

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

ANALÚCIA GUEDES SILVEIRA CABRAL

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA DE *Combretum duarteanum*
CAMBESS. (COMBRETACEAE)

João Pessoa – PB

2013

ANALÚCIA GUEDES SILVEIRA CABRAL

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA DE *Combretum duarteanum*
CAMBESS. (COMBRETACEAE)**

Tese 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 Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

João Pessoa – PB

2013

C117c Cabral, Analúcia Guedes Silveira.
Constituintes químicos e atividade
farmacológica de *Combretum duarceanum* cambess.
(Combretaceae) / Analúcia Guedes Silveira Cabral.--
João Pessoa, 2013.
178f. : il.
Orientador: José Maria Barbosa Filho
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacoquímica.
3. Combretaceae. 4. *Combretum duarceanum*. 5.
Constituintes químicos. 6. Atividade antimicrobiana.
7. Atividade antitumoral.

ANALÚCIA GUEDES SILVEIRA CABRAL

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE *Combretum duarteanum* CAMBESS. (COMBRETACEAE)

APROVADA EM: 29 de Agosto de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (Orientador)

Pós-Doutorado em Química de Produtos Naturais

Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Marx Young (Membro Externo-IBT)

PhD em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho (Membro Externo-UFPB)

PhD em Química pelo Departamento de Química Fundamental da UFPE

Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessoa (Membro Interno)

PhD em Farmacologia pela Universidade Federal da Paraíba.

Prof. Dr. Emído Leitão da Cunha (Membro Interno)

PhD em Pharmaceutical Sciences - University of Strathclyde (Glasgow, Escócia)

Prof^a. Dr^a. Sonia Pereira Leite (Membro Suplente-UFPE)

PhD em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba

Dedico esta tese as mulheres mais importantes da minha vida: minha mãe Ana Rita, apesar do pouco tempo que tivemos juntas sua presença é constante; a minha tia Zélia (tia e mãe) pelo exemplo de vida, humildade e dedicação; e a minha avó Aline (avó e mãe) pela minha formação, por sua força e perseverança. Infelizmente vocês já não estão mais aqui hoje para ver esta conquista, mas sinto a presença de cada uma, olhando e orando por mim junto a Deus!

“Mas os que esperam no senhor, renovarão as suas forças, subirão com asas como águias, correrão e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão.” (Isaías 40:31)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de infinita bondade, obrigada pelo dom da vida, pela fé e pela graça de poder alcançar inúmeras conquistas; pelo discernimento, pela presença, pela força e constante proteção em todos os momentos. *“Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.”* Sl. 91.

As minhas maiores riquezas neste mundo. A minha mãe, **Ana Rita**, por ter sido instrumento de Deus para gerar-me, e apesar do pouco tempo de convivência, a felicidade dos anos que nos foram dados preenche a minha vida de boas lembranças. A minha **tia Zélia** por seu exemplo de moral, dignidade, humildade, pelo carinho que sempre me teve e por ter sido minha mãe e amiga. A minha **avó Aline** por ter sido inúmeras vezes meu pai e minha mãe, pelo exemplo de pessoa forte, guerreira e por não medir esforços para me ajudar. A vocês três, meu maior obrigada! A saudade imensa de não tê-las mais aqui comigo, por muitas vezes me entristece porque cada perda foi a sua maneira marcante, mas hoje tenho a certeza que “minhas mães” estão olhando e orando por mim. E hoje se alegram pela minha conquista! *“Não sei por que vocês se foram, quantas saudades eu senti, e de tristezas vou viver, e aquele adeus não pude dar... Vocês marcaram na minha vida...”*

A minha família linda e abençoada, minha irmã **Amanda** (Chinho), minhas primas, **Valéria** (mamis), **Edna** (Dinha), **Gabriela** (Bi) e **Catarina** (Cacá), vocês são anjos de luz que Deus colocou em minha vida. São minhas fortalezas, meus portos seguros, amo vocês incondicionalmente!

Ao meu namorado **Rodrigo Cephas** (Digo), você veio para alegrar a minha vida, me trazer paz, amor, felicidade. Agradeço por todo o amor, compreensão, companheirismo e amizade. Agradeço também a toda sua família, por ter me acolhido e me incentivar nesta caminhada. Vocês são presentes de Deus em minha vida.

Ao Prof. Dr. **José Maria Barbosa Filho**, orientador há 10 anos desde a minha iniciação científica. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos e por trilhar este caminho juntamente comigo.

Ao Prof. Dr. **Josean Fachine Tavares**, coorientador desta tese, por todo empenho, ensinamentos e exigência.

A professora Dr^a. **Marianna Vieira Sobral** e aos alunos do Labetox, **João Pita**, **Aline**, **Débora**, **Heloísa** e **Thaísa** pela parceria nos testes antitumoral. A professora Dr^a. **Edeltrudes de Oliveira Lima** e ao aluno **Felipe**, pela parceria nos testes antimicrobianos. Agradeço pelas contribuições farmacológicas destas duas equipes.

A equipe do laboratório de fitoquímica: **Fabiana** (amiga, prestativa e sempre calma), **Ana Silvia** (por todo apoio), **Madalena** (pela amizade, conversas, risadas...), **Sócrates** (por aguentar todos os meus aperreios e pela disponibilidade em ajudar) e **Jéssica** (por ser sempre prestativa e amiga). Aos demais que fazem parte desta equipe: **Jacqueline**, **Ricardo**, **Isis**, **Camila**, **Élida**, **Tainá**, **Manso**, **Sara**, **Vicente**, **Ania**, **Raquel**. Aos alunos de iniciação científica: **Rose**, **Karlienne**, **Laine**, **Denise**, **Katerine**, obrigada pela contribuição mesmo que indiretamente.

Ao aluno **Yuri Mangureira**, por me acompanhar, por seu empenho e parceria neste trabalho, saiba que sua contribuição foi essencial para a conclusão desta tese.

A minha turma de doutorado, **Marianne**, **Denise**, **Fabiana** e **Antonileni**, pela caminhada ao longo desses quatro anos, por tantas dificuldades compartilhadas e por saber que podemos contar uns com os outros.

Aos que não estão mais no programa, mas que se fizeram presentes: **Gabriela Lemos** (pela amizade, carinho, ensinamentos, por estar sempre presente mesmo distante, sei que nossa amizade será eterna), **Vivianne Marcelino** (por toda ajuda e pela amizade), **Sandro Leal** (por toda contribuição desde o mestrado).

Aos amigos de toda uma vida, “o quarteto fantástico”: **Dayse** (por todos os momentos, por todas as vezes que me ouviu chorar ou pelas vezes que gargalhamos juntas, pela sincera amizade); **Thaísa** (pelas nossas conversas, por seu apoio e por saber que posso sempre contar com você, e a recíproca é verdadeira!); **Fábio**, ou melhor, Frustrecoooo (obrigada por ser esta pessoa sincera, amiga em todos os momentos, esse cara inteligente e simples que só você sabe ser); **Heloisa Mara** (minha afilhada querida, que chegou pra conquistar meu coração, sempre amável e prestativa, não somos apenas amigas, somos confidentes, somos madrinha-afilhada!). Vocês formam também esta tese, porque o apoio e a amizade de vocês me fez e fará que eu possa vencer qualquer obstáculo.
“Há amigos mais chegados que um irmão” Prov.18.24

Aos professores desta Pós-Graduação pela disponibilidade, ensinamentos partilhados e contribuição profissional.

A todos os técnicos de laboratório, em especial: **Raimundo Nonato** (sem ele nada seria possível no laboratório, pode ter certeza que sua presteza, habilidade e disposição para ajudar são imprescindíveis), **Vicente Carlos** (pela amizade e disponibilidade), **Wellington e Alessandro** pela ajuda na execução dos experimentos.

As secretárias do curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos: **Tânia e Carol**; a todos os seguranças, funcionários da limpeza e da manutenção por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por toda disponibilidade e atenção e por estar sempre lutando para a melhoria deste programa.

Há ainda muito que agradecer... Agradeço a todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em diversos momentos, o meu reconhecido e meu muito obrigada!

Ao CNPq, CAPES, LTF, CBioTec e UFPB pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento desta tese.

RESUMO

CABRAL, Analúcia Guedes Silveira. **CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE *Combretum duarteanum* CAMBESS. (COMBRETACEAE)** 178 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

A família Combretaceae compreende 18 gêneros com mais de 600 espécies, sendo os dois maiores gêneros *Combretum* e *Terminalia*, com aproximadamente de 250 espécies cada. Visando contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família Combretaceae e do gênero *Combretum*, as folhas de *Combretum duarteanum* foram submetidas ao estudo fitoquímico e farmacológico. O óleo essencial (2,0 mL) foi obtido das folhas frescas da espécie através da hidrodestilação, sendo posteriormente analisada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Os extratos e fases obtidos foram submetidos a métodos cromatográficos usuais, para a purificação e isolamentos dos constituintes químicos. Para a identificação das substâncias isoladas, utilizaram-se métodos espectroscópicos, tais como Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e espectométricos, como espectrometria de massas, além de comparação com dados da literatura. O estudo químico das folhas de *C. duarteanum* resultou na identificação de doze substâncias: cicloartan-24-ene-1 α ,3 β -diol (Cd-1), isolada pela primeira vez na família em estudo; ácido 2 α ,3 β -urs-12-en-28-óico (Cd-2); 4 α -carboxi-3 β -hidroxi-24-cicloarteno (Cd-3), isolada pela primeira vez no gênero *Combretum*; 2 α , 3 β , 28-trihidroxiurs-12-eno (Cd-4); ácido 2 α ,3 β ,23 α -trihidroxiurs-12-ene-28-óico e ácido 2 α ,3 β ,23 α -trihidroxiolean-12-ene- 28-óico (Cd-5); estigmasterol (Cd-6); estigmasterol e espinasterol (Cd-7); galato de metila (Cd-8); 3',5,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Cd-9), 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-O-galactopiranosídeo (Cd-10), catequina (Cd-11) e Canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (Cd-12). A composição química do óleo essencial apresentou vinte e oito componentes, dentre os quais, espatulenol (15,1%) e β -cariofileno (14,1%), foram os compostos majoritários. As fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila, o extrato metanólico, bem como as substâncias Cd-2, Cd-5, e Cd-10 foram testadas frente cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas, cepas de fungos do gênero *Candida*. Todas as fases, extrato e substâncias testadas não mostraram qualquer atividade antibacteriana e

antifúngica considerável. As substâncias Cd-2, Cd-5, Cd-9 e Cd-10 foram testadas *in vitro* no ensaio de citotoxicidade em células de carcinoma ascítico de Ehrlich para avaliar a atividade antitumoral. As substâncias Cd-2 ($CI_{50} = 17,82 \mu\text{g/mL}$) e Cd-5 Cd-2 ($CI_{50} = 31,23 \mu\text{g/mL}$) mostraram uma potente atividade citotóxica.

Palavras-chave: Combretaceae, *Combretum duarteanum*, constituintes químicos, atividade antimicrobiana e atividade antitumoral.

ABSTRACT

CABRAL, Analúcia Guedes Silveira. **CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *Combretum duarteanum* CAMBESS. (COMBRETACEAE)** 178 p. Thesis (Doctor in Natural Products and Synthetic Bioactives) - Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2013.

The family Combretaceae comprises of genera with over 600 species, in which *Combretum* and *Terminalia* are the two largest genera, with about 250 species each. Aiming to contribute to the chemotaxonomic study of the family Combretaceae and the genus *Combretum*, the leaves of *Combretum duarteanum* were subjected to phytochemical and pharmacological study. The essential oil (2.0 mL) was obtained from fresh leaves by steam distillation of the species, and subsequently analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. The extracts and phases obtained were subjected to usual chromatographic methods for the isolation and purification of the chemical constituents. For the identification of the isolated substances, spectroscopic methods such as infrared, uni-dimensional and bi-dimensional spectroscopic ^1H NMR and ^{13}C NMR for mass spectrometry were used in addition to the comparison with published data. Chemical studies of the *C. duarteanum* leaves resulted in the identification of twelve substances: cycloartane-24-ene-1 α , 3 β -diol (Cd-1), isolated for the first time in the investigated family; 2 α , 3 β -urs-12-en-28-oic acid (Cd-2); 4 α -carboxy-3 β -hydroxy-24-cycloartenol (Cd-3), isolated for the first time in the genus *Combretum*; 2 α , 3 β , 28-trihydroxyurs-12-ene (Cd-4); 2 α , 3 β acid, 23 α -trihydroxyurs-12-ene-28-oic acid and 2 α , 3 β , 23 α -trihydroxyolean-12-ene-28-oic acid (Cd-5); stigmasterol (Cd-6); stigmasterol and spinasterol (Cd-7); methyl gallate (Cd-8); 3',5,7-trihydroxy-3, 4'- dimethoxyflavone (Cd-9); 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone-3-O-galactopyranoside (Cd-10), catechin (Cd-11) and kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (Cd-12). The chemical composition of the essential oil showed twenty-eight components, among which spathulenol (15.1%) and β -caryophyllene (14.1%) were the major compounds. Hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol extract phases, as well as the Cd-2, Cd-5, and Cd-10 substances were tested against bacterial strains of Gram positive and Gram negative, strains of the *Candida* genera. All phases, extracts and substances tested did not show any

significant antibacterial and antifungal activity. Substances Cd-2, Cd-5, Cd-9 and Cd-10 were tested *in vitro* during the cytotoxicity assay on Ehrlich ascites carcinoma cells, in order to evaluate antitumor activity. The substances Cd-2 ($IC_{50} = 17.82 \mu\text{g/mL}$) and Cd-5 Cd-2 ($IC_{50} = 31.23 \mu\text{g/mL}$) showed potent cytotoxic activity.

Keywords: Combretaceae, *Combretum duarteanum*, chemical constituents, antimicrobial activity and antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição do gênero <i>Combretum</i> no mundo (em verde).....	32
Figura 2 - Partes aéreas e caule de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	42
Figura 3 - Deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-24 na ausência e na presença de hidroxilas com orientação α ou β	67
Figura 4 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl_3	70
Figura 5 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl_3 ...	70
Figura 6 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl_3 ...	71
Figura 7 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl_3	71
Figura 8 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl_3	72
Figura 9 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl_3	72
Figura 10 - Deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-24 na presença de hidroxilas com orientação α ou β	74
Figura 11 - Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-2 em pastilhas de KBr.....	77
Figura 12 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	77
Figura 13 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	78
Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	78
Figura 15 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	79
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	79
Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD.....	83
Figura 18 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD.....	83
Figura 19 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD.....	84
Figura 20 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.....	84
Figura 21 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.....	85
Figura 22 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.....	85
Figura 23 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	89

Figura 24 - Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	89
Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	90
Figura 26 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$...	90
Figura 27 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$...	91
Figura 28 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	95
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	95
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	96
Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	96
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	97
Figura 33 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	97
Figura 34 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl_3	100
Figura 35 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl_3	100
Figura 36 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl_3	101
Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl_3	101
Figura 38 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl_3	102
Figura 39 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl_3	102
Figura 40 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl_3	106
Figura 41 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl_3	106
Figura 42 - Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl_3	107
Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl_3	107
Figura 44 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl_3	108
Figura 45 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl_3	108
Figura 46 - Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-8 em pastilhas de KBr.....	112
Figura 47 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-8 em MeOD.....	112
Figura 48 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-8 em MeOD.....	113
Figura 49 - Espectro de HMQC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8.....	113
Figura 50 - Espectro de HMBC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8.....	114

Figura 51 - Espectro de Massas de Cd-9.....	120
Figura 52 - Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-9 em pastilhas de KBr.....	120
Figura 53 - Espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	121
Figura 54 - Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	121
Figura 55 - Espectro de ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	122
Figura 56 - Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	122
Figura 57 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	123
Figura 58 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	123
Figura 59 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3	124
Figura 60 - Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-10 em pastilhas de KBr.....	128
Figura 61 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$	128
Figura 62 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$	129
Figura 63 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$	129
Figura 64 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$	130
Figura 65 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$	130
Figura 66 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$	131
Figura 67 - Espectro de Massas de Cd-11.....	136
Figura 68 - Espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	136
Figura 69 - Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	137
Figura 70 - Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	137
Figura 71 - Espectro de ^{13}C (125 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	138
Figura 72 - Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	138
Figura 73 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	139
Figura 74 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	139
Figura 75 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	140

Figura 76 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD.....	140
Figura 77 - Espectro de Massas de Cd-12 [M-H] – (EM-ESI, modo negativo).....	144
Figura 78 - Espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	144
Figura 79 - Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	145
Figura 80 - Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	145
Figura 81 - Espectro de ^{13}C (125 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	146
Figura 82 - Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	146
Figura 83 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	147
Figura 84 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	147
Figura 85 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	148
Figura 86 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	148
Figura 87 - Espectro de COSY (500 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	149
Figura 88 - Expansão do espectro de COSY (500 MHz) de Cd-12 em MeOD.....	149
Figura 89 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	150
Figura 90 -. Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com o composto Cd-2 ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.....	153
Figura 91 - Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com o composto Cd-5 ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-1 (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelo (Mo-1) da literatura (δ , CDCl_3 , 150 MHz).....	69
Tabela 2 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) com modelo (Mo-2) da literatura (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz).....	76
Tabela 3 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-3a (δ , MeOD , 50 MHz) com modelo (Mo-3) da literatura (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz).....	82
Tabela 4 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-4 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz) com modelo (Mo-4) da literatura (δ , CDCl_3 , 22.6 MHz).....	88
Tabela 5 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-5 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) com modelo da literatura (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz).....	94
Tabela 6 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-6 (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelo (Mo-6) da literatura (δ , CDCl_3 , 50 MHz).....	99
Tabela 7 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-7 (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelos da literatura (δ , CDCl_3 , 50 MHz).....	105
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de Cd-8 registrados em MeOD (δ em ppm e J em Hz) e comparação com valores de RMN de ^{13}C (125 MHz) em $\text{DMSO}-d_6$ da literatura (Mo-8).....	111
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de Cd-9 registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).....	118
Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de Cd-9 e comparação com valores da literatura (Mo-9) (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz).....	119
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 registrados em $\text{DMSO}-d_6$ (δ em ppm e J em Hz) e comparação com os valores de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da literatura (Mo-10).....	127
Tabela 12 - Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Cd-11 em MeOD com valores encontrados na literatura (δ em ppm e J em Hz).....	135
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) de Cd-12 registrados em MeOD (δ em ppm e J em Hz) e comparação com os valores de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) da literatura (Mo-12).....	143

Tabela 14 - Constituintes Químicos do óleo essencial das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	151
---	-----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de <i>Combretum duarteanum</i> ...	53
Esquema 2 - Obtenção dos Extratos Brutos de <i>Combretum duarteanum</i>	54
Esquema 3 - Fracionamento da Fase Hexânica das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	54
Esquema 4 - Fracionamento da Fase Clorofórmica das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	55
Esquema 5 - Fracionamento da Fase Acetato de Etila das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	56
Esquema 6 - Fracionamento da Fase Metanólica das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i>	34
Quadro 2 - Estruturas de alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i>	36
Quadro 3 - Substâncias isoladas das folhas de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
Cd	<i>Combretum duarteanum</i>
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
Cl₅₀	Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dubleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EB	Extrato Bruto
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EtOH	Etanol
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
Hex.	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LABETOX	Laboratório de Ensaios Toxicológicos
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
m	Multiplete
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
ppm	Partes por milhão

p/v	Peso/volume
R_f	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI	<i>Instituto Roswell Park Memorial</i>
s	simpleto
sl	simpleto largo
t	triplete
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFS	Universidade Federal de Sergipe
δ	Deslocamento químico em ppm
μL	Microlitro
μm	Micromêtro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
2.1. Considerações sobre a família Combretaceae.....	30
2.2. Considerações sobre o gênero <i>Combretum</i>	32
2.2.1. Aspectos químicos, biológicos e farmacológicos do gênero <i>Combretum</i>	32
2.3. Considerações sobre as espécies de <i>Combretum</i> encontradas na Paraíba.....	39
2.3.1. <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	39
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo Geral.....	44
3.1. Objetivos Específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Métodos de análise.....	46
4.1.1. Métodos cromatográficos.....	46
4.1.2. Métodos espectroscópicos e espectrométricos.....	46
4.2. Estudo Fitoquímico.....	47
4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	47
4.2.2.Obtenção e Análise do óleo essencial das folhas frescas de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	48
4.2.3.Processamento das folhas e caule de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	48
4.2.4.Obtenção dos extratos brutos (EB) de <i>Combretum duarteanum</i>	49
4.2.5.Fracionamento cromatográfico da Fase Hexânica das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	49
4.2.6. Fracionamento cromatográfico da Fase Clorofórmica das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	50
4.2.7. Fracionamento cromatográfico da Fase Acetato de Etila das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	51
4.2.8. Fracionamento cromatográfico do Extrato Metanólico das folhas de	

<i>Combretum duarteanum</i>	51
4.3 Estudos Farmacológicos.....	58
4.3.1 Estudo Antimicrobiano.....	58
4.3.2 Estudo Antitumoral.....	59
4.3.2.1 Linhagem de células tumorais.....	59
4.3.2.2 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich.....	59
4.3.2.3 Análise estatística.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1. Determinação estrutural de Cd-1	66
5.2. Determinação estrutural de Cd-2	73
5.3. Determinação estrutural de Cd-3	80
5.4. Determinação estrutural de Cd-4	86
5.5. Determinação estrutural de Cd-5	92
5.6. Determinação estrutural de Cd-6	98
5.7. Determinação estrutural de Cd-7	103
5.8. Determinação estrutural de Cd-8	109
5.9. Determinação estrutural de Cd-9	115
5.10. Determinação estrutural de Cd-10	125
5.11. Determinação estrutural de Cd-11	132
5.12. Determinação estrutural de Cd-12	141
5.13 Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Combretum duarteanum</i>	150
5.14. Resultados Farmacológicos.....	152
5.14.1 Estudo Antimicrobiano.....	152
5.14.2 Estudo Antitumoral.....	152
5.14.2.1 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich.....	152
6 CONCLUSÕES	156
REFERÊNCIAS	159

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais está em contínua expansão em nível mundial. A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos. Diante desta realidade, várias pesquisas de bioprospecção dos nossos biomas vêm sendo incrementadas objetivando a busca racional de bioprodutos de valor agregado (BARREIRO; BOLZANI, 2009). A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se também pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado, e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitoterápicos, como alternativas terapêuticas (GUERRA; NODARI, 2003).

Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada. Muitos metabólitos secundários ou especiais se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, comprovando que a parceria entre químicos medicinais e químicos de produtos naturais é uma estratégia para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O Brasil é o país que possui a maior floresta tropical, e também a maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Com sua enorme biodiversidade apresenta-se com grande potencial para a descoberta de princípios ativos (GUERRA; NODARI, 2003). As plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, mas não é verdade. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As

pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (PINTO; VEIGA Jr., 2005).

Neste contexto, os estudos fitoquímicos realizados com plantas medicinais compreendem etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica (TOLEDO *et al.*, 2003). Entretanto, a análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isto, existe a necessidade de um trabalho em colaboração mais ampla entre químicos e farmacólogos para a análise de extratos, onde se obtém extratos semi-puros, frações e finalmente, os compostos puros (YUNES; CHECHINEL-FILHO, 1997).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas. Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos associados, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo. Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) de fármacos, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna (GUIDO *et al.*, 2010).

Diante destas premissas, evidenciou-se a importância do estudo das plantas medicinais para a descoberta de moléculas bioativas, obtendo-se, portanto, protótipos para a síntese de novas substâncias, ou adaptando as estruturas químicas já existentes, tornando-as mais potentes ou ativas. Deste modo, percebendo o potencial farmacológico e a importância do gênero *Combretum*, bem como, a ocorrência de algumas espécies na Paraíba, optou-se pela investigação de *Combretum duarteanum* Cambess. Além disso,

estudos farmacológicos recentes realizados com esta espécie, relataram a presença de atividades farmacológicas, como, antiinflamatórias, antioxidantes e antiúlcera, fato que instigou nosso grupo de pesquisas à procura dos seus metabólitos secundários e de outras atividades farmacológicas.

*Fundamentação
Teórica*

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre a família Combretaceae

A família Combretaceae compreende 18 gêneros com mais de 600 espécies, sendo os dois maiores gêneros *Combretum* e *Terminalia*, com aproximadamente de 250 espécies cada. As espécies do gênero *Combretum* são mais amplamente utilizadas para fins medicinais que espécies do gênero *Terminalia*. (MCGAW et al., 2001; KATERERE et al., 2003).

Esta família possui distribuição tropical, ocorrendo em ambientes quentes de todos os continentes, com centros de diversidade na África e Ásia. Espécies da família constituem importantes elementos de mangues, florestas úmidas e de regiões semi-áridas (STACE, 2004).

Combretaceae apresenta-se botanicamente como: ervas, arbustos escandentes e árvores, heliófilas, xerófilas a halófitas, inermes, raro espinhosas; plantas hermafroditas, andromonóicas ou raramente dióicas. Folhas opostas, alternas, espiraladas ou verticiladas, simples, pecioladas, sem estípulas; Inflorescências axilares ou terminais, espigas, panículas de espigas, capítulos, ou raramente racemos subcapitados, com o mesmo padrão de tricomas das folhas. Flores 4-5-meras, actinomorfas ou raramente zigomorfas, epíginas ou raramente semi-epíginas, monoclamídeas ou diclamídeas. Ovário ínfero, unilocular; Fruto geralmente indeiscente, seco ou suculento (LOIOLA et al., 2007).

Espécies de Combretaceae não se destacam pelo valor econômico; poucas são cultivadas como ornamentais, *Quisqualis indica* L. e *Terminalia catappa*, por exemplo. Algumas são referidas pelo seu emprego na medicina popular (BRAGA, 1960; AGRA, 1996; FYHRQUIST et al., 2002) ou potencial farmacológico (FÉRREA et al., 1993; BABA-MOSSA et al., 1999). As sementes dos frutos de *Terminalia catappa* (castanhola ou amêndoa-indiana) são oleaginosas e empregadas como alimento na Índia (STACE, 2004). O estudo mais completo para Combretaceae no Brasil foi realizado por Eichler (1867), que reconheceu nove gêneros e 65 espécies. A partir de então, poucos trabalhos foram publicados, alguns em 3 floras (MARQUETE et al., 2003; MARQUETE; VALENTE, 2006), porém a maioria envolvendo descrições de

novos *taxa* (ENGLER; DIELS, 1899; FAWCETT; RENDLE, 1925) e novas combinações (EXELL, 1931; 1953; EXELL; STACE, 1966). Entretanto, de acordo com Marquete & Valente (2006), atualmente estima-se a ocorrência de 78 espécies subordinadas a seis gêneros no país.

No Nordeste do Brasil, representantes de Combretaceae foram citados em trabalhos pontuais, como floras e listas regionais, dentre os quais se destacam o estudo de Zappi (1995), para a Bahia, com o registro de duas espécies de *Terminalia*; Loiola & Sales (1996) e Loiola (1998), referiram nove e três espécies, respectivamente, para Pernambuco; Giulietti et al. (2002), indicaram três espécies como endêmicas para a caatinga; mais recentemente, Silva e Valente (2005) relacionam uma lista de 12 espécies para a região.

Para a Paraíba, as informações existentes para a família são pontuais, com apenas duas espécies referidas em levantamentos florísticos e trabalhos etnobotânicos. Andrade-Lima & Rocha (1971) e Barbosa et al. (2004) referiram a ocorrência de *Buchenavia capitata* para a Mata do Buraquinho, no litoral, e para a Mata de Pau-ferro, em Brejo de Altitude, respectivamente; Agra et al. (2004) registraram a presença de *Combretum leprosum* no Pico do Jabre, uma área de mata serrana. Além disso, Agra (1996) e Agra et al. (2007) referiram os usos etnomedicinais desta espécie para a microrregião do Cariri Paraibano.

As características químicas da família Combretaceae mostraram a presença de taninos, flavonoides, triterpenos, derivados dos ácidos elágico e gálico, fenantrenos e dihidrofenantrenos (WATT; BREYER-BRANDWIJK, 1962).

As plantas do gênero *Terminalia* são amplamente distribuídas nas áreas tropicais do mundo e conhecidas como uma fonte rica de metabólitos secundários, tais como triterpenoides pentacíclicos e seus derivados glicosilados, flavonoides, taninos e outros compostos aromáticos (KATERERE et al., 2003; GARCEZ et al., 2003). As espécies do gênero *Terminalia* apresentam diversas atividades farmacológicas reveladas pelos extratos ou substâncias isoladas, tais como antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, anti-HIV-1, antimalárica e outras (VALSARAJ et al., 1997; CARPANO et al.; KHAN et al., 2002; MAU et al.; RAO et al.; 2003).

2.2 Considerações sobre o gênero *Combretum*

O gênero *Combretum* (Combretaceae), compreende 250 espécies, de distribuição cosmopolita (Figura 1, pág. 32), que são principalmente nativas das regiões tropicais e subtropicais (POTT; POTT, 1994).

O gênero *Combretum* apresenta-se, botanicamente, como lianas, arbustos escandentes; folhas opostas sem glândulas de sal no pecíolo; flores com ou sem pétalas e frutos betulídios (LOIOLA *et al.*, 2007).

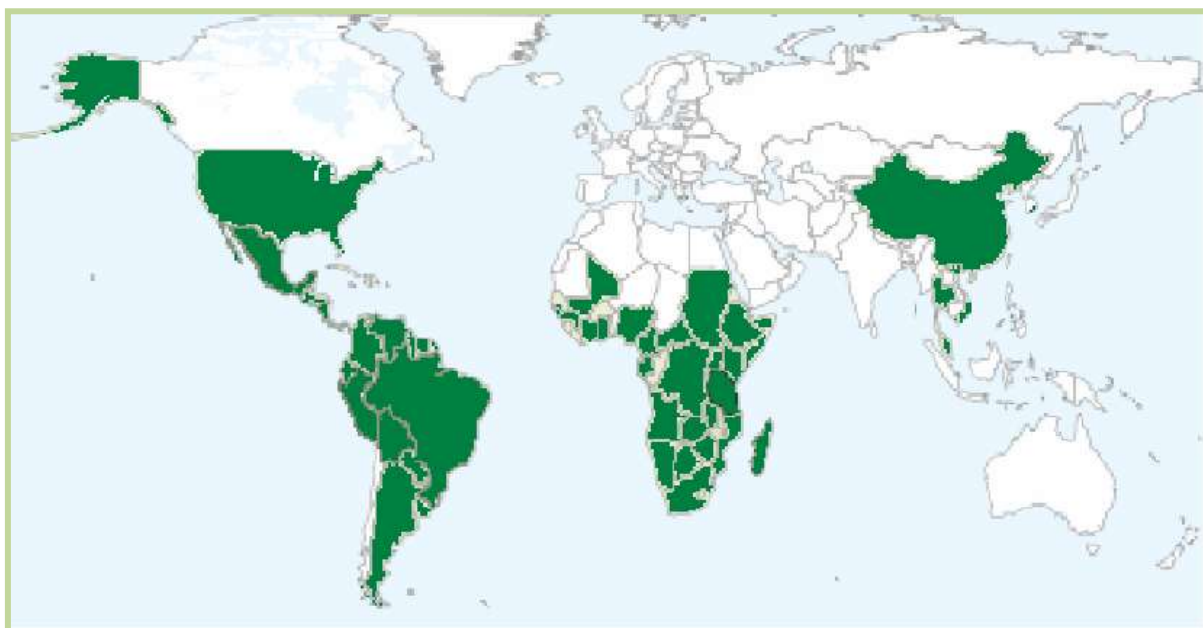


Figura 1. Mapa de distribuição do gênero *Combretum* no mundo (em verde).
(In:MissouriBotanicalGarden:<http://www.tropicos.org/Name/40012776?tab=maps&usenonflash=1>)

2.2.1 Aspectos químicos, biológicos e farmacológicos do gênero *Combretum*

Uma série de triterpenóides tipo cicloartano, damarano e oleanano, flavonóides, dibenzil aromáticos, estilbenos, fenantrenos, lignanas e aminoácidos não protéicos (Quadros 1 e 2 , pág. 34-38) foram relatados a partir de espécies do gênero *Combretum* (DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS, 2001).

Espécies de *Combretum* (Combretaceae) são utilizadas na medicina popular para o tratamento da hepatite, malária, infecções respiratórias, e até mesmo câncer em diferentes partes da Ásia e África (PETTIT *et al.*, 1995).

As folhas de espécies *Combretum* são amplamente usadas para tratar distúrbios abdominais (por exemplo, dor abdominal, diarreia) dor nas costas, tosse peitoral, constipações, conjuntivite, dismenorréia, dor de ouvido, febre, cefaléia, ancilostomíase, infertilidade em mulheres, lepra, pneumonia, picada de escorpião e cobra, inchaço causado por caxumba, sífilis, dor de dente e fraqueza geral (OLIVER-BEVER, 1986; HUTCHING *et al.*, 1996).

Outros estudos demonstraram que alguns dos extratos ou princípios ativos obtidos a partir de espécies de *Combretum* têm um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antibacteriana (ALI *et al.*; FYRQUIST *et al.*, 2002; MARTINI *et al.*, 2004; AHMAD; AQUÍ; OWAIS, 2006), antifúngica (AHMAD; AQUÍ; OWAIS, 2006), antiprotozoária (ASRES *et al.*, 2001; ANCOLIO *et al.*, 2002; YOUNG; CHAPLIN, 2004;), anticancerígenos (GRIGGS *et al.*, 2001; NABHA *et al.*, 2000; NAM, 2003; YOUNG; CHAPLIN, 2004), citotóxica (ALI *et al.*, 2002), analgésicos (LIRA *et al.*, 2002), antiinflamatórios (ALI *et al.*, 2002; OLAJIDE *et al.*, 2003; YOUNG; CHAPLIN, 2004; AHMAD; AQUÍ; OWAIS, 2006), hepatoprotetores (ADNYANA *et al.*, 2001) e atividades antivirais (YOUNG; CHAPLIN, 2004; BENSSONG *et al.*, 2005).

Em recente revisão sobre o gênero *Combretum*, relatou-se ainda, outras atividades para este gênero, como, inibição da acetilcolinesterase, atividade antileishmania, hipoglicemiante, antioxidante, imunoestimulante, citotóxica e gastroprotetora, demonstrando a grande contribuição das espécies deste gênero como alternativa terapêutica em inúmeras doenças (LIMA *et al.*, 2012).

Quadro 1. Alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Combretum*.

ESPÉCIES	SUBSTÂNCIAS	REFERÊNCIAS
METILXANTINAS		
<i>C. jaquinii</i>	Cafeína (1)	WILLAMAN; SCHUBERT, 1961; FREISE, 1935
<i>C. loeflingii</i>		WILLAMAN; SCHUBERT, 1961 FREISE, 1935
<i>C. toeffelingii</i>		
FLAVONOIDES		
<i>C. micranthum</i>	Vitexina (2)	BASENE <i>et al.</i> , 1985; DAFPE, 1980
<i>C. quadrangulare</i>		ADNYANA <i>et al.</i> , 2000b
<i>C. quadrangulare</i>	Combretol (3)	CASTLEDEN <i>et al.</i> , 1985; SOMANABANDHU <i>et al.</i> , 1980
BENZENOIDES		
<i>C. caffrum</i>	Combrestatina (4)	PETTIT <i>et al.</i> , 1988
<i>C. erythrophyllum</i>		SCHWIKKARD <i>et al.</i> , 2000
<i>C. kraussii</i>		PELIZZONI <i>et al.</i> , 1994 BROOKES <i>et al.</i> , 1999
<i>C. caffrum</i>	Combrestatina B-1 (5)	PETTIT <i>et al.</i> , 1987a
<i>C. erythrophyllum</i>		SCHWIKKARD <i>et al.</i> , 2000
<i>C. kraussii</i>		PELIZZONI <i>et al.</i> , 1993
ESTILBENOS		
<i>C. caffrum</i>	Combrestatina A-1 (6)	PETTIT <i>et al.</i> , 1987a
<i>C. erythrophyllum</i>		SCHWIKKARD <i>et al.</i> , 2000
<i>C. kraussii</i>		PELIZZONI <i>et al.</i> , 1993
TERPENOS		
<i>C. imberbe</i>	Ácido Betulínico (7)	ROGERS; SUBRAMONY, 1988
<i>C. quadrangulare</i>		BANSKOTA <i>et al.</i> , 2000
Continua...		

...Continuação

<i>C. elaeagnoides</i>	Ácido Jéssico (8)	OSBORNE; PEGEL, 1984
<i>C. molle</i>		PANZINI <i>et al.</i> , 1993
<i>C. quadrangulare</i>		BANSKOTA <i>et al.</i> , 2000
<i>C. erythrophyllum</i>	Cicloartano (9)	ROGERS, 1998
<i>C. quadrangulare</i>		GANZERA <i>et al.</i> , 1998

ÁCIDOS FENÓLICOS

<i>C. caffrum</i>	Ácido Elágico (10)	PETTIT <i>et al.</i> , 1987b
<i>C. kraussii</i>		BROOKES <i>et al.</i> , 1999
<i>C. species</i>		MILITO <i>et al.</i> , 1993
<i>C. yunnanensis</i>		ASAMI <i>et al.</i> , 2003

LIGNANAS

<i>C. quadrangulare</i>	Isolariciresinol (11)	ADNYANA <i>et al.</i> , 2000a
-------------------------	-----------------------	-------------------------------

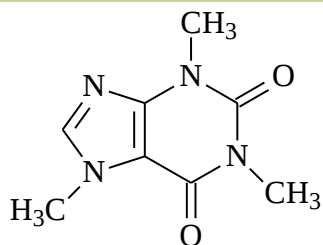
TANINOS

<i>C. glutinosum</i>	Punicalagina (12)	JOSSANG <i>et al.</i> , 1994
----------------------	-------------------	------------------------------

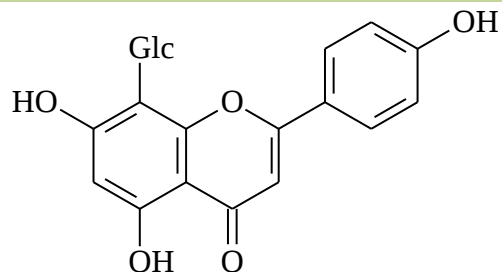
ESTEROIDES

<i>C. kraussii</i>	β -sitosterol (13)	BROOKES <i>et al.</i> , 1999
<i>C. quadrangulare</i>		BANSKOTA <i>et al.</i> , 2000
<i>C. quadrangulare</i>	Daucosterol (14)	ADNYANA <i>et al.</i> , 2000a

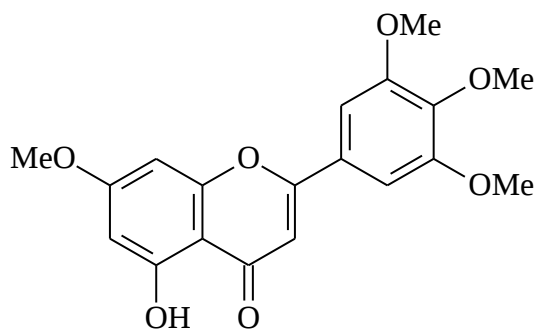
Quadro 2. Estruturas de alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Combretum* (citados no Quadro 1, pag. 35).



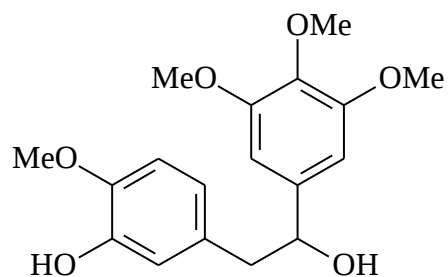
Cafeína (1)



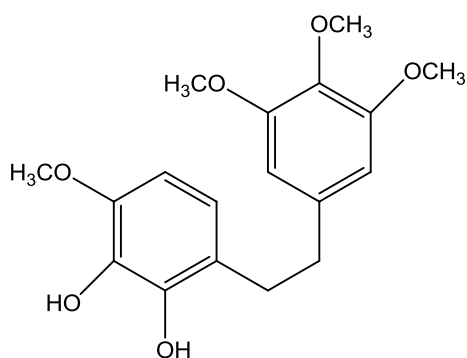
Vitexina (2)



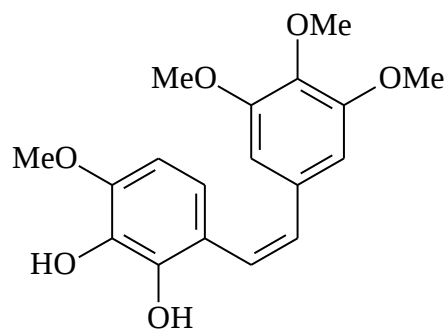
Combretol (3)



Combrestatina (4)

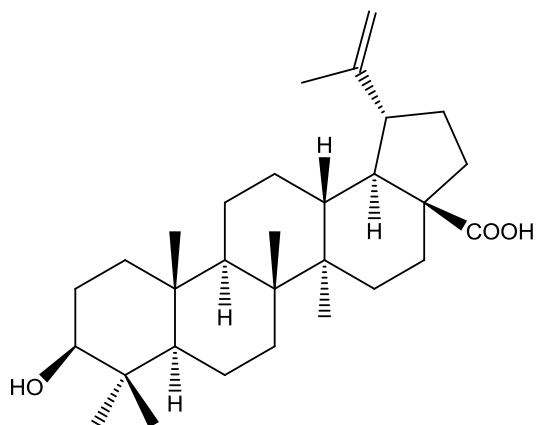


Combrestatina B-1 (5)

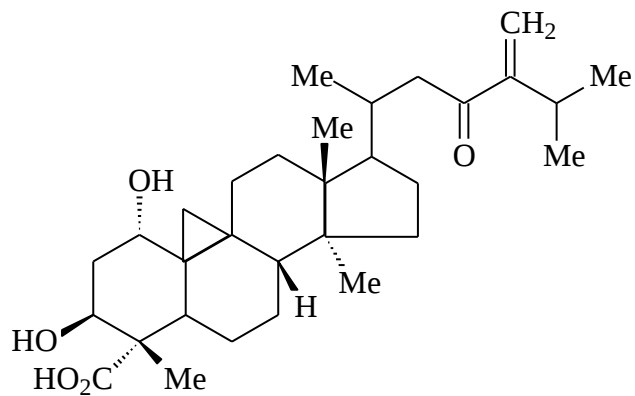


Combrestatina A-1 (6)

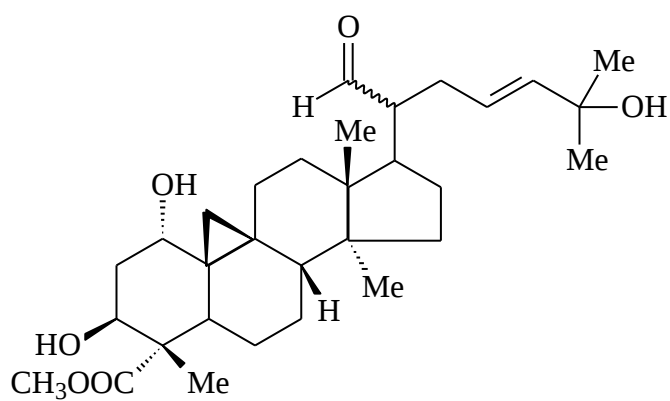
Continuação do **Quadro 2**.



Ácido Betulínico (7)

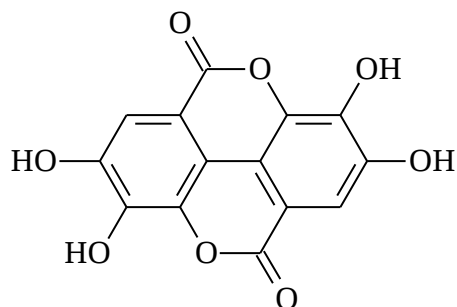


Ácido Jéssico (8)

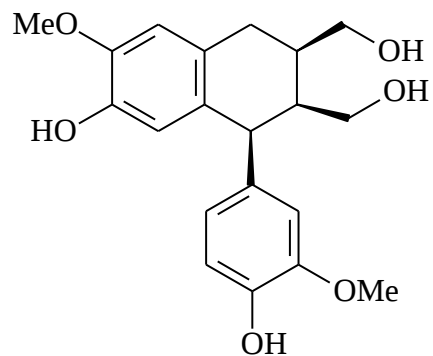


**Metil Quadrangularato A
(9)**

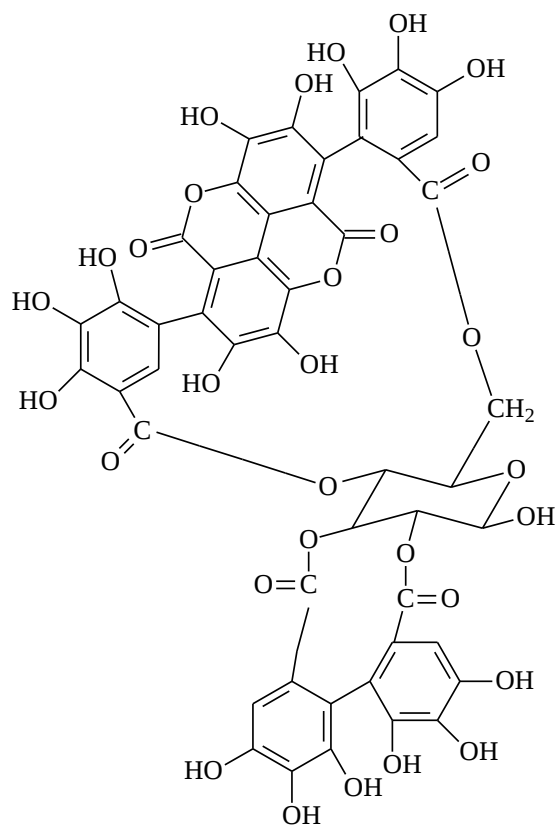
Continuação do **Quadro 2.**



Ácido Elágico (10)

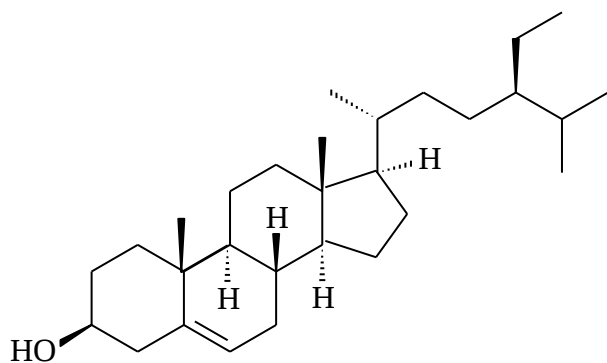


Isolariciresinol (11)

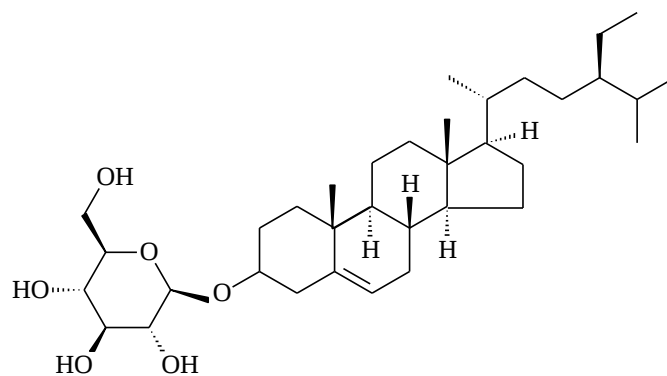


Punicalagina (12)

Continuação do **Quadro 2.**



β -sitosterol (13)



Daucosterol (14)

2.3 Considerações sobre as espécies de *Combretum* encontradas na Paraíba

Na Paraíba foram registradas sete espécies para este gênero, sendo elas: *Combretum duarteanum* Cambess., *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz, *Combretum glaucocarpum* Mart., *Combretum hilarianum* D. Dietr., *Combretum laxum* Jacq., *Combretum leprosum* Mart. e *Combretum pisonioides* Taub. A maioria das espécies possui distribuição restrita, algumas ocorrem em manguezais, outras em ambientes de caatinga ou em área de floresta Atlântica (LOIOLA *et al.*, 2007).

2.3.1 *Combretum duarteanum* Cambess.

Combretum duarteanum, conhecida popularmente como mufumbo, é caracterizado botanicamente como: arbustos eretos a escandentes, até 1,5 m de altura; toda planta lepidota, tricomas escamosos, hialinos ou ferrugíneos, revestindo caules, ramos, folhas, botões e frutos; caule e ramos estriados, cinéreos. Folhas opostas, curto-pecioladas (Figura 2, pág. 41). Flores 8-9 mm comprimento, esverdeadas; bractéola 1, 1-2 mm comprimento, espatulada, com ápice acuminado (LOIOLA *et al.*, 2007).

Espécie exclusiva da América do Sul, com registro na Bolívia, Paraguai e Brasil (EXELL, 1953). Segundo Loiola & Sales (1996), ocorre no Brasil nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Piauí), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo). A presença desta espécie associada a ambientes de caatinga foi reportada para os estados da Bahia, Paraíba e Pernambuco (LOIOLA; SALES, 1996). Sua ocorrência na Paraíba está restrita à caatinga, encontrada geralmente em afloramentos rochosos (LOIOLA *et al.*, 2007).

Nascimento *et al.* (1990) investigaram a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade de extratos de 30 espécies de plantas, relatando que apenas *Combretum duarteanum* demonstrou atividade antimicrobiana. Albuquerque *et al.* (2007) relataram que as folhas e flores de *Combretum duarteanum* Cambess possuem atividade expectorante. Diante deste estudo, decidiu-se

investigar se as fases e/ou substâncias isoladas da espécie possuíam a atividade antimicrobiana.

Algumas atividades bastante estudadas em outras espécies deste gênero e com bons resultados farmacológicos, como antiinflamatória, gastroprotetora e antitumoral, incentivou os estudo com *Combretum duarteanum* Cambess.

Estudos em parceria com a equipe de Prof. Lucindo José Quintães Júnior (UFS) sugerem que o extrato etanólico de *C. duarteanum* (EB) apresenta uma ação antioxidante que previne lipoperoxidação, provavelmente devido à atividade sequestradora do radical hidroxila, e uma atividade antinociceptiva em camundongos. O efeito antinociceptivo ocorre provavelmente através de mecanismos inibitórios centrais (sistema opióide) e não é devido a alterações na coordenação motora. A provável atividade antiinflamatória do extrato pode desempenhar um papel em ações que interferem com a síntese de prostaglandinas e também pode envolver mecanismos mediados pelo sistema redox (GOUVEIA *et al.*, 2011).

Outro estudo, em parceria com a Prof^a. Leônia Maria Batista (UFPB), relatou que o extrato etanólico bruto e a fase hexânica de *C. duarteanum* possuem atividade gastroprotetora, sugerindo o potencial para o desenvolvimento e utilização como uma droga anti-úlceras gástrica (LIMA *et al.*, 2013) . Outros estudos mais avançados ainda estão em fase de conclusão.

Perante estes resultados, surgiu um grande interesse para uma investigação dos constituintes químicos, tendo em vista, ainda não haver relato sobre estudo químico. Bem como, avaliar outras atividades biológicas para esta espécie, já descritas no gênero *Combretum*.



Figura 2. Partes aéreas e caule de *Combretum duarteanum* Cambess. (Foto: J. F. TAVARES, 2008)

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Buscar compostos biologicamente ativos da família Combretaceae, utilizando como objeto de estudo as folhas de *Combretum duarteanum* Cambess., visando contribuir para o estudo químico, biológico e quimiotaxonômico de plantas da Paraíba.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Extrair, purificar e isolar metabólitos secundários das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess., utilizando diferentes métodos cromatográficos.
- ✓ Identificar biometabólitos de *C. duarteanum* através de técnicas de IV, EM e RMN (uni e bidimensionais);
- ✓ Caracterizar os constituintes voláteis da espécie em estudo;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana das fases e das substâncias isoladas de *Combretum duarteanum*;
- ✓ Avaliar atividade antitumoral *in vitro* de substâncias isoladas de *Combretum duarteanum*;
- ✓ Disponibilizar extratos brutos, fases, frações e/ou substâncias isoladas da espécie em estudo para realização de atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiúlcera, dentre outras.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Métodos de análise

4.1.1 Métodos cromatográficos

Na cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e 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. Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi preparada com sílica gel 60 PF₂₅₄ artigo 7749, Merck, suspensa em água destilada (1:2), espalhada sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quickfit” que conferia a camada espessura de 0,25 mm. As cromatoplasas obtidas foram secas e, em seguida, ativadas em estufa a 110 °C durante duas horas.

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 pela pulverização com o reagente vanilina clorídrica. Também foi utilizado como revelador câmara saturada com vapores de iodo. O grau de pureza das substâncias foi evidenciado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), determinando-se a pureza quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três tipos de sistemas de eluição diferentes, como também pela variação do ponto de fusão das substâncias.

Os solventes empregados foram das marcas MERCK, TEDIA BRASIL e solventes comerciais destilados no LTF/UFPB.

4.1.2 Métodos espectroscópicos e espectrométricos

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro: BOMEM, modelo MB 100, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas de KBr.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro da marca MERCURY-VARIAN do

Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (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). Utilizou-se também, o espectrofotômetro Bruker® DPX-300, operando a 300 e 75 MHz, respectivamente (Central Analítica – IQ/USP) e em espectrofotômetro Bruker® DRX-500, operando a 500 e 125 MHz, respectivamente (Central Analítica – IQ/USP). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se em solvente deuterado da Cambridge Isotope Laboratories (CDCl_3 , CD_3OD , DMSO e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). 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 destes solventes: clorofórmio (δ_{H} 7,24), metanol (δ_{H} 3,30), DMSO (δ_{H} 2,50) e piridina (δ_{H} 7,55 ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio (δ_{C} 77,0), metanol (δ_{C} 49,00 ppm), DMSO (δ_{C} 39,50) e piridina (δ_{C} 135,90 ppm). As multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), dl (duplete largo), t (triplete), q (quadruplete), m (multiplete).

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos em modo de íons negativos pela técnica de Ionização por Eletrospray (-) utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker, Microtof II) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise LMCA/UFPB.

A rotação específica das substâncias (quando necessário) foi realizada no polarímetro do modelo Polarimeter, série P-2000, marca JASCO do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise LMCA/UFPB.

4.2 Estudo Fitoquímico

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Combretum duarteanum* foram coletados no município de Serra Branca-PB, em junho de 2008, identificada pela botânica Prof^a Dra. Maria de Fátima Agra do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). A exsicata desta espécie encontra-se catalogada, sob o código

Agra *et al.*, 6767, no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB.

4.2.2 Obtenção e Análise do óleo essencial das folhas frescas de *Combretum duarteanum* Cambess.

O óleo foi obtido a partir de 1000 g de folhas frescas de *Combretum duarteanum*, cortadas em pedaços, por hidrodestilação, durante 4 horas, utilizando um aparelho tipo Clevenger. O óleo obtido (2,0 mL) foi seco com sulfato de sódio anidro, e armazenado em temperatura baixa em um recipiente âmbar, sendo posteriormente encaminhado para análise química.

O óleo de *C. duarteanum* foi analisado por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG / EM). A análise da CG foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu GC-17A com um software Shimadzu GC 10, usando uma coluna capilar de sílica fundida (0,25 mm x 30 m, revestida com DB-5 (J & W Scientific. 25 µm espessura de filme). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 220 °C; temperatura do detector: 250 °C; programa de temperatura: 60-240 °C, 3 °C/min.; gás de arraste He 0,7 bar, 1 mL/min.; volume de amostra injetada: 1-2 µL. Composições percentuais foram obtidos a partir de medidas de integração eletrônica com detecção de ionização de chama, sem levar em conta os fatores de resposta. As análises foram realizadas em um sistema de capilar CG-EM quadrupolo (QP 5000) operando a 70 eV nas mesmas condições descritas acima.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos índices de retenção (determinado em relação aos tempos de retenção de uma série de n-alcenos) e espectros de massa com as amostras autênticas.

4.2.3 Processamento das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess.

O material vegetal (5000 g) foi seco em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 4 dias. Após a secagem, submeteu-se a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se o pó seco.

4.2.4 Obtenção dos extratos brutos (EB) e Fases de *Combretum duarteanum*

O alíquota do pó das folhas (2500 g) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitos três processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotavapor a uma temperatura média de 50 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, o extrato etanólico bruto (EEB) das folhas (200 g) foi suspenso em solução de metanol/água (7:3 v/v) sob agitação mecânica, por 60 min., obtendo-se a solução hidrometanólica. A solução obtida foi submetida a uma extração líquido/líquido, em uma ampola de separação, sob agitação manual de forma exaustiva e sucessiva, utilizando seguidamente os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções obtidas foram tratadas com NaSO₄ anidro e submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após esse processo, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo a uma temperatura média de 50 °C, fornecendo as fases hexânica (65,4 g), clorofórmica (28,7 g), acetato de etila (22,5 g) e n-butanólica (15,4 g) (Esquema 1, pág. 52).

A outra alíquota do pó (1500 g) foi submetida a maceração exaustiva diretamente com os solventes, obtendo-se os seguintes extratos, hexânico (50,0 g), clorofórmico (18,5 g) acetato de etila (20,1 g) e metanólico (25,0 g) (Esquema 2, pág. 53).

4.2.5 Fracionamento cromatográfico da Fase Hexânica do EEB das folhas de *Combretum duarteanum*

Uma alíquota da fase hexânica (7,0 g) foi submetida à coluna cromatográfica (CC), utilizando como adsorvente sílica gel 60, e como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo a um grau crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 146 frações que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas no evaporador rotativo.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus perfis

cromatográficos, após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara de vapores de iodo. As frações foram reunidas em 33 grupos.

A fração 40-41 (Esquema 3, pág. 53), apresentou-se, após lavagem com hexano, como cristais brancos em forma de agulha, fornecendo a substância codificada como Cd-6, que foi encaminhada para análise espectral.

A fração 43-50 também se apresentou como cristais brancos em forma de agulha, que após lavagem com hexano foi codificado como Cd-7.

A fração 106, mostrou-se como um sólido amarelado, codificado como Cd-1. A fração 116 apresentou-se também, como um sólido amorfo branco, que após análise em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi codificada como Cd-2.

A fração 114 apresentou-se como um pó branco que após análise em CCDA mostrou-se como uma mistura de duas substâncias, codificada como Cd-3. As substâncias foram encaminhadas para análise espectral (Esquema 3, pág. 53).

4.2.6 Fracionamento cromatográfico da Fase Clorofórmica do EEB das folhas de *Combretum duarteanum*

Uma alíquota da fase Clorofórmica (5,0 g) foi submetida à coluna cromatográfica (CC), utilizando como adsorvente sílica gel 60, e como eluentes, hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo um grau crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 199 frações que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas no evaporador rotativo.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus perfis cromatográficos, após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara de vapores de iodo. As frações foram reunidas em 38 grupos.

A fração Fr.90-93 foi submetida a outra cromatografia em coluna, utilizando-se sephadex, e como eluente, metanol a 100%. Foram obtidas 15 frações, que foram reunidas em cinco grupos após análise em CCDA (Fr.90-93.1-3; Fr.90-93.4; Fr.90-93.5-7; Fr.90-93.8-11; Fr.90-93.12-15). A fração Fr.90-93.12-15, após nova análise em CCDA mostrou-se como uma única mancha, sendo codificada como Cd-9 (Esquema 4, pág. 54).

A fração 117-120 foi submetida a CCDP, em sistema de solventes CH₂Cl₂:MeOH (95:5), obtendo-se 4 faixas, que após serem retiradas, filtradas e concentradas foram submetidas a uma CCDA, mostrando que a fração 117-120.3 apresentou apenas uma mancha sendo codificada como Cd-5.

A fração 138-141 foi submetida a outra coluna cromatográfica (CC), utilizando como adsorvente sílica gel 60, e como eluentes, hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo um grau crescente de polaridade. Obteve-se 16 frações que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas no evaporador rotativo. Após análise em CCDA a fração 138-141.4 mostrou-se como uma única mancha e foi codificada como Cd-5 (Esquema 4, pág. 54).

4.2.7 Fracionamento cromatográfico da fase Acetato de Etila do EEB das folhas de *Combretum duarteanum*

A fase Acetato de Etila (18,0 g) foi submetida à coluna cromatográfica (CC), utilizando como adsorvente sílica gel 60, e como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo a um grau crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 32 frações que foram coletadas e posteriormente concentradas no evaporador rotativo.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus perfis cromatográficos, após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara de vapores de iodo. Algumas frações, porém, mostraram-se como precipitados, os quais foram lavados com acetona P.A, destacando-se as frações 7, 13 e 17, as quais foram codificadas como Cd-4, Cd-2 e Cd-5, respectivamente (Esquema 5, pág. 55).

4.2.8 Fracionamento cromatográfico do Extrato Metanólico das folhas de *Combretum duarteanum*

O Extrato Metanólico (18,0 g) foi submetido à coluna cromatográfica (CC), utilizando como adsorvente sílica gel 60, e como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo a um grau crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 22 frações que foram coletadas e posteriormente concentradas no evaporador rotativo.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus perfis cromatográficos, após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara de vapores de iodo.

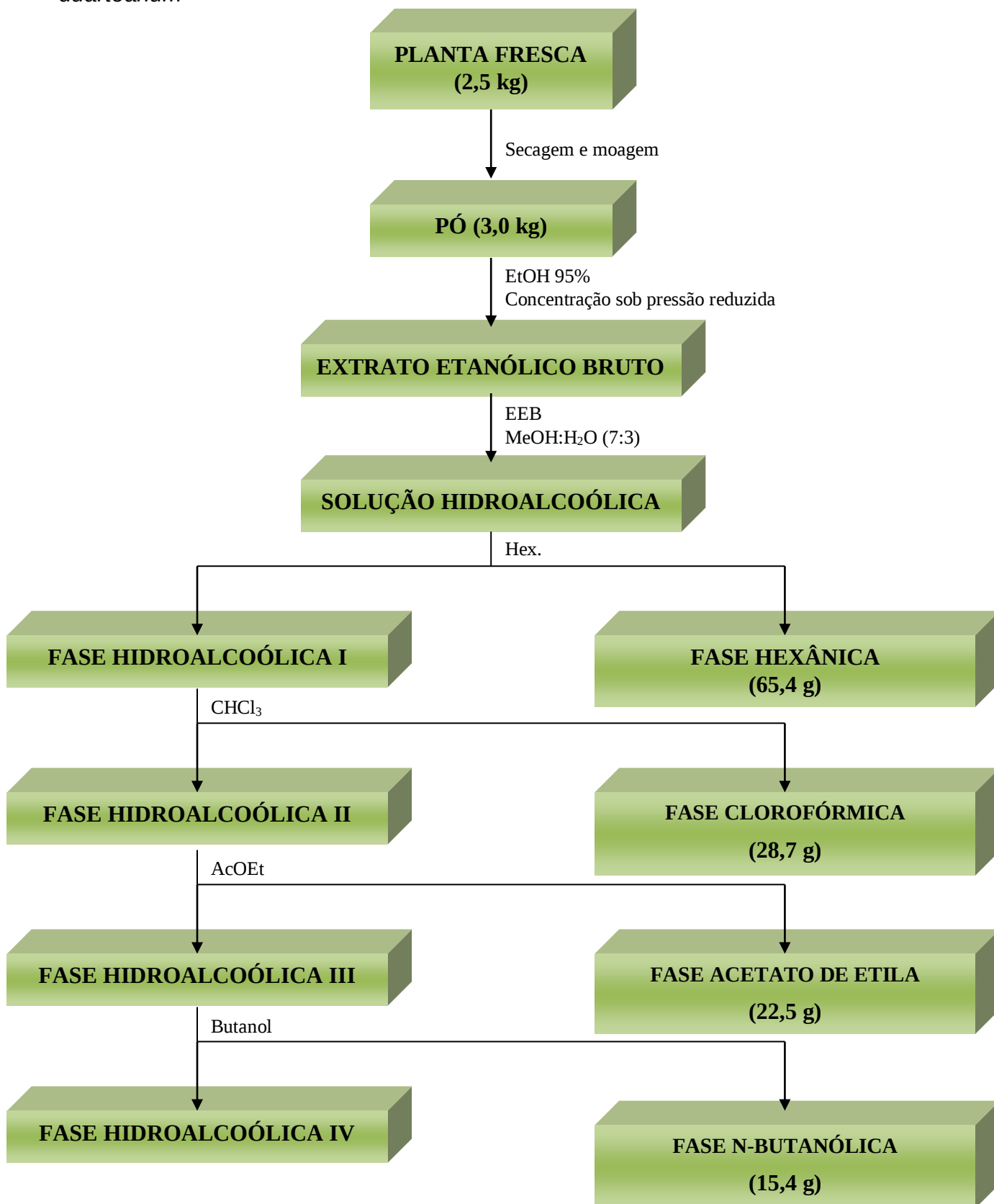
A fração 13 foi submetida a uma nova CC utilizando sephadex e como eluente metanol (100%), obtendo-se 15 frações, as quais, após análise em CCDA, foram reunidas em quatro grupos (Fr.13.1-6; Fr.13.7-9; Fr.13.10-11; Fr.13.12-15). A fração Fr.13.12-15 foi novamente submetida a uma CC, utilizado sephadex, nas mesmas condições anteriores, obtendo 18 frações. Após análise em CCDA a fração 13.12-15.3 e a fração 13.12-15.9 foram codificadas como Cd-8 e Cd-11, respectivamente.

A fração 17 foi submetida a uma CC utilizando sephadex e como eluente MeOH (100%), obtendo-se 10 frações. Após análise em CCDA, a fração 17.2 foi codificada como Cd-10 (Esquema 6, pág. 56).

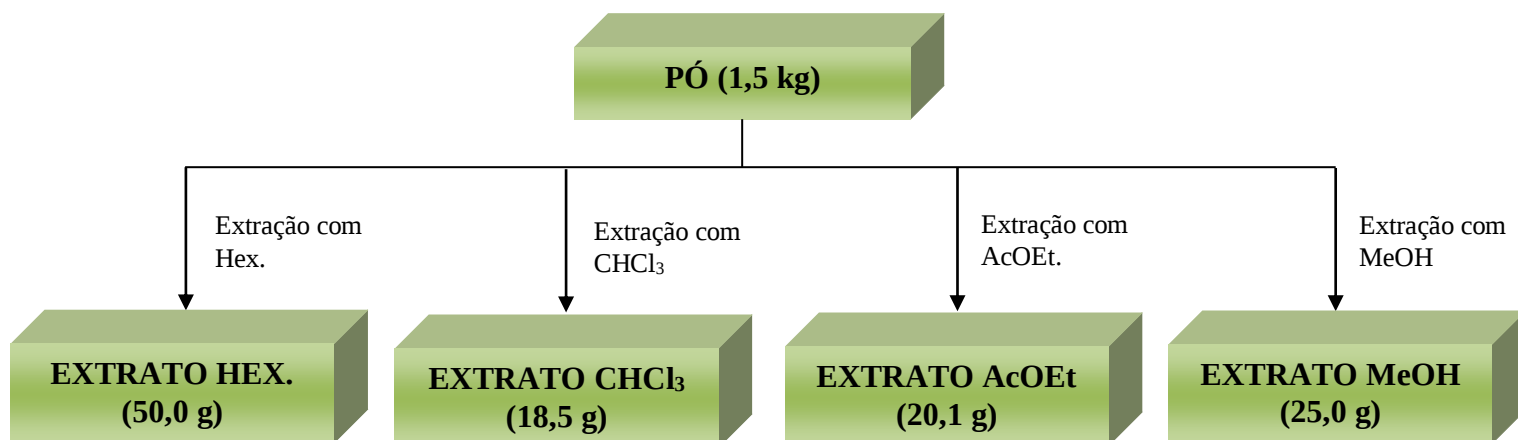
Outra alíquota do extrato metanólico (1,0 g) foi submetido a uma CC utilizando sephadex e como eluente MeOH (100%), obtendo-se 43 frações. Após análise em CCDA, estas frações foram reunidas em cinco grupos (Fr.1-12; Fr.13-15; Fr.16-20; Fr.22-32; Fr.33-43). A fração Fr.13-15 foi submetida novamente a uma CC utilizando sephadex nas mesmas condições anteriores, obtendo-se 12 frações. A fração Fr. 13-15.7, após análise em CCDA foi codificada como Cd-12 (Esquema 6, pág. 56).

Todas as frações foram encaminhadas para análise espectral de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, quando necessário.

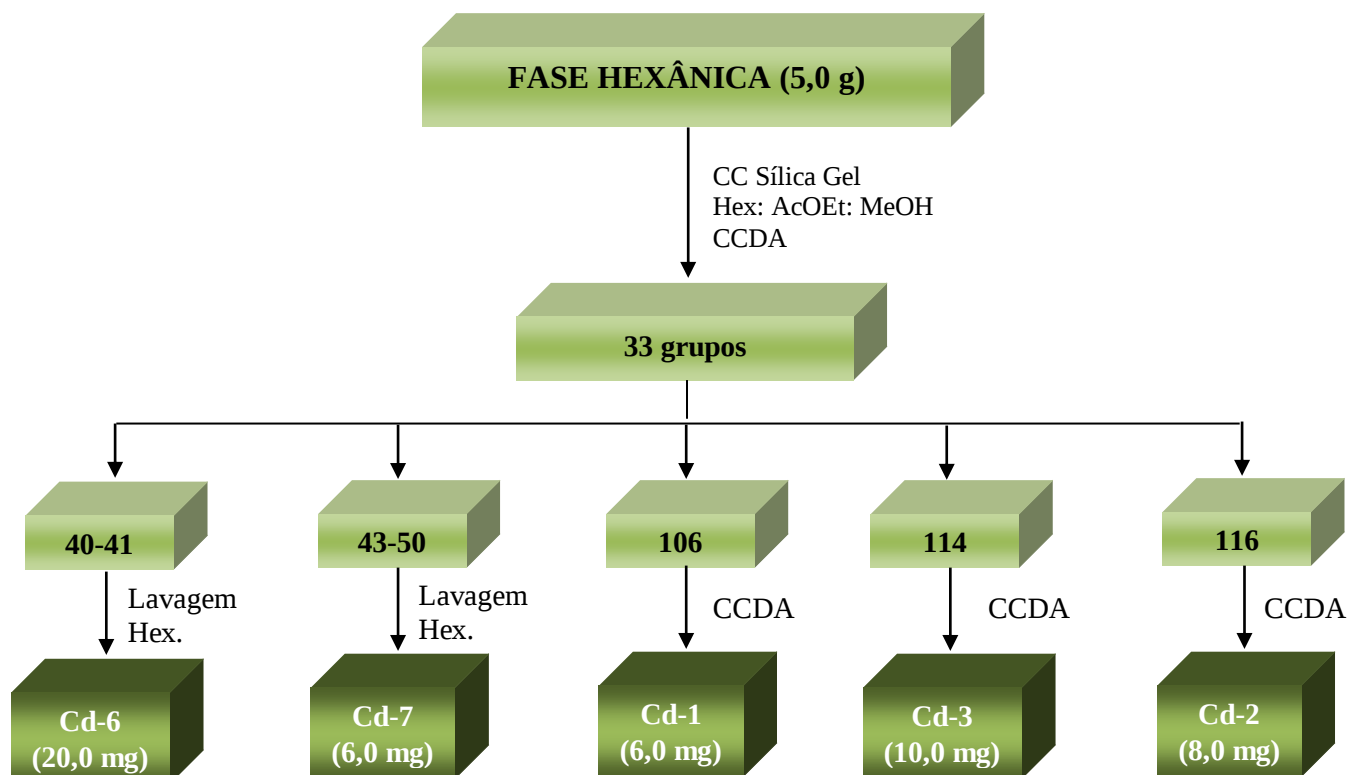
Esquema 1. Obtenção e particionamento do Extrato Etanólico Bruto de *Combretum duarteanum*



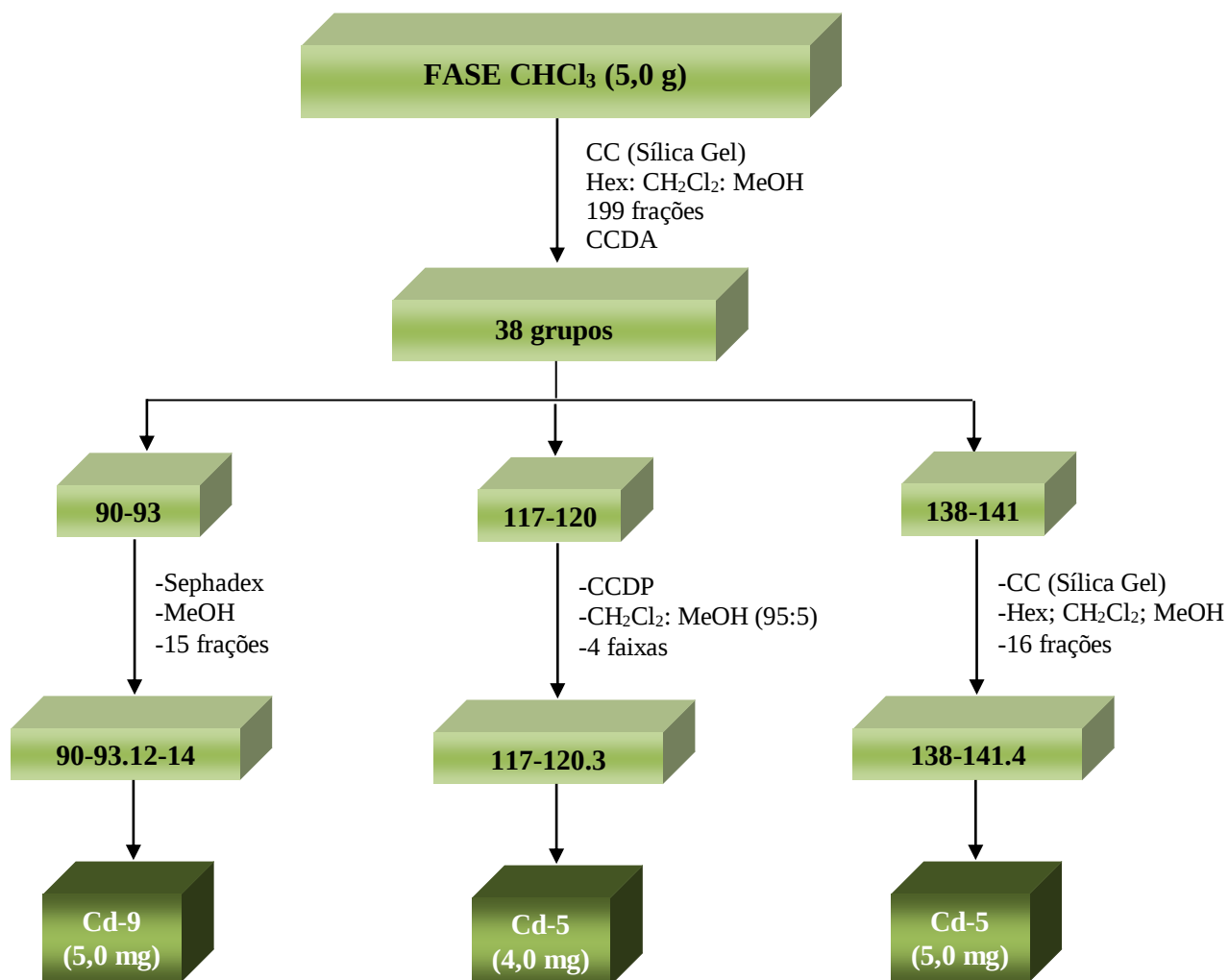
Esquema 2. Obtenção dos Extratos Brutos de *Combretum duarteanum*



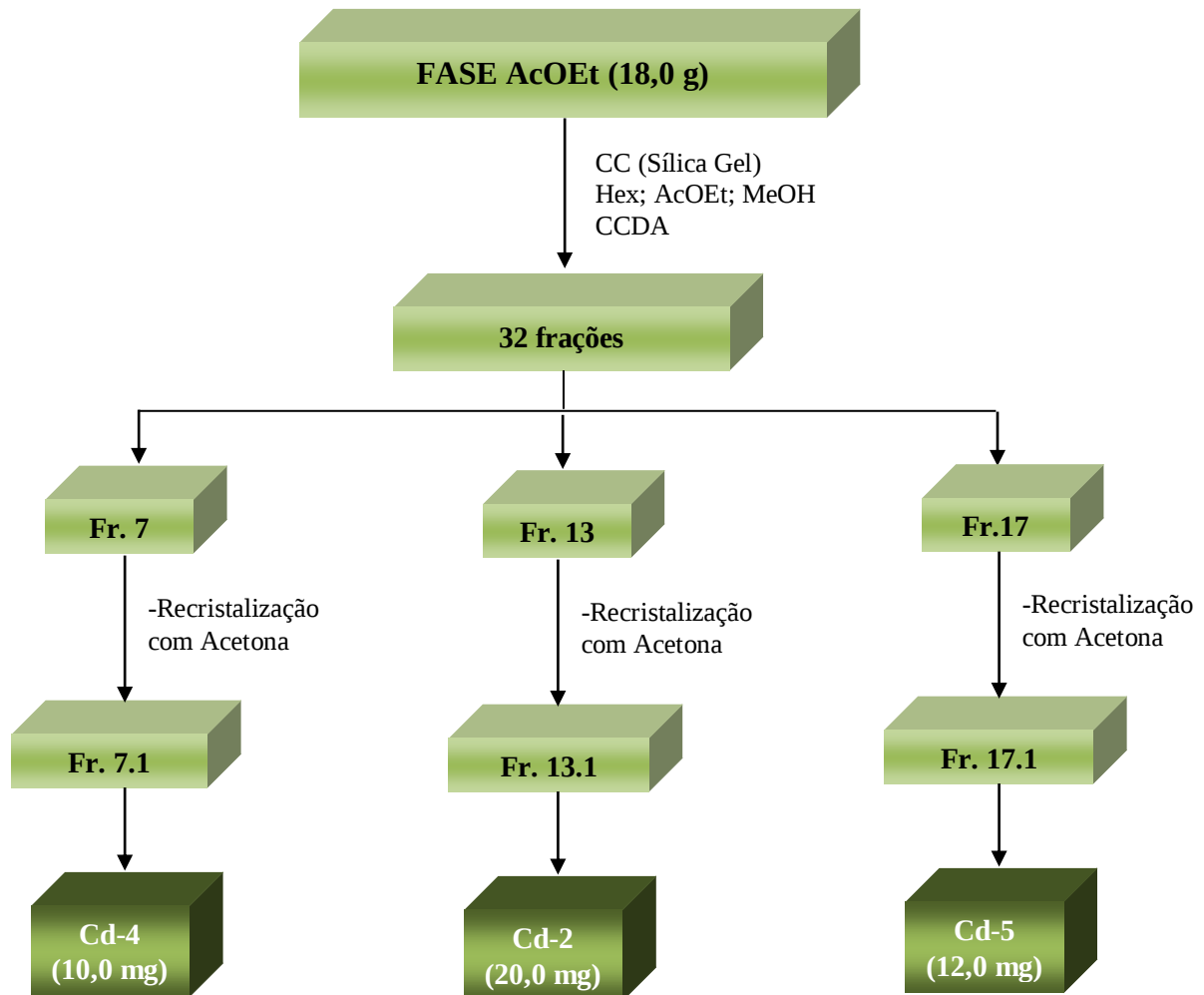
Esquema 3. Fracionamento da Fase Hexânica das folhas de *Combretum duarteanum*.



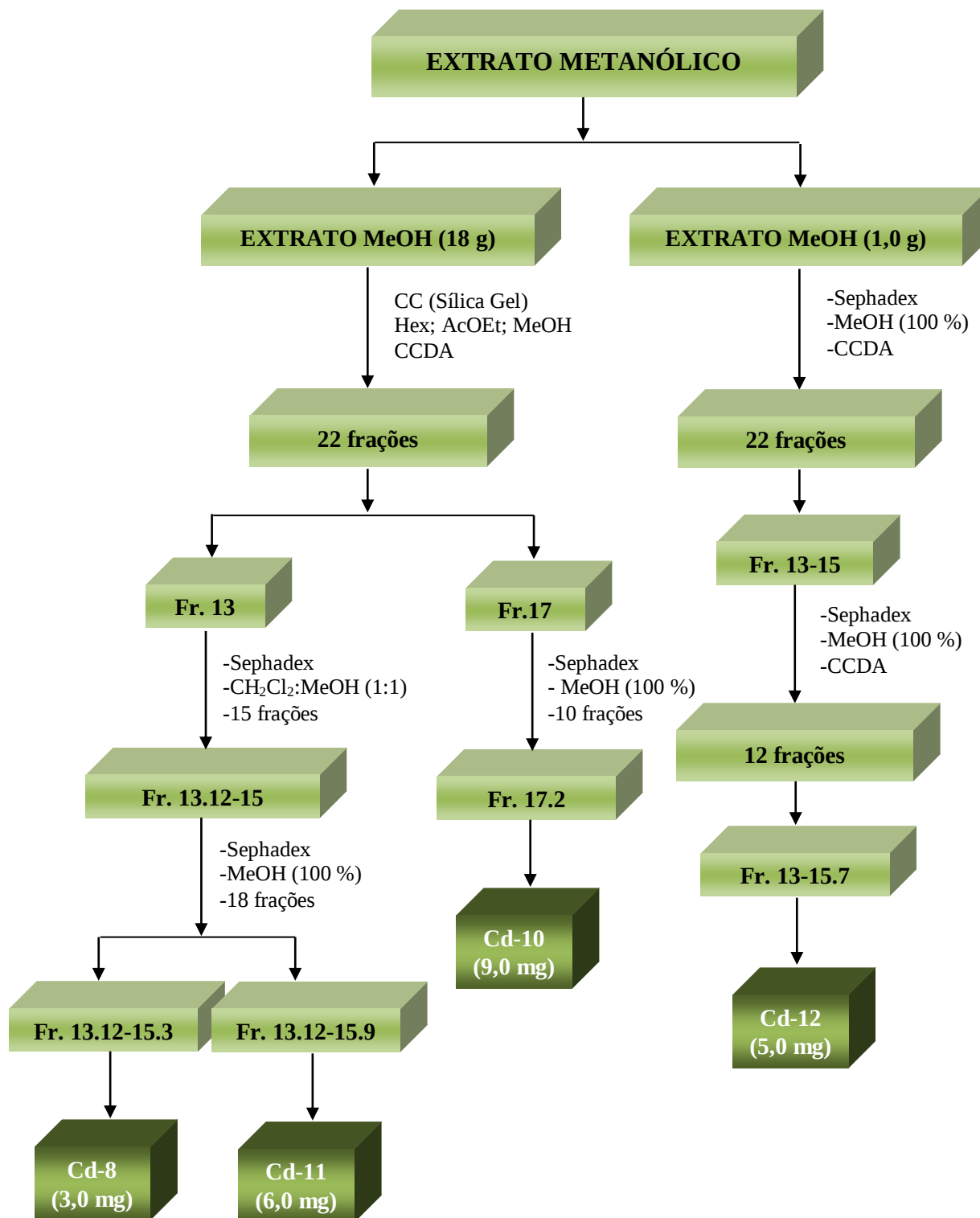
Esquema 4. Fracionamento da Fase Clorofórmica das folhas de *Combretum duarteanum*.



Esquema 5. Fracionamento da Fase Acetato de Etila das folhas de *Combretum duarteanum*



Esquema 6. Fracionamento da Fase Metanólica das folhas de *Combretum duarتمان*



4.3 Estudos Farmacológicos

4.3.1 Estudo Antimicrobiano

Diante do estudo de Nascimento *et al.* (1990), que relatou uma atividade antimicrobiana para o extrato etanólico bruto de *Combretum duarteanum*, decidiu-se a realização do screening microbiológico com outros extratos e substâncias isoladas, dentre eles, extrato hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico, bem como, as substâncias Cd-2, Cd-5 e Cd-10. O estudo antimicrobiano foi realizado no Laboratório de Micologia – UFPB, sob a orientação de Prof^a. Edeltrudes Lima.

O screening microbiológico realizou-se com base na técnica de microtitulação com placa contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” (ALAMAR®) (KONEMAN *et al.*, 1993; HADACEK; GREGER, 2000; SANTOS; HAMDAN, 2005; ALVES, 2006). Dividindo a placa ao meio, metade dela foi adicionada 100 µL do meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose duplamente concentrado e na outra metade foi adicionado 100 µL do meio líquido de caldo nutriente.

Posteriormente, 100 µL da emulsão das fases e substâncias, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades horizontais, tendo estes atingido concentração inicial de 1024 µg / mL. Por fim, adicionou-se 10 µL do inóculo das espécies bacterianas (2×10^6 UFC / mL): *Staphylococcus epidermides* – ATCC-12228, *Staphylococcus aureus* – ATCC-13150, *Staphylococcus aureus* – ATCC-25923, *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC-25853, *Escherichia coli* –ATCC-11105 e *Escherichia coli* –ATCC-25922; e as espécies fúngicas: *Candida albicans* – LM 111, *Candida albicans* – LM 109, *Candida tropicalis* – LM 6, *Candida tropicalis* – ATCC 13803, *Candida Krusei* – LM 08 e *Candida Krusei* – LM 13. Todas as espécies foram colocadas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa microbiana, especificamente. O ensaio realizado foi incubado a 35-37 °C, durante 24-48 horas.

Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com os micro-organismos, foram adicionados 20 µL da solução de resazurina sódica (0,01%; p/v) (SIGMA), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias. Foi feita uma nova incubação a 35-37 °C. A leitura se procedeu, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão). E também pela observação da mudança da coloração da solução,

de azul para rosa, indicando crescimento do mesmo (ALLEGRIANI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973; MANN e MARKHAM, 1998; PALOMINO *et al.*, 2002).

4.3.2 Estudo Antitumoral

A análise de que algumas espécies de *Combretum* apresentaram excelente atividade antitumoral e citotóxica (*C. apiculatum*, *C. cafferum*, *C. collinum*, *C. fruticosum*, *C. psidioides*, dentre outras) (LIMA *et al.*, 2013), incentivou o estudo com *Combretum duarteanum*. O estudo antitumoral foi realizado no LABETOX UFPB sob a coordenação de Prof^a. Dr^a. Mariana Vieira Sobral Castelo Branco, utilizando-se as substâncias Cd-2, Cd-5, Cd-9 e Cd-10.

4.3.2.1 Linhagem de células tumorais

Para os ensaios *in vitro*, utilizaram-se as linhagens de carcinoma ascítico de Ehrlich, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/UNICAMP). As células foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus musculus*) no Biotério Prof. Thomas George, sendo realizado repique semanal.

4.3.2.2 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich

Células da linhagem carcinoma ascítico de Ehrlich foram utilizadas para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. As células foram coletadas da cavidade peritoneal do camundongo com sete dias de inoculação, suspensas com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e em seguida centrifugadas à 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Nutricell®) suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Nutricell®). As células tumorais foram então semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware®) e incubadas com diferentes concentrações (10 - 500 µg/mL) de Cd-2 e Cd-5 por 24 h (37 °C e 5 % CO₂). O óleo essencial foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt CHEMICALS®) e então em meio RPMI-1640 suplementado. A

concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,5%. O experimento foi realizado em quadruplicata e repetido duas vezes. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich®).

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado espectrofotometricamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Melo *et al.* (2003), com algumas modificações. Na placa de 96 poços com as células sob 24 h de tratamento, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 h (37 °C e 5% CO₂), o sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se aos 96 poços, 100 µL de etanol absoluto para solubilizar o formazan produzido. A placa foi então agitada por 15 minutos e a absorbância lida em 570 nm. O cálculo da concentração da droga que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI₅₀) foi realizado através da determinação da percentagem de células viáveis com base na seguinte fórmula:

$$\%Viabilidade\ celular = \frac{[(DO_{Células\ tratadas} - DO_{Branco})]}{[(DO_{Controle\ negativo} - DO_{Branco})]} \times 100$$

Onde:

DO_{Células tratadas} = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO_{Controle negativo} = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DO_{Branco} = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

4.3.2.3 Análise estatística

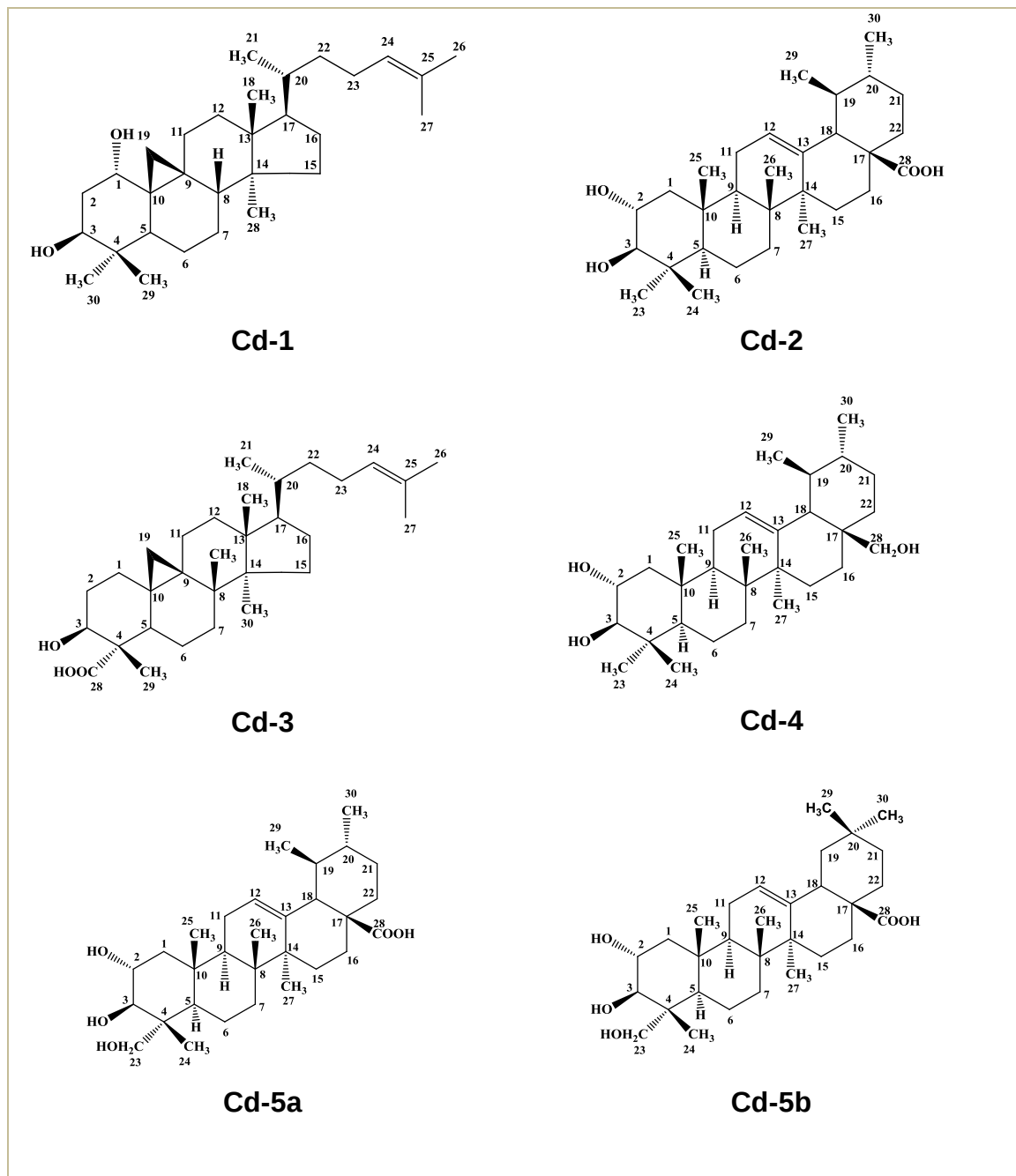
Para os ensaios *in vitro* com eritrócitos, foram realizados três experimentos em triplicata. Os valores de CI_{50} foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussões

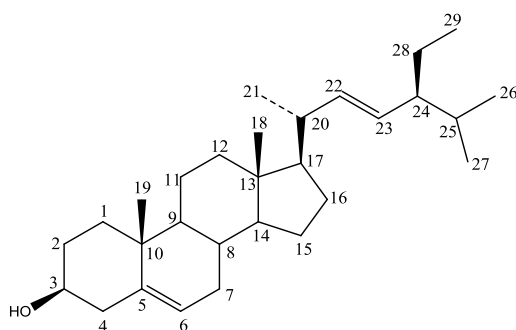
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo fitoquímico das folhas de *Combretum duarteanum* resultou na identificação de 13 substâncias, sendo 2 substâncias isoladas em mistura (Quadro 3, pag. 62).

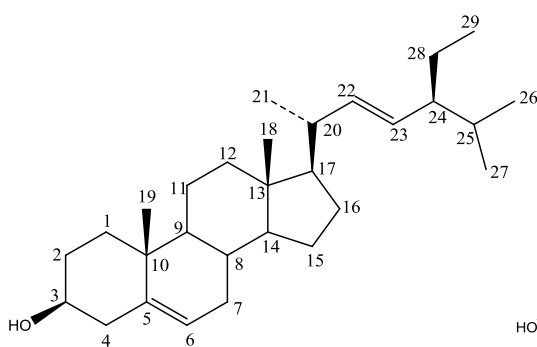
Quadro 3. Substâncias isoladas das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess.



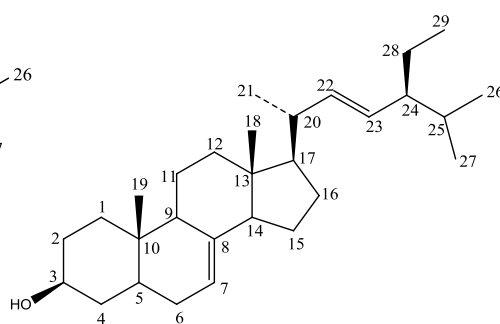
Continuação Quadro 3...



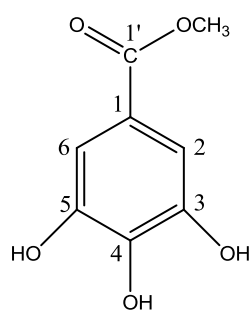
Cd-6



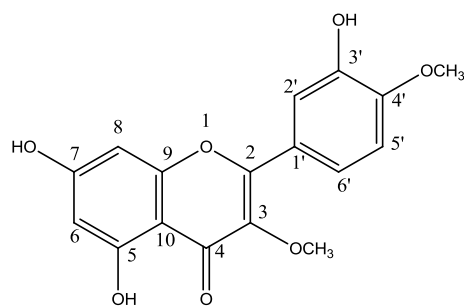
Cd-7a



Cd-7b

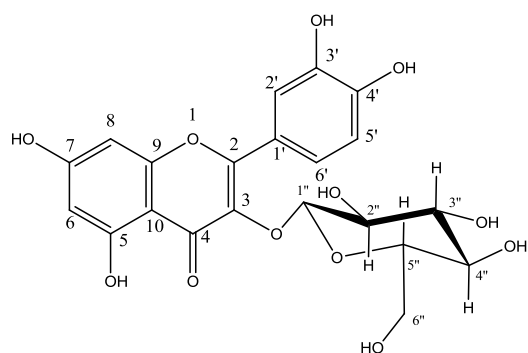


Cd-8

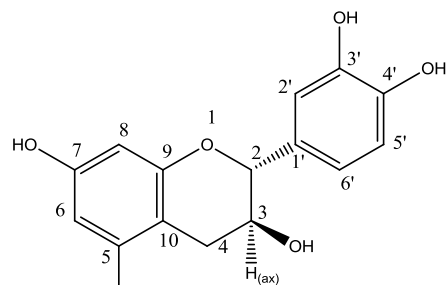


Cd-9

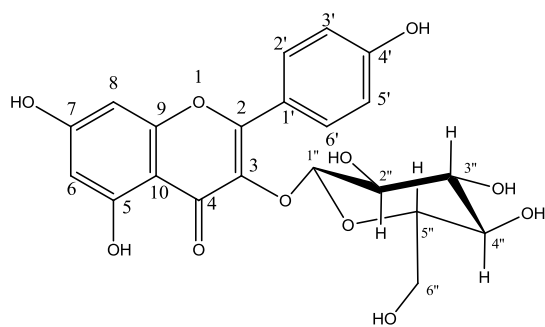
Continuação Quadro 3...



Cd-10



Cd-11



Cd-12

5.1 Identificação estrutural de Cd-1

A substância codificada como Cd-1 foi obtida na forma de um pó amorfo, com massa de 6,0 mg.

O espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3), revelou a presença de trinta sinais (Figuras 4-6, pág. 70 e 71), dos quais seis referentes a carbonos quaternários, sete a carbonos metínicos, dez a carbonos metilênicos e sete a carbonos metílicos, sugerindo, tratar-se de um esqueleto triterpênico (MAHATO; KUNDU, 1994).

Observou-se neste espectro sinais em δ_{C} 125,1 e δ_{C} 130,8, referentes a carbonos sp^2 metínico e não hydrogenado, respectivamente, assim como um sinal em δ_{C} 30,0 atribuído ao carbono metilênico. Segundo a literatura, os dois primeiros sinais são atribuídos aos carbonos C-24 e C-25, propondo a presença de uma dupla ligação entre esses carbonos, e o sinal em δ_{C} 30,0 atribuído ao carbono C-19, o que sugere a presença de um triterpeno do tipo cicloartano (SHEN et al., 2008). Observaram-se também dois carbonos oximetínicos em δ_{C} 73,5 e δ_{C} 73,6, atribuídos aos carbonos C-1 e C-3, respectivamente. As inserções das hidroxilas foram obtidas com base em informações da literatura (AHMAD; RAHMAN, 1994) de que triterpenos nos quais as hidroxilas estão ausentes os carbonos C-1, C-2 e C-3 absorvem em δ_{C} 39,9; δ_{C} 19,2 e δ_{C} 42,2, respectivamente. Quando as hidroxilas estão presentes em C-1 e C-3, estes carbonos absorvem na faixa entre δ_{C} 75,8 – 70,0 e δ_{C} 79,8 - 72,0, respectivamente.

Para a definição da estereoquímica, observou-se que quando as hidroxilas em C-1 e C-3 encontram-se em posição equatorial, estes carbonos absorvem aproximadamente em δ_{C} 75,7 e δ_{C} 79,5, respectivamente. Quando ambas hidroxilas encontram-se em posição axial, C-1 e C-3 absorvem aproximadamente em δ_{C} 70,2 e 75,4, respectivamente. Entretanto, quando a hidroxila em C-1 encontra-se axial e em C-2 encontra-se equatorial, estes carbonos absorvem aproximadamente em 72,9 e 72,0 (AHMAD; RAHMAN, 1994). De acordo com os deslocamentos químicos, pode-se inferir que as hidroxilas em C-1 e C-3 encontram-se axial e equatorial, respectivamente (Figura 3, pág. 65).

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 7, pág. 71) apresentou um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_{H} 0,3 – 2,2 característicos de substâncias pertencentes a classe dos terpenoides (SILVERSTEIN et al., 2007;

PAVIA et al., 2012). As expansões deste espectro (Figura 8 e 9, pág. 71 e 72) evidenciaram a presença de um hidrogênio olefínico em δ_H 5,05 (t, $J = 7,0$ Hz), atribuído a H-24, e dois hidrogênios oximetínicos em δ_H 3,52 (sl), e em δ_H 3,68 (dd, $J = 4,8; 11,8$ Hz), confirmando a presença das hidroxilas em OH-1 e OH-3. Observaram-se seis metilas terciárias em δ_H 0,73; 0,81; 0,84; 0,93; 1,55; 1,63 e uma metila secundária em δ_H 0,88 (d, $J = 5,0$ Hz), atribuída aos H-21. O espectro mostrou ainda a presença de dois dupletos em δ_H 0,64 (d, $J = 4,6$ Hz) e δ_H 0,40 (d, $J = 4,6$ Hz), característicos de hidrogênios metilênicos referentes a um núcleo ciclopropano (SHEN et al., 2008).

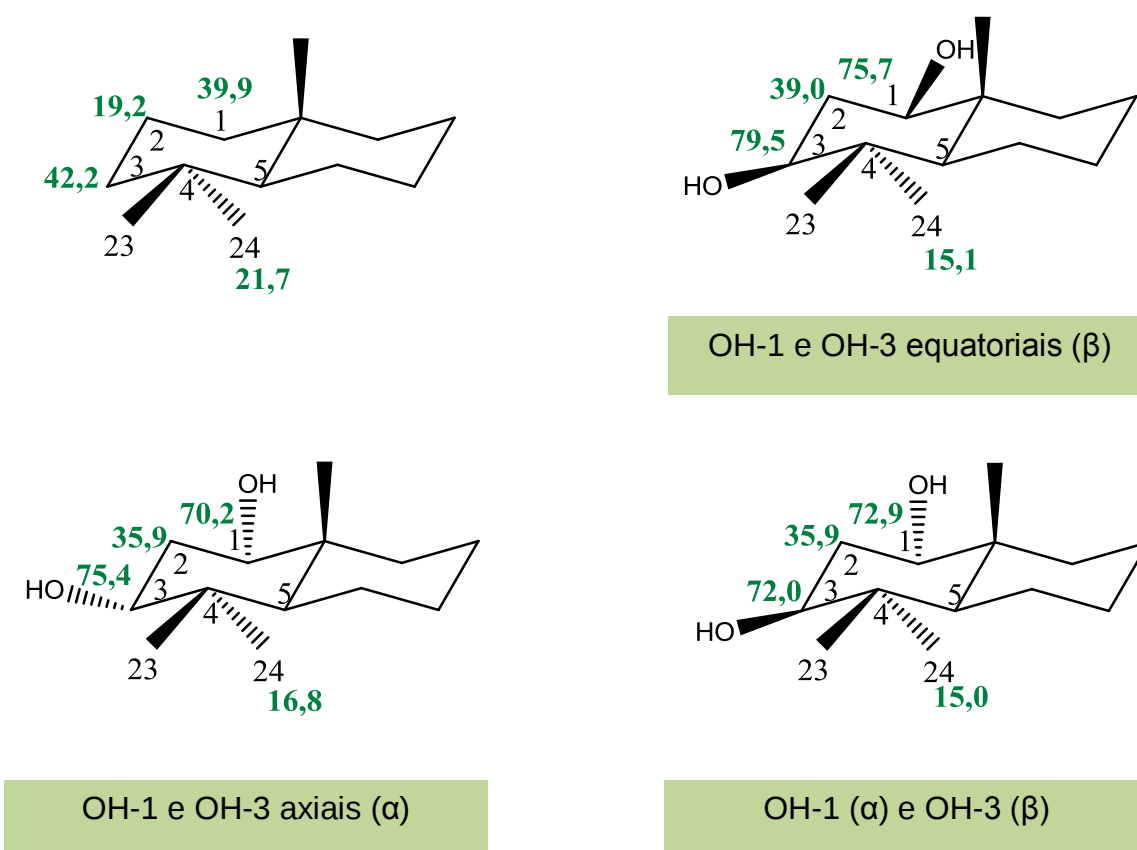
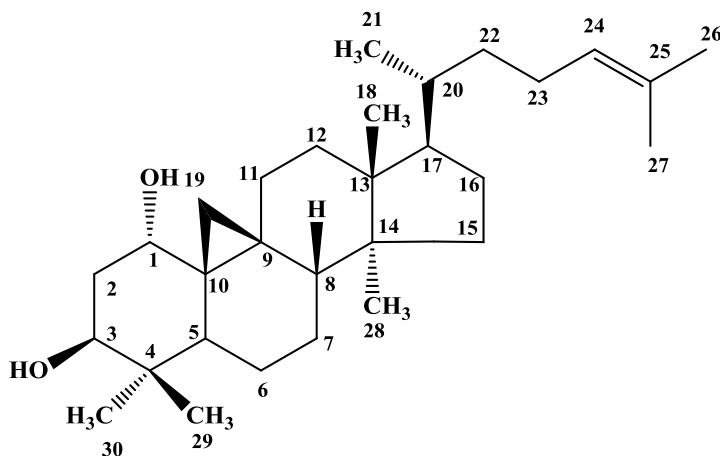


Figura 3. Deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-24 na ausência e na presença de hidroxilas com orientação α ou β .

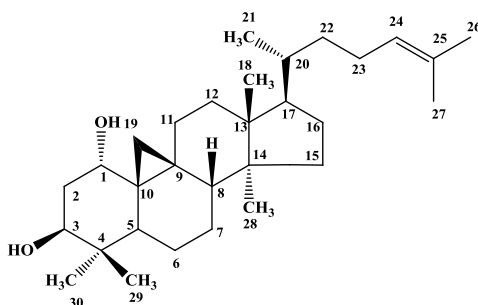
Estas informações, em conjunto com os valores de RMN ^{13}C descritos na literatura (SHEN et al., 2008) (Tabela 1, pág. 69) permitiram concluir que Cd-1 possui

a OH-1 em posição axial e a OH-3 em posição equatorial, sendo portanto identificado como um triterpeno do tipo cicloartano, o cicloartan-24-en-1 α ,3 β -diol, substância está relatada pela vez na família Combretaceae.



Cicloart-24-eno-1 α ,3 β -diol

Tabela 1. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância **Cd-1** (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelo (**Mo-1**) da literatura (δ , CDCl_3 , 150 MHz) (SHEN *et al.*, 2008).



	Cd-1	Mo-1
	δ_{C}	δ_{C}
C		
4	40,3	40,5
9	20,7	20,8
10	30,0	30,3
13	45,0	45,1
14	48,6	48,7
25	130,8	131,0
CH		
1	73,5	73,7
3	73,6	73,8
5	39,4	39,5
8	48,0	48,0
17	52,2	52,3
20	35,8	35,9
24	125,1	125,2
CH₂		
2	36,4	36,6
6	20,7	20,8
7	24,8	25,8
11	25,9	26,1
12	32,7	32,8
15	35,5	35,7
16	28,2	28,1
19	30,0	30,0
22	36,4	36,3
23	24,8	24,9
CH₃		
18	18,0	18,2
21	18,0	18,2
26	17,7	17,6
27	25,5	25,7
28	19,5	19,4
29	25,2	25,1
30	13,2	13,0

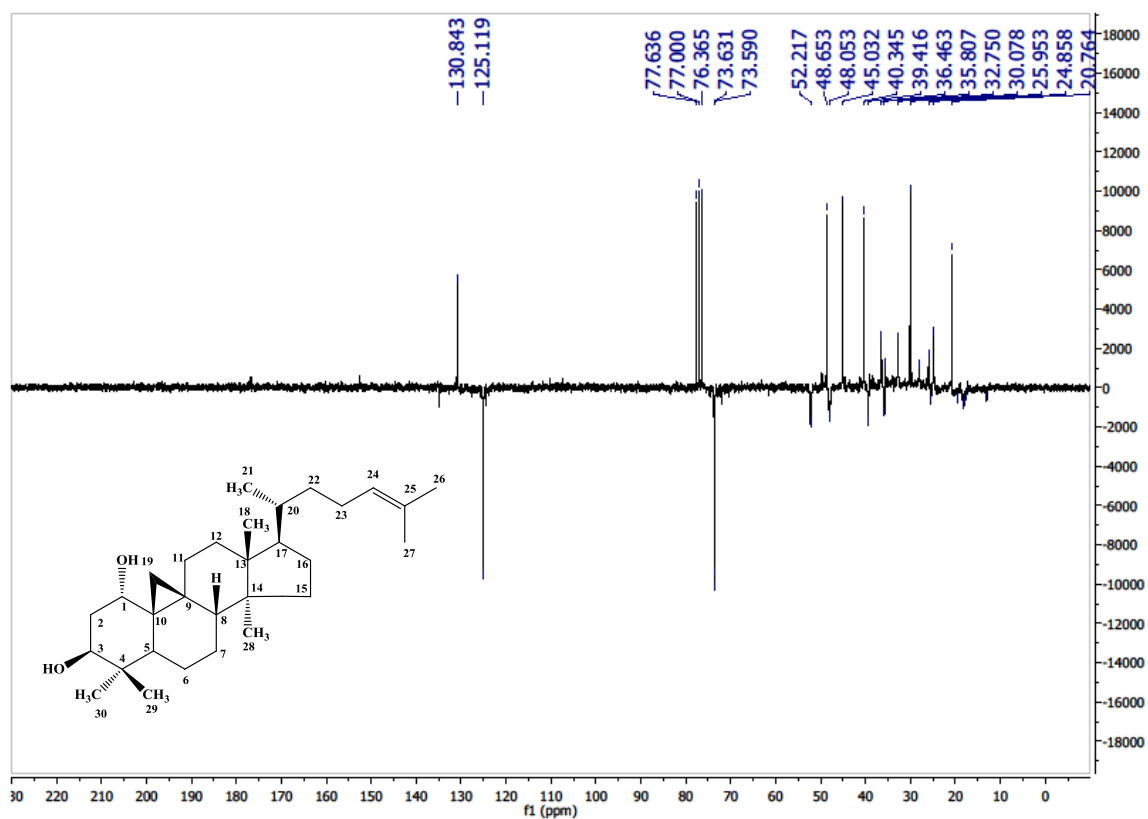


Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl_3

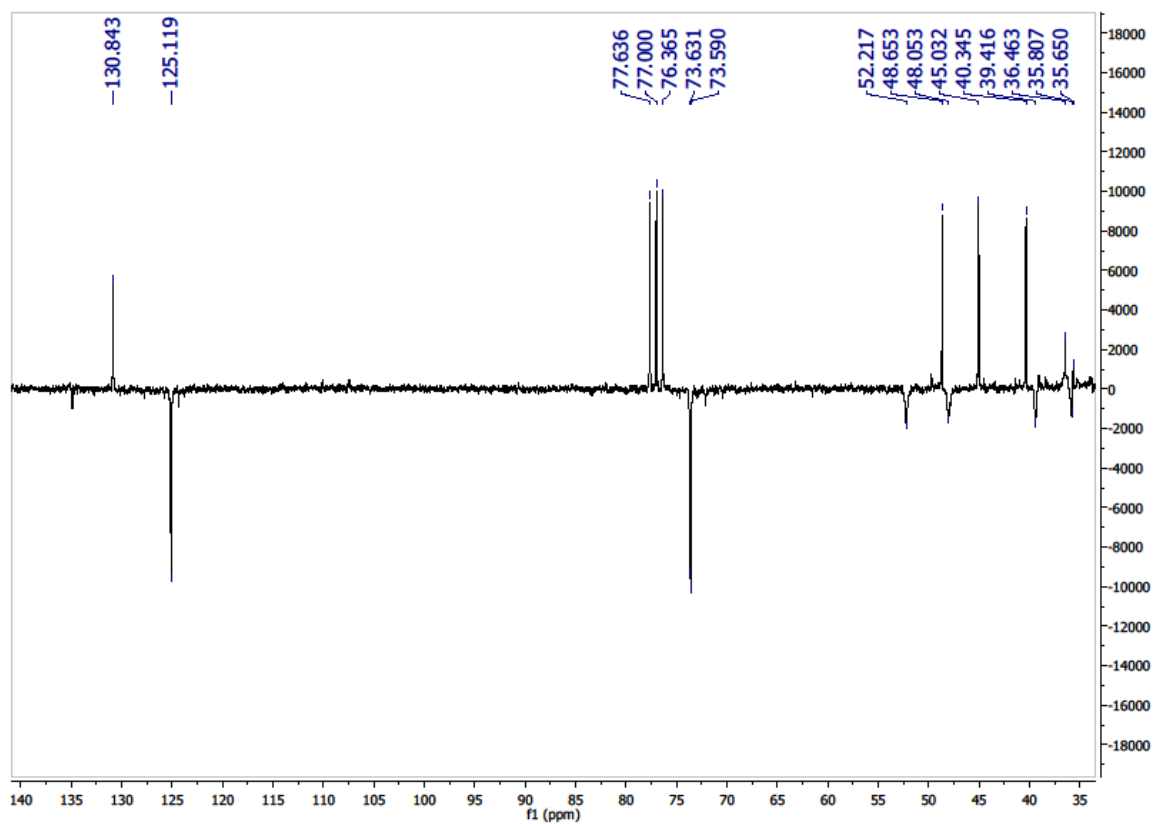


Figura 5. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl_3

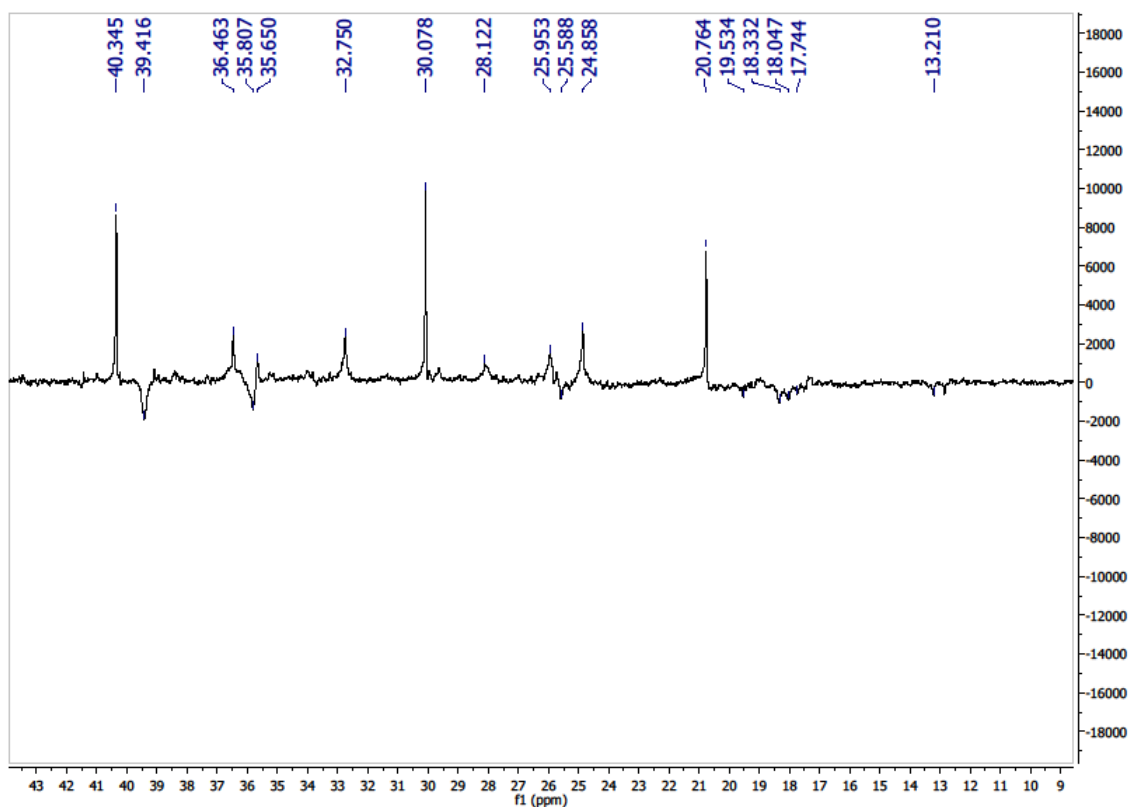


Figura 6. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl_3

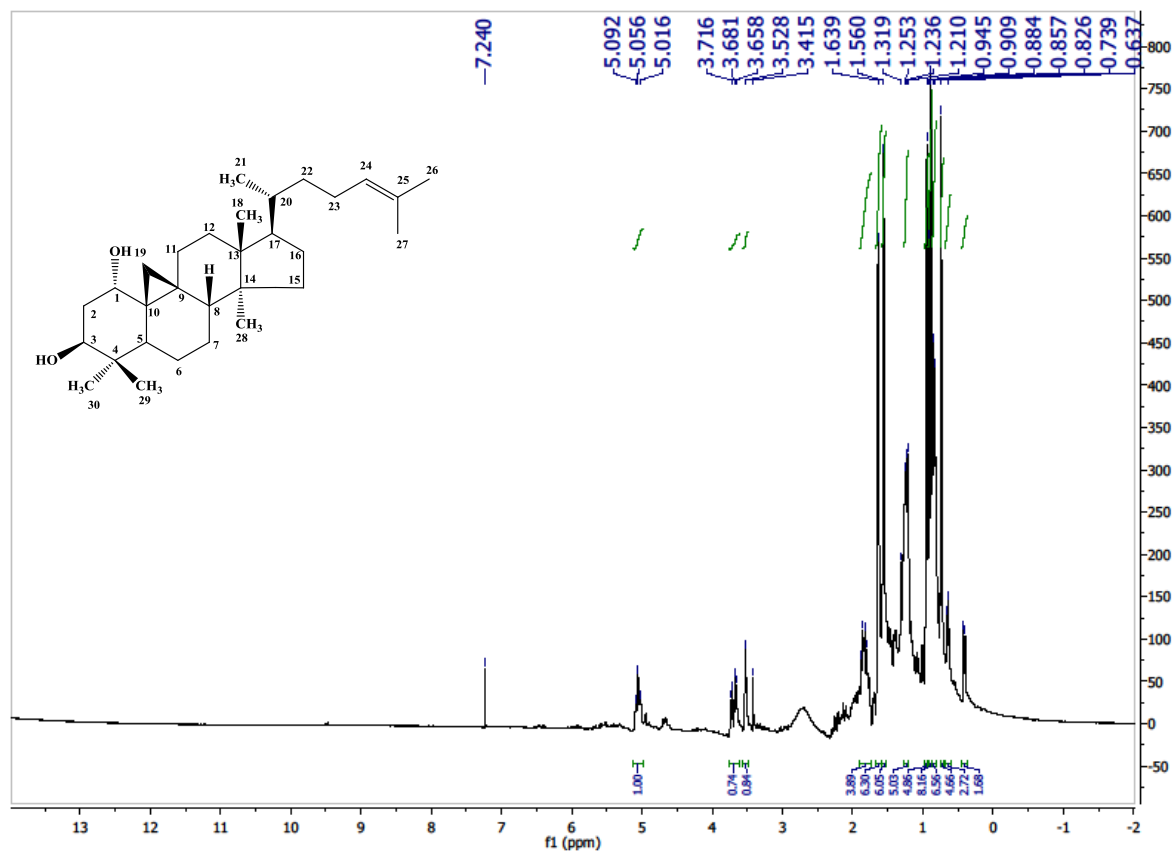


Figura 7. Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl_3

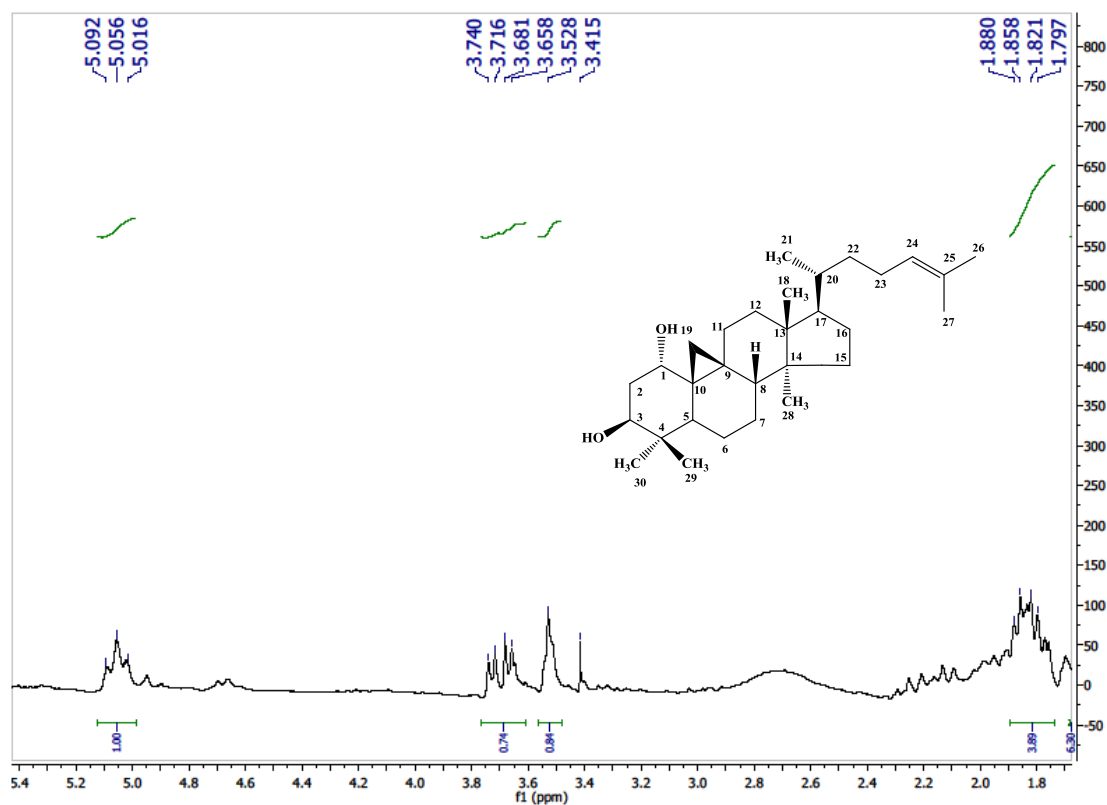


Figura 8. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl_3

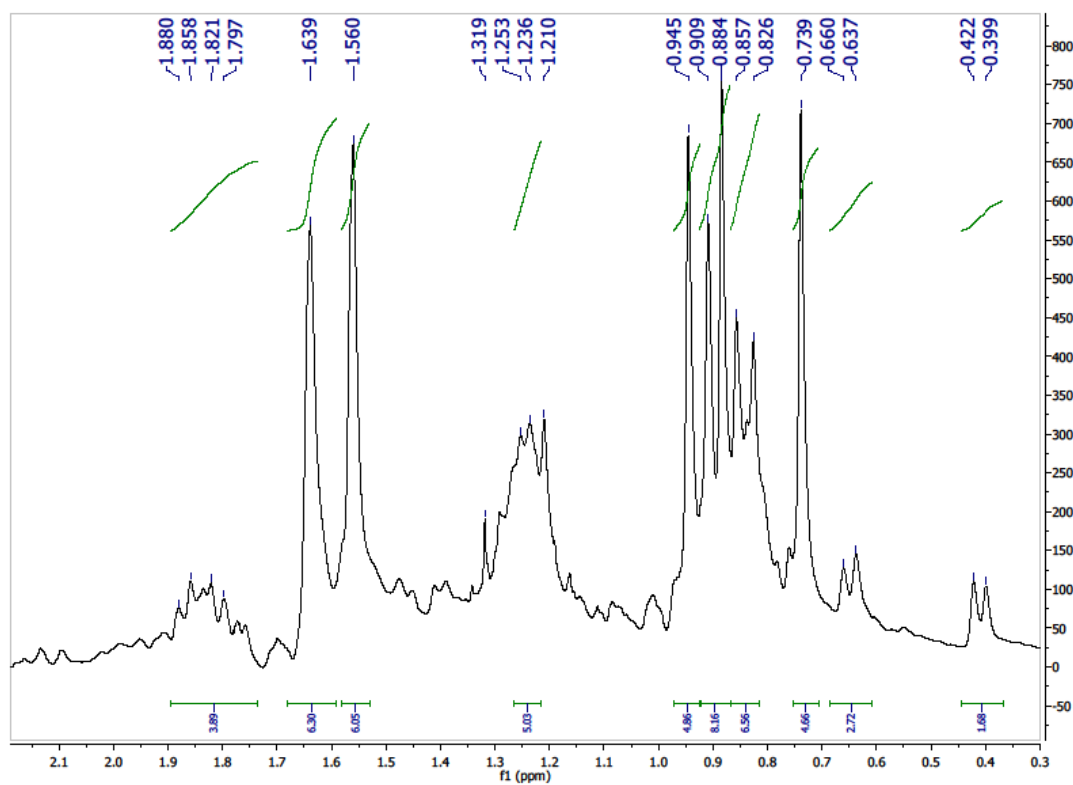


Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl_3

5.2 Identificação estrutural de Cd-2

A substância codificada como Cd-2 foi obtida na forma de um pó branco e amorfo (28,0 mg). O espectro de IV de Cd-2 (Figura 11, pág. 77) revelou bandas de absorção características de deformações axiais de grupamentos O-H (3.354 cm^{-1}), vibrações de deformações axiais de ligações C=O referente a carbonila de ácido (1.690 cm^{-1}) e C-O de álcoois (1.280 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 12, pág. 77) e suas expansões (Figura 13, pág. 78) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre δ_{H} 0,7 e δ_{H} 2,1 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp^3 presentes em estruturas como triterpenos e esteróides. Em δ_{H} 4,07 (ddd, $J = 4,0\ 10,0\ \text{e}\ 12,0\ \text{Hz}$) pôde-se verificar a presença de um duplo duplo duplete, atribuído ao hidrogênio da posição H-2 β , e um duplete em δ_{H} 3,38 (d, $J = 8\ \text{Hz}$) relacionado ao hidrogênio H-3 α . Absorções em δ_{H} 5,42 (sl) e δ_{H} 2,57 (d, $J = 10\ \text{Hz}$) foram atribuídas aos H-12 e H-18, respectivamente. As absorções em δ_{H} 0,78, 0,98, 0,99, 1,00, 1,09, 1,22 e 1,29 relacionados aos hidrogênios metílicos, sugeriram a presença de um núcleo triterpênico para Cd-2 (ALI *et al.*, 2007).

A análise espectral de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 14, pág. 78) e suas expansões (Figuras 15 e 16, pág. 79) revelou a presença de trinta sinais, dos quais sete referentes a carbonos quaternários, oito a carbonos metínicos, oito a carbonos metilênicos e sete a carbonos metílicos, sugerindo tratar-se de um esqueleto triterpênico pentacíclico. Os sinais em δ_{C} 125,42 e δ_{C} 139,14 sugeriram a presença de um grupamento vinílico entre os carbonos C-12 e C-13, referente a um triterpeno pentacíclico da série ursano (AHMAD; RAHMAN, 1994). Observou-se ainda a presença de um sinal para carbonila em δ_{C} 179,84 demonstrando a presença de um grupamento ácido para o composto.

As inserções das hidroxilas nos carbonos C-2 e C-3 foram obtidas com base em informações da literatura (AHMAD; RAHMAN, 1994; ALI *et al.*, 2007; WEN *et al.*, 2007). Quando os carbonos C-2 e C-3 estão hidroxilados estes absorvem na faixa entre δ_{C} 71,5 - 68,8 e δ_{C} 83,8 - 78,3, respectivamente, enquanto o carbono C-1 absorve na faixa entre δ_{C} 46,8 - 41,4.

Para a definição da estereoquímica das hidroxilas novamente recorreu-se à literatura anteriormente citada. Assim, sugere-se que o composto apresenta as

hidroxilas α e β ligadas aos carbonos C-2 e C-3, respectivamente, como pode ser observado adiante na Figura 10:

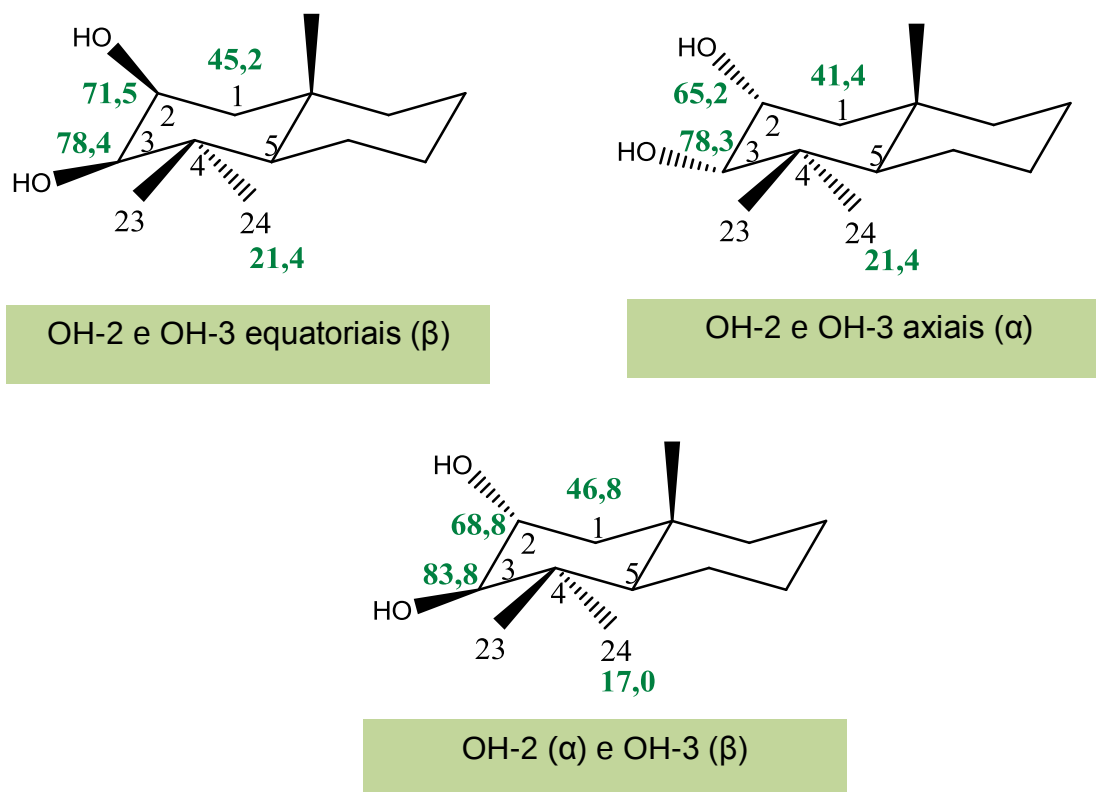
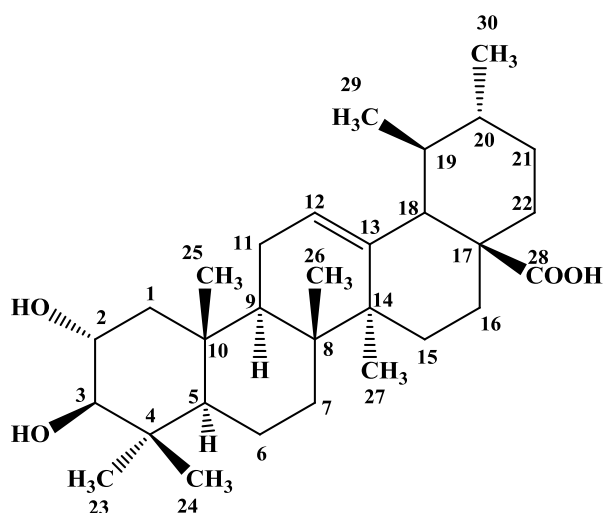


Figura 10. Deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-3, C-24 na presença de hidroxilas com orientação α ou β .

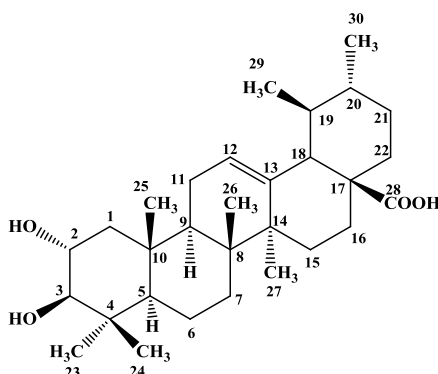
Desta forma, comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN ^{13}C de Cd-2 com modelo (Mo-2) da literatura (ALI et al., 2007) (Tabela 2, pag. 76) corroboraram para a identificação da substância como sendo o ácido 2 α ,3 β -diidroxirs-12-en-28-óico (ácido corosólico), um triterpeno da série ursano, cuja presença é bem característica em várias espécies vegetais, entretanto, sendo descrita pela primeira vez na espécie *Combretum duarteanum*.



Ácido 2 α ,3 β -urs-12-en-28-óico

O Ácido corosólico demonstrou algumas atividades farmacológicas, como um excelente inibidor dos superóxidos, sendo utilizado como anti-inflamatório (ALI *et al.*, 2007), uma potente atividade hipoglicemiante (WEN *et al.*, 2007), além de potencializar a atividade dos antimicrobianos (GARO *et al.*, 2007).

Tabela 2. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-2 (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) com modelo (Mo-2) da literatura (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz), (ALI *et al.*, 2007).



	Cd-2	Mo-2
	δ_{C}	δ_{C}
C		
4	39,74	39,5
8	39,87	39,8
10	39,27	38,4
13	139,14	138,7
14	42,39	42,4
17	47,94	47,9
28	179,33	180,9
CH		
2	67,96	68,8
3	83,14	83,8
5	55,76	55,6
9	47,89	47,8
12	125,42	125,6
18	52,85	53,2
19	37,32	39,4
20	39,34	39,2
CH₂		
1	46,02	46,8
6	18,72	18,6
7	33,36	33,2
11	23,59	23,6
15	28,50	28,3
16	24,76	24,5
21	30,93	30,9
22	38,29	37,1
CH₃		
23	29,26	28,7
24	17,35	17,0
25	16,86	17,0
26	17,42	17,0
27	23,79	23,7
29	17,63	17,0
30	21,32	21,3

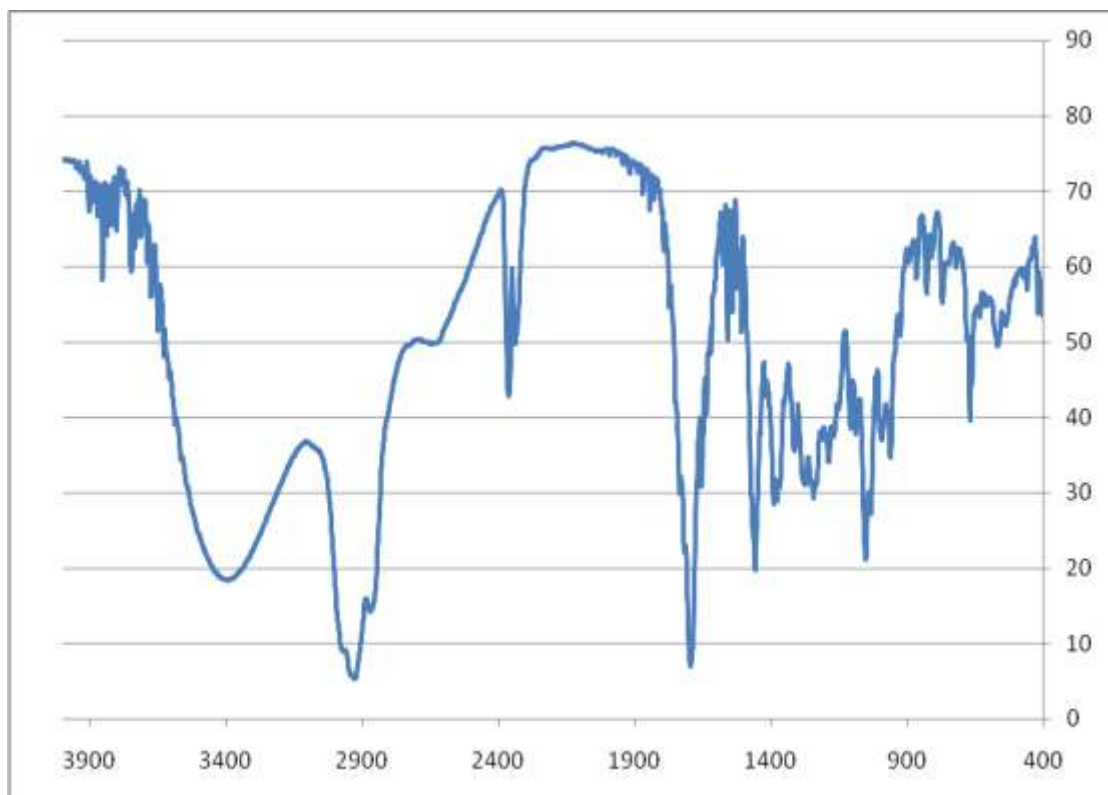


Figura 11. Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-2 em pastilhas de KBr.

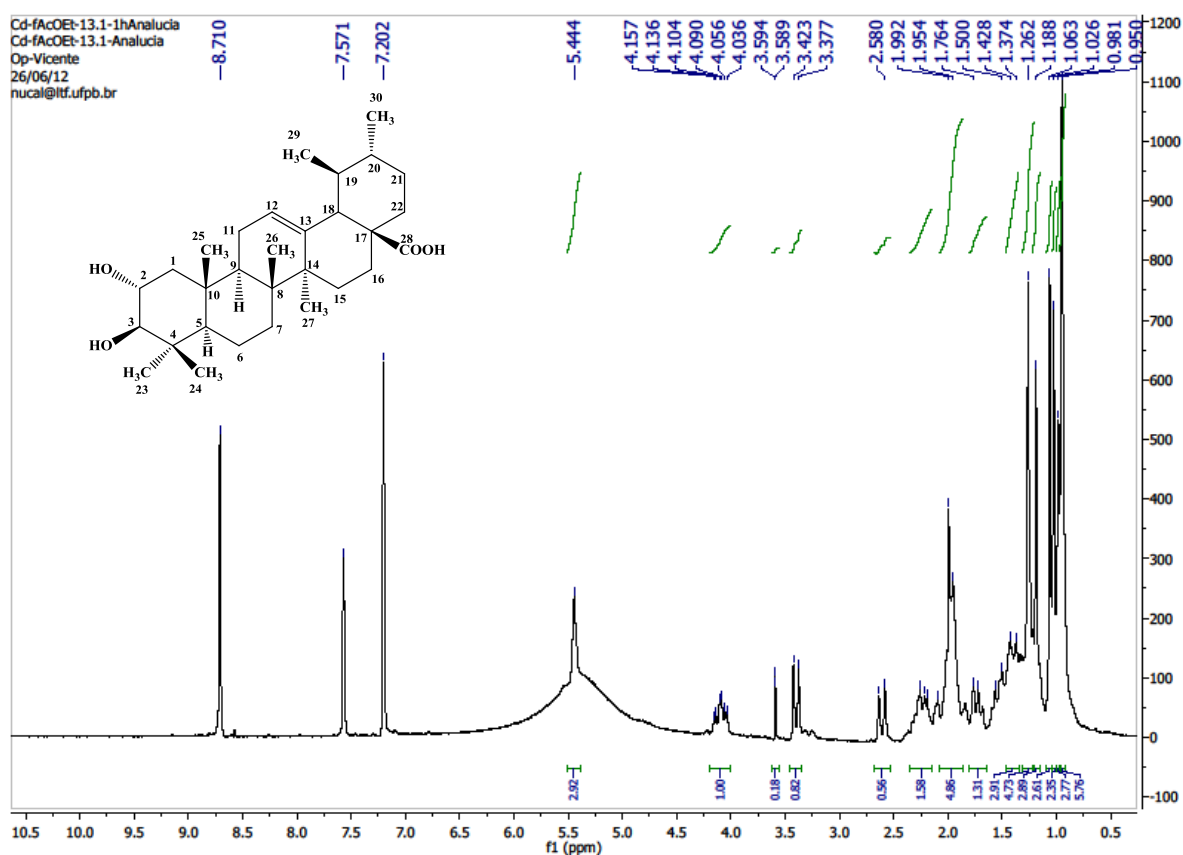


Figura 12. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

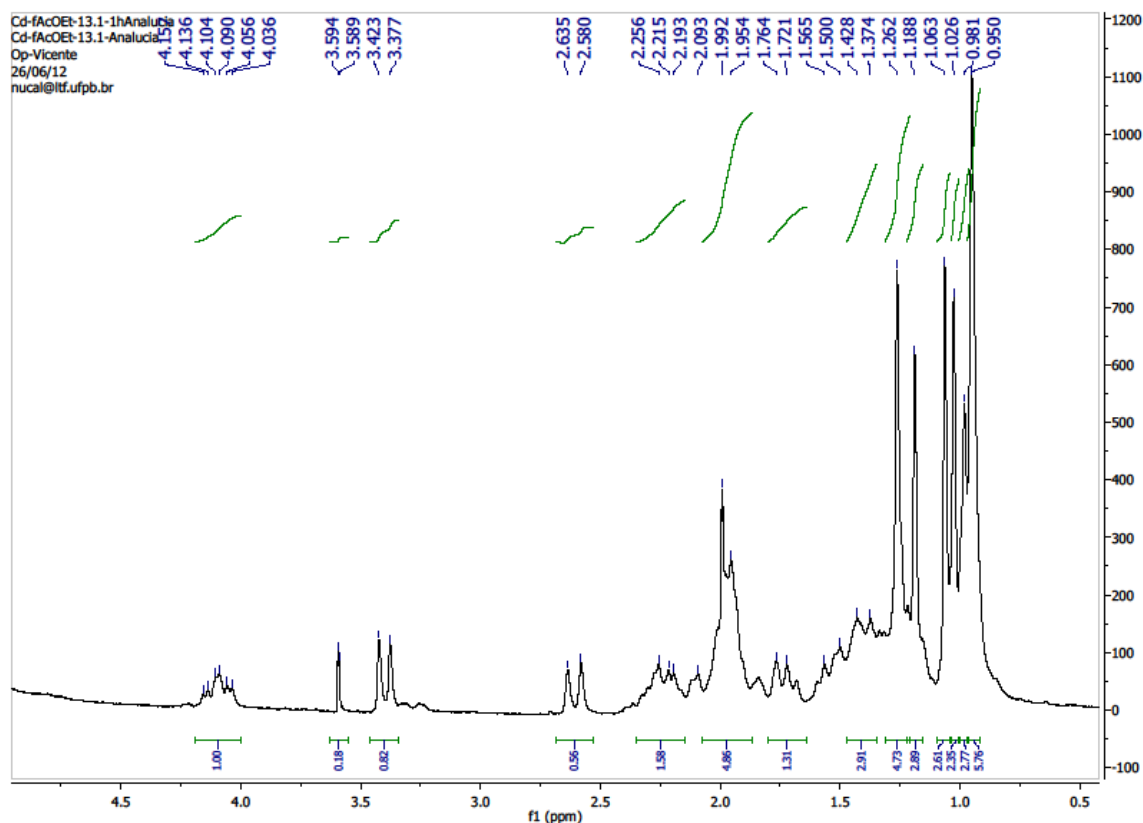


Figura 13. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

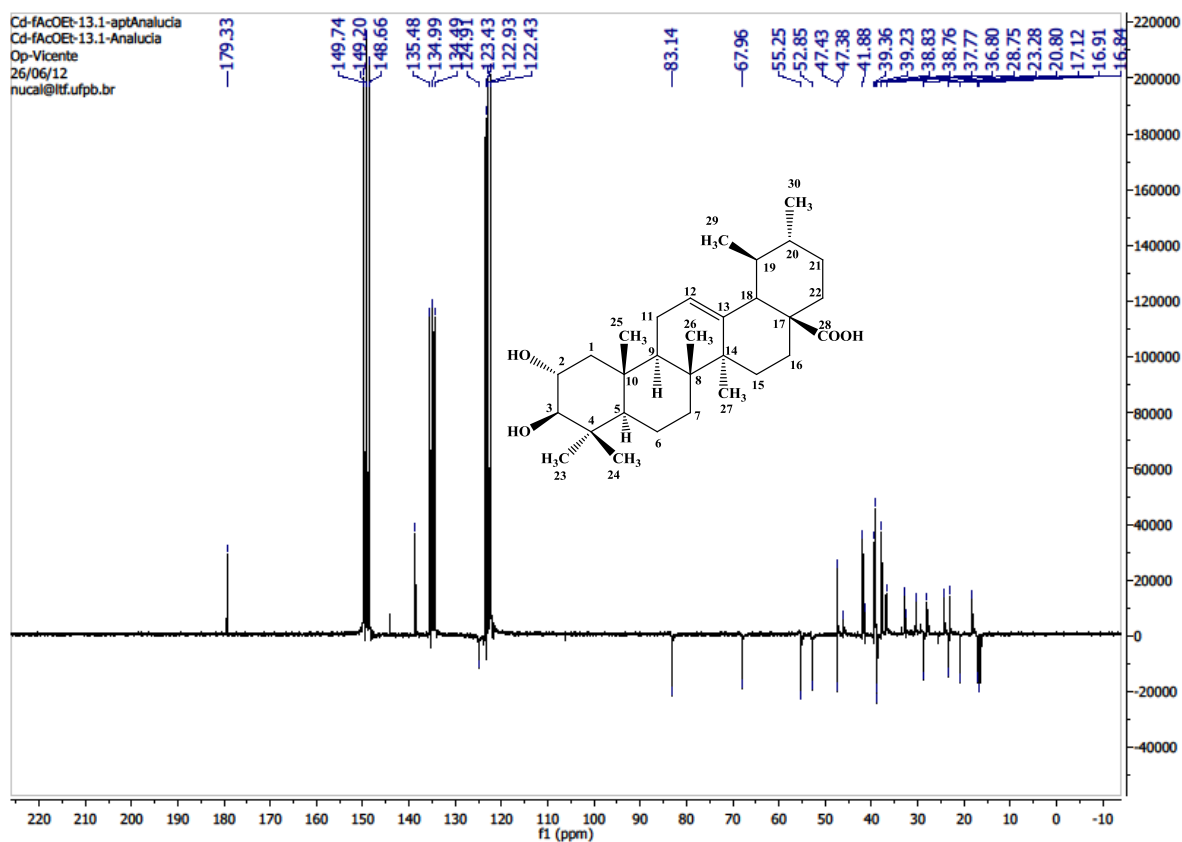


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

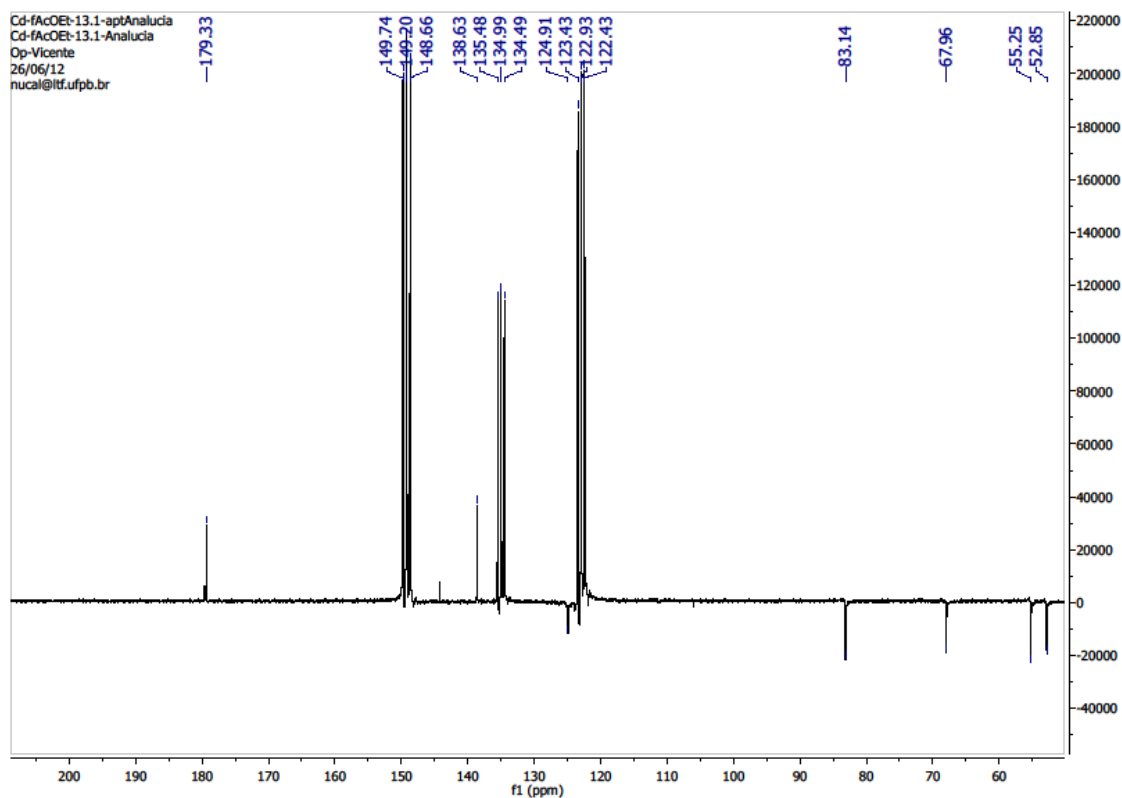


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

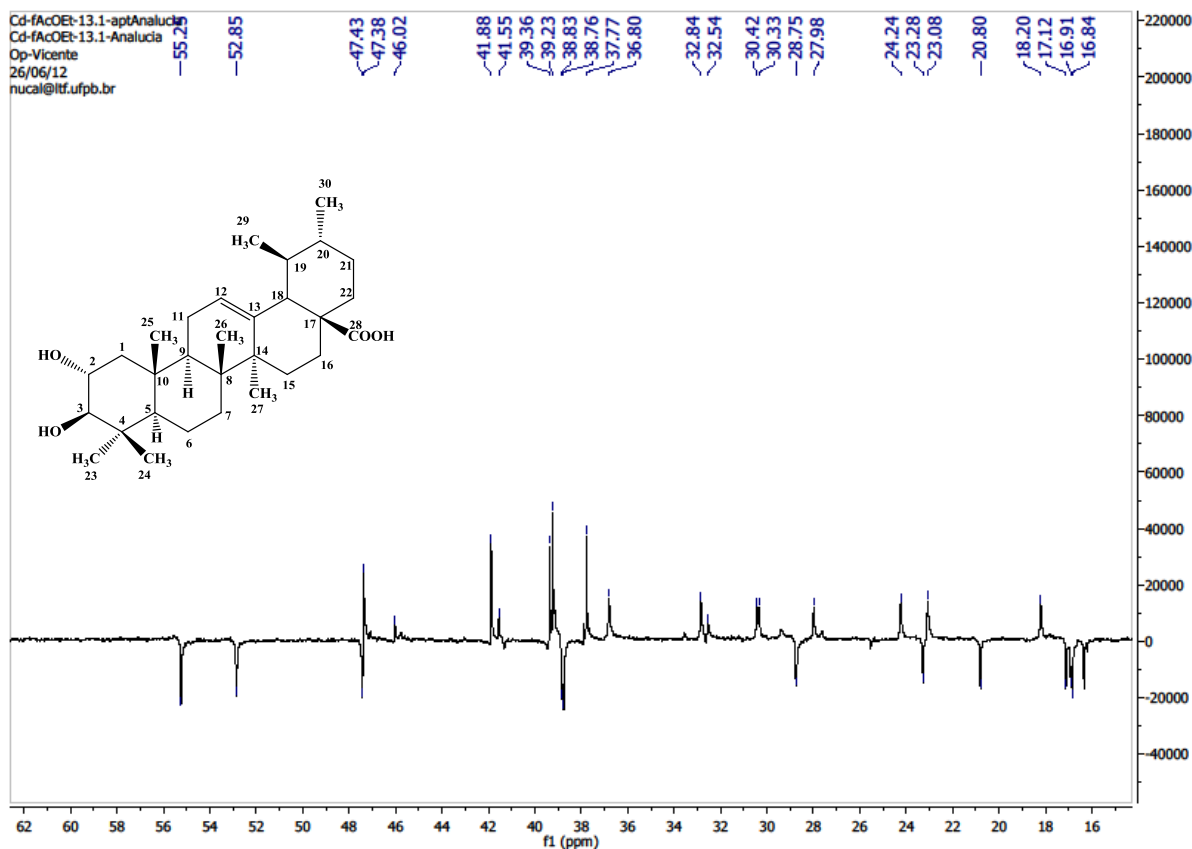


Figura 16. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-2 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

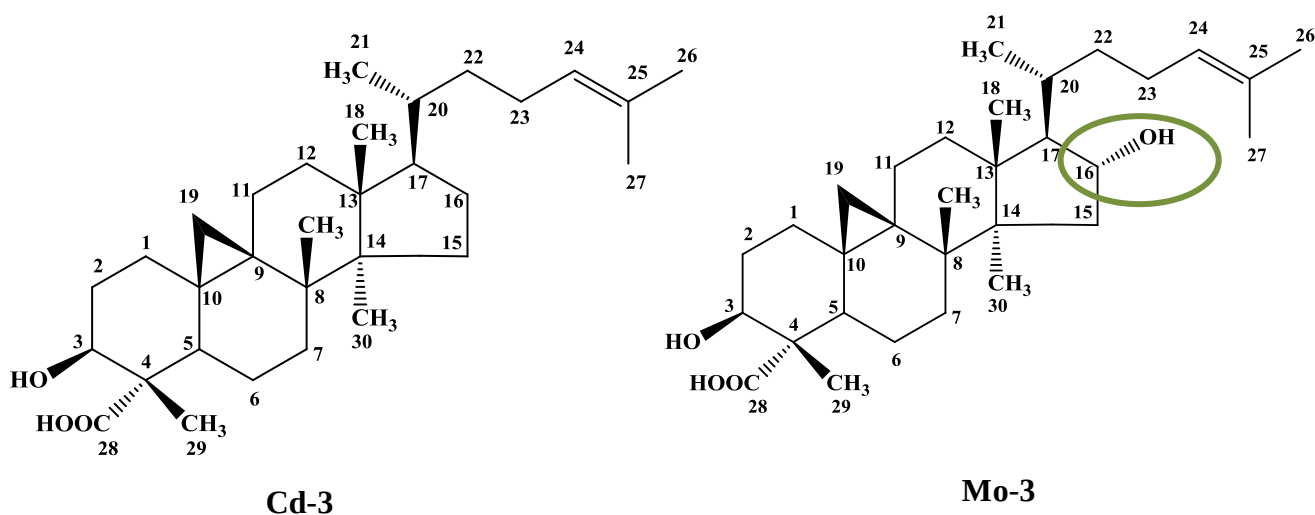
5.3 Identificação estrutural de Cd-3

A substância Cd-3 foi obtida na forma de pó amorfo (10,0 mg). O espectro RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, MeOD) de Cd-3, mostrou a presença de cinquenta linhas espectrais (Figuras 17-19, pág. 83 e 84), sugerindo que Cd-3 tratar-se-ia de uma mistura de dois triterpenos. Observaram-se sinais referentes ao composto Cd-2 e um outro composto não identificado (Cd-3). Retirando-se os sinais referentes a Cd-2, observou-se a presença de 30 sinais, dos quais sete referentes a carbonos não hidrogenados, seis a carbonos metínicos, onze a carbonos metilênicos e seis a carbonos metílicos, confirmando tratar-se de um esqueleto triterpênico (MAHATO; KUNDU, 1994).

Os sinais em δ_{C} 126,1 e δ_{C} 131,7 sugerem a presença de uma dupla ligação entre os carbonos C-24 e C-25, assim como um sinal em δ_{C} 30,5 atribuído ao carbono metilênico C-19, o que indicam a presença de um triterpeno do tipo cicloartano. Observaram-se também um carbono oximetínico em δ_{C} 76,2 atribuído ao carbono C-3. Destaca-se ainda, no espectro de RMN de ^{13}C -APT, um sinal em δ_{C} 180,8 que foi atribuído a uma carboxila de ácido.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, MeOD) (Figuras 20-22, pág. 84 e 85) mostrou absorções na região entre δ_{H} 0,8 e δ_{H} 2,3 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp^3 presentes em estruturas como triterpenos e esteróides. Ainda neste espectro, observou-se, ainda, a presença de um hidrogênio oximentínico em δ_{H} 3,65 (ddd, $J = 3,6; 8,8$ e $12,6$ Hz), atribuído ao H-3. Além de cinco metilas terciárias em δ_{H} 0,80; 0,93; 1,00; 1,11; 1,59; 1,66 e uma metila secundária em δ_{H} 1,10 (d, $J = 5,4$ Hz), corroborando com a presença de um núcleo triperpênico para Cd-3. Evidenciou-se um sinal para hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,24 (t, $J = 3,2$ Hz), atribuído a H-24, e dois dupletos em δ_{H} 0,61 (d, $J = 4,0$ Hz) e δ_{H} 0,40 (d, $J = 4,0$ Hz), absorções que comprovam a ocorrência um anel propânico, característica de triterpenos do tipo cicloartano, como observado em Cd-1 (FURLAN *et al.*, 1993; FACUNDO *et al.*, 2008).

Comparando Cd-3 com o modelo (Mo-3) da literatura, o 4 α -carboxi-3 β ,16 α -dihidroxi-24-cicloarteno (FACUNDO *et al.*, 2008), observou-se diferenças nos sinais em δ_{C} 53,6 e δ_{C} 29,1 de Cd-3, com os sinais em δ_{C} 62,6 e δ_{C} 77,3 do Mo-3 atribuídos aos carbonos C-17 e C-16, respectivamente. Isso porque Mo-3 possui uma hidroxila na posição C-16, não encontrada em Cd-3.



Estas informações, em conjunto com os valores de RMN ^{13}C descritos na literatura (Tabela 3, pág. 82) permitiram identificar Cd-3 como sendo o triterpene do tipo cicloartano, 4 α -carboxi-3 β -hidroxi-24-cicloarteno, substância relatada pela vez no gênero *Combretum*.

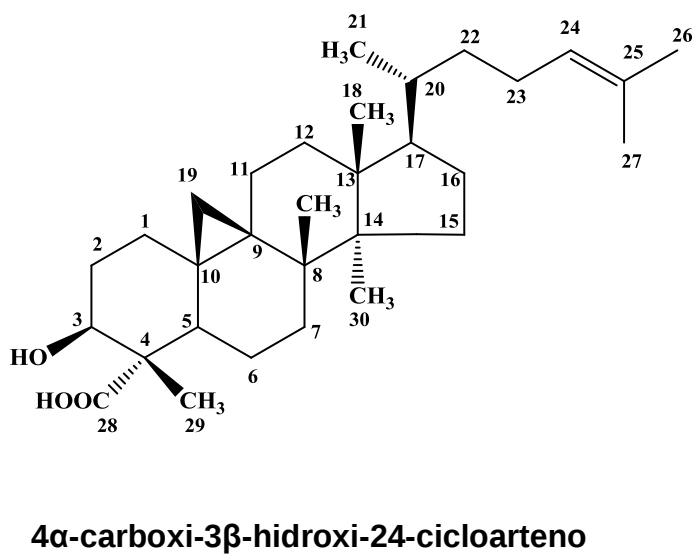
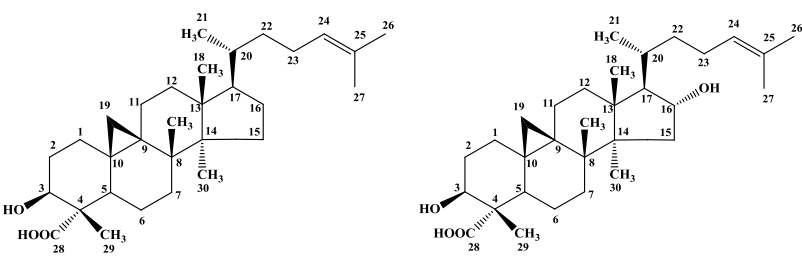


Tabela 3. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-3a (δ , MeOD, 50 MHz) com modelo (Mo-3) da literatura (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz), (FACUNDO *et al.*, 2008).



	Cd-3 δ_{C}	Mo-3 δ_{C}
C		
4	55,7	56,0
8	48,1	48,6
9	21,1	20,0
10	24,4	24,1
13	47,7	47,6
14	49,0	49,1
25	131,7	131,1
28	180,8	180,4
CH		
3	76,2	75,9
5	45,6	45,4
17	53,6	62,6
20	37,0	35,7
24	126,1	126,8
CH₂		
1	32,8	32,7
2	30,5	30,8
6	26,7	26,8
7	26,3	26,4
11	27,4	27,2
12	34,0	33,7
15	48,5	48,7
16	29,1	77,3
19	31,7	31,4
22	36,5	36,8
23	25,8	26,3
CH₃		
18	18,5	19,8
21	19,5	19,6
26	17,7	18,3
27	25,8	26,4
29	9,9	11,0
30	20,9	19,7

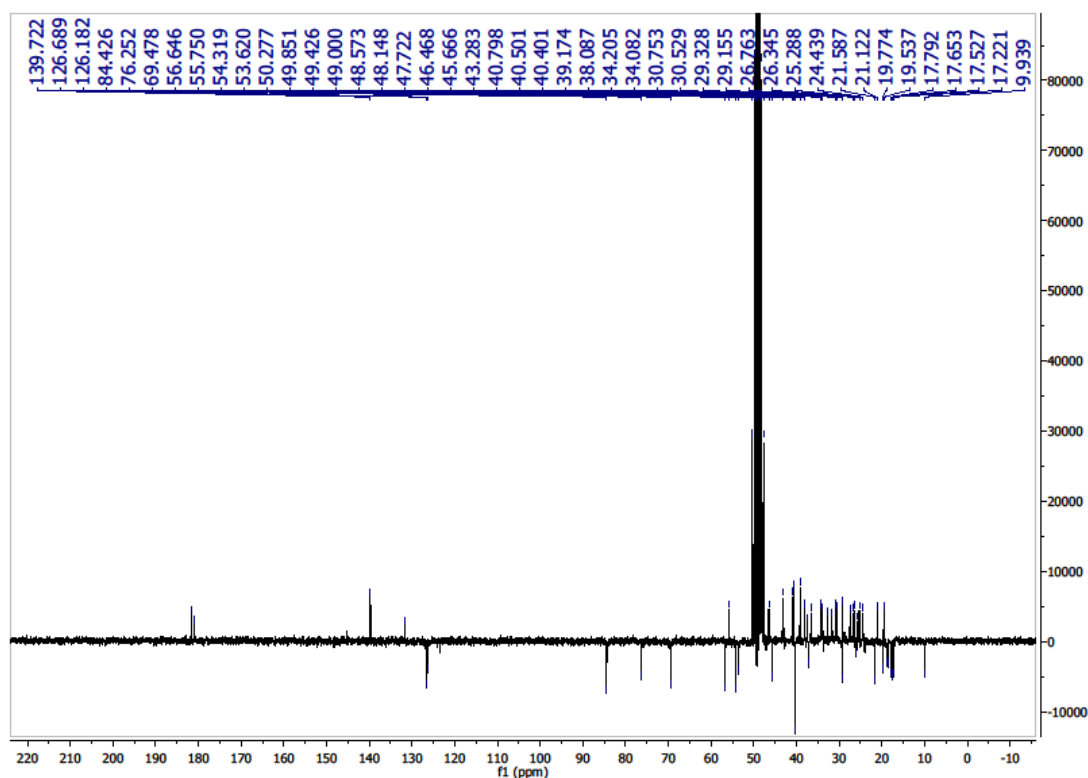


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD

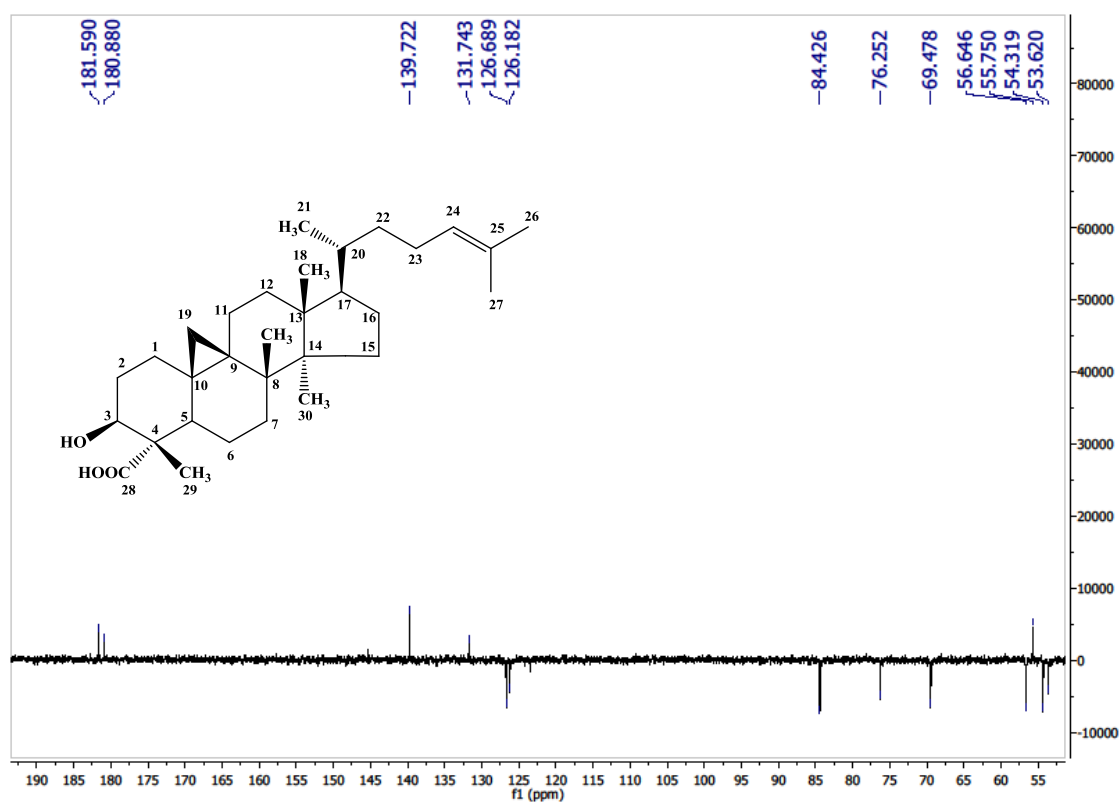


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD

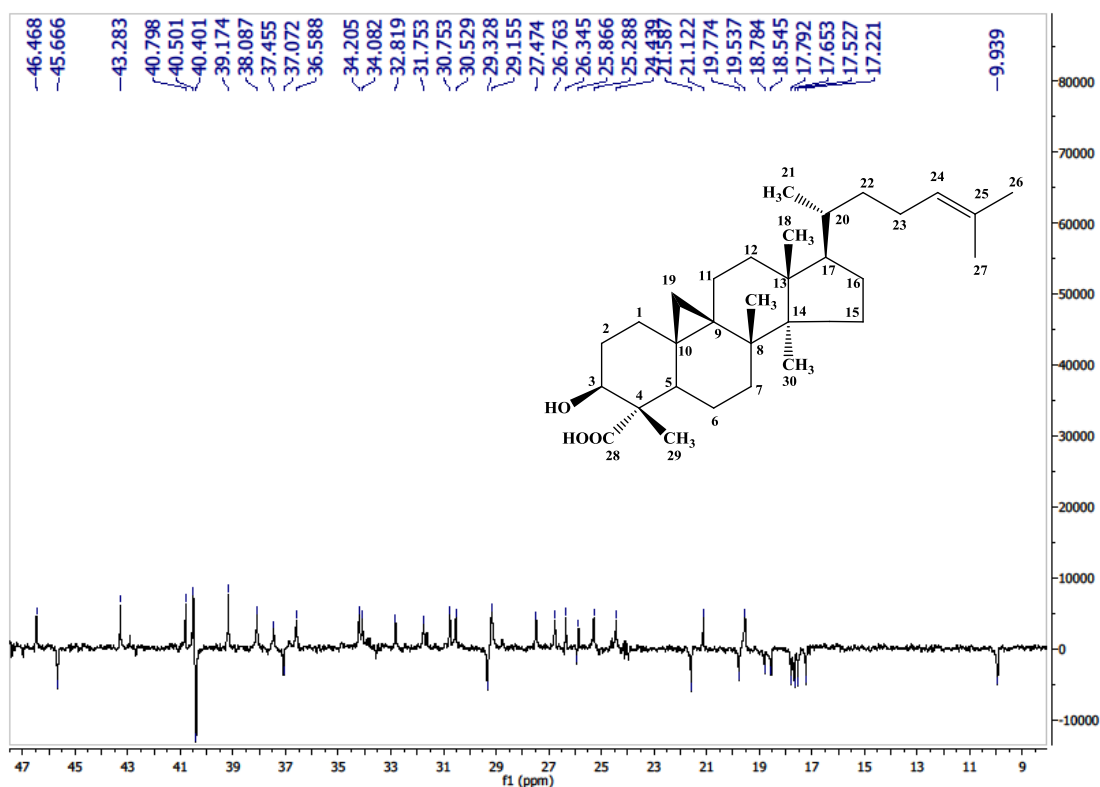


Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD

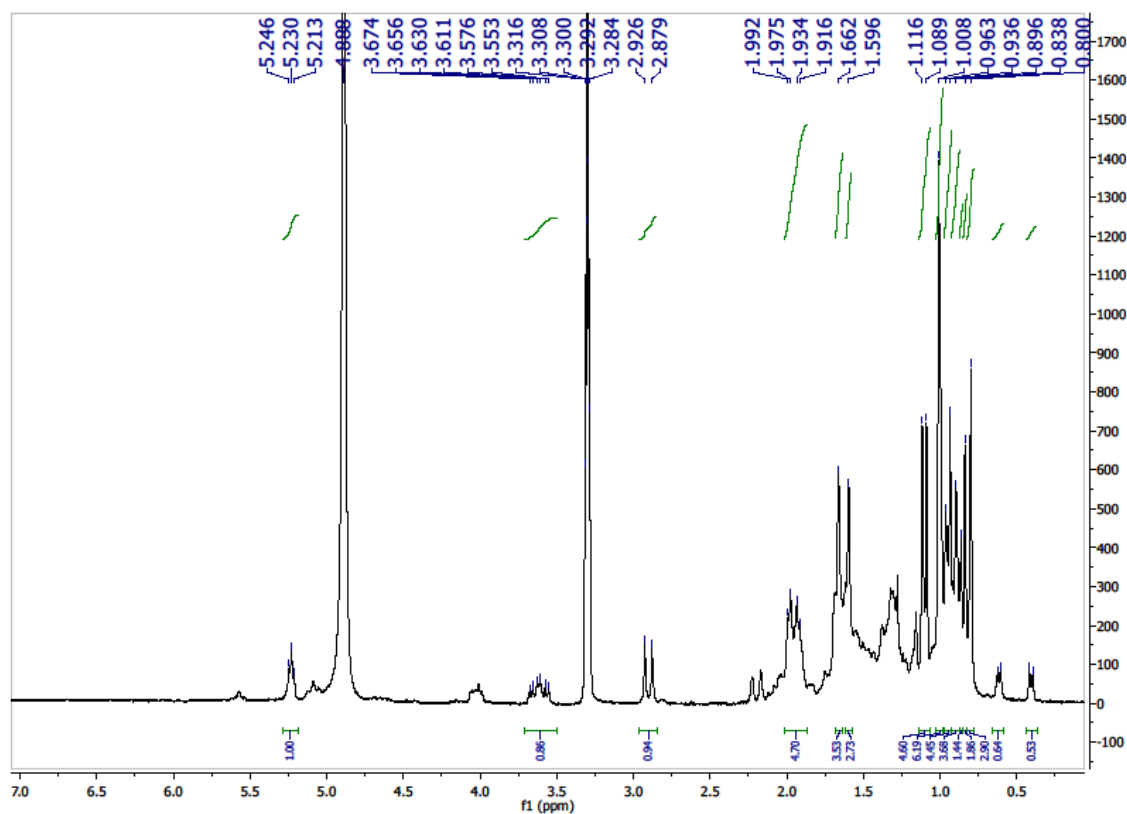


Figura 20. Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.

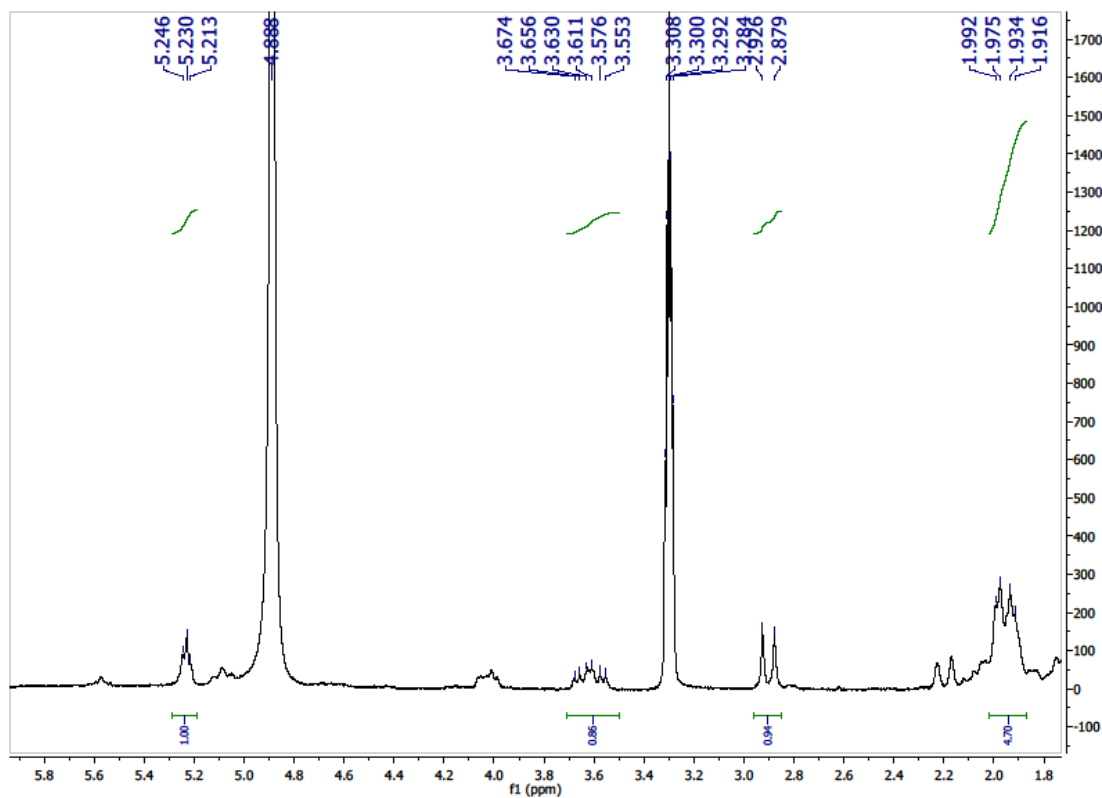


Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.

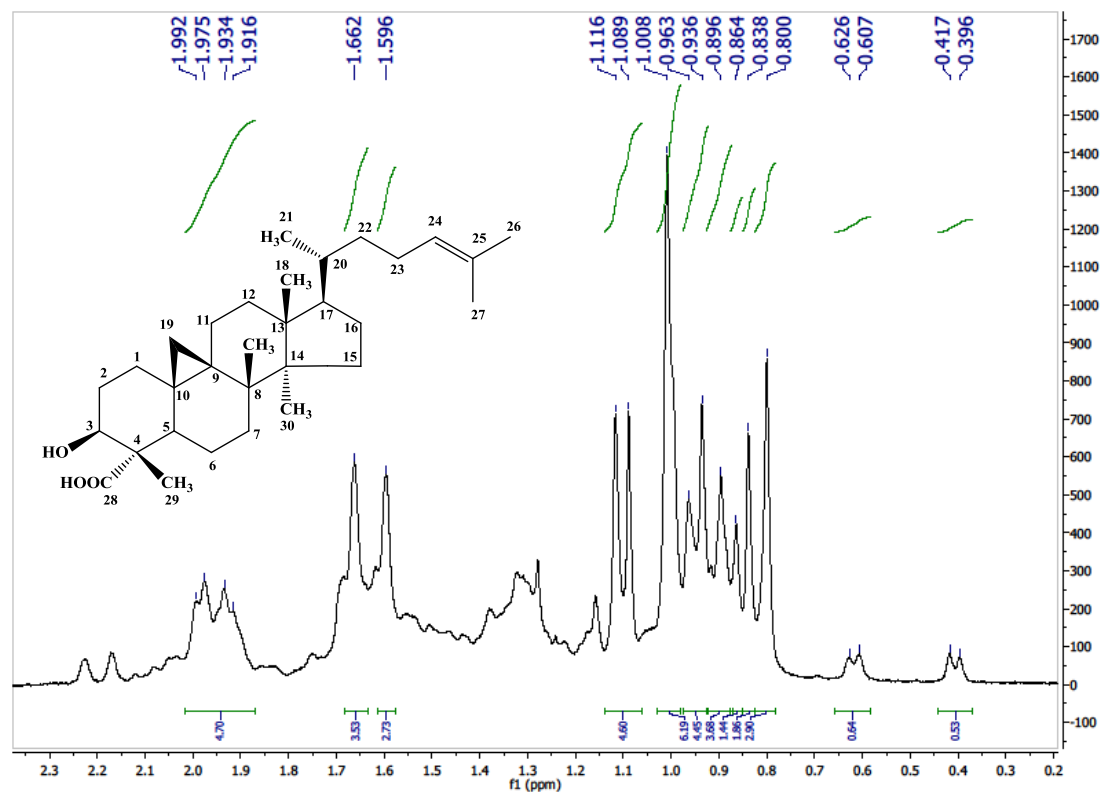


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD

5.4 Identificação estrutural de Cd-4

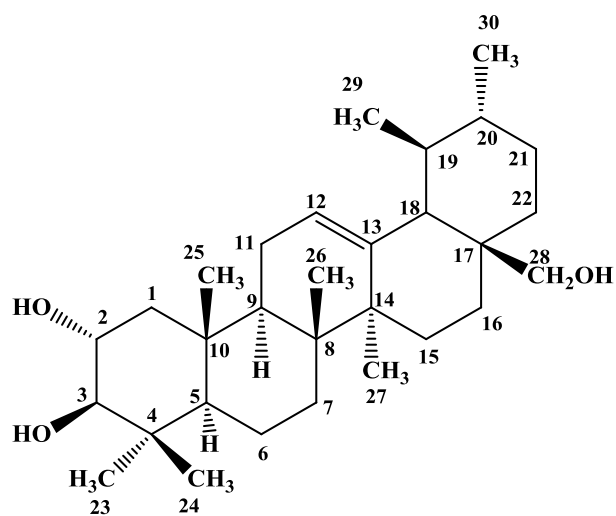
A substância codificada como Cd-4 foi obtida na forma de pó amorfo (10,0 mg). O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figuras 23 e 24, pág. 89), evidenciou um envelope de sinais na região entre δ_{H} 2,1 e 0,7, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos pentacíclicos. Observaram-se sinais em δ_{H} 0,87 a δ_{H} 1,70 atribuídos as metilas do esqueleto triterpênico. Adicionalmente, observou-se um sinal em δ_{H} 2,59 (d, $J = 9,6$ Hz) atribuído a H-18. O duplete em δ_{H} 3,35 e tripleto δ_{H} 4,04 foram atribuídos aos H-3 e H-2, respectivamente. E um simpleto largo em δ_{H} 5,43 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-12 (MAHATO; KUNDU, 1994).

O espectro de RMN de ^{13}C -Broad Band (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), revelou a presença de trinta sinais (Figuras 25-27, pág. 90 e 91), dos quais seis referentes a carbonos quaternários, oito a carbonos metínicos, nove a carbonos metilênicos e sete a carbonos metílicos, sugerindo tratar-se de um esqueleto triterpênico pentacíclico (MAHATO; KUNDU, 1994).

Observaram-se sinais em δ_{C} 125,51 e δ_{C} 139,24 os quais sugerem a presença de uma dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13, referente a um triterpeno pentacíclico urs-12-eno.

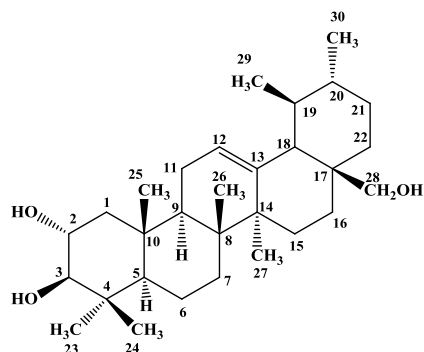
Dentre os carbonos metínicos observaram-se sinais em δ_{C} 68,56 e δ_{C} 83,77 que sugerem a presença de dois carbonos carbinólicos em C-2 e C-3, cuja estereoquímica já foi relatada para Cd-2 (Figura 10, pág. 74) (MAHATO; KUNDU, 1994). Destaca-se, ainda, a ausência de um sinal entre δ_{C} 179 – 181, indicando que não existe uma carbonila de ácido, como em Cd-2 e Cd-3.

Estas informações, em conjunto com os valores de RMN ^{13}C descritos na literatura (Tabela 4, pág. 88) permitiram identificar Cd-4 como sendo o triterpeno da série ursano, o 2α , 3β , 28-trihidroxiurs-12-eno, substância foi isolada pela vez em *C. duarteanum*.



2α, 3β, 28-trihidroxiurs-12-eno

Tabela 4. Dados comparativos de RMN¹³C da substância Cd-4 (δ , C₅D₅N, 75 MHz) com modelo (Mo-4) da literatura (δ , CDCl₃, 22.6 MHz), (MAHATO; KUNDU, 1994)



	Cd-4	Mo-4
	δ_C	δ_C
C		
4	40,0	39,5
8	39,7	39,8
10	38,4	38,4
13	139,2	138,7
14	42,5	42,4
17	48,0	47,9
CH		
2	68,5	68,8
3	83,7	83,8
5	55,8	55,6
9	47,9	47,8
12	125,5	125,6
18	53,5	53,2
19	30,9	30,9
20	37,3	37,1
22	39,3	39,2
CH₂		
1	47,6	46,8
6	18,8	18,6
7	33,4	33,2
11	23,6	23,6
15	28,6	28,3
16	24,8	24,5
21	39,4	39,4
28	68,5	68,5
CH₃		
23	29,3	28,7
24	16,9	17,0
25	17,4	17,0
26	17,6	17,0
27	23,8	23,7
29	17,4	17,0
30	21,3	21,3

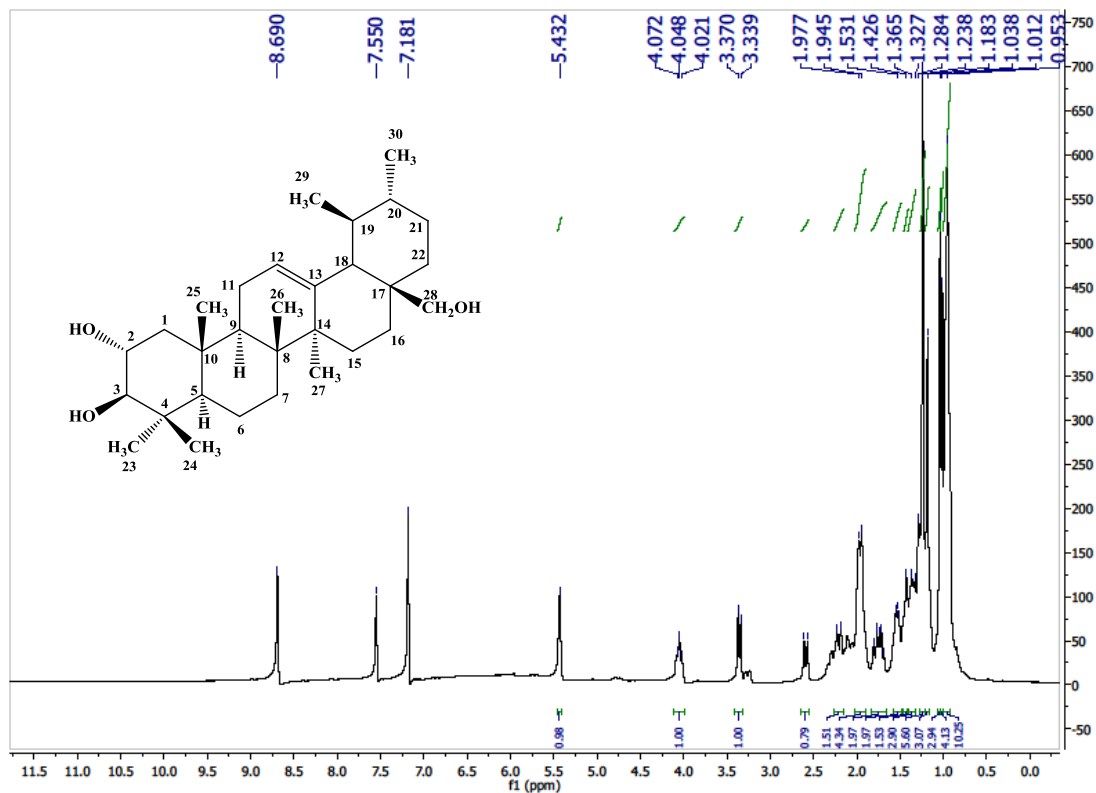


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

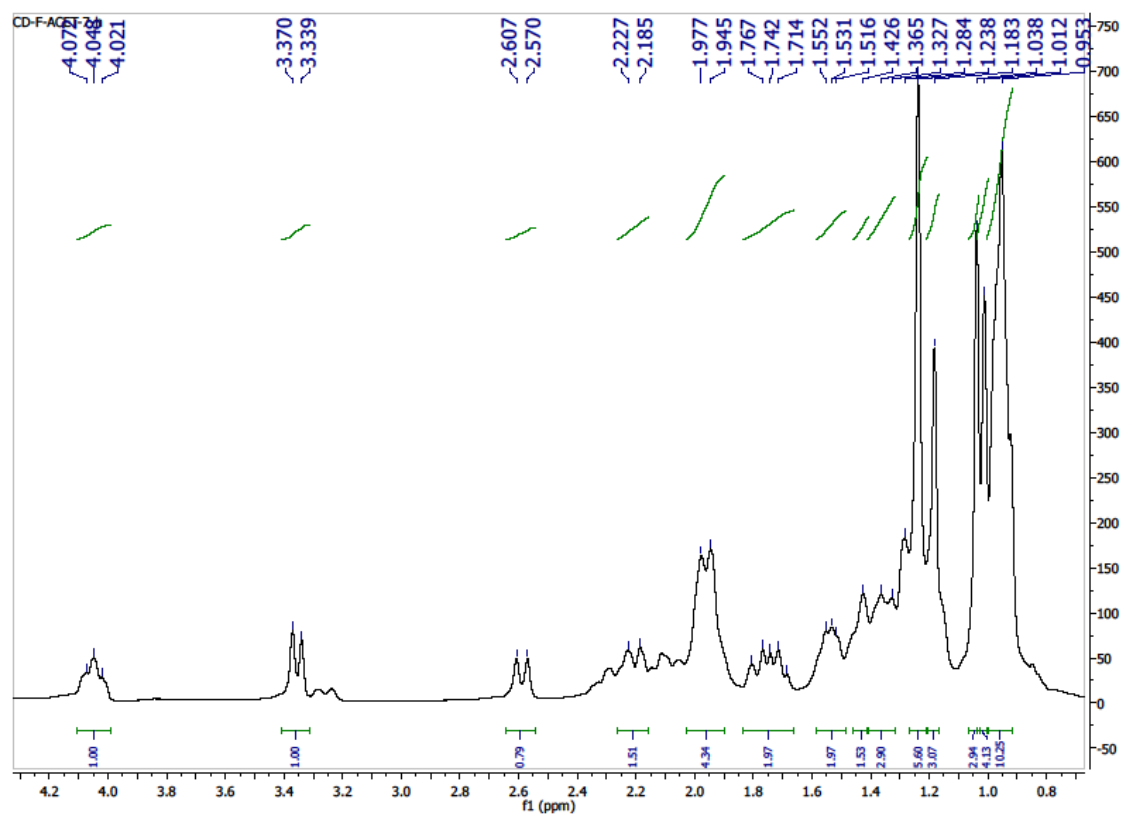


Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

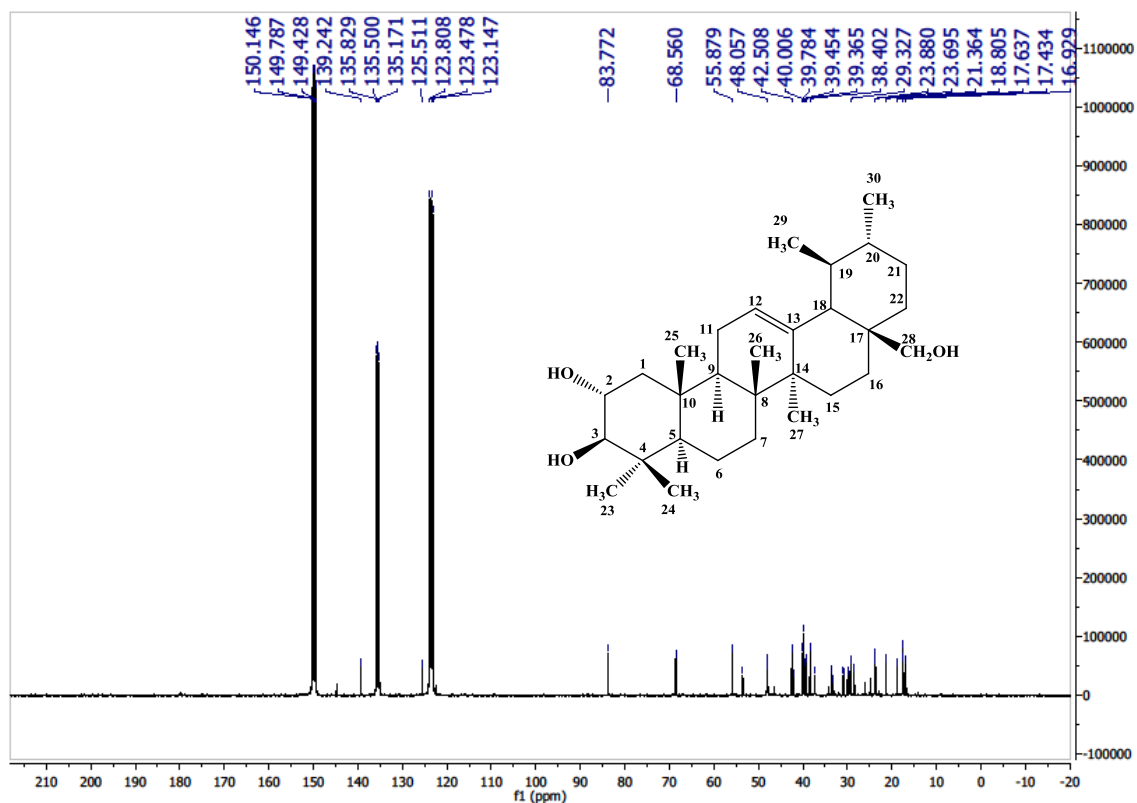


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

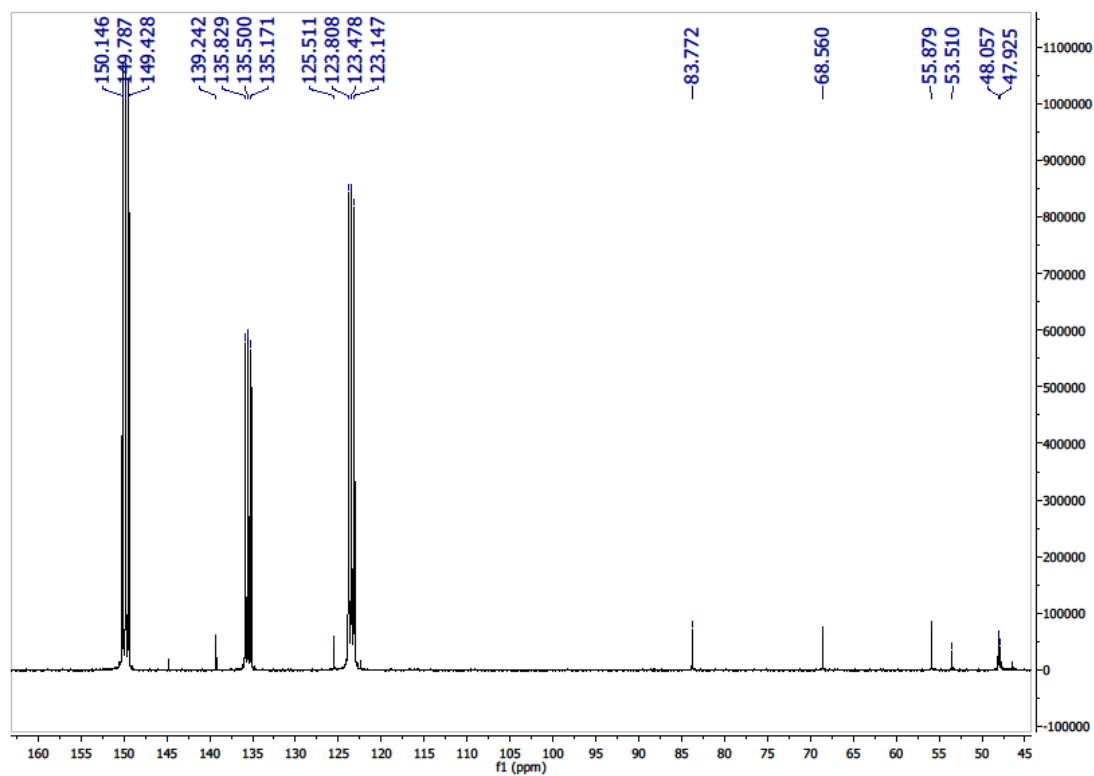


Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

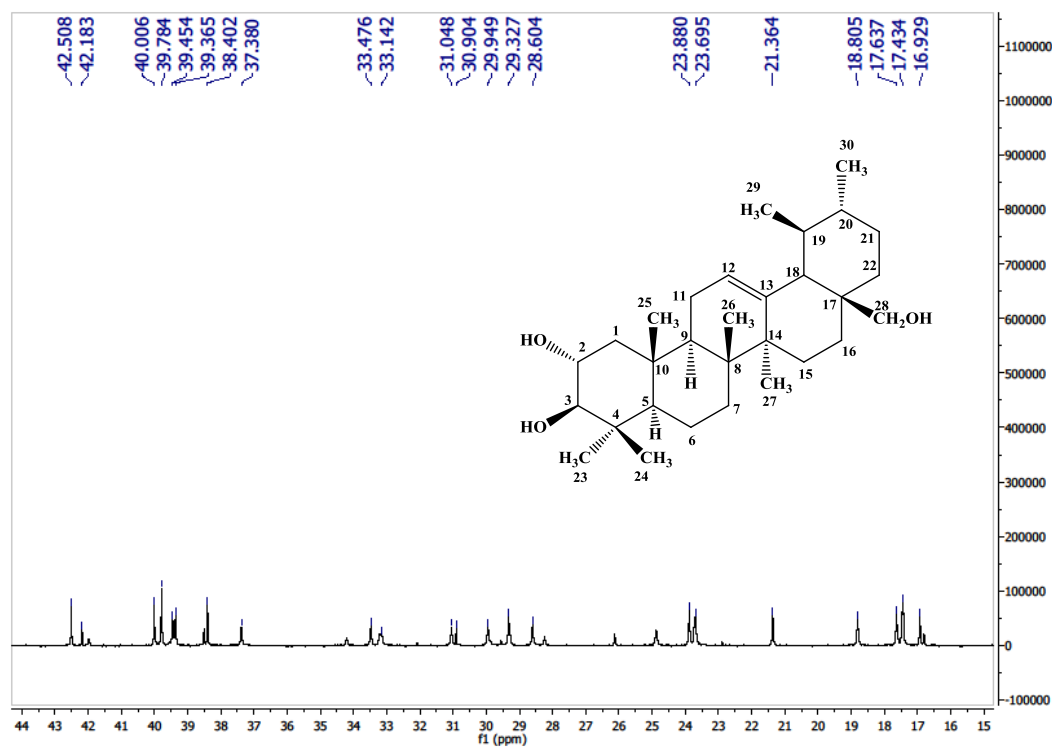


Figura 27. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz) de Cd-4 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

5.5 Identificação estrutural de Cd-5

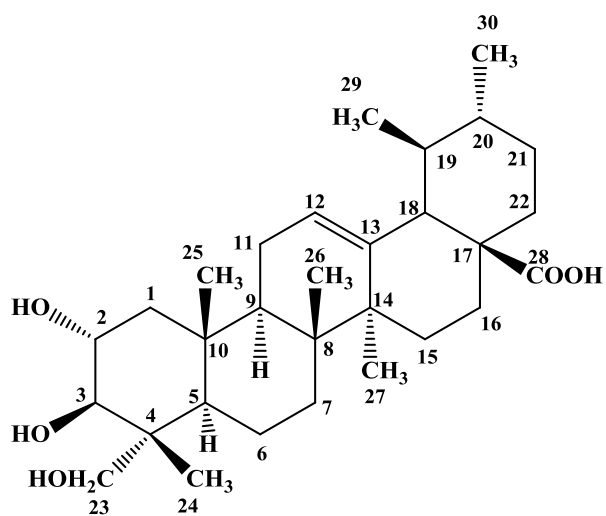
A substância codificada como Cd-5 foi obtida na forma de pó amorfo amarelado (21,0 mg).

O espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de Cd-5 revelou a presença de mais de trinta sinais (Figuras 31-33, pág. 96 e 97), referentes a carbonos quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. Os sinais em δ_{C} 139,15, δ_{C} 125,38, δ_{C} 144,72 e δ_{C} 123,73, sugeriram a presença dois grupamentos vinílicos, indicando tratar-se de uma mistura de triterpenos, Cd-5a e Cd-5b.

Observou-se que os sinais em δ_{C} 139,15 e δ_{C} 125,38 eram semelhantes àqueles encontrados nos espectros dos compostos Cd-2 e Cd-4, tratando-se, portanto, de um triterpeno pentacíclico da série ursano (Cd-5a). Adicionalmente, sinais em δ_{C} 144,72 e δ_{C} 123,73, sugeriram a presença de um triterpeno pentacíclico da série oleanano (Cd-5b). Os sinais em δ_{C} 77,96, δ_{C} 68,79 e δ_{C} 66,15 sugerem a presença de três carbonos oxigenados em C-2 e C-3 e C-23, respectivamente (MAHATO; KUNDU, 1994). Além da presença de sinais para carbonilas de ácidos em δ_{C} 180,13 e δ_{C} 179, 85, atribuído aos C-28 de Cd-5a e Cd-5b.

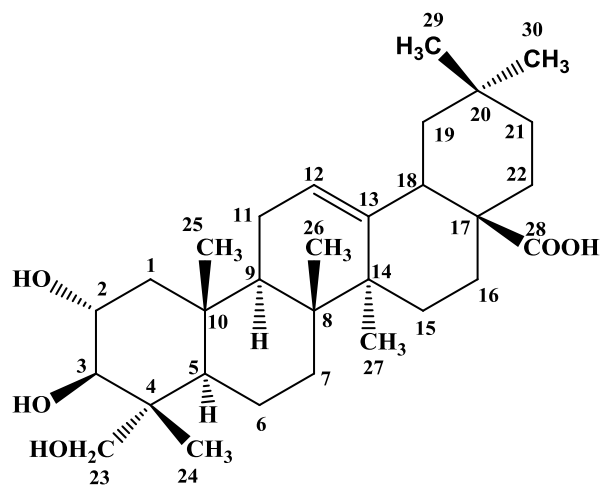
O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figuras 28-30, pág. 95 e 96), evidenciou um envelope de sinais na região entre δ_{H} 2,0 e 0,8, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos pentacíclicos. Observaram-se sinais em δ_{H} 0,88 a δ_{H} 1,20 atribuídos as metilas de núcleo triterpênico. O espectro de RMN de ^1H mostrou, ainda, um simpleto em δ_{H} 5,42 (2H) atribuído aos H-12 dos dois triterpenos. Um duplete δ_{H} 4,18 (6H, $J = 7,6$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios oximetínicos H-23 α , H-3 β e H-2 α , respectivamente. Outro duplete em δ_{H} 3,70 (2H, $J = 10,6$ Hz) foi atribuído aos H-23 β de Cd-5a e Cd-5b (LI *et al.*, 2012).

Estas informações, em conjunto com os valores de RMN ^{13}C descritos na literatura (Tabela 5, pág. 94) permitiram identificar Cd-5a e Cd-5b como sendo dois triterpenos, o ácido 2 α , 3 β , 23 α -trihidroxiurs-12-ene- 28-óico (Ácido Asiático) e ácido 2 α , 3 β , 23 α -trihidroxiolean-12-ene- 28-óico (Ácido Arjunólico), respectivamente, ambos isolados pela vez em *Combretum duarteanum*.



Cd-5a

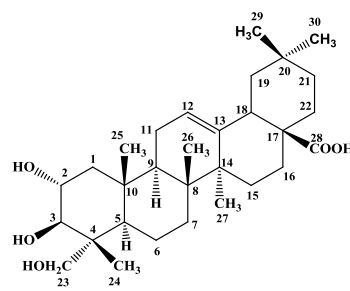
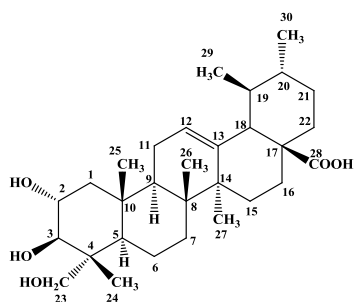
Ácido 2 α , 3 β , 23 α –
trihidroxiurs-12-en- 28-óico



Cd-5b

Ácido 2 α , 3 β , 23 α –
trihidroxiolean-12-en- 28-óico

Tabela 5. Dados comparativos de RMN¹³C da substância Cd-5 (δ , C₅D₅N, 125 MHz) com modelo da literatura (δ , C₅D₅N, 100 MHz), (LI *et al.*, 2012).



	Cd-5a	Ácido Asiático	Cd-5b	Ácido Arjunónico
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
C				
4	43,5	43,7	43,5	43,7
8	39,9	40,1	39,8	40,1
10	38,1	38,4	38,1	38,5
13	139,1	139,4	144,7	145,0
14	42,4	42,6	42,2	42,3
17	47,8	48,0	47,8	47,8
20	-	-	30,8	31,0
28	180,1	180,1	179,8	180,4
CH				
2	68,7	69,0	68,7	68,9
3	77,9	78,3	77,9	78,3
5	48,0	48,2	47,9	48,1
9	47,7	48,1	47,6	48,2
12	125,3	125,6	123,7	122,5
18	53,3	53,6	41,8	42,0
19	39,2	39,4	-	-
20	39,2	39,4	-	-
CH₂				
1	47,8	48,0	47,8	48,0
6	18,3	18,6	18,3	18,6
7	33,0	33,2	33,0	32,9
11	23,6	23,8	23,6	21,4
15	28,5	28,7	28,1	28,4
16	24,7	25,0	24,7	23,7
19	-	-	46,5	46,5
21	30,8	31,1	33,0	34,3
22	37,3	37,5	33,0	33,3
23	66,1	66,6	66,1	66,6
CH₃				
24	14,3	14,4	14,3	14,4
25	17,3	17,6	17,3	17,6
26	17,3	17,6	17,3	17,6
27	23,7	23,9	23,7	26,2
29	17,3	17,6	33,1	33,3
30	21,2	21,4	23,7	24,0

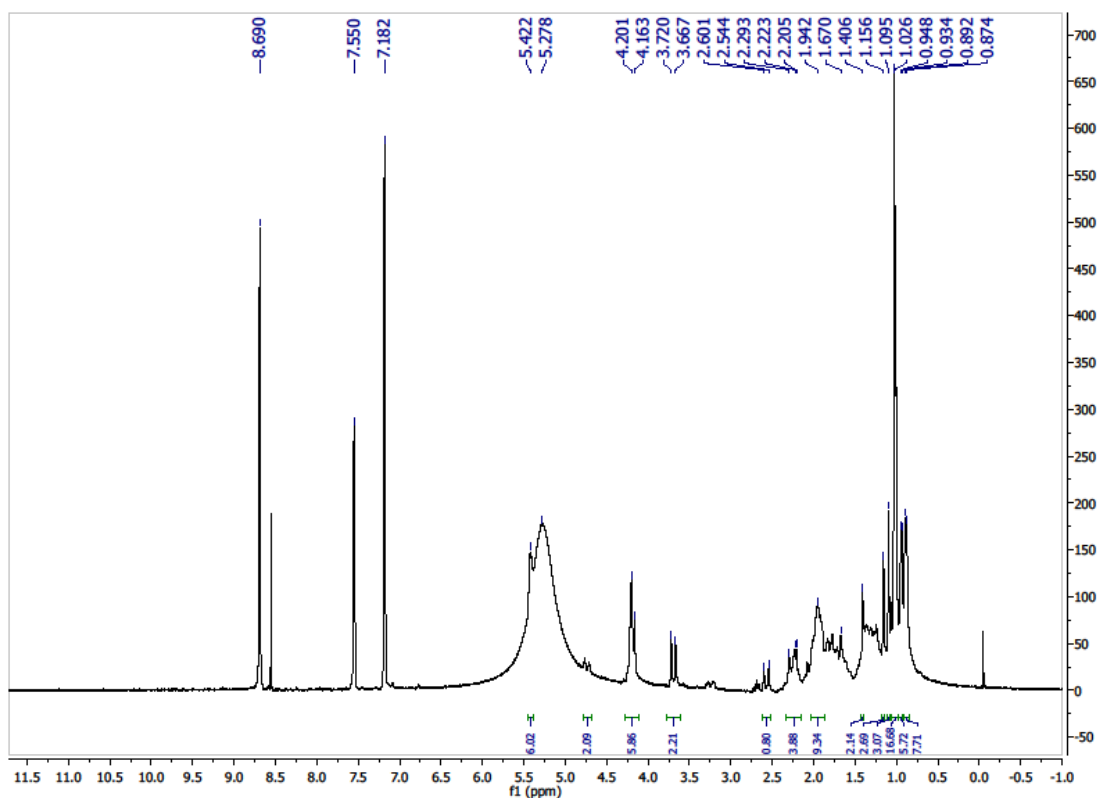


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

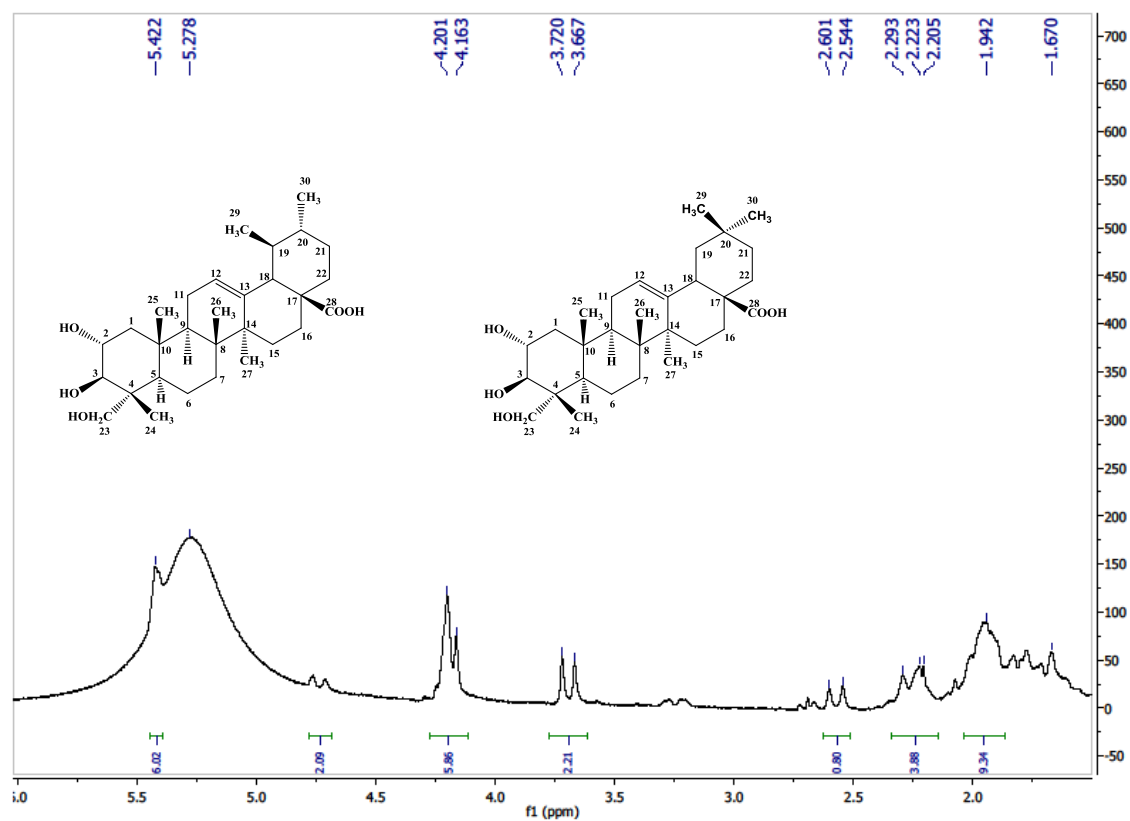


Figura 29. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

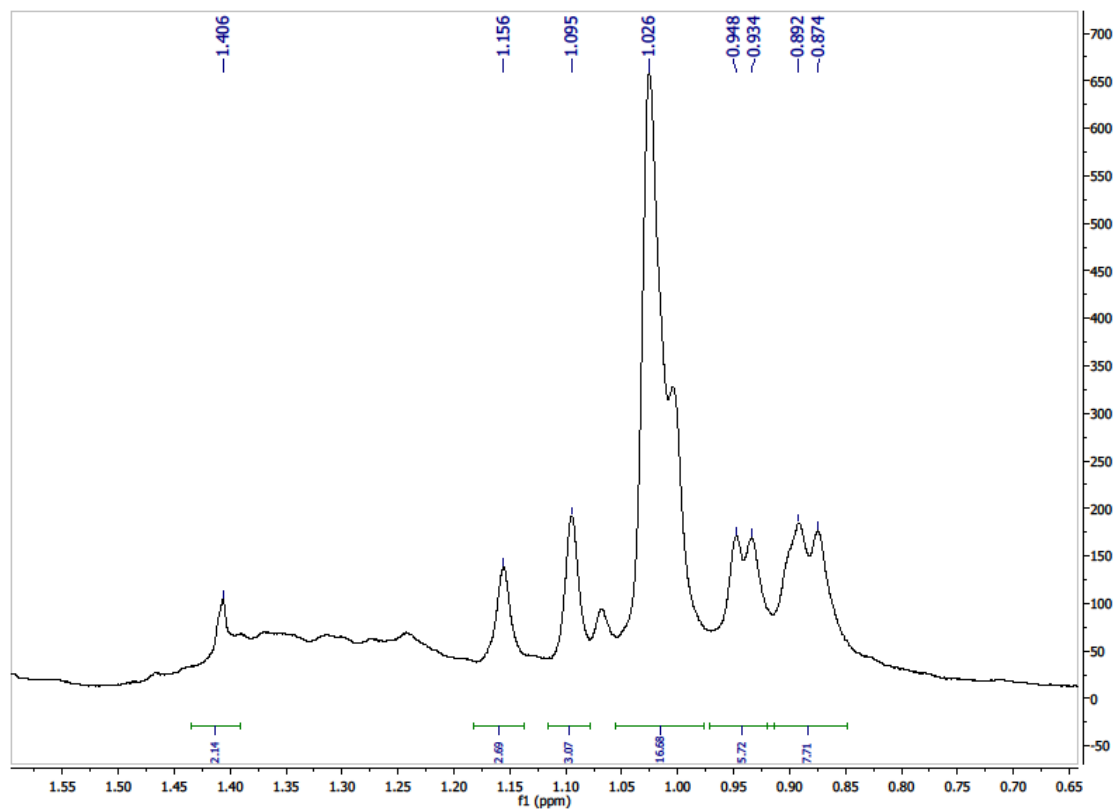


Figura 30. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

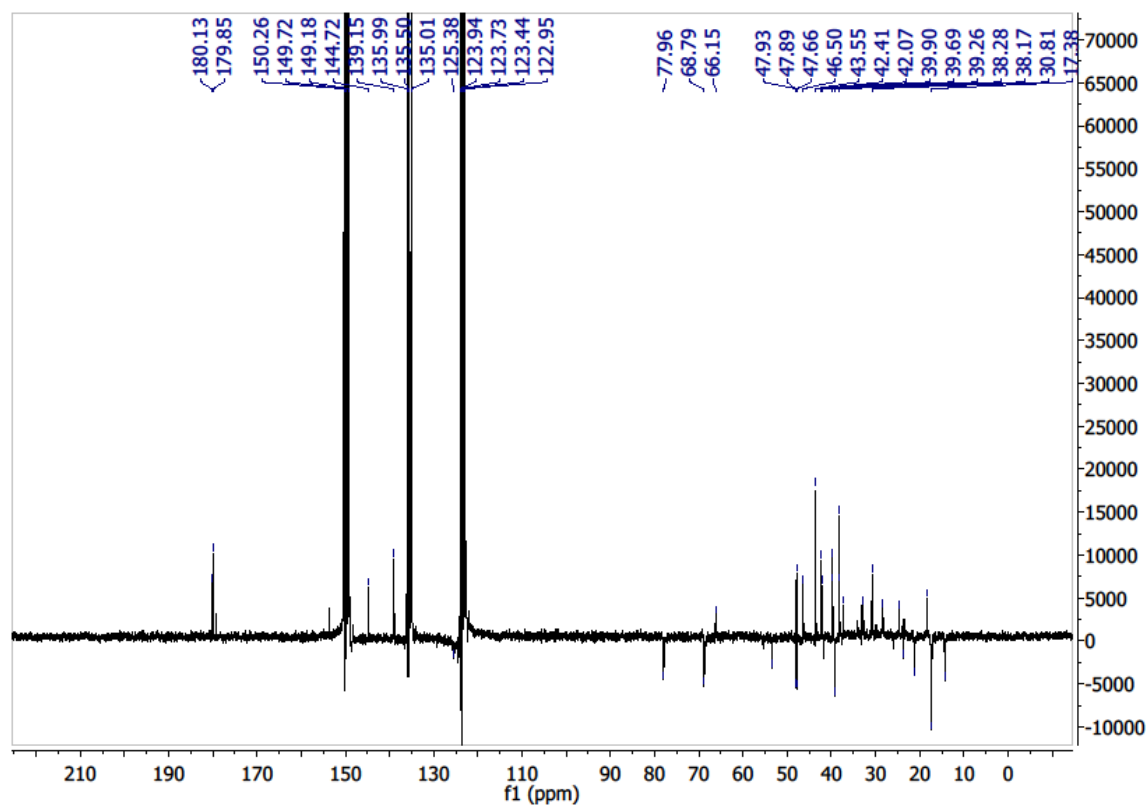


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

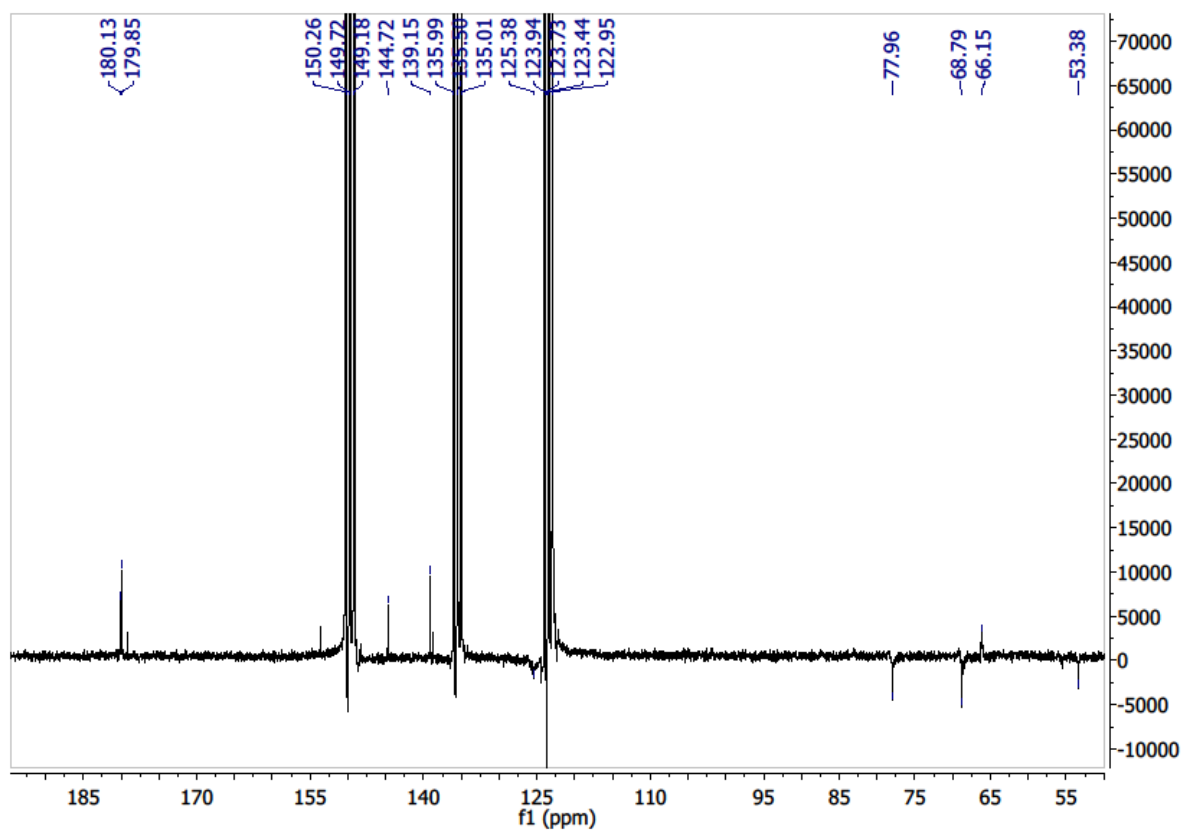


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

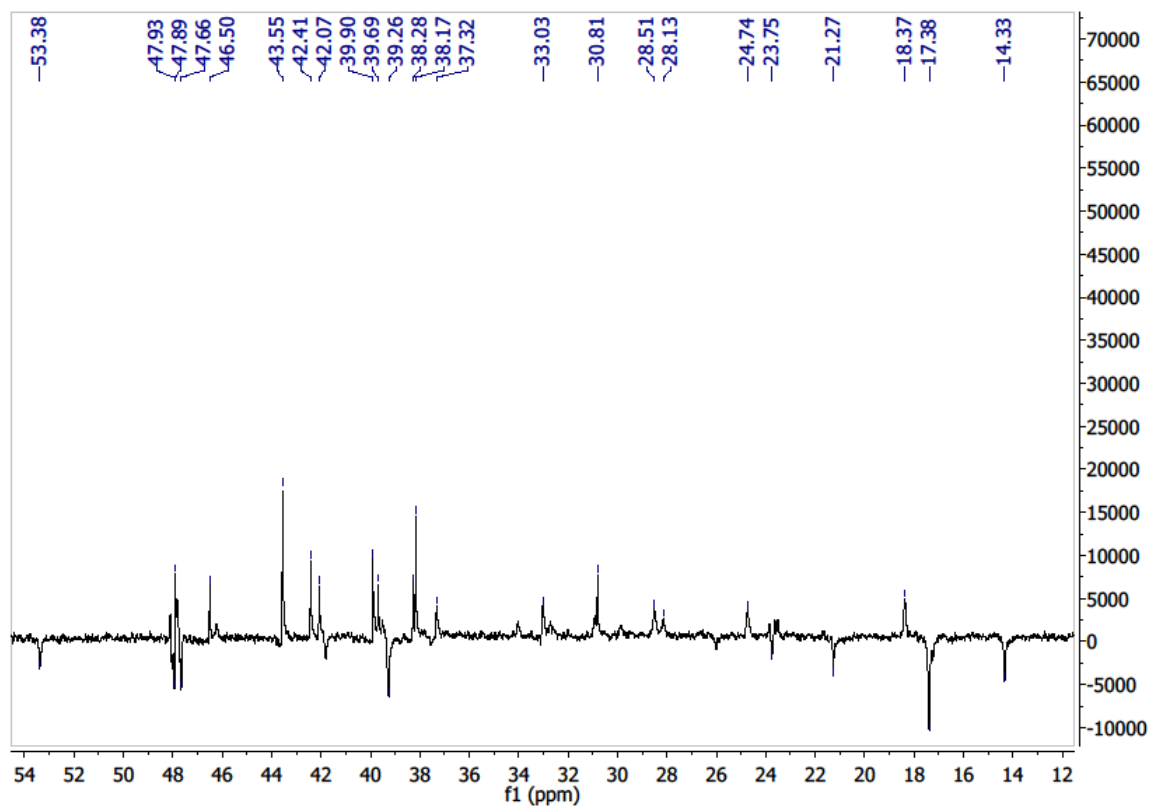
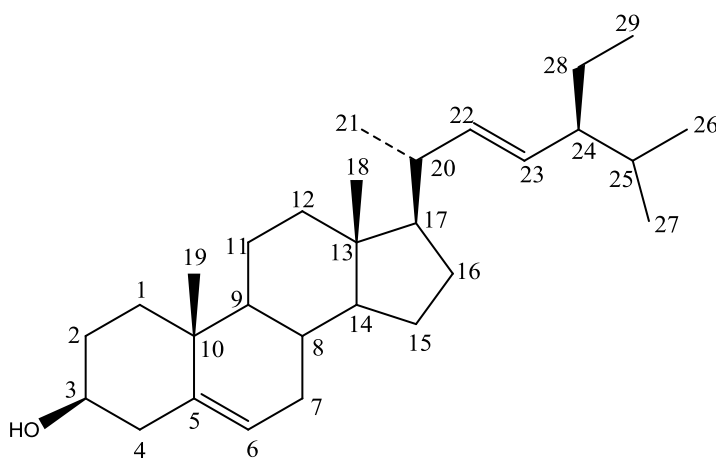


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-5 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

5.6 Identificação estrutural de Cd-6

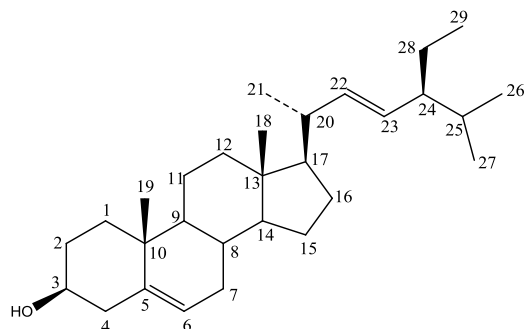
A substância codificada como Cd-6 foi obtida na forma de cristais brancos (20,0 mg). O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figuras 34-36, pág. 98 e 99) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre δ_{H} 0,64 e δ_{H} 1,49 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp^3 presentes em estruturas como triterpenos e esteroides. Em δ 3,48 pôde-se verificar a presença de um multipeto atribuído a hidrogênio da posição H-3 do núcleo esteroidal (TOMAZ *et al.*, 2008), e um dupeto em δ_{H} 5,31 típico de hidrogênio olefínico na posição H-6 de fitoesteróides, possibilitou sugerir que Cd-6 possui o núcleo esteroidal (FALCÃO, 2003).

A análise espectral de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (Figuras 37-39, pág. 99 e 100) demonstrou a presença de metilas esteroidais pelo conjunto de absorções entre δ_{C} 11,80 e δ_{C} 21,18 características destes grupos, reforçando, portanto, a proposta de núcleo esteroidal, dada pelo espectro de RMN ^1H . Os sinais em δ_{C} 121,65 e δ_{C} 140,66 são condizentes com dupla ligação nas posições 5 e 6 e as absorções δ_{C} 129,20 e δ_{C} 138,28 são pertinentes aos carbonos olefínicos (C-22 e C-23) de Cd-6. Comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN ^{13}C com modelo da literatura (FALCÃO, 2003; TOMAZ *et al.*, 2008) (Tabela 6, pág. 97) tornaram possível identificar Cd-6 como sendo o estigmasterol, cuja presença é bem característica em várias espécies vegetais.



Estigmasterol

Tabela 6. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância Cd-6 (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelo (Mo-6) da literatura (δ , CDCl_3 , 50 MHz), (FALCÃO, 2003).



	Cd-6	Mo-6
	δ_{C}	δ_{C}
C		
5	140,7	140,6
10	36,4	36,4
13	42,2	42,1
CH		
3	71,7	71,7
6	121,7	121,6
8	31,8	31,8
9	50,1	50,0
14	56,8	56,7
17	55,9	55,9
20	40,5	40,4
22	138,3	138,2
23	129,2	129,1
24	51,2	51,1
25	31,8	31,8
CH₂		
1	37,2	37,1
2	31,6	31,5
4	42,2	42,1
7	31,8	31,8
11	21,0	21,1
12	39,6	39,7
15	24,3	24,2
16	28,9	28,8
28	25,3	25,3
CH₃		
18	12,0	11,9
19	19,4	19,3
21	21,1	21,1
26	21,0	21,0
27	18,9	18,9
29	12,2	12,1

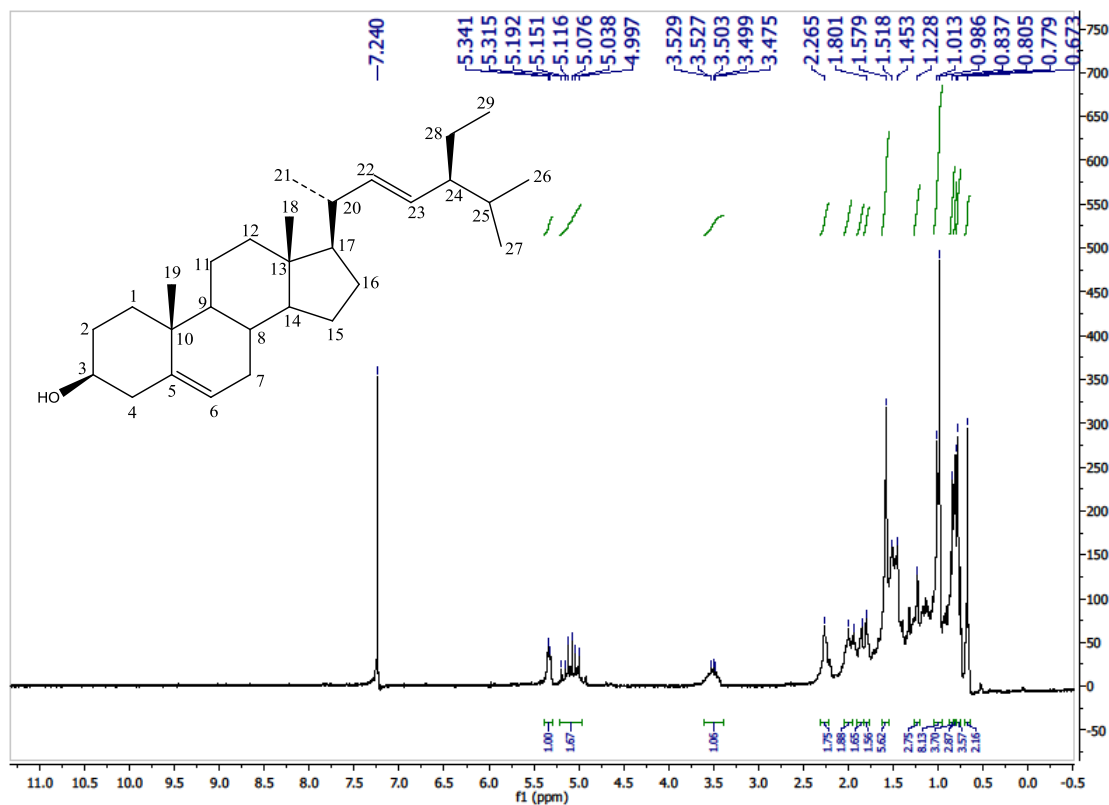


Figura 34. Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl_3

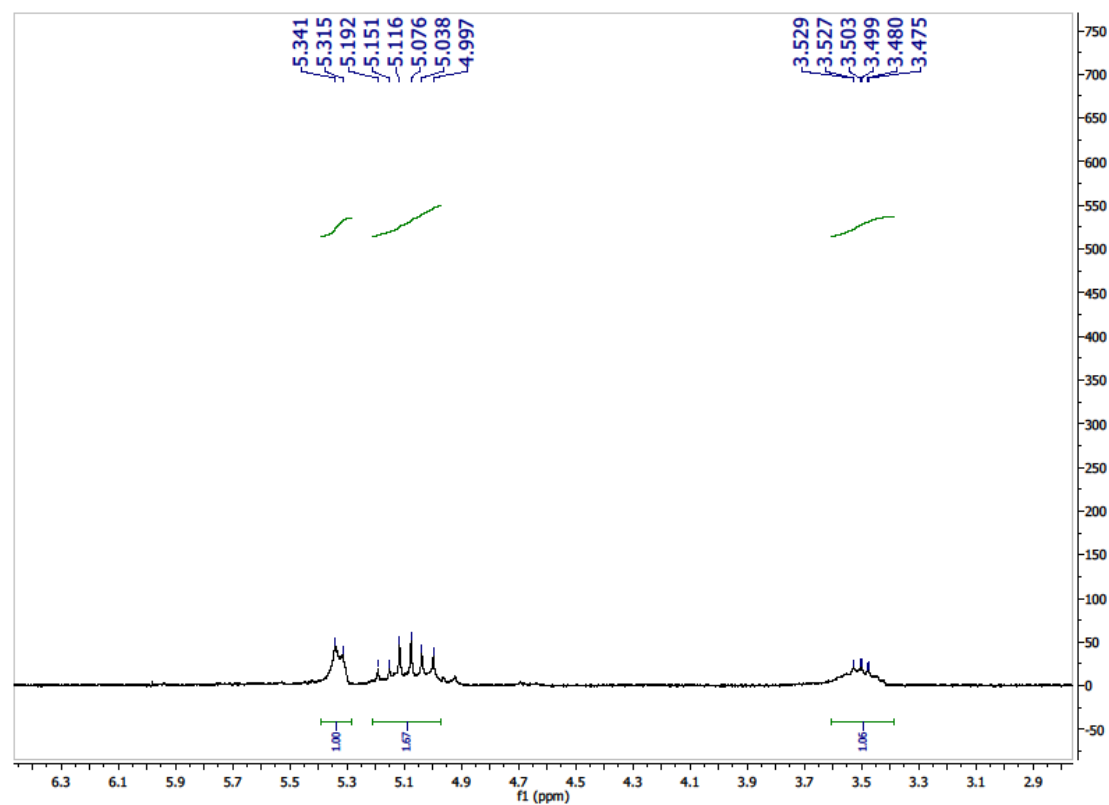


Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl_3

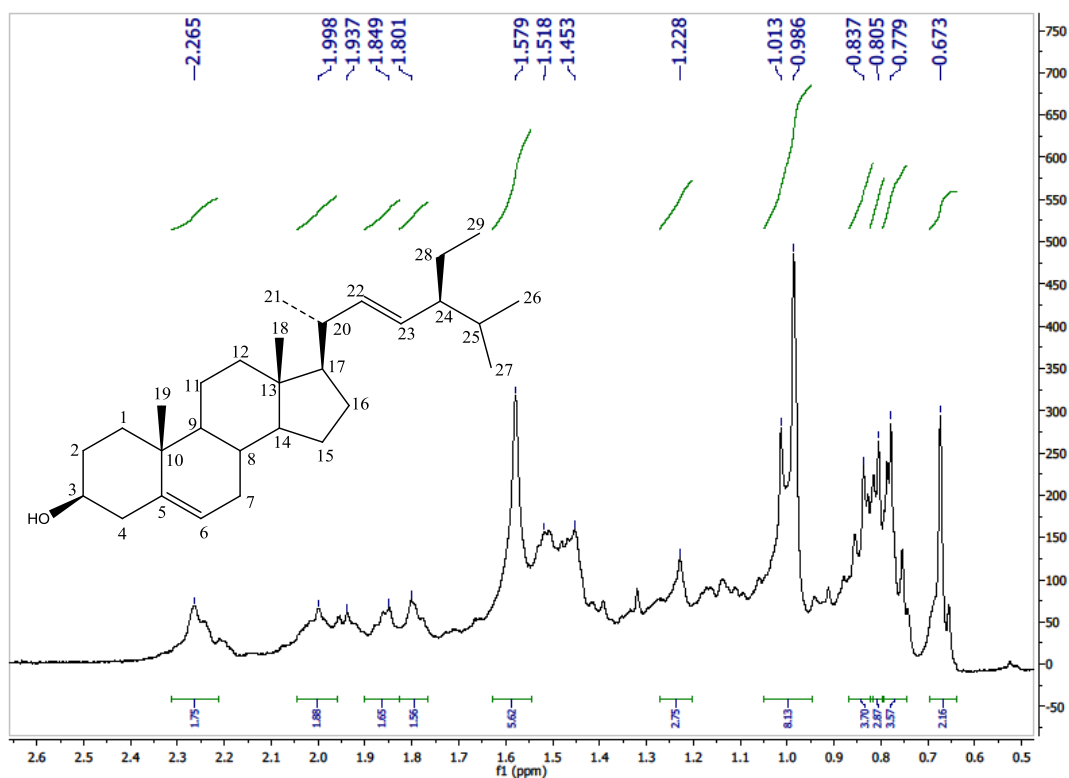


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl_3

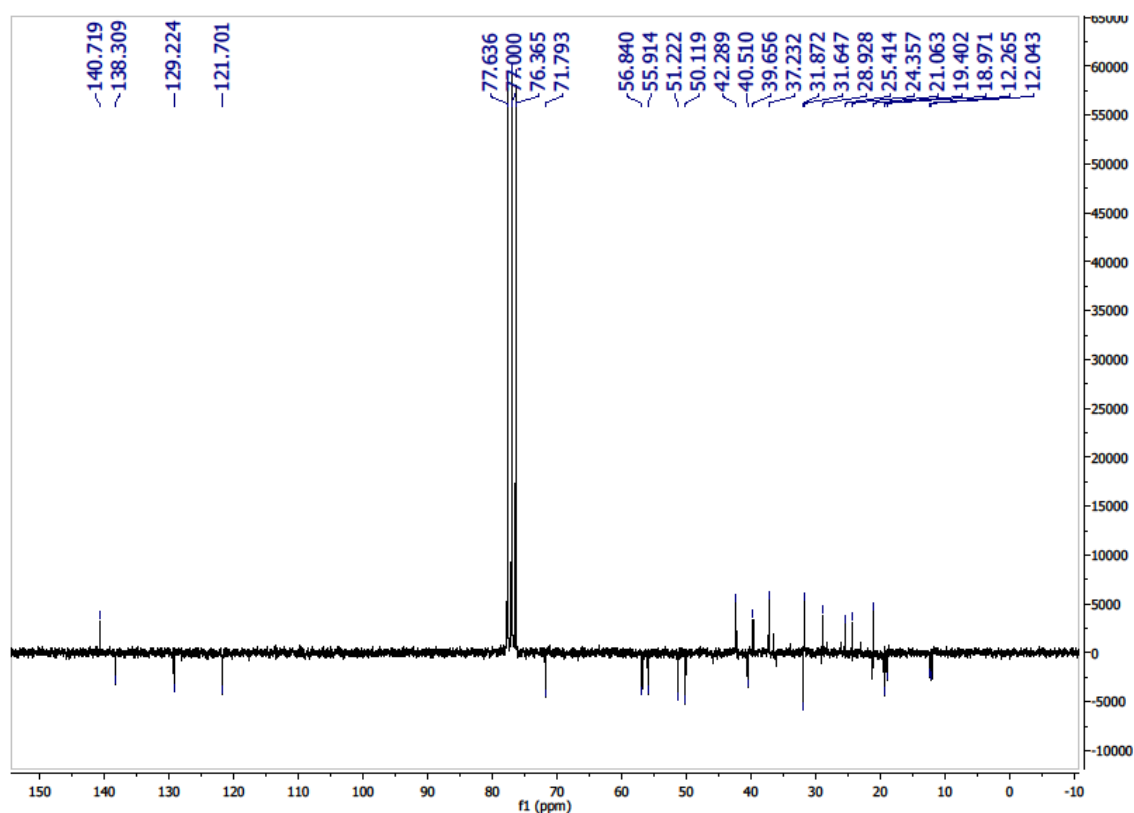


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl_3

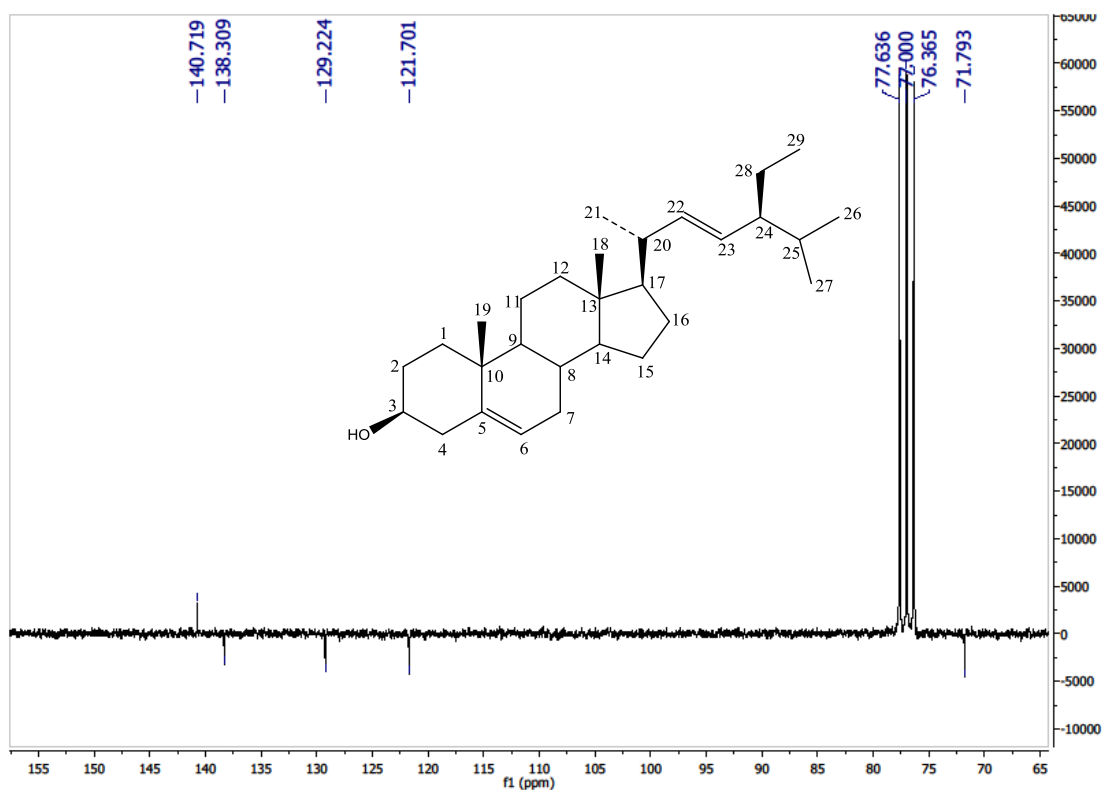


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl_3

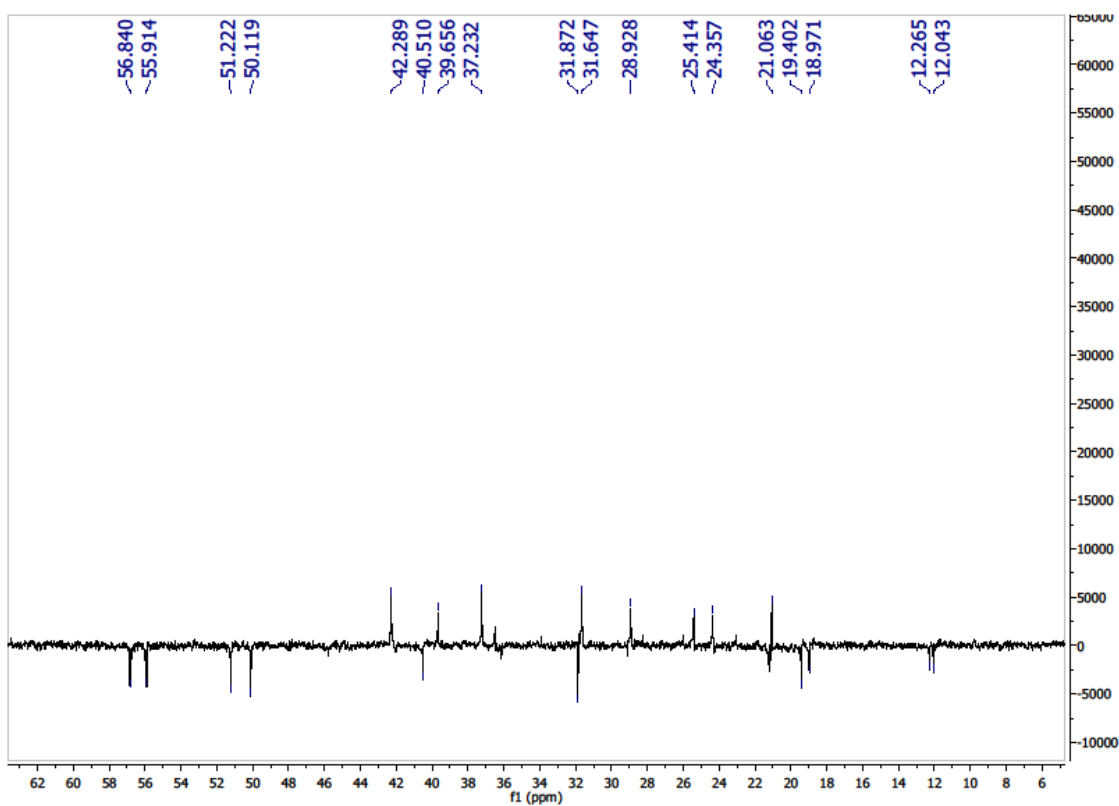


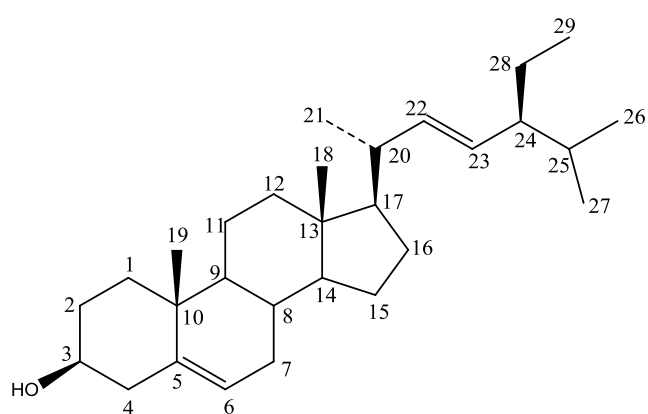
Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl_3

5.7 Identificação estrutural de Cd-7

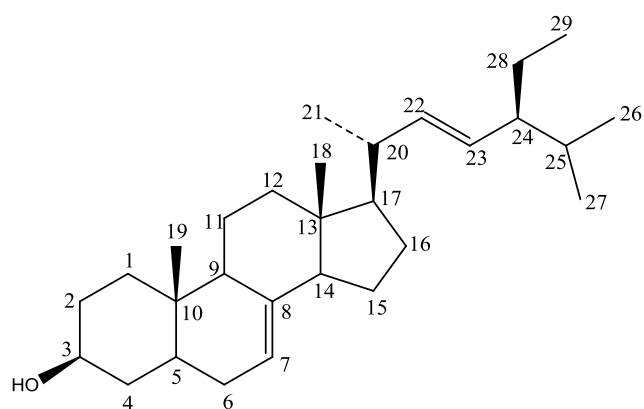
A substância codificada como Cd-7 foi obtida na forma de cristais brancos (6,0 mg).. O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e suas expansões de Cd-7 (Figuras 40-42, pág. 106 e 107) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre δ_{H} 0,67 e δ_{H} 1,57 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp^3 presentes em estruturas como triterpenos e esteróides. Em δ_{H} 3,49 pôde-se verificar a presença de um multipeto que pode ser atribuído a hidrogênio da posição 3 de núcleo esteroidal, e um dupeto em δ_{H} 5,33 ($J= 5,2$ Hz) típico de hidrogênio olefínico na posição 6 de fitoesteróides (RIPARDO FILHO *et al.*, 2012), juntamente com as absorções entre δ_{H} 0,64 e δ_{H} 2,25 possibilitou sugerir que Cd-7 possui o núcleo esteroidal.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) mostrou a presença de 50 linhas espectrais intensas (Figuras 43-45, pág. 107 e 108), inferindo que Cd-7 trata-se de uma mistura de esteroides (Cd-7a e Cd-7b). Absorções de metilas esteroidais entre δ_{C} 12,02 e δ_{C} 21,36 características destes grupos, reforça, portanto, a proposta de núcleos esteroidais, dada pelo espectro de RMN ^1H . Os sinais para carbonos intensos em δ_{C} 121,68 e δ_{C} 140,70 são condizentes com dupla ligação nas posições 5 e 6, bem como as absorções δ_{C} 129,20 e δ_{C} 138,28 são pertinentes aos carbonos olefínicos C-22 e C-23, respectivamente, da substância Cd-7a. Estes sinais juntamente com outros são compatíveis com a substância descrita anteriormente, o Estigmasterol (Cd-6).

Já as absorções em δ_{C} 117,42 e δ_{C} 139,52 são condizentes com carbonos vinílicos nas posições 7 e 8 da substância Cd-7b. Comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN ^{13}C com modelo da literatura (RIPARDO FILHO *et al.*, 2012) (Tabela 7, pág. 105) tornaram possível identificar Cd-7 como sendo uma mistura de esteroides, o estigmasterol e o espinasterol.

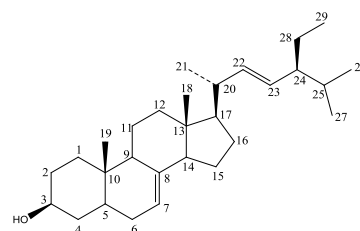
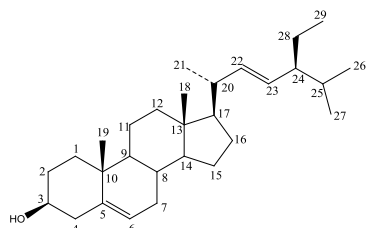


Estigmasterol



Espinasterol

Tabela 7. Dados comparativos de RMN¹³C da substância Cd-7 (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos da literatura (δ , CDCl₃, 50 MHz) (RIPARDO FILHO *et al.*, 2012).



	Cd-7a	Estigmasterol	Cd-7b	Espinasterol
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
C				
1	37,2	37,1	37,1	37,1
2	31,6	31,5	31,4	31,4
3	71,7	71,7	71,0	71,1
4	42,2	42,1	37,9	37,9
5	140,7	140,6	40,2	40,2
6	121,7	121,6	29,6	29,6
7	31,8	31,8	117,4	117,5
8	31,8	31,8	140,7	139,5
9	50,1	50,0	49,3	49,4
10	36,4	36,4	34,1	34,2
11	21,0	21,1	21,5	21,5
12	39,6	39,7	39,6	39,5
13	42,2	42,1	42,2	43,3
14	56,8	56,7	55,0	55,1
15	24,3	24,2	22,9	23,0
16	28,9	28,8	28,4	28,5
17	55,9	55,9	55,8	55,8
18	12,0	11,9	12,0	12,0
19	19,4	19,3	13,0	13,0
20	40,5	40,4	40,8	40,8
21	21,1	21,1	21,3	21,4
22	138,3	138,2	138,2	138,2
23	129,2	129,1	129,2	129,4
24	51,2	51,1	51,2	51,2
25	31,8	31,8	31,8	31,9
26	21,0	21,0	18,9	19,0
27	18,9	18,9	19,3	21,1
28	25,3	25,3	25,3	25,4
29	12,2	12,1	12,2	12,2

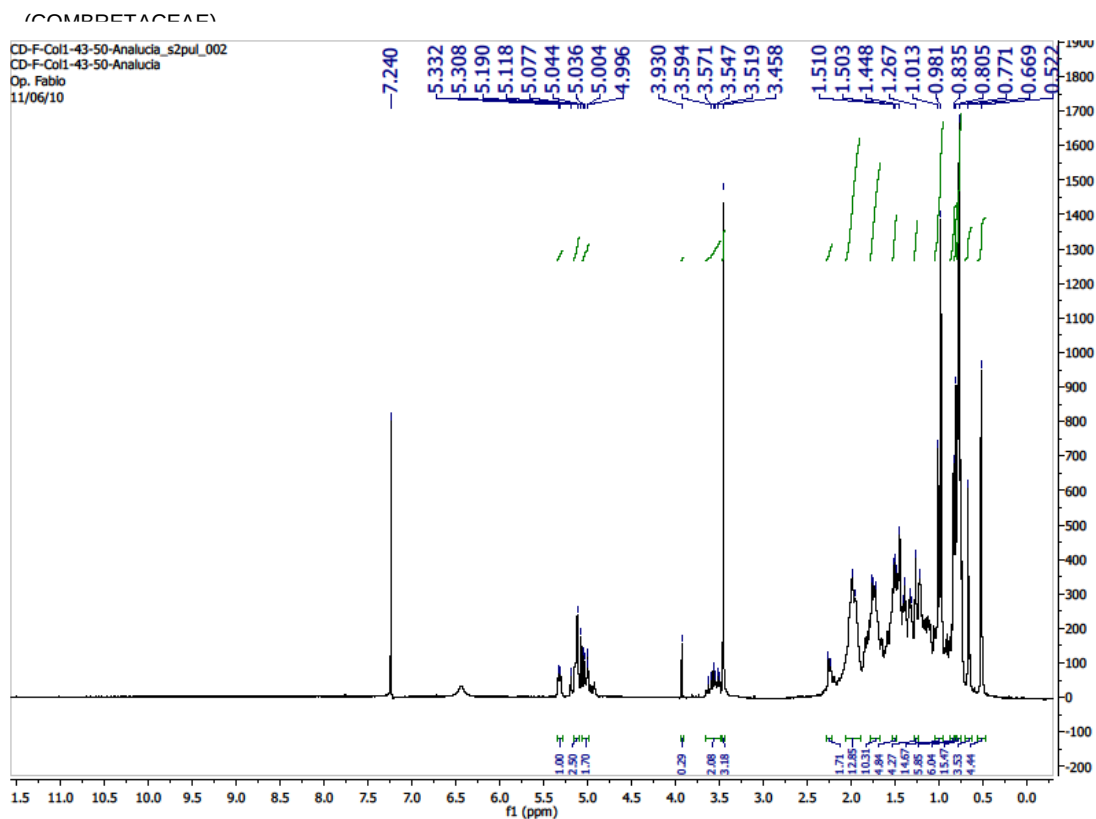


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl_3

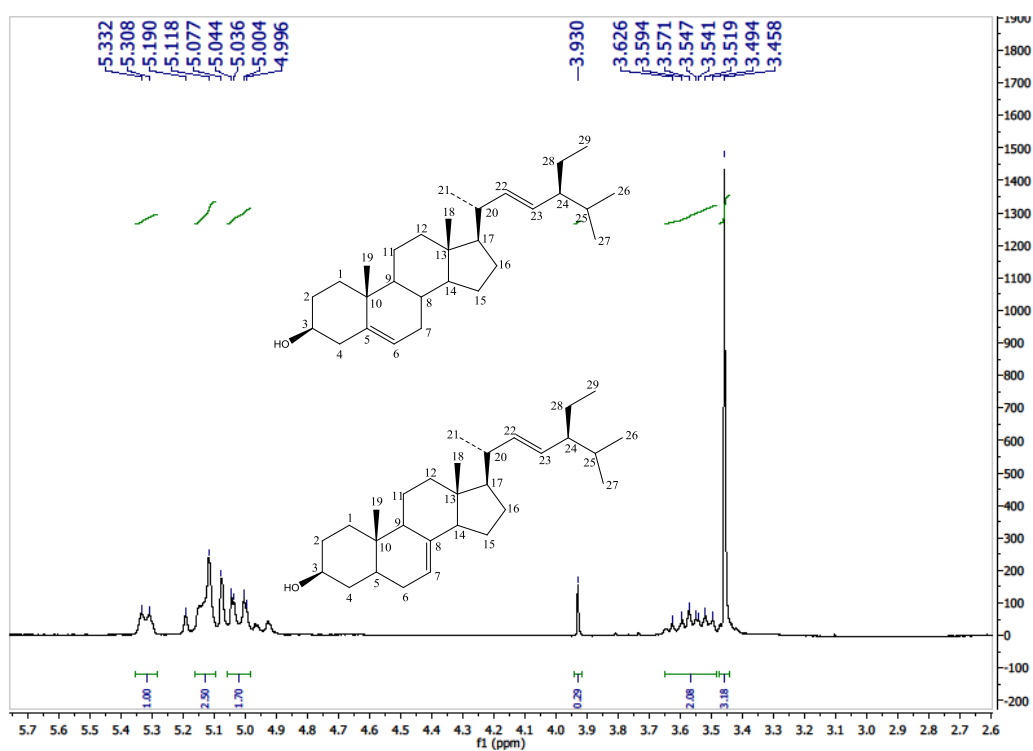


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl_3

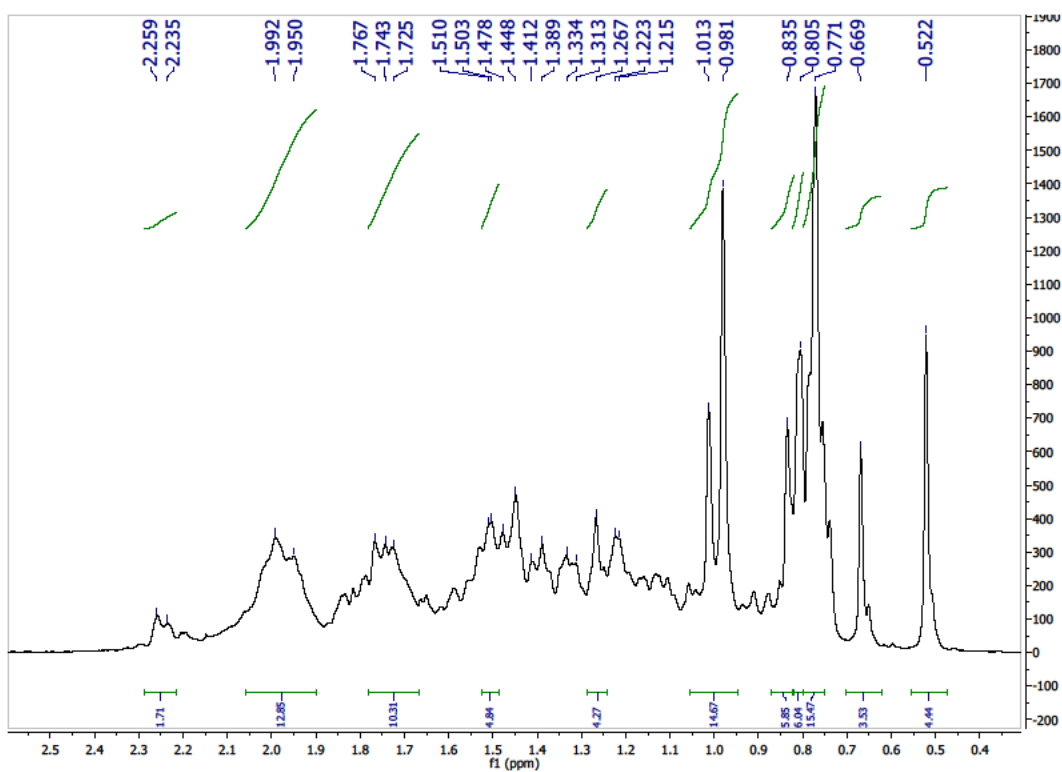
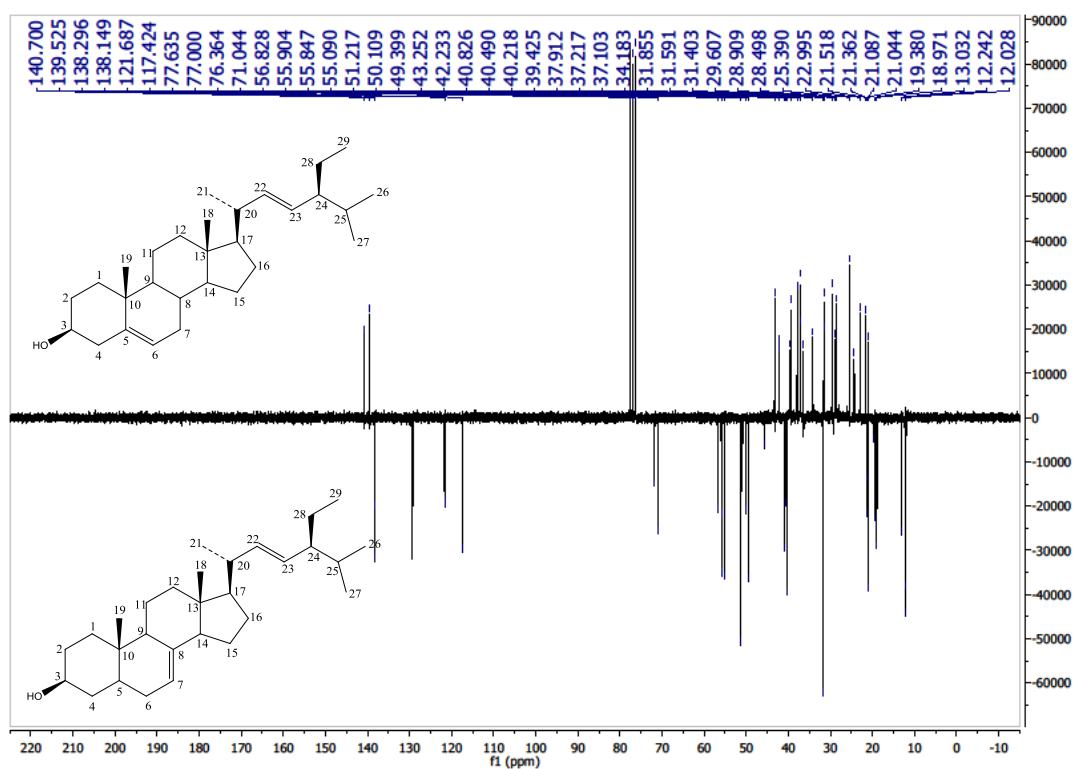


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl_3



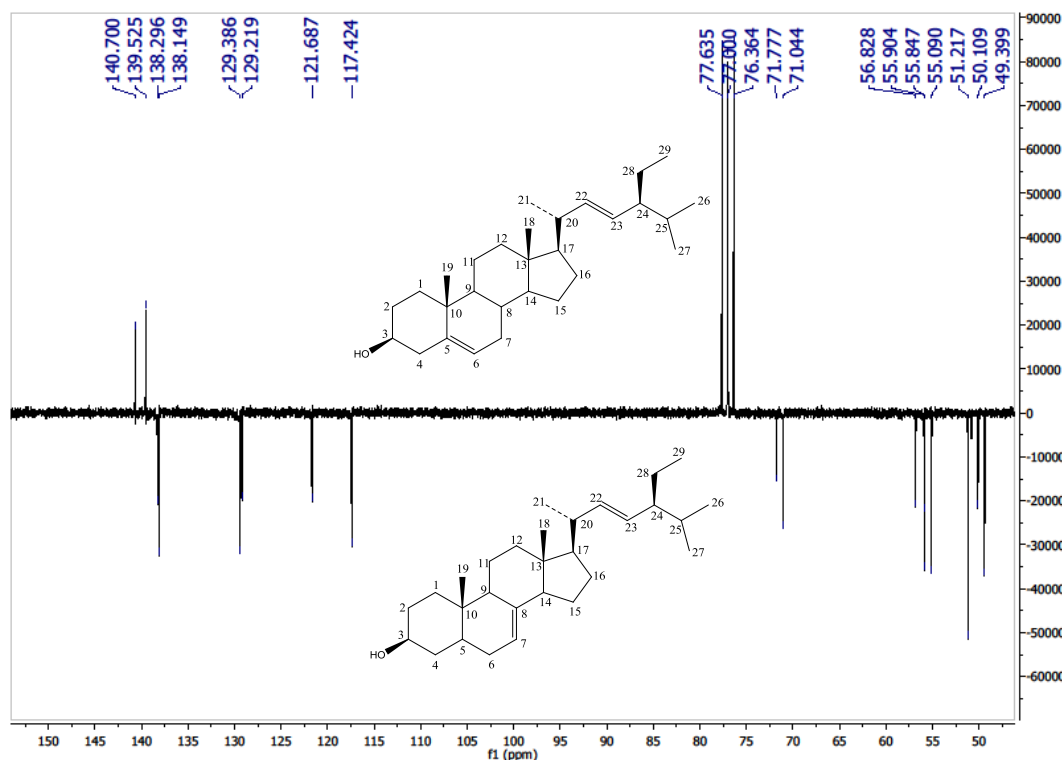


Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl_3

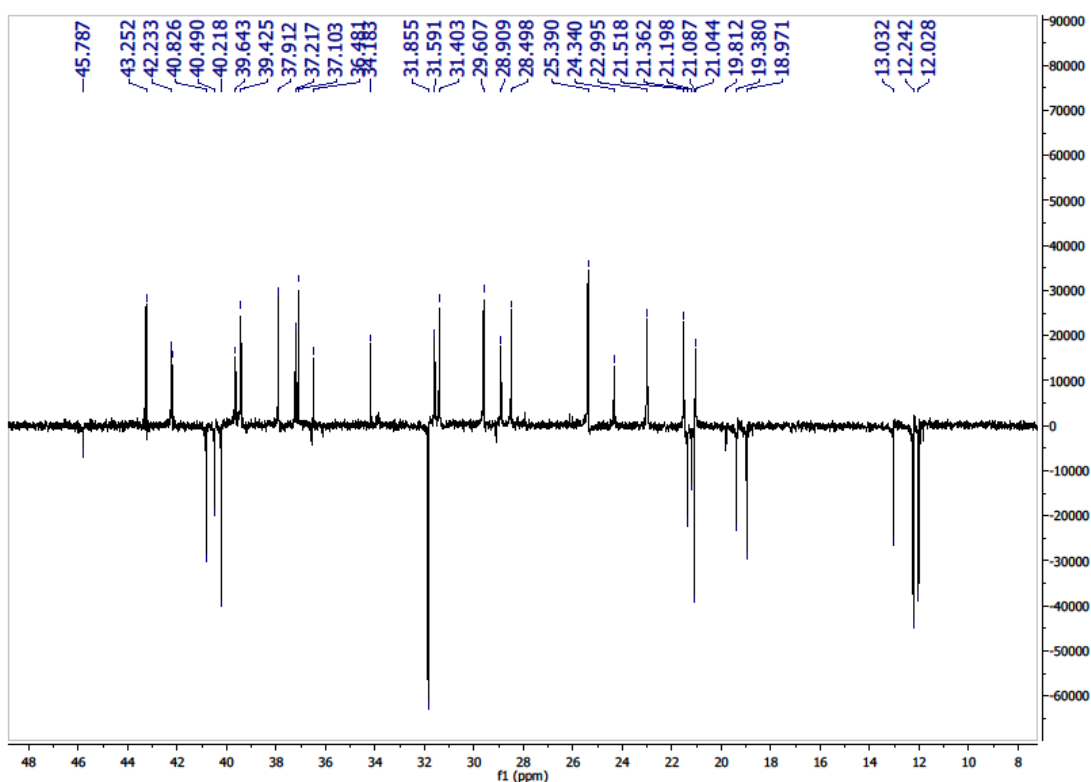


Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl_3

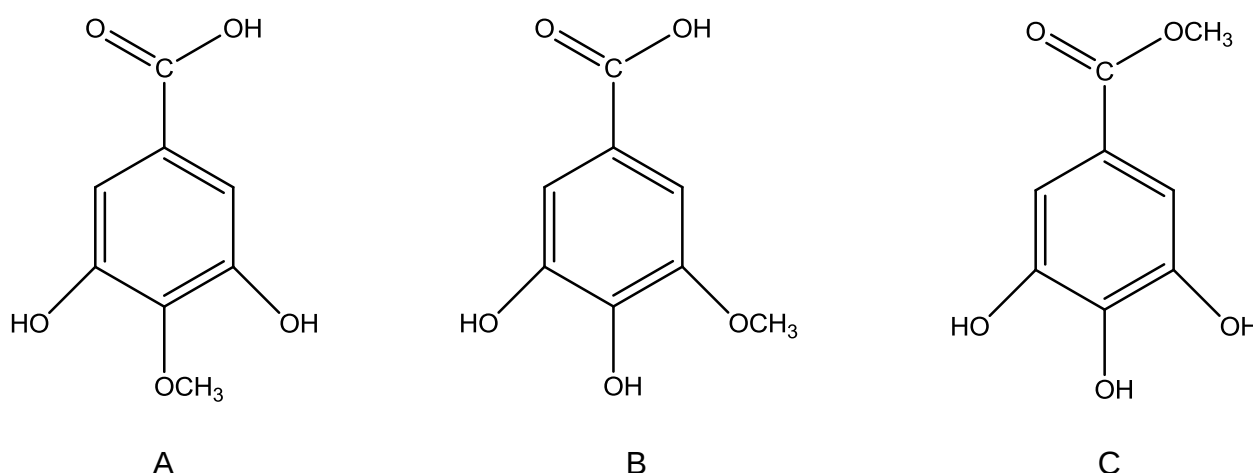
5.8 Identificação estrutural de Cd-8

A substância codificada como Cd-8 foi obtida na forma de pó amorfo marrom (3,0 mg). O espectro de IV de Cd-8 mostrou bandas de estiramentos de grupamentos O-H (3600 cm^{-1}), uma absorção de estiramento de carbonila C=O (1730 cm^{-1}), e vibrações de estiramento C-O (1260 cm^{-1}) (Figura 46, pág. 112).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Cd-8 (Figura 47, pág. 112) mostrou apenas duas absorções, dois singletos em δ_{H} 7,02 (2 H) e δ_{H} 3,80 (3 H), atribuídos a um hidrogênio aromático e hidrogênios metílicos, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) de Cd-8 (Figura 48, pág. 113) mostrou apenas uma absorção em δ_{C} 110,09, sendo os demais carbonos inferidos após análise das correlações dos espectros heteronucleares HMQC e HMBC.

O espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Figura 49, pág. 113) mostraram correlações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, podendo sugerir algumas propostas estruturais para Cd-8:



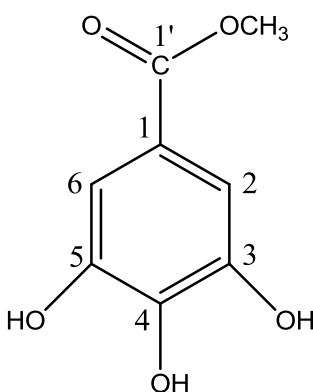
A correlação no espectro de HMQC dos hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,80 com seu respectivo carbono em δ_{C} 51,86, fez descartar as duas primeiras hipóteses, pois nas estruturas A e B os carbonos das metoxilas absorveriam em δ_{C} ~60 e δ_{C} ~56, respectivamente.

O espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (Figura 50, pág. 114) mostraram correlações do hidrogênio aromático em δ_{H} 7,02 com os carbonos em δ_{C} 108,65, 138,36, 145,07 e 167,69. Observou-se ainda, uma correlação da

metoxila em δ_H 3,80 com um carbono carboxílico em δ_C 167,69, confirmando a proposta C para Cd-8.

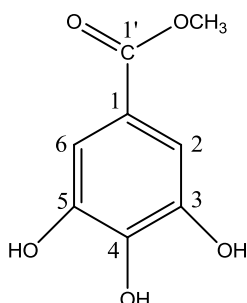
Assim, após análise dos dados espectrais e comparação com dados da literatura (Tabela 8, pág. 111), a substância codificada como Cd-8 foi identificada como sendo o Galato de Metila, isolada pela primeira vez na espécie em estudo.

Esta substância tem sido isolada de várias espécies como derivado do ácido gálico, apresentando atividade antibacteriana e antiviral (MEVYRE-SILVA, 2003).



Galato de metila

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de **Cd-8** registrados em MeOD (δ em ppm e J em Hz) e comparação com valores de RMN de ^{13}C (125 MHz) em DMSO- d_6 da literatura (Mo-8) (MOURA *et. al*, 2011).



Cd-8			Mo-8
	HMQC		
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
1'	167,47*	-	165,6
1	119,70*	-	119,7
3	144,92*	-	145,5
4	138,21*	-	138,0
5	144,92*	-	145,5
CH			
2	110,09	7,02 (s)	108,8
6	110,09	7,02 (s)	108,8
CH₃O			
CH ₃ O	51,87*	3,80 (s, 3H)	52,3

*Valores observados através dos espectros de RMN 2D.

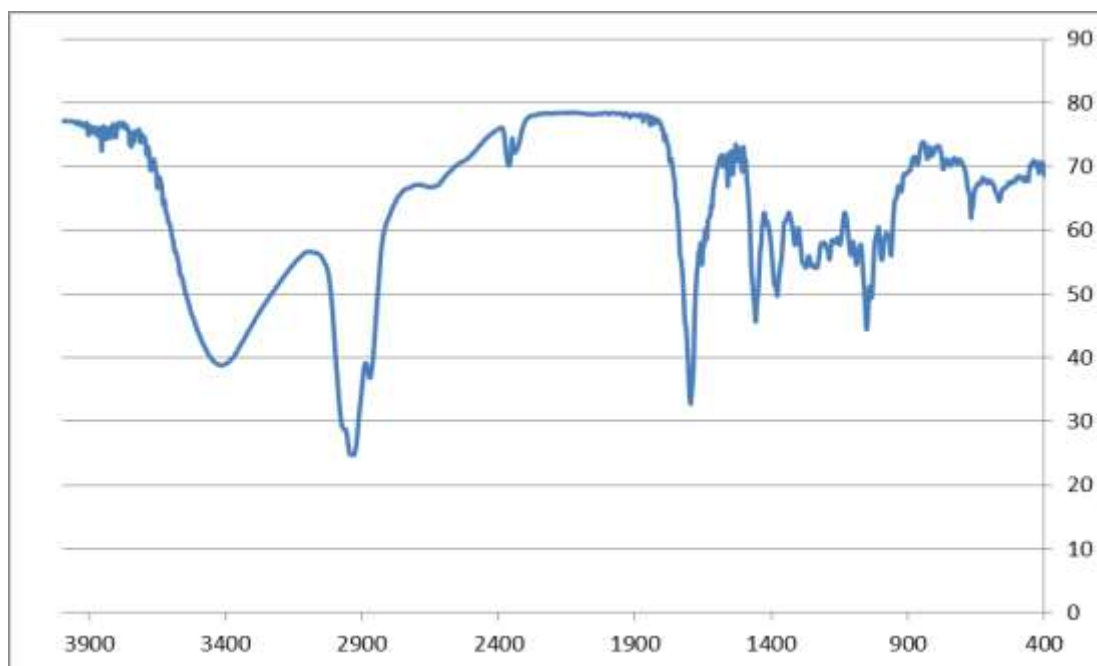


Figura 46. Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-8 em pastilhas de KBr.

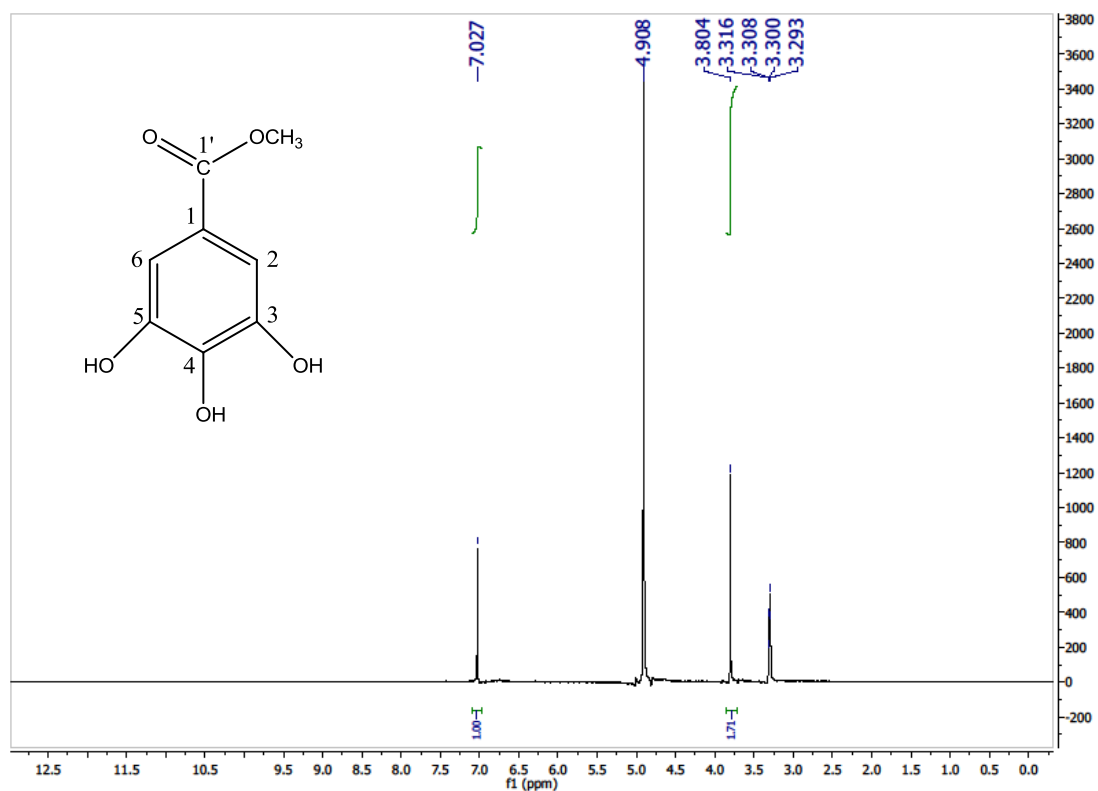


Figura 47. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-8 em MeOD.

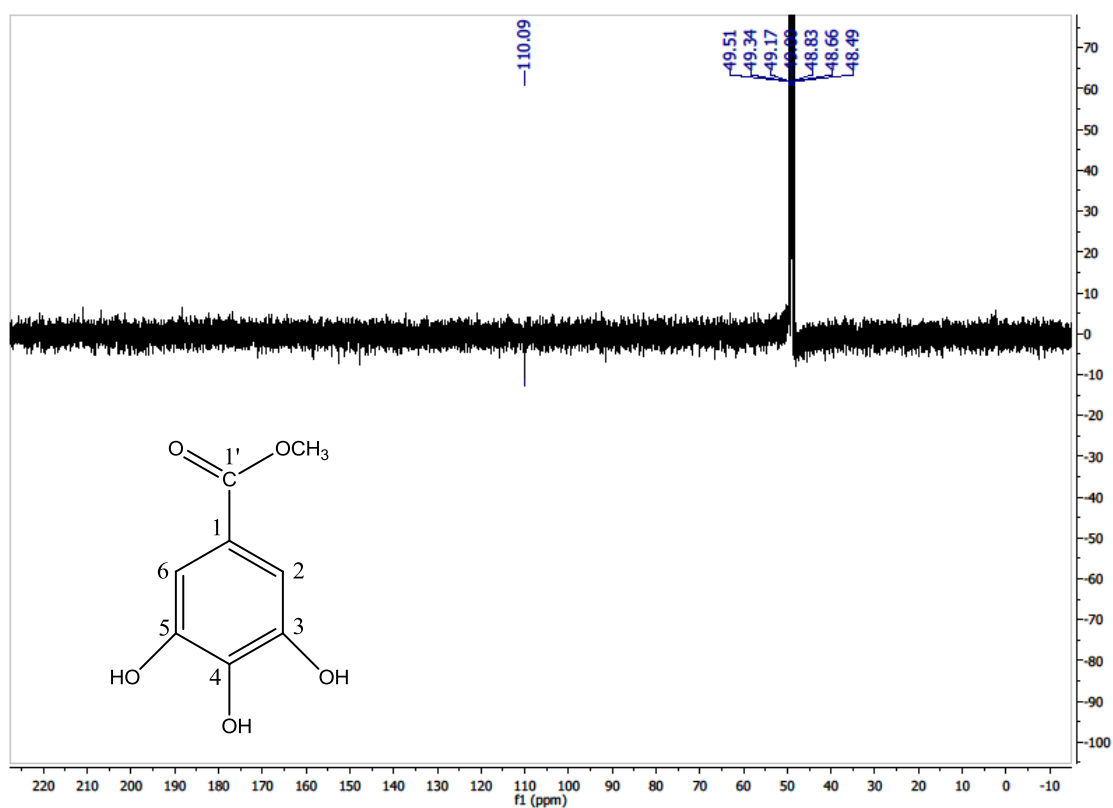


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-8 em MeOD.

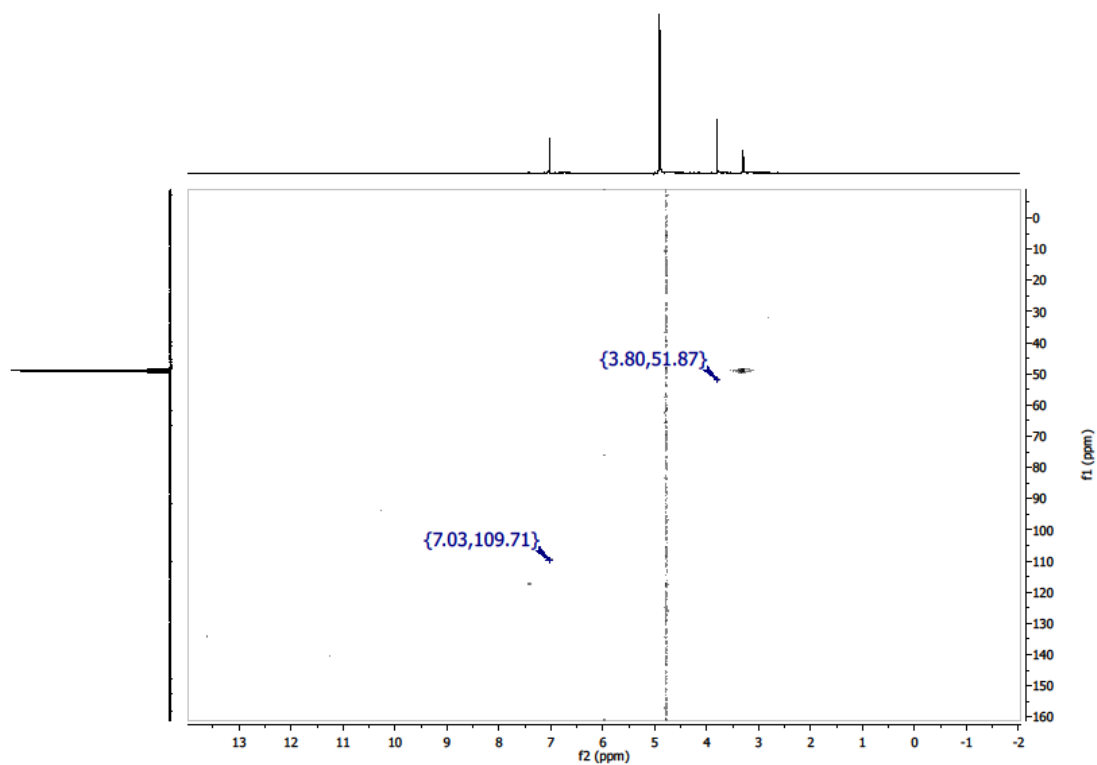


Figura 49. Espectro de HMQC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8.

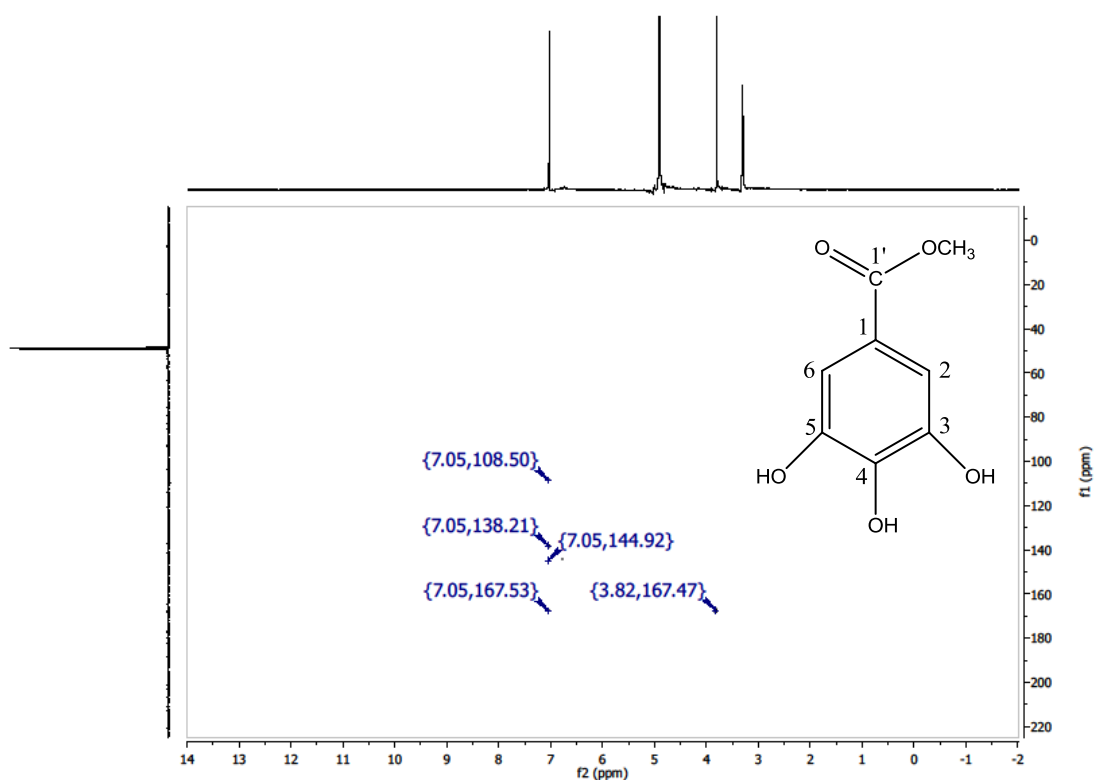


Figura 50. Espectro de HMBC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8.

5.9 Identificação estrutural de Cd-9

A substância Cd-9 apresentou aparência amorfa de cor amarelada (5,0 mg). O espectro de Massas com EM-ESI (Figura 51, pág. 120) mostrou o pico do íon molecular em 329,0 m/z [M-H], compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_7$.

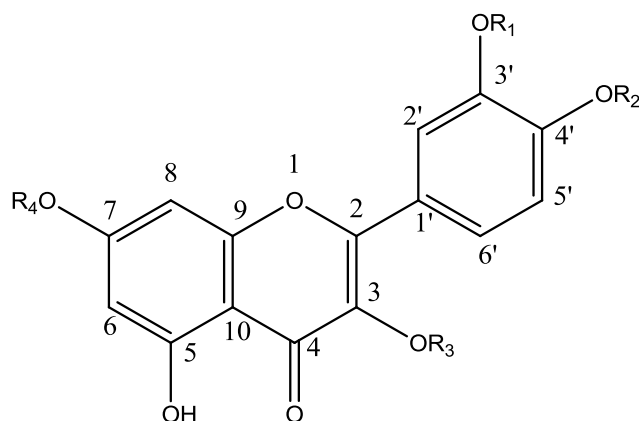
O espectro de IV de Cd-9 (Figura 52, pág. 120) mostrou bandas de estiramentos de grupamentos O-H (3400 cm^{-1}), uma absorção de estiramento de carbonila C=O (1690 cm^{-1}), vibrações de deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos (1.600 cm^{-1}) e vibrações de estiramento C-O (1200 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 53, pág. 121) e sua expansão (Figura 54, pág. 121), mostraram a presença de múltiplos dupletos na região de hidrogênios aromáticos. Observou-se um duplo duplete em δ_{H} 7,68 com acoplamento *orto* ($J = 8,5\text{ Hz}$) e *meta* ($J = 2,5\text{ Hz}$), um duplete em δ_{H} 6,95 com acoplamento *orto* ($J = 8,5\text{ Hz}$) e outro duplete em δ_{H} 7,65 ($J = 2,0\text{ Hz}$) mostrando acoplamento *meta*. Essas absorções revelaram um padrão de hidrogenação de um sistema ABX, sugerindo a presença de uma substância fenólica. Observou-se ainda, dois dupletos em δ_{H} 6,38 e δ_{H} 6,25 com acoplamento *meta* ($J = 2,5\text{ Hz}$), sugerindo a presença de outro anel tetrassubstituído. O conjunto destes sinais indicam a presença de um núcleo flavonoídico para Cd-9.

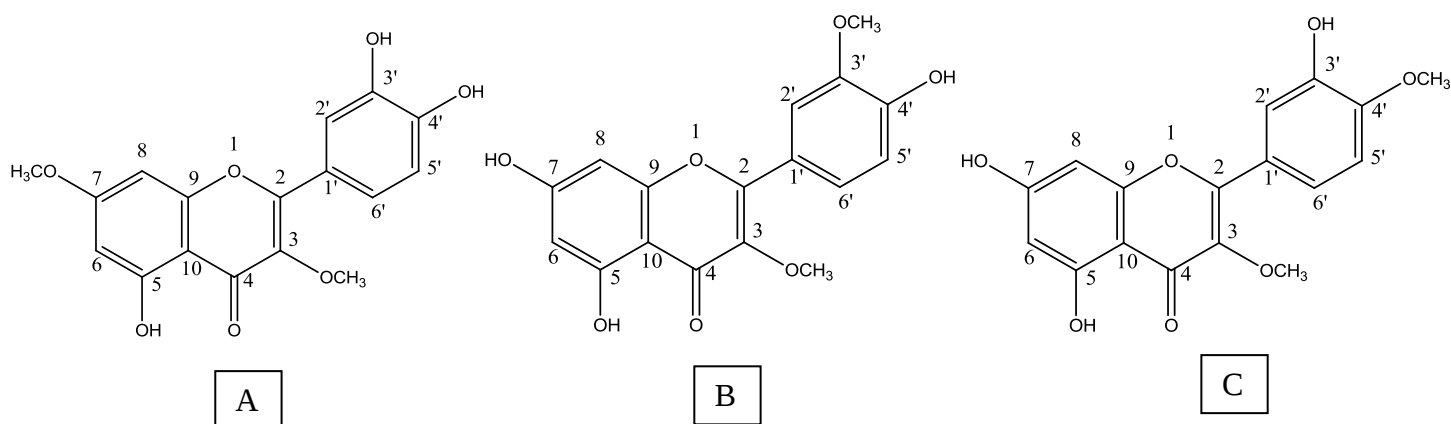
No espectro de RMN ^1H observou-se ainda, duas outras absorções referentes à metoxilas em δ_{H} 3,96 e δ_{H} 3,84. E a ausência de um simpleto na região entre δ_{H} 6,39-6,94, sugerindo que a posição C-3 do anel C encontra-se substituída (AGRAWAL, 1989).

Os dados de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figura 55, pág. 122) revelou a presença de sinais em δ_{C} 121,46, δ_{C} 114,39 e δ_{C} 110,42 corresponde aos carbonos 6', 2' e 5' respectivamente, corroborando com o padrão de substituição ABX para o anel B do anel flavonoídico. Observou-se ainda, sinais em δ_{C} 99,02 e δ_{C} 93,94, referentes aos carbonos 6 e 8, respectivamente, confirmando que o anel A possui um padrão de substituição nos carbonos C-5 e C-7 (AGRAWAL, 1989).

Pela análise do padrão de substituição observado nos anéis A e B através dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , foi possível sugerir a presença de substituintes oxigenados nas posições 3',4',5 e 7, permitindo propor o seguinte anel flavonoídico:



O espectro de RMN ^{13}C mostrou também dois sinais em δ_{C} 56,06 e δ_{C} 60,16 referentes a duas metoxilas, sendo esta última impedida estericamente (AGRAWAL, 1989). Então, através das atribuições destes sinais foi possível propor as seguintes estruturas para Cd-9:



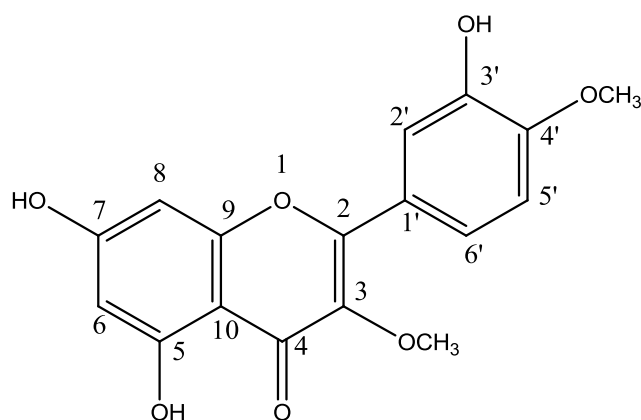
O espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Figuras 56 e 57, pág. 122 e 123) permitiu observar todas as correlações dos hidrogênios da molécula com seus respectivos carbonos.

O espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (Figura 58, pág. 123) e sua expansão (Figura 59, pág. 124) mostraram correlações a duas e três ligações. Para tanto, observou-se uma correlação a três ligações dos hidrogênios da metoxila desimpedida estericamente em δ_{H} 3,97 com um carbono não hydrogenado em δ_{C} 148,77, o que permite inferir que este carbono está ligado a respectiva metoxila. As correlações dos hidrogênios em δ_{H} 7,65 e δ_{H} 6,95 (H-2' e H-5', respectivamente), com o mesmo carbono (δ_{C} 148,77), fez sugerir que este seria o carbono C-3' ou C-4', descartando assim a proposta A. Além disso, outra correlação

do H-6' em δ_H 7,68 a três ligações, com o carbono que sustenta a metoxila confirmou que o deslocamento em δ_C 148,07 pertencia ao C-4', descartando, portanto, a proposta B.

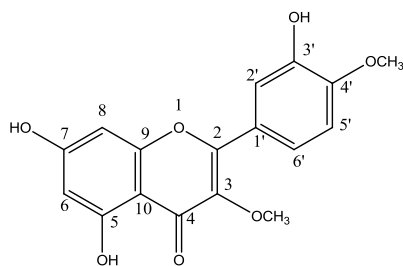
Comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C de Cd-9 com dados da literatura (BARBERÁ *et al.*, 1986) (Tabelas 9 e 10, pág. 118 e 119), permitiram a determinação da proposta estrutural, como sendo a 3',5,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona, também conhecida como jaceosidina ou quercetina 3,4'-dimetil éter, descrita pela primeira vez em *Combretum duarteanum*.

Algumas atividades farmacológicas já foram atribuídas ao flavonoide jaceosidina, entre elas a redução da formação de edema em orelha de camundongo no processo inflamatório. Inibiu, também a indução de NFkB, fator de transcrição que regula a resposta imune frente a um processo inflamatório (COUTINHO *et al.*, 2009). Além da ação vasorrelaxante em aortas de ratos (GUERRERO *et al.*, 2002).



3',5,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMBC) de **Cd-9** registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

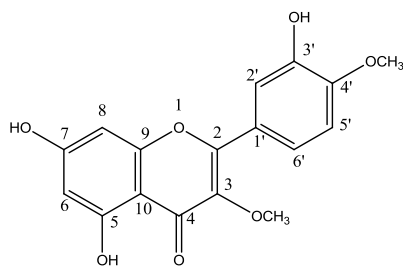


	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	155,10**	-		
3	139,12*	-		
4	177,81**	-		
5	161,72*	-		
7	162,23*	-		
9	156,79*	-		
10	105,00	-		
1'	124,18	-		
3'	145,53*	-		
4'	148,70*	-		
CH				
6	99,02	6,25 (<i>d</i> , $J=2,5\text{Hz}$, 1H)		C-8, C-10
8	93,94	6,38 (<i>d</i> , $J=2,5\text{Hz}$, 1H)	C-9	C-6, C-10
2'	114,39	7,65 (<i>d</i> , $J=2\text{Hz}$, 1H)	C-3'	C-4', C-6'
5'	110,42	6,95 (<i>d</i> , $J=8,5\text{Hz}$, 1H)	C-4'	C-1', C-3'
6'	121,46	7,68 (<i>dd</i> , $J=2,5$ e $J=8,5\text{ Hz}$, 1H)		C-2', C-4'
CH₃O				
CH ₃ O-3	56,06	3,96 (<i>s</i> , 3H)		C-3
CH ₃ O-4'	60,16	3,84 (<i>s</i> , 3H)		C-4'

*Valores observados através dos espectros de RMN 2D.

**Valores dados pela literatura.

Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **Cd-9** e comparação com valores da literatura (Mo-9) (δ , $\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz) (BARBERÁ *et al.*, 1986).



	Cd-9 δ_c	Mo-9 δ_c
C		
2	155,10	155,10
3	139,12	137,94
4	177,81	177,81
5	161,72	161,21
7	162,23	164,78
9	156,79	156,39
10	105,00	103,99
1'	124,18	122,31
3'	145,53	146,33
4'	148,70	150,16
CH		
6	99,02	98,70
8	93,94	93,68
2'	114,39	114,92
5'	110,42	111,93
6'	121,46	120,27
CH₃O		
CH ₃ O-3	56,06	55,62
CH ₃ O-4'	60,16	59,70

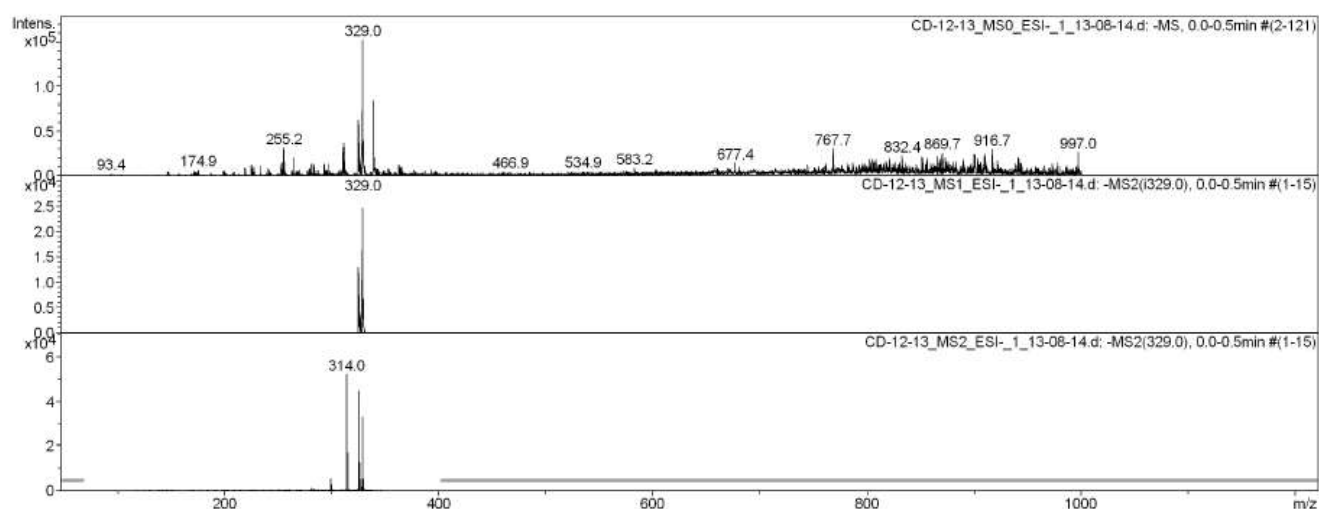


Figura 51. [M-H] – (EM-ESI, modo negativo) Espectro de Massas de Cd-9.

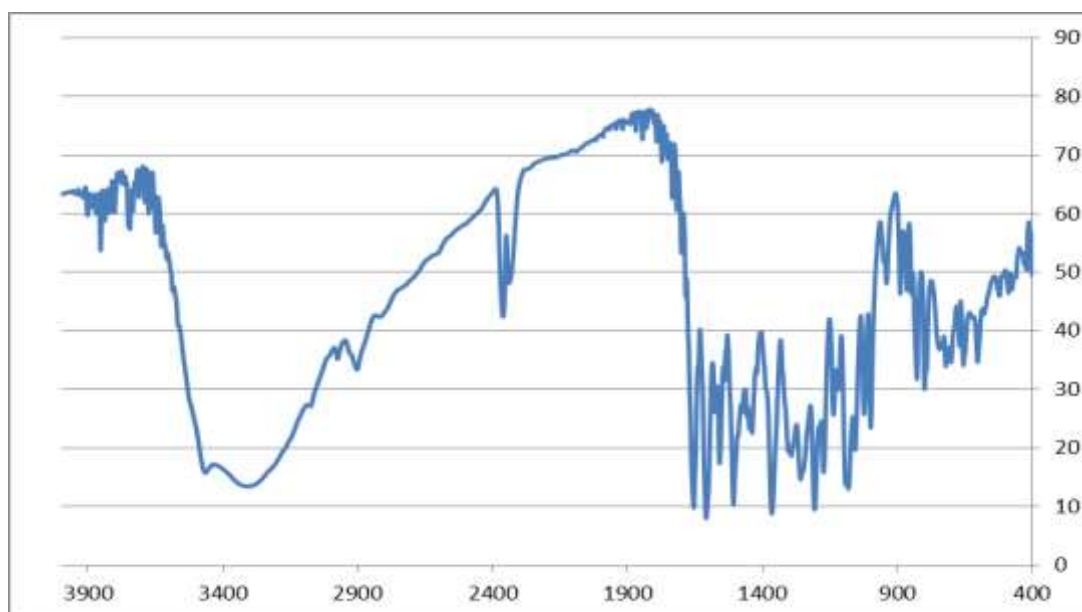


Figura 52. Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-9 em pastilhas de KBr.

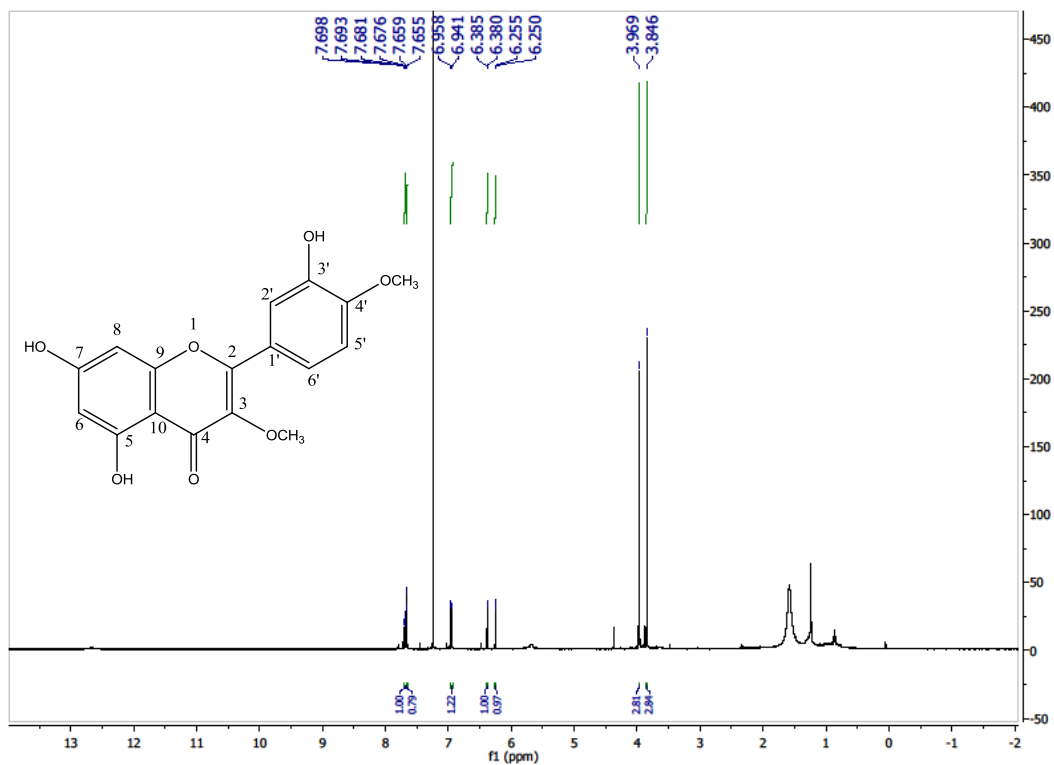


Figura 53. Espectro de ¹H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl₃

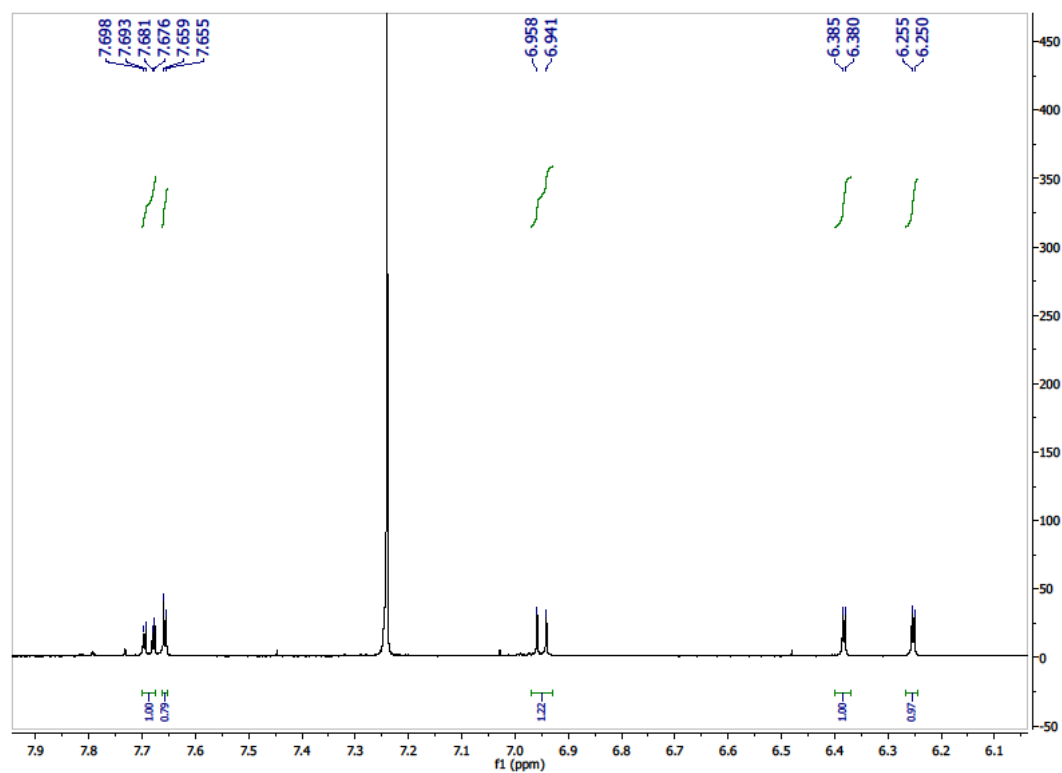


Figura 54. Expansão do espectro de ¹H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl₃

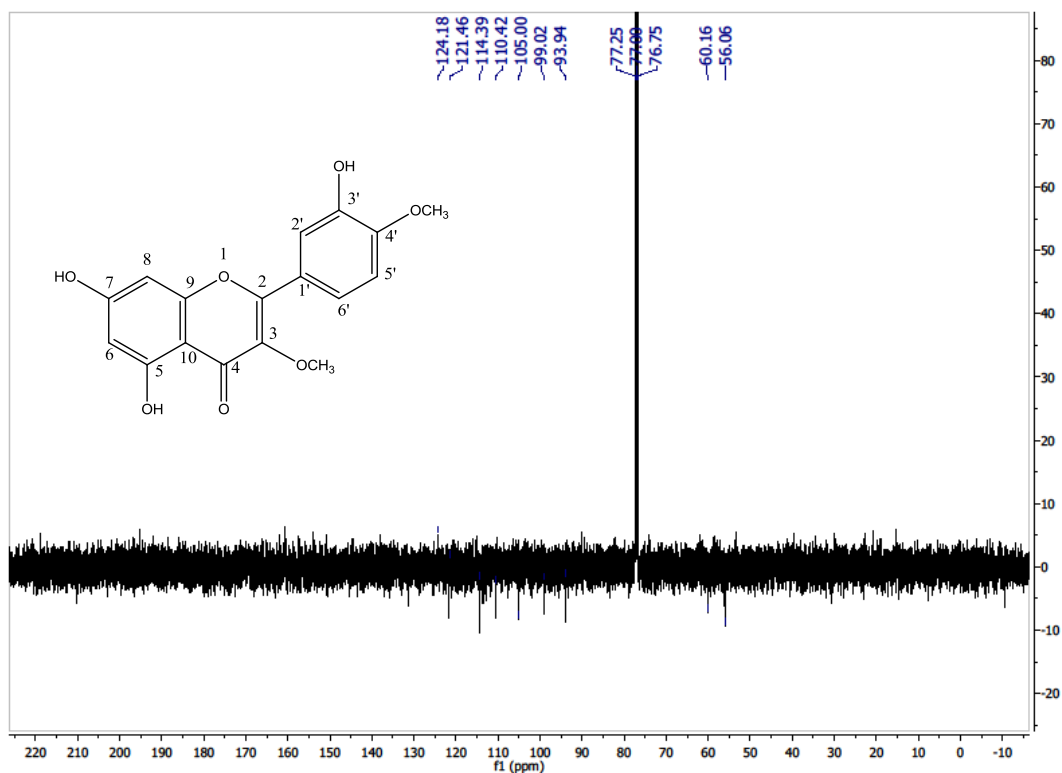


Figura 55. Espectro de ^{13}C -APT (125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3

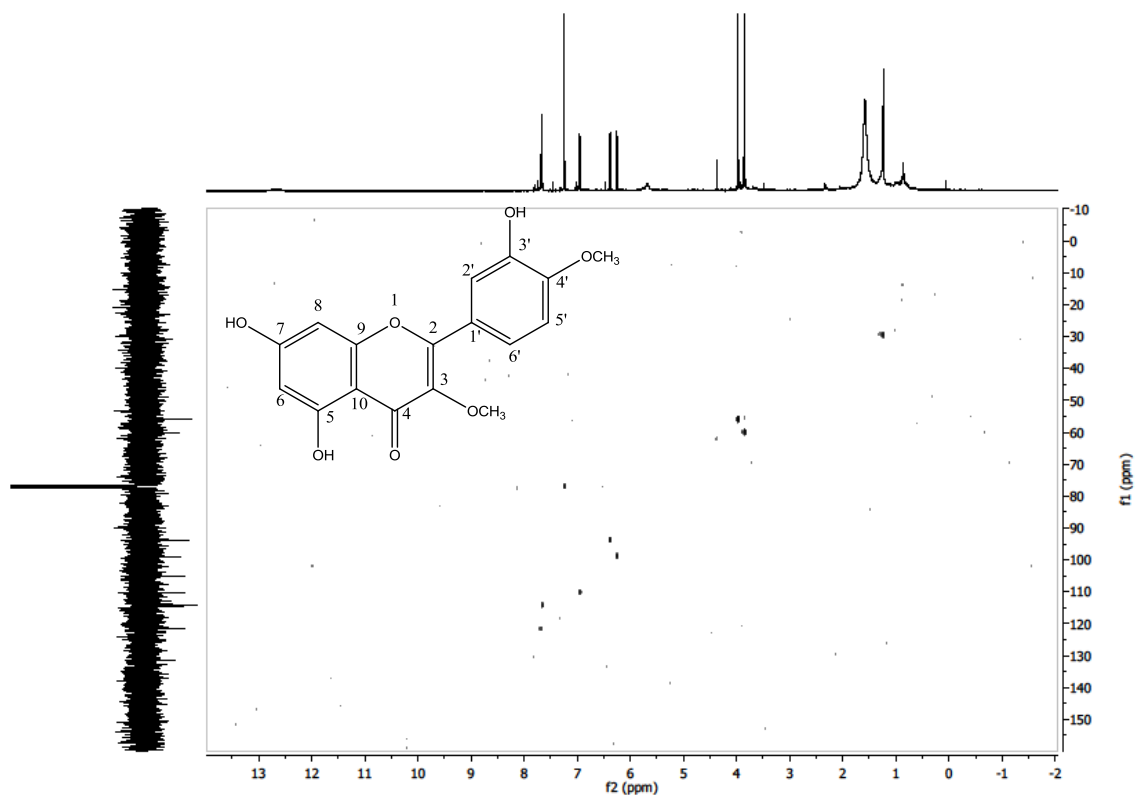


Figura 56. Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3

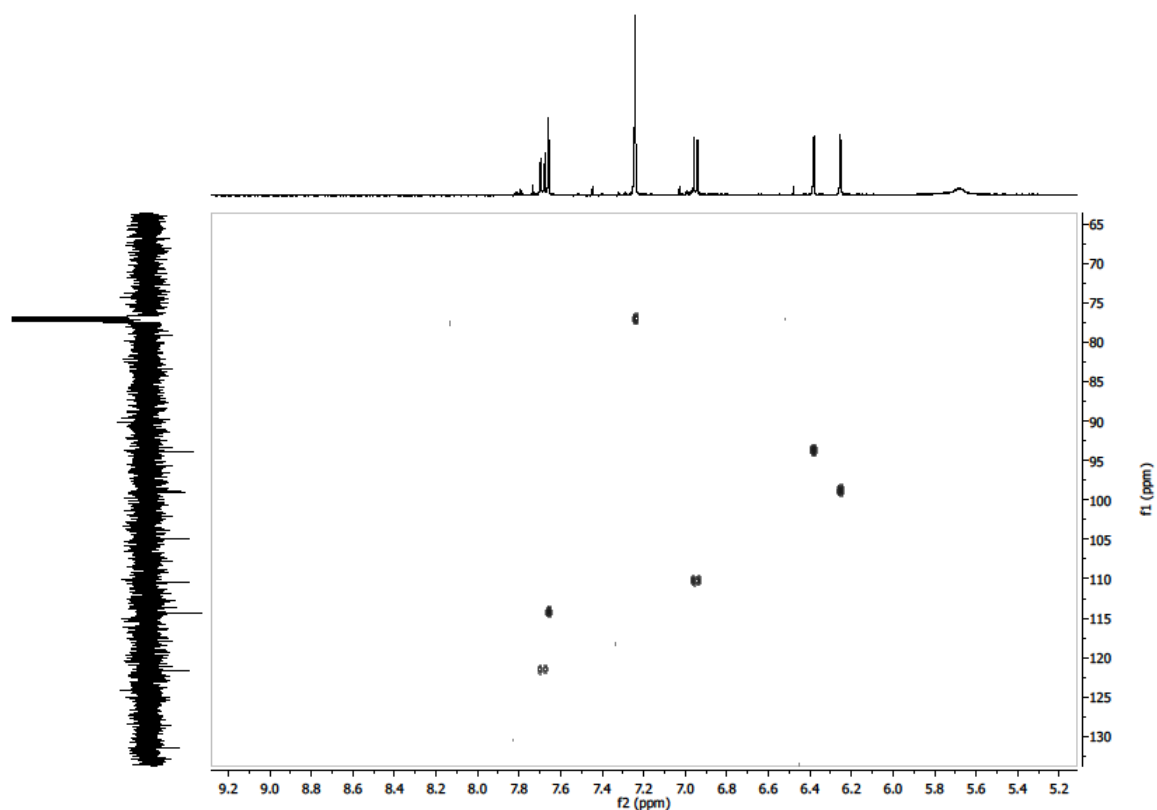


Figura 57. Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3

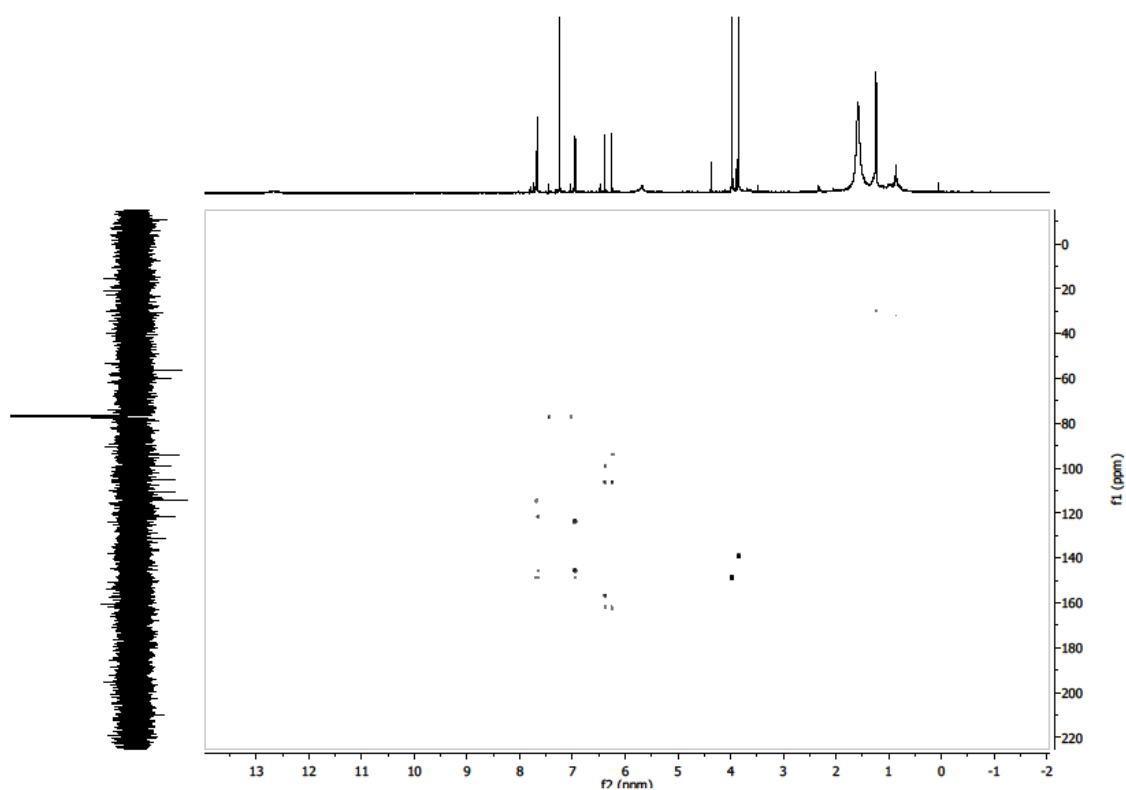


Figura 58. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl_3

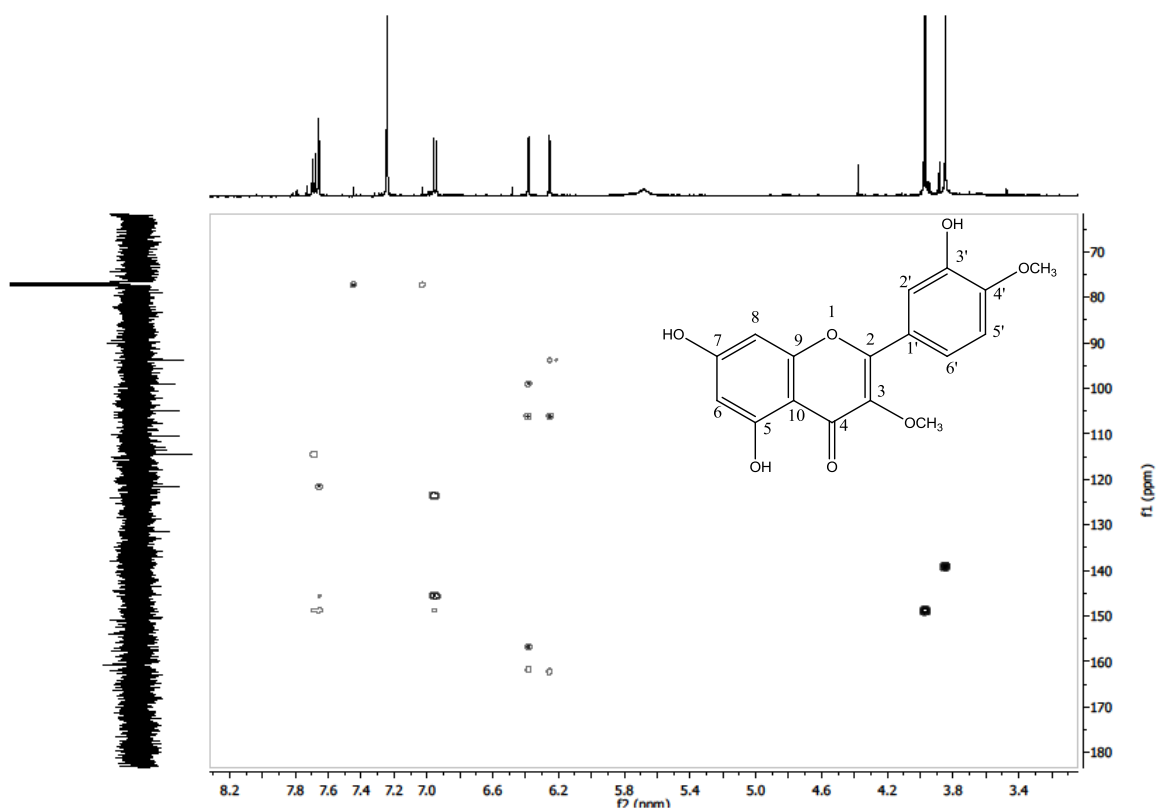


Figura 59. Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl₃

5.10 Identificação estrutural de Cd-10

A substância codificada como Cd-10 (9,0 mg) apresentou-se como um pó amorfo amarelado. O espectro de IV de Cd-10 (Figura 60, pág. 128) evidenciou bandas de estiramentos de grupamentos O-H (3400 cm^{-1}), uma absorção de estiramento de carbonila C=O (1650 cm^{-1}), vibrações de deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos (1.600 cm^{-1}) e vibrações de estiramento C-O (1300 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Cd-10 e suas expansões (Figuras 61-63, pág. 128 e 129), mostraram deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, semelhante a Cd-9. Observou-se um duplo duplete em δ_{H} 7,65 com acoplamento *orto* ($J = 8,5\text{ Hz}$) e *meta* ($J = 2,5\text{ Hz}$), um duplete em δ_{H} 7,53 com acoplamento *meta* ($J = 2,5\text{ Hz}$) e outro duplete em δ_{H} 6,81 ($J = 8,5\text{ Hz}$) mostrando acoplamento *orto*. Essas absorções revelaram um padrão de hidrogenação de um sistema ABX para núcleo flavonoídico. Observou-se ainda, dois dupletos em δ_{H} 6,40 e 6,20 com acoplamento *meta* ($J = 2,0\text{ Hz}$) sugerindo a presença de um anel A 5,7 dissubstituído, semelhante ao que foi observado para Cd-9.

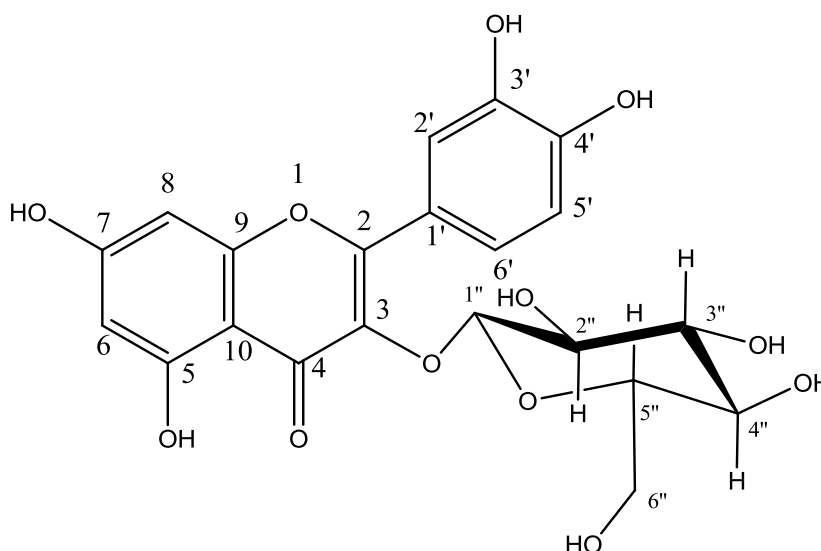
No espectro de RMN ^1H , ainda foi possível observar um conjunto de sinais na região entre δ_{H} 5,20 - 3,30, sugerindo a presença de uma unidade osídica, destacando-se um duplete em δ_{H} 5,36 ($J = 7,5\text{ Hz}$), atribuído ao hidrogênio anomérico desta unidade osídica (HARBORNE, 1994).

O espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6), bem como suas expansões (Figuras 64-66, pág. 130 e 131), mostraram a presença de 21 linhas espectrais, atribuídas a dez carbonos quaternários, dez carbonos metínicos e um carbono metilênico. Neste espectro observou-se a presença de 15 sinais característicos de flavonoides, com destaque para os sinais norteadores em δ_{C} 156,32 e δ_{C} 133,46, atribuídos aos carbonos da dupla ligação em C-2 e C-3, e o sinal em δ_{C} 177,49, referente a uma carbonila em C-4, corroborando com a presença de um flavonoide do tipo flavona para Cd-10. Os sinais intensos em δ_{C} 115,20, δ_{C} 115,93 e δ_{C} 122,03, referentes aos carbonos C- 2', 5' e 6', respectivamente, confirmam a proposta de um sistema ABX para o anel B deste composto. Assim como também, os sinais em δ_{C} 98,72 e δ_{C} 93,55, referentes aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, confirmam o padrão 5,7 dissustituído do anel A.

O conjunto de sinais característicos de carbonos oximetínicos em δ_C 101,77; 75,86; 73,19; 71,21; 67,94 e 60,15 corroboram a presença de uma unidade osídica na estrutura. A natureza da unidade osídica foi revelada pela presença do sinal em δ_C 60,15, atribuído ao carbono oximetilênico de uma unidade osídica, assim como, pela presença, no espectro de RMN de 1H , do duplete em 5,36 ($J= 7,5$ Hz), corroborando para a presença de uma unidade galactose em Cd-10 (HARBONE, 1994). A inserção da unidade osídica em Cd-10 foi confirmada pelo deslocamento do C-3 em δ_C 133,46, característico de carbono ligado a unidade osídica.

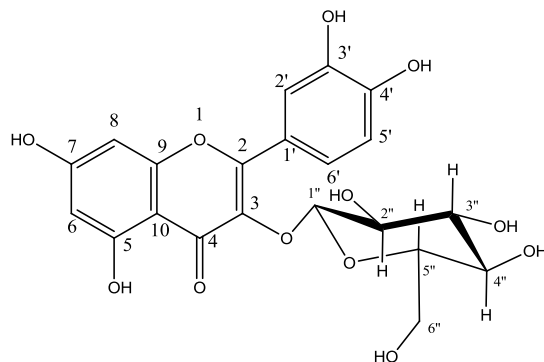
Assim, o composto codificado como Cd-7, após análise dos dados e comparação com a literatura (Tabela 11, pág. 127) foi identificado como o 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-O-galactopiranosídeo, também conhecido como hiperina, isolado pela primeira vez na espécie em questão.

A hiperina possui relato de inibição do óxido nítrico (NO) por meio da inibição da expressão de iNOS, por atenuação de proteínas quinases como p44/p42 MAPK p38 MAPK e JNK, participando como anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2008).



5,7,3',4'- tetrahidroxiflavona-3-O-galactopiranosídeo

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) de **Cd-10** registrados em DMSO- d_6 (δ em ppm e J em Hz) e comparação com os valores de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da literatura (Mo-10) (SANTOS *et al.*, 2005).



	Cd-10		Mo-10
	δ_{C}	δ_{H}	
C			
2	156,32	-	156,86
3	133,46	-	134,01
4	177,49	-	178,00
5	161,24	-	161,74
7	164,22	-	164,88
9	156,32	-	156,75
10	103,90	-	104,34
1'	121,09	-	121,61
3'	144,85	-	145,38
4'	148,50	-	149,03
CH			
6	98,72	6,20 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)	99,28
8	93,55	6,40 (<i>d</i> , $J=2$ Hz, 1H)	94,09
2'	115,20	7,53 (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz, 1H)	116,50
5'	115,93	6,81 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz, 1H)	115,63
6'	122,03	7,65 (<i>dd</i> , $J=2,5$ e $J=8,5$ Hz, 1H)	122,50
1''	101,77	5,36 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz, 1H)	102,37
2''	71,21	-	71,75
3''	73,19	-	73,73
4''	67,94	-	68,49
5''	75,86	-	76,27
CH₂			
6''	60,15	-	60,46
OH		12,61 (<i>s</i> , 1H)	

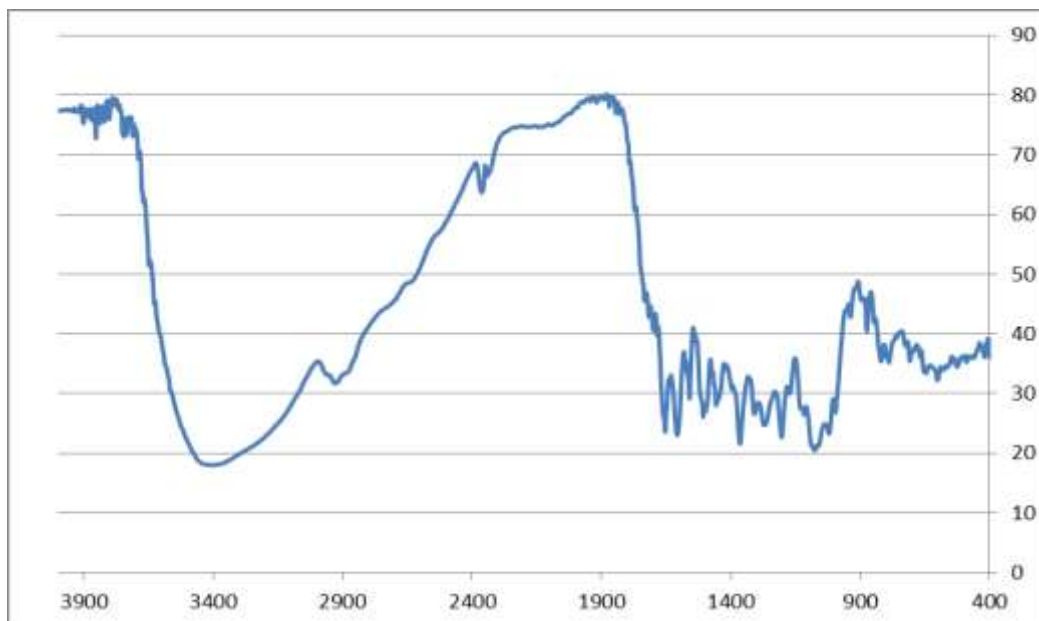


Figura 60. Espectro de IV (cm^{-1}) de Cd-10 em pastilhas de KBr.

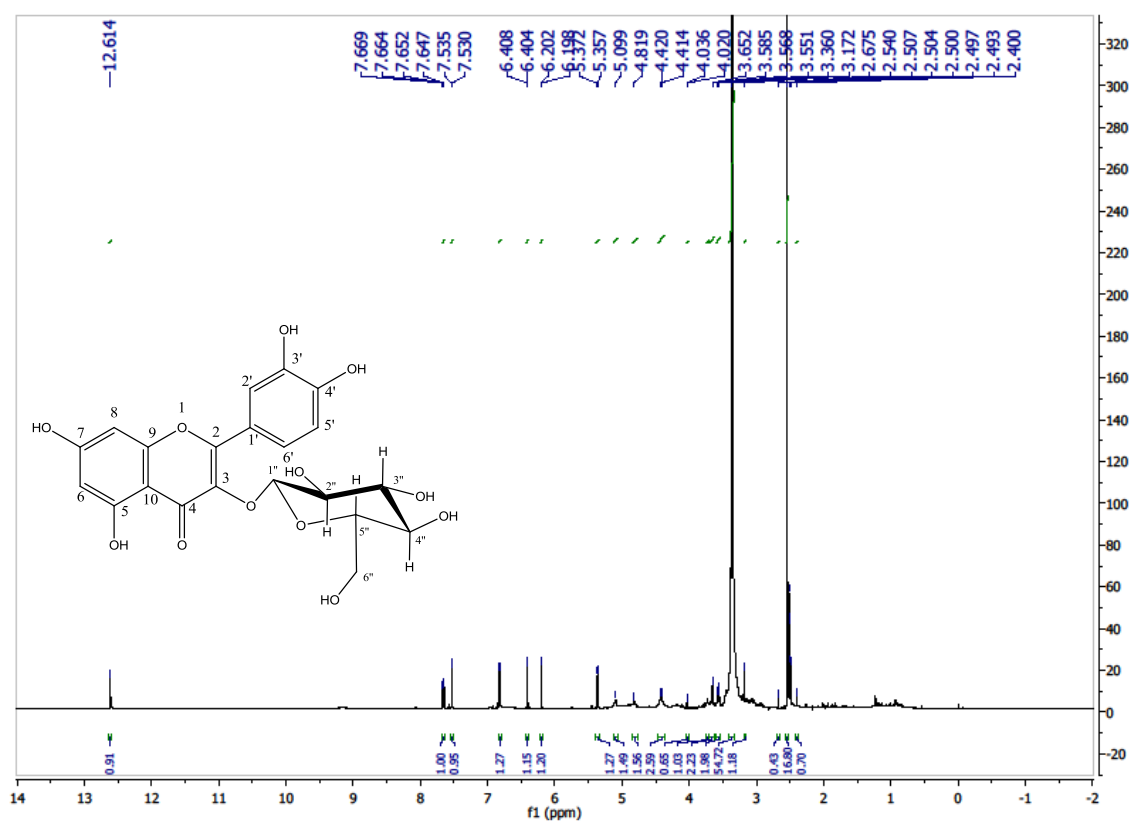


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$

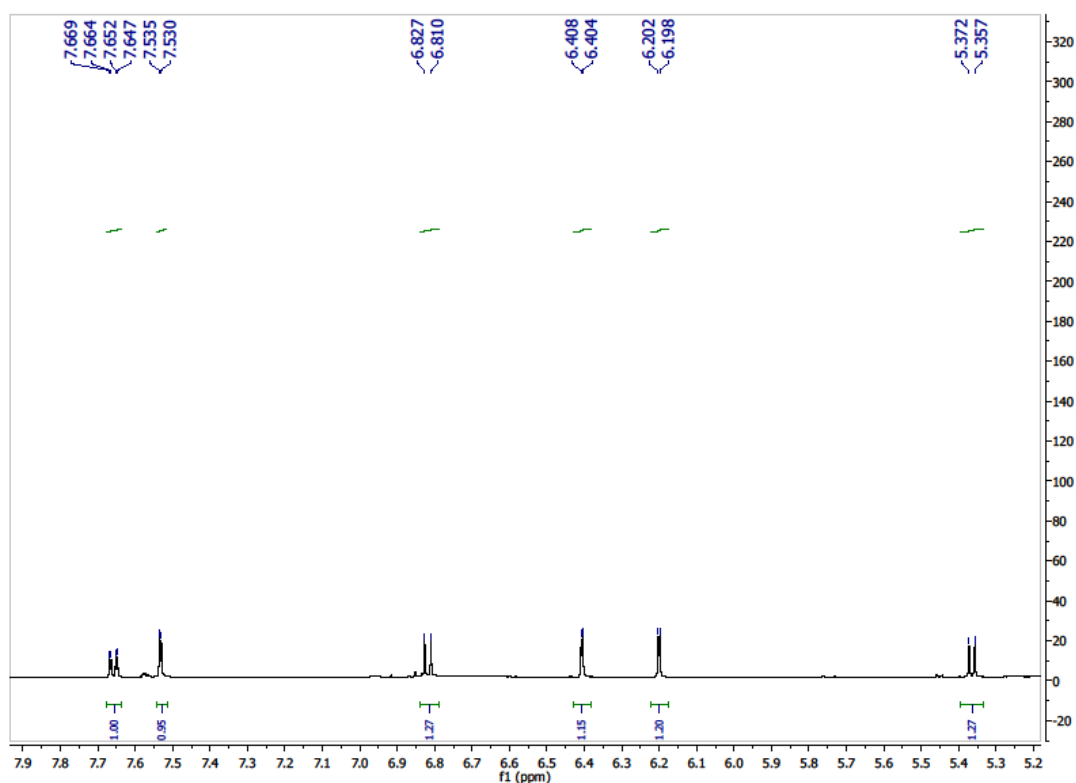


Figura 62. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO-}d_6$

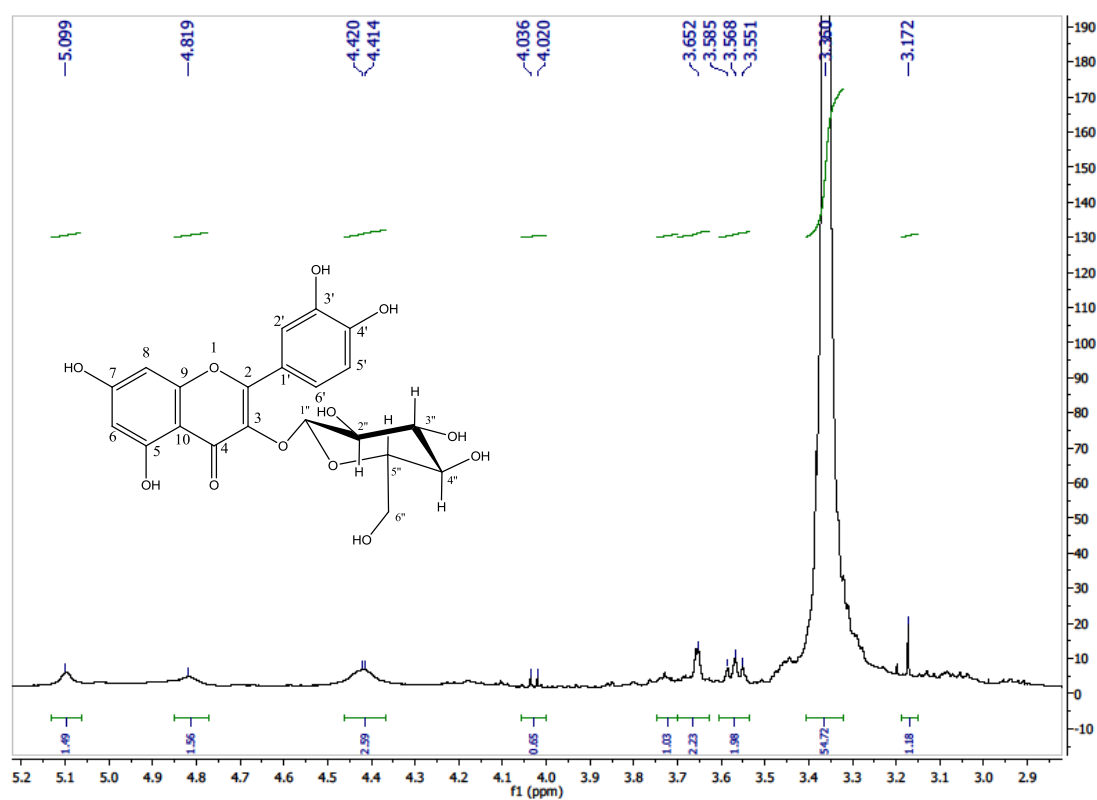


Figura 63. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO-}d_6$

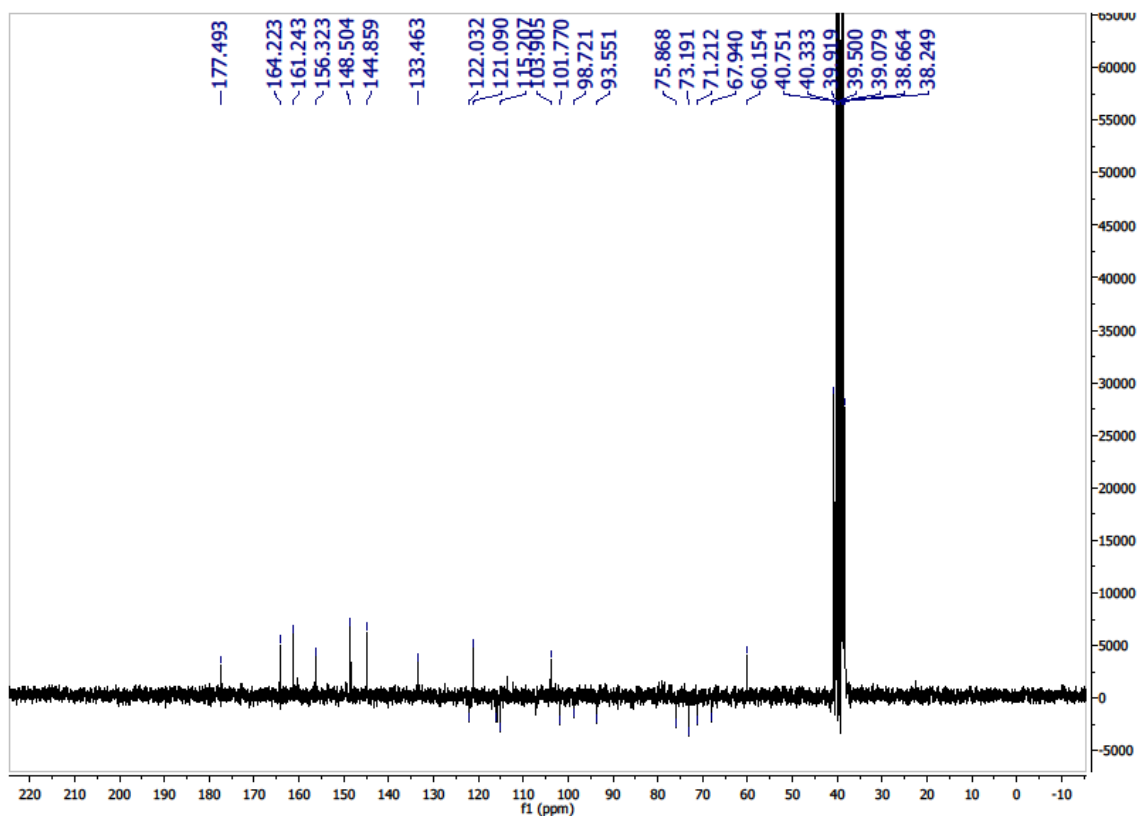


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$

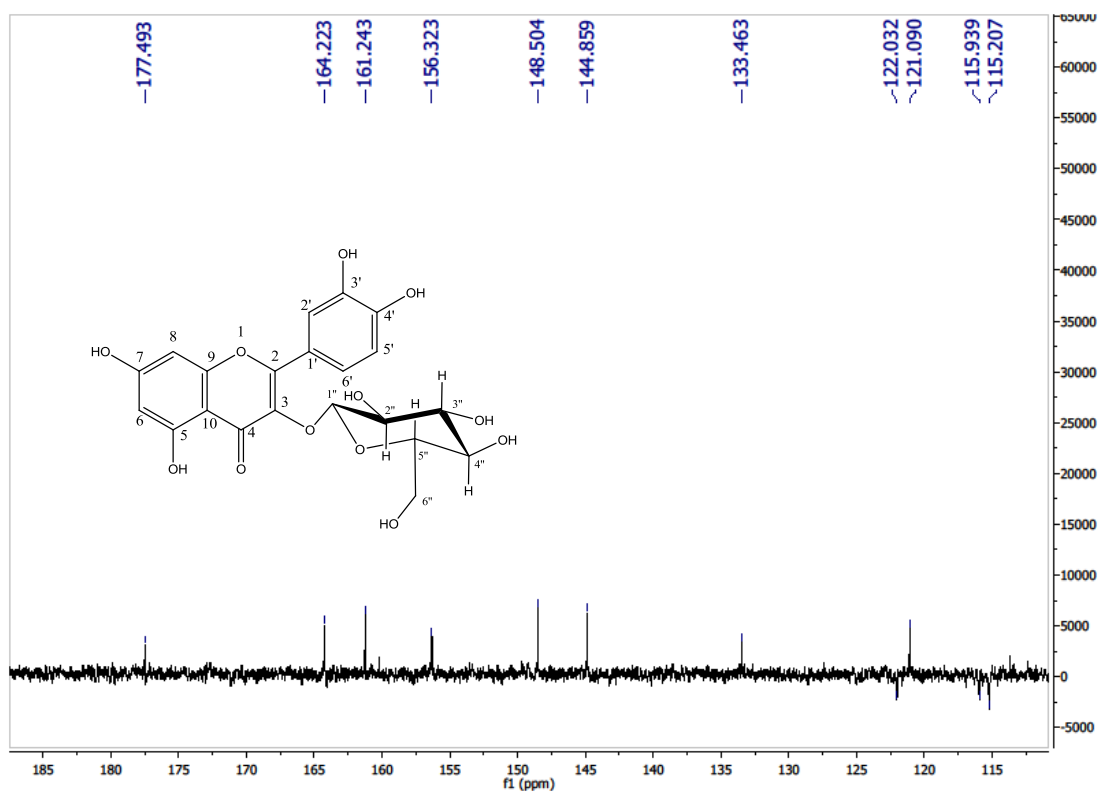


Figura 65. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$

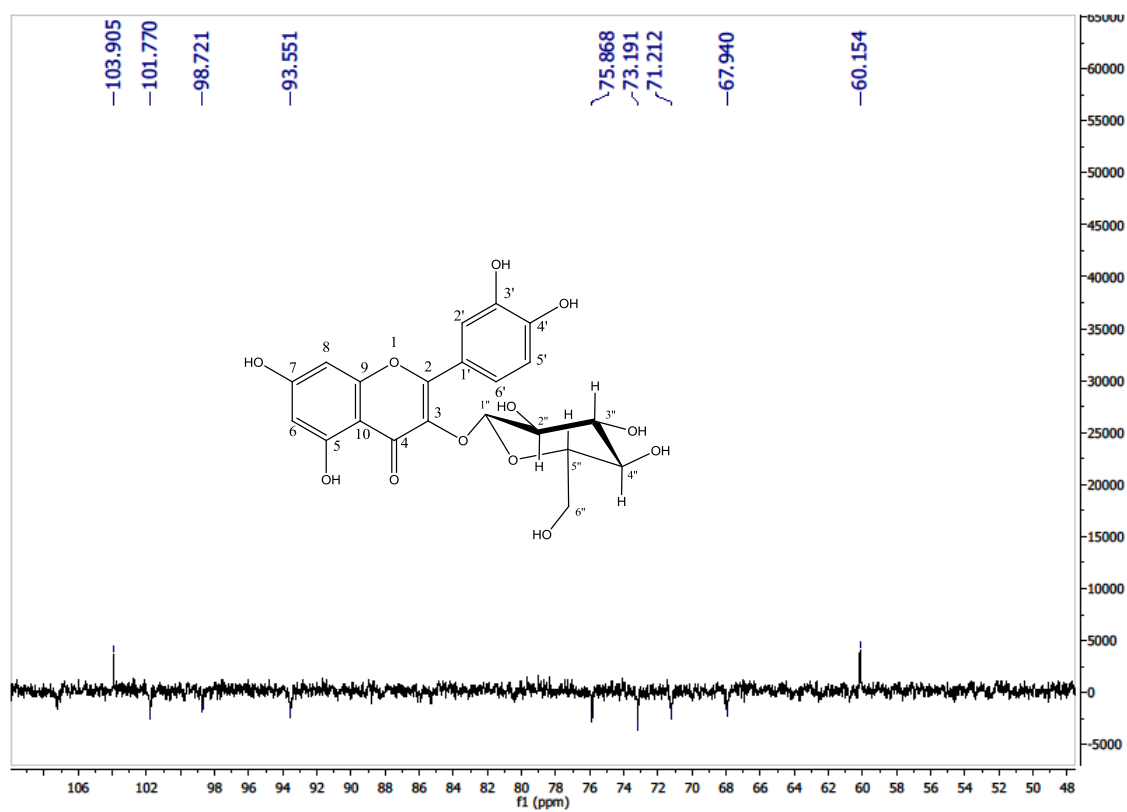
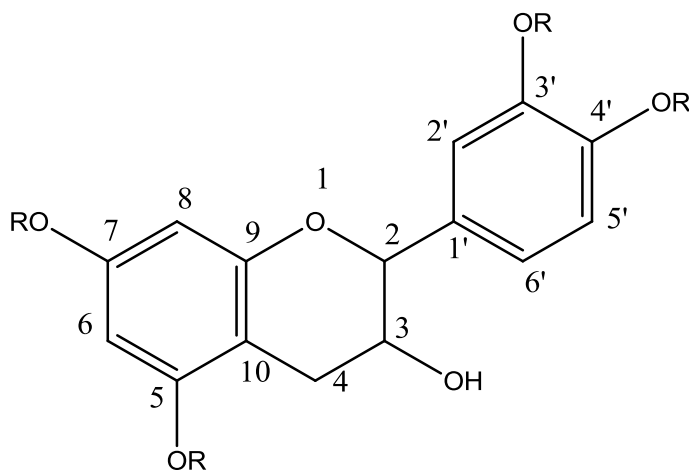


Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de Cd-10 em $\text{DMSO}-d_6$

5.11 Identificação estrutural de Cd-11

A substância codificada como Cd-11 (6,0 mg) foi obtida como um pó marrom amorfo. O espectro de Massas com EM-ESI (Figura 67, pág. 136) mostrou o pico do íon molecular em 289,0 m/z [M-H], compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$.

Os espectros de RMN 1H (500 MHz, MeOD) de Cd-11 e suas expansões (Figuras 68-70, pág. 136 e 137), mostraram deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos. Observou-se um duplo duplete em δ_H 6,71 com acoplamento *orto* ($J= 8,0$ Hz) e *meta* ($J= 2,0$ Hz), um duplete em δ_H 6,82 com acoplamento *meta* ($J= 2,0$ Hz) e outro duplete em δ_H 6,75 ($J= 8,0$ Hz) mostrando acoplamento *orto*. Essas absorções revelaram um padrão de hidrogenação de um sistema ABX para o anel B de um núcleo flavonoídico, como foi anteriormente mencionado para Cd-9 e Cd-10. Observou-se ainda, dois dupletos em δ_H 5,92 e δ_H 5,84 com acoplamento *meta* ($J= 2,5$ Hz) sugerindo um anel A 5,7 dissustituído. A presença de um duplete em δ_H 4,55 ($J= 7,5$ Hz), um duplo tripleto em δ_H 3,96 ($J= 8,0$ e 5,0 Hz), dois duplo dupletos em δ_H 2,49 ($J= 5,0$ e 16,0 Hz) e δ_H 2,83 ($J= 8,0$ e 16,0 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-2, H-3, H-4eq e H-4ax, respectivamente, sugerem a presença de um núcleo do tipo flavan-3-ol (LÔBO *et al.*, 2008).



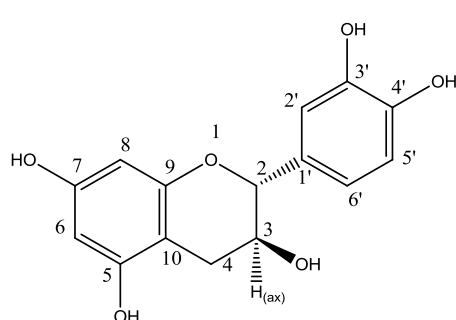
O espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, MeOD) (Figura 70, pág. 137) revelou a presença de oito sinais, cinco metínicos, dois oximetínicos e um metilênico. Não foram observados os sinais para carbonos não hidrogenados, os mesmos foram inferidos através dos espectros de correlações heteronucleares HMQC e HMBC. Os sinais em δ_c 115,32, δ_c 116,14 e δ_c 120,06, foram atribuídos aos carbonos C-2', C-5' e C-6', respectivamente, confirmando o padrão de substituição ABX para o anel B.

Os sinais em δ_c 96,37 e δ_c 95,57 atribuídos aos carbonos C-6 e C-8, também confirmaram o padrão 5,7 dissustituído para o anel A do flavonoide. Observou-se, ainda sinais para carbonos oximetínicos em 82,86 e 68,81, atribuídos aos carbonos C-2 e C-3, respectivamente, de Cd-11.

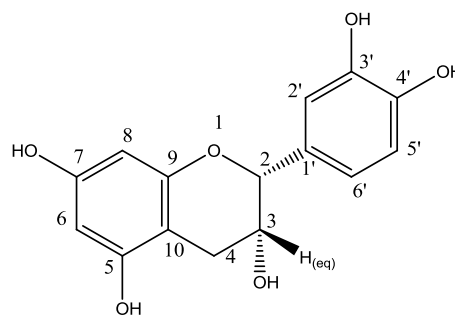
O espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Figuras 72-73, pág. 138 e 139) mostraram correlações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, confirmando a presença de um núcleo do tipo flavan-3-ol.

O espectro de correlações heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) e suas expansões (Figura 74-76, pág. 139 e 140), mostraram uma correlação a duas ligações (2J) dos hidrogênios H-2' e H-5' (δ_H 6,82 e δ_H 6,75) com os carbonos C-3' e C-4' (δ_c 146,31), respectivamente. Observaram-se outras correlações dos hidrogênios em δ_H 4,55 e δ_H 6,75 (H-2 e H-5') com o carbono C-1' (δ_c 132,21), confirmando o deslocamento deste carbono.

Através das análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais permitiu identificar Cd-11 como sendo o flavonoide o 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavana. Entretanto, dados da literatura (LÔBO *et al.*, 2008) relatam a existência de dois isômeros para Cd-11: a **epicatequina**, onde a hidroxila ligada a C-3 encontra-se em posição axial, e a **catequina** onde esta hidroxila encontra-se em posição equatorial.



Catequina

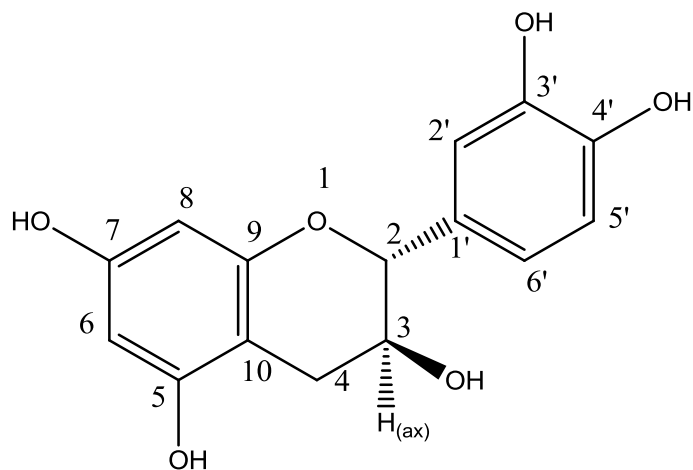


Epicatequina

A literatura ainda esclarece como diferencial entre elas o fato de que no espectro de RMN de ^1H o H-3eq na epicatequina encontra-se mais desblindado (δ_H ~4,01) que o H-ax da

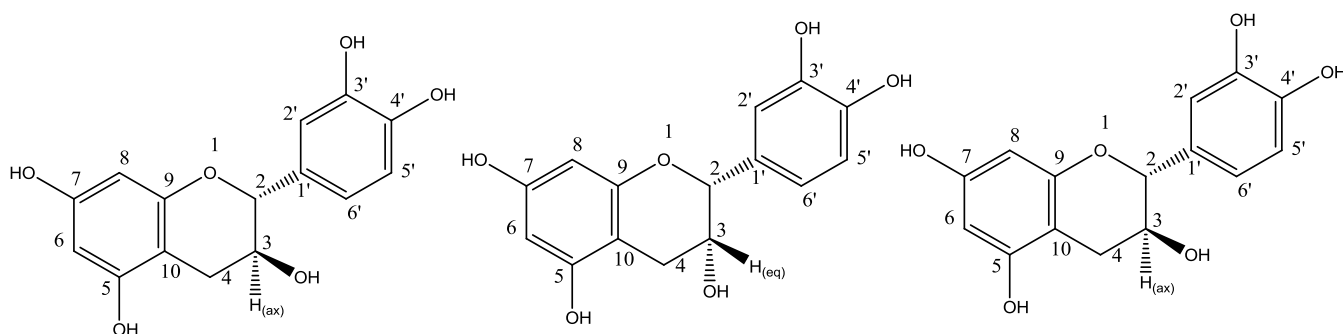
Cd-11 no α D foi de +11. Portanto, diante destes dados a estereoquímica proposta para Cd-11 foi a catequina.

Assim através da análise de todos os dados expostos acima pode se afirmar que a substância Cd-11 trata-se do isômero Catequina. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Cd-11 e comparação com a literatura estão compilados na Tabela 12, pág. 135.



3,3',4',5,7-pentaidroxiflavona: Catequina

Tabela 12. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Cd-11 em MeOD com valores encontrados na literatura (LÔBO *et al.*, 2008) (δ em ppm e J em Hz).



	Catequina		Epicatequina		Cd-11	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C						
5	157,58	-	157,97	-	157,04*	-
7	157,82	-	157,63	-	157,04*	-
9	156,93	-	157,36	-	156,93*	-
10	100,89	-	100,13	-	100,77*	-
1'	132,25	-	132,29	-	132,21*	-
3'	146,23	-	145,91	-	146,21**	-
4'	146,25	-	145,75	-	146,21*	-
CH						
2	82,85	4,57	79,85	4,81	82,86	4,55 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz)
3	68,82	3,98	67,48	4,17	68,81	3,96 (<i>td</i> , $J=8$ e 5 Hz)
6	96,37	5,93	96,46	5,95	96,37	5,92 (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz)
8	95,58	5,87	95,95	5,93	95,57	5,84 (<i>d</i>

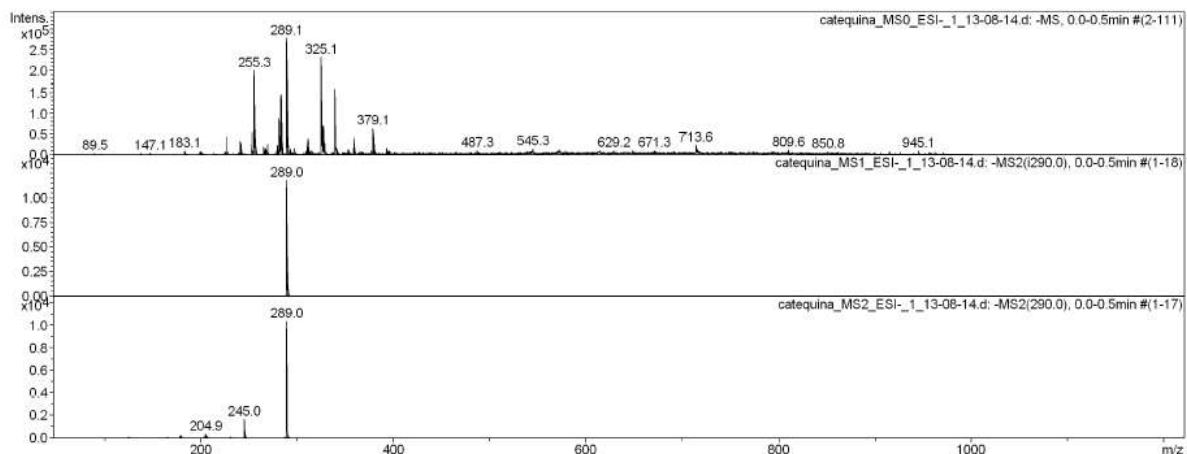


Figura 67. [M-H] – (EM-ESI, modo negativo) Espectro de Massas de Cd-11

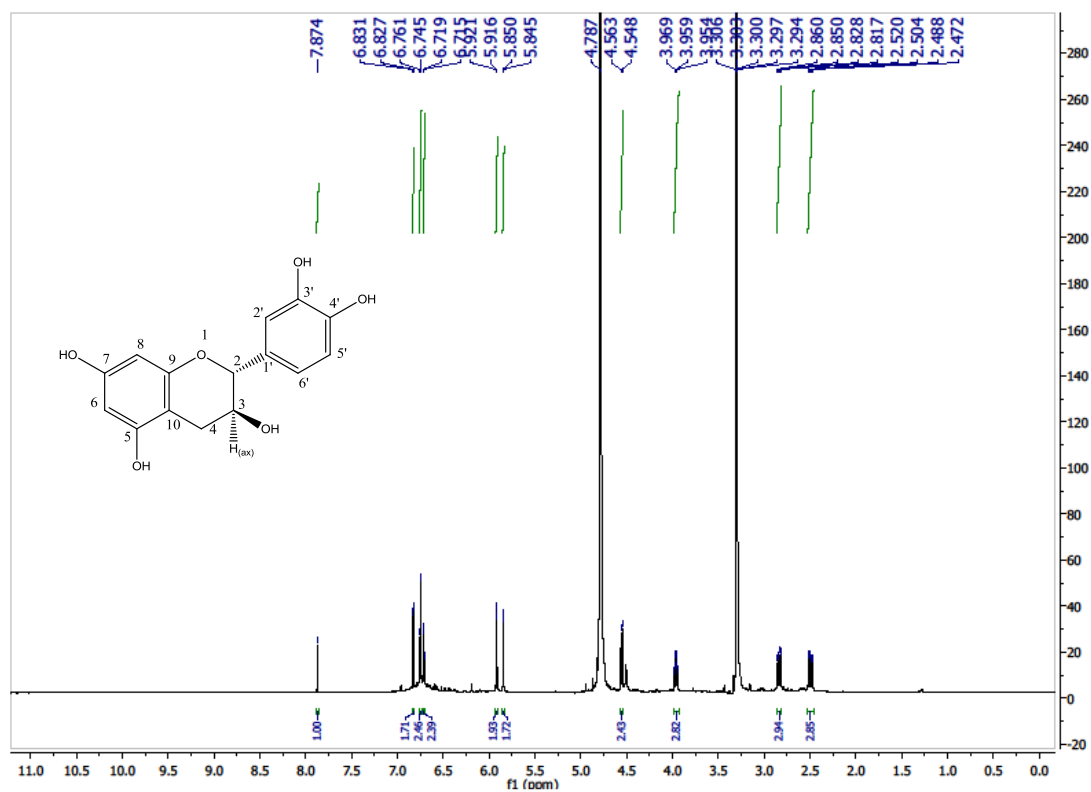


Figura 68. Espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD

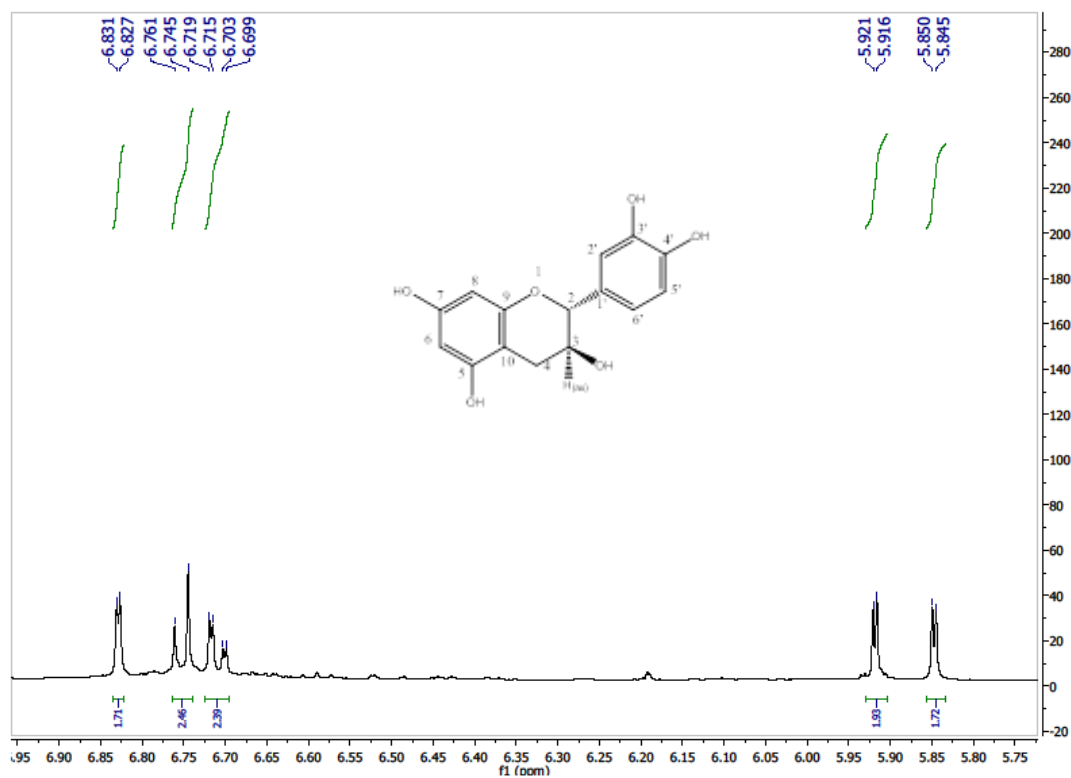


Figura 69. Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD

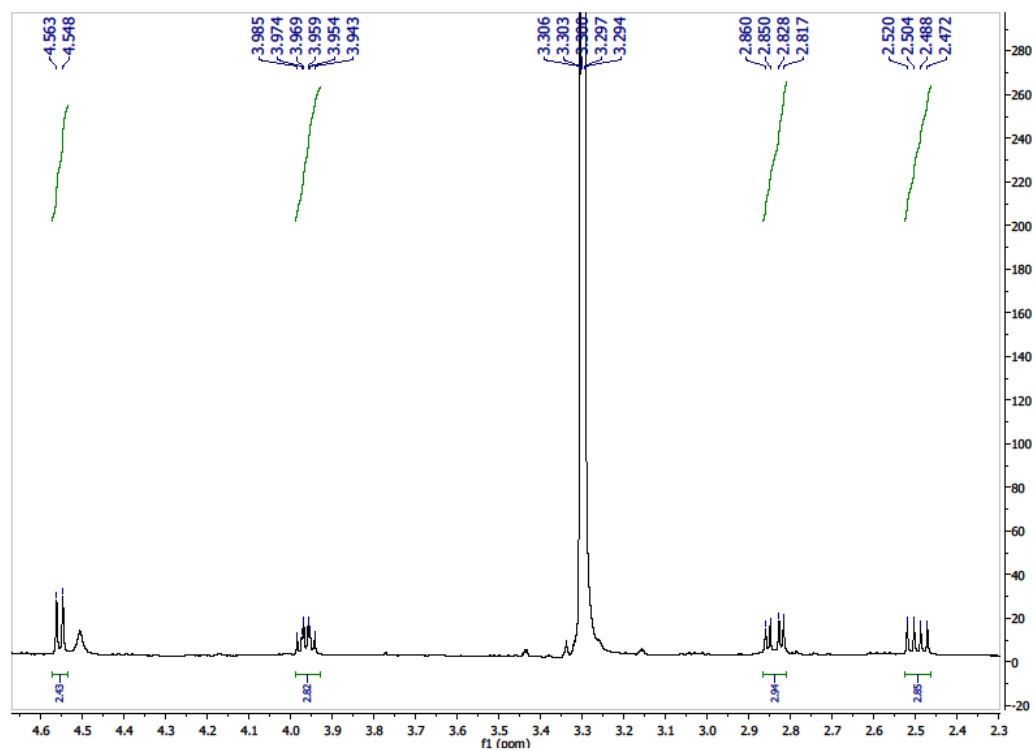


Figura 70. Expansão do espectro de ^1H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD

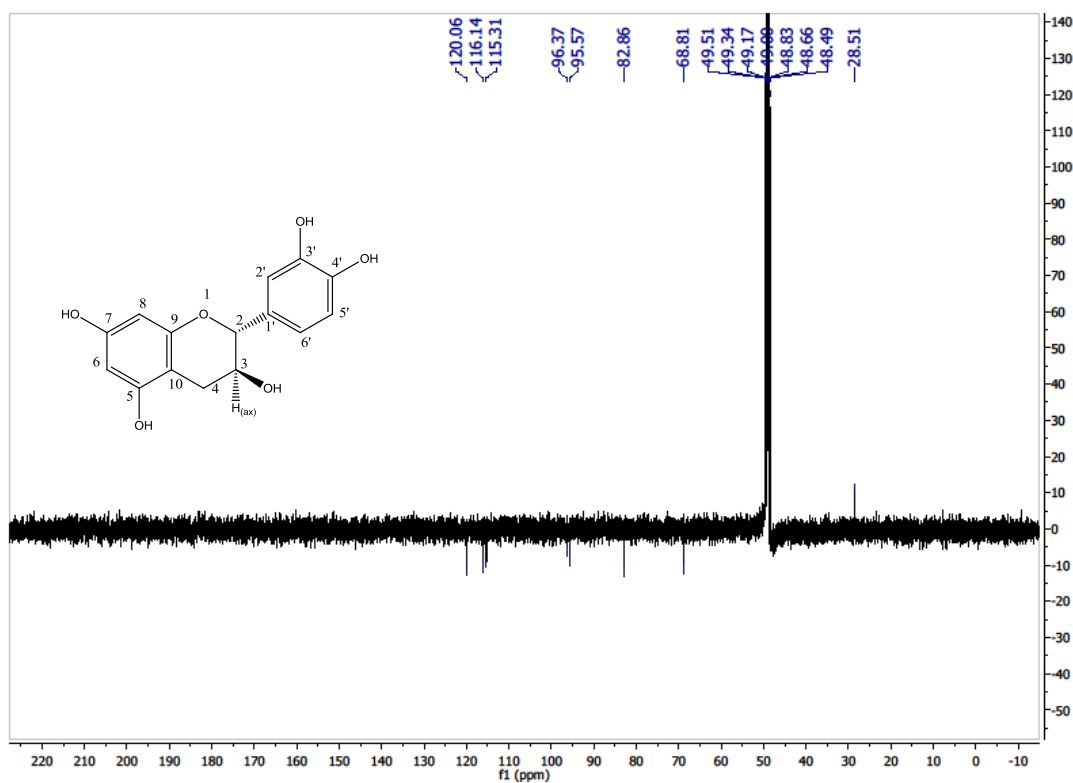


Figura 71. Espectro de ¹³C (125 MHz) de Cd-11 em MeOD

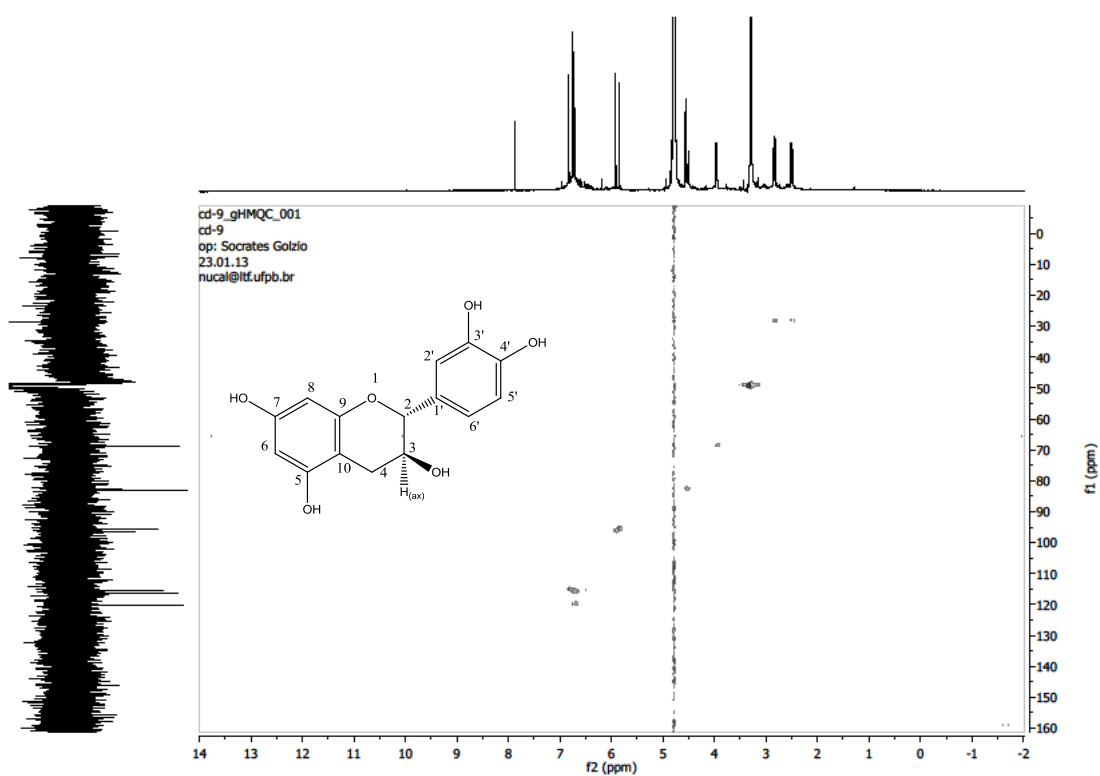


Figura 72. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD

