

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

Estudo Fitoquímico de *Piptadenia stipulacea* (Fabaceae: Mimosoideae)

JÉSSICA CELESTINO FERREIRA SOUSA

João Pessoa – PB

2012

JÉSSICA CELESTINO FERREIRA SOUSA

Estudo Fitoquímico de *Piptadenia stipulacea* (Fabaceae: Minosoideae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientadora:

Profª. Drª. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

João Pessoa – PB

2012

JÉSSICA CELESTINO FERREIRA SOUSA

Estudo Fitoquímico de *Piptadenia stipulacea* (Fabaceae: Minosoideae)

Dissertação aprovada em 28/02/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Universidade Federal da Paraíba – Orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Sousa

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno

Prof. Dr. João Xavier Araújo Junior

Universidade Federal de Alagoas – Examinador Externo

“Conheceri a verdade, e a verdade vos libertará”.

Jesus

*Aos meus pais, Ivo de Lima Ferreira e Cláudia de
Cássia Celestino Ferreira por terem concedido
todos os seus ensinamentos, me deixando como
maior herança a educação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão do meu viver, refúgio e fortaleza, socorro bem presente. A minha força e alegria vem do Senhor.

Aos meus pais, Ivo de Lima Ferreira e Cláudia de Cássia C Ferreira, que estão sempre presentes com seu amor incondicional, dedicação exclusiva e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Júlio Ivo C. Ferreira e Ivo Júnior C. Ferreira, pelo amor, apoio e amizade.

Ao meu marido, Wagner Sousa, pelo amor, paciência, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus familiares, minha tia Carmen Rezende e meu primo Yuri Rezende, que se fizeram presente com todo carinho e apoio, em todos os momentos desta caminhada, me desejando sempre o melhor.

A minha orientadora Prof^a Bárbara Viviana de Oliveira Santos por ter me dado a oportunidade de ingressar neste meio acadêmico, por todos os ensinamentos valiosos, apoio, dedicação, compreensão, paciência, incentivo e amizade.

A professora Magna Suzana Alexandre-Moreira da Universidade Federal de Alagoas, pela grande contribuição científica para a realização desse trabalho.

Ao professor Edilberto Silveira da Universidade Federal do Ceará/CENAUREM e ao colega **Vicente Costa** da UFPB/Nucal, pela realização dos espectros deste trabalho.

A professora **Tania Maria Sarmento da silva** da Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao professor **Jnannabrata Bhattacharya** pelo grande apoio científico na realização desse trabalho.

À banca examinadora composta pelos professores **Maria de Fátima Vanderlei de Souza** (UFPB) e **João Xavier Araújo Júnior** (UFAL) pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos funcionários pelos diversos serviços prestados, especialmente **Ataíde, Raimundo, Sócrates Golzio, Tânia Alves e Carol Mangueira** pela amizade, atenção e por proporcionar o bom andamento dos nossos trabalhos.

A amiga **Daysianne Lira** pela atenção, disponibilidade, ensinamentos e amizade.

As amigas **Ana Lúcia Guedes, Ana Sílvia Suassuna, Jaqueline Iris, Marianne Guedes, Narlize Silva**, pelo acolhimento, amizade e pelos ensinamentos compartilhados.

A todos os alunos da turma do mestrado 2010, especialmente aos amigos, **Everton Queiroz, Jeane, Madalena Rocha, Manuela, Otemberg, Ricardo e Ronaldo**.

Aos amigos da graduação que continuam presentes em minha vida, **Jonathas Saldanha, Késia Clementino, Nathalie Helen, Ryanne Monteiro, Lídia Renata, Yanna Teles**, pela amizade, carinho, companherismo.

As minhas amigas, **Alice Maria, Amanda Bárbara, Mariângela Araújo e Maria Rita** presentes em todos os momentos de minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

O gênero *Piptadenia* Benth. faz parte da subfamília Mimosoideae a qual pertence à família Fabaceae, a terceira maior família das angiospermas, de ampla distribuição geográfica, sendo uma das maiores em dicotiledôneas e de importância econômica. *Piptadenia stipulacea* apresenta ampla distribuição no bioma da caatinga nordestina, sendo utilizada na medicina popular no tratamento das inflamações, atividade esta, já comprovada farmacologicamente. O presente trabalho tem o objetivo de dar continuidade ao conhecimento químico de *P. stipulacea*. Os constituintes químicos isolados foram identificados por meio da análise de dados obtidos por métodos espectroscópicos, tais como RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. O estudo fitoquímico da fase clorofórmica resultou no isolamento de dois flavonoides: 3,3',5,7-tetrahidroxi-4',6-dimetoxiflavona e 4',5,7-trihidroxi-3',6-dimetoxiflavona, ambos já descritos na espécie, da fase acetato de etila uma mistura de dois flavonoides inéditos na espécie (5,7,4' trihidroxi-6-metoxiflavona e 3,5,7,4'-tetrahidroxi-6-flavonol) enquanto que, da fase hidroalcoolica remanescente resultou no isolamento de um alcaloide indólico: N-metil-indol-1,3-etanamina, descrito pela primeira vez na literatura.

Palavras chaves: *Piptadenia stipulacea*, Fabaceae, flavonoide, alcaloide.

ABSTRACT

The genus *Piptadenia* Benth. part of the Mimosoideae subfamily which is included to the Fabaceae family, the third largest family of angiosperms, widely distributed, being one of the largest in dicotyledonous and economic importance. *Piptadenia stipulacea* is widely distributed in the caatinga biome, and is used in popular medicine to treat inflammation, activity that has been proven pharmacologically. This paper aims to continue the chemical knowledge of *P. stipulacea*. The chemical compounds were identified using analysis of data obtained by spectroscopic methods, such as ¹H and ¹³C NMR uni- and bidimensional. The phytochemical study of chloroform phase resulted in the isolation of two flavonoids: 3,3',5,7-tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavone and 4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone, both previously described in the species, of ethyl acetate phase resulted in the isolation of a mixture of two novel flavonoids in the species (5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone e 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavonol), whereas the remaining hydroalcoholic phase resulted in the isolation of an indolic alkaloid: methyl(2-{3-[2-(methylamino)ethyl]-1H-indol-1-yl}ethyl)amine, firstly described in the literature.

Keywords: *Piptadenia stipulacea*, Fabaceae, flavonoid, alkaloid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição da família Fabaceae, representada nas áreas em verde (In: Missouri Botanical Garden)	27
Figura 2. Mapa de distribuição do gênero <i>Piptadenia</i> , representada nas áreas verdes (In: Missouri Botanical Garden)	30
Figura 3. <i>Piptadenia Stipulacea</i> (Benth.) Ducke. A. árvore; B. madeira; C. galhos (In: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas).....	33
Figura 4. . Substâncias isolados de <i>Piptadenia stipulacea</i> (WILLAMAN e LI, 1970; LIRA, 2009).	35
Figura 5. Espectros de RMN de ^1H da substância Ps-05	48
Figura 6. Espectros de RMN de ^{13}C da substância Ps-05	49
Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD ₃ OD) de Ps-01	54
Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD ₃ OD) de Ps-01	55
Figura 10. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD ₃ OD) de Ps-02.....	58
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD ₃ OD) de Ps-02	59
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CD ₃ OD).....	65
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 125 ⁰ (125 MHz, CD ₃ OD) de Ps-03+Ps-04	65
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HSQC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD ₃ OD)	66
Figura 17. Expansão do espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HSQC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD ₃ OD)	67
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMBC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD ₃ OD)	67

Figura 19. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD_3OD).....	68
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD).....	73
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C -BB de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	74
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C – APT de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD).....	74
Figura 23. Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMQC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)....	75
Figura 24. Expansão de espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMQC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	75
Figura 25. Expansão de espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMQC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	76
Figura 26. Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	76
Figura 27. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	77
Figura 28. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	77
Figura 29. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-01, com dados da literatura (LIRA, 2009) registrados em CD ₃ OD (δ em ppm e J em Hz).	53
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-02, com dados da literatura (LIRA, 2009) registrados em CD ₃ OD (δ em ppm e J em Hz).	57
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) Ps-03 x Ps-04 registrados em CD ₃ OD (δ em ppm e J em Hz).....	63
Tabela 4. Correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMBC) de Ps-03 x Ps-04 registrados em CD ₃ OD (δ em ppm e J em Hz).....	64
Tabela 5. Dados espectrocópicos de RMN de H e C da Ps-05. Os deslocamentos químicos estão apresentados em δ (PPM) e as constantes de acoplamento em (Hz).	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação taxonômica da espécie <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.) Ducke	32
Quadro 2. Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Piptadenia stipulacea</i> . Legenda: (-) Reação negativa, (+) Reação fracamente positiva, (++) Reação positiva, (+++) Reação fortemente positiva.	42
Quadro 3. Frações obtidas na CC e sistema de solvente utilizado.....	43
Quadro 4. Frações obtidas na CC e sistema de solvente utilizado.....	45

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Estruturas de ressonância dos carbocátons formados com a entrada de um eletrólito nas posições C-2 e C-3 do núcleo indólico	71
Esquema 2. Estruturas de ressonância eletrônica do Indol.....	71

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke.....	41
Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BB: Broadening

CC: Cromatografia de adsorção em coluna

CCDA: Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP: Cromatografia em camada delgada preparativa

CD₃OD: Metanol deuterado

CENAUREM: Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

d: Dupleto

dd: Duplo dupleto

EtOH: Etanol

g: Grama

HA: Hidroalcoólica

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

m: Multipletos

MeOH: Metanol

mg: miligrama

mL: mililitro

MHz: Megahertz

nm: Nanômetro

pág: Página

ppm: Partes por milhão

Rf: Fator de retenção

RMN de 1H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de 13C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Simpleto

SI: Sistema Internacional de Unidades

t: Tripleto

UFC: Universidade Federal do Ceará

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UV: Ultravioleta

v/v: volume por volume

δ: Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. Introdução	21
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. Fundamentação Teórica.....	27
3.1 Considerações sobre a família Fabaceae	27
3.2 Considerações sobre o gênero Piptadenia.....	30
3.3 Considerações sobre <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.) Ducke	31
3.3.1 Estudo químico e farmacológico de <i>P. stipulacea</i>	34
4 Parte Experimental	37
4.1 Estudo fitoquímico	37
4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	37
4.2 Métodos de análise	37
4.2.1 Métodos cromatográficos	37
4.2.2 Métodos espectrométricos.....	39
4.2.2.1 – Ressonância Magnética Nuclear	39
4.3 Processamento do Material botânico.....	39
4.3.1 Preparação do extrato	39
4.3.2 Triagem fitoquímica preliminar dos constituintes químicos.....	42
4.3.3. Fase Clorofórmica	42
4.3.4. Fase Acetato de Etila - FAET	45

4.3.5 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sílica-gel da FAET	45
4.3.6 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex da FAET	46
4.3.7 Fase hidroalcoólica remanescente (FHAR)	46
4.3.7.1. Isolamento dos alcaloides da FHAR.....	47
5. Resultados e Discussão	51
5.1 Constituintes químicos isolados da fase clorofórmica de <i>P. stipulaceae</i>	51
5.1.1 Identificação estrutural de Ps-01	51
5.1.2 Identificação estrutural de Ps-02	56
5.2 Constituintes químicos isolados da fase Acetato de Etila (FATE) de <i>P.stipulaceae</i>	60
5.2.1 Identificação estrutural de Ps-03 e PS-04	60
5.3 Contituintes químicos isolados da fase Hidroalcoolica remanescente (FHAR) de <i>P.stipulaceae</i>	69
5.3.1 Identificação estrutural de Ps-05	69
6. Conclusão	80

1. Introdução

1. Introdução

Os produtos naturais derivam do fenômeno da biodiversidade, ou seja, da riqueza na diversidade de organismos na ecosfera. A interação entre estes organismos e o ambiente tem como consequência a evolução de diferentes estruturas químicas complexas nestes organismos, o que possibilitou sua sobrevivência e competitividade. Existem literalmente milhões de estruturas químicas naturais resultantes da química combinatória realizada pela mãe natureza, fornecendo uma diversidade química inimaginável, com estruturas complexas com diversos grupos funcionais, moléculas ideais para interagir especificamente com alvos biológicos (MCCHESNEY et al., 2007).

A descoberta de novos compostos é motivada pela busca de substâncias mais ativas e menos tóxicas, que possam ser utilizadas no tratamento de diversas patologias, ou em substituição àquelas já existentes. Fontes alternativas aos medicamentos industrializados e a implementação de um projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais, são de grande interesse para comunidade científica (SANTOS et al., 2006), visto que, cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna, foram desenvolvidos direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (YUNES e CALIXTO, 2001).

A botânica nos permite identificar a espécie vegetal, e conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas. Ressalta-se ainda a importância para o desenvolvimento de fitoterápicos, o estabelecimento de marcadores químicos, que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformações tecnológicas, aliado a estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final. Para isso, o conhecimento da estrutura química tem especial relevância no caso de substâncias facilmente degradáveis por fatores tais como luz, calor e solventes, atrelados ao processo tecnológico. Nesta ótica, destacam-se a avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e o perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final; por meio de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, devendo possuir especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, viabilizando-se que o mesmo possa ser utilizado em estudos de

estabilidade, permitindo, inclusive, a detecção de produtos oriundos da degradação das substâncias ativas ou dos marcadores químicos (TOLEDO et al., 2003).

Desta forma, as pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e, finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002).

É importante ressaltar também que, devido ao fantástico desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, nas últimas três décadas, mais recentemente de instrumentos analíticos hifenados, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados das angiospermas, muitos desses ainda sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Logo, os produtos naturais e seus derivados foram, e continuam sendo, extremamente importantes, em uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos oriundos de síntese (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% da flora mundial. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Diante do exposto, concretizou-se a importância do estudo das plantas medicinais para a obtenção de moléculas bioativas, obtendo-se, portanto, protótipos para a síntese de novas moléculas ou para modificações em moléculas já existentes, tornando-as mais potentes, ativas ou menos tóxicas.

Vislumbrando o isolamento de novas moléculas bioativas, considerou-se que a espécie *P. stipulacea* pertencente à família Fabaceae, apesar, de poucos estudos fitoquímicos (LIRA, 2009), é uma espécie promissora, visto que, estudos recentes demonstraram potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e espasmolítico (MACÊDO et al., 2011; QUEIROZ et al., 2010). Desta forma, realizando um estudo fitoquímico

mais aprofundado desta espécie, pretende-se descobrir possíveis moléculas inovadoras e com alto potencial farmacológico.

2. Objetivos

1. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o estudo quimiotaxonômico do gênero *Piptadenia*, através do estudo fitoquímico da espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar e dar continuidade ao estudo fitoquímico das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*, através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos.

- ✓ Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos isolados através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (uni e bidimensionais).

- ✓ Integrar estudos biológicos ao estudo fitoquímico de *Piptadenia stipulacea*, através da disponibilização de seus extratos e/ou substâncias isoladas para posterior avaliação da sua atividade biológica.

3. Fundamentação Teórica

2. Fundamentação Teórica

3.1 Considerações sobre a família Fabaceae

A família Fabaceae é a terceira maior das angiospermas, de ampla distribuição geográfica, com exceção das regiões Ártica e Antártica, com distribuição nas regiões tropicais, subtropicais e em zonas áridas ou semiáridas do planeta (Figura 1). Fabaceae está entre as maiores famílias de plantas com flores, abrangendo 727 gêneros e cerca de 19.300 espécies, sendo uma das maiores em dicotiledôneas e em importância econômica (SOUZA e LORENZI, 2008).



Figura 1. Mapa de distribuição da família Fabaceae, representada nas áreas em verde (In: Missouri Botanical Garden).

No Brasil a família Fabaceae está representada por aproximadamente 188 gêneros e 2.100 espécies, com distribuição cosmopolita e ocorre abundantemente em diversas formações vegetais, provavelmente devido à sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico por meio de associação simbiótica com bactérias em nódulos radiculares (LEWIS, et al. 2005).

Esta família encontra-se entre um dos grupos botânicos mais avaliados tanto do ponto de vista químico como farmacológico. Os gêneros que se apresentam como plantas herbáceas, considerados sob o ponto de vista quimiotaxonômico, são mais difundidas nas regiões temperadas, enquanto que as plantas lenhosas são

mais representativas nas regiões tropicais e subtropicais. Suas espécies igualmente se caracterizam como ervas anuais ou perenes, eretas, prostadas, difusas ou escandentes, subarbustos, arbustos eretos e árvores de pequeno, médio e grande porte, possuem sistema radicular bem desenvolvido com predominância de raiz principal sobre suas ramificações. As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas ou estipelas às vezes são transformadas em espinhos. As folhas podem apresentar modificadas em gavinhas ou podem estar reduzida a dois ou um só folíolo. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base, nos pecíolos ou nos peciólulos, que permitem movimentos diurnos (às vezes muito rápidos) às folhas em resposta a variados agentes. Flores variadas sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfas, diclamídeas com cálice gamossépalo, pentâmero ou tetrâmero; corola dialipétala pentâmera ou tetrâmera na maioria das vezes com pétalas muito desiguais. Androceu formado por quatro a dez estames, livres ou soldados entre si. Ovário sempre súpero, unicarpelar e unilocular, às vezes divididos por falsos septos, com muitos óvulos, fruto variado em geral legume, seco, deiscente por duas valvas, do tipo lomento segmentando-se, seco e indeiscente ou ainda de pericarpo mais ou menos carnoso. Sementes às vezes envoltas em mucilagens ou polpa doce, ou com arilo ou testa duríssima (JOLY, 1998).

A família Fabaceae possui grande interesse econômico, como por exemplo, espécies que são utilizadas na alimentação, especialmente o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o tremoço (*Lupinus spp.*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e o tamarindo (*Tamarindus indica*). Inúmeras são as espécies de Fabaceae utilizadas como ornamentais, sendo a principal família utilizada na arborização urbana no Brasil (SOUZA e LORENZI, 2008).

A química da família Fabaceae é composta por várias classes de substâncias, destacando-se as classes dos flavonoides e alcaloides que são tidos como marcadores taxonômicos. Entre os flavonoides são encontrados flavonóis, flavonóis glicosilados, flavonas, isoflavonas, chalconas, entre outros. Entre os alcaloides encontram-se, entre outros aqueles derivados da fenilalanina, da tirosina e do triptofano entre outros (HARBONE, 1971). Além dos alcaloides e flavonoides, foram também relatados, vários outros tipos de metabólitos, tais como aminoácidos não

proteícos, aminas, cumarinas, antraquinonas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, glicosídeos cianogênicos, entre outros (WINK, 2003).

A família Fabaceae compreende três subfamílias, muitas vezes tratadas individualmente, dependendo do arranjo sistemático adotado, são elas, a Caesalpinoideae (Leguminosae I); Mimosoideae (Leguminosae II); e Papilionoideae (Leguminosae III), (DI STASI et al., 2002). Dentre estas três subfamílias, a Papilionoideae apresenta-se como o maior, sendo constituída por cerca de 430 gêneros e 12.615 espécies, seguido por Caesalpinoideae com cerca de 150 gêneros e 2.700 espécies e de Mimosoideae com 40 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (JUDD et al., 1999).

As Mimosoideae constituem-se a menor subfamília das Fabaceae com espécies distribuídas nos trópicos, subtrópicos e regiões de clima temperado, sendo a América Tropical, África e Ásia-Austrália centros de grande diversidade do grupo, com gêneros e espécies representativas no ecossistema caatinga, no nordeste brasileiro (SILVA e BARBOSA, 2000).

A subfamília Mimosoideae possui grande importância na fixação de nitrogênio com microrganismos, por apresentar maior incidência de gêneros com capacidade para associação simbiótica facultativa com bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, denominadas genericamente rizóbio, fornecendo assim subsídios para a fixação do N₂ atmosférico (KLEIN, 2000). Sendo assim, esse alto potencial de modulação com o nitrogênio, justifica a grande diversidade de alcaloides já isolados nesta família.

No Brasil destacam-se as espécies dos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Prakia*, *Piptadenia* e *Stryphnodendron*, muitos deles de valor medicinal (BARROSO, 1991). Suas espécies, geralmente ocupam os primeiros lugares na maioria dos levantamentos florísticos, realizados em ecossistemas de caatinga, onde em muitas delas no fim da estação chuvosa, suas flores, na maioria bem alvas, se tornam características na paisagem (PEREIRA et al., 2001). No Cariri Paraibano, esta subfamília é apresentada por 14 espécies, pertencentes a sete gêneros: *Acácia*, *Adenanthera*, *Chloroleucon*, *Mimosa*, *Piptadenia*, *Parapiptadenia* e *Prosopis* (BARBOSA et al., 2007).

3.2 Considerações sobre o gênero *Piptadenia*

O gênero *Piptadenia* Benth. faz parte de um dos maiores grupos de leguminosas reconhecido como a subfamília Mimosoideae (LEWIS e ELIAS, 1981). O gênero ocorre nos trópicos da América do Sul, com centros de diversidade na Amazônia e na floresta Atlântica do Brasil (LEWIS et al., 2005; LUCKOW 2005), com cerca de 80 espécies, das quais 21 ocorrem no Brasil e são encontradas nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. (CARDOZO, 2006).

Apesar de muitas espécies serem nativas da América tropical, tais como *Piptadenia stipulacea*, *Piptadenia gonoacantha*, *Piptadenia moniliformis* Benth, *Pipitadenia viridifolia* (JOBSON e LUCKOW, 2007). Existem várias espécies, incluindo: *Piptadenia peregrina*, *Piptadenia macrocarpa*, *Piptadenia rigida*, *Piptadenia vidiflora*, *Piptadenia paraguayensi* que estão distribuídas na África tropical, do Senegal a Angola e em todo o Congo, (Figura 2) e ainda a *Piptadenia africana* que é encontrada em Camarões (MBOUANGOUERE et al., 2007).

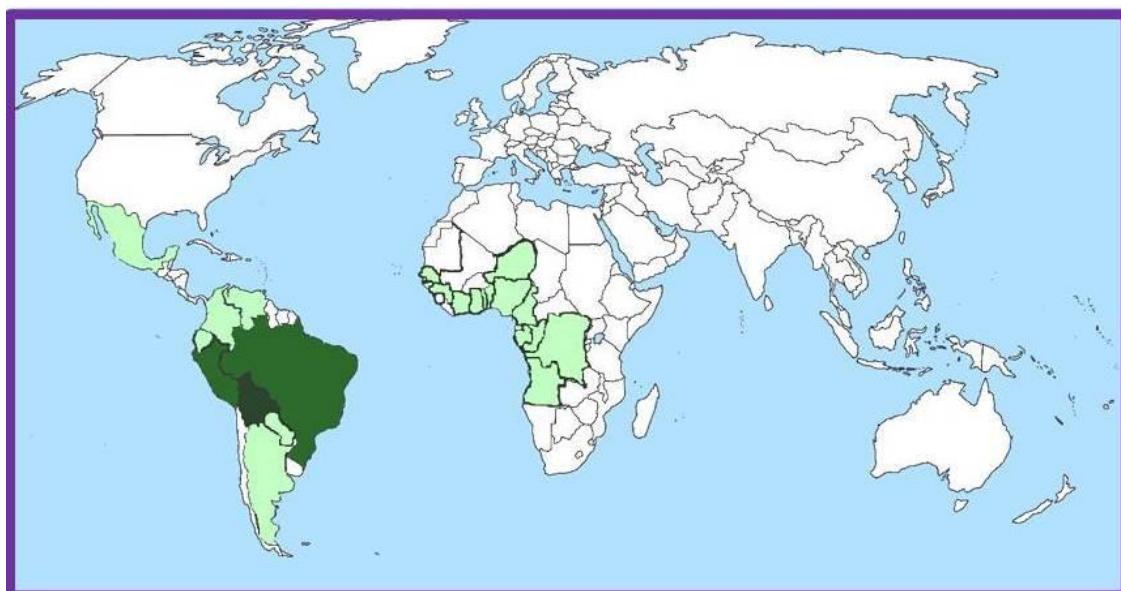


Figura 2. Mapa de distribuição do gênero *Piptadenia*, representada nas áreas verdes (In: Missouri Botanical Garden).

Muitas espécies de *Piptadenia* são exploradas para utilização de sua madeira na construção naval e civil, em telhados e também como lenha e carvão, além de ser usado para a recuperação ambiental, pois cresce muito bem em solos pobres e degradados (RIZZINI, 1998; CORREA, 1984). Suas sementes possuem teores altos de alcaloides e por isso são importantes em projetos fitoquímicos e farmacológicos (FISH et al., 1955; HOFMAN, 1959).

Entretanto, um dos primeiros trabalhos fitoquímicos no gênero, foi a determinação do conteúdo de taninos na espécie *Piptadenia cebil* (ZELADA e CONI, 1915), o que justifica a utilização das espécies do gênero *Piptadenia* pela indústria até os dias atuais (CARDOZO, 2006).

Do ponto de vista etnomedicinal, o extrato aquoso da espécie *Piptadenia africana* (Fabaceae) é usado externamente para o tratamento da gonorréia (AKENDENGUE, 1992). Já as folhas de *Piptadenia macrocarpa* (Fabaceae) é reportado como tóxico ao gado (CANELLA, et al., 1966).

3.3 Considerações sobre *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke

No Brasil *Piptadenia stipulacea* é conhecida popularmente como jurema branca (FABRICANTE e ANDRADE, 2007), jurema malícia-da-serra, carcará (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002), calumbi (FLORENTINO et al., 2007) e apresenta ampla distribuição no bioma da caatinga nordestina, ocorrendo do Piauí até a Bahia (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002).

Piptadenia stipulacea é uma árvore de pequeno porte com cerca de 2-4 m de altura, possui folhas alternas compostas bipinadas com 10-16 pares de pinas opostas e nectários foliares presentes. As flores em espigas simples, axilares, de cor alva, na extremidade dos ramos onde se encontram até três espigas por axila de folha (Figura 3). Seu fruto é uma vagem de cor castanho-pálido, com superfície ondulada nas áreas onde ficam as sementes. Contém 2-12 sementes pequenas livres, não carnosas, ovais de cor marrom por vagem. A madeira é de cor clara (BEZERRA, 2008).

O enquadramento taxonômico da espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke segundo Grupo para a Filogenia das Angiospermas (APG-II). encontra-se inserido no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação taxonômica da espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke

Quadro 1. Classificação taxonômica de <i>Piptadenia stipulacea</i>
Divisão: Angiospermae
Classe: Dicotyledoneae
Ordem: Rosales
Família: Fabaceae
Sub-família: Mimosoideae
Gênero: <i>Piptadenia</i>
Espécie: <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.) Ducke



Figura 3. *Piptadenia Stipulacea* (Benth.) Ducke. A. árvore; B. madeira; C. galhos (In: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas).

Nativa da caatinga, a jurema branca é uma planta pioneira que facilmente ocupa capoeiras e beiras de estrada, sendo tolerante a elevados níveis de perturbação da vegetação. Por ser uma planta caducifólia a sua floração ocorre na estação chuvosa, mas pode também ser encontrada na estação seca, seguida pela frutificação que se estende até essa estação (MAIA, 2004). A espécie é bastante utilizada como alimento por ovinos, caprinos e bovinos principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação (BEZERRA, 2008).

Na medicina popular é conhecida como anti-inflamatório, de uso externo, a partir do decocto ou tintura preparados com a casca do caule e suas folhas (ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002). Seu uso também já foi indicado como cicatrizante (BEZERRA, 2008).

3.3.1 Estudo químico e farmacológico de *P. stipulacea*

Do ponto de vista químico, esta espécie possui estudos relativamente escassos, visto que, o primeiro estudo fitoquímico levou ao isolamento apenas do alcaoide indólico bufotenina (**I**) (WILLAMAN e LI, 1970), e o seu segundo estudo, realizado recentemente pela equipe de pesquisa da Profa. Bárbara Viviana de Oliveira Santos, promoveu o isolamento dos flavonoides 5-7-diidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona (**II**); 3,3',5,7-tetraidroxi-4',6dimetoxiflrona (**III**); 4',5,7-triidroxi-3,3',6-trimetoxiflavona (**IV**); e 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxiflavona (**V**); 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**VI**) (LIRA, 2009), (Quadro 2).

Em parceria com a farmacologia, foi possível comprovar o potencial farmacológico desta espécie, através dos estudos com suas fases e com flavonoide galentina 3,6 dimetil éter, o qual apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (QUEIROZ et al., 2010), além, do efeito espasmolítico não seletivo em cobaias (MACÊDO et al., 2011).

Do ponto de vista farmacológico além dos estudos recentes citados, esta espécie já demonstrou também atividade antimicrobiana (CHIAPPETA e MELLO, 1984; BEZERRA, 2008).

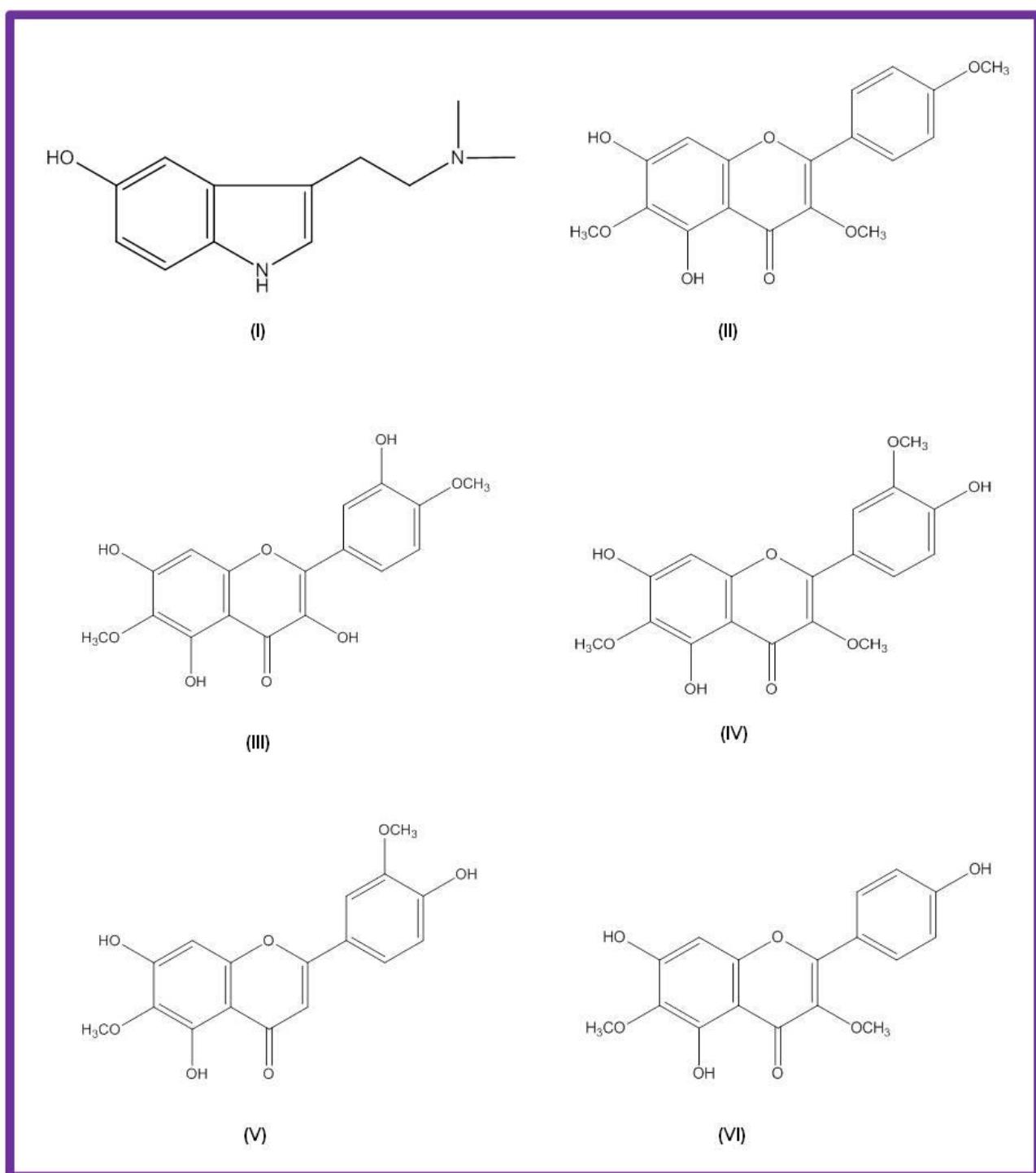


Figura 4. Substâncias isolados de *Piptadenia stipulacea* (WILLAMAN e LI, 1970; LIRA, 2009).

4. Parte Experimental

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Estudo fitoquímico

4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal (partes aéreas) de *Piptadenia stipulacea* foi coletado no município de Serra Branca, no estado da Paraíba, em abril de 2005, e identificado pela botânica Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba.

Uma exsicata desta espécie foi codificada e encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba (JPB), sob o registro Agra et al. 3331 (JPB).

4.2 Métodos de análise

4.2.1 Métodos cromatográficos

Na Cromatografia em Coluna (CC) foi utilizada como fase estacionária, sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e o Sephadex LH-20 da AMERSHAM BIOSCIENCES, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Tendo como objetivo o isolamento químico.

Na Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Preparativa (CCDP) foi usada como fase fixa, sílica gel 60 PF254 ART 7749 da MERCK, as placas cromatográficas de vidro (20 x 20, 10 x 20, 5 x 20 cm) foram preparadas com uma suspensão gel de sílica em água, distribuída com ajuda de um espalhador mecânico tipo quick fit, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As cromatoplacas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110,0 °C durante 2 horas. Visando com isso a análise e separação dos componentes de uma mistura, uma vez que, a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos, como os fenóis (COOLINS et al., 2007).

As revelações das substâncias nas CCDA, foram executadas pela exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58 e/ou pelos reveladores químicos universais e específicos, para detecção de grupos químicos, ou aqueles já consagrados classicamente como é o caso do vapores de iodo e Dragendorff.

O grau de pureza das substâncias foi evidenciado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) da MERCK, determinando-se a pureza quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três tipos de sistemas de eluição diferentes.

Como fase móvel foram utilizados os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, isoladamente ou em misturas binárias em gradiente crescente de concentração.

Para a análise do perfil cromatográfico de algumas substâncias foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC - High Performance Liquid Chromatography). Os cromatogramas de CLAE foram obtidos em equipamento Varian ProStar 410 Autosampler, bomba modelo 230, detector de arranjo de fotodiodo 335 (Universidade Federal Rural do Pernambuco). Em todos os procedimentos de CLAE utilizou-se solventes grau HPLC. A água utilizada foi purificada no sistema Puritech/Permution PT0020, filtro 0,2 µm, apresentando alto grau de pureza.

A coluna utilizada na CLAE, cujo modelo foi Microsorb-MV 100-5 C18 de dimensões 150 mm por 4,6 mm. As amostras foram injetadas utilizando-se loop de 10 µl e manteve-se uma vazão de 0,8 ml/min. Antes de serem injetadas no equipamento as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com poros de abertura 0,22 µm da Milipore ®.

Unidades e símbolos foram baseados no Sistema Internacional de Unidades (SI) de acordo com a recomendação da IUPAC.

4.2.2 Métodos espectrométricos

4.2.2.1 – Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C), unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espetrômetro Bruker Ac-500 [500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)] (CENAUREM/UFC) e MERCURY-VARIAN (LMCA/UFPB) operando a 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C) e VARIAN-NMR-SYSTEM (LMCA/UFPB) operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-as em metanol deuterado (CD_3OD) da MERCK. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente metanol ($\delta_{\text{H}} = 3,30$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados, metanol ($\delta_{\text{C}} = 49,00$ ppm).

As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), d (dupleto), t (triplete), m (multipletos).

4.3 Processamento do Material botânico.

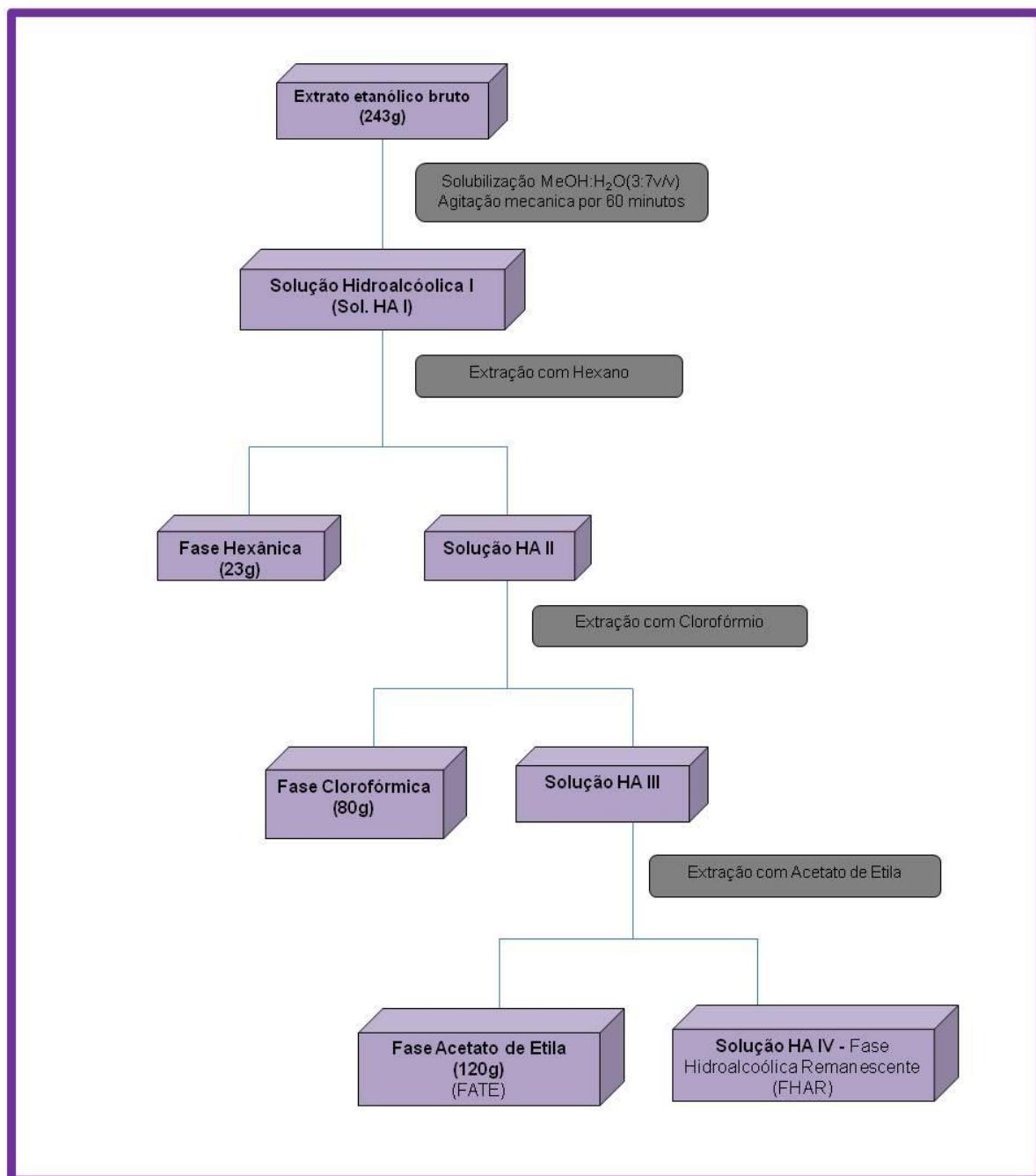
O material vegetal foi dessecado em estufa com ar circulante, à temperatura média de 40°C, por cerca de 72-96 horas. Após a completa secagem, o material foi pulverizado em moinho de lâminas cortantes, obtendo-se 1,200 Kg do pó.

4.3.1 Preparação do extrato

O material vegetal seco e pulverizado (1,200 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitos vários processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. Esta solução etanólica foi filtrada, fazendo-se em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rota-evaporador a uma temperatura média de 50 °C. Assim, o extrato etanólico bruto

obtido, foi solubilizado em um mistura de MeOH:H₂O (7:3 v/v) e homogeneizado por meio de um agitador mecânico por 60 minutos, obtendo-se a solução hidroalcoólica, a qual foi submetida a um processo de partição líquido-líquido (Fluxograma 1) com solventes de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio e acetato de etila, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades.

Fluxograma 1. Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.



* Fase hexânica estudada anteriormente, com resultados à serem publicados.

4.3.2 Triagem fitoquímica preliminar dos constituintes químicos

A triagem fitoquímica utilizada com o extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*, buscou sistematizar ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem o extrato vegetal, através de um exame qualitativo rápido, no qual se utiliza reagentes de coloração ou precipitação. A triagem fitoquímica preliminar foi realizada seguindo a metodologia descrita por Matos (1997) e seus resultados encontram-se sumarizados no Quadro 2.

Quadro 2. Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*. Legenda: (-) Reação negativa, (+) Reação fracamente positiva, (++) Reação positiva, (+++) Reação fortemente positiva.

Grupos químicos	Reagentes	Resultados
Alcaloide	Bouchardat	++
	Mayer	++
	Dragendorff	+++
	Ácido sílico-tungstico	++
Esteroides e terpenoides	Lieberman-Buchard	++
Taninos	Cloreto férrego 2%	+++
Flavonoides	Shinoda	++
	Oxalo-bórico	++
Saponinas	Teste de espuma	+

4.3.3. Fase Clorofórmica

Dando continuidade à fase clorofórmica estudada anteriormente por (LIRA, 2009) e objetivando encontrar novos constituintes químicos. A fase clorofórmica (40g) foi submetida a duas técnicas cromatográficas (fluxograma 2). Em princípio, foi empregada à cromatografia de adsorção em coluna (CC-1) utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 175

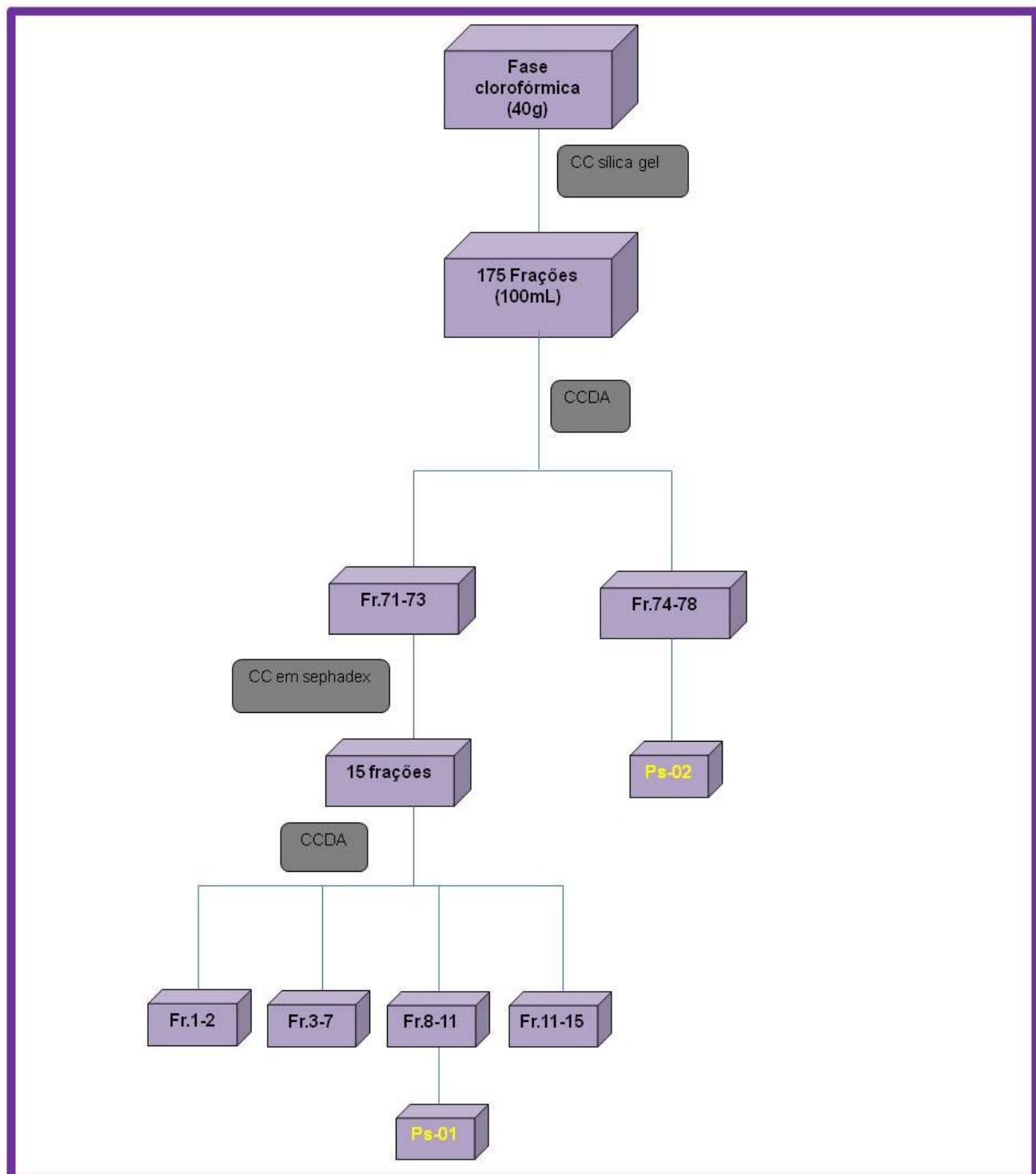
frações de 100 mL (Quadro 3), que foram concentradas com o auxílio de um rota-evaporador e reunidas após CCDA de acordo com seu fator de retenção (Rf).

Quadro 3. Frações obtidas na CC e sistema de solvente utilizado.

Sistemas de solventes	Frações obtidas	Proporção
Hexano: Diclorometano	01-12	50:50 v/v
Hexano: Diclorometano	13-24	30:70 v/v
Diclorometano	24-37	100 v/v
Diclorometano: Metanol	37-44	99,5: 0,5 v/v
Diclorometano: Metanol	44-72	99:1 v/v
Diclorometano: Metanol	73-95	98:2 v/v
Diclorometano: Metanol	95-112	96:4 v/v
Diclorometano: Metanol	113-130	94:6 v/v
Hexano: Acetato de etila	131-140	92:8 v/v
Hexano: Diclorometano	140-157	88:12 v/v
Diclorometano: Metanol	158-169	80:20 v/v
Diclorometano: Metanol	170-175	70:30 v/v

Na análise em CCDA, as frações reunidas 44-72, cujo peso (87,09 mg) apresentou-se como duas manchas. Desta forma, a mesma foi submetida à CC-2, utilizando como fase estacionária sephadex LH 20 e como fase móvel diclorometano e metanol, na proporção 70:30. Obtendo-se 15 frações, que foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas as frações que possuíam mesmo Rf. Destas a fração reunida 8-11 demonstrou seu grau de pureza pela presença de uma única mancha. E assim, a mesma foi codificada como sendo a substância **Ps-01**.

Após análise em CCDA as frações reunidas 73-95, cujo peso (15,09 mg) demonstrou seu grau de pureza pela presença de uma única mancha, sendo codificada como sendo a substância **Ps-02**.

Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica.

4.3.4. Fase Acetato de Etila - FAET

4.3.5 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sílica-gel da FAET

A FAET (12,18 g) foi submetida à coluna cromatográfica (CC), utilizando como fase estacionária sílica-gel e como fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e metanol puro ou em misturas binárias, obedecendo a um grau crescente de polaridade. Obtendo-se 15 frações (Quadro 4), que foram concentradas em rotavapor.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), a mudança de polaridade de solvente foi realizada após visualização na luz ultravioleta, revelação em câmara de vapores de iodo e reagentes para alcaloide e flavonoide. Observou-se a ausência de alcaloides e presença de flavonoides.

Quadro 4. Frações obtidas na CC e sistema de solvente utilizado.

Sistemas de solventes	Frações obtidas	Proporção
Hexano	01	100 v/v
Hexano: Acetato de etila	02	95:5 v/v
Hexano: Acetato de etila	03	85:15 v/v
Hexano: Acetato de etila	04	80:20v/v
Hexano: Acetato de etila	05	75:25 v/v
Hexano: Acetato de etila	06	60:40 v/v
Hexano: Acetato de etila	07	50:50 v/v
Hexano: Acetato de etila	08	40:60 v/v
Hexano: Acetato de etila	09	30:70 v/v
Hexano: Acetato de etila	10	20:80 v/v
Hexano: Acetato de etila	11	10:90 v/v
Acetato de etila	12	100 v/v
Acetato de etila: Metanol	13	95:5 v/v
Acetato de etila: Metanol	14	90:10 v/v
Acetato de etila: Metanol	15	75:25 v/v

4.3.6 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex da FAET

No caso da FAET, o processo de isolamento das substâncias empregando sílica convencional não foi suficiente. Foram obtidos com esta metodologia três frações (Fr. 7, 8 e 9) com um bom grau de pureza e sugestivas de compostos flavonoídicas visto que reagiu positivo para reagentes específicos de flavonoides.

Diante essas premissas e objetivando isolar os flavonoides dessas frações cujo peso depois de reunidas foi 95,06 mg, utilizou-se sephadex LH-20 como fase estacionária. Obtendo-se a substância (Ps-03), considerado puro quando analisado por CCDA frente a vários sistemas de eluentes. No entanto, análises espectrais, principalmente de ^{13}C -RMN, mostrou que a amostra não se encontrava pura em função do número de sinais observado sendo, portanto, observado uma mistura de dois flavonoides (Ps-03 + Ps-04)

A purificação das frações remanescentes desta fase acetato de etila será um desafio para os trabalhos futuros deste grupo de pesquisa, uma vez que diversos métodos foram testados e que demonstravam a dificuldade da separação em função da proximidade dos seus coeficientes de retenção, além da grande perda de materiais pelo método utilizado.

4.3.7 Fase hidroalcoólica remanescente (FHAR)

Após o fracionamento com acetato de etila, o conteúdo remanescente (FHAR) foi concentrado em evaporador rotatório a 40°C. Foi feita a CCDA prévia em cromatoplaca de sílica gel G, utilizando como fase móvel diclorometano e metanol na proporção de 7:3 que após visualizada em câmara de luz ultravioleta e borrificada com reagente de Dragendorff, detectou-se a presença de alcaloides.

4.3.7.1. Isolamento dos alcaloides da FHAR

A FHAR foi solubilizada em solução de ácido sulfúrico 2%, e agitada por cerca de 2h e 30 minutos, filtrou-se e adicionou amônia (10 mL), ao decantar filtrou-se e obteve um resíduo de 10g que após análise por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel diclorometano e metanol na proporção de 9:1 em cuba saturada com vapores de amônia, foi confirmada a presença de dois pontos, que após revelação positiva com revelador Dragendorff clorídrico sugere presença de alcaloides.

Com este material, quase totalmente purificado, foi realizada Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) com 20 cm de altura e 20 cm de largura utilizando como fase móvel diclorometano e metanol na proporção de 9:1 em cuba saturada com vapores de amônia. Sob visualização em câmara de luz ultravioleta e comparando-se a uma CCDA nas mesmas condições e revelada com Dragendorff, a cromatoplaca foi assinalada com grafite demarcando a região de corrida maior, onde estava o alcaloide, e esta região foi raspada com auxílio de espátula metálica. A sílica contendo o alcaloide foi suspensa em metanol e filtrada em filtro até esgotamento do material aderido à sílica. O material obtido foi codificado como PS-5 e encaminhado para obtenção de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 5 e 6 respectivamente). Análise desses espectros observou que a amostra ainda não estava totalmente pura, que de acordo com a análise espectral verificou picos característicos de núcleo indólico.

Após diversas tentativas de separação desse alcaloide e devido a dificuldade da separação em função da proximidade dos seus coeficientes de retenção em cromatografia em camada delgada e em cromatografia de coluna e sabendo-se que esse alcaloide indólico apresenta-se normalmente polar e instável, optou-se pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no isolamento e purificação de compostos desta classe.

Para tanto foi utilizado cromatógrafo marca Schimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-6^a, detector espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu SPD-6AV, sistema controlador SCL-10Avp, conectado a um computador com software Shimadzu Class-VP versão 5.02 e injetor automático. Utilizou-se coluna cromatográfica preparativa de fase reversa C18 fabricada pela mesma companhia. Como fase móvel foi utilizada água acidificada 1% ácido fórmico na fase A e metanol

na fase B, sob vazão de 15 mL / min. e um gradiente iniciando-se de fase B com 20% (0,01-5 min.), elevando-se 40% (5-10 min.), 50% (10-20 min.), permanecendo 100% de fase B até 30 minutos. O Aparelho de CLAE está instalado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRP) e foi gentilmente disponibilizado pela Profa. Dra. Tânia Maria Sarmento da Silva.

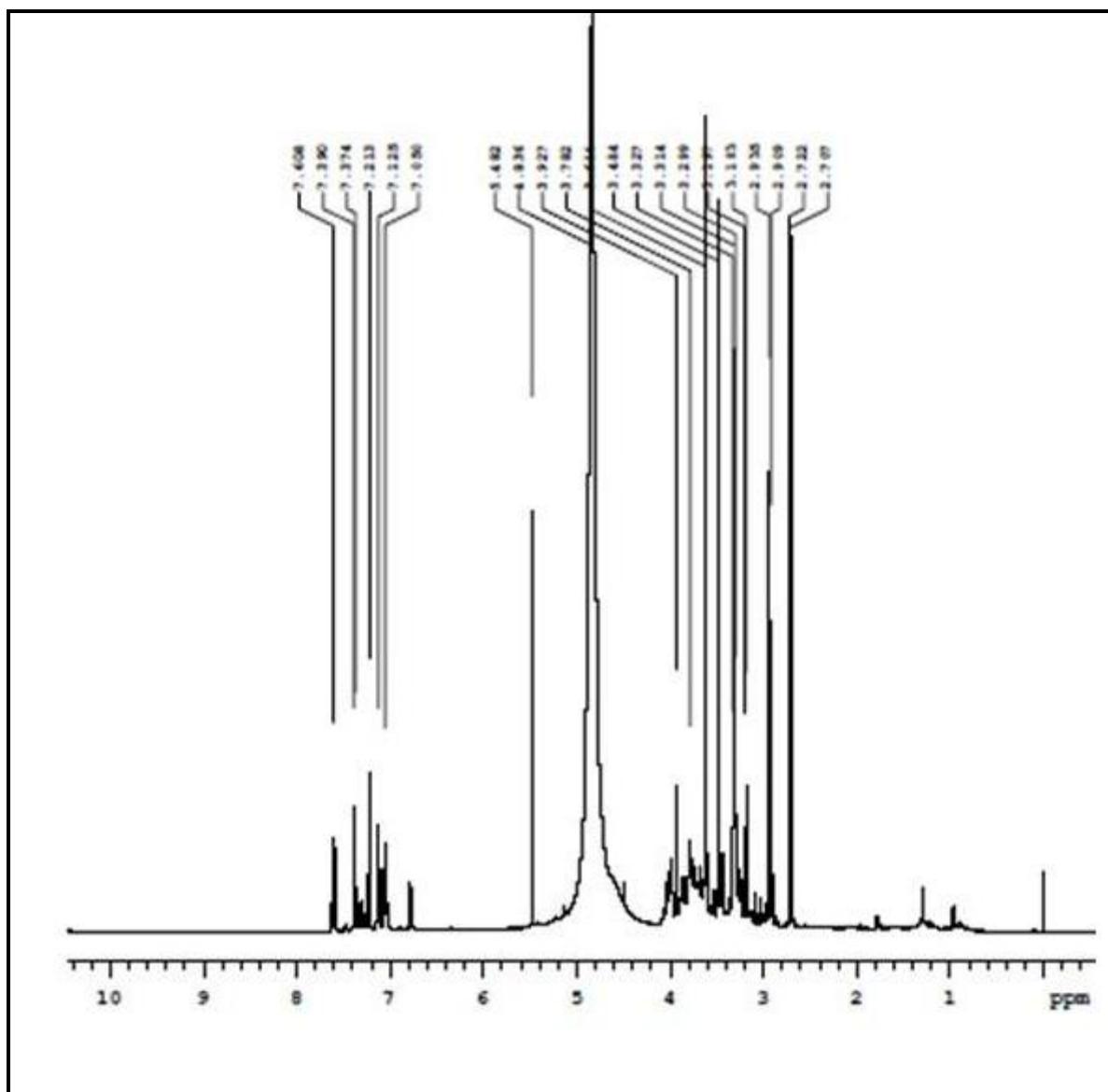


Figura 5. Espectros de RMN de ^1H da substância Ps-05

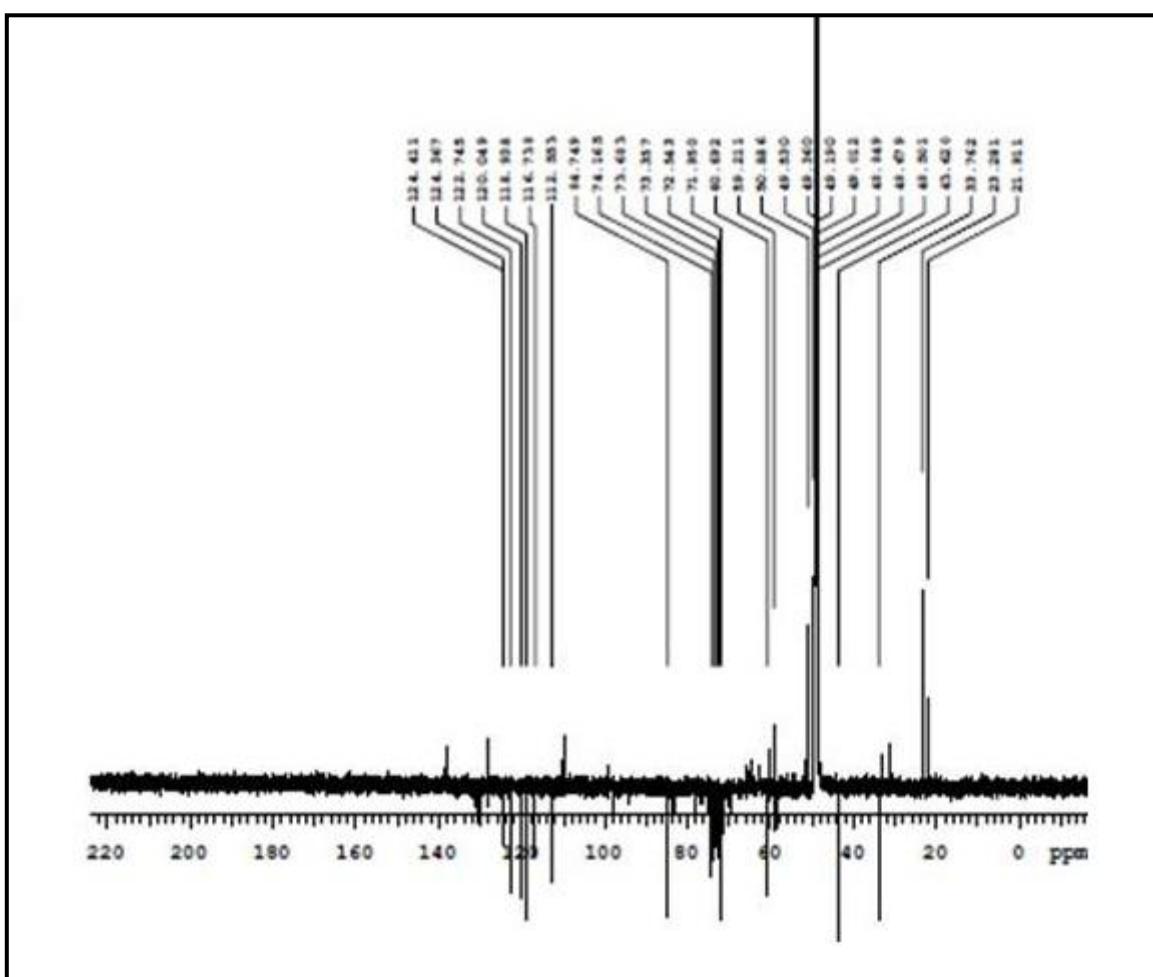


Figura 6. Espectros de RMN de ^{13}C da substância Ps-05

5. Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1 Constituintes químicos isolados da fase clorofórmica de *P. stipulacea*

5.1.1 Identificação estrutural de Ps-01

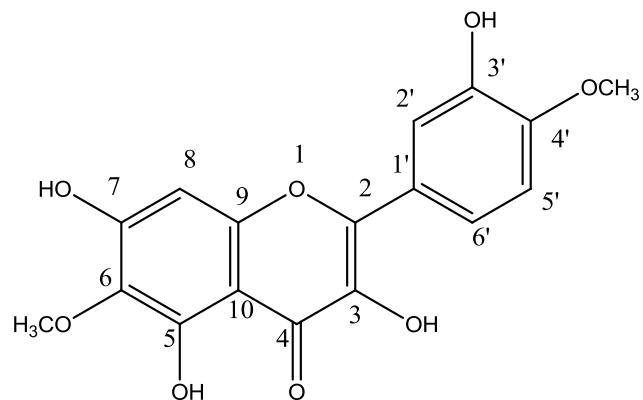
A substância, codificada como, Ps-01 apresentou-se na forma de pó amorfo amarelo claro, solúvel em CD₃OD. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de RMN ¹H e ¹³C unidimensionais.

A análise espectral de RMN ¹³C, utilizando a técnica Broadening (BB) (Figura 7; Tabela 1) permitiu observar a presença de 21 sinais de carbonos. Destes sinais, dez foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, quatro a carbonos metínicos e dois a carbonos metoxílicos. Baseado nestes dados e levando-se em consideração o número de carbonos na molécula, foi proposto um esqueleto flavonoídico para o composto em análise.

O espectro de RMN ¹H (Figura 8; Tabela 1) e sua expansão (Figura 9), mostraram absorções na região de aromático com presença de um conjunto de sinais correspondentes a um duplo duplet em δ_H 7,71 com acoplamento *ortho* (*J*= 8,5 Hz) e *meta* (*J*= 2 Hz), um duplet em δ_H 6,91 com acoplamento *ortho* (*J*= 8,5 Hz) e outro duplet em δ_H 7,84 (*J*=1,5 Hz) mostrando acoplamento *meta*. Estes valores sugerem um sistema ABX característico do anel B dos flavonoides. Ainda na região de aromáticos, observa-se também um simpleto em δ_H 6,5 característico do H-8 no anel A de flavonoides, sugestivo de substituição nos carbonos 5, 6 e 7 por funções oxigenadas.

No espectro de RMN ¹H (Figura 8; Tabela 1), foi possível observar também a presença de metoxilas aromáticas em δ_H 3,87 e δ_H 3,92, sendo uma impedida estericamente e a outra não, dado este confirmado, pelos valores encontrados no espectro de RMN ¹³C em δ_C 60,98 e 56,52 respectivamente.

Comparando os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹H e ¹³C com os valores da literatura (LIRA, 2009) (Tabela 1), foi possível confirmar que o composto Ps-01 trata-se do 3,3',5,7-tetrahidroxi-4',6-dimetoxiflavona, também conhecido como laciniatina, já isolado na espécie.



Estrutura Química de Ps-01:

Laciniatina

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-01, com dados da literatura (LIRA, 2009) registrados em CD_3OD (δ em ppm e J em Hz).

	δC	δH	δC (Literatura)
C			
2	149,98	–	148,82
3	136,99	–	135,48
4	177,55	–	176,08
5	150,75	–	151,66
6	132,27	–	130,83
7	158,65	–	157,18
9	153,65	–	151,36
10	104,95	–	103,38
1'	121,98	–	121,98
3'	156,76	–	156,76
4'	148,78	–	147,34
CH			
8	94,84	6,503 (s, 1H)	93,85
2'	112,61	7,844 (d, $J=1,5\text{Hz}$ 1H)	111,74
5'	116,28	6,911 (d, $J=8,5\text{Hz}$, 1H)	115,52
6'	122,91	7,715(dd, $J=8,5\text{Hz}$ e $J=2,0\text{Hz}$, 1H)	121,71
CH_3O			
$\text{CH}_3\text{O} - 6$	60,98	3,87 (s, 3H)	60,00
$\text{CH}_3\text{O} - 4'$	56,52	3,92 (s, 3H)	55,75

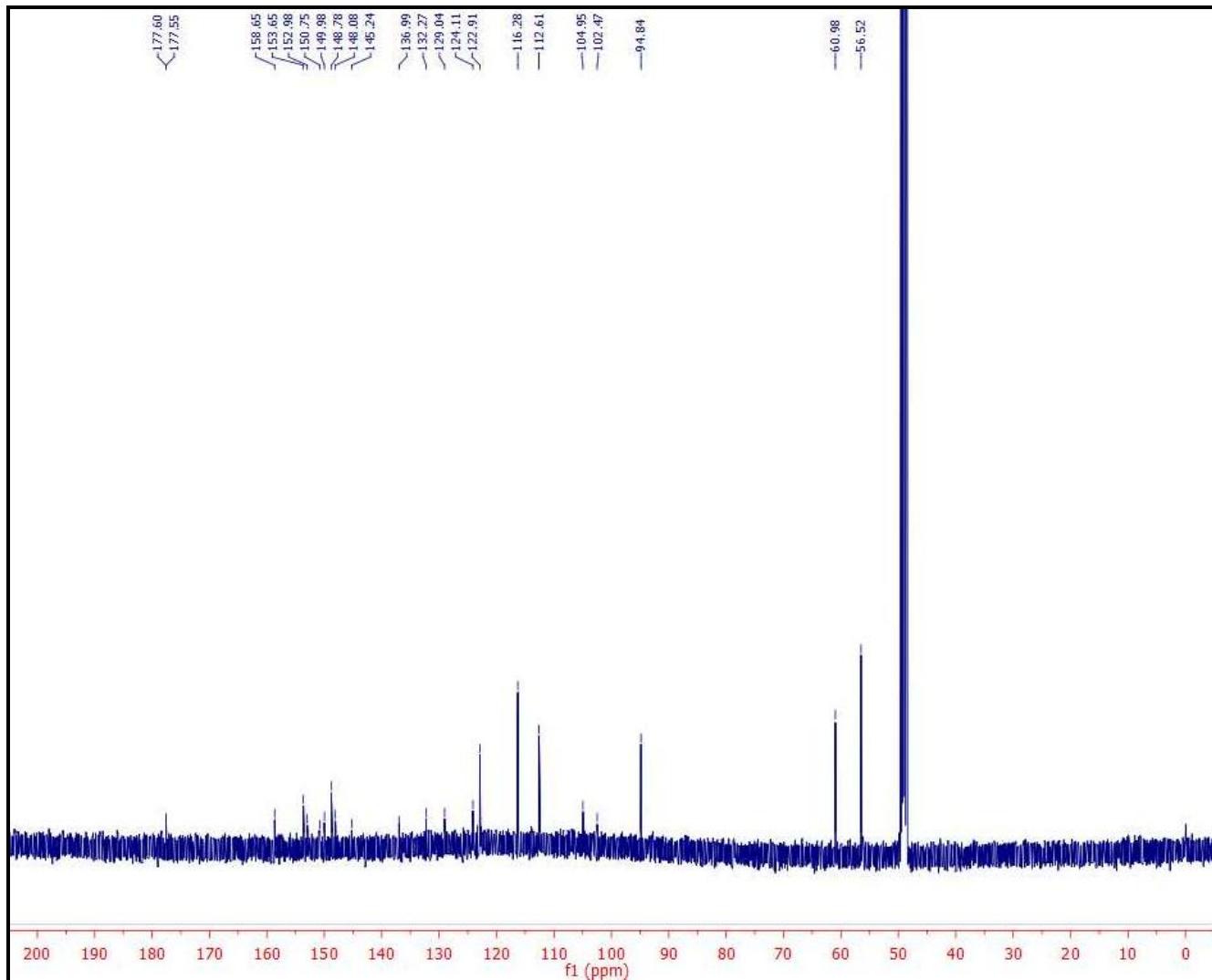


Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de Ps-01

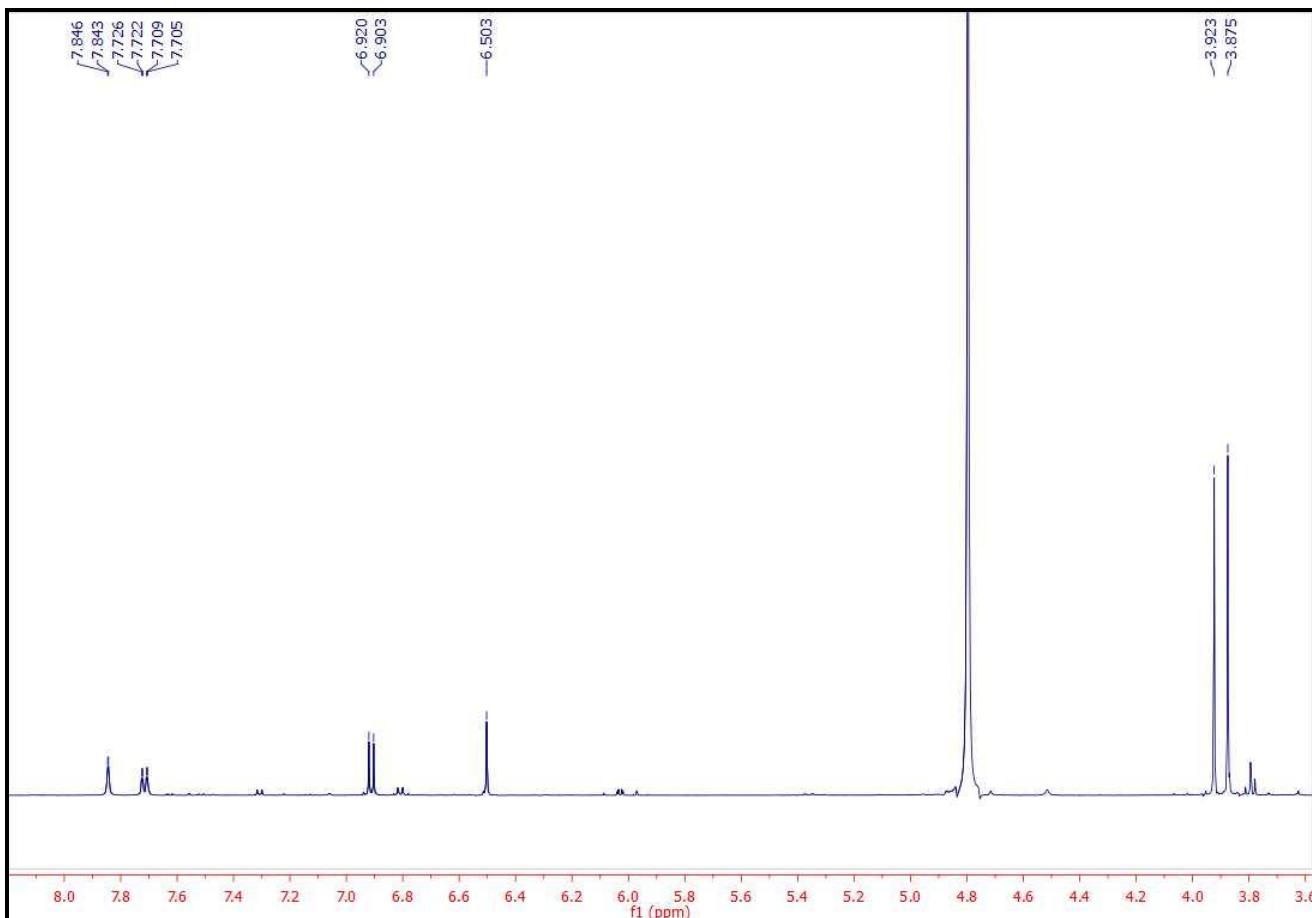


Figura 8. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ps-01.

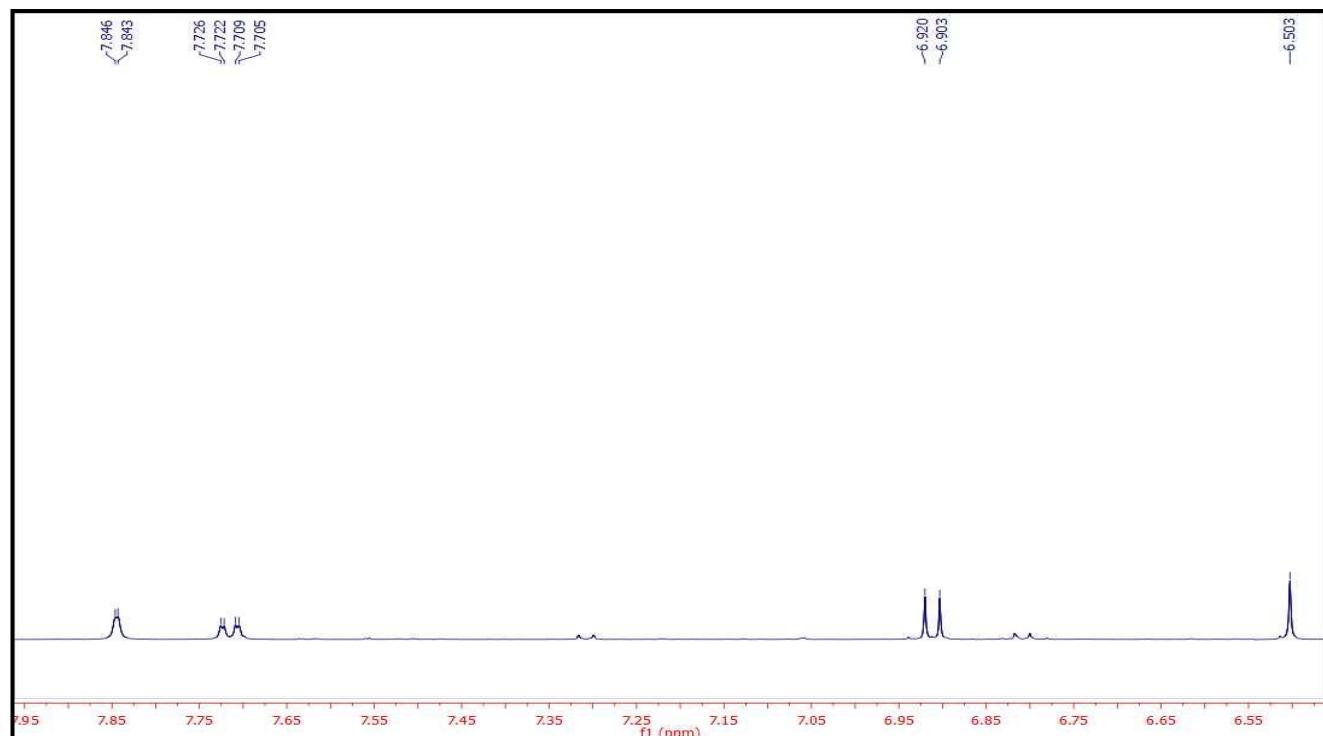


Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ps-01

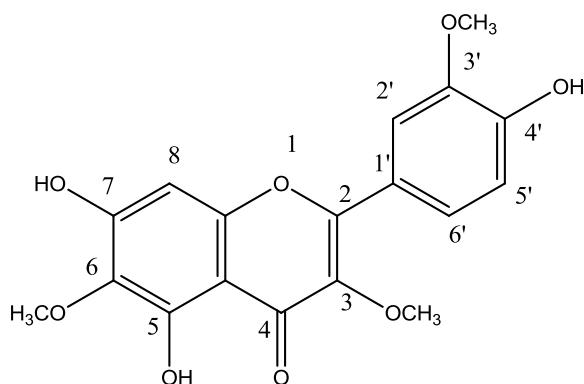
5.1.2 Identificação estrutural de Ps-02

A substância PS-02 apresentou-se na forma de cristais amarelo claro, solúvel em metanol. Sua identificação foi realizada através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais.

O espectro de RMN ^1H (Figura 10; Tabela 2) e suas expansões (Figuras 11), revelaram absorções com o mesmo padrão de hidrogenação que Ps-01, ou seja: um sistema ABX [$\delta_{\text{H}} 7,64$ (d, $J= 2,0$ Hz, 1H), $\delta_{\text{H}} 6,88$ (d, $J= 8,4$ Hz, 1H) e $\delta_{\text{H}} 7,66$ (dd, $J= 2,0$ e $8,4$ Hz, 1H)], com o anel A pentasubstituído, devido a presença de um simpleto em $\delta_{\text{H}} 6,43$ referente ao hidrogênio H-8. O espectro de RMN ^1H (Figura 8, pág. 32) mostrou ainda, três outras absorções referentes à metoxilas aromáticas.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 12; Tabela 2) utilizando a técnica APT, mostrou 17 absorções de carbonos, sendo dez carbonos não-hidrogenados, quatro carbonos metínicos e três carbonos metoxílicos, diferenciando de Ps-01 por apresentar uma metoxila a mais, no caso duas empedidas estericamente ($\delta_{\text{C}} 60,95$ e $60,55$) e uma desempedida em $\delta_{\text{C}} 56,53$. Um outro valor diferenciado, refere-se ao deslocamento em $\delta_{\text{C}} 139,24$, sugerindo que o carbono 3 está substituído por uma metoxila e não por uma hidroxila.

Assim, comparações realizadas entre os dados espetrais de RMN ^{13}C de Ps-01 e Ps-02 bem como, com os dados da literatura (Lira, 2009), (Tabela 2), permitiram a determinação estrutural de Ps-02, como sendo a 4',5,7-trihidroxi-3',6-dimetoxiflavona, também conhecida como jaceosidina, já descrita na espécie.



Estrutura Química de Ps-02:

Jaceosidina

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Ps-02, com dados da literatura (LIRA, 2009) registrados em CD_3OD (δ em ppm e J em Hz).

	δC	δH	δC (Literatura)
C			
2	157,84	–	155,84
3	139,24	–	138,03
4	180,23	–	178,58
5	152,92	–	152,92
6	132,53	–	132,24
7	158,63	–	159,77
9	153,65	–	152,50
10	106,34	–	104,62
1'	122,86	–	121,58
3'	148,88	–	148,18
4'	151,05	–	150,48
CH			
8	95,02	6,43 (s, 1H)	95,02
2'	112,85	7,64(d,J=2,0Hz1H)	112,68
5'	116,40	6,88(d,J=8,4Hz,1H)	116,37
6'	123,66	7,66(dd,J=8,5Hz e J=2,0Hz, 1H)	122,82
CHO₃			
CH₃O – 3	60,55	3,90 (s, 3H)	60,42
CH₃O – 3'	56,53	3,85 (s, 3H)	56,42
CH₃O – 6	60,95	3,75 (s, 3H)	60,53

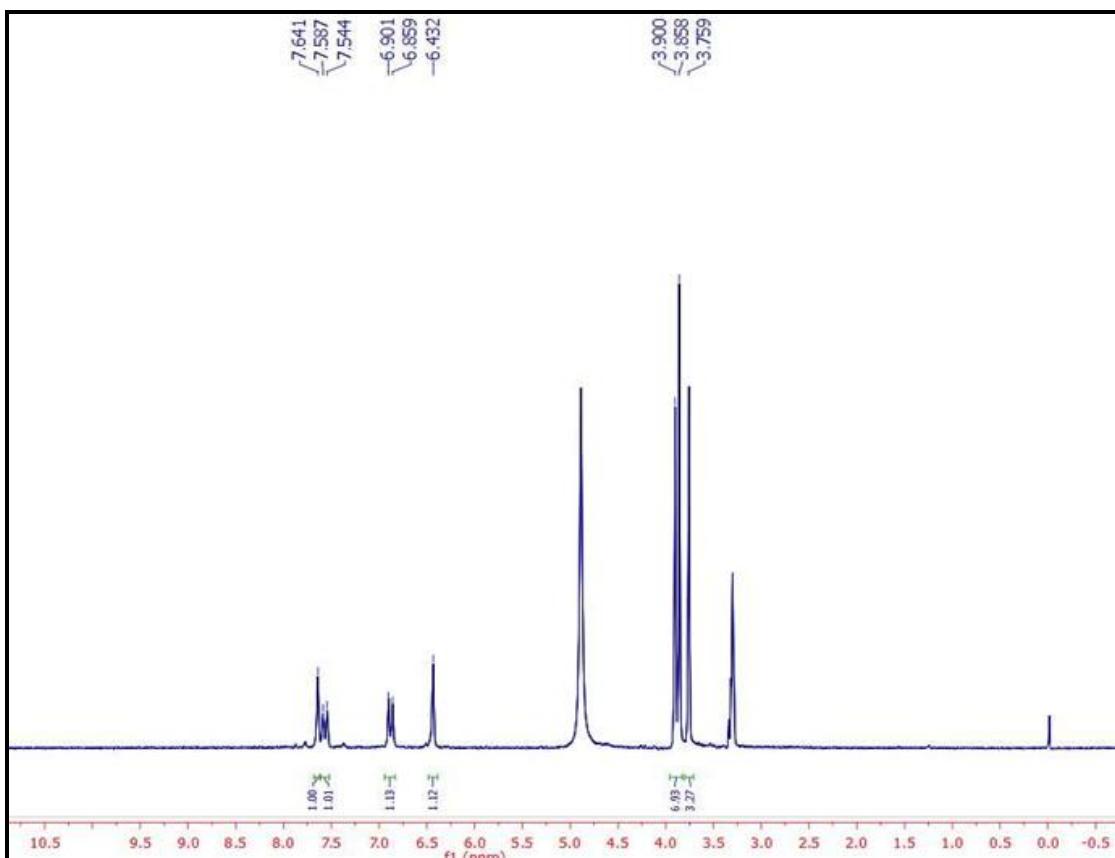


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ps-02.

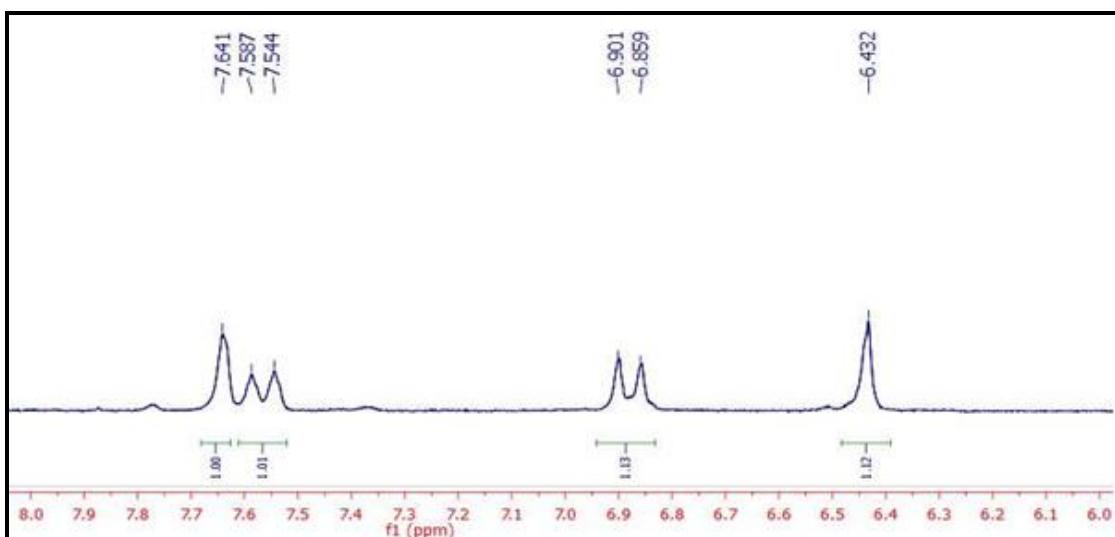


Figura 11. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ps-02.

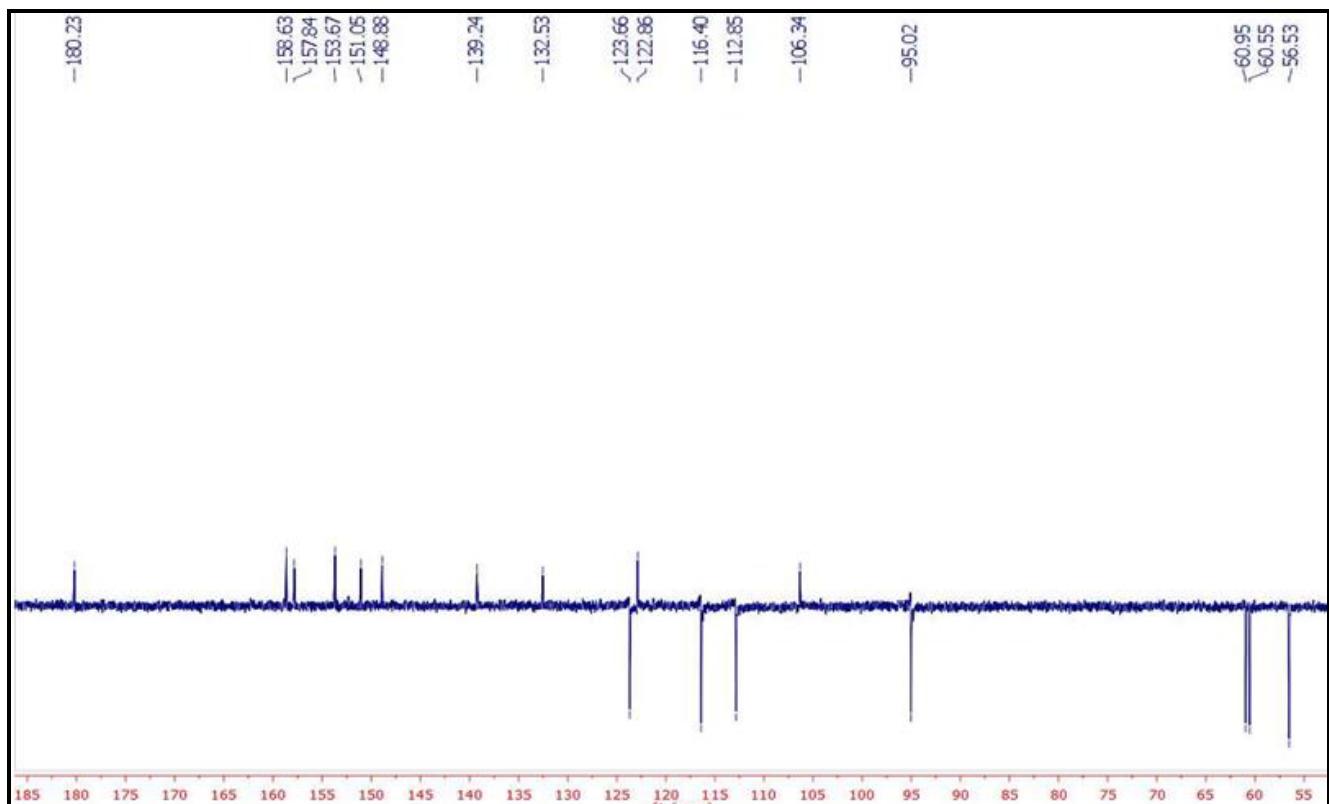


Figura 12. Espectro de RMN ¹³C-APT (125 MHz, CD₃OD) de Ps-02

5.2 Constituintes químicos isolados da fase Acetato de Etila (FATE) de *P.stipulaceae*

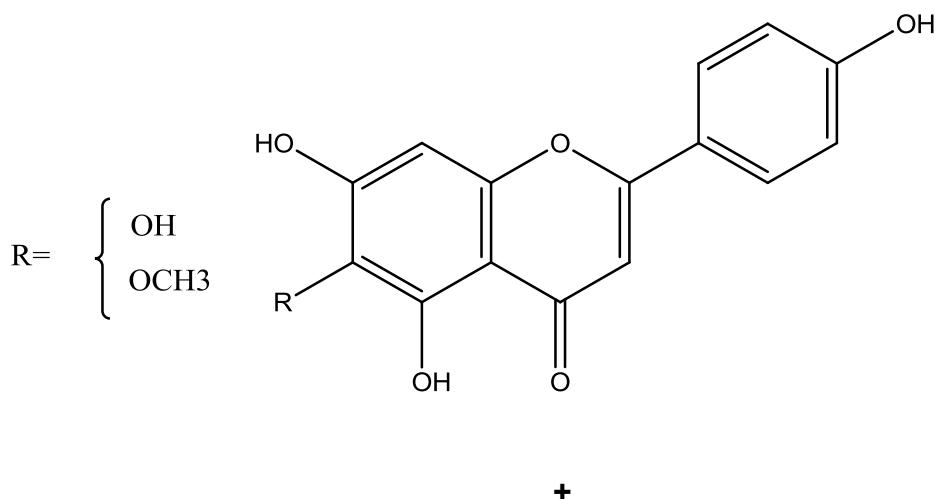
5.2.1 Identificação estrutural de Ps-03 e PS-04

A substância apresentou-se como um pó amarelo escuro solúvel em metanol e de acordo com os reagentes específico apresentou características de esqueleto flavonoídico.

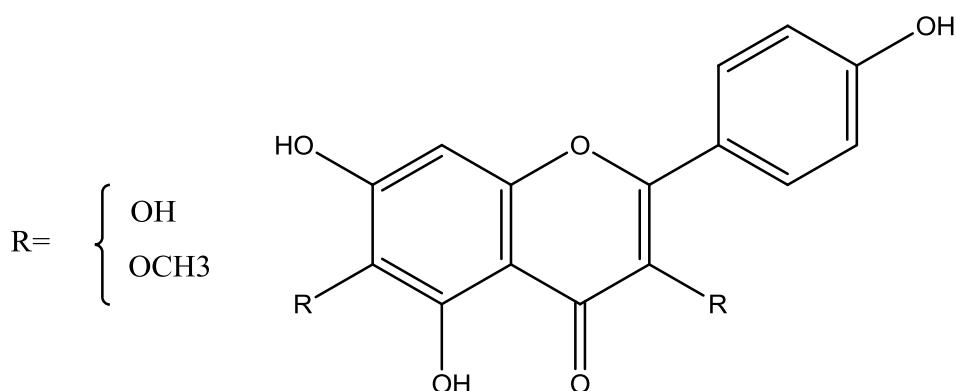
Análise espectral de RMN de ^{13}C (Figura 13) utilizando a técnica BB mostrou a ausência de carbonos quaternários em virtude da quantidade da amostra enviada para a confecção dos respectivos espectros. No estudo detalhado do espectro de carbono 13, através da técnica DEPT 135 (Figura 14), observou-se a presença de picos entre a região 130,8 e 94,5 ppm característicos de carbonos sp^2 metínicos e picos em 61,1 ppm característicos de carbono metoxílico em região com impedimento estérico que pela intensidade dos sinais sugere tratar-se de uma mistura de dois flavonoides.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 15) mostra a presença de 2 sistemas AA'BB' com absorções δ 6,93 (d , $J=8.8$ Hz, 2H); δ 6,91 (d , $J=9$ Hz 2H) δ 8,08 (d , $J=8,9$; Hz, 2H) e δ 7,82 (d , $J= 8.8$ Hz, 2H) compatíveis com hidrogênios 3'/5' e 2'/6' do **anel B** de flavonoides, sugerindo assim uma substituição em C-4' em ambas as estruturas em análise. Esse mesmo espectro observa-se três simpletos em (δ): 6,50; 6,56 e 6,70 compatível com hidrogênio 8 do anel A de flavonoides quando estão substituídos nas posições 5, 6 e 7. Análise do espectro de HMQC (Figura 16 e 17) nas regiões dos simpletos mostra correlação de δ / δ 6,50/94,95 e 6,56/95,53 compatíveis com deslocamento químico do hidrogênio H-8 do **anel A** de flavonoides quando estão substituídos nas posições 5,6 e 7. Análise da correlação do simpleto δH 6,70 com o carbono δC 103,55 sugere que uma das estruturas em análise, trata-se de um esqueleto do tipo **FLAVONA**. Diante essas informações, sugere-se que as propostas estruturais para o composto em análise são:

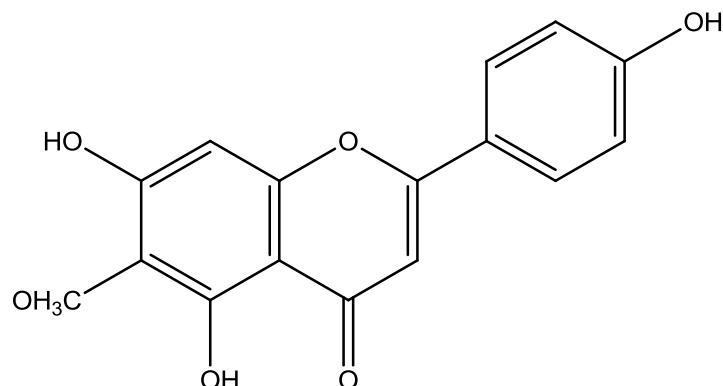
ESTRUTURA PS-03



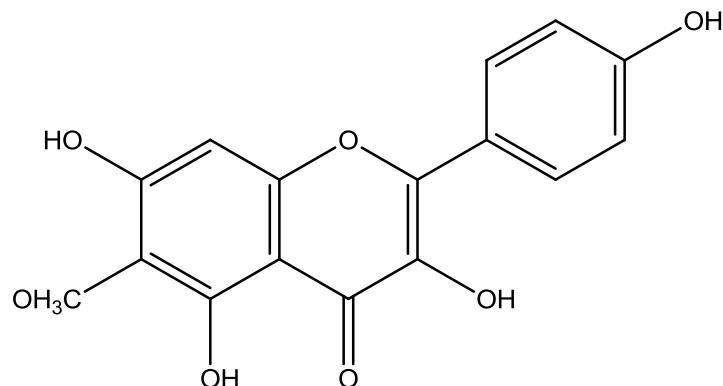
ESTRUTURA PS-04



Objetivando atribuir, inequivocamente, as estruturas acima bem como os deslocamentos químicos referentes aos H-8, H-2'/H-6' e H-3'/H-5' e posicionamento da metoxila de cada estrutura, foi realizado o experimento de HMBC (Figura 18). Inicialmente, observou-se correlação entre δ 6,56 (H-8) e 6,50 com os carbonos em δ C 133 e 132, carbonos estes que sustentam os hidrogênios do carbono metoxílico em δ H 3,31 (Figura 19 – expansão do experimento do HMBC). Diante esses dados sugere-se que **ambos os anéis A das estruturas em análises** (flavona e flavonol) estariam com metoxila na posição-6, impedida estericamente pela presença de duas hidroxilas nas posições 5 e 7, ou seja:

Hipótese estrutural da flavona

5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona (PS-03)

Hipótese estrutural da flavonol

3,5,7,4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavanol (PS-04)

A proposta estrutural de Ps-03 e Ps-04 ainda teve suas confirmações pela análise detalhada de todos os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono realizada no experimento de HMBC (Figura 18, 19 e 20), plotada na tabela 4.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) Ps-03 x Ps-04 registrados em CD₃OD (δ em ppm e J em Hz).

Ps 03			Ps 04		
C	δ_{C}	δ_{H}	C	δ_{C}	δ_{H}
2	166,54	—	2	158,80	—
3	—	—	3	147,08	—
4	170,35	—	4	170,35	—
5	132,01	—	5	133,06	—
7	159,20	—	7	158,80	—
9	154,87	—	9	154,87	—
10	106,05	—	10	105,02	—
1'	123,00	—	1'	124,01	—
4'	162,91	—	4'	160,77	—
CH					
3	103,55	6,70 (s, 1 H)	3	—	—
8	95,53	6,56 (s, 1 H)	8	94,95	6,50 (s, 1H)
2'	129,60	7,80 (<i>d</i> , $J=8,8$ Hz, 2H)	2'	130,80	8,08 (<i>d</i> , $J=8,9$ Hz, 2H)
3'	117,18	6,93(<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)	3'	116,47	6,91 (<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)
5'	117,18	6,93(<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)	5'	116,47	6,91 (<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)
6'	129,60	7,80 (<i>d</i> , $J=8,8$ Hz, 2H)	6'	130,80	8,08 (<i>d</i> , $J=8,9$ Hz, 2H)
OCH₃					
6	61,09	3,8 (s, 6 H)	6	61,12	3,8 (s, 6 H)

Tabela 4. Correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMBC) de Ps-03 x Ps-04 registrados em CD₃OD (δ em ppm e J em Hz).

HMBC							
	Ps 03			Ps 04			
H	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	H	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
3	6,70 (s, 1 H)	C-2	C-10; C-2	3	—	—	—
8	6,56 (s, 1 H)	C-9; C-7	C-10; C-6	8	6,50 (s, 1H) C-2; C-9	C-2;	C-6;C-10
2'	7,80 (<i>d</i> , $J=8,8$ Hz, 2H)	C-2'	C-2; C-4'	2'	8,08 (<i>d</i> , $J=8,9$ Hz,2H)	C-2;	C-6'
3'	6,93(<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)		C-1'; C-3'	3'	6,91 (<i>d</i> , $J=8$ Hz,2H)	C-1'; C-3'	
5'	6,93(<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)		C-1'; C-3'	5'	6,91 (<i>d</i> , $J=8$ Hz,2H)	C-1'; C-3'	
6'	7,80 (<i>d</i> , $J=8,8$ Hz, 2H)	C-2'	C-2; C-4'	6'	8,08 (<i>d</i> , $J=8,9$ Hz, 2H)	C-2; C-6'	

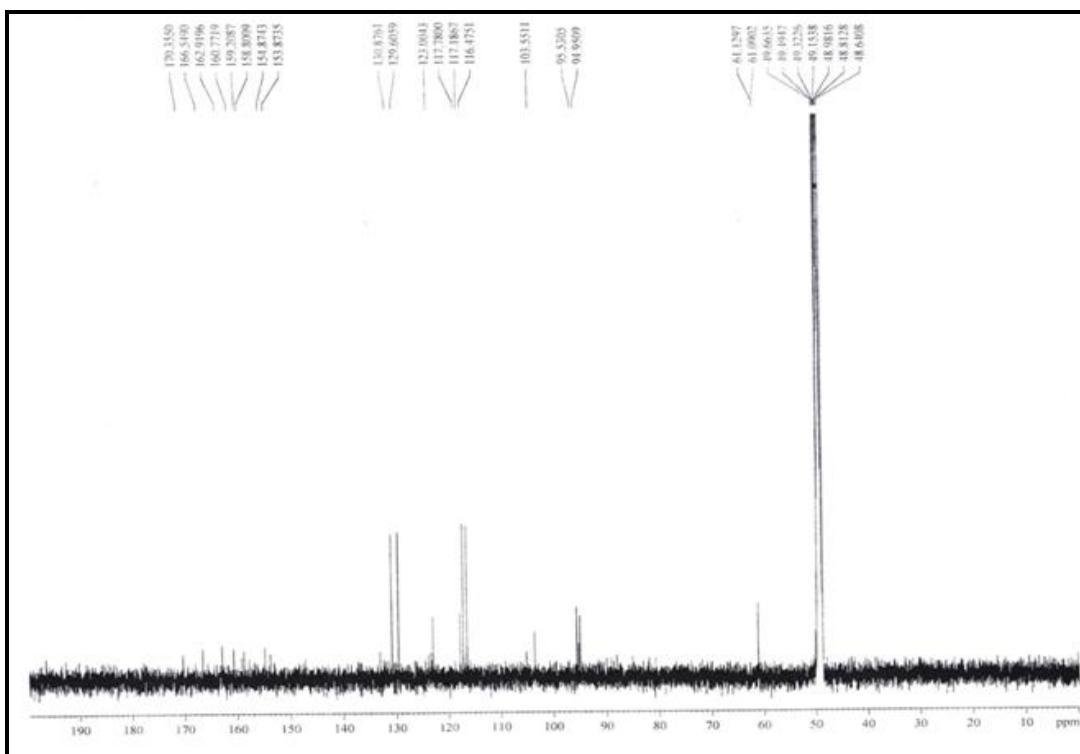


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD).

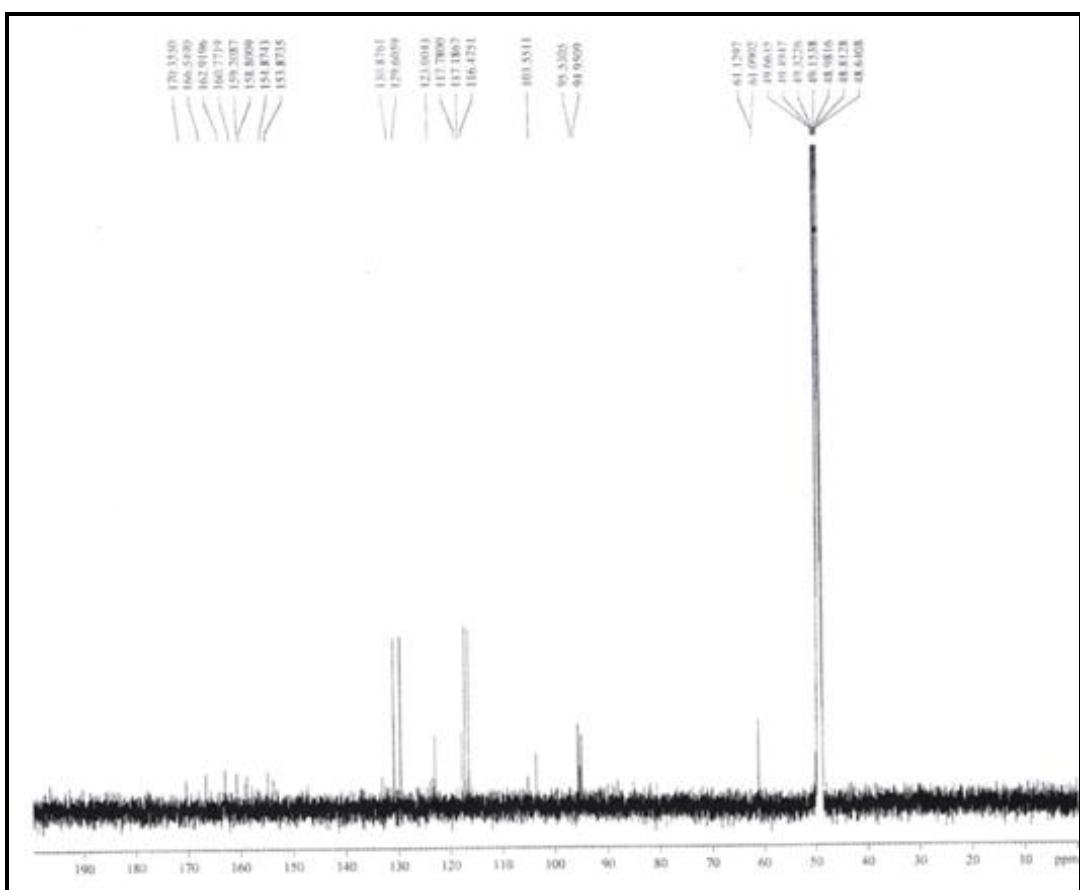


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 125° (125 MHz, CD_3OD) de Ps-03+Ps-04

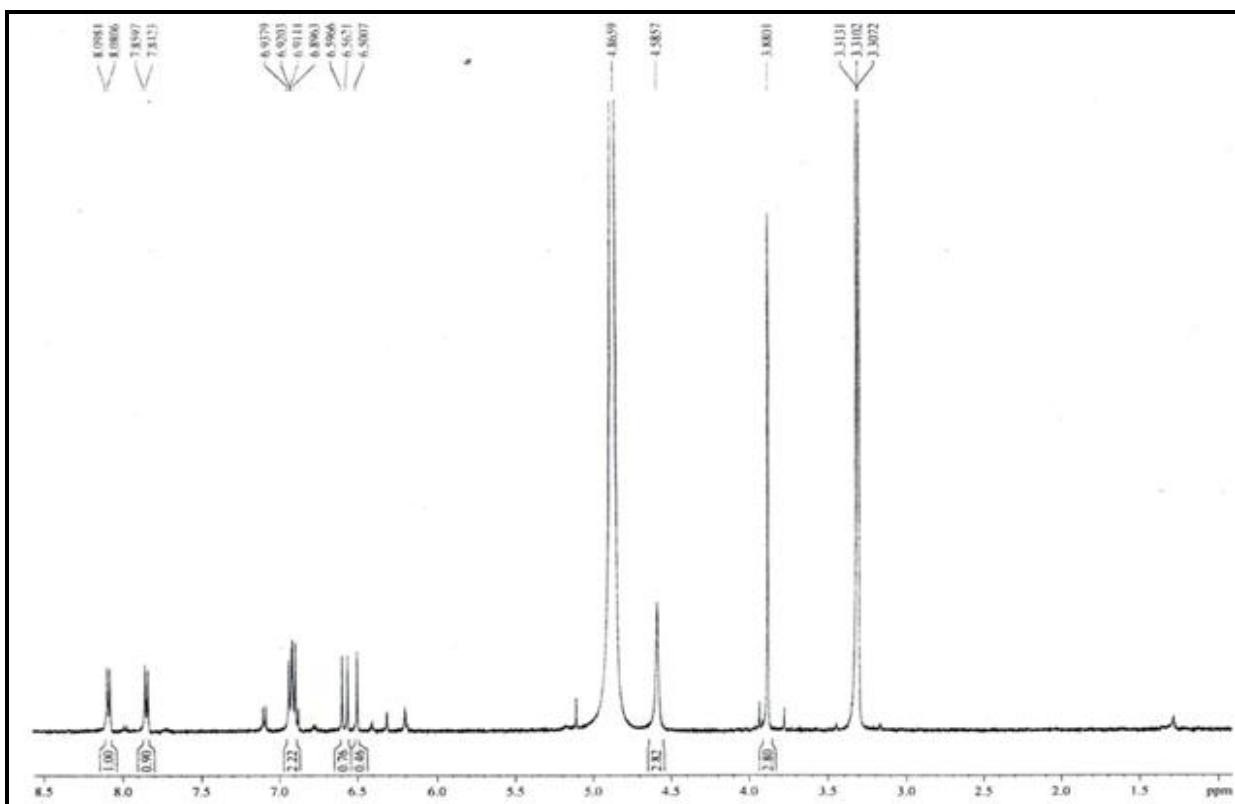


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD_3OD)

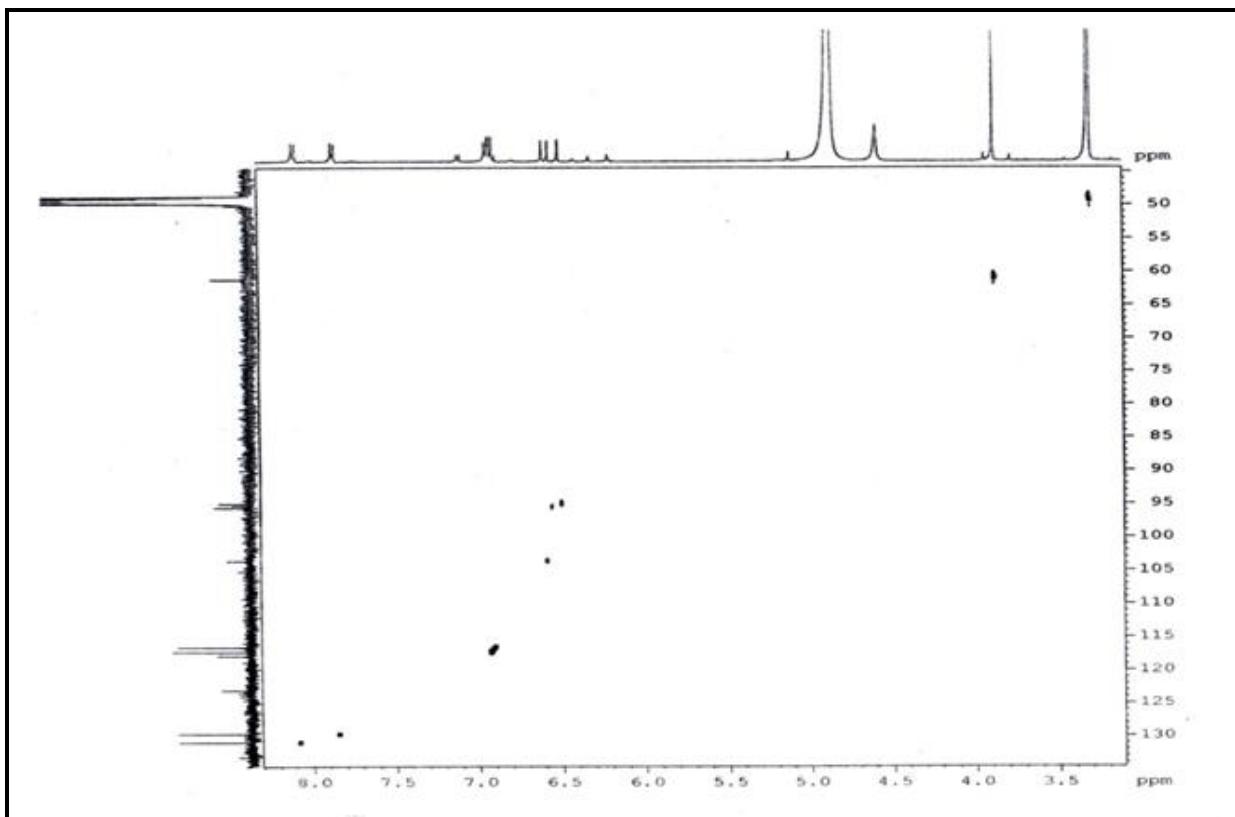


Figura 16. Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD_3OD)

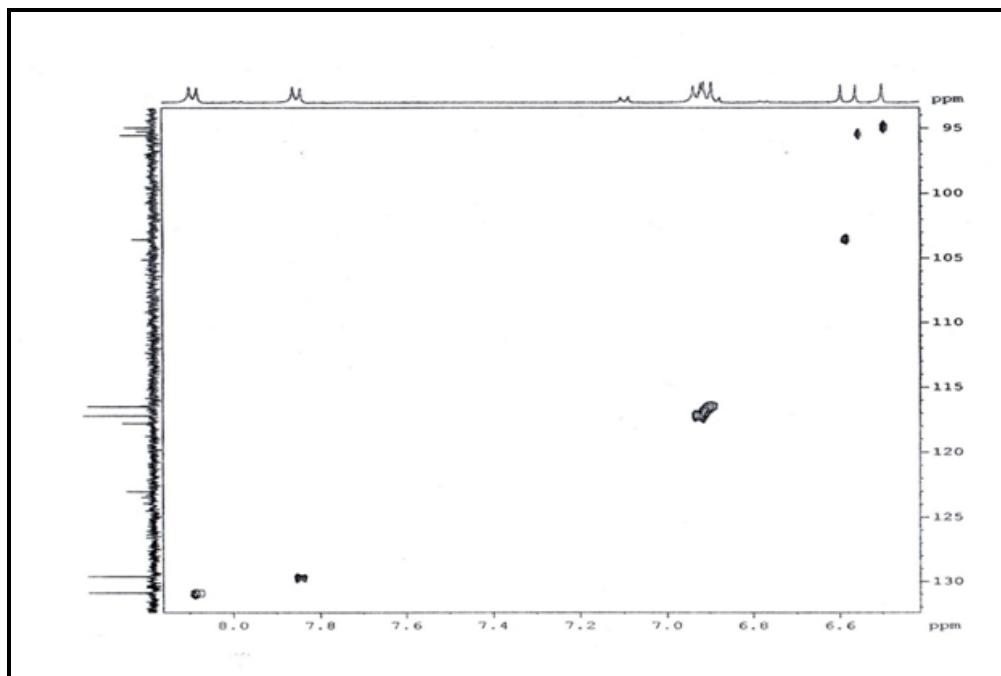


Figura 17. Expansão do espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HSQC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD_3OD)

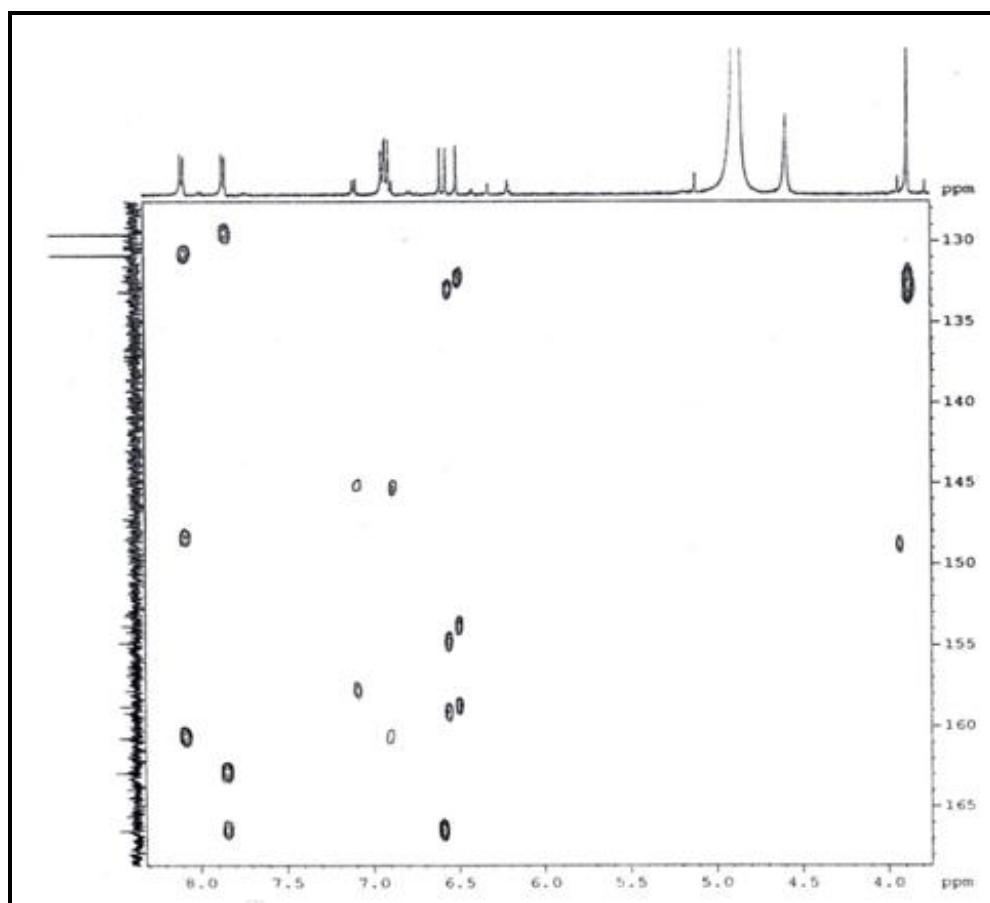


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMBC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD_3OD)

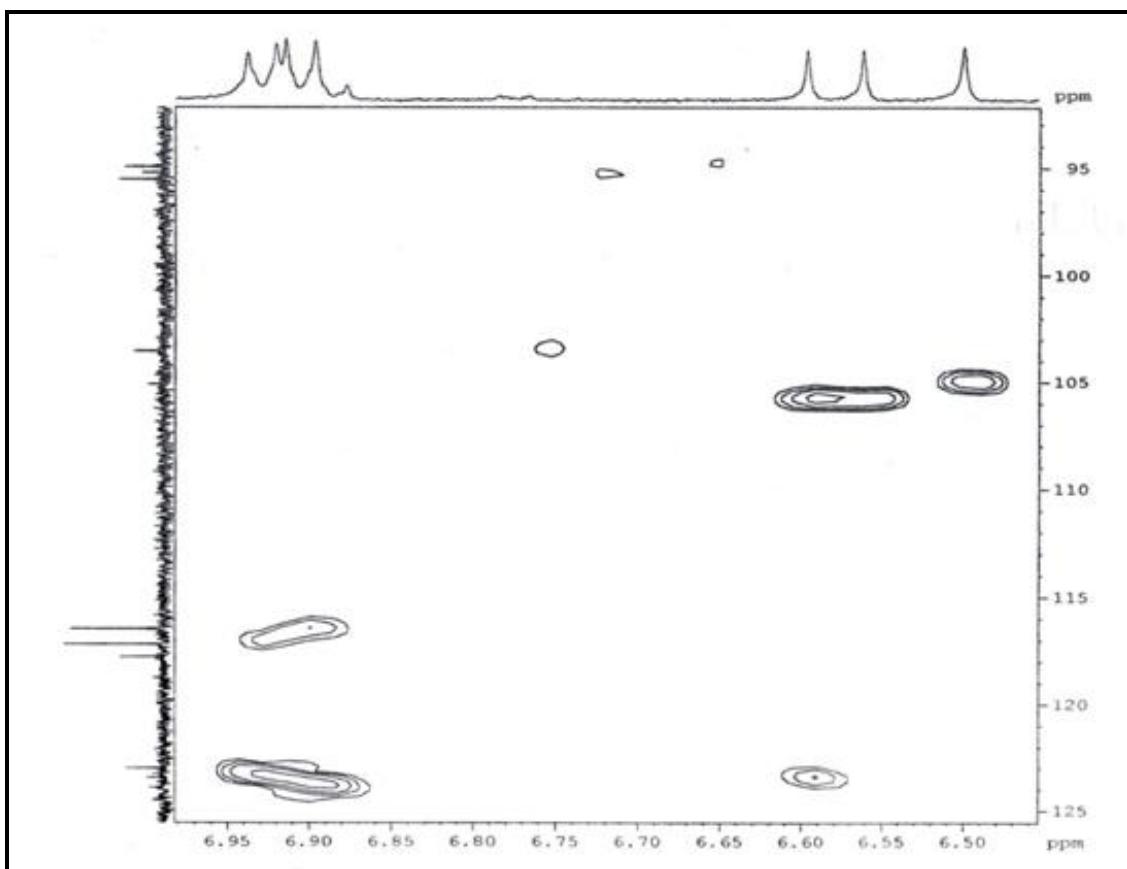


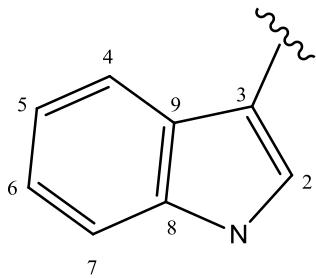
Figura 19. Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de Ps-03+Ps-04 (500 MHz, CD_3OD).

5.3 Contituintes químicos isolados da fase Hidroalcoolica remanescente (FHAR) de *P.stipulacea*

5.3.1 Identificação estrutural de Ps-05

A substância **PS-05** apresentou Rf 0,363 (FM: Clorofórmio:metanol- 70:20 e vapores de amônia), que em CCDA, após revelação com reagente de Dragendorff apresentou coloração amarelo-tijolo. Sua identificação foi feita por métodos espectrométricos: RMN-¹H, e RMN-¹³C, além de RMN-2D (COSY, HMBC e HMQC).

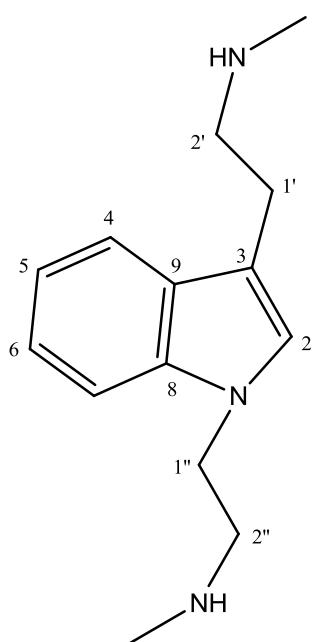
Os dados principais que evidenciaram a estrutura em estudo foram obtidos dos espectros de RMN-¹H e ¹³C. Na região menos blindada do espectro de RMN-¹H (Figura 21) evidencia-se a presença do anel indólico pela presença de uma dupla de dupletos e uma dupla de triplets na região de aromáticos, na faixa em torno de δ 7-8 (ERDELMEIER et al., 1991). Esses sinais foram identificados em δ7,59 (d, J=8,1 Hz), δ7,38 (d, J=8,0 Hz), δ7,20 (s), δ 7,13 (t, J= 7,0 Hz) e δ 7,05 (t, J=7,0 Hz). Esses dados evidenciam um padrão de substituição representado pela estrutura abaixo:



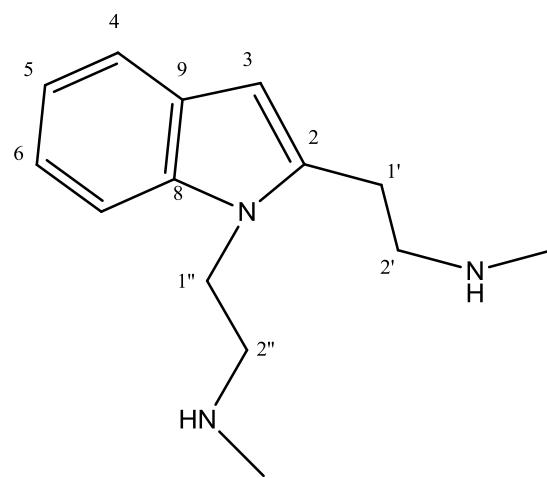
No espectro RMN-¹³C-BB e APT (Figura 22 e 23) observou-se o mesmo padrão de assinalamento dos núcleos de ¹H referentes àqueles encontrados na literatura quando comparados ao núcleo INDOL, ou seja, três átomos de carbono não hidrogenados sp², C-3 (δC 110,0) e C-8 (δC 138,6), C-9 (δC 128,3), cinco carbonos metínicos sp² em δC 124,5; δC 122,9; δC 120,3; δC 119,1 e δC 112,7 que de acordo com os experimentos de HSQC (Figura 24, 25 e 26) teve sua

proposta estrutural corroborada ao mostrar correlações a uma ligação com seus respectivos hidrogênios (Tabela 5).

Análise detalhada do espectro de RMN de ^1H (figura 21) observa-se absorções na região δH 3,45-3,15 característico de grupamento $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-\text{CH}_3$, absorções estas com integração para dois hidrogênios levando a sugerir as seguintes propostas estruturais para Ps-05:

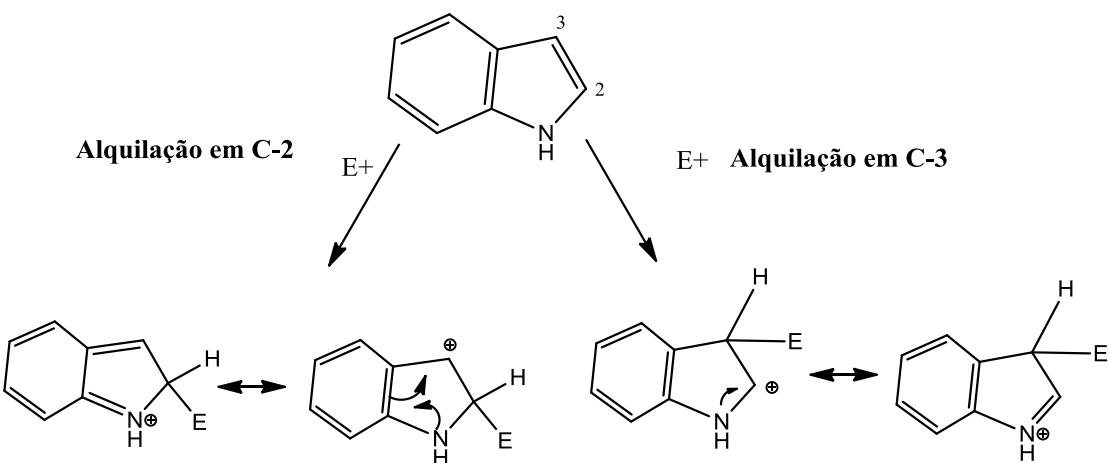


Estrutura 1

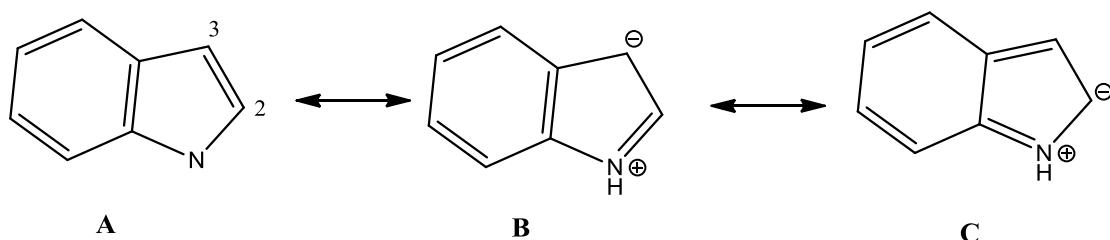


Estrutura 2

Do ponto de vista de estabilização relativa dos intermediários da reação, a formação de um carbocáton na posição C-2 do núcleo indólico (através da entrada de um eletrófilo em C-3) é mais favorecida, visto que essa espécie pode ser estabilizada por ressonância pelo par de elétrons não compartilhado do nitrogênio, sem comprometimento da aromaticidade do anel benzênico, ao contrário do que ocorre com a formação de um carbocáton em C-3 (Esquema 1).



Esquema 1. Estruturas de ressonância dos carbocátions formados com a entrada de um eletrólito nas posições C-2 e C-3 do núcleo indólico



Esquema 2. Estruturas de ressonância eletrônica do Indol.

Dados da literatura já relatam que a biossíntese dos alcaloides indólicos originam-se do triptofano via descarboxilação, metilação e/ou hidroxilação específicas do aminoácido. No entanto como não existe um modelo comum para a biossíntese dos alcaloides indólicos nas plantas que o sintetizam, e visto que a reatividade do núcleo indol para as reações de substituições eletrofílicas ocorrem preferencialmente em C-3, posição esta onde há o sítio de maior densidade eletrônica no núcleo indólico (Robert, 1968) (Esquema 2), sugere-se a forma que o radical N-metil etilamina da estrutura em análise, se liga ao anel indólico na **posição 3**. Essa hipótese foi corroborada pela correlação no HMBC (J^3) do H – 1' e 1'' (3,16 e 3,22) com o C-2 em 124,46 (Figura 30) confirmando que a estrutura em análise é o N-metil-indol-1,3-etanamina (estrutura 1), alcaloide inédito na literatura.

Objetivando confirmar inequivocamente todos os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio de Ps-05, análise detalhada dos dados espectrais da molécula em estudo pelos experimentos de RMN bidimensionais – HMBC (Figura 27 a 3 e Tabela 4) foram realizados, visto que trata-se de um novo alcaloide indólico.

Tabela 5. Dados espectrocópicos de RMN de H e C da Ps-05. Os deslocamentos químicos estão apresentados em δ (PPM) e as constantes de acoplamento em (Hz).

	HMBC			
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C				
3	110,11	–	–	–
8	138,56	–	–	–
9	128,29	–	–	–
CH				
2	124,46	7,20 (s)	C-3	C-8; C-9
4	120,28	7,05 (<i>t</i> , $J=7,0$ Hz)	C-5	C-9
5	112,75	7,38 (<i>d</i> , $J=8,1$ Hz)	C-4	C-9
6	122,99	7,13 (<i>t</i> , $J=7,0$ Hz)	C-5; C-7	C-8
7	119,06	7,59 (<i>d</i> , $J=8,1$ Hz)	C-6; C-8	C-5; C-9
1'	23,58	3,16 (<i>t</i> , $J=8,5, 1$ Hz)	C-3; C-2'	C-2; C9
2'	51,06	3,31 (<i>t</i> , $J=8,5, 1$ Hz)	C-1'	C-4'; C-3
1''	22,23	3,22 (<i>t</i> , $J=8,5, 1$ Hz)	C-2''	
2''	59,46	3,43 (<i>t</i> , $J=8,5, 1$ Hz)	C-1''	C-2'
CH₃				
4'	33,87	2,69 (s)	C-2'	
4''	43,81	2,91 (s)	C-4''	C-2''

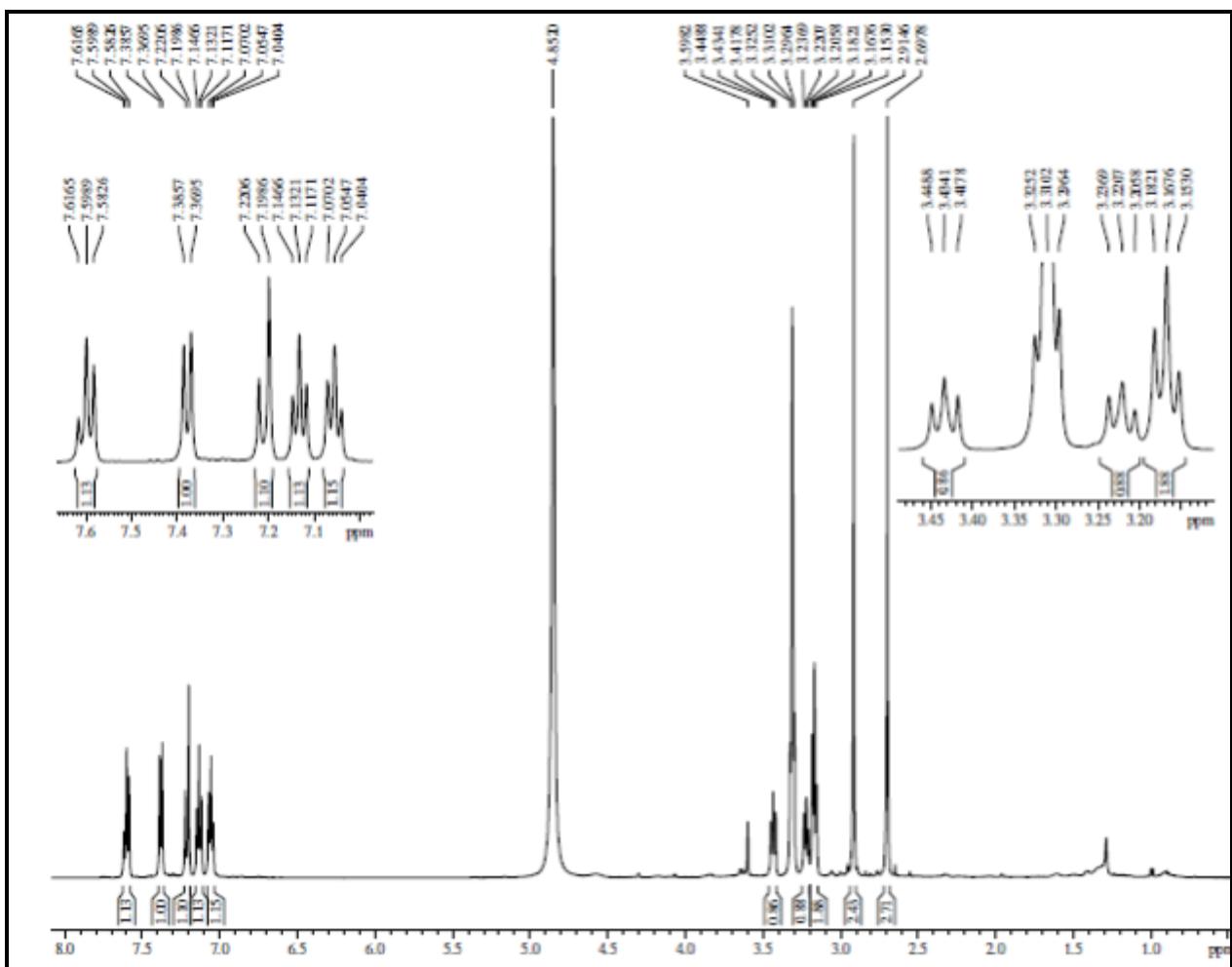


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD).

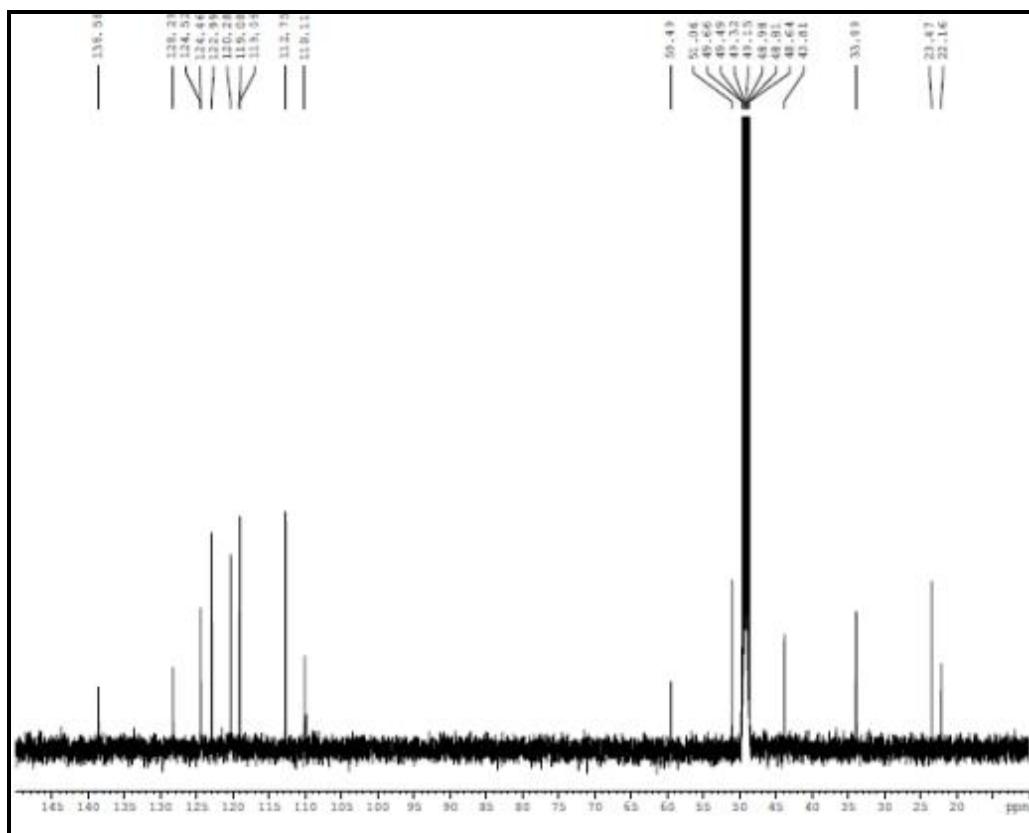


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C -BB de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

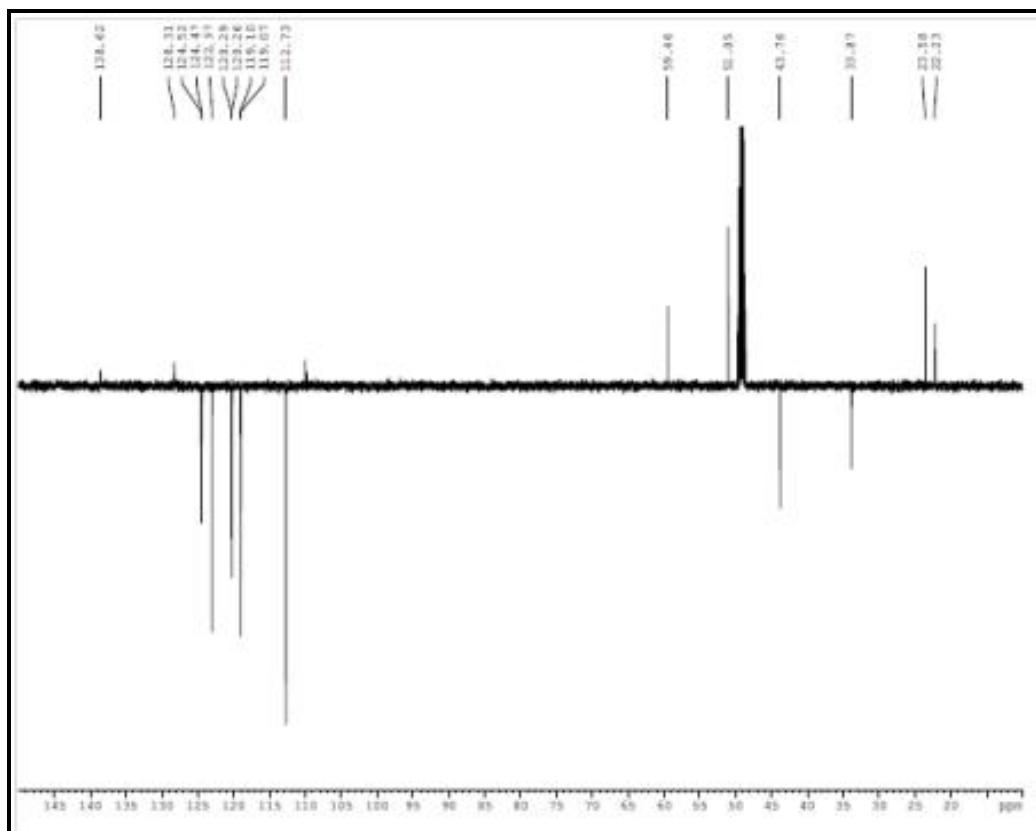


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C – APT de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

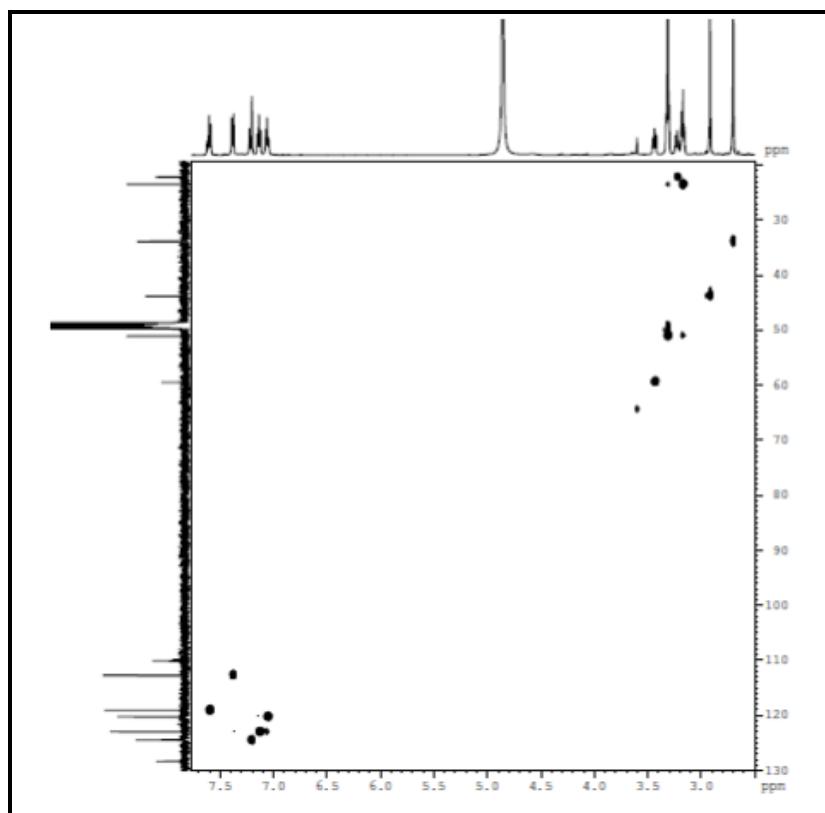


Figura 23. Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMQC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

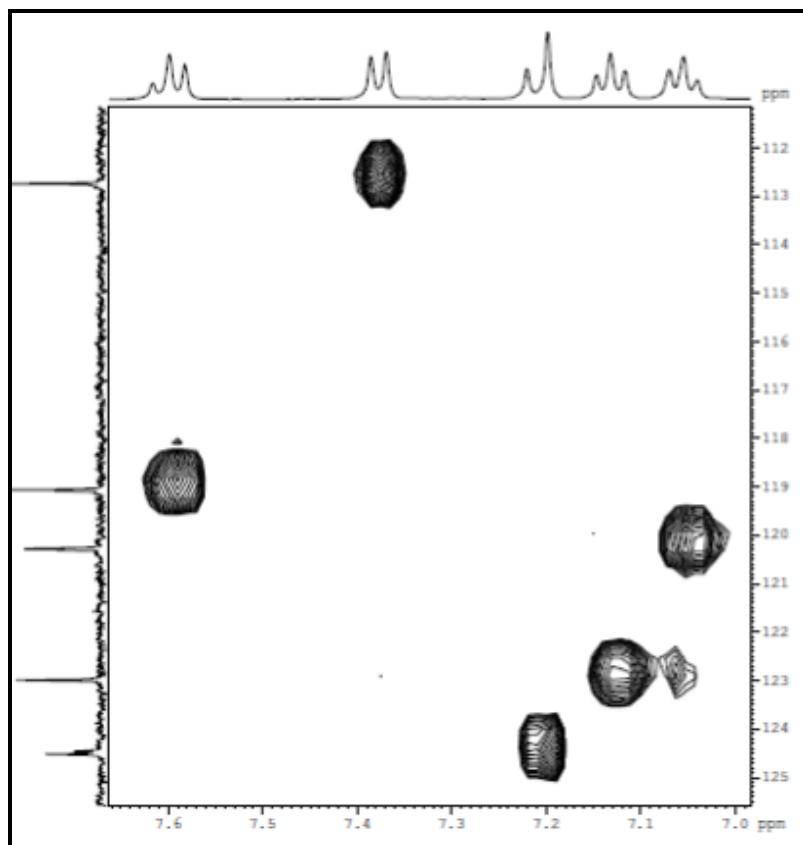


Figura 24. Expansão de espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ –HMQC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

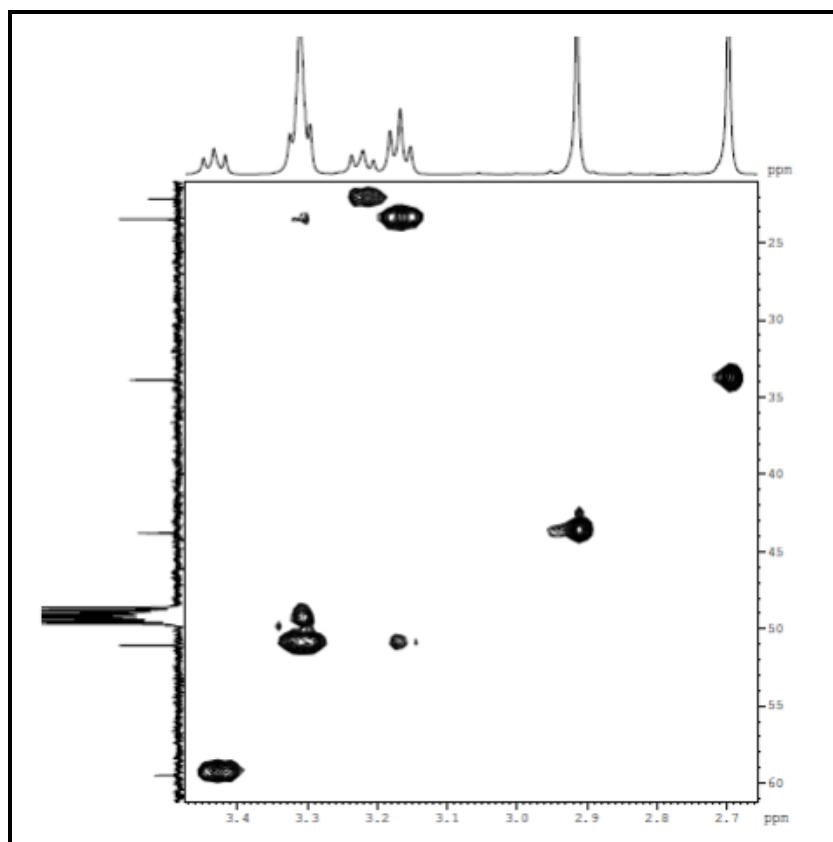


Figura 25. Expansão de espectro de RMN de ^1H x ^{13}C –HMQC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

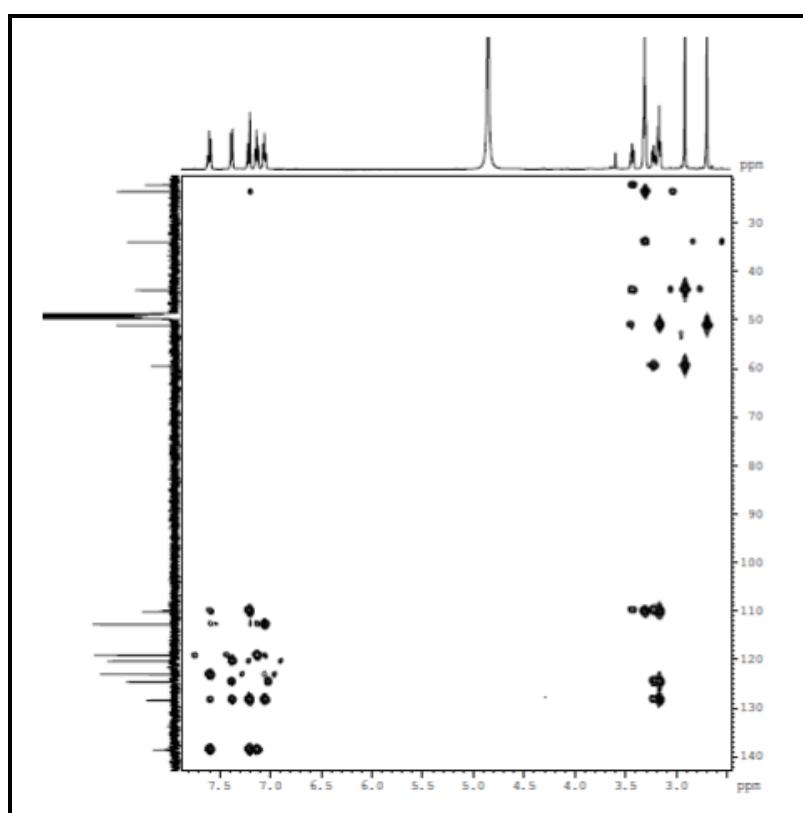


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

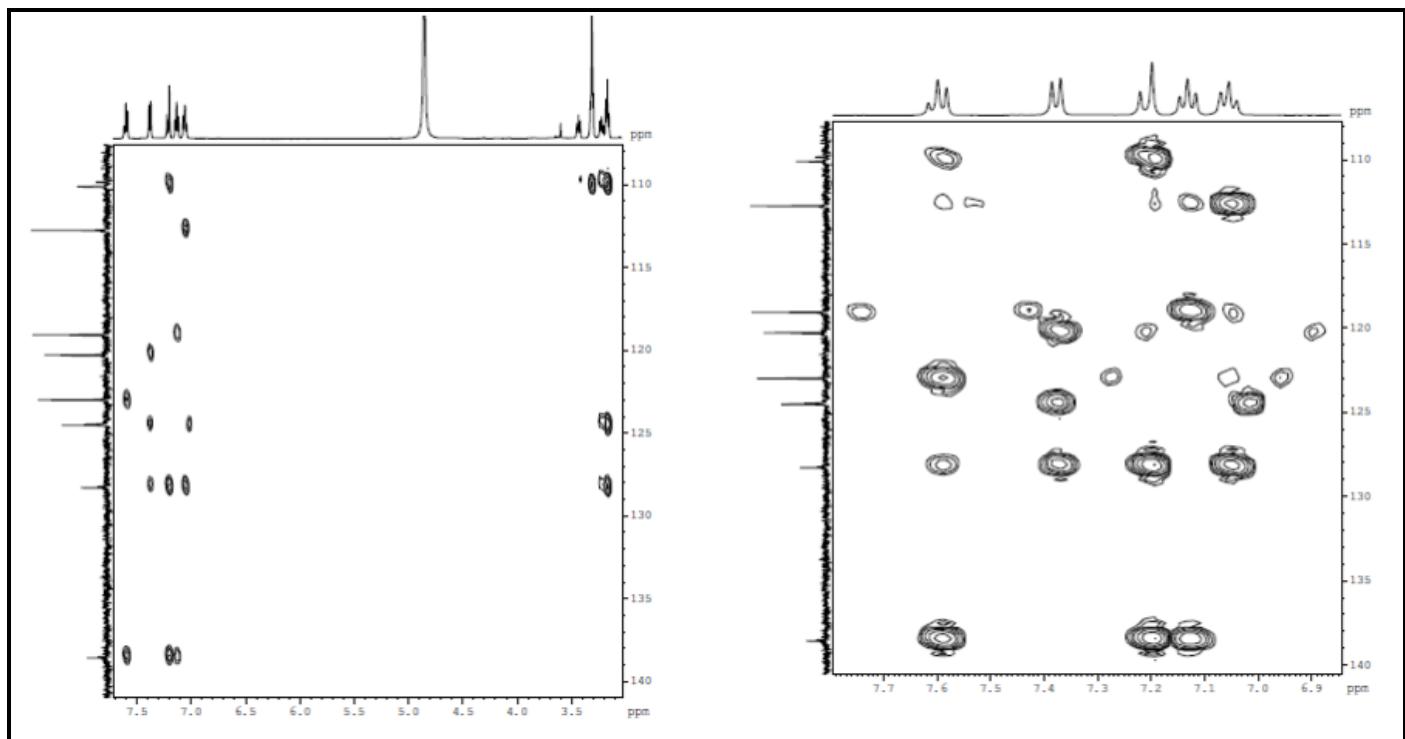


Figura 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H x ^{13}C –HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

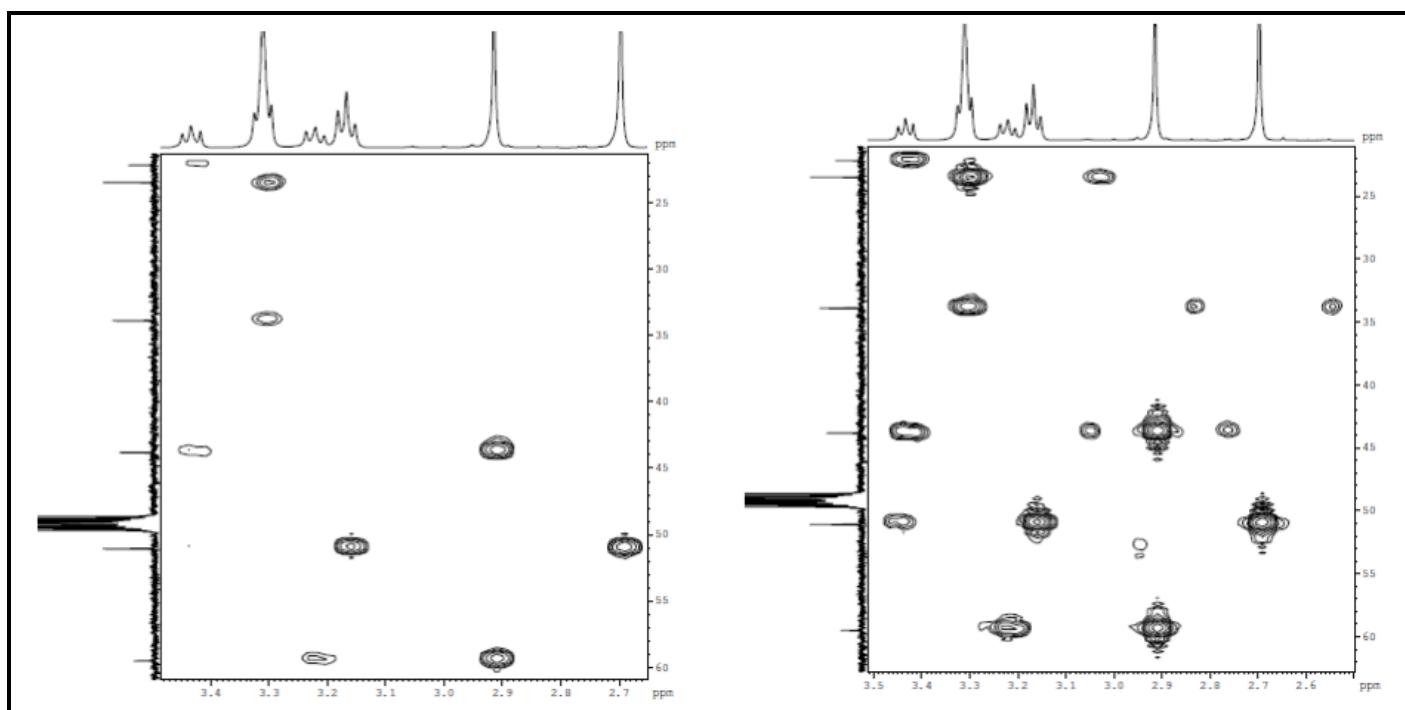


Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD_3OD)

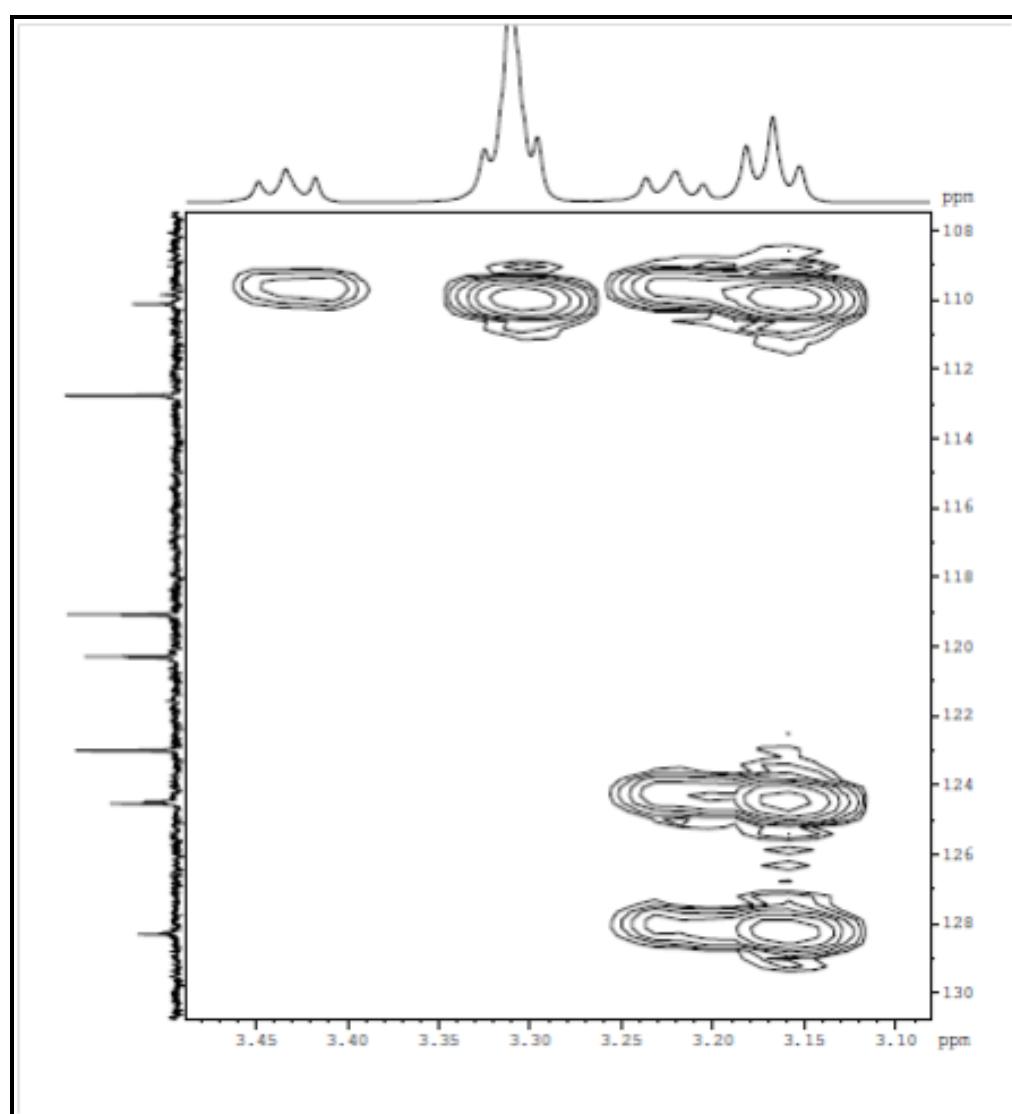


Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ¹H x ¹³C
– HMBC de Ps-05 (500 MHz, CD₃OD)

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho atingiu o objetivo principal que se fundamentou na ampliação do conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Piptadenia*, utilizando as partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*;

- O estudo fitoquímico da fase clorofórmica de *P. stipulacea* levou ao isolamento e identificação de dois flavonoides: 3,3',5,7- tetrahidroxi-4',6-dimetoxiflavona e 4',5,7- trihidroxi-3',6-dimetoxiflavona, já descritos na espécie;
- O estudo fitoquímico da fase acetato de etila de *P. stipulacea* resultou no isolamento de uma mistura de dois flavonoides: (5,7,4' trihidroxi-6-metoxiflavona e 3,5,7,4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavonol) inéditos na espécie.
- O estudo fitoquímico da fase hidroalcoolica remanescente *P. stipulacea* proporcionou o isolamento e identificação de um alcaloide indólico: N-metil-indol-1,3-etanamina, inédito na literatura.

Referências

REFERENCIAS

- ALBUQUERQUE; U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciênciac**, 27 (7), 2002.
- ARAÚJO, E. L.; U. P. ALBUQUERQUE e C.C. CASTRO. Dynamics of Brazilian caatinga - a review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and Communities** 1:15-29, 2007.
- AKENDENGUE, B. Medicinal plants used by the fang traditional healers in Equatorial Guinea. **J. Ethnopharmacol**, 37 (2): 165-173, 1992.
- BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **O ecologia Brasiliensis**, 11 (3): 313- 322, 2007.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universitária, v.2, 1991.
- BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de Mimosa tenuiflora (Wild) Poiret e Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande. 2008.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciência e Cultura. V.55, p. 37-39, 2003.
- CANELLA, C. F. C.; TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER ,J. Experiments with plants supposedly toxic to cattle in northeastern brazil, with negative results. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1: 345-352, 1966.

CARDOZO, N. A. R. **Metabolitos especiais isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae).** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** São Paulo: Unicamp, 2007.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil; e das exóticas cultivadas.** RJ, I. Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELLO, J. F. Higher plants with biological activity. Plants of Pernambuco. **Rev. Inst. Antibiot.**, 11 (1/2): 99-11, 1984.

DI STASI, L.C.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M.; HIRUMA-LIMA,C.A.; SOUZA-BRITO, A.R.M. *Fabales medicinais.* In DI STASI, L.C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2^a edi. rev. e ampl. São Paulo: Editora UNESP. 2002, 604 p.

ERDELMEIER, C.A.A.; WRIGHT, A.D.; ORJALA,J.; BAUMGARTNER,B.; RALI,T.; STICHER, O. New índole alkaloid glycosides from *Nauclea orientalis*. *Planta Médica*, v.57, p.149-152, 1991.

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **Oecologia Brasiliensis.**, 11 (3): 341-349, 2007.

FISH, M.S.; JOHNSON, N.M.;HORNING, E.C. *Piptadenia alkaloids. Índole bases of Piptadenia peregrina and related species.* **Journal of the American Chemical Society**, 77: 5892-5895, 1955.

FLORENTINO, A. T. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da Caatinga, Município de Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, 21(1): 37-47, 2007.

HARBORNE, J. B. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. Ed. Academic press Inc. (London) LTD. 1971.

HOFMAN, A. 1959. Psychotomimetic drugs: chemical and pharmacological aspects. **Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica**. 8 :240 - 158.

JOBSON, R. W.; LUCKOW, M. Phylogenetic Study of the Genus *Piptadenia* (Mimosoideae: Leguminosae) using Plastid *trnL-F* and *trnK/matK* Sequence Data. **Systematic Botany**, 32(3): 569–575, 2007

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.372, 1998.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, USA, 1999.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens, Kew**, p.577, 2005.

LEWIS, G.P.; T.S.; ELIAS. 1981. Mimosaceae. Pp. 155-168. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (eds.). Advances in Legume Systematics. v.1. **Royal Botanic Gardens, Kew**.

LIRA, D. P. **Flavonóides isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. (fabaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. 2009.

KLEIN, A. L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro.** Unesp: São Paulo, p. 131-145, 2000.

LUCKOW, M. 2005. Tribe Mimosaceae. Pp 162 - 183. In G.P.Lewis, B.Schrire, B.Mackinder, M.Lock (eds.), Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens, Kew.**

MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades.** São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.

MACÉDO, C.L.; LUIZ, H.C.V.; CORREIA, A.C.C.; MARTINS, I.R.R.; LIRA, D.P.; SANTOS, B.V.O.; SILVA, B.A. Spasmolytic effect os galentin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Duck. **J.Smooth Muscle Res.**, v. 47, n. 5, p. 123-134, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA -JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 2ed. Fortaleza: edições UFC,1997.

MBOUANGOUERE, R. N. ; TANE, P. ; NGAMGAA, D. ; DJEMGOUA, P.; CHOUDHARYB, M. I.; NGADJUI, B. T. Piptaderol from *Piptadenia africana*. **Afr. J. Trad. CAM**, 4 (3): 294 – 298, 2007.

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

MC CHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J. T. Plant natural products Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

PEREIRA, I. M.; ANDRADE, L. A.; COSTA, J. R. M.; DIAS, J. M. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. **Acta Botanica Brasílica**, v. 15(3): 413-426, 2001.

QUEIROZ, A.C.; LIRA, D.P.; DIAS, T.L.M.F.; SOUZA, E.T.; MATTA, C.B.B.; AQUINO, A.B.; SILVA, L.H.A.C.; SILVA, D.J.C.; MELLA, E.A.C.; AGRA, M.F.; BARBOSA FILHO, J.M.; ARAÚJO JÚNIOR, J.X.; SANTOS, B.V.O.; MOREIRA, M.S.A. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *piptadenia stipulacea* benth. (fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 377-383, 2010.

RIZZINI, C.T. 1971. Árvores e madeiras úteis do Brasil. p. 97 - 104. Ed. Edgard Blucher e Ed. Universidade de São Paulo.

RIZZINI, C.T. Manual de Dendrologia Brasileira – árvore e madeiras úteis Brasil. Ed. Nacional. SP. 1998.

ROBERT, B.H. Int. Quantum Chem., vol.2, p. 165-177, 1968

SANTOS, C. C., LIMA, M. A. S., FILHO, R. B., SILVEIRA, E. R., Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 1304-1308, 2006.

SILVA, L. M. B.; BARBOSA, D. C. A. Crescimento e sobrevivência de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae), em uma área de Caatinga, Alagoinha, PE. **Acta Botanica Brasílica**, v.14, n.3, p.251-261, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. Ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008.

TABARELLI, M., e J.M.C. SILVA. 2003. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. Pages 777-796 in I.R. Leal, M. TABARELLI e J.M.C. SILVA, editors. **Ecologia e Conservação da caatinga**. Editora Universitária, Recife, Brasil.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica, **Revista Lecta**. Bragança Paulista, v. 21, n.1/2, p. 7-13, 2003.

WILLAMAN, J. J.; LI, H. L. alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids, 1957-1968. (continued from a2230). **LLOYDIA**, 33S (1): 1-286, 1970.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry** 64 (3–19): 3-19, 2003.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Argos – Editora Universitária: Chapecó – Santa Catarina-UNOESC, 2001.

ZELADA , F.; CONI, H. **Contribution to the study of *Piptadenia cebil***. Tese, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, p. 72, 1915.