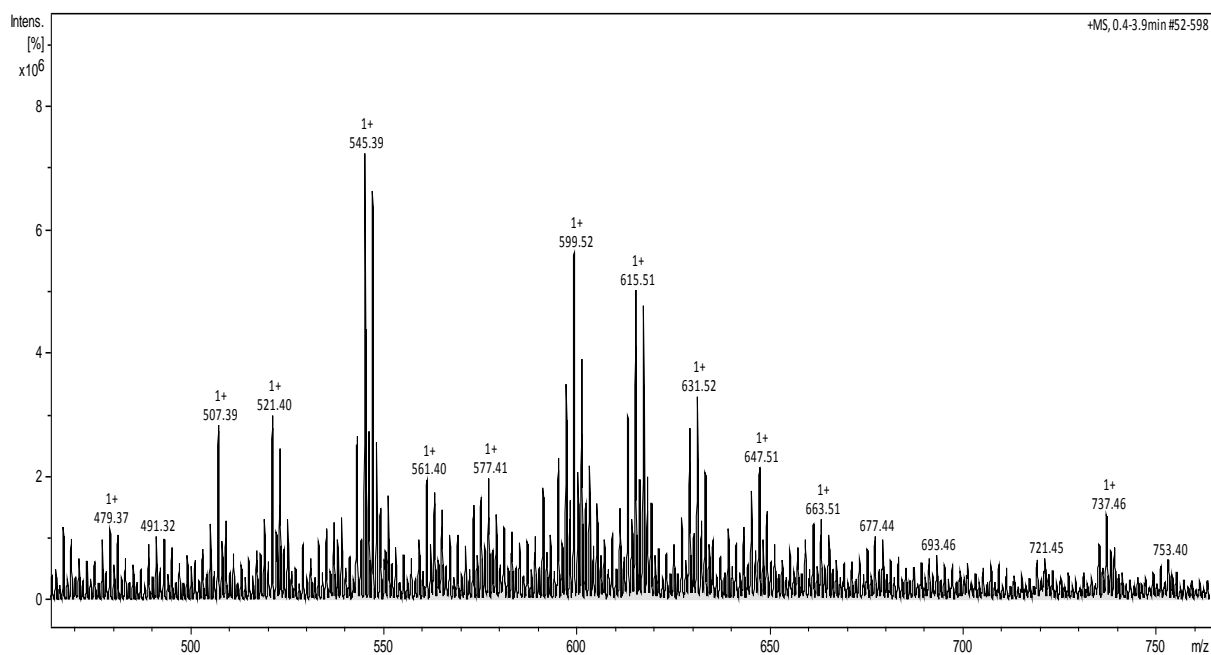




Figura 69 - Espectro de massas ESI(+) em baixa resolução da BV-8 – Ampliação em faixa de m/z 720-995

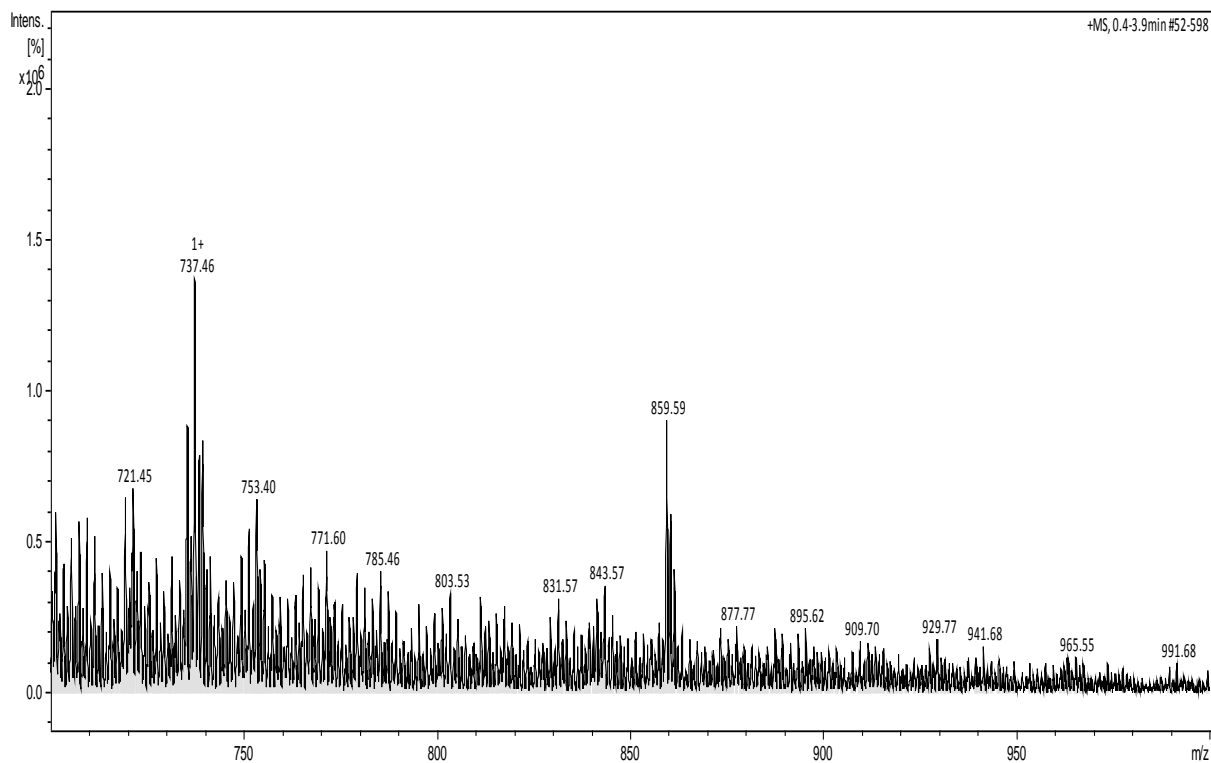


Figura 70 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8 - Modo negativo. Faixa de m/z 270-650

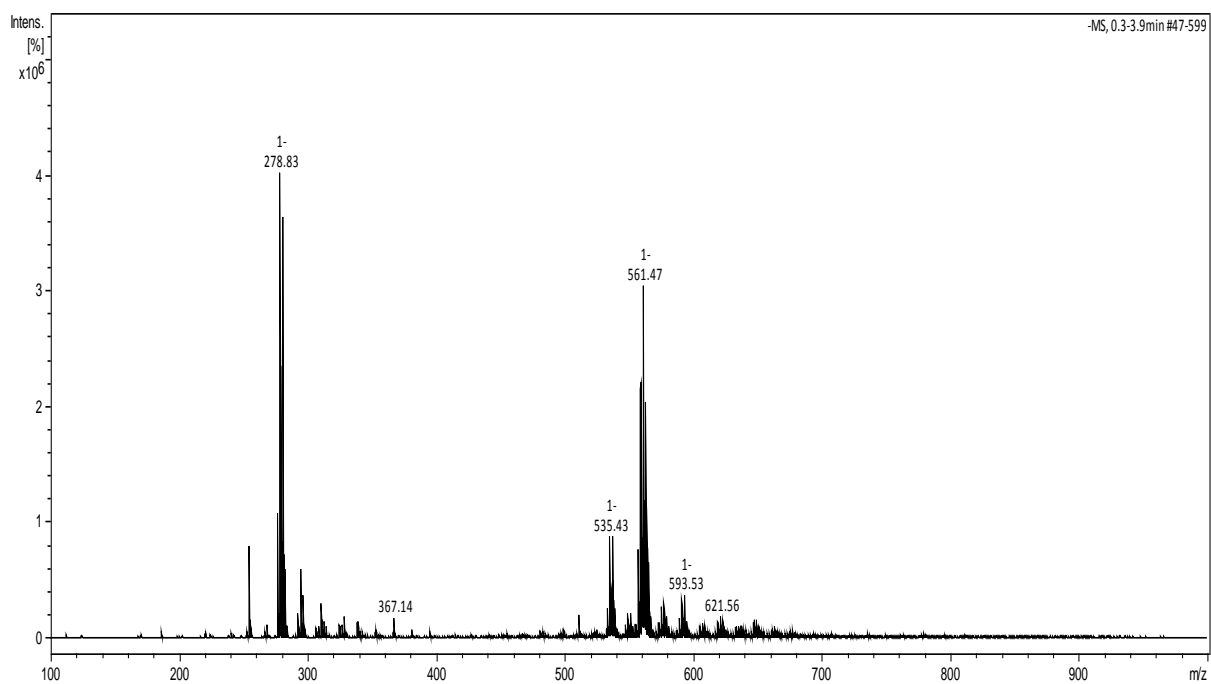




Figura 71 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de m/z 250-370

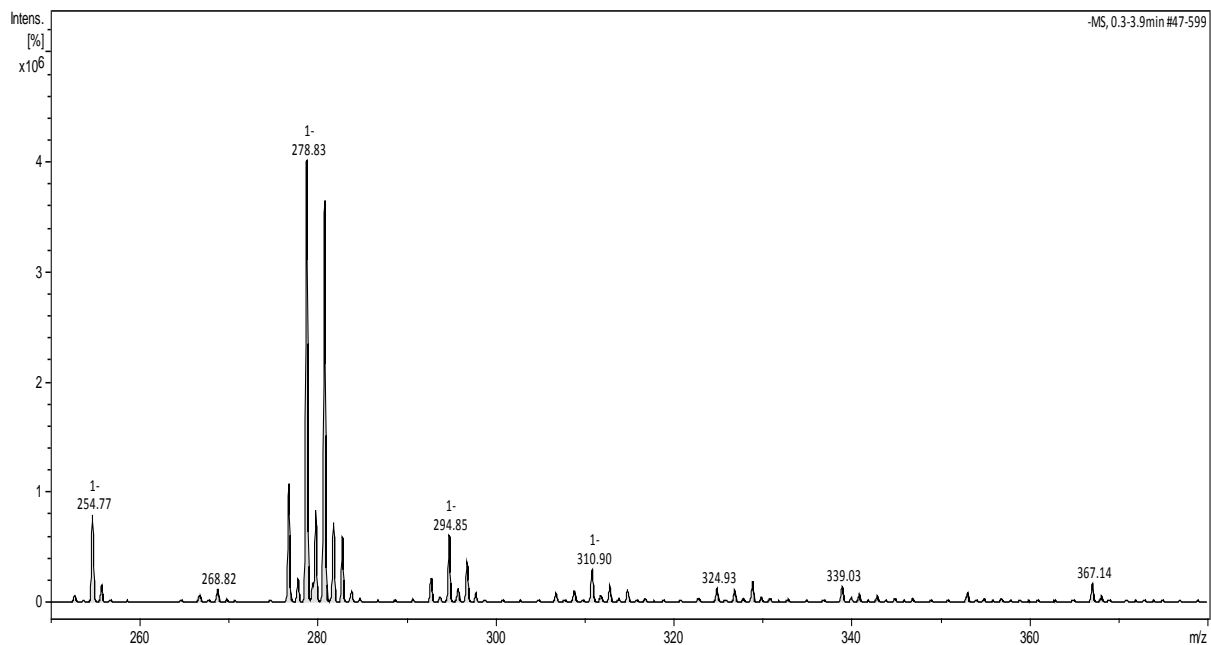


Figura 72 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de m/z 260-300

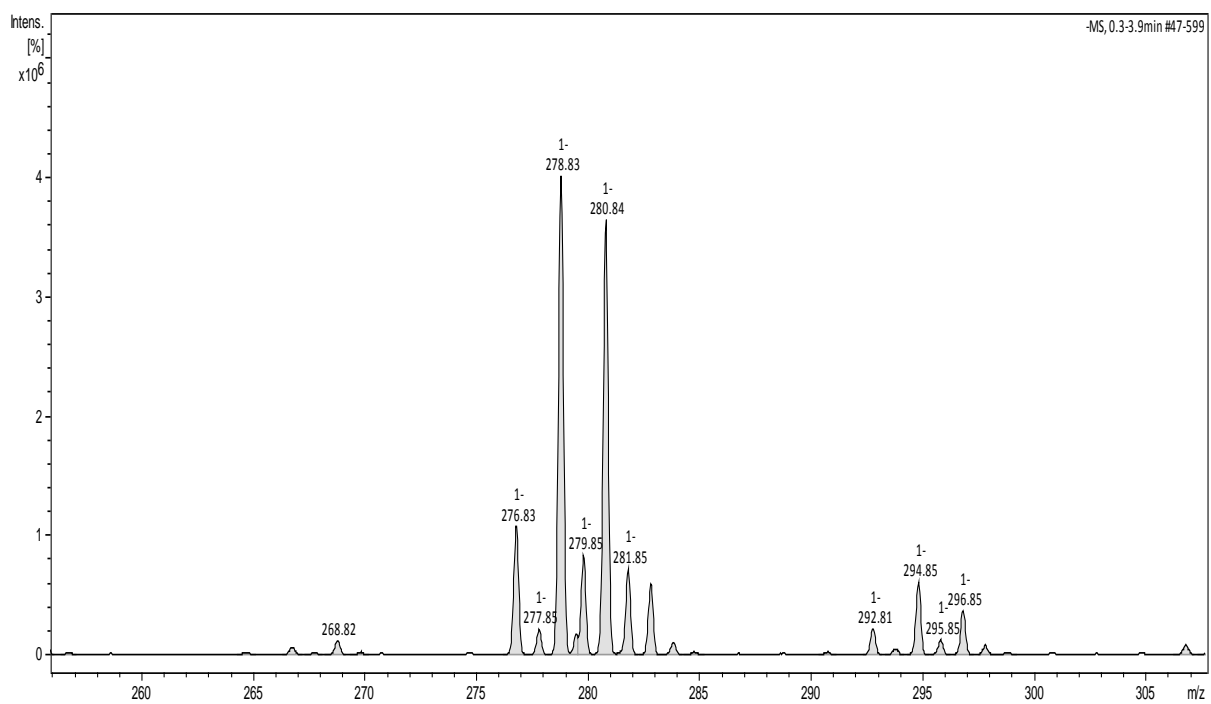




Figura 73 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de 500-675m/z

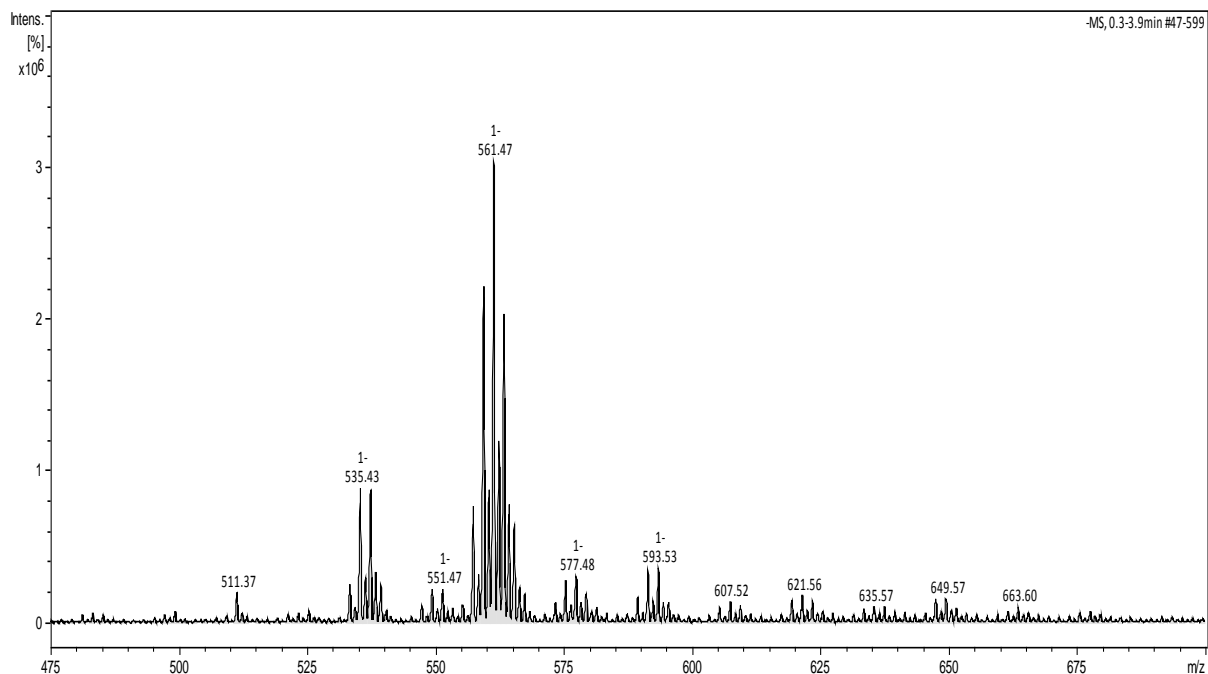
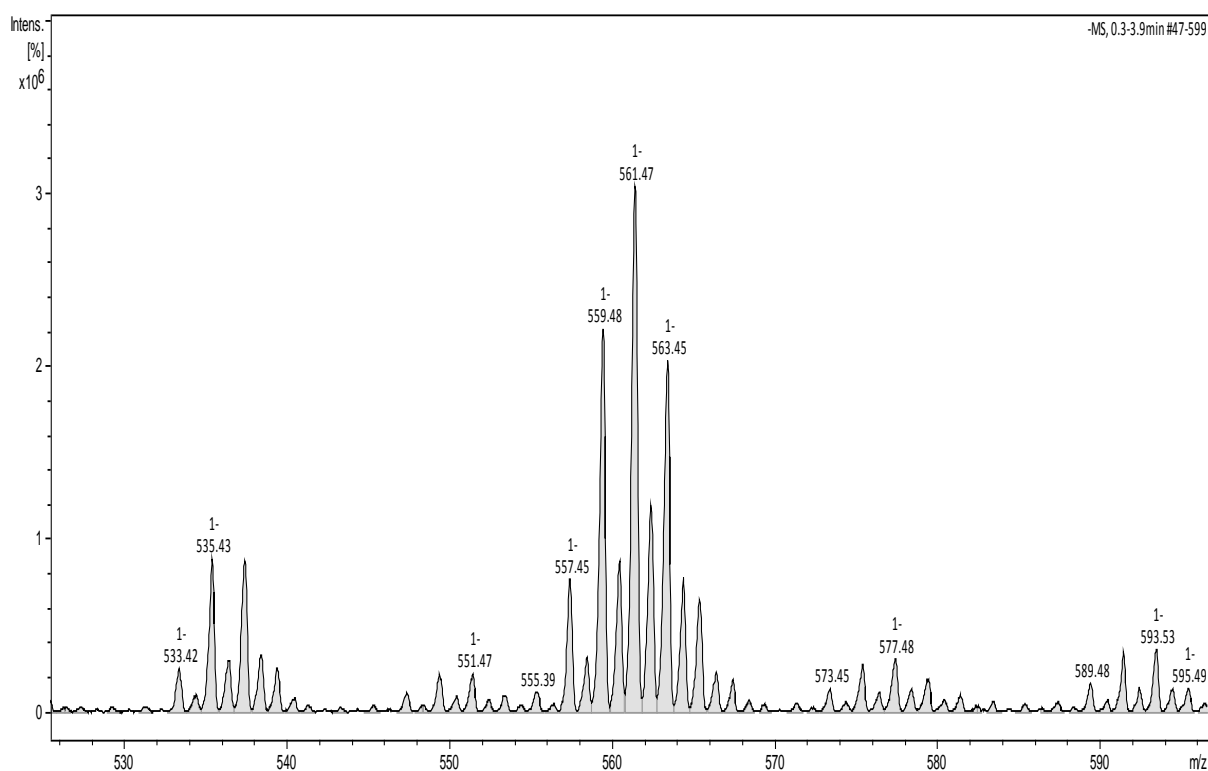


Figura 74 - Espectro de massas ESI(-) em baixa resolução da BV-8. Faixa de m/z 530-596



**Tabela 23** - Picos registrados em EM. Para o modo negativo são relacionadas a segunda coluna com a terceira. Modo negativo relaciona quinta e sexta colunas

| Denominação arbitrária | m/z modo (-) | Configuração da cadeia principal do AGL | - | m/z modo (+) | Configuração da cadeia principal do AGL + (íon) |
|------------------------|--------------|---|---|--------------|---|
| A | 254,77 | C16:0 | - | 293,26 | C16:1+(Na ⁺) |
| B | 268,82 | C17:0 | - | 301,24 | C18:3+(Na ⁺) |
| C | *283,0 | C18:0 | - | 303,26 | C18:2+(Na ⁺) |
| C' | *281,0 | C18:1 | - | 305,26 | C18:1+(Na ⁺) |
| C'' | 278,83 | C18:2 | - | 317,27 | C18:3+(K ⁺) |
| C''' | *277,0 | C18:3 | - | 319,27 | C18:2+(K ⁺) |
| D | *298,0 | C19:0 | - | 321,28 | C18:1+(K ⁺) |
| D' | 294,85 | C19:1 | - | 335,27 | C19:1+(K ⁺) |
| D'' | *293 | C19:2 | - | 333,27 | C19:2+(K ⁺) |
| E | 310,9 | C20:0 | - | 337,28 | C19:0+(K ⁺) |
| E' | 324,93 | C21:0 | - | 349,26 | C20:1+(K ⁺) |
| E'' | 339,03 | C22:0 | - | 351,26 | C20:0+(K ⁺) |
| F | 367,14 | C24:0 | - | 349,26 | C20:1+(K ⁺) |
| G | 535,43 | C36:0 | - | 361,19 | C21:2+(K ⁺) |
| G' | 533,33 | C36:1 | - | 479,37 | C30:1+(H ⁺) |
| H | *549 | C37:0 | - | 491,32 | C31:2+(H ⁺) |
| I | 563,45 | C38:0 | - | 507,39 | C32:1+(H ⁺) |
| I' | 561,47 | C38:1 | - | 521,40 | C33:1+(H ⁺) |
| I'' | 559,48 | C38:2 | - | 545,39 | C33:0+(H ⁺) |
| I''' | 557,45 | C38:3 | - | 561,4 | C36:2+(H ⁺) |
| J | 577,48 | C39:0 | - | 577,41 | C37:1+(H ⁺) |
| J' | *575,0 | C39:1 | - | 599,52 | C39:1+(Na ⁺) |
| J'' | 573,45 | C39:2 | - | 615,51 | C40:1+(Na ⁺) |
| K | 595,49 | C40:0 | - | 631,52 | C41:0+(Na ⁺) |
| K' | 593,53 | C40:1 | - | 647,51 | C42:1+(Na ⁺) |
| K'' | 589,48 | C40:2 | - | - | - |
| L | 607,52 | C41:1 | - | - | - |

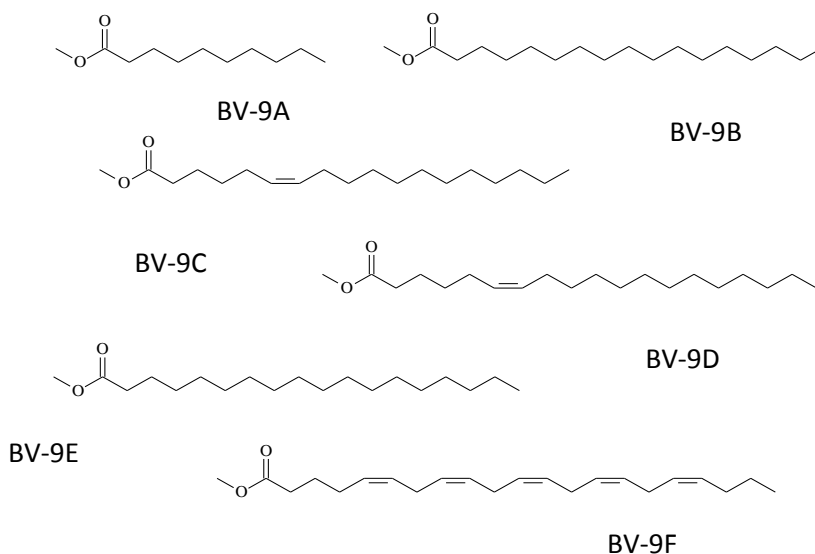


| | | | | | |
|----------|--------|-------|---|---|---|
| M | 621,52 | C42:1 | - | - | - |
| N | 635,57 | C43:1 | - | - | - |
| O | 649,57 | C44:1 | - | - | - |
| P | 663,60 | C45:1 | - | - | - |

*Valores não exatos representativos dos picos encontrados nos espectros de massa obtidos da amostra que originou a mistura **BV-8**

4.4 Elucidação estrutural da BV-9 – Ésteres metílicos

Figura 75 - Estruturas dos principais ésteres metílicos em mistura - BV-9



Da fase MeOH foi possível o isolamento na fração EMBV B (Tabela 3, pág. 37), traços de ésteres metílicos mais o triglicerídeos que após análises originou **BV-9**. A verificação de sinais característicos de carbonila de ácido em δ 192,4; carbonila de éster δ 172,4 e outros sinais entre δ 51,0-69,0 para grupos $-\text{OCH}_3$ e $-\text{OCH}_2$ de éster podem ser visualizados no espectro de ^{13}C (Figura 82, pág.115). Sinais entre δ 128,0-130,0, sobrepostos, sugerem duplas ligações ao longo da cadeia alifática e outros sinais em região mais protegida entre δ 22,9 – 34,3 de carbonos metilênicos – (CH_2) - também são visualizados. Além disso, no espectro de RMN de ^1H (Figura 83,



pág. 115) aparecem os duplos dubletos característicos dos hidrogênios do glicerol próximos a δ 4,48 – 4,58; ratificando a presença desses compostos.

Foi feita reação de transesterificação para amostra EMBV B a fim de constatar a presença dos ácidos graxos na mistura e a efetividade da reação com a geração da mistura de ésteres metílicos **BV-9**.

Figura 76 - Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 (500MHz)] da fração EMBV B da fase MeOH

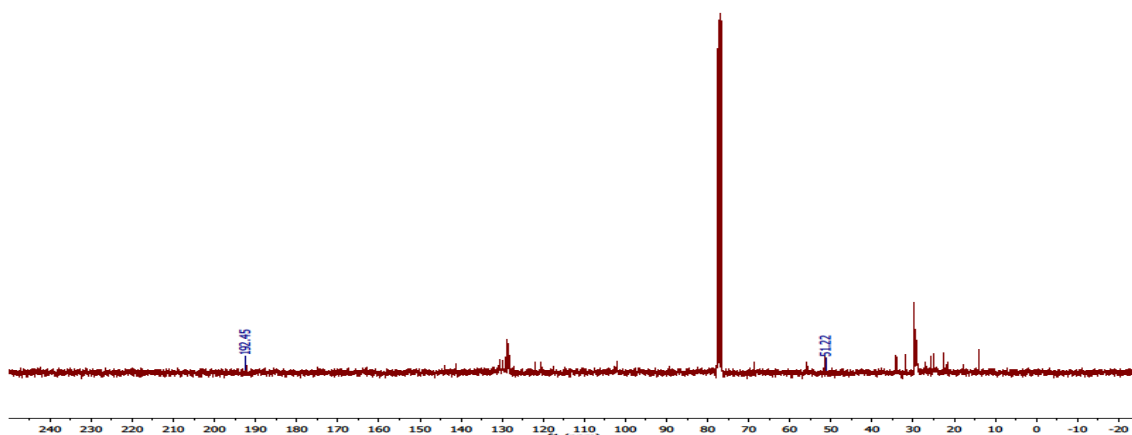
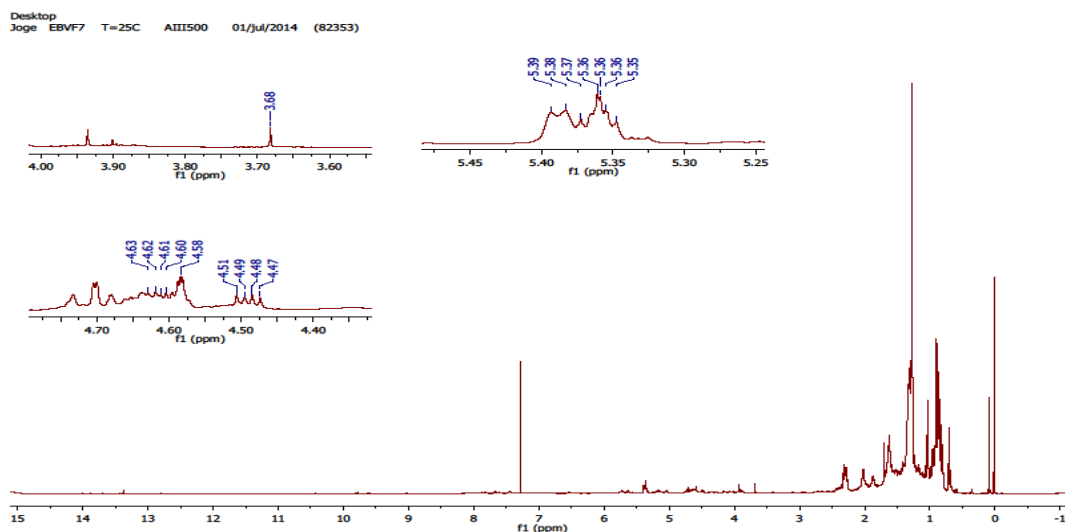


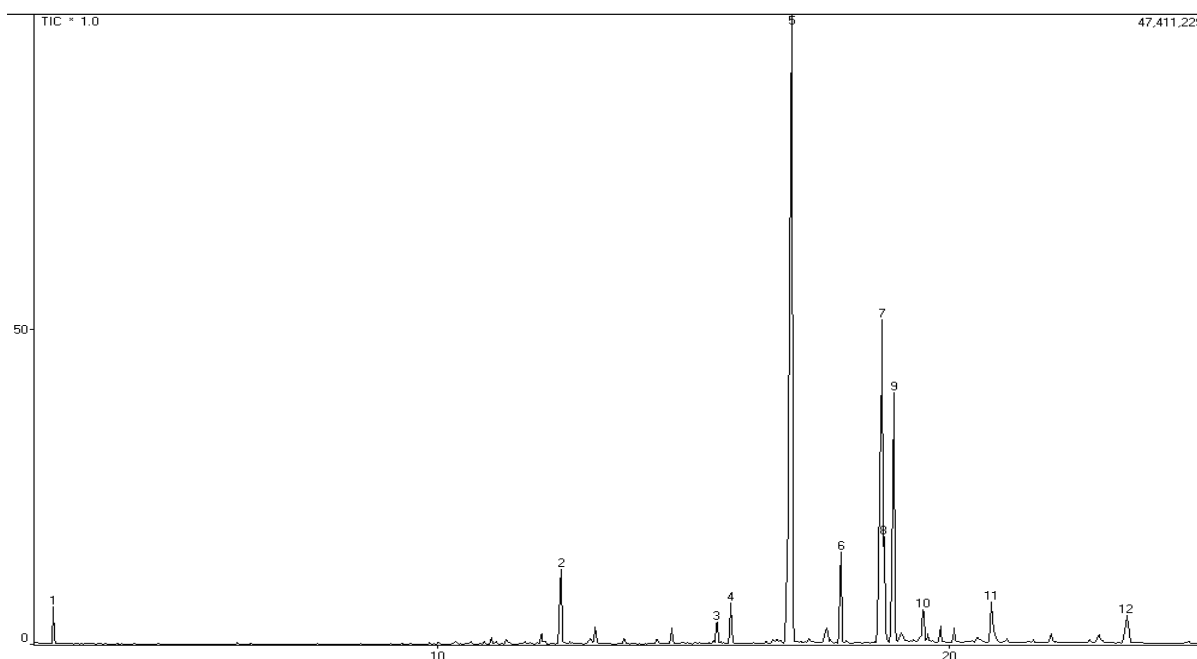
Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 (500MHz)] da amostra EMBV B da fase MeOH





Pela análise dos picos no cromatograma (Figura 84) e a observação dos sinais evidenciados nos espectros de massas após derivatização (Figuras 85–90, págs. 117-120), foi possível atribuir as propostas estruturais dos ésteres indicados anteriormente na série **BV-9 de A-F** das substâncias isoladas. Foram propostas seis estruturas de ésteres (Figura 81, pág.114). Alguns ésteres identificados na **BV-9** ratificam, por conseguinte, a presença de alguns ácidos graxos relatados na mistura **BV-8**.

Figura 78 - Cromatograma da mistura de ésteres metílicos - BV-9



Apenas os picos mais intensos vistos no CG foram identificados como ésteres metílicos, outros sinais menores foram atribuídos às impurezas do solvente. Os respectivos EM abaixo apontam padrões de fragmentação que sustentam a proposta de mistura de ésteres metílicos derivados de ácidos graxos saturados e insaturados. Foi feito comparativo utilizando banco de dados do equipamento e análise das fragmentações nos respectivos espectros de massa para elucidação dos compostos na mistura. O pico 74 relativo ao rearranjo McLafferty e os sinais dos picos dos íons moleculares permitiram confirmar a série da Tabela 24: 185 (BV-9 A) decanoato de metila; 285 (BV-9 B) heptadecanoato de metila; 283 (BV-9 C) heptadecenoato de



metila; 296 (BV-9 D) octadecenoato de metila; 298 (BV-9 E) octadecanoato de metila e 354 (BV-9 F) docosenoato de metila.

Tabela 24 - Relação de picos identificados no Cromatograma dos ésteres metílicos

| T. de Retenção | Indicação do Pico | Série BV-9 |
|----------------|-------------------|------------|
| 12,358 | 2 | A |
| 16,792 | 5 | B |
| 17,842 | 6 | C |
| 18,592 | 7 | D |
| 18,775 | 9 | E |
| 23,425 | 12 | F |

Figura 79 - BV-9 A. EM do decanoato de metila - cadeia do ácido de origem (C10:0)

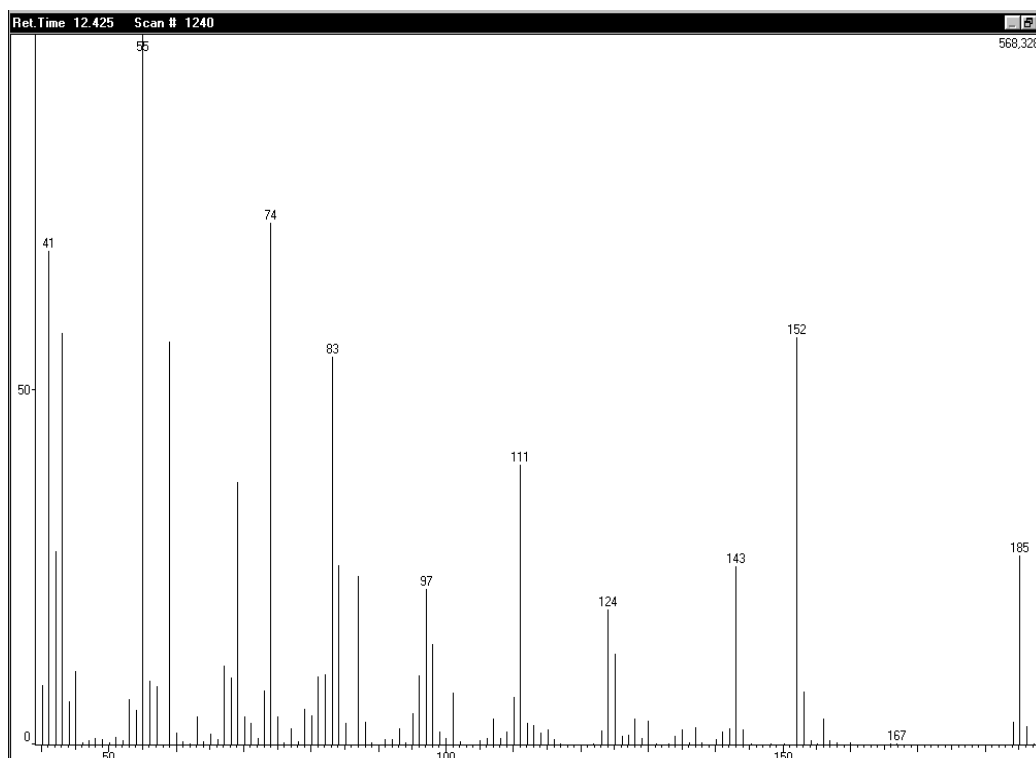




Figura 80 - BV-9 B. EM do heptadecanoato de metila – cadeia do ácido de origem (C17:0)

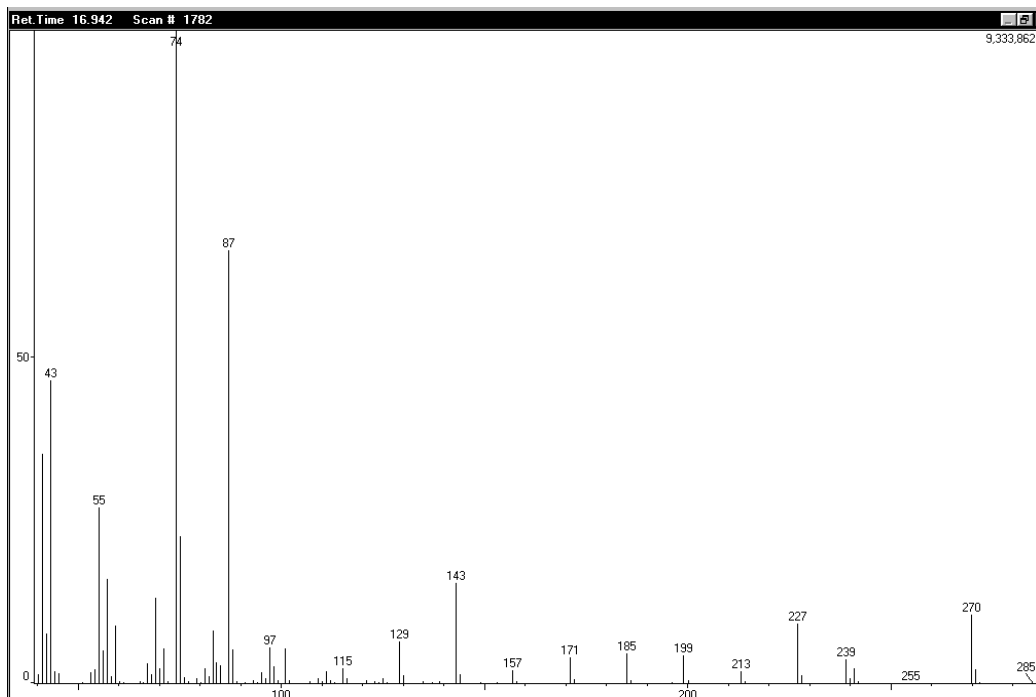


Figura 81 - BV-9 C. EM do heptadecenoato de metila – cadeia do ácido de origem (C17:1)

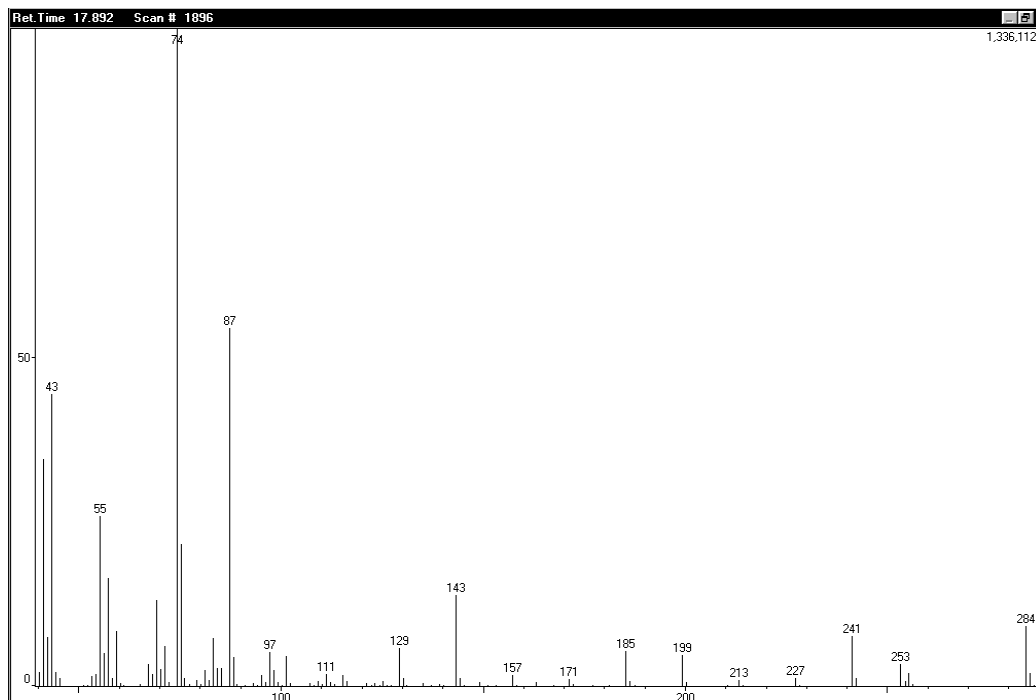




Figura 82 - BV-9 D. EM do octadecenoato de metila – cadeia do ácido de origem (C18:1)

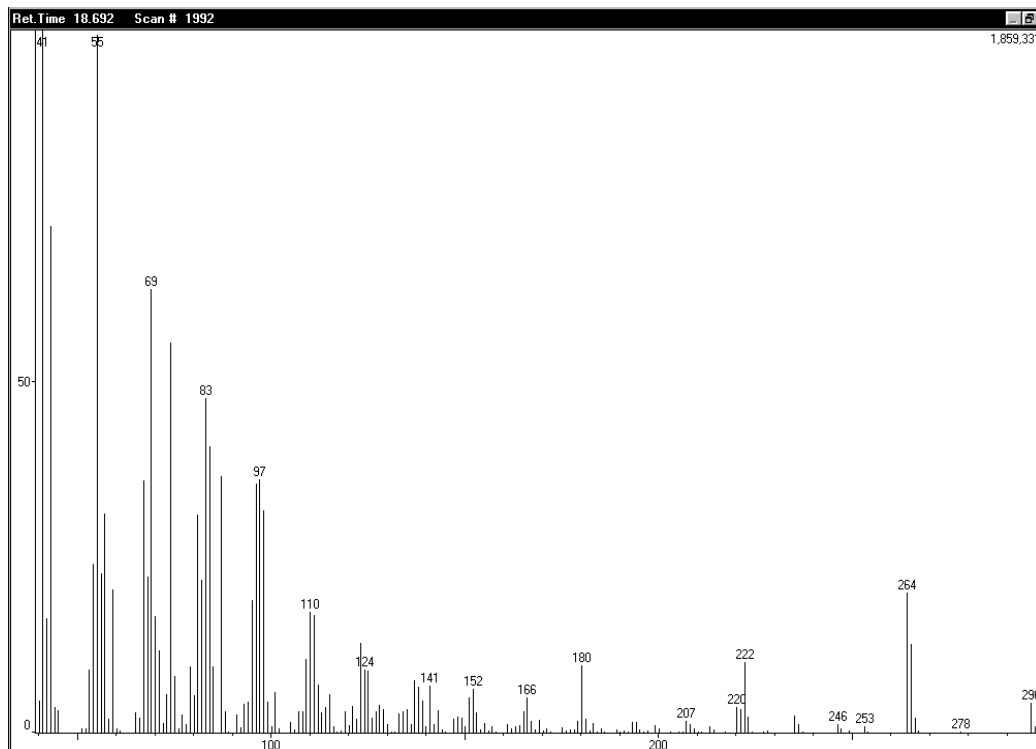


Figura 83 - BV-9 E. EM do octadecanoato de metila – cadeia do ácido de origem (C18:0)

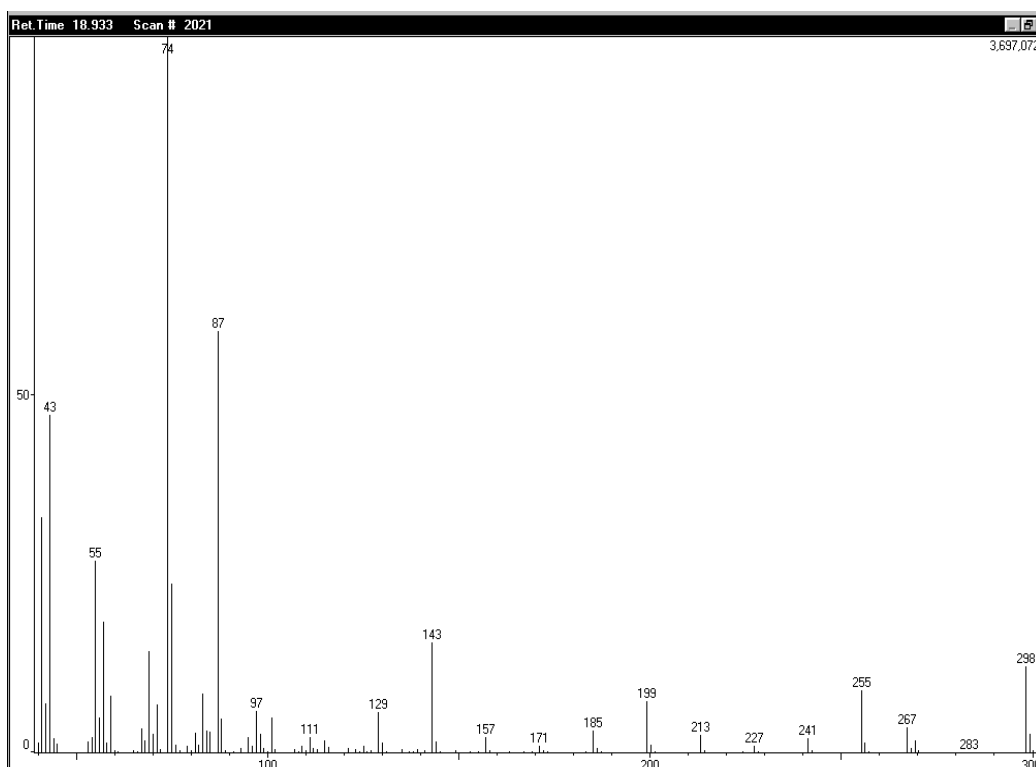
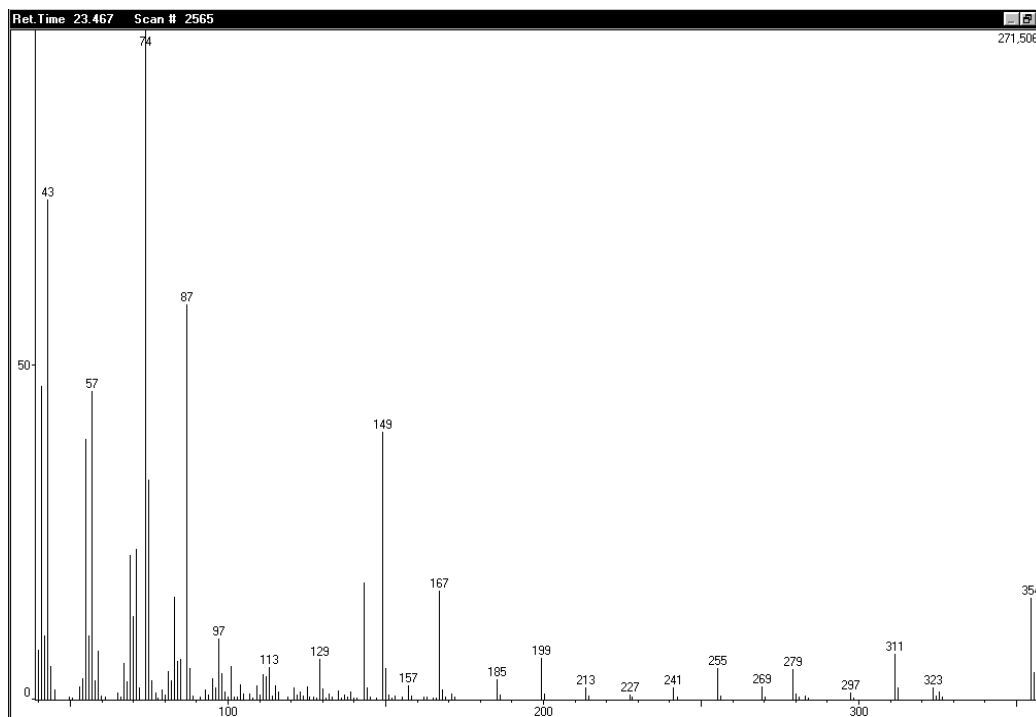




Figura 84 - BV-9 F. EM do docosenoato de metila – cadeia do ácido de origem (C22:5)



5. TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos de avaliação de atividade antioxidante (AA) permitem dirigir os processos de separação e purificação das fases orgânicas até as substâncias com maior potencial de apresentar atividade. Diversas técnicas validadas têm sido utilizadas para detectar atividade antioxidante *in vitro*, destacando-se os sistemas usados de co-oxidação do β -caroteno/ácido linolênico e o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Tais procedimentos servem como guia para otimização do trabalho de seleção de substâncias capazes de auxiliar na prevenção de doenças crônico-degenerativas, como flavonoides. Estes métodos foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante das fases orgânicas polares de *B. virgilioides*.



5.1 Análise quantitativa da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante se dá através da monitorização do consumo do radical livre DPPH, pelas diferentes concentrações das amostras dispostas em ordem, através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância. As medidas são realizadas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 517nm.

5.1.1 Atividade sequestrante de radicais livres de DPPH

A atividade sequestrante (%ASRL) ou porcentagem de descoloração (%descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ ASRL} = (\% \text{DESCOLORAÇÃO}) = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Onde, A_c : absorbância controle ou branco;

A_t : absorbância teste (amostra).

A estabilização dos radicais livres de DPPH através da ligação com átomo de hidrogênio explica a efetividade do método em avaliar a atividade antioxidante de extratos e substâncias puras. Inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre e perdem esta cor, tendendo ao amarelo, quando um radical hidrogênio é doado por uma molécula antioxidante, diminuindo, assim, a absorbância. O DPPH é um radical relativamente estável e não degrada ou reage facilmente com outros compostos. Somente redutores fortes são capazes de sequestrar radicais estáveis sob controle estequiométrico. A diminuição da absorbância pressupõe atividade sequestrante de radicais livres (SOUSA et al., 2007).

Abaixo têm-se os gráficos de resultados das atividades antioxidantes das fases orgânicas, confrontando-os com padrões utilizados. Não foram feitos os testes com compostos isolados. Na Figura 91, pág.123, são visualizados os resultados das absorbâncias após o teste. Triplicatas das fases orgânicas (em concentrações de 50 – 500ppm) juntamente com os padrões de (quercetina, BHT, trolox e ácido gálico) foram submetidas à solução na presença de DPPH.



5.1.2 Atividade antioxidante na reação β -caroteno/ácido linolênico

A atividade sequestrante (%ASRL) para o teste do β -caroteno/ácido linolênico seguiu o mesmo cálculo feito acima para o teste do DPPH. O β -caroteno, assim como outras substâncias antioxidantes presentes em alimentos e vegetais, agem inibindo o radical oxigênio na reação de peroxidação lipídica (Moreira & Mancini Filho, 2003).

O sistema utilizou ácido linolênico em uma mistura contendo um emulsificante, amostra ou padrão e o β -caroteno. O decaimento das absorbâncias reflete a oxidação do β -caroteno promovida pelos produtos da degradação lipídica. A adição de amostra ou padrão antioxidante deve retardar a ação oxidativa desses subprodutos da peroxidação sobre o β -caroteno. Foram feitas triplicatas de amostra (fase MeOH) e padrão (quercetina) de cada concentração (100 – 250 ppm). Na figura 92, pág.124, estão dispostos os dados de absorbâncias observados em quatro séries testadas.



Figura 85 - Dados de AA% das fases frente aos padrões. Observam-se os gráficos individuais para cada padrão confrontado. Concentrações utilizadas de 50-500ppm

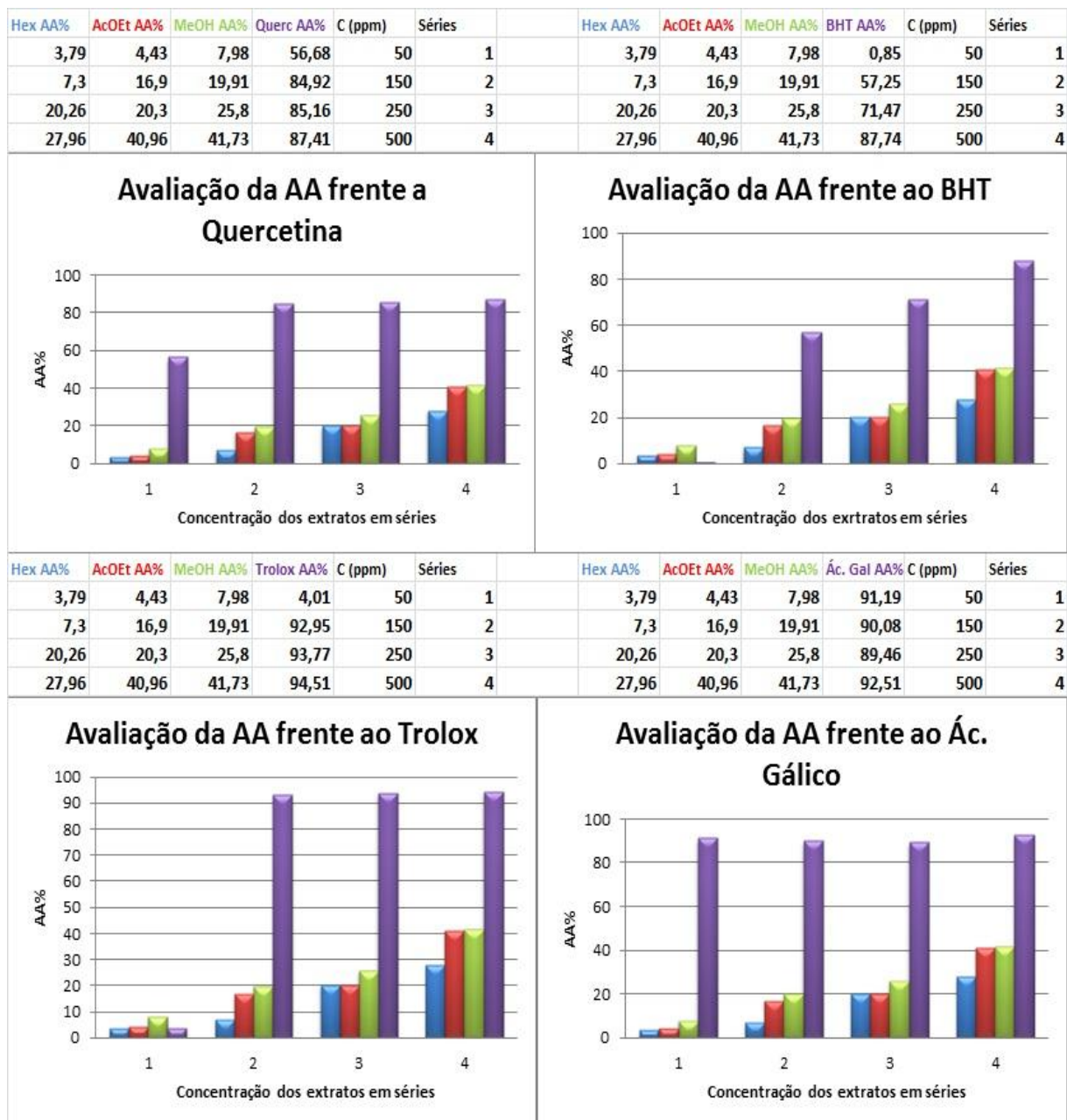
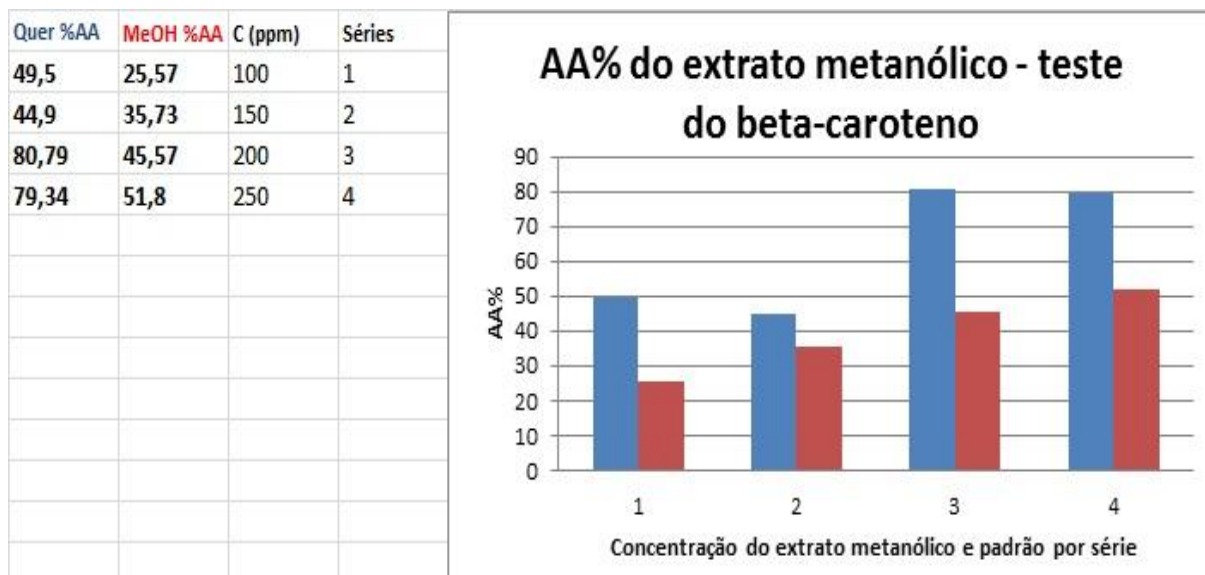




Figura 86 - Dados obtidos da fórmula AA% – Reação de co-oxidação de β -caroteno/ácido linolênico



6. TESTE DE TOXICIDADE FRENTE LARVAS DE ARTEMIA

Seguindo-se o teste de citotoxicidade frente às larvas de *artemia salina* (Tabela 25), tem-se um resumo do procedimento feito para exposição da fase larval em cada concentração da fase MeOH testada. A segunda coluna mostra o total de indivíduos testados por grupo, divididos por cada concentração. O teste foi feito em triplicatas distinguidas pelos grupos teste (1), (2) e (3). Na última coluna, estão dispostos o total de indivíduos mortos após exposição à amostra por um período de 24 horas.

Tabela 25 - Resultado da exposição das larvas de artemia salina à fase MeOH frente à diferentes concentrações

| Conc. da fase MeOH (ppm) | Total de indivíduos/tripl icata 0 h | Grupo (1) 24h | Grupo (2) 24h | Grupo (3) 24h | Total de mortos 24h |
|--------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------|
| 50 | 30 | 8 | 9 | 8 | 5 |
| 100 | 30 | 1 | 3 | 4 | 22 |



| | | | | | |
|------------|----|---|---|---|----|
| 150 | 30 | 2 | 0 | 0 | 28 |
| 200 | 30 | 0 | 0 | 1 | 29 |
| 250 | 30 | 0 | 0 | 1 | 30 |

Para categorizar a toxicidade demonstrada após o teste, foi usado o parâmetro de dose letal (DL_{50}) - concentração capaz de inviabilizar 50% dos indivíduos expostos. Para isso são considerados $DL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, extrato muito tóxicos; valor entre $80 \mu\text{g/mL}$ and $250 \mu\text{g/mL}$, extrato moderadamente tóxico e $DL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, extrato com baixa toxicidade (DOLABELA, 1997). Neste mesmo método, caso não haja mortalidade de 50% em nenhuma das concentrações usadas, o extrato é considerado não tóxico. O tratamento dos dados obtidos após 24horas revelou um valor de DL_{50} de $76,82 \mu\text{g/ml}$. Tal valor demonstra que a fase MeOH da *B. virgilioides* possui toxicidade alta



7. CONCLUSÃO

O presente trabalho constitui um apanhado contributivo às pesquisas envolvendo metabólitos secundários e atividades biológicas de fases orgânicas oriundos da espécie *B. virgilioides* Kunt. (Fabaceae), aqui demonstrado através de estudos com as raízes deste vegetal, com predomínio em território baiano e de ocorrência na América do Sul.

As raízes de *B. virgilioides* moídas (1,621Kg) foram submetidas a processo de maceração em metanol, originando extrato bruto (116,54g). Após partição, surgiram quatro fases orgânicas de diferentes polaridades: MeOH (10,77g), AcOEt (30,01g), Hex (5,6g) e BuOH (15,02g). Dentre as fases orgânicas obtidas, a fase MeOH, juntamente com a fase AcOEt, apresentaram resultados positivos nos testes preliminares quanto a presença de substâncias fenólicas, triterpenos, alcaloides e ácidos fenólicos, em concordância com estudos fitoquímicos preliminares.

A pesquisa da fase MeOH apresentou quantidade e variedade de triterpenos e flavonoides bastante significativa, corroborando com dados já relatados de isolamento de alguns compostos dessas classes. Foram elucidadas oito substâncias da fase MeOH da raiz do vegetal. Dessas, 2 triterpenos já conhecidos na literatura: lupeol (BV-3) e lupenona (BV-4); três esteroides: sitosterol (BV-5), estigmasterol (BV-6) e sitostenona (BV-7); outros dois são flavonoides: isocordoína (BV-2) e cordoína (BV-1); uma mistura de AGL's raros de cadeia ímpar e de cadeia longa (BV-8) e ésteres metílicos em mistura que ratificam a existência destes AGL's (BV-9).

A Isocordoína (BV-2) é um flavonoide de ocorrência natural em vegetais, de estrutura já conhecida e de elevado potencial terapêutico. Não há registros de ocorrência desta chalcona na espécie estudada, fato este que impulsiona para outras pesquisas fitoquímicas com a espécie. Outra chalcona foi identificada: cordoína (BV-1). Também não há relatos do isolamento deste composto na espécie *B. virgilioides*. Apenas a isoliquiritigenina foi relatada como chalcona isolada da planta. Além destes, os AGL's (BV-8) raros encontrados abrem espaço para novas abordagens sobre a contribuição destes compostos nos organismos vivos.



A avaliação da atividade antioxidante revelou que as fases orgânicas obtidas do extrato metanólico bruto apresentaram grau de atividade moderada em relação aos padrões utilizados, sendo que as fases MeOH e AcOEt foram mais expressivas, no grupo testado, frente ao radical DPPH. A fase MeOH mostrou-se moderadamente ativa também frente à reação de co-oxidação usando β -caroteno/ácido linolênico, corroborando com o resultado anterior.

Quanto à citotoxicidade, a fase MeOH demonstrou ser tóxica frente às larvas de *A. salina* sp. Este resultado abre espaço para maiores investigações sobre o potencial citotóxico, através de testes mais elucidativos, a ser explorado tanto da fase orgânica como das substâncias isoladas.

Sendo uma espécie bastante explorada pela comunidade científica, os resultados evidenciados em trabalhos publicados sobre sua eficácia avaliada em modelos *in vitro* e/ou de animais, além é claro de seu uso popular no tratamento de malária (DEHARO et al, 2001) e outros microorganismos e afecções (CONCEIÇÃO, 1987; FRIESE, 1934), faz-se necessária a continuidade das investigações sobre a potencialidade fitoquímica e farmacológica de *B. virgilioides*.

Para esta espécie, vegetal superior e árvore de grande porte, amplamente utilizada pela população nas mais diversas necessidades humanas desde a confecção de móveis, construção civil até o uso medicinal, foco da investigação primordial deste trabalho, é de grande valia também a concepção de avaliações comportamentais de esqueletos orgânicos já encontrados na planta e a prospecção de novos compostos capazes de modificar parâmetros regulatórios em outros organismos.

8. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.K.; AGRAWAL, S.K.; RASTOGI, R.P.; OSTERDAHL, B.G. **Planta Medica**, v.43, p.82, 1981.
- ALCARAZ, M. J.; CARVALHO, J. C. T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. **CARVALHO, JCT, Fitoterápidos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**, p. 79-97, 2004.
- ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 638-641, 2006.
- AMAZONIA CONTRA MALÁRIA. **Rev Pesq Fapesp**, v.100, p.87-89, 2004.
- ANTONISAMY, Paulrayer; DURAIANDIYAN, Veeramuthu; IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1070-1077, 2011.
- II, AGP et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399-436, 2003.
- ARRIAGA, Ângela Martha C. et al. Volatile constituents from roots of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 2, p. 205-206, 1998.
- ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; BRAZ-FILHO, R. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 211-212, 2000.
- ARAÚJO, Afranio Cesar et al. Caracterização socio-econômico-cultural de raizeiros e procedimentos pós-colheita de plantas medicinais comercializadas em Maceió, AL. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 81-91, 2009.
- AVILA-VILLARREAL, Gabriela et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-A isolated from *Lonchocarpus xuul* Lundell by NO production: Computational and ex vivo approaches. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1241-1246, 2013.
- BACCHI, Elfriede Marianne. Ação anti-úlceras e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Rev. bras. farmacogn**, v. 1, n. 1, p. 93-100, 1986.
- BAIG, H. S.; SAIFULLAH, S. M.; DAR, A. Occurrence and toxicity of *Amphidinium carterae* Hulburt in the North Arabian Sea. **Harmful Algae**, v. 5, n. 2, p. 133-140, 2006.
- BARBOSA-FILHO, José Maria et al. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **Journal of Asian natural products research**, v. 6, n. 1, p. 11-17, 2004.

BARROS, Wander M. et al. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* HBK stem bark. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 609-616, 2010.

BORGES-ARGÁEZ, Rocío; PEÑA-RODRÍGUEZ, Luis M.; WATERMAN, Peter G. Flavonoids from two *Lonchocarpus* species of the Yucatan Peninsula. **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 533-540, 2002.

BORGES-ARGÁEZ, Rocio et al. Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. **Planta medica**, v. 75, n. 12, p. 1336-1338, 2009.

BRANDÃO, M.; FERREIRA, P. B. D. Flora apícola do cerrado. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 15, n. 168, p. 4-8, 1991.

BRANDÃO, Maria G. Lins et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAGA, Renato; DO NORDESTE, Plantas. especialmente do Ceará. **Centro de Divulgação Universitária—Fortaleza, Brasil**, 1953.

BURKE, R. W. et al. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. **Clinical chemistry**, v. 20, n. 7, p. 794-801, 1974.

CALIXTO, Brasil JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 2, 2000.

CARDOSO, D. B. O. S. **Taxonomia da tribo Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae) na Bahia, Brasil**. 2008. Tese de Doutorado. MS Thesis, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.

CHOI, Chang W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CONCEIÇÃO, Moacir. **As plantas medicinais no ano 2000: dicionário de plantas medicinais**. Brasília: Thesaurus Editora 282 p.-illus.. Por Plant records. Geog, 1987.

CORREIA, M. P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. v. I–VII. **Brasília, Ministério da Agricultura, IBDF, reimpressão**, 1984.

CRUZ, Gilberto Luiz da. Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. **Belo Horizonte, MG**, v. 2, p. 779-780, 1965.

CURI, Rui et al. **Entendendo a Gordura-Os Ácidos Graxos**. Editora Manole Ltda, 2001.

DANG, Zhao et al. New betulinic acid derivatives for bevirimat-resistant human immunodeficiency virus type-1. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2029-2037, 2013.

DA SILVA, André Luiz Gomes; CHAVES, Samyra Ramos; BRITO, Jéfferson Mesquita. Reproductive biology of *Bowdichia virgilioides* Kunth (Fabaceae)-doi: 10.4025/actascibiolsci. v33i4. 9003. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 463-470, 2011.

DAVID, Jorge M. et al. Flavonoid and triterpenes from *Stigmaphyllon paralias*. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 484-487, 2003.

DE-EKNAMKUL, Wanchai; POTDUANG, Buppachart. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 389-398, 2003.

ALVES, C. Q. Flavonóides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tul.(Leguminosae). **Salvador, Bahia, UFBA**, 2007.

DEHARO, Eric et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FEITOSA, J. G. R. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Bowdichia virgilioides* pelo método de difusão em placa. **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2004.

FRIESE, F.W. **Plantas Medicinais Brasileiras**. Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo, São Paulo, v.3, 1934.

Gomes G.A. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Bowdichia virgilioides* [dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 1997.

GONZÁLEZ-CASTEJÓN, Marta; RODRIGUEZ-CASADO, Arantxa. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 5, p. 438-455, 2011.

GOULART, L. A. et al. Electrochemical behavior of flavonoids and derivative isolated of skin of root from *Bowdichia virgilioides* kunt (leguminosae). 2011.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HARBORNE, J.B. Flavonoids. In *Phytochemistry VII*. (L.P. Miller, ed.). Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1973.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. The Flavonoids: Advances in Research. London - New York: Chapman and Hall. 91, 1982.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUYKE, Constance et al. Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 4, n. 2, p. 132-136, 2006.

JIANG, Zhi-Hong; TANAKA, Takashi; KOUNO, Isao. A lupane triterpene and two triterpene caffeates from *Rhoiptelea chiliantha*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1223-1226, 1995.

Jorge-Neto J. Pharmacognostic study of essential oil of sucupira, *Bowdichia virgilioides*. **Rev Fac Farm Odontol Araraquara**, v.4, p.203-204, 1970.

JUCK, Débora BF et al. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. **Natural product research**, v. 20, n. 1, p. 27-30, 2006.

JUNIOR, Valdir F. Veiga; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Egland: Royal Botanic Gardens Kew**. 369, 1987.

LIMA, H. C. Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica. Uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro. 151, 2000.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, camb.).Tese. [Doutorado em Bromatologia] - **Universidade de São Paulo**; 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, v.2, p. 368, 1992.

LUNA, J. de S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

LUZ, S. M. et al. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do PH. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 14, n. Supl 1, p. 45-47, 2004.

MARCO, Gino J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.

MARINHO, L.C.; CUNHA, M.T.M.C.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J.M. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**. 65 (5), 475, 1994.

MELO, Francisca N. et al. Bowdenol, a new 2, 3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*. **Natural product letters**, v. 15, n. 4, p. 261-266, 2001.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, 45(1), 31-34, 1982..

McLAUGHLIN, J.L. **Methods in plant biochemistry: Volume 6. Assays for bioactivity**. Academic Press Ltd., 1991.

MIDDLETON, Elliott; KANDASWAMI, Chithan; THEOHARIDES, Theoharis C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILARDOVIĆ, Stjepan; IVEKOVIĆ, Damir; GRABARIĆ, Božidar S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 2, p. 175-180, 2006.

MOHAMED, Zakaria A.; EL-SHAROUNY, Hassan M.; ALI, Wafaa SM. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 584-590, 2006.

MOREIRA, Ana Vlória Bandeira; MANCINI FILHO, Jorge. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 25, p. 31-46, 2003.

NAVARRO, V.R.; MELO, F.N.; CUNHA, E.V.L.; BARBOSA-FILHO, J.M. Novos constituintes químicos de *Bowdichia virgilioides*. In: VII Encontro de Iniciação Científica da UFPB, **Livro de Resumos**. João Pessoa-PB. 1999.

OLIVEIRA, Fernando de; SAITO, Maria Lucia. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Rev. bras. farmacogn**, v. 2, p. 170-96, 1989.

OMS, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Situación regulamentaria de los medicamentos: una reseña mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: **OPAS**, 62, 2000.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, O papel do farmacêutico no sistema de atenção de saúde, CFF. Brasília, 2004.

PARMAR, V. S. et al. ¹³C nuclear magnetic resonance studies on 3-methylbut-2-enylated 1, 3-diphenylprop-2-enones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 48, n. 4, p. 617-620, 1992.

PAVIA, D. L.; LAMPAM, G. M.; KRIZ, G. M.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, 2012.

PENNINGTON, R. Toby et al. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast trnL intron. **Systematic Botany**, v. 26, n. 3, p. 537-556, 2001.

Pennington, R. T., Stirton, C. H. & Schrire, B. D. (2005). Tribe Sophoreae. In: G. Lewis, B. Schrire, B. Mackinder & M. Lock (eds.), **Legumes of the World**, pp. 227 – 249. Royal Botanic Gardens, Kew.

PERFEITO, J. P. et al. Characterization and biological properties of Pouteria torta extracts: a preliminary study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 183-186, 2005.

Polhill, R. M. Tribe Sophoreae. In: R. M. Polhill & P. H. Raven (eds.), **Advances in Legume Systematics**, part 1, pp. 213 – 230, 1981. **Royal Botanic Gardens**, Kew.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - **Universidade de São Paulo**; 2009.

RATES, Stela Maria Kuze. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REYNOLDS, William F. et al. Total assignment of 13 C and 1 H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of 1 H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3419-3428, 1986.

RIZZINI, Carlos Toledo. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. Editôra E. Blücher, 1990.

ROBERTS, Susan C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 7, p. 387-395, 2007.

SALEEM, Mohammad. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer letters**, v. 285, n. 2, p. 109-115, 2009.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: Shahidi F. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. Newfoundland: Aocs; 1-11, 1996.

DA SILVA, Marlene Freitas; DE SOUZA, Luiz Augusto Gomes; CARREIRA, Léa Maria Medeiros. **Nomes populares das Leguminosas do Brasil**. EDUA, 2004.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 2, p. 178-82, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Editora da Universidade, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

SOUZA, Afonso Duarte Leão de et al. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 439-442, Aug. 2001.

SOUZA, CM de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, Vinicius; LORENZI, Harri. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2008.

TORRENEGRA, G. et al. Homoormosanine, the major alkaloid of the bark from *Bowdichia virgiloides*. **Planta medica= journal of medicinal plant research**, 1985.

TORRENEGRA, Ruben; BAUEREIß, Peter; ACHENBACH, Hans. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 8, p. 2219-2221, 1989.

VELOZO, L. S. M. et al. Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 5, p. 532-535, 1999.

VELOZO, Leosvaldo SM et al. Odoratin 7-O- β -D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1473-1477, 1999.

WILLMANN, M. et al. Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound. **European journal of clinical investigation**, v. 39, n. 5, p. 384-394, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Draft WHO guidelines on safety monitoring and pharmacovigilance of herbal medicines. **Geneva: World Health Organization**, 2003.

XIONG, Quanbo; WILSON, William K.; PANG, Jihai. The Liebermann–Burchard reaction: Sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. **Lipids**, v. 42, n. 1, p. 87-96, 2007.

YUNES, R. A. et al. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.