

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

SAPONINAS TRITERPÊNICAS DA ESPÉCIE *Pentaclethra macroloba*
Kuntze (Pracaxi)

FRANCISCO ARNALDO VIANA

TESE DE DOUTORADO

Fortaleza - Ceará

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

SAPONINAS TRITERPÊNICAS DA ESPÉCIE *Pentaclethra*
macroloba Kuntze

Francisco Arnaldo Viana

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientadora:

Profa. Yvone Brígido Memória Pouliquen

Fortaleza –Ceará

2002

A Deus, à Mãe Rainha, pelas forças espirituais a mim concedidas

Aos meus pais,
Raimundo Viana e Dária

À minha esposa e filhos,
Filó, Arnaldo Filho, Michel e Fernanda

A meus amigos

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Yvone Brígido Memória Pouliquen pela orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Doutores Manoel Andrade Neto e Raimundo Braz Filho pela amizade, incentivo e co-orientação deste trabalho. Ao professor Raimundo especialmente a valiosa e fundamental contribuição na determinação estrutural das saponinas triterpênicas.

Aos Professores Benildo Sousa Cavada e Francisco José Queiroz Monte, pela amizade e cessão dos equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência, imprescindíveis no isolamento das substâncias relatadas neste trabalho.

A Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago pela amizade e fundamental ajuda no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Aos amigos Petrônio e Silvana Saker pela valiosa ajuda, orientação e questionamentos sobre cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos bolsistas e amigos de todas as horas, Rafael, Eduardo, Norberto e Gardênia pela amizade e apoio técnico.

Aos Professores Marcos Mattos, Nágila Ricardo, Luís de Souza e Edson Rodrigues Filho pela atenção e obtenção dos espectros de massas.

Aos amigos peladeiros Edilberto, Ronaldo, Galberto, Kirley por ter proporcionado a exibição e o aperfeiçoamento dos meus dotes futebolísticos nesta cidade maravilhosa que é Fortaleza.

Às amigas Nilce (N-1), Sônia, Fádía, Moema, Mazé, Lúcia Belém, Edinilza pelo companheirismo vivenciado durante minha estadia em Fortaleza.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica por tudo que possam ter feito para a realização deste trabalho.

Ao Daniel Esdras pelo empenho e dedicação na obtenção dos espectros das trabalhosas saponinas e apoio técnico na área de informática.

Ao Departamento de Química da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN pela concessão do afastamento.

Ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA pelo apoio prestado no fornecimento do material botânico e acessórios necessários no processo de isolamento das saponinas triterpênicas por CLAE.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente trabalho relata pela primeira vez a investigação fitoquímica relacionada ao isolamento de saponinas na espécie *Pentaclethra macroloba* Kuntze, mimosoideae, conhecida popularmente como “pracaxi” na região Amazônica.

A investigação fitoquímica dos extratos das sementes (PES), cascas (PEC) e lenho (PEL) de *Pentaclethra macroloba* levou ao isolamento de oito glicosídeos triterpênicos do ácido oleanóico e da hederagenina, denominados de saponinas, constituídas de dois a sete açúcares, a saber: PES-F1(1) ácido 3-O- α -L-ramanopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil oleanóico, PES-F2 (2) 3-O- α -L-ramanopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina, PEC-76 (3) ácido 3-O- β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil-oleanóico, PEC-6P (4) ácido 3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-[β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil-oleanóico, PES-2V (5) 3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil-hederagenina, PEC-5P (6) ácido 3-O- {[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3) - α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]}- α -L-arabinopiranosil-oleanóico, PEC-A3 (7) ácido 3-O- {[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]}- α -L-arabinopiranosil-oleanóico, PEL-LH1 (8) 3-O- {[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]}- α -L-arabinopiranosil-hederagenina. Cabe ressaltar que das saponinas supracitadas, quatro são inéditas: PES-2V (5), PEC-5P (6), PEC-A3 (7), PEL-LH1 (8).

Através da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, realizou-se a análise quantitativa da composição da mistura de saponinas presentes no extrato etanólico das sementes (PES), revelando a presença majoritária de PEC-76 (3) [30,2%], PES-F1 (1) [23,0%] e PES-F2 (2) [18,5%].

As estruturas das saponinas triterpênicas foram elucidadas utilizando-se métodos espectrométricos, principalmente E.M. (FAB, EI), RMN ^1H e ^{13}C , bem como, as técnicas bidimensionais (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) e comparação com dados da literatura.

ABSTRACT

In the present work it is reported, for the first time, the phytochemical investigation related to the isolation of present saponins in the specie *Pentaclethra macroloba* Kuntze - mimosoideae, popularly known as "pracaxi" in the Amazon Region .

From an ethanolic seed (PES), bark (PEC) and stem (PEL) extracts of a specimen of *Pentaclethra macroloba* were isolated eight triterpenoid saponins of the acid oleanolic and the hederagenin, constituted of two to seven sugars: 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid (1); 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl hederagenin (2); 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid (3), 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid (4); 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopyranosyl hederagenin (5); 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid (6); 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) - β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid (7) and 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) - β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] $\}$ - α -L-arabinopyranosyl hederagenin (8). It is noteworthy that, among the aforementioned compounds, the saponins 5, 6, 7 and 8 were novel saponins.

Quantitative analyses of saponins by HPLC, in reverse phase, of the ethanolic extract of seeds (mixture saponins), showed the major presence of saponins components (1) [23%], (2) [18,5%] and (3) [30%].

The structures were elucidated by spectroscopy methods such as IR, MS (FAB, ESI), ^1H NMR and ^{13}C NMR including two dimensional techniques (COSY, NOESY, HMQC and HMBC) and comparison with literature data.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A ESPÉCIE ESTUDADA E LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O TÁXON GENÉRICO <i>Pentaclethra</i>	8
2.1. Introdução	8
2.2. Química da <i>Pentaclethra</i>	10
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SAPONINAS TRITERPÊNICAS	16
3.1. Introdução	16
3.2. Saponinas triterpênicas	16
3.3. Distribuição nos reinos vegetal e animal.....	20
3.4. Isolamento e análise estrutural	20
4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS SEMENTES, CASCA E DO LENHO DE <i>Pentaclethra macroloba</i>	24
4.1. Determinação estrutural de PES-F1 (1)	24
4.2. Determinação estrutural de PES-F2 (2)	33
4.3. Determinação estrutural de PEC-76 (3)	42
4.4. Determinação estrutural de PEC-6P (4).....	54
4.5. Determinação Estrutural de PES-2V (5)	67
4.6. Determinação estrutural de PEC-5P (6).....	78
4.7. Determinação estrutural de PEC-A3 (7)	91
4.8. Determinação Estrutural de PEL-LH1 (8).....	105
5. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ATIVIDADES LARVICIDA E BACTERICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES E DE ALGUMAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DE <i>Pentaclethra macroloba</i>	121
5.1. Introdução	121
5.2. Atividade larvicida	121
5.3. Atividade bactericida.....	122
6. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS TRITERPÊNICAS NO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES – PES POR CLAE	124
6.1. Introdução	124
6.2. Análise quantitativa.....	125
6.3. Validação do método desenvolvido	128
7. PARTE EXPERIMENTAL.....	131
7.1. Material Botânico	131
7.2. Métodos cromatográficos	131
7.3. Métodos Químicos.....	132
7.4. Métodos espectrométricos	132
7.5. Rotação Ótica	133
7.6. Determinação do ponto de fusão	133
7.7. Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico da casca ,lenho e sementes de <i>P. macroloba</i>	133
7.8. Ensaio biológico	147
8. CONCLUSÃO.....	149
9. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS.....	152

9.1. PES – F1(1)	152
9.2. PES – F2(2)	152
9.3. PEC – 76(3)	153
9.4. PEC – 6P(4)	153
9.5. PES – 2V(5)	154
9.6. PEC – 5P(6)	154
9.7. PEC – A3(7)	155
9.8. PEL – LH1(8)	155
10. Referências Bibliográficas	157

Lista de Figuras

Figura 01 - Fotografia da árvore da espécie <i>Pentaclethra macroloba</i> Kuntze.	6
Figura 02 - Biossíntese de triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos	18
Figura 03 - Núcleos mais comuns de triterpenos pentacíclicos	19
Figura 04 - Espectro de massa por bombardeamento rápido de átomos (íons positivos) – FAB de PES-F1 (1).....	24
Figura 05 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F1 (1)	25
Figura 06 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F1(1).....	25
Figura 07 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de PES-F1 (1).....	26
Figura 08 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F1(1)	28
Figura 09 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H - COSY (500 MHz x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PES-F1(1).....	28
Figura 10 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F1(1).....	29
Figura 11 - Correlações entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e desta com a genina de PES-F1 (1)	29
Figura 12 - Espectro de RMN ^1H - NOESY (500 MHz x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PES-F1 (1)	30
Figura 13 - Espectro na região de infravermelho – IV (KBr) de PES-F2 (2)	34
Figura 14 - Espectro de massa por bombardeamento rápido de átomos – FAB (íons positivos) de PES-F2 (2)	34
Figura 15 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - 500 MHz) de PES-F2 (2)	35
Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F2 (2)	36
Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F2 (2).....	36
Figura 18 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2)	37
Figura 19 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2).....	38
Figura 20 - Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PES-F2 (2) observado no espectro de HMBC (Fig. 19, Pag. 37)	39
Figura 21 - Espectro na região de infravermelho da substância PEC-76 (3).....	43
Figura 22 - Espectro de massa por bombardeamento rápido de átomos (íons negativos) da substância PEC-76 (3).....	44
Figura 23 - Espectro de RMN ^1H na região da substância PEC-76 (3)	44
Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-76 (3)	45
Figura 25 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3)	45
Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-76 (3)	46
Figura 27 – Proposta mecanística para justificar as principais fragmentações de PEC-76(3) no espectro de massa.	47
Figura 28 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-76 (3).	48
Figura 29 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3)	49

Figura 30 - Espectro de RMN ^1H - NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC - 76(3).	50
Figura 31 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância PEC-76(3).	50
Figura 32 - Espectro de massa por ionização química por eletrospray ESI-MS de PEC-6P(5).	55
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(5).	55
Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(5).	56
Figura 35 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(5).	56
Figura 36 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4).	58
Figura 37 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(4).	59
Figura 38 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4).	60
Figura 39 - Espectro de RMN ^1H - NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(4).	62
Figura 40 - Correlação entre ^1H , ^{13}C das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PEC-6P (4).	63
Figura 41- Proposta mecanística para justificar as principais fragmentações de PEC-6P(4) no espectro de massa.	64
Figura 42 - Espectro de massa por ionização química eletrospray EI-MS de PES-2V (5).	68
Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-2V(5).	69
Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-2V(5).	69
Figura 45 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de PES - 2V (5).	70
Figura 46 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-2V(5).	71
Figura 47 - Proposta mecanística para justificar os principais fragmentos de PES-2V(5) no espectro de massa.	72
Figura 48 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H - COSY (500 MHz x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PES - 2V(5).	73
Figura 49 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-2V(5).	74
Figura 50 - Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PES-2V(5) observado no espectro de HMBC (Fig. 43, Pag. 69).	75
Figura 51 - Espectro de massa por ionização química eletrospray - ESI de PEC-5P(6).	79
Figura 52 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de PEC-5P(6).	79
Figura 53 - Espectro de HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de 5P	80
Figura 54 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-5P(6).	81
Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-5P(6).	82
Figura 56 - Proposta mecanística para justificar os principais fragmentos de PEC-5P(6) no espectro de massa.	83
Figura 57 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-5P(6).	84
Figura 58 - Espectro de HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-5P (6).	86
Figura 59 - Espectro de NOESY parcial ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de PEC - 5P.	87
Figura 60 - Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PEC-5P (6) observado no espectro de HMBC (Fig. 61, Pág. 92).	88

Figura 61 - Espectro de massa por ionização química eletrospray - EI de PEC-A3(7).	92
Figura 62 - Espectro de RMN ¹³ C - HBBD (C ₅ D ₅ N - 125 MHz) de PEC-A3(7).	92
Figura 63 - Espectro de RMN ¹³ C - DEPT 135 (C ₅ D ₅ N - 125 MHz) de PEC-A3(7).	93
Figura 64 - Espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N - 500 MHz) de PEC-A3(7).	93
Figura 65 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C à uma ligação - HMQC (C ₅ D ₅ N, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-A3(7).	96
Figura 66 - Proposta mecanística para justificar as principais fragmentações de PEC-A3(7). 97	
Figura 67 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H - COSY (500 MHz x 500 MHz, C ₅ D ₅ N) de PEC-A3(7).	98
Figura 68 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C a mais de uma ligação - HMBC (C ₅ D ₅ N, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-A3(7).	100
Figura 69 - Espectro de RMN ¹ H - NOESY (500 MHz x 500 MHz, C ₅ D ₅ N) de PEC- A3(7).	101
Figura 70 - Espectro de massa por ionização química por eletrospray ESI de PEL-LH1(8).1	105
Figura 71 - Proposta mecanística para justificar as principais fragmentações de PEL-LH1(8).	106
Figura 72 - Espectro de RMN ¹³ C - HBBD (C ₅ D ₅ N - 125 MHz) de PEL-LH1(8).	108
Figura 73 - Espectro de RMN ¹³ C - DEPT135 (C ₅ D ₅ N - 125 MHz) de PEL-LH1(8).	108
Figura 74 - a) Espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N - 500 MHz) de PEL-LH1(8).	110
Figura 75 - a) Espectro de HMQC de PEL-LH1 em C ₅ D ₅ N	111
b) Expansão do espectro a região dos átomos de carbonos anoméricos.	111
Figura 76 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C à mais de uma ligação - HMBC (C ₅ D ₅ N, 500 MHz x 125 MHz) de PEL-LH1(8).	112
Figura 77 - a) Espectro de COSY de PEL-LH1(8) em C ₅ D ₅ N (500 MHz); b) Expansão na região de δ 3,0 - 6,2 do espectro	113
Figura 78 - Espectro de NOESY (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de PEL-LH1(8).	114
Figura 79 - a) Correlação entre ¹ H, ¹³ C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PES-F1(1) observado no espectro de HMBC (Fig. 76, Pag. 112).	115
Figura 80 - Curvas de calibração para as saponinas de referência PEL-LH1(8), PEC-A3(7), PES-5P(6), PES-2V(5), PEC- 6P(4), PEC-76(3), PES-F2(2) e PES-F1(1).	126
Figura 81 - Cromatograma do extrato etanólico das sementes de <i>Pentaclethra macroloba</i> - PES (1000 ppm) em CLAE - fase reversa (Nova Pack C-18, Marca Waters).	127
Figura 82 - Cromatograma de obtenção de PES-1V, PES-2V(5) e PES-3V(4) por CLAE em FR-8.	136
Figura 83 - Cromatograma de obtenção de PEC-3P(5), PEC-4P, PEC-5P(6) e PEC-6P(4) por CLAE, em FR-8.	139
Figura 84 - Cromatograma de obtenção de PEC-A2 e PEC-A3(7) por CLAE em fase reversa - FR8.	141
Figura 85 - Cromatograma de obtenção de PEL-LH1(8) e PEL-LH2(7) por CLAE em fase reversa FR-8.	145

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PES-F1(1) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	31
Tabela 02 - Dados de RMN ^{13}C , RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PES-F1(1) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	32
Tabela 03 - Deslocamentos químicos de alguns metilglicosídeos em piridina - $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	32
Tabela 04 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3)] em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ da genina de PES-F2(2).	40
Tabela 05 - Dados de RMN ^{13}C (125 MHz), de RMN ^1H (500 MHz) e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3)] em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ da unidade osídica de PES-F2 (2)	41
Tabela 06 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H da aglicona de PEC-76(3) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	52
Tabela 07 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H da unidade osídica de PEC-76(3) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	53
Tabela 08 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H da aglicona de PEC-6P(4).	65
Tabela 09 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H dos açúcares de PEC-6P(4).	66
Tabela 10 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PES-2V(5) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	76
Tabela 11- Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) dos açúcares de PES-2V(5) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	77
Tabela 12 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PEC-5P(6) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	89
Tabela 13 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PEC-5P(6) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	90
Tabela 14 - Dados de RMN ^{13}C do ácido oleanóico em CDCl_3^{75} e das agliconas das saponinas PES-F1 (1), PEC-76 (3), PEC-6P (4), PEC-5P (6) e PEC-A3 (8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	102
Tabela 15 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PEC-A3(7) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	103
Tabela 16 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PEC-A3(7) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	104
Tabela 17 - Dados de RMN ^{13}C da hederagenina em CDCl_3^{75} e das agliconas das saponinas PES-F2(2), PES-2V(5) e PEL-LH1(8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	117
Tabela 18 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PEL-LH1(8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	118
Tabela 19 - Dados de RMN ^{13}C , RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PEL-LH1(8) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	119
Tabela 20 - Valores de DL_{50} (ppm) apresentados pelas substâncias PEC-6P(4), PEL-LH1(8) e pelo extrato etanólico das sementes - PES frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i>	122
Tabela 21 - Concentrações mínimas do extrato etanólico das sementes de <i>Pentaclethra macroloba</i> - PES e das saponinas triterpênicas PES-F2 (2), PEC-6P (4), PES-2V (5) e PEC-A3 (7) capazes de matar 100% das bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	122
Tabela 22 - Dados dos tempos de retenção das saponinas submetidas à análise por CLAE. 125	
Tabela 23 - Dados da construção das curvas de calibração dos padrões externos: saponinas PES-F1(1), PEC-76(3), PES-F2(2), PEC-6P(4), PEC-5P(6), PEC-A3(7), PES-2V(5) e PEL-LH1(8) - tempos de retenção (Tr), curvas de calibração (equações) e coeficiente de correla-	

ção linear (r ²).	126
Tabela 24 - Áreas dos picos referentes às saponinas PES-2V(5), PEC-A3(7), PEC-6P(4), PEC-76(3), PES-F1(1) e PES-F2(2) presentes no extrato etanólico das sementes de <i>Pentaclethra macroloba</i> - PES.	127
Tabela 25 - Resultado da validação do método para a determinação quantitativa das saponinas triterpênicas no extrato etanólico das sementes de <i>Pentaclethra macroloba</i> - PES	129
Tabela 26 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PES-1V, PES-2V(5) e PES-3V(4).	136
Tabela 27 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PEC-3P(5), PEC-4P, PEC-5P(6) e PEC-6P(4).	139
Tabela 28 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PEC-A2 e PEC-A3(7).	140
Tabela 29 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PEL-LH1(8) e PEL-LH2(7).	145

Lista de Quadros

Quadro 01 - Saponinas triterpênicas isoladas de <i>Pentaclethra macroloba</i>	3
Quadro 02 - Lista das substâncias isoladas no gênero <i>Pentaclethra</i> registradas na literatura .	11
Quadro 03 - Estruturas das substâncias isoladas do gênero <i>Pentaclethra</i>	12
Quadro 04 - Etapas utilizadas na elucidação estrutural das saponinas isoladas de <i>Pentaclethra macroloba</i>	22

Lista de Fluxogramas

- Fluxograma 01 - Rota de isolamento das saponinas triterpênicas PES-F1(1), PES-F2(2), PES-37-38(3), PES-1V, PES-2V(5), PES-3V(4) do extrato etanólico das sementes – PES 137
- Fluxograma 02 - Rota de isolamento das saponinas triterpênicas PEC-76(3), PEC-6P(4), PEC-3P(5), PEC- 5P(6), PEC-4P, PEC-A2 e PEC-A3(7) do extrato etanólico da casca – PEC..... . 142
- Fluxograma 03 - Rota de isolamento das saponinas triterpênicas PEL-(17), PEL-F-30(3), PEL-LH2(7) e PEL-LH1(8) do estudo do extrato etanólico do lenho – PEL..... 146

LISTA DE ABREVIATURAS

PES	Extrato etanólico das sementes
PEC	Extrato etanólico da casca
PEL	Extrato etanólico do lenho
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
LH – 20	Sephadex hidrofóbico
IV	Infravermelho
EM – ESI	Espectrometria de massa por ionização química por eletrospray
EM – FAB	Espectrometria de massa por bombardeamento rápido de átomos
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – 1
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
HBBD	Hydrogen Broad Band Decoupled
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Correlated Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Band Correlation

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pentaclethra* (Leguminosae – mimosoideae), táxon natural de regiões tropicais, é constituído de três espécies, *Pentaclethra macrophylla* Benth. , *Pentaclethra eetveldeana* De Willd, encontradas na África e a *Pentaclethra macroloba* é encontrada nas Américas, especificamente na regiões de várzea de florestas da Costa Rica, do Panamá e da Região Amazônica^{1,2}.

O interesse pelo estudo da espécie *Pentaclethra macroloba* (Fig. 01, Pág. 06) encontrada na região Amazônica, especificamente no Estado do Amapá, decorreu de sua utilização na medicina popular no tratamento de dores de ouvido e de picadas de cobra³, bem como, cicatrização pós-parto cesariano , além de estudos relacionados às propriedades inseticidas de suas sementes^{4,5,6}; e da detecção na outra espécie do táxon, *Pentaclethra eetveldeana*⁷, de uma classe de metabólitos secundários denominados de saponinas, detentoras de um amplo espectro de atividades biológicas, tais como, atividade anticancerígena, moluscicida, entre outras^{8,9,10}. Estas observações reforçaram a proposta de estudo fitoquímico da espécie *Pentaclethra macroloba* presente no Estado do Amapá.

No presente trabalho é relatada pela primeira vez a investigação fitoquímica relacionada ao isolamento de saponinas presentes na espécie *Pentaclethra macroloba* Kuntze, conhecida popularmente como “pracaxi” na Região Amazônica, particularmente no Estado do Amapá; com objetivo de contribuir para o processo de desenvolvimento de alternativas de recursos naturais sustentáveis para a população local, através de possíveis aplicações farmacológicas e quimiossistemáticas, ampliando assim o conhecimento científico da flora amapaense.

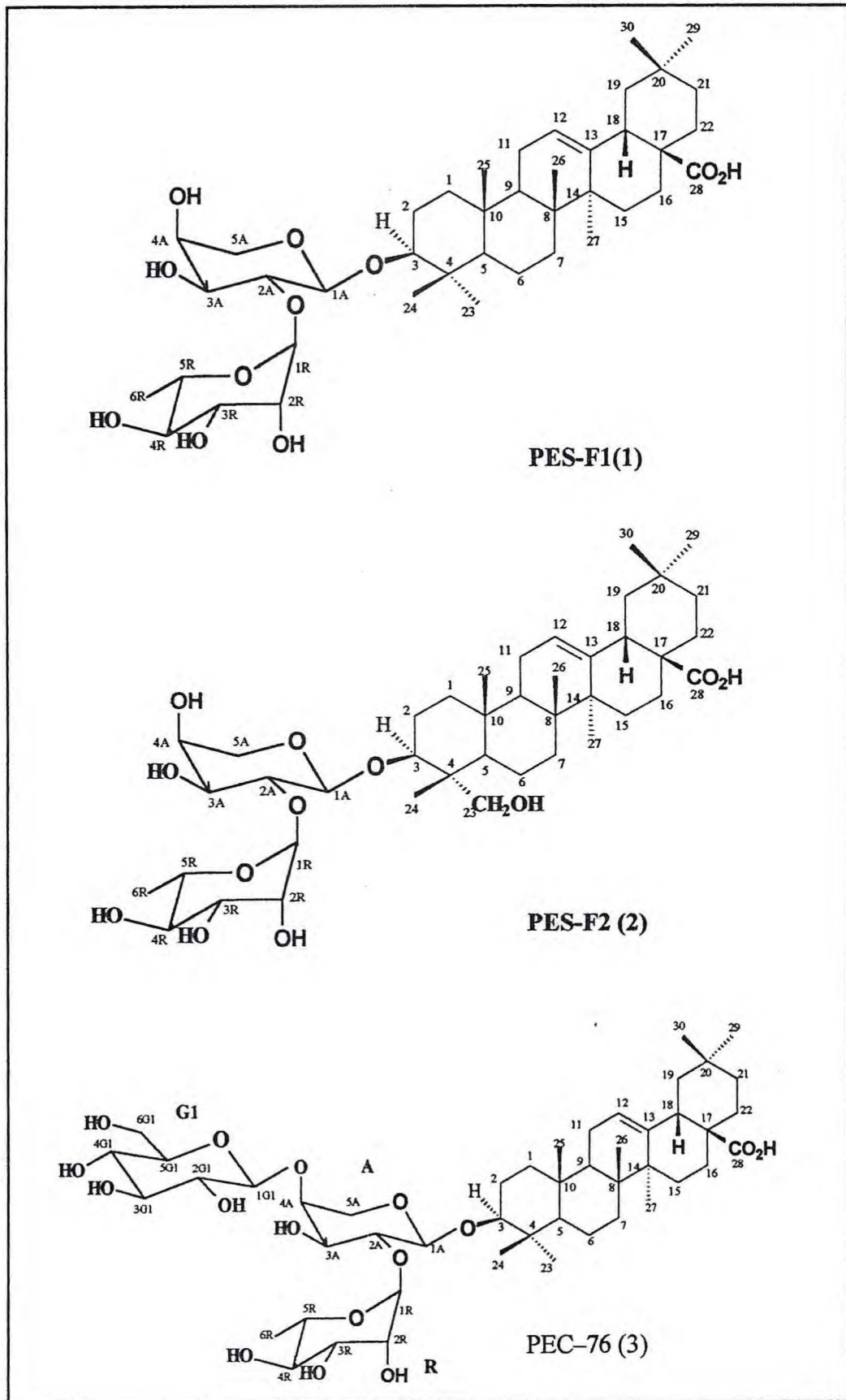
Do extrato etanólico das sementes da *Pentaclethra macroloba*, denominado PES, foram isoladas quatro saponinas, sendo uma inédita, designada como PES-2V (5) e as outras três designadas como PES-F1 (1)^{11,12}, PES-F2 (2)¹²⁻¹⁵, PES-3V (4)^{11,16}. De acordo com a literatura, a saponina PES-F2 (2), um 3-O- glicosídeo da hederagenina, revelou em estudos recentes, atividades tais como, antiespasmódica¹⁷, citotóxica^{18,19} e antileishmaniose²⁰, onde sugere-se a possibilidade do uso da mesma saponina como provável fármaco no tratamento de câncer e de leishmaniose.

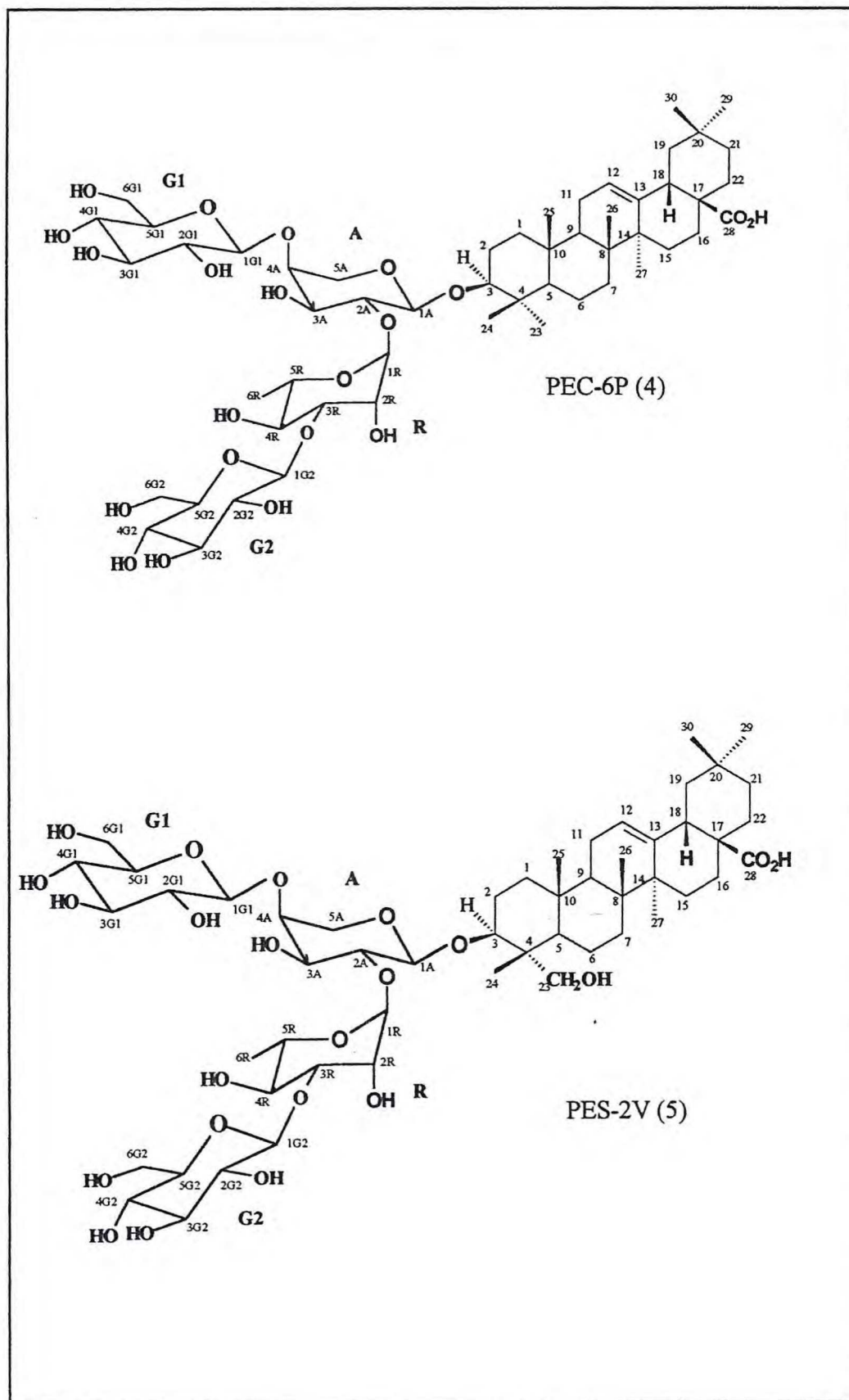
A partir do extrato etanólico das cascas, denominado PEC, foram isoladas as saponinas triterpênicas PEC-76 (3), PEC-6P (4), PEC-5P (6), PEC-4P, PEC-A3 (7) e PEC-A2. Destas saponinas isoladas, apenas duas não foram caracterizadas, ou seja, as saponinas PC-4P e PC-A2. Entretanto, as saponinas PEC-5P (6) e PEC-A3 (7), glicosídeos do ácido oleanólico constituídas, respectivamente, de cinco e sete açúcares, na unidade osídica, são descritas pela primeira vez na literatura.

Por outro lado, o estudo do extrato etanólico do lenho, denominado PEL, permitiu o isolamento de quatro saponinas triterpênicas PEL-F17 (1), PEL-F-30 (3), PEL-LH1 (8) e PEL-LH2 (7), sendo as saponinas PEL-F17, PEL-F30 e PEL-LH2 equivalentes estruturalmente às saponinas PES-F1 (1), PEC-76 (3) e PEC-A3 (7), respectivamente. A posterior pesquisa bibliográfica sobre estas saponinas, revelou que PEL-LH1 (8), um glicosídeo da hederagenina, constituído de sete unidades de açúcares, é uma substância inédita.

É válido salientar que neste trabalho, isolou-se saponinas sem a necessidade de derivatização, através do processo de acetilação dos extratos, além de não usar do processo de hidrólise das mesmas para a sua caracterização. Empregou-se no processo de isolamento uma combinação de técnicas clássicas de purificação em coluna cromatográfica de gel de sílica, precipitação com acetona, cromatografia de exclusão molecular com sephadex LH-20, bem como, técnica atual de alta precisão e reprodutibilidade como cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE em fase reversa; aliadas ao emprego de novas técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais no processo de elucidação estrutural, bem como, espectrometria de massa por ionização química por eletrospray (ESI) e por bombardeamento rápido de átomos (FAB), fundamentais na análise da seqüência de ligação dos açúcares nas unidades osídicas.

O capítulo 1 trata da presente Introdução; o capítulo 2 relata as considerações botânicas sobre a família Leguminosae - Mimosoideae e o gênero *Pentaclethra*, bem como, da revisão bibliográfica das substâncias isoladas das espécies pertinentes ao gênero *Pentaclethra*. O capítulo 3 trata das considerações gerais sobre saponinas triterpênicas, o capítulo 4 relata a elucidação estrutural das saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba*. No capítulo 5 são descritos bioensaios do extrato etanólico das sementes e de algumas saponinas, o capítulo 6 trata da análise quantitativa das saponinas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE; o capítulo 7 descreve¹ os procedimentos experimentais envolvidos no processo de isolamento dessas saponinas, as técnicas utilizadas e especificações dos materiais e instrumentos. Nos capítulos 8, 9 e 10 são relatados, respectivamente, conclusão, constantes físicas e dados espectrométricos e referências bibliográficas citadas no presente trabalho.

Quadro 01 - Saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba*.

Quadro 01 - Saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba*.

Quadro 01 - Saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba*.

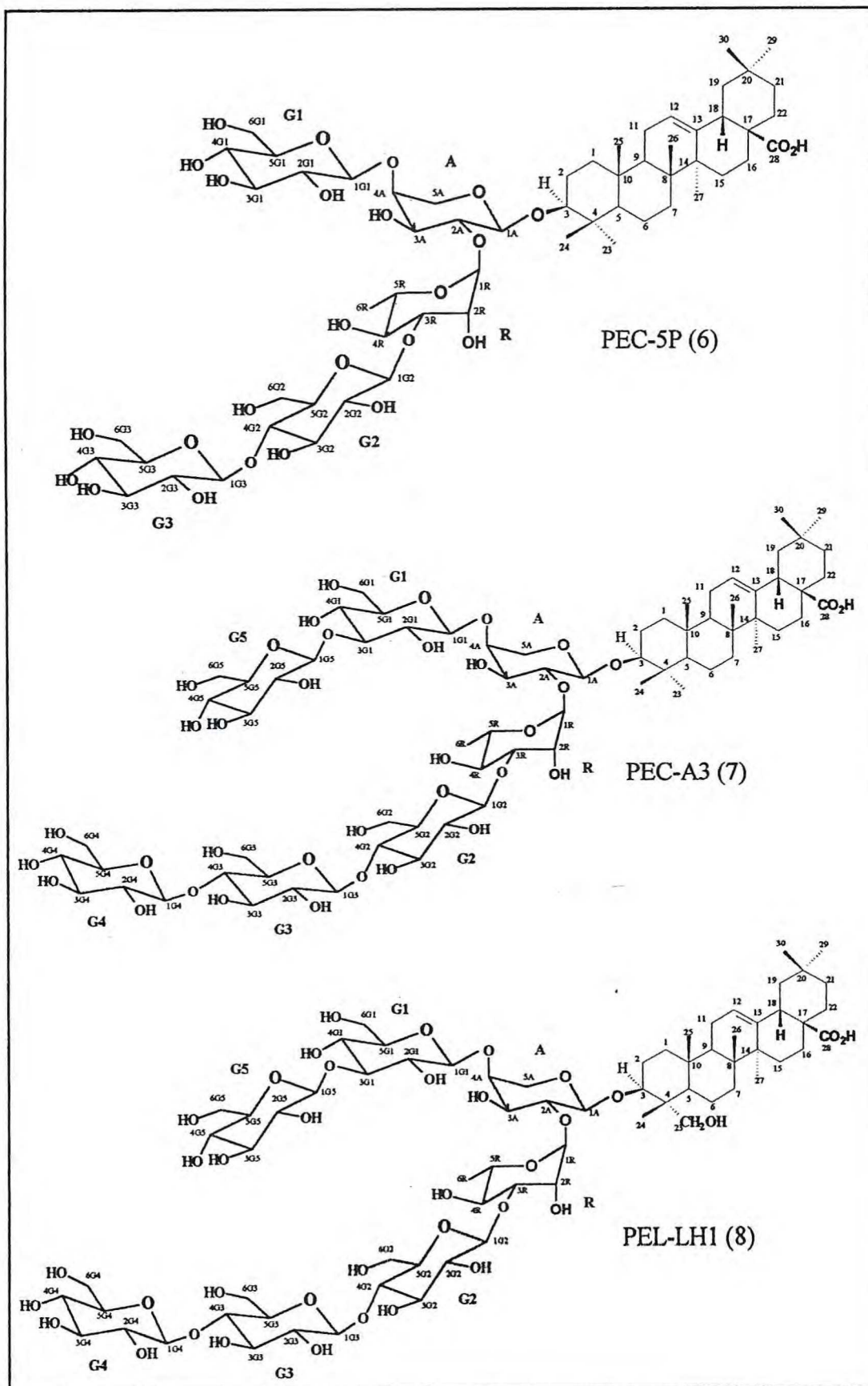




Figura 01 - Fotografia da árvore da espécie *Pentaclethra macroloba* Kuntze.

**CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A
ESPÉCIE ESTUDADA E LEVANTAMENTO
BIBLIOGRÁFICO SOBRE O GÊNERO
*PENTACLETHRA***

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A ESPÉCIE ESTUDADA E LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O TÁXON GENÉRICO *Pentaclethra*

2.1. Introdução

A família Leguminosae compreende aproximadamente 17000 a 18000 espécies, distribuídas em torno de 750 gêneros, difundidas nas diversas regiões do globo, especialmente nas regiões subtropicais¹. Tradicionalmente, a família é dividida em três grandes grupos, as subfamílias Mimosoidea, Caesalpinoidea e a Papilionoidea constituídas por diversas tribos, gêneros e espécies. As espécies das subfamílias Caesalpinoideae e Mimosoideae são, principalmente, tropicais e as da Papilionoideae encontram-se, freqüentemente, nas regiões subtropicais²¹.

São plantas de hábitos muito variados, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais e perenes e também trepadeiras; vivendo nos mais variados ambientes, em diferentes altitudes e latitudes. Entretanto, todas são plantas que vivem simbioticamente com certas bactérias capazes de fixar o nitrogênio do ar, encontradas nos conhecidos nódulos das raízes^{22,23}.

A subfamília Mimosoideae compreende cerca de 60 gêneros, que abrangem aproximadamente 2800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e cáldo-temperado do globo²¹. Apresentam flores de simetria radial, podendo estas serem pentâmeras ou tetrâmeras, diclamídeas e hermafroditas. São plantas subarbusivas, arbustivas ou arbóreas, de folhas freqüentemente pinadas. Apresentam cálice gamossépalo com 4 a 5 dentes, corola gamopétala com 4 a 5 pétalas, e em geral não são vistosas e têm estames isômeros com a corola em número duplo, livre entre si, e fruto seco, tipo legume, ou indeiscente, com sementes mergulhadas em polpa doce, ou do tipo lomento como encontramos em Mimosa.

Representantes desta subfamília são especialmente abundantes nas regiões tropicais. Dentre os gêneros que se encontram no Brasil destacam-se pelo número de espécies; Mimosa (jurema, sabiá, bracatinga), Calliandra (esponjinha), Ingá (ingá), Pithecellobium (olho de cachorro), Piptadenia (angico) e Parkia²². O gênero *Pentaclethra* encontra-se inserido na tribo Parkia que atualmente compreende dois gêneros: *Parkia* e *Pentaclethra*^{1, 21, 22, 24}.

As espécies do gênero *Pentaclethra* são árvores altas que habitam regiões de florestas úmidas, especificamente localizadas em terras baixas ao longo dos rios. São árvores que crescem aproximadamente 21 metros e apresentam diâmetro em torno de 6 metros e produzem madeira de boa qualidade. Possuem folhas bipinadas, linear-oblíguas, agudas, dez ou mais pares de jugas, escuras e brilhantes, folíolos numerosos; flores alvas bissexuais normalmente brancas e dispostas em grandes cachos ou espigas cilíndricas compridas, freqüentemente peniculatas; fruto

vagem, comprida, chata coriácea^{1,3,25}.

As duas espécies localizadas na África, a *Pentaclethra macrophylla* e *Pentaclethra eetveldeana* são comumente conhecidas pela denominação de árvore do óleo do feijão (oil bean tree) e óleo de owala. Suas sementes fornecem óleos comestíveis, que também são utilizados na fabricação de sabões, lubrificantes e loções medicinais^{1,25}.

A espécie *Pentaclethra macroloba*, denominada de Pracaxi ou Paraocaxi na Região Amazônica e de Gavilan na Costa Rica, no Panamá e na Nicarágua, fornece madeira avermelhada, resistente, usada em obras hidráulicas e na construção civil. Sua casca é adstringente e as sementes têm várias aplicações medicinais, especialmente na cicatrização de úlceras e de picadas de cobras³, além de exibir propriedades inseticidas⁴⁻⁶.

2.2. Química da *Pentaclethra*

A pesquisa bibliográfica realizada sobre o táxon *Pentaclethra* no Chemical Abstract, revelou estudos relacionados ao aproveitamento do óleo extraído das sementes, nas áreas de alimentos, de bebidas e medicinal, além do isolamento de substâncias pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários como alcalóides, quinonas, triterpenos e saponinas, cujos nomes estão listadas no Quadro 02 (Pág. 11) e suas respectivas estruturas estão apresentadas no Quadro 03 (Pág. 12).

Estudos relacionados à espécie *Pentaclethra macrophylla* Benth, relatou a análise da composição dos aminoácidos e ácidos graxos presentes nas sementes, em virtude da utilização desse óleo ser usado como fonte de proteínas e calorias na alimentação de 14 milhões de pessoas, bem como, do melhoramento do processo do sistema de produção de alimento popular rico em proteínas, denominado ugba²⁶⁻³³. Também revelou o isolamento de aminoácidos denominados de ácido penmarico^{34,35}, de ácido dicostachinico³⁶ e de um alcalóide denominado de paucina³⁷.

Estudo fitoquímico do extrato etanólico das sementes da espécie *Pentaclethra eetveldeana*, levou ao isolamento e identificação de uma mistura de saponinas triterpênicas⁷, constituídas de geninas identificadas como hederagenina e ácido oleanólico, e unidade osídica constituídas dos açúcares arabinose, ramnose e glicose. O estudo fitoquímico dessa espécie³⁸, levou ao isolamento e identificação de outros triterpenos e derivados do triacilglicerol.

Os primeiros estudos descritos na literatura sobre a espécie *Pentaclethra maculoba*, relatam o uso de sua madeira como matéria prima, sob a forma de polpa, na fabricação de papel^{39,40}. Em 1957, foi relatada uma abordagem sobre o uso do óleo das sementes de Pracaxi na área industrial⁴¹, bem como, a análise da composição deste óleo, no qual foi observada a presença dos fitoesteróides β -Sitosterol, estigmasterol, campesterol e de ácidos graxos⁴².

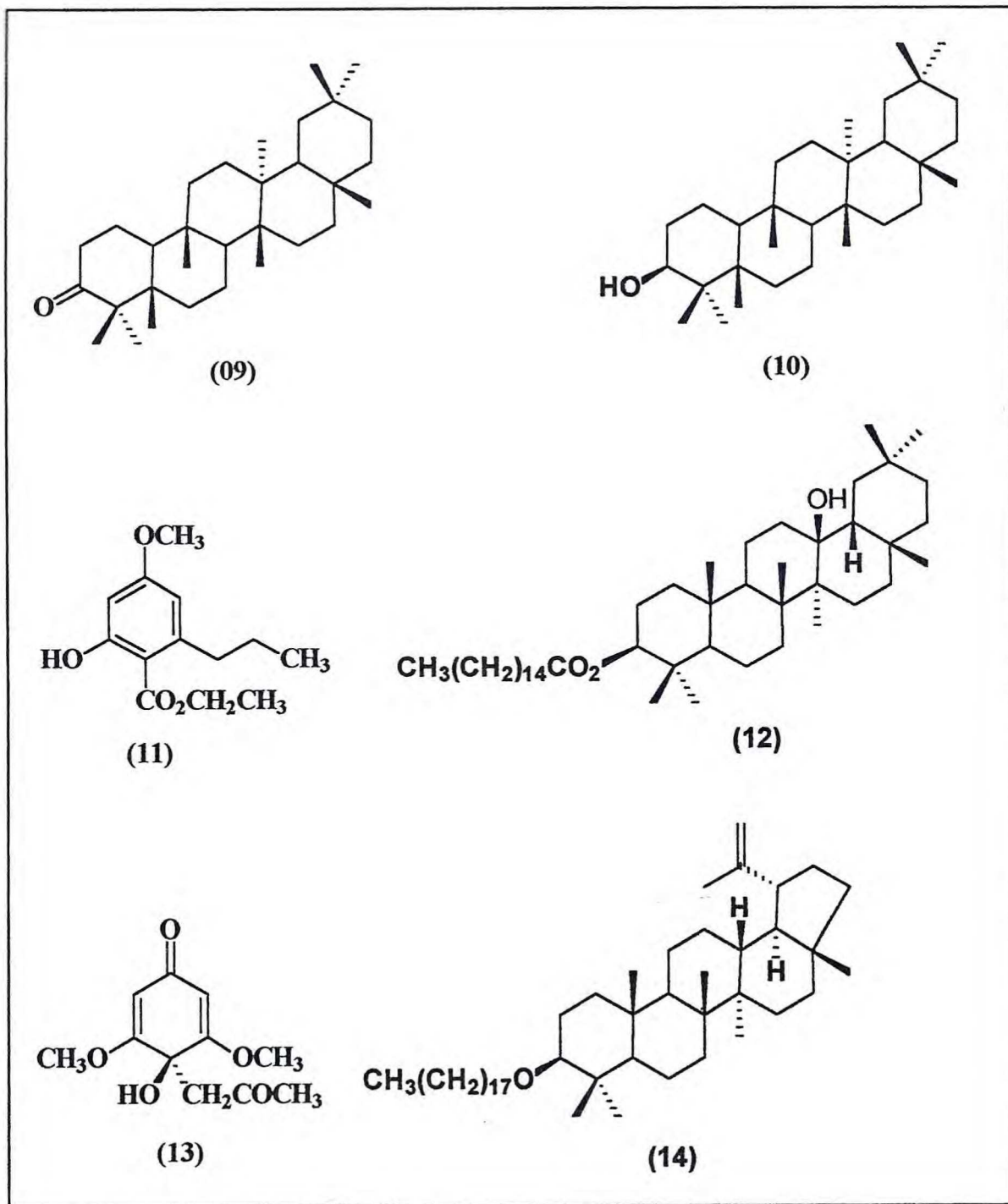
Estudos desenvolvidos na área de entomologia revelaram efeitos inibitórios do extrato bruto aquoso das sementes sobre o crescimento de insetos e de herbívoros roedores^{4,5}, além de estudos sistemáticos na área botânica⁴³⁻⁴⁸.

Segundo a literatura, não existe nenhum registro de estudos relacionados ao isolamento de saponinas na espécie *Pentaclethra maculoba*. Desta forma, esta é primeira vez que se aborda o estudo fitoquímico relacionado ao isolamento de saponinas presentes nesta espécie, bem como, da análise quantitativa das saponinas no extrato etanólico das sementes – PES, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

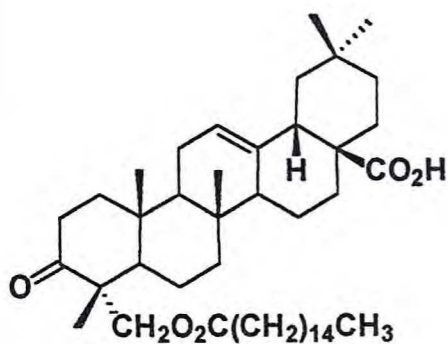
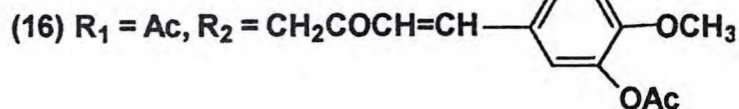
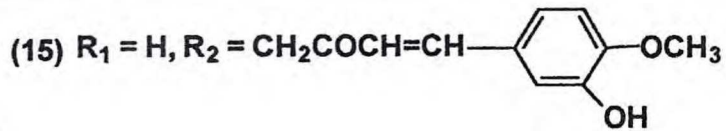
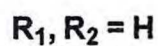
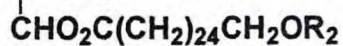
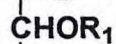
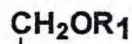
Quadro 02 - Lista das substâncias isoladas no gênero *Pentaclethra* registradas na literatura

Substâncias	Estruturas	Espécies do gênero <i>Pentaclethra</i>	Referências
Friedelina	09	<i>eetveldeana</i>	38
3-Epifriedelanol	10	"	"
2-Hidroxi-4-metoxi-6-n-propilbenzoato	11	"	"
3-β-palmitoxi-13-b-hidroxioleanano	12	"	"
2,6-Dimetoxi-1-acetomilquinol	13	"	"
Lupeil - estearil - éter	14	"	"
1-(26-Hidroxihexacosanoil) - glicerol	15	"	"
1-(26-Ferruloxihexacosanoil)-glicerol	16	"	"
Ácido 24-palmitoxioleanólico	17	"	"
Hederagenina	18	"	07
Ácido oleanólico	19	"	"
Glicose	20	"	"
Arabinose	21	"	"
Rhamnose	22	"	"
Ácido hexacosanóico	23	<i>macrophylla</i>	27
Ácido octacosanóico	24	"	"
Ácido dicostachinico	25	"	36
Ácido permacrico	26	"	34, 35
Paucina	27	"	37
β- Sitosterol	28	<i>macroloba</i>	42
Estigmasterol	29	"	"
Campesterol	30	"	"

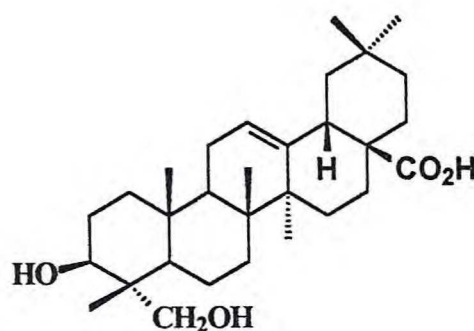
Quadro 03 - Estruturas das substâncias isoladas do gênero *Pentaclethra*



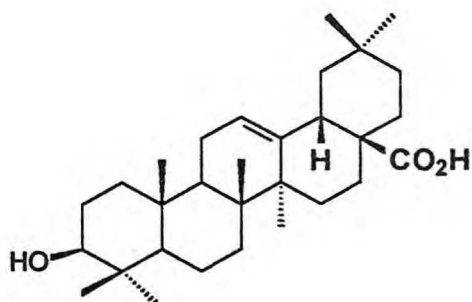
Quadro 03 - Estruturas das substâncias isoladas do gênero *Pentaclethra*



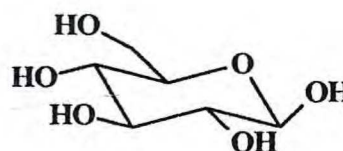
(17)



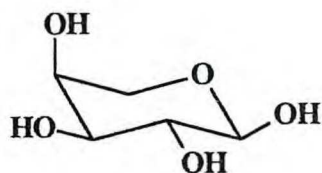
(18)



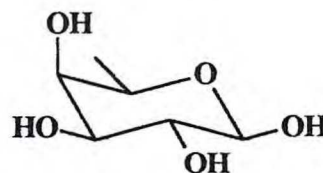
(19)



(20)

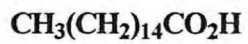


(21)

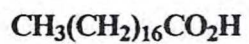


(22)

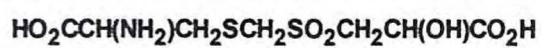
Quadro 03 - Estruturas das substâncias isoladas do gênero *Pentaclethra*



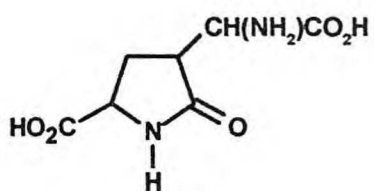
(23)



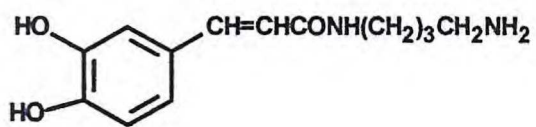
(24)



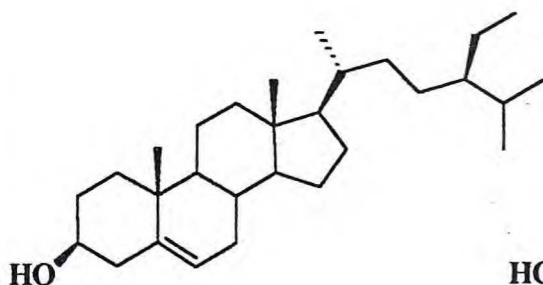
(25)



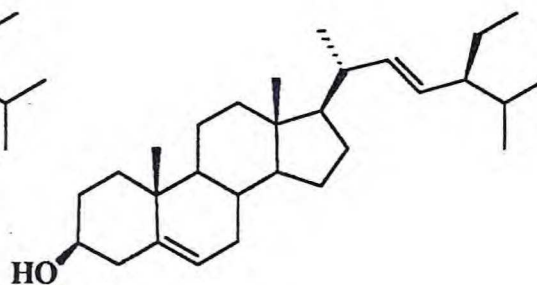
(26)



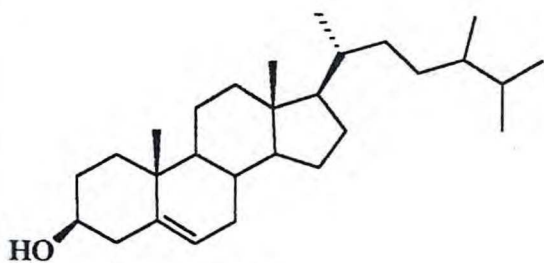
(27)



(28)



(29)



(30)

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SAPONINAS TRITERPÊNICAS

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SAPONINAS TRITERPÊNICAS

3.1. Introdução

Quimicamente o termo saponina é reservado aos derivados glucoconjugados de triterpenos e esteróides, isto é, são glicosídeos de esteróides e de triterpenos. São substâncias anfífilas de elevada massa molar (600 a 2000), que possuem em suas estruturas, uma parte com características lipofílicas (triterpênica ou esteroidal) e outra parte, hidrofílica (açúcares). O balanço hidrófilo- lipófilo (BHL) entre essas duas partes determina diferentes propriedades, tais como, redução da tensão interfacial, ação detergente e emulsificante⁴⁹⁻⁵¹.

Outras propriedades físicoquímicas e biológicas⁵²⁻⁵⁶ encontradas, mas, nem sempre, presentes em todas as saponinas, são ação sobre as membranas das células sanguíneas (atividade hemolítica) ou sobre células das brânquias em peixes (atividade ictiotóxica); e complexação com esteróides, razão pela qual frequentemente apresentam ação antifúngica e hipocolesteremiante.

3.2. Saponinas triterpênicas

Nas saponinas triterpênicas, a aglicona ou genina é formada por um esqueleto constituído de 30 átomos de carbono. Biogeneticamente, formam-se via pirofosfato de isopentenila originando o óxido de esqualeno, que cicliza numa conformação cadeira – cadeira – cadeira - barco e de acordo com dois tipos de rearranjos, podem originar os triterpenos tetracíclicos e os pentacíclicos⁵⁷⁻⁵⁹ (Fig. 02, Pag. 18).

Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em três grupos principais, segundo seu esqueleto β -amirina, α -amirina e lupeol. As saponinas do tipo β -amirina isoladas nesse trabalho conhecidas como oleananos, apresentam dois grupos metilas em C-20, enquanto aquelas do tipo α -amirina ou ursanos, apresentam um grupo metila em C-20 e outro em C-19. Nessas saponinas, a estereoquímica da fusão entre os anéis A/B, B/C e C/D é *trans* e entre D/E, é *cis* (Fig. 03, Pag. 19). As saponinas do tipo lupeol diferem, daquelas citadas anteriormente, na estereoquímica da fusão entre os anéis D/E, que é *trans*. Além disso, o quinto anel (E) possui cinco átomos de carbono, não sendo hexagonal como nas outras saponinas triterpênicas.

As saponinas podem ser classificadas também quanto ao número de cadeias osídicas ligadas à aglicona. Assim, as saponinas denominadas monodesmosídicas possuem uma unidade osídica, enquanto as bidesmosídicas têm duas unidades de cadeias osídicas, a maioria com ligação éter em C-3 e outras com ligação éster em C-28. Essa diferenciação é importante, uma vez que, frequentemente, as saponinas bidesmosídicas não apresentam atividades biológicas relacionadas para as saponinas monodesmosídicas⁵³.

A unidade osídica apresenta um número variável de monossacarídeos ligados entre si em cadeia linear ou ramificada. Os monossacarídeos, comumente encontrados nas plantas são D-glicose, D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-fucose e os ácidos glicurônico e galacturônico^{51,58, 60-62}.

Esse trabalho tratará das saponinas triterpênicas de núcleo pentacíclico da série da β -amirina, especificamente do ácido oleanólico e da hederagenina isoladas da espécie *Pentaclethra macroloba*.

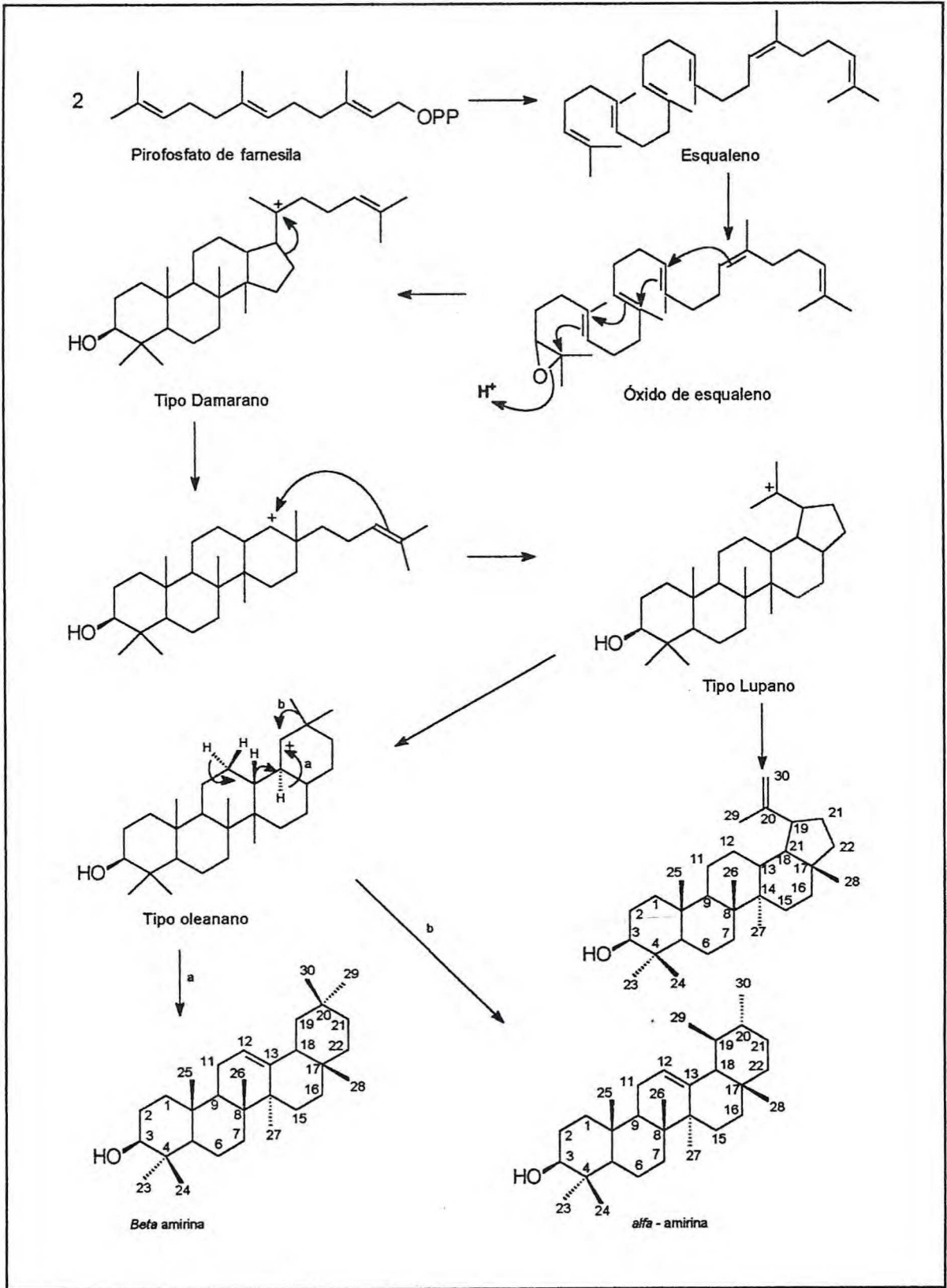


Figura 02 - Biossíntese de triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos

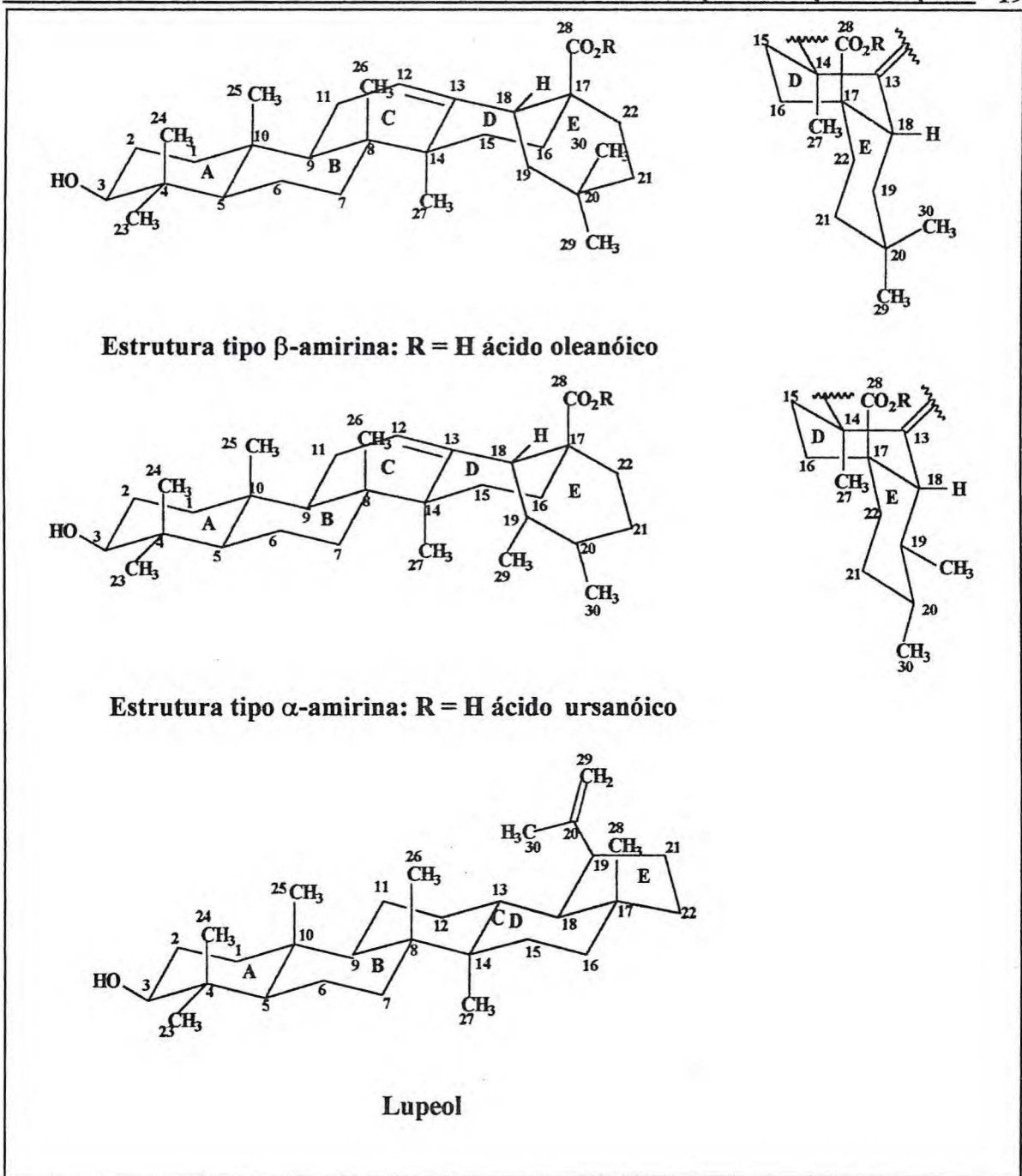


Figura 03 - Núcleos mais comuns de triterpenos pentacíclicos

3.3. Distribuição nos reinos vegetal e animal

Esses compostos são frequentemente encontrados nos vegetais, ocorrendo raramente nos animais. Com algumas poucas exceções, as saponinas triterpênicas são raras nas monocotiledôneas e abundantes nas dicotiledôneas, em particular nas famílias Sapindaceae, Araliaceae, Caryophyllaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, etc⁵⁸. No reino animal marinho, as saponinas triterpênicas ocorrem nos gêneros *Holothuria*, *Asteropus* e *Bbohadshia* que fazem parte do grupo dos Echinodermatas (pepinos do mar)⁴⁹.

3.4. Isolamento e análise estrutural

O isolamento de saponinas é um processo bastante laborioso, pois sendo glicosídeos e, portanto, substâncias polares com muitas variações quanto ao número de açúcares presentes para uma aglicona ou genina, e/ou abrangendo variações quanto às agliconas e aos açúcares presentes, proporcionam propriedades físicas semelhantes. Assim, são utilizados diversos tipos de processos cromatográficos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE – FR), cromatografia de micro-gotas em contra corrente versão estática (DCCC) e versão centrífuga (RLCC e CCP), bem como XAD-2 e exclusão molecular em Sephadex LH-20⁶³⁻⁶⁵.

No processo de isolamento das saponinas triterpênicas de *Pentaclethra maculosa*, utilizou-se uma combinação de técnicas, como cromatografia em coluna em gel de sílica e em Sephadex LH-20, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em escala semipreparativa, além de método de precipitação química com acetona.

As saponinas triterpênicas constituídas de dois e três açúcares foram isoladas em coluna de gel de sílica, eluída com uma mistura ternária $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (9 : 1 : 0,1) com polaridade crescente; precipitação com acetona e posteriormente por cromatografia de exclusão molecular com sephadex LH-20. No entanto, as demais saponinas triterpênicas constituídas de quatro, cinco e sete açúcares, somente foi possível isolá-las com emprego da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, utilizando um sistema de gradiente linear de acetonitrila e água, depois da utilização do processo cromatográfico em coluna de gel de sílica, precipitação com acetona e cromatografia de exclusão molecular em Sephadex LH-20.

A análise estrutural das saponinas triterpênicas foi realizada através de métodos químicos e espectroscópicos. Como método químico, a hidrólise ácida ou básica, dependendo da estrutura da saponina^{66,67} ajuda a identificar por CCD comparativa, com padrões de açúcares e de triterpenos, os tipos de açúcares presentes, bem como, a aglicona. A determinação da sequência de ligação dos açúcares na unidade osídica pode ser realizada por cromatografia gasosa simples ou gasosa acoplada à espectrometria de massas dos derivados acetilados,

principalmente peracetilados ou por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

O advento de novas técnicas modernas de ressonância magnética nuclear e de novas técnicas de espectrometria de massas, contribuiu muito para a elucidação estrutural das saponinas nas suas formas originais, sem lançar mão de tratamentos químicos como hidrólise. A comparação dos dados espectroscópicos dos átomos de carbono anoméricos dos açúcares com seus respectivos metilglicosídeos⁶⁸⁻⁷⁰, mediante a detecção por meio do efeito da substituição do sítio pelo efeito da glicosilação, permitiu definir a sequência das ligações interglicosídicas. A espectrometria de massas⁷¹⁻⁷³, particularmente as técnicas de ionização química (ESI-MS) e de bombardeamento rápido de átomos (FAB-MS), são atualmente, empregadas na determinação das massas molares dos açúcares, tais como hexose, metil-pentose, pentose, e da sequência de açúcares na unidade osídica. Estes dados são, portanto, de fundamental importância na elucidação estrutural, principalmente, de saponinas constituídas de mais de cinco unidades de açúcares⁷⁴.

A metodologia empregada na determinação estrutural das saponinas isoladas de *Pentaclethra macroleoba* foi desenvolvida segundo as etapas descritas no Quadro 04 (Pág. 22), no qual são abordados os métodos de análise estrutural da unidade osídica e da aglicona, sem a necessidade do processo de degradação da saponina.

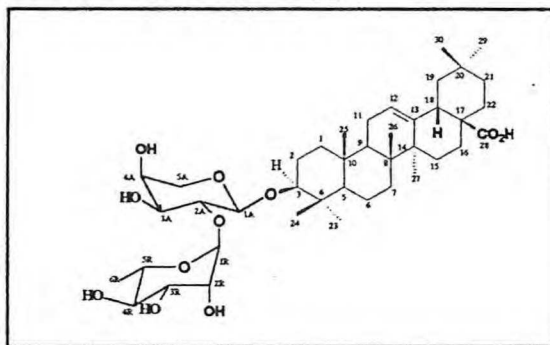
Quadro 04 - Etapas utilizadas na elucidação estrutural das saponinas isoladas de *Pentaclethra macroloba*

Identificação da Agliconas ou Geninas	Identificação dos Açúcares
<p>a) Massa molar identificada no espectro de massas;</p> <p>b) Comparação de dados de RMN ^1H, de RMN ^{13}C – HBBD com os respectivos dados de agliconas relatados na literatura;</p> <p>c) Análise do espectro de HMBC: pontos básicos de aglicona;</p> <p>- Correlação de sinais de átomos de hidrogênio de grupos metila;</p> <p>- Correlação de sinais de átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono que estão ligados a heteroátomos;</p> <p>- Correlação de sinais de átomos de hidrogênio, mostrando sinais bem definidos no espectro COSY.</p>	<p>a) Comparação por CCD, com padrões de açúcares autênticos, depois do processo de hidrólise ácida;</p> <p>b) Identificação no espectro de massas; (FAB, ESI), de fragmentos característicos de perdas relacionadas às unidades hexosila, desoxiesoxila e pentosila;</p> <p>c) Determinação da configuração do átomo de carbono anomérico através da análise da constante de acoplamento $^3\text{J}(\text{H,H})$;</p> <p>d) Determinação do deslocamento químico de cada tipo de carbono através de HMQC, proporcionando comparação com os sinais correspondentes aos átomos de carbono de seus respectivos metilglicosídeos;</p> <p>e) Análise dos sinais de hidrogênios através de sinais bem definidos utilizados como pontos de partida (hidrogênios anoméricos, C-6 (CH_3) de deoxihexose, correlacionado no espectro de COSY, corroborados com os dados de HMQC;</p> <p>f) Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono das oses com unidade osídica semelhante.</p>

**DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS
SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DOS
EXTRATOS ETANÓLICOS DAS SEMENTES,
CASCA E DO LENHO DE *Pentaclethra*
*macroloba***

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS SEMENTES, CASCA E DO LENHO DE *Pentaclethra macroloba*

4.1. Determinação estrutural de PES-F1 (1)



A saponina PES-F1 (1) apresentou – se como um sólido branco amorfo, solúvel em piridina, de ponto de fusão 221-224 °C. Seu espectro de massa FAB de íons positivos $[M + H]^+$ (Fig. 04, Pag. 24) mostrou fragmentos em m/z 734 $[M]^+$, m/z 588 $[M-146]^+$, m/z 456 $[M-146-132]^+$, 439 $[M-146-132-17]^+$ sugerindo fórmula molecular $C_{41}H_{66}O_{11}$.

No espectro de RMN ^{13}C – HBBD (Fig. 05, Pag. 25) foram identificadas 41 linhas espectrais, que por comparação com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 06, Pag. 25), permitiu reconhecer o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono, das quais oito são correspondentes a átomos de carbono metílicos, onze metilênicos, quatorze metínicos e, por exclusão, 8 átomos de carbono não hidrogenados (Tab.01, Pag. 31) e (Tab. 02, Pag. 32).

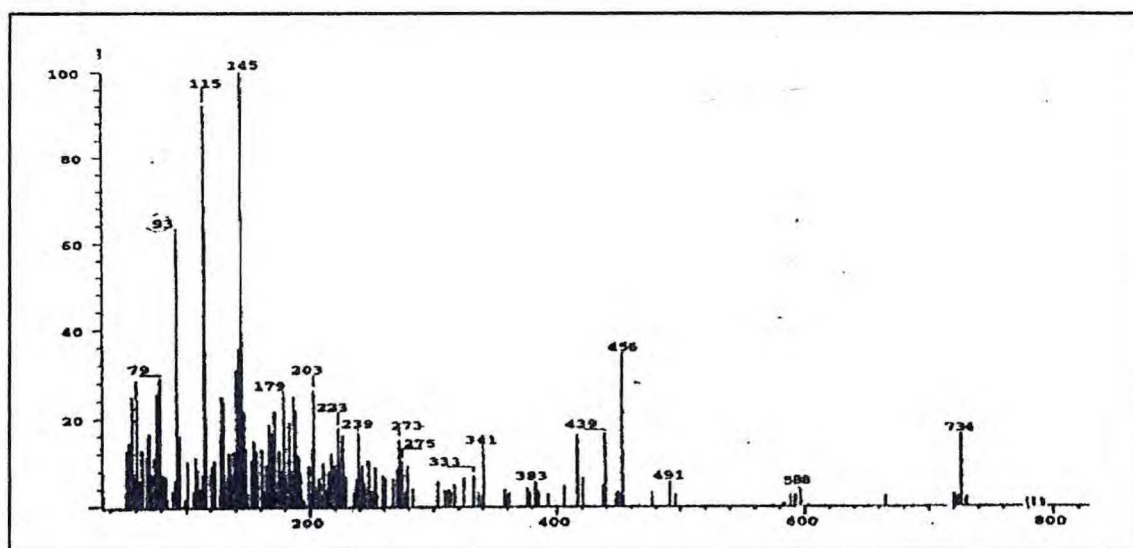


Figura 04 - Espectro de massas por bombardeamento rápido de átomos (íons positivos) – FAB de PES-F1 (1)

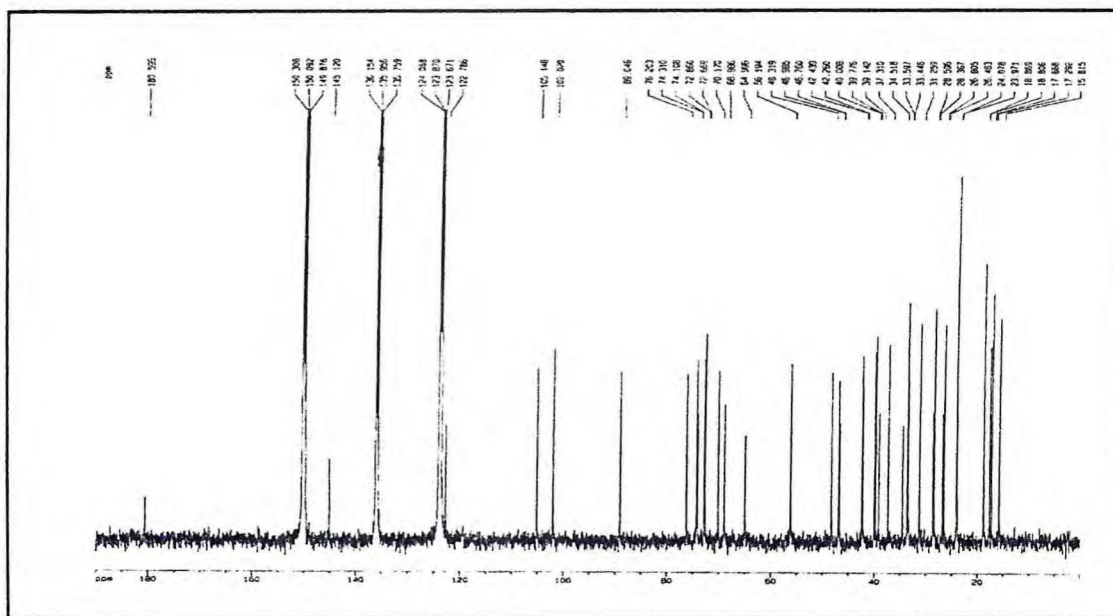


Figura 05 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES–F1 (1)

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – HBBD e DEPT 135, baseados nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, indicou a presença de uma saponina triterpênica, constituída de 41 átomos de carbono, dos quais 30 estão relacionados à genina ou aglicona triterpênica do ácido oleanólico e os 11 átomos de carbono restantes estão relacionados à unidade osídica, constituída de dois açúcares, uma metilpentose (desoxiexose) e uma pentose.

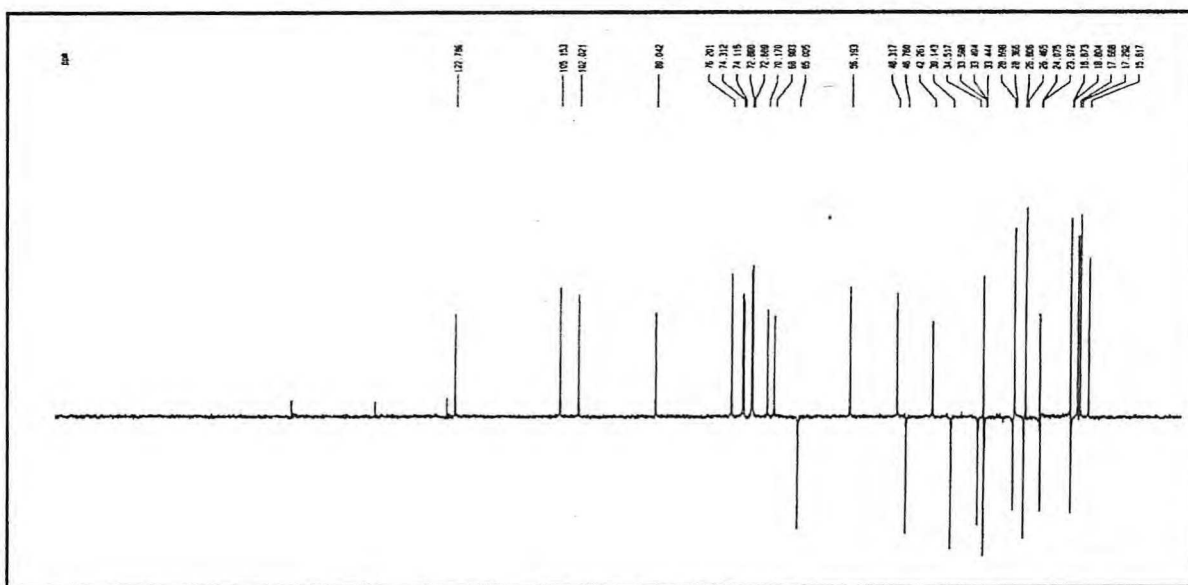


Figura 06 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES–F1(1)

O espectro de RMN ^1H (Fig.07, Pag. 26) apresentou sete sinais correspondentes a hidrogênios de grupos metila ligados a átomos de carbonos não hidrogenados, compreendidos entre δ 0,8 e δ 1,3 ppm; um sinal correspondente a um átomo de hidrogênio olefínico de dupla ligação trissubstituída em δ 5,5 (t), sugerindo a presença de triterpeno pentacíclico da série olean-12-eno; o que está em concordância com o aparecimento de dois sinais na região de carbonos olefínicos em δ 122,8 e δ 145,1 no espectro de RMN ^{13}C – HBBD (Fig.05, Pag. 25), atribuídos aos átomos de carbono C-12 e C-13 de triterpeno, constituído de esqueleto da série olean-12-eno⁷⁵. Também observou-se no espectro de RMN ^{13}C – HBBD, a presença de um sinal em δ 180,6 ppm, atribuído a um carbono de carboxila, sugerindo que o triterpeno tratava-se do ácido oleanólico.

Adicionalmente, verificou-se de maneira inequívoca, no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta – HMQC (Fig. 08, Pag. 28), a correlação do sinal correspondente ao átomo de carbono C-12 em δ 122,8 com o sinal do hidrogênio H-12; a correlação do átomo de carbono C-18 em δ 42,3 com o hidrogênio metínico H-18 em δ 3,3(dd, 13,7 e 3,9), além do sinal correspondente ao carbono carbinólico C-3 em δ 89,1 que está correlacionado ao sinal correspondente ao hidrogênio H-3 em δ 3,2 (dd, 11,7 e 4,1 Hz) definindo-se, portanto, a presença do ácido oleanólico.

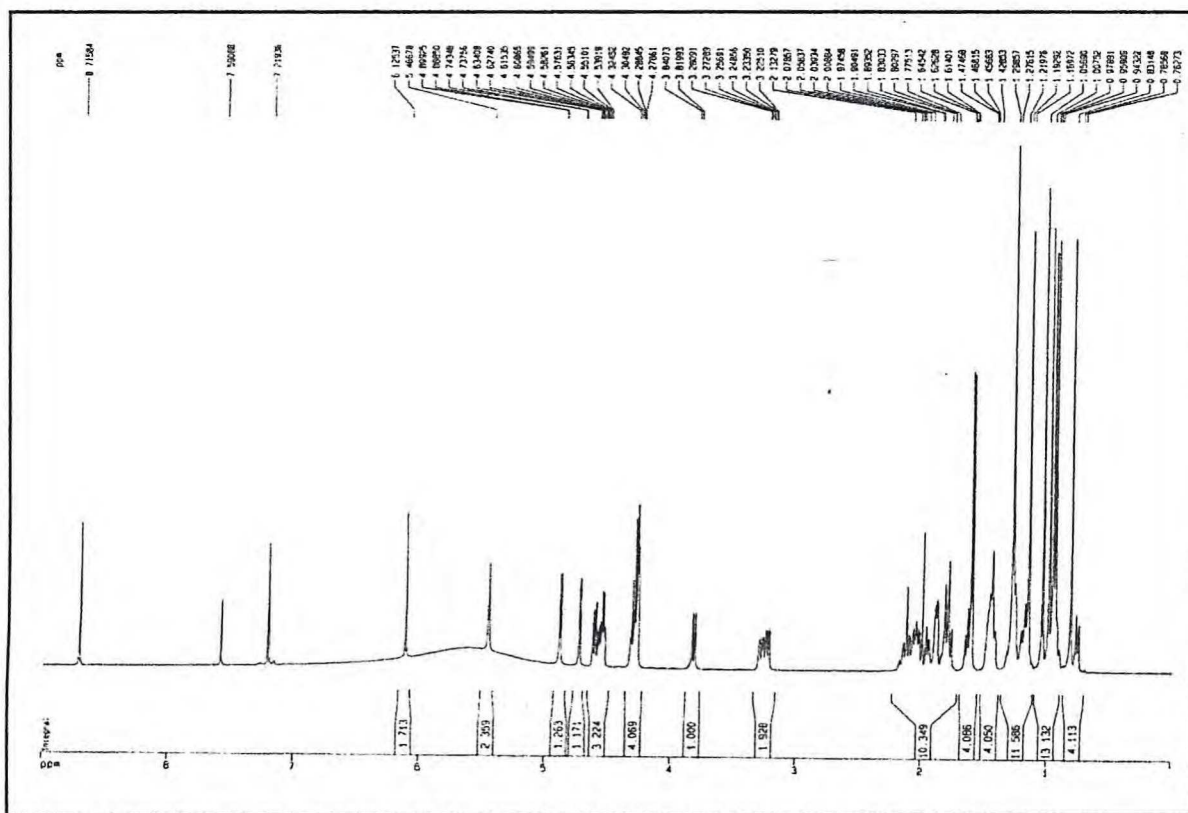


Figura 07 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de PES-F1 (1)

Também no espectro de RMN ^1H (Fig.07, Pag. 26) observou-se na região de sinais correspondentes a hidrogênios de carboidratos, a presença de dois sinais correspondentes a átomos de hidrogênio anoméricos em δ 4,9 (d, 5,4 Hz) e em δ 6,1 (sl), sugerindo a presença de uma unidade osídica constituída de dois açúcares^{51,76}.

Através da hidrólise ácida total⁷⁶ da saponina PES-F1(1) em solução aquosa de ácido clorídrico 2N, pode-se constatar através de CCD comparativa com padrões de açúcares e de triterpenos, a presença de arabinose e ramnose, além de aglicona com comportamento cromatográfico semelhante ao do ácido oleanólico.

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) (Fig.09, Pag. 28) e heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC) (Fig. 08, Pag. 28), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente das absorções referentes aos dois hidrogênios anoméricos e aos dois carbonos anoméricos, bem como do sinal do carbono metílico da metilpentose em δ 18,9 (C-6) e de seus hidrogênios em δ 1,6 (d, 6,1Hz), permitiu estabelecer as absorções referentes aos deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio e de carbono relacionados aos dos monossacarídeos arabinose (A) e ramnose (R) (Tab. 02, Pag. 32).

A comparação adicional dos sinais correspondentes aos átomos de carbonos de saponinas estruturalmente semelhantes^{11,12} (Tabela 02, Pag. 32), constituídas dos mesmos açúcares, bem como, a comparação com os sinais correspondentes aos átomos de carbono de seus respectivos metilglicosídeos⁶⁸ (Tabela 03, Pag. 32), permitiu estabelecer a presença de uma α -L-arabinopirranose e de uma α -L-ramnopirranose na saponina PES-F1 (1).

Com relação à ligação da unidade osídica com a aglicona, foi evidenciado o efeito da glicosilação no átomo de carbono metínico hidroxilado C-3 da aglicona, onde observou-se uma desproteção de 10,4 ppm em relação ao sinal correspondente ao átomo de carbono 3 do ácido oleanólico⁷⁵.

A afirmação acima é confirmada pela detecção no espectro de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC (Fig.10, Pag. 29) do correlacionamento a três ligações da linha espectral referente ao átomo de carbono anomérico da arabinose em δ 105,2 com o sinal correspondente ao átomo de hidrogênio H-3 da aglicona em δ 3,2 (dd, 11,7 e 4,2 Hz), bem como, a interação dipolar do hidrogênio anomérico da arabinose H1 α em δ 4,9 (d, 5,4 Hz) com o hidrogênio H-3 no espectro bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY (Fig. 12, Pag. 30).

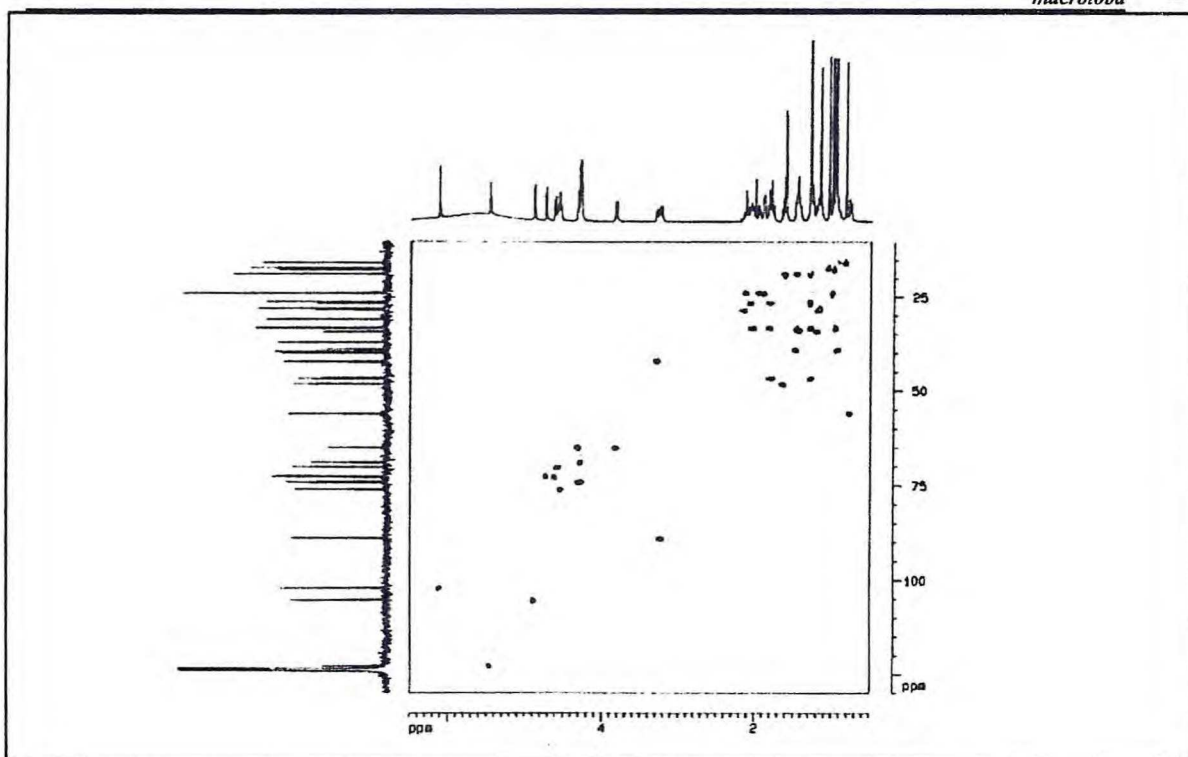


Figura 08 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F1(1)

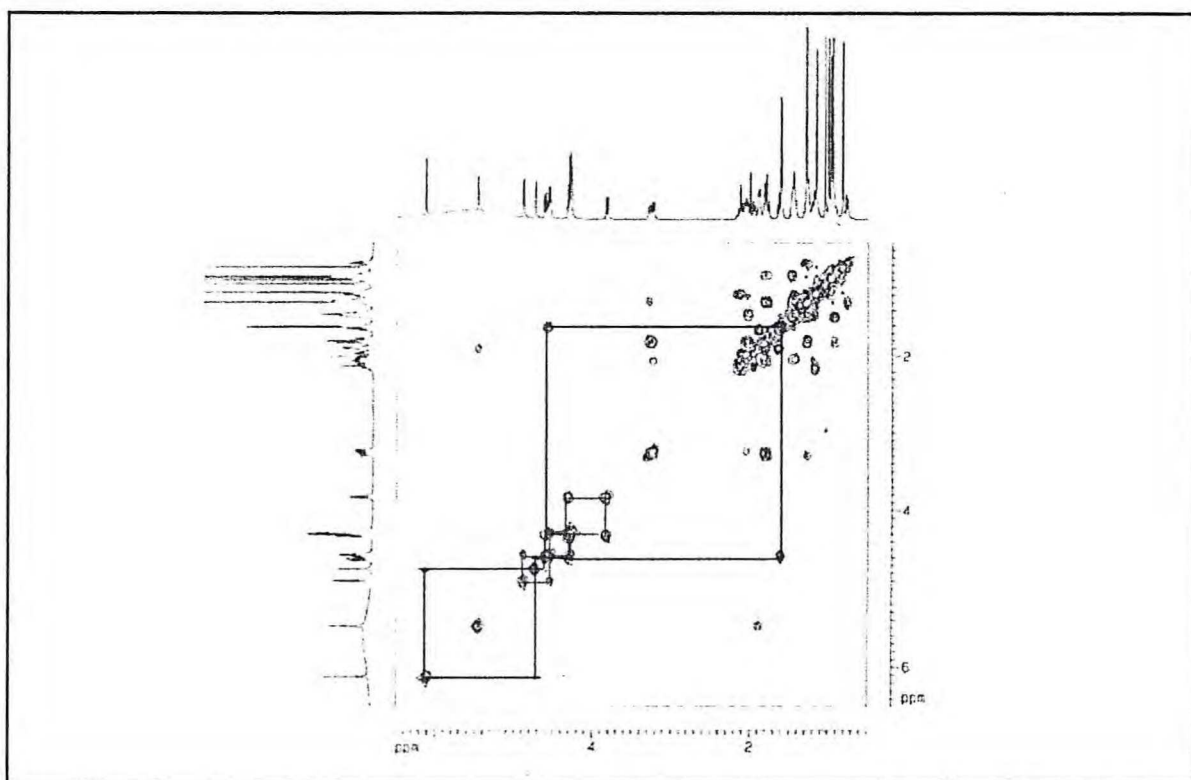


Figura 09 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (500 MHz x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PES-F1(1)

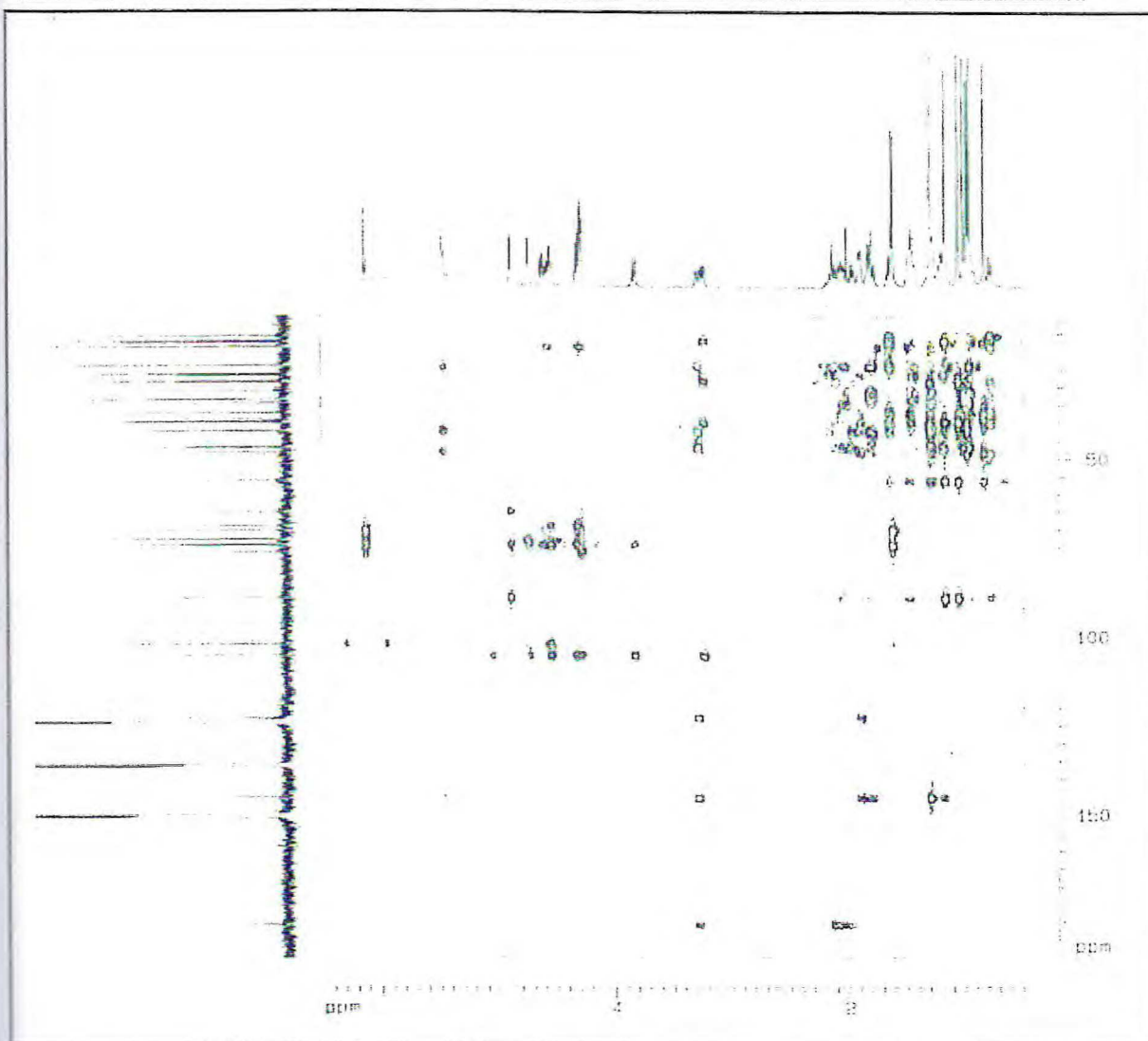


Figura 10 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F1(1)

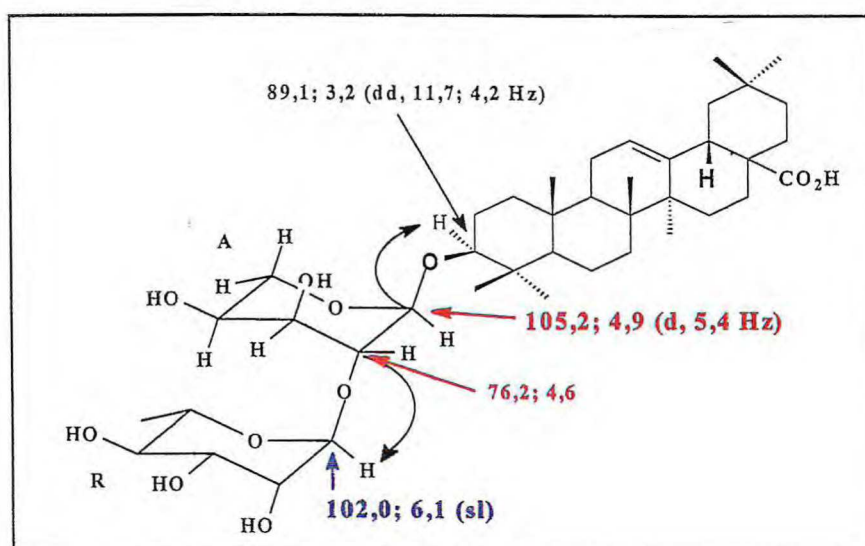


Figura 11 - Correlações entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e desta com a genina de PES-F1 (1)

A ligação interglicosídica entre a arabinose e a ramnose, também foi deduzida através da análise comparativa do deslocamento químico do átomo do carbono C-2 da arabinose (C-2, δ 76,2) com o correspondente deslocamento químico do seu respectivo metilglicosídeo (C-2, δ 72,2), em virtude do efeito da glicosilação⁶⁸ nesse carbono, sugerindo, assim, uma ligação (ramnose 1 \rightarrow 2 arabinose)^{11,12}. Esta dedução foi confirmada pela observação, no espectro de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC (Fig. 10, Pag. 29), do acoplamento a três ligações do átomo de carbono anomérico da ramnose em δ 102,0 com o hidrogênio H-2 da arabinose em δ 4,9, bem como, da interação espacial entre o hidrogênio anomérico da arabinose com o hidrogênio H-3a do aglicona (Fig. 10, Pag. 29), definindo a seqüência estrutural: ramnose (1 \rightarrow 2) arabinose-O-aglicona (Fig. 11, Pag. 29).

A configuração α da arabinose⁶⁸ foi sugerida pela sua constante de acoplamento dos seus sinais de hidrogênios ($J_{1,2} = 5,4$ Hz), bem como, da ramnose em virtude de apresentar um singlete largo em δ 6,1 ppm⁷⁸, sendo a saponina denominada de ácido 3-O- α -L-ramanopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil-olean-12-eno-28-óico.

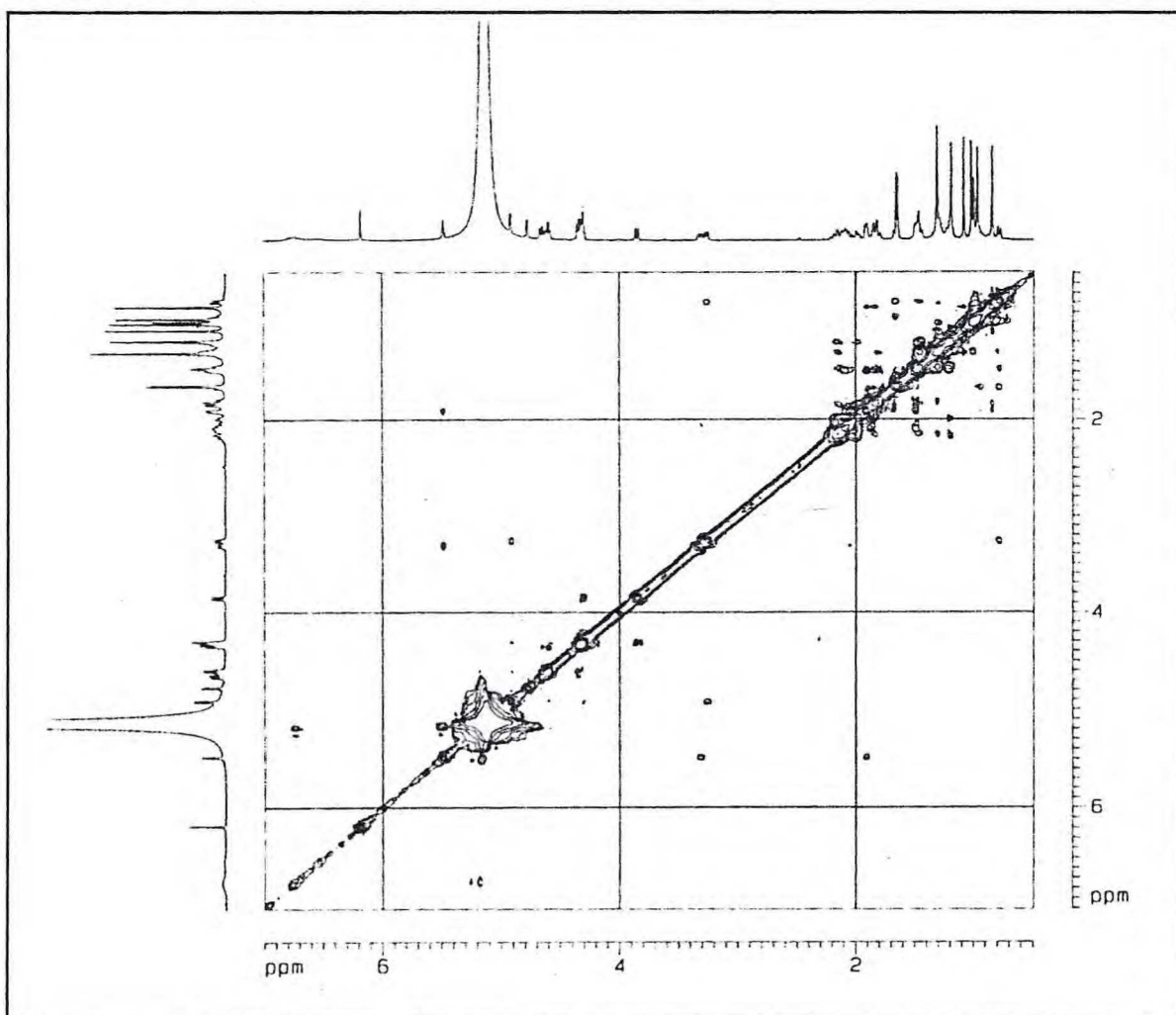


Figura 12 - Espectro (expansão) de RMN ¹H - NOESY (500 MHz x 500 MHz, C₅D₅N) de PES-F1 (1)

Tabela 01 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2, 3$) da genina de PES-F1 (1) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 75 $\delta \text{ C}$
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1 CH_2	39,1	1,5; 0,9		H-5, 3H-25	38,5
2 CH_2	26,8	2,1; 1,8			27,4
3 CH	89,1	3,2 (dd, 11,7 e 4,2)		H-1 A, H-5, 3H-23, 3H-24	78,7
4 C	39,7	-	3H-23, 3H-24		38,7
5 CH	56,2	0,8 (d, 11,5)	H-6 ^a	H-7b, H-9, 3H-23, 3H-24, 3H-25	55,2
6 CH_2	18,8	1,5; 1,3	2H-7		18,3
7 CH_2	33,5	2,1; 1,8	H-6 ^a	H-5	32,6
8 C	40,0	-	H-9, 3H-26	H-6 ^a , 2H-11, 3H-27	39,3
9 CH	48,3	1,6	2H-11	H-5, H-12, 3H-25, 3H-26	47,6
10 C	37,3	-	H-5, H-9, 3H-25		37,0
11 CH_2	24,1	1,9 (dd, 10,3 e 3,0)	H-9, H-12		23,1
12 CH	122,8	5,5 (t)	2H-11	H-18	122,1
13 C	145,1	-	H-18	2H-11, 3H-27	143,3
14 C	42,4	-	3H-27	H-12, H-18, 3H-26	41,6
15 CH_2	28,6	2,1; 1,2		3H-27	27,7
16 CH_2	24,1	2,1; 2,0	H-15 ^a	H-18	23,4
17 C	46,9	-	H-16b, H-18	H-15 ^a , 2H-19, H-21 ^a	46,6
18 CH	42,3	3,3 (dd, 13,7 e 3,9)			41,3
19 CH_2	46,8	1,8; 1,3	H-18	3H-29, 3H-30	45,8
20 C	31,3	-	2H-19, 3H-29, 3H-30	H-22b	30,6
21 CH_2	34,5	1,5; 1,2			33,8
22 CH_2	33,5	1,5; 1,3			32,3
23 CH_3	28,4	1,2 (s)		H-3, H-5, 3H-24	28,1
24 CH_3	17,3	1,1 (s)		H-3, 3H-23	15,6
25 CH_3	15,8	0,8 (s)		H-5, H-9	15,3
26 CH_3	17,7	1,0 (s)			16,8
27 CH_3	26,5	1,3 (s)			26,0
28 C	180,6	-		H-18, 2H-16	181,0
29 CH_3	33,6	1,0 (s)		3H-30	33,1
30 CH_3	24,0	1,0 (s)		3H-29	23,6

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

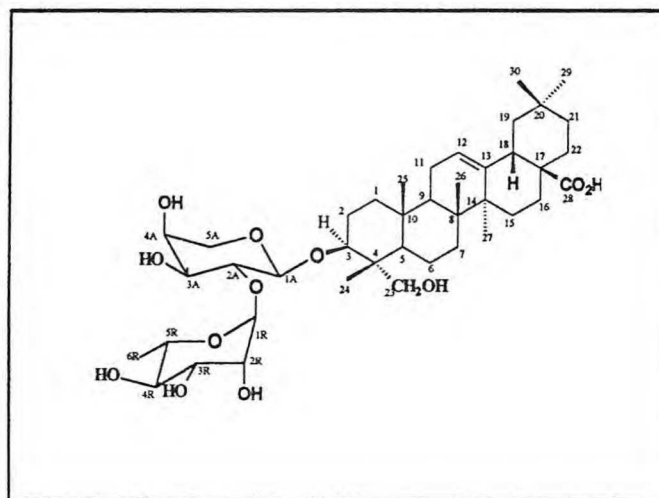
Tabela 02 - Dados de RMN ^{13}C , RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PES-F1(1) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 57	Ref. 11
	δC	δH	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δC	δC
1 A	105,2	4,9 (d, 5,4)	H-2A	2H-5 A, H-3	105,9	104,5
2 A	76,2	4,6	H-3A	H1R	72,2	76,1
3 A	74,1	4,3	H-2A	H-1 A, 2H-5	74,4	73,3
4 A	69,0	4,2 (sl)	H-5A	H2A	69,1	68,2
5 A	65,0	4,3 3,8 (d, 10,4)		H-1 A	66,6	65,9
1 R	102,0	6,1 (sl)	H-2R	H-2 A	102,4	101,7
2 R	72,7	4,7 (d, 3,3)	HIR		71,9	72,3
3 R	72,9	4,6 (dd, 9,2 e 3,3)	H-2 R	H-1 R	72,5	72,5
4 R	77,3	4,3 (t, 9,4)	H-3 R	H-2 R, 3H-6 R	73,6	74,0
5 R	70,1	4,6 (qd, 9,4 e 6,1)	3H-6 R	H-1 R	69,9	69,9
6 R	18,9	1,6 (d, 6,1)	H-5 R	H-4 R	18,4	18,5

 Tabela 03 - Deslocamentos químicos de alguns metilglicosídeos em piridina - $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^{68}$.

Metilglicopiranosídeo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Glicopiranosídeo	101,2	73,7	75,3	72,0	73,9	62,7
β -D-Glicopiranosídeo	105,4	74,8	78,1	71,4	78,0	62,5
α -L-ramnopiranosídeo	102,4	71,9	72,5	73,6	69,4	18,4
β -L-Ramnopiranosídeo	102,7	72,2	75,4	73,8	73,5	18,5
α -L-Arabinopiranosídeo	105,9	72,2	74,4	69,1	66,6	-----
β -L-Arabinopiranosídeo	102,0	70,1	70,4	70,8	63,9	-----

4.2. Determinação estrutural de PES-F2 (2)



A substância PES-F2 (2), obtida por tratamento cromatográfico e químico do extrato etanólico das sementes - PES, é um sólido branco amorfo, solúvel em metanol e decompõe-se na faixa de temperatura entre 225,1 e 257,0°C. Apresentou natureza triterpênica, evidenciada pelo teste positivo frente ao reagente de Liebermann-Buchard, bem como teste positivo para saponinas⁸⁰.

O espectro de absorção na região de infravermelho (Fig. 13, Pag. 34) apresentou banda de absorção larga em 3412 cm⁻¹ característica de compostos hidroxilados, além de um banda em 1701,4 cm⁻¹ referente à absorção característica de grupamento carboxila de ácido. Seu espectro de massas (Fig. 14, Pag. 34) utilizando a técnica de bombardeamento rápido de átomos (FAB/MS) de íons positivos [M+H]⁺, indicou um íon pseudo molecular em m/z 750, sugerindo fórmula molecular C₄₁H₆₆O₁₂.

O espectro de RMN ¹H (Fig. 15, Pag. 35) apresentou na região de sinais correspondentes a átomos de hidrogênios metílicos, seis singletos compreendidos entre δ 0,9 a 1,2 ppm; um singlete largo correspondente a um átomo de hidrogênio olefínico em δ 5,5 ppm, característico de triterpenos pentacíclicos da série olean-12-eno⁷⁵, bem como sinais característicos de dois hidrogênios anoméricos em δ 5,1 (d, 6,1 Hz) e δ 6,3 (sl), sugerindo a presença de uma unidade osídica constituída de dois açúcares na molécula, evidenciando, portanto, a natureza glicosídica da mesma^{51,76}.

O espectro de RMN ¹³C - HBBD (Fig. 16, Pag. 36) de PES-F2 (2) mostrou a presença de 41 linhas espectrais e a análise comparativa entre este e o espectro de RMN ¹³C, utilizando a técnica DEPT 135 (Fig. 17, Pag. 36), permitiu observar que dentre estes 41 átomos de carbonos, 7 são metílicos, 12 metilênicos, 14 metínicos e por exclusão 8 são átomos de carbono não hidrogenados (Tab. 4, Pag. 40) e (Tab. 5, Pag. 41), sendo, portanto 30 correspondentes à unidade triterpênica e os onze restantes referentes à unidade osídica, constituída de uma hexose e de uma pentose. Dentre os 14 sinais referentes aos átomos de carbonos metínicos, 10 são oxigenados, dos quais dois são átomos de carbono anoméricos, com deslocamentos químicos em δ 104,2 e δ

101,5, podendo-se sugerir que a substância PES-F2 (2) tratava-se de uma saponina^{15,51,54}, com unidade osídica estruturalmente semelhante à da saponina PES-F1 (1).

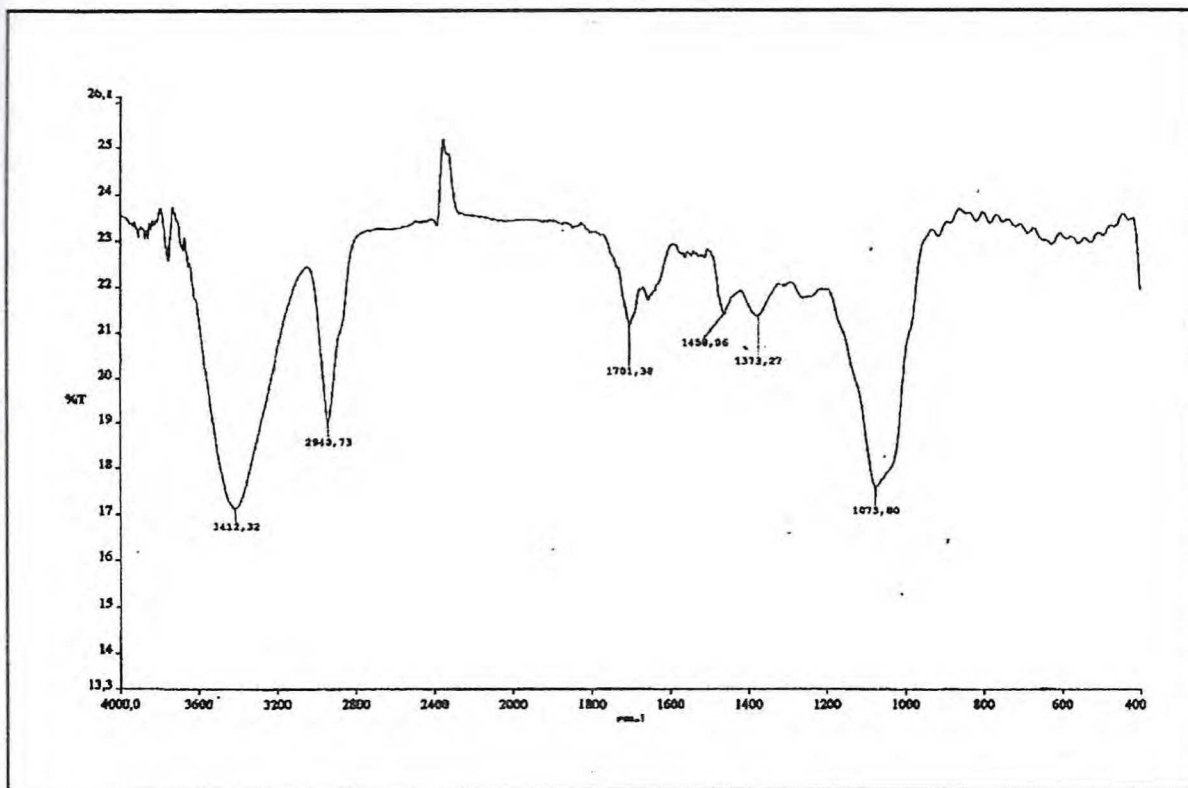


Figura 13 - Espectro na região de infravermelho – IV (KBr) de PES-F2 (2)

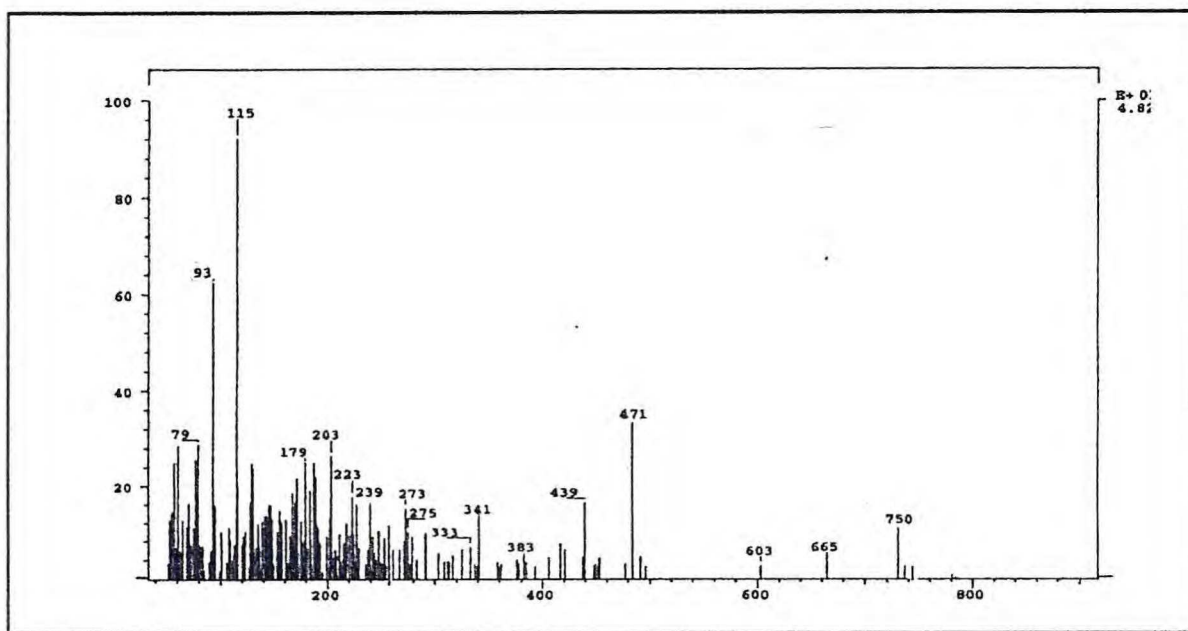


Figura 14 - Espectro de massas por bombardeamento rápido de átomos – FAB (íons positivos) de PES-F2 (2)

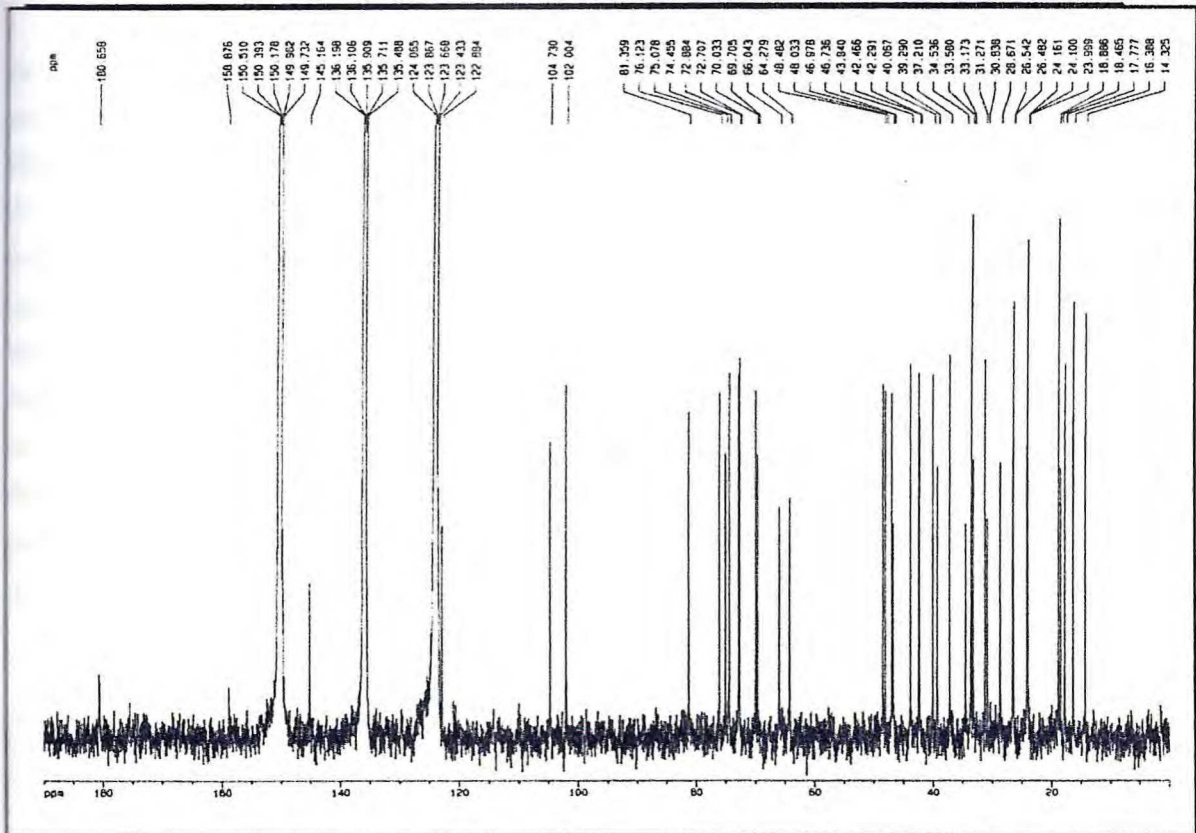


Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F2 (2)

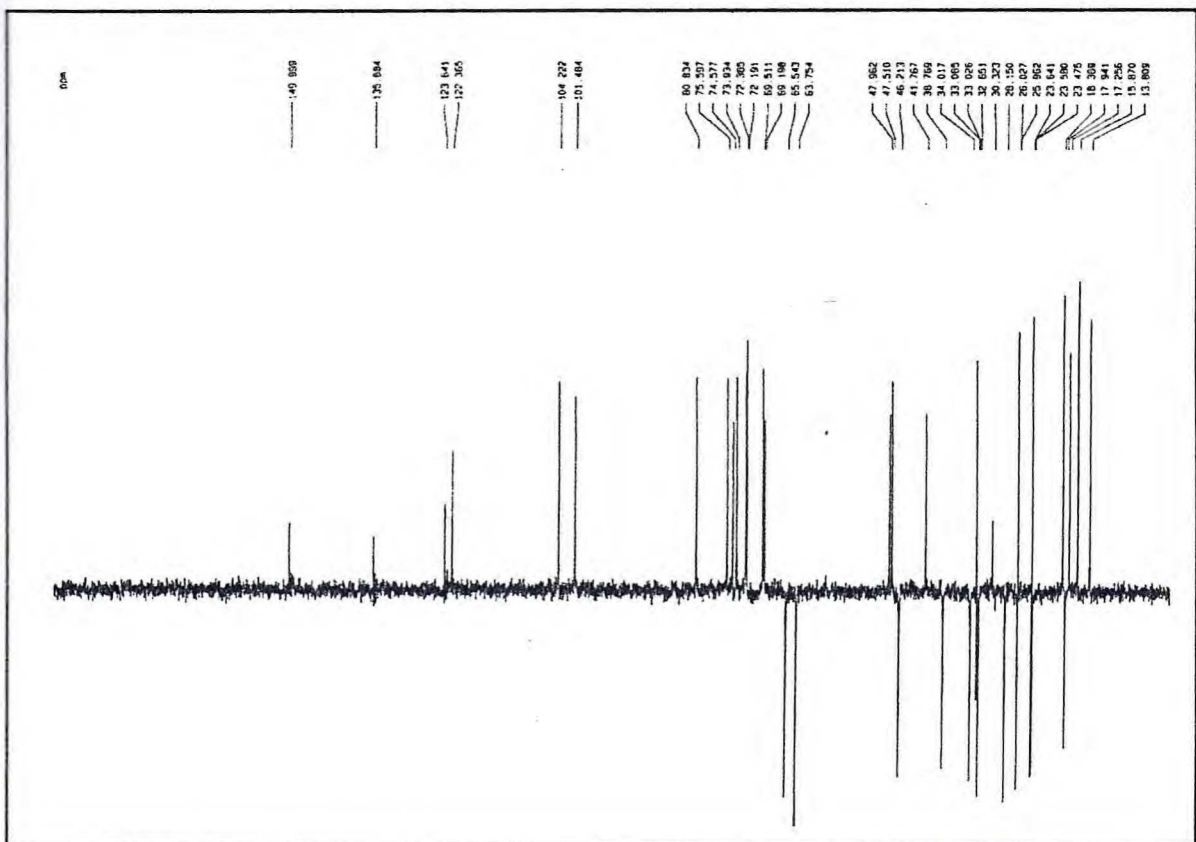


Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F2 (2)

Observou-se também no espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135 (Fig. 17, Pag. 36), a presença de dois átomos de carbono hidroximetilênicos em δ 63,8 e em δ 65,5, sugerindo-se que o sinal em δ 65,5 deva pertencer a uma unidade osídica, em virtude da detecção no seu espectro de HMBC (Fig.19, Pag. 38) de um acoplamento a três ligações deste sinal de carbono com o sinal de hidrogênio anomérico em δ 5,1 (d, 6,1 Hz) e este sinal, por sua vez, encontrava-se acoplado a três ligações ao carbono (C-3) da genina em δ 80,8, sendo desta forma, definida a ligação da unidade osídica com a genina. A presença de outro sinal atribuído a outro átomo de carbono hidroximetilênico em δ 63,8 ppm, indicou que um dos grupos metila foi substituído de acordo com a comparação dos dados de RMN ^{13}C - HBBD (Fig. 16, Pag. 36) referentes aos átomos de carbono C-3 (δ 89,1), C-4 (δ 39,7) e C-5 (δ 56,2) da saponina PES-F1(1) com os respectivos deslocamentos atribuídos para a saponina PES-F2 (2), onde pode-se contatar efeitos de proteção gama (γ) nos carbonos C-3 (δ 80,8), C-5 (δ 48,0) e desproteção no carbono C-4 (δ 43,8) da saponina PES-F2 (2) (Tab. 16, Pag. 36), em virtude da substituição do grupo metila (C-23) por um grupo hidroximetilênico^{14, 81, 82}, sugerindo a hederagenina como genina.

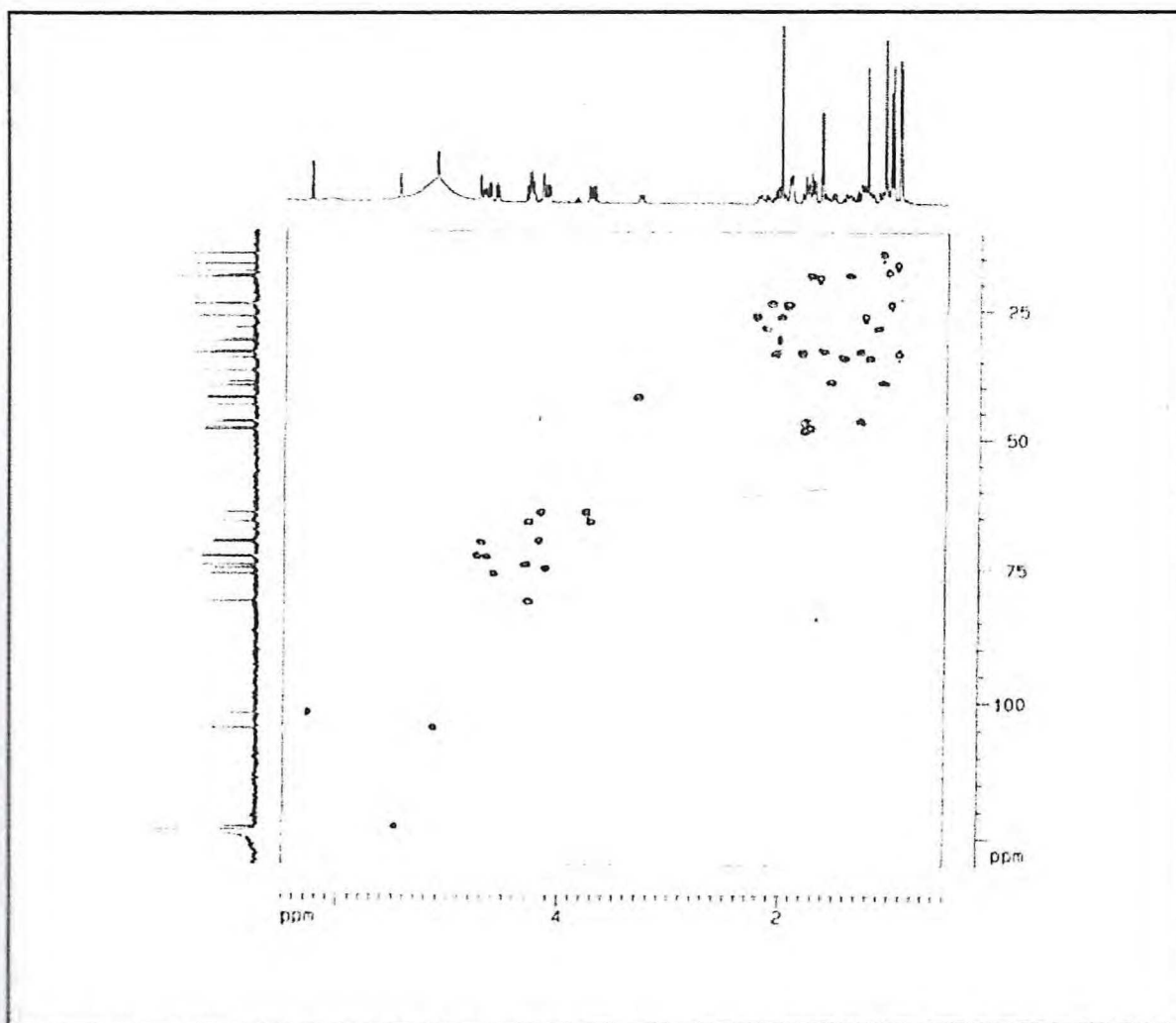


Figura 18 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2).

A presença dos dois açúcares na unidade osídica foi confirmada através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação – HMQC (Fig. 18, Pag. 37), na qual pode-se observar a correlação de dois sinais transversais referentes aos átomos de carbono anoméricos em δ 101,5 e 104,2 com os sinais de átomos de hidrogênio anoméricos em δ 6,3 (sl) e 5,1 (d, 6,1 Hz), respectivamente. É válido acrescentar que no respectivo espectro da saponina PES-F2 (2) (Fig. 10, Pag. 29) foram observadas as mesmas correlações descritas anteriormente para a unidade osídica da saponina PES-F1 (1).

Adicionalmente, a comparação dos valores de seus deslocamentos químicos com os valores descritos na literatura para saponinas estruturalmente semelhantes (Tab. 04, Pag. 40 e Tab. 05, Pag. 41)^{12-15, 81,82}, permitiu identificar os açúcares de PES-F2 (2) como arabinose e ramnose.

A afirmação acima é evidenciada, de forma inequívoca, pela observação no espectro de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC (Fig. 19, Pag. 38), do acoplamento a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o sinal correspondente ao hidrogênio anomérico da arabinose - H1A em δ 5,1 (d, 6,1 Hz) com o sinal do carbono C-3 (δ 80,8) da aglicona (Fig. 20, Pag. 39). Por sua vez, a seqüência da ligação interglicosídica foi confirmada pela detecção de picos transversais correspondentes à correlação do carbono anomérico da ramnose – C1R em δ 101,5 com o hidrogênio H2A da arabinose em δ 6,3 (sl), confirmando a mesma seqüência estrutural observada na saponina PES-F1 (1), ou seja, ramnose (1 \rightarrow 2) arabinose-aglicona.

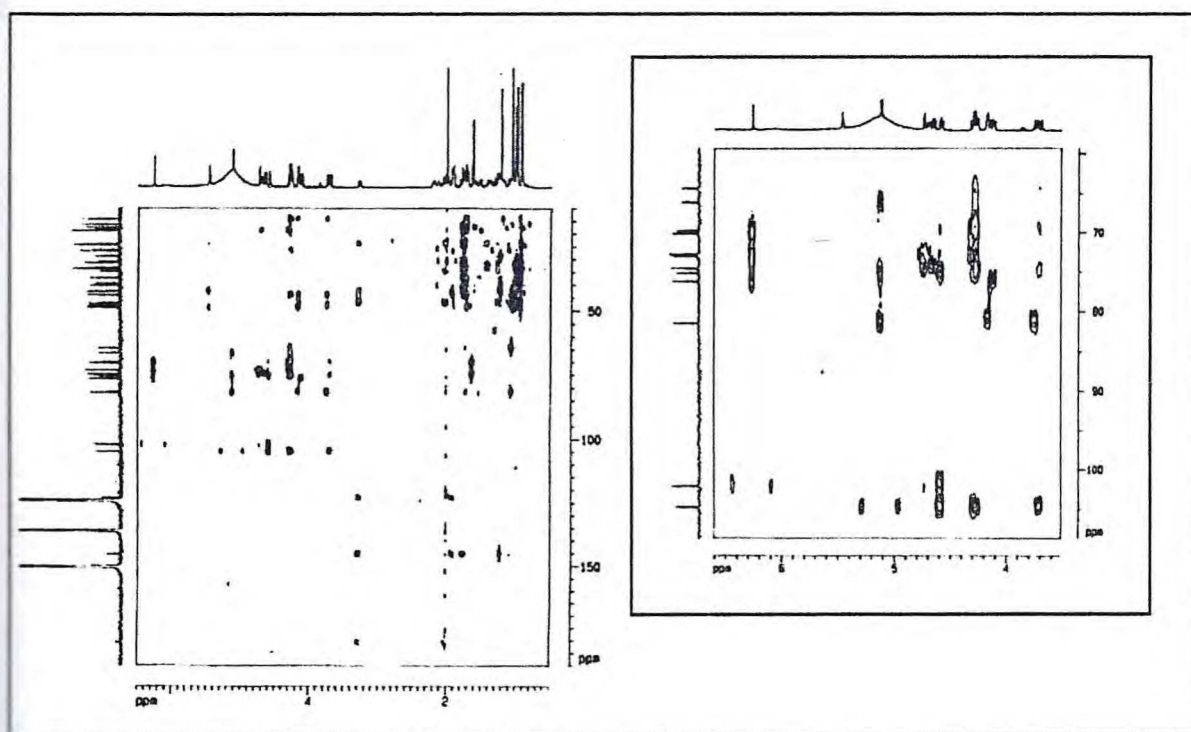


Figura 19 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2).

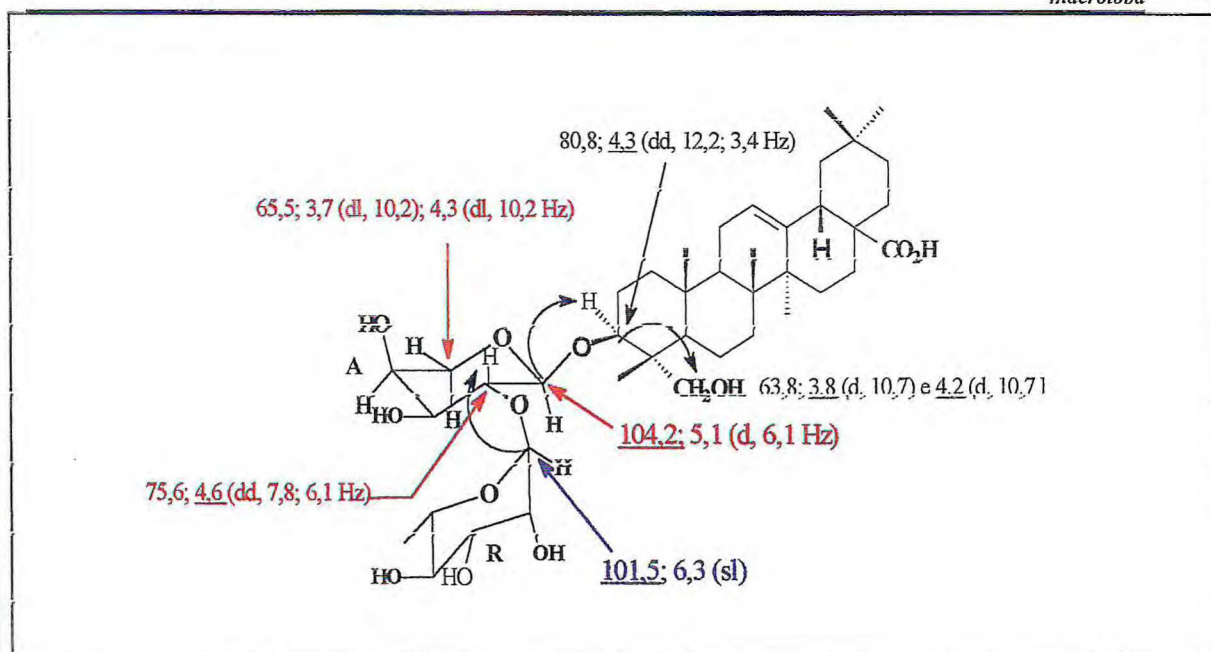


Figura 20 - Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PES-F2 (**2**) observado no espectro de HMBC (Fig. 19, Pag. 38)

A configuração α da arabinose⁶⁸ foi sugerida pela sua constante de acoplamento ($J_{1,2} = 6,6$ Hz), bem como a da ramnose em virtude de apresentar um singlete largo em δ 6,1⁷⁸, sendo a saponina denominada de 3-O- α -L-ramanopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina.

Tabela 04 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3)] em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ da genina de PES-F2 (2).

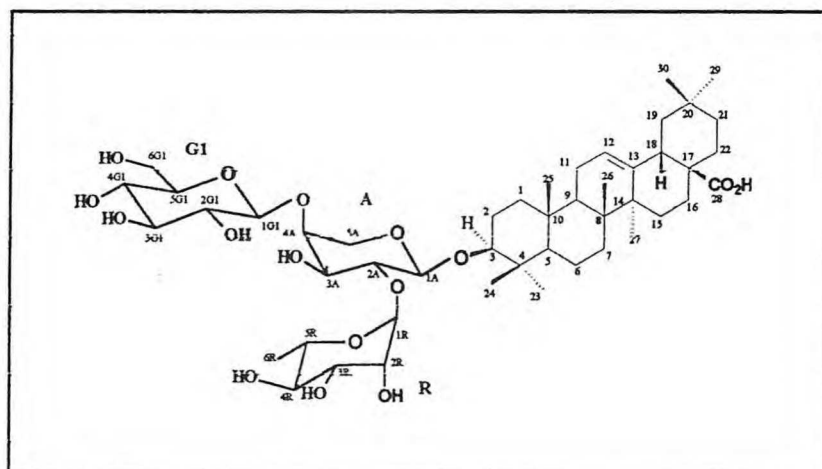
C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PES -FI (1)
	δ_{C}	δ_{H} , m, J (Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta \text{ C}$
1 CH_2	39,3	1,6; 1,1			39,1
2 CH_2	26,5	2,2; 2,0			26,8
3 CH	80,8	4,3 (dd, 12,2 e3,4)		H-1A, 2H-23, 3H-24	89,1
4 C	43,8	-	H-3, 2H-23, 3H-24		39,7
5 CH	48,0	1,8		2H-23, 3H-24	56,2
6 CH_2	18,5	1,8; 1,5			18,8
7 CH_2	34,5	1,5; 1,2			33,5
8 C	40,1	-		3H-27	40,0
9 CH	48,5	1,8		H-12, 3H-25, 3H-26	48,3
10 C	37,2	-	3H-25		37,3
11 CH_2	24,1	1,9 (dt, 10,3)			24,1
12 CH	122,7	5,5 (sl)	H-11	H-18	122,8
13 C	145,2	-	H-18	H-11, 3H-27	145,1
14 C	42,5	-	3H-27	H-12, H-18	42,4
15 CH_2	28,7	2,2; 1,1		3H-27	28,6
16 CH_2	24,0	2,1; 2,0		H-18	24,1
17 C	47,0	-	H-18		47,0
18 CH	42,3	3,3 (dd, 13,6 e3,6)			42,3
19 CH_2	46,7	1,8; 1,3		3H-29, 3H-30	46,8
20 C	31,3	-	2H-19, 3H-29, 3H-30		31,3
21 CH_2	33,6	2,1; 1,3		3H-29, 3H-30	34,5
22 CH_2	33,2	1,6; 1,3			33,5
23 CH_2	63,8	4,2 (d, 10,7)3,8 (d, 10,7)			28,4
24 CH_3	14,3	1,1 (s)		H-3, 2H-23	17,3
25 CH_3	16,4	0,9 (s)			15,8
26 CH_3	17,8	1,0 (s)			17,7
27 CH_3	26,5	1,2 (s)			26,5
28 C	180,7	-		H-18	180,6
29 CH_3	33,6	0,9 (s)			33,6
30 CH_3	24,2	1,0 (s)			24,0

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 05 - Dados de RMN ^{13}C (125 MHz), de RMN ^1H (500 MHz) e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3)] em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ da unidade osídica de PES-F2 (2).

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PES-F1(1)	Ref.11
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ C}$
1A	104,2	5,1 (d, 6,1)	H-2A	2H-5A, H-3	105,5	104,5
2A	75,6	4,6 (dd, 7,8 e 6,1)	H-3A		76,2	76,1
3A	74,6	4,3 (dd, 7,8 e 3,5)	H-2A	H-1A	74,1	73,3
4A	69,2	4,2 (sl)	2H-5A		69,0	68,2
5A	65,5	4,3 (dl, 10,2)3,7 (dl, 10,2)		H-1A	65,0	64,5
1R	101,5	6,3 (sl)		H-2A	102,0	101,7
2R	72,2	4,8 (sl)		H-4R	72,7	72,3
3R	72,4	4,7 (dd, 9,2 e 3,3)	H-4R	H-1R	72,9	72,5
4R	73,9	4,3 (t, 9,2)	H-3R	H-2R, 3H-6R	74,3	74,0
5R	69,5	4,7 (qd, 9,2 e 6,1)	H-4R, 3H-6R	H-1R	70,2	69,9
6R	18,9	1,7 (d, 6,1)	H-5R	H-4R	18,9	18,5

4.3. Determinação estrutural de PEC-76 (3)



A substância PEC-76 (3) é um sólido branco amorfo, solúvel em metanol e em piridina, decompõe-se na faixa de 250-260°C. Seu espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 21, Pag. 43) mostrou-se semelhante ao de saponina PES-F2 (2), com a presença de banda de absorção característica de compostos hidroxilados ($\nu_{OH} = 3403 \text{ cm}^{-1}$), além da banda de absorção correspondente ao estiramento da carboxila de ácido ($\nu_{CO} = 1692 \text{ cm}^{-1}$).

O espectro de massas por bombardeamento rápido de átomos (FAB-MS) de íons negativos (Fig. 22, Pag. 44) revelou fragmento m/z 895 correspondente ao íon pseudomolecular $[M-H]^-$, compatível com a fórmula molecular $C_{47}H_{76}O_{16}$.

O espectro de RMN 1H (Fig. 23, Pag. 44) mostrou sinais correspondentes a átomos de hidrogênio de sete grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados compreendidos entre δ 0,8 e δ 1,4 ppm, um sinal atribuído a um átomo de hidrogênio olefínico de uma dupla ligação trissubstituída em δ 5,4 (sl), além de sinal em δ 3,3 (dd, 13,8 e 3,9 Hz) referente ao H-18, sugerindo, desta forma, a presença da mesma aglicona da saponina PES-F1 (1).

A presença do ácido oleanóico⁷⁵ como aglicona em PEC-76 (3) é, adicionalmente, confirmada através da análise do espectro de RMN ^{13}C - HBBD (Fig. 24, Pag. 45), pela presença dos sinais correspondentes aos átomos de carbono C-12 e C-13 em δ 122,8 e δ 145,1 ppm, respectivamente (Tabelas 6 e 7, Pag. 52, 53); bem como, pela observação no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta - HMQC ($^1H \times ^{13}C - J_{CH}$) (Fig. 25, Pag. 45), da correlação do hidrogênio H-12 (δ 5,4 (sl)) com o átomo de carbono C-12 em δ 122,8.

O espectro de RMN ^{13}C - HBBD (Fig. 24, Pag. 45) mostrou 6 linhas espectrais adicionais quando comparado ao respectivo espectro da substância PES-F1 (1), totalizando portanto 47 linhas espectrais, compatível com a massa molar detectada no espectro de massa.

Dessas, 30 linhas correspondem aos sinais de átomos de carbono da aglicona e as 17 restantes são referentes à unidade osídica, sugerindo, a presença adicional de uma unidade de hexose, bem caracterizada pela presença de sinais correspondentes a um carbono anomérico, a um carbono hidroximetilênico e a quatro carbonos metínicos oxigenados.

A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C - HBBDD (Fig. 24, Pag. 45) e de RMN ^{13}C - DEPT 135 (Fig. 26, Pag. 46) permitiu deduzir a presença de 02 átomos de carbono metilênicos oxigenados (hidroximetilênicos) em δ 62,9 e δ 64,9, além de 15 átomos de carbono metínicos oxigenados (Tab. 6 e 7, Pag. 52, 53).

A presença de três unidades de açúcares foi confirmada pela presença no espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$) (Fig. 25, Pag. 45) de três sinais correspondentes a átomos de hidrogênio anoméricos em δ 4,7 (d, 6,0 Hz), em δ 5,1 (d, 7,9 Hz) e em δ 6,2 (sl), cujos picos transversais estão relacionados aos átomos de carbono anoméricos em δ 105,3, em δ 106,7 e em δ 102,1, respectivamente; bem como, pela detecção no espectro de massa por bombardeamento rápido de átomos (FAB-MS) de ions negativos dos fragmentos em m/z 733, em m/z 587 e em m/z 455 atribuíveis, respectivamente, a eliminação de uma hexose, de uma metilpentose $[\text{M}-\text{H}-162 - 146]^-$ e de uma pentose $[\text{M}-\text{H}-162 - 146 - 132]^-$ (Fig. 27, Pag. 47)¹¹.

A hidrólise em meio ácido da saponina PEC-76 (3) permitiu detectar, por comparação com padrões de açúcares em processo cromatográfico (CCD), a presença de arabinose, ramnose e glicose.

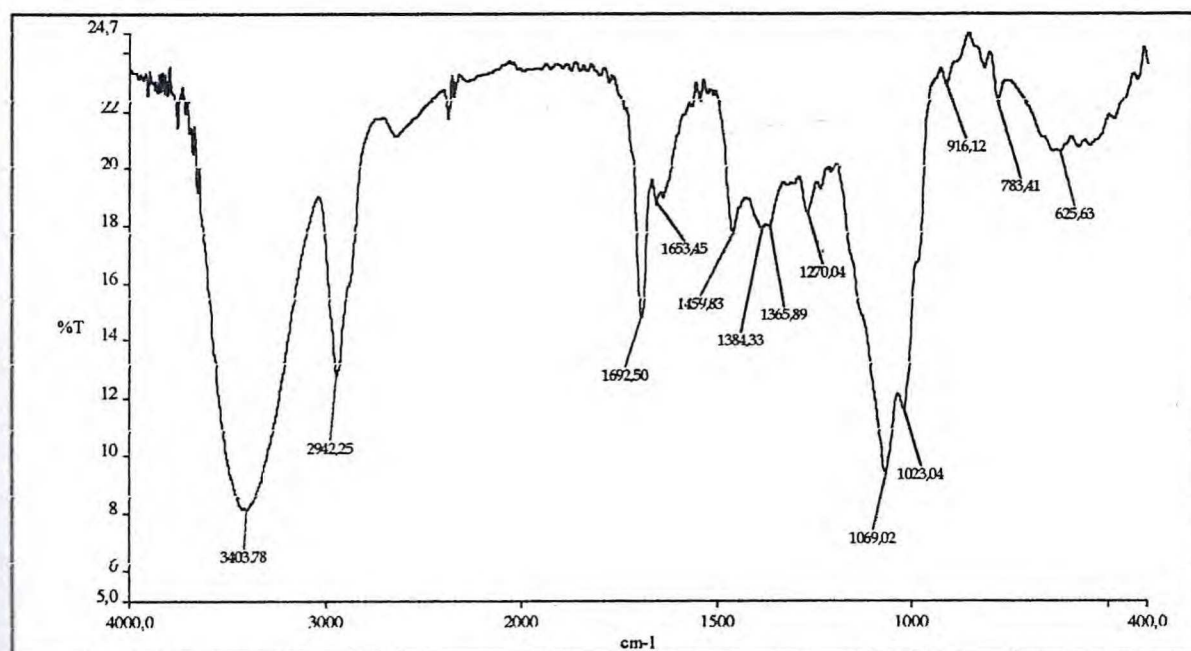


Figura 21 - Espectro na região de infravermelho da substância PEC-76 (3).

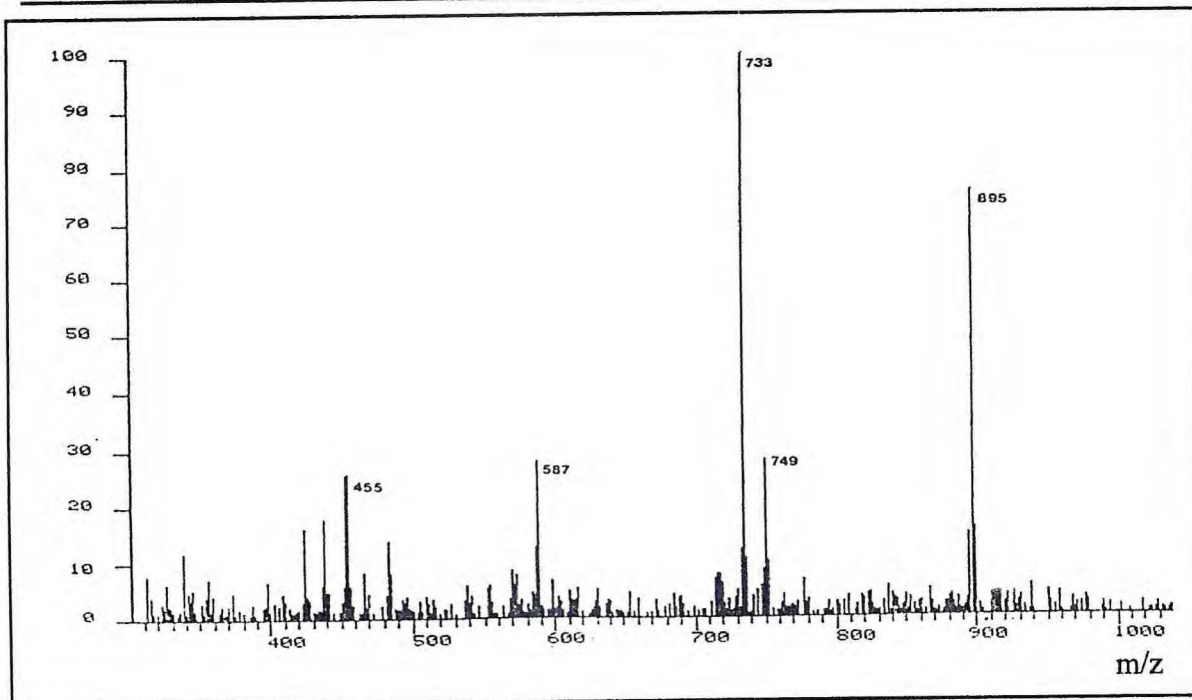


Figura 22 - Espectro de massa por bombardeamento rápido de átomos (íons negativos) da substância PEC-76 (3).

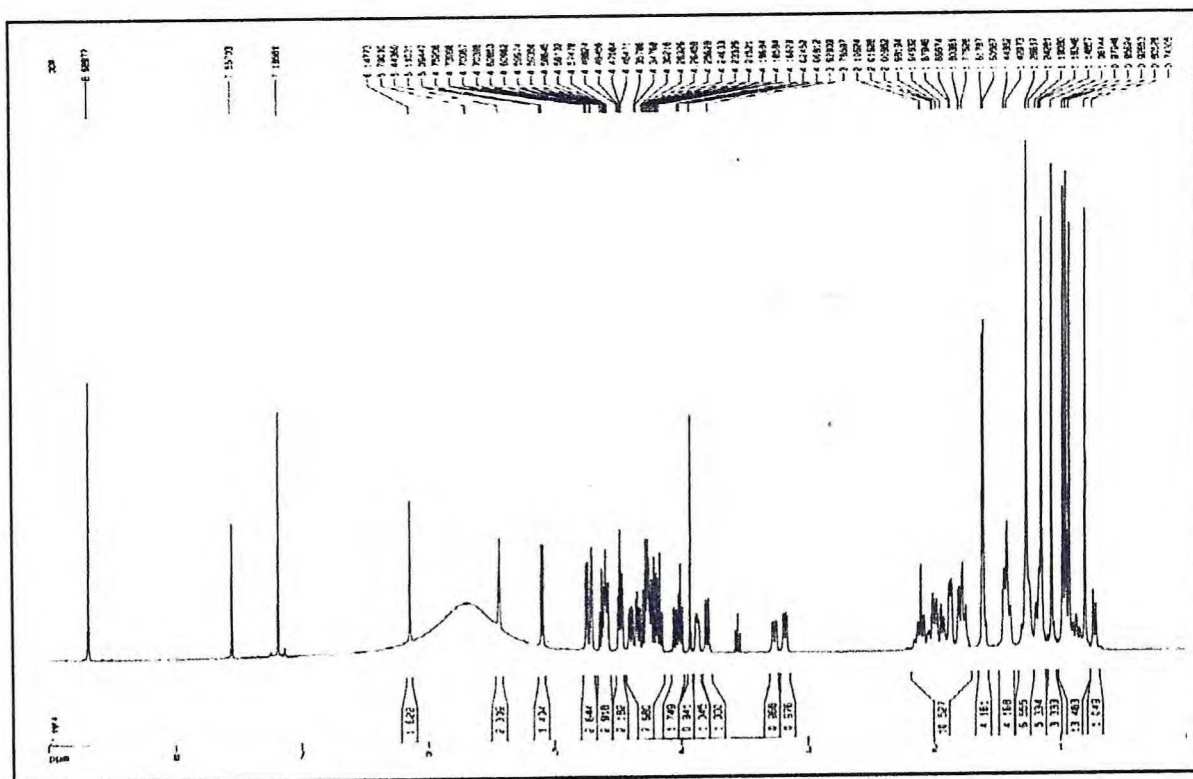


Figura 23 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-76(3).

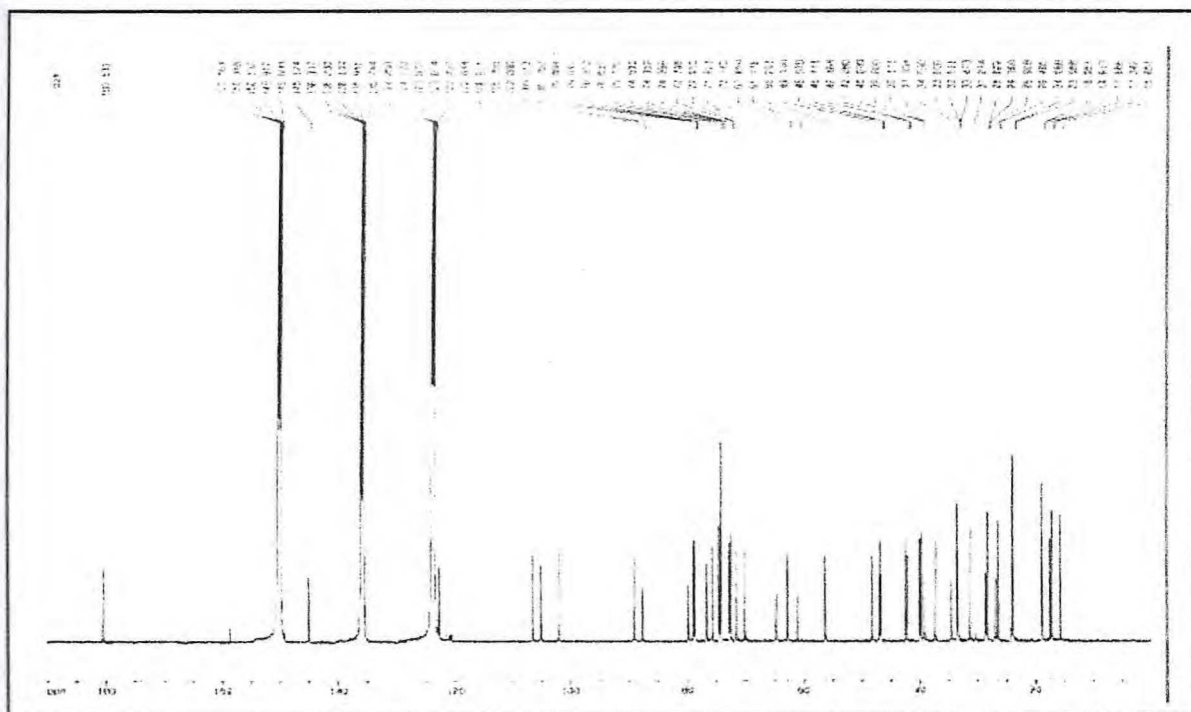


Figura 24 - Espectro de RMN ¹³C – HBBD (C₅D₅N, 125 MHz) de PEC-76 (3)

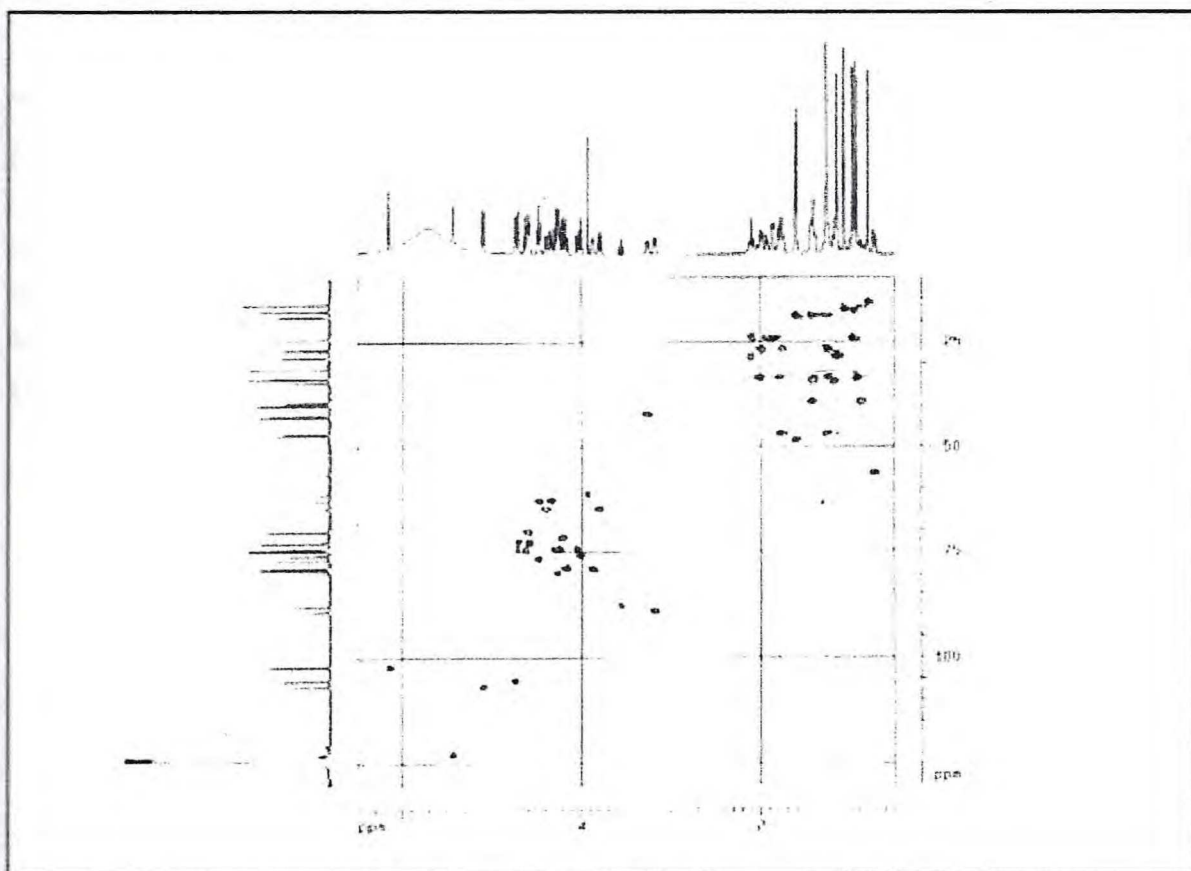


Figura 25 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C à uma ligação - HMQC (C₅D₅N, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3)

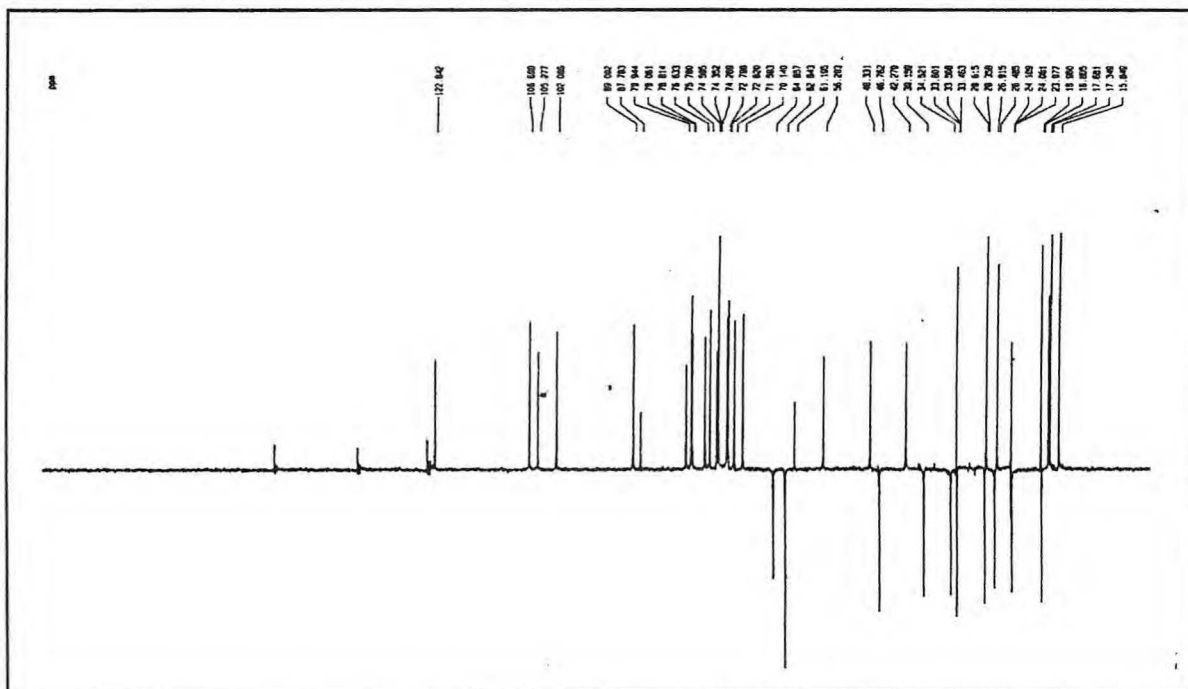


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-76 (3)

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) (Fig. 28, Pag. 48) e de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC) (Fig. 25, Pag. 45), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente, a região dos sinais correspondentes aos átomos hidrogênio e aos átomos de carbono anoméricos, bem como a correlação entre os sinais em δ 1,6 (d, 6,1 Hz) e em δ 18,9 ppm atribuídos ao carbono do grupo metila da metilpentose, permitiu sugerir as absorções referentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos relacionados aos dos monossacarrídeos arabinose (A), ramnose (R) e glicose (G) (Tab. 7, Pag. 53).

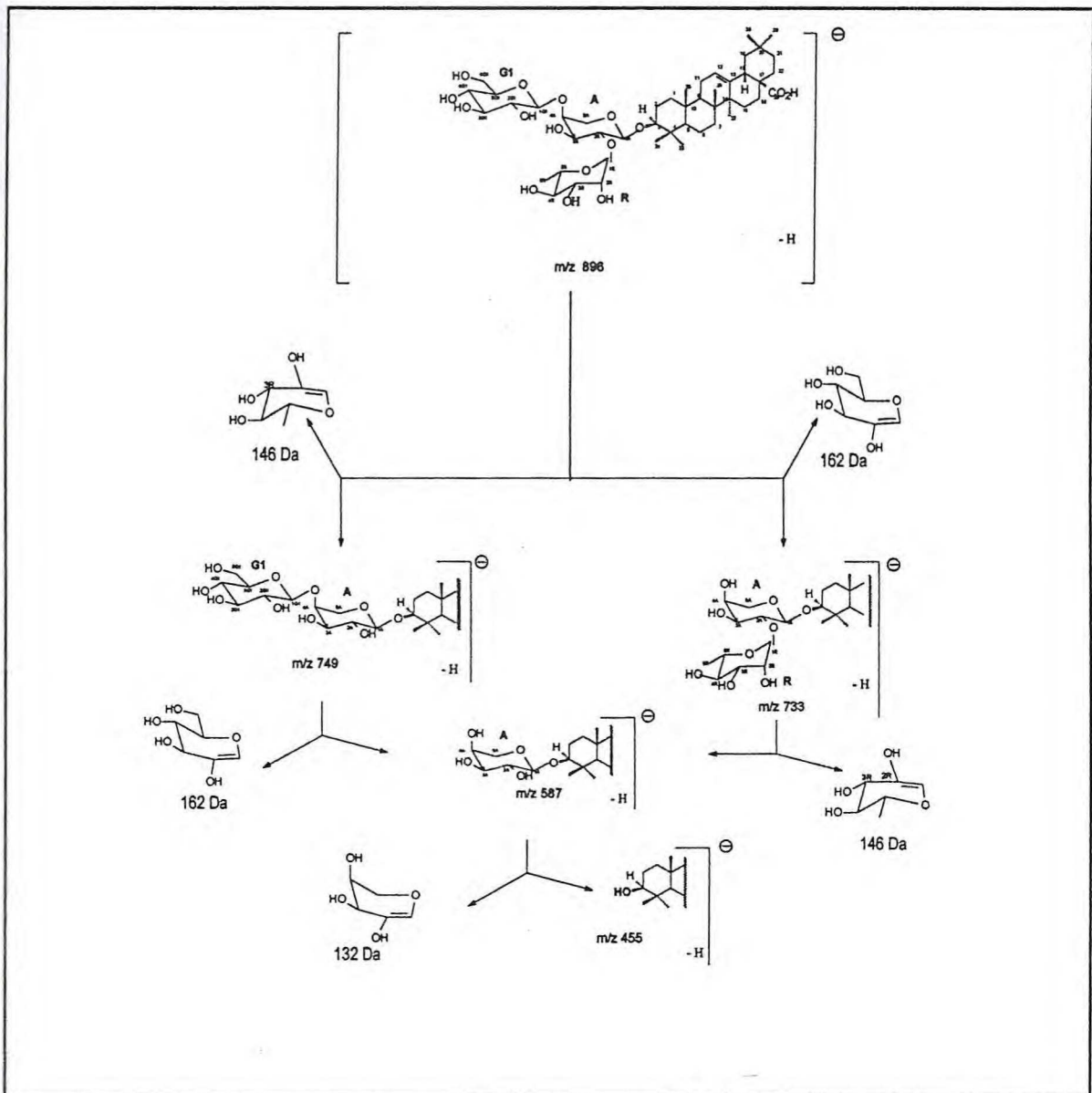


Figura 27 – Proposta mecanística para as principais fragmentações de PEC-76(3) no espectro de massas.

A comparação adicional dos deslocamentos químicos de átomos de carbono anoméricos destas oses com a dos seus metilglicosídeos⁶⁸ (Tab. 03, Pag. 31), assim como, com a de dados descritos na literatura para saponinas estruturalmente semelhantes^{11,16} (Tab. 06 e 07, Pag. 52, 53), permitiu estabelecer a presença de uma α -L-arabinopiranosose, de uma α -L-ramnopiranosose e de uma β -L-glicopiranosose na saponina PEC-76 (3).

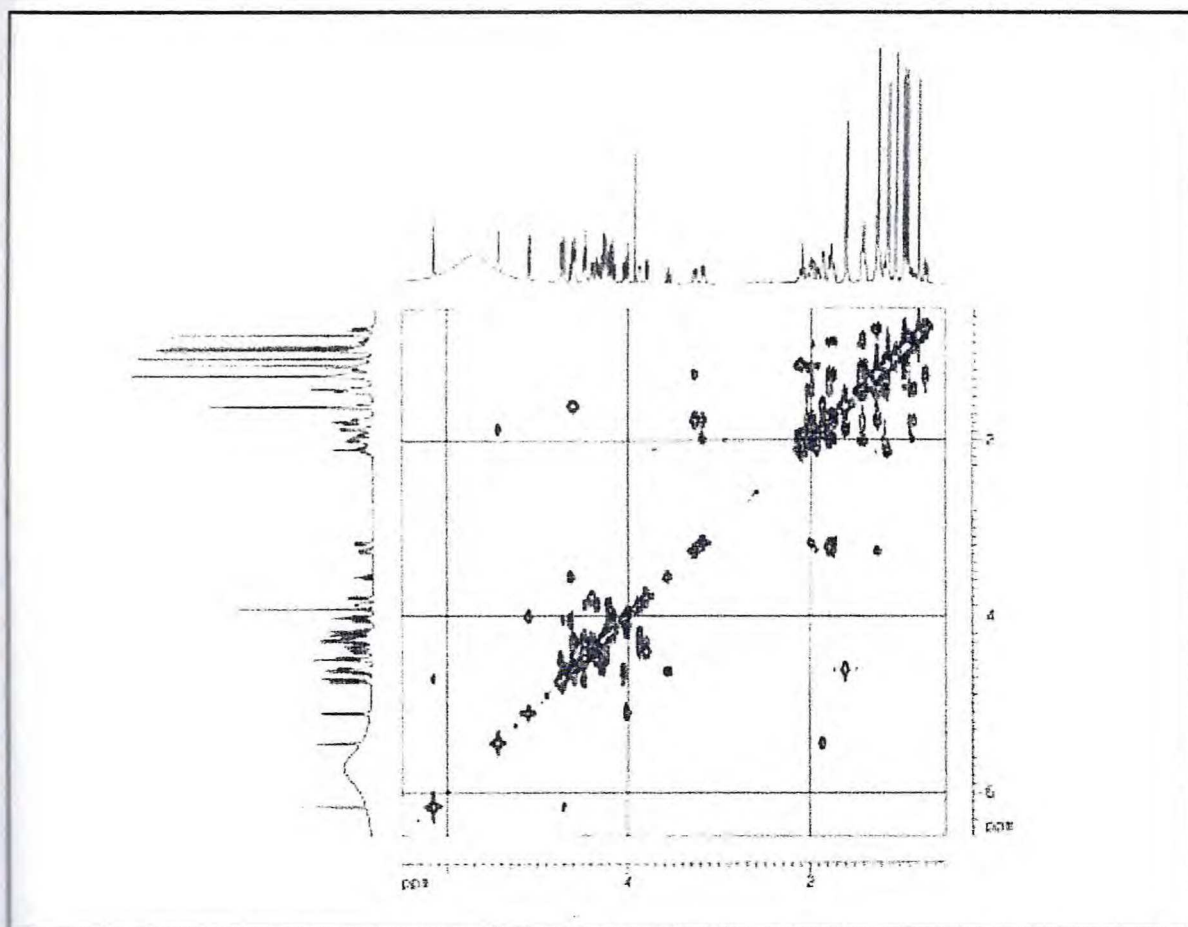


Figura 28 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-76 (3).

A determinação da seqüência das ligações interglicosídicas da unidade osídica e desta com a aglicona, foi feita através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância - HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2,3$) e de experimento bidimensional de efeito nuclear Overhauser homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (NOESY).

A observação no espectro de correlação heteronuclear a longa distância - HMBC com acoplamento a três ligações ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) (Fig. 29, Pag. 49), da correlação entre o sinal correspondente ao átomo de hidrogênio anomérico da arabinose H1-A em δ 4,7 (d, 6,0 Hz) e o sinal correspondente ao átomo de carbono C-3 (δ 89,0) da aglicona (Fig. 30, Pag. 50), bem como, a correlação reversa do átomo de carbono C-3 da aglicona com o hidrogênio anomérico H1A da arabinose (Tab. 07, Pag.53), bem como, a observação no espectro bidimensional de efeito nuclear Overhauser homonuclear da interação dipolar do átomo de hidrogênio anomérico da arabinose com o átomo de hidrogênio ($\text{H}\alpha$) da genina, permitiu concluir que a unidade osídica está ligada ao átomo de carbono C-3 da genina através da arabinose (Fig. 30, Pag. 50).

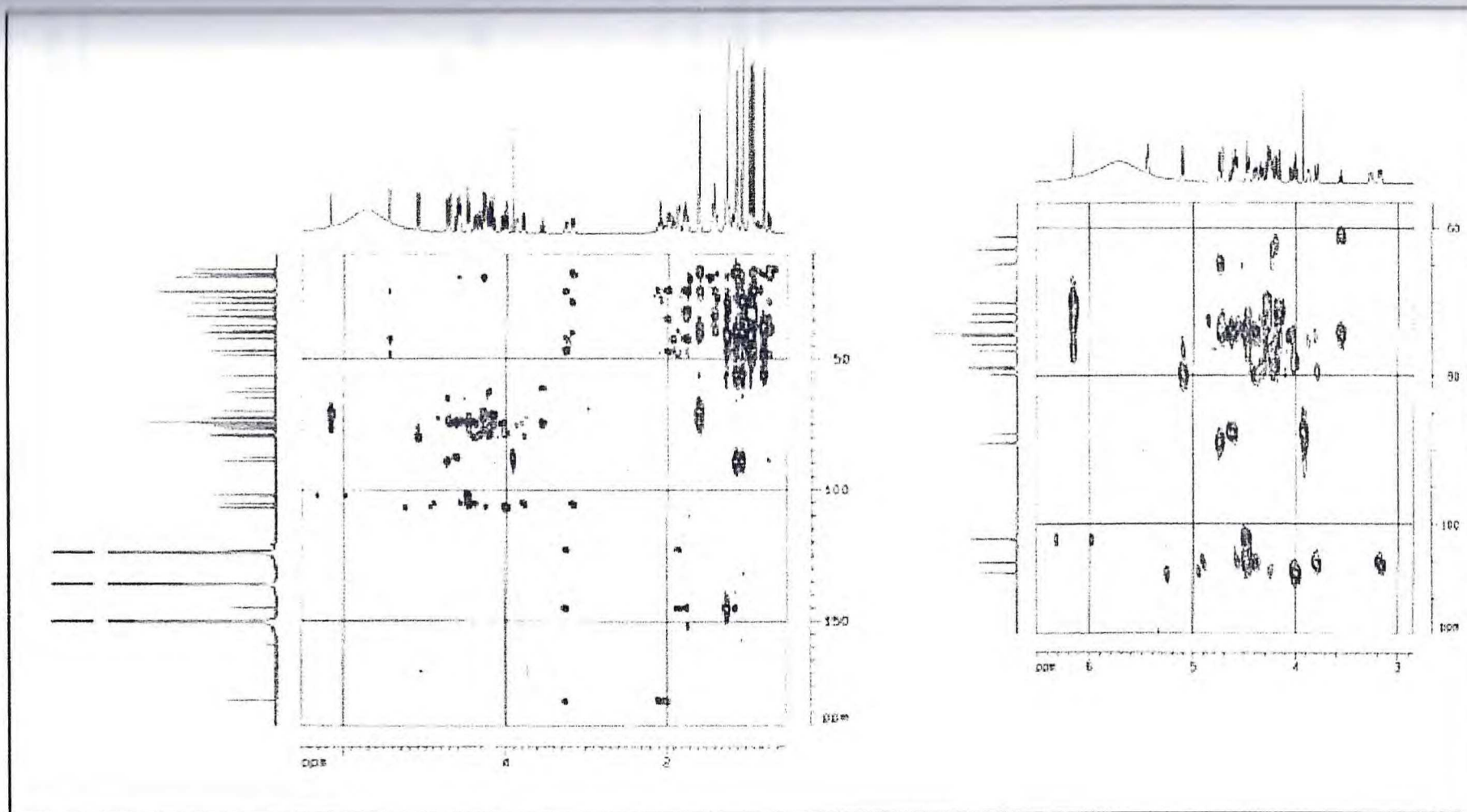


Figura 29 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3).

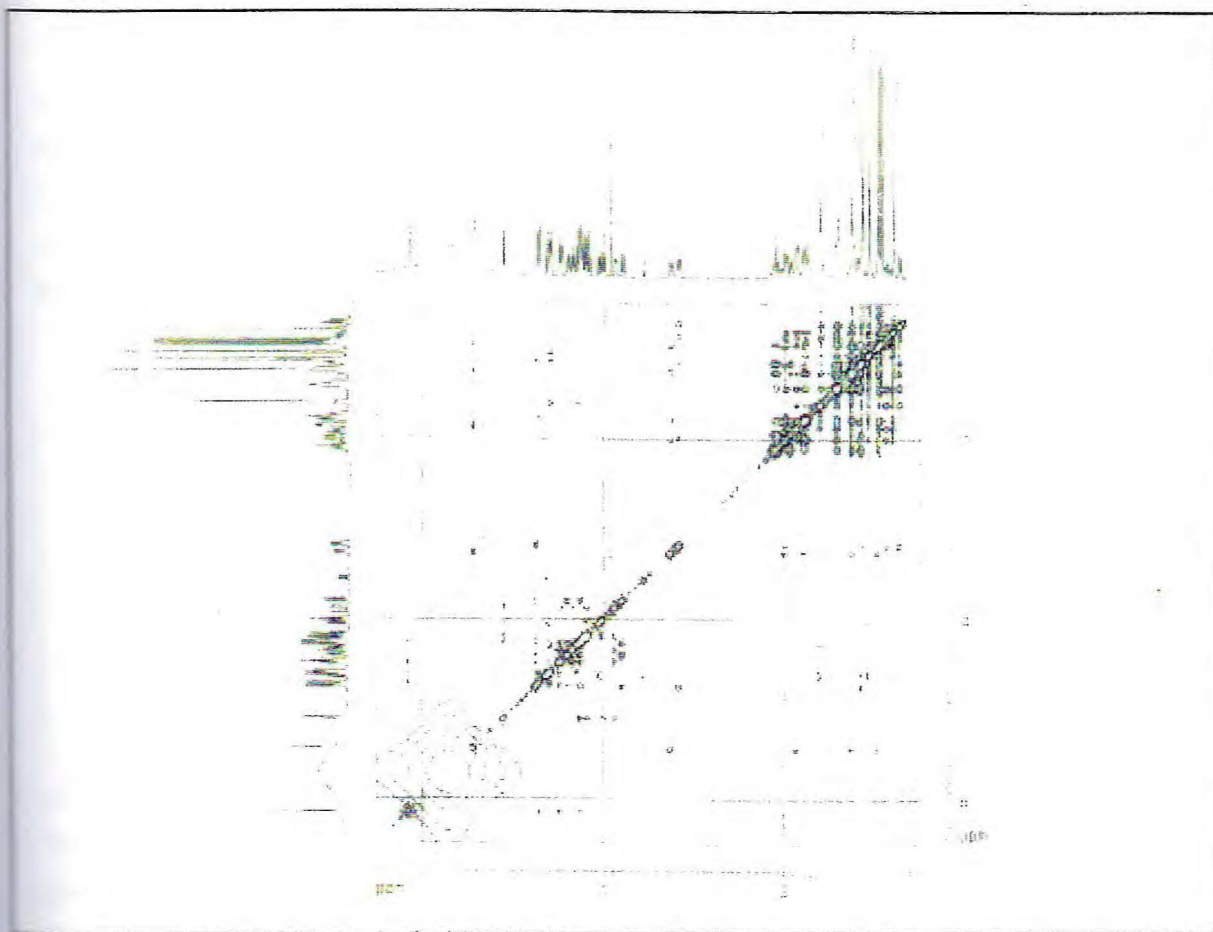


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H - NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC - 76(3).

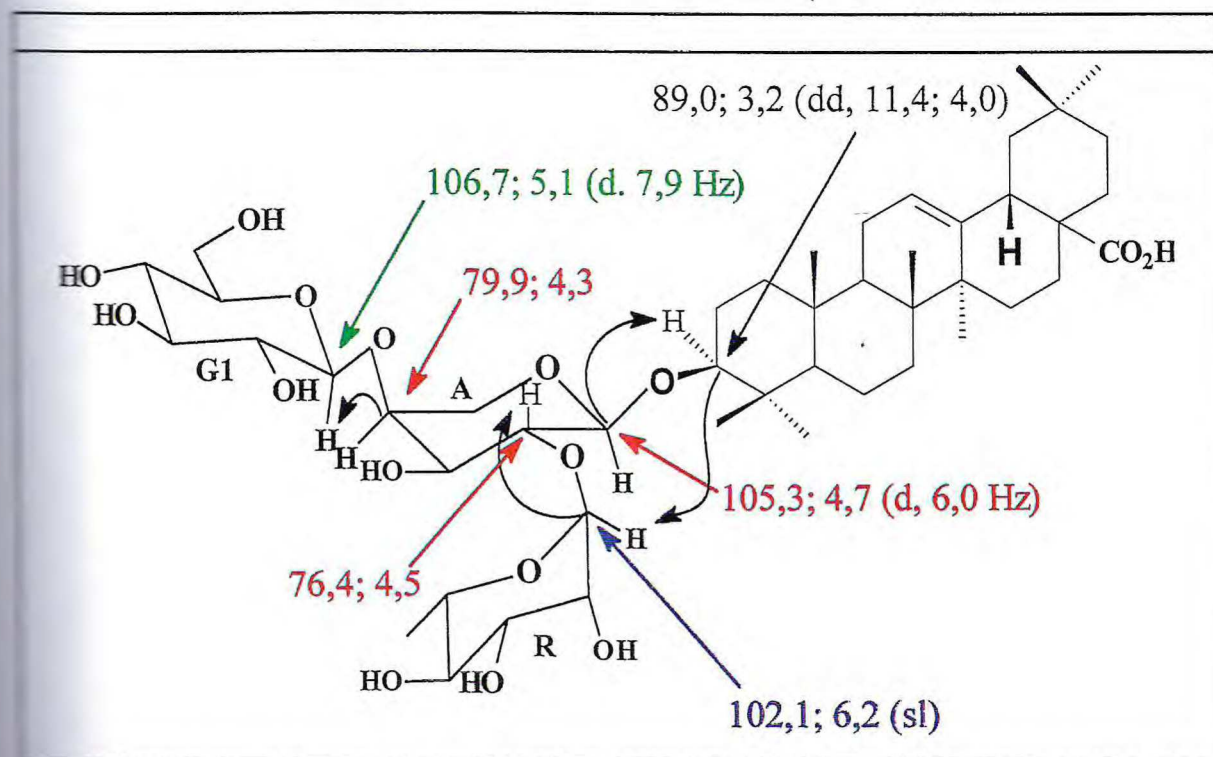


Figura 31 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância PEC-76(3).

Por outro lado, também no espectro de HMBC (Fig. 29, Pag. 48), detectou-se a correlação entre o sinal correspondente ao átomo de carbono anomérico da ramnose (H1R) em δ 102,1 ppm e o sinal do hidrogênio H2A da arabinose em δ 4,5 ppm, bem como, da correlação a três ligações do hidrogênio anomérico da glicose H1G em δ 5,1 ppm (d, 7,9 Hz) com o carbono C4A da arabinose em δ 79,9 ppm, foram de fundamental importância na determinação da sequência das ligações interglicosídicas.

Assim, a sequência dos açúcares na unidade foi definida como:

Glicose (1 →4)-Arabinose - Genina

↑ (1→2)

Ramnose

As configurações dos açúcares em α para a arabinose e ramnose e β para a glicose são adicionalmente confirmadas com base no valor de suas constantes de acoplamentos (J_{H_1, H_2}) deduzidas do espectro de RMN 1H (Fig. 23, Pag. 44). Portanto, a saponina PEC-76 (3) é inédita nesse táxon e denomina-se Ácido 3-O- $[\beta$ -D-glicopiranosil-(1→4)- $[\alpha$ -L-ramnanopiranosil-(1→2)]- α -L-arabinopiranosiloleanóico e de acordo a literatura⁶⁶ revelou forte atividade moluscicida sobre *Biomphalaria alexandrina*, um vetor do *Schistosoma mansoni* no vale do Rio Nilo.

Tabela 06 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H da aglicona de PEC-76 (3) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 75
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1 CH_2	39,2	1.4, 0.9	-	3H-25, H-5, H-9	38,5
2 CH_2	26.9	2.0, 1.8	-	-	27,4
3 CH	89,0	3.2 (dd, 11,6; 4.0)	-	3H-23, 3H-24, H-5, H-1A	78,7
4 C	39.8	-	3H-23, 3H-24	-	38,7
5 CH	56,3	0.7	-	3H-23, 3H-24, 3H-25	55,2
6 CH_2	18.8	1.4; 1,3	-	-	18,3
7 CH_2	32,5	1.4; 1.2	-	3H-26	32,6
8 C	40.0	-	3H-26	3H-27	39,3
9 CH	48,3	1.6	-	3H-25, H-12	47,6
10 C	37.3	-	3H-25	-	37,0
11 CH_2	24,0	1.9	H-9	-	23,1
12 CH	122.8	5.4 (t)	2H-11	H-18	122,8
13 C	145,0	-	H-18	3H-27	143
14 C	42.5	-	3H-27	H-18, 3H-26	41,6
15 CH_2	28,6	2,1	-	3H-27	27,7
16 CH_2	24.1	2.1,1.9	-	-	23,4
17 C	47.0	-	H-18	-	46,6
18 CH	42.3	3.3 (dd, 13,8 ; 3,9)	-	-	41,3
19 CH_2	47.8	1.8, H-19b,1.32, H-19a	H-18	3H-29, 3H-30	45,8
20 C	31.3	-	3H-29, 3H-30, H-19	-	30,6
21 CH_2	34.5	1.8; 1,4	-	3H-29, 3H-30	33,8
22 CH_2	33,5	2.1; 1.4	-	-	32,3
23 CH_3	28,4	1.2 (s)	-	H-5; 3H-24	28,1
24 CH_3	17,4	1.1 (s)	-	3H-23, H-5	15,6
25 CH_3	15,9	0.8 (s)	-	H-5; H-9	15,3
26 CH_3	17,7	1.0 (s)	-	-	16,8
27 CH_3	26,5	1.3 (s)	-	-	26,0
28 C	180,5	-	-	-	181,0
29 CH_3	33,7	0.9 (s)	-	-	33,1
30 CH_3	24,1	1.0 (s)	-	-	23,6

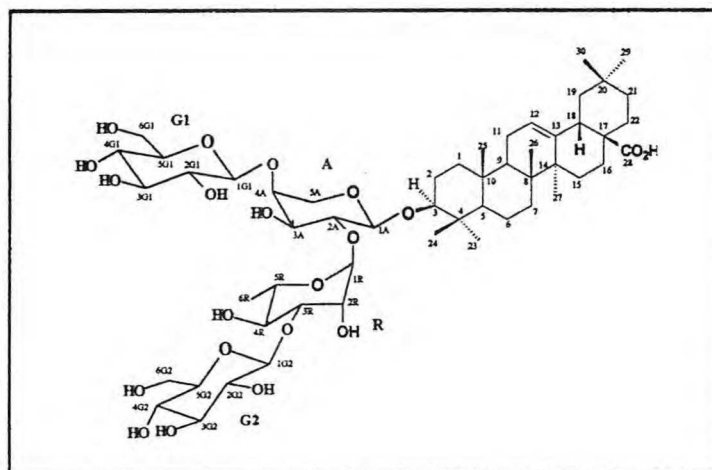
*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 07 - Dados de RMN ¹³C e de RMN ¹H da unidade osídica de PEC-76 (3) em C₅D₅N.

C	¹ H x ¹³ C - HMQC - ¹ J _{CH}		¹ H x ¹³ C - HMBC - ¹ J _{CH}		PES-F1	Ref.11
	δ C	δ H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ C	δ C
1A	105,3	4,7 (d, 6,0)	H-2A	H-3, 2H-5 A	105,2	104,9
2A	75,6	4,5			76,2	76,4
3A	74,3	4,3			74,1	74,0
4A	79,9	4,3	2H-5A	H-1G	69,0	69,5
5A	64,9	4,4 (dd, 11, 1,9)3,7 (dl, 11,2)		H-1A,H-3A	65,0	64,5
1R	102,1	6,2 (sl)		H-2A	102,0	101,5
2R	72,6	4,7	H-1R		72,7	71,6
3R	72,8	4,6 (dd, 9,2 e 3,3)		H-1R	72,9	72,2
4R	73,4	4,3		3H-6R	74,3	72,2
5R	70,1	4,6 (qd, 9,2 e 6,10)	H-4R, 3H-6R	H-1R	70,2	69,8
6R	18,9	1,6 (d, 6,1)	H-5R	H-4R	18,9	18,3
1G	106,7	5,1 (d, 7,9)	H-2G	H-4A		106,3
2G	75,8	4,0 (dd, 7,8 e 8,8)	H1G1			75,4
3G	78,8	4,2 (t, 8,8)	H-2G, H4G			78,7
4G	71,6	4,2 (t,8,8)	H-3G Ee H4G			71,3
5G	79,1	3,9 (m)				78,4
6G	62,9	4,5 (dl, 11,9)3,8 (dd, 11,8 e 5,0)		H-5G		62,5

* Espectros em Piridina

4.4. Determinação estrutural de PEC-6P (4)



A substância PEC-6P (4) é um sólido branco amorfo, solúvel em piridina e funde com decomposição na faixa entre 244 – 248 °C. Nos produtos da hidrólise ácida, foi possível detectar através de CCD comparativa, a presença de glicose, ramnose e arabinose, além de aglicona com comportamento cromatográfico semelhante ao do ácido oleanólico.

O espectro de massas utilizando a técnica por ionização química por eletrospray (ESI-MS) de íons negativos (Fig. 32, Pag. 55) revelou fragmentos em m/z 1057,7 relativo ao íon pseudo-molecular $[M - H]^-$; m/z 895,7 $[M - H - \text{hexose}]^-$; m/z 733,7 $[M - H - 2 \text{ hexoses}]^-$; m/z 587,4 $[M - H - 2 \text{ hexoses} - \text{metilpentose}]^-$; m/z 455,4 $[M - H - 2 \text{ hexoses} - \text{metilpentose} - \text{pentose}]^-$ correspondente à aglicona, sugerindo fórmula molecular $C_{53}H_{86}O_{21}$.

O espectro de RMN 1H de PEC-6P (4) (Fig. 33, Pag. 55) mostrou sete singletos, compreendidos entre δ 0,8 e δ 1,3, correspondentes a átomos de hidrogênios de grupos metilas ligados a átomos de carbono não hidrogenados; um singletto largo em δ 5,5 ppm, correspondente ao hidrogênio olefínico de dupla ligação trissubstituída, sugerindo a presença de triterpeno pentacíclico da série olean-12-eno o que está em concordância com o aparecimento de dois sinais na região de carbonos olefínicos em δ 122,7 e em δ 144,9 ppm no seu espectro de RMN ^{13}C – HBBD (Fig. 34, Pag. 56), atribuídos aos átomos de carbono C-12 e C-13 de triterpenos constituídos de esqueleto da série olean-12-eno⁷⁵. Também foi observado no espectro de RMN ^{13}C – HBBD (Fig. 34, Pag. 56), a presença de um sinal em δ 180,3 atribuível a um átomo de carbono de carboxila. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – HBBD e de RMN ^{13}C - DEPT 135 (Fig. 35, Pag. 56) permitiu observar a presença de oito átomos de carbono não hidrogenados, por exclusão dos sinais com deslocamentos químicos em δ 31,1; 37,2; 37,9; 39,7; 42,4; 46,9; 144,9 e δ 180,5 ppm sugerindo que o triterpeno tratava-se do ácido oleanólico.

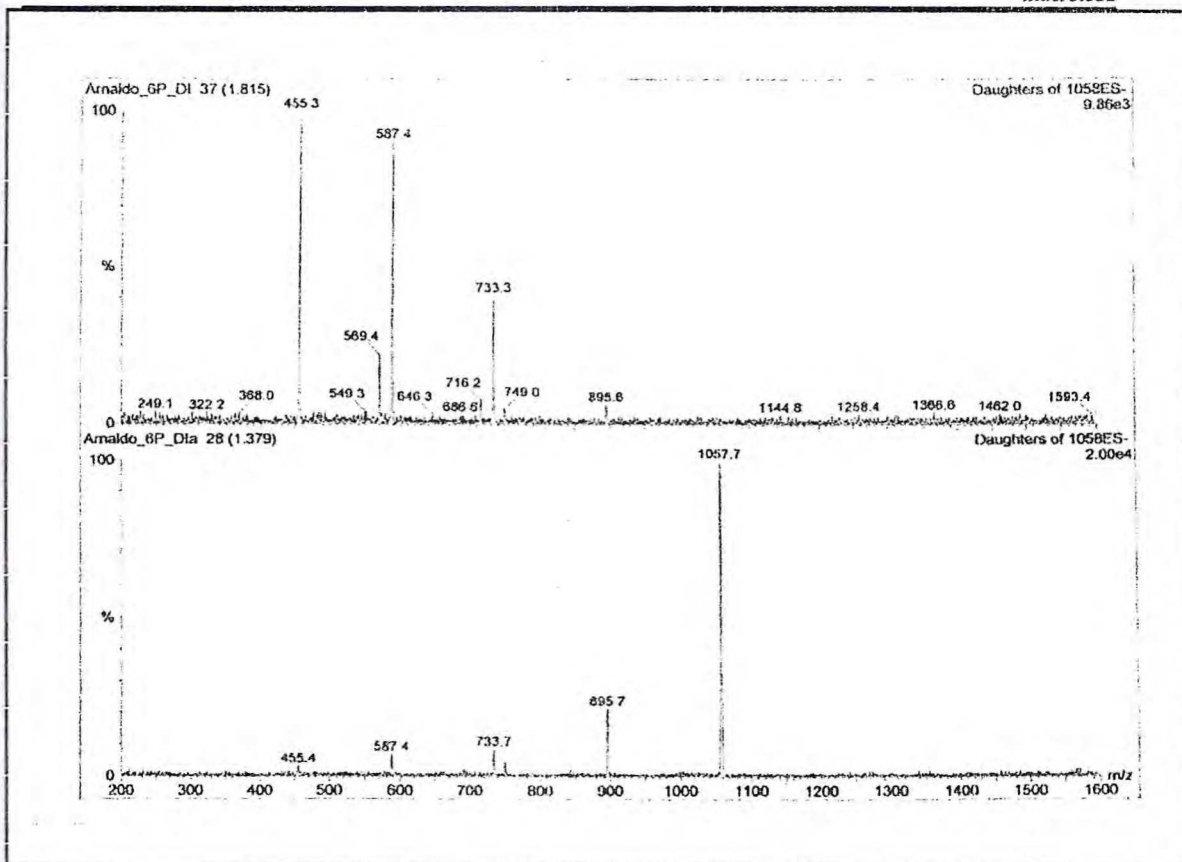


Figura 32 - Espectro de massa por ionização química por eletrospray ESI-MS de PEC-6P(4).

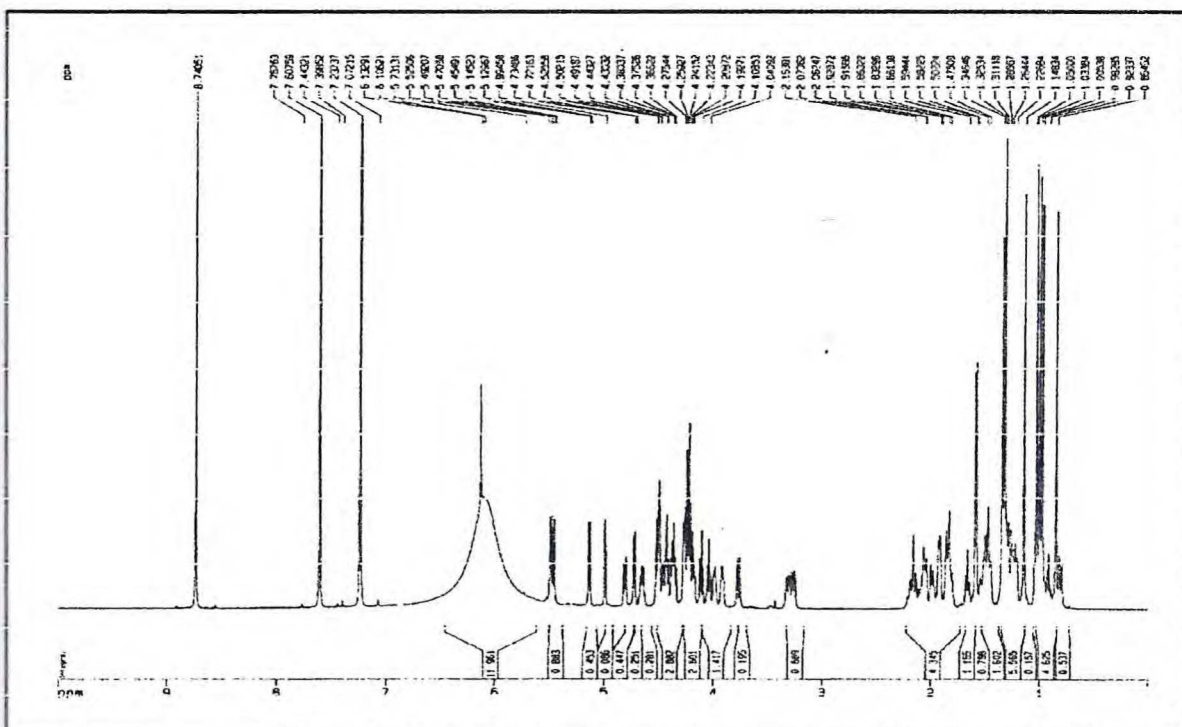


Figura 33 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-6P(4).

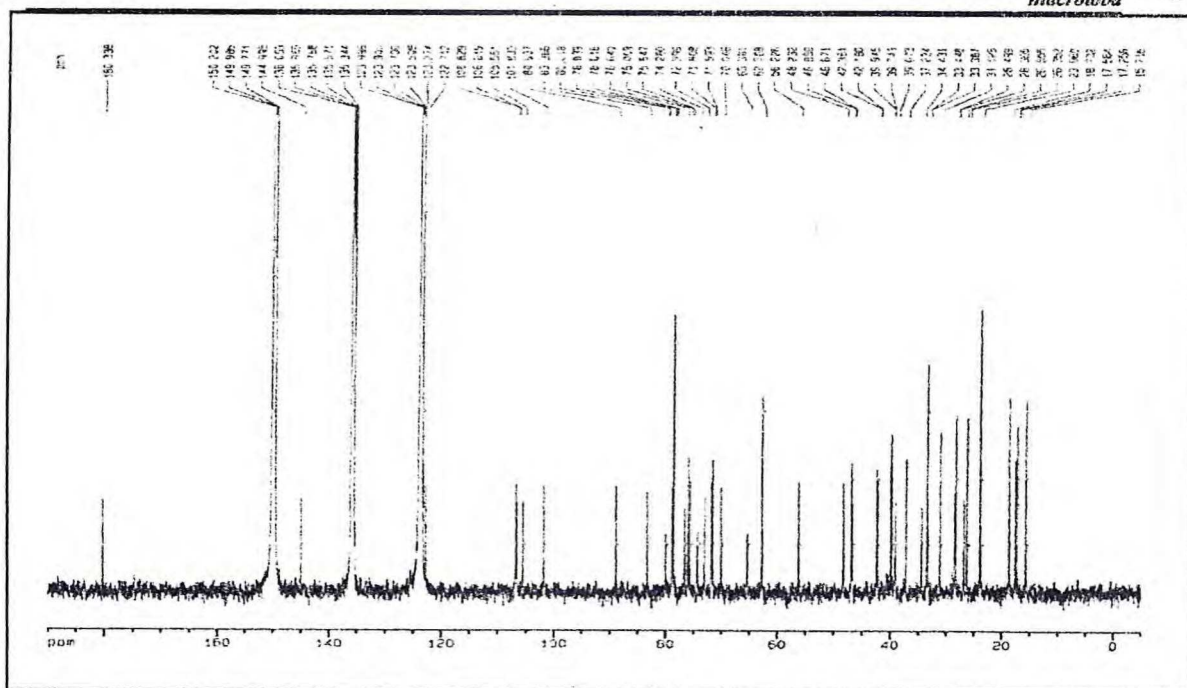


Figura 34 - Espectro de RMN ¹³C – HBBD (125 MHz, C₅D₅N) de PEC-6P(4).

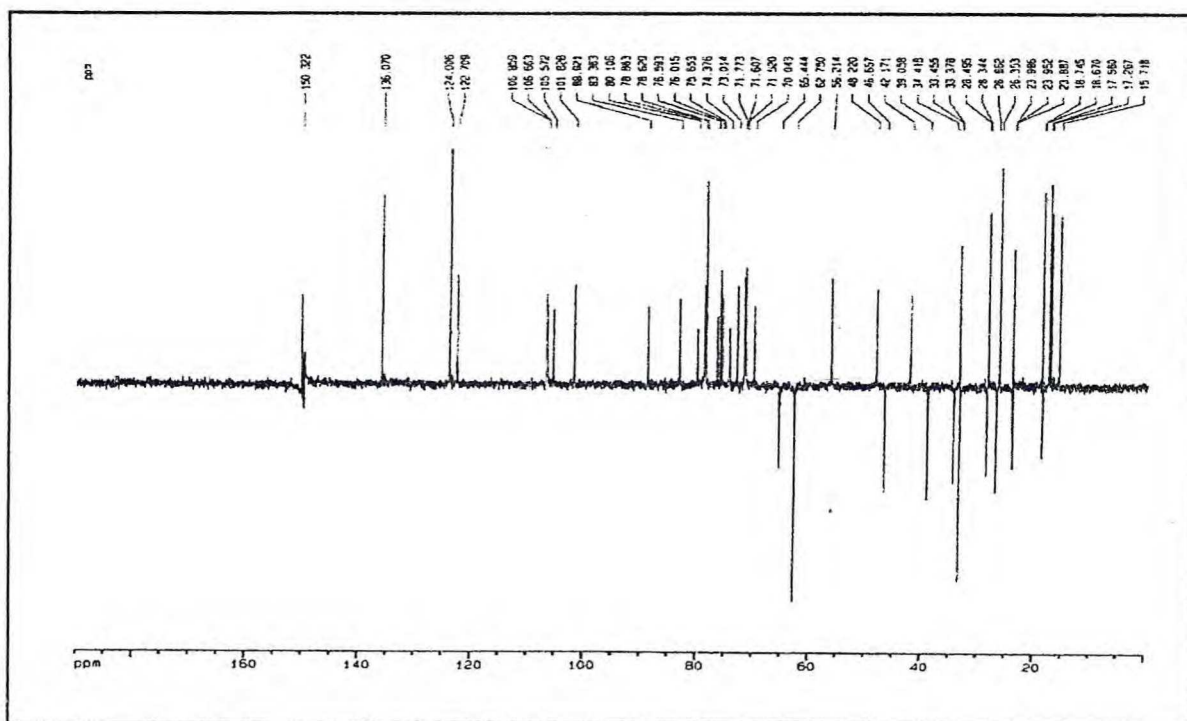


Figura 35 - Espectro de RMN ¹³C – DEPT 135 (125 MHz, C₅D₅N) de PEC-6P(4).

Adicionalmente, verificou-se de maneira inequívoca no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta – HMQC (Fig. 36, Pag. 58) a correlação do sinal correspondente ao carbono C-12 em δ 122,7 com sinal do hidrogênio H-12; a correlação do carbono C-18 em δ 42,2 com o hidrogênio metínico H-18 (δ 3,3), além do carbono carbinólico C-3 em δ 89,0 que está correlacionado ao hidrogênio H-3 em δ 3,3 (dd, 11,7 e 4,1 Hz). Esses dados, aliados à observação do fragmento em m/z 455 daltons, permitiram concluir que a aglicona desta saponina era o ácido oleanólico.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – HBBD (Fig. 34, Pag. 56) e de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 35, Pag. 56) com base nos deslocamentos químicos dos carbonos, bem como, a presença do íon pseudo-molecular $[\text{M-H}]^-$ em m/z 1057 no espectro de massa (Fig. 32, Pag. 55) e dos demais fragmentos referentes à perda de duas unidades de glicose, uma de metilpentose e outra de pentose, confirmaram a presença de um glicosídeo, pertencente à classe das saponinas, constituído de 53 átomos de carbono, dos quais 30 estão relacionados à genina ou aglicona triterpênica do ácido oleanólico e os 23 átomos de carbono restantes estão relacionados à unidade osídica constituída de quatro açúcares.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 33, Pag. 55) revelou na região de deslocamentos químicos característicos de carboidratos, a presença de um sinal de hidrogênio anomérico adicional, em relação ao respectivo espectro da saponina PEC-76 (3), em δ 5,5 (d, 7,4 Hz), além dos três hidrogênios anoméricos, com absorções semelhantes às da saponina PEC-76 (3), ou seja em δ 4,7 (d, 6,7 Hz), δ 6,1 (sl) e δ 5,1 (d, 7,8 Hz). Sugere-se que a hexose adicional é uma outra unidade de glicose, uma vez que, conforme descrito anteriormente, após a hidrólise ácida desta saponina, foram detectados por CCD, os monossacarrídeos glicose, ramnose e arabinose.

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear (^1H x ^1H -COSY) (Fig. 37, Pag. 59) e heteronuclear (^1H x ^{13}C -HMQC) (Fig. 36, Pag. 58), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente das absorções referentes aos quatro hidrogênios e aos quatro carbonos anoméricos, bem como, da absorção em δ 1,6 ppm (d, 6,0 Hz) correlacionada ao sinal em δ 18,8 ppm atribuído ao átomo de carbono de grupo metila da metilpentose, permitiu caracterizar as absorções referentes aos deslocamentos químicos de átomos de hidrogênios e de carbonos relacionados aos dos monossacarrídeos arabinose (A), ramnose (R) e duas unidades de glicose designadas de G1 e de G2 (Tab. 09, Pag. 66).

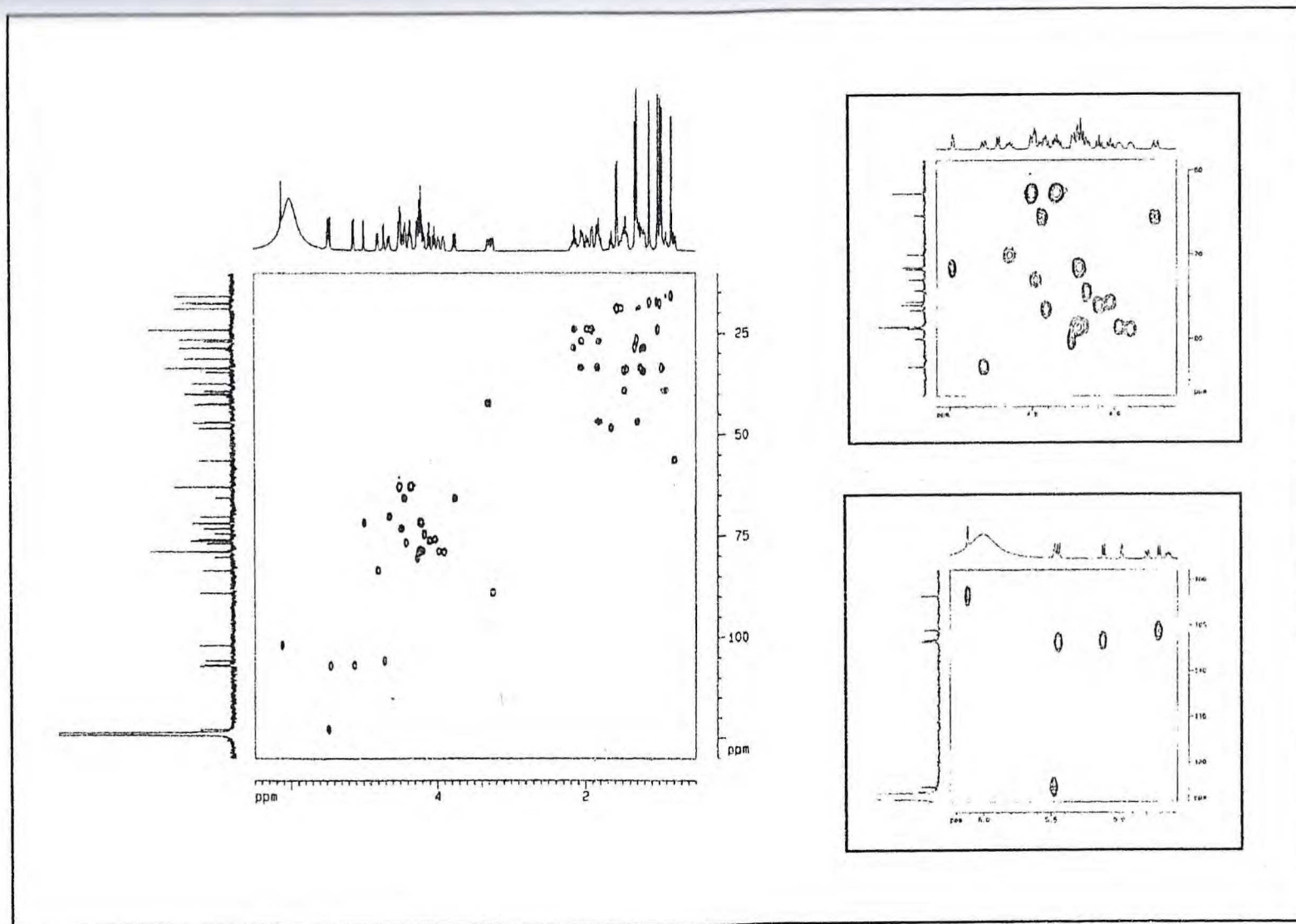


Figura 36 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4).

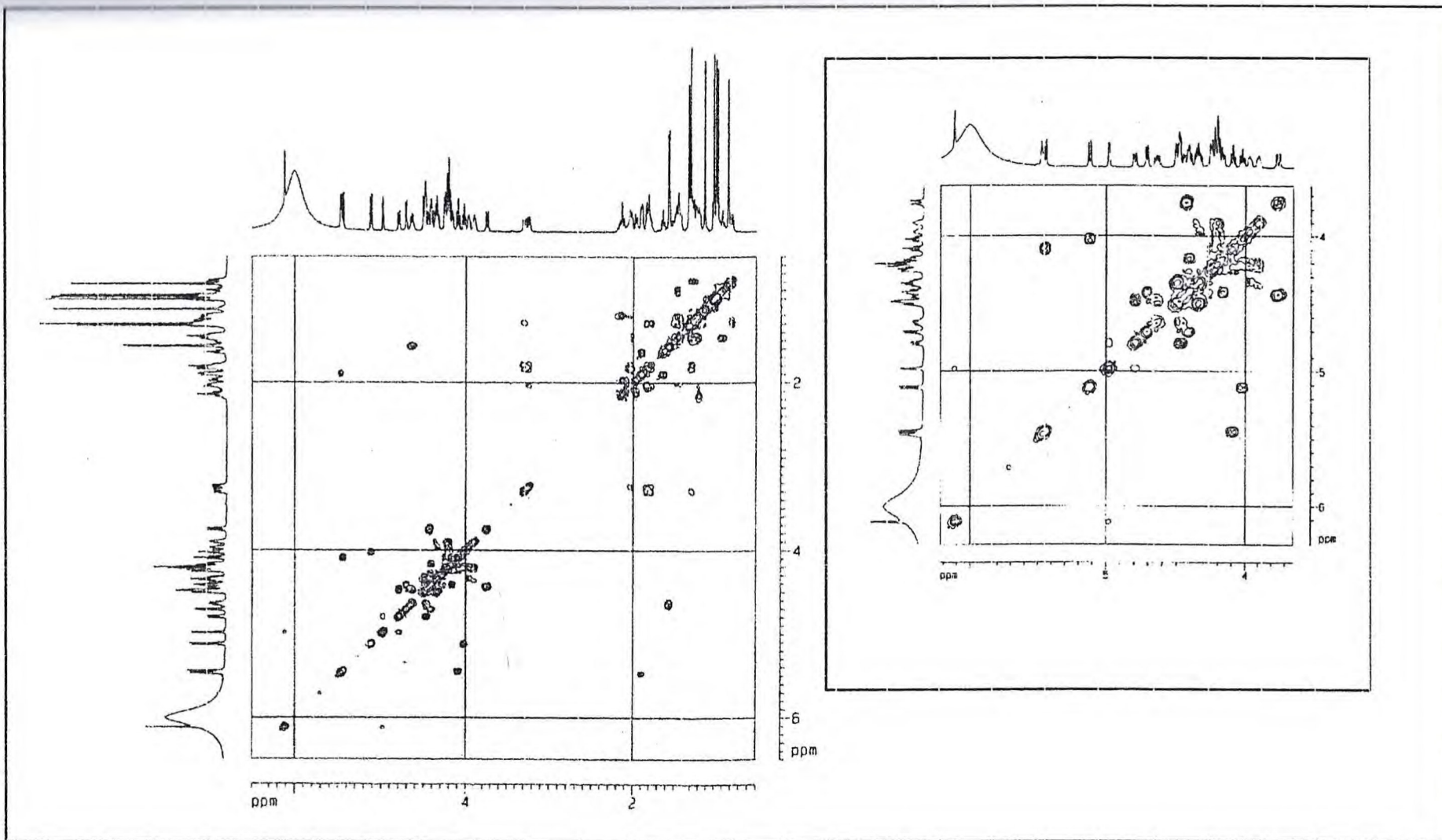


Figura 37 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H - COSY (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-6P(4).

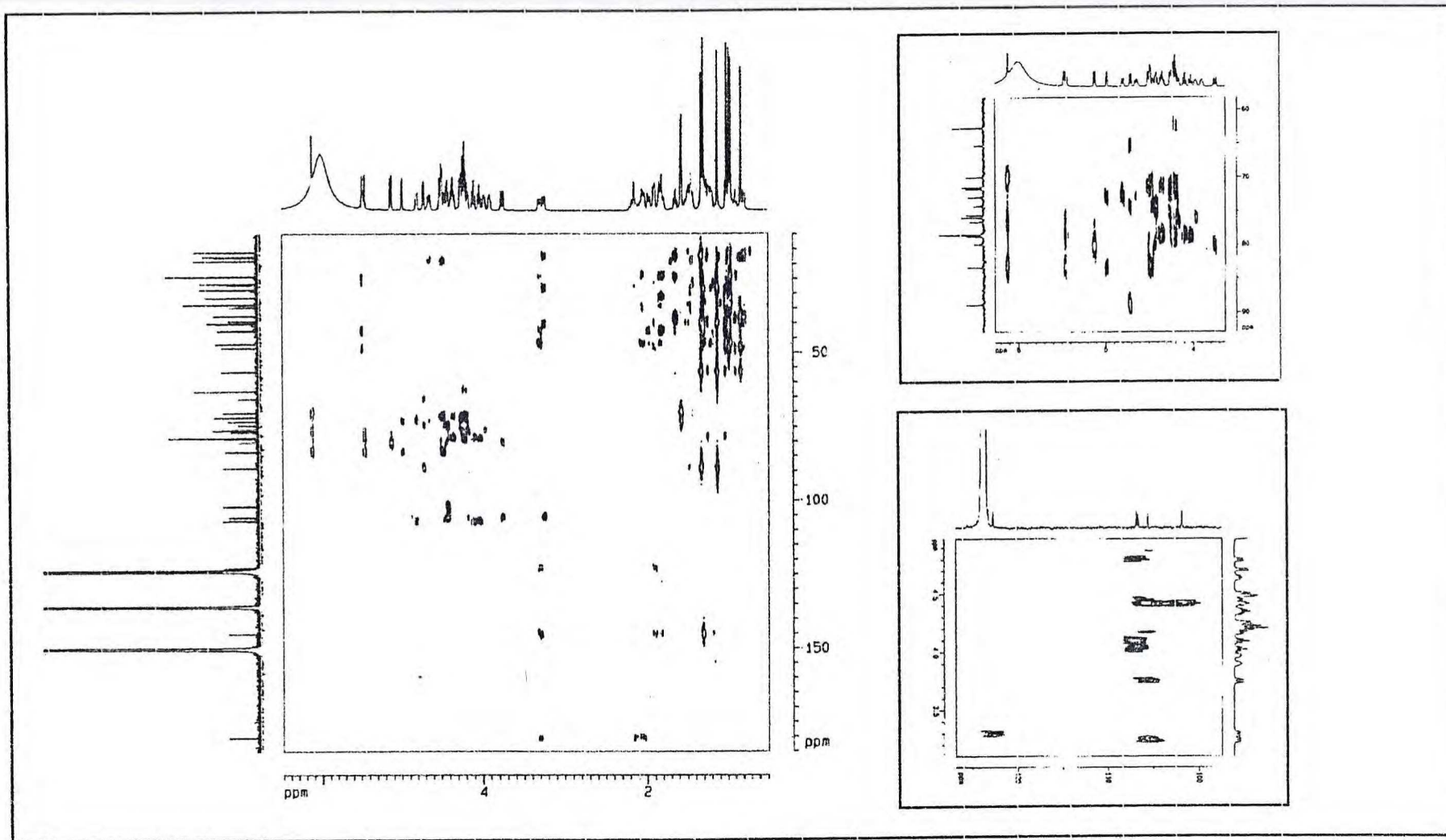


Figura 38 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4)

Adicionalmente, a análise comparativa dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono anoméricos inseridos na faixa entre δ 93 e 110⁵² no espectro de RMN ¹³C- HBBD (Fig. 34, Pag. 56), com os deslocamentos químicos dos seus metilglicosídeos⁶⁸ (Tab. 03, Pag. 32) e com os deslocamentos de átomos de carbonos de saponinas constituídas dos mesmos açúcares (Tab. 09, Pag. 66)¹¹, permitiu estabelecer a presença de uma α -L-arabinopiranosose, α -L-raminopiranosose e duas β -glicopiranosose na saponina PEC-6P (4).

A ligação da unidade osídica com a aglicona, foi deduzida através do deslocamento químico do carbono metínico hidroxilado (C-3) da aglicona em δ 89,0, observando-se que o efeito de sua respectiva glicosilação, promoveu uma desproteção em relação ao carbono C-3 da β -Amirina⁷⁵, definindo-se dessa forma a ligação da unidade osídica ao carbono C-3 da aglicona.

A afirmação acima foi confirmada pela detecção no espectro de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC (Fig. 38, Pag. 60) da correlação a três ligações da linha espectral referente ao carbono anomérico da arabinose em δ 105,6 com o hidrogênio H-3 da aglicona em δ 3,2 (dd, 11,7 e 4,1 Hz), bem como, da interação dipolar do hidrogênio anomérico da arabinose H1A em δ 4,7 (d, 6,7 Hz) com os hidrogênios H-3 e H-5a da aglicona no espectro bidimensional ¹H x ¹H -NOESY (Fig. 35, Pag. 62).

A natureza das ligações interglicosídicas, foi deduzida a partir da arabinose, observando-se no espectro de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (Fig. 40, Pag. 63), a correlação do sinal referente ao átomo de carbono C-2 A da arabinose em δ 76,4 com o hidrogênio anomérico da ramnose em δ 6,1 (sl), definindo uma ligação ramnose(1→2) arabinose, bem como, a correlação do sinal correspondente ao carbono C-4 A da arabinose em δ 80,2 com o sinal do hidrogênio anomérico da glicose denominada de G1 em δ 5,1 (d, 7,8 Hz), definindo uma ligação glicose-G1(1→4)arabinose, caracterizando uma arabinose com sítios de ligação nos carbonos 2 e 4, semelhante a saponina PEC-76 (3). Adicionalmente, com relação à segunda glicose denominada de G2, observou-se a correlação do seu hidrogênio anomérico em δ 5,5 (d, 7,8 Hz) com o átomo de carbono 3R da ramnose em δ 83,4, sendo definida, portanto, uma ligação glicose-G2 (1→3) ramnose (Figura 40, Pag. 63).

É válido acrescentar que esta sequência de ligações na unidade osídica ramificada é confirmada no espectro de massa (Fig. 41, Pag. 64), através da observação de fragmentos referentes às perdas de duas unidades de glicose terminais em m/z 733,7 [M - 2x162 - H]⁺, de duas unidades de glicose e uma de ramnose em m/z 587,4 [M - 2x162 - 146 - H]⁺ e de duas unidades de glicose, uma de ramnose e uma de arabinose em m/z 455,4 [M - 2x162 - 146 - 132 - H]⁺; além da presença do fragmento em m/z 749 atribuído à perda de uma hexose (glicose G2) e de uma metilpentose (ramnose) [M - 162 - 146 - H]⁺, que juntamente com o fragmento em m/z 733 atribuída à perda de duas hexoses [M - 2x162 - H]⁺, confirmaram a existência de ramificação na unidade osídica ligada ao carbono 3 da aglicona⁸³.

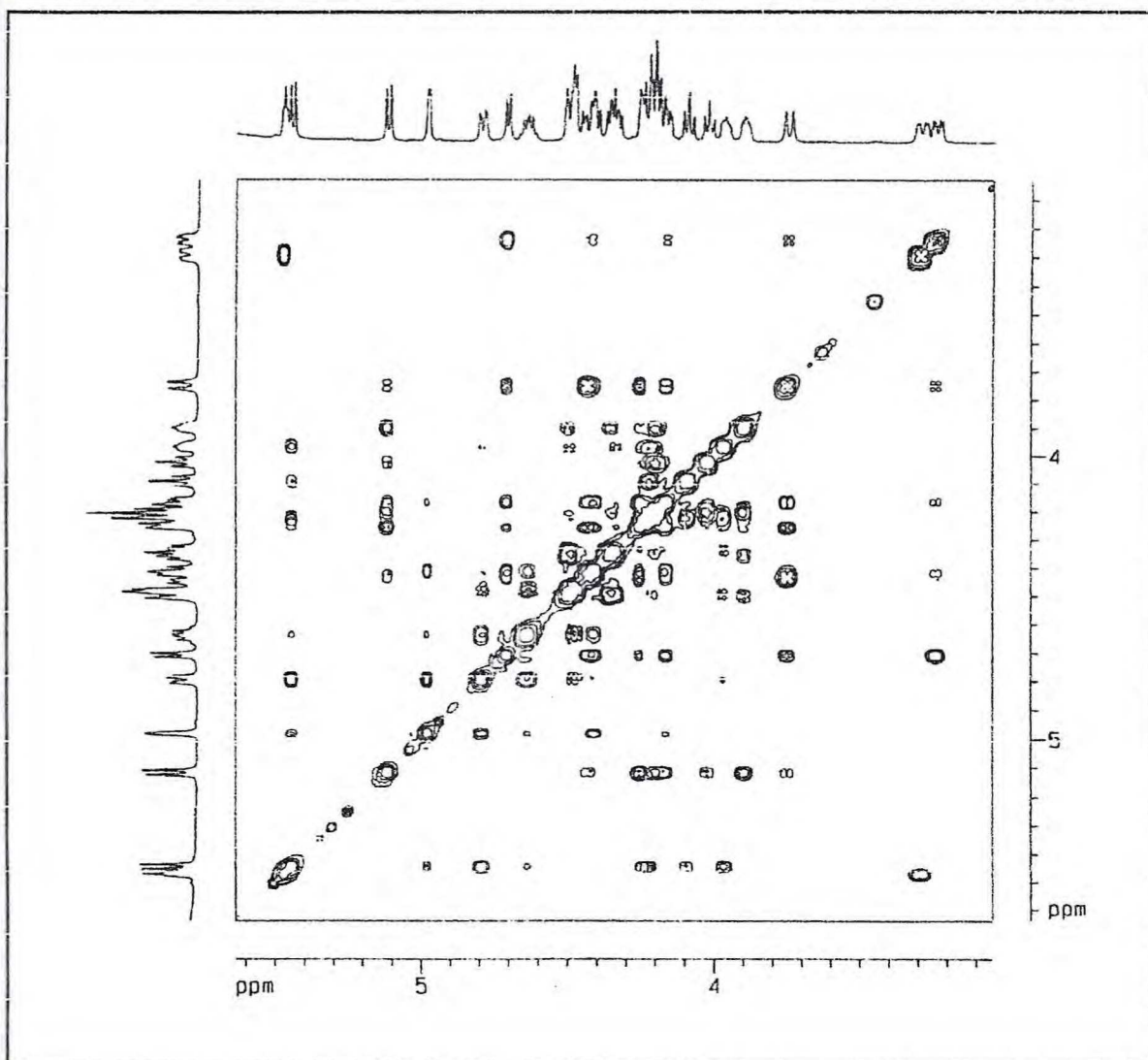


Figura 39 - Espectro (expansão) de RMN ^1H - NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(4).

As configurações α para arabinose e ramnose e β para a glicose são adicionalmente, confirmadas com base no valor de suas constantes de acoplamentos ($J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$) deduzidas do espectro de RMN ^1H (Fig. 33, Pag. 55). Finalmente, a análise dos dados descritos anteriormente, bem como, a comparação com dados relatados na literatura¹¹ (Tab. 09, Pag. 66), permitiu a identificação da saponina PEC-6P (5) como Ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosiloleanóico.

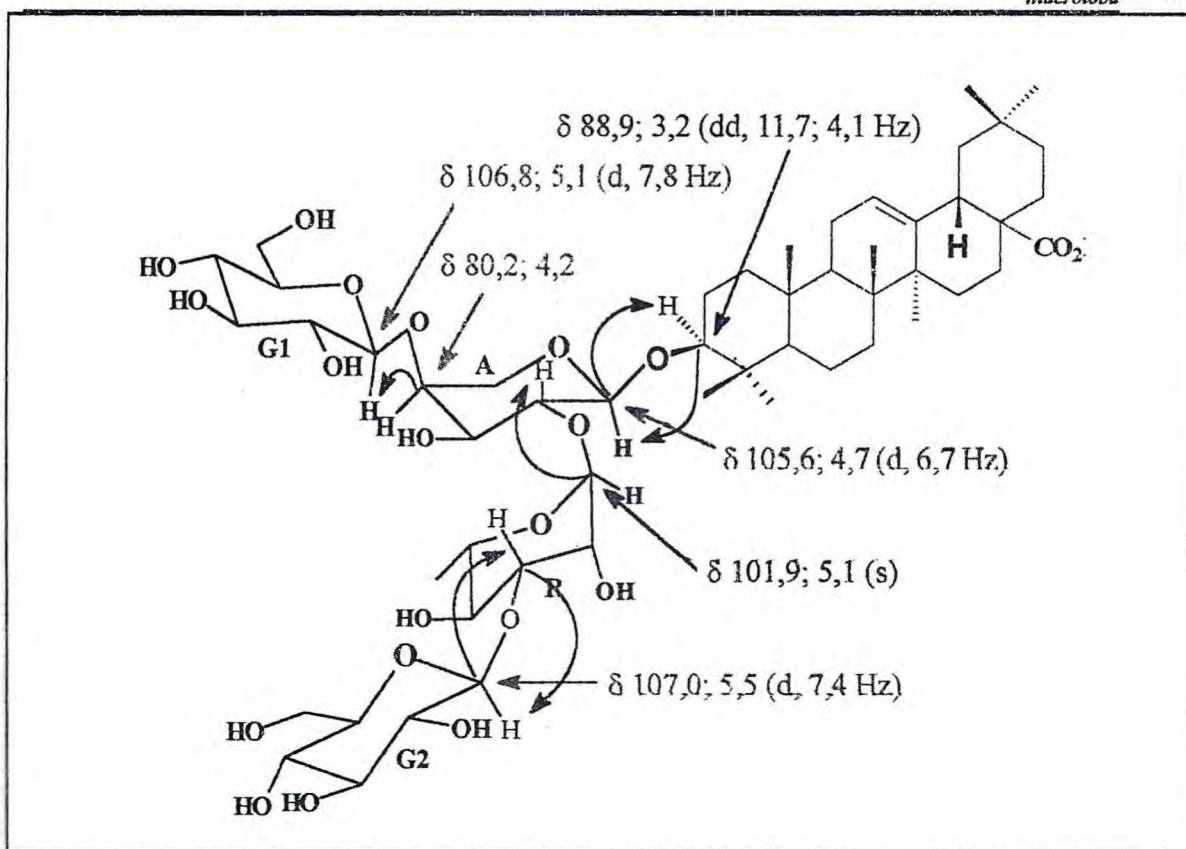


Figura 40 - Correlação entre ^1H , ^{13}C das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PEC-6P (4).

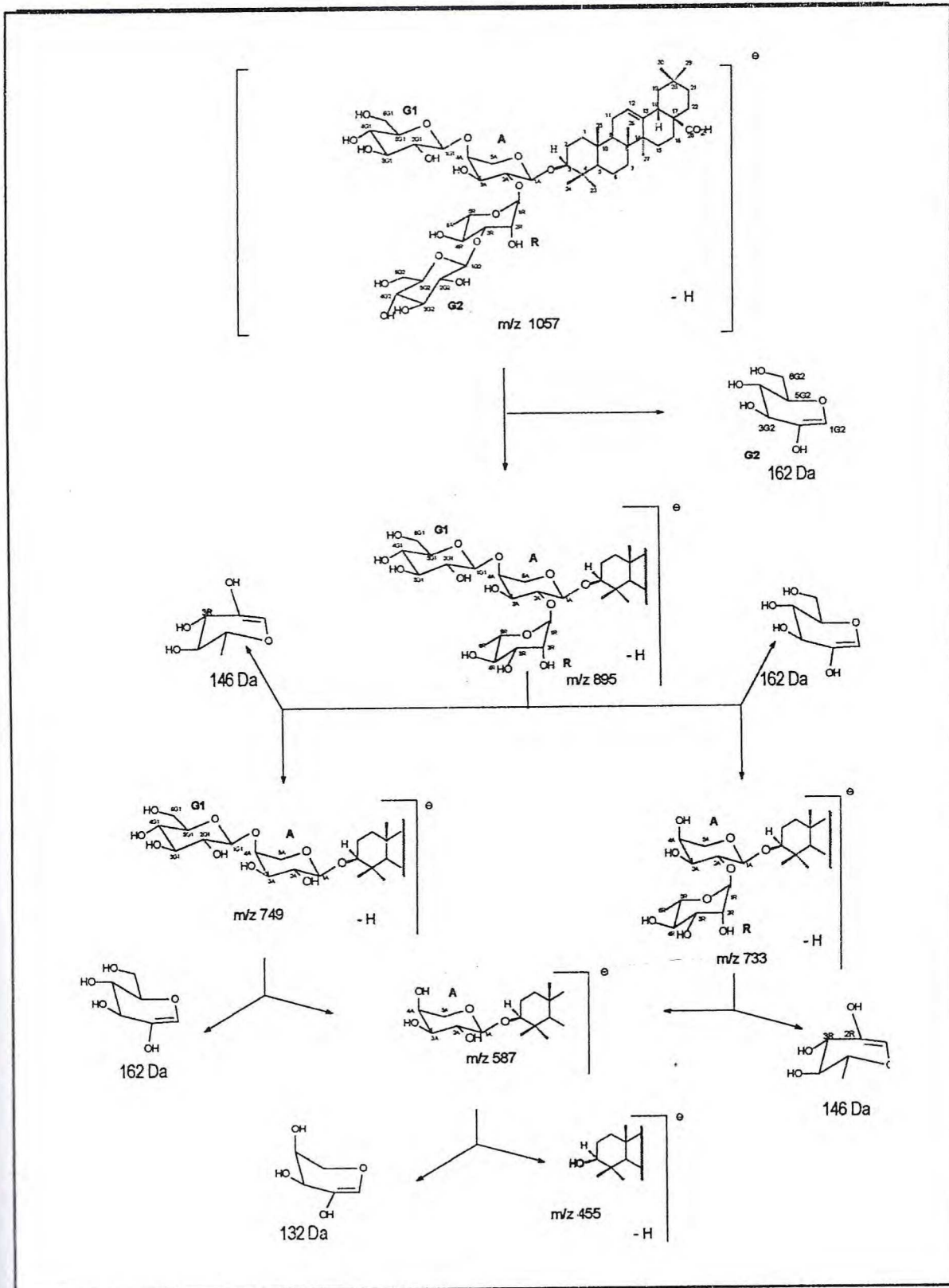


Figura 41 - Proposta mecanística para justificar as principais fragmentações de PEC-6P(4) no espectro de massa.

Tabela 08 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H da aglicona de PEC-6P(4).

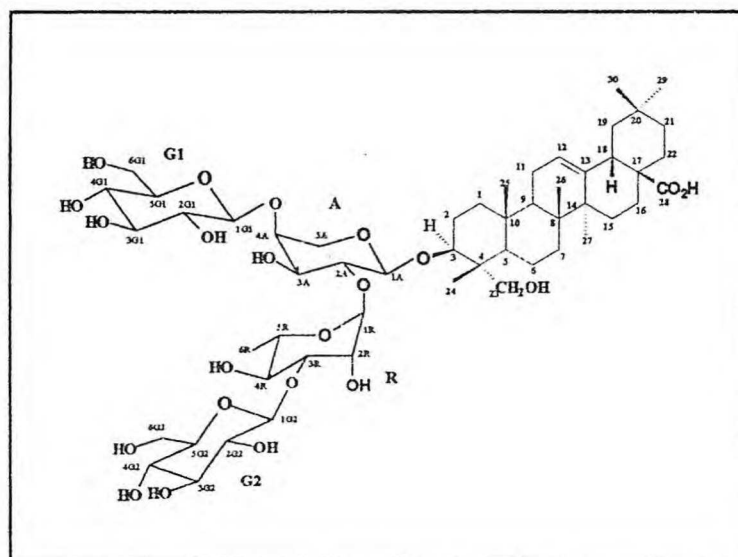
C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^nJ_{\text{CH}}$		Ref. 75
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
1 CH_2	39,0	1,5; 0,9	-	3H-25	38,5
2 CH_2	26,8	2,10; 1,8	-	-	27,4
3 CH	89,9	3.2 (dd, 11,7; 4.1)	-	3H-23, 3H-24, H-1A	78,7
4 C	39,7	-	3H-23, 3H-24	-	38,7
5 CH	56,2	0,8 (d, 11.4)	-	3H-23, 3H-24, 3H-25	55,2
6 CH_2	18,7	1,5; 0,9	-	-	18,3
7 CH_2	33,4	1,5; 1,3	-	-	32,6
8 C	39,9	-	3H-26, H-9	3H-27	39,3
9 CH	48,2	1.6 (t, 8,7)	H-11	H-12, 3H-25, 3H-26	47,6
10 C	37,2	-	H-5, H-9, 3H-25	-	37,0
11 CH_2	23,9	1,9	H-9, H-12	-	23,1
12 CH	122,7	5,5 (sl)	H-11	H-18	122,1
13 C	144,9	-	H-18	H-11, 3H-27	143,3
14 C	42,4	-	3H-27	H-9, H-12, 3H-26	41,6
15 CH_2	28,5	2.1; 1,2	-	3H-27	27,7
16 CH_2	23,9	2,1; 1,2	-	-	23,4
17 C	46,9	-	H-18	-	46,6
18 CH	42,2	3.3 (dd)	-	-	41,3
19 CH_2	46,6	1,8; 1,3	H-18	3H-29, 3H-30	45,8
20 C	31,1	-	3H-29, 3H-30, H-19b	-	30,6
21 CH_2	34,4	1,4; 1,1	-	3H-29, 3H-30	33,8
22 CH_2	33,4	2.1; 1,8	-	-	32,3
23 CH_3	28,3	1,3 (s)	-	3H-24	28,1
24 CH_3	17,3	1.1 (s)	-	3H-23, H-5	15,6
25 CH_3	15,7	0,8 (s)	-	H-9	15,3
26 CH_3	17,6	1.0 (s)	-	-	16,8
27 CH_3	26,3	1,3 (s)	-	-	26,0
28 C	180,3	-	-	-	181,0
29 CH_3	33,4	0,9 (s)	-	-	33,1
30 CH_3	23,9	1.03 (s)	-	3H-29	23,6

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 09 - Dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H dos açúcares de PEC-6P(4).

CH	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 11
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1A	105,6	4,7 (d, 6,7)	H-2A	H-3	105,9
2A	76,4	4,4		H-1R	72,2
3A	74,6	4,1 (dd, 8,4; 3,5)	H-2A	H-2A	74,4
4A	80,2	4,2		2H-5A;H-1G1	69,1
5A	66,5	4,53,7 (d,11.5) - Hax		H-1A	66,6
1R	101,9	6,1 (sl)	H-2R	H-2A	102,4
2R	71,8	5,0 (sl)			71,9
3R	83,4	4,8 (dd, 9,4; 2,9)	H-2R, H-4R	H-1R, H-1G2	72,25
4R	73,1	4,5	H-3R	3H-6R	73,6
5R	70,0	4,6 (m)	3H-6R		69,4
6R	18,8	1,6 (d, 6,0)		H-4R	18,4
1G1	107,8	5,1 (d,7,8)	H-2G1		105,4
2G1	75,7	4,0 (d,7,8; 8,2)	H-3G1		74,8
3G1	78,7	4,2	H-2G1		78,1
4G1	71,5	4,2	H-3G1		71,4
5G1	78,9	3,9 (m)	H-6G1b		78,0
6G1	62,8	4,3; 4,5			62,5
1G2	107,0	5,5 (d, 7,4)	H-2G2	H-3R	105,4
2G2	76,1	4,1 (dd, 7,4; 8,2)	H-3G2		74,8
3G2	78,7	4,2	H-2G2		78,1
4G2	71,7	4,2	H-3G2		71,4
5G2	78,6	4,0 (m)	H-6G2h	H-3G2	78,0
6G2	62,8	4,3 ;4,5		H-4G2	62,5

4.5. Determinação Estrutural de PES-2V (5)



A substância PES – 2V(5) é um sólido branco amorfo, solúvel em piridina e funde com decomposição entre 251 - 268 °C. Seu espectro de massas obtido pela técnica de ionização química por eletrospray (ESI-MS) (Fig. 42, Pag. 68), exibiu um pico de íon pseudo molecular $[(M - H)]^-$ em m/z 1073,9, indicando massa molar 1074,9, compatível com a fórmula molecular $C_{53}H_{86}O_{22}$. O fragmento em m/z 911,9 corresponde à perda de uma hexose $[(M - H) - 162]^-$ terminal. Posteriormente, esse íon sofre cisão, levando a dois fragmentos, observados em m/z 765,4 $[(M - H) - 162 - 146]^-$ e em m/z 749,4 $[(M - H) - 2 \times 162]^-$, mostrando a perda simultânea de uma metilpentose e de outra hexose, respectivamente, sugerindo, portanto, uma unidade osídica com ramificação⁸³. Outro fragmento em m/z 603,4 é correspondente à perda de duas unidades de hexose e de uma metilpentose $[(M - H) - 2 \times 162 - 146]^-$. Adicionalmente, observou-se que o fragmento em m/z 471,3, resultante da perda de duas unidades de hexose, de uma metilpentose e de uma pentose $[(M - H) - 2 \times 162 - 146 - 132]^-$ está relacionado à aglicona, especificamente a hederagenina.

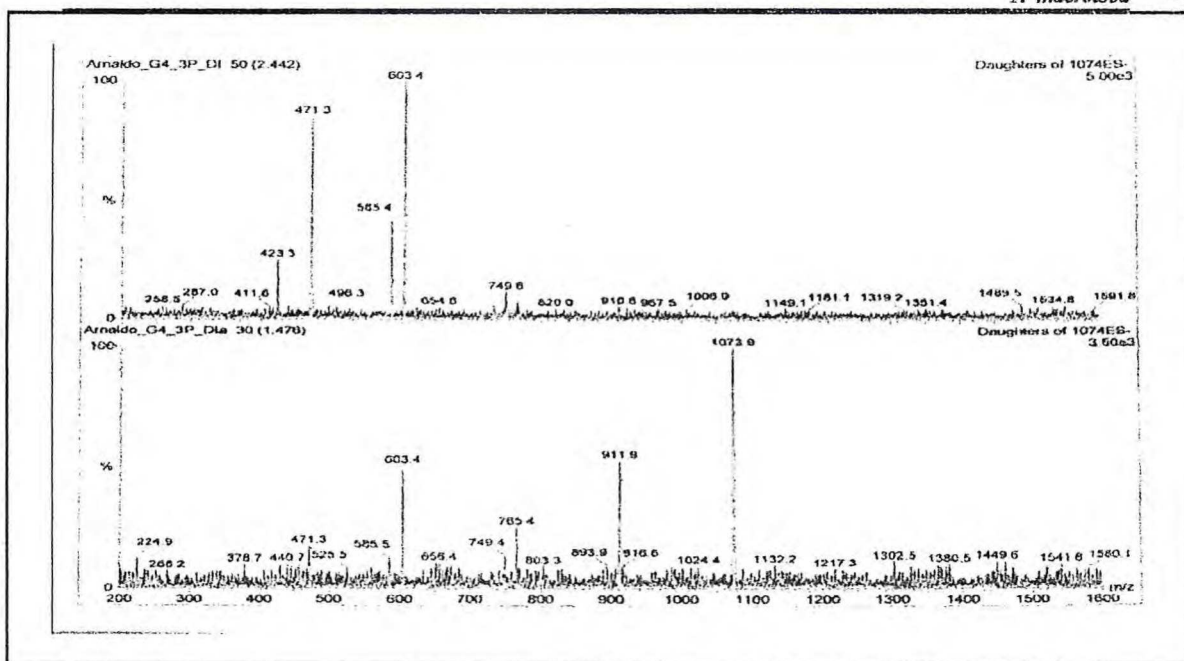


Figura 42 - Espectro de massas por ionização química eletrospray EI-MS de PES-2V (5)

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C - HBBDD (Fig. 43, Pag. 69) e de RMN ^{13}C - DEPT 135 (Fig. 44, Pag. 69) evidenciou, que estes espectros apresentaram na região de sinais correspondentes à aglicona, o mesmo perfil observado para a aglicona da saponina PES-F2 (2) (Tab. 10, Pag. 76), bem como, a detecção no espectro de RMN ^1H (Fig. 45, Pag. 70) da presença de seis sinais correspondentes a átomos de hidrogênio metílicos ligados a carbonos não hidrogenados, também observados no respectivo espectro da saponina PES-F2 (2) (Fig. 15, p. 35). Adicionalmente, observou-se no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta - HMQC (Fig. 46, Pag. 71), a correlação do carbono C-12 em δ 122,8 com o hidrogênio H-12 em δ 5,5 (t); a correlação do carbono C-18 em δ 42,1 com o hidrogênio metínico H-18 em δ 3,3 (dd, 13,6 e 3,8), além do acoplamento do carbono carbinólico C-3 em δ 81,5 com o hidrogênio H-3 em δ 4,2 confirmaram a hederagenina como aglicona^{14,15,82}.

A hidrólise ácida dessa saponina, seguida da análise de sua respectiva fase aquosa por CCD comparativa com padrões de açúcares, levou à detecção de arabinose, de ramnose e de glicose e a ocorrência dos referidos açúcares em PES-2V (5) está em concordância com o padrão de fragmentação observado no seu respectivo espectro de massa (Fig. 47, Pag. 72).

Também no espectro de RMN ^1H (Fig. 45, Pag. 70) foi revelada, na região de sinais correspondentes a hidrogênios de carboidratos, a presença de sinais que correspondem a quatro hidrogênios anoméricos em δ 6,2 (s), δ 5,5 (d, 7,8 Hz), δ 5,1 (d, 7,9 Hz) e δ 4,9 (7,0 Hz), os quais encontram-se correlacionados no espectro de HMQC (Fig. 46, Pag. 71) com os carbonos em δ 101,7, δ 106,9, δ 107,0 e δ 105,1 respectivamente, sugerindo a presença de uma unidade osídica constituída de quatro açúcares com absorções semelhantes às da saponina PEC-6P(4)^{11,79}.

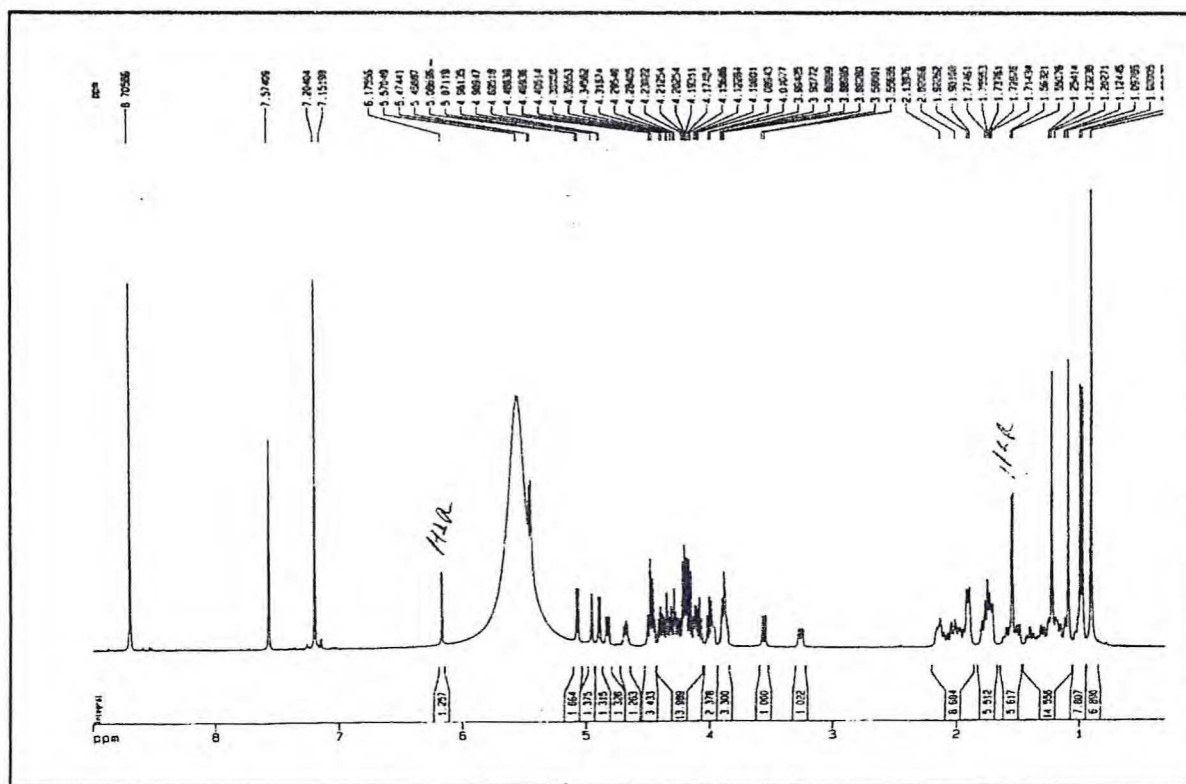


Figura 45 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de PES - 2V(5).

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) (Fig. 48, Pag. 73) e heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Fig. 46, Pag. 71), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente das absorções referentes aos quatro hidrogênios e aos quatro carbonos anoméricos, bem como, da correlação da absorção em δ 1,6 (d, 6,2 Hz) com a absorção em δ 18,7, atribuída ao átomo de carbono metílico da metilpentose, permitiu caracterizar as absorções referentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos relacionados aos dos monossacarrídeos arabinose (A), ramnose (R) e duas unidades de glicose designadas G1 e G2. Esta afirmativa é corroborada pela análise em CCD e análise comparativa com os dados espectroscópicos da saponina PEC-6P(4) (Tab. 11, Pag. 77).

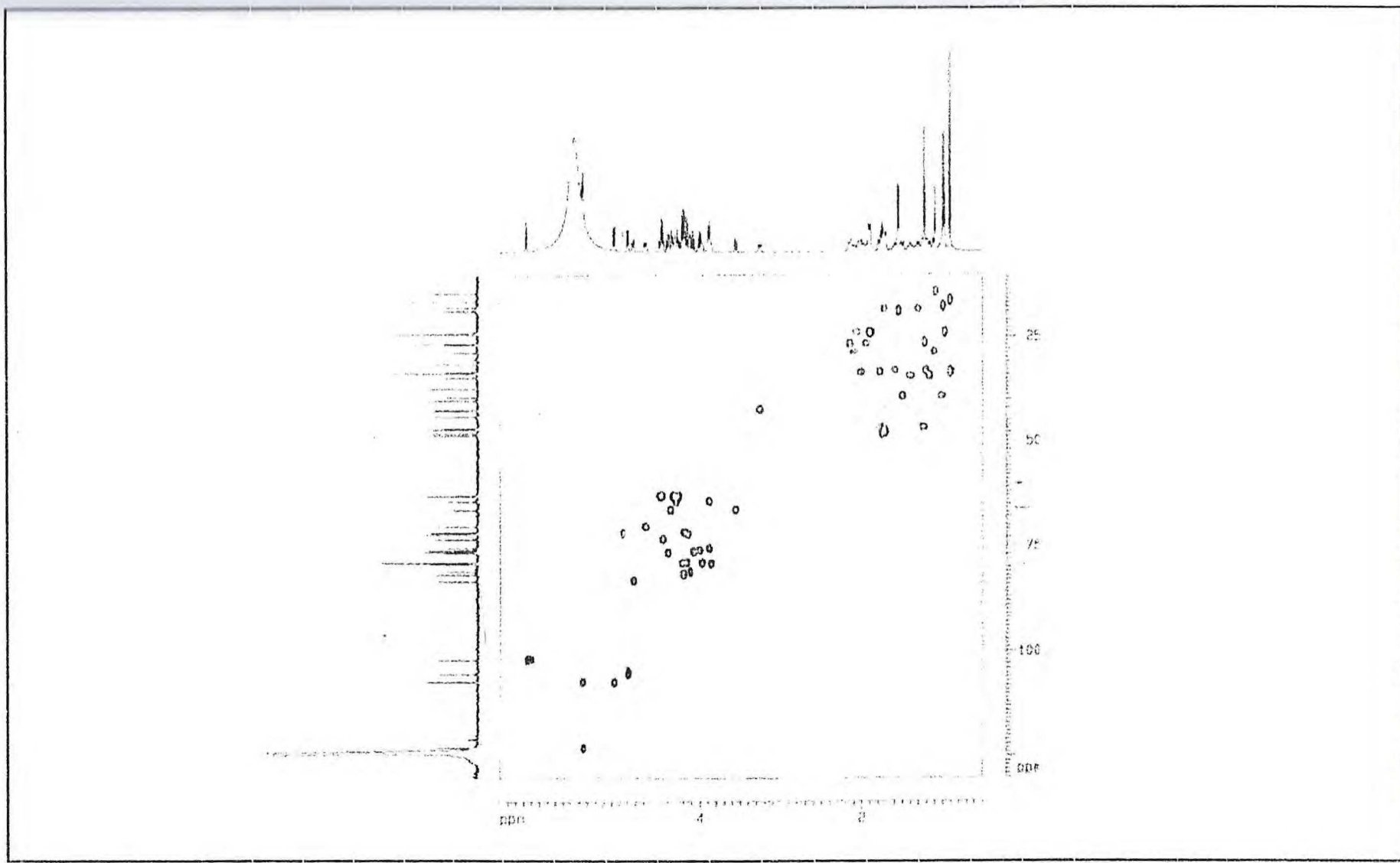


Fig. 46 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_2\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-2V(5).

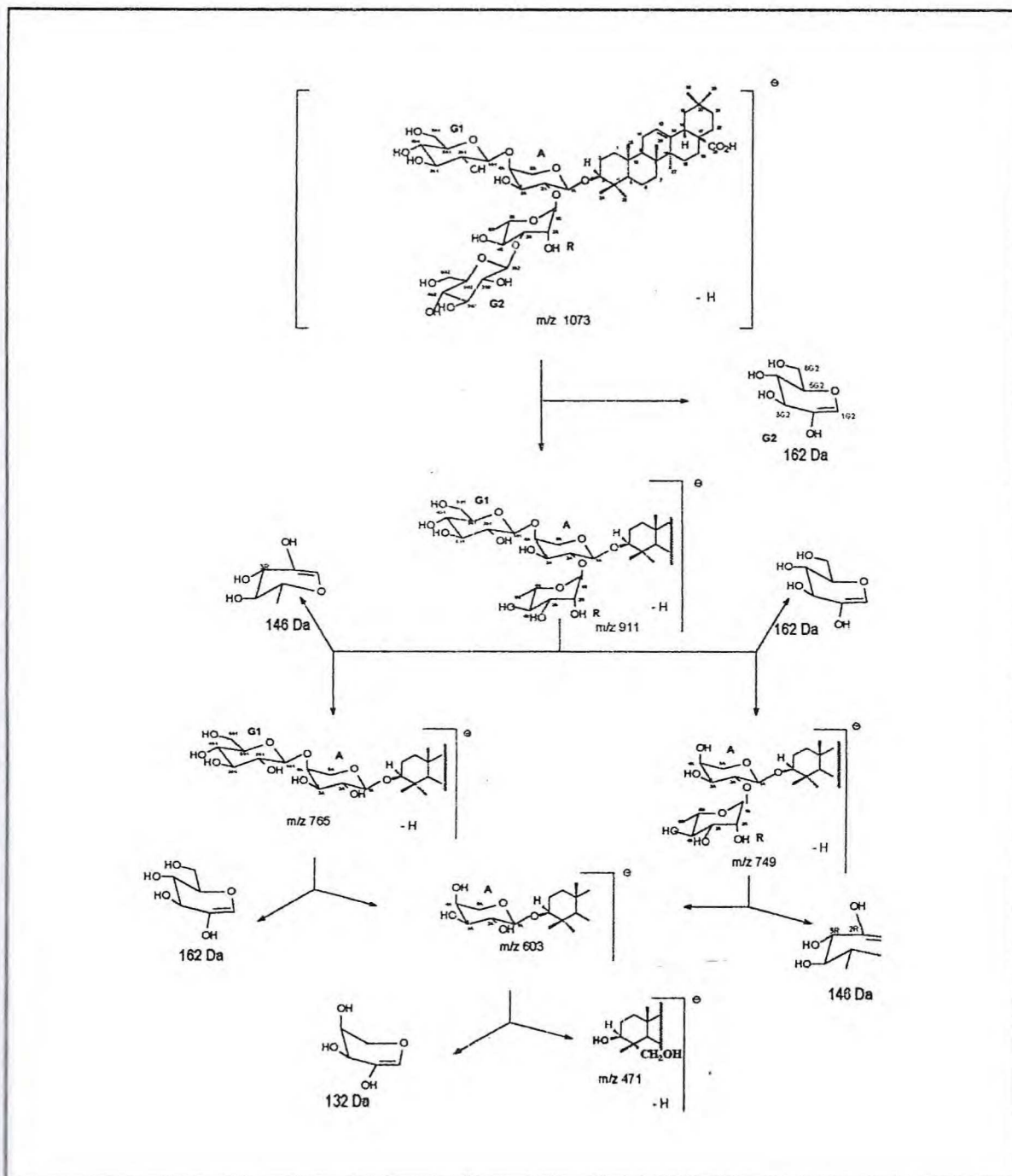


Figura 47 – Proposta mecanística para justificar os principais fragmentos de PES-2V(5) no espectro de massa.

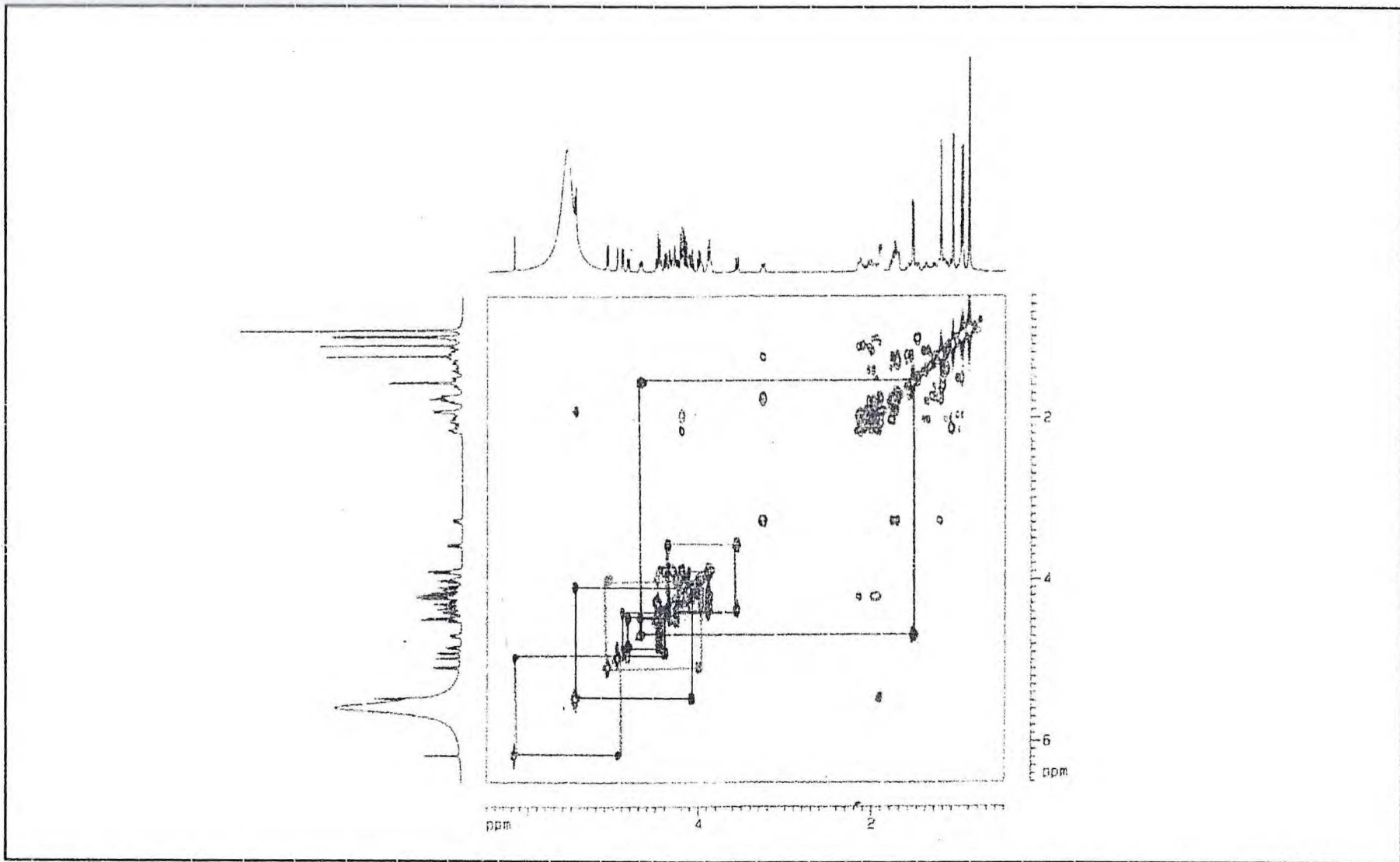


Figura 48 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H - COSY (500 MHz x 500 MHz, C₅D₅N) de PES - 2V(5).

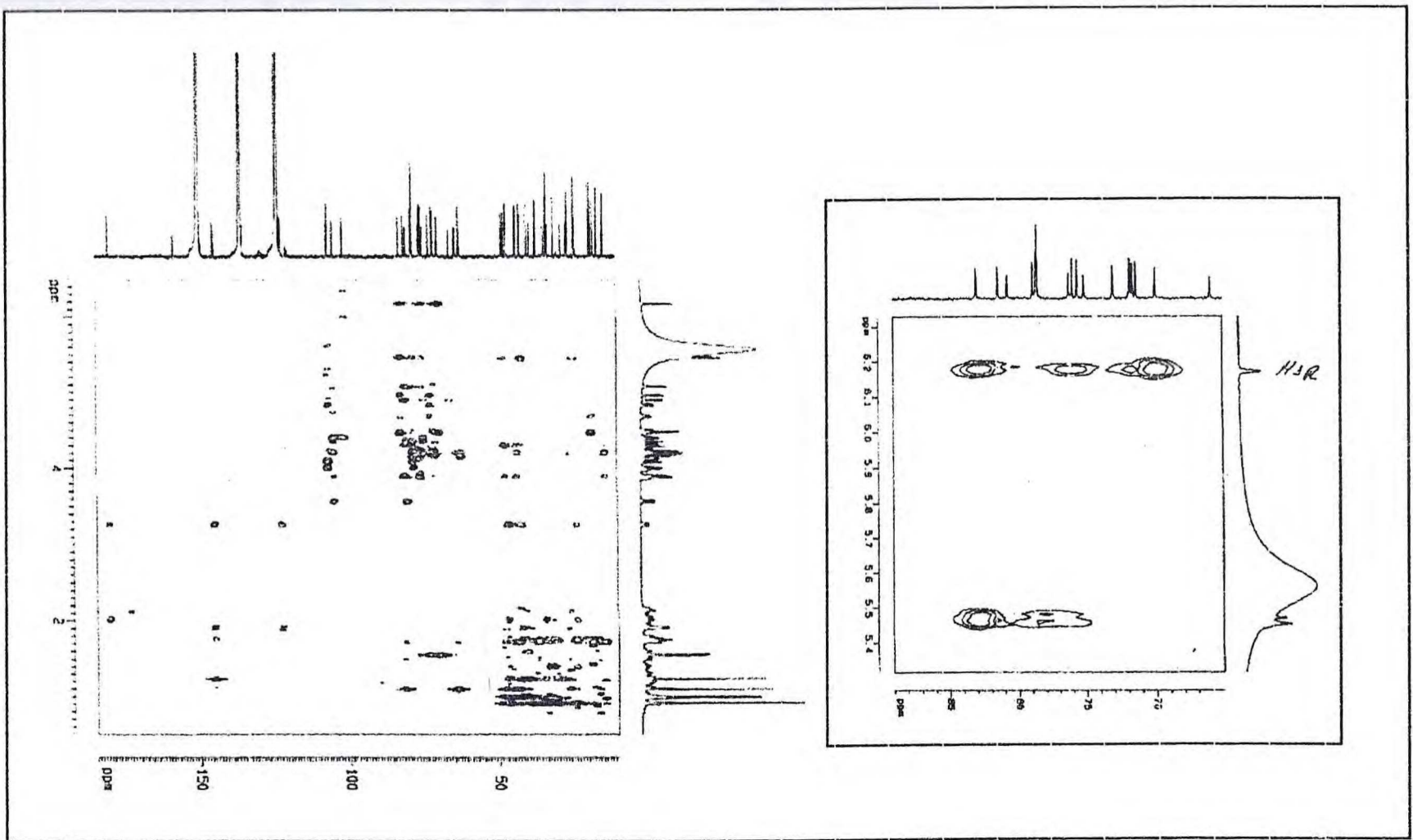


Figura 49 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-2V(5).

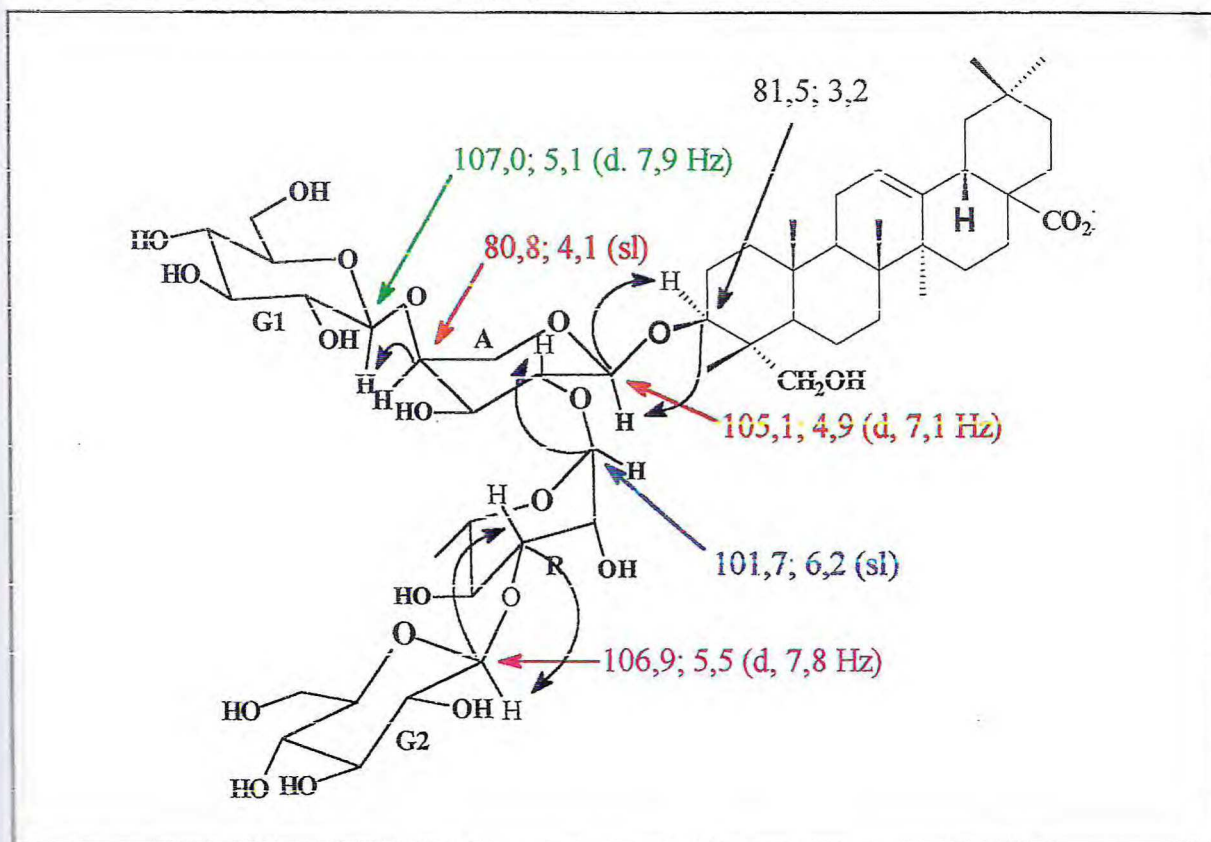


Figura 50 - Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PES-2V(5) observado no espectro de HMBC (Fig. 49, Pag. 74).

Através da análise dos espectros de HMBC e NOESY (Tab. 11, Pag. 77), foi observado que a natureza das ligações interglicosídicas e da ligação da unidade osídica com a aglicona em PES-2V(5), eram as mesmas observadas para a saponina PEC - 6P(4) descrita anteriormente e que esta sequência de ligações é compatível com fragmentos característicos observados no seu espectro de massa.

As configurações α para a arabinose e ramnose e β para a glicose são adicionalmente confirmadas com base no valor de suas constantes de acoplamentos ($J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$) deduzidas do espectro de RMN ^1H (Fig. 45, Pag. 70). A análise dos dados descritos anteriormente, bem como, a comparação com os dados relatados na literatura¹¹ referentes à estrutura da unidade osída (Tab. 11, Pag. 77), permitiu identificar a saponina PES-2V(5) como 3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)}[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosilhederagenina. É válido salientar que esta saponina ainda não havia sido descrita, de acordo com levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstracts.

Tabela 10 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PES-2v (5) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

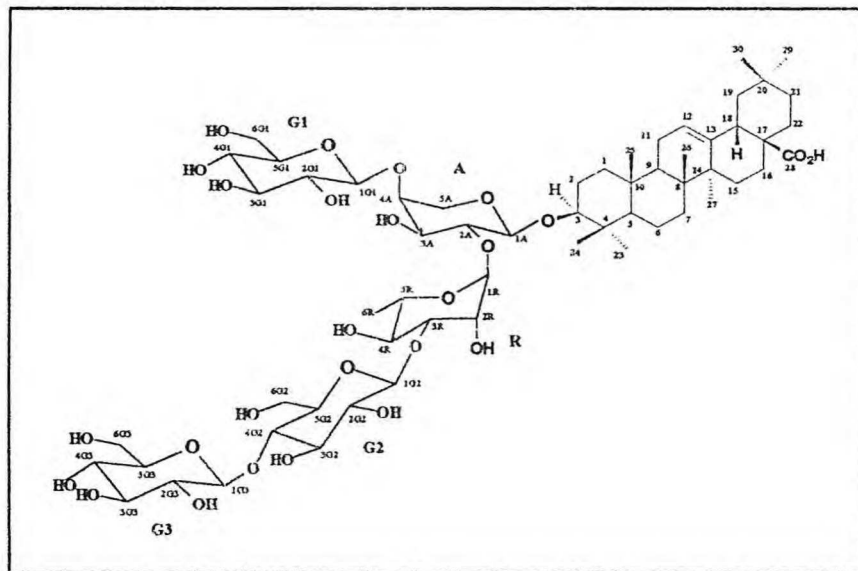
	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PEC-6P(4)
1 CH_2	39,1	1,5, 1,0	-	3H-25	39,0
2 CH_2	26,6	2,2, 2,0	H-3	-	26,8
3 CH	81,5	3,2	-	2H-23, 3H-24, H-1A	89,9
4 C	43,7	-	H-3, 2H-23, 3H-24	-	39,7
5 CH	47,7	1,70	-	2H-23, 3H-24	56,2
6 CH_2	18,3	1,7, 1,3	H-5	-	18,7
7 CH_2	33,2	1,8, 1,2	-	3H-26	33,4
8 C	39,9	-	3H-26	3H-27	39,9
9 CH	48,3	1,7	-	H-5, 3H-25, 3H-26	48,0
10 C	37,1	-	3H-25	-	37,2
11 CH_2	24,0	1,9	H-12	H-9, H-18	23,9
12 CH	122,8	5,5 (t)	H-11	H-18	122,7
13 C	145,0	-	H-18	H-11, 3H-27	144,9
14 C	42,3	-	3H-27	H-18, H-12, 3H-26	42,4
15 CH_2	28,5	2,2; 1,1	-	3H-27	28,5
16 CH_2	23,4	2,1, 1,9	-	H-18	23,9
17 C	46,8	-	H-18	-	46,9
18 CH	42,1	3,3 (dd, 13,6; 3,8)	-	-	42,2
19 CH_2	46,6	1,6; 1,1	-	3H-29, 3H-30	46,6
20 C	31,1	-	3H-29, 3H-30	-	31,1
21 CH_2	34,4	1,4; 1,1	-	3H-29, 3H-30	34,4
22 CH_2	33,4	2,1; 1,8	-	-	33,4
23 CH_2	64,1	4,3 (11,7)3,9 (11,7)	-	H-3; 3H-24	28,3
24 CH_3	14,3	1,1 (s)	-	H-23b, H-5, H-3	17,3
25 CH_3	16,2	0,9 (s)	-	H-5; H-9	15,7
26 CH_3	17,6	1,0 (s)	-	-	17,6
27 CH_3	26,3	1,2 (s)	-	2H-15	26,3
28 C	180,4	-	-	H-18	180,3
29 CH_3	33,4	0,9 (s)	-	-	33,4
30 CH_3	23,4	1,0 (s)	-	3H-29	23,9

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 11- Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) dos açúcares de PES-2V(5) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

CH	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PEC-6P(4)	Ref. 11
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ C}$
1A	105,1	4,9 (d, 7,1)	H-2A	H-3	105,6	105,3
2A	76,3	4,4 (8,2; 7,1)	H-3A	H-1R	76,4	76,6
3A	75,1	3,9		H-5Aeq	74,6	73,6
4A	80,8	4,1 (sl)	2H-5	H-1G1	80,2	79,4
5A	66,1	4,4 (d, 11,7)3,6 (d,11.5) - Hax		H-1A	65,5	64,9
1R	101,7	6,2(s)		H-3A	101,9	101,6
2R	71,7	5,0 (sl)			71,8	71,3
3R	83,0	4,8 (dd, 2,8; 9,5)	H-2R, H-4R	H-1R, H-1G2	83,4	82,9
4R	73,1	4,5	H-3R	3H-6R	73,1	72,6
5R	70,0	4,7 (m)	3H-6R	H-1R	70,0	69,8
6R	18,7	1,6 (d,6.2)	H-5R	H-4R	18,8	18,3
1G1	107,0	5.1 (d,7,9)	H-2G1		106,8	106,2
2G1	75,7	4.0 (d,7,9; 8.8)			75,7	75,6
3G1	78,6	4,2	H-2G1		78,7	78,2
4G1	71,8	4,2			71,5	71,3
5G1	78,7	3,9 (m)		H-3G1	78,9	78,2
6G1	62,7	4,54,3 (dd; 11,9; 4,9)		H-4G1	62,8	62,5
1G2	106,9	5,5 (d, 7,8)	H-2G2	H-3R	107,0	106,2
2G2	76,0	4,1 (dd, 7,9; 9,1)	H-3G2		76,1	75,3
3G2	78,7	4,2 (t, 9,1)	H-2G2	H1-G2	78,7	78,2
4G2	71,4	4,2 (t, 9.3)			71,7	71,3
5G2	78,9	4,0			78,6	78,2
6G2	62,7	4,3 (dd,12.0,3.5)4,5		H-4G2	62,8	62,5

4.6. Determinação estrutural de PEC-5P (6)



A substância denominada de PEC-5P(6) é um sólido branco amorfo, solúvel em piridina e funde com decomposição na faixa entre 245 – 247°C.

Seu espectro de massa utilizando a técnica por ionização química por eletrospray (ESI-MS) de íons negativos (Fig. 51, Pag. 79) revelou fragmentos em m/z 1220 relativo ao íon pseudomolecular ($M - H$); compatível com fórmula molecular $C_{59}H_{96}O_{26}$.

O espectro de RMN 1H de PEC-5P(6) (Fig. 52, Pag. 79) apresentou-se semelhante ao da saponina PEC-6P(4) com relação à parte referente à aglicona (Tab. 12, Pag. 89), no entanto, na região de sinais correspondentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios dos açúcares, detectou-se a presença de uma unidade adicional de glicose, evidenciada pelo aparecimento do sinal de seu hidrogênio anomérico em δ 5,2 (d, 7,8 Hz) e confirmada pelo correlacionamento desse hidrogênio anomérico com carbono anomérico em δ 106,3 no espectro de HMQC (Fig. 53, Pag. 80), sugerindo assim a presença de uma unidade osídica constituída de cinco açúcares^{52,79}.

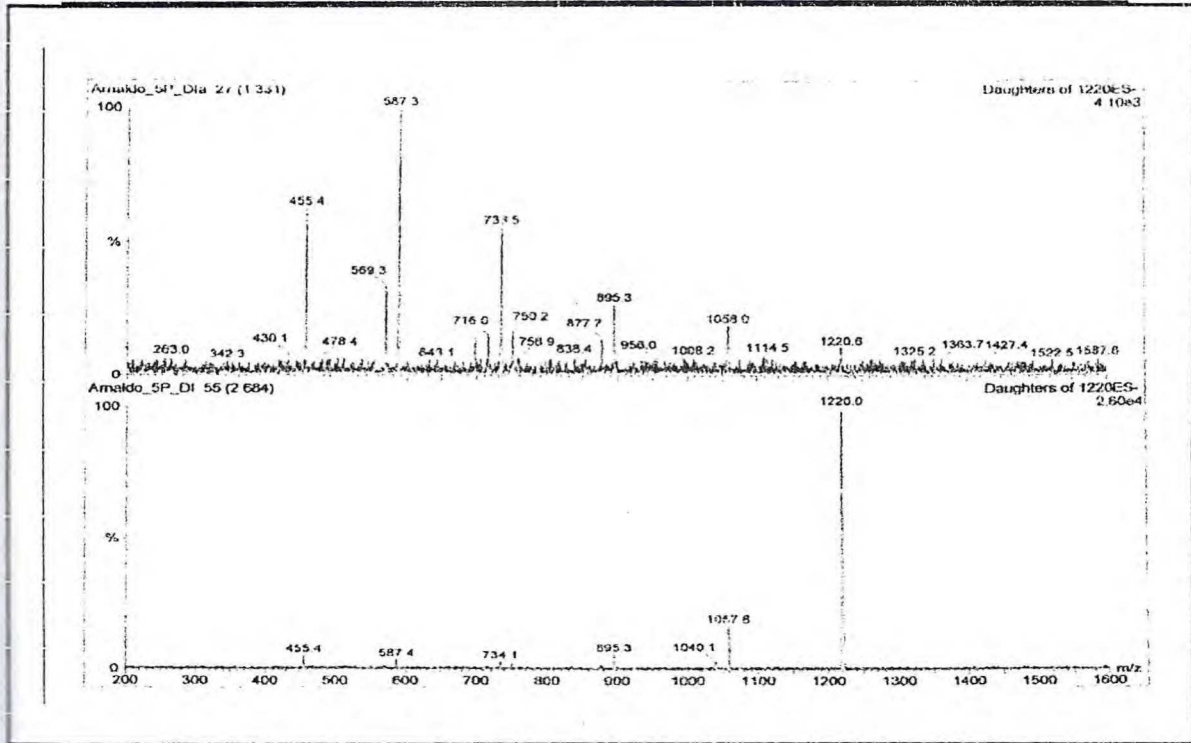


Figura 51 - Espectro de massa por ionização química eletrospray – ESI de PEC-5P(6).

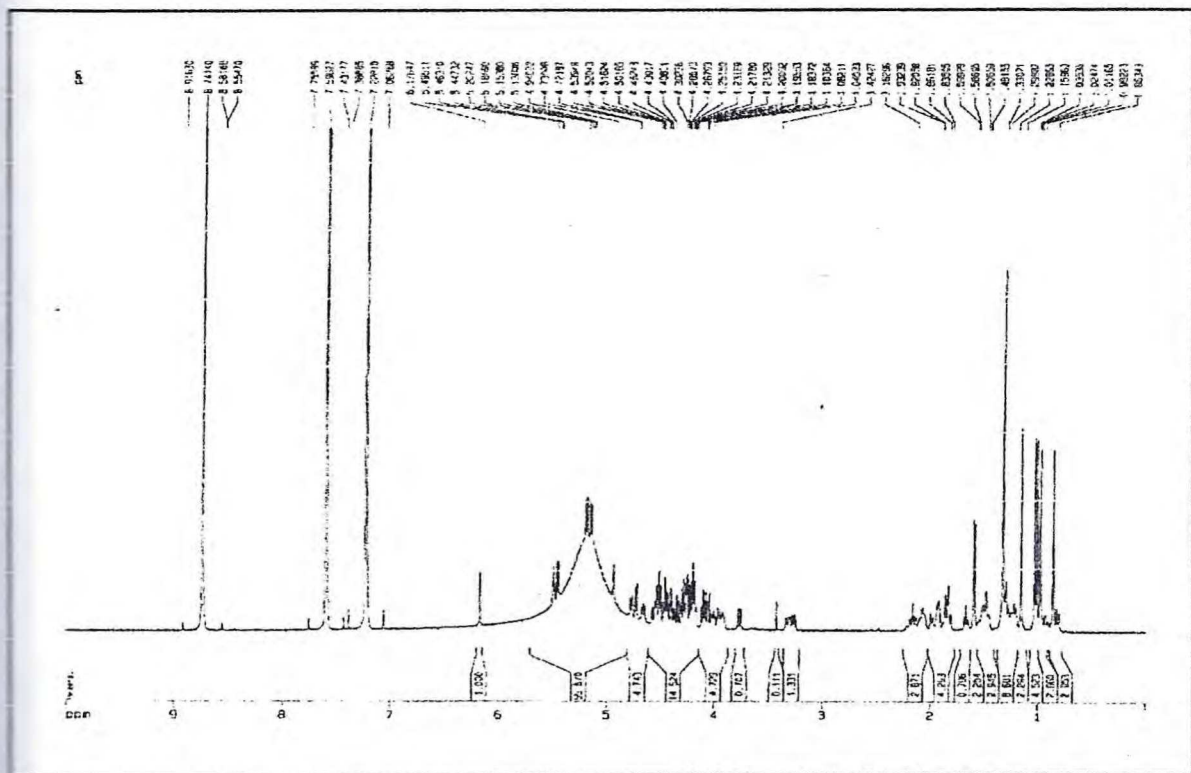


Figura 52 - Espectro de RMN ¹H (C₃D₃N, 500 MHz) de PEC-5P(6).

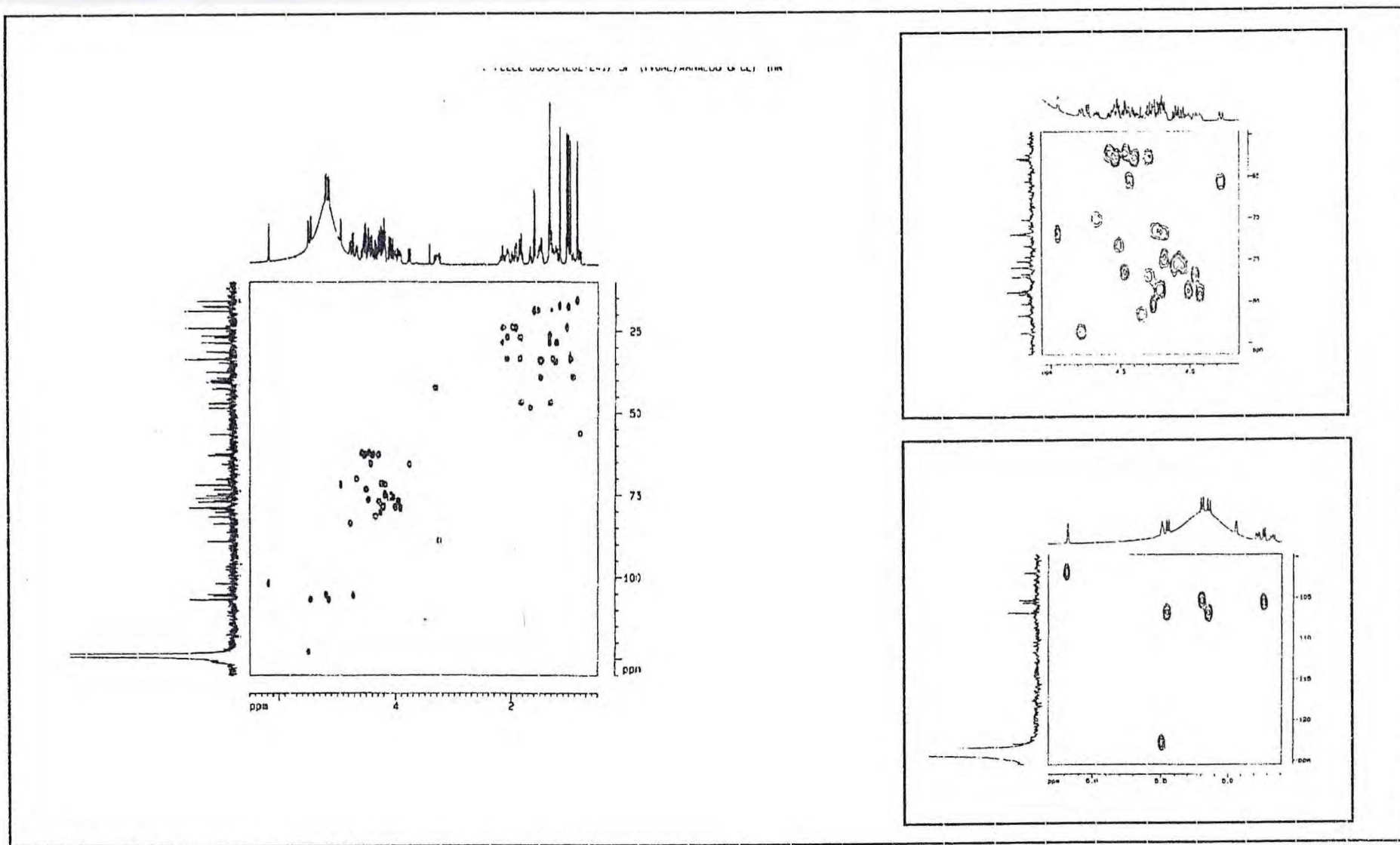


Figura 53 - Espectro de HMQC (C_5D_5N , 125 MHz) de 5P

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – HBBD (Fig. 54, Pag. 81) e DEPT 135° (Fig. 55, Pag. 82), levando-se em consideração, a teoria do deslocamento químico de carbono, bem como, baseados em dados de seu respectivo espectro de massa (Fig. 51, Pag. 79), ou seja, na presença do íon pseudo-molecular em m/z 1220 e os de outros três fragmentos referentes à perda de três unidades de glicose $[(M - H) - 2 \times 162]^-$ em m/z 733,7, de três unidades de glicose e de uma metilpentose $[(M - H) - 3 \times 162 - 146]^-$ em m/z 587,4 e de três unidades de glicose, de uma metilpentose e de uma pentose $[(M - H) - 3 \times 162 - 146 - 132]$ em m/z 455,4 (Fig. 56, Pag. 83), confirmaram a presença de um glicosídeo pertencente à classe das saponinas, constituído de 59 átomos de carbono, dos quais 30 estão relacionados à genina ou aglicona triterpênica do ácido oleanóico e os 29 átomos de carbono restantes são atribuídos à unidade osídica constituída de cinco açúcares.

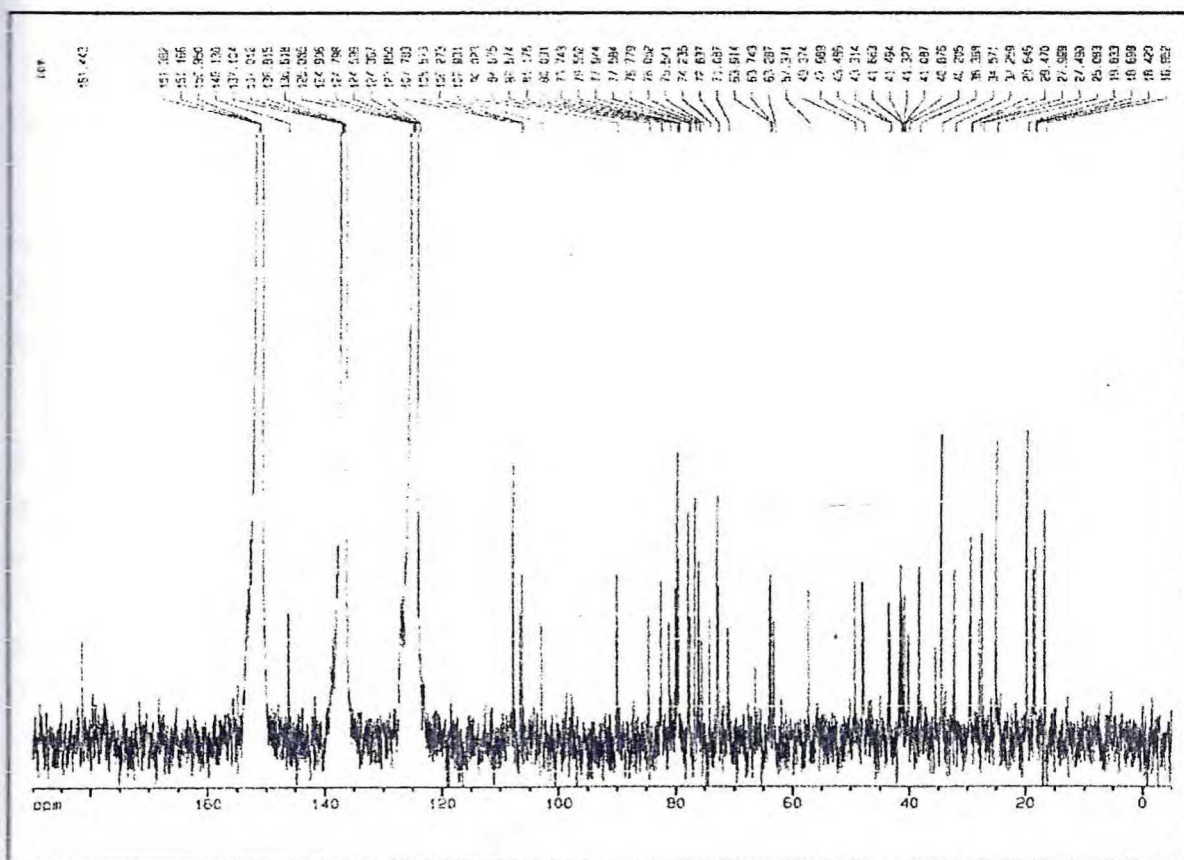


Figura 54 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_3\text{D}_3\text{N}$, 125 MHz) de PEC-5P(6).

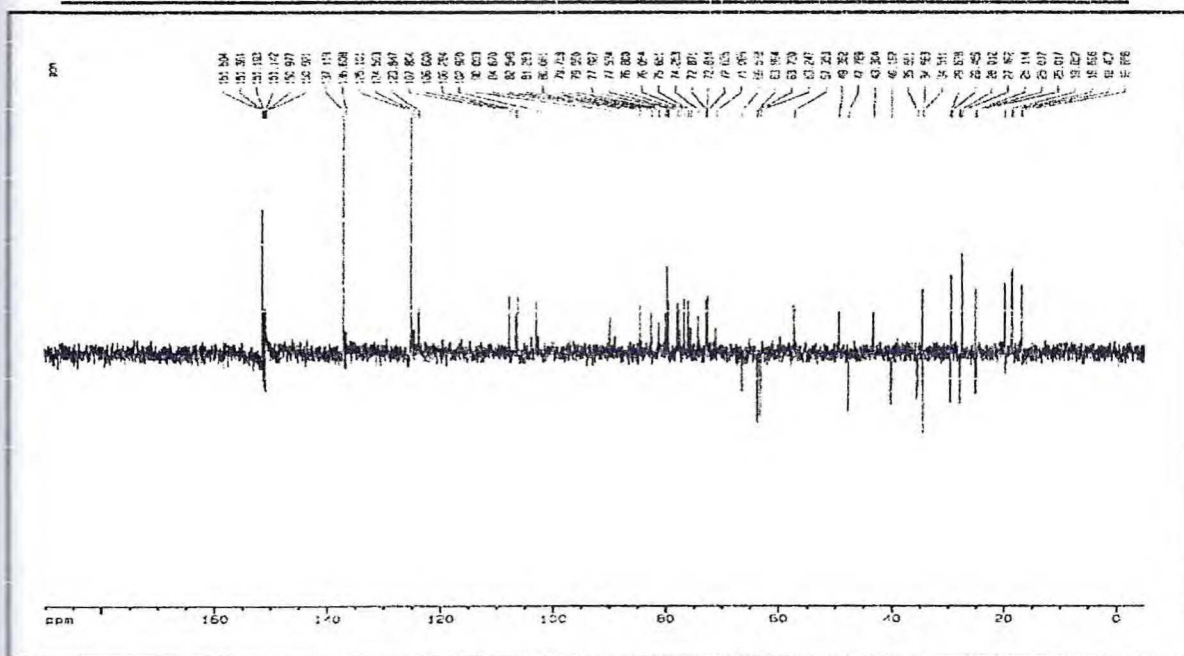


Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-5P(6).

Os açúcares presentes na unidade osídica de PEC-5P(6) foram definidos através da análise de seus respectivos dados de RMN ^{13}C , de espectrometria de massa e pelo método químico.

Pelo método químico empregou-se a hidrólise ácida total da saponina PEC-5P(6), onde detectou-se através de CCD do produto bruto desta reação, por comparação com padrões de açúcares e de triterpenos, a presença dos açúcares arabinose, ramnose e glicose e do triterpeno ácido oleanólico.

Através do método espectroscópico de RMN ^{13}C foi feita a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos anoméricos, inseridos na faixa entre δ 93 e δ 110^{52,79} com os deslocamentos químicos dos metilglicosídeos⁶⁸ descritos na Tabela 03 (Pag. 32) e com os respectivos dados de saponinas estruturalmente semelhantes, constituídas dos mesmos açúcares (Tab.12, Pag. 89e Tab. 13, Pag. 90), foi possível estabelecer a presença de uma α -L-arabinopiranosose, de uma α -L-ramnopiranosose e de três β -glicopiranososes na estrutura de PEC-5P(6).

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) (Fig. 57, Pag. 84) e heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Fig. 53, Pag. 80), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente das absorções referentes aos hidrogênios e aos carbonos anoméricos, bem como, da detecção no espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC), de correlação entre as absorções em δ 1,6 (d , 6,2 Hz) e em δ 19,8 atribuída ao carbono metílico da metilpentose, permitiu afirmar que as absorções referentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos estavam relacionadas às absorções de uma arabinose (A), de uma ramnose (R) e de três unidades de glicose designadas de G1, G2 e G3 (Tab. 13, Pag. 90).

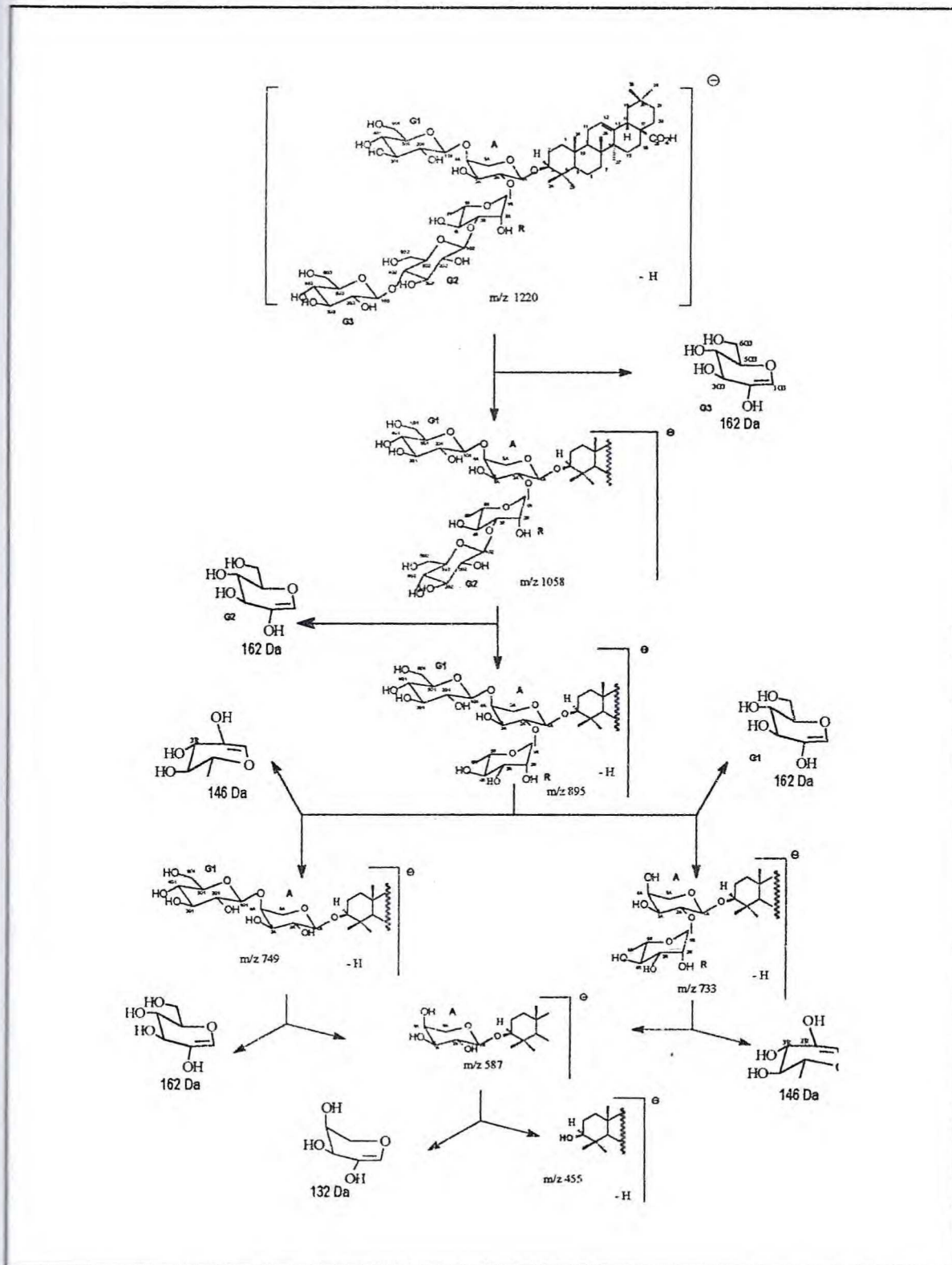


Figura 56 – Proposta mecânica para justificar os principais fragmentos de PEC-5P(6) no espectro de massas.

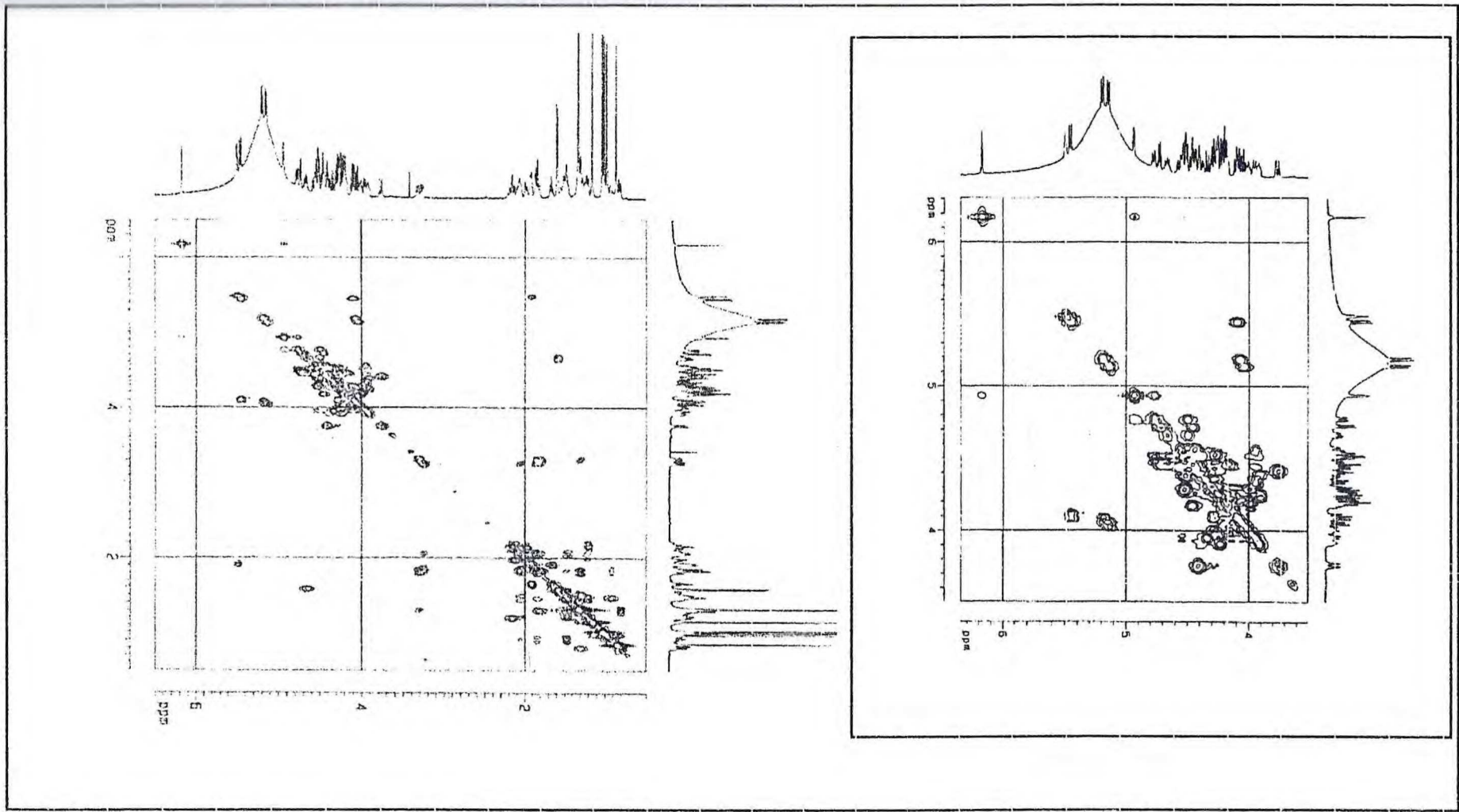
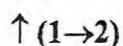


Figura 57 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H - COSY (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-5P(6).

A ligação da unidade osídica com a aglicona, foi deduzida através da análise do efeito da glicosilação no carbono oxometínico C-3, que apresentou sinal em δ 90,0, sendo observada uma desproteção em relação ao respectivo átomo de carbono da β -amirina⁷⁵, definindo, portanto, a ligação da unidade osídica com o carbono C-3 da aglicona. Esta afirmação foi confirmada pela detecção no espectro de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC (Fig. 58, Pag. 86), do correlacionamento a três ligações da linha espectral referente ao carbono anomérico da arabinose (δ 105,6) com o hidrogênio H-3 da aglicona em δ 3,3 (dd, 11,7 e 4,1 Hz), bem como, a interação dipolar do hidrogênio anomérico da arabinose H1-A em δ 4,7 (d, 6,7 Hz) com os hidrogênios H-3 e H α da aglicona no espectro bidimensional ¹H x ¹H -NOESY (Fig. 59, Pag. 87).

A natureza das ligações interglicosídicas foi deduzida a partir da arabinose, sendo observadas no espectro de correlação heteronuclear a longa distância - HMBC (Fig. 58, Pag. 86), a correlação do carbono anomérico da ramnose em δ 102,9 (H1R) com o hidrogênio H-2 da arabinose (δ 4,5), a correlação do carbono anomérico da glicose G1 (δ 107,8) com H-3 da ramnose (δ 4,8), do carbono anomérico da glicose G2 (δ 107,8) com o H-4 da arabinose (δ 4,3) (Fig. 60, Pag. 88), definindo a seguinte sequência de açúcares na unidade osídica, compatível com os fragmentos observados no espectro de massa.

Glicose-G1(1→4)-Arabinose- O – Genina



Glicose-G3(1→4)-Glicose-G2(1→3)-Ramnose

Esta saponina foi denominada de ácido 3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1→4)- β -D-glicopiranosil-(1→3)- α -L-ramnopiranosil-(1→2)]-[β -D-glicopiranosil-(1→4)]]- α -L-arabinopiranosil oleonóico, que segundo levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstracts, trata-se de uma saponina ainda não descrita na literatura.

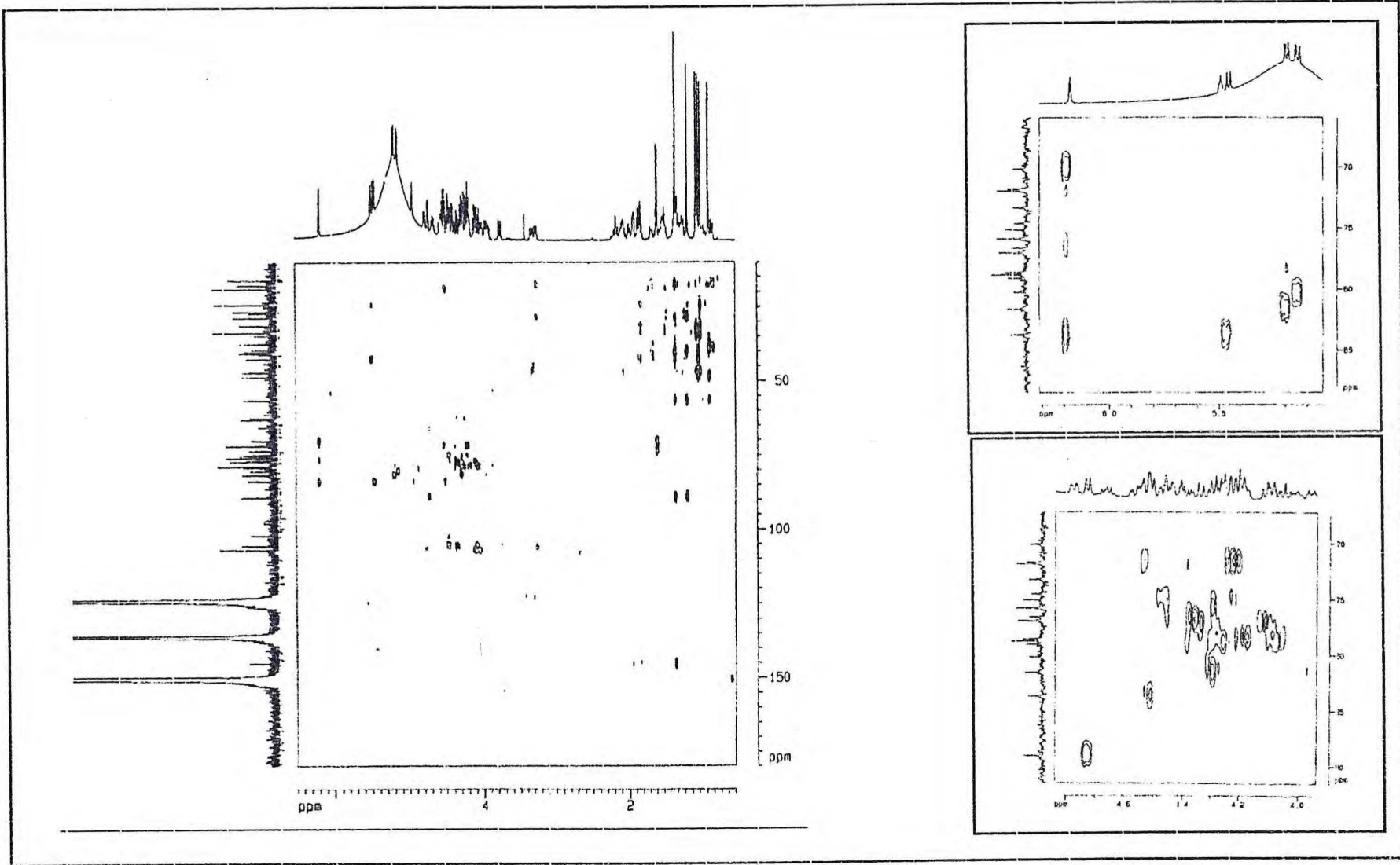


Figura 58 - Espectro de HMBC (C₅D₅N, 125 MHz) de PEC-5P (6).

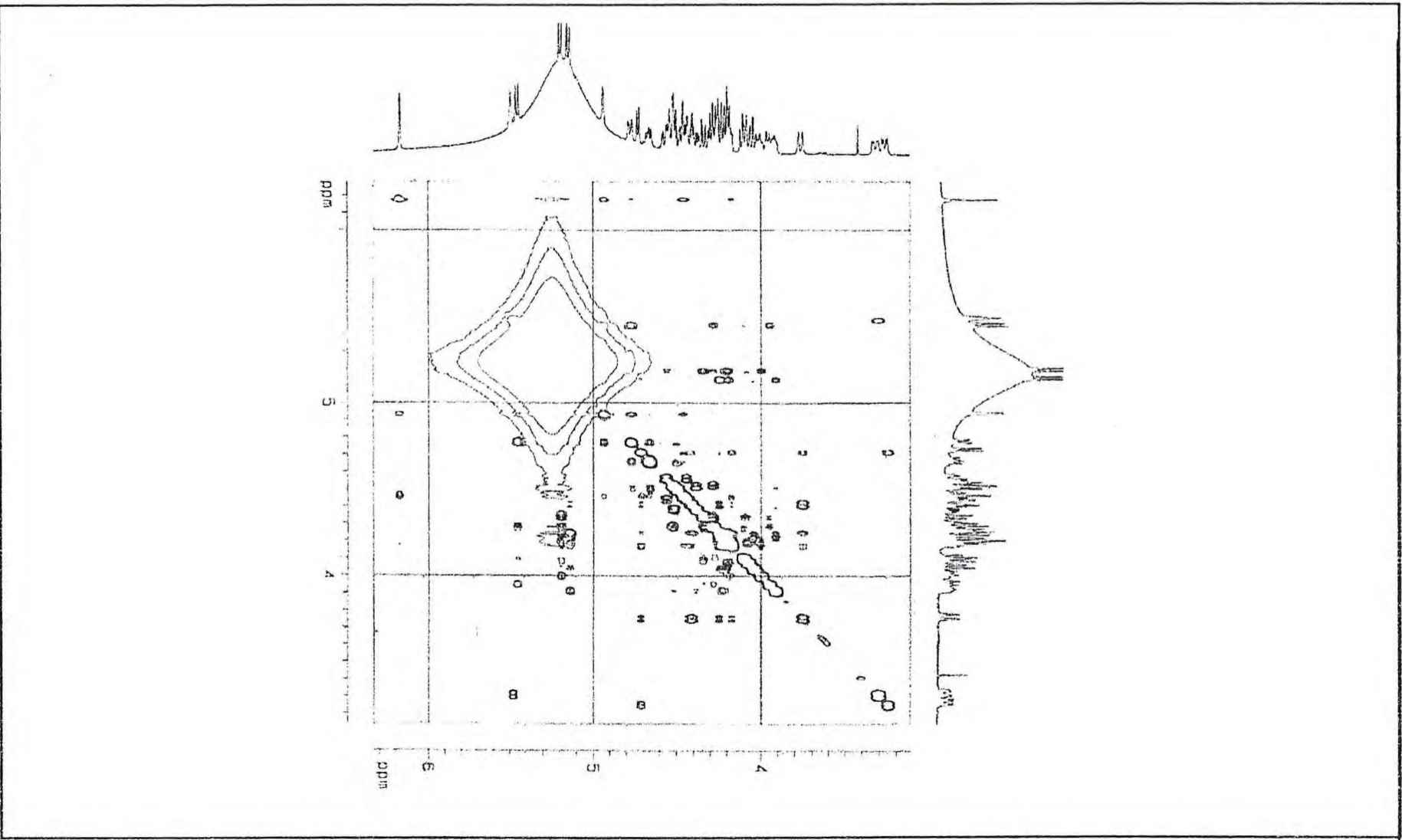


Figura 59 - Espectro de NOESY parcial (C_5D_5N , 500 MHz) de PEC - 5P.

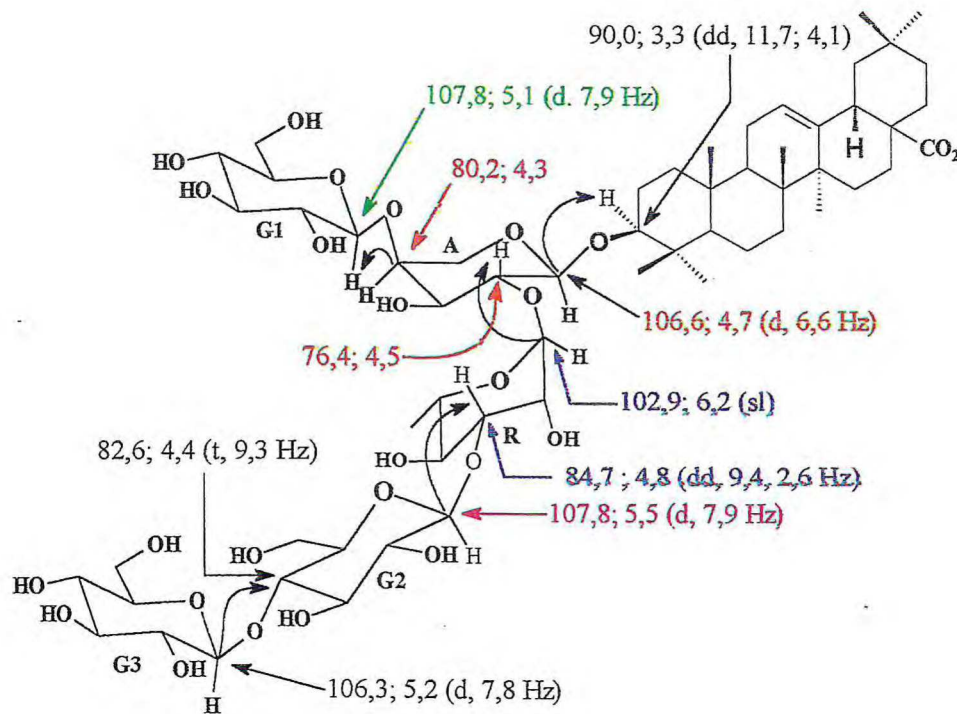


Figura 60 - Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PEC-5P (6) observado no espectro de HMBC (Fig. 58, Pag. 86).

Tabela 12 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2, 3$) da genina de PEC-5P (6) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

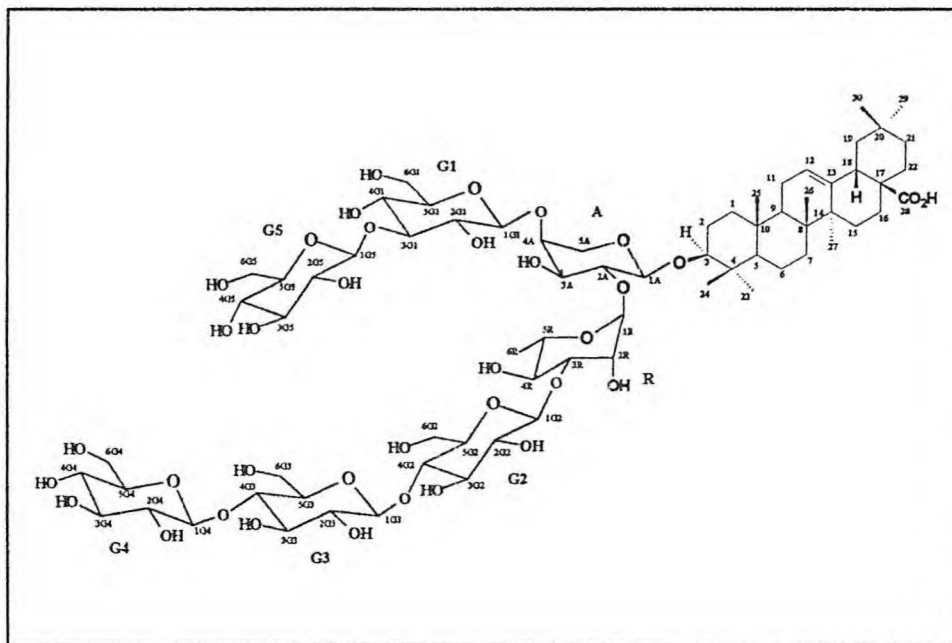
C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PEC-6P(4)
	δC	δH	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1 CH_2	40,2	1,5, H-1b, 0,93	-	3H-25, H-5, H-9	39,0
2 CH_2	28,0	2,1; 1,8 H-2b	-	-	26,8
3 CH	90,0	3,3 (dd, 11,7, 4,1)	-	3H-23, 3H-24, H-1'	89,9
4 C	39,9	-	3H-23, 3H-24	-	39,7
5 CH	57,4	0,8 (d, 11,4)	-	3H-23, 3H-24, 3H-25	56,2
6 CH_2	18,9	1,8; 1,3 H-6b	-	-	18,7
7 CH_2	34,5	1,5 H-7b, 1,29	-	3H-26	33,4
8 C	40,2	-	3H-26, H-9	3H-27	39,9
9 CH	49,4	1,7 (t, 8,6)	-	3H-25, 3H-26	48,2
10 C	37,4	-	3H-25	-	37,2
11 CH_2	25,1	1,92	H-12	-	23,9
12 CH	123,9	5,5 (t)	-	-	122,7
13 C	146,1	-	-	3H-27	144,9
14 C	42,4	-	3H-27	H-18, 3H-26	42,4
15 CH_2	29,6	2,2 H-5a; 1,2 H-15b	-	3H-27	28,5
16 CH_2	25,0	2,2; 2,0	-	-	23,9
17 C	47,0	-	H-18	-	46,9
18 CH	43,3	3,3 (dd)	-	-	42,2
19 CH_2	47,8	1,83 H-19b; 1,3 H-19a	H-18	3H-29, 3H-30	46,6
20 C	31,3	-	3H-29, 3H-30, H-19b	-	31,1
21 CH_2	35,6	1,5; 1,2	-	3H-29, 3H-30	34,4
22 CH_2	34,5	2,1H-22b; 1,8	-	-	33,4
23 CH_3	29,6	1,4 (s)	-	3H-24	28,3
24 CH_3	18,4	1,2 (s)	-	3H-23, H-5	17,3
25 CH_3	16,9	0,86 (s)	-	H-9	15,7
26 CH_3	18,7	1,0 (s)	-	H-9	17,6
27 CH_3	27,5	1,4 (s)	-	-	26,3
28 C	181,4	-	-	-	180,3
29 CH_3	34,58	0,98 (s)	-	-	33,4
30 CH_3	25,08	1,03 (s)	-	3H-29	23,9

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 13 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PEC-5P(6) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

CH	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PEC-6P(4)	Ref. 11
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ C}$
1A	105.6	4,7 (d, 6,6)		H-3	105,6	105,3
2A	77.6	4.5	H-1R		76,4	76,6
3A	75.5	4.2	H-2A		74,6	73,6
4A	81.2	4.3		H-1G1	80,2	79,4
5A	66.5	4.53.8 (d,11.5)			65,5	64,9
1R	102.9	6.2 (s)		H-5R	101,9	101,6
2R	72.8	4.9 (sl)	H-1R		71,8	71,3
3R	84.7	4.8 (dd,9.3,2.6)	H-4R	H-1G2	83,4	82,9
4R	74.2	4.50		3H-6R	73,1	72,6
5R	71.1	4.7 (m)	3H-6R	H-1R	70,0	69,8
6R	19.8	1.6 (d,6.2)		H-4R	18,8	18,3
1G1	107.8	5.1 (d,7.9)	H-2G1		106,8	106,2
2G1	76.8	4.0 (d,7.9, 8.8)			75,7	75,6
3G1	79.8	4.2	H-2G1		78,7	78,2
4G1	72.6	4.2			71,5	71,3
5G1	80.0	3.9		H-3G1	78,9	78,2
6G1	63.9	4.54.4			62,8	62,5
1G2	107.8	5.5	H-2G2		107,0	106,2
2G2	76.8	4.1 (dd,7.9,8.4)	H-3G2		76,1	75,3
3G2	77.9	4.3	H-4G2, H-2G2		78,7	78,2
4G2	82.6	4.4 (T,9.3)	H-3G2	H1G3	71,7	71,3
5G2	77.9	4,0 (dt,9.3)	H-4G2		78,6	78,2
6G2	63.3	4.6 (dd,12.0,3.5)4.46			62,8	62,5
1G3	106.3	5.2 (d,7.8)	H-2G3	H-4G2	-	-
2G3	76.1	4.1 (dd,7.8,8.4)			-	-
3G3	79.6	4.2	H-4G3		-	-
4G3	72.9	4.2	H-3G3	H-1G3	-	-
5G3	79.8	4.0 (m)			-	-
6G3	63.7	4.34.5			-	-

4.7. Determinação estrutural de PEC-A3 (7)



A substância PEC-A3(7) é um sólido branco amorfo, solúvel em piridina e funde com decomposição na faixa de 251 – 270 °C. Seu espectro de massa obtido por ionização química eletrospray – ESI / MS (Fig. 61, Pag. 92) apresentou um íon molecular em m/z 1545,7 [M]⁺, compatível com fórmula molecular $C_{71}H_{116}O_{36}$. Outros fragmentos importantes em m/z 1383,9 [(M – 162)], 1220,8 [M – 2 x 162], 1059,3 [M – 3 x 162], 896,6 [(M – 4 x 162)], [(M – 5 x 162)] indicaram, respectivamente, a perda de cinco unidades hexosila, de uma desoxihexosila e de uma pentosila. Foi, também, observado o fragmento em m/z 455 correspondente à aglicona.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C - HBBDD (Fig. 62, Pag. 92) e de RMN ^{13}C – DEPT (Fig. 63, Pag. 93) de PES-A3(7), bem como, a detecção no seu espectro de RMN 1H (Fig. 64, Pag. 93) de sete singletos correspondentes a átomos de hidrogênio metílicos, um singlete largo em δ 5,5 atribuído a um hidrogênio de dupla ligação trissubstituída e de um sinal de hidrogênio de metínico em δ 3,3 (dl, 13,5), evidenciaram o mesmo perfil espectroscópico das agliconas das saponinas PES-F1(1), PEC-76(3), PEC-6P(4) e PEC-5P(6) (Tab. 14, Pag. 102). Adicionalmente, observou-se no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta – HMQC (Fig. 65, Pag. 96), a correlação do carbono C-12 em δ 122,3 com o hidrogênio H-12 em δ 5,5 (sl); a correlação do carbono C-18 em δ 41,8 com o hidrogênio metínico H-18 em δ 3,3 (dl, 13,5); além da correlação do carbono carbinólico C-3 em δ 88,6 com o hidrogênio H-3 em δ 3,2, definindo a presença da ácido oleanóico como aglicona.

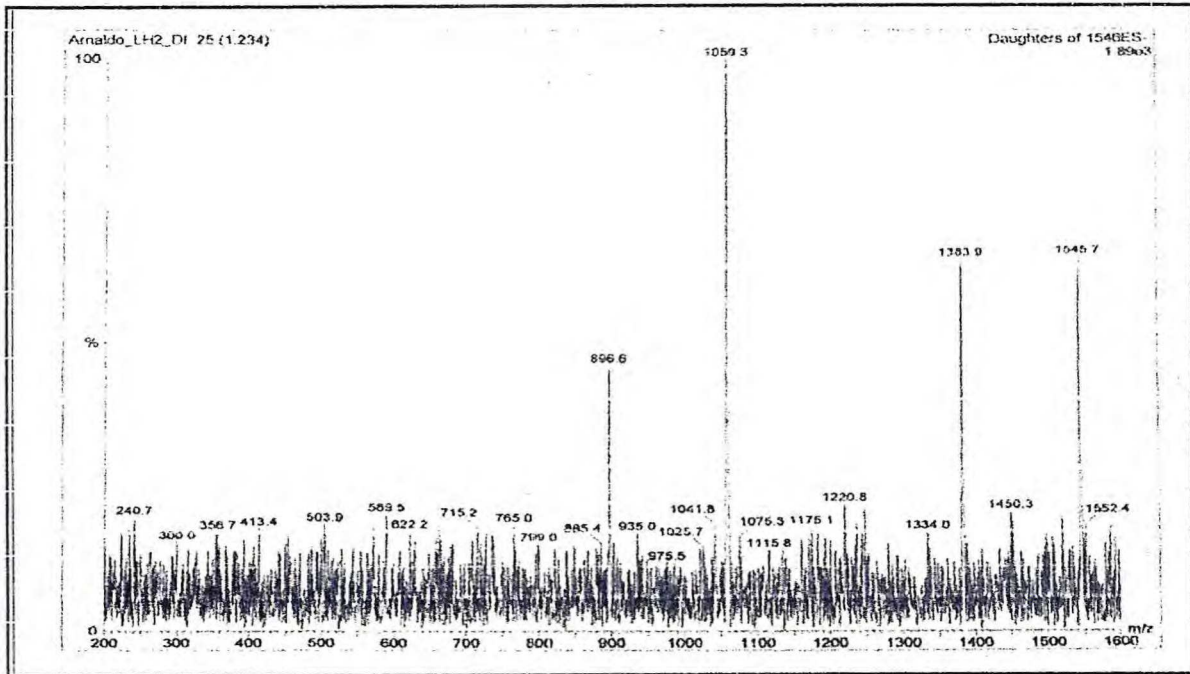


Figura 61 - Espectro de massas por ionização química eletrospray - EI de PEC-A3(7).

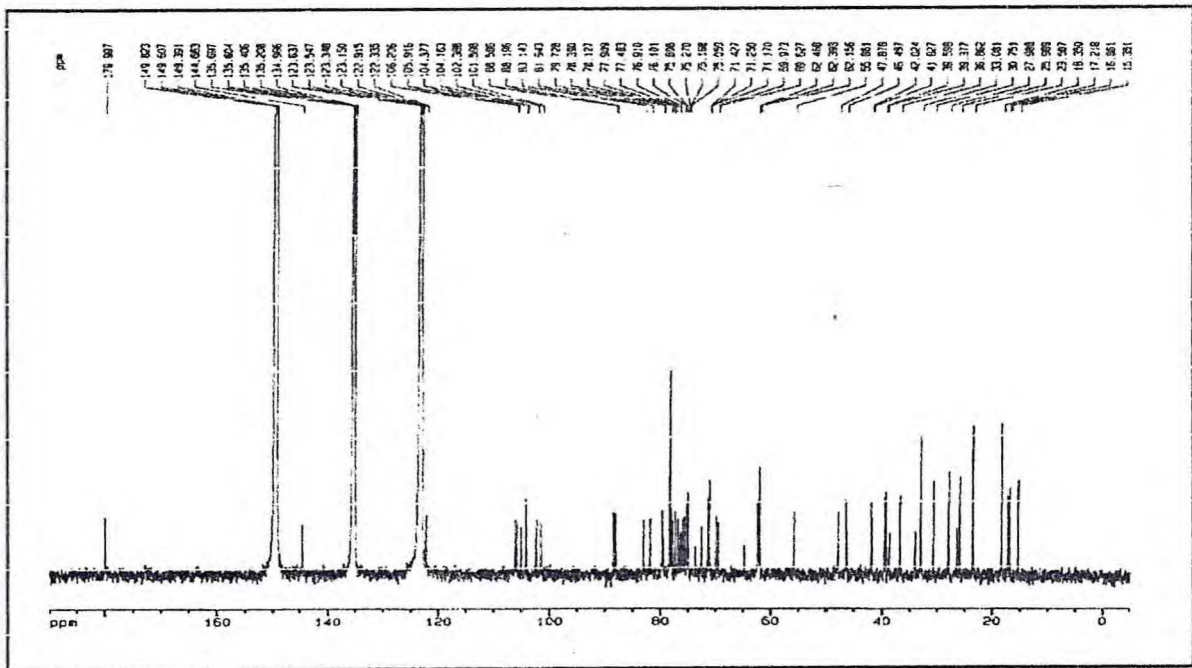


Figura 62 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - 125 MHz) de PEC-A3(7).

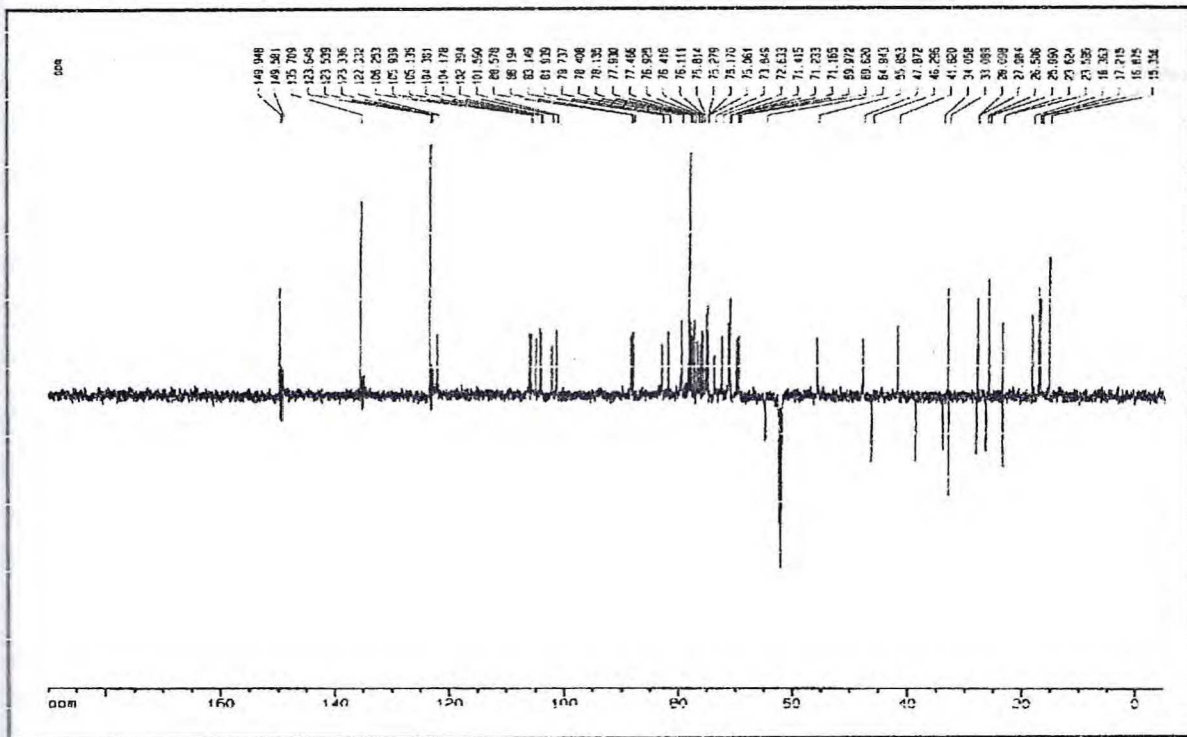


Figura 63 - Espectro de RMN ¹³C - DEPT 135 (C₅D₅N - 125 MHz) de PEC-A3(7).

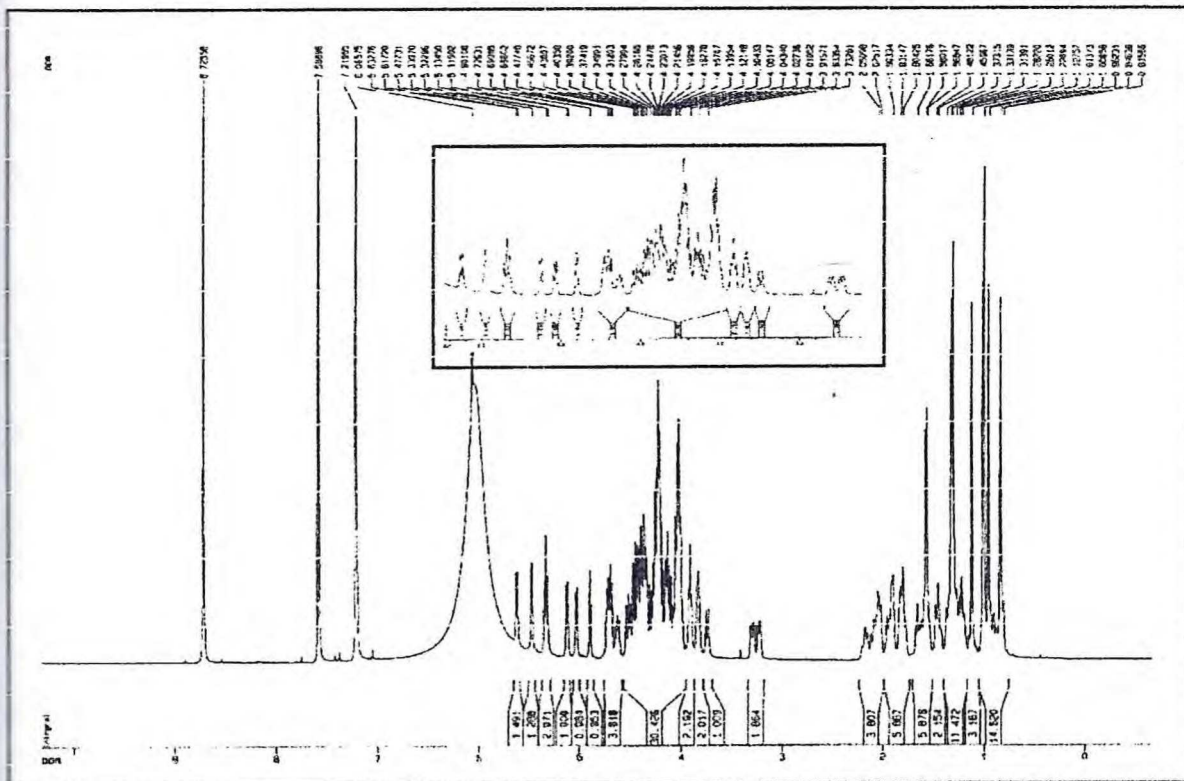


Figura 64 - Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N - 500 MHz) de PEC-A3(7).

A observação do íon molecular em m/z 1545,7 $[(M)^-]$ e dos demais fragmentos referentes à perda de cinco unidades de hexose, de uma metilpentose e de pentose no espectro de massa (Fig. 66, Pag. 97) permitiram, juntamente com dados anteriormente relatados, afirmar que a substância PEC-A3(7) tratava-se de um glicosídeo pertencente à classe das saponinas e que era constituída de 76 átomos de carbono, dos quais 30 estão relacionados à aglicona do ácido oleanólico e os 46 átomos de carbono restantes constituem a unidade osídica (Tab. 15, Pag. 103e Tab. 16, Pag. 104).

O espectro de correlação heteronuclear HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, $^1J_{\text{CH}}$) (Fig. 65, Pag. xx) de PEC-A3(7) confirmou a presença de sete açúcares, através da correlação de sete átomos de carbonos anoméricos em δ 106,2; 105,9; 105,1; 104,4; 104,2; 102,4 e 101,6 com os hidrogênios anoméricos em δ 5,1 (d, 7,7); 5,3 (7,8); 4,7 (d, 6,9); 5,3 (d, 8,4); 5,6 (d, 7,8); 5,0 (d, 7,6) e 6,1 (sl), respectivamente. Estes dados são compatíveis com a ocorrência de uma unidade osídica constituída de uma pentose, de uma metilpentose e de cinco hexoses e a presença destes açúcares pode ser confirmada pelos fragmentos correspondentes às suas respectivas perdas no espectro de massa de PEC-A3(7).

A observação do efeito de glicosilação no átomo de carbono C-3 da aglicona e a detecção do sinal em δ 180,0, correspondente ao átomo de carbono de carboxila, permitiram classificar a saponina como monodesmosídica⁵⁸.

Com o objetivo identificar os açúcares presentes em sua unidade osídica, a saponina PEC-A3 (7) foi submetida à reação de hidrólise ácida e a análise comparativa por CCD, do produto bruto desta reação com padrões de açúcares, permitiu constatar a presença dos açúcares glicose, ramnose e arabinose na unidade osídica desta saponina.

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) (Fig. 67, Pag. 98) e heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC) (Fig. 65, Pag. 96), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente das absorções referentes aos hidrogênios e carbonos anoméricos, bem como, da correlação entre o carbono metílico (C-6) da metilpentose em δ 18,8 e hidrogênio (H-6) em δ 1,6 (d, 5,8 Hz), permitiu estabelecer as absorções referentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios e de carbonos compatíveis aos dos monossacarídeos arabinose (A), ramnose (R) e cinco unidades de glicose designadas de G1, G2, G3, G4 e G5 (Tab. 16, Pag. 104).

A comparação adicional dos deslocamentos químicos de carbonos anoméricos com os dos seus respectivos metilglicosídeos (Tab.03, Pag. 32) confirmou a presença de uma α -L-arabinose, de uma α -L-ramnose e de cinco β -D-glicose (Tab. 03, Pag. 32).

A determinação da natureza das ligações interglicosídicas, bem como, da unidade osídica com a aglicona (ácido oleanólico) foi feita através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$, $n = 2, 3$) (Fig. 68, Pag. 100)

e de efeito nuclear espacial de correlação homonuclear – NOESY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) (Fig. 72, Pag. 101), sendo, desta forma, proposta para a saponina PEC-A3 (7), uma estrutura parcial idêntica à da saponina PEC-5P (6), glicosídeo constituído de cinco unidades de açúcares, ou seja, de uma arabinose, de uma ramnose e de três unidades de glicose.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC (Fig. 71, Pag. 100), observou-se o acoplamento a três ligações - ^3J do carbono anomérico da arabinose - H1A em δ 105,1 com o hidrogênio H -3 do ácido oleanólico em δ 3,2 (Fig. 72, Pag. 101), adicionalmente confirmado pela interação dipolar de H3 α do ácido oleanólico com o hidrogênio anomérico da arabinose no espectro NOESY (Fig. 72, Pag. 101), definindo, portanto, a ligação da aglicona com a unidade osídica através da arabinose.

Na determinação das ligações interglicosídicas, partindo da arabinose (A), que conforme descrito anteriormente, está ligada ao carbono C-3 da aglicona, foi constatado que este açúcar encontrava-se substituído nos átomos de carbono C-2 e C-4 por uma ramnose (R) e uma glicose (G1), respectivamente, através dos acoplamentos do carbono C-2A da arabinose em δ 76,4 com o hidrogênio anomérico da ramnose em δ 6,1 (sl) e do carbono C-4 A da arabinose em δ 79,7 com o hidrogênio anomérico da glicose designado (1GH-1) em δ 5,1 (d, 7,7 Hz). A substituição do carbono C-3R da ramnose por uma segunda unidade glicose designada G-2, foi detectada pelo acoplamento de hidrogênio anomérico de G2 (1GH-2) em δ 5,4 com carbono C-3R em δ 83,2 [G2 (1 \rightarrow 3) R], bem como, pelo acoplamento do carbono C4-G2 em δ 81,9 com o hidrogênio anomérico de uma terceira glicose designado 1GH-3 em δ 5,0 (d, 7,6 Hz), definindo a substituição em C4 da glicose -G2 [G3 (1 \rightarrow 4) G2].

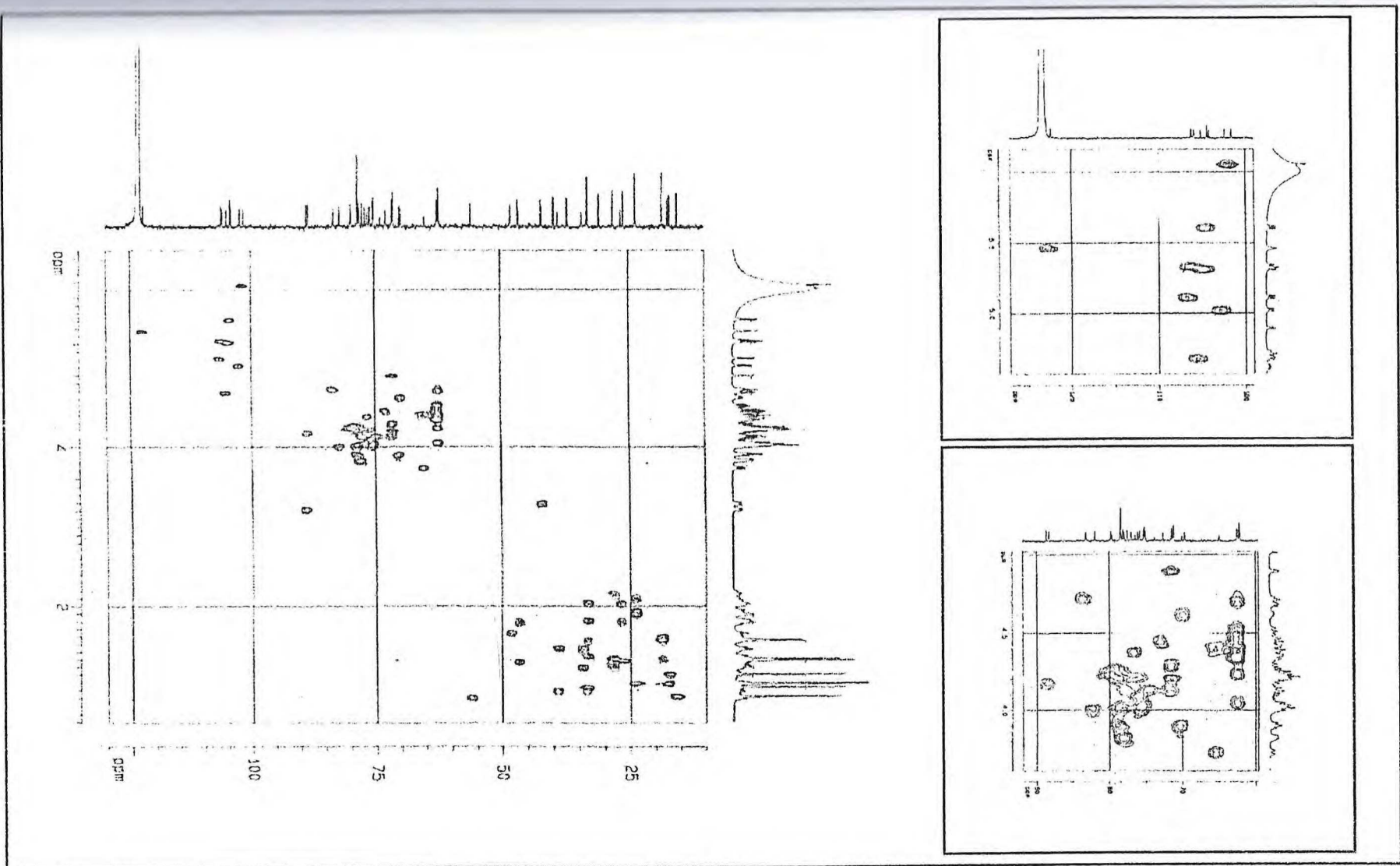


Figura 65 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_3\text{D}_3\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-A3(7).

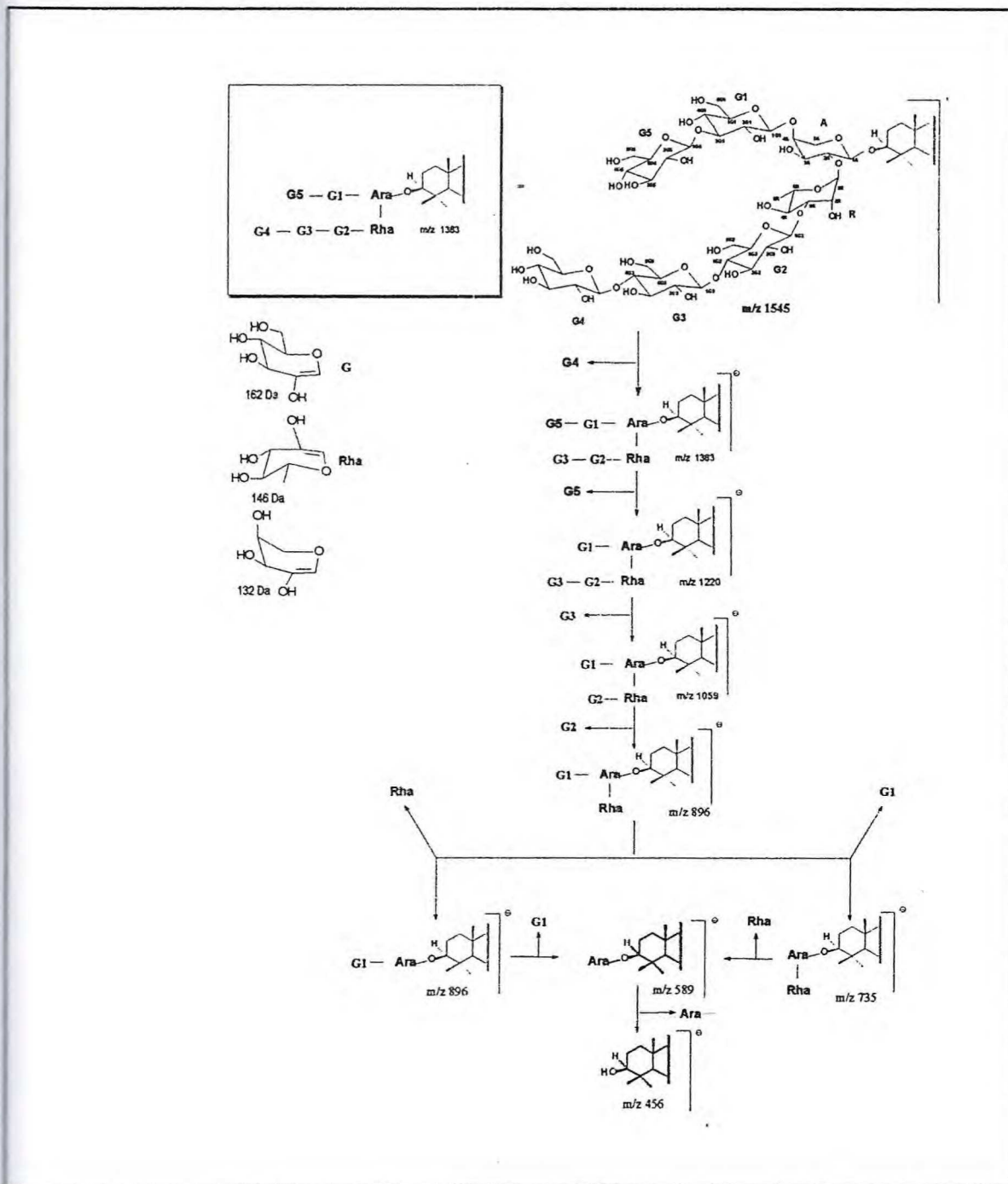


Figura 66 – Proposta mecanística para justificar as principais fragmentações de PEC-A3(7).

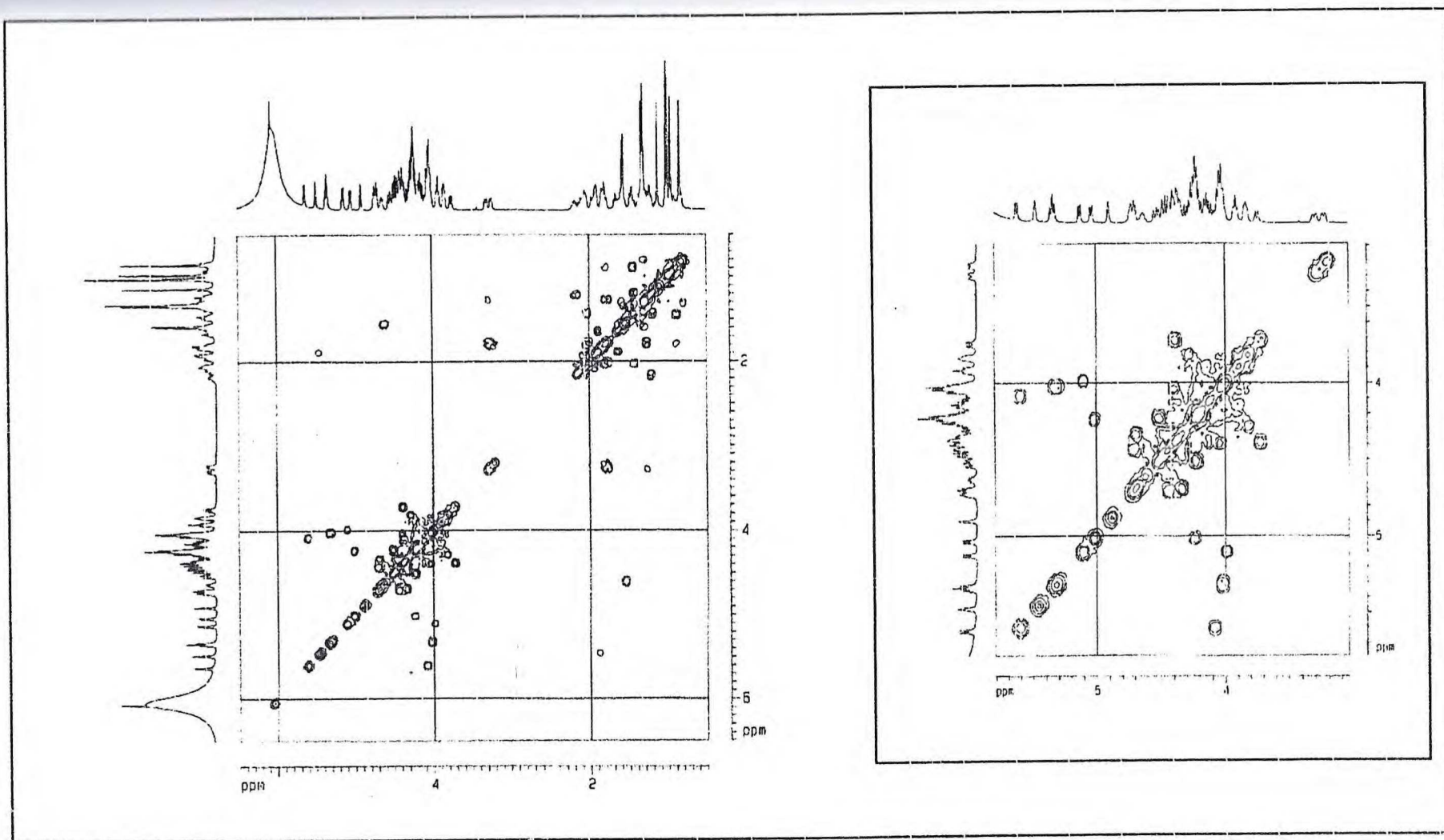
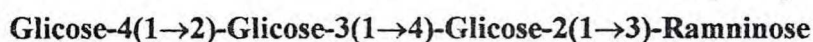
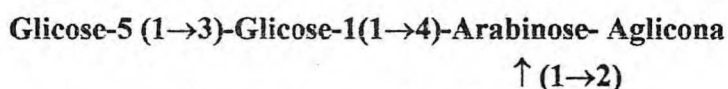


Figura 67 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H - COSY (500 MHz x 500 MHz, C₃D₃N) de PEC-A3(7).

O acoplamento do hidrogênio anomérico da quarta unidade de glicose designado de 1GH-4 em δ 5,6 (d, 7,8 Hz) com o carbono 2 da terceira unidade de glicose (2G3) em δ 79,6, definiu uma ligação G4 (1→2) G3. A presença e posição da quinta e última unidade de glicose designada de G5, foram confirmadas pelo acoplamento a três ligações do carbono C3 da glicose designada como 3G1 em δ 88,2 com o hidrogênio anomérico denominado de 1GH5 em δ 5,3 (d, 8,4 Hz), sendo, portanto, definida a estrutura abaixo da unidade osídica:



A presença de D-glicose e L-arabinose e L-ramnose, comumente encontradas nos glicosídeos de plantas, bem como, da detecção dessas configurações na estrutura acima baseados nos dados de RMN ¹³C. A conformação das açúcares foram avaliados através dos valores das constantes de acoplamentos no espectro de RMN ¹H. As cinco glicoses, apresentaram $J_{H1,H2}$ superior a 7,6 HZ indicando conformação β das mesmas; enquanto a arabinose e ramnose apresentaram conformação α em virtude da primeira apresentar um $J_{H1,H2}$ em torno de 6,9 Hz enquanto a ramnose apresentou um singlete largo.

A análise dos dados descritos anteriormente permitiu identificar a saponina PEC-A3(7) como ácido 3-O- $\{\beta$ -D-glicopiranosil(1→2) β -D-glicopiranosil(1→4)- β -D-glicopiranosil-(1→3)- α -L-ramnanopiranosil-(1→2)- $[\beta$ -D-glicopiranosil(1→3) β -D-glicopiranosil(1→4)] $\}$ - α -L-arabinopiranosil-oleanóico. É válido salientar que esta saponina ainda não havia sido descrita na literatura, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstracts.

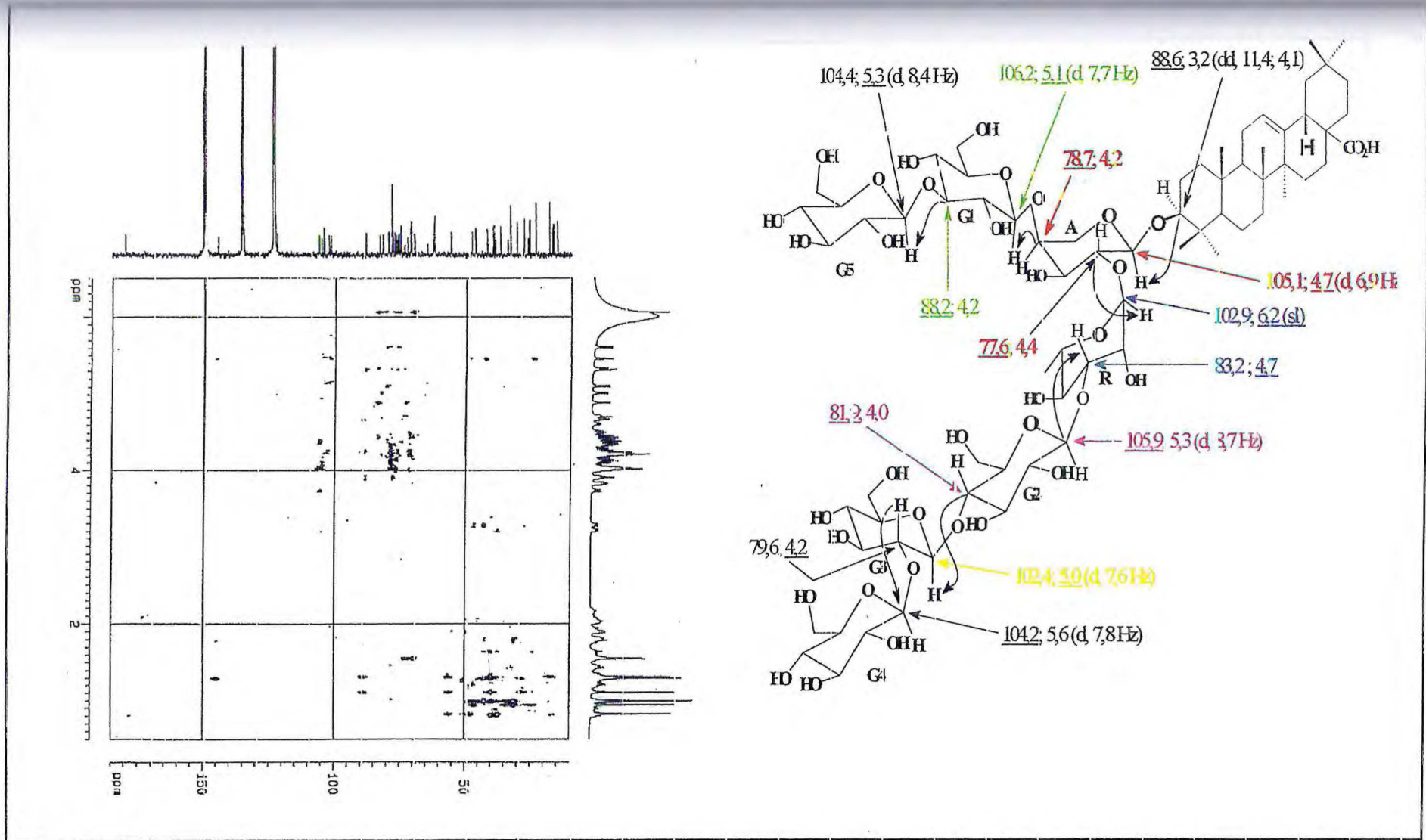


Figura 68 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEIC-A3(7).

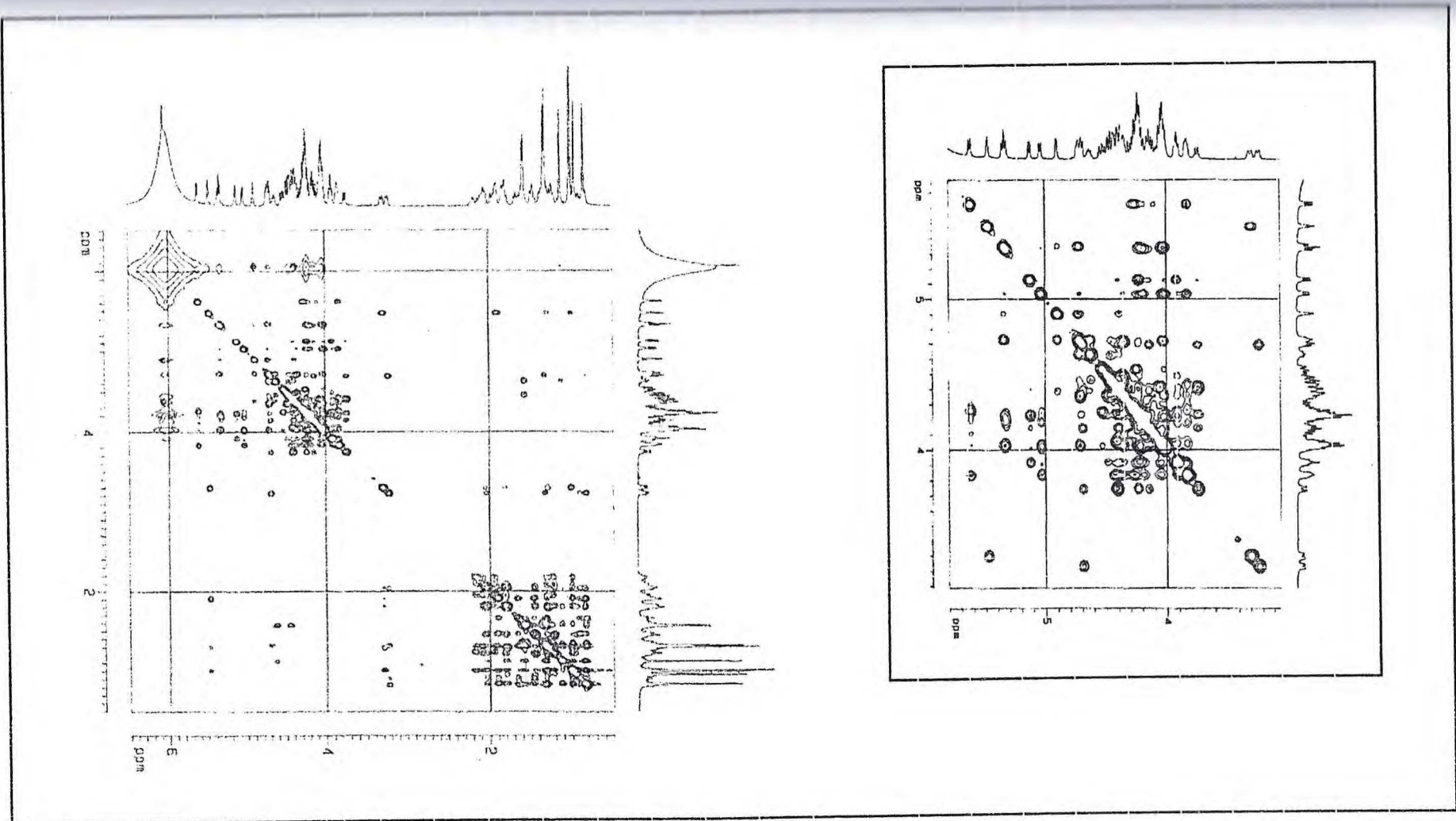


Figura 69 - Espectro de RMN ¹H - NOESY (500 MHz x 500 MHz, C₃D₃N) de PEC- A3(7).

Tabela 14 – Dados de RMN ^{13}C do ácido oleanóico em CDCl_3 ⁷⁵ e das agliconas das saponinas PES-F1 (1), PEC-76 (3), PEC-6P (4), PEC-5P (6) e PEC-A3 (8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	Referência ⁷⁵	PES-F1 (1)	PEC-76 (3)	PEC-6P (4)	PEC-5P (6)	PEC-A3 (8)
1	38,5	39,1	39,2	39,0	40,2	38,7
2	27,4	26,8	26,9	23,8	28,0	26,5
3	78,7	89,1	89,0	88,9	90,0	88,6
4	38,7	39,7	39,8	39,7	39,9	39,4
5	55,2	56,2	56,3	56,2	57,4	55,9
6	18,3	18,8	18,8	18,7	18,4	18,4
7	32,6	33,5	33,5	33,4	34,5	33,0
8	39,3	40,0	40,0	39,9	40,2	39,6
9	47,6	48,3	48,3	48,2	49,4	48,4
10	37,0	37,3	37,7	37,2	38,4	36,9
11	23,1	24,1	24,0	24,0	25,1	23,6
12	122,1	122,8	122,8	122,7	123,9	122,3
13	143,4	145,1	145,1	144,9	146,1	144,7
14	41,6	42,4	42,5	42,4	42,4	42,0
15	27,7	28,6	28,7	28,5	29,6	28,0
16	23,4	24,1	24,1	23,9	25,0	23,5
17	46,6	47,0	47,0	46,9	47,0	46,5
18	41,3	42,3	42,3	42,2	43,3	41,8
19	45,8	46,8	46,8	46,6	47,8	46,3
20	30,6	31,3	31,3	31,1	31,9	30,8
21	33,8	34,5	34,5	34,4	35,6	34,1
22	32,3	33,5	33,5	33,4	34,5	33,0
23	28,1	28,4	28,4	28,3	29,6	28,0
24	15,6	17,3	17,4	17,3	18,4	16,9
25	15,3	15,8	15,9	15,7	16,9	15,4
26	16,8	17,7	17,7	17,6	18,7	17,2
27	26,0	26,5	26,5	26,3	27,5	26,0
28	181,0	180,6	180,5	180,3	181,4	180,0
29	33,1	33,6	33,6	33,4	34,6	33,1
30	23,6	24,0	24,1	23,9	25,1	23,6

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 15 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PEC-A3 (7) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

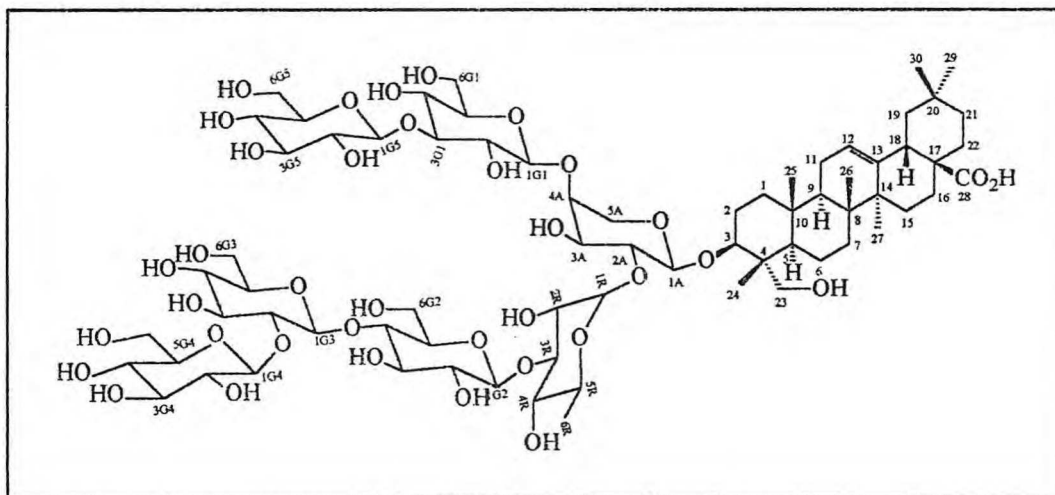
C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 75
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1 CH_2	38,7	1,5, 0,9	-	H-3, H-25	38,5
2 CH_2	26,5	2,0, 1,8	-	-	27,4
3 CH	88,6	3,2	-	3H-23, 3H-24, H-1A	78,7
4 C	39,4	-	3H-23, 3H-24	-	38,7
5 CH	55,9	0,8	-	3H-23, 3H-24, 3H-25	55,2
6 CH_2	18,4	1,6, 1,3	-	-	27,4
7 CH_2	33,0	1,5, 1,4	-	3H-26	32,6
8 C	39,6	-	3H-26	3H-27	39,3
9 CH	47,9	1,6	-	3H-25, 3H-26	47,6
10 C	39,6	-	3H-25	-	37,0
11 CH_2	23,6	1,9	H-12	-	23,1
12 CH	122,3	5,5 (sl)	-	-	122,8
13 C	144,7	-	-	3H-27	143,3
14 C	42,0	-	3H-27	H-18, 3H-26	41,6
15 CH_2	28,0	2,2, 1,2	-	3H-27	27,7
16 CH_2	23,5	2,1; 1,9	-	-	23,4
17 C	46,5	-	H-18	-	46,6
18 CH	41,8	3,3 (dl, 13,6)	-	-	41,3
19 CH_2	46,3	1,8; 1,3	-	3H-29, 3H-30	45,8
20 C	30,8	-	3H-29, 3H-30	-	30,6
21 CH_2	34,1	1,5; 1,2	-	3H-29, 3H-30	33,8
22 CH_2	33,0	2,2; 1,8	-	-	32,3
23 CH_3	28,0	1,3 (s)	-	3H-24	28,1
24 CH_3	16,9	11,1 (s)	-	3H-23, H-5	15,6
25 CH_3	15,4	09 (s)	-	H-9	15,3
26 CH_3	17,2	1,0 (s)	-	H-9	16,8
27 CH_3	26,0	1,3 (s)	-	-	26,0
28 C	180,0	-	-	-	181,0
29 CH_3	33,1	1,0 (s)	-	-	33,1
30 CH_3	23,6	1,0 (s)	-	3H-29	23,6

*Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 16 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2, 3$) da unidade osídica de PEC-A3 (7) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PEC-5P(6)
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1A	105,1	4,7 (d, 6,9)		H-3, 2H5A	106,6
2A	76,4	4,4		H-1R	77,6
3A	73,8	4,1	H-2A	H-1A	75,5
4A	79,7	4,2	H-3A, 2H-5A	H-1G1	81,2
5A	64,9	4,4; 3,7 (d, 11,5)			66,5
1R	101,6	6,1 (sl)			102,9
2R	71,2	4,9			72,8
3R	83,2	4,7	H-2R, H-4R	H-1R	84,7
4R	72,6	4,5	H-3R	H-2R, 3H-6R	74,2
5R	69,6	4,6	3H-6R	H-1R	71,1
6R	18,4	1,6 (d, 5,8)			19,8
1G1	106,2	5,1 (d, 7,7)	H-2G1	H4A	107,8
2G1	76,1	4,0			76,8
3G1	88,2	4,2	H-2G1, H-4G1	H-1G5	79,9
4G1	69,9	3,9		H-2G1, 2H-6G1	72,6
5G1	78,4	3,9			80,0
6G1	62,4	4,1 - 4,8			63,9
1G2	105,9	5,3 (d, 8,7)	-	H-3R	107,8
2G2	75,8	4,0			76,8
3G2	78,2	4,2			77,9
4G2	81,9	4,0	H-3G2	H-1G3	82,6
5G2	77,9	4,0			77,9
6G2	62,1	4,1 - 4,8			63,3
1G3	102,4	5,0 (d, 7,6)	H-2G3		106,3
2G3	79,6	4,2		H-1G4	76,1
3G3	76,9	4,2			79,6
4G3	71,6	4,1			72,9
5G3	78,2	3,8			79,8
6G3	62,5	4,1; 4,8			63,7
1G4	100,4,2	5,6 (d, 7,8)		H-2G3	
2G4	75,8	4,1	H-1G4		
3G4	78,60	4,25		H-1G4	
4G4	71,2	43,8			
5G4	77,5	3,8			
6G4	66,2	4,1 - 4,8			
1G5	104,4	5,3 (d, 8,4)			
2G5	76,1	4,1	H-1G5		
3G5	78,4	4,2			
4G5	71,7	4,1			
5G5	78,3	4,0			
6G5	4,1 - 4,8				

4.8. Determinação Estrutural de PEL-LH1 (8)



A substância PEL-LH1 (8) é um sólido branco amorfo, solúvel em piridina e funde com decomposição na faixa entre 260 a 270 °C. Seu espectro de massa obtido por ionização química eletrospray – ESI/MS (Fig. 70, Pag. 105) apresentou um íon molecular em m/z 1560,1 [M-H]⁻ compatível com fórmula molecular C₇₁H₁₁₆O₃₇. Outros fragmentos importantes em m/z 1398,0 [M-H-162]⁻, 1073,7 [M-H-3 x 162]⁻, 911,3 [M-H-4 x 162]⁻, 765,4 [M-H-4 x 162 - 146]⁻, 749,4 [M-H-5 x 162]⁻, 603,0 [M-H-5 x 162 - 146]⁻, 471,3 [M-H-5 x 162 - 146 - 132]⁻ indicaram a perda de cinco unidades hexosila, de uma desoxihexosila e de uma de pentosila, sendo o fragmento em m/z 471,3 correspondente à aglicona (Fig. 71, Pag. 106).

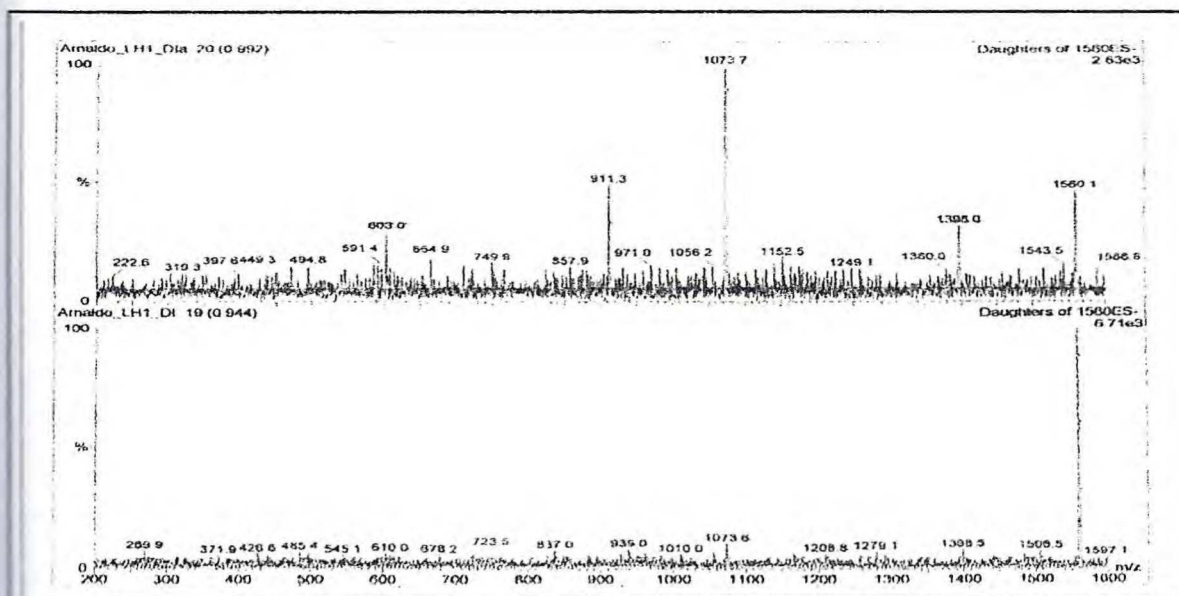


Figura 70 - Espectro de massa por ionização química por eletrospray ESI de PEL-LH1(8).

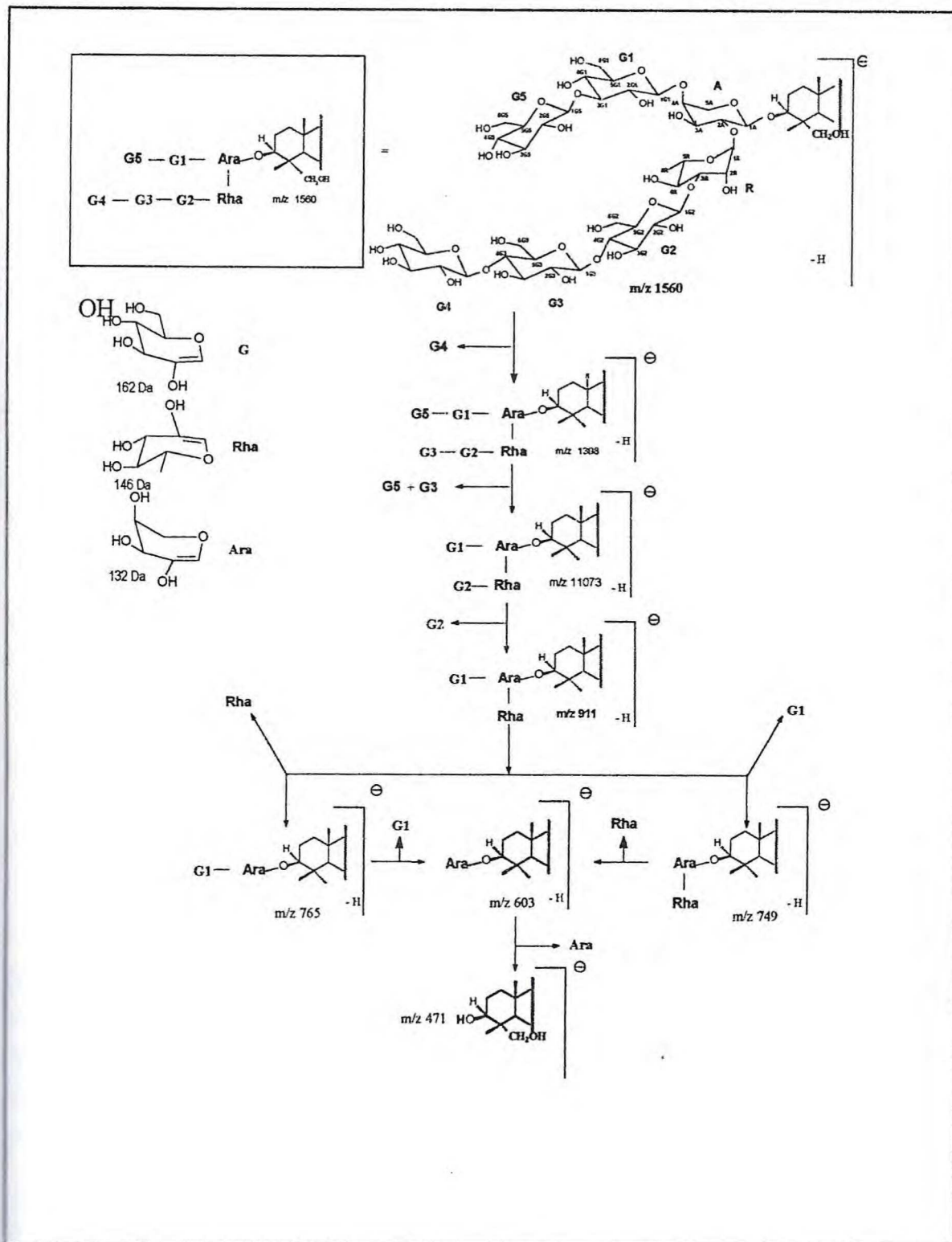


Figura 71 – Proposta mecânica para justificar as principais fragmentações de PEL-LH1(8).

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C - HBBD (Fig. 72, Pag. 108) e de RMN ^{13}C - DEPT 135 (Fig. 73, Pag. 108) evidenciou a presença da mesma aglicona das saponinas PES-F2 (2) e PES-2V (4), ou seja, a hederagenina (Tab.17, Pag. 117). Esta proposta também fundamentou-se na detecção no espectro de RMN ^1H de PEL-LH1 (Fig. 74, Pag. 110), da presença seis singletos atribuídos aos átomos de hidrogênio metílicos e de um singlete largo em δ 5,5, atribuído ao hidrogênio da dupla ligação trissubstituída. A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta - HMQC (Fig. 75, Pag. 111), permitiu detectar a correlação do carbono C-12 em δ 122,3 com o hidrogênio H-12 em δ 5,5 (sl); a correlação do carbono C-18 em δ 42,2 com o hidrogênio metínico H-18 em δ 3,3; a correlação do hidrogênio H-18 com o carbono da carboxila (C-28) em δ 180,5; além da correlação do carbono carbinólico C-3 em δ 81,5 com o hidrogênio H-3 em δ 4,2 da aglicona. Observou-se também no espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135 (Fig. 75, Pag. 108) a presença de sete átomos de carbono metilênicos hidroxilados (hidroximetilênicos) em δ 66,1 e δ 64,1 e cinco inseridos na faixa entre δ 62,7 a 62,5 (HMBC - Fig. 76, Pag. 112) característico de absorção de átomo de carbono C-6 de glicose⁶⁸.

A presença do sinal em δ 64,1 referente à absorção do carbono hidroximetilênico (C23 α), quando comparada com os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C atribuídos para as saponinas PES-F2 (2) e PES-2V (4) (Tab.17, Pag. 117), evidenciou a presença da hederagenina, confirmada pelo efeito de proteção (efeito gama) nos carbonos C-5 e C-3, oriundo da substituição em C-23 α , explicado pelo fenômeno da compressão estérica entre o substituinte de C-23 em C-5 e C-3, bem como, do efeito de desproteção ocasionado no átomo de carbono não hydrogenado em C-4^{81,83}, além da detecção do fragmento no espectro de massa em m/z 471,3 relacionado à aglicona, permitiu definir de maneira inequívoca a presença da hederagenina como aglicona.

Com relação à unidade osídica, detectou-se no espectro de HMQC (Fig. 75, Pag. 111), a correlação de sete átomos de carbonos anoméricos em δ 106,2; 105,9; 105,1; 104,4; 104,2; 102,4 e 101,6 com os hidrogênios anoméricos em δ 5,1 (d, 7,7); 5,3 (7,8); 4,7 (d, 6,9); 5,3 (d, 8,4); 5,6 (d, 7,8); 5,0 (d, 7,6) e 6,1 (sl), respectivamente, evidenciando a presença de sete açúcares, compatível com uma unidade osídica constituída de uma pentose, uma metilpentose (deoxihexose) e cinco hexoses, conforme os fragmentos característicos das mesmas apresentados no espectro de massa (Fig. 71, Pag. 106).

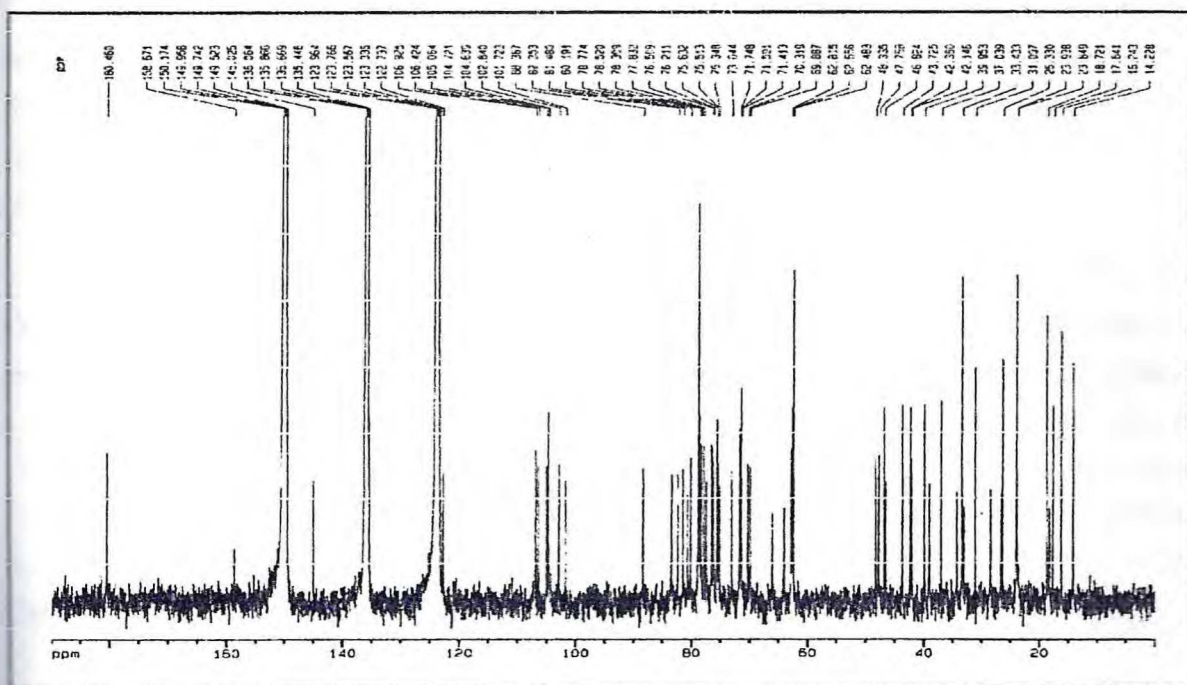


Figura 72 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - 125 MHz) de PEL-LH1(8).

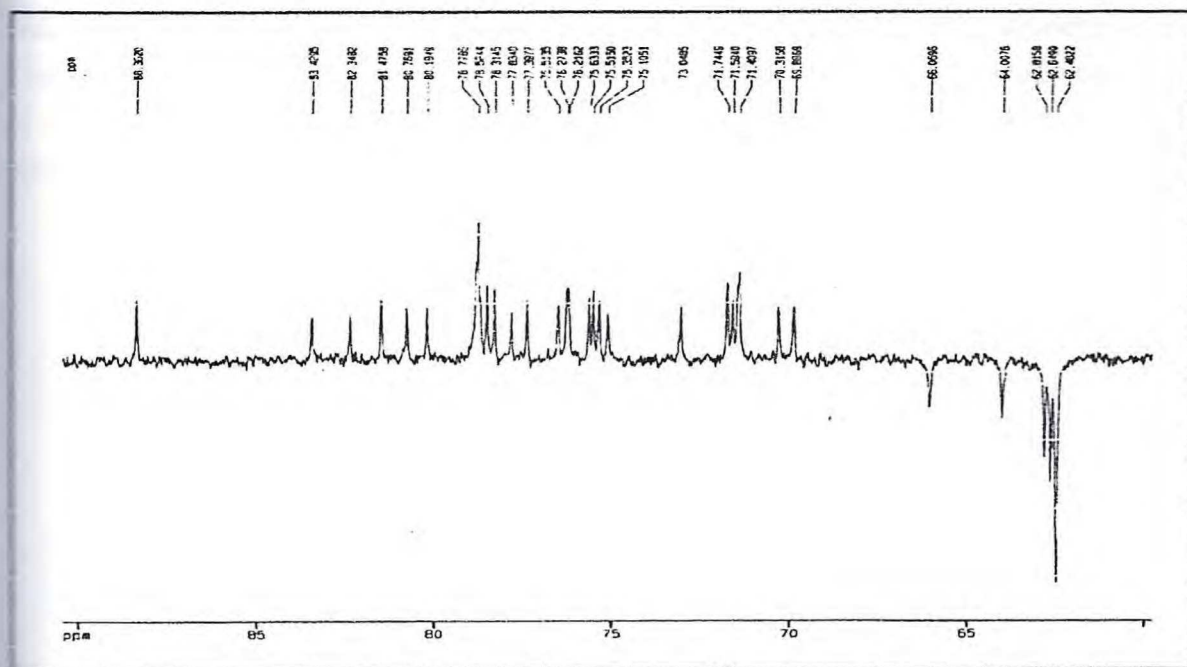


Figura 73 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - 125 MHz) de PEL-LH1(8).

A análise descrita anteriormente, mostrou uma unidade osídica com a mesma estrutura determinada para a saponina PEC-A3(7) (Tab. 16, Pag. 104) e esta proposta foi, adicionalmente, confirmada através da hidrólise ácida de PEL-LH1(8), onde constatou-se através de CCD, por comparação com amostras de açúcares, a presença de arabinose, de glicose e de ramnose no produto bruto desta reação.

A análise conjunta dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY) (Fig. 77, Pag. 113) e heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Fig. 75, Pag. 111), partindo da região não congestionada dos espectros, especificamente das absorções referentes aos hidrogênios e carbonos anoméricos, bem como, da correlação do carbono metílico da metilpentose em δ 18,8 (C-6) com o hidrogênio em δ 1,6 (d, 6,0 Hz), permitiu estabelecer as absorções referentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos compatíveis aos dos monossacarídeos arabinose (A), ramnose (R) e cinco unidades de glicose designadas de G1, G2, G3, G4 e G5 (Tab. 19, Pag. 119).

Comparação adicional dos sinais de deslocamentos químicos correspondentes aos átomos de carbonos anoméricos dos açúcares com os de seus metilglicosídeos (Tab. 03, Pag. 32) confirmou a presença de uma α -L-arabinose, α -L-ramnose e cinco β -D-glicoses.

A natureza das ligações interglicosídicas na unidade osídica, bem como, esta com ahederagenina revelou através de análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear a longa distância – HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$, $n = 2, 3$) (Fig. 76, Pag. 112), de efeito nuclear espacial de correlação homonuclear – NOESY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) (Fig. 78, Pag. 114), a mesma estrutura de unidade osídica determinada para a saponina PEC-A3(7).

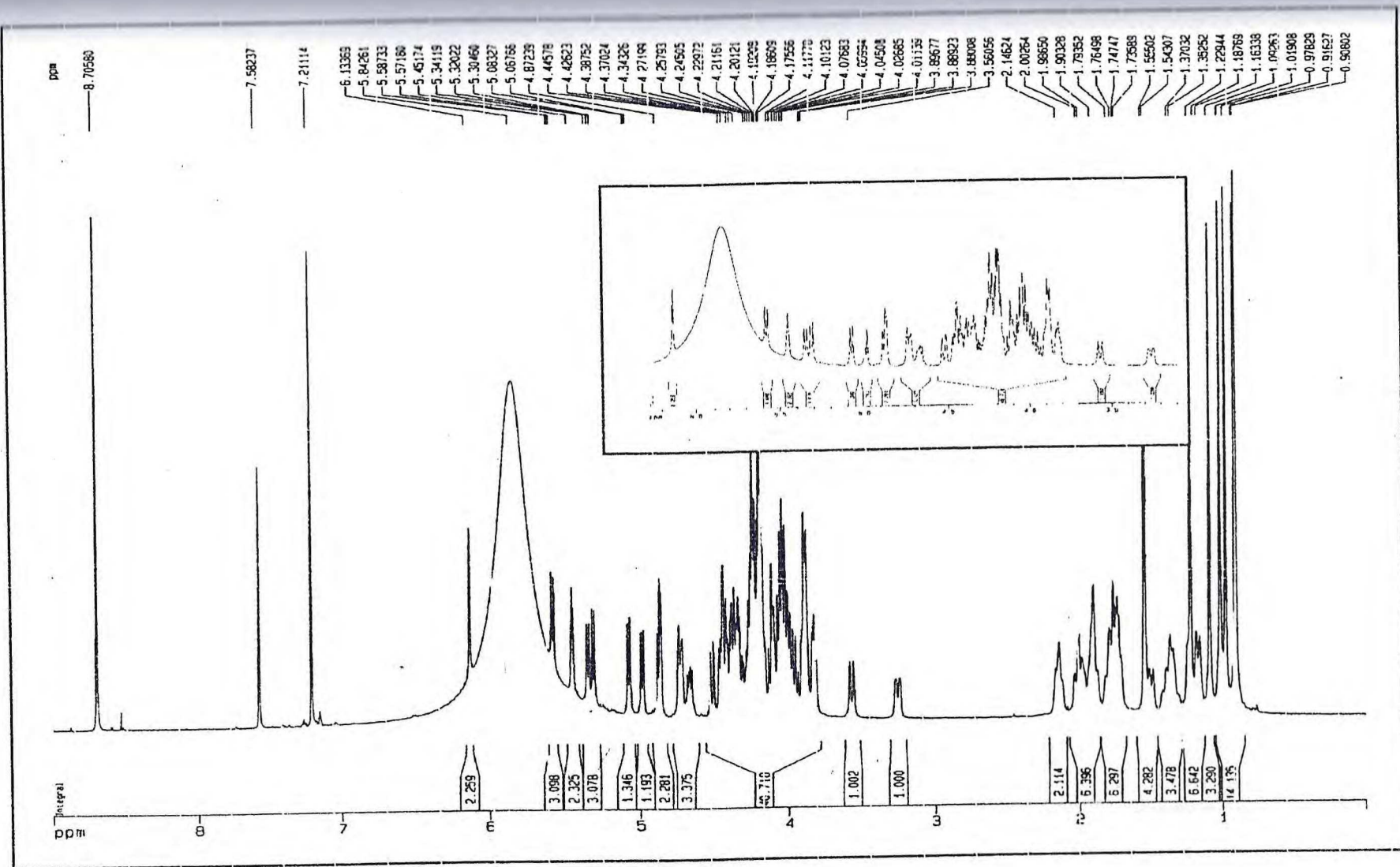


Figura 74 - a) Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N – 500 MHz) de PEL-LH1(8).

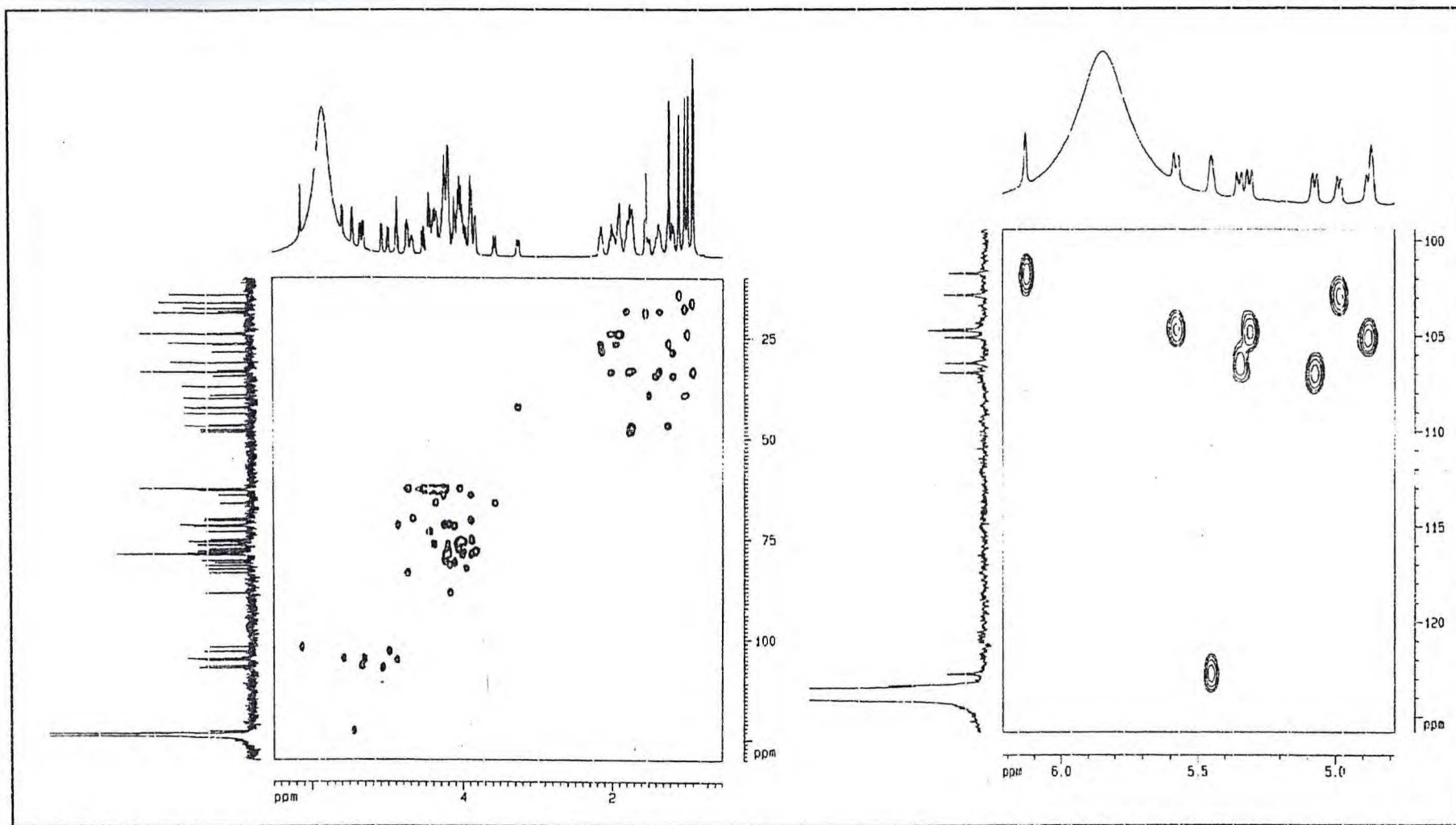


Figura 75 - a) Espectro de HMQC de PEL-LH1 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$;
b) Expansão do espectro a região dos átomos de carbonos anoméricos.

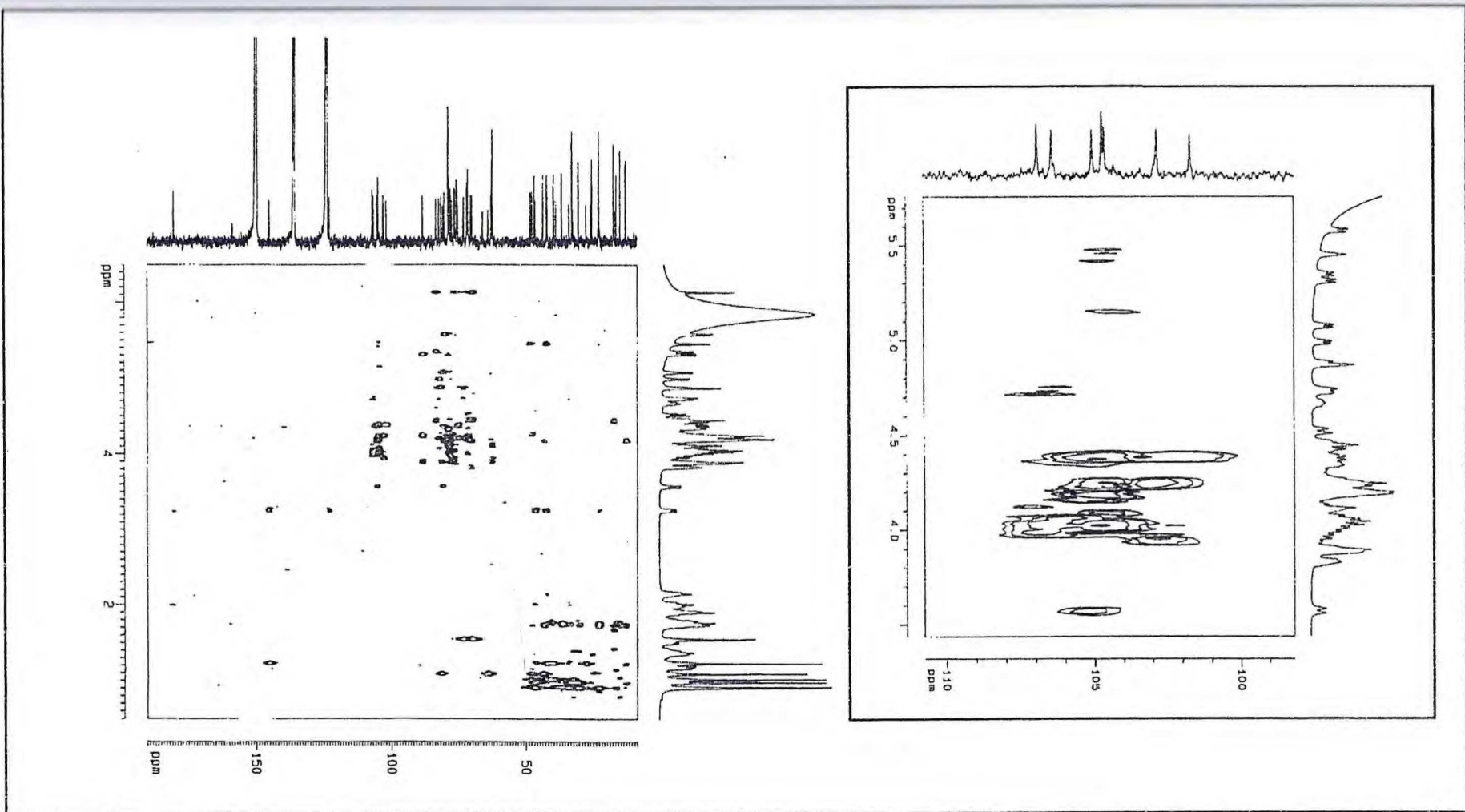


Figura 76 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEL-LH1(8).

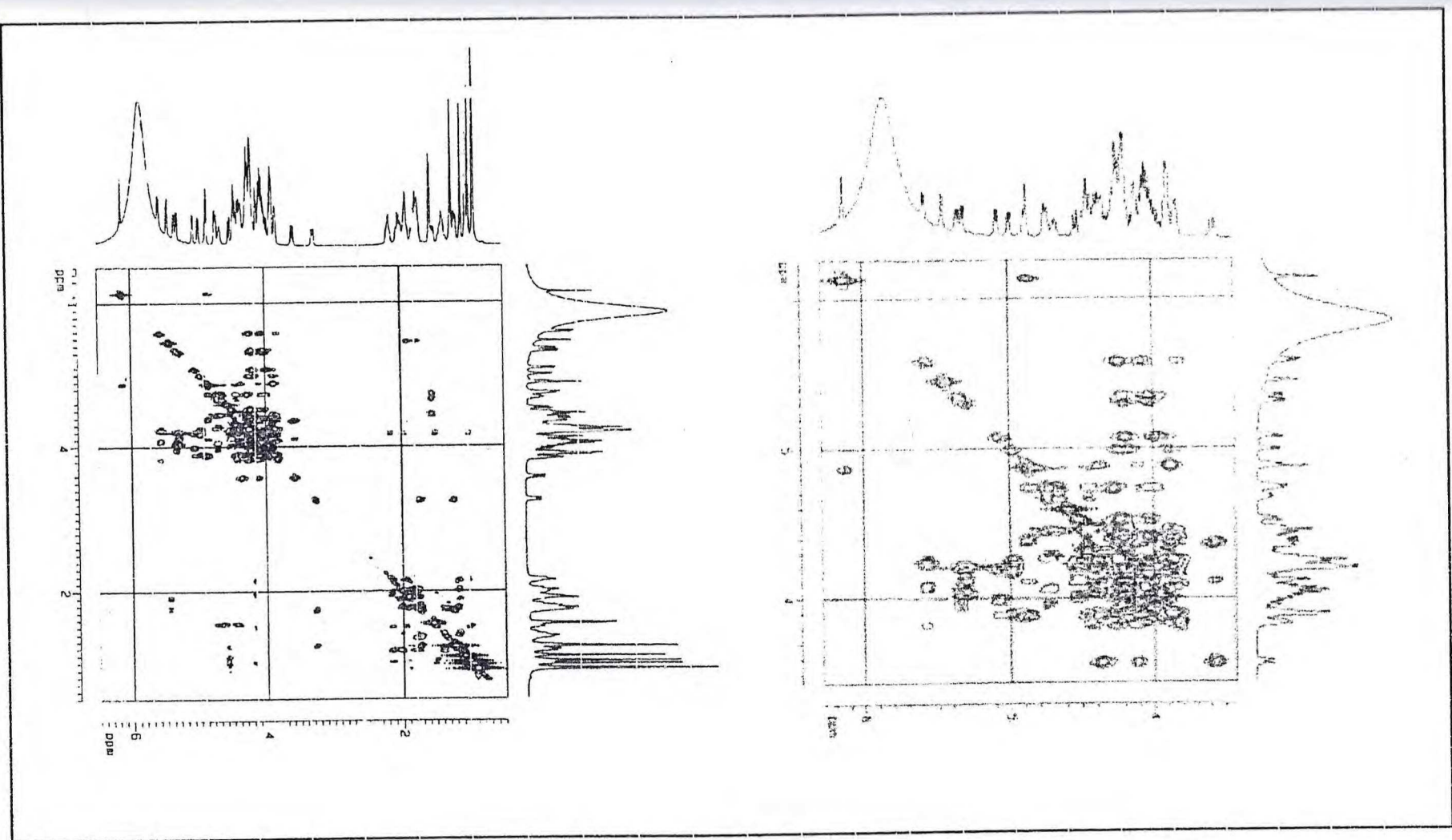


Figura 77 - a) Espectro de COSY de PEL-LH1(8) em C_5D_5N (500 MHz); b) Expansão na região de δ 3,0 – 6,2 do espectro a).

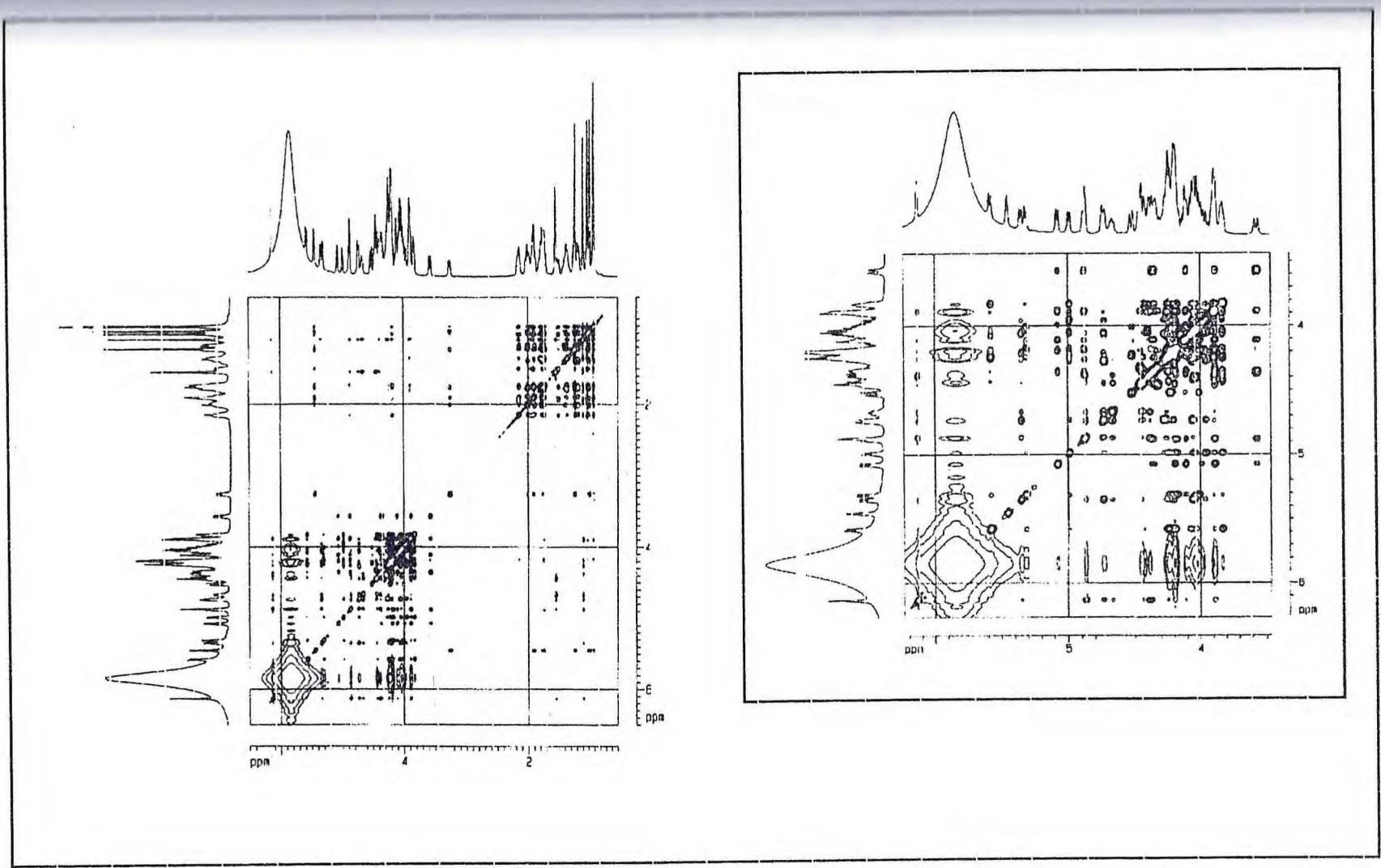


Figura 78 - Espectro de NOESY (C_3D_3N , 500 MHz) de PEL-LH1(8).

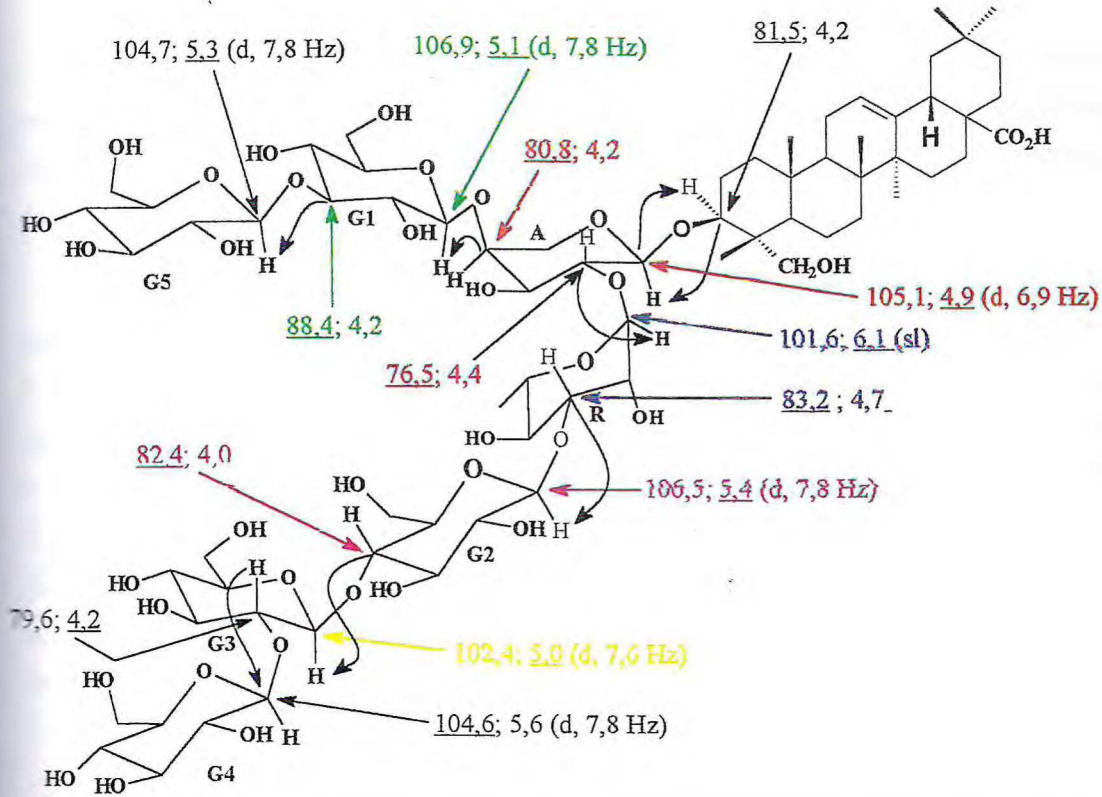
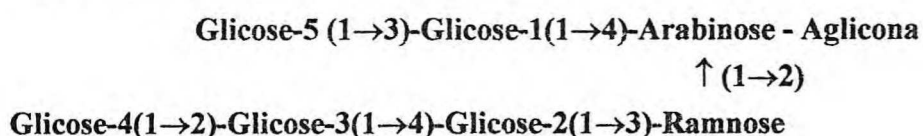


Figura 79 - a) Correlação entre ^1H , ^{13}C a longa distância das ligações interglicosídicas da unidade osídica e esta com a genina de PES-F1(1) observado no espectro de HMBC (Fig. 76, Pag. 112).

No o espectro de HMBC (Fig. 76, Pag. 112), observou-se o acoplamento a três ligações $-^3J$ do carbono anomérico da arabinose - H1A em δ 105,1 com o hidrogênio H-3 da hederagenina em δ 4,2 adicionalmente confirmado pela interação dipolar de H - 3 da hederagenina com o hidrogênio anomérico da arabinose no espectro NOESY (Fig. 75, Pag. 111), definindo a ligação da aglicona com a unidade osídica através da arabinose.

Partindo da arabinose (A), esta encontra-se substituída nos carbonos C-2 e C-4 por uma ramnose (R) e por uma glicose (G1), respectivamente, através da correlação do átomo de carbono C-2A em δ 76,5 com o hidrogênio anomérico da ramnose em δ 6,1 (sl) [R (1→2)A] e da correlação de C-4 A da arabinose em δ 80,8 com o hidrogênio anomérico da glicose designada (1GH-1) em δ 106,9 [G1(1→4)A]. A substituição do carbono C-3R da ramnose por uma segunda glicose designada G1, foi detectada pelo acoplamento do átomo de carbono 3 da rhamnose - C3R em δ 83,4 com o hidrogênio anomérico da glicose- G2 em δ 5,4 [G2 (1→3) R], bem como, o acoplamento do átomo de carbono quatro da glicose-G2 em δ 82,3 com o hidrogênio anomérico de uma terceira glicose designada G3 (1GH-3) em δ 5,0 (d, 7,6 Hz) definindo a substituição em C4 da glicose -G2 [G3 (1→4) G2].

A correlação do hidrogênio anomérico da quarta unidade de glicose (G4), designado de 1GH-4, em δ 5,6 (d, 7,8 Hz) com o átomo de carbono 2 da terceira glicose (2G3) em δ 80,2, definindo uma ligação G4 (1→2) G3. A presença da quinta e última unidade de glicose designada de G5, observou-se o acoplamento a três ligações do carbono C3 da glicose designada como 3G1 em δ 88,4 com seu hidrogênio anomérico (1GH5) em δ 5,3 (d, 8,4 Hz), definindo a estrutura abaixo da unidade osídica:



É válido acrescentar que as configurações dos açúcares são as mesmas das determinadas na saponina PEC-A3(8), isto é, α para arabinose e ramnose e β para as cinco glicoses. Portanto, a estrutura desta saponina, foi denominada de 3-O- $\{\beta$ -D-glicopiranosil(1→2)- β -D-glicopiranosil(1→4)- β -D-glicopiranosil-(1→3)- α -L-ramnanopiranosil-(1→2)- $[\beta$ -D-glicopiranosil (1→3)- β -D-glicopiranosil(1→4)] $\}$ - α -L-arabinopiranosil-hederagenina., substância segundo levantamento bibliográfico no Chemical Abstracts, é inédita na literatura.

Tabela 17 – Dados de RMN ^{13}C da hederagenina em CDCl_3 ⁷⁵ e das agliconas das saponinas PES-F2(2), PES-2V(5) e PEL-LH1(8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	Referência ⁷⁵	PES-F2 (2)	PES-2V (5)	PEL-LH1 (8)	Referência ⁸⁵
1	38,9	39,3	39,1	39,1	39,6
2	27,6	26,5	26,5	26,6	26,6
3	73,7	80,8	81,5	81,5	82,7
4	42,9	43,8	43,7	43,7	43,9
5	48,8	48,0	48,3	47,8	47,8
6	18,7	18,5	18,3	18,3	18,8
7	33,6	34,5	33,2	33,1	34,3
8	39,8	40,1	39,9	39,9	40,4
9	48,2	48,5	47,7	48,4	48,1
10	37,3	37,2	37,1	37,0	37,6
11	23,8	24,1	24,0	24,0	24,5
12	122,7	122,7	122,8	122,7	122,5
13	145,0	145,2	145,0	145,0	146,5
14	42,2	42,5	42,3	43,4	43,0
15	28,4	28,7	28,5	28,4	29,2
16	23,8	24,0	23,9	23,8	24,4
17	46,7	46,9	46,8	46,8	46,9
18	42,0	42,3	42,1	42,2	43,3
19	46,5	46,7	46,6	46,6	48,0
20	31,0	31,3	31,1	31,1	31,7
21	34,3	33,6	34,4	34,4	35,4
22	33,3	33,2	33,4	33,4	35,5
23	68,2	63,4	64,1	64,1	64,5
24	13,1	14,3	14,3	14,2	13,6
25	16,0	16,4	16,2	16,2	16,3
26	17,5	17,8	17,6	17,6	17,9
27	26,2	26,5	26,3	26,3	26,5
28	180,4	180,7	180,4	180,5	185,8
29	33,3	33,6	33,4	33,4	33,8
30	23,8	24,2	23,8	23,9	24,2

* CD_3OD

Tabela 18 - Dados de RMN ^{13}C , de RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da genina de PEL-LH1(8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 75
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1 CH_2	39,1	1,5, 1,0	-	3H-25	38,5
2 CH_2	26,6	2,2, 2,0	-	-	27,4
3 CH	81,5	4,2	-	2H-23, 3H-24, H-1A	78,7
4 C	43,7	-	H-3, H-5, 3H-24	-	38,7
5 CH	47,8	1,8	-	H-23a, 3H-24	55,2
6 CH_2	18,3	1,8, 1,4	2H-7	-	27,4
7 CH_2	33,1	1,7, 1,4	-	3H-26	32,6
8 C	39,9	-	3H-26	3H-27	39,3
9 CH	48,4	1,8	-	H-12, 3H-25, 3H-26	47,6
10 C	37,0	-	3H-25	-	37,0
11 CH_2	24,0	1,9	-	-	23,1
12 CH	122,8	5,5 (t)	-	H-18	122,1
13 C	145,0	-	H-18	3H-27	143,4
14 C	42,4	-	3H-27	H-18, 3H-26	41,6
15 CH_2	28,4	2,2; 1,2	-	3H-27	27,7
16 CH_2	23,8	2,0, 1,9	-	-	23,4
17 C	46,8	-	H-18	-	46,6
18 CH	42,2	3,3 (dd, 13,6; 2,3)	-	H-12	41,3
19 CH_2	46,6	1,8; 1,3	-	3H-29, 3H-30	45,8
20 C	31,1	-	3H-29, 3H-30	-	30,6
21 CH_2	34,4	1,5; 1,2	-	3H-29, 3H-30	33,8
22 CH_2	33,4	2,0; 1,8	-	-	32,3
23 CH_3	64,1	4,3; 3,9	-	3H-24	28,1
24 CH_3	14,3	1,1 (s)	-	H-5, H-3	15,6
25 CH_3	16,2	0,9 (s)	-	H-9	15,3
26 CH_3	17,6	1,0 (s)	-	-	16,8
27 CH_3	26,3	1,2 (s)	-	-	26,0
28 C	180,5	-	-	H-18	181,0
29 CH_3	33,1	0,9 (s)	-	-	33,1
30 CH_3	23,6	1,0 (s)	-	3H-29	23,6

Tabela 19 - Dados de RMN ^{13}C , RMN ^1H e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ [HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2, 3) da unidade osídica de PEL-LH1(8) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC} - ^n\text{J}_{\text{CH}}$		PEC-A3(7)
	δC	δH	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1A	105,1	4.88 (d)		H-3	105,9
2A	76,5	4.38		H-1R	72,2
3A	71,4	3.90			74,4
4A	80,8	4.19	2H-5A	H-1G1	70,8
5A	66,1	4.35, 3.8 (d, 11.7)			63,9
1R	101,7	6.1 (sl)			102,4
2R	71,4	4.87			71,9
3R	83,4	4.73	H-2R, H-4R	H-1R, H-1G2	72,5
4R	73,1	4.45	H-3R	H-2R, 3H-6R	73,6
5R	69,9	4.66	H-4R, 3H-6R	H-1R	69,4
6R	18,7	1.6 (d, 6.0)		H-4R	18,5
1G1	106,9	5.1 (d, 7.8)	H-2G1		106,2
2G1	75,4	4.00			76,1
3G1	88,4	4.19	H-4G1	H-1G5	88,2
4G1	70,3	3.91	H-3G1		69,9
5G1	78,5	3.90			78,4
6G1					62,4
1G2	106,5	5,4 (d, 7,8)	H-2G2	H-3R	105,9
2G2	75,51	4,0			75,8
3G2	78,8	4,2			78,2
4G2	82,3	4,0	H-3G2	H-1G3	81,9
5G2	78,5	4,0			77,9
6G2					62,1
1G3	102,8	5,0 (d, 7,6)	H-2G3		102,4
2G3	80,2	4,3	H-3G3	H-1G4	79,6
3G3	77,6	4,2		H-5G3	76,9
4G3	71,4	4,2			71,6
5G3	78,8	3,9			78,2
6G3					62,5
1G4	104,6	5,6 (d, 7,8)			104,2
2G4	76,6	4,1			75,8
3G4	78,6	4,3			78,6
4G4	71,4	4,3			71,2
5G4	78,6	3,8			77,5
6G4					62,2
1G5	104,7	5,3 (d, 7,8)	H-2G5		105,4
2G5	75,1	4,1			74,8
3G5	78,8	4,2			78,1
4G5	71,7	4,2			71,4
5G5	78,8	4,0			78,0
6G5					62,5

CAPÍTULO 5

**CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ATIVIDADES
LARVICIDA E BACTERICIDA DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS SEMENTES E DE ALGUMAS
SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DE
*Pentaclethra macroloba***

5. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ATIVIDADES LARVICIDA E BACTERICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES E DE ALGUMAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DE *Pentaclethra macroloba*

5.1. Introdução

O conhecimento de um amplo espectro de atividades biológicas de saponinas triterpênicas^{8, 41, 85-89}, tais como, atividade fungicida, larvicida, bactericida, citotóxica entre outras nos levou a avaliar a atividade biológica do extrato etanólico das sementes - PES e de duas saponinas isoladas das diferentes partes da *Pentaclethra macroloba*.

O conhecimento de estudos prévios de atividade inseticida do extrato aquoso das sementes de *Pentaclethra macroloba*, que revelou forte atividade inseticida associada a proteínas naturais inibidoras de proteases, ocasionando uma proteção dessa planta contra ataques de insetos e nematóides⁴⁻⁶.

O interesse em avaliar a atividade larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti* decorreu da praticidade do método, bem como, da procura de substâncias biotivas de origem natural que venham a ajudar à população no combate à dengue, tendo em vista que esta espécie está distribuída por todo o território nacional, possibilitando assim, um aproveitamento racional dos recursos naturais renováveis disponíveis na região.

5.2. Atividade larvicida

Mosquitos, em particular das espécies de *Anopheles* spp. e *Aedes aegypti*, são importantes vetores de doenças tropicais como malária, dengue e febre amarela, respectivamente, cuja disseminação afeta mais de 200 milhões de pessoas em mais de 100 países no Mundo⁹⁰. Atualmente no Brasil, a dengue é um dos principais problemas de saúde pública⁹¹

Os bioensaios para avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* foram realizados segundo a metodologia descrita no item 7.8.1 (Pag. 147) da parte experimental e os dados obtidos foram aplicados no programa Probit⁹² para o cálculo da DL₅₀ e os resultados destes encontram-se descritos na Tabela 20 (Pag. 122).

A análise dos resultados dos bioensaios permitiu observar valores de DL₅₀ inferiores a 500 ppm; valores estes, considerados bastante expressivos em relação a atividade larvicida⁹³. Dentre as amostras que foram submetidas aos bioensaios, observou-se que o extrato etanólico das sementes *Pentaclethra macroloba*, denominado PES apresentou a melhor atividade larvicida. Por outro lado, dentre as saponinas isoladas dos extratos das diferentes partes da plantas que foram testadas, foi observado que aquelas que continham o menor número de açúcares em suas respectivas unidades glicosídicas, apresentaram uma melhor atividade larvicida.

Tabela 20 - Valores de DL₅₀ (ppm) apresentados pelas substâncias PEC-6P(4), PEL-LH1(8) e pelo extrato etanólico das sementes - PES frente às larvas de *Aedes aegypti*.

Amostras testadas	Número de açúcares na unidade osídica	Genina	DL50 (ppm) para <i>Aedes aegypti</i>
PES	-	-	2,8
PES-F2 (2)	2	Ácido Oleanólico	18,6
PEC - 76 (3)	3	Ácido Oleanólico	25,1
PEC - 6P (4)	04	Ácido Oleanólico	27,9
PEL-LH1 (8)	07	Hederagenina	104,7

5.3. Atividade bactericida

A avaliação da atividade bactericida foi realizada segundo a metodologia descrita no item 7.8.2 (Pag. 148) da parte experimental. Foram submetidos aos testes, o extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES e as saponinas triterpênicas PES-F2 (2), PEC-6P (4), PES-2V (5) e PEC-A3 (7) frente às bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*.

As concentrações mínimas capazes de matar 100% das bactérias das diferentes espécies submetidas aos testes são mostradas na Tabela 21 (Pag. 122), observando-se, portanto, que tanto o extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES e as saponinas triterpênicas PES-F2 (2), PEC-6P (4), PES-2V (5) e PEC-A3 (7) apresentaram um razoável efeito bactericida somente sobre as espécies *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Tabela 21 - Concentrações mínimas do extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES e das saponinas triterpênicas PES-F2 (2), PEC-6P (4), PES-2V (5) e PEC-A3 (7) capazes de matar 100% das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*

Amostras testadas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 19430	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 0675
PES-F2(2)	>100mg/ml	>1000mg/ml	>250mg/ml
PEC-6P(4)	>100mg/ml	>1000mg/ml	>250mg/ml
PES-2V(5)	>100mg/ml	>1000mg/ml	>250mg/ml
PEC-A3(7)	>100mg/ml	>1000mg/ml	>250mg/ml
PES	>50mg/ml	>1000mg/ml	>100mg/ml

**DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
SAPONINAS TRITERPÊNICAS NO EXTRATO
ETANÓLICO DAS SEMENTES – PES POR
CLAE**

6. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS TRITERPÊNICAS NO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES – PES POR CLAE

6.1. Introdução

Extratos de produtos naturais têm sido largamente usados no tratamento de algumas enfermidades desde os tempos antigos. Muitas substâncias têm sido isoladas desses extratos e purificadas pelas mais diferentes técnicas cromatográficas clássicas⁹⁴

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE tem se tornado uma prática cada vez mais frequente na análise qualitativa e quantitativa de extratos vegetais, traçando assim um perfil cromatográfico dos mesmos, bem como, ferramenta indispensável no processo de isolamento de substâncias com estruturas complexas.

Publicações prévias de condições utilizadas na CLAE em fase reversa para a separação e quantificação de saponinas triterpênicas presentes em extratos vegetais, relatam a dificuldade no processo de detecção das mesmas, em virtude da necessidade de realizá-las em baixos comprimentos de onda (203 a 210 nm), o que conduz a problemas de linha de base instável e interferência dos eluentes na análise. Entretanto essas dificuldades são contornadas mediante o processo de derivatização dos extratos ou substâncias isoladas pela introdução de grupo cromóforo, que absorva em comprimentos de onda mais elevado (254 nm para os derivados de 4-bromofenacila)⁹⁵⁻⁹⁸, além do uso de outro tipo de detector menos seletivo como o detector de índice de refração, apropriado, somente, para sistema isocrático de solventes⁹⁹.

O objetivo principal desse capítulo foi desenvolver e validar um método utilizando CLAE em fase reversa, sem a necessidade de derivatizar a amostra no processo de determinação e quantificação das saponinas presentes no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES .

6.2. Análise quantitativa

O estudo fitoquímico das diferentes partes da planta, tais como, sementes, casca do caule e lenho (cerne), realizado neste trabalho levou ao isolamento de glicosídeos do ácido oleanóico e da hederagenina, constituídos de dois a sete açúcares na unidade osídica PEL-LH1(8), PEC-A3(7), PEC-5P(6), PEC-6P(4), PES-2V(5), PEC-76(3), PES-F2(2) e PES-F1(1), caracterizadas pelos métodos espectroscópicos e químicos, conforme descrito anteriormente no capítulo 4.

As saponinas foram submetidas à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, sob condições similares às desenvolvidas no processo de isolamento das mesmas, isto é, sistema cromatográfico analítico com gradiente constituído de fase móvel composta por água e acetonitrila (38% a 60% de acetonitrila em 16 minutos), fluxo de 1 mL/min, detecção a 210 nm, coluna C-18 Nova Pack (4,6 x 150 mm, f = 4 m) e loop de 50 mL.

A análise qualitativa por CLAE nas condições descritas, permitiu a determinação dos tempos de retenção de todas as saponinas triterpênicas (Tab. 22, Pag. 125), bem como, a avaliação de suas respectivas purezas. Em seguida, foram preparados os padrões externos em concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm correspondentes às saponinas processadas na coluna, variando de 6,25 a 50 mg, respectivamente.

Com relação à preparação do extrato etanólico das sementes o mesmo foi submetido ao tratamento prévio de partição com n-butanol¹⁰⁰ para eliminar açúcares livres, geralmente, presentes nos extratos de natureza polar, com posterior precipitação das saponinas com éter etílico.

Tabela 22 - Dados dos tempos de retenção das saponinas submetidas à análise por CLAE

	Saponinas Triterpênicas isoladas de <i>Pentaclethra macroloba</i>							
Código	PEL-LH1	PES-2V	PEC-A3	PEC-5P	PEC-6P	PES-F2	PEC-76	PES-F1
Tr (min)	2,8	3,8	4,5	6,1	6,7	7,1	8,0	12,1

A quantificação das saponinas foi realizada segundo o método do padrão externo¹⁰¹, onde determinou-se as curvas de calibração para as saponinas triterpênicas que foram obtidas pela injeção de soluções padrões em concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm. Cada substância na mesma concentração, foi injetada cinco vezes e utilizou-se a média aritmética das áreas para a construção de suas respectivas curvas de calibração.

Os gráficos de calibração linear (Fig. 80, Pag. 126) obtidos através das áreas dos picos das saponinas triterpênicas (y), usadas como padrões externos versus a concentração injetada (x), bem como, as equações de regressão e os coeficientes de correlação encontram-se na Tabela 23 (Pag. 126). Os dados obtidos (Tab. 24, Pag. 127) mostraram correlação adequada dentro desta faixa de concentração.

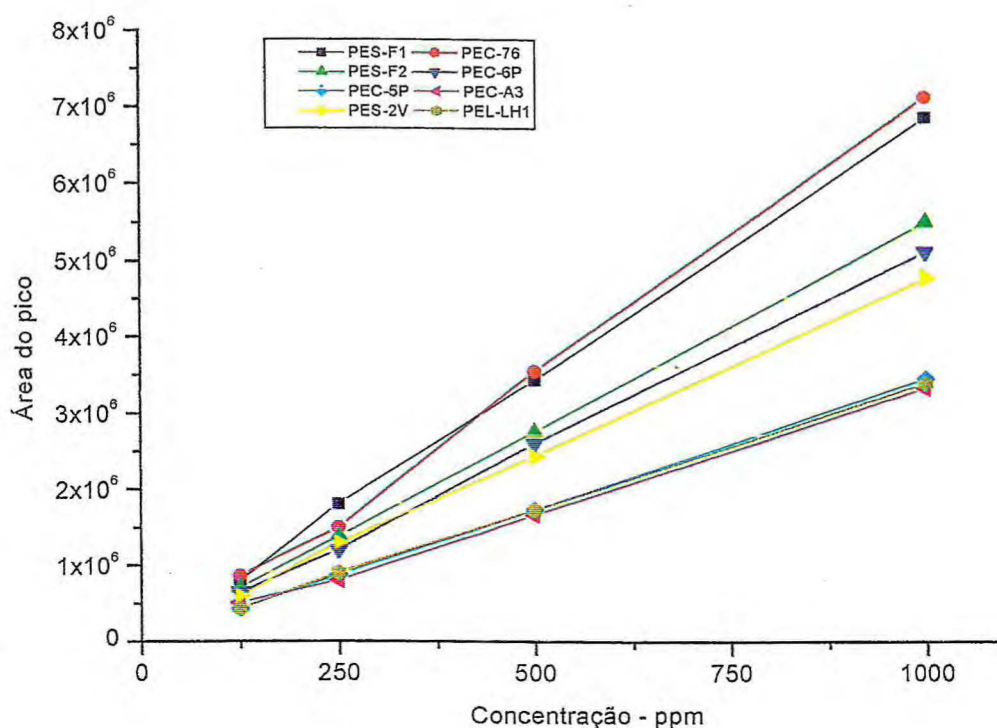


Figura 80 - Curvas de calibração para as saponinas de referência PEL-LH1(8), PEC-A3(7), PES-6P(6), PES-2V(5), PEC-6P(4), PEC-76(3), PES-F2(2) e PES-F1(1).

Tabela 23 - Dados da construção das curvas de calibração dos padrões externos: saponinas PES-F1(1), PEC-76(3), PES-F2(2), PEC-6P(4), PEC-5P(6), PEC-A3(7), PES-2V(5) e PEL-LH1(8) tempos de retenção (T_r), curvas de calibração (equações) e coeficiente de correlação linear (r²).

Padrões externos	T _r (min)	y = a + bx	r ²
PES-F1 (1)	12,1	Y = 5971,0 + 6869,3 X	0,9997
PEC-76 (3)	8,0	Y = -161571,2 + 7291,7 X	0,9998
PES-F2 (2)	7,1	Y = 13647,8 + 5488,2 X	0,9996
PEC-6P (4)	6,7	Y = -28471,2 + 5160,1 X	0,9998
PEC-5P (6)	6,1	Y = 6795,7 + 3447,7 X	0,9993
PEC-A3 (7)	4,5	Y = 41450,1 + 3266,9 X	0,9991
PES-2V (5)	3,8	Y = 62112,7 + 4730,9 X	0,9996
PEL-LH1 (8)	2,8	Y = 37878,4 + 3360,4 X	0,9995

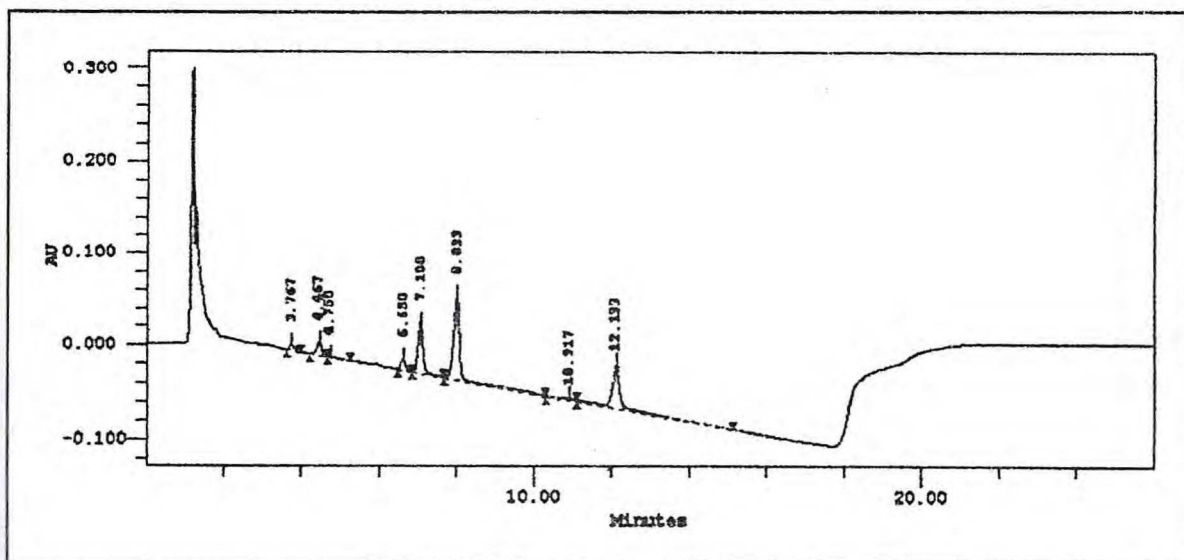


Figura 81 - Cromatograma do extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* – PES (1000 ppm) em CLAE – fase reversa (Nova Pack C-18, Marca Waters).

Tabela 24 - Áreas dos picos referentes às saponinas PES-2V(5), PEC-A3(7), PEC-6P(4), PEC-76(3), PES-F1(1) e PES-F2(2) presentes no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES.

PES	PES-2V	PEC-A3	PEC-6P	PES-F2	PEC-76	PES-F1
1000 ppm	100392	231042	195890	1029876	2039853	1598777
1000 ppm	101106	232167	196057	1025997	2040887	1588026
1000 ppm	102001	231099	198011	1029978	2038551	1601421
1000 ppm	101017	232111	197066	1030518	2050334	1548012
1000 ppm	103011	233307	199001	1038127	2045985	1588177
Soma	507529	1155726	986025	5154496	10215614	7924413
Média	101506	231945	197205	1030899	2043123	1584883
Desvio Padrão	1018,6	9289,0	1317,4	4424,8	3078,1	21486,9
DPR - %	1,0	0,4	0,7	0,4	0,2	0,02

DPR - Desvio Padrão Relativo

A quantificação das saponinas no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES foi feita tomando como base a área dos picos obtidos dos padrões externos, cujos resultados mostraram uma relação linear evidenciada pelos coeficientes de correlação próximo à unidade. A determinação das concentrações médias obtidas em 1000 mg (1 mg) de

extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES analisado revelou os seguintes teores, ou seja, 30,2 % de PEC-76(3); 23,0 % de PES-F1(1); 18,5 % de PES-F2(2); 4,4 % de PEC-6P(4); 5,8 % de PEC-A3(7) e 8,2 % de PES-2V(5), confirmando, desta forma, a presença majoritária dos glicosídeos PES-F1(1), PES-F2(2) e PEC-76(3), constituídos de dois e três açúcares na unidade osídica, no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES.

A análise também não detectou a presença das saponinas PEC-5P(6) e PEL-LH1(8) no extrato etanólico das sementes, confirmando assim o não isolamento das mesmas no prévio estudo realizado com este extrato.

6.3. Validação do método desenvolvido

Todo processo cromatográfico desenvolvido na análise quantitativa de materiais ou substâncias requer um tratamento estatístico. A validação do processo¹⁰² foi feita através das variáveis repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação, e os resultados encontram-se demonstrados na Tabelas 25 (Pag. 129).

A análise de repetibilidade foi realizada com um padrão externo, a saponina PES-F1(1); onde injetou-se dez vezes a amostra num único dia, e o cálculo do desvio padrão relativo revelou um valor inferior a 10 %, definindo, portanto, um bom grau de repetibilidade do método.

Por sua vez, a análise da reprodutibilidade do método foi avaliada através da injeção em dois dias alternados de cinco amostras, em duplicata, do extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES na concentração de 500 mg/ml, cujo valor do desvio padrão relativo foi de 2,4 %; valor este inferior a 10 % indicando, assim, uma boa reprodutibilidade do método.

O estudo da recuperação do método foi realizado através da dopagem do extrato na concentração de 500 ppm (500 mg/mL) com os padrões externos nas concentrações de 250, 500 e 1000 ppm na proporção de 1:1, perfazendo três injeções referentes à cada amostra. Os valores do método de recuperação encontram-se compreendidos na faixa de 97,3 a 99,7 % de material adicionado.

Tabela 25 - Resultado da validação do método para a determinação quantitativa das saponinas triterpênicas no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macroloba* - PES

	PES-F1	PES-F2	PEC-76	PES-2V	PEC-6P	PEC-A3
Recuperação (%)	98,5	98,3	99,7	97,8	98,9	97,3
Resultado	98,5 ± 0,3	98,5 ± 1,0	99,7 ± 0,3	97,8 ± 1,2	98,9 ± 2,1	97,3 ± 3,7

Número de Injeções - 03

CAPÍTULO 7

PARTE EXPERIMENTAL

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Material Botânico

Ramos grossos e sementes da espécie *Pentaclethra macroloba*, família Leguminosae-Mimosoideae, foram coletados na localidade de Fazendinha, no Município de Macapá, Estado de Amapá. A exsicata da planta representando esta coleta encontra-se arquivada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob número EAC - 25947 e foi identificada pelo professor Afrânio Gomes Fernandes.

7.2. Métodos cromatográficos

7.2.1. Cromatografia em coluna

Nas separações por cromatografia em coluna foram utilizadas como fase fixa os seguintes adsorventes: gel de sílica ($f = 0,05$ mm) código 453337, marca Carlos Erba, sephadex LH - 20, marca Pharmacia. Os comprimentos e diâmetros das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem cromatografadas e adsorventes utilizados. Como eluentes foram usados clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Estes solventes foram usados puros ou em misturas binárias e ternárias programadas para produzir ordem de polaridade crescente.

7.2.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se placas de vidro nas dimensões de 10 x 5 cm, com camada de gel de sílica G-60 ($f = 0,25$ mm) código 15684, marca Merck. As revelações das substâncias nas placas foram realizadas por exposição em lâmpada de irradiação modelo UVSL-25 da Mineral Light com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm), pela pulverização com uma solução de vanilina e ácido perclórico em etanol, seguida de aquecimento em estufa ou por vapores de iodo presentes em câmara saturada. Como eluentes foram usados diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, isopropanol e água, puros ou com misturas binárias e ternárias com gradiente crescente de polaridade.

7.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O isolamento das saponinas constituídas de quatro, cinco e sete açúcares de *Pentaclethra macroloba* foi realizada por CLAE, em equipamento marca WATERS, constituído de duas bombas de alta pressão série 515, detectores UV dual série 4758 e refratométrico série 410 do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas - Lectinas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará - UFC. Utilizou-se coluna WATERS C - 8, 150 x 7,9 mm em

corridas semi-preparativas, bem como, coluna C - 18, 150 x 4,6 mm em corridas analíticas. Como fase móvel usou-se água deionizada mili-Q com TFA 0,1%, metanol e acetonitrila puros grau CLAE ou em misturas binárias com gradiente de polaridade crescente.

7.3. Métodos Químicos

Nas reações de hidrólise ácida, alíquotas de 5mg das respectivas saponinas, dissolvidas em 2,5 mL de metanol foram tratadas com 20 mL de solução aquosa de HCl 2N e submetidas a refluxo por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 20 mL de água destilada às misturas reacionais e extraiu-se as agliconas com acetato de etila. As fases orgânicas foram secadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas sob pressão reduzida. Posteriormente, as agliconas foram identificadas por cromatografia em camada delgada, através da comparação destas com padrões de triterpenos, utilizando-se como eluente clorofórmio: metanol (99:01).

As frações aquosas contendo os açúcares foram ajustadas a pH 6,5 com bicarbonato de sódio e posteriormente, evaporadas até a secura. Em seguida, os açúcares foram extraídos com piridina e analisados, comparativamente, por cromatografia em camada delgada em gel de sílica, com amostras autênticas de açúcares sob eluição de um sistema acetato de etila: isopropanol: água (7:3:1) e revelados com orcinol.

7.4. Métodos espectrométricos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em aparelhos pertencentes a várias Instituições. Os modelos e as condições operacionais utilizadas para a obtenção dos espectros das substâncias estão descritos a seguir.

7.4.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono - 13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Brucker AC-500, pertencentes a Universidade Federal do Ceará, operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN ^1H) e 125 MHz para carbono (RMN ^{13}C). Os espectros unidimensionais de RMN ^{13}C foram obtidos totalmente desacoplados – HBBD, técnica DEPT – 135 (ângulo de mutação 135°). Foram utilizadas algumas técnicas de RMN bidimensionais: espectroscopia de correlação homonuclear ($^1\text{H} - ^1\text{H} - \text{COSY}$), espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (NOESY). Os métodos de detecção inversa utilizados foram a coerência quântica múltipla heteronuclear (HMQC) e correlação de ligações múltiplas heteronuclear (HMBC). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e a multiplicidade dos sinais conforme a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t

(triplete), q (quarteto) e multiplete (m). Os solventes utilizados na dissolução das substâncias submetidas às análises foram clorofórmio-deuterado (CDCl_3) e piridina-deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

7.4.2. Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetros pertencentes a três instituições de pesquisa, utilizando as técnicas FAB e ESI em modos positivo e negativo.

- Espectrômetro Kratos Concept 1S High Resolution – Universidade de Manchester;
- Espectrômetro Micromass Quatro LC Instrument - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar;
- Espectrômetro VG Auto Spec de Fisions Instrument - Universidade de São Paulo – USP.

7.4.3. Espectrometria na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região de infravermelho foram registrados em Espectrômetro Perkin – Elmer, modelo 720, pertencente a Universidade Federal do Ceará, sendo utilizadas pastilhas de KBr.

7.5. Rotação Ótica

A determinação da rotação ótica foi realizada em um aparelho Perkin Elmer (Polarimetr 341) pertencente a Universidade Federal do Ceará.

7.6. Determinação do ponto de fusão

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados no equipamento METTLER, modelo FP 52, com placa aquecedora e unidade de controle FP5, existente no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

7.7. Isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico da casca, lenho e sementes de *P. macroloba*

7.7.1. Obtenção dos extratos

Os ramos grossos da *Pentaclethra macroloba* foram separados em casca (800g) e lenho (1200g) e juntamente com as sementes (350g) foram secos em estufa a uma temperatura de 70°C, sendo posteriormente, moídos. Aliquotas de 400g de casca, 450g de lenho e 304g de

sementes foram submetidos à extração exaustiva com hexano, seguida de etanol. Os extratos hexânicos e etanólicos das diferentes partes da planta obtidos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando os extratos denominados:

- Extrato hexânico da casca – **PHC** (2,7g)
- Extrato hexânico do lenho – **PHL** (1,4g)
- Extrato hexânico das sementes -- **PHS** (30,0g)
- Extrato etanólico da casca – **PEC** (92,8g)
- Extrato etanólico do lenho – **PEL** (68,4g)
- Extrato etanólico das sementes – **PES** (16,5g)

7.7.2. Fracionamento do extrato etanólico das sementes – PES

O extrato etanólico das sementes – **PES** (16,5 g) foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com clorofórmio, metanol e água, em crescente gradiente de polaridade, produzindo 100 frações de 125 mL.

E l u e n t e	P r o p o r ç ã o	F r a ç õ e s
C H C l_3	1	0 1 - 0 6
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	9 : 1 : 0 , 1	0 7 - 3 9
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	8 : 2 : 0 , 1	1 9 - 4 9
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	7 : 3 : 0 , 1	5 0 - 7 6
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	6 : 4 : 0 , 1	7 7 - 8 6
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	5 : 5 : 0 , 1	8 7 - 9 8
$\text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	1 : 0 , 1	9 9 - 1 0 0

As frações obtidas foram comparadas por CCD, sendo reunidas, portanto, aquelas que apresentaram comportamento cromatográfico semelhante. Após a análise por CCD, todos os grupos de frações reunidas foram submetidos ao teste para saponinas e destes, os grupos de frações 21 a 26 (1710 mg), 27 a 38 (525 mg), 53 a 79 (1965 mg) e 82 a 85 (176 mg), apresentaram teste positivo para saponinas.

7.7.2.1. Elaboração da fração PES(21-26) e obtenção de PES-F1(1) e PES-F2(2)

Uma alíquota de 200 mg da fração PES(21-26) foi processada em coluna cromatográfica de gel de sílica (20g), eluída clorofórmio : metanol (80 : 20), obtendo-se 50 frações de 10 mL. As frações compreendidas entre 23 a 34 (55 mg) e 49 a 50 (21 mg) apresentaram um único spot

mediante análise por CCD e as substâncias isoladas foram denominadas, respectivamente, de PES-F1(1) e de PES-F2(2).

7.7.2.2. Elaboração da fração PES (27-38) e obtenção de PES - 37-38(3)

Uma alíquota de 500 mg fração PES (27-38) foi submetida à cromatografia em coluna usando gel de sílica (20g), eluída com clorofórmio : metanol : água (8 : 2 : 0,1), obtendo-se 50 frações de 10 mL. As frações compreendidas entre 37-38, revelaram por análise em CCD, a presença de um único spot, sendo, portanto, a substância isolada denominada de PES-37-38(3).

7.7.2.3. Elaboração da fração PES (53-79) e obtenção de PES-1V, PES-2V(5) e PES-3V(4)

A fração PES (53-79) (1965mg) foi dissolvida em um volume mínimo de metanol e a posterior adição de acetona levou à precipitação de um material com aspecto amarelo pardo. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi retirado com pipeta de Pasteur, obtendo-se 1025 mg de saponina bruta. Este material foi submetido a uma coluna de filtração em gel do tipo sephadex LH-20, com uma mistura de diclorometano : metanol (1 : 1), perfazendo um total de 50 frações de 25 mL. As frações 07 a 17 (156 mg) foram reunidas com base na análise por CCD, apresentando um único spot. Esta fração foi submetida a análise em cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE em fase reversa, utilizando uma coluna analítica Nova Pack-C18 (4,6 x 150 mm), sistema isocrático de solvente metanol : água (1 : 1); onde detectou-se picos de substâncias próximo ao volume morto da coluna. Após sucessivas modificações no desenvolvimento do método de separação, usando o sistema isocrático, não obteve-se boa resolução do mesmo. O desenvolvimento de corridas cromatográficas com um sistema de gradiente linear (acetonitrila : água) descritas na Tabela 26 (Pag. 136), bem como, através da injeção de 110 mg de amostra, foi possível isolar três frações de saponinas denominadas de PES-1V, de PES-2V(5) e de PES-3V(4). As amostras separadas por CLAE foram posteriormente liofilizadas, obtendo-se as saponinas PES-1V, PES-2V e PES-3V em massas de 7,7 mg, 18,7 mg e 44,5 mg, respectivamente. O cromatograma de obtenção de PES-1V, PES-2V (5) e PES-3V (4) por CLAE em FR-8 encontra-se na Figura 82 (Pag. 136).

Tabela 26 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PES-1V, PES-2V(5) e PES-3V(4).

Coluna Semipreparativa - C-8 Waters; Dimensões: 7,8 x 150 mm, $\phi = 7 \mu\text{m}$. Detector Dual 2487 : UV - 210 nm ; Loop: 50 μL				
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN	CURVA
-	1	60	40	-
25,0	1	48	52	6
26,0	1	48	52	1
26,1	1	60	40	6
40,0	1	60	40	1

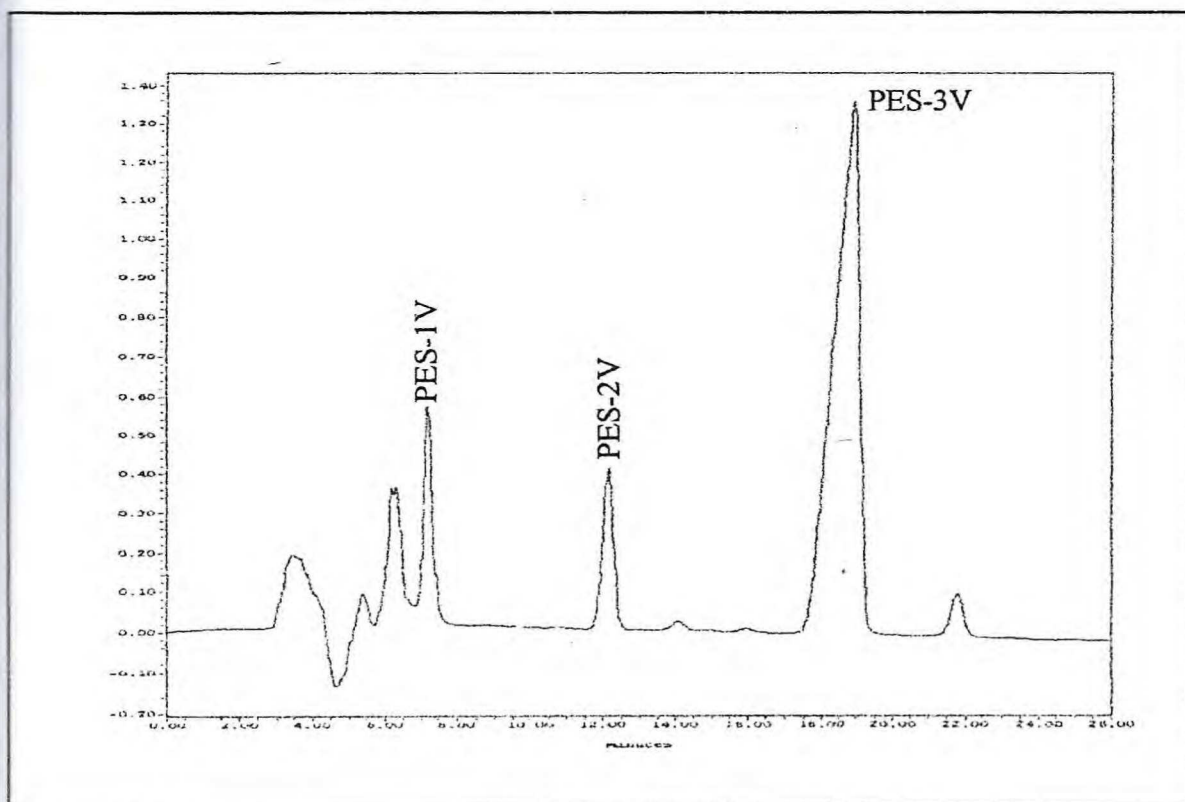
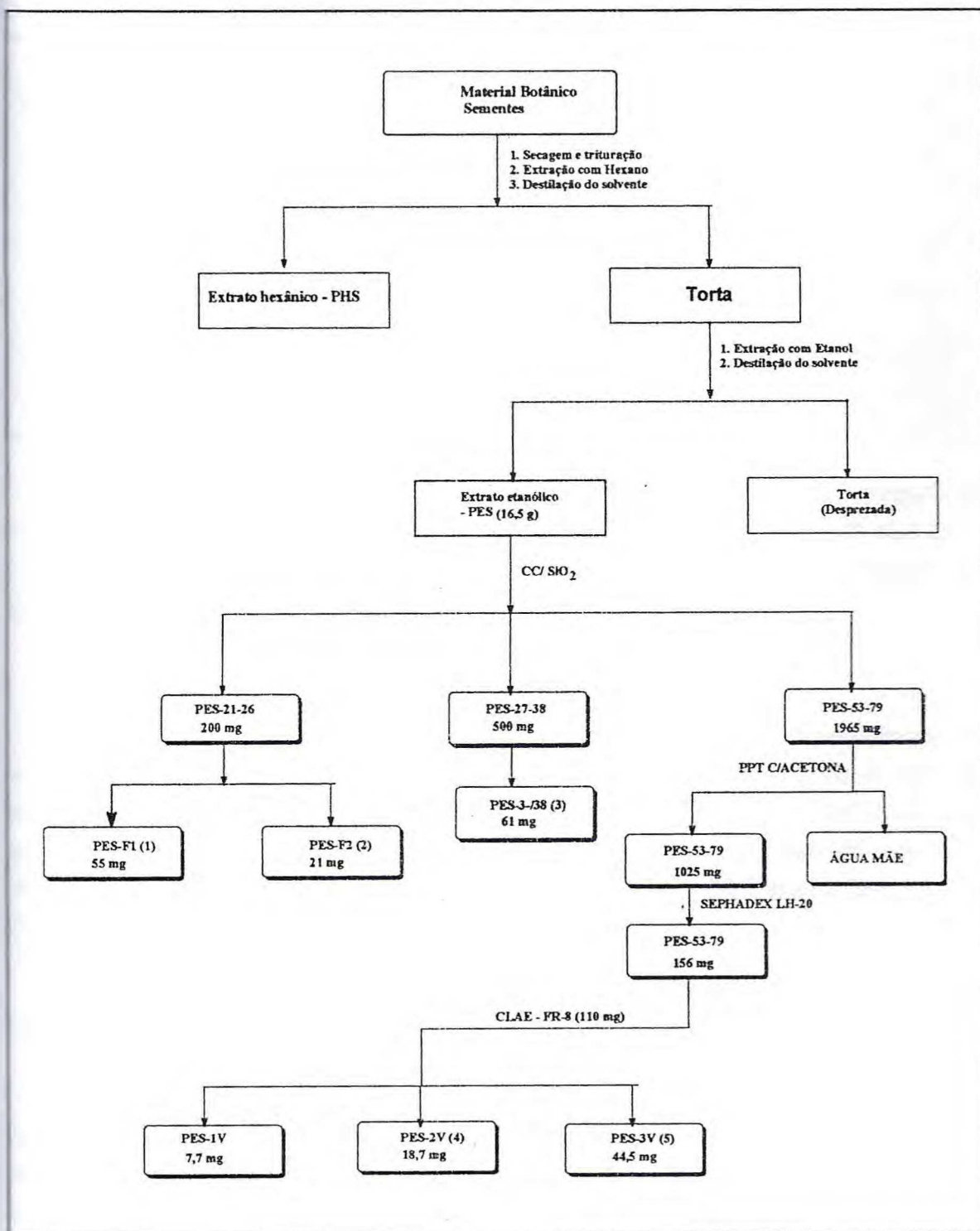


Figura 82 - Cromatograma de obtenção de PES-1V, PES-2V(5) e PES-3V(4) por CLAE em FR-8.

Fluxograma 01 - Rota de isolamento das saponinas triterpênicas PES-F1(1), PES-F2(2), PES-37-38(3), PES-1V, PES-2V(5), PES-3V(4) do extrato etanólico das sementes - PES.



7.7.3. Fracionamento do extrato etanólico da casca – PEC

Uma alíquota de 26,0g de extrato etanólico da casca foi cromatografada em uma coluna de gel de sílica (300g), eluída com clorofórmio, metanol e água, em crescente gradiente de polaridade produzindo 126 frações de 125 mL.

E l u e n t e	P r o p o r ç ã o	F r a ç õ e s
C H C l_3	1	01 - 05
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	9 : 1 : 0,1	10 - 18
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	8 : 2 : 0,1	19 - 31
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	7 : 3 : 0,1	32 - 76
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	6 : 4 : 0,1	75 - 98
$\text{C H C l}_3 : \text{C H}_3\text{O H} : \text{H}_2\text{O}$	5 : 5 : 0,1	99 - 121
$\text{C H}_3\text{O H}$	1	122 - 126

As frações obtidas conforme descrito anteriormente, após análise por cromatografia em camada delgada, foram reunidas, sendo, desta forma obtidas as frações 18-26 (205 mg), 28-36 (2405 mg), 41-52 (1507 mg) e 80-111 (1710 mg) e todas estas frações apresentaram teste positivo para saponinas.

7.7.3.1. Elaboração da fração PEC (28-36) e obtenção de PEC-76 (3)

A fração PEC 28-36 (2405 mg) foi submetida ao mesmo processo de precipitação das saponinas com acetona, conforme descrito no item 7.7.2.3, produzindo 1875 mg de saponina bruta. Este material foi submetido à coluna cromatográfica de gel de sílica (30g), eluída com uma mistura ternária de clorofórmio-metanol-água, com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 100 frações de 125 mL. A fração 76 (55 mg) mostrou-se pura, através da análise por CCD e foi denominada de PEC-76 (3).

7.7.3.2. Elaboração da Fração PEC (41-52) e Obtenção de PEC-3P(5), PEC-4P, PEC-5P(6) e PEC-6P(4)

Uma alíquota de 430 mg da fração PEC (41-52) foi submetida ao processo de precipitação de saponinas com a adição de acetona de acordo com o item 7.7.2.3, obtendo-se 295 mg de material. Este material foi submetido à cromatografia por exclusão molecular em sephadex LH-20, eluída com metanol perfazendo um total de 30 frações de 10 mL, das quais, as frações 07-15 foram reunidas com base na análise por CCD. A injeção de uma alíquota de 160 mg no processo de separação em escala semi-preparativa no cromatógrafo líquido de alta eficiência, segundo as

condições descritas na Tabela 27 (Pag. xx), permitiu o isolamento das substâncias denominadas de PEC-3P(5) (14,5mg), de PEC-4P (7,5 mg), de PEC-5P(6) (15,1 mg) e de PEC-6P(4) (47,5mg), cujo cromatograma pode ser visualizado na Figura 83 (Pag. 139).

Tabela 27 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PEC-3P(5), PEC-4P, PEC-5P(6) e PEC-6P(4).

Coluna Semipreparativa - C-8 Waters; Dimensões: 7,8 x 150 mm, $\phi = 7 \mu\text{m}$ Detector Dual 2487 : UV - 210 nm ; Loop: 50 μL				
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN	CURVA
-	1	80	20	-
5,0	1	55	45	6
20,0	1	40	60	1
25,1	1	20	80	6
25,0	1	80	20	1
35	1	80	20	1

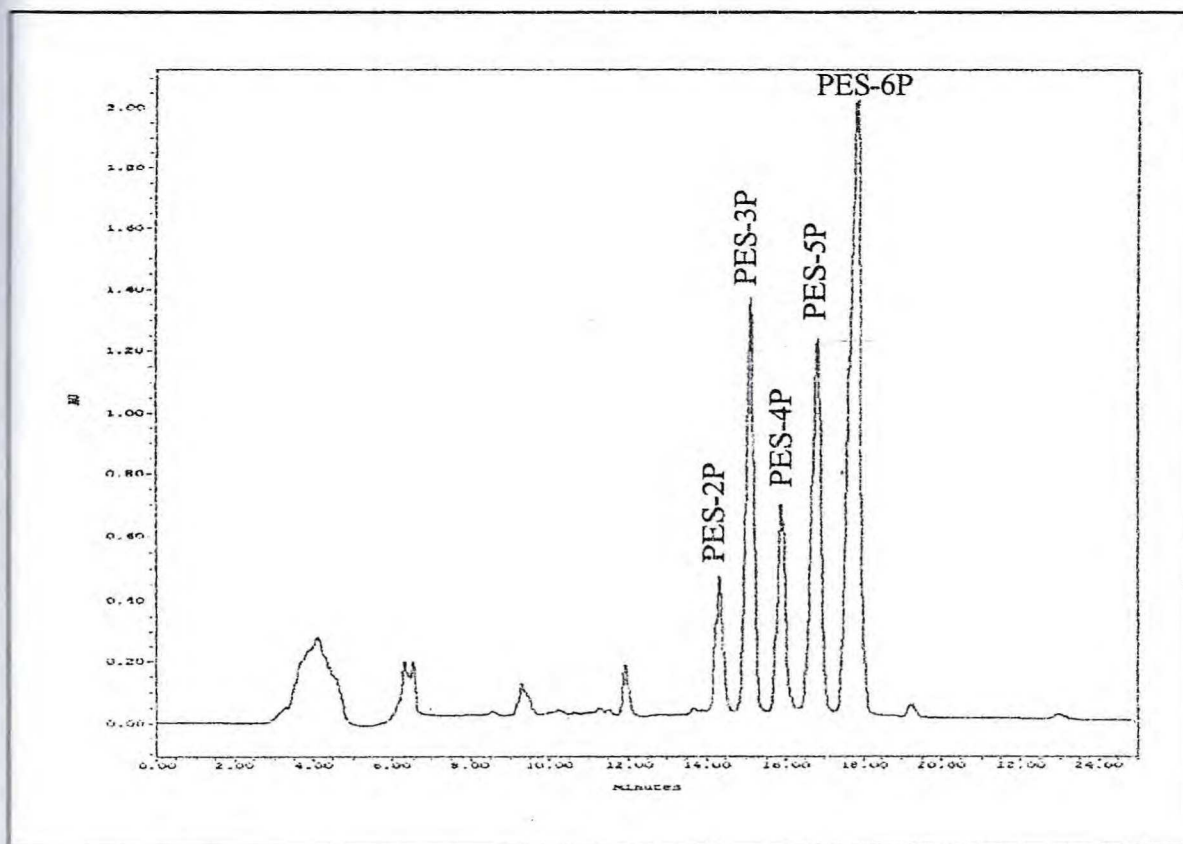


Figura 83 - Cromatograma de obtenção de PEC-3P(5), PEC-4P, PEC-5P(6) e PEC-6P(4) por CLAE, em FR-8.

7.7.3.3. Elaboração da fração PEC (80 -111) e obtenção de PEC-A2 e PEC-A3(7)

A fração PEC (80-111) foi submetida ao processo de precipitação de saponinas com a adição de acetona de acordo com o item 7.7.2.3, obtendo-se 910 mg de material. Este material foi submetido à cromatografia por exclusão molecular em sephadex LH-20, eluída com metanol perfazendo um total de 30 frações de 10 mL. As frações 07 a 10 (81 mg) foram reunidas através da análise por CCD. A análise por CLAE em sistema analítico, permitiu identificar a presença de dois componentes majoritários que foram separados por CLAE, conforme cromatograma xx (Fig. 84, Pag. 141), usando as condições cromatográficas descritas na Tabela 28 (Pag. 140). As amostras separadas por CLAE foram, posteriormente, liofilizadas, obtendo-se as saponinas PEC-A2 e PEC-A3(7) em massas de 12,7 mg e 37,5 mg, respectivamente. A substância PEC-A2 não foi analisada por métodos espectroscópicos, em virtude da massa de amostra obtida ser insuficiente para a análise

Tabela 28 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PEC-A2 e PEC-A3(7).

Coluna Semipreparativa - C-8 Waters; Dimensões: 7,8 x 150 mm, $\phi = 7 \mu\text{m}$ Detector Dual 2487 : UV - 210 nm ; Loop: 50 μL				
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% H₂O	% CH₃CN	CURVA
-	1,0	60	40	-
15,0	1,0	30	70	6
15,1	1,0	30	70	1
16,0	1,0	60	40	6
26,0	1,0	60	40	1

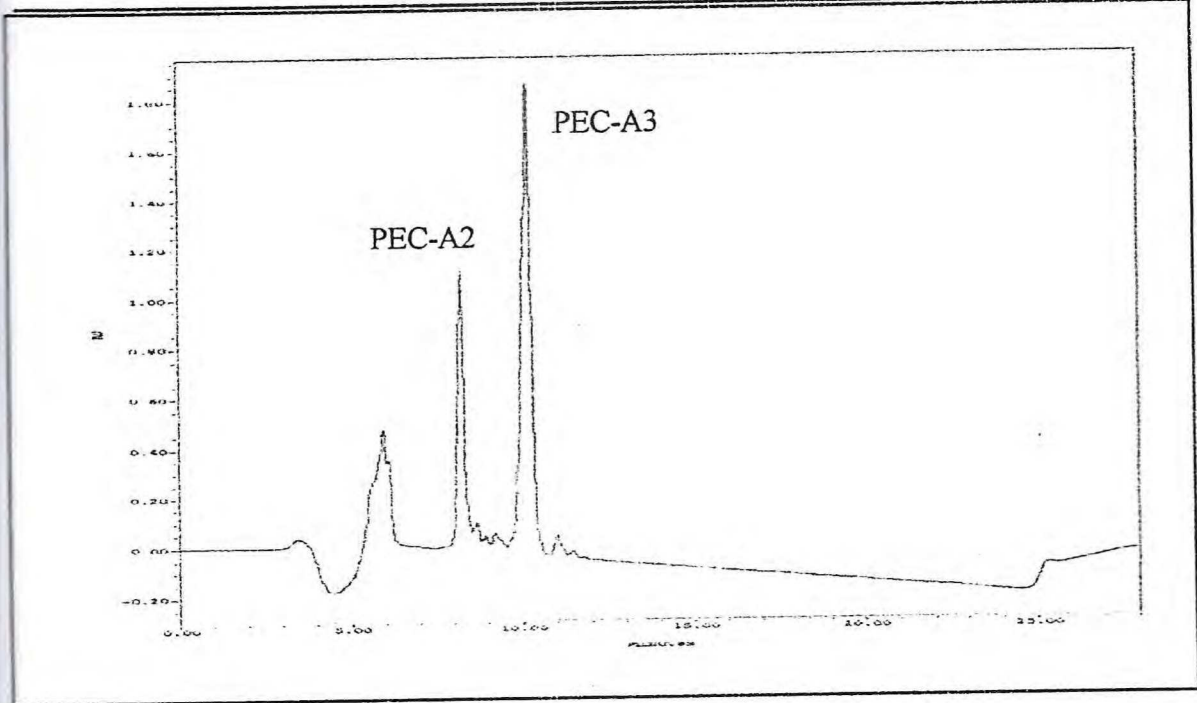
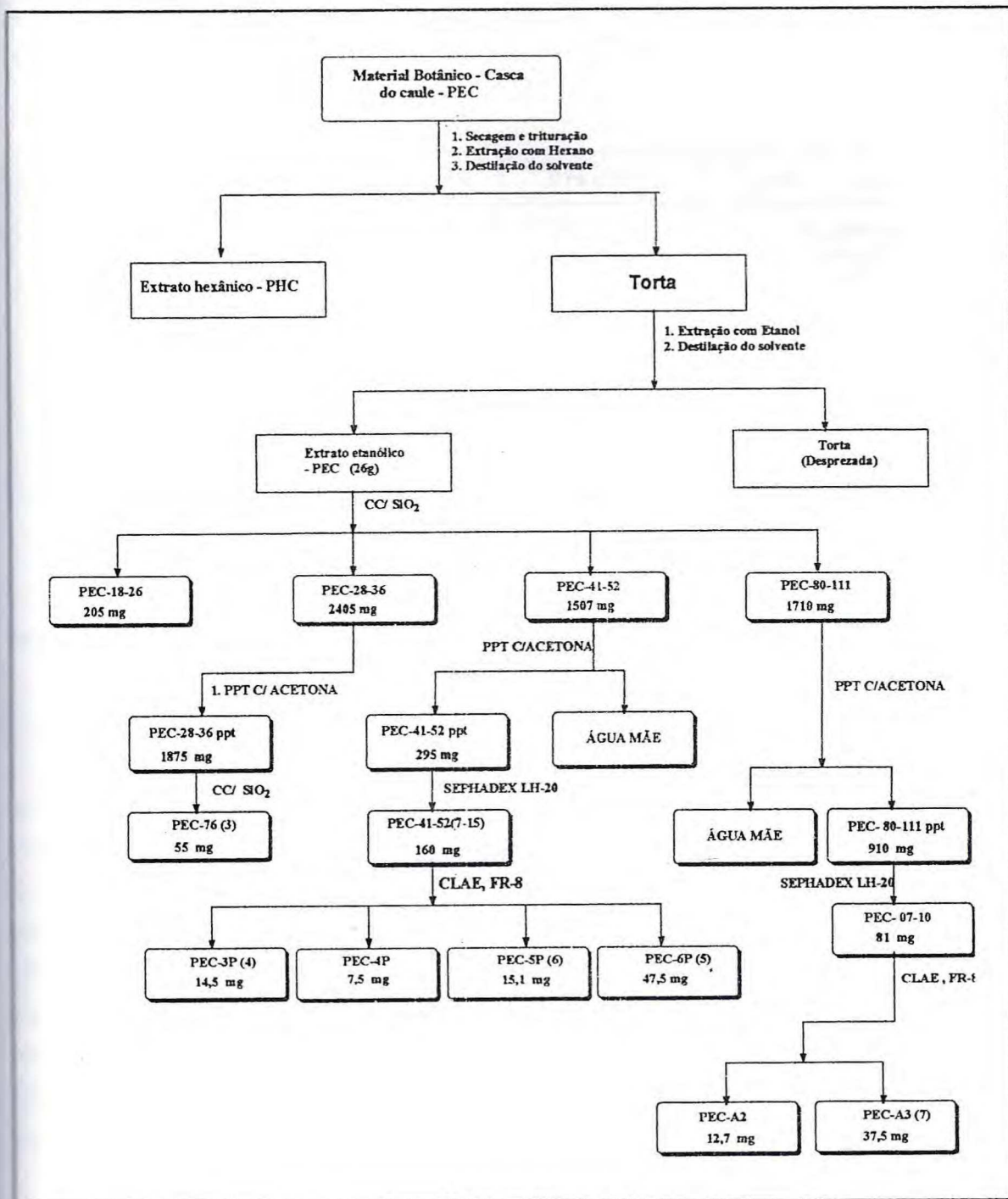


Figura 84 - Cromatograma de obtenção de PEC-A2 e PEC-A3(7) por CLAE em fase reversa - FR8.

Fluxograma 02 - Rota de isolamento das saponinas triterpênicas PEC-76(3), PEC-6P(4), PEC-3P(5), PEC- 5P(6), PEC-4P, PEC-A2 e PEC-A3(7) do extrato etanólico da casca - PEC.



7.7.4. Fracionamento do extrato etanólico do lenho – PEL

Uma alíquota de 30g de extrato etanólico do lenho foi submetida à cromatografia em uma coluna de gel de sílica (500g), eluída com clorofórmio e metanol com crescente gradiente de polaridade, sendo, desta forma, obtidas 52 frações de 250 mL. Destas, seis grupos de frações foram reunidas conforme análise por CCD.

Eluente	Proporção	Frações	Teste - Saponinas
CHCl ₃ : CH ₃ OH	9,5 : 0,5	01 a 16	Negativo
CHCl ₃ : CH ₃ OH	9 : 1	16 a 28	Positivo
CHCl ₃ : CH ₃ OH	8 : 2	29 a 35	Positivo
CHCl ₃ : CH ₃ OH	7 : 3	36 a 43	Positivo
CHCl ₃ : CH ₃ OH	5 : 5	44 a 51	Positivo
CH ₃ OH : H ₂ O	9 : 1	52	Negativo

O isolamento das substâncias presentes nas respectivas frações obtidas, conforme descrito anteriormente, estão demonstradas no Fluxograma 03 (Pag. 146).

7.7.4.1. Elaboração da fração PEL (16-28) e obtenção de PEL-F17(1)

A fração PEL (16-28) mostrou-se como um material de cor marrom, com presença de sólido. Fez-se a dissolução da fração em um volume mínimo de metanol e adicionou-se acetona à solução metanólica concentrada até ser observada a formação de precipitado de cor branca. Em seguida separou-se a água mãe do precipitado com uma pipeta de Pasteur e fez-se, posteriormente, várias lavagens do mesmo com acetona, até a obtenção de um material branco (75 mg), solúvel em metanol, denominado de PEL-F17(1). Este material quando submetido à análise por CCD e à determinação de seu respectivo ponto de fusão na faixa de 221-224 °C, mostrou-se como substância pura. A análise de seus respectivos dados espectroscópicos e de seus produtos obtidos a partir de sua hidrólise ácida, permitiu identificá-lo como sendo uma saponina idêntica à PES-F1(1), isolada do extrato etanólico das sementes.

7.7.4.2. Elaboração da fração PEL (29-36) e obtenção de PEL-F30(3)

A fração PEL (29-36) foi cromatografada em coluna de gel de sílica, eluída com clorofórmio : metanol : água (90 : 10 : 0,1). Após comparação por CCD, foram reunidas as frações 28 a 30, as quais foram denominadas PEL-29-36 F(28-30). Posteriormente, esta fração foi submetida ao mesmo processo descrito no item 7.7.2.3, obtendo-se um material com aspecto

branco amarelado. O precipitado denominado PEL-28-30 ppt foi submetido à separação em um cartucho sep-pack C-18 de Marca Supelco (6 mL), de acordo com as especificações a seguir.

Eluentes	Proporção	Frações
H ₂ O	1	01 - 02
H ₂ O : CH ₃ OH	1 : 1	03 - 09
CH ₃ OH	1	10 - 16

A partir das frações PEL (28-30)ppt 07 a 12 obteve-se um material sólido branco amorfo (34,7 mg), solúvel em metanol e em piridina, que apresentou ponto de fusão na faixa de 251 a 260 °C. Esta saponina, denominada de PEL-F30, mostrou a mesma estrutura da saponina PES-37-38(3).

7.7.4.3. Elaboração da fração PEL (41-51) e obtenção de PEL-LH1(8) e PEL-LH2(7).

A fração PEL (41-51) foi submetida ao processo de precipitação de saponinas com a adição de acetona de acordo com o item 7.7.2.3, obtendo-se 445 mg de material. Este material foi submetido à cromatografia por exclusão molecular em sephadex LH-20, eluída com metanol, obtendo-se, desta forma, 30 frações de 10 mL. Após análise por CCD, as frações 11 a 16 (187 mg) foram reunidas e, posteriormente, submetidas a uma precipitação com acetona, sendo obtidas 117 mg de material. A análise por CLAE em sistema analítico, permitiu identificar a presença de dois componentes majoritários, que foram, em seguida, separados por este método, conforme cromatograma 88 (Fig. 85, Pag. 145), usando as condições cromatográficas descritas na Tabela 29 (Pag. 145). As amostras separadas por CLAE foram, posteriormente, liofilizadas, obtendo-se as saponinas denominadas de PEL-LH1(8) e de PEL-LH2(7), em massas de 35,0 mg e 36,7 mg, respectivamente. A substância PEL-LH2 revelou a mesma estrutura de PEC-A3(7), através da análise dos seus respectivos dados espectroscópicos e de cromatografia por CCD e CLAE.

Tabela 29 - Condições cromatográficas usadas na separação dos compostos PEL-LH1(8) e PEL-LH2(7).

Coluna Semipreparativa - C-8 Waters; Dimensões: 7,8 x 150 mm, $\phi = 7 \mu\text{m}$ Detector Dual 2487 : UV - 210 nm ; Loop: 50 μL				
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN	CURVA
-	1	60	40	-
15,0	1	40	60	6
15,1	1	40	60	1
16	1	60	40	6
26	1	60	40	1

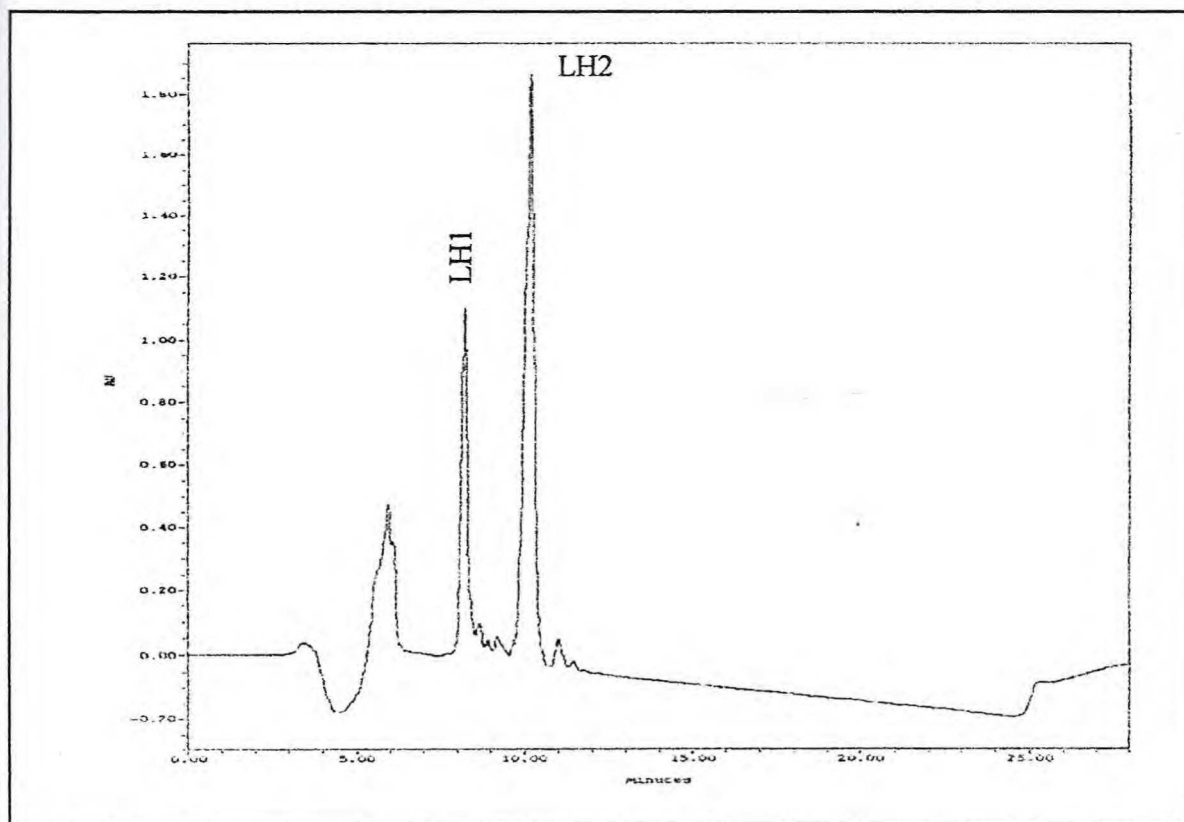
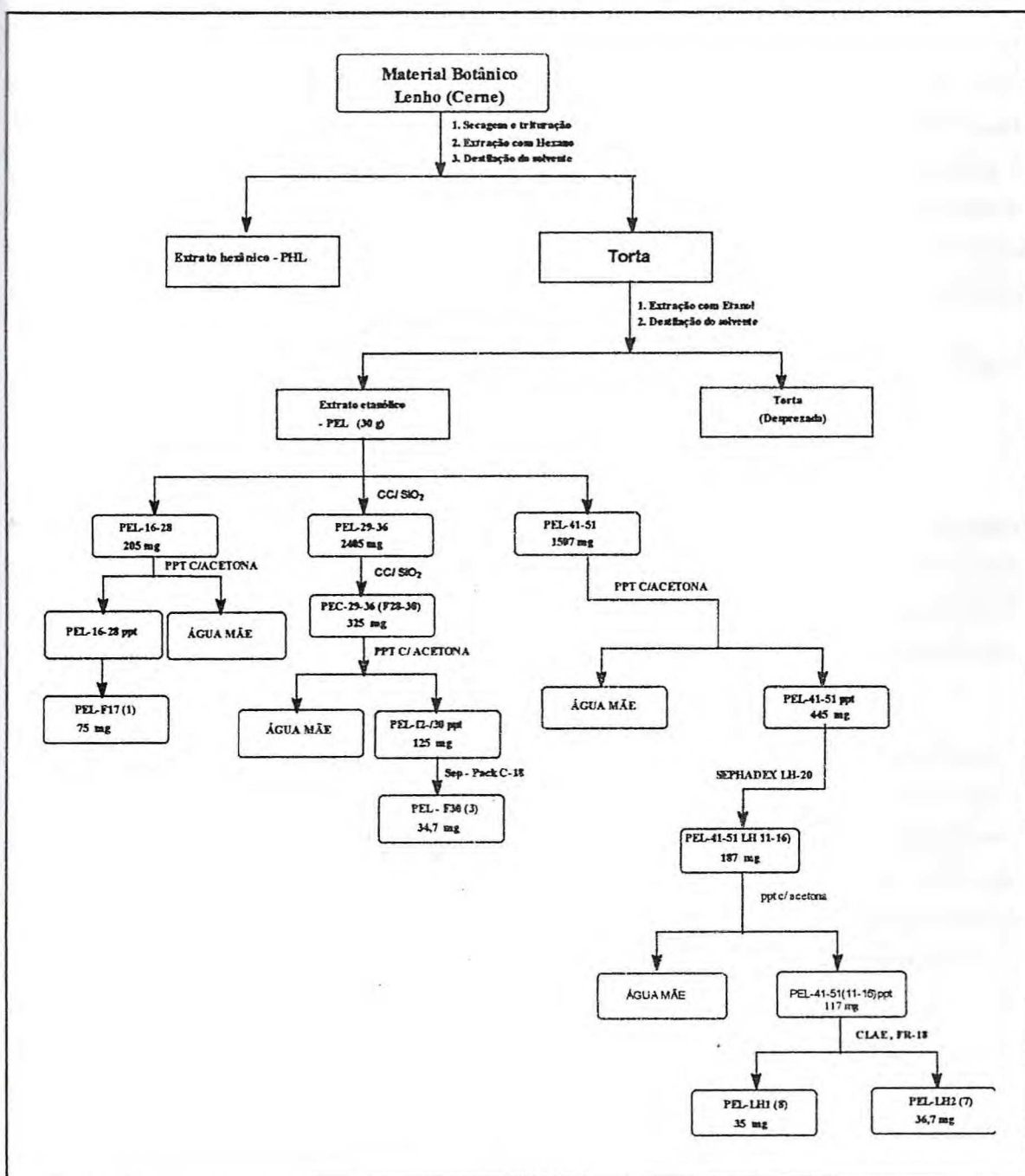


Figura 85 - Cromatograma de obtenção de PEL-LH1(8) e PEL-LH2(7) por CLAE em fase reversa FR-8.

Fluxograma 03 - Rota de isolamento das saponinas triterpênicas PEL-(17), PEL-F-30(3), PEL-LH2(7) e PEL-LH1(8) do estudo do extrato etanólico do lenho - PEL.



7.8. Ensaio biológicos

7.8.1. Atividade larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti*

O extrato etanólico das sementes – PES e as saponinas PES-F1(1), PEC-76(3), PES-3V(4), PEL-LH1(8) em diferentes concentrações (500, 100, 10 e 5 ppm) e em duplicatas, foram dissolvidos em 0,3 mL de dimetil-sulfóxido (DMSO) e a solução resultante foi posteriormente completada com água para o volume de 20 mL. Às soluções preparadas foram adicionadas 50 larvas (estágio 3)⁸⁹ e após 24 horas, foram contadas as larvas vivas e mortas, e, este resultado foi utilizado para a determinação da DL₅₀. Paralelamente aos bioensaios realizados testes em branco, utilizando o mesmo volume de DMSO, e o mesmo não apresentou qualquer atividade larvicida.

Os resultados obtidos foram aplicados ao Programa Probit para o cálculo da DL₅₀, os quais encontram-se descritos na Tabela 20 (Pag. 122).

7.8.2. Atividade bactericida

Com relação à atividade bactericida foram realizados bioensaios dos extratos etanólicos das sementes - PES, bem como, das saponinas PES-F2(2), PES-3V(4), PEL-LH1(8) e PEC-A3(7) frente às bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella choleaesus* (ATCC 19430) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 0675) no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

O teste foi realizado pelo método de difusão em meio Muller (Ágar), no qual as bactérias foram crescidas em meio caldo LB e posteriormente diluídas com nutriente Ágar. O extrato PES e as saponinas, acima citadas, foram dissolvidas em uma solução aquosa de dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10% em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 1000 ppm) e aplicadas em disco de papel. Os discos secos foram colocados sobre placas de Ágar e incubadas a 37 °C. Depois da estocagem de 48 horas analisou-se das zonas de inibição, cujos resultados encontram-se descritos na Tabela 23 (Pag.126).

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível isolar dez substâncias pertencentes à classe das saponinas. Destas, oito foram identificados como glicosídeos do ácido oleanólico e da hederagenina, denominados **PES-F1(1)** ácido 3-O- α -L-ramanopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil oleanólico, **PES-F2 (2)** 3-O- α -L-ramanopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina, **PEC-76 (3)** ácido 3-O- β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil-oleanólico, **PEC-6P (4)** ácido 3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-[β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil-oleanólico, **PES-2V (5)** 3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil-hederagenina, **PEC-5P (6)** ácido 3-O-{{ β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3) - α - L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]}- α -L-arabinopiranosil-oleanólico, **PEC-A3 (7)** ácido 3-O-{{ β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]}- α -L-arabinopiranosil-oleanólico, **PEL-LH1 (8)** 3-O-{{ β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnanopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β - D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]}- α -L-arabinopiranosil-hederagenina.

O levantamento bibliográfico demonstrou que duas destas saponinas, **PES-2V(5)** e **PEL-LH1(8)**, glicosídeos da hederagenina, constituídas de quatro e de sete açúcares, respectivamente, são substâncias inéditas. Por outro lado, duas outras saponinas, **PEC-5P(6)** e **PEC-A3(7)**, glicosídeos do ácido oleanólico, constituídos de cinco e sete açúcares, respectivamente, também são descritas pela primeira vez na literatura.

Com o isolamento das saponinas descritas anteriormente, pode-se ressaltar a relevância da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, técnica de alta reprodutibilidade, no isolamento de saponinas estruturalmente complexas, ou seja, com unidades osídicas constituídas de quatro e sete açúcares, sem a necessidade de derivatização e degradação dos extratos, assim como, na determinação dos teores das mesmas, na mistura de saponinas presentes no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macrolaba* – **PES**, a qual revelou a presença majoritária das saponinas denominadas **PEC-76(3)**, **PES-F1(1)** e **PES-F2(2)** com teores correspondentes a 30,0, 23,0 e 18,5 %, respectivamente.

No processo de busca de substâncias com possível(is) atividade(s) biológica(s), os testes para a avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, utilizando as saponinas **PEC-6P(4)** e **PEL-LH1(8)**, constituídas, respectivamente, de quatro e sete açúcares em suas unidades osídicas, sugerem uma possível correlação entre estrutura e atividade entre estes glicosídeos, ou seja, a diminuição no número de açúcares osídicas na estrutura, leva ao incremento da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*, o que pode ser evidenciado pela menor DL_{50} observada para a

saponina **PEC-6P(4)** em relação à DL_{50} observada para a saponina **PEL-LH1(8)**.

Os estudos confirmaram a presença de metabólitos secundários, ou seja, de saponinas no táxon *Pentaclethra*. No entanto, somente nesse trabalho conseguiu-se elucidar as estruturas das mesmas, uma vez que trabalhos anteriores⁷ descrevem a caracterização dos seus produtos de hidrólise, ou seja, das geninas - ácido oleanólico e hederagenina e dos açúcares - glicose, arabinose e ramnose; além de desenvolver e validar um método de quantificação de uma mistura de saponinas presentes no extrato etanólico das sementes de *Pentaclethra macrolaba* - **PES**.

**CONSTANTES FÍSICAS E DADOS
ESPECTROMÉTRICOS**

9. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS

9.1. PES – F1(1)

F. M. : $C_{41}H_{66}O_{11}$

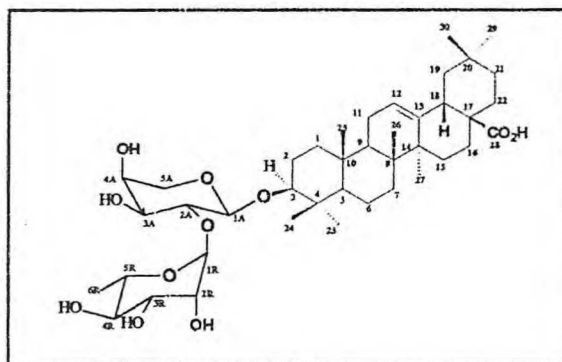
P. M. : 734 Da

Ponto de fusão : 221 – 224°C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N); RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) : ver Tabelas 01 e 02, Pag. 31 e 32, respectivamente.



9.2. PES – F2(2)

F. M. : $C_{41}H_{66}O_{12}$

P. M. : 750 Da

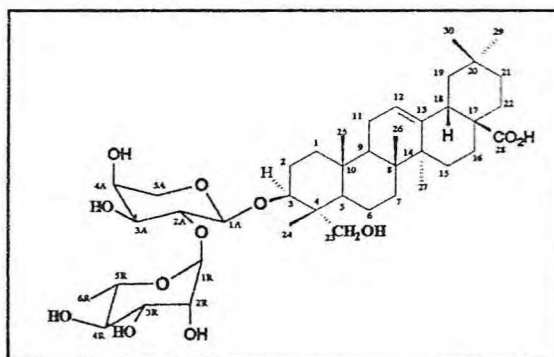
Ponto de fusão.: 225 – 257°C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}): ver figura 13, Pag. 34

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N); de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) : ver Tabelas 04 e 05 nas páginas 40 e 41, respectivamente.



9.3. PEC – 76(3)

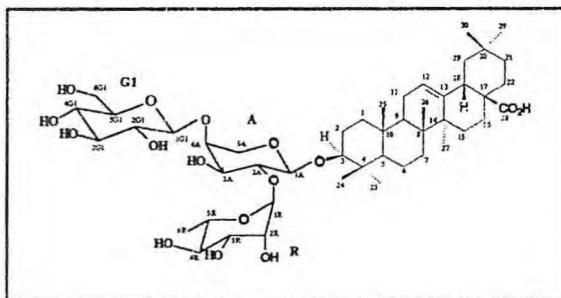
F. M. : $C_{47}H_{36}O_{16}$

P. M. : 896 Da

Ponto de fusão.: 251 – 260°C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}): ver Figura 21, pág. 43.Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N); de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): Ver Tabe. 6 e 7 nas Pag. 52 e 53, respectivamente.

9.4. PEC – 6P(4)

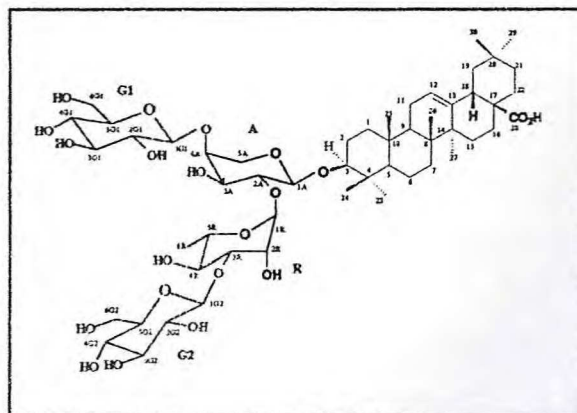
F. M. : $C_{53}H_{86}O_{21}$

P. M. : 1059 Da

Ponto de fusão: 244 – 248°C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Rotação ótica: $[\alpha]_D^{25} = +2,4$ Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}); de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N) e de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): Tab. 8 e 9 nas Pag.65 e 66.

9.5. PES – 2V(5)F. M. : $C_{53}H_{87}O_{22}$

P. M. : 1075 Da

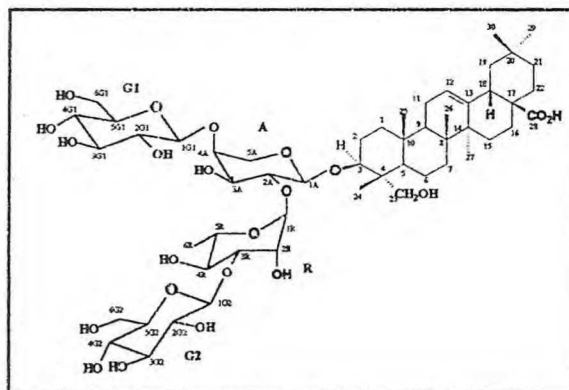
Ponto de fusão: 251 – 268°C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Rotação ótica: $[\alpha]_D^{25} = -3,0$ [0,5 - MeOH]

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}); de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N) e de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) : Tabelas 10 e 11, nas Pag. 76 e 77, respectivamente.

**9.6. PEC – 5P(6)**F. M. : $C_{59}H_{96}O_{26}$

P. M. : 1220 Da

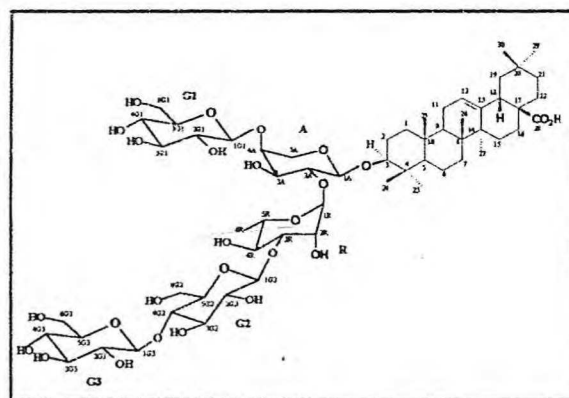
Ponto de fusão:

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Rotação ótica: $[\alpha]_D^{25} = -0,004$ [MeOH]

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}); de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N) e de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) : Tabelas 12 e 13, nas Pag. 89 e 90, respectivamente.



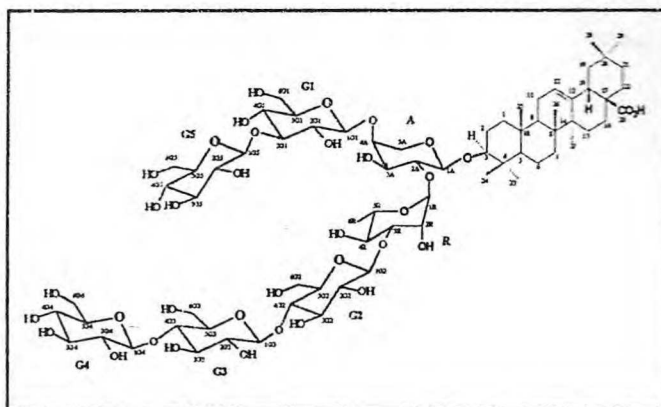
9.7. PEC – A3(7)F. M. : $C_{71}H_{116}O_{36}$

P. M. : 1545 Da

Ponto de fusão: 251 – 270° C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Rotação ótica: $[\alpha]_D^{25} = -0,06$ [2,5 - MeOH]

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}); de RMN 1H (500 MHz, C_3D_3N) e de RMN ^{13}C (125 MHz, C_3D_3N) : Tabelas 15 e 16 nas Páginas 103 e 104, respectivamente.

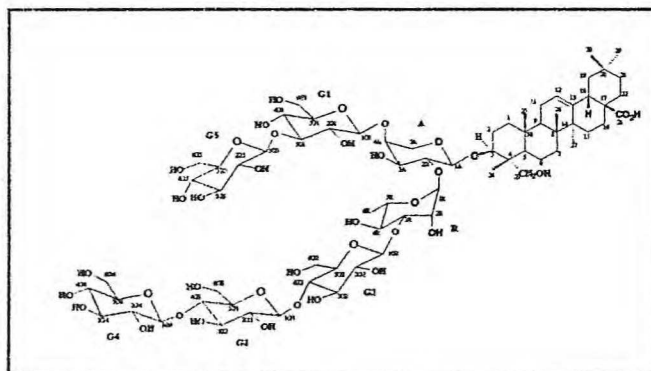
9.8. PEL – LH1(8)F. M. : $C_{71}H_{116}O_{37}$

P. M. : 1561 Da

Ponto de fusão: 255 – 270° C

Aspecto : sólido branco amorfo

Solubilidade : Piridina

Rotação ótica: $[\alpha]_D^{25} = -0,4$ [0,5 - MeOH]

Espectroscopia na região do IV (KBr, cm^{-1}); de RMN 1H (500 MHz, C_3D_3N) e de RMN ^{13}C (125 MHz, C_3D_3N) : Tabelas 18 e 19 nas Páginas 118 e 119, respectivamente.

CAPÍTULO 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALLEEN, O. N.; ALLEN, E. K. The Leguminosae - A Source Book of Characteristic, Uses and Nodulation. Madison: University of Wisconsin Press, 1981.
02. HAZLTT, D. L. Seasonal Cambial Activity for *Pentaclethra macroloba*, *Goethalsia* and *Carapa* Trees in Costa Rica – Rican Lowland Forest. **Biotropica** v.19(4), p. 357-360 ,1987.
03. CORREIA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. 14, p.1-19, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1980.
04. CHUN, J.; GOODMAN, C. L.; RICE, W. C.; McINTOSH, A. H.; CHIPPENDALE, G. M.; SCHUBERT, K. R. *Pentaclethra macroloba* seed effect on larval growth cell viability and midgut enzyme activity of *Helicoverpa zea*. **Journal of Economic Entomology**. v.87 (6), p. 1754 - 1760 ,1994.
05. RATHBURN, H. B. Trypsin inhibitor protein from *pentaclethra macroloba* having insecticidal properties, international patent publication number WO 9719109 a 970529, 1997.
06. SCHUBERT, K. R.; CHEN, R.; CZAPLA, T. H. Trypsin inhibitors with insecticidal properties obtained from *Pentaclethra macroloba* seed. W09915009, 1999.
07. WELTER, A.; DELAUDE, C. **Bull. Soc. Chim. Belg.** v. 84, p. 243 – 252, 1975.
08. MARTSON, A. ; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. Contribution à étude chimique des saponines d'ume Mimosacée Africaine: *Pentaclethra etveldeana* de Wild. **Journal of Ethnopharmacology**, 38, p. 215-223, 1993
09. AGARWAL, S. K.; RASTOGI, R. P. **Phytochemistry** v. 13 , p. 2623-2645, 1974.
10. HONG, K. J.; TOKANANGA, S.; ISHIGAMI, Y. ; KAJINCHI, T. **Chemosphere**. v 41 (3), p.345-352, 2000.
11. SCHENKEL, E. P.; WERNER, W.; SCHULTE, K. E. Saponins from *Thinouia coriaceae*. **Planta Medica** v. 57, p.463 -467, 1991.
12. HIGUCHI, I, R.; KAWASAKI, T. **Chem. Pharm. Bull.**, v.24, 1021–1032, 1976.
13. ENCARNACIÓN, R.; KENNE, L.; SAMUELSON. G.; SANDBERG, F. **Phytochemistry**, v.20, p.1939-1942, 1981
14. LAVAUD, C.; VOUTQUENNE, L.; MASSIOT, G.; LE MEN-OLIVIER, L.; DELAUDE, C. Saponines Triterpeniquês de *Smelophyllum capense*. **Bulletin de la Société Royale des**

Sciences de Liège, v.63, p.455 – 463, 1994.

15. KANG, S. S.; KIM, J. S.; KIM, Y. H.; CHOI, J. S. Saponin from *Patricia scabiosaefolia*. *J. Nat. Prod.* (1997), **60**, 1060-1062.
16. EKABO, O. A.; FARNSWORTH, N. R. Antifungal and Molluscicidal Saponins from *Serjania salzmaniana*. *J. Nat. Prod.* v. 59, p.431 – 435, 1996.
17. EKABO, O. A.; FARNSWORTH, N. R. Antifungal and Molluscicidal from *Serfania salzmanniana*. *J. N. T. Prod.* v.59, p. 431-435, 1985.
18. TRUTE, A.; GROSS, J. ; MUSTSCHLER, E.; NAHRSTED, A. *Planta Medica* v. 63, 125-129, 1997
19. LEE, K. T.; SOHN, C.; PARK, H. J.; KIM, D. W.; JUNG, G. O. ; PARK, K. Y. Essential Moiety for Antimutagenic and Cytotoxic of Hederagenin Monodesmosides and Bidesmosides Isolated from Stem Bark of *Kalopanax pictus*. *Planta Medica* v. 66, p.329-332, 2000.
20. PARK, H. J.; KWON, S. H. ; LEE, J. H. ; LEE, K. H.; MIYAMOTO, K. ; Lee, K. T. Kalopanaxsaponin A is a Basic saponin structure for the anti-tumoractivity of hederagenin monodesmosides. *Planta Medica* v. 67(2), p.118-121, 2001
21. DELMAS, F.; DI GIORGIO, C.; ELIAS, R.; GASQUET, M.; AZAS, N.; MSHVILDADZE, V.; DEKANOSIDZE, G.; DAVIS, P. T. Antileishmanial Activity of Three Saponins Isolated from Ivy, α -Hederin, β -Hederin and Hederacolchiside A₁, as Compared to Their Action on Mammalian Cells Cultured in Vitro. *Planta Medica* v. 66, p.343-347, 2000.
22. BARROSO, G. M. Sistemática de Angiosperma do Brasil, Viçosa - MG: Imprensa Universitária -p. 15-17, 1984.
23. JOLY, A. B. Introdução à Taxonomia Vegetal. 7.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.371-377, 1985.
24. SCHULTZ, A. R. Introdução ao estudo da botânica sistemática. 2ed. Porto Alegre: Ed. Da Livraria Globo, 1963.
25. HARBONE, J. B.; BUCKINGHAN, J.; BISBY, F. A. Phytochemical Dictionary of The Leguminosae. 1.ed., v.1-2., London: Chapman & Hall, 1994.
26. ABBIW, D. Useful plants of Ghana. Key Botanic Garden – Kew UK, 1990.
27. IKEDIABI, C. O. Amino and Fatty Composition of *Pentaclethra macrophylla* and *Treculia africana* Seeds. *JAOCS*, January, p.30 – 31, 1981.

27. JONES, A. C. ; ROBINSON, J. M.; SOUTHWEL, K. H. Investigation into *Pentaclethra macrophylla* seed oil: Identification of hexacosanoic (C26:O) and octacosanoic (C28:O) fatty acids. **J. Sci. Food Agric.** v.40, p.189-194., 1987.
28. SOKARI, T. G.; WACHUKWU, C. K.; Simple rapid processing of African oil bean seeds for ugba production. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.32 (1), p.77 – 79, 1997.
29. MBAJUNWA, O. K.; AKINGBALA, J. O.; MULONGOY, K.; OGUNTIMEIN, G. Starter culture evaluation for the production of ugba from African oil bean *Pentaclethra macrophylla*. **J. Sci. Food. Agric.**, v.77(1), p.127 – 132., 1998.
30. MORAH, F.N. I. Physicochemical properties of lipids extracted from four tropical sements. **Global J. Pure Appl. Sci.**, v. 4(3), p.259 – 262, 1998.
31. ONYEIKE, E. N.; ONWUK, O. Chemical composition of some fermented vegetable seeds used as soup condiments in Nigéria east of the Niger. **Global J. Pure Appl. Sci.**, p.5(3), 337 – 342, 1999.
32. ISU, N. R.; ABU, G. O. An evaluation of the effect of Bacillus cells and Bacillus spores in association with cowpea granules as starter cultures for the fermentation of African oil bean (*Pentaclethra macrophylla*) to ugba. **Plant. Foods. Hum. Nutr.** v.55(2), p.127 – 138, 2000.
33. ISU, N. R. ; OFUYA, C. O . Improvement of the traditional processing and fermentation of African oil bean (*Pentaclethra macrophylla*) in a food sack – ugba. **Intern. J. of Food Micr.**, v.59, p.235-239, 2000.
34. MBADIWE, E. I. . **Phytochemistry**,. v.14(5-6), p.1351-1354, 1975.
35. 27. WELTER, A. ; JADOT, J. **Phytochemistry**, v.14(5-6), p.1347-1350, 1975
36. KRAUS, G. I. ; REINBOTHE, H. **Phytochemistry**, v.12, p.15-142., 1973.
37. MBADIWE, E. I. . **Phytochemistry** , 12, p. 2546-2546, 1993
38. BYLA, B.; HERTZ, W. Triterpenes and 1-(w-Hidroxyceatyl) Glycerols from *Pentaclethra eetveldeana* root bark. **Phytochemistry**, v.42 (2), p.501-504, 1996.
39. British Guiana Woods as Paper Making. **II Anon. Bull. Imp. Inst.** v.26, p.4-17, 1928
40. Trinidad Woods as Paper Making Materials. **II Anon. Bull. Imp. Inst.**, v.11, p.1-12, 1932
41. MARKEY, K. S. Fat and oil and resources and industry of Brazil. **Econ. Botanic.**, v.11,

- p.91-125, 1957.
42. LAGO, R. C. A.; **Bol. Tec. Cent. Tecnol. Agric. Aliment.**, v.14, p.1-16, 1980.
 43. WALTER, C.A.; BIEN, A. **Oecologia**, v.80(1), p.27-31, 1989.
 44. OBERBAUER, S. F.; STRAIN, B.R. **Am. J. Bot.**, v.73(3), p.409-416, 1986.
 45. WILLIAMSON, G. B.; COSTA, F. **Biotropica**, v.32(3), p.548-552, 2000.
 46. OBERBAUER, S. F.; STRAIN, B.R. **Oecologia**, v.71(3), p.369-374, 1987
 47. DA SILVA, J. O. Avaliação do efeito o extrato de *Pentaclethra macroloba* sobre as atividades letal e miotóxica induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox.*, 2001, Dissertação de Mestrado – USP – Ribeirão Preto,
 48. CHEN, R.; SCHUBERT, K. R. Plant interaction with other organisms. **Plant Biology**, p. 898, 2000
 49. BRUNETON, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales. 2 ed. Paris: Lavoisier, 1993.
 50. COSTA, A. F. Farmacognosia. 2ed. V.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.
 51. CHANDEL, R. S.; RASTOGI, R. S. **Phytochemistry**, v.19, p.1889-1908, 1980
 52. DAS, M. C.; MAHATO, S. B. **Phytochemistry**, v.22 (5), p.1070-1095, 1983
 53. KAPOOR, V.K.; CHAWLA, A.S. **J. Sc. Ind. Res.**, v.45 , p.503-511, 1986.
 54. MAHATO, S. B.; PAL, B.C.; PRICE, K. R. **Phytochemistry**, v.28(1), p.207-210, 1989
 55. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. **Phytochemistry** , 30, p. 3864-3874, 1991.
 56. KLOOS, H.; McCullough, F.S. **Planta medica**, v.46 , p.195-208, 1982.
 57. HERBERT, R. B. The Biosynthesis of Secondary Metabolites. New York: Chapman and Hall, 1981.
 58. SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 1999.
 59. ABE, I.; ROHMER, M.; PRESTWICH, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. **Chem. Rev.**, v.93, p.2189-2206, 1993.

60. KENNEDY, J. F. Carbohydrate chemistry. New York: Clarendon Press – Oxford, 1988.
61. SHALLENBERGER, R. S.; BIRCH, G. G. Sugar Chemistry. Connecticut.: The Avi Publishing, 1975.
62. PIGMAN, W.; HORTON, D. The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry. 2ed. v.1, New York: Academic Press, Inc., 1972.
63. SCHOPKE, T. H.; HILLER, K. Triterpenes saponins. **Pharmazie**, v.45(5), p.313-342, 1990.
64. HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Chemistry and Pharmacology of Natural Products: saponins. Cambridge University Press, 326-327, 1995.
65. MAHATO, S. B.; NANDY, A. K. **Phytochemistry**, v.30 (5), p.1357 – 1390, 1991.
66. HARIHARAN, V.; RANGASWAMI, S. **Phytochemistry**, v.9, p.409 – 414, 1970
67. LEMOS, T. L. G.; SOUSA, M. P.; MENDES, A. L.; FILHO BRAZ, R. New saponin from *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, v.15 (6), p.515 -517, 1992.
68. SEO, S. T.; TORI, K.; YOSHIMURA, Y. **J. Am. Chem. Soc.**, v.100, p.3331 – 3339, 1978.
69. GAFNER, F.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. **Helv. Chim. Acta**, 68, 555, 1985.
70. HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; FUJIOKA, T.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T. **Phytochemistry**, v.26, p.229 – 235, 1987.
71. HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T. **Phytochemistry**, v.27, p.1165–1168, 1988.
72. OKABE, H.; NAGAO, T.; HACHIYMA, T. **Chem. Pharm. Bull.**, v.37, p.895, 1989.
73. AZEVEDO, D. A.; NETO AQUINO, F. R. **Química Nova**, v.14(4), 262-271, 1991.
74. PLOCK, A.; BEYER, G.; HILLER, K.; GRUNDEMANN, E.; KRAUSE, E.; MANFRED, N.; Wray, V. **Phytochemistry**, v.57, p.489-496, 2001.
75. MARATTO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v.37(6), p.1517-1575, 1994.
76. RAHMAN, A. U.; SHAHWAR, D.; CHOUDHARY, M. I.; SANER, B.; TOKER, G.; BASER, K. H. C. Triterpenoids Saponins from *Bongardia chrysonum*. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.251–253, 2000.

77. ISHI, H.; KITAGAWA, I.; MATSUSHITA, K.; SHIRAKAWA, K.; TORI, K.; TOZYO, T.; YOSHIKAWA, M. **Tetrahedron Lett.**, v.22, p.1529 – 1532, 1981.
78. BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v.42, p.193-225, 1984.
79. AGRAWAL, P. K. **Phytochemistry**, v.31(10), p.3307-3330, 1992.
80. MATOS, F. J. A. *Introdução a fitoquímica experimental*. Fortaleza: EUFC, 1988.
81. SRIVASTAVA, S. K.; JAIN, D. C. **Phytochemistry**, v.28 (2), p.644-647, 1988.
82. LAVAUD, C.; CRUBLET, M. L.; POUNY, I.; LITAUDON, M.; SÉVENET, T. **Phytochemistry**, v.57, 469-478, 2001.
83. HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L. The search for biological active secondary metabolites. **Pestic. Sci.**, v.51, p.471-482, 1997.
84. MILITÃO, J. S. L. Identificação com auxílio de computador: triterpenos de *Vochysia pyramidal* Mart., 1996, Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
85. HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Search for new anti-fungal compounds from higher plants. **Pure & Appl. Chem.**, v.66, p.2231., 1994.
86. FAVEL, A. ; STEINMETZ, M.D.; REGLI, P.; VIDAL-OLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. **Planta Medica**, v.60(1), p.50-53, 1994.
87. CEPLEANU, F.; HAMBURGER, M.; SONDAT, B.; MSONTHI, J. D.; GUPTA, M. P.; SAADOU, M.; HOSTETTMANN, K. Screening of tropical medicinal plants for molluscidal, larvicidal, fungicidal and activities and brine toxicity. **Int. J. Pharmacogn.**, v.32, 294-307, 1994.
88. KONISHI, M.; HANO, Y.; TAKAYAMA, M.; NOMURA, T.; HAMZAH, A. S.; AHMAD, R.; JASMANI, H. Triterpenoid saponins from *Hedyotis Nudicaulis*. **Phytochemistry**, v.48(3), p.525-528, 1998.
89. BEDIR, E.; KIRMIZIPEKMEZ, H.; STICHER, O.; CALIS, I. Triterpene saponins from fruits of *Hedera Helix*. **Phytochemistry**, v.53, p.905-909, 2000.
90. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p.3864-3874, 1991.

91. CONSOLI, R. A. G.; LOURENÇO, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994, 225.
92. FINNEY, D. J. Probit Analysis. 3 ed. Cambridge University Press, 1971, 76.
93. CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants, **Ethnopharmacology**, v.72(1-2), p.185-189, 2000.
94. DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
95. RADOSEVICH, M. B.; DELFIEL, N. E. **Journal of Chromatography**, v.368, p.433 – 438, 1986.
96. DUMON, B.; DORSAZ, A. C.; HOSTETTMANN, K. High Performance liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v.315, p.441-446, 1984.
97. SLACANIN, I.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Journal of Chromatography**, v.448, p.2665-274, 1988.
98. OLESZEK, W.; JURYSTA, M. **Journal of Chromatography**, v.519, p.109-116, 1990.
99. PARK, I. S.; KANG, E. M.; Kim, N. **Journal of Chromatography Science.**, v.38, p.229-233, 2000.
100. GAIDI, G., MYAMOTO, T.; RUSTAIYAN, A.; LAURENT, V.; DUBOIS, M. A. L. **J. Nat. Prod.** v. 63, p.1495-1502, 2000.
101. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1997.
102. FURMAN, W. B.; LAYLOFF, T. P.; TETZLAFF, R. F. Validation of computerized liquid chromatographic systems. **J. AOAC**, v. 77(5), p.1314-1318, 1984.

ANEXOS

ESPECTROS DE PES-F1 (1)

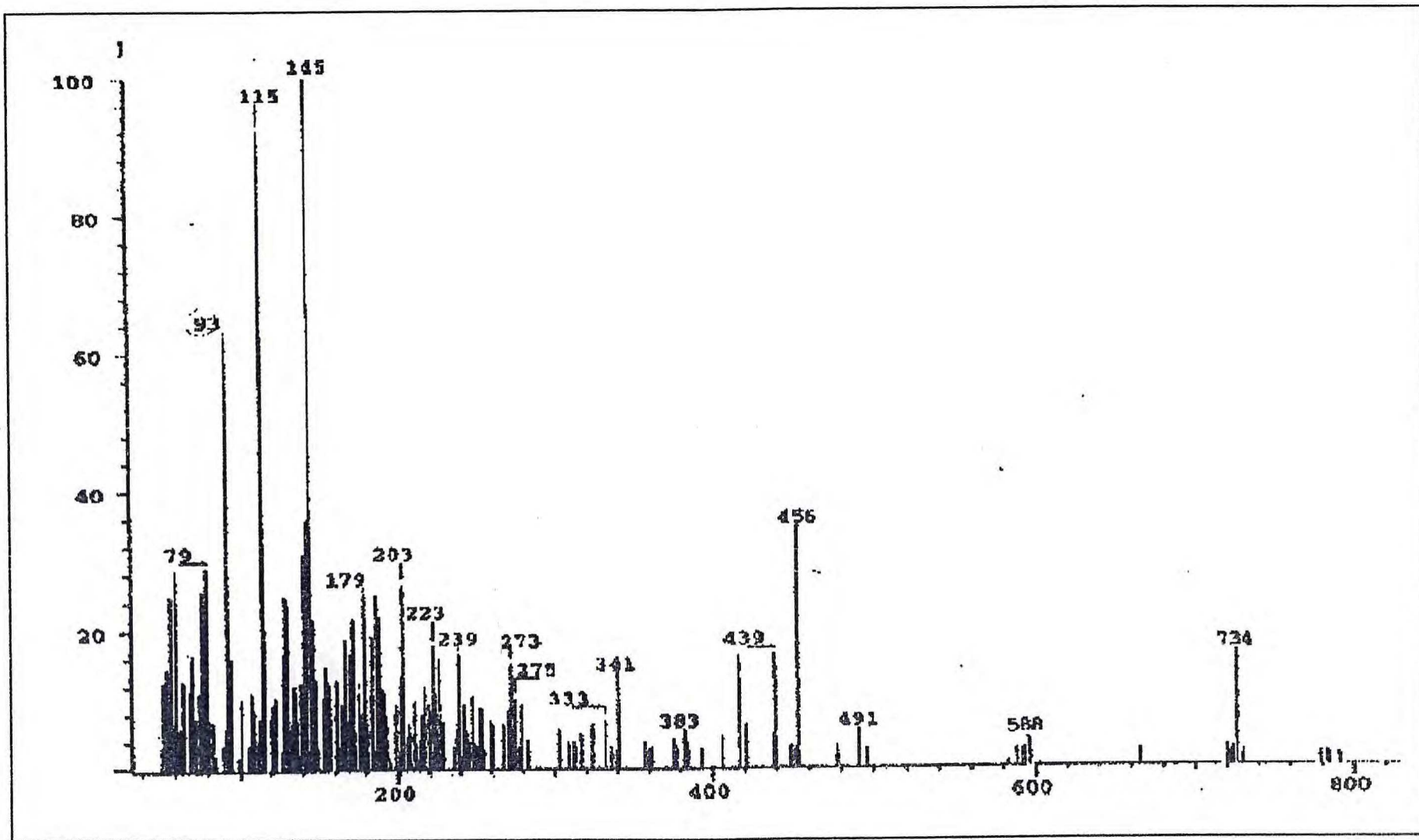


Figura 04 - Espectro de massas por bombardeamento rápido de átomos (íons positivos) - FAB de PES-F1 (1)

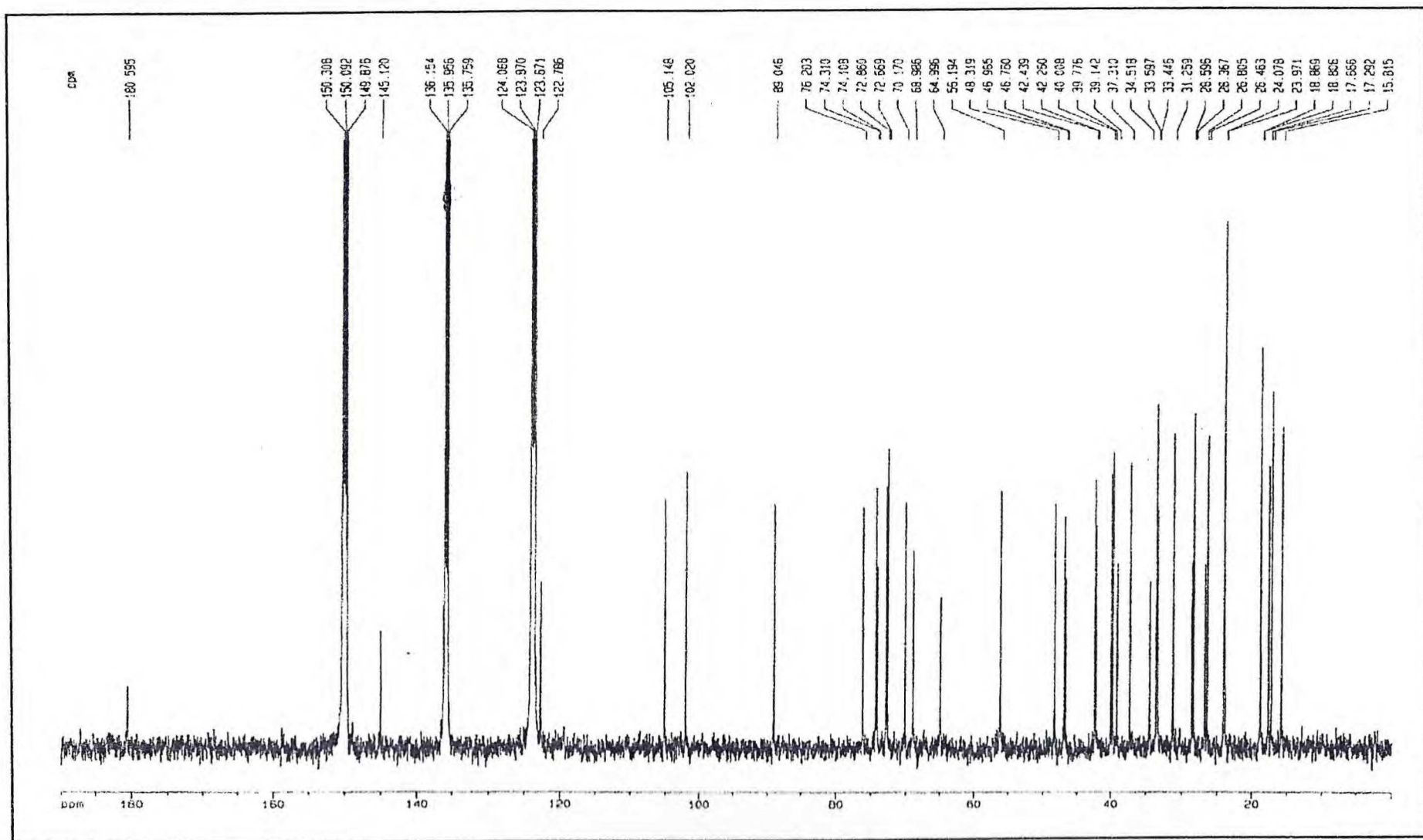


Figura 05 - Espectro de RMN ^{13}C – HBBD ($\text{C}_3\text{D}_3\text{N}$, 125 MHz) de PES-F1 (1)

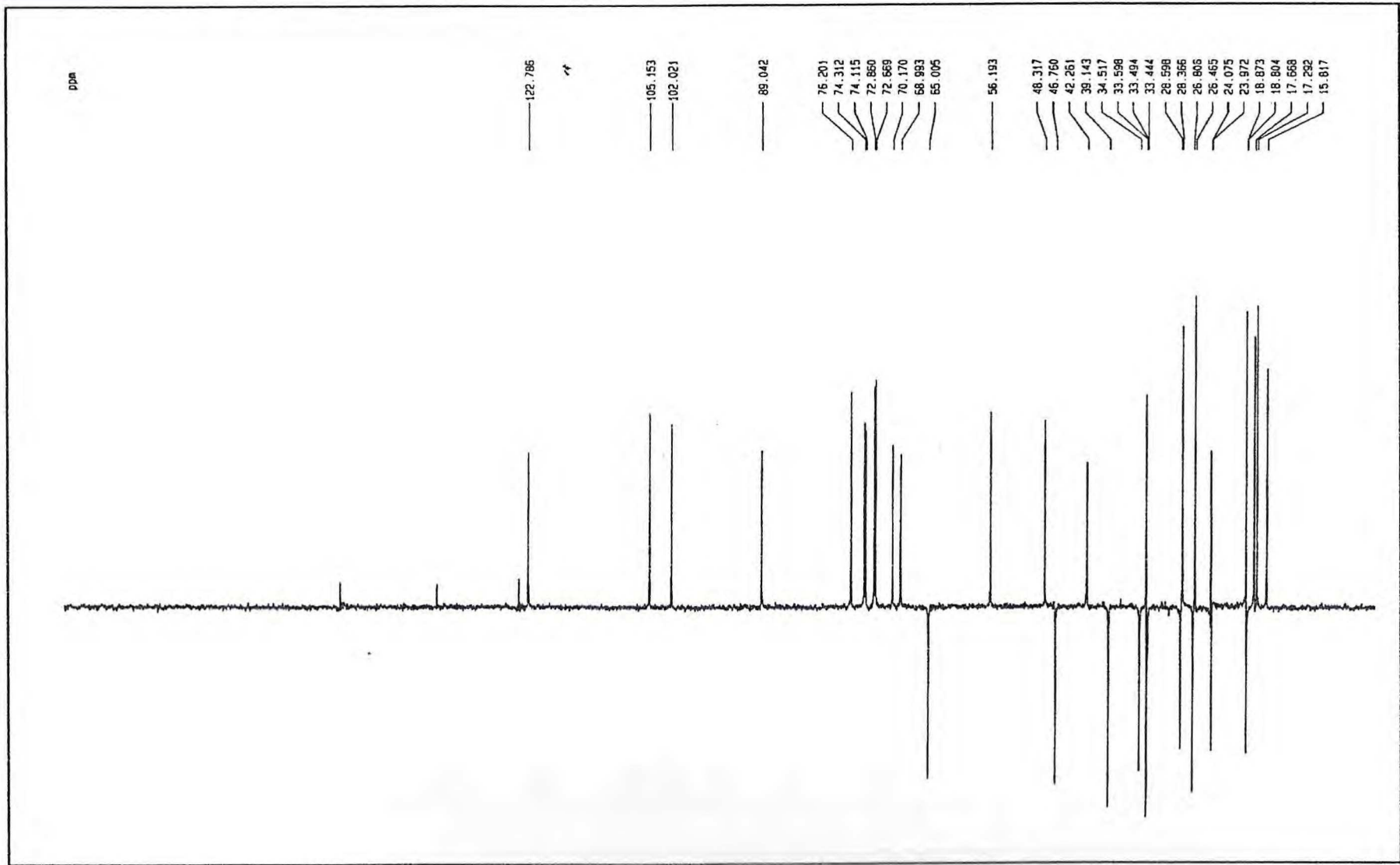


Figura 06 - Espectro de RMN ¹³C – DEPT (C₃D₅N, 125 MHz) de PES-F1(1)

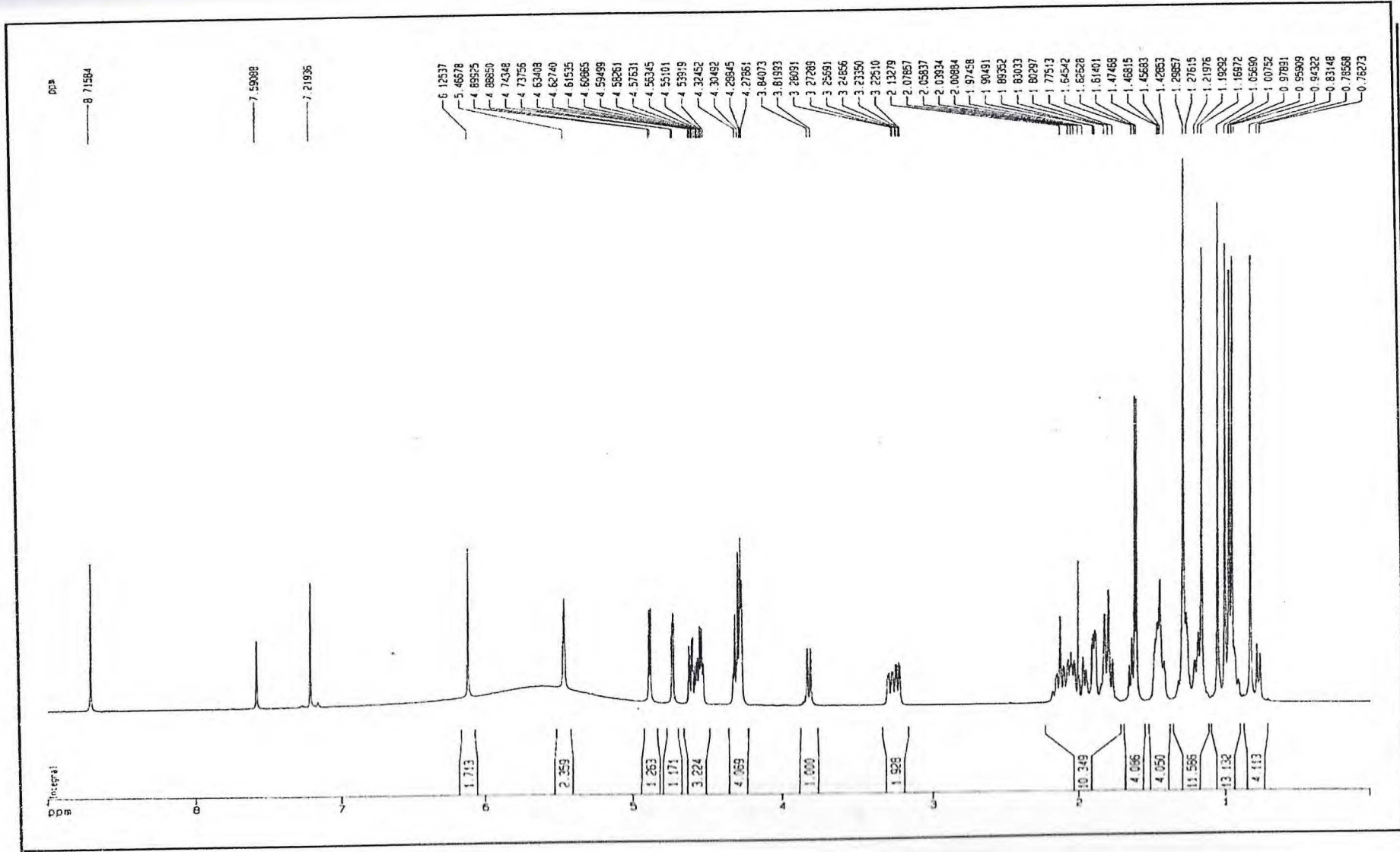


Figura 07 - Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N, 500 MHz) de PES-F1 (1)

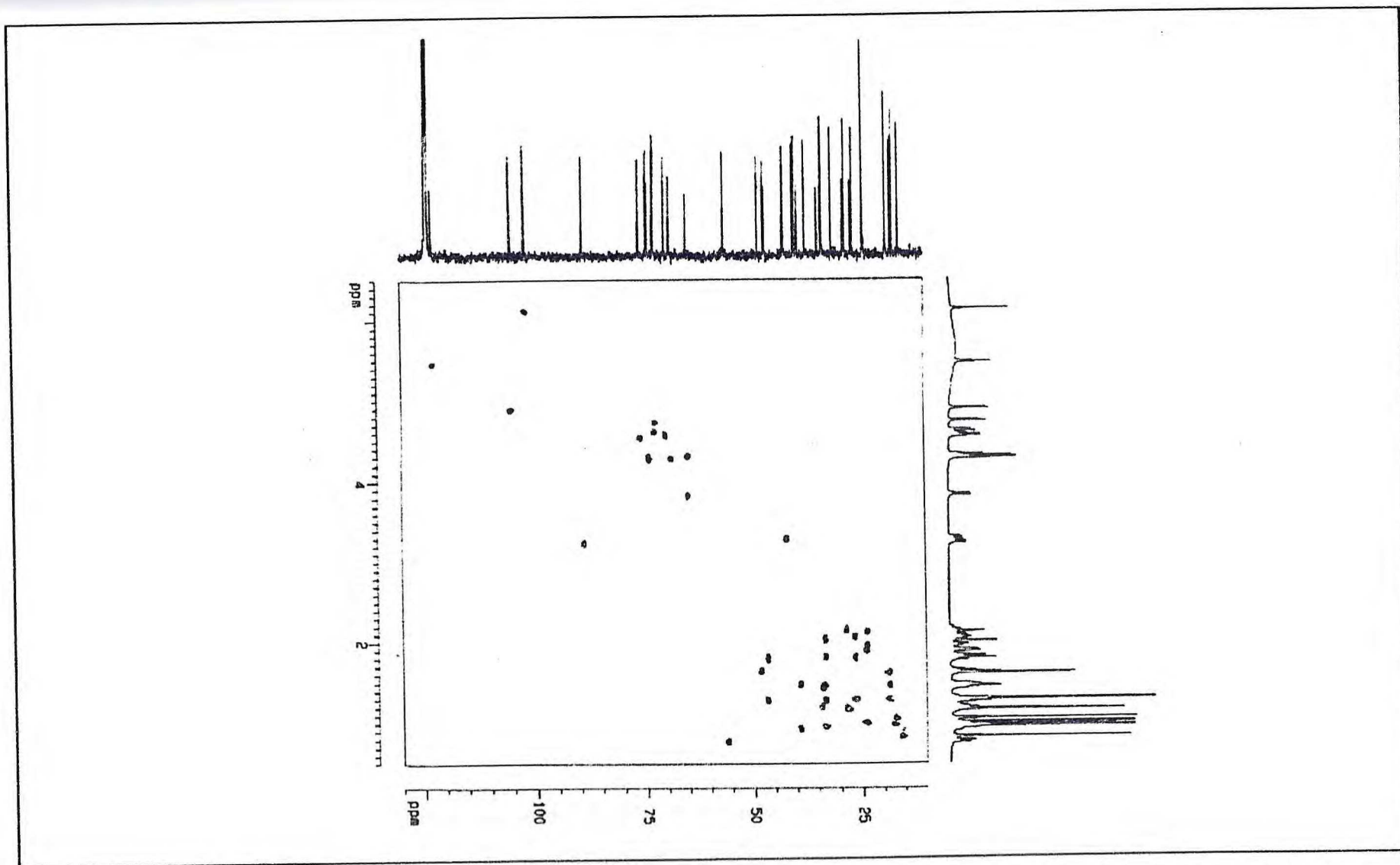


Figura 08 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F1(1)

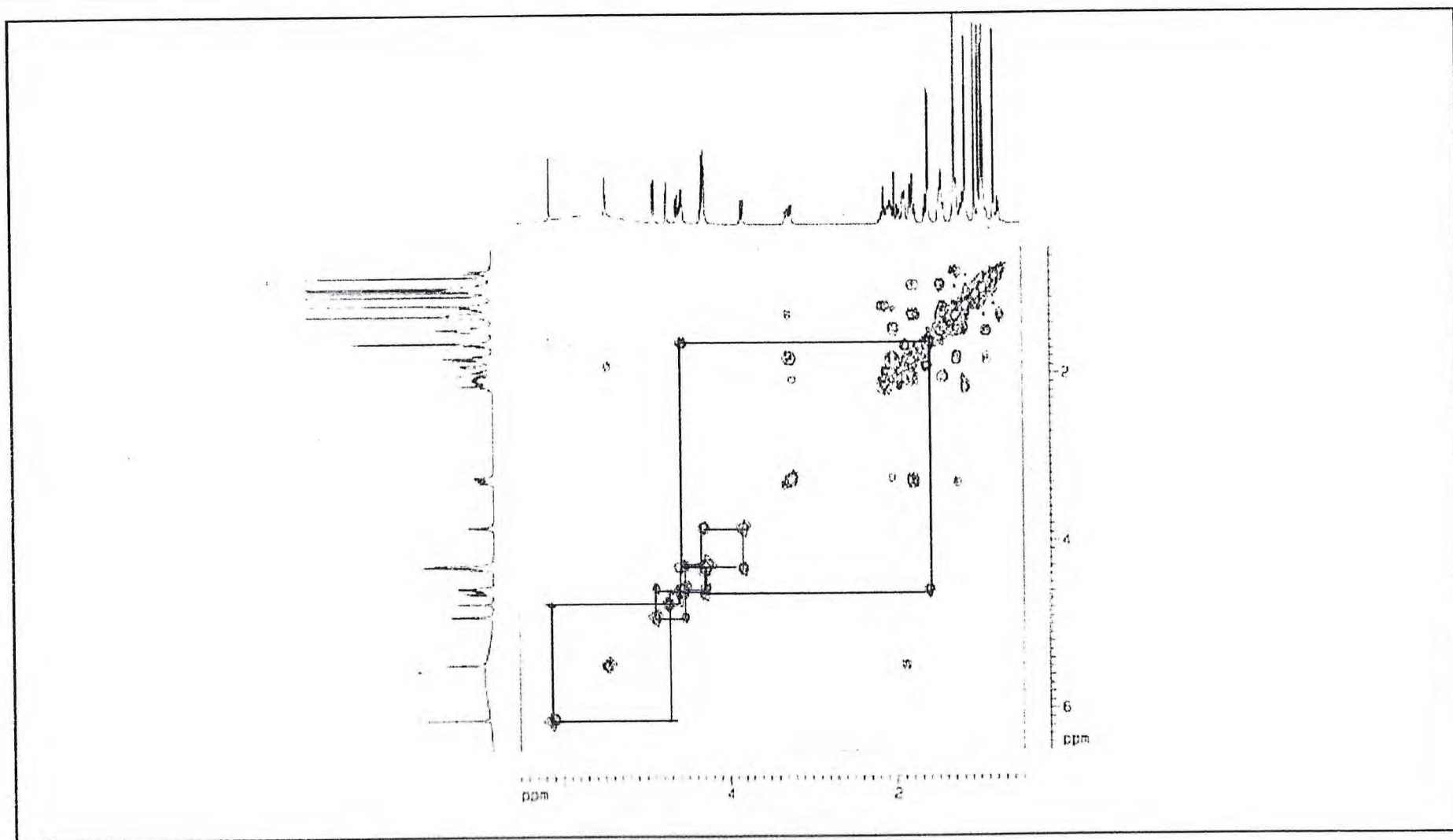


Figura 09 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (500 MHz x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PES-F1(1)

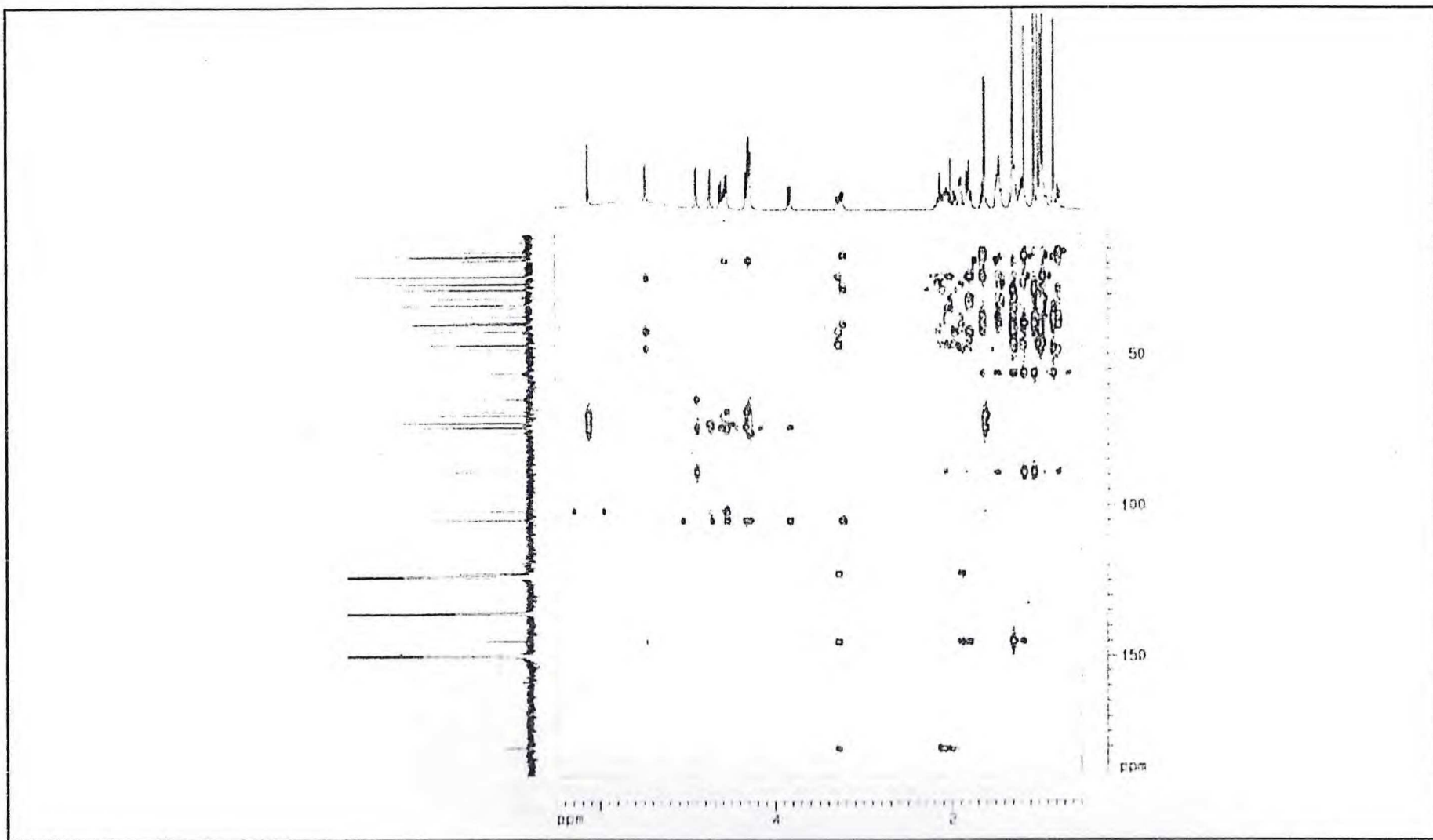


Figura 10 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F1(1)

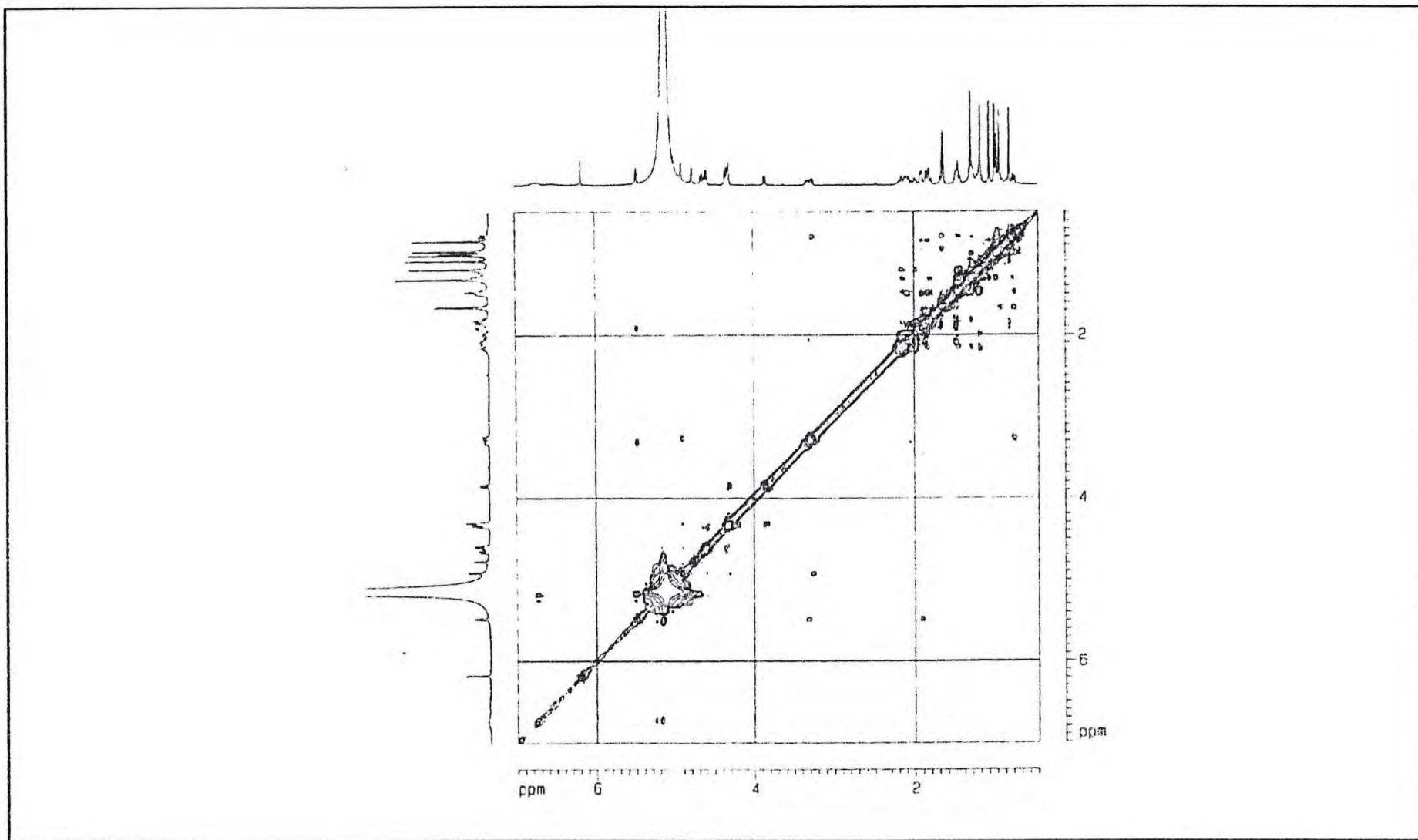


Figura 12 - Espectro (expansão) de RMN ¹H - NOESY (500 MHz x 500 MHz, C₅D₅N) de PES- F1 (1)

Espectros de PES-F2 (2)

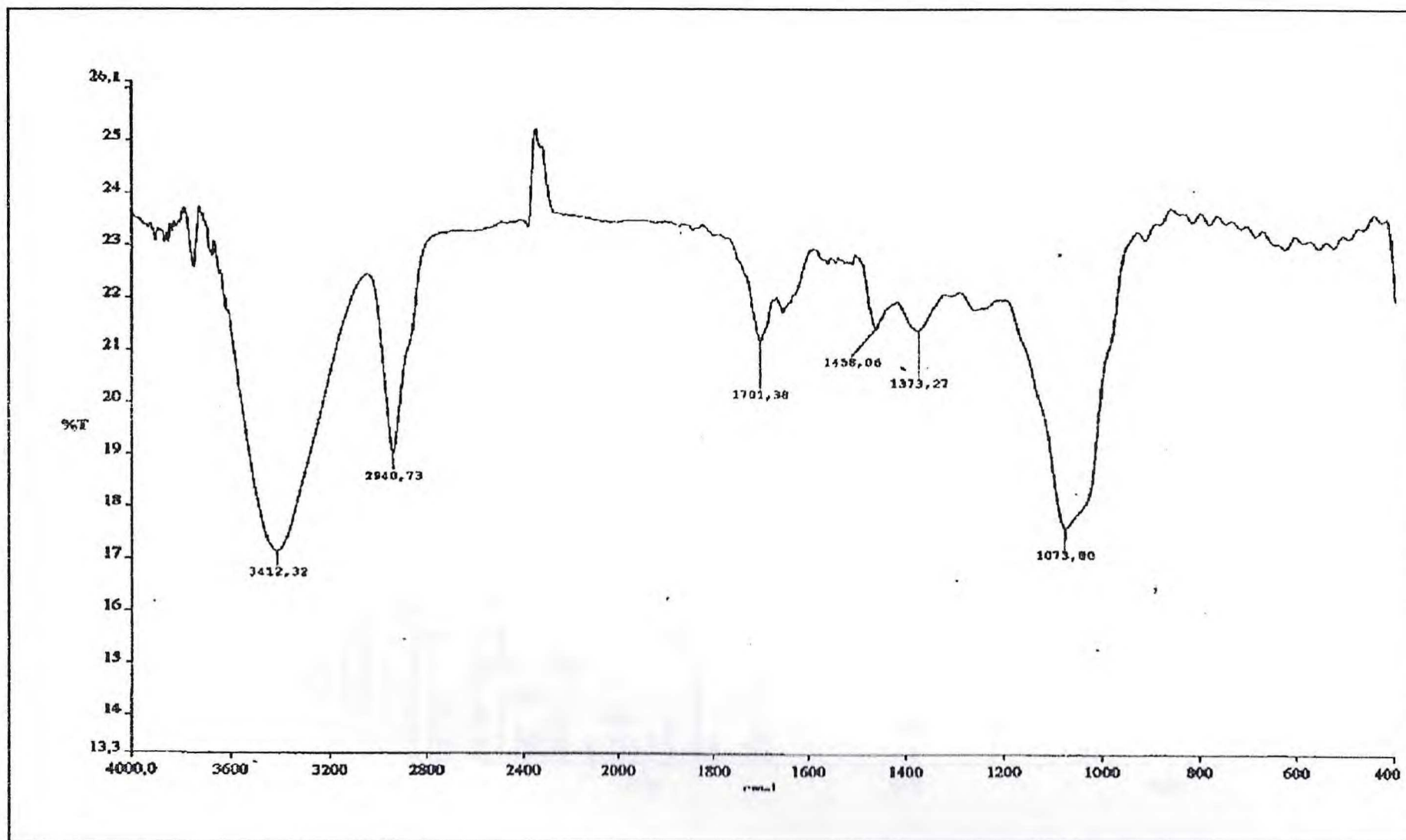


Figura 13 - Espectro na região de infravermelho – IV (KBr) de PES-F2 (2)

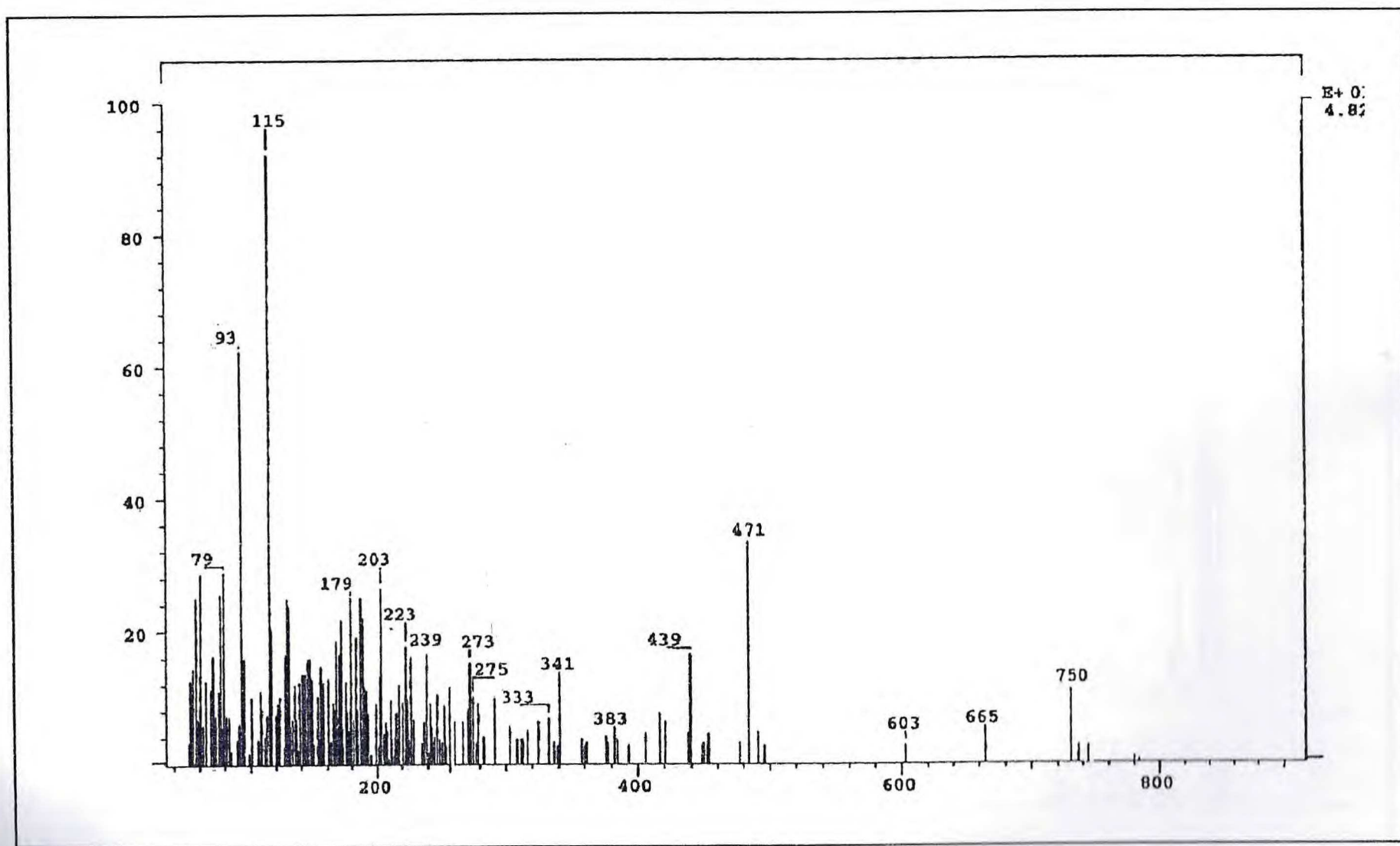


Figura 14 - Espectro de massas por bombardeamento rápido de átomos – FAB (íons positivos) de PES-F2 (2)

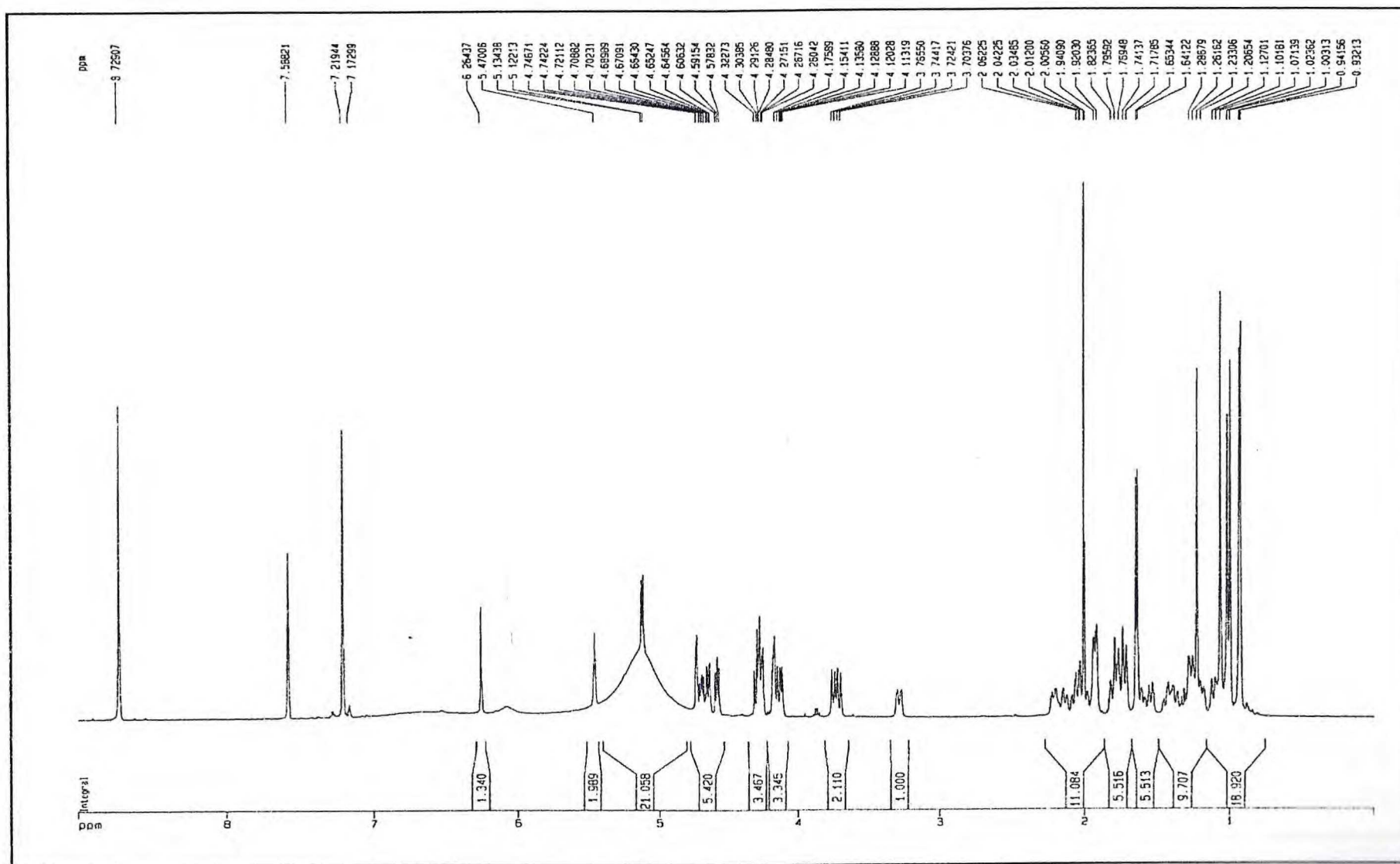


Figura 15 - Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N - 500 MHz) de PES-F2 (2)

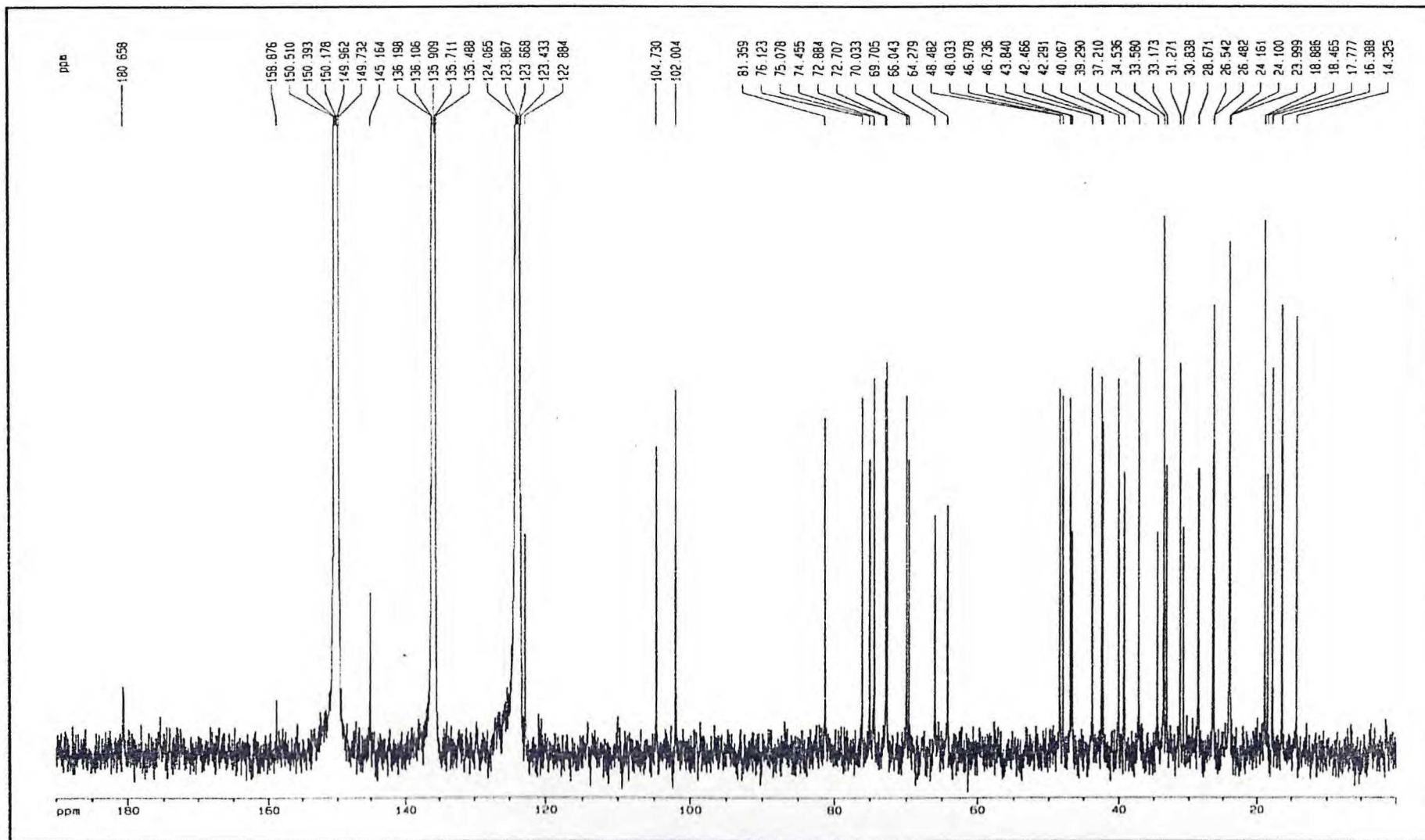


Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F2 (2)

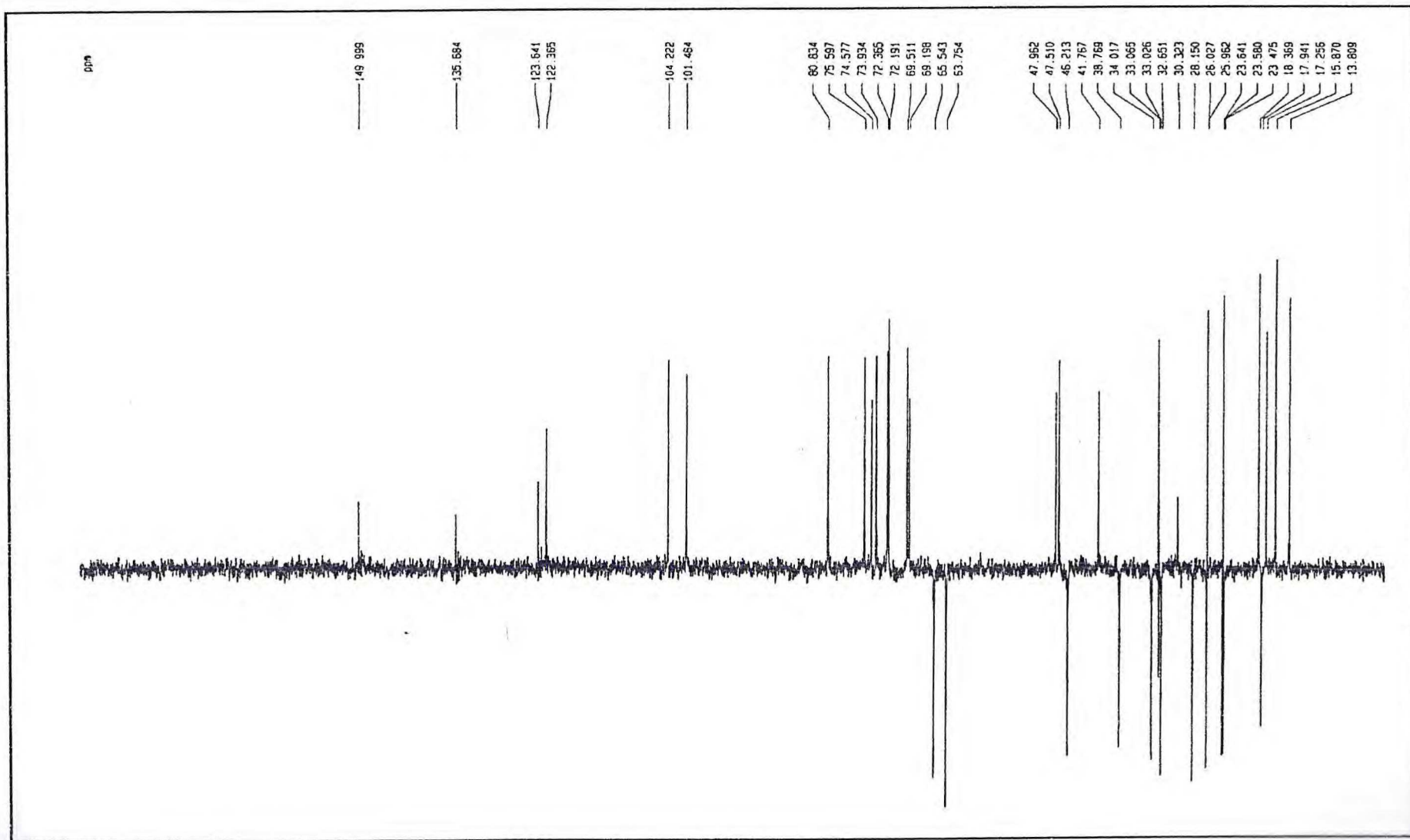


Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PES-F2 (2)

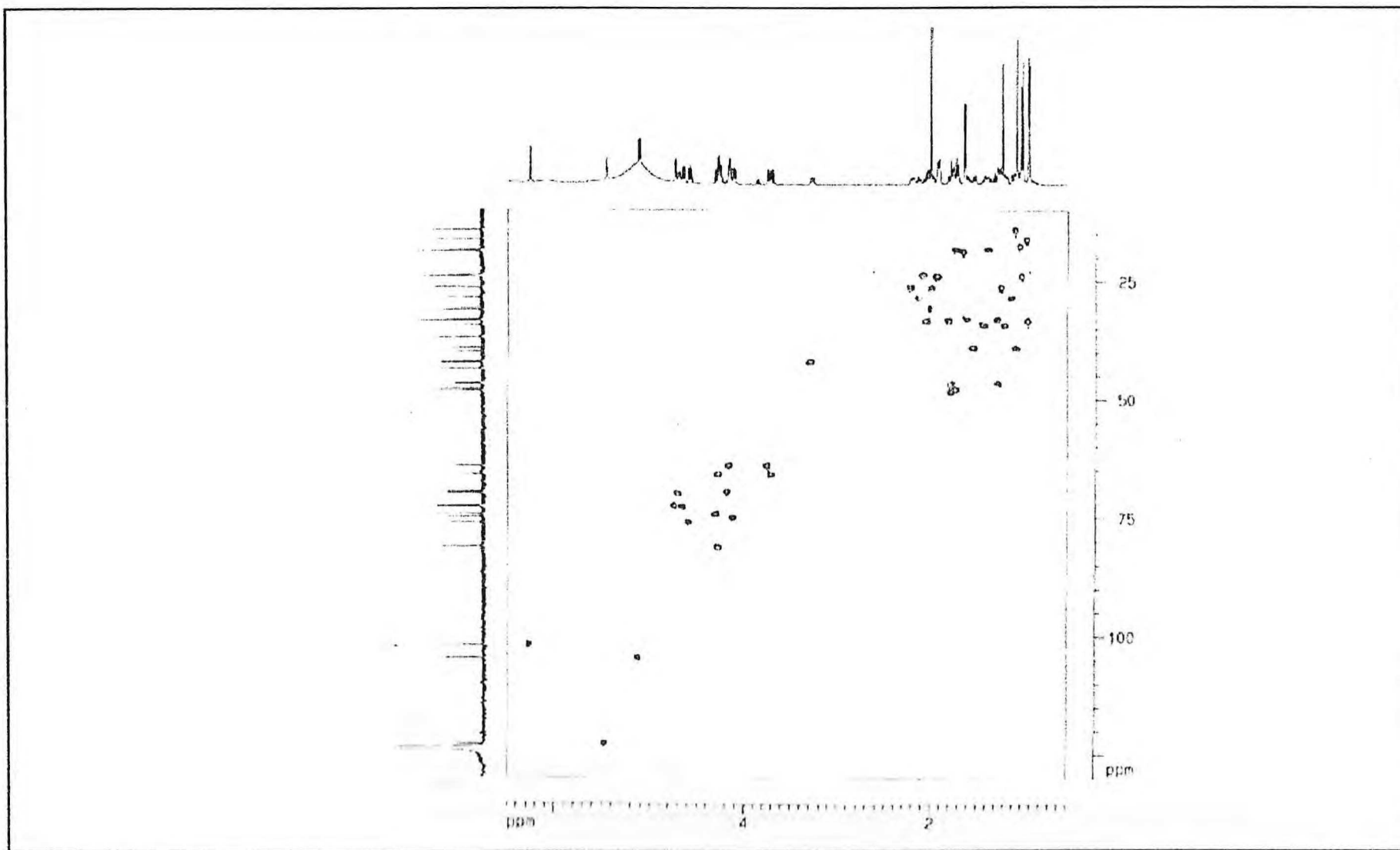


Figura 18 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_3\text{D}_3\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2).

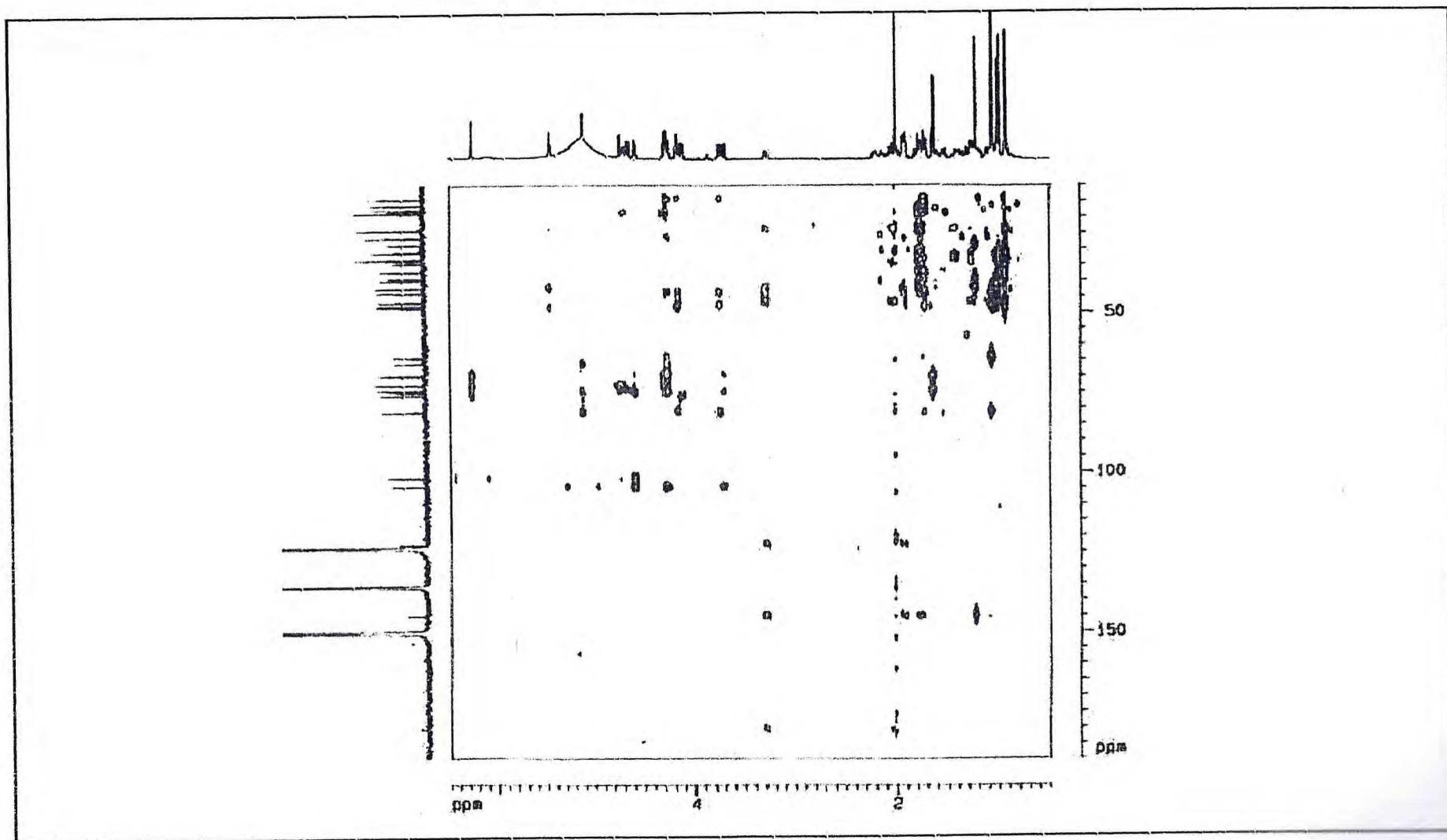


Figura 19 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2).

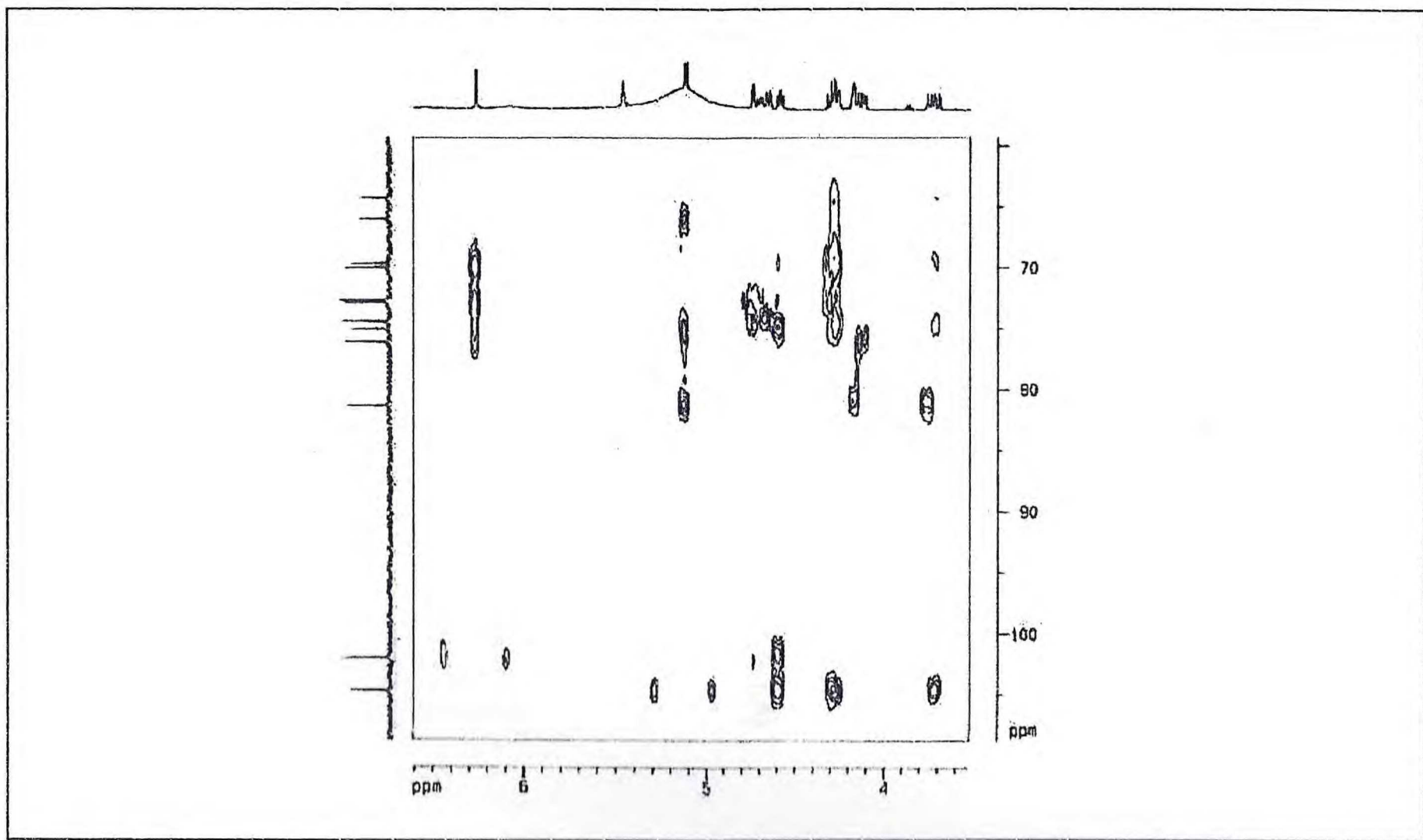


Figura 19 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PES-F2 (2).

Espectros de PEC-76 (3)

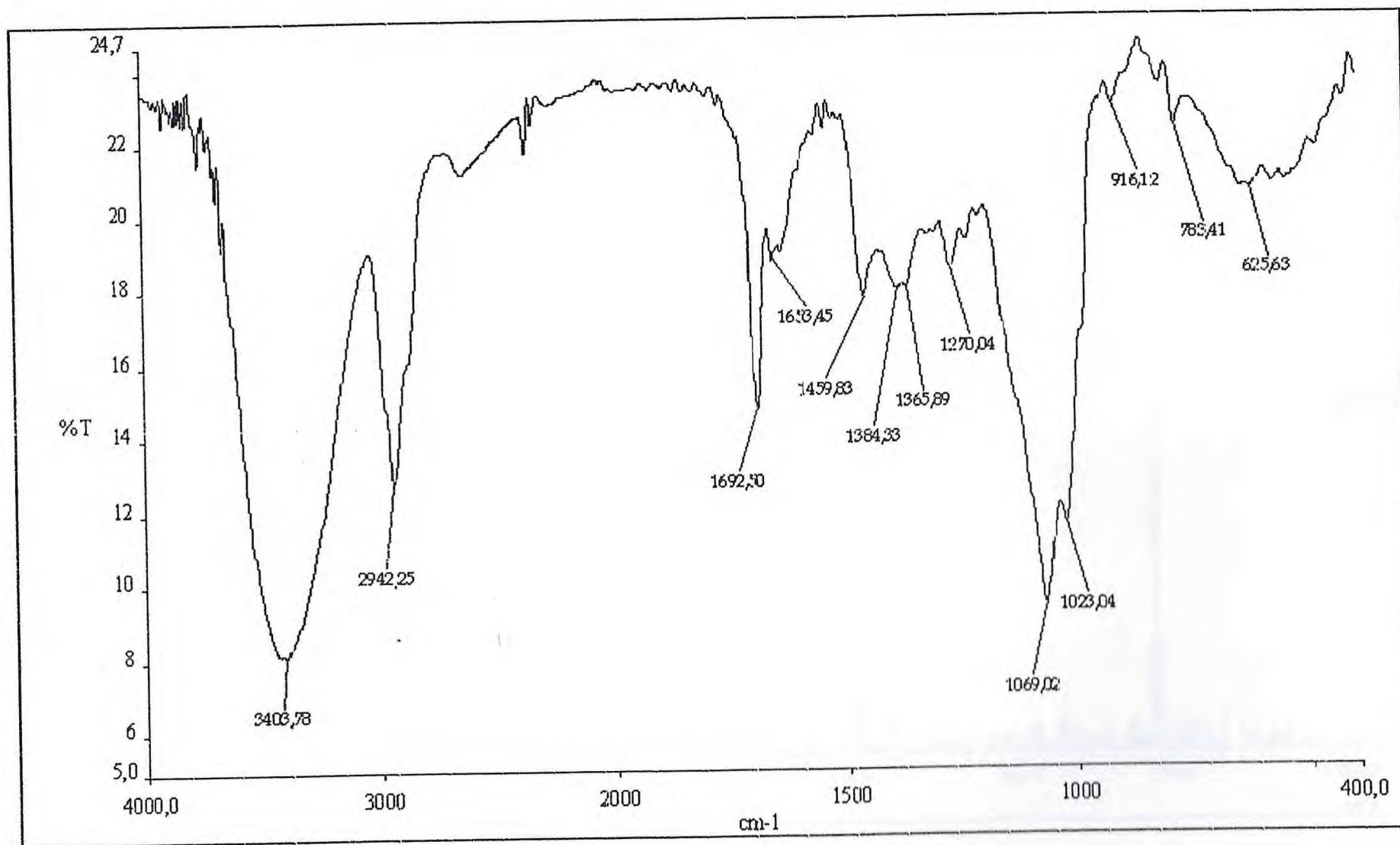


Figura 21 - Espectro na região de infravermelho da substância PEC-76 (3).

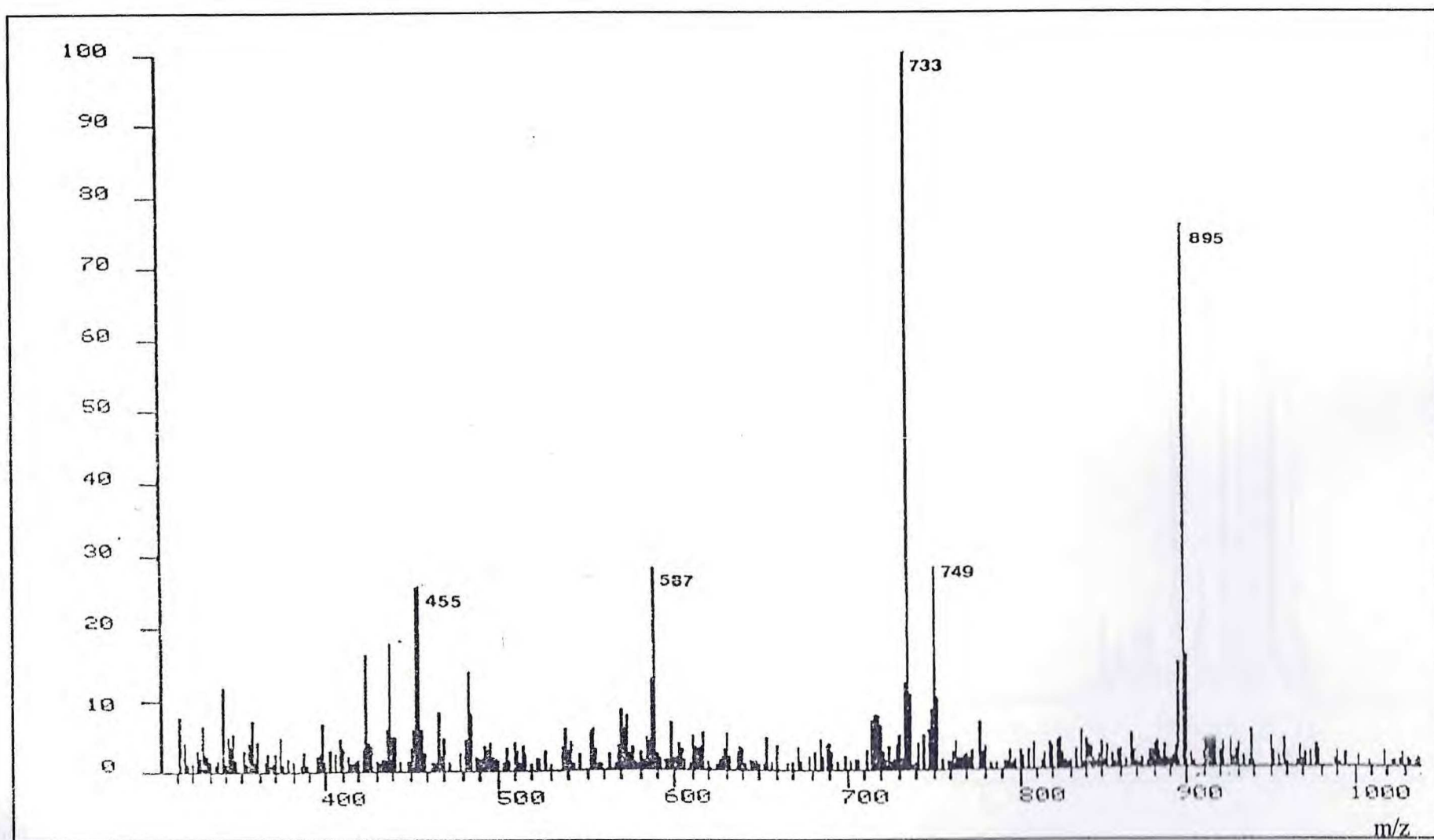


Figura 22 - Espectro de massa por bombardeamento rápido de átomos (íons negativos) da substância PEC-76 (3).

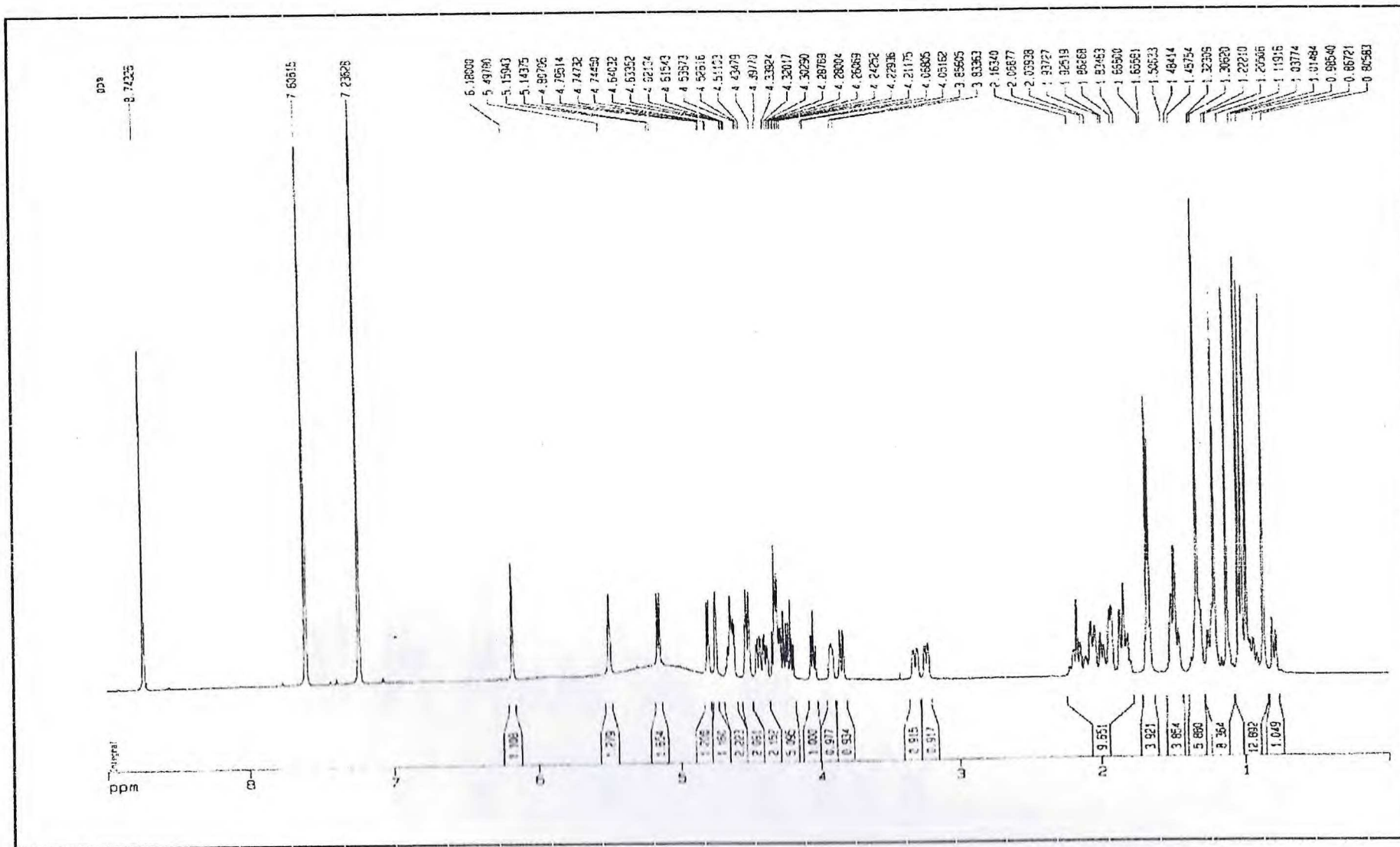


Figura 23 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₃D₃N) de PEC-76(3).

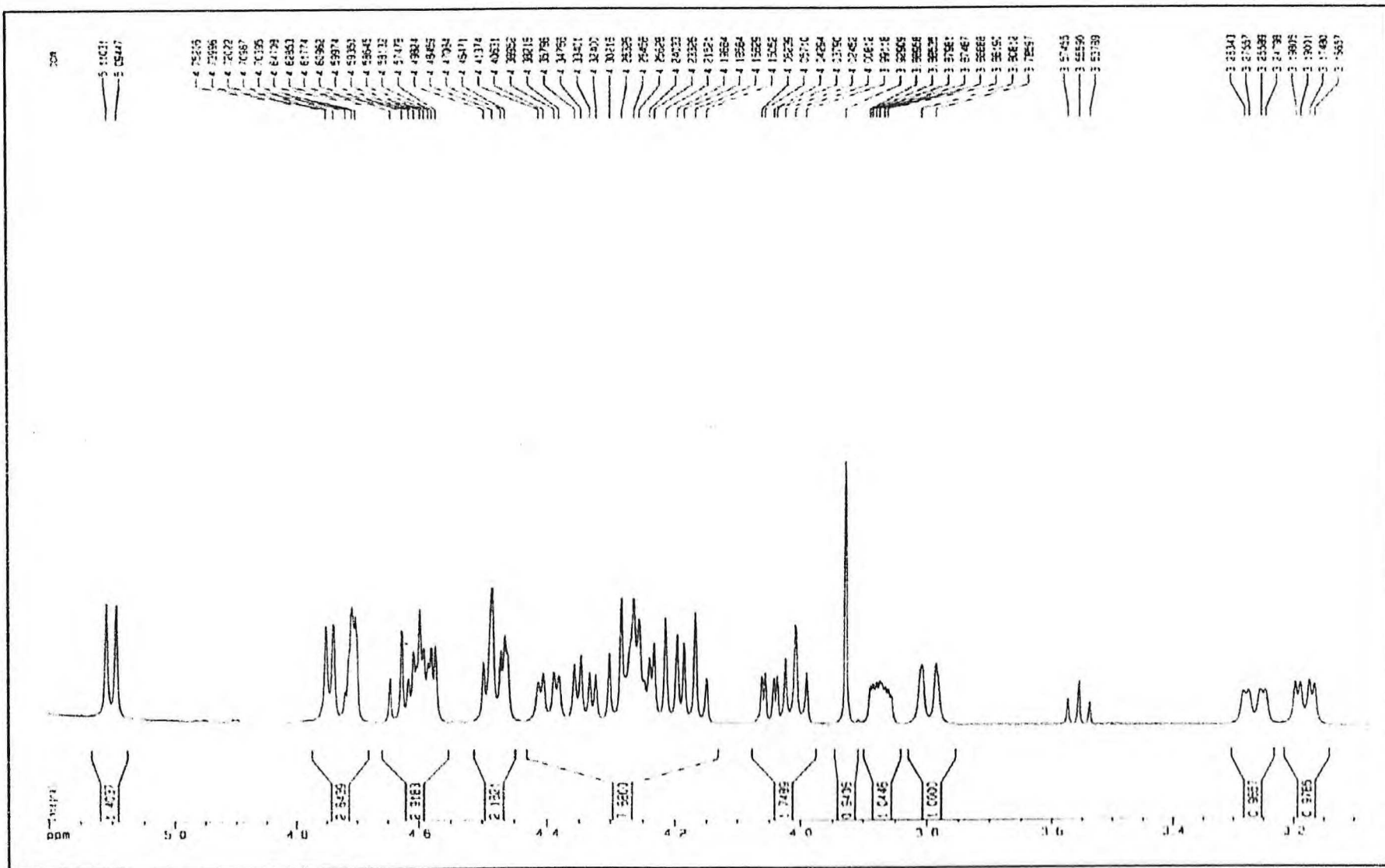


Figura 23 - Espectro (expansão) de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-76(3).

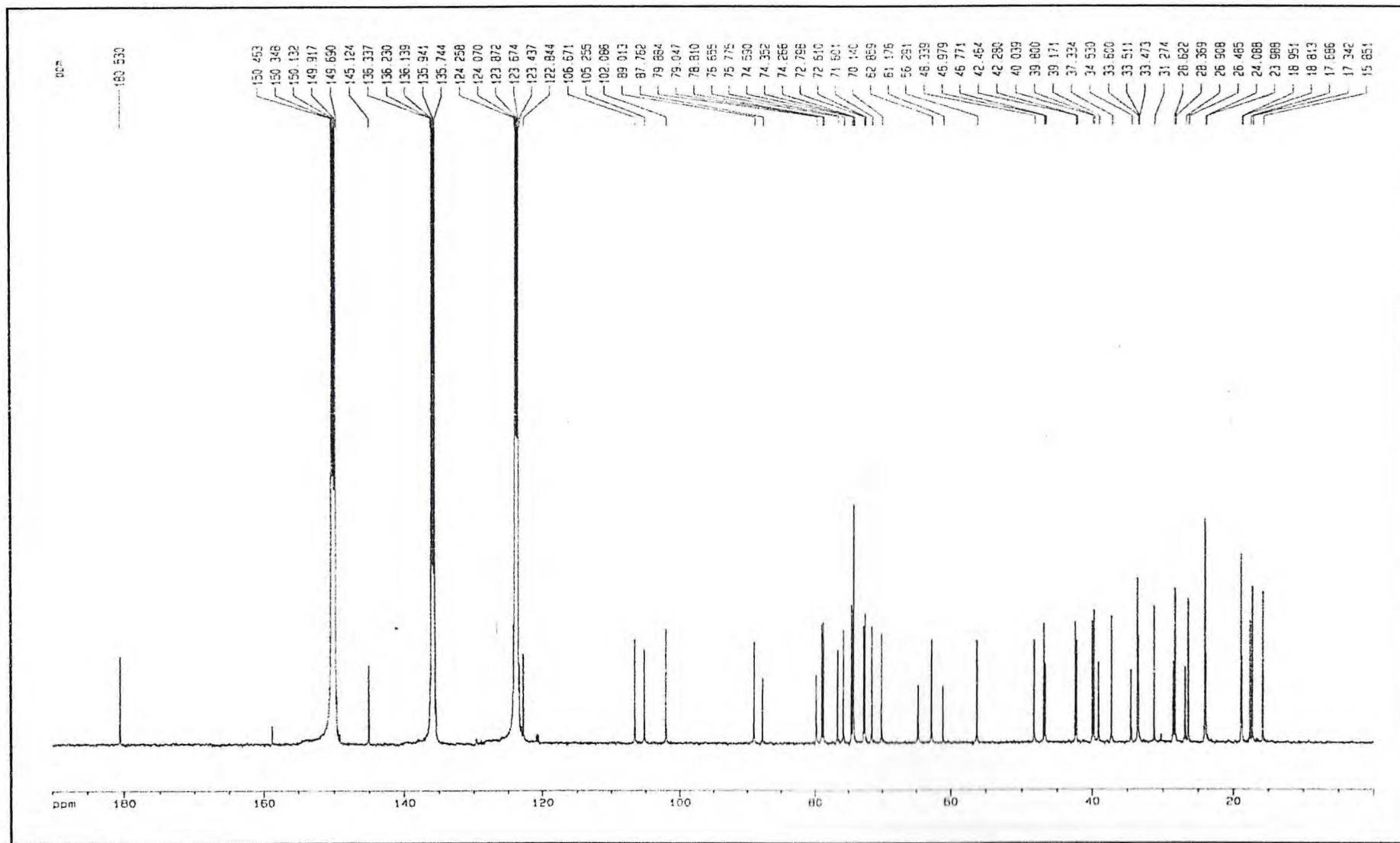


Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C - HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-76 (3)

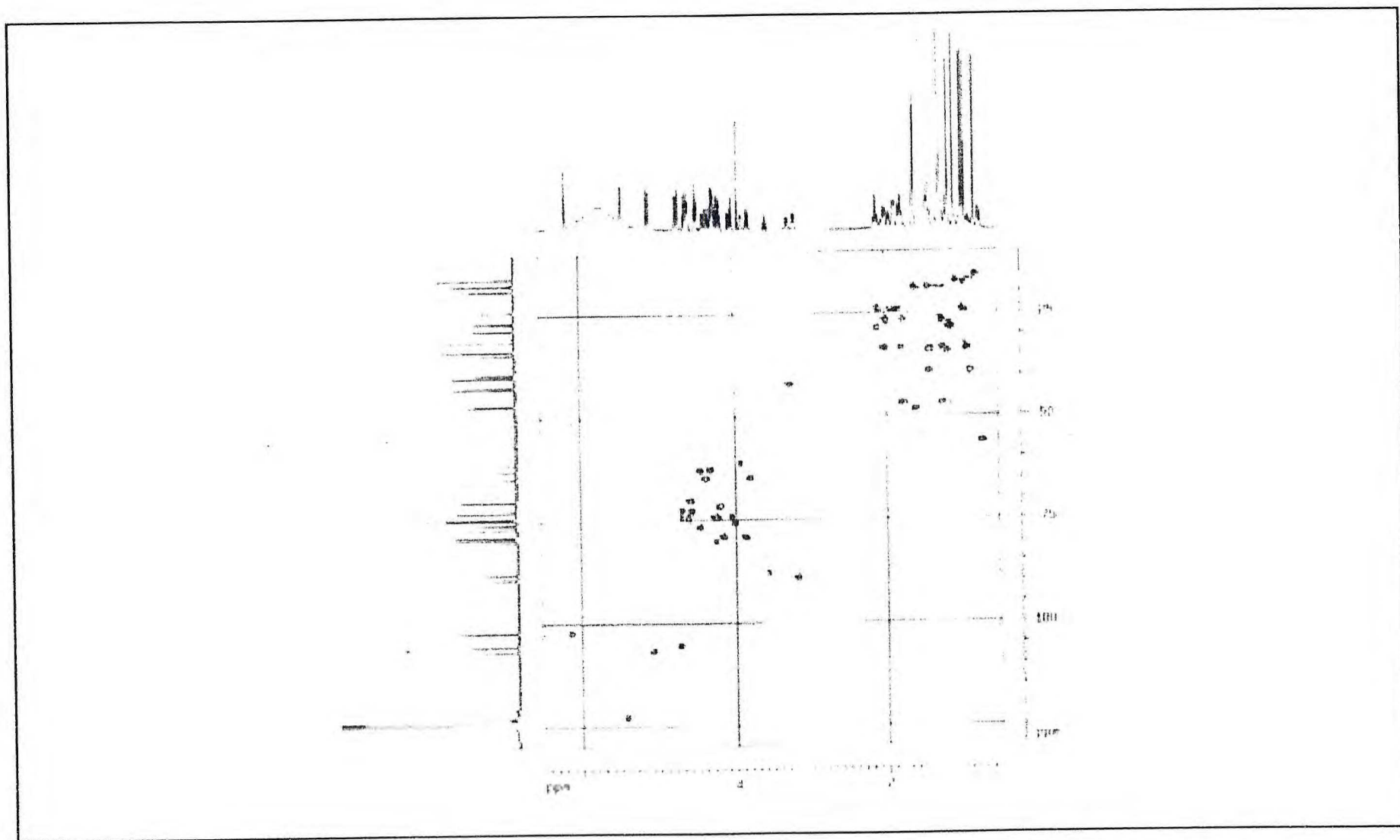


Figura 25 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3)

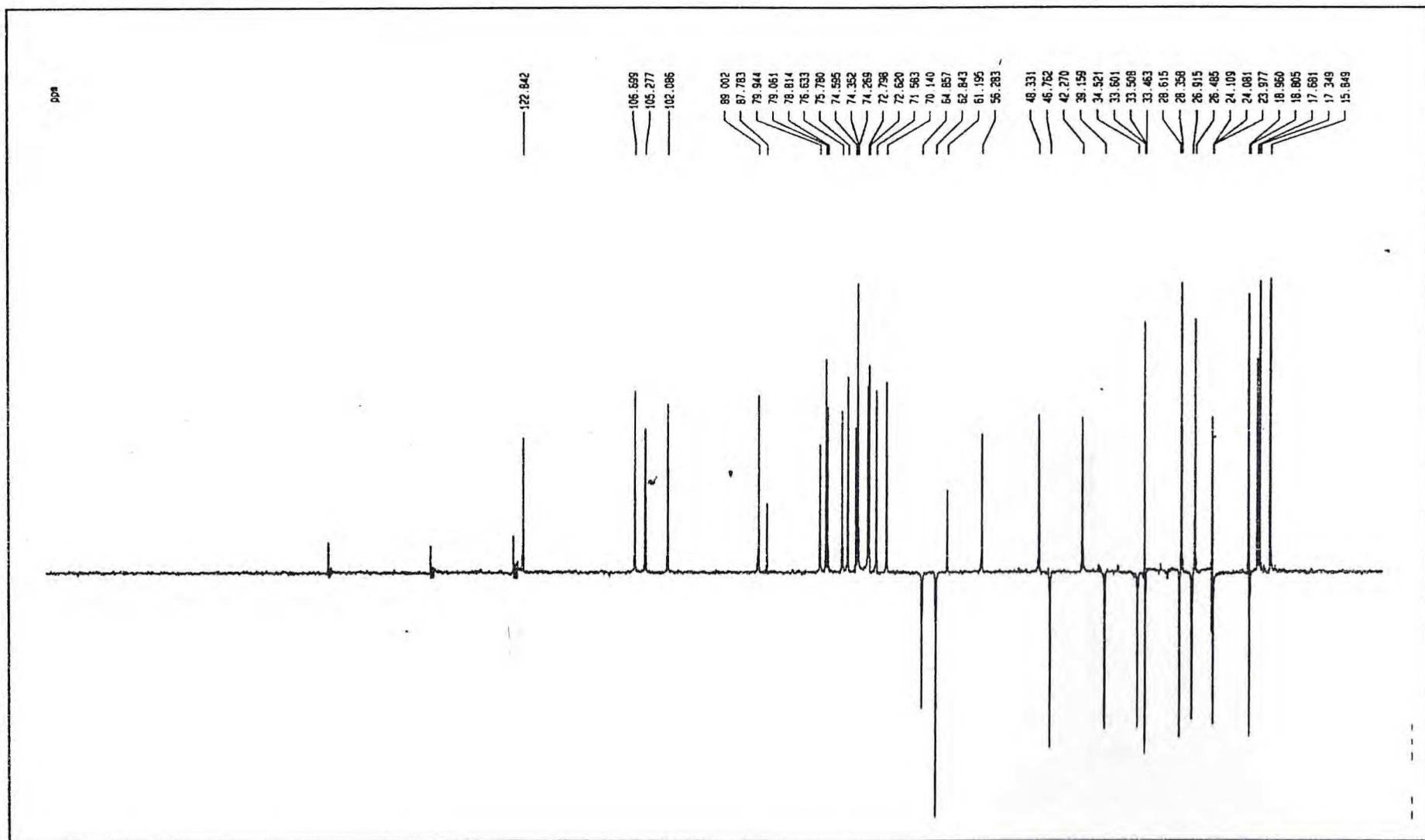


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de PEC-76 (3)

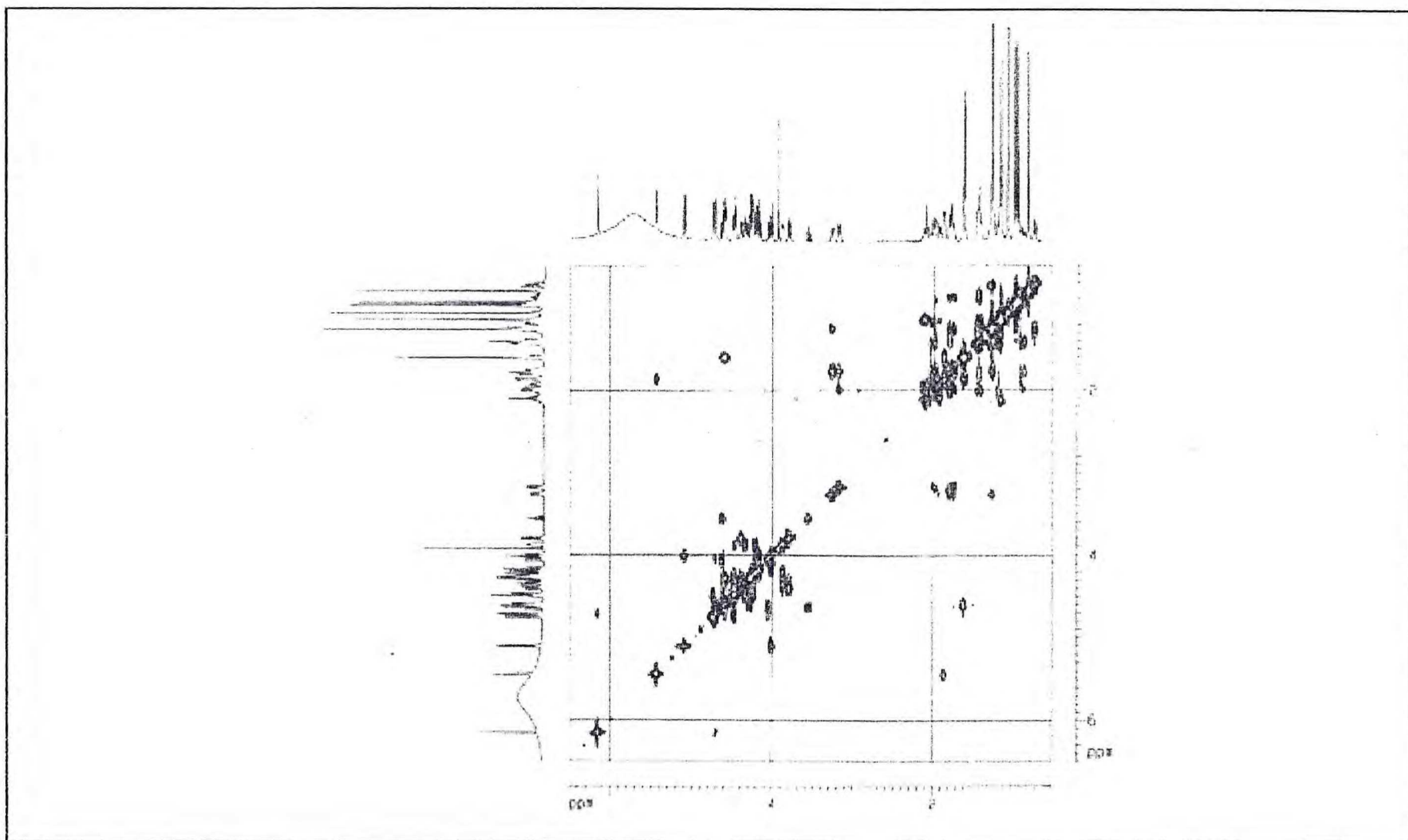


Figura 28 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H - COSY (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-76 (3).

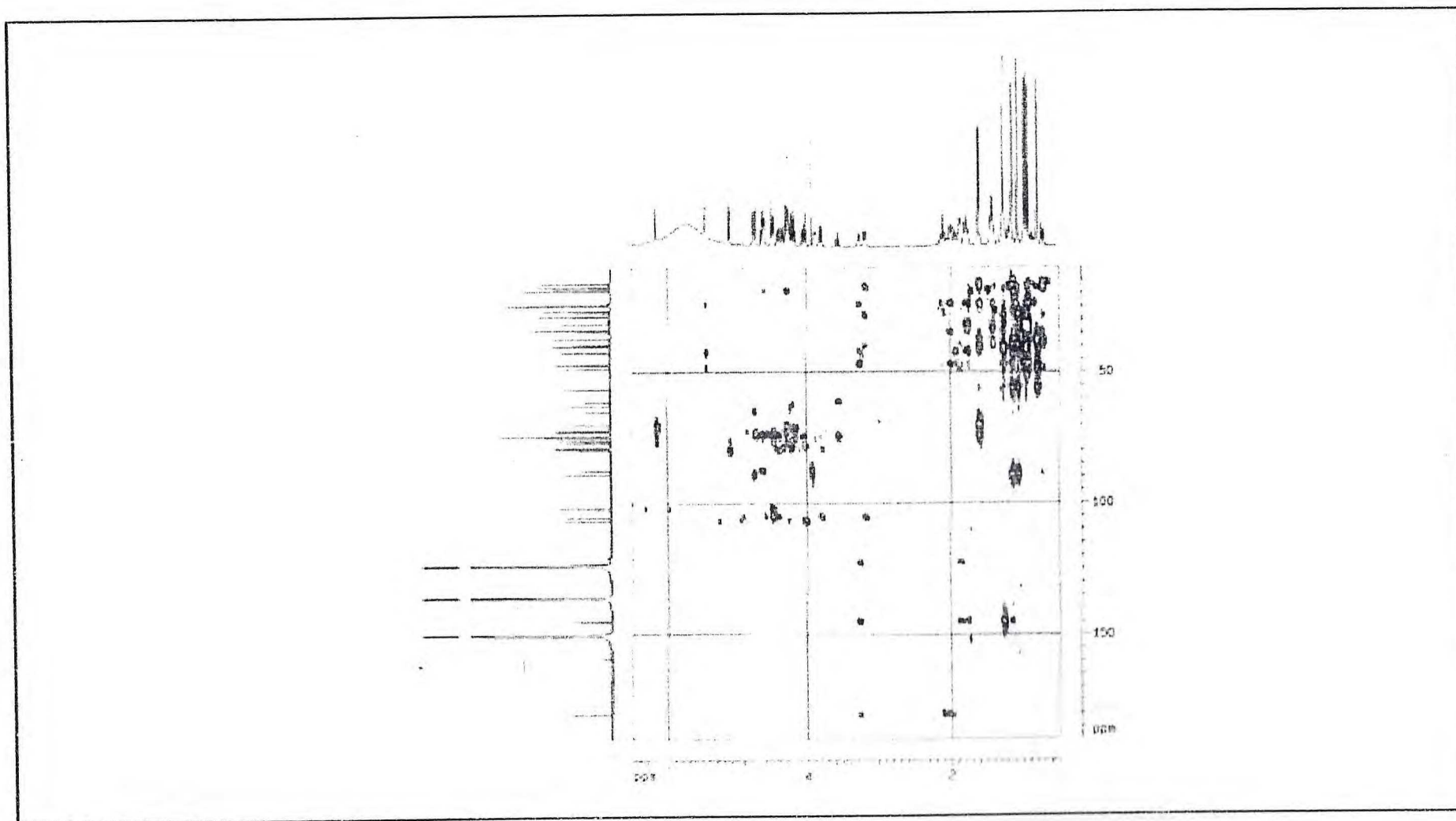


Figura 29 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3).

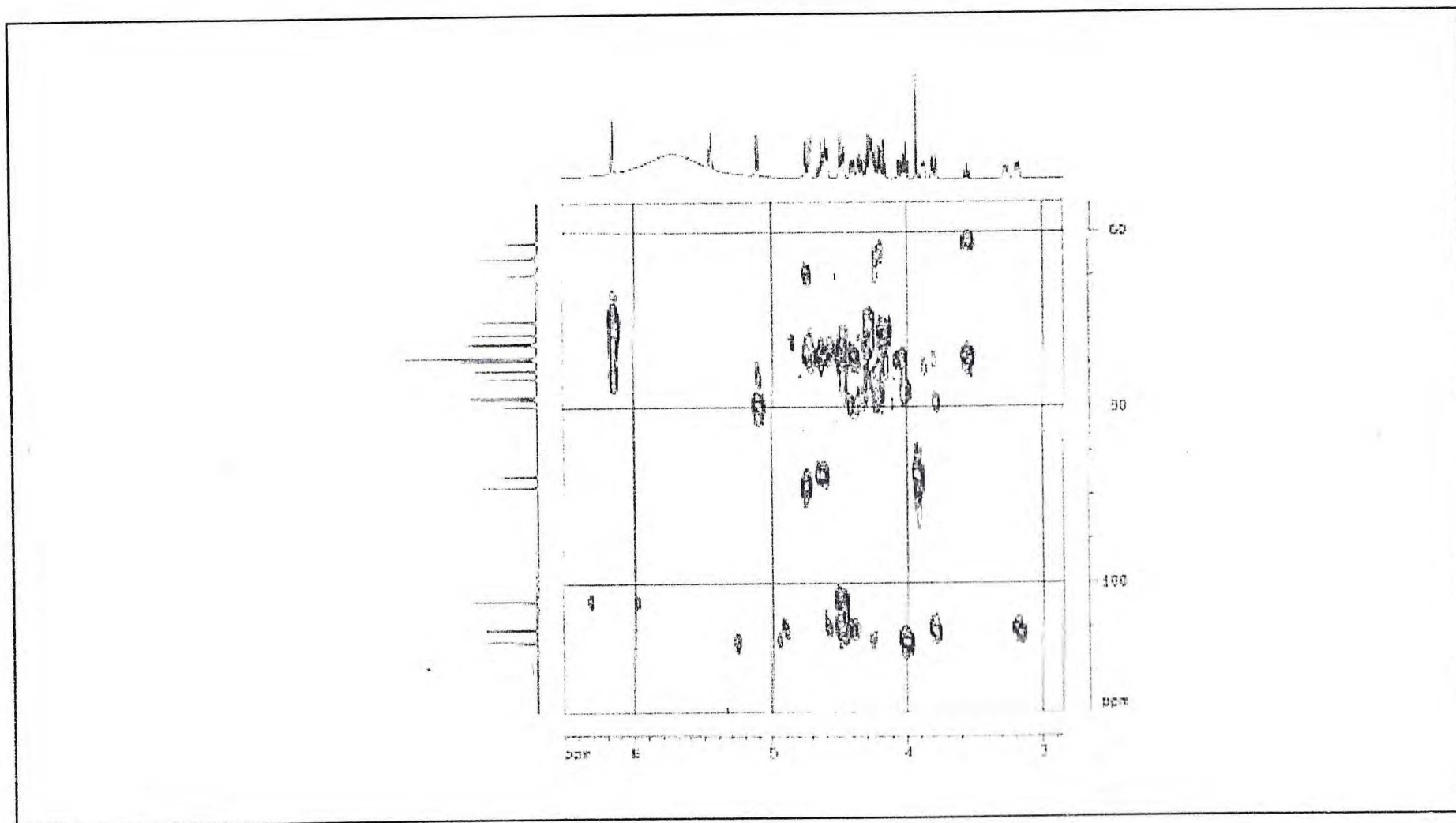


Figura 29 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-76 (3).

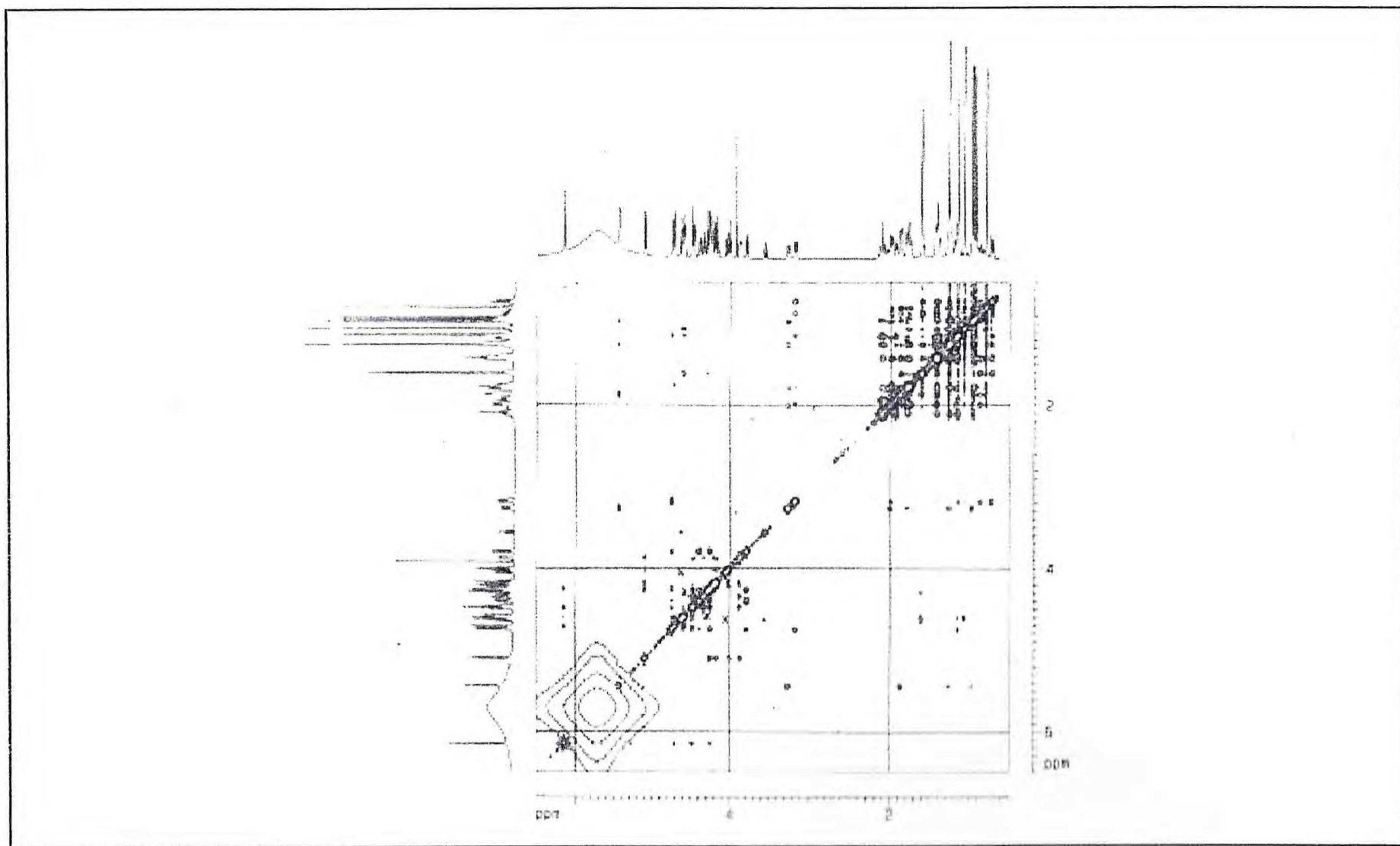


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H - NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC - 76(3).

Espectros de PEC-6P (4)

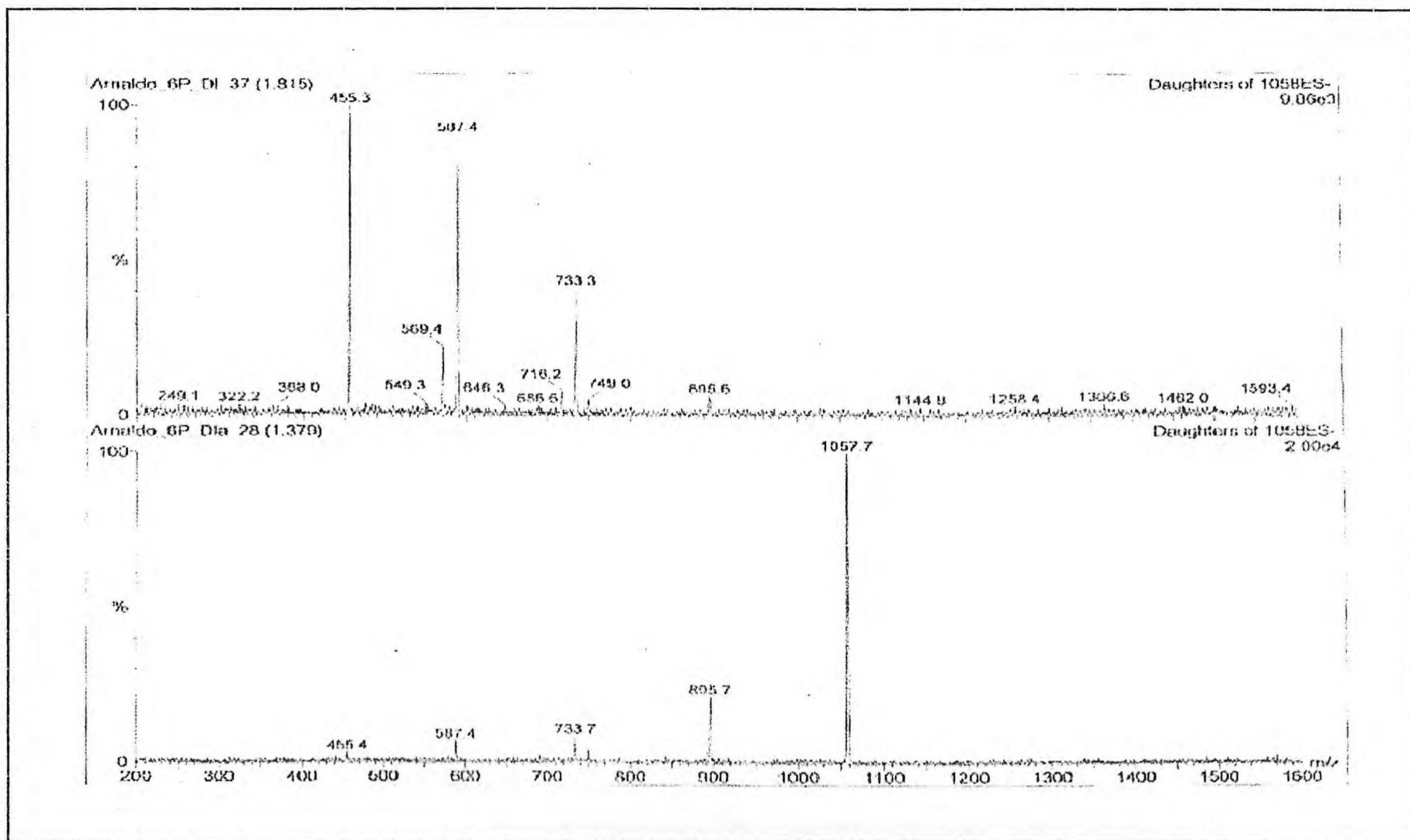


Figura 32 - Espectro de massa por ionização química por eletrospray ESI-MS de PEC-6P(4).

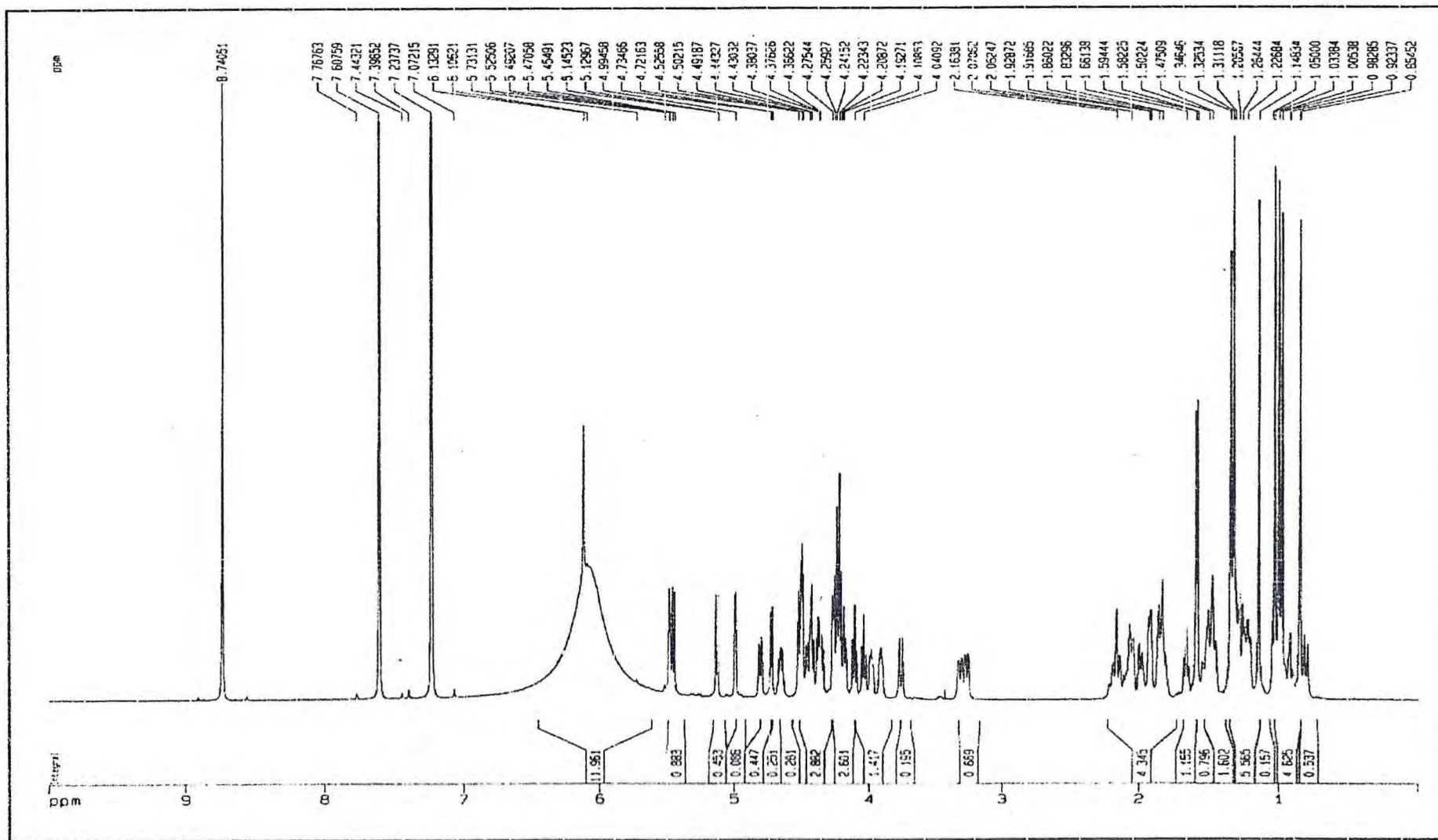


Figura 33 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-6P(4).

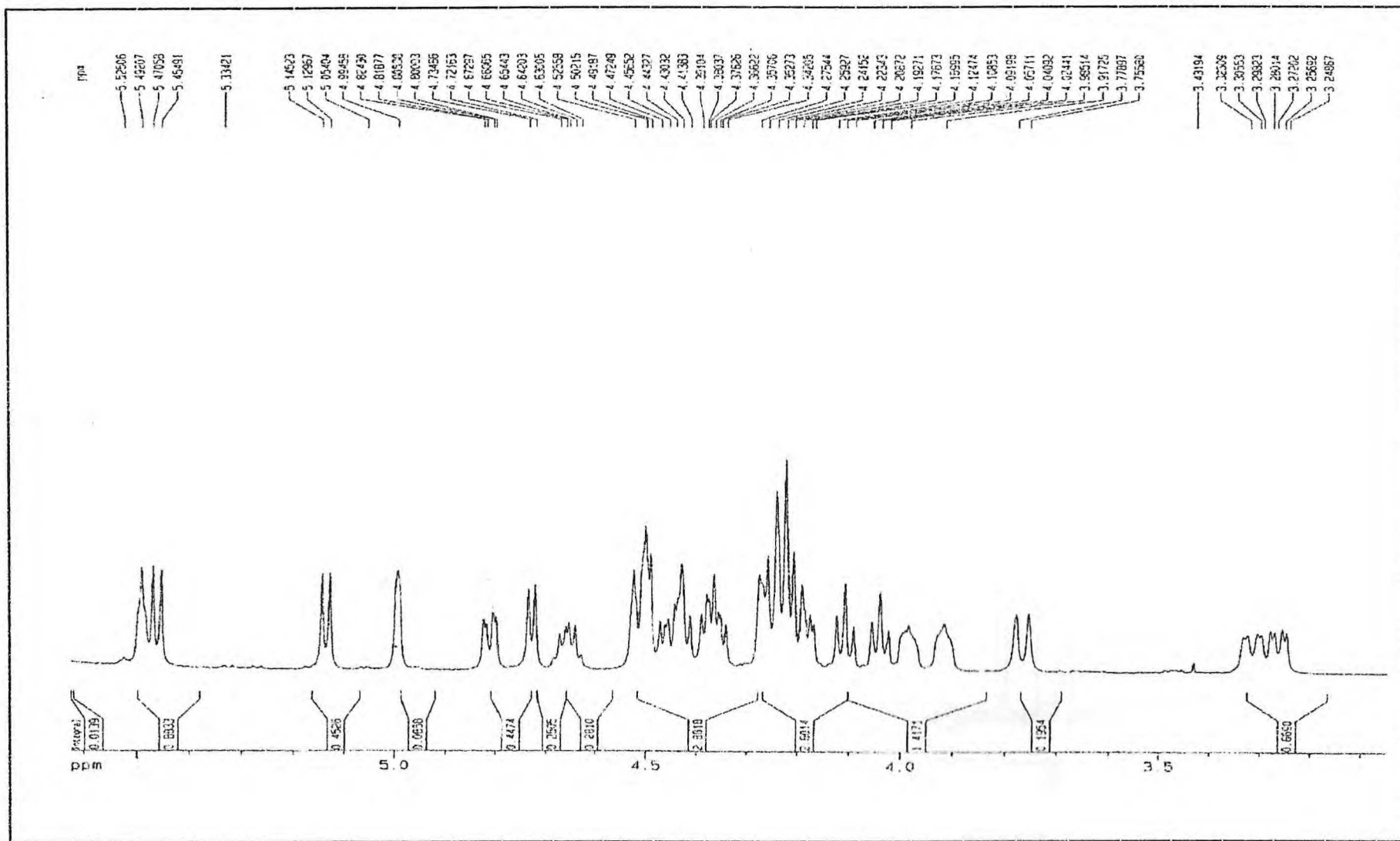


Figura 33 - Espectro (expansão) de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de PEC-6P(4).

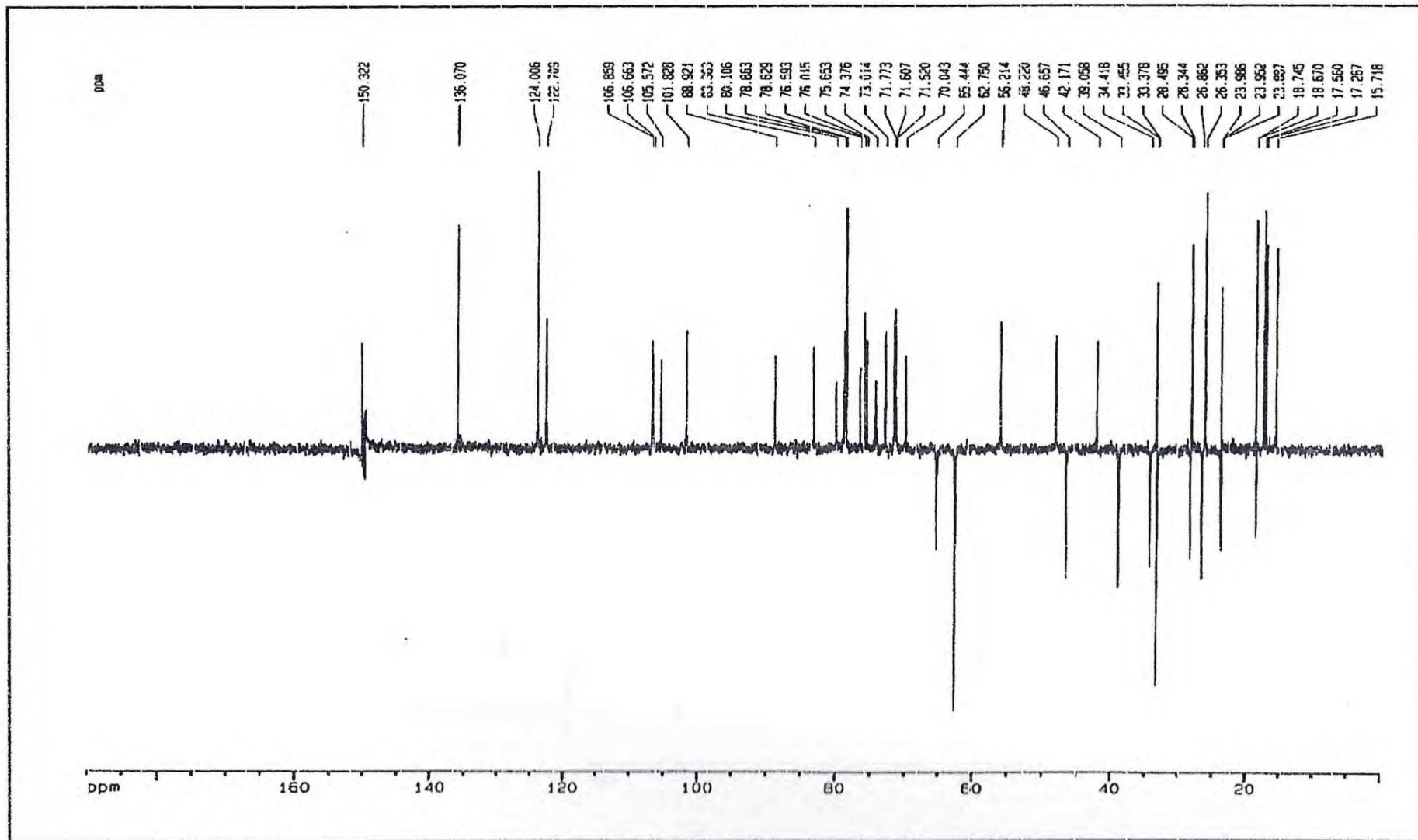


Figura 35 - Espectro de RMN ^{13}C -- DEPT 135 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(4).

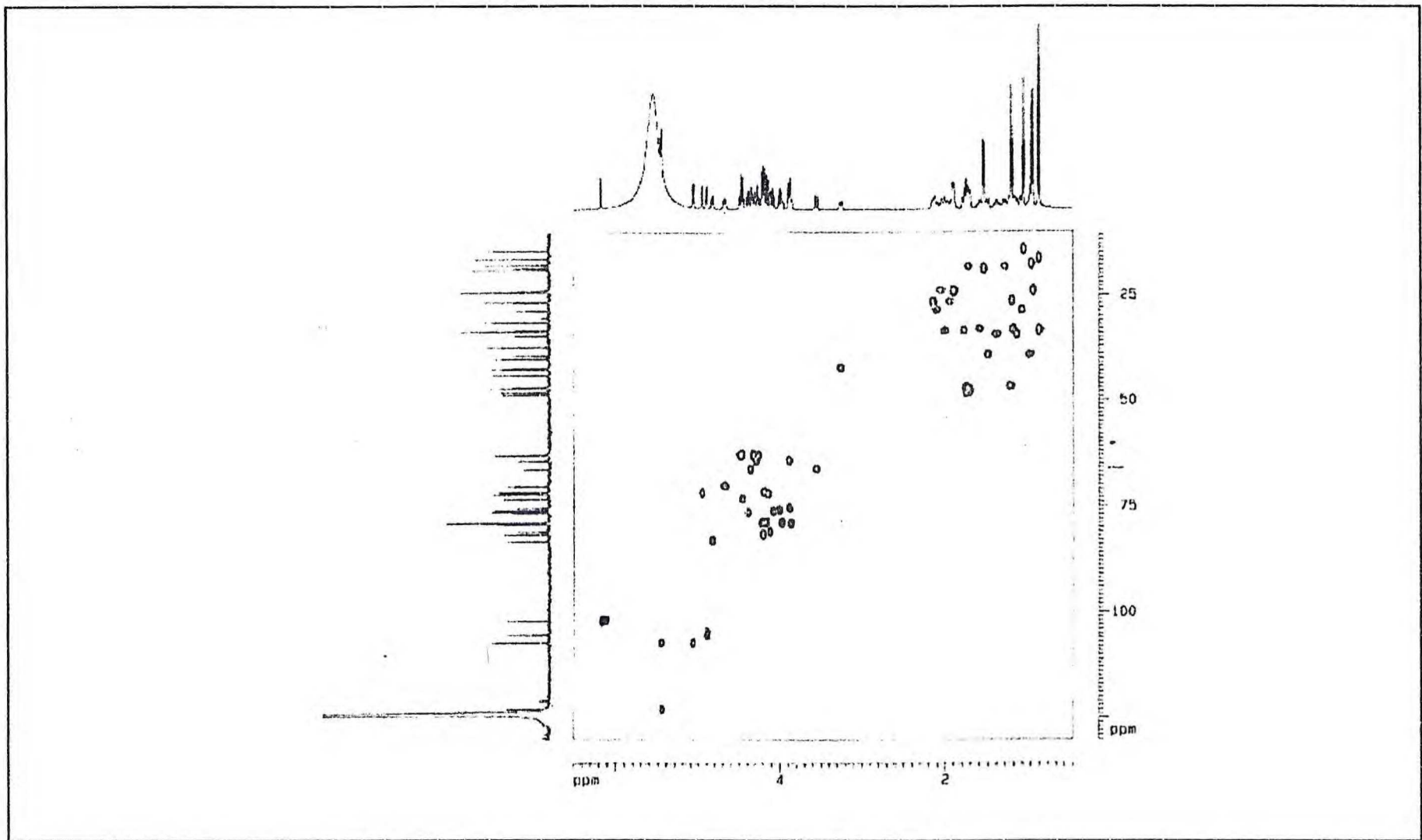


Figura 36 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4).

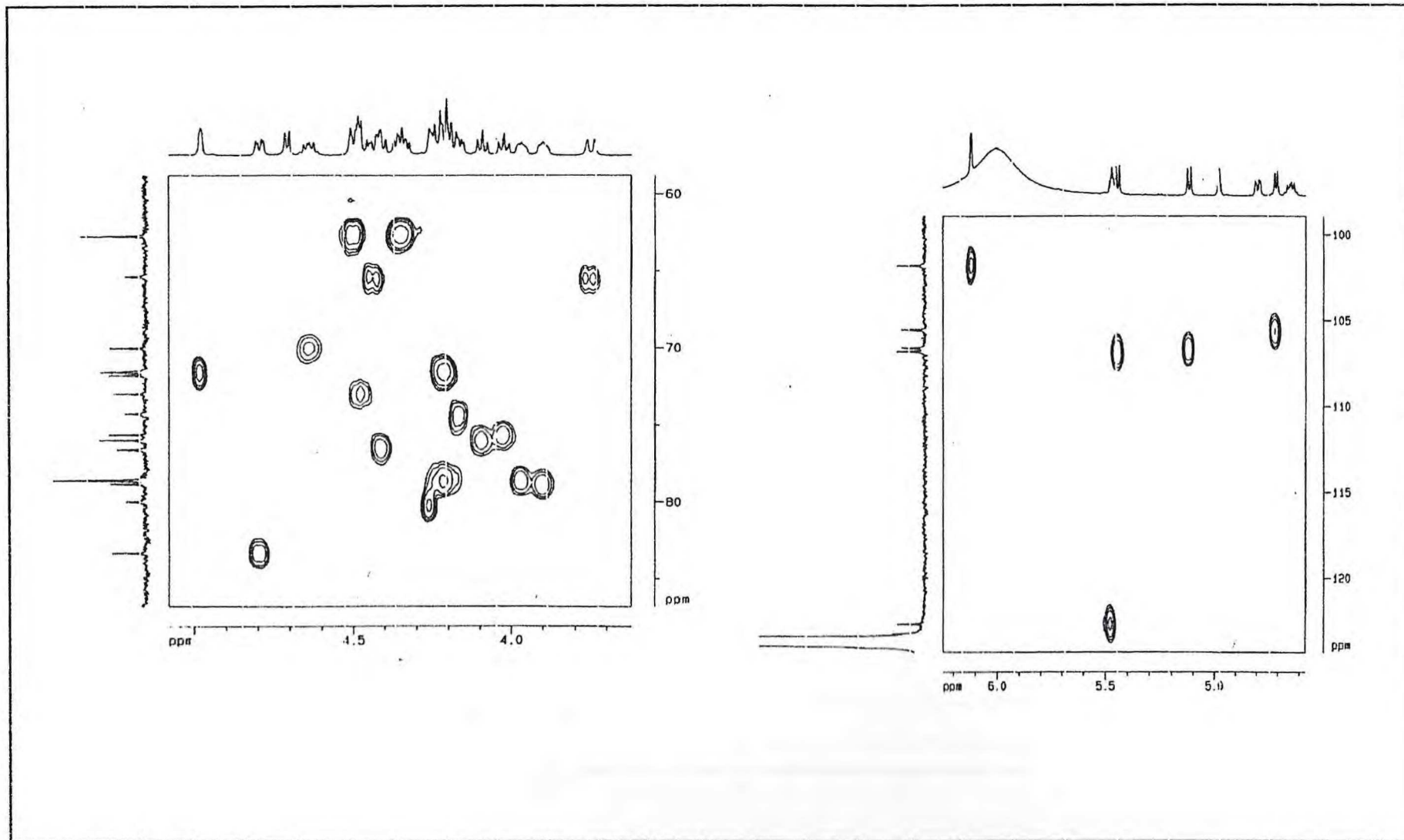


Figura 36 - Espectro bidimensional (expansão) de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação - HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4).

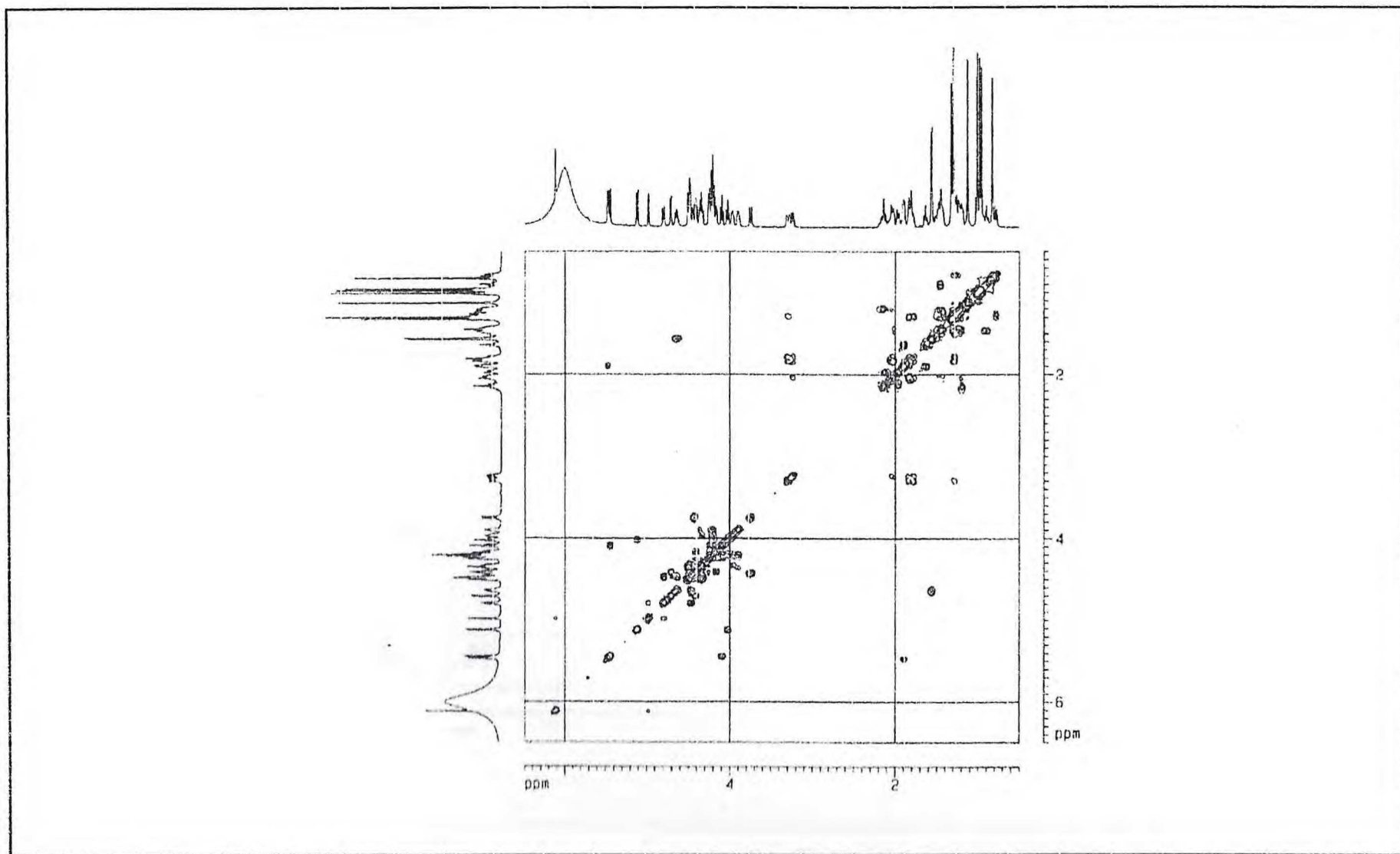


Figura 37 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H - COSY (500 MHz, C₃D₃N) de PEC-6P(4).

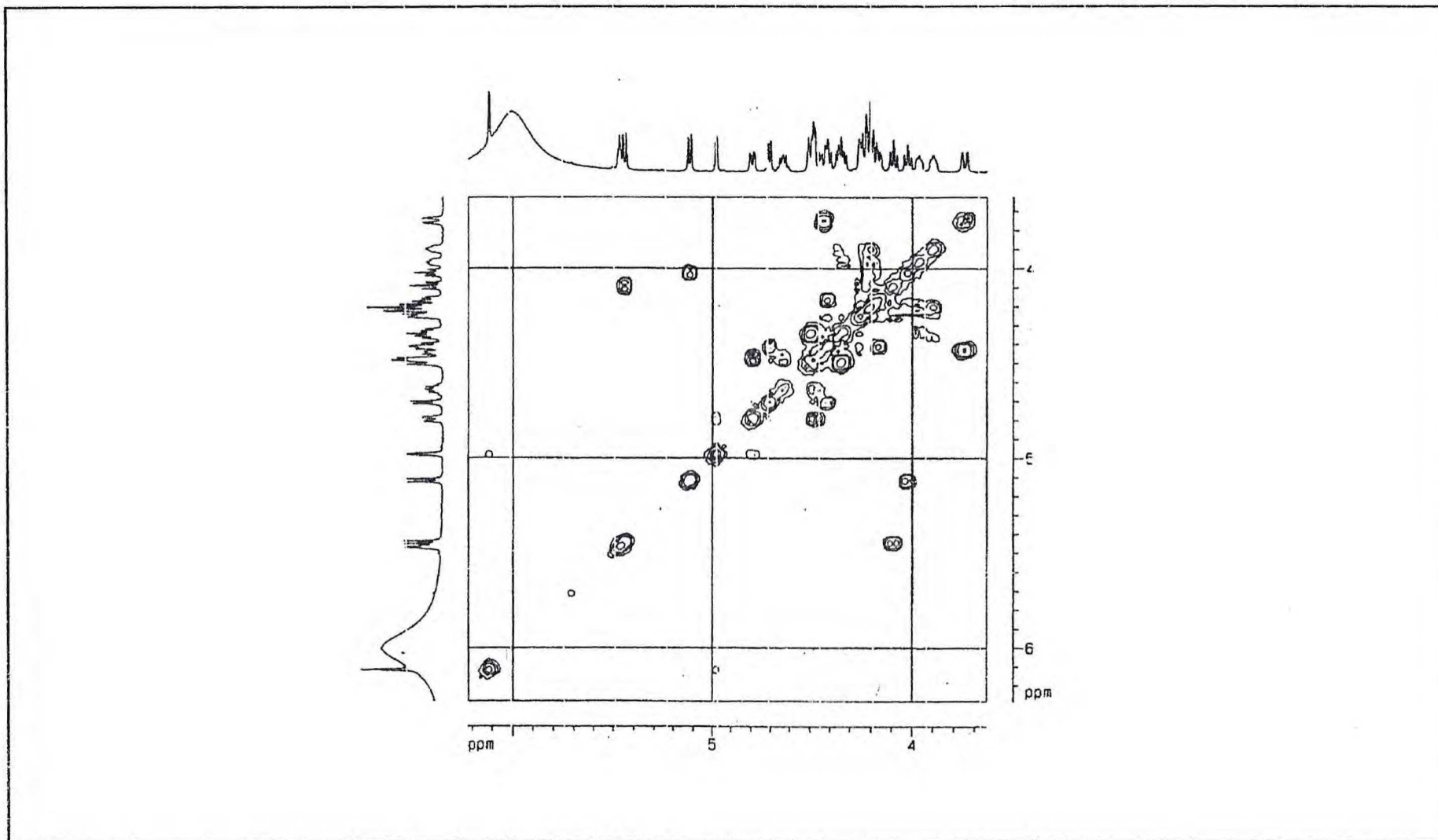


Figura 37 - Espectro bidimensional (expansão) de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PEC-6P(4).

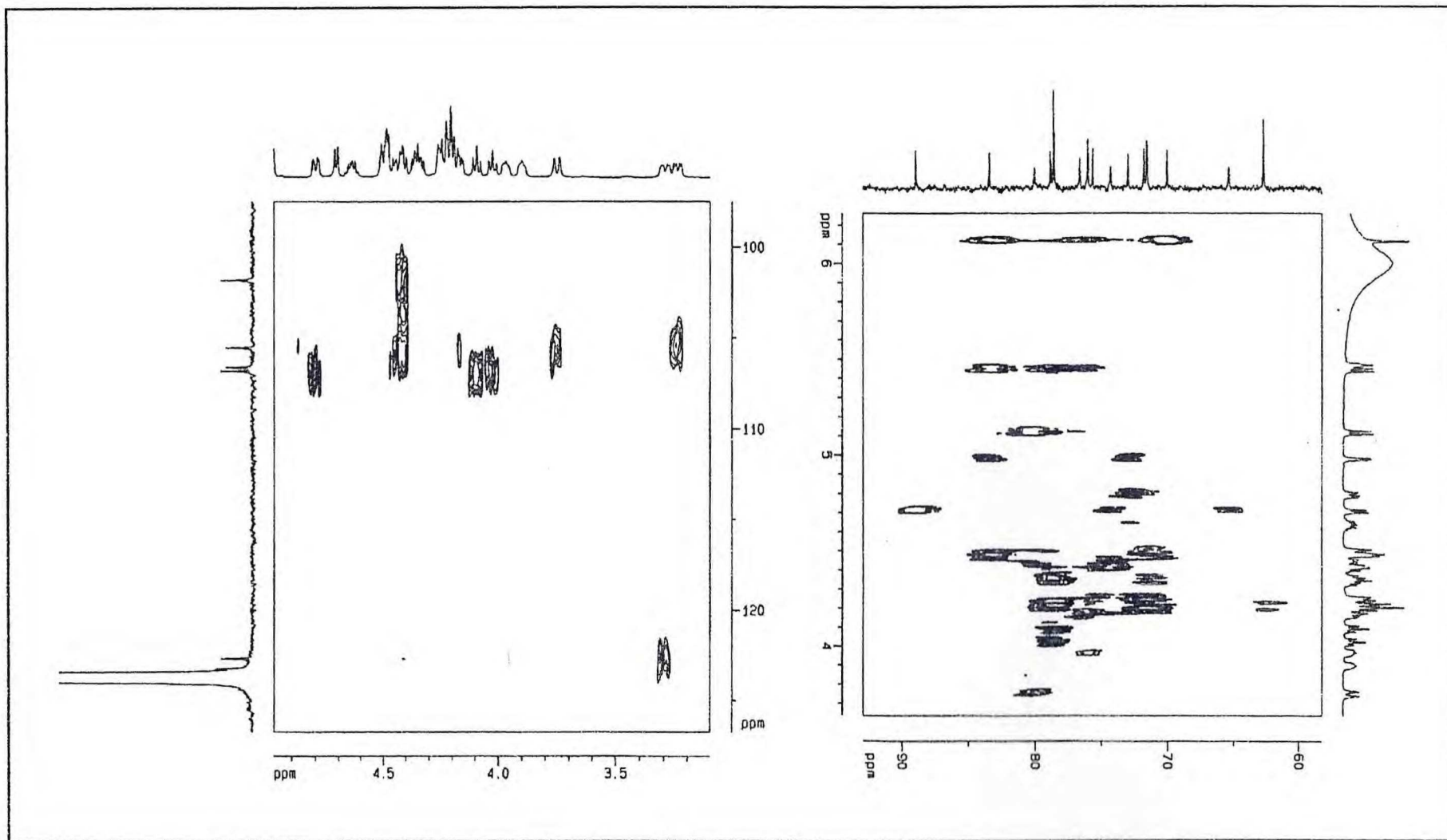


Figura 38 - Espectro bidimensional (expansão) de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-6P(4)

Espectros de PES-2V (5)

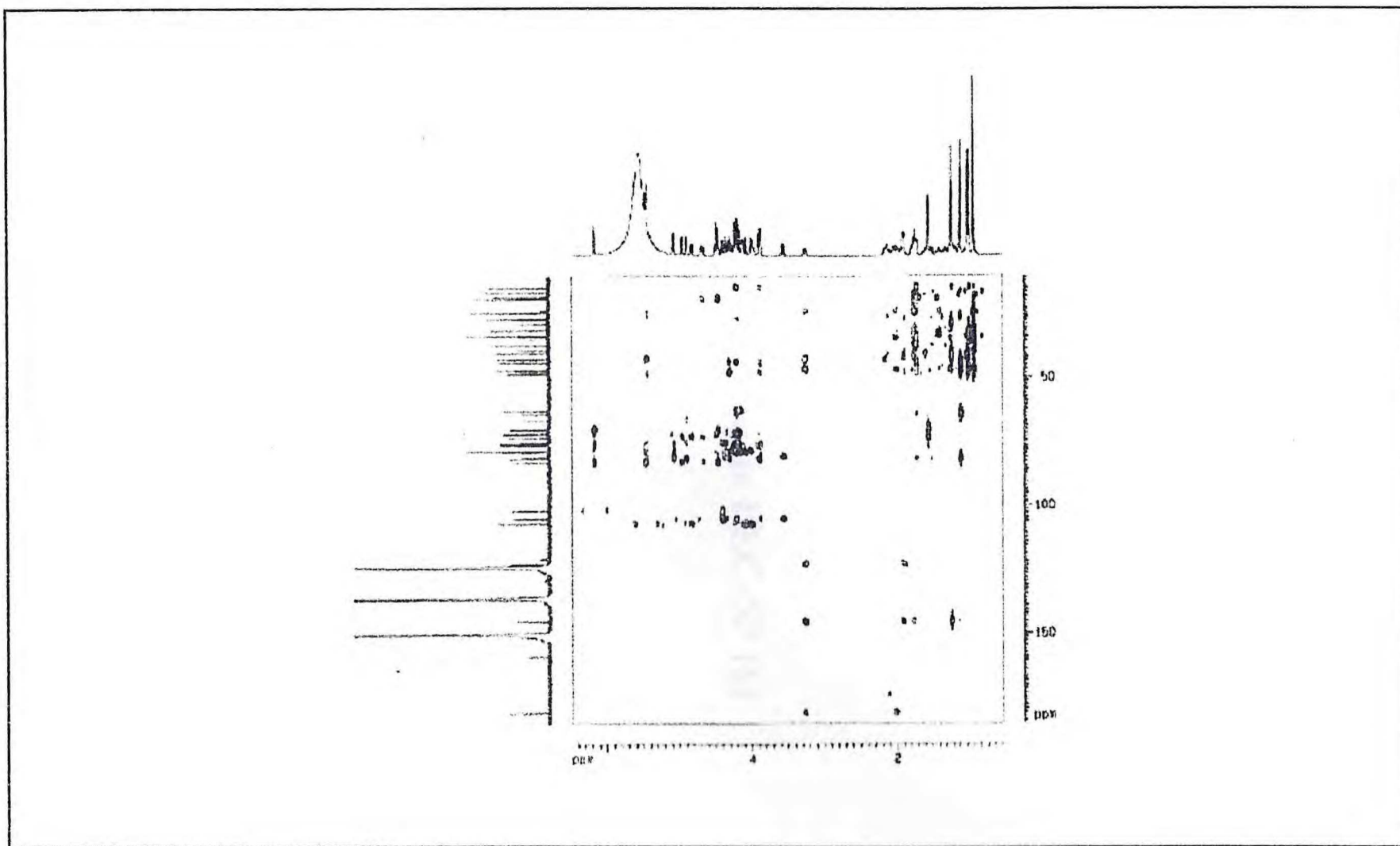


Figura 49 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500 MHz x 125 MHz) de PES-2V(5).

Espectros de PEC-5P (6)

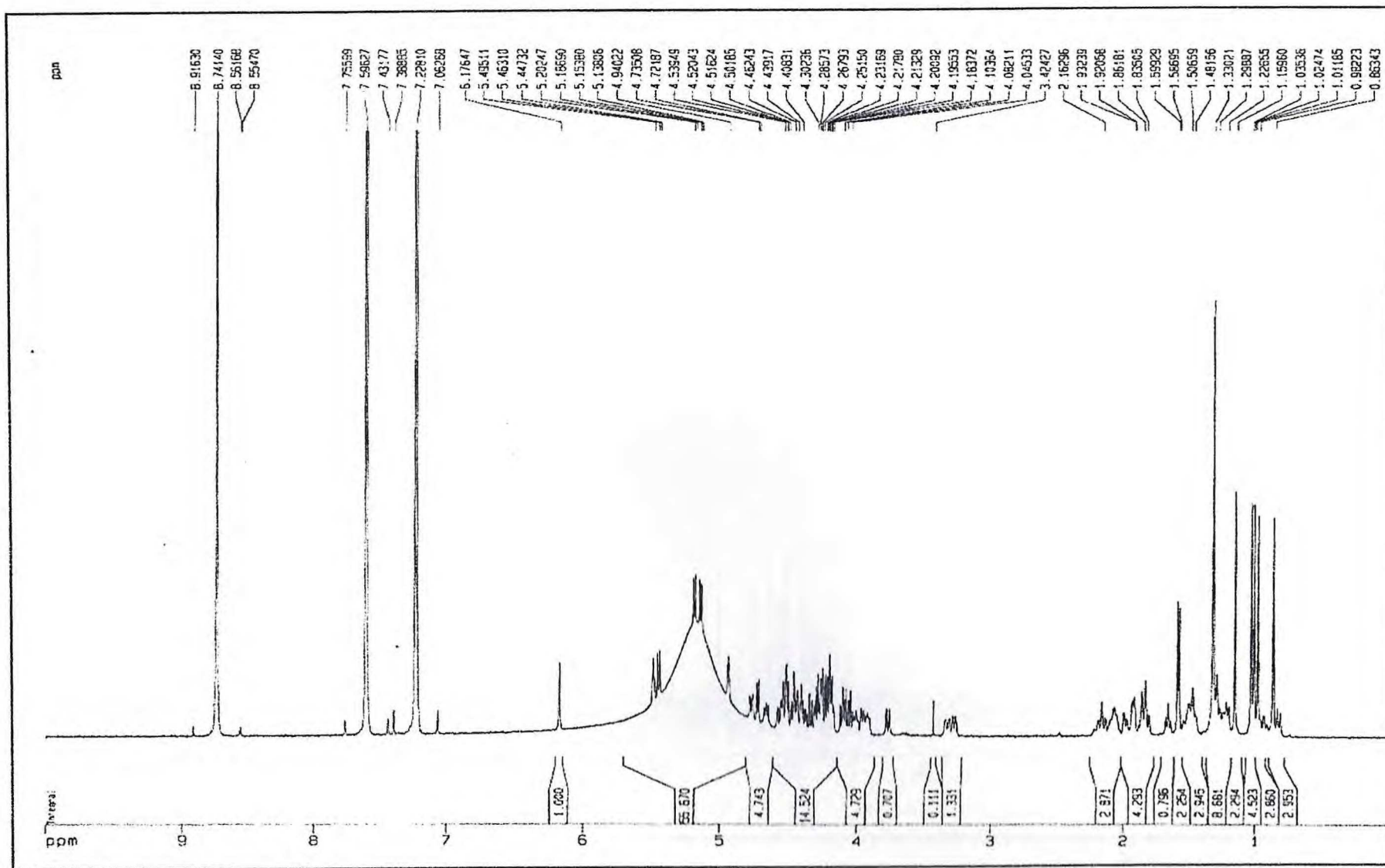


Figura 52 - Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N, 500 MHz) de PEC-5P (6).

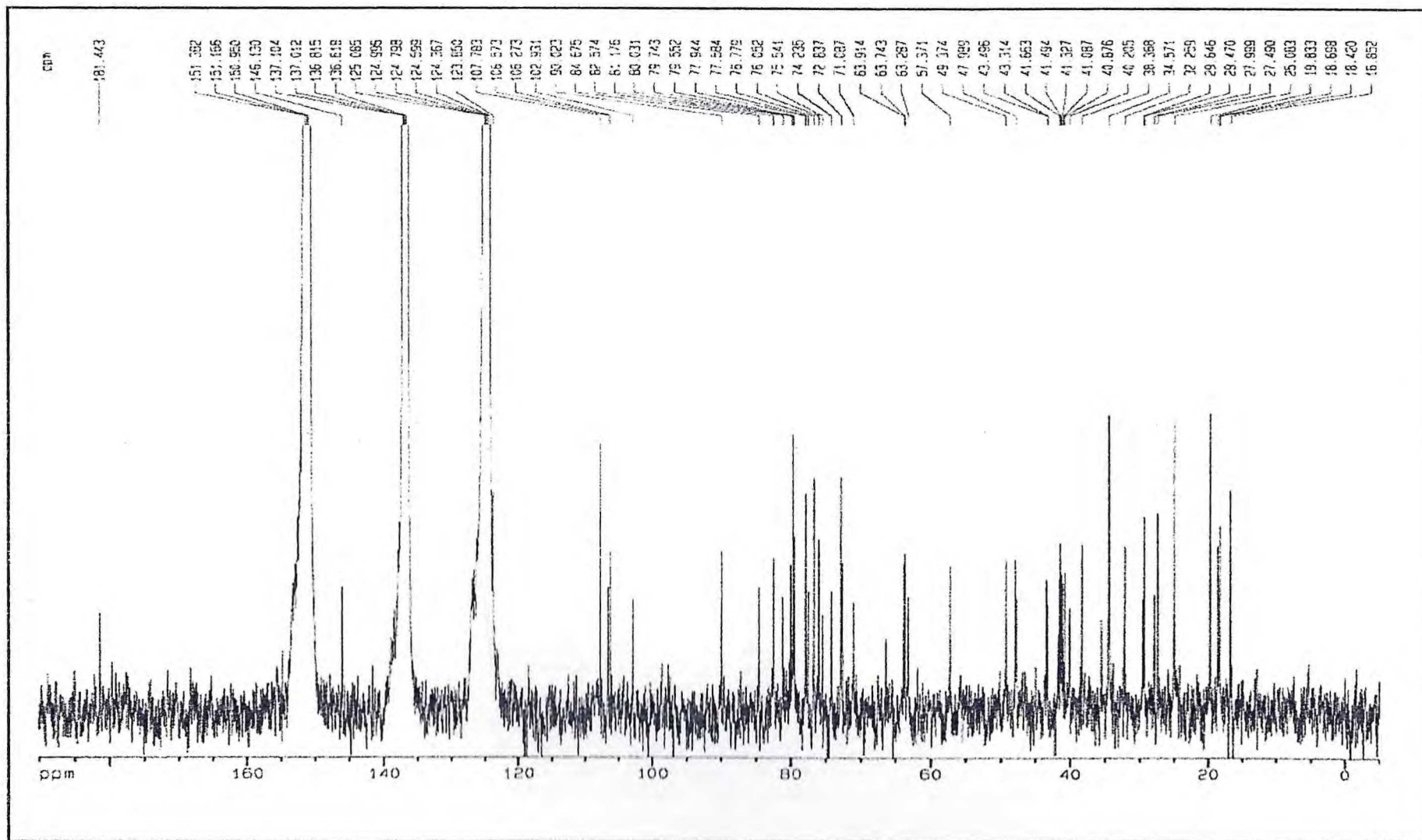


Figura 54 - Espectro de RMN ¹³C – HBBD (C₅D₅N, 125 MHz) de PEC-5P(6).

Espectros de PEC-A3 (7)

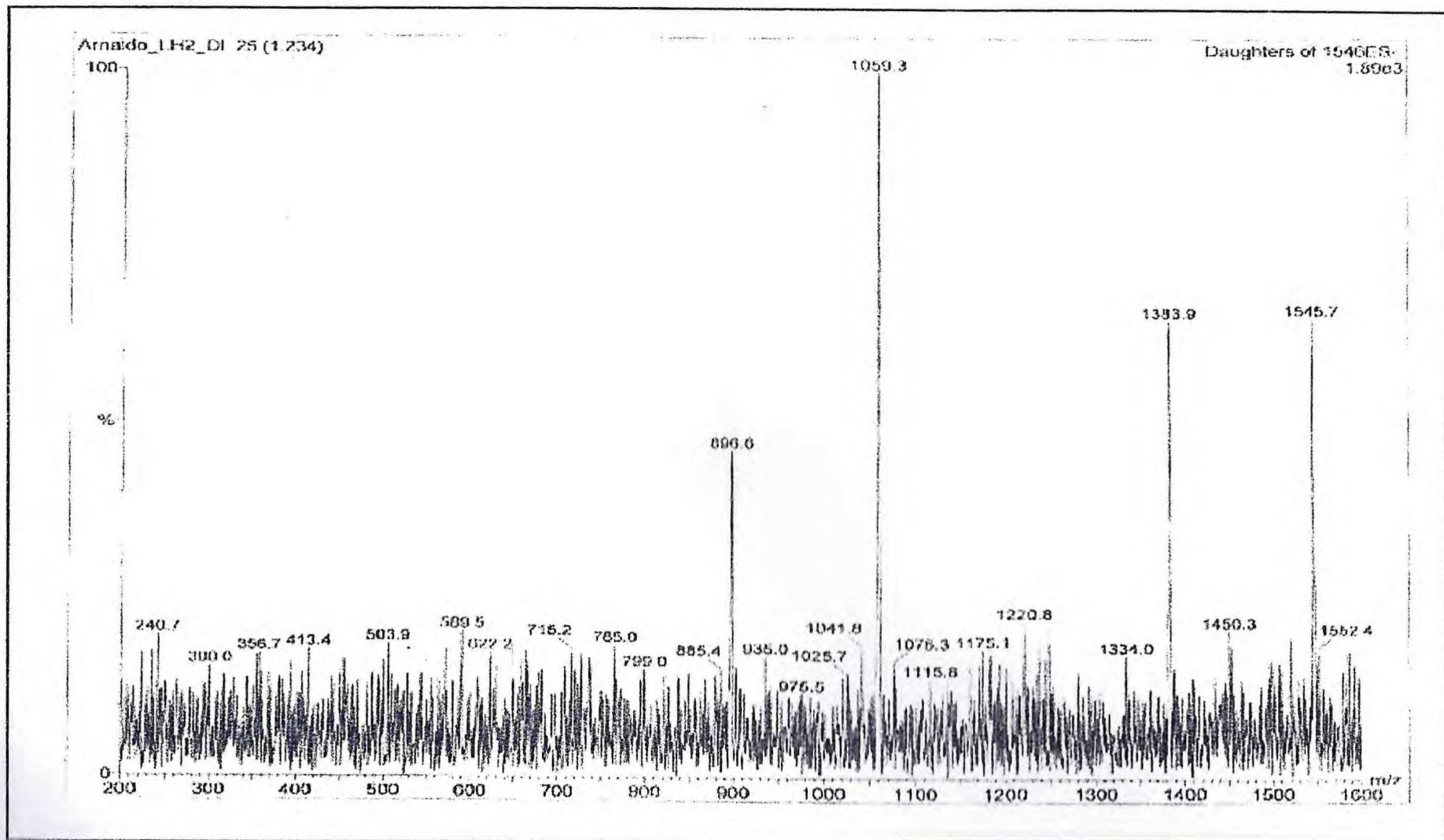


Figura 61 - Espectro de massas por ionização química eletrospray - EI de PEC-A3(7).

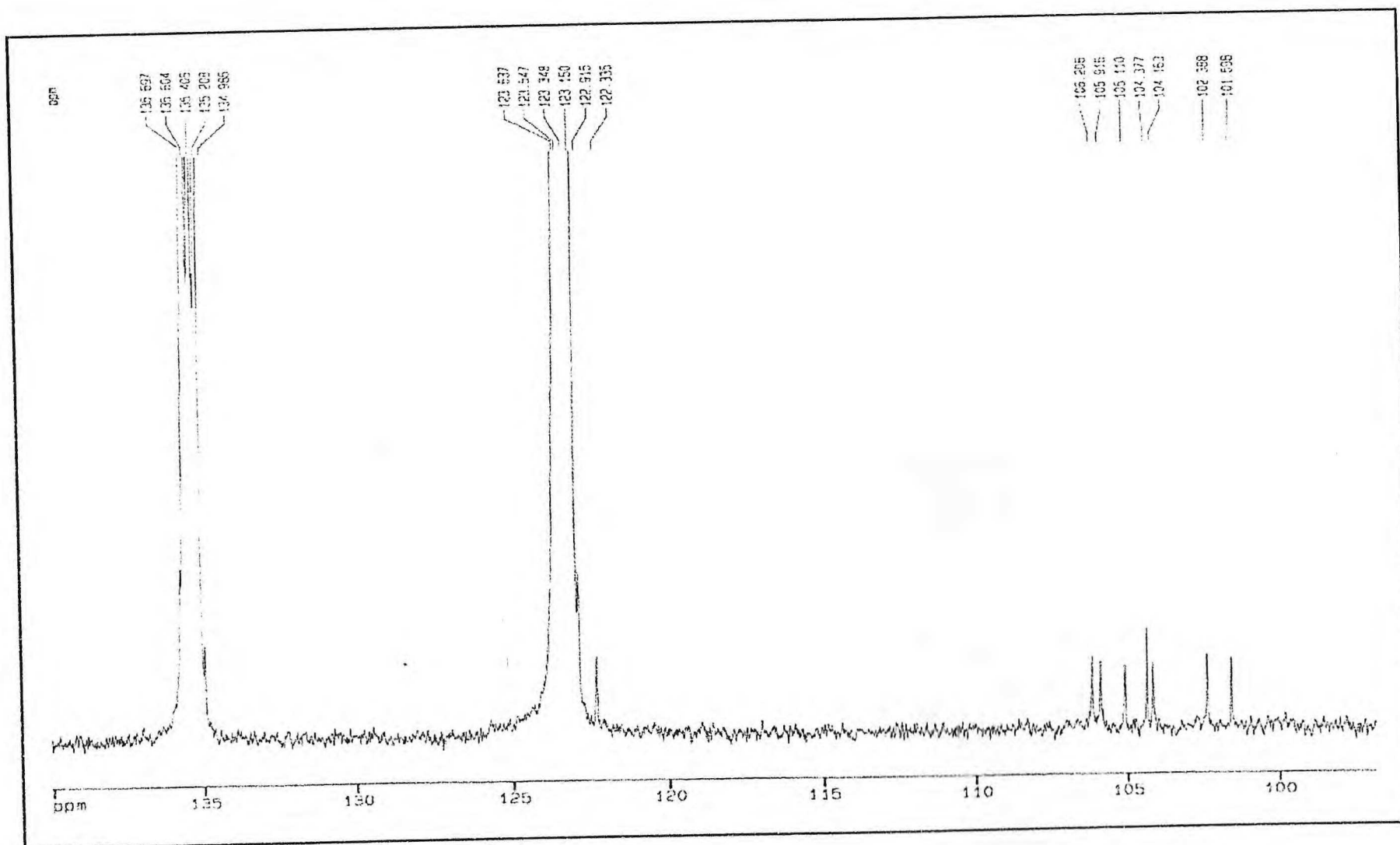


Figura 62 - Espectro (expansão) de RMN ^{13}C - HBBD ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - 125 MHz) de PEC-A3(7).

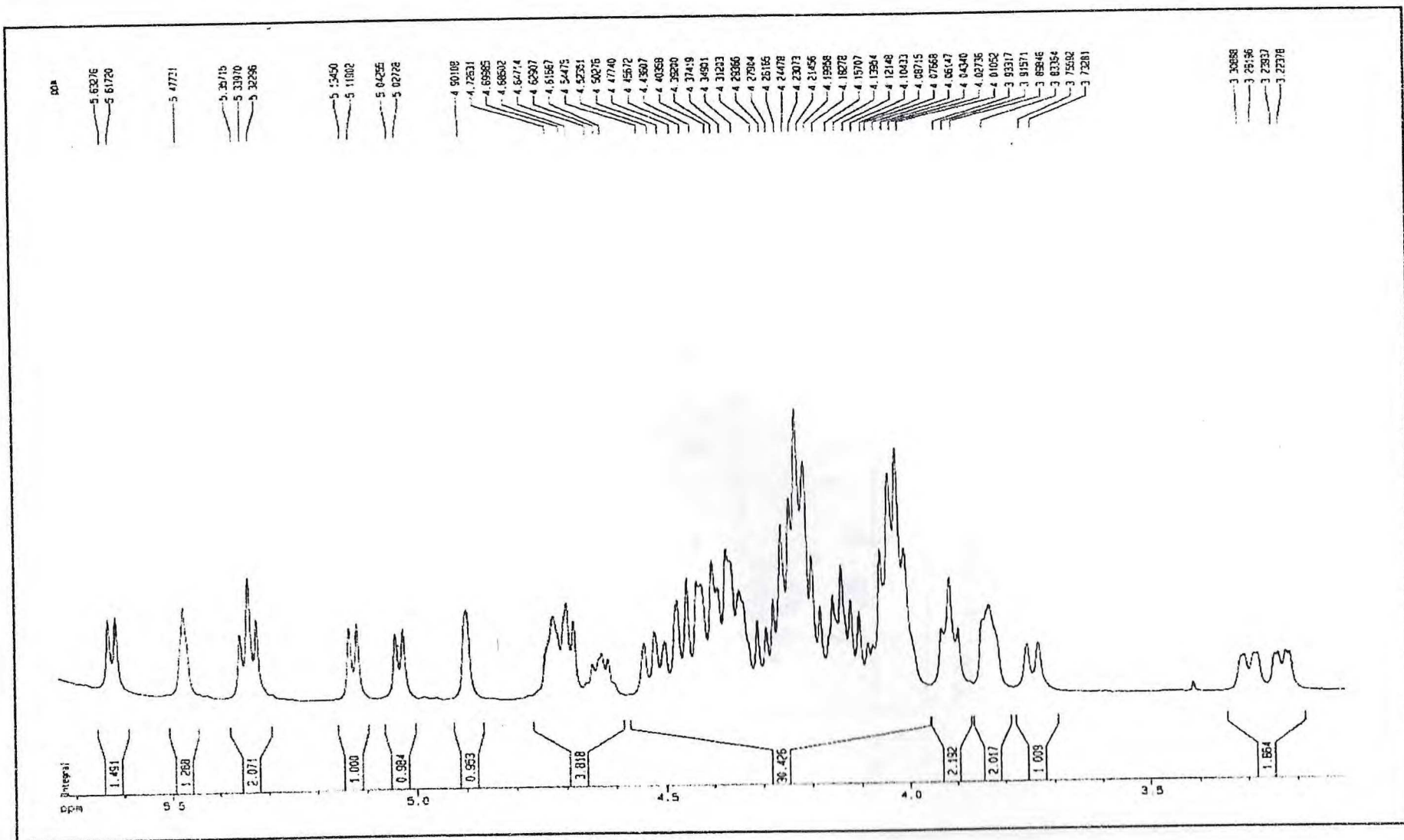


Figura 64 - Espectro (expansão) de RMN ¹H (C₅D₅N - 500 MHz) de PEC-A3(7).

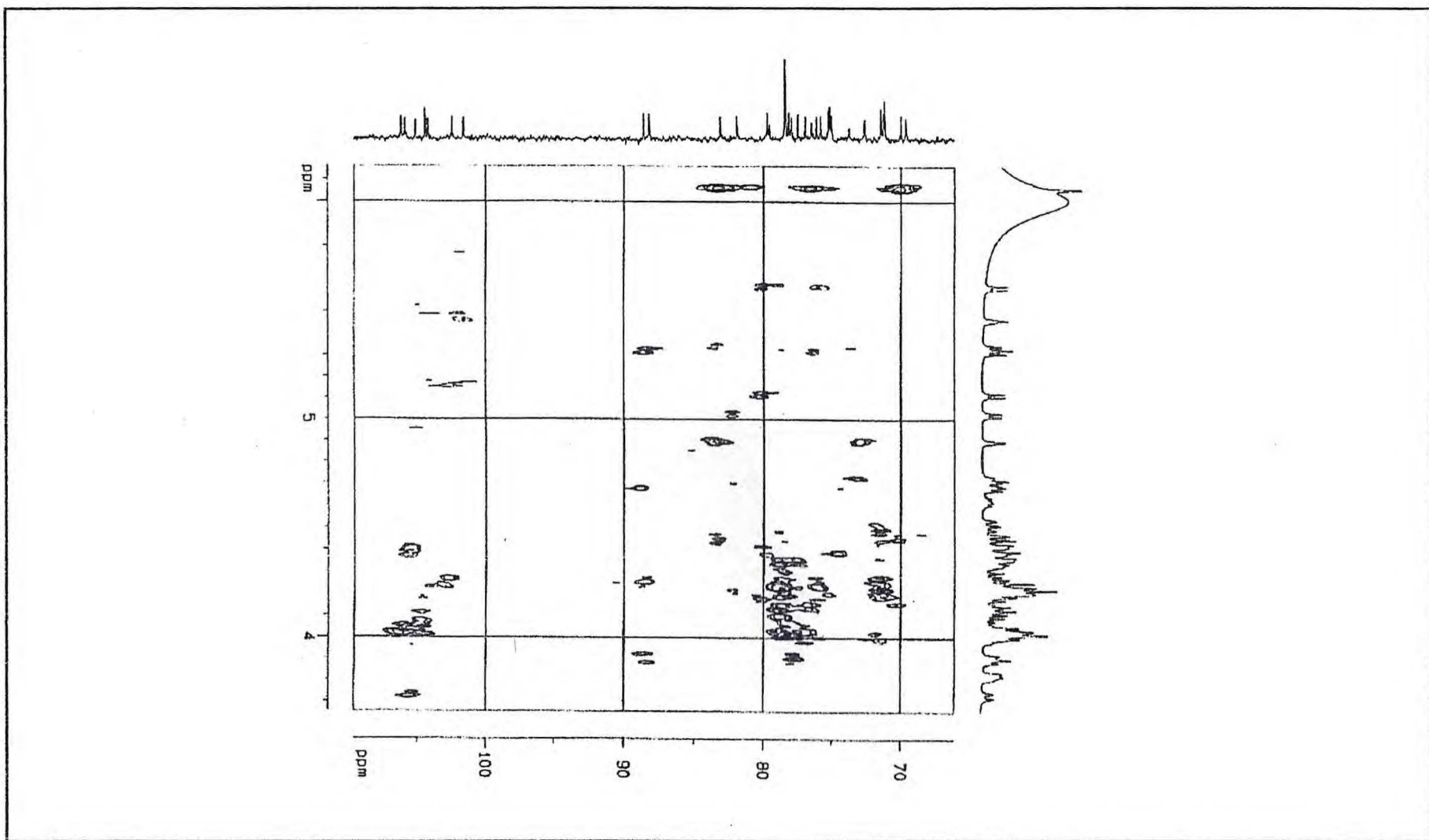


Figura 68 - Espectro (expansão) bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação - HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz x 125 MHz) de PEC-A3(7).

Espectros de PEL-LH1 (8)

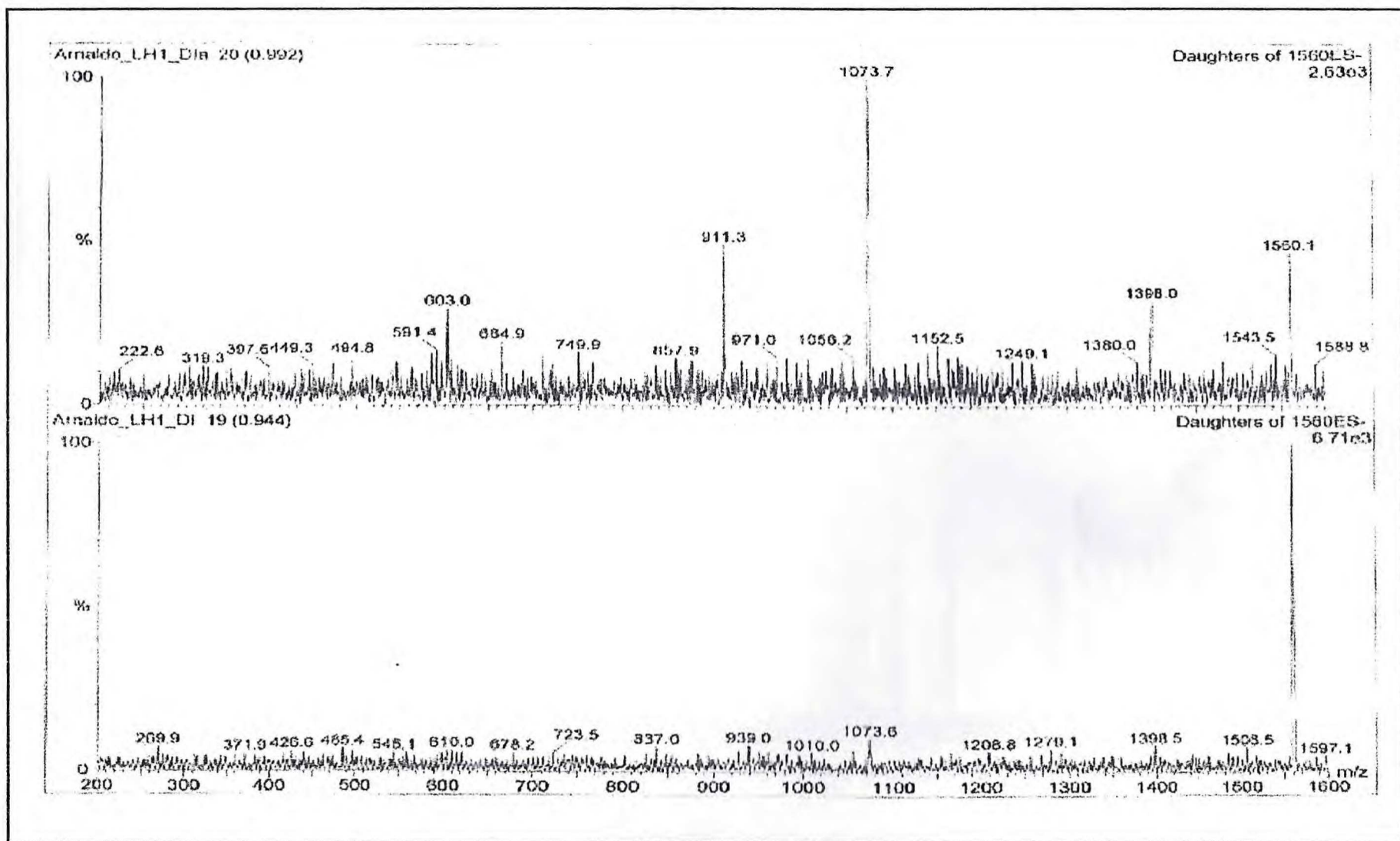


Figura 70 - Espectro de massa por ionização química por eletrospray ESI de PEL-LH1(8).

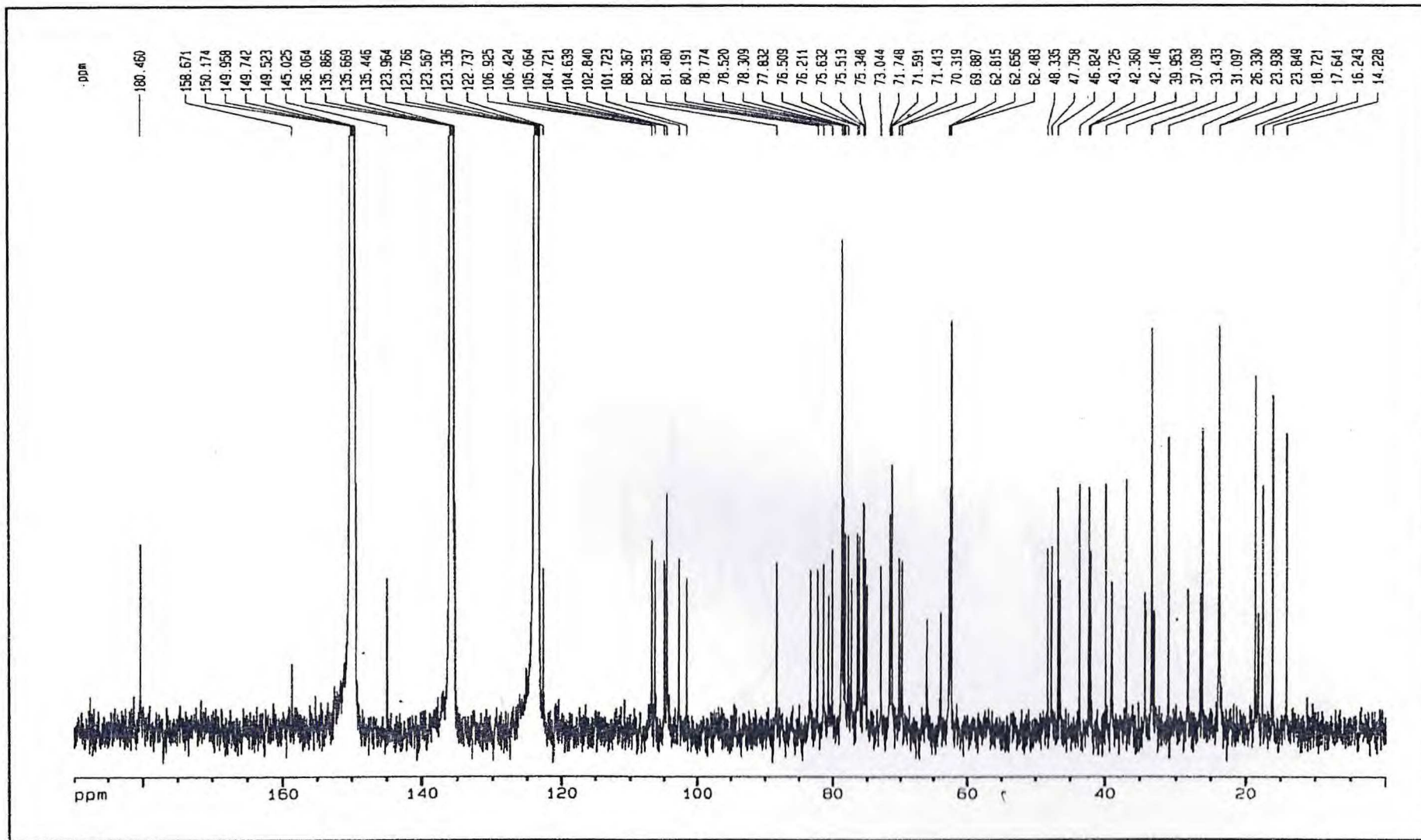


Figura 72 - Espectro de RMN¹³C - HBBD (C₃D₃N – 125 MHz) de PEL-LH1(8).

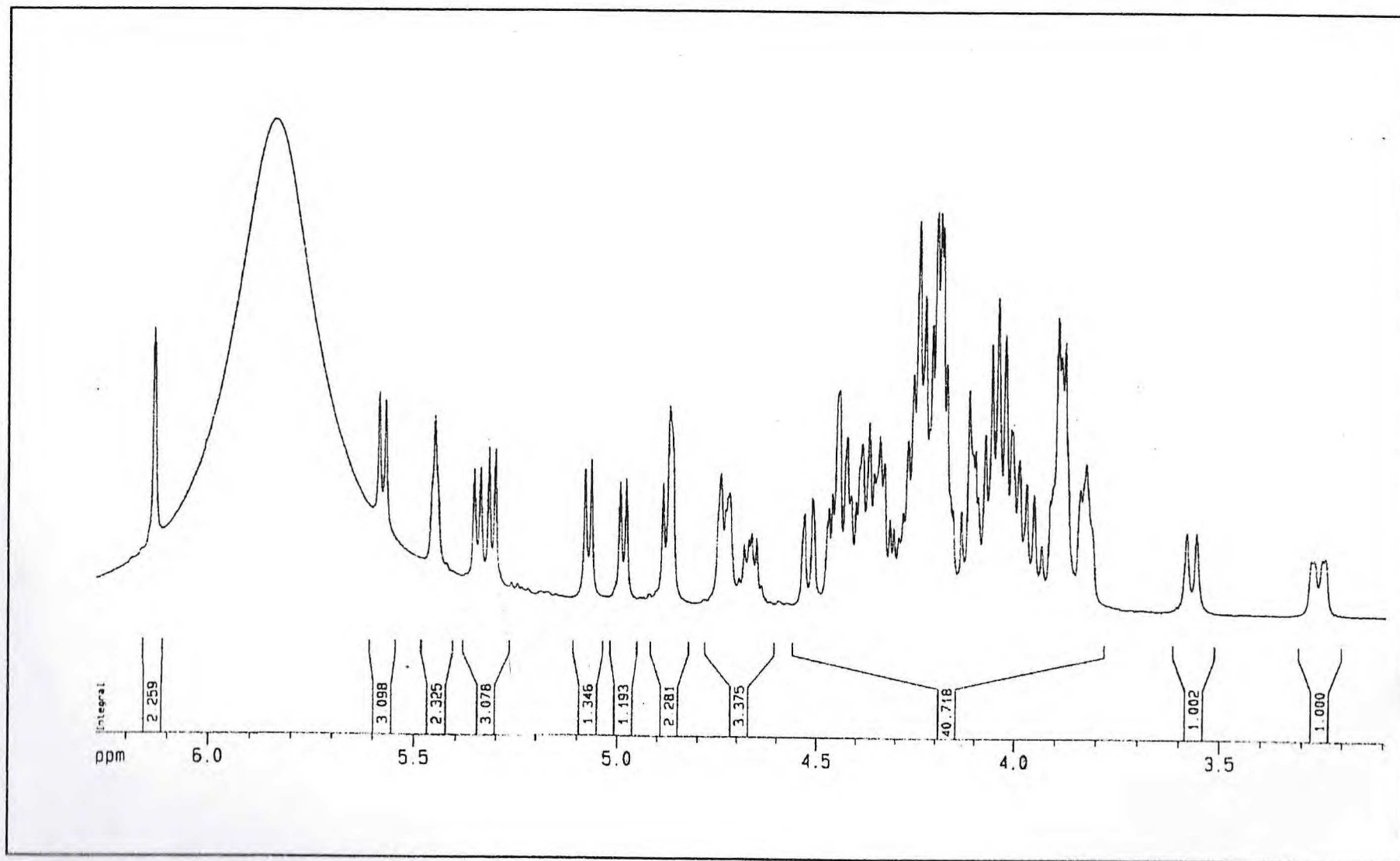


Figura 74 - a) Espectro de RMN ^1H (expansão) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ - 500 MHz) de PEL-LH1(8).