



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

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO EXTRATO DAS  
CASCAS DAS RAÍZES DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul.  
(LEGUMINOSAE)**

**JOSÉ CÂNDIDO SELVA DE OLIVEIRA**

Salvador  
2010



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

**JOSÉ CÂNDIDO SELVA DE OLIVEIRA**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO EXTRATO DAS  
CASCAS DAS RAÍZES DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul.  
(LEGUMINOSAE)**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Jorge Maurício David.**

Dissertação submetida ao colegiado do curso de  
Pós-graduação em Química da UFBA para  
obtenção do grau de Mestre em Química

Salvador  
2010

O48

Oliveira, José Cândido Selva de

Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul (Leguminosae) / José Cândido Selva de Oliveira. – Salvador, 2010.

74 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David.

Dissertação (mestrado) Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2010.

1. *Caesalpinia pyramidalis*. 2. Flavonóides. 3. Fitoquímica. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. II. David, Jorge Mauricio. II. Título

CDU: 547.9

**JOSÉ CÂNDIDO SELVA DE OLIVEIRA**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO EXTRATO DAS  
CASCAS DAS RAÍZES DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul.  
(LEGUMINOSAE)**

Dissertação submetida ao colegiado do curso de  
Pós-graduação em Química da UFBA para  
obtenção do grau de Mestre em Química

**Aprovada em: 25/03/2010**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARIA DE FÁTIMA VANDERLEI DE SOUSA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. JUCENI PEREIRA DAVID**

---

**Prof. Dr. JORGE MAURICIO DAVID**

**Orientador**

Salvador

2010

## DEDICATÓRIA

A minha **família**, em especial aos meus filhos José Luiz da Silva Selva de Oliveira e Maria Cândida da Silva Selva de Oliveira pelas alegrias proporcionadas.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha esposa Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lourinalda Luiza Dantas da Silva Selva de Oliveira pelo companheirismo, amor e incentivo durante o período deste trabalho. O Matheus Luiz da Silva Greenburg, meu filho José Luiz da Silva Selva de Oliveira e minha filhinha Maria Cândida da Silva Selva de Oliveira pelos momentos de alegria proporcionada.

A minha mãe Miriam Selva Carneiro Leão que sempre me apóia nos momentos mais difíceis e que tem me incentivado nas minhas batalhas pessoais e profissionais.

A meus irmãos Edwirges Selva Carneiro Leão, Edmar Carneiro Leão Filho e Juliana Selva Carneiro Leão pela força e incentivo nesta caminhada.

Ao professor Dr. Jorge Mauricio David pela orientação, apoio, incentivo e dedicação para meu desenvolvimento técnico e científico ao longo deste período.

A professora Dr<sup>ª</sup>. Juceni Pereira David por nos acolher em seu laboratório quando o Instituto de Química (IQ-UFBA) estava interditado.

Ao professor Dr. Marcelo Sobral da Silva e o técnico do LTF/UFPA Vicente Carlos de Oliveira pela amizade e obtenção dos espectros de RMN - 1 D e 2 D.

Aos colegas de laboratório, Bruno Oliveira, Iblize (Bel), Darlan Coutinho, Rauldenis Almeida, Larissa Cavalcante, Daiara, Patrícia Assis, Luciano Lima, Charleston Ribeiro, Clayton Queiroz, Jeferson Chagas, Aparecida (Cida), Erika Maria, Marcos Vinicius, Marcos Sasakura, Manuela Cardoso.

Aos professores Dr. Frederico Guaré Cruz, Dr. Silvio do Desterro Cunha e Dr. Mauricio Moraes Victor do IQ-UFBA que acompanharam meu desenvolvimento acadêmico durante este período.

**José C. S. de Oliveira**

## RESUMO

O presente trabalho relata o estudo químico das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., uma árvore pertencente a família Leguminosae endêmica da região da caatinga baiana cujas folhas são utilizadas na medicina popular como diurético e digestivo. O extrato metanólico bruto foi submetido à extração líquido-líquido e sua atividade citotóxica e antioxidante foram avaliadas. O extrato hexânico apresentou-se atóxico para o teste de letalidade de *Artemia salina* e os demais extratos foram moderadamente tóxicos. Em relação à atividade antioxidante, o extrato AcOEt foi o mais ativo, seguido do BuOH e MeOH. O fracionamento cromatográfico da fase hexânica permitiu o isolamento do lupeol, acacetina, um novo fenilpropanóide, ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico, além de uma mistura de sitosterol e estigmasterol. Da fase metanólica foram isolados o mesmo fenilpropanóide encontrado na hexânica além de um novo biflavonóide, 7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5 $\alpha$ -2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona. A estrutura deste novo biflavonóide bem como das outras substâncias isoladas foram elucidadas a partir da análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (BB e APT) juntamente com a RMN de correlação (HMQC e HMBC).

Palavras-chave: *Raiz de Caesalpinia pyramidalis*, *Estudo fitoquímico*, *Avaliação biológica*, *Flavonóide*, *Biflavonóide*.

## ABSTRACT

This paper reports the study of bark`s of the roots of *Caesalpinia pyramidalis* Tul., a endemic tree belonging to the Leguminosae family from caatinga region of Bahia whose leaves are used in folk medicine as diuretic and digestive. The crude methanol extract was subjected to liquid-liquid extraction and its antioxidant and cytotoxic activities were evaluated. The hexane extract was nontoxic to the *Artemia salina* lethality test and, the other extracts were moderately toxic. Regarding the antioxidant activity the AcOEt extract was the most active, followed by BuOH and MeOH. The fractionation of the hexane phase allowed the isolation of lupeol, acacetin, a new phenylpropanoid acid (E)-8-hydroxy-3,5-dimethoxycumaric, and a mixture of sitosterol and stigmasterol. Methanol phase were isolated even phenylpropanoid found in hexane and a new biflavonoid, 7-hydroxy-4'-methoxyflavone-5 $\alpha$ -2,4-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone. The structure of this new biflavonoid and the other compounds were elucidated from the data analysis and <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR (BB and APT) NMR correlation (HMQC and HMBC).

Keywords: *Root of the Caesalpinia pyramidalis, Phytochemistry studies, Biological evaluation, Flavonoids, biflavonoids.*



## SUMÁRIO

	Página
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	16
<b>1.1 - Química de Produtos Naturais</b>	16
<b>1.2 - Família Leguminosae</b>	17
<b>1.3 - Subfamília Caesalpinoideae</b>	18
<b>1.4 - Espécie <i>Caesalpinia pyramidalis</i></b>	20
<b>1.5 - Substâncias isoladas de <i>Caesalpinia pyramidalis</i></b>	20
<b>1.6 - Descrição botânica de <i>Caesalpinia pyramidalis</i></b>	22
<b>1.7 - Características gerais de <i>Caesalpinia pyramidalis</i></b>	22
<b>2 - OJETIVOS</b>	24
<b>3 - EXPERIMENTAL</b>	25
<b>3.1 - Materiais e métodos</b>	25
<b>3.2 - Análises espectroscópicas</b>	26
<b>3.3 - Material para extração</b>	26
<b>3.4 - Partição do extrato de <i>Caesalpinia pyramidalis</i></b>	27
<b>3.5 - Testes biológico e bioquímico</b>	28
<b>3.5.1 - Teste de letalidade contra <i>Artemia salina</i></b>	28
<b>3.5.2 - Seqüestro da DPPH</b>	28
<b>3.6 - Fracionamento cromatográfico</b>	29
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	30
<b>4.1 - Rendimento dos extratos</b>	30
<b>4.2 - Letalidade contra <i>Artemia salina</i></b>	30
<b>4.3 - Teste do seqüestro de DPPH</b>	30
<b>4.4 - Isolamento dos constituintes da fase hexânica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i></b>	32
<b>4.5 - Isolamento dos constituintes da fase metanólica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i></b>	35
<b>4.6 - Elucidação estrutural</b>	42
<b>4.6.1 - Identificação de CPCR1 (Lupeol)</b>	43
<b>4.6.2 - Identificação de CPCR2 (Sitosterol e Estigmasterol)</b>	46
<b>4.6.3 - Identificação de CPCR3 (Acacetina)</b>	49
<b>4.6.4 - Identificação de CPCR4 (Ácido (E)-8-hidroxi-3,5-</b>	52

dimetoxicumarico)	
<b>4.6.5 - Identificação de CPCR5 (Alquil fenóis)</b>	58
<b>4.6.6 - Identificação de CPCR6 (Ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico)</b>	58
<b>4.6.7 - Identificação de CPCR7 (7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5<math>\alpha</math>-2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona)</b>	59
<b>4.6.8 - Identificação de CPCR8, CPCR9 e CPCR10</b>	67
<b>5 - CONCLUSÕES</b>	68
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	69

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Substâncias isoladas das folhas de <i>C. pyramidalis</i> .	20-21
<b>Figura 2.</b> Substâncias isoladas do caule de <i>C. pyramidalis</i> .	21
<b>Figura 3.</b> <i>Caesalpinia pyramidalis</i> : A (exsicata; Herbário Alexandre Leal Costa, Instituto de Biologia - UFBA), B e C ( <i>espécie in natura</i> ) e D (época de estiagem).	22
<b>Figura 4.</b> AA do padrão e das fases orgânicas das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	31
<b>Figura 5.</b> RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de <b>CPCR1</b> .	43
<b>Figura 6.</b> RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de <b>CPCR1</b> .	44
<b>Figura 7.</b> Lupeol, triterpeno isolado das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	45
<b>Figura 8.</b> RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de <b>CPCR2</b> .	46
<b>Figura 9.</b> RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de <b>CPCR2</b> .	47
<b>Figura 10.</b> Esteróides isolados, em mistura, das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	47
<b>Figura 11.</b> RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) de <b>CPCR3</b> .	49
<b>Figura 12.</b> RMN $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz) de <b>CPCR3</b> .	50
<b>Figura 13.</b> Acetina, substância majoritária de <b>CPCR3</b> .	51
<b>Figura 14.</b> RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) de <b>CPCR4</b> .	52
<b>Figura 15.</b> Prováveis posições para hidrogênio $\beta$ à carbonila.	53
<b>Figura 16.</b> RMN $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) de <b>CPCR4</b> .	53
<b>Figura 17.</b> Estrutura do ácido <i>p</i> -hidroxicumarico.	54
<b>Figura 18.</b> Propostas estruturais de <b>CPCR4</b> com base nos dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ - APT.	54
<b>Figura 19.</b> RMN HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de <b>CPCR4</b> .	55
<b>Figura 20.</b> RMN HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de <b>CPCR4</b> .	56
<b>Figura 21.</b> Estrutura de <b>CPCR4</b> com base no HMBC.	57
<b>Figura 22.</b> Correlações observadas no HMBC de <b>CPCR4</b> .	58
<b>Figura 23.</b> RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz) de <b>CPCR7</b> .	59
<b>Figura 24.</b> RMN $^{13}\text{C}$ - APT ( $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ , 50MHz) de <b>CPCR7</b> .	60
<b>Figura 25.</b> Proposta para as unidades flavonoídicas de <b>CPCR7</b> .	61
<b>Figura 26.</b> RMN HMQC ( $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ , 500MHz) de <b>CPCR7</b> .	62

<b>Figura 27.</b> 7-hidroxi-4'-metoxiflavona (Pratol).	63
<b>Figura 28.</b> 2,4-Dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona.	64
<b>Figura 29.</b> Proposta estrutural da substância <b>CPCR7</b> com base no espectro de HMBC.	66
<b>Figura 30.</b> Principais correlações observadas no HMBC de <b>CPCR7</b> .	66
<b>Figura 31.</b> RMN HMBC (CO(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 500MHz) de <b>CPCR7</b> .	67

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Espécies do gênero <i>Caesalpinia</i> utilizadas na medicina popular.	19
<b>Tabela 2.</b> Rendimento das fases obtidas das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	30
<b>Tabela 3.</b> % CDL das fases obtidas do extrato MeOH das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	31
<b>Tabela 4.</b> Resultado das frações coletadas da fase hexânica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	32
<b>Tabela 5.</b> Resultado das frações coletadas da subfração CPCREH 10-12 obtida da fase hexânica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	33
<b>Tabela 6.</b> Resultado das frações coletadas da subfração CPCREH 9 obtida da fase hexânica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	34
<b>Tabela 7.</b> Resultado das frações coletadas da fase metanólica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	36
<b>Tabela 8.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCREM 20-33 [Tabela 7].	36
<b>Tabela 9.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCREM 34-36 [Tabela 7, pág. 36].	37
<b>Tabela 10.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 9 [Tabela 9].	37
<b>Tabela 11.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 3-8 [Tabela 10, pág. 37].	38
<b>Tabela 12.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 16-19 [Tabela 11].	38
<b>Tabela 13.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 10-15 [Tabela 12, pág. 38].	39
<b>Tabela 14.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 10-11 [Tabela 9, pág. 37].	39
<b>Tabela 15.</b> Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 6-8 [Tabela 14, pág. 39].	40
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C de <b>CPCR1</b> e da literatura do lupeol.	45
<b>Tabela 17.</b> Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da mistura de	48

esteróides.

<b>Tabela 18.</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>CPCR3</b> e da acetina.	51
<b>Tabela 19.</b> Acoplamentos observados no HMQC de <b>CPCR4</b> .	55
<b>Tabela 20.</b> Acoplamentos observados no HMBC de <b>CPCR4</b> .	56
<b>Tabela 21.</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>CPCR4</b> e do ácido <i>p</i> -hidroxicumarico.	57
<b>Tabela 22.</b> Acoplamentos observados no HMQC de <b>CPCR7</b> .	61
<b>Tabela 23.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de CPCR4 e 7-hidroxi-4'-metoxiflavona (Pratol).	63
<b>Tabela 24.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>CPCR7</b> e de RMN $^{13}\text{C}$ de uma dihidrochalcona.	64
<b>Tabela 25.</b> Acoplamentos observados no HMBC de <b>CPCR7</b> .	65

## LISTA DE ESQUEMAS

	Página
<b>Esquema 1.</b> Partição do extrato metanólico bruto das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	27
<b>Esquema 2.</b> Fracionamento da fase hexânica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	34
<b>Esquema 3.</b> Fracionamento da fase metanólica das cascas das raízes de <i>C. pyramidalis</i> .	41

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA – Atividade Antioxidante

AcOEt – Acetato de etila

APT – Attached Proton Test

BB – Bound Band

BuOH – Butanol

CC – Coluna cromatográfica

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDL – Consumo de Radical Livre

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CPCR – *Caesalpinia pyramidalis* Casca da Raiz

d – dubleto

D – Deuterado

dd – duplodubleto

DPPH - 1,2-difenil-2-picril-hidrazil

EtOH – Etanol

Hex – Hexano

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hz – Hertz

*J* – constante de acoplamento

LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

m – múltiplo

MeOH – Metanol

MHz – Megahertz

q – quarteto

Qtd – Quantidade

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Próton

s – singleto

t – tripleto

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UV/Vis – Ultravioleta/Visível



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Química de Produtos Naturais

O uso de plantas medicinais e o conhecimento de algumas de suas propriedades terapêuticas têm acompanhado o homem desde os primórdios de sua história. Acredita-se que o primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado cerca de 2700 anos a.C. durante o império de Shennung na China. Entre as 365 drogas mencionadas no Inventário de Shennung, encontra-se espécies tais como *Ephedra*, indicada para problemas de asma, *Ricinus communis* como purgativo, além do ópio de *Papaver somniferum* ([www.simillimum.com/TheLittleLibrary/References/Shennung.html](http://www.simillimum.com/TheLittleLibrary/References/Shennung.html)). Outro exemplo é o *Papyrus Ebers*, documento escrito a cerca de 1550 anos a.C. que enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO *et al*, 2002).

O emprego de plantas no Brasil originou-se provavelmente a partir de crenças das antigas tribos indígenas e também entre os antigos escravos e europeus. Esses últimos adaptaram em nosso país procedimentos empregados nas suas tribos de origem. Muitas dessas plantas têm sido empregadas até hoje na medicina popular. O estudo de plantas medicinais tem sido uma tradição nas áreas de pesquisa em Botânica, Farmacognosia e Farmacologia. Fármacos derivados de plantas demonstram possuir uma importância global nas economias dos diferentes países industrializados. São utilizadas na medicina aproximadamente 119 substâncias químicas puras que são extraídas de plantas superiores. Por outro lado, das 25 drogas farmacêuticas mais vendidas nos EUA, doze são derivados de produtos naturais. O Brasil é um país privilegiado em termos de biodiversidade. Entre os ecossistemas ricos em variedades vegetais, destaca-se a floresta amazônica, a mata atlântica, o cerrado e a caatinga. Estima-se que existam cerca de 55.000 espécies vegetais floridas, ou seja, cerca de 50% das espécies de floresta tropical ([www.comciencia.br/reportagens/farmacos/forma16.html](http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/forma16.html)). Apesar desta grande biodiversidade, somente uma percentagem muito pequena de sua flora tem sido estudada sob o ponto de vista químico, e uma percentagem menor ainda de estudos realizados sobre as atividades dessas plantas e das suas substâncias. Em 1987 estimava-se que de um total de aproximadamente 60 mil espécies, somente em 880 algum estudo químico havia sido realizado (BAHIA, 2002). Apesar deste levantamento refletir dados de 20 anos atrás, pode-se considerar que não houve uma mudança abrupta no conhecimento da composição química da flora brasileira na última década. Ressaltando que apenas

recentemente a comunidade científica tem intensificado estudos interdisciplinares, no intuito de testar biologicamente as substâncias isoladas.

A Bahia, na riqueza de sua flora, possui regiões de cerrado no oeste, caatinga no centro e norte, mangue em algumas áreas do litoral, campos rupestres na região da Chapada Diamantina e resquícios de mata atlântica concentrados principalmente ao sul na região da Reserva de Monte Pascal.

A pesquisa em Química dos Produtos Naturais tem possibilitado encontrar novos modelos estruturais e substâncias bioativas eficazes, o que tem contribuído muito para a pesquisa e obtenção de novos medicamentos bem como para a produção de fitoterápicos. Dentre os candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos a partir de fontes naturais destacam-se substâncias com atividades anticancerígenas, antimicrobianas e antivirais usados nas doenças infecciosas. Estes fármacos de origem natural representam respectivamente 51%, 78% e 70% de todos os fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e outros órgãos similares de outros países no período de 83-94. Dentre os 520 novos fármacos aprovados nesse período, 30 vieram diretamente de fontes naturais; 120 são semi-sintéticos derivados de fontes naturais e 46 são sintéticos, obtidos a partir de um protótipo natural, os demais são de origem essencialmente sintética (DAVID & DAVID, 2002).

## 1.2 - Família Leguminosae

A família Leguminosae pertencente à divisão das Angiospermas, classe Dicotiledôneas da ordem Rosales possui em torno de 670 gêneros e 17.500 espécies, distribuídos nas zonas tropicais e subtropicais e presentes em quase todo o mundo (LEWIS, 1987). As plantas desta família são de hábitos muito variados. Nas matas tropicais ocorrem como árvores ou arbustos, ervas anuais ou perenes e também muitas trepadeiras, vivendo em variados ambientes. O seu fruto é variado, mas em geral são legumes. Nos países em desenvolvimento, o cultivo de leguminosas consta do meio mais eficaz para o aumento da produção de proteínas vegetais. Muitas espécies da família Leguminosae são economicamente importantes como plantas forrageiras, produtoras de fibras, tintas, gomas, resinas e óleos; e como adubo verde e ainda como alimento. São exemplos de espécies de Leguminosas de interesse a: ervilha (*Pisum sativum*), Grão-de-bico (*Cicer arietinum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) entre outros (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>). Como exemplo de legumes produtores de tintas, podemos citar o azul "indigo" de algumas espécies de *Indigofera* e o

vermelho vinho "brasil" de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil). Em outras regiões do mundo, as leguminosas são usadas como condimentos, fonte de taninos, produção de perfumes e óleos, além de medicamentos como componente de contraceptivos orais e em alguns casos como narcóticos alucinogênicos (LEWIS, 1987).

As plantas da família Leguminosae são particularmente valiosas nas colheitas porque não requerem fertilizantes nitrogenados, pois vivem simbioticamente com certas bactérias que são capazes de retirar o nitrogênio do ar (JOLY, 1977). Segundo Lewis (LEWIS, 1987), reconhecemos nesta família três subfamílias importantes: Mimosoideae (5 tribos, 63 gêneros), Papilionoideae (31 tribos, 443 gêneros) e Caesalpinoideae (5 tribos, 152 gêneros).

Do ponto de vista químico, cada subfamília tende a possuir certos grupos característicos de flavonóides e outros compostos polifenólicos. A subfamília Mimosoideae é rica em catequinas, leucoantocianidinas e outros taninos, já a subfamília Caesalpinoideae contém elagitaninos (gênero *Caesalpinia*) e a Papilionoideae caracteriza-se por ter isoflavonas e rotenóides, mas também, são ricas em antocianidinas e flavonóis glicosilados (HARBONE & MABRY, 1982).

### 1.3 - Subfamília Caesalpinoideae

A subfamília Caesalpinoideae compreende cerca de cinco tribos e 152 gêneros. Esta subfamília está muito bem representada no Brasil, sendo o gênero *Cassia* com o maior número de espécies. Outros gêneros frequentemente encontrados são *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Bauhinia*, *Copaifera*, *Hymenaea* e *Swartzia* (SCHULTZ, 1984).

O gênero *Caesalpinia* é formado por árvores tropicais e subtropicais além de arbustos, compreendendo mais de 150 espécies disseminadas por todo o mundo (JOLY, 1977), algumas são, inclusive, originárias da flora brasileira, como por exemplo, a *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) cuja madeira teve grande importância no início da colonização do Brasil devido ao comércio de madeira com países europeus para obtenção de corante (REZENDE *et al*, 2004). Por outro lado, estudos anteriores de espécies deste gênero revelam propriedades biológicas interessantes para sua espécie, tais como: antibióticos (SAAEDE & SABIR, 2001), antidiabéticos (SHARMA *et al*, 1997) para *C. bonducella*; antimaláricos (KURIA *et al*, 2001; DEHARO *et al*, 2001) para *C. volkensii* e *C. pluviosa*; além da atividade antiinflamatória

(HIKINO *et al*, 1977; CARVALHO *et al*, 1996) para *C. sappan* e *C. ferrea*. Outras espécies do gênero *Caesalpinia* são bastante utilizadas pela medicina popular.

Na Tabela 1 se encontram listadas as espécies deste gênero que são mais utilizadas e suas respectivas atividades.

**Tabela 1.** Espécies do gênero *Caesalpinia* utilizadas na medicina popular.

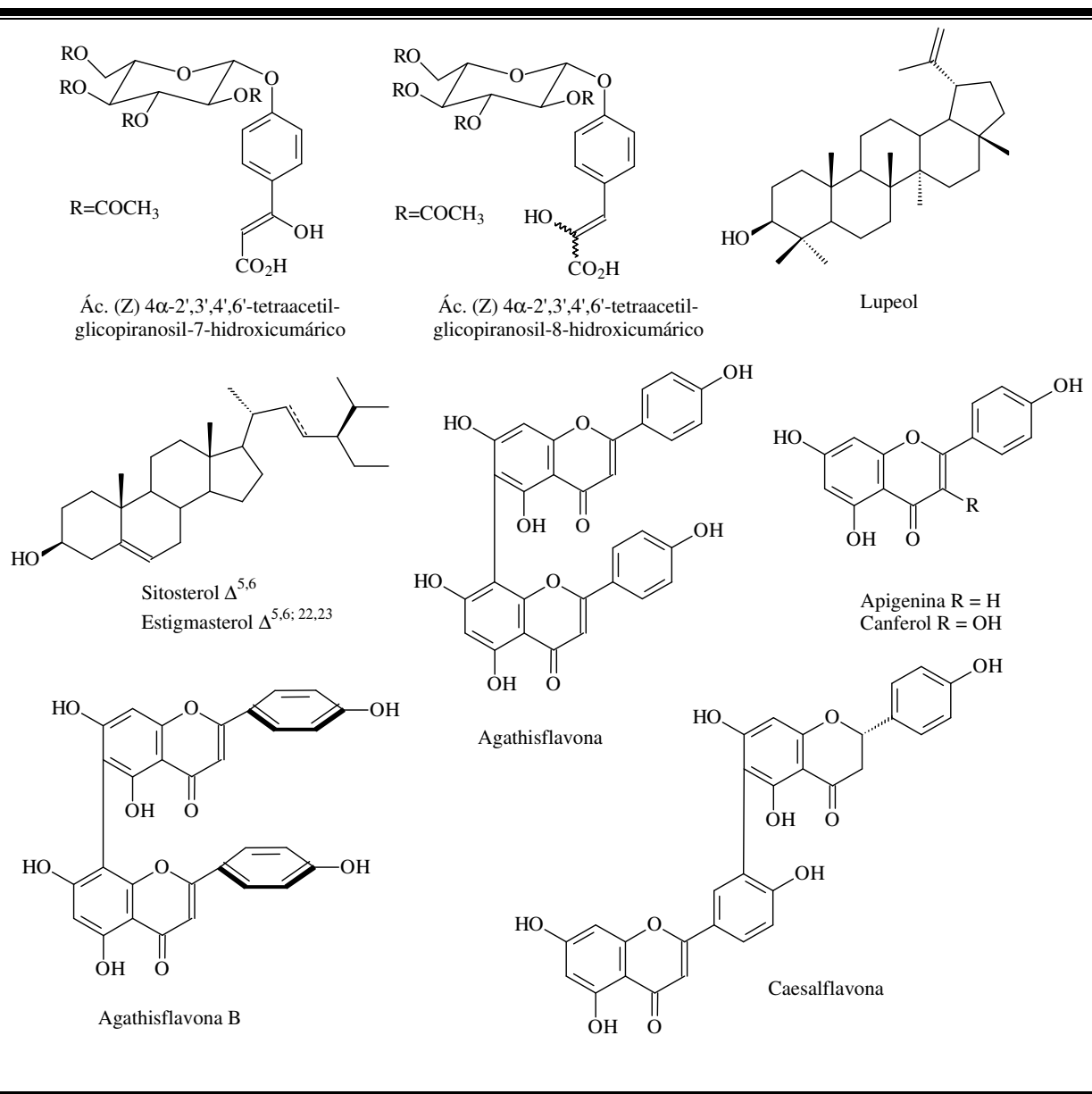
<b>Espécies</b>	<b>Parte Utilizada</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referências</b>
<i>C. bonduc</i>	Sementes	Hemorragia cerebral.	(Bouquet, 1974)
	Raízes	Antihelmítico, anticâncer, antimalária, hipoglicêmico e antiinflamatório.	(Chakrabarti <i>et al</i> , 2003); (Gupta <i>et al</i> , 2004)
<i>C. bonducella</i>	Sementes	Asma, antimalária e diabetes.	(Kannur <i>et al</i> , 2006)
	Folhas	Antiinflamatório.	(Hukla <i>et al</i> , 2010)
	Raízes	Hipoglicêmico.	(Sarma & Das, 2009)
<i>C. coriacea</i>	Frutos	Aftas.	(Hebbar <i>et al</i> , 2004)
<i>C. crista</i>	Sementes	Antidispéptico, antimalária e antiinflamatório.	(Linn <i>et al</i> , 2005)
	Raízes	Reumatismo.	(Linn <i>et al</i> , 2005)
<i>C. decapetala</i>	Raízes	Imunomoduladora e antiinflamatória.	(Kiem <i>et al</i> , 2005)
<i>C. ferrea</i>	Frutos	Disenteria.	(Baldach, 1972)
<i>C. japonica</i>	Raízes	Neuralgia.	(Ogawa <i>et al</i> , 1992)
<i>C. major</i>	Raízes	Reumatismo e dores lombares.	(Kitagawa <i>et al</i> , 1994)
<i>C. minax</i>	Sementes	Disenteria, antitérmico e resfriado.	(Jiang <i>et al</i> , 2001)
<i>C. pluviosa</i>	Cascas	Disenteria.	(de Lucca & Zalles, 1992)
<i>C. pulcherrima</i>	Todas as partes	Pirexia, bronquite, diarreia, disenteria e antimalária.	(Ragasa <i>et al</i> , 2003)
<i>C. pyramidalis</i>	Folhas	Diurético, digestivo, antidispéptico, estomático e antitérmico.	(Bahia, 1979)
<i>C. sappan</i>	Madeira	Antiinflamatório, reumatismo, tratamento de trombose ou de tumores e analgésico.	(Tang & Eisenbrand, 1992)

### 1.4 - Espécie *Caesalpinia pyramidalis*

A espécie vegetal *C. pyramidalis* é conhecida popularmente como “caatingueiro” ou “pau-de-rato” e suas folhas são empregadas no preparo de infusos e decoctos prescritos na medicina popular como mostrado no Tabela 1 [pág. 19].

### 1.5 - Substâncias isoladas de *Caesalpinia pyramidalis*

Nas Figuras 1 e 2 [pág. 21] encontram-se as substâncias isoladas a partir do estudo das folhas e do caule de *C. pyramidalis* (MENDES *et al*, 2000; BAHIA *et al*, 2005; BAHIA *et al*. 2006), respectivamente.



Continuação

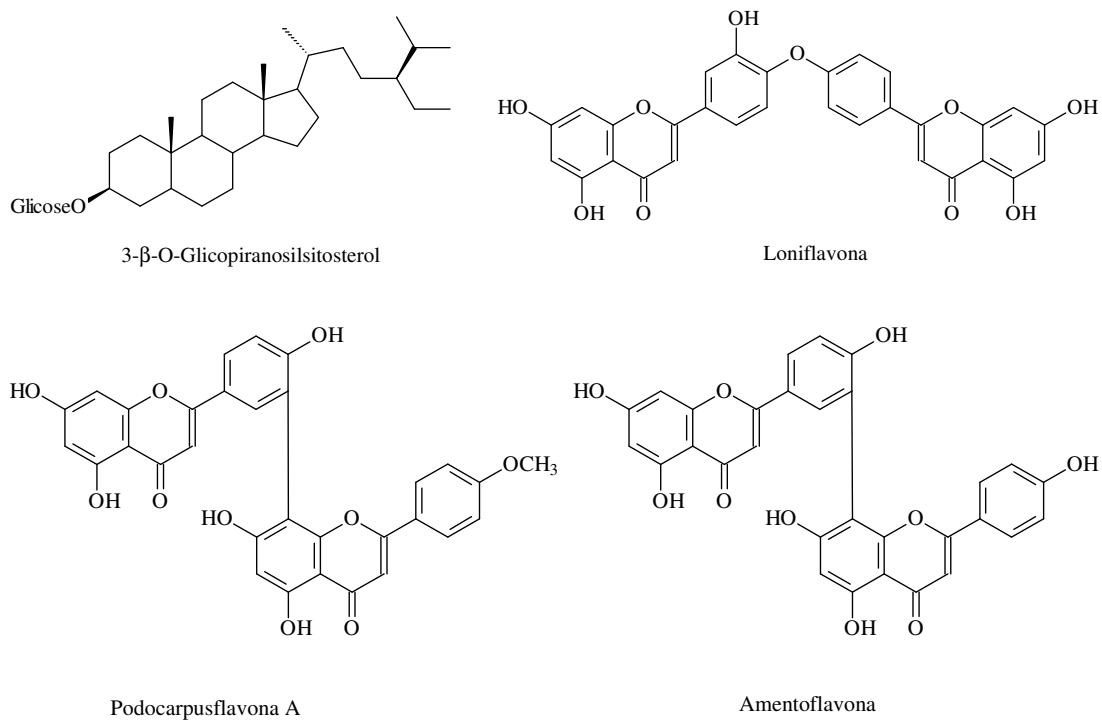


Figura 1. Substâncias isoladas das folhas de *C. pyramidalis*.

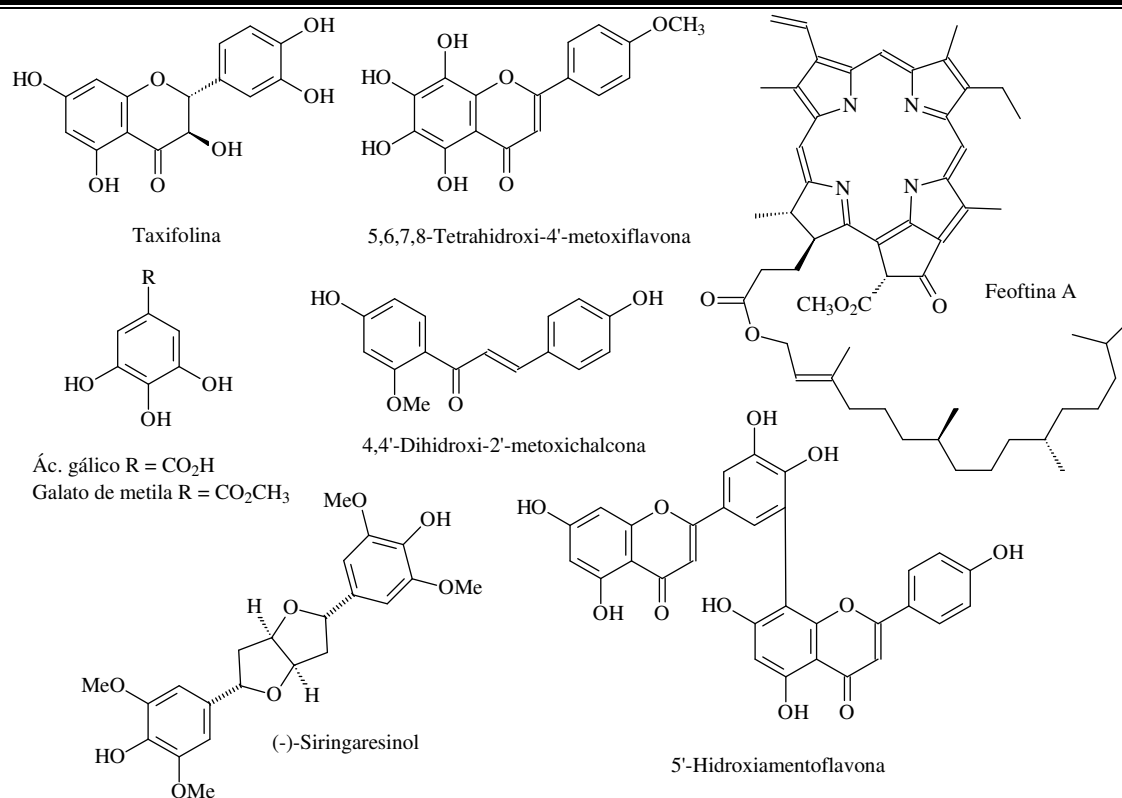


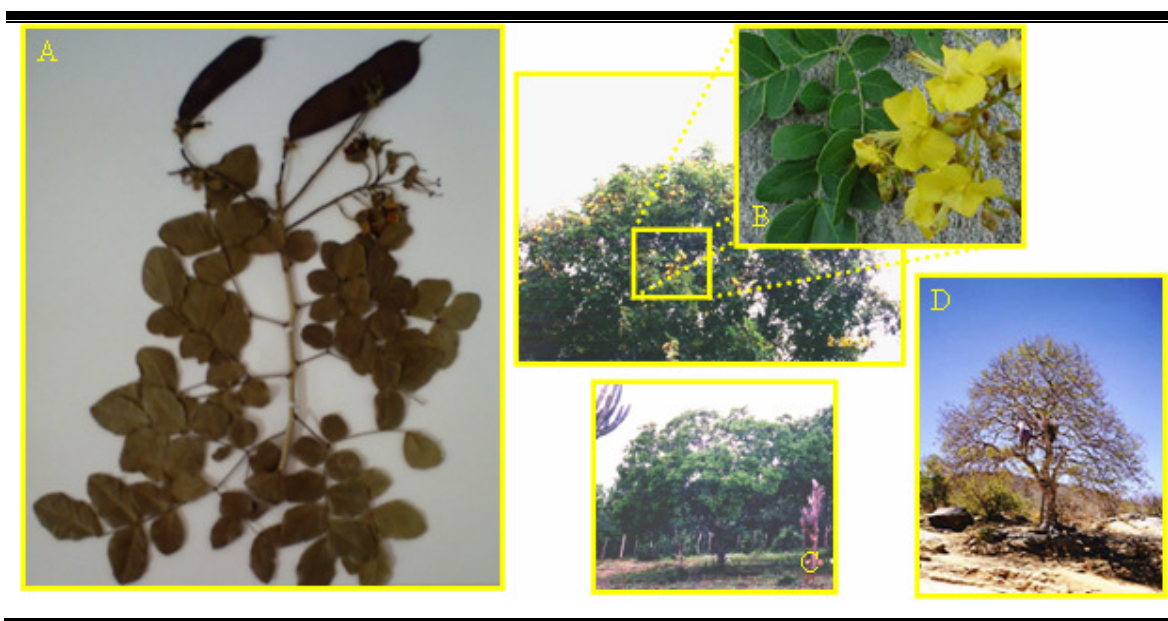
Figura 2. Substâncias isoladas do caule de *C. pyramidalis*.

### 1.6 - Descrição botânica de *Caesalpinia pyramidalis* (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>)

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Fabales
- Família: Leguminosae
- Subfamília: Caesalpinioideae
- Tribo: Caesalpinieae
- Gênero: *Caesalpinia*
- Espécie: *Caesalpinia pyramidalis* Tul.

### 1.7 - Características gerais de *Caesalpinia pyramidalis*

A espécie *C. pyramidalis* (Figura 3) pode alcançar até 4 m de altura e possuem flores amarelas dispostas em racemos poucos maiores ou tão longo quanto às folhas. Esta espécie representa uma das plantas sertanejas cujos gomos brotam às primeiras manifestações de umidade anunciadoras do período das chuvas. Durante esta fase de desenvolvimento o gado procura as suas folhas para alimentação, desprezando-as pouco depois, talvez pelo cheiro desagradável que adquirem ao crescer (BAHIA, 1979).



**Figura 3.** *C. pyramidalis*: A (exsicata; Herbário Alexandre Leal Costa, Instituto de Biologia - UFBA), B e C (*espécie in natura*) e D (época de estiagem).

Recentemente a *C. pyramidalis* passou por uma atualização do qual agora é conhecida como *Poincianella pyramidalis* (QUEIROZ, 2009). Por outro lado, devido à literatura reportar dados químicos e farmacológicos de *C. pyramidalis*, não se fez necessário à mudança de nomes.

Estudos químicos realizados anteriormente com *C. pyramidalis* relataram que nas folhas e caules são encontrados triterpenos, esteróides, fenilpropanóides, lignana, taninos e, principalmente flavonóides e biflavonóides (MENDES *et al.*, 2000; BAHIA *et al.*, 2005; BAHIA *et al.* 2006).

Com isso, objetivo deste trabalho foi o estudo químico e avaliação biológica dos extratos, fases e substâncias puras isoladas das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.



## 2 - OJETIVOS

- Realizar bioensaios simples com o extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (testes antioxidante e letalidade contra *Artemia salina*);
- Estudar quimicamente o extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul.;
- Isolar substâncias responsáveis pela bioatividade;
- Determinar as estruturas das substâncias através de métodos espectroscópicos;
- Identificar substâncias responsáveis pelas atividades demonstradas nos testes biológicos realizados nos extratos.

### 3 - EXPERIMENTAL

#### 3.1 - Materiais e métodos

Para moagem das cascas das raízes de *C. pyramidalis* foi utilizado moinho de facas Thomas Wiley Laboratory Mill-Model4.

Para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram empregadas placas comerciais 20x20 da Merck®. As placas para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram confeccionadas no laboratório empregando placas de vidro 20x20 e usando sílica gel 60 PF<sub>254,366</sub> da Merck®, em suspensão em água destilada (1:2). Depois de preparadas, as placas foram ativadas em estufa a 80 °C, por uma hora. Nas placas preparativas foram aplicadas no máximo 40 mg de amostra, por placa. As frações obtidas da CCDP foram raspadas com auxílio de espátula de inox e filtradas em funil sinterizado utilizando solventes puros ou em misturas apropriadas para remoção das amostras, seguida de evaporação sob pressão do solvente em evaporador rotativo (40 °C, ± 120 rpm). As amostras obtidas foram pesadas e codificadas.

Os métodos de revelação das CCDC consistiram de exposição das placas à radiação, empregando-se lâmpada ultravioleta em cabine apropriada da marca Spectroline model CM-10 equipada com lâmpada Spectroline model Enf-260 C nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, vapores de iodo em cubeta de vidro com tampa e/ou reagente de Liebermann-Burchard.

O reagente de Liebermann-Burchard foi preparada misturando 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético, posteriormente essa mistura foi cuidadosamente adicionada a 50 mL de etanol resfriado em banho de gelo. Este reagente foi utilizado borrifando-se as placas e posteriormente aquecido-as em placa de aquecimento até 100 °C.

As colunas cromatográficas (CC) empregadas para isolamento dos constituintes químicos foram escolhidas com base na massa das amostras a ser submetida ao processo de separação. Para as CC em adsorção em sílica gel foram utilizadas sílica gel 60 (63-200 µm) e sílica gel 60 H (70-230 µm) ambas da Merck®, para CC em permeação em gel utilizou-se Sephadex LH-20 da Pharmacia.

Todas as frações obtidas das CC realizadas, tanto do extrato hexânico quanto do extrato metanólico das cascas das raízes de *C. pyramidalis*, foram coletadas em balões de 250 mL, com exceção das frações coletadas das colunas em Sephadex, que foi utilizado frascos de vidro com aproximadamente 10 mL. Todas as frações foram monitoradas por CCDC, agrupadas quando necessário (ex. semelhança de Rf) e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo, transferidas para recipientes previamente tarados e seus rendimentos calculados no término de cada coluna cromatográfica.

As amostras obtidas de cada coluna foram evaporadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Buchi 461 (40 °C, ± 120 rpm).

Os solventes utilizados na CC foram de grau PA das marcas QUIMEX® para CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, EtOH, AcOEt e Hex e SINTH® para BuOH.

### 3.2 - Análises espectroscópicas

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1-D) foram gerados em espectrômetro Varian Mercury 300 MHz (IQ-UFBA), e Varian Mercury 200 MHz (LTF-UFPB). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de correlação <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (2-D) HMQC e HMBC, foram gerados em espectrômetro Varian System 500 MHz (LTF-UFPB).

As análises no LTF-UFPB foram realizadas pelo técnico Vicente Carlos de Oliveira Costa, sob supervisão do Prof. Marcelo Sobral da Silva.

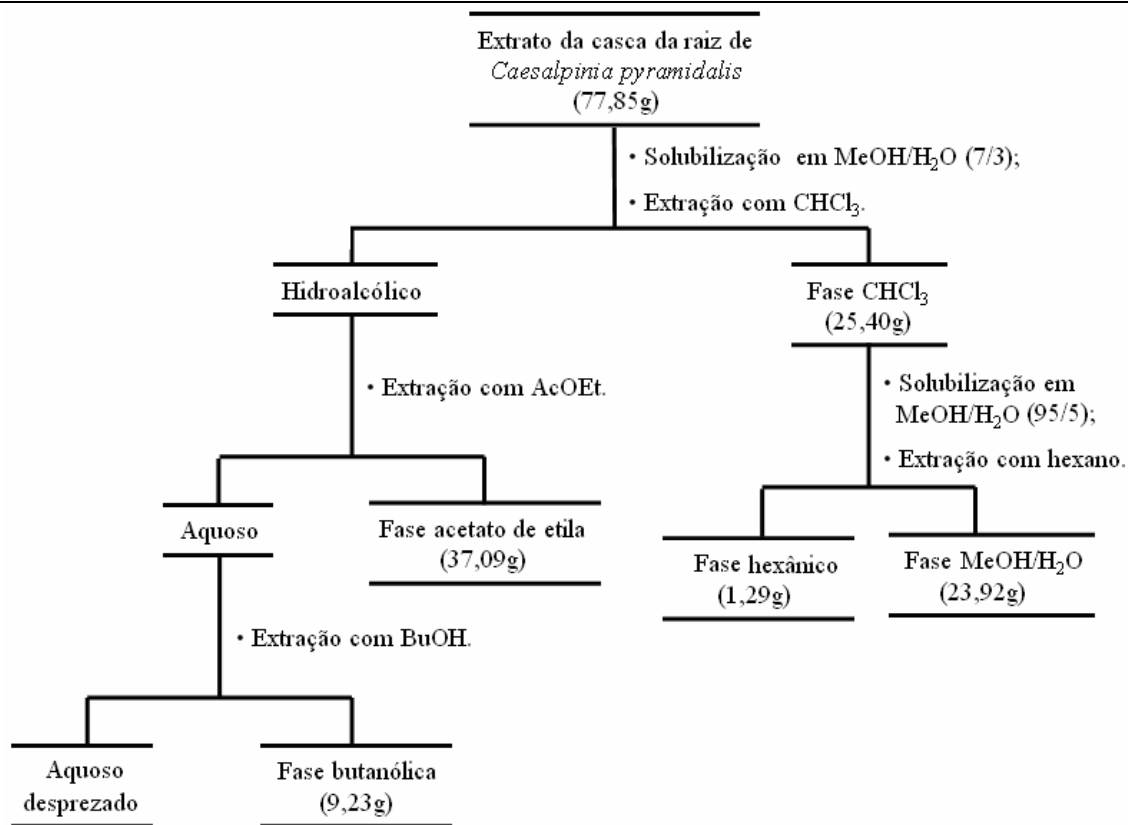
### 3.3 - Material para extração

As raízes de *C. pyramidalis* foram coletadas nos campos secos do município de Valente-BA, em uma região onde predomina como vegetação a caatinga. A identificação da espécie foi realizada pela Prof<sup>a</sup> Maria Lenise da Silva Guedes, curadora do Herbário Alexandre Leal da Costa do Instituto de Biologia da UFBA, onde a exsicata de *C. pyramidalis* encontra-se depositada sob o número 71432.

Em seguida, a casca da raiz, obtido através da raspagem da raiz de *C. pyramidalis* (402,80g) foi triturada e submetidas à extração exaustiva com metanol (MeOH, 6 x 48 horas), pelo método de maceração. O MeOH foi recuperado em rotaevaporador sob pressão reduzida restando no final o extrato bruto das cascas das raízes de *C. pyramidalis* (91,84g).

### 3.4 - Partição do extrato de *Caesalpinia pyramidalis*

O extrato metanólico bruto da casca da raiz de *C. pyramidalis* foi submetido à partição conforme protocolo empregado pelo grupo de pesquisa, dessa maneira a partir do extrato em MeOH foi possível obter quatro fases de diferentes polaridades: hexânica, metanólica, acetato de etila e butanólica. Segundo protocolo normalmente empregado pelo nosso grupo, o extrato bruto de *C. pyramidalis* foi submetido à extração líquido-líquido, sendo solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O 7:3 e extraído com CHCl<sub>3</sub> (3x de 200 ml) que foi pesada após a completa evaporação do CHCl<sub>3</sub>. Em seguida, a fase clorofórmica foi solubilizada em MeOH/H<sub>2</sub>O 95:5 e extraído com hexano (3x de 200 ml), originando assim a fase hexânica e a fase metanólica, a partir da fase clorofórmica. A fase hidroalcoólica da partição com CHCl<sub>3</sub> foi submetida à evaporação sob pressão reduzida para eliminação de excesso de MeOH e extraído com acetato de etila (3x de 200ml), A fase aquosa foi vaporado para retirar excesso de acetato de etila e extraído com BuOH (3x de 200 ml). No final do processo de partição, obtiveram-se quatro fases de polaridades diferentes (Esquema 1), o qual, no presente trabalho só a fase hexânica e fase metanólica foram fracionados em CC.



**Esquema 1.** Partição do extrato metanólico bruto das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

### **3.5 - Testes biológico e bioquímico**

#### **3.5.1 - Teste de letalidade contra *Artemia salina***

Para a realização do bioensaio contra *A. salina*, foi utilizada a metodologia proposta por Meyer (MEYER *et al*, 1982), com modificações. As fases obtidas pela cromatografia de partição foram testados contra *A. salina*, preparando-se uma solução estoque de 20 mL na concentração de 1 µg/mL de cada fase, separadamente, em solução marinha artificial. A solução estoque foi diluída para obter sete concentrações finais (25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 µg/mL). Para facilitar a diluição das fases em solução salina, fez-se necessário a utilização de DMSO:EtOH (2:3; gota/gota). As concentrações foram testadas em triplicata em frascos de penicilina, sendo adicionado 10 naupilis a cada frasco, contendo 5 mL de solução análise. A contagem dos naupilis vivos e mortos foi realizada após o período de 24 horas incubadas na ausência de luz.

Os valores da CL<sub>50</sub> foram obtidos através do método Probit de análise, com limite de confiança de 95% (FINNEY, 1971).

Os critérios de classificação da toxicidade com base nos níveis de CL<sub>50</sub> em *A. salina* foram os mesmos estabelecidos por Dolabela (DOLABELA, 1997), a saber: altamente tóxico (CL<sub>50</sub> < 80 µg/mL), moderadamente tóxico (entre 80 µg/mL e 250 µg/mL) e com baixa toxicidade ou não tóxico (CL<sub>50</sub> > 250 µg/mL).

#### **3.5.2 - Seqüestro da DPPH**

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada seguindo metodologia descrita na literatura (MILIAUSKAS *et al*, 2004 e SOUSA *et al*, 2007), monitorando-se o consumo do radical livre estável 1,2-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações.

Uma solução estoque de DPPH em metanol 40 µg/mL foi preparada e armazenada em frasco âmbar. Para o teste uma alíquota de 0,3 mL da solução amostra ou controle positivo foi adicionado a 2,7 mL de solução de DPPH em cubeta com volume de 3 mL. As amostras foram analisadas em seis concentrações diferentes (25, 50, 100, 150, 200 e 250 µmol/L). A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 515 nm, usando como controle positivo ácido gálico. As leituras foram realizadas no ato da

mistura ( $t_0$ ) após 15 minutos ( $t_{15}$ ), em seguida  $t_{30}$  e  $t_{60}$ . Todas as concentrações das amostras foram avaliadas em triplicata. As atividades obtidas serão comparadas com aquelas apresentadas por antioxidantes conhecidos tais como o 2,6,-diterc-butil-4-metoxifenol (BHT), galato de propila e o  $\alpha$ -tocoferol.

### **3.6 - Fracionamento cromatográfico**

Apenas as fases hexânica e metanólica foram submetidas à CC e o qual foram analisadas por CCDC, revelada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm), exposição a vapores de iodo e/ou reagente de Liebermann-Burchard de modo a estabelecer o melhor sistema de eluição das CC.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Rendimento dos extratos

O rendimento das fases obtidas foi calculado a partir da massa do material inicialmente utilizado (77,85 g). Na Tabela 2 encontram-se os rendimentos para as fases hexânica, acetato de etila, metanólica e butanólica obtidos no final do processo de partição.

**Tabela 2.** Rendimento das fases obtidas das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Fase hexânico	1,29 g	1,66 %
Fase acetato de etila	37,09 g	47,64 %
Fase metanólico	23,92 g	30,72 %
Fase butanólico	9,23 g	11,85 %

### 4.2 - Letalidade contra *Artemia salina*

A atividade contra *A. salina* foi baseada na mortalidade dos naupilis em presença dos constituintes químicos de cada fase diluído em meio salino. Após a incubação por 24 horas observou-se que algumas das fases de *C. pyramidalis* possuem atividade citotóxica frente *A. salina*. A fase acetato de etila apresentou maior toxicidade seguido da fase metanólico,  $CL_{50}$  de 149,12 e 193,98  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para a fase hexânica a  $CL_{50}$  foi de 535,55  $\mu\text{g/mL}$ , sendo considerado atóxico nas concentrações testadas. Já a fase butanólico, apresentou  $CL_{50}$  de 228,97  $\mu\text{g/mL}$ , o menor em relação as fases polares. Logo, em ordem crescente de citotoxicidade temos as fases: acetato de etila > metanólico > butanólico > hexânico.

Com exceção da fase hexânica, todos os outros são moderadamente tóxicos segundo Dolabela (DOLABELA, 1997).

### 4.3 - Teste do seqüestro de DPPH

Soluções metanólicas do controle positivo e do extrato metanólico particionado (fase hexânica, fase MeOH, fase AcOEt e fase BuOH) na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  foram diluídas em seis concentrações diferentes (25, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ). As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle

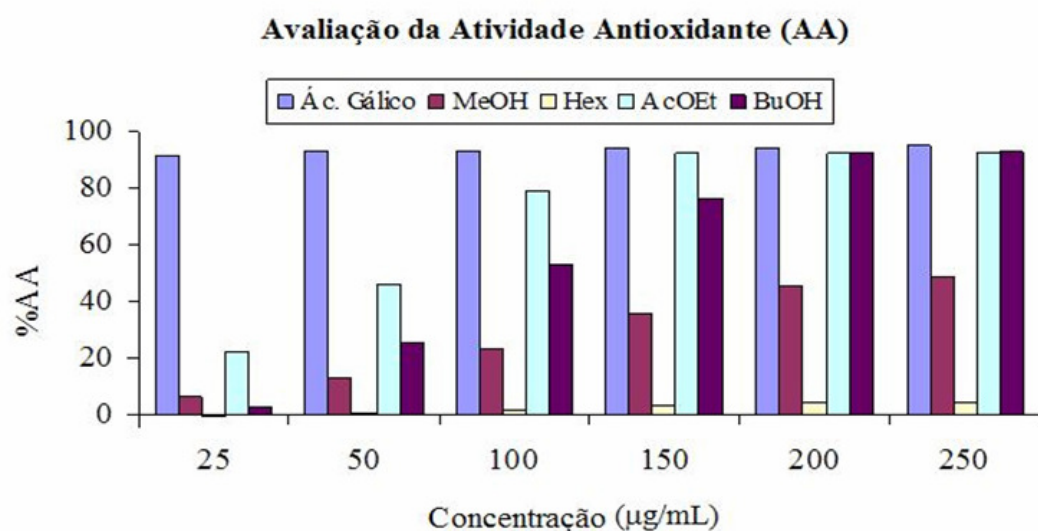
positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ ) foram realizadas a 515 nm, no 1°, 15°, 30° e 60° minutos. Para o teste em branco, foi utilizada 2,7 mL de solução de DPPH e 0,3 mL MeOH.

Na Tabela 3 encontram-se sumarizadas a porcentagem da Atividade antioxidante expressa no consumo do radical livre (CDL) DPPH da fase hexânica, fase metanólica, fase acetato de etila e ácido gálico (padrão).

**Tabela 3.** % CDL das fases obtidas do extrato MeOH das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Espécie	[ ] $\mu\text{g.L}^{-1}$	% CDL			
		Padrão		Fase	
		Ac. gálico	Hexânica	MeOH	AcOEt
<i>C. pyramidalis</i>	50	92.85	0.73	13.4	46.34
	100	92.92	1.58	23.12	79.27
	150	94.54	3.62	35.91	92.12
	200	94.81	4.27	45.56	92.47
	250	95.03	4.45	48.82	92.75

Na Figura 4 esta o gráfico em colunas da atividade antioxidante do controle positivo (ác. gálico) e das fases orgânicas testadas.



**Figura 4.** AA do padrão e das fases orgânicas das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.



Observa-se que aquele com maior atividade antioxidante foi o extrato particionado em AcOEt seguido do BuOH em relação aos demais extratos. Por outro lado, o extrato particionado em MeOH apresentou atividade antioxidante de aproximadamente 50% na concentração de 200 µg/mL.

Mediante os resultados obtidos no teste de atividade antioxidante, o extrato metanólico, pela moderada atividade, foi inicialmente submetido à CC para isolamento de seus constituintes.

#### 4.4 - Isolamento dos constituintes da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*

A fase hexânica da extração hidroalcoólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis* (1,29 g; 1,66 %), obtido da extração líquido-líquido do extrato metanólico bruto, foi submetido à análise em CCDC, ao qual foi revelada sob luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm) de modo a escolher os melhores sistemas de solventes. Em seguida 1,10g da fase hexânica foi submetido à CC sob sílica gel 60. A coluna foi compactada com hexano e eluída em hexano e misturas binárias hexano:acetato de etila em gradiente de polaridade crescente. A CC da fase hexânico das cascas das raízes de *C. pyramidalis* resultou em dezesseis frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes (Rf), restando no final sete frações majoritárias (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado das frações coletadas da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCREH 1-2	Hexano	192,4 mg
CPCREH 3-4	Hexano:Acetato de etila (9:1)	124,3 mg
CPCREH 5-8	Hexano:Acetato de etila (9:1)	252,7 mg
CPCREH 9	Hexano:Acetato de etila (7:3)	122,0 mg
CPCREH 10-12	Hexano:Acetato de etila (1:1)	204,1 mg
CPCREH 13-14	Hexano:Acetato de etila (3:7)	31,1 mg
CPCREH 15-16	Acetato de etila	56,4 mg

A partir do fracionamento deste extrato, foi possível isolar as substâncias designadas como **CPCR1** (CPCREH 3-4) e **CPCR2** (CPCREH 5-8), ambas na forma de cristais brancos e positivos ao teste de Lieberman-Burchard.

A fração CPCREH 10-12 (204,1 mg) [Tabela 4, pág. 32] foi submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20, eluída de modo isocrático e empregando mistura de solventes constituído de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1). A CC da fração CPCREH 10-12 resultou em outras vinte frações. Análise das destas frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final duas frações majoritárias (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultado das frações coletadas da subfração CPCREH 10-12 obtida da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCR FH 1-15	Diclorometano:Metanol (1:1).	185,3 mg
CPCR FH 16-20	Diclorometano:Metanol (1:1).	18,8 mg

A partir do fracionamento de CPCREH 10-12, foi possível isolar a substância designada como **CPCR3** (CPCR FH 16-20) na forma de sólido amorfo amarelo.

A fração CPCR FH 1-15 (185,3 mg) [Tabela 5] apresentava ainda dois spots e logo foi eluída novamente em gel de Sephadex LH-20 e eluída de modo isocrático empregando uma mistura de solventes constituído de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1). Porém não foi possível isolar as substâncias por CC. Portanto, utilizou-se CCDP e assim isolou-se a substância designada de **CPCR4** também na forma de sólido amorfo amarelo.

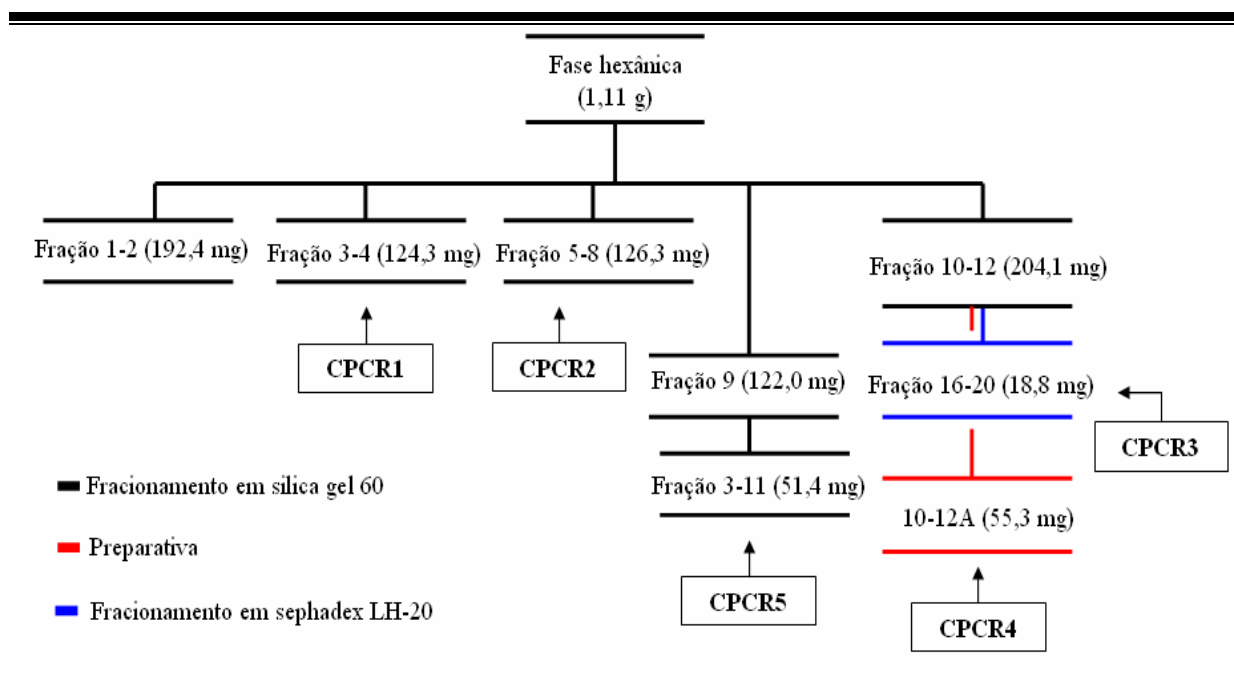
A fração CPCREH 9 (122,0 mg) [Tabela 4, pág. 32] foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi compactada com hexano e eluída com hexano e misturas binárias hexano:acetato de etila em gradiente de polaridade crescente. A CC da fração CPCREH 9 resultou em outras trinta e sete frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final cinco frações majoritárias (Tabela 6) [pág. 34].

**Tabela 6.** Resultado das frações coletadas da subfração CPCREH 9 obtida da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFH 1-2	Hexano:Acetato de etila (9:1)	28,9 mg
CPCRFH 3-11	Hexano:Acetato de etila (8:2)	51,4 mg
CPCRFH 12-26	Hexano:Acetato de etila (7:3)	10,9 mg
CPCRFH 27-36	Hexano:Acetato de etila (1:1)	16,5 mg
CPCRFH 37	Acetato de etila	16,8 mg

A partir do fracionamento de CPCREH 9 [Tabela 4, pág. 32], foi possível isolar a substância designada como **CPCR5** (CPCRFH 3-11) na forma de óleo viscoso laranja.

O esquema dois sumariza os procedimentos adotados para purificação da fase hexânica. Deste modo, foi possível isolar as substâncias designadas como **CPCR1**, **CPCR2**, **CPCR3**, **CPCR4** e **CPCR5** (Esquema 2).



**Esquema 2.** Fracionamento da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Com o tratamento cromatográfico da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis* foi possível isolar **CPCR1** (14,0 mg), na forma de sólido amorfo branco, após recristalização com hexano da fração CPCREH 3-4 [Tabela 4, pág. 32]. Também através da

recristalização da fração CPCREH 5-8 [Tabela 4, pág. 32] com hexano foi possível isolar **CPCR2** (27,0 mg), também na forma de cristais branco.

Análise da fração CPCREH 10-12 (204,1 mg) [Tabela 4, pág. 32] em CCDC apresentou dois spots. Assim, esta fração foi eluída em Sephadex (MeOH:CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, 1:1), obtendo-se a fração CPCRFH 16-20 (18,8 mg) [Tabela 5, pág. 33], denominada **CPCR3**. O outro componente da mistura não foi possível isolar por coluna cromatográfica. Portanto, foi utilizada CCDP e assim isolou-se a substância designada de **CPCR4** na forma de sólido amorfo amarelado.

Análise de RMN <sup>1</sup>H da fração CPCREH 9 [Tabela 4, pág. 32] (122,0 mg) indicou presença de mistura, porém, após submeter a fração CPCREH 9 em CC sob sílica gel 60, eluída com hexano e misturas binárias hexano:acetato de etila em gradiente de polaridade crescente. Obteve-se na fração CPCRFH 3-11, na forma de um gel amarelo, a substância denominada **CPCR5**. Análise de RMN <sup>1</sup>H mostrou sinais idênticos ao RMN <sup>1</sup>H de CPCREH 9. Com isso, após análise de CG/EM foi possível observar que a mesma trata-se de uma mistura de alquil fenóis, onde seu esqueleto básico e tamanho da cadeia alquílica ainda estão em fase de elucidção.

#### **4.5 - Isolamento dos constituintes da fase metanólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis***

A fase metanólica da extração hidroalcoólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis* (23,92 g; 30,72%), obtido da extração líquido-líquido do extrato metanólico bruto, foi submetido à análise em CCDC, o qual foi revelado sob luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm). Em seguida 22,95 g da fase metanólica foi submetido à CC de adsorção utilizando sílica gel 60. A coluna foi compactada com clorofórmio e eluída com clorofórmio e misturas binárias clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade crescente. A CC da fase metanólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis* resultou em noventa e oito frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final nove frações majoritárias (Tabela 7) [pág. 36].

**Tabela 7.** Resultado das frações coletadas da fase metanólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCREM 1-10	Clorofórmio	186,6 mg
CPCREM 11-19	Clorofórmio	92,9 mg
CPCREM 20-33	Clorofórmio	144,3 mg
CPCREM 34-36	Clorofórmio:Metanol (9:1)	4,45 g
CPCREM 37-40	Clorofórmio:Metanol (9:1)	2,34 g
CPCREM 41-92	Clorofórmio:Metanol (9:1)	11,88 g
CPCREM 93-96	Clorofórmio:Metanol (1:1)	680,4 mg
CPCREM 97	Metanol	1,07 g
CPCREM 98	Água	180,1 mg

A fração CPCREM 20-33 (144,3 mg) [Tabela 7] foi submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20, eluída de modo isocrático e empregando sistema de solventes constituído de mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1). A CC da fração CPCREM 20-33 resultou em outras quinze frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final duas frações majoritárias (Tabela 8)

**Tabela 8.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCREM 20-33 [Tabela 7].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1-5	Diclorometano:Metanol (1:1)	38,6 mg
CPCRFM 6-15	Diclorometano:Metanol (1:1)	74,3 mg

A partir do fracionamento de CPCREM 20-33 [Tabela 7], foi possível isolar a substância designada como **CPCR6** (CPCRFM 1-5), na forma de sólido amorfo amarelado.

A fração CPCREM 34-36 (4,45 g) [Tabela 7] foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi compactada em clorofórmio e eluída com clorofórmio e misturas binárias clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade crescente. A CC da fração CPCREM 34-36 resultou em outras vinte frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final seis frações majoritárias (Tabela 9) [pág. 37].

**Tabela 9.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCREM 34-36 [Tabela 7, pág. 36].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1-8	Clorofórmio	22,5 mg
CPCRFM 9	Clorofórmio:Metanol (95:5)	3,35 g
CPCRFM 10-11	Clorofórmio:Metanol (95:5)	877,4 mg
CPCRFM 12-15	Clorofórmio:Metanol (9:1)	281,6 mg
CPCRFM 16-19	Clorofórmio:Metanol (9:1)	41,3 mg
CPCRFM 20	Metanol	18,5 mg

Com o tratamento cromatográfico da fração CPCREM 34-36 [Tabela 7, pág. 36] não foi possível isolar nenhuma substância. Logo, a fração CPCRFM 9 (3,35 g) [Tabela 9] foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi compactada em clorofórmio e eluída com clorofórmio e misturas binárias clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade crescente. A CC da fração CPCRFM 9 [Tabela 9] resultou em outras treze frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final cinco frações majoritárias (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 9 [Tabela 9].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1	Clorofórmio	7,5 mg
CPCRFM 2	Clorofórmio:Metanol (98:2)	837,4 mg
CPCRFM 3-8	Clorofórmio:Metanol (98:2)	2,07 g
CPCRFM 9-10	Clorofórmio:Metanol (97:3)	126,1 mg
CPCRFM 11-13	Metanol	86,2 mg

Em seguida, a fração CPCRFM 3-8 (2,07 g) [Tabela 10] foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi compactada em clorofórmio e eluída com clorofórmio e misturas binárias clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade crescente. A CC da fração CPCRFM 3-8 resultou em outras vinte frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final sete frações majoritárias (Tabela 11) [pág. 38].

**Tabela 11.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 3-8 [Tabela 10, pág. 37].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1-2	Clorofórmio	8,0 mg
CPCRFM 3-5	Clorofórmio:Metanol (99:1)	482,7 mg
CPCRFM 6-10	Clorofórmio:Metanol (99:1)	39,8 mg
CPCRFM 11	Clorofórmio:Metanol (98:2)	498,8 mg
CPCRFM 12-15	Clorofórmio:Metanol (98:2)	550,9 mg
CPCRFM 16-19	Clorofórmio:Metanol (97:3)	42,0 mg
CPCRFM 20	Metanol	25,0 mg

Posteriormente, a fração CPCRFM 16-19 (42,0 mg) [Tabela 11] foi submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20, eluída de modo isocrático e empregando um sistema de solventes constituído de mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1). A CC da fração CPCRFM 16-19 [Tabela 11] resultou em outras quinze frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final três frações majoritárias (Tabela 12).

**Tabela 12.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 16-19 [Tabela 11].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1-5	Diclorometano:Metanol (1:1)	5,1 mg
CPCRFM 6-9	Diclorometano:Metanol (1:1)	4,7 mg
CPCRFM 10-15	Diclorometano:Metanol (1:1)	31,2 mg

A fração CPCRFM 10-15 (31,2 mg) [Tabela 12] foi submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20, eluída de modo isocrático e empregando MeOH. A CC da fração CPCRFM 10-15 resultou em outras vinte e uma frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final quatro frações majoritárias (Tabela 13) [pág. 39].

**Tabela 13.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 10-15 [Tabela 12, pág. 38].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1-7	Metanol	7,5 mg
CPCRFM 8-9	Metanol	3,2 mg
CPCRFM 10-16	Metanol	10,7 mg
CPCRFM 17-21	Metanol	4,7 mg

A partir do fracionamento da fração CPCRFM 10-15 [Tabela 12, pág. 38], foi possível isolar a substância designada como **CPCR7** (CPCRFM 1-7) [Tabela 13] e **CPCR8** (CPCRFM 17-21) [Tabela 13], na forma de sólido amorfo amarelo e sólido amorfo marrom, respectivamente.

A fração CPCRFM 10-11 (877,4 mg) [Tabela 9, pág. 37], obtida da fração CPCREM 34-36 [Tabela 7, pág. 36], foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi compactada com clorofórmio e eluída com clorofórmio e misturas binárias clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade crescente. A CC da fração CPCRFM 10-11 [Tabela 9, pág. 37] resultou em outras vinte e oito frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final nove frações majoritárias (Tabela 14).

**Tabela 14.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 10-11 [Tabela 9, pág. 37].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1	Clorofórmio:Metanol (95:5)	7,0 mg
CPCRFM 2-4	Clorofórmio:Metanol (95:5)	584,0 mg
CPCRFM 5	Clorofórmio:Metanol (95:5)	24,2 mg
CPCRFM 6-8	Clorofórmio:Metanol (95:5)	53,4 mg
CPCRFM 9-11	Clorofórmio:Metanol (95:5)	106,1 mg
CPCRFM 12-14	Clorofórmio:Metanol (95:5)	58,8 mg
CPCRFM 15-18	Clorofórmio:Metanol (95:5)	22,5 mg
CPCRFM 19-22	Clorofórmio:Metanol (9:1)	5,1 mg
CPCRFM 23-28	Metanol	18,0 mg



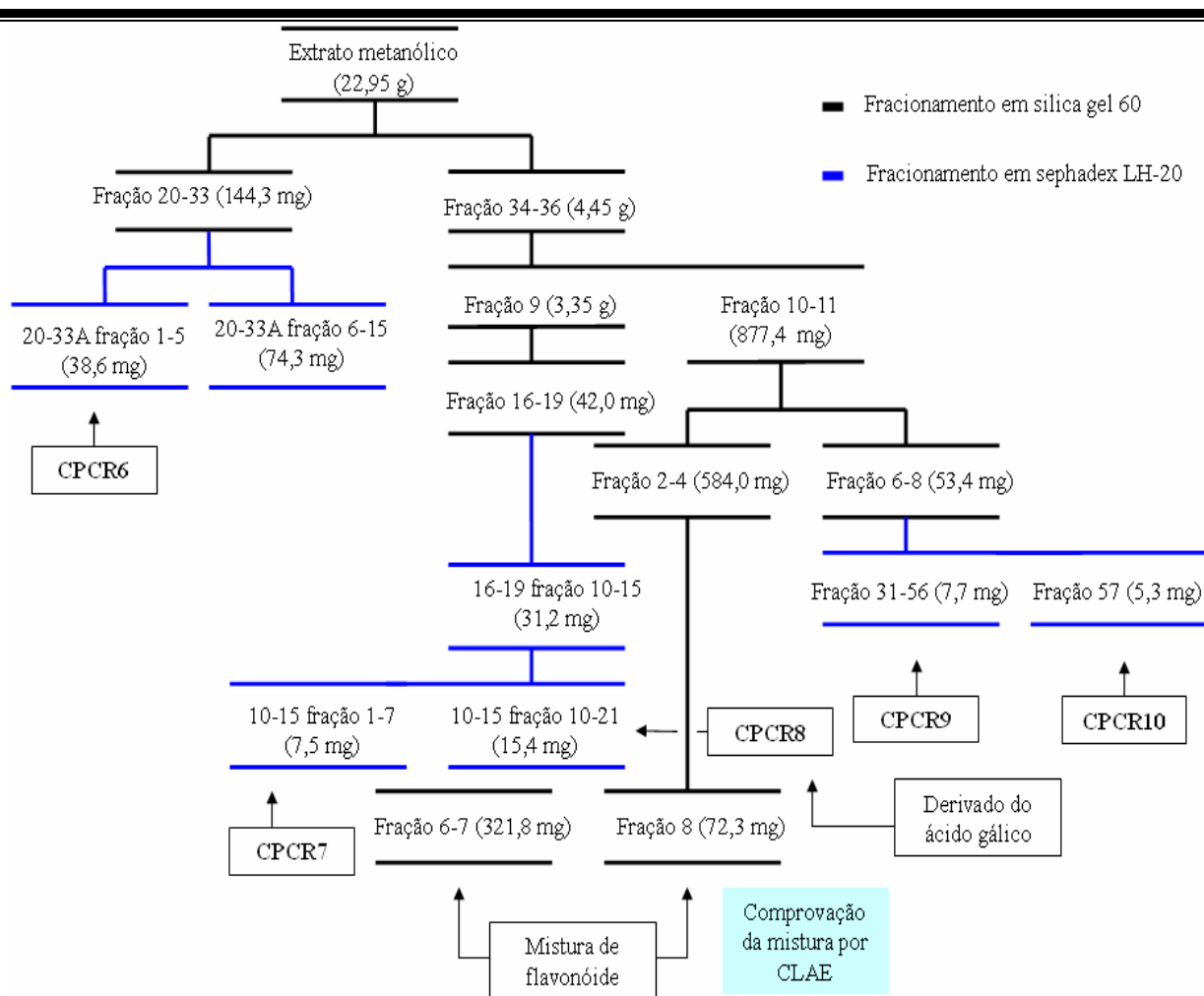
A fração CPCRFM 6-8 (53,4 mg) [Tabela 14, pág. 39] foi submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20, isocrático e empregando MeOH. A CC da fração CPCRFM 6-8 [Tabela 14, pág. 39] resultou em cinquenta e sete frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final oito frações majoritárias (Tabela 15).

**Tabela 15.** Resultado das frações coletadas pelo processo cromatográfico da subfração CPCRFM 6-8 [Tabela 14, pág. 39].

Fração	Sistema de solvente	Massa
CPCRFM 1	Metanol	21,7 mg
CPCRFM 2-5	Metanol	10,4 mg
CPCRFM 6-11	Metanol	4,4 mg
CPCRFM 12-18	Metanol	5,1 mg
CPCRFM 19-25	Metanol	9,1 mg
CPCRFM 26-30	Metanol	2,7 mg
CPCRFM 31-56	Metanol	7,7 mg
CPCRFM 57	Metanol	5,3 mg

A partir do fracionamento de CPCRFM 10-11 [Tabela 9, pág. 37], foi possível isolar a substância designada como **CPCR9** (CPCRFM 31-56) [Tabela 15] e **CPCR10** (CPCRFM 57) [Tabela 15], na forma de sólido amorfo vermelho e sólido amorfo amarelo, respectivamente.

O esquema três sumariza os procedimentos adotados para purificação da fase metanólica. Deste modo, foi possível isolar as substâncias designadas como **CPCR6**, **CPCR7**, **CPCR8**, **CPCR9** e **CPCR10** (Esquema 3) [pág. 41].



**Esquema 3.** Fracionamento da fase metanólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

A substância designada **CPCR6** (38,6 mg) foi isolada da fração CPCREM 20-33 (144,3 mg) [Tabela 7, pág. 36], após CC sob gel de Sephadex (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1).

As substâncias designadas **CPCR7** (7,5 mg) e **CPCR8** (15,4 mg), foram oriundas da fração CPCREM 34-36 (4,45 g) [Tabela 7, pág. 36]. A separação em CC da fração CPCREM 34-36 sob sílica gel 60, forneceu a fração CPCRFM 9 (3,35 g) [Tabela 9, pág. 37] do qual foi novamente submetida à CC sob sílica gel 60, fornecendo a fração CPCRFM 16-19 (42,0 mg) [Tabela 11, pág. 38]. Em seguida, a mesma foi submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1), obtendo-se a fração CPCRFM 10-15 (31,2 mg) [Tabela 12, pág. 38]. Por último, esta fração foi novamente submetida à CC sob gel de Sephadex LH-20 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1), do qual obteve-se as substâncias designadas **CPCR7** e **CPCR8**.

As substâncias designadas **CPCR9** (7,7 mg) e **CPCR10** (5,3 mg), também foram oriundas da fração CPCREM 34-36 (4,45 g) [Tabela 7, pág. 36]. Porém, o fracionamento de CPCREM 34-36, também forneceu a fração CPCRFM 10-11 (877,4 mg) [Tabela 9, pág. 37] do qual foi submetida à CC sob sílica gel, fornecendo a fração CPCRFM 6-8 (53,4 mg) [Tabela 14, pág. 39]. Em seguida, a mesma foi submetida à CC sob permeação em gel de Sephadex (MeOH, 100%), ao qual obteve-se as substâncias designadas **CPCR9** e **CPCR10**. A análise de RMN de  $^1\text{H}$  de **CPCR9** e **CPCR10** revelou presença de um flavonóide possivelmente esterificado com derivado do ácido *para*-hidroxicinâmico na primeira e derivado do ácido gálico na segunda, porém, devido à pequena massa obtida as mesmas ainda não tiveram suas estruturas concluídas.

#### 4.6 - Elucidação estrutural

As análises espectroscópicas foram realizadas com as substâncias isoladas da fase hexânica e fase metanólica das cascas das raízes de *C. pyramidalis* cujos dados referente a cada uma encontra-se descritos a seguir.

#### 4.6.1 - Identificação de CPCR1 (Lupeol)

A substância **CPCR1**, sólido cristalino branco, isolada da fração CPCREH 3-4 [Tabela 4, pág. 32] da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis*. Sua análise por CCDC após borrifamento com reagente de Lieberman-Burchard e aquecimento, apresentou coloração rosa indicando a presença de substância com núcleo esteroidal ou triterpênico. Análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram suficientes para elucidação de **CPCR1**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 5) de **CPCR1** apresentou sinais para sete singletos múltiplos na região que compreende hidrogêneos de natureza alquílica ( $\delta$  0,5 a  $\delta$  2,0), um multipletto em  $\delta$  2,5 (m) característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico e dois dubletos, um em  $\delta$  4,7 (d,  $J=2,2$  Hz) outro, 4,57 (d,  $J=2,2$  Hz) de hidrogênios olefinicos geminais. Estes sinais são indicativos de triterpenos pentacíclicos.

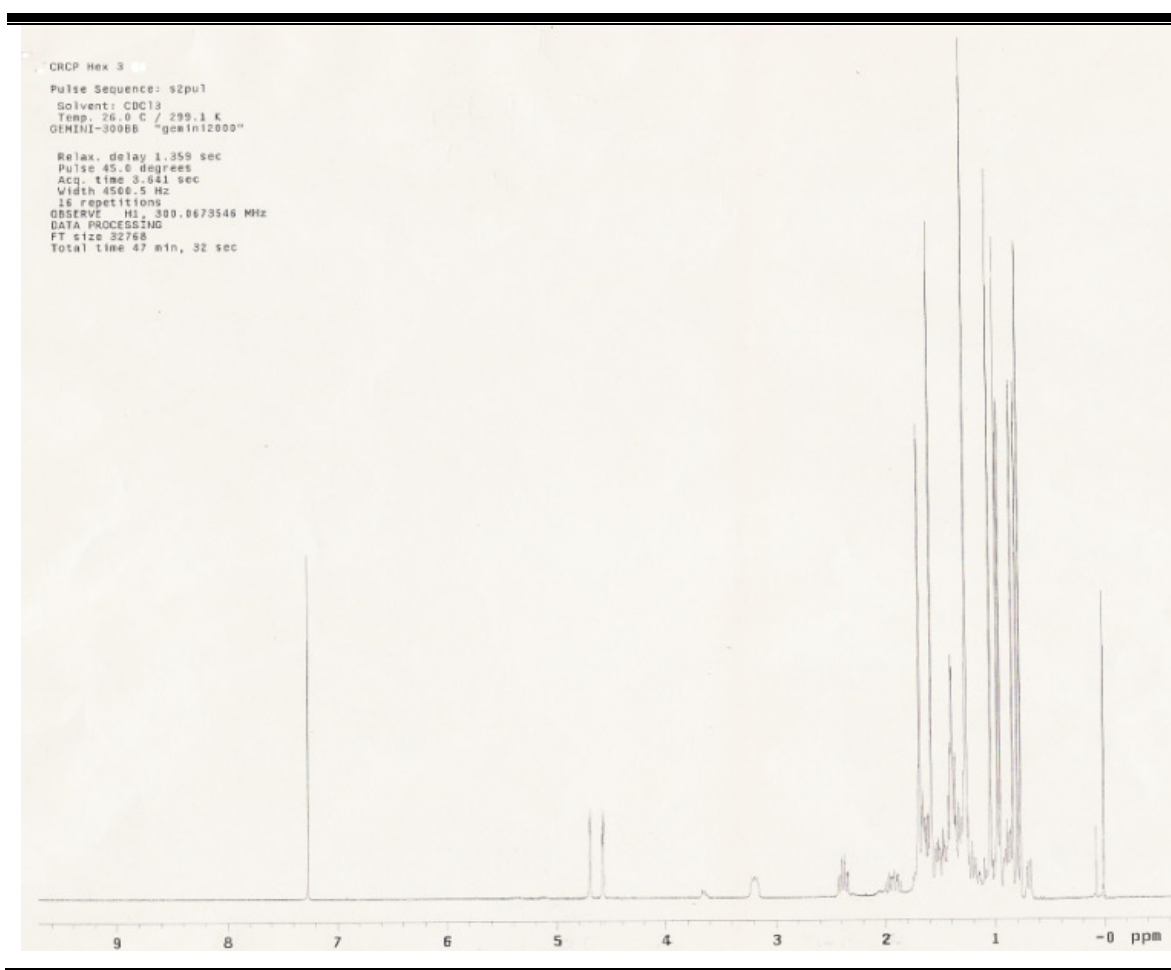
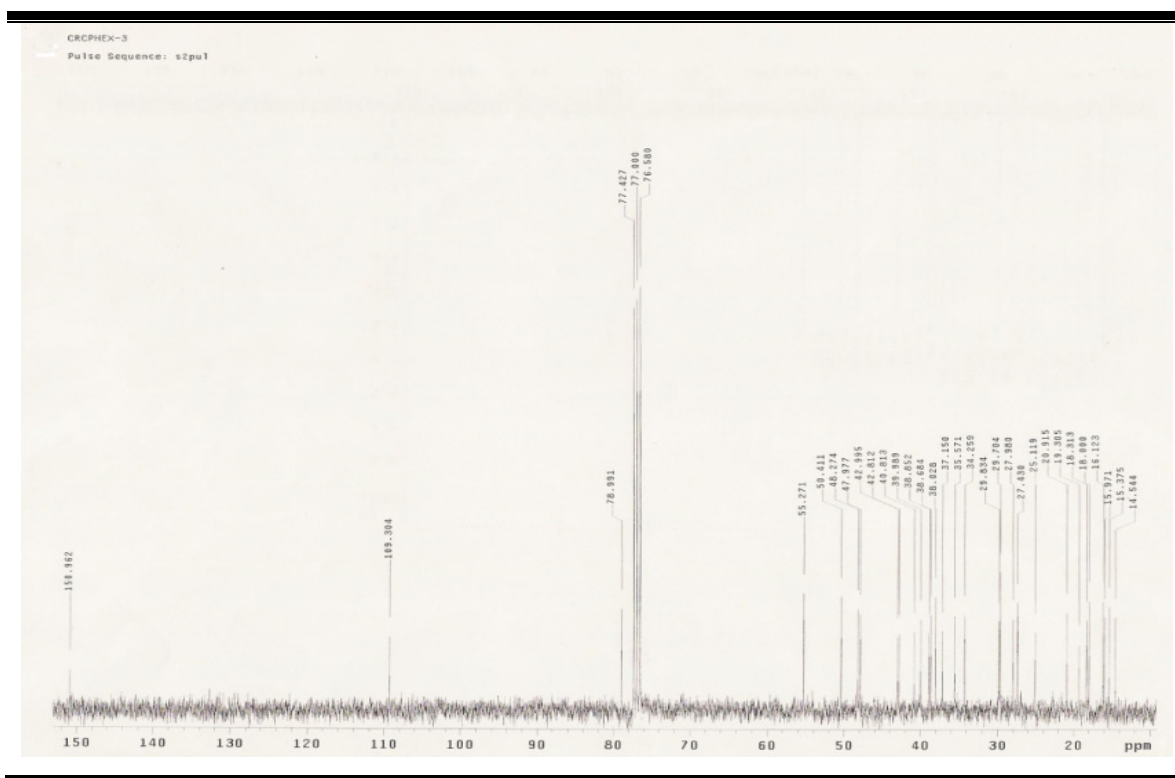


Figura 5. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de **CPCR1**.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 6) apresenta 30 sinais ao qual sua maioria esta localizada entre  $\delta$  14,0 a  $\delta$  56,0. A conclusão da estrutura se deu através da comparação dos dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994), principalmente dos sinais em  $\delta$  78,9 (C-3) do carbono carbinólico;  $\delta$  109,3 (C-29) e  $\delta$  150,9 (C-20), ambos pertencentes aos carbonos olefinicos e característico de esqueleto triterpênico do tipo lupenico (Tabela 16) [pág. 45].



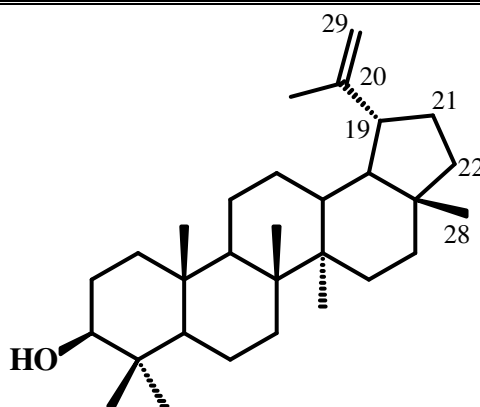
**Figura 6.** RMN  $^{13}\text{C}$  - BB ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de **CPCR1**.

**Tabela 16.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **CPCR1** e da literatura do lupeol.

N°	$^{13}\text{C}$ CPCR1	lupeol $^{13}\text{C}^*$	N°	$^{13}\text{C}$ CPCR1	lupeol $^{13}\text{C}^*$
1	38,7	38,7	16	35,6	35,5
2	27,4	27,4	17	42,8	43,0
3	79,0	78,9	18	48,3	48,2
4	38,8	38,8	19	48,0	47,9
5	55,3	55,3	20	150,9	150,9
6	18,3	18,3	21	29,7	29,8
7	34,2	34,2	22	40,0	40,0
8	40,8	40,8	23	28,0	28,0
9	50,4	50,4	24	15,4	15,4
10	37,1	37,1	25	16,1	16,1
11	20,9	20,9	26	16,0	15,9
12	25,1	25,1	27	14,5	14,5
13	38,0	38,0	28	18,0	18,0
14	43,0	42,8	29	109,3	109,3
15	27,4	27,4	30	19,3	19,3

\*(MAHATO &amp; KUNDU, 1994).

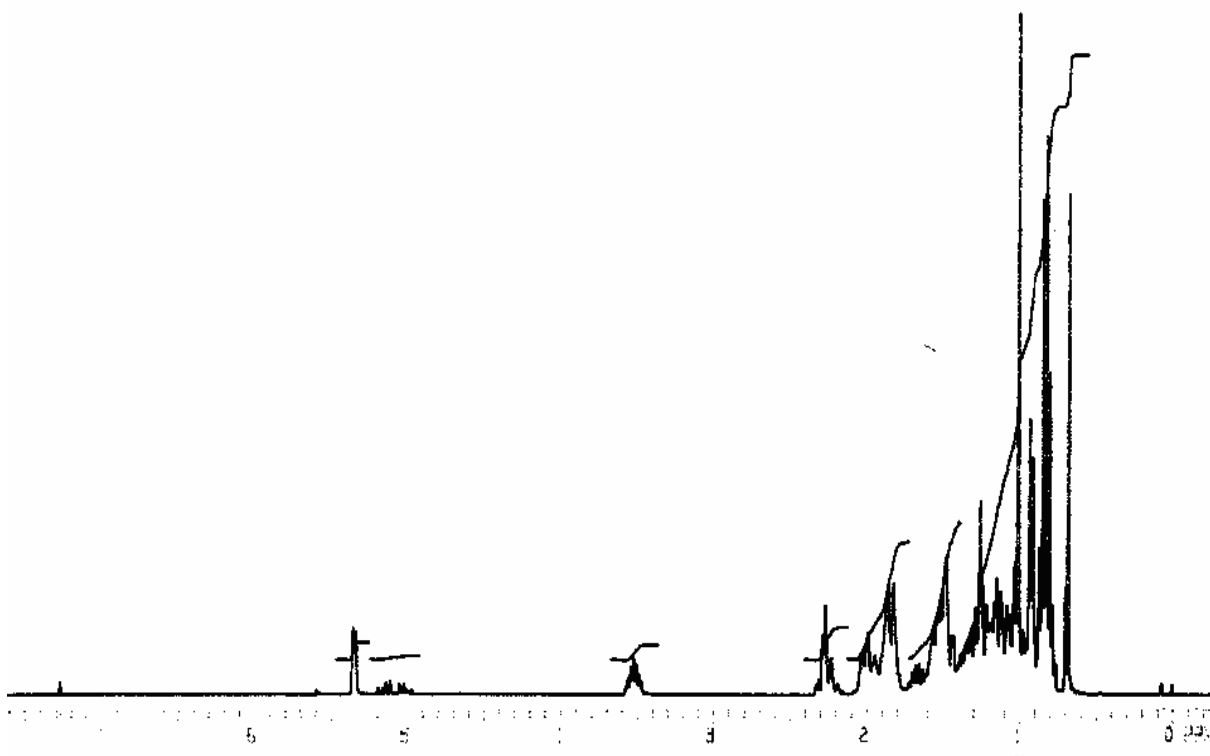
Através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura (Tabela 15) inferiu-se que **CPCR1** tratava-se do lupeol (Figura 7), um triterpeno bastante comum em plantas.

**Figura 7.** Lupeol, triterpeno isolado das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.

#### 4.6.2 - Identificação de CPCR2 (Sitosterol e Estigmasterol)

A substância **CPCR2**, sólido cristalino branco, isolada da fração CPCREH 5-8 [Tabela 4, pág. 32] da fase hexânica das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis*. Sua análise por CCDC após borrifamento com reagente de Lieberman-Burchard e aquecimento, apresentou coloração rosa indicando a presença de substância com núcleo esteróidal ou triterpênico. Análise por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **CPCR2** foram suficientes para determinar com clareza que se tratava de uma mistura de esteróides pertencente à classe do colestano.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 8) apresenta vários sinais na forma de singletos na região entre  $\delta$  0,8 a  $\delta$  2,4 característicos de hidrogênios alquílicos. Outro sinal em  $\delta$  3,5 (m,  $J=4,8\text{Hz}$  e  $11,2\text{Hz}$ ) que revelou a presença do hidrogênio carbinólico (H-3), bem como o dubleto em  $\delta$  5,3 (d,  $J=5,3\text{Hz}$ ) de hidrogênio olefínico (H-6). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriu que **CPCR2** tratava-se de uma mistura de sitosterol e estigmasterol ao exibir, além dos sinais acima, um padrão de multiplicidade e deslocamentos químicos através dos duplos dubletos em  $\delta$  5,17 (dd,  $J=15,2\text{Hz}$  e  $8,6\text{Hz}$ ) e  $\delta$  5,03 (dd,  $J=15,2\text{Hz}$ ) condizentes com os hidrogênios H-23 e H-22 da estrutura do estigmasterol, respectivamente.



**Figura 8.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de **CPCR2**.

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 9) confirmou a presença dos carbonos olefínicos em  $\delta$  140,7 (C-5) e  $\delta$  121,7 (C-6) da ligação dupla trissubstituída do núcleo sitosterol. Outros sinais, também de carbonos olefínicos, correspondente à ligação dupla dissubstituída da cadeia lateral do estigmasterol em  $\delta$  138,3 (C-22) e  $\delta$  129,2 (C-23). O sinal em  $\delta$  71,7 foi atribuído ao C-3 carbinólico. Logo, em **CPCR2** está presente uma mistura de sitosterol e estigmasterol (Tabela 17) [pág. 48], esteróides de núcleo colestano e predominância do sitosterol, substância muito freqüente em plantas e animais (Figura 10).

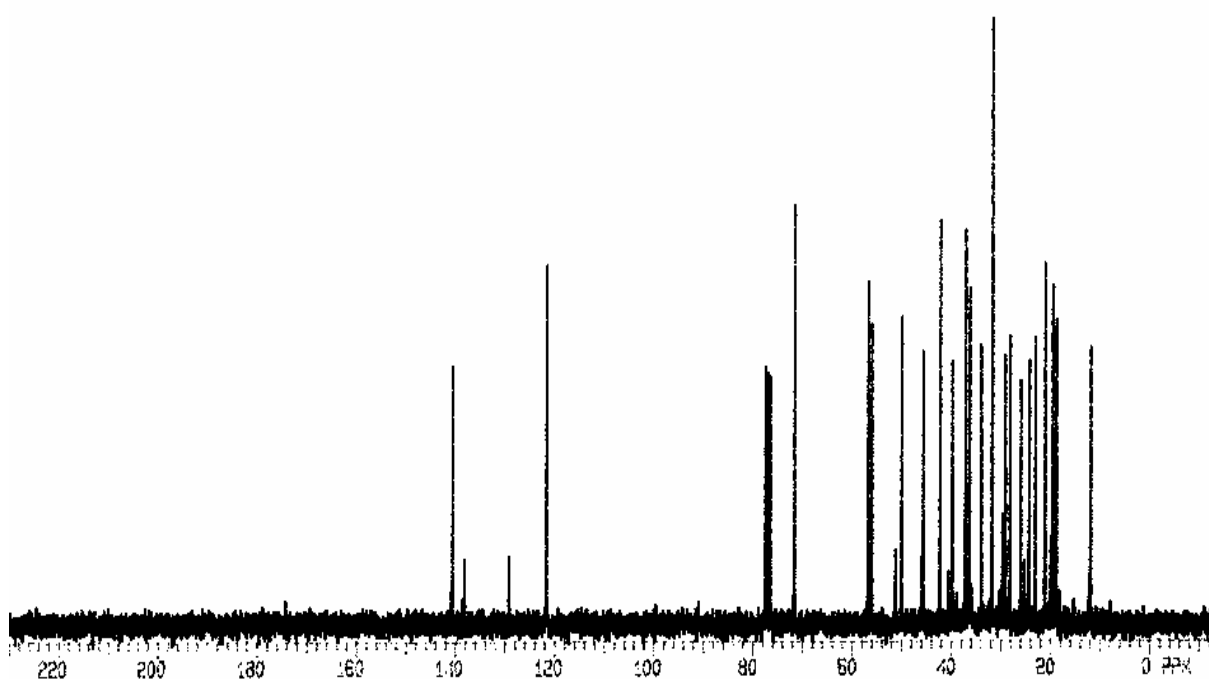


Figura 9. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) de CPCR2.

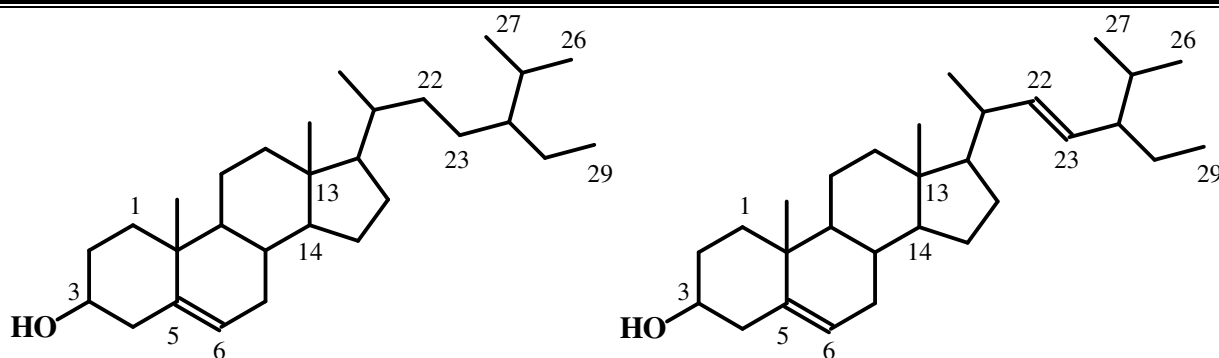


Figura 10. Esteróides isolados, em mistura, das cascas das raízes de *C. pyramidalis*.



**Tabela 17.** Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da mistura de esteróides.

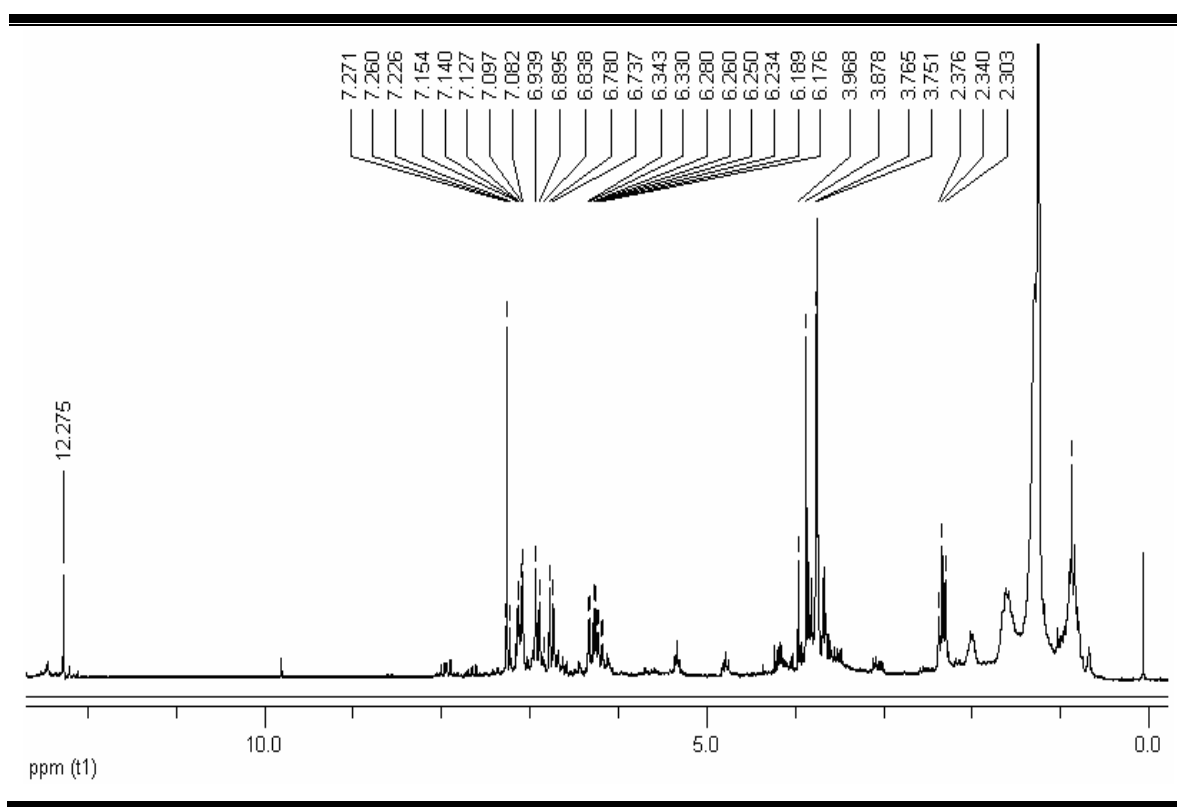
Nº do C	CPCR2	sitosterol*	CPCR2	estigmasterol*
1	31,5	31,6	31,5	31,6
2	26,0	26,1	26,0	26,0
3	71,8	71,3	71,8	72,0
4	42,2	41,5	41,5	42,5
5	140,6	140,2	140,6	140,8
6	121,7	121,6	121,7	121,8
7	31,5	31,7	32,0	32,1
8	31,8	31,9	32,5	32,2
9	50,0	50,1	50,0	50,5
10	36,4	36,7	36,7	36,5
11	21,0	20,8	21,0	21,2
12	39,7	39,5	39,7	40,0
13	42,3	42,5	42,0	42,2
14	56,7	56,6	56,9	57,1
15	19,8	20,0	24,2	24,5
16	28,2	28,5	29,0	28,9
17	56,0	55,8	56,7	56,3
18	11,8	11,6	12,0	12,2
19	19,4	19,2	19,3	19,5
20	39,8	40,1	39,8	40,4
21	19,8	20,4	21,2	21,4
22	36,5	36,5	137,9	138,3
23	28,2	28,2	129,9	129,7
24	51,2	51,0	51,2	51,5
25	31,8	32,0	31,8	32,2
26	19,0	19,0	20,9	21,2
27	19,4	21,2	19,3	19,2
28	24,7	25,4	25,9	25,4
29	12,0	12,0	11,9	12,2

\*(GOAD, 1991)

#### 4.6.3 - Identificação de CPCR3 (Acacetina)

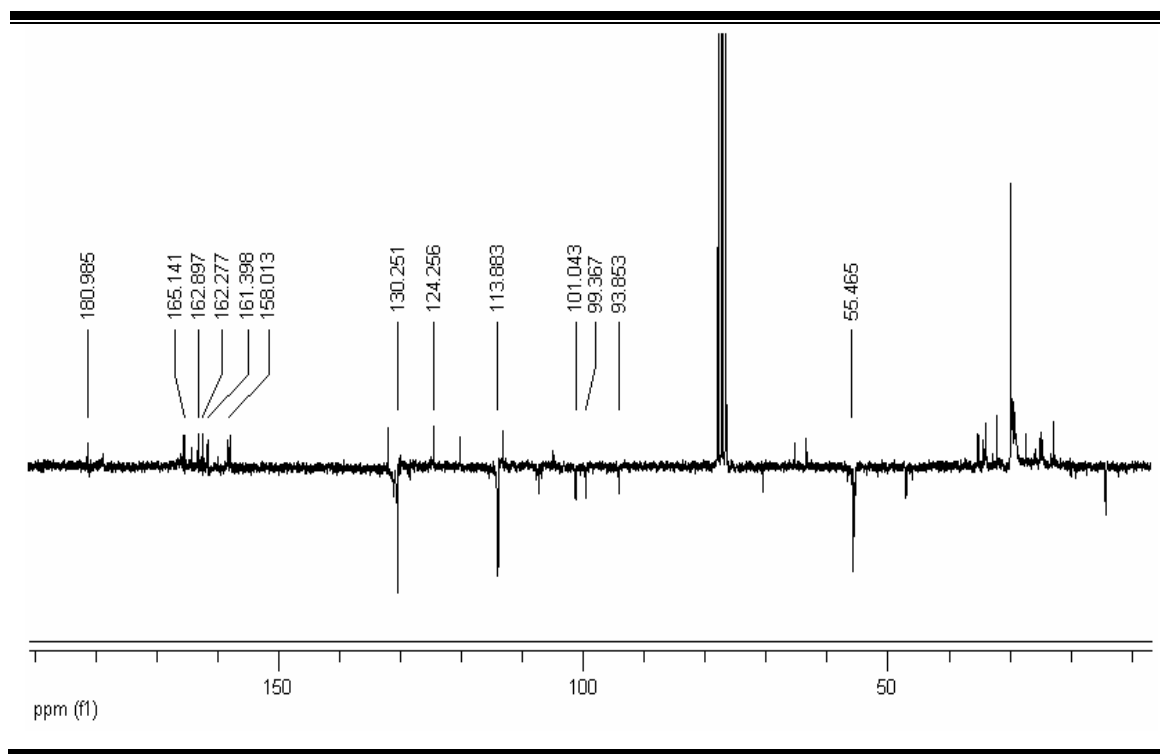
A substância **CPCR3**, sólido amorfo amarelo, isolada da fração CPCREH 10-12 [Tabela 4, pág. 32] obtida da fase hexânica das cascas das raízes de *C. pyramidalis* e sua estrutura foi elucidada a partir de análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - APT, HMQC e HMBC juntamente com dados da literatura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **CPCR3** (Figura 11) apresentam sinais que compreende a região de  $\delta$  6,0 a  $\delta$  7,5. Com isso, foi possível determinar a natureza da estrutura como sendo de origem aromática. Porém, pela integração do RMN de  $^1\text{H}$  revela que **CPCR3** não encontrava-se totalmente pura. Por outro lado, o sinal em  $\delta$  12,27 característico de hidroxila quelada na posição cinco integrada para um hidrogênio foi sugestivo da presença de núcleo flavonóide com OH no C-5 para a molécula em análise. A presença de singlete em  $\delta$  3,73. Este sinal é indicativo de grupo metoxilico ligado a carbono  $\text{sp}^2$  de núcleo aromático.



**Figura 11.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) de **CPCR3**.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT (Figura 12) foi possível observar o grupo metoxílico em  $\delta$  55,4. Além de vários sinais entre  $\delta$  90,0 a  $\delta$  165,0 e carbonila em  $\delta$  180,9. No espectro também foi observada a presença de sinais em  $\delta$  113,8 e  $\delta$  130,2 indicativo de anel aromático 1,4 dissustituído, possivelmente pertencente ao anel B de flavonóide.



**Figura 12.** RMN  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz) de **CPC3**.

De acordo com os dados da literatura, juntamente com a análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - APT de **CPC3** inferiu-se que na mistura há presença majoritária da substância 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona, conhecida como acacetina (Figura 13) [pág. 51].

Kaneta e colaboradores, estudando 12 gêneros de leguminosas isolaram acacetina glicosíada em 1980. Por outro lado, em 2000 Tian e McLaughlin também isolaram acacetina da família Leguminosae, porém, do extrato etanólico de *Robinia pseudoacacia*. Lan e colaboradores também isolaram acacetina na forma livre na espécie *Eremosparton songoricum* (LAN *et al*, 2005) e *Robinia pseudoacacia* (TIAN & MCLAUGHLIN, 2000) Ambas da família Leguminosae.

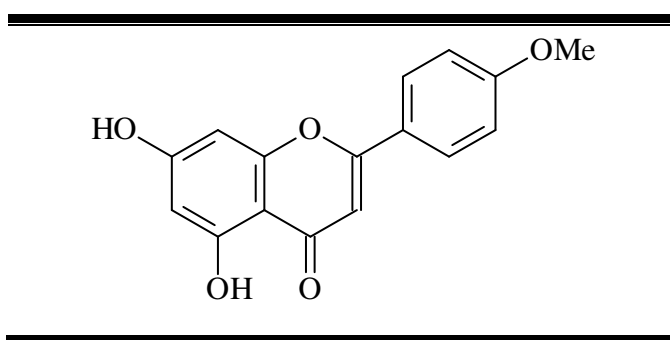
Além da família Leguminosae, na literatura há relato da presença deste flavonóide em *Cirsium rhinoceros*, pertencente à família Compositae. Sendo isolado do extrato hexânico de

suas folhas e a comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - APT de **CPCR3** com os dados da literatura encontram-se na Tabela 18 (YIM *et al*, 2003).

**Tabela 18.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **CPCR3** e da acetina.

Posição	$^1\text{H}$ CPCR3	$^{13}\text{C}$ CPCR3	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$
2	-	162,2	-	163,9
3	6,31 (s)	101,0	6,95 (s)	103,9
4	-	180,9	-	182,3
5	-	158,0	-	157,9
6	6,26 (d, $J=2,2$ Hz)	99,3	6,78 (d, $J=2,5$ Hz)	99,4
7	-	165,1	-	164,8
8	6,23 (d, $J=2,2$ Hz)	93,8	6,84 (d, $J=2,5$ Hz)	94,3
9	-	161,3	-	162,2
10	-	104,6	-	104,4
1'	-	124,2	-	123,5
2' - 6'	7,09 (d, $J=8,8$ Hz)	130,2	7,96 (d, $J=9,0$ Hz)	128,4
3' - 5'	6,89 (d, $J=8,8$ Hz)	113,8	7,10 (d, $J=9,0$ Hz)	114,8
4'	-	162,8	-	162,8
OCH <sub>3</sub>	3,75 (s)	55,4	3,76 (s)	55,5

\*(YIM *et al*, 2003).



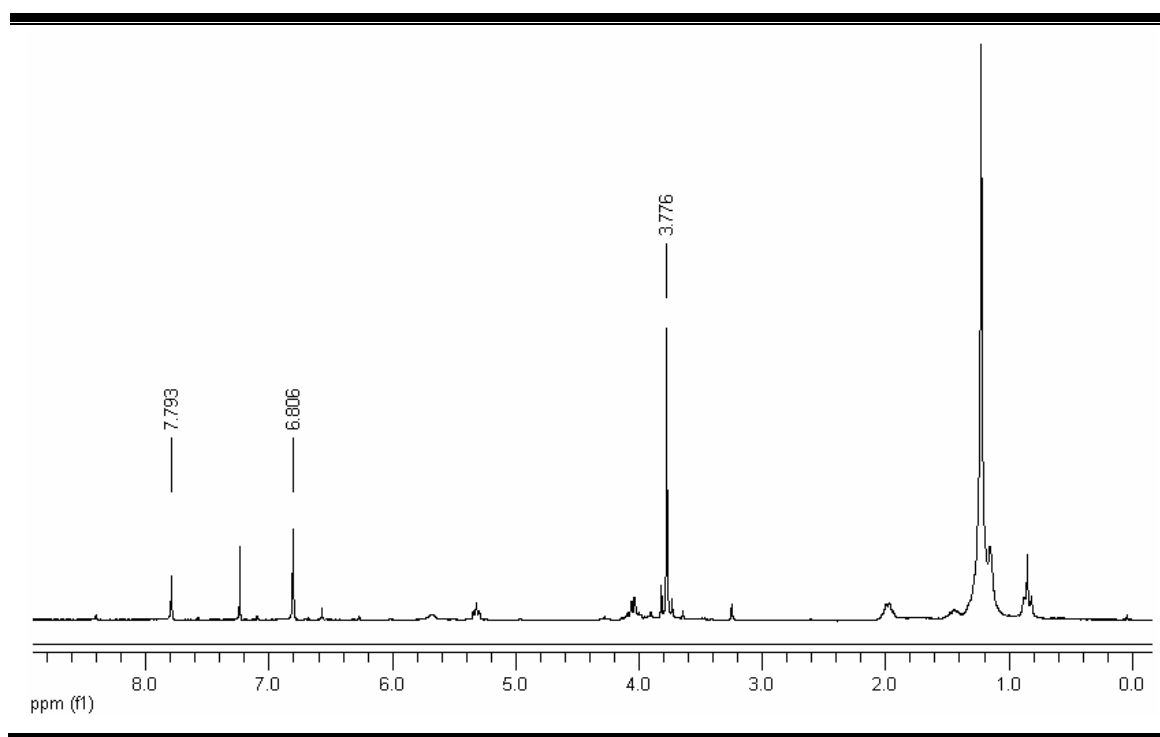
**Figura 13.** Acetina, substância majoritária de **CPCR3**.

A pequena variação no deslocamento químico de hidrogênio e carbono pode ser atribuída ao solvente, uma vez que, a análise de RMN para **CPCR3** foi realizada em  $\text{CDCl}_3$  e acetina em piridina- $\text{D}_5$  (YIM *et al*, 2003).

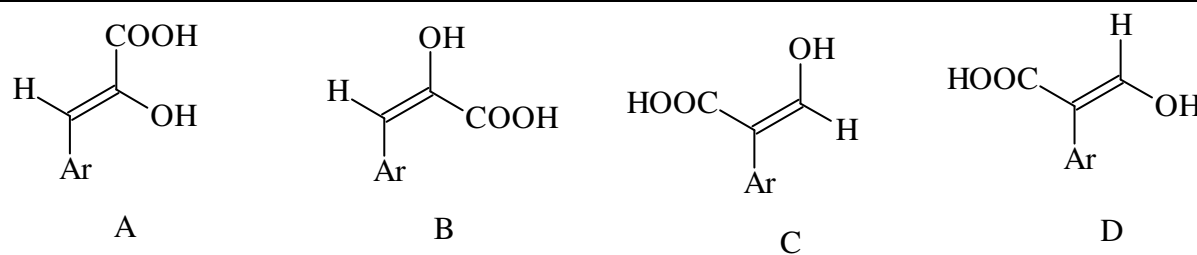
#### 4.6.4 - Identificação de **CPCR4** (Ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico)

A substância **CPCR4**, sólido amorfo amarelo, foi isolada tanto na fase hexânica quanto da fase metanólica (**CPCR6**) e sua estrutura foi elucidada a partir de análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - APT, HMQC e HMBC juntamente com dados da literatura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 14) é relativamente simples, devido à presença de um singlete, relativos a dois grupos metoxílicos  $\delta$  3,79 (6H), além dos sinais em  $\delta$  6,80 (2H) e  $\delta$  7,79 (1H) de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$ . A partir destes dados é possível propor algumas estruturas, merecendo destaque a de núcleo aromático 1,3,4,5 tetrassubstituído, além do fragmento com hidrogênio  $\beta$  a carbonila insaturada. Ressaltando a existência das duas metoxilas e que elas possuem deslocamento químico característico por estarem ligadas diretamente ao anel aromático. Logo, **CPCR4** deve possuir substituinte na posição quatro, caso contrário, o deslocamento do H-4 tenderia a cair num campo mais baixo, devido o efeito doador dos grupos  $\text{OCH}_3$  ligado nas posições três e cinco. Havendo, portanto, substituição na posição 4 possivelmente de grupo hidroxílico. Singlete em  $\delta$  6,80 pertence aos hidrogênios H-2 e H-6, o singlete em  $\delta$  7,79 deve pertencer a um hidrogênio  $\beta$  insaturado. Assim é possível propor quatro possibilidades de arranjos dos grupos ligados ao anel aromático, A-D (Figura 15) [pág. 53].

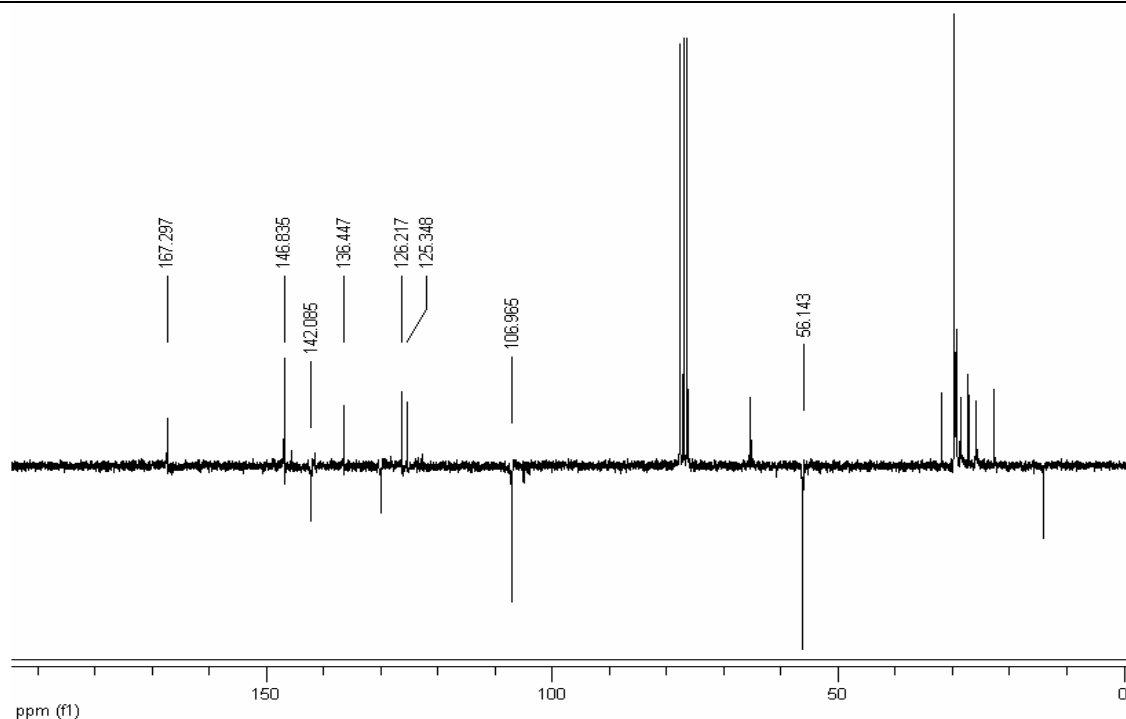


**Figura 14.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) de **CPCR4**.

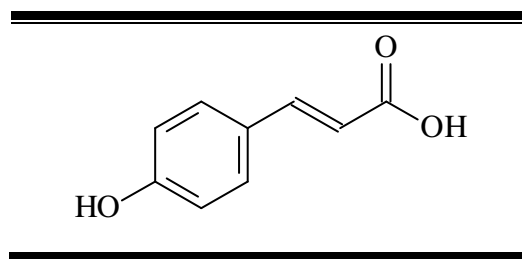


**Figura 15.** Prováveis posições para hidrogênio  $\beta$  à carbonila.

Na análise dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT desta substância (Figura 16) observou-se a presença dos sinais em  $\delta$  56,1 (2-OCH<sub>3</sub>),  $\delta$  106,9 (2-CH, C-2 e C-6) e  $\delta$  146,8 (2-C, C-3 e C-5) confirmando a presença de anel aromático 1,3,4,5 tetrassubstituído. Dois sinais, ambos de C não hydrogenado em  $\delta$  136,4 (1-C, C-4) e  $\delta$  125,3 (1-C, C-1) corroboram com os dados de RMN  $^1\text{H}$  que sugere que **CPCR4** é um derivado do ácido *p*-hidroxicumarico (Figura 17) [pág. 54]. Um outro sinal em  $\delta$  142,0 registrado como carbono metínico (1-CH, C-7) confirma que há H de carbono  $\beta$  insaturado, além de sinal em  $\delta$  126,2 (1-C, C-8) relativo ao carbono  $\alpha$  carregando um grupo OH e  $\delta$  167,2 (1-C, C-9) caracterizando carbonila de ácido carboxílico.

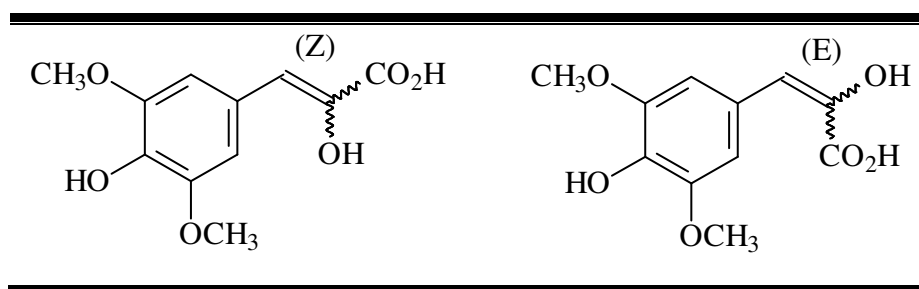


**Figura 16.** RMN  $^{13}\text{C}$  - APT (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz) de **CPCR4**.



**Figura 17.** Estrutura do ácido *p*-hidroxicumarico.

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido *p*-hidroxicumarico, número de registro CAS 7400-08-0 (Figura 17) isolado por Shin *et al* de fontes naturais oriundo do rizoma de *Sparganium stoloniferum*, pertencente à família Sparganiaceae (SHIN *et al*, 2000), foi comparado com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **CPCR4**. Assim, foi observado que a cadeia lateral alílica possui deslocamentos de carbono bastante semelhante aos de **CPCR4**, principalmente o carbono  $\beta$  carbonílico, corroborando com a informação que o sinal em  $\delta$  142,0 (CH) é do carbono  $\beta$  carbonílico. Por outro lado, não há informação alguma na literatura que relate a estrutura do ácido 3,5-dimetoxi-5-hidroxicumarico. Porém, dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de estrutura similar justificam o sinal em  $\delta$  146,8 como pertencente a dois carbonos não hidrogenados e simétricos de grupo aril oxigenado. A presença dos grupos metoxilícos no anel aromático é responsável pelos efeitos observados no anel aromático no RMN  $^{13}\text{C}$  de **CPCR4**, assim como a variação no deslocamento do carbono  $\alpha$  carbonílico ligado diretamente a uma hidroxila, quando comparados com o do ácido *p*-hidroxicumarico. Logo, unindo as informações do RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **CPCR4**, juntamente com auxílio da literatura e dados espectrais obtidos pelo software SciFinder Scholar de moléculas de núcleo semelhante pode-se concluir que **CPCR4** pertença à classe fenilpropanóide, cujo esqueleto básico é do tipo  $\text{C}_6\text{-C}_3$ . Com isso, duas estruturas prováveis podem ser atribuídas à **CPCR4** (Figura 18).



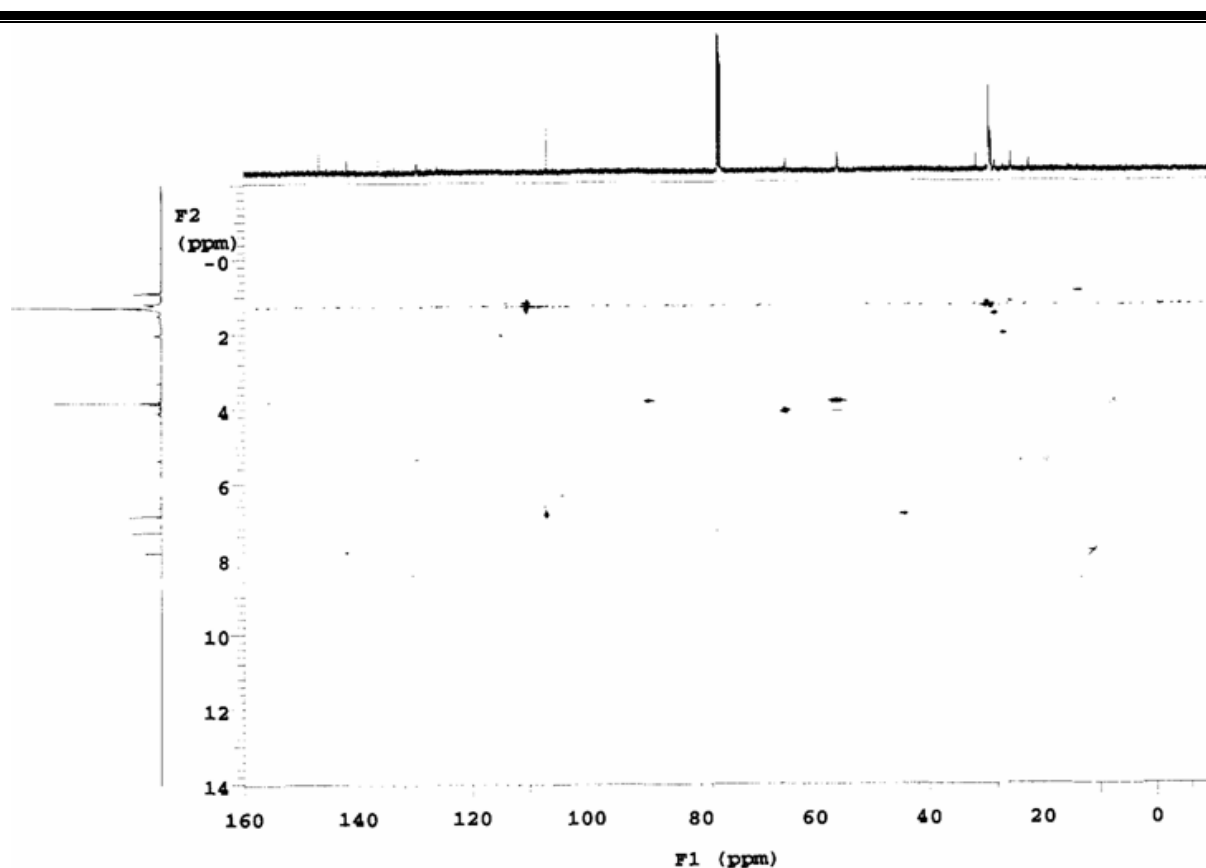
**Figura 18.** Propostas estruturais de **CPCR4** com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - APT.

No espectro de RMN HMQC  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) foram observados alguns sinais que não condizem com as estruturas propostas, provavelmente devido a impurezas presentes na amostra. Os sinais dos hidrogênios em relação direta com seus respectivos carbonos encontram-se listados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Acoplamentos observados no HMQC de **CPCR4**.

HMQC	
RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
7,79	142,0 (1-CH)
6,80	106,9 (2-CH)
3,79	56,1 (2-OCH <sub>3</sub> )

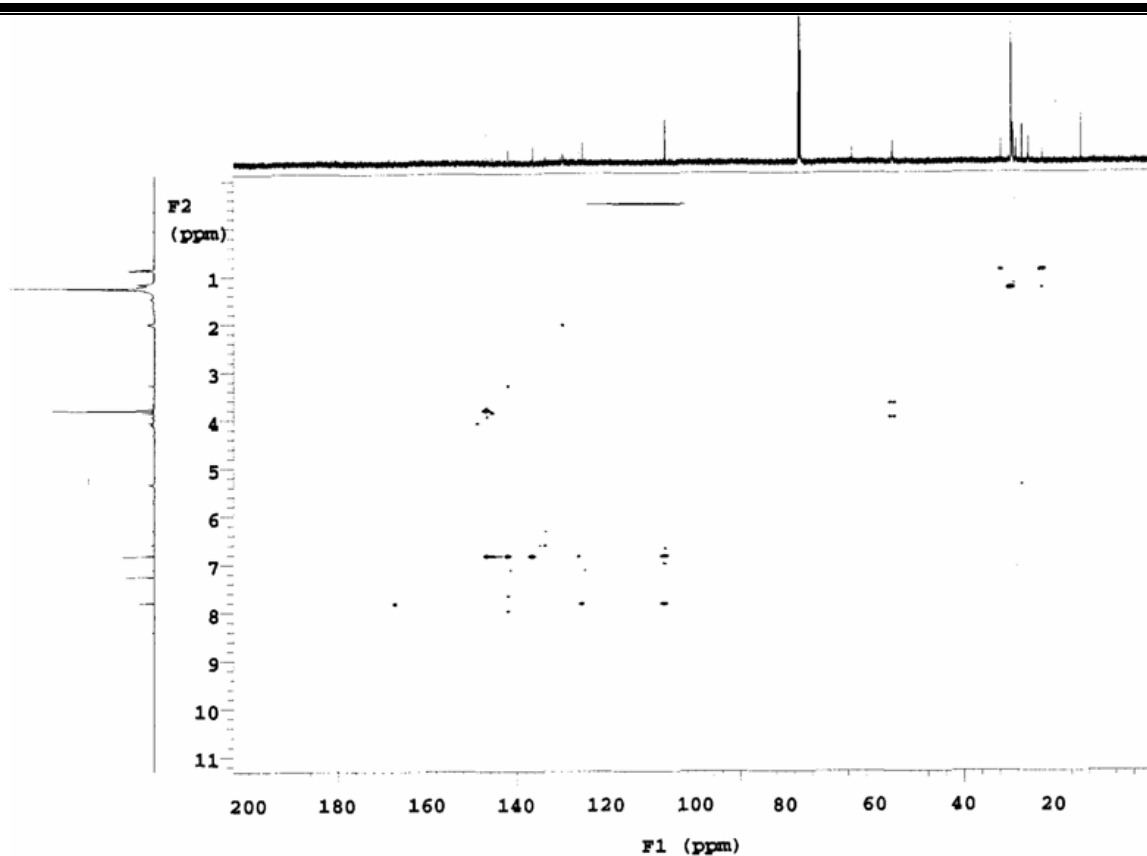
Uma vez que não foram encontrados dados espectrais de **CPCR4** na literatura para comprovação da estrutura e atribuição dos dados de RMN, foi realizado o HMQC que auxiliou na confirmação da estrutura de **CPCR4**.



**Figura 19.** RMN HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de **CPCR4**.



O espectro RMN HMBC  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (Figura 20) mostrou correlações importantes que encontram-se sumarizadas na Tabela 20.



**Figura 20.** RMN HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) de **CPCr4**.

**Tabela 20.** Acoplamentos observados no HMBC de **CPCr4**.

HMBC	
RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
7,79 (H-7)	167,3 (C-9); 125,3 (C-1) e 106,9 (C-2 e 6)
6,80 (H-2 e 6)	146,8 (C-3 e 5); 142,0 (C-7); 136,4 (C-4) e 106,9 (C-2 e 6)
3,79 ( $\text{OCH}_3$ )	146,8 (C-3 e 5)

As correlações observadas entre H-7 com C-9, C-1 e C-2 corroborou com a estrutura de configuração E proposta (Figura 21, Tabela 21) [pág. 57], bem como atribuir inequivocamente os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os respectivos carbonos. Da mesma forma, as correlações observadas para H-2 e os carbonos ligados aos grupos metoxílicos permitiram

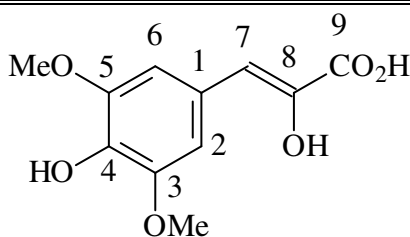
atribuir os dados de RMN dos respectivos carbonos. Com isso, os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram estabelecidos e, a Tabela 21 sumariza essas informações.

**Tabela 21.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **CPCR4** e do ácido *p*-hidroxicumarico.

Posição	$^1\text{H}$ CPCR4	$^{13}\text{C}$ CPCR4	$^{13}\text{C}^*$ Ac. <i>p</i> -hidroxicumarico
1	-	125,3	126,1
2-6	6,80 (s)	106,9	130,4
3-5	-	146,8	116,1
4	-	136,4	160,0
7	7,79 (s)	142,0	145,3
8	-	126,2	115,5
9	-	167,3	168,5
OCH <sub>3</sub>	3,79 (s)	56,1	-

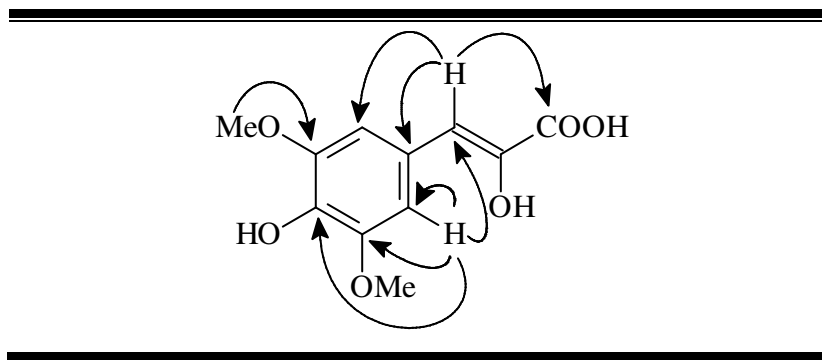
\*(SHIN *et al*, 2000).

Os dados do HMBC corroboraram na elucidação da estrutura de **CPCR4**, porém a configuração da dupla ligação foi determinada com auxílio da literatura (MENDES *et al*, 2000), como sendo de configuração (E). Logo, **CPCR4** é um fenilpropanóide inédito (Figura 21) denominado ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico.



**Figura 21.** Estrutura de **CPCR4** com base no HMBC.

Na Figura 22 encontram-se as correlações observadas para hidrogênio pertencente ao anel aromático e também aqueles da cadeia alquílica lateral.



**Figura 22.** Correlações observadas no HMBC de **CPCR4**.

#### 4.6.5 - Identificação de CPCR5 (Alquil fenóis)

A substância **CPCR5**, óleo viscoso de cor laranja, isolada da fase hexânica e foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) que mostrou que a mesma pode ser mistura de alquil ou alquenil fenol e sua elucidação encontra-se em andamento.

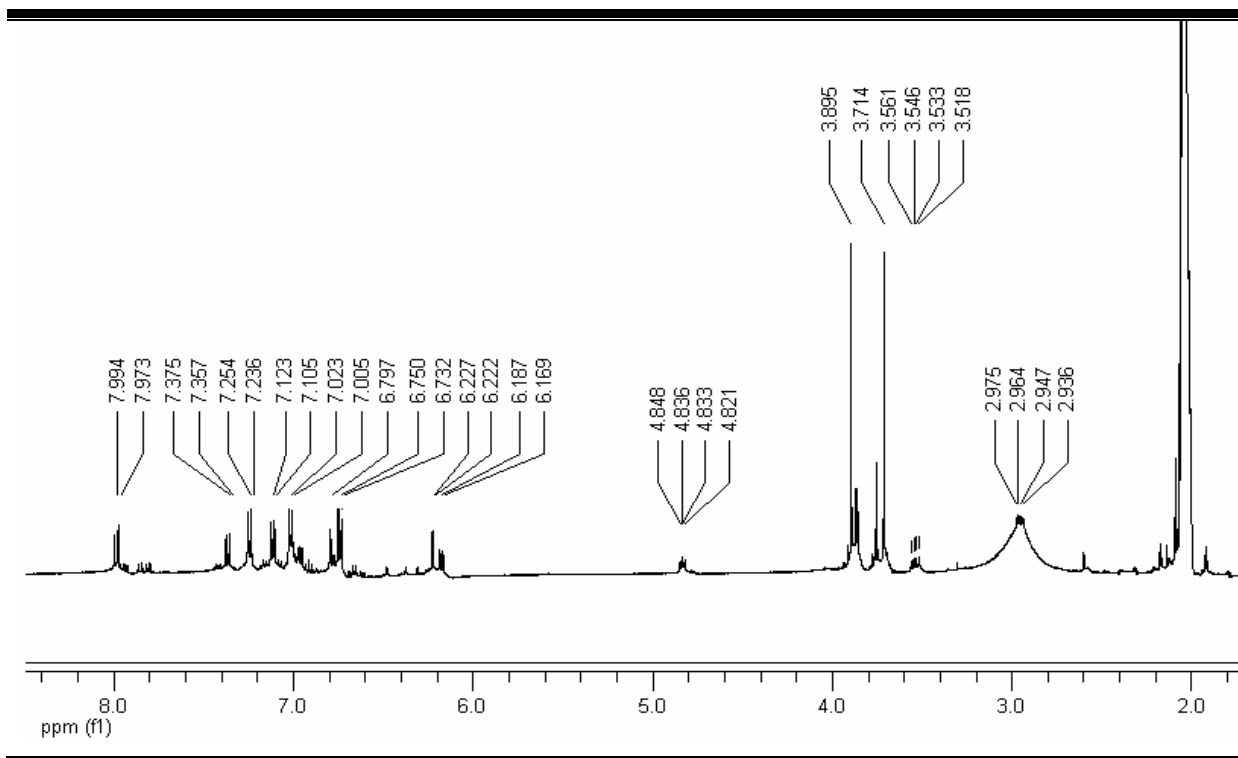
#### 4.6.6 - Identificação de CPCR6 (Ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico)

A substância **CPCR6**, isolada do extrato metanólico, quando analisada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mostrou-se idêntica à substância **CPCR4** descrita anteriormente. Portanto, trata-se do fenilpropanóide denominado Ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico. Esta substância está presente tanto na fase hexânica quanto na fase metanólica.

#### 4.6.7 - Identificação de **CPCR7** (7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5 $\alpha$ -2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona)

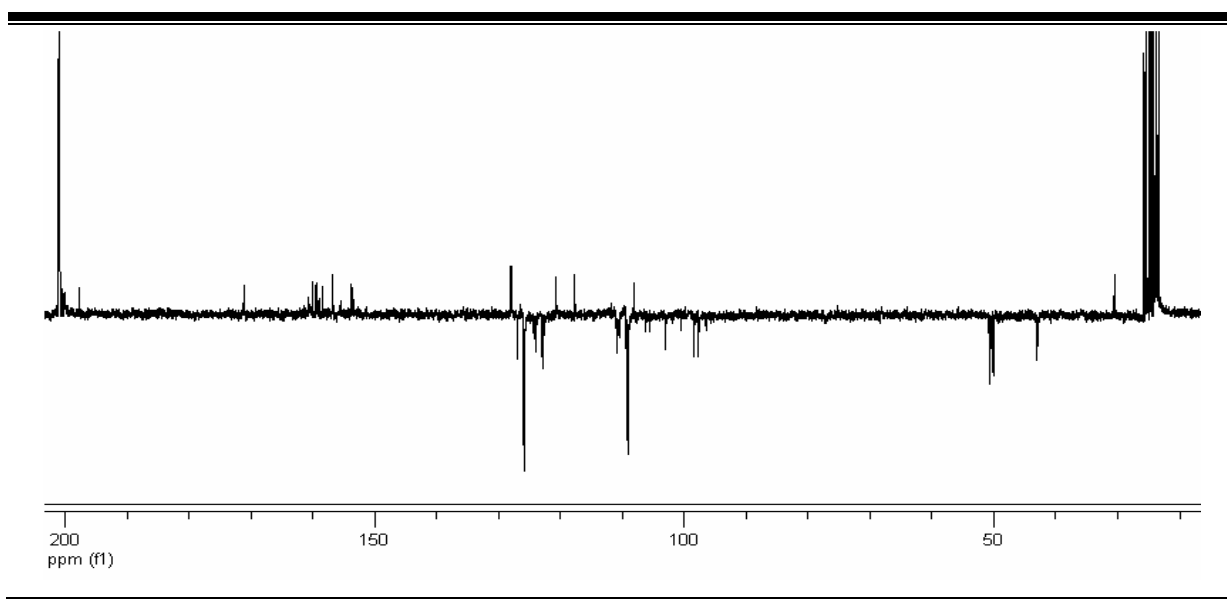
A substância **CPCR7**, sólido amarelo, foi isolada partir de sucessivos fracionamentos cromatográficos a partir da fração CPCREM 34-36 [Tabela 7, pág. 36] e sua estrutura foi elucidada a partir de análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - APT, HMQC e HMBC juntamente com dados da literatura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 23) apresentou dois singletos integrados para três hidrogênios cada, em  $\delta$  3,9 e  $\delta$  3,7 característicos de grupos metoxilícos ligados a carbono  $\text{sp}^2$ . Pode-se observar também a presença de outros dois duplos-dubletos, em  $\delta$  2,9 ( $J=5,8$  e  $13,8$  Hz) e  $\delta$  3,5 ( $J=7,6$  e  $13,8$  Hz) integrados para um hidrogênio cada e pertencentes à hidrogênios diasterotópicos de grupo metilênico. Bem como o tripleto registrado em  $\delta$  4,8 ( $J=5,8$  e  $7,6$  Hz), integrado para um hidrogênio e pertencente a hidrogênio oxibenzílico. Estes sinais são característicos dos H- $\beta$  e H- $\alpha$  de dihidrochalconas. Outros sinais na forma de singletos e dubletos ( $J=8,6$  Hz) foram observados na região de  $\delta$  6,0 a  $\delta$  8,0 indicando a presença de anéis aromáticos.



**Figura 23.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz) de **CPCR7**.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - APT (Figura 24) registra sinais referentes a duas unidades flavanóidicas, totalizando 28 sinais no qual, 2 pares correspondem à carbonos  $\text{sp}^2$  metínicos simétricos de anéis aromáticos 1-4 dissustituídos, além de 2 sinais de grupos metoxilicos observados em  $\delta$  55,3 e  $\delta$  55,8. Estes dados, aliados aos sinais observados no RMN de  $^1\text{H}$  sugerem que **CPCR7** seja um biflavonóide formado por duas unidades flavonoídicas distintas. Os carbonos metilênicos e metínicos observados em  $\delta$  35,7 e  $\delta$  48,2 respectivamente excluem a possibilidade de que haja uma unidade de flavanona, cujos valores de deslocamentos são registrados em torno de  $\delta$  45,0 ( $\text{CH}_2$ ) e  $\delta$  78,0 ( $\text{CH}$ ), respectivamente. Portanto, estes sinais ( $\delta$  35,7 e  $\delta$  48,2) devem pertencer a unidade dihidrochalcona, sendo que o sinal em  $\delta$  48,2 ( $\text{CH}$ ) é do carbono que pode estar ligado diretamente à unidade flavona. Os demais sinais foram observados na região que compreende  $\delta$  100,0 a  $\delta$  205,0. Dentre estes, onze são sinais de carbonos metínicos ( $\text{CH}$ ) e doze de carbonos não hidrogenados ( $\text{C}$ ). Entre os  $\text{CH}$  observados, verifica-se que há quatro sinais duplicados, comumente relativos a anéis aromáticos dissustituídos nas posições 1, 4. Tendo em vista que existem dois pares de sinais, pode se inferir que os mesmos pertençam a unidades flavanoídicas diferentes. Merece destaque também os sinais correspondentes ao grupo carbonila, uma  $\delta$  176,3 ( $\text{C}-3$ ) característico de carbonila de flavonas e outra registrada em  $\delta$  202,8 característico de carbonila ( $\text{C}-\beta'$ ) de dihidrochalconas. Esse sinal ( $\delta$  202,8) favorece o descarte da possibilidade da existência da unidade flavanona, haja vista que o sinal para essa carbonila deva ser registrado em torno de  $\delta$  195,0 e, portanto auxilia a excluir definitivamente a proposta que uma das unidades seja de uma flavanona (AGRAWAL, 1989).



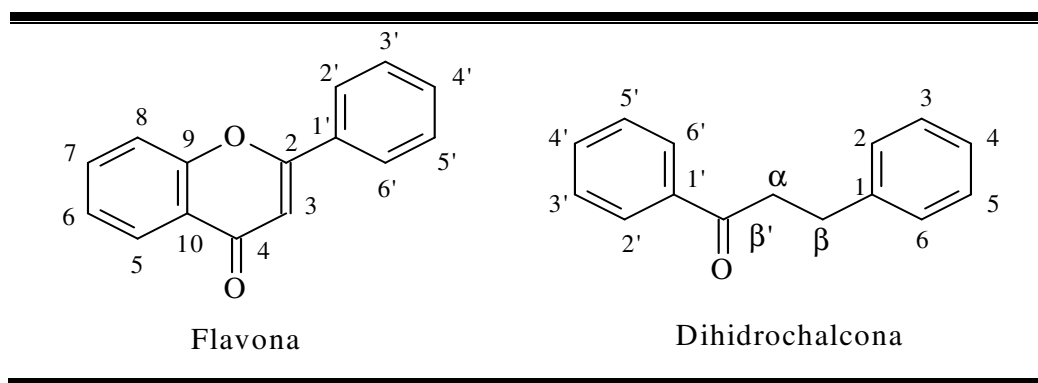
**Figura 24.** RMN  $^{13}\text{C}$  - APT ( $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ , 50MHz) de **CPCR7**.

Análise das correlações observadas no espectro bidimensional HMQC da substância **CPCR7** permitiu correlacionar os sinais de hidrogênios com os respectivos carbonos. Os dados observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  HMQC [Figura 25, pág. 62] encontra-se sumarizados na Tabela 22, sendo que as unidades I e II referem-se à flavona e dihidrochalcona, respectivamente.

**Tabela 22.** Acoplamentos observados no HMQC de **CPCR7**.

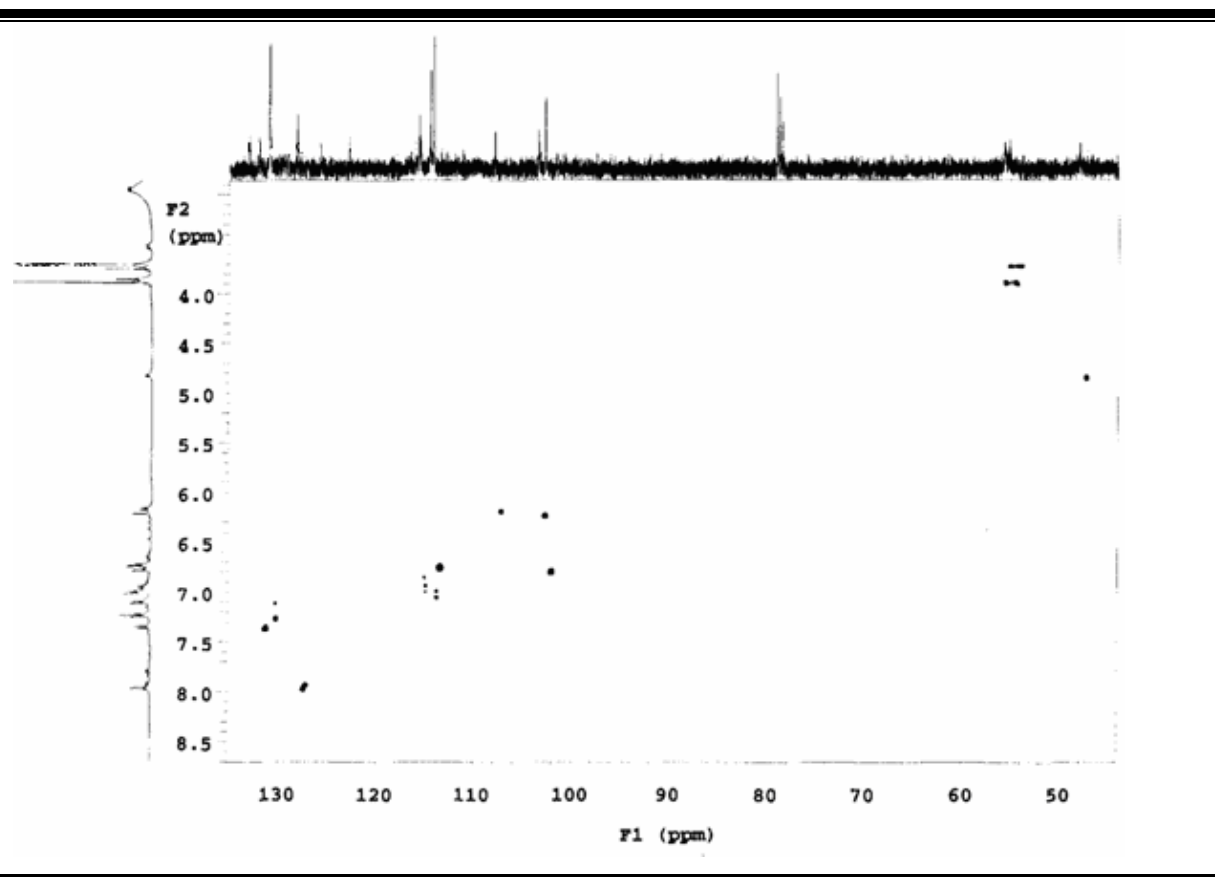
HMQC					
Unidade I			Unidade II		
Qtd.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Qtd.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	7,24 (d, $J=8,6$ Hz)	131,11	1	7,35 (d, $J=8,6$ Hz)	132,1
2	7,00 (d, $J=8,6$ Hz)	114,5	2	7,11 (d, $J=8,6$ Hz)	131,15
1	6,96 (dd, $J=8,6$ Hz)	114,7	2	6,69 (d, $J=8,6$ Hz)	114,2
1	6,73 (s)	102,9	1	6,94 (d, $J=8,6$ Hz)	116,1
1	6,20 (s)	103,6	1	6,15 (d, $J=8,6$ Hz)	108,2
3	3,90 (s, $\text{OCH}_3$ )	55,3	1	4,80 (q, $J=5,8$ e $7,6$ Hz)	48,2
			3	3,70 (s, $\text{OCH}_3$ )	55,8
			1	3,54 (dd, $J=7,6$ e $13,8$ Hz)	35,7
			1	2,94 (dd, $J=5,8$ e $13,8$ Hz)	35,7

Portanto, a análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  [Figura 23, pág. 59] e  $^{13}\text{C}$  – APT [Figura 24, pág. 60] e do espectro de correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC) [Figura 26, pág. 62] corroborou a proposta estrutural do biflavonóide com presença de uma unidade flavona e uma dihidrochalcona (Figura 25).



**Figura 25.** Proposta para as unidades flavonoídicas de **CPCR7**.

O espectro HMQC de **CPCR7** (Figura 26) possibilitou concluir que o anel A, da flavona era dioxigenada e que um dos anéis aromáticos da dihidrochalcona possui oxigenação em duas posições, caso contrário, deveria haver três pares de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, sendo um deles da unidade flavona e dois pares na dihidrochalcona.



**Figura 26.** RMN HMQC ( $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ , 500MHz) de **CPCR7**.

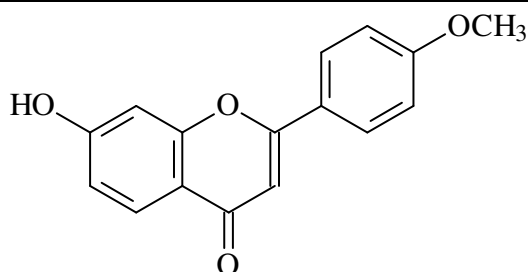
Devido à ocorrência de vários biflavonóides em estudos com outras partes da espécie (BAHIA, *et al*, 2005), os dados apresentados corroboram com a proposta que **CPCR7** seja um biflavonóide. Assim, Consequentemente é possível que as unidades de flavona e dihidrochalcona estejam unidas através de ligação C-C entre C-5 da flavona e C- $\alpha$  da dihidrochalcona, uma vez que carbono  $\alpha$  possui apenas um hidrogênio. Além disso, análises dos dados de deslocamento químico permitiram estabelecer inequivocamente que a junção entre as unidades é do tipo C-C. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , juntamente com dados da literatura corroboraram a identificação da unidade flavona apresentando grupo hidroxílico em C-7 e metoxílico em C-4' como mostra a Tabela 23 [pág. 63]. A flavona com este padrão de substituição é conhecida na literatura como pratol (Figura 27) [pág. 63]. Os dados registrados para **CPCR7** são similares com os obtidos por Huo e colaboradores que

isolou esta flavona do extrato clorofórmico das raízes de *Caragana microphylla* (Leguminosae).

**Tabela 23.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CPC4 e 7-hidroxi-4'-metoxiflavona (Pratol).

CPCR4 (unidade I)			7-hidroxi-4'-metoxiflavona (Pratol)		
Nº.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Nº.	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$
2	-	163,5	2	-	162,50
3	6,20 (s)	103,6	3	6,05 (1H, s)	107,94
4	-	176,3	4	-	174,50
5	-	122,9	5	7,97 (1H, d, $J=8,7$ Hz)	125,67
6	6,96 (d, $J=2,4$ Hz)	114,7	6	6,94 (1H, dd, $J=2,1; 8,7$ Hz)	115,06
7	-	158,9	7	-	158,89
8	6,73 (s)	102,9	8	6,86 (1H, d, $J=2,1$ Hz)	102,02
9	-	164,2	9	-	157,35
10	-	113,3	10	-	116,56
1'	-	125,9	1'	-	129,94
2'-6'	7,24 (d, $J=8,6$ Hz)	131,11	2'-6'	7,72 (2H, d, $j=8,7$ Hz)	127,19
3'-5'	7,00 (d, $J=8,6$ Hz)	114,5	3'-5'	6,99 (2H, d, $J=8,7$ Hz)	113,52
4'	-	162,1	4'	-	162,45
OCH <sub>3</sub>	3,90 (s)	55,8	OCH <sub>3</sub>	3,77 (3H, s)	55,05
-	-	-	OH	10,81 (1H, s)	-

\*(HUO *et al*, 2007).



**Figura 27.** 7-hidroxi-4'-metoxiflavona (Pratol).

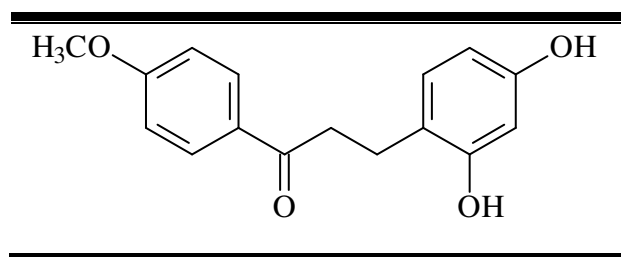


A outra unidade, dihidrochalcona, foi proposta com base nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e dados da literatura. Huneck e colaboradores isolaram em 1985 a substância conhecida como 2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (Figura 28) da espécie *Artemisia glauca* (Asteraceae), cujos dados foram comparados com os de RMN  $^{13}\text{C}$  de **CPCR7** (Tabela 24).

**Tabela 24.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **CPCR7** e de RMN  $^{13}\text{C}$  de uma dihidrochalcona.

CPCR7 (unidade II)			2,4-Dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	
Nº.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Nº.	$^{13}\text{C}^*$
B'	-	202,8	$\beta'$	199,6
$\alpha$	4,80 (dd, $J=5,8$ ; 7,6 Hz)	48,2	$\alpha$	42,7
$\beta\text{A}$	2,94 (dd, $J=5,8$ ; 13,8 Hz)	35,7	$\beta\text{A}$	26,0
$\beta\text{B}$	3,54 (dd, $J=7,6$ ; 13,8 Hz)	35,7	$\beta\text{B}$	
1	-	114,0	1	118,5
2	-	164,7	2	155,4
3	6,15 (d, $J=8,6$ Hz)	108,2	3	103,0
4	-	165,2	4	156,3
5	6,94 (d, $J=8,6$ Hz)	116,1	5	107,2
6	7,35 (d, $J=8,6$ Hz)	132,1	6	130,5
1'	-	133,2	1'	131,3
2'-6'	7,11 (d, $J=8,6$ Hz)	131,15	2'-6'	131,2
3'-5'	6,69 (d, $J=8,6$ Hz)	114,2	3'-5'	112,2
4'	-	158,7	4'	163,5
$\text{OCH}_3$	3,70 (s)	55,3	$\text{OCH}_3$	55,3

\*(HUNECK *et al*, 1985).



**Figura 28.** 2,4-Dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona.

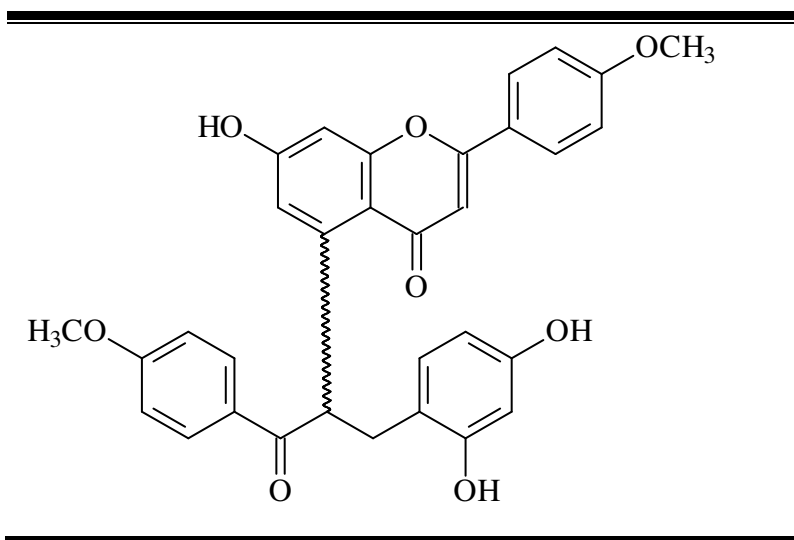
Vale salientar que no registro dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , Huo utilizou DMSO- $\text{D}_6$  em seus experimentos em RMN de 500 MHz. A substância **CPCR7** é insolúvel em clorofórmio, sendo solúvel apenas em acetona ou metanol. Logo, as diferenças de deslocamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , podem ser atribuídas ao solvente utilizado nos experimentos de RMN bem como a ligação direta entre as duas unidades flavanoídica em questão. A estereoquímica do carbono  $\alpha$  da dihidrochalcona em **CPCR7** ainda não é conhecida.

Os dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  HMBC (Figura 31) [pág. 67] encontra-se sumarizado na Tabela 25, cujas unidades I e II referem-se à flavona e dihidrochalcona, respectivamente.

**Tabela 25.** Acoplamentos observados no HMBC de **CPCR7**.

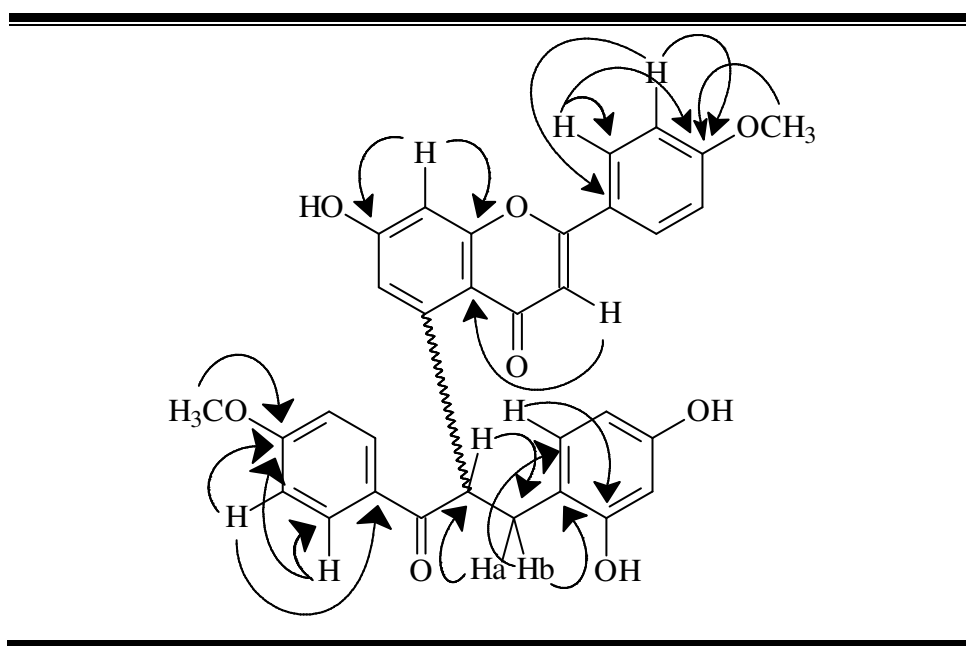
HMBC			
Unidade I		Unidade II	
$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
7,24 (H-2')	162,1 (C-4') - 131,11 (C-2')	7,35 (H-6)	165,2 (C-4)
7,00 (H-3')	162,1 (C-4') - 125,9 (C-1')	7,11 (H-2')	158,7 (C-4') - 131,15 (C-2')
6,73 (H-8)	164,2 (C-9) - 158,9 (C-7) - 114,7 (C-6)	6,69 (H-3')	158,7 (C-4') - 133,2 (C-1')
6,20 (H-3)	113,3 (C-10)	4,80 (H- $\alpha$ )	35,7 (C- $\beta$ )
3,9 (OCH <sub>3</sub> )	162,1 (C-4')	3,7 (OCH <sub>3</sub> )	158,7 (C-4')
		3,54/2,94 (H- $\beta$ )	48,2 (C- $\alpha$ ) - 132,1 (C-6) - 133,2 (C-1)

De acordo com os dados espectrais foi possível propor uma nova estrutura para a substância **CPCR7** (Figura 29) [pág. 66], na qual a unidade flavona esta ligada diretamente pelo C-5 através de ligação C-C ao carbono  $\alpha$  da unidade dihidrochalcona. Fato esse proposto devido à existência de apenas um hidrogênio na posição  $\alpha$  da dihidrochalcona. Por outro lado, não foi observada nenhuma correlação de hidrogênios da unidade I com carbonos da unidade II ou vice-versa.



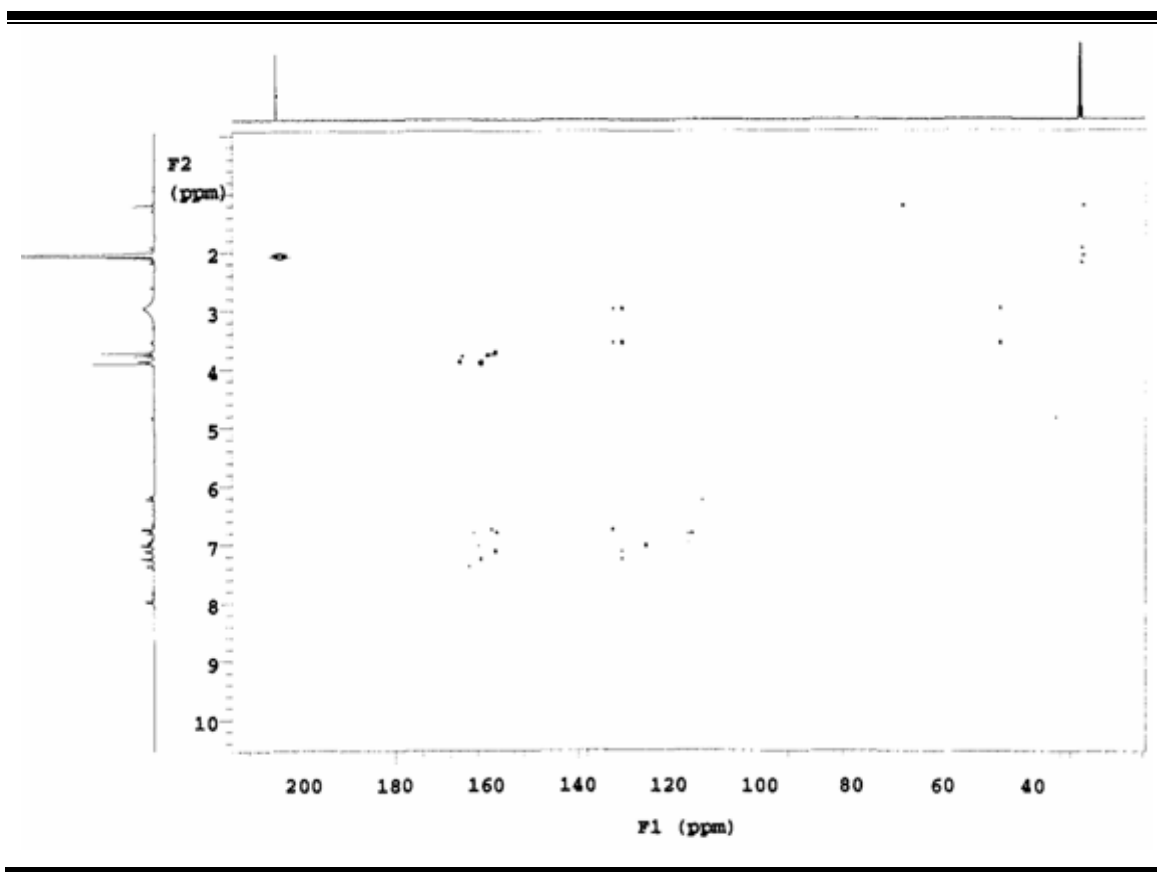
**Figura 29.** Proposta estrutural da substância **CPCR7** com base no espectro de HMBC.

Na Figura 30 são observadas as principais correlações observadas no espectro de HMBC. Portanto, a proposta estrutural para **CPCR7** é de ocorrência inédita.



**Figura 30.** Principais correlações observadas no HMBC de **CPCR7**.

Outras análises para determinação inequívoca da estrutura de **CPCR7** encontram-se em andamento.



**Figura 31.** RMN HMBC (CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 500MHz) de **CPCR7**.

#### 4.6.8 - Identificação de **CPCR8**, **CPCR9** e **CPCR10**

As substâncias designadas **CPCR8**, **CPCR9** e **CPCR10** encontram-se em fase de determinação estrutural. Porém, **CPCR8** de acordo com dados de RMN <sup>1</sup>H revelou presença de mistura de flavonóide inseparáveis por métodos cromatográficos de bancada, sendo separados apenas por CLAE. Para **CPCR9** já se tem uma idéia de sua estrutura, porém outros experimentos estão sendo realizados a fim de determinar inequivocamente a estrutura da mesma. Por outro lado, **CPCR10** trata-se de um derivado do ácido gálico, porém outras análises encontram-se em andamento a fim de concluir sua estrutura.

## 5 - CONCLUSÕES

No presente trabalho, a fase metanólica obtido da extração líquido-líquido do extrato metanólico bruto se apresentou moderada tóxico quando testadas frente *Artemia salina*. Por outro lado, dentre as fases testadas, apenas a fase hexânica se apresentou atóxica. Já para atividade antioxidante observa-se uma maior atividade nas fases em AcOEt e BuOH, porém a fase em MeOH apresentou atividade moderada quando comparada ao padrão utilizado.

A partir do fracionamento da fase hexânica foi obtido um triterpeno de núcleo lupenico bastante comum em plantas conhecido como lupeol e denominada **CPCR1**, mistura de esteróides de núcleo colestano conhecido como sitosterol e estigmansterol e denominada **CPCR2**, além de mistura de flavonóide, o qual foi identificado à presença majoritária de acacetina denominada **CPCR3**, uma flavona metoxilada em C-4' e dihidroxilado em C-5 e C-7, sendo seu primeiro relato no gênero *Caesalpinia* e o ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico, um fenilpropanóide de ocorrência inédita denominado **CPCR4**.

Para o fracionamento da fase metanólica obteve-se um biflavonóide 7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5 $\alpha$ -2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona, denominado **CPCR7**, cujas unidades são pertencentes a uma unidade flavona e outra unidade dihidrochalcona que de acordo com a proposta estrutural possui junção do tipo C-C.

Outros estudos com relação à confirmação estrutural de **CPCR7** estão em andamento a fim de concluir a proposta da mesma. Com isso, é promissor o contínuo estudo da casca das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* devido a grande quantidade de flavonóides e/ou biflavonóides ainda presente em suas sub-frações e extratos polares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**, Ed. 39, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., 1989.

BAHIA, SEPLANTEC. **Subsecretária de Ciência e Tecnologia. Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979.

BAHIA, M. V. **Estudo químico de *Caesalpinia pyramidalis*. (Leguminosae)**. Salvador: UFBA, 2002, 104 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

BAHIA, M. V.; DOS SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae)**, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 16, n. (6), p. 1402-1405, **2005**.

BAHIA, M. V.; BATISTA, J. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Outros biflavonóides de *Caesalpinia pyramidalis***, 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN – 210, Águas de Lindóia – SP, **2006**.

BALDACH, A. **As Plantas que Curam**. São Paulo: Editora Três Press, **1972**.

BOUQUET, A.; DEBRAY, M. **Plantes Médicinales de la Côte d'Ivoire**. Paris: Orstom, **1974**.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. **Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract**. *Journal Ethnopharmacology*, Vol. 53, p. 175-178, **1996**.

CHAKRABARTI, S.; BISWAS, T. K.; ROKEYA, B.; ALI, L.; MOSIHUZZAMAN, M.; NAHAR, N.; KHAN, A. K. A.; MUKHERJEE, B. **Advanced studies on the hypoglycemic effect of *Caesalpinia bonducella* F. in type 1 and 2 diabetes in Long Evans rats**. *Journal of ethnopharmacology*, Vol. 84, n. 1, p. 41-46, **2003**.

DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Vol. único, 6ª edição, **2002**.

DE LUCCA, M.; ZALLES, J. **Flora Medicinal Boliviana**. La Paz: Editora Los Amigos del Libro, Diccionario Enciclopédico, **1992**.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEDO, C.; MUÑOZ, V.; SAUVIN, M. A. **Search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians**. *Journal Ethnopharmacology*, Vol. 77, n. 1, p. 91-98, **2001**.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-Trypanossoma Cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Belo Horizonte: UFMG, 1997. 128 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press: 3<sup>a</sup> ed. **1971**.

GOAD, L. J. **Phytoosterols**, In: Charlwood, B. V. and Bathorpe, D. V. (Eds). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press. London, 1991.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M. **Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice**. *Journal of Pharmacological Sciences*, Vol. 94, n. 2, p. 177-184, **2004**.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The flavonoids: Advances in research**. London: Chapman and Hall, **1982**.

HEBBAR, S. S.; HARSHA, V. H.; SHIRIPATHI, V.; HEGDE, G. R. **Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India-plants used in oral health care**. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 94, n. 2-3, p. 261-266, **2004**.

HIKINO, H.; TAGUSHI, T.; FUJIMURA, H.; HIRAMATSU, Y. **Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood**. *Planta Medica*, Vol. 31, n. 3, p. 214-220, **1977**.

HUKLA, S.; MEHTA, A.; MEHTA, P.; VYAS, S. P.; SHUKLA, S.; BAJPAI, V. K. **Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F.**

**seed oil in experimental animal models.** *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48, n. 1, p. 61-64, **2010**.

HUNECK, S.; BOHLMANN, F.; BANERJEE, S.; HARTONO, L.; ANG, W.; KHAIDAV, T. **Constituents from four species of the tribe Anthemideae from Mongolia.** *Pharmazie*, Vol. 40, n. 5, 365-366, **1985**.

HUO, Y.; GUO, C.; LU, S.; ZHANG, Q-Y.; QIN, L-P. **Chemical research of *Caragana microphylla* Seeds,** *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 43, n. 2, p. 214-215, **2007**.

JIANG, R. W.; BUT, P. P. H.; MA, S. C. MAK, T. C. W. **New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*.** *Journal of Natural Products*, Vol. 64, n. 10, p. 1266-1272, **2001**.

JOLY, A. B.; **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal.** São Paulo: Cia Editora Nacional, 4ª ed. **1977**.

KANETA, M; HIKICHI, H; ENDO, S; SUGIYAMA, N. F. **Identification of flavones in sixteen Leguminosae species.** *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 44, n. 6, p. 1407-1408, **1980**.

KANNUR, D. M.; HUKKERI, V. I.; AKKI, K. S. **Antidiabetic activity of *Caesalpinia bonducella* seed extracts in rats.** *Fitoterapia*, Vol. 77, n. 7-8, 546-549, **2006**.

KIEM, P. V.; MINH, C. V.; HUONG, H. T.; LEE, J. J.; KIM, Y. H. **Cesaldecane, cassane diterpenoid from the leaves of *Caesalpinia decapetala*.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 53, n. 4, p. 428-430, **2005**.

KITAGAWA, I.; SIMANJUNTAK, P.; WATANO, T.; SHIBUYA, H.; FUJII, S.; YAMAGATA, Y.; KOBAYASHI, M. **Indonesian medicinal plants. XI. Chemical structures of caesaldekarins A and B, two new cassane-type furanoditerpenes from the roots of *Caesalpinia major* (Fabaceae).** *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 42, n. 9, p. 1798-1802, **1994**.

KURIA, K. A. M.; DE COSTER, S.; MURIUKI, G.; MASENGO, W.; KIBWAGE, I.; HOOGMARTENS, J.; LAEKEMAN, G. M. **Antimalarial activity of *Ajuga remota***



(Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae): In vitro confirmation of ethnopharmacological use. *Journal Ethnopharmacology*, Vol. 74, n. 2, p. 141-148, 2001.

LAN, D.; GUOAN, L.; LI, H.; HAN-QING, W. Studies on the flavonoid constituents in herb of *Eremosparton songoricum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, Vol. 30, n. 2, p. 126-128, 2005.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Whitstasble: Kew Royal Botanic Gardens, 1987.

LINN, T. Z.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; KALAUNI, S. K.; ATTAMIMI, F.; UEDA, J.; ASIH, P. B. S.; SYAFRUDDIN, D.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Cassane and norcassane type diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their antimalarial activity against the growth of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Natural Products*, Vol. 68, p. 706-, 2005.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, Vol. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*, *Fitoterapia*, Vol. 71, p. 205-207, 2000.

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*, Vol. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, Vol. 85, p. 231-237, 2004.

OGAWA, K.; AOKI, I.; SASHIDA, Y. Cesaljapin, a cassane diterpenoid from *Caesalpinia decapetala* Var. *japonica*. *Phytochemistry*, Vol. 31, n. 8, p. 2897-2898, 1992.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, Vol. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Editora Universitária da UEFS, 1º Ed. **2009**.

RAGASA, C. Y.; GANZON, J.; HOLIFEÑA, J.; TAMBOONG, B.; RIDEOUT, J. A. **A new furanoids diterpene from *Caesalpinia pulcherrima***. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 51, n. 10, n. 1208-1210, **2003**.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S. **Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.)**. *Química Nova*, Vol. 27, n. 3, p. 414-416, **2004**.

SAAED, M. A.; SABIR, A. W. **Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds**. *Fitoterapia*, Vol. 72, n. 7, p. 807-809, **2001**.

SARMA, G. & DAS, S. **Hypoglycemic action of seed kernel of *Caesalpinia bonducella* Fleming in normal and alloxan- induced diabetic albino rats**. *Internet Journal of Pharmacology* Vol. 6, n. 2, **2009**.

SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. Porto Alegre: Editora universitária, 4º ed, **1984**.

SHARMA, S. R.; DWIVEDI, S. K.; SWARUP, D. **Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats**. *Journal Ethnopharmacology*, Vol. 58, n. 1, p. 39-44, **1997**.

SHIN, S. Y.; DOH, S. H.; SHIN, K. H. **Chemical constituents of the rhizomes of *Sparganium stoloniferum***. *Yakhak Hoechi*, Vol. 44, n. 4, p. 334-339, **2000**.

SOUSA, C. M. M.; E SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. E CHAVES, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. *Química Nova*, Vol. 30, n. 2, p. 351-355, **2007**.

TANG, W.; EISENBRAND, G. **Chinese Drugs of Plant Origin**, New York: Springer, **1992**.

TIAN, F.; MCLAUGHLIN, J. L. **Bioactive flavonoids from the black locust tree, *Robinia pseudoacacia***. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 38, n. 3, p. 229-234, **2000**.

YIM, S-H.; KIM, H. J.; LEE, I-S. **A Polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros***, *Archives of Pharmacal Research*, Vol. 26, n. 2, p.128-131, **2003**.

[www.simillimum.com/TheLittleLibrary/References/Shennung.html](http://www.simillimum.com/TheLittleLibrary/References/Shennung.html). Acesso em: 27 de fev. 2008.

[www.comciencia.br/reportagens/farmacos/forma16.html](http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/forma16.html). Acesso em: 27 de fev. 2008.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>. Acesso em 15 de dez. 2009.