



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA "Prof.
DELBY FERNANDES DE MEDEIROS"
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

BIBLIOTECA CENTRAL

MARCUS VINICIUS MENDES NEVES

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *CAESALPINIA PLUVIOSA* DC.
***PELTOPHOROIDES BENTH* G.P. LEWIS**

JOÃO PESSOA

2008

MARCUS VINICIUS MENDES NEVES

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *CAESALPINIA PLUVIOSA* DC.
PELTOPHOROIDES BENTH G.P. LEWIS

CE
547.9(043)
7516c

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho - UFPB

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Maurício David - UFBA

João Pessoa

2008

MARCUS VINICIUS MENDES NEVES

CONSTITUENTES QUÍMICOS DE *CAESALPINIA PLUVIOSA* DC.
PELTOPHOROIDES BENTH G.P. LEWIS

Aprovado em ___/___/___

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Maurício David

Co-orientador - UFBA

Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha

Examinador - UFPB

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Examinador - UFPB

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio (*in memoriun*) e Ivone.

A meu pai quero deixar registrado que tento seguir fielmente os seus ensinamentos, às vezes fraquejo, mas logo recomeço sempre me espelhando em você, porque nunca o vi se entregar.

“Tenha a certeza de que partiu com o dever cumprido”

A minha mãe, obrigado pela educação, pela dedicação, pelo exemplo de vida, pelos conselhos e pelo amor e carinho que sempre demonstrou por mim.

Saibam que vocês construíram em mim o sentimento de cidadania e foram decisivos para formação da minha personalidade.

Eu os amo muito. Meu pai quanta saudade!!! Você me faz muita falta!!!!

Transportai um punhado de terra todos os dias e farás
uma montanha.

"Confúcio"

O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é
no dicionário.

"Albert Einstein"

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, sabedoria, paciência, proteção, auxílio, coragem e fé nas horas que precisei para continuar a caminhar.

Aos meus pais Antônio (*in memoriun*) e Ivone que sempre apostaram em mim e que muitas vezes abdicaram de seus desejos para realizar os meus.

A minha avó Carlinda (*in memoriun*) quantas saudades!!!

As minhas irmãs Joelma e Conceição pelos bons momentos que já passamos juntos.

A Cíntia pela amizade, confiança, respeito e convivência em todos esses anos e principalmente por tentar socorrer meu pai na minha ausência e na hora que ele mais precisou.

A minha esposa Alessandra, pela compreensão em todos os momentos importantes que deixei de estar presente, mas que entendeu que tinha um objetivo a cumprir.

Aos meus tios e suas famílias, Reinaldo, Raimundo e Ubirajara por estarem presentes nas minhas realizações e conquistas.

Aos meus sobrinhos Luis Antônio e Ivana.

A Sr^a Zulmira a quem considero como minha avó, pela sua demonstração de fé e pelas constantes orações e pedido de proteção a Deus para mim e minha família.

À Noedy, Batista, Vannessa e Polyanna pela amizade que construímos ao longo dos anos.

À Palominha, essa eu não podia esquecer que me conquistou desde o seu nascimento.

A Débora e Thiago que se revelaram verdadeiros amigos, parceiros, companheiros e sempre estão lá quando precisamos.

BIOTECA

Ao professor Jorge David, que me orientou neste trabalho e soube compreender as minhas limitações e dificuldades e, principalmente, pela convivência e amizade durante esses anos.

Ao professor José Maria Barbosa Filho por aceitar me orientar e pela confiança depositada em meu trabalho.

À professora Maria de Fátima Agra pela identificação do material botânico.

A Raimundo Nonato pelo apoio técnico prestado, cuja ajuda foi de extrema importância.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela ajuda na minha formação acadêmica, especialmente, à prof. Bagnólia pelas dúvidas que sempre me tirou.

Aos amigos Vicente, Josean e Steno pelas conversas nas horas em que realmente se precisa de um amigo.

Aos alunos de iniciação científica Ana Silvia (UFPB), Marcos, Lidiane, Renato, Patrícia e Rafael (UFBA) pelas constantes ajudas prestadas no laboratório.

Aos amigos Juliane e Xirlei pelo apoio dado no laboratório quando precisei.

Ao prof. Jackson pelos ensinamentos dados no laboratório e pela amizade que construímos.

Aos amigos César, Guto, Carol e Willian pela confiança, apoio, carinho, amizade e convivência ao longo do tempo.

A todos os funcionários do LTF-UFPB e UFBA pelos diversos serviços prestados.

Aos colegas de trabalho do Hospital Governador João Alves Filho pelas trocas de serviços.

A todos os colegas de minha turma de mestrado pelos bons momentos e pelas dificuldades que enfrentamos juntos.

Aos alunos do laboratório do prof. Sílvio e do prof. Frederico Guaré.

Ao prof. Pedro Afonso e seus alunos Fábio e Adalberto que me auxiliaram em seu laboratório no CG-EM.

Aos colegas do lab.110 Clayton, Luciano, Larissa, Manuela, Bruno e Marcus Bahia por estarem sempre dispostos a me ajudar. A Jeferson, Charleston, Cândido pela companhia no laboratório.

À prof. Zenis e seus alunos Denise e Carlos pelos espectros de infravermelho.

À prof. Juceni por ceder seu laboratório para realização de algumas análises.

À Universidade Federal da Bahia pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Enfim agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que sempre acreditaram em mim, sempre confiantes de que chegaria aonde cheguei.

A todos; meu muito obrigado.

RESUMO

Caesalpinia pluviosa DC. *peltophoroides* Benth GP. Lewis é uma espécie da família Leguminosae, conhecida popularmente como sibipiruna ou sibipira e coração de negro. A espécie em estudo foi coletada no jardim do LTF, o qual está situado no Campus I da UFPB em João Pessoa-PB. Após a coleta deste material botânico, foram retiradas as cascas do caule e as mesmas postas para dessecar em estufa a uma temperatura aproximadamente 40°C. As cascas do caule, secas, foram então pulverizadas e submetidas a uma maceração exaustiva com etanol a 95 %. A solução extrativa foi concentrada em rota-evaporador sob pressão reduzida e a uma temperatura de 45-50°C obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB). Os extratos obtidos foram submetidos a diversos fracionamentos cromatográficos, utilizando sílica gel e sephadex LH-20 como suportes. Deste fracionamento foram isolados um novo biflavonoide, uma mistura de flavonas, um derivado da vanilina (4 - hidroxí - 3,5 - dimetóxi - benzaldeído) e estigmasterol. A elucidação estrutural dos constituintes químicos isolados foi realizada através de métodos espectroscópicos como IV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C .

Palavras-chave: Leguminosae, *Caesalpinia pluviosa*, Flavonóide, Biflavonóide.

ABSTRACT

Caesalpinia pluviosa DC. *peltophoroides* Benth GP. Lewis is a sort of the family Leguminosae. Known popularly like sibipiruna or sibipira and coração de negro. The sort in study was collected in the garden of the LTF what it is situated in the Campus I of the UFPB in João Pessoa-PB, Paraíba state. After the collection of this botanical material, there were withdrawn the stem barks and the same pieces to dry in stove to a temperature approximately 40°C. The dry stem barks, were pulverized then and subjected to an exhaustive maceration with ethanol to 95 %. The extractive solution was concentrated in route - evaporador under reduced pressure and to a temperature of 45-50°C. The obtained extracts were subjected to several fragmentations cromatográficos, using a column of sílica gel and sephadex LH-20 like supports. Of this fragmentation they were isolated a new biflavonoide, a mixture of flavonas, a derivate of the vanillin (4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzaldeydo) and stigmasterol. The structural elucidation of the chemists constituent isolated was carried out through analytical methods like IR, MS and ^1H and ^{13}C NMR spectral data, with the add of homonuclear (COSY) and heteronuclear (HMBC and HMQC) two dimensional techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quimioterápicos de origem vegetal de interesse na indústria farmacêutica	21
Figura 2: <i>Caesalpinia echinata</i> (pau-brasil)	25
Figura 3: <i>Caesalpinia pluviosa</i> DC. Peltophoroides	30
Figura 4: Esqueleto básico de um flavonóide (anéis A, B e C)	32
Figura 5: Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	48
Figura 6: Espectro de Massas modo IE 70 eV de CP1	52
Figura 7: Espectro de absorção na região do IV em pastilha de KBr de CP1	52
Figura 8: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP1	53
Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP1	54
Figura 9a: Espectro expandido de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP1	54
Figura 10: Mecanismo de fragmentação proposto para CP1	55
Figura 11: Espectro de absorção na região do IV de CP2 em KBr	59
Figura 12: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] de CP2	60
Figura 12a: Espectro expandido de RMN ^1H [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] de CP2	60
Figura 13: Espectro DEPT 135°, CD_3OD de CP2	61
Figura 13a: Espectro expandido DEPT 135°, CD_3OD de CP2	61
Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] de CP2	62
Figura 15: Espectro de gHMBC de CP2	63
Figura 16: Espectro de gHMQC de CP2	63
Figura 17: Espectro de massas de CP3, APCI modo positivo	69
Figura 18: Espectro de Massas de Alta Resolução (HREIMS), modo negativo ESI de CP3	69
Figura 19: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CD_3COCD_3 , δ (ppm)] de CP3	70
Figura 19a: Espectro Expandido RMN ^1H [300 MHz, CD_3COCD_3 , δ (ppm)] de CP3	70
Figura 19b: Espectro Expandido RMN ^1H [300 MHz, CD_3COCD_3 , δ (ppm)] de CP3	71

Figura 20: Espectro DEPT 135°, CD ₃ COCD ₃ de CP3	72
Figura 21: Espectro de RMN ¹³ C [75 MHz, CD ₃ COCD ₃ , δ (ppm)] de CP3	72
Figura 21a: Espectro Expandido RMN ¹³ C[75 MHz, CD ₃ COCD ₃ , δ (ppm)] de CP3 ..	73
Figura 22: Espectro gCOSY de CP3	74
Figura 22a: Espectro Expandido gCOSY de CP3	74
Figura 23: Espectro gHMQC de CP3	75
Figura 24: Espectro gHMBC de CP3.....	75
Figura 24a: Espectro gHMBC de CP3.....	76
Figura 24b: Espectro gHMBC de CP3.....	76
Figura 25: Estrutura de CP4 (Estigmasterol).....	77
Figura 26: Espectro de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] de CP4	79
Figura 26a: Espectro expandido de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] de CP4	79
Figura 27: Espectro de RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] de CP4.....	80
Figura 27a: Espectro expandido de RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] de CP4	80
Figura 28: Inibição da oxidação de CP1, CP2 e CP3.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados do screening fitoquímico do EEB de <i>Caesalpinia pluviosa</i>	41
Tabela 2: Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica.....	42
Tabela 3: Dados referentes ao fracionamento da fração CP 12-20 (coluna A)	42
Tabela 4: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP4A	43
Tabela 5: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP10A	44
Tabela 6: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP10A3	45
Tabela 7: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP11A	45
Tabela 8: Dados referentes ao fracionamento da fração CP 1-11 (coluna B)	46
Tabela 9: Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) [<i>J</i> (Hz); δ (ppm)], CDCl ₃ de CP1	51
Tabela 10: Dados de RMN ¹ H(300 MHz) e ¹³ C(75 MHz); [<i>J</i> (Hz), δ (ppm)] de CP2 em CD ₃ OD para apigenina e acacetina	58
Tabela 11: Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) [CD ₃ COCD ₃ , <i>J</i> (Hz), δ (ppm)]	66
Tabela 12: Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) [<i>J</i> (Hz); δ (ppm)], CDCl ₃ ..	78

LISTA DE QUADROS E FLUXOGRAMAS

Quadro 1: Atividades biológicas de algumas espécies do gênero <i>Caesalpinia</i>	26
Quadro 2: Substâncias isoladas do gênero <i>Caesalpinia</i>	27
Fluxograma 1 : Obtenção e particionamento do EEB das cascas do caule de <i>C. pluviosa</i>	40
Fluxograma 2 : Esquema geral para fracionamento, isolamento e purificação de constituintes da fase clorofórmica	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt: Acetato de etila

APCI: Ionização química à pressão atmosférica

BB: Broad Band

CC: Cromatografia em Coluna

CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl_3 : Clorofórmio Deuterado

CD_3OD : Metanol Deuterado

CD_3COCD_3 : Acetona Deuterada

CHCl_3 : Clorofórmio

COSY: Correlated Spectroscopy

d: dubleto

DCM: Diclorometano

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EM: Espectro de Massa

EtOH: Etanol

FM: Fórmula Molecular

Fig.: Figura

HA: Hidroalcoólica

HEX: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HREIMS: High Resolution Eletronic Impact Mass Spectroscopy

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

m / z: Relação - massa/carga

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

nm: Nanômetro

PM: Peso Molecular

ppm: partes por milhão

R_f : Retention factor (Fator de Retenção)

RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

s: singleto

s/: singleto largo

Sol: Solução

t: tripleto

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre a família Fabaceae.....	23
1.2. Considerações sobre a subfamília caesalpinoideae	25
1.3. Características botânicas da espécie <i>Caesalpinia pluviosa</i> DC. <i>Peltophoroides</i> (Benth) G.P. Lewis	30
1.4. Considerações sobre Flavonóides.....	31
1.5. Considerações sobre atividade antioxidante.....	32

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos	35

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material Vegetal.....	37
3.1.1. Processamento das cascas do caule.....	37
3.1.2. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB)	37
3.2. Métodos de análise.....	38
3.2.1. Métodos cromatográficos.....	38
3.2.2. Métodos espectroscópicos.....	38
3.3. Avaliação fitoquímica preliminar dos constituintes químicos	41
3.4. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica	41
3.4.1. Fracionamento da Fração CP 12-20.....	42
3.4.1.1. Fracionamento da Sub-fração CP4A	43

3.4.1.2. Fracionamento da Sub-fração CP10A	44
3.4.1.2.1. Fracionamento da Sub-fração CP10A3	44
3.4.1.3. Fracionamento da Sub-fração CP11A	45
3.4.2. Fracionamento da Fração CP 1-11	46
3.5. Teste de atividade antioxidante	48
3.5.1. Seqüestro do radical livre DPPH•	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Identificação estrutural de CP1	50
4.2. Identificação estrutural de CP2	56
4.3. Proposta estrutural para CP3.....	64
4.4. Identificação estrutural de CP4.....	77
4.5. Avaliação da atividade antioxidante de CP1, CP2 e CP3	81
5. CONCLUSÃO	82
6. REFERÊNCIAS	84

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

As plantas utilizadas na medicina popular representam uma alternativa viável para o tratamento e controle de certas doenças. Nos países em desenvolvimento, mais de 80% da população usam a medicina tradicional (acupuntura, terapias manuais e plantas medicinais) como cuidado básico da saúde, seja por tradição cultural ou por falta de alternativas (WHO, 2005).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (GURIB-FAKIM, 2006).

Segundo Lapa e cols (2004) é comum o pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas devido ao seu uso prolongado na espécie humana. Desta maneira, poderiam ser considerados remédios eficazes e seguros, naturalmente balanceados, desprovidos de efeitos colaterais comuns quando comparados aos produtos sintéticos, não necessitando, assim, da avaliação exigida para este tipo de medicamento. A automedicação milagrosa com plantas medicinais chega ao extremo de substituir terapias em doenças graves especialmente nos países em desenvolvimento. São exemplos, plantas utilizadas como hipoglicemiantes ou antidiabéticas (KISS, 2006; WANG e NG, 1999).

Nos últimos anos têm-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica. Como exemplos, podem ser citados a morfina a emetina, a vincristina, a colchichina, a rutina, entre outros (Fig.1, p. 21), (MONTANARI; BOLZANI, 2001; LIANDA et al, 2003).

A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas; algumas de relevante ação farmacológica, como por exemplo, o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua

síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se uma alternativa para pessoas portadoras de câncer nos ovários, na mama, no cérebro nos pulmões e de garganta (CORRÊA, 1995), a forscolina, obtida de *Coleus barbatius*, um diterpeno labdânico (SOUZA et al. 1977), constitui-se hoje um potente vasodilatador e agente inotrópico (LEVIN, 1996), e que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (YUNES, 2001). A artemisinina, outro exemplo, obtida de *Artemisia annua*, que apresenta potente atividade antimalárica (KAMCHONWONGPAISAN et al., 1996).

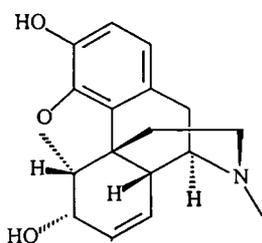
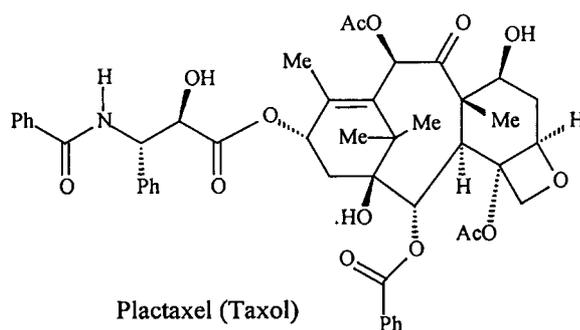
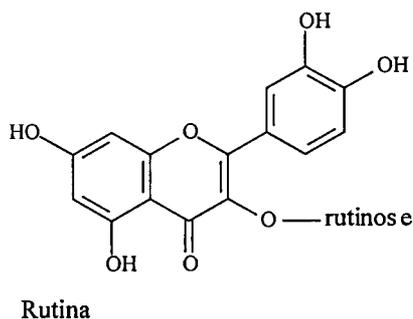
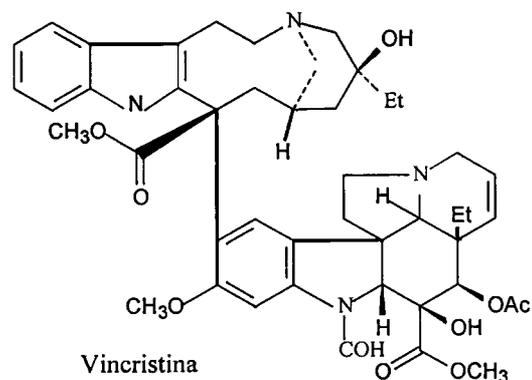
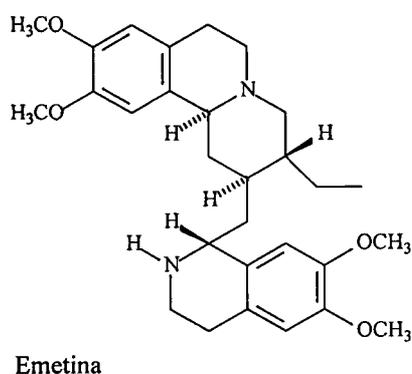


Figura1: Quimioterápicos de origem vegetal de interesse na indústria farmacêutica (MONTANARI; BOLZANI, 2001; LIANDA et al, 2003).

A importância das plantas medicinais deve-se não só por sua contribuição como fonte natural de fármacos, mas também por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas. No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (NOLDIN, 2003; CAPASSO et. al., 2000).

A Fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, ao ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. Dentro desta perspectiva, esperar-se-ia que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial. Além disso, existe no país um grande número de grupos de pesquisa que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, a quimiotaxonomia, a farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al, 2001).

Cabe mencionar que dados da literatura indicaram que, em 1980, os consumidores dos Estados Unidos pagaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos, em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades. Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO et al, 1998).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, os quais já foram comprovados as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de

futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais. Sob este aspecto, é importante ressaltar que o sucesso das investigações na área de princípios ativos naturais depende, principalmente, do grau de interação entre a Botânica, a Química e a Farmacologia (CECHINEL FILHO et al, 1998).

1.1. Considerações sobre a família Fabaceae

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae é uma família vasta, cosmopolita e geologicamente antiga. Está ausente apenas nas regiões ártica e antártica, sendo pobremente representada na Nova Zelândia. Os trópicos são particularmente ricos em espécies herbáceas e lenhosas dessa família. É de grande importância para a flora amazônica, cabendo-lhe o primeiro lugar entre os vegetais lenhosos, quanto ao número de gêneros e espécies (ALMEIDA et al, 2005).

Entre as plantas com flores (fanerógamas), Fabaceae pode ser considerada a terceira. Sua importância econômica é muito diversificada, sendo utilizada desde a alimentação humana e animal até na produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas. Apresenta ainda, uso medicinal, agrônômico (enriquecimento de solos), ornamental e principalmente para produção de madeiras nobres e valiosas usadas na marcenaria, entalhadura e construção em geral, (LIMA et al. 1994). As leguminosas vêm sendo apontadas como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, particularmente para os países subdesenvolvidos (FERREIRA, 2004).

Esta família pertence à classe das Angiospermas, contendo aproximadamente 730 gêneros e 19.400 espécies. Está dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, pertencendo boa parte originalmente à flora brasileira (DE-PAULA, 2007). Caesalpinioideae é tida como grupo ancestral dentre as leguminosas, possuindo as tribos Cassieae, Cercideae e Caesalpinieae que se diferenciaram próximo ao Cretáceo, embora haja poucos registros fósseis de leguminosas nesse período (BIONDO et al, 2005).

Suas espécies apresentam hábito muito variado, desde grandes árvores, arbusto, erva e trepadeiras, tanto escandentes como volúveis, encontradas em diferentes ambientes. Quase sempre apresentam folhas compostas; filotaxia alterna e sempre com estípulas na base; flores actinomorfas ou zigomorfas,

com cálice mais freqüentemente gamossépalo, podendo apresentar-se dialissépalo e corola dialipétala, androceu geralmente com 10 estames, podendo apresentar menor ou maior número, livres ou soldados; ovário com inserção acima das peças florais, com um ou muitos óvulos; o fruto em geral é um legume, porém, podem apresentar outros tipos como lomento, folículo e sâmara (FERREIRA, 2004).

Algumas famílias como Euphorbiaceae, Bignoniaceae, Cactaceae e principalmente Leguminosae são muito importantes por representarem a maior parte da diversidade florística em algumas regiões. Muitos táxons de Leguminosae como os pertencentes aos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Caesalpinia* e *Senna* contribuem para a formação dos estratos arbóreos e arbustivos que compõem a paisagem característica das caatingas, um tipo de vegetação estacional que cobre a maior parte da área com clima semi-árido da Região Nordeste do Brasil, caracterizando-se, em geral, como florestas de porte baixo, compreendendo principalmente árvores e arbustos que geralmente apresentam espinhos e microfilia, com presença de plantas suculentas e um estrato herbáceo efêmero, presente somente durante a curta estação chuvosa ocupando cerca de 800.000 km², principalmente em altitudes mais baixas, entre planaltos e serras (CARDOSO et. al. 2007; ALBUQUERQUE et al, 2007).

As leguminosas, no contexto da floresta atlântica representam uma das famílias de valores expressivos de riqueza e também de diversidade taxonômica. No sudeste brasileiro os estudos realizados em um trecho de floresta ombrófila densa da Serra do Mar, Serra de Macaé, mostraram a relevância deste complexo montanhoso como um expressivo núcleo de distribuição de Leguminosae. Há um destaque também para o Maciço do Itatiaia, remanescente de floresta atlântica importante da Serra da Mantiqueira, primeiro Parque Nacional do Brasil criado em 1937, onde foi demonstrado que 45% do total dos gêneros e 28% do montante de espécies estão presentes na flora deste parque. O tratamento florístico e taxonômico dos táxons arbustivos e arbóreos de Leguminosae do Parque Nacional do Itatiaia resultaram em um total de 50 espécies e propiciou, a partir da consulta, as revisões de gêneros e em herbários, a reunião de um conjunto de informações sobre as amplitudes geográficas e a ocorrência das espécies, por vezes, também em outras formações vegetacionais (MORIM, 2006).

geográficas e a ocorrência das espécies, por vezes, também em outras formações vegetacionais (MORIM, 2006).

1.2. Considerações sobre a subfamília Caesalpinoideae.

O gênero *Caesalpinia* pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Possui mais de 150 espécies mundialmente distribuídas, composta por árvores e arbustos predominando nas florestas tropicais ou subtropicais. Algumas espécies brasileiras nativas como *Caesalpinia echinata* (fig. 2), conhecida como "pau-brasil", nos tempos coloniais, teve importante valor econômico devido ao comércio da madeira com países europeus para obtenção de corante.



Figura 2 *Caesalpinia echinata* (pau-brasil)

Fonte: www.imagem.ufrj.br acesso em 02/06/2008.

Outras espécies de plantas do gênero *Caesalpinia* apresentam importantes atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antidiabética (*C. bonducella*), antimalárica (*C. volkensis* e *C. pluviosa*), antiinflamatória (*C. sappan* e *C. Ferrea*), (BAHIA, et. al. 2005).

Segundo a OMS as doenças infecciosas continuam a ser a principal causa de morte em todo o mundo, devido a infecções causadas por microorganismos resistentes aos antibióticos. A partir do extrato diclorometano:

Chaco, região semi-árida do sul da América do Sul, pôde-se observar uma atividade contra *Staphylococcus aureus* metilino- resistente (KURIA et. al., 2001) e *Enterococcus faecium* vancomicina – resistente (WOLDEMICHAEL et al, 2002).

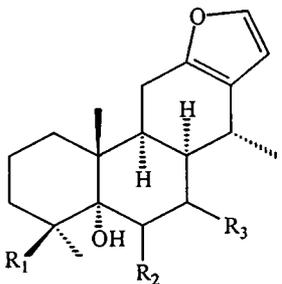
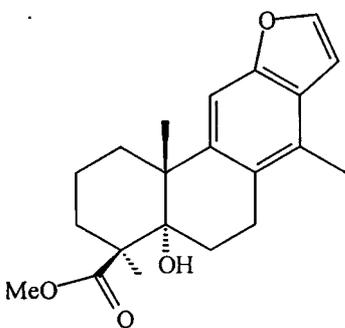
Muitas espécies do gênero *Caesalpinia* têm importância na medicina popular devido as suas atividades biológicas, as quais estão presentes em várias partes da planta. O emprego popular de algumas espécies do gênero está representado no quadro1.

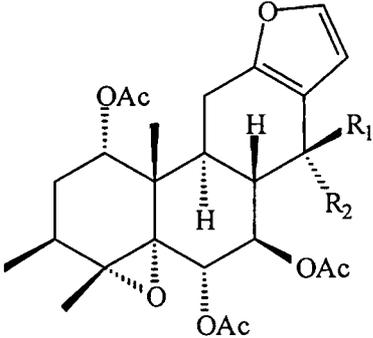
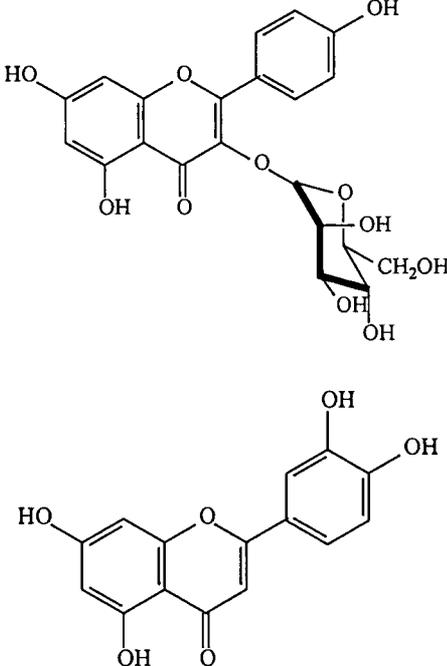
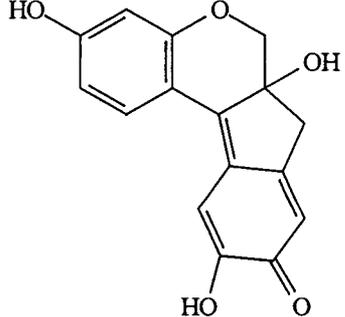
Quadro1. Atividades biológicas de algumas espécies do gênero *caesalpinia*

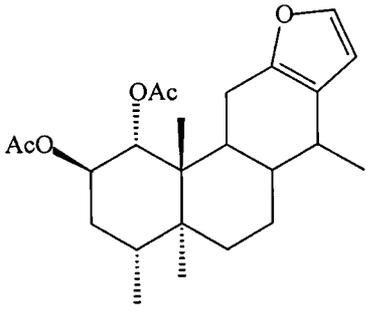
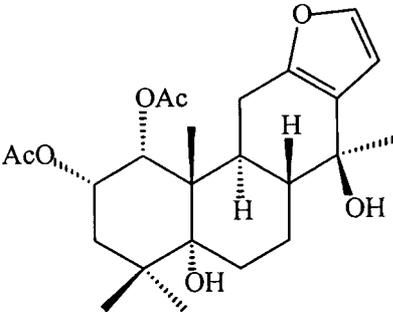
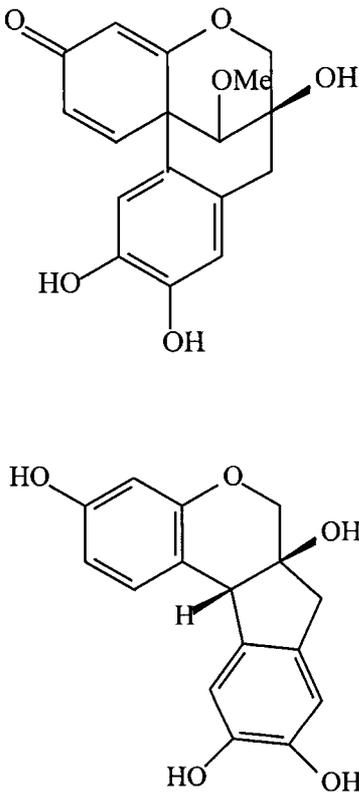
ESPÉCIES	PARTE UTILIZADA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<i>C. bonduc.</i>	Folhas/sementes	Anti-helmíntico	Saravanan et.al.
<i>C. sappan</i>	cerne	Antibacteriana	Lim et. al.
<i>C.benthamiana</i>	Raiz seca	Antioxidante	Dickson et. al.
<i>C. mimosoides</i>	Brotos/Folhas	Antioxidante	Chanwitheesuk et. al.
<i>C. digyna</i>	Raiz	Antioxidante	Srinivasan et. al.
<i>C. paraensis</i>	Flores/Folhas	Antidiarreico	Someya et. al.
<i>C. minax</i>	Sementes	Antiviral	Jiang et. al.
<i>C. echinata</i>	cerne	Inseticida	Da Silva et. al.
<i>C. decapetala</i>	Folhas	Anti-inflamatório	Kiem et. al.
<i>C. major</i>	Raiz	Anti-helmíntico	Roengsumran et. al.
	Sementes	Expec./antitussígeno	Roengsumran et. al.
<i>C. ferrea</i>	Caule	Inib. Topoisomerase II	Nozaki et. al.
	Casca do caule	Cardiovascular	Menezes et. al.
<i>C. crista</i>	Sementes	Anti-helmíntico	Jabbar et. al.

Sob o ponto de vista químico, muitas espécies do gênero *Caesalpinia* foram estudadas. A literatura menciona trabalhos descrevendo a presença de classes diferenciadas de compostos fenólicos característicos desta subfamília (Quadro 2).

Quadro 2. Substâncias isoladas do gênero *Caesalpinia*

Espécie	Estrutura	Referência
<i>C. bonducella</i>	 <p> $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \beta\text{-OAc}$; $R_3 = \text{H}$ $R_1 = \text{CH}_2\text{OAc}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$ $R_1 = \text{COOH}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$ $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \beta\text{-OH}$ $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \beta\text{-OAc}$ </p> 	(Mors et al. 2000)

<p><i>C. crista</i></p>	 <p>$R_1 = \text{CH}_3; R_2 = \text{OH}$ $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{CH}_3$</p>	<p>(Linn <i>et al.</i> 2005)</p>
<p><i>C. decapetala</i></p>		<p>(Kiem <i>et al.</i> 2005)</p>
<p><i>C. echinata</i></p>		<p>(Oliveira <i>et al.</i> 2002)</p>

<p><i>C. major</i></p>		<p>(Roengsumran <i>et al.</i> 2000)</p>
<p><i>C. minax</i></p>		<p>Jiang <i>et al.</i> 2001</p>
<p><i>C. sappan</i></p>		<p>(Nguyen <i>et al.</i> 2004)</p>

1.3. Características botânicas da espécie *Caesalpinia pluviosa* DC. *Peltophoroides* (Benth)G.P. Lewis.

Caesalpinia pluviosa DC. *Peltophoroides* (Fig. 3), conhecida popularmente como sibipiruna e também como coração-de-negro ou sibipira, é uma árvore de grande porte, originária no Brasil. Chega a medir 18 metros de altura, para 7 metros de diâmetro da copa arredondada. Ela também pode ser confundida com o Pau-Brasil ou Pau-Ferro, pela semelhança da sua folhagem. Na verdade é a de maior crescimento da espécie, sendo muito usada para arborização urbana, especialmente da cidade de São Paulo e Rio de Janeiro.

É uma árvore de clima tropical, de crescimento rápido, com folhas pequenas e caducas. A floração ocorre entre setembro a novembro e produz flores amarelas organizadas em cachos. A frutificação dá origem a vagens entre julho e agosto (FLORA BRASILIENSIS).

Em um levantamento bibliográfico realizado no banco de dados NATural PProducts ALERT (NAPRALERT) da University of Illinois em Chicago e Chemical Abstracts não foi encontrado nenhum estudo químico nem farmacológico com essa espécie.



Figura 3: *Caesalpinia pluviosa* DC. *Peltophoroides*.
Fonte: www.wikipedia.org acesso em 01/07/2008.

1.4. Considerações sobre Flavonóides

Os flavonóides estão presentes em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal e normalmente fazem parte da dieta humana. Os flavonóides apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre na forma de glicosídeos (também chamados de heterosídeos), sendo a glicose o carboidrato mais usual, porém outras unidades de açúcares podem também ser encontrados, como xilose, galactose e ramnose. O sítio de glicosilação preferido dos flavonóides é a posição 3 e, com menos freqüência a posição 7 (FILHO et al., 2001).

A presença de flavonóides em plantas é de fundamental importância e pode estar associada a sua capacidade de agir como filtros de UV, protegendo os tecidos responsáveis pela fotossíntese de possíveis danos, ao absorver radiação solar especialmente a banda UV-B (280-315 nm). Além disso, essas substâncias oferecem proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; agem como antioxidantes; atuam no controle da ação dos hormônios vegetais; como agentes aleopáticos; e na inibição de enzimas (SIMÕES et al. 1999).

De modo geral, os polifenóis, em particular os flavonóides, são considerados antioxidantes mais efetivos que o α -tocoferol e o ácido ascórbico. Sua atividade depende de sua estrutura, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H^+ e de elétrons. Os flavonóides monohidroxilados apresentam atividade muito baixa se comparados com os flavonóides dihidroxilados. Quercetina, miricetina, luteonina, possuem múltiplas hidroxilas e são por isso, conhecidos como potentes antioxidantes naturais (BARREIROS et al, 2000; CAO et al, 1997).

Os flavonóides são compostos fenólicos complexos e sua estrutura caracteriza-se por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C) (Fig. 4, p.32). São biossintetizados a partir da via do ácido chiquímico e do acetato, constituindo uma importante classe de polifenóis e apresentando uma relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais.

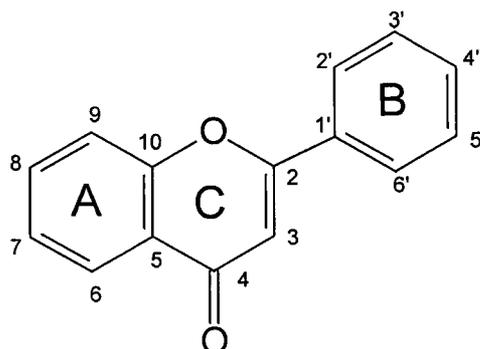


Figura 4: Esqueleto básico de um flavonóide (anéis A, B e C)

1.5. Considerações sobre atividade antioxidante

A peroxidação lipídica tem recebido muita atenção, devido ao seu papel nos efeitos patológicos das doenças, tais como arteriosclerose, câncer e também no envelhecimento. É bem sabido que o estresse oxidativo, especialmente a exposição a raios ultravioletas é a causa principal da peroxidação lipídica e celulares o qual provoca danos à pele. A partir de uma infusão preparada com flores e folhas de *Caesapinia paraensis*, utilizada em comunidade indiana no tratamento de diarréia e bronquite, foram identificados compostos fenólicos e polifenóis (SHIMIZU et al, 2003), os quais, em estudo posterior mostraram-se responsáveis pelos efeitos antioxidantes dos extratos desta planta e seus resultados comparados ao tocoferol e ácido ascórbico (SOMEYA et al, 2003).

A busca por substâncias antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos, especialmente após a introdução do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* na terapêutica (MOREIRA et al, 2002). Os antioxidantes protegem os organismos vivos dos danos causados pela produção de radicais livres (espécies cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio) e são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN), peroxidação lipídica, danos a proteínas e lise do DNA.

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes.

Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios como: peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (SARMA, 1999).

O uso de plantas na medicina tradicional ainda acontece de forma generalizada, e uma grande fonte de antioxidantes naturais mostra-se como verdadeiros promissores no desenvolvimento de novos fármacos (SRINIVASAN et al, 2007).

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

-Contribuir para o estudo quimiotaxonômico do gênero *Caesalpinia*, através do estudo químico da espécie *Caesalpinia pluviosa* DC. *Peltophoroides* Benth G.P. Lewis.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar alguns constituintes químicos presentes nas cascas do caule de *Caesalpinia pluviosa*;
- Identificar e/ou propor a estrutura dos constituintes isolados;
- Avaliar a atividade antioxidante das substâncias isoladas;
- Disponibilizar extratos, frações para testes biológicos e/ou farmacológicos.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material Vegetal

As cascas do caule de *Caesalpinia pluviosa* foram coletadas no jardim do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, situado no campus I da Universidade Federal da Paraíba, no município de João Pessoa, estado da Paraíba, em abril-maio de 2006. O material botânico foi identificado pela professora Dr^a Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF); uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba sob o código Agra et al 7040.

3.1.1. Processamento das cascas do caule

O material botânico foi dessecado em estufa com ar circulante à temperatura aproximadamente de 40° c, durante três dias. Após secagem, foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 14 kg de pó de casca de caule.

3.1.2. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das cascas do caule

O pó das cascas do caule seco e pulverizado foi submetido a um processo de maceração com EtOH a 95%, em um recipiente de aço inoxidável, em um intervalo aproximadamente 3 - 5 dias, por três vezes, a fim de garantir ao máximo a extração dos constituintes químicos. Após maceração exaustiva a solução extrativa foi concentrada em rota-vapor sob pressão reduzida e a uma temperatura de 45 – 50° c, obtendo-se o extrato etanólico bruto (377,1g, representando 2,7% de rendimento). Este extrato foi solubilizado em uma mistura de MeOH:H₂O (3:7) sob agitação com auxílio de um homogeneizador por aproximadamente 40 minutos e em seguida particionado com os solventes HEX, CHCl₃ e AcOEt, em ampola de separação sob agitação manual, obtendo-se respectivamente as fases hexânica (25,16g), clorofórmica 16,91g) e acetato de etila (51,94g) (fluxograma 1, p. 40).

3.2. Métodos de análise

3.2.1. Métodos cromatográficos

Na cromatografia de adsorção em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,040 – 0,063 mm. O extrato em forma de pastilha foi colocado no topo da coluna, procedendo-se então a eluição com o solvente HEX, CHCl₃, DCM, AcOET e MeOH, puros ou em mistura binária em gradiente crescente de polaridade. O diâmetro e comprimento das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de sílica utilizadas.

Para cromatografia em camada delgada comparativa, foram utilizadas cromatoplasas sílica gel 60, PF₂₅₄ procedência MERCK, na espessura de 0,25 mm. Para cromatografia em camada delgada preparativa foram utilizadas placas de 1 mm de espessura de procedência MERCK.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram executadas pela exposição das mesmas à lâmpada de irradiação ultravioleta, em aparelho Spectroline[®], modelo ENF-260C, 115volts, 60Hz, 0,20Amps, com dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), pela pulverização com reagente de Lieberman-Buchard, ou ainda, pela saturação em câmara com vapores de iodo.

O grau de pureza das substâncias foi evidenciado por CCDC, determinando-se a pureza quando observada uma única mancha após revelação e através de análises dos espectros de RMN ¹H e ¹³C 1D e 2D (BB) das substâncias isoladas.

Como fases móveis foram utilizadas os solventes HEX, CHCl₃, DCM, AcOET e MeOH, isoladamente ou em mistura binária em ordem de polaridade crescente. Os solventes empregados foram das marcas quemis e quimex .

3.2.2. Métodos espectroscópicos

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetros BOMEM-MB-102, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros VARIAN, modelo GEMINI 2000, operando a 300 MHz para hidrogênio (RMN ¹H) e 75

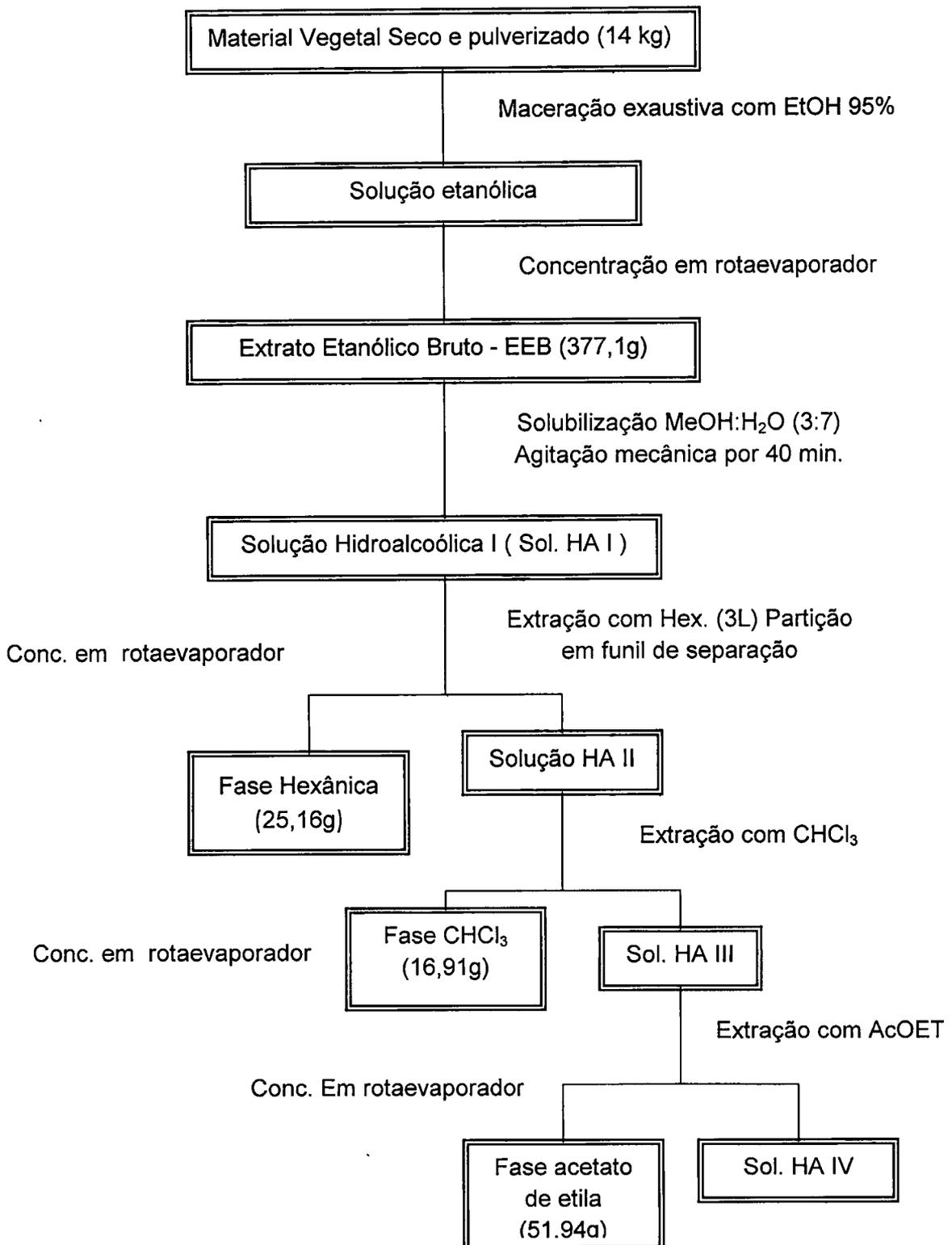
MHz para carbono-13 (RMN ^{13}C). Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD) e acetona deuterada (CD_3COCD_3). O tetrametilsilano foi usado como sinal do solvente de referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz. As multiplicidades dos sinais em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *t* (tripleto).

Os Espectros de Massas foram obtidos no sistema CL-EM 2310 da Shimadzu, modo APCI, no MicroTOF Brucker Esquire 300 (alta resolução) e no LCMS-2010 A da Shimadzu, modo positivo e negativo.

Os testes de atividade antioxidante foram obtidos em espectrofotômetro CARY 50 UV-VISIBLE da VARIAN.

Todas as análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia – IQ – UFBA.

FLUXOGRAMA 1 : Obtenção e particionamento do EEB das cascas do caule de *C. pluviosa*.



3.3. Avaliação fitoquímica preliminar dos constituintes químicos

Esta avaliação procura sistematizar ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem um extrato vegetal. Pode ser considerada uma análise rápida e superficial por meio de reagentes específicos, os quais indicaram, através de mudança na coloração ou precipitação, a presença ou a ausência de metabólitos secundários neste extrato. A triagem fitoquímica preliminar foi realizada com o EEB, utilizando a metodologia descrita por Matos (1997). Os resultados do "screening" encontram-se disposto na Tabela 1.

Tabela 1: Dados do screening fitoquímico do EEB de *C.pluviosa*

GRUPOS QUÍMICOS	TESTES APLICADOS	RESULTADOS
Alcalóides	Bouchardat	-
	Mayer	-
	Dragendorff	-
	Ácido Sílico Tungstico	-
Esteróides / Terpenóides	Lieberman-Burchard	+
Taninos	Cloreto Férrico 2%	++
Flavonóides	Shinoda	++
	Oxalo-Bórico	+++
Saponinas	Teste de Espuma	+

Nos resultados dos testes foram utilizadas as seguintes convenções:

- (-) Reação Negativa
- (+) Reação fracamente positiva
- (++) Reação positiva
- (+++) Reação fortemente positiva

3.4. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica

A fase clorofórmica (16,91g) foi submetida à CC utilizando como adsorvente sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) Merck e como eluentes os solventes CHCl_3 e MeOH individualmente ou em misturas binárias em gradiente crescente de polaridade. Nesta CC foram coletadas 44 frações de 500 mL cada, as quais foram concentradas em rota-evaporador. Os resultados obtidos após o fracionamento cromatográfico são mostrados na Tabela 2, p.42.

Tabela 2: Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica

FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1-8	CHCl ₃	100
9-12	CHCl ₃ :MeOH	97:3
13-23	CHCl ₃ :MeOH	93:7
24-28	CHCl ₃ :MeOH	90:10
29-30	CHCl ₃ :MeOH	85:15
31-41	CHCl ₃ :MeOH	50:50
42-44	MeOH	100

As 44 frações foram monitoradas através de CCDC em diversos sistemas de solventes e reunidas em 6 grupos de acordo com seus R_f, como mostrados a seguir: CP 1-11; CP 12-20; CP 21-24; CP 25-29; CP 30-34; CP 35-44. Após a reunião das frações e evaporação do solvente em temperatura ambiente, as mesmas foram pesadas obtendo-se, respectivamente: 0,4203g; 6g; 0,1715g; 0,081g; 0,163g; 0,243g.

3.4.1. Fracionamento da Fração CP 12-20

A fração CP 12-20 apresentou a maior massa e foi submetida novamente a CC usando-se como fase estacionária sílica gel 60 Flash e fase móvel os solventes CHCl₃, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, obedecendo à ordem crescente de polaridade. Nesta CC foram coletadas 53 sub-frações de 250 mL cada, as quais foram concentradas em rotaevaporador. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados referentes ao fracionamento da fração 12-20 (coluna A)

SUB-FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1-3	CHCl ₃	100
4-11	CHCl ₃ :AcOEt	90:10
12-13	CHCl ₃ :AcOEt	88:12
14-15	CHCl ₃ :AcOEt	88:15
16-20	CHCl ₃ :AcOEt	80:20
21-26	CHCl ₃ :AcOEt	70:30
27-28	CHCl ₃ :AcOEt	60:40
29-30	CHCl ₃ :AcOEt	40:60
31-32	CHCl ₃ :AcOEt	20:80
33-40	AcOEt	100
41-43	AcOEt: MeOH	90:10
44-50	AcOEt: MeOH	50:50
51-53	MeOH	100

Após análise em CCDC usando-se como eluentes CHCl_3 (100) e CHCl_3 :AcOEt (90:10), as sub-frações foram pesadas e reunidas em 13 grupos de acordo com os seus R_f , a saber: CP1A; CP2A; CP3A; CP4A (0,109 g); CP5A (0,0543g); CP6A(0,2166 g); CP7A(0,0971 g); CP8A(0,0671g); CP9A(0,2668 g); CP10A (0,1808 g); CP11A (0,529 g); CP12A (0,8746 g); CP13A (1,539 g).

As sub-frações CP1A; CP2A e CP3A foram descartadas após análise do espectro de RMN ^1H por se tratarem de material graxo. As demais ficaram expostas ao ambiente para evaporação do solvente.

Depois de analisadas em CCDC, as sub-frações CP4A, CP10A e CP11A foram submetidas a uma CC usando sílica flash como fase estacionária e fase móvel clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo à ordem crescente de polaridade.

3.4.1.1. Fracionamento da Sub-fração CP4A

Na CC de CP4A foram coletadas 19 sub-frações de 50 mL cada, as quais foram concentradas em rota-evaporador. Os resultados do fracionamento cromatográfico são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP4A

SUB-FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1	CHCl_3	100
2-7	CHCl_3 :AcOEt	90:10
8-12	CHCl_3 :AcOEt	80:20
13	CHCl_3 :AcOEt	70:30
14	CHCl_3 :AcOEt	50:50
15-16	AcOEt	100
17-18	AcOEt:MeOH	50:50
19	MeOH	100

As 19 sub-frações foram monitoradas através de CCDC em diversos sistemas de solventes, reunidas em 4 grupos de acordo com seus R_f e pesadas: CP4A1(0,0204g); CP4A2(0,0427g); CP4A3(0,0216g). A CP4A4 foi descartada após análise do espectro de RMN ^1H .

Após o agrupamento e evaporação do solvente à temperatura ambiente, observou-se na sub-fração CP4A1 a presença de um precipitado, o qual, após análise em CCDC, indicou um aspecto de mistura. A mesma foi submetida a

uma CC usando Sephadex LH-20 como fase fixa e uma mistura de DCM-MeOH 1:1, como fase móvel. A substância isolada da sub-fração CP4A1 foi codificada como CP1 (20,4 mg).

3.4.1.2. Fracionamento da Sub-fração CP10A

A purificação de CP10A em CC forneceu 32 sub-frações de 50 mL cada, as quais foram concentradas em rota-evaporador. Os resultados do fracionamento cromatográfico são fornecidos na Tabela 5.

Tabela 5: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP10A

SUB-FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1-13	CHCl ₃ :AcOEt	60:40
14-20	CHCl ₃ :AcOEt	50:50
21-24	CHCl ₃ :AcOEt	20:80
25-27	AcOEt	100
28-32	AcOEt:MeOH	70:30

As 32 sub-frações foram monitoradas através de CCDC em diversos sistemas de solventes e reunidas em 5 grupos de acordo com seus R_f: CP10A1; CP10A2; CP10A3; CP10A4; CP10A5. As sub-frações 26-32 não mostraram cromatogramas satisfatórios e foram, por isso, guardadas separadamente para análise posterior.

3.4.1.2.1. Fracionamento da Sub-fração CP10A3

Após o agrupamento e evaporação do solvente à temperatura ambiente, a fração CP10A3 (0,0627g) foi submetida à CC, utilizando sílica flash (0,035-0,070 mm) como fase estacionária e fase móvel o solvente DCM e MeOH, puro ou em misturas binárias, obedecendo à ordem crescente de polaridade.

A CC de CP10A3 forneceu 8 sub-frações de 50 mL cada, as quais foram concentradas em rota-evaporador. Os resultados do fracionamento cromatográfico são fornecidos na Tabela 6, p.45.

Tabela 6: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP10A3

SUB-FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1-4	DCM:MeOH	90:10
5	DCM:MeOH	80:20
6-7	DCM:MeOH	50:50
8	MeOH	100

As 8 sub-frações foram monitoradas através de CCDC em diversos sistemas de solventes e após análise do cromatograma as frações de 2 a 4 mostraram presença de duas substâncias na placa. Foram reunidas, pesadas e identificadas sob o código CP10A3a (0,0471g).

Após análise dos espectros de ^1H e ^{13}C da fração CP10A3a, a mesma foi submetida a uma CCDP. Após análise em CCDC, observou-se novamente as 2 manchas, revelando R_f muito próximo e de difícil separação. Esta fração foi posta em CC usando sephadex LH-20 como fase fixa e uma mistura de DCM:MeOH 1:1, como fase móvel. A substância da sub-fração CP10A3a foi isolada em mistura e codificada como CP2 (25 mg).

3.4.1.3. Fracionamento da Sub-fração CP11A

A purificação de CP11A em CC forneceu 8 sub-frações de 100 mL cada, as quais foram concentradas em rota-evaporador. Os resultados do fracionamento cromatográfico são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados referentes ao fracionamento da sub-fração CP11A

SUB-FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1-3	CHCl_3 :MeOH	95:5
4-5	CHCl_3 :MeOH	90:10
6-7	CHCl_3 :MeOH	80:20
8	CHCl_3 :MeOH	60:40

As 8 sub-frações foram monitoradas através de CCDC em diversos sistemas de solventes e reunidas em 6 grupos de acordo com seus R_f : CP11A1; CP11A2; CP11A3; CP11A4; CP11A5; CP11A6. Após o agrupamento e evaporação do solvente à temperatura ambiente, observou-se na fração CP11A6 um precipitado amarelado, o qual foi analisado através de técnicas de RMN ^1H e ^{13}C (BB) e codificado como CP3.

3.4.2. Fracionamento da Fração CP 1-11

A fração CP 1-11 (0,4203g) foi analisada por CCDC em um sistema HEX:AcOEt 80:20 e revelado com o reagente Lieberman Bouchard, o qual mostrou resultado positivo indicando a presença de esteroides.

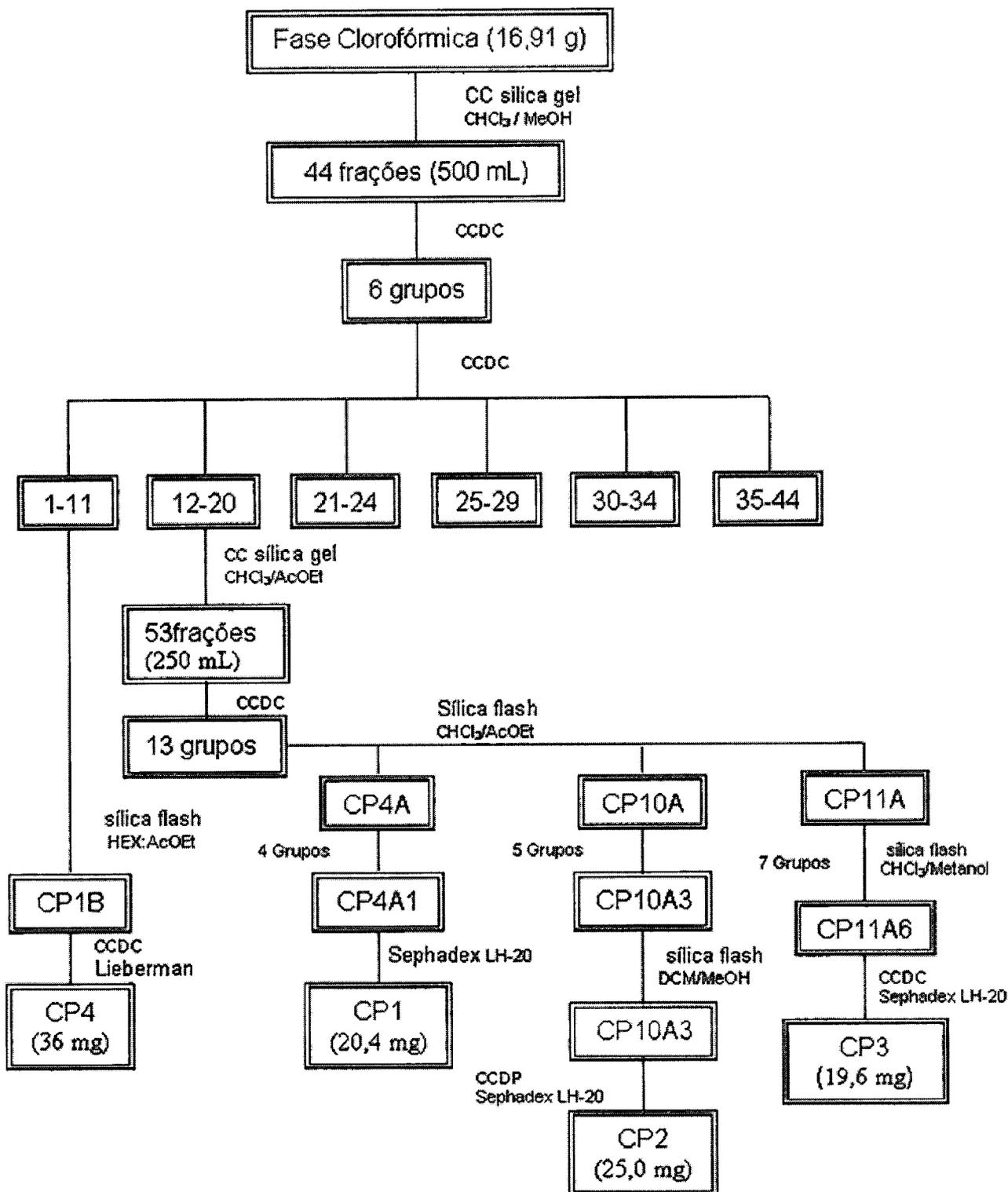
Esta fração foi submetida a CC empregando-se sílica flash usando como fase móvel os solventes HEX, AcOEt e MeOH puro ou em misturas binárias de acordo com a ordem crescente de polaridade e coletadas sub-frações de 50mL. O resultado do fracionamento é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Dados referentes ao fracionamento da fração CP 1-11 (coluna B)

SUB-FRAÇÕES	SOLVENTE	PROPORÇÃO (%)
1-3	HEX:AcOEt	90:10
4-8	HEX:AcOEt	80:20
9-12	HEX:AcOEt	70:30
13-15	HEX:AcOEt	50:50
16-19	AcOEt	100
20-21	AcOEt:MeOH	50:50
22	MeOH	100

A sub-fração CP1B, após evaporação do solvente à temperatura ambiente, apresentou-se como um pó amarelado, o qual, após análise de seus espectros de ^1H e ^{13}C , indicou a presença de uma substância codificada como CP4 (36 mg).

FLUXOGRAMA 2 : Esquema geral para fracionamento, isolamento e purificação de constituintes da fase clorofórmica.



3.5. Teste de atividade antioxidante

As substâncias CP1, CP2 e CP3, isoladas de *Caesalpinia pluviosa* foram submetidas ao teste de atividade antioxidante *in vitro*, pelo seqüestro do radical DPPH•, (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), (Fig. 5), e os seus resultados comparados aos padrões quercetina e ácido gálico. O teste foi realizado no Laboratório da Faculdade de Farmácia da UFBA.

3.5.1. Seqüestro do radical livre DPPH•

Para este procedimento, foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (40µg/mL) e soluções com as substâncias testes (CP1, CP2 e CP3) e padrão (Quercetina e Ácido Gálico) em 3 concentrações diferentes (120, 60 e 30 µg/mL). Foram utilizadas ainda cubeta-UV macro (1cm x 1cm x 3cm) da marca BRAND, onde se colocava, separadamente, 1ml das substâncias testes e/ou padrão + 2ml de DPPH•. O aparelho foi calibrado ao se fazer uma leitura com MeOH puro. Para a leitura do branco foi utilizado 1ml de MeOH + 2,0 ml da solução de DPPH•. As análises foram realizadas em triplicatas. As absorbâncias foram registradas a 517nm no tempo zero e imediatamente após 15 minutos de incubação da reação à temperatura ambiente e protegida da incidência direta de iluminação no espectrofotômetro (CARY 50 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER Varian, Austrália).

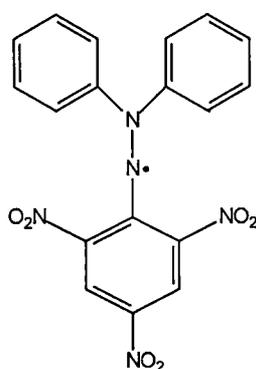


Figura 5: DPPH•

**RESULTADOS
E DISCUSSÃO**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1. Identificação estrutural de CP1

O composto CP1 foi isolado como um sólido branco e sua identificação foram baseados nas análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (BB), espectro de IV e EM.

O EM (Fig. 6, p.52) de CP1 apresentou íon molecular m/z 182 e juntamente com dados obtidos no espectro de RMN ^1H e ^{13}C permitiram propor FM $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$, para esta substância.

O espectro de absorção no IV (Fig. 7, p.52) mostrou bandas de estiramento características de O-H (ν . 3274 cm^{-1}), de carbonila conjugada (ν . 1707 cm^{-1}), absorções na região característica de sistema aromático, que envolvem a deformação axial das ligações C=C do anel (ν .1600-1585 cm^{-1} ; 1500-1400 cm^{-1}) e deformações axiais do C-O (ν .1100-1000 cm^{-1}).

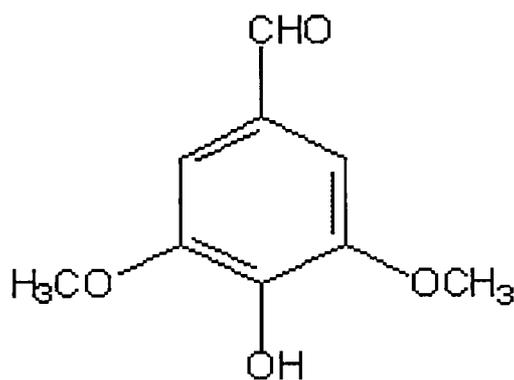
O espectro de RMN ^1H (Fig. 8, p.53) de CP1 apresentou sinal característico de hidrogênio do grupo aldeído, hidrogênio ligado a anel aromático bem como de grupos metoxílas. O singleto em δ 9,89 integrado para 1H foi atribuído ao hidrogênio característico do grupo aldeído. O sinal em δ 7,25 (s) com integração para 2H, referente aos hidrogênios ligados a anel aromático, sugeriu a presença de anel aromático tetra substituído. O singleto em δ 4,05 integrado para 6H foi indicativo da presença de dois grupos metoxílicos quimicamente equivalentes ligado a anel aromático (Tab. 9, p.51).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 9 e 9a, p.54) indicou presença de 6 sinais, sendo 3 deles referentes a carbonos não hidrogenados, 2 carbonos metínicos e 1 carbono metoxílico. A intensidade do sinal em δ 56,49 sugeriu a presença de dois grupos metoxílicos, os quais em comparação com dados descritos na literatura foram indicativos de estarem nas posições 3 e 5. Além deste, o sinal em δ 106,76, também de intensidade dobrada, confirmou a presença de dois carbonos química e magneticamente equivalentes. O sinal em δ 179,03 corrobora com a informação obtida no espectro de IV, referente à presença de um grupo aldeído, assim como o sinal em δ 140,88 a C sp^2 hidroxilado (Tab. 9, p.51). Estes dados juntamente com análise da

fragmentação (Fig. 10, p.55) observada no EM permitiram identificar CP1 como sendo 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído.

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) [J (Hz); δ (ppm)], CDCl_3 de CP1

POSIÇÃO	δ ^1H ; multiplicidade	δ ^{13}C
1		128,39
2/6	7,25 (s)	106,76
3/5		147,36
4		140,88
CHO	9,89 (s)	179,03
OCH_3	4,05 (s)	56,49



CP1

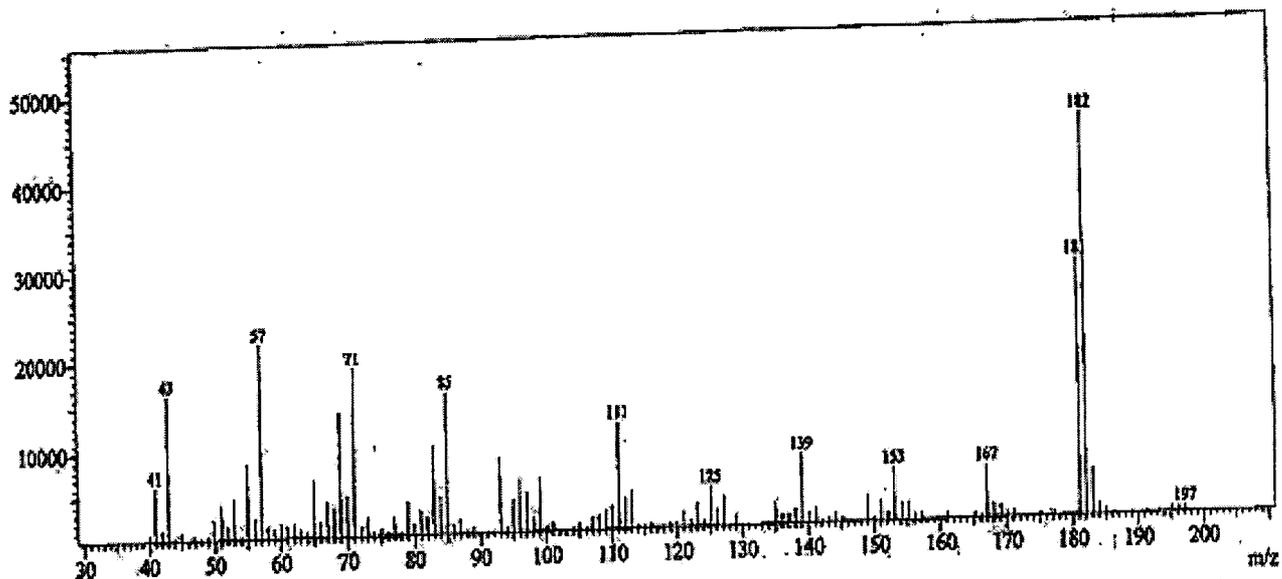


Figura 6: Espectro de Massas modo IE 70eV de CP1

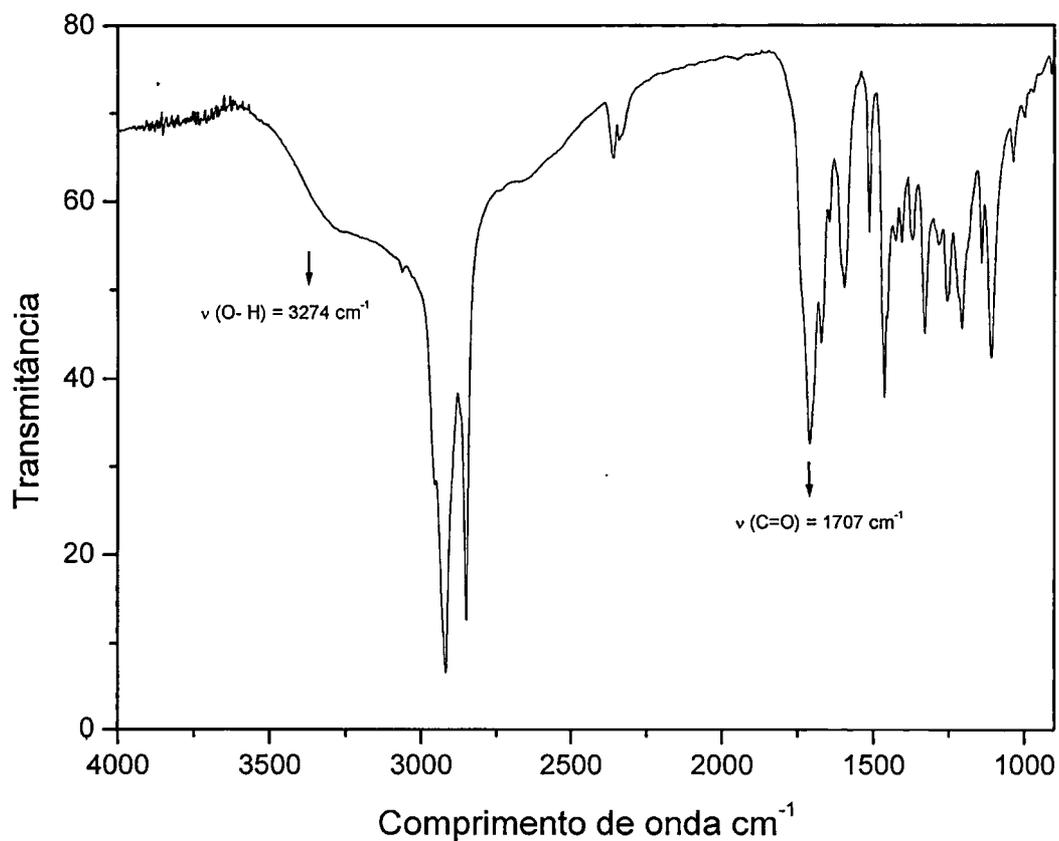


Figura 7: Espectro de absorção na região do IV em pastilha de KBr de CP1

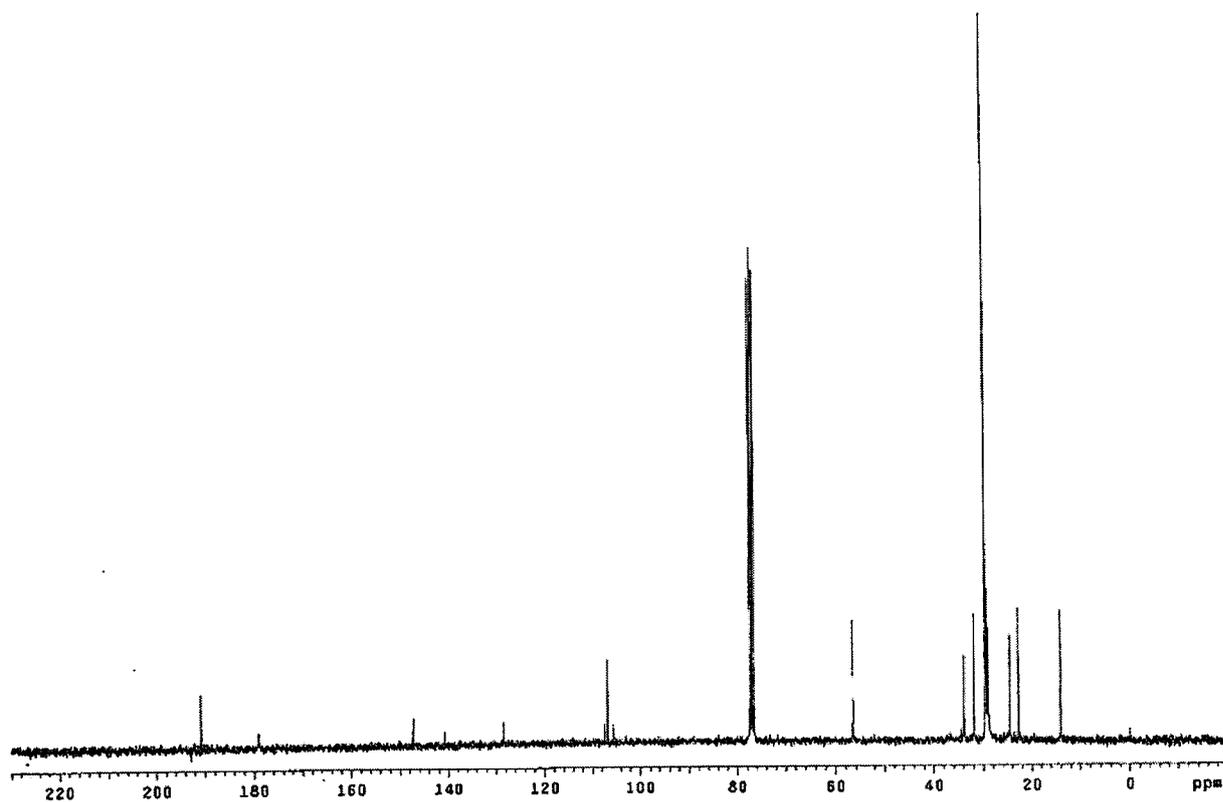


Figura 9 : Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP1

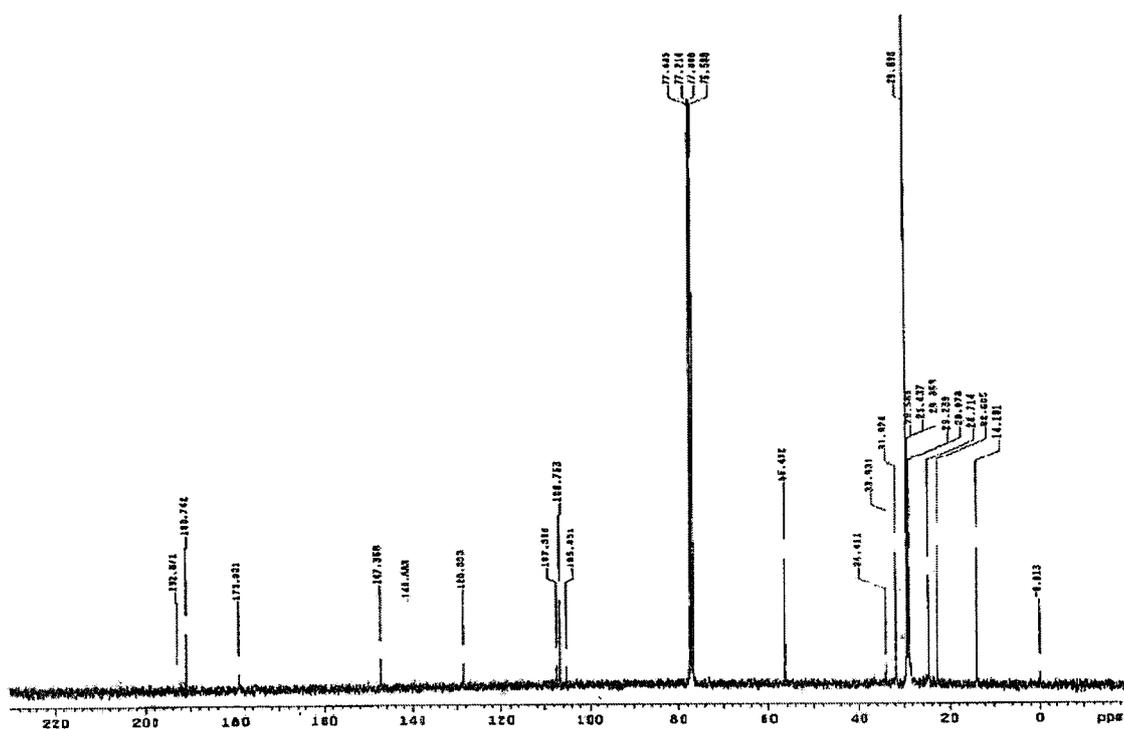


Figura 9a : Espectro expandido de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP1

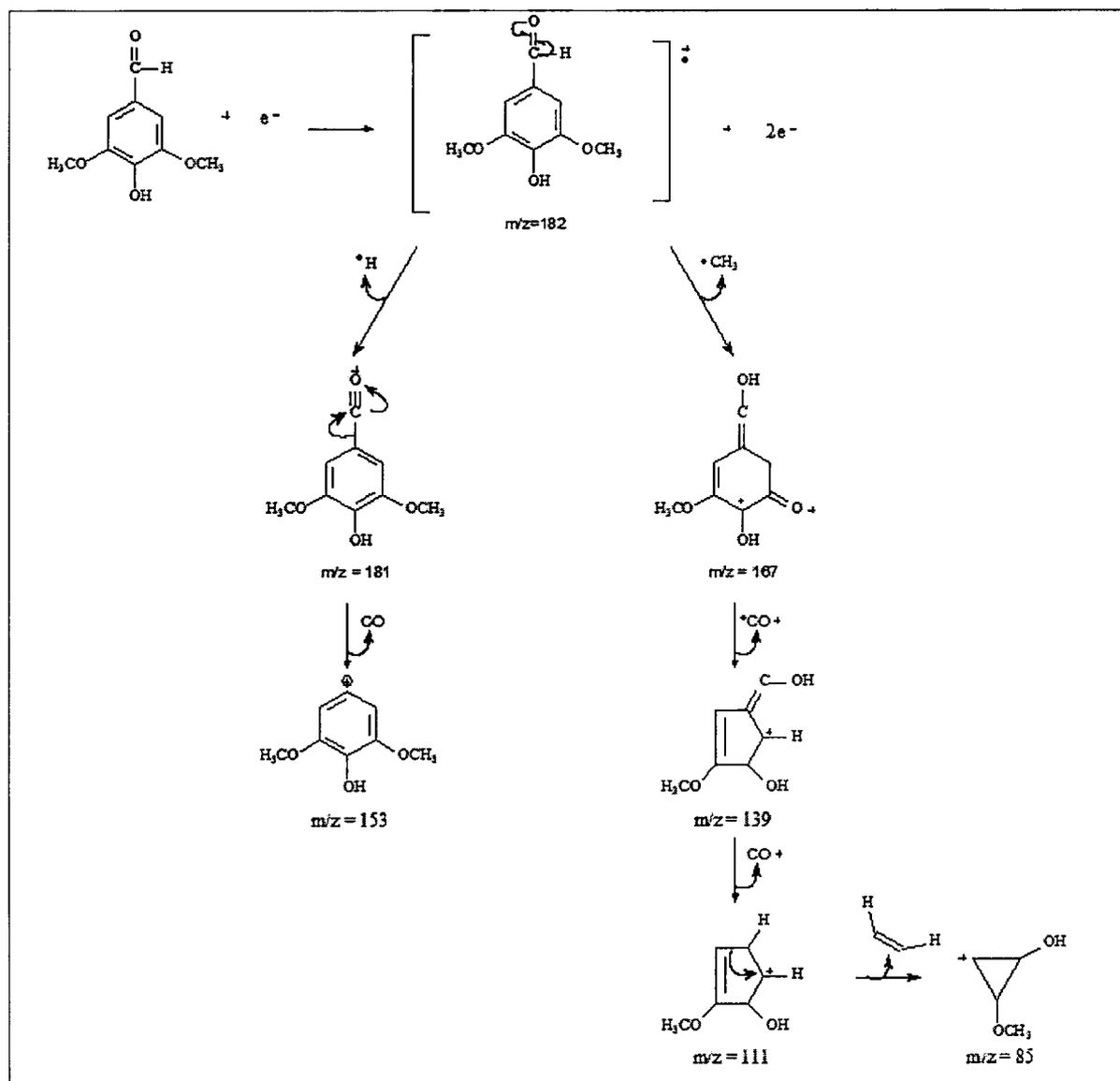


Figura 10: Mecanismo de fragmentação proposto para CP1

4.2. Identificação estrutural de CP2 :

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (BB) quando comparados com dados relatados na literatura, sugeriram que a fração era constituída por uma mistura de flavonas (AGRAWAL, 1989, GU et al, 2008). O espectro de IV indicou a presença de hidroxilas fenólicas em $\nu_{\text{O-H}}$ 3252 cm^{-1} e de carbonilas conjugadas em $\nu_{\text{C=O}}$ 1650 cm^{-1} (Fig. 11, p.59).

Os sinais registrados no espectro de RMN de ^1H indicaram tratar-se de uma mistura, uma vez que foram registrados vários sinais na região de δ 6 – 7,8 ppm. Nesta região são comumente registrados os hidrogênios ligados a carbonos aromáticos dos anéis A e C de flavonóides. O sinal em δ 7,78 (*d*, $J= 8,7$ Hz) e δ 7,03 (*d*, $J= 8,4$ Hz), sugeriu a presença de um sistema 1-4 dissubstituído compatível com os dados descritos na literatura para a flavona apigenina (GU et al, 2008), assim como o sinal em δ 7,18 (*d*, $J= 9,0$ Hz) e δ 6,96 (*d*, $J= 8,1$ Hz) sugeriu a presença de outro sistema 1-4 dissubstituído com sinais compatíveis para acacetina. A análise do espectro de RMN de ^{13}C de CP2, aliado a análise dos espectros de DEPT 135°, permitiu identificar a presença de pelo menos duas flavonas como constituintes majoritários da mistura. O sinal em δ 131,80 ppm referente ao (C- 2'/6') e δ 116,51* ppm referente ao (C- 3'/5'), confirmou os dados espectrais de um sistema p-substituído para apigenina (GU et al, 2008). O sinal em δ 132,0 ppm e δ 116,85* ppm confirmou o sistema 1-4 dissubstituído para acacetina (DA COSTA et al, 2008; AGRAWAL, 1989) (Fig. 12 e 12a, p.60; Fig.13 e 13a, p.61; Fig.14, p.62, Tab. 10, p. 58).

A partir da análise do espectro de gHMBC foi possível verificar a correlação entre os hidrogênios do grupo metoxila com o carbono não hidrogenado (C - 4') em δ 162,93. Para a acacetina este carbono foi descrito em δ 163,6 (fig. 15, p.63) (DA COSTA et al, 2008).

O espectro de gHMQC mostrou um sinal em δ 104,7 (C-3) correlacionando com o sinal do H δ 6,07 para acacetina. O sinal em δ 99,6 (C-3) sugere correlação com o sinal do H δ 6,11 para apigenina. Os mesmos aparecem na literatura em δ 105,0 e δ 102,73 respectivamente (DA COSTA et al, 2008 (GU et al 2008). O padrão de substituição do anel A das flavonas foi

determinado pela presença dos carbonos C-H em δ 98,9 e δ 93,1 ppm (Fig. 16, p.63).

Estes dados, quando comparados com os dados descritos na literatura para apigenina e acacetina, permitiram identificar CP2 como uma mistura destas flavonas.

* Os valores podem estar trocados

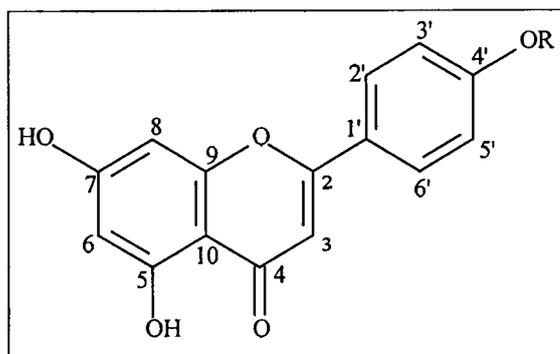
Tabela 10: Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz); [J(Hz), δ (ppm)] de CP2 em CD_3OD para apigenina e acacetina.

Posição	δ ^1H , multiplicidade, J	δ ^{13}C
1		
2		167,9 / 167,2
3	6,11 / 6,07 (s)	99,6** / 104,7**
4		184,1 / 184,1
5		158,9 / 156,7
6	6,14 / 6,26 J*	99,5 / 99,5
7		166,1 / 167,2
8	6,34 / 6,26 J*	93,2**/ 93,2
9		156,7 / 158,9
10		104,7 / 109,9
1'		121,5 / 123,8
2'	7,03, d, J= 8,7	131,8 / 132,0
3'	7,78, d, J= 8,7	116,8 / 116,5
4'		161,3 / 162,9 ***
5'	7,78, d, J= 8,7	116,8 / 116,5
6'	7,03, d, J= 8,7	131,8 / 132,0
OCH_3	3,29, (s)	55,9

J* Constante indeterminada

**Atribuído através de gHMQC

***Atribuído através de gHMBC



R= H: Apigenina

R= Me: Acacetina

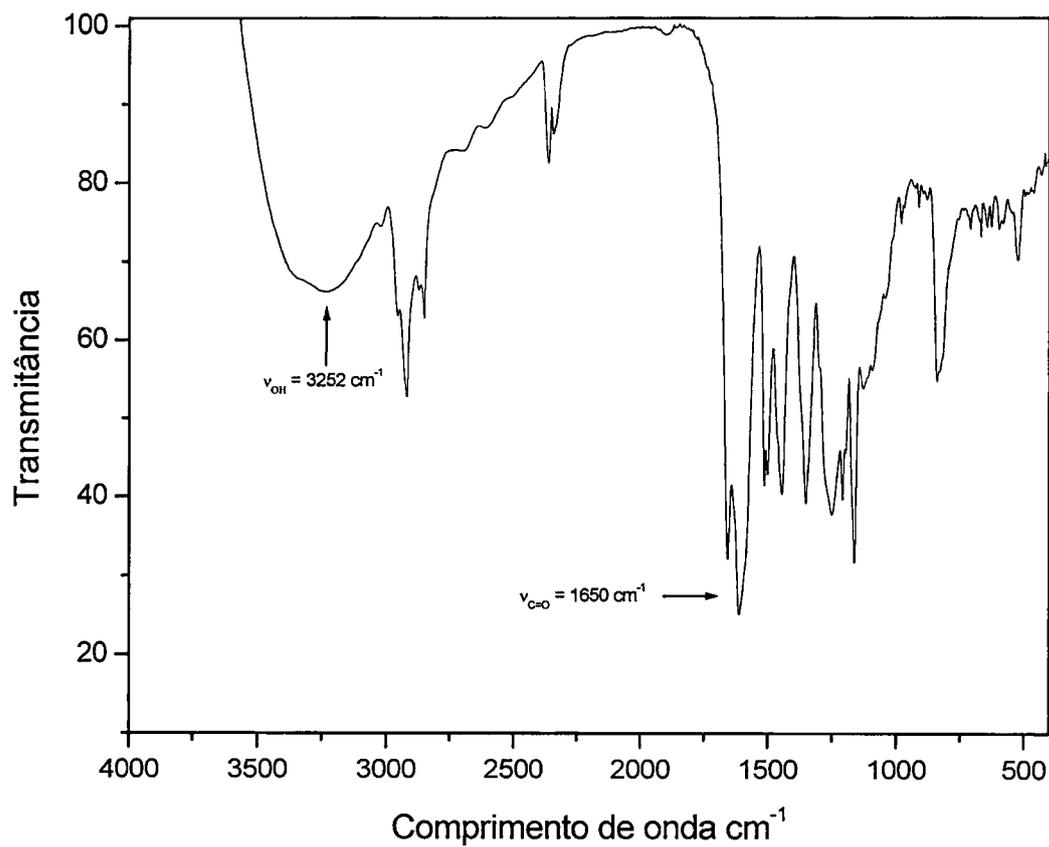


Figura 11: Espectro de absorção na região do IV de CP2 em KBr.

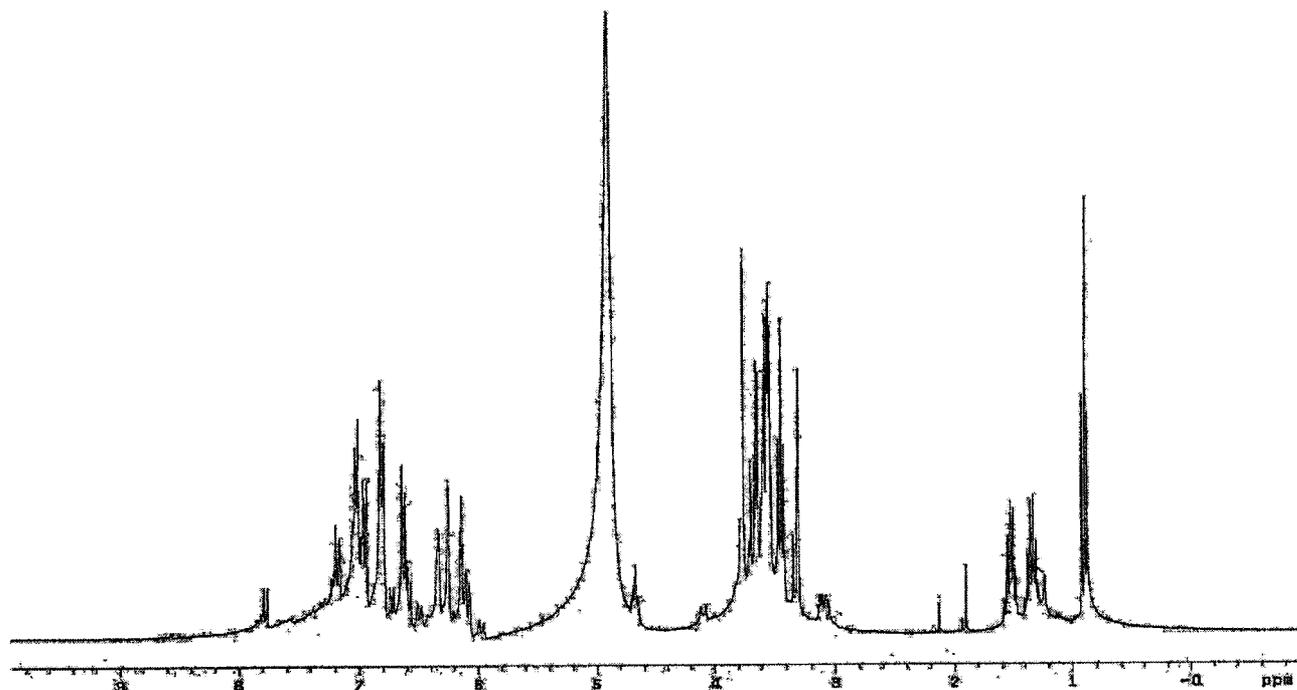


Figura 12: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] de CP2

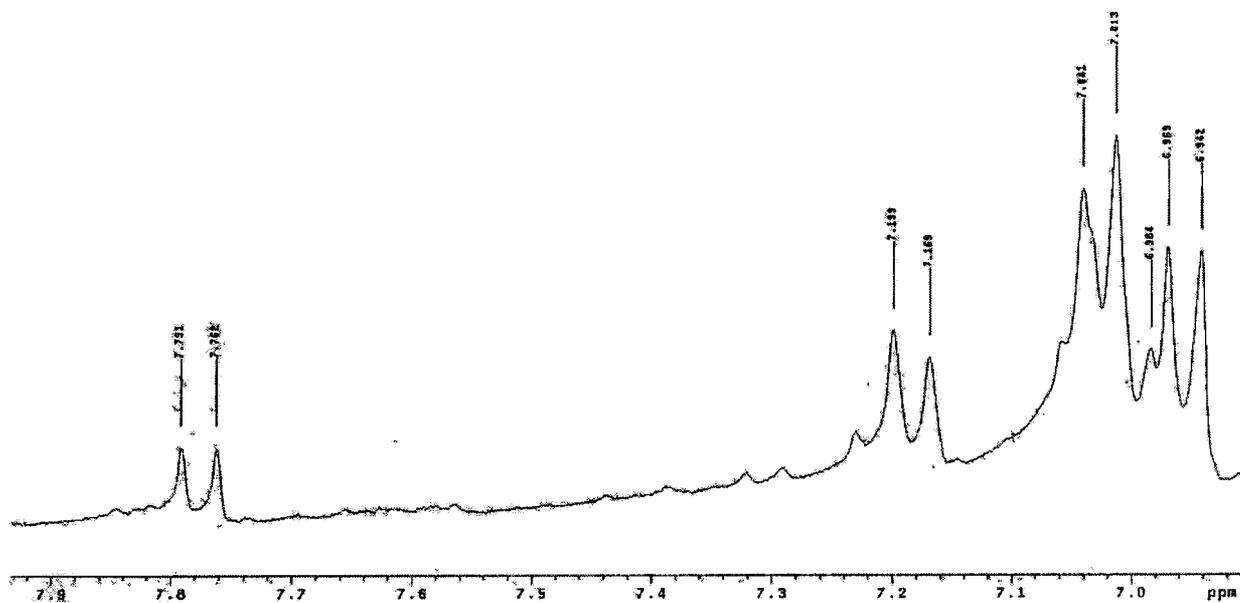
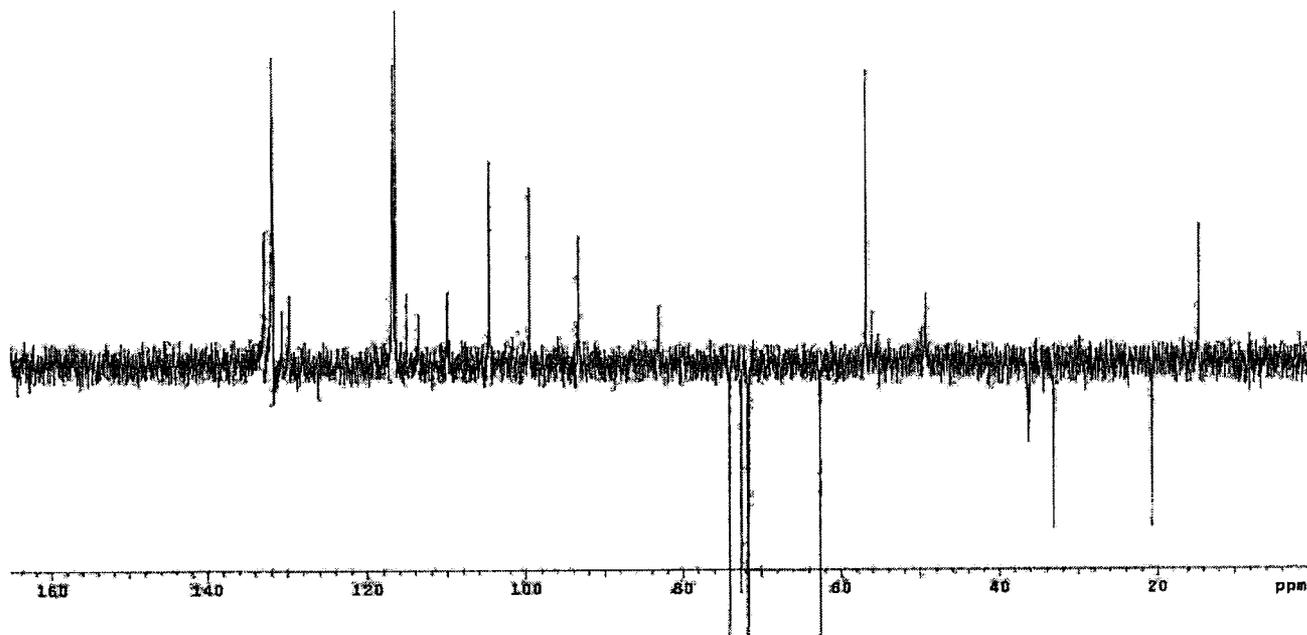
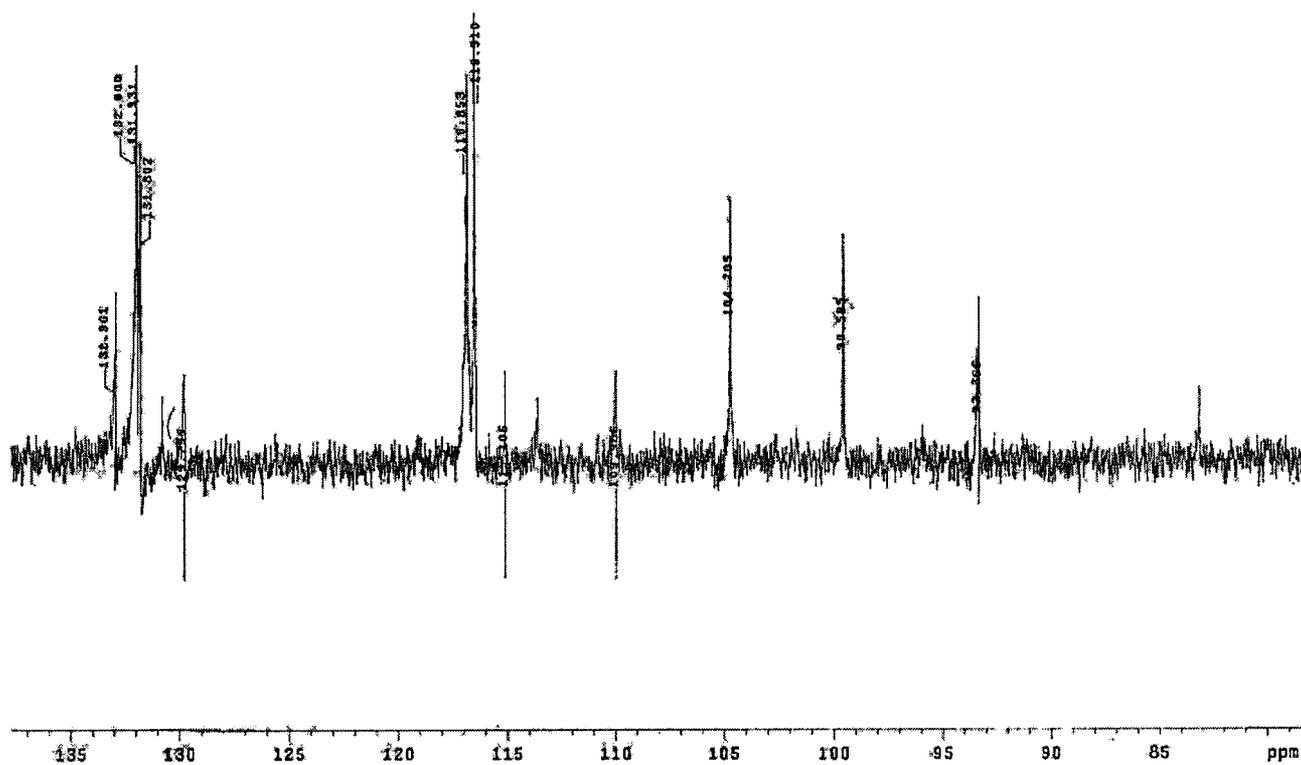


Figura 12a: Espectro expandido de RMN ^1H [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] de CP2

Figura 13: Espectro DEPT 135°, CD₃OD de CP2Figura 13a: Espectro expandido DEPT 135°, CD₃OD de CP2

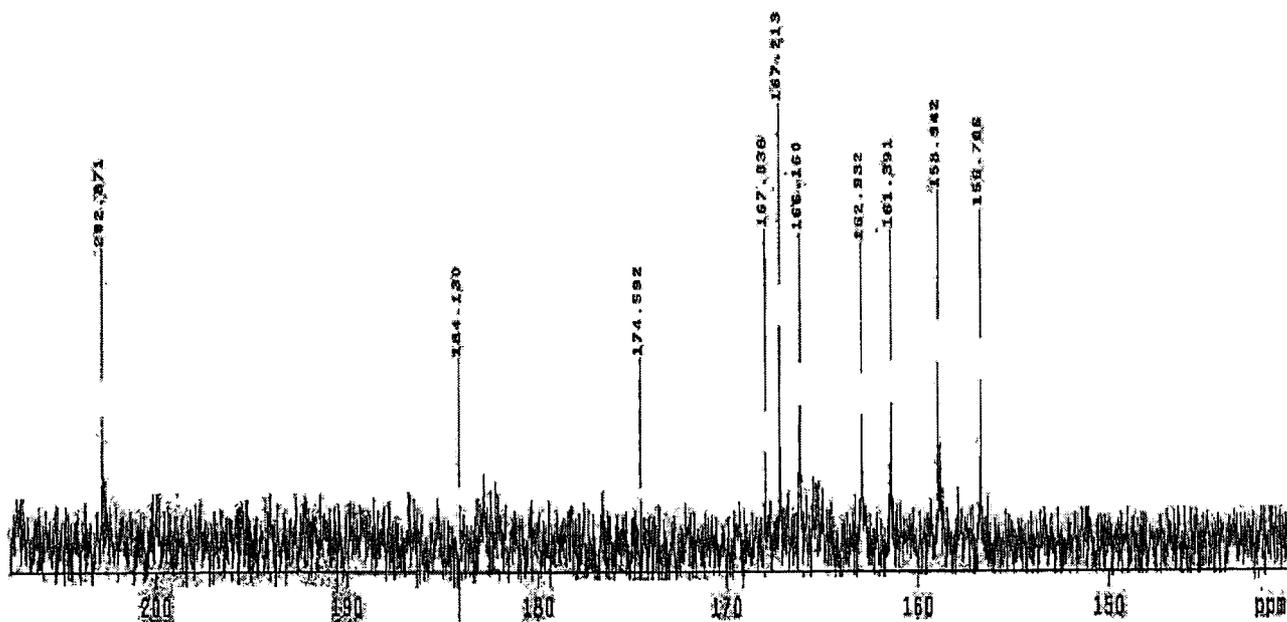


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)] de CP2

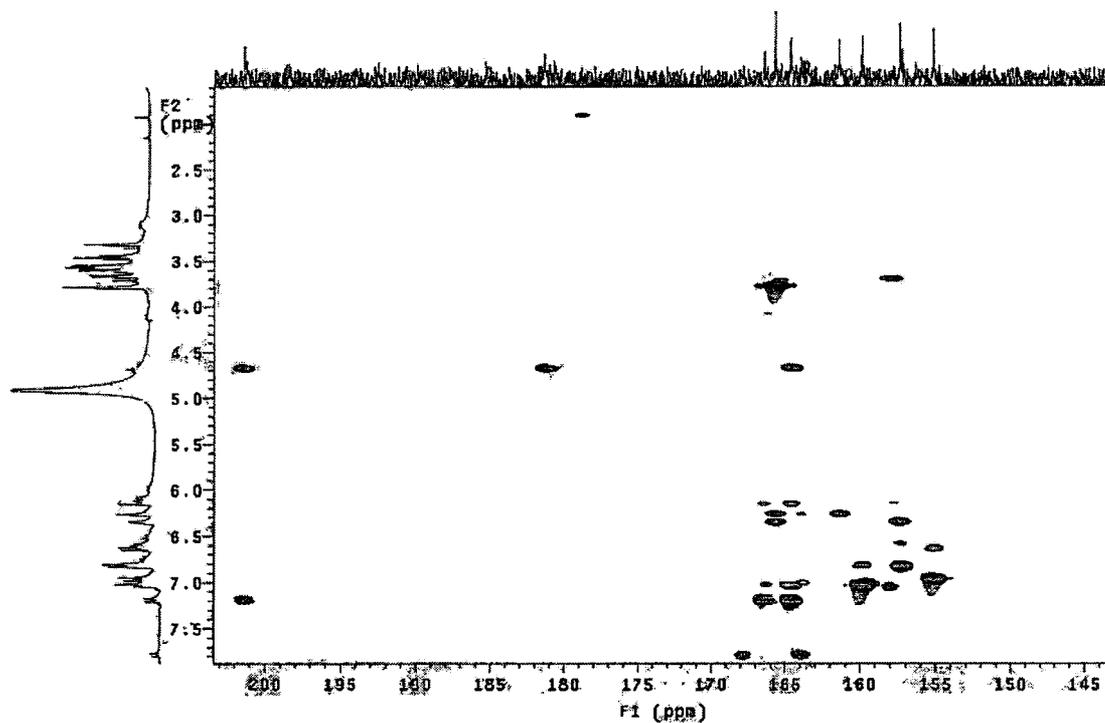


Figura 15: Espectro gHMBC de CP2

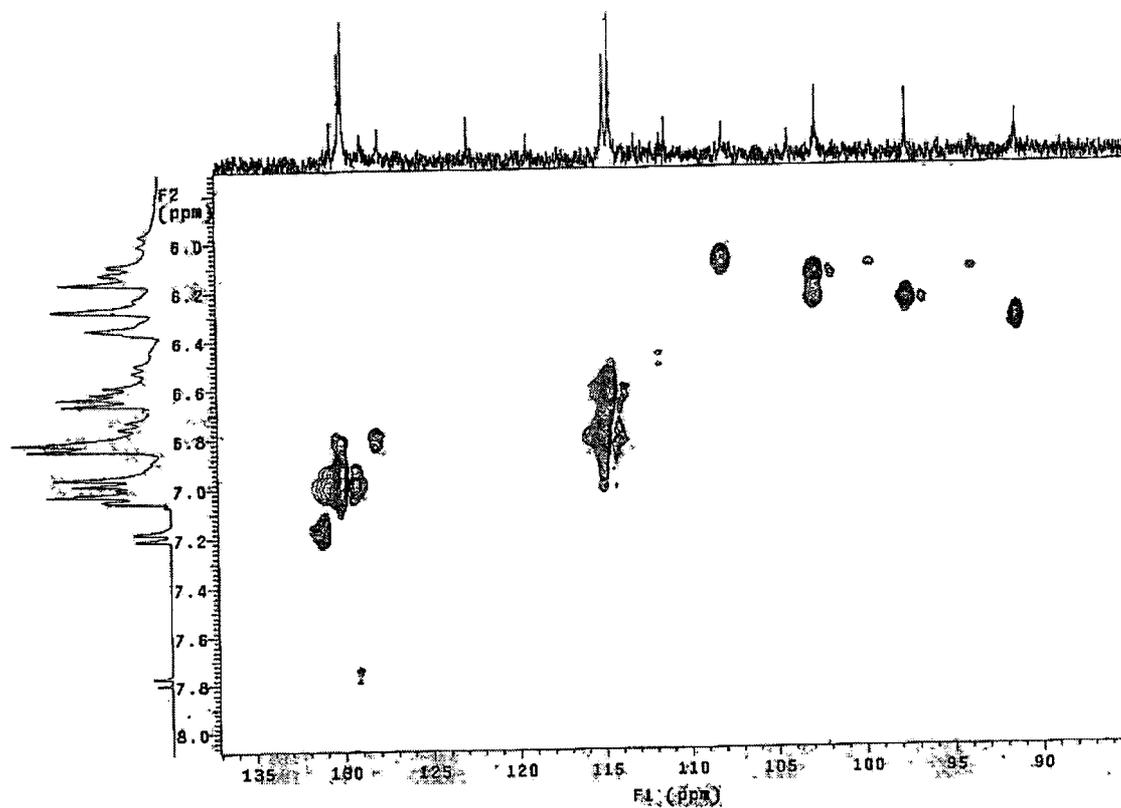


Figura 16: Espectro gHMQC de CP2

4.3. Proposta estrutural para CP3

A substância CP3 foi isolada como sólido amarelo claro a partir do extrato CHCl_3 . A proposta para sua estrutura foi baseada na análise dos dados espectrométricos, principalmente RMN (mono e bidimensionais) e HREIMS.

No espectro de massas de CP3 no modo APCI positivo e negativo (Fig. 17, p.69) foi registrado o íon pseudo-molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 527. O HREIMS apresentou íon pseudo-molecular $[\text{M} - \text{H}]^+$ em 525,1186 (M^+ , requer 525,1185) referente a FM $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_9$ (Fig. 18, p.69)

Estes dados aliado aos sinais registrados nos espectros de RMN (BB) 1D ^1H e ^{13}C , bem como 2D gCOSY, gHMQC e gHMBC, comparados com os dados descritos na literatura permitiram identificar as unidades biflavonoídicas como sendo unidades de chalcona (MDEE et al, 2003; DE CARVALHO et al, 2004).

Assim, o espectro de RMN ^1H (Fig. 19, 19a, p.70 e 19b, p.71) desta substância apresentou sinais característicos de duas unidades flavonoídicas. Este espectro mostrou sinais em δ 7,19 d, $J= 8,7$ Hz (H – 2/6) e outro em δ 6,95 d, $J= 9,0$ Hz (H – 3/5) indicativo de anel B 1,4 dissustituído na unidade (I); além dos sinais em δ 7,05 d, $J= 8,7$ Hz (H – 2/6) e δ 6,69 d, $J= 8,7$ Hz (H – 3/5) indicativos da presença do anel B 1,4 dissustituído da unidade (II) do biflavonóide. Foram também registrados dois dubletos em δ 6,34 e δ 6,26 com $J= 2,1$ Hz, sugerindo presença de dois hidrogênios em posição meta, os quais foram atribuídos aos H-3' e H-5' da unidade II e um singlete em δ 6,24 referente ao H-5' da unidade I, sugerindo presença de um anel aromático pentasustituído. Estes dados são indicativos de que as unidades do biflavonóide estariam conectadas a partir do C-3' da unidade I.

Os dubletos em δ 6,23 e δ 7,37 foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos (H- α e H- β da unidade I). A constante de acoplamento $J= 8,7$ Hz observada para os hidrogênios olefínicos, sugere uma estereoquímica de configuração Z para esta unidade.

Os H- α e H- β da unidade II foram registrados como hidrogênios ligados a carbono CH_2 e CH e os tripletos em δ 4,74 e δ 3,41 ($J=6,6$ Hz) foram atribuídos a estes hidrogênios

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 25 sinais, sendo 14 carbonos não hidrogenados, 10 carbonos metínicos e 1 carbono metilênico identificados a partir da análise do espectro de DEPT 135° (Fig. 20, p.72). O espectro de RMN ^{13}C mostrou valores de deslocamentos químicos dobrados e muito próximos, este espectro confirmou a presença de chalconas nesta substância, pois os dois sinais em δ 203,44 e δ 197,8 (CP3) são características de carbonilas conjugadas de unidades chalconóidicas, as quais são comumente registradas em δ 192,4 (MDEE et al, 2003; DE CARVALHO et al, 2004).

Além disso, os dados de RMN ^{13}C também corroboraram a presença de dois anéis aromáticos 1,4 dissubstituídos, δ 132,0 / δ 165,8 (C-1 e C-4, unidade I) e δ 120,8 / δ 159,1 (C-1 e C-4, unidade II) para CP3, quando comparados aos dados descritos na literatura, δ 129,3 / δ 161,5 (C-1 e C-4, unidade I) e δ 129,8 / δ 167,3 (C-1 e C-4, unidade II). Também mostrou a presença de um carbono metínico em δ 103,8 referente a C-5' (unidade I), δ 94,5 / C-3' e δ 99,9 / C-5' (unidade II) referentes aos anéis A, (Fig. 21 p.72 e 21a, p.73, Tab. 11, p.66).

O espectro de gCOSY (Fig. 22 e 22a, p.74) apresentou correlações importantes que confirmaram a presença dos dois sistemas 1,4 dissubstituídos no anel B nas duas unidades da bichalcona. A correlação do sinal em δ 7,19 (H-2/H-6) com o sinal em δ 6,95 (H-3/H-5), unidade I e do sinal em δ 7,05 (H-2/H-6) com o sinal em δ 6,69 (H-3/H-5), unidade II. Destacaram-se também a correlação observada para o H- α / H- β da unidade I, sinal em δ 6,23 acoplado com o sinal em δ 7,37.

Através da análise do espectro de gHMQC (Fig. 23, p.75) foi possível correlacionar os deslocamentos dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, possibilitando assim reconhecer os sinais dos C- α e C- β ; C-3' e C-5' da unidade II e C-5' da unidade I.

Para a proposta estrutural de CP3 foram observadas nos espectros gHMBC as correlações de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância. Estas correlações confirmaram a localização dos substituintes nos anéis A e B que culminaram na proposta para CP3, as quais podem se destacar a correlação do sinal do H-5' δ 6,24 com o C-3' δ 113,7 (não hidrogenado) e o sinal em δ 163,3 referente ao C-

4' (unidade I, anel A) e as correlações do tripleto em δ 4,74 referente ao H- β com C-1 δ 120,8 e carbonila δ 203,4 da unidade II a 2 e 3 ligações respectivamente. Estes dados corroboram com a proposta estrutural onde as unidades encontram-se ligadas pelos C-3' e C- β das unidades I e II, respectivamente (Fig. 24, p.75, 24a e 24b, p.76).

Outras correlações importantes observadas no espectro de gHMBC foram aquelas entre o H- β da unidade I com o carbono carbonílico (δ 197,8) e o C-2' da unidade I. Estas correlações são indicativas que este hidrogênio olefínico encontrava-se a três ligações dos referidos carbonos. Deste modo pode-se inferir que a unidade I era formada por uma chalcona com padrão não-usual (dupla com configuração Z e carbonila não ligada a porção do fluoroglucinol). Este tipo de substância já havia sido anteriormente isolado em *Imperata cylindrica* e *Pancratium biflorum* (GHOSAL et al, 1986).

Após a análise de todos os dados espectrais em conjunto, pôde-se propor que as unidades do biflavonóide encontravam-se conectadas a partir de C3' da unidade I com o C- β da unidade II.

Tabela 11: Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) [CD_3COCD_3 , $J(\text{Hz})$, δ (ppm)]

Posição	δ ^1H CP3	δ ^{13}C CP3
	UNIDADE I	
1'		113,7 **
2'		165,9 **
3'		113,7 **
4'		163,3
5'	6,24 (s)	103,8 *
6'		161,0
C=O		197,8**
H- α	6,23 (d, $J= 8,7$ Hz)	108,4
H- β	7,37 (d, $J= 9,0$ Hz)	132,4

1		132,0
2/6	7,19(d, J= 8,7 Hz)	131,4
3/5	6,95(d, J= 8,7 Hz)	116,2
4		165,8
	UNIDADE II	
1'		124,5
2'		165,6
3'	6,34(d, J= 2,1 Hz)	94,5 *
4'		156,7
5'	6,26(d, J= 2,1 Hz)	99,9 *
6'		165,6
C=O		203,4 **
H- α	3,41 (t, J= 6,6 Hz)	35,1
H- β	4,74 (t, J= 6,6 Hz)	30,0
1		120,8**
2/6	7,05 (d, J= 8,7 Hz)	131,3
3/5	6,69 (d, J= 8,7 Hz)	116,0
4		159,1

*Atribuido através de gHMQC

**Atribuido através de gHMBC

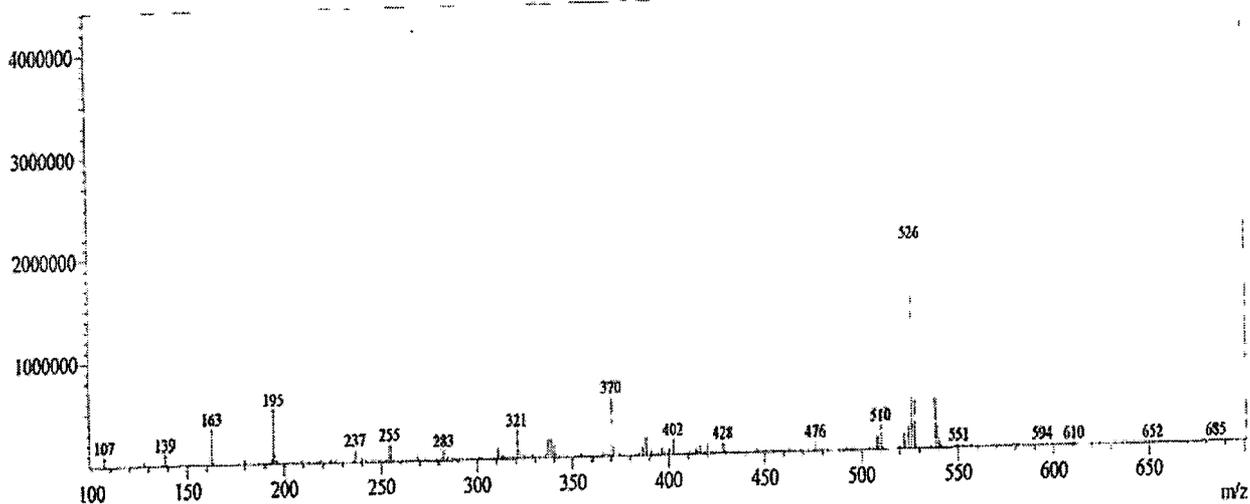


Figura 17: Espectro de massas de CP3, APCI modo positivo

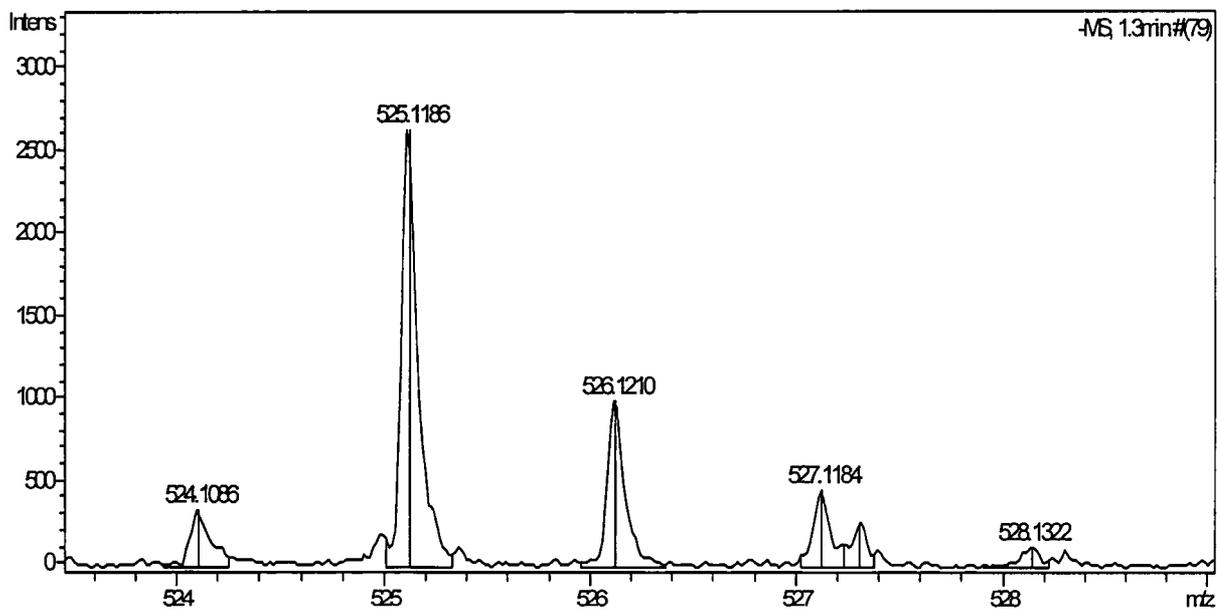


Figura 18: Espectro de Massas de Alta Resolução (HREIMS), modo negativo ESI de CP3

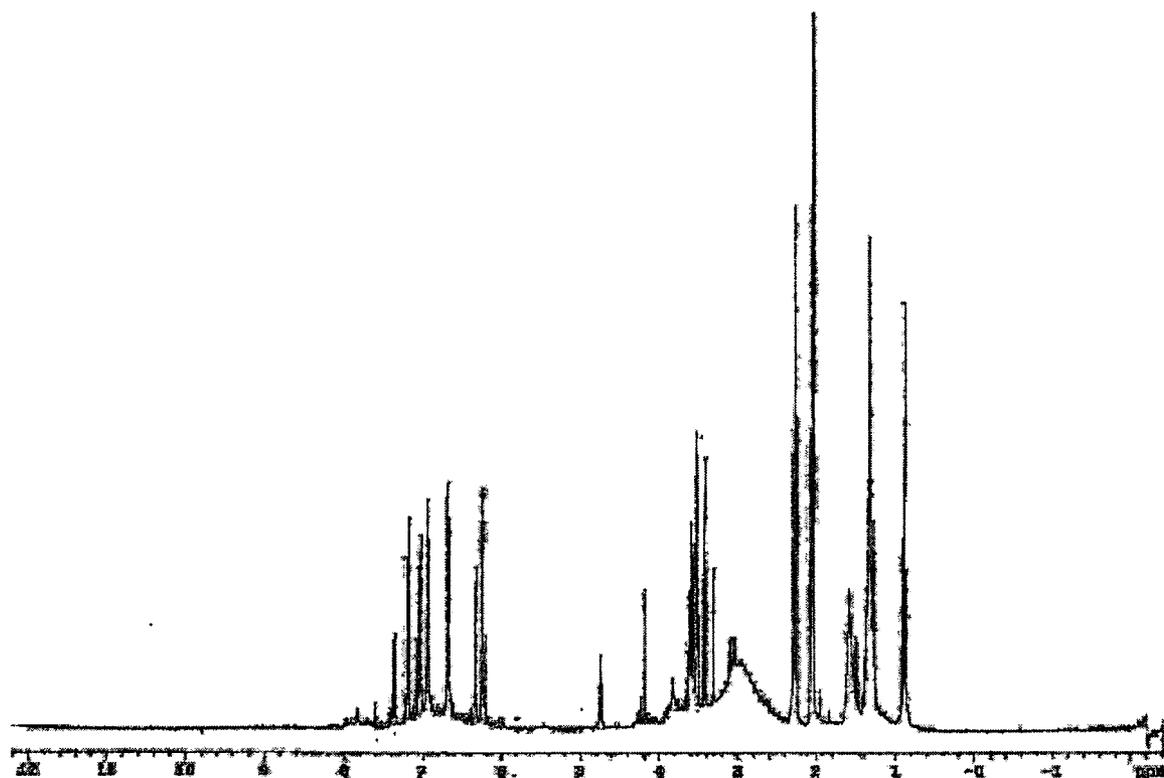


Figura 19: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CD_3COCD_3 , δ (ppm)] de CP3

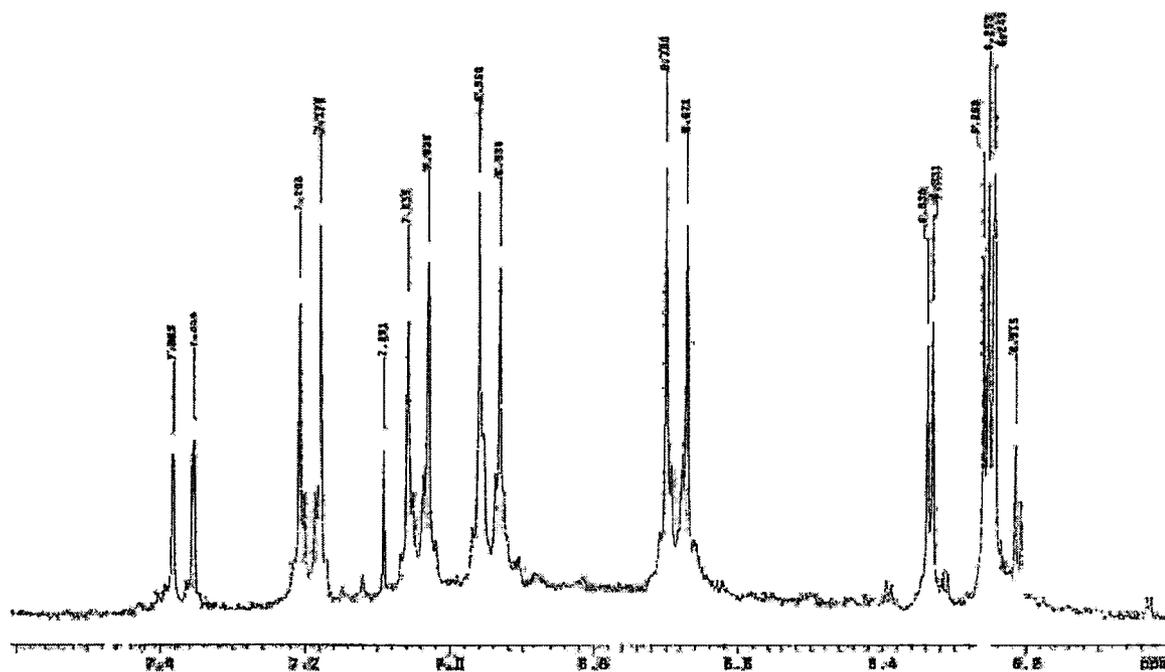
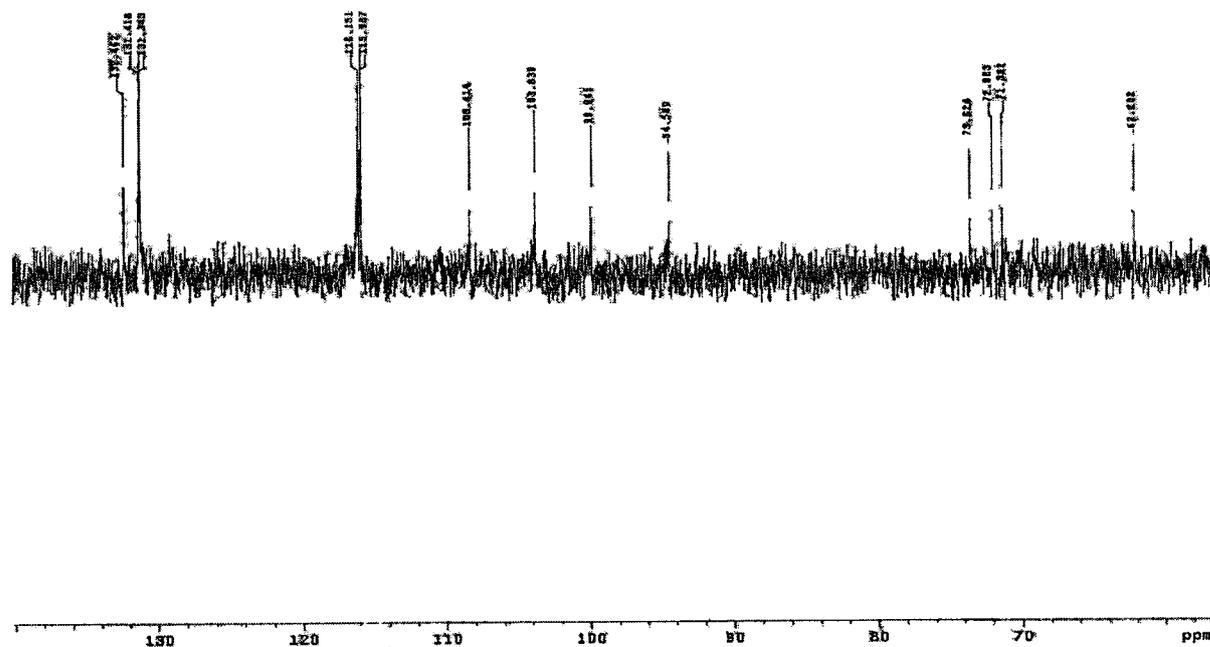
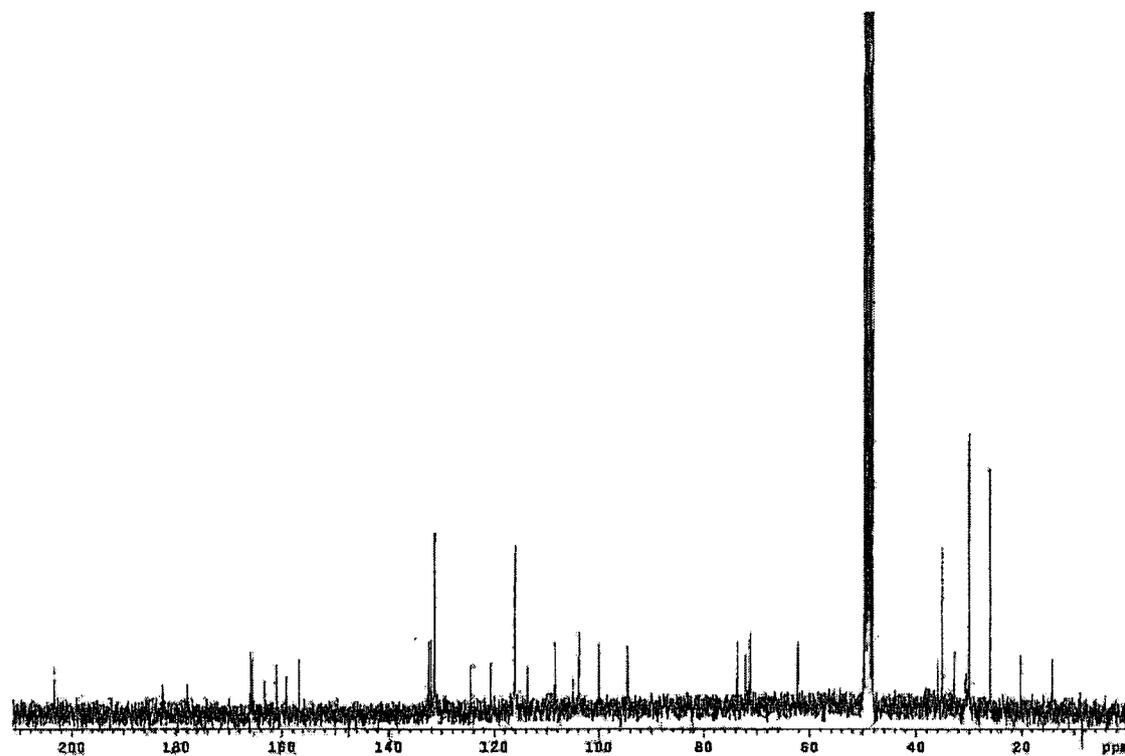


Figura 19a: Espectro Expandido RMN ^1H [300 MHz, CD_3COCD_3 , δ (ppm)] de CP3

Figura 20: Espectro DEPT 135°, CD₃COCD₃ de CP3Figura 21: Espectro de RMN ¹³C [75 MHz, CD₃COCD₃, δ (ppm)] de CP3

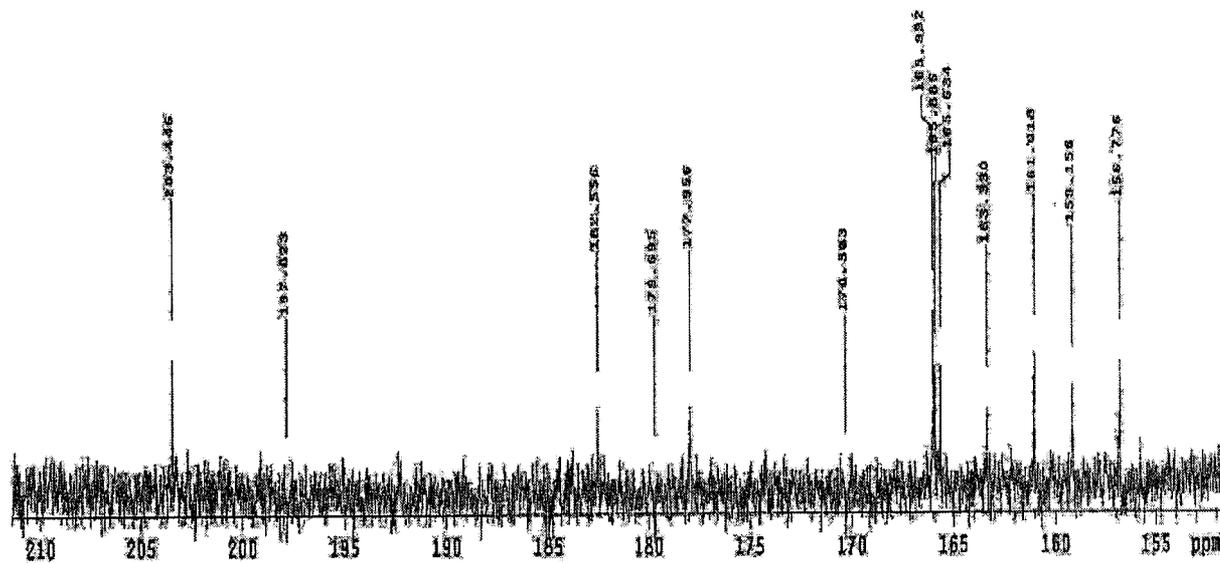


Figura 21a: Espectro Expandido RMN ^{13}C [75 MHz, CD_3COCD_3 , δ (ppm)] de CP3

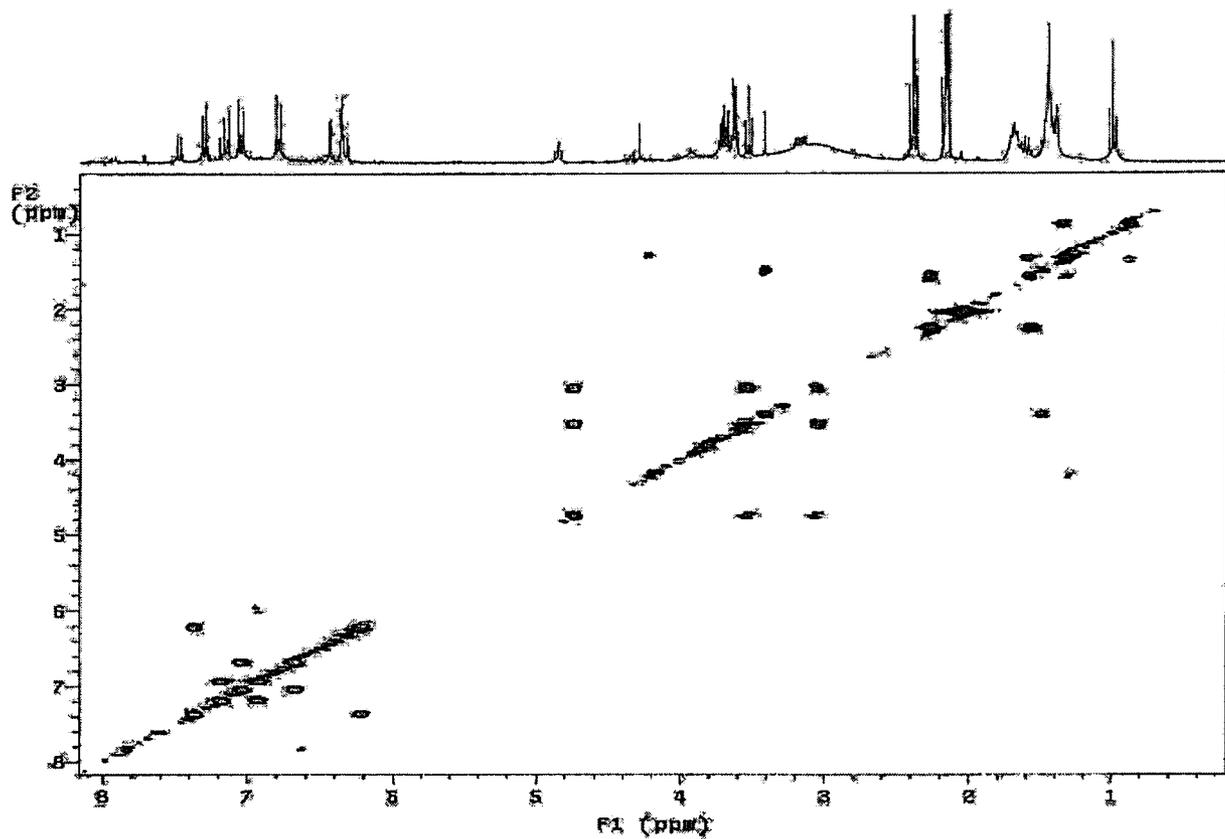


Figura 22: Espectro gCOSY de CP3

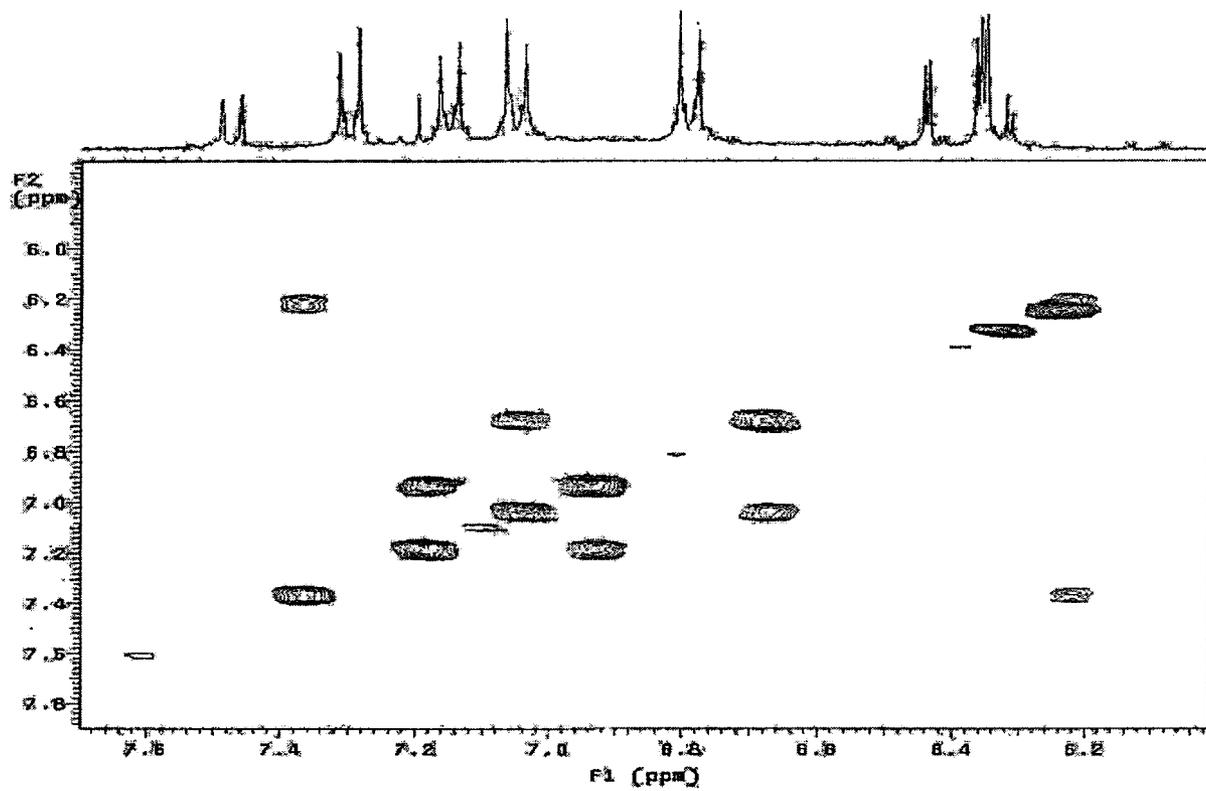


Figura 22a: Espectro Expandido gCOSY de CP3

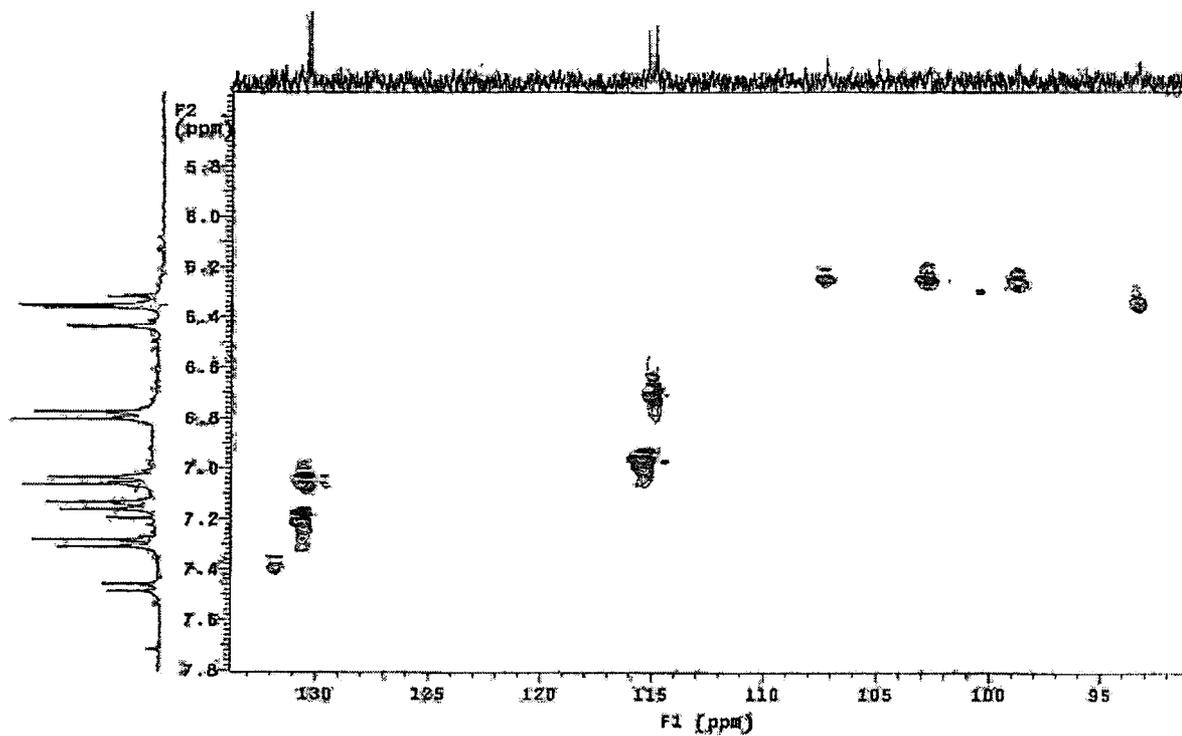


Figura 23: Espectro gHMBC de CP3

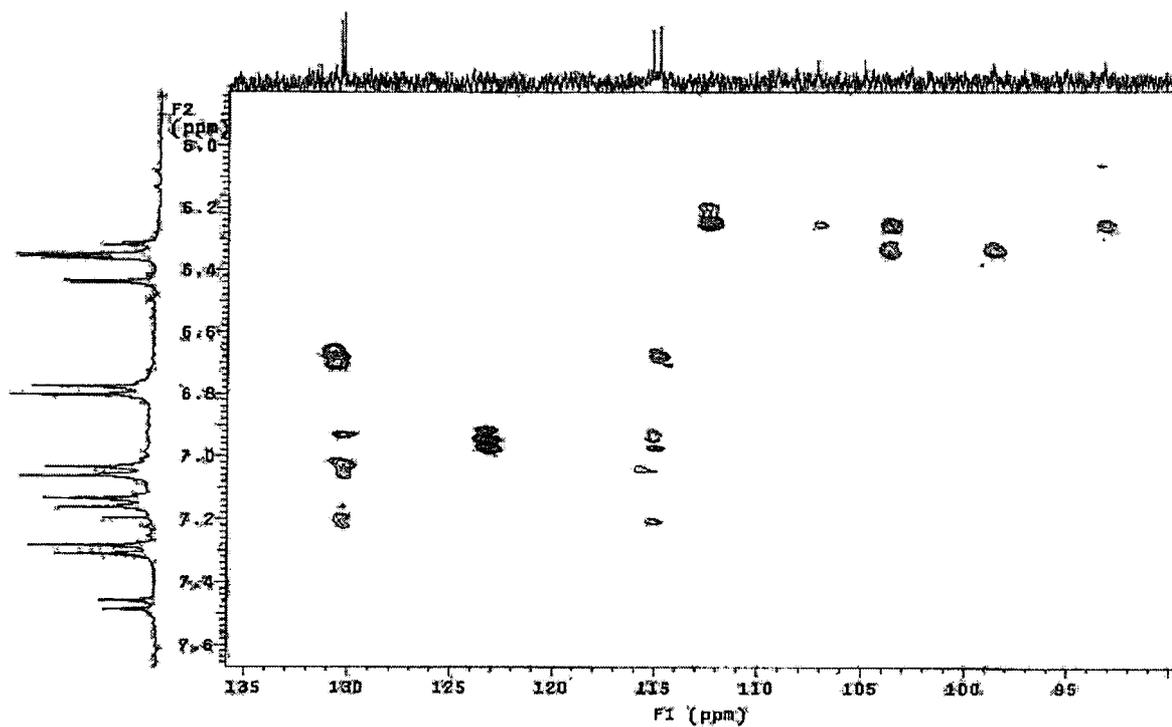


Figura 24: Espectro gHMBC de CP3

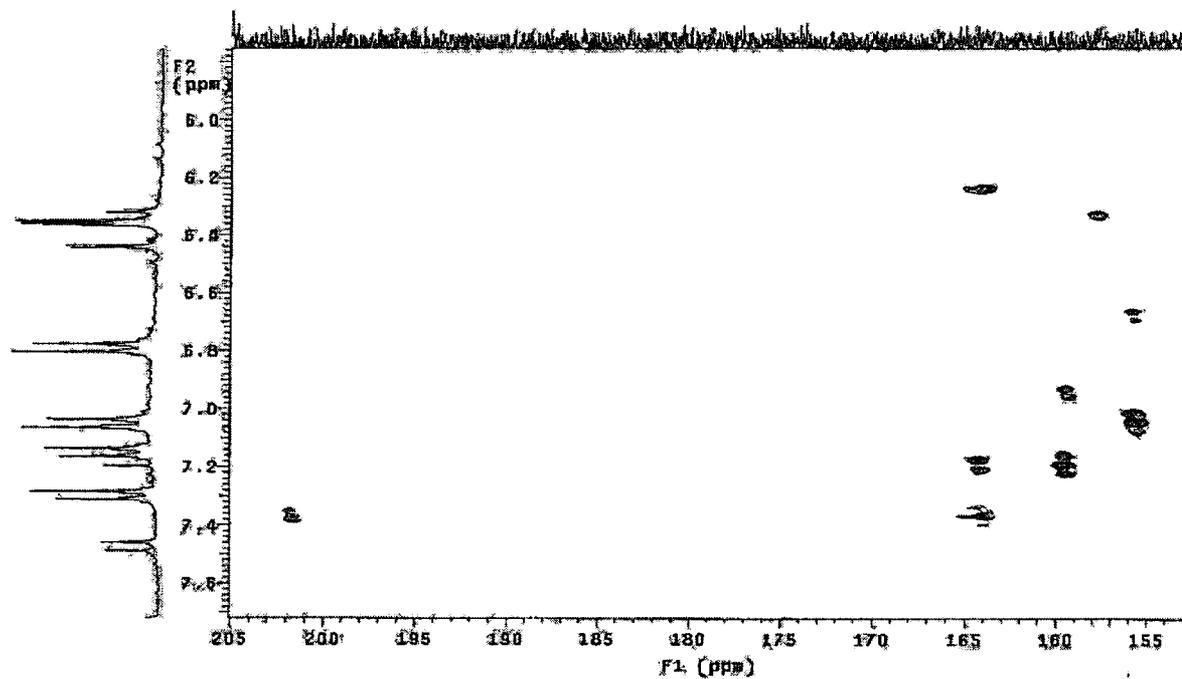


Figura 24a: Espectro gHMBC de CP3

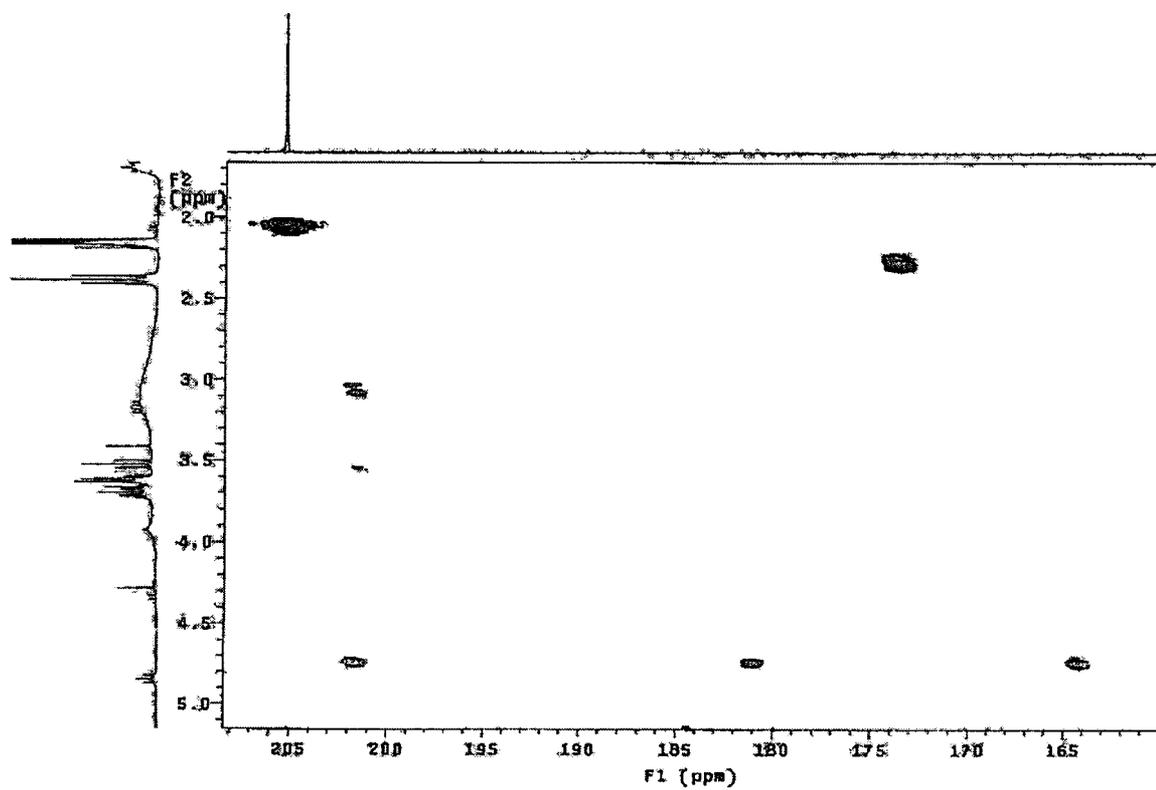


Figura 24b: Espectro gHMBC de CP3

4.4. Identificação estrutural de CP4:

A identificação do composto esteroidal denominado como estigmasterol (CP4), (Fig. 25, p.77), foi realizada a partir da análise de dados de RMN ^1H e ^{13}C 1D (BB), bem como comparação de seus R_f a partir de cromatograma obtido em CCDC utilizando um padrão do mesmo composto, seguida de revelação com reagente de Lieberman-Bouchard (GOULART et al, 1993; RIBEIRO 1999).

O espectro de RMN ^1H apresentou um sinal característico que foi importante para identificação do composto: singlete largo em δ 5,36 referente ao hidrogênio olefínico não conjugado na posição 6 (anel B). A presença de dois duplos dubletos entre δ 5,0 e 5,2 é característico dos hidrogênios olefínicos não conjugados presentes na cadeia lateral e o multiplete em δ 3,5 é indicativo da presença de um hidrogênio na posição 3 (anel A), (Fig. 26 e 26a, p.79). Os sinais entre δ 0,6 e 2,6 foram atribuídos aos demais hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos também presentes na estrutura (Tabela 12, p.78).

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 4 sinais em 140,74 ppm (C-5), 121,69 ppm (C-6), 138,28 ppm (C-22) e 129,28 ppm (C-23) característicos de carbonos sp^2 e um sinal em 71,80 ppm (C-3) referente ao carbono oximetínico, (Figuras 27 e 27a, p.80, Tab. 12, p.78).

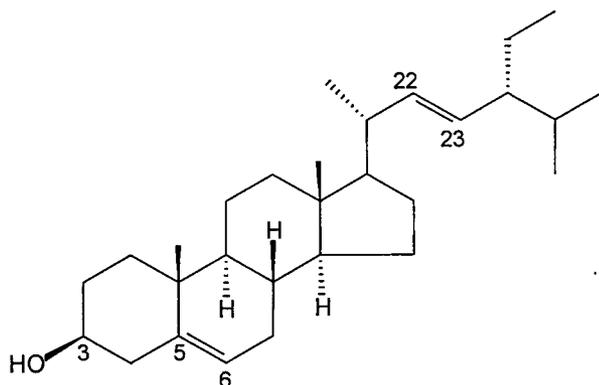
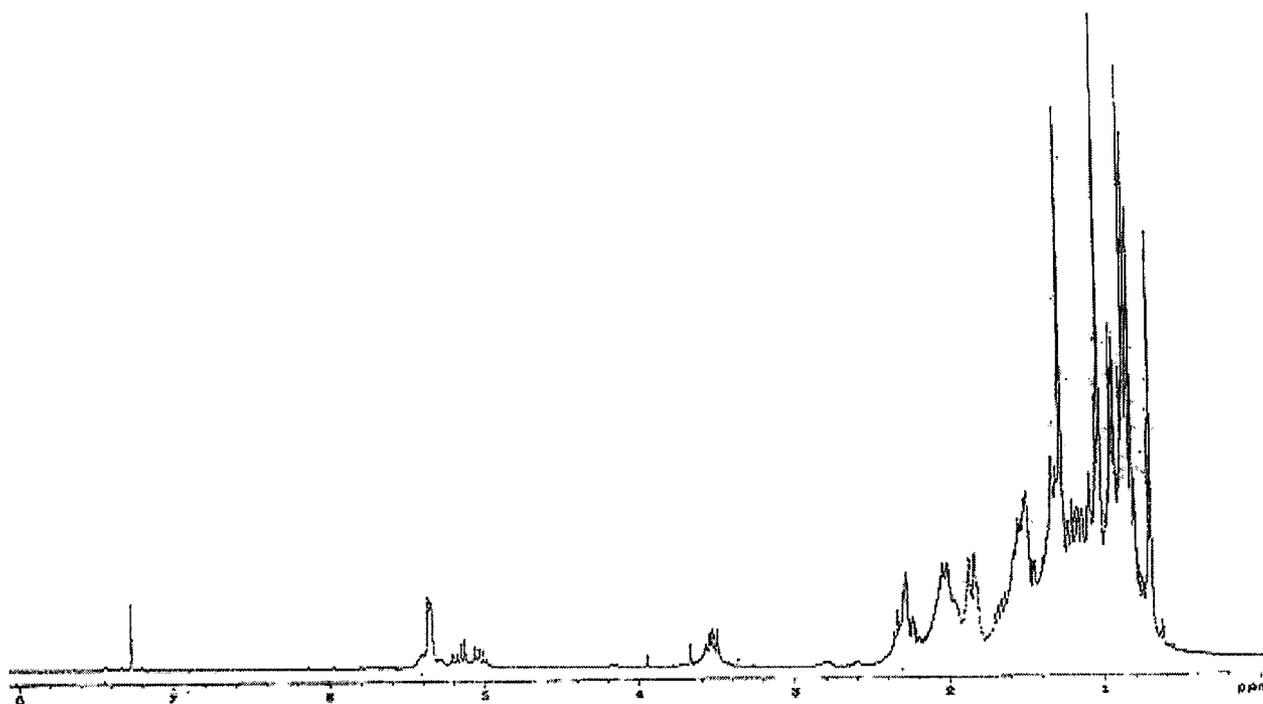
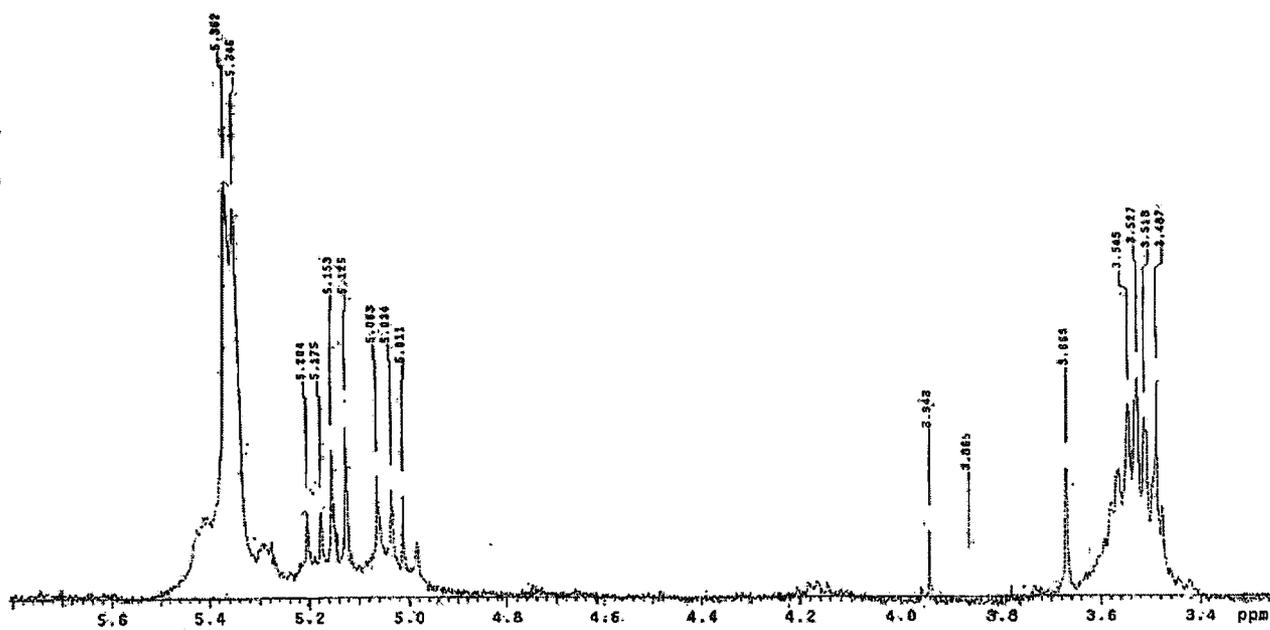


Fig. 25: CP4 (Estigmasterol)

Tabela 12: Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) [$J(\text{Hz})$; δ (ppm)], CDCl_3

POSIÇÃO	δ ^1H ; multiplicidade	δ ^{13}C
3	3,5 (<i>m</i>)	71,80
5		140,74
6	5,36 (<i>sl</i>)	121,69
22	5,2 (<i>d</i> ; $J= 8,7$)	138,28
23	5,0 (<i>d</i> ; $J= 8,7$)	129,28

Figura 26: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP4Figura 26a: Espectro expandido de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP4

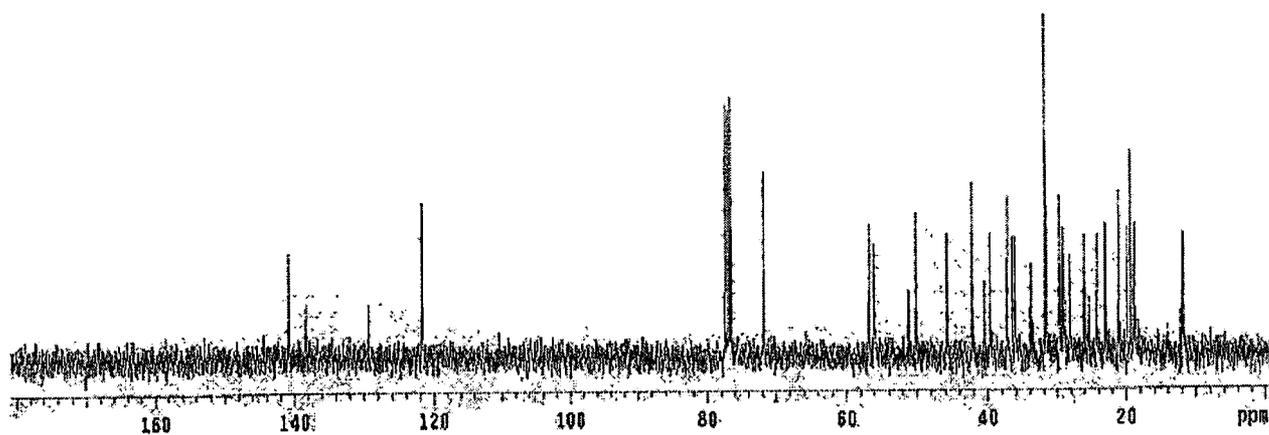


Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP4

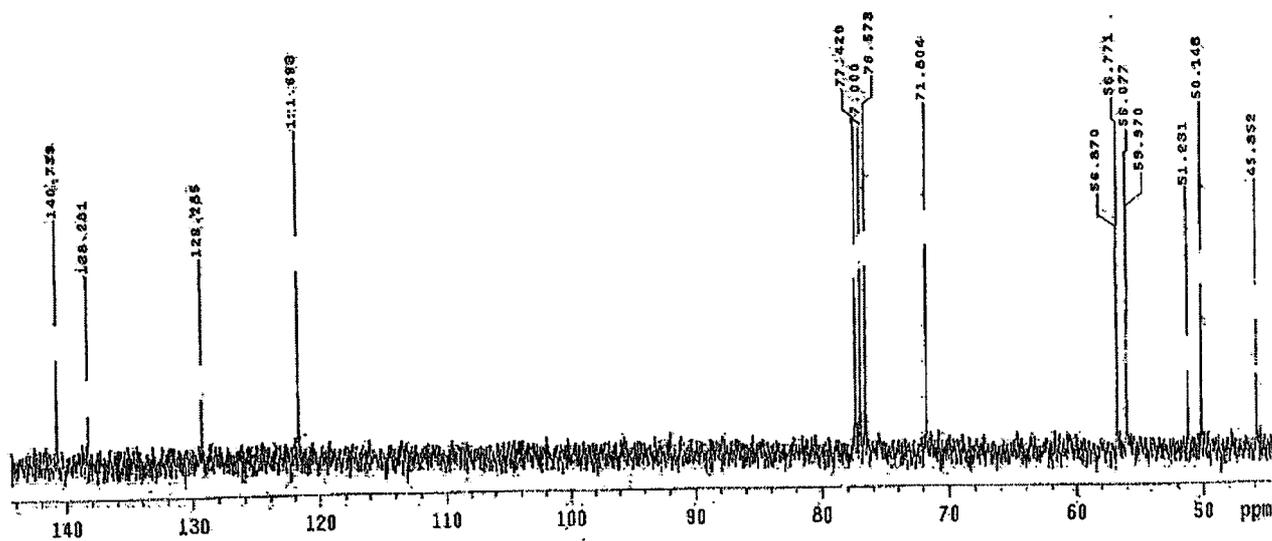


Figura 27a: Espectro expandido de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CP4

4.5. Avaliação da atividade antioxidante de CP1, CP2 e CP3

Os resultados da atividade antioxidante dos compostos avaliados foram plotados em função do seu percentual de inibição da oxidação. Para realização do teste foram utilizados os padrões quercetina e ácido gálico. O potencial antioxidante foi avaliado pelo teste do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um radical livre estável à temperatura ambiente, com coloração violeta característica em solução metanólica. O radical estável DPPH• mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio radicalar (OH•) a este radical, assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior a atividade antioxidante (Fig. 28).

Nos testes realizados foram utilizados concentrações de 30µg, 60µg e 120µg. Observou-se que as substâncias CP2 e CP3 (120µg) apresentaram alta atividade antioxidante, com CP3 chegando a ser maior que os padrões utilizados. Nas concentrações (30µg e 60µg) CP2 e CP3 mostraram atividade fraca e moderada respectivamente. CP1 não mostrou resultado significativo.

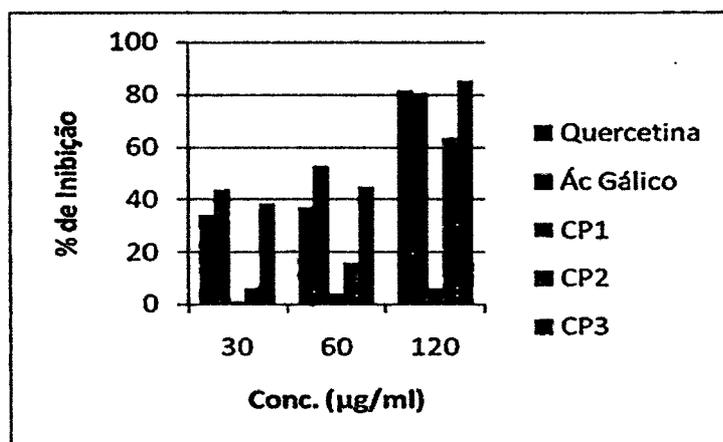


Figura 28: Inibição da oxidação de CP1, CP2 e CP3

CONCLUSÃO

5 - CONCLUSÃO:

O estudo fitoquímico parcial do extrato clorofórmico das cascas do caule de *C. pluviosa* levou ao isolamento de substâncias das classes flavonóides e esteróides e um derivado da vanilina (1-hidroxi,3,5-dimetoxi-benzaldeido), que foram identificados através de análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, bem como por espectrometria de massas.

Embora os dados do screening fitoquímico tenha apresentado uma reação fracamente positiva para esteróides, foi possível isolar o estigmasterol da fração clorofórmica.

A análise fitoquímica preliminar revelou também uma forte presença de flavonóides neste extrato, do qual se isolou as flavonas apigenina e acacetina em mistura e um biflavonóide. As flavonas já haviam sido isoladas anteriormente de *Perilla frutescens* e *Vernonia chalybaea*, respectivamente. O biflavonóide está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

As substâncias isoladas foram submetidas ao teste de atividade antioxidante "*in vitro*" utilizando o método do seqüestro do radical livre estável DPPH•. A substância CP1 não apresentou atividade antioxidante, mas as substâncias CP2 e CP3 apresentarão boa atividade.

Assim torna-se necessário a continuação do trabalho com as frações que não foram estudadas na busca de mais produtos do metabolismo secundário a fim de contribuir com a quimiotaxonomia desta espécie.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS:

AGRAWAL, P.K., Carbon-13 NMR of Flavonoids ed. By P.K. Agrawal. Elsevier-Amsterdam, 1989.

ALMEIDA, J.R.G.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CABRAL, A.G.S.; AGRA, M.F.; DA-CUNHA, E.V.L.; DA SILVA, M.S.; DO NASCIMENTO, S.C.; BRAZ-FILHO, R., Diploflavone, a New Flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae), *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 16, n.6B, p.1454-1457, 2005.

ALVES, C.Q., Constituintes Químicos Isolados dos Extratos Polares de *Cenostigma gardnerianum* TUL. (Leguminosae), 93f. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

BAHIA, M. V.; DOS SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., Biflavonoids and other Phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 16, n.6B, p.1402-1405, 2005.

BAHIA, M.V., Estudo Químico de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). 88f. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Quimica Nova*, vol.29, n.1, p.113-123, 2006.

BIONDO, E; MIOTTO, S.T.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T., Citogenética de espécies arbóreas da subfamília caesalpinioideae - leguminosae do sul do Brasil, *Ciência Florestal*, vol.15, n.3, p.241-248, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.;BERSET, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, vol. 28, p.25-30, 1995.

CAO, G.H.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L., Free radical, *Biology & Medicine*, vol. 22, p.749-760, 1997.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO T.; VITOBELLO, C.; ASCOLO, N., Phytotherapy and quality of herbal medicines, *Fitoterapia*, vol. 71, S58 - S65, 2000.

CARDOSO, D.B.O.S.; DE QUEIROZ, L.P., Diversidade de leguminosae nas caatingas de tucano, bahia: implicações para a fitogeografia do semi-árido do nordeste do brasil, *Rodriguésia*, vol. 58 n.2, p.379-391, 2007.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J.D.; RAKARIYATHAM, Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk *Food Chemistry*, n.100, p.1044-1048, 2007.

CORRÊA, A.G., Taxol: da descoberta ao uso terapêutico, *Química Nova*, vol.18 n.5, p.460, 1995.

CRUZ, F.C., Estudo fitoquímico de *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae), 85f. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

DA SILVA, C. A.; MONTEIRO, M. B. B.; BRAZOLIN, S.; LOPEZ, G. A. C.; RICHTER, A.; BRAGA, M. R., Biodeterioration of brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae—Caesalpinioideae) by rot fungi and termites *International Biodeterior. & Biodegrad.*, n.60, p.285–292, 2007.

DE ALBUQUERQUE, U.P.; DE MEDEIROS, P.M.; DE ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; DE MELO, J.G.; DOS SANTOS, J.P., Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of ne brazil: a quantitative approach, *Journal of Ethnopharmacology*, n.14, p.325–354, 2007.

DE CARVALHO, M.G.; ALVES, C.C.F.; SILVA, K.G.S.; EBERLIN, M.N.; WERLE, A.A., Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*, *J. Braz. Chem. Soc.*, vol.15, n.1, p.146-149, 2004.

DE LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J-P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N.; Antibacterial activity of some brazilian medicinal plants, *Journal of ethnopharmacology*, 2005

DE-PAULA, O. C., OLIVEIRA, D. M. T., Variação da estrutura carpelar em seis espécies de cassiinae (leguminosae: caesalpinioideae) *Acta bot. bras.*, vol. 21, n.4, p.915-925, 2007.

DICKSON, R. A.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J., Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*, *Phytochemistry*, vol. 68, p.1436–1441, 2007.

FERREIRA, G.C.; HOPKINS, M.J.G.; SECCO, R.S., Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosae comercializadas no estado do Pará, como "angelim", *acta amazônica*, vol. 34, n.2, p.219 – 232, 2004.

FILHO, D.W.; DA SILVA, E.D.; BOVERIS, A., Extraído do livro: Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal; Chapecó: Argos. p. 319-330, 2001.

FILHO, V. C.; YUNES R. A., Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, *Química Nova*, vol.21,n.1 1998.

GHOSAL, S.; KUMAR, Y.; CHAKRABARTI, D.K.; LAL, J.; SINGH, S.K., Parasitism of *Imperata cylindrica* on *Pancratium biflorum* and the concomitant

chemical changes in the host species, *Phytochemistry*, vol. 25, n.5, p.1097-1102, 1986.

GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G.; DE LIMA, R.A.; CAVALCANTE, S.H.; DE CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R., Fitoconstituíntes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos Diterpenos Jatrolonas A e B, *Química Nova*, vol.16 n.2, p.95-100, 1993.

GU, L.; WU, T.; WANG, Z., TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens*, var. *acuta*, *LWT- Food Science and Technology*, n.42, p. 131-136, 2008.

GURIB-FAKIM, A., Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine*, n.27 p.1-93, 2006.

JABBAR, A.; ZAMAN, M. A.; IQBAL, Z.; YASEEN, M.; SHAMIM, A., Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematodes of sheep, *Journal of Ethnopharmacology*, n.114, p.86-91, 2007.

JIANG, REN-W., MA, SHUANG-C., HE, ZHEN-D., HUANG, XUE-S., BUT, P. PUI-H., WANG, H., CHAN, SIU-P., OOI, V. ENG-C., XUB, HONG-X., MAK, T.C.W., Molecular structures and antiviral activities of naturally occurring and modified cassane furanoditerpenoids and friedelane triterpenoids from *Caesalpinia minax*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n.10, p.2161-2170, 2002.

KAMCHONWONGPAISAN, S.; MESHNICK, S. R., The Mode of Action of the Antimalarial Artemisinin and its Derivatives, *Gen. Pharmac.*, vol. 27, n.4, p. 587-592, 1996.

KIEM, P. V.; MINH, C. V.; HUONG, H. T.; LEE, J. J.; KIM, Y. H., Caesaldecane, a Cassane Diterpenoid from the Leaves of *Caesalpinia decapetala*, *Chem. Pharm. Bull.*, vol.53, n.4, p.428-430, 2005 .

KISS, A.C.I.; TAKAKU, M.; DAMASCENO, D.C.; CAMPOS K.E.; SINZATO, Y.K.; LIMA, P.O.; VOLPATO, G.T., Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por Streptozotocin, *Rev. Bras. Planta Médica*, vol.8, n.3, p.24-30, 2006.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L., Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, p.248. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2004.

LEVIN, J.I., The Preparation of Forskolol Analogs via Quinone Diels-Alder Reactions *Tetrahedron Letters*, vol. 37, n.18, p. 3079-3082, 1996.

LIANDA, R.L.P.; CASTRO, R.N.; DA FONSECA, N.F., Isolamento e Identificação do Flavonóide Rutina em Mel Laranjeira de *Apis mellifera*, *Química Nova*, vol.26, n.1, p.90-96, 2003.

LIM, MI-Y.; JEON, JU-H.; JEONG, EUN-Y.; LEE, CHI-H.; LEE, HOI-S., Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria, *Food Chemistry*, n.100, p.1254-1258, 2007.

MATOS, F.J.A., Introdução a Fitoquímica Experimental, 2º ed.; editora UFC, 128p, 1988.

MDEE, L.K.; YEBOAH, S.O.; ABEGAZ, B.M., Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from the root bark of *Rhus pyroides*, *J. Nat. Prod.*, vol. 66, p.599-604, 2003.

MENDES, C.C., Metabólitos secundários presentes nas folhas de *Caesalpinia pyramidalis* e *Byrsonina microphylla*. 66f, *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1996.

MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J.A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V., Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels, *Vascular Pharmacology*, n.47, p.41-47, 2007.

MOREIRA, D. L.; ENGELHARDT, R. L.; REIS A. S.; SANCHES, E. M.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G., Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae) *Rev. Bras. Farmacognosia*, vol. 12, suplem., p.124-125, 2002.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S., Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais, *Química Nova*, vol. 24, n.1, p.105-111, 2001.

MORIM, M.P., Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do parque nacional do itatiaia, sudeste do brasil: padrões de distribuição, *Rodriguésia*, vol.57, n.1, p.27-45, 2006.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; HRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A., Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil, *Quim. Nova*, Vol.26, n.3, p. 331-334, 2003.

NOZAKI, H.; HAYASHI, KEN-I.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, M.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMA, M.; AKAO, Y., Pauferrol A, A novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity *Tetrahedron Letters*, n.48, p.8290-8292, 2007.

- RIBEIRO, J.S., Benzofenonas, triterpenos e esteróides de *Clusia obdeltifolia* (Clusiaceae). 1999. 180f. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.
- ROENGSUMRAN, S.; LIMSUWANKESORN, S.; NGAMROJNAVANICH, N.; PETSOM, A.; CHAICHANTIPYUTH, C.; ISHIKAWA, T., Cassane diterpenoid from *Caesalpinia major*, *Phytochemistry*, n.53, p.841–844, 2000.
- SARAVANAN, K. S.; PERIYANAYAGAM, K.; BETANABHATLA, K. S.; THIMOOLAM, J.; SARASWATHY, G. R., Anthelmintic activity of various extracts of leaf and fixed oil from the seeds of *Caesalpinia bonduc* (L) roxb, *Pharmacologyonline*, n.1, p.82-89, 2008.
- SARMA, A.D.; SHARMA, R., Anthocyanin-DNA Co pigmentation Complex: Mutual Protection against Oxidative Damage, *Phytochemistry*, vol. 52, p.1313-1318, 1999.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Editora da Universidade, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.
- SLIMESTAD, R; FOSSEN, T; VERHEUL, M.J., The Flavonoids of Tomatoes, *J. Agric. Food Chem*, n.56, p.2436–2441, 2008.
- SOMEYA, K.; SHIMIZU, H.; UCHIYAMA, C.; NAKAJIMA, I.; HAYASHI, T.; TAKADA, K.; KUROYANAGI, M.; MIYAZAWA, T., Antioxidant effects of *Caesalpinia paraensis* extract on human skin lipid peroxidation, *Journal of oleo science*, vol. 52, n.9, p.463-470, 2003.
- SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, M.J.N.; NANJAN, M.J.; SURESH, B., Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root, *Journal of Ethnopharmacology* n.113, p.284–291, 2007.
- WANG, H.X.; NG, T.B., Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities, *Life Sciences*, vol. 65. n.25, p.2663-2677, 1999.
- WOLDEMICHAEL, G. M.; SINGH, M. P.; MAIESE, W. M.; TIMMERMANN, B. N., Constituents of Antibacterial Extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk, *Zeitschrift Für Naturforschung*, n.58c, p.70-75, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Traditional medicine: 2008. Available from: <<http://www.who.int/mediacentre>>2008. Acesso em: 9 maio. 2008.
- YUNES, R.A; PEDROSA R.C.; FILHO, V.C., Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil, *Química Nova*, vol.24, n.1, p.147-152, 2001.