# 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 Pósgraduação 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 duarteanum 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 duarteanum. 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 Profa. Dra. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilzeth de Luna Freire Pessôa (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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Pereira Leite (Membro Suplente-UFPE)

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!



#### **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." SI. 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 Fechine Tavares**, coorientador desta tese, por todo empenho, ensinamentos e exigência.

A professora Dr<sup>a</sup>. **Marianna Vieira Sobral** e aos alunos do Labetox, **João** Pita, **Aline**, **Débora**, **Heloísa** e **Thaísa** pela parceria nos testes antitumoral. A professora Dr<sup>a</sup>. **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 Mangueira**, 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); **Thaisa** (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 Massass. 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 <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C uni e bidimensionais e espectométricos, como espectometria 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-1α,3β-diol (Cd-1), isolada pela primeira vez na família em estudo; ácido 2α,3β-urs-12-en-28-óico (Cd-2); 4α-carboxi-3β-hidroxi-24-cicloarteno (Cd-3), isolada pela primeira vez no gênero Combretum; 2α, 3β, 28-trihidroxiurs-12-eno (Cd-4); ácido 2α,3β,23α-trihidroxiurs-12ene-28-óico e ácido 2α,3β,23α-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 (Cl<sub>50</sub> = 17,82  $\mu$ g/mL) e Cd-5 Cd-2 (Cl<sub>50</sub> = 31,23  $\mu$ 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 Massass 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 bidimensional spectroscopic <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>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 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol (Cd-1), isolated for the first time in the investigated family; 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ urs-12-en-28-oic acid (Cd-2); 4α-carboxy-3β-hydroxy-24-cycloartenol (Cd-3), isolated for the first time in the genus *Combretum*; 2α, 3β, 28-trihidroxiurs-12-ene (Cd-4); 2α, 3β acid, 23α-trihidroxiurs-12-ene-28-oic acid and 2α, 3β, 23α-trihydroxyolean-12-ene-28-oic acid (Cd-5); stigmasterol (Cd-6); stigmasterol and spinasterol (Cd-7); methyl 3',5,7-trihydroxy-3, 4'dimethoxyflavone (Cd-9); 5,7,3',4'gallate (Cd-8); tetrahydroxyflavone-3-O-galactopyranoside (Cd-10), catechin (Cd-11) 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 ( $IC_{50} = 17.82 \mu g/mL$ ) and Cd-5 Cd-2 ( $IC_{50} = 31.23 \mu g/mL$ ) 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 Combretum no mundo (em
verde)	32
Figura 2 - Partes aéreas e caule de Combre	etum duarteanum Cambess42
Figura 3 - Deslocamentos químicos dos ca	bonos C-1, C-2, C-3, C-24 na ausência e
na presença de hidroxilas com orientação o	ou β67
Figura 4 - Espectro de RMN $^{13}$ C-APT (50 M	IHz) de Cd-1 em CDCl <sub>3</sub> 70
Figura 5 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>	<sup>3</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl <sub>3</sub> 70
Figura 6 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>	<sup>3</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl <sub>3</sub> 71
Figura 7 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz)	de Cd-1 em CDCl <sub>3</sub> 71
Figura 8 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>	H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl372
Figura 9 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>	H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl372
Figura 10 - Deslocamentos químicos dos c	arbonos C-1, C-2, C-3, C-24 na presença
de hidroxilas com orientação α ou β	74
Figura 11 - Espectro de IV (cm <sup>-1</sup> ) de Cd-2 e	m pastilhas de KBr77
Figura 12 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz)	de Cd-2 em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N77
Figura 13 - Expansão do espectro de RMN	$^1H$ (500 MHz) de Cd-2 em $C_5D_5N78$
Figura 14 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125	MHz) de Cd-2 em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N78
Figura 15 - Expansão do espectro de I	RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz) de Cd-2 em
C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N	79
Figura 16 - Expansão do espectro de I	RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz) de Cd-2 em
C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N	79
Figura 17 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50	MHz) de Cd-3 em MeOD83
Figura 18 - Expansão do espectro de	RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-3 em
MeOD	83
Figura 19 - Expansão do espectro de	RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-3 em
MeOD	84
Figura 20 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz)	de Cd-3 em MeOD84
Figura 21 - Expansão do espectro de	e RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-3 em
MeOD	85
Figura 22 - Expansão do espectro de	
MeOD	
Figura 23 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz)	

<b>Figura 24 -</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) de Cd-4 em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N89
<b>Figura 25 -</b> Espectro de RMN $^{13}$ C-BB (75 MHz) de Cd-4 em $C_5D_5N$ 90
<b>Figura 26 -</b> Expansão do espectro de RMN $^{13}$ C-BB (75 MHz) de Cd-4 em $C_5D_5N90$
<b>Figura 27 -</b> Expansão do espectro de RMN $^{13}$ C-BB (75 MHz) de Cd-4 em C $_5$ D $_5$ N91
<b>Figura 28 -</b> Espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Cd-5 em C₅D₅N95
<b>Figura 29 -</b> Expansão do espectro de RMN $^1$ H (500 MHz) de Cd-5 em $C_5D_5N$ 95
<b>Figura 30 -</b> Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Cd-5 em C₅D₅N96
<b>Figura 31 -</b> Espectro de RMN $^{13}$ C-APT (125 MHz) de Cd-5 em $C_5D_5N$ 96
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz) de Cd-5 em
$C_5D_5N$
Figura 33 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz) de Cd-5 em
$C_5D_5N$
Figura 34 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl <sub>3</sub> 100
<b>Figura 35 -</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl <sub>3</sub> 100
<b>Figura 36 -</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl <sub>3</sub> 101
Figura 37 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl <sub>3</sub> 101
Figura 38 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-6 em
CDCl <sub>3</sub>
Figura 39 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-6 em
CDCl <sub>3</sub> 102
<b>Figura 40 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl <sub>3</sub> 106
Figura 41 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-7 em
CDCl <sub>3</sub> 106
<b>Figura 42 -</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl <sub>3</sub> 107
<b>Figura 43 -</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl <sub>3</sub> 107
Figura 44 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-7 em
CDCl <sub>3</sub>
Figura 45 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz) de Cd-7 em
CDCl <sub>3</sub> 108
<b>Figura 46 -</b> Espectro de IV (cm <sup>-1</sup> ) de Cd-8 em pastilhas de KBr112
<b>Figura 47 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-8 em MeOD112
Figura 48 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz) de Cd-8 em MeOD113
Figura 49 - Espectro de HMQC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8113

Figura 51 - Espectro de Massas de Cd-9120
Figura 52 - Espectro de IV (cm <sup>-1</sup> ) de Cd-9 em pastilhas de KBr120
Figura 53 - Espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl <sub>3</sub>
Figura 54 - Expansão do espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl <sub>3</sub> 121
Figura 55 - Espectro de <sup>13</sup> C-APT (125 MHz) de Cd-9 em CDCl <sub>3</sub> 122
Figura 56 - Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCI <sub>3</sub> 122
Figura 57 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em
CDCl <sub>3</sub> 123
Figura 58 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl <sub>3</sub> 123
Figura 59 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em
CDCI <sub>3</sub> 124
<b>Figura 60 -</b> Espectro de IV (cm <sup>-1</sup> ) de Cd-10 em pastilhas de KBr128
Figura 61 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-10 em DMSO-d <sub>6</sub> 128
Figura 62 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-10 em DMSO
<i>d</i> <sub>6</sub> 129
Figura 63 - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-10 em DMSO
<i>d</i> <sub>6</sub> 129
<b>Figura 64 -</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-10 em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> 130
Figura 65 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-10 em DMSO
<i>d</i> <sub>6</sub> 130
Figura 66 - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-10 em DMSO
<i>d</i> <sub>6</sub> 131
Figura 67 - Espectro de Massas de Cd-11136
Figura 68 - Espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD136
<b>Figura 69 -</b> Expansão do espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD137
<b>Figura 70 -</b> Expansão do espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD137
<b>Figura 71 -</b> Espectro de <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-11 em MeOD138
Figura 72 - Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD138
Figura 73 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em
MeOD139
<b>Figura 74 -</b> Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD139
Figura 75 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em
MeOD140

Figura 76 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em
MeOD140
Figura 77 - Espectro de Massas de Cd-12 [M-H] - ( EM-ESI, modo negativo)144
Figura 78 - Espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD144
<b>Figura 79 -</b> Expansão do espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-12 em
MeOD145
Figura 80 - Expansão do espectro de <sup>1</sup> H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD145
<b>Figura 81 -</b> Espectro de <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-12 em MeOD146
Figura 82 - Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD146
Figura 83 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em
MeOD147
Figura 84 - Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em
MeOD147
Figura 85 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD148
Figura 86 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em
MeOD148
Figura 87 - Espectro de COSY (500 MHz) de Cd-12 em MeOD149
Figura 88 - Expansão do espectro de COSY (500 MHz) de Cd-12 em
MeOD149
Figura 89 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de Combretum
duarteanum150
Figura 90 Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento
com o composto Cd-2 (μg/mL). Cada ponto representa média ± 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 (µg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média
de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de
95%

#### **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 -</b> Dados comparativos de RMN <sup>13</sup> C da substância <b>Cd-1</b> (δ, CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)
com modelo (Mo-1) da literatura (δ, CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz)69
Tabela 2 - Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-2 ( $\delta$ , $C_5D_5N$ , 125
MHz) com modelo (Mo-2) da literatura ( $\delta$ , $C_5D_5N$ , 50 MHz)76
Tabela 3 - Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-3a ( $\delta$ , MeOD, 50
MHz) com modelo (Mo-3) da literatura ( $\delta$ , $C_5D_5N$ , 100 MHz)82
<b>Tabela 4 -</b> Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-4 ( $\delta$ , C $_5$ D $_5$ N, 75 MHz)
com modelo (Mo-4) da literatura (δ, CDCl <sub>3</sub> , 22.6 MHz)88
<b>Tabela 5 -</b> Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-5 ( $\delta$ , C $_5$ D $_5$ N, 125 MHz)
com modelo da literatura ( $\delta$ , $C_5D_5N$ , 100 MHz)94
Tabela 6 - Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-6 ( $\delta$ , CDCl $_3$ , 50 MHz)
com modelo (Mo-6) da literatura (δ, CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)99
Tabela 7- Dados comparativos de RMN¹³C da substância Cd-7 (δ, CDCl₃, 50 MHz)
com modelos da literatura (δ, CDCI <sub>3</sub> , 50 MHz)105
Tabela 8 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz), <sup>13</sup> C (125 MHz) e correlações entre
sinais de $^{1}{\rm H~x~^{13}C}$ (HMQC) de ${\bf Cd\text{8}}$ registrados em MeOD ( $\delta$ em ppm e ${\it J}$ em Hz) e
comparação com valores de RMN de $^{13}$ C (125 MHz) em DMSO- $d_6$ da literatura (Mo-
8)111
Tabela 9 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz), <sup>13</sup> C (125 MHz) e correlações entre
sinais de $^{1}\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ (HMBC) de <b>Cd-9</b> registrados em CDCI $_{3}$ ( $\delta$ 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, DMSO-d <sub>6</sub> , 50 MHz)119
Tabela 11 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz), <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-10 registrados
em DMSO- $d_6$ ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz) e comparação com os valores de RMN de $^{13}$ C
(DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 100 MHz) da literatura (Mo-10)127
Tabela 12 - Comparação dos dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da substância
Cd-11 em MeOD com valores encontrados na literatura ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz)135
Tabela 13 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz), <sup>13</sup> C (125 MHz) de Cd-12 registrados
em MeOD ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz) e comparação com os valores de RMN de $^{13}\mathrm{C}$
(DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) da literatura (Mo-12)143

Tabela	14 -	Constituintes	Químicos	do	óleo	essencial	das	folhas	de	Combretum
duartea	num.									151

#### LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de Combretum
duarteanum53
Esquema 2 - Obtenção dos Extratos Brutos de Combretum duarteanum54
Esquema 3 - Fracionamento da Fase Hexânica das folhas de Combretum
duartenum54
Esquema 4 - Fracionamento da Fase Clorofórmica das folhas de Combretum
duartenum55
Esquema 5 - Fracionamento da Fase Acetato de Etila das folhas de Combretum
duarteanum56
Esquema 6 - Fracionamento da Fase Metanólica das folhas de Combretum
duarteanum57

#### LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns constituintes	químicos	isolados	de	espécies	do	gênero
Combretum						34
Quadro 2 - Estruturas de alguns d	onstituintes	químicos	iso	lados de	espé	cies do
gênero Combretum						36
Quadro 3 - Substâncias isoladas da	as folhas de	e Combret	tum	duarteanui	m Ca	ambess.
						63

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APT Attached Proton Test

CC Cromatografia em coluna

CCDA Cromatografia em Camada Delgada Analítica

**CCDP** Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Cd Combretum duarteanum

CG-EM Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

**Cl**<sub>50</sub> Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular

COSY Correlation Spectroscopy

**d** Dubleto

**dd** Duplo dupleto

**ddd** Duplo duplo dupleto

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DMSO-***d*<sub>6</sub> Dimetilsulfóxido deuterado

**EB** Extrato Bruto

**EM** Espectrometria de massas

ESI Electrospray Ionization

**EtOH** Etanol

**HEPES** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico

**Hex.** Hexano

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HMQC** Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

**Hz** Hertz

IV Infravermelho

J Constante de acoplamento

LABETOX Laboratório de Ensaios Toxicológicos

LTF Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

**LMCA** Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise

**m** Multipleto

MHz Megahertz

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

**ppm** Partes por milhão

**p/v** Peso/volume

**R**<sub>f</sub> Fator de Retenção

RMN <sup>13</sup>C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup>H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPMI Instituto Roswell Park Memorial

s simpleto

sl simpleto largo

t tripleto

UFC
 Unidades Formadoras de Colônias
 UFPB
 Universidade Federal da Paraíba
 UFS
 Universidade Federal de Sergipe
 δ
 Deslocamento químico em ppm

μL Microlitroμm 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	
Combretum	32
2.3. Considerações sobre as espécies de <i>Combretum</i> encontradas na	
Paraíba	39
2.3.1. Combretum duarteanum 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
1.2.2.Obtenção e Analíse do óleo essencial das folhas frescas de Combretum	
duarteanum Cambess	48
4.2.3.Processamento das folhas e caule de Combretum duarteanum	
Cambess	48
4.2.4.Obtenção dos extratos brutos (EB) de <i>Combretum</i>	
duarteanumduarteanum	49
4.2.5.Fracionamento cromatográfico da Fase Hexânica das folhas de	
Combretum duarteanum	49
4.2.6. Fracionamento cromatográfico da Fase Clorofórmica das folhas de	
Combretum duarteanum	50
4.2.7. Fracionamento cromatográfico da Fase Acetato de Etila das folhas de	
Combretum duarteanum	51
4.2.8. Fracionamento cromatográfico do Extrato Metanólico das folhas de	

Combretum duarteanum	51
4.3 Estudos Farmacólogicos	58
4.3.1 Estudo Antimicrobiano	58
4.3.2 Estudo Antitumural	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 Combretum	
duarteanum	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 estratégica 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, optouse 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 antiúlceras, 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 cattapa* (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=map s&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, diarréia) 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; AQUI; OWAIS, 2006), antifúngica (AHMAD; AQUI; 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; AQUI; 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	
C jaquinii	Cafeína (1)	WILLAMAN; SCHUBERT,
		1961; FREISE, 1935
C. loeflingii		WILLAMAN; SCHUBERT, 1961
		FREISE, 1935
C. toeffelingii		
	FLAVONOIDES	
C. micranthum	Vitexina (2)	BASENE et al., 1985; DAFFE,
		1980
C. quadrangulare		ADNYANA et al., 2000b
C. quadrangulare	Combretol (3)	CASTLEDEN et al., 1985;
		SOMANABANDHU et al., 1980
	BENZENOIDES	
C. caffrum	Combrestatina (4)	PETTIT et al., 1988
C. erythrophyllum		SCHWIKKARD et al., 2000
C. kraussii		PELIZZONI et al., 1994
		BROOKES et al., 1999
C. caffrum	Combrestatina B-1 (5)	PETTIT et al., 1987a
C. erythrophyllum		SCHWIKKARD et al., 2000
C. kraussii		PELIZZONI et al., 1993
	<b>ESTILBENOS</b>	
C. caffrum	Combrestatina A-1 (6)	PETTIT et al., 1987a
C. erythrophyllum		SCHWIKKARD et al., 2000
C. kraussii		PELIZZONI et al., 1993
	TERPENOS	
C. imberbe	Ácido Betulínico (7)	ROGERS; SUBRAMONY, 1988
C. quadrangulare		BANSKOTA et al., 2000
Continua		

Continuação		
C. elaeagnoides C. molle	Àcido Jéssico (8)	OSBORNE; PEGEL, 1984 PANZINI et al., 1993
<ul><li>C. quadrangulare</li><li>C. erythrophyllum</li><li>C. quadrangulare</li></ul>	Cicloartano (9)	BANSKOTA et al., 2000 ROGERS, 1998 GANZERA et al., 1998
	ÁCIDOS FENÓLICOS	
C. caffrum C. kraussii C. species C. yunnanensis	Ácido Elágico (10)  LIGNANAS	PETTIT et al., 1987b BROOKES et al., 1999 MILITO et al., 1993 ASAMI et al., 2003
C. quadrangulare	Isolariciresinol (11) TANINOS	ADNYANA et al., 2000a
C. glutinosum	Punicalagina (12) ESTEROIDES	JOSSANG et al., 1994
C. kraussii C. quadrangulare C. quadrangulare	β-sitosterol (13)  Daucosterol (14)	BROOKES et al., 1999 BANSKOTA et al., 2000 ADNYANA et al., 2000a
	` '	,

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

#### Continuação do Quadro 2.

#### Ácido Betulínico (7)

$$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \text{Me} \\ \text{OH} \\ \text{O} \\ \text{Me} \\ \text{HO}_2\text{C} \\ \text{Me} \\ \end{array}$$

#### 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 efeito antinociceptiva em camundongos. O 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<sup>a</sup>. 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-úlcera 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)

Objetívos

#### 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 PF<sub>254</sub> 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 cromatoplacas 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<sup>-1</sup>, utilizando-se pastilhas de KBr.

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

Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB) operando a 200 MHz (<sup>1</sup>H) e 50 MHz (<sup>13</sup>C) e VARIAN- NMR-SYSTEM (LMCA/UFPB) operando a 500 MHz (1H) e 125 MHz (13C). 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 (CDCI<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO e C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de <sup>1</sup>H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes: clorofórmio ( $\delta_H$  7,24), metanol ( $\delta_H$  3,30), DMSO ( $\delta_H$  2,50) e piridina ( $\delta_H$ 7,55 ppm). Para os espectros de RMN de <sup>13</sup>C, estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio ( $\delta_C$  77,0), metanol ( $\delta_C$  49,00 ppm), DMSO ( $\delta_C$  39,50) e piridina  $(\delta_{\text{C}}$  135,90 ppm). As multiplicidades no espectro de RMN  $^{1}$ H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (dupleto), dd (duplo dupleto), dl (dupleto largo), t (tripleto), q (quadrupleto), m (multipleto).

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<sup>a</sup> 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 nm 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 nalcanos) 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 nbutanol. As soluções obtidas foram tratadas com NaSO<sub>4</sub> 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 analise em Comatografia 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: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 <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C uni e bidimensionais, quando necessário.

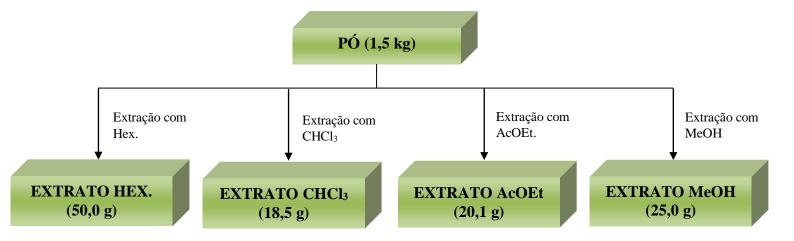
FASE N-BUTANÓLICA

(15,4 g)

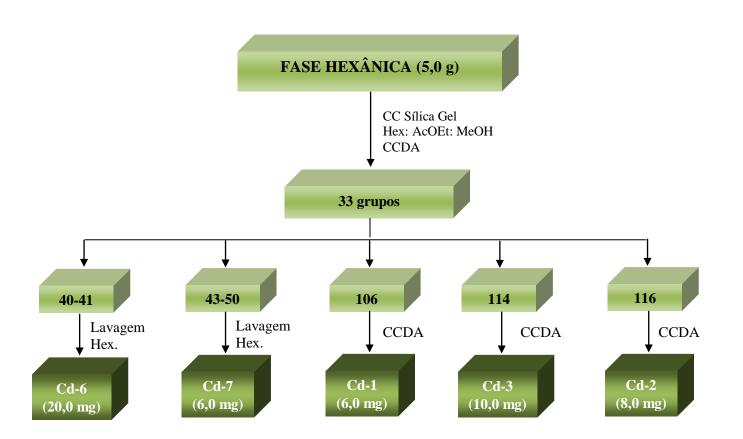
Esquema 1. Obtenção e particionamento do Extrato Etanólico Bruto de Combretum duarteanum PLANTA FRESCA (2,5 kg)Secagem e moagem PÓ (3,0 kg) EtOH 95% Concentração sob pressão reduzida EXTRATO ETANÓLICO BRUTO **EEB** MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3) SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA Hex. FASE HIDROALCOÓLICA I FASE HEXÂNICA (65,4 g)CHCl<sub>3</sub> FASE HIDROALCOÓLICA II FASE CLOROFÓRMICA (28,7 g)AcOEt FASE HIDROALCOÓLICA III FASE ACETATO DE ETILA (22,5 g)Butanol

FASE HIDROALCOÓLICA IV

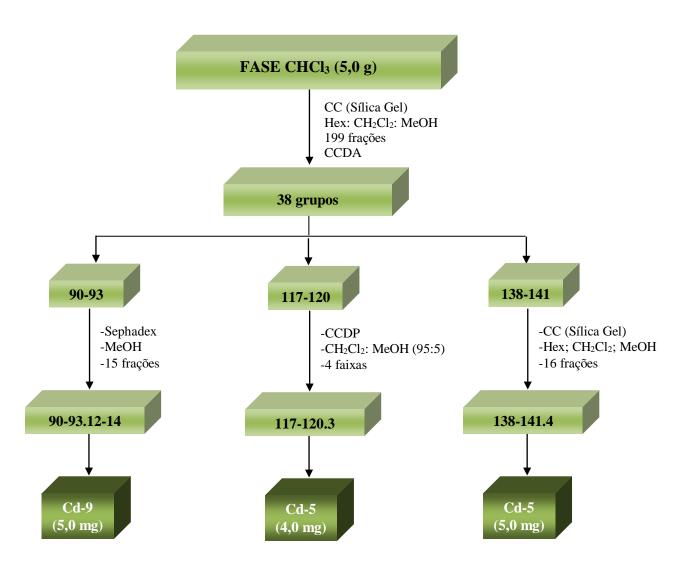
Esquema 2. Obtenção dos Extratos Brutos de Combretum duarteanum



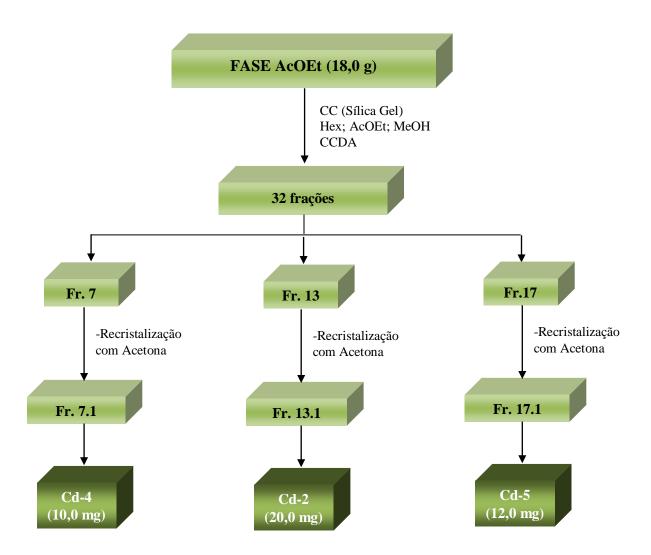
Esquema 3. Fracionamento da Fase Hexânica das folhas de Combretum duarteanum.



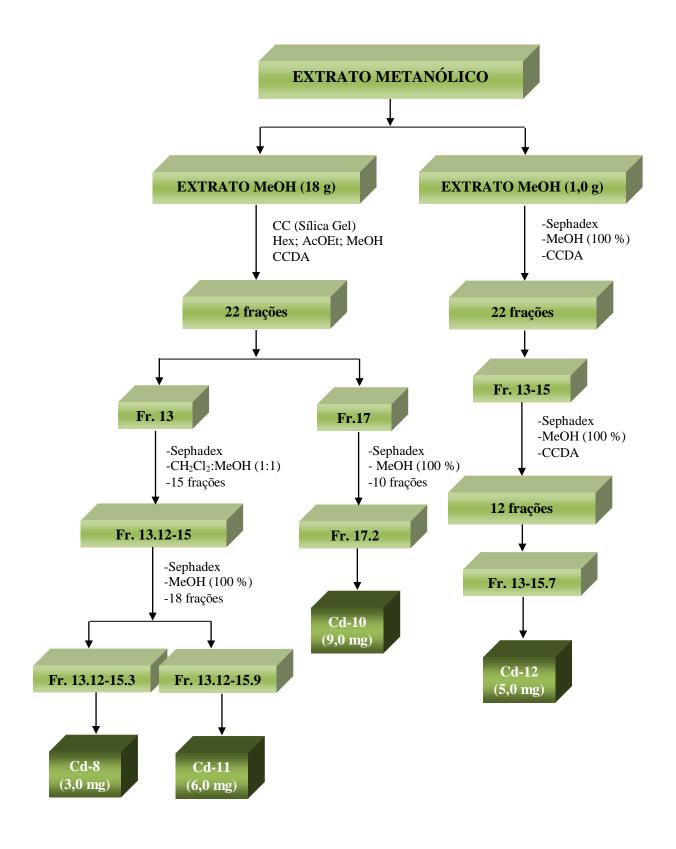
**Esquema 4.** Fracionamento da Fase Clorofórmica das folhas de *Combretum duarteanum*.



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



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



#### 4.3 Estudos Farmacólogicos

#### 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<sup>a</sup>. 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  $\mu$ L do meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose duplamente concentrado e na outra metade foi adicionado 100  $\mu$ L 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 x 10<sup>6</sup> 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 feito 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 (ALLEGRINI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973; MANN e MARKHAM, 1998; PALOMINO *et al.*, 2002).

#### 4.3.2 Estudo Antitumural

A análise de que algumas espécies de *Combretum* apresentaram excelente atividade antitumoral e citotóxica (*C. apiculatum, C. caffrum, 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 x 10<sup>5</sup> 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 % CO<sub>2</sub>). 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 (CI<sub>50</sub>) foi realizado através da determinação da percentagem de células viáveis com base na seguinte fórmula:

Onde:

DO<sub>Células tratadas</sub> = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO<sub>Controle negativo</sub> = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DO<sub>Branco</sub> = 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<sub>50</sub> 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... 10 Cd-6 Cd-7a Cd-7b Cd-9 Cd-8

#### 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.

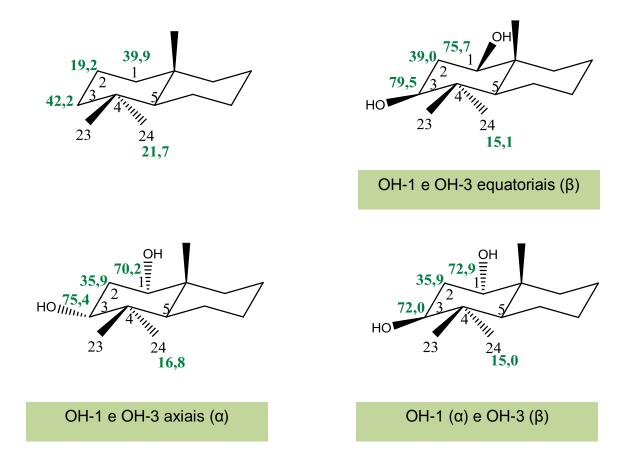
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), revelou a presença de trinta sinais (Figuras 4-6, pág. 70 e 71), dos quais seis referentes a carbonos quaternários, sete a carbonos metínicos, dez a carbonos metilênicos e sete a carbonos metílicos, sugerindo, tratar-se de um esqueleto triterpênico (MAHATO; KUNDU, 1994).

Observou-se neste espectro sinais em  $\delta_C$  125,1 e  $\delta_C$  130,8, referentes a carbonos sp² metínico e não hidrogenado, respectivamente, assim como um sinal em  $\delta_C$  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  $\delta_C$  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  $\delta_C$  73,5 e  $\delta_C$  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  $\delta_C$  39,9;  $\delta_C$  19,2 e  $\delta_C$  42,2, respectivamente. Quando as hidroxilas estão presentes em C-1 e C-3, estes carbonos absorvem na faixa entre  $\delta_C$  75,8 – 70,0 e  $\delta_C$  79,8 - 72,0, respectivamente.

Para a definição da esterioquímica, observou-se que quando as hidroxilas em C-1 e C-3 encontram-se em posição equatorial, estes carbonos absorvem aproximadante em  $\delta_C$  75,7 e  $\delta_C$  79,5, respectivamente. Quando ambas hidroxilas encontram-se em posição axial, C-1 e C-3 absorvem aproximadamente em  $\delta_C$  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, podese 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  $^{1}$ H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Figura 7, pág. 71) apresentou um conjunto de sinais de alta multiplicidade em  $\delta_{H}$  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  $\delta_H$  5,05 (t, J=7,0 Hz), atribuído a H-24, e dois hidrogênios oximetínicos em  $\delta_H$  3,52 (sl), e em  $\delta_H$  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  $\delta_H$  0,73; 0,81; 0,84; 0,93; 1,55; 1,63 e uma metila secundária em  $\delta_H$  0,88 (d, J=5,0 Hz), atribuída aos H-21. O espectro mostrou ainda a presença de dois dupletos em  $\delta_H$  0,64 (d, J=4,6 Hz) e  $\delta_H$  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  $\alpha$  ou  $\beta$ .

Estas informações, em conjunto com os valores de RMN <sup>13</sup>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 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol, substância está relatada pela vez na família Combretaceae.

Cicloart-24-eno-1α,3β-diol

**Tabela 1.** Dados comparativos de RMN  $^{13}$ C da substância **Cd-1** ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) com modelo (**Mo-1**) da literatura ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) (SHEN *et al.*, 2008).

	30 29		
	Cd-1	Mo-1	
	δ <sub>C</sub>	$\delta_{C}$	
С			
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	100,0	101,0	
1	73,5	73,7	
3	73,6	73,8	
5	75,6 39,4	75,5 39,5	
8			
	48,0	48,0	
17	52,2	52,3	
20	35,8	35,9	
24	125,1	125,2	
CH <sub>2</sub>			
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	
CH <sub>3</sub>	,	•	
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		25,1	
	25,2 13.2		
30	13,2	13,0	

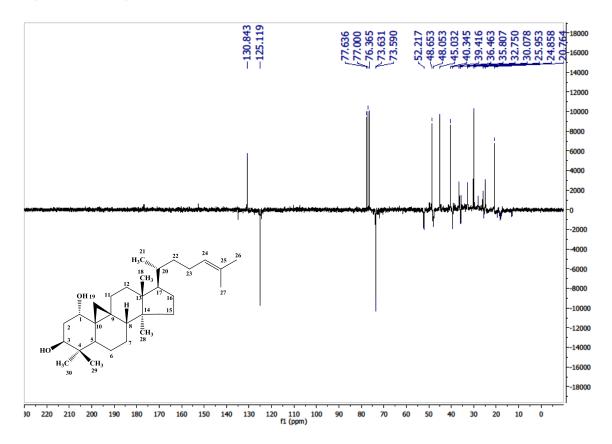


Figura 4. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl<sub>3</sub>

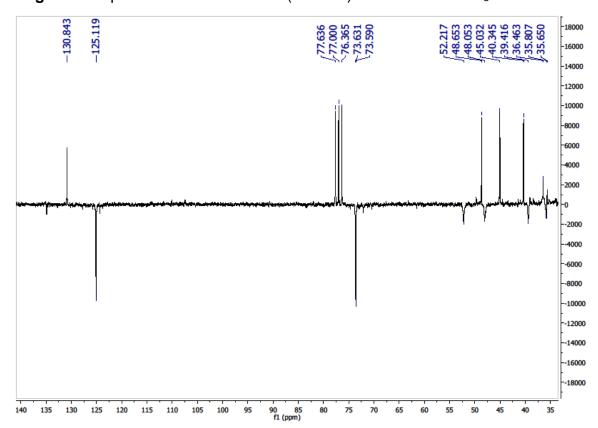


Figura 5. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl<sub>3</sub>

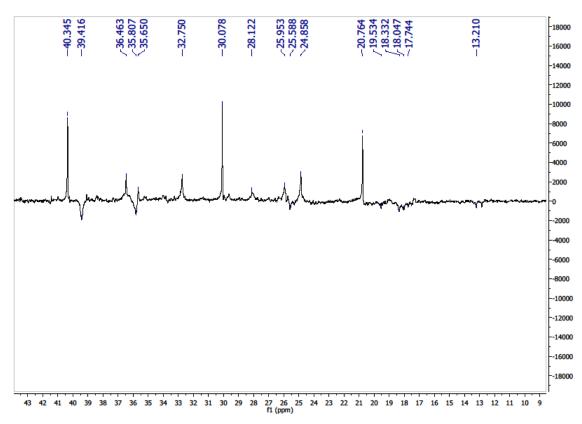


Figura 6. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-1 em CDCl<sub>3</sub>

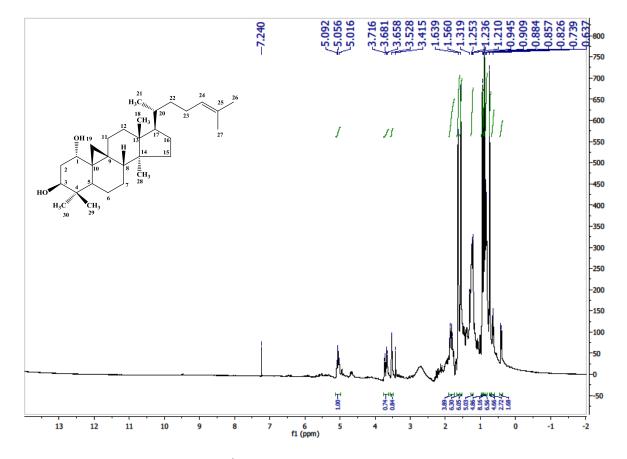


Figura 7. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl<sub>3</sub>

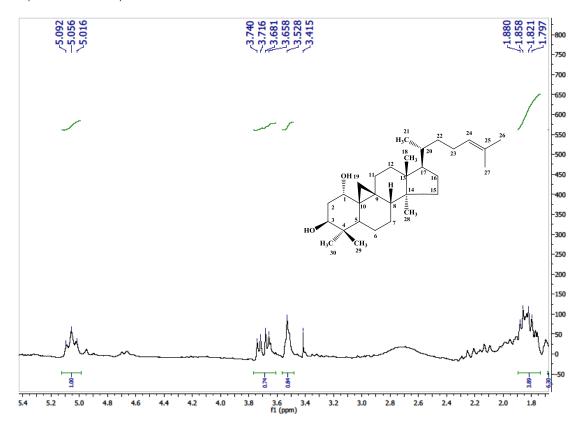


Figura 8. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl<sub>3</sub>

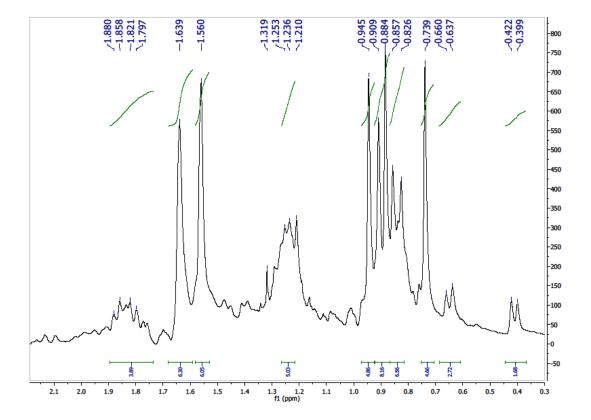


Figura 9. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-1 em CDCl<sub>3</sub>

# 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<sup>-1</sup>), vibrações de deformações axiais de ligações C=O referente a carbonila de ácido (1.690 cm<sup>-1</sup>) e C-O de álcoois (1.280 cm<sup>-1</sup>).

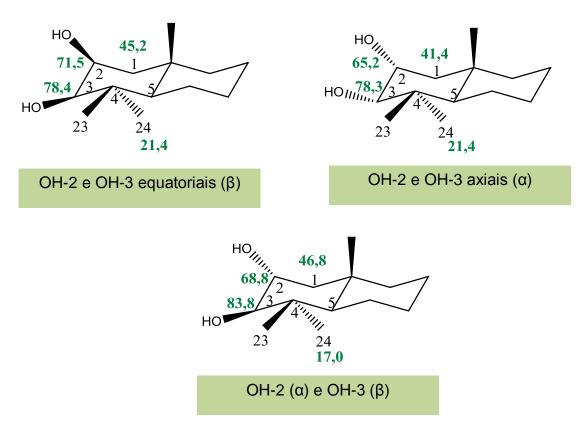
O espectro de RMN  $^1$ H (500 MHz,  $C_5D_5N$ ) (Figura 12, pág. 77) e suas expansões (Figura 13, pág. 78) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre  $\delta_H$  0,7 e  $\delta_H$  2,1 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp³ presentes em estruturas como triterpenos e esteróides. Em  $\delta_H$  4,07 (ddd, J=4,0 10,0 e 12,0 Hz) pôde-se verificar a presença de um duplo duplo dupleto, atribuído ao hidrogênio da posição H-2 $\beta$ , e um dupleto em  $\delta_H$  3,38 (d, J=8 Hz) relacionado ao hidrogênio H-3 $\alpha$ . Absorções em  $\delta_H$  5,42 (sl) e  $\delta_H$  2,57 (d, J=10 Hz) foram atribuídas aos H-12 e H-18, respectivamente. As absorções em  $\delta_H$  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,  $C_5D_5N$ ) (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  $\delta_C$  125,42 e  $\delta_C$  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  $\delta_C$  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  $\delta_{\rm C}$  71,5 - 68,8 e  $\delta_{\rm C}$  83,8 - 78,3, respectivamente, enquanto o carbono C-1 absorve na faixa entre  $\delta_{\rm C}$ - 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  $\alpha$  e  $\beta$  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  $\alpha$  ou  $\beta$ .

Desta forma, comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN <sup>13</sup>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 2α,3β-diidroxiurs-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*.

$$\begin{array}{c} 30 \\ \text{CH}_{3} \\ \\ 19 \\ \\ 20 \\ \\ 19 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\ \\ 20 \\ \\ 20 \\ \\ 21 \\ \\ 20 \\$$

Ácido 2α,3β-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 ( $\delta$ , C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) com modelo (Mo-2) da literatura ( $\delta$ , C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 50 MHz), (ALI *et al.*, 2007).

$$\begin{array}{c} 30 \\ \text{CH}_{3} \\ \text{H}_{3}\text{C} \\ \text{H}_{3}\text{C}$$

	Cd-2	Mo-2
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>
С	00	OC
	20.74	30 F
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	07.00	00.0
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
CH <sub>2</sub>		
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

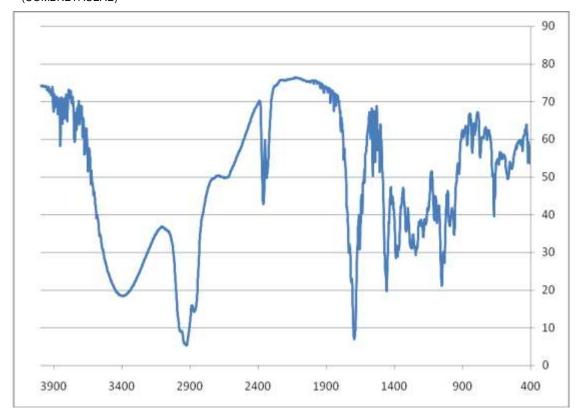


Figura 11. Espectro de IV (cm<sup>-1</sup>) de Cd-2 em pastilhas de KBr.

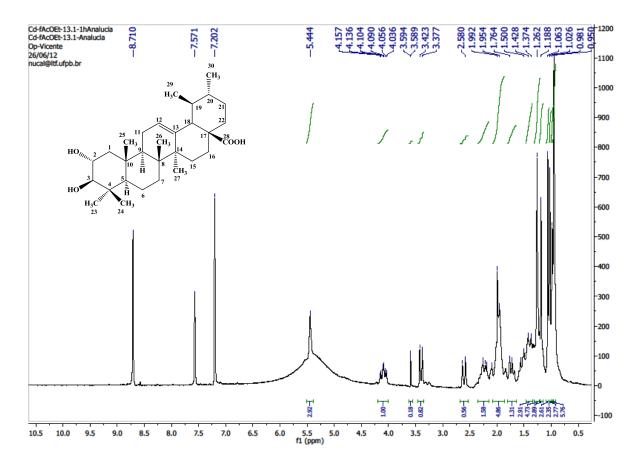


Figura 12. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-2 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

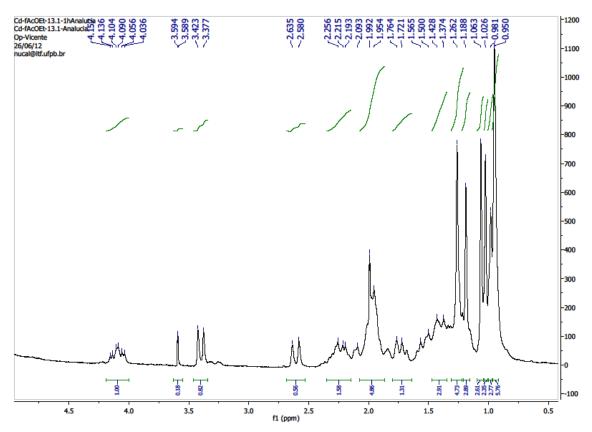


Figura 13. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-2 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

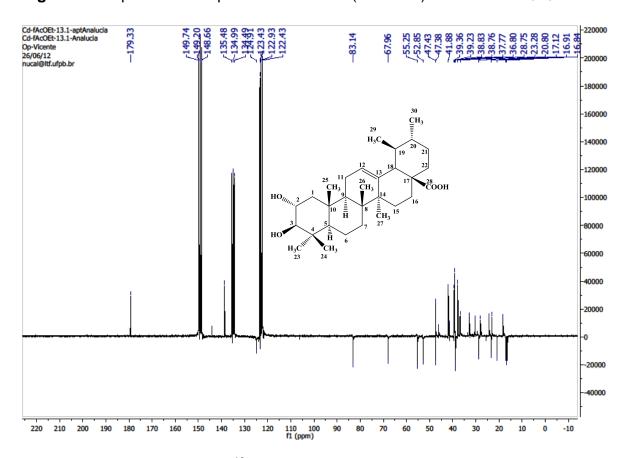


Figura 14. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz) de Cd-2 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

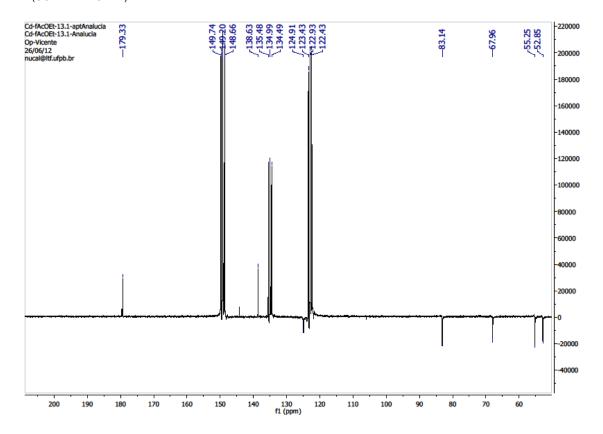


Figura 15. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz) de Cd-2 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

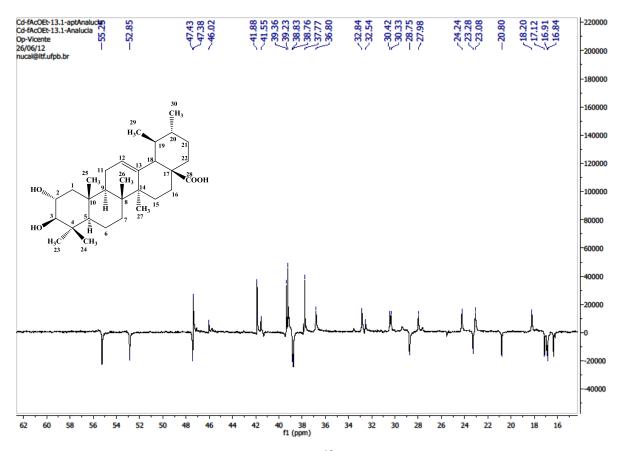


Figura 16. Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C-APT}$  (125 MHz) de Cd-2 em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 

# 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 <sup>13</sup>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  $\delta_C$  126,1 e  $\delta_C$  131,7 sugerem a presença de uma dupla ligação entre os carbonos C-24 e C-25, assim como um sinal em  $\delta_C$  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  $\delta_C$  76,2 atribuído ao carbono C-3. Destaca-se ainda, no espectro de RMN de  $^{13}$ C-APT, um sinal em  $\delta_C$  180,8 que foi atribuído a uma carboxila de ácido.

O espectro de RMN de  $^{1}$ H (200 MHz, MeOD) (Figuras 20-22, pág. 84 e 85) mostrou absorções na região entre  $\delta_{H}$  0,8 e  $\delta_{H}$  2,3 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp³ presentes em estruturas como triterpenos e esteróides. Ainda neste espectro, observou-se, ainda, a presença de um hidrogênio oximentínico em  $\delta_{H}$  3,65 (ddd, J = 3,6; 8,8 e 12,6 Hz), atribuído ao H-3. Além de cinco metilas terciárias em  $\delta_{H}$  0,80; 0,93; 1,00; 1,11; 1,59; 1,66 e uma metila secundária em  $\delta_{H}$  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  $\delta_{H}$  5,24 (t, J = 3,2 Hz), atribuído a H-24, e dois dupletos em  $\delta_{H}$  0,61 (d, J = 4,0 Hz) e  $\delta_{H}$  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  $4\alpha$ -carboxi- $3\beta$ , $16\alpha$ -dihidroxi-24-cicloarteno (FACUNDO et al., 2008), observou-se diferenças nos sinais em  $\delta_C$  53,6 e  $\delta_C$  29,1 de Cd-3, com os sinais em  $\delta_C$  62,6 e  $\delta_C$  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 triterpeno do tipo cicloartano,  $4\alpha$ -carboxi- $3\beta$ -hidroxi-24-cicloarteno, substância relatada pela vez no gênero *Combretum*.

4α-carboxi-3β-hidroxi-24-cicloarteno

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

	Cd-3	Mo-3
	$\delta_{C}$	$\delta_{ extsf{C}}$
С		
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
СН	,	,
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
CH <sub>2</sub>		
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

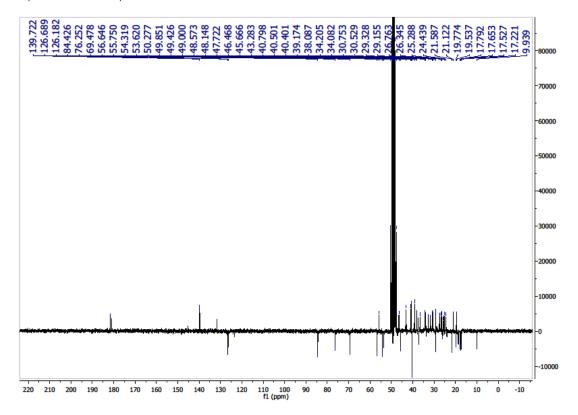


Figura 17. Espectro de RMN  $^{13}$ C-APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD

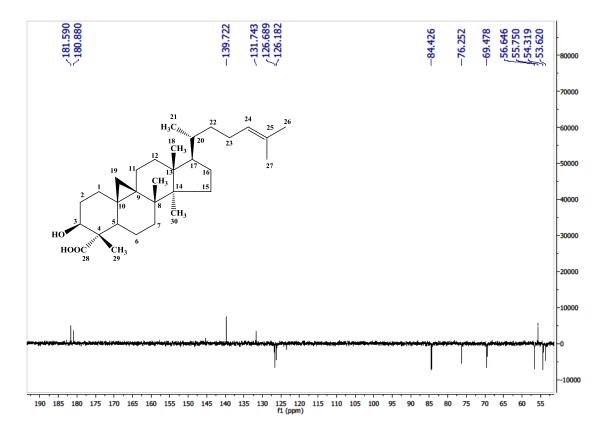


Figura 18. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD

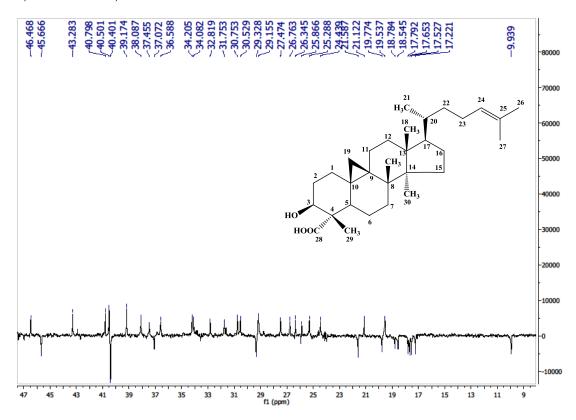


Figura 19. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-3 em MeOD

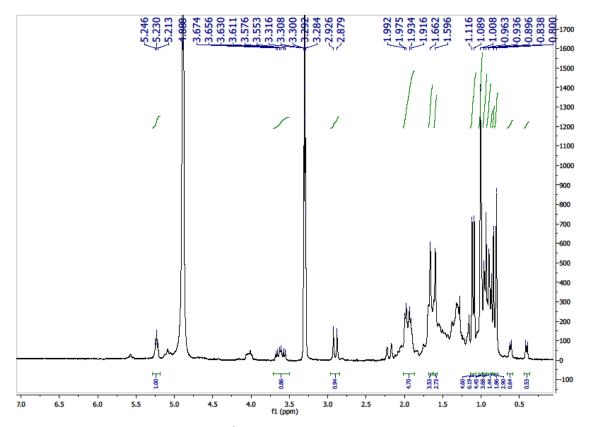


Figura 20. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.

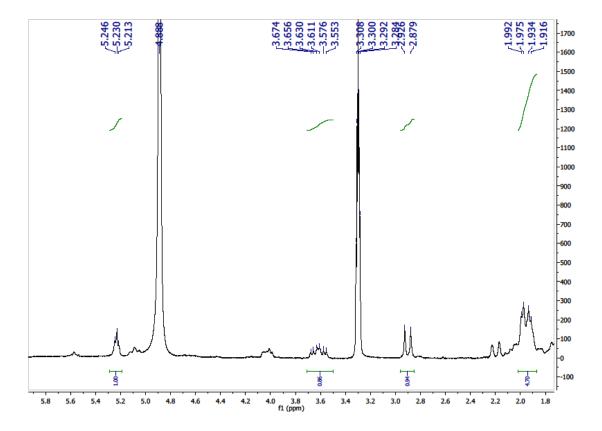


Figura 21. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD.

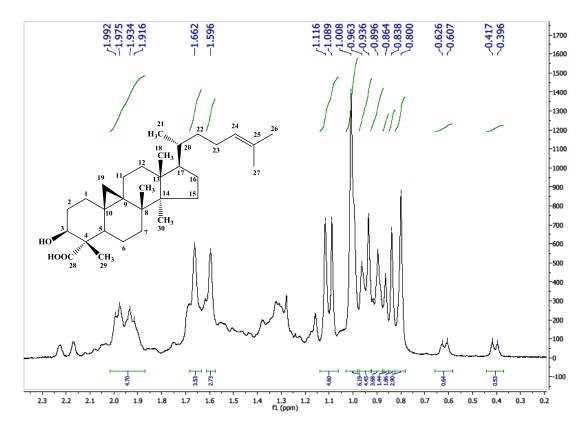


Figura 22. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-3 em MeOD

# 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  $^1$ H (300 MHz,  $C_5D_5N$ ) (Figuras 23 e 24, pág. 89), evidenciou um envelope de sinais na região entre  $\delta_H$  2,1 e 0,7, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos pentacíclicos. Observaram-se sinais em  $\delta_H$  0,87 a  $\delta_H$  1,70 atribuídos as metilas do esqueleto triterpênico. Adicionalmente, observou-se um sinal em  $\delta_H$  2,59 (d, J = 9,6 Hz) atribuído a H-18. O dupleto em  $\delta_H$  3,35 e tripleto  $\delta_H$  4,04 foram atribuídos aos H-3 e H-2, respectivamente. E um simpleto largo em  $\delta_H$  5,43 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-12 (MAHATO; KUNDU, 1994).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C-Broad Band (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>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  $\delta_C$  125,51 e  $\delta_C$  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  $\delta_C$  68,56 e  $\delta_C$  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  $\delta_C$  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  $2\alpha$ ,  $3\beta$ , 28-trihidroxiurs-12-eno, substância foi isolada pela vez em C. duarteanum.

 $2\alpha$ ,  $3\beta$ , 28-trihidroxiurs-12-eno

**Tabela 4.** Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-4 ( $\delta$ , C $_5$ D $_5$ N, 75 MHz) com modelo (Mo-4) da literatura ( $\delta$ , CDCl $_3$ , 22.6 MHz), (MAHATO; KUNDU, 1994)

	H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub> 23 24		
	Cd-4	Mo-4	
	$\delta_{C}$	$\delta_{C}$	
С			
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	
CH <sub>2</sub>			
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	20.0	20.7	
23	29,3	28,7	
24	16,9	17,0 17.0	
25	17,4 17.6	17,0 17.0	
26	17,6	17,0	
27 29	23,8	23,7	
	17,4	17,0	
30	21,3	21,3	

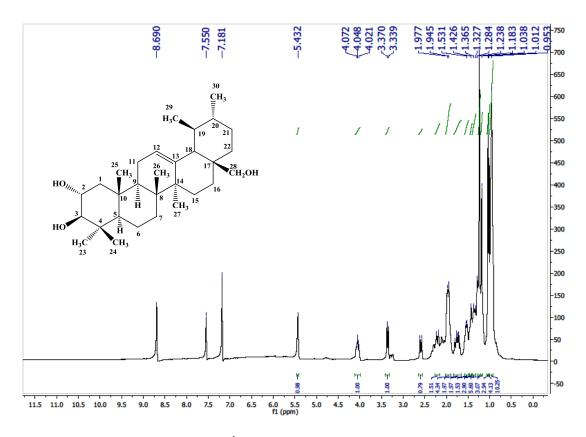


Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de Cd-4 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

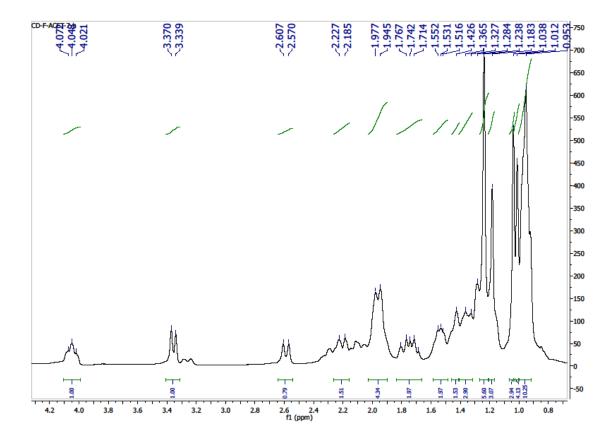


Figura 24. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de Cd-4 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

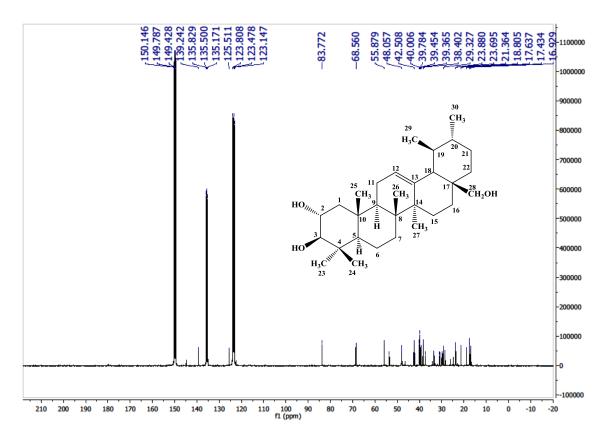


Figura 25. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (75 MHz) de Cd-4 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

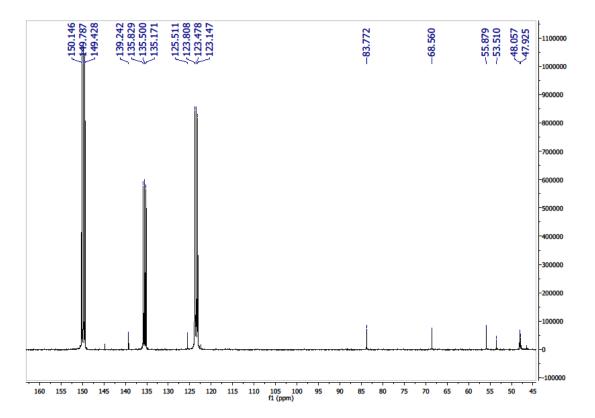


Figura 26. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (75 MHz) de Cd-4 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

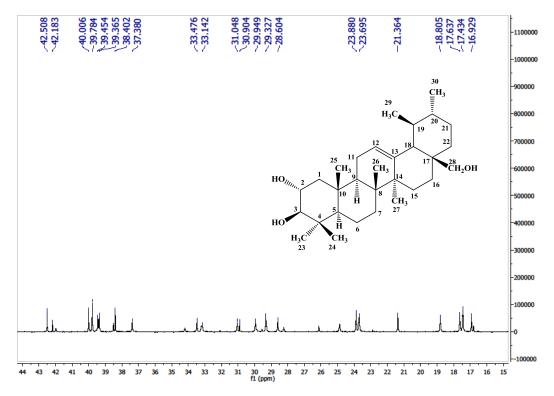


Figura 27. Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C-BB}$  (75 MHz) de Cd-4 em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 

# 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,  $C_5D_5N$ ) 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  $\delta_C$  139,15,  $\delta_C$  125,38,  $\delta_C$  144,72 e  $\delta_C$  123,73, sugeriram a presença dois grupamentos vinílicos, indicando tratar-se de uma mistura de triterpenos, Cd-5a e Cd-5b.

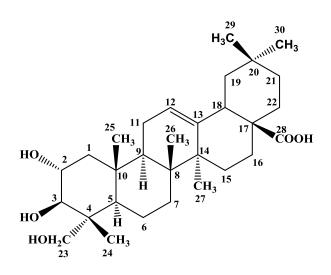
Observou-se que os sinais em  $\delta_C$  139,15 e  $\delta_C$  125,38 eram semelhantes àqueles encontrados nos espectros dos compostos Cd-2 e Cd-4, tratando-se, portanto, de um triterpeno pentacíclico da série ursano (Cd-5a). Adicionalmente, sinais em  $\delta_C$  144,72 e  $\delta_C$  123,73, sugeriram a presença de um triterpeno pentacíclico da série oleanano (Cd-5b). Os sinais em  $\delta_C$  77,96,  $\delta_C$  68,79 e  $\delta_C$  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  $\delta_C$  180,13 e  $\delta_C$  179, 85, atribuído aos C-28 de Cd-5a e Cd-5b.

O espectro de RMN de  $^1$ H (500 MHz,  $C_5D_5N$ ) (Figuras 28-30, pág. 95 e 96), evidenciou um envelope de sinais na região entre  $\delta_H$  2,0 e 0,8, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de triterpenos pentacíclicos. Observaram-se sinais em  $\delta_H$  0,88 a  $\delta_H$  1,20 atribuídos as metilas de núcleo triterpênico. O espectro de RMN de  $^1$ H mostrou, ainda, um simpleto em  $\delta_H$  5,42 (2H) atribuído aos H-12 dos dois triterpenos. Um dupleto  $\delta_H$  4,18 (6H, J = 7,6 Hz) foi atribuído aos hidrogênios oximetínicos H-23 $\alpha$ , H-3 $\beta$  e H-2 $\alpha$ , respectivamente. Outro dupleto em  $\delta_H$  3,70 (2H, J = 10,6 Hz) foi atribuído aos H-23 $\beta$  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  $2\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $23\alpha$  -trihidroxiurs-12-ene- 28-óico (Ácido Asiático) e ácido  $2\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $23\alpha$  -trihidroxiolean-12-ene- 28-óico (Ácido Arjunólico), respectivamente, ambos isolados pela vez em *Combretum duarteanum*.

$$\begin{array}{c} 30 \\ \text{CH}_{3} \\ 29 \\ \text{H}_{3}\text{C} \\ 20 \\ 21 \\ 20 \\ 21 \\ 21 \\ 22 \\ 21 \\ 22 \\ 21 \\ 22 \\ 21 \\ 22 \\ 23 \\ 24 \\ \end{array}$$

Cd-5a Ácido 2α, 3β, 23α – trihidroxiurs-12-en- 28-óico



Cd-5b Ácido 2α, 3β, 23α – trihidroxiolean-12-en- 28-óico

**Tabela 5.** Dados comparativos de RMN $^{13}$ C da substância Cd-5 ( $\delta$ , C $_5$ D $_5$ N, 125 MHz) com modelo da literatura ( $\delta$ , C $_5$ D $_5$ N, 100 MHz), (LI *et al.*, 2012).

$$\begin{array}{c} 30 \\ \text{CH}_3 \\ \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C$$

	HOH <sub>2</sub> CN CH <sub>3</sub>		HOH <sub>2</sub> C CH <sub>3</sub> 23 24	
	Cd-5a	Àcido Asiático	Cd-5b	Àcido Arjunólico
	$\delta_{C}$	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>	$\delta_{C}$
С				
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	-	-
CH <sub>2</sub>				
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

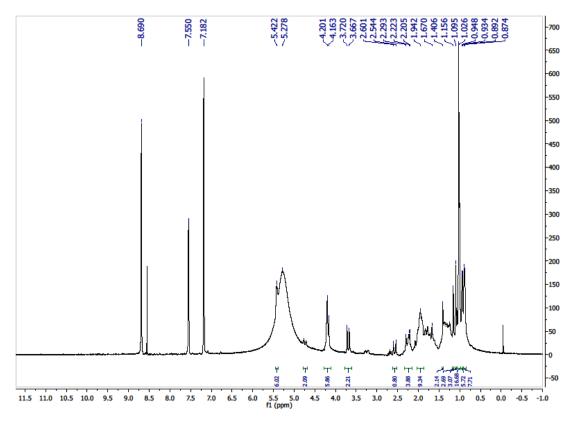


Figura 28. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-5 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

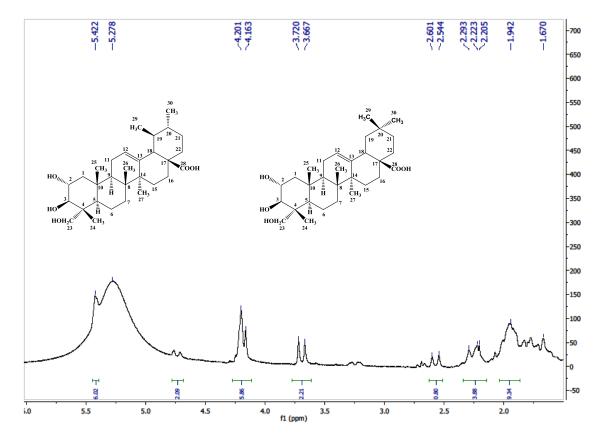


Figura 29. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Cd-5 em C₅D₅N

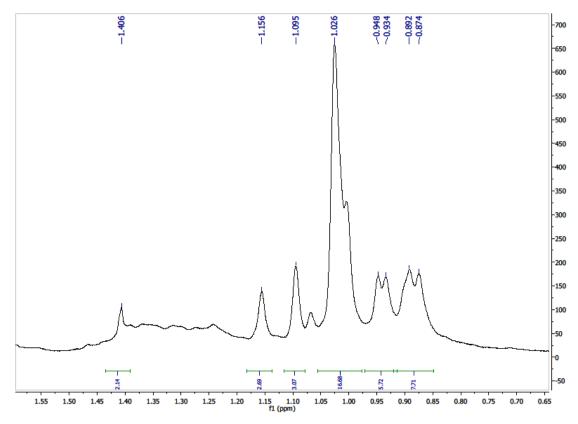


Figura 30. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Cd-5 em C₅D₅N

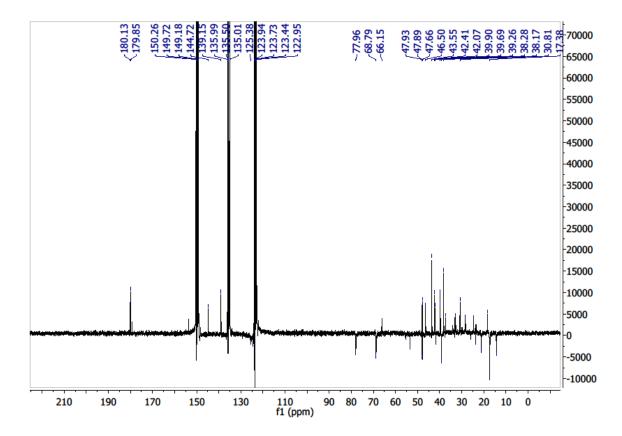


Figura 31. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz) de Cd-5 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

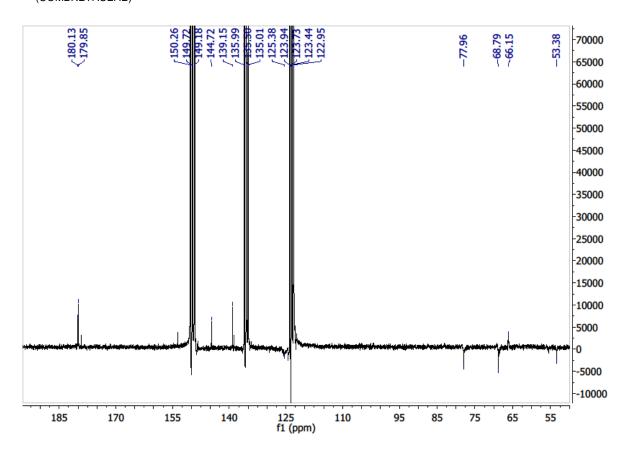


Figura 32. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz) de Cd-5 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

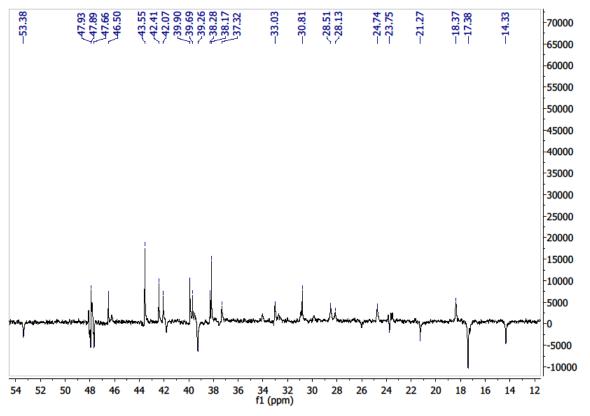


Figura 33. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz) de Cd-5 em C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N

# 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  $^1$ H (200 MHz, CDCl $_3$ ) e suas expansões (Figuras 34-36, pág. 98 e 99) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre  $\delta_H$  0,64 e  $\delta_H$  1,49 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp $^3$  presentes em estruturas como triterpenos e esteroides. Em  $\delta$  3,48 pôde-se verificar a presença de um multipleto atribuído a hidrogênio da posição H-3 do núcleo esteroidal (TOMAZ *et al.*, 2008), e um dupleto em  $\delta_H$  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<sub>3</sub>) (Figuras 37-39, pág. 99 e 100) demonstrou a presença de metilas esteroidais pelo conjunto de absorções entre  $\delta_{\rm C}$  11,80 e  $\delta_{\rm C}$  21,18 características destes grupos, reforçando, portanto, a proposta de núcleo esteroidal, dada pelo espectro de RMN $^{1}$ H. Os sinais em  $\delta_{\rm C}$  121,65 e  $\delta_{\rm C}$  140,66 são condizentes com dupla ligação nas posições 5 e 6 e as absorções  $\delta_{\rm C}$  129,20 e  $\delta_{\rm C}$  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 ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) com modelo (Mo-6) da literatura ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz), (FALCÃO, 2003).

	0	
	Cd-6	Mo-6
	$\delta_{C}$	$\delta_{\text{C}}$
С		
5	140,7	140,6
10	36,4	36,4
13	42,2	42,1
СН		
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
CH <sub>2</sub>		
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 <b>CH₃</b>	25,3	25,3
Сп₃ 18	12.0	11.0
19	12,0 19,4	11,9 19,3
21	21,1	21,1
26	21,1	21,1
20 27	18,9	18,9
29	12,2	12,1
	14,4	14,1

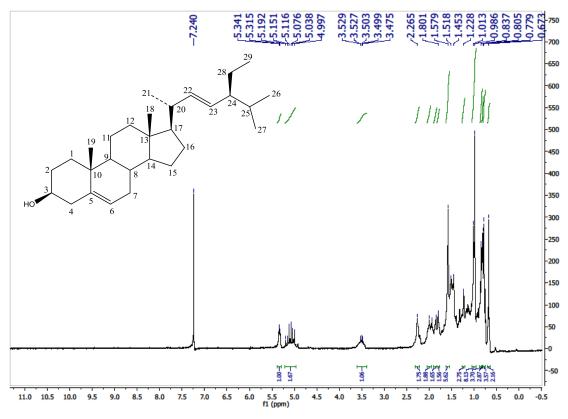


Figura 34. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl<sub>3</sub>

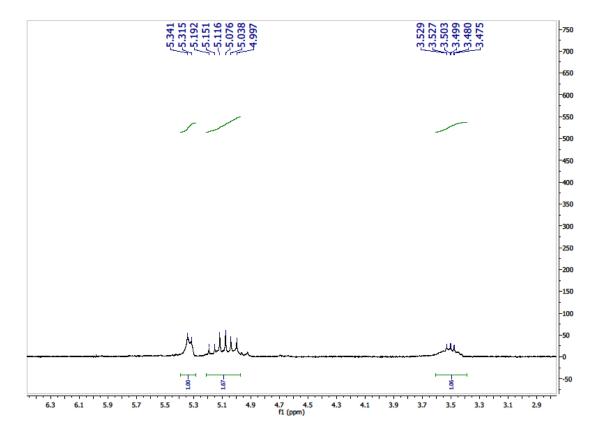


Figura 35. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl<sub>3</sub>

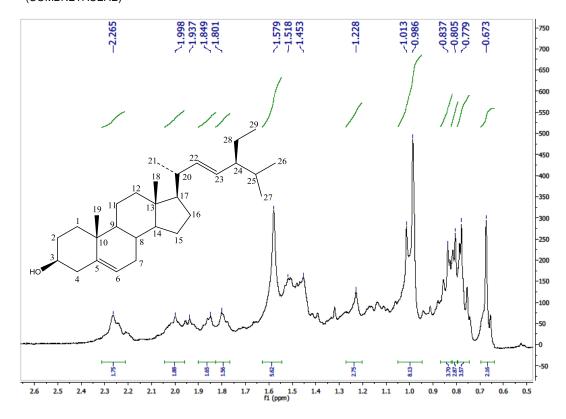


Figura 36. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-6 em CDCl<sub>3</sub>

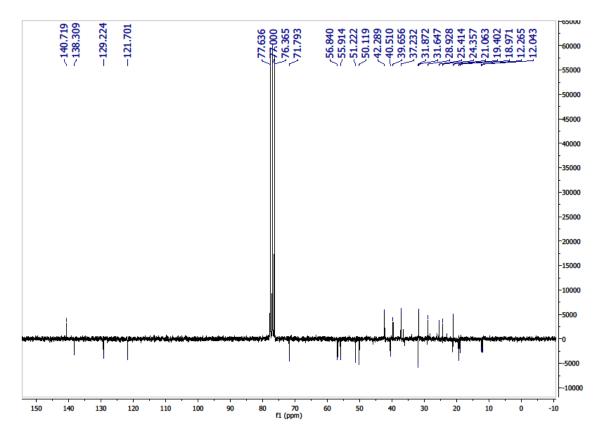


Figura 37. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl<sub>3</sub>

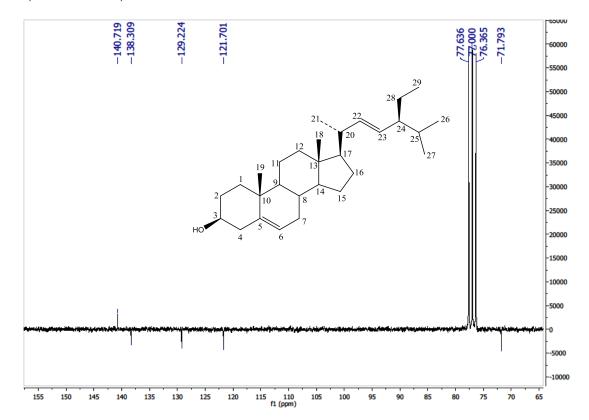


Figura 38. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl<sub>3</sub>

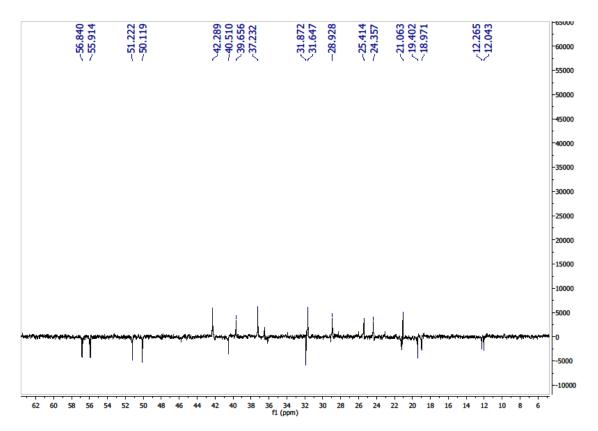


Figura 39. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-6 em CDCl<sub>3</sub>

# 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  $^1$ H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e suas expansões de Cd-7 (Figuras 40-42, pág. 106 e 107) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre  $\delta_{\rm H}$  0,67 e  $\delta_{\rm H}$  1,57 características de hidrogênios metílicos e metilênicos de carbono sp<sup>3</sup> presentes em estruturas como triterpenos e esteróides. Em  $\delta_{\rm H}$  3,49 pôde-se verificar a presença de um multipleto que pode ser atribuído a hidrogênio da posição 3 de núcleo esteroidal, e um dupleto em  $\delta_{\rm H}$  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  $\delta_{\rm H}$  0,64 e  $\delta_{\rm H}$  2,25 possibilitou sugerir que Cd-7 possui o núcleo esteroidal.

O espectro de RMN  $^{13}$ C-APT (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) mostrou a presença de 50 linhas espectrais intensas (Figuras 43-45, pág. 107 e 108), inferindo que Cd-7 tratase de uma mistura de esteroides (Cd-7a e Cd-7b). Absorções de metilas esteroidais entre  $\delta_{\rm C}$  12,02 e  $\delta_{\rm C}$  21,36 características destes grupos, reforça, portanto, a proposta de núcleos esteroidais, dada pelo espectro de RMN  $^{1}$ H. Os sinais para carbonos intensos em  $\delta_{\rm C}$  121,68 e  $\delta_{\rm C}$  140,70 são condizentes com dupla ligação nas posições 5 e 6, bem como as absorções  $\delta_{\rm C}$  129,20 e  $\delta_{\rm C}$  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  $\delta_C$  117,42 e  $\delta_C$  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 RMN $^{13}$ C da substância Cd-7 ( $\delta$ , CDCI $_3$ , 50 MHz) com modelos da literatura ( $\delta$ , CDCI $_3$ , 50 MHz) (RIPARDO FILHO *et al.*, 2012).

	4 6		HOV 4 5 6	
	Cd-7a	Estigmasterol	Cd-7b	Espinasterol
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{ extsf{C}}$
С				
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

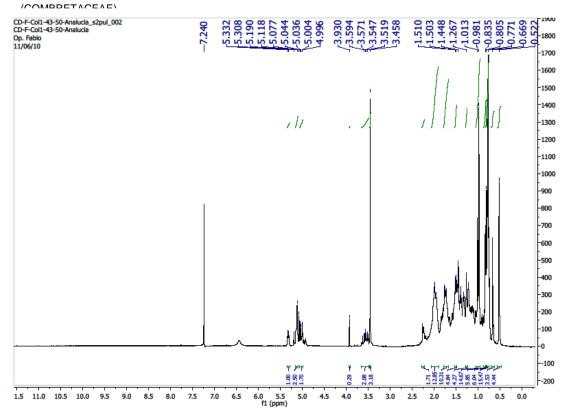


Figura 40. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl<sub>3</sub>

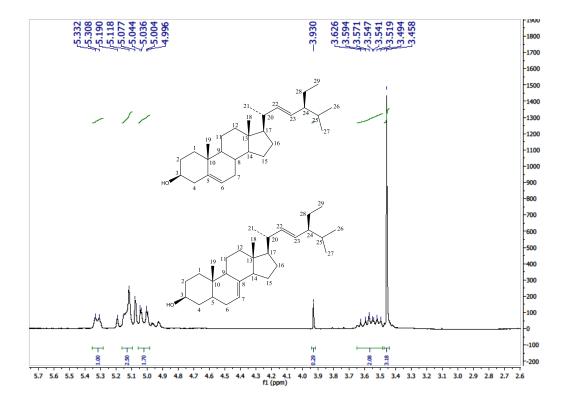


Figura 41. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl<sub>3</sub>

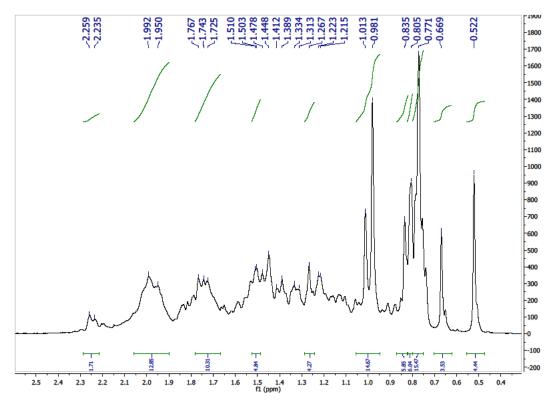


Figura 42. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) de Cd-7 em CDCl<sub>3</sub>

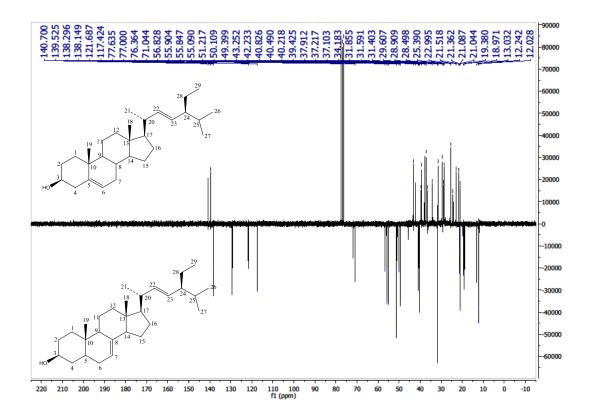


Figura 43. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl<sub>3</sub>

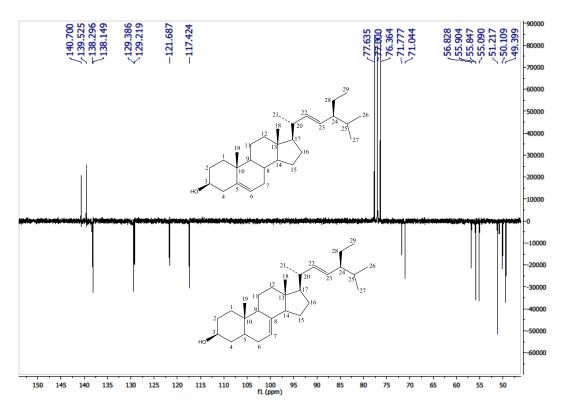


Figura 44. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl<sub>3</sub>

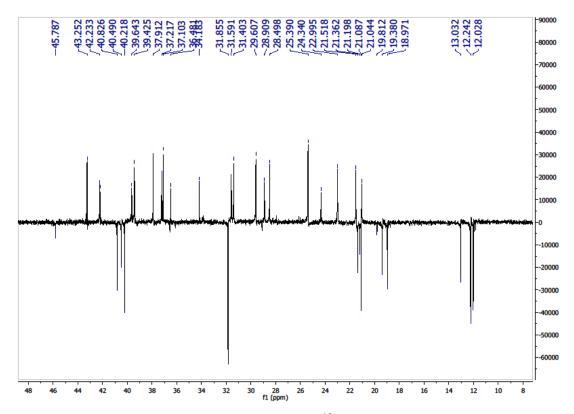


Figura 45. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz) de Cd-7 em CDCl<sub>3</sub>

# 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<sup>-1</sup>), uma absorção de estiramento de carbonila C=O (1730 cm<sup>-1</sup>), e vibrações de estiramento C-O (1260 cm<sup>-1</sup>) (Figura 46, pág. 112).

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

O espectro de RMN  $^1$ C (125 MHz, MeOD) de Cd-8 (Figura 48, pág. 113) mostrou apenas uma absorção em  $\delta_C$  110,09, sendo os demais carbonos inferidos após análise das correlações dos espectros heteronucleares HMQC e HMBC.

O espectro de correlação heteronuclear (<sup>1</sup>H X <sup>13</sup>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  $\delta_H$  3,80 com seu respectivo carbono em  $\delta_C$  51,86, fez descartar as duas primeiras hipóteses, pois nas estruturas A e B os carbonos das metoxilas absorveriam em  $\delta_C$  ~60 e  $\delta_C$  ~56, respectivamente.

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

metoxila em  $\delta_H$  3,80 com um carbono carboxílico em  $\delta_C$  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  $^{1}$ H (500 MHz),  $^{13}$ C (125 MHz) e correlações entre sinais de  $^{1}$ H x  $^{13}$ 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).

		On	
		Cd-8	Mo-8
		HMQC	
	$\delta_{C}$	δн	$\delta_{C}$
С			
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
CH <sub>3</sub> O		· ,	
CH <sub>3</sub> O	51,87*	3,80 (s, 3H)	52,3

<sup>\*</sup>Valores observados através dos espectros de RMN 2D.

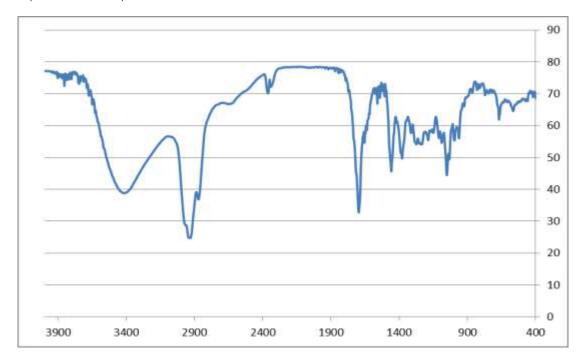


Figura 46. Espectro de IV (cm<sup>-1</sup>) de Cd-8 em pastilhas de KBr.

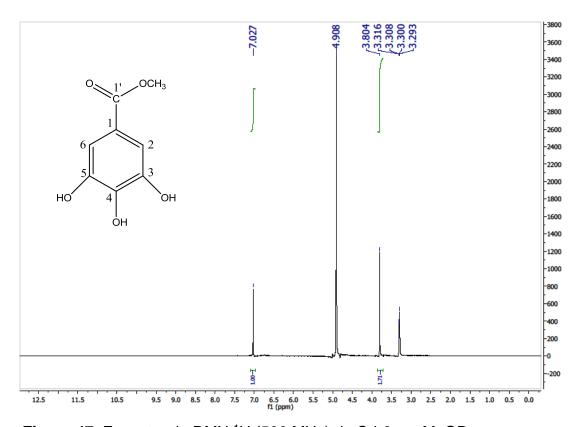


Figura 47. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-8 em MeOD.

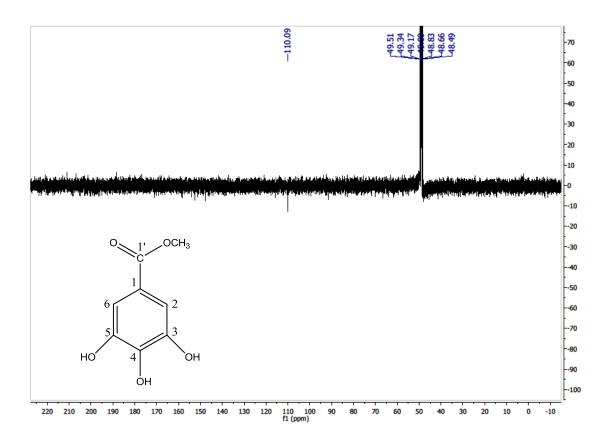


Figura 48. Espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz) de Cd-8 em MeOD.

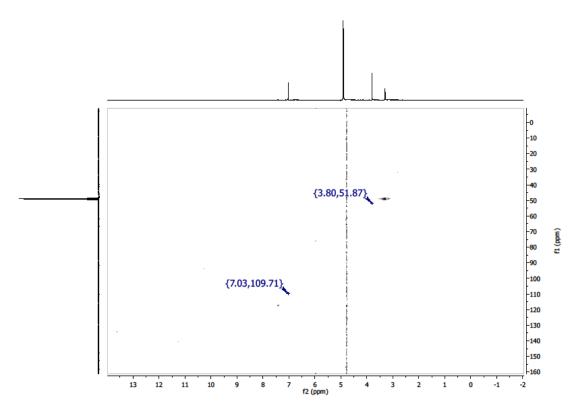


Figura 49. Espectro de HMQC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8.

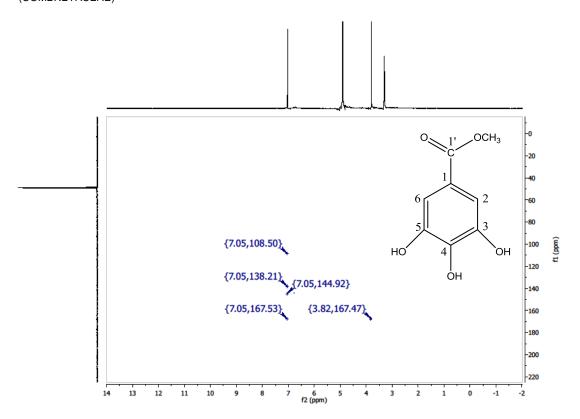


Figura 50. Espectro de HMBC (MeOD, 500 e 125 MHz) de Cd-8.

### 5.9 Identificação estrutural de Cd-9

A sustância 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<sup>-1</sup>), uma absorção de estiramento de carbonila C=O (1690 cm<sup>-1</sup>), vibrações de deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos (1.600 cm-1) e vibrações de estiramento C-O (1200 cm<sup>-1</sup>).

O espectro de RMN  $^1$ H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (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 dupleto em  $\delta_H$  7,68 com acoplamento *orto* (J = 8,5 Hz) e *meta* (J = 2,5 Hz), um dupleto em  $\delta_H$  6,95 com acoplamento *orto* (J = 8,5 Hz) e outro dupleto em  $\delta_H$  7,65 (J = 2,0 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  $\delta_H$  6,38 e  $\delta_H$  6,25 com acoplamento *meta* (J = 2,5 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  $^1$ H observou-se ainda, duas outras absorções referentes à metoxilas em  $\delta_H$  3,96 e  $\delta_H$  3,84. E a ausência de um simpleto na região entre  $\delta_H$  6,39-6,94, sugerindo que a posição C-3 do anel C encontra-se substituída (AGRAWAL, 1989).

Os dados de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Figura 55, pág. 122) revelou a presença de sinais em δc 121,46, δc 114,39 e δc 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 δc 99,02 e δc 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 <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>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  $\delta_{\rm C}$  56,06 e  $\delta_{\rm C}$  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 (<sup>1</sup>H X <sup>13</sup>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 ( $^{1}$ H X  $^{13}$ 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  $\delta_{H}$  3,97 com um carbono não hidrogenado em  $\delta_{C}$  148,77, o que permite inferir que este carbono está ligado a respectiva metoxila. As correlações dos hidrogênios em  $\delta_{H}$  7,65 e  $\delta_{H}$  6,95 (H-2' e H-5', respectivamente), com o mesmo carbono ( $\delta_{C}$  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  $\delta_H$  7,68 a três ligações, com o carbono que sustenta a metoxila confirmou que o deslocamento em  $\delta_C$  148,07 pertencia ao C-4', descartando, portanto, a proposta B.

Comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>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  $^1$ H (500 MHz),  $^{13}$ C (125 MHz) e correlações entre sinais de  $^1$ H x  $^{13}$ C (HMBC) de **Cd-9** registrados em CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

		OH O			
	HMQC			HMBC	
	δ <sub>C</sub>	$\delta_{H}$	<sup>2</sup> <b>J</b> CH	<sup>3</sup> <b>Ј</b> сн	
С					
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> , <i>J</i> =2,5Hz, 1H)		C-8, C-10	
8	93,94	6,38 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,5Hz, 1H)	C-9	C-6, C-10	
2'	114,39	7,65 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2Hz, 1H)	C-3'	C-4', C-6'	
5'	110,42	6,95 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8,5Hz, 1H)	C-4'	C-1', C-3'	
6'	121,46	7,68 ( <i>dd</i> , J=2,5 e <i>J</i> =8,5 Hz, 1H)		C-2', C-4'	
CH₃O					
CH <sub>3</sub> O-3	56,06	3,96 (s, 3H)		C-3	
CH <sub>3</sub> O-4'	60,16	3,84 (s, 3H)		C-4'	

<sup>\*</sup>Valores observados através dos espectros de RMN 2D.

<sup>\*\*</sup>Valores dados pela literatura.

**Tabela 10**. Dados de RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **Cd-9** e comparação com valores da literatura (Mo-9) (δ, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz) (BARBERÁ *et al.*, 1986).

		OH O
	Cd-9	Mo-9
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>
С		
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 <sub>3</sub> O-3	56,06	55,62
CH <sub>3</sub> O-4'	60,16	59,70

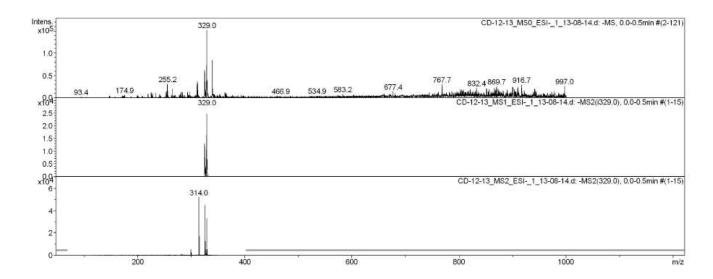


Figura 51. [M-H] – (EM-ESI, modo negativo) Espectro de Massas de Cd-9.

.

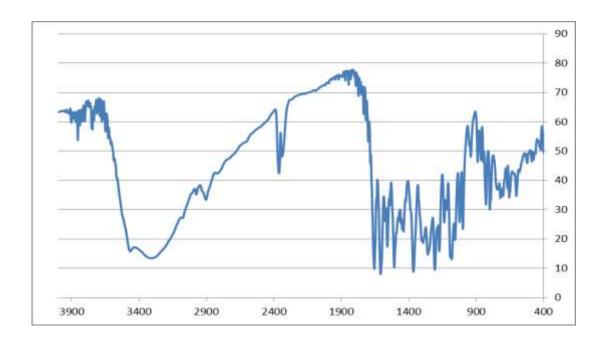


Figura 52. Espectro de IV (cm<sup>-1</sup>) de Cd-9 em pastilhas de KBr.

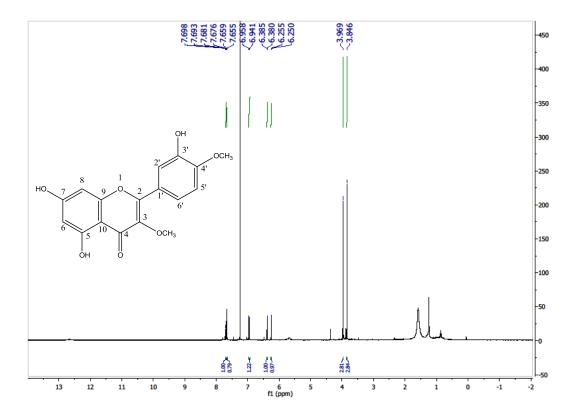


Figura 53. Espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl<sub>3</sub>

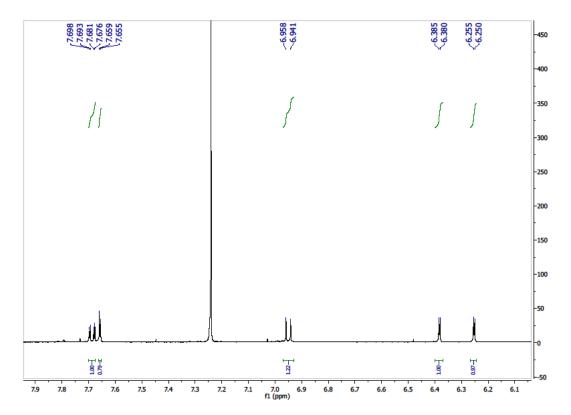


Figura 54. Expansão do espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-9 em CDCl<sub>3</sub>

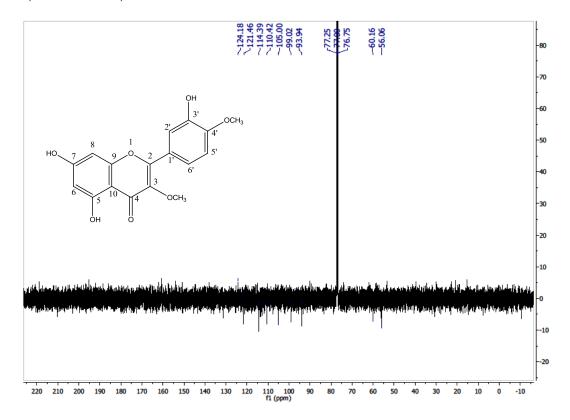


Figura 55. Espectro de  $^{13}$ C-APT (125 MHz) de Cd-9 em CDCl $_3$ 

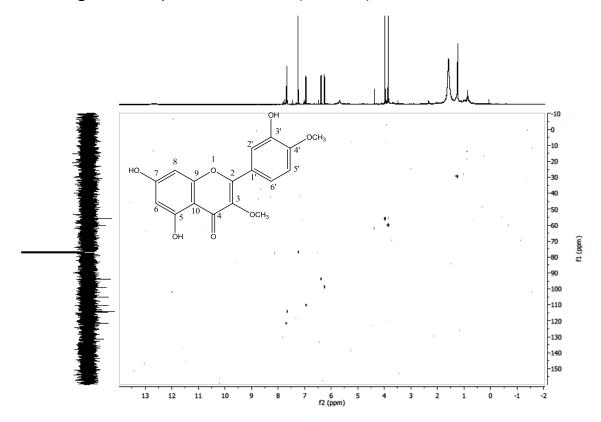


Figura 56. Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl<sub>3</sub>

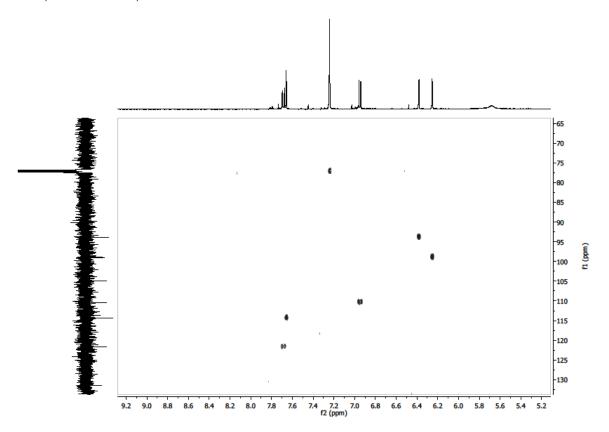


Figura 57. Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl<sub>3</sub>

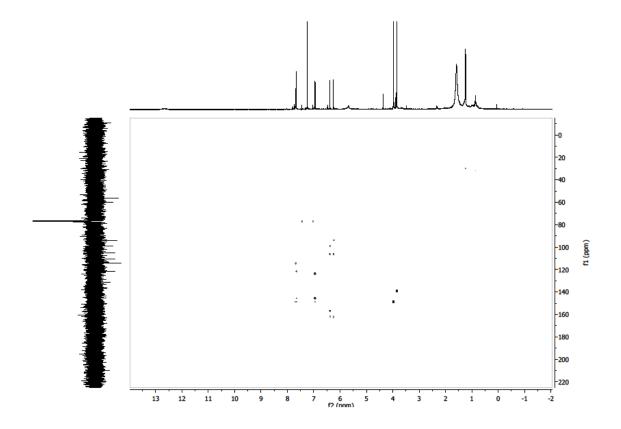


Figura 58. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl<sub>3</sub>

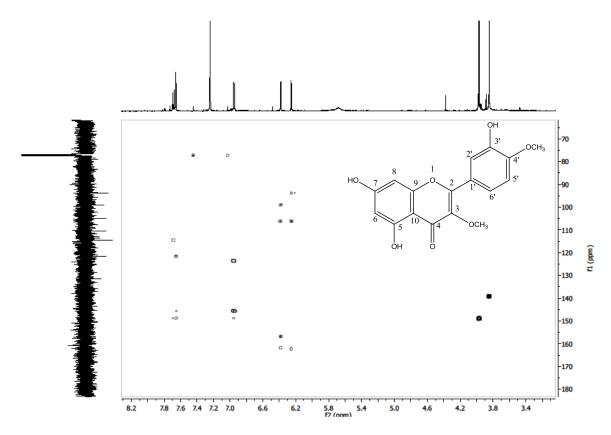


Figura 59. Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-9 em CDCl<sub>3</sub>

### 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<sup>-1</sup>), uma absorção de estiramento de carbonila C=O (1650 cm<sup>-1</sup>), vibrações de deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos (1.600 cm-1) e vibrações de estiramento C-O (1300 cm<sup>-1</sup>).

O espectro de RMN  $^1$ H (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 dupleto em  $\delta_H$  7,65 com acoplamento orto (J=8,5 Hz) e meta (J=2,5 Hz), um dupleto em  $\delta_H$  7,53 com acoplamento meta (J=2,5 Hz) e outro dupleto em  $\delta_H$  6,81 (J=8,5 Hz) mostrando acoplamento orto. Essas absorções revelaram um padrão de hidrogenação de um sistema ABX para núcleo flavonoídico. Observou-se ainda, dois dupletos em  $\delta_H$  6,40 e 6,20 com acoplamento meta (J=2,0 Hz) sugerindo a presença de um anel A 5,7 disubstituído, semelhante ao que foi observado para Cd-9.

No espectro de RMN  $^{1}$ H, ainda foi possível observar um conjunto de sinais na região entre  $\delta_{H}$  5,20 - 3,30, sugerindo a presença de uma unidade osídica, destacando-se um dupleto em  $\delta_{H}$  5,36 (J= 7,5 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  $\delta_C$  156,32 e  $\delta_C$  133,46, atribuídos aos carbonos da dupla ligação em C-2 e C-3, e o sinal em  $\delta_C$  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  $\delta_C$  115,20,  $\delta_C$  115,93 e  $\delta_C$  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  $\delta_C$  98,72 e  $\delta_C$  93,55, referentes aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, confirmam o padrão 5,7 dissubstituído do anel A.

O conjunto de sinais característicos de carbonos oximetínicos em  $\delta_C$  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  $\delta_C$  60,15, atribuído ao carbono oximetilênico de uma unidade osídica, assim como, pela presença, no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, do dupleto 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  $\delta_C$  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  $^{1}$ H (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 <sub>C</sub>	$\delta_{H}$	
С			
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> , <i>J</i> =2 Hz, 1H)	99,28
8	93,55	6,40 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2 Hz, 1H)	94,09
2'	115,20	7,53 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,5 Hz, 1H)	116,50
5'	115,93	6,81 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz, 1H)	115,63
6'	122,03	7,65 ( <i>dd</i> , J=2,5 e <i>J</i> =8,5 Hz,	122,50
		1H)	
1"	101,77	5,36 ( <i>d</i> , <i>J</i> =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
CH <sub>2</sub>			
6"	60,15	-	60,46
ОН		12,61 (s, 1H)	

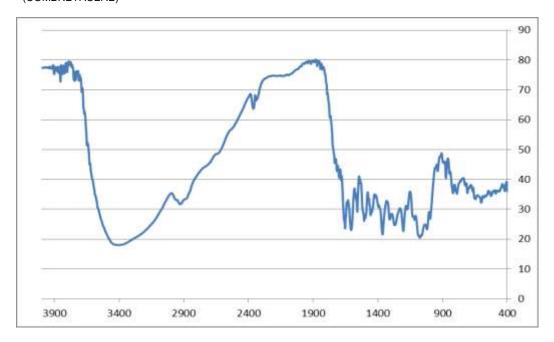


Figura 60. Espectro de IV (cm<sup>-1</sup>) de Cd-10 em pastilhas de KBr.

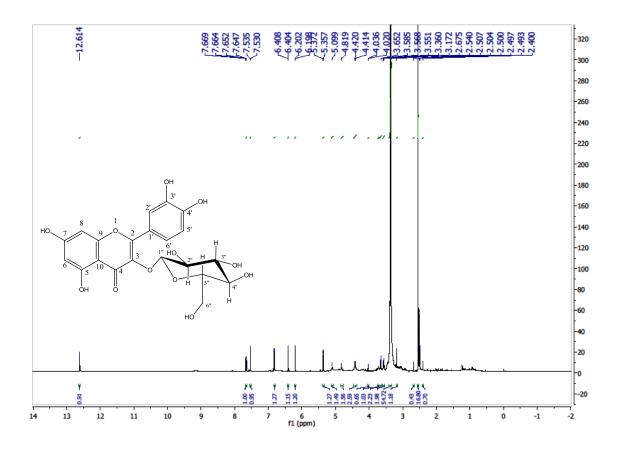


Figura 61. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-10 em DMSO-d<sub>6</sub>

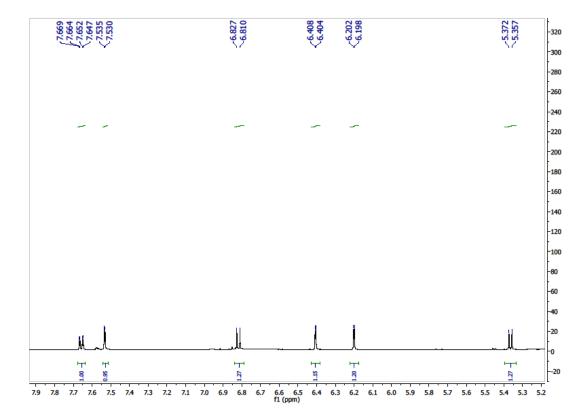


Figura 62. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-10 em DMSO-d<sub>6</sub>

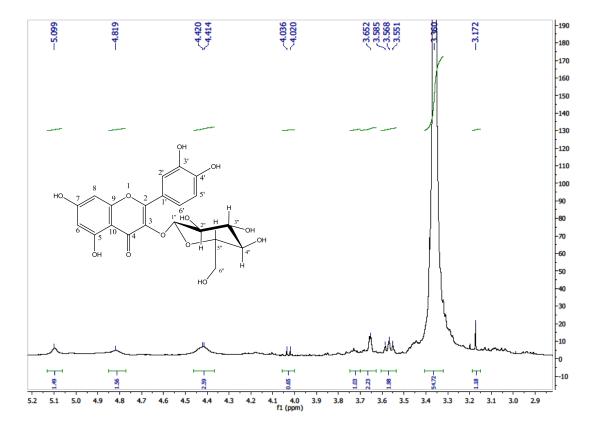


Figura 63. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-10 em DMSO-d<sub>6</sub>

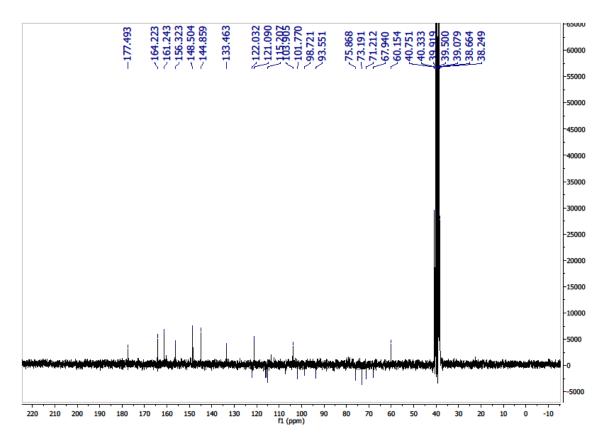


Figura 64. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) de Cd-10 em DMSO-d<sub>6</sub>

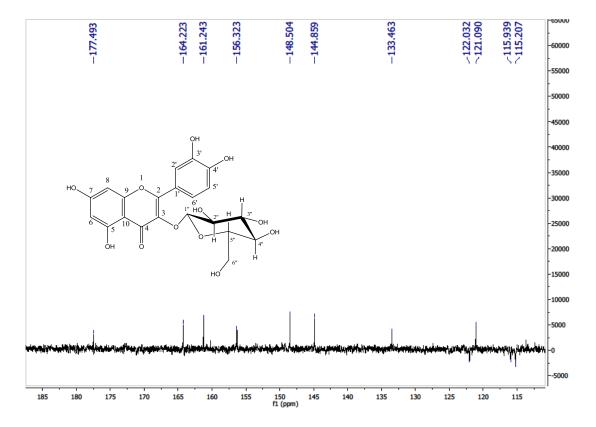


Figura 65. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) de Cd-10 em DMSO-d<sub>6</sub>

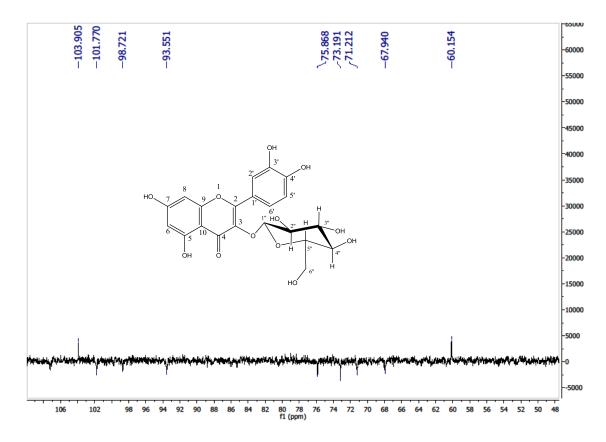


Figura 66. Expansão do espectro de RMN  $^{13}$ C (125 MHz) de Cd-10 em DMSO- $d_6$ 

# 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  $^1$ H (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 dupleto em  $\delta_H$  6,71 com acoplamento *orto* (J= 8,0 Hz) e *meta* (J= 2,0 Hz), um dupleto em  $\delta_H$  6,82 com acoplamento *meta* (J= 2,0 Hz) e outro dupleto em  $\delta_H$  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  $\delta_H$  5,92 e  $\delta_H$  5,84 com acoplamento *meta* (J= 2,5 Hz) sugerindo um anel A 5,7 dissubstituído. A presença de um dupleto em  $\delta_H$  4,55 (J= 7,5 Hz), um duplo tripleto em  $\delta_H$  3,96 (J= 8,0 e 5,0 Hz), dois duplo dupletos em  $\delta_H$  2,49 (J= 5,0 e 16,0 Hz) e  $\delta_H$  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  $\delta_c$  115,32,  $\delta_c$  116,14 e  $\delta_c$  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  $\delta_c$  96,37 e  $\delta_c$  95,57 atribuídos aos carbonos C-6 e C-8, também confirmaram o padrão 5,7 dissubstituído 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 (<sup>1</sup>H X <sup>13</sup>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 ( $^{1}$ H X  $^{13}$ C-HMBC) e suas expansões (Figura 74-76, pág. 139 e 140), mostraram uma correlação a duas ligações ( $^{2}$ J) dos hidrogênios H-2' e H-5' ( $\delta_{H}$  6,82 e  $\delta_{H}$  6,75) com os carbonos C-3' e C-4' ( $\delta_{c}$ 146,31), respectivamente. Observaram-se outras correlações dos hidrogênios em  $\delta_{H}$  4,55 e  $\delta_{H}$  6,75 (H-2 e H-5') com o carbono C-1' ( $\delta_{c}$  132,21), confirmando o deslocamento deste carbono.

Através das análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>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.

A literatura ainda esclarece como diferencial entre elas o fato de que no espectro de RMN de  $^1$ H o H-3eq na epicatequina encontra-se mais desblindado ( $\delta_H$  ~4,01) que o H-ax da catequina ( $\delta_H$  ~3,83) e que o hidrogênio metilênico benzílico H-4ax embora protegido em ambas, é ligeiramente mais protegido na catequina. Além disso, no espectro de RMN de  $^{13}$ C a diferença epimérica entre catequina/epicatequina é  $\delta_c$  +3,4 (C-2),  $\delta_c$  +2,1 (C-3) e  $\delta_c$  -0,7(C-4) (Tabela 12, pág. 135) (AGRAWAL, 1989; LÔBO *et al.*, 2008). A análise da estereoquímica absoluta de

Cd-11 no  $\alpha D$  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 <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>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  $^1$ H e  $^{13}$ C da substância Cd-11 em MeOD com valores encontrados na literatura (LÔBO *et al.*, 2008) ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

HO 
$$\frac{7}{6}$$
  $\frac{8}{10}$   $\frac{9}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{4}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{4}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{4}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{4}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{4}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{4}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{3}{10$ 

	Catequina		Epi	Epicatequina		Cd-11	
	δ <sub>C</sub>	δн	δ <sub>C</sub>	δн	δς	$\delta_{H}$	
С							
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> , <i>J</i> =7,5 Hz)	
3	68,82	3,98	67,48	4,17	68,81	3,96 (td, J=8 e 5 Hz)	
6	96,37	5,93	96,46	5,95	96,37	5,92 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,5 Hz)	
8	95,58	5,87	95,95	5,93	95,57	5,84 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2,5 Hz)	
2'	115,29	6,84	115,34	6,98	115,31	6,82 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2 Hz)	
5'	116,15	6,76	115,95	6,76	116,14	6,75 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8 Hz)	
6'	120,09	6,72	119,46	6,80	120,06	6,71 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2 e 8 Hz)	
CH <sub>2</sub>							
4 <sub>(ax.)</sub>	28,49	2,51	29,25	2,86	28,51	2,49 (dd, J=8 e 16 Hz)	
$4_{\text{(eq.)}}$		2,85		2,74		2,83(dd, J=5 e 16 Hz)	

<sup>\*</sup>Valores observados através dos espectros de RMN 2D.

<sup>\*\*</sup>Valores dados pela literatura.

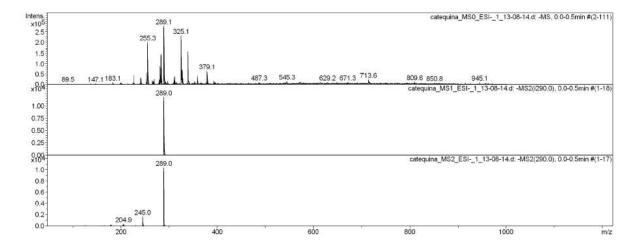


Figura 67. [M-H] – (EM-ESI, modo negativo) Espectro de Massas de Cd-11

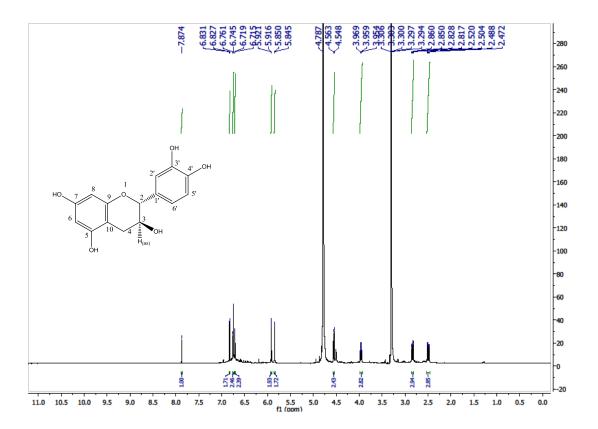


Figura 68. Espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD

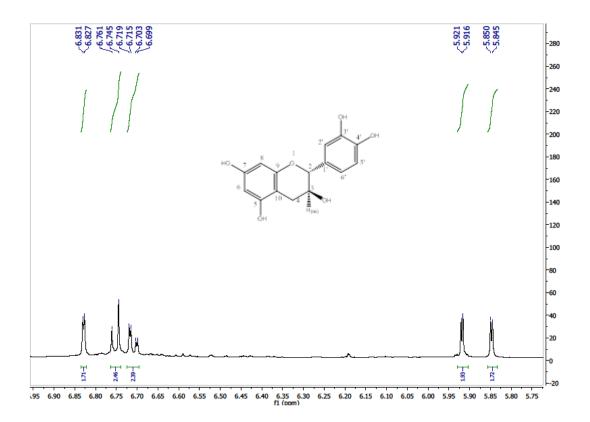


Figura 69. Expansão do espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD

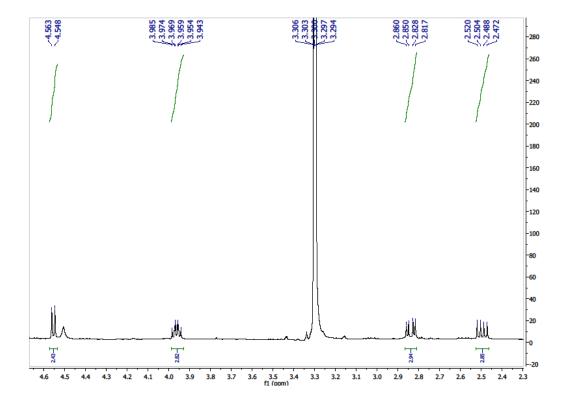


Figura 70. Expansão do espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-11 em MeOD

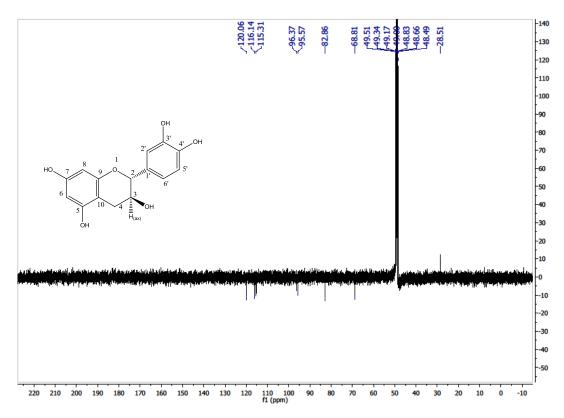


Figura 71. Espectro de <sup>13</sup>C (125 MHz) de Cd-11 em MeOD

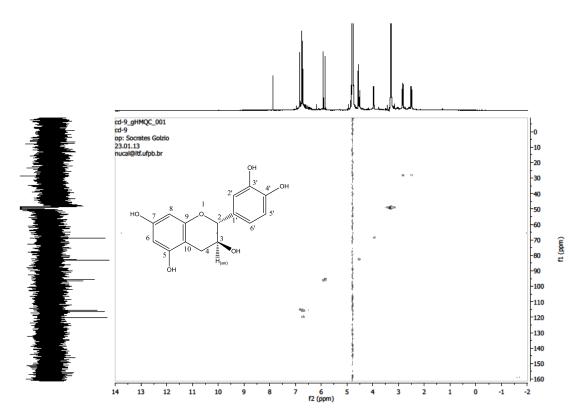


Figura 72. Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD

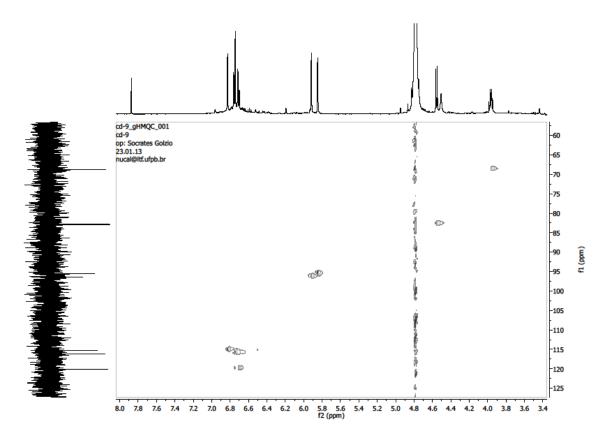


Figura 73. Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD

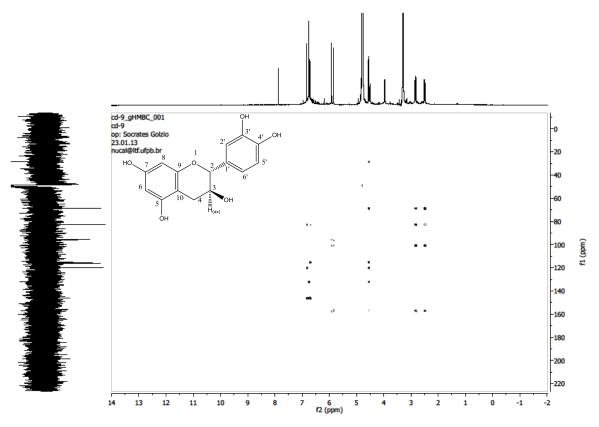


Figura 74. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD

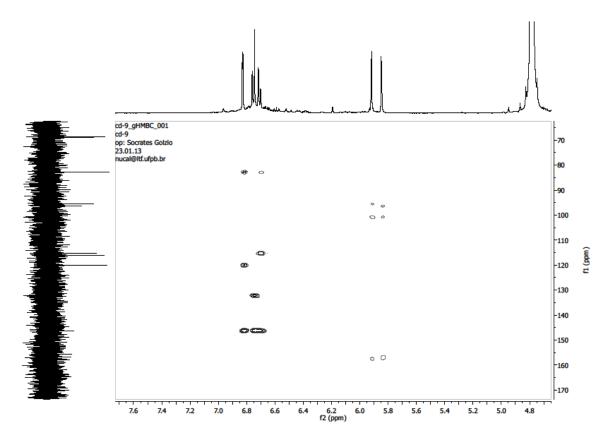


Figura 75. Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD

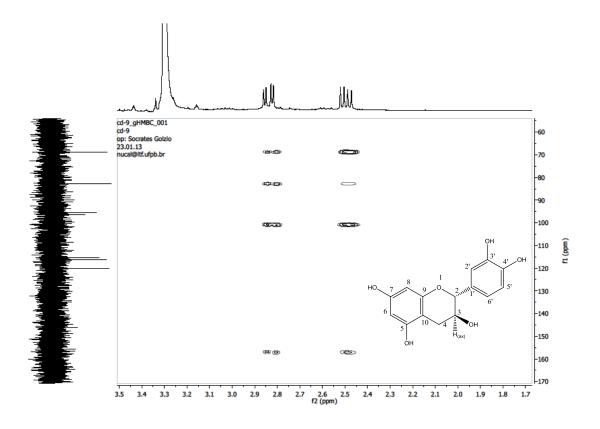


Figura 76. Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-11 em MeOD

# 5.12 Identificação estrutural de Cd-12

A substância codificada como Cd-11 (5,0 mg) foi obtida como um pó amorfo amarelado.

O espectro de Massas obtido com EM-ESI (Figura 75, pág. 141) mostrou o pico do íon molecular em m/z 447,1 [M-H], compatível com a fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{11}$ .

Os espectros de RMN  $^1$ H (500 MHz, MeOD) de Cd-12 e suas expansões (Figuras 76-78, pág. 141 e 142), mostraram deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos. Observaram-se dois duplos dupletos um em  $\delta_H$  8,05 com acoplamento *orto* (J=7,0 Hz) e *meta* (J=2,5 Hz), e outro em  $\delta_H$  6,88 com acoplamento *orto* (J=7,0 Hz) e *meta* (J=2,5 Hz), além de dois dupletos um em  $\delta_H$  8,05 (J=8,5 Hz) e outro em  $\delta_H$  6,67 (J=8,5 Hz), ambos com acoplamento em *orto*. Essas absorções revelaram um padrão de hidrogenação de um sistema AA'BB' para o anel B de um núcleo flavonoídico. Observaram-se ainda, dois dupletos em  $\delta_H$  6,40 e  $\delta_H$  6,20 com acoplamento *meta* (J=2,0 Hz) sugerindo um anel A 5,7 dissubstituído. A presença de um dupleto em  $\delta_H$  5,24 (J=7,5 Hz) e outros sinais na região entre  $\delta_H$  4,6-3,0 sugerem a presença de uma unidade osídica para Cd-12 (HARBORNE, 1994).

O espectro de RMN  $^{13}$ C-APT (125 MHz, MeOD), bem como suas expansões (Figura 79, pág. 143), mostraram a presença de 11 linhas espectrais. Destaque os sinais em  $\delta_{\rm C}$  116,10 e  $\delta_{\rm C}$  132,28, atribuídos aos carbonos C-2'/C- 5' e C-3'/C-6', respectivamente, caracterizando o sistema AA'BB' do anel B. Além dos sinais em  $\delta_{\rm C}$  99,57 e  $\delta_{\rm C}$  94,79, atribuídos aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, corroborando com a presença de um anel A 5,7 dissubstituído para Cd-12. 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  $\delta_c$  104,12, atribuído ao carbono anomérico da unidade osídica e os sinais em  $\delta_c$  78,43,  $\delta_c$  78,08,  $\delta_c$  75,75,  $\delta_c$  71,40 e  $\delta_c$  62,67, sugerem a presença de uma unidade osídica do tipo - O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

O espectro de correlação heteronuclear (<sup>1</sup>H X <sup>13</sup>C-HMQC) (Figuras 80-82, pág. 143 e 144) mostraram correlações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos, confirmando a presença de um flavonoide glicosilado para Cd-12.

O espectro de correlações heteronuclear ( $^{1}$ H X  $^{13}$ C-HMBC) (Figura 83-84, pág. 145) e suas expansões (Figuras 62 e 63, p.), mostraram correlações dos hidrogênios em  $\delta_{H}$  8,05 (H-2'/H-6') com os carbonos C-2'/C-6' em  $\delta_{c}$  132, 29, com o C-2 em  $\delta_{c}$  158,92 e com C-4' em  $\delta_{c}$  161, 49, confirmando os deslocamentos destes carbonos. Observaram-se outras correlações do hidrogênio em  $\delta_{H}$  6,20 (H-6) com o carbono C-10 ( $\delta_{c}$  105,64), e outra correlação do hidrogênio  $\delta_{H}$  6,40 (H-8) com o carbono C-7 ( $\delta_{c}$  158,47).

O espectro de correlações homonuclear ( $^1$ H X  $^1$ H-COSY) (Figura 85-86, pág. 146), mostrou, melhor visualizado em sua expansão, correlações entre os hidrogênios em  $\delta_H$  8,05 (H-2'/H-6') com os hidrogênios em  $\delta_H$  6,88 (H-3'/H-5') e do hidrogênio em  $\delta_H$  6,40 (H-8) com o hidrogênio em  $\delta_H$  6,20 (H-6), confirmando as atribuições destes hidrogênios.

Assim, o composto codificado como Cd-12, após análise dos dados e comparação com a literatura (Tabela 13, pág. 140) foi identificado como o Canferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo, isolado pela primeira vez na espécie em questão.

Canferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo

**Tabela 13**. Dados de RMN de  $^{1}$ H (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 (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) da literatura (Mo-12) (SANTOS *et al.*, 2005).

	Сd-12 Мо-12			
	<b>x</b>		Mo-12	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	
С				
2	158,9*	-	156,4	
3	132,2	-	133,4	
4	177,5**	-	177,5	
5	161,1**	-	161,1	
7	164,2**	-	164,2	
9	156,9	-	156,4	
10	105,0*	-	104,0	
1'	122,7*	-	120,9	
4'	161,4*	-	159,9	
СН	·		·	
6	99,5	6,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2 Hz, 1H)	98,8	
8	94,3	6,40 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2 Hz, 1H)	93,8	
2'	115,7	8,05 ( <i>dd</i> , J=2,5 e <i>J</i> =7,0 Hz, 2H)	115,1	
3'	132,2	6,88 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2,5 e <i>J</i> =7,0 Hz, 2H)	131.0	
5'	115,7	•	115,1	
6'	132,2	8,05 ( <i>dd</i> , J=2,5 e <i>J</i> =7,0 Hz, 2H)	131.0	
1"	104,1	5,24 ( <i>d</i> , <i>J</i> =7,5 Hz, 1H)	104,0	
2"	75,7	-	76,0	
3"	78,4	-	78,9	
4"	71,4	-	71,4	
5"	78,0	-	78,5	
CH <sub>2</sub>	•		,	
6"	62,6	-	62,5	

<sup>\*</sup>Valores observados através dos espectros de RMN 2D.

<sup>\*\*</sup>Valores dados pela literatura.

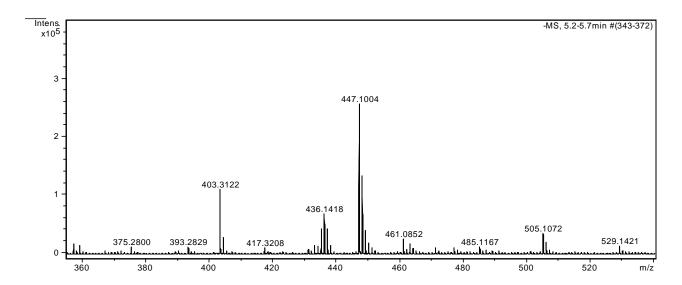


Figura 77. Espectro de Massas de Cd-12 [M-H] – (EM-ESI, modo negativo)

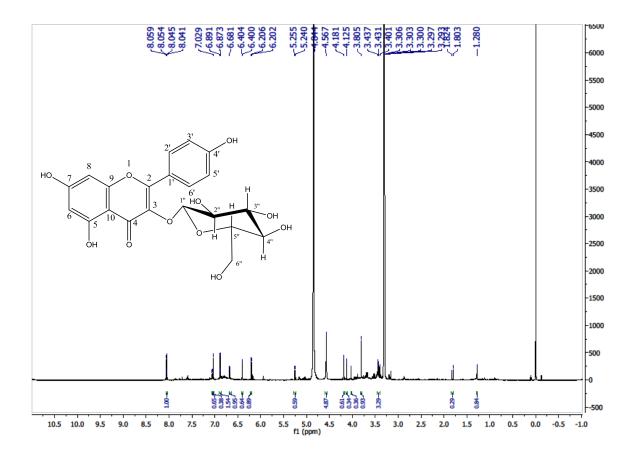


Figura 78. Espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD

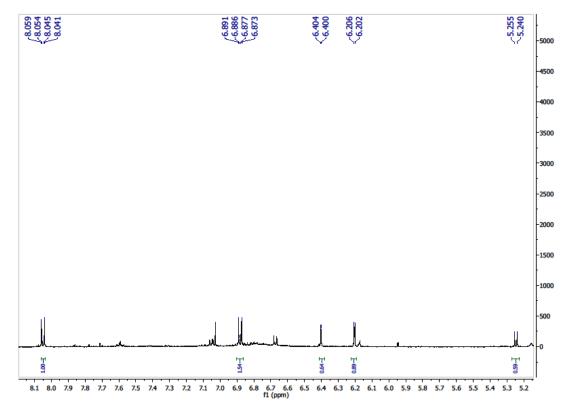


Figura 79. Expansão do espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD

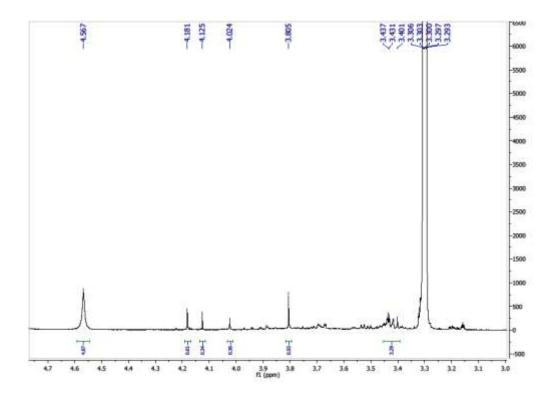


Figura 80. Expansão do espectro de <sup>1</sup>H (500 MHz) de Cd-12 em MeOD

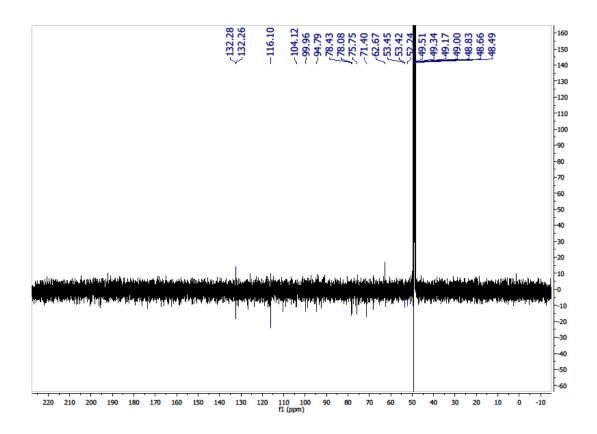


Figura 81. Espectro de <sup>13</sup>C (125 MHz) de Cd-12 em MeOD

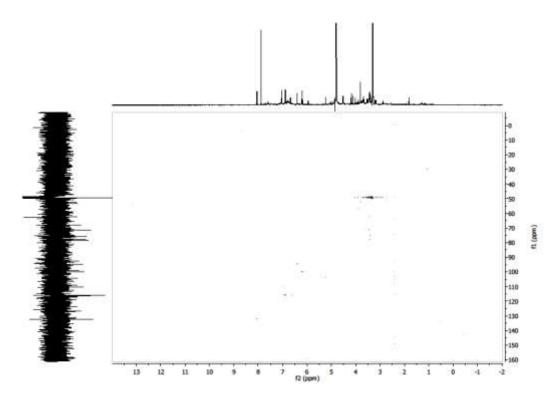


Figura 82. Espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD

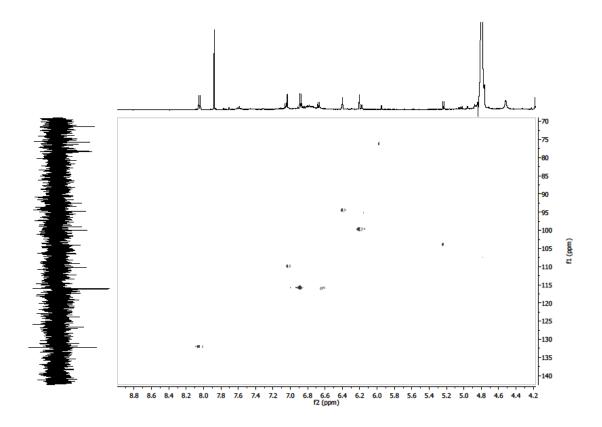


Figura 83. Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD

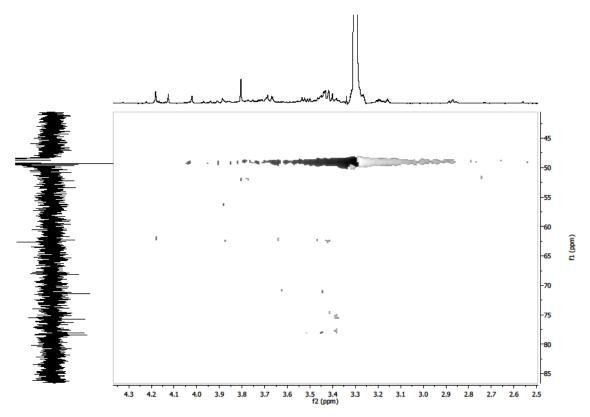


Figura 84. Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD

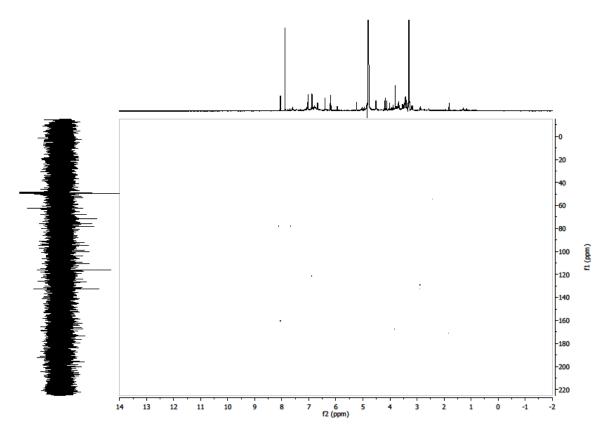


Figura 85. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD

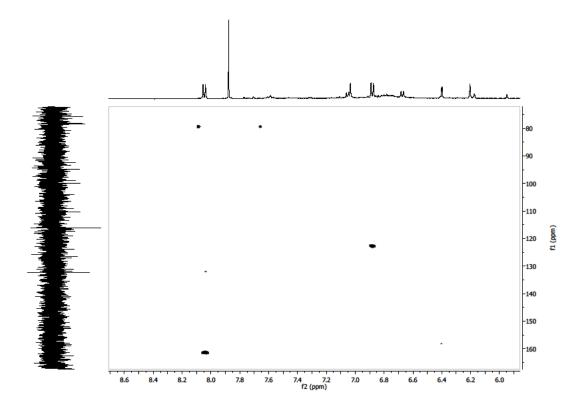


Figura 86. Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz) de Cd-12 em MeOD

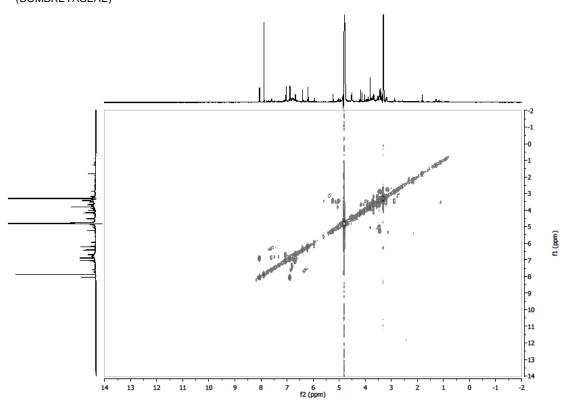


Figura 87. Espectro de COSY (500 MHz) de Cd-12 em MeOD

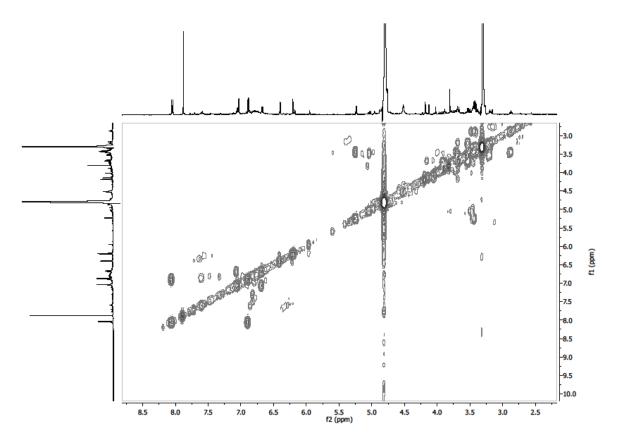


Figura 88. Expansão do espectro de COSY (500 MHz) de Cd-12 em MeOD

# 5.13 Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess.

A hidrodestilação forneceu um óleo com cor e odor característicos de rendimento médio de 0,15%. A composição química do óleo essencial das folhas de *Combretum duarteanum* é apresentada no cromatograma (Figura 87, pág.147), bem como, na Tabela 14, pág. 148. Vinte e oito compostos foram identificados (88,86%) e sete não identificados (11,14%), totalizando 100% de sua caracterização. Os componentes majoritários foram espatulenol (15,14%), β-cariofileno (14,12%), óxido de cariofileno (12,52%) e β-bouboneno (6,87%).

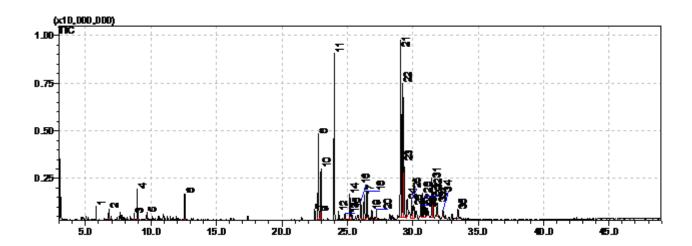


Figura 89. Cromatograma do óleo essencial das folhas de Combretum duarteanum.

**Tabela 14.** Constituintes Químicos do óleo essencial das folhas de *Combretum duarteanum*.

Pico	TR (min)	Composto	(%)	IRR	IRR
	<b>-</b>		GC-MS	exp.*	lit.**
1	5.804	n-nonano	0.77	900	
2	6.780	Não identificado	0.62	931	004
3	8.719	mesitileno	0.43	992	994
4	8.963	n-decano	1.89	1000	-
5	9.723	alcano	0.42	1021	-
6	12.582	n-undecano	2.09	1100	1071
7	22.513	α-copaeno	0.86	1374	1374
8	22.788	β-bouboneno	6.87	1381	1387
9	22.892	co-eluição com o β- boubon	0.74		
10	22.987	β-elemeno	4.22	1387	1389
11	24.005	β-cariofileno	14.12	1418	1419
12	24.343	β-copaeno	0.67	1428	1430
13	24.824	aromadendreno	0.45	1443	1439
14	25.193	lpha-humuleno	2.25	1454	1442
15	25.332	allo-aromadendreno	0.91	1458	1458
16	26.029	germacreno-D	1.44	1479	1484
17	26.292	viridifloreno	2.41	1487	1496
18	26.510	biciclogermacreno	2.31	1494	1500
19	26.885	germacreno A	0.69	1506	1508
20	27.223	$\delta$ -cadineno	0.79	1517	1522
21	29.077	espatulenol	15.14	1576	1577
22	29.248	oxido de cariofileno	12.52	1581	1582
23	29.318	co-eluição com o pico 22	5.51	1584	-
24	29.576	salvial-4(14)-em-1-ona	2.24	1592	1492
25	29.925	Não identificado	1.79	1603	-
26	30.092	epóxido humuleno -II	1.99	1609	1608
27	30.626	Não identificado	0.90	1627	-
28	30.767	allo-epoxido aromadendreno	2.47	1632	1639
29	30.914	Não identificado	2.07	1636	
30	31.103	Não identificado	1.01	1637	
31	31.460	Não identificado	3.42	1643	-
32	31.544	intermedeol	2.58	1658	1665
33	31.878	14-hidroxi-9-epi-E- cariofileno	1.58	1669	1668
34	32.305	eudesma-4(15),7-dien- 1β-ol	0.50	1683	1687
35	33.455	Não identificado	1.33	1724	-

### 5.14 Resultados Farmacológicos

#### 5.14.1 Estudo Antimicrobiano

O estudo realizado no Laboratório de Micologia – UFPB, sob a orientação de Prof<sup>a</sup>. Edeltrudes Lima, resultou no ensaio antimicrobiano *in vitro* dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico, bem como, as substâncias **Cd-2** (ácido corosólico), **Cd-5** (ácido asiático e ácido arjunólico) e **Cd-10** (hiperina) de *Combretum duarteanum*. Entretanto, não mostraram atividade contra as cepas de bactérias gram positivas e gram negativas testadas: *S. epidermides* – ATCC-12228, *S. aureus* – ATCC-13150, *S. aureus* – ATCC-25923, *P. aeruginosa* – ATCC-25853, *E. coli* –ATCC-11105 e *E. coli* –ATCC-25922; e também contra as cepas fúngicas: *C. albicans* – LM 111, *C. albicans* – LM 109, *C. tropicalis* – LM 6, *C. tropicalis* – ATCC 13803, *C. Krusei* – LM 08 e *C. Krusei* – LM 13.

Demostrando que os extratos de *Combretum duarteanum*, bem como os triterpenos pentacíclicos, ácido corosólico, ácido asiático e ácido arjunólico, e o flavonoide glicosilado, hiperina, não possuem atividade antimicrobiana. Portanto, a atividade antimicrobiana já relatada na literatura para o extrato etanólico bruto (NASCIMENTO *et al.*,1990) pode ser associada ao complexo e ao sinergismo de todas substâncias contidas no extrato bruto.

Estudo com o ácido corosólico (Cd-2) e o ácido asiático (Cd-5a) demonstraram que eles potencializam a atividade dos antimicrobianos (GARO *et al.*, 2007). Portanto, outros ensaios mais específicos podem ser realizados com estas substâncias.

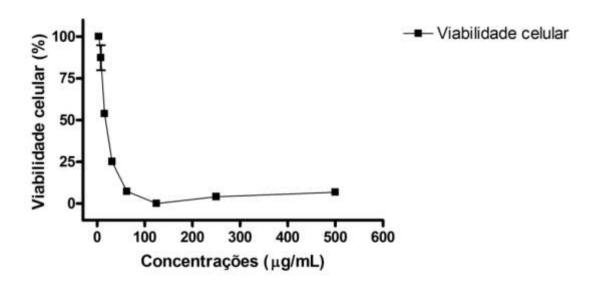
#### 5.14.2 Estudo Antitumoral

## 5.14.2.1 Citotoxicidade frente células de Carcinoma ascítico de Ehrlich

O estudo antitumoral foi realizado no LABETOX UFPB sob a coordenação de Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Vieira Sobral Castelo Branco. Células da linhagem carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratadas com concentrações crescentes das substâncias **Cd-2** (ácido corosólico),**Cd-5** (ácido asiático e ácido arjunólico), **Cd-9** (jaceosidina) e

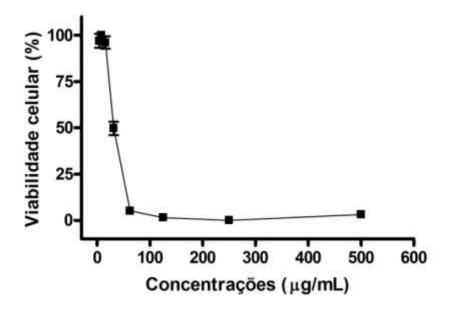
**Cd-10** (hiperina) por 24 h, e a viabilidade celular foi analisada através do ensaio de redução do MTT.

Os resultados mostram que o composto **Cd-2** reduziu a porcentagem de viabilidade celular de maneira concentração dependente, apresentando um valor de Cl<sub>50</sub> de 17,82 (16,96 – 18,73) µg/mL (Figura 90, pág. 153).



**Figura 90.** Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com o composto **Cd-2** (μg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados do composto **Cd-5** também demonstraram reduzir a porcentagem de viabilidade celular de maneira concentração dependente, apresentando um valor de  $\text{Cl}_{50}$  de 31,23 (30,76 – 31,71)  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 90, pág. 154).



**Figura 91.** Viabilidade de células de carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com o composto **Cd-5** (μg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média de três experimentos com quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.

Os compostos Cd-9 e Cd-10 apresentaram IC<sub>50</sub> superior a 1000 µg/mL. Verificou-se, então, através do ensaio de MTT que os compostos **Cd-2** e **Cd-5** reduziram o crescimento de células de carcinoma ascítico de Ehrlich, de forma dependente de concentração, o que caracteriza uma forte atividade citotóxica para sustâncias isoladas, no entanto, o composto **Cd-2** mostrou ser mais potente que o composto **Cd-5**.

O Ácido corosólico (Cd-2) demonstrou em estudos anteriores algumas atividades farmacológicas, sendo utilizado como anti-inflamatório (ALI *et al.*, 2007), uma potente atividade hipoglicemiante (WEN *et al.*, 2007), além de atividade citotóxica frente a PKC de células leucêmicas 562 K (KYUNG-SEOP *et al.*, 1998). Os ácido asiático e arjunólico (Cd-5) também exibiram atividade hipoglicemiante (HOU *et al.*, 2009).

O flavonoide jaceosidina (Cd-9) já foi relatado como antiinflamatório (COUTINHO et al., 2009), além da ação vasorrelaxante em aortas de ratos

(GUERRERO et al., 2002). A hiperina (Cd-10) possui relato de inibição do óxido nítrico (NO), participando como anti-inflamatória (LEE et al., 2008).

Apesar dos resultados obtidos com as substâncias Cd-2 e Cd-5, novos ensaios com uma droga padrão, como a doxorrubicina, utilizando a mesma linhagem e método experimental, devem ser realizados para avaliar a possibilidade de desenvolvimento de resistência das células em estudo.

Conclusões

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho relata pela primeira vez o estudo fitoquímico da espécie Combretum duarteanum, revelando-a como bioprodutora de diversos metabólitos, tais como terpenoides, esteroides e flavonoides, ressaltando a importância deste estudo para o gênero Combretum;

O estudo das folhas de *C. duarteanum* possibilitou o isolamento e identificação de doze constituintes químicos, presentes nas fases Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e no extrato Metanólico, sendo eles:

- ✓ Cinco triterpenos: dois são triterpenos do tipo cicloartano, o cicloartan-24en-1α,3β-diol e o 4α-carboxi-3β-hidroxi-24-cicloarteno; dois triterpenos pentacíclicos da série ursano; e uma mistura de triterpenos da série ursano e oleanano;
- ✓ Dois esteroides, o espinasterol e o estigmasterol
- ✓ Um derivado do ácido gálico: o galato de metila
- ✓ Quatro flavonoides, destes dois glicosilados, um flavonol e uma flavona.

A composição química do óleo essencial das folhas de *Combretum duarteanum*, mostrou a presença de vinte e oito compostos identificados (88,86%) e sete não identificados (11,14%), totalizando 100% de sua caracterização. Os componentes majoritários foram espatulenol (15,14%),  $\beta$ -cariofileno (14,12%), óxido de cariofileno (12,52%) e  $\beta$ -bouboneno (6,87%).

O screening microbiológico dos extratos e substâncias de *Combretum* duarteanum não revelou atividade contra as cepas de bactérias gram positivas e gram negativas e também contra as cepas dos fungos analisados.

O estudo antitumoral utilizando células da linhagem carcinoma ascítico de Ehrlich, demostraram que os compostos triterpênicos, ácido corosólico, ácido asiático e ácido arjunólico, reduziram o crescimento de células do carcinoma, de forma dependente de concentração, o que caracteriza uma forte atividade citotóxica para compostos isolados. Já os flavonoides apresentaram uma IC<sub>50</sub> maior que 1000 µm/mL.

Portanto, este é um trabalho de grande importância por contribuir com um gênero etnofarmacologicamente utilizado, descrevendo os constituintes químicos, bem como, atividades farmacológicas de *Combretum duarteanum*.

Referências

# **REFERÊNCIAS**

ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; XIONG, Q. B.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. Quadranosides I-V, new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. **Journal of Natural Products.** v. 63 (4) p. 496-500, 2000 a.

ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; AWALE, S; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. Quadranosides VI-XI, six new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** v. 48 (8) p. 2000 b.

ADNYANA, I. K; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. O.; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. **Journal of Natural Products.** v. 64, p. 360–363, 2001.

AGRA, M.F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa. Editora União, 1996.

AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; STEVENS, W. D. Levantamento Florístico Preliminar do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil. Pp. 123-138. In: Porto, K. C.; Cabral, J. J. P.; Tabarelli, M. (Org.), **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: História Natural, Ecologia e Conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente (Série Biodiversidade, 9). 2004.

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 111, p. 383-395, 2007.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Studies in Organic Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 1989.

AHMAD, I.; AQUI, F.; OWAIS, M. **Modern Phytomedicine**: Turning Medicinal Plants into Drugs. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 109-113, 2006.

AHMAD, V. U.; RAHMAN, A. U. Handbook of Natural Products Data. **Pentacyclic Triterpenoids**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1994.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.;

LINS- NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semiarid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p. 325-354, 2007.

ALEXANDRA, D. M.; BHANA, N.; BHIKA, K. H.; ROGERS, C. B. Antimicrobial testing of selected plant extracts from *Combretum* species. **South African Journal of Science.** n. 88, p. 342–344. 1992.

ALI, H.; KONIG, G. M.; KHALID, S. A.; WRIGHT, A. D.; KAMINSKY, R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.83, p. 219–28, 2002.

ALI, M. S.; IBRAHIM, S. A.; JALIL S.; CHOUDHARY, M. I. Ursolic acid: A potent inhibitor of superoxides produced in the cellular system. **Phytotherapy Research.** v. 21, p.558–561, 2007.

ALLEGRINI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Émulsions d'huiles esentielles fabrication et applications en microbiologie. **Societé de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, p. 86, 1973.

ALVES, A. J. Atividade biológica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre espécies de *Mycobacterium*. Tese de doutorado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2006.

AMRESH, G.; REDDY, G. D.; RAO, C. V.; SINGH, P. N. Evaluation of antiinflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p 526-531, 2007.

ANCOLIO, C.; AZAS, N.; MAHIOU, V.; OLLIVER, E.; GIORGIO, C.; KEITA, A. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. **Phytotherapy Research.** v.19, p. 646–649, 2002.

ANDRADE-LIMA; ROCHA, G.N. Observações preliminares sobre a Mata do Buraquinho, João Pessoa. Paraíba. **Anais Instituto de Ciências Biológicas.** v. 1, p. 47-61, 1971.

APG II. An update of the Angiosperms phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society.** v. 141, p. 399-436. 2003.

ASAMI, Y.; OGURA, T.; OTAKE, N.; NISHIMURA, T.; YAO, X. S.; SAKURAI, T.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S.; TATSUTA, K. Isolation and synthesis of a new bioactive ellagic acid derivative from *Combretum yunnanensis*. **Journal of Natural Products.** v. 66 (5) p. 729-731, 2003.

ASRES, K.; BUCAR, F.; KNAUDER, E.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H.; CROFT, S. L. In vitro antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combetum molle*. **Phytotherapy Research.** v. 15, p. 613–7, 2001.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, F. K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 66 (3), p. 335-338, 1999.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S.; Methyl quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** v.48 (4) p. 496-504, 2000.

BARBERÁ, O.; MARCO, J. A.; SANZ, J. F.; SÁNCHEZ-PARAREDA J. 3-Methoxyflavones and coumarins from *Artemisia incanescens*. **Phytochemistry**. v. 25, p. 2357-2360, 1986.

BARBOSA FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora Paraibana. **Caderno de Farmácia,** v.13, p. 85-102, 1997.

BARBOSA, M. R. V.; AGRA, M. F.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CUNHA, J. P.; ANDRADE, L. A. Diversidade Florística na Mata do Pau-Ferro. Pp. 111-122. In: PORTO, K. C.; CABRAL, J. J. P.; TABARELLI, M. (Ufrgs.), **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: História Natural, Ecologia e Conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente (Série Biodiversidade, 9). 2004.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**. V. 32, N. 3, p.679-688, 2009.

BASENE, E.; LAURANCE, A.; OLSCHWANG, D.; POUSSET, J. L. African medicinal plants. XIX. Determination of vitexin by High Performance Liquid Chromatography in a crude extract of *Combretum micranthum* dc. **Journal of Chromatography.** v. 346 pp. 428-430. 1985.

BENSSONG, P. O.; ANDRE OLA, M. L.; ROJAS, L.B.; POUYSE GU, L.; IGUMBOR, E. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties

against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrate. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 99, p. 83–91, 2005.

BENTHAM, G.; HOOKER, J. D. **Genera plantarum**, vol 1. Reeve, London, pp 683–690, 1867.

BENTLEY, G. A.; NEWTON, S. H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **British Journal of Pharmacology**. v. 73, p. 325-333, 1981.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2ª ed. Fortaleza: Imprensa Oficial. 1960.

BRANDIS, D. Combretaceae. In: A. Engler; K.A.E. Prantl (Eds.). **Nat**ürlichen **Pflanzenfamilien**, vol 3. Engelmann, Leipzig, p 115, 1898.

BROOKES, K. B.; DOUDOUKINA, O. V.; KATSOULIS, L. C.; VEALE, D. J. H.; Uteroactive constituents from *Combretum kraussii*. **South African Journal of Science.** v. 52 (4) p. 127-132, 1999.

BRUINS, A. P.; COVEY, T. R.; HENION, J. T. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass-spectrometry. **Analytical Chemistry**. v. 59, p. 262, 1987.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Argos – Editora Universitária, Santa Catarina, 2001.

CARPANO, S. M.; SPEGAZZINI, E. D.; ROSSI, J. S.; CASTRO, M. T.; DEBENEDETTI, S. L.; Antifungal activity of *Terminalia australis*. **Fitoterapia**.v. 74, p. 294, 2003.

CASTLEDEN, I. R.; HALL, S. R.; NIMGIRAWATH, S.; THADANITI, S.; WHITE, A. H. The flavonoids of *Combretum quadrangulare*: crystal structures of the polymorphic forms of 5-hydroxy-2-(4'-hydroxy- 3',5'-dimethoxyphenyl)-3,7-dimethoxy-4h-1-benzopyran-4-one. **Australian Journal of Chemistry.** v. 38 (8) p. 1177-1185, 1985.

CECHINEL-FILHO, V.; Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais correlação estrutura quimica-atividade farmacologica. Tese de Doutorado em Química, UFSC, Florianópolis, SC, 1995.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p. 99-105, 1998.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. In. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Argos – Editora Universitária, Santa Catarina, p.47, 2001.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. Venezenin: a new bioactive annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. **Journal of Natural Products**. v. 58, p. 532-539, 1995.

CONTI, E.; LITT, A.; SYTSMA, K. J. Circumscription of Myrtales and their relationships to other rosids: evidence from *rbcL* sequence data. **American Journal of Botany.** v. 83, p. 221–233, 1996.

CONTI, E.; LITT, A.; WILSON, P.G.; GRAHAM, S.A.; BRIGGS, B.G.; JOHNSON, L.A.S.; SYTSMA, K.J. Interfamilial Relationships in Myrtales: Molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. **Systematic Botany.** v. 22 (4), p. 629-647, 1997.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, vol. I-VI, 1984.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v.1 (3), p. 241-256, Rio Janeiro, 2009.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**, 2<sup>a</sup> ed. New York Botanical Garden, New York, 1988.

DAFFE, M. Comparative study of *Combretum micranthum* (g.don) and *Combretum glutinosum* (perr.). **African medicinal plants**. p.7-14, 1980.

DALHGREN, R. M. T.; THORNE, R. F. The order Myrtales: circumscription, variation and relationship. **Annals of the Missouri Botanical Garden.** v. 71, p. 633-699. 1984.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunological Methods**. v. 89, p. 271-277, 1986.

DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS (DNP) on CD-ROM, Version 9:2, 2001. Chapman & Hall/ CRC, Boca Raton, Florida, USA.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**. v. 21, p. 341-343, 1988.

DUCREY, B.; WOLFENDER, J. L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Analysis of flavonol glycosides of 13 epilobium species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. **Phytochemistry**. v. 38, p. 129, 1995.

EICHLER, A.G. Combretaceae. In: C.F.P Martius; A.W. Eichler & I. Urban (eds.). Flora Brasiliensis. v. 14 (2), p. 77-128. 1867.

ENGLER, A.; DIELS, L. Monographieen Afrikanischer Pflanzenfamilien und Gattungen 3: *Combretum*. Leipzig, Verland von Wilhelm Engelmann. 116p. 1899.

EXELL, A.W. The genera of Combretaceae. **Journal of Botany.** v. 69, p. 113-128. 1931.

EXELL, A.W. The *Combretum* species of the new world. **Botanical Journal of the Linnean Society.** v. 55 (356), p. 130-141. 1953.

EXELL, A. W.; STACE, C. A. Revision of the Combretaceae. **Boletim Sociedade Broteriana.** v. 40, p.5-25. 1966.

FACUNDO, V. A.; ANDRADAE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; FILHO, R. B.; HUFFORD, C. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**. v. 32 (2) pp. 411-415. 1993.

FACUNDO, V. A.; RIOS, K. A.; MOREIRA, L. S.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Two new cycloartanes from *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). **Revista Latinoamericana de Química.** v. 36 (3) p. 76-82, 2008.

FALCÃO, D.Q. Estudo químico e farmacológico de quatro espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

FAWCETT, W.; RENDLE, A. B. Notes on Jamaica plants: *Combretum.* **Journal of Botany.** v. 63, p.114-115, 1925.

FÉRREA, G., CANESSA, A., SAMPIETRO, F., CRUNIANI, M., ROMUSSI, G. & BASSETTI, D. In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. **Antiviral Research.** v. 21(4), p. 317-325, 1993.

FOTO. Frutos e flores de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz. Fonte: **Missouri Botanical Garden**. (Disponível em: <a href="http://www.tropicos.org/Name/8200197">http://www.tropicos.org/Name/8200197</a>>. Acesso em: Dezembro/2008).

FRANKE, R. **Theorical drug design method.** Elsevier, Berlin, 1984.

FREISE, F.W. The occurrence of caffeine in Brazilian medicinal plants. **Pharmazeutische zentralhalle fur Deutschland.** Brazil. v. 76, p. 704-706, 1935.

FYHRQUIST, P., MWASUMBI, L., HAEGGSTRÖM, C. A., VUORELA, H., HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzânia. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 79(2), p. 169-177, 2002.

FURLAN. M.; ROQUE, N. F.; WOLTER FILHO, W. Cycloartane derivatives from *Guarea trichilioides*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p. 1519-1522, 1993.

GANZERA, M; ELLMERER-MULLER, E. P; STUPPNER, H. Cycloartane triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Phytochemistry.** v. 49 (3), p. 835-838, 1998.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MIGUEL, D. L. S.; SEREA, A. A. T.; PRADO, F. C. **Journal of Brazilian Chemical Society.** v. 14, p. 461. 2003.

GARO, E.; ELDRIDGE, G. R.; GOERING, M. G.; PULCINI, E. D.; HAMILTON, M. A.; COSTERTON, J. W.; JAMES, G. A. asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.51, n.5, p. 1813–1817, 2007.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; BARBOSA, M. R. V.; BOCAGE NETA, A. L.; FIGUEIREDO, M. A. Espécies endêmicas da caatinga. pp. 103-118. In: E.V.S.B. Sampaio, A.M. Giulietti, J. Virgínio, C.F.L. Gamarra-Rojas (eds.). **Vegetação e Flora da Caatinga**. Associação Plantas do Nordeste/ Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, Recife. 2002.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. A. Fitoquímica Amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**. n. 34, p. 252, 1978.

GOUVEIA, M. G. S.; XAVIER, M. A.; BARRETO, A. S.; GELAIN, D.P.; SANTOS, J. P. A.; ARAÚJO, A. A. S.; SILVA, F. A.; QUINTANS, J. S.; AGRA, M. F.; CABRAL, A. G. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-inflammatory Properties of the Ethanolic Extract of *Combretum duarteanum* in Rodents. **Journal of Medicinal Food**. v.14 (11), p.1389–1396, 2011.

GRANICHER, F.; CHRISTEN, P.; VUAGNAT, P. Rapid high-perfomance liquid-chromatographic quantification of valeprotiates in hairy root cultures of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia* Mikan. **Phytochemical Analysis**. v. 5, p. 297, 1994.

GRIGGS, J; METCALFE, J. C.; HESKETH, R. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A- 4. **Lancet Oncology.** v. 2, p. 82–7. 2001.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Ed. FRGS/ Ed. UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, Cap. I, p. 14, 2003.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; SAN ROMÁN, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 54(10), p.1373-1378, 2002.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados.** v.24, p.70, 2010.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungical natural products: methodologies, comparability of results and assay choise. **Phytochemical Analysis**. v.11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. v. 30, p. 3864, 1991.

HARBORNE, J.B. The flavonoids. 1a ed. London: Champman & Hall, 676p., 1994.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K. PITCHER, G. M.; CODERRE, T. J. Physiological evidence that the interphase in the formalin test is due to active inhibition. **Pain**. v. 82, p. 57-63, 1999.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L. Application of LC/MS and LC/NMR in the search for new bioactive compounds from plants of the Americas . In. **Medicinal Plants of the Americas**. Hostettmann, K, Gupta, M. P., Marston, M. (Eds), Harwood, Amsterdam, 1998.

HOU, W.; LI, Y.; ZHANG, Q.; WEI, X.; PENG, A.; CHEN, L.; WEI, Y. Triterpene Acids Isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as α-glucosidase inhibitors. **Phytotherapy Research**. v.23, p. 614–618, 2009.

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, p. 103-114, 1987.

HUTCHING, A., SCOTT, A. M., LEWIS, G., CUMNGHAM, A. M. **Zulu Medicinal Plants.** An Inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburg, South Africa. 1996.

IKEDA, Y.; UENO, A.; H NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**. v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JOSSANG, A; POUSSET, J. L.; BODO, B. Combreglutinin, a hydrolyzable tannin from *Combretum glutinosum*. **Journal of Natural Products.** v. 57 (6), p. 732-737. 1994.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**. v. 63, p. 81–8, 2003.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. **Fitoterapia.** v. 73, p. 737, 2002.

KONEMAN E. W.; ALLEN, S. D.; DOWEL-JÚNIOR, V. R.; SAMERS, H. M.; **Diagnóstico Microbiológico**. Texto Atlas. Editora Médica Panamericana. 2ª ed. p. 452-485, 1993.

KOSTER R.; ANDERSON M.; DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** v. 18, p. 412, 1959.

KYUNG-SEOP, A.; MOON, S. H.; EUN, J. P.; HYEONG-KYU, L.; IK-HWAN, K. Corosolic acid isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida* var. psilosa is a protein kinase C ilnhibitor as well as a cytotoxic agent. **Planta Medica.** v. 64(5): p.468-470, 1998.

LAPA, A. J; SOUCCAR, C; LANDMAN-LIMA, M. T. R; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Porto Alegre: Gráfica Metrópole. **Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 119, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews.** v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, S.; PARK, H. S.; NOTSU, Y.; BAN, H. S.; KIM, Y. P.; ISHIHARA, K.; HIRASAWA, N.; JUNG, S. H.; LEE, Y. S.; LIM, S. S.; PARK, E. H.; SHIN, K. H.; SEYAMA, T.; HONG, J.; OHUCHI, K. Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. *Phytotherapy* **Research**. v.22(11), p.1552-1556, 2008.

LI, L. M.; PU, J. X.; XIAO, W. L.; SUN, H. D. Triterpenes from *Isodon xerophilus*. Chinese Journal of Natural Medicines. v.10, n.4, p.307-310, 2012.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; FALCÃO, H. S.; DE JESUS, N. Z. T.; CABRAL, A. G. S.; GOMES, I. F.; AGRA, M. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Gastroprotective activity of the ethanolic extract and hexane phase of *Combretum duarteanum* Cambess. (Combretaceae). **Journal of Nature Medicinal.** v.67(3), p. 492-502, 2013.

LIMA, G. R. M.; SALES, I. R. P.; FILHO, M. R. D. C.; DE JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CABRAL, A. G. S.; SOUTO, A. L.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. **Molecules**. V. 17, p. 9142-9206, 2012.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; SIDELMANN, U. G.; WILSON, I. D. Directly coupled HPLC-NMR and its application to drug metabolism. **Drug Metabolical Review**. v. 29, p. 705, 1997.

- LIRA, S. R. D.; ALMEIDA, R. N., ALMEIDA, F. R. C., OLIVEIRA, F. S, DUARTE, J. C. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *C. leprosum*. **Pharmaceutical Biology.** v. 40, p. 213–5. 2002.
- LÔBO, L. T., CASTRO, K. C. F., ARRUDA, M. S. P., SILVA, M. N., ARRUDA, A.C., MULLER, A. H., ARRUDA, G. M. S., SANTOS, A. S. Potencial alelopatico de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosea). **Quimica Nova**, v.31, n. 3, p. 493-497, 2008.
- LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. Estudos taxonômicos do gênero *Combretum* Loefl. (Combretaceae R. Br.) em Pernambuco Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.** 34(2), p. 173-190, 1996.
- LOIOLA, M. I. B. Combretaceae. Pp. 58. In: Sales, M.F.; Mayo, S.J. & Rodal, M.J.N. (Eds.), **Plantas Vasculares das Florestas Serranas de Pernambuco:** um checlist da Flora Ameaçada dos Brejos de Altitude, Pernambuco, Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1998.
- LOIOLA, M. I. B.; ROCHA, E. A.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. **Flora da Paraíba, Brasil:** Combretaceae. R. Br. In: 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo-SP. Resumos 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007.
- LOPES, W. B; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico.** Uberlândia. v. 1, n. 1, 2002. Disponível em: <a href="http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/">http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/</a>>. Acesso em: 25 ago. 2006.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA -JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, **Química Nova.** v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N.  $\alpha$  -(-)-Peltatin, an antiviral constituent of *Amanoa aff. oblongifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, p. 223-6, 1988.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, 37(6): 1517-1575, 1994.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p. 538-544, 1998.

MAPA de distribuição do genêro *Combretum* no mundo. In: **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <a href="http://mobot1.mobot.org/website/map">http://mobot1.mobot.org/website/map</a> post.asp. Acesso em: dezembro de 2008.

MARQUETE, N. F. S.; TEIXEIRA, J.; VALENTE, M. C. *Terminalia* (Combretaceae) na região sudeste do Brasil. **Bradea.** v. 9 (16), p. 99-123. 2003.

MARQUETE, N. F. S.; VALENTE, N. M. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia.** v. 56 (86), p. 131-140. 2006.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF, J. N. Biological activity of antibacterial flavonoides from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology.** v. 93, p. 207–212, 2004.

MASOKO, P. PICARD, J. ELOFF, J. N. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum species* (Combretaceae). **South African Journal of Botany**. v. 73, p. 173–183, 2007.

MAU, J. L.; KO, P. T.; CHYAU, C. C. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Research International.** v. 36, p. 97-104, 2003.

MCGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, A. K.; ELOFF, J. N.; STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 75, p. 45 –50, 2001.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C-J.; SMITH, D. L.; In **Studies in Natural Products Chemistry.** Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, v. 9, p. 383-409, 1991.

MCLAUGHLIN, J. L., CHANG, C-J.; SMITH, D. L.; In **Human Medicinal Agents from Plants.** Kinghorn, A. D. & BALANDRIN, M. F., eds., Symposium Series N°. 534, American Chemical Society, Washington, D.C. p. 112-137, 1993.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from

Cissampelos sympodialis Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 143–151, 2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. v. 45, p. 31-34, 1982.

**MEYRE-SILVA,** Análise fitoquímica e farmacológica de plantas. Medicinais selecionadas da: flora catarinense: **Aleurites moluccana, Bauhinia microstachya E Marrubium vugare.** [Tese de Doutorado em Química Orgânica-Universidade Federal de Santa Catarina], Florianópolis, 2003.

MILITO, J. S. L. T.; ANDRADA, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ FILHO, R. Chemical study of *Thilosa glaucocarpa* and *Combretum sp.* **Química Nova**. v.16 (1), p. 35-39, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**. v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

NABHA, S. M.; WALL, N. R.; MOHAMMED, R. M.; PETTIT, G. R.; AL-KATID, A. M. Effects of Combretastatin A-4 prodrug against a panel of malignant human Blymphoid Cell Lines. **Anticancer Drugs**. v. 11, p. 385–92, 2000.

NAM, N. H. Combrestatin A-4 analogues as antimitotic antitumor agents. **Current Medicinal Chemistry.** v. 10, p.1697–1722, 2003.

NASCIMENTO, S.C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**. v. 61, n. 3, p. 353-355, 1990.

OLAJIDE, A. O; MAKINDE, J. M; OKPAKO, D. T. Evaluation of the anti-inflammatory property of the extract of *Combretum micrantum* G Don (Combretaceae). **Inflammopharmacology**. v. 11, p. 293–298, 2003.

OLIVER-BEVER, B. **Medicinal Plants in Tropical West Africa.** Cambridge University Press, Cambridge. 1986.

OLIVEIRA, F. S.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive. Effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 31 (4), p. 588-591, 2008.

OSBORNE, R.; PEGEL, K. H.; Jessic acid and related acid triterpenoids from *Cmbretum elaeagnoides*. **Phytochemistry**. v. 23 (3), p. 635-637,1984.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistence *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 46, p.2720-2722, 2002.

PANZINI, I; PELIZZONI, F; VEROTTA, L; ROGERS, C. B. Constituents of the fruit of South African *Combretum* species. **South African Journal of Science.** v. 89 (7), p. 324-328, 1993.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia.** Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PEGEL, K. H.; ROGERS, C. B. The characterisation of mollic acid 3-beta-d-xyloside and its genuine aglycone mollic acid, two novel 1-alphahydroxycycloartenoids from *Combretum molle*. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I.** v. 8, p. 1711-1715, 1985.

PELIZZONI, F.; VEROTTA, L.; ROGERS, C. B.; COLOMBO, R.; PEDROTTI, B.; BALCONI, G.; ERBA, E.; D'INCALCI, M. Cell growth inhibitor constituents from *Combretum kraussii*. **Natural Products Letter.** v. 1 (4), p. 273-280, 1993.

PELIZZONI, F.; COLOMBO, R.; D'INCALCI, M.; VEROTTA, L. Combretastatin derivatives with antitumor activity, and process for the preparation thereof. **Patent-Pct Int Appl-94.** v. 05, 682, p. 28, 1994.

- PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; NIVEN, M. L.; HAMEL, E.; SCHMIDT, J. M. Isolation, structure, and synthesis of Combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products.** v. 50 (1), p. 119-131, 1987 (a).
- PETTIT, G. R.; CRAGG, G. M.; SINGH, S. B. Antineoplastic Agents, 122. Constituents of *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products.** v. 50 (3), p. 386-391, 1987 (b).
- PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; NIVEN, M. L.; SCHMIDT, J. M. Cell growth inhibitory dihydrophenanthrene and phenanthrene constituents of the African tree *Combretum caffrum*. **Canadian Journal of Chemistry.** v. 66 (3), p. 406-413, 1988.
- PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; BOYD, M. R.; HAMEL, E.; PETTIT, R. K.; SCHMIDT, J. M.; HOGAN, F. Journal of Medicinal Chemistry. v. 38, p. 1666-1672, 1995.
- PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas Medicinais: Cura Saudável? **Química Nova**. V. 28, Nº. 3, p. 519-528, 2005.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Brasília, p. 82-84, 1994.
- RAO, B. K.; SUDARSHAN, P. R.; RAJASEKHAR, M. D.; NAGARAJU, N.; RAO, C. A. Antidiabetic activity of *Terminalia pallida* fruit in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 85, p.169; 2003.
- RIPARDO FILHO, H.S.; PACHECO, L. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S. Bioensaios de atividade alelopática dos esteroides espinasterol, espinasterona e glicopiranosil espinasterol. **Planta Daninha.** v.30, n.4, p.705-712, 2012.
- RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involviment of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal* of *Pharmacology*, v. 387, p. 111-118, 2000.
- RODRIGUES, M. V. N.; REYES, F. G. R.; REHDER, V. L. G.; RATH, S. Na SPMEGC- MS method for determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plant infusions. **Chromatographia**. v. 61, p. 291-297, 2005.

- ROGERS, C. B.; SUBRAMONY, G.; The structure of imberbic acid, a 1-alphahydroxy pentacyclic triterpenoid from *Combretum imberbe*. **Phytochemistry.** v. 27 (2), p. 531-533, 1988.
- ROGERS, C. B.; COOMBES, P. H.; Acidic triterpene glycosides in trichome secretions differentiate subspecies of *Combretum collinum* in South Africa. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 27 (3), p. 321-323, 1999. ROGERS, C.B.; Isolation of the 1-alpha-hydroxycycloartenoid mollic acid alpha-larabinoside from *Combretum edwardsii* leaves. **Phytochemistry.** v. 28 (1), p. 279-281, 1989.
- ROGERS, C. B.; COOMBES, P. H.; Mollic acid and its glycosides in the trichome secretions of *Combretum petrophilum*. . **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 29 (3), p. 329-330, 2001.
- ROGERS, C. B.; Cycloartenoid dienone acids and lactones from *Combretum erythrophyllum*. **Phytochemistry.** v. 49 (7), p. 2069-2076, 1998.
- ROSLAND JH, HUNSKAAR S, HOLE K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacology Toxicology** v.66, p.382-386, 1990.
- SAHPAZ, S; BORIES, C; LOISEAU, P M; CORTES, D; HOCQUEMILLER, R; LAURENS, A; CAVE, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**. v. 60, p. 538-40, 1994.
- SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER. R. M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15(4), p.321-325, 2005.
- SCHWIKKARD, S.; XHOU, B. N.; GLASS, T. E.; SHARP, J. L.; MATTERN, M. R.; JOHNSON, R. K.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive compounds from *Combretum erythrophyllum*. **Journal of Natural Products.** v. 63 (4), p. 457-460, 2000.
- SHEN, T., YUAN, H. Q.; WAN, W. Z.; WANG, X. L.; WANG, X. N.; JI, M.; LOU, H. X. Cycloartane-type triterpenoids from the resinous exudates of *Commiphora opobalsamum*. **Journal of Natural Products**. v.71(1), p.81-86, 2008.

SILVA, M. N. F.; VALENTE, M. C. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**. Rio de Janeiro, v. 56, n. 86, p. 131-140, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7ª Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI. U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochemical Biophysics Acta**, v.77; p. 383-393,1963.

STACE, C.A. Combretaceae. In: N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W. Stevenson; S.V. Heald (eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**. The New York Botanical Garden. Princenton University Press. United Kingdom. p. 110-111, fig. 55, pl 15. 2004.

SOMANABANDHU, A.; WUNGCHINDA, S.; WIWAT, C. Chemical composition of *Combretum quadrangulare* Kurz.(abstract). **Abstract 4th Asian Symposio Medicinal Plants Spices Bangkok**, Thailand, September p. 15-19, 1980.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica.** v. 26, p. 175-184, 2003.

TAHKTAJAN, A. **Diversity and Classification of Flowering Plants**. Columbia University Press, New York. 1997.

TAN, F.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X. & WANG, Y. Phylogenetic relationships of Combretoideae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research.** v. 115 (6), p. 475–481. 2002.

TAVARES, J. F. Foto das partes aéreas e caule de *Combretum duarteanum* Cambess., 2008.

TJØLSEN A, HOLE K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., editors. **The pharmacology of pain** (Handbook of experimental pharmacology), vol. 30/I. Berlin Springer Verlag; p. 1-20. 1997

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

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; LEITÃO DA-CUNHA, E. V. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18(1), p. 47-52, 2008.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U. W.; ADSERSEN, A.; CHRISTENSEN, S. B.; SITTIE, A.; NYMAN, U.; NIELSEN, C.; OLSEN, C. E. **Journal of Natural Products.** v. 60, p. 739, 1997.

VANEGAS H, SCHAIBLE, HANS-GEORG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews.** v. 46, p 295-309, 2004.

WATANABE, N.; NIKI, E.; SHIMIZU, S. An experiment on direct combination of high performance liquid chromatography with FT-NMR (LC-NMR). **Jeol News**. v.15A, p. 2, 1979.

WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. **Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.** Livingstone, Edinburgh, 2nd edn., p. 192, 1962.

WEN, X.; XIA, J.; CHENG, K.; ZHANG, L.; ZHANG, P.; LIU, J.; ZHANG, L.; NI, P.; SUN, H. Pentacyclic triterpenes. Part 5: Synthesis and SAR study of corosolic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 17 p. 5777–5782, 2007.

WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical Chemistry**. v. 57, p. 675, 1985.

WILLAMAN, J. J.; SCHUBERT, B. G. Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. Washington DC, 1961.

WINTER CA, RISELEY EA, NUSS GW. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p 544-547, 1962.

WOLFENDER, J. J.; HOSTETTMANN, K. Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to the investigation of medicinal plants. In: **Phytochemistry of Medicinal Plants**. ARNASON, J. T., MATA, R., ROMEO, J. (Eds), Plenum Press, New York, p. 189, 1995.

WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S.; HILLER, W.; HOSTETTMANN, K. LC-UV-MS and LC-NMR analices of crude extracts of *Gentianaceae* species. **Phytochemical Analysis**. v. 8, p. 97, 1997.

YUNES; R. A.; CHECHINEL-FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova.** v.21, n.1, 1997.

YOSHIMURA, I.; YASUHIRO, K.; YOSHICAZU, Y.; HUNECK, S.; YASUYUKI, Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by High Performance Liquid Chromatography With A Photodiode-Array Detector. **Phytochemical Analysis**. v. 5, p. 197, 1994.

YOUNG, S. L.; CHAPLIN, D. J. Combrestatin A-4 phosphate: background and current clinical status. **Expert Opinion on Investigational Drugs.** v. 13, p. 1171–1182, 2004.

ZANI, C. L; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-trypanosoma cruzi activity. **Phytomedicine**. v. 2, p. 47, 1995.

ZAPPI, D.C. Combretaceae. In: B.L. Stannard (ed.), Flora of the Pico das Almas. Chapada Diamantina. Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 174-175, 1995.