

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Contribuição ao Estudo
Fitoquímico de
Dioclea lasiophylla

André Luís Bacelar Silva Barreiros

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso de Pós-
graduação em Química da UFBA para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Salvador
2000

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Contribuição ao Estudo
Fitoquímico de
Dioclea lasiophylla

André Luís Bacelar Silva Barreiros

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química da UFBA para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

Salvador
2000

DADOS CURRICULARES
ANDRÉ LUÍS BACELAR SILVA BARREIROS

NASCIMENTO 18.06.1974 – Salvador/BA

FILIAÇÃO Geraldo Silva Barreiros
Lêda Maria Bacelar Silva Barreiros

1993/1997 Curso de Graduação
Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia

Trabalhos
apresentados

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. E DAVID, J. P.
“ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE DE *DIOCLEA GRANDIFLORA*”
LOCAL: XXXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA
CAMPUS DO BACANGA- UFMA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO) SÃO LUÍS –MA

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. E DAVID, J. P.
“ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS HEXÂNICO E CLOROFÓRMICO
DO CAULE DE *DIOCLEA GRANDIFLORA*”
LOCAL: 22^A REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
QUÍMICA- HOTEL CASSINO POÇOS DE CALDAS-MG

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. E DAVID, J. P.
“NOVO TRITERPENO DE *DIOCLEA LASIOPHYLLA*”
LOCAL: III REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE
FITOQUÍMICA E IX SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO
FARMACOBOTÂNICA- HOTEL SERRANO GRAMADO-RS

Trabalho
Submetido

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. E DAVID, J. P.

“AN A2 TIPE PROANTHOCYANIDIN FROM *DIOCLEA LASIOPHYLLA*”

REVISTA: *PHYTOCHEMISTRY*

.

Ao Professor Jorge Maurício David

Pela paciência, incentivo e orientação, e acima de tudo pela amizade, sem as quais não seria possível concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto aqui a minha sincera gratidão:

A minha amada companheira, Marizeth Viana Libório pelo suporte emocional, paciência e valiosas contribuições em forma de discussão.

Aos meus pais: Geraldo Silva Barreiros e Lêda Maria Bacelar Silva Barreiros pela maravilhosa educação que me proporcionaram com algum sacrifício financeiro, sem a qual não chegaria tão longe, e pelo amor recebido.

A Prof.^a Dr.^a Juceni Pereira de Lima David, por ter acreditado em mim, e pela maravilhosa co-orientação e suporte.

Aos meus colegas de laboratório, Ihanmark, Roberval, Hélio, Eliana, Tatiana, Nayara, Rouse, Sóstenes, Ademir, Daniel, Edilene, Fernando, Matheus e todos os outros que tiveram passagem pelo LPPN pelo companheirismo e apoio.

Aos meus professores da graduação e da pós-graduação, que tanto contribuíram para minha formação.

Aos meus colegas de pós-graduação, destacando-se Josanaide pela inestimável ajuda na obtenção de espectros, fundamentais para a conclusão de meu trabalho, Carla Cardeal Mendes, Vânia Rastely, Pedro e José Torquato pelas discussões de espectros, paciência e opiniões, Sérgio e Clarivaldo pela ajuda com a obtenção de espectros de UV.

Aos técnicos, em especial a Josemário pela obtenção dos espectros de IV.

Aos bibliotecários, em especial a Ana Hilda Freitas e Alice Ribeiro pela cooperação e eficiência durante a pesquisa bibliográfica.

Ao Prof. Dr. Luciano P. de Queiroz da universidade Estadual de Feira de Santana pela coleta do material vegetal.

As professoras da Faculdade de Farmácia Fernanda Washington de Mendonça Lima e Alaíse Gil Guimarães pelos testes microbiológicos, a Prof.^a Dr.^a Adelaide F. Alario pelas curvas de DC, ao Prof. Dr. Massayoshi Yoshida pela análise elementar.

Ao Dr. Geoffrey A. Cordell pelos espectros de FABMS.

Ao Prof. Dr. Edilberto da R. Silveira e Daniel Uchoa da CENAURENN-UFC, pelo espectro de HMBC.

A todos os demais que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIII
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Experimental	6
3.1. Materiais Métodos	6
3.2. Coleta e Identificação	7
3.3. Extração dos componentes do caule e das folhas de <i>D. lasiophylla</i>	7
3.4. Purificação do extrato hexânico do caule	10
3.5. Purificação do extrato clorofórmico do caule	18
3.6. Purificação do extrato acetato de etila das folhas	25
3.7. Metodologia dos testes	31
3.7.1. Teste de atividade microbiológica	31
3.7.2. Teste de atividade anti-oxidante	31
4. Substâncias isoladas de <i>D. lasiophylla</i>	34
4.1. Extrato hexânico	34
4.2. Extrato clorofórmico	35
4.3. Extrato acetato de etila	36
5. Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas	37
6. Identificação e determinação estrutural	44
6.1. Triterpenos de esqueleto lupano	44
6.1.1. Identificação da lupenona	45
6.1.2. Identificação do lupeol	47
6.1.3. Identificação do ácido betulínico	49
6.2. Triterpenos de esqueleto oleanano	53
6.2.1. Identificação do ácido acetil oleanólico	54

6.2.2. Identificação do ácido oleanólico	58
6.2.3. Determinação estrutural do oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila	61
6.2.4. Identificação do ácido cafeil oleanólico	70
6.2.5. Determinação estrutural do ácido ferulil oleanólico	75
6.3. Esteróides	79
6.3.1. Identificação do b -sitosterol e do estigmasterol	79
6.4. Vanilina e vanilato de metila	82
6.4.1. Identificação da vanilina	82
6.4.2. Identificação do vanilato de metila	85
6.5. Flavonóides	88
6.5.1. Identificação da (-)-epicatequina	88
6.5.2. Identificação da 3'- b -D-glicopiranosídeo luteolina	92
6.5.3. Identificação do 7- b -D-glicopiranosídeo crisoeriol	95
6.6. Proantocianidina A2	99
6.6.1. Determinação da <i>epigalocatequina</i> -(2 b →7, 4 b →8)- <i>epicatequina</i>	99
6.7. Lipidol	117
6.7.1. Identificação do 2-metil-2,4-pentanodiol	117
7. Testes bioquímicos	119
7.1. Testes de atividade microbiológica	119
7.2. Teste de atividade anti-oxidante	121
8. Considerações Finais	123
9. Referências Bibliográficas	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Obtenção dos extratos orgânicos do caule de <i>D. lasiophylla</i>	8
FIGURA 2 – Obtenção dos extratos orgânicos das folhas de <i>D. lasiophylla</i>	9
FIGURA 3 – Espectro de RMN ^1H de DL1 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	45
FIGURA 4 – Espectro de RMN ^{13}C de DL1 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	46
FIGURA 5 – Espectro de Massas de DL1	46
FIGURA 6 – Espectro de RMN ^1H de DL2 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	47
FIGURA 7 – Espectro de RMN ^{13}C de DL2 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	48
FIGURA 8 – Espectro de Massas de DL2	48
FIGURA 9 – Espectro de RMN ^1H de DL8 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	50
FIGURA 10 – Espectro de RMN ^{13}C de DL8 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	50
FIGURA 11 – Espectro de Massas de DL8	51
FIGURA 12 – Espectro de RMN ^1H de DL3 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	55
FIGURA 13 – Espectro de RMN ^{13}C de DL3 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	56
FIGURA 14 – Espectro de IV de DL3	56
FIGURA 15 – Espectro de Massas de DL3	57
FIGURA 16 – Espectro de RMN ^1H de DL9 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	59
FIGURA 17 – Espectro de RMN ^{13}C de DL9 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	59
FIGURA 18 – Espectro de Massas de DL9	60
FIGURA 19 – Espectro de RMN ^1H de DL10 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	63
FIGURA 20 – Espectro de RMN ^1H de DL10 (Ampliação) [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	64
FIGURA 21 – Espectro de RMN ^{13}C de DL10 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	64
FIGURA 22 – Espectro de RMN ^{13}C de DL10 (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	65
FIGURA 23 – Espectro de RMN ^{13}C de DL10 (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	65
FIGURA 24 – Espectro DEPT 90° de DL10 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	65
FIGURA 25 – Espectro DEPT 135° de DL10 (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	66
FIGURA 26 – Correlações a longa distância ^2J e ^3J obtidas por HMBC de DL10	66
FIGURA 27 – Espectro bidimensional HMBC de DL10	67
FIGURA 28 – Espectro de Massas de DL10	68

FIGURA 29 – Principais fragmentações de DL10	69
FIGURA 30 – Espectro de RMN ^1H de DL11 [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]	72
FIGURA 31 – Espectro de RMN ^{13}C de DL11 [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]	72
FIGURA 32 – Espectro Bidimensional HETCOR ^1H - ^{13}C ($J=9\text{Hz}$) de DL11	73
FIGURA 33 – Correlações a longa distância ^3J obtidas por HETCOR de DL11	73
FIGURA 34 – Espectro de Massas de DL11 (10 eV)	74
FIGURA 35 – Espectro de RMN ^1H de DL12 [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	76
FIGURA 36 – Espectro de RMN ^1H de DL12 (ampliação)	
[300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	77
FIGURA 37 – Espectro de RMN ^1H de DL12 (ampliação)	
[300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	77
FIGURA 38 - Espectro de RMN ^{13}C de DL12 [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	77
FIGURA 39 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura DL4 e DL5 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	80
FIGURA 40 – Espectro de Massas da mistura DL4 e DL5	80
FIGURA 41 – Fragmentações principais da Vanilina	83
FIGURA 42 – Espectro de RMN ^1H de DL6 [300 MHz, CD_3Cl_3 , δ (ppm)]	84
FIGURA 43 – Espectro de massas de DL6	84
FIGURA 44 – Fragmentações principais do Vanilato de Metila	86
FIGURA 45 – Espectro de RMN ^1H de DL7 [300 MHz, CD_3Cl_3 , δ (ppm)]	87
FIGURA 46 – Espectro de massas de DL7	87
FIGURA 47 – Espectro de RMN ^1H de DL15 [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	89
FIGURA 48 – Espectro de RMN ^{13}C de DL15 [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	89
FIGURA 49 – EMIE de DL15	90
FIGURA 50 – Espectro de RMN ^1H de DL18 [300 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)]	93
FIGURA 51 – Espectro de RMN ^{13}C de DL18 [75 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)]	93
FIGURA 52 – Espectro de massas de DL18	94
FIGURA 53 – Espectro de RMN ^1H de DL19 [300 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)]	96
FIGURA 54 – Espectro de RMN ^{13}C de DL19 [75 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)]	96
FIGURA 55 – Espectro de Massas de DL19	97
FIGURA 56 – Espectro de RMN ^1H de DL17 [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	102

FIGURA 57 – Espectro de RMN ^1H de DL17 (Ampliação)	
[300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	103
FIGURA 58 – Espectro de RMN ^1H de DL17 (Ampliação)	
[300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	103
FIGURA 59 – Espectro de RMN ^1H de DL17 (Ampliação)	
[300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	104
FIGURA 60 – Espectro de RMN ^{13}C de DL17 [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	104
FIGURA 61 – Espectro de RMN ^{13}C de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	105
FIGURA 62 – Espectro de RMN ^{13}C de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	105
FIGURA 63 – Espectro de RMN ^{13}C de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	106
FIGURA 64 – Espectro de RMN ^{13}C de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	106
FIGURA 65 – Experimento DEPT 135° de DL17 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	107
FIGURA 66 – Experimento DEPT 135° de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	107
FIGURA 67 – Experimento DEPT 135° de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	108
FIGURA 68 – Experimento DEPT 90° de DL17 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]	108
FIGURA 69 – Experimento DEPT 90° de DL17 (Ampliação)	
[75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]	109
FIGURA 70 - Experimento HETCOR ^1H - ^{13}C de DL17 (J= 140 Hz)	109
FIGURA 71 - Experimento HETCOR ^1H - ^{13}C (J= 9Hz) de DL17	110
FIGURA 72 - Experimento HETCOR ^1H - ^{13}C (J= 11Hz) de DL17	110
FIGURA 73 - Experimento COSY ^1H - ^1H de DL17	111
FIGURA 74 – Dicroísmo Circular de DL17	112
FIGURA 75 – FAB negativo de DL17	113
FIGURA 76 – FAB positivo de DL17	114

FIGURA 77 – Correlações observadas nos espectros bidimensionais de DL17	116
FIGURA 78 – Espectro de RMN ^1H de DL16 [300 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]	118
FIGURA 79 – Espectro de RMN ^{13}C de DL16 [75 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]	118
FIGURA 80 – Atividade microbiológica contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dos extratos brutos de <i>D. lasiophylla</i>	119
FIGURA 81 - Atividade microbiológica contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> das Substâncias puras do extrato acetato de etila das folhas	120
FIGURA 82 – Atividade anti-oxidante das substâncias puras do extrato acetato de etila das folhas	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frações obtidas da CC principal do extrato hexânico do caule	10
Tabela 2 – Frações obtidas da CC de CDLH21	11
Tabela 3 – Frações obtidas da CC de CDLH30	13
Tabela 4 – Frações obtidas da CC de CDLH30-7	13
Tabela 5 – Frações obtidas da CC de CDLH31	14
Tabela 6 – Frações obtidas da CC de CDLH35	14
Tabela 7 – Frações obtidas da CC de CDLH101	16
Tabela 8 – Frações obtidas por CE em gel de Sephadex LH-20 de CDLH101-60	17
Tabela 9 – Frações obtidas da CC principal do extrato clorofórmico do caule	18
Tabela 10 – Frações obtidas por CCDP de CDLC4 e CDLC8	19
Tabela 11 – Frações obtidas por CCDP de CDLC33	20
Tabela 12 – Frações obtidas por CE de CDLC33A	20
Tabela 13 – Frações obtidas por CCDP de CDLC37	21
Tabela 14 – Frações obtidas por CCDP de CDLC37	21
Tabela 15 – Frações obtidas por CC de CDLC51	22
Tabela 16 – Frações obtidas por CCDP de CDLC51-25	23
Tabela 17 – Frações obtidas por CCDP de CDLC51-33	23
Tabela 18 – Frações reunidas por CCDC de CDLC51-25 e CDLC51-33	23
Tabela 19 – Frações obtidas por CC de CDLC88	24
Tabela 20 – Frações obtidas da CC principal do extrato AcOEt das folhas	25
Tabela 21 – Frações obtidas da CC de FDLA11	26
Tabela 22 – Frações obtidas por CE em gel de Sephadex LH-20 de FDLA11-9	27
Tabela 23 – Frações obtidas por CE em gel de Sephadex LH-20 de FDLA11-19	27
Tabela 24 – Frações obtidas da CC em poliamida de FDLA67	28
Tabela 25 – Frações obtidas por CE em Sephadex LH-20 de FDLA67-2	28
Tabela 26 – Frações obtidas por CC em poliamida 6 de FDLA78	29
Tabela 27 – Frações obtidas por CCDP de FDLA78-2	30
Tabela 28 – Dados de RMN de ^{13}C dos triterpenos de esqueleto lupano [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	52

Tabela 29 – Dados de RMN de ^{13}C dos triterpenos de esqueleto oleanano [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	78
Tabela 30 – Dados de RMN de ^{13}C dos esteróides [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	81
Tabela 31 – ^1H NMR, ^{13}C NMR, HETCOR e correlações ^1H - ^{13}C a longa distância de DL15	91
Tabela 32 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de DL18 e DL19	98
Tabela 33 – ^1H RMN, ^{13}C RMN, HETCOR e correlações ^1H - ^{13}C a longa distância de DL17	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
BuOH	butanol
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDLA	extrato acetato de etila do caule
CDLC	extrato clorofórmico do caule
CDLH	extrato hexânico do caule
CE	cromatografia por exclusão
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa/espectrometria de massas
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>d</i>	dubleto
δ	deslocamento químico
DC	dicroísmo circular
DCM/MeOH	diclorometano/metanol
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
<i>dt</i>	duplo tripleto
EM	espectrometria de massas
EMIE	espectrometria de massas por impacto de elétrons
EtOH	etanol
FABMS	espectrometria de massas por bombardeamento rápido de átomos
FDLC	extrato clorofórmico das folhas
F ₂₅₄	fluoresceína
FM	fórmula molecular
Hex.	Hexano
HETCOR	espectroscopia de correlação heteronuclear
HMBC	Heteronuclear Multi Bond Correlation

IE	impacto de elétrons
J	constante de acoplamento
λ	comprimento de onda
[M] ⁺	íon molecular
MeOH	metanol
MHz	megahertz
<i>m/z</i>	relação massa/carga
<i>m</i>	multiplete
MM	massa molecular
PND	“proton-noise-decoupled”
Pyr-d ₅	piridina deuterada
<i>q</i>	quarteto
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	singleto
<i>t</i>	triplete
UV	ultra violeta
UV-Vis-NIR	ultra violeta – visível – infravermelho próximo

RESUMO

Dioclea lasiophylla é uma trepadeira da subfamília Papilionoideae (Leguminosae) de ocorrência na costa nordeste do Brasil. *D. lasiophylla* e outras onze espécies pertencentes a esse gênero formam um grupo de plantas conhecidas popularmente como “feijão-bravo” ou “mucunã”. Essas plantas são utilizadas pela população local como analgésicos, para o tratamento de pedras nos rins e reumatismo. Até o momento não foi relatado nenhum estudo fitoquímico prévio de *D. lasiophylla*. A partir de estudos das raízes de *D. grandiflora*, uma planta também conhecida como “mucunã”, foi isolada a diocleína, uma flavanona que apresentou atividade analgésica além de outros flavonóides.

Esse trabalho descreve o isolamento, a elucidação estrutural, e a atividade anti-oxidante dos compostos obtidos a partir dos extratos hexânico e clorofórmico do caule e acetato de etila das folhas de *D. lasiophylla*.

Do caule dessa espécie foram isolados por combinação de métodos cromatográficos 5 compostos do extrato hexânico e 7 do extrato clorofórmico. A maioria deles tratavam-se de terpenóides. Foram isolados os triterpenos lupenona, lupeol, ácido betulínico, ácido acetil oleanólico, ácido oleanólico, ácido cafeil oleanólico e as novas substâncias oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila e ácido ferulil oleanólico. Também foram isolados o **b**-sitosterol, estigmasterol, vanilina e vanilato de metila.

Uma nova proantocianidina do tipo A2, *epigallocatequina-(2b→7,4b→8)-epicatequina*, em conjunto com a (-)-*epicatequina*, a 3'-**b**D-glicopiranosídeo luteolina, o 7-**b**D-glicopiranosídeo crisoeriol e o 2-metil-2,4-pentanodiol foram isolados por técnicas cromatográficas do extrato acetato de etila das folhas de *D. lasiophylla*. Todas as estruturas foram estabelecidas com base em seus dados espectrais.

A atividade anti-oxidante das substâncias isoladas foi avaliada utilizando o método da auto-oxidação do **b**-caroteno em suspensão com ácido linoleico.

ABSTRACT

Dioclea lasiophylla is a climber plant of subfamily Papilionoideae (Leguminosae) occurring on Brazil in the northeastern Atlantic coast. In this country, *D. lasiophylla* and others eleven species belonging to this genus embraces a set of plants called “feijão-bravo” and “mucunã”. These plants are prescribed by local populations as analgesic, for the treatment of kidney stones and rheumatism. To date, there have been no previous phytochemical reports of *D. lasiophylla*. However it is noteworthy that from the roots of *D. grandiflora*, a plant also known as “mucunã”, were isolated dioclein, a flavanone which present analgesic activity and other flavonoids.

This work describes the isolation, structure elucidation, and antioxidant activity of the isolates from hexane and chloroform extracts of barks and ethyl acetate from leaves of EtOAc extract of leaves of *D. lasiophylla*.

From barks of this species were isolated by combined chromatographic methods 5 compounds from hexane extract and seven from chloroform extract. Mainly of them were terpenoids. It was isolated the triterpenes lupenone, lupeol, betulinic acid, acetyl oleanolic acid, oleanolic acid and cafeyl oleanolic acid besides the two new triterpenes 7',8'-epoxyconiferyl oleanolate and ferulyl oleanolic acid. In addition it was isolated **b**-sitosterol, stigmasterol, vanillin and methyl vanilate.

A new A2-type proanthocyanidin, *epigallocatechin-(2b→7,4b→8)-epicatechin* besides (-)-*epicatechin*, luteolin 3'-**b**D-glucopyranoside, chrysoeriol 7-**b**D-glucopyranoside and 2-methyl-pentan-2,4-diol were isolated by chromatographic techniques from leaves of *Dioclea lasiophylla*. All the structures were established on the basis of their spectral data. Antioxidant activities of isolates were measured using the auto-oxidation of **b**-carotene in a linolenic acid suspension method.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais e o conhecimento de algumas de suas propriedades terapêuticas é algo que tem acompanhado o homem desde os primórdios de sua história. Um dos primeiros relatos de propriedades medicinais de plantas dos quais se tem notícia é o *Papyrus Ebers* do antigo Egito (Goldfarb, 1988), no entanto, existem vestígios do uso de plantas com fins medicinais em sociedades pré-históricas européias e pré-colombianas antes de 3000 a.C.

No Brasil os povos indígenas já faziam e fazem uso de plantas medicinais para tratamento de suas enfermidades. Com o desmatamento e a devastação da Mata Atlântica, além da dizimação de povos e culturas indígenas ocorridos a partir da colonização do Brasil grande parte desse conhecimento foi perdido e o restante está se perdendo com a inserção do índio na sociedade moderna e a perda de sua identidade cultural. Outra grande contribuição ao uso de plantas medicinais no Brasil provém dos representantes dos povos africanos trazidos para o país como escravos com a finalidade de trabalhar nas lavouras, e que trouxeram consigo o conhecimento acumulado de seus antepassados da sua cultura do uso de diversas plantas com finalidades terapêuticas, sendo este transmitido aos seus descendentes principalmente através da sua religião, o candomblé, e adaptado à flora brasileira.

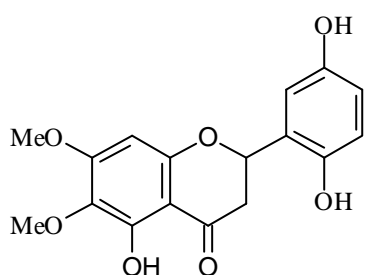
O desmatamento e destruição de matas nativas não está restrito ao nosso país e vem ocorrendo de maneira sistemática por todo o mundo. O Brasil é detentor de uma enorme biodiversidade dispersa em vários ecossistemas, entre eles o pantanal, a Amazônia, o cerrado, a caatinga, a mata atlântica, o mangue e os campos. Apesar desta grande biodiversidade, somente uma percentagem muito pequena de sua flora tem sido estudada sob o ponto de vista químico (Ribeiro, 1987) e uma percentagem menor ainda de estudos têm sido realizados sobre as atividades dessas plantas e de suas substâncias (Cordell, 1995). Com o surgimento de novas doenças como a AIDS e o ebola, o ressurgimento de doenças antes consideradas curáveis a exemplo da tuberculose e a presença cada vez maior de doenças que têm acompanhado o homem por séculos como o câncer, é crescente a demanda e o interesse mundial na busca de novos fármacos. Uma das fontes para essa busca é a natureza. Essa é uma busca multidisciplinar que envolve desde profissionais das áreas de

botânica, farmacologia, farmacognosia e química até profissionais da área de medicina em testes na fase clínica. Faz-se então necessário um estudo detalhado da flora brasileira com o intuito de conhecer e aproveitar melhor os nossos recursos naturais.

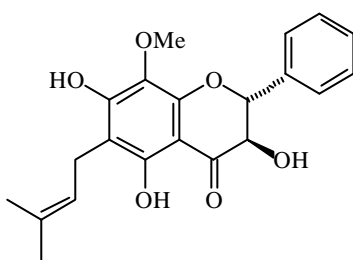
A Bahia, na riqueza de sua flora, possui regiões de cerrado no oeste, caatinga no centro e norte, mangue em algumas poucas áreas do litoral, campos rupestres na região da Chapada Diamantina e resquícios de mata atlântica concentrados principalmente ao sul na região da Reserva de Monte Pascoal.

Dioclea lasiophylla que foi objeto deste trabalho é representante da família Leguminosae, a qual compreende aproximadamente 13000 espécies distribuídas em cerca de 600 gêneros. Pertence a subfamília Papilionoideae, formada por aproximadamente 150 gêneros compostos de plantas arbustivas, arbóreas, trepadeiras e raramente ervas (Joly, 1993). No Brasil ocorrem cerca de 25 espécies de *Dioclea*, podendo este número já ter sido ampliado já que esse relato data de 1984, são elas: *D. bicolor* Benth (Amazonas e Mato Grosso), *D. densiflora* Hub. (Pará), *D. fimbriata* Hub. (Pará), *D. glabra* Benth (Guiana até Pernambuco, Goiás e Mato Grosso), *D. grandiflora* M. (Pernambuco, Paraíba e Bahia), *D. lasiophylla* Benth. (Guiana até São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso), *D. latifolia* Benth. (São Paulo, Goiás e Mato Grosso), *D. macrantha* Hub. (Pará), *D. macrocarpa* Hub. (Guiana e Amazônia), *D. reflexa* Hook. variedades *glabrescens* e *grandifolia* (Amazônia até Piauí e Rio de Janeiro), *D. rufescens* Benth. (Brasil central, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas), essas oito conhecidas popularmente como feijão bravo; *D. sclerocarpa* Ducke. (Amazonas) conhecida como mandiocaçu; *D. rostrata* Benth. (Pará, Ceará, Minas Gerais e Mato Grosso) conhecida como mandioca silvestre, *D. argentea* Desv. (Pará até Bahia) conhecida como cavany ou cava; *D. ferruginea* Ducke. (Amazônia), *D. flexuosa* Hook. (Amazônia), *D. lasiocarpa* Mart. ou *D. virgata* Amsh. (Guiana até São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso), *D. leiophylla* Ducke. (Amazônia), *D. malacocarpa* Ducke. (Amazônia), *D. sericea* HKB. (originária da Colômbia, introduzida no Brasil) conhecidas como mucuna; *D. erecta* Hoehne. (Mato Grosso), *D. violacea* M. (Guiana até São Paulo e Mato Grosso) conhecidas por coroanha; *D. glycinoides* DC. (São Paulo até Rio Grande do Sul e Mato Grosso) conhecida por cutello; *D. jacquiniana* Bello. (Amazonas, São Paulo, Bahia e Minas Gerais) conhecida por cumandatiá (Correa, 1984). De todas essas espécies somente as raízes de *D. grandiflora* foram estudadas até o presente momento sob o ponto de vista

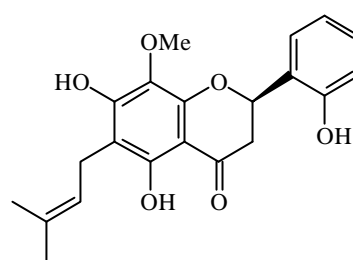
químico e farmacológico. *D. grandiflora* tem ocorrência restrita nas regiões de tabuleiro e semi-árido nordestino, sendo conhecida popularmente como olho-de-boi. Possui emprego na medicina popular no tratamento de cálculos renais e doenças da próstata. Estudos fitoquímicos anteriores realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, com suas raízes levaram ao isolamento de seis flavonóides prenilados, sendo cinco até aquele momento inéditos, um flavonóide metoxilado inédito e um triterpeno de ocorrência comum. O primeiro deles a ser isolado foi denominado diocleína (**1**) (5,2',5'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavanona) (Bhattacharyya, 1995). Esta substância apresentou atividade analgésica intensa (Batista, 1995). As outras substâncias não tiveram atividade relatada, são elas o dioclenol (**2**) um flavonol (Bhattacharyya, 1997), uma nova flavanona denominada dioflorina (**3**) (Bhattacharyya, 1998), além do agrandol (**4**), uma nova flavanona prenilada, o diosalol (**5**) um novo flavonol prenilado, o paraibanol (**6**) um novo flavonol além das já relatadas 5,7,2',5'-tetraidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona (**7**) e *b*-amirina (**8**) (Bhattacharyya, 1999).



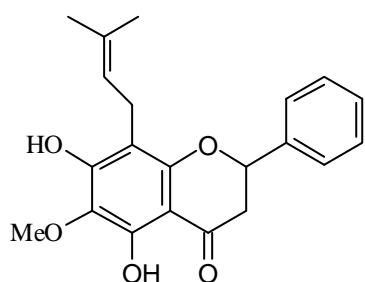
1



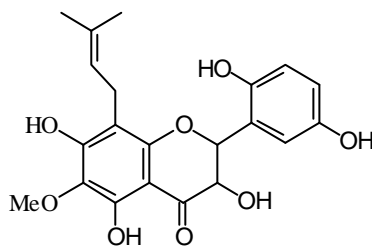
2



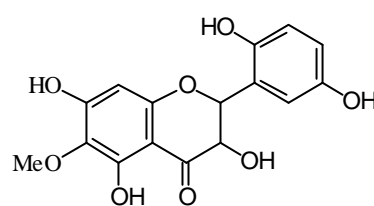
3



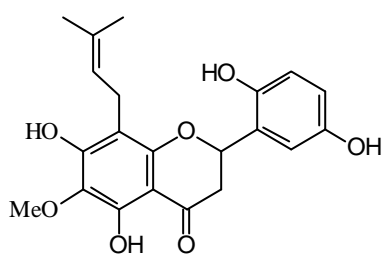
4



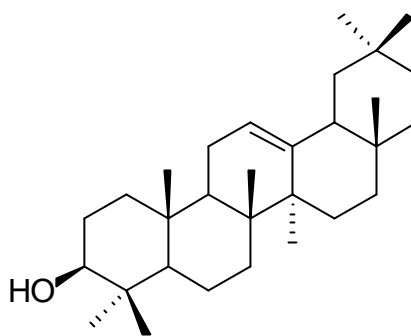
5



6



7



8

O interesse inicial no estudo do gênero *Dioclea* partiu de consulta ao Prof. Dr. Lucianno Paganucci da Universidade Estadual de Feira de Santana, que informou existirem algumas dificuldades em classificar plantas desse gênero pois algumas espécies, a exemplo de *D. grandiflora* e *D. lasyophylla*, apresentam semelhanças botânicas com espécies dos gêneros *Cratylia* e *Lonchocarpus*, enquanto que outras como *D. guianensis*, uma outra espécie que ocorre também no Estado, tem mais semelhança com *Canavalia*. Desta maneira, o estudo de espécies do gênero *Dioclea* pode contribuir para um melhor conhecimento fitoquímico e servirá portanto como um trabalho de quimiosistemática ao relacioná-las com espécies dos gêneros aos quais elas mais se assemelham, ratificando ou retificando suas classificações. Outro motivo de interesse é o fato de *D. grandiflora* já ter tido suas raízes analisadas e ter apresentado nestas uma substância com intensa atividade analgésica (Batista, 1995), permanecendo não estudadas porém suas outras partes. Também pretende-se averiguar se seu uso na medicina popular possui algum fundamento dando respaldo ou não à sua utilização.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- 1) Isolar substâncias provenientes do metabolismo secundário presentes nos extratos das partes aéreas de *D. lasiophylla*.
- 2) Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos.
- 3) Submeter todas as substâncias isoladas a bioensaios simples tais como teste de atividade anti-oxidante, letalidade de *Artemia salina*, antimicrobiano e antifungico.
- 4) Contribuir ao conhecimento da química do gênero *Dioclea*.

3 Experimental

3.1 Materiais e Métodos

Nas separações por CC foram empregadas como fases estacionárias sílica gel 60 da Merck com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e sílica gel 60H da Merck com diâmetro de partícula aproximado de 15 μm para CC, sob pressão de N_2 , poliamida 6 Baker TLC com diâmetro de 50 μm , e sephadex LH-20 da Pharmacia para a CE.

Nas CCDC foram utilizadas placas preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ da Merck, as quais foram ativadas em estufa a 100°C por 1h. Também foram utilizadas placas pré-preparadas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck e de sílica gel IB2-F₂₅₄ da J. T. Baker- Chemical Co.

Nas CCDP foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ e 1mm de espessura da Merck, e placas cromatográficas de alta resolução de sílica gel fluorescente a 254 nm com 200 μm de espessura da Whatman.

Os solventes utilizados foram: hexano, éter de petróleo, benzeno, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, acetona, etanol, metanol, ácido acético e butanol das marcas ACS, CRQ, Grupo Química, Merck, Nuclear, QUIMEX, Reagen, Synth, TECHNION e VETEC, todos grau P.A.

A evaporação dos solventes foi realizada à pressão reduzida utilizando evaporadores rotatórios da marca Büchi, a temperaturas em geral entre 40°C e 60°C.

As placas de CCDP foram reveladas por irradiação com luz UV (254 e 366 nm), enquanto que as placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm), vapores de iodo e/ou reveladores químicos. Dentre estes, os mais utilizados foram a vanilina/ H_2SO_4 , reagente de Liberman-Burchard, anisaldeído/ H_2SO_4 e reagente de Dragendorff (Stahl, 1969).

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho GEMINI 300 da Varian operando a 300MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C e utilizando CDCl_3 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, Pyr- d_5 , DMSO- d_6 e D_2O como solventes e o sinal do hidrogênio ou ^{13}C

dos solventes, como referência interna. Os espectros HMBC foram obtidos em aparelho BRUKER ADVANCE DRX-500 operando a 500MHz para ^1H e 125MHz para ^{13}C .

Os espectros de massas da técnica FAB foram registrados em espectrômetros de massas Finnigan MAT 90, e da técnica IE em espectrômetros HP modelo 5988-A e modelo 5973 através do método de inserção direta ou CG/EM com CG HP modelo 6890.

Os espectros de infravermelho foram registrados em aparelho da JASCO modelo VALOR-III em filme ou em pastilha de KBr.

Os espectros de UV foram registrados em espectrofotômetro Varian modelos Cary I-E e Cary 5E .

A curva de DC foi obtida num espectro polarímetro da JASCO.

3.2 Coleta e Identificação

Partes do caule e folhas de um espécimen de *Dioclea lasiophylla* foram coletados em região de tabuleiro, na reserva do campus da Universidade Estadual de Feira de Santana e identificadas pelo Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz. A exsiccata da planta foi catalogada sob o número 24822 e encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana.

3.3 Extração dos componentes do caule e das folhas de *D. lasiophylla*

As partes coletadas foram secas em estufa a 40°C com ventilação. Após a secagem, as folhas foram separadas do caule e moídas separadamente, obtendo-se assim 403 g das folhas e 1008 g do caule. Ambas foram submetidas separadamente à maceração por 3 vezes consecutivas com MeOH, e depois particionadas entre Hexano:MeOH/H₂O (9/1), CHCl₃:MeOH/H₂O (6/4), AcOEt:H₂O e BuOH:H₂O, conforme esquemas propostos nas Figuras 1 e 2.

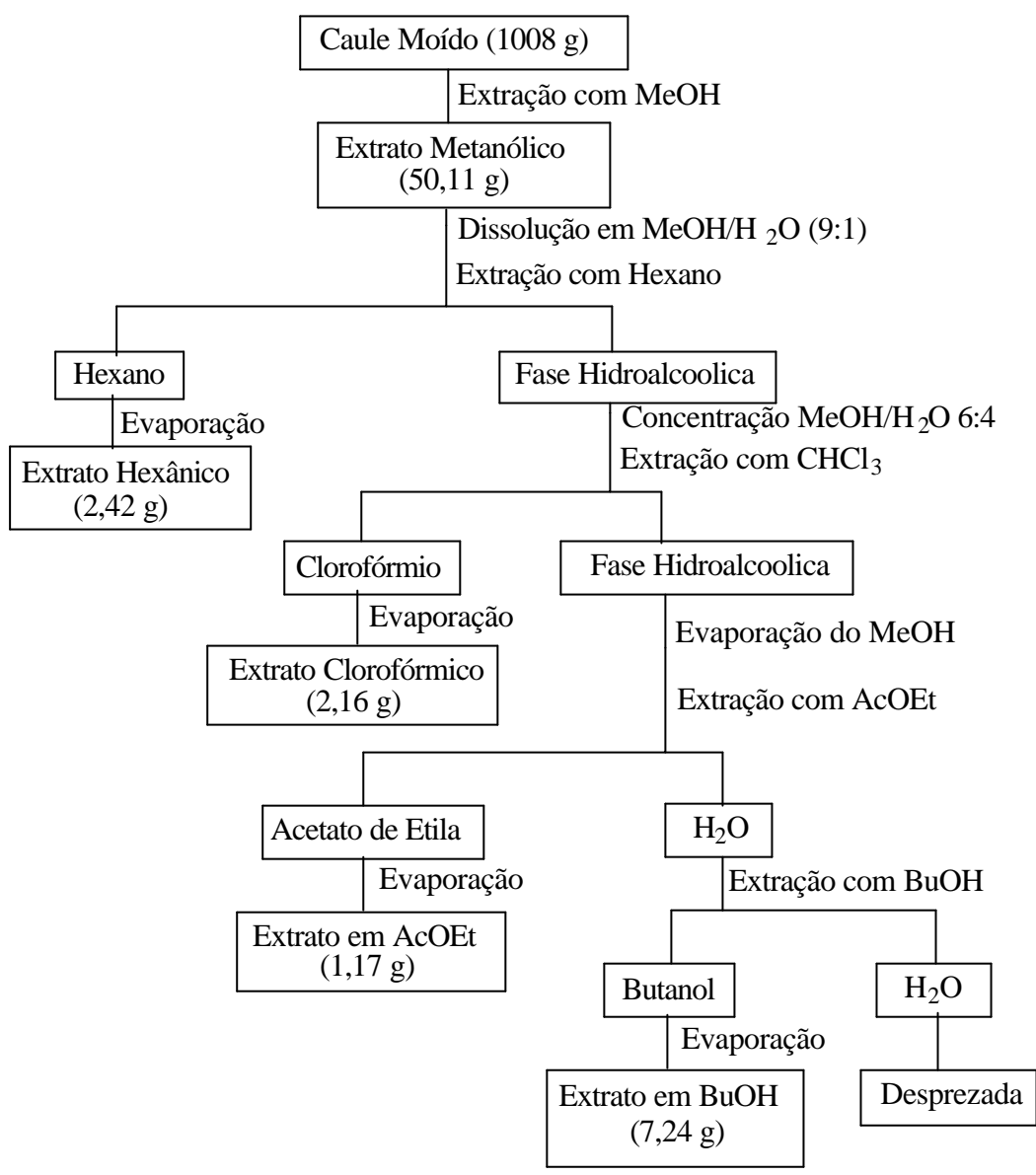


FIGURA 1 – Obtenção dos extratos orgânicos do caule de *D. lasiophylla*

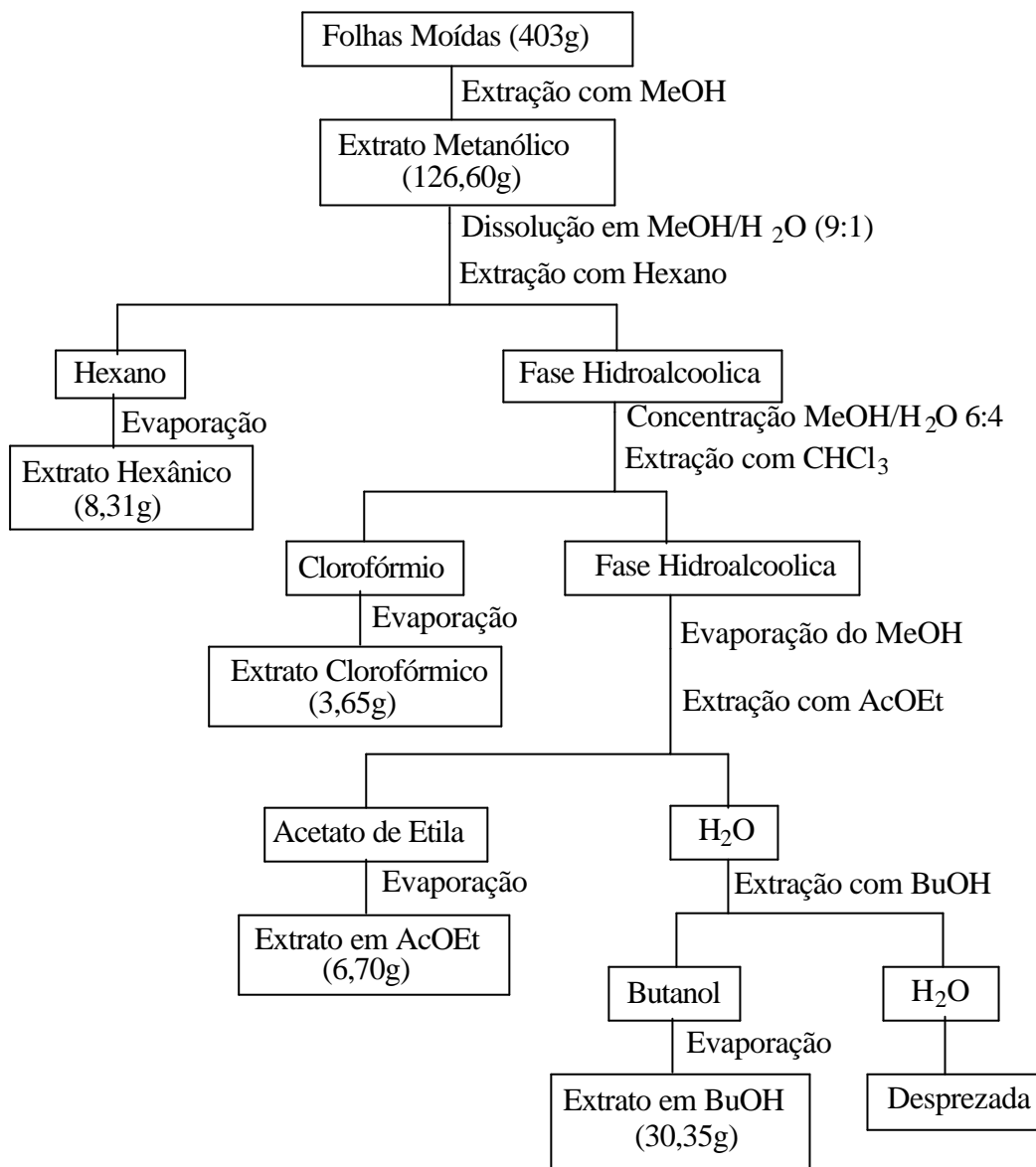


FIGURA 2 – Obtenção dos extratos orgânicos das folhas de *D. lasiophylla*.

3.4 Purificação do extrato hexânico do caule

O extrato hexânico do caule (2,42 g) foi fracionado através de cromatografia em coluna sob sílica gel 60, utilizando como fase móvel o sistema hexano/acetato de etila em grau crescente de polaridade. Dessa coluna principal foram recolhidas 101 frações de 50 mL que foram reunidas posteriormente em 15 frações após análise em CCDC (Tabela 1).

Tabela 1 – Frações obtidas da CC principal do extrato hexânico do caule

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema Hex/AcOEt	Substâncias Isoladas
CDLH21	20-21	339,8	9:1	MDL1 e DL1
CDLH23	22-23	38,5	9:1	CCDC: DL1 e DL2
CDLH24	24	10,9	9:1	CCDC: DL1 e DL2
CDLH25	25	18,9	9:1	CCDC: DL1 e DL2
CDLH30	26-30	166,9	8:2	DL2
CDLH31	31	116,3	8:2	DL2 e DL3
CDLH35	32-35	284,1	8:2	DL2 , DL3 , DL4 e DL5
CDLH46	36-46	318,8	8:2	DL4 e DL5
CDLH56	47-56	89,8	7:3	Desprezada: Graxa
CDLH61	57-61	62,5	7:3	Desprezada: Igual CDLH56
CDLH74	62-74	284,7	6:4	Desprezada: Igual CDLH56
CDLH84	75-84	164,8	1:1	Desprezada: Igual CDLH56
CDLH101	85-101	219,6	4:6 e AcOEt	-

3.4.1 Estudo da fração CDLH21

A fração CDLH21 (339,8 mg), um óleo amarelo de cheiro agradável teve suas condições de separação testadas em CG, e seus constituintes avaliados por CG/EM, revelando a presença de triterpenos além dos ésteres graxos octadecanoato de metila, hexadecanoato de metila e provavelmente do 12-octadecenoato de metila. Esta foi então submetida a fracionamento em coluna sob sílica gel 60 utilizando hexano/AcOEt em grau crescente de polaridade. Desta forma foram obtidas 78 frações, que foram reunidas em 6 novas frações após análise em CCDC (Tabela 2). A utilização de reagente de Liebermann-Burchard indicou a presença de triterpenos na fração CDLH21- 32 (180,6 mg). Análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das demais frações indicou que as mesmas eram constituídas de substâncias de natureza graxa.

Tabela 2 – Frações obtidas da CC de CDLH21

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema Hex/AcOEt
CDLH21-32	21-32	180,6	9:1
CDLH21-49	33-49	25,3	9:1
CDLH21-51	50-51	1,0	8:2
CDLH21-65	52-65	18,0	8:2
CDLH21-73	66-73	13,1	AcOEt
CDLH21-78	74-78	89,7	AcOEt

CC da fração CDLH21-32 (180,6 mg) sob sílica gel 60, com hexano/AcOEt em grau crescente de polaridade forneceu 40 frações. Estas foram reunidas em 6 novas frações após análise por CCDC utilizando reagente de Liebermann-Burchard como revelador químico. As quatro últimas eram compostas de ácidos graxos. A segunda fração denominada CDLH21-32-25 era constituída de lupenona (**DL1**) (5,2 mg), enquanto a primeira chamada CDLH21-32-23 compreendia uma mistura de lupenona com outras duas substâncias. Tentou-se então purificar estas substâncias a partir da fração CDLH21-32-23

por CC em sílica gel 60H sob pressão de N₂. A primeira fração coletada foi desprezada devido a massa CDLH21-32-23-17 (2,1 mg). As três seguintes apresentaram ainda lupenona e a mistura de outras duas substâncias denominada **MDL1**, enquanto que a última (CDLH21-32-23-31) também era constituída de lupenona (21,0 mg) pura.

3.4.2 Estudo da fração CDLH30

Para a purificação da fração CDLH30 o sistema que apresentou melhor resolução Hex/AcOEt 8:2 foi utilizado em coluna isocrática sob sílica gel 60 seguida de eluição da coluna com AcOEt. Foram obtidas 37 frações que foram reunidas por CCDC, utilizando-se uma mistura de Hex/AcOEt 7:3 e reveladas com reagente de Liebermann-Burchard, em 8 frações (Tabela 3).

Tabela 3 – Frações obtidas da CC de CDLH30

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema Hex/AcOEt
CDLH30-4	1-4	33,8	8:2
CDLH30-7	5-7	81,0	8:2
CDLH30-9	8-9	10,5	8:2
CDLH30-13	10-13	4,5	8:2
CDLH30-18	14-18	5,7	8:2
CDLH30-21	19-21	1,9	8:2
CDLH30-31	22-31	4,6	8:2
CDLH30-37	32-37	17,5	AcOEt

Através de CCDC foi possível observar a presença de duas substâncias nas frações CDLH30-4 e CDLH30-7 além de substâncias de natureza graxa nas outras frações. A fração CDLH30-7 foi submetida a uma nova coluna cromatográfica isocrática sob sílica gel 60, utilizando CHCl₃, e eluindo a coluna com AcOEt ao final. Dessa coluna foram recolhidas 49 frações que foram reunidas com base ao perfil cromatográfico das mesmas obtido por CCDC (Tabela 4). A fração CDLH30-7-9 era constituída de uma substância

cristalina rosa (1,5 mg). Purificação da fração CDLH30-7-13 através de CC em sílica gel 60 impregnada de AgNO₃, usando sistema isocrático em CHCl₃, forneceu a substância cristalina rosa (1,1 mg), bem como lupeol (**DL2**) que foi reunido a CDLH30-7-26. A fração CDLH30-7-26 era constituída de lupeol (38,9 mg) puro. Análise das demais frações por RMN indicou serem todas constituídas de substâncias de caráter graxo.

Tabela 4 – Frações obtidas da CC de CDLH30-7

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema
CDLH30-7-9	3-9	1,5	CHCl ₃
CDLH30-7-13	10-13	29,5	CHCl ₃
CDLH30-7-26	14-26	38,9	CHCl ₃
CDLH30-7-41	27-41	7,3	CHCl ₃
CDLH30-7-45	42-45	1,1	CHCl ₃
CDLH30-7-49	46-49	3,5	AcOEt

3.4.3 Estudo de fração CDLH31

A fração CDLH31 (116,3 mg) foi submetida a CC sob sílica gel 60 usando hexano/AcOEt em grau crescente de polaridade, coletando-se 25 frações. Porém, análise em CCDC possibilitou reunir em 6 novas frações (Tabela 5).

Tabela 5 – Frações obtidas da CC de CDLH31

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema Hex/AcOEt
CDLH31-2	1-2	3,3	8:2
CDLH31-3	3	21,2	8:2
CDLH31-4	4	28,4	8:2
CDLH31-6	5-6	24,2	8:2
CDLH31-9	7-9	17,4	8:2
CDLH31-14	10-14	12,6	8:2

A fração CDLH31-2 foi desprezada devido a sua pequena massa e por não ter revelado em reagente de Liberman-Burchard. A fração CDLH31-3 era constituída de lupeol. As demais frações eram constituídas de lupeol, ácido acetil oleanólico (**DL3**) e graxa.

3.4.4 Estudo da fração CDLH35

A fração CDLH35 (284,1 mg) foi submetida a fracionamento por CC em sílica gel 60 eluindo com CHCl_3 e recolhidas 59 frações de 10 mL reunidas posteriormente em 6 novas subfrações através da análise destas em CCDC utilizando sistemas CHCl_3 e $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e revelador químico de Liebermann-Burchard (Tabela 6).

Tabela 6 – Frações obtidas da CC de CDLH35

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema
CDLH35-17	1-17	17,9	CHCl_3
CDLH35-21	18-21	6,2	CHCl_3
CDLH35-28	22-28	11,1	CHCl_3
CDLH35-38	29-38	15,1	CHCl_3
CDLH35-55	39-55	70,9	CHCl_3
CDLH35-59	56-59	195,6	AcOEt

A fração CDLH35-17 também era constituída de lupeol. Na fração CDLH35-21 foi detectada por CCDC mistura de lupeol e de duas outras substâncias, **b**-sitosterol (**DL4**) e estigmasterol (**DL5**). Em CDLH28 e CDLH38 foi detectada por CCDC e RMN ¹³C mistura de **b**-sitosterol e estigmasterol em diferentes proporções. CDLH35-55 era constituída do ácido acetil oleanólico em mistura com substâncias de carácter graxo, e finalmente em CDLH35-59 foi detectada por RMN ¹H grande quantidade de material graxo e outras impurezas, juntamente com ácido acetil oleanólico.

3.4.5 Estudo da fração CDLH46

A fração CDLH46 (318,8 mg) apresentava cristais muito bem definidos. Devido à esse fato e a sua grande massa ela foi submetida a recristalização em MeOH. Assim foi obtida mistura de 100 mg de cristais de **b**-sitosterol e estigmasterol que por serem bastante conhecidos foram identificados em mistura (p.79).

3.4.6 Estudo das frações CDLH23, CDLH24 e CDLH25

As frações CDLH23 (38,5 mg), CDLH24 (10,9 mg) e CDLH25 (18,9 mg) foram comparadas com as substâncias anteriormente isoladas através de CCDC eluída com Hex/AcOEt 9:1. Assim demonstraram conter as substâncias já isoladas lupenona (**DL1**) e lupeol (**DL2**).

3.4.7 Estudo das frações CDLH56, CDLH61, CDLH74 e CDLH84

As frações CDLH56 (89,8 mg), CDLH61 (62,5 mg), CDLH74 (284,7 mg) e CDLH84 (164,8 mg) não foram submetidas a purificação pois os espectros de RMN de ¹H bem como as CCDC em hexano/AcOEt 1:1, hexano/AcOEt 7:3 e CHCl₃/AcOEt 8:2 reveladas com UV e reagentes específicos (Liebermann-Burchard e Vanilina/H₂SO₄) indicaram que as mesmas eram constituídas de material graxo.

3.4.8 Estudo da fração CDLH101

A fração CDLH101 (219,6 mg) foi submetida a fracionamento através de CC em sílica gel 60 utilizando o sistema hexano/acetona em grau crescente de polaridade. Dessa forma foram recolhidas 72 frações que foram reunidas em 12 novas frações por CCDC com esse mesmo sistema (Tabela 7).

As frações CDLH101-8 a CDLH101-16 foram analisadas por RMN ¹H permitindo observar que eram constituídas de material graxo. A fração CDLH101-22 demonstrou também, por RMN ¹H, tratar-se de mistura de material graxo e ftalato. Este último sendo um contaminante presente no hexano utilizado. As frações CDLH101-17, CDLH101-27 e CDLH101-51 não foram trabalhadas devido à sua pequena massa. As frações CDLH101-47, CDLH101-69 a CDLH101-72 foram desprezadas pois tratavam-se de material graxo. A fração CDLH101-60 revelou com reagente de Liebermann-Burchard, tendo sido posteriormente submetida a permeação em coluna de gel de Sephadex LH-20 (Tabela 8).

Tabela 7 – Frações obtidas da CC de CDLH101

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema Hex/Acetona
CDLH101-8	1-8	2,4	8:2
CDLH101-14	9-14	27,4	8:2
CDLH101-16	15-16	3,5	8:2
CDLH101-17	17	2,0	8:2
CDLH101-22	18-22	14,0	8:2
CDLH101-27	23-27	8,6	8:2
CDLH101-47	28-47	27,7	8:2
CDLH101-51	48-51	10,1	7:3
CDLH101-60	52-60	26,1	6:4
CDLH101-69	61-69		1:1
CDLH101-70	70		Acetona
CDLH101-72	71-72		MeOH

Tabela 8 – Frações obtidas por CE em gel de Sephadex LH-20 de CDLH101-60

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema MeOH: CHCl ₃
CDLH101-60-11	1-11	0,8	9:1
CDLH101-60-12	12	0,4	9:1
CDLH101-60-17	13-17	0,5	9:1
CDLH101-60-44	18-44	3,3	9:1
CDLH101-60-95	45-95	7,6	9:1
CDLH101-60-126	96-126	9,3	9:1
CDLH101-60-167	127-167	7,8	9:1

Análise de RMN da fração CDLH101-60-126 indicou tratar-se de uma única substância com material graxo, entretanto, devido a grande quantidade de graxa na mistura, foi impossível a determinação da sua estrutura.

Desta maneira do extrato hexânico do caule foram isolados 26,2 mg de lupenona (**DL1**), 78,1 mg de lupeol (**DL2**), 112,5 mg do ácido acetil oleanólico (**DL3**) e 126,2 mg da mistura de *b*-sitosterol (**DL4**) e estigmasterol (**DL5**).

3.5 Purificação do extrato clorofórmico do caule

O extrato clorofórmico do caule (2,14 g) foi submetido a CC sob sílica gel 60 com sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$. Foram obtidas 88 frações de 50 mL, que posteriormente foram reunidas através dos cromatogramas obtidos por CCDC e revelados com luz UV e revelador químico de Liebermann-Burchard. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Frações obtidas da CC principal do extrato clorofórmico do caule

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$	Substâncias Isoladas
CDLC4	1-4	7,8	1:0	DL6 e DL7
CDLC8	5-8	9,1	1:0	DL6 e DL7
CDLC10	9-10	3,7	1:0	-
CDLC22	11-22	19,7	1:0	-
CDLC25	23-25	8,7	95:5	-
CDLC27	26-27	6,6	95:5	-
CDLC33	28-33	27,5	95:5	DL8
CDLC37	34-37	34,9	9:1	DL9
CDLC40	38-40	24,0	9:1	DL10
CDLC45	41-45	100,7	8:2	-
CDLC51	46-51	189,5	7:3	DL11, DL12 e DL13
CDLC59	52-59	72,8	7:3	-
CDLC88	60-88	146,7	6:4, 1:1, 4:6 e Acetato	DL14

3.5.1 Estudo das frações CDLC4 e CDLC8

As frações CDLC4 (7,8 mg) e CDLC8 (9,1 mg) embora apresentassem massa pequena chamaram a atenção devido ao seu odor adocicado. CCDC usando $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 9:1 e revelação das cromatoplasas com UV e reagente químico de Liebermann-Burchard, demonstrou que CDLC4 apresentava 2 substâncias, enquanto CDLC8 era formada por 3 substâncias. Desta forma, foram submetidas separadamente a CCDP em placas de sílica gel de alta resolução utilizando o sistema anteriormente descrito (Tabela 10).

Tabela 10 – Frações obtidas por CCDP de CDLC4 e CDLC8

Código	Massa (mg)
CDLC4A	3,3
CDLC4B	2,3
CDLC8A	3,0
CDLC8B	3,2
CDLC8C	1,7
CDLC8D	3,3

Devido à pequena massa obtida não foi possível obter espectro de RMN ^{13}C das substâncias. Essas foram identificadas por RMN ^1H e EM. Em CDLC4 não foi possível obter separação razoável. As frações CDLC8A e CDLC8B eram constituídas de substâncias puras e foram identificadas como vanilina (**DL6**) e o vanilato de metila (**DL7**). As frações CDLC8C e CDLC8D apresentavam apenas substâncias de caráter graxo.

3.5.2 Estudo da Fração CDLC33

A fração CDLC33 (27,5 mg) foi submetida a CCDP em sílica gel 60 F₂₅₄ utilizando-se o sistema CHCl₃/MeOH 95:5, eluindo-a por duas vezes consecutivas (Tabela 11).

Tabela 11 – Frações obtidas por CCDP de CDLC33

Código	Massa (mg)
CDLC33A	10,1
CDLC33B	3,6
CDLC33C	4,4
CDLC33D	3,4

A fração CDLC33A foi então submetida à permeação em Sephadex LH-20 utilizando-se CH₂Cl₂/ MeOH 1:2 como sistema eluente. Foram obtidos assim 6,8 mg do ácido betulínico (**DL8**) (Tabela 12).

Tabela 12 – Frações obtidas por CE de CDLC33A

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema CH ₂ Cl ₂ /MeOH
CDLC33A-12	1-12	6,8	4:8
CDLC33A-30	13-30	3,3	4:8

3.5.3 Estudo da fração CDLC37

A fração CDLC37 (34,9 mg) foi submetida a CCDP em sílica gel 60 F₂₅₄ usando o sistema CHCl₃/MeOH 95:5 eluindo-se por duas vezes consecutivas. Os resultados foram sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13 – Frações obtidas por CCDP de CDLC37

Código	Massa (mg)
CDLC37A	8,4
CDLC37B	3,2
CDLC37C	4,7
CDLC37D	4,3

A fração CDLC37A foi identificada como sendo o ácido oleanólico (**DL9**). As demais frações foram desprezadas devido a pequena massa e ao fato de apresentarem espectro de RMN ¹H característico de compostos graxos.

3.5.4 Estudo da fração CDLC40

A fração CDLC40 (24,0 mg) foi submetida a CCDP em sílica gel 60 F₂₅₄ utilizando o sistema CHCl₃/MeOH 95:5 eluindo-se por duas vezes consecutivas. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 14.

Tabela 14 – Frações obtidas por CCDP de CDLC37

Código	Massa (mg)
CDLC40A	5,8
CDLC40B	4,2
CDLC40C	4,3

A fração CDLC40 era constituída do oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila (**DL10**) pura. As frações CDLC40B e CDLC40C foram desprezadas por apresentarem pequena massa e sinais característicos de compostos graxos nos espectros de RMN ¹H.

3.5.5 Estudo da fração CDLC51

O espectro de RMN ^1H da fração CDLC51 (189,5 mg) apresentou sinais característicos de compostos aromáticos, e outros característicos de terpenos. CC sob sílica gel 60 em sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ em grau crescente de polaridade forneceu 48 frações, que foram reunidas posteriormente em 7 subfrações através de CCDC reveladas com luz UV e revelador de Liebermann-Burchard (Tabela 15).

Tabela 15 – Frações obtidas por CC de CDLC51

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$
CDLC51-14	1-14	7,8	8:2
CDLC51-20	15-20	10,1	8:2
CDLC51-25	21-25	38,5	8:2
CDLC51-33	26-33	22,2	7:3
CDLC51-41	34-41	7,6	7:3
CDLC51-42	42	1,4	1:1
CDLC51-48	43-48	8,9	Acetato

Estudos das frações reunidas por CCDC usando sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) seguido de revelação das cromatoplasas com Liebermann-Burchard e UV, bem como análise dos espectros de RMN ^1H mostraram que as substâncias de interesse encontravam-se nas frações CDLC51-25 e CDLC51-33. As demais frações continham compostos de natureza graxa. A fração CDLC51-25 (38,5 mg) foi submetida a CE em gel de Sephadex LH-20 para promover a eliminação de parte da graxa. Posteriormente, as frações CDLC51-25 e CDLC51-33 foram submetidas separadamente a CCDP em placas de sílica gel 60 utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 (Tabelas 16 e 17). As frações obtidas em ambos os processos foram comparadas e reunidas por CCDC no mesmo sistema (Tabela 18).

Tabela 16 – Frações obtidas por CCDP de CDLC51-25

Código	Massa (mg)
CDLC51-25A	12,7
CDLC51-25B	6,8
CDLC51-25C	3,6
CDLC51-25D	3,8
CDLC51-25E	2,0
CDLC51-25F	2,1

Tabela 17 – Frações obtidas por CCDP de CDLC51-33

Código	Massa (mg)
CDLC51-33A	9,1
CDLC51-33B	6,9
CDLC51-33C	3,8
CDLC51-33D	3,4
CDLC51-33E	4,2
CDLC51-33F	4,8
CDLC51-33G	4,0

Tabela 18 – Frações reunidas por CCDC de CDLC51-25 e CDLC51-33

Código	Massa (mg)
CDLC51-33A	21,8
CDLC51-33B	13,7
CDLC51-33C	7,4
CDLC51-33D	7,2
CDLC51-33E	6,2
CDLC51-33F	6,9
CDLC51-33G	4,0

A fração CDLC51-25A era constituída do ácido cafeil oleanólico (**DL11**), a fração CDLC51-25B era constituída do ácido ferulil oleanólico (**DL12**) e a fração CDLC51-25D era constituída de **DL13**. Análise por RMN das demais frações indicou que as mesmas eram compostas de substâncias de caráter graxo.

3.5.6 Estudo da fração CDLC88

A fração CDLC88 (146,7 mg) foi submetida a CC sob sílica gel 60 usando como sistema eluente misturas $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em grau crescente de polaridade. Sendo assim, foram coletadas 47 frações, posteriormente reunidas em 7 novas subfrações por CCDC (Tabela 19).

Tabela 19 – Frações obtidas por CC de CDLC88

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$
CDLC88-9	1-9	69,0	95:5
CDLC88-11	10-11	6,9	9:1
CDLC88-13	12-13	10,0	9:1
CDLC88-20	14-20	11,5	9:1
CDLC88-33	21-33	8,9	8:2
CDLC88-42	34-42	-	7:3
CDLC88-47	43-47	-	MeOH

Análise dos dados de RMN demonstrou que as frações CDLC88-9, CDLC88-11 e CDLC88-13 eram constituídas de substâncias de natureza graxa, enquanto CDLC88-20 era constituída da substância **DL14** pura. As outras subfrações tratavam-se de impurezas.

Dessa forma, foram obtidos desse extrato 3,0 mg de vanilina (**DL6**), 3,3 mg do vanilato de metila (**DL7**), 6,8 mg do ácido betulínico (**DL8**), 8,4 mg do ácido oleanólico (**DL9**), 5,8 mg do oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila (**DL10**), 21,8 mg do ácido cafeil oleanólico (**DL11**), 13,7 mg do ácido ferulil oleanólico(**DL12**), 7,2 mg de **DL13** e 11,5 mg de **DL14**.

3.6 Purificação do extrato acetato de etila das folhas

O extrato FDLA (6,9 g) foi submetido a CC sob sílica gel 60 usando como sistema eluente misturas de AcOEt/MeOH em ordem crescente de polaridade, resultando em 144 frações de 10 mL, posteriormente reunidas em 13 frações após análise destas através de CCDC reveladas com Liebermann-Burchard e UV (Tabela 20).

Tabela 20 – Frações obtidas da CC principal do extrato AcOEt das folhas

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema AcOEt/MeOH	Substâncias Isoladas
FDLA6	1-6	184,2	1:0	Não trabalhada
FDLA11	7-11	596,5	1:0	DL15, DL16 e DL17
FDLA15	12-15	236,0	1:0	Não trabalhada
FDLA20	16-20	184,2	1:0	Não trabalhada
FDLA30	21-30	214,4	1:0	Não trabalhada
FDLA54	31-54	91,9	9:1	Não trabalhada
FDLA57	55-57	137,7	9:1	Não trabalhada
FDLA67	58-67	549,2	9:1 e 8:2	DL16, DL18, DL19 e DL20
FDLA78	68-78	535,7	8:2	DL16, DL18 e DL19
FDLA80	79-80	43,6	8:2	Não trabalhada
FDLA102	81-102	180,9	7:3	Não trabalhada
FDLA117	103-117	124,4	1:1	Não trabalhada
FDLA144	118-144	153,5	0:1	Não trabalhada

3.6.1 Estudo da fração FDLA11

A purificação da fração FDLA11 (596,5 mg) foi realizada através de CC em sílica gel 60 utilizando a mistura CHCl_3 /Acetona como eluente em ordem crescente de polaridade. Desta CC foram coletadas 54 frações de 10 mL que foram reunidas em 15 novas subfrações através de CCDC revelada por UV, e em alguns casos por revelador químico de Liebermann-Burchard (Tabela 21).

Tabela 21 – Frações obtidas da CC de FDLA11

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema CHCl_3 /Aceton/MeOH
FDLA11-2	1-2	9,3	7:3:0
FDLA11-4	3-4	30,1	7:3:0
FDLA11-8	5-8	7,5	7:3:0
FDLA11-9	9	59,2	1:1:0
FDLA11-11	10-11	124,7	1:1:0
FDLA11-14	12-14	14,1	1:1:0
FDLA11-16	15-16	62,4	4:6:0
FDLA11-19	17-19	57,4	4:6:0
FDLA11-21	20-21	4,8	0:1:0
FDLA11-24	22-24	43,0	0:1:0
FDLA11-29	25-29	29,6	0:9:1
FDLA11-32	30-32	43,0	0:9:1
FDLA11-36	33-36	21,2	0:8:2
FDLA11-39	37-39	24,8	0:8:2
FDLA11-53	40-53	58,6	0:0:1

Assim, a partir dos espectros de RMN uni e bidimensionais, além de FABMS foi possível observar que FDLA11-9 era composta das substâncias **DL15** e **DL16** e, que as frações FDLA11-16 e FDLA11-24 eram constituídas das substâncias **DL16** e **DL17**, enquanto que a fração FDLA11-11 compreendia a mistura das três substâncias. CE em gel

de Sephadex LH-20 de FDLA11-9 e FDLA11-19 utilizando DCM/MeOH 4:6 como eluente (Tabelas 22 e 23) possibilitou a obtenção das substâncias (-)-*epicatequina* (**DL15**) (22,6 mg) e *epigallocatequina-(2b→7, 4b→8)-epicatequina* (**DL17**) (24,6 mg) puras.

Tabela 22 – Frações obtidas por CE em gel de Sephadex LH-20 de FDLA11-9

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema DCM/MeOH
FDLA11-9-1	1		4:6
FDLA11-9-4	2-4		4:6
FDLA11-9-6	5-6	22,6	4:6

Tabela 23 – Frações obtidas por CE em gel de Sephadex LH-20 de FDLA11-19

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Sistema DCM/MeOH
FDLA11-19-1	1	3,2	4:6
FDLA11-19-4	2-4	9,5	4:6
FDLA11-19-6	5-6	24,6	4:6

3.6.2 Estudo da fração FDLA67

A fração FDLA67 (549,2 mg), por ser bastante polar, foi submetida a CC sob poliamida 6, usando como sistema eluente misturas H₂O/MeOH em grau decrescente de polaridade (Tabela 24). As frações foram recolhidas por polaridade (100 mL cada). O MeOH foi eliminado em evaporador rotatório, seguido de extrações com AcOEt. Assim foram obtidas 6 frações.

Tabela 24 – Frações obtidas da CC em poliamida de FDLA67

Código	Massa (mg)	Sistema H ₂ O/MeOH
FDLA67-1	87,1	6:4
FDLA67-2	133,5	6:4
FDLA67-3	22,7	1:1
FDLA67-4	9,4	4:6
FDLA67-5	8,2	3:7
FDLA67-6	8,1	2:8

A análise das frações foi realizada através dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C. A fração FDLA67-3 era constituída da 3'-**b**-D-glicopiranosídeo luteolina (**DL18**) pura. A fração FDLA67-2 demonstrou ser mistura de substâncias e foi submetida a CE em coluna de gel de Sephadex LH-20 usando como eluente CHCl₃/MeOH 1:4, tendo sido recolhidas 7 frações (Tabela 25). A fração FDLA67-1 mistura das substâncias **DL19** e **DL16**, foi redissolvida em MeOH a fase solúvel manteve a mistura, mas a fase insolúvel era constituída do 7-**b**-D-glicopiranosídeo crisoeriol (**DL19**) na forma pura.

Tabela 25 – Frações obtidas por CE em sephadex LH-20 de FDLA67-2

Código	Massa (mg)	Sistema CHCl ₃ /MeOH
FDLA67-2-1	-	2:8
FDLA67-2-2	8,4	2:8
FDLA67-2-3	31,6	2:8
FDLA67-2-4	79,0	2:8
FDLA67-2-5	5,2	2:8
FDLA67-2-6	-	2:8
FDLA67-2-7	-	2:8

Nas frações obtidas da coluna de Sephadex obteve-se o seguinte resultado: as frações FDLA67-2-1, FDLA67-2-6 e FDLA67-2-7 foram desprezadas devido a pequena massa. FDLA67-2-2 era constituída do 7-**b**-D-glicopiranosídeo crisoeriol (**DL19**). A fração FDLA67-2-3 era constituída de 7-**b**-D-glicopiranosídeo crisoeriol (**DL19**) e **DL16**, a fração FDLA67-2-4 era também constituída de 7-**b**-D-glicopiranosídeo crisoeriol (**DL19**) e 3'-**b**-D-glicopiranosídeo luteolina (**DL18**) e a fração FDLA60-2-5 era constituída de 3'-**b**-D-glicopiranosídeo luteolina (**DL18**) pura.

3.6.3 Estudo da fração FDLA78

A fração FDLA78 (535,7 mg) foi submetida a CC em poliamida 6 sistema H₂O/MeOH em grau decrescente de polaridade, utilizando 200 mL de cada mistura de solventes e coletando tudo em balões de 500 mL. O metanol foi eliminado em evaporador rotatório, e a fase aquosa restante extraída 3 vezes com porções de 100 mL de AcOEt (Tabela 26).

Tabela 26 – Frações obtidas por CC em poliamida 6 de FDLA78

Código	Massa (mg)	Sistema H ₂ O/MeOH
FDLA78-1	54,7	1:0
FDLA78-2	32,1	9:1
FDLA78-3	23,3	8:2
FDLA78-4	54,6	7:3
FDLA78-5	101,2	6:4
FDLA78-6	79,1	1:1
FDLA78-7	49,2	4:6

As frações FDLA78-7 e FDLA78-6 eram formadas por 3'-**b**-D-glicopiranosídeo luteolina (**DL18**) pura, e foram reunidas com o nome FDLA78-6 (128,3 mg). Análise por CCDC das frações FDLA78-4 e FDLA78-5 com as substâncias isoladas em sistema eluente AcOEt/MeOH 8:2 mostrou a presença de **DL18** e **DL19**. A fração FDLA78-3 e FDLA78-2

por comparação apresentavam-se idênticas e com a presença de duas substâncias. Foram então reunidas com o nome FDLA78-2 (55,4mg) e submetidas a CCDP em sílica gel 60 mesmo sistema, onde foram recolhidas 4 frações (Tabela 27).

Tabela 27 – Frações obtidas por CCDP de FDLA78-2

Código	Massa (mg)
FDLA78-2A	3,3
FDLA78-2B	13,9
FDLA78-2C	19,8
FDLA78-2D	16,6

A fração FDLA78-2C era constituída de 2-metil-2,4-pentanodiol (**DL16**) enquanto que FDLA78-2D era constituída da mesma substância em conjunto com substâncias de natureza graxa. As frações FDLA78-2A e FDLA78-2B não foram analisadas.

Assim, deste extrato foram obtidos 22,6 mg da (-)-*epicatequina* (**DL15**), 19,8 mg do 2-metil-2,4-pentanodiol (**DL6**), 24,6 mg da *epigallocatequina*-(2**b**→7, 4**b**→8)-*epicatequina* (**DL17**), 156,2 mg da 3'-**b**-D-glicopiranosídeo luteolina (**DL18**) e 8,4 mg do 7-**b**-D-glicopiranosídeo crisoeriol (**DL19**).

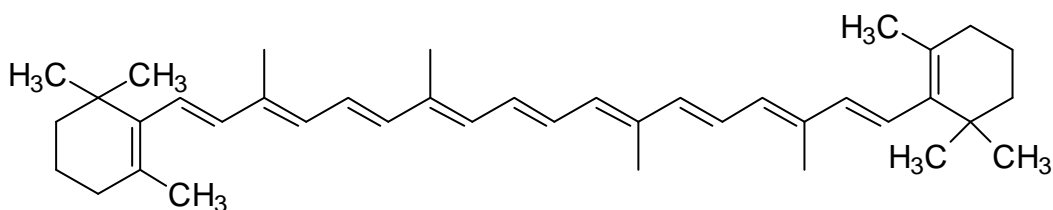
3.7. Metodologia dos testes

3.7.1 Teste de atividade microbiológica

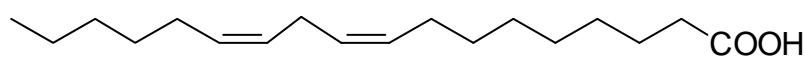
Para avaliação antimicrobiana foi utilizada a metodologia da ação de esterases na hidrólise do acetato de fluoresceína (Método FDA) desenvolvido por Chand *et al.* (Chand, 1994). Foram testados os seguintes microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

3.7.2 Teste de atividade anti-oxidante

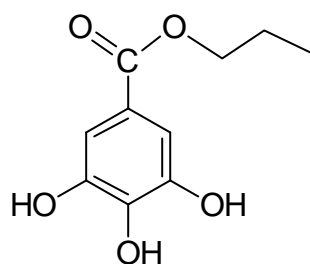
O teste de atividade anti-oxidante das substâncias isoladas foi desenvolvido avaliando-se a inibição da reação de auto-oxidação do **b**-caroteno (**9**). A reação de auto-oxidação foi provocada pela adição de um agente oxidante, o ácido linoléico (**10**), e acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda_{\text{max.}} = 470$ nm. A atividade foi comparada com um anti-oxidante conhecido. Entre os anti-oxidantes que podem ser utilizados como referência estão o propilgalato (**11**), o ácido tio-barbitúrico (BHT) (**12**) ou o **a**-tocoferol (**13**). Nesse trabalho a atividade obtida foi comparada com o **a**-tocoferol e o propilgalato. A metodologia discutida a seguir foi adaptada daquela descrita por Hidalgo *et al.* (Hidalgo, 1994)



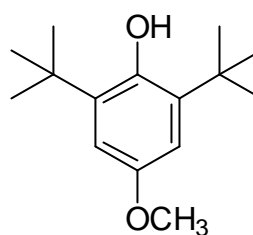
9



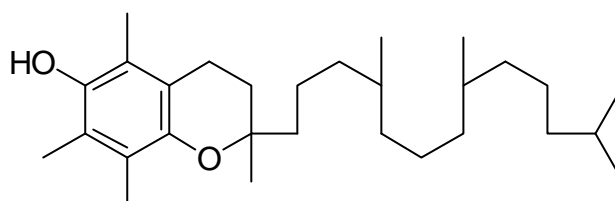
10



11



12



13

Metodologia:

1) Preparação do meio oxidante do ***β***-caroteno

Tomou-se 2 mg do ***β***-caroteno cristalino e dissolveu-se em 10 mL de CHCl_3 (0,2 mg/mL). Adicionou-se uma alíquota de 1 mL dessa solução a 20 mg de ácido linoléico purificado e 200 mg de emulsificador Tween 40 em balão com boca de vidro esmerilhado. O CHCl_3 foi então removido em evaporador rotatório, e então adicionados 50 mL de água destilada sob agitação rigorosa.

2) Preparação da solução de anti-oxidante

Foram preparadas soluções de 1 mg/mL em EtOH tanto dos anti-oxidantes conhecidos quanto as substâncias puras a serem testadas.

3) Procedimento

Uma alíquota de 5 mL do meio oxidante foi adicionada a cada tubo de espectrofotômetro contendo 0,2 mL do padrão ou da amostra a ser testada. Os tubos foram fechados, foi feita uma leitura de cada e foram colocados em banho de H₂O a 50°C . As leituras foram realizadas a 470 nm de 10 em 10 min até completar-se 1h.

4) Branco

O branco foi preparado com 5 mL da solução oxidante e 0,2 mL de EtOH 99,5% e tratado da mesma maneira que as amostras. O branco do aparelho foi o próprio etanol.

5) Cálculo da Atividade Antioxidante (AA)

A AA foi avaliada pelo efeito do aditivo em relação ao branco seguindo a fórmula abaixo.

$$AA = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

A_0 = Absorbância inicial da amostra

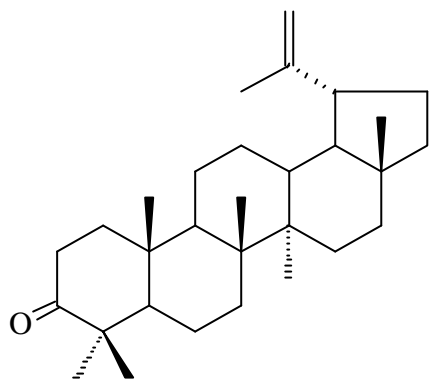
A_t = Absorbância final da amostra

A_0^0 = Absorbância inicial do branco

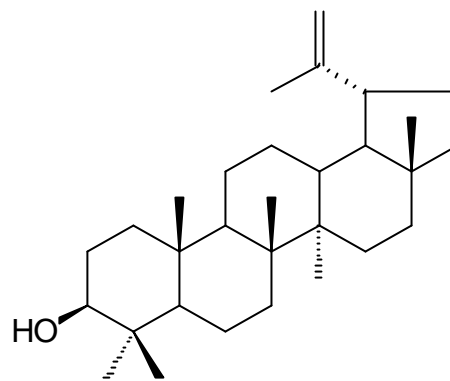
A_t^0 = Absorbância final do branco

4. Substâncias Isoladas de *Dioclea lasiophylla*

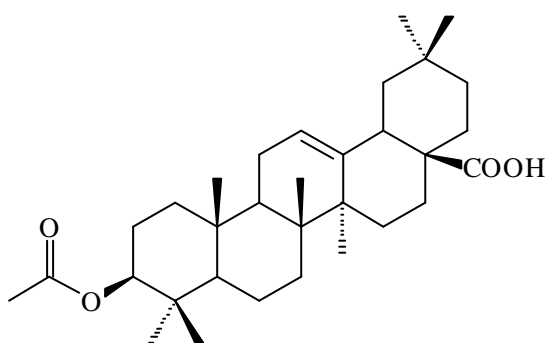
4.1. Extrato hexânico



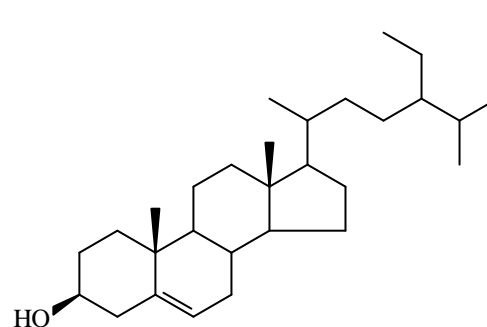
Lupenona (**DL1**)



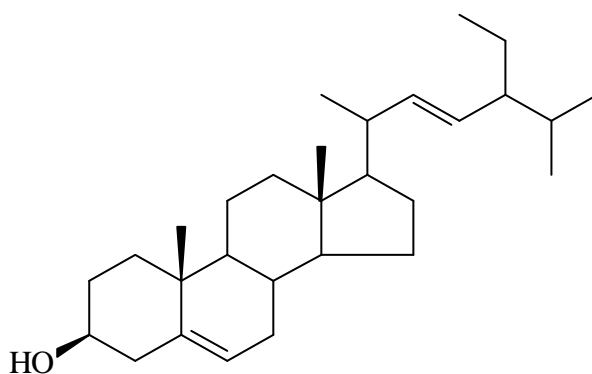
Lupeol (**DL2**)



Ácido acetil oleanólico (**DL3**)

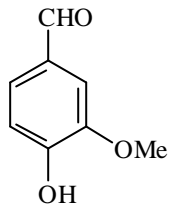


b-Sitosterol (**DL4**)

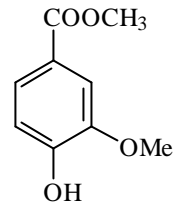


Estigmasterol (**DL5**)

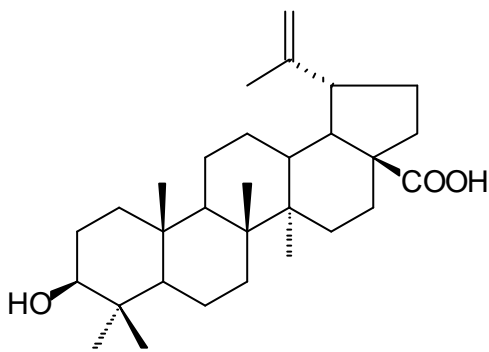
4.2. Extrato clorofórmico



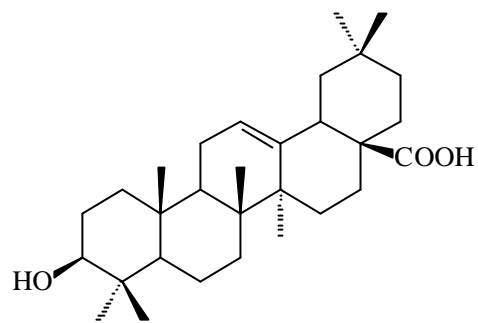
Vanilina (**DL6**)



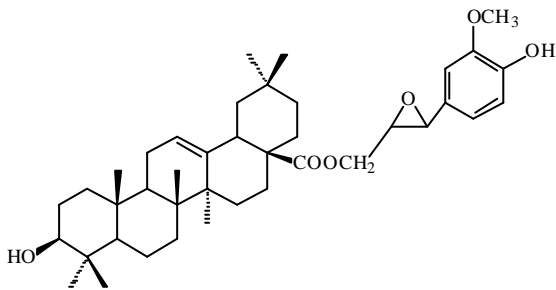
Vanilato de metila (**DL7**)



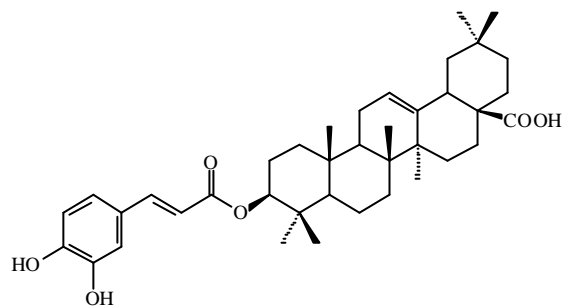
Ácido betulínico (**DL8**)



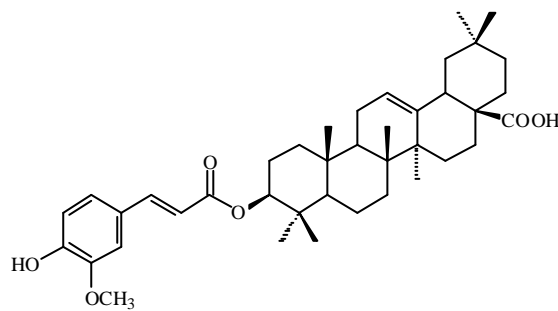
Ácido oleanólico (**DL9**)



Oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila (**DL10**)

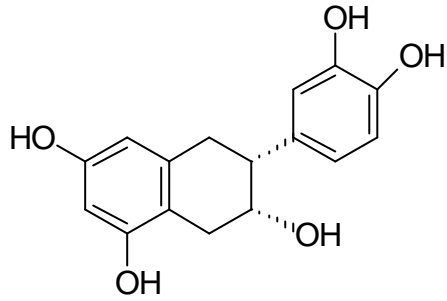


Ácido cafeil oleanólico (**DL11**)

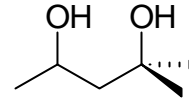


Ácido ferulil oleanólico (**DL12**)

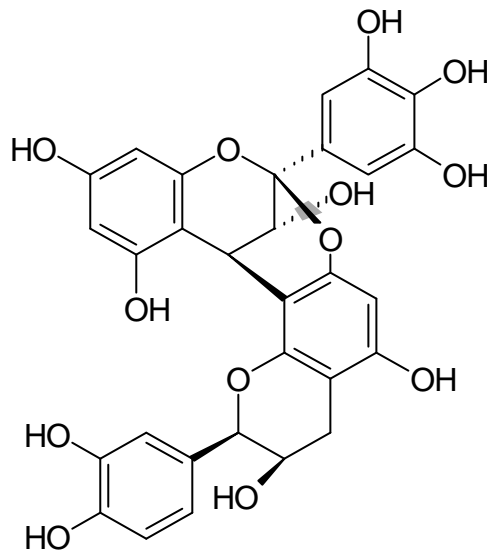
4.3. Extrato acetato de etila



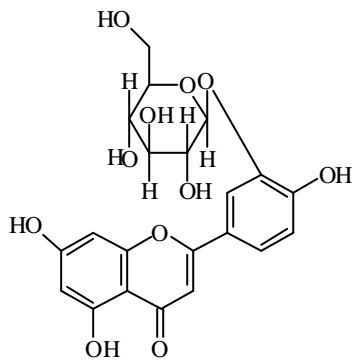
(-)-Epicatequina (**DL15**)



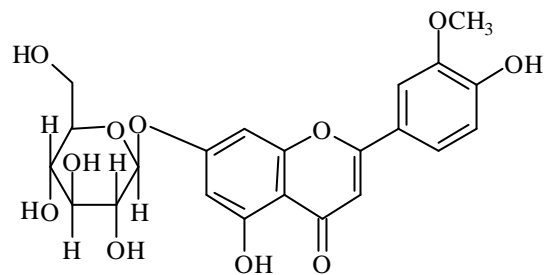
2-Metil-2,4-pentanodiol (**DL16**)



Epigallocatequina-(2**b**→7,4**b**→8)-epicatequina (**DL17**)



3'-**bD**-glicopiranosídeo Luteolina (**DL18**)



7-**bD**-glicopiranosídeo Crisoeriol (**DL19**)

5. Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas

DL1 – Lupenona ou Lupeona

20(29)-Lupen-3-ona

Cristais brancos, PF= 115-117°C, C₃₀H₄₈O, MM= 424

RMN ¹H: δ 4,69 (*d*, J=2,1, 1H), δ 4,57 (*d*, J=2,1, 1H), δ 1,68 (*s*, 3H), δ 1,07 (*s*, 6H), δ 1,02 (*s*, 3H), δ 0,95 (*s*, 3H), δ 0,93 (*s*, 3H), δ 0,79 (*s*, 3H)

RMN ¹³C: Tabela 28, p. 52

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa): [M]⁺ 424 (28), 410 (5), 313 (29), 245 (27), 233 (5,7), 232 (17), 219 (15), 218 (34), 217 (15), 206 (30), 205 (100), 204 (30), 203 (34), 191 (17), 190 (12), 189 (40), 175 (21), 161 (22), 149 (27), 135 (26), 123 (27), 109 (36)

DL2 – Lupeol

20(29)-Lupen-3**b**ol

Cristais brancos, PF= 134-136°C, C₃₀H₅₀O, MM= 426

RMN ¹H: δ 4,69 (*d*, J=2,1, 1H), δ 4,57 (*d*, J=2,1, 1H); δ 3,20 (*dd*, 1H), δ 1,68 (*s*, 3H), δ 1,03 (*s*, 3H), δ 0,97 (*s*, 3H), δ 0,95 (*s*, 3H), δ 0,83 (*s*, 3H), δ 0,79 (*s*, 3H), δ 0,76 (*s*, 3H)

RMN ¹³C: Tabela 28, p. 52

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa): [M]⁺ 426 (33), 411 (15), 315 (17), 257 (15), 234 (18), 218 (95), 207 (92), 203 (63), 189 (100), 175 (38), 161 (37), 147 (38), 135 (64), 121 (50), 109 (46)

DL3 – Ácido acetil oleanólico

Ácido 3-**b**acetil-12-oleanen-28-óico

Cristais brancos, PF= 186-188 °C, C₃₂H₅₀O₄, MM= 498

RMN ¹H: δ 5,27 (*t*, J= 3,2, 1H), δ 4,5 (*t*, J= 7,8, 1H), δ 2,82 (*dd*, J= 3,96 e 12,75, 1H), δ 2,06 (*s*, 3H), δ 1,13 (*s*, 3H), δ 0,94 (*s*, 3H), δ 0,93 (*s*, 3H), δ 0,91 (*s*, 3H), δ 0,87 (*s*, 3H), δ 0,86 (*s*, 3H), δ 0,76 (*s*, 3H)

RMN ^{13}C : Tabela 29, p. 78

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[\text{M}]^+$ 498 (8), 442 (14), 396 (19), 368 (24), 248 (100), 203 (91), 189 (38), 175 (20)

IV $\nu^{\text{KBr}}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 2930, 1733, 1694, 1464, 1366, 1028, 1248, 758

DL4 - *b*-Sitosterol

Estigmast-5-en-3-*b*-ol

Cristais brancos, $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, MM= 414

RMN ^{13}C : Tabela 30, p.81

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[\text{M}]^+$ 414 (100)

DL5 – Estigmasterol

Estigmast-5, 22-dien-3-*b*-ol

Cristais brancos, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$, MM= 412

RMN ^{13}C : Tabela 30, p. 81

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[\text{M}]^+$ 412 (48)

DL6 – Vanilina ou vanilaldeído ou aldeído vanílico

4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído

Sólido amorfo de odor adocicado agradável, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, MM= 152

RMN ^1H : δ 9,84 (*s*, 1H), δ 7,44 (*dd*, $J= 8,55$ e $1,77$, 1H), δ 7,42 (*d*, $J= 1,77$, 1H), δ 7,05 (*d*, $J= 8,55$, 1H), δ 6,20 (*s*, 1H), δ 3,98 (*s*, 3H)

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[\text{M}]^+$ 152 (86), 151 (100), 137 (4), 123 (16), 109 (27), 81 (34)

DL7 – Vanilato de metila

4-Hidroxi-3-metoxibenzoato de metila

Sólido amorfo de odor agradável, $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$, MM= 182

RMN ^1H : δ 7,64 (*dd*, $J= 8,31$ e $1,83$, 1H), δ 7,56 (*d*, $J= 1,83$, 1H), δ 6,95 (*d*, $J= 8,31$, 1H), δ 6,00 (*s*, 1H), δ 3,96 (*s*, 3H), δ 3,89 (*s*, 3H)

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M]^+$ 182 (44), 167 (7), 151 (100), 139 (4), 123 (17), 108 (11), 80 (6)

DL8 – Ácido betulínico

Ácido 3-**b**-Hidroxi-20(29)-lupen-28-óico

Sólido amorfo, $C_{30}H_{48}O_3$, MM= 456

RMN 1H : δ 4,74 (1H), δ 4,61 (1H), δ 3,20 (*dd*, 1H), δ 1,69 (*s*, 3H), δ 0,97 (*s*, 3H), δ 0,95 (*s*, 3H), δ 0,88 (*s*, 3H), δ 0,82 (*s*, 3H), δ 0,76 (*s*, 3H)

RMN ^{13}C : Tabela 28, p. 52

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M]^+$ 456 (13), 248 (44), 219 (20), 207 (50), 203 (38), 190 (38), 189 (100), 175 (39), 135 (44), 119 (42), 107 (43)

DL9 – Ácido oleanólico

Ácido 3-**b**-Hidroxi-12-oleanen-28-óico

Sólido amorfo branco, $C_{30}H_{48}O_3$, MM= 456

RMN 1H : δ 5,28 (*t*, 1H), δ 3,22 (*t*, $J= 5,2$, 1H), δ 2,82 (*dd*, $J= 4,23$ e $13,89$, 1H), δ 1,14 (*s*, 3H), δ 0,98 (*s*, 3H), δ 0,93 (*s*, 3H), δ 0,91 (*s*, 3H), δ 0,90 (*s*, 3H), δ 0,78 (*s*, 3H), δ 0,76 (*s*, 3H)

RMN ^{13}C : Tabela 29, p. 78

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[M]^+$ 456 (2), 300 (2), 249 (22), 248 (100), 207 (25), 203 (71), 189 (16), 133 (21)

DL10- Oleanolato de 7', 8'-epoxiconiferila

3-**b**hidroxi-12-oleanen-28-ato de 4'-hidroxi-3'-metoxi -7',8'epoxicinamoila

Sólido amorfo branco, $C_{40}H_{58}O_6$, MM= 634

RMN 1H : δ 6,88 (*d*, $J=2,01$, 1H), δ 6,86 (*d*, $J= 8,14$, 1H), δ 6,80 (*dd*, $J=2,01$ e $8,14$, 1H), δ 5,26 (*t*, $J= 3,72$, 1H), δ 4,71 (*d*, $J= 4,32$, 1H), δ 4,23 (*dd*, $J= 9,1$ e $4,32$, 1H), δ 3,89 (*s*, 3H), δ 3,86 (*dd*, $J= 9,1$, 2H), δ 3,2 (*dd*, $J= 11,4$,

1H), δ 3,08 (*s* largo, 1H), δ 1,13 (*s*, 3H), δ 0,96 (*s*, 3H), δ 0,91 (*s*, 3H), δ 0,88 (*s*, 3H), δ 0,84 (*s*, 3H), δ 0,79 (*s*, 3H), δ 0,72 (*s*, 3H)

RMN ^{13}C : Tabela 29, p. 78

HMBC: Figura 27, p. 67

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa): 512 (7), 456 (8), 426 (1), 303 (17), 262 (25), 257 (15), 248 (100), 208 (13), 207 (48), 203 (89), 189 (39), 175 (32), 133 (43), 119 (31), 105 (28)

DL11 – Ácido cafeil oleanólico

Ácido 3-**b**(3,4-dihidroxicinamoil)-12-oleanen-28-óico

Sólido amorfo, $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_6$, MM= 618

RMN ^1H : δ 7,53 (*d*, J=15,78, 1H), δ 6,25 (*d*, J= 15,78, 1H), δ 7,04 (*d*, J= 1,89, 1H), δ 6,94 (*dd*, J= 1,89 e 8,28, 1H), δ 6,78 (*d*, J= 8,28, 1H), δ 5,25 (*t*, J= 3,30, 1H), δ 4,56 (*dd*, J= 11,5 e 4,9, 1H), δ 2,85 (*dd*, J= 11,76, 1H), δ 1,28 (*s*, 3H), δ 1,18 (*s*, 3H), δ 1,00 (*s*, 3H), δ 0,96 (*s*, 3H), δ 0,94 (*s*, 3H), δ 0,91 (*s*, 3H), δ 0,83 (*s*, 3H)

RMN ^{13}C : Tabela 29, p. 78

HETCOR ^1H - ^{13}C J=9Hz: Figuras 32 e 33, p. 73

EMIE (70 eV) *m/z* (intensidade relativa): 279 (9), 167 (22), 149 (95), 111 (29), 97 (44), 83 (47), 71 (65), 57 (100)

EMIE (10 eV) *m/z* (intensidade relativa): 574 (4), 438 (14), 423 (3), 495 (15), 494 (14), 392 (4), 371 (3), 369 (4), 351 (10), 248 (100), 204 (17), 191 (47), 190 (47), 180 (18), 163 (33), 136 (11)

DL12 – Ácido ferulil oleanólico

Ácido 3-**b**(3-metoxi,4-hidroxicinamoil)-12-oleanen-28-óico

Sólido amorfo, $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_6$, MM= 632

RMN ^1H : δ 7,54 (*d*, J=15,81, 1H), δ 6,30 (*d*, J= 15,81, 1H), δ 7,17 (*d*, J= 1,95, 1H), δ 7,03 (*dd*, J= 1,95 e 8,19, 1H), δ 6,87 (*d*, J= 8,19, 1H), δ 5,25 (*t*, J= 3,30, 1H), δ 4,58 (*dd*, J= 10,7 e 5,1, 1H), δ 3,91 (*s*, 3H), δ 1,20 (*s*, 3H), δ

1,00 (s, 3H), δ 0,96 (s, 3H), δ 0,94 (s, 3H), δ 0,92 (s, 3H), δ 0,90 (s, 3H), δ 0,83 (s, 3H)

RMN ^{13}C : Tabela 29, p. 78

DL15 – (-)-*Epicatequina*

3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavana

Cristais amarelos, PF= 242-245 °C, $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, MM= 290

RMN 1 : Tabela 31, p. 91

RMN ^{13}C : Tabela 31, p. 91

HOMOCOSY ^1H - ^1H : Tabela 31, p. 91

HETCOR ^1H - ^{13}C : Tabela 31, p.91

HETCOR ^1H - ^{13}C J= 9 Hz: Tabela 31, p. 91

HETCOR ^1H - ^{13}C J= 11 Hz: Tabela 31, p. 91

FAB positivo m/z (intensidade relativa): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 291 (100), 287 (33), 207 (31), 152 (24), 139 (91), 123 (31), 115 (71)

EMIE (10 eV) m/z (intensidade relativa): $[\text{M}]^+$ 290 (100), 285 (20), 272 (8), 167 (1), 152 (13), 139 (39), 124 (24)

$[\alpha]_{\text{D}} = -16^\circ$

DL16 – 2-metil-2,4-pentanodiol

Líquido amarelado, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$, MM= 118

RMN ^1H (300 MHz; CD_3OD): H1 δ 1,26 (s, 3H), H3a δ 1,60 (dd, J= 14,46 e 9,03, 1H), H3b δ 1,52 (dd, J= 14,46 e 3,48, 1H), H4 δ 4,10 (m, 1H), H5 δ 1,16 (d, J= 6,27, 3H), H6 δ 1,21 (s, 3H)

RMN ^{13}C (75 MHz; CD_3OD): C1 δ 30,73 (CH_3), C2 δ 71,93 (C), C3 δ 51,03 (CH_2), C4 δ 66,37 (CH), C5 δ 24,79 (CH_3), C6 δ 28,81 (CH_3)

DL17 – *Epigallocatequina-(2b→7, 4b→8)-epicatequina*

Cristais marrons, PF= 223-225 °C, $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$, MM= 592

RMN ^1H : Tabela 33, p. 115

RMN ^{13}C : Tabela 33, p. 115

HOMOCOSY ^1H - ^1H : Figura 77, p. 116

HETCOR H^1 - ^{13}C : Tabela 33, p. 115

HETCOR H^1 - ^{13}C J= 9Hz: Tabela 33, p. 115, Figura 77, p. 116

HETCOR H^1 - ^{13}C J= 11Hz: Tabela 33, p. 115, Figura 77, p. 116

“nOe diff”: Figura 77, p. 116

FAB positivo m/z (intensidade relativa): [M+H] 593 (5), 441 (4), 303 (10), 287 (8), 277 (8), 207 (31), 149 (9), 115 (100)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 210 (5,16), 225 (5,10), 277 (3,98)

DC: $[\Phi]_{211} -79573$, $[\Phi]_{227} +119573$

Análise Elementar: C, 54,1%; H, 5,0%. $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{13} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ requer C, 54,2%; H, 4,8%

DL18 –3'-**b**D-glicopiranosídeo Luteolina

4',5,7-trihidroxi-3'-O-**b**D-glicopiranosídeo-flavona

Cristais amarelos, PF= 203-205 °C, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$, MM=448

RMN ^1H : Tabela 32, p. 98

RMN ^{13}C : Tabela 32, p. 98

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): 394 (2), 342 (3), 311 (2), 300 (3), 286 (100), 269 (6), 258 (13), 229 (9), 153 (17)

EMIE (10 eV) m/z (intensidade relativa): 446 (3), 430 (17), 412 (16), 359 (4), 290 (6), 84 (100), 66 (25)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 272, 278, 389

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ nm: 280, 295, 346, 385

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$ nm: 280, 295, 346, 385

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$ nm: 275, 330, 396

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{NaOAc}}$ nm: 279, 326, 395

DL19 –7-**b**D-glicopiranosídeo Crisoeriol

4',5-dihidroxi-3' metoxi-7-O-**b**D-glicopiranosídeo-flavona

Cristais amarelos, PF= 171-173 °C, $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, MM= 462

RMN ^1H : Tabela 32, p. 98

RMN ^{13}C : Tabela 32, p. 98

EMIE (70 eV) m/z (intensidade relativa): $[\text{M}]^+$ 462 (2), 330 (5), 300 (100),
286 (7), 271 (6), 257 (9), 229 (11), 152 (16)

UV $\lambda^{\text{MeOH}}_{\text{max}}$. nm: 274, 278, 346

UV $\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}_{\text{max}}$. nm: 277, 296, 354, 389

UV $\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}_{\text{max}}$. nm: 277, 296, 354, 389

UV $\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}_{\text{max}}$. nm: 274, 278, 418

UV $\lambda^{\text{MeOH} + \text{NaOAc}}_{\text{max}}$. nm: 280, 292, 398

6. Identificação e Determinação Estrutural

6.1. Triterpenos de esqueleto Lupano

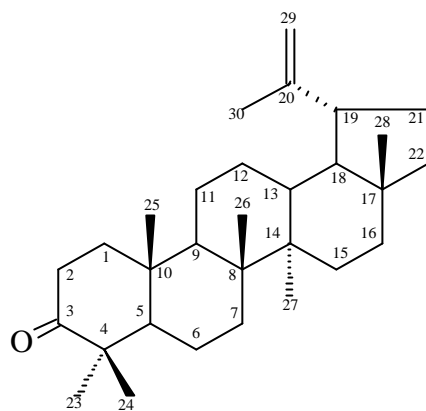
Os triterpenos de esqueleto lupano fazem parte de uma classe muito comum de triterpenos, os pentacíclicos. Todos os triterpenos pertencentes a essa classe revelam positivamente em reagente de Liberman-Burchard.

Os lupanos apresentam alguns dados de RMN ^1H em comum destacando-se a presença de dois prótons olefínicos em δ 4,69 e δ 4,57 como dubletos com constante de acoplamento de prótons geminados ($J= 2,1$ Hz) e a presença de 7 metilas todas como singletos sendo uma delas bem característica, um singletos em δ 1,68, ligada a Csp^2 .

As características do espectro de RMN ^{13}C dessa classe de triterpeno são os sinais dos Csp^2 : δ 150,9 (carbono sp^2 não hidrogenado) e um Csp^2 metilênico em aproximadamente δ 109,4, bastante característicos da dupla ligação do lupano. A metila ligada a Csp^2 com deslocamento em aproximadamente δ 19,3 também é característica desse tipo de esqueleto (Mahato, 1994).

Outra característica dos triterpenos em geral é a presença de oxidação no C-3. Este carbono quando apresenta uma hidroxila tem deslocamento em aproximadamente δ 78,9.

6.1.1. Identificação da Lupenona



Lupenona (**DL1**)

A lupenona (**DL1**) foi identificada principalmente através da análise dos dados obtidos dos espectros de massas (Figura 5 e pg. 37), RMN de ^1H (Figura 3) e ^{13}C (PND e DEPT) (Figura 4, Tabela 28). Estes espectros apresentaram sinais característicos de esqueleto triterpênico da série lupano, além da presença de um sinal em δ 218,3 e ausência do sinal do carbono oximetínico em C-3, que sugeriu presença de uma carbonila nessa posição. Comparação dos valores de deslocamento obtidos com a literatura (Roshan, 1980) confirmou que a substância **DL1** tratava-se da Lupenona.

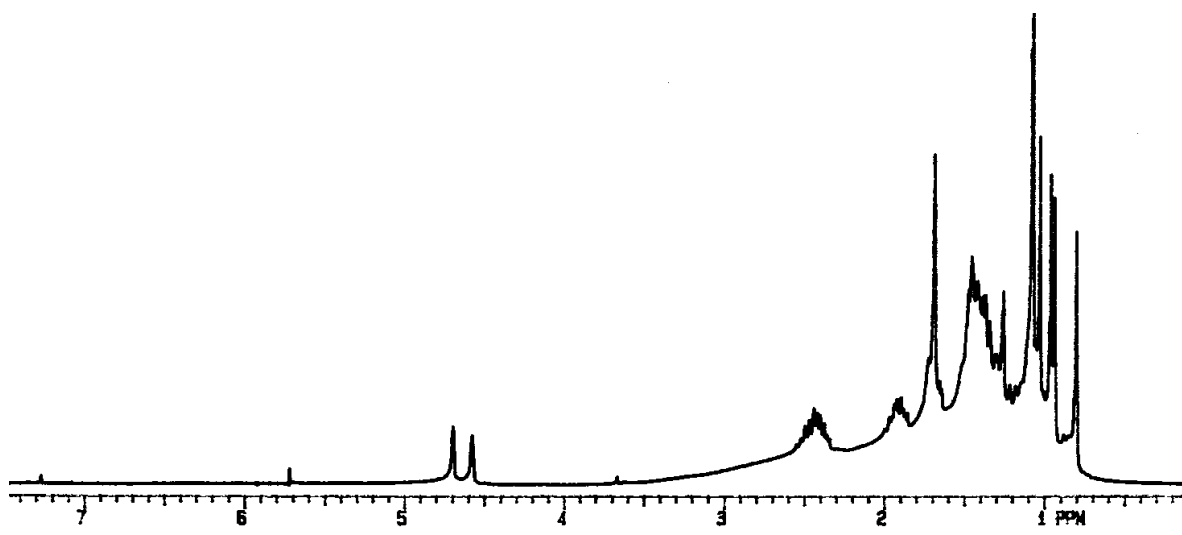


FIGURA 3 – Espectro de RMN ^1H de **DL1** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

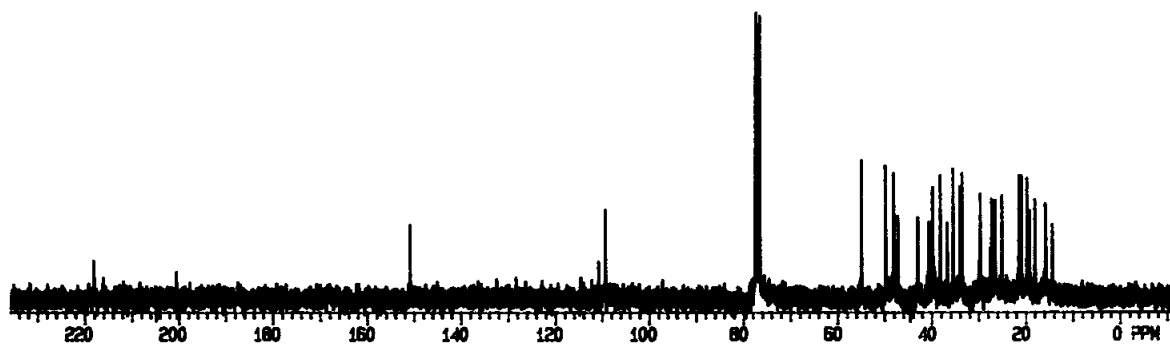


FIGURA 4 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL1** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

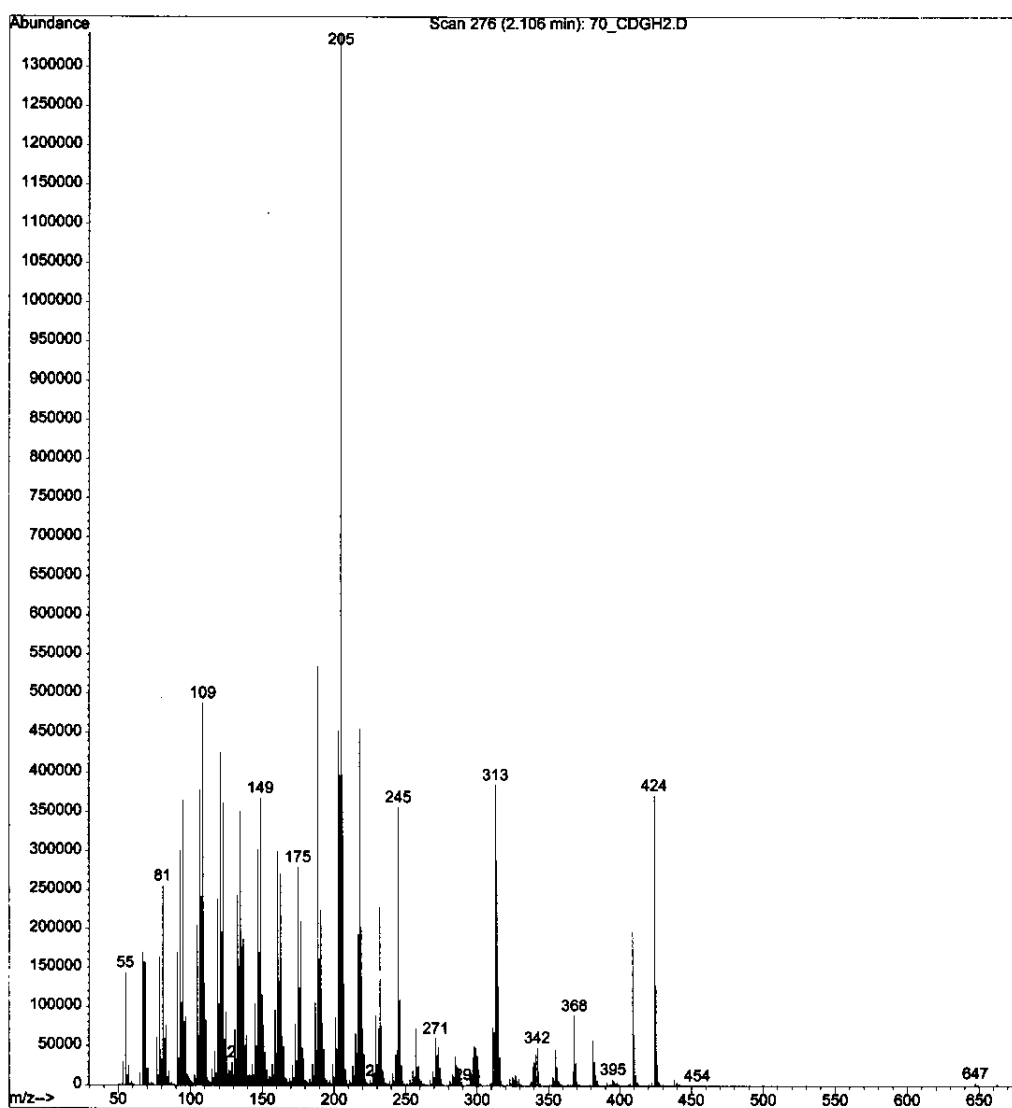
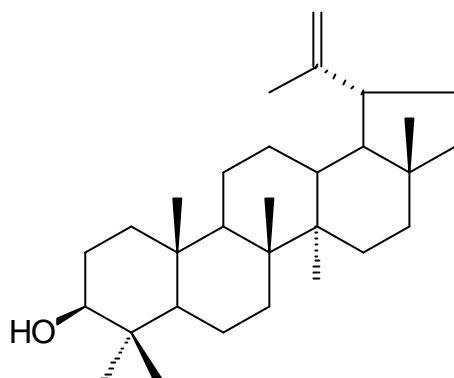


FIGURA 5 – Espectro de Massas de **DL1**

6.1.2. Identificação do Lupeol



Lupeol (**DL2**)

O lupeol (**DL2**) foi identificado principalmente através da análise dos dados de massas (Figura 8 e pg. 37), RMN de ¹H (Figura 6) e ¹³C (PND e DEPT) (Figura 7, Tabela 28). Sinais característicos de esqueleto triterpênico da série lupano, sinal de próton ligado ao carbono oximetínico em δ 3,20, e presença de um sinal em δ 79,0 do carbono oximetínico em C-3 indicaram a presença de uma hidroxila em equatorial nessa posição, o que sugeriu tratar-se do lupeol. Comparação dos valores de deslocamento obtidos com a literatura (Mahato, 1994) confirmou que a substância **DL2** tratava-se do Lupeol.

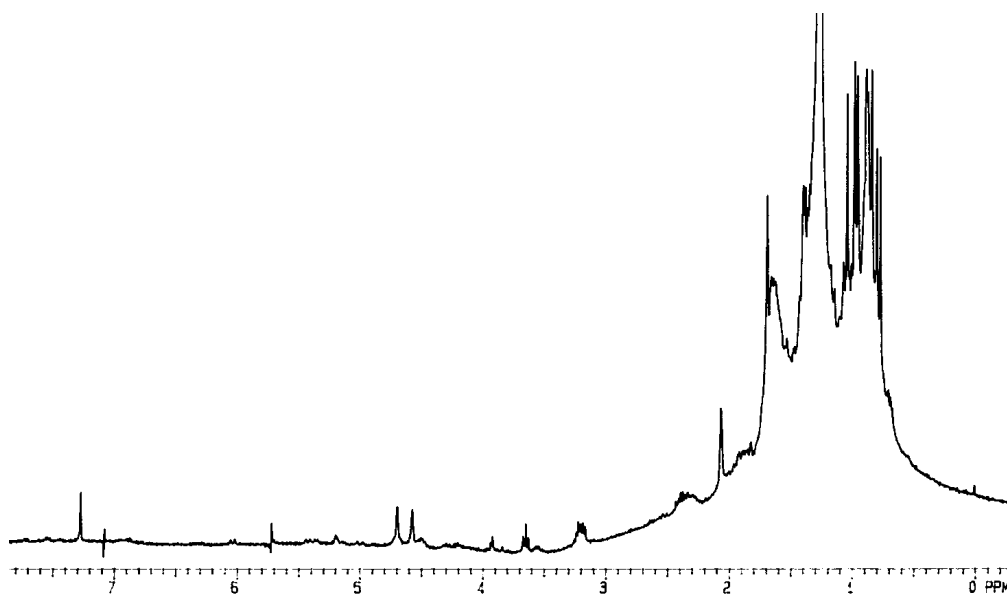


FIGURA 6 – Espectro de RMN ¹H de **DL2** [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

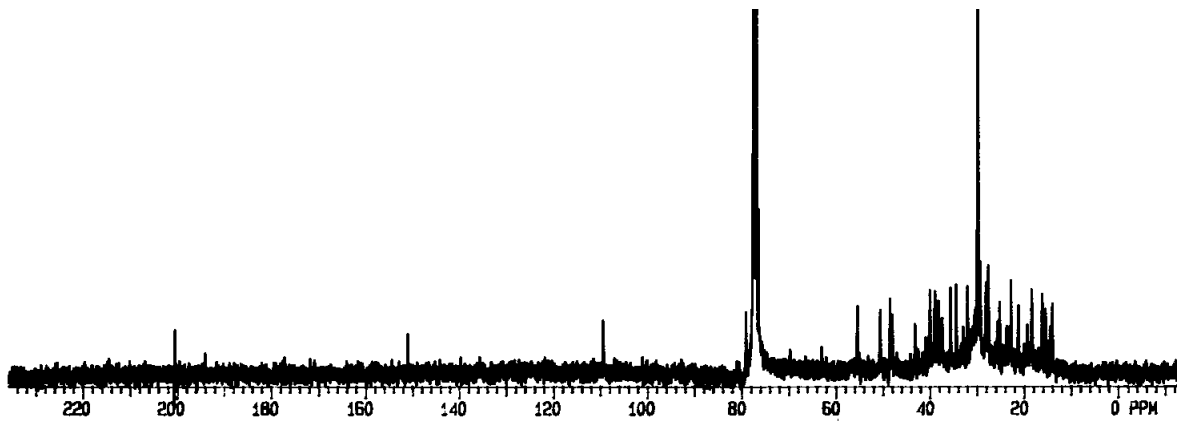


FIGURA 7 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL2** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

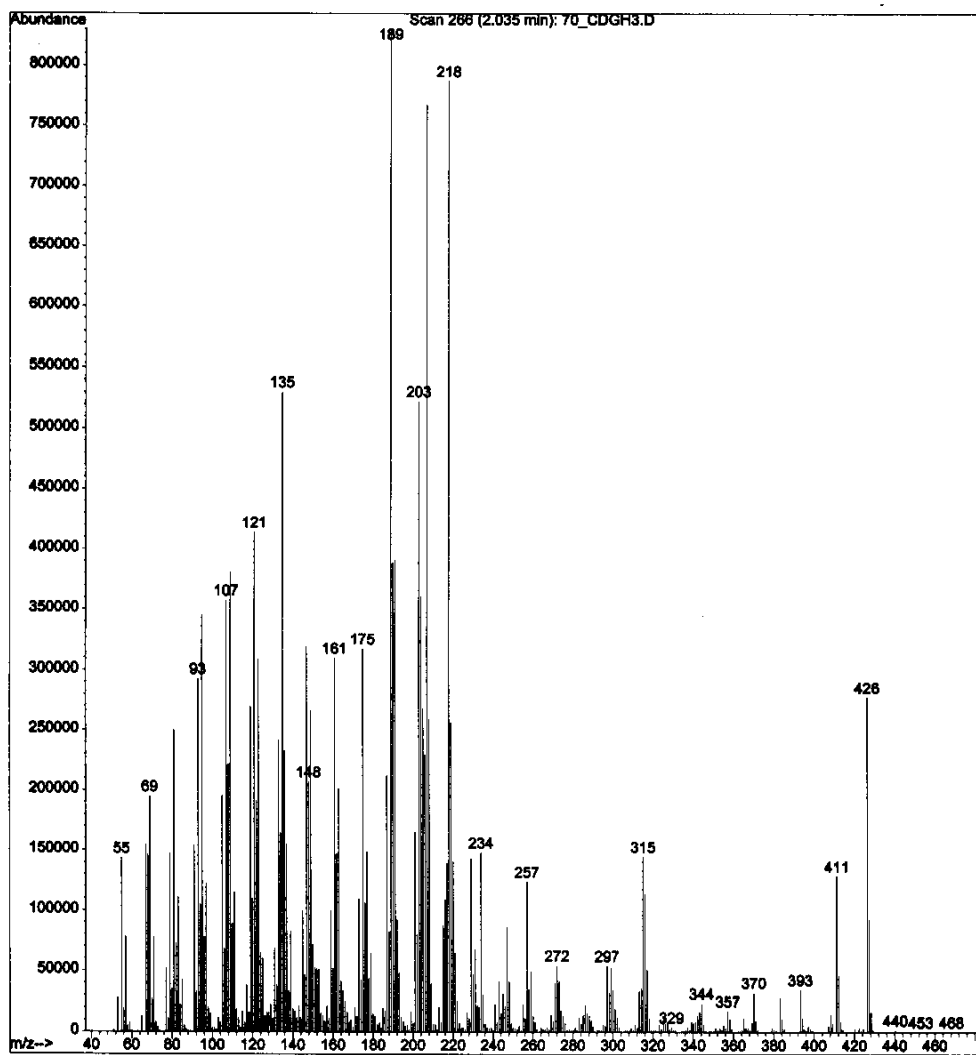
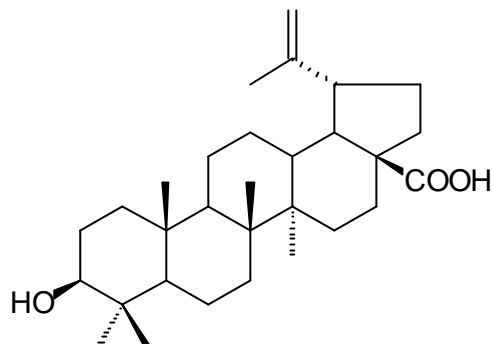


FIGURA 8 – Espectro de Massas de **DL2**

6.1.3. Identificação do Ácido Betulínico



Ácido Betulínico (**DL8**)

O ácido betulínico (**DL8**) foi identificado através da análise dos dados de massas (Figura 11 e pg. 39) e de RMN de ^1H (Figura 9) e ^{13}C (Figura 10). O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos do esqueleto do lupano, porém com uma metila a menos (Dados físicos, p. 39). O sinal em δ 3,20 *dd* foi atribuído ao próton oximetínico em axial ligado ao carbono 3.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 30 sinais predominantes confirmando a presença de 30 átomos de carbono (Tabela 28). O sinal em δ 182,4 foi atribuído a carbonila do ácido na posição 28, devido a ausência de uma metila em aproximadamente δ 18,0. O sinal em δ 79,0 (CH) deveu-se ao carbono oximetínico em 3 confirmando que a hidroxila encontrava-se em equatorial. Comparação dos valores de deslocamento obtidos com a literatura (Mahato, 1994) confirmou que a substância **DL8** tratava-se do ácido betulínico.

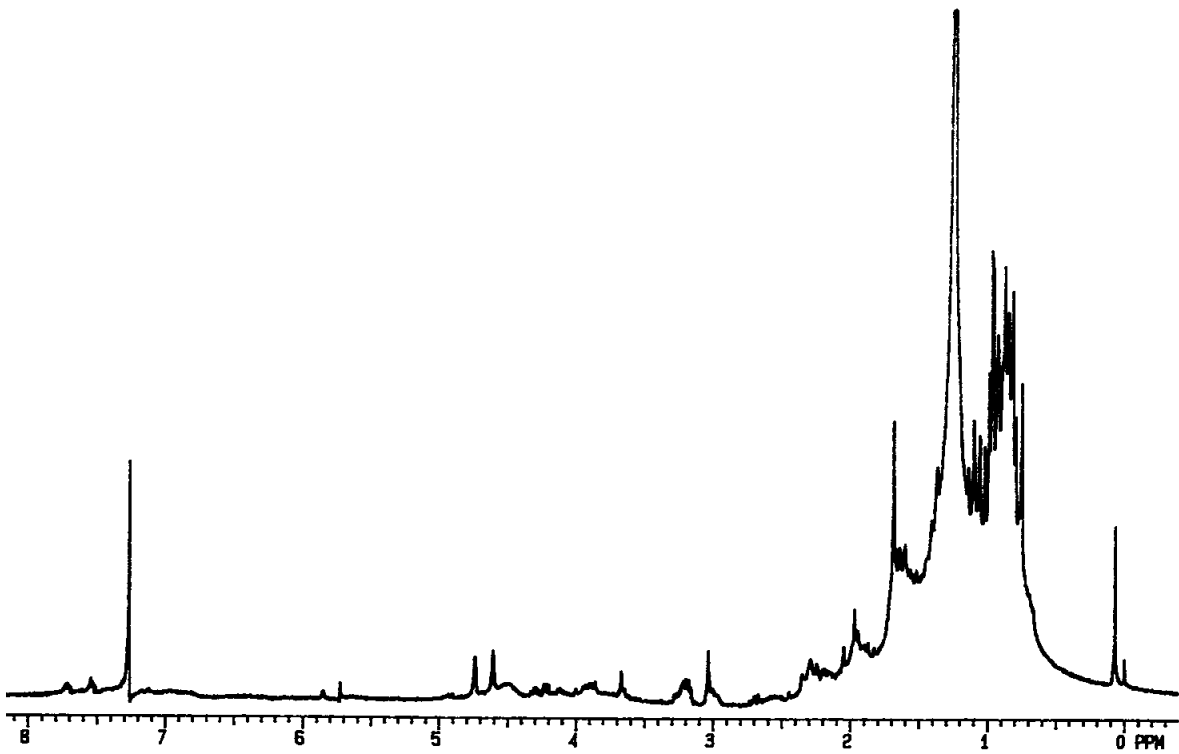


FIGURA 9 – Espectro de RMN ^1H de **DL8** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

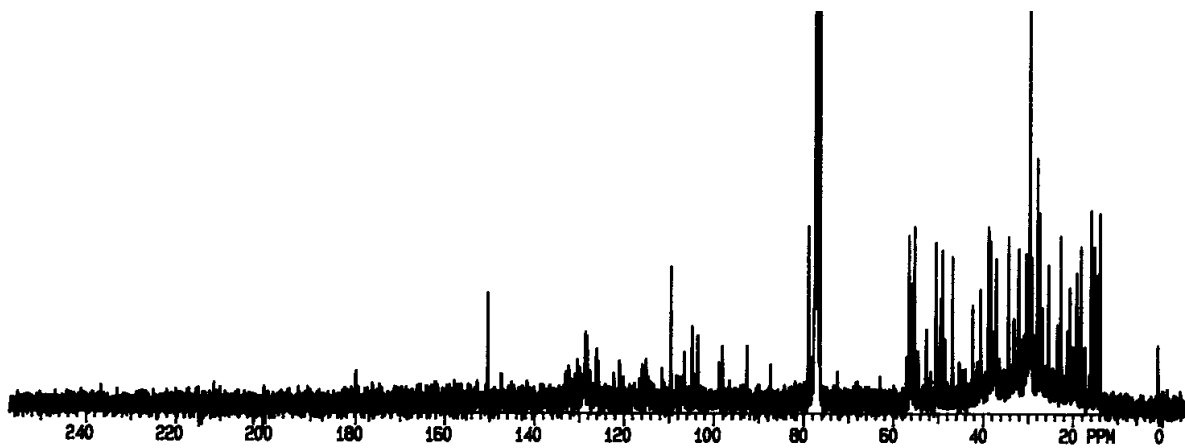


FIGURA 10 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL8** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

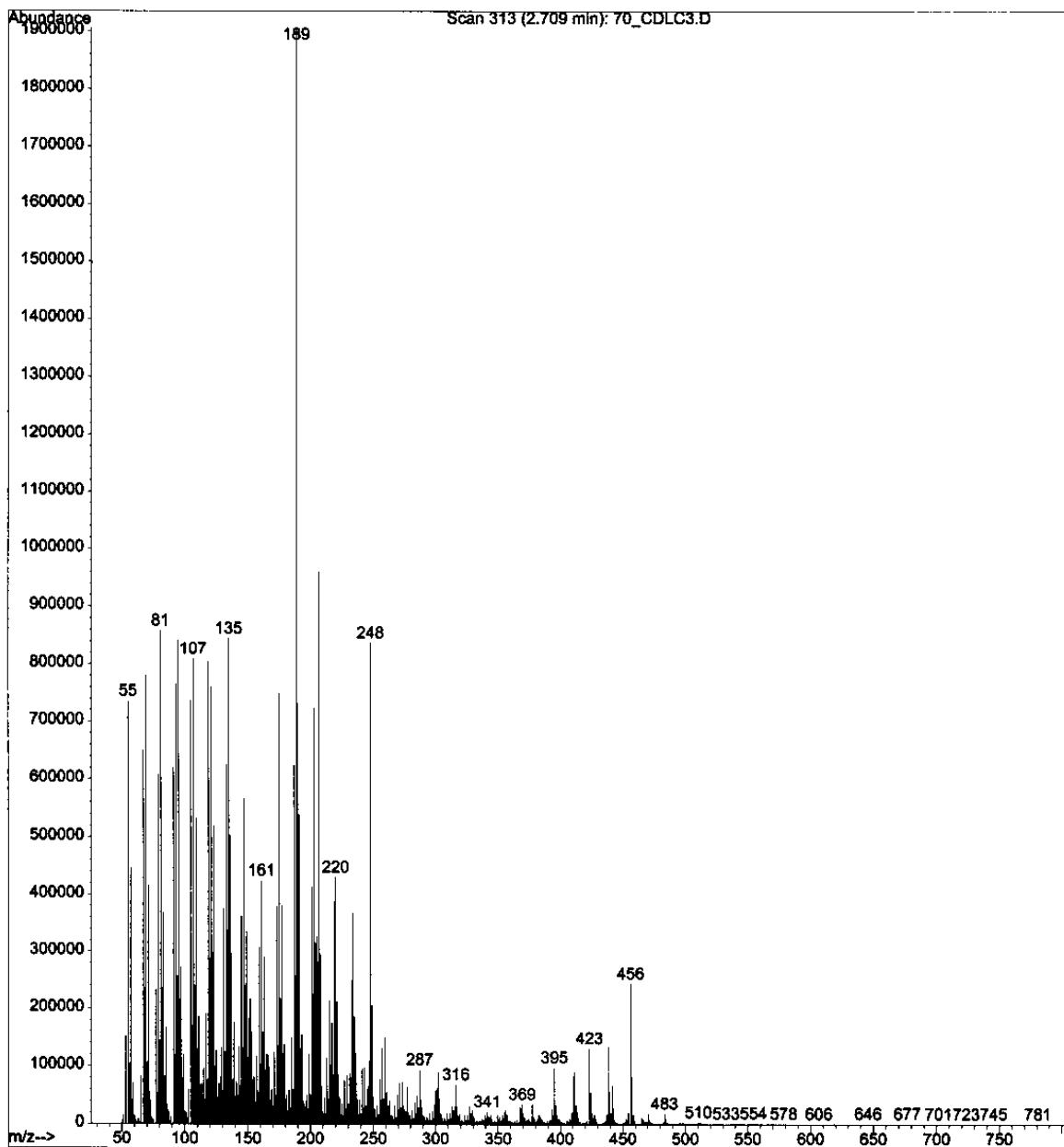


FIGURA 11 – Espectro de Massas de DL8

Tabela 28 – Dados de RMN de ^{13}C dos triterpenos de esqueleto do lupano [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]*

C	DL1	DL2	DL8
1	39,6 CH ₂	38,7 CH ₂	38,7 CH ₂
2	34,2 CH ₂	27,4 CH ₂	27,4 CH ₂
3	218,3 C	79,0 CH	79,0 CH
4	47,3 C	38,8 C	38,9 C
5	54,9 CH	55,3 CH	55,3 CH
6	19,7 CH ₂	18,3 CH ₂	18,3 CH ₂
7	33,6 CH ₂	34,3 CH ₂	34,3 CH ₂
8	40,8 C	40,8 C	40,7 C
9	49,8 CH	50,4 CH	50,5 CH
10	36,9 C	37,2 C	37,2 C
11	21,5 CH ₂	20,9 CH ₂	20,9 CH ₂
12	25,1 CH ₂	25,2 CH ₂	25,5 CH ₂
13	38,2 CH	38,1 CH	38,4 CH
14	42,9 C	42,8 C	42,4 C
15	27,4 CH ₂	27,4 CH ₂	30,6 CH ₂
16	35,5 CH ₂	35,6 CH ₂	32,2 CH ₂
17	43,0 C	43,0 C	56,6 C
18	48,2 CH	48,3 CH	46,9 CH
19	47,9 CH	47,9 CH	49,3 CH
20	150,9 C	150,9 C	150,4 C
21	31,9 CH ₂	29,8 CH ₂	29,4 CH ₂
22	40,0 CH ₂	40,0 CH ₂	37,0 CH ₂
23	26,6 CH ₃	28,0 CH ₃	28,0 CH ₃
24	21,0 CH ₃	15,4 CH ₃	15,3 CH ₃
25	16,0 CH ₃	16,1 CH ₃	16,0 CH ₃
26	15,8 CH ₃	16,0 CH ₃	16,1 CH ₃
27	14,5 CH ₃	14,5 CH ₃	14,7 CH ₃
28	18,0 CH ₃	18,0 CH ₃	182,4 C
29	109,4 CH ₂	109,3 CH ₂	109,7 CH ₂
30	19,3 CH ₃	19,3 CH ₃	19,4 CH ₃

* As multiplicidades foram obtidas por DEPT 135° e DEPT 90°

6.2. Triterpenos de esqueleto do Oleanano

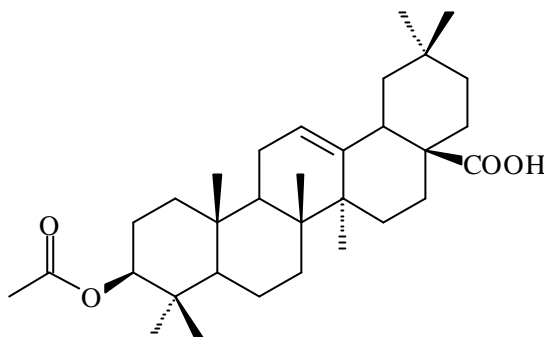
Os triterpenos de esqueleto do oleanano também fazem parte da mesma classe de triterpenos que os de esqueleto lupano, os pentacíclicos. Como todos os triterpenos eles revelam positivamente em reagente de Liberman-Burchard.

Apresentam alguns dados de RMN de ^1H em comum destacando-se um sinal em δ 5,27 como um tripleto com J de aproximadamente 3,2 Hz, pertencente ao próton olefínico na posição 12, o qual acopla com os dois prótons metilênicos vizinhos. Além disso apresentam 8 singletos referentes as metilas na faixa δ 0,5 a 1,5 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C também apresenta sinais característicos tais como os sinais referentes a ligação dupla em Δ^{12} , δ 143,6 e 122,5, sendo o primeiro não hidrogenado e o segundo um $\text{Csp}^2\text{-H}$. Além disso presença de 8 metilas que podem ser identificadas através da análise conjunta dos espectros de DEPT 90°, 135° e PND. Assim como os lupanos apresentam oxigenação no C-3, sendo que este carbono oximetínico ocorre entre δ 78-81 ppm (Mahato, 1994).

Todos os triterpenos com esse esqueleto isolados de *D. lasiophylla* são ácidos ou derivados de ácidos. Essa característica pode ser determinada através da ausência da $\text{CH}_3\text{-28}$ no espectro de RMN de ^{13}C (δ 28,1) quando comparado com a **b**-amirina (Mahato, 1994), bem como um sinal referente a carbonila na região δ 174-185 ppm.

6.2.1. Identificação do Ácido acetil oleanólico



Ácido acetil oleanólico (**DL3**)

A substância **DL3** apresentou sinais característicos do esqueleto oleanano (Dados físicos, p. 37). Análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 12) apresentou um sinal em δ 4,50 (*t*, $J = 7,8$, 1H) pertencente ao próton oximetínico na posição 3, porém em campo mais baixo que o esperado, sugerindo que o triterpeno estivesse esterificado. Em δ 2,06 tem-se um singlete integrado para 3H característico de metila do grupo acetil, o que sugeriu que o composto deveria encontrar-se acetilado nesta posição.

Análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 13) apresentou sinais correspondentes a 32 carbonos (Tabela 29). Os espectros de DEPT 135° e DEPT 90° demonstraram tratar-se de 8 carbonos metílicos, 10 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 9 carbonos não hidrogenados. Notaram-se os sinais característicos do esqueleto oleanano, além dos sinais em δ 171,1 e δ 21,3 referentes ao grupo acetoxila e em δ 81,0 pertencente ao carbono oximetínico também deslocado para campo mais baixo que esperado. Esses dois sinais confirmaram a esterificação na posição 3-**b**. Comparação dos valores de deslocamento com dados da literatura para o ácido oleanólico (Mahato, 1994) sugeriram que **DL3** tratava-se do ácido acetil oleanólico. Porém, comparação dos deslocamentos da carbonila do ácido oleanólico e **DL3** indicou pequena diferença ($\Delta = 3,9$ ppm), provavelmente devido à diferença entre os solventes utilizados no registro dos espectros. Mesmo assim, a partir do ácido oleanólico isolado de outra fonte vegetal, e anteriormente identificado, foi realizada a síntese parcial deste composto através de acetilação. Do derivado acetilado foram registrados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , além dos experimentos de DEPT 135° e 90°,

confirmando a semelhança os valores de deslocamento entre **DL3** e o derivado acetilado do ácido oleanólico.

O espectro de Infra Vermelho de **DL3** (Figura 14) confirmou a presença do grupo ácido através de banda larga em 2930 cm^{-1} , além de confirmar a presença das duas carbonilas uma de ácido e outra de éster pelos estiramentos de C=O em 1733 cm^{-1} e 1694 cm^{-1} .

O ácido acetil oleanólico apesar de ter sido isolado pela primeira vez de *Gymnema alternifolium* (Lai, 1994), sendo posteriormente isolada na família Leguminosae de *Vigna unguiculata* (Noorwala, 1995), ainda não havia sido detectado na subfamília Papilionoideae.

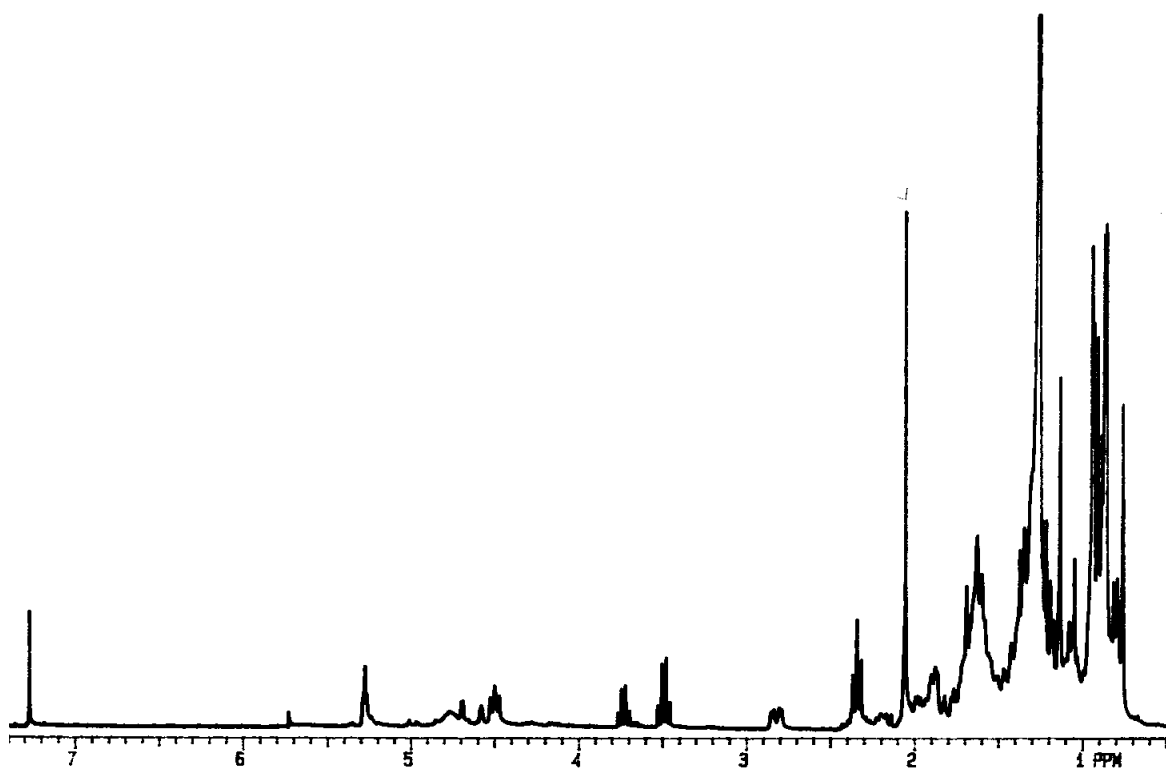


FIGURA 12 – Espectro de RMN ^1H de **DL3** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

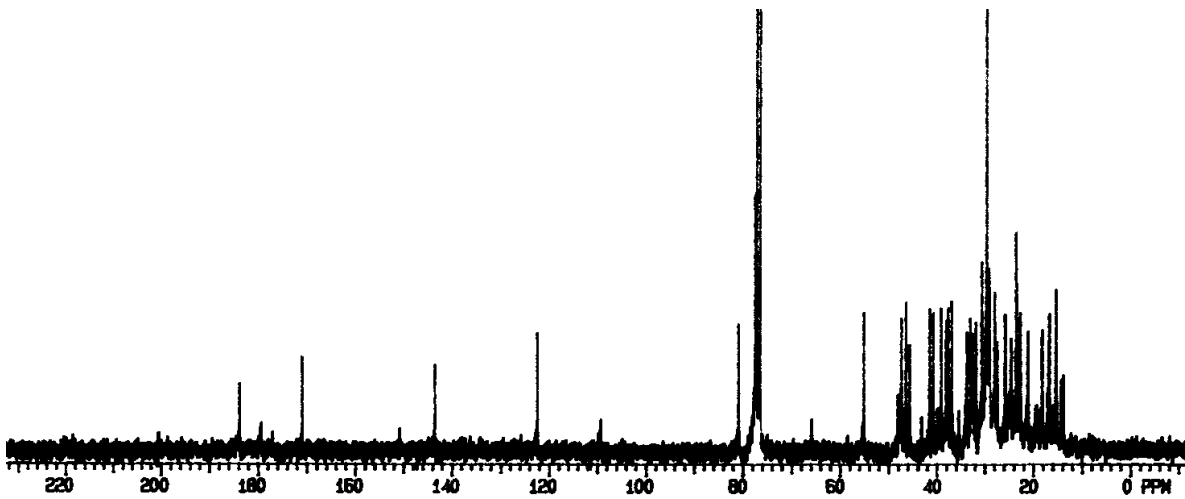
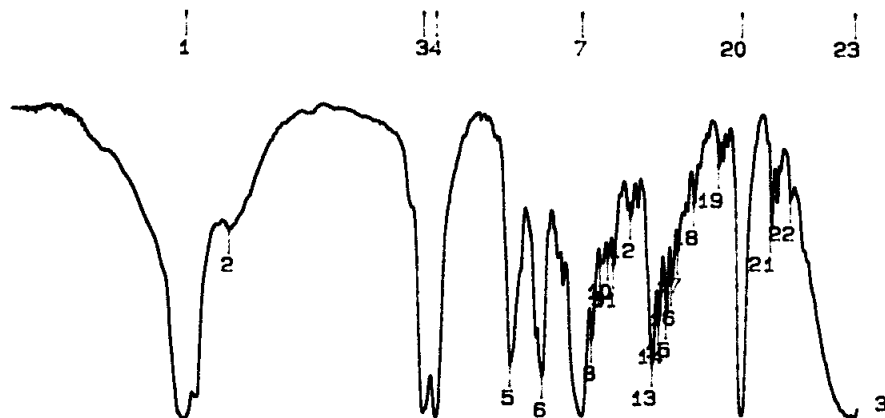


FIGURA 13 – Espectro de RMN ^{13}C de DL3 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



Condition							
upper	100.00	lower	0.00	depth	2.00		
Peak table							
1:	2930.23 (0.3)	2:	2656.30 (46.7)	3:	1733.25 (1.9)	4:	1694.67 (0.8)
5:	1464.15 (14.4)	6:	1366.73 (11.4)	7:	1248.10 (1.2)	8:	1215.30 (20.4)
9:	1189.26 (38.7)	10:	1165.15 (40.6)	11:	1148.75 (38.5)	12:	1096.67 (50.5)
13:	1028.18 (14.4)	14:	1008.89 (24.7)	15:	985.74 (26.2)	16:	970.31 (34.1)
17:	951.02 (42.0)	18:	901.83 (53.8)	19:	827.56 (63.0)	20:	758.12 (1.4)
21:	667.45 (47.4)	22:	607.65 (54.8)	23:	409.92 (0.7)		

FIGURA 14 – Espectro de IV de DL3

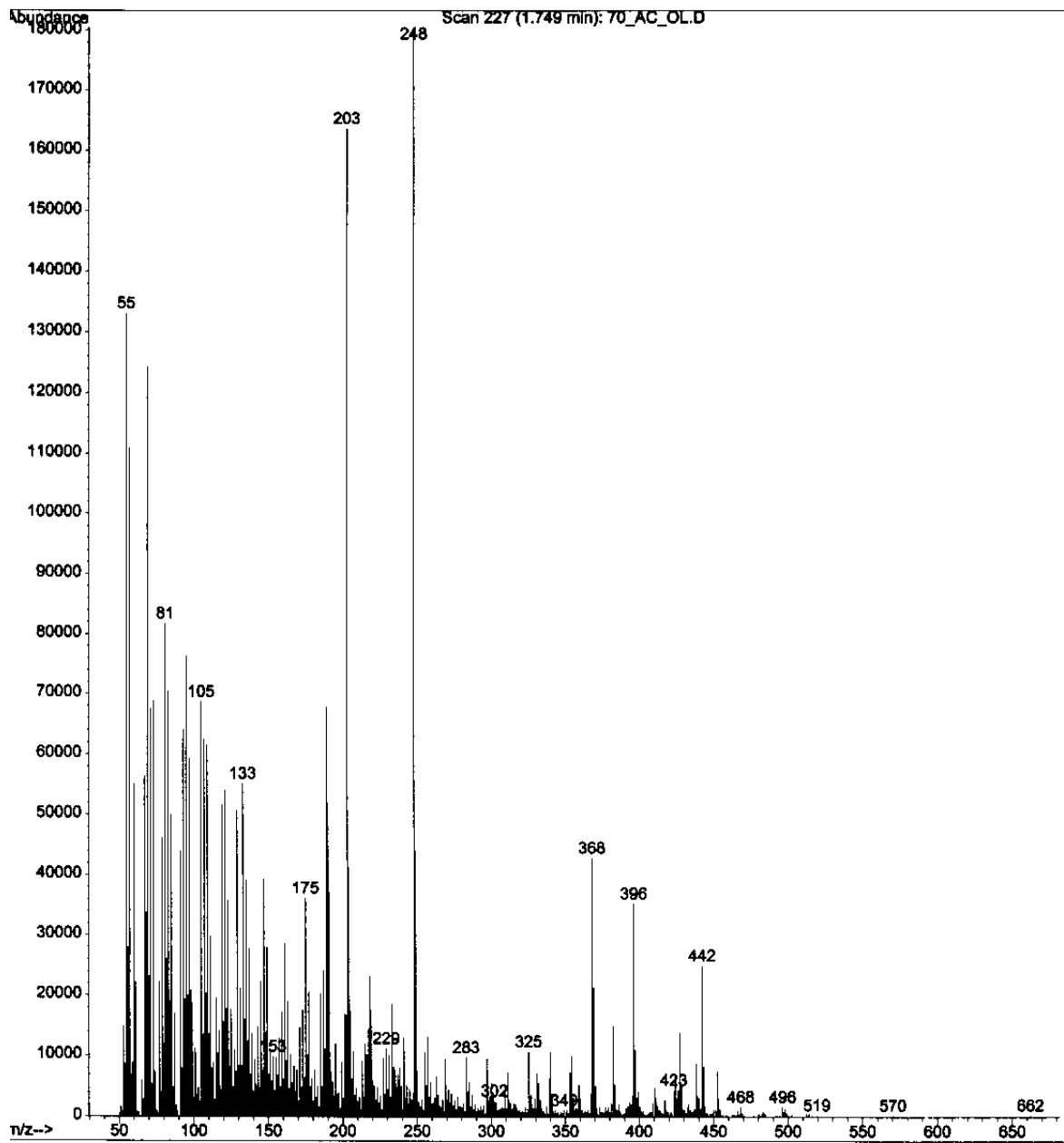
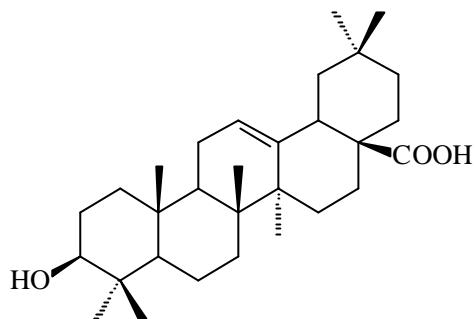


FIGURA 15 – Espectro de Massas de DL3

6.2.2. Identificação do ácido oleanólico



Ácido oleanólico (**DL9**)

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 16) da substância **DL9** também apresentou sinais característicos do esqueleto do oleanano (Dados físicos, p. 39).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 17) apresentou além dos sinais característicos de ácidos graxos a presença de 30 sinais (Tabela 29). A análise dos espectros DEPT 135° e DEPT 90° confirmou a presença de 7 carbonos metílicos, 10 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 8 carbonos não hidrogenados. Além dos sinais característicos do esqueleto oleanano, a comparação dos valores de deslocamento com dados da literatura (Mahato, 1994) e com padrão anteriormente isolado sugeriu que **DL9** tratava-se do ácido oleanólico. O EMIE a 70 eV (Figura 18) reinterou a proposição através do íon molecular em m/z 456.

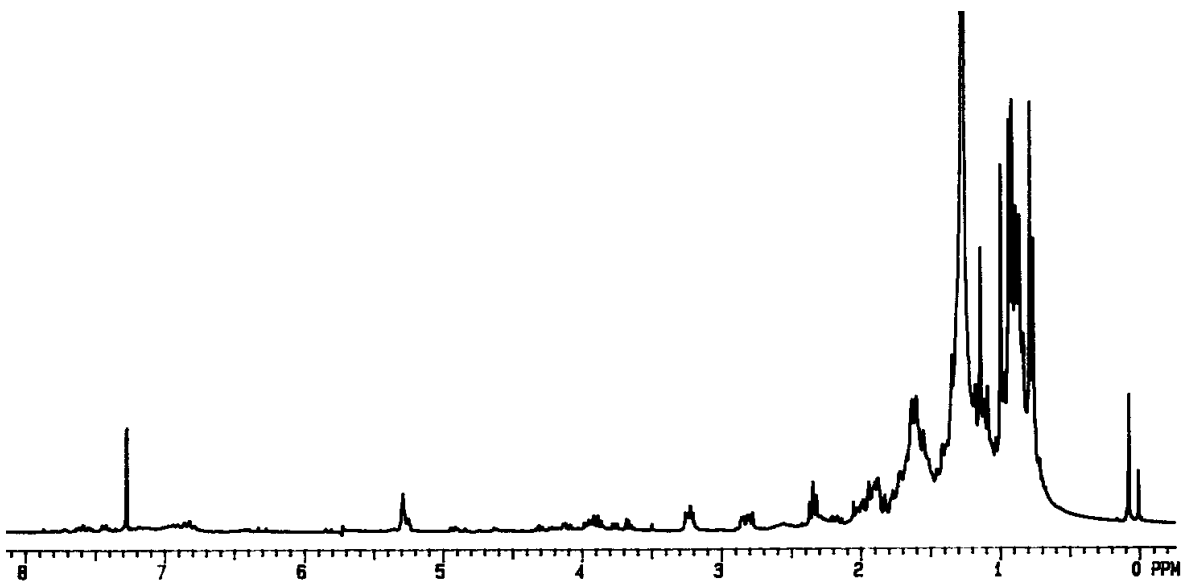


FIGURA 16 – Espectro de RMN ^1H de **DL9** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

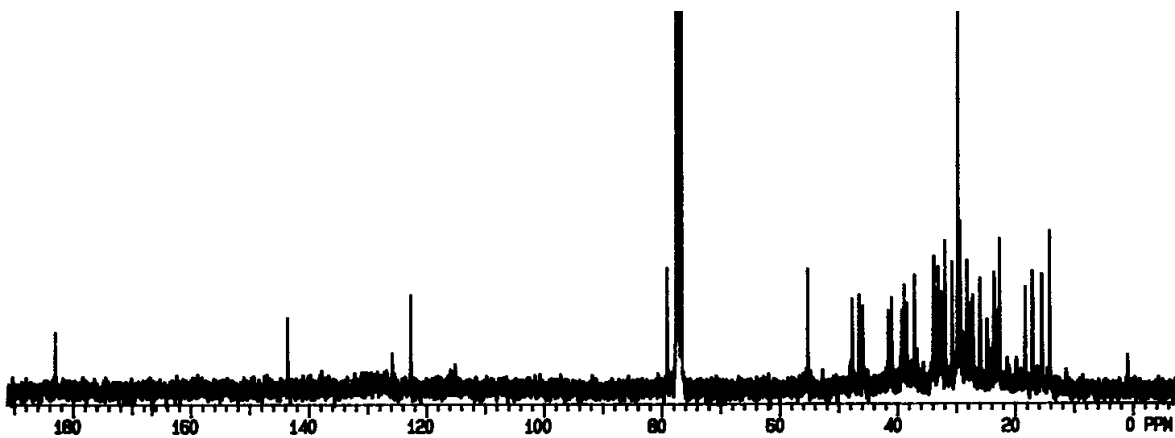


FIGURA 17 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL9** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

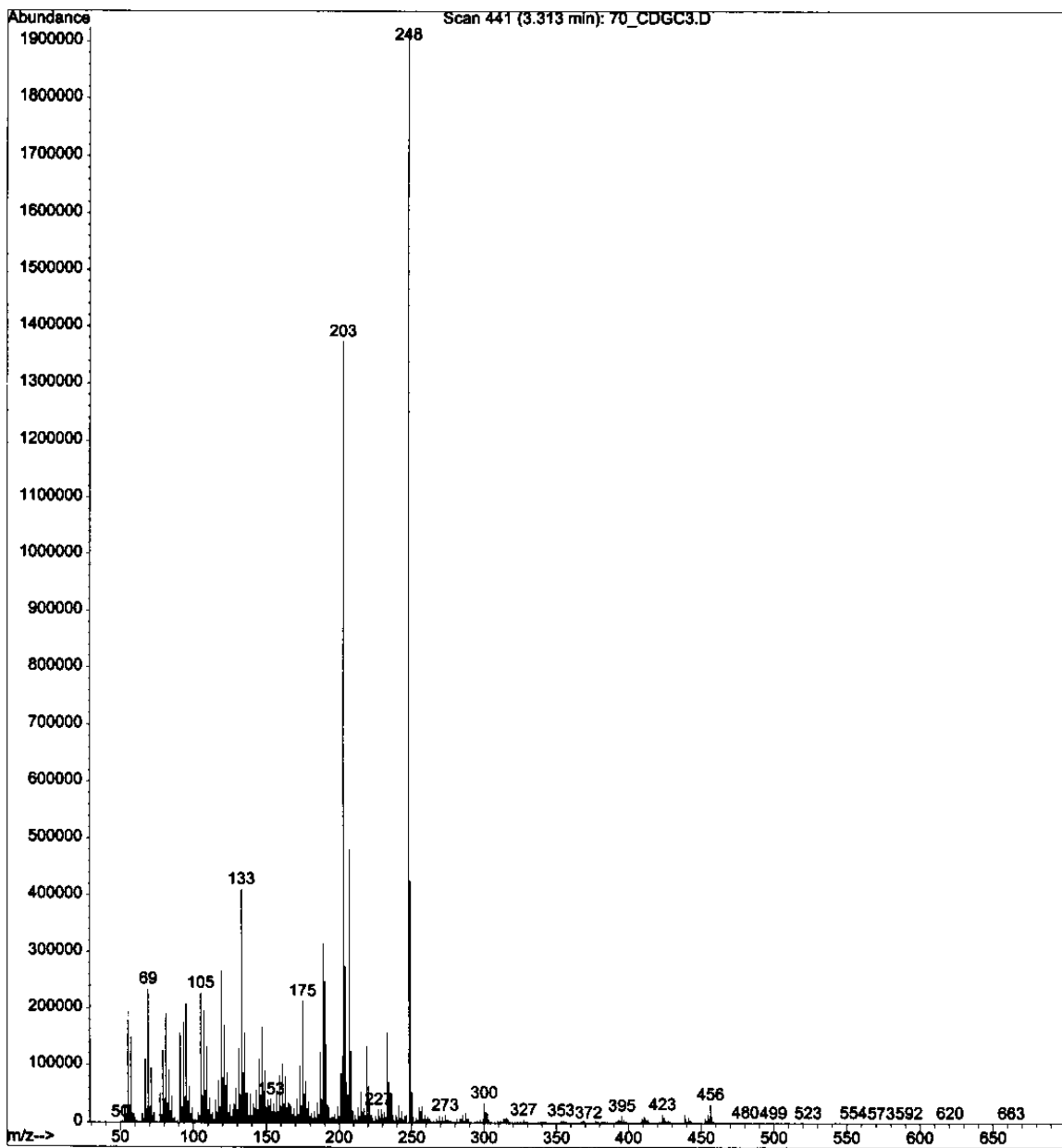
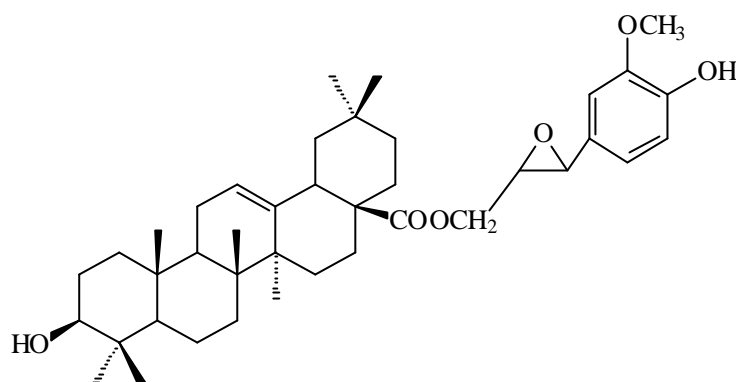


FIGURA 18 – Espectro de Massas de DL9

6.2.3. Determinação estrutural do oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila



Oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila (**DL10**)

Como todos os terpenos isolados a substância **DL10** revelou positivamente em reagente de Liberman-Burchard, porém revelou também em UV indicando a presença de grupo cromóforo. Análise do espectro de RMN de ^1H (Figuras 19 e 20) apresentou sinais característicos de esqueleto do oleanano. Foram também observados sinais em δ 6,88 (*d*, $J=2,0$, 1H), δ 6,86 (*d*, $J= 8,1$, 1H) e δ 6,80 (*dd*, $J=2,0$ e 8,1, 1H) característicos para um sistema AMX , no caso, um anel aromático tri-substituído. A análise dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento do próton oxibenzílico H-7' em δ 4,71 (*d*, $J= 4,3$), do próton oximetínico H-8' (δ 4,23, *dd*, $J= 9,1$ e 4,3) e dos dois prótons oximetilênicos H-9' (δ 3,86, *dd*, $J= 9,1$) permitiu propor também uma cadeia alquílica trioxigenada. O singlete característico em δ 3,89 integrando para 3 hidrogênios indicou presença de um grupo metoxílico ligado a carbono sp^2 . O duplo dubleto em δ 3,2 ($J= 11,4\text{Hz}$) foi atribuído ao próton oximetínico da posição 3 em axial, característico dos triterpenos pentacíclicos. O sinal em δ 3,08 (*sl*, 1H) foi atribuído a um próton da hidroxila ligada a C aromático. Análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 21, 22, 23) revelou a presença de 40 átomos de carbono. Análise conjunta com os espectros DEPT 135° (Figura 25) e DEPT 90° (Figura 24) indicou tratarem-se de 8 carbonos metílicos, um deles sendo uma metoxila (δ 55,9), 11 carbonos metilênicos, 10 carbonos metínicos e 11 carbonos não hidrogenados. Dentre os sinais de carbono tivemos aqueles que são característicos de triterpenos. Dois sinais em δ 143,6 (C) e 122,6 (CH), referentes a dupla no C-12, são característicos de esqueleto

oleanano. Estes dados sugeriram que **DL10** era formada por um triterpeno do tipo oleanano ligado a um fenilpropanóide. Considerando-se que o carbono oximetínico em δ 79,0 se refere ao C-3 do triterpeno os outros sinais na região de δ 70-86 ppm (Figura 23), bem como os deslocamentos na região dos carbonos aromáticos deveriam ser os responsáveis pela parte fenilpropanoídica. Comparação dos valores de deslocamento (Tabela 29) com os descritos na literatura para o ácido oleanólico e oleanolatos (Mahato, 1994) confirmou que o esqueleto triterpênico era derivado do ácido oleanólico. No entanto os valores da C=O do ácido encontravam-se ligeiramente protegidos ($\Delta\delta$ 1,3 ppm) quando comparados com o ácido oleanólico (Tabela 29). Desta comparação, verificou-se a presença de um carbono metínico adicional em δ 54,2 (Figura 24). Este sinal foi atribuído a cadeia alquílica do fenilpropanóide, devido ao valor de deslocamento em campo relativamente alto para um carbono oximetínico, este foi o primeiro indício da presença do grupo oxirano (Paulson, 1975). Os dados obtidos permitiram propor que a parte fenilpropanoídica de **DL10** era formada por um derivado do álcool coniferílico. Descartou-se a possibilidade de ser um derivado do álcool 3-hidroxi-4-metoxi cinâmico a partir de comparação dos dados de C-13 com os descritos na literatura para os derivados dos ácidos ferúlico e iso-ferúlico (Nkengfack, 1997), como também pelas correlações observadas no espectro HMBC .

Espectro de correlação bidimensional HMBC (Figura 27) permitiu confirmar as proposições efetuadas anteriormente, bem como os deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes a unidade fenilpropanoídica. Dentre as correlações mais importantes observadas (Figura 26) verificou-se que os prótons da metoxila (δ 3,89) correlacionavam a três ligações com o carbono aromático em δ 146,7 (C-3'). O H-6' em δ 6,80 correlaciona o carbono em δ 145,2 (C-4'). Essas correlações foram conclusivas que o grupo metoxila se encontra na posição 3'. Correlação dos prótons H-2' e H-6' em δ 6,88 e δ 6,80 com carbono oxibenzílico em δ 85,9 (C-7'), e a recíproca do próton H-8' em δ 4,71 com os carbonos C-2' em δ 108,6 e C-6' em δ 118,9 respectivamente confirmou a ligação do anel aromático ao carbono oxibenzílico. A localização do oximetínico C-8' em δ 54,2 e metilênico C-9' em δ 71,7 foi confirmada através das correlações a 2 e 3 ligações observadas neste espectro (Figura 27). Infelizmente não foi observada a correlação dos

prótons H-9' em δ 3,86 com a carbonila em δ 182,6 (C-28). A Figura 27 sumariza as correlações observadas no grupo coniferilóxi.

Os EMIE de **DL10** a 70 eV (Figura 28) e a 10 eV não apresentaram o íon molecular $[M]^+$ em m/z 634, no entanto, apresentaram um fragmento importante em m/z 512 referente a perda do anel aromático. Esse fragmento além de ter confirmado o epóxido, confirmou o resto da estrutura, já que as correlações HMBC observadas foram conclusivas que o anel aromático estava ligado com o C-7'. O fragmento em m/z 456, confirmou a identificação do ácido oleanólico derivado do fenilpropanóide (Figura 29). Outro fragmento importante na elucidação estrutural de **DL10** foi íon m/z 303 proveniente do Retro Diels Alder (Ogunkoya, 1981) do fragmento $[M\text{-Guaiacila}]^+$. Este fragmento corroborou a proposição que a unidade fenilpropanoídica encontrava-se esterificada à carboxila C-28. Dessa maneira, a estrutura de **DL10** foi sugerida como sendo o oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila. Esse foi o primeiro relato dessa substância na literatura.

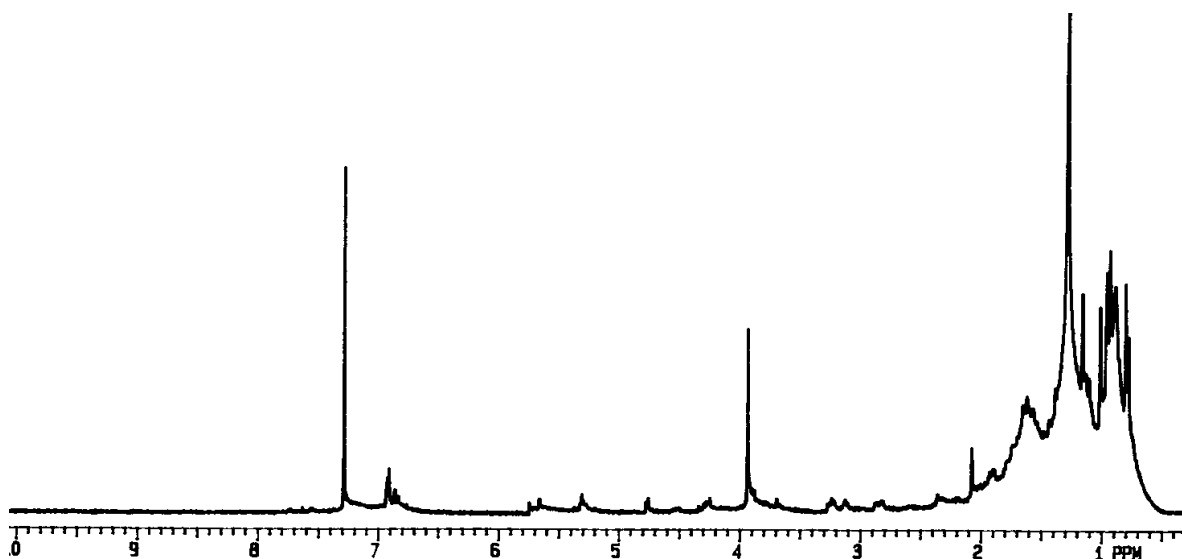


FIGURA 19 – Espectro de RMN ^1H de **DL10** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

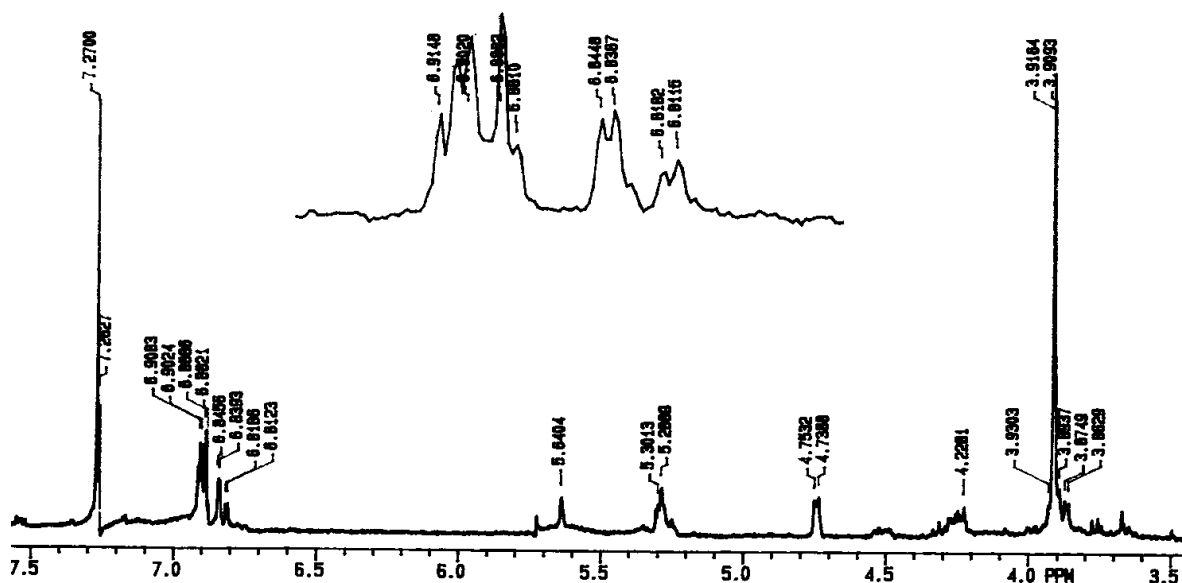


FIGURA 20 – Espectro de RMN ¹H de DL10 (Ampliação) [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

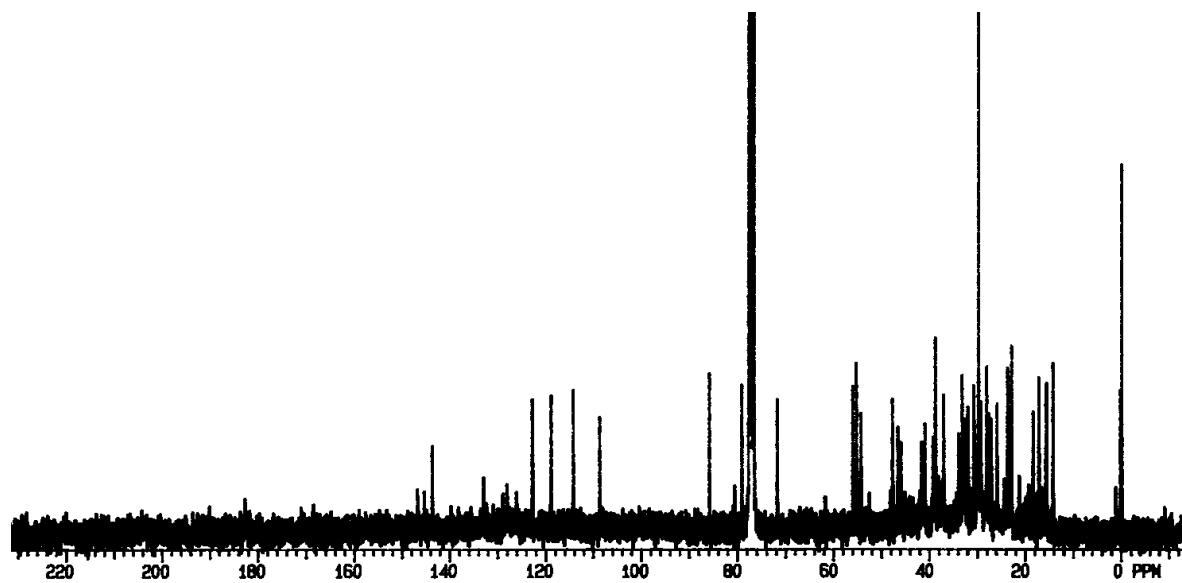


FIGURA 21 – Espectro de RMN ¹³C de DL10 [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

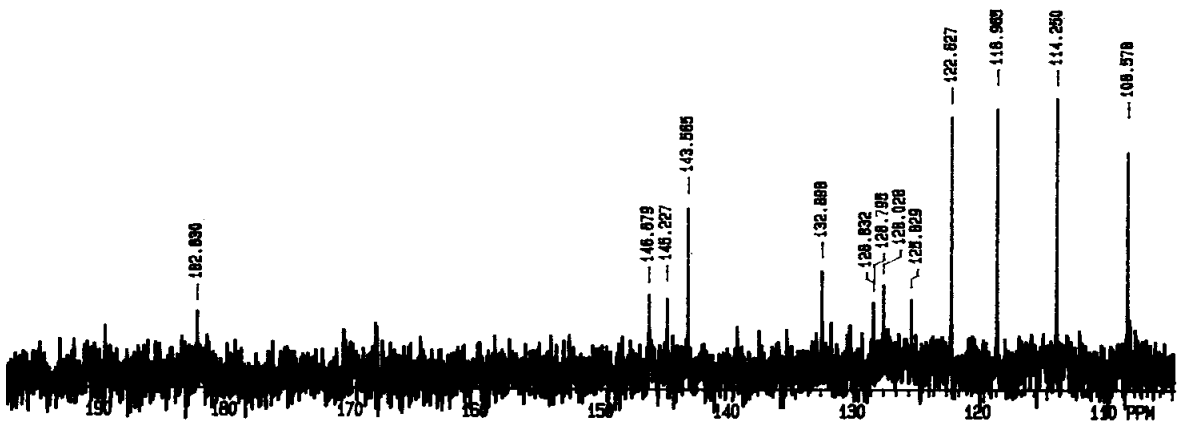


FIGURA 22 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL10** (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

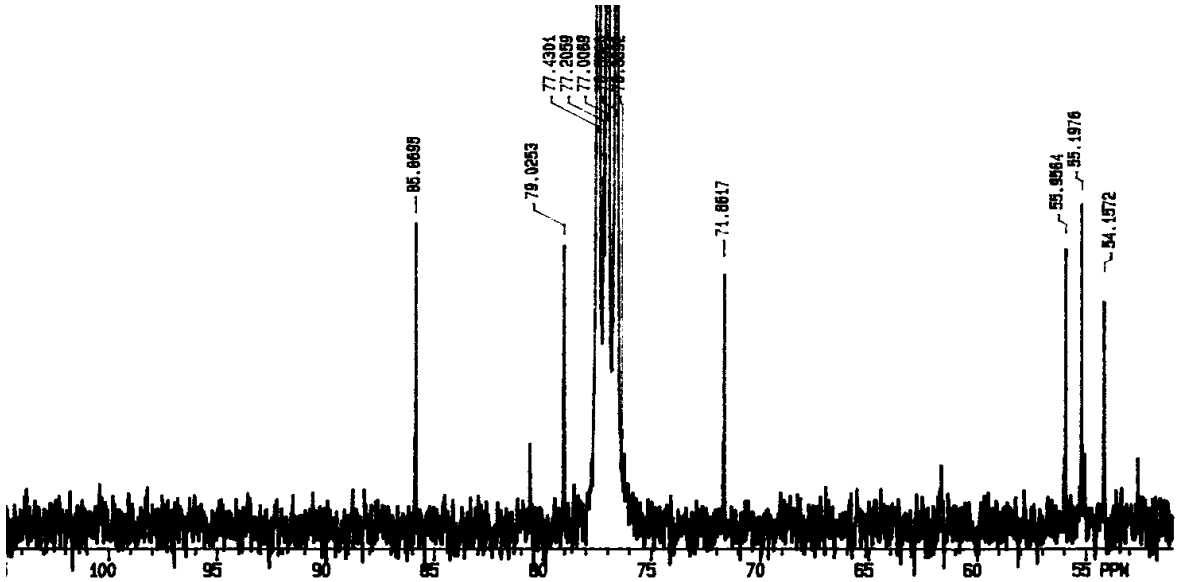


FIGURA 23 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL10** (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

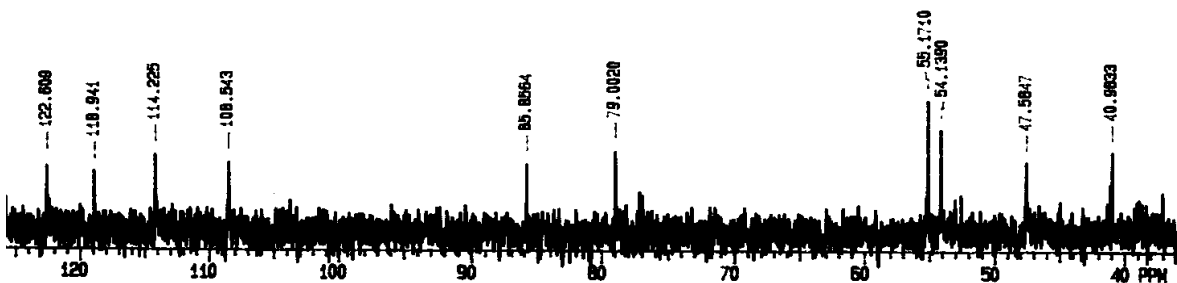


FIGURA 24 – Espectro DEPT 90° de **DL10** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

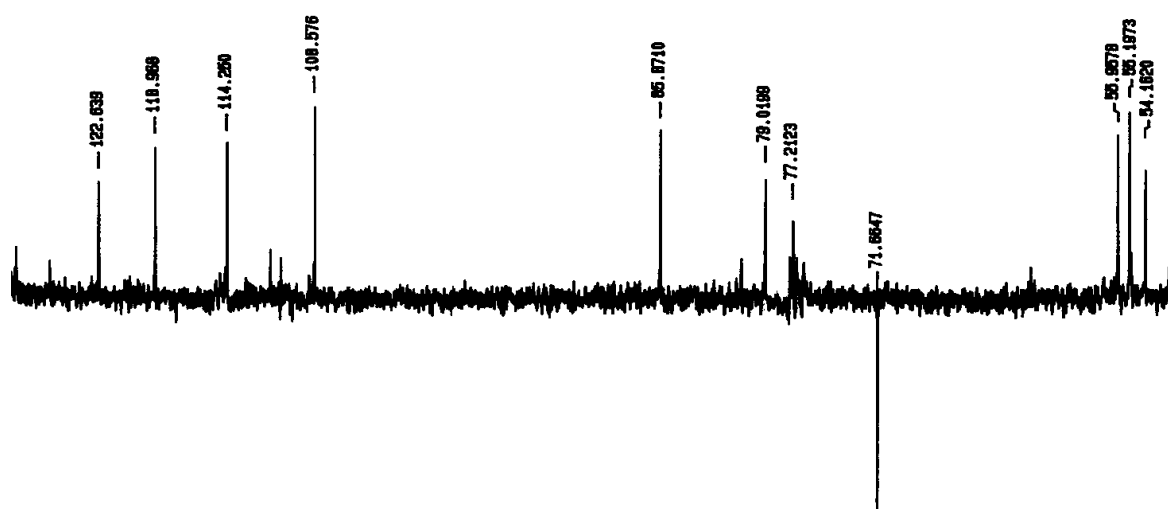


FIGURA 25 – Espectro DEPT 135° de **DL10** (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

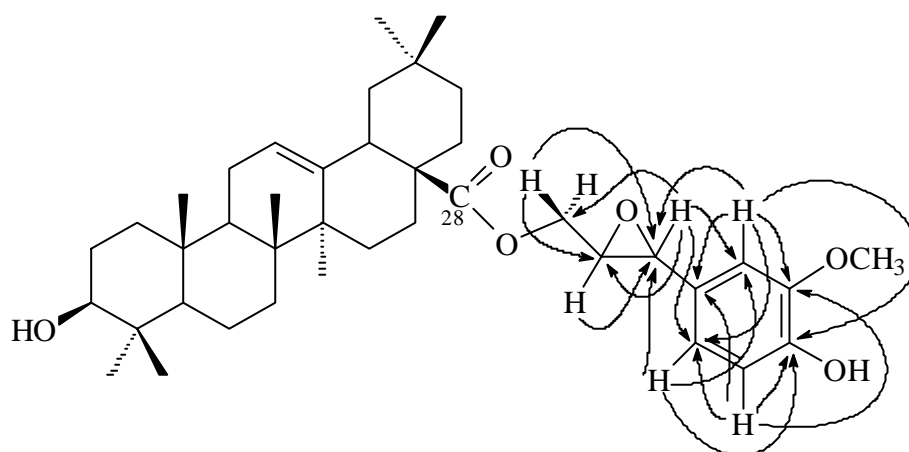


FIGURA 26 – Correlações a longa distância 2J e 3J obtidas por HMBC de **DL10**

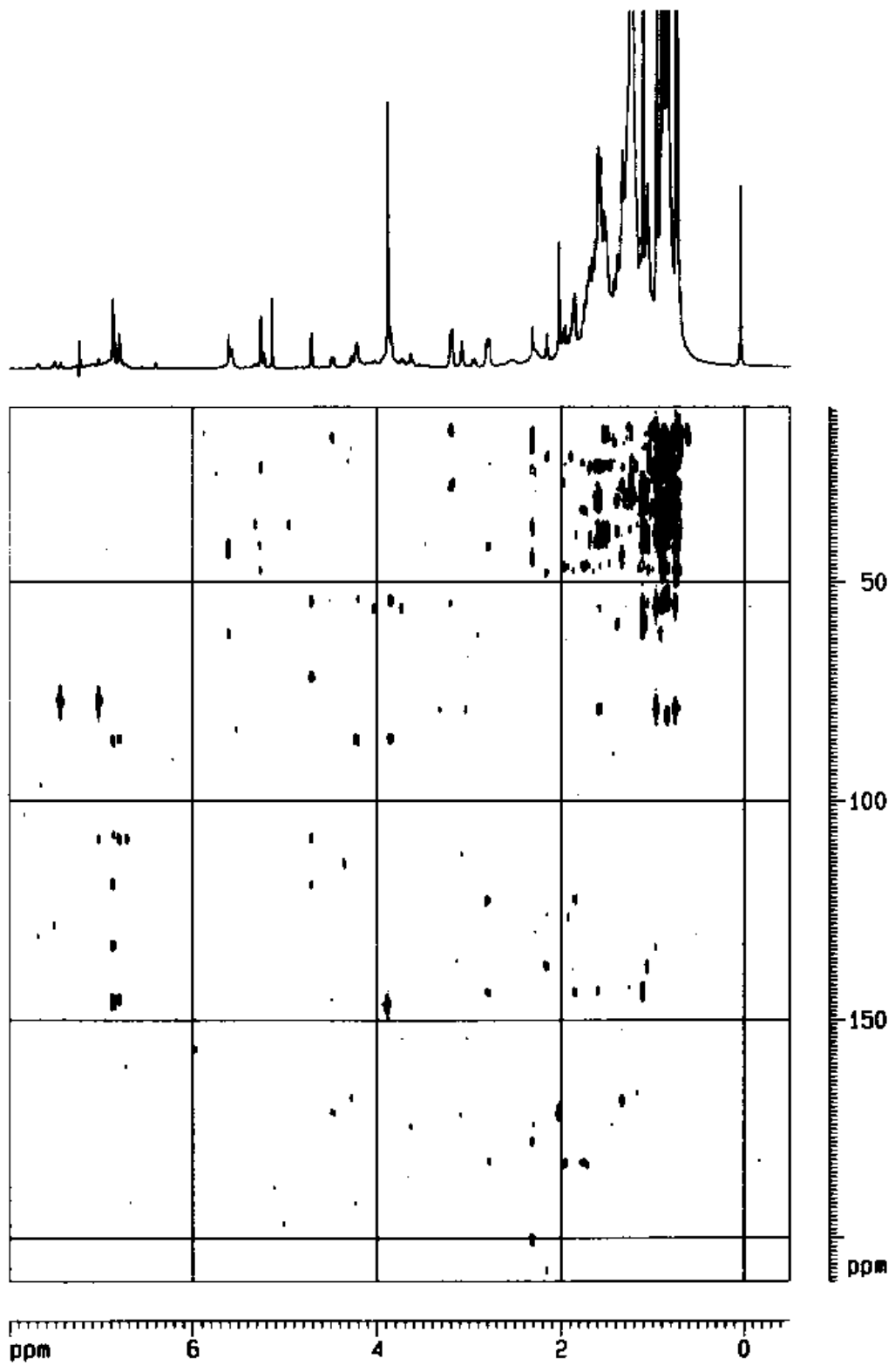


FIGURA 27 – Espectro bidimensional HMBC de **DL10**

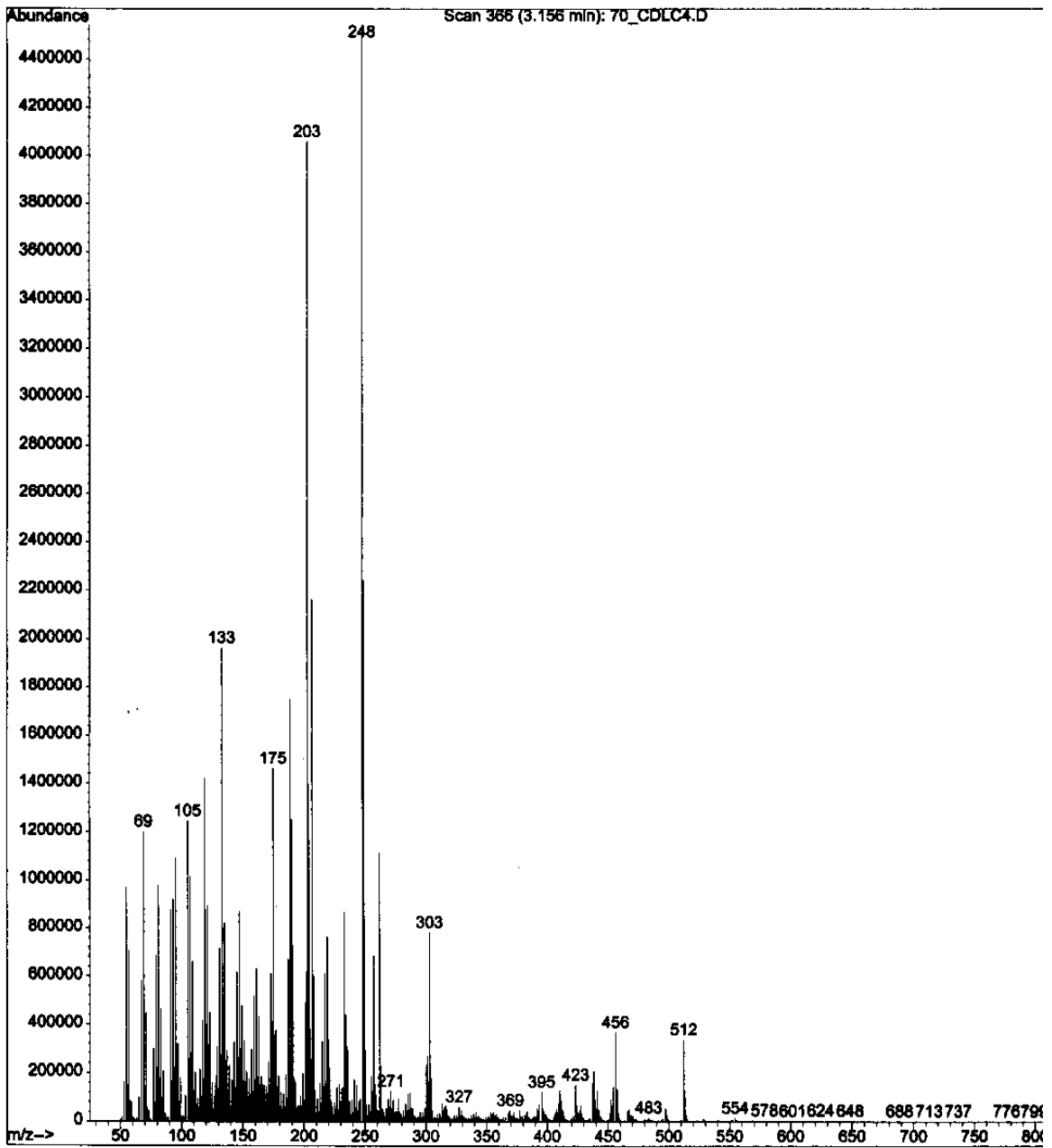


FIGURA 28 – Espectro de Massas de **DL10**

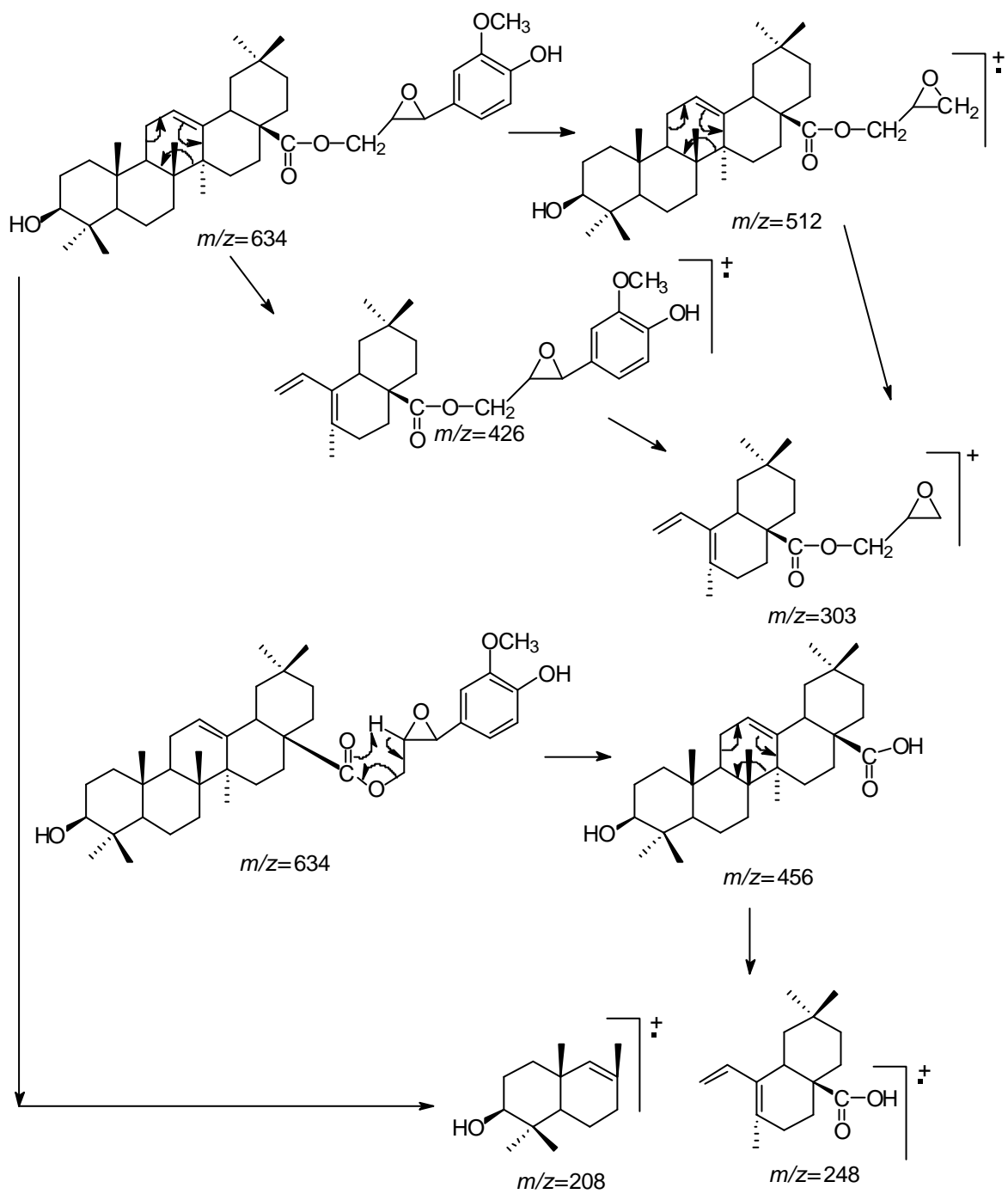
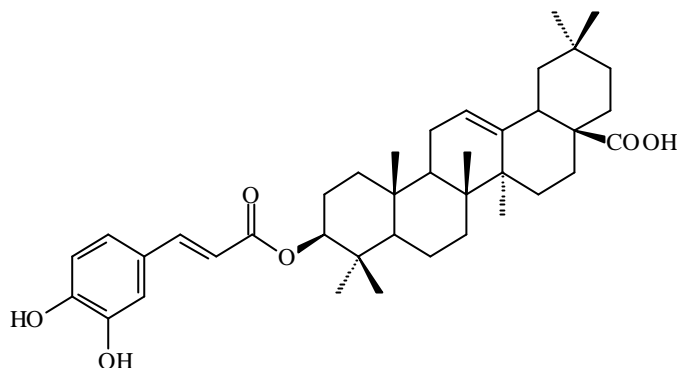


FIGURA 29 – Principais fragmentações de DL10

6.2.4. Identificação do ácido cafeil oleanólico



Ácido cafeil oleanólico (**DL11**)

A CCDC de **DL11** em sílica gel PF₂₅₄ também revelou na radiação UV, indicando a presença de um grupo cromóforo. Análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 30) apresentou além dos sinais característicos do esqueleto oleanano dubletos em δ 7,53 e δ 6,25 sendo que, a constante de acoplamento ($J= 15,8$ Hz) destes era característica de ligação dupla *trans* conjugada a C=O. Os sinais em δ 7,04 (*d*, $J= 1,9$, 1H), δ 6,94 (*dd*, $J= 1,9$, e 8,3, 1H) e δ 6,78 (*d*, $J= 8,3$, 1H) foram atribuídos aos prótons do anel aromático tri-substituído num sistema tipo AMX. O duplo dubleto em δ 4,56 ($J= 11,5$ e 4,9) pertence a um próton oximetínico (H-3) em axial, deslocado para campo mais baixo do que os H-3 dos oleananos em geral, o que sugeriu esterificação nessa posição.

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 31) apresentou sinais para 39 átomos de carbono. Análise conjunta com os espectros de DEPT 135° e DEPT 90° indicou a natureza dos carbonos. Comparação dos valores de deslocamento (Tabela 29) com os descritos na literatura para o ácido oleanólico (Mahato, 1994) confirmou o esqueleto triterpênico. Dentre os sinais de carbono, além daqueles característicos da classe dos oleananos, destacou-se um sinal em δ 169,2 (C-9') atribuído a carbonila de éster o qual encontrava-se ligado, provavelmente, na posição 3 do triterpeno. Os sinais entre δ 145,2-115,1 pertencem aos carbonos *sp*² do anel aromático e das ligações olefínicas do triterpeno e do fenilpropanóide. O sinal do carbono oximetínico em δ 82,3 pertence ao carbono 3 e o fato dele estar deslocado para campo mais baixo quando comparado com o ácido oleanólico

(Tabela 29), confirmou que o mesmo encontrava-se esterificado. Deste modo, **DL11** foi identificado como sendo o ácido cafeil oleanólico, o qual já havia sido isolado de *Betula pubescens* (Pan, 1994). Comparação direta com os dados descritos na literatura para essa substância confirmou a identificação.

Para atribuir inequivocamente alguns deslocamentos de carbono, foi registrado um espectro HETCOR ^1H - ^{13}C (Figura 32) com correlações a longa distância. Correlação do próton H-7' em δ 7,53 com os carbonos em δ 169,2 (C-9'), δ 122,9 (C-6'), δ 115,1 (C-2') e em α com o carbono em δ 146,7 (C-7') (Figura 33) confirmou as atribuições desses carbonos. O próton H-8' em δ 6,25 por sua vez correlacionou com o C-1' em δ 127,7 confirmando a atribuição para esse carbono. As correlações do próton H-2' em δ 7,04 com os carbonos em δ 149,5 (C-4'), δ 122,9 (C-6') e δ 146,7 (C-7') e em α com o carbono em δ 115,1 confirmaram as atribuições para esses carbonos (Figura 33). Esses dados corroborados pelas correlações dos prótons H-6' em δ 6,94 com C-4' e H-5' em δ 6,78 com C-1' e C-3' (Figura 33) confirmaram as atribuições para a unidade fenilpropanoídica.

Embora os EMIE a 70 eV e a 10 eV (Figura 34) não tenham detectado o íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 618, o fragmento m/z 574, formado pela perda de CO_2 , confirmou a identificação de **DL1**.

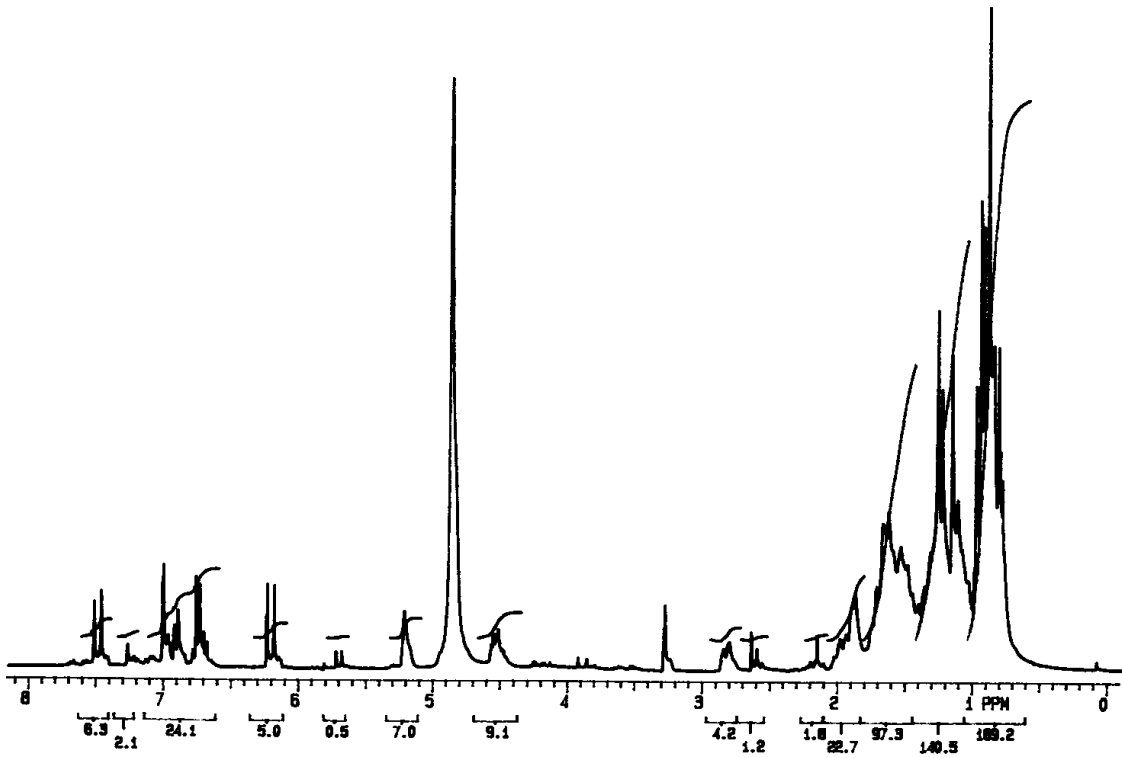


FIGURA 30 – Espectro de RMN ¹H de **DL11** [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

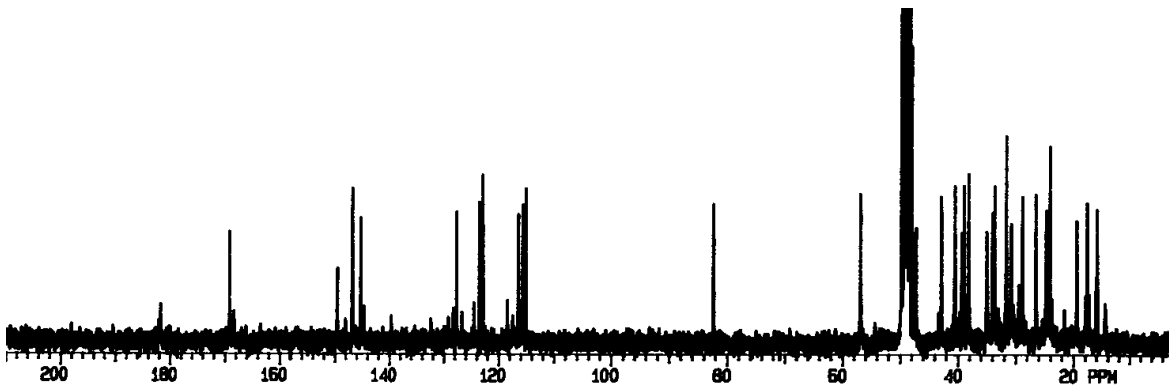


FIGURA 31 – Espectro de RMN ¹³C de **DL11** [75 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

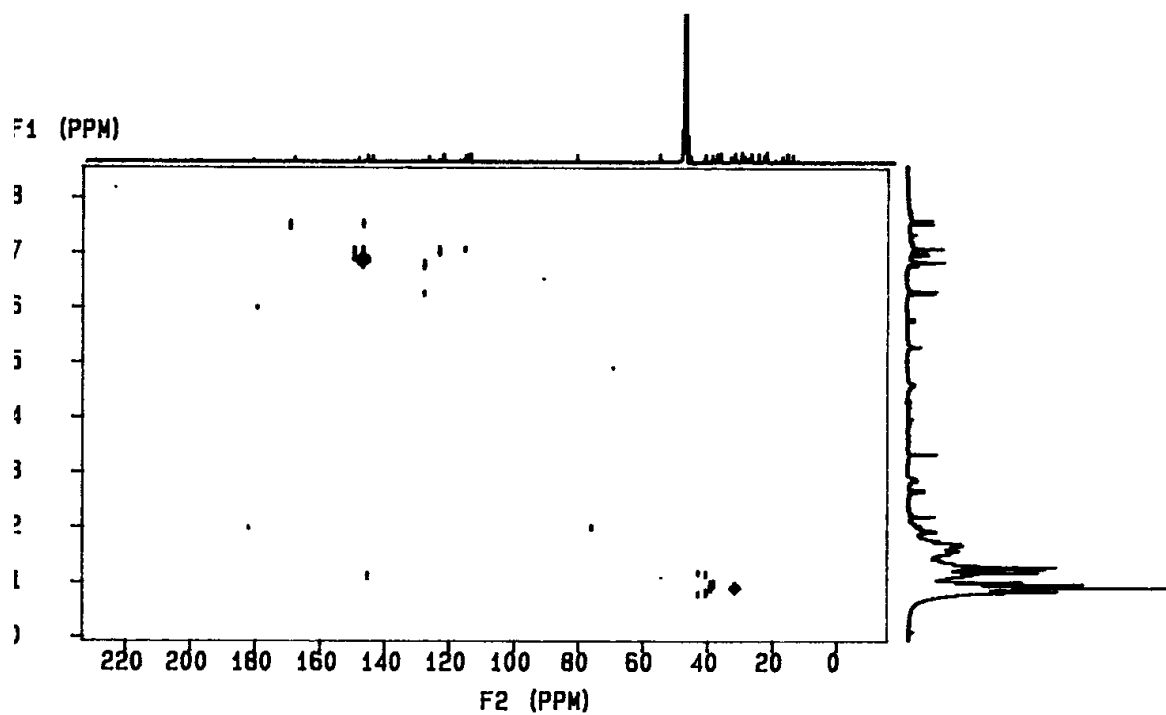


FIGURA 32 – Espectro Bidimensional HETCOR ^1H - ^{13}C $J=9\text{Hz}$ de **DL11**

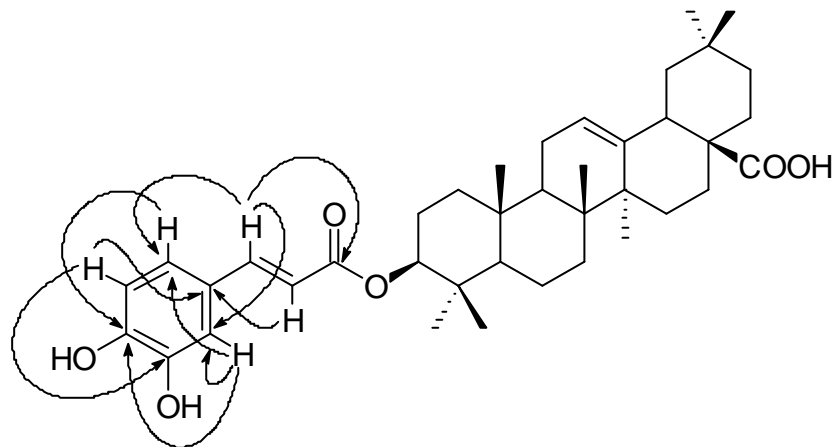


FIGURA 33 – Correlações a longa distância 3J obtidas por HETCOR de **DL11**

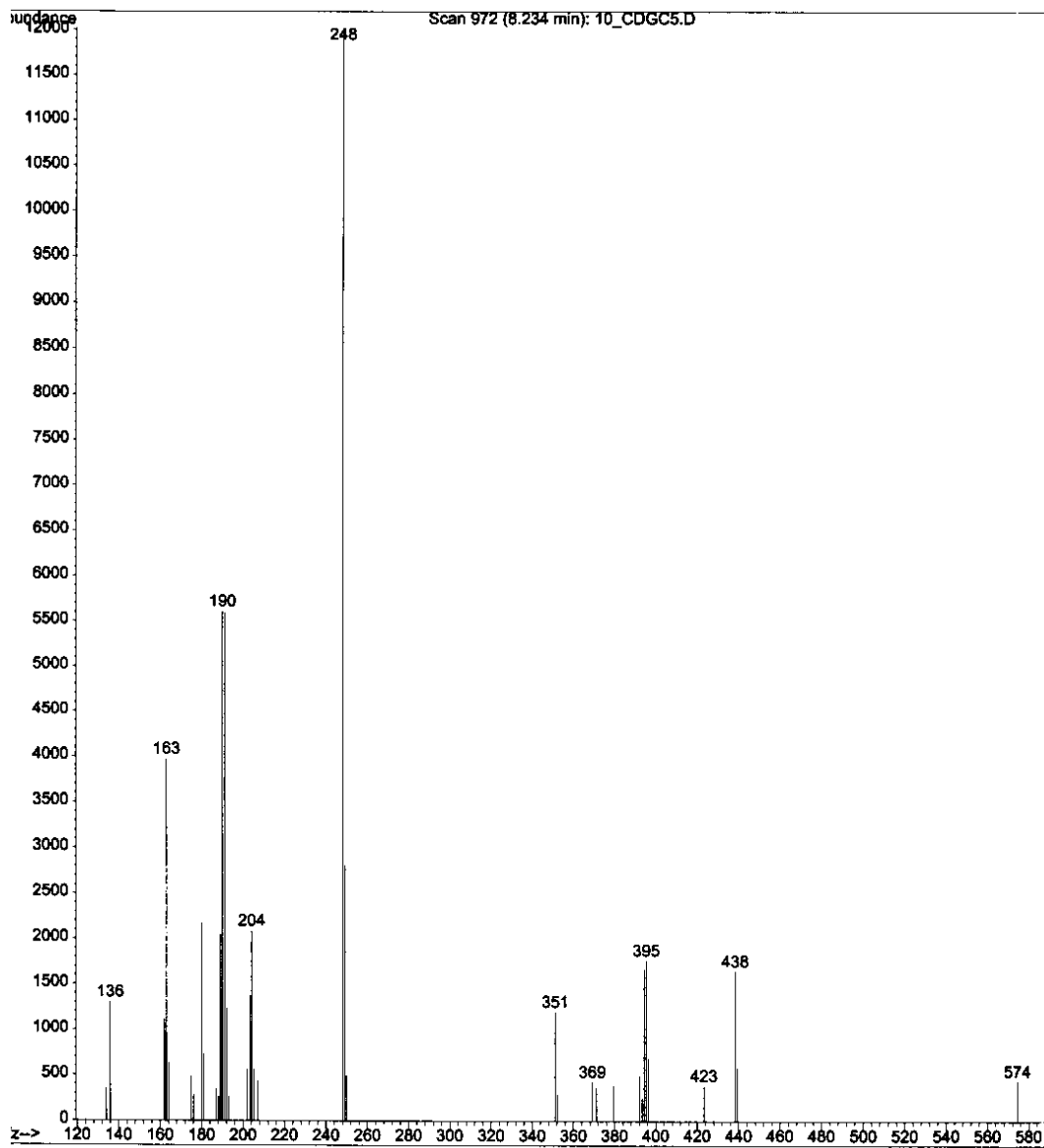
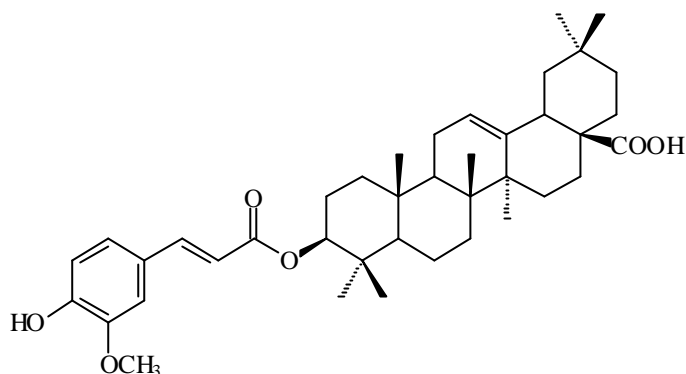


FIGURA 34 – Espectro de Massas de **DL11** (10 eV)

6.2.5. Determinação estrutural do ácido ferulil oleanólico



Ácido ferulil oleanólico (**DL12**)

Assim como **DL11**, a substância **DL12** revelou positivamente em reagente de Liberman-Burchard indicando a natureza triterpênica ou esteroidal e em UV sugerindo a presença de um grupo cromóforo. Análise do espectro de RMN de ^1H (Figuras 35, 36 e 37) apresentou além dos sinais característicos do oleanano (Dados físicos, p. 40) dubletos em δ 7,54 e δ 6,30 com constante de acoplamento ($J= 15,8$) característica da ligação dupla na posição *trans*. Os sinais em δ 7,17 (*d*, $J= 1,95$, 1H), δ 7,03 (*dd*, $J= 1,95$ e 8,19, 1H) e δ 6,87 (*d*, $J= 8,19$, 1H) puderam ser atribuídas aos prótons do anel aromático tri-substituído num sistema AMX. O singlete em δ 3,91 integrando para 3H é característico para metoxila. O sinal em δ 4,58 pertencente ao próton oximetínico (H-3) em axial, deslocado para campo mais baixo que os H-3 dos oleananos em geral, e indicou que o esqueleto triterpênico encontrava-se esterificado nessa posição.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 38) apresentou sinais para 40 átomos de carbono e a análise em conjunto com os espectros DEPT 135° e DEPT 90° indicou tratarem-se de 8 carbonos metílicos, 10 carbonos metilênicos, 10 carbonos metínicos e 12 carbonos não hidrogenados. Dentre os sinais de carbono, além daqueles característicos da classe dos oleananos, destacou-se um sinal em δ 167,2 atribuído a carbonila de éster, o qual provavelmente encontrava-se ligado na posição 3 do triterpeno. O sinal do carbono oximetínico em δ 80,9 pertencia ao carbono 3 e o fato dele estar deslocado para campo mais baixo ($\Delta\delta= 1,8$ ppm) quando comparado ao ácido oleanólico (Tabela 29) indicou que

o mesmo encontrava-se esterificado. Comparação dos demais valores de deslocamento (Tabela 29) com a literatura para o ácido oleanólico (Mahato, 1994) confirmou esse esqueleto triterpênico. A posição do grupo metoxila em C-3' no grupo fenilpropanoídico foi sugerida através da comparação dos dados com os descritos na literatura (Nkengfack, 1997). Dessa maneira **DL12** teve sua estrutura determinada como sendo o ácido ferulil oleanólico.

Comparação dos dados de ^{13}C de **DL12** com **DL11** permitiu atribuir todos os deslocamentos para esta substância, uma vez que os dados de **DL11** haviam sido anteriormente atribuídos com experimento bidimensional HETCOR. Esse foi o primeiro registro dessa substância na literatura.

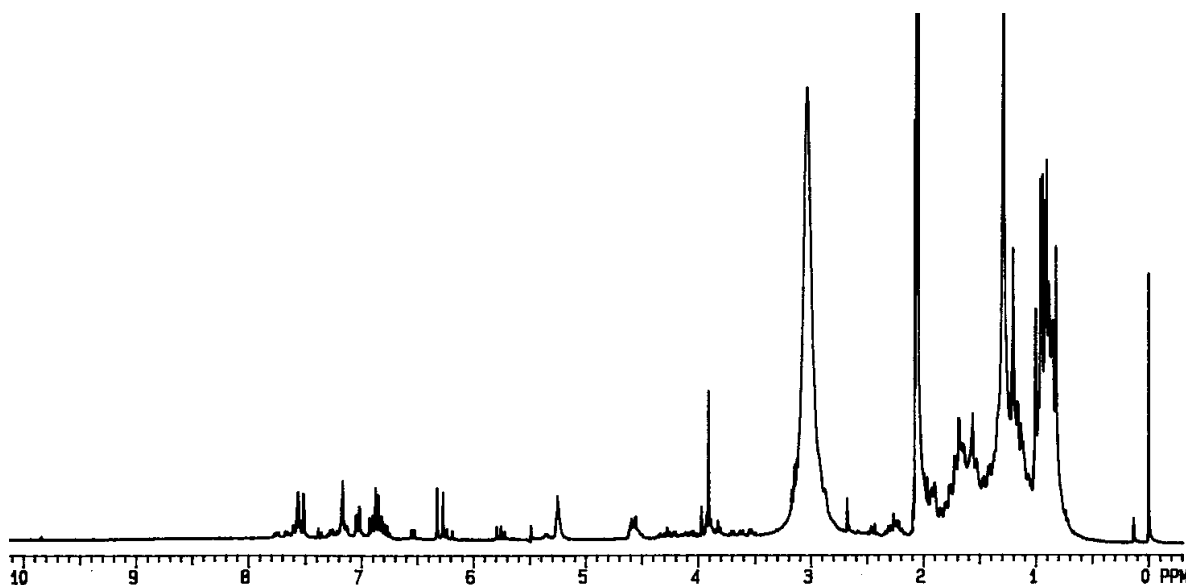


FIGURA 35 – Espectro de RMN ^1H de **DL12** [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

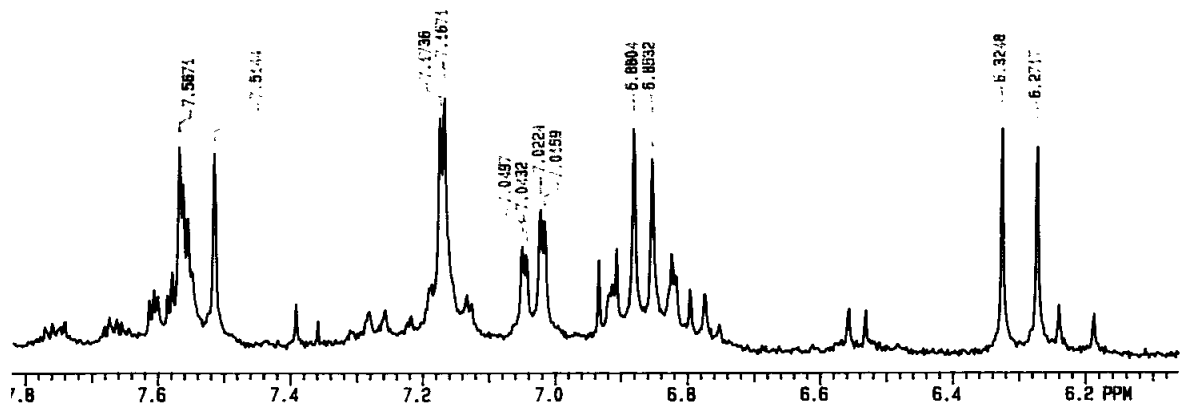


FIGURA 36 – Espectro de RMN ¹H de **DL12** (Ampliação) [300 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

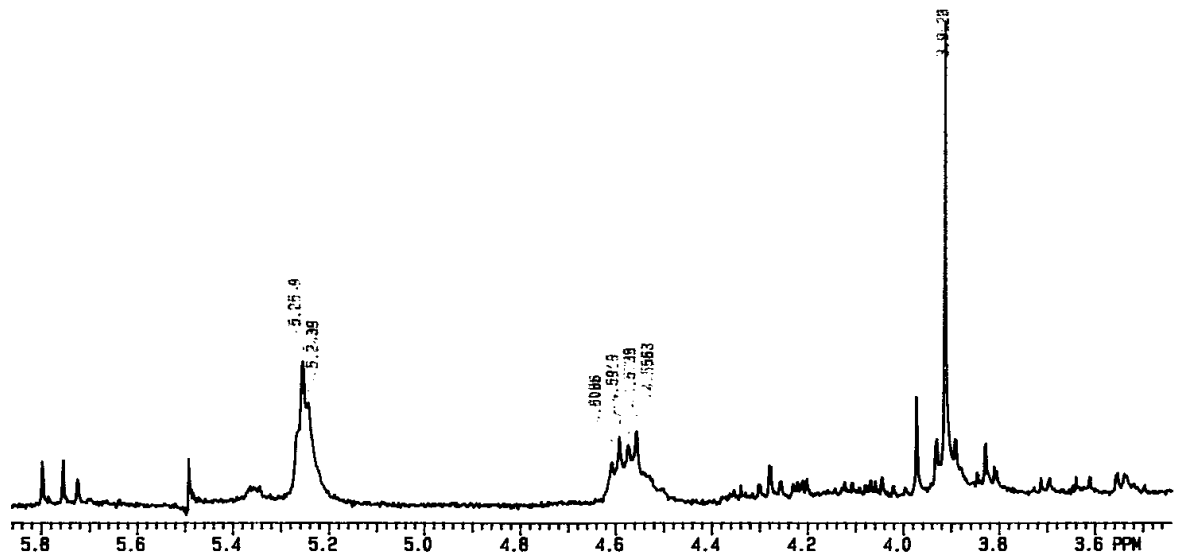


FIGURA 37 – Espectro de RMN ¹H de **DL12** (Ampliação) [300 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

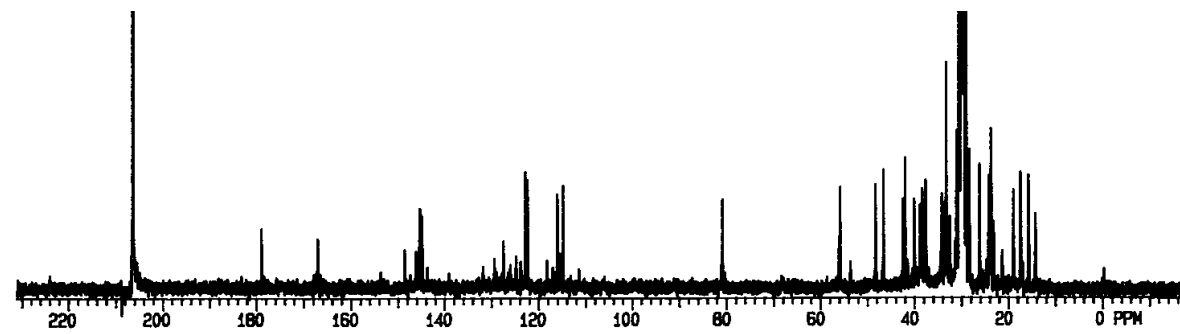


FIGURA 38 - Espectro de RMN ¹³C de **DL12** [75 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

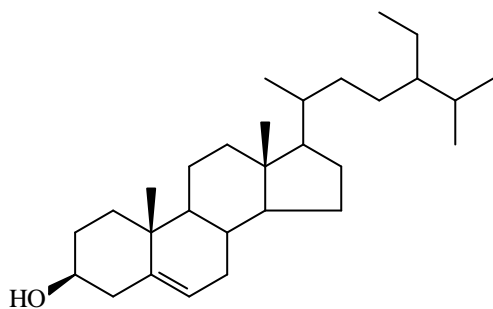
Tabela 29 – Dados de RMN ^{13}C dos triterpenos de esqueleto do oleanano [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$][•]

C	DL3	DL9	DL10	DL11*	DL12**
1	38,1 CH ₂	38,4 CH ₂	38,4 CH ₂	39,4 CH ₂	38,8 CH ₂
2	23,5 CH ₂	27,1 CH ₂	27,2 CH ₂	24,7 CH ₂	24,3 CH ₂
3	81,0 CH	79,1 CH	79,0 CH	82,3 CH	80,9 CH
4	37,7 C	38,7 C	38,7 C	39,0 C	38,5 C
5	55,3 CH	55,2 CH	55,2 CH	56,8 CH	55,9 CH
6	18,2 CH ₂	18,3 CH ₂	18,3 CH ₂	19,4 CH ₂	18,9 CH ₂
7	32,6 CH ₂	32,6 CH ₂	32,6 CH ₂	33,9 CH ₂	33,4 CH ₂
8	39,3 C	39,2 C	39,3 C	40,6 C	40,1 C
9	47,6 CH	47,6 CH	47,6 CH	49,0 CH	48,3 CH
10	37,0 C	37,1 C	37,1 C	38,2 C	37,7 C
11	23,4 CH ₂	22,7 CH ₂	23,4 CH ₂	24,5 CH ₂	24,0 CH ₂
12	122,5 CH	122,6 CH	122,6 CH	123,5 CH	122,8 CH
13	143,6 C	143,5 C	143,6 C	145,2 C	144,9 C
14	41,6 C	41,6 C	41,6 C	42,9 C	42,5 C
15	27,7 CH ₂	27,7 CH ₂	27,7 CH ₂	28,8 CH ₂	30,3 CH ₂
16	23,0 CH ₂	23,4 CH ₂	22,9 CH ₂	24,1 CH ₂	23,6 CH ₂
17	46,6 C	46,5 C	46,5 C	47,6 C	46,8 C
18	41,0 CH	41,0 CH	41,0 CH	42,7 CH	42,1 CH
19	45,8 CH ₂	45,8 CH ₂	45,9 CH ₂	47,3 CH ₂	46,7 CH ₂
20	30,7 C	30,7 C	30,7 C	31,6 C	31,2 C
21	33,8 CH ₂	33,6 CH ₂	33,8 CH ₂	34,9 CH ₂	34,4 CH ₂
22	32,4 CH ₂	31,9 CH ₂	32,4 CH ₂	33,8 CH ₂	33,5 CH ₂
23	28,0 CH ₃	28,1 CH ₃	28,1 CH ₃	28,7 CH ₃	28,4 CH ₃
24	16,7 CH ₃	15,6 CH ₃	15,5 CH ₃	17,4 CH ₃	17,2 CH ₃
25	15,4 CH ₃	15,3 CH ₃	15,3 CH ₃	16,0 CH ₃	15,7 CH ₃
26	17,0 CH ₃	17,0 CH ₃	17,1 CH ₃	17,7 CH ₃	17,5 CH ₃
27	25,9 CH ₃	25,9 CH ₃	25,9 CH ₃	26,5 CH ₃	26,2 CH ₃
28	183,9 C	183,1 C	182,6 C	181,8 C	178,9 C
29	33,1 CH ₃	33,1 CH ₃	33,0 CH ₃	33,6 CH ₃	33,3 CH ₃
30	23,6 CH ₃	23,6 CH ₃	23,6 CH ₃	24,0 CH ₃	23,8 CH ₃
1'	171,1 C	-	132,9 C	127,7 C	127,5 C
2'	21,3 CH ₃	-	108,6 CH	115,1 CH	114,9 CH
3'	-	-	146,7 C	146,8 C	146,3 C
4'	-	-	145,2 C	149,5 C	148,7 C
5'	-	-	114,3 CH	116,5 CH	116,2 CH
6'	-	-	118,9 CH	122,9 CH	122,4 CH
7'	-	-	85,9 CH	146,7 CH	145,4 CH
8'	-	-	54,2 CH	115,6 CH	115,9 CH
9'	-	-	71,7 CH ₂	169,2 C	167,2 C
OCH ₃	-	-	55,9 CH ₃	-	56,0 CH ₃

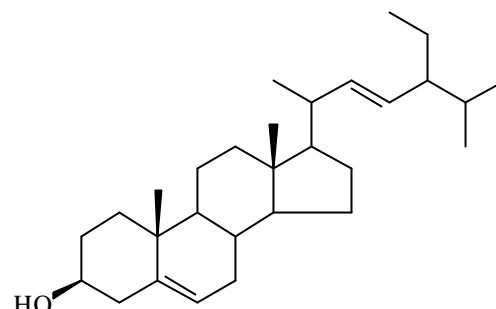
* CD_3OD , ** $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, •multiplicidades obtidas por DEPT 135° e DEPT 90°

6.3. Esteróides

6.3.1. Identificação do **b**-sitosterol e do estigmasterol



b-sitosterol (DL4)



stigmasterol (DL5)

A amostra apresentou resultado positivo para revelador químico de Liberman-Burchard sugerindo tratarem-se de duas substâncias **DL4** e **DL5** da classe dos triterpenos ou esteróides. Devido à polaridade na qual foram isoladas suspeitou-se previamente tratarem-se do **b**-sitosterol e do estigmasterol. CCDC da mistura juntamente com padrões dessas substâncias, anteriormente isolados e caracterizados de outra fonte vegetal, indicaram que a mesma era constituída desses dois bem conhecidos esteróides.

A pesar da identificação foi registrado o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) da mistura onde observou-se a presença de 56 sinais, já que os referentes a dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 coincidiram no mesmo ponto, porém com intensidade maior, tendo portanto 58 átomos de carbono, 29 para cada. Como o **b**-sitosterol encontrava-se em quantidade maior que o estigmasterol, a identificação dos sinais foi facilmente realizada, com ajuda dos espectros DEPT 135° e DEPT 90°. Dentre os sinais registrados os mais relevantes foram δ 140,7 (C) e δ 121,7 (CH) da dupla referente ao C-5 bem como δ 138,3 (CH) e δ 129,2 (CH) pertencentes a dupla do C-22 do estigmasterol, além dos sinais em δ 71,8 (CH) do carbono 3 hidroxilado. Comparação dos demais deslocamentos de ambos (Tabela 30) com dados da literatura confirmou a presença dos dois esteróides (Ricca, 1978; Greca, 1990).

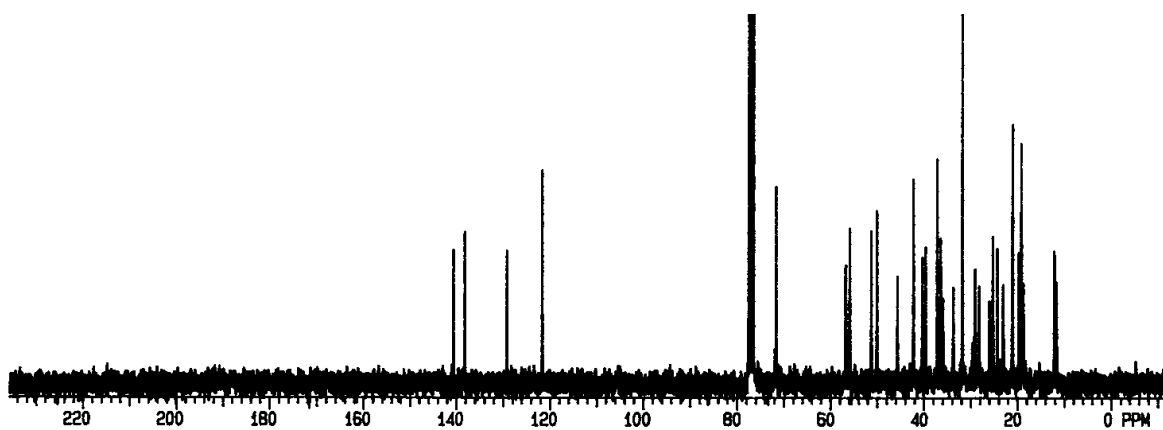


FIGURA 39 – Espectro de RMN ^{13}C da mistura **DL4** e **DL5** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

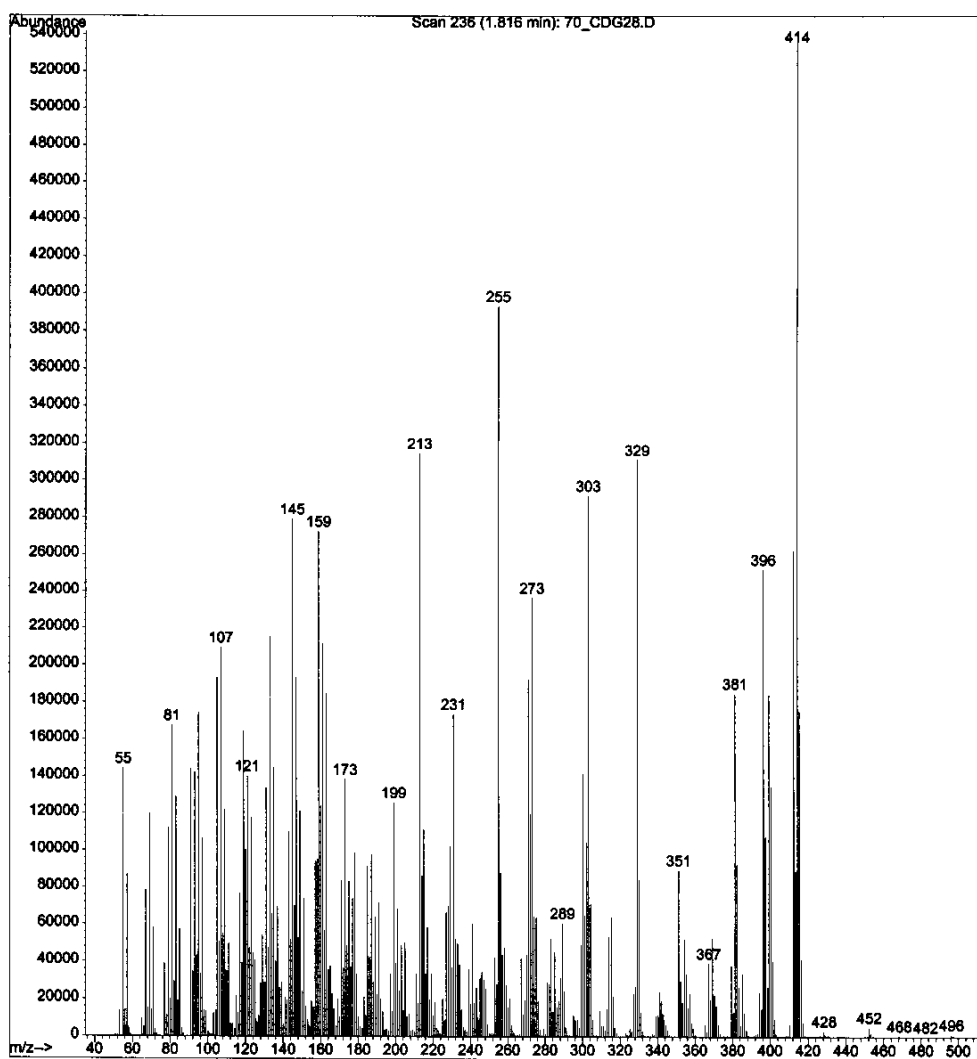


FIGURA 40 – Espectro de Massas da mistura **DL4** e **DL5**

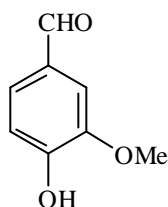
Tabela 30 – Dados de RMN de ^{13}C dos esteróides [75 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]*

C	DL4	DL5
1	37,2 CH ₂	37,2 CH ₂
2	31,6 CH ₂	31,6 CH ₂
3	71,8 CH	71,8 CH
4	42,3 CH ₂	42,2 CH ₂
5	140,7 C	140,7 C
6	121,7 CH	121,7 CH
7	31,9 CH ₂	31,9 CH ₂
8	31,9 CH	31,9 CH
9	50,1 CH	50,1 CH
10	36,5 C	36,1 C
11	21,1 CH ₂	19,8 CH ₂
12	39,7 CH ₂	39,7 CH ₂
13	42,2 C	42,2 C
14	56,7 CH	56,0 CH
15	24,4 CH ₂	24,3 CH ₂
16	28,2 CH ₂	28,9 CH ₂
17	55,9 C	56,8 C
18	11,9 CH ₃	12,0 CH ₃
19	19,4 CH ₃	19,4 CH ₃
20	36,1 CH	40,5 CH
21	18,8 CH ₃	21,1 CH ₃
22	33,9 CH ₂	138,3 CH
23	26,1 CH ₂	129,2 CH
24	45,8 CH	51,2 CH
25	29,1 CH	31,9 CH
26	19,8 CH ₃	21,2 CH ₃
27	19,0 CH ₃	18,9 CH ₃
28	23,0 CH ₂	25,4 CH ₂
29	11,8 CH ₃	12,2 CH ₃

* multiplicidades obtidas por DEPT 135° e DEPT 90°

6.4. Vanilina e vanilato de metila

6.4.1 Identificação da Vanilina



Vanilina (**DL6**)

A substância **DL6** apresentou odor agradável, ligeiramente adocicado, e, como a CCDC dessa substância revelava em luz UV foi submetida a análise instrumental. Análise de seu espectro de RMN de ^1H (Figura 42) foi bastante simples e elucidativa. Apresentou um singlete em δ 9,84 integrando para 1 hidrogênio, característico para próton de aldeído. Os sinais na região de δ 7.5 – 7.0 (Dados físicos, p. 38) permitiram estabelecer a natureza aromática da substância com sistema AMX de substituição. Outras características foram a presença de um singlete em δ 6,20 pertence a hidroxila fenólica, e um singlete em δ 3,98 integrando para 3 hidrogênios, característico de metoxila ligada a C_{sp^2} .

Comparação do espectro de RMN de ^1H com a literatura (Sadler, 1972), análise da multiplicidade e constantes de acoplamento bem como análise do espectro de massas (Figura 43) em comparação com o arquivo de espectros do equipamento confirmou que **DL6** era a vanilina. Foi observado além do íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 152, o íon referente a perda de H radicalar muito intenso em aldeídos aromáticos em m/z 151, seguido da perda de CO do aldeído em m/z 123. Destacou-se também a perda de CH_3 em m/z 137, seguida da perda de CO em m/z 109. As fragmentações são detalhadas a seguir (Figura 41).

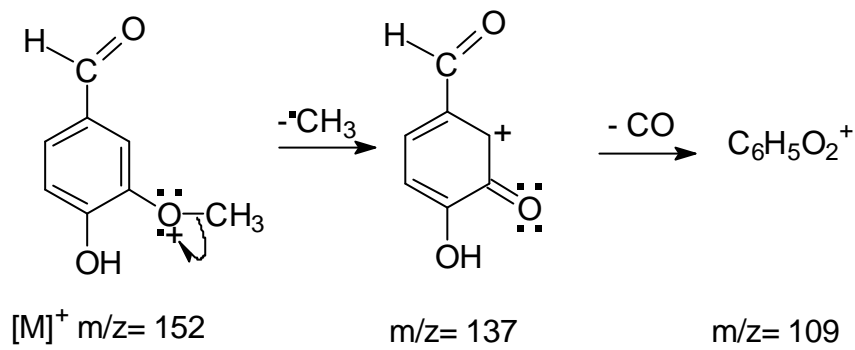
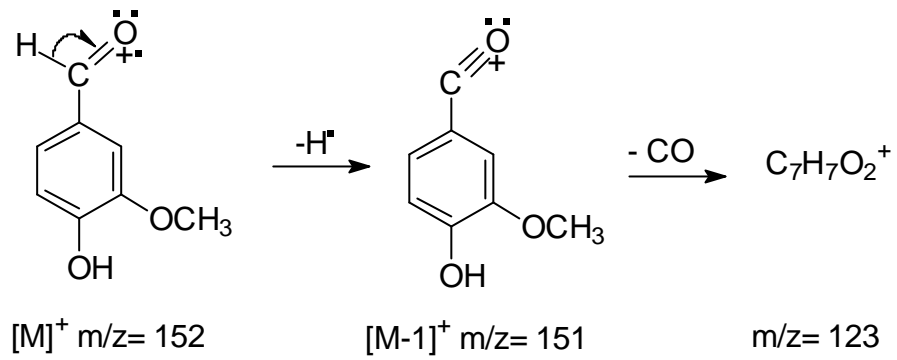


FIGURA 41 – Fragmentações principais da Vanilina

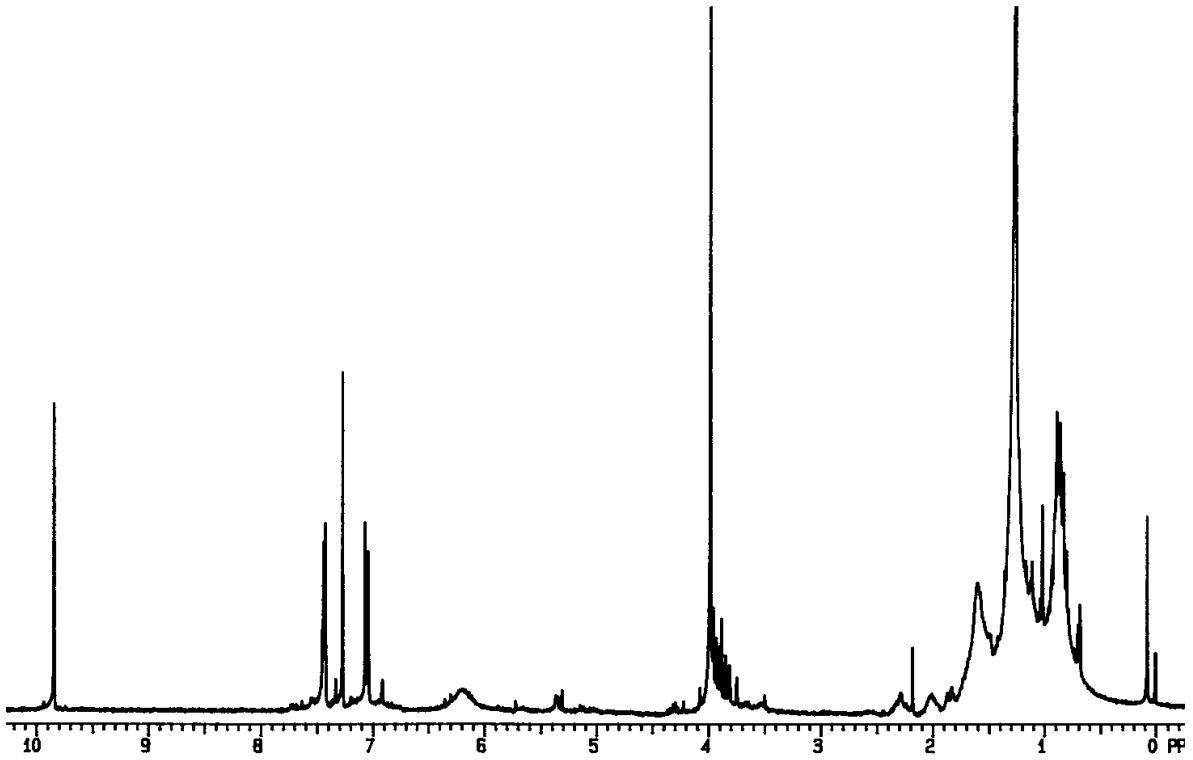


FIGURA 42 – Espectro de RMN ^1H de **DL6** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

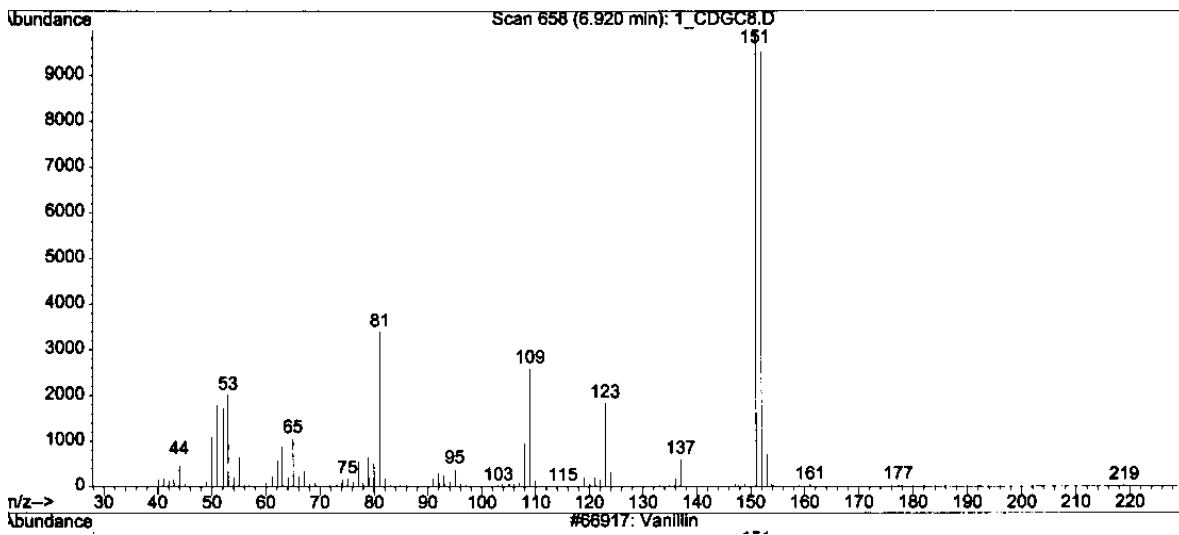
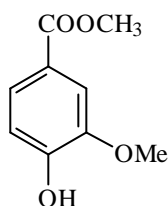


FIGURA 43 – Espectro de massas de **DL6**

6.4.2. Identificação do vanilato de metila



Vanilato de metila (**DL7**)

A substância **DL7** também apresentou odor agradável, ligeiramente adocicado, e como a sua CCDC revelava em luz UV foi submetida a análise instrumental. Análise de seu espectro de RMN de ¹H (Figura 45) foi suficiente para a identificação da amostra. Os sinais na região de δ 7.7 – 6.9 (Dados físicos, p. 38) permitiram estabelecer a natureza aromática da substância apresentando um anel benzênico com sistema AMX de substituição. Pode-se verificar também um singlete em δ 6,00 referente a hidroxila fenólica, bem como dois singletos característicos de grupos metoxílicos (δ 3,96 e δ 3,89).

Comparação do espectro de RMN de ¹H com a literatura (Sadtler, 1972), análise da multiplicidade e constantes de acoplamento bem como análise do espectro de massas (Figura 46) em comparação com o arquivo de espectros do equipamento identificou **DL7** como sendo o vanilato de metila. No EMIE a 70 eV de **DL7**, além do íon molecular [M]⁺ em m/z 182, destacou-se o pico base em m/z 151 referente a perda da metoxila do éster. As fragmentações são detalhadas a seguir (Figura 44).

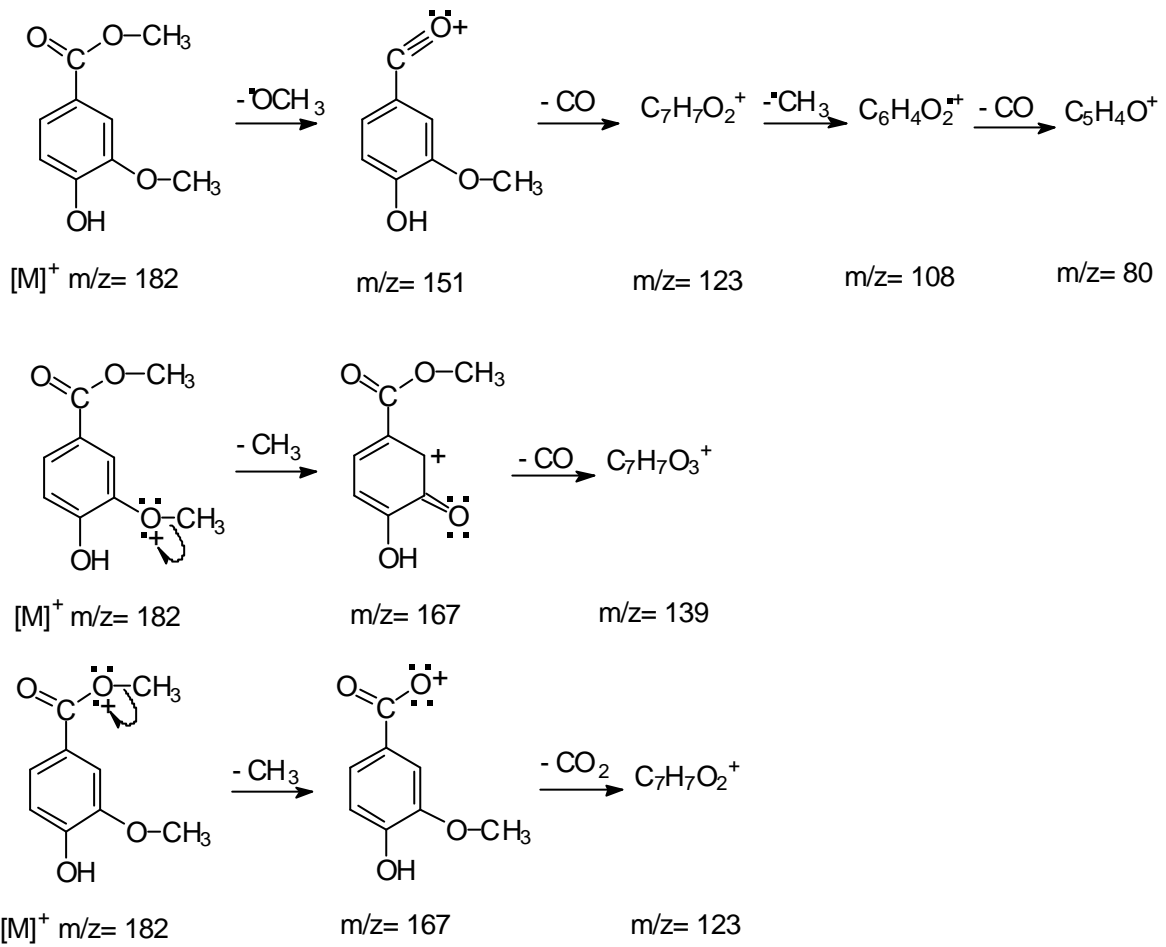


FIGURA 44 – Fragmentações principais do vanilato de metila

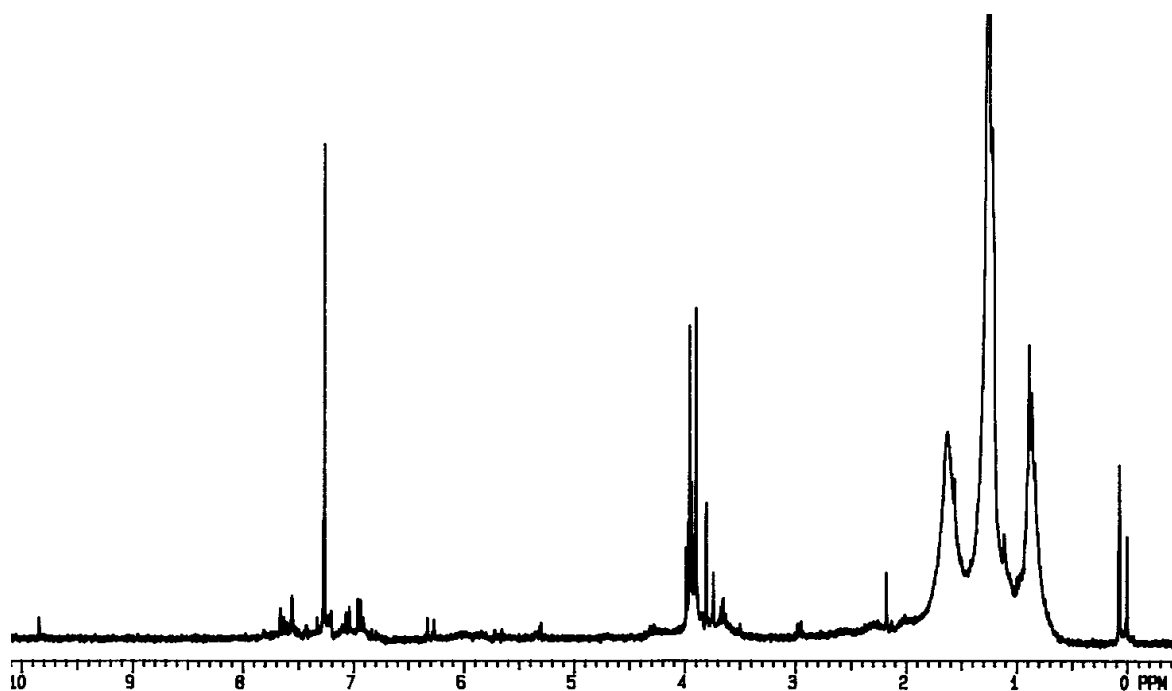


FIGURA 45 – Espectro de RMN ¹H de **DL7** [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

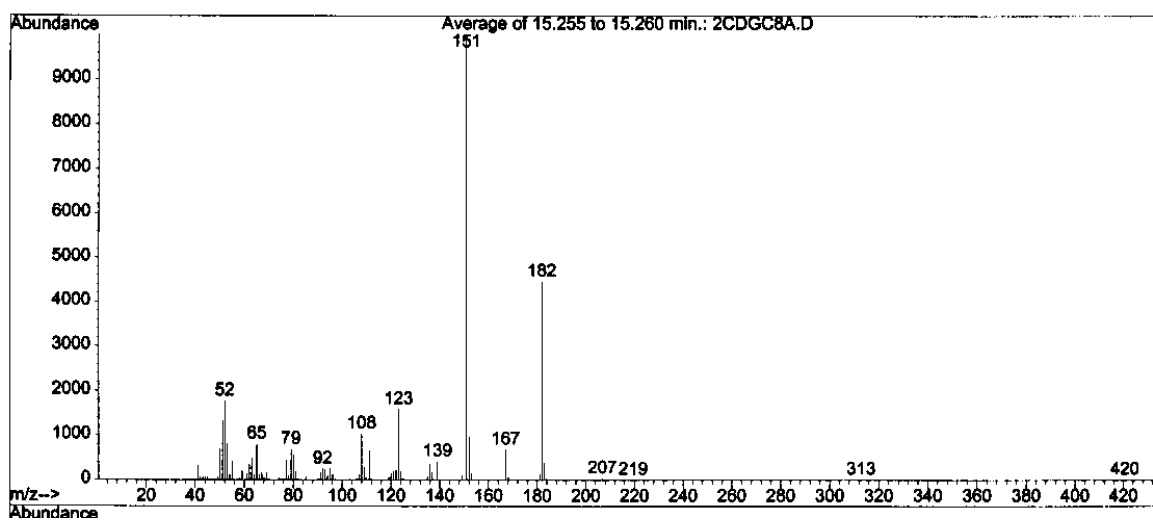
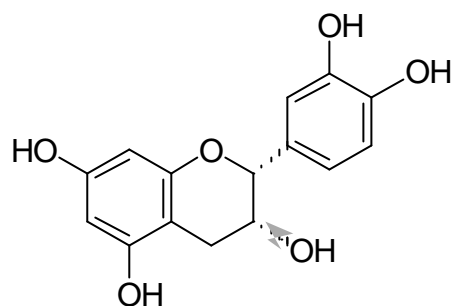


FIGURA 46 – Espectro de massas de **DL7**

6.5. Flavonóides

6.5.1. Identificação da (-)-epicatequina



(-)-epicatequina (**DL15**)

A substância **DL15** revelou positivamente em luz UV sugerindo a presença de grupo cromóforo. Análise de seu espectro de RMN de ^1H (Figura 47), em mistura com o lipídol, apresentou dois sinais em δ 2,86 *dd* e δ 2,74 *dd* característicos de flavanas ou flavanóis devido ao CH_2 na posição 4. Os 5 sinais referentes a prótons aromáticos (Tabela 31) com suas constantes de acoplamento além dos outros sinais sugeriram um flavonóide substituído nas posições 3, 3', 4', 5 e 7. O sinal em δ 4,80 *br s* confirmou a configuração relativa *cis* para os prótons nas posições 2 e 3.

O EMIE a 70 eV apresentou íon molecular m/z 290 (Figura 49) e o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 48) apresentou 15 sinais (Dados físicos, p. 41), tendo sido esses dados condizentes com as catequinas. Análise dos espectros DEPT 135° e DEPT 90° demonstrou tratarem-se de 1 carbono metilênico, 7 carbonos metínicos e 7 carbonos não hidrogenados. Comparação direta com os dados da literatura (Jacques, 1974) confirmou **DL15** como sendo a *epicatequina*. O carbonos foram atribuídos com base em experimentos bidimensionais HETCOR ^1H - ^{13}C a longa distância (Tabela 31). A obtenção do $[\alpha]_{\text{D}} = -16^\circ$ confirmou tratar-se da (-)-*epicatequina*.

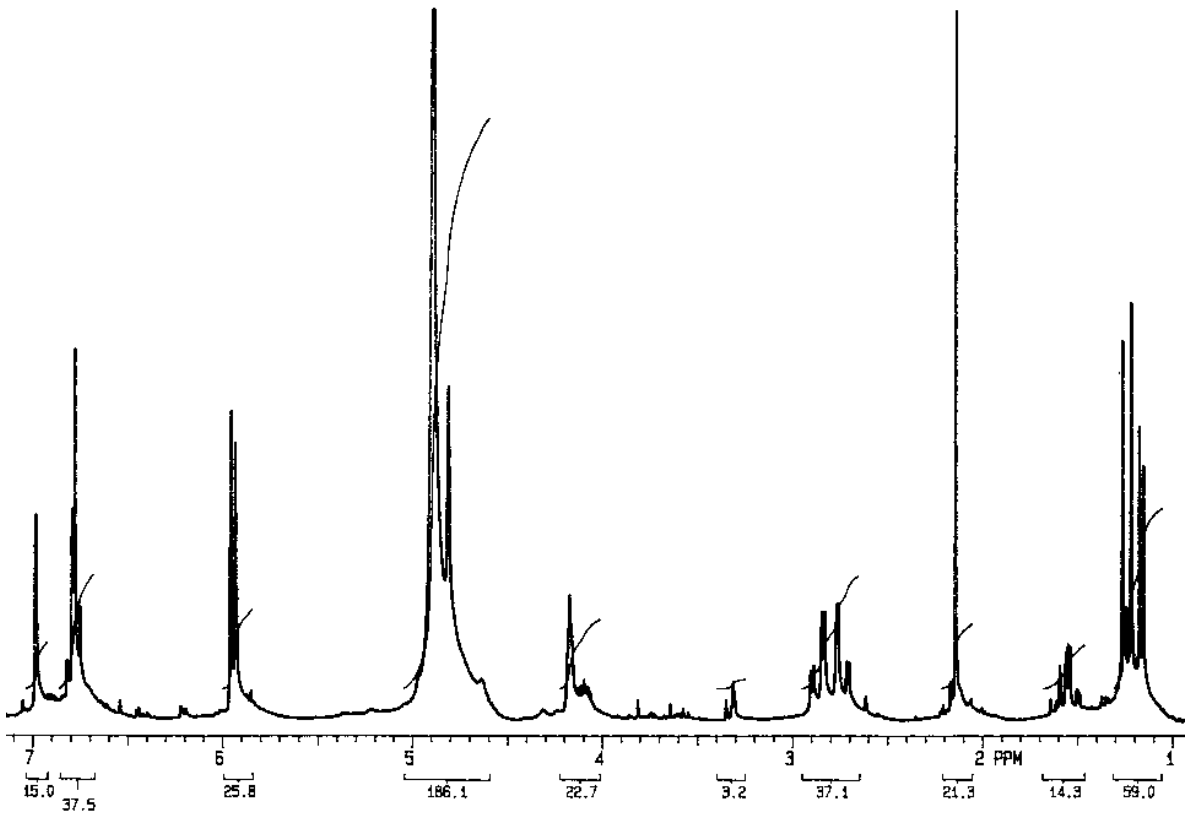


FIGURA 47 – Espectro de RMN ^1H de **DL15** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] em mistura com **DL16**

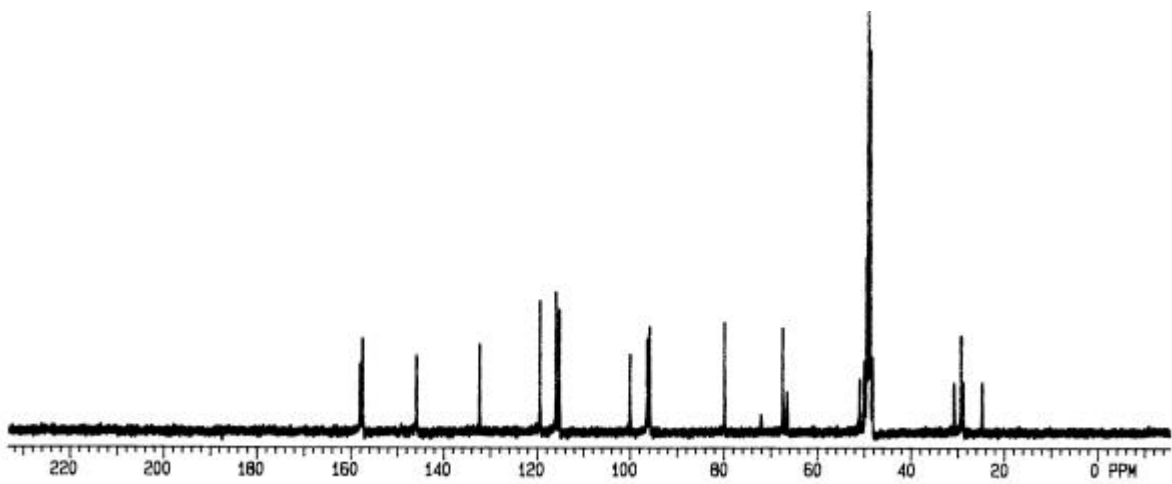


FIGURA 48 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL15** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

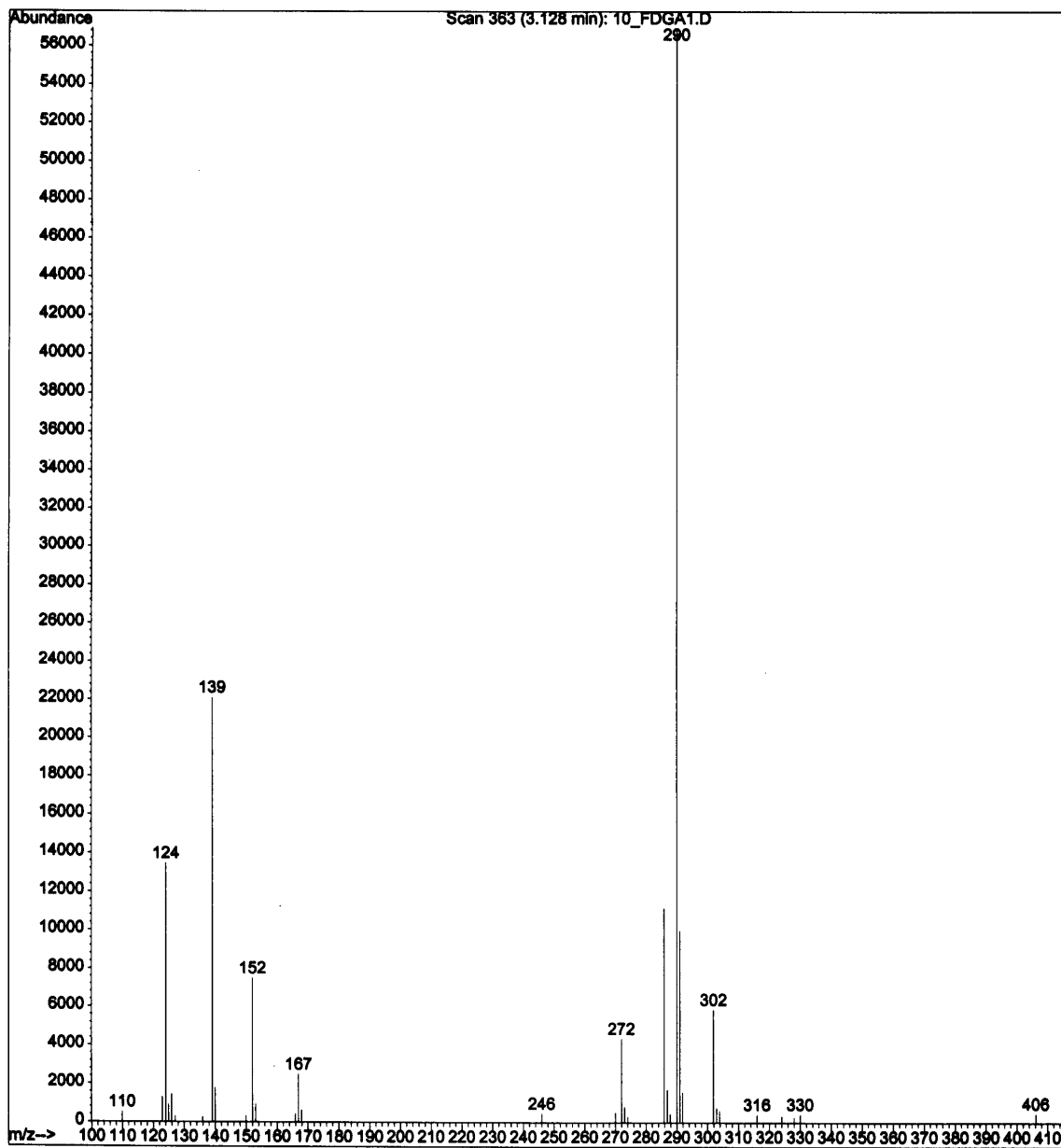


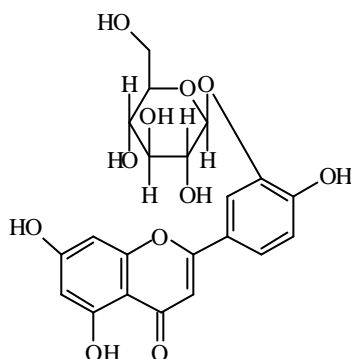
FIGURA 49 – EMIE de **DL15**

Tabela 31 – ^1H NMR*, ^{13}C NMR**, HETCOR e correlações ^1H - ^{13}C a longa distância de DL15

Posição	δ -C Multiplicidade [#]	δ -H	LRHETCOR	
			^2J	^3J
2	79,78 CH	4,80 br <i>s</i>	132,22	115,27; 119,39
3	67,40 CH	4,17 <i>m</i>	79,78	100,06
4a	29,20 CH ₂	2,86 <i>dd</i> (16,9; 4,4)	67,40; 100,06	79,78; 157,29; 157,55
4b		2,74 <i>dd</i> (16,9; 2,9)	67,40; 100,06	79,78; 157,29; 157,55
5	157,29 C	-	-	-
6	94,39 CH	5,95 <i>d</i> (2,2)	157,90	-
7	157,90 C	-	-	-
8	95,88 CH	5,93 <i>d</i> (2,2)	157,55	96,39
9	157,55 C	-	-	-
10	100,06 C	-	-	-
1'	132,22 C	-	-	-
2'	115,27 CH	6,98 <i>d</i> (1,8)	79,78	145,68; 119,39
3'	145,85 C	-	-	-
4'	145,68 C	-	-	-
5'	115,89 CH	6,76 <i>d</i> (7,8)	-	145,85; 132,22
6'	119,39 CH	6,80 <i>dd</i> (7,8; 1,8)	115,89; 132,22	115,27; 79,78

*300 MHz, CD₃OD, δ (ppm), J(Hz); **75 MHz. [#]Multiplicidade obtida por DEPT 135° e DEPT 90°.

6.5.2 Identificação da 3'-*b*-D-glicopiranosídeo luteolina



3'-*b*-D-glicopiranosídeo luteolina (**DL18**)

O espectro de RMN de ^1H de **DL18** (Figura 50) revelou a presença de um singlete largo em δ 12,9 característico de um próton referente a hidroxila fenólica na posição *b* a carbonila. Os três hidrogênios ligados a carbonos aromáticos na região δ 6,8-8,0 e análise de suas constantes de acoplamento indicaram um anel B de flavonóide com padrão de substituição AMX. O singlete em δ 6,80 é característico de H-3 de flavona, assim como os dois dubletos em δ 6,19 e δ 6,52 ($J = 1,7$ Hz) são característicos do anel A de flavonas substituídas em C-5 e C-7 (Harborne, 1994). Além desses sinais, puderam-se verificar vários outros entre δ 5,0-3,2 de prótons ligados a carbonos oxigenados, sugerindo um *b*-glicosídeo.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 51) apresentou 21 sinais, coerentes com uma flavona glicosilada. Experimentos de DEPT 135° e DEPT 90° permitiram juntamente com a comparação dos deslocamentos de C-13 (Tabela 32) com os dados da literatura (Markhan, 1978) identificar **DL18** como sendo a 3'-*b*-D-glicopiranosídeo luteolina. Para confirmar a posição do açúcar foram registrados espectros de UV em MeOH com adição de reagentes diagnóstico de deslocamento (AlCl_3 , MeONa, e NaOAc) (Dados físicos, p. 42). O deslocamento batocrômico de 52 nm da banda I (300-380 nm) com a adição de MeONa indicou que a HO-4' estava livre. O não decaimento desse sinal com o passar do tempo indicou a ausência de hidroxila livre em 3'. O deslocamento batocrômico de 7 nm da banda II (240-280 nm) ao adicionar NaOAc devido a ionização de uma hidroxila, diagnosticou a sua presença em C-7. A adição de AlCl_3 forma complexo com hidroxila vizinha a carbonila

e com duas hidroxilas vizinhas causando efeito batocrômico em ambas as bandas, porém no caso de hidroxilas vizinhas esse complexo se desfaz com a adição de HCl. Como não foi observada diminuição de efeito batocrômico ($\Delta\lambda = 7$ nm) com a adição de HCl ao complexo formado com $AlCl_3$, comprovou-se a ausência de hidroxilas vizinhas (Mabry, 1970). Deste modo conclui-se então a presença de hidroxilas em 5, 7, e 4', e como não ocorreram hidroxilas em posições vizinhas, a flavona encontra-se glicosilada na posição 3'. O espectro de massas (Figura 52) embora não tenha apresentado o íon molecular apresentou o fragmento em m/z 446, referente a perda de uma molécula de H_2 .

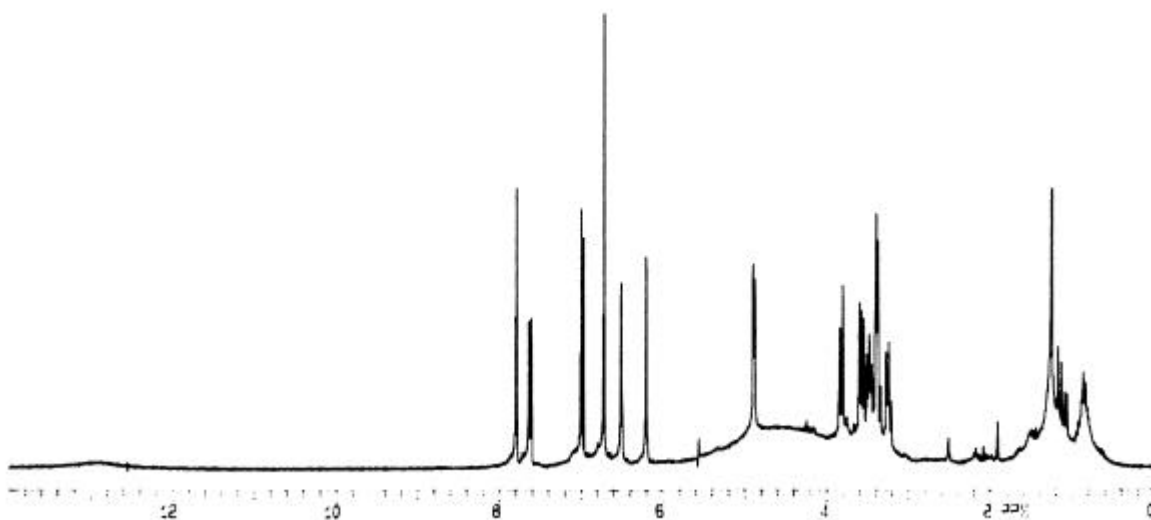


FIGURA 50 – Espectro de RMN 1H de **DL18** [300 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

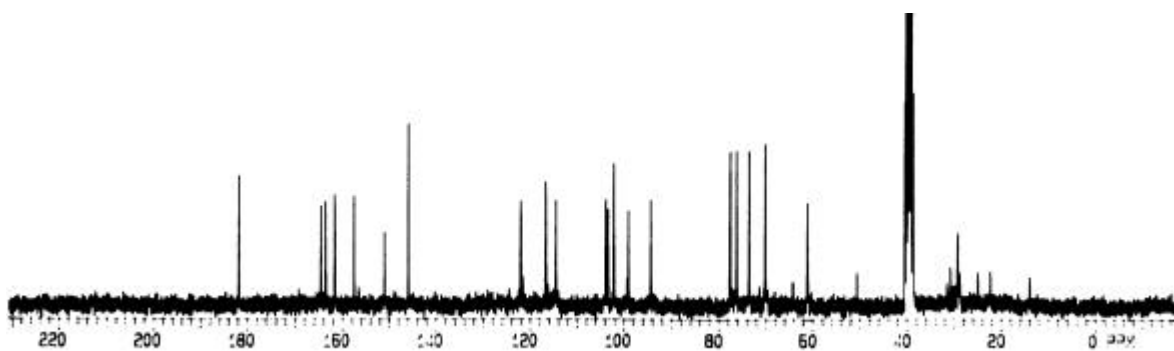


FIGURA 51 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL18** [75 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

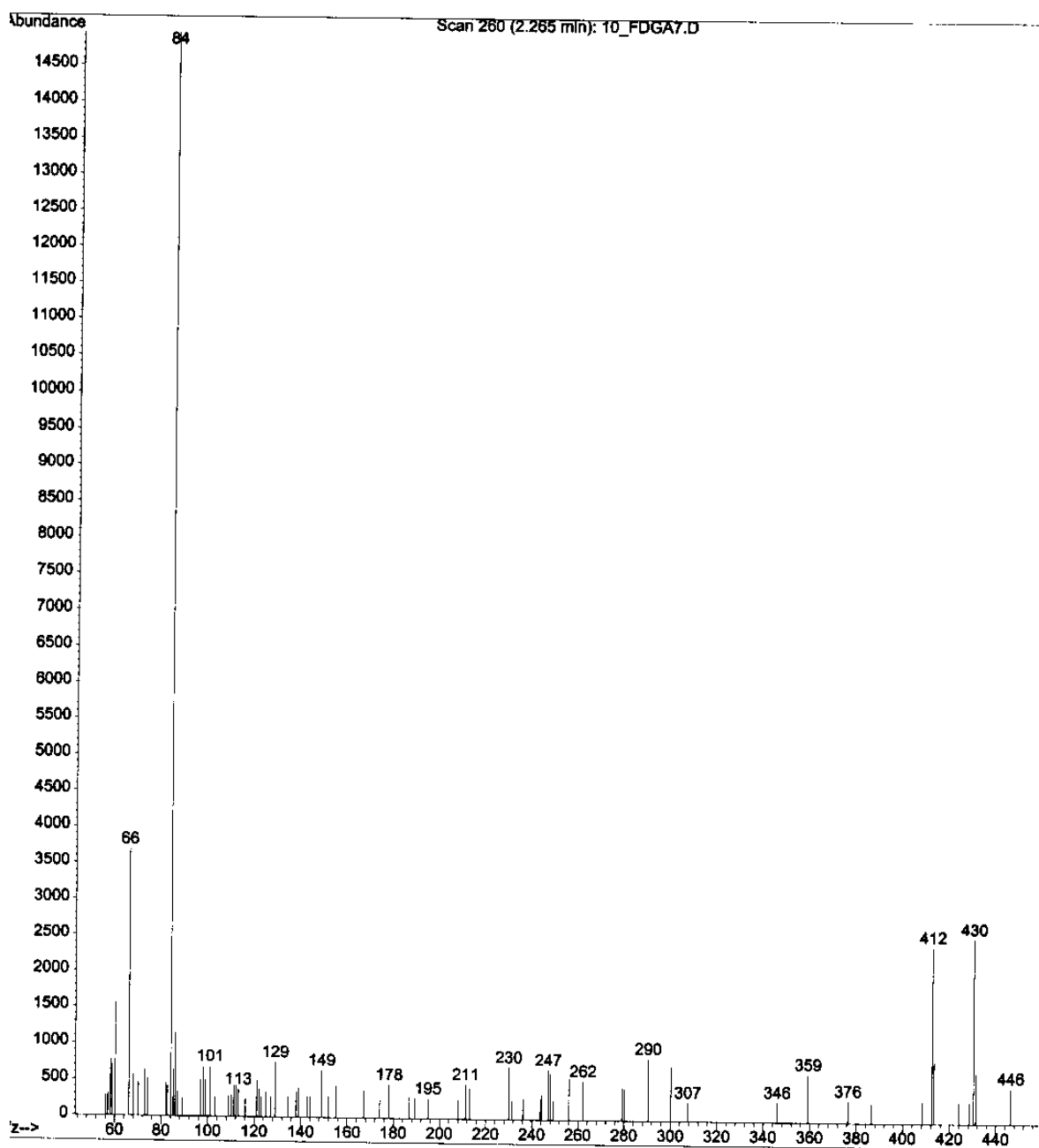
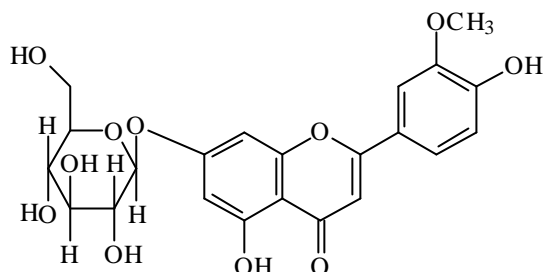


FIGURA 52– Espectro de massas de **DL18**

6.5.3. Identificação do 7-**b**-D-glicopiranosídeo crisoeriol



7-**b**D-glicopiranosídeo crisoeriol (**DL19**)

O espectro de RMN ^1H de **DL19** (Figura 53) revelou a presença de um singlete largo em δ 12,9 característico de um próton referente a hidroxila fenólica na posição **b** a carbonila. Os três hidrogênios ligados a carbonos aromáticos na região δ 6,8-8,0 e análise de suas constantes de acoplamento indicaram um anel B de flavonóide com substituição AMX como em **DL18**. O singlete em δ 6,97 é característico de H-3 de flavona, assim como os dois dubletos em δ 6,45 e δ 6,87 (2,1 Hz) são característicos do anel A de flavonas substituídas em C-5 e C-7 (Harborne, 1994). Além desses havia o dubleto em δ 5,0 ($J=7,3$) característico de H anomérico de glicosídeos, além de outros prótons ligados a carbonos oxigenados na região δ 4,0-3,0, o que sugeriu um **b**-glicosídeo. Adicionalmente o espectro de RMN de ^1H apresentou um singlete em δ 3,89 referente a presença de um grupo metoxílico. Este grupamento foi confirmado pelo sinal em δ 56,0 no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54) característico de carbono metoxílico ligado a carbono aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54) apresentou 22 sinais coerentes com uma flavona metoxilada e glicosilada. Experimentos de DEPT 135° e DEPT 90° permitiram juntamente com comparação dos deslocamentos de C-13 (Tabela 32) com os dados da literatura (Agrawal, 1989) identificar **DL19** como sendo o crisoeriol 7-**b**-D-glicopiranosídeo. O EMIE de **DL19** (Figura 55) apresentou íon molecular em m/z 462, bem como fragmentos (Dados físicos, p. 42) que confirmaram a estrutura do crisoeriol glicosilado. Para confirmar a posição do açúcar foram registrados espectros de UV com reagentes diagnóstico de deslocamento (AlCl_3 , MeONa e NaOAc) (Dados físicos, p. 42). O

deslocamento batocrômico de 72 nm da banda I (300-380 nm) com a adição de MeONa indicou que a HO-4' estava livre. O não decaimento desse sinal com o passar do tempo indicou a ausência de hidroxila livre em 3'. A adição de AlCl_3 seguida da adição de HCl causou efeito batocrômico irreversível ($\Delta\lambda = 43$ nm), comprovando a vizinhança da hidroxila em 5 com a carbonila em 4, assim como a ausência de hidroxilas vizinhas (Mabry, 1970). Concluiu-se então que como observaram-se hidroxilas em 5 e 4', e não ocorreram hidroxilas vizinhas, a glicose poderia estar ligada tanto em 3' quanto em 7. Como os deslocamentos de carbono para a essas duas posições são diferentes, confirmou-se por comparação com os dados da literatura que **DL19** era o 7-*b*-D-glicopiranosídeo crisoeriol (Agrawal, 1989).

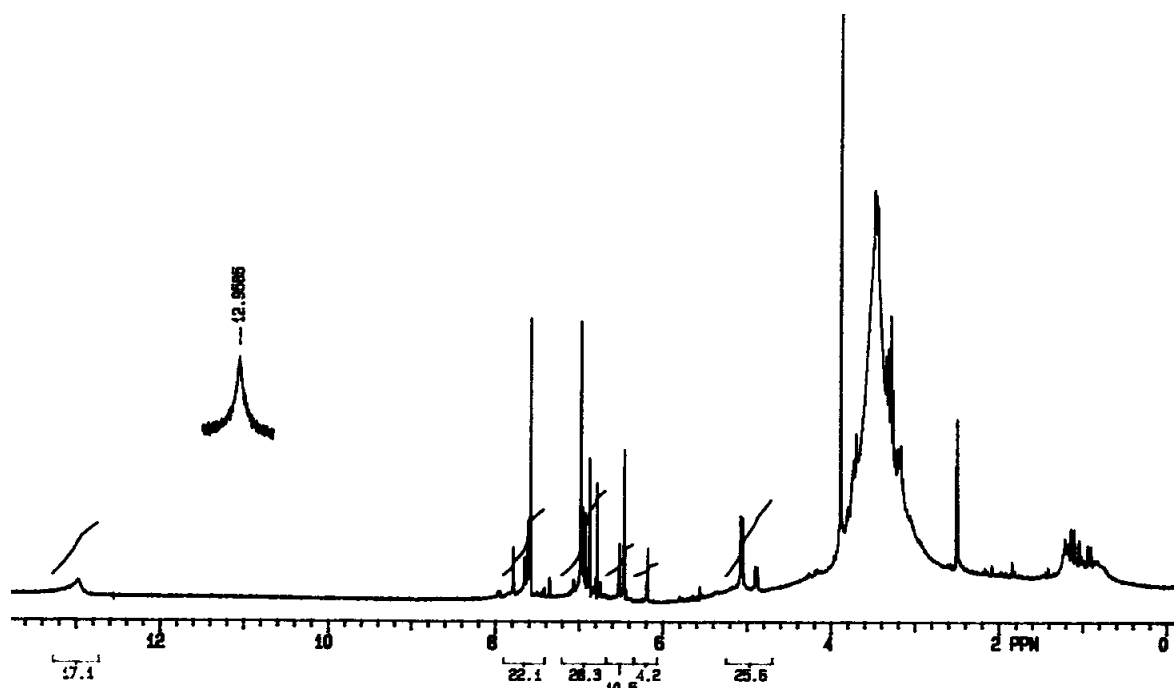


FIGURA 53 – Espectro de RMN ^1H de **DL19** [300 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)]

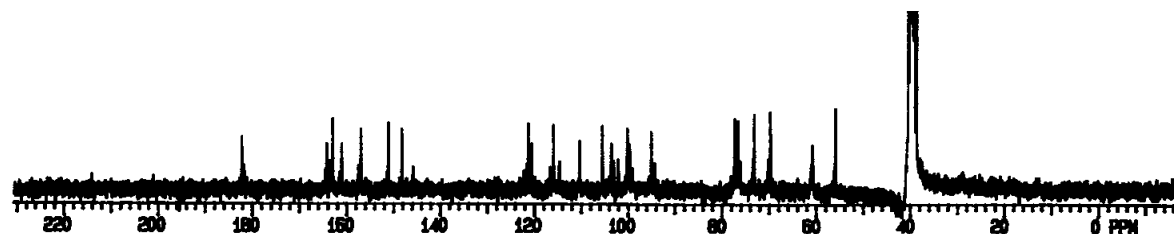


FIGURA 54 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL19** [75 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)]

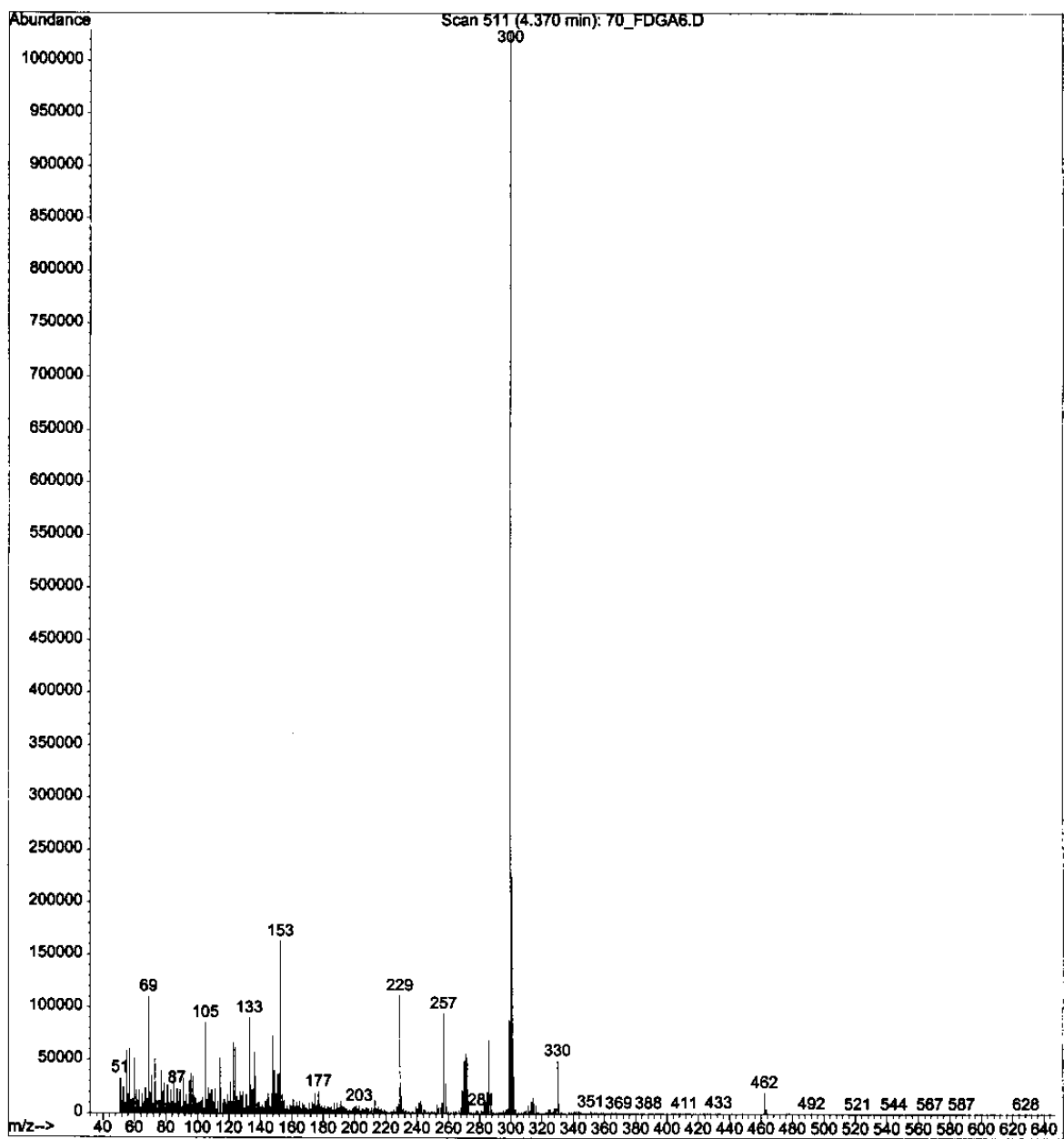


FIGURA 55 – Espectro de Massas de **DL19**

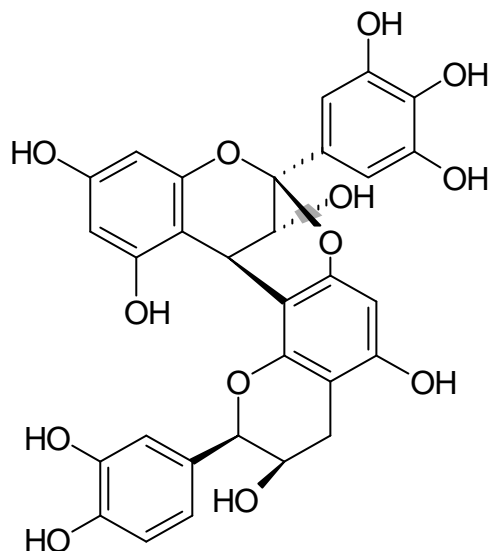
Tabela 32 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de DL18 e DL19*

Posição	DL18		DL19	
	$\delta\text{-H}$	$\delta\text{-C}$	$\delta\text{-H}$	$\delta\text{-C}$
2	-	164,2 C	-	163,04 C
3	6,80 <i>s</i>	103,3 CH	6,97 <i>s</i>	103,50 CH
4	-	181,7 C	-	182,12 C
5	-	161,4 C	-	161,16 C
6	6,19 <i>d</i> (1,7)	98,9 CH	6,45 <i>d</i> (2,1)	99,59 CH
7	-	163,4 C	-	164,27 C
8	6,52 <i>d</i> (1,7)	94,2 CH	6,87 <i>d</i> (2,1)	95,11 CH
9	-	157,3 C		157,01 C
10	-	103,7 C		105,43 C
1'	-	121,7 C		121,35 C
2'	7,79 <i>d</i> (2,2)	114,4 CH	7,58 <i>d</i> (2,0)	110,33 CH
3'	-	145,7 C	-	148,15 C
4'	-	150,7 C	-	151,09C
5'	6,97 <i>d</i> (8,5)	116,5 CH	6,94 <i>d</i> (7,6)	115,88 CH
6'	7,64 <i>dd</i> (8,5; 2,2)	121,9 CH	7,59 <i>dd</i> (7,6; 2,0)	120,62 CH
1''	4,88 <i>d</i> (7,3)	101,9 CH	5,06 <i>d</i> (7,3)	100,1 CH
2''	3,38 <i>dd</i> (7,3; 2,1)	73,3 CH		73,2 CH
3''	3,82 <i>dd</i> (11,6; 2,1)	77,3 CH		77,3 CH
4''	3,56 <i>dd</i> (11,6; 6,5)	70,0 CH		69,7 CH
5''	3,46 <i>dt</i> (8,9; 6,5)	76,0 CH		76,5 CH
6''	3,25 <i>d</i> (8,9)	60,9 CH ₂		60,7 CH ₂
OCH ₃	-	-	3,89 <i>s</i>	56,0 CH ₃

* em DMSO-*d*₆ com multiplicidades obtidas por DEPT 135° e DEPT 90°

6.6. Proantocianidina A2

6.6.1. Determinação da *epigalocatequina-(2b→7,4b→8)-epicatequina*



Epigalocatequina-(2b→7,4b→8)-epicatequina (DL17)

A substância **DL17** apresentou-se na forma de cristais marrons. O EMFAB (positivo) apresentou íon “*quasi-molecular*” $[M+H]^+$ em m/z 593 (Figura 76) e o EMFAB (negativo) apresentou íon “*quasi-molecular*” $[M-H]^+$ em m/z 591 (Figura 75). Estes dados juntamente com o resultado de análise elementar de **DL17** que indicou 54,1% C e 5% H sugeriram $C_{30}H_{24}O_{13}$ como fórmula molecular (para a análise elementar $C_{30}H_{24}O_{13} \cdot 4H_2O$ requer c 54,2% e H 4,8%). Na análise de seu espectro de RMN de 1H (Figuras 56, 57, 58 e 59) pode-se verificar a presença de 13 sinais. Os sinais em δ 7,28 (*d*, $J= 2,0$, 1H), δ 7,04 (*dd*, $J= 8,1$ e 2,0, 1H) e δ 6,85 (*d*, $J= 8,1$, 1H) por seus deslocamentos e valores das suas constantes de acoplamento caracterizaram um anel aromático com sistema AMX de substituição (Figura 57). O singlete em δ 6,76, integrando para 2 hidrogênios, sugeriu presença de outro anel aromático substituído nas posições 1', 3', 4' e 5'. Nessa mesma região do espectro puderam ser verificados ainda dois dubletos em δ 6,06 e 5,98 cuja constante de acoplamento ($J= 2,3$ Hz) indicou correlação *meta* entre os hidrogênios, e um singlete em δ 6,13 integrando para 1 hidrogênio. Pelo exposto análise preliminar da região

indicou a presença de quatro anéis aromáticos sendo um tri-substituído, dois tetra-substituídos e um penta-substituído. Em outra região espectral (Figura 58) foram verificados dois dubletos (δ 4,31 e δ 4,11) que, pelas constantes de acoplamento e pelo espectro ^1H - ^1H COSY (Figuras 73 e 77) indicaram estar acoplados. Além disso, verificaram-se outros quatro sinais em δ 4,96 (Figura 58), δ 4,24 [visível quando o espectro foi registrado em CD_3OD], δ 2,94 e δ 2,80 (Figura 59) que, tanto pelas constantes e acoplamento quanto pelo COSY (Figuras 73 e 77) também encontravam-se acoplados. Os duplos dubletos em δ 2,94 e 2,80, referentes aos hidrogênios de um carbono metilênico, foram um indicativo da natureza de uma das unidades das catequinas. O multipletto em δ 4,24 possivelmente pertence a um próton oximetínico de uma unidade catequina. Já o singlete em δ 4,96, referente a um próton oxibenzílico, parecia ser o singlete característico de catequinas onde a hidroxila encontram-se em posição *cis* em relação ao grupo fenila (Jacques, 1974).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 60, 61, 62, 63 e 64) apresentou 28 sinais, porém dois deles encontravam-se com o dobro da intensidade normal (δ 107,28 e 145,67). Estes sinais aliados ao singlete em δ 6,76 integrando para 2 hidrogênios, observado no espectro de RMN de ^1H sugeriram um anel aromático 3, 4, 5 trioxigenado. Este dado possibilitou comprovar que esses sinais de carbono encontravam-se dobrados, tendo-se valores para 30 carbonos, estando de acordo com a FM. Análise conjunta dos dados de RMN ^{13}C com os experimentos DEPT 135° (Figuras 65, 66 e 67) e DEPT 90° (Figuras 68 e 69) indicou a presença de 1 carbono metilênico, 12 carbonos metínicos e 17 carbonos não hidrogenados. O número de átomos de carbono, assim como a quantidade de carbonos não hidrogenados sugeriu tratar-se de um biflavonóide. Todos os hidrogênios foram correlacionados com os carbonos aos quais encontravam-se diretamente ligados através do espectro HETCOR (Figura 70), este experimento permitiu fazer a atribuição dos valores de deslocamento químico de todos os carbonos hidrogenados (Tabela 33). Na literatura é convencional dividir as unidades das proantocianidinas em unidade superior (*u*) e unidade inferior (*l*) (Baldé, 1991). Os sinais de carbonos metínicos em δ 81,54 (C-2*l*) e δ 65,90 (C-3*l*) sustentaram a configuração *cis* para uma das unidades, esta proposição foi baseada na comparação direta com dados de catequinas descritos na literatura (Agrawal, 1989). Os sinais em δ 99,81 (C-2*u*) carbono não hidrogenado, e δ 28,58 (C-4*u*), carbono metínico,

sugeriram que as duas unidades flavanas da proantocianidina encontravam-se ligadas nessas posições.

As correlações a longa distância observadas no espectro de HETCOR ^1H - ^{13}C (Figuras 71, 72 e 77) possibilitaram atribuir os deslocamentos químicos da maioria dos carbonos, incluindo-se os não hidrogenados, além de indicar como as unidades catequinas e os anéis aromáticos encontravam-se ligados. O H-2l em δ 4,96 correlacionou a longa distância C-1'l (δ 130,73), C-2'l (δ 115,54) e C6' (δ 120,42). Esta observação permitiu concluir que o anel com 1', 3', 4'tri-substituído encontrava-se ligado ao C-2l da unidade inferior. Isso sugeriu que a unidade inferior tratava-se da *epicatequina*. As correlações obtidas através de espectro HOMOCOSY entre os dois prótons metilênicos H-4al e H-4bl, característico para CH_2 de flavanas, e o multiplete em δ 4,24 (H-3l), bem como o singlete largo em δ 4,96 (H-2l) confirmaram esta proposição.

A unidade superior também foi identificada através de espectros bidimensionais. Esta correlação permitiu a localização do anel aromático 3, 4, 5-trioxigenado em C-2u. Deste modo, foi possível identificar a unidade superior como sendo formada pela *epigalocatequina*.

Pelo exposto **DL17** é uma proantocianidina formada por uma unidade *epicatequina* inferior e uma unidade *epigalocatequina* superior. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C sugeriram que a interligação parte de C-2u e C-4u. Essas ligações interflavanas foram determinadas através de correlações obtidas por HETCOR a longa distância e ^1H - ^1H COSY (Figuras 73 e 77), assim como comparação com dados da literatura (Baldé, 1991). A correlação observada entre H-4u (δ 4,31) e C-8l (δ 106,65), C-7l (δ 151,72) e C-9l (δ 151,56), assim como o deslocamento químico do carbono não hidrogenado C-2u (δ 99,81), demonstraram claramente a ligação C-C de C-4u com C-8l e presença da ligação C-O-C entre C-2u e C-7l. Essa proantocianidina é denominada do tipo A2 (Thompson, 1972). Todas as correlações observadas nos experimentos bidimensionais estão sumarizadas na Tabela 33 e Figura 77.

A estereoquímica relativa de **DL17** foi obtida através de experimento de "nOe diff". A associação de nOe observada entre H-2l e H-4u com 12% de incremento desses prótons, bem como a observada entre H-6u e H-6'l foram conclusivas para entender o modo como as duas catequinas se ligavam. Para H-2l e H-4u correlacionarem é necessário que eles se encontrem do mesmo lado do plano. Desse modo, a ligação interflavanas deveria ocorrer

para o mesmo lado do plano que a ligação na unidade *epicatequina* entre C-2*l* e o anel aromático. A associação de nOe observada entre H-3*u* e H-6*l* com 2% de incremento demonstrou que estes encontravam-se do mesmo lado do plano, determinando dessa maneira a configuração relativa de C-3*u*. Todos os incrementos visualizados no experimento estão sumarizados na Figura 77.

A configuração absoluta no C-4*u* foi estabelecida por dados de DC (Figura 74) em MeOH. Através do registro de curvas de DC de diversas proantocianidinas, foi observado que dependendo do Efeito Cotton nos seus comprimentos de onda mais baixos, é possível estabelecer a estereoquímica do centro C-4*u*. A principal distinção nas curvas DC para as proantocianidinas é uma banda muito intensa, positiva ou negativa, em comprimento de onda baixo (200-230 nm). Uma banda positiva intensa nessa região está relacionada a estereoquímica absoluta 4*R* enquanto que uma banda negativa intensa relaciona-se a estereoquímica absoluta 4*S* (Barrett, 1979). O Efeito Cotton em 227 nm ($[\Phi]_{211} +119573$) observado para **DL17** indicou portanto a configuração 4*R*. Com base em todas essas observações, a proantocianidina **DL17** foi determinada como sendo a *epigallocatequina*-(2*b*→7, 4*b*→8)-*epicatequina*, até o momento inédita.

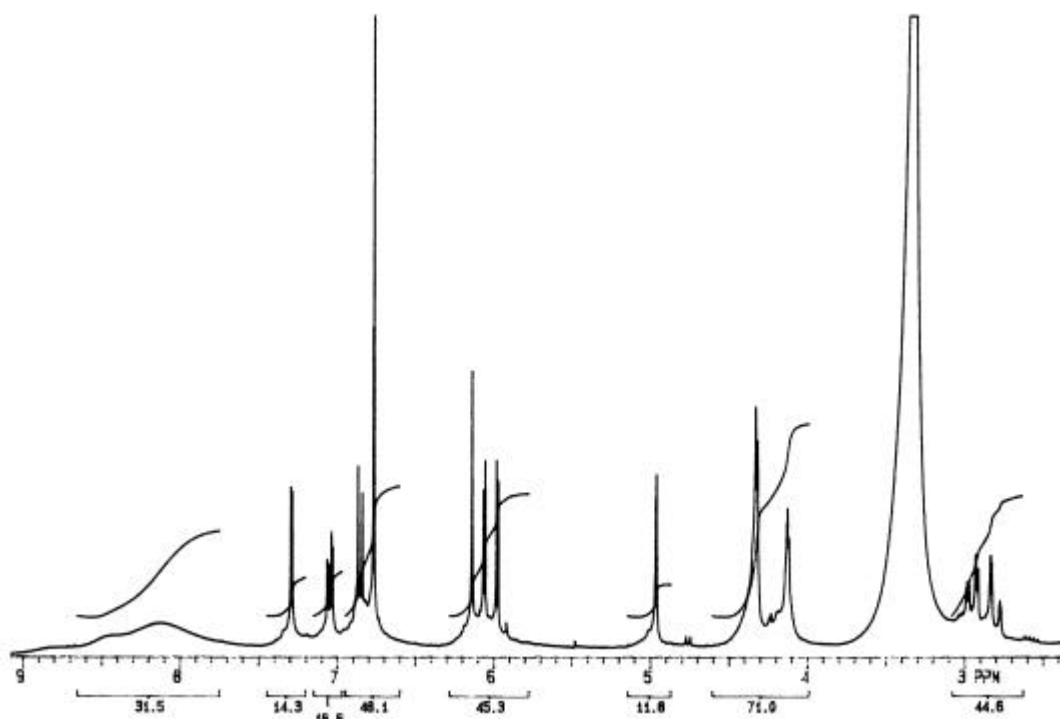


FIGURA 56 – Espectro de RMN ¹H de **DL17** [300 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

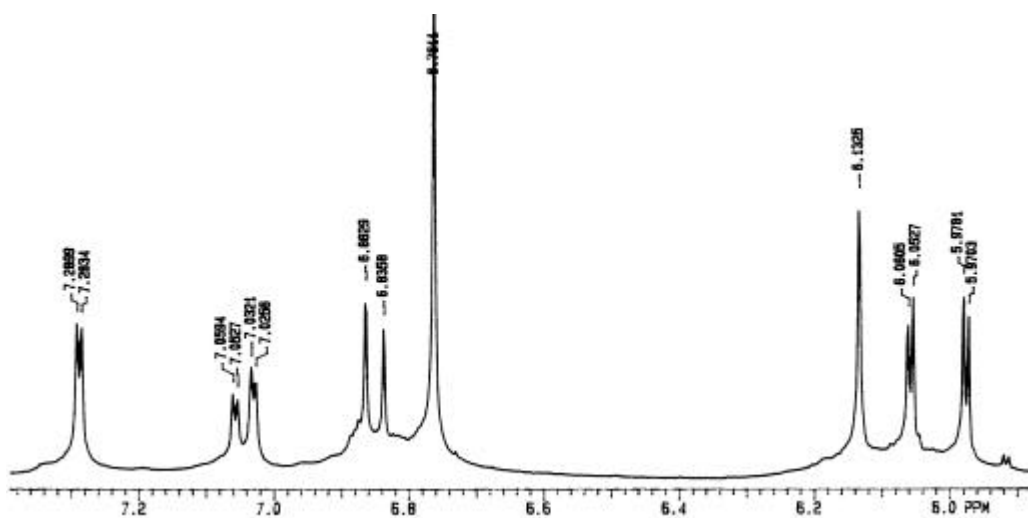


FIGURA 57 – Espectro de RMN ^1H de **DL17** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

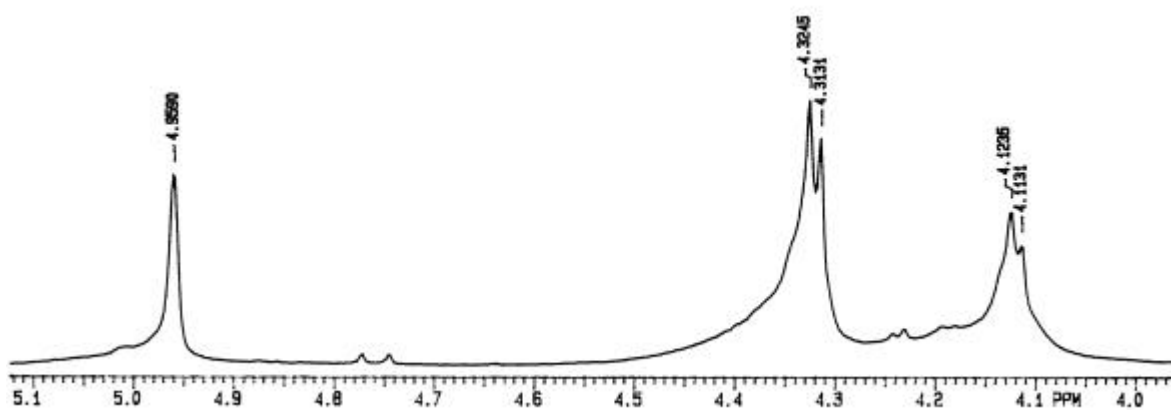


FIGURA 58 – Espectro de RMN ^1H de **DL17** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

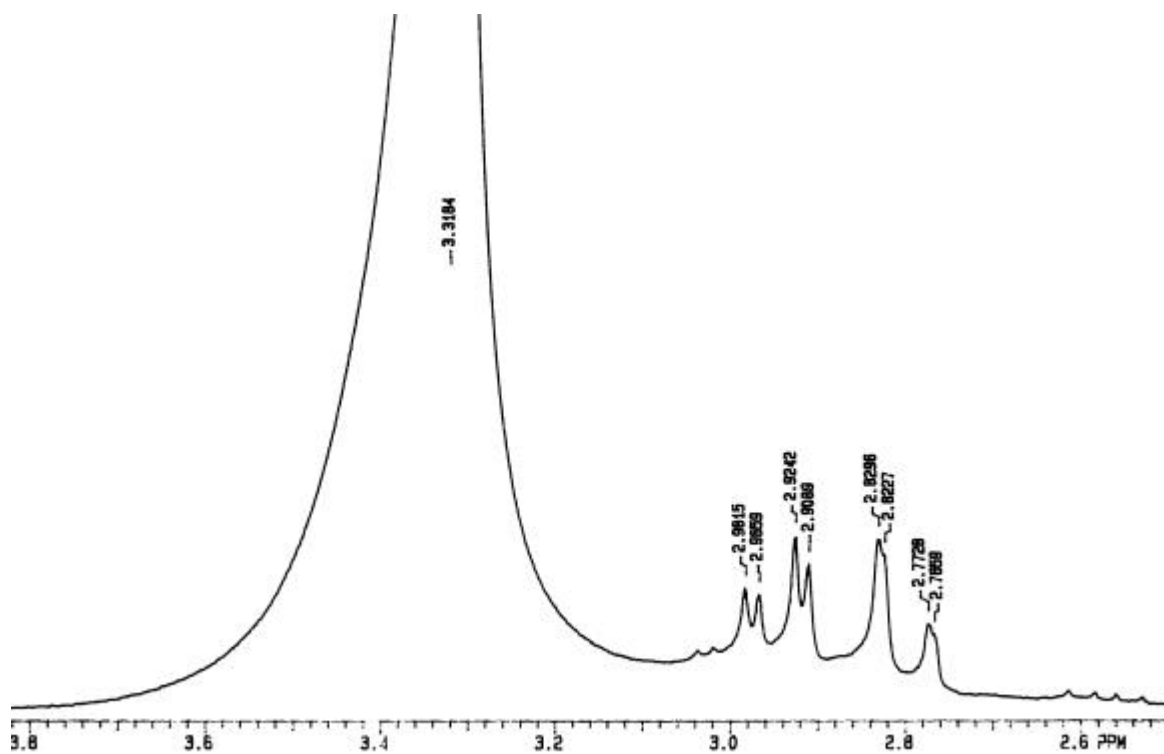


FIGURA 59 – Espectro de RMN ^1H de **DL17** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

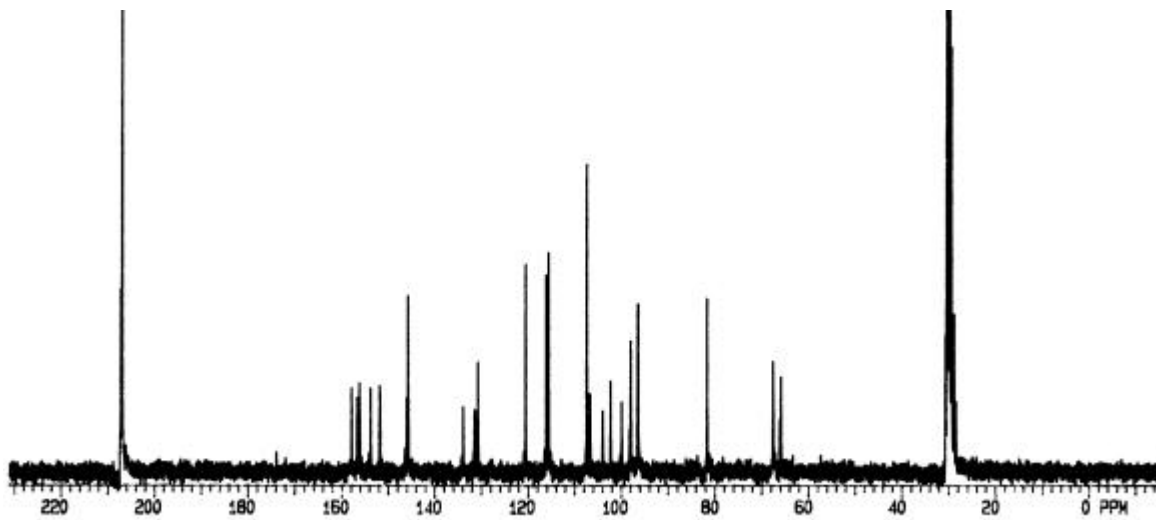


FIGURA 60 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL17** [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

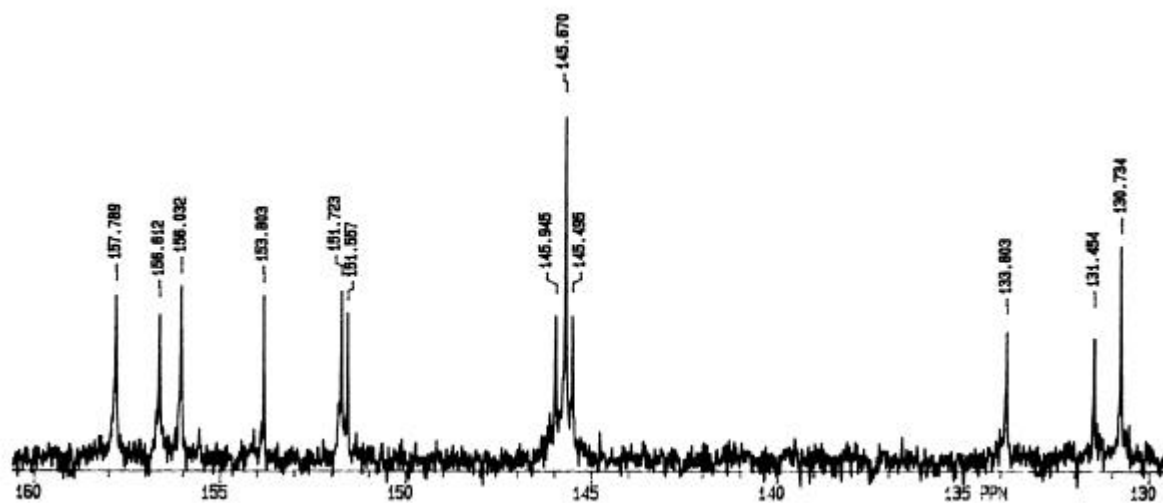


FIGURA 61 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL17** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

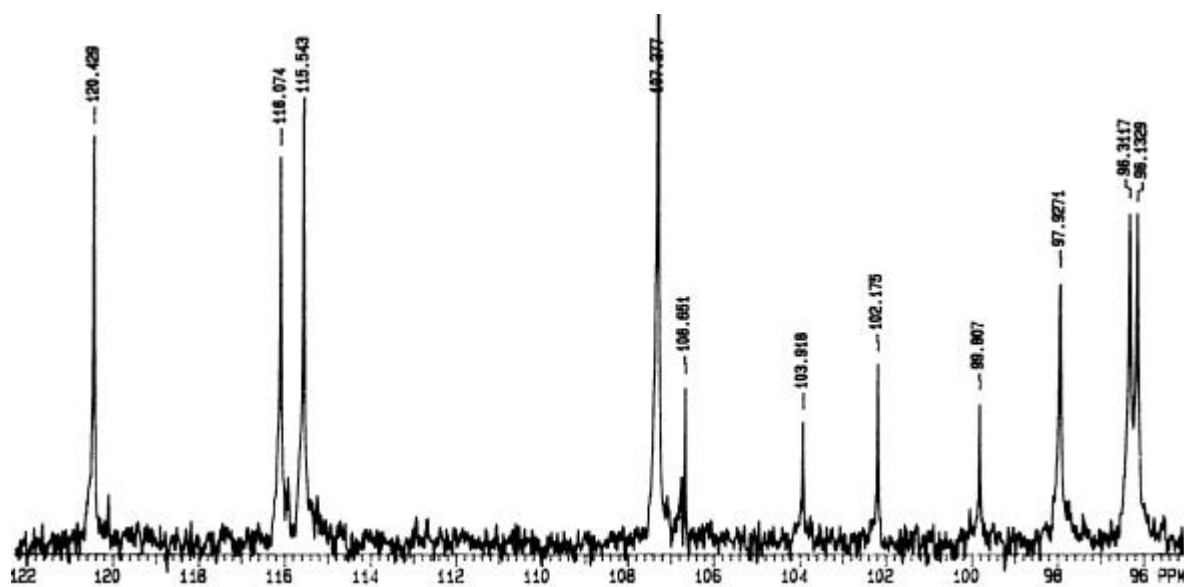


FIGURA 62 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL17** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

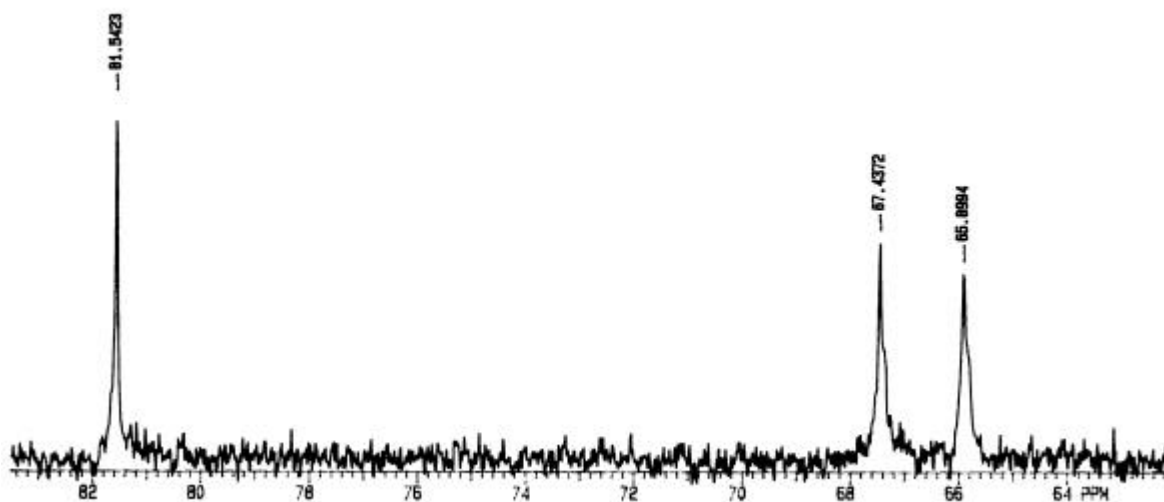


FIGURA 63 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL17** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

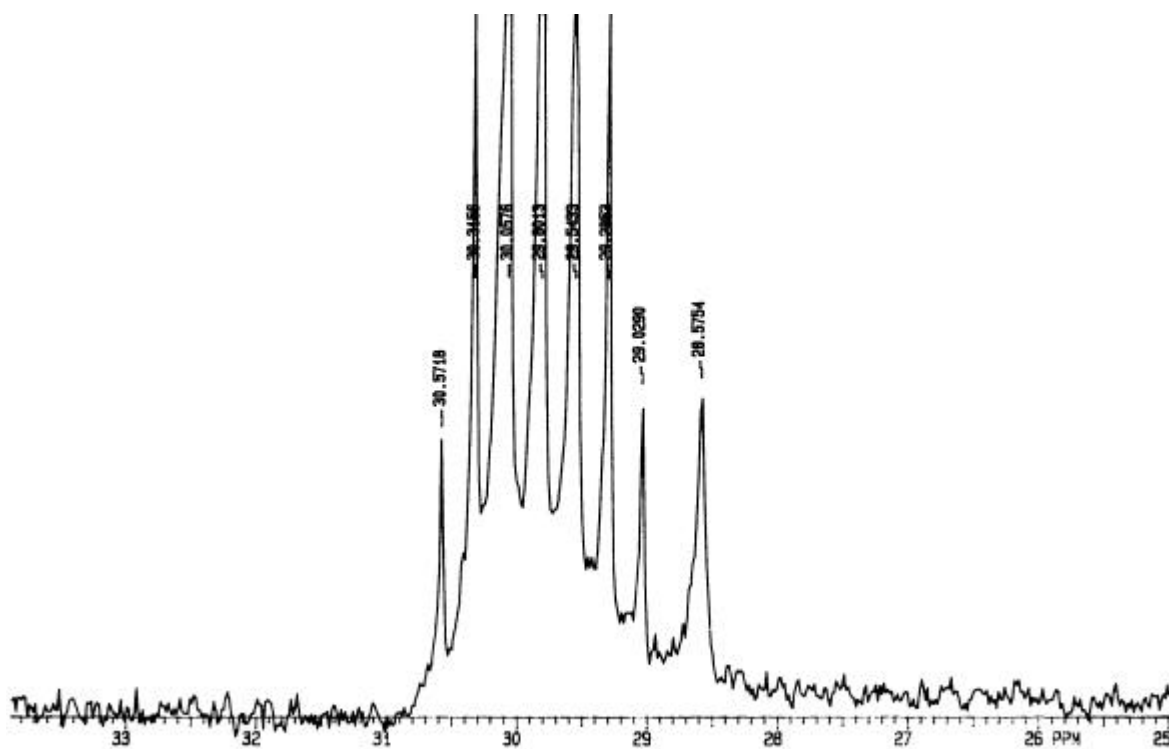


FIGURA 64 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL7** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

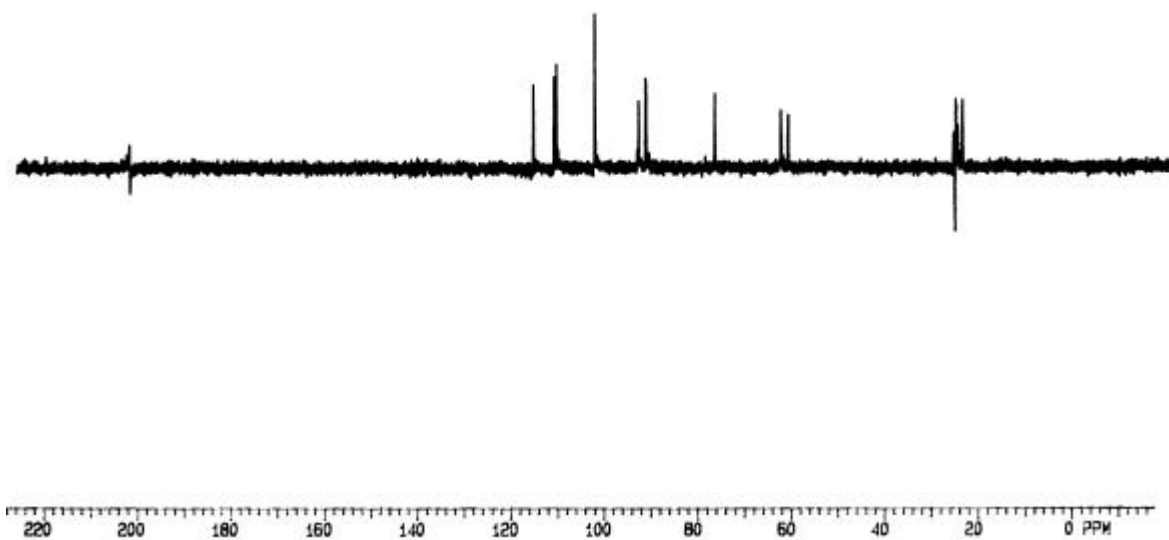


FIGURA 65 – Experimento DEPT135 de **DL17** [75 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

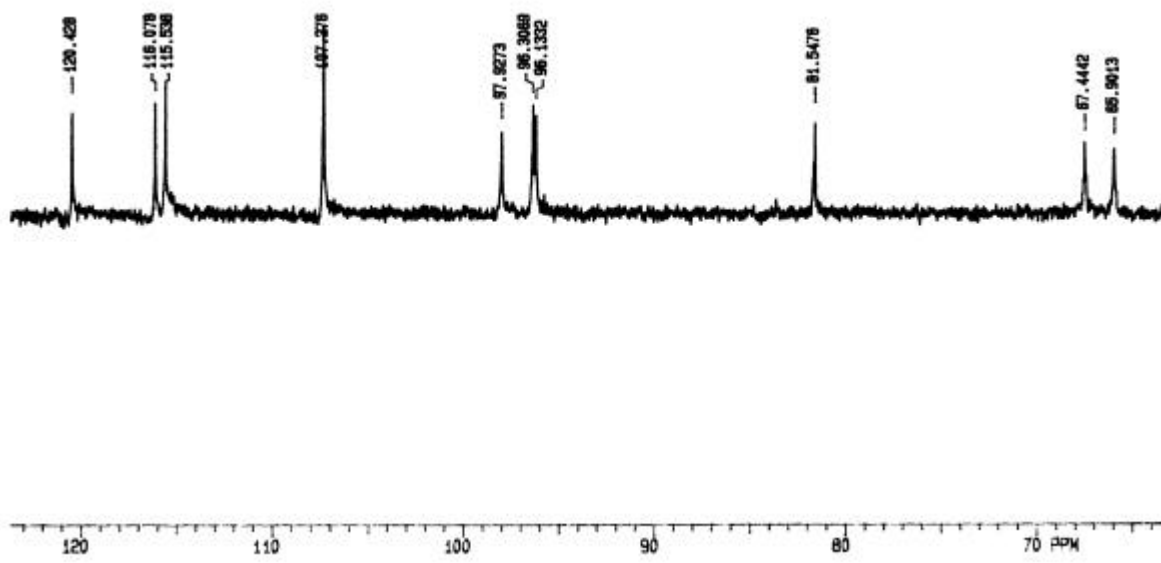


FIGURA 66 – Experimento DEPT135 de **DL17** (Ampliação) [75 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

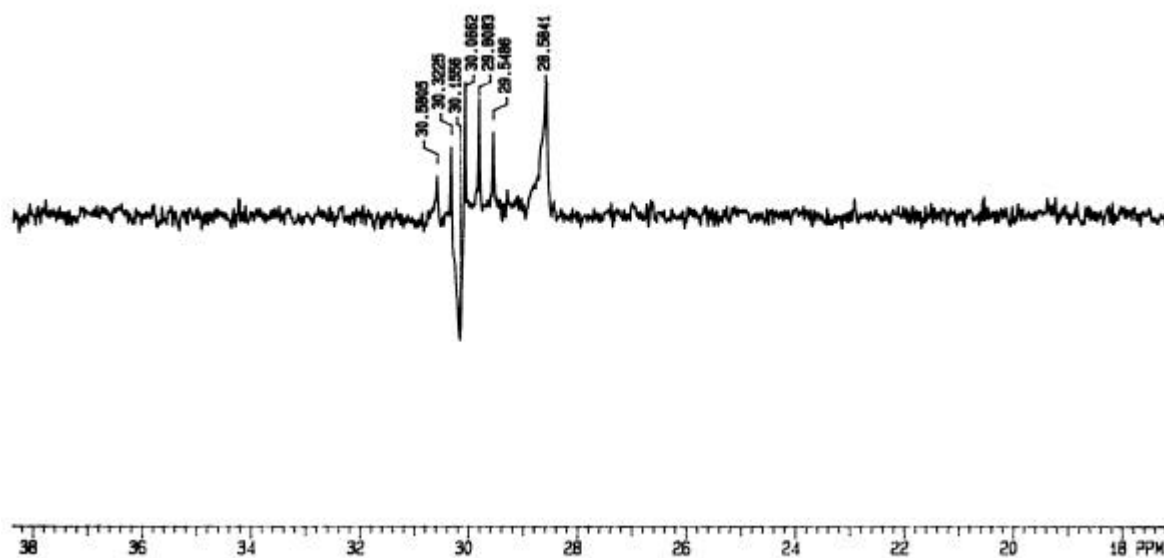


FIGURA 67 – Experimento DEPT135 de **DL17** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

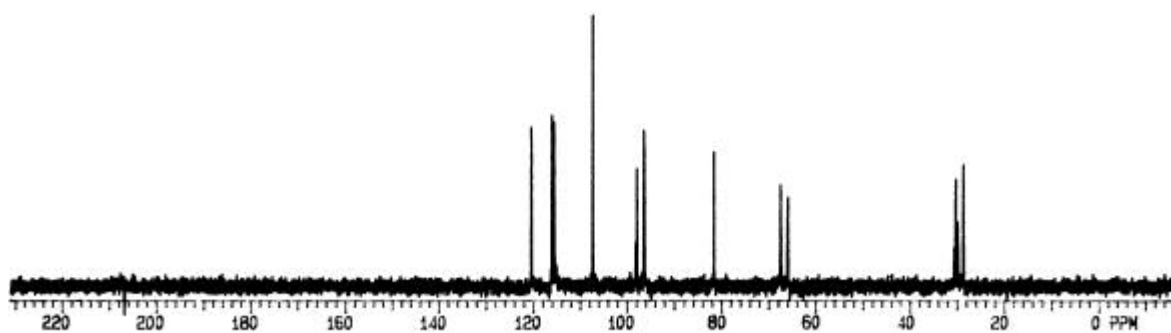


FIGURA 68 – Experimento DEPT90 de **DL17** [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

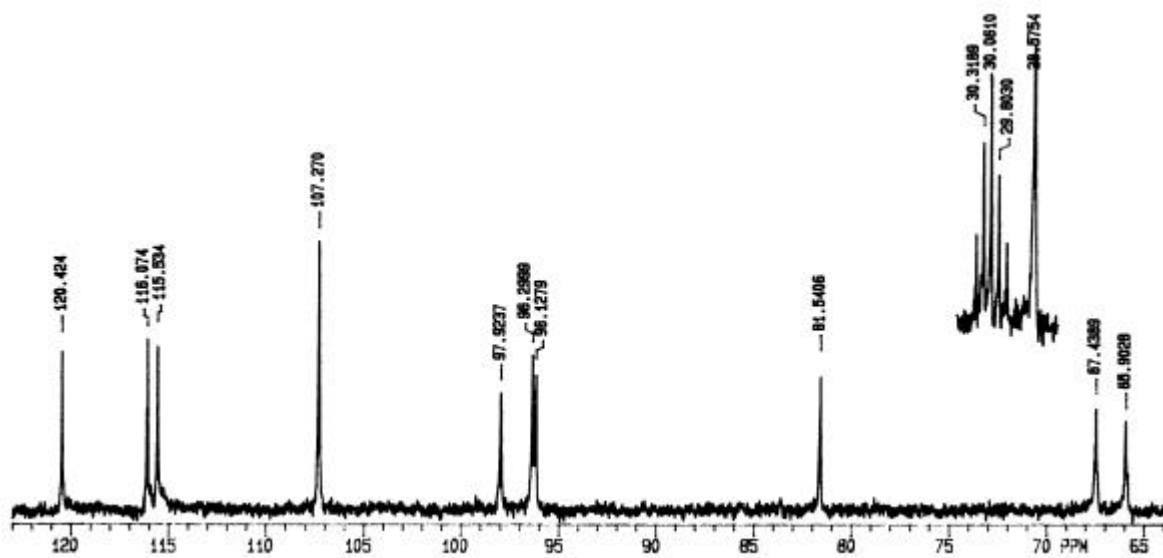


FIGURA 69 – Experimento DEPT90 de **DL17** (Ampliação) [75 MHz, (CD₃)₂CO, δ (ppm)]

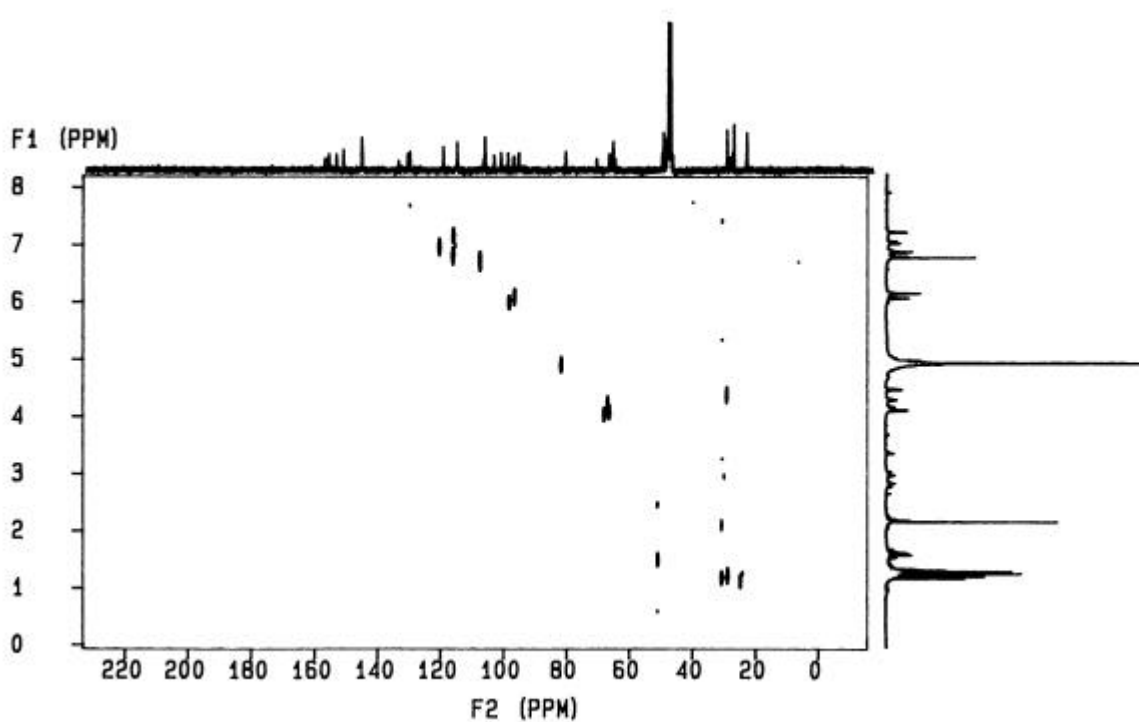


FIGURA 70 – Experimento HETCOR ¹H-¹³C de **DL17** (J= 140 Hz)

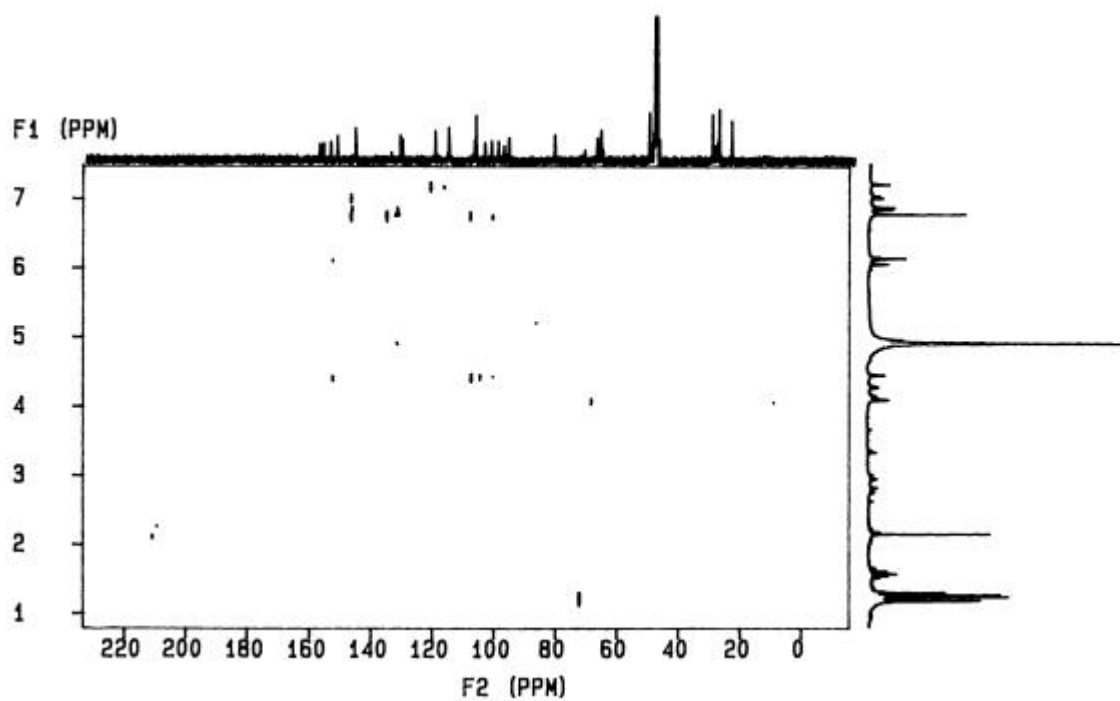


FIGURA 71 – Experimento HETCOR ^1H - ^{13}C ($J= 9\text{Hz}$) de **DL17**

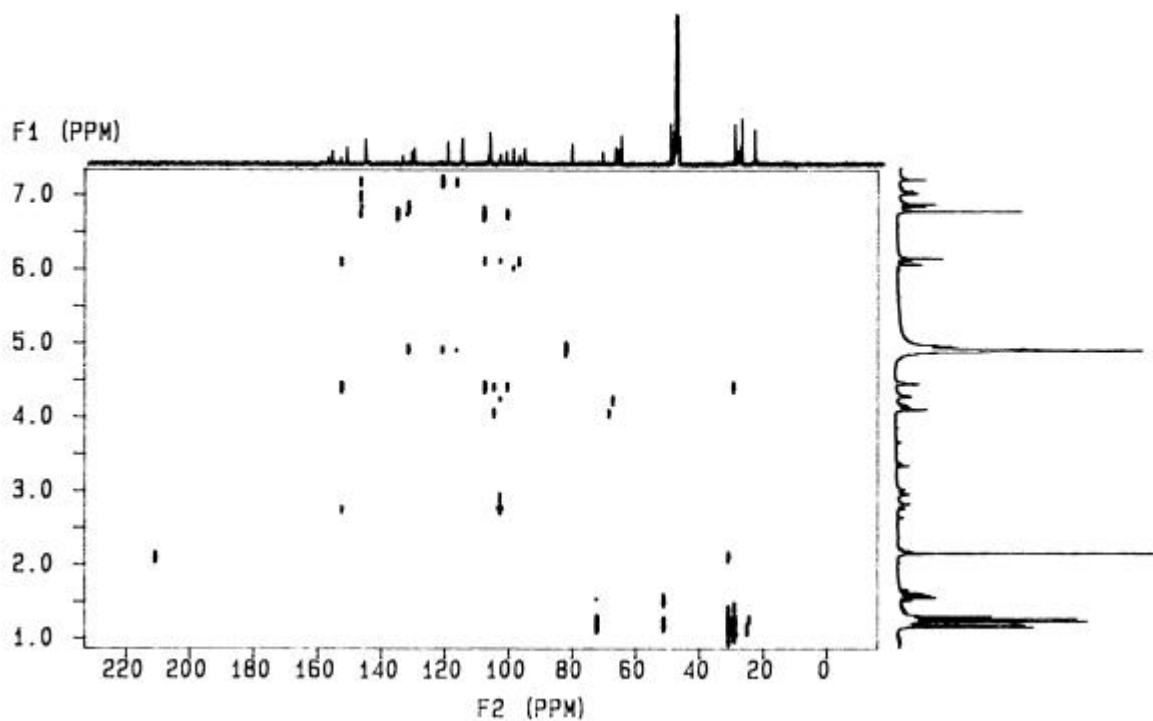


FIGURA 72 – Experimento HETCOR ^1H - ^{13}C ($J= 11\text{Hz}$) de **DL17**

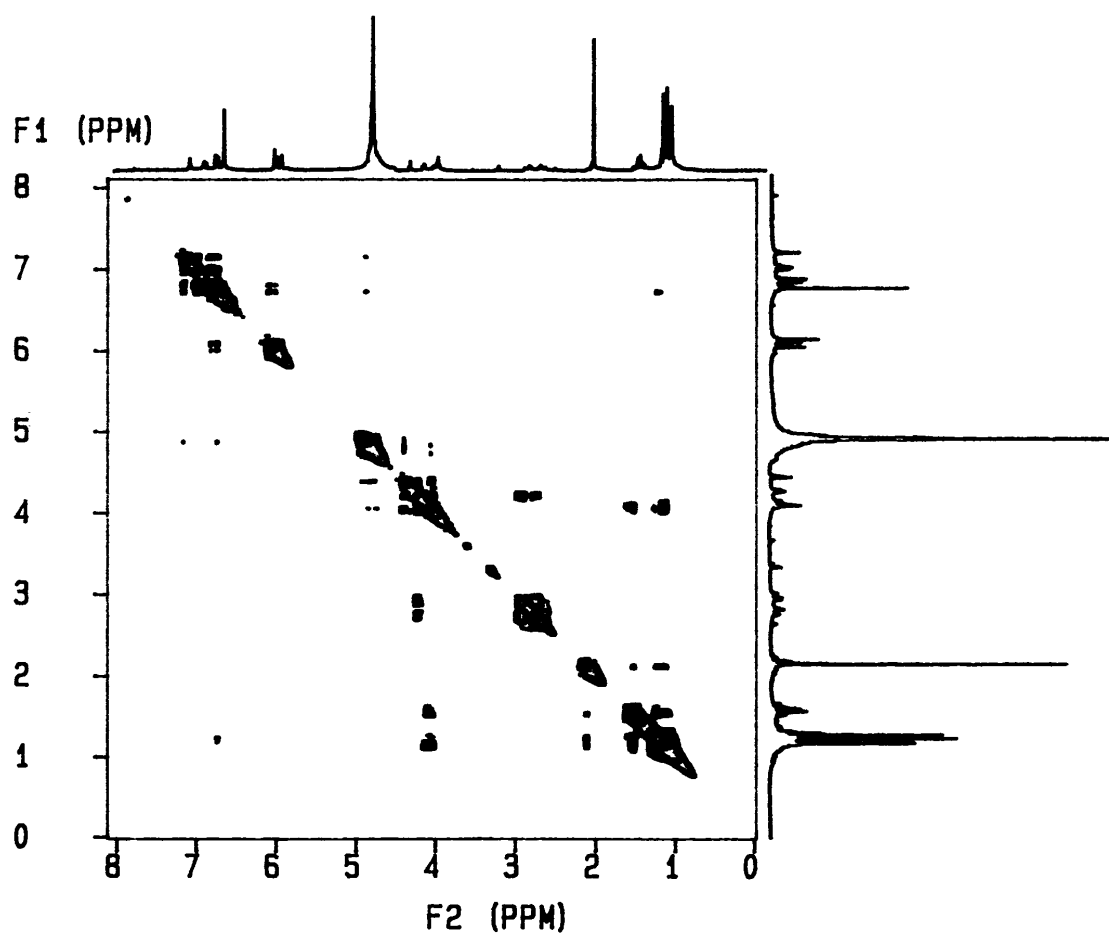


FIGURA 73 – Experimento COSY ^1H - ^1H de DL17

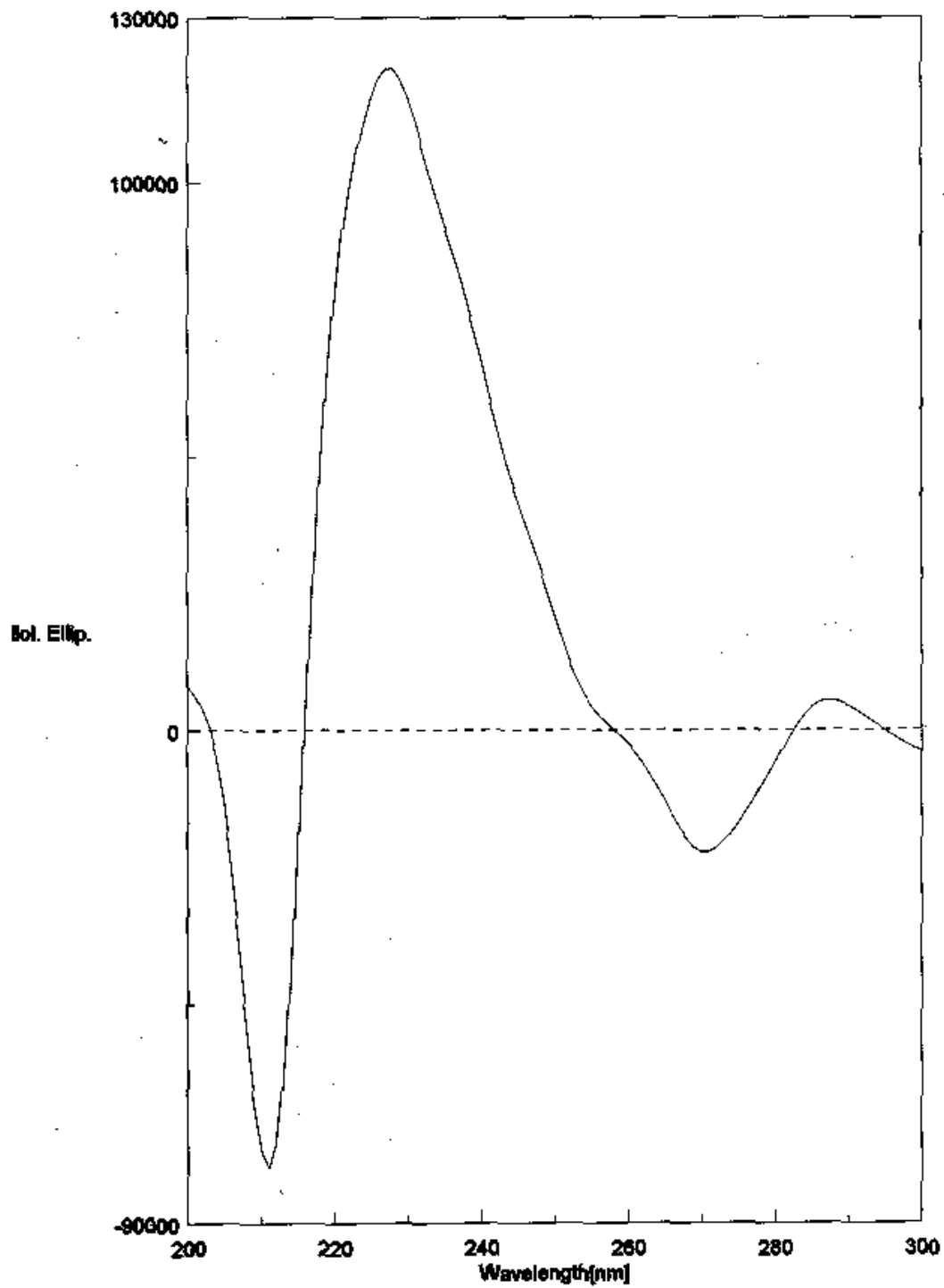


FIGURA 74 – Dicroísmo Circular de DL17

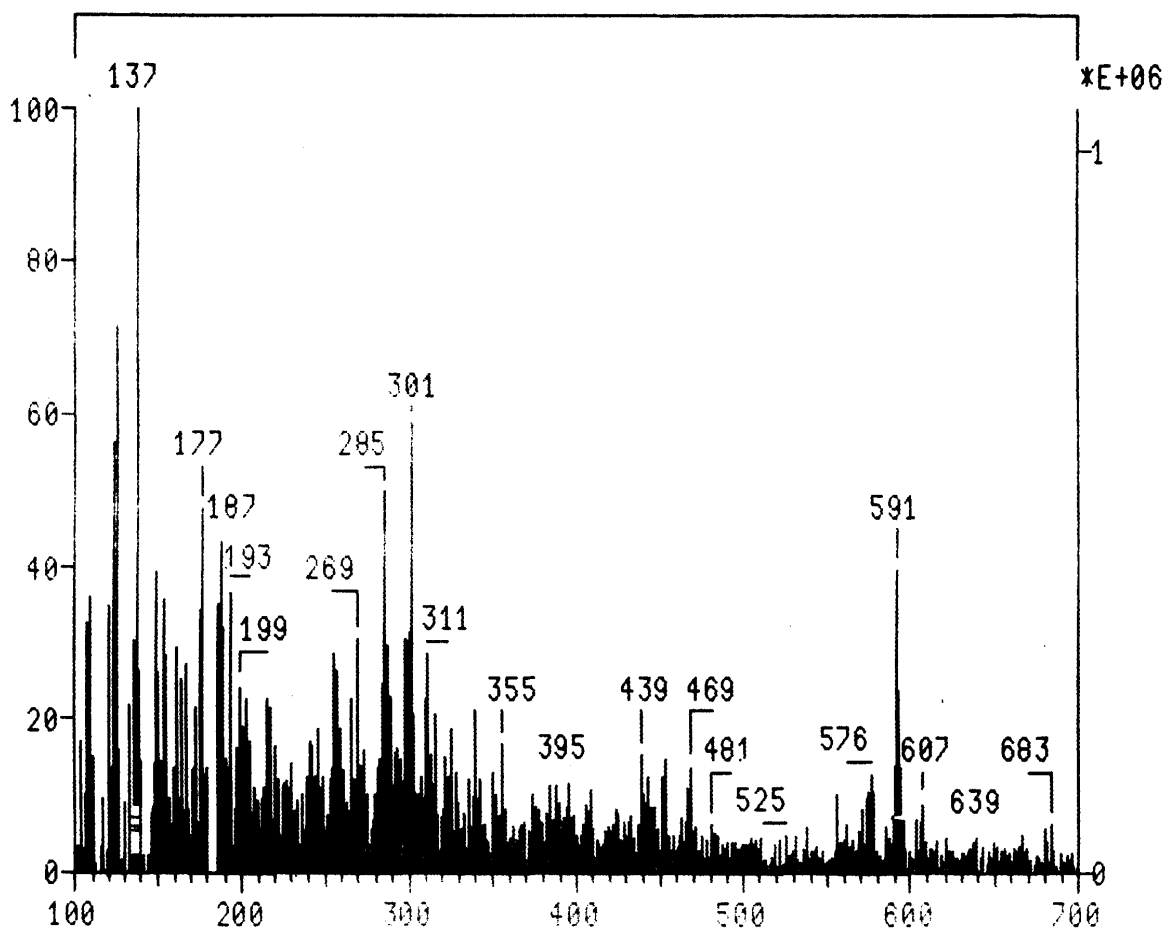


FIGURA 75 – FAB negativo de DL17

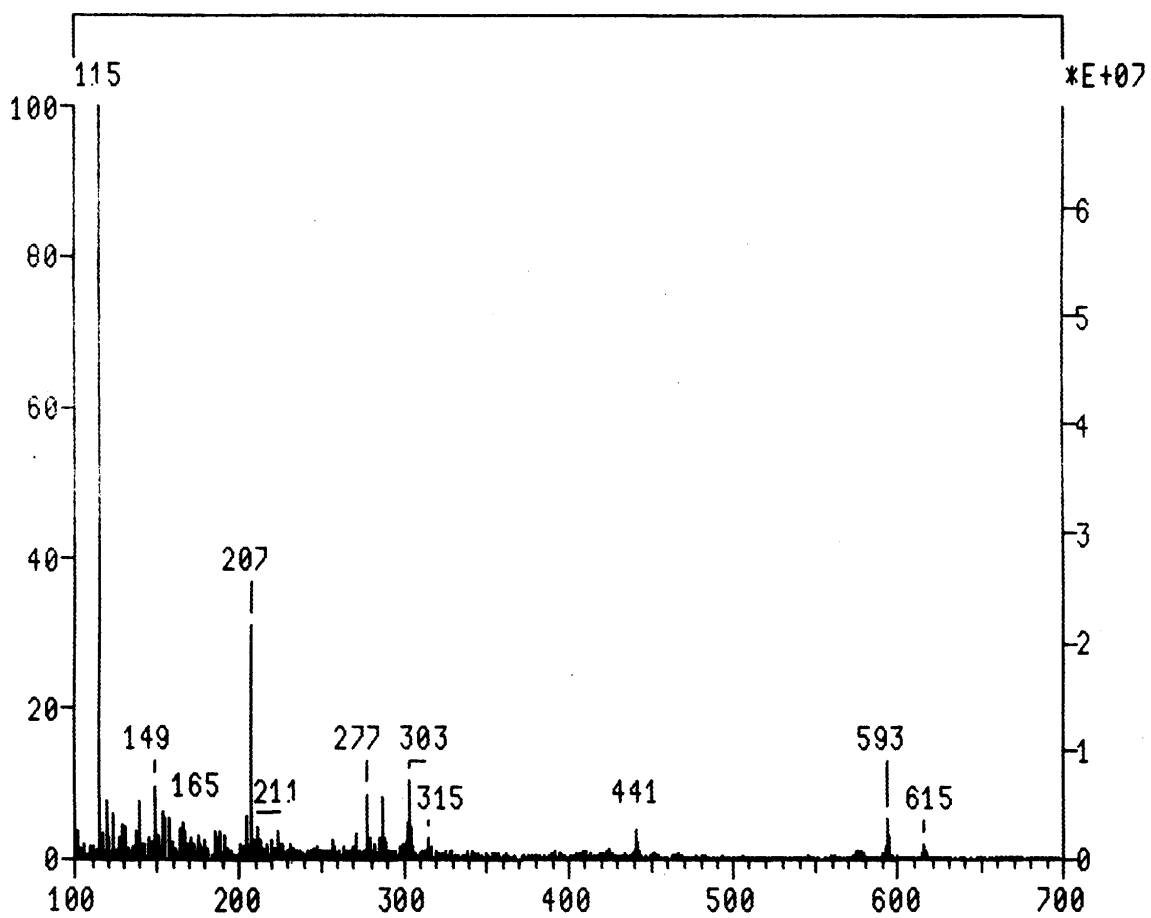
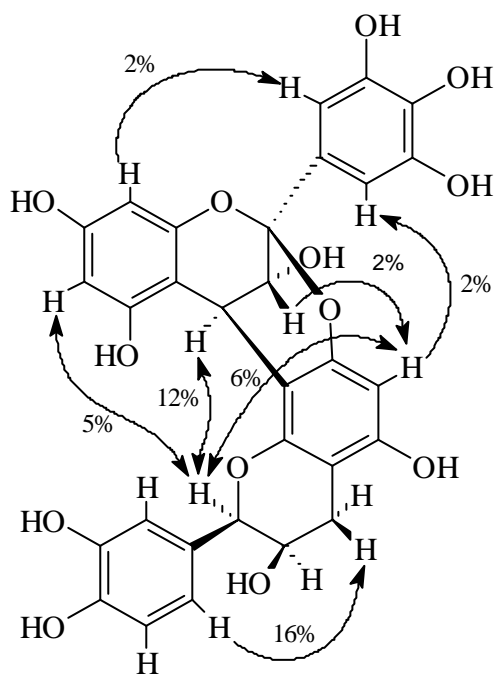
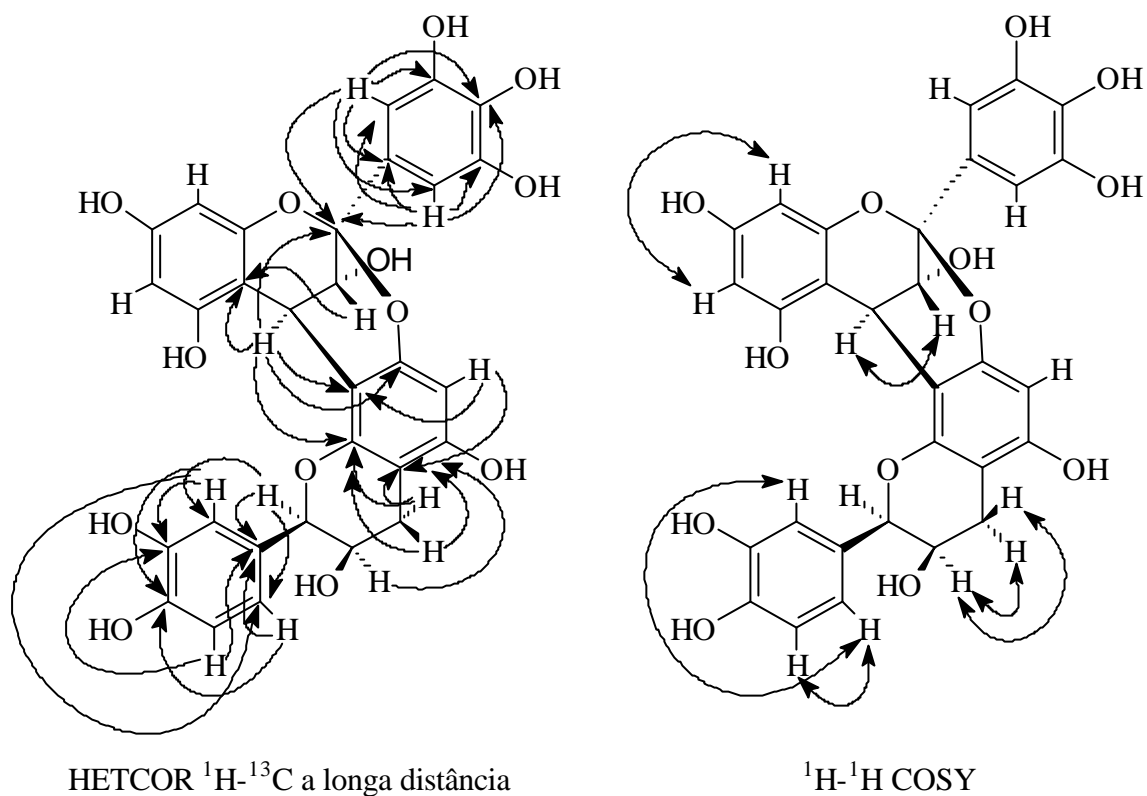


FIGURA 76 – FAB positivo de **DL17**

Tabela 33 – ^1H NMR*, ^{13}C NMR**, HETCOR e correlações ^1H - ^{13}C a longa distância de DL17

Posição	δ -C Multiplicidade [#]	δ -H	HETCOR longa distância	
			^2J	^3J
2u	99,81 C	-	-	-
3u	67,44 CH	4,11 <i>d</i> (3,1)	-	103,92
4u	28,58 CH	4,31 <i>d</i> (3,1)	103,92; 106,65	99,81; 151,72; 151,56
5u	156,03 C	-	-	-
6u	97,92 CH	5,98 <i>d</i> (2,3)	-	-
7u	157,79 C	-	-	-
8u	96,31 CH	6,06 <i>d</i> (2,3)	-	-
9u	153,80 C	-	-	-
10u	103,92 C	-	-	-
1'u	131,45 C	-	-	-
2'u	107,28 CH	6,76 <i>s</i>	131,45; 145,67	133,80; 107,28; 99,81
3'u	145,67 C	-	-	-
4'u	133,80 C	-	-	-
5'u	145,67 C	-	-	-
6'u	107,28 CH	6,76 <i>s</i>	131,45; 145,67	133,80; 107,28; 99,81
2l	81,54 CH	4,96 <i>br s</i>	130,73	115,54; 120,42
3l	65,90 CH	4,24 <i>m</i> em CD_3OD	-	102,18
4al	30,16 CH_2	2,94 <i>dd</i> (17,2; 4,7)	102,18	151,56
4bl		2,80 <i>dd</i> (17,2; 2,1)	102,18	151,56
5l	156,61 C	-	-	-
6l	96,13 CH	6,13 <i>s</i>	151,72	106,65; 102,18
7l	151,72 C	-	-	-
8l	106,65 C	-	-	-
9l	151,56 C	-	-	-
10l	102,18 C	-	-	-
1'l	130,73 C	-	-	-
2'l	115,54 CH	7,28 <i>d</i> (2,0)	145,50	145,95; 120,18
3'l	145,50 C	-	-	-
4'l	145,95 C	-	-	-
5'l	116,07 CH	6,85 <i>d</i> (8,1)	-	145,50; 130,73
6'l	120,42 CH	7,04 <i>dd</i> (8,1; 2,0)	130,73	145,95

*300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm), J(Hz); **75 MHz. [#]Multiplicidade obtida por DEPT 135° e DEPT 90°, *u*= unidade superior (*epigalocatequina*), *l*= unidade inferior (*epicatequina*).

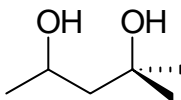


Incrementos observados através de experimentos “nOe diff”

FIGURA 77 – Correlações observadas nos espectros bidimensionais de **DL17**

6.7. Lipídiol

6.7.1. Identificação do 2-metil-2,4-pentanodiol



2-metil-2,4-pentanodiol (**DL16**)

A análise de RMN de ^1H de **DL16** (Figura 78) foi bastante simples. O espectro apresentou seis sinais de deslocamentos. Três desses sinais integraram para três hidrogênios, o que indicou que se tratavam de metilas, dois deles eram singletos, um em δ 1,26 e o outro em δ 1,21, o que sugeriu que essas duas metilas estavam ligadas ao mesmo carbono não hidrogenado. O terceiro em δ 1,16 dubleto sugeriu uma metila ligada a carbono oximetínico. Estavam presentes também dois duplos dubletos em δ 1,60 ($J= 14,5$ e $9,0$) e δ 1,52 ($J= 14,5$ e $3,5$) indicando pela constante de acoplamento tratarem-se de dois prótons geminados estando portanto ligados a um carbono metilênico. Por fim o multipletto em δ 4,10 deslocado para campo mais baixo indicou um próton ligado a carbono oximetínico. Somente pelos dados de RMN de ^1H foi possível sugerir a estrutura de **DL16** como sendo o 2-metil-2,4-pentanodiol.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 79) apresentou 6 sinais. Análise conjunta com os espectros de DEPT 135° e DEPT 90° indicou que tratavam-se de 3 carbonos metílicos, 1 carbono metilênico, 1 metínico e 1 não hidrogenado. A substância **DL16** foi identificada como sendo o 2-metil-2,4-pentanodiol com base nesses deslocamentos. Comparação com os dados da literatura (Jia, 1992) confirmou a proposta estrutural. Embora seja uma substância bem simples, existem poucos registros de seu isolamento como produto natural.

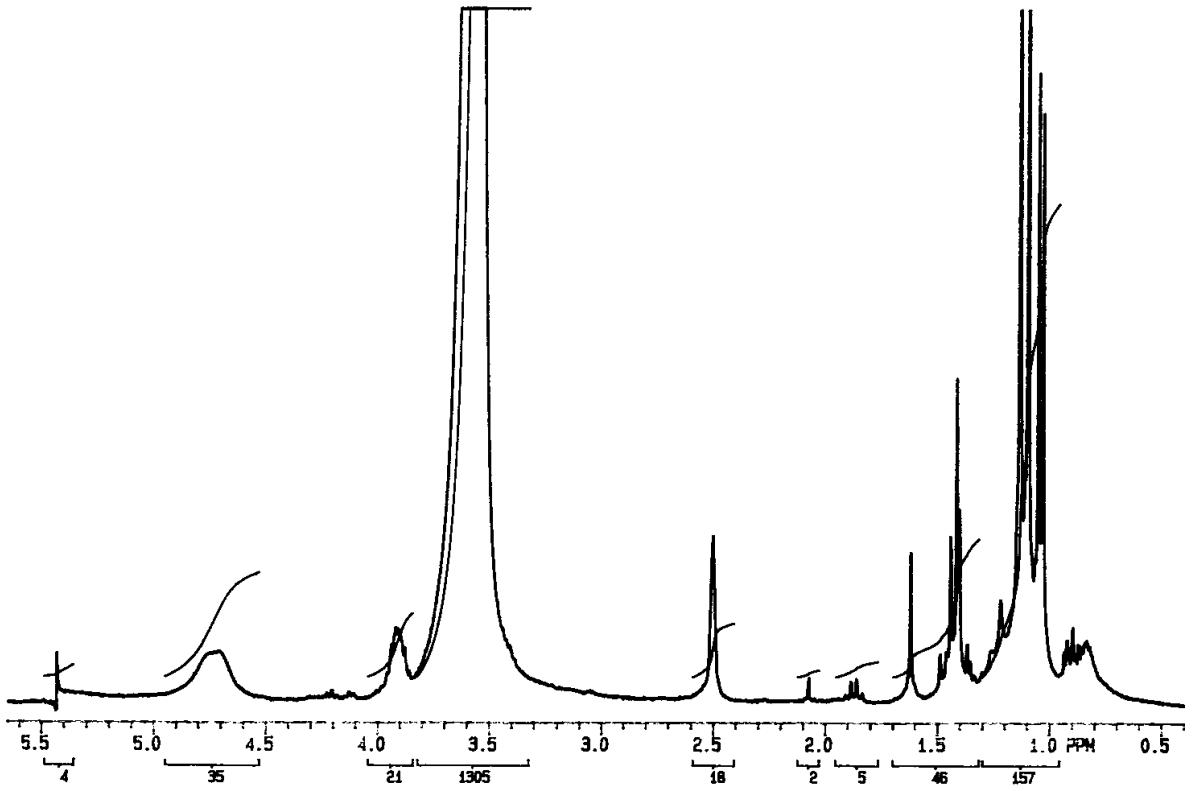


FIGURA 78 – Espectro de RMN ^1H de **DL16** [300 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

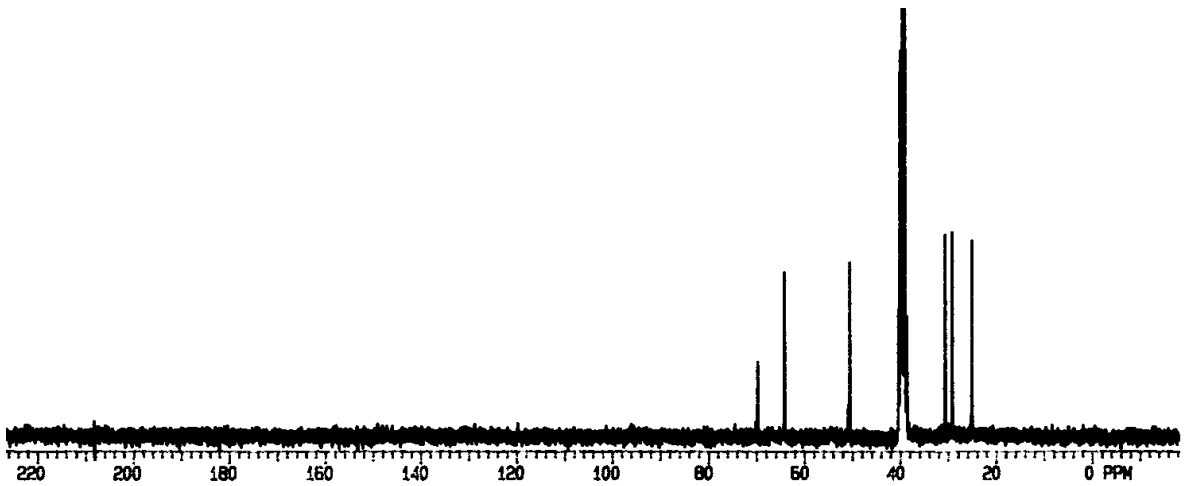


FIGURA 79 – Espectro de RMN ^{13}C de **DL16** [75 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

7. Testes bioquímicos

Com o intuito de verificar a potencialidade da planta estudada quanto a presença de substâncias bioativas, foram realizados alguns testes bioquímicos com extratos e substâncias puras isoladas de *D. lasiophylla*.

7.1. Testes de atividade microbiológica

Para avaliar se a espécie continha substâncias que apresentassem atividade antimicrobiana, os extratos foram testados em microorganismos utilizando a metodologia desenvolvida por Chand (Chand, 1994).

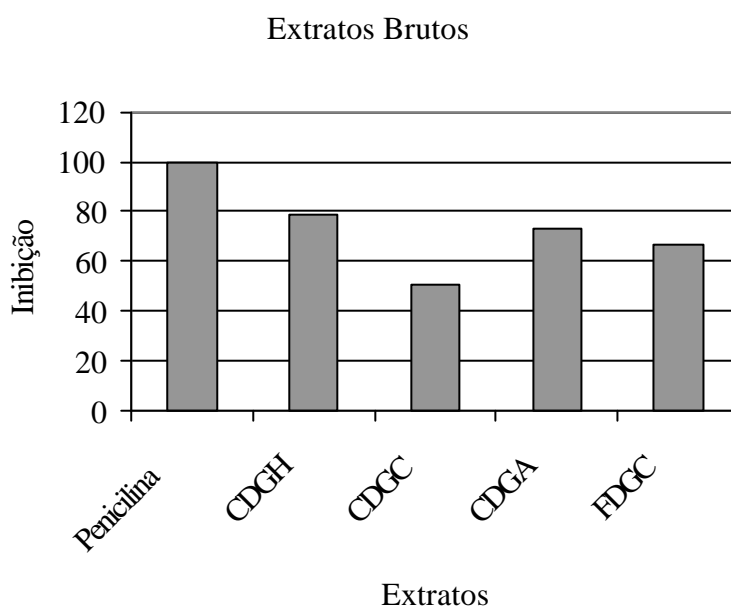


FIGURA 80 – Atividade microbiológica contra *Pseudomonas aeruginosa* dos extratos brutos de *D. lasiophylla*

Foram testados alguns representantes dos extratos brutos hexânico (CDGH), clorofórmico (CDGC) e acetato de etila (CDGA) do caule e clorofórmico (FDGC) das folhas de *D. lasiophylla* com o intuito de comparar as atividades dos extratos e das substâncias puras isoladas dos mesmos. Apesar da metodologia permitir avaliar atividade

antimicrobiana para 4 espécies de bactérias, infelizmente, a única cepa que se apresentou em condições para os testes naquele momento foi da *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os extratos apresentaram atividade, sendo que o extrato hexânico do caule apresentou 78,6% de inibição (20 µg) em relação a penicilina enquanto o extrato em acetato de etila do caule apresentou 73,4% de inibição (20 µg). Esses foram os que extratos que obtiveram melhores resultados. A Figura 80 sumariza os resultados alcançados.

Posteriormente, as substâncias puras isoladas a partir do extrato acetato de etila das folhas tiveram suas atividades microbiológicas avaliadas (Figura 81). No entanto das substâncias nenhuma apresentou atividade considerável, como pode-se confirmar na Figura 81.

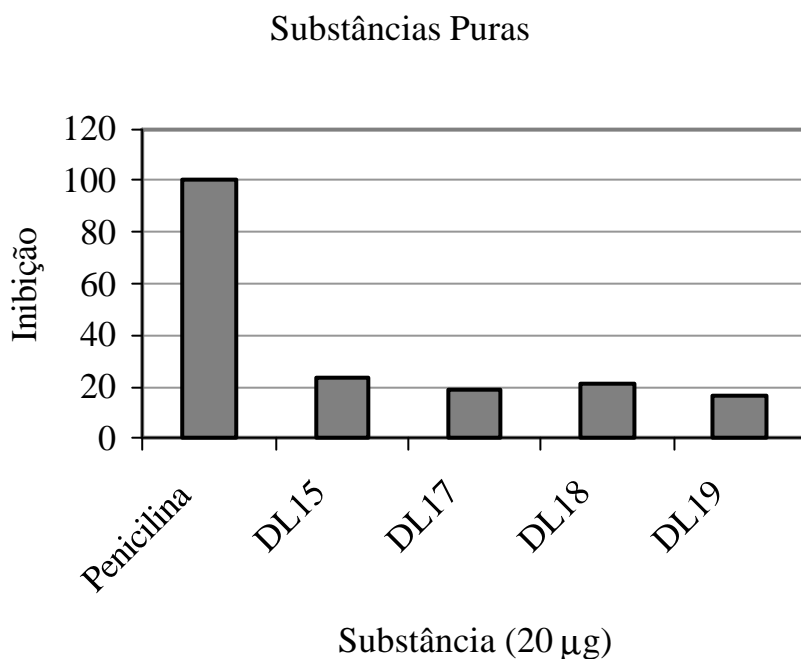


FIGURA 81 – Atividade microbiológica contra *Pseudomonas aeruginosa* das substâncias puras isoladas do extrato acetato de etila das folhas

7.2. Teste de atividade anti-oxidante

A importância dos anti-oxidantes vem aumentando consideravelmente nos dias de hoje, devido principalmente ao estudo do efeito dos radicais livres no organismos. É muito difícil encontrar alguma doença humana na qual os radicais livres não estejam envolvidos de alguma forma. Eles estão relacionados em mais de 100 patologias desde artrite e choque hemorrágico passando até pela AIDS tendo maior ou menor importância a depender do caso. Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O H^\bullet e o HO^\bullet são considerados os principais radicais livres produzidos pelos organismos. O excesso de radicais no organismo em geral, é combatido principalmente pela ação do α -tocoferol, também conhecido como vitamina E. Por outro lado, excesso de substâncias anti-oxidantes também podem ocasionar patologias devido principalmente a produção de H_2O_2 (Halliwell, 1992). Além disso, anti-oxidantes são utilizados para a proteção de cosméticos, drogas e alimentos contra a decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e umidade (por exemplo propil galato). Tem sido demonstrado também, em diversos experimentos que enzimas e metabólitos presentes em plantas superiores as protegem da ação oxidante do meio ambiente, através da inibição da formação de radicais livres pelo “seqüestro” de espécies oxigenadas, como por exemplo os radicais peróxido. Substâncias apresentando grupos fenólicos, tais como flavonóides e lignanas, são exemplos de substâncias naturais que apresentam várias atividades anti-oxidantes (Fauré, 1984). Um outro aspecto interessante é a correlação existente entre atividade anti-oxidante de substâncias polares e a capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral. (Ho, 1994).

Para uma substância apresentar boa atividade anti-oxidante é necessário que ela tenha a capacidade de deslocalizar o elétron desemparelhado do radical. As substâncias que possuem anel aromático ou duplas conjugadas tem essa capacidade, portanto os flavonóides isolados de *D. lasiophylla* se mostraram bons candidatos a esse estudo.

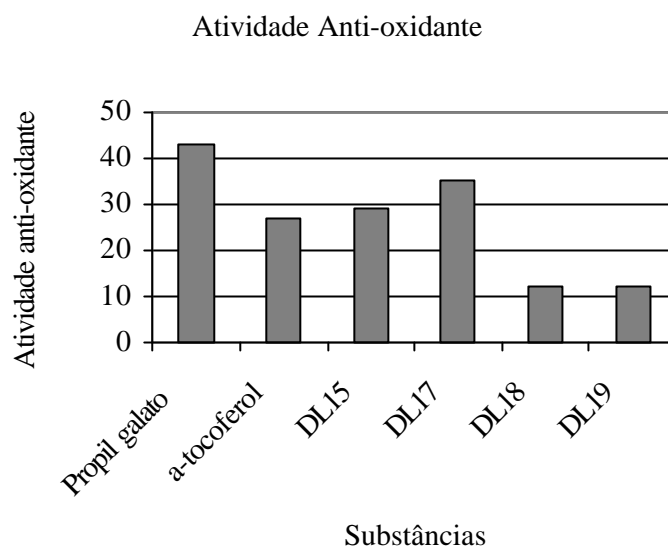


FIGURA 82 – Atividade anti-oxidante das substâncias puras do extrato acetato de etila das folhas.

As substâncias foram testadas utilizando-se o sistema **b**-caroteno/ácido linoléico (parte experimental). As atividades foram comparadas com dois anti-oxidantes conhecidos, um comercial o propilgalato e outro isolado de fonte natural o **a**-tocoferol. Os dados obtidos (Figura 82) indicaram que a (-)-*epicatequina* (**DL15**) (AA= 29) e a *epigallocatequina-(2**b**→7,4**b**→8)-epicatequina* (**DL17**) (AA= 35) apresentaram alguma atividade anti-oxidante, quando comparadas ao propil galato (AA= 49) e ao **a**-tocoferol (AA= 27). A Figura 82 sumariza os resultados obtidos.

8. Considerações finais

O presente estudo de *D. lasiophylla* levou ao isolamento de 17 substâncias naturais entre triterpenos e flavonóides. Os triterpenos isolados podem ser subdivididos de acordo com o seu esqueleto. Foram encontrados triterpenos de esqueleto lupano e de esqueleto oleanano. Quanto aos lupoanos foram três triterpenos de ocorrência bastante comum: lupenona, lupeol e ácido betulínico. Os triterpenos da classe dos oleananos foram isolados cinco deles: ácido acetil oleanólico, ácido oleanólico, oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila, ácido cafeil oleanólico e ácido ferulil oleanólico. Apesar do ácido oleanólico ser de ocorrência comum, o ácido acetil oleanólico foi isolado pela primeira vez de *Gymnema alternifolium* (Lai, 1994), tendo sido posteriormente isolado na família Leguminosae de *Vigna unguiculata* (Noorwala, 1995). No entanto, sua presença ainda não havia sido detectada na subfamília Papilionoideae. O ácido cafeil oleanólico já foi isolado anteriormente de *Betula pubescens* (Pan, 1994) na família Betulaceae, porém não havia sido registrado ainda em Leguminosae. Esse foi o primeiro registro do ácido ferulil oleanólico e do oleanolato de 7',8'-epoxiconiferila, sendo porém ainda sugestões estruturais já que faz-se necessário ainda a confirmação através de EM e um bom IV. Os esteróides isolados foram dois: **b**-sitosterol e estigmasterol, ambos de ocorrência comum.

Foram isolados e caracterizados flavonóides de duas classes: flavonas e catequinas. As flavonas isoladas encontravam-se glicosiladas, foram elas a 3'-**b**D-glicopiranosídeo luteolina e o 7-**b**D-glicopiranosídeo crisoeriol. Ambas são de ocorrência geral (Markan, 1978; Agrawal, 1989). A (-)-epicatequina isolada também tem ocorrência em todo reino vegetal (Jacques, 1974). Finalmente foi isolado uma nova proantocianidina do tipo A2, cuja estrutura, inclusive estereoquímica absoluta, foi elucidada como sendo a epigalocatequina-(2**b**→7,4**b**→8)-epicatequina.

As demais substâncias isoladas foram um lipidol, o 2-metil-2,4-pentanodiol, que, embora de estrutura simples, possui ocorrência rara como produto natural, já tendo sido encontrado somente uma vez em *Liguraria veitchiana* (Jia, 1992), a vanilina e o vanilato de metila, ambas de ocorrência comum.

Em comparação, os estudos realizados com a única espécie do gênero anteriormente estudada, *D. grandiflora* (Batista, 1995; Bhattacharyya, 1995; 1997; 1998; 1999) pode-se

verificar que nas raízes de *D. grandiflora* foram isolados principalmente flavanonas e flavonóis. No presente trabalho não foram encontrados flavonóides nos caules, somente nas folhas.

Alguns dos extratos de *D. lasiophylla* foram submetidos a teste de atividade microbiológica, tendo todos apresentado alguma atividade, destacando-se os extratos hexânico e acetato de etila do caule. Devido a esse fato, as substâncias puras isoladas do extrato acetato de etila das folhas foram submetidas ao mesmo teste, porém nenhuma delas apresentou atividade considerável. Essas mesmas substâncias foram submetidas a teste de atividade anti-oxidante, sendo que duas delas apresentaram valores de atividade considerável, maiores que o **a**tocoferol. Foram elas a (-)-epicatequina (AA= 29) e a epigallocatequina-(2**b**→7,4**b**→8)-epicatequina (AA= 35). Essas substâncias com alta atividade foram submetidas ao teste de *Artemia salina* no intuito de averiguar sua toxicidade, tendo revelado-se não tóxicas.

Os pontos de fusão obtidos para os triterpenos são discordantes da literatura, mas mesmo na literatura há muita variação, o que pode ser atribuído a diferente cristalização.

Para estudos futuros sugere-se dar continuidade ao estudo dessa planta, já que a maior parte de seu extrato acetato de etila do caule ainda não foi estudada, assim como seu extrato butanólico também aguarda estudo. Esse estudo revela-se promissor, visto que outras substâncias das classes das catequinas, flavonas e outros biflavonóides podem vir a ser isolados. Outro estudo interessante a ser realizado é o do extrato das sementes que demonstrou ser rico em ácidos graxos. O estudo também deve manter a sua linha de testes de bioatividade e atividade anti-oxidante.

9. Referências Bibliográficas

- AGRAWAL, P. K., BANSAL, M. C., PORTER, L. J., FOO, L. Y. *Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam: Ed. Elsevier, 1989.
- BALDÉ, A. M., PIETERS, L. A., GERGELY, A., KOLODZIEJ, H. CLAEYS, M., VLIETINCK, A. J. A-type Proanthocyanidins from Stem-bark of *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 337, 1991.
- BANTHORPE, D. V. Terpenoids. In: MANN, J. *et al. Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*. 3. ed. London: Longman, 1996. 289-360p.
- BARRETT, M. W., KLYNE, W., SCOPES, P. M., FLETCHER, A. C., PORTER, L. J., HASLAM, E. Plant Proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical Studies. Part 95. Circular Dichroism of Proanthocyanidins. *Journal of Chemical Society. Perkin I*, p. 2375, 1979.
- BATISTA, J. S., ALMEIDA, R. N., BHATTACHARYYA, J. Analsesic Effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. *Journal of Etnopharmacology*, v. 45, p. 207-210, 1995.
- BHATTACHARYYA, J., BATISTA, J. S., ALMEIDA, R. N. Dioclein, a Flavanone from the Roots of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 277-278, 1995.
- BHATTACHARYYA, J., MAJETICH, G., SPEARING, P., ALMEIDA, R. N. Dioclenol, a Minor Flavanonol from the Root-Bark of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry* v. 46, p. 385-387, 1997.
- BHATTACHARYYA, J., MAJETICH, G., JENKINS, T. M., ALMIDA, R. N. Dioflorin, a Minor Flavonoid from *Dioclea grandiflora*. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 413-414, 1998.

CHAND, S., LUSUNZI, I., VEAL, D. A., WILLIAMS, L. R., KARUSO, P. Rapid Screening of the Antimicrobial Activity of Extracts and Natural Products. *The Journal of Antibiotics* v. 47, p. 1295-1304, 1994.

CORREA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. II, 59-93p., v. III, 160-245p. e v. V, 410-472p.

CORDELL, G. A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry *Phytochemistry* v. 40, p. 1585-1612, 1995.

FAURÉ, M., LESSI, E., TORRES, R., VIDELA, C. A. *Phytochemistry* v. 29, p. 3773.

GOLDFARB, A. H. A. *Da Alquimia a Química 2^a*. ed São Paulo Nova Stella, 1988.

GRECA, M. D., MONACO, P., PREVITERA, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *Journal of Natural Products* v. 53, p. 1430-5, 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., CROSS, C. E. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* v. 119, p. 598-620, 1992.

HARBORNE, J. B. *The Flavonoids. Advances in Research since 1996: ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids and Their Glicosides in Hexadeutero Dimethylsulfoxide*. New York: Chapman & Hall, 441-498p., 1994.

HIDALGO, M. E., FERNÁNDEZ, E., QUILHOT, W., LISSI, E. Antioxidant Activity of Depsides and Depisidones. *Phytochemistry*, v. 37, p. 1585-87, 1994.

HO, C. T., FERRARO, T., CHEN, Q., HOSEN, R. T., HUANG, M. T. *Phytochemicals in Teas and Rosemary and their Cancer-Preventive Properties in: Food Phytochemicals*

- for Cancer Prevention II. HO, C. T., OSAWA, T., HUANG, M. T., HOSEN, R. T. Washington DC: ed. By American Chemical Society. 2p., 1994.
- JACQUES, D., HASLAN, E., BEDFORD, G. R., GREATBANKS, D. Plant Proanthocyanidins. Part II. Proanthocyanidin-A2 and its derivatives. *Journal of Chemical Society. Perkin I* p. 2663-71, 1974.
- JENKINS, T., BHATTACHARYYA, J., MAJETICH, G., TENG, Q. I. C., de FATIMA, A. M., ALMEIDA, R. Flavonoids from the Root-Bark of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry* v. 52, p. 723-730, 1999.
- JIA, Z. J., ZHAO, Y., TAN, R. X., LI, Y. Sesquiterpenes and other constituents from *Liguraria veitchiana*. *Phytochemistry* v. 31, p. 199, 1992.
- JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. 11 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 370-383p.
- LAI, J. S. *et al.* Constituents from the Stems of *Gymnena alternifolium*. *Chemical and Pharmacological Journal* v.43, p.219-225, 1994.
- MABRY, T. J., MARKHAN K. R., THOMAS, M. B. *The Sistematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag, 1970.
- MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. ¹³CNMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids: a Compilation and Some Salient Feature. *Phytochemistry*, v.37, p. 1517-75, 1994.
- MARKHAN, K. R., TERNAL, B., GEIGER, H., MABRY, T. J. Carbon-13 NMR Studies of Flavonoids-III. Naturally Occuring Flavonoid Glycosides and their Acylated Derivatives *Tetrahedron*, v. 34, p. 1389-97, 1978.

- NKENGFAK, A. E., VOUFFO, T. W., VARDAMIDES, J. C., KOUAM, J., FOMUM, Z. T., MEYER, M., STERNER, O. Phenolic Metabolites from *Erythrina* Species. *Phytochemistry* v. 46, p. 573-8, 1997.
- NOORWALA, M. *et al.* A new Monodesmosidic Triterpenoid Saponin from the Seeds of *Vigna unguiculata* subspecies Unguiculata. *Journal of Natural Products* v.58, p.1070-74, 1995.
- OGUNKOYA, L. Applications of Mass Spectroscopy in Structural Problems in Triterpenoids. *Phytochemistry* v. 20, p. 121-6, 1981.
- PAN, H., LUNDGREN, L. N., ANDERSSON, R. Triterpene Caffeates from Bark of *Betula pubescens*. *Phytochemistry*. V. 37, p. 795-99, 1994.
- PAULSON, D. R., TANG, F. Y., MORAN, G. F., URRAY, A. S., PELKA, B. P., VASQUEZ, E. M. J. Carbon-13 Magnetic Resonance Spectroscopy. Quantitative Correlations of the Carbon Chemical Shifts of Simple Epoxides *Organic Chemistry* v. 40, p. 184-186, 1975.
- RIBEIRO, M. N. S., ZOGHBI, M. G. B., SILVA, M. L., GOTTLIEB, O. R., RESENDE, C. M. M. Cadastro Fitoquímico Brasileiro 2 ed Manaus IMPA/FUA 1987.
- RICCA, G. S., NICOTRA, F. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some Phytosterols. *Gazzetta Chimica Italiana*, v.108, p.713-15, 1978.
- ROSHAN, C. C., SOTHEESWARAN, S., UVAIS, M., SULTANBAWA, S., TERNAL, B. ¹³C NMR Studies of Some Lupane and Taraxerane Triterpenes *Organic Magnetic Resonance*, v. 14, p. 462-5, 1980.
- STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. 2. ed. New York: Heidelberg, 1969. p.1041.

THOMPSON, R. S., JACQUES, D., TANNER, R. J. N. Plant Proanthocyanidins. Part I. Introduction; the Isolation, Structure, and Distribution in Nature of Plant Proanthocyanidins *Journal of Chemical Society* p. 1387-1399, 1972.