



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTES E INIBIÇÃO DA AChE DAS SUBSTÂNCIAS DE  
*CRATYLIA MOLLIS* (LEGUMINOSAE) E *ERIOPE BLANCHETII*  
(LAMIACEAE)**

**Luciano da Silva Lima  
Salvador – 2009**

**LUCIANO DA SILVA LIMA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTES E INIBIÇÃO DA AChE DAS SUBSTÂNCIAS DE  
*CRATYLIA MOLLIS* (LEGUMINOSAE) E *ERIOPE BLANCHETII*  
(LAMIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração-Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química - Área: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Drº. Jorge Maurício David

**Salvador – 2009**

Aos meus pais, Maura e Benedito, meus irmãos, Mônica, Luiz e  
Márcia (*in memorium*).

## AGRADECIMENTOS

Aqui venho a agradecer as pessoas que ao longo desta jornada da minha vida contribuíram para a retirada de pedras no caminho, e destas pedras me ajudaram a construir uma fortaleza.

Agradeço primeiramente a Deus que colocou sempre pessoas certas no meu caminho.

Agradeço muito aos meus Pais, Maura da Silva Lima e Benedito C. Lima por uma formação moral e incentivo nas horas difíceis. Aos meus irmãos, Mônica, Luiz e Márcia (*in memoriam*) e ao querido Joanizio.

Ao Prof. Jorge M. David pela orientação, amizade e pela referência como pesquisador ético. A prof. Juceni pelo abrigo em um triste capítulo e trágico na vida de todos nós.

Como não poderia esquecer dos meus amigos companheiros de caminhada que construíram uma grande “historia” e “estória” Isley, Fabio e depois os agregados Giovani, Alisson, Anderson, foguinho (Miquéias) e Erik, que as magoas da convivência jamais deixem a essência da amizade acabar.

Agradeço também a professora Fernanda Mendonça e a Kelli pelo auxílio na realização dos testes biológicos.

Uma das grandes virtudes do homem é crescer como pessoa e jamais esquecer aqueles que te ajudaram e como tal não poderia esquecer os meus amigos mestre da graduação pelos seus ensinamentos, Rosilene, Fernando, Raildo, Roberto Carlos e Reinaldo Gramacho e os meus professores da pós-graduação.

Aos amigos colegas do GPPN, Clayton “ Alf ”, Larissa “cão bravo”, Marcus Bahia, Renato, Lurdinha, Bruno ” enéas mortalha”, Fabio Dias, Hugo, Tais, Everaldo, Manuela, Lidercia, Rosane, Jerefson, Darlan ” vera verão”, José Candido “ raspa”, Roberta “ fome zero”, Patrícia “ fome um”, Marcus “ tartaruga”, Eliezer, Raul “da lua”, Erika, Charliston e em especial meus alunos de iniciação científicas que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho Marcos Barreto e Lidiane Martins. A vocês os meus sinceros agradecimentos pela convivência, pelos momentos engraçados e pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Como não poderia também esquecer os colegas de Instituto de Química e amigos: Ivoneide, Caline, Airam, Edson, Paulo Daniel, Ana Paula, Ivon, Maria, Martins, João

Victor, Robson, Valéria, Cleber, Eduardo, Ítala, Adriano, Eric, entre outros. O meu obrigado por tudo.

Aos Funcionários do instituto de Química, principalmente, Cristóvão, Paulo, Alice, Judith, Egídia e Aliomar. A todos os funcionários, professores e colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, que me ajudaram a escrever este e mais alguns capítulos da minha vida possibilitando-me experiências enriquecedoras e gratificantes, da maior importância para meu crescimento como ser humano e profissional. **MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico dos extratos orgânicos das folhas de *Cratylia mollis* Mart. ex. Benth e do caule e folhas de *Eriope blanchetti* xxx, pertencentes as famílias Leguminosae e Lamiaceae, respectivamente. A *Cratylia mollis* é um arbusto pertencente à subfamília Faboideae (Papilionoideae) que se distribui em toda América do Sul. Sendo a espécie mais abundante no semi-árido nordestino, onde é conhecida popularmente como “Camaratuba” e “caramatu” e tem sido utilizada como forrageira, principalmente na alimentação do gado e caprinos. Já a *Eriope blanchetti* é uma espécie endêmica das regiões de restinga, encontrada principalmente na restinga do parque metropolitano da Lagoa do Abaeté na cidade de Salvador-BA. Este trabalho teve como objetivo o isolamento dos constituintes químicos a partir de *Cratylia mollis* e *Eriope blanchetti*, além da investigação das atividades, antioxidante e anticolinesterásica das substâncias isoladas. O extratos metanólico de ambos vegetais foram particionados entre MeOH: Hex e MeOH/ H<sub>2</sub>O: CHCl<sub>3</sub> e fracionados através de técnicas cromatográficas em colunas e em camada delgada preparativa sob sílica gel. As substâncias foram identificadas através de métodos espectrométricos (RMN, IV, EM) e comparação dos dados da literatura. Dos extratos orgânicos de *Cratylia mollis* foram isolados nove substâncias com destaque para um novo nor-isoprenoide, (4*S*\*, 6*S*\*)-4-but-1-enil-4,6-diidroxi-3,5,5-trimetil-ciclo-hex-2-enona, o dipetídeos, N-benzoil-fenilalaninoil-fenilalaninolacetato e o Ester, 4-[3-(4-hidroxi-fenil)-acrilóiloxi] ácido benzóico, sendo este último descrito pela segunda vez na literatura. A partir de *Eriope blanchetti* foram isoladas doze substâncias com destaque para a podofilitoxina. Todas as substâncias isoladas de ambos os vegetais foram avaliados para atividade antioxidante e inibição AChE. Onde foi verificada na avaliação de inibição da enzima AChE que o N-benzoil-fenilalaninoil-fenilalaninolacetato apresentou uma inibição satisfatória comparado com CI<sub>50</sub>=111,34 μmol.L<sup>-1</sup> comparado com a substância padrão Fisostigmina, CI<sub>50</sub>= 141,51 μmol.L<sup>-1</sup>.

**Palavras- chave:** *Cratylia mollis*, Leguminosae, *Eriope blanchetti*, Lamiaceae, anticolinesterásico.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa dos Biomas Brasileiros .....	15
Figura 2. Algumas substâncias naturais e derivadas semi-sintéticos .....	16
Figura 3. Mapa de localização da Caatinga no Brasil.....	17
Figura 4. Caatinga na Época de Chuvas Fonte: <a href="http://www.zoologiarn.hpg.ig.com.br/caatinga.htm">http://www.zoologiarn.hpg.ig.com.br/caatinga.htm</a> [16], acessado em 20.12.2004) ....	18
Figura 5. Caatinga na Época de Estiagem.....	19
Figura 6. Cactácea- <i>Cereus jamacuru</i> (mandacaru) .....	19
Figura 7. Mapa de distribuição de espécies da Família Leguminosae.....	21
Figura 8. Vista panorâmica do parque metropolitano da lagoa do Abaeté [].....	26
Figura 9. Foto de um espécime de <i>E. blanchetti</i> ( Parque Restinga da Lagoa do Abaeté, foto Hugo N. Brandão).....	27
Figura 10- Estruturas de alguns inibidores de AChE utilizados no tratamento da MA.....	30
Figura 11- Estruturas de alguns antioxidantes naturais e sintéticos .....	32
Figura 12. Representação esquemática do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila e do 1,1- difenil-2-picrilhidrazina .....	40
Figura 13- Megastigmano isolado de <i>Sauropus androgynus</i> .....	42
Figura 14. Correlações observadas no espectro de gHMBC para as propostas estruturais para CM1 .....	42
Figura 15- Correlações observadas no espectro de NOESY .....	43
Figura 16- Clivagem dos carotenóides (C40) levando aos nor-isoprenoides (C-13 e C- 15) .....	44
Figura 17. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM1 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	45
Figura 18. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM1 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	45
Figura 19. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM1 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	45
Figura 20. Espectro de DEPT 135° de CM1 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	46
Figura 21. Espectro de gHMBC de CM1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	46
Figura 22. Expansão do espectro de gHMBC de CM1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz) .....	46
Figura 23. Espectro de gHMQC de CM1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz) .....	47
Figura 24. Expansão do espectro de gHMQC de CM1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz) .....	47
Figura 25. Espectro de NOESY de CM1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	48
Figura 26. Espectro de gCOSY de CM1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	48
Figura 27. Espectro de massas de baixa resolução de CM1 – ESI(-) .....	48
Figura 28. Espectro de massas de alta resolução de CM1 – ESI(-).....	49
Figura 29. Espectro no infravermelho de CM1 .....	49
Figura 30. Espectro no infravermelho o produto obtido do derivado da redução de CM1 .....	50
Figura 31. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do produto da reação de redução de CM1 (C <sub>5</sub> D <sub>4</sub> N, 300 MHz).....	50
Figura 33- Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM2 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).....	52
Figura 32- Espectro de massas de baixa resolução de CM2 [APCI (+)] .....	52

Figura 34- Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM1 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz). .....	53
Figura 35- Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM1 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz). .....	53
Figura 36. Correlações observadas no espectro de gHMBC.....	56
Figura 37. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM3 [CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz].....	58
Figura 38. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM3 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	58
Figura 39. Espectro de DEPT 90° de CM3 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	59
Figura 40. Espectro de gHMQC de CM3 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz]. .....	59
Figura 41. Espectro de gHMBC de CM3 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz]. .....	60
Figura 42. Espectro de gCOSY de CM3 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz].....	60
Figura 43. Espectro de Infravermelho de CM3 .....	61
Figura 44. Exemplos de valores de deslocamento químico do grupo metoxila em flavanas [ , ] .....	63
Figura 45. Estrutura do bolusanthol A.....	63
Figura 46 – Modelos de isoflavanas com substituintes em C-2' e uma metoxila em C-4' .....	64
Figura 47. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM4 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	65
Figura 48. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM4 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz].....	65
Figura 49. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM4 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	66
Figura 50. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM4 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	66
Figura 51. Espectro de massas de alta resolução de CM4[M-H-H <sub>2</sub> O] [ESI (-)].....	67
Figura 52. Correlações observadas no espectro gCOSY .....	69
Figura 53. Correlações observadas no espectro gHMBC .....	69
Figura 54. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM5 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz].....	71
Figura 55. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM5 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	71
Figura 56. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM5 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz,].....	72
Figura 57. Espectro de gCOSY de CM5 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	72
Figura 58. Espectro de gHMBC de CM5 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) .....	73
Figura 59. Expansão do espectro de gHMBC de CM5 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) .....	73
Figura 60. Espectro de gHMQC de CM5 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) .....	74
Figura 61. Expansão do Espectro de gHMQC de CM5 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) .....	74
Figura 62. Identificação do sistema α, β insaturado carbonílico .....	75
Figura 63. Correlações observadas no espectro gHMBC .....	76
Figura 64. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM6 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	77
Figura 65. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM6 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	77
Figura 66. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM6 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz,].....	78
Figura 67. Espectro de RMN DEPT 135° de CM6 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz] .....	78
Figura 68. Espectro de gHMBC de CM6 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	79
Figura 69. Espectro de gHMQC de CM6 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz) .....	79
Figura 70. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de CM7 e CM8 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz] .....	82
Figura 71. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM7 e CM8 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz,] .....	82
Figura 72. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM7 e CM8 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz,] .....	83
Figura 73. Estruturas proposta para CM9 .....	84
Figura 74. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H CM9 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	85
Figura 75. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de CM9 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz].....	85



Figura 76. Espectro de massas de baixa resolução de CM9 [APCI (+)].....	86
Figura 77. Sistema insaturado conjugado com uma carbonila.....	88
Figura 78- Correlações observadas no espectro gHMBC.....	88
Figura 79. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB1 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	89
Figura 80. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB1 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	90
Figura 81. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB1 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz].....	90
Figura 82. Espectro de gHMBC de EB1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	91
Figura 83. Expansão do espectro de gHMBC de EB1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	91
Figura 84. Espectro de RMN DEPT 135° de EB1 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz].....	92
Figura 85. Espectro de gHMQC de EB1 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	92
Figura 86- Correlações observadas no espectro gHMBC.....	94
Figura 87. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB2 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz].....	95
Figura 88. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB2 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz].....	96
Figura 89. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB2 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	96
Figura 92. Expansão do Espectro de gHMBC de EB2 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	97
Figura 91. Espectro de DEPT 135° de EB2 [CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz].....	97
Figura 91. Espectro de gHMBC de EB2 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	97
Figura 93. Espectro de gHMQC de EB2 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	98
Figura 94. Expansão do Espectro de gHMQC de EB2 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	98
Figura 95. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura de EB4 e EB5 [C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz].....	100
Figura 96. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura de EB4 e EB5 [C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz].....	100
Figura 97. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB3 [C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz].....	101
Figura 98. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB3 [C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz].....	101
Figura 99. Correlações observadas no espectro bidimensional gHMBC.....	104
Figura 100- Correlações significativas observadas no NOESY de EB-6.....	104
Figura 101. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB6 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	106
Figura 102- Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB6 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz].....	106
Figura 103. Espectro de gHMBC de EB6 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	107
Figura 104. Expansão do Espectro de gHMBC de EB6 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	107
Figura 105. Espectro de gHMQC de EB6 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	108
Figura 106. Espectro de DEPT 135° de EB6 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz].....	108
Figura 107. Espectro de gCOSY de EB6 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	109
Figura 108. Espectro de gNOESY de EB6 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	109
Figura 109. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB7 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	111
Figura 110. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB7 [CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz].....	111
Figura 111. Espectro de gHMBC de EB7 [CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz].....	112
Figura 112. Expansão do espectro de gHMQC de EB7 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz).....	112
Figura 113. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB8 [CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz].....	116
Figura 114. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB8 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	116
Figura 115. Espectro de DEPT 135° de EB8 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	117
Figura 116. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de EB9 e EB10 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	120
Figura 117. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de EB9 e EB10 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	120
Figura 118. Espectro de DEPT 135° de EB9 e EB10 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	121

Figura 119. Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente da coloração púrpura em CCDC .....	123
Figura 120. Reações químicas envolvidas no teste de atividade inibidora de AChE desenvolvido por Ellman.....	124
Figura 121. Demonstração do resultado positivo para o composto CM3 no teste qualitativo em CCDC de inibição da enzima Ache .....	124
Figura 122. Porcentual de inibição atividade de I% demonstrada pela diminuição da concentração da substância aumenta quando a concentração de amostra .....	125
Figura 123. Esquema geral de oxidação .....	126

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (75 MHz) e $^{13}\text{C}$ (300 MHz) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	44
Tabela 2 - Dados espectrométricos de RMN $^{13}\text{C}$ (300 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ) .....	54
Tabela 3. Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (300 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	57
Tabela 4. Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para CM4 e Bolusanthol A.....	64
Tabela 5. Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (75 MHz) e $^{13}\text{C}$ (300 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	70
Tabela 6. Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz).....	76
Tabela 7. Dados espectrométricos de RMN $^{13}\text{C}$ [(75 MHz), $\text{CD}_3\text{OD}$ ].....	81
Tabela 8. Dados espectrométricos RMN $^{13}\text{C}$ de EB1 (300 MHz).....	88
Tabela 9. Dados espectrométricos de RMN $^{13}\text{C}$ de EB2 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	95
Tabela 10. Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).....	102
Tabela 11. Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ [(300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz), $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de EB-6.....	105
Tabela 12. Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ de EB-7 [(300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz), $\text{CD}_3\text{OD}$ ].....	113
Tabela 13. Dados espectrométricos de RMN de $^{13}\text{C}$ de EB8 (75 MHz), $\text{CDCl}_3$ ].....	115
Tabela 14. Dados espectrométricos de $^{13}\text{C}$ de EB9 e EB10 [(75 MHz), $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]....	119
Tabela 15. $\text{CI}_{50}$ do teste quantitativo de sequestro de DPPH das substancias isoladas de <i>C.M</i> e <i>E.B.</i> ....	127

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substâncias isoladas em estudos fitoquímicos de <i>C. mollis</i> .....	23
Quadro 2 – Substâncias isoladas de <i>E. blanchetii</i> .....	28
Quadro 3. Massas das fases do extrato bruto obtidos de <i>C. mollis</i> .....	35
Quadro 4. Massas das fases do extrato bruto obtidos de <i>E. blanchetii</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt – Acetato de etila

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância magnética de hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância magnética de Carbono 13

Hex – Hexano

MeOH – Metanol

HAc – Ácido acético

HMQC – Heteronuclear Multi Quantum Correlation

HMBC – Heteronuclear Multi Bond Correlation

COSY – Correlated spectroscopy

DEPT – Distortionless Enhancement Polarization Transfer

*dd*- duplo dubleto

*d*- dubleto

*s*- singleto

*m*- multipleteo

$\delta$  - deslocamento químico

ppm – parte por milhão

*t* – tripleto

J – Constante de acoplamento

MHz – MegaHertz

AChE- Acetilcolinesterase

EM – Espectrometria de massas

MA- Mal de Alzheimer

ERN- Espécie reativa do nitrogênio

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Considerações preliminares.....	14
1.2. Caatinga .....	17
1.2.1. Aspectos gerais sobre a família das leguminosae.....	19
1.3. Composição química da espécie <i>Cratylia mollis</i> .....	22
1.4. Restinga.....	26
1.4.1. Aspectos gerais sobre a família das Lamiaceae .....	26
1.5. Aspectos químicos das espécies <i>Eriope blanchetii</i> .....	27
1.6. Testes biológicos e farmacológicos .....	28
1.6.1. Substâncias naturais utilizadas no tratamento do mal de alzheimer.....	29
1.6.2. Substâncias antioxidantes de fontes naturais .....	31
2. Objetivos.....	33
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	34
3.1 Coleta do material vegetal e identificação das espécies.....	34
3.2 Procedimento geral.....	34
3.3 Isolamento e extração dos constituintes das folhas de <i>C. mollis</i> .....	34
3.4 Isolamento e extração dos constituintes das folhas de <i>E. blanchetii</i> .....	36
3.4.1 Reação de Redução do composto CM1 .....	38
3.5 Avaliações biológicas.....	38
3.5.1 Avaliação de inibição da Enzima acetilcolinesterase.....	38
3.5.2 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .....	39
4. Resultados e discussão.....	41
4.1 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>Cratylia mollis</i> 41	
4.1.1 Determinação estrutural de CM1.....	41
4.1.2 Identificação estrutural de CM2 .....	51
4.1.3 Identificação de CM3.....	55
4.1.4 Determinação Estrutural de CM4 .....	62
4.1.5 Identificação Estrutural de CM5.....	68
4.1.6 Identificação Estrutural de CM6.....	75
4.1.7 - Identificação Estrutural de CM7 e CM8 em mistura.....	80
4.1.8 Identificação Estrutural de CM9.....	84
4.2 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>ERIOPE BLANCHETTI</i> .....	87
4.2.1 Identificação estrutural de EB1 .....	87
4.2.2. Identificação estrutural de EB2 .....	93
4.2.3. Identificação estrutural de EB3, EB4 e EB5 .....	99
4.2.4. Identificação estrutural de EB6 .....	103
4.2.5. Identificação estrutural de EB7 .....	110
4.2.6. Identificação estrutural de EB8 .....	114
4.2.7. Identificação estrutural de EB9 e EB10.....	118
4.2.8. Identificação estrutural de EB11 e EB12.....	122
5. Resultados e discussão da avaliação biológica .....	123
5.1. Métodos de avaliação de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	123
5.2. Avaliação da atividade do seqüestro de radical estável DPPH .....	125
6. Considerações Finais.....	128

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações preliminares

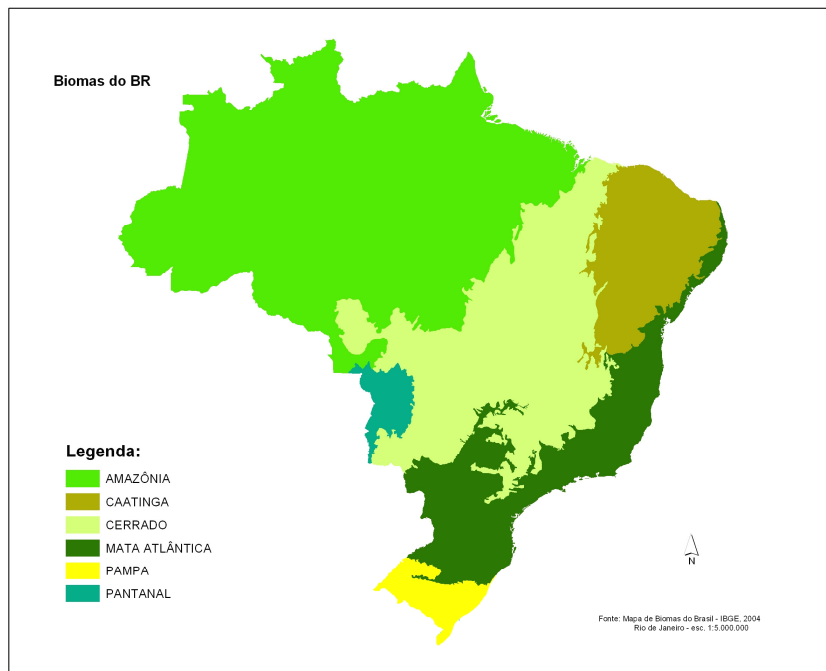
Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, ainda hoje, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. Estima-se que os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas [1].

O estudo químico e farmacológico de plantas é uma área de pesquisa que apresenta um grande volume de trabalhos publicados. Apesar do grande número de informações disponíveis, ainda existe um vasto número de espécies cuja composição química ainda não foi investigada. A necessidade da descoberta de novos fármacos, devido ao surgimento de novas doenças, impulsiona pesquisas visando o estudo fitoquímico e farmacológico de plantas a encontrar substâncias biologicamente ativas. As plantas superiores representam uma fonte a ser explorada no desenvolvimento de novas drogas, que podem fornecer novas substâncias a partir das quais podem ser desenvolvidos efetivos agentes terapêuticos [2].

Substâncias oriundas de fontes naturais podem ser utilizadas na sua forma natural ou após ligeiras modificações químicas ou mesmo servir de modelo para o desenvolvimento de novas drogas [3]. Como exemplo pode-se citar o diterpeno Taxol **(1)** que possui atividade contra o câncer do colo do útero [4]. Diversos grupos de pesquisadores se empenharam no desenvolvimento de métodos alternativos de obtenção do taxol buscando viabilizar o emprego comercial desta substância, uma vez que esta ocorre em concentração muito pequena nas cascas do teixo (*Taxus breviflora*) [5]. Outro exemplo de sucesso na aplicação de substâncias oriundo fontes natural como drogas, pode-se destacar a lignana podofilotoxina **(2)**, isolada primeiramente em *Podophyllum peltatum*, que possui dois derivados semi-sintéticos: o etoposídeo **(3)**, empregado no tratamento de câncer de testículo e certos tipos de câncer de pulmão, e o tenoposídeo **(4)**, que tem emprego no tratamento leucemia linfoblástica aguda, linfoma não-Hodgkin e neuroblastomas [6]. Também é digno de nota dois alcalóides da vinca, a vincristina **(5)** e a vimblastina **(6)** que talvez represente a descoberta de fármaco de fonte vegetal mais significativa uma vez que estes alcalóides são utilizados em todo o mundo no tratamento de câncer de pele e casos de câncer de mama, testículo e linfoma [7].

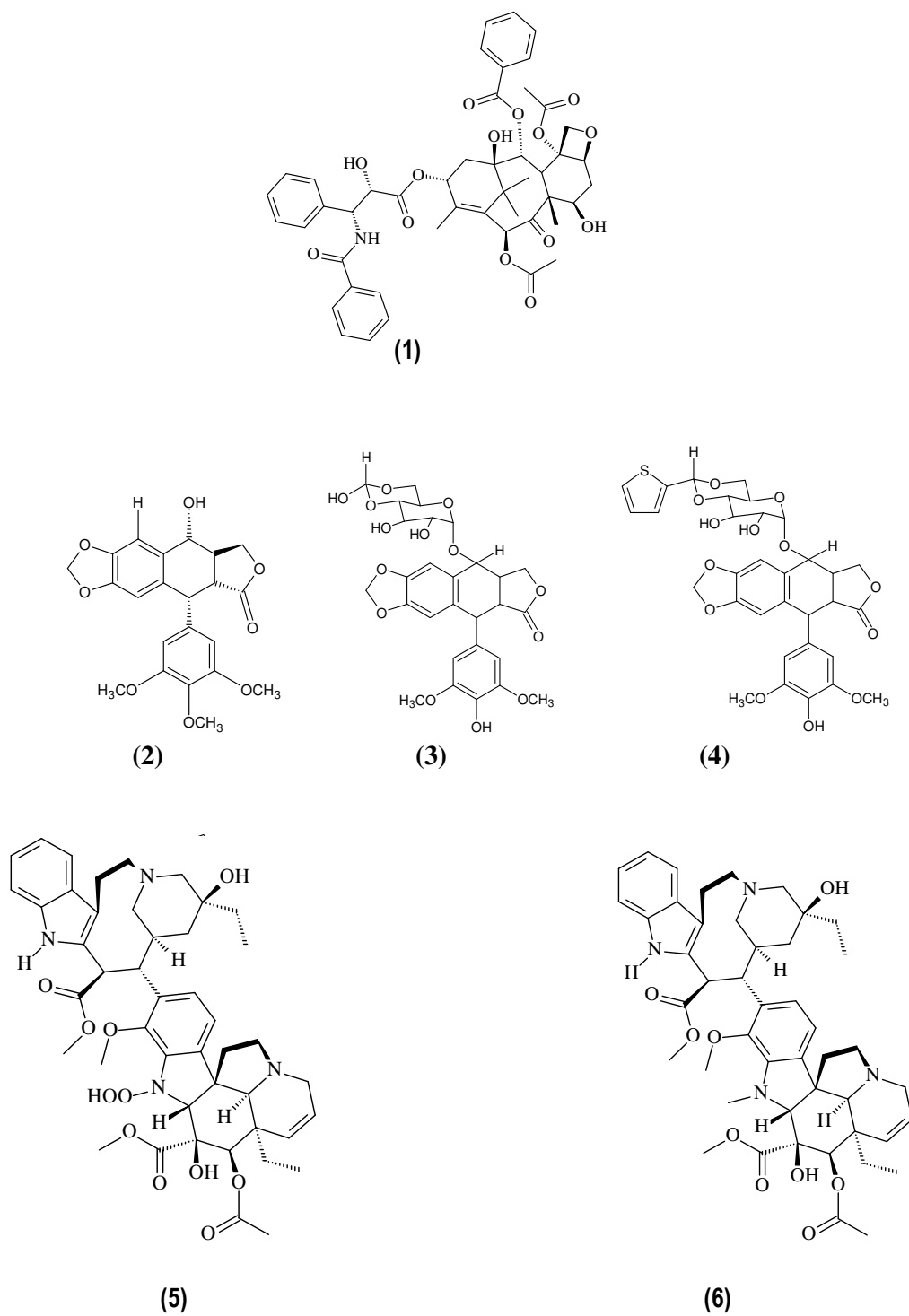
MENDELSON & BALICK [8], relatam que embora sejam conhecidas um número significativo de substâncias extraídas de espécies vegetais, ainda existem aproximadamente 250000 espécies vegetais sem qualquer estudo científico. Apesar de se passarem mais de uma década da publicação deste trabalho ainda não houve mudanças abruptas dessa situação.

O Brasil possui diversos tipos de vegetação (Figura 1) que se estende da praia até as montanhas centrais apresentando uma riqueza de várias famílias de plantas dispersas nos diferentes habitats, sendo o país com a flora mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitofármacos [9]. Apesar de toda esta diversidade, estima-se que apenas 8% das plantas já foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e biológico, e todo esse potencial pode ser perdido sem que haja uma compilação do conhecimento das espécies, uma vez que a cada ano novas fronteiras agrícolas são redesenhadas no país podendo acarretar assim, desaparecimento de diversas espécies nativas.



**Figura 1.** Mapa dos Biomas Brasileiros





**Figura 2.** Algumas substâncias naturais e derivadas semi-sintéticos

## 1.2. Caatinga

Geograficamente não existe região no Brasil cujo aspecto seja mais agressivo ou desolador na época do estio do que a área onde se encontra a caatinga. A caatinga é um ecossistema, exclusivamente brasileiro que ocupa 11% (844.453 quilômetros quadrados) do território nacional, abrangendo parte dos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e norte de Minas Gerais (Figura 3) [10, 11].

A palavra caatinga, de origem tupi, significa mata branca. A razão para esta denominação reside no fato de apresentar-se à caatinga verde somente no inverno, a estação das chuvas, de curta duração (Figura 4). No restante do ano a caatinga, inteiramente, ou parcialmente, sem folhas, apresenta-se clara, mostrando os caules esbranquiçados que na ausência da folhagem dão um tom claro a essa vegetação [12] (Figura 5).



**Figura 3.** Mapa de localização da Caatinga no Brasil

A caatinga tem um aspecto de deserto. A temperatura em geral é muito elevada, as umidades relativas médias são baixas, bem como as precipitações pluviométricas médias anuais, em torno de 250 e 500 mm. Além dessas condições climáticas rigorosas, a região da caatinga está submetida a ventos fortes e secos que contribuem para aridez da paisagem nos meses de seca [13]. Este tipo de vegetação, caatinga, é formada por árvores baixas e arbustos, que em geral perdem as folhas na estação das secas (caducifolia), além de muitas cactáceas (Figura 6).

As espécies vegetais resistentes da caatinga têm servido como suporte forrageiro para os rebanhos que delas dependem como principal, e às vezes a única fonte de alimento durante a época da seca.

O grupo de plantas predominante na caatinga é o da família Leguminosae. Dentre as quais, pode-se destacar *Cratylia mollis* (caramatuba), *Poecilanthe ulei* (carrancudo), *Piptadenia viridiflora* (surucucu), *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta), *Desmanthus virgatus* (desmanto).

Extensivas pesquisas na área de agronomia têm sido desenvolvidas de modo a identificar espécies da caatinga com potencial para serem utilizadas como forragem para suplementação alimentar nos períodos de estiagem [14].

Embora a Caatinga seja uma região de grande riqueza em espécies vegetais e animais, com aproximadamente 932 espécies de plantas, 148 espécies mamíferos e 510 espécies de aves vem sendo destruídas mais rápidas do que outros ecossistemas como a floresta amazônica, considerada o “pulmão do mundo”, de grande interesse para o mundo todo.

Em discurso recente para os diversos meios de comunicação em 2008, o até então Ministro do Meio Ambiente, Carlos Minc, mostrou a sua preocupação com a destruição desse bioma, que é um dos mais ameaçados, menos estudados e menos protegido do país. Ainda na ocasião, o ministro também apresentou um mapeamento das áreas de proteção da caatinga, mostrando que atualmente apenas 7% da área estão protegidos, mas apenas 1% está em unidades de proteção e reservas indígenas. Os demais 6% fazem parte das Áreas de Proteção Ambiental (APAs), que não são consideradas de proteção efetiva [15].



**Figura 4.** Caatinga na Época de Chuvas

Fonte: <http://www.zoologiarn.hpg.ig.com.br/caatinga.htm> [16], acessado em 20.12.2004)



**Figura 5.** Caatinga na Época de Estiagem

Fonte: <http://www.zoologiarn.hpg.ig.com.br/caatinga.htm> [16], acessado em 20.12.2004)



**Figura 6.** Cactácea- *Cereus jamacuru* (mandacaru)

Fonte: <http://www.zoologiarn.hpg.ig.com.br/caatinga.htm> [16], acessado em 20.12.2004)

### **1.2.1. Aspectos gerais sobre a família das leguminosae**

A família Leguminosae compreende 670 gêneros e cerca de 17500 espécies, distribuído nas zonas tropicais e presentes em quase todo o mundo (Figura 7). Esta família pertence à divisão da Angiospermas, classe Dicotiledônea e da ordem Rosales (Lewis, 1987). Nesta família são reconhecidas três subfamílias importantes: Caesalpinoideae (5 tribos, 152 gêneros), Mimodoideae (5 tribos, 63 gêneros) e Faboideae (Papilionoideae) (31 tribos, 443 gêneros).

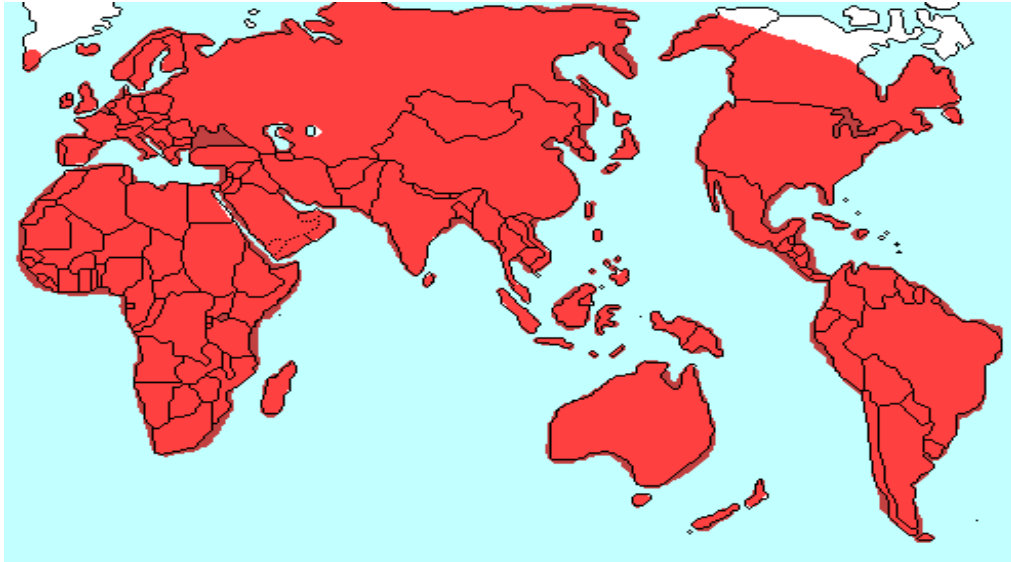
Muitos legumes conhecidos e utilizados pelo homem, como por exemplo, feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*), lentilha (*Lens culinaris*), fava

(*Vicia faba*), soja (*Glycine max*) e amendoim (*Arachis hypogaea*), todos ricos em proteínas, óleos e carboidratos e pertencem a subfamília Faboideae [17].

Das plantas predominantes nesta subfamília destacam-se como forrageiras *Melilotus alba* e *Medicago sativa*, ambas conhecidas como alfafa. Como planta produtora de corantes utilizados nas indústrias têxteis destaca-se o gênero *Indigofera*. Como produtora de madeira destacam-se a cabriúva ou balsamo (*Myroxylum balsamum*), a caviúna (*Machaerium scleroxylon*), o jacarandá (*Dalbergia nigra*), a sucupira preta (*Bowdichia virgilioides*), angelim (*Andira anthelmia*) e o cumaru da Amazônia (*Dipteryx odorata*). Algumas plantas são cultivadas por possuírem lindas flores, como por exemplo, a ervilha-de-cheiro (*Lathyrus odoratus*), giesta (*Spartium junceum*), lupino (*Lupinus hybridus*). Ainda é cultivada como plantas produtoras de sementes ornamentais a *Ormosia arborea* (olho-de-cabra), que é uma árvore da Serra do Mar encontrada nas regiões litorâneas [18].

As espécies da família leguminosae são de grande ocorrência nas caatingas, representando um dos principais recursos naturais da flora nativa do semi-árido. Além disso, apresentam uma série de características que as credenciam como importante fonte de alimento para o gado criado nesta região [19]. Ainda, as plantas desta família também possuem hábito bastante variado, sendo grandes árvores ou arbustos, subarbustos ou ervas anuais ou perenes e muitas trepadeiras, podendo ser encontradas em variados ambientes. O seu fruto também é muito variado, mas em geral são legumes e suas sementes sendo às vezes envoltadas com mucilagem ou polpa doce ou com arilo [17].

Nos países em desenvolvimento, o cultivo de leguminosas é o meio mais eficaz para o aumento da produção de proteínas vegetais. Também, são economicamente importante como produtoras de forragem, fibras, gomas, resinas, tintas e alimentos como, por exemplo, ervilha, lentilha, amendoim, feijão.



**Figura 7.** Mapa de distribuição de espécies da Família Leguminosae

Muitos legumes podem converter nitrogênio atmosférico em amônia (forma solúvel do nitrogênio acessível a outras plantas). Isto é alcançado pela presença de nódulos de raiz contendo bactérias do gênero *Rhizobium*. Estas bactérias têm relação simbiótica com legumes, enquanto fixador de nitrogênio livre para as plantas. Como a relação é simbiótica, os legumes provêm as bactérias com fonte de carbono fixo produzida por fotossíntese. Isto permite muitos legumes sobreviver e competir efetivamente em solos pobres em nitrogênio.

#### **1.2.1.1. O gênero *Cratylia***

Neste gênero destacam-se com grande potencial forrageiro as espécies *C. mollis* e *C. argentea* [20]. Além destas espécies o gênero *Cratylia* compreende as espécies [17]:

- *Cratylia hypargyrea*
- *Cratylia bahiensis*
- *Cratylia intermedia*
- *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze sinônimo de *Dioclea argentea* Dev., *C. floribunda* Benth. e *C. nitens* Benth.
- *Cratylia hypargyrea* Mart. Ex Benth. Sinônimo de *C. hypargyrea* Mart. ex Benth. subespécie *glabrior* Benth.
- *Cratylia nuda* Tul.

#### **1.2.1.1.1. A espécie *Cratylia mollis***

A espécie *Cratylia mollis* Mart. Ex Benth é um arbusto da família Leguminosae, subfamília Faboideae (Papilionoideae) cuja distribuição é restrita na América do Sul. É uma espécie caducifólia e forrageira que apresenta grande resistência à seca. Além disso, é a vegetação predominante na caatinga [19].

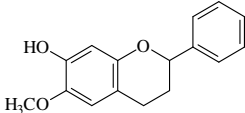
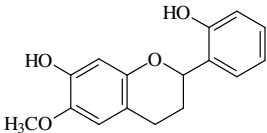
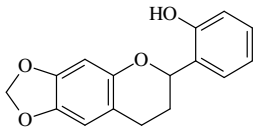
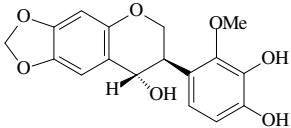
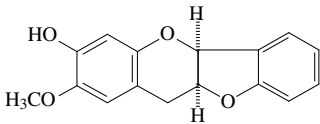
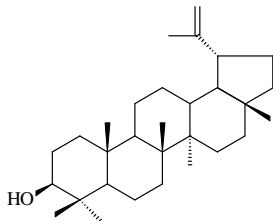
O arbusto pode alcançar 2m a 6m de altura e possui inflorescência ereta, flor com cálice acinzentado, com lobos verdes claros, corola lilás internamente e alva externamente, filete alvos, anteras amarelas. Folhas membranáceas, vilosas, discolor, verdes na face adaxial e acinzentada na face abaxial. Frutos maduros deiscentes e vilosos. A espécie como um todo é recomendada para melhorar a dieta de caprinos e ovinos, especialmente na época de seca, na região semi-árida. É conhecida popularmente como “caramatu” ou “caramatuba” [14].

Trabalhos de campo efetuados com objetivo de identificar leguminosas demonstraram que esta espécie é uma das mais adaptadas à caatinga, devido a grande capacidade de rebrotar ramos jovens relativamente macios e com poucos espinhos. Daí sua característica para o potencial forrageiro [19].

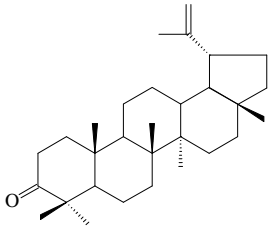
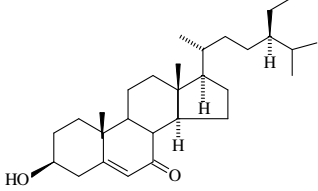
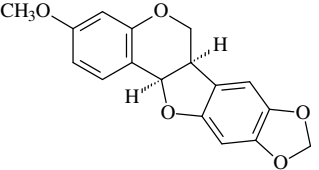
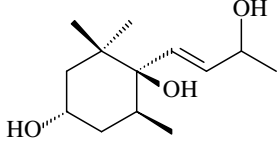
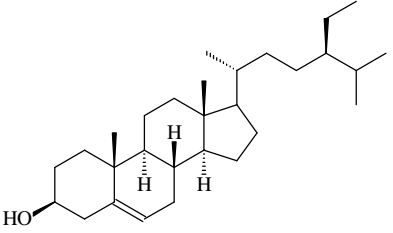
### **1.3. Composição química da espécie *Cratylia mollis***

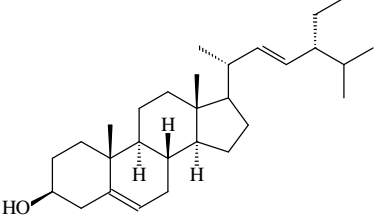
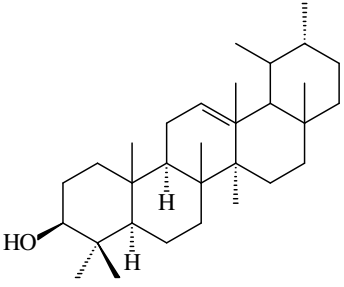
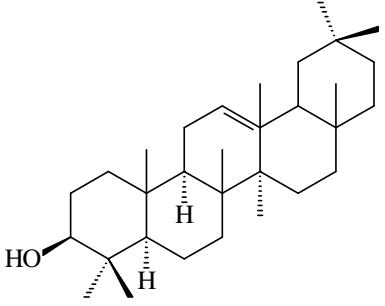
Existem apenas dois estudos fitoquímico realizado com esta espécie [14,21], ambos os estudos foram realizados pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFBA. As substâncias isoladas dos estudos fitoquímicos encontram-se descritas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Substâncias isoladas em estudos fitoquímicos de *C. mollis* [14, 21]

SUBSTÂNCIA	PARTE DA PLANTA	ESTRUTURA
7-hidroxi-6-metoxiflavana	Caule	
7,2'-hidroxi-6-metoxiflavana		
2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana		
4,3',4'-triidroxi-2'-metoxi-6,7-metilenodioxiiisoflavana		
3R*, 2R*, 3,2'-oxi-7-hidroxi-6-metoxiflavana		
Lupeol		



SUBSTÂNCIA	PARTE DA PLANTA	ESTRUTURA
lupenona	Caule	
<p data-bbox="298 615 651 646">3-<math>\beta</math>-hidroxi-7-oxo-estigmast-5-eno</p> <p data-bbox="410 919 540 951">Pterocarpina</p> <p data-bbox="315 1266 634 1297">3,6-di-idroxi-5,6-diidro-<math>\beta</math>-ionol</p> <p data-bbox="415 1654 532 1686"><math>\beta</math>-sitosterol</p>	Folhas	   

SUBSTÂNCIA	PARTE DA PLANTA	ESTRUTURA
estigmasterol		
$\alpha$ -amirina	Folhas	
$\beta$ -amirina		

#### 1.4. Restinga

Restinga é o termo empregado para designar de forma genérica as planícies litorâneas, que, de forma descontínua, se estende pela costa do Brasil, perfazendo cerca de 7400 km. É marcada por fatores ambientais como elevadas temperaturas, grande luminosidade, alta salinidade e solos arenosos [22]. Essas planícies arenosas ocorrem para o interior do continente com extensões bastante variadas.

O parque metropolitano da lagoa do Abaeté é uma região de restinga localizada na região metropolitana da cidade de Salvador na Bahia (Figura 8), onde ocupa uma extensão cerca de 225 há. Essa região tão cantada em prosa e versos pelos artistas locais, principalmente o “saudoso” Dorival Caymmi que a denominava como “lagoa escura arrodeada de areia branca” [23], apresenta uma vasta riqueza de espécies vegetais. As informações pioneiras sobre a flora nas dunas da lagoa do Abaeté, disponíveis na literatura, podem ser encontradas em Torrend (1938) [24] e Seabra [25] (1949). Britos *et al.*(1993) identificou nessa área cerca de 410 espécies vegetais pertencentes a 238 gêneros de 88 famílias [26].



**Figura 8.** Vista panorâmica do parque metropolitano da lagoa do Abaeté [27]

##### 1.4.1. Aspectos gerais sobre a família das Lamiaceae

A família Lamiaceae compreende cerca de 250 gêneros e 6970 espécies e é constituída por ervas, arbustos ou árvores. Possuem, caules geralmente quadrados em corte transversal, pêlos glandulares, com óleos voláteis, e simples, não glandulares [28]. No Brasil, existem cerca de 23 gêneros e 232 espécies nativas.

Essa família tem grande importância econômica, devido principalmente a algumas espécies apresentarem-se como importantes fontes de óleos essenciais (*Mentha*,

*Lavandula, Marrubium, Nepeta, Ocimum, Origanum, Rosmarinus, Salvia, Satureja, Thymus* etc.) tanto para cosmético quanto para fins medicinais. Ainda, muitas espécies desta família são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que conferem aos alimentos [29].

#### **1.4.1.1. Gênero *Eriope***

O gênero *Eriope* pertencente à família Lamiaceae (Labiatae) é nativo das regiões tropical e subtropical da América do Sul e possui cerca de 20 espécies, sendo que 18 destas estão restritas ao território brasileiro. No Brasil, estas espécies distribuem-se principalmente em áreas de campo rupestre em Minas Gerais, Bahia, Goiás e estados vizinhos [30, 31].

##### **1.4.1.1.1. A espécie *Eriope blanchetii***

A espécie *Eriope blanchetii* (Figura 9) é um arbusto endêmico das restingas costeiras [32]. No parque metropolitano da lagoa do Abaeté, *E. blanchetii* é encontrado como tendo a sexta maior densidade dentre as espécies arbóreas e arbustivas (cerca de 3 ind./ha) [33]. Distribui-se em áreas abertas expostas à insolação durante quase todo dia, nas bordas das manchas de vegetação, e arbustos emergentes, ocorre em áreas centrais das manchas de vegetação. Sua altura varia entre 0,5 m e 4,3 m, sendo que a maioria das plantas em idade reprodutiva tem de 0,7 a 2,7 m [34].

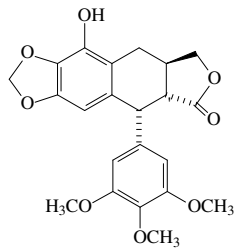
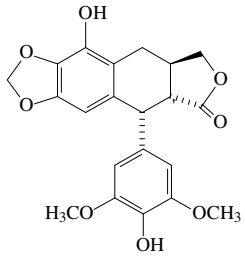
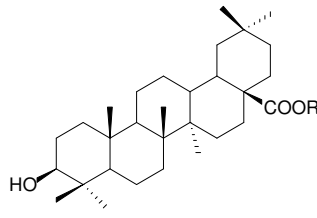
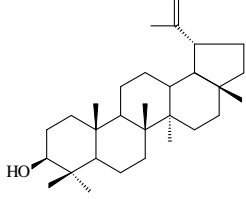


**Figura 9.** Foto de um espécime de *E. blanchetii* ( Parque Restinga da Lagoa do Abaeté, foto Hugo N. Brandão)

#### **1.5. Aspectos químicos das espécies *Eriope blanchetii***

Até o momento existe apenas um estudo fitoquímico realizado anteriormente com as partes aéreas da espécie e, esse estudo foi realizado pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFBA. As substâncias isoladas nesse estudo fitoquímico encontram-se sumarizadas no quadro 2 [35].

**Quadro 2** – Substâncias isoladas de *E. blanchetii*

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA
. $\beta$ - Peltatina	
$\alpha$ -Peltatina	
R=H Àcido oleanóico R=CH <sub>3</sub>	
Lupeol	

### 1.6. Testes biológicos e farmacológicos

A busca por substâncias com atividades biológicas surge como uma nova tendência na área de Produtos Naturais impulsionando cada vez mais para uma interdisciplinaridade entre profissionais das mais diversas áreas. Como consequência disso a separação tradicional entre as diversas áreas profissionais estão ficando cada dia menos distinto. A procura por produtos naturais com atividade biológica complementa o isolamento de metabolitos secundários (ou especiais) tradicionalmente realizado por químicos de produtos naturais.

Diversas substâncias naturais já são exploradas os seus potenciais para cura ou tratamento diversos males da humanidade, entre esses males pode-se destacar o mal de Alzheimer e doenças causadas pelo excesso de radicais livres.

#### **1.6.1. Substâncias naturais utilizadas no tratamento do mal de Alzheimer**

O mal de Alzheimer (MA) é uma doença patológica degenerativa que está associada com “déficits” dos diversos neurotransmissores cerebrais como, por exemplo, a acetilcolina. Os principais sintomas associados a MA envolvem a deficiência orgânica cognitiva, principalmente perda de memória. Outras características associadas com os estágios avançados de MA incluem déficit na linguagem, depressão, problemas de comportamento, inclusive agitação, alterações de humor e psicose. Embora possa ocorrer nas idades mais jovens, está associada principalmente ao fenômeno do envelhecimento, ocorrendo com maior frequência em indivíduos com idade superior a 65 anos.

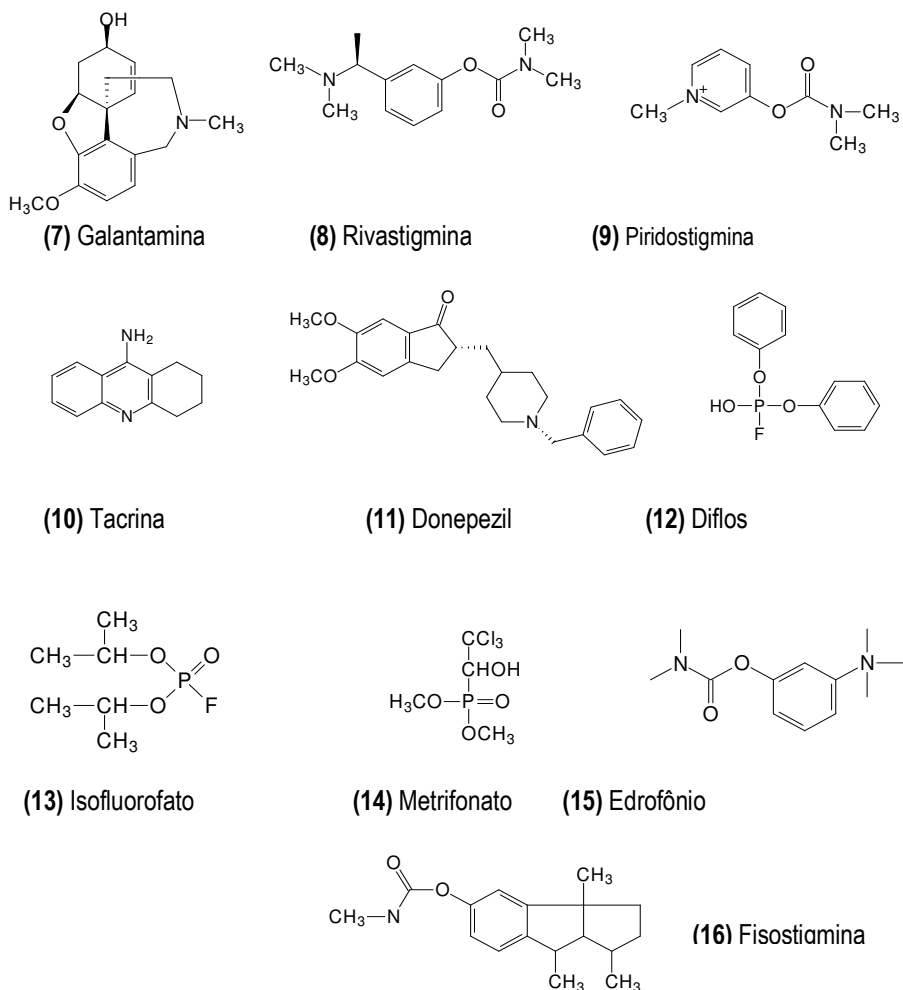
O tratamento da doença do mal de Alzheimer visa prorrogar o tempo de vida médio do neurotransmissor, a acetilcolina, através da inibição diretamente da enzima acetilcolinesterase, que é a enzima responsável pela degradação da acetilcolina produzida e liberada por neurônios no cérebro. A deficiência de acetilcolina é considerada epifenômeno da doença de Alzheimer, portanto elevação no nível desse neurotransmissor restitui a função colinérgica [36].

Atualmente são comercializados diversos medicamentos que atuam na inibição da enzima acetilcolinesterase (Figura 10). Onde se destacam os originados de fontes naturais, como a galantamina (7), rivastigmina (8), tracrina (10), fisostigmina (16), entre outros. Mal de Alzheimer é uma doença considerada um dos principais males geriátricos e acomete cerca de 26 milhões em todo mundo, nas mais variadas classes sociais e econômicas. Os medicamentos utilizados no tratamento do MA ainda apresentam um valor de comercialização bastante elevado o que impulsiona a procura de outras fontes naturais que acarrete na redução no preço do tratamento para as classes de menor poder econômico.

Estima-se que o MA atinge cerca de 20 milhões em todo mundo, e a situação tende a piorar com o aumento da população de idosos. Estudos apresentados na conferência da associação de Alzheimer, realizada em Washington (EUA) em junho passado, revelaram que em 2050 o número de pessoas acometidas pelo mal de Alzheimer deverá quadruplicar. De acordo com pesquisadores da Universidade Johns

Hopkins, uma em cada 85 pessoas terá a doença cerebral degenerativa. As projeções indicam que o maior crescimento ocorrerá na Ásia, onde estão hoje registrados 12,6 milhões de casos, quase a metade do contingente de portadores de MA. Até 2050, a Ásia terá 62,8 milhões dos 106 milhões de pacientes do mundo. Na América do Norte, a previsão é de um aumento de 3,1 milhões para 8,8 milhões; na África, de 1,3 milhão para 6,3 milhões; na Europa, de 7,2 milhões para 16,5 milhões; na América Latina e no Caribe, de 2 milhões para 10,8 milhões; e na Oceania de 200 mil para 800 mil casos [37].

Assim, a busca por novos anticolinesterásicos mais eficazes, além do fato de fármacos desta classe já terem sido isolados de fontes naturais, tem estimulado o estudo fitoquímico de várias espécies vegetais que possam oferecer substâncias com atividade anticolinesterásicas [38, 39].



**Figura 10-** Estruturas de alguns inibidores de AChE utilizados no tratamento da MA

### 1.6.2. Substâncias antioxidantes de fontes naturais

Nos últimos anos, se tem investigado os efeitos dos antioxidantes em relação às enfermidades, principalmente nos países desenvolvidos do ocidente. As pesquisas têm tentado explicar os benefícios dos antioxidantes nas enfermidades cardiovasculares, em numerosos tipos de câncer, na AIDS, e inclusive em outras enfermidades diretamente associadas com o processo de envelhecimento, como a cataratas, Doença de Alzheimer [40] e outras alterações do sistema nervoso.

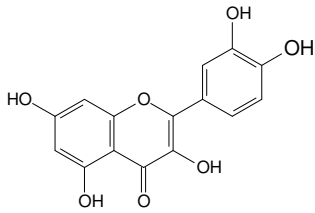
Pela definição geral, antioxidante é uma molécula capaz de retardar ou inibir a oxidação de outras moléculas. Em general, as reações da oxidação em sistemas orgânicos produzem os radicais livres que inicia processo de reação em cadeia. Os Antioxidantes atuam “seqüestrando” os elétrons sem formar um novo radical reativo, ou seja, parando o processo de oxidação ou reduzindo a sua velocidade [41]. Pode-se classificar um radical livre com uma espécie química que contem um ou mais elétrons desemparelhados, podendo ocorrer no organismo vivo de forma endógeno ou exógeno. Os radicais livres mais importantes presentes nos organismos vivos são os radicais hidroxilas ( $\text{HO}^\cdot$ ), o anion superoxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^\cdot$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) [42].

Uma das mais importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas, que possuem metabolitos secundários que atuam como fontes de antioxidantes, como por exemplo, quercetina (**17**),  $\beta$ -caroteno (**18**), luteína (**19**) e licopeno (**20**), vitamina C (ácido ascórbico) (**21**), ácido gálico (**22**), entre outros metabolitos secundários com potencial antioxidante.

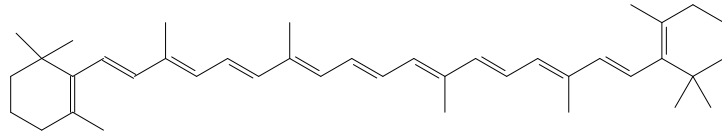
Os antioxidantes comerciais mais utilizados em alimentos 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) (**23**), di-terc-butil metil fenol (BHT) (**24**) e terbutil-hidroquinona (TBHQ) (**25**) (Figura 11). Alguns estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais. Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gatrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido; em humanos, a relevância dessa observação não esta clara. Tendo em vista problemas que podem ser causados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas para a busca por novos antioxidantes de fontes naturais em substituição a esses utilizados comumente nos



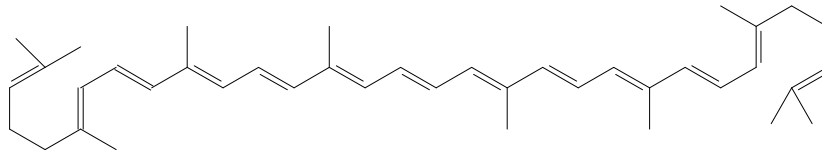
alimentos ou mesmo fazer associações entre eles, com intuito de diminuir a quantidade de antioxidantes sintéticos nos alimentos [43, 44, 45].



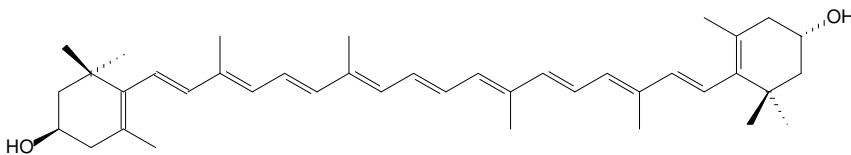
(17) Quercetina



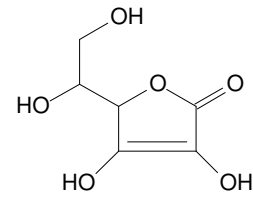
(18)  $\beta$ -caroteno



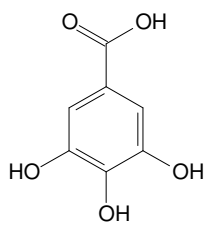
(19) Licopeno



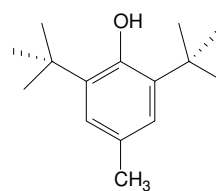
(20) Luteina



(21) Vitamina C

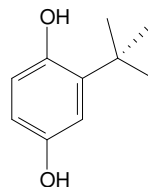
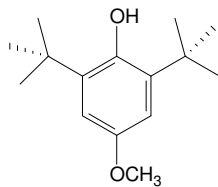


(22) Ácido gálico



(23) 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA)

(24) di-terc-butil metil fenol (BHT)



(25) Terbutil-hidroquinona (TBHQ)

**Figura 11-** Estruturas de alguns antioxidantes naturais e sintéticos

## 2. Objetivos

- Isolar substâncias presentes nos diferentes extratos orgânico das espécies *Cratylia mollis* e *Eriope blanchetii*;
- Elucidar estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos (RMN, IV, EM);
- Contribuir para a quimiotaxonomia das famílias Leguminosae e Lamiaceae;
- Contribuir para o conhecimento da composição química de espécies do semi-árido nordestino e da restinga;
- Descobrir substâncias que atuem na inibição da enzima acetilcolinesterase;
- Descobrir novas fontes naturais de antioxidantes através da avaliação *in vitro*, pelo métodos de seqüestro do radical livre estável DPPH.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Coleta do material vegetal e identificação das espécies

O material vegetal (folhas) de *C. mollis* foi coletado no município de Jacobina, Bahia, onde a vegetação caatinga predomina. A espécie foi coletada e identificada pelo botânico Prof. Dr. Luciano Pagnucci da Universidade Estadual de Feira de Santana. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz sob número LP5119.

Já o material vegetal (folhas e caule) de *E. blanchetii* foi coletado na Restinga do parque Metropolitano da Lagoa do Abaéte, localizado na cidade de Salvador, Bahia. Identificado pela botânica Profa. Dra. Maria Lenise Guedes do Departamento de Biologia da Universidade Federal da Bahia. Uma exsicata foi depositada no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob o n° 045599

#### 3.2 Procedimento geral

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300/500 MHz) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (75/125 MHz) e bidimensionais foram obtidos em espectrofotômetro VARIAN GEMINI 2000/ Varian INIOVA 500. Utilizando Solvente Deuterado como  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$  e o tetrametilsilano como o sinal do solvente de referência interna. Os espectros no infravermelho e obtidos em espectrofotômetro ABB BOMEM SÉRIE MB e os espectros de massas (baixa e alta resolução) foram registrados em equipamento Shimadzu LCMS-2010 e Brucker microTof, respectivamente. Nos procedimentos cromatográficos em coluna foi utilizada gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm da Merck) e gel de sílica (Akros 0,04-0,073 mm) e nos procedimentos cromatográficos em CCD e CCDP foram utilizadas sílica gel PF<sub>254+366</sub> MERCK. Também foram utilizadas placas pré-fabricadas com sílica gel PF<sub>253</sub> da MERCK para procedimentos cromatográficos. Para a revelação das cromatoplas foram utilizados reagente spray Libermann-Buchard, luz UV (254/366 nm) e/ou vapores de iodo.

Os solventes empregados nas extrações, partições de extratos e nas análises por CCDC, CC, CCDP foram solventes de grau analítico das marcas QUIMEX e MERCK.

#### 3.3 Isolamento e extração dos constituintes das folhas de *C. mollis*

As folhas coletadas foram secas e pulverizadas (4,1Kg) e em seguida foram extraídas 4 vezes consecutivamente com MeOH a temperatura ambiente. O extrato bruto metanólico obtido foi então particionado com  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (6:4), obtendo

assim duas fases  $\text{CHCl}_3$  e hidrometanólica. A fase  $\text{CHCl}_3$  foi particionado com hexano/MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1), com obtenção de duas fases metanólica (28,89 g) e hexânica (49,95 g). Já a fase hidrometanólica foi submetida à partição entre AcOEt:H<sub>2</sub>O obtendo assim a fração AcOEt (2,21 g) (Quadro 3).

**Quadro 3.** Massas das fases do extrato bruto obtidos de *C. mollis*

PARTE PLANTA	DA	MASSA DAS FASES DOS EXTRATOS (g)		
		MeOH	Hex	AcOET
Folhas		28,89	49,95	2,21

A fase MeOH (28,89 g) foi submetida a CC usando gel de sílica como adsorvente e eluída com a mistura de solventes  $\text{CHCl}_3$ :MeOH com gradiente de polaridade, fornecendo 11 frações de 100 mL cada. A fração 10 (1,88 g) obtida após eluição com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1) foi submetida a um novo fracionamento por CC em gel de sílica utilizando-se uma misturas  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5) e (9:1) como eluentes coletando-se frações de 50 mL cada. A subfração 4 eluída com 5% de MeOH (88,8 mg) foi submetida a CCDP utilizando a mistura de solventes  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:HAc (90:9:1) como eluente e assim permitindo obter o composto **CM1** (15,6 mg). Da subfração 6 eluída com 2% de MeOH após mais um fracionamento em CC em gel de sílica utilizando a mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (99:1) foi fornecido o composto **CM4** (7,1 mg).

Ainda da fase metanólica, a fração 3 (165 mg) eluída com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5) foi submetida a um novo fracionamento em gel de sílica com a mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (99:1) onde foi fornecido 22 subfrações de 50 mL cada. A subfração 6 foi submetida a CCDP eluída com a mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:HAc (99:1+2 gotas) onde foi forneceu o composto **CM3** (8,3 mg).

A fase hexânica (49,95 g) foi submetida a um fracionamento em gel de sílica utilizando a mistura de Hex:AcOEt com aumento gradativo da polaridade, e assim sendo obtido um total de 12 frações de 100 mL cada. A fração 3 (278,2 mg) eluída em Hex:AcOEt (99:1) foi submetida a fracionamento em CC utilizando gel de sílica como fase estacionária onde foi obtido 40 subfrações de 50 mL cada. Da subfração 24 eluída 10% de AcOEt forneceu o composto **CM5** (15 mg). A fração 8 (199,6 mg) eluída com a mistura de Hex:AcOEt (95:5) foi submetida a fracionamento por CC em gel de sílica com a mistura de solventes de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH. A subfração eluída com 1% de MeOH

(13,7mg) forneceu o composto **CM2 (7 mg)**. Ainda da fase hexânica, a fração 10 (54 mg) eluída com 10% de AcOEt foi submetida a um novo fracionamento em coluna com gel de sílica com a mistura de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2) onde foi fornecido o composto **CM9 (6 mg)**.

A fase AcOEt (2,21 g) foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente, fornecendo 22 frações de 7 mL cada. As frações 7 e 8 foram submetidas a novos fracionamentos com Sephadex LH-20 com a mistura de solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) onde foi fornecido da fração 7 formada pela mistura dos composto **CM7 e CM8 (15 mg)** e da fração 8 o composto **CM6 (14 mg)**.

### 3.4 Isolamento e extração dos constituintes das folhas de *E. blanchetii*

As folhas e caules pulverizados (922,04g) e (819,73 g), respectivamente, foram extraídos separadamente por 4 vezes consecutivas com MeOH a temperatura ambiente. O extrato metanólico bruto obtido foi particionado com CHCl<sub>3</sub>/MeOH:H<sub>2</sub>O (6:4), sendo obtido assim duas fases, a CHCl<sub>3</sub> e a hidrometanólica. A fase CHCl<sub>3</sub> foi particionada com hexano/MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1), resultando duas fases, a metanólica e a hexânica. Enquanto que, a fase hidrometanólica foi fracionada com AcOEt fornecendo a fase AcOEt. As massas dos extratos obtidos encontram-se sumarizadas no quadro 4.

**Quadro 4.** Massas das fases do extrato bruto obtidos de *E. blanchetii*

PARTE DA PLANTA	MASSA DAS FASES DOS EXTRATOS (g)		
	MeOH	Hex	AcOEt
Caule	7,86	10,2	7,89
Folhas	8,44	11,1	3,22

Nas fases de partição dos extratos metanólico e hexânico dos caules e folhas foi observada grande quantidade de sólido de cor amarelada, que depois de filtrado e recristalizado forneceu o composto **EB3 (1,06 g)**.

A fase MeOH das folhas (8,44 g) foi submetida a fracionamento em CC usando gel sílica como fase estacionária e eluída com a mistura de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH com aumento gradativo de polaridade. Assim foram obtidas 18 frações de 100 mL cada, após reagrupamentos. A fração 5 eluída CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:5 foi submetida a CC em gel de Sephadex LH-20 com a mistura CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1), assim sendo obtidos os

compostos **EB2** (88 mg) e **EB8** (16 mg). A fração 6 eluída em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 85:15 foi submetida a novo fracionamento em gel de sílica com o aumento gradativo de polaridade da mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH sendo obtido 38 subfrações. Assim, foram obtidos os compostos **EB2** (60 mg) e **EB4** (600 mg), bem como a mistura de **EB4** e **EB5** (40 mg) nas subfrações eluídas em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5) e em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2), respectivamente.

Ainda da fase metanólica das folhas, a fração 8 da coluna principal eluída em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2) foi submetida a fracionamento em CC de gel sílica com a mistura de solvente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH e em seguida a subfração eluída em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (85:15) foi fracionada em gel de sephadex utilizando o MeOH com eluente fornecendo o composto **EB7** (27 mg). Enquanto que, a fração da coluna principal eluída em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (7:3) foi submetida a um novo fracionamento em gel de Sephadex LH-20 com a mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1) fornecendo o composto **EB6** (78 mg).

A Fase AcOEt das folhas (3,22 g) foi submetida a fracionamento em coluna preenchida com gel de sílica utilizando como eluente a mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH, fornecendo 16 frações de 50 mL cada. A fração 9 eluída com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (85:15) foi submetida a fracionamentos em gel de Sephadex LH-20 utilizando como eluente MeOH, fornecendo os compostos **EB7** (102 mg) e **EB1** (45 mg).

A Fase AcOEt dos caules de *E.blanchetii* (7,89 g) foi submetida a fracionamento em CC de gel sílica utilizando como eluente a mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH, de onde foram obtidas 12 frações de 100 mL cada. As frações 6 e 8 eluídas com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2 e 6:4), respectivamente, foram submetidas a fracionamentos em gel sephadex LH-20 utilizando como eluente, MeOH. E assim da fração 6 foi obtido o composto **EB1** (80 mg) e da fração 8 os compostos **EB1** (35 mg) e **EB7** (42 mg).

A fase hexânica (8,44 g) das folhas foi submetida a fracionamento em coluna de gel de sílica utilizando como eluente a mistura de solvente de Hex:AcOEt, fornecendo 29 frações de 50 mL cada. A fração 20 eluída em Hex:AcOEt (95:5) foi submetida a novo fracionamento em CC usando gel de sílica e a mistura de Hex:AcOEt como eluente. Assim a subfração 7 eluída com Hex:AcOEt (95:5) forneceu a mistura dos compostos **EB11** e **EB12** (35 mg).

### **3.4.1 Reação de Redução do composto CM1**

A substância CM1 (5mg) foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH e logo em seguida foi adicionada a uma solução de NaBH<sub>4</sub> em MeOH e condicionada a temperatura ambiente. Após 30 minutos de reação a o methanol foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em CHCl<sub>3</sub> e sendo obtido o derivado reduzido de CM1(3,5 mg) .

## **3.5 Avaliações biológicas**

### **3.5.1 Avaliação de inibição da Enzima acetilcolinesterase**

#### **3.5.1.1 Avaliação qualitativa em CCDC de inibição da enzima acetilcolinesterase**

Para a realização do teste, AChE (1000 U/mL) foi dissolvida em 150 mL de tampão, pH 8 e soro de albumina bovina (150 mg). Esta solução foi estocada a 4 °C. Soluções dos compostos isolados e da substância padrão (fisostigmina) foram então aplicadas em uma placa de CCDC da Merk PF<sub>254</sub>, eluída em um sistema de mistura de solvente e seca. A placa foi então borrifada com a solução da enzima estocada e novamente posta para secar. Posteriormente a placa foi encubada em estufa a 37 °C por 20 min, onde foi depositada uma vasilha com água na estufa para que o ambiente permaneça umedecido. Nestas condições de temperatura e umidade a enzima é estável [46,47,48].

Para a detecção da atividade inibidora a solução de acetato de 1-naftil (250 mg) em etanol (100 mL) e o sal Fast Blue B (400 mg) em água (160 mL) preparadas imediatamente antes do uso. Após incubação da placa 10 mL da solução de acetato de 1-naftil e 40 mL da solução do sal Fast Blue B foram misturadas e a placa foi borrifada com esta solução. Verifica-se a atividade anticolinesterase através da presença de manchas brancas sobre o fundo púrpuro de 2 a 3 minutos após a revelação das placas.

#### **3.5.1.2 Avaliação quantitativa de inibição da ACHE**

Os compostos isolados que demonstraram resultado positivo na avaliação qualitativa da inibição da AChE em placas cromatográficas (item 4.1) foram submetidos à avaliação de um ensaio quantitativo com uma metodologia adaptada do teste de Ellman [49, 50, 51].

Para a realização do teste foram depositadas nas cavidades das microplacas 13 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 62 µL de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]

(3 mM), 25 µL de tampão fosfato, pH 8 com 0.1% de soro de albumina bovina a todos os poços de uma placa de ELISA. Foi adicionado ao primeiro poço 100 µL da amostra a ser testada. Com auxílio de uma micropipeta foram feitas as diluições nos poços para as concentrações finais 500, 250, 125 e 62,5 µmol.L<sup>-1</sup>. Feito isto a placa de ELISA foi incubada em uma estufa a 37°C e após 10 minutos a foi feito uma leitura de espectrofotômetro a 405 nm. Posteriormente foram adicionados 12 µL da enzima (0,22 U/mL) e a absorbância foi novamente registrada após 5 min a 405 nm.

Os valores de CI<sub>50</sub> foi calculado com o software ED50v10 e o percentual de inibição foi obtido através da formula (Equação 1):

**Equação 1.** Formula para calculo de inibição da enzima AChE

$$\% I = \frac{(AChE - AChI) \times 100}{AChE}$$

Onde, AChI atividade obtida na presença do inibidor e AChE na ausência do inibidor.

### **3.5.2 Atividade Antioxidante *in vitro***

#### **3.5.2.1 Ensaio qualitativo do método de seqüestro de radical estável DPPH**

Sobre uma cromatoplaça de sílica gel foram aplicadas, pontualmente, as amostras testadas. Após a total evaporação do veículo de solubilização de amostra, a placa foi nebulizada com solução metanólica de DPPH ( radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila) a 0,2 mM. A atividade antioxidante foi evidenciada pela presença de manchas brancas ou amarelas decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração púrpura de fundo, após 30 min. à temperatura ambiente [52,53]. Como padrões positivos foram utilizados 5 µL de solução-mãe a 1 mg/mL de quercetina e BHT.

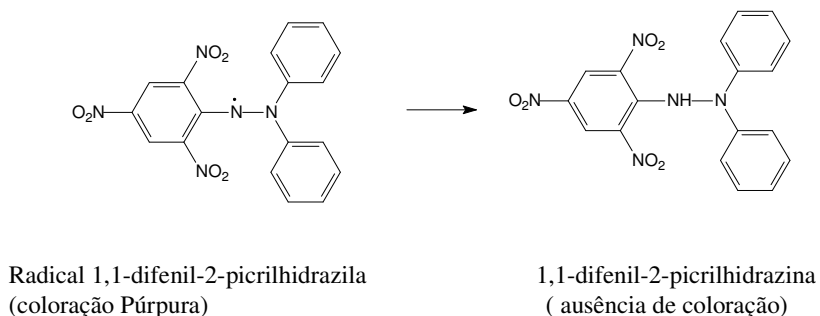
#### **3.5.2.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante do método de seqüestro de radical estável DPPH**

Os compostos antioxidantes têm a propriedades de doar hidrogênios, os quais provocariam a redução do radical DPPH (coloração púrpura) no meio reacional originando uma coloração amarelada (Figura 13). Portanto, este método avalia a capacidade da amostra em seqüestrar o radical livre.

Os compostos isolados que demonstraram resultado positivo pela avaliação qualitativa (item 4.3.1) foram submetidos à avaliação frente ao DPPH, utilizando um



espectrofotômetro UV/VIS. Para esta avaliação primeiramente, foi preparado 50 mL de uma solução metanólica de DPPH (45 µg/mL) e as soluções com as substâncias testes e padrão em três concentrações diferentes (120, 60, 30 µg/mL) em MeOH. Neste ensaio foi utilizado a quercetina e o BHT como substâncias referencia, com poder de sequestrar 100% dos radicais.



**Figura 12.** Representação esquemática do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila e do 1,1-difenil-2-picrilhidrazina

O teste foi realizado em sistema com 1 mL da solução da amostra nas diferentes concentrações sendo adicionado 3mL da solução metanólica de DPPH, á temperatura ambiente e protegida da luz. Após 15 minutos procedeu á leitura em espectrofotômetro a 517 nm das amostras. O branco foi utilizado como 3 mL de DPPH com adição de 1mL de MeOH. Por ação de um antioxidante o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida, sendo que a quantidade de amostra necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em %AA pela Equação 2 e os valores de CI<sub>50</sub> foi obtido com auxílio do software ED50v10 :

**Equação 2.** Fórmula para cálculo de atividade antioxidante

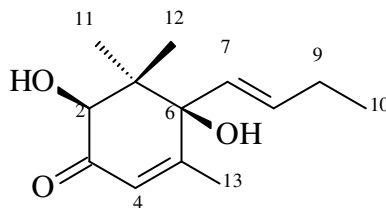
$$\% \text{ A.A} = \frac{(\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}) \times 100}{\text{ABS controle}}$$

Onde Abs<sub>controle</sub> é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e Abs<sub>amostra</sub> é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra). Os ensaios foram realizados em triplicatas [54].

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas de *Cratylia mollis*

#### 4.1.1 Determinação estrutural de CM1



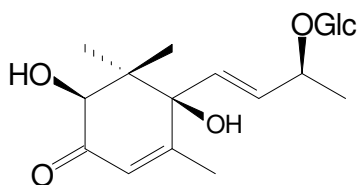
CM1

A determinação da estrutura de **CM1** foi baseada na análise dos dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (BB e DEPT) e correlações observadas nos espectros obtidos por técnicas de RMN bidimensionais (gCOSY, gHMQC, gHMBC), além das análises obtida nos espectros de massas utilizando as fontes de ionização APCI nos modo positivo e negativo e por análises espectrofotométricas no infravermelho. A configuração relativa dos centros estereogênicos foi determinada através de correlações observadas no espectro de NOESY como também através da análise das constantes de acoplamento dos hidrogênios observadas no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado preparado pela redução do grupo carbonílico utilizando o borohidreto de sódio,  $\text{NaBH}_4$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18, pág.49; Tabela 1, pág. 48) apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios olefínicos ( $\delta$  5,95,  $\delta$  5,79 e  $\delta$  5,81) referentes a três hidrogênios sendo que as multiplicidades não foram indicadas claramente, pois os sinais apresentavam-se muito próximos. Ainda neste espectro foi possível destacar a presença de quatro grupos metilas registrados como três singletos e um tripleto, além do multipletto em  $\delta$  4,38 referentes a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) (Figura 19, pág. 45) apresentou 13 sinais sugerindo a presença de um  $\text{C}_{13}$ -norisoprenóide. E com auxílio do espectro DEPT  $135^\circ$  (Figura 21, pág.46) esses sinais de carbonos foram identificados como quatro carbonos metílicos, um carbono metilênico, quatro carbonos metínicos e quatro não

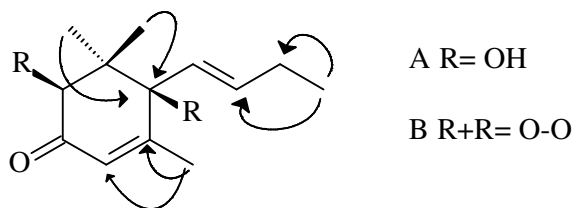
hidrogenados. Ainda no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível observar a presença de sinais em  $\delta$  198,5,  $\delta$  126,7 que concomitantemente com o singlete em  $\delta$  5,79 observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  são indicativos da presença de uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada. Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  observados puderam ser relacionados com dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  descritos na literatura para os megastimanos glicosílicos isolado de *Sauropus androgynus* (Euphorbiaceae) (Figura 13 e Tabela-1, Pág. 48) [55]. No entanto os dados de RMN dos megastimanos isolados de *Sauropus androgynus* apresentavam um sinal para carbono oximetínico a mais do que os dados obtidos para **CM1**.



**Figura 13-** Megastigmano isolado de *Sauropus androgynus*

O espectro de gHMQC (Figuras 23 e 24, pág. 47) permitiu associar os sinais dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, através das correlações observadas no espectro.

As correlações observadas no espectro bidimensional gHMBC foram cruciais para elucidação estrutural de **CM1** que concomitantemente com os sinais observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi possível propor duas possíveis estruturas (A e B) para a substância (Figura 14).



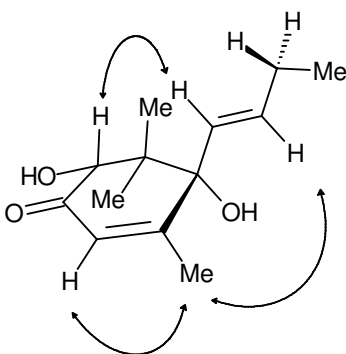
**Figura 14.** Correlações observadas no espectro de gHMBC para as propostas estruturais para **CM1**

No entanto, com análises de espectrometria de massas (Figura 27, pág. 48) que apresentou os íons *quasi*-moleculares  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  323 e  $[\text{M}-\text{H}+\text{MeOH}]^- m/z$  255 condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$  e análise espectrométrica no

infravermelho (Figura 29, pág. 49) que apresentou estiramento em  $\nu$ : 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$ , foi possível observar a presença de uma hidroxila.

A configuração relativa de **CM1** foi proposta através de correlações no espectro NOESY (Figura 26, pág. 48), assim sendo observadas interações espaciais de H-7 com H-2 indicando que o grupo butenila e o H-2 encontram-se na mesma face (Figura 15). A estereoquímica relativa proposta, foi confirmada pela análise das constantes de acoplamento do derivado obtido como produto majoritário da redução de **CM1** com  $\text{NaBH}_4$ . O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado indicou, entre outros, a presença de um duplo duplete em  $\delta$  3.39 ( $J = 12,5; 6,3$  Hz) (Figura 31, página 50) atribuído para H-3 do produto majoritário do derivado reduzido, indicando acoplamento diaxial para os hidrogênios H-2 e H-3 e assim corroborando a estereoquímica proposta para **CM1**. Deste modo esta substância foi identificada como sendo identificado como (4*S*\*, 6*S*\*)-4-but-1*E*-enil-4,6-diidroxi-3,5,5-trimetil-ciclo-hex-2-enona.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 28, pág. 49) apresentou o pico  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  223,1333 com erro de 0.0448 ppm para a massa da fórmula molecular teórica, que é de 223,1334. Assim com esses valores apresentados no espectro de massas de alta resolução pode-se confirmar a formula molecular para **CM1** como  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ , confirmando assim estrutura proposta como a (4*S*\*, 6*S*\*)-4-but-1*E*-enil-4,6-diidroxi-3,5,5-trimetil-ciclo-hex-2-enona. Vale ainda ressaltar que esta substância esta sendo descrita pela primeira vez na literatura.

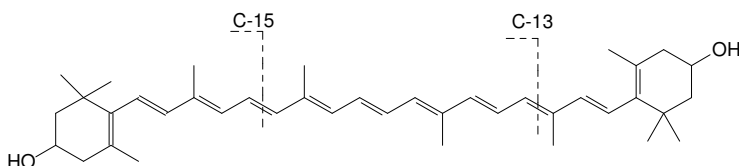


**Figura 15-** Correlações observadas no espectro de NOESY

Os nor-isoprenoides são substâncias compostas por 13 a 15 átomos de carbonos. Alguns autores [56] sugerem que esta classe de substâncias são provenientes da clivagem fotooxidativa da cadeia poliênica dos carotenóides. Lutz e Winterhalter [57] isolaram nor-isoprenoides de *Cydonia oblonga* (Rosaceae) e sugeriram que esta classe

de compostos é proveniente da degradação de carotenóides (Figura 16). Entretanto, apesar dos vários estudos sobre esses compostos, pouco se conhece a respeito dos sistemas catalíticos que agem no início da degradação dos carotenóides nas plantas.

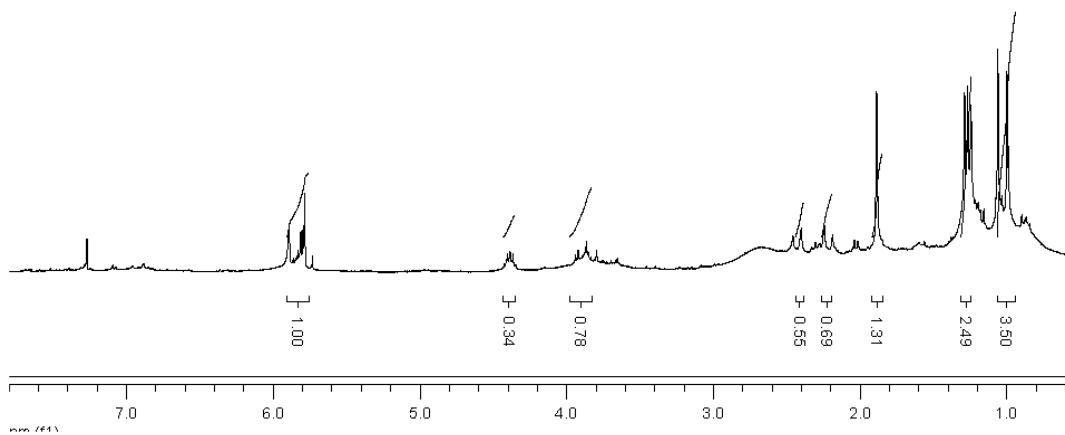
Tetraterpenos são representados unicamente pelos carotenóides. Esses apresentam papel importante na fotossíntese, porém são também encontrados em tecidos de plantas que não realizam a fotossíntese, fungos e bactérias [58].



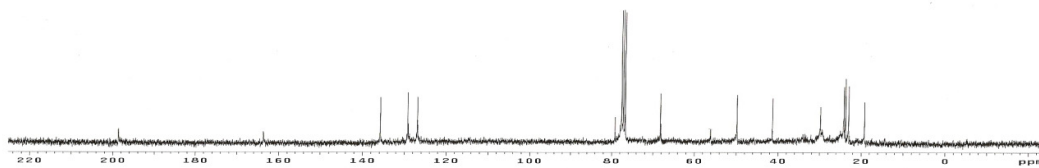
**Figura 16-** Clivagem dos carotenóides (C40) levando aos nor-isoprenoides (C-13 e C-15)

**Tabela 1.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (75 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (300 MHz) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

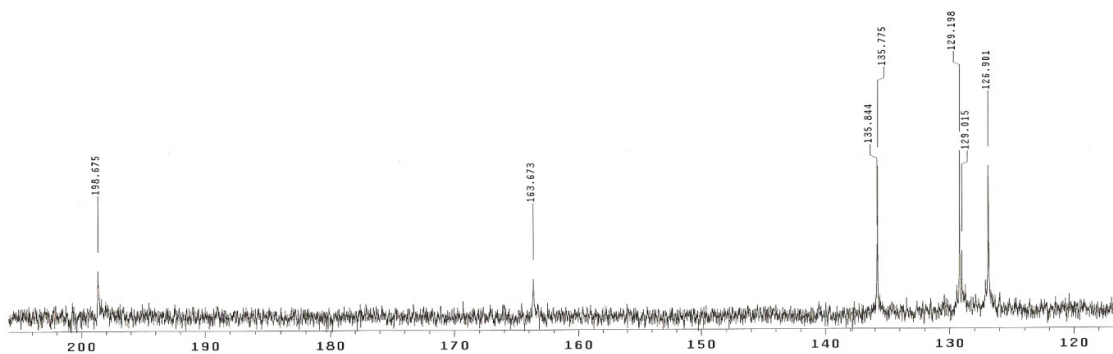
Posição	CMI		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC( $\text{H}^{\text{c}}$ C)
1	-	41,1 (C)	-
2	4,38( <i>m</i> )	68,0 (CH)	-
3	-	198,5 (C=O)	-
4	5,95 ( <i>s</i> )	126,7 (CH)	C-6
5	-	163,4 (C)	-
6	-	78,9 (C)	-
7	5,79 ( <i>d</i> ,15,6)	129,0 (CH)	C-6, C-13
8	5,81 ( <i>ddd</i> , 15,6, indt)	135,6 (CH)	-
9	2,43 ( <i>ddt</i> , 8,1, indt, indt ) 2,37 ( <i>ddt</i> , 8,1, 6,6)	49,6(CH <sub>2</sub> )	-
10	1,22 ( <i>t</i> , 6,6)	23,6 (CH <sub>3</sub> )	C-8, C-9
11	0,92 ( <i>s</i> )	23,9 (CH <sub>3</sub> )	C-2
12	0,95 ( <i>s</i> )	22,8 (CH <sub>3</sub> )	C-2
13	1,90( <i>s</i> )	19,1 (CH <sub>3</sub> )	C-2, C-3, C-4



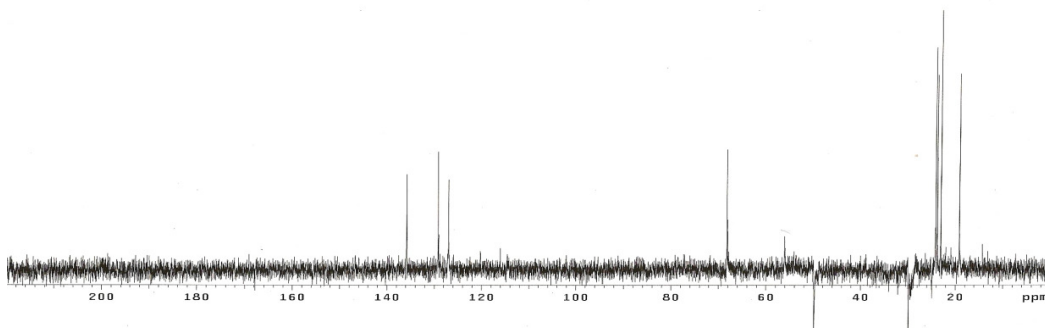
**Figura 17.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de CM1 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).



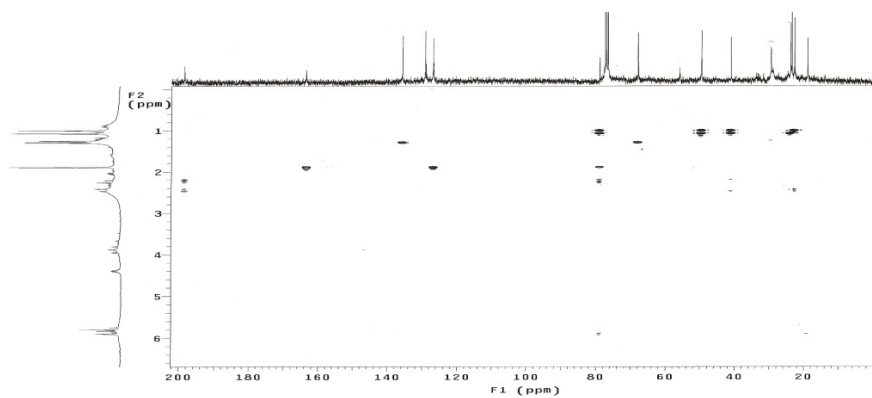
**Figura 18.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de CM1 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



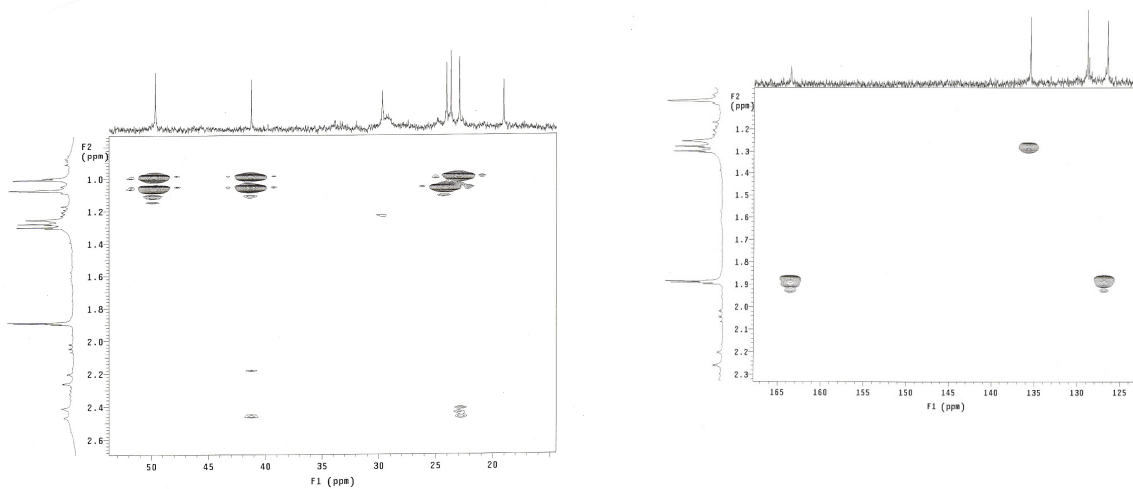
**Figura 19.** Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C de CM1 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)



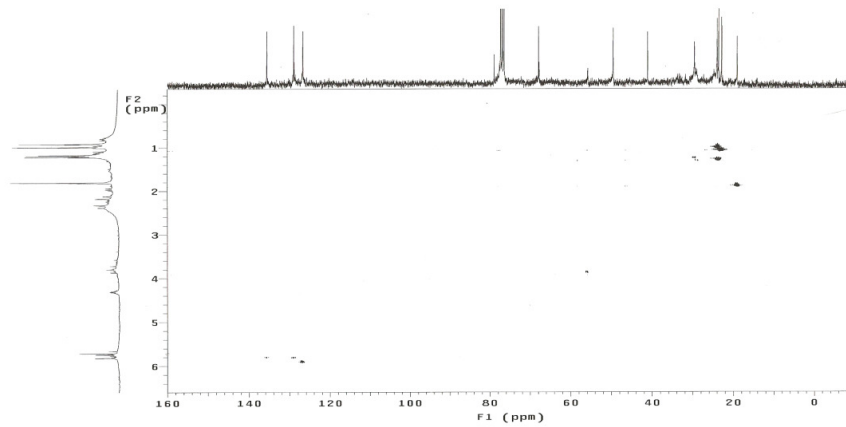
**Figura 20.** Espectro de DEPT 135° de CM1 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



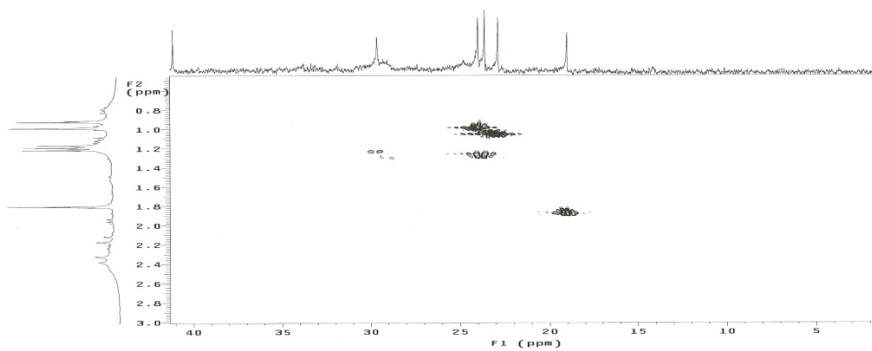
**Figura 21.** Espectro de gHMBC de CM1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)



**Figura 22.** Expansão do espectro de gHMBC de CM1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)

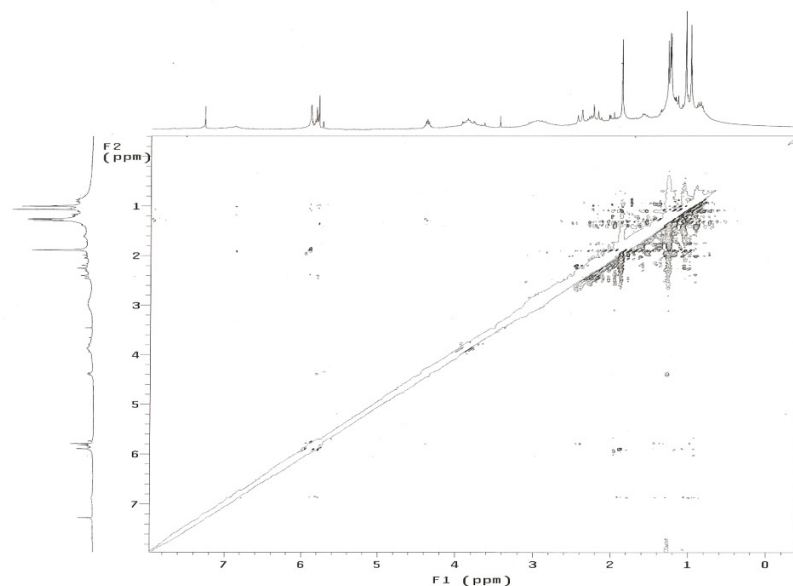


**Figura 23.** Espectro de gHMQC de CM1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)

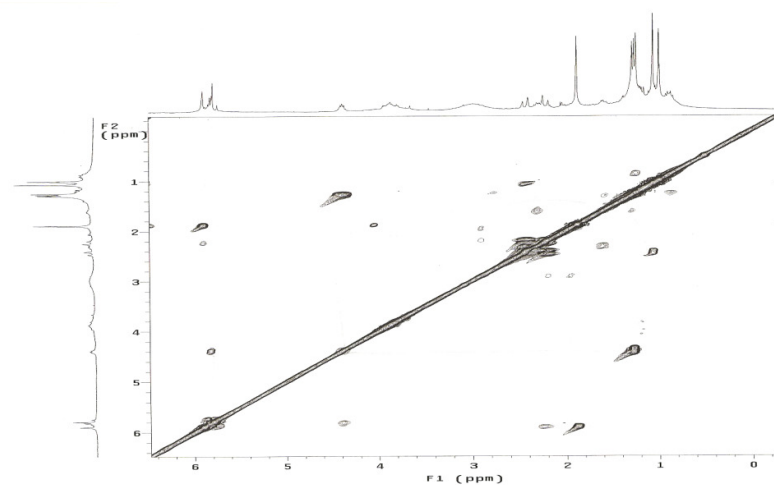


**Figura 24.** Expansão do espectro de gHMQC de CM1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)

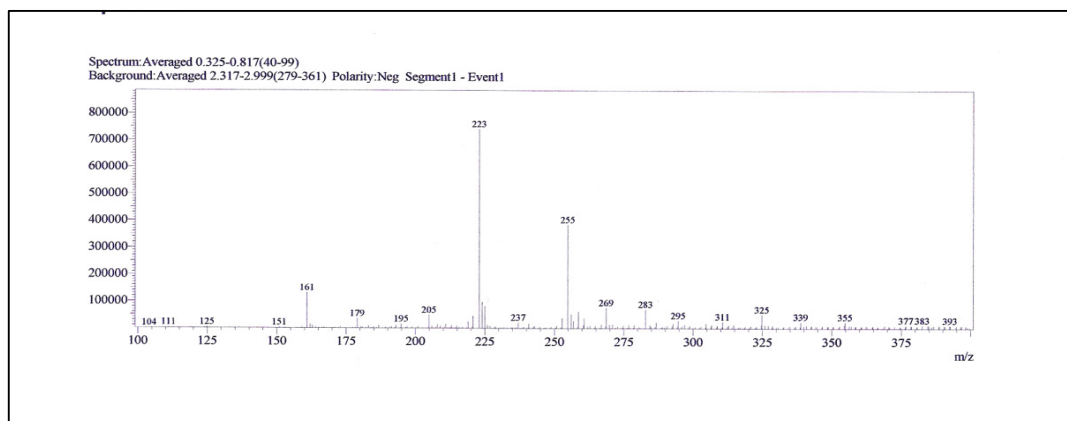




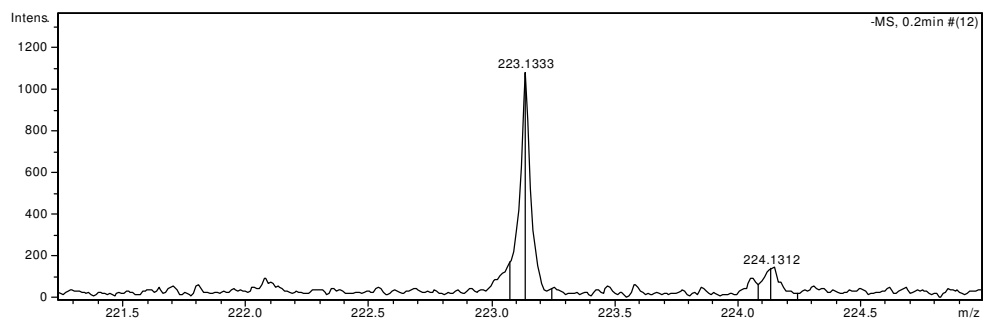
**Figura 25.** Espectro de NOESY de CM1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).



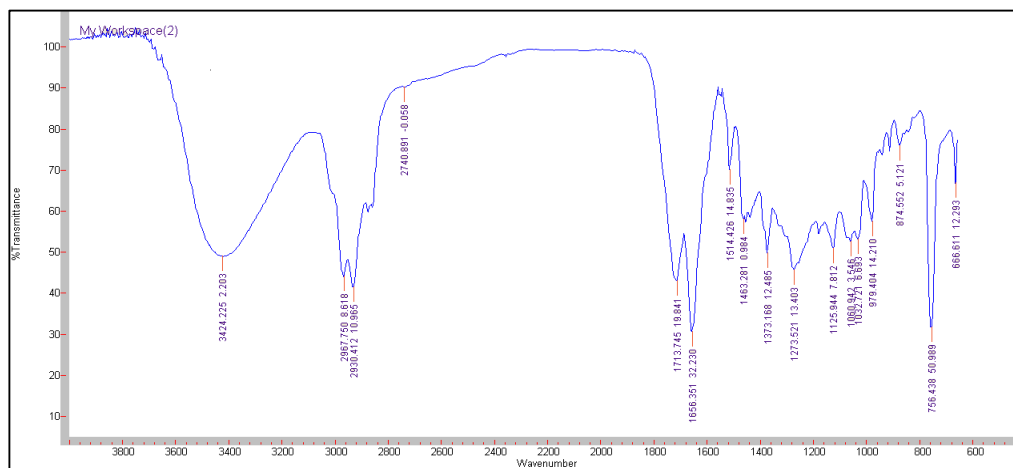
**Figura 26.** Espectro de gCOSY de CM1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).



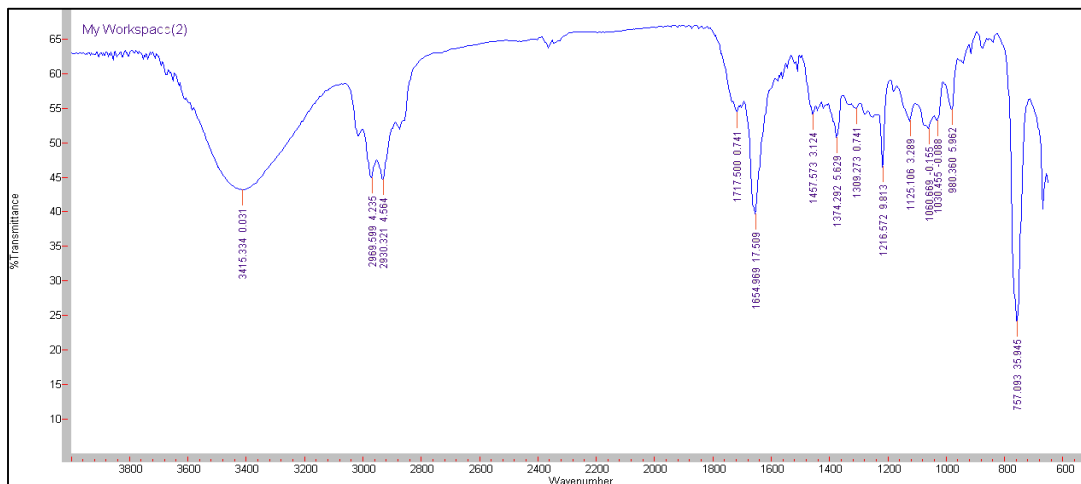
**Figura 27.** Espectro de massas de baixa resolução de CM1 – ESI(-)



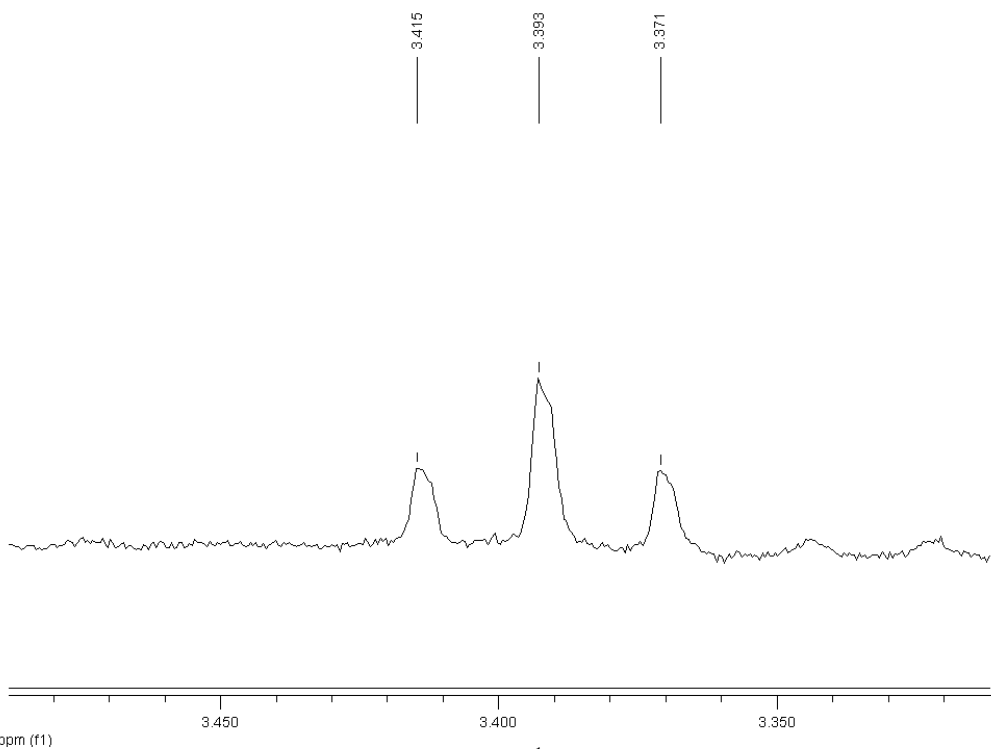
**Figura 28.** Espectro de massas de alta resolução de CM1 – ESI(-)



**Figura 29.** Espectro no infravermelho de CM1

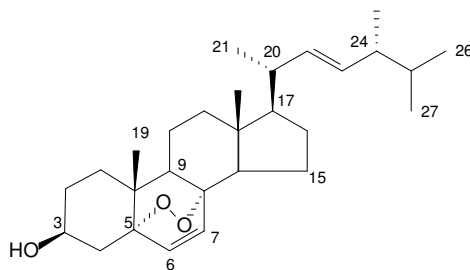


**Figura 30.** Espectro no infravermelho o produto obtido do derivado da redução de **CM1**



**Figura 31.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto da reação de redução de **CM1** ( $\text{C}_5\text{D}_4\text{N}$ , 300 MHz).

#### 4.1.2 Identificação estrutural de CM2



**CM2**

A identificação de **CM2** foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (BB e DEPT) e dados espectrométricos de RMN bidimensionais (gCOSY, gHMQC, gHMBC), EM e através de comparação de dados da literatura.

O espectro massas (Figura 32, pág. 52) de CM2 apresentou um íon molecular  $m/z$  428 condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 33, pág.52) apresentou dois dupletos em  $\delta$  6,52 ( $J = 8,9$  Hz) e  $\delta$  6,25 ( $J = 8,9$  Hz) atribuído aos hidrogênios olefínicos nas posições H-6 e H-7, respectivamente. Além desses sinais, pode-se destacar ainda no espectro de RMN  $^1\text{H}$  o multipletto em  $\delta$  3,97 referente ao hidrogênio hidroximetínico H-3 e os sinais em  $\delta$  5,14 (*dd*), 5,24 (*dd*) atribuídos aos hidrogênios olefínicos nas posições C-22 e C-23, respectivamente.

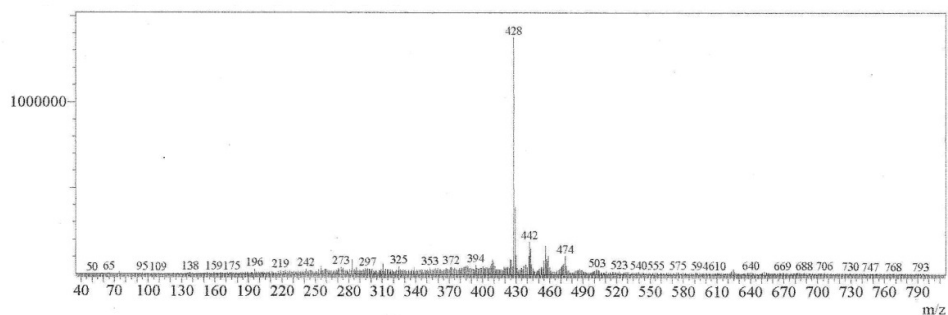
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 34, pág.53) apresentou 28 sinais que, com auxílio do DEPT  $135^\circ$ , foram determinados como seis carbonos metílicos, sete carbonos metilênicos, onze carbonos metínicos e quatro carbonos não hidrogenados. Entre esses sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 2, pág. 54) foi possível destacar a presença dois carbonos não hidrogenados oxigenado registrados em  $\delta$  82,0 e  $\delta$  79,3 e também a presença de quatro sinais de carbonos olefínicos ( $\delta$  135,3,  $\delta$  135,1,  $\delta$  132,2 e  $\delta$  130,6).

Através da comparação com dados previamente publicados [59, 60, 61] foi possível identificar **CM-2** como o esteróide do tipo ergostano denominado como  $\alpha,8\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3- $\beta$ -ol, com a ocorrência comum em diferentes fungos, mas de ocorrência rara em espécies de plantas superiores.

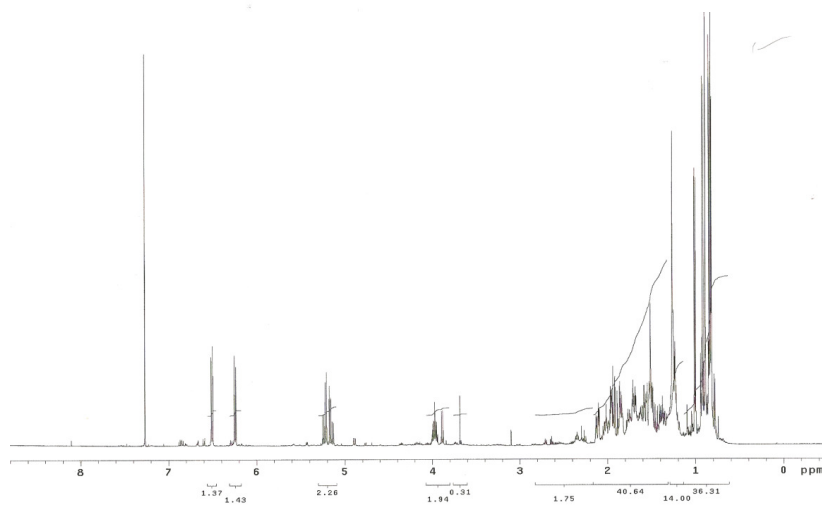
Os espectros bidimensionais (gHMBC, COSY e gHMQC) permitiram ratificar a identificação de **CM2**. Estes espectros, especialmente o HMBC permitiram reatribuir os valores de deslocamento de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  nas posições 7 e 6 que encontravam-se

atribuídos de forma errônea na literatura através das correlações de H-6 com C-7, H-7 com C-6.

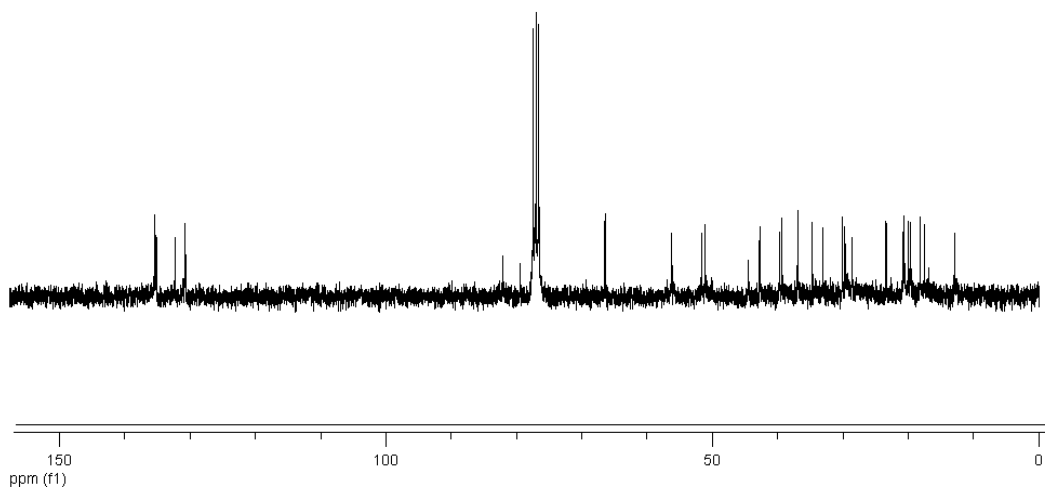
Este é a primeira ocorrência deste esteróide em espécie da família Leguminosae; o  $\alpha,8\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3- $\beta$ -ol é um esteróide tipo-ergostano que tem sido reportado previamente como metabolito secundário de fungos [59] e também foi anteriormente isolado nas famílias Anacardiaceae [60] e Polyporaceae [62]. Entre essas diversas fontes de isolamento foram atribuídos a esse composto algumas atividades biológicas como antibacteriana antiplasmodial [63] e anti-HIV [64].



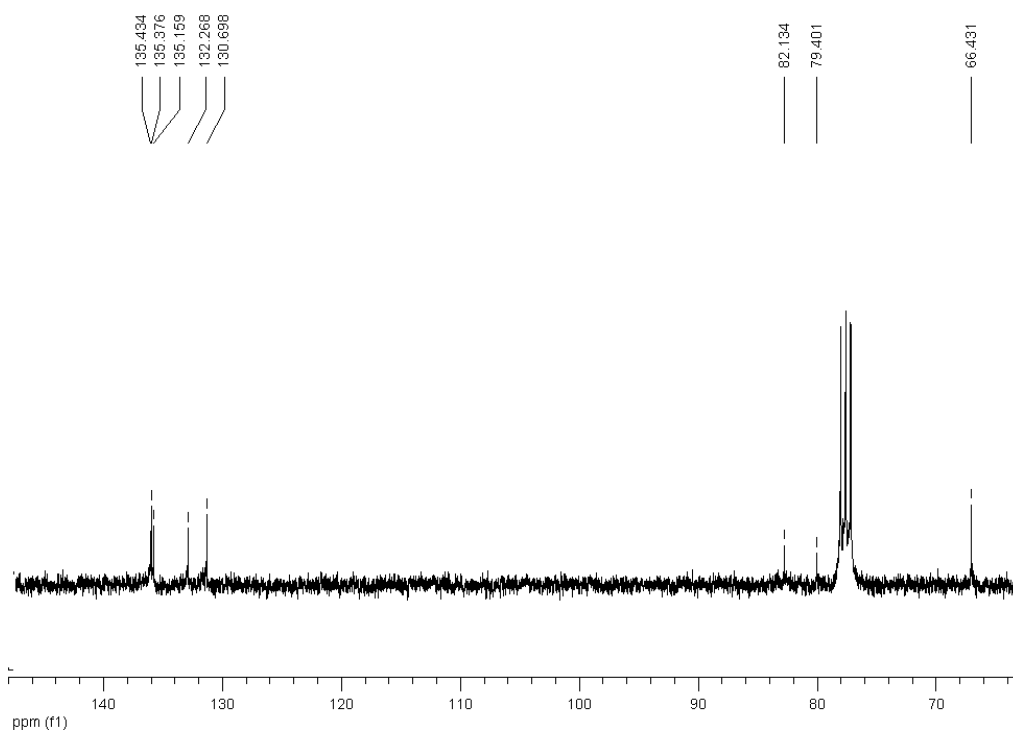
**Figura 32-** Espectro de massas de baixa resolução de CM2 [APCI (+)]



**Figura 33-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM2 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Figura 34-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

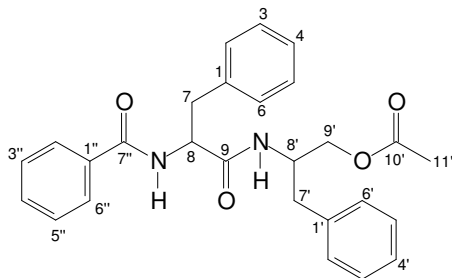


**Figura 35-** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

**Tabela 2** - Dados espectrométricos de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz) (  $\text{CDCl}_3$ )

Posição	RMN $\delta(\text{ppm})$ $^{13}\text{C}$	
	CM2	[59]
1	30,0	30,2
2	34,6	34,7
3	66,6	66,4
4	39,2	39,4
5	82,0	82,1
6	135,1	135,2
7	130,6	130,7
8	79,3	79,4
9	51,0	51,2
10	36,8	37,0
11	20,5	20,6
12	36,8	37,0
13	44,4	44,6
14	51,6	51,7
15	23,3	23,4
16	28,5	28,5
17	56,1	56,3
18	12,8	12,9
19	18,1	18,1
20	39,6	39,6
21	20,8	20,9
22	135,3	135,4
23	132,2	132,3
24	42,6	42,8
25	32,9	33,1
26	19,5	19,6
27	19,8	19,9
28	17,4	17,5

### 4.1.3 Identificação de CM3



CM3

A elucidação estrutural de **CM3** foi baseada na análise dos espectros de massas (APCI e ESI), IV, de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (BB e DEPT) e correlações observadas nos espectros obtidos por técnicas de RMN bidimensionais (gCOSY, gHMBC e gHMBC) além da comparação com dados da literatura. O peptídeo **CM3** foi identificado como sendo N-benzoil-fenilalaninoil-fenilalaninolacetato (conhecida como acetato de aurentiamida)

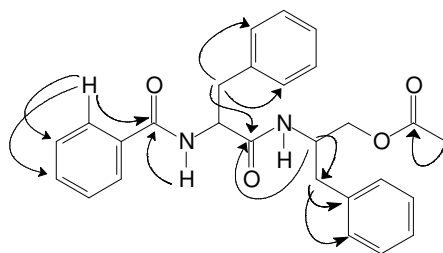
O espectro no infravermelho (Figura 43, pág.57) apresentou as seguintes:  $3.032\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H),  $2932$  e  $2860\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H),  $1726\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O) e  $1650\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  NHCO).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 37, pág.58) foi observado a presença de sinais na região de absorção de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos entre  $\delta$  8-6,9. Destes foi possível apenas identificar a multicplicidade de dois dupletos em  $\delta$  7,08 ( $J = 7,2\text{ Hz}$ ) e  $\delta$  7,69 ( $J = 7,5\text{ Hz}$ ) integrando para 2 hidrogênios cada, atribuídos para os hidrogênios nas posições H-2'', H-6'' e H-2', H-6'. Ainda neste espectro foi possível destacar a presença de um singlete em  $\delta$  2,01 com integração para três hidrogênios, atribuído a um grupo acetila e ainda a presença de dois dupletos em  $\delta$  6,84 e  $\delta$  6,04 com integração para um hidrogênio cada, que foi atribuído a dois hidrogênios ligado a nitrogênios (N-H). O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  registrou 18 sinais de carbonos que com o auxílio dos espectros de DEPT  $135^\circ$  e  $90^\circ$  (Figura 39, pág. 59) foi possível identificar a presença de três carbonos metilênicos, seis carbonos não hidrogenados, 11 carbonos metínicos e um carbono metílico. Neste espectro foi possível também identificar a presença de três grupos acilas em  $\delta$  167,6,  $\delta$  170,3 e  $\delta$  170,7. Neste espectro ainda foi possível ratificar a presença do grupo acetila devido ao registro de um sinal referente ao grupo metílico ( $\delta$  20,1).



O espectro gHMBC de **CM-3** permitiu a atribuição dos hidrogênios com seus respectivos carbonos através das correlações observadas (Tabela 3, pág.53).

As correlações observadas no espectro de gHMBC (Figura 41, pág.60) e gCOSY (Figura 42, pág. 60) concomitantemente com dados descritos da literatura foram pontos cruciais para identificação estrutural de CM3 como acetato aurentiamida. Estas correlações são destacadas na figura 36. “Dentre estas é possível destacar as correlações dos hidrogênios H-8’ com C-9 (170,3) e com C-7’, H-7 com C-9 (170,3), H-2” com C-3”, C-4” e C-7” sugestionando o esqueleto básico da aurentimiamida.



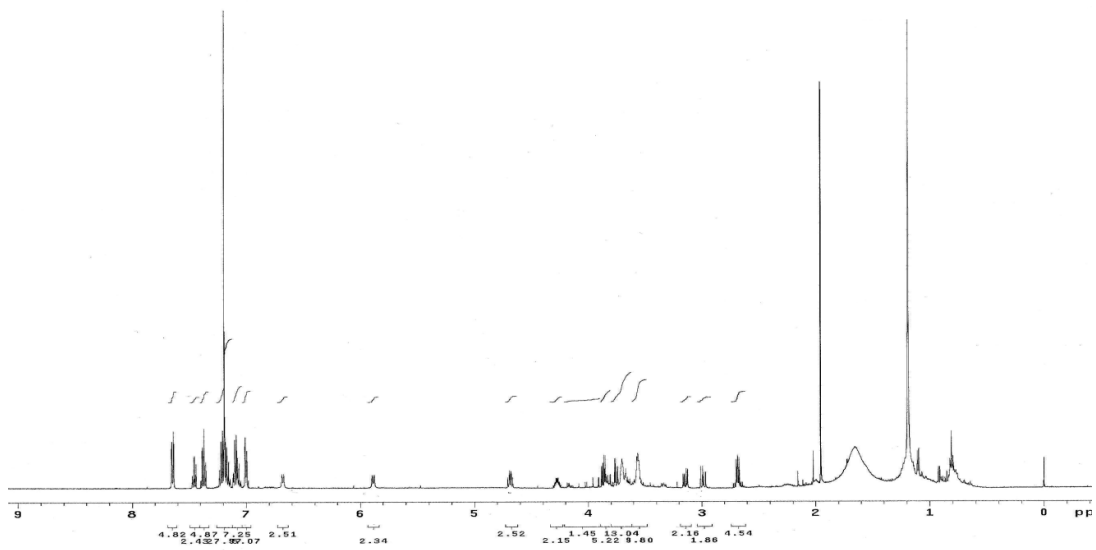
**Figura 36.** Correlações observadas no espectro de gHMBC

Análise de espectrometria de massas utilizando a fonte de ionização ESI nos modos positivos e negativos apresentou o íon *quasi*-molecular  $[M-2H]^-$   $m/z$  442, condizente com a fórmula molecular  $C_{27}H_{28}N_2O_4$ , e análise espectrométrica no infravermelho pôde-se corroborar a estrutura de CM3, através de comparação das absorções apresentada com os descritos da literatura [65].

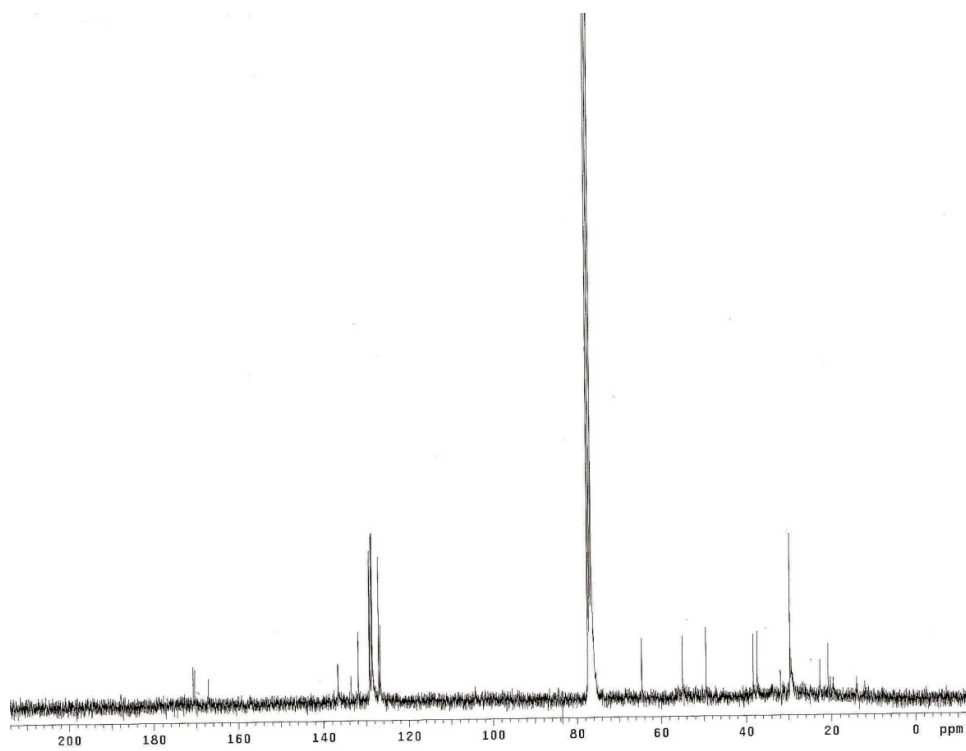
Este é a primeira ocorrência deste peptídeo em *Cratylia*; acetato de aurentiamida é uma raro dipetídeo que tem sido reportado previamente de Algas vermelhas [66] e também têm sido isolados nas famílias Piperaceae [67], Renunciaceae [68], *Aspergillus penicilloides* [69], Guttiferae [70], Moringaceae [71], Labiatae [72] Polygonaceae [74]. Em Leguminosae foi isolado da espécie *Mucuna cinerea* [73]. Entre essas diversas fontes de isolamento foram atribuídos a esse composto algumas atividades biológicas como antiinflamatório [74], antibacteriana, antimicrobiana e xantina oxidase [75].

**Tabela 3.** Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (300 MHz) ( CDCl<sub>3</sub>)

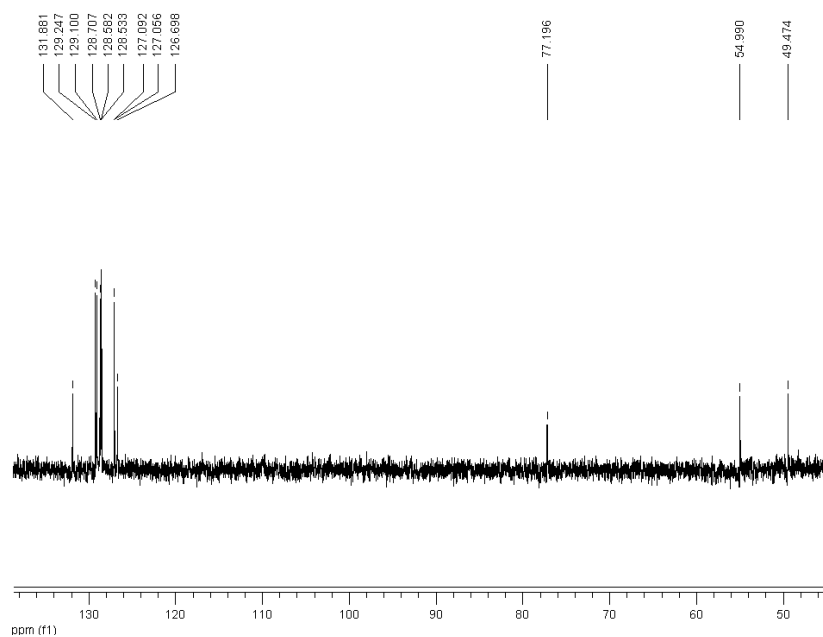
Posição	CM3	
	$\delta^1_{\text{H}}$	$\delta^{13}_{\text{C}}$
1''	----	134,4
2''	7,69 (d)	127,8
3''	7,42 (m)	128,2
4''	7,51 (t)	131,4
5''	7,42 (m)	128,2
6''	7,69 (d)	127,8
7''	----	167,6
1	----	137,0
2	7,22 – 7,29 (m)	125,8
3	7,22 – 7,29 (m)	128,3
4	7,22 – 7,29 (m)	126,0
5	7,22 – 7,29 (m)	128,3
6	7,22 – 7,29 (m)	125,8
7	3,04 (dd) – 3,21 (dd)	38,8
8	4,75 (ddd)	55,0
9	----	170,3
1'	----	137,0
2'	7,08 (dd)	127,3
3'	7,11 – 7,17 (m)	127,7
4'	7,11 – 7,17 (m)	125,3
5'	7,11 – 7,17 (m)	127,7
6'	7,08 (dd)	127,3
7'	2,72(dd)-2,75 (dd)	38,7
8'	4,29 - 4,36 (m)	50,5
9'	3,80 (dd) – 3,96 (dd)	66,5
10'	-	170,7
11'	2,01 (s)	20,7



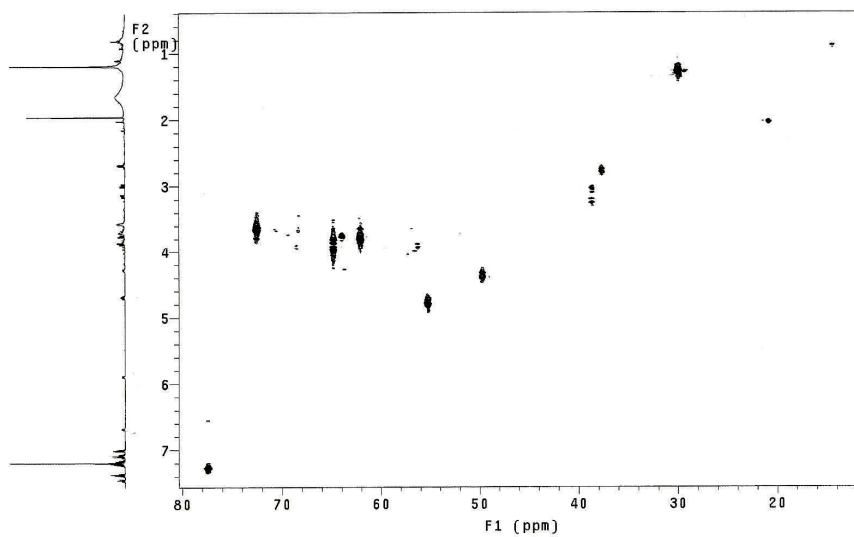
**Figura 37.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM3 [ $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz].



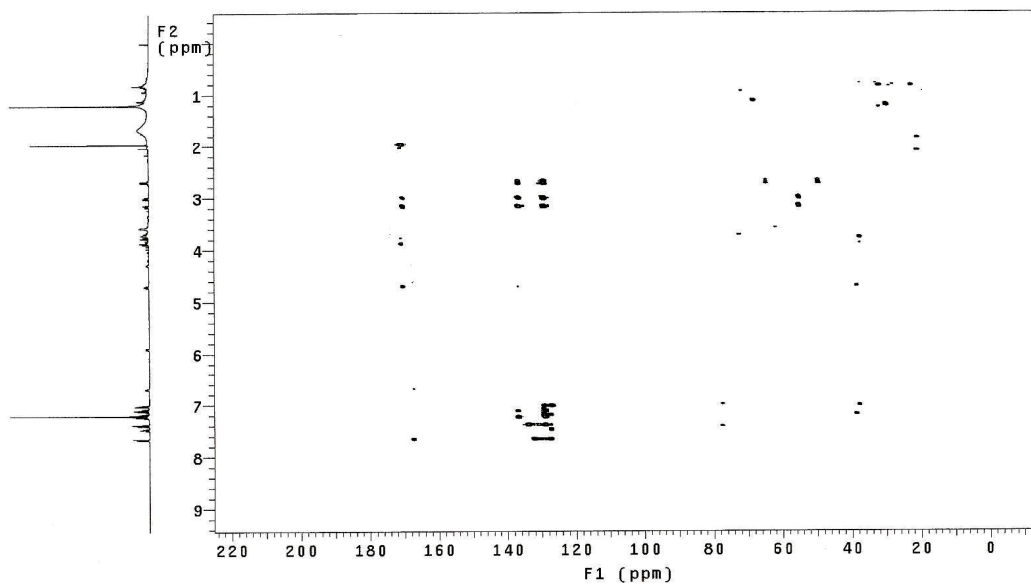
**Figura 38.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM3 [ $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz].



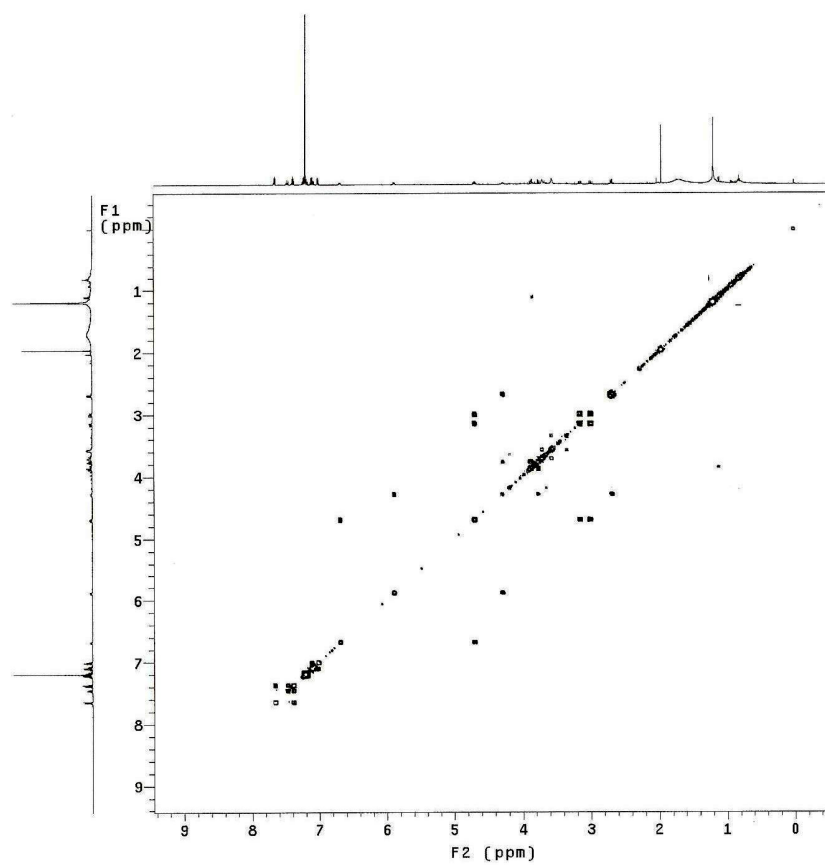
**Figura 39.** Espectro de DEPT 90° de CM3 [CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz].



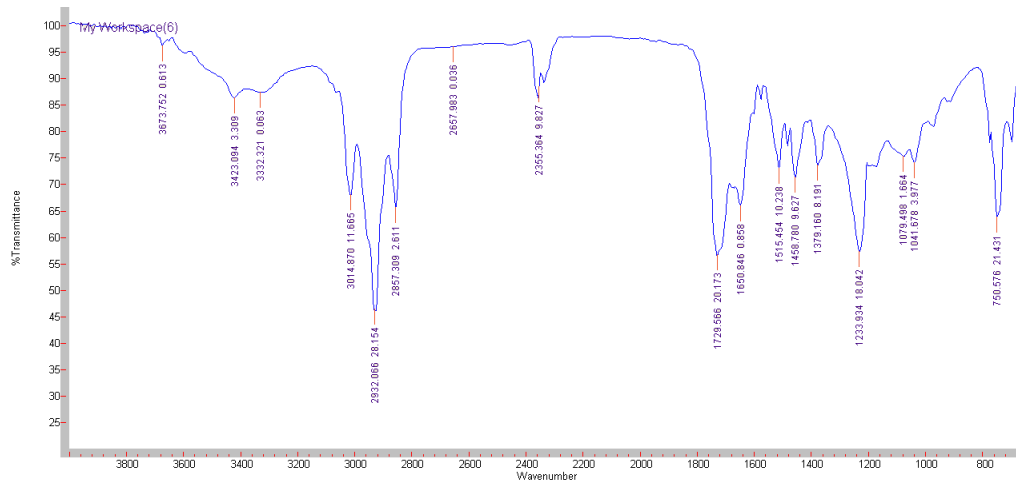
**Figura 40.** Espectro de gHMBC de CM3 [CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz].



**Figura 41.** Espectro de gHMBC de CM3 [CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz].

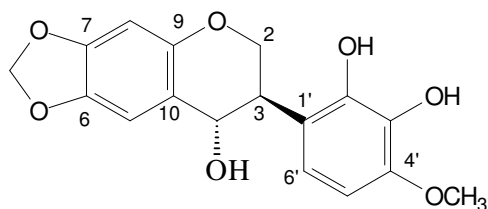


**Figura 42.** Espectro de gCOSY de CM3 [CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz].



**Figura 43.** Espectro de Infravermelho de CM3

#### 4.1.4 Determinação Estrutural de CM4



**CM4**

A determinação estrutural de **CM4** foi baseada na análise de dados de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (BB e DEPT), comparação de dados registrado da literatura para a bolusanthol [76] e através de análise em espectrometria de massas de alta resolução utilizando a fonte de ionização ESI no modo negativo. O EM (Figura 51, pág.67) apresentou o íon quasi-molecular  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]$   $m/z$  313,0717 condizente com a formula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$  (requer 313.0712)

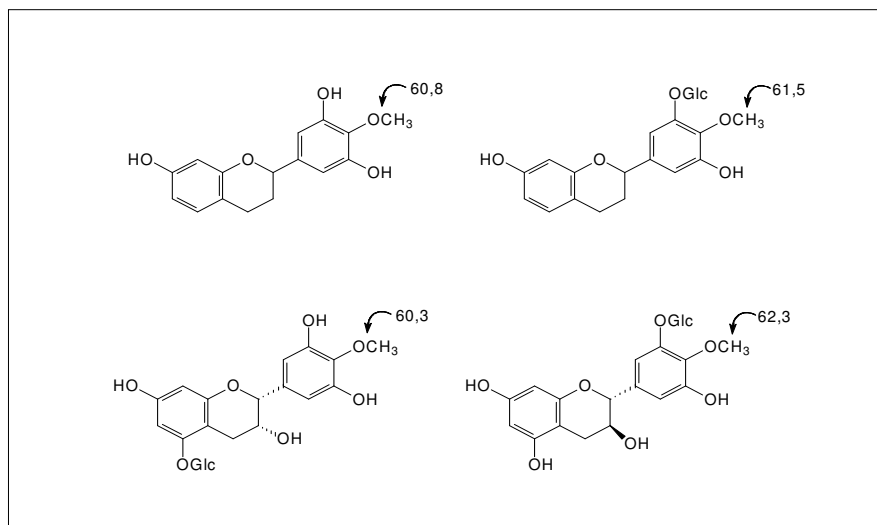
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **CM4** (Figuras 47 e 48 pág. 65) apresentou sinais característicos de esqueleto de uma 4-hidroxiisoflavona. Dentre os sinais característicos destacam-se um par de duplo dupletos em  $\delta$  3,7 ( $J = 7,0$  e 11 Hz) e  $\delta$  4,3 ( $J = 5,0$  e 11,0 Hz) referentes aos hidrogênios do grupo oximetilênico (H-2), um multipletto entre  $\delta$  3,49-3,60 e um dupletto em  $\delta$  5,52 ( $J = 7,0$  Hz) referentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. Também foi observado a presença de dois dupletos em  $\delta$  7,0 e  $\delta$  6,6 ( $J = 8,4$  Hz) atribuído aos H-5' e H-6' demonstrando que o anel B se encontrava como 1,2,3,4-tetra substituído. Os dois singletos em  $\delta$  6,7 e  $\delta$  6,4 foram atribuídos aos H-5 e H-8 do anel A.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( Figuras 49 e 50 pág. 66) registrou 17 sinais onde foi possível destacar a presença do grupo metilenodioxí em  $\delta$  101,5, um grupo metoxila em  $\delta$  56,5. Além destes sinais podemos destacar ainda, a presença de sinal de carbono oximetilênico em  $\delta$  67,1 e de um carbono oximetínico em  $\delta$  78,6.

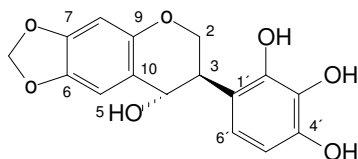
A localização do grupo metoxílico em **CM4** foi realizada a partir da comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 4, pág. 64) com os dados da literatura. Foi observado que quando a metoxila encontra-se localizada entre dois grupos hidroxílicos o valor do deslocamento do carbono metoxílico deve aparecer mais desprotegido [77]. Portanto baseado nos dados encontrados na literatura (Figura 44), a possibilidade da metoxila

está localizada entre as duas hidroxilas foi desconsiderada, uma vez que o valor apresentado para o carbono metoxílico de CM3 foi de  $\delta$  56,25.

Comparação de dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM4 com de 4,2',3',4'-tetraidroxi-6,7-metilenodioxiiisoflavana (bolusanthol A) (Figura 45, pág. 63) isolado de *Bolusanthus speciosus* [76]. A posição do grupamento metoxila foi determinada baseada em comparação de dados da literatura e são mostrados na figura 46 [78]. Pode observar nos exemplos descritos que a presença dos substituintes oxigenados em C-2' e uma metoxila em C-4' protegeu o C-5 e o sinal foi registrado aproximadamente 107 ppm. Portanto, através das comparações realizadas foi possível estabelecer que a metoxila de CM4 estava localizada na posição 4', devido o valor de deslocamento químico apresentado protegido para C-5 ( $\delta$  105,6) de CM4. Sendo assim CM4 foi identificada como 4,2',3'-triidroxi-4'-metoxi-6,7-metilenodioxiiisoflavana.

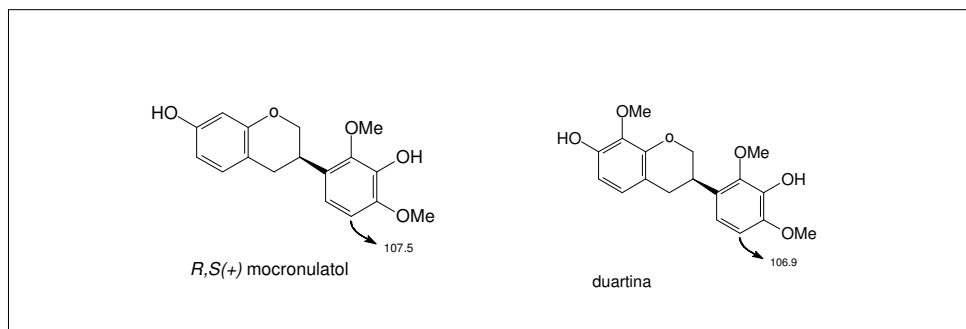


**Figura 44.** Exemplos de valores de deslocamento químico do grupo metoxila em flavanas [79, 80]



**Figura 45.** Estrutura do bolusanthol A





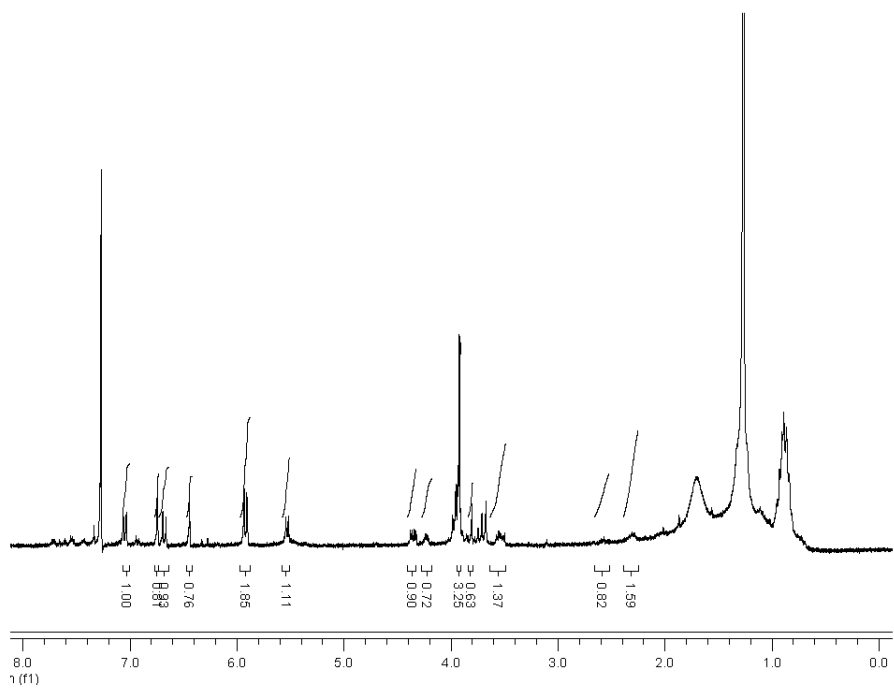
**Figura 46** – Modelos de isoflavanas com substituintes em C-2' e uma metoxila em C-4'

**Tabela 4.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para CM4 e Bolusanthol A

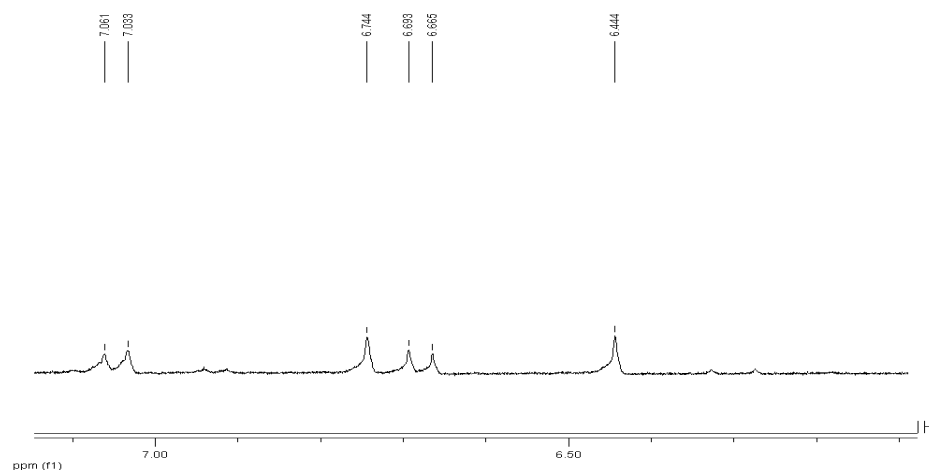
Estrutura	CM4 *			Bolusanthol A**		
	posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{^{13}\text{C}}$	
	2	3,7 ( <i>dd</i> , J*)	67,1	3,7 ( <i>dd</i> , 10,8, 11,0)	67,4	
		4,3 ( <i>dd</i> , 5,1, 10,8)		4,3 ( <i>dd</i> , 5,0, 10,8)		
	3	3,5 ( <i>ddd</i> , J*)	40,5	3,5 ( <i>ddd</i> , 5,0, 7,0, 11,0)	40,7	
	4	5,5 ( <i>d</i> , 6,9)	78,6	5,5 ( <i>d</i> , 7,0)	78,7	
	5	6,7 ( <i>s</i> )	105,6	6,7 ( <i>s</i> )	105,0	
	6	-	144,1	-	142,2	
	7	-	147,6	-	148,6	
	8	6,4 ( <i>s</i> )	94,0	6,4 ( <i>s</i> )	94,3	
	9	-	154,4	-	154,7	
	10	-	117,9	-	117,9	
	1'	-	114,2	-	112,1	
	2'	-	145,5	-	143,5	
	3'	-	131,0	-	131,9	
	4'	-	134,2	-	144,8	
	5'	6,6 ( <i>d</i> , 8,4)	105,6	6,70 ( <i>d</i> , 8,5)	110,0	
	6'	7,0( <i>d</i> , 8,4)	121,2	7,0 (8,5)	122,1	
	OCH <sub>3</sub>	3,9 ( <i>s</i> )	56,5	-	-	
	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub>	5,9( <i>dd</i> , 2,7, 10,2)	101,5	5,9 ( <i>dd</i> , 7,8)	101,7	
	OH	-	-	-	-	

(300 MHz, J em Hz 300 MHz, nos parênteses) J\* Indeterminado

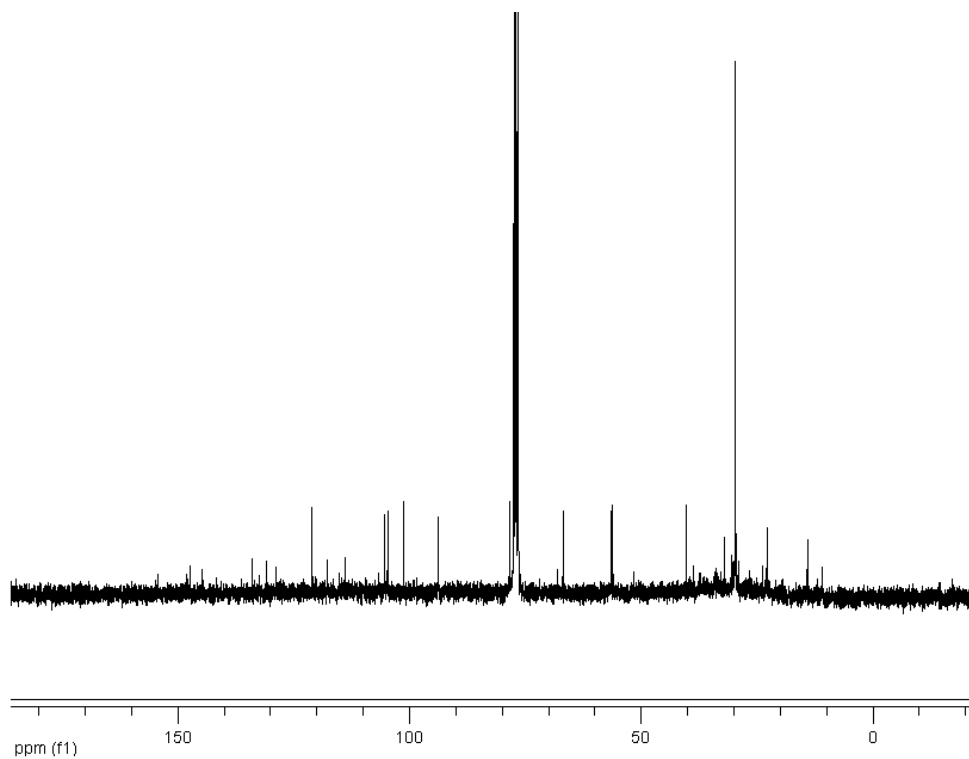
(\* CDCl<sub>3</sub>, \*\* C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO)



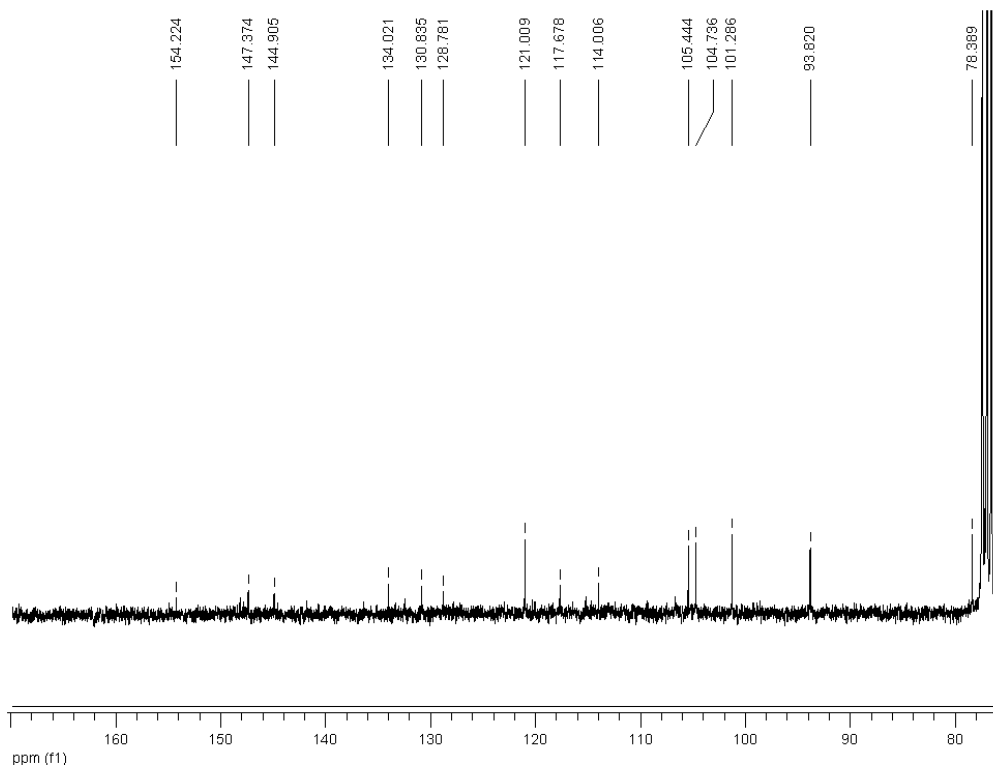
**Figura 47.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM4 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



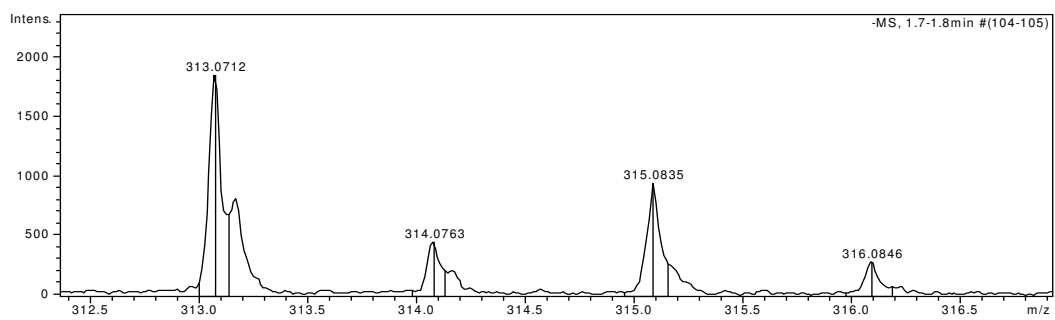
**Figura 48.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM4 [ $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz]



**Figura 49.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM4 [ $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz].

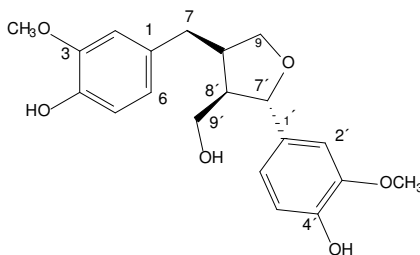


**Figura 50.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM4 [ $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz]



**Figura 51.** Espectro de massas de alta resolução de CM4[M-H-H<sub>2</sub>O] [ESI (-)]

#### 4.1.5 Identificação Estrutural de CM5



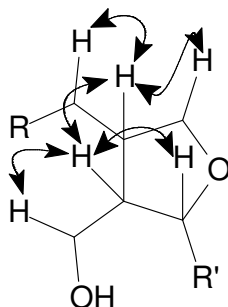
CM5

A substância CM5 foi identificada como 4,4',9-triidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9'-epoxilignana baseada em análise de dados espectrométricos de RMN unidimensional  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e DEPT), bidimensional (gHMBC, gCOSY e gHMQC) e por comparação de dados registrados na literatura.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 55, pág.71) apresentou 20 sinais de carbonos que com auxílio de experimento DEPT  $135^\circ$  foram atribuídos como três carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos, dois carbonos metflicos e seis carbonos não hidrogenados. Entre os sinais presentes no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível destacar o sinal de  $\delta$  55,9 que se correlaciona no gHMQC (Figuras 60 e 61, pág.74) a dois singletos ( $\delta$  3,89 e  $\delta$  3,88), indicando a presença de 2 grupamentos metoxílicos. Além disso, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  também pode ser observado a presença de três carbonos oxigenados um referente ao sinal do carbono oximetileno  $\delta$  62,4 (C-9'). Este carbono no espectro de HMQC correlaciona-se com dois duplos dupletos em  $\delta$  4,06 ( $J = 8,7, 6,6\text{Hz}$ ) e 4,18 ( $J = 11,1, 7,2\text{ Hz}$ ). O outro sinal é também referente a carbono oximetilenico em  $\delta$  72,6 (C-9) relacionando no gHMQC a também a dois dupletos em 4,06 ( $J = 8,4, 6,1\text{ Hz}$ ) e a um duplo duplo em  $\delta$  3,78 ( $J = 8,4, 6,1\text{ Hz}$ ) e o sinal de um carbono oximetínico em  $\delta$  83,0 (C-7') encontra-se correlacionando no gHMQC a um duplo em  $\delta$  4,78 ( $J = 6.1\text{ Hz}$ ).

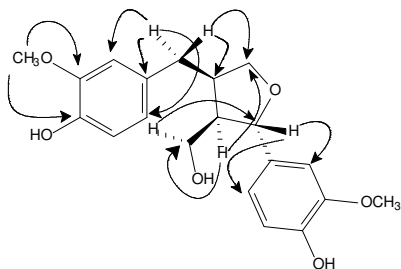
Já o espectro de gHMBC apresentou correlações importantes que auxiliaram na identificação de **CM-5** e estas encontram-se resumidas na figuras 58 e 59 na página 73. Estas correlações permitiram estabelecer o padrão de substituição da lignana. Assim como o espectro de gHMBC o espectro de gCOSY (Figura 57, pág.72) também apresentou correlações importantes como por exemplo, em H-9' ( $\delta$  4,06,  $\delta$  4,18) com H-8' ( $\delta$  2,55) e entre o H-8' ( $\delta$  2,55) com o H-7' ( $\delta$  4,78). Observa-se também correlação H-8' ( $\delta$  2,55) com H-8 ( $\delta$  2,66); e entre H-8 com H-7 ( $\delta$  2,26 e  $\delta$  2,88) e o hidrogênio H-

9 ( $\delta$  4,06,  $\delta$  4,18). Assim, baseado nestas correlações foi possível propor uma unidade da estrutura da lignana (Figura 52).



**Figura 52.** Correlações observadas no espectro gCOSY

Portanto com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  concomitantemente como os dados obtidos nas séries de espectros bidimensionais (gCOSY, gHMBC e gHMQC) e dados da literatura foi possível identificar CM5 como 4,4',9-triidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9'-epoxilignana. A configuração relativa dos centros estereogênicos foi sugerida com base na análise comparativa com dados da literatura [82].

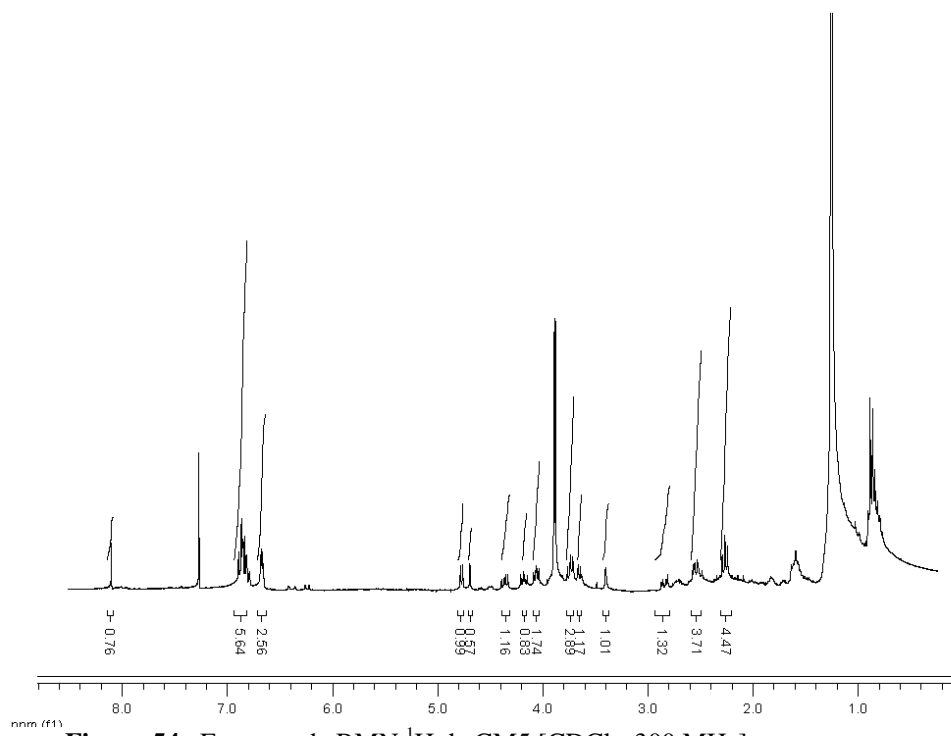


**Figura 53.** Correlações observadas no espectro gHMBC

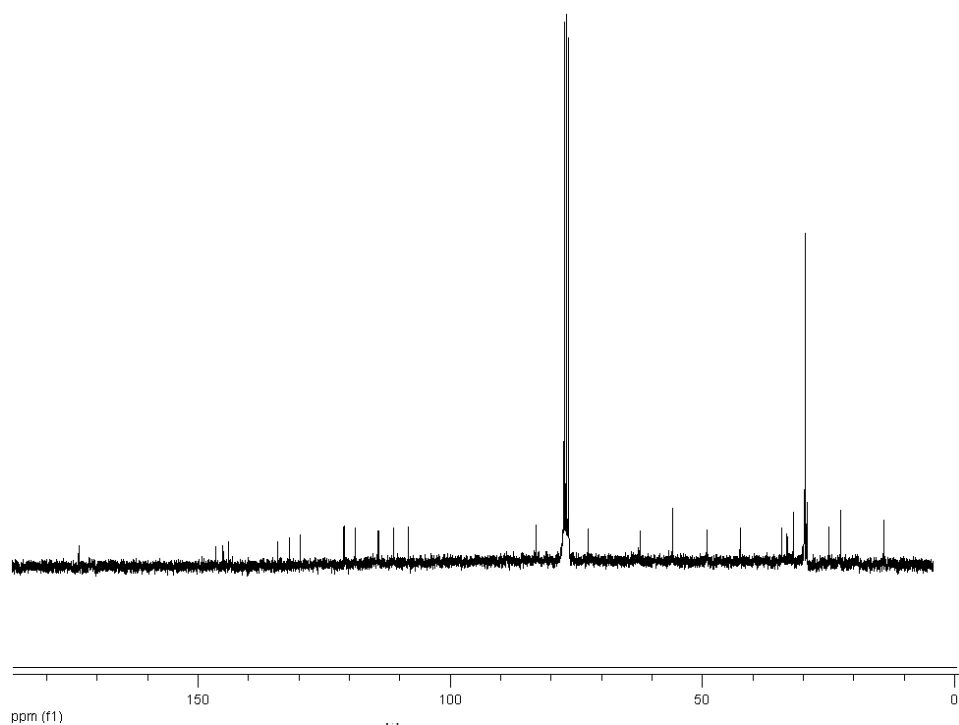
Este é o primeiro relato da lignana 4,4',9-triidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9'-epoxilignana em espécies pertencente a família Leguminosae, esta lignana já foi isolada anteriormente nas famílias *Araucariaceae* [81] e *Apocynaceae* [82].

**Tabela 5.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (75 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (300 MHz) (  $\text{CDCl}_3$ )

Posição	CM 5		[82]
	$\delta^1_{\text{H}}$	$\delta^{13}_{\text{C}}$	$\delta^{13}_{\text{C}}$
1	-	131,8	132,6
2	6,67 <i>m</i>	111,1	111,5
3	-	143,9	144,3
4	-	146,4	146,9
5	6,92 <i>m</i>	114,1	114,7
6	6,67 <i>m</i>	121,0	121,4
7	2,26 <i>dd</i> ( $J=15,3, 7,1\text{Hz}$ ) 2,88 <i>dd</i> ( $J=13,2, 4,8\text{ Hz}$ )	31,2	33,5
8	2,66 <i>m</i>	42,5	42,5
9	4,06 <i>dd</i> ( $J=8,4, 6,1\text{Hz}$ ) 3,78 <i>dd</i> ( $J=8,4, 6,1\text{ Hz}$ )	72,6	73,1
1'	-	134,4	135,1
2'	6,92 <i>m</i>	108,2	108,5
3'	-	145,0	145,4
4'	-	146,4	147,0
5'	6,92 <i>m</i>	114,3	114,4
6'	6,92 <i>m</i>	118,7	119,0
7'	4,78 <i>d</i> ( $J=6,1\text{ Hz}$ )	83,0	83,0
8'	2,55 <i>m</i>	49,0	52,8
9'	4,06 <i>dd</i> ( $J=8,7, 6,6\text{Hz}$ ) 4,18 <i>dd</i> ( $J=11,1, 7,2\text{ Hz}$ )	62,4	61,1
$\text{OCH}_3$	-	55,9	56,6
		55,9	56,6

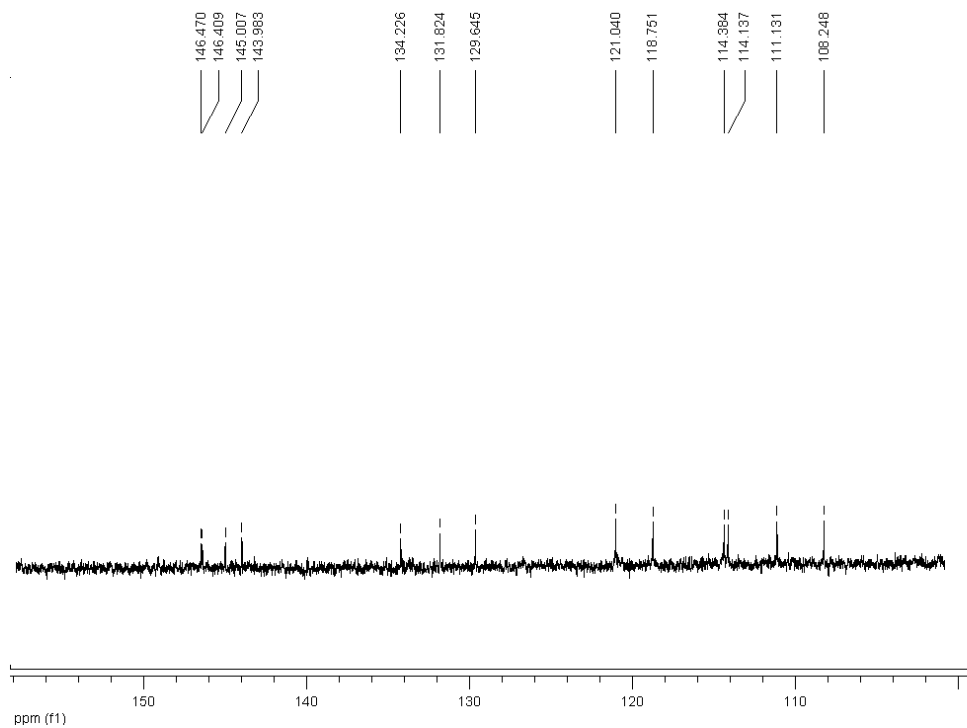


**Figura 54.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM5 [ $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz].

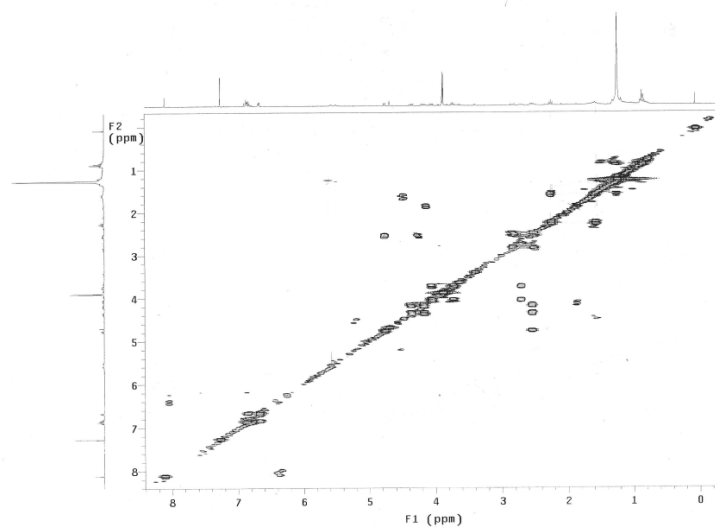


**Figura 55.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM5 [ $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz].

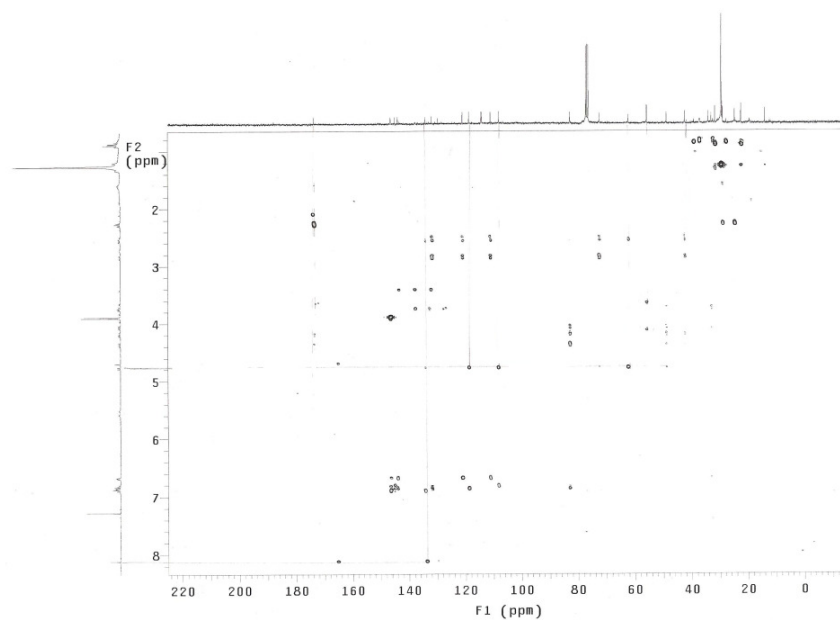




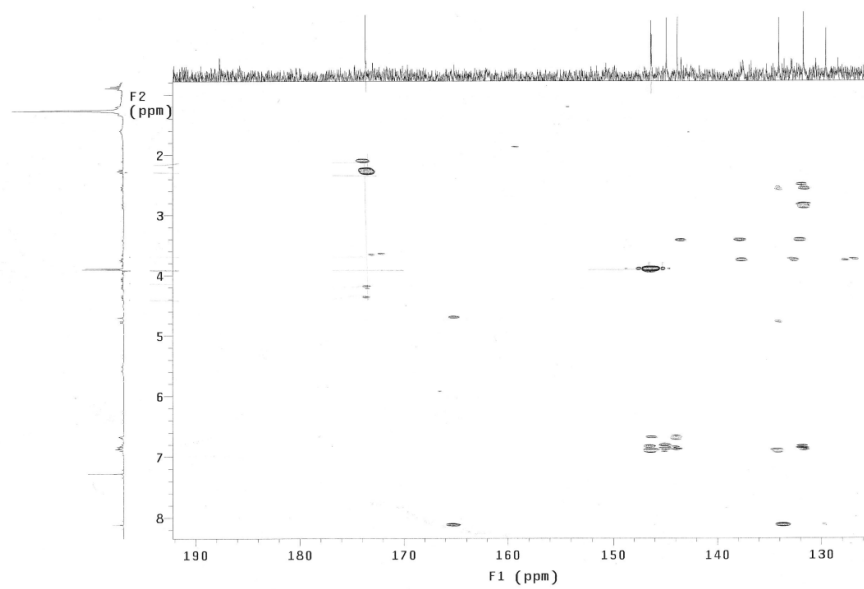
**Figura 56.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM5 [ $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,]



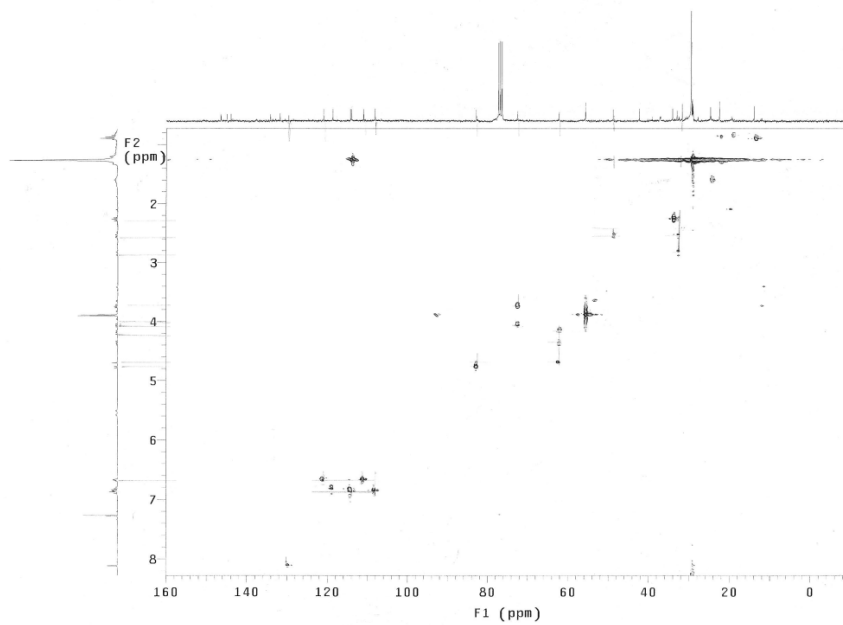
**Figura 57.** Espectro de gCOSY de CM5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



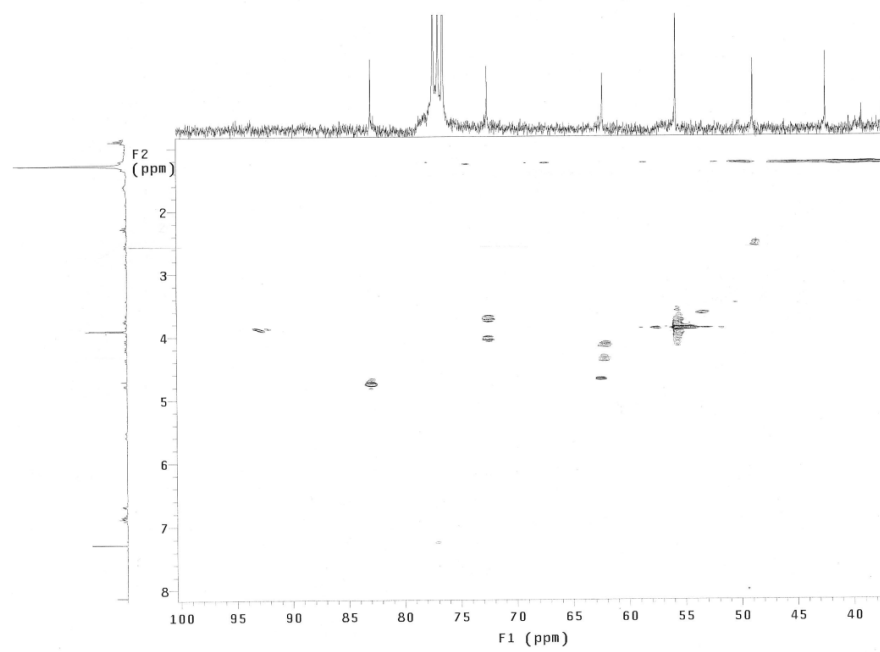
**Figura 58.** Espectro de gHMBC de CM5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)



**Figura 59.** Expansão do espectro de gHMBC de CM5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

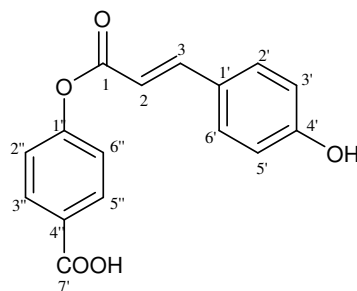


**Figura 60.** Espectro de gHMQC de CM5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)



**Figura 61.** Expansão do Espectro de gHMQC de CM5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

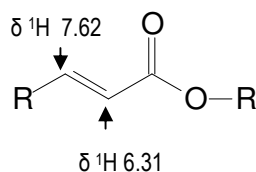
#### 4.1.6 Identificação Estrutural de CM6



**CM6**

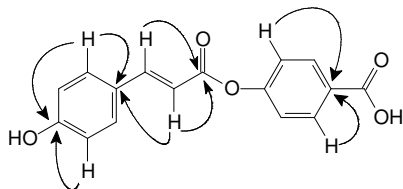
O éster **CM6** foi identificado como 4-[3-(4-hidroxi-fenil)-acrililóxi] ácido benzóico baseado em análise de dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e DEPT) e também através de experimentos de RMN bidimensionais (gHMBC, gCOSY e gHMQC). O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 67, pág. 78) apresentou 14 sinais que com auxílio do DEPT  $135^\circ$  (Figura 67, pág. 78) foi atribuído como oito carbonos metínicos e oito carbonos não hidrogenados. Foi observado que os sinais em  $\delta$  115,9,  $\delta$  116,7,  $\delta$  131,0 e  $\delta$  132,9 correspondiam para dois carbonos quimicamente equivalentes. Ainda neste espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível observar a presença de dois sinais de carbonos carbonílicos em  $\delta$  171,1 e  $\delta$  170,1. A atribuição dos hidrogênios com os respectivos carbonos foi obtido através do espectro bidimensional gHMQC (Figura 72, pág. 79; Tabela 6, pág.76).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 64, pág. 77) foi evidenciado a presença de quatro dupletos, integrando para dois hidrogênios cada, que permitiram identificar a presença de dois sistemas aromáticos 1,4-dissubstituídos. Ainda no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi observado a presença de sistema olefínico  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado conjugado a grupo acila (Figura 62), evidenciado pela presença de dois dupletos em  $\delta$  7,62 e  $\delta$  6,31 ( $J = 15,5$  e  $15,5$  Hz), respectivamente. Os valores das constantes de acoplamento foi indicativo que o sistema tinha configuração *Z*. O espectro de gHMQC confirmou a presença deste grupo devido a correlações observada entre os hidrogênios acima descritos com os carbonos em  $\delta$  146,5 e  $\delta$  115,7, respectivamente.



**Figura 62.** Identificação do sistema  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado carbonílico

O espectro gHMBC (Figura 68, pág. 75) apresentou correlações importantes (Figura 63) que permitiram localizar os substituintes em CM-6. Dentre as principais, a correlação de H-3 ( $\delta$  7,62) com C-2 ( $\delta$  131,0) e C-9 (170,1) e H-8 ( $\delta$  6,30) com C-1 ( $\delta$  127,2) e C-9 ( $\delta$  170,1) permitiram localizar o grupo acila insaturado e o H-2 ( $\delta$  7,45) com C-1 ( $\delta$  127,2) e C-4 ( $\delta$  161,1) permitiram propor que a outra unidade era formada do ácido 4-hidroxibenzóico.



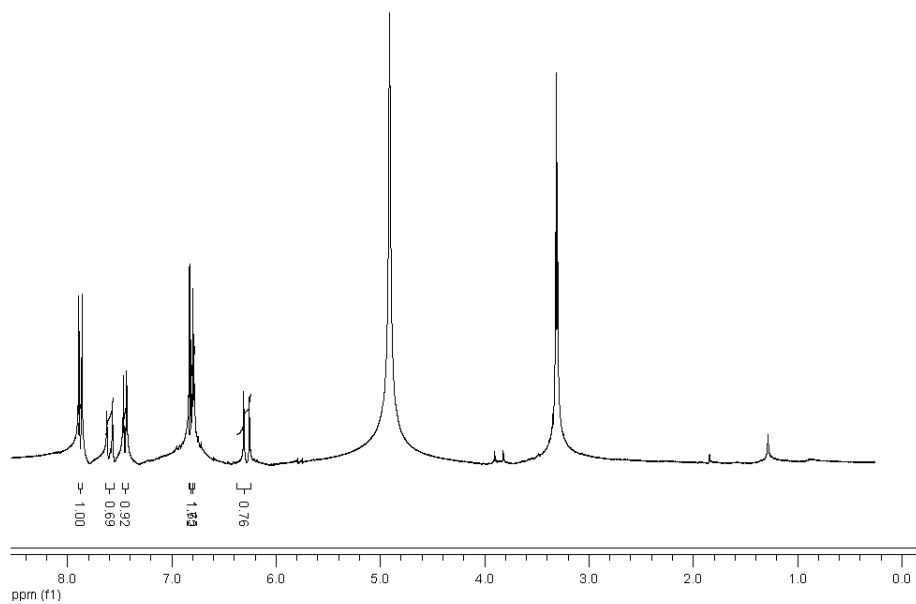
**Figura 63.** Correlações observadas no espectro gHMBC

O ester 4-[3-(4-hidroxi-fenil)-acrilóiloxi] ácido benzóico, foi isolado pela primeira vez em 2006 das raízes da espécie *Semiaquilegia adoxoides* (Ranunculaceae) [83]. Portanto, este é o segundo relato do isolamento em espécies vegetais e o primeiro relato de isolamento do composto na família Leguminosae.

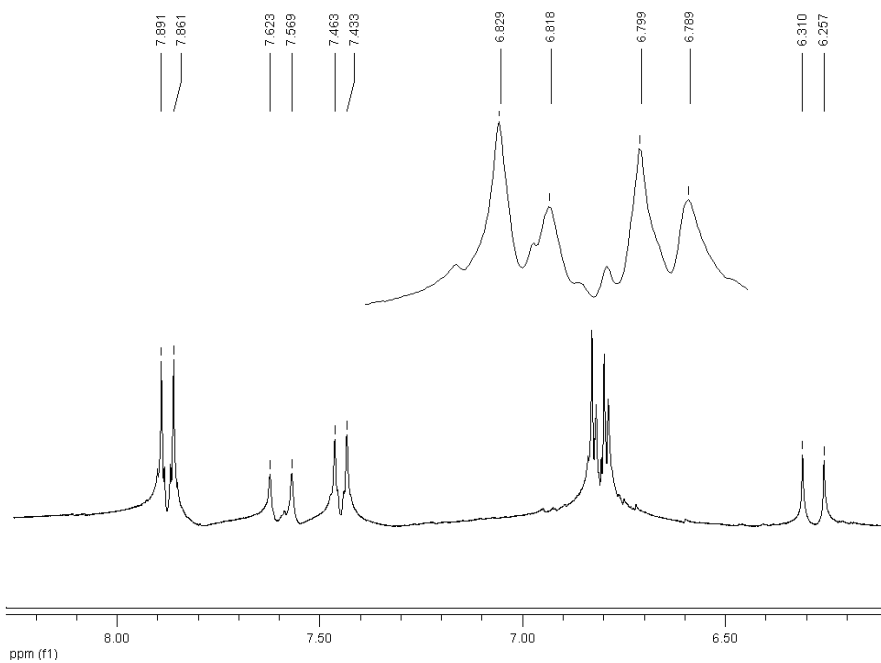
**Tabela 6.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz)

Posição	CM 5**		[83] *
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	170,1	168,0
2	6,31 ( <i>d</i> , <i>J</i> =15,5 Hz)	115,7	115,7
3	7,62 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 15,5)	146,5	145,5
1''	-	163,1	162,4
2''	7,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9Hz)	132,9	130,9
3''	6,82 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9Hz)	131,0	132,7
4''	-	122,7	129,7
5''	6,82 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9Hz)	131,0	132,7
6''	7,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9Hz)	132,9	130,9
7''	-	171,1	167,3
1'	-	127,2	127,1
2'	7,46 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9Hz)	116,7	116,6
3'	6,81( <i>J</i> = 8,7)	115,9	115,8
4'	-	161,1	160,4
5'	6,81( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)	115,9	115,8
6'	7,46 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9Hz)	116,7	116,6

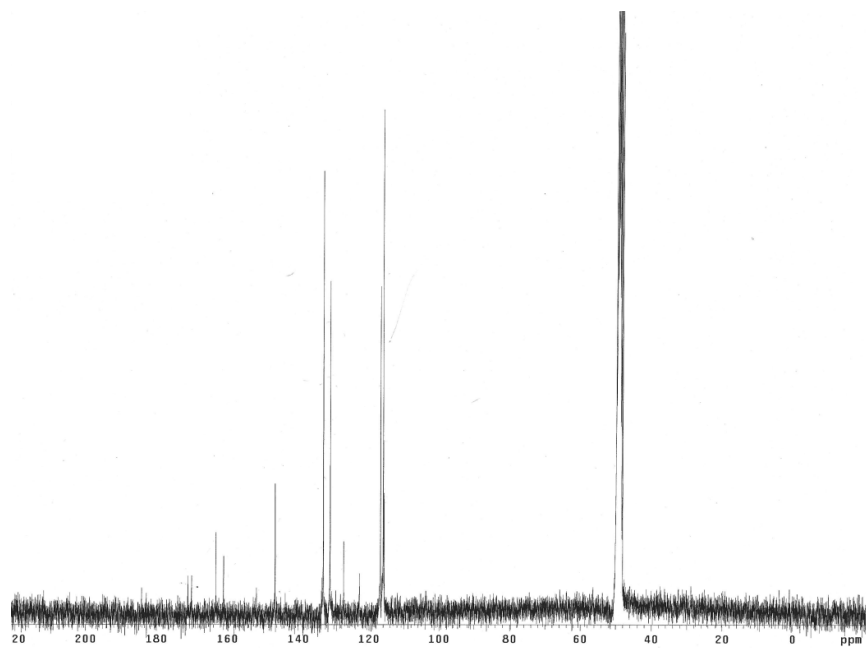
\* Adquirido em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , \*\*  $\text{CD}_3\text{OD}$



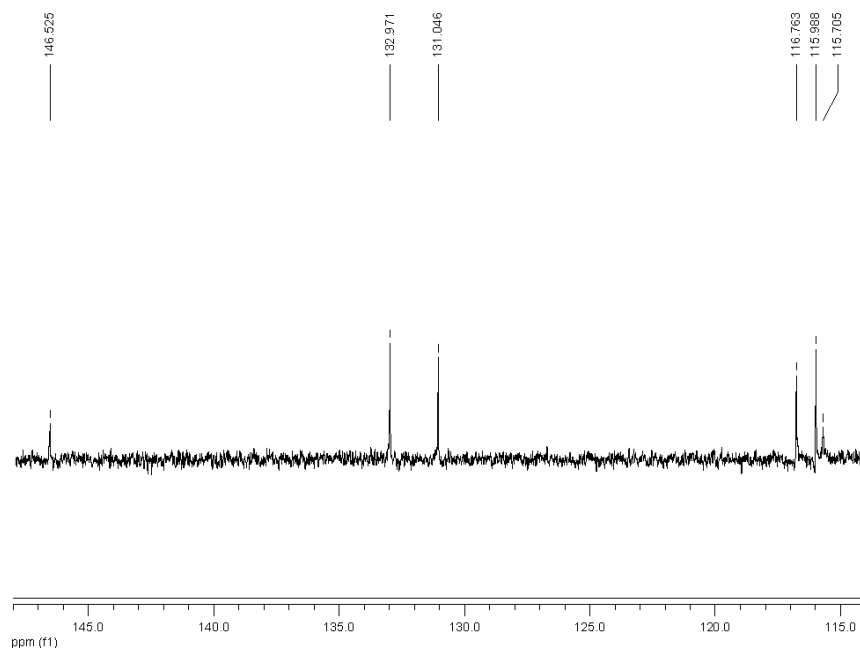
**Figura 64.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM6 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]



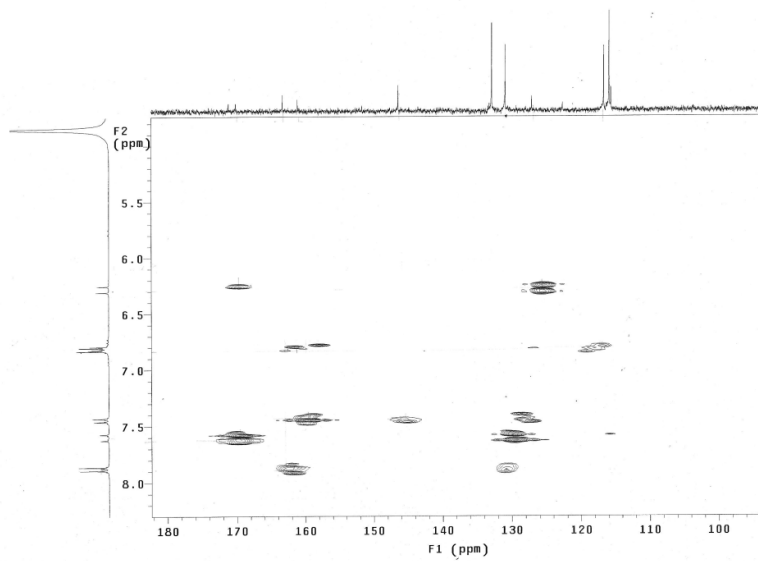
**Figura 65.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM6 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]



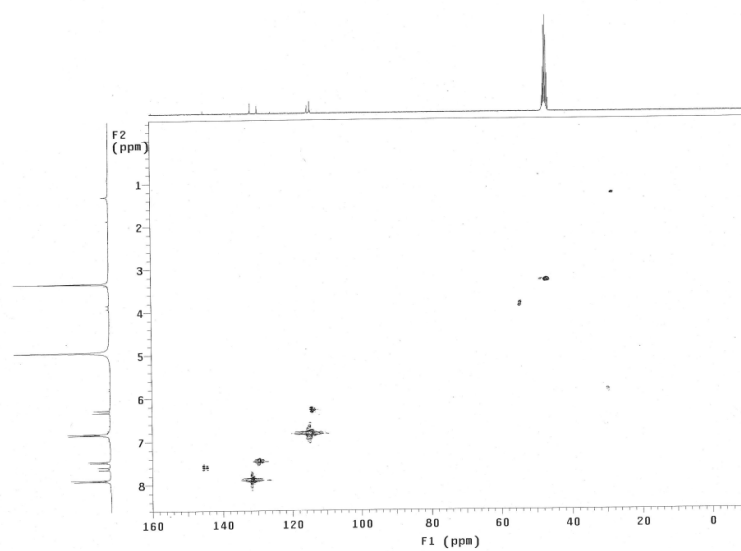
**Figura 66.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM6 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz,]



**Figura 67.** Espectro de RMN DEPT  $135^\circ$  de CM6 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz]



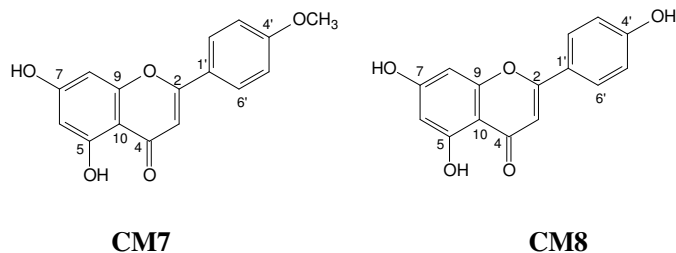
**Figura 68.** Espectro de gHMBC de CM6 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)



**Figura 69.** Espectro de gHMQC de CM6 (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)



#### 4.1.7 - Identificação Estrutural de CM7 e CM8 em mistura



As substâncias CM7 e CM8 foram identificadas em mistura, como apigenina e acacetina, respectivamente, baseado em análise de dados espectrométricos uni e bidimensional de RMN, EM e através de comparação de dados publicados na literatura.

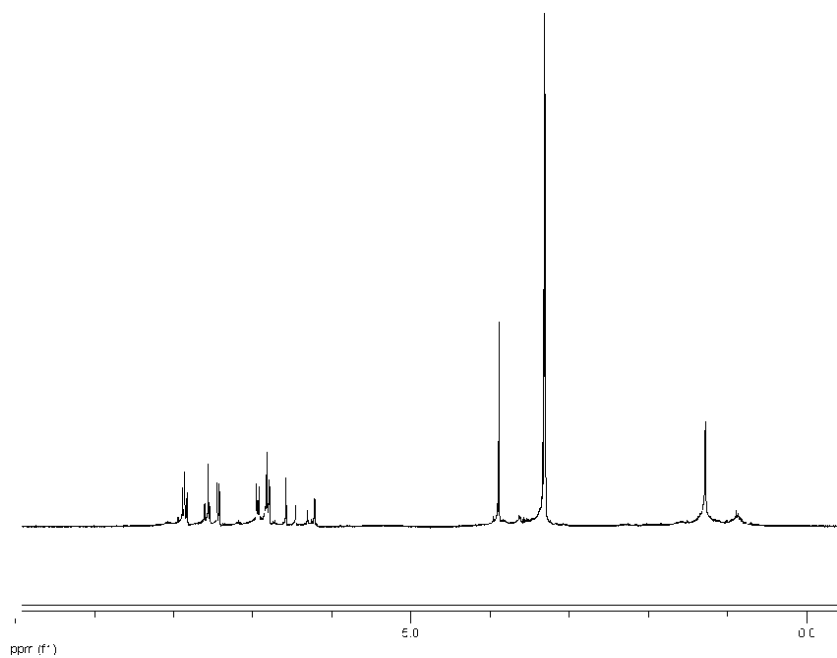
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 70, pág. 82) da mistura foi possível destacar os sinais de absorção de hidrogênios aromáticos entre 6-8 ppm e a presença de um grupo metoxílico em  $\delta$  3,95.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 71 e 72, pág. 82 e 83) apresentou sinais importantes que culminaram com a identificação de pelo menos dois flavonóides na mistura. Como por exemplo, os sinais em  $\delta$  129,8,  $\delta$  117,3,  $\delta$  130,9 e  $\delta$  116,7 correspondendo a dois carbonos, que foram atribuídos aos carbonos nas posições C-2' e C-6', C-3' e C-5'. Baseado nestes sinais foi determinado a presença de um anel 1,4-dissubstituído na estruturas de CM7 e CM8. Ainda neste espectro foi possível destacar o sinal o qual destaca a presença do grupo carbonila em  $\delta$  183,2 e a corroboração da presença do grupo metoxilia em  $\delta$  54,5.

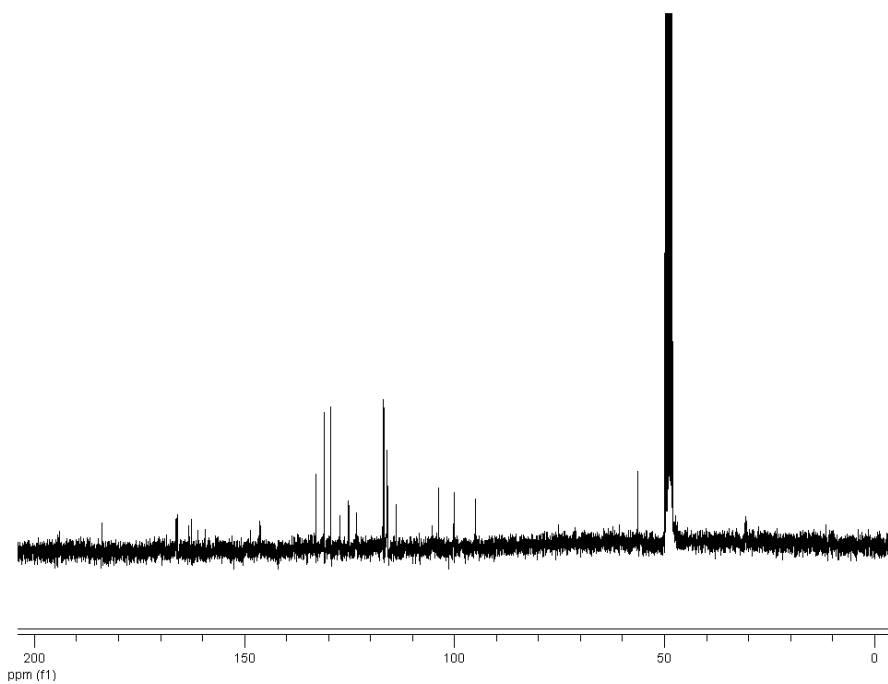
Os dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos foram comparados com dados descritos na literatura para a Acacetina e a Apigenina [78] (Tabela 7, pág 78). A identificação de CM7 e CM8 foi corroborada através do espectro de massas, que apresentou os íons quasi-molecular  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  285 e  $[\text{M}-\text{H}]^-$  269 condizente com as formulas moleculares  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$  e  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ , respectivamente.

**Tabela 7.** Dados espectrométricos de RMN <sup>13</sup>C [(75 MHz), CD<sub>3</sub>OD]

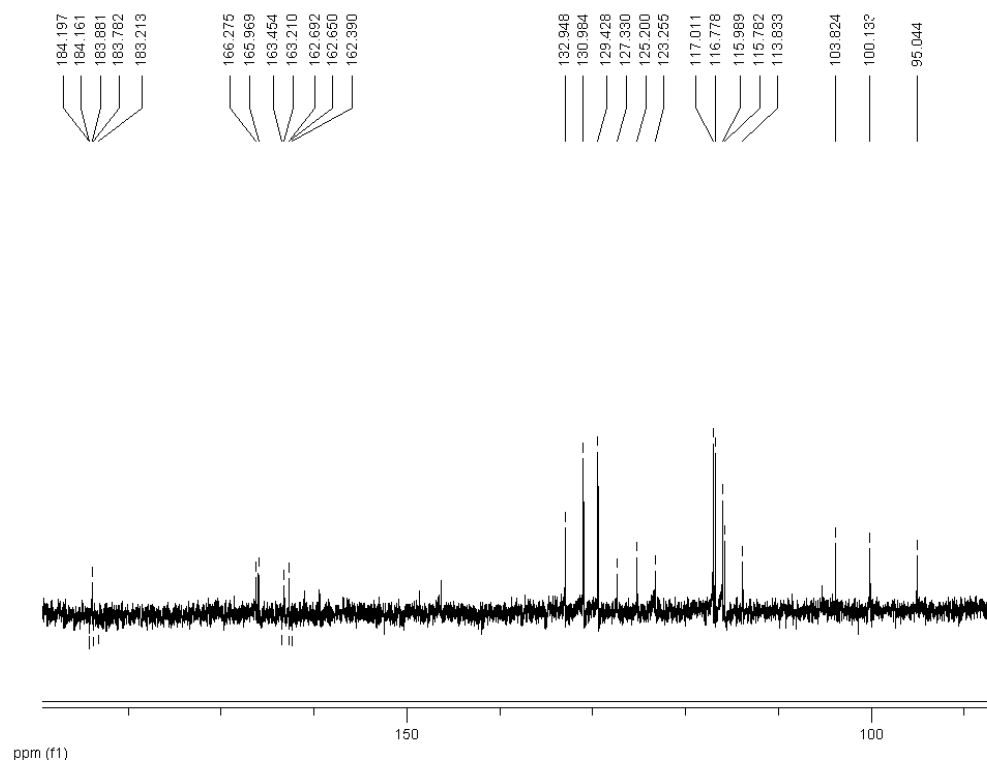
Posição	Isolados <i>C.mollis</i>		Dados da Literatura [78]	
	CM7	CM8	Apigenina	Acacetina
2	164,9	162,9	163,8	163,9
3	103,8	103,8	102,8	103,9
4	183,2	183,2	181,8	182,3
5	162,0	163,2	161,1	162,2
6	100,3	100,3	98,8	99,4
7	165,5	166,2	164,1	164,8
8	95,6	95,0	94,0	94,3
9	158,7	159,8	157,3	157,9
10	103,8	103,8	103,7	104,4
1'	125,2	123,2	121,3	123,5
2'	129,8	130,9	128,4	128,4
3'	117,3	115,7	116,0	114,8
4'	161,8	161,8	161,5	162,8
5'	117,3	115,7	116,0	114,8
6'	129,8	130,9	128,4	128,4
OCH <sub>3</sub>	-	56,4	-	56,8



**Figura 70.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CM7 e CM8 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]

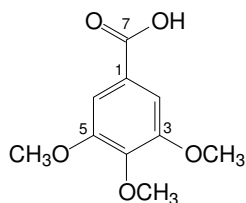


**Figura 71.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM7 e CM8 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz,]



**Figura 72.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM7 e CM8 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz,]

#### 4.1.8 Identificação Estrutural de CM9

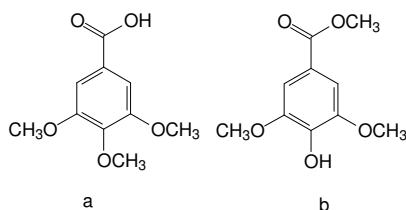


**CM9**

A substância CM9 foi identificada como ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico baseada em análise de dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB*), EM e através de modelos encontrados na literatura.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 74, pág. 82) foi verificado apenas dois sinais, sendo três singletos, um com integração para dois hidrogênios em  $\delta$  7,36, atribuído aos hidrogênios aromático nas posições 2 e 6 e os outros em  $\delta$  3,92 e  $\delta$  3,93 com integração três e seis hidrogênios que foram atribuídos a presença de três grupos metoxílicos.

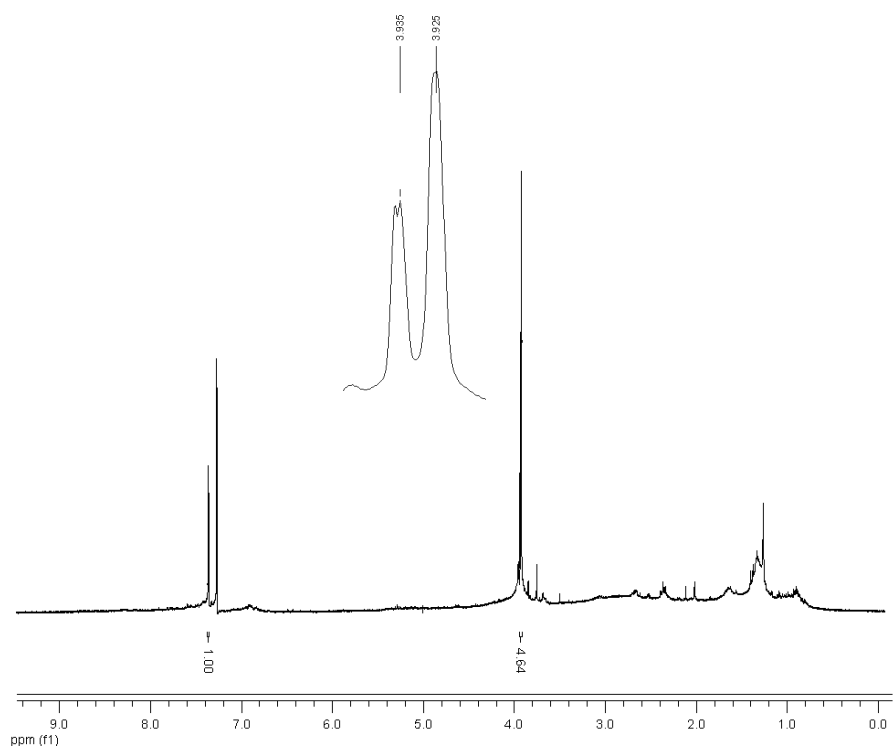
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 75, pág. 75) foi possível verificar e destacar os sinais em  $\delta$  107,3 atribuídos aos carbonos magneticamente equivalente nas posições 2 e 6 e a presença dos grupos metoxílicos em  $\delta$  56,2 e  $\delta$  60,9. Com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  concomitantemente com os dados apresentados no espectro de massas (Figura 76, pág. 83), que apresentou um íon *quasi*-molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  213 condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , são sugeridos duas estruturas para o composto (Figura 73).



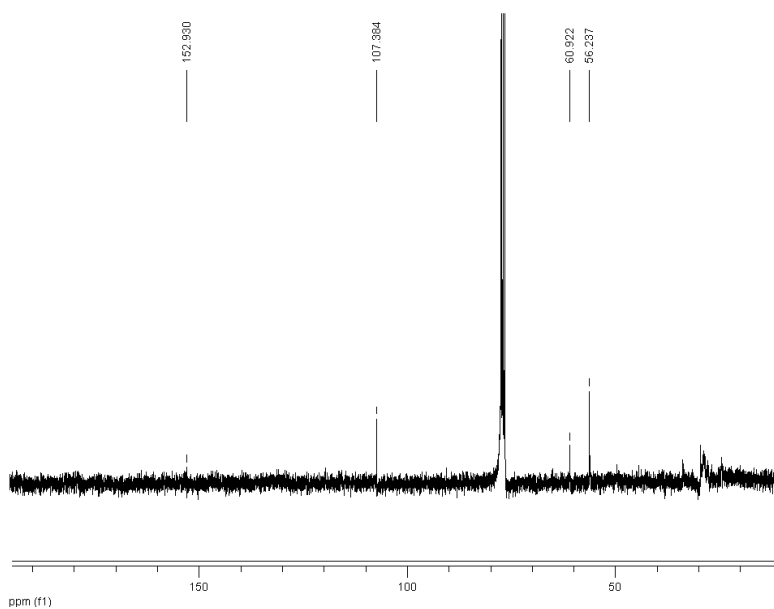
**Figura 73.** Estruturas proposta para CM9

Baseado nos valores de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentado para os grupos metoxílicos de **CM9** foi confirmado a estrutura (a) para o composto. Uma vez que nos modelos encontrado na literatura foi observado que quando o grupo metoxila se encontrava substituído na posição entre as outras duas metoxilas, o valor do deslocamento do carbono metoxílico aparece mais desprotegido. O que esta de acordo com o valor de deslocamento apresentado para este carbono no espectro de RMN, que foi de  $\delta$  60,9.

O ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico têm sido descrito de diversas espécies vegetais como por exemplo, *Piper solmsianum* (Piperaceae) [84].



**Figura 74.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  CM9 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]



**Figura 75.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CM9 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz]

<Spectrum>

Retention Time:0.917(Scan#:56)  
Max Peak:440 Base Peak:212.85(1412511)  
Spectrum:Averaged 0.700-1.350(43-82)  
Background:Averaged 0.200-0.553(13-34) Polarity:Neg Segment1 - Event1

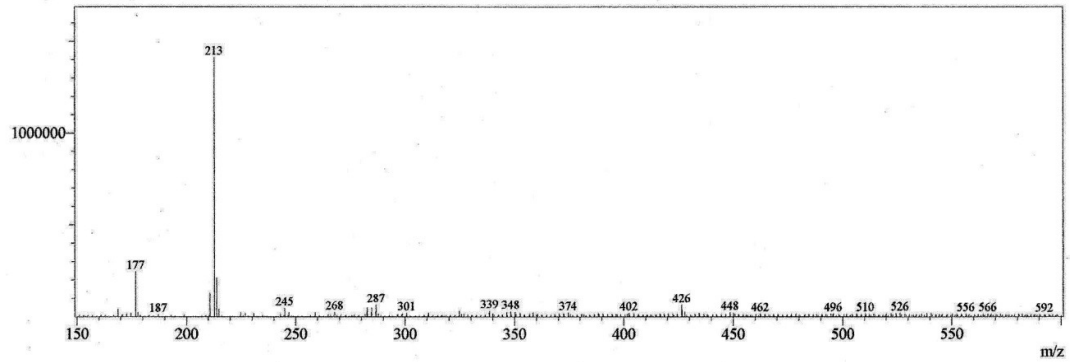
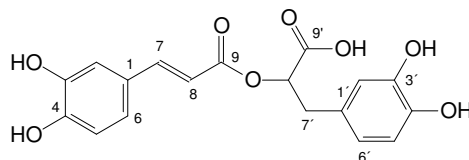


Figura 76. Espectro de massas de baixa resolução de CM9 [APCI (+)]

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *ERIOPE BLANCHETTI*

### 4.2.1 Identificação estrutural de EB1



**EB1**

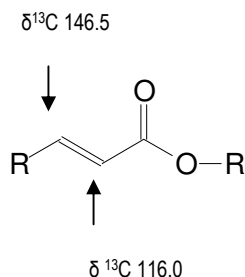
A identificação de **EB1** foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e DEPT), correlações observadas em técnicas espectrométrica de RMN bidimensionais (gCOSY, gHMQC, gHMBC) e através de comparação de dados da literatura [85].

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 79, pág. 90; Tabela 8, pág. 89) foi observado na região de absorção de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos a presença de dois dupletos, cujas constantes de acoplamento indicava acoplamento *meta* ( $J = 2,1$  Hz e  $J = 2,4$  Hz) em  $\delta$  7,03 e  $\delta$  6,79, respectivamente, bem como, dois duplos dupletos com constante *orto* e *meta* ( $J = 8,4$  e  $2,1$  Hz e  $J = 8,4$ ,  $2,1$  Hz) em  $\delta$  6,90 e  $\delta$  6,64. Além desses, pode-se observar dois dupletos em  $\delta$  6,78,  $J = 8,4$  Hz e  $\delta$  6,70 com  $J = 8,1$  Hz referente a presença de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituídos. Ainda neste espectro foi possível destacar a presença de dois dupletos em  $\delta$  6,28 ( $J = 15,9$  Hz) e  $\delta$  7,52 ( $J = 15,9$  Hz) integrando para um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios olefínicos do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado. Em face dos valores das constantes de acoplamentos apresentado para esses hidrogênios foi atribuído a geometria espacial *trans* para os mesmos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 81, pág.90) apresentou 18 sinais e com auxílio DEPT  $135^\circ$  (Figura 84, pág. 92) foram atribuídos como sendo um de carbono metilênico, nove carbonos metínicos e oito carbonos não hidrogenados. Assim no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível observar a presença de dois carbonos carbonílicos em  $\delta$  177,6 e  $\delta$  169,1. Também foi possível destacar no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a presença de sinais, característicos de sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado (Figura 77, pág. 88), em  $\delta$  146,5 e  $\delta$  116,0 atribuídos aos carbonos nas posições 7 e 8.

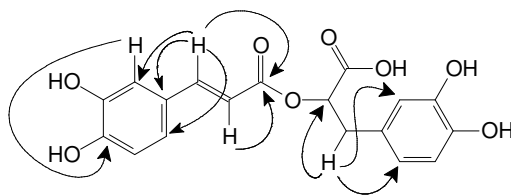


Os sinais dos hidrogênios com seus respectivos carbonos foram atribuídos através das correlações observadas no espectro bidimensional gHMQC (Figura 85, pág. 89).



**Figura 77.** Sistema insaturado conjugado com uma carbonila

Através do espectro gHMBC (Figura 83, pág. 91) foi possível observar correlações a longa distancia (Figura 78) que concomitantemente com os dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram crucias para identificação de **EB1** como sendo o ácido rosmarínico. A identificação do ácido rosmarínico foi corroborada através de comparação dos dados da literatura, bem como através de dados de espectrometria de massas, que apresentou os íons *quasi*-molecular  $[\text{M}-\text{H}]^-$  em  $m/z$  359, condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ .



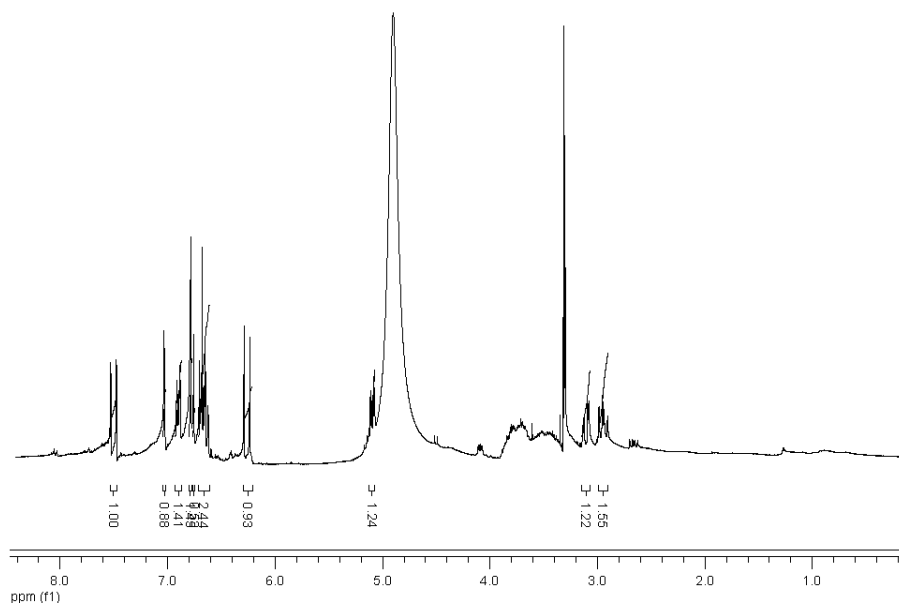
**Figura 78-** Correlações observadas no espectro gHMBC

O ácido rosmarínico embora seja um constituinte químico comum em espécies pertencente à família Lamiaceae e desperta grande interesse científico e comercial, em viurte principalmente das inúmeras atividades biológicas que apresenta, como por exemplo, antibacteriana, hepatoprotetora, cardioprotetora, antiinflamatória, antimiotóxica agindo contra venenos de serpentes [86] e, inibidora da HIV-Integrase [87]

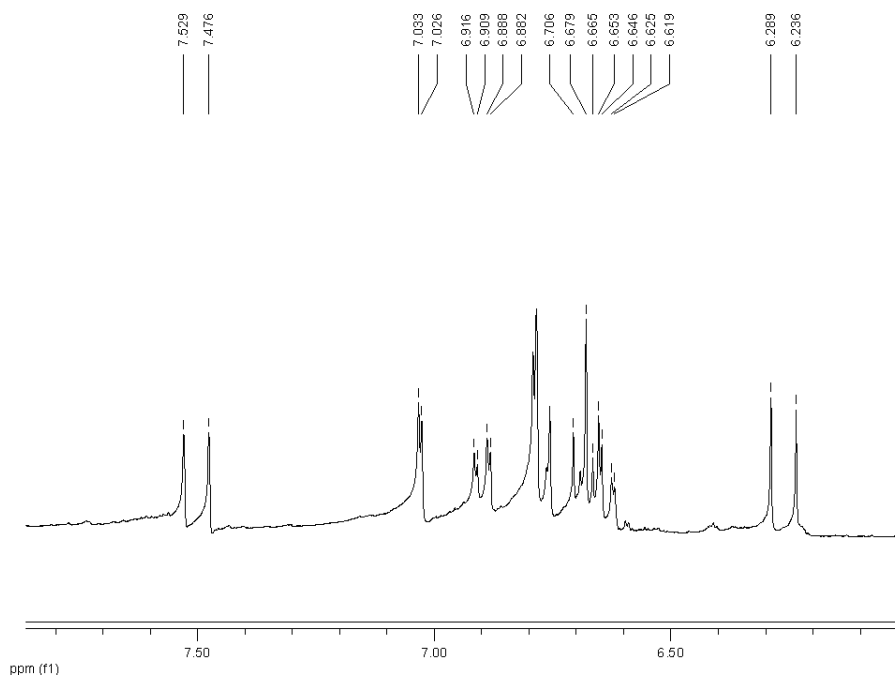
**Tabela 8.** Dados espectrométricos RMN  $^{13}\text{C}$  de **EB1** (300 MHz)

Posição	EB1*	[85]**
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}_*$
1	127,9	127,8
2	115,1	123,5
3	145,6	147,5
4	149,5	150,2
5	116,0	117,2
6	121,7	123,7
7	145,6	147,2
8	116,2	116,2
9	169,1	169,0
1'	131,1	131,5
2'	117,5	120,1
3'	146,5	147,4
4'	146,6	147,4
5'	116,4	116,4
6'	122,8	126,1
7'	38,7	39,5
8'	77,7	78,0
9'	177,6	177,8

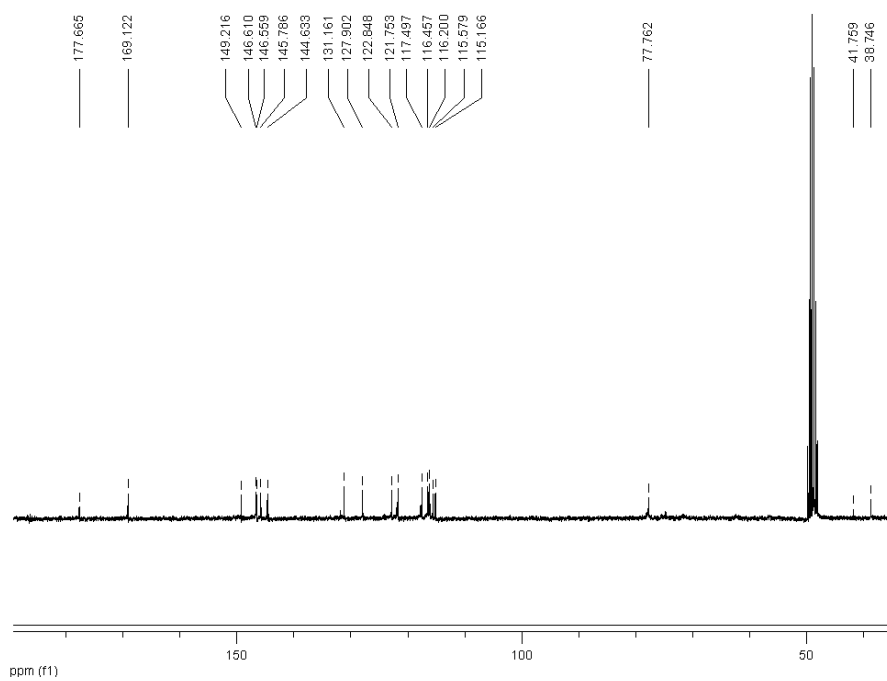
\* adquirido em  $\text{CD}_3\text{OD}$  \*\* adquirido em DMSO



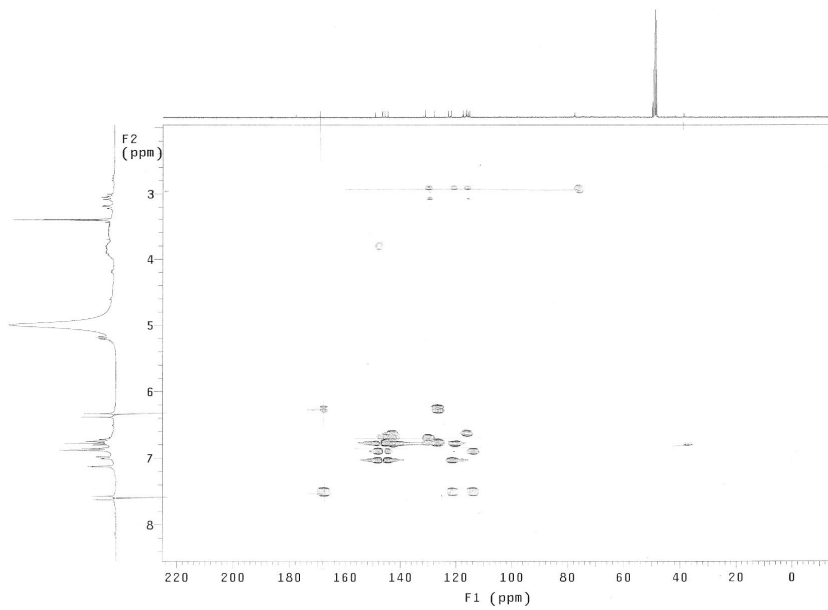
**Figura 79.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de EB1 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]



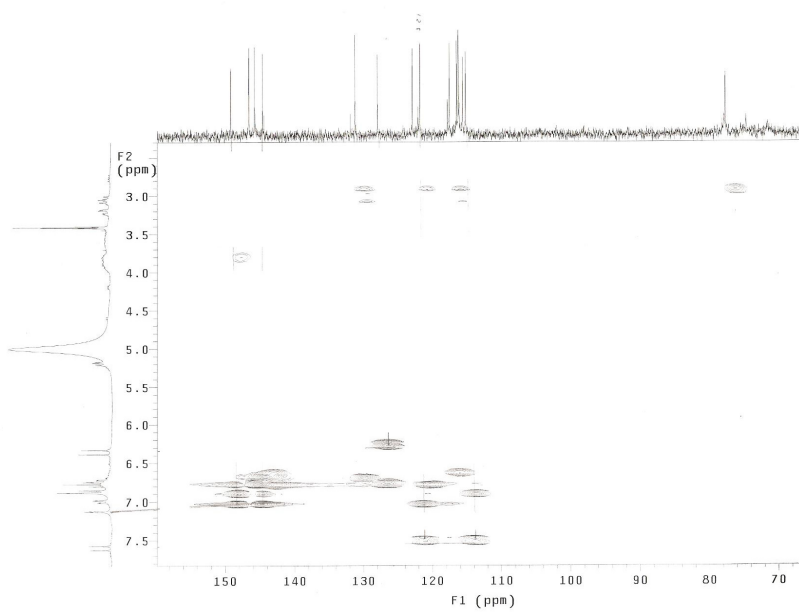
**Figura 80.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **EB1** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]



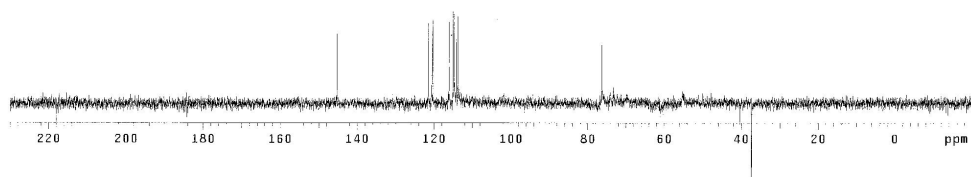
**Figura 81.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **EB1** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz].



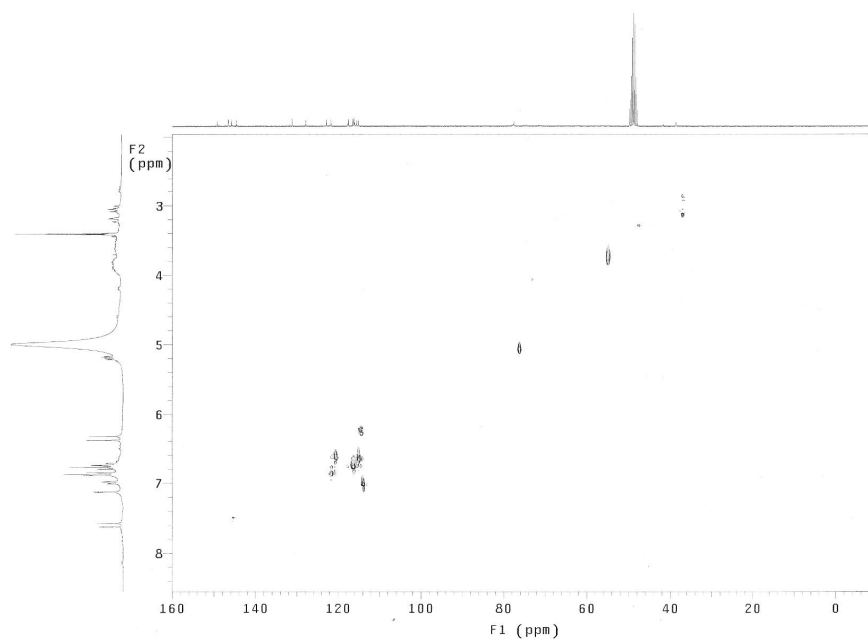
**Figura 82.** Espectro de gHMBC de **EB1** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)



**Figura 83.** Expansão do espectro de gHMBC de **EB1** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)

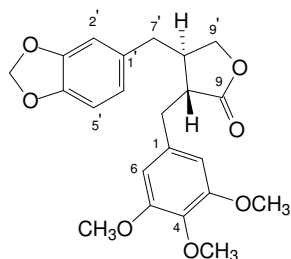


**Figura 84.** Espectro de RMN DEPT 135° de **EB1** [CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz]



**Figura 85.** Espectro de gHMQC de **EB1** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)

#### 4.2.2. Identificação estrutural de EB2



#### EB2

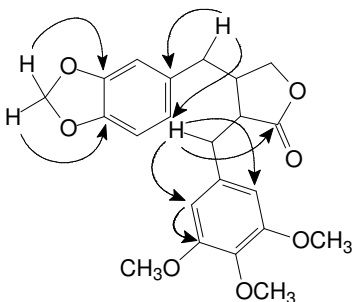
A identificação de **EB2** foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e DEPT), correlações observadas em técnicas espectrométrica de RMN bidimensionais (gCOSY, gHMQC, gHMBC) e através de comparação de dados da literatura [88].

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 87 e 88, pág. 95 e 96) foi observado a presença de um duplete em  $\delta$  6,34 ( $J = 2,3$  Hz) com integração para dois hidrogênios atribuído aos H-6 e H-2, um duplete em  $\delta$  6,46 ( $J = 2,3$  Hz) atribuído a H-2', um duplo duplete em  $\delta$  6,54 ( $J = 8,2$  e 2,3 Hz) atribuído ao hidrogênio na posição 6' e um duplete em  $\delta$  6,68 ( $J = 8,1$  Hz) atribuído ao hidrogênio na posição 5'. Além dos sinais para os hidrogênios aromáticos o espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou os sinais em  $\delta$  2,88,  $\delta$  2,53,  $\delta$  4,61,  $\delta$  2,27,  $\delta$  2,82 atribuídos aos H-7, H-8', H-9', H-8, H-7', respectivamente.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (*BB*) (Figura 89, pág. 96) foi observado a presença de 19 sinais que com o auxílio do DEPT  $135^\circ$  foram identificados como sendo quatro carbonos metilênicos, sete carbonos metínicos e sete carbonos não hidrogenados. Entre esses sinais registrados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível observar os sinais do carbono carbonílico em  $\delta$  178,4, do grupo metilenodioxí em  $\delta$  100,1, dos carbonos metoxilicos em  $\delta$  55,6 e  $\delta$  60,7, bem como os sinais de carbonos aromáticos entre  $\delta$  154,3 e  $\delta$  112,0.

Correlações importantes foram observadas nas séries de espectros bidimensionais que quando analisados em conjunto com os dados encontrados na literatura tornou possível identificar o composto **EB-2** como a yateína. Assim, as correlações observada no espectro gHMBC (Figuras 91 e 92, pág. 94) que estão sumarizada na figura 86 auxiliaram na identificação dessa substância.

A atribuição dos carbonos com o seus respectivos hidrogênios foi realizada através do das correlações encontradas no espectro de gHMQC (Figura 93 e 94, pág. 98).



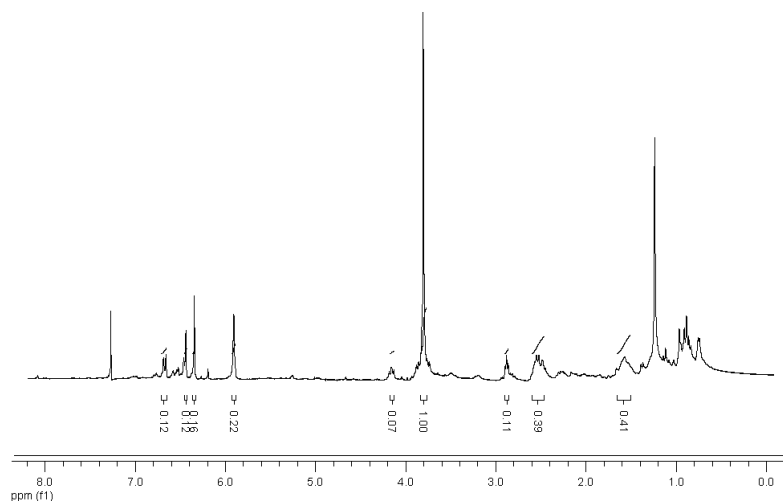
**Figura 86-** Correlações observadas no espectro gHMBC

A configuração relativa de **EB-2** foi determinada através de correlações observada no espectro NOESY. Neste espectro foram observadas interações espaciais de H-6' com H-3 e H-2, indicando que esses hidrogênios encontram-se na mesma face. A comparação com dados da literatura também permitiu assinalar a configuração relativa de **EB-2**.

Destaca-se que a Yateina é considerada um dos compostos precursores da rota biosintética da lignana podofilotoxina. Além disso, à ela tem sido atribuídas algumas atividades biológicas e farmacológicas, tais como ação antiviral [88].

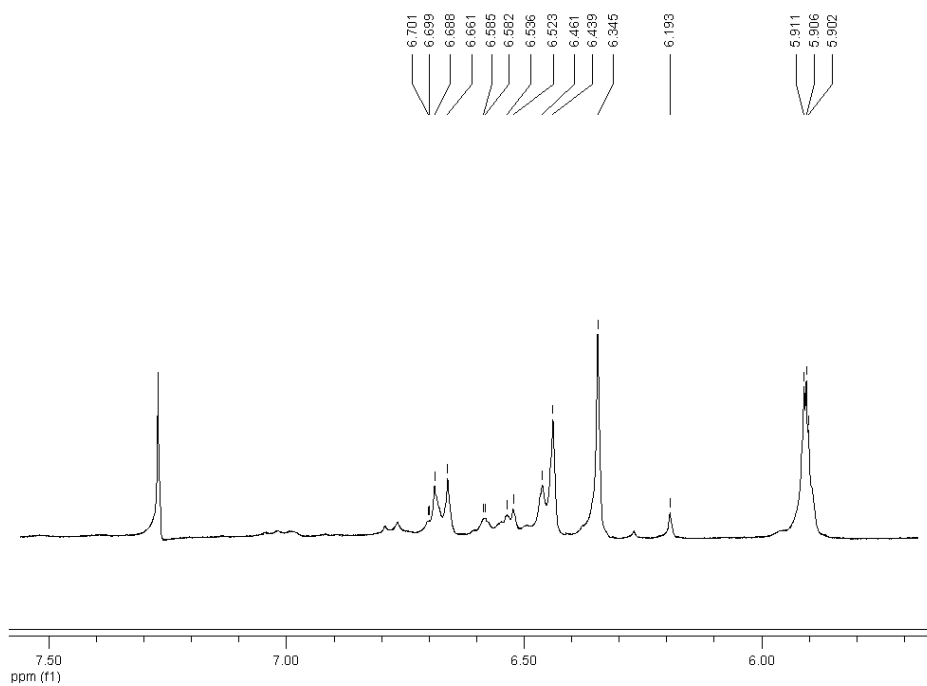
**Tabela 9.** Dados espectrométricos de RMN  $^{13}\text{C}$  de EB2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Posição	EB-2	[88]
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	131,4	131,9
2	106,0	106,2
3	153,1	153,2
4	136,6	136,8
5	153,1	153,2
6	106,0	106,2
7	35,1	35,2
8	46,4	46,4
9	178,5	178,5
1'	133,2	133,3
2'	108,6	108,8
3'	147,8	147,9
4'	146,2	146,4
5'	108,2	108,2
6'	121,4	121,5
7'	38,2	38,3
8'	40,9	41,0
9'	71,1	71,1
$\text{OCH}_3$	56,0	56,1
$\text{OCH}_3$	56,0	56,1
$\text{OCH}_3$	60,7	60,8
$\text{OCH}_2\text{O}$	100,1	101,0

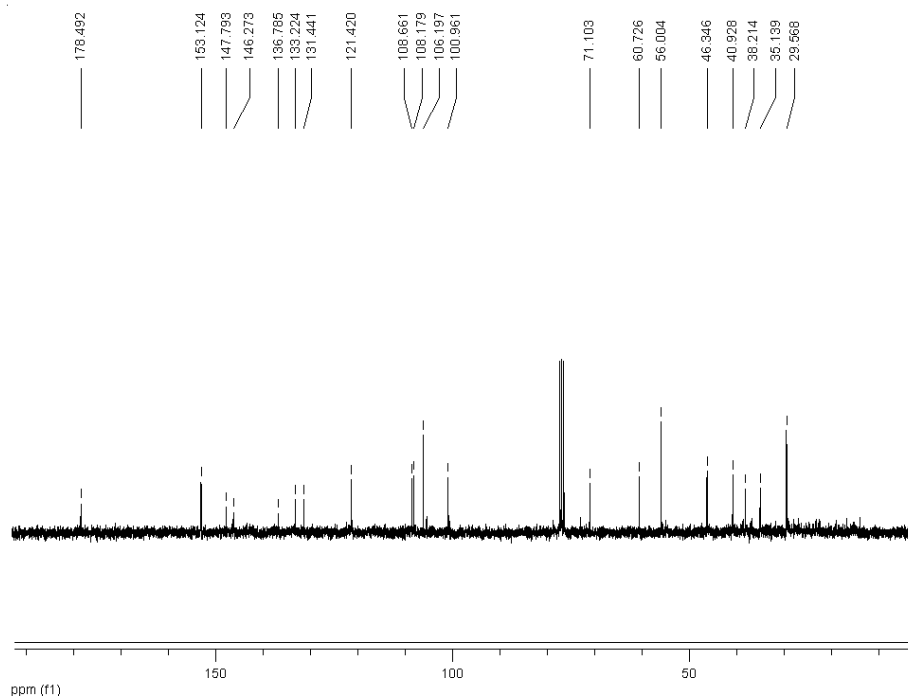


**Figura 87.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de EB2 [ $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz]





**Figura 88.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **EB2** [ $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz]



**Figura 89.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **EB2** [ $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz].

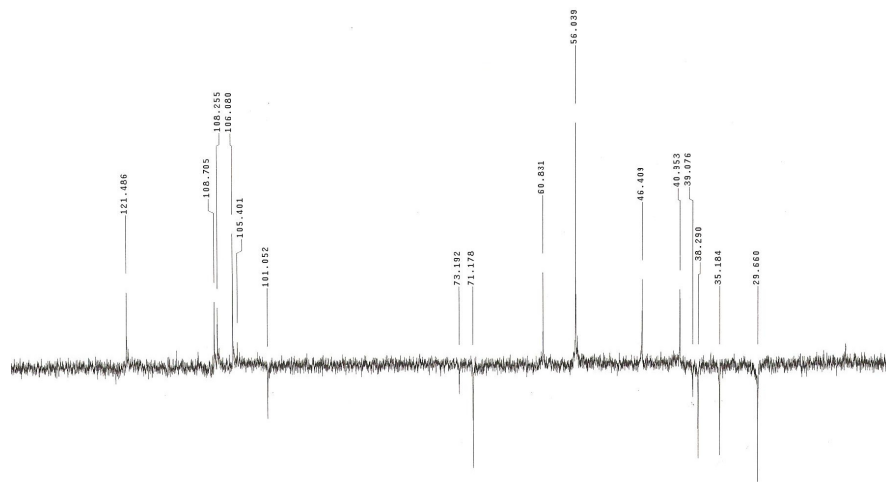


Figura 91. Espectro de DEPT 135° de **EB2** [CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz].

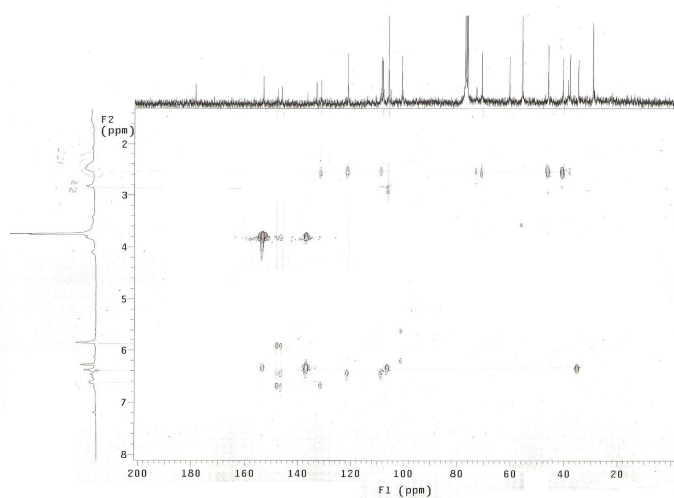


Figura 91. Espectro de gHMBC de **EB2** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

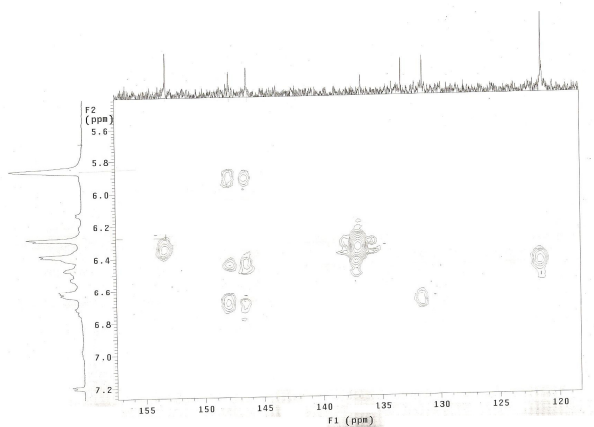
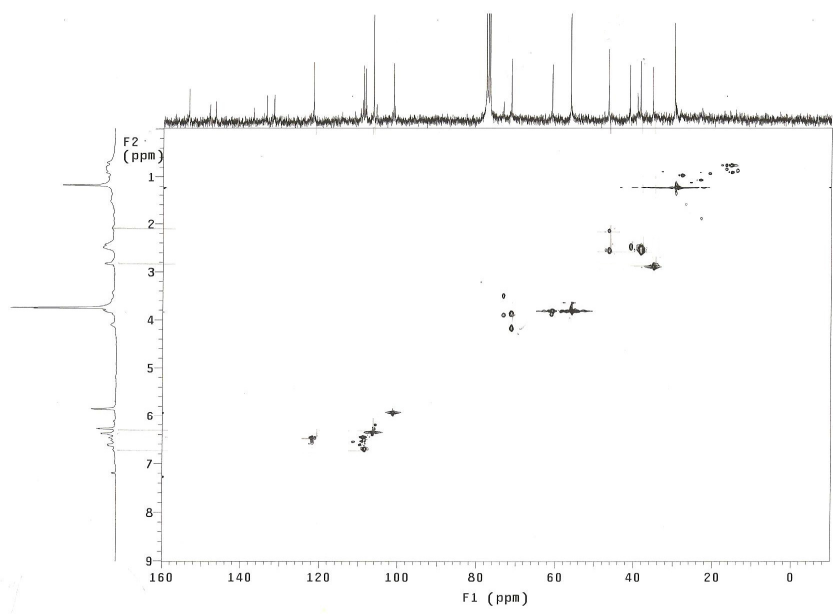
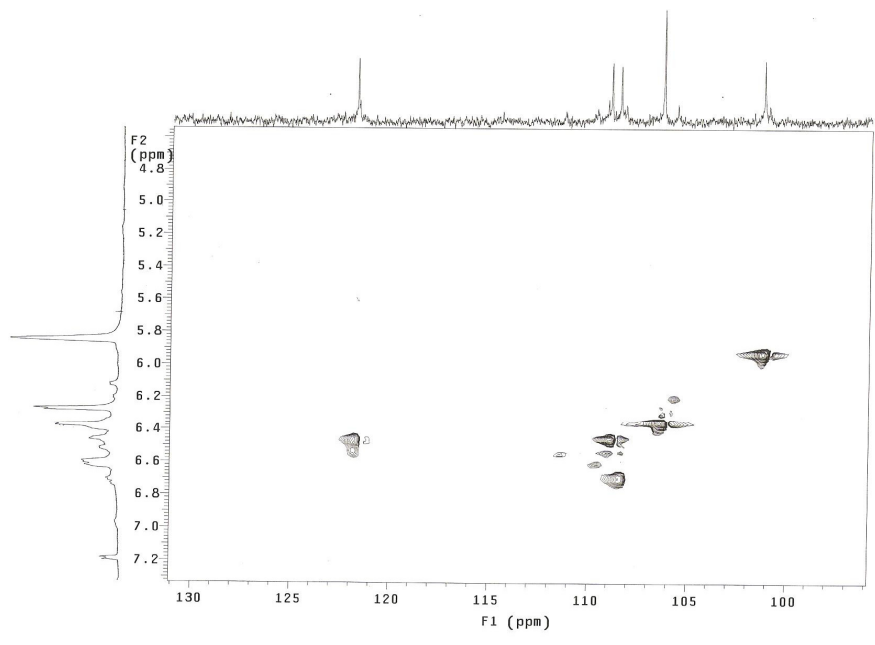


Figura 92. Expansão do Espectro de gHMBC de **EB2** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

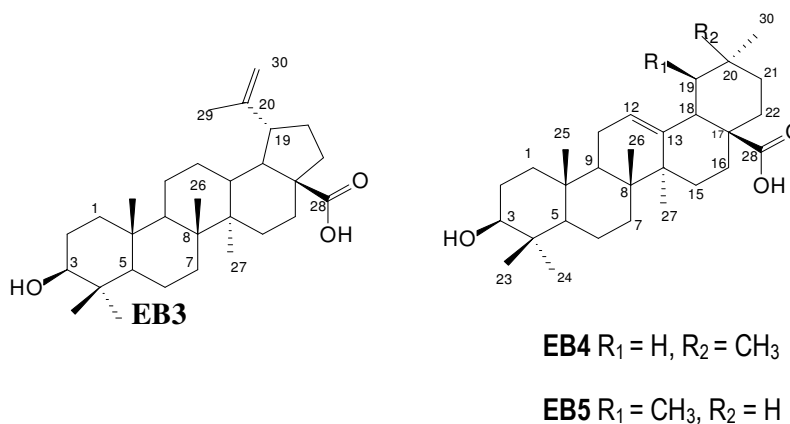


**Figura 93.** Espectro de gHMBC de **EB2** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)



**Figura 94.** Expansão do Espectro de gHMBC de **EB2** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

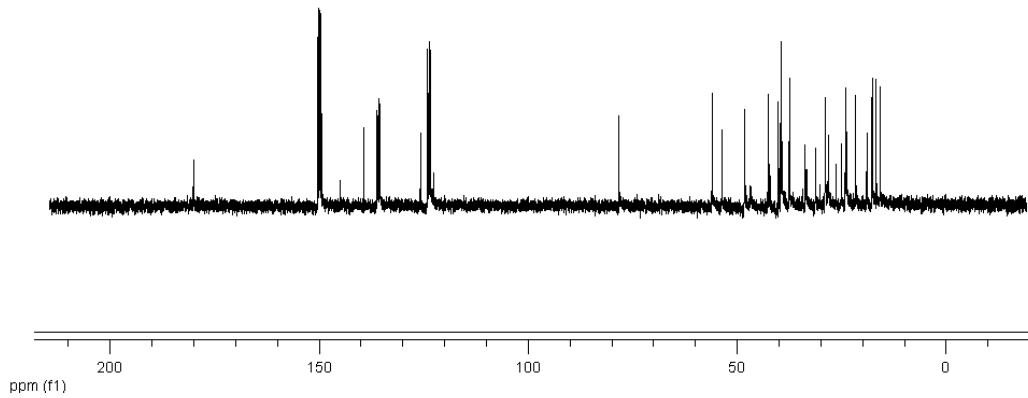
#### 4.2.3. Identificação estrutural de EB3, EB4 e EB5



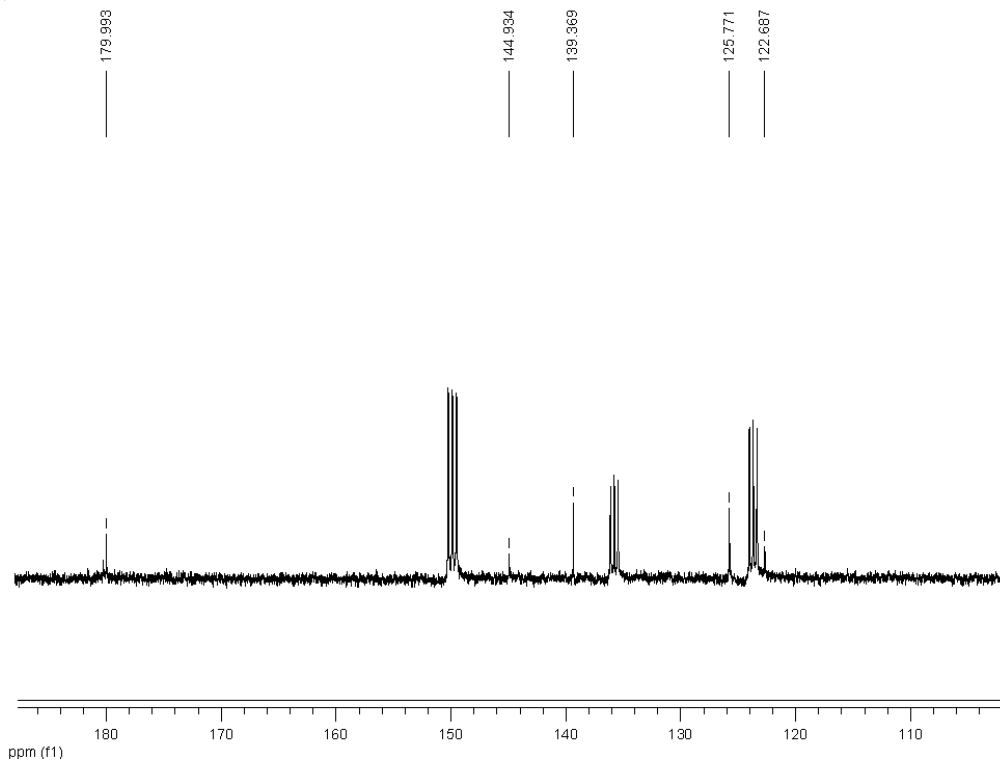
Os compostos **EB-3**, **EB-4** e **EB5** foram identificados como ácido betulínico (ácido 3 $\beta$ , hidroxilup-20(29)-en-28-oico), ácido oleanóico (ácido 3 $\beta$ , hidroxiolean-12-en-28-oico) e ácido ursólico (ácido 3 $\beta$ , hidroxieurs-12-en-28-oico), respectivamente. Esta identificação foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e *DEPT*) e principalmente através de comparação de dados publicados na literatura [89].

Os sinais observados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 95, 96, 97 e 98, pág. 101 e 102) para os carbonos olefínicos desses triterpenos foram pontos cruciais para identificação dos mesmos. Assim, no espectro RMN-*BB* pode-se observar os sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  110,5 e  $\delta$  150,2 do ácido betulínico, em  $\delta$  122,7 e  $\delta$  144,9 do ácido oleanóico e em  $\delta$  125,7 e  $\delta$  139,3 do ácido ursólico. Ainda neste espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foram registrados os sinais dos grupos carbonílicos presentes em suas estruturas em  $\delta$  179,9,  $\delta$  179,9 e  $\delta$  178,9, respectivamente. Na tabela 10 na página 103 estão os valores de deslocamentos químicos encontrados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ .

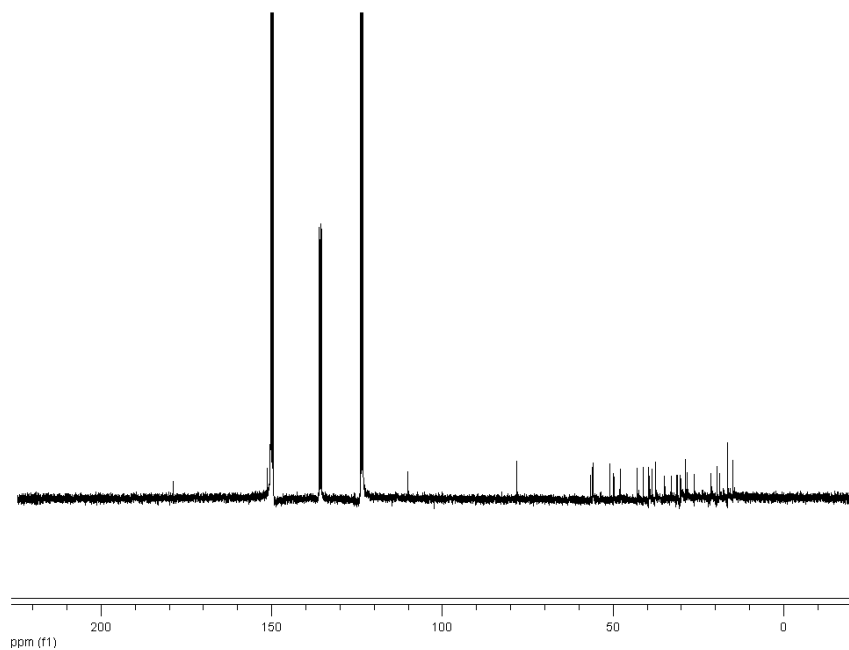
Encontrados em diversas espécies vegetais, entre as quais *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Salvia sclarea* L. todas pertencentes a família Lamiaceae [90], esses triterpenos pentacíclicos possuem diversas propriedades biológicas e farmacológicas por exemplo, o ácido betulínico mostra ter propriedade anti-HIV [91] e atividade anti-cancer [92].



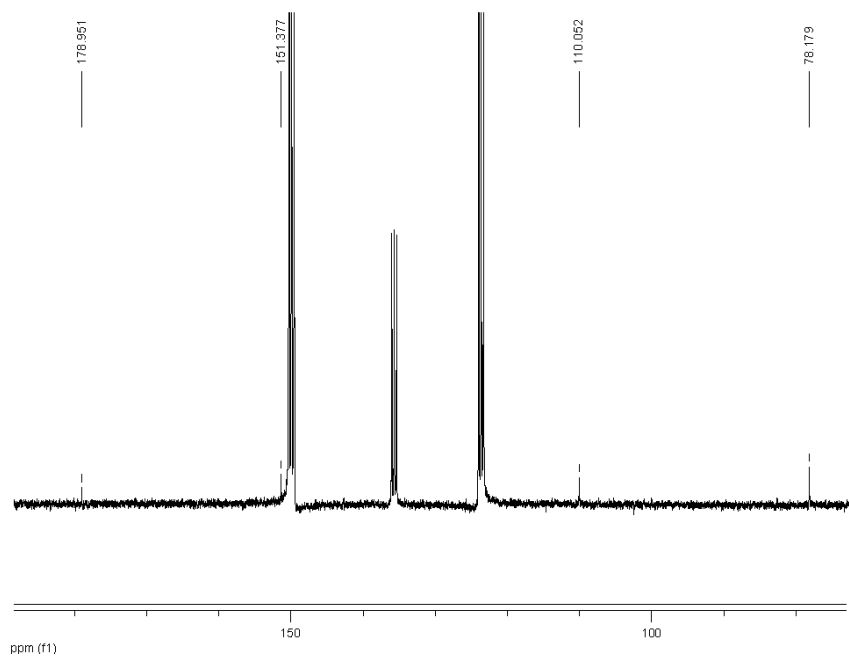
**Figura 95.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura de **EB4** e **EB5** [ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz].



**Figura 96.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura de **EB4** e **EB5** [ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz].



**Figura 97.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de EB3 [ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz].

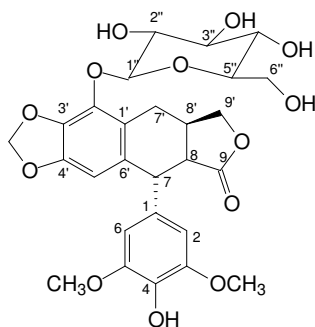


**Figura 98.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de EB3 [ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz].

**Tabela 10.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

Posição	E.B.			[89]		
	EB3	EB-4	EB5	Ac.	Ac.	Ac.
				Betunilico	Oleanóico	Ursólico
$\delta^{13}\text{C}$						
1	38,5	38,8	39,5	38,5	38,5	39,2
2	27,2	27,3	28,6	27,2	27,4	28,2
3	78,1	78,8	78,0	78,1	78,7	78,1
4	38,6	38,8	39,5	38,6	38,7	39,6
5	54,9	55,5	55,1	54,9	55,2	55,9
6	18,0	18,4	18,7	18,0	18,3	18,8
7	34,0	33,0	33,7	34,0	33,1	33,7
8	40,3	39,6	40,1	40,3	39,3	40,1
9	49,9	47,5	48,1	49,9	47,6	48,1
10	37,6	37,0	37,5	37,6	37,0	37,5
11	20,5	23,3	23,7	20,5	23,1	23,7
12	25,1	122,7	125,7	25,1	122,1	125,7
13	38,3	144,9	139,3	38,3	143,4	139,3
14	41,9	41,2	42,6	41,9	41,6	42,6
15	30,1	28,2	28,8	30,1	27,7	28,8
16	31,7	41,6	25,0	31,7	41,6	25,0
17	55,4	48,1	48,1	55,4	46,6	48,1
18	46,6	41,3	53,6	46,6	41,3	53,6
19	48,5	45,8	39,5	48,5	45,8	39,5
20	150,2	30,6	39,4	150,2	30,6	39,4
21	29,1	33,8	31,1	29,1	33,8	31,1
22	36,7	32,3	37,4	36,7	32,3	37,4
23	28,0	28,1	28,8	28,0	28,1	28,8
24	15,7	15,6	16,5	15,7	15,6	16,5
25	15,8	15,3	15,8	15,8	15,3	15,7
26	15,9	16,9	17,5	15,9	16,8	17,5
27	14,3	26,0	24,0	14,3	26,0	24,0
28	178,7	180,0	179,9	180,7	181,0	179,7
29	110,5	33,1	17,5	109,5	33,1	17,5
30	19,0	21,2	21,4	19,0	23,6	21,4

#### 4.2.4. Identificação estrutural de EB6



**EB-6**

A identificação de **EB-6** como  $\alpha$ -peltatina-5-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi baseada na análise de dados de experimentos de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (*BB* e DEPT), correlações observadas em técnicas bidimensionais de RMN (gCOSY, gHMQC, gHMBC), espectrometria de massas e através de comparação de dados da literatura.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 101, pág.107) foi observada a presença de um singlete em  $\delta$  3,89 correspondendo para seis hidrogênios, atribuído a presença de dois grupos metoxílicos, um duplete integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  5,97 atribuído ao grupo metilenodioxí. Na região de absorção de hidrogênios aromáticos foram observados um simpleto em  $\delta$  6,34 atribuído ao H-5' demonstrando a presença de um anel benzênico pentasubstituído e um duplete  $\delta$  6,47 ( $J = 2,3$  Hz) com integração para dois hidrogênios denotando a existência de dois hidrogênios quimicamente equivalentes e conseqüentemente a presença de um outro anel benzênico 1,3,4,5 tetrasubstituído.

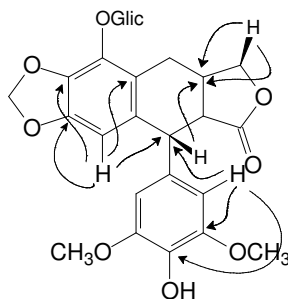
O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 102, pág.107) apresentou 22 sinais, que com o auxílio do experimento de DEPT 135° (Figura 106, pág. 109) foram distinguidos como quatro carbonos metilênicos, nove metínicos e dez carbonos não hidrogenados. Entre os sinais registrados nos espectro de RMN <sup>13</sup>C pode-se destacar aquele em  $\delta$  55,4 ratificando a presença dos grupos metoxílicos, o sinal em  $\delta$  179,0 destacando a presença do grupo carbonílico e o sinal em  $\delta$  101,1 que foi atribuído a presença do carbono metilienodioxí. Ainda neste espectro foi possível observar a presença dos sinais em  $\delta$  101,4,  $\delta$  76,6,  $\delta$  73,9,  $\delta$  69,9,  $\delta$  61,0 atribuídos ao açúcar, que através de comparação dos dados da literatura foi identificado como sendo a glicose.

As correlações observadas nas séries de espectros bidimensionais (gHMBC, <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY e gHMQC) foram cruciais para a elucidação e identificação estrutural de



**EB6.** O espectro de gHMBC (Figura 103, pág. 108) mostrou correlações importantes que corroboraram a identificação de **EB6** (Figura 99), sendo as principais aquela entre H-5' ( $\delta$  6,34 ) com C-4' ( $\delta$  147,9), C-3', C-6' e C-7; H-2 ( $\delta$  6,44) com C-3, C-7; H-6 (6,44) com C-5, C-4, C-7; H-7 com C-8'; H-9' com C-8 e C-8'.

Com o espectro de gHMQC (Figura 105, pág.109) permitiu correlacionar os sinais dos hidrogênios com seus respectivos carbonos (Tabela 11, pág.106).

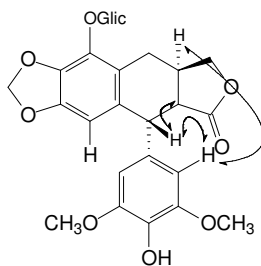


**Figura 99.** Correlações observadas no espectro bidimensional gHMBC

A localização da posição do grupamento do açúcar (glicose) foi realizada através da observação da correlação no espectro gHMBC entre o sinal do hidrogênio anomérico em  $\delta$  5,39 e o carbono na posição C-2' ( $\delta$  137,4).

A configuração relativa do C-7 e do C-8' de **EB-6** foram determinadas através de correlações observadas no espectro NOESY (Figura 108, pág. 110). Nesse espectro foram observadas interações espaciais de H-6 com H-7, H-8' e H-7 com H-8 (Figura 100) indicando que o H-8 e o grupo fenil encontram-se na mesma face e, assim o H-7 e H-8 encontram-se na posição equatorial.

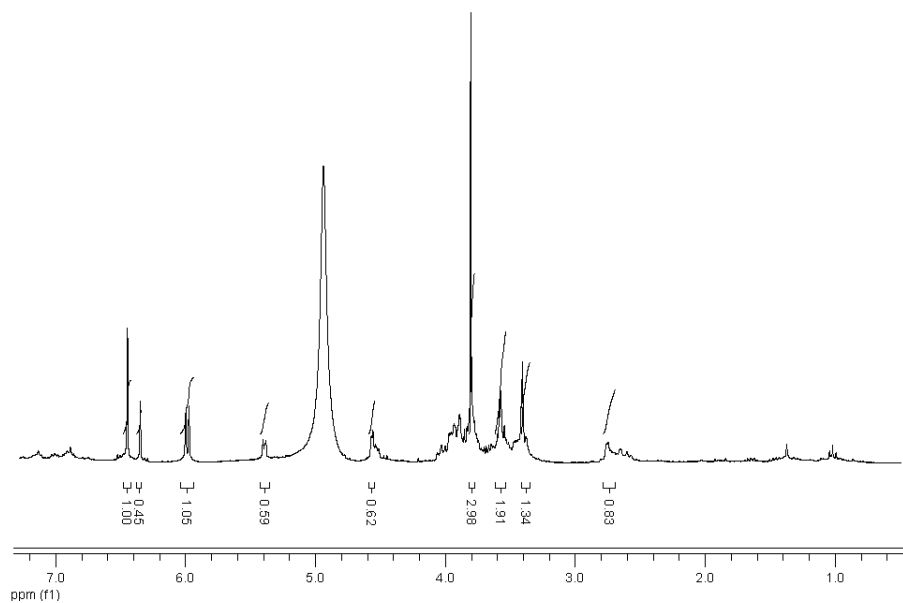
O -  $\alpha$ -peltatina-5-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo foi isolado anteriormente de *Podophyllum peltatum* L[93].



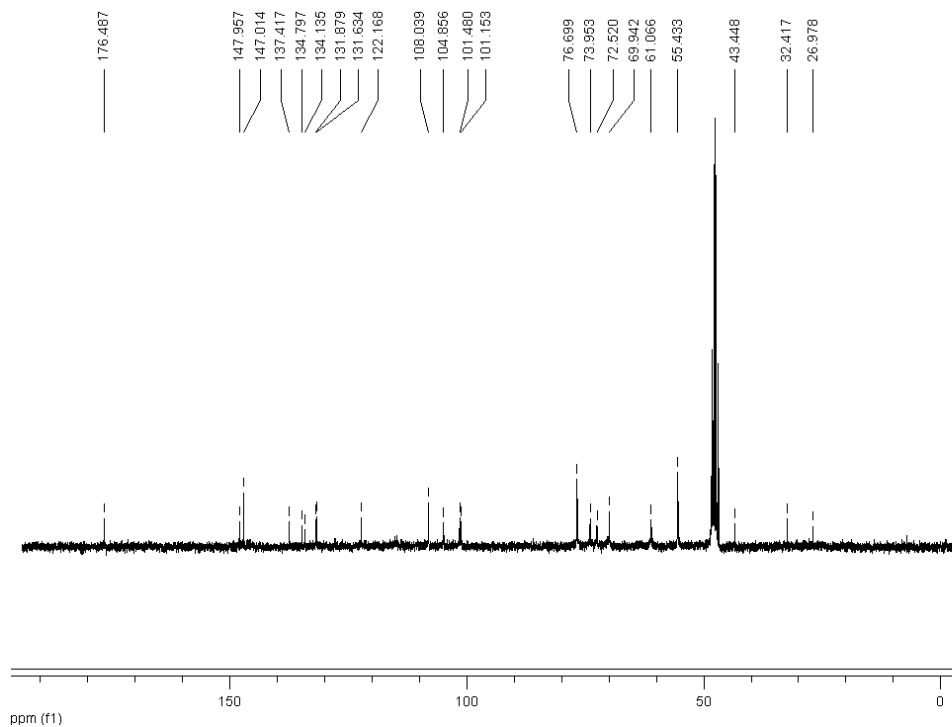
**Figura 100-** Correlações significativas observadas no NOESY de **EB-6**

**Tabela 11.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  [(300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] de **EB-6**

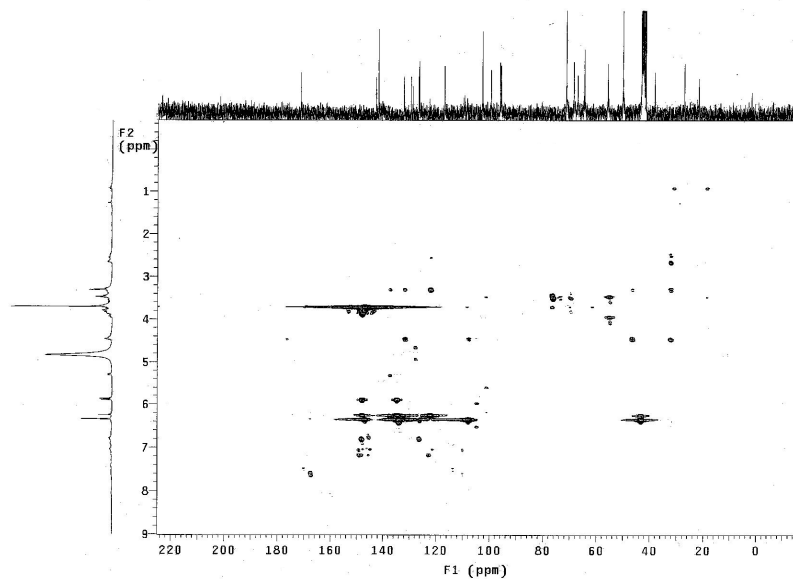
Posição	EB6	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	137,4
2	6,44 ( <i>d</i> , 2,3 Hz)	108,0
3	-	147,0
4	-	131,6
5	-	147,0
6	6,44 ( <i>d</i> , 2,3 Hz)	108,0
7	2,74 ( <i>m</i> )	43,4
8	3,3 ( <i>m</i> )	48,1
9	-	176,4
1'	-	122,1
2'	-	137,4
3'	-	134,1
4'	-	147,9
5'	6,34 ( <i>s</i> )	104,8
6'	-	134,7
7'	3,4 ( <i>m</i> )	26,9
8'	2,71 ( <i>m</i> )	32,5
9'	3,5 ( <i>m</i> )	72,5
1''	5,21 ( <i>d</i> , 7,2)	104,2
2''	3,24-3,61	75,6
3''	3,24-3,61	78,0
4''	3,24-3,61	71,1
5''	3,24-3,61	78,0
6''	3,72 ( <i>dd</i> , 12, 2,4 Hz)	61,0



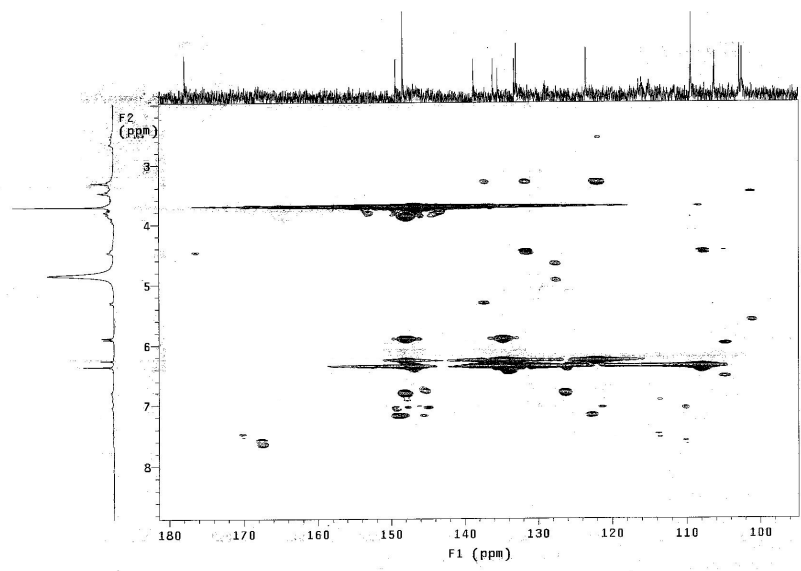
**Figura 101.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de EB6 [CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz]



**Figura 102-** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de EB6 [CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz]

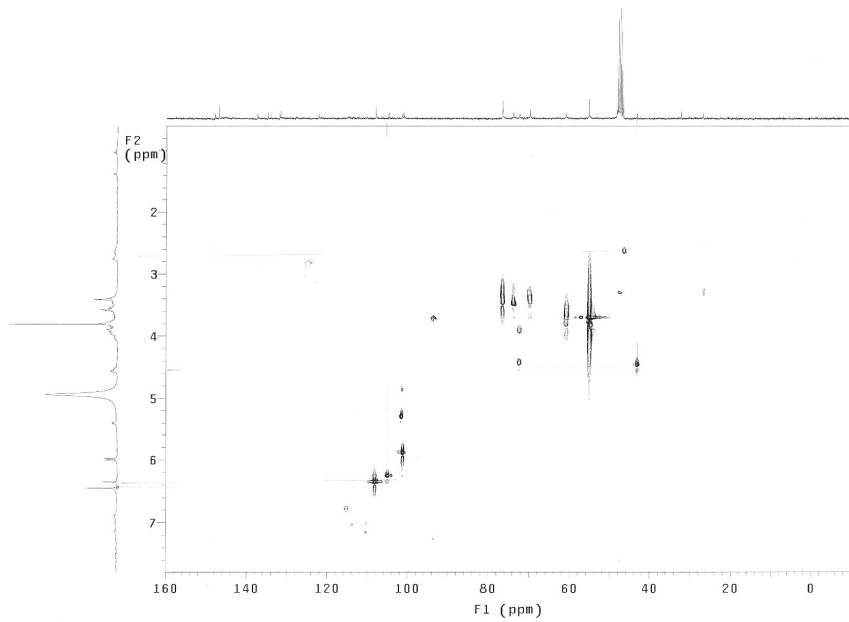


**Figura 103.** Espectro de gHMBC de **EB6** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)

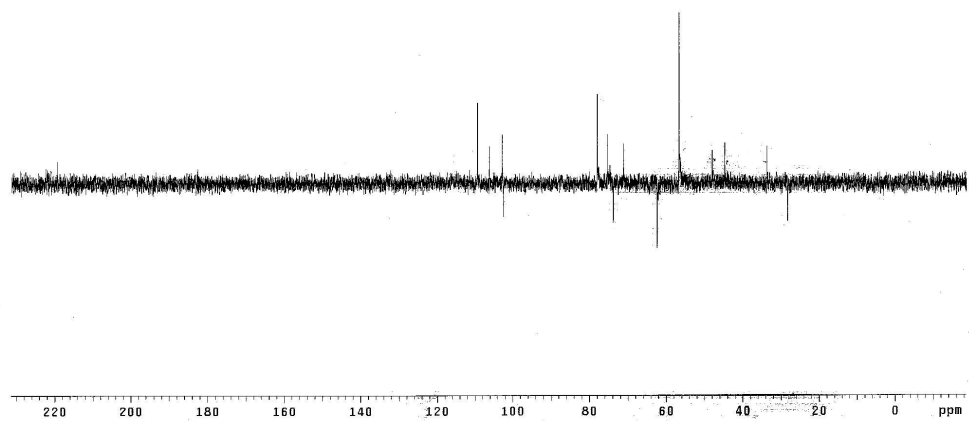


MHz)

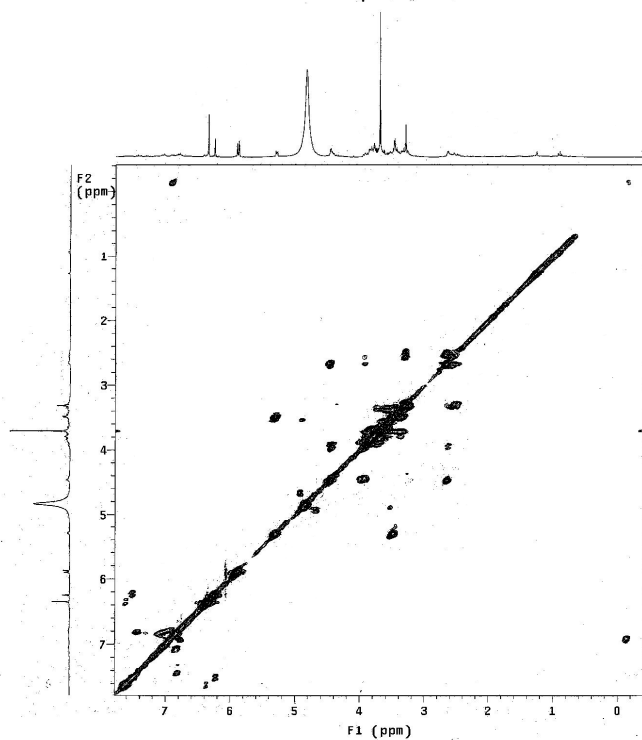
**Figura 104.** Expansão do Espectro de gHMBC de **EB6** (CD<sub>3</sub>OD, 300



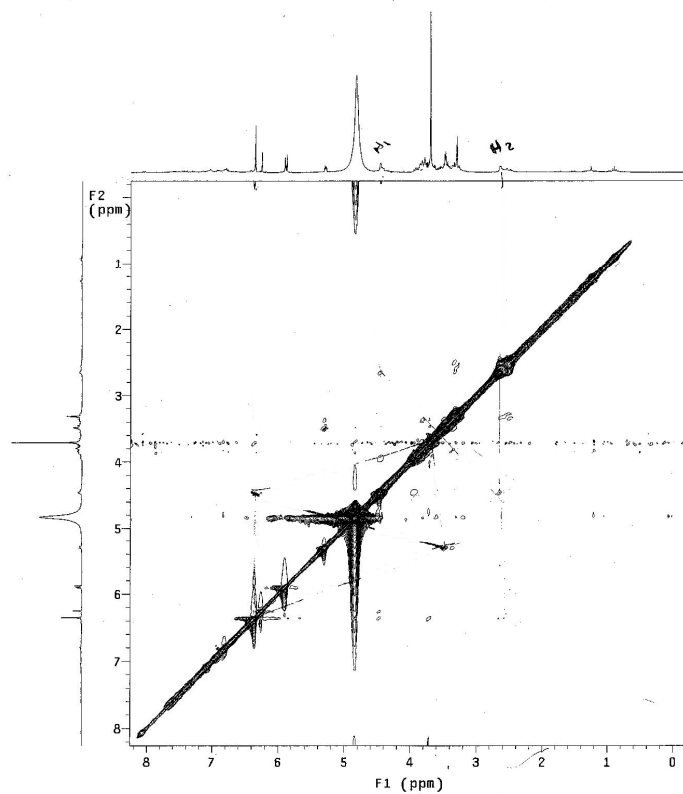
**Figura 105.** Espectro de gHMQC de **EB6** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)



**Figura 106.** Espectro de DEPT  $135^\circ$  de **EB6** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz].

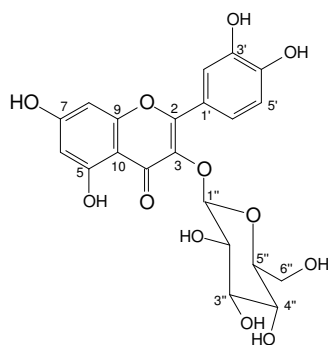


**Figura 107.** Espectro de gCOSY de EB6 [CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz].



**Figura 108.** Espectro de gNOESY de EB6 [CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz].

#### 4.2.5. Identificação estrutural de EB7



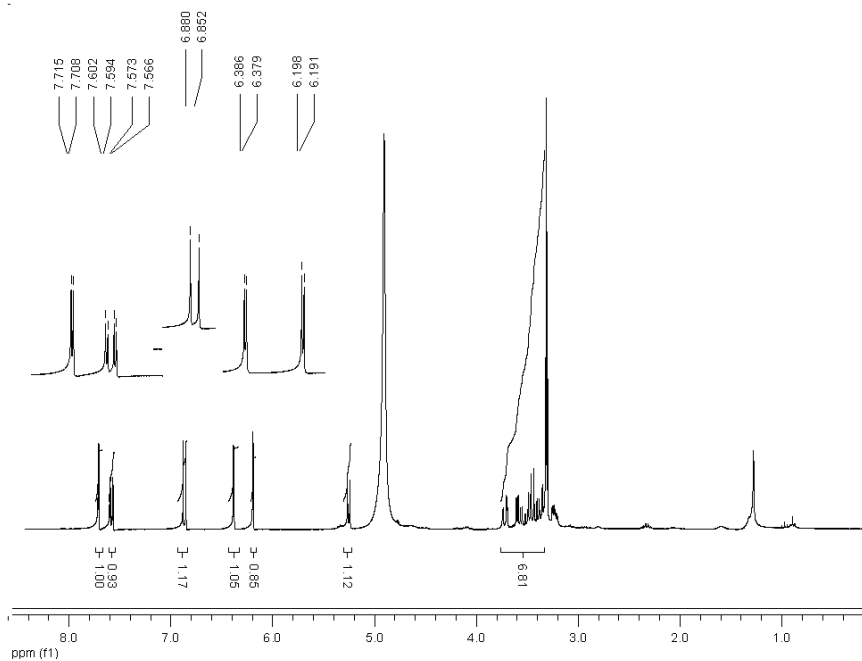
**EB7**

A identificação de **EB-7** como Quercetina-3-*O*- $\beta$ -*D*-glicopiranosídeo, também conhecida como quercetrina, foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e DEPT), correlações observadas em técnicas bidimensionais (gHMQC, gHMBC) e através de comparação de dados da literatura [94] [95].

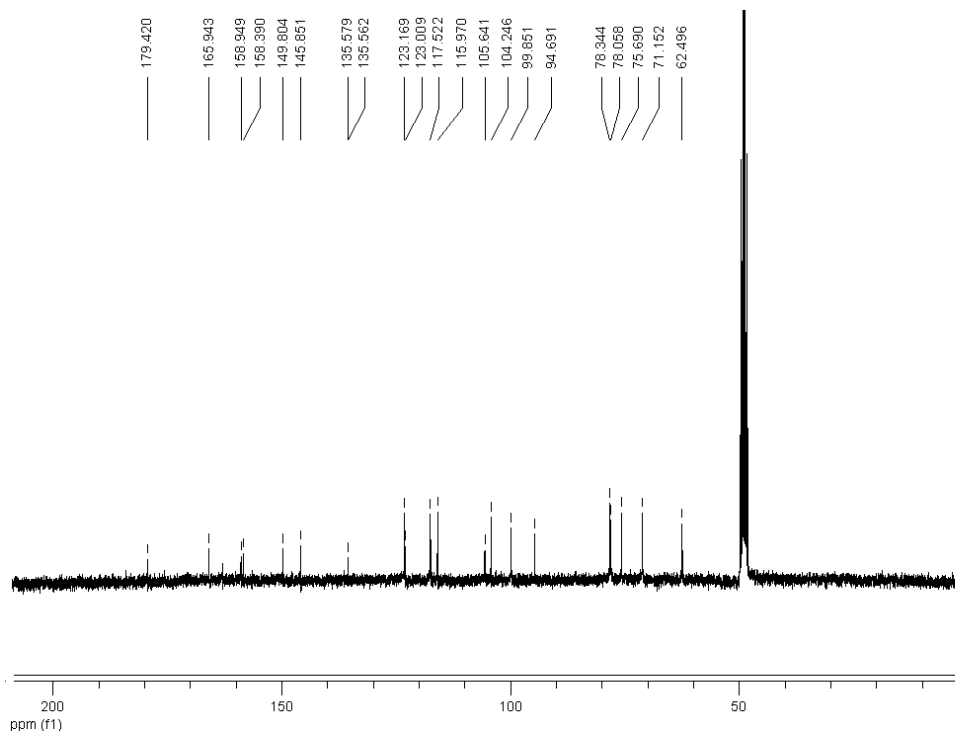
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 109, pág.112) apresentou sinais na região de absorção de hidrogênio aromáticos, onde se podem destacar dois dupletos em  $\delta$  6,38 e  $\delta$  6,19 ( $J = 2,1$  Hz, cada), determinando o anel A como sendo 1,3,5,6 tetrasubstituído. O anel B foi determinado como 1,3,4 trissubstituído devido a presença de um duplo duplete em  $\delta$  7,59 ( $J = 8,7$  e  $2,4$  Hz), um duplete em  $\delta$  6,88 ( $J = 8,4$  Hz) e um duplete em  $\delta$  7,71 ( $J = 2,1$  Hz). Este ainda apresentou sinais, na região entre  $\delta$  3,24-3,61, característicos para hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, bem como um duplete em  $\delta$  5,26 ( $J = 7,5$  Hz) característico de hidrogênio anomérico de  $\beta$ - glicosídeo.

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 110, pág.112) apresentou 21 sinais, que através de comparação dos dados RMN  $^{13}\text{C}$  da literatura tornou possível a identificação de **EB7** como um flavonol glicosilado.

A unidade glicosídica foi identificada como sendo a glicose, pela presença do carbono oximetilênico em  $\delta$  62,5 atribuído ao C-6'' e por comparação com dados da literatura para este glicosídeo [96]. A atribuição dos carbonos com seus respectivos hidrogênios foram realizados com auxílio do gHMQC (Figura 112, pág.113). O espectro de gHMBC ( Figura 111, pág.113) corroborou a estrutura proposta para **EB7** através das correlações apresentadas, bem como possibilitou a localização da ligação glicosídica, a partir da correlação observada ( $^3J$ ) entre o H-1'' ( $\delta$  5,26) com o C-3 ( $\delta$  135,6).

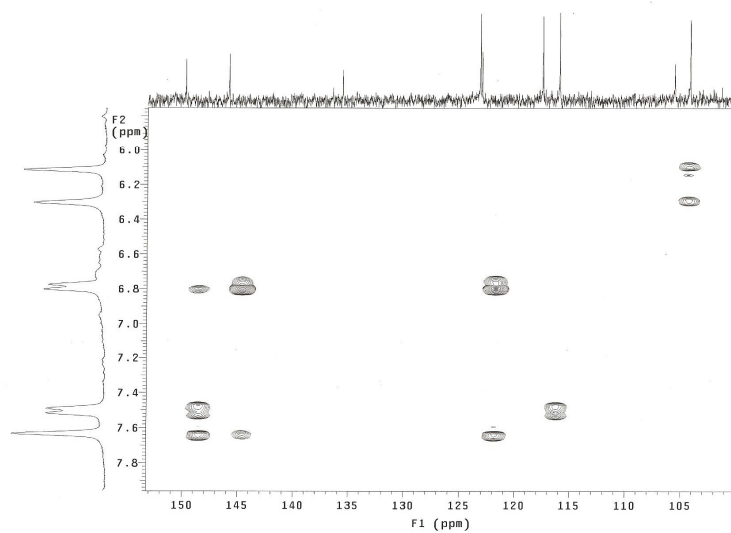


**Figura 109.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de EB7 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz]

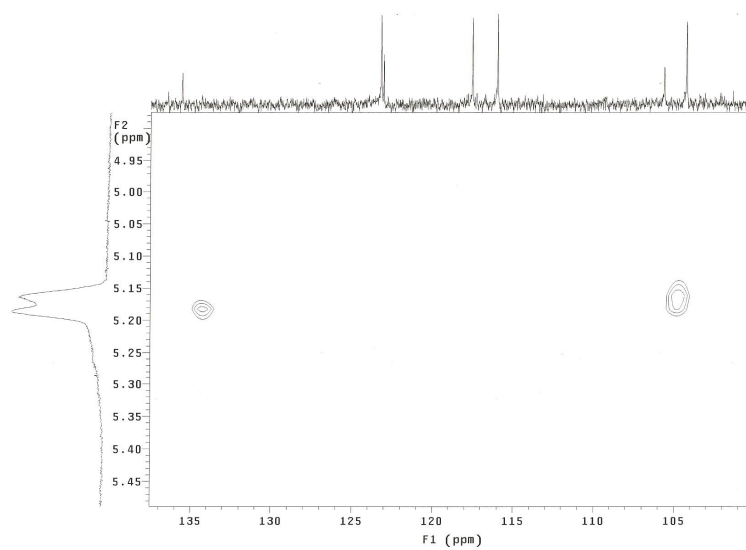


**Figura 110.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de EB7 [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz]





**Figura 111.** Espectro de gHMBC de **EB7** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz].

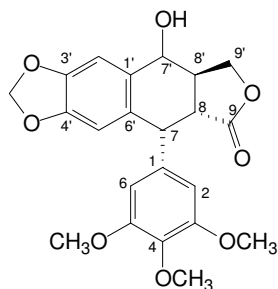


**Figura 112.** Expansão do espectro de gHMQC de **EB7** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)

**Tabela 12.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  de **EB-7** [(300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ ]

Posição	EB7	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	-	158,3
3	-	135,6
4	-	179,4
5	-	162,9
6	6,19 ( <i>d</i> , 2,1 Hz)	99,8
7	-	166,0
8	6,36 ( <i>d</i> , 2,1 Hz)	94,7
9	-	158,9
10	-	105,6
1'	-	123,2
2'	7,71 ( <i>d</i> , 2,1 Hz)	117,5
3'	-	145,8
4'	-	149,8
5'	6,85 ( <i>d</i> , 8,7 Hz)	115,9
6'	7,75 ( <i>dd</i> , 8,7, 2,1 Hz)	123,0
1''	5,21 ( <i>d</i> , 7,2)	104,2
2''	3,24-3,61	75,6
3''	3,24-3,61	78,0
4''	3,24-3,61	71,1
5''	3,24-3,61	78,3
6''	3,72 ( <i>dd</i> , 12, 2,4 Hz)	62,5

#### 4.2.6. Identificação estrutural de EB8



**EB8**

A identificação de **EB8** como sendo a podofilotoxina foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (*BB* e DEPT), através de dados encontrados na literatura [96, 97] e de comparação por CCDC utilizando o padrão podofilotoxina.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 113, pág.117) foi observado a presença de dois simpletos em  $\delta$  3,89 e  $\delta$  3,90 integrando para três e seis hidrogênios, respectivamente, atribuídos à três grupos metoxílicos e, um duplete integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  5,97 atribuído ao grupo metilendioxi. Na região de absorção de hidrogênios aromáticos foram observados dois simpletos em  $\delta$  6,78 e  $\delta$  6,55 atribuído ao H-5' e H-2', demonstrando a presença de anel aromático 1,3,4,6 tetrasubstituído. Ainda nesta região do espectro de RMN de <sup>1</sup>H foi observado a presença de um simpleto em  $\delta$  6,40 ( $J = 2,3$  Hz) com integração para dois hidrogênios demonstrando a existência de dois hidrogênios quimicamente equivalentes e conseqüentemente a presença de anel benzênico 1,3,4,5 tetrasubstituído.

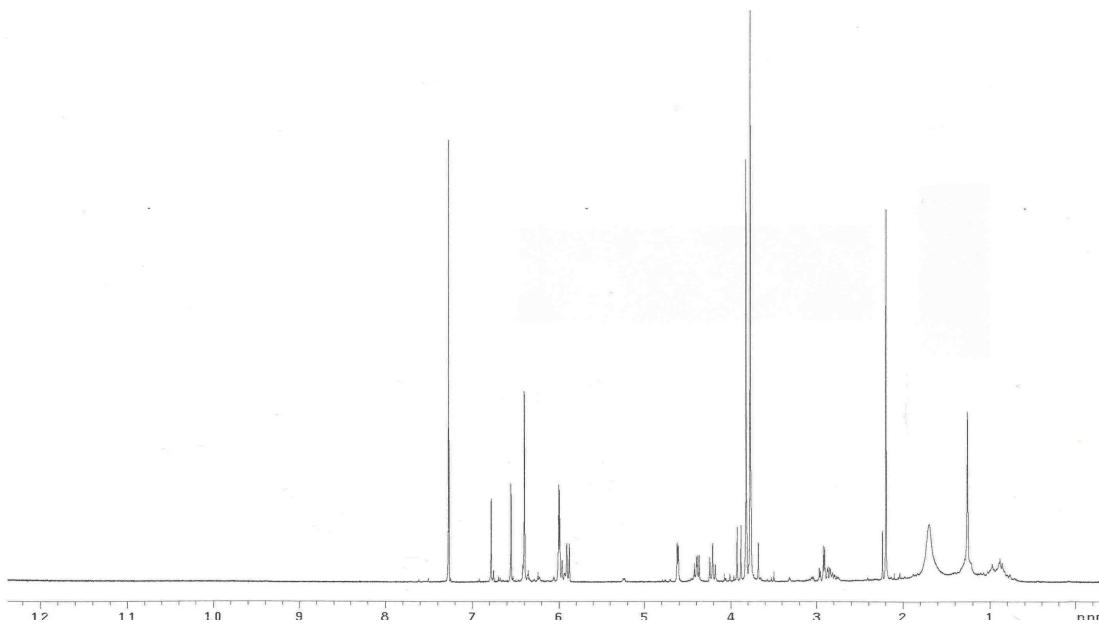
O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 114, pág. 117) apresentou 21 sinais, que com auxílio do experimento de DEPT 135° (Figura 115, pág. 118) foram atribuídos como sendo de dois carbonos metilênicos, oito metínicos, três metílicos e nove carbonos não hidrogenados. Entre os sinais apresentados nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C o sinal em  $\delta$  179,0 demonstra a presença de carbono carbonílico e, os sinais em  $\delta$  101,1, bem como, em  $\delta$  56,1 e  $\delta$  60,7 corroboram a presença grupo metilendioxi e dos grupos metoxílicos, respectivamente.

Através da avaliação conjunta dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e por comparação com dados descritos na literatura [98] foi possível identificar a substância **EB8** como sendo a podofilotoxina. A identificação desta substância foi corroborada através de comparação em CCDC utilizando uma amostra padrão de podofilotoxina.

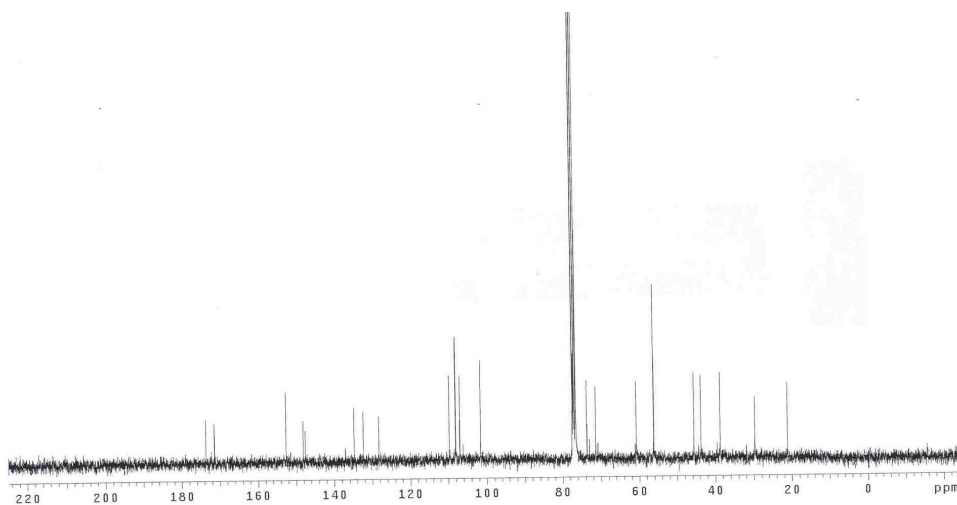
A lignana podofilotoxina tem sido usada em diferentes terapias. Possui efeito antitumoral comprovado cientificamente e pronunciada atividade citotóxica [99].

**Tabela 13.** Dados espectrométricos de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **EB8** (75 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ]

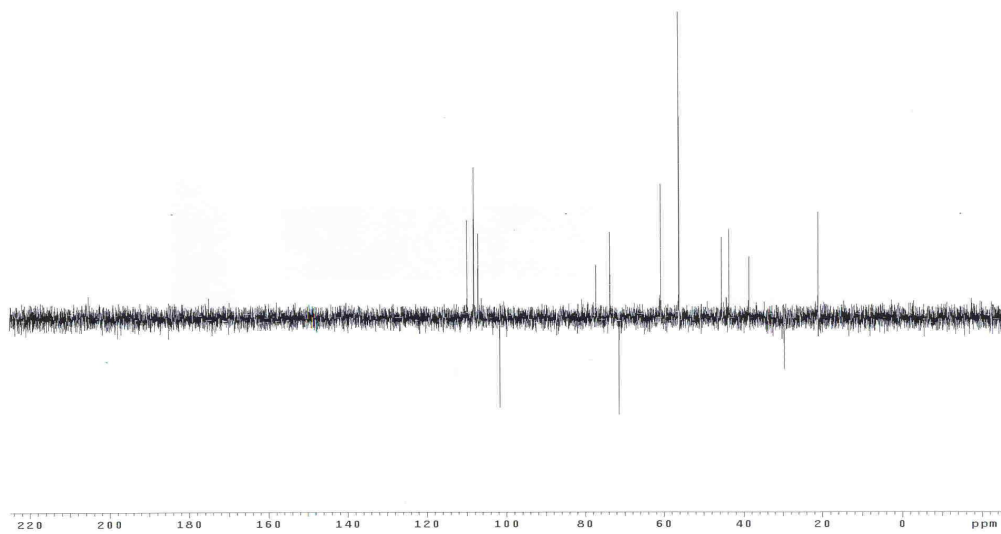
Posição	EB8	[98]
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	132,3	134,6
2	108,1	108,1
3	152,6	152,1
4	134,8	136,6
5	152,6	152,2
6	108,1	108,1
7	43,8	44,0
8	45,6	45,0
9	173,6	174,6
1'	137,1	133,1
2'	109,7	106,2
3'	148,1	147,2
4'	147,5	147,2
5'	106,2	109,3
6'	128,2	130,6
7'	73,6	72,1
8'	38,7	40,0
9'	71,3	71,3
$\text{OCH}_2\text{O}$	101,1	101,1
2 $\text{OCH}_3$	56,1	56,0
$\text{OCH}_3$	60,7	60,5
CO	172,1	171,1



**Figura 113.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de EB8 [ $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz]

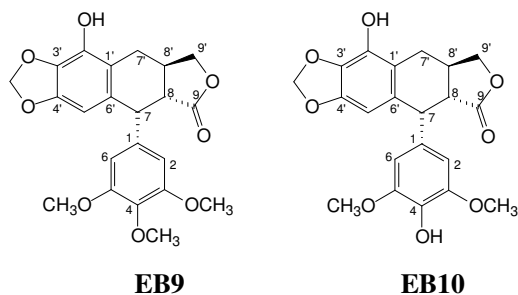


**Figura 114.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de EB8 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



**Figura 115.** Espectro de DEPT 135° de **EB8** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

#### 4.2.7. Identificação estrutural de EB9 e EB10



A identificação de **EB9** e **EB10** como  $\alpha$ -Peltatina e  $\beta$ -Peltatina, respectivamente foi baseada em análise de dados de experimentos de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (*BB*), através de dados publicados na literatura e por comparação em CCDC utilizando os padrões de  $\beta$ -Peltatina e  $\alpha$ -Peltatina.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da mistura de **EB9** e **EB10** (Figura 116, pág. 121) apresentou sinais característicos de lignanas do tipo aril-tetra-hidronaftaleno lactonica. Como por exemplo, um singleto em  $\delta$  6,66 referente a hidrogênio ligado à carbono aromático que foi indicativo da presença de anel aromático 1,2,3,5,6 penta-substituído. Esse espectro mostrou também um singleto largo integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  5,93 e, na região correspondente aos hidrogênios metilênicos foram observados dois sinais na forma de duplo duplete em  $\delta$  3,07 e  $\delta$  2,73. Esses sinais são resultantes do acoplamento geminal entre os hidrogênios metilênicos H-7 e do acoplamento vicinal entre cada um deste hidrogênio metilênico com o hidrogênio H-8.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 117, pág. 121) evidenciou uma mistura composta por duas lignanas. Assim, os vinte e dois sinais registrados foram identificados com o auxílio do DEPT 135° (Figura 118, pág. 122) como sendo três carbonos metilênicos, três metílicos, seis metínicos e dez carbonos não hidrogenados. Deste espectro, pode-se destacar os sinais em  $\delta$  174,9,  $\delta$  101,1,  $\delta$  72,0 atribuídos a aos grupos carbonílico, metilienodioxí e oximetilênico, respectivamente.

Com os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e os dados obtidos da literatura a mistura foi identificada como sendo a  $\alpha$ - e  $\beta$ -peltatina [35]. A identificação dos componentes desta mistura, como sendo  $\alpha$ - e  $\beta$ -peltatina, foi corroborada através de comparação em CCDC utilizando uma amostra padrão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -peltatina.

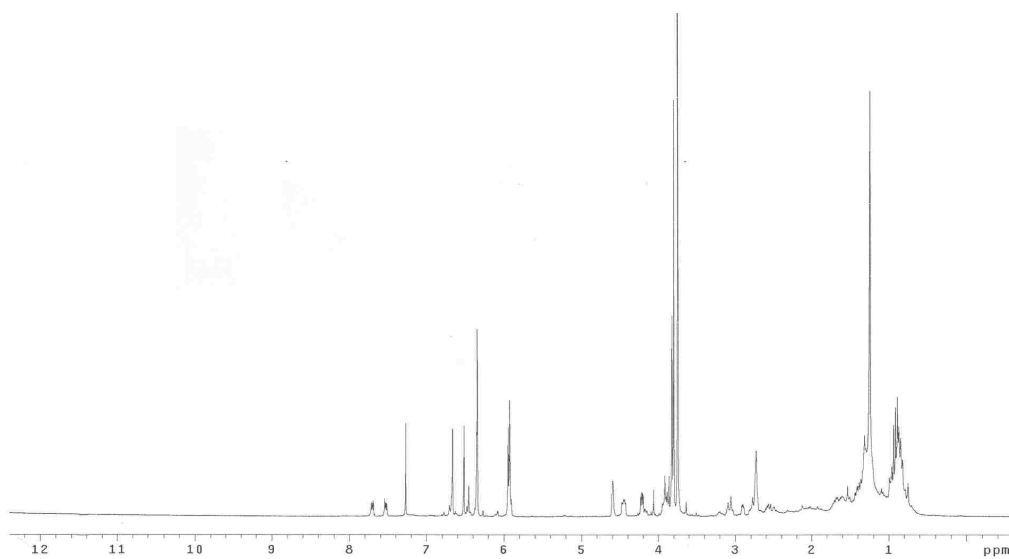
A estereoquímica relativa nas posições 8, 7 e 8' foram determinadas através da análise das constantes de acoplamento encontradas entre  $J_{7,8}$  ;  $J_{8,8'}$  e  $J_{7',8'}$  e posterior comparação com os dados encontrados na literatura [35], sugerindo a relação *trans* entre (C-8 e C8') da lactona e *cis* entre C-8' e C-7'.

A  $\alpha$ -peltatina apresenta dados espectrais de RMN similares a  $\beta$ - peltatina. Entretanto, destacando-se a presença de apenas dois carbonos metoxílicos ligados a um dos anéis aromático. Na Tabelas 14 encontram-se os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **EB9** e **EB10**, bem como os valores da literatura [35].

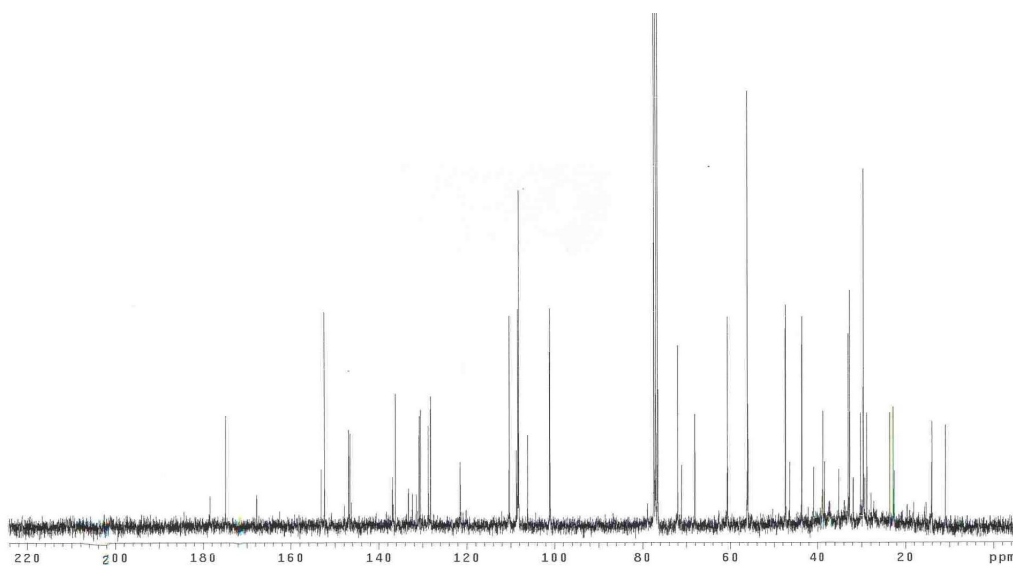
**Tabela 14.** Dados espectrométricos de  $^{13}\text{C}$  de **EB9** e **EB10** [(75 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

Posição	EB9	EB10	[35]	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
			$\alpha$ -peltatina	$\beta$ -Peltatina
1	131,5	132,3	131,8	132,9
2	108,2	108,2	108,4	108,3
3	152,4	146,9	152,5	148,0
4	133,3	132,9	132,9	131,9
5	152,4	147,8	152,5	148,0
6	108,2	108,2	108,4	108,3
7	32,7	32,7	32,2	32,3
8	47,4	47,4	47,4	47,4
9	174,9	174,9	175,1	175,1
1'	120,9	118,2	118,2	118,2
2'	136,2	136,9	137,1	136,9
3'	130,5	132,9	130,9	132,9
4'	153,2	152,6	152,5	152,6
5'	104,6	103,5	103,5	103,5
6'	136,2	136,3	136,3	136,3
7'	28,9	32,0	32,2	32,0
8'	43,7	44,0	43,9	44,0
9'	72,0	72,4	72,4	72,4
OCH <sub>2</sub> O	101,1	101,1	101,7	102,3
2 OCH <sub>3</sub>	56,1	56,0	56,0	56,7
OCH <sub>3</sub>	60,7	-	60,7	-

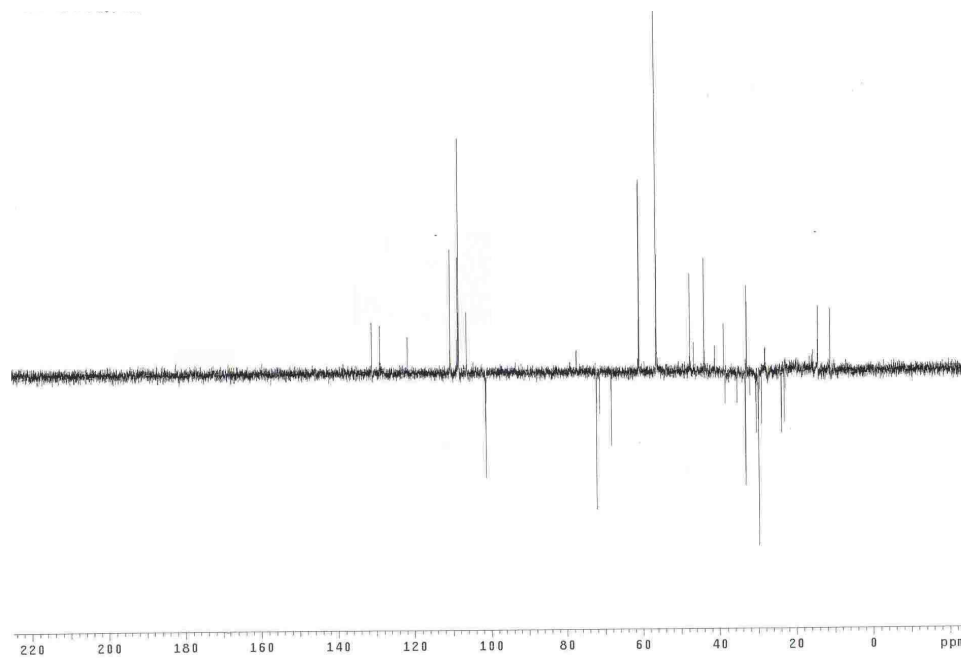




**Figura 116.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **EB9** e **EB10** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

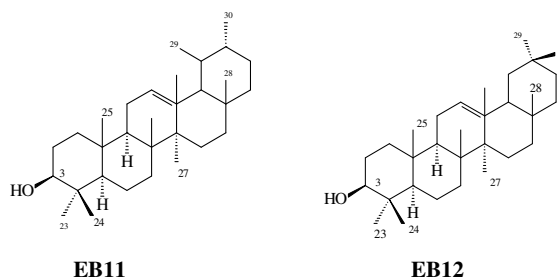


**Figura 117.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **EB9** e **EB10** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



**Figura 118.** Espectro de DEPT 135° de **EB9** e **EB10** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).

#### 4.2.8. Identificação estrutural de EB11 e EB12



As substâncias codificadas como **EB11** e **EB12** foram isoladas e identificadas em mistura, através de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (*BB* e *DEPT*), através de dados encontrados na literatura. Assim **EB11** e **EB12** foram identificadas como  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, respectivamente.

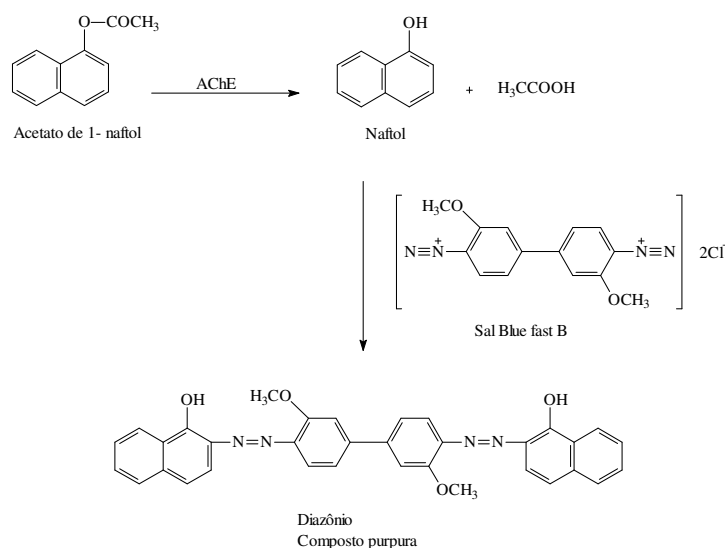
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura apresentou sinais importantes que permitiram a identificação das mesmas através de comparação de dados da literatura. Sinais de carbonos olefínicos apresentando deslocamento químico em 124,4 ppm (CH), 139,6 ppm (C); 145,1 ppm (C), 121,7 ppm (CH) são indicativos de triterpenos da série ursano e oleaneno. Logo quando comparado com a literatura revelou que esta mistura tratava-se dos triterpenos  $\alpha$ -amirina (série ursano),  $\beta$ -amirina (série oleaneno) [100,101,102].

## 5. Resultados e discussão da avaliação biológica

### 5.1. Métodos de avaliação de inibição da enzima acetilcolinesterase

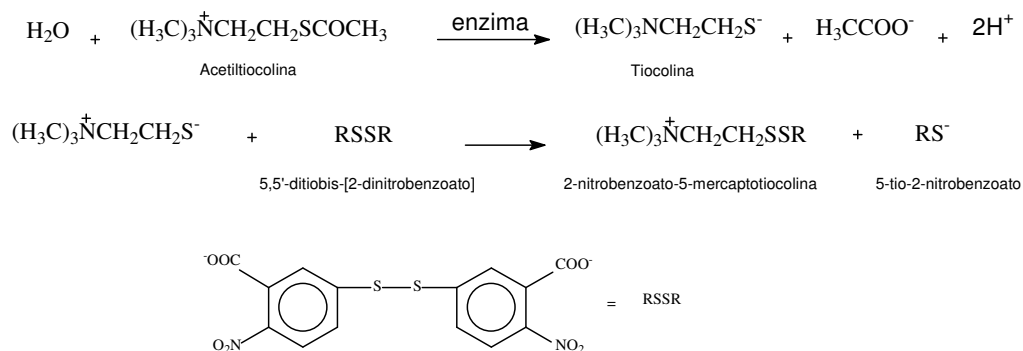
A busca por novos inibidores da enzima AChE entre os compostos isolados e descritos neste trabalho foram utilizadas duas metodologias.

Inicialmente um foi feito uma triagem através da avaliação qualitativa em CCDC. Esta avaliação consistiu numa autobiografia desenvolvida sobre uma placa cromatográfica de sílica gel onde são aplicadas as amostras. A avaliação é baseada na hidrólise de acetato de 1-naftil para 1-naftol pela enzima AChE, onde o naftol formado reage com o sal Fast Blue B originando um composto diazônio de coloração púrpura (Figura 119).



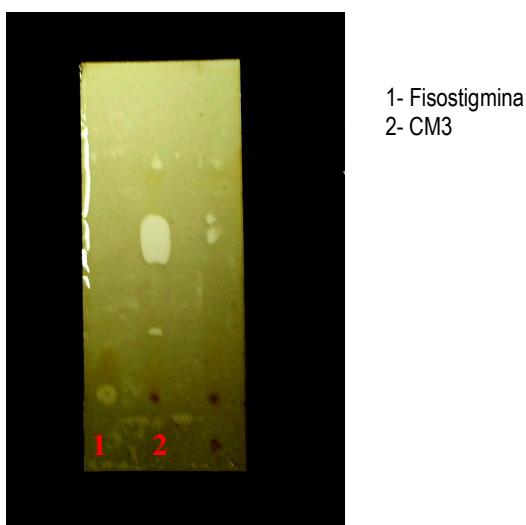
**Figura 119.** Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente da coloração púrpura em CCDC

Já a segunda avaliação foi a quantitativa de inibição da AChE, que consiste em um método fotométrico de detecção da ação inibidora da enzima AChE. Um análogo do substrato natural acetilcolina como substrato, a acetilticolina, e a atividade enzimática é avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise de acetilticolina a acetato e tiocolina, este último após reagir com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (reagente de Ellman) produz o íon colorido 5-tio-2-nitro-benzoato cuja formação pode ser medida a 405 nm em um espectrofotômetro (**Figura 120**).



**Figura 120.** Reações químicas envolvidas no teste de atividade inibidora de AChE desenvolvido por Ellman.

O resultado da avaliação qualitativa desenvolvida em CCDC, onde foram aplicados todos os compostos isolados descritos neste trabalho comparando com um padrão de conhecida atividade, a fisostigmina. A caracterização positiva desta avaliação é descrita por aparecimento de manchas brancas nas regiões da placa que contem substâncias capazes de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase contra a coloração do fundo da placa [103]. Embora todas as substâncias isoladas tenham sido submetidas a esta avaliação qualitativa, apenas o composto **CM3** apresentou resultado positivo, como é mostrado na figura 121.

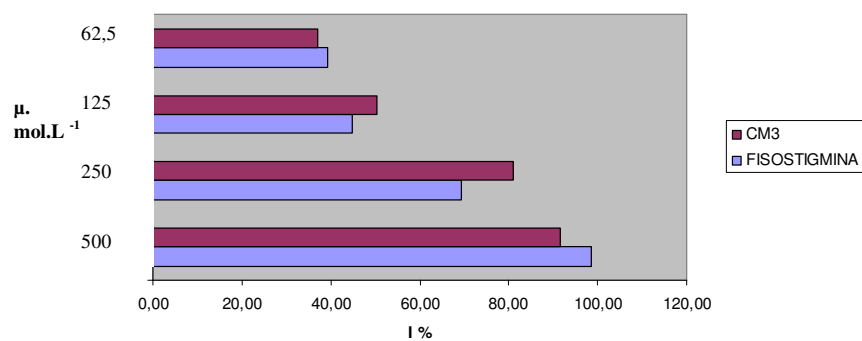


**Figura 121.** Demonstração do resultado positivo para o composto CM3 no teste qualitativo em CCDC de inibição da enzima Ache

Assim, com os resultados obtidos na avaliação qualitativa, o composto CM3 foi selecionado para um ensaio quantitativo, que é uma ferramenta para determinar o  $CI_{50}$  e a porcentagem de inibição para a substância.

O gráfico da figura 122 resume os resultados obtidos para o percentual de inibição, obtido após 10 minutos de reação e leitura em espectrofotômetro para diferentes concentrações testadas de CM3 e com o padrão, fisostigmina, que é já utilizado como medicamento para o tratamento do do mal de Alzheimer. Neste gráfico é mostrado que o composto CM3 apresenta percentual de inibição (I%) semelhante ao do padrão utilizado em todas as concentrações analisadas.

Avaliação de **CM-3** pelo teste de Elman permitiu determinar o  $CI_{50}=111,34 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , já a fisostigmina, que já é utilizado como medicamento, apresenta o valor de  $CI_{50}= 141,51 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Deste modo pode-se verificar que CM-3 apresenta atividade bastante elevada quando comparada com a fisostigmina, no entanto, existem a necessidade de mais pesquisas para avaliar as ações desta substância para torná-la como uma alternativa mais barata para o tratamento do mal de Alzheimer.



**Figura 122.** Percentual de inibição atividade de I% demonstrada pela diminuição da concentração da substância aumenta quando a concentração de amostra

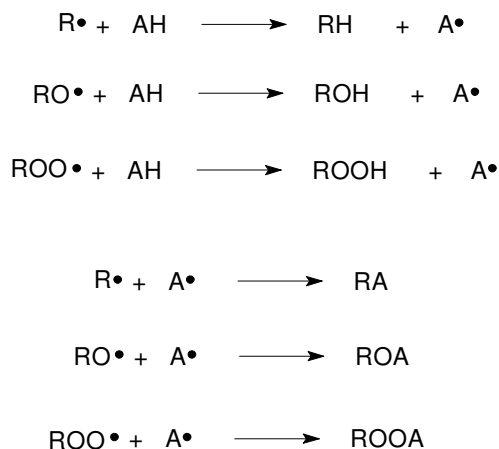
## 5.2. Avaliação da atividade do seqüestro de radical estável DPPH

As substâncias isoladas descritas neste trabalho foram submetidas à avaliação da atividade antioxidante com base na capacidade de seqüestro do radical estável DPPH em solução. O DPPH é um radical livre estável, para o qual as substâncias antioxidantes

transferem elétrons ou átomos de hidrogênios, neutralizando seu caráter radicalar (Figura 123) [104]. Esta reação proporciona mudança de cor violeta para amarelo e absorvância da solução onde houve a reação, a 517nm, diminui [105].

Através de uma análise qualitativa em CCDC, foi possível selecionar quais as substâncias isoladas que apresentavam atividades antioxidantes. Esta avaliação qualitativa é caracterizada por um surgimento de manchas amarelas nas regiões da placa que contém substâncias capazes de seqüestrar o radical estável (DPPH), com o fundo violeta. Enquanto que no cromatograma, onde não existe substância antioxidante, a coloração permanece violeta.

Os compostos isolados que demonstraram resultados positivos na avaliação qualitativa foram avaliados e submetidos a teste quantitativo de avaliação do seqüestro do radical utilizando espectrofotômetro com determinação do  $CI_{50}$ , em comparação com substâncias com potencial antioxidantes conhecidos. A partir dos resultados obtidos, a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio de reação pode ser determinada. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) e maior a sua atividade antioxidante [106].



**Figura 123.** Esquema geral de oxidação

Os valores de  $CI_{50}$  (Tabela 15) é definida como a concentração necessária da amostra teste para reduzir 50% do radical DPPH do controle.

Nas condições experimentais, nenhuma das substâncias isoladas apresentaram atividade significativa quando comparada com o controle BHT, que é um antioxidante sintético utilizado em produtos comercializados. No entanto, alguns compostos isolados apresentaram atividades antioxidantes mais significativas do que o padrão quercetina, que é uma substância encontrada em fontes naturais, normalmente utilizada como padrão antioxidante de substância natural, pois apresenta estrutura planar e totalmente conjugada.

**Tabela 15.**  $CI_{50}$  do teste quantitativo de seqüestro de DPPH das substancias isoladas de *C.M* e *E.B.*

Amostras	$CI_{50}$ amostras ( $\mu.L^{-1}$ )	$CI_{50}$ do BHT ( $\mu.L^{-1}$ )
Quercetina	88.3	
$\alpha$ -peltatina-5-O- $\beta$ -D- glicopiranosideo (EB6)	71.0	
quercetrina (EB7)	94,2	
Yateina (EB2)	84.0	44.7
Àcido rosmárinico (EB1)	92.4	
Podofilotoxina (EB8)	92.1	
4-[3-(4-hidroxi-fenil)-acrilóiloxi]		
acido benzóico (CM6)	92.5	
acetato de aurentiamida (CM3)	85.1	



## 6. Considerações Finais

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da constituição química das espécies *Cratylia mollis* (Leguminosae) e *Eriope blanchetti* (Lamiaceae) que são espécies endêmicas do semi-árido nordestino e da restinga, respectivamente.

Pode-se verificar nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho que foram isoladas substâncias da mais variada classe. Dos extratos orgânicos de *Cratylia mollis* foram isolados nove substâncias com destaque para um novo nor-isoprenoide, (4*S*\*, 6*S*\*)-4-but-1-enil-4,6-diidróxi-3,5,5-trimetil-ciclo-hex-2-enona, o dipetídeo, N-benzoil-fenilalaninoil-fenilalaninolacetato e o Ester, 4-[3-(4-hidroxi-fenil)-acrilóiloxi] ácido benzóico, sendo este último descrito pela segunda vez na literatura. A partir de *Eriope blanchetti* foram isoladas doze substâncias com destaque para a podofilotoxina, que tem sido usada em diferentes terapias e possui efeito antitumoral comprovado cientificamente.

Na avaliação de inibição AChE foi verificada que o N-benzoil-fenilalaninoil-fenilalaninolacetato apresentou uma inibição satisfatória comparado com  $CI_{50}=111,34 \mu\text{mol.L}^{-1}$  comparado com a substância padrão Fisostigmina,  $CI_{50}= 141,51 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , o que é de grande impacto para a sociedade, uma vez que a inibição desta enzima é um dos tratamentos para o mal de Alzheimer que é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo mundo. Assim existindo a necessidade de novos fármacos com menores preços, uma vez que os disponíveis no mercado ainda apresentam preços bastantes elevados para a população mais carente.

---

## 7. Referência

- [1] Cragg, G.A.; Newman, D.J.; Snader, K.M. *Jornaul of Natural Product* 1997, 60, 52.
- [2] Farnsworth, N.R.; Soerjato, D.D. *Economy Botany* 1985, 39, 3, 231..
- [3] Wilson, E.O. The current satate of biological diversity. In: WILSON, E.O.( Ed.) Biodiversity, National Academy Press, Washington, p .3-18, 1988.
- [4] Guéritte-Volgelein, F.; Guénard, D. G.; Lavette, F.; Le Goff, M.; Mangatal, L. e potier, P. J. *Journal of Medicinal Chemistry* 1991, 34, 3, 992.
- [5] Furukawa, T.; Morihara, K.; Horiguchi, Y. and Kuwajima, T. *Tetrahedron* 1994, 48, 6975.
- [6] Kinghorn, A. D., Balandrin, M. Washington: *American Chemical Society*, 1993, 356.
- [7] Jenkis, P. *Chemistry in Britain* 1996, 32, 43.
- [8] Mendelsohn R., Balick M.J. *Economic Botany* 1995, 49, 223.
- [9] Braz-filho,R. *Química Nova* 1994, 17,5, 405.
- [10] Navas, A. C.; Antoniazzi, M. M.; Jared, C. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga. A brasilian semi-arid environment. International Congress series1275, p.298-305, 2004.
- [11] Joly, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia Vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 4 ed, 1977, 777p.
- [12] Ferri, M.G. *Vegetação Brasileira/ Belo Horizonte: Ed Itatiaia - São Paulo*, 1980, 34p.
- [13] Bahia, M.V. Estudo Químico de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). 2002. 88f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- [14] Juck, D.B.F. Estudo dos Constituintes Químicos de *Cratylia mollis* e de *Bowdichia Virgilioides* (Leguminosae) 2003.160f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.
- [15] *Jornal correio da Bahia*, 29.10.2008
- [16] <http://www.zoologiam.hpg.ig.com.br/caatinga.htm>, acessado em 20.12.2004
- [17] Lewis, G.P. *Legumes of Bahia*. England: Royal Botanic Gardens Kew, 1987, 1.
- [18] Joly, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia Vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 4 ed, 1977, 777p.
- [19] Baracat, A. B.1995 *Boletim Plantas do Nordeste*. Royal botanic gardens, kew Richmond surrey tw9 3AE. Acesso em: 20 de novembro de 2004, England. [http://www.rbgkew.org.uk/scihort/pne/pne7\\_port.pdf](http://www.rbgkew.org.uk/scihort/pne/pne7_port.pdf).
- [20] Lascano, C. E.; Argel, P. J. *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntse : *Pasturas tropicales* 1998, 20, 1, 1.

- 
- [21] Lima, L da S. Estudo Fitoquímico das Folhas De *Cratylia Mollis*: Isolamento e Elucidação Estrutural de um Novo Norsesquiterpeno, Terpenos e Pterocarpana 2005. 86f. Dissertação de mestrado- Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.
- [22] Freire MSB (1990) Levantamento florístico do parque estadual das dunas de Natal. *ActaBotanica Brasilica* 4:41-59.
- [23] <http://soteropolitanosdeitapua.wordpress.com/2007/11/19/lendas-do-abaete/> acessado em 19.01.2009.
- [24] Torrend, C.S.J. 1938. Nova Contribuição para a Flora da Bahia. In *Separata do Anuário da Escola Agrícola da Bahia*, Salvador, Brasil, p. 258-330.
- [25] Seabra, J.J.A. 1949. A flora das dunas: apontamentos sobre a flora psamófila das dunas de Itapoã, Bahia. *Lilloa* 20:187-192.
- [26] Viana, B.F.; DA Silva, F.O. e Kleinert, A.DE M.P. *Revista Brasileira Botânica* 2006, 29, 1, 13.
- [27] WWW.
- [28] Judd, W. S.; Campell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F. *Plant Systematics. A phylogenetic approach*. Inglaterra, Sinauer Associates Inc., 1999. p. 383-5.
- [29] Menezes, F. S. Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae. Tese de Mestrado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1994. 94 p.
- [30] Harley, R. M.; Simmons, N. A. *Flora of Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil*. Royal Botanic Garden, Kew, 1986.
- [31] Harley, R. M.; *Hooker's Icones Plantarum* 1976, XXXVIII, 1.
- [32] Harley, R. M. Kew, Royal Botanic Gardens 1976, 38, 3. 107p.
- [33] Viana, B. F.; Silva, F. O.; Kleinert, A. M. P. *Revista Brasileira de Botânica* 2006, 1, 29, 13.
- [34] Da Silva, F.O.; Viana, B.F.; Pigozzo, C.M. *Iheringia, Sér. Zool.* 2007, 97, 1, 87.
- [35] David, J.P.; da Silva, E.F.; Moura, D.L.; Guedes, M.L.S.; Assunção, R.J.; David, J.M. *Química Nova* 2001, 24, 6, 730.
- [36] Nair, V.P.; Hunter, J.M. *Continuing education in Anesthesia: Critical Care & Pain.* 2004, 4, 168.
- [37] Sano, M.; Grossman, H.; Dyk, K.V. *CNS Drugs* 2008, 22, 11, 887.
- [38] Viegas- J., Bolzani, V. S. ; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. *Química nova* 2004, 27, 655.
- [39] Giordani, R.B.; Pagliosa, L.B.; Henriques, A.T.; Zuanazzi, J.A.S. *Química nova* 2008, 31, 8, 2042.
- [40] Praticó, D. *Trends in Pharmacological Sciences* 2008, 29, 12, 609.
- [41] Aluyor, E.O.; Ori-Jesu, M. *African Journal of Biotechnology* 2008, 7, 25, 4836.
- [42] Halliwell, B.; *Mutation Reaserch: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1999, 443, 37.
- [43] Rocha, F.D.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A. C.; Teixeira, V.L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2007, 17, 4, 631.
- [44] Ramalho, V. C.; Jorge, N. *Química Nova*, in press.

- 
- [45] Botterweck, A. A. M.; Verhagen, H.; Goldbohm, R. A.; Kleinjans, J.; *Food Chem. Toxicol.* 2000, 38, 599.
- [46] Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K.; *Phytochemical Analysis* 2002, 13,51.
- [47] Hwang, S. Y.; Jang, Y. P.; Byun, S. J.; Jeon, M. H.; Kim, Y. C. *Kor.J. Pharmacogn.* 1996, 27, 91.
- [48] Giordani, R.B. Estudo químico e farmacológico em *Hippeastrum morelianum* Lem. e *Hippeastrum santacatarina* (Traub) Dutilh: duas espécies de Amarylidaceae. 2007. 107f. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- [49] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr.; Featherstone, R.M.; *Biochemical Pharmacology* 1961, 7, 88.
- [50] Houghton, P.J.; Agbedahunsi, J.M.; Agbedahunsi, A. *Phytochemistry* 2004, 65, 2893.
- [51] Lee, J.H.; Lee, K.T.; Yang, J.H.; Baek, N.I.; Kim, D.K. *Archive Pharmcal Research* 2004, 27, 1, 53.
- [52] Cotellet, N.; Bernier, J.L.; Catteau, J.P.; Pommery, J.; Wallet, J.C.; Gaydou, E. M. *Free Radic Biol Med* 1996, 20, 1, 35.
- [53] Budzianowski, J.; Budzianowska, A. *Herva polonica* 2006, 52,1, 51.
- [54] Miliuskas, G; Venskutonis, P.R.; van Beek, T.A. *Food Chemistry* 2004; 85, 231.
- [55] Kanchanapoom, T.; Chumsri, P.; Kasai, R.; Otsuka, H.; Yamasaki, K. *Phytochemistry* 2003, 63, 985.
- [56] Isoe, S. *Chemical and Biology* 1970, 8, 575.
- [57] Lutz, A.; Winterhalter, P. *Tetrahedron Letter* 1992, 33, 36, 5169.
- [58] Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products- A Biosynthetic Approach* 1997, 1º edição, New York, John Wiley & Sons.
- [59] Yue, J-M.; Chen, S.M.; Lin, Z.W. *Phytochemistry* 2001, 56, 801;
- [60] Cardoso, M. P.; David, J. M.; David, J. P. *Nat. Prod. Res.* **2005**, 19, 431.
- [61] Greca, M. D.; Mangoni, L.; Molinaro, A.; Monaco, P.; Previtera, L. *Gazz. Chim. Ital.* 1990, 120, 391.
- [62] Ko, H.H.; Hung, C.F.; Wang, J.P.; Lin, C.N. *Phytochemistry* 2008, 69, 234.
- [63] Kuria, K.A. M.; Chepkwony, H.; Govaerts, C.; Roets, E.; Busson, R.; Witte, P.; Zupko, I.; Hoornaert, G.; Quiryne, L.; Maes, L.; Janssens, L.; Hoogmartens, J.; Laekeman, G. *Journal Natural. Product* 2002, 65, 789.
- [64] El-mekawy, S.; Meselhy, M.R.; Nakamura, N.; Tezuka, Y.; Hattori, M.; Kakiuchi, N.; Shimotohno, K.; Kawahata, T.; Otake, T. *Phytochemistry* 1998, 49, 6, 1651.
- [65] Nascimento, J.C. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinera* e quantificação de L-DOPA em três espécies de *Mucuna* 1999. 124f. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- [66] Wahidulla, S.; DiSouza, L.; Kamat, S.Y. *Phytochemistry* 1991, 30 3323.
- [67] Banerji, A.; Ray, R. *Phytochemistry* 1981, 20, 2217.
- [68] Anjaneyulu, S.R.; Raju, S.N. *Journal Indian Chemical Society* 1988, 65 147.

- 
- [69] Isshiki, K.; Asai, Y.; Tanaka, S.; Nishio, M.; Uchida, T.; Okuda, T.; Komatsubara, S.; Sakurai, N. *Biosci. Biotechnol. Biochemical* 2001, 65, 1195.
- [70] Ishiguro, K.; Nagata, S.; Fukumoto, H.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Isoi, K. *Phytochemistry* 1991, 30, 11, 6639.
- [71] Sashidhara, K.V.; Rosaiah, J.N.; Tyagi, E.; Shukla, R.; Raghur, R.; Rajendran, S.M. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 44, 432.
- [72] Isobae, T.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nagata, K.; Masuoka, N.; Ohsaki, A. *Yakugaku Zasshi* 2007, 127, 2, 389.
- [73] Demuner, A.J.; Barbosa, L.C.A.; Nascimento, J.C.; Vieira, J.J.V. *Quimica Nova* 2003, 26, 3, 335.
- [74] Tsai, P.Y.; WANG, J.; CHANG, C.; CHAO, P. L. *Phytochemistry* 1998, 49, 6, 1663.
- [75] Isobe, T.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nagata, K.; Masuoka, N.; Ohsaki, A. *The Pharmaceutical Society of Japan* 2007, 127, 2, 389.
- [76] Bojase, G.; Wanjala, C.C.W.; Majinda, R.R.T. *Phytochemistry* 2001, 56, 837.
- [77] Hussein, G.; Nakamura, N.; Meselhy, M.R.; Hattori, M. *Phytochemistry* 1999, 50, 68.
- [78] Agrawal, P.K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam: Ed. By P. K. Agrawal, 1989, 219 p.
- [79] Nakagawa, H.; Takaishi, Y.; Fujimoto, Y.; Duque, C.; Garzon, C.; Sato, M.; Okamoto, M.; Oshikawa, T.; Ahmed, S.U. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 1919.
- [80] Hussein, G.; Nakamura, N.; Meselhy, M.R.; Hattori, M. *Phytochemistry* 1999, 50, 689.
- [81] Fonseca, S.F.; Campelo, J.P.; Barata, L.E.S.; Rúveda, E.A. *Phytochemistry* 1978, 17, 499.
- [82] Lima, V.B. *Estudo fitoquímico de Himatanthus obovatus (Muell. Arg) Woodson (APOCYNACEAE): Isolamento, elucidação e atividade biológica*. 2005. 174f. Tese de Doutorado- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- [83] Niu, F.; Cui, Z.; Chang, H.T.; Jiang, Y.; Chen, F.; Tu, P.F. *Chinese Journal of Chemistry* 2006, 24, 12, 1788.
- [84] Martins, R.C.C.; Lago, J.H.G.; Albuquerque, S.; Kato, M.J. *Phytochemistry* 2003, 64, 667.
- [85] Vogelsang, K.; Schneider, B.; Petersen, M. *Planta* 2006, 223, 369.
- [86] Ticli, F.K.; Hage, L. I.S.; Cambraia, R.S.; Pereira, P.S.; Magro, A.J.; Fontes, M.R.M.; Sta'beli, R.G.; Giglio, J.R.; Franc, S.C.; Soares, A.M.; Sampaio, S.V. *Toxicon* 2005, 46, 318.
- [87] Melo, E.B.M.; Bruni, A.T.; Ferreira, M.M.C. *Quimica Nova* 2006, 29, 3, 555.
- [88] Kuo, Y.C.; Kuo, Y.H.; Lin, Y.L.; Tsai, W.J. *Antiviral Research* 2006, 70, 112.
- [89] Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2003, 41, 636.
- [90] Razborsek, M.I.; Voncina, D.B.; Dolecek, V.; Voncina, E. *Chromatographia* 2008, 67, 5/6, 433.

- 
- [91] Fulda, S. *International Journal of Molecular Sciences* 2008, 9, 1096.
- [92]. \_\_\_\_\_ - *Molecule Nutrition Food Res* 2009, 53, 140.
- [93] Stoll, A.; Wartburg, A. V.; Renz, J. *Journal American Chemical Society* 1955, 77, 6, 1710.
- [94 ] Harbone, J.B.; Mabry, T.J. Mabry, H. *The Flavonoids: Advance in Research*. London- New York: Chapman and Hall, 91. 1992.
- [95] Alves, C.Q. Flavonóides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae) 2007. 91f. Dissertação de mestrado- Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.
- [96 ]Agrawal, P.K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam: Ed. By P. K. Agrawal, 1989, 219 p.
- [97 ] Harbone, J.B.; Mabry, T.J. Mabry, H. *The Flavonoids: Advance in Research*. London- New York: Chapman and Hall, 91, 1982.
- [98] Fonseca, S.F.; Rúveda, E.A.; McChesney, J.D. *Phytochemistry* 1980, 19, 1527.
- [99 ] Canel, C.; Moraes, R.M.; Dayan, F.E.; Ferreira, D. *Phytochemistry* 2000, 54, 115.
- [100] Aguiar, R.M. Triterpenos, Catequinas e Derivados não usuais de Naftoquinonas do Extrato Clorofórmico de *Byrsonima microphylla*. 2003. 84f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- [101] Mahatos, S. B.; Kundu, A. *Phytochemistry* 1994, 37, 6, 1517.
- [102] Reynolds, W. F.; Mclean, S; Poplawski, J. *Tetrahedron* 1986, 42, 3419.
- [103] Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K.; *Phytochemical Analysis* 2002, 13,51.
- [104] Naik, G.H.; Priyadarsini, K.I.; Satav, J.G.; Banavalikar, M.M.; Sohoni, P.P.; Biyani, M.K.; Mohan, H. *Phytochemistry* 2003, 63, :97.
- [105] Banerjee A, Dasgupta N, De B. *Food Chememistry* 2005, 90, 727.
- [106] Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-JR, G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araujo, D.S.; Cavacante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H. *Quimica Nova* 2007, 30, 2.