



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

Contribuição ao Conhecimento Químico de  
*Combretum fruticosum* Stuntz  
(Combretaceae)

**THICIANA DA SILVA SOUSA**

**Fortaleza-Ce**

**2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Contribuição ao Conhecimento Químico de  
*Combretum fruticosum* Stuntz  
(Combretaceae)

**Dissertação** submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química com Área de Concentração em Química Orgânica** sob orientação da Profa. Dra. Otilia Deusdênia Lioila Pessoa.

**THICIANA DA SILVA SOUSA**

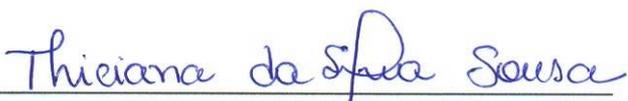
**Fortaleza-Ce**

**2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S713c      Sousa, Thiciana da Silva.  
              Contribuição ao Conhecimento Químico de *Combretum fruticosum* Stuntz (Combretaceae) /  
              Thiciana da Silva Sousa – 2012.  
              134 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de  
              Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2012.  
              Área de Concentração: Química Orgânica.  
              Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.
1. Metabolitos secundários. 2. Triterpenos. 3. Lignanais. I. Título.
-

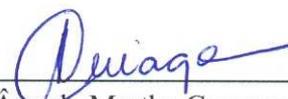
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

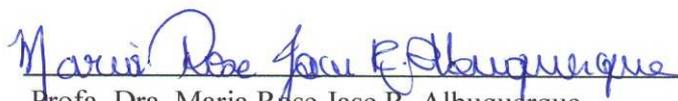
  
Thiciana da Silva Sousa

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 25/02/2010

EXAMINADORES:

  
Profª. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Profª. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Profª. Dra. Maria Rose Jase R. Albuquerque  
Universidade Federal do Ceará - UFC

## Dedicatória

Aos meus dois exemplos de vida, *Nonato* e *Elizabeth*,  
que me ensinaram a perseguir meus ideais  
com dedicação e coragem.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a reflexão e realização deste trabalho, especialmente:

A Deus por todas as bênçãos que me concedeu que muitas pessoas chamam de sorte ou de coincidência.

Aos meus pais, Raimundo Nonato de Sousa e Elizabete da Silva, e minhas irmãs, Diana e Thatiana, que sempre me apoiaram em cada etapa da minha vida, me ajudando e me incentivando em tudo.

A minha orientadora Prof. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa pela paciência, dedicação, companheirismo e incentivo que muito me ajudaram a prosseguir os estudos nesta área.

Aos Professores Francisco Arnaldo Viana e Jaécio Carlo Diniz (UERN), por terem me acolhido em seu laboratório em Mossoró (RN) e por terem contribuído numa etapa importante dos meus experimentos.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, pela sua contribuição na coleta da planta, e por ter concedido a realização dos experimentos de RMN dos metabólitos secundários isolados.

Ao professor Raimundo Braz-Filho, pelo grande auxílio na determinação estrutural de alguns compostos isolados.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Química Orgânica pela valiosa transmissão de conhecimentos e amizade em mais uma etapa de minha vida.

Aos amigos Gustavo, Max, Isabel, Ceíça, Andreza, Patrícia, Chaguinha, Aurélio, Roberto, Roberio, Cléia e Luiz Claudio, pela acolhida no laboratório, pela transmissão de conhecimentos, pelas palavras de apoio e pelas horas de descontração que fazem do laboratório um ambiente mais alegre.

Aos amigos Karisia, Mariano, Vanessa, Ayla, Leonardo e Ynayara, que são presenças fortes em minha vida, pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

A amiga Luciana Bertini, pelo apoio constante a cada novo desafio, pela confiança, pelo respeito, pelo aprendizado e pela cumplicidade vivenciada em nossa união.

Aos secretários Célia e Orlando, e funcionários técnicos Lana, Mundinha e Sr. Paulo, pela ajuda, suporte, e atenção sempre que os procurei.

As instituições CNPq, CAPES, FUNCAP, FINEP, PRONEX pelo suporte financeiro ao curso de pós-graduação, em particular ao CNPq pela bolsa de pesquisa concedida, proporcionando maior tempo de dedicação a pesquisa.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	IV
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	IX
<b>LISTA DE FLUXOGRAMAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	X
<b>RESUMO</b> .....	XI
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS</b> .....	04
1.1. Considerações gerais sobre a família Combretaceae .....	04
1.2. Considerações gerais sobre o gênero <i>Combretum</i> .....	05
1.3. Considerações gerais sobre a espécie <i>Combretum fruticosum</i> .....	05
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	08
2.1. Revisão bibliográfica sobre os constituintes químicos das espécies pertencentes ao gênero <i>Combretum</i> da família Combretaceae .....	08
<b>CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	24
3.1. Determinação estrutural de CFFE-1 .....	24
3.2. Determinação estrutural de CFFE-2 .....	34
3.3. Determinação estrutural de CFFE-3 .....	39
3.4. Determinação estrutural de CFTH-1.....	47
3.5. Determinação estrutural de CFTE-1 .....	51
3.6. Determinação estrutural de CFTE-2 .....	59
3.7. Determinação estrutural de CFRE-1 .....	68
3.8. Determinação estrutural de CFRE-2 .....	74
3.9. Determinação estrutural de CFRE-3 .....	77
<b>CAPÍTULO 4 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	85

4.1. Métodos cromatográficos .....	85
4.1.1. Cromatografia de adsorção .....	85
4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	85
4.2. Métodos Espectrométricos .....	86
4.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV) .....	86
4.2.2. Espectrometria de massas (EM) .....	86
4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	86
4.2.4. Ponto de fusão .....	87
4.2.4. Rotação óptica .....	87
4.3. Estudo dos constituintes fixos de <i>Combretum fruticosum</i> .....	87
4.3.1. Coleta e identificação do material vegetal .....	87
4.3.2. Preparação dos extratos .....	87
4.3.3. Partição líquido-líquido do extrato bruto denominado CFFE .....	88
4.3.4. Fracionamento cromatográfico da fração DCM do extrato CFFE .....	88
4.3.4.1. Fracionamento cromatográfico da fração F3 .....	89
4.3.4.2. Tratamento Cromatográfico da Fração F7-17 por CLAE .....	90
4.3.4.3. Fracionamento cromatográfico da fração F6 .....	90
4.3.4.4. Fracionamento cromatográfico da fração F27-53 .....	91
4.3.4.5. Reação de acetilação da fração F21-48 .....	91
4.3.5. Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt do extrato CFFE .....	92
4.3.5.1. Fracionamento cromatográfico da fração F2 .....	92
4.3.6. Fracionamento cromatográfico do extrato bruto denominado CFTH .....	93
4.3.6.1. Fracionamento cromatográfico da fração F7 .....	93
4.3.7. Partição líquido-líquido do extrato bruto denominado CFTE .....	94
4.3.8. Fracionamento cromatografico da fração DCM do extrato CFTE .....	94
4.3.8.1. Fracionamento cromatográfico da fração 3 .....	95
4.3.8.2. Tratamento cromatográfico da fração F8-15 por CLAE .....	95
4.3.8.3. Tratamento Cromatográfico da Fração F28-40 por CLAE .....	96
4.3.9. Partição líquido-líquido do extrato bruto denominado CFRE.....	97
4.3.10. Fracionamento Cromatográfico da Fração n-Hexano do extrato CFRE.	97
4.3.10.1. Fracionamento cromatográfico da fração F2 .....	98
4.3.11. Fracionamento Cromatográfico da Fração DCM do extrato CFRE.....	98

4.3.11.1. Fracionamento cromatográfico da fração F6 .....	98
4.3.11.2. Tratamento Cromatográfico da Fração F11-14.....	99
<b>CAPITULO 5 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>CAPITULO 6 – CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS....</b>	<b>104</b>
6.1. CFFE-1 .....	104
6.2. CFFE-2 .....	104
6.3. CFFE-3 .....	105
6.4. CFTH-1 .....	106
6.5. CFTE-1 .....	106
6.6. CFTE-2 .....	107
6.7. CFRE-1 .....	107
6.8. CFRE-2 .....	108
6.9. CFRE-3 .....	108
<b>CAPITULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classes de constituintes químicos de plantas pertencentes ao táxon Combretum (Combretaceae), resultantes da revisão bibliográfica realizada até 2007....	09
<b>Tabela 2:</b> Constituintes químicos de plantas pertencentes ao táxon Combretum (Combretaceae), dados resultantes da revisão bibliográfica realizada de 2008 a 2009.....	10
<b>Tabela 3:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFFE -1 .....	25
<b>Tabela 4:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) e <sup>13</sup> C (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFFE -1, comparado com os valores na literatura (Chen et al., 2009) para o ácido maslínico.....	27
<b>Tabela 5:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125MHz, clorofórmio) de CFFE -2.....	35
<b>Tabela 6:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) e <sup>13</sup> C (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CFFE -2, comparado com os valores na literatura (Khac et al,1989) para o ácido 4'-O-Acetil-3',3,4-tri-O-metilelágico.....	36
<b>Tabela 7:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFFE -3.....	40
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) e <sup>13</sup> C (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFFE -3, comparado com os valores na literatura (March et al., 2007) para apigenina 8-C-β-D-glicosídeo.....	42
<b>Tabela 9:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C (125MHz,CDCl <sub>3</sub> ) de CFTH - 1, comparado com os valores na literatura (Albuquerque, 2006) para a mistura dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol.....	48
<b>Tabela 10:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFTE -1.....	52
<b>Tabela 11:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) e <sup>13</sup> C (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFTE -1, comparado com os valores na literatura (John e Tinto, 1992) para (-) trachelogenina....	53
<b>Tabela 12:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFTE-2.....	60
<b>Tabela 13:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) e <sup>13</sup> C (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFTE -2, comparado com os valores na literatura (Lee et al., 2007) para o vladinol F.	62

<b>Tabela 14:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CFRE-1	69
<b>Tabela 15:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (500MHz) e <sup>13</sup> C (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de CFRE -1, comparado com os valores na literatura (Vandrensen, 2005) para o ácido oleanólico...	70
<b>Tabela 16:</b> Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° (125 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFRE -3.....	78
<b>Tabela 17:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C (125MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFRE-3, comparado com os valores na literatura para o ácido arjunólico.....	79
<b>Tabela 18:</b> Dados referentes aos extratos das folhas, talos e raízes de <i>C. fruticosum</i> ...	88
<b>Tabela 19:</b> Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração DCM de CFFE.....	89
<b>Tabela 20:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F3.....	89
<b>Tabela 21:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F6.....	90
<b>Tabela 22:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt de CFFE....	92
<b>Tabela 23:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F2.....	93
<b>Tabela 24:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico CFTH.....	93
<b>Tabela 25:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração DCM de CFTE.....	94
<b>Tabela 26:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F3.....	95
<b>Tabela 27:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração n-hexano de CFRE.	97
<b>Tabela 28:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração DCM.....	98
<b>Tabela 29:</b> Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F6.....	99

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografias ilustrando folhas, flores e frutos da espécie <i>C. Fruticosum</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Acoplamento a longa distância (HMBC) de CFFE -1 .....	26
<b>Figura 3.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFFE-1.....	28
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	28
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ - expansão (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	29
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	29
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	30
<b>Figura 8.</b> Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	30
<b>Figura 9.</b> Espectro de HSQC- expansão (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	31
<b>Figura 10.</b> Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	31
<b>Figura 11.</b> Espectro de HMBC - expansão (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1...	32
<b>Figura 12.</b> Espectro de $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	32
<b>Figura 13.</b> Espectro de Massas de CFFE-1.....	33
<b>Figura 14.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFFE-2.....	36
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFFE-2.....	37
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFFE-2.....	37
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFFE-2.....	38
<b>Figura 18.</b> Espectro de Massas de CFFE-2.....	38
<b>Figura 19 -</b> Acoplamento a longa distancia (HMBC) de CFFE -3.....	40
<b>Figura 20.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFFE-3.....	42
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	43
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ - expansão (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	43
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	44
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	44
<b>Figura 25.</b> Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	45
<b>Figura 26.</b> Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	45
<b>Figura 27.</b> Espectro de $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-3.....	46
<b>Figura 28.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFTH-1.....	49
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFTH-1.....	49
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFTH-1.....	50
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - expansão (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFTH-1.....	50

<b>Figura 32.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFTE-1.....	54
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	54
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ - expansão (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-1.....	55
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-1.....	55
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-1....	56
<b>Figura 37.</b> Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-1.....	56
<b>Figura 38.</b> Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-1.....	57
<b>Figura 39.</b> Espectro de $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-1.....	57
<b>Figura 40.</b> Espectro de Massas de CFTE-1.....	58
<b>Figura 41-</b> Acoplamento a longa distancia (HMBC) de CFTE -2.....	61
<b>Figura 42.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFTE-2.....	63
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-2.....	63
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFFE-2.....	64
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-2.....	64
<b>Figura 46.</b> Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-2.....	65
<b>Figura 47.</b> Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-2.....	65
<b>Figura 48.</b> Espectro de $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina $d_5$ ) de CFTE-2.....	66
<b>Figura 49.</b> Espectro de Massas de Alta Resolução de CFTE-2.....	66
<b>Figura 50.</b> Espectro de Massas de CFTE-2.....	67
<b>Figura 51.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFRE-1.....	71
<b>Figura 52.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1.....	71
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1.....	72
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1.....	72
<b>Figura 55.</b> Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1.....	73
<b>Figura 56.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFRE-2.....	75
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE-2.....	75
<b>Figura 58.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, piridina - $d_5$ ) de CFRE-2.....	76
<b>Figura 59.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, piridina - $d_5$ ) de CFRE-2..	76
<b>Figura 60:</b> Acoplamentos a longa distância (HMBC) de CFRE-3.....	78
<b>Figura 61.</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFRE-3.....	80
<b>Figura 62.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE-3.....	80
<b>Figura 63.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, piridina - $d_5$ ) de CFRE-3.....	81
<b>Figura 64.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135° (125 MHz, piridina - $d_5$ ) de CFRE-3..	81

<b>Figura 65.</b> Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFRE-3.....	82
<b>Figura 66.</b> Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) de CFRE-3.....	82
<b>Figura 67.</b> Espectro de Massas de CFRE-3.....	83
<b>Figura 68:</b> Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de F21-48.....	91

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Proposta mecanística para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massas de CFTE -2.....	60
<b>Quadro 2:</b> Constituintes químicos de isolados de <i>C. fruticosum</i> .....	102

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1:</b> Partição líquido-líquido do extrato bruto CFFE .....	88
<b>Fluxograma 2:</b> Partição líquido-líquido do extrato bruto CFTE .....	94
<b>Fluxograma 3:</b> Fracionamento da fração F3 para o isolamento dos constituintes químicos CFTE-1 e CFTE-2.....	96
<b>Fluxograma 4:</b> Partição líquido-líquido do extrato bruto CFRE .....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$\delta$	Deslocamento químico
$\Phi$	Diâmetro Interno
<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LCMS-IT-TOF</b>	Quadrupolo íon trap-time of flight mass spectrometer
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b><math>[\alpha]_{20}^D</math></b>	Rotação ótica específica

## RESUMO

Neste trabalho é descrito o isolamento dos constituintes químicos micromoleculares das folhas, talos e raízes de *Combretum fruticosum* (Combretaceae), popularmente conhecida como “escova-de-macaco-alaranjada”. O estudo fitoquímico da espécie, empregando métodos cromatográficos em coluna gravitacional e cromatografia líquida de alta eficiência, permitiu o isolamento de nove constituintes químicos pertencentes a diferentes classes estruturais: três triterpenos de esqueleto oleanano identificados como ácido malínico, ácido oleanólico e ácido arjunólico, duas lignanas denominadas (-) trachelogenina e vladinol F, uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol incluindo suas respectivas formas glicosiladas, uma lactona aromática ácido 4'-*O*-Acetil-3',3,4-tri-*O*-metilelágico e o flavonóide apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo. A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM e EM-IES) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), incluindo técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e comparação com dados descritos na literatura.

## ABSTRACT

This work describe the isolation of the chemical constituents from leaves, stems and roots of *Combretum fruticosum* (Combretaceae), popularly known as “escova-de-macaco-alaranjada”. The phytochemical studies, using chromatographic methods such as gravity column chromatography over silica gel and high performance liquid chromatography (HPLC), allowed the isolation and characterization of nine chemical constituents belonging to different structural class: three oleanane triterpenes identified as malinic acid, oleanolic acid and arjunolic acid; two lignans named (-)-trachelogenin and vladinol, the mixture of  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol, including its glucoside forms, a aromatic lactone 4'-*O*-acetyl-3',3,4-tri-*O*-methylelagic and the flavonoid apigenin 8-*C*- $\beta$ -D-glucoside. The structural determination was realized by spectrometric techniques such as: infrared (IR), mass spectrometry (EM and EM-IES), and magnetic resonance of hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR) and carbon-13 ( $^{13}\text{C}$  NMR), including bidimensional techniques (COSY, HSQC e HMBC) and comparison with literature.

# Introdução

## INTRODUÇÃO

O gênero *Combretum* é reconhecido pelas inúmeras propriedades medicinais (Petrovski et al., 2004), por exemplo, as folhas e raízes de *C. zeyheri* são usadas no tratamento de tumores e diarreia; as raízes de *C. molle* são usadas como anticéptico (Fyhrquist et al., 2002) e, segundo Matos (1999), as cascas e folhas de *C. leprosum* são utilizadas no tratamento de sangramento, garganta e câncer.

Plantas pertencentes a esse gênero são fontes prolíficas de metabólitos secundários e seu estudo fitoquímico relata especialmente o isolamento de triterpenos e flavonóides (Katerere et al., 2003), bifenilas (Adnyana et al., 2001), fenantrenos (Cirla e Mann, 2003), lignanas (Letcher e Nhamo, 1971), lactonas (Adnyana et al., 2000) e taninos (Jossang et al., 1994).

Este trabalho tem como objetivo contribuir com o conhecimento químico sobre o gênero *Combretum*, isolando e caracterizando os metabólitos secundários presentes nas folhas, talos e raízes de *C. fruticosum*.

*C. fruticosum*, também conhecido pelas sinonímias *C. loeflingii*, *C. oxypetalum* e *Gaura fruticosa* é uma planta originária da América do Sul, que devido suas características ornamentais foi introduzida em vários países, especialmente naqueles de clima tropical, onde melhor se adapta.

O estudo químico dessa espécie resultou no isolamento de nove substâncias pertencentes a diferentes classes. O fracionamento do extrato etanólico das folhas permitiu o isolamento do ácido maslínico (CFFE-1), um triterpeno da serie oleaneno, do ácido 4'-O-Acetil-3',3,4-tri-O-metilelágico (CFFE-2), lactona derivada do ácido elágico e ainda o isolamento de um flavonóide denominado apigenina 8-C-β-D-glicosídeo (CFFE-3). O estudo dos talos proporcionou o isolamento e a identificação da mistura dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol (CTTH-1), obtidas a partir do extrato hexânico e das lignanas, relatadas pela primeira vez no gênero, denominadas (-) trachelogenina (CFTE-1) e vladinol (CFTE-2), obtidas a partir do extrato etanólico. Do extrato etanólico das raízes foram isolados os triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico (CFRE-1) e ácido arjunólico (CFRE-3) e a mistura dos glicosídeos β-sitosterol e estigmasterol (CFRE-2).

Durante o desenvolvimento desse trabalho foram utilizadas técnicas cromatográficas como cromatografia em coluna e cromatográfica em camada delgada,

utilizando sílica gel, e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Técnicas espectrométricas como Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), incluindo técnicas bidimensionais como  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY, HSQC e HMBC foram utilizadas na elucidação estrutural dos metabólitos secundários isolados.

A apresentação deste trabalho de pesquisa encontra-se organizado em seis capítulos: Capítulo 01 - Considerações Botânicas; Capítulo 02 – Revisão bibliográfica; Capítulo 03 - Determinação Estrutural; Capítulo 04 - Procedimentos Experimentais; Capítulo 05 – Conclusões; Capítulo 06 – Constantes físicas e dados espectroscópicos; Capítulo 07 - Referências Bibliográficas. As referências bibliográficas utilizadas foram organizadas conforme as normas da ABNT.

# CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

## 1. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 1.1 Considerações gerais sobre a família Combretaceae

Combretaceae é uma família botânica da ordem Myrtales, que ocorre predominantemente em áreas tropicais e subtropicais. A família compreende cerca de 400 espécies incluindo árvores, arbustos e lianas distribuídas em aproximadamente 20 gêneros. Os dois gêneros mais comumente encontrados são *Combretum* e *Terminalia*, distribuídas largamente nas regiões da África ocidental, Ásia e região nordeste do Brasil (Katerere et al., 2003).

Souza (2005), descreve essa família da seguinte forma:

Folhas opostas, simples, estípulas ou vestigiais, margem inteira, peninérvias, freqüentemente concentradas no ápice dos ramos, ocasionalmente nectários extraflorais. Inflorescência racemosa, geralmente espiga. Flores geralmente pouco vistosas e bissexuadas, actinomorfas, mono ou diclamídeas, geralmente com disco nectarífero. Cálice com 4,5 ou 8 pétalas, diali ou gamossépalo. Corola com 4, 5 ou 8 pétalas, dialipétala, prefloração valvar. Estames geralmente em número duplo ao número de sépalas, muitos longos e vistosos, anteras rimosas. Ovário ínfero, com 2-5 carpelos, unilocular, placentação pêndula, 2-6 óvulos, estilete único. Fruto dupra ou sâmara, com uma única semente, indeiscente.

Muitas espécies dessa família são utilizadas medicinalmente em vários continentes do mundo. Na África algumas espécies do gênero *Combretum* e *Terminalia* são utilizadas tradicionalmente para tratar dores abdominais, infecções bacterianas, conjutivite, febre, úlceras gástricas, dores de cabeça, hemorragias, doenças cardíacas, doenças de pele, câncer e doenças venéreas (Eloff et al., 2008).

## 1.2 Considerações gerais sobre o gênero *Combretum*.

O gênero *Combretum* é um dos maiores pertencentes a família Combretaceae com cerca de 370 espécies (Petrovski et al., 2006). É representado por árvores, arbustos, subarbustos e lianas, distribuídos pelas regiões tropicais da África, Ásia e América. (Catarino et al., 2000).

Plantas pertencentes a esse gênero são prolíficas fontes de metabólitos secundários bioativos. Os compostos fenantrenos, estilbenos, flavonóides, bifenilas, triterpenos são bastante encontrados em espécies desse gênero, além de exibem importantes atividades farmacológicas como: antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, anti-HIV tipo 1 e 2, analgésica, antimicrobiana, entre outras (Garcez et al., 2003).

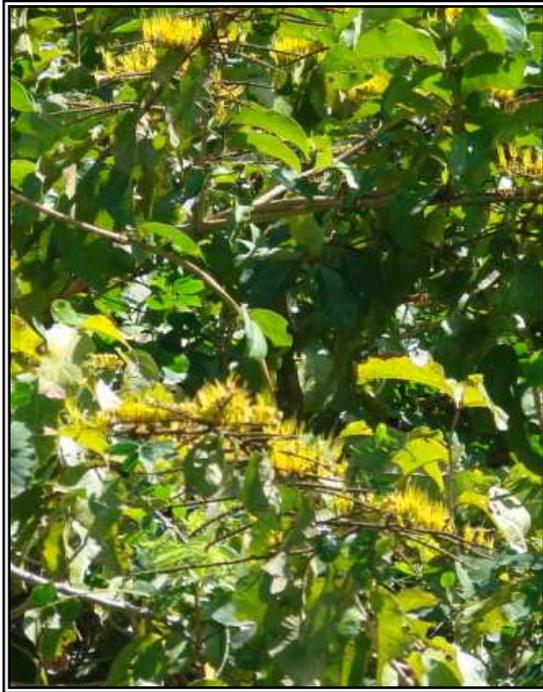
Segundo Silva (2005), o gênero *Combretum* apresenta as seguintes características:

Arbustos escandecentes, folhas opostas, não aglomeradas no ápice; indumento com tricomas escamiformes e combretáceo-compartimentados; frutos com 4-5 alas membranáceas; flores dispostas em dibrótios multifloro ou em espigas ou racemos simples; bractéolas longas, laceoladas.

### 1.2 Considerações gerais sobre a espécie *Combretum fruticosum*

*C. fruticosum* (Fig. 1 pág. 6), também conhecido pelas sinonímias *Gaura fruticosa*, *Combretum loeflingii*, *Combretum oxypetalum*, é um arbusto originário da América do Sul, conhecido popularmente como escova-de-macaco-alaranjada, em virtude do formato de sua inflorescência densa e da cor alaranjada dos longos estames (Lorenzi et al., 2001).

É uma planta ramificada de porte médio bastante versátil no paisagismo, alcançando até 3 metros de altura e 6 metros de largura. Suas folhas são opostas, elípticas, perenes, de cor bronzeada, quando jovens e verde quando maduras. As inflorescências surgem no verão e são do tipo espiga, com aspecto de escova. As flores desabrocham inicialmente com a cor amarelo-esverdeada e à medida que amadurecem, adquirem uma tonalidade laranja intensa. Os frutos são secos, do tipo sâmara, avermelhados e decorativos (<http://www.jardineiro.net/br/banc/combretumfruticosum>).



**Figura 1:** Fotografias ilustrando folhas, flores e frutos da espécie *C. Fruticosum*\*.  
\* Fotos cedidas pelo prof. Edilberto Rocha Silveira

**REVISÃO  
BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1-Revisão bibliográfica sobre os constituintes químicos das espécies pertencentes ao gênero *Combretum* da família Combretaceae

A revisão bibliográfica realizada por Rocha (2008) em sua dissertação de mestrado, intitulada como Estudo Químico de *Combretum mellifluum* Eichler (Combretaceae), descreve sobre as classes, os constituintes químicos e as atividades biológicas de espécies pertencentes ao táxon *Combretum* (Combretaceae). Os dados foram obtidos de publicações registradas até o ano de 2007, tendo como fonte de consulta os sites científicos de busca “Scifinder”, “Sciencedirect” e “SciELO”.

Nesse levantamento 21 espécies foram investigadas, resultando no isolamento e caracterização de 182 metabólitos secundários, os quais apresentaram entre seus principais constituintes substâncias pertencentes à classe dos triterpenos, fenantrenos, bifenilas, flavonóides, lactonas, lignanas e outras. Na Tabela 1 (pág. 9), esta relacionada as espécies estudadas e as classes de constituintes químicos isolados.

Os triterpenos foram os compostos encontrados em maior quantidade, sendo responsáveis pelo percentual de 61,8% dos compostos isolados, representados principalmente pelos esqueletos lupano, ursano e oleanano, seguido pelos tipos damarano e cicloartano. Em seguida destacam-se os fenantrenos e bifenilas com 16,5% e os flavonóides com 11,8%, a maioria constituídos de flavonas.

As plantas pertencentes ao gênero *Combretum* são prolíficas fontes de metabólitos secundários bioativos. Na revisão foi possível observar inúmeras atividades biológicas e farmacológicas relacionadas às espécies, entre as quais se destacam as atividades antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antelmíntica, analgésica e anti-HIV tipo 1 e 2.

Em pesquisa bibliográfica também realizada em sites científicos de busca (“Scifinder”, “Sciencedirect” e “SciELO”) sobre os constituintes químicos identificados em plantas das espécies pertencentes ao gênero *Combretum*, no período de 2008 a 2009, observou-se registros para algumas das espécies anteriormente estudadas e o aparecimento de três novas espécies que não haviam sido investigadas até então, são elas: *C. laxum*, *C. olivaeforme* e *C. sundaicum*.

Observou-se ainda a publicação de trabalhos onde foram isolados vários constituintes inéditos para as espécies já estudadas. O resultado deste levantamento

encontra-se relacionado no Quadro 1 (pág. 9), por ordem alfabética das espécies com registros à partir de 2008, seus constituintes químicos e classe a que pertencem.

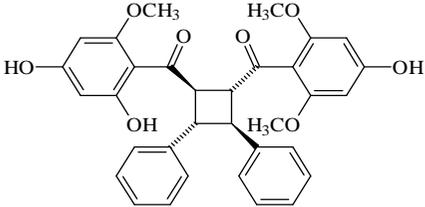
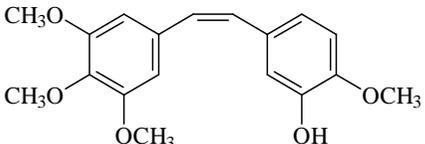
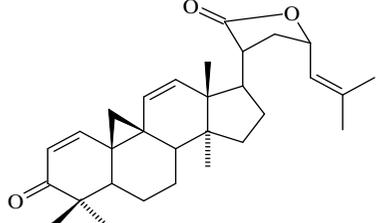
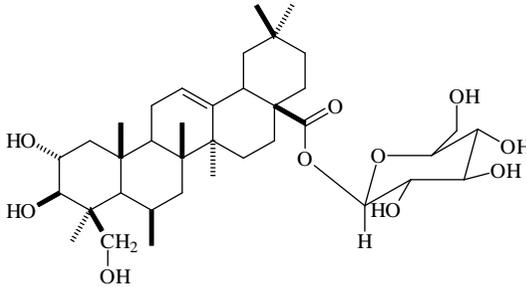
**Tabela 1:** Classes de constituintes químicos de plantas pertencentes ao táxon *Combretum* (Combretaceae), resultantes da revisão bibliográfica realizada até 2007 (Rocha, 2008)

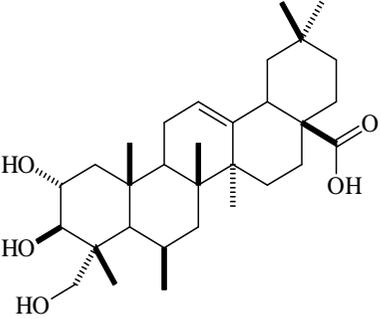
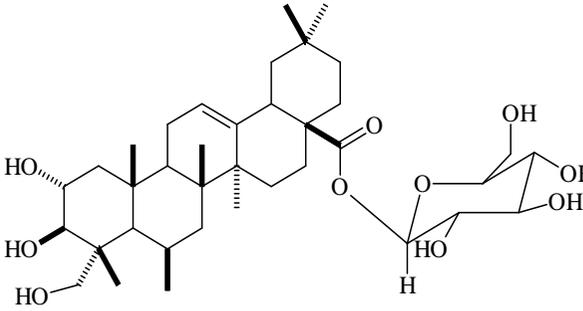
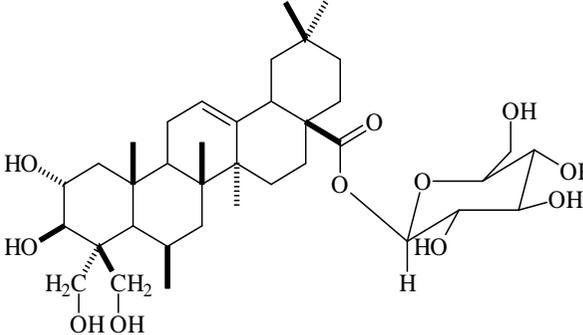
<b>Espécie</b>	<b>Classe de constituintes identificados</b>
<i>Combretum apiculatum</i>	Fenantrenos e bifenilas
<i>Combretum albopunctatum</i>	Flavonóides
<i>Combretum caffrum</i>	Fenantrenos, bifenilas e lactonas
<i>Combretum coccineum</i>	Triterpenos
<i>Combretum edwardsii</i>	Triterpenos
<i>Combretum elaeagnoides</i>	Triterpenos
<i>Combretum erythrophyllum</i>	Taninos, fenantrenos, bifenilas, flavonóides e lactonas
<i>Combretum glutinosum</i>	Taninos
<i>Combretum imberbe</i>	Triterpenos
<i>Combretum kraussii</i>	Triterpenos, fenantrenos e bifenilas
<i>Combretum leprosum</i>	Triterpenos e flavonoides
<i>Combretum molle</i>	Triterpenos, taninos, fenantrenos e bifenilas
<i>Combretum micranthum</i>	Flavonóides
<i>Combretum nigricans</i>	Triterpenos
<i>Combretum padoides</i>	Triterpenos
<i>Combretum psidioides</i>	Fenantrenos e bifenilas
<i>Combretum quadrangulare</i>	Triterpenos, flavonóides e lignanas
<i>Combretum yunnanensis</i>	Lactonas
<i>Combretum rotundifolium</i>	Triterpenos
<i>Combretum woodii</i>	Triterpenos, fenantrenos e bifenilas
<i>Combretum zeyheri</i>	Compostos fenólicos

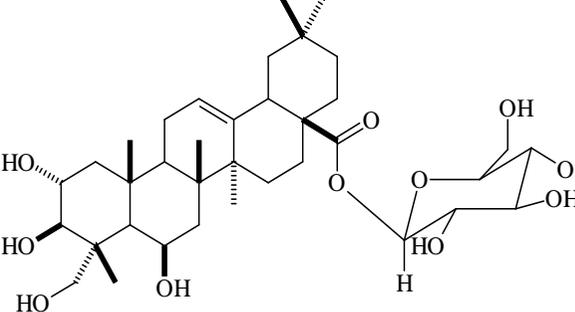
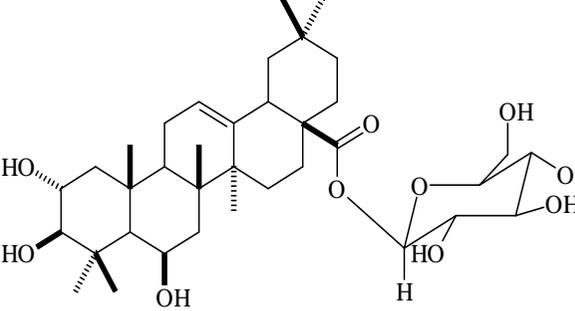
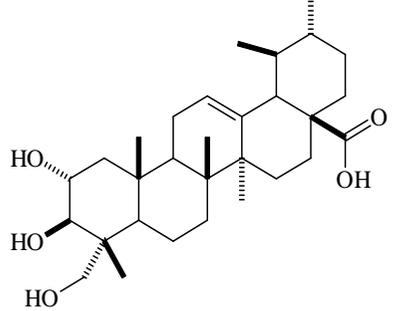
---

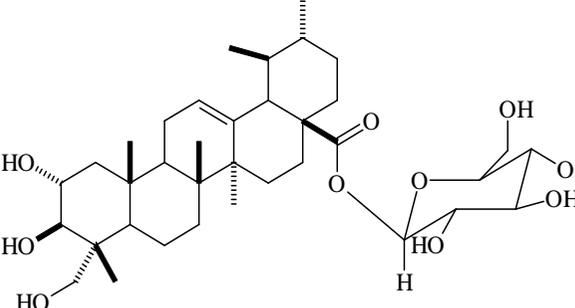
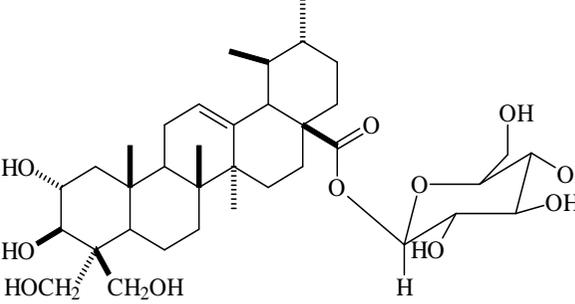
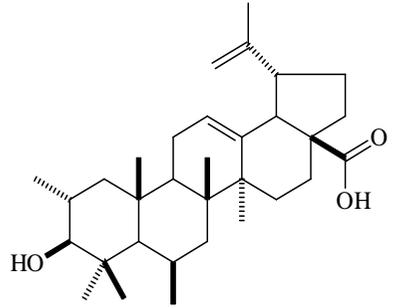
**Tabela 2:** Constituintes químicos de plantas pertencentes ao táxon Combretum (Combretaceae), dados resultantes da revisão bibliográfica realizada de 2008 a 2009.

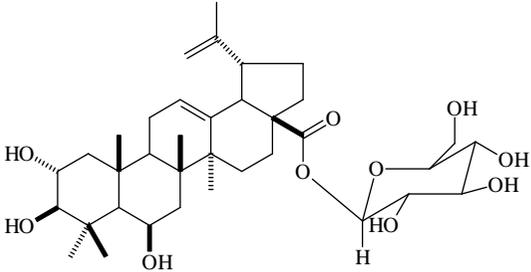
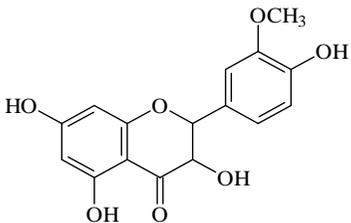
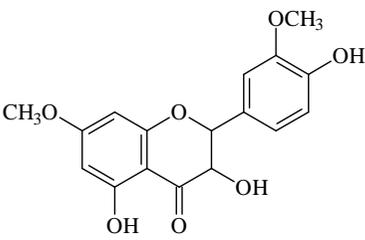
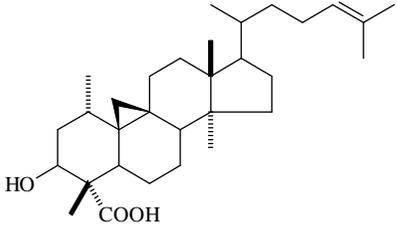
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
---------	--------------	--------	-----------	------------

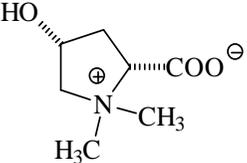
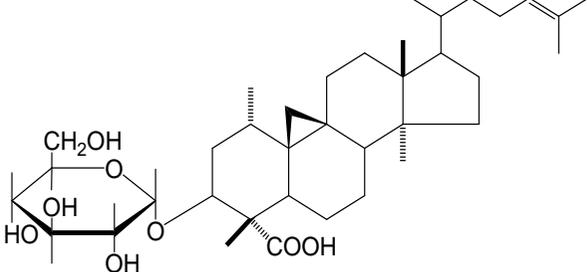
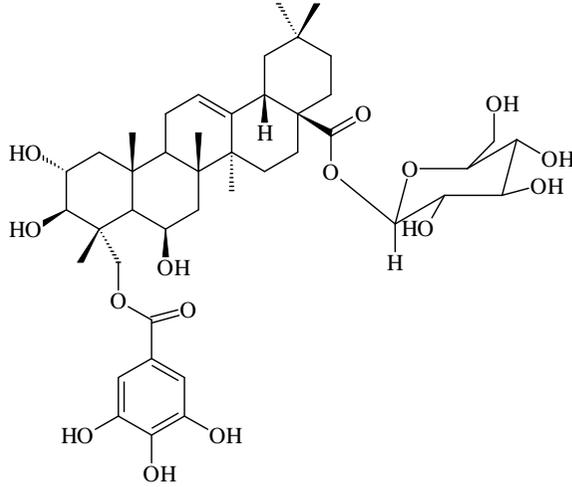
<i>mbretum apiculatum</i> ; <i>Combretum albopunctatum</i>	Metanona	Polifenol		ELOFF <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum caffrum</i>	Combretastatina A4	Estilbenos		LI <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum erythrophyllum</i>	Ácido eritrofilico	Triterpeno		ELOFF <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i>	$\beta$ -D-glucopiranosil 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24- trihidroxiolean-12-en- 28-oato	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008

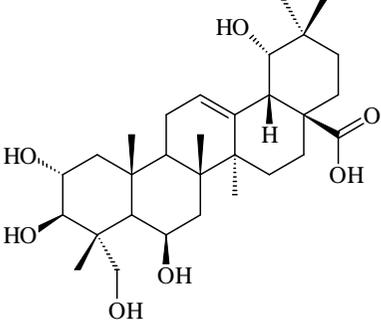
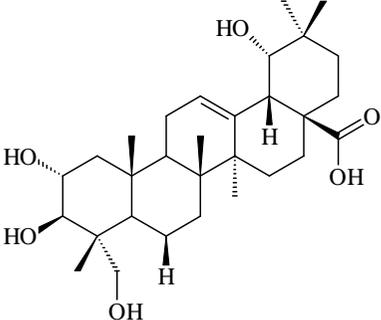
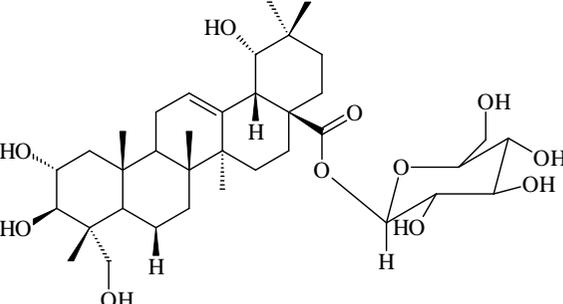
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum laxum</i> , <i>Combretum nelsonii</i> <i>Combretum leprosum</i>	Ácido arjunólico	Triterpeno		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008; MASOCO <i>et al.</i> , 2008; FACUNDO <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i>	Arjunoglicosídeo II	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i>	Bellericosídeo	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008

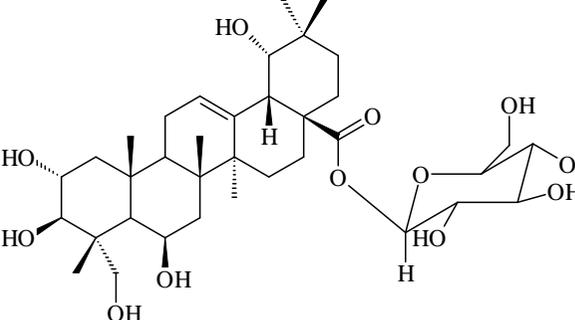
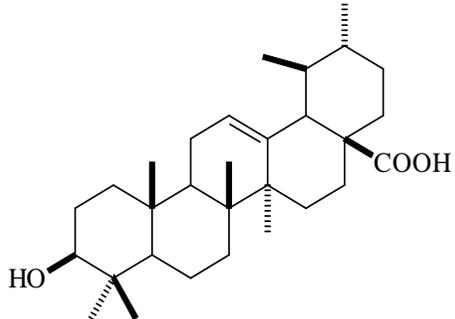
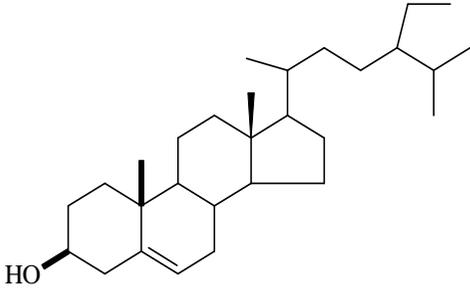
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum laxum</i>	Chebulosideo II	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i>	$\beta$ -D-glicopiranosil 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,6 $\beta$ - trihidroxiolean-12-en- 28-oate	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i> , <i>Combretum nelsonii</i>	Ácido asiático	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008 MASOCO <i>et al.</i> , 2008

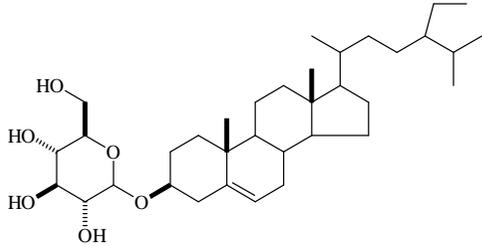
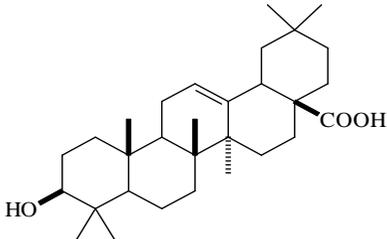
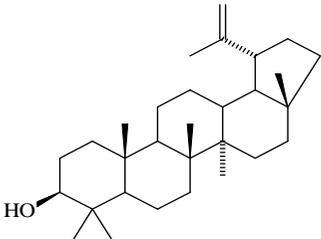
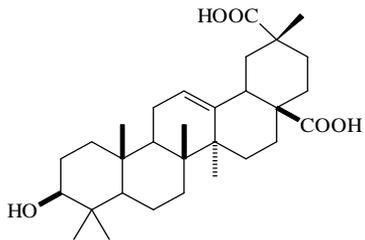
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum laxum</i>	Quadranosideo IV	Triterpeno		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i>	$\beta$ -D-glicopiranosil 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23,24- tetrahidroxy-12-en- 28-oato	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum laxum</i>	Ácido betulínico	Triterpeno		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008

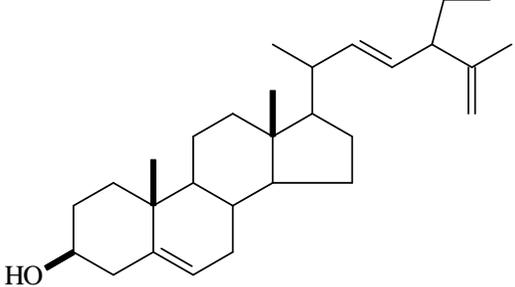
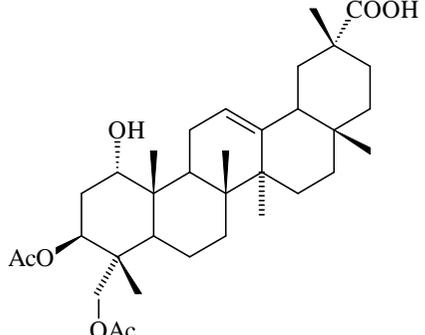
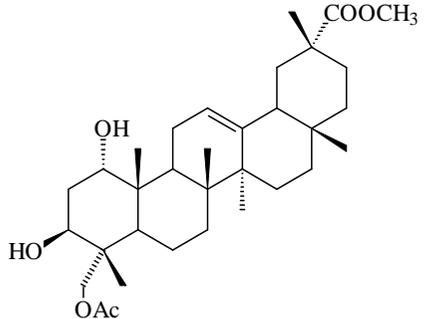
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum laxum</i>	Quadranosideo I	Triterpeno glicosilado		GARCEZ <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum leprosum</i>	Isorhamnetina	Flavonóide		FACUNDO <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum leprosum</i>	Rhamnazina	Flavonóide		FACUNDO <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum leprosum</i>	Ácido mólico	Triterpeno		FACUNDO <i>et al.</i> , 2008

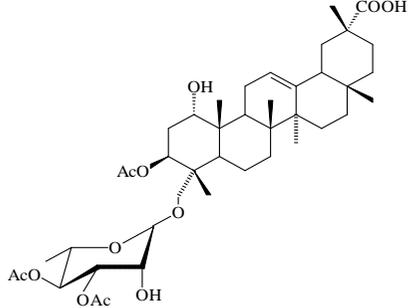
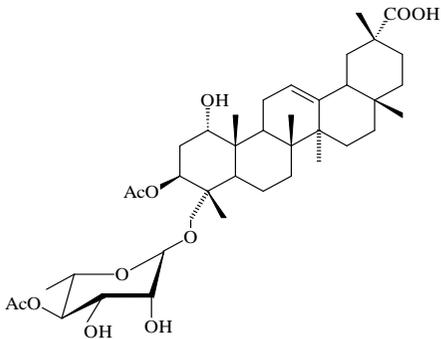
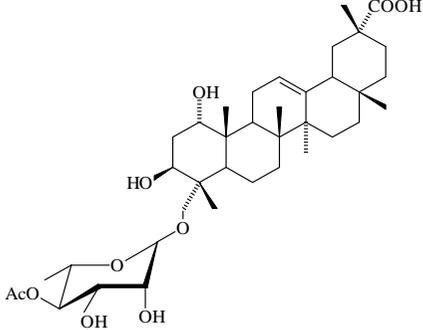
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum micrantum</i>	Betonicina	Alcalóide		ELOFF <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum molle</i>	Ácido mólico glicosilado	Triterpeno glicosilado		PONOU <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum molle</i>	Ácido terminólico	Triterpeno		PONOU <i>et al.</i> , 2008

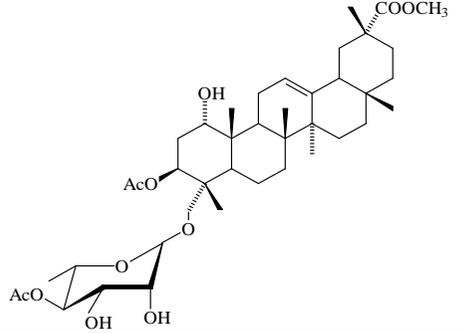
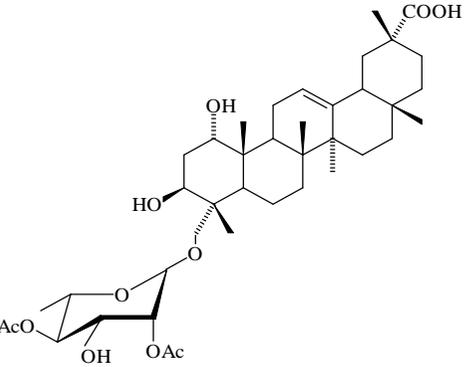
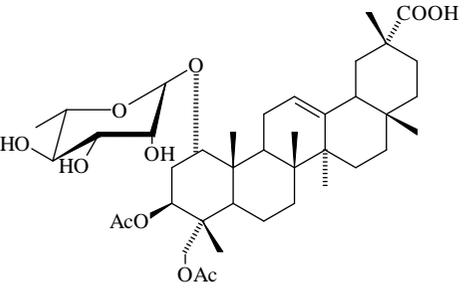
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum molle</i>	Combregenina	Triterpeno		PONOU <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum molle</i>	Arjungenina	Triterpeno		PONOU <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum molle</i>	Arjunoglicosideo I	Triterpeno glicosilado		PONOU <i>et al.</i> , 2008

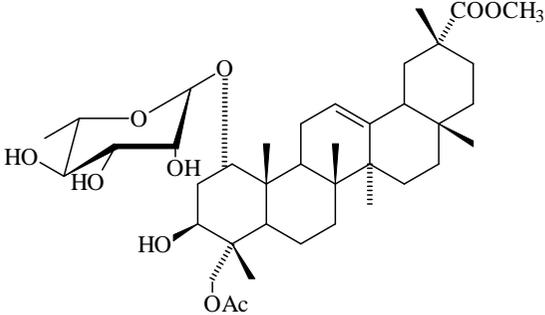
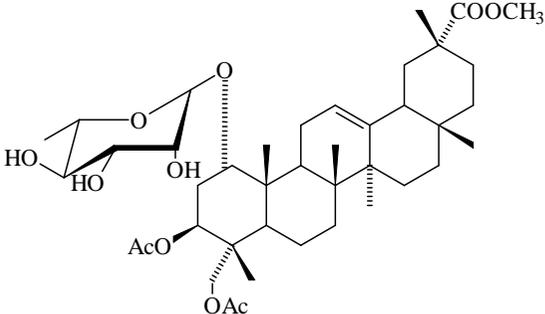
Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum molle</i>	Combreglicosideo	Triterpeno glicosilado		PONOU <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum olivaeforme</i>	Ácido ursólico	Triterpeno		CHEN <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum olivaeforme</i>	$\beta$ -sitosterol	Esteróide		CHEN <i>et al.</i> , 2008

Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum olivaeforme</i>	$\beta$ -sitosterol glicosilado	Esteróide glicosilado	 <p>The structure shows a steroid nucleus with a glucose molecule attached to the C-3 position via an oxygen atom. The glucose ring has hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6, and a hydroxymethyl group at C-4. The steroid nucleus has methyl groups at C-10 and C-13, and a long branched side chain at C-17.</p>	CHEN <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum olivaeforme</i>	Ácido oleonóico	Triterpeno	 <p>The structure is a pentacyclic triterpene with a hydroxyl group at C-14 and a carboxylic acid group at C-28. It features methyl groups at C-13 and C-14, and a double bond between C-15 and C-16.</p>	CHEN <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum olivaeforme</i>	Lupeol	Esteróide	 <p>The structure is a pentacyclic triterpene with a hydroxyl group at C-14 and a methyl group at C-28. It features methyl groups at C-13 and C-14, and a double bond between C-15 and C-16.</p>	CHEN <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum olivaeforme</i>	Ácido serratagênico	Triterpeno	 <p>The structure is a pentacyclic triterpene with hydroxyl groups at C-14 and C-28, and a methyl group at C-28. It features methyl groups at C-13 and C-14, and a double bond between C-15 and C-16.</p>	CHEN <i>et al.</i> , 2008

Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum olivaeforme</i>	Estigmastatrienol	Esteróide		CHEN <i>et al.</i> , 2008
<i>Combretum sundaicum</i>	Ácido 23-acetoxi-3-acetilimberbico	Triterpeno		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum sundaicum</i>	29-metil éster do ácido 23-acetoxi-imberbico	Triterpeno		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009

Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum sondaicum</i>	Ácido 23- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-3',4'-diacetilrhampiranosil]-3 $\beta$ -acetilimberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum sondaicum</i>	Ácido 23- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-4'-acetilrhampiranosil]-3-acetilimberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum sondaicum</i>	Ácido 23- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-4'-acetilrhampiranosil]imberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009

Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum sundaicum</i>	29-metil éster do ácido 23- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-4'-acetilrhamnopiranosil]-3-acetylimberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum sundaicum</i>	Ácido 23- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-2',4'-diacetilrhamnopiranosil]-imberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum sundaicum</i>	Ácido 1- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-rhamnopiranosil]-23-acetoxi-3-acetil-imberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009

Espécie	Constituinte	Classe	Estrutura	Referência
<i>Combretum sundaicum</i>	29-metil éster do ácido 1- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-(rhamnopiranosil)]-23-acetoxi-imberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009
<i>Combretum sundaicum</i>	29-metil éster do ácido 1- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-rhamnopiranosil]-23-acetoxi-3-acetilimberbico	Triterpeno glicosilado		LITAUDON <i>et al.</i> , 2009

# **DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL**

### 3.1- Determinação estrutural de CFFE -1

A fração diclorometano (DCM) do extrato etanólico das folhas de *C. fruticosum* (item 4.3.4.2, pág. 90) após sucessivos tratamentos cromatográficos, incluindo CLAE, forneceu 25 mg de um sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 254-257 °C,  $[\alpha]_{20}^D + 39,1^\circ$  (c. 0,25 g/100 mL, MeOH), codificado como CFFE -1.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 3, pág 28), apresentou uma banda larga em  $3428\text{ cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de ligação OH de álcoois e/ou fenóis, além de bandas entre  $1050\text{-}1273\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial de ligação C-O. Exibiu também absorções em  $2944\text{ cm}^{-1}$  e em aproximadamente  $2900\text{ cm}^{-1}$ , características de deformações axiais de ligações C-H ( $\text{C-sp}^3$ ) e absorções em  $1692\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=O.

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  com desacoplamento com pulso composto (RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD) [125 MHz, piridina  $d_5$ ] (Fig. 6, pág. 29), revelou sinais correspondentes a trinta átomos de carbono. A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  (Fig. 7, pág. 30) permitiu determinar o padrão de hidrogenação correspondentes a seis carbonos metínicos, um deles  $\text{sp}^2$  ( $\delta_{\text{C}} 122,9$ ) e dois oxigenados  $\delta_{\text{C}} 69,1$  (C-2) e  $84,3$  (C-3), nove carbonos metilênicos, sete carbonos metílicos e oito carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}} 180,7$  relativo à carbonila de ácido e o sinal em  $\delta_{\text{C}} 145,3$  relativo a um carbono  $\text{sp}^2$ . Os valores dos deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}} 122,9$  (C-12) e  $145,3$  (C-13) são compatíveis com uma estrutura triterpenica de esqueleto oleanano.

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  [500 MHz, piridina  $d_5$ ] (Figs. 4 e 5, págs. 28 e 29), mostrou sinais em  $\delta_{\text{H}} 5,47$  (1H, sl, H-12) característico de hidrogênio olefinico e em  $\delta_{\text{H}} 4,09$  (1H, m, H-2) e  $3,41$  (1H, d, H-3) relativos à hidrogênios carbinólicos. A concentração de sinais nas regiões de  $\delta_{\text{H}} 0,95\text{-}1,27$ , referentes a grupos metílicos, e de  $\delta_{\text{H}} 1,45\text{-}2,25$ , referentes a grupos metilênicos e metínicos, foram coerentes com uma estrutura de natureza terpênica. A multiplicidade correspondente ao H-18 ( $\delta_{\text{H}} 2,29$ ,  $J=11,8$  Hz) como um dd confirma o esqueleto oleanano como deduzido anteriormente.

Os dados espectroscópicos acima descritos permitiram propor a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$  em acordo com o íon molecular em  $m/z$  472 Daltons, apresentado pelo espectro de massas (Fig. 13, pág. 33). Através da fórmula molecular pode-se calcular sete graus de

insaturação, retificados pela presença de uma carbonila, uma dupla ligação entre C-12 e C-13 e cinco ciclos, confirmando a estrutura de um triterpeno.

**Tabela 3.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (125 MHz, piridina- $d_5$ ) de CFFE -1

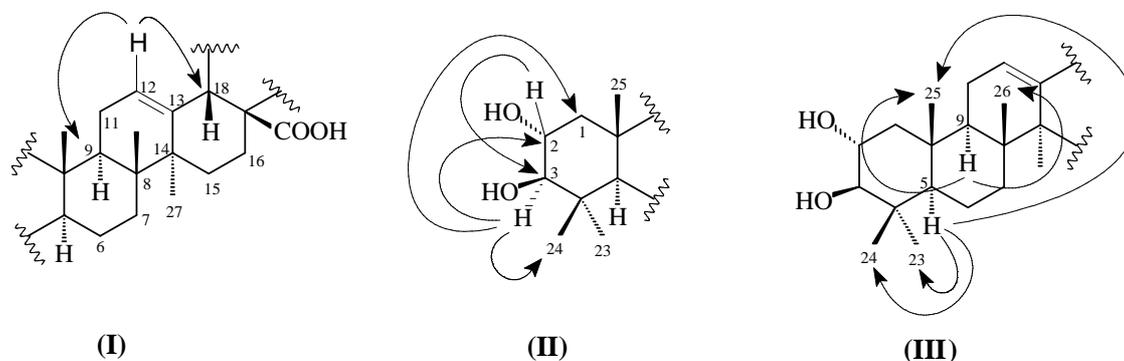
<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>CH<sub>3</sub></i>	Formula Molecular
180,7 (CO <sub>2</sub> H)	122,9 (CH-sp <sup>2</sup> )	48,2	33,7	
145,3 (C-sp <sup>2</sup> )	84,3 (CH-OH)	46,9	29,8	
47,2	69,1 (CH-OH)	34,7	26,6	
42,7	56,4	33,7	24,2	
40,3	48,6	33,7	18,1	
40,3	42,5	28,8	17,9	
39,0	-	24,4	17,3	
31,4	-	24,1	-	
-	-	19,4	-	
<b>8C</b>	<b>6CH</b>	<b>9CH<sub>2</sub></b>	<b>7CH<sub>3</sub></b>	

Através do espectro HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation* – Correlação Heteronuclear Simples-Quântica) (Figs. 8 e 9, págs. 30 e 31) foi possível correlacionar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono (Tab. 3, pág 25). Com este experimento os sinais correspondentes aos hidrogênios oximetínicos foram atribuídos de forma inequívoca ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ : 4,09/69,1 e 3,41/84,3).

O espectro COSY (*Correlation Spectroscopy* – espectroscopia de correlação) (Fig. 12, pág. 32), reforçou a posição dos grupos funcionais no anel A, através do acoplamento vicinal entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,09 (H-2), com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,25 e 1,30 (2H-1) e com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,41 (H-3).

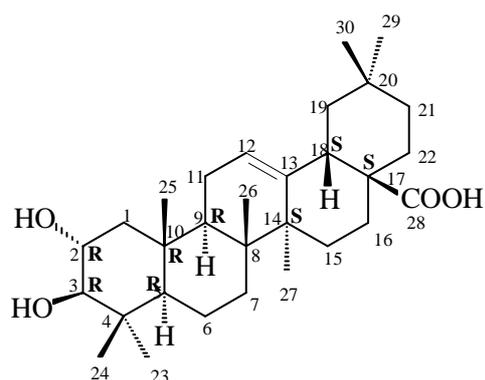
Com base na análise do espectro HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation* – Coerência Heteronuclear através de Muitas Ligações) (Figs. 10 e 11, págs. 31 e 32), foi determinado com segurança a localização da dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13, em função da correlação a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) do hidrogênio olefínico em  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (H-12) com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  48,6 (C-9) e 42,5 (C-18) (I). A posição dos carbonos oxigenados também pode ser determinada em função da correlação a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,09 (H-2) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  84,3 (C-3) e da correlação a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,41 (H-3) com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  48,2 (C-1) e 18,2 (C-24). Outras correlações de H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1,05) a três ligações com os carbonos C-23 ( $\delta_{\text{C}}$  29,8), C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  18,1) e C-25 ( $\delta_{\text{C}}$  17,3) e de H-9 a três ligações com os carbonos C-25 e

C-26 ( $\delta_C$  17,9), foram também importantes para a elucidação da estrutura conforme mostrado nas subestruturas abaixo.



**Figura 2-** Acoplamento a longa distância (HMBC) de CFFE -1

Após análise dos dados espectrais e comparação com dados descritos na literatura (W. How et al., 2009), pode-se concluir que CFFE-1 trata-se de um triterpeno de esqueleto oleaneno denominado ácido maslínico. Apesar de triterpenos serem constituintes majoritários de *Combretum*, este é o primeiro relato do referido composto a partir do gênero. O ácido maslínico foi isolado anteriormente de *Lagerstroemia speciosa* (W. How et al., 2009), pertencente a família das Lythraceas.



Ácido maslínico – CFFE-1

**Tabela 4.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFFE -1, comparado com os valores na literatura (Chen et al., 2009) para o ácido maslínico.

C	HSQC		HMBC		Literatura*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	48,2	2,25; 1,30	-	-	47,3	-
2	69,1	4,09 (m)	H-3	-	68,0	4,09 (ddd)
3	84,3	3,41 (d, $J = 9.2$ )	H-2	-	82,4	3,39 (d, $J = 9.0$ )
4	40,4	-	-	-	39,4	-
5	56,4	1,05	-	3H-23; 3H-24; 3H-25	55,4	-
6	19,4	1,60; 1,40	-	-	18,4	-
7	33,7	1,80; 1,30	-	-	32,7	-
8	40,3	-	-	-	39,3	-
9	48,7	1,80	-	3H-25; 3H-26	47,7	-
10	39,0	-	3H-25	-	38,0	-
11	24,4	2,10; 1,90	-	-	23,5	-
12	122,3	5,47 (sl)	-	H-18	121,6	5,46 (s)
13	145,8	-	H-18	-	144,4	-
14	42,7	-	-	-	41,7	-
15	28,8	2,15; 1,30	-	-	27,8	-
16	24,1	2,15; 1,20	-	-	23,3	-
17	47,2	-	-	-	46,2	-
18	42,5	2,29 (dd, $J = 11.8$ )	-	-	41,5	-
19	46,9	1,80; 1,25	-	-	46,0	-
20	31,5	-	-	-	30,5	-
21	34,7	1,45; 1,20	-	-	33,8	-
22	33,7	2,05; 1,50	-	-	32,8	-
23	29,8	1,27 (s)	-	-	28,9	1,26 (s)
24	18,2	1,08 (s)	-	-	17,2	1,07 (s)
25	17,3	0,98 (s)	-	-	16,4	0,98 (s)
26	17,9	1,00 (s)	-	-	17,1	0,99 (s)
27	26,7	1,25 (s)	-	-	25,7	1,25 (s)
28	180,8	-	-	H-18; H-22a	178,7	-
29	33,8	0,95 (s)	-	-	32,8	0,93 (s)
30	24,3	1,01 (s)	-	-	23,3	1,01 (s)

\* RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (400MHz) usando DMSO

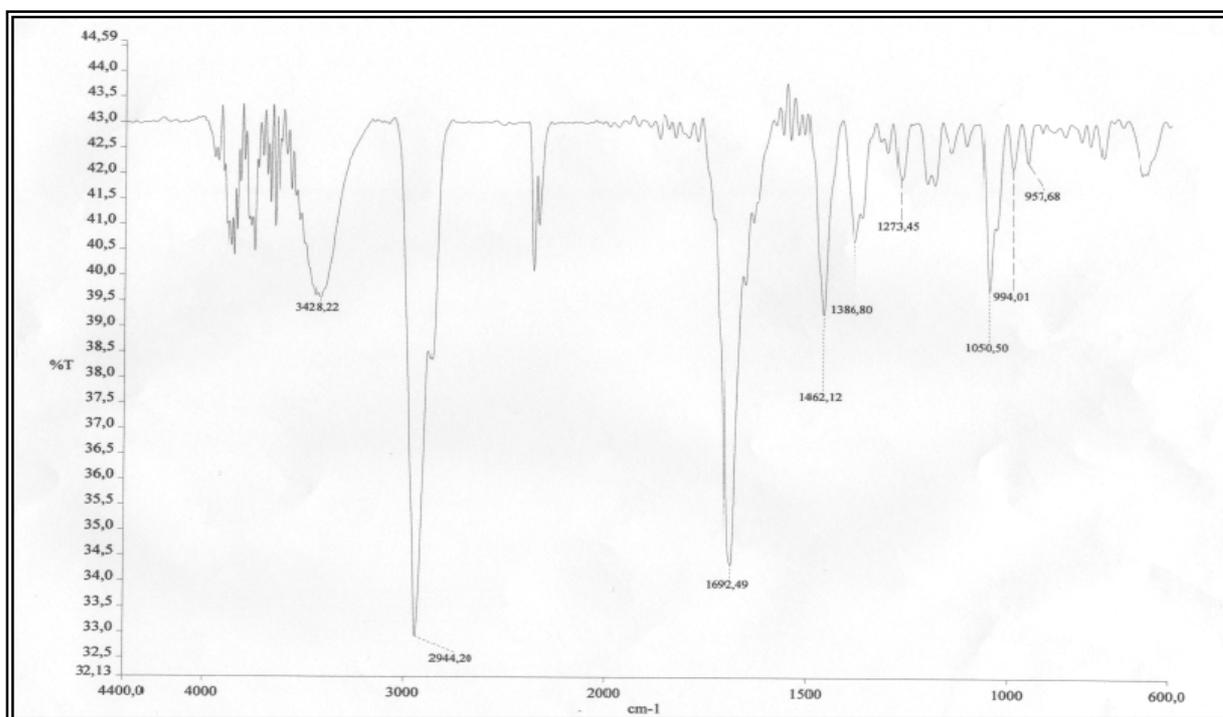


Figura 3. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFFE-1.

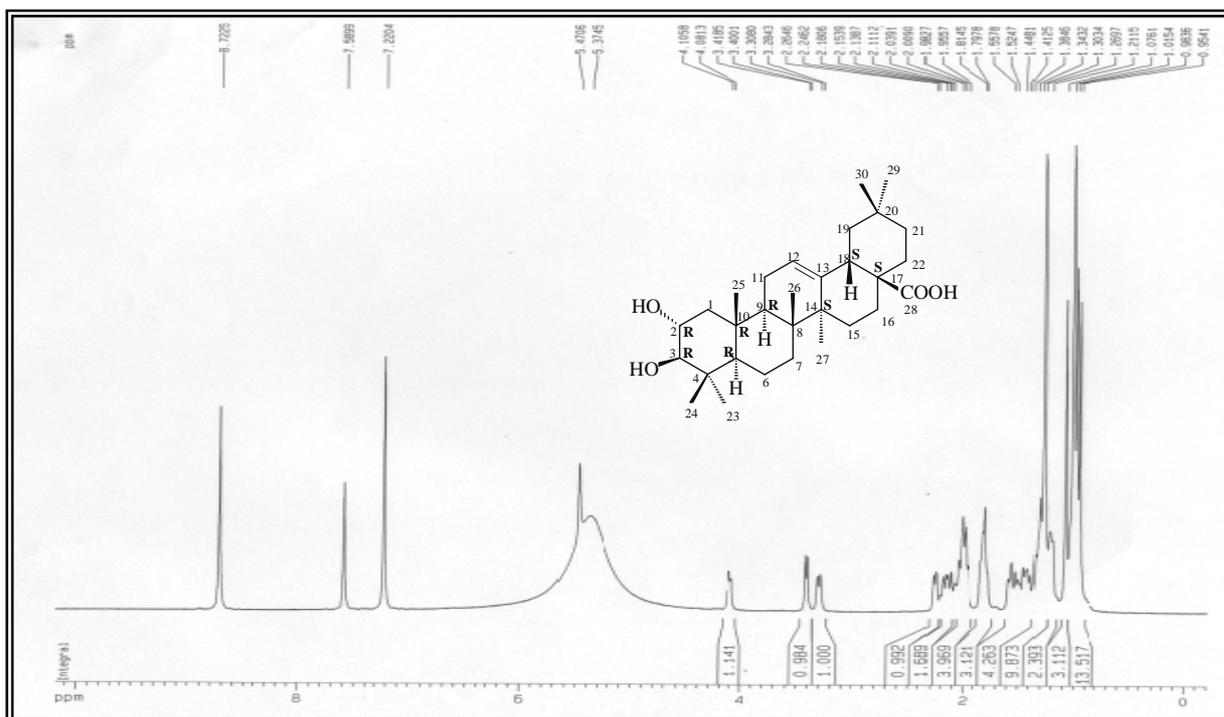


Figura 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

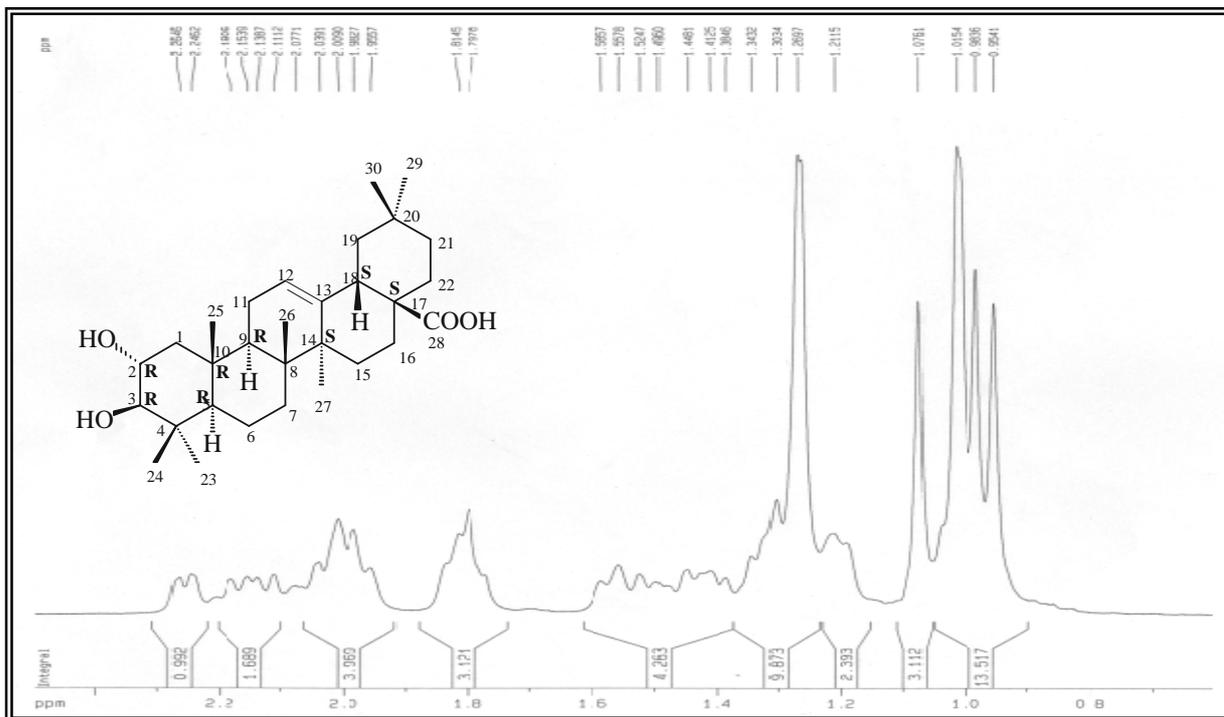


Figura 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$ - expansão (500MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

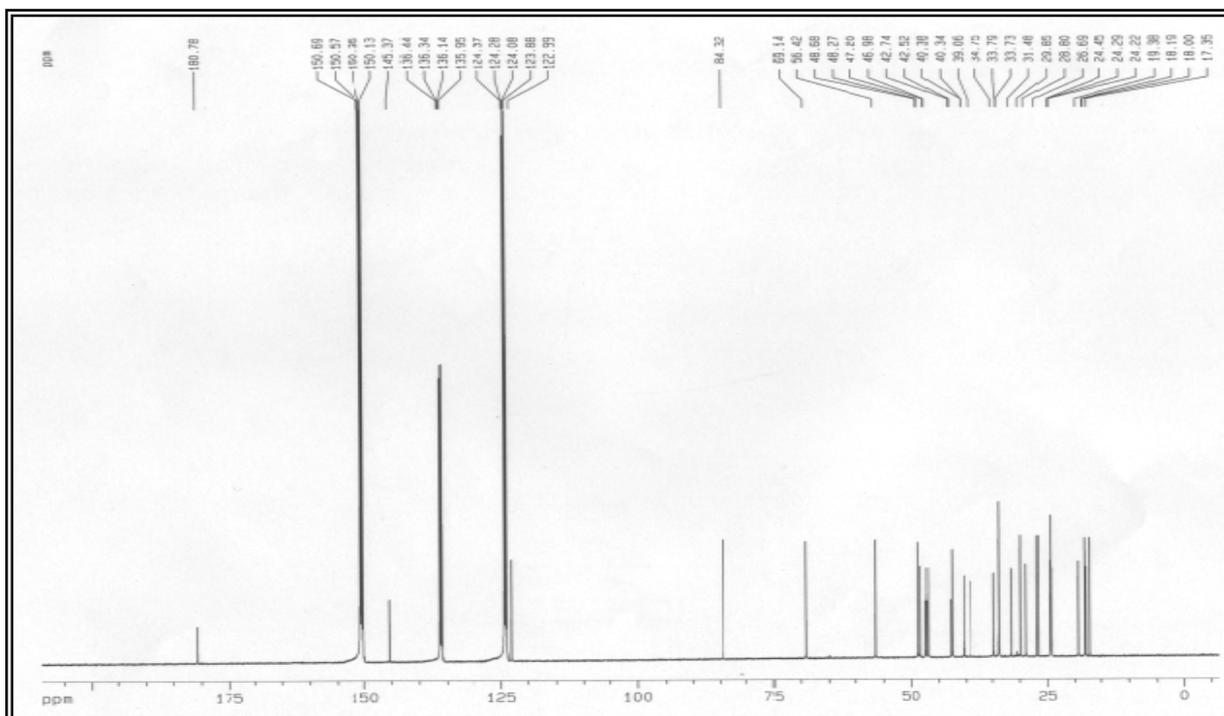


Figura 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

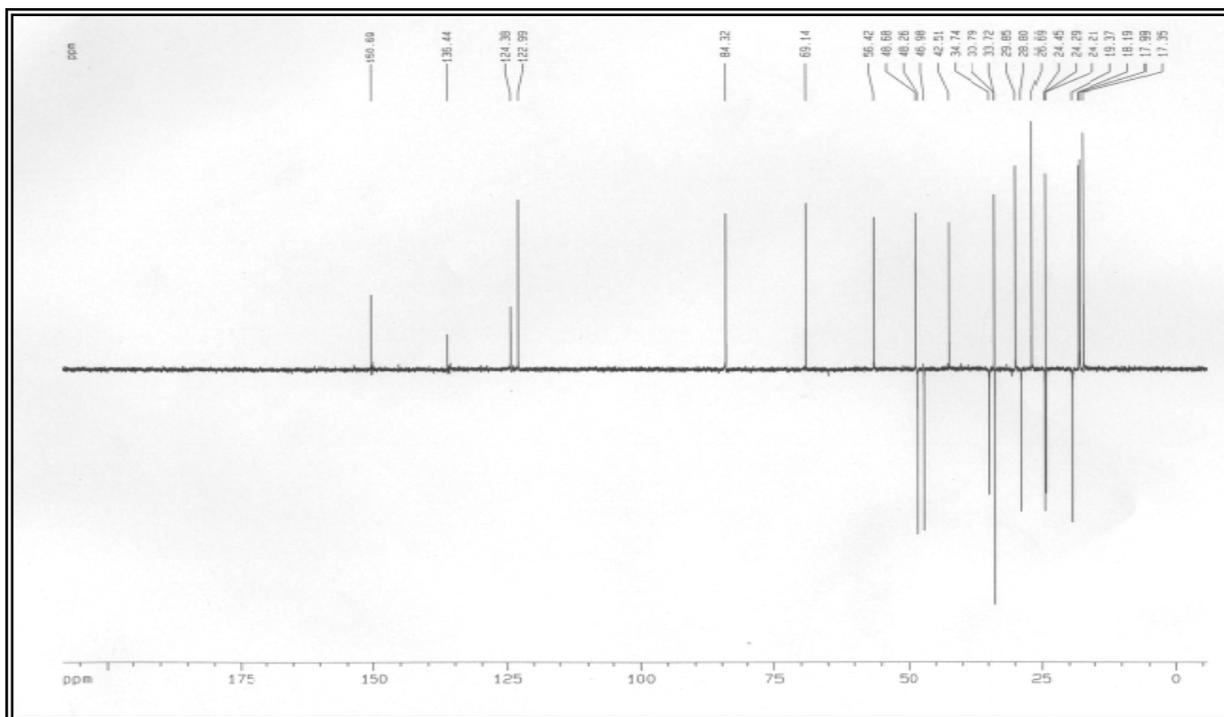


Figura 7. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

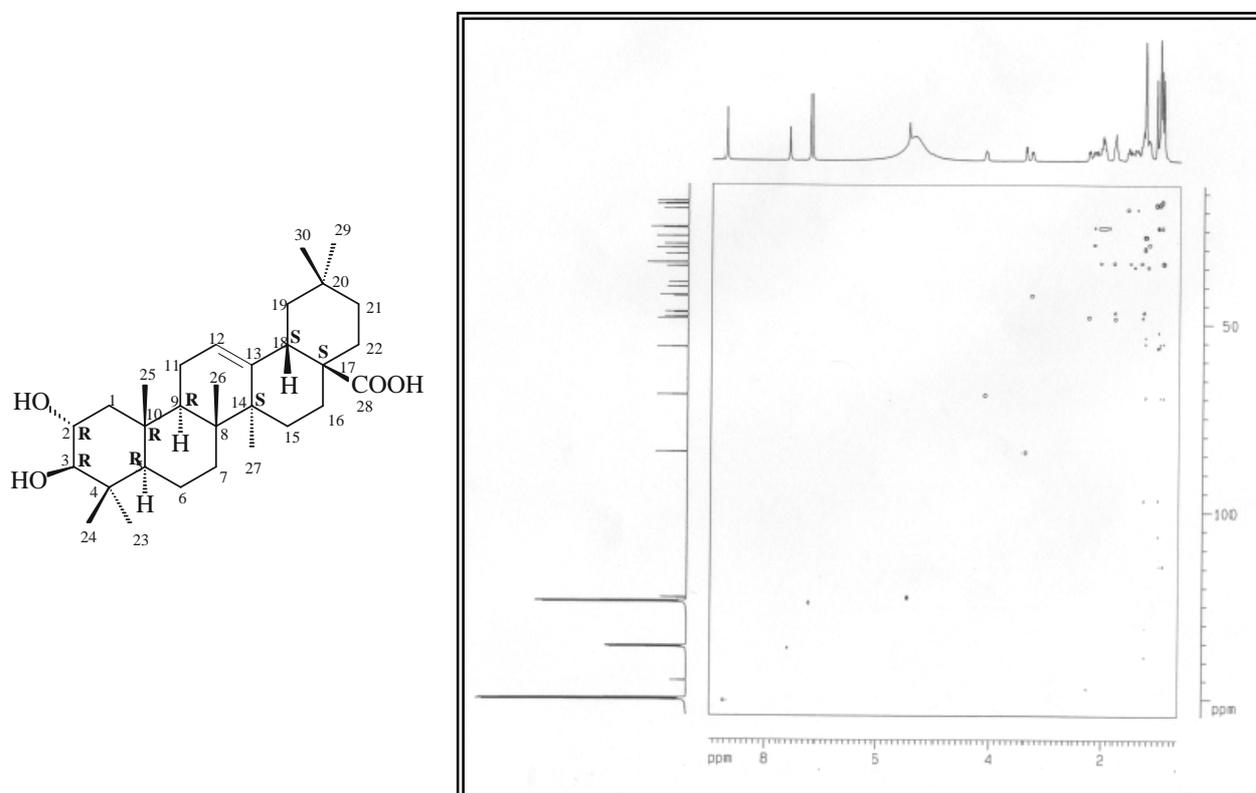


Figura 8. Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

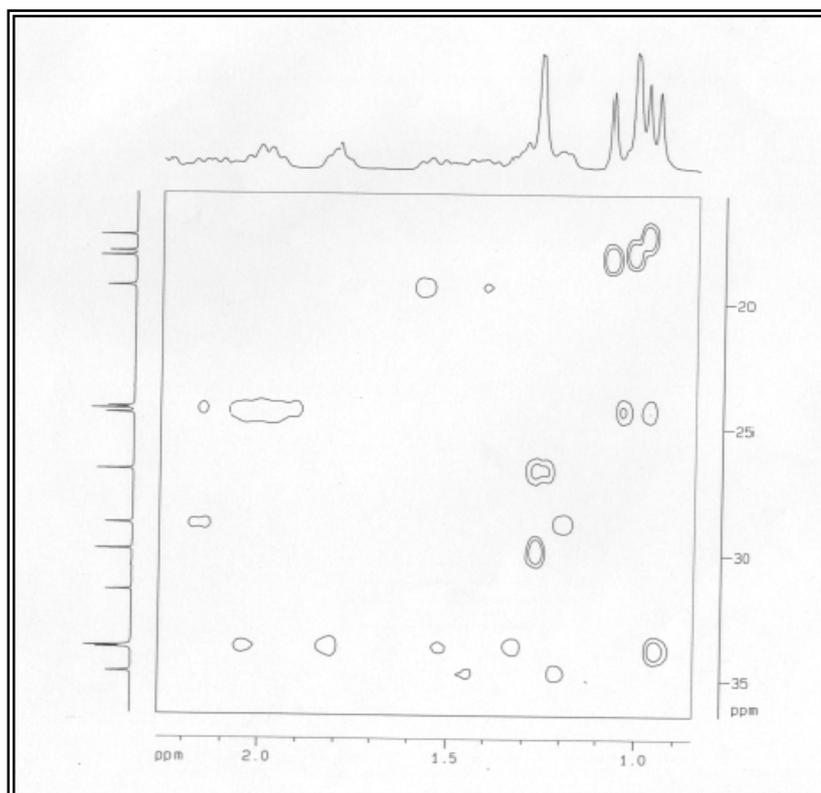
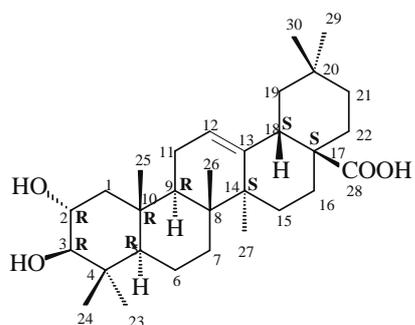


Figura 9. Espectro de HSQC- expansão (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

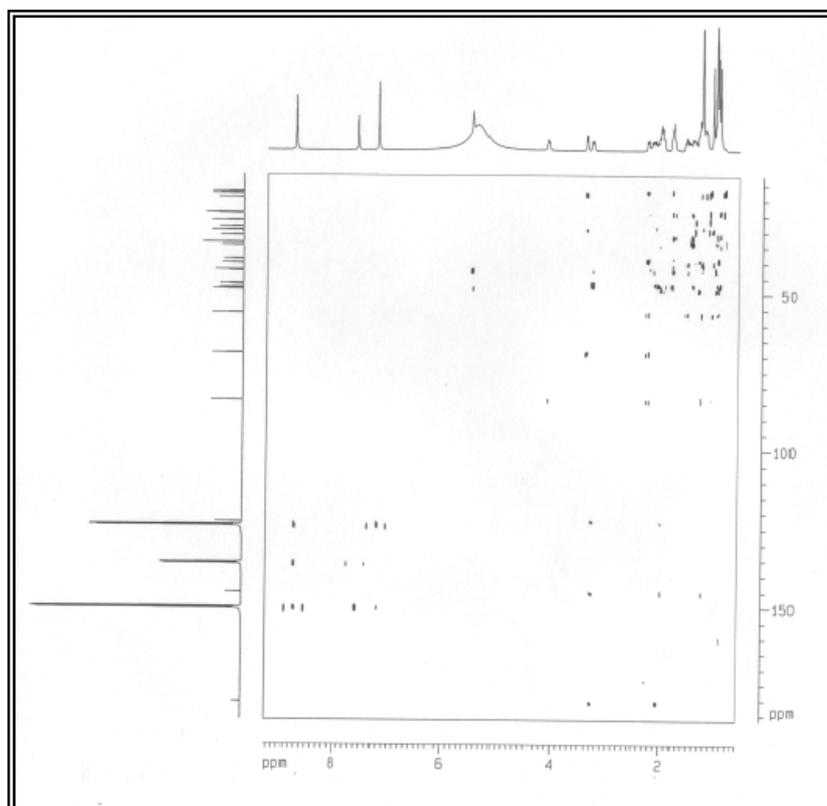
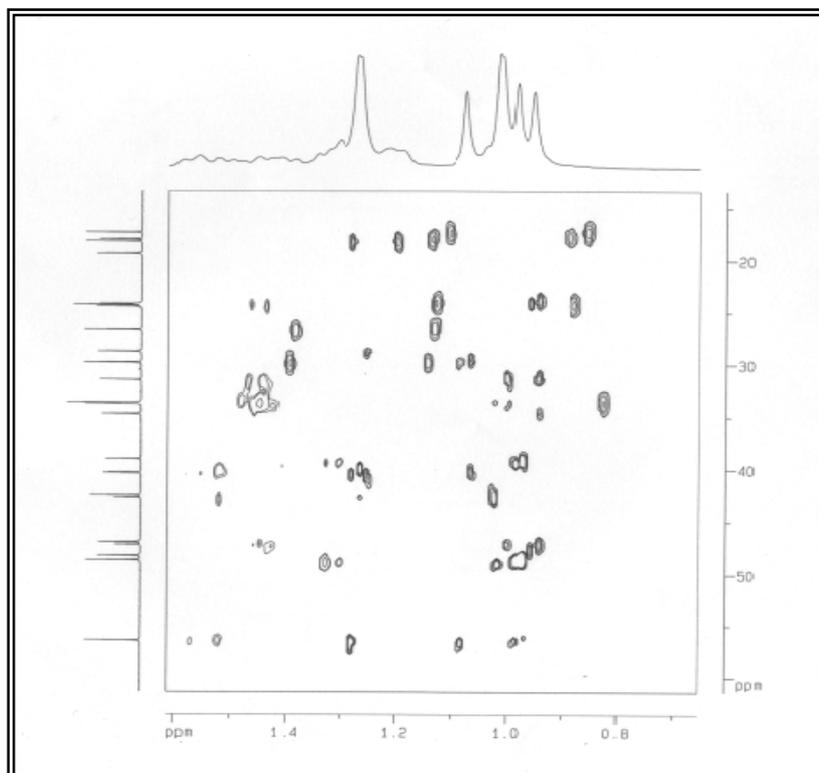
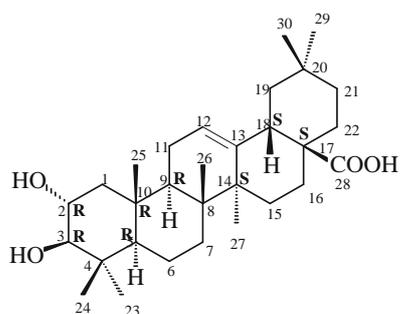
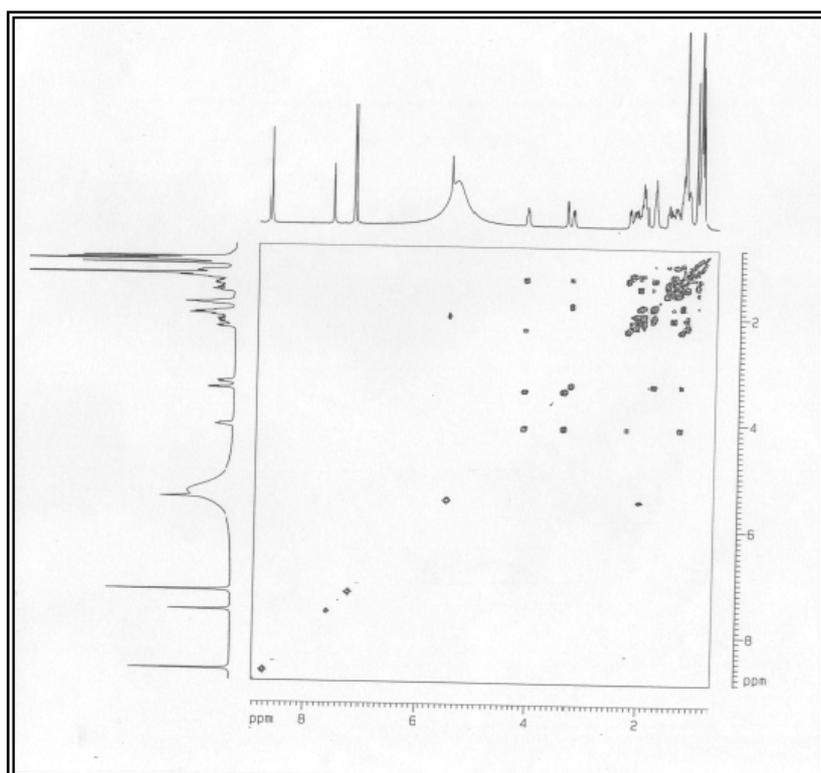


Figura 10. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.



**Figura 11.** Espectro de HMBC - expansão (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.



**Figura 12.** Espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-1.

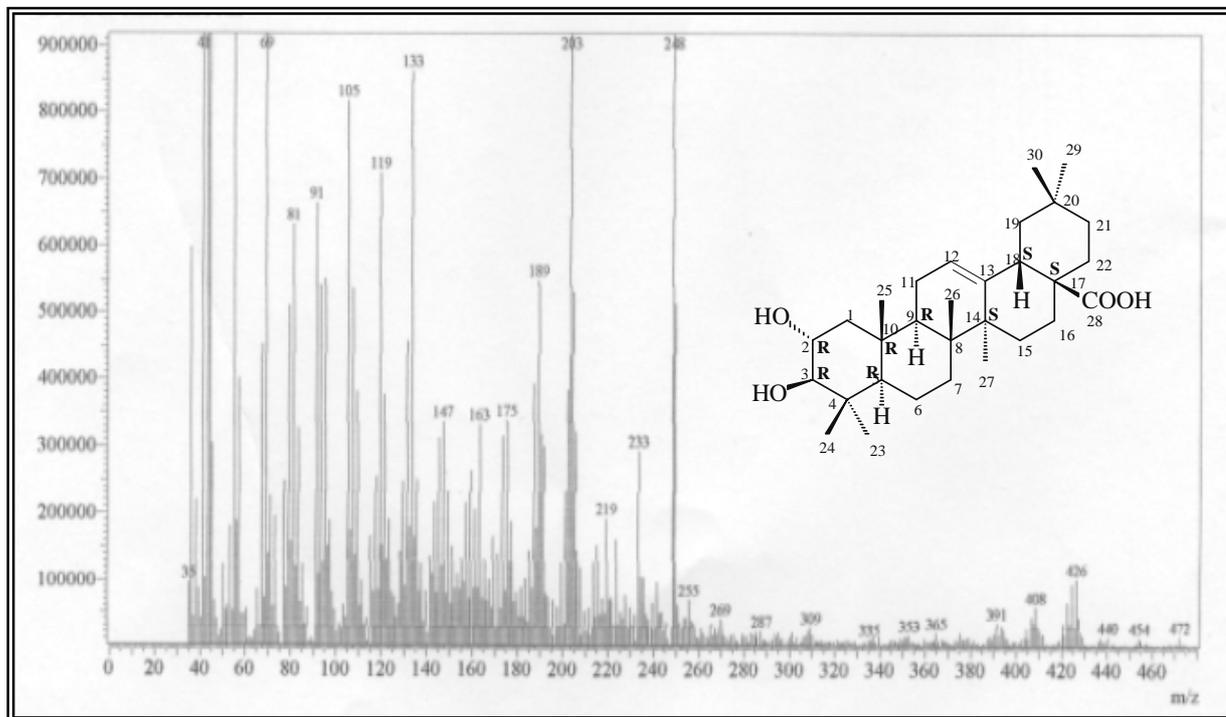


Figura 13. Espectro de Massas de CFFE-1.

### 3.2- Determinação estrutural de CFFE -2

A partir da fração DCM das folhas de *C. fruticosum* obteve-se um material sólido amarelo insolúvel em solventes como clorofórmio, piridina, metanol e acetona. Devido a essa insolubilidade 100,4 mg desse material foi acetilado em piridina/anidrido acético (item 4.3.4.5, pág. 91) fornecendo, após cromatografia em gel de sílica 15 mg de um composto sólido de cor branca com ponto de fusão na faixa de 264-265°C, denominado CFFE-2.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 14, pág. 36), apresentou uma absorção intensa em 1739  $\text{cm}^{-1}$  de deformação axial de ligação C=O de éster, bandas em 1203 e 1253  $\text{cm}^{-1}$  indicativas de ligação C-O, além de uma banda intensa em 1097  $\text{cm}^{-1}$  de deformação axial assimétrica de C-O-C.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig.16, pág 37), mostrou 18 linhas espectrais, uma delas ( $\delta_c$  62,3) com intensidade elevada, sugerindo sobreposição de sinais. A comparação entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (Fig. 17, pág. 38), permitiu determinar o padrão de hidrogenação para cada átomo de carbono: dois carbonos metínicos, quatro metílicos e treze carbonos não-hidrogenados, sendo os sinais em  $\delta_c$  158,3 (C-7); 158,5 (C-7') e 168,8 (C-1'') ppm correspondentes a três carbonilas, enquanto que os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  141,0 (C-4); 141,7 (C-3); 142,2 (C-2''); 144,5(C-3'); 144,8 (C-4') e 155,3 (C-2) ppm são compatíveis com átomos de carbonos aromáticos oxigenados.

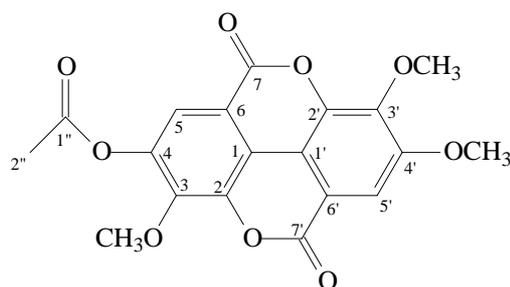
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 15, pág. 37), revelou um sinal simples, correspondente a um grupo acetoxilíco, em  $\delta_H$  2,36 (s), sinais intensos na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em  $\delta_H$  4,02 (s); 4,18 (s) e 4,25 (s), característicos de grupos metoxilas e ainda dois sinais na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,68 (s) e 7,85(s).

A comparação dos dados de RMN acima descritos juntamente com o íon molecular em  $m/z$  386 Daltons, apresentado pelo espectro de massas (Fig. 18, pág 38), permitiram determinar a fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_9$  a qual apresenta treze graus de insaturação, justificados pela presença de três carbonilas, seis ligações duplas e quatro ciclos.

**Tabela 5.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (125MHz, clorofórmio) de CFFE -2.

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH<sub>3</sub></i>	Formula Molecular
168,8 (C=O)	120,3	62,1	
158,5 (C=O)	108,1	62,1	
158,3 (C=O)	-	57,0	
155,3 (C-O)	-	20,6	
144,8 (C-O)	-	-	
144,5 (C-O)	-	-	
142,2 (C-O)	-	-	
141,7 (C-O)	-	-	
141,0 (C-O)	-	-	
117,8	-	-	
113,0	-	-	
112,1	-	-	
105,4	-	-	
<b>13C</b>	<b>2CH</b>	<b>4CH<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>9</sub></b>

Estes dados evidenciam uma estrutura de natureza aromática e policíclica. A análise dos dados espectrais mencionados exibidos por CFFE-2 e a comparação com dados descritos na literatura (Khac *et al.*, 1989), permitiram concluir que o composto trata-se do ácido 4'-O-Acetil-3',3,4-tri-O-metilelágico, um derivado do ácido elágico já isolado de *Combretum kraussii* (Brookes *et al.*, 1999), no entanto, esta sendo relatado pela primeira vez a partir da espécie.

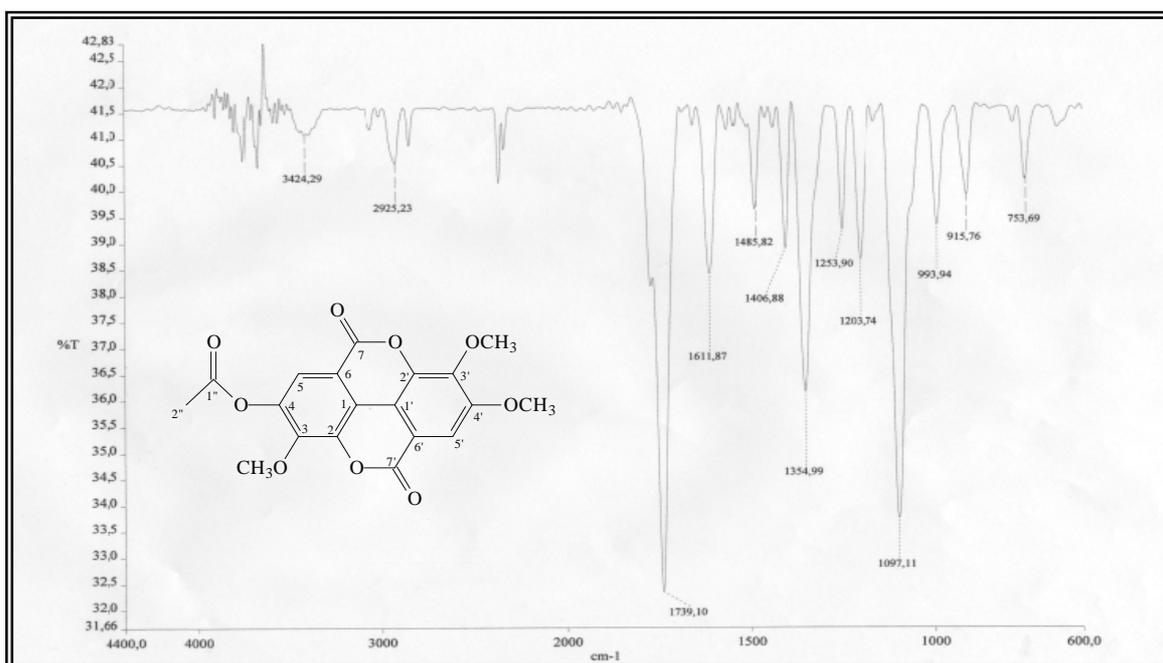


4-O-Acetil-3,3',4'-tri-O-metilelágico – CFFE-2

**Tabela 6:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFFE -2, comparado com os valores na literatura (Khac et al, 1989) para o ácido 4'-O-Acetil-3',3,4-tri-O-metilêglico.

Carbono	CFFE-2		Literatura*	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	113,0	-	112,6
2	-	155,3	-	141,5
3	-	141,7	-	141,2
4	-	141,0	-	154,8
5	7,68 (s)	108,1	7,73 (s)	108,2
6	-	105,4	-	114,8
7	-	158,3	-	158,0
1'	-	117,8	-	113,5
2'	-	142,2	-	142,6
3'	-	144,5	-	145,0
4'	-	144,8	-	151,4
5'	7,85 (s)	120,3	7,94 (s)	120,3
6'	-	112,1	-	114,8
7'	-	158,5	-	158,0
1''	-	168,8	-	169,9
2''	2,36 (s)	20,6	2,35 (s)	20,6
OMe (4)	4,02 (s)	57,0	4,02 (s)	57,0
OMe (3)	4,25 (s)	62,1	4,27 (s)	62,0
OMe (3')	4,18 (s)	62,1	4,20 (s)	62,0

\* RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) e  $^{13}\text{C}$  (400MHz) usando DMSO



**Figura 14.** Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFFE-2.

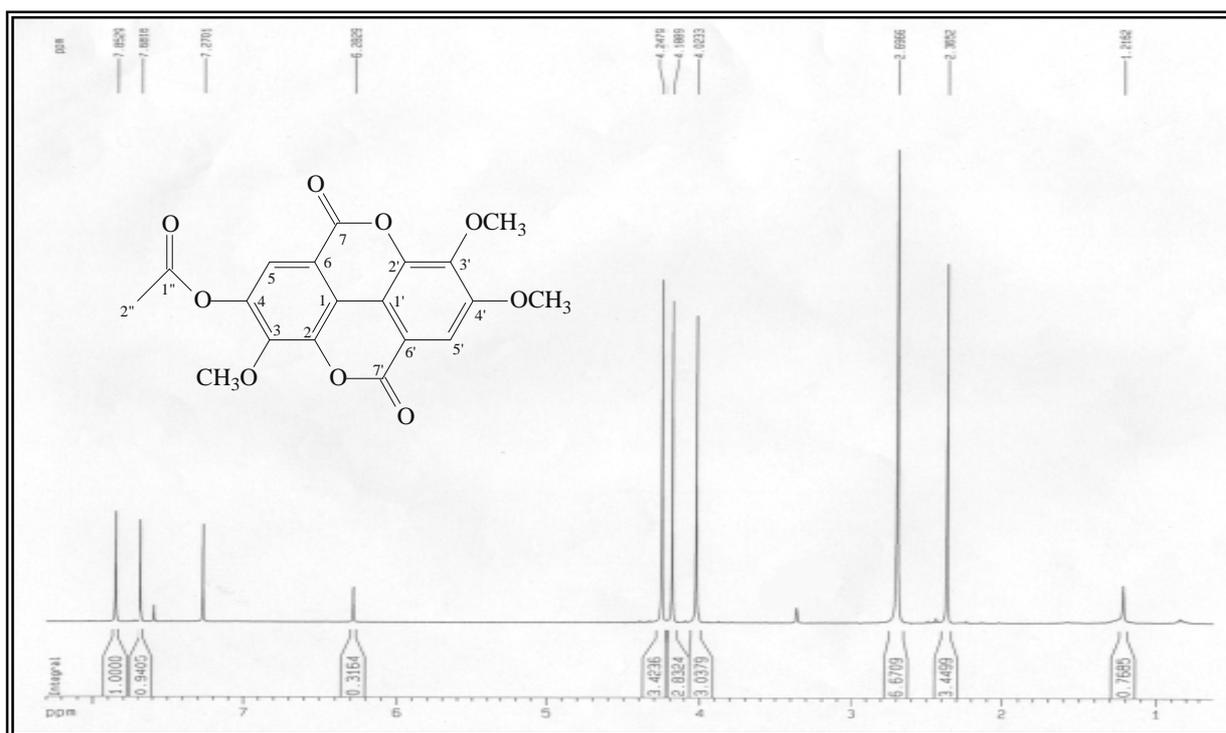


Figura 15. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CFE-2.

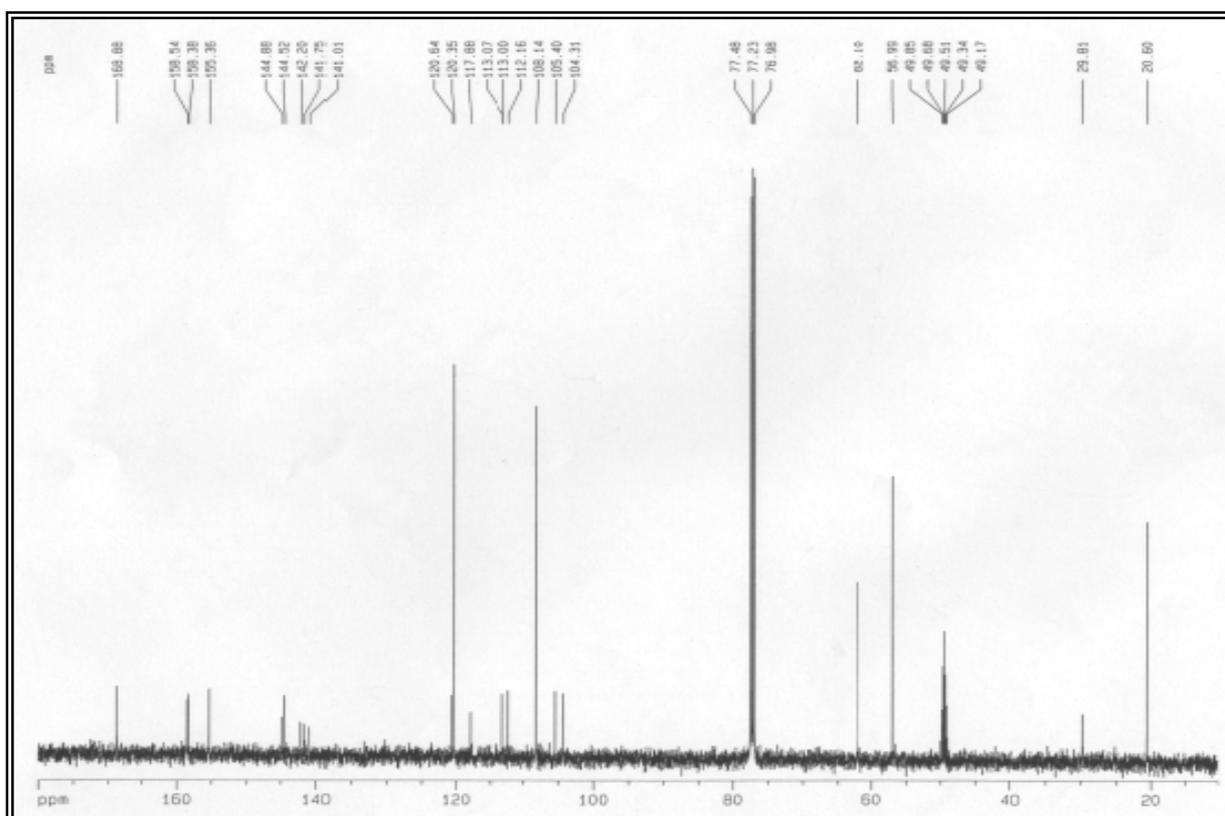


Figura 16. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CFE-2.

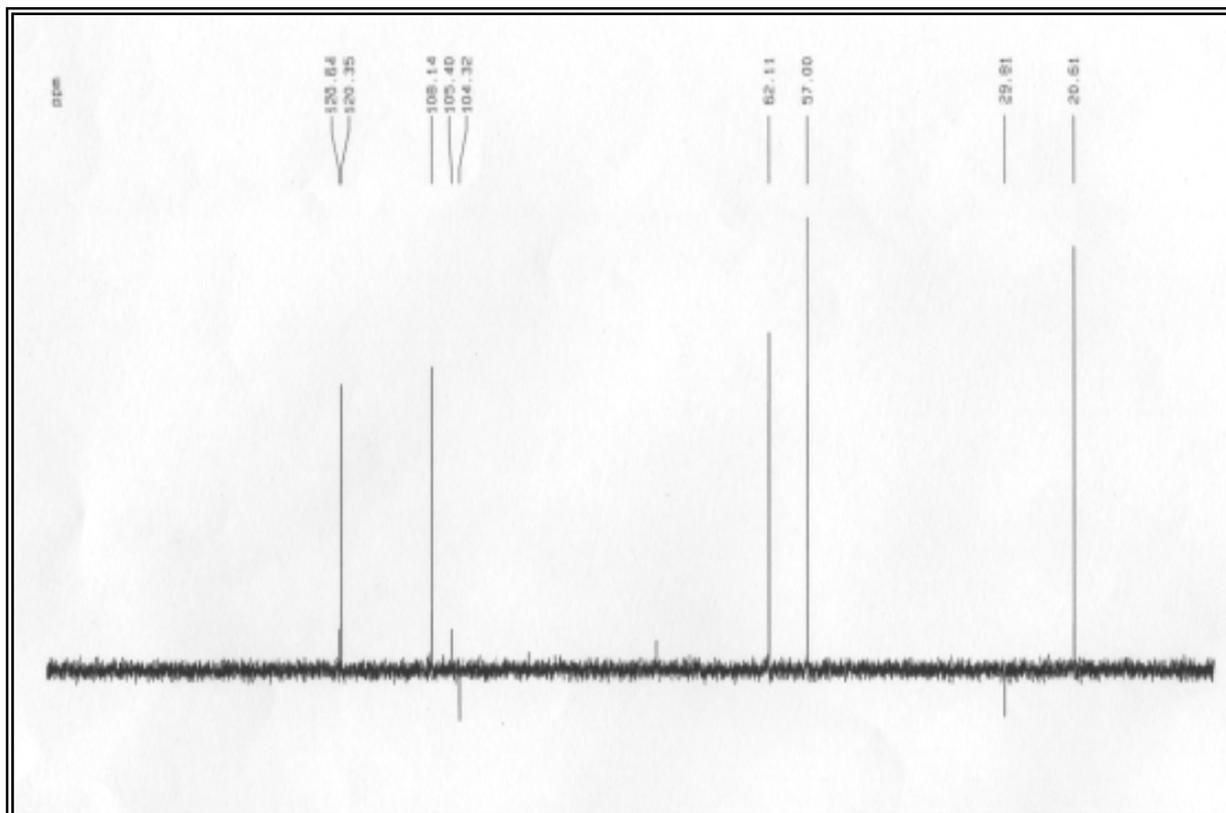


Figura 17. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFFE-2.

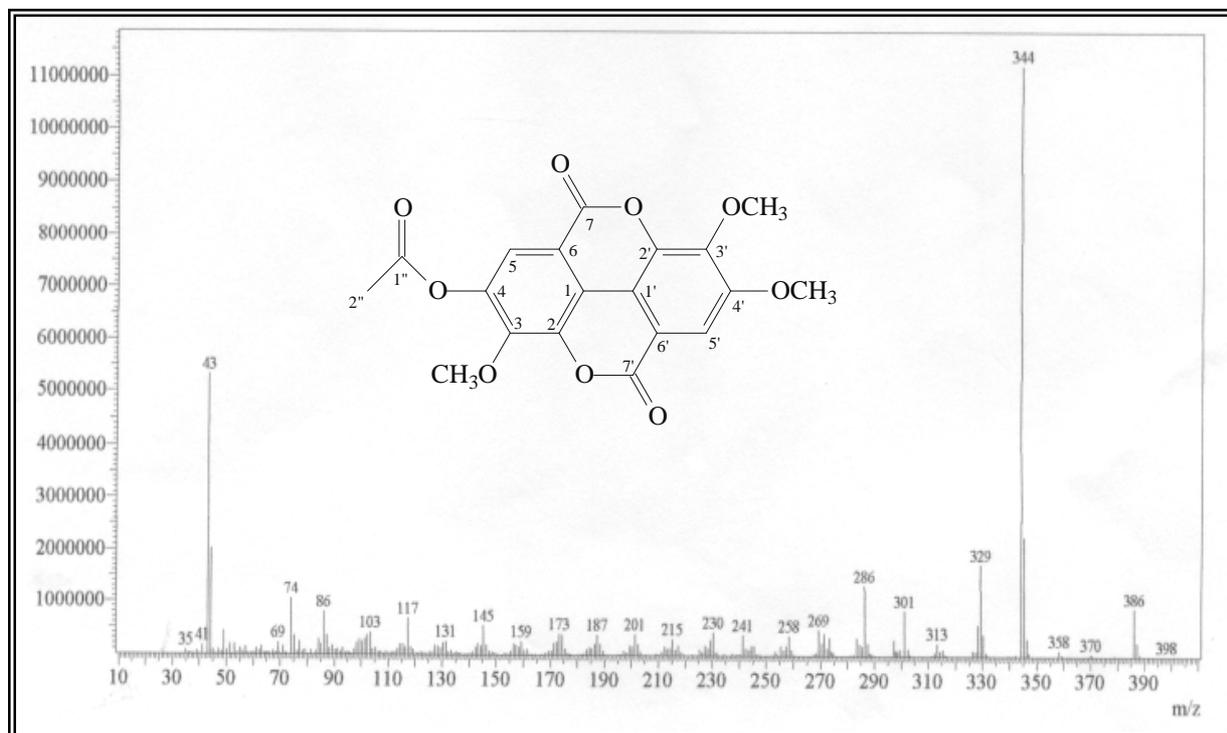


Figura 18. Espectro de Massas de CFFE-2.

### 3.3- Determinação estrutural de CFFE -3

O tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (AcOEt) do extrato etanólico das folhas de *C. fruticosum* (item 4.3.5.1, pág. 92), permitiu o isolamento de 25 mg de um sólido amorfo amarelo com ponto de fusão na faixa de 262-265 °C, denominado CFFE -3.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 20, pág. 42) apresentou absorções em 3390 e 3250  $\text{cm}^{-1}$ , típicas de deformação axial de ligação O-H de álcoois e/ou fenóis corroborado pela absorção em 1363  $\text{cm}^{-1}$ , referente à deformação angular no plano de grupo O-H. Exibiu uma forte absorção em 1657  $\text{cm}^{-1}$  de deformação axial de ligação C=O conjugada, além de bandas entre 1614 e 1428  $\text{cm}^{-1}$ , compatíveis com deformação axial de C=C de aromáticos. As bandas em 1228 e 1041  $\text{cm}^{-1}$  referentes à deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-O-C, confirmaram o caráter oxigenado de CFFE-3.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz, piridina- $d_5$ ] (Fig. 23, pág. 44), apresentou 21 linhas espectrais cujo padrão de hidrogenação foi determinado pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (Fig. 24, pág. 44). Deste modo verificou-se a presença de um carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  63,3 (C-6''), onze carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  99,4 (C-3); 103,4 (C-6); 129,8 (C-2'); 117,0 (C-3'); 117,2 (C-5'); 129,4 (C-6'); 75,7 (C-1''); 73,6 (C-2''); 81,1 (C-3''); 73,2 (C-4''); 83,7 (C-5'') e oito carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  106,2, referente a carbono anomérico, enquanto o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  183,2 foi inferido a uma carboníla conjugada, corroborando com o espectro de IV.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz, piridina- $d_5$ ] (Figs. 21 e 22, págs. 43), mostrou na região de campo baixo sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,78 (s); 6,85 (s); 7,30 (d,  $J=8.5$  Hz) e 8,30 (d,  $J=8.5$  Hz) característicos de uma estrutura do tipo flavonóide, onde o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  13,93 (s), consistente com a presença de um grupo hidroxila em C-5, formando ligação de hidrogênio com a carbonila em C-4. Apresentou também sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados entre  $\delta_{\text{H}}$  4,50 e 5,94 permitindo inferir a presença de uma unidade de açúcar.

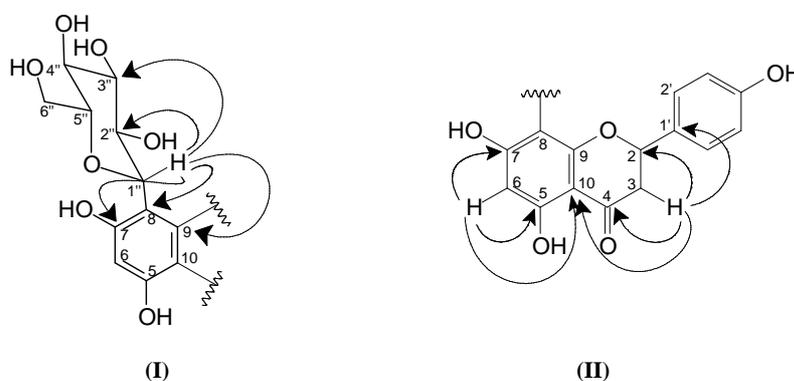
Os dados de RMN acima descritos permitiram determinar a fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$  a qual apresenta doze graus de insaturação atribuídos a uma carbonila, sete ligações duplas e quatro ciclos, um deles referente a uma unidade de açúcar.

**Tabela 7.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFFE -3.

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH</i> <sub>2</sub>	Formula Molecular
183,2 (C=O)	129,8	63,3 (C-O)	
165,3 (C-O)	129,4	-	
164,8 (C-O)	117,2	-	
162,9 (C-O)	117,0	-	
162,4 (C-O)	103,4	-	
157,6 (C-O)	99,4	-	
122,7 (C-O)	83,7 (C-O)	-	
106,2	81,1 (C-O)	-	
105,5	75,7	-	
-	73,6 (C-O)	-	
-	73,2 (C-O)	-	
<b>9C</b>	<b>11CH</b>	<b>1CH<sub>2</sub></b>	

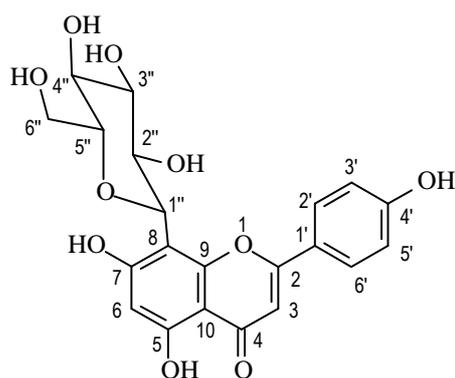
O espectro de COSY (Fig. 27, págs. 46) evidenciou o sistema AA'BB' pelos acoplamentos mostrados entre os pares de hidrogênio H-2'/H-6' com H-3'/H-5', enquanto o acoplamento seqüenciado entre os hidrogênios H-1''/H-2''; H-2''/H-3''; H-3''/H-4''; H-4''/H-5'' e H-5''/H-6'' foram atribuídos aos sinais de hidrogênio referentes à uma unidade de açúcar, glicose. Através do espectro de HSQC (Fig. 25, pág. 45), foi possível atribuir os sinais de hidrogênio aos seus respectivos carbonos, inclusive determinar o deslocamento químico do carbono anomérico em  $\delta_{\text{C}}$  75,7 (C-1''), pela correlação com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,94 (d, J=10Hz, H-1''). Com essa informação foi possível determinar que o composto em discussão trata-se de um flavonóide C-glicosilado.

O espectro HMBC (Fig. 26, pág. 45), mostrou a correlação a duas ligações entre o hidrogênio anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,94 (H-1'') com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  73,6 (C-2'') e com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  106,2, estabelecendo assim a posição da unidade de glicose no carbono 8. Correlação a três ligações para esse mesmo hidrogênio foi observada com os carbonos C-7 ( $\delta_{\text{C}}$ 164,8), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$ 157,5) e C-3'' ( $\delta_{\text{C}}$  81,1), como mostrados na Figura 3.

**Figura 19** - Acoplamento a longa distancia (HMBC) de CFFE -3

O espectro HMBC ainda exibiu correlações a duas ligações de H-3 ( $\delta_H$  6,85) com C-2 ( $\delta_C$  165,3) e C-4 ( $\delta_C$  183,2) e a três ligações com C-10 ( $\delta_C$  105,5) e C-1' ( $\delta_C$  122,7); assim como correlações de H-6 ( $\delta_H$  6,78), a duas ligações com C-5 ( $\delta_C$  162,4) e C-7 ( $\delta_C$  164,8) e a três ligações com C-10 ( $\delta_C$  105,5) (**II**), confirmando as atribuições feitas anteriormente, a partir dos espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ .

A interpretação dos dados espectroscópicos de CFFE -3 bem como a análise comparativa com dados da literatura (Darcy et al., 2007) permitiram concluir que o metabólito secundário em discussão trata-se do flavonóide glicosilado denominado apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo, o qual já foi isolado anteriormente de *C. quadrangulare* (Adnyana et al., 2000) e de *C. micranthum* (Bassene et al., 1987), contudo está sendo relatado pela primeira vez na espécie.

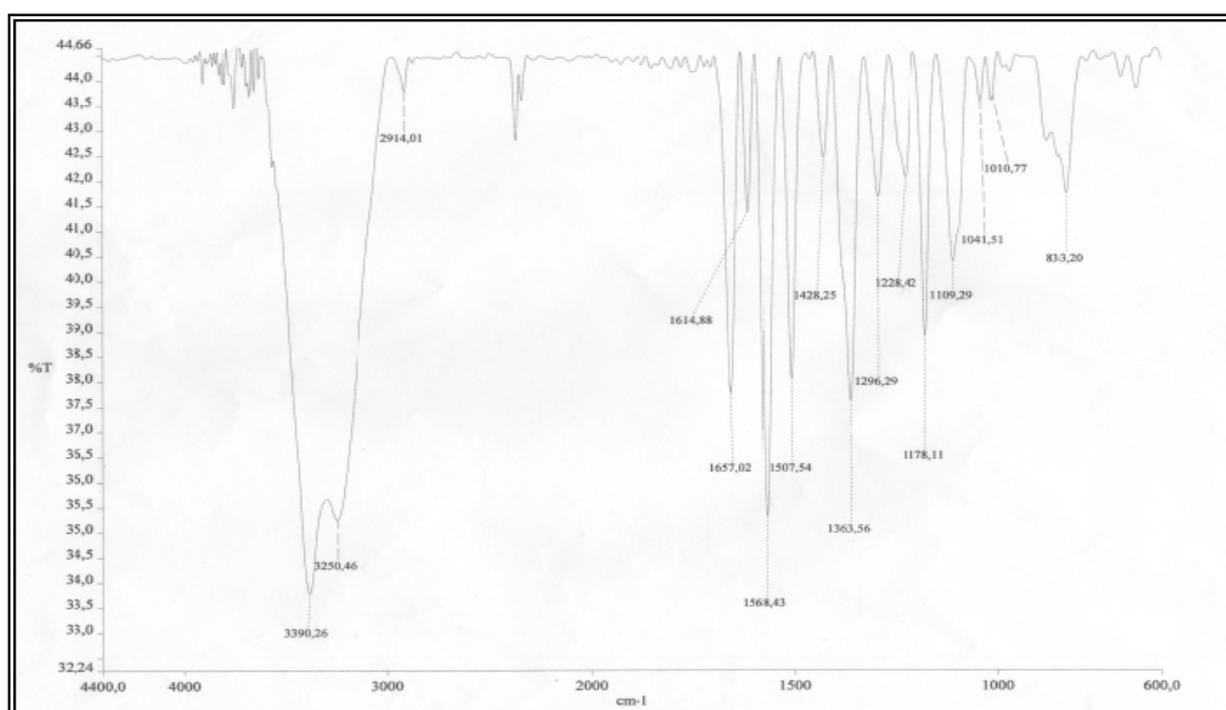


Apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo- CFFE -3

**Tabela 8.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFFE -3, comparado com os valores na literatura (March et al., 2007) para apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo.

C	HSQC		HMBC		Literatura*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	165,3	-	H-3	H-2'/ H-6'	163,5
3	99,4	6,85 (s)	-	-	120,2
4	183,2	-	H-3	-	181,8
5	162,4	-	H-6	-	160,2
6	103,4	6,98 (s)	-	-	97,9
7	164,8	-	H-6	H-1''	162,2
8	106,2	-	H-1''	H-2''	104,3
9	157,6	-	-	H-1''	155,7
10	105,5	-	-	H-6/ H-3	103,8
1'	122,7	-	-	H-3/ H-3'/ H-5'	-
2'/6'	129,8 / 129,4	8,30 (d, $J = 8.5$ )	-	-	128,7
3'/5'	117,0/ 117,2	7,30 (d, $J = 8.5$ )	-	-	115,5
4'	162,9	-	H-3'/ H-5'	H-2'/ H-6'	160,8
1''	75,7	5,94 (d, $J = 10.0$ )	H-2''	H-3''	73,2
2''	73,6	5,04 (t, $J = 10.0$ )	H-3''/ H-1''	-	70,6
3''	81,1	4,50 (t, $J = 10.0$ )	H-2''	H-1''--	78,4
4''	73,2	4,68 (t, $J = 10.0$ )	H-3''	-	70,3
5''	83,7	4,23 (m)	H-4''/ H-6''	H-1''	81,5
6''	63,3	4,64 / 4,56	-	H-4''	61,0

\* RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz) usando DMSO



**Figura 20.** Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFFE-3.

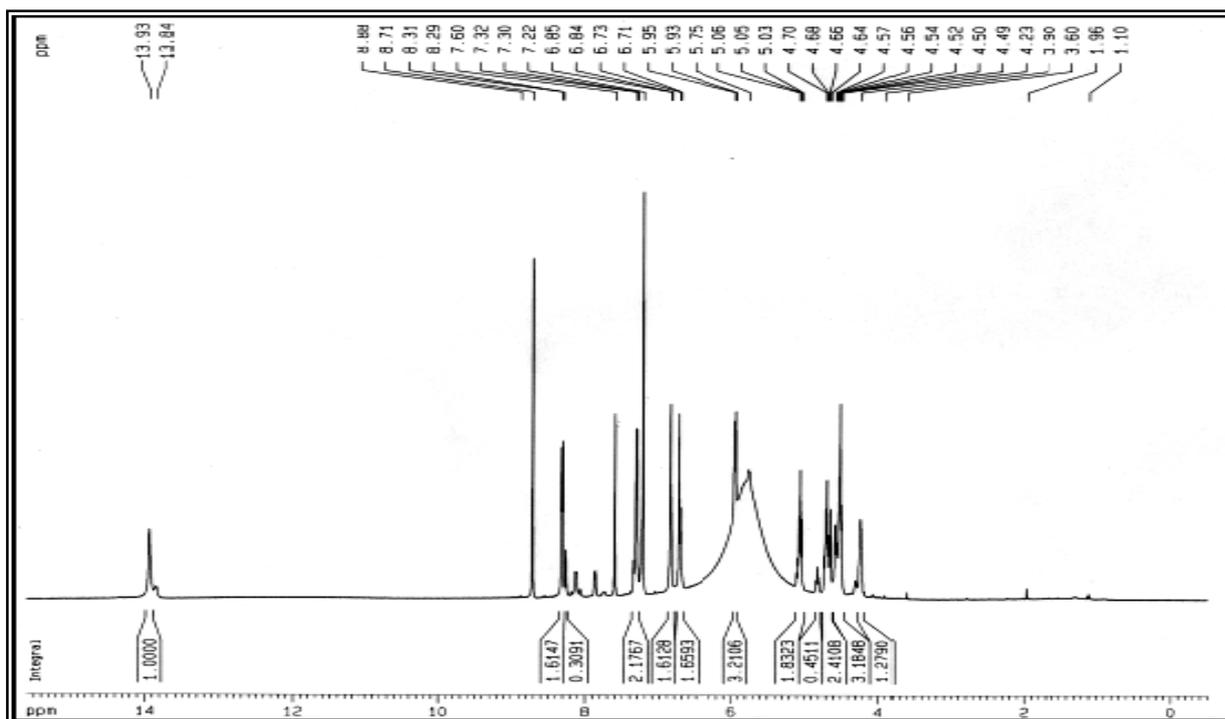


Figura 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-3.

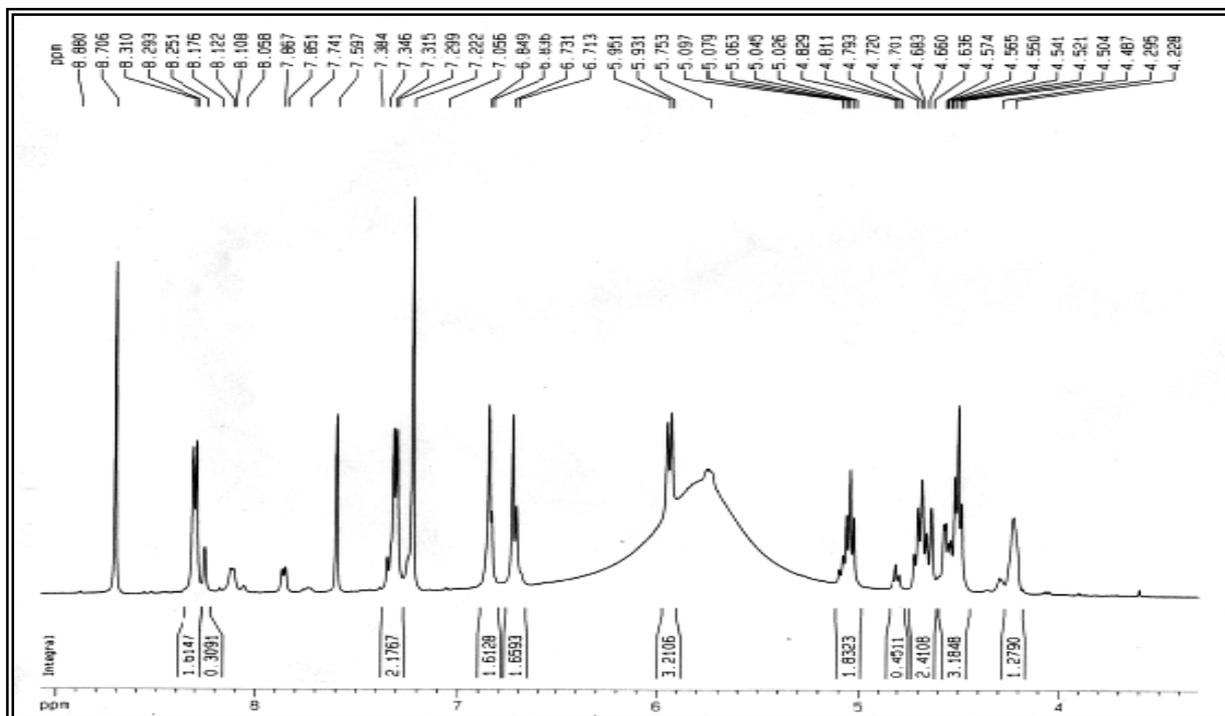


Figura 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  - expansão (500MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-3.

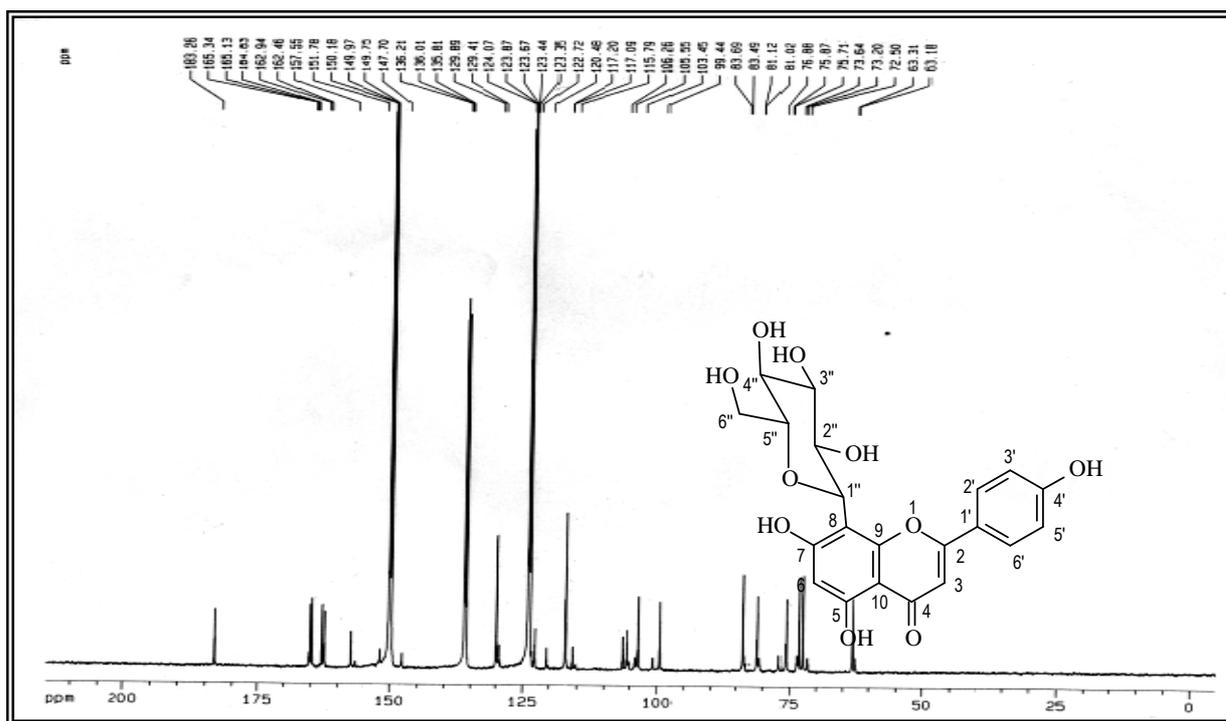


Figura 23. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-3.

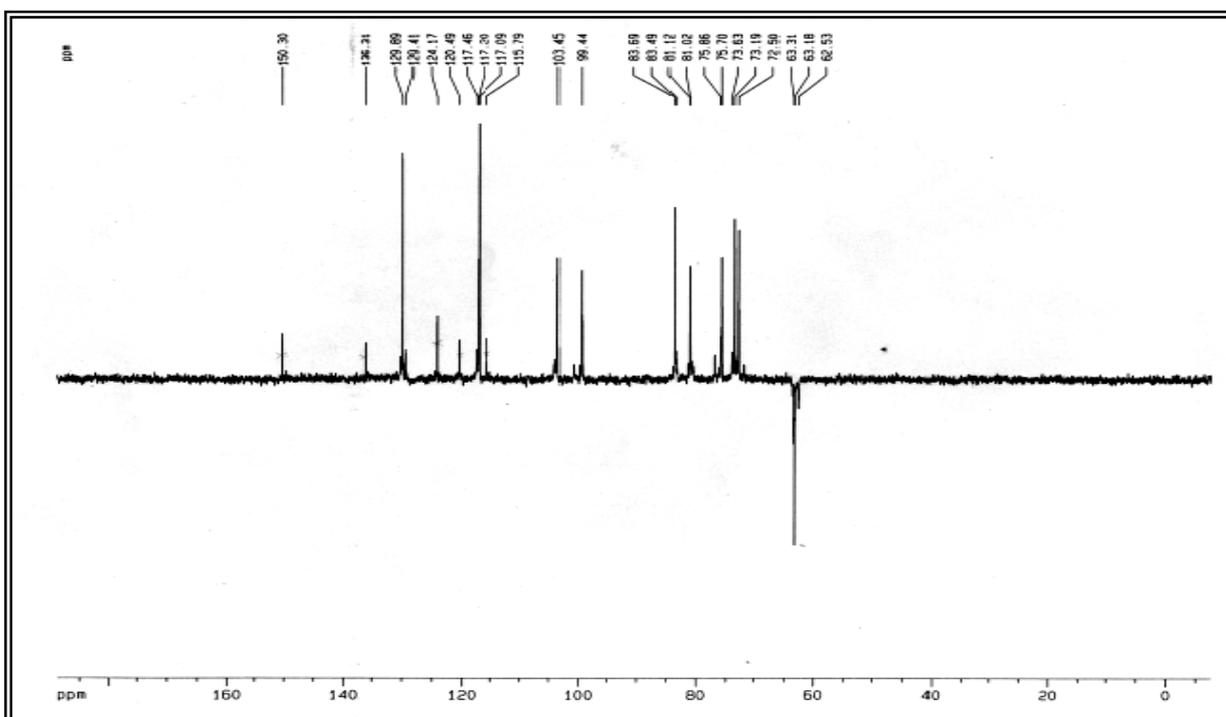
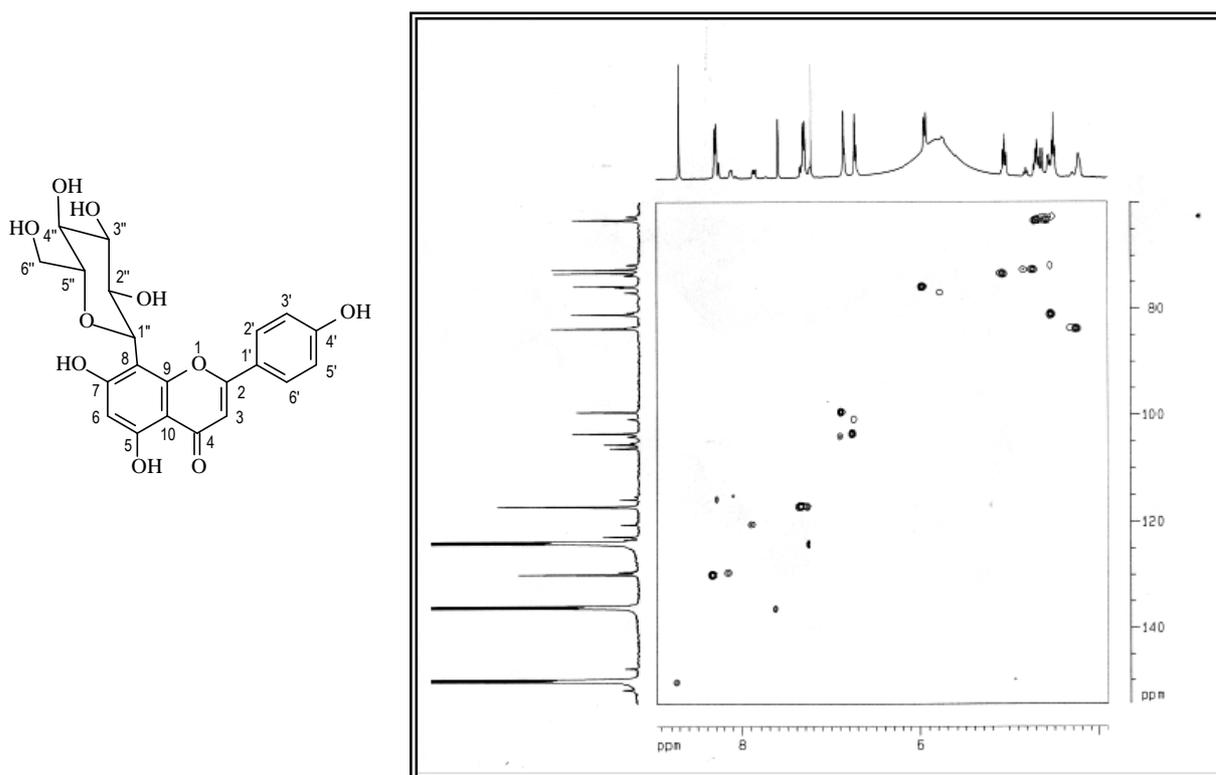
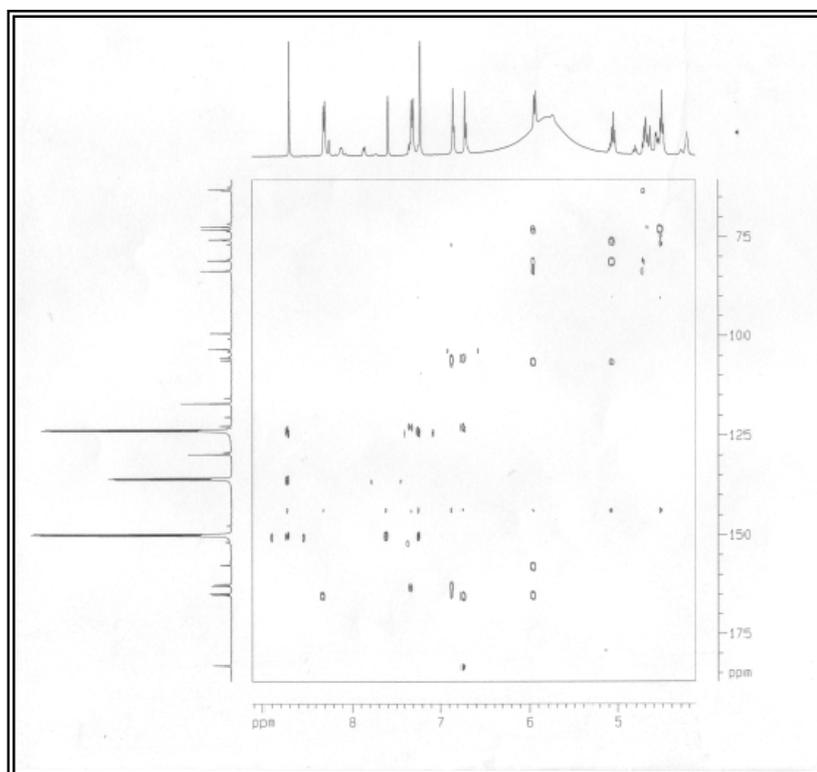


Figura 24. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-3.



**Figura 25.** Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFE-3.



**Figura 26.** Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFE-3.

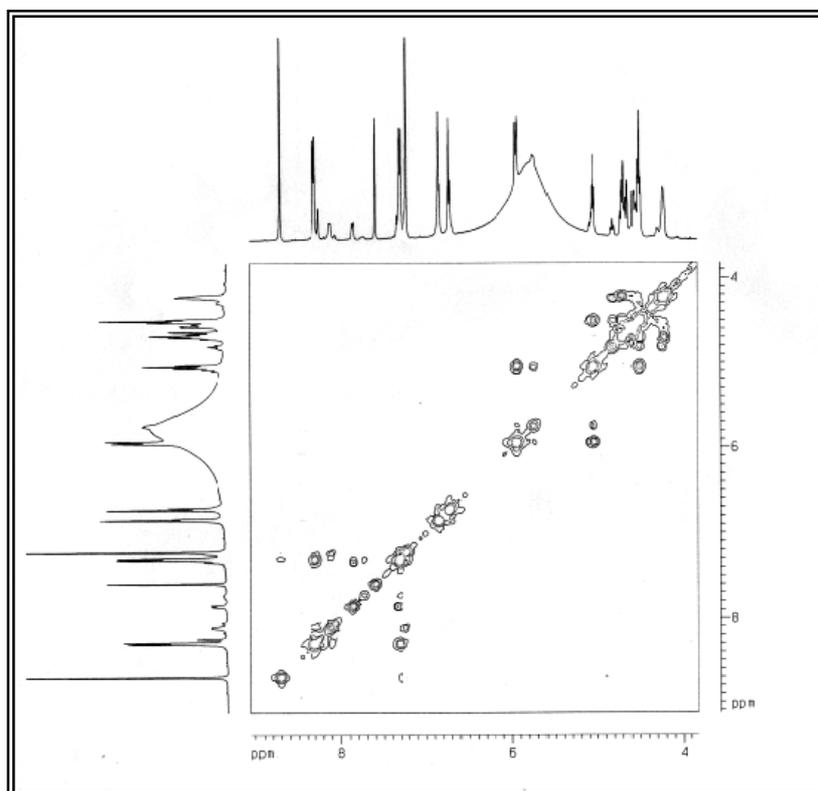
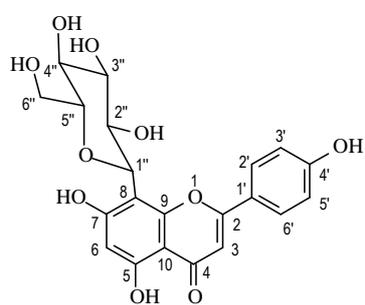


Figura 27. Espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-3.

### 3.4 - Determinação estrutural de CFTH -1

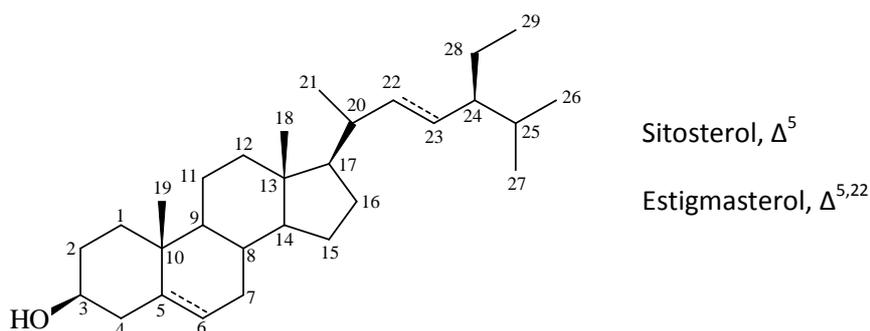
O metabólito CFTH-1 foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos talos de *C. fruticosum* (item 4.3.6.1, pág. 93), sob a forma de cristais com ponto de fusão na faixa de 130-132 °C.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 28, pág. 49), apresentou banda uma larga em 3424  $\text{cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em 2935 e 2866  $\text{cm}^{-1}$  características de deformação axial de ligação C-H; absorção em 1640  $\text{cm}^{-1}$  associada a vibrações de deformação axial C=C de olefina, além da banda em 1052  $\text{cm}^{-1}$  de deformação axial atribuída a ligação C-O.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , mostraram um grande número de sinais sugerindo uma mistura de dois compostos. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figs. 30 e 31, pág. 50), apresentou sinais em  $\delta_{\text{C}}$  140,9 (C), 138,9 (CH), 129,5 (CH) e 121,9 (CH), peculiar de carbonos olefínicos, caracterizando duas dupla ligações. Observou-se ainda um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,0, condizente com a presença de um carbono carbinólico na molécula.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 29, pág. 49), apresentou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 (d); 5,17 (dd,  $J = 15$  Hz) e 5,03 (dd,  $J = 15$  Hz) correspondentes a átomos de hidrogênios olefínicos, um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,53 (m) característico de hidrogênio ligado a átomo de carbono carbinólico e uma grande quantidade de sinais característicos de hidrogênios ligados a átomos de carbono hibridizados  $\text{sp}^3$ , revelando o perfil esteroidal dos compostos. Os dados acima foram compatíveis com a mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Essa proposta foi reforçada ainda por comparação em CCD, com amostra padrão.

A análise dos dados espectroscópicos de CFTH-1 e comparação desses com aqueles descritos na literatura (Albuquerque, 2006), permitiram afirmar que a mistura em análise se tratava dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, bastante comuns na família Combretaceae.



**Tabela 9.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFTH - 1, comparado com os valores na literatura (Albuquerque, 2006) para a mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

C	CFTH-1	$\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ )	CFTH-1	Estigmasterol ( $\text{CDCl}_3$ )
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	37,4	37,5	37,4	37,5
2	29,1	29,1	29,1	29,1
3	72,0	72,0	72,0	72,0
4	42,5	42,5	42,5	42,5
5	140,9	140,9	140,9	140,9
6	121,9	121,9	121,9	121,9
7	31,8	31,9	31,8	31,9
8	32,1	32,1	32,1	32,1
9	50,3	50,4	50,3	50,4
10	36,3	36,7	36,7	36,7
11	21,3	21,3	21,3	21,3
12	39,9	39,9	39,9	39,9
13	42,4	42,5	42,4	42,5
14	56,9	57,1	56,9	57,1
15	24,5	24,6	24,5	24,6
16	29,4	29,1	29,9	29,1
17	56,3	56,2	56,3	56,2
18	12,0	12,0	12,0	12,3
19	20,0	19,6	20,0	19,6
20	36,0	36,7	40,6	40,7
21	19,2	19,3	19,2	19,3
22	34,1	32,1	138,5	138,5
23	24,5	25,6	129,5	129,5
24	46,0	46,1	51,4	51,5
25	28,4	29,1	29,1	29,1
26	19,6	19,2	19,2	19,2
27	21,4	21,3	20,4	21,4
28	23,3	23,3	26,3	25,6
29	12,2	12,2	12,2	12,4



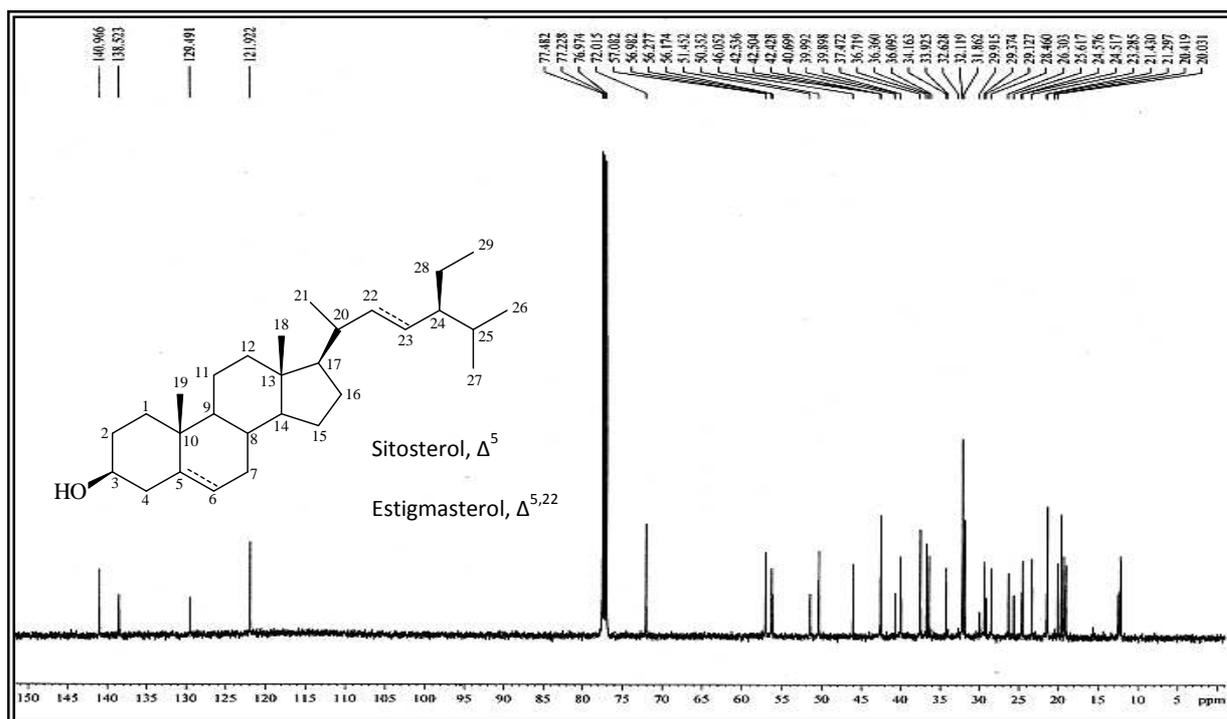


Figura 30. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFTH-1.

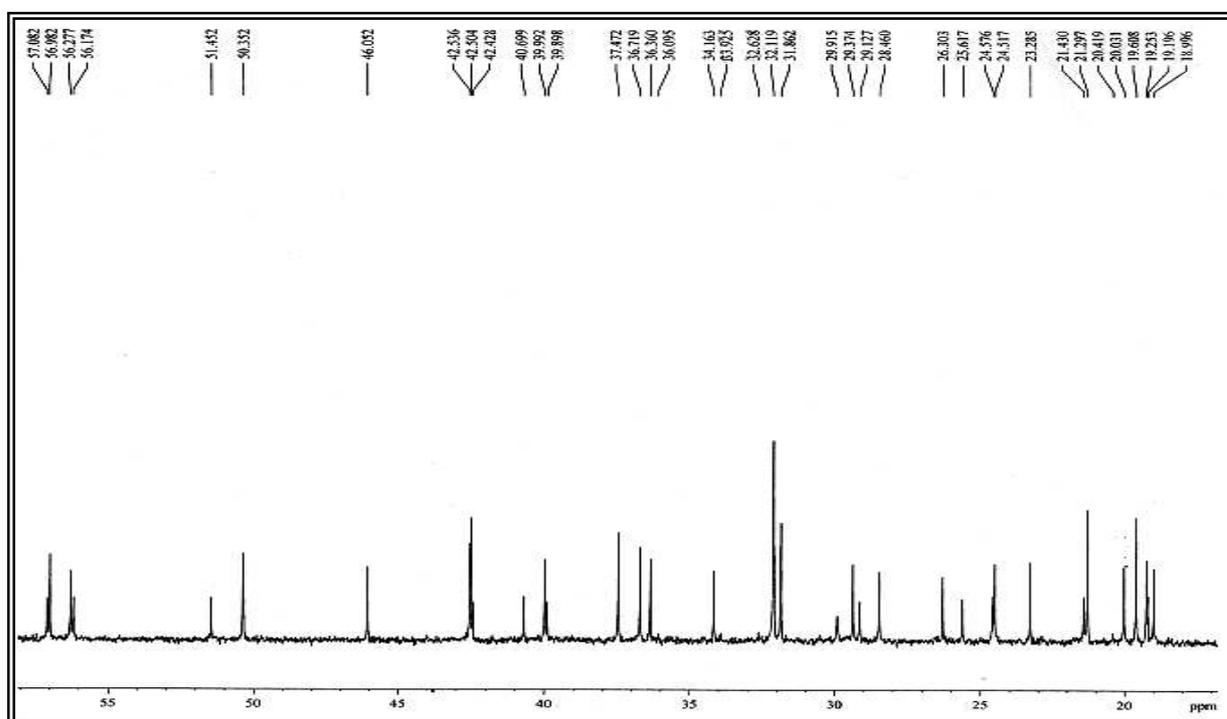


Figura 31. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - expansão (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFTH-1.

### 3.5 - Determinação estrutural de CFTE -1

A fração DCM do extrato etanólico dos talos de *C. fruticosum* (item 4.3.8.2, pág. 95), após sucessivos tratamentos cromatográficos, incluindo CLAE, forneceu 15,5 mg de um sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 200-203 °C,  $[\alpha]_{20}^D$  - 46,4° (c. 0,25 g/100 mL, MeOH), codificado como CFTE -1.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 32, pág. 54) mostrou uma banda larga centrada em 3424  $\text{cm}^{-1}$ , característica de grupo hidroxila, uma absorção intensa em 1771  $\text{cm}^{-1}$  de deformação axial de ligação C=O de lactonas, absorções em 1601, 1517 e 1459  $\text{cm}^{-1}$  compatíveis com deformação axial de C=C de aromáticos, além de bandas em 1271 e 1025  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-O-C.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz, piridina- $d_5$ ] (Fig. 35, pág. 55), exibiu 20 linhas espectrais, uma delas ( $\delta_{\text{C}}$  56,6) com intensidade elevada sugerindo sobreposição de sinais. A análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 36, pág. 56), revelou a presença de sete carbonos metínicos, seis dos quais são  $\text{sp}^2$ ; três carbonos metilênicos, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  71,9 oxigenado; três carbonos metílicos, todos referentes à metoxilas e oito carbonos não-hidrogenados, onde o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  180,7 (C-9) foi compatível com carbonila de lactona, enquanto os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  146,8 (C-3); 150,6 (C-4); 149,5 (C-3') e 150,6 (C-4'), foram correspondentes com átomos de carbonos aromáticos e oxigenados.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz, piridina- $d_5$ ] (Fig. 33, pág. 54), apresentou seis sinais na região de hidrogênios aromáticos compatíveis com dois sistemas AMX:  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (d,  $J=8.5$ ); 6,71 (d,  $J=2.0$ ); 6,57 (dl,  $J=7.9$ ) e 6,83 (d,  $J=8.5$ ); 6,69 (sl); 6,70 (d,  $J=2.0$ ). O espectro revelou ainda dois duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,79 ( $J=13,4$ ;  $J=4,5$ ) e 2,50 ( $J=13,4$ ;  $J=9,4$ ), cujos valores de constantes de acoplamentos evidenciam hidrogênios em posição geminal e vicinal. Os sinais intensos em  $\delta_{\text{H}}$  3,77(s), 3,77(s) e 3,78 (s), foram característicos de grupos metoxilas.

O espectro de massas (Fig. 40, pág. 58) de CFTE-1, apresentou um pico em  $m/z$  388 Daltons condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ , determinada a partir dos dados de RMN (Tab. 10, pág. 52). A fórmula molecular encontrada exhibe dez graus de insaturação, explicados pela presença de uma carbonila, seis ligações duplas e três ciclos. Estes dados permitiram inferir a presença de dois anéis aromáticos trissubstituídos e de uma lactona.

**Tabela 10.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFTE -1.

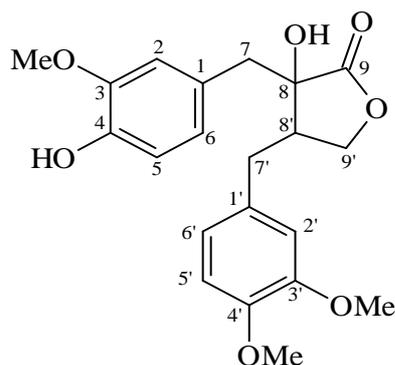
<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>Formula Molecular</b>
180,7 (C=O)	124,2	71,9 (C-O)	56,6	
150,6 (C-O)	122,9	42,0	56,6	
149,6 (C-O)	116,2	32,3	56,5	
149,5 (C-O)	115,0	-	-	
146,8 (C-O)	113,9	-	-	
133,5	113,3	-	-	
128,3	44,6	-	-	
77,5 (C-O)	-	-	-	
<b>8C</b>	<b>7CH</b>	<b>3CH<sub>2</sub></b>	<b>3CH<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub></b>

Através do espectro COSY (Fig. 39, pág. 57), destacou-se os acoplamentos entre os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,71 (H-5) com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,57 (H-6) e em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (H-5') com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (H-6'), assim como do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  2,48 (H-8') com os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,50 (H-7'a)/2,79 (H-7'b) e 3,96 (H-9'a)/3,99 (H-9'b).

O espectro bidimensional HSQC (Fig. 37, pág. 56) possibilitou correlacionar cada sinal de carbono hydrogenado com seu respectivo sinal de hidrogênio (Tab. 11, pág. 53), incluindo os sinais dos carbonos metilênicos com os hidrogênios diastereotópicos:  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ , 32,3 com 2,50/2,79 e 71,9 com 3,96/3,99.

Com base no espectro HMBC (Fig. 38, pág. 57), determinou-se a relação entre os anéis aromáticos e o anel lactônico. Através das correlações a duas e a três ligações entre os hidrogênios metilênicos 2H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2,85/3,12) com os carbonos C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  128,3), C-8 (77,5), C-9 (180,7) e C-8' ( $\delta_{\text{C}}$  44,7) e 2H-7' ( $\delta_{\text{H}}$  2,50/2,79) com os carbonos C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  133,6), C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  122,9), C-8' ( $\delta_{\text{C}}$  44,7) e C-9' ( $\delta_{\text{C}}$  71,9) foi possível determinar que CFTE-1 tratava-se de uma lignana. . A posição dos substituintes nos carbonos C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  56,3), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  149,7) e C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  56,3) e C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  56,5) dos anéis aromáticos também foram confirmadas através deste experimento.

De acordo com os dados espectroscópicos do composto em questão apresentados, bem como comparação com os dados os descritos na literatura (Jonh et al.,1992), chegou-se a conclusão de que CFTE-1 tratava-se da lignana (-) trachelogenina, a qual já foi isolada anteriormente das folhas de *Glycydendron amazonicum* pertencente a família Euphorbiaceae (Jonh et al.,1992), no entanto, esta sendo relatada pela primeira vez no gênero *Combretum*.



(-)-Trachelogenina

**Tabela 11.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFTE -1, comparado com os valores na literatura (John e Tinto, 1992) para (-) trachelogenina.

C	HSQC		HMBC		Literatura*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	128,3	-	2H-7	-	126,3	-
2	115,0	6,71(d, $J = 2.0$ Hz)	-	-	112,7	6,71 (d, $J = 2.0$ Hz)
3	146,8	-	-	-	146,6	-
4	149,7	-	-	-	144,9	-
5	116,2	6,85(d, $J = 8.5$ Hz)	-	-	114,3	6,83 (d, $J = 8.0$ Hz)
6	124,2	6,57 (dl, $J = 7.9$ Hz)	-	H-2; 2H-7	123,0	6,63(d, $J = 8.0; 2.0$ Hz)
7	42,0	3,12 (d, $J = 13.7$ Hz) 2,85 (d, $J = 13.7$ Hz)	-	H-2; H-6; H-8'	41,8	3,13 2,93
8	77,51	-	2H-7; H-8'	2H-7'; 2H-9	76,8	-
9	180,7	-	-	2H-7; 2H-9'	178,7	-
1'	133,6	-	2H-7'	H-5'; H-8'	131,0	-
2'	113,9	6,69 (sl)	-	-	112,0	6,62 ( $J = 2.0$ Hz)
3'	149,6	-	-	H-5'; MeO-3'	147,7	-
4'	150,7	-	-	-	148,9	-
5'	113,3	6,83 (d, $J = 8.5$ Hz)	H-6'	-	111,3	6,78 ( $J = 8.1$ Hz)
6'	122,9	6,70 (d, $J = 2.0$ Hz)	H-5'	H-2'; 2H-7'	120,8	6,67( $J = 8.1; 2.0$ Hz)
7'	32,3	2,79 (dd, $J = 13.4; 4.5$ Hz) 2,50 (dd, $J = 13.4, 9.4$ Hz)	H-8'	H-2'; H-6'; 2H-9'	31,4	2,92 2,53
8'	44,7	2,48 (m)	2H-7'; 2H-9'	2H-7	43,6	2,51
9'	71,9	3,99 (dd) 3,96 (dd)	H-8'	2H-7'	70,3	4,02 4,02
MeO-3	56,6	3,77 (s)	-	-	55,9	-
MeO-3'	56,6	3,77 (s)	-	-	55,9	-
MeO-4'	56,5	3,78 (s)	-	-	55,8	-

\* RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100,66 MHz) usando  $\text{CDCl}_3$

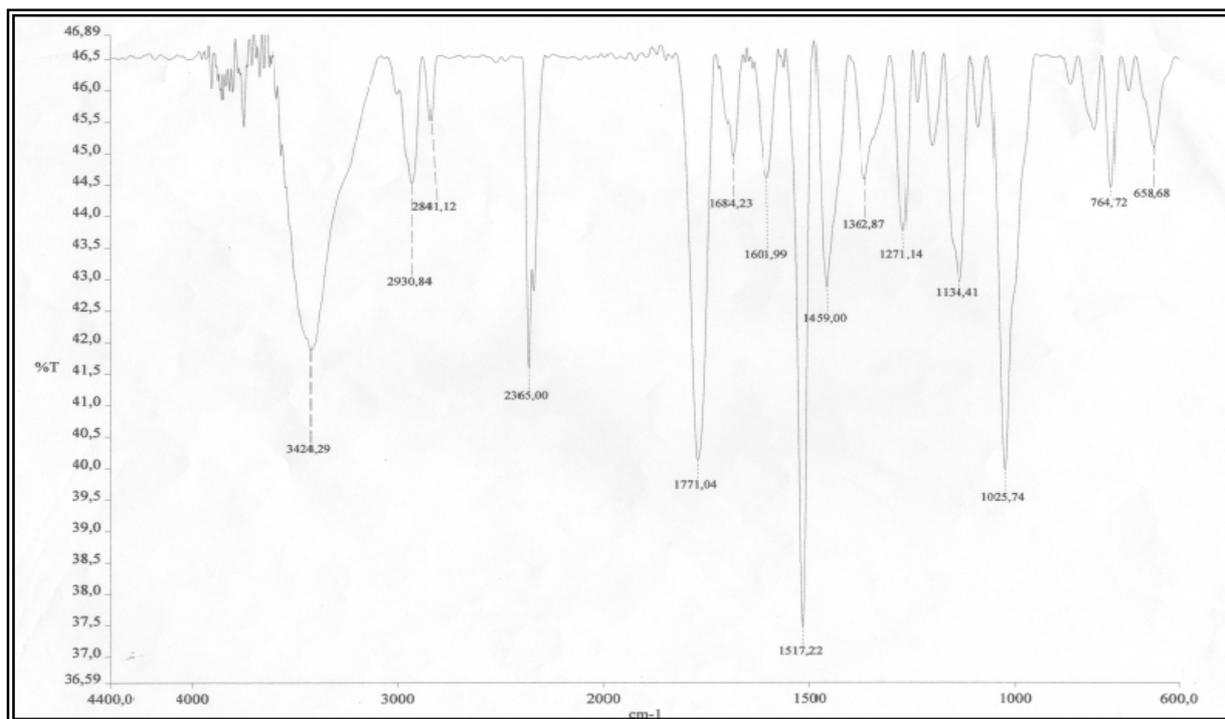


Figura 32. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFTE-1.

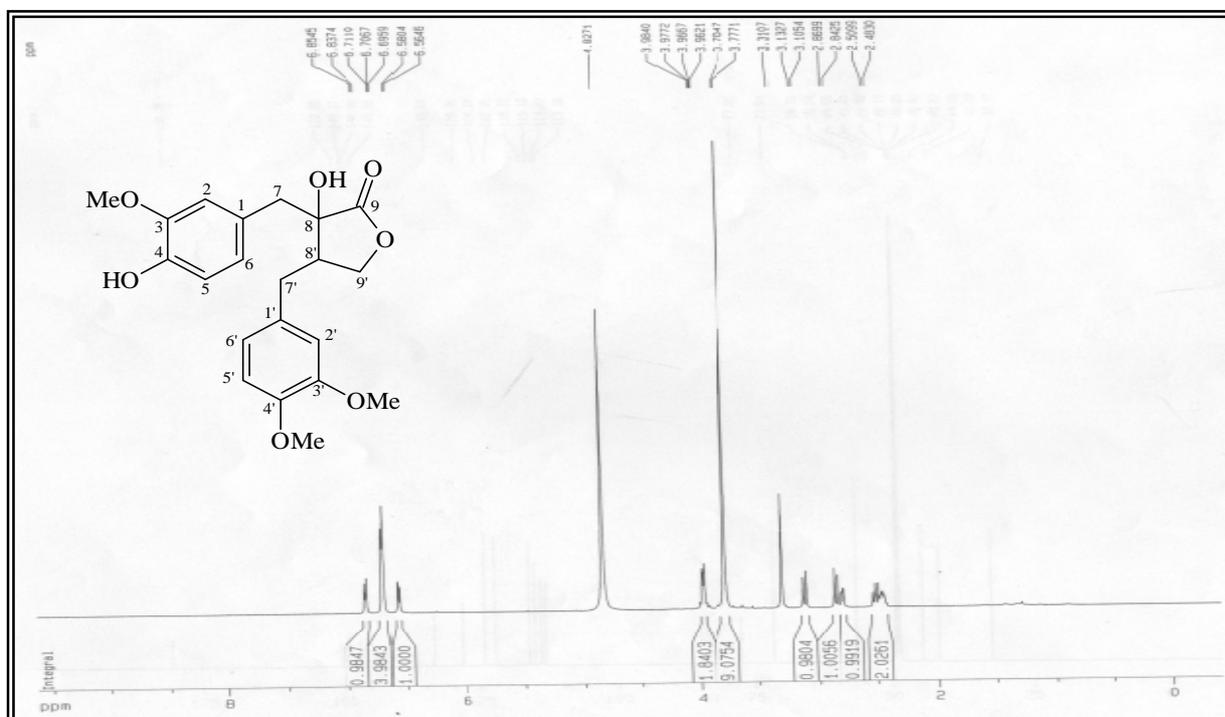
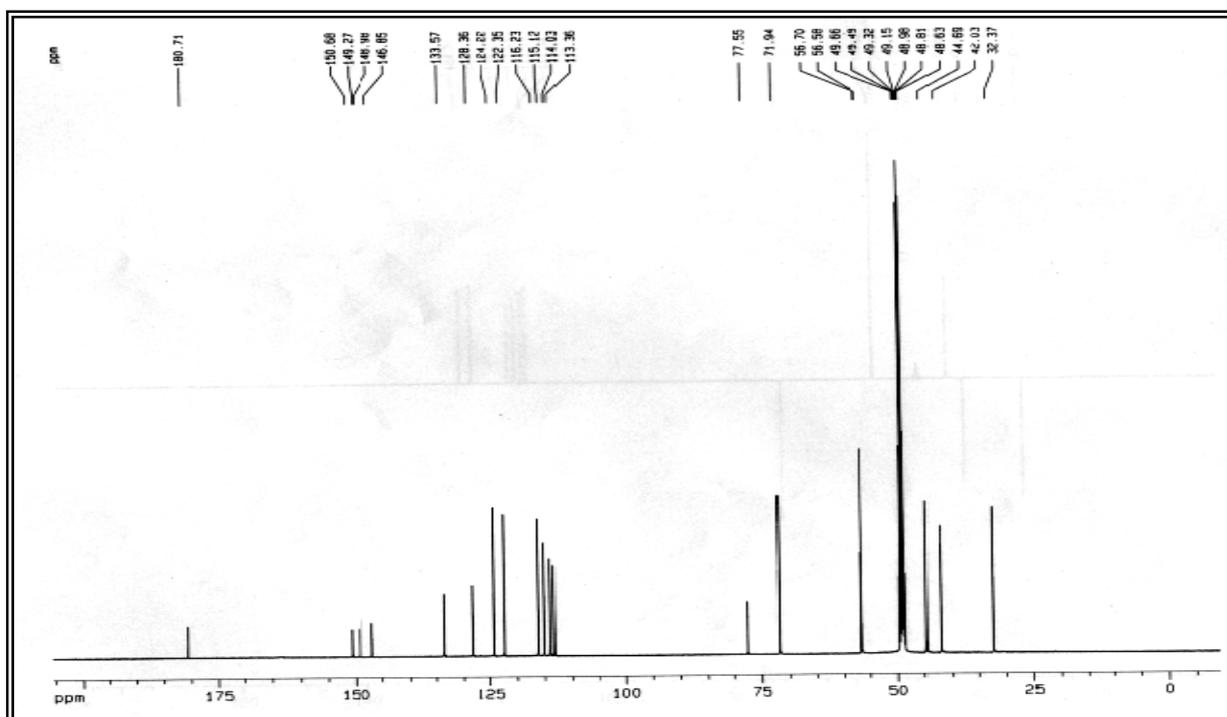
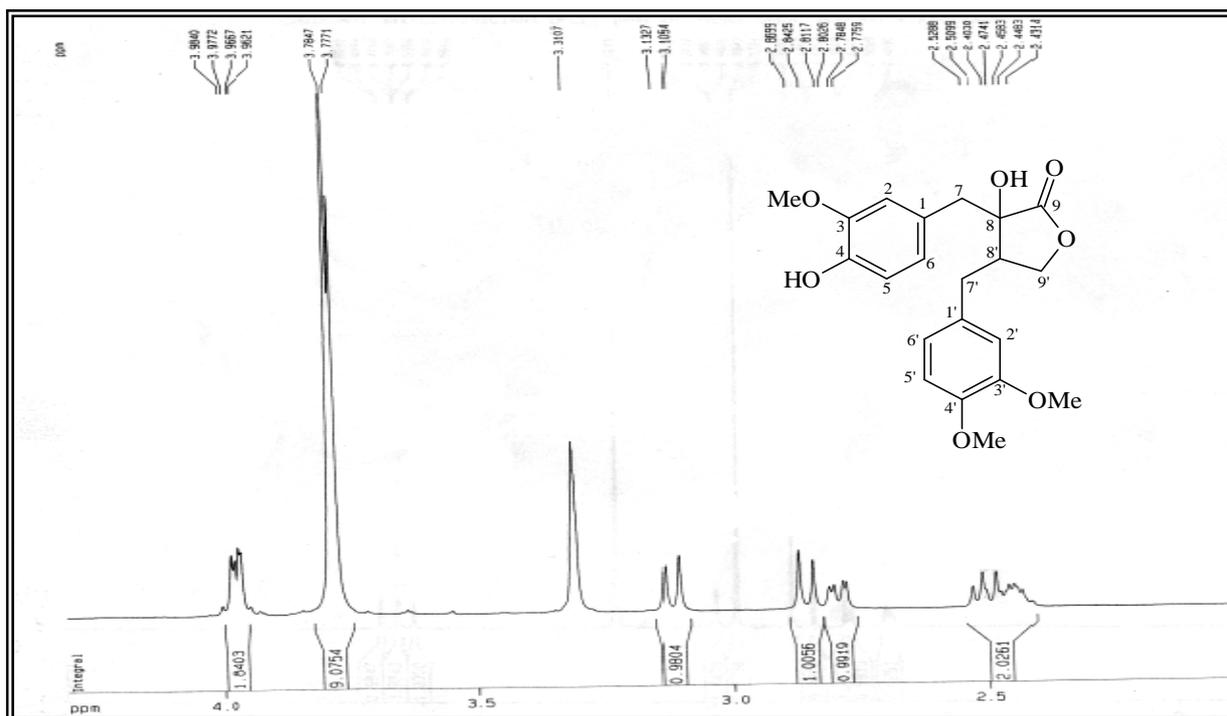


Figura 33. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, piridina d<sub>5</sub>) de CFE-1.



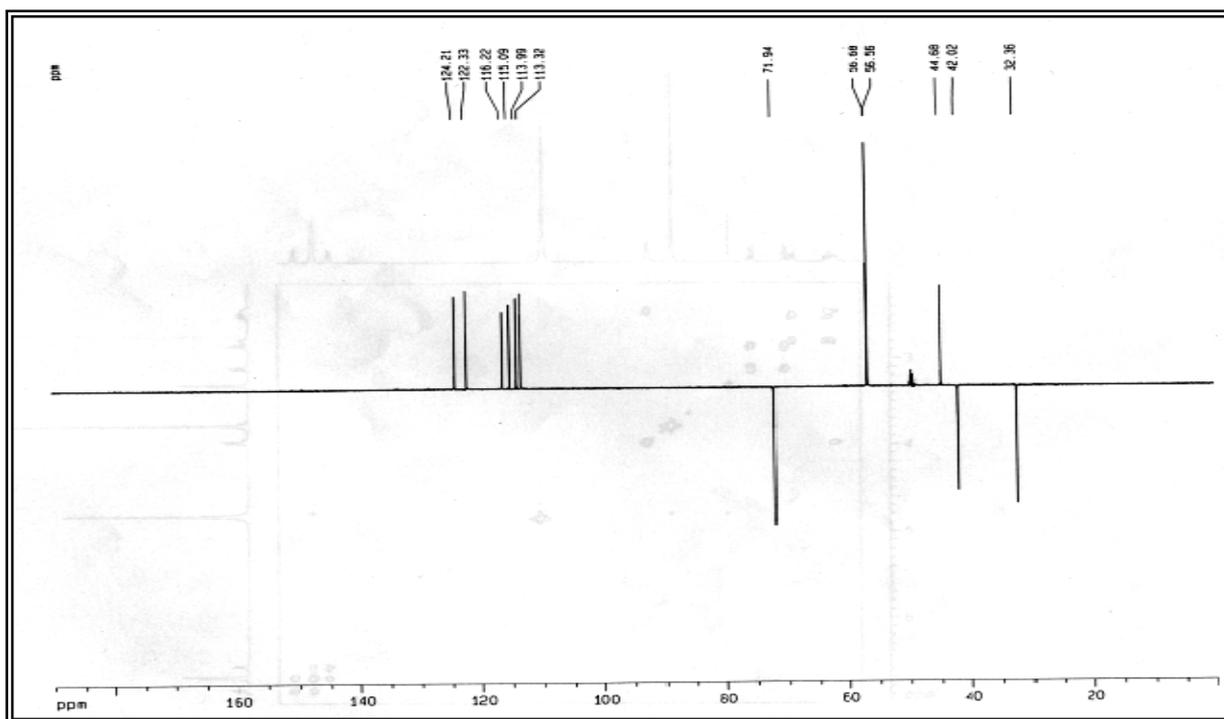


Figura 36. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFTE-1.

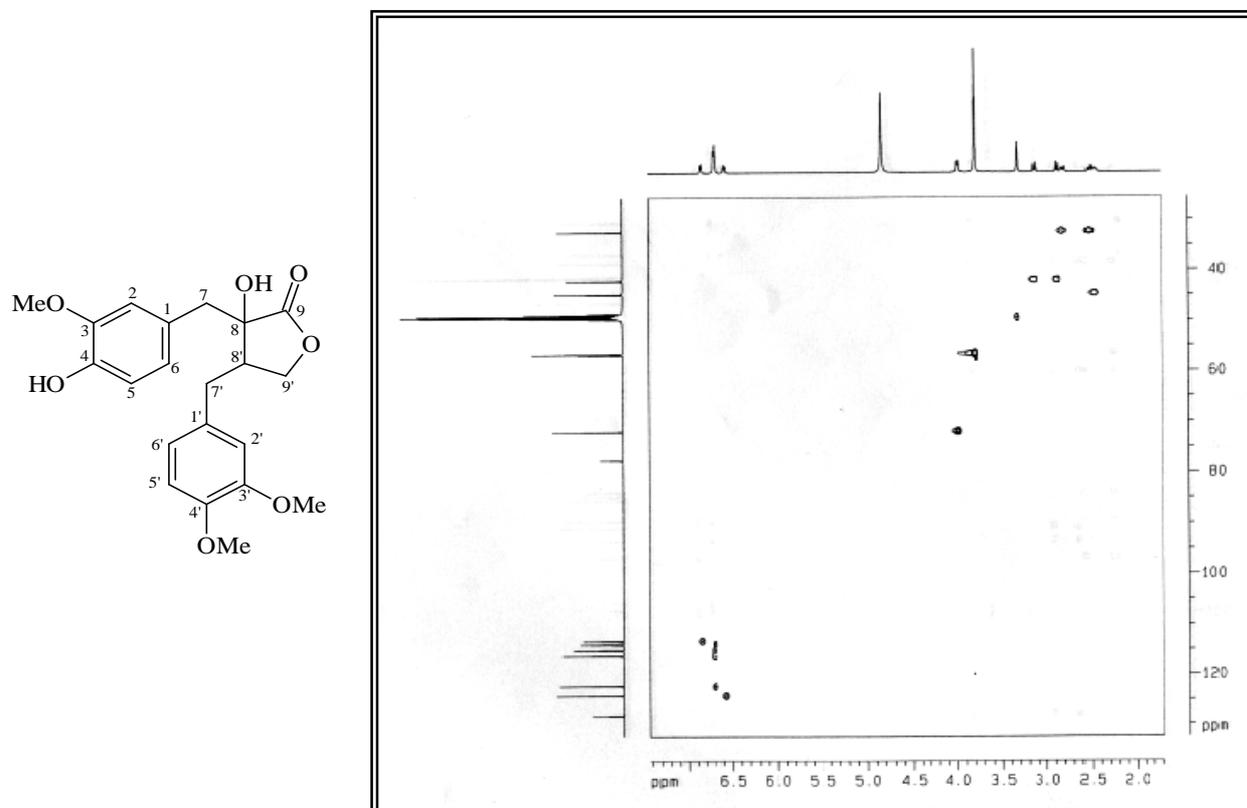
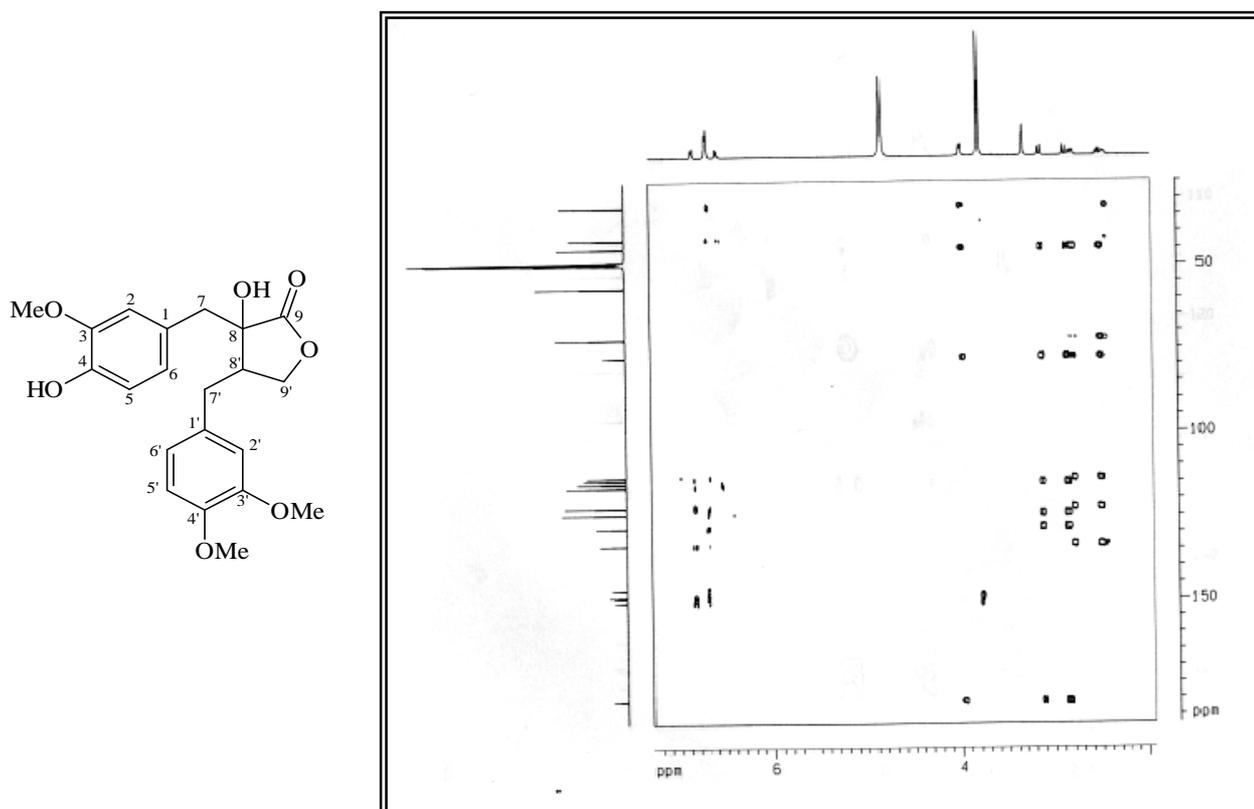
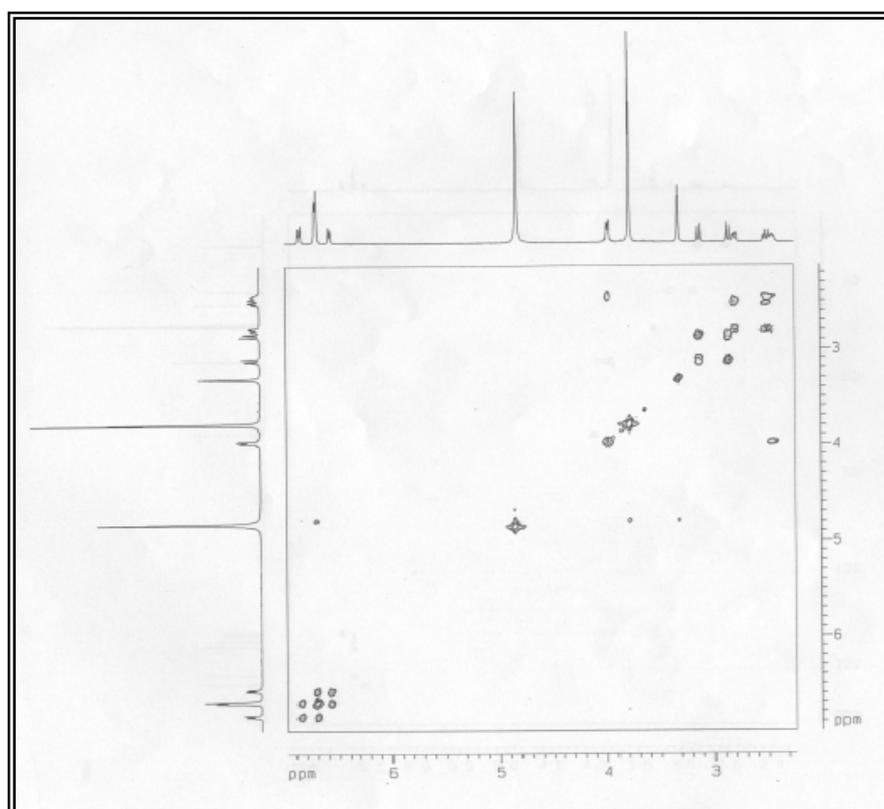


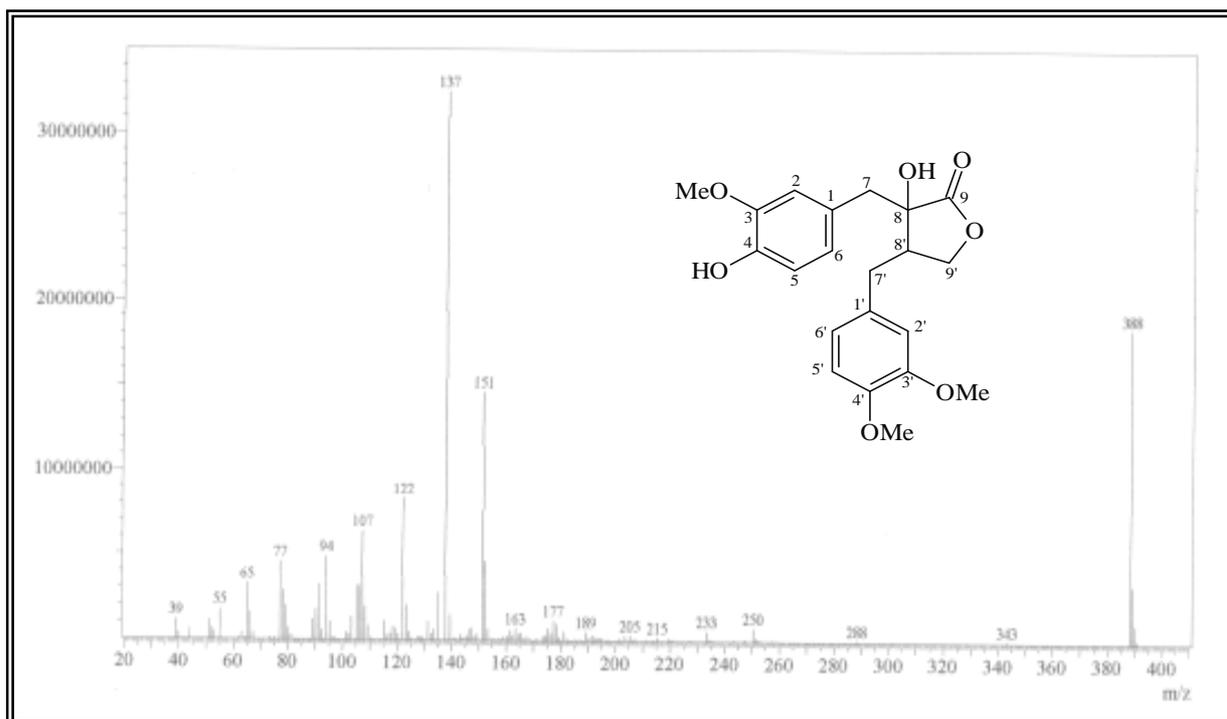
Figura 37. Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFTE-1.



**Figura 38.** Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFTE-1.



**Figura 39.** Espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFTE-1.



**Figura 40.** Espectro de Massas de CFTE-1.

### 3.6 - Determinação estrutural de CFTE-2

O metabólito CFTE-2 (9,6 mg) foi isolado a partir da fração DCM do extrato etanólico dos talos de *C. fruticosum* (item 4.3.8.3, pág. 96), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este composto apresentou-se como um sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 281-283 °C e  $[\alpha]_{20}^D -8^\circ$  (c. 0,25 g/100 mL, MeOH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 42, pág 63), revelou uma banda larga em  $3414\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de ligação OH, e uma absorção em  $2932\text{ cm}^{-1}$ , de deformação axial da ligação C-H de grupamentos metílico e metilênico. Observou-se também uma banda intensa em  $1684\text{ cm}^{-1}$ , associada à deformação axial de ligação C=O de lactona, além de bandas em 1611, 1519 e  $1458\text{ cm}^{-1}$  compatíveis com deformação axial de C=C de aromáticos.

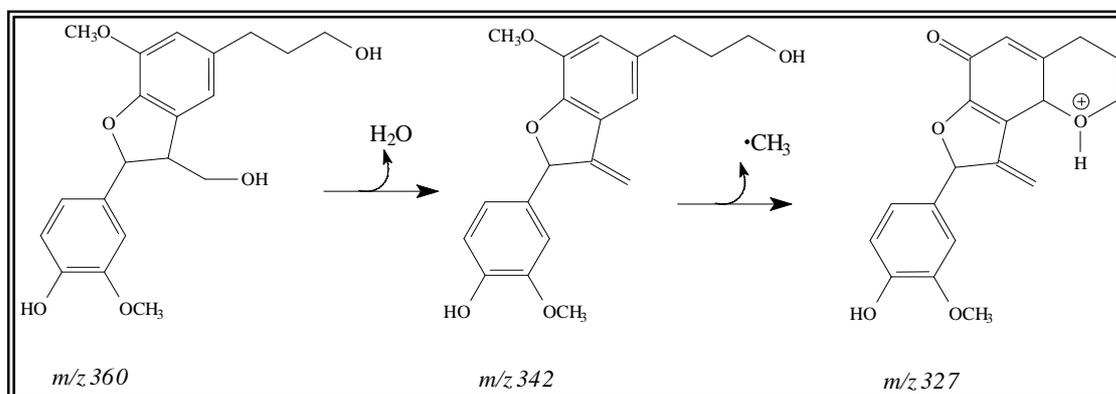
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz, piridina- $d_5$ ] (Fig. 44, pág. 64), apresentou sinais correspondentes a vinte átomos de carbono, que após a análise comparativa com o espectro DEPT  $135^\circ$  (Fig. 45, pág. 64), revelou a presença de sete carbonos metínicos (cinco  $\text{sp}^2$  e dois  $\text{sp}^3$ ), incluindo um oxigenado ( $\delta_{\text{C}} 88,3$ ), quatro carbonos metilênicos, dos quais, dois são oxigenados ( $\delta_{\text{C}} 64,6$  e  $61,3$ ), além de dois carbonos metílicos oxigenados. Por subtração dos referidos espectros, constatou-se a presença de sete carbonos não-hidrogenados, dos quais os sinais em  $\delta_{\text{C}} 149,0$ ;  $148,3$ ;  $147,5$  e  $144,9$  são referentes a carbonos ligados a átomos de oxigênio. Estes dados permitiram deduzir a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$ , a qual apresenta nove graus de insaturação, justificadas pela presença de seis ligações duplas e três ciclos.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz, piridina- $d_5$ ] (Fig. 43, pág. 63), exibiu cinco singletos largos em  $\delta_{\text{H}} 6,92$  (H-2');  $7,05$  (H-6');  $7,24$  (H-5);  $7,25$  (H-6) e  $7,34$  (H-2), cada um com integração para um átomo de hidrogênio, compatíveis com hidrogênios aromáticos. Exibiu também dois sinais intensos em  $\delta_{\text{H}} 3,64$  e  $3,69$  referentes a duas metoxilas, bem como sinais referentes a hidrogênios geminados ligados a carbonos oxigenados entre  $\delta_{\text{H}} 3,92$  e  $4,28$ .

**Tabela 12.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFTE-2.

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH</i> <sub>2</sub>	<i>CH</i> <sub>3</sub>	Formula Molecular
149,0 (C-O)	119,9	64,6 (C-O)	56,4	
148,3 (C-O)	117,7	61,6 (C-O)	56,0	
147,5 (C-O)	116,7	36,2	-	
144,9 (C-O)	113,78	32,9	-	
136,1	111,0		-	
134,1	88,6 (C-O)		-	
130,3	55,3	-	-	
<b>7C</b>	<b>7CH</b>	<b>4CH</b> <sub>2</sub>	<b>2CH</b> <sub>3</sub>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub></b>

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 50, pág. 67), apresentou o pico íon molecular em  $m/z$  360 Daltons, confirmado pelo espectro de massas de alta resolução (Fig. 49, pág. 66), que forneceu picos correspondentes a molécula cationizada, formando adutos com sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , em  $m/z$  383,1379 Daltons e com potássio  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , em  $m/z$  399,1109 Daltons. Em conformidade com o espectro de massas de baixa resolução, justifica-se facilmente os picos em  $m/z$  342 Daltons, correspondente a perda de uma molécula de água ( $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6 - \text{H}_2\text{O}$ ) e em  $m/z$  327 Daltons, compatível com a perda de um radical metila, conforme mostrados no quadro abaixo.

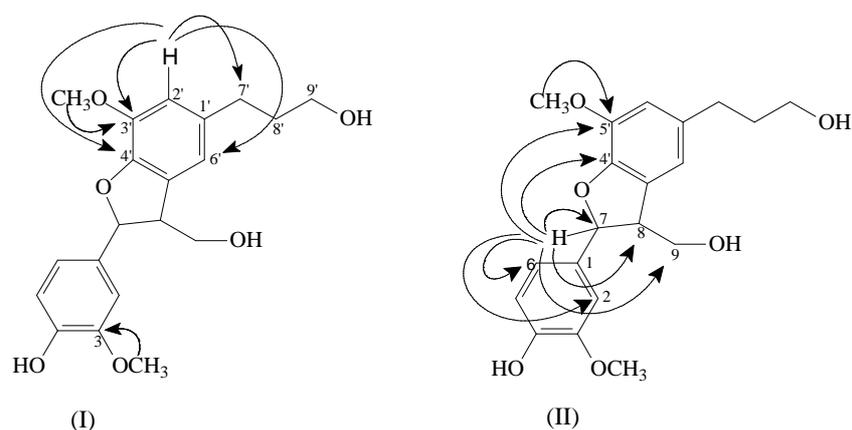


**Quadro 1** – Proposta mecanística para as fragmentações que justificam alguns picos registrados no espectro de massas de CFTE -2.

Pelo espectro de COSY (Fig. 48, pág. 66), observou-se o acoplamento do sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,07 (H-7) com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,95 (H-8) e deste com hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,22 (H-9a);  $\delta_{\text{H}}$  4,28 (H-9b), bem como dos hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,86 (2H-7') com  $\delta_{\text{H}}$  2,08 (2H-8') e deste com  $\delta_{\text{H}}$  3,92 (2H-9').

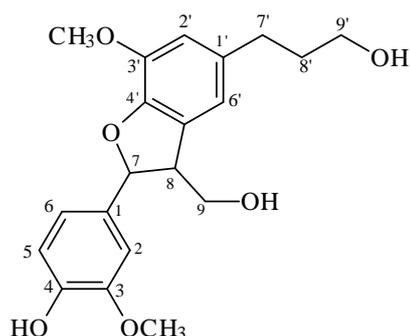
O experimento HSQC (Fig. 46, pág. 65) foi essencial para correlacionar com segurança todos os sinais de hidrogênio aos seus respectivos átomos de carbonos, conforme a Tabela 13 (pág. 62).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear – HMBC (Fig. 47, pág. 65), mostrou correlações do hidrogênio aromático em  $\delta_H$  6,92 (H-2', sl) a três ligações com os carbonos em  $\delta_C$  147,5 (C-4');  $\delta_C$  117,7 (C-6') e  $\delta_C$  32,9 (C-7') e a duas ligações com o carbono em  $\delta_C$  144,9 (C-3'), como mostra a subestrutura (I). Também por meio deste, pode-se determinar a posição dos substituintes através da correlação a três ligações entre os carbonos C-3' ( $\delta_C$  144,9) e C-3 ( $\delta_C$  148,3) e os hidrogênios dos grupos metoxilas. As correlações a duas e a três ligações do hidrogênio em  $\delta_H$  6,07 (H-7; d,  $J=6,5$ ), exibidas na subestrutura (II) determinam a relação entre os três anéis da molécula.



**Figura 41-** Acoplamento a longa distancia (HMBC) de CFTE -2

Levando-se em consideração as informações acima discutidas e comparando-as com dados descritos na literatura (Lee et al., 2007), conclui-se que o referido composto trata-se da lignana denominada de vladinol F. De acordo com levantamento bibliográfico realizado no *Sci Finder* esse metabolito, isolado anteriormente de *Cornus Kousa* pertencente a família Comaceae (Lee et al., 2007), esta sendo relatado pela primeira vez no gênero.



**Tabela 13.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFTE -2, comparado com os valores na literatura (Lee et al., 2007) para o vladinol F.

C	HSQC		HMBC		Literatura*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	134,1	-	H-7; H-2; H-6	H-8; H-5	133,9	-
2	111,0	7,34 (sl)	-	H-7; H-6	110,8	7,33 (d, $J= 1.6$ Hz)
3	148,3	-	-	H-5; MeO-3	148,8	-
4	149,0	-	-	H-2	147,3	-
5	116,7	7,24 (sl)	H-6'	-	117,5	7,11 (d, $J= 8.4$ Hz)
6	119,9	7,25 (sl)	-	H-7; H-2	119,7	7,24 (dd, $J= 8.4;$ 1.6 Hz)
7	88,6	6,07 (d, $J= 6.5$ Hz)	-	2H-9; H-2	88,5	6,06 (d, $J= 6.4$ Hz)
8	55,3	3,95	H-7; 2H-9	-	49,8	3,96 (ddd, $J=$ 6.4; 6.4; 5.6 Hz)
9	64,6	4,28 (dd, $J=10.5;$ 5.5 Hz) 4,22 (dd, $J= 10.5;$ 7.0 Hz)	H-8	H-7	64,4	4,27 (dd, $J=$ 10.4; 5.6 Hz) 4,20 (dd, $J=$ 10.4; 6.4 Hz)
1'	136,2	-	H-7'	2H-8'	136,1	-
2'	113,8	6,92 (sl)	-	2H-7'; H-6'	113,6	6,91 (s)
3'	144,9	-	H-2'	MeO-3'	144,6	-
4'	147,5	-	-	H-7; H-2'; H-6'; H-8	148,1	-
5'	130,4	-	H-8	H-7; 2H-9	130,2	-
6'	117,7	7,05 (sl)	-	H-2'; 2H-7'	116,5	7,06 (s)
7'	32,9	2,86 (t, $J=7.5$ Hz)	2H-8'	H-2'; H-6'; 2H-9'	36,2	2,87 (t, $J= 7.2$ Hz)
8'	36,2	2,08 (m)	2H-7'; 2H-9'	-	32,8	2,07 (tt, $J= 7.2,$ 6.4 Hz)
9'	61,6	3,92 (m)	2H-8'	2H-7'	61,5	3,92 (d, $J= 6.4$ Hz)
MeO-3	56,0	3,64 (sl)	-	-	55,8	3,61 (s)
MeO-3'	56,4	3,69 (sl)	-	-	56,3	3,82 (s)

\* RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) usando MeOH

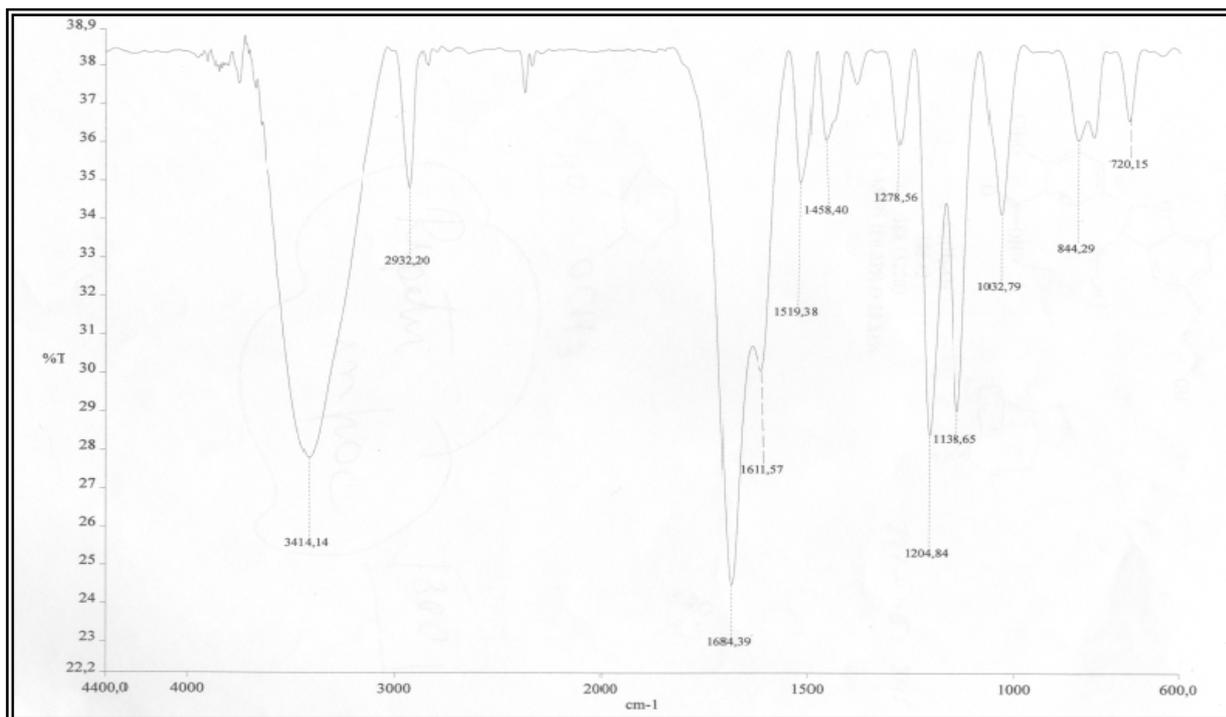


Figura 42. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFTE-2.

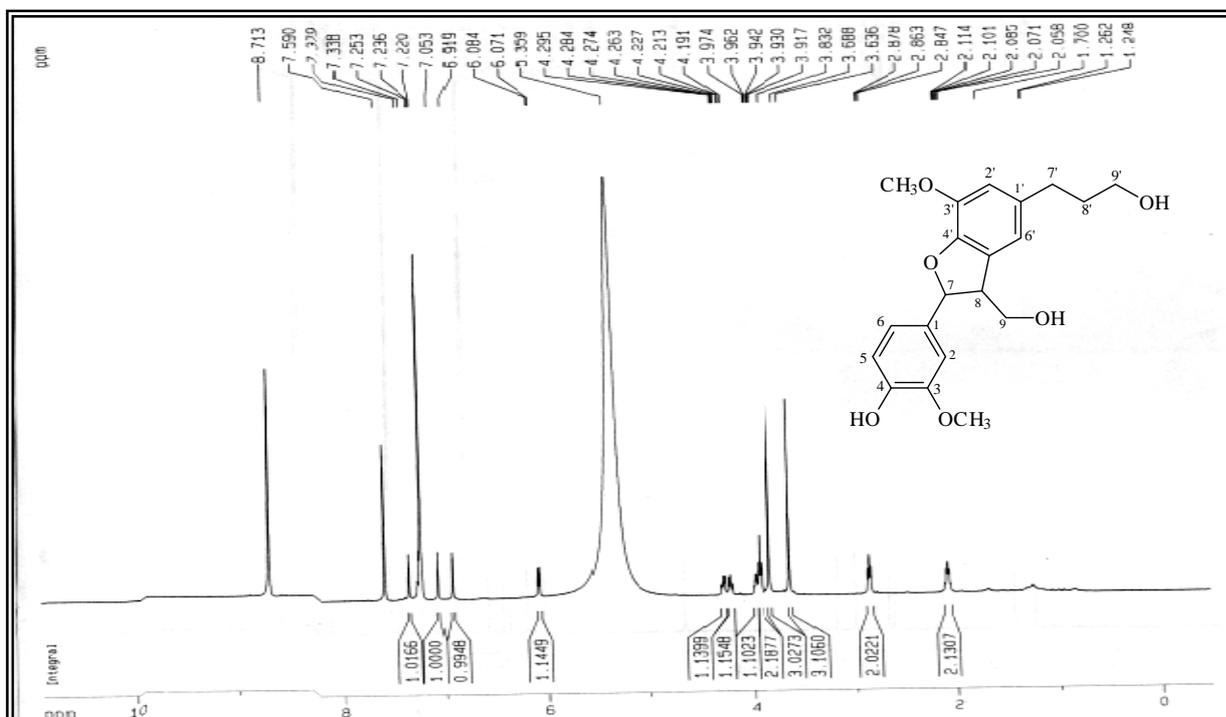


Figura 43. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, piridina d<sub>5</sub>) de CFTE-2.

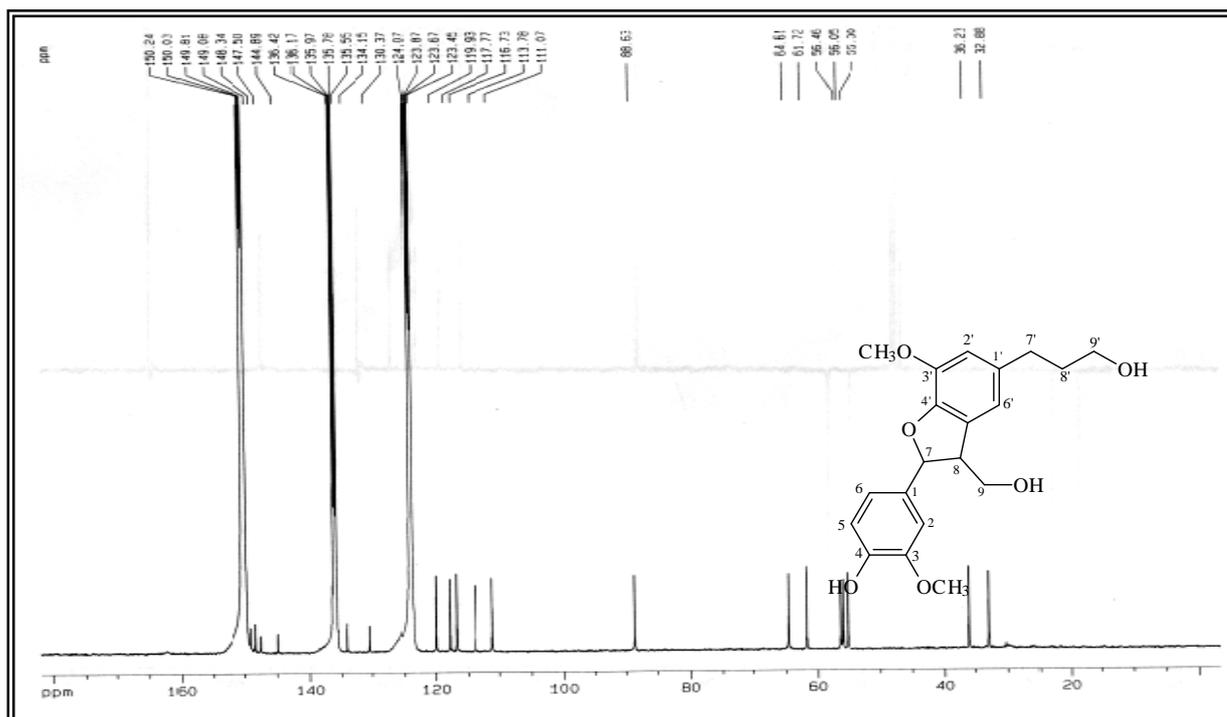


Figura 44. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-2

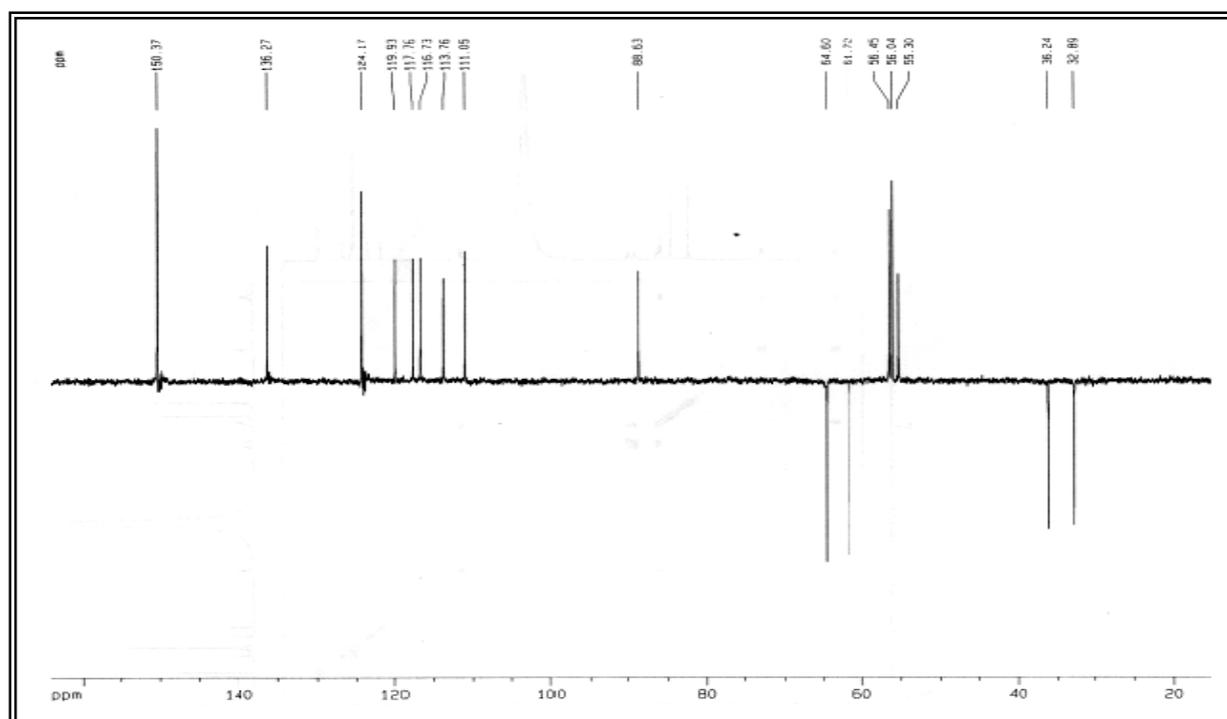
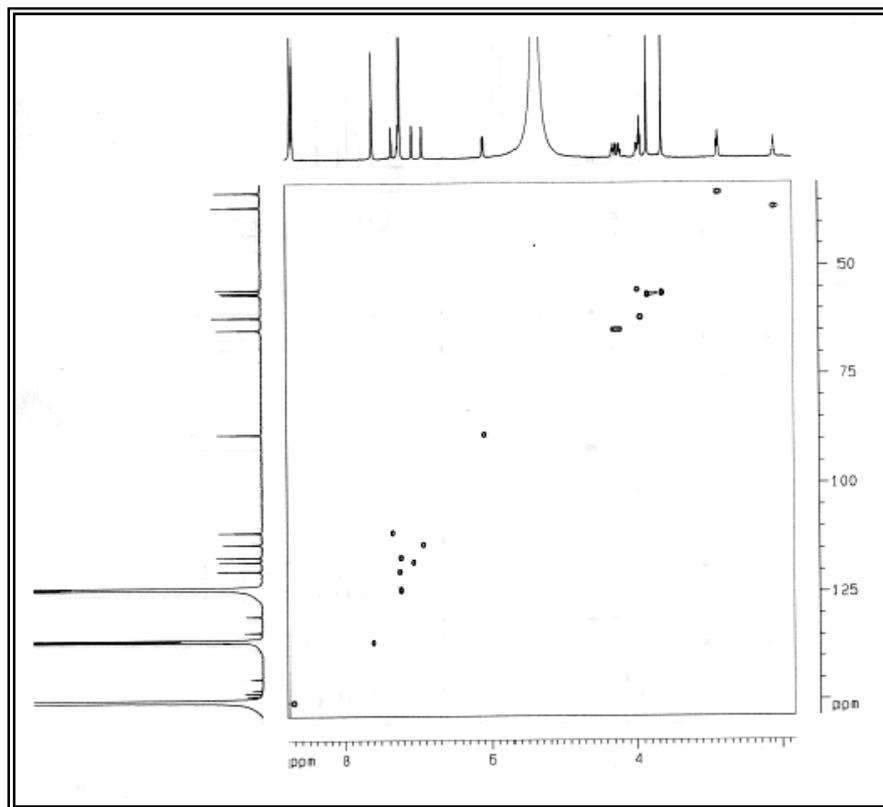
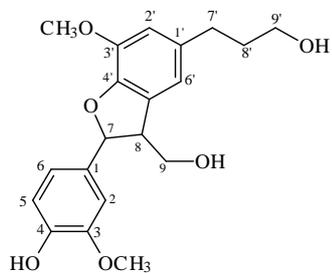
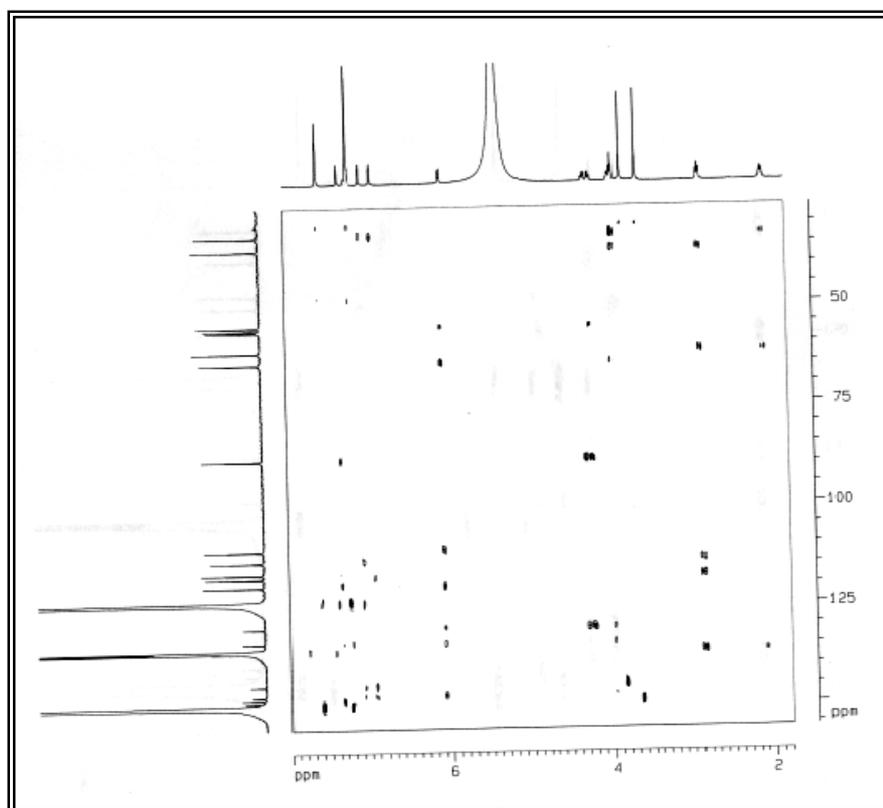


Figura 45. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFFE-2.



**Figura 46.** Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina *d*<sub>5</sub>) de CFTE-2.



**Figura 47.** Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina *d*<sub>5</sub>) de CFTE-2.

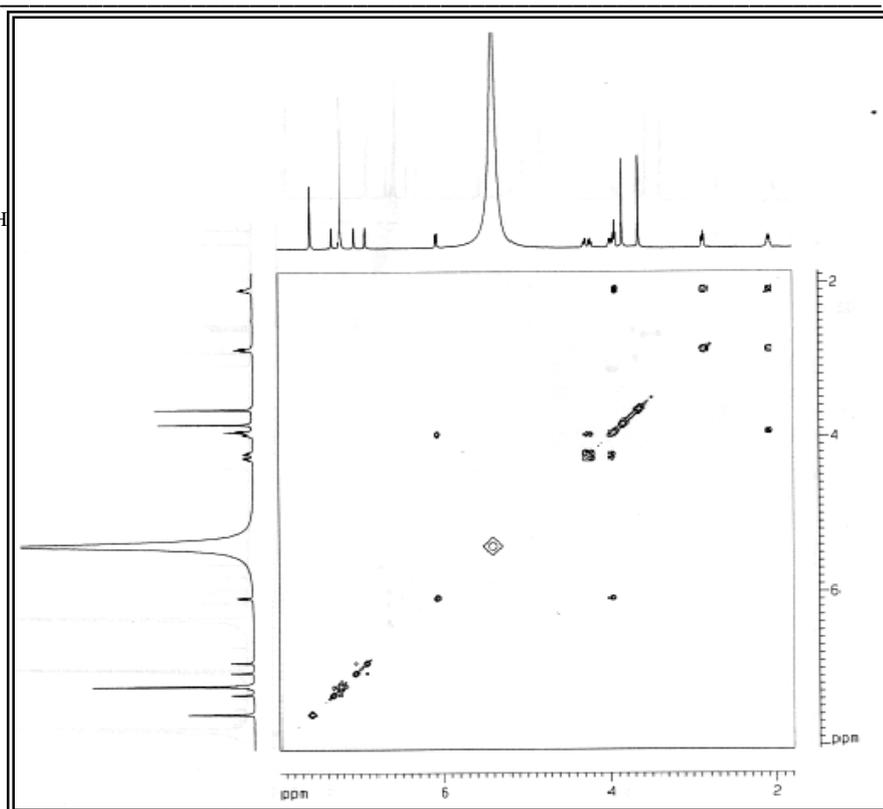
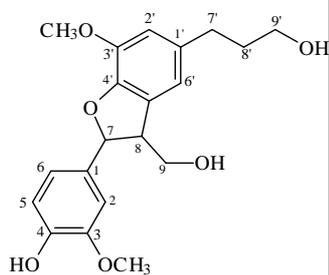


Figura 48. Espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, piridina  $d_5$ ) de CFTE-2.

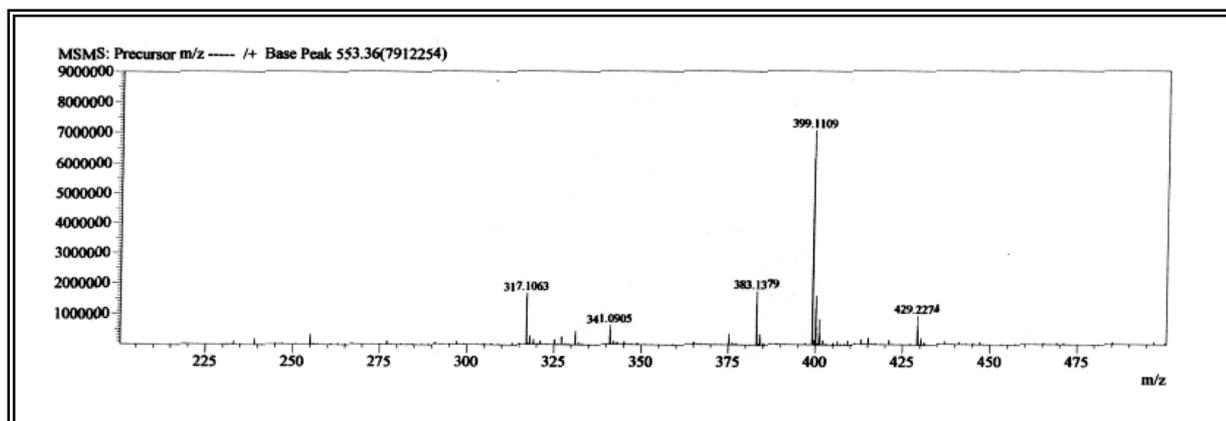


Figura 49. Espectro de Massas de Alta Resolução de CFTE-2

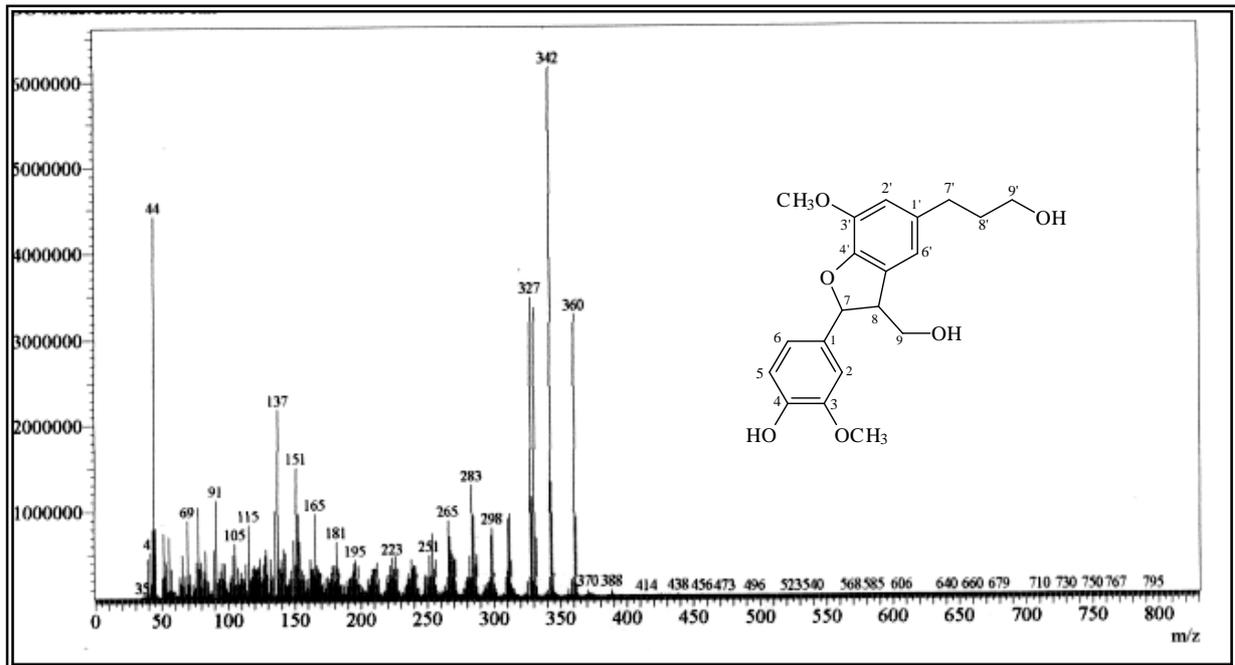


Figura 50. Espectro de Massas de CFTE-2

### 3.7 - Determinação estrutural de CFRE -1

A fração hexânica do extrato etanólico das raízes de *C. fruticosum* (item 4.3.10.1, pág. 98) após sucessivos tratamentos cromatográficos forneceu 6,8 mg de um fino sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 279-282 °C, codificado como CFRE -1.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 51, pág. 71), destacou uma larga absorção em 3421  $\text{cm}^{-1}$  referente a estiramento de ligação O-H, que juntamente com a banda em 1692  $\text{cm}^{-1}$  para a ligação C=O, indicam a presença de um ácido carboxílico. Observou-se também absorções em 2930  $\text{cm}^{-1}$ , características de deformação axial de ligação C-H e em 1271 e 1031  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-O-C.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 53, pág. 72), mostrou trinta linhas espectrais, sugerindo uma estrutura de natureza triterpênica para CFRE-1. A análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 54, pág. 72), mostrou a presença de cinco carbonos metínicos, um deles  $\text{sp}^2$  ( $\delta_{\text{C}}$  122,8) e um oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$  79,2 (C-3), dez carbonos metilênicos, sete carbonos metílicos e oito carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  183,4 referente a uma carboxila de ácido e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  143,2 relativo a um carbono  $\text{sp}^2$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Fig. 52, pág. 71), mostrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,29 (d,  $J = 12,3$  Hz) típico de um hidrogênio vinílico (H-12), em  $\delta_{\text{H}}$  3,22 (dd,  $J = 4,5$  e 10,5 Hz) pertencente a hidrogênio carbinólico (H-3) e em  $\delta_{\text{H}}$  2,83 (dd,  $J=3,9$  e 13,6 Hz), compatível com hidrogênio  $\alpha$  a carbonila (H-18). O espectro exibiu também sete singletos atribuídos a hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  0,99 (H-23), 0,77 (H-24); 0,90 (H-25), 0,75 (H-26), 1,13 (H-27), 0,93 (H-29) e 0,91 (H-30).

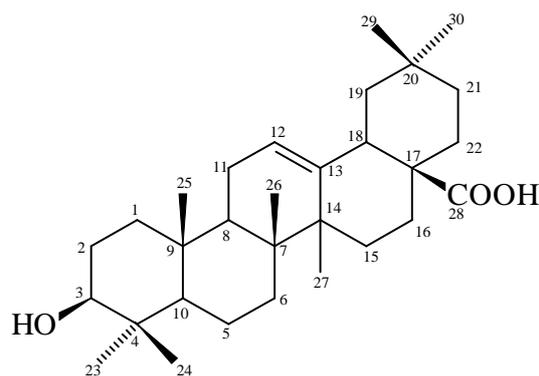
Os dados de RMN acima descritos permitiram determinar a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$  a qual apresenta sete graus de insaturação atribuídos a uma carbonila, uma ligação dupla e cinco ciclos, confirmando a estrutura de um triterpeno contendo a função ácido.

**Tabela 14.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE -1

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH</i> <sub>2</sub>	<i>CH</i> <sub>3</sub>	Formula Molecular	
183,4 (CO <sub>2</sub> H)	122,8 (CH-sp <sup>2</sup> )	38,6	33,3		
143,2 (C-sp <sup>2</sup> )	79,2 (CH-OH)	27,4	28,3		
46,7	41,2	55,4	26,1		
41,8	37,3	18,5	23,8		
47,8	39,5	23,1	17,5		
38,9	-	27,9	15,7		
32,8	-	23,6	15,5		
30,9	-	46,1	-		
-	-	34,0	-		
-	-	32,6	-		
<b>8C</b>	<b>5CH</b>	<b>10CH<sub>2</sub></b>	<b>7CH<sub>3</sub></b>		<b>C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub></b>

As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos (Tab. 15, pág. 70) foram confirmadas através das correlações observadas no espectro HSQC (Fig. 55, pág. 73).

Após a comparação dos dados espectrais obtidos para CFRE-1 e comparação com os dados da literatura (Vandrensen, 2005) concluiu-se que esta substância trata-se de um triterpeno da série oleananos, denominado ácido oleanólico (ácido 3β-hidróxi-olea-12-en-28-óico), comum em plantas do gênero *combretum*.



Ácido oleanólico – CFRE-1

**Tabela 15.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE -1, comparado com os valores na literatura (Vandrensen, 2005) para o ácido oleanólico.

C	HSQC		Literatura*	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	38,6	1,62 (m)	38,6	1,62 (m)
2	27,4	1,65 (m)	27,4	1,63 (m)
3	79,2	3,22 (dd, $J = 4,5$ e $10,5$ Hz)	79,2	3,22 (dd, $J = 4,5$ e $10,2$ Hz)
4	38,9	-	38,9	-
5	55,4	0,73 (sl)	55,4	0,73 (m)
6	18,5	1,53 (m)	18,5	1,55 (m)
7	32,8	0,88 (m)	32,9	0,87 (m)
8	39,5	-	39,4	-
9	47,8	1,56 (m)	47,8	1,55 (m)
10	37,3	-	37,2	-
11	23,1	1,90 (m)	23,2	1,90 (m)
12	122,8	5,29 (d, $J = 12,3$ Hz)	122,9	5,30 (t, $J = 3,6$ Hz)
13	143,2	-	143,7	-
14	41,8	-	41,9	-
15	27,9	0,99 (m)	27,9	0,95 (m)
16	23,6	0,88 (m)	23,6	0,85 (m)
17	46,7	-	46,6	-
18	41,2	2,83 (dd, $J = 3,9$ e $13,6$ Hz)	41,4	2,82 (dd, $J = 3,9$ e $12,9$ Hz)
19	46,1	1,71 (m)	46,1	1,71 (m)
20	30,9	-	30,8	-
21	34,0	1,59 (m)	34,0	1,55 (m)
22	32,6	1,60 (m)	32,6	1,60 (m)
23	28,3	0,99 (s)	28,3	0,99 (s)
24	15,7	0,77 (s)	15,8	0,78 (s)
25	15,5	0,90 (s)	15,5	0,90 (s)
26	17,5	0,75 (s)	17,2	0,77 (s)
27	26,1	1,13 (s)	26,1	1,14 (s)
28	183,4	-	180,5	-
29	33,3	0,93 (s)	33,2	0,93 (s)
30	23,8	0,91 (s)	23,7	0,91(s)

\* RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500MHz) usando  $\text{CDCl}_3$

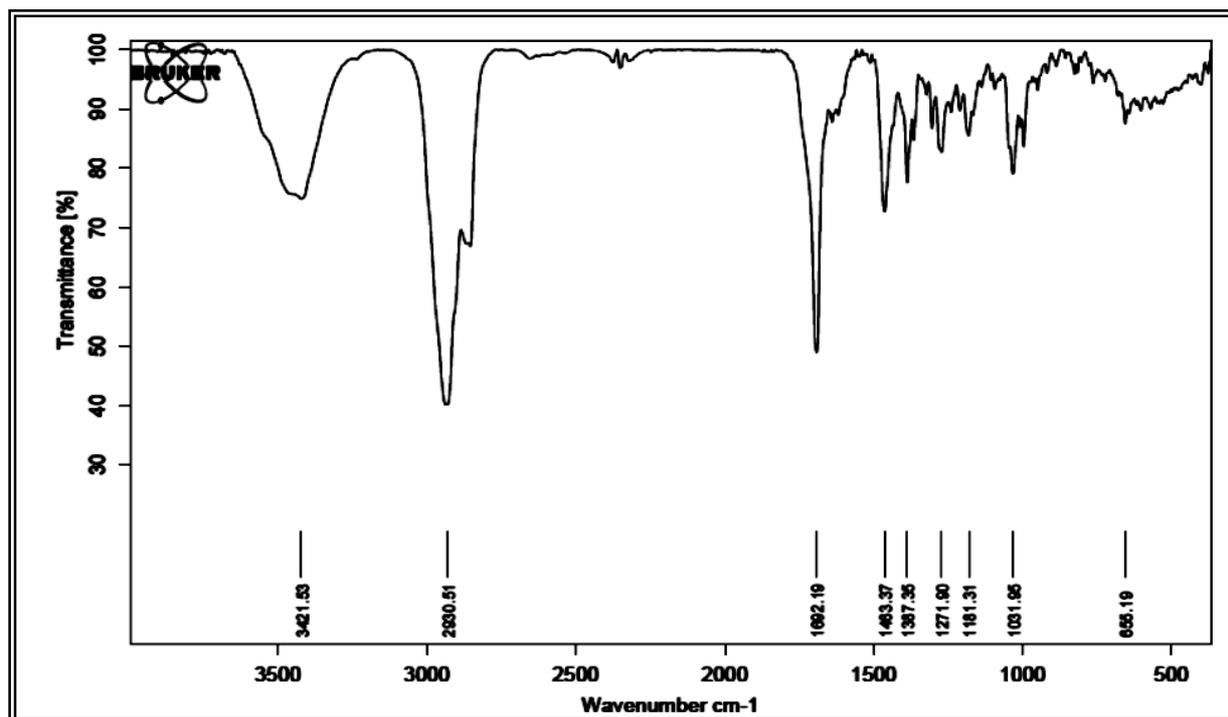


Figura 51. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFRE-1.

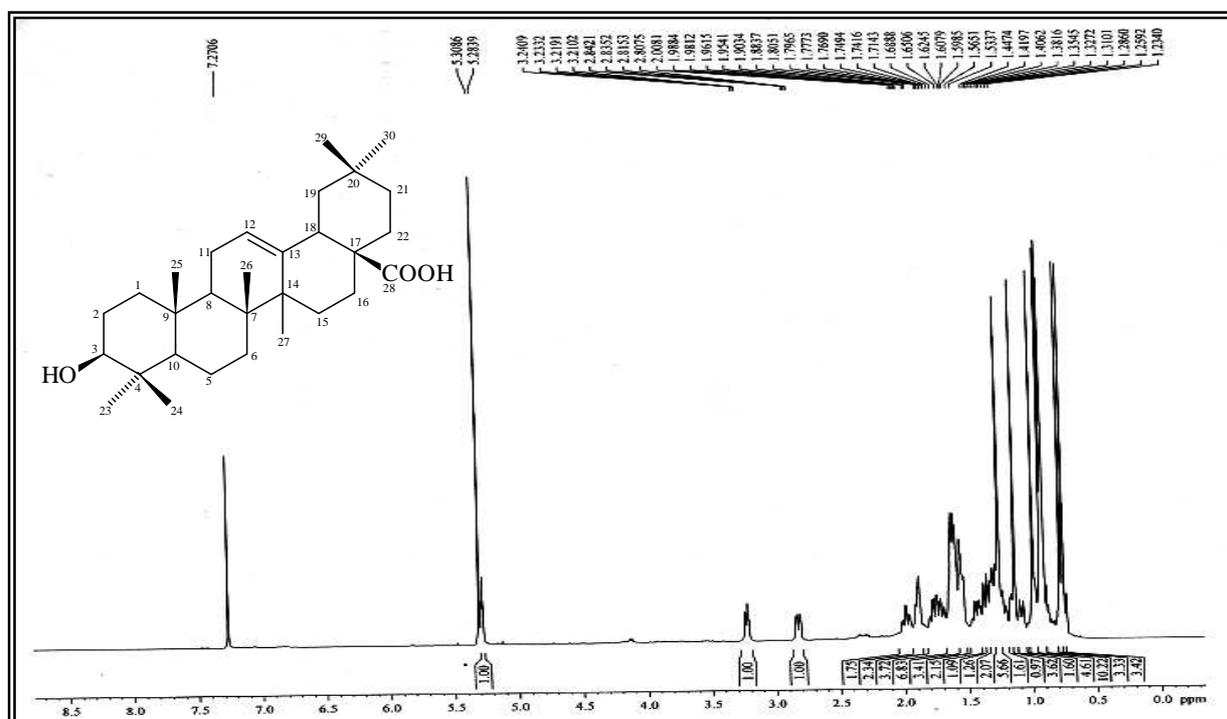


Figura 52. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de CFRE-1.

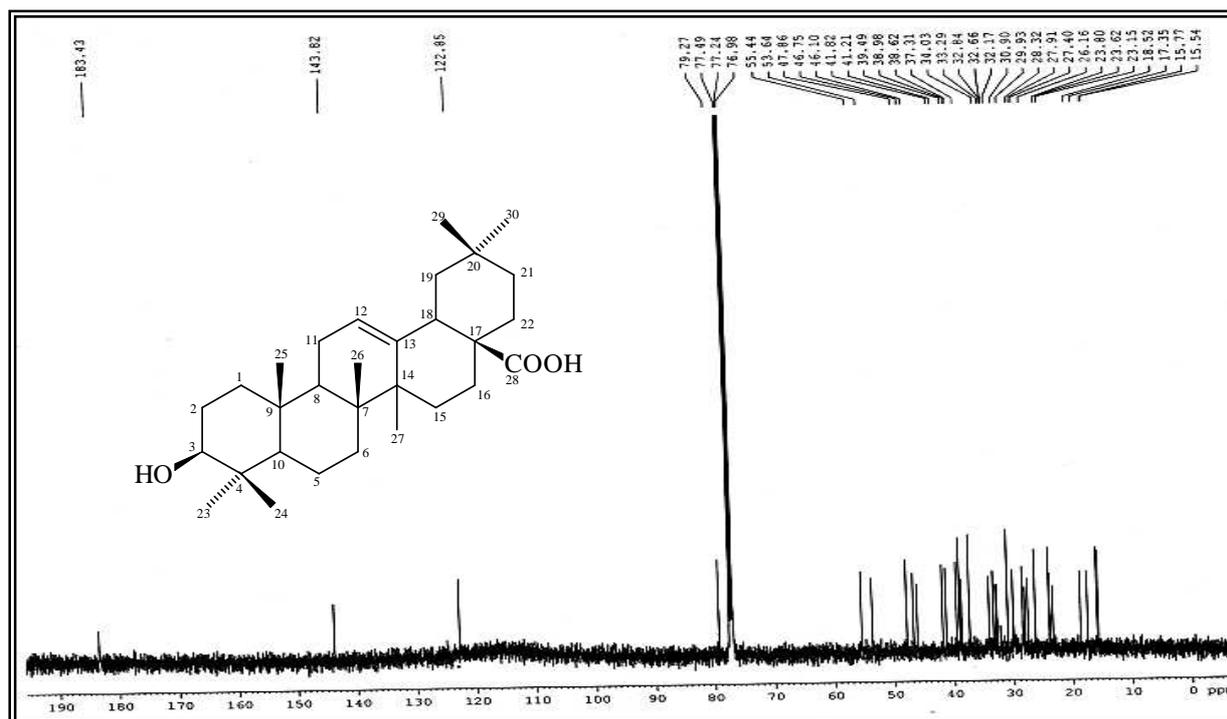


Figura 53. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1

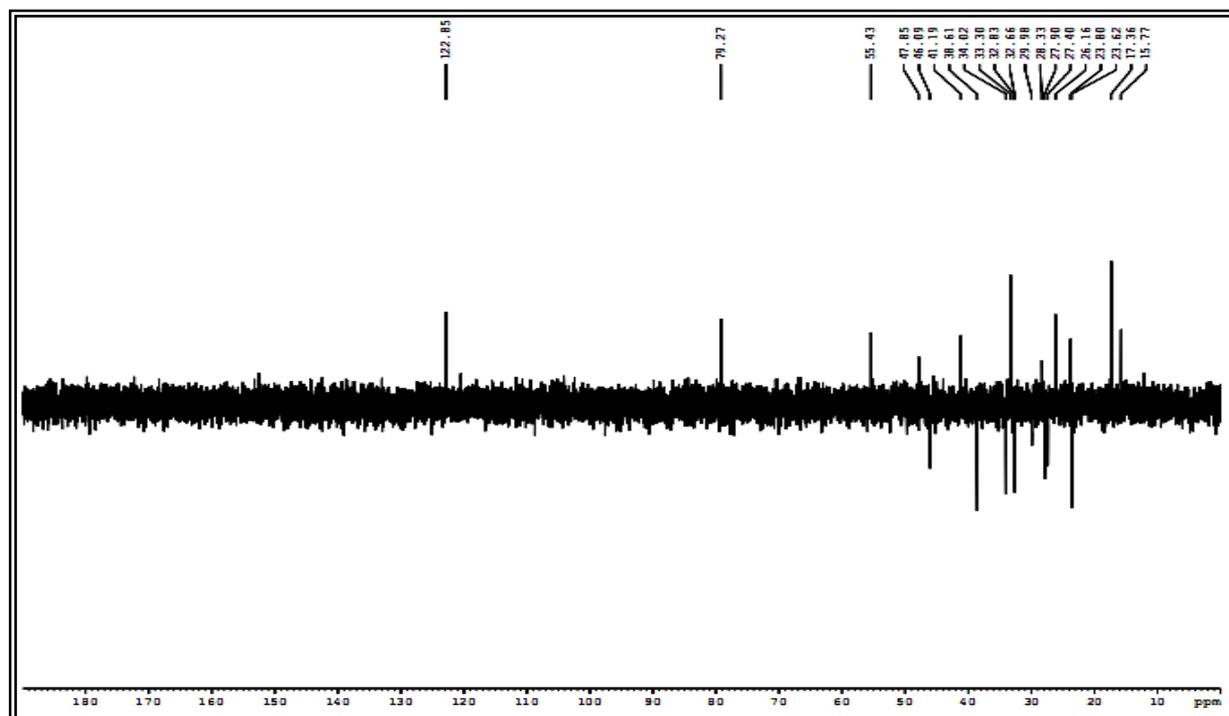
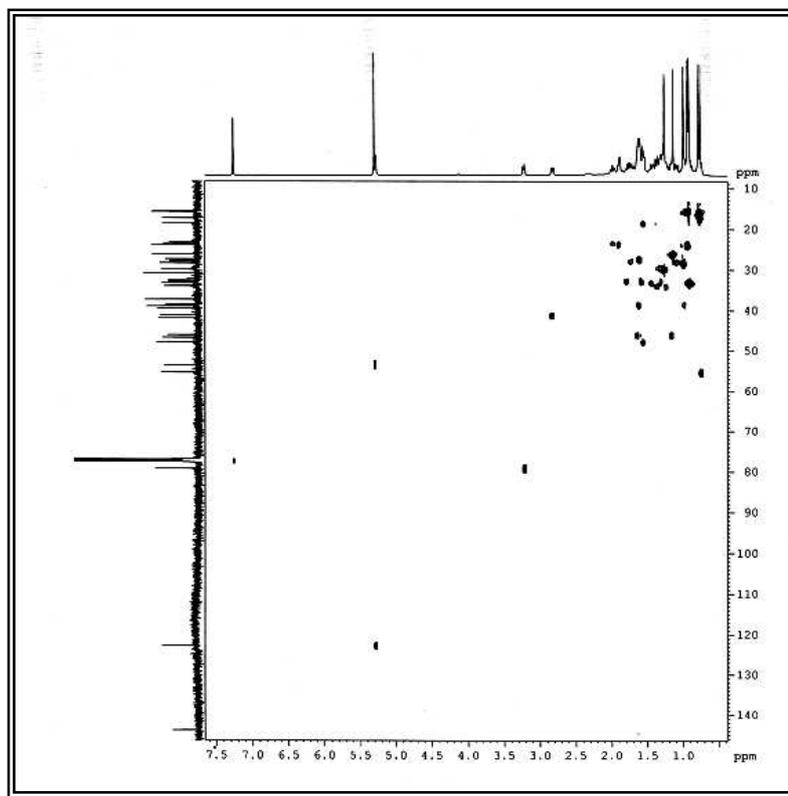
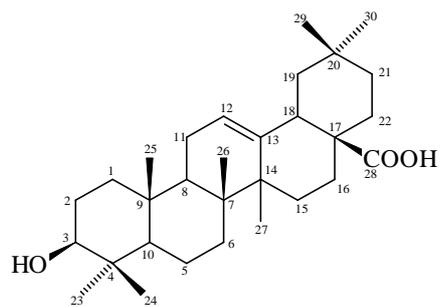


Figura 54. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1



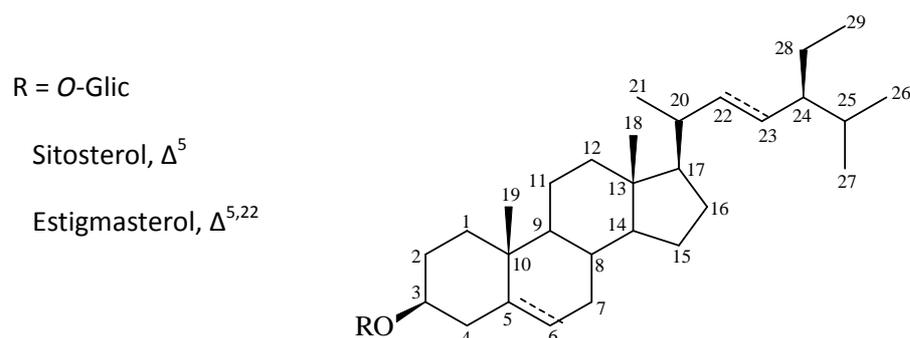
**Figura 55.** Espectro de HSQC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CFRE-1.

### 3.8 - Determinação estrutural de CFRE -2

O composto denominado CFRE-2 (item 4.3.11.1, pág. 99) foi isolado a partir da fração DCM do extrato etanólico das raízes de *C. fruticosum* sob forma de um sólido branco com ponto de fusão 294-296 °C.

O espectro de absorção na região do IV (Fig. 56, pág. 75) apresentou uma banda larga em 3414  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de ligação O-H, bandas em 2933 e 2869  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes a deformações axiais de ligação C-H, e na faixa entre 1166 e 1024  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a deformações axiais de ligação C-O.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (Figs. 57, 58 e 59, págs. 75 e 76) de CFRE-2, incluindo comparação em CCD com amostra padrão da mistura dos esteróides glicosilados sitosterol e estigmasterol permitiram determinar que o metabólito em questão se tratava da mistura das respectivas substâncias.



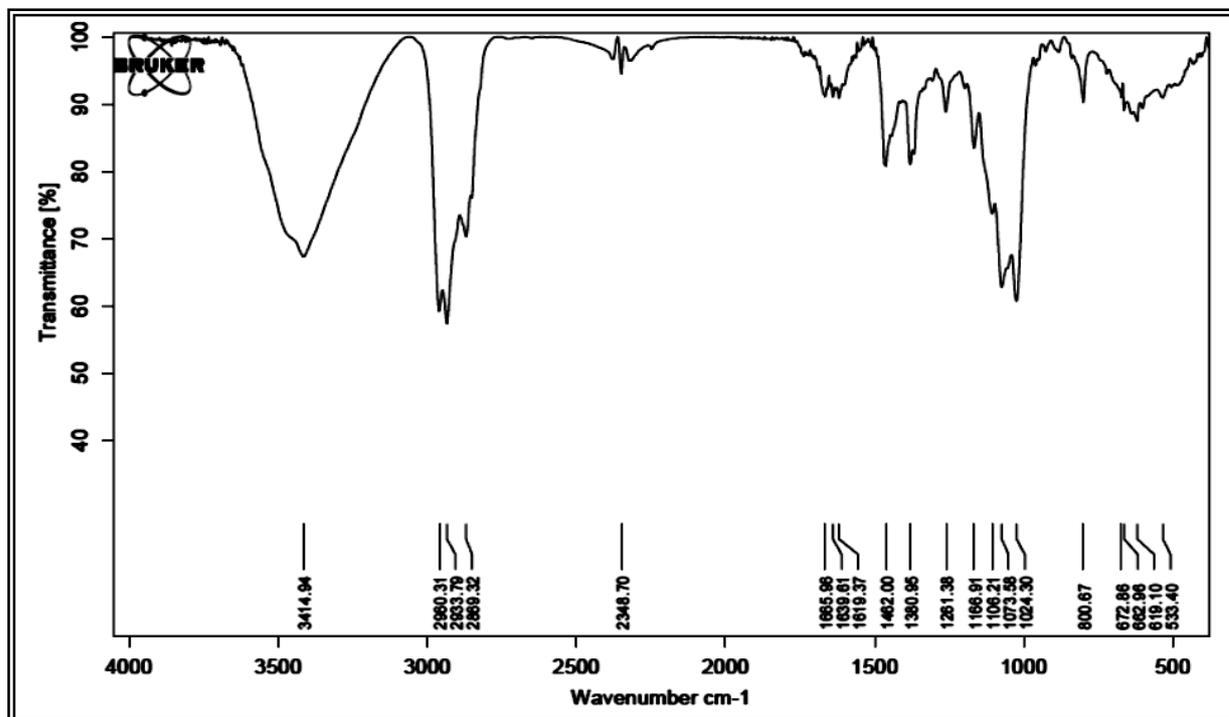


Figura 56. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFRE-2.

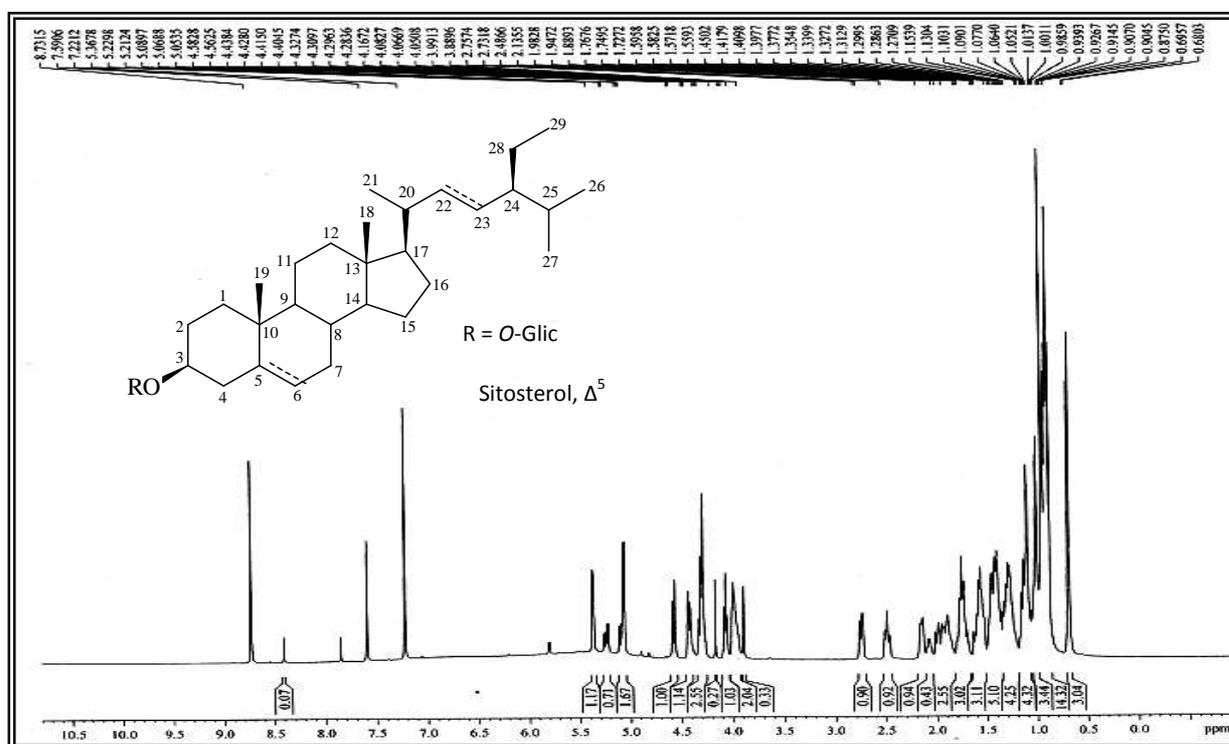


Figura 57. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, piridina-d<sub>5</sub>) de CFRE-2.

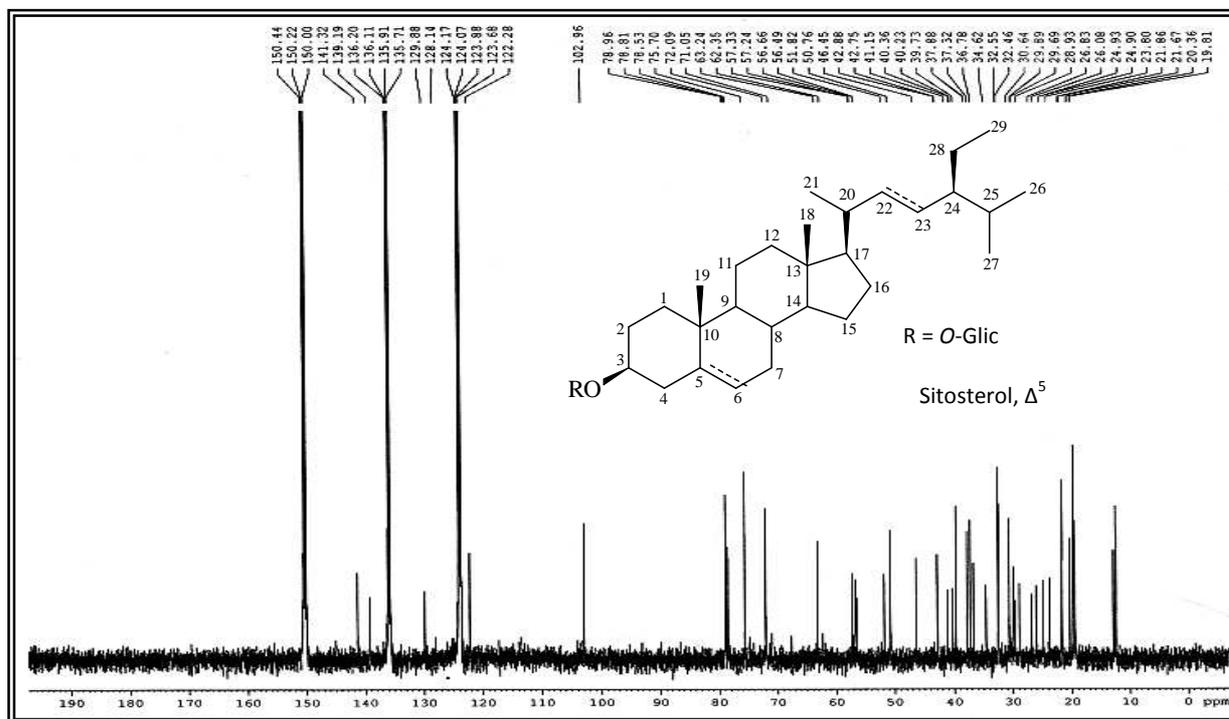


Figura 58. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina  $-d_5$ ) de CFRE-2

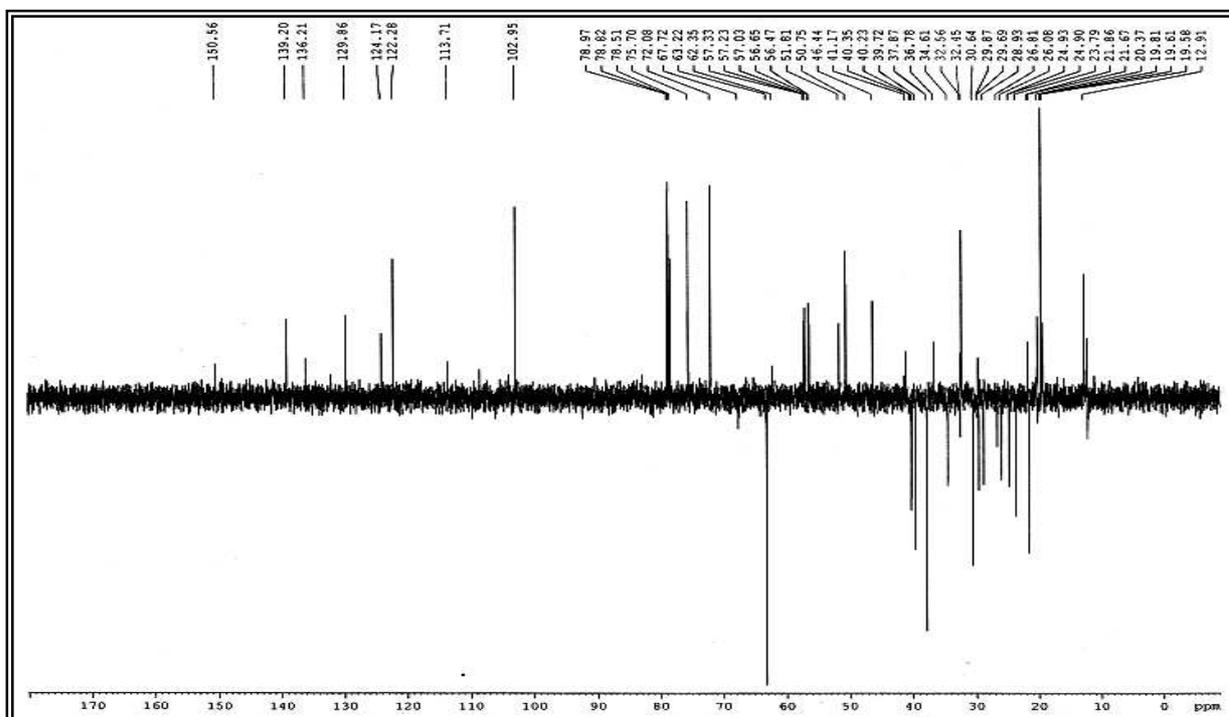


Figura 59. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT 135° (125 MHz, piridina  $-d_5$ ) de CFRE-2

### 3.9 - Determinação estrutural de CFRE -3

A fração diclorometano (DCM) do extrato etanólico das raízes de *C. fruticosum* (item 4.3.11.2, pág. 99) após sucessivos tratamentos cromatográficos, incluindo CLAE, forneceu 36 mg de um sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 332-335 °C, codificado como CFRE -3.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 61, pág. 80), apresentou uma banda larga em 3430  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de ligação OH, absorções em 2944  $\text{cm}^{-1}$  e em aproximadamente 2900  $\text{cm}^{-1}$ , características de deformações axiais de ligações C-H (C- $\text{sp}^3$ ), além de uma absorção em 1697  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação C=O, e uma absorção em 1050  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação axial de ligação C-O.

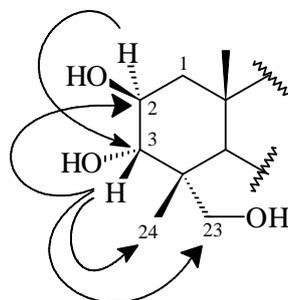
Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apresentaram dados característicos do esqueleto básico de triterpenos oleananos. A análise comparativa dos dados espectrais deste composto com CFRE-1 mostram-se semelhantes, entretanto, sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  69,2 e 66,8 revelaram dois carbonos oxigenados adicionais.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD [125 MHz, piridina  $d_5$ ] (Fig. 63, pág. 81) de CFRE-3, mostrou sinais referentes a trinta átomos de carbono. A comparação entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (Fig. 64, pág. 81) inferiu a presença de seis carbonos metínicos, um deles  $\text{sp}^2$  ( $\delta_{\text{C}}$  122,8) e dois oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  69,2 (C-2) e 78,6 (C-3), dez carbonos metilênicos, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  66,8 (C-23) oxigenado, seis carbonos metílicos e oito carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  180,5 relativo à carboxila de ácido e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  145,2 relativo a um carbono  $\text{sp}^2$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz, piridina  $d_5$ ] (Fig. 62, pág. 80), mostrou sinais relativos à hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 (1H, m, H-2) e 4,22 (1H, m, H-3) e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (1H, sl, H-12) característico de hidrogênio olefinico. Observou-se ainda singletos na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,92-1,25, referentes a grupos metílicos, e sinais referentes a grupos metilênicos e metínicos na região de  $\delta_{\text{H}}$  1,45-2,25.

Conforme análise dos dados espectrais de RMN a diferença entre CFRE-1 e CFRE-3 encontra-se no anel A, pela presença de dois grupos hidroxilas adicionais localizados no carbono metínico C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  69,2) e no carbono metilênico C-23 (66,8). Este posicionamento foi baseada nas correlações observadas nos espectros bidimensionais HSQC e HMBC (Figs. 65 e 66, pág. 82), onde foi verificado a correlação a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 (H-2) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  78,6 (C-3) e da correlação a três

ligações ( $^3J_{CH}$ ) do hidrogênio em  $\delta_H$  4,22 (H-3) com os sinais de carbono em  $\delta_C$  66,8 (C-23) e 14,7 (C-24).



**Figura 60:** Acoplamentos a longa distância (HMBC) de CFRE-3

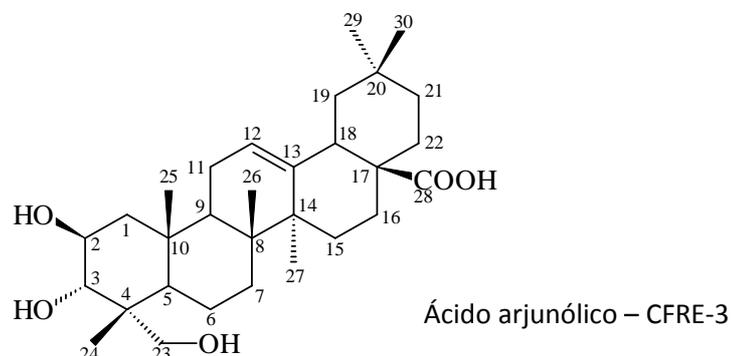
Com base nos dados espectroscópicos de CFRE-3, foi possível propor a fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_5$  em acordo com o íon molecular em  $m/z$  488 Daltons, apresentado pelo espectro de massas (Fig. 67, pág. 83). A fórmula molecular mostra sete graus de insaturação, retificados pela presença de uma carbonila, uma dupla ligação e cinco ciclos, confirmando a estrutura de um triterpeno.

**Tabela 16.** Dados espectrais de RMN  $^{13}C$  e DEPT 135° (125 MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE - 3

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Formula Molecular
180,5 (CO <sub>2</sub> H)	122,8 (CH-sp <sup>2</sup> )	66,8 (CH <sub>2</sub> -OH)	31,3	
145,2 (C-sp <sup>2</sup> )	78,6 (CH-OH)	48,0	26,5	
46,9	69,2 (CH-OH)	46,7	24,0	
44,9	48,5	34,5	17,9	
42,3	48,3	33,6	17,7	
40,2	42,3	33,5	14,7	
38,7	-	28,6	-	
33,2	-	24,3	-	
-	-	24,1	-	
-	-	18,8	-	
<b>8C</b>	<b>6CH</b>	<b>10 CH<sub>2</sub></b>	<b>6CH<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub></b>

A interpretação dos dados espectroscópicos de CFRE-3 permitiu determinar este composto como ácido arjunólico, isolado anteriormente de *C. laxum* (GARCEZ *et al.*, 2008), *C. leprosum* (FACUNDO *et al.*, 2008) e *C. nelsonii* (MASOCO *et al.*, 2008), cujos

dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tab. 17, pág. 79) estão em acordo com aqueles descritos na literatura (Mahato *et al.*, 1992).



**Tabela 17.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE-3, comparado com os valores na literatura para o ácido arjunólico (Mahato, 1992)

C	HSQC		HMBC		Literatura*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	48,0	2,31(dd) 2,29(dd)	-	-	47,1
2	69,2	4,24 (m)	H-3	-	68,9
3	78,6	4,22 (m)	H-2	-	78,7
4	43,9	-	-	-	43,5
5	48,3	1,89	-	3H-23; 2H-24; 3H-25	48,4
6	18,8	1,72; 1,43	-	-	18,6
7	33,6	2,03; 1,82	-	-	33,1
8	40,2	-	-	-	40,1
9	48,5	1,92	-	3H-25; 3H-26	48,5
10	38,7	-	3H-25	-	38,5
11	24,1	2,09; 1,91	-	-	23,8
12	122,8	5.47 (sl)	-	H-18	123,5
13	145,2	-	H-18	-	144,1
14	42,3	-	-	-	42,4
15	28,6	2,16; 1,20	-	-	28,3
16	24,3	2,06; 1.20	-	-	23,9
17	46,9	-	-	-	47,0
18	42,6	3.29 (dd, J=13.7 Hz)	-	-	43,5
19	46,7	1,79(m); 1,29 (m)	-	-	46,3
20	33,2	-	-	-	30,7
21	34,5	1,43; 1,24	-	-	34,2

22	33,5	2,05; 1,65	-	-	33,0
23	66,8	4,22 (m) 3,72 (d, J= 10.5 Hz)	-	-	67,2
24	14,7	1,07 (s)	-	-	14,0
25	17,9	0,99 (s)	-	-	17,6
26	17,7	1,04 (s)	-	-	17,2
27	26,5	1,25 (s)	-	-	26,1
28	180,5	-	-	H-18; H-22a	178,6
29	31,3	0,92 (s)	-	-	29,1
30	24,0	1,01 (s)	-	-	23,7

\* RMN  $^{13}\text{C}$  (500MHz) usando piridina  $-d_5$

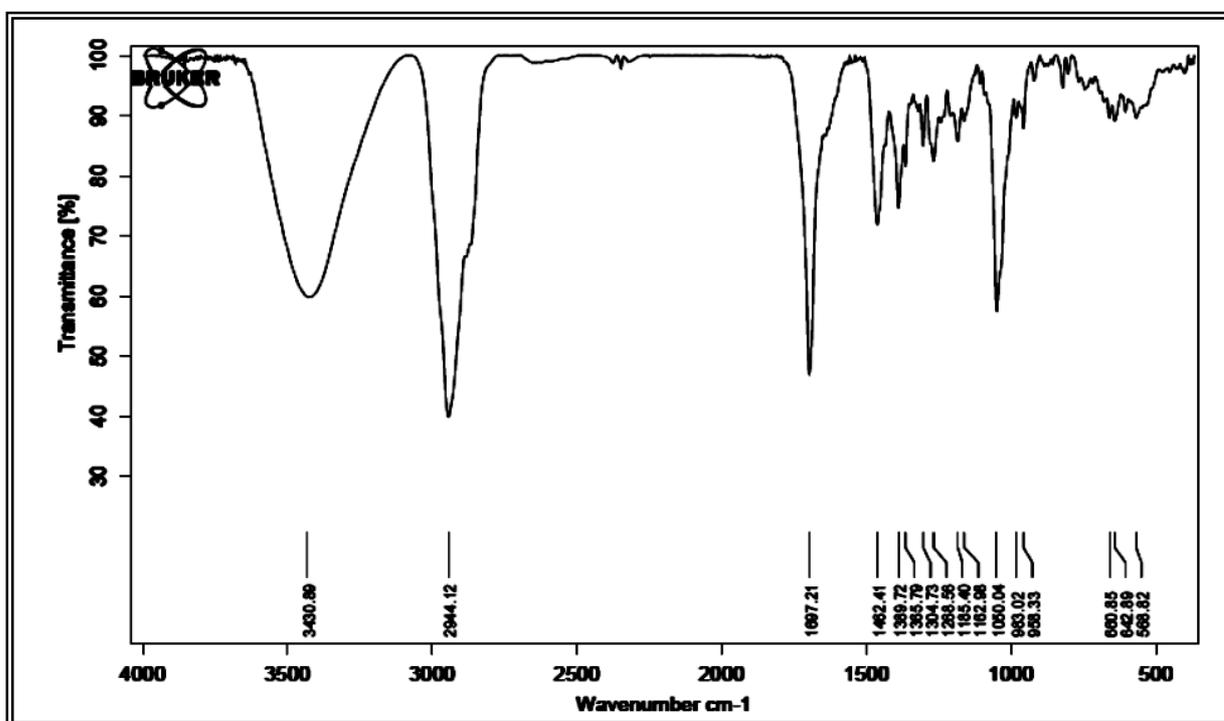


Figura 61. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CFRE-3

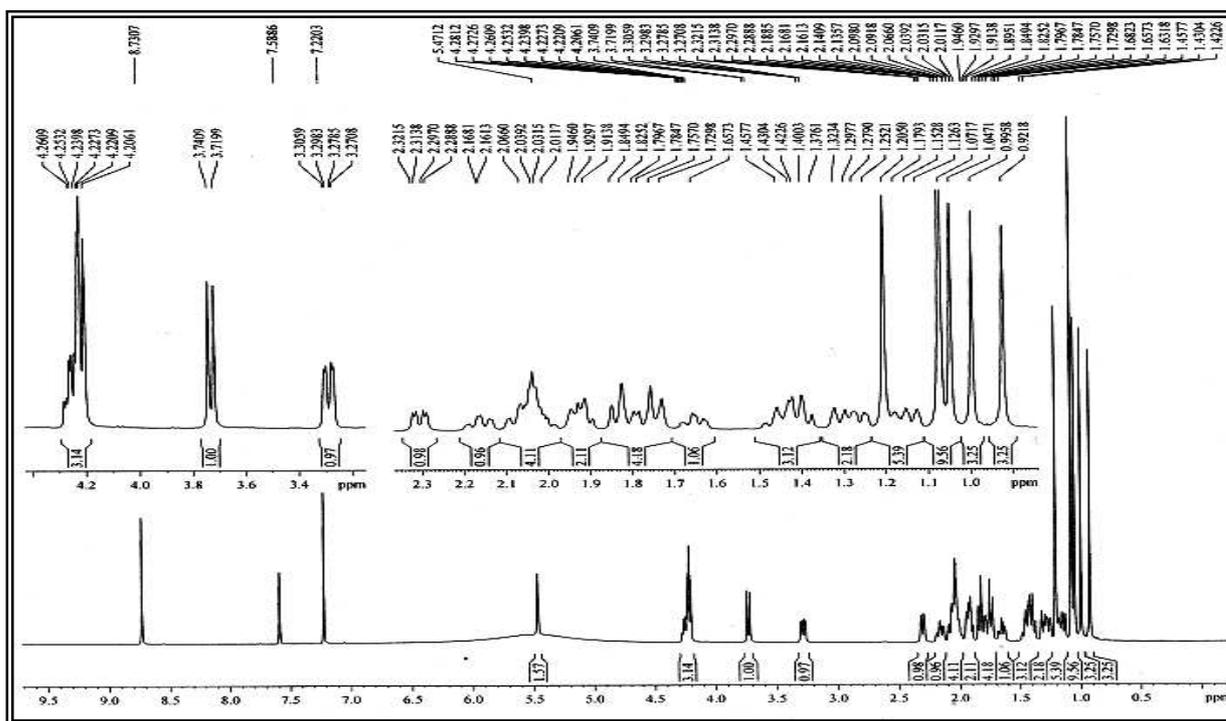


Figura 62. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE-3

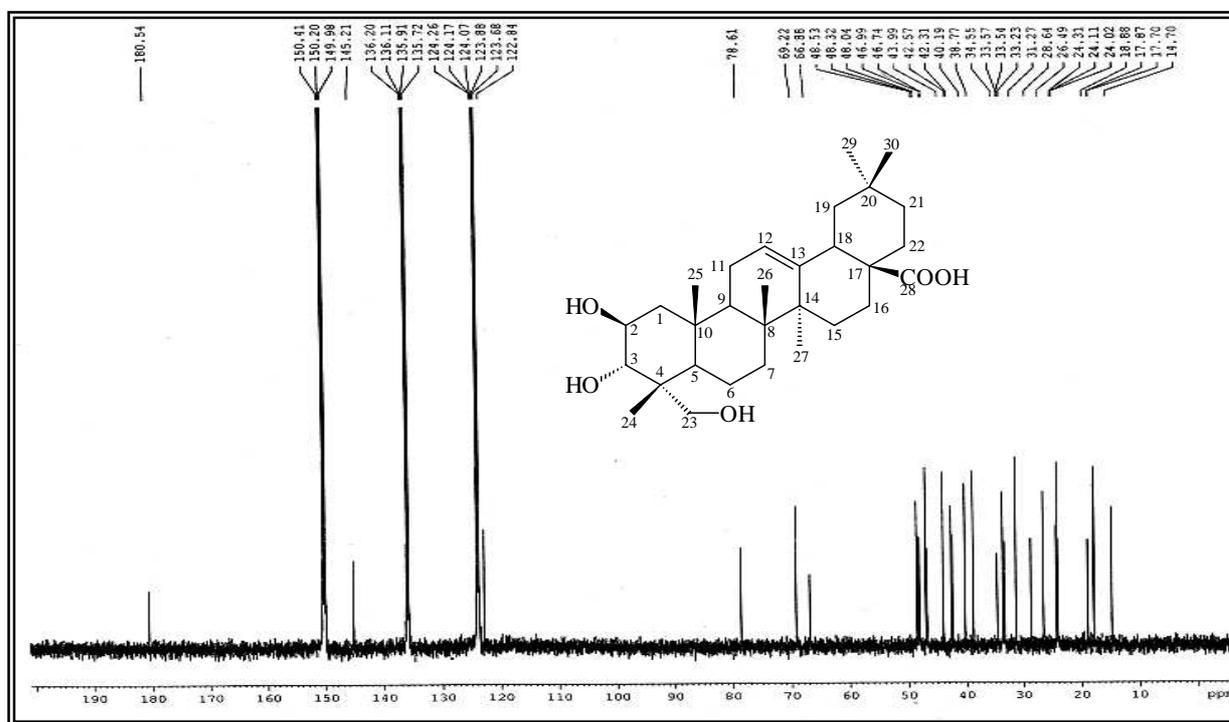
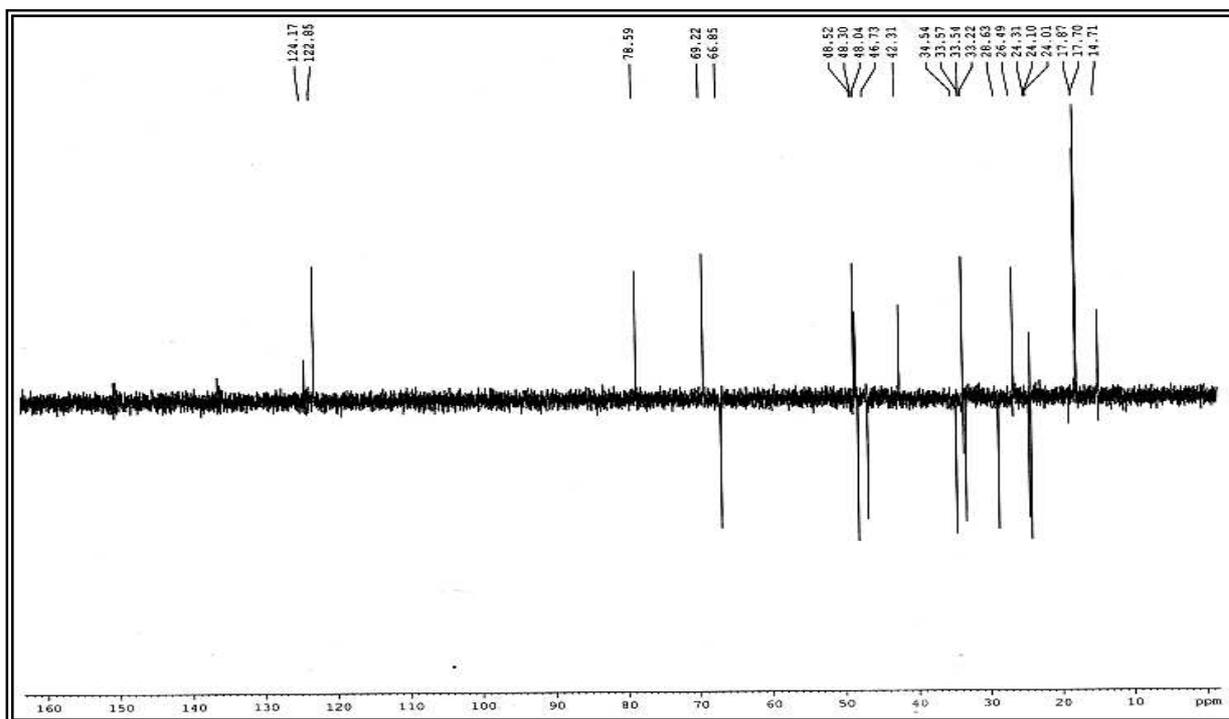
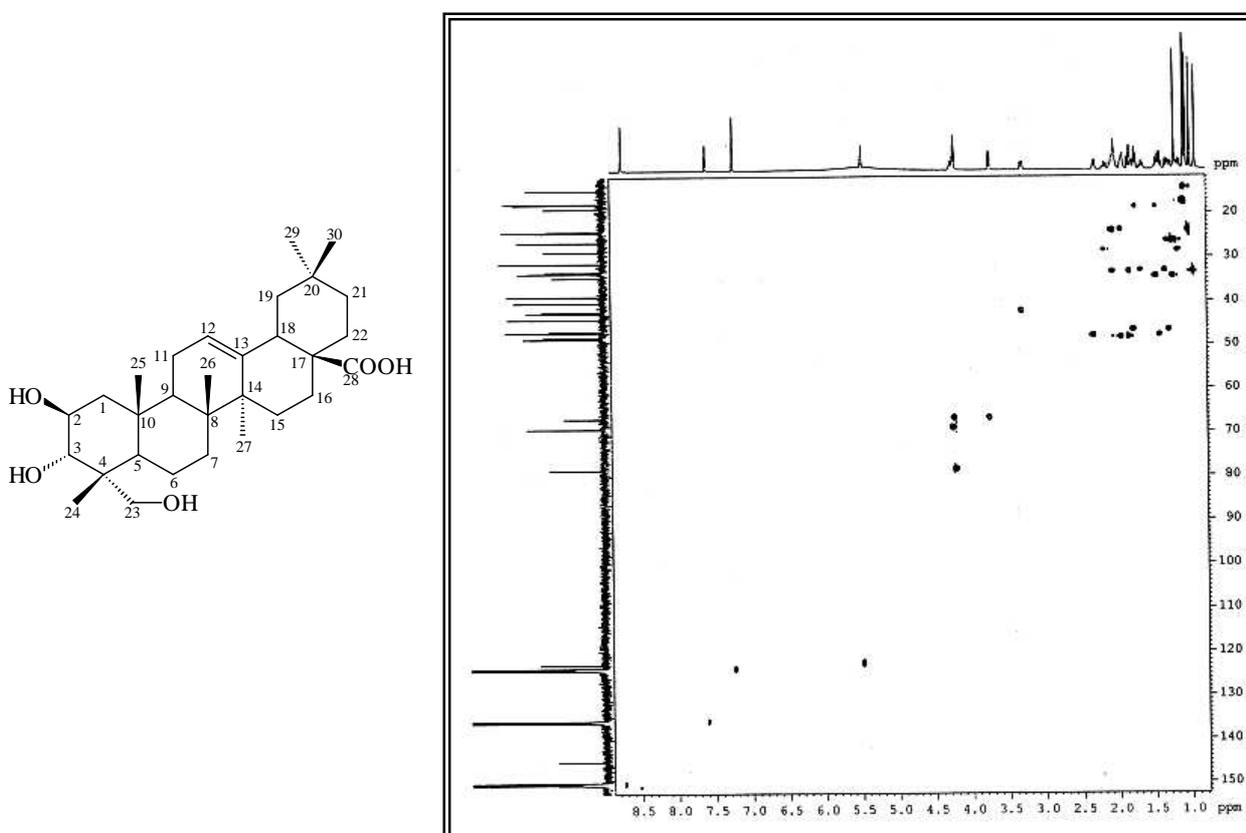


Figura 63. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE-3



**Figura 64.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT  $135^\circ$  (125 MHz, piridina  $-d_5$ ) de CFRE-3



**Figura 65.** Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina  $-d_5$ ) de CFRE-3.

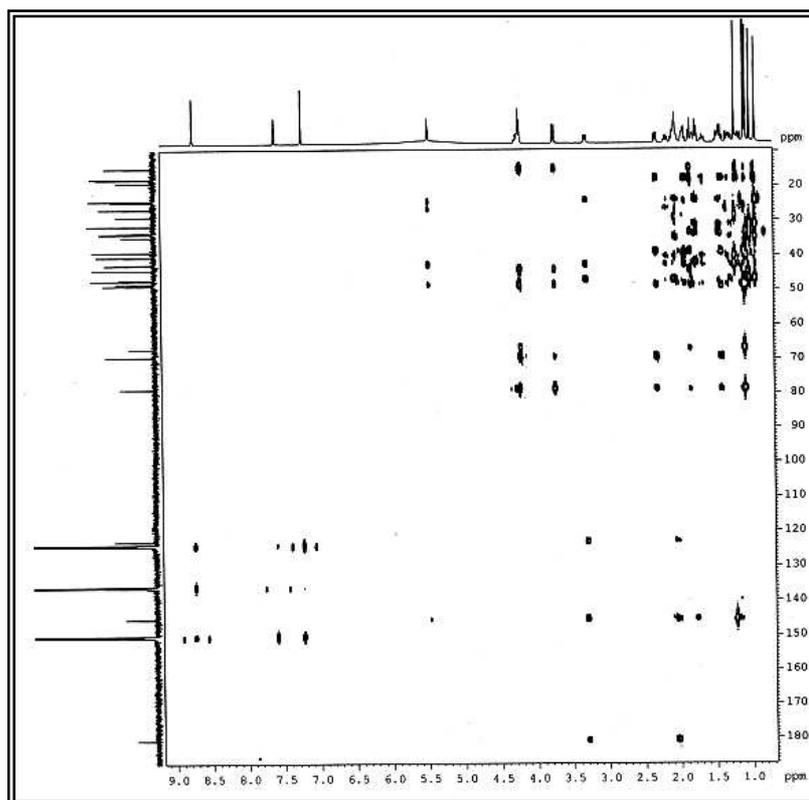


Figura 66. Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, piridina- $d_5$ ) de CFRE-3.

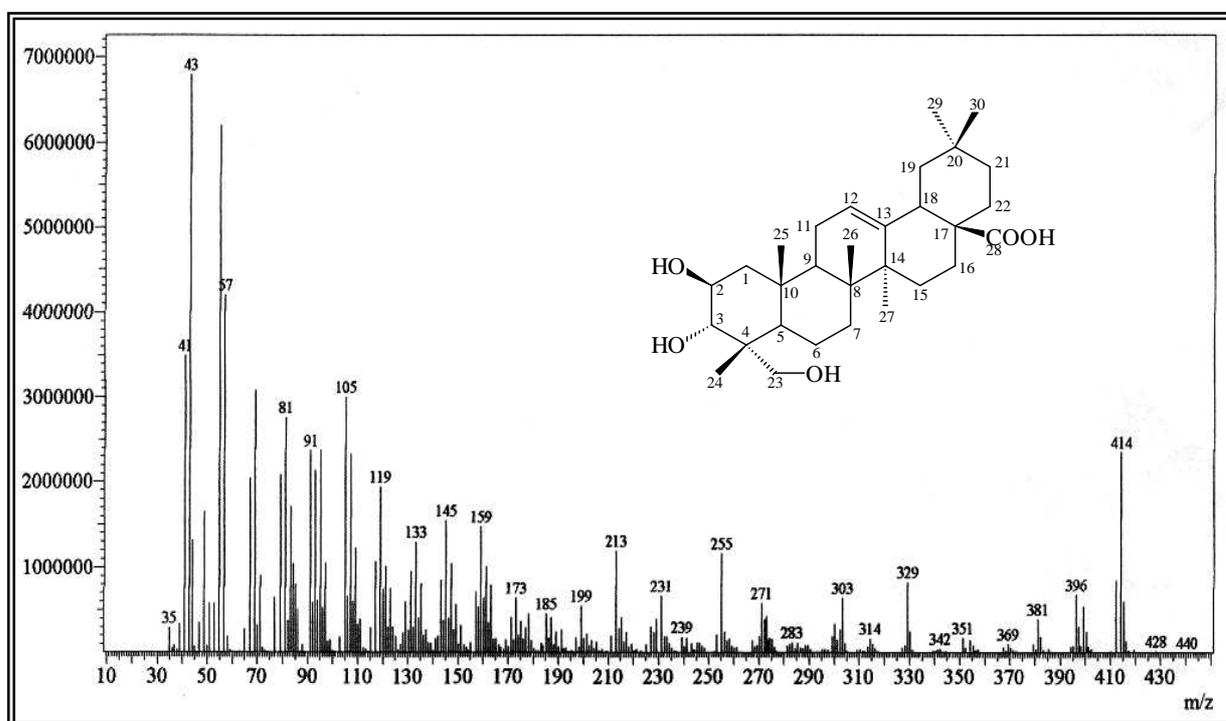


Figura 67. Espectro de Massas de CFRE-3

# **PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

## 4.1 – Métodos Cromatográficos

### 4.1.1 – Cromatografia de Adsorção

Para o fracionamento dos extratos empregou-se a técnica de adsorção em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60, com granulometria de 70-30 mesh, da marca VETEC (cromatografia gravitacional) e 230-400 mesh da marca MERCK para cromatografia sob média pressão (cromatografia flash). A dimensão e o comprimento das colunas variam de acordo com as quantidades de material a ser cromatografado e de gel de sílica utilizada. Para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica, 1.05735, 60 Å, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (MERCK) e placas de vidro cobertas com gel de sílica 60 G VETEC cód 1094.

As substâncias foram reveladas nas cromatoplasmas de gel de sílica sob luz ultravioleta (254 e 366 nm), e/ou pelas asperção com solução de vanilina (5,0 g) / ácido perclórico 0,75 M/ etanol (100 mL), e/ou pela pulverização com solução de *para*-anisaldeído, seguido de aquecimento em estufa ou chapa aquecedora a 100 °C por alguns minutos, e/ou pela exposição ao iodo.

Os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol, acetonitrila e água, puros ou em misturas binárias em proporções crescentes de polaridade. Todos os solventes eram de qualidade P.A., destilado ou grau CLAE.

Os extratos e as frações resultantes das colunas cromatográficas foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório BUCHI.

### 4.1.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no laboratório de cromatografia da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), em aparelho da marca SHIMADZU, constituído de duas bombas de alta pressão, modelo LC-10Atvp, detector com arranjo de dióxido e um forno termostático para acomodação da coluna. Para as corridas utilizou-se uma coluna semi-preparativa Supercosil (LC, 250 x 10 mm, 5µm) e como fase móvel os solventes metanol e água com grau HPLC, que foram filtrados em membranas de nylon com poros de PTFE de 0,45 µm e desgaseificados com gás hélio por aproximadamente 10 minutos. As amostras foram dissolvidas com os solventes utilizados

na fase móvel e filtradas num sistema manual de membranas de teflon 0,45µm da Whatman.

## 4.2 - Métodos Espectrométricos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central de Analítica do Departamento de Química e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará.

### 4.2.1 – Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro da marca Perckin- Elmer, modelo FT-IR SPECTRUM 1000 e VERTEX70 da maracá BRUKER, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

### 4.2.2 – Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massa QP5050A da SHIMADZU com impacto eletrônico de 70 eV, enquanto os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos usando um espectrômetro de massa mod. LCMS-IT-TOF (225-07100-34) - SHIMADZU, equipado com fonte de ionização por *electrospray*.

### 4.2.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni- e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 500 e 300MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz para carbono-13, ambos pertencentes as Centro Nordestino de aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN – UFC).

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e piridina ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio ( $\delta\text{H}$ , 7,27), metanol ( $\delta\text{H}$ , 4,87; 3,30) e piridina ( $\delta\text{H}$ , 8,70; 7,59; 7,22) e para os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  pelos picos de carbono-13 dos solventes: clorofórmio ( $\delta\text{C}$  77,23), metanol ( $\delta\text{C}$ 49,15) e piridina ( $\delta\text{C}$  123,87; 135,91 e 150,35).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), dl (duplete largo), dt (duplete triplo), td (tripleto duplo), t (tripleto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH<sub>2</sub> (carbono metilênico) e CH<sub>3</sub> (carbono metílico).

#### **4.2.4 – Ponto de Fusão**

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em aparelho de microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 3°C/min e não foram corrigidos.

#### **4.2.5 – Rotação óptica**

As rotações ópticas foram obtidas em Polarímetro digital da Perckin-Elmer 341 à temperatura de 25°C e concentração de 1mg/2mL de solvente.

### **4.3 – Estudo dos Constituintes Fixos de *Combretum fruticosum***

#### **4.3.1 - Coleta e identificação do material vegetal**

O material vegetal (folhas, talos e raízes) foi coletado em seu habitat natural no quilometro 15, Br 020, no município de Caucaia-CE em Julho de 2008, pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.

Este material vegetal foi identificado como *Combretum fruticosum*, pela botânica Maria Iracema Bezerra Loiola, cuja exsicata n°. 43054 encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

#### **4.3.2 - Preparação dos extratos**

As folhas (2.33 Kg), os talos (3.135 Kg) e as raízes (2.325 Kg) de *C. fruticosum* foram secos à temperatura ambiente, triturados e submetidos individualmente à extração exaustiva com hexano e posteriormente com etanol. Após o procedimento de extração, o solvente foi eliminado com auxílio de um evaporador rotatório, à pressão reduzida, para a obtenção do extrato etanólico. As massas e os rendimentos obtidos para cada extrato estão sumarizados na tabela 18, pág. 88.

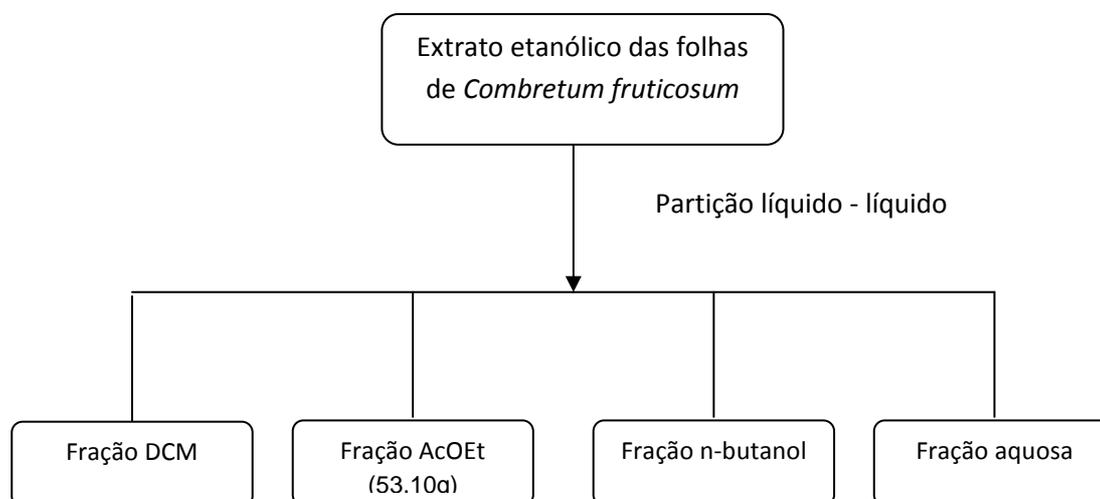
**Tabela 18** – Dados referentes aos extratos das folhas, talos e raízes de *C. fruticosum*

Extrato	Sigla	Peso (g)	Rend. (%)*
Hexânico das folhas	CFFH	48,43	2,08
Etanólico das folhas	CFFE	184,6	7,92
Hexânico dos talos	CFTH	3,245	0,10
Etanólico dos talos	CFTE	64,70	2,06
Hexânico das raízes	CFRH	3,104	0,13
Etanólico das raízes	CFRE	53,97	2,32

\* Rendimento baseado no peso do material seco

#### 4.3.3 - Partição líquido-líquido do extrato bruto denominado CFFE

O extrato etanólico das folhas CFFE (184,6g) foi dissolvido em metanol/água 70% e fracionado por partição líquido – líquido utilizando os solventes diclorometano, acetato de etila e n-butanol.



**Fluxograma 1:** Partição líquido-líquido do extrato bruto CFFE

#### 4.3.4 - Fracionamento Cromatográfico da Fração DCM do extrato CFFE

A fração DCM (52,9g) foi submetida à cromatografia em coluna, sendo adsorvida em 71 g de gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre 92,97 g de gel de sílica em coluna de 8,0 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com os solventes

hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade nas proporções indicadas na tabela 19, pág. 89.

**Tabela 19:** Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração DCM de CFFE

<b>Eluentes</b>	<b>Frações</b>	<b>Peso(g)</b>
n-hexano/AcOEt (8:2)	1	9,55
n-hexano/AcOEt (6:4)	2	5,53
n-hexano/AcOEt (4:6)	3	3,95
n-hexano/AcOEt (2:8)	4	2,25
AcOEt	5	1,80
AcOEt/MeOH (8:2)	6	10,45
AcOEt/MeOH (1:1)	7	18,12
MeOH	8	1,34

As frações resultantes foram comparadas por cromatografia em camada delgada e reunidas adequadamente.

#### 4.3.4.1 - Fracionamento Cromatográfico da Fração F3

A fração F3 (3,95 g), resultado da eluição com n-hexano/AcOEt (4:6) foi fracionada sobre gel de sílica (87,7 g) em coluna com 6 cm de diâmetro interno utilizando combinações binárias dos solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. As frações resultantes, após o monitoramento em CCD, foram reunidas como descritas na tabela 20.

**Tabela 20.** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F3

<b>Eluentes</b>	<b>Frações</b>
n-hexano/AcOEt (8:2)	1-29
n-hexano/AcOEt (7:3)	30-45
n-hexano/AcOEt (6:4)	46-54
n-hexano/AcOEt (5:5)	55-65
AcOEt	66-73
MeOH	74-85

As frações F62-73 apresentaram-se uniformes e foram reunidas resultando em 2,52 g de material. A mesma foi submetida a sucessivos fracionamentos cromatográficos sobre gel de sílica utilizando como eluentes os solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em combinações binárias. Na eluição com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt foram reunidas as frações uniformes C15 F7-17 resultando num material sólido branco (97,3 mg) solúvel em metanol.

#### 4.3.4.2 – Tratamento Cromatográfico da Fração F7-17 por CLAE

O sólido branco obtido (97,3 mg) resultante da fração F7-17 foi solubilizado 5mL de uma mistura dos solventes grau HPLC metanol/acetonitrila 10% e filtrada num sistema manual com filtros de 0,45 µm. Alíquotas de 100µL foram injetadas num aparelho CLAE, provido de coluna semi-preparativa de fase reversa. A fase móvel utilizada foi metanol/água com TFA 0,1% (84:16), adotando um fluxo de 3,0 mL/min e uma corrida de 25 minutos. Selecionando-se a detecção de UV para 254 nm, obteve-se um cromatograma que exibiu dois picos cujo os tempos de retenção foram de 22,17 min (pico 1) e 23,84 min (pico 2). O pico 1 rendeu 25 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 254-257 °C , codificada como CFFE -1. A caracterização deste composto encontra-se na pág. 24.

#### 4.3.4.3 - Fracionamento Cromatográfico da Fração F6

A fração F6 (10,45 g), resultado da eluição com AcOEt/MeOH (8:2) foi submetida a cromatografia em coluna ( $\Phi_E$  8 cm) sobre gel de sílica (76,7 g), utilizando-se os eluentes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH, fornecendo respectivamente as frações conforme disposto na tabela 21.

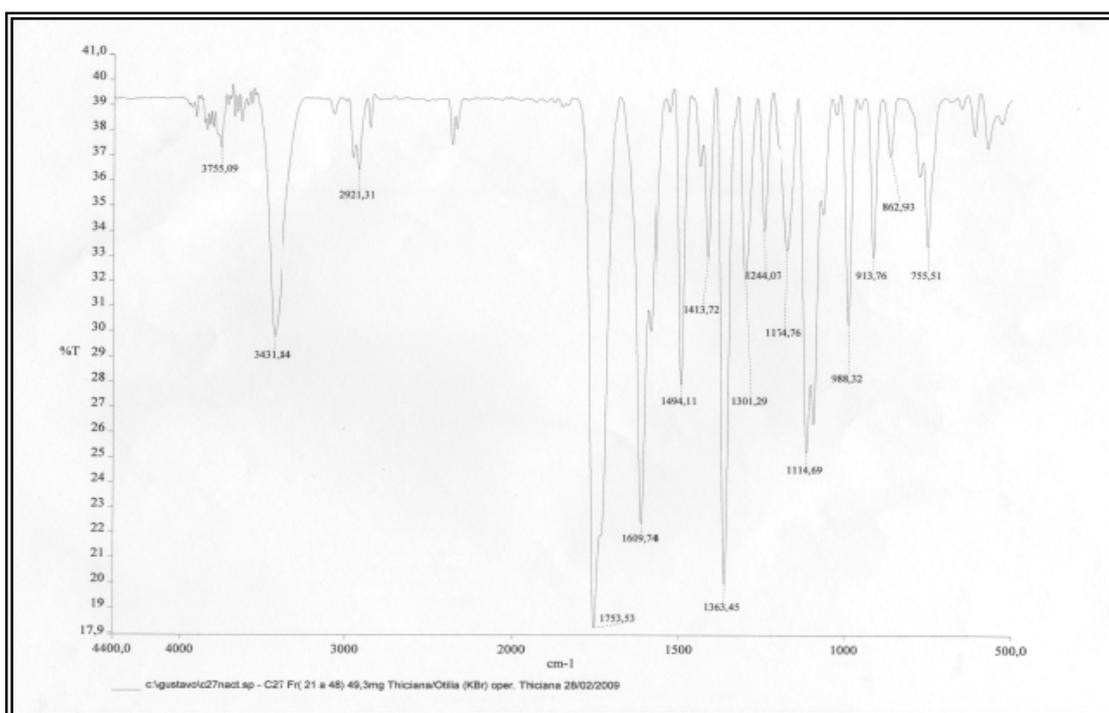
**Tabela 21.** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F6

Eluentes	Frações
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-23
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (7:3)	24-39
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (4:6)	40-56
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (1:9)	57-68
AcOEt/MeOH (8:2)	69-74
MeOH	75-91

As frações coletadas foram monitoradas por CCD, permitindo o agrupamento das semelhantes. As frações F27-53 foram reunidas e após a evaporação do solvente obteve-se 2,81g desse material.

#### 4.3.4.4 - Fracionamento cromatográfico da fração F27-53

A fração F27-53 (2,81 g) foi recromatografada em coluna flash ( $\Phi$  4 cm) sobre gel de sílica (78 g) e eluída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  10%. As frações F27-43 apresentaram uniformidade e foram reunidas fornecendo um precipitado de cor amarelo (206 mg) de difícil solubilidade. Esse precipitado foi novamente submetido a cromatografia em coluna flash ( $\Phi$  2,5 cm) sobre gel de sílica (57,8 g) usando como eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  5%. As frações reunidas F21-48 (100,4 mg) mostraram-se na forma de sólido amarelo, também de difícil solubilidade. O espectro de infravermelho foi obtido para o material.



**Figura 68:** Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de F21-48

#### 4.3.4.5 - Reação de Acetilação da fração F21-48

30 mg de F21-48 e 0,9mL da mistura piridina/anidrido acético (1:2) foram acondicionados em um balão de 25 mL, sob agitação magnética e aquecimento por 12 horas. A reação foi monitorada por CCD e pelo espectro de infravermelho. Ao termino da reação foi adicionado gelo seguido da adição de 10 mL de água destilada. A mistura foi neutralizada por uma solução de HCl 20%. O material foi transferido para um funil de separação de 50 mL e extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). O produto foi então seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrado em evaporador rotativo até a secura, fornecendo 33mg de um material sólido amarelo que foi submetido a cromatografia em coluna (Φ 1,5 cm) com gel de sílica (12,96 g) utilizando na eluição CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH puros ou combinados. A análise em CCD permitiu reunir as frações F5-7 (15,1 mg) obtidas por eluição com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que após a evaporação do solvente forneceram um material sólido branco com ponto de fusão na faixa de 264-265 °C, codificado como CFFE -2, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 34.

#### 4.3.5 - Fracionamento Cromatografico da Fração AcOEt do extrato CFFE

A fração AcOEt (53,1g) foi submetida à fracionamento cromatográfico em coluna, sendo absorvida em gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre 93,7 g de gel de sílica em coluna de 8,0 cm de diametro interno. A eluição foi realizada com os solventes acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade nas proporções indicadas na tabela 22, pág. 92.

**Tabela 22:** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt de CFFE

Eluentes	Frações	Peso(g)
AcOEt	1	2,27
AcOEt/MeOH (9:1)	2	5,92
AcOEt/MeOH (7:3)	3	2,27
AcOEt/MeOH (1:1)	4	21,62
MeOH	5	15,70
MeOH/H <sub>2</sub> O (7:3)	6	5,22

As frações resultantes foram analisadas por cromatografia em camada delgada e as que se apresentaram uniformes foram reunidas adequadamente.

#### 4.3.5.1 - Fracionamento Cromatográfico da Fração F2

A fração F2 (5,92 g), resultado da eluição com AcOEt/MeOH 9:1, foi recromatografada em coluna ( $\Phi$  6 cm) sobre gel de sílica (92 g) percolada com os eluentes conforme descritos na tabela 16. As frações F81-90 mostraram-se uniformes em CCD e foram reunidas, resultando em 25 mg de um sólido amarelo com ponto de fusão na faixa de 262-265 °C. Este material foi codificado como CFFE-3 e sua elucidação estrutural encontra-se discutida na pág. 39.

**Tabela 23.** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F2

Eluentes	Frações
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (1:1)	1-19
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (3:7)	20-30
AcOEt	31-61
AcOEt /MeOH (95:5)	62-94
AcOEt/MeOH (9:1)	95-105
AcOEt/MeOH (8:2)	106-117
AcOEt/MeOH (1:1)	118-121
MeOH	122

#### 4.3.6 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto denominado CFTH

O extrato hexânico CFTH (3,25 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna sobre gel de sílica (30,2 g), utilizando os eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, fornecendo respectivamente as frações conforme disposto na tabela 24.

**Tabela 24:** Resultado do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico CFTH

Eluentes	Frações	Peso(g)
n-hexano	1	0,221
n-hexano /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (7:2)	2	0,224

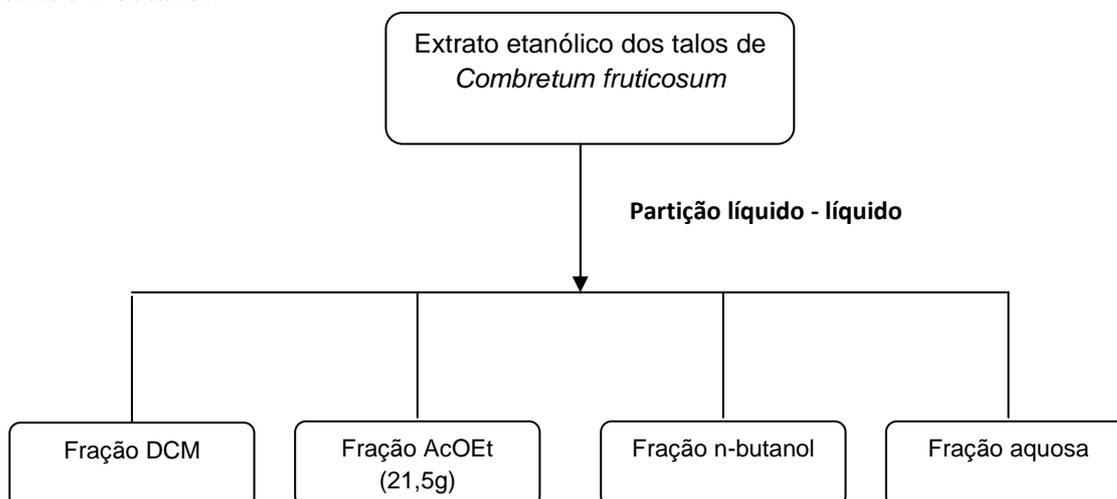
n-hexano /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (6:4)	3	0,089
n-hexano / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (4:6)	4	0,042
n-hexano / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2:8)	5	0,037
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6	0,493
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (7:2)	7	0,464
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (1:1)	8	0,375
MeOH	9	0,654

#### 4.3.6.1 – Fracionamento cromatográfico da Fração 7

A fração 7 (464 mg) foi recromatografada em coluna flash sobre média pressão ( $\Phi$  2,5 cm) contendo gel de sílica (37,60 g), percolada isocraticamente com a mistura dos solventes n-hexano/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1). As frações obtidas F41-50, após monitoramento em CCD, foram reunidas em 42 mg de um sólido cristalino com PF. 130-132°C solúvel em CHCl<sub>3</sub>, denominado CFTH-1, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 47.

#### 4.3.7 - Partição líquido-líquido do extrato bruto denominado CFTE

O extrato etanólico dos talos CFTE (64,70g) foi dissolvido em metanol/água 70% e fracionado por partição líquido – líquido utilizando os solventes diclorometano, acetato de etila e n-butanol.



**Fluxograma 2:** Partição líquido-líquido do extrato bruto CFTE

#### 4.3.8 - Fracionamento Cromatográfico da Fração DCM do extrato CFTE

A fração DCM (10,2g) foi cromatografada em coluna ( $\Phi$  6 cm) contendo gel de sílica (43,11 g), percolada com os solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias em gradiente crescente de polaridade, fornecendo respectivamente as frações conforme disposto na tabela 25, pág. 94.

**Tabela 25:** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração DCM de CFTE

Eluentes	Frações	Peso(g)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1	0,596
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (7:3)	2	2,190
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (4:6)	3	1,096
AcOEt	4	0,257
AcOEt/MeOH (7:3)	5	3,835
AcOEt/MeOH (4:6)	6	0,325
MeOH	7	0,375

As frações resultantes foram comparadas por cromatografia em camada delgada e reunidas adequadamente.

##### 4.3.8.1 - Fracionamento Cromatográfico da Fração 3

A fração F3 (1,096 g), resultado da eluição com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  (4:6) foi submetida à cromatografia em coluna ( $\Phi$  3 cm) utilizando gel de sílica (14,44 g) como adsorvente e na eluição os solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seguida da mistura dos solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , finalizando com MeOH. As frações resultantes, após o monitoramento em CCD, foram reunidas como descritas na tabela 26.

**Tabela 26.** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F3

Eluentes	Frações
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1-10
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1)	11-21
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3)	22-31
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5)	32-36
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:50)	37-47

As frações foram analisadas por CCD e as que se apresentaram uniformes foram reunidas conforme o fluxograma 3, pág. 96.

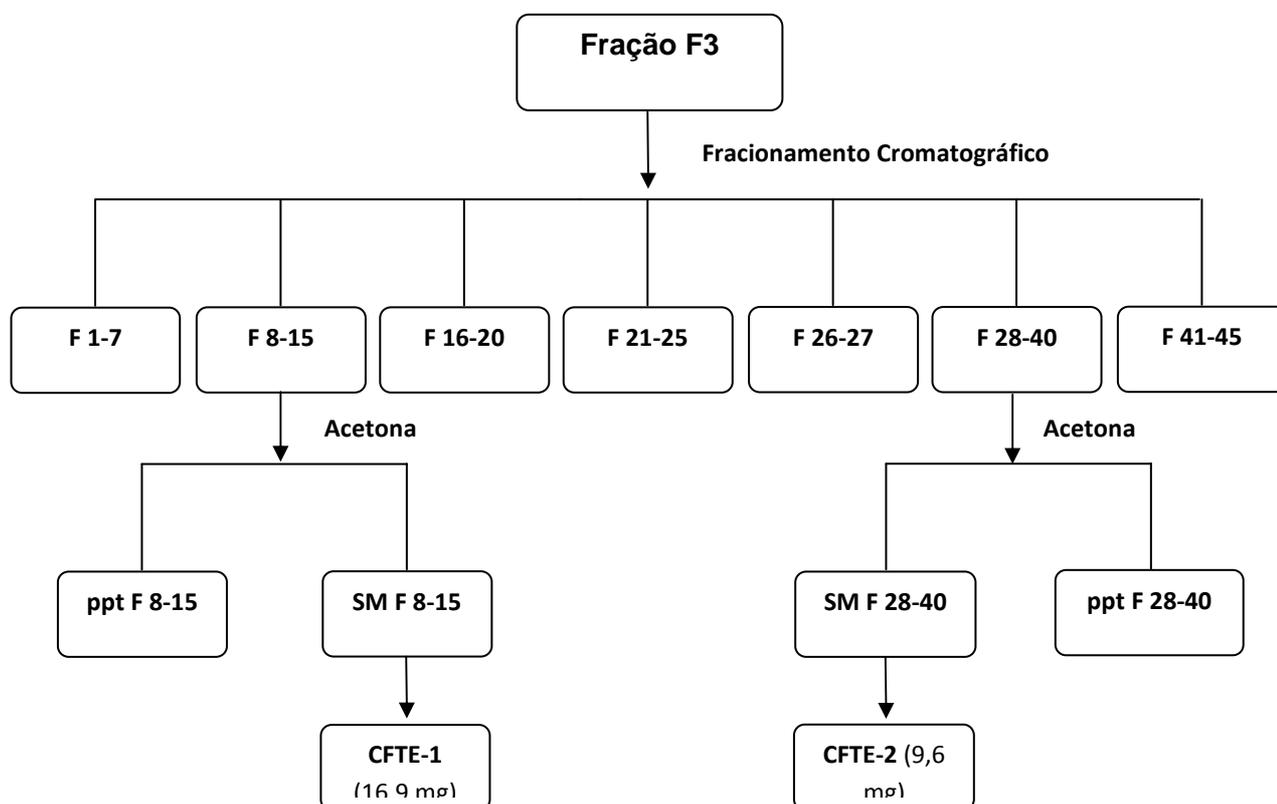
As frações reunidas F8-15 e F28-40 foram lavadas com acetona e suas soluções mãe selecionadas para isolamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### **4.3.8.2 – Tratamento cromatográfico da fração F8-15 por CLAE**

A fração SM F8-15 (98,4 mg) foi inicialmente solubilizada em 2,5 mL de metanol grau HPLC e filtrada utilizando membranas de 0,45µm. O método escolhido utilizou coluna semi-preparativa de fase reversa e eluente metanol/água com TFA 0,1% (60:40), adotando um fluxo de 3,6 mL/min e uma corrida de 15 minutos. Selecionando-se a detecção de UV para 254 nm, obteve-se um cromatograma que exibiu dois picos cujo os tempos de retenção foram de 8,60 min (pico 1) e 9,26 min (pico 2). O pico 1 rendeu 16,5 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 200-203 °C, codificado por CFTE-1, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 51.

#### **4.3.8.3– Tratamento Cromatográfico da Fração F28-40 por CLAE**

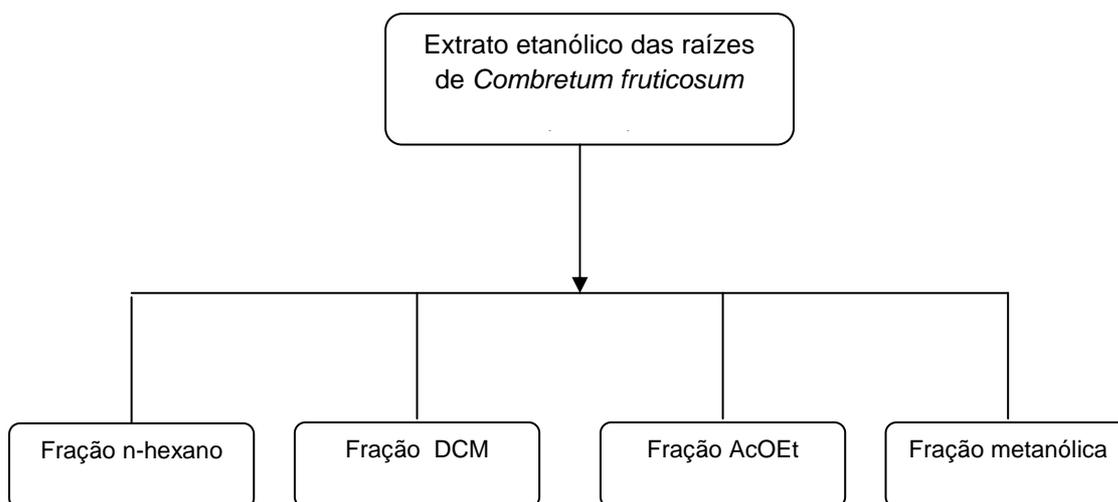
A fração SM F28-40 (256,9 mg) foi inicialmente solubilizada em 9 mL de metanol grau HPLC e filtrada utilizando membranas de 0,45 µm. O método escolhido utilizou coluna semi-preparativa de fase reversa e eluente metanol/água com TFA 0,1% (44:56), adotando um fluxo de 3,0 mL/min e uma corrida de 20 minutos. Selecionando-se a detecção de UV para 254 nm, obteve-se um cromatograma que exibiu pico majoritário com tempo de retenção de 18,93 min. O rendimento foi de 9,6 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 281-283 °C, codificado como CFTE-2, cuja elucidação estrutural encontra-se na pág. 59.



**Fluxograma 3:** Fracionamento da fração F3 para o isolamento dos constituintes químicos CFTE-1 e CFTE-2

#### 4.3.9- Partição líquido-líquido do extrato bruto denominado CFRE

O extrato etanólico das raízes CFRE (59,0g) foi dissolvido na mistura de solventes metanol/água (7:3) e fracionado por partição líquido – líquido utilizando os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila.



**Fluxograma 4:** Partição líquido-líquido do extrato bruto CFRE

#### 4.3.10 - Fracionamento Cromatográfico da Fração n-Hexano do extrato CFRE

A fração hexânica obtida da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de *C. fruticosum* foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna ( $\Phi$  2,5 cm) sobre gel de sílica (43,6 g), utilizando n-hexano, acetato de etila e metanol como eluentes. As frações resultantes, após monitoramento em CCD, foram reunidas como descrito na tabela 27.

**Tabela 27.** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração n-hexano de CFRE

Eluentes	Frações	Peso(g)
n-hexano	1	0,376
n-hexano /AcOEt (8:2)	2	0,266
n-hexano /AcOEt (6:4)	3	3,355
n-hexano /AcOEt (2:8)	4	0,712
AcOEt	5	0,375
AcOEt/MeOH (8:2)	6	0,075

#### 4.3.10.1 - Fracionamento Cromatográfico da Fração 2

A fração F6 (266 mg) foi recromatografada em coluna flash sobre pressão média ( $\Phi$  2,5 cm) utilizando gel de sílica (41,9 g) e percolada isocraticamente com a mistura dos eluentes n-hexano/AcOEt (85:15). As frações F12-14 apresentaram uniformidade em CCD possibilitando que fossem reunidas fornecendo 6,8 mg de um material sólido amorfo branco com ponto de fusão na faixa de 279-282 °C, denominado CFRE-1, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na pág. 68.

#### 4.3.11 - Fracionamento Cromatográfico da Fração DCM do extrato CFRE

A fração DCM (23,7 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna ( $\Phi$  8 cm) utilizando gel de sílica desativada (50,7 g) e percolada com os solventes diclorometano, acetato de etila e metanol. A análise em CCD permitiu reunir aquelas que se apresentaram semelhantes, fornecendo 10 frações, cujas massas encontram-se descritas na tabela 28 abaixo.

**Tabela 28:** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração DCM

Eluentes	Frações	Peso(g)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	0,011
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / AcOEt (8:2)	2	0,765
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / AcOEt (6:4)	3	1,621
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / AcOEt (4:6)	4	0,158
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / AcOEt (2:8)	5	2,017
AcOEt	6	1,440
AcOEt /MeOH(8:2)	7	0,681
AcOEt /MeOH(6:4)	8	5,978
AcOEt /MeOH(3:7)	9	0,670
MeOH	10	0,410

#### 4.3.11.1 - Fracionamento Cromatográfico da Fração 6

A fração F6 (1,44 g) foi fracionada em coluna cromatografica sobre gel de sílica (17,1 g). Os solventes AcOEt e MeOH foram utilizados na eluição em combinações binárias ou puros (Tab. 29, pág. 99). As frações coletadas foram monitoradas por CCD, permitindo o agrupamento das semelhantes.

**Tabela 29.** Resultado do fracionamento cromatográfico da fração F6

<b>Eluentes</b>	<b>Frações</b>
AcOEt	1-25
AcOEt /MeOH (9:1)	26-38
AcOEt /MeOH (8:2)	39-45
AcOEt /MeOH (1:1)	46-52
MeOH	53-54

As frações F11-14 (605,3 mg) foram reunidas e submetidas a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). De maneira semelhante às frações F15-32 foram reunidas e após a evaporação do solvente resultou na obtenção de 43,5 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 294-296 °C, denominado CFRE-2, cuja elucidação estrutural encontra-se descrita na pág. 74.

#### **4.3.11.2 - Tratamento Cromatográfico da Fração F11-14**

A fração F11-14 foi submetida a análise em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE em fase reversa. Uma alíquota da fração F11-14 (130,9 mg) foi solubilizada em 5 mL acetonitrila grau HPLC (26,2 mg/mL) e filtrada num sistema manual com filtros de 0,45 µm. Quantidades de 100µL foram injetadas no aparelho provido de pré-coluna e coluna semi-preparativa. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (8:2), adotando um fluxo de 4,1 mL/min e uma corrida de 4,5 minutos. Selecionando-se a detecção de UV para uma varredura entre 215 a 400 nm, obteve-se um cromatograma que exibiu um pico majoritário cujo o tempo de retenção foi 3,94 min. Após a coleta do material e a evaporação do solvente obteve-se 36 mg de um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 332-335 °C , codificada como CFRE -3. A caracterização deste composto encontra-se na pág. 77.

# CONCLUSÕES

## 5. CONCLUSÕES

A prospecção química do extrato etanólico de *C. fruticosum*, empregando métodos cromatográficos clássicos, inclusive cromatografia líquida de alta eficiência, resultou no isolamento e caracterização de nove metabólitos secundários (Quadro 3, pág. 102), pertencentes a diferentes classes estruturais, mas comuns ao gênero *Combretum*.

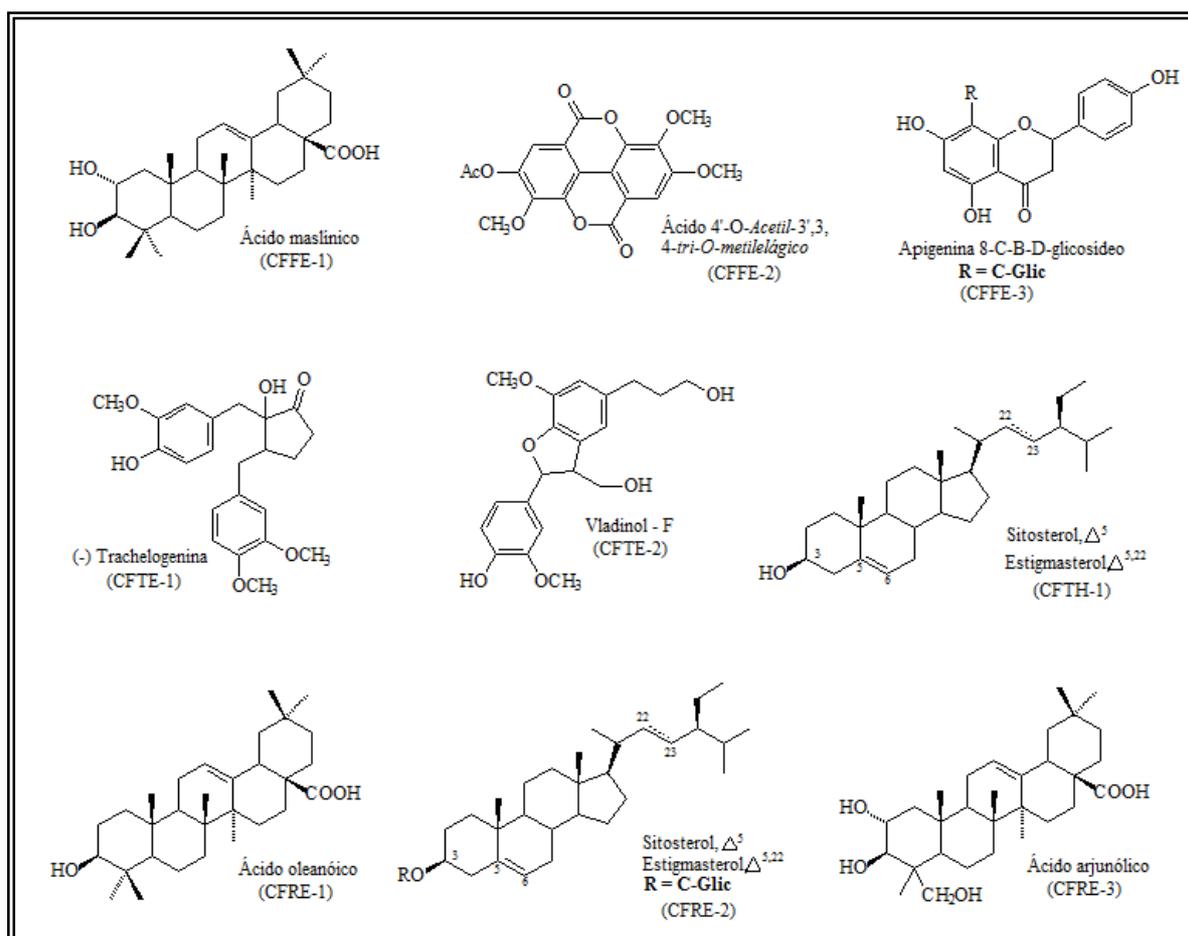
Os constituintes isolados das folhas foram um triterpeno da série oleanano, ácido maslínico; uma lactona derivada do ácido elágico, ácido 4'-O-Acetil-3',3,4-tri-O-metilelágico e um flavonóide glicosilado, apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo. Do extrato hexânico dos talos foi isolado a mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, enquanto do extrato etanólico foram obtidas duas lignanas, cujas estruturas foram determinadas como sendo (-) trachelogenina e vladinol F. A partir das raízes foram obtidos os triterpenos ácido oleanólico e ácido arjunólico, e a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol nas formas glicosiladas.

Dos compostos isolados, o triterpeno ácido maslínico e as lignanas (-) trachelogenina e vladinol, estão sendo registrados no gênero *Combretum* pela primeira vez. A lactona ácido 4'-O-acetil-3',3,4-tri-O-metilelágico, foi previamente isolada de *Combretum kraussii*, enquanto o flavonóide apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo, foi isolado de *C. quadrangulare* e *C. micranthum*. Os ácidos oleanólico e arjunólico são bastantes comuns no gênero *Combretum*.

Conforme levantamento bibliográfico acerca dos constituintes químicos do gênero *Combretum*, os triterpenos são os compostos encontrados em maior proporção. Assim, a constituição química de *C. fruticosum* está, portanto, em acordo com o levantamento realizado.

O estudo desenvolvido com a espécie *C. fruticosum* poderá contribuir para a ampliação do conhecimento do potencial químico e farmacológico de espécies presentes no ecossistema do nordeste brasileiro.

Os resultados obtidos impulsionam a continuação do estudo fitoquímico da espécie, bem como a investigação de possíveis atividades farmacológicas dos constituintes isolados, visto que o gênero *Combretum* é reconhecido por suas inúmeras propriedades medicinais.

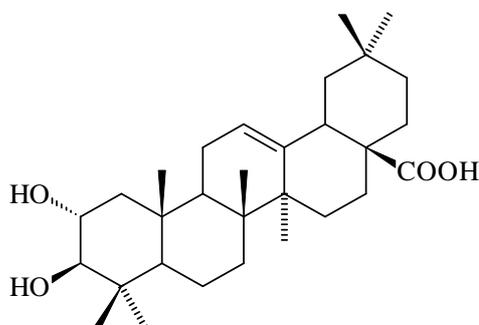


**Quadro 3:** Constituintes químicos isolados de isolados de *C. fruticosum*

# CONSTANTES FÍSICAS

## 6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

### 6.1. CFFE-1



Nome: Ácido maslínico

Fórmula molecular:  $C_{30}H_{48}O_4$

Peso molecular: 472 u

Ponto de fusão: 254-257 °C

Rotação ótica: + 39,1° (c. 0,25 g/100 mL, MeOH)

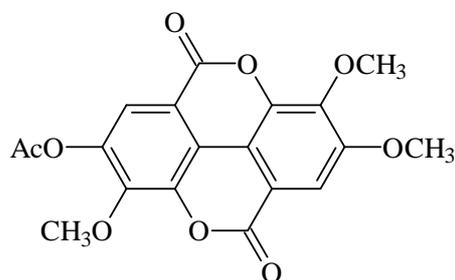
Aspecto: sólido branco amorfo

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3428, 2944, 1692, 1462, 1386, 1050.

Espectrometria de RMN  $^1H$  (500 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 4, pág. 27

Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 4, pág. 27

### 6.2. CFFE-2



Nome: Ácido 4'-O-Acetil-3',3,4-tri-O-metilelágico

Fórmula molecular:  $C_{19}H_{14}O_9$

Peso molecular: 386 u

Ponto de fusão: 264-265°C

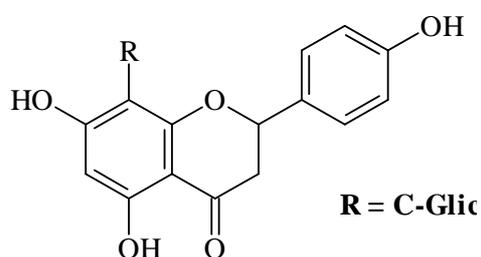
Aspecto: cristais brancos

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3424, 2925, 1739, 1611, 1354, 1097.

Espectrometria de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): ver Tabela 6, pág. 36

Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): ver Tabela 6, pág. 36

### 6.3. CFFE-3



Nome: Apigenina 8-C- $\beta$ -D-glicosídeo

Fórmula molecular:  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$

Peso molecular: 432 u

Ponto de fusão: 262-265  $^{\circ}\text{C}$

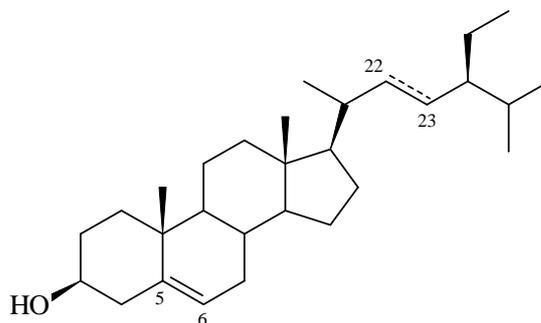
Aspecto: sólido amarelo amorfo

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3390, 3250, 2914, 1657, 1568, 1363, 1178, 1109.

Espectrometria de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, piridina  $\text{d}_5$ ): ver Tabela 8, pág. 42

Espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina  $\text{d}_5$ ): ver Tabela 8, pág. 42

#### 6.4. CFTH-1



Nome:  $\beta$ -sitosterol ( $\Delta^5$ ) e estigmasterol ( $\Delta^{5,22}$ )

Fórmula molecular:  $C_{29}H_{50}O$  ( $\beta$ -sitosterol) e  $C_{29}H_{48}O$  (estigmasterol)

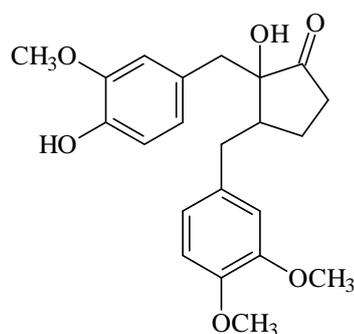
Ponto de fusão: 130-132 °C

Aspecto: cristais brancos

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3424, 2935, 2866, 1465, 1381, 1052.

Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 9, pág. 48

#### 6.5. CFTE-1



Nome: (-) Trachelogenina

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{24}O_7$

Peso molecular: 388 u

Ponto de fusão: 200-203 °C,

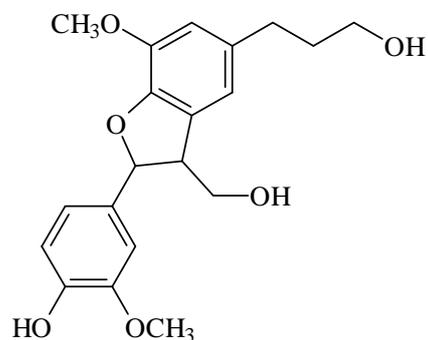
Rotação ótica: - 46,4° (c. 0,25 g/100 mL, MeOH)

Aspecto: sólido branco amorfo

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3424, 2930, 2881, 1771, 1517, 1025.

Espectrometria de RMN  $^1H$  (500 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 11, pág. 53

Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 11, pág. 53

**6.6. CFTE-2**

Nome: Vladinol F

Fórmula molecular:  $C_{20}H_{24}O_6$

Peso molecular: 360 u

Ponto de fusão: 281-283 °C

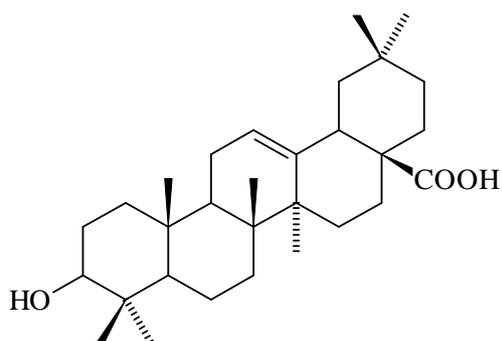
Rotação ótica:  $-8^\circ$  (c. 0,25 g/100 mL, MeOH)

Aspecto: sólido branco amorfo

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3414, 2932, 1684, 1611, 1204, 1138.

Espectrometria de RMN  $^1H$  (500 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 13, pág. 62

Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 13, pág. 62

**6.7. CFRE-1**

Nome: Ácido oleanólico

Fórmula molecular:  $C_{30}H_{46}O_3$

Peso molecular: 442 u

Ponto de fusão: 279-282 °C

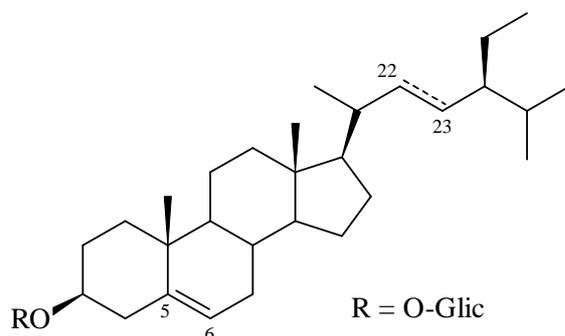
Aspecto: sólido branco

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3421, 2930, 1692, 1463, 1387, 1031.

Espectrometria de RMN  $^1H$  (500 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 15, pág. 70

Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 15, pág. 70

## 6.8. CFRE-2



Nome: Glicosídeo do  $\beta$ -sitosterol ( $\Delta^5$ ) e estigmasterol ( $\Delta^{5,22}$ )

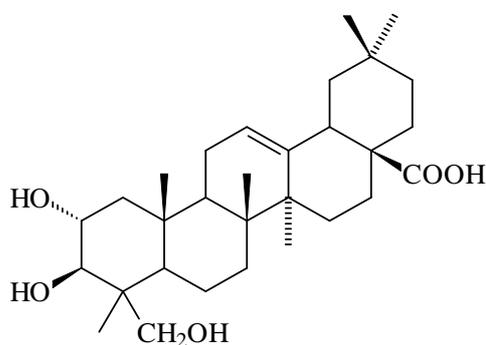
Fórmula molecular:  $C_{35}H_{59}O_6$  e  $C_{35}H_{57}O_6$

Ponto de fusão: 294-296 °C

Aspecto: sólido branco

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3414, 2960, 2933, 1073, 1024.

## 6.9. CFRE-3



Nome: Ácido arjunólico

Fórmula molecular:  $C_{30}H_{48}O_5$

Peso molecular: 488 u

Ponto de fusão: 332-335 °C

Aspecto: sólido branco

Espectroscopia na região do I.V (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3430, 2944, 1697, 1462, 1389, 1050.

Espectrometria de RMN  $^1H$  (500 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 17, pág. 79

Espectrometria de RMN  $^{13}C$  (125 MHz, piridina  $d_5$ ): ver Tabela 17, pág. 79

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNYANA, K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. Hepatoprotective constituents of the seeds of *Combretum quadrangulare*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1328-1332, 2000.

ADNYANA, K.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. 1-O-galloyl-6-(4-hydroxyl-3,5-dimetoxy) benzoyl- $\beta$ -D-glucose, a new hepatoprotective constituents from *Combretum quadrangulare*. **Planta Medica**, v. 67, n. 4, p. 370-371, 2001.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R. Estudo Químico de Asterácea do Ceará. **Tese de Doutorado (química Orgânica)**. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2006.

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

CATARINO, L.; MARTINS, E. S.; DINIZ, M. A. O gênero *Combretum* na flora de Guiné-Bissau. **Portugaliae Acta Biol.** v.19, p. 397-408, 2000.

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

CHEN, G.; WU, X.; JIANG, C.; ZHU, G.; FANG, H. Terpenoids from the leaves of *Combretum olivaeforme* Chao. **Zhongcaoyao**, v. 39 (4), p. 512-514, 2008.

CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug Discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 20, p. 558-564, 2003.

ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R.; MC GAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **J. Ethnopharmacol.** v. 119, p. 686-699, 2008.

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

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, C. A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum*. **J. Ethnopharmacol.** v.79, n.2, p. 169-77, 2002.

GARCEZ, F. R.; BISOLI, E.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; TIEPPO, C. Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. **Molecules**, v. 13, p. 2717-2728, 2008.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; LOPES, F. A. Triterpenoids, lignan and flavans from *Terminalia argentea* (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p. 229–232, 2003.

JARDINEIRO. NET. Disponível via internet em: <http://www.jardineiro.net/br/banco/combretumfruticosum.php>. Acesso em 16 jul. 2009.

JOSSANG, A.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Combreglutinin, a hydrolyzable tannin from *Combretum glutinosum*. **J. of Nat. Prod.**, v. 57, n. 6, p. 732-737, 1994.

JOHN, L. M. D. & TINTO, W. F. Revised <sup>13</sup>C-NMR Assignments for the Biologically Active Butyrolactone (-)-Trachelogenin. **J. Nat. Prod.** v. 55, p. 1313-1314, 1992.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASK, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p.81-88, 2003.

KHAC, D. D.; TRAN-VAN, S.; CAMPOS, A. M.; LALLEMAND, J.; FETIZON, M. **Phytochemistry**, v. 29, 1989.

LEE, D. Y.; SONG, M. C.; YOO, K. H.; BANG, M. H.; CHUNG, I. S.; KIM, S. H.; KIM, D. K.; KWON, B. M.; JEONG, T. S.; PARK, M. H.; BAEK, N. I. Lignans from the Fruits of *Comus kousa* Burg. and Their Cytotoxic Effects on Human Cancer Cell Lines. **Arch Pharm Res.** v. 30 (4), p. 402-407, 2007.

LETCHER, R. M.; NHAMO, L. R. M.; Chemical constituents of the Combretaceae. Part I. Substitued phenanthrenes and 9,6-dihydrophenantrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. **J. Chem. Soc.**, (C), p. 3071-3076, 1971.

LI, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, C.; LAI, Y. Combretastatin A4 and its analogues: research advances. **Yaoxue Yanjiu Zazhi**, v. 36 (1), p. 48-53, 2009.

LITAUDON, M.; JOLLY, C.; CALLNEC, C. L.; CUONG, D. D.; RETAILLEAU, P.; NOSJEAN, O.; NGUYEN, V. H.; PFEIFFER, B.; BOUTIN, J. A.; GUÉRITTE, F. Cytotoxic Pentacyclic Triterpenoids from *Combretum sundaicum* and *Lantana camara* as Inhibitors of Bcl-xL/BakBH3 Domain Peptide Interaction. **J. Nat. Prod.** v. 72, p. 1314–1320, 2009.

LORENZI, H.; MOREIRA, S. Hermes: **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 3a. Edição, 2001.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. Triterpenoids and Their Glycosides from *Terminalia chebula*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 999-1002, 1003.

MARCH, R. E.; BURNS, D. C.; ELLIS, D. A. A predictive tool for assessing <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of flavonoids. **Magn. Reson. Chem.** v. 45, p. 835–845, 2007.

MATOS, F. J. A. **Plantas da Medicina Popular do Nordeste**. p.26, Fortaleza: Edições UFC, 1999.

MASOKO, P.; MDEE, L. K.; MAMPURU, L. J.; ELOFF, J. N. Biological activity of 2 related triterpenes isolated from *Combretum nelsonii* (Combretaceae) leaves. **Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products**, v. 22 (12), p. 1074-1084, 2008.

PIETROVSKI, E, F. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos obtidos das flores de *Combretum leprosum* Mart.; **Dissertação de mestrado (Farmacologia)** Departamento de pós graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2004.

PIETROVSKI, E, F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ , 16 $\beta$ -tryhydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** V. 83, p. 90-99, 2006.

PONOU, B. K.; BARBONI, L.; TEPONNO, R. B.; MBIANTCHA, M.; NGUELEFACK, T. B.; PARK, H.; LEE, K. T.; TAPONDJOU, L. A. Polyhydroxyoleanane-type

triterpenoids from *Combretum molle* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 1, p. 183–187, 2008.

ROCHA, S. A. S. Estudo Químico de *Combretum mellifluum* Eichler (Combretaceae). **Dissertação de Mestrado (Química orgânica)**, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2008.

SILVA, N. M.; VALENTE, M. C. F. **Flora da Reserva Ducke, Amazonas Brasil: Combretaceae**, 2005.

VANDRESEN, F. Constituição Química, Atividades Antibacteriana, Antiedematogênica e Toxicidade frente à *Artemia salina* da Espécie Vegetal *Aloysia gratissima* Troncoso (Verbenaceae). **Dissertação de Mestrado (Química Aplicada)**. Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá – UEM, 2005.