



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

**Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar
(Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith**

KIRLEY MARQUES CANUTO

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

Fortaleza-Ceará

2007

Este trabalho científico foi realizado sob a orientação do Prof. Edilberto Rocha Silveira, no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

***“Onde estiver vosso tesouro,
Aí estará também vosso coração.”
Mt 6, 21***

***À Deus, em quem deposito a confiança de conduzir-me sempre por caminhos de felicidade.
À minha mãe Dagmar (in memoriam), ainda “viva” em minha memória.
Aos meus pais, pelos referenciais cristãos e por terem priorizado minha educação.
Aos irmãos, amigos e familiares, por compartilharem solidariamente a alegria das vitórias
e o dissabor dos insucessos.
À Carol, minha maior conquista e credora do meu amor, carinho e respeito.***

AGRADECIMENTOS

Neste momento sublime da carreira acadêmica, gostaria de expressar o meu apreço por todos aqueles que contribuíram, mesmo que modestamente, para a obtenção deste título de Doutor, pois se hoje posso orgulhar-me deste feito, é porque encontrei pessoas dotadas de sensibilidade para compreender o desafio, disposição para colaborar e confiança no meu potencial para concretizar este projeto. No entanto, certas pessoas se notabilizaram por suas relevantes e despretensiosas cooperações, por isso terão seus nomes merecidamente mencionados, como forma de perpetuar suas valiosas participações. Meu grato reconhecimento:

Ao Prof. Edilberto Rocha Silveira, pesquisador obstinado e perfeccionista, pelo seu esmero e dedicação na transmissão de conhecimentos científicos agregados a valores éticos (elementos fundamentais para uma boa qualificação profissional) e pelas oportunidades concedidas para meu aperfeiçoamento acadêmico, as quais têm me permitido acessar novos campos de estudo. *“Espero corresponder às suas expectativas.”*

À Prof^a. Otília Deusdênia P. Cavalcante, pela sua disposição em cooperar e propor novos desafios, possibilitando o aprimoramento técnico e o enriquecimento curricular. *“Obrigado pelos toques de classe nas sugestões e intervenções.”*

Aos professores Prof^a. Mary Anne Souza Lima, Prof^a Telma Leda G. Lemos e Prof. Francisco José Queiroz Monte, sempre solícitos quando precisei de auxílio material ou teórico para a viabilização de algum experimento. *“Tentarei retribuir-lhes quando solicitado.”*

Aos professores Prof^a. Maria Conceição Oliveira Ferreira, Prof^a. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, Prof. Marcos Carlos de Matos e Prof. Manoel Andrade Neto por terem introduzido, didaticamente, fundamentos teóricos essenciais para um bom rendimento acadêmico. *“Comprometo-me a difundir e compartilhar os conhecimentos adquiridos onde estiver.”*

Ao amigo Dr. Daniel Esdras de A. Uchoa, por ter me treinado e repassado parte de seu *know-how* em duas importantes técnicas analíticas (HPLC e RMN), além das orientações extras, permitindo-me realizar minha pesquisa com um relativo grau de independência. *“Espero ser útil quando precisar de mim.”*

Aos amigos Prof. Dr. Fco. Geraldo Barbosa, Prof. Dr. José Galberto M. da Costa, Dr. Adriano Nunes Cunha, Prof^a. Dra. Regina Cláudia M. Dourado, Prof^a. Dra. Nirla Romero, Prof^a. Dra. Nilce Gramosa, Prof. José Hélder Filgueiras Jr., por terem me ensinado muito sobre suas experiências em Química de Produtos Naturais, durante o período de Graduação e Pós-Graduação, cujo aprendizado acelerou o amadurecimento da minha formação científica. *“Sou grato pelas informações que produziram atalhos, e pelo apoio emocional que fortaleceu-me durante a caminhada.”*

Ao Prof. Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra, pelo cultivo e beneficiamento primário das plantas jovens de *A. cearensis*, atividades árduas que lhe exigiam grande dedicação de tempo e esforço físico, mas que não lhe deixavam abater, semeando alegria e energia para o trabalho. *“Meu franco reconhecimento pela profícua parceria, a qual certamente atenua sua dor crônica de colher fracassos futebolísticos.”*

À Prof. Luzia Kalyne de A. Moreira Leal, pela realização de um incontável número de testes farmacológicos (extratos e substâncias puras de *A. cearensis*), cujos resultados da pesquisa me renderam uma parcela significativa da minha produção científica. *“Que sua obstinação científica gere novos projetos em conjunto.”*

Aos professores Prof. Carlos Roque D. Correia (UNICAMP) e Prof Norberto Peporini (USP- Ribeirão Preto), pela realização de espectros de massas, imprescindíveis para a elucidação estrutural das substâncias isoladas inéditas na literatura.

Ao colega de Pós-Graduação João Carlos, pela presteza na realização dos espectros de massa (baixa resolução).

Às agências de fomento à pesquisa (CAPES, CNPq, FUNCAP, FINEP), ao Banco do Nordeste e à Selachii por terem viabilizado financeiramente o estudo, através de recursos para custeio de materiais de consumo, viagens para congressos e aquisição de equipamentos e produtos para melhoria da infra-estrutura laboratorial. Ao CNPq, pela bolsa concedida desde o período de Iniciação Científica, sem a qual não teria condições de dedicar-me e persistir na carreira científica.

Aos companheiros de laboratório e Pós-graduação, dos quais guardo lembranças memoráveis pelas boas relações de amizade, cujo convívio salutar tornava as jornadas de trabalho mais agradáveis e menos cansativas: Francigláuber, Maria Conceição (“Lobinha”), Hélcio, Rosa Virgínia, Mônica, Flávio, Lincoln Davi, Gizelle, Grazielle, Sammy, Fátima, Renata Paiva, Renata Mendonça, Arthur, Jackson, Jefferson, Alexandre Praxedes, Alexandre Oliveira, Érica, Rogério, Fábio (“El Larvagol”), Leopoldina, Juliana (“Juju”). E sobretudo aos amigos de “boa cepa” Jacqueline, Cláudio e Henrique, com os quais compartilhava sucessos e infortúnios.

Aos funcionários da UFC (Raimunda -“Mundinha”, Aurilana-“Lana”, Sr. Paulo, Célia e Orlando) e terceirizados (Rogério, Sr. Raimundo, Paula e Cícero), pessoas cordiais e bem-humoradas, pela qualidade nos préstimos de seus serviços.

A todos, meu eterno obrigado e pedido de desculpas pelas gozações, nem sempre bem compreendidas. “*Faz parte.*”

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	XVII
LISTAS DE QUADROS	XVIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XVIII
RESUMOS.....	XIX
ABSTRACT.....	XX

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO	1
------------------------------------	----------

CAPÍTULO II CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	6
---	----------

2.1 Família Leguminosae Papilionoideae (Fabaceae).....	6
2.2 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Amburana cearensis</i> A.C. SMITH	7
<i>Referências</i>	12

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO III- BIFLAVONÓIDES.....	13
---	-----------

3.1 Características Fundamentais e Relevância.....	13
3.2 Ressonância magnética nuclear de ¹³ C.....	16
3.2.1 Subclasses de biflavonóides.....	16
3.2.2 Aspectos Estereoquímicos.....	50
3.2.3 Metilação e Acetilação.....	54
3.2.4 Glicosilação.....	54
3.2.5 Conectividade.....	54
3.2.6 Sulfatação.....	55
3.2.7 Biflavonóides atípicos.....	55
3.3 Atividade biológica.....	57
<i>Referências</i>	60

CAPÍTULO IV- VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	69
---	-----------

4.1. Seletividade.....	69
4.2. Linearidade.....	69
4.3. Sensibilidade.....	69
4.4. Precisão.....	69
4.5. Limite de Detecção (LD).....	70
4.6. Limite de Quantificação (LQ).....	71
4.7. Exatidão.....	71
<i>Referências</i>	71

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO V- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	72
--	-----------

5.1. Amburanina A (ACCE-5).....	72
5.2. Amburanina B (ACCE-6).....	84

5.3. Amburosídeo A (ACS-7).....	95
5.4. Acetato de 6''-amburosila- (ACS-8).....	100
5.5. Protocatecuato de 6''-amburosila (ACS-9).....	108
5.6. Ferulato de 6''-amburosila (ACS-10).....	117
5.7. Vanilato de 6''-amburosila (ACS-11)	127
5.8. Sinapato de 6''-amburosila (ACS-12)	134
5.9. Galato de 6''-amburosila (ACS-2)	143
5.10. Amburosídeo B (ACPa-6)	154
5.11. Ácido (<i>E</i>)- <i>o</i> -cumárico glicosilado (ACPa-7)	162
5.12. Ácido (<i>Z</i>)- <i>o</i> -cumárico glicosilado (ACX-1)	171
5.13. Formononetina (ACCE-9)	180
5.14. Aiapina (ACPa-4)	187
5.15. 6-hidroxi-cumarina (ACS-5)	192
5.16. Protocatecuato de- 6-cumarila (ACCE-8)	199
5.17. Ácido protocatecuico (ACCE-2)	209
5.18. Ácido vanílico (ACCE-4)	213
5.19. Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico (ACPa-5)	218
5.20. Ácido (<i>E</i>)- <i>o</i> -cumárico (ACS-6)	221
5.21. Quercetina (ACCE-1)	225
5.22. Isocampferídio (ACCE-7)	229
5.23. Cumarina (ACS-1 e ACPa-2)	233
<i>Referências</i>	237

CAPÍTULO VI- PROPOSTA BIOGENÉTICA DE FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *A. CEARENSIS*.....239

6.1. Amburosídeos.....	242
6.2. Cumarinas.....	242
6.3. Flavonóides.....	243
6.4. Isoflavonóides.....	246
<i>Referências</i>	246

CAPÍTULO VII- VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....247

7.1. Validação.....	247
7.2. Doseamento.....	251

CAPÍTULO VIII- BREVE ABORDAGEM FARMACOLÓGICA DO ESTUDO INTERDISCIPLINAR DE *A. cearensis*264

8.1. Avaliação da atividade farmacológica dos extratos etanólicos de espécimens jovens.....	264
8.2. Avaliação da atividade farmacológica de substâncias isoladas de <i>A. cearensis</i>	267
<i>Referências</i>	269

CAPÍTULO IX- ATIVIDADE ALELOPÁTICA270

9.1. Alelopatia.....	270
9.2. Atividade alelopática do extrato aquoso das sementes de <i>A. cearensis</i>	270
<i>Referências</i>	271

CAPÍTULO X PARTE EXPERIMENTAL	272
10.1. ESTUDO QUÍMICO DOS CONSTITUINTES DE <i>A. CEARENSIS</i>	272
10.1.1. MATERIAL BOTÂNICO.....	272
10.1.2. METODOLOGIA AGRONÔMICA.....	272
10.1.3 Métodos cromatográficos.....	273
10.1.3.1. <i>Cromatografia de adsorção</i>	273
10.1.3.2. <i>Cromatografia de exclusão</i>	273
10.1.3.3 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE≈HPLC)</i>	274
10.1.3.4. <i>Extração em Fase Sólida (EFS ≈SPE)</i>	274
10.1.4. Métodos espectroscópicos.....	274
10.1.4.1. <i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	274
10.1.4.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)</i>	274
10.1.4.3. <i>Espectrometria de massa (EM)</i>	274
10.1.5. Métodos físicos.....	276
10.1.5.1. <i>Determinação do ponto de fusão (pf)</i>	276
10.1.5.2 <i>Determinação da rotação óptica (α)</i>	277
10.1.6. Estudo Fitoquímico da casca do caule de <i>A. cearensis</i>	277
10.1.6.1. Obtenção do extrato etanólico da casca do caule (ACCE ₁)	277
10.1.6.2. Partição líquido-líquido do extrato etanólico ACCE ₁	277
10.1.6.3. Fracionamento de ACCEAM ₁	278
10.1.6.4. Cromatografia em sílica de ACCE ₁ AM/CA	278
10.1.6.5. Cromatografia em Sephadex LH-20 de ACCE ₁ AM/CA(24-31)- Isolamento de ACCE-1 (quercetina)	279
10.1.6.6. Isolamento de ACCE-2 ACCE- 3 e ACCE-4 (ácido protocatecuico, amburosídeo A e ácido vanílico)	279
10.1.6.7. Isolamento de ACCE-5 (Amburanina A)	279
10.1.6.8. Isolamento de ACCE-6 (Amburanina B)	279
10.1.6.9. Obtenção e partição de ACCE ₂	281
10.1.6.10. Fracionamento de ACCE ₂ AM.....	282
10.1.6.11. Cromatografia em sílica de ACCE ₂ AM/CA.....	282
10.1.6.12. Isolamento de ACCE-7 e ACCE-8 (protocatecuato de 6-cumarila e isocampferídio)	282
10.1.6.13. Isolamento de ACCE-9 (formononetina).....	282
10.1.7. Estudo Fitoquímico das Sementes de <i>A. cearensis</i>	
10.1.7.1. Obtenção dos extrato etanólico das sementes (ACS)- Isolamento de ACS-1 (cumarina).....	283
10.1.7.2. Partição do extrato etanólico ACSE.....	283
10.1.7.3. Cromatografia em Sephadex LH-20 de ACSEA.....	284
10.1.7.4. Isolamento de ACS-2 (galato de amburosila).....	285
10.1.7.5. Cromatografia em sílica de ACSEA(2-11)(11-18)-Isolamento de ACS-3 e ACS-4.....	286
10.1.7.6. Separação por HPLC- Isolamento de ACS-5 e ACS-6 (6-hidroxi-cumarina e ácido (E)-o-cumárico).....	286
10.1.7.7. Separação por HPLC- Isolamento de ACS-(7-12).....	287
10.1.8. Obtenção dos extratos etanólicos dos xilopódios e das partes aéreas de plantas cultivadas (ACX e ACPA).....	290
10.1.8.1. Partição do extrato etanólico E7-ACX.....	290
10.1.8.2. Fracionamento de ACXQ.....	292

10.1.8.3. Separação por HPLC de ACXQ/B- Isolamento de ACX-1 (ác. (E)-o-cumárico glicosilado)	293
10.1.8.4. Tratamento cromatográfico de E7-ACXAM- Isolamento de ACX-2 (amburanina B)	293
10.1.8.5. Partição do extrato etanólico E7-ACPa.....	294
10.1.8.6. Cromatografia em sílica de E7-ACPaAD.....	295
10.1.8.7. Cromatografia em Sephadex LH-20 de E7-ACPaAD(3-6) (1,8 g)- Isolamento de ACPa-1 (ácido vanílico).....	295
10.1.8.8. Cromatografia em sílica de E7-ACPaAD(4-6)-Isolamento de ACPa-2-4 (cumarina, e aiapina).....	296
10.1.8.9. Isolamento de ACPa- 5 e ACPa-6 (ácido p-hidroxi benzóico e amburosídio B).....	296
10.1.8.10. Fracionamento de E7-ACPaQ.....	296
10.1.8.11. Purificação por HPLC- Isolamento de E7-ACPa-7 (ácido (E)-o-cumárico glicosilado).....	297
10.2. Validação do método de quantificação de 4 substâncias presentes nos extratos de <i>Amburana cearensis</i>	299
10.2.1. Preparo das Soluções.....	299
10.2.2. Condições analíticas.....	300
CAPÍTULO XI- CONCLUSÃO	302

LISTA DE SIGLAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD- Cromatografia de Camada Delgada
CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COSY- Correlation Spectroscopy
COX- Cicloxigenase
CPD- Composite Pulse Decoupling
CV- Coeficiente de Variação
DAD- Diode-array Detector
DEPT- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO- Dimetilsulfóxido
EM- Espectrometria de Massas
FUNCAP- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
GABA- Ácido γ -aminobutírico
HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC- Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HPLC- High Performance Liquid Chromatography
HSQC- Heteronuclear Single Quantum Correlation
IDH- Índice de Deficiência de Hidrogênio
IE- Impacto Eletrônico
IES- Ionização por Electrospray
INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry
IV- Infravermelho
LD- Limite de Detecção
LQ- Limite de Quantificação
NOESY- Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PAL- Phenylalanine Ammonia Lyase
PLP- Pyridoxal 5'-phosphate
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
SAM- S-adenosil-metionina
SPE- Solid Phase Extraction
T_C- Temperatura de coalescência
t_R- Tempo de retenção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotos digitais das formas exploradas comercialmente de <i>A. cearensis</i> , com fins medicinais: casca (à dir.) e xarope (à esq.).....	4
Figura 2- Mapa de distribuição de espécimens de <i>A. cearensis</i> na América do Sul.....	8
Figura 3- Fotos digitais de diferentes partes de <i>A. cearensis</i> : (A) sementes, (B e C) flores, (D e E) frutos, (F) galhos.....	10
Figura 4- Fotos digitais de um espécimen adulto silvestre de <i>A. cearensis</i> : estação chuvosa (esq.) e período de estiagem (dir.).....	10
Figura 5- Fotos digitais de <i>A. cearensis</i> cultivada: canteiro (esq.) e espécimens colhidos aos 6 meses de desenvolvimento (dir.).....	11
Figura 6- Fotos de <i>Dipterix odorata</i> (esq.) e <i>Commiphora leptophloeos</i> (dir.).....	11
Figura 7- Estruturas químicas da biflavona amentoflavona, numeradas sob duas formas.....	15
Figura 8- Espectros de RMN ¹³ C de GB-1 (148) registrados em diferentes temperaturas e solventes, obtidos num espectrômetro Bruker (HAN et al., 2005).....	53
Figura 9- Espectro de absorção na região de infravermelho de ACCE-5.....	77
Figura 10- Espectro de RMN ¹ H de ACCE-5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).....	77
Figura 11- Espectro RMN-COSY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 x 500 MHz) de ACCE-5.....	78
Figura 12- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACCE-5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	78
Figura 13- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACCE-5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	79
Figura 14- Espectro RMN-HMQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-5.....	79
Figura 14a- Expansão da região δ 5,5-7,5 x 95,0-133.....	80
Figura 15- Espectro RMN-HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-5.....	80
Figura 15a- Expansões do espectro HMBC de ACCE-5: (I) δ 6,4-7,6 x 112-131; (II) δ 9,0-13,4 x 153-172; (III) δ 9,0-13,4 x 103-120.....	81
Figura 15b- Expansões do espectro HMBC de ACCE-5: (I) δ 5,5-7,5 x 95,0-133; (II) δ 5,8-7,4 x 152-171.....	82
Figura 16- Espectro de massa de ACCE-5 (Ionização por Impacto Eletrônico).....	83
Figura 17- Espectro RMN-NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 x 500 MHz) de ACCE-5.....	83
Figura 18- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACCE-6.....	89
Figura 19- Espectro de RMN ¹ H de ACCE-6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).....	89
Figura 20- Espectro RMN-COSY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 x 500 MHz) de ACCE-6.....	90
Figura 21- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACCE-6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	90
Figura 22- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACCE-6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	91
Figura 23- Espectro RMN-HMQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-6.....	91
Figura 24- Espectro de massa de ACCE-6 (Ionização por Impacto Eletrônico).....	92
Figura 25- Espectro RMN-HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-6.....	92
Figura 25a- Expansões do espectro HMBC de ACCE-6: (I) δ 5,5-7,6 x 77-108; (II) δ 11,5-13,6 x 89-110; (III) δ 6,4-8,4 x 111-135.....	93
Figura 25b- Expansões do espectro HMBC de ACCE-6: (I) δ 11,4-13,4 x 160-169; (II) δ 5,7-8,4 x 126-172.....	94
Figura 26- Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de ACS-7.....	98
Figura 27- Espectro de RMN ¹³ C-CPD (CD ₃ OD, 75 MHz) de ACS-7.....	98
Figura 28- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 (CD ₃ OD, 75 MHz) de ACS-7.....	99
Figura 29- Espectro de RMN ¹ H de ACS-8 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	103
Figura 30- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-8 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	104
Figura 30a- Expansão da região δ 98-125 do espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-8.....	104
Figura 31- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-8 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	105
Figura 32- Espectro de massa de ACS-8 (Ionização por Electron-spray).....	105

Figura 33- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-8.....	106
Figura 33a- Expansões do espectro HSQC de ACS-8: (I) δ 3,3-5,4 x 62-81; (II) δ 6,7-7,5 x 114-133.....	106
Figura 34- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-8.....	107
Figura 34a- Expansões do espectro HMBC de ACS-8: (I) δ 6,7-7,5 x 115-135; (II) δ 6,7-7,5 x 143-162.....	107
Figura 35- Espectro de RMN ¹ H de ACS-9 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	112
Figura 36- Espectro de RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACS-9.....	112
Figura 36a- Expansão da região δ 6,7-7,7 x 6,5-7,7.....	112
Figura 37- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-9 (MeOD, 125 MHz).....	113
Figura 38- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-9 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	113
Figura 39- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-9.....	114
Figura 39a- Expansão da região δ 6,7-7,7 x 104-134.....	114
Figura 40- Espectro de massa de ACS-9 (Ionização por Electron-spray).....	114
Figura 41- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-9.....	115
Figura 41a- Expansões do espectro HMBC de ACS-9: (I) δ 6,6-7,7 x 143-163; (II) δ 4,3-7,5 x 164-173.....	116
Figura 42- Espectro de RMN ¹ H de ACS-10 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	121
Figura 43- Espectro RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACS-8.....	122
Figura 43a- Expansão da região δ 6,2-7,7 x 6,2-7,7.....	121
Figura 44- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-10 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	122
Figura 44a- Expansão da região δ 108-135 do espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-10 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	122
Figura 45- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-10 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	123
Figura 46- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-10.....	123
Figura 46a- Expansão da região δ 6,3-7,5 x 110-135.....	123
Figura 47- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-10.....	124
Figura 47a- Expansões do espectro HMBC de ACS-10: (I) δ 6,7-7,5 x 142-162; (II) δ 6,3-7,8 x 120-136; (III) δ 6,9-8,0 x 108-121.....	125
Figura 48- Espectro de massa de ACS-10 (Ionização por Electron-spray).....	126
Figura 49- Espectro de RMN ¹ H de ACS-11 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	130
Figura 50- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-11 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	130
Figura 50a- Expansão da região δ 102-135.....	130
Figura 51- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-11 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	131
Figura 52- Espectro RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACS-11.....	131
Figura 53- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-11.....	132
Figura 53a- Expansão da região δ 6,5-7,7 x 6,5-7,7.....	132
Figura 54- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-11.....	132
Figura 54a- Expansões do espectro HMBC de ACS-11: (I) δ 4,2-7,8 x 173-165; (II) δ 6,7-7,7 x 142-156.....	133
Figura 55- Espectro de RMN ¹ H de ACS-12 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	138
Figura 55a- Expansões do espectro de RMN ¹ H de ACS-12: (I) δ 6,3-7,8; (II) δ 6,3-7,8; (III) δ 6,3-7,8.....	138
Figura 56- Espectro RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACS-12.....	139
Figura 56a- Expansão da região δ 6,3-7,7 x 6,3-7,7.....	139
Figura 57- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-12 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	139
Figura 58- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-12 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	140
Figura 59- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACS-12.....	140
Figura 59a- Expansão da região δ 6,3-7,5 x 106-132.....	140
Figura 60- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-12.....	141

Figura 60a- Expansão da região δ 4,3-7,8 x 165-173.....	141
Figura 60b- Expansões do espectro HMBC de ACS-11: (I) δ 6,7-7,5 x 137-160; (II) δ 6,4-7,7 x 114-135.....	142
Figura 61- Espectro de RMN ^1H de ACS-2 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	149
Figura 61a- Expansão do espectro de RMN ^1H de ACS-2: (I) δ 3,1-5,3.....	149
Figura 62- Espectro RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACS-2.....	150
Figura 63- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACS-2 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	150
Figura 64- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	151
Figura 65- Espectro de massa de ACS-2 (Ionização por Electron-spray).....	151
Figura 66- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-2.....	152
Figura 67- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACS-2.....	152
Figura 67a- Expansão da região δ 6,7-7,5 x 153-172.....	153
Figura 68- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACPa-6.....	158
Figura 69- Espectro de RMN ^1H de ACPa-6 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	158
Figura 70- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACPa-6 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	159
Figura 71- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-6 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	159
Figura 72- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-6.....	160
Figura 73- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-6.....	160
Figura 74- Espectro de RMN ^1H de ACPa-7 (CD ₃ OD), 500 MHz).....	166
Figura 74a- Expansão do espectro de RMN ^1H de ACPa-7 da região de: (I) δ 3,2-4,0.....	166
Figura 75- Espectro RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACPa-7.....	167
Figura 76- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACPa-7 (MeOD, 125 MHz).....	167
Figura 77- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-7 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	168
Figura 78- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-7.....	168
Figura 79- Espectro de massa de ACPa-7 (Impacto eletrônico).....	169
Figura 80- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACPa-7.....	169
Figura 81- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-7.....	170
Figura 81a- Expansão da região δ 6,3-8,4 x 124-144.....	170
Figura 82- Espectro de RMN ^1H de ACX-1 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	175
Figura 83- Espectro RMN-COSY (CD ₃ OD, 500 x 500 MHz) de ACX-1.....	175
Figura 84- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACX-1 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	176
Figura 85- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (CD ₃ OD, 125 MHz) de ACX-1.....	176
Figura 86- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACX-1.....	177
Figura 87- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ OD, 125 x 500 MHz) de ACX-1.....	177
Figura 87a- Expansão do espectro HMBC de ACS-11: (I) δ 6,7-7,8 x 110-145.....	178
Figura 88- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACX-1.....	178
Figura 89- Espectro de massa de ACX-1 (Impacto Eletrônico).....	179
Figura 90- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACCE-9 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz).....	183
Figura 91- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de de ACCE-9 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz).....	183
Figura 92- Espectro de RMN ^1H de ACCE-9 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz).....	184
Figura 93- Espectro RMN-HSQC (C ₅ D ₅ N, 125 x 500 MHz) de ACCE-9.....	185
Figura 93a- Expansão do espectro HSQC de ACCE-9: δ 7,0-8,5 x 100-133.....	185
Figura 94- Espectro RMN-HMBC (C ₅ D ₅ N, 125 x 500 MHz) de ACCE-9.....	186
Figura 95- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACPa-4.....	189
Figura 96- Espectro de RMN ^1H de ACPa-4 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	189
Figura 97- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACPa-4 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	190
Figura 98- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-4 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	190
Figura 99- Espectro de massa de ACPa-4 (Impacto Eletrônico).....	191
Figura 100- Espectro de RMN ^1H de ACS-5 (CD ₃ COCD ₃ , 500 MHz).....	195
Figura 101- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACS-5 (CD ₃ COCD ₃ , 125 MHz).....	195

Figura 102- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-5 (CD ₃ COCD ₃ , 125 MHz).....	196
Figura 103- Espectro RMN-HSQC (CD ₃ COCD ₃ , 125 x 500 MHz) de ACS-5.....	196
Figura 104- Espectro de massa de ACS-5 (Impacto Eletrônico).....	197
Figura 105- Espectro RMN-HMBC (CD ₃ COCD ₃ , 125 x 500 MHz) de ACS-5.....	197
Figura 106- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de umbeliferona (CD ₃ COCD ₃ , 125 MHz).....	198
Figura 107- Cromatograma de HPLC de 6-hidroxi-cumarina (254 nm).....	198
Figura 108- Cromatograma de HPLC de umbeliferona (7-hidroxi-cumarina: 254 nm).....	198
Figura 109- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACCE-8.....	203
Figura 110- Espectro de RMN ¹ H de ACCE-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).....	203
Figura 111- Espectro RMN-COSY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 x 500 MHz) de ACCE-8.....	204
Figura 112- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACCE-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	204
Figura 113- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACCE-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	205
Figura 114- Espectro de RMN ¹³ C (gated) de ACCE-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).....	205
Figura 115- Espectro de massa de ACCE-8 (Impacto Eletrônico).....	206
Figura 116- Espectro RMN-HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-8.....	206
Figura 116a- Expansão da região δ 6,4-7,5 x 113-124.....	206
Figura 117- Espectro RMN-HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-8.....	207
Figura 117a- Expansões do espectro HMBC de ACCE-8: (I) δ 6,9-8,1 x 140-157; (II) δ 6,4-8,2 x 113-132.....	208
Figura 118- Espectro RMN-NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 x 500 MHz) de ACCE-8.....	208
Figura 119- Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) de ACCE-2.....	211
Figura 120- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 (CD ₃ OD, 125 MHz) de ACCE-2.....	211
Figura 121- Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de ACCE-2.....	212
Figura 122- Espectro de absorção na região do IV de ACCE-4 (pastilha de KBr).....	215
Figura 123- Espectro de RMN ¹ H de ACCE-4 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	215
Figura 124- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACCE-4 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	216
Figura 125- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACCE-4 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	216
Figura 126- Espectro de massa de ACCE-4 (Impacto Eletrônico).....	217
Figura 127- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC) de ACCE-4.....	217
Figura 128- Espectro de RMN ¹ H de ACPa-5 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	219
Figura 129- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACPa-5 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	219
Figura 130- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACPa-5 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	220
Figura 131- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACS-6 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	223
Figura 132- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 de ACS-6 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	223
Figura 133- Espectro de absorção na região do IV de ACS-6.....	224
Figura 134- Espectro de RMN ¹ H de ACS-6 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	224
Figura 135- Espectro de RMN ¹ H de ACCE-1 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	227
Figura 136- Espectro de RMN ¹³ C (CPD) de ACCE-1 (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	227
Figura 137- Espectro RMN-HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 x 500 MHz) de ACCE-1.....	228
Figura 138- Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de ACCE-7.....	231
Figura 139- Espectro de RMN ¹³ C-CPD (CD ₃ OD, 125 MHz) de ACCE-7.....	231
Figura 140- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 (CD ₃ OD, 125 MHz) de ACCE-7.....	232
Figura 141- Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de ACS-1.....	235
Figura 142- Espectro de RMN ¹³ C-CPD (CDCl ₃ , 75 MHz) de ACS-1.....	235
Figura 143- Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135 (CDCl ₃ , 75 MHz) de ACS-1.....	236
Figura 144- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da casca do caule (ACCE)-sohxlet.....	256
Figura 145- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do xilopódio da planta jovem (9 m)....	256
Figura 146- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da parte aérea da planta jovem (9 m)....	256
Figura 147- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do xilopódio da planta jovem (7 m)....	257

Figura 148- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da parte aérea da planta jovem (7 m)..	257
Figura 149- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do xilopódio da planta jovem (4 m)....	257
Figura 150- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da parte aérea da planta jovem (4 m)..	258
Figura 151- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do xilopódio da planta jovem (2 m)....	258
Figura 152- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da parte aérea da planta jovem (2 m)..	258
Figura 153- Cromatograma de HPLC do ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico.....	260
Figura 154- Cromatograma de HPLC do ácido cumárico.....	260
Figura 155- Cromatograma de HPLC do ácido (<i>Z</i>)-cumárico glicosilado.....	260
Figura 156- Cromatograma de HPLC do ácido (<i>E</i>)-cumárico glicosilado.....	261
Figura 157- Cromatograma de HPLC da aiapina.....	261
Figura 158- Cromatograma de HPLC da cumarina.....	261
Figura 159- Cromatograma de HPLC do ácido vanílico.....	262
Figura 160- Cromatograma de HPLC do Amburosídio B.....	262
Figura 161- Cromatograma de HPLC do Amburosídio A.....	262
Figura 162- Cromatograma de HPLC do ácido protocatecuico.....	263
Figura 163- Detalhe das plântulas normais (esq.), anormais (centro) e sementes não germinadas (dir.) observadas no bioensaio com ext. aquoso das sementes de cumaru.....	271
Figura 164- Cromatograma de HPLC da fração ACCE ₁ AM/CA(24-31)(19-33)(5-12).....	280
Figura 165- Cromatograma de HPLC da fração ACSEA(2-11)(11-18)(13-17).....	287
Figura 166- Cromatograma de HPLC da fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20).....	288
Figura 167- Cromatograma de HPLC do pico 4 da fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20)....	288
Figura 168- Cromatograma de HPLC da fração ACXQ(3)B.....	293
Figura 169- Cromatograma de HPLC da fração E7-ACP _a Q(7)(2-3).....	297
Figura 170- Cromatograma dos quatro padrões (conc.= 60 µg/mL) utilizados na validação de amostras de <i>A. cearensis</i> : A - ácido protocatecuico, B - ácido vanílico, C - cumarina e D - amburosídio A.....	301

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos biflavonóides descritos na literatura, contendo os tipos de conectividade, as fontes botânicas, os solventes empregados para obtenção dos espectros de RMN e as referências correspondentes.....	46
Tabela 2- Relação das atividades biológicas demonstradas por biflavonóides.....	59
Tabela 3- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-5 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de aromadendrina e floretina, registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).....	76
Tabela 4- Dados de RMN ^{13}C de ACCE-5 e ACCE-6.....	87
Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de aromadendrina e campferol, registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).....	88
Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-7 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de amburosídio A, registrado na literatura (BRAVO et al., 1999).....	97
Tabela 7- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-8 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	102
Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-9 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	111
Tabela 9- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-10 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	120
Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-11 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	129
Tabela 11- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-12 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	137
Tabela 12- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-2 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	146
Tabela 13- Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ACS-8, 10 e 11 e substâncias análogas (192-194) isoladas de <i>Ilex litsaefolia</i>	147
Tabela 14- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de amburosídio B, registrados na literatura	157
Tabela 15- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-7 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	165
Tabela 16- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACX-1 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	174
Tabela 17- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-9 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de formononetina, registrados na literatura.....	182
Tabela 18- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-4 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de aiapina, registrados na literatura	188
Tabela 19- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-5 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de 6-hidroxi-cumarina, registrados na literatura	194
Tabela 20- Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ACS-5 com dois registros de deslocamentos químicos de ^{13}C de 6-hidroxi-cumarina, encontrados na literatura.....	194
Tabela 21- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-9 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	202

Tabela 22- Dados de RMN ^{13}C de ACCE-2 e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de ácido protocatecuico, registrados na literatura	210
Tabela 23- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-4 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de ácido vanílico, registrados na literatura	214
Tabela 24- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-5 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de ácido p-hidroxibenzoico, registrados na literatura	218
Tabela 25- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de ácido (<i>E</i>)-o-cumárico, registrados na literatura.....	222
Tabela 26- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-1 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de quercetina, registrados na literatura	226
Tabela 27- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-7 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de isocampferídio, registrados na literatura	230
Tabela 28- Dados de RMN ^{13}C de ACS-1 e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de cumarina, registrados na literatura	234
Tabela 29- Equações e coef. de correlação das retas dos quatro constituintes majoritários de <i>A. cearensis</i> : ác. protocatecuico, ác. vanílico, cumarina e amburosídio A.....	248
Tabela 30- Parâmetros de desempenho analítico dos quatro constituintes majoritários de <i>A. cearensis</i> : ácido protocatecuico, ácido vanílico, cumarina e amburosídio A.....	250
Tabela 31- Concentração dos quatro principais constituintes químicos detectados em diferentes extratos de <i>A. cearensis</i> , expressos em relação à massa de extrato e de material botânico.....	255
Tabela 32- Relação das substâncias químicas identificadas, segundo seus tempos de retenção registrados em análises por HPLC, nos extratos de <i>A. cearensis</i> : planta adulta (casca do caule) e espécimens jovens (xilopódio e parte aérea).....	259
Tabela 33- Acompanhamento mensal das massas (g) e dos rendimentos (%) dos extratos etanólicos da parte aérea e do xilopódio de <i>A. cearensis</i>	291

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Concentração dos quatro constituintes majoritários em extratos etanólicos das cascas do caule de <i>A. cearensis</i> , obtidos por maceração e soxhlet.....	251
Gráfico 2- Concentrações de ácido vanílico e cumarina em extratos etanólicos de plantas jovens de <i>A. cearensis</i> (valores expressos em relação à massa de extrato e à biomassa).....	252
Gráfico 3- Concentração de ácido vanílico em extratos etanólicos de plantas jovens de <i>A. cearensis</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento.....	253
Gráfico 4- Concentração de cumarina em extratos etanólicos de plantas jovens de <i>A. cearensis</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento.....	253
Gráfico 5- Concentração de amburosídio A em extratos etanólicos de plantas jovens de <i>A. cearensis</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento.....	254

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Esqueletos básicos das diferentes subclasses de flavonóides.....	14
Quadro 2- Estruturas de flavonóides farmacologicamente ativos.....	58
Quadro 3- Proposta biogenética de formação de ácidos fenólicos simples e aminoácidos aromáticos.....	240
Quadro 4- Proposta biogenética de formação de amburosídeos e derivados dos ácido benzóico e cinâmico.....	241
Quadro 5- Proposta biogenética de formação de ác. cumáricos glicosilados e cumarinas....	243
Quadro 6- Proposta biogenética de formação de flavonóis e biflavonóides.....	244
Quadro 7- Proposta mecanística de formação da amburanina A.....	245
Quadro 8- Proposta biogenética de formação da isoflavona formononetina.....	246

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1- Partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas do caule de <i>A. cearensis</i>	278
Fluxograma 2- Metodologia de Isolamento de 6 substâncias obtidas do extrato etanólico da casca do caule de <i>A. cearensis</i>	281
Fluxograma 3- Metodologia de Isolamento de 3 substâncias obtidas do extrato etanólico da casca do caule de <i>A. cearensis</i>	283
Fluxograma 4- Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das sementes de <i>A. cearensis</i> . Isolamento de ACS-1.	284
Fluxograma 5- Partição do extrato etanólico das sementes de <i>A. cearensis</i>	285
Fluxograma 6- Metodologia de isolamento das 9 substâncias obtidas do extrato etanólico das sementes de <i>A. cearensis</i>	289
Fluxograma 7- Partição do extrato etanólico do xilopódio da planta jovem (7 meses) de <i>A. cearensis</i>	292
Fluxograma 8- Metodologia de isolamento de duas substâncias isoladas do xilopódio das plantas jovens de <i>A. cearensis</i> (7 meses).....	294
Fluxograma 9- Partição do extrato etanólico da parte aérea da planta jovem (7 meses) de <i>A. cearensis</i>	295
Fluxograma 10- Metodologia de isolamento das 7 substâncias isoladas da parte aérea das plantas jovens de <i>A. cearensis</i> (7 meses).....	298

RESUMO

Amburana cearensis A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) é uma árvore típica da caatinga nordestina, popularmente conhecida como imburana-de-cheiro ou cumaru, caracterizada por sua casca vermelho-pardacenta e odor peculiar agradável, atribuído à cumarina. Apresenta relevante importância econômica, sobretudo na carpintaria e perfumaria, e inestimável valor medicinal (propriedades terapêuticas contra afecções respiratórias cientificamente comprovadas), todavia esta espécie sofre ameaça de extinção devido ao extrativismo predatório. Em virtude da necessidade de elaboração de um modelo de exploração auto-sustentável de *A. cearensis*, foi proposto um estudo integrado Química-Agronomia-Farmacologia. Este trabalho relata a abordagem fitoquímica da pesquisa interdisciplinar, visando o isolamento, a purificação e a caracterização estrutural de novos constituintes químicos da planta adulta (silvestre), bem como a identificação e a quantificação de compostos químicos já conhecidos, considerados biomarcadores, em espécimens jovens de diferentes meses de desenvolvimento (cultivados). As investigações químicas da planta silvestre de *A. cearensis* foram realizadas com os extratos etanólicos da casca do caule, coletadas no município de Quixeramobim-CE, e das sementes, adquiridas no comércio de Fortaleza-CE. Os extratos etanólicos foram submetidos a partições líquido-líquido, cromatografias convencionais (adsorção-gel de sílica e exclusão-gel de dextrana) e modernas (HPLC-fase reversa), resultando no isolamento e identificação de: **A. Cumarinas**- 6-hidroxi-cumarina e protocatecuato de 6-cumarila; **B. Ácidos fenólicos**- ácido vanílico e ácido (*E*)-*o*-cumárico; **C. Flavonóides**- quercetina, formononetina, e os biflavonóides amburanina A e B; **Amburosídeos**- amburosídeo A, ferulato de 6''-amburosila, protocatecuato de 6''-amburosila, galato de 6''-amburosila, acetato de 6''-amburosila, sinapato de 6''-amburosila e vanilato de 6''-amburosila. Os espécimens cultivados de *A. cearensis*, divididos em parte aérea e xilopódio, foram extraídos com etanol e submetidos a uma metodologia química semelhante à adotada para a planta silvestre. Da parte aérea foram obtidos cumarina, aiapina, amburanina B, isocampferídio, ácido vanílico e ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado, enquanto que do xilopódio foram isolados ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido (*Z*)-*o*-cumárico glicosilado e amburosídeo B. As substâncias químicas isoladas tiveram suas estruturas elucidadas por métodos físicos (ponto de fusão e rotação óptica) e espectrométricos (Espectrometria na região do Infravermelho, Espectrometria de Massa e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C, incluindo técnicas uni e bidimensionais), além de comparação com dados da literatura. Os extratos etanólicos da planta silvestre (casca do caule) e de espécimens cultivados (parte aérea e xilopódio) foram quimicamente comparados através de análises por HPLC, empregando-se método cromatográfico validado (linearidade, precisão, exatidão, fator de recuperação aceitáveis) e utilizando-se padrões de ácido protocatecuico, ácido vanílico, cumarina e amburosídeo A, obtidos em estudos anteriores. Amburosídeo A foi o constituinte majoritário do extrato da planta silvestre. Nos espécimens jovens, ácido vanílico e cumarina revezaram-se como principais componentes, dependendo da parte e da idade da planta estudada.

ABSTRACT

Amburana cearensis A.C. Smith is a typical tree of the northeastern Brazil flora designated “caatinga”. It is popularly known either as “imburana-de-cheiro” or “cumaru” and characterized by its red-gray bark of peculiar and pleasant smell due to coumarin. Despite *A. cearensis* relevant economical (particularly for carpentry and perfumery) and medicinal importance (therapeutic properties against respiratory affections scientifically proved), it is one of the plant species treated of extinction due to predatory extractivism. Taking in account the necessity of elaborating a sustainable plan of exploitation it was suggested an integrated study covering the chemical, agronomical and pharmacological aspects of *A. cearensis*.

This work reports the phytochemical component of the interdisciplinary study pursuing the isolation, purification and structure characterization of new secondary metabolites of the wild adult plant, as well as the identification and quantification of the already known chemicals, considered the plant biomarkers, from young cultivated specimens at different developmental stages. The chemical investigation of adult wild plants was performed with the ethanol extract from barks of *A. cearensis* collected at Quixeramobim County, Ceará state, and the hexane extract of seeds purchased from herbal stores at Fortaleza. The ethanol extracts were submitted to liquid-liquid partition, conventional (silica gel adsorption and gel exclusion with dextran) and modern (HPLC) chromatography leading to the isolation and characterization of:

A. Coumarins 6-hydroxy-coumarin, 6-coumaryl protocatechuate, acid; **B. Phenol Acids-** vanillic acid, *o*-coumaric; **C. Flavonoids-** quercetin, formononetin, amburanin A and B; **Amburosídes-** amburoside A, 6''-amburosyl-ferulate, 6''-amburosyl-protocatechuate, 6''-amburosyl-galate, 6''-amburosyl-acetate, 6''-amburosyl-sinapate and 6''-amburosyl-vanillate.

The cultivated specimens, separated in aerial part and xylopode, were extracted with ethanol and submitted to the same methodology employed for the wild plant. From the aerial part were isolated coumarin, ayapin, amburanin B, isokaempferide, vanillic acid, (*E*)-*o*-coumaric acid glucoside, while from the xylopode were isolated *p*-hydroxy-benzoic acid, (*Z*)-*o*-coumaric acid glucoside and amburoside B. All chemical substances had their structures elucidated through physical (mp and optical rotation) and spectroscopical methods (IR, MS and NMR, including uni and bidimensional techniques) and comparison to the literature wherever the case. The ethanol extracts from either wild or cultivated (aerial part and xylopode) plants were compared by HPLC through a validated chromatographic method (acceptable linearity, precision, accuracy and recovering factor) using as standard the protocatechuic acid, vanillic acid, coumarin and amburoside A, obtained from the previous studies. Amburoside A was the major component of wild plant, while coumarin and vanilic acid take turns as the principal metabolites of cultivated young plants depending on the plant part and plant age.

I. INTRODUÇÃO

Amburana cearensis A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All), pertencente à família das Leguminosae Papilionoideae (Fabaceae), é uma árvore frondosa, típica da caatinga nordestina, especialmente do Ceará, onde é conhecida como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru. Embora nativa do sertão nordestino, *A. cearensis* pode ser encontrada em praticamente toda América do Sul (do Peru à Argentina), juntamente com a outra representante do gênero, *Amburana acreana*, presente principalmente no sudoeste da Floresta Amazônica. *A. cearensis* pode atingir até 15 m de altura e 50 cm de diâmetro, caracterizando-se por possuir flores brancas, vagem achatada e escura, além da casca aromática com odor peculiar de cumarina. Suas sementes são escuras, aladas e exalam também um forte cheiro de cumarina (semelhante à baunilha) (CARVALHO, 1994).

Do ponto-de-vista econômico, *A. cearensis* apresenta valiosa importância comercial dado às suas várias aplicações, particularmente empregada em carpintaria e perfumaria. Comercializada com o nome de cerejeira-do-nordeste, sua madeira é utilizada na fabricação de móveis, portas, e caixotaria devido à sua reconhecida durabilidade. As sementes servem como aromatizantes e repelentes de insetos para roupas e estantes (MAIA, 2004). Aquino et al. (2005) propõem a aplicação do pó da madeira em tonéis de aguardente de cana-de-açúcar com o objetivo de acelerar o processo de maturação da bebida, devido à riqueza de compostos fenólicos. Na medicina popular, a casca do caule é utilizada na preparação de "lambedôs" caseiros para o tratamento de doenças respiratórias. Industrialmente, a forma farmacêutica disponível é o xarope de cumaru o qual é produzido pelo Programa Farmácias Vivas, Farmácia-Escola/UFC e empresas privadas como a Selachii e Bionatus (MATOS, 2002).

Em virtude do difundido uso de *A. cearensis* para fins terapêuticos, tornou-se indispensável a realização de estudos científicos que justificassem a sua indicação para o tratamento de afecções respiratórias. Assim, desde o início dos anos 90, são realizados testes farmacológicos visando à determinação das propriedades terapêuticas desta planta. Através de ensaios pré-clínicos, foram comprovadas as atividades broncodilatadora, analgésica, antiinflamatória do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *A. cearensis*, o qual demonstrou ser isento de toxicidade, em doses terapêuticas, garantindo eficácia e segurança ao seu uso no tratamento de asma, bronquite, gripes e resfriados (LEAL et al., 1997 e 2003).

Ao passo que se avançavam as pesquisas farmacológicas, paralelamente, surgiu a necessidade de se conhecer melhor a química desta espécie, até então limitada à cumarina,

isocampferídio e alguns poucos compostos químicos (3,4-dimetoxi-cinamato de metila, afrormosina, 7-hidroxi-8,4'-dimetoxi-isoflavona, 24-metilenocicloartanol, β -sitosterol e 6-hidroxi-cumarina), sendo a primeira apontada *a priori* como única responsável pelas propriedades biológicas descritas (BASTOS, 1983).

Deste modo, a fim de se descobrir os supostos princípios ativos de *A. cearensis*, foi proposta a realização de um estudo químico, concomitante aos ensaios farmacológicos, visando o isolamento, purificação e a caracterização estrutural de substâncias químicas presentes na casca do caule e sementes, devido ao emprego medicinal destas partes botânicas. A casca do caule, coletada no município de Quixeramobim-CE, e as sementes, adquiridas no comércio de Fortaleza-CE foram pulverizadas e submetidas à extração com etanol, separadamente. Cromatografias convencional, gel de sílica ou dextrana, e moderna (HPLC-fase reversa), foram adotadas para o isolamento e purificação das substâncias, sendo suas estruturas químicas elucidadas por métodos físicos (ponto de fusão e rotação óptica) e espectrométricos (Espectroscopia na região do Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massa), além de comparação com dados da literatura.

A investigação química da casca do caule de *A. cearensis* resultou no isolamento de 7 substâncias: amburosídio A, protocatecuato de 6-cumarila, ácido vanílico, quercetina, formononetina, e os biflavonóides amburanina A e B. A prospecção das sementes revelou a presença de 9 substâncias: 6-hidroxi-cumarina, ácido (*E*)-*o*-cumárico, ácido vanílico, e seis amburosídeos (C-H), acetato de 6''-amburosila, protocatecuato de 6''-amburosila, ferulato de 6''-amburosila, galato de 6''-amburosila, vanilato de 6''-amburosila e sinapato de 6''-amburosila.

A abundante ocorrência de flavonóides descrita para *A. cearensis* motivou a realização de um levantamento bibliográfico sobre a ocorrência botânica, tipos estruturais e atividades biológicas exibidas por biflavonóides. Esta revisão propiciou ainda a construção de um banco de dados de RMN ^{13}C de biflavonóides, representando uma atualização do livro "Carbon-13 of Flavonoids"- (Autor: AGRAWAL, P.K. Editora: Elsevier. Ano: 1989), principal fonte de consulta de dados espectroscópicos desta classe química.

O êxito alcançado nas pesquisas químicas e farmacológicas do extrato de *A. cearensis* e seus constituintes intensificou o uso medicinal desta planta, tanto a nível caseiro como pela produção de seu fitoterápico, em escala industrial (**Fig. 1, p. 4**). Esta crescente

demanda no emprego da casca do caule de *A. cearensis* tem provocado uma séria ameaça para a existência da espécie num futuro não muito distante, visto que a mesma já é classificada como espécie em perigo de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000 *apud* RAMOS et al., 2004).

A fim de evitar possíveis conseqüências nefastas do extrativismo predatório de *A. cearensis*, foi desenvolvido um projeto de pesquisa interdisciplinar Agronomia-Química-Farmacologia visando à proposição de um modelo de exploração racional e auto-sustentável de *A. cearensis*. Desta iniciativa surgiu a proposta de substituição da planta adulta silvestre por espécimens jovens, cultivados sob parâmetros agronômicos controlados, de forma a conciliar a preservação da espécie e o seu uso comercial, sobretudo pelo mercado farmacêutico. Além de que a produção de mudas poderia ser utilizada no reflorestamento de áreas degradadas. Faz-se mister salientar que a idéia da troca da planta silvestre pela cultivada foi inicialmente aventada pelo Prof. Francisco José de Abreu Matos, a exemplo do que foi idealizado para *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) no seu livro sobre implantação do programa Farmácias Vivas (MATOS, 2002).

Este estudo integrado e multidisciplinar, financiado pelo Banco do Nordeste, CNPq, CAPES e pela FUNCAP, constou de três fases:

Fase 1 (agronomia)- germinação de sementes e produção de plantas jovens, realizada pelo Prof. Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra, no Departamento de Fitotecnia-UFC.

Fase 2 (química)- no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, foram efetuados a preparação e fracionamento dos extratos etanólicos das plantas jovens; quantificação dos teores de substâncias químicas comuns aos extratos da planta silvestre e da planta cultivada (ácido protocatecuico, ácido vanílico, cumarina e amburosídio A); e isolamento e caracterização estrutural de substâncias presentes nos extratos das plantas jovens: amburanina B, isocampferídio, aiapina, amburosídio B, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado e o seu estereoisômero ácido (*Z*)-*o*-cumárico glicosilado.

Fase 3 (farmacologia)- avaliação farmacológica comparativa entre o extrato da planta silvestre e os extratos das plantas cultivadas em diferentes estágios de crescimento, realizada pela Prof^a. Luzia Kalyne de Almeida Moreira Leal, no Departamento de Farmacologia-UFC.

Em virtude da falta de padronização crônica dos fitoterápicos nacionais, a pesquisa contemplou ainda o desenvolvimento de um método de análise química qualitativa e quantitativa para extratos e produtos comerciais de *A. cearensis*, como mecanismo de garantia de qualidade e atoxicidade dos mesmos, em doses terapêuticas.

Além disso, *A. cearensis* teve seu potencial bio-herbicida investigado num ensaio de inibição da germinação de alface, efetuado pelo Prof. Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra. O extrato aquoso das sementes, dotado de atividade alelopática, foi quimicamente caracterizado (BEZERRA et al., 2001).

O presente trabalho, confeccionado segundo as normas preconizadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), é composto por onze capítulos: **Introdução** (cap. I), **Considerações Botânicas- Família Leguminosae Papilionoideae e a Espécie *A. cearensis*** (cap. II), **Revisão Bibliográfica- Biflavonóides** (cap. III), **Validação de Metodologia Analítica** (cap. IV), **Resultados e Discussão: Determinação Estrutural** (cap V), **Proposta Biogenética de Formação das Substâncias Isoladas** (cap. VI), **Validação de Método Cromatográfico** (cap VII), **Breve Abordagem Farmacológica do Estudo Interdisciplinar de *A. cearensis*** (cap. VIII) e **Atividade Alelopática** (cap. IX), **Parte Experimental** (cap. X) e **Conclusão** (cap. XI).



Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira

Figura 1- Fotos digitais das formas exploradas comercialmente de *A. cearensis*, com fins medicinais: casca (à dir.) e xarope (à esq.)

OBJETIVOS DO ESTUDO QUÍMICO DE *A. CEARENSIS*

- Continuação do estudo fitoquímico das cascas do caule e sementes;
- Avaliação química comparativa dos extratos etanólicos de *A. cearensis* (planta silvestre e cultivada);
- Validação de método cromatográfico para doseamento de 4 constituintes de extratos de *A. cearensis*;
- Análise quantitativa e caracterização química dos extratos de plantas jovens farmacologicamente ativos.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, F. W. B.; RODRIGUES, S.; NASCIMENTO, R. F.; CASIMIRO, A. R. S. Phenolic compounds in imburana (*Amburana cearensis*) powder extracts. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 221, p. 739-745, 2005.
- BASTOS, C. R. V. Contribuição ao conhecimento químico de *Torresea cearensis* (Fr. All.) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 1983.
- BEZERRA, A. M. E.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; FREITAS, J. B. S.; MEDEIROS-FILHO, S. Efeito do extrato aquoso das sementes de cumaru na germinação de alface. **Hortic. Bras.**, v. 19, n. 2, p. 243, 2001.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA, 1994, 640 p.
- HILTON-TAYLOR, C. **2000 IUCN Red List of Threatned Species**. IUCN, Cambridge-UK, 2000.
- LEAL, L. K. A. M.; MATOS, M. E.; MATOS, F. J. A.; RIBEIRO, R. A.; FERREIRA, F. V.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v. 4, n. 3, p. 221-227, 1997.
- LEAL, L. K. A. M.; OLIVEIRA, F. G.; FONTENELE, J. B.; FERREIRA, M. A. D.; VIANA, G. S. B. Toxicological study of hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmac. Biol.**, v. 41, n. 4, p. 308-314, 2003.
- MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Editora, 2004. 413 p.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4ª ed., Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267 p.
- RAMOS, K. M. O.; FELFILI, J. M.; FAGG, C. W.; SOUSA-SILVA, J. C.; FRANCO, A. C. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (All.) A. C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta. Bot. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 351-358, 2004.

II. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1. Considerações botânicas sobre a família Leguminosae papilionoideae (Fabaceae)

A família Leguminosae, também denominada Fabaceae, é caracterizada pelo fruto na forma de vagem, sendo composta por cerca de 740 gêneros inseridos em três subfamílias, facilmente distinguíveis por caracteres vegetativos:

- Mimosoideae- apresenta folhas bipinadas e glândulas, suas flores são actinomórficas;
- Caesalpinoideae- apresenta folhas paripinadas, sem glândulas, suas flores são variáveis;
- Papilionoideae- apresenta folhas imparipinadas e flores zigomórficas

Leguminosae Papilionoideae é a mais numerosa das subfamílias, detendo aproximadamente 500 gêneros e mais de 10.000 espécies divididas em 31 tribos. Seus representantes estão distribuídos em todo o globo terrestre, majoritariamente nos trópicos americanos e africanos (RIBEIRO et al., 1999). Esta subfamília é tida como a mais evoluída, sendo ainda caracterizada pela prefloração imbricado-descendente da corola e a posição infletida do eixo radícula-hipocótilo, em relação aos cotilédones (BARROSO, 1991). As espécies apresentam folhas compostas, alternas, raramente opostas (somente *Platymiscium e Taralea*), com um pulvino na base do pecíolo e um pulvínulo para cada folíolo. Geralmente, apresentam estípulas na base das folhas e estipelas entre os folíolos. Os folíolos podem ser opostos, subopostos ou alternos de margem inteira. Possuem um folíolo terminal, isto é, são imparipinadas. Exsudação vermelha é comum, mas rara nas outras duas subfamílias (RIBEIRO et al., 1999).

A inflorescência pode ser racemo ou panícula, normalmente portando brácteas e bractéolas. As flores são bissexuais, zigomórficas, com cinco sépalas unidas (RIBEIRO, 1999). A corola possui de uma a cinco pétalas livres, formando um arranjo papilionáceo, ou seja, semelhante a uma borboleta, sendo considerado o tipo mais evoluído. Há uma pétala superior chamada de estandarte ou vexilo, o qual pode ser oblongo, reniforme ou orbicular. As pétalas laterais são denominadas alas e as inferiores são as carenas (BARROSO, 1991).

As flores típicas são lilases e bem vistosas à luz ultravioleta, são providas de néctar e pólen como recompensa para os visitantes. Há um só carpelo, o ovário é súpero, podendo haver mais de um óvulo.

Por tratar-se de uma leguminosa, o fruto é uma vagem com uma ou mais sementes, podendo ser deiscente ou não. A superfície pode ser glabra ou pubescente, até urticante. O fruto pode ser espesso ou achatado, seco ou carnosos, sendo, às vezes, alado.

As sementes e frutos de muitos gêneros são fontes nutricionais ricas em carboidratos, proteínas e vitaminas, como é caso do feijão, da soja e da ervilha. As madeiras de espécies de *Dipteryx*, *Hymenolobium* e *Dalbergia* são empregadas na construção civil e na marcenaria (RIBEIRO et al., 1999).

2.2. Considerações botânicas sobre *Amburana cearensis* A.C. Smith

O táxon *Amburana* é formado por apenas duas espécies, *A. acreana* Ducke e *A. cearensis* A.C. Smith, as quais possuem grande importância econômica e medicinal. Enquanto que a primeira espécie apresenta-se na forma arborescente de alto fuste, ocorrendo em matas altas e fechadas, *A. cearensis* assume a forma arbustiva de fuste curto, predominando em formações vegetais tropicais a subtropicais secas (CARVALHO, 1994).

Nativa do sertão nordestino, *A. cearensis* é encontrada ainda nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Tocantins e da Região Centro-Oeste. Contudo, a outra espécie do gênero, *A. acreana*, tem sua distribuição restrita ao sudoeste da floresta amazônica (Rondônia, Acre e Amazonas) (LORENZI, 1992). Há registros de sua ocorrência em outros países: Argentina (norte), Bolívia (sul), Paraguai e Peru (nordeste) (LEITE, 2005). A figura 2 mostra o mapa de distribuição da espécie na América do Sul (**Fig 2, p. 8**).

De acordo com Pio Corrêa (1984), *A. cearensis* pode ser descrita como:

Árvore regular, até 15 m de altura e 50 cm de diâmetro; casca grossa, suberosa, gordurosa, aromática, vermelho-pardacenta e que se desprende em finas lâminas; ramos novos cilíndricos; folhas alternas, irregularmente pinadas, composta de 11-15 folíolos alternos, peciolados, ovados, arredondados no ápice e na base, inteiros, nervura dorsal saliente; flores brancas ou branco-amareladas, ou amarelo-pálido, aromáticas, pequenas, dispostas em racimos axilares, multiflorida; ovário longo-estipitado; fruto vagem achatada, escura, quase preta, contendo uma semente alada e rugosa. Fornece madeira de alburno branco-acinzentado e cerne amarelo-castanho, normalmente avermelhado e com tons verde-azeitona, assetinada, raios e poros fracamente visíveis.

Carvalho (1994) descreve *A. cearensis* como árvore caducifolia que demonstra certas particularidades dependendo do habitat. Na Caatinga, seu porte é de 3-10 m de altura e a copa é achatada e curta, todavia na Floresta Pluvial Tropical, esta planta pode atingir até 40 m, sendo sua copa alta, larga e umbeliforme (**Fig 3, p. 10**).

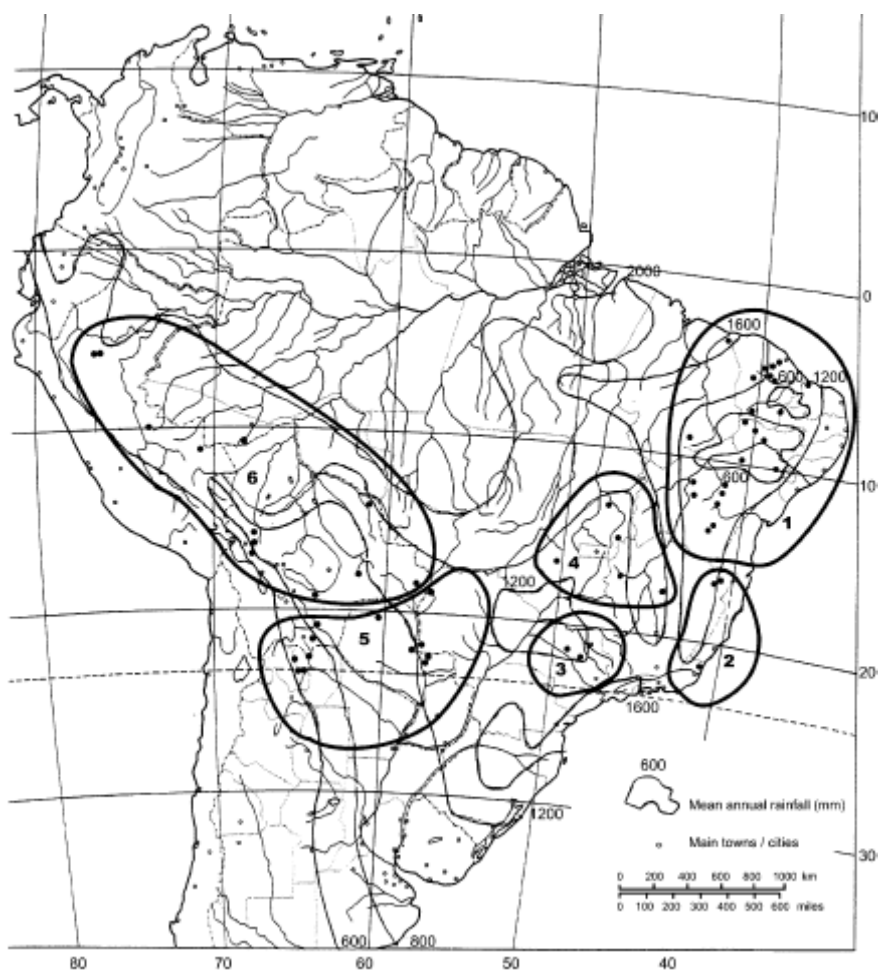


Figura 2– Mapa de distribuição de espécimens de *A. cearensis* na América do Sul: **1.** Nordeste (BRA); **2.** Sudeste (BRA); **3 e 4.** Centro-Sul (BRA); **5.** Oeste (BRA, ARG e PAR) e **6.** Oeste (BRA, BOL e PER). (LEITE, 2005).

A. cearensis recebe diferentes designações populares em diversas localidades: ambaurana (SP), baru (SE), cumaru-do-ceará, cumaru-das-caatingas (MG), imburana-de-cheiro (CE, BA, PE, RN e SE), louro-ingá, umburana (BA, RN), angelim (MS), cerejeira-rajada, cumaré (CE, BA, PE, RN e PB), roble criollo (ARG), tumi (BOL) e palo trébol (PAR). (CARVALHO, 1994).

No Nordeste, o período de floração de *A. cearensis* ocorre no início da estação seca, entre maio e julho, e a frutificação se dá de agosto a outubro, após a perda de suas folhas (MAIA, 2004) (**Fig 4, p. 10**). A floração e a frutificação são observadas após 10 anos de plantio. No Brasil, os espécimens são encontrados numa faixa de altitude entre 20-800 m, em regiões nas quais o índice pluviométrico e a temperatura média anual podem variar de 500-1700 mm e 19-29 °C, respectivamente. Mesmo sendo uma espécie heliófila, *A. cearensis*

crece favoravelmente em níveis de sombra acima de 56%, em sua fase inicial de desenvolvimento (CARVALHO, 1994).

As plântulas de *A. cearensis* desenvolvem uma hipertrofia subterrânea, denominada xilopódio, que contribui para reserva de água e nutrientes necessários para o desenvolvimento da espécie, nos primeiros anos de vida (LIMA, 1989). Cunha e Ferreira (2003) confirmam que a tuberosidade da raiz constitui-se numa estratégia adaptativa, a qual dota a planta de um alto poder de rebrotamento, em caso de dano à parte aérea. O xilopódio apresenta-se carnoso, napiforme e de coloração vermelha. Aos 9 meses, o tubérculo atinge 3 cm de diâmetro e emite numerosas raízes fibrosas, longas e finas (CARVALHO, 1994) (**Fig. 5, p. 11**).

A. cearensis é frequentemente confundida com a espécie *Dipteryx odorata* devido à denominação popular comum cumaru, além de ser equivocadamente classificada como pertencente aos gêneros *Pterodon* ou *Stryphnodendron* (PIO CORRÊA, 1984). Já o termo imburana costuma provocar iguais equívocos na identificação, por se referir também à *Commiphora leptophloeos* (Burseraceae), conhecida comumente como imburana-de-espinho (MAIA, 2004) (**Fig. 6, p. 11**).



Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira

Figura 3- Fotos digitais de diferentes partes de *A. cearensis*: (A) sementes, (B e C) flores, (D e E) frutos, (F) galhos.



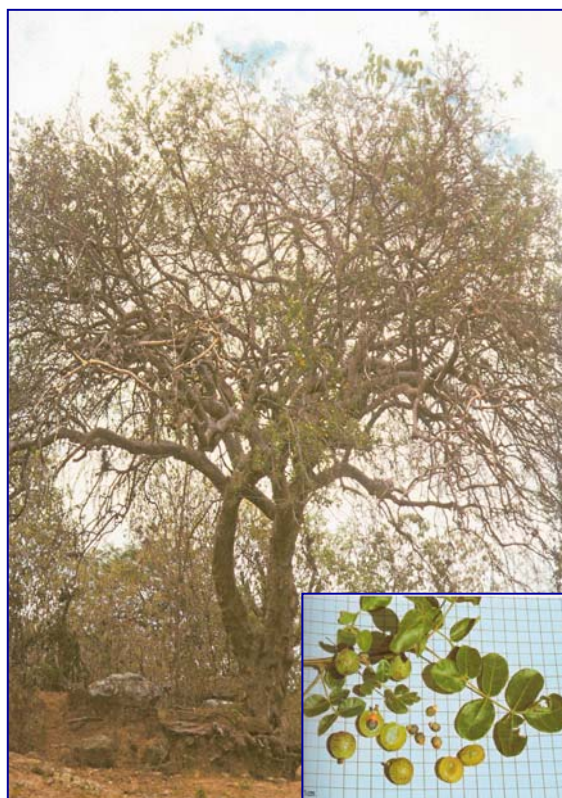
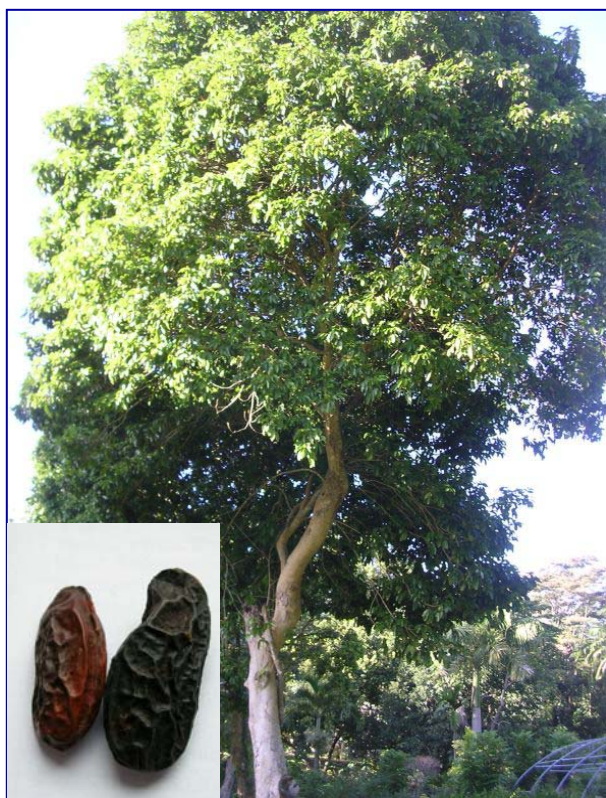
Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira

Figura 4- Fotos digitais de um espécimem adulto silvestre de *A. cearensis*: estação chuvosa (à esq.) e período de estiagem (à dir.)



Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira

Figura 5- Fotos digitais de *A. cearensis* cultivada: canteiro (à esq.) e espécimens colhidos aos 6 meses de desenvolvimento (à dir.)



Extraído de MAIA, 2004

Figura 6- Fotos de *Dipterix odorata* (à esq.) e *Commiphora leptophloeos* (à dir.).

REFERÊNCIAS

- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária-Universidade Federal de Viçosa, v. 3, 1991.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA, 1994.
- CUNHA, M. C. L.; FERREIRA, R. A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* A.C. Smith - Cumaru - Leguminosae Papilionoideae. **Rev. Bras. Sementes**, v. 25, n. 2, p. 89-96, 2003.
- LEITE, E. J. State-of-knowledge of *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A. C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. **J. Nat. Conservat.**, v. 13, p. 49-65, 2005.
- LIMA, D. A. **Plantas das caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. 243 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992.
- MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Editora, 2004. 413 p.
- PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 816 p.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III. BIFLAVONÓIDES

3.1. Características fundamentais e Relevância

Os flavonóides figuram entre as classes de substâncias químicas de maior ocorrência botânica, sendo contabilizados em números superiores a seis mil exemplares (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Sua estrutura química é facilmente reconhecida pela presença de um esqueleto aromático C₆-C₃-C₆, um anel cromano (anel benzênico-A + anel heteronuclear-C) ligado a um anel benzênico (anel B) (ROBBERS et al., 1997). Fisicamente, apresentam-se geralmente como sólidos amarelos, justificando o emprego do termo grego *flavus*, porém são encontrados também com coloração vermelha, azul e até mesmo incolor (SIMÕES et al., 1999).

Biossinteticamente, os flavonóides são obtidos pela convergência de duas vias biogênicas formadas a partir da acetil-CoA e do ácido chiquímico, as quais geram respectivamente as duas unidades fundamentais para a origem dos flavonóides: malonil-CoA (3 moléculas) e *p*-cumaroil-CoA (ROBBERS et al., 1997).

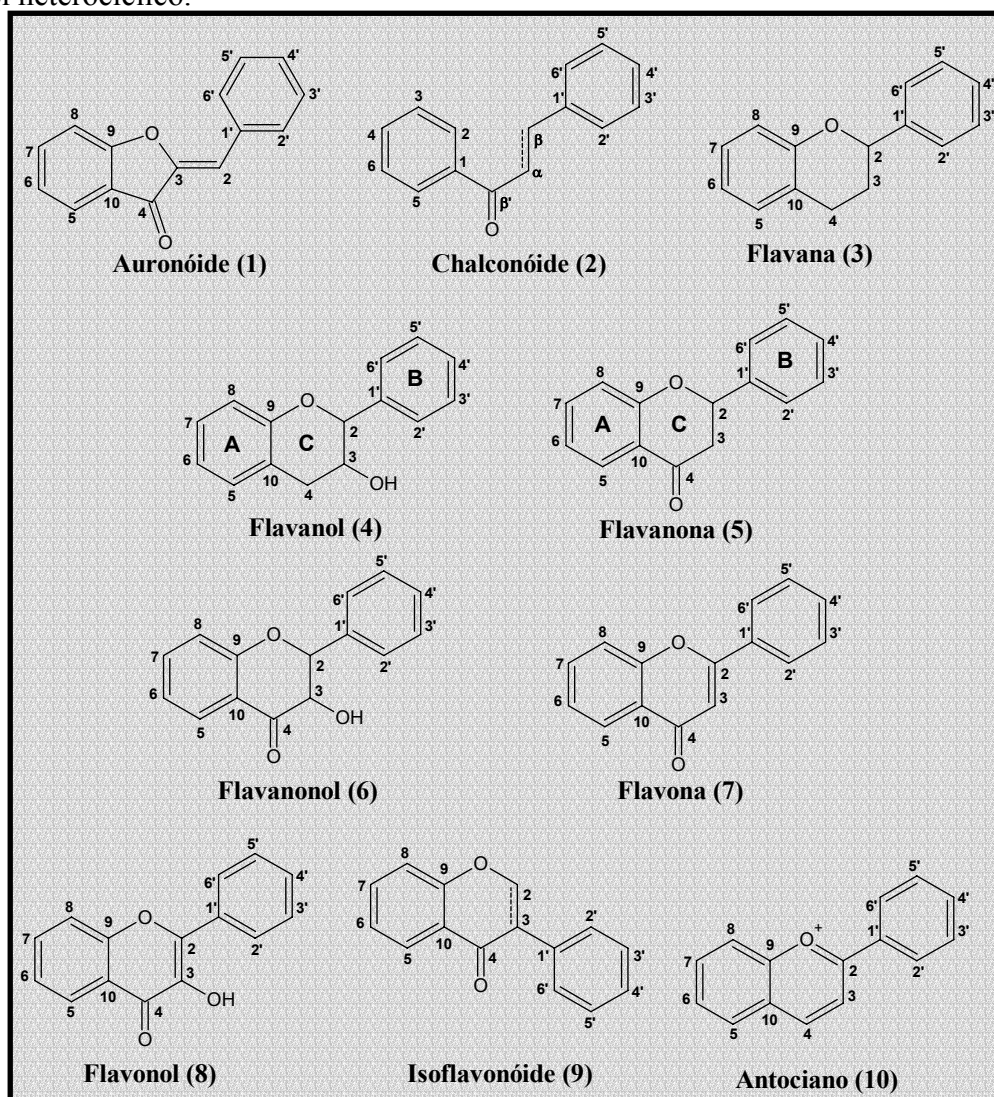
Nas plantas, os flavonóides assumem importantes papéis fisiológicos como: defesa contra insetos e microorganismos, proteção contra raios ultravioleta, ação alelopática, inibição de enzimas e atração de agentes polinizadores, entre outros (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Sob o ponto de vista econômico, os flavonóides despertam grande interesse comercial por parte das indústrias alimentícias, corantes e sobretudo farmacêutica, devido às suas comprovadas atividades farmacológicas: antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, etc (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

As inúmeras possibilidades de arranjos estruturais, em virtude dos diferentes padrões de oxigenação, metilação, glicosilação e dimerização dos flavonóides resultam numa gama elevada de compostos flavonoídicos, os quais podem ser classificados nas seguintes categorias: aurona, chalcona, flavana, flavanol, flavanona, flavanonol, flavona, flavonol, isoflavona e antociano (**Quadro 1, p. 14**).

1. Auronóide- composto derivado da 2-benzilidenocumaranona, o qual pode exibir estereoquímica (*E*) ou (*Z*).

2. **Chalconóide**- composto formado pelo núcleo fundamental 1,3-diarilpropano, o qual pode ser carbonilado, olefínico ou hidroxilado.
3. **Flavana**-estrutura química contendo uma fenila ligada ao anel benzopirano, na posição 2.
4. **Flavanol**- flavana hidroxilada na posição 3.
5. **Flavanona** (di-hidro-flavona)- flavonóide cetônico com carbonila na posição 4.
6. **Flavanonol** (di-hidro-flavanol)- flavanona hidroxilada na posição 3.
7. **Flavona**- anel heterocíclico com carbonila α,β -insaturada.
8. **Flavonol**- flavona hidroxilada na posição 3.
9. **Isoflavonóide**- flavonóide portando a fenila posicionada no carbono 3.
10. **Antociano**- flavonóide catiônico, cuja carga positiva se encontra posicionada no oxigênio do anel heterocíclico.



Quadro 1- Esqueletos básicos das diferentes subclasses de flavonóides

Os biflavonóides são espécies diméricas formadas por monômeros idênticos ou distintos, os quais podem ainda ser mistos quanto à categoria das unidades e podem apresentar vários tipos de conectividades entre si. A possibilidade de atropisomerismo (estereoisomeria de eixo) entre os monômeros também contribui para a diversidade de estruturas biflavonoídicas (SIMÕES et al., 1999).

Estima-se que a quantidade de biflavonóides seja superior a duzentas substâncias, dispersas principalmente entre as plantas gimnospermas e angiospermas, das quais se destacam as famílias Guttiferae, Ochnaceae e Anacardiaceae. Entre os gêneros, os biflavonóides são abundantes nas espécies de *Selaginella* (Selaginellaceae), *Calycopteris* (Combretaceae), *Daphne* (Thymelaeaceae), *Lophira* e *Ochna* (Ochnaceae) (BARBOSA, 2003).

A nomenclatura dos biflavonóides é feita de modo análogo a dos flavonóides monoméricos, obedecendo a mesma ordem de numeração. No entanto, há duas possibilidades de denominação dos anéis aromáticos: na primeira, as unidades são referidas através de algarismos romanos (I e II), na segunda, a estrutura é subdividida em dois conjuntos de anéis (1- A, B e C; 2- D, E e F). As posições são diferenciadas apenas pelo acréscimo de linhas sobrescritas ('). Os carbonos 9 e 10 também podem ser chamados 8a e 4a, respectivamente (SIMÕES et al., 1999).

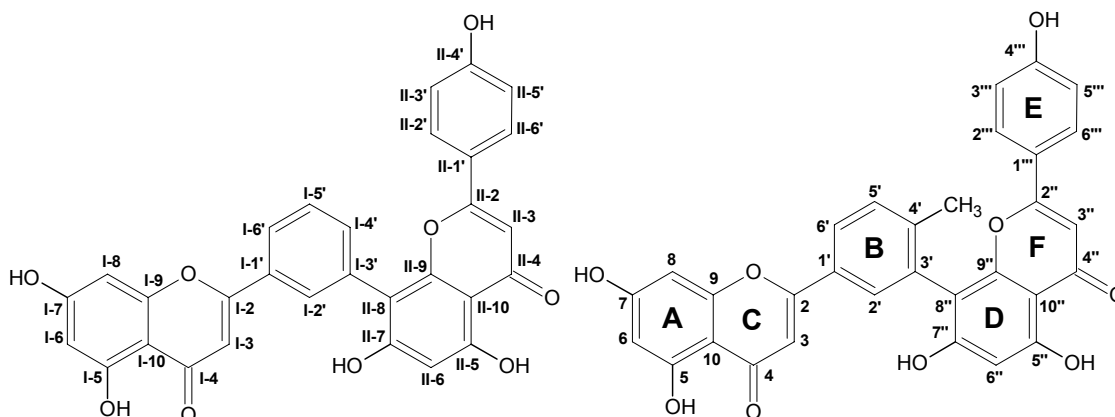


Figura 7- Estruturas químicas da biflavona amentoflavona, numeradas sob duas formas

Os biflavonóides são substâncias polares, solúveis em solventes hidrofílicos (metanol, DMSO, piridina), por isso suas metodologias de isolamento, em geral, requerem a aplicação de cromatografias de adsorção de fase reversa (octadecilsilano, ciano) e de exclusão (Sephadex LH-20) (SIMÕES et al., 1999).

3.2. Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C

Tendo em vista que o livro intitulado “Carbon-13 of Flavonoids” (AGRAWAL, 1989), uma das fontes bibliográficas mais completas de dados de RMN ¹³C de biflavonóides, encontrava-se bastante defasado quanto à descoberta de dezenas de novos exemplares da classe, foi efetuada uma minuciosa revisão bibliográfica de biflavonóides, visando uma atualização dos dados espectroscópicos de ¹³C das novas entidades químicas desta classe.

O *Scifinder*, uma base de dados que reúne informações registradas no *Chemical Abstracts*, foi a ferramenta de pesquisa empregada para catalogar os 188 biflavonóides naturais, de origem vegetal, descritos na literatura no período de 1988-2006, resultando num banco de dados cujos deslocamentos químicos estão localizados juntos aos respectivos carbonos, existentes em cada estrutura química. É válido ressaltar que, no levantamento, não constam biflavonóides inéditos cujos dados de RMN ¹³C não estavam disponibilizados nas publicações correspondentes ou ainda de títulos cuja aquisição tornou-se impraticável ou inacessível, em virtude da parca distribuição do periódico. Além disso, foram incluídos também biflavonóides conhecidos cujos dados não haviam sido descritos entre os 69 biflavonóides da referência supra-citada.

Na tabela 1 (p. 46), foram listados os números correspondentes às estruturas biflavonoídicas, as quais foram divididas em subclasses (**Quadro 1, p. 14**) e classificadas por tipo de conectividade, juntamente com o nome da espécie botânica da qual foi obtida a substância, a referência consultada e o solvente deuterado utilizado no experimento.

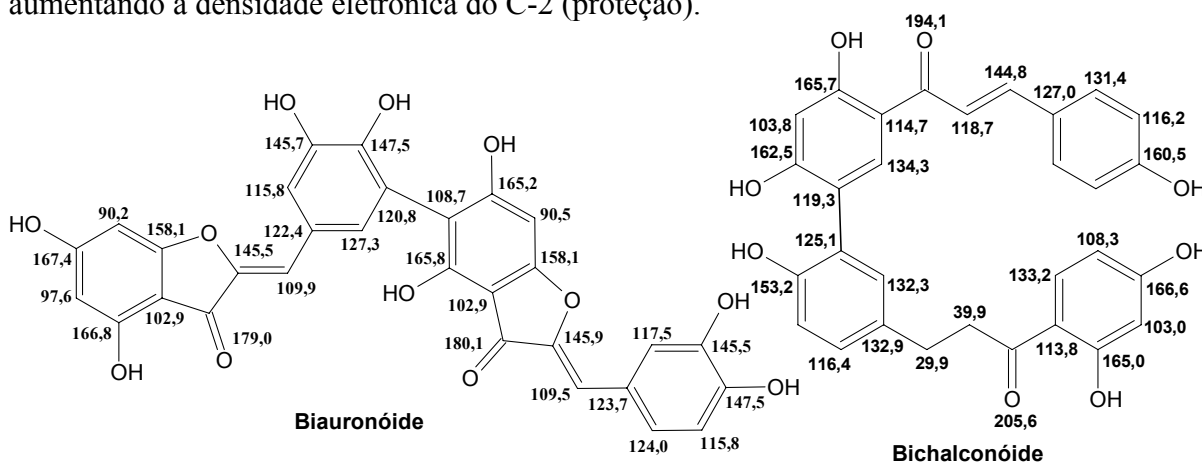
A seguir são apresentados os deslocamentos químicos de RMN ¹³C característicos de cada subclasse de flavonóides e comentados os possíveis efeitos de (des)blindagem que justificam os valores encontrados. Esta discussão foi baseada no livro “Carbon-13 of Flavonoids” (AGRAWAL, 1989)

3.2.1. Subclasses de biflavonóides

a. Auroa

A absorção da carbonila (C-4) é registrada geralmente entre δ 185-178. Os carbonos C-2 (monohidrogenado e exocíclico- δ_{C-2} 148-145) e C-3 (não-hidrogenado- δ_{C-3} 113-105) são carbonos olefínicos, os quais apresentam uma significativa diferença de deslocamento

químico devido à oxigenação do C-3 e à conjugação do oxigênio com a dupla-ligação, aumentando a densidade eletrônica do C-2 (proteção).

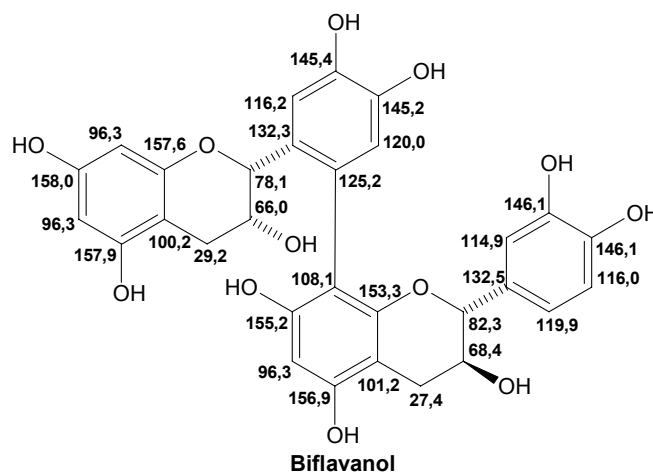
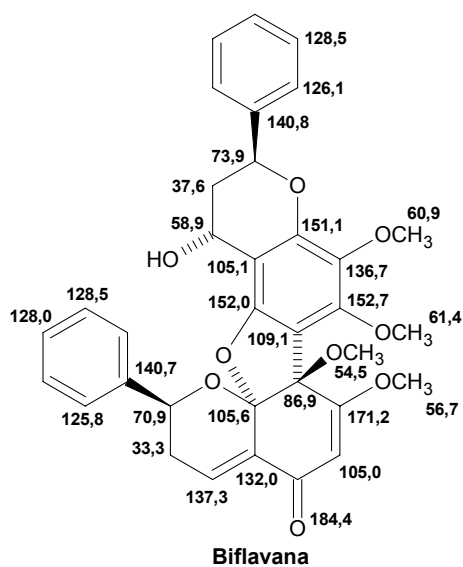


b. Chalcona

Todos os sinais de uma chalcona são observados entre δ 195-90, sendo a carbonila facilmente identificada pela absorção entre δ 195-187. O sinal do carbono C- β em δ 147-136 para um carbono sp^2 não-funcionalizado é justificado pelo efeito mesomérico retirador da carbonila. O sinal de C- α aparece em δ 129-116, como não é um valor de δ característico, sua atribuição é feita sob auxílio do espectro de HMBC. Nas di-hidrochalconas (chalcanona), a absorção da carbonila se dá em torno de δ 207-203, porque não ocorre blindagem da ligação dupla como ocorre nas chalconas. Os deslocamentos químicos dos carbonos C- α e C- β , ambos metilênicos, são observados numa região compatível com a de carbonos sp^3 : δ 47-39 e 32-29, respectivamente.

c. Flavana

O anel heteronuclear de uma flavana é desprovido de carbonila, logo os sinais associados aos carbonos C-2, C-3 e C-4 são todos de carbonos sp^3 (δ_{C-2} 79-74; δ_{C-3} 31-29 e δ_{C-4} 26-19). O efeito indutivo retirador do oxigênio, elemento entre os mais eletronegativos, justifica o maior deslocamento químico para C-2.

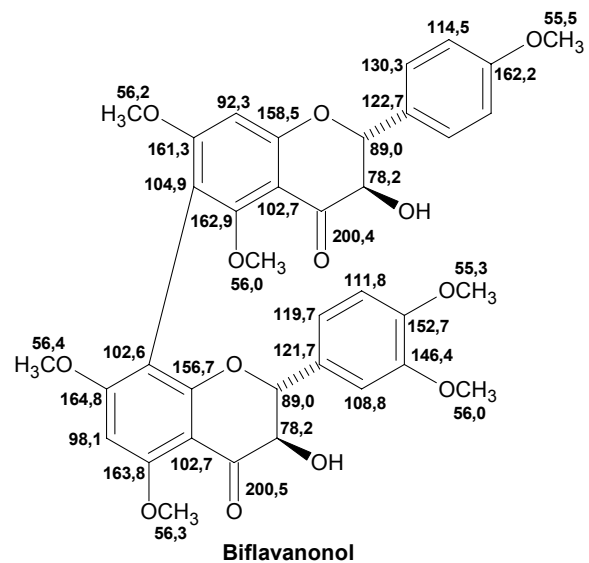
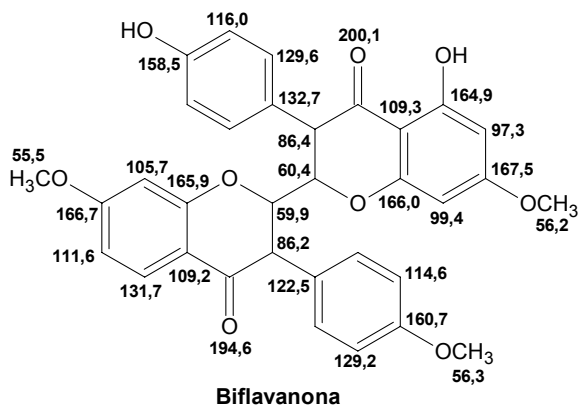


d. Flavanol

Em virtude de sua hidroxilação, o C-3 (δ 70-65) de um flavanol torna-se nitidamente desblindado, quando comparado ao carbono correlato de uma flavana. Contudo, seu deslocamento químico ainda mostra-se inferior ($\Delta\delta$ 12-15) ao exibido por C-2 (δ 82-77), em virtude deste último carbono, também monoxigenado, sofrer maior influência dos efeitos α e β de desproteção do anel B. O carbono metilênico (C-4) apresenta um sutil incremento no seu deslocamento químico (δ 33-24), em relação ao C-4 da flavana (δ 26-19), em razão do efeito β de desproteção da hidroxila.

e. Flavanona

Tendo em vista que as flavanonas possuem o anel C saturado e um grupo cetona postado na posição 4, os deslocamentos químicos característicos deste tipo de flavonóides são atribuídos ao carbono oximetínico (C-2: δ 80-71), ao carbono metilênico (C-3: δ 47-39), e à carbonila (C-4: δ 198-186). No entanto, a absorção de C-2 depende de substituintes presentes nas posições 2' e 6' (anel B). Sendo o anel B não substituído nestas posições, a absorção fica em torno de δ 79, enquanto que C-2' ou C-6' oxigenados, C-2 se torna mais blindado (δ 75) em razão de um efeito γ de proteção, exercido pelos oxigênios. A absorção da carbonila sofre forte desblindagem por uma hidroxila posicionada no C-5, devido à possibilidade de quelação.

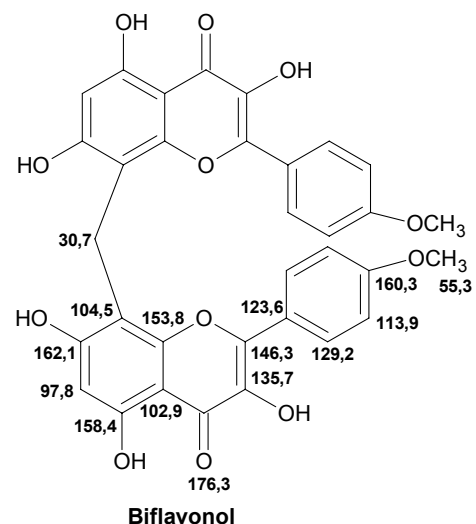
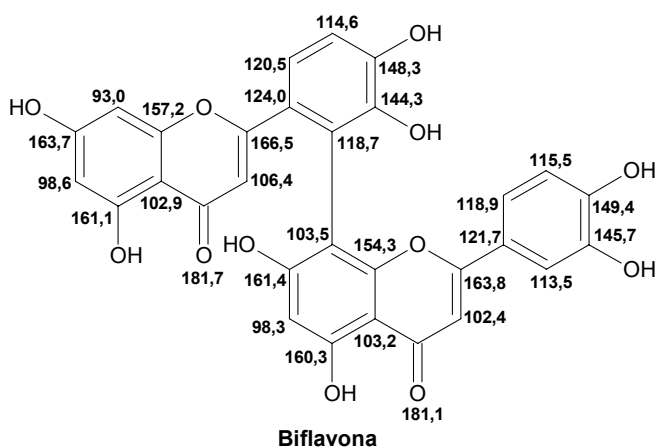


f. Flavanonol

A hidroxilação na posição 3 produz uma desblindagem no carbono C-3 ($\Delta\delta +30$), mas também no carbono C-2 ($\Delta\delta +5$), em relação a uma flavanona. O deslocamento químico da carbonila permanece praticamente inalterado.

g. Flavona

A dupla-ligação entre os carbonos C-2 e C-3 provoca um incremento significativo nos valores de deslocamento químico destes carbonos ($\Delta\delta +86$ e $+64$, respectivamente), quando comparados aos registrados para flavanona. C-3 apresenta absorção compatível com a de carbono sp^2 (δ 113-102), todavia C-2 em razão de ser oxigenado exibe maior desblindagem (δ 166-157). Como a carbonila se torna α,β -insaturada, percebe-se uma blindagem em relação ao C-4 de uma flavanona ($\Delta\delta -13$), atribuída ao efeito mesomérico doador, produzido pela conjugação com o enol-éter (C-4: δ 183-175).

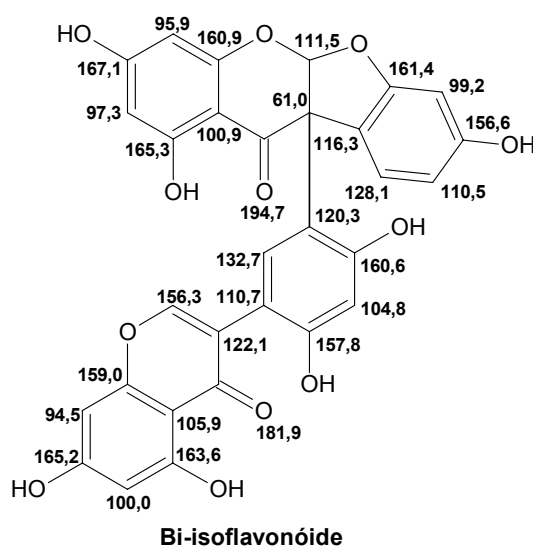


h. Flavonol

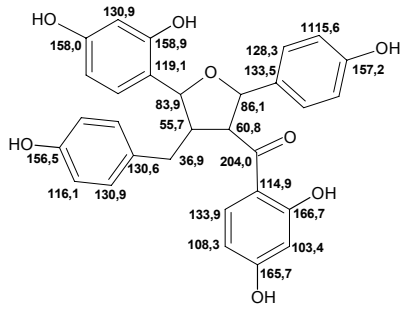
A introdução de uma hidroxila no carbono C-3 afeta sensivelmente as absorções de C-2 ($\Delta\delta+17$) e C-3 ($\Delta\delta+32$) e apenas levemente C-4 ($\Delta\delta+5$), em relação aos deslocamentos químicos observados para uma flavona. Entretanto, até mesmo no carbono C-9 observa-se o efeito da hidroxilação ($\Delta\delta-5$).

i. Isoflavona

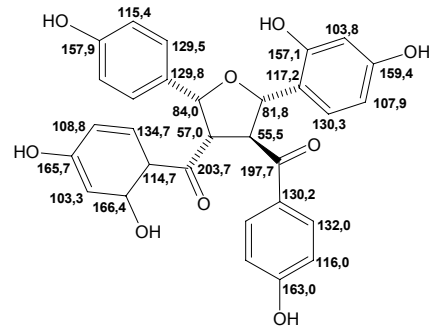
Os deslocamentos químicos dos carbonos C-2 e C-3 são particularmente afetados pela troca da posição de ligação da fenila: δ 155-150 e 126-122, respectivamente. Isto é, os carbonos sofrem efeitos opostos, ($\Delta\delta_{C_2} +10$ e $\Delta\delta_{C_3} -10$). A absorção da carbonila (C-4) não se altera (δ 181-174), a menos que exista uma hidroxila no carbono C-2', a qual pode provocar uma desblindagem ($\Delta\delta_{C_4} +3$), decorrente da possível formação de ponte de hidrogênio intramolecular entre a hidroxila e a carbonila. No entanto, a técnica de RMN ^{13}C -DEPT135 permite a identificação inequívoca de uma isoflavona através da exibição de um sinal em δ 155-150, associado a carbono sp^2 oxigenado e hidrogenado (C-2).



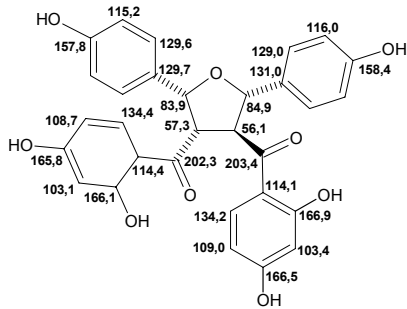
Bichalconóide



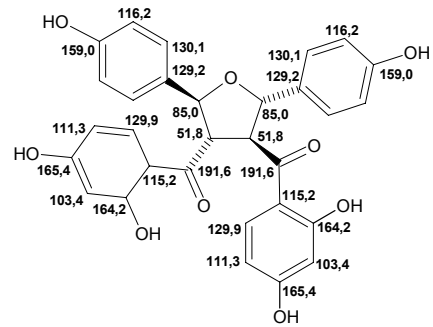
8



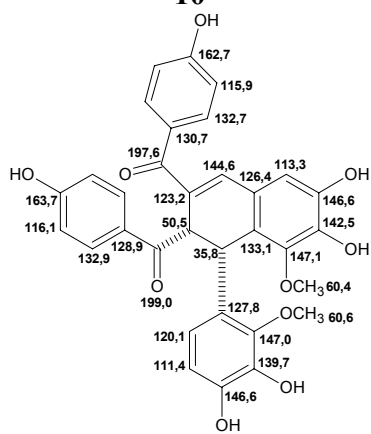
9



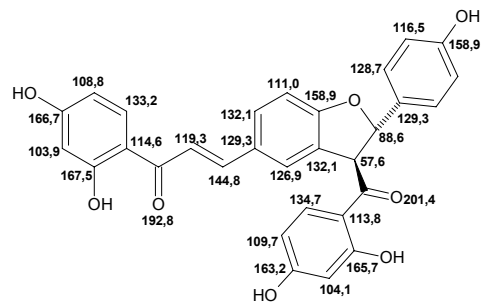
10



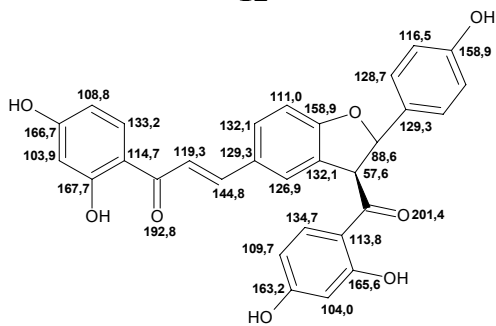
11



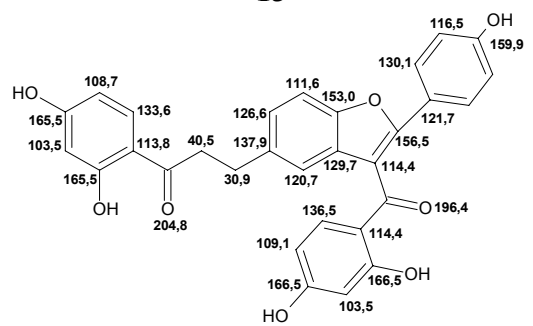
12



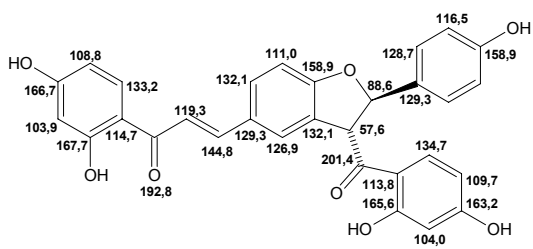
13



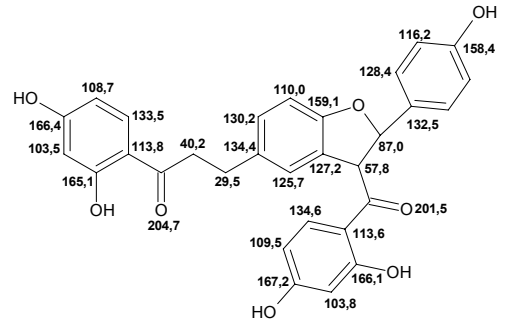
14



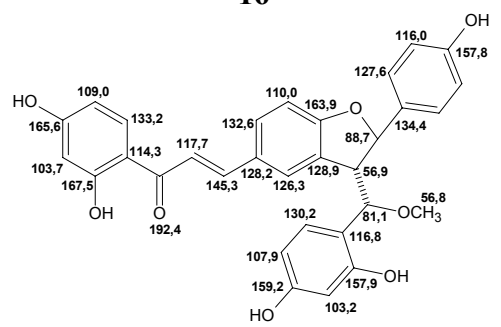
15



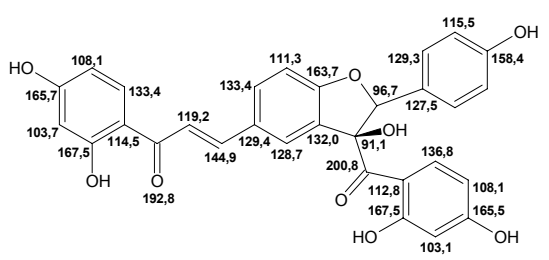
16



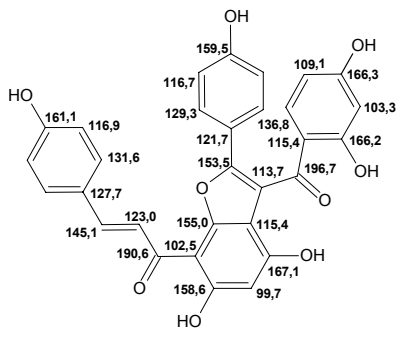
17



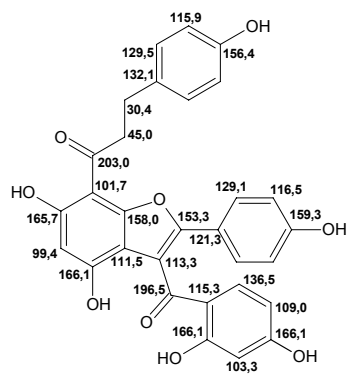
18



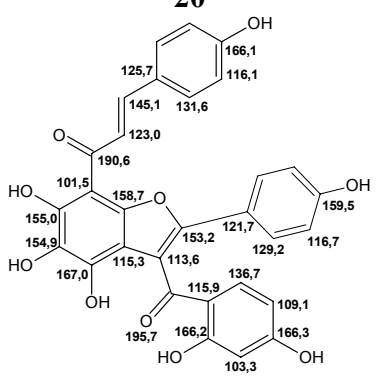
19



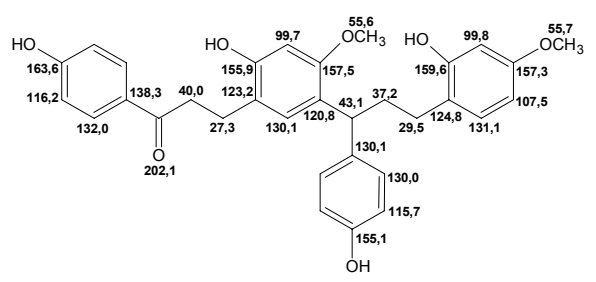
20



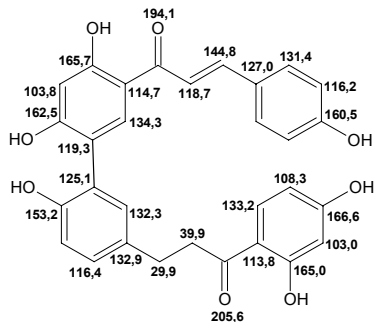
21



22

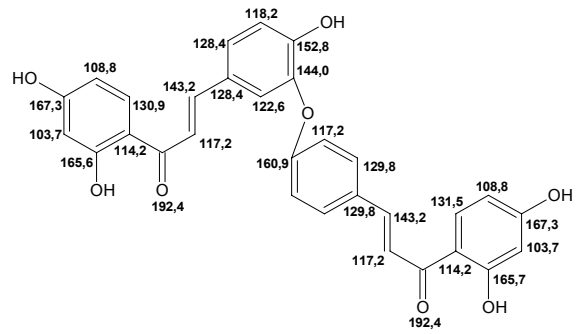


23

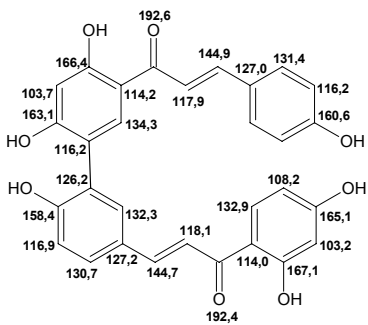


Bichalconóide

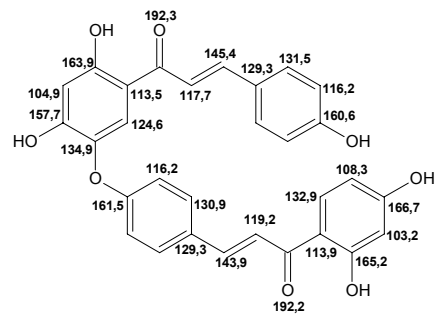
24



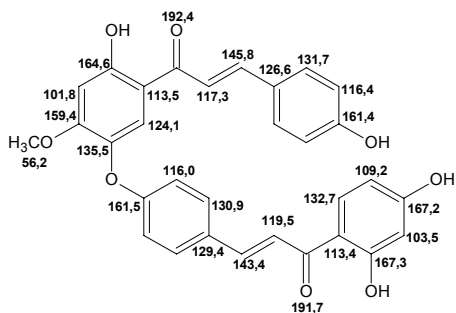
25



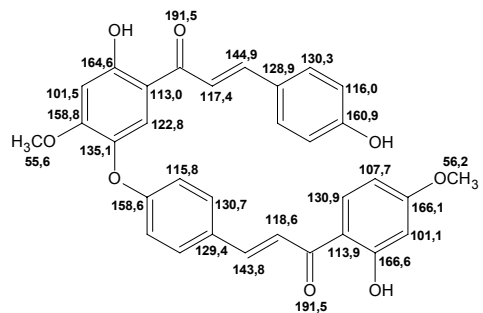
26



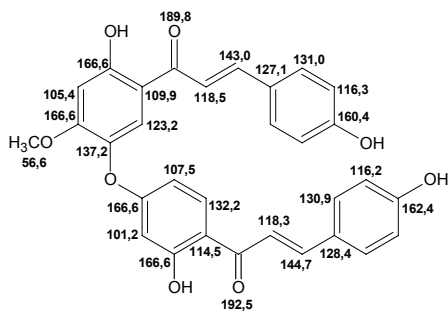
27



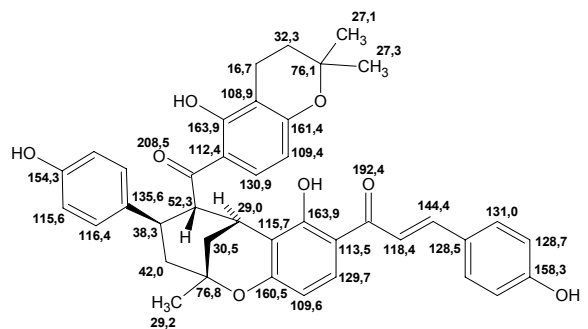
28



29

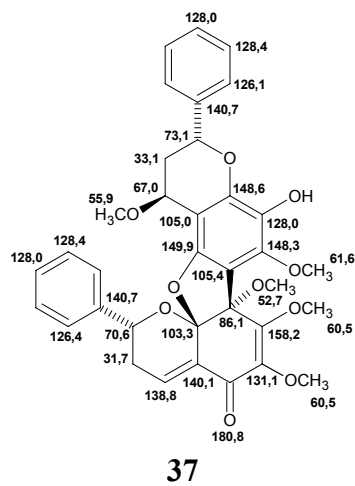
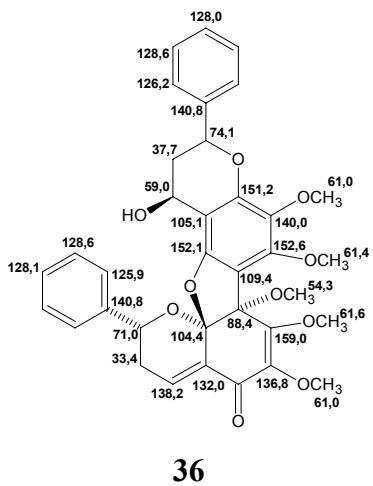
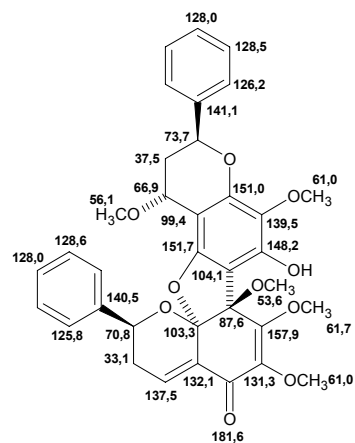
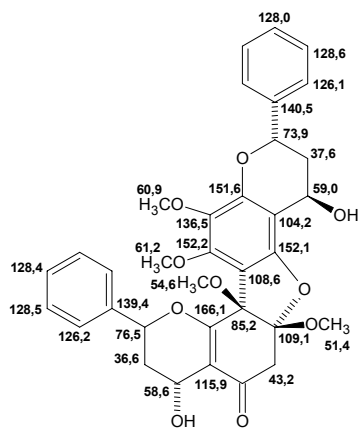
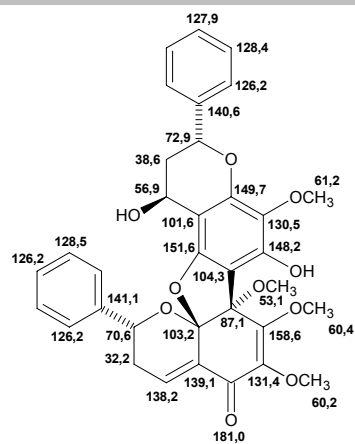
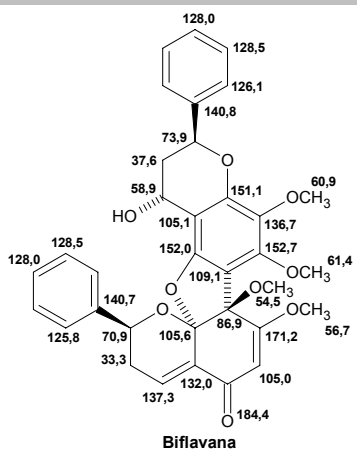


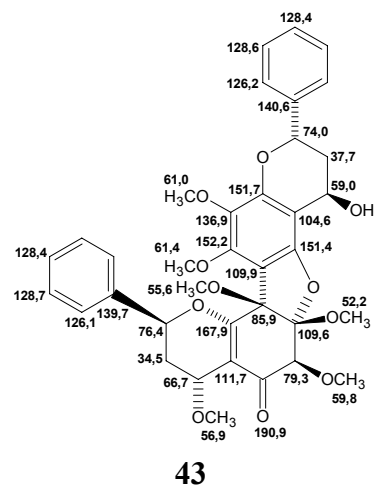
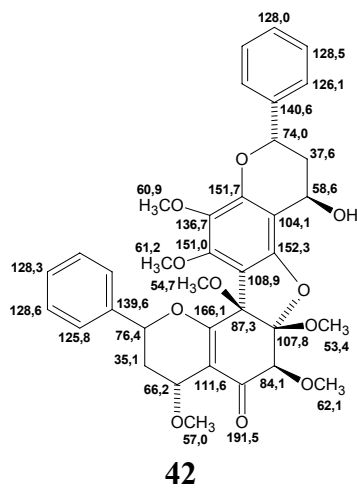
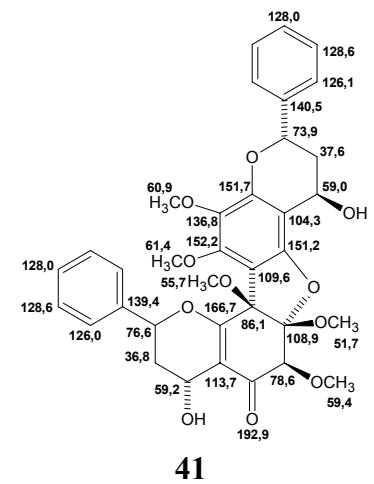
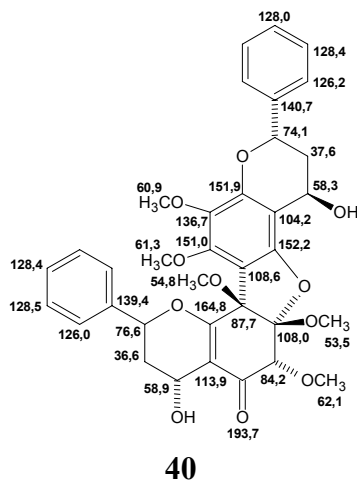
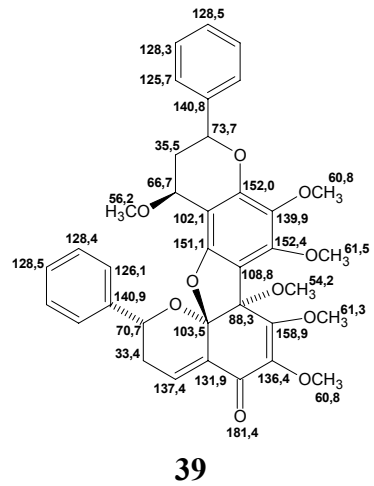
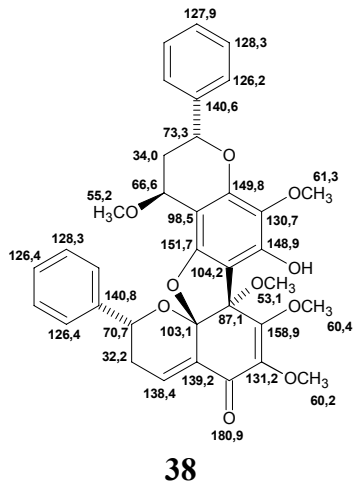
30

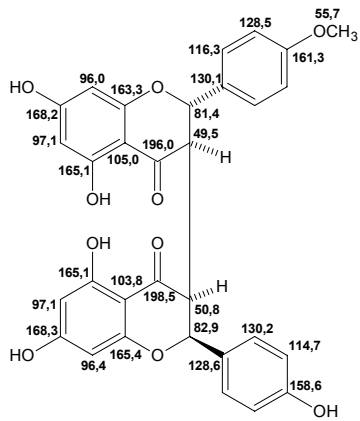


31

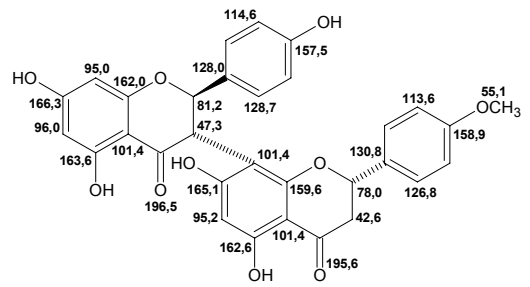
Biflavana



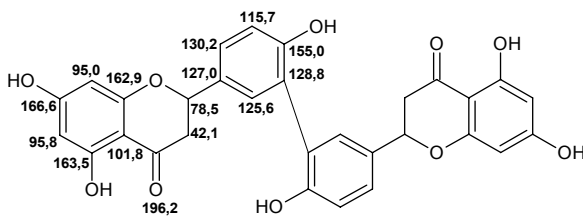




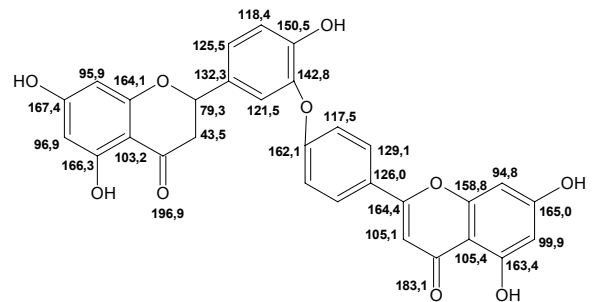
58



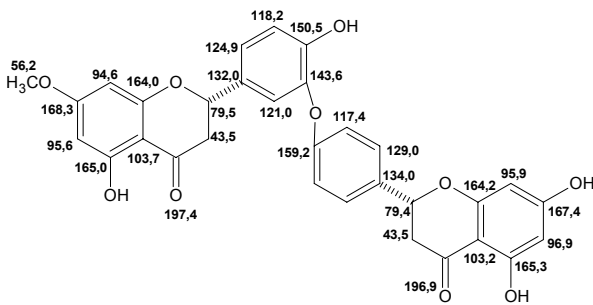
59



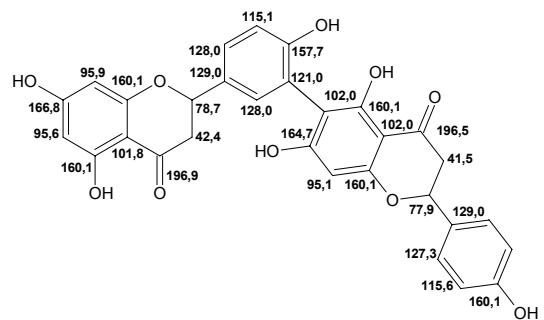
60



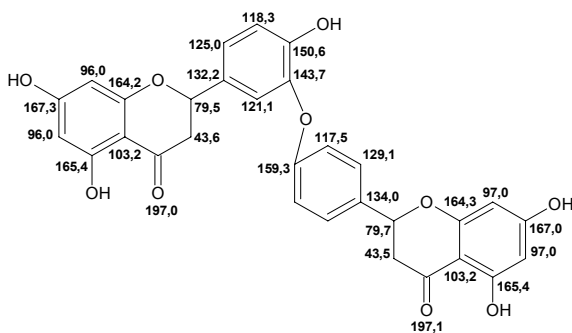
61



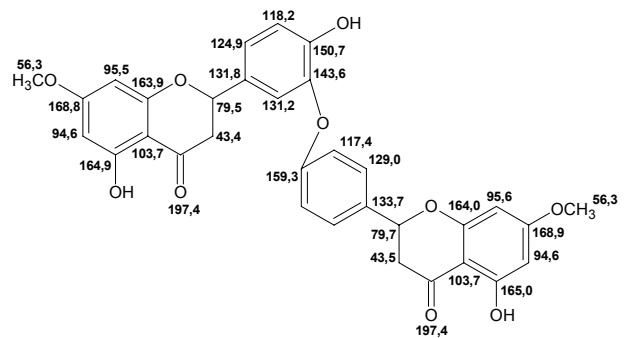
62



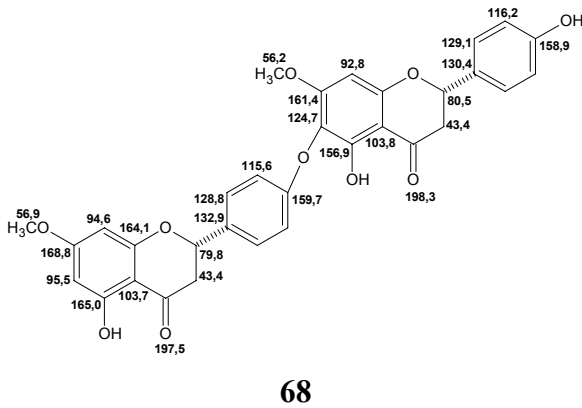
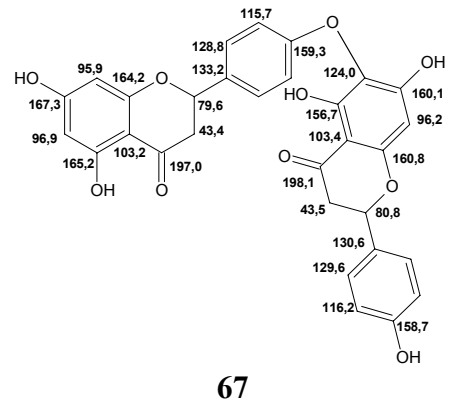
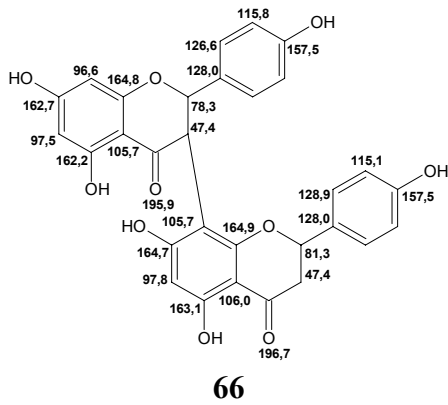
63



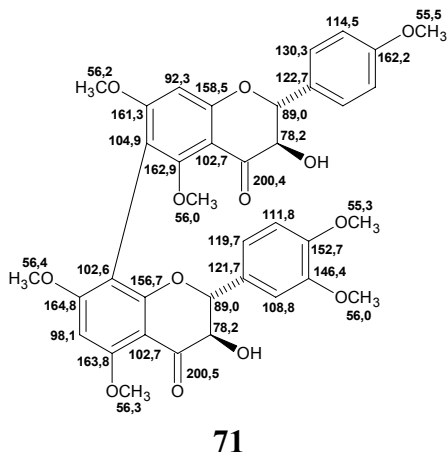
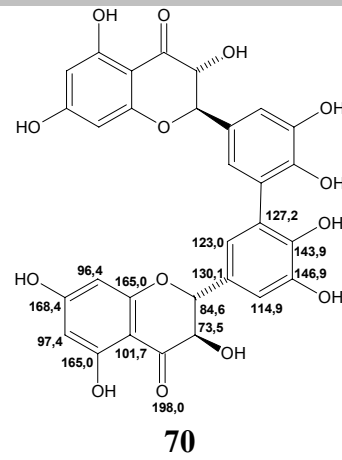
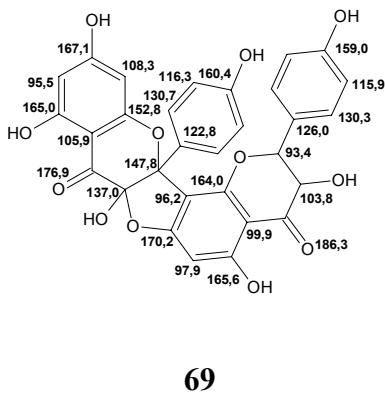
64



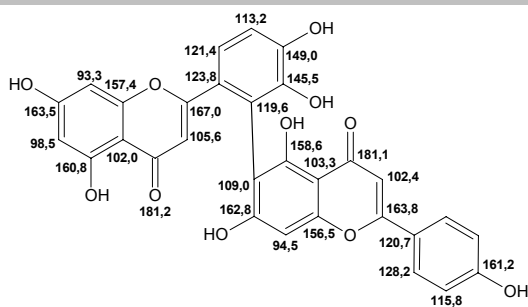
65



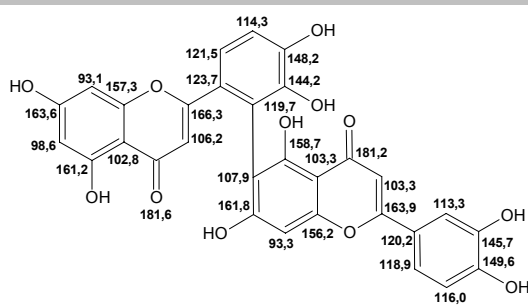
Biflavanonol



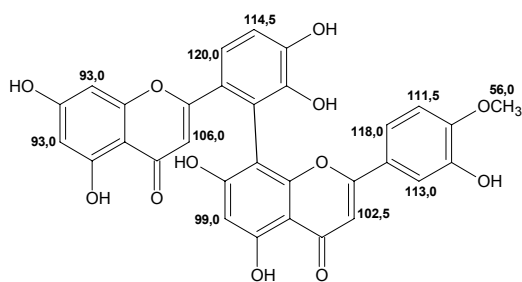
Biflavona



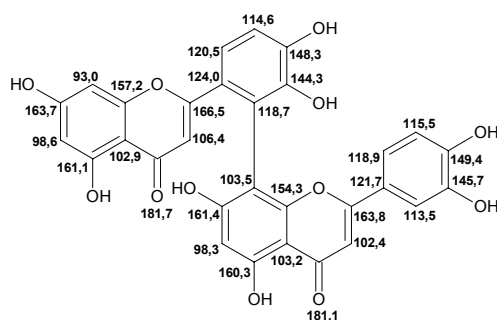
72



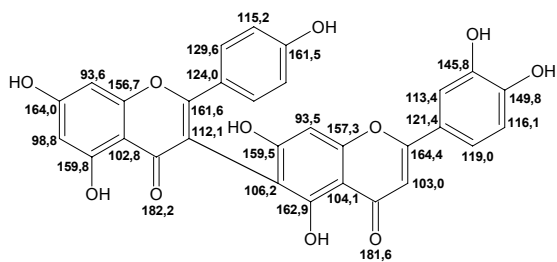
73



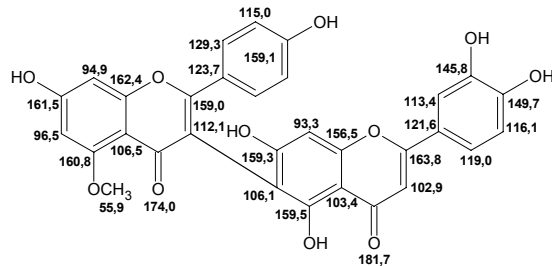
74



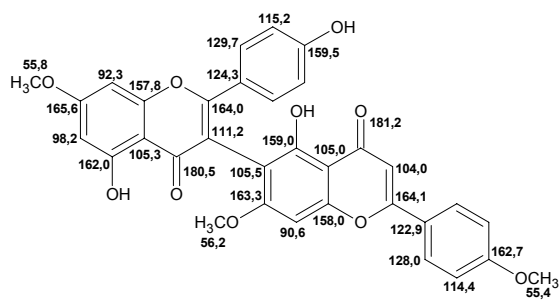
75



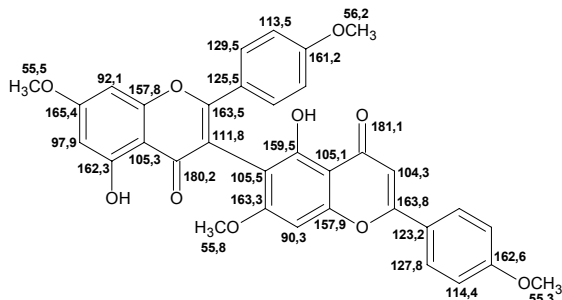
76



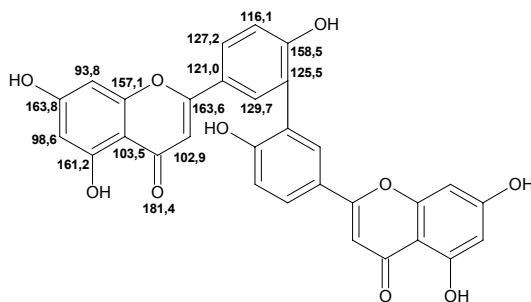
77



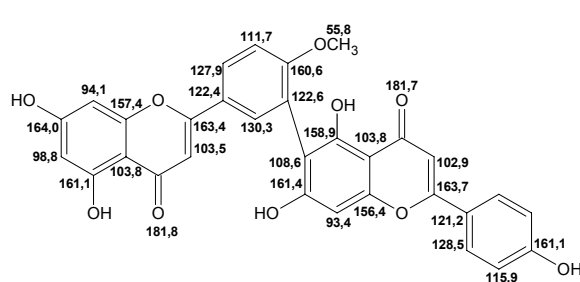
78



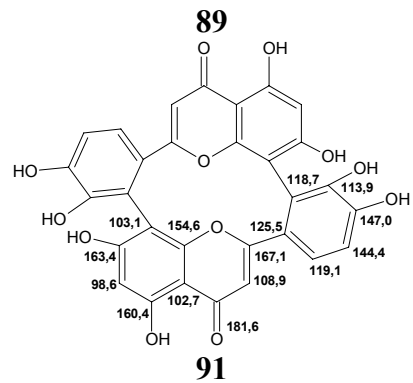
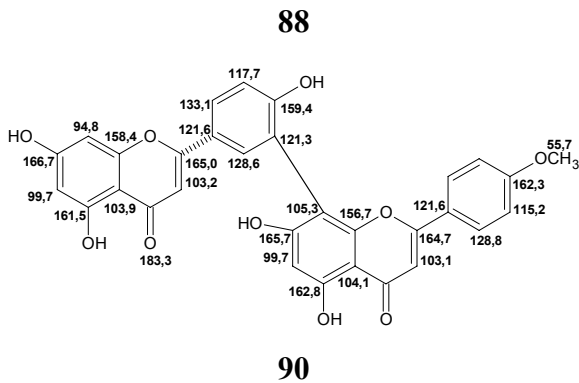
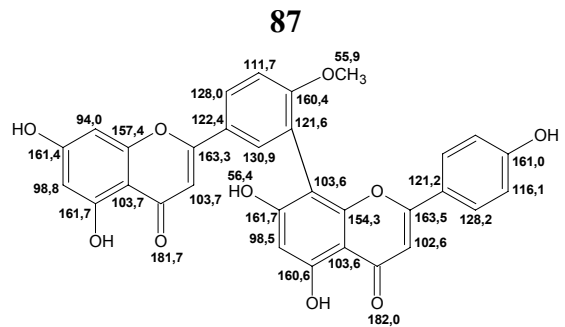
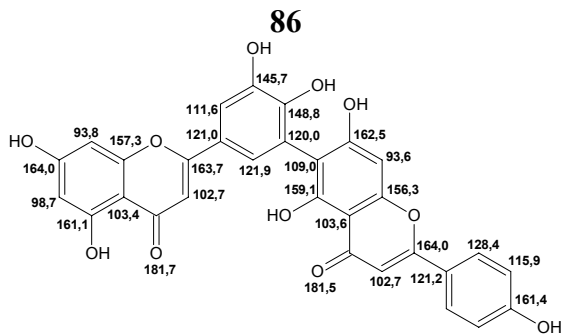
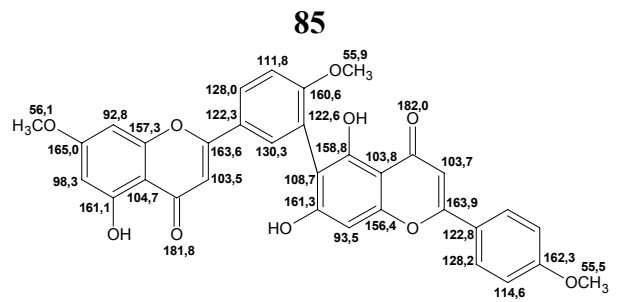
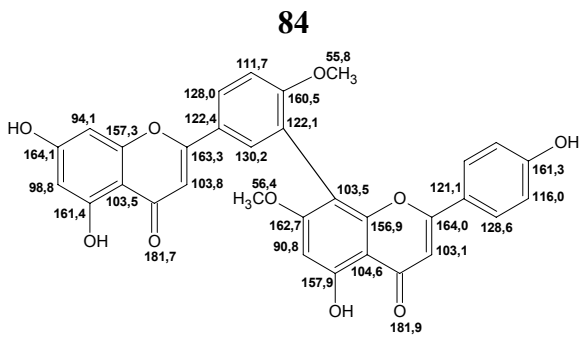
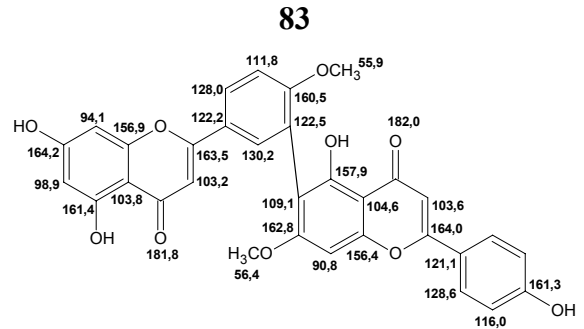
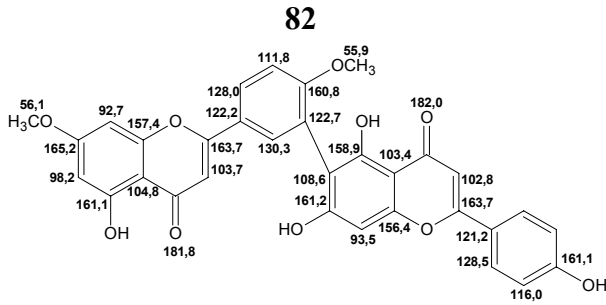
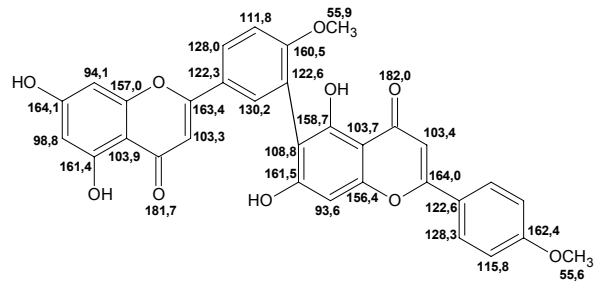
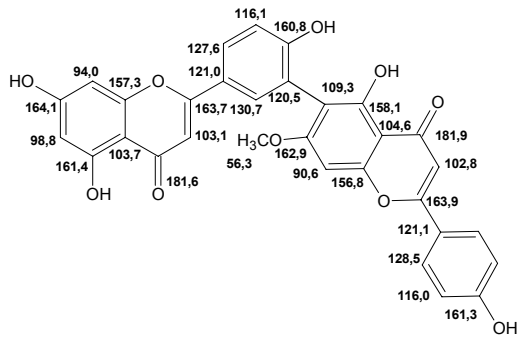
79

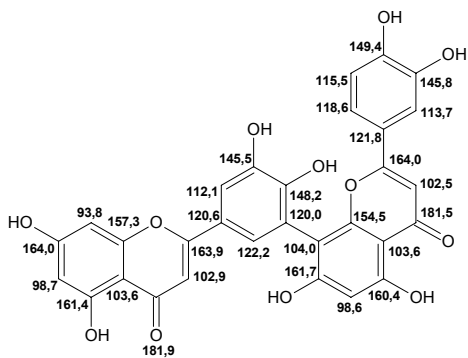


80

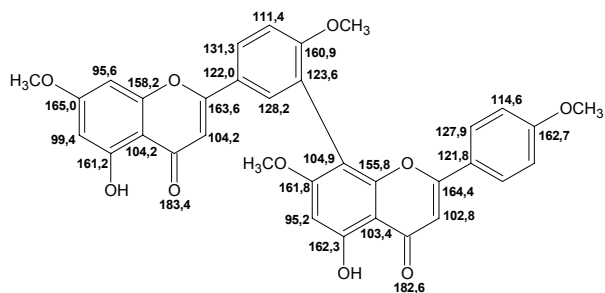


81

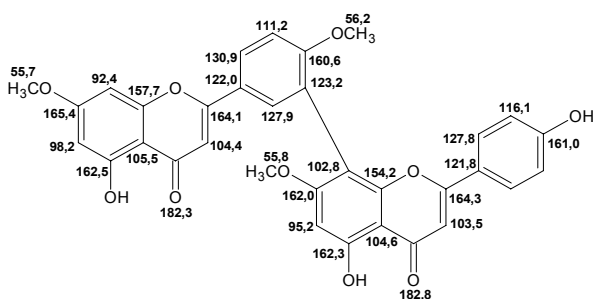




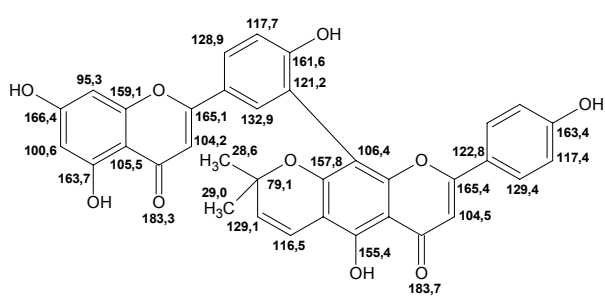
92



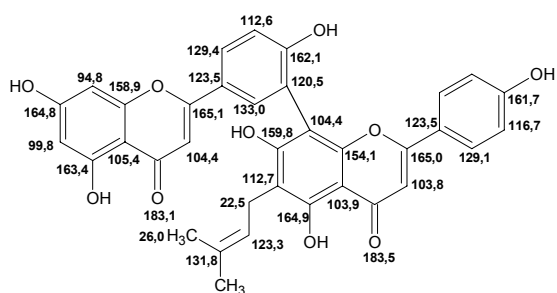
93



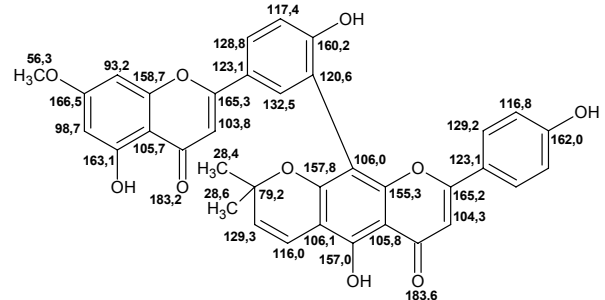
94



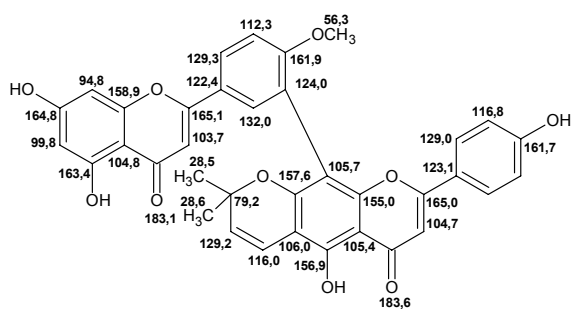
95



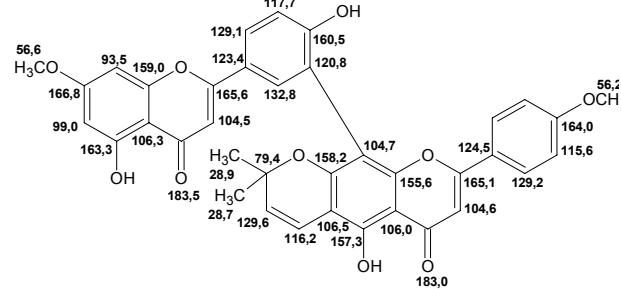
96



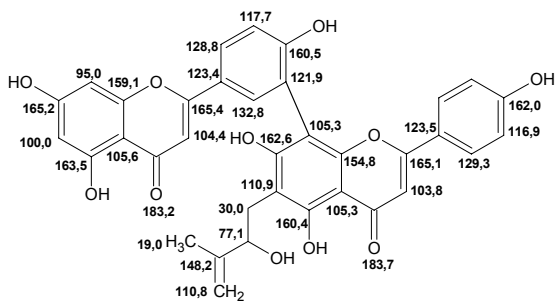
97



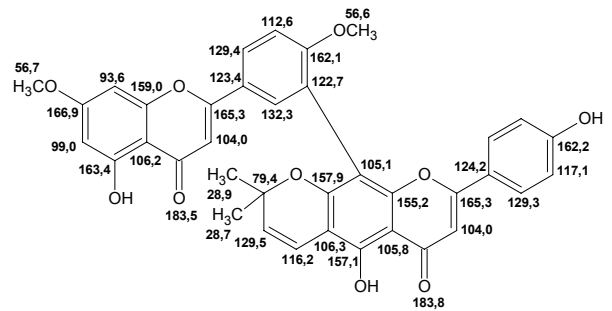
98



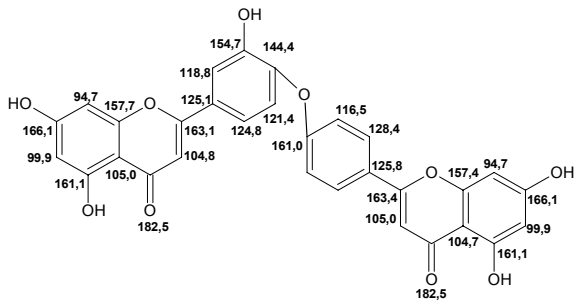
99



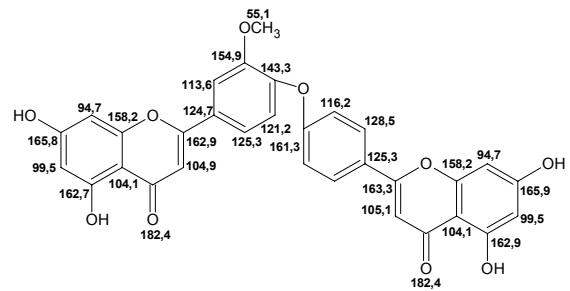
100



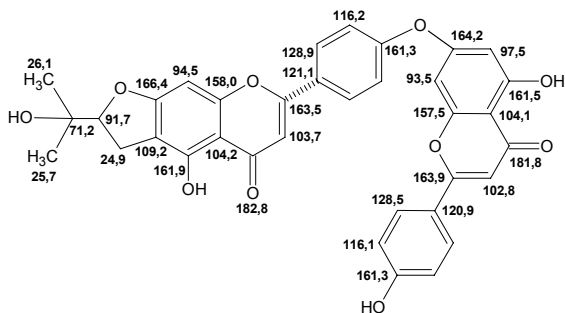
101



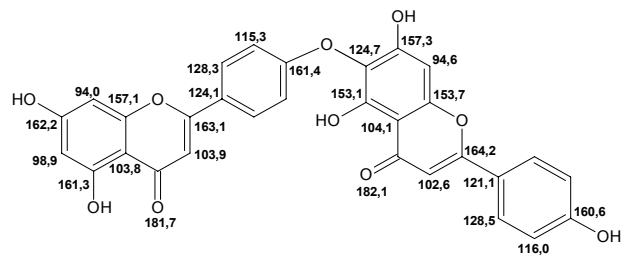
102



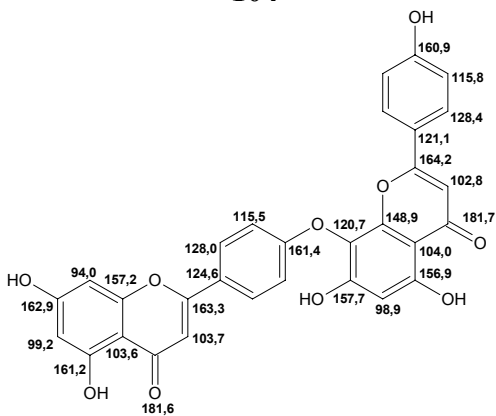
103



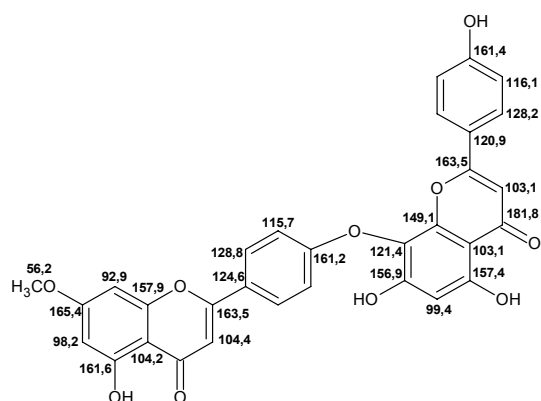
104



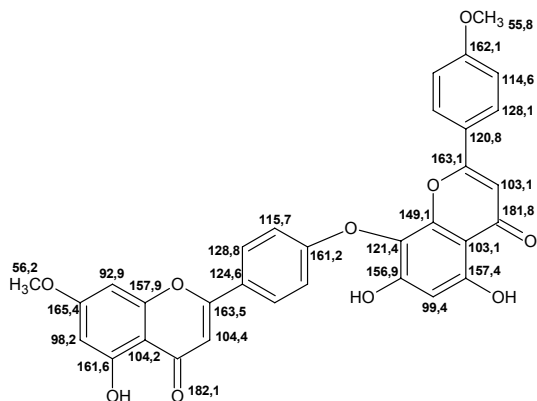
105



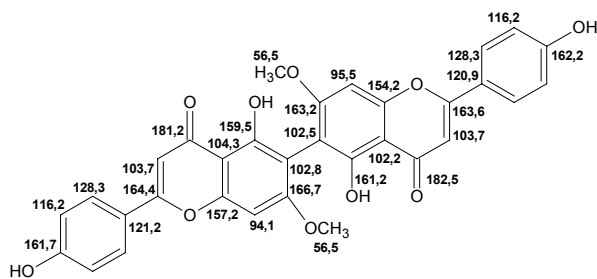
106



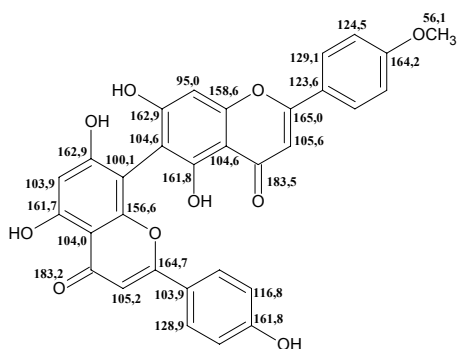
107



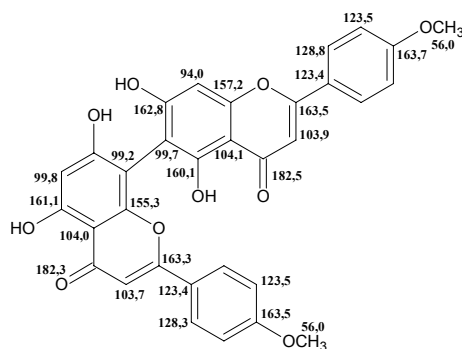
108



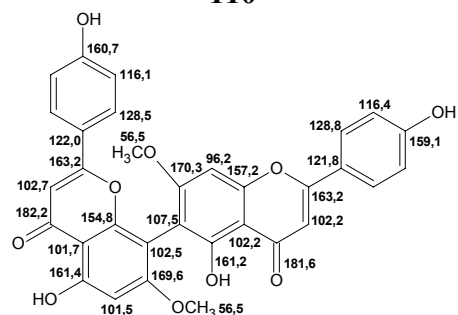
109



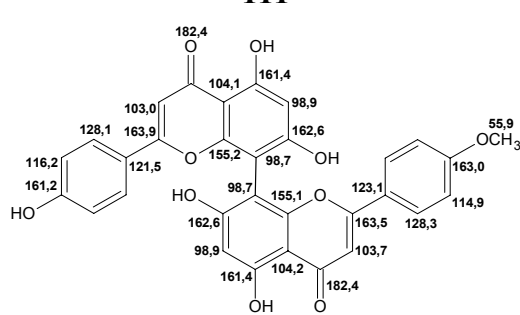
110



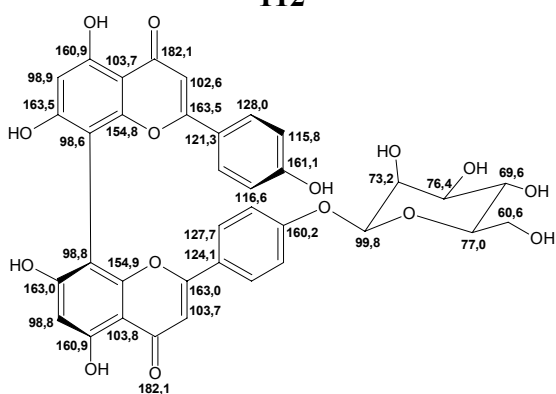
111



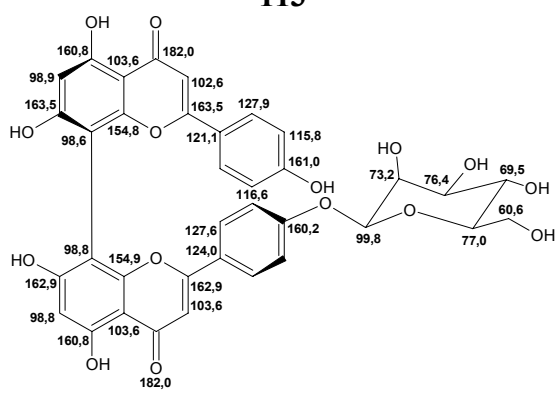
112



113

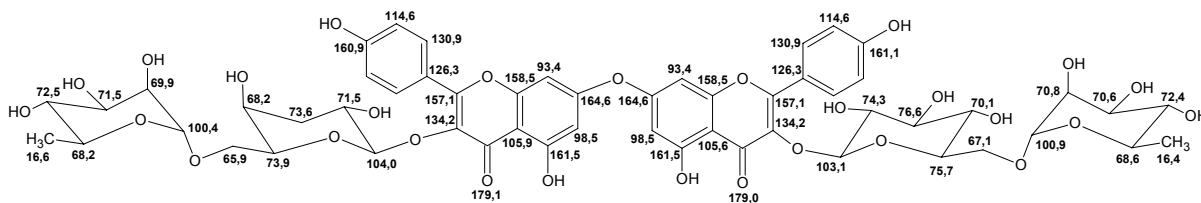


114

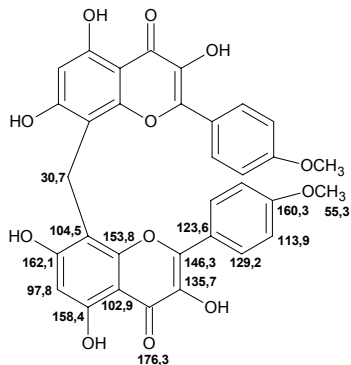


115

Biflavonol

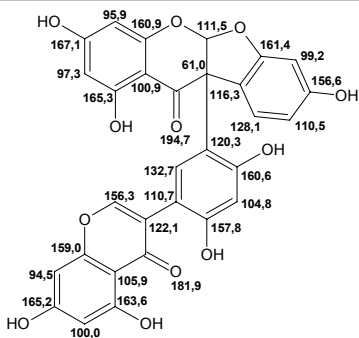


116



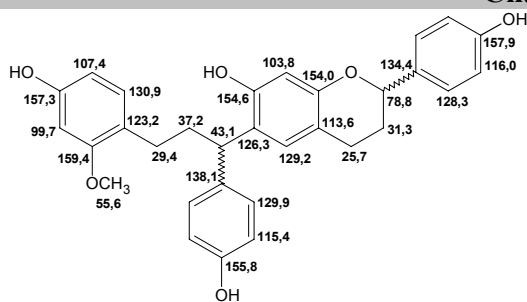
117

Bi-isoflavona

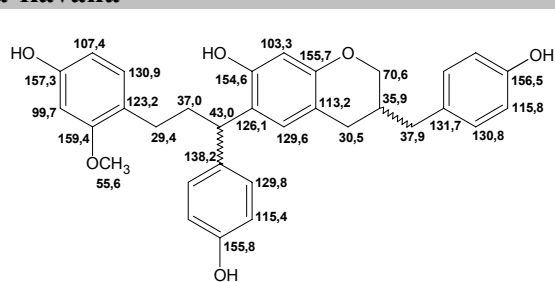


118

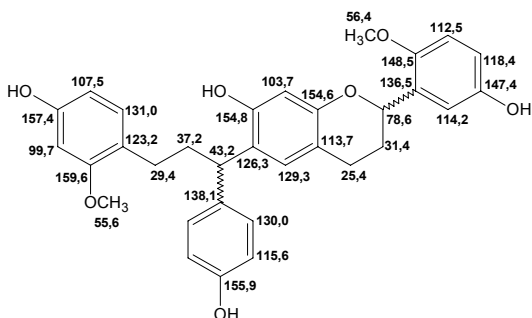
Chalcona-flavana



119

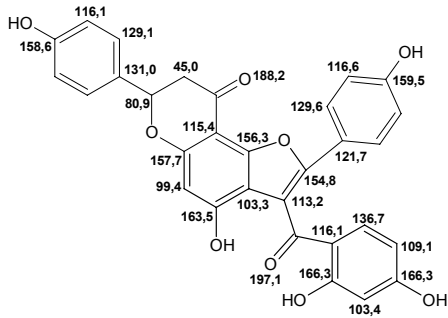


120

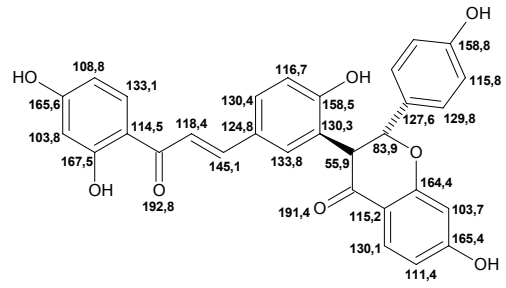


121

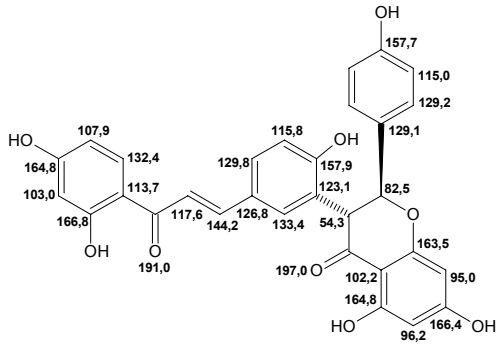
Chalcona-flavanona



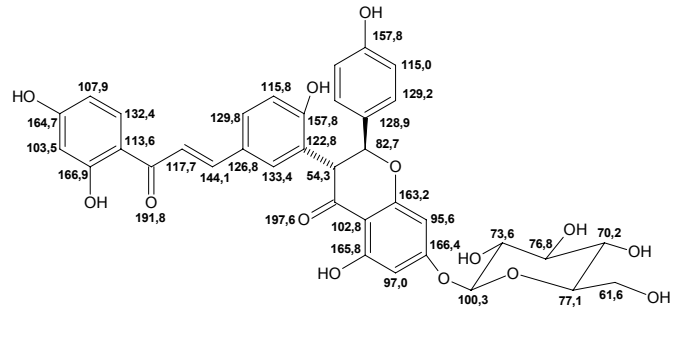
122



123

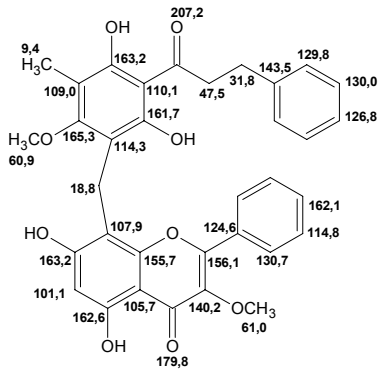


124

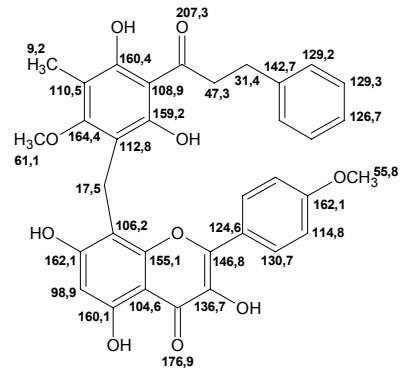


125

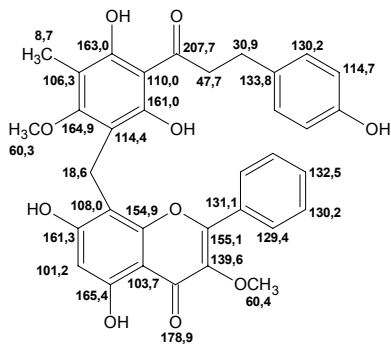
Chalcona-flavonol



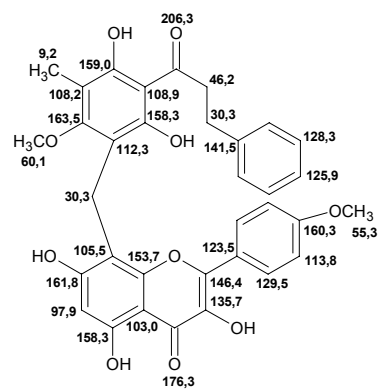
126



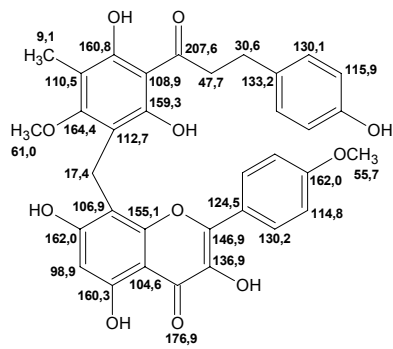
127



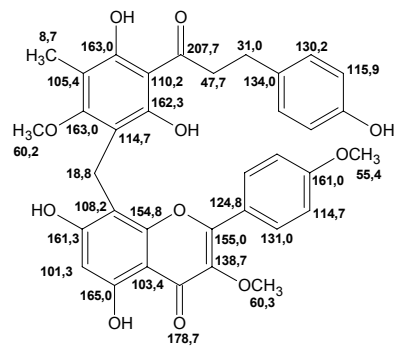
128



129

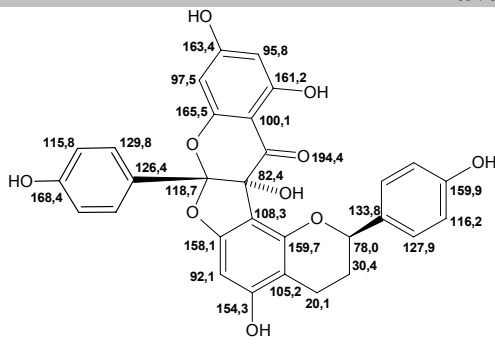


130

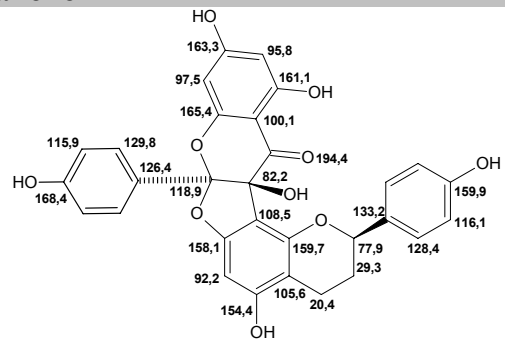


131

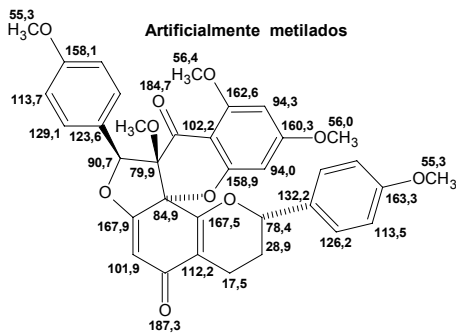
Flavana-Flavanonol



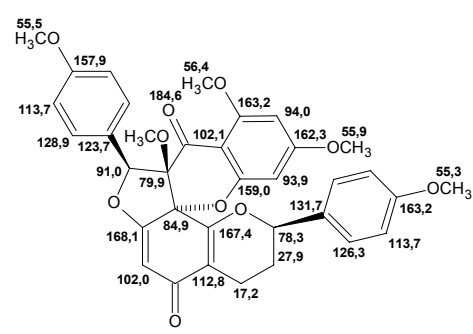
132



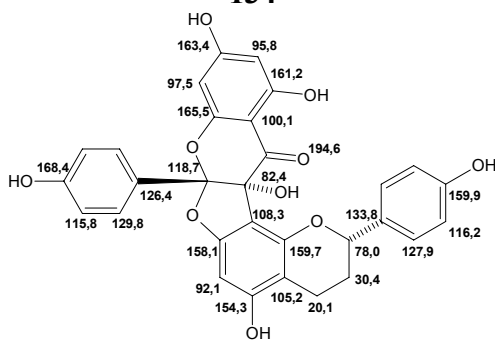
133



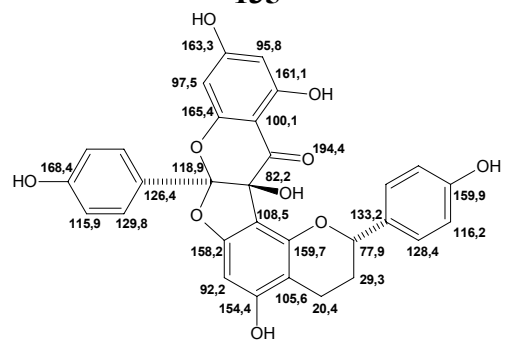
134



135

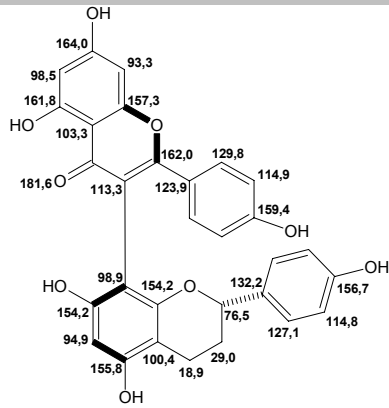


136

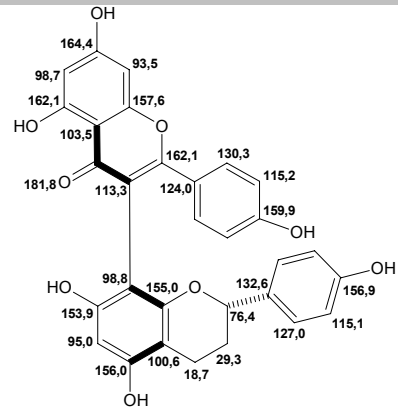


137

Flavana-flavona

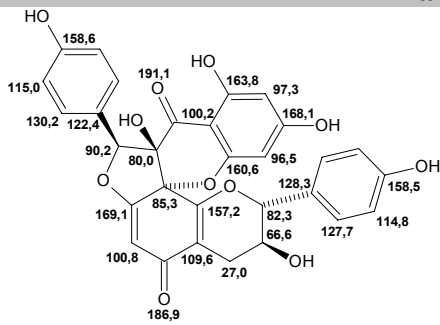


138

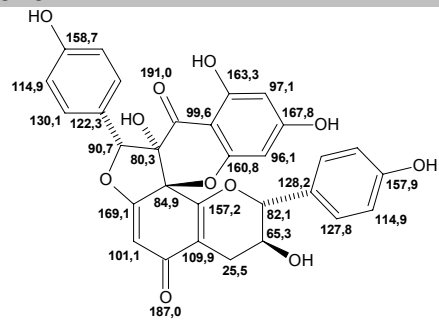


139

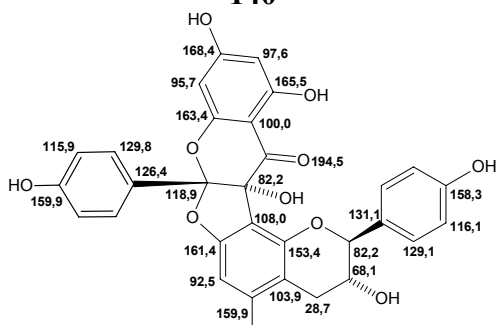
Flavanol-Flavanonol



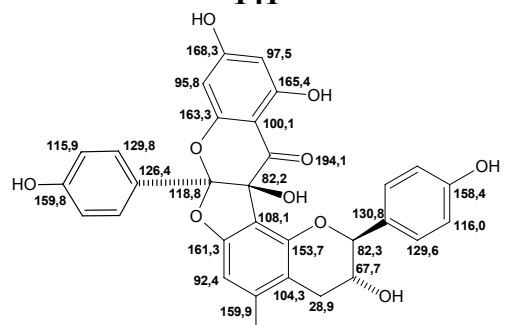
140



141

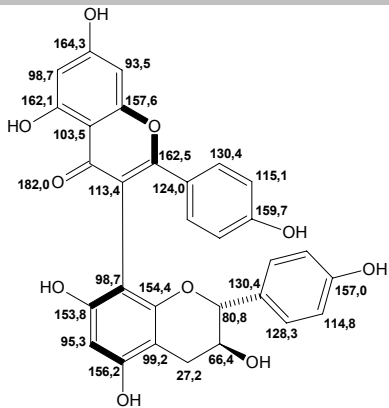


142

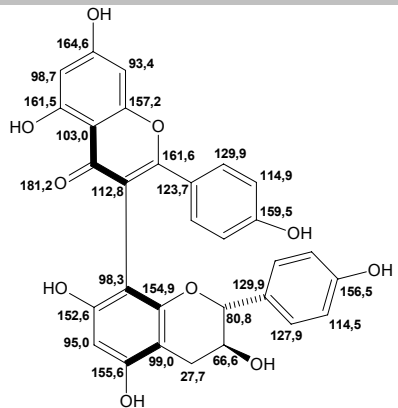


143

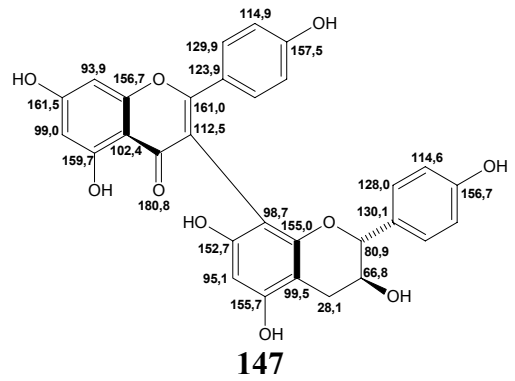
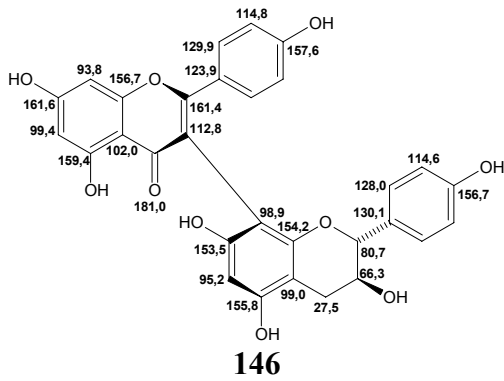
Flavanol-flavona



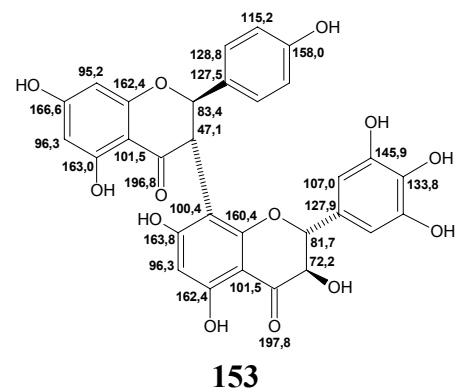
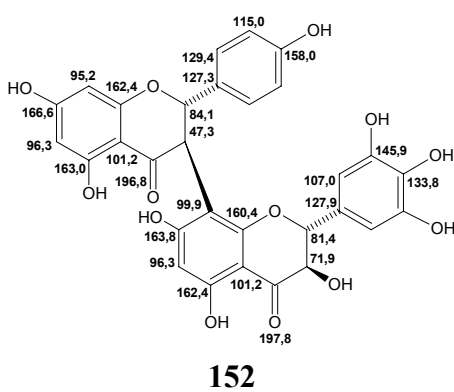
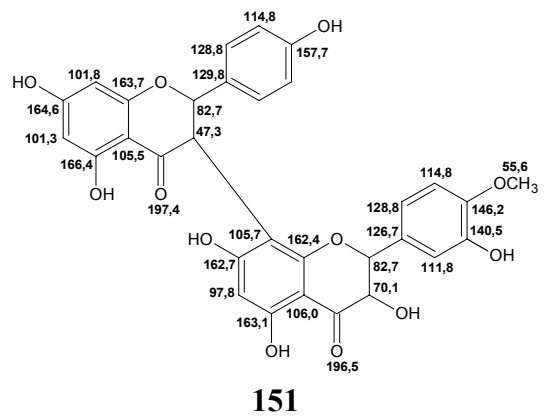
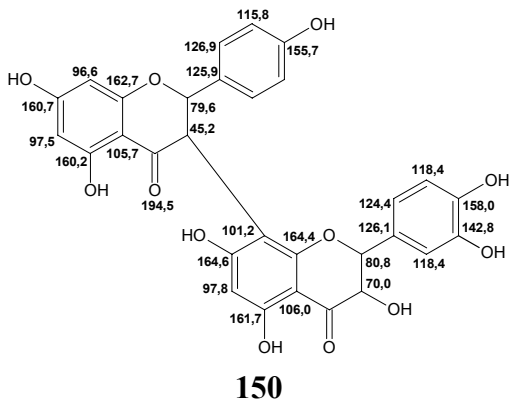
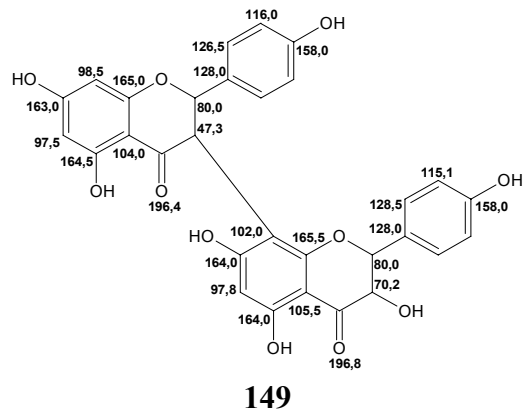
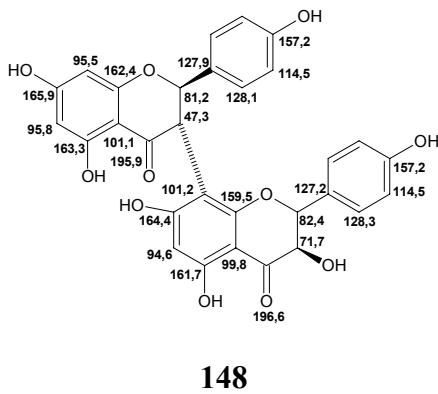
144

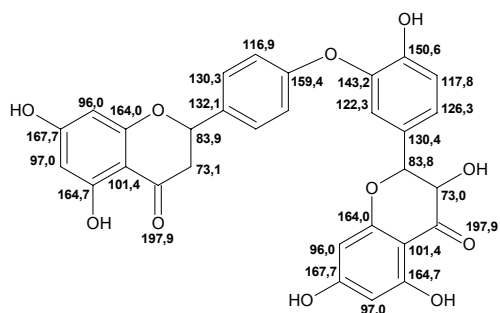


145



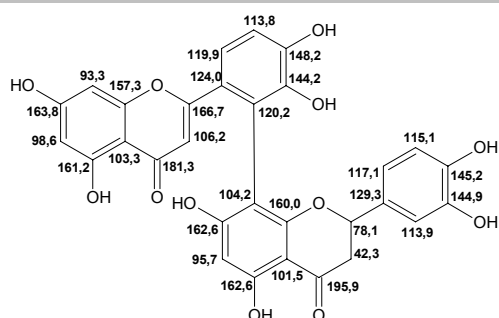
Flavanona-Flavanonol



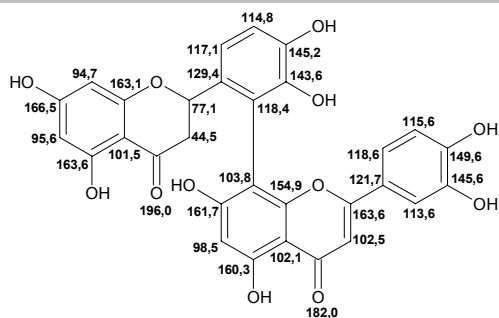


154

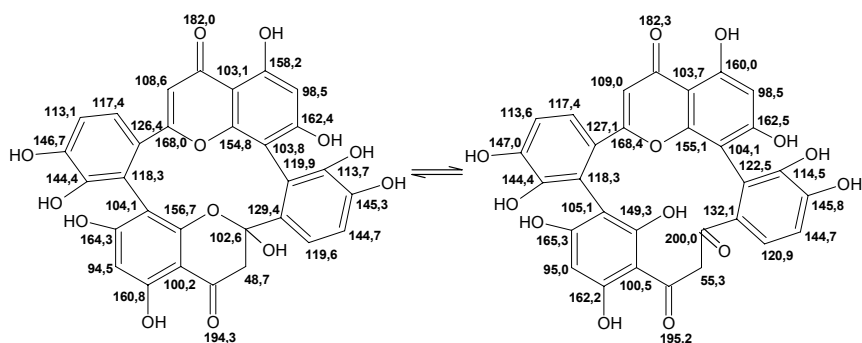
Flavanona-flavona



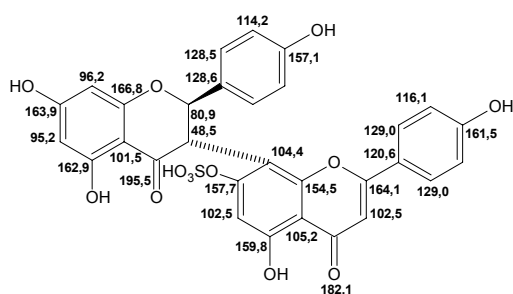
155



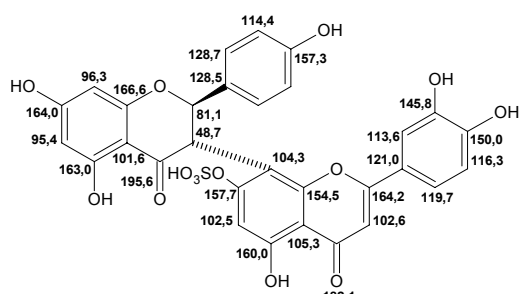
156



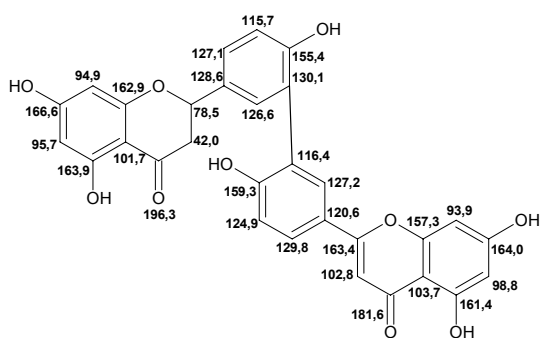
157



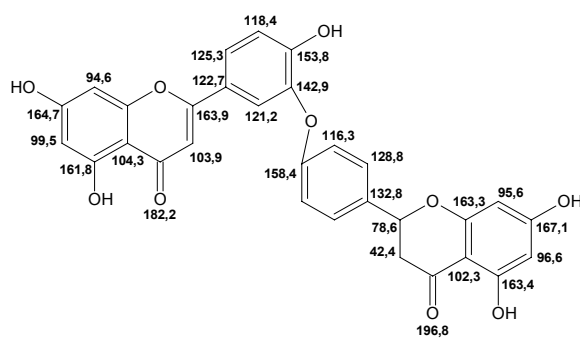
158



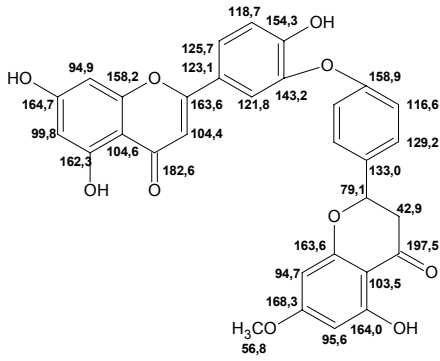
159



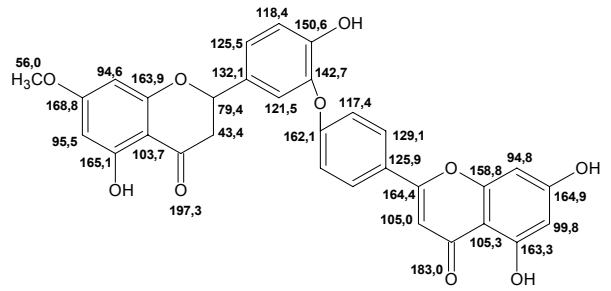
160



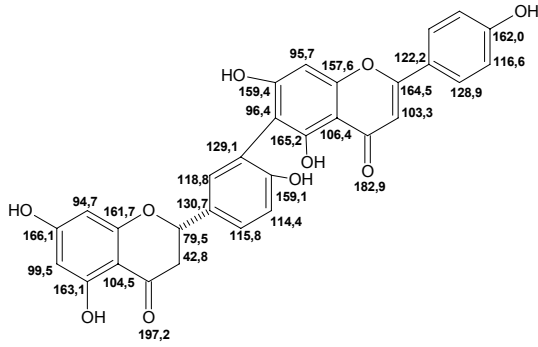
161



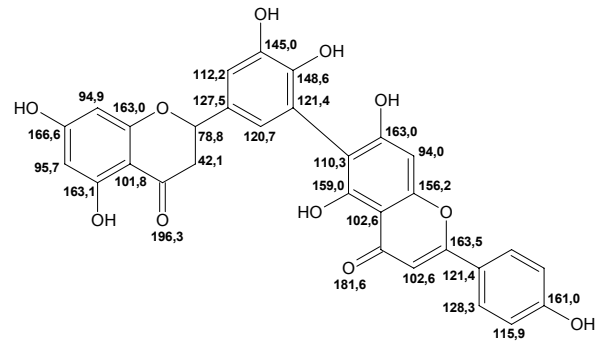
162



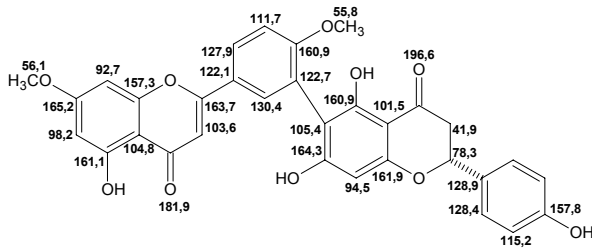
163



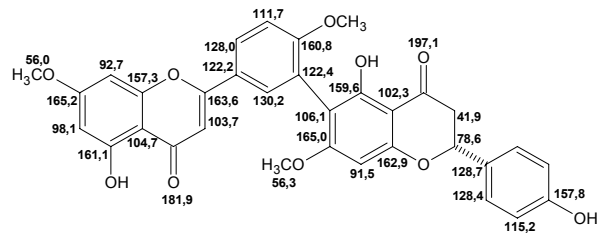
164



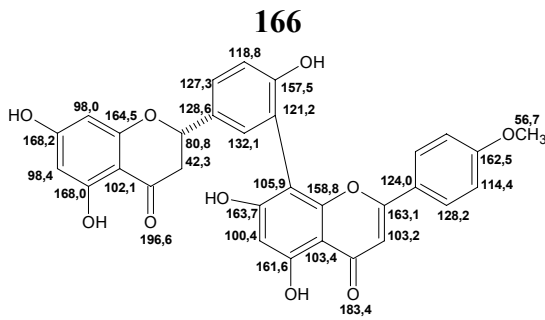
165



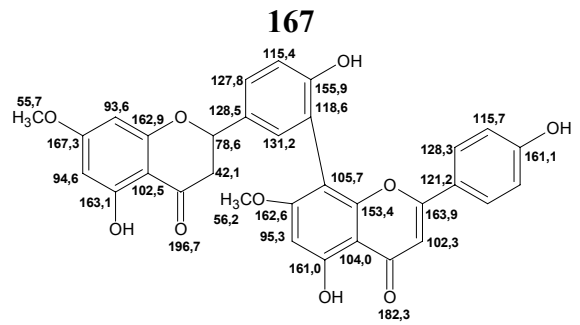
166



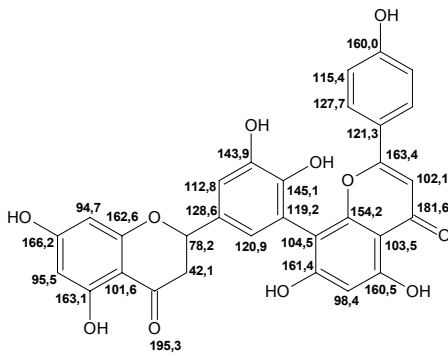
167



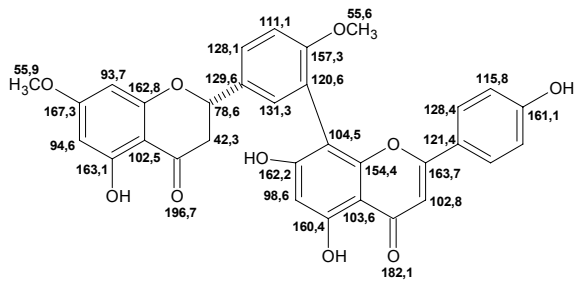
168



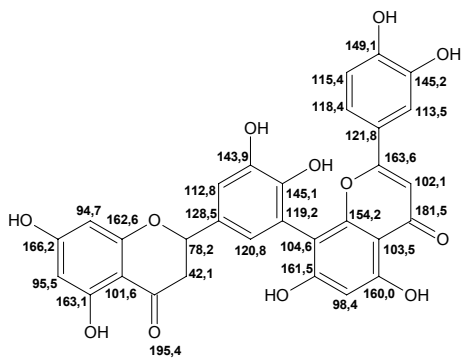
169



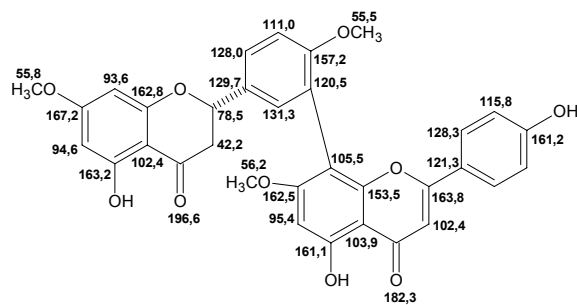
170



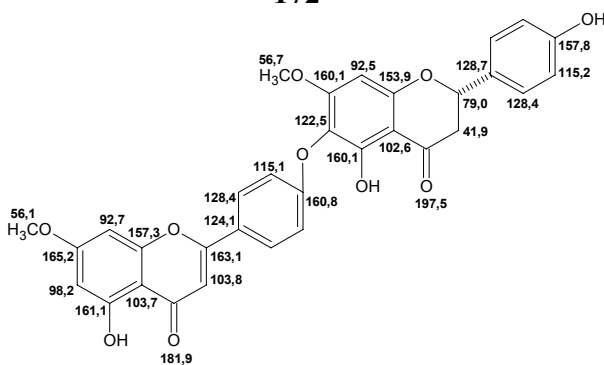
171



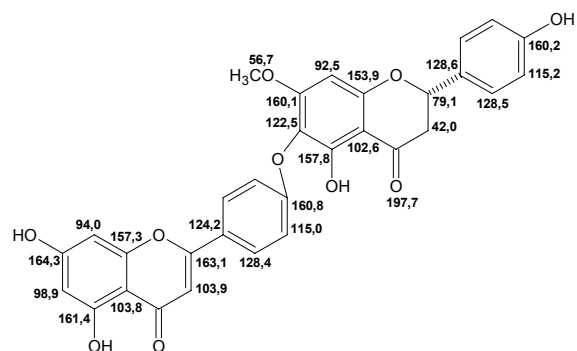
172



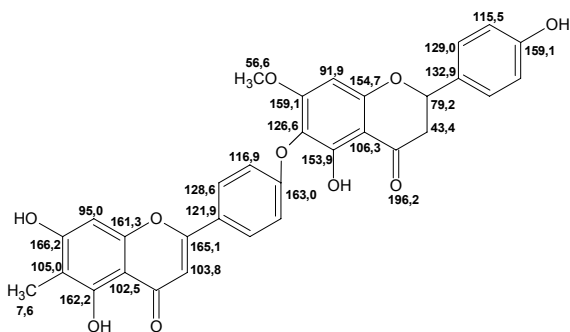
173



174

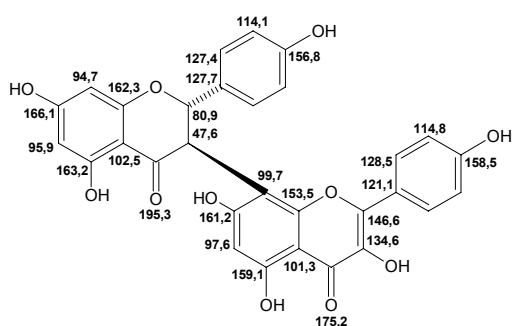


175

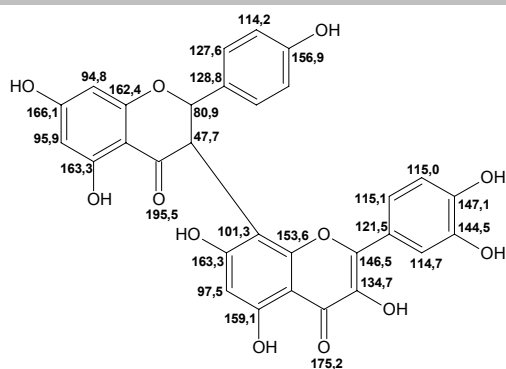


176

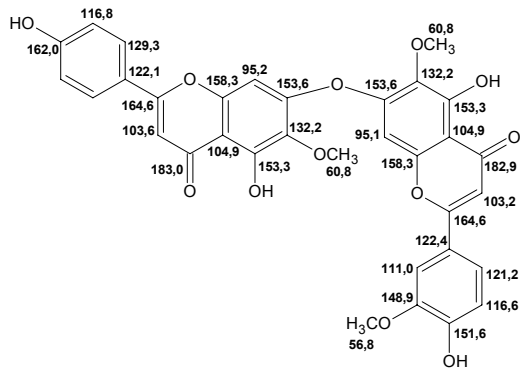
Flavanona-Flavonol



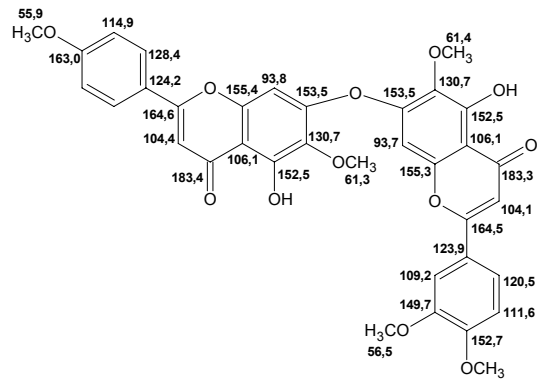
177



178

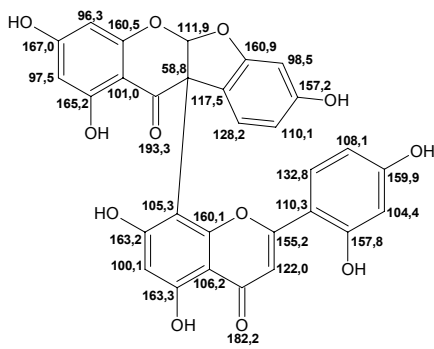


185

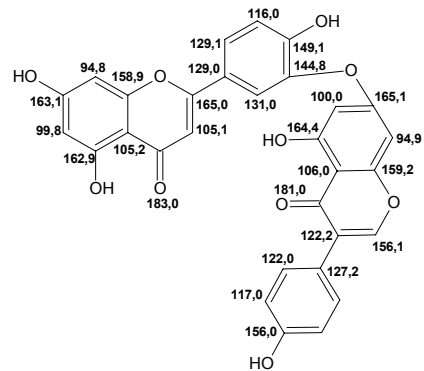


186

Flavona-isoflavona



187



188

Tabela 1- Relação dos biflavonóides descritos na literatura, contendo os tipos de conectividade (conectiv.), as fontes botânicas (espécie), os solventes empregados para obtenção dos espectros de RMN e as referências correspondentes.

Biflavonóide	Conectiv.	Espécie	Solvente	Referência
1-2	(3→8)	<i>Daphne odora</i>	CD ₃ COCD ₃	TANIGUCHI et al, 1996
3	(2'→6)	<i>Pilotrichella flexilis</i>	CD ₃ SOCD ₃	BRINKMEIER et al, 2000
4	(3'→6)	<i>Cycas beddomei</i>	CD ₃ COCD ₃	RANI et al, 1998
5-6	(3→9)	<i>Berchemia zeyheri</i>	CDCl ₃	BEKKER et al, 2000
7	(5→5')	<i>Aulacomnium palustre</i>	CD ₃ SOCD ₃	HAHN et al, 1995
8	(α→α)	<i>Lophira lanceolata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 1988
9		<i>Ochna macrocalyx</i>	CD ₃ COCD ₃	TANG et al, 2003
10-11		<i>Lophira lanceolata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 1990
12		<i>Glycyrrhiza uralens</i>	MeOD	BAI et al, 2003
13	(α→3)	<i>Lophira lanceolata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 1989
14-15		<i>Ochna afzelii</i>	CD ₃ COCD ₃	PEGNYEMB et al, 2001
16		<i>Ochna calodendron</i>	CD ₃ COCD ₃	MESSANGA et al, 1994
17		<i>Ochna afzelii</i>	CD ₃ COCD ₃	PEGNYEMB et al, 2001
18		<i>Lophira alata</i>	CD ₃ COCD ₃	MURAKAMI et al, 1992
19		<i>Ochna calodendron</i>	CD ₃ COCD ₃	MESSANGA et al, 1994
20-21	(α→5')	<i>Ochna calodendron</i>	CD ₃ COCD ₃	MESSANGA et al, 1994
22		<i>Ouratea flava</i>	CD ₃ COCD ₃	MBING et al, 2003
23	(β→3')	<i>Dracaena cinnabari</i>	MeOD	MASAOUD et al, 1995
24	(3→3')	<i>Rhus pyroides</i>	CD ₃ COCD ₃	MDEE et al, 2003
25	(3→4)	<i>Luxemburgia octandra</i>	CD ₃ COCD ₃	CARVALHO et al, 2004
26	(3→5')	<i>Rhus pyroides</i>	CD ₃ COCD ₃	MDEE et al, 2003
27-28	(4→5')	<i>Rhus pyroides</i>	CD ₃ COCD ₃	MDEE et al, 2003
29		<i>Rhus pyroides</i>	CDCl ₃	MASESANE et al, 2000
30	(4'→5')	<i>Rhus pyroides</i>	CD ₃ COCD ₃	MDEE et al, 2003
31	(6→8)	<i>Dorstenia prorepens</i>	CDCl ₃	ABEGAZ et al, 2002
32		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER, 2004
33		<i>Calycopteris floribunda</i>	CD ₃ SOCD ₃	WALL et al, 1994
34-35		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER, 2004
36		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER et al, 1999
37-38		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	WALL et al, 1994
39		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER et al, 1999
40		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER, 2004
41		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER et al, 1999
42		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER, 2004
43-44		<i>Calycopteris floribunda</i>	CDCl ₃	MAYER et al, 1999

Biflavonóide	Conectiv	Espécie	Solvente	Referência
45-46	(2'→8)	<i>Vitis vinifera</i>	MeOD	FOO et al, 1998
47		<i>Potentilla viscosa</i>	CD ₃ COCD ₃	ZHANG et al, 1998
48-49	(4→4)	<i>Acacia melanoxylon</i>	CD ₃ COCD ₃	FOO, 1989
50-53	(4→5)	<i>Acacia galpinii</i>	C ₆ D ₆	BENNIE et al, 2002
54-55	(2→2)	<i>Ochna macrocalyx</i>	CD ₃ COCD ₃	TANG et al, 2003
56	(2'→6)	<i>Pilotrichella flexilis</i>	CD ₃ SOCD ₃	BRINKMEIER et al, 2000
57-58	(3→3)	<i>Wikstroemia indica</i>	MeOD	NUNOME et al, 2004
59	(3→8)	<i>Garcinia livingstonei</i>	MeOD	MBWAMBO et al, 2006
60	(3'→3')	<i>Pilotrichella cuspidata</i>	CD ₃ SOCD ₃	SEEGER et al, 1992
61	(3'→4')	<i>Ochna obtusata</i>	CD ₃ COCD ₃	RAO et al, 1997
62		<i>Ochna beddomei</i>	CD ₃ COCD ₃	JAYAPRAKASAM et al, 2000
63	(3'→6)	<i>Schinus tebenthefolus</i>	MeOD	KASSEM et al, 2004
64-65	(3'→7)	<i>Quintinia acutifolia</i>	CD ₃ COCD ₃	ARYASENA, 2004
66	(3'→8)	<i>Lophira lanceolata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 1989B
67	(4'→6)	<i>Cycas beddomei</i>	CD ₃ COCD ₃	RANI et al, 1998
68		<i>Cycas beddomei</i>	CD ₃ COCD ₃	JAYAPRAKASAM et al, 2000b
69	(2→8)	<i>Vahlia capensis</i>	CD ₃ COCD ₃	MAJINDA et al, 1997
70	(2'→4')	<i>Pseudotsuga menzitsii</i>	MeOD	FOO et al, 1992
71	(6→8)	<i>Ouratea multiflora</i>	CDCl ₃	FELICIO et al, 2001
72-73	(2'→6)	<i>Plagiomnium undulatum</i>	CD ₃ SOCD ₃	RAMPENDAHL et al, 1996
74	(2'→8)	<i>Mnium hornum</i>	CD ₃ SOCD ₃	BRINKMAIER et al, 1999
75		<i>Philonotis fontana</i>	CD ₃ SOCD ₃	GEIGER et al, 1989
76-77	(3→6)	<i>Aristolochia ridicula</i>	CD ₃ SOCD ₃	MACHADO et al, 2005
78-79		<i>Stephania tetrandai</i>	CDCl ₃	SI et al, 2001
80	(3'→3')	<i>Homolothecium lutescens</i>	CD ₃ SOCD ₃	SEEGER et al, 1993
81	(3'→6)	<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	LIN et al, 2000
82		<i>Selaginella willdenowii</i>	CD ₃ SOCD ₃	SILVA et al, 1995
83		<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	CHEN et al, 2005
84		<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	LIN et al, 2000
85		<i>Dysoxylum lenticellare</i>	CD ₃ SOCD ₃	HE et al, 1996
86		<i>Selaginella willdenowii</i>	CD ₃ SOCD ₃	SILVA et al, 1995
87		<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	CHEN et al, 2005
88		<i>Rhytidadelphus squarrosus</i>	CD ₃ SOCD ₃	SEEGER et al, 1990
89	(3'→8)	<i>Selaginella willdenowii</i>	CD ₃ SOCD ₃	SILVA et al, 1995
90		<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	CD ₃ COCD ₃	BAHIA et al, 2005
91		<i>Bartramia stricta</i>	CD ₃ SOCD ₃	GEIGER et al, 1995
92		<i>Plagiomnium cuspidatum</i>	MeOD	ANHUT et al, 1989

Biflavonóide	Conectiv.	Espécie	Solvente	Referência
93-94	(3'→8)	<i>Araucaria angustifolia</i>	MeOD	FONSECA et al, 2000
95		<i>Calophyllum inophylloide</i>	C ₅ D ₅ N	GOH, 1992
96		<i>Calophyllum venulosum</i>	CD ₃ COCD ₃	CAO et al, 1997
97-98		<i>Calophyllum venulosum</i>	CD ₃ COCD ₃	CAO et al, 2001
99-101		<i>Calophyllum venulosum</i>	CD ₃ COCD ₃	CAO et al, 1997
102-103	(4'→4'')	<i>Lonicera japonica</i>	C ₅ D ₅ N	KUMAR et al, 2005
104		<i>Origanum syriacum</i>	CD ₃ SOCD ₃	EL-DESOKY et al, 2004
105-106	(4'→8)	<i>Lanaria lanata</i>	CD ₃ SOCD ₃	DORA et al, 1991
107-108		<i>Ouratea semiserrata</i>	CD ₃ SOCD ₃	VELANDIA et al, 2002
109	(6→6)	<i>Ouratea spectabilis</i>	CD ₃ SOCD ₃	FELICIO et al, 1995
110	(6→8)	<i>Ouratea nigroviolacea</i>	CD ₃ COCD ₃	MBING et al, 2006
111	(6→8)	<i>Ouratea nigroviolacea</i>	CD ₃ SOCD ₃	MBING et al, 2006
112	(6→8)	<i>Ouratea spectabilis</i>	CD ₃ SOCD ₃	FELICIO et al, 1995
113	(8→8)	<i>Cupressocyparis leylandii</i>	CD ₃ SOCD ₃	K.-BARANOWSKA et al, 1999
114-115		<i>Juniperus communis</i>	CD ₃ SOCD ₃	INATOMI et al, 2005
116	(7→7)	<i>Chimarris turbinata</i>	MeOD	CARDOSO et al, 2005
117	(8→8)	<i>Pentagramma triangularis</i>	CD ₃ SOCD ₃	ROITMAN et al, 1993
118	(β→6)	<i>Lupinus albus</i>	MeOD	SAKASAI et al, 2000
119-121		<i>Dracaena cinnabarii</i>	MeOD	MASAOUD et al 1995
122	(α→6)	<i>Ouratea flava</i>	CD ₃ COCD ₃	MBING et al, 2003
123	(3→3)	<i>Lophira lanceolata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 1989
124-125		<i>Ochna integerrima</i>	CD ₃ COCD ₃	KAEWAMATAWONG et al, 2002
126-127	(3'→8)	<i>Pentagramma triangularis</i>	CD ₃ COCD ₃	IINUMA et al, 1994
128		<i>Pentagramma triangularis</i>	CD ₃ COCD ₃	IINUMA et al, 1997
129		<i>Pentagramma triangularis</i>	CD ₃ SOCD ₃	ROITMAN et al, 1993
130-131		<i>Pentagramma triangularis</i>	CD ₃ COCD ₃	IINUMA et al, 1997
132-133	(2→8)	<i>Daphne odora</i>	CD ₃ COCD ₃	TANIGUCHI et al, 1996
134-135		<i>Daphne acutiloba</i>	CD ₃ COCD ₃	TANIGUCHI et al, 1998
136-137	(3→8)	<i>Daphne odora</i>	CD ₃ COCD ₃	BABA et al, 1995
138-139		<i>Wikstroemia sikokiana</i>	CD ₃ SOCD ₃	BABA et al, 1994
140-141	(2→8)	<i>Daphne genkwa</i>	CD ₃ SOCD ₃	BABA et al, 1993
142-143		<i>Daphne odora</i>	CD ₃ COCD ₃	TANIGUCHI et al, 1996
144-145	(3→8)	<i>Wikstroemia sikokiana</i>	CD ₃ SOCD ₃	BABA et al, 1994
146-147		<i>Stellera chamaejasme</i>	CD ₃ SOCD ₃	FENG et al, 2003
148		<i>Garcinia kola</i>	CD ₃ SOCD ₃	HAN et al, 2005
149-151		<i>Garcinia kola</i>	CD ₃ SOCD ₃	KAPADIA et al, 1994
152-153		<i>Gnidia involucrata</i>	CD ₃ SOCD ₃	FERRARI et al, 2003
154	(3'→4'')	<i>Ouratea sulcata</i>	CD ₃ COCD ₃	PEGNYEMB et al, 2005

Biflavonóide	Conectiv	Espécie	Solvente	Referência
155	(2'→8)	<i>Mnium hornum</i>	CD ₃ SOCD ₃	BRINKMAIER et al, 1999
156	(2'→8)	<i>Philonotis fontana</i>	CD ₃ SOCD ₃	GEIGER et al, 1989
157	(2'→8)	<i>Bartramia pomiformis</i>	CD ₃ COCD ₃	SEEGER et al, 1991
158-159	(3→8)	<i>Rheedia acuminata</i>	CD ₃ SOCD ₃	LI et al, 2002
160	(3'→3')	<i>Homalothecium lutescens</i>	CD ₃ SOCD ₃	SEEGER et al, 1993
161	(3'→4')	<i>Luxemburgia nobilis</i>	MeOD	OLIVEIRA et al, 2002
162		<i>Ochna integerrima</i>	CD ₃ SOCD ₃	LIKHITWITAYAWUID, 2001
163		<i>Ochna obtusata</i>	CD ₃ COCD ₃	RAO et al, 1997
164	(3'→6)	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	CD ₃ COCD ₃	BAHIA et al, 2005
165		<i>Plagiomnium undulatum</i>	CD ₃ SOCD ₃	RAMPENDAHL et al, 1996
166-167		<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	LIN et al, 2000
168	(3'→8)	<i>Cycas beddomei</i>	CD ₃ COCD ₃	DAS et al, 2005
169		<i>Amentotaxus yunnanensis</i>	CD ₃ SOCD ₃	LI et al, 2003
170		<i>Bartramia pomiformis</i>	CD ₃ COCD ₃	SEEGER et al, 1991
171		<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	CHEN et al, 2005
172		<i>Plagiomnium cuspidatum</i>	MeOD	ANHUT et al, 1989
173-174		<i>Selaginella delicatula</i>	CD ₃ SOCD ₃	CHEN et al, 2005
175	(4'→6)	<i>Selaginella willdenowii</i>	CD ₃ SOCD ₃	SILVA et al, 1995
176		<i>Cephalotaxus wilsoniana</i>	C ₅ D ₅ N	KUO et al, 2002
177	(3→8)	<i>Garcinia kola</i>	CD ₃ SOCD ₃	TERASHIMA et al, 1995
178		<i>Calophyllum paniciflorum</i>	CD ₃ SOCD ₃	ITO et al, 1999
179	(3→4)	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	CD ₃ COCD ₃	LI et al, 2000
180	(3'→4')	<i>Ouratea sulcata</i>	CD ₃ COCD ₃	PEGNYEMB et al, 2005
181	(3'→7)	<i>Lophira alata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 2006
182	(3'→8)	<i>Aristolochia contorta</i>	CD ₃ COCD ₃	YU et al, 2005
183-184		<i>Ginkgo biloba</i>	CD ₃ SOCD ₃	HYUN et al, 2005
185-186	(7→7)	<i>Lippia alba</i>	CD ₃ COCD ₃	BARBOSA et al, 2005
187	(3→8)	<i>Lupinus albus</i>	MeOD	SAKASAI et al, 2000
188	(3→7)	<i>Lophira alata</i>	CD ₃ COCD ₃	TIH et al, 2006

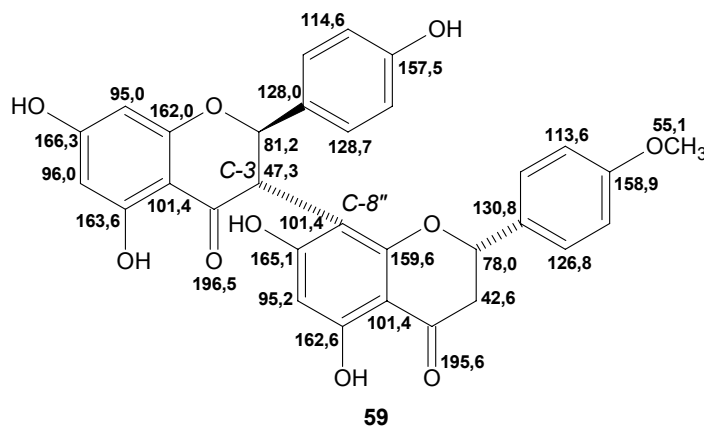
3.2.2 Aspectos Estereoquímicos

❖ *Atropisomerismo*

O espectro de RMN ^{13}C de um biflavonóide costuma provocar dúvida na sua interpretação devido ao elevado número de sinais, levando quase sempre o espectroscopista a suspeitar de que a amostra é uma mistura de flavonóides monoméricos. Evidentemente que um simples experimento de espectrometria de massa seria suficiente para dirimir esta dúvida. Entretanto, a análise se torna substancialmente complexa quando ocorre pareamento dos sinais, em virtude da presença de atropisômeros.

Atropisômeros (grego: *a*= não; *tropos*= giro, rotação) são estereoisômeros conformacionais cuja quiralidade é atribuída ao impedimento na rotação em torno de uma ligação simples, devido à existência de grupos volumosos. Os exemplos clássicos são as bifenilas. Em 1983, M. Oki definiu arbitrariamente as condições de atropisomerismo: isômeros separáveis com meia-vida de pelo menos 1000 s (16,7 min), não importando o valor da barreira energética, a qual varia com a temperatura (ELIEL et al., 1994).

O atropisomerismo em biflavonóides é bem freqüente em estruturas cujas unidades estão interligadas através dos carbonos C-3→ C-8'' (Ex.: estruturas **59**, **129-139**, **144-153**, **158-159**, **177-178** e **187**), tão comum que passou a ser característico para este tipo de biflavonóide (HAN et al., 2005), muito embora este fenômeno também seja observado em estruturas conectadas pelos carbonos (C-8→ C-8'') (Ex.: **114** e **115**) (INATOMI et al., 2005).



Em geral, um experimento realizado sob aquecimento a 90 °C simplifica o espectro devido ao desaparecimento das linhas espectrais duplicadas, facilitando a elucidação estrutural. Em alguns casos, como o da garcianina (**177**), os experimentos são efetuados a 150 °C (TERASHIMA et al., 1995).

HAN *et al* (2005) realizaram um monitoramento do comportamento rotamérico por espectroscopia de RMN ^{13}C de uma amostra do biflavonóide GB-1 (**148**), obtido de *Garcinia kola*, em diferentes temperaturas (-50, -30, 21, 23 e 90 °C). À temperatura ambiente (21 e 23 °C), foram observados sinais pareados referentes à mistura de rotâmeros. Entretanto, em extremos térmicos (-50 e 90 °C) foi constatada a existência de apenas um conjunto de sinais. Este estudo, denominado de RMN dinâmica, foi desenvolvido com diferentes solventes deuterados (DMSO, piridina e acetona), sendo em todos observado o mesmo comportamento (**Fig 8, p. 53**).

Estudos de RMN dinâmica permitem uma boa compreensão sobre a restrição na rotação da ligação entre os anéis C-I (C-3) e A-II (C-8''), originado do impedimento estérico de substituintes aromáticos, os quais restringem a rotação em torno desta ligação. Desta forma, à temperatura ambiente coexiste um par de confôrmeros, em razão da lenta interconversão causada pela elevada barreira energética, resultando num espectro de RMN mais complexo, cujos sinais aparecem dobrados. Entretanto, à medida que se eleva a temperatura, observa-se que os sinais duplos tendem a se aproximar (alargamento dos picos), coalescerem (pico único alargado) e por último obtém-se um sinal simples cuja absorção corresponde a uma frequência central às duas existentes anteriormente. Isto acontece porque o aquecimento acelera a velocidade de interconversão, fazendo com que seja superada mais facilmente a barreira energética, favorecendo a formação exclusiva de um dos confôrmeros. O resfriamento pode, em certos casos, gerar preferencialmente o confôrmero mais estável, implicando igualmente numa simplificação do espectro de RMN. Este tipo de investigação pode ser feita tanto para ^1H como para ^{13}C , todavia como a faixa de deslocamento químico deste último é mais ampla, a temperatura de coalescência (T_C) ocorre em temperaturas mais altas. Além disso a temperatura de coalescência é dependente da frequência de análise do espectrômetro: quanto maior a frequência do aparelho, maior será T_C (FRIEBOLIN, 1991).

Da espécie *Juniperus communis*, foi isolado e purificado pela primeira vez um par de atropisômeros (*P* e *M*-**114** e **115**) de fonte natural, os quais mostraram estabilidade em DMSO, mesmo submetidos a aquecimento a 50 °C (INATOMI *et al.*, 2005).

❖ Estereoquímica E/Z

A configuração da dupla ligação de uma aurona pode ser determinada através do deslocamento químico do carbono C- α , conforme o raciocínio aplicado por Geiger e Markham (1992) para definição da estereoquímica Z para campylopusaurona, uma auronaf flavanona isolada de *Campylopus clavatus*. Segundo estes autores, um deslocamento químico de δ 109,9 é compatível com C- α pertencente à dupla ligação com configuração Z. Ao contrário, o deslocamento químico previsto seria ao menos 10 ppm mais desblindado, devido aos fatores estéricos.

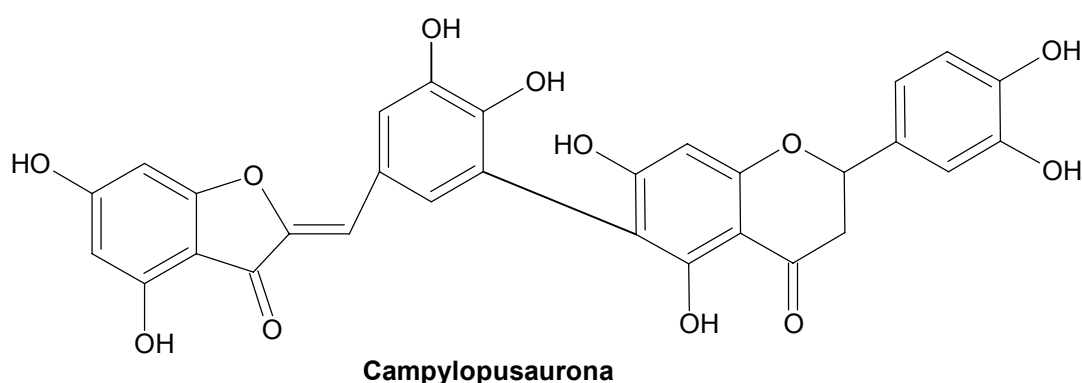
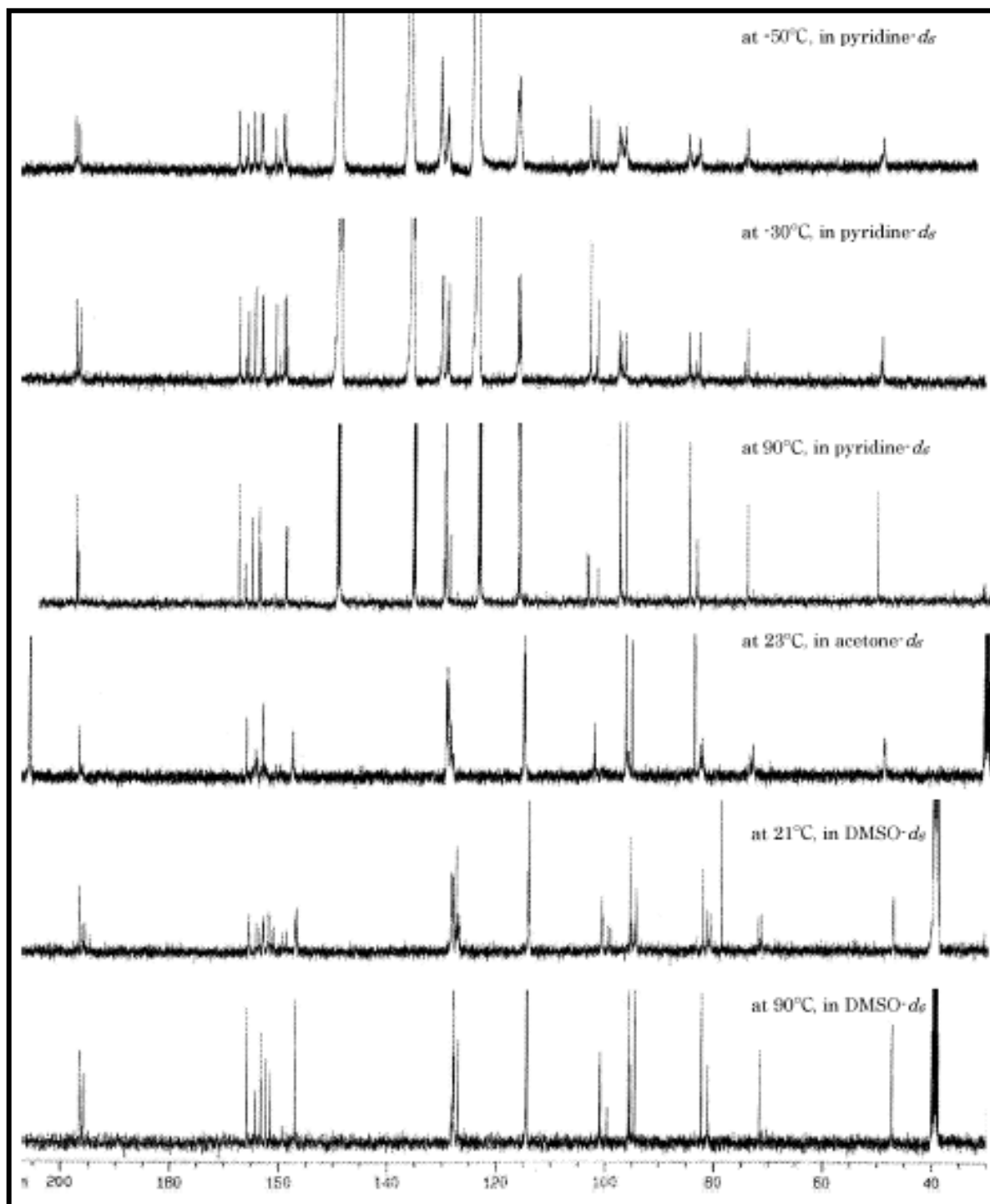


Figura 8- Espectros de RMN ^{13}C de GB-1 (**148**) registrados em diferentes temperaturas e solventes, obtidos num espectrômetro Bruker (HAN et al., 2005). Observação: os parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos não foram divulgados.



Extraído do artigo “Complete NMR assignments of the antibacterial biflavonoid GB1 from *Garcinia kola*.” **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 8, p. 1034-1036, 2005.

3.2.3 Metilação e Acetilação

Em virtude da alta polaridade dos biflavonóides, durante muito tempo os artifícios utilizados para o isolamento e a caracterização destes compostos foram a metilação ou a acetilação das hidroxilas fenólicas.

A acetilação de bichalconas isoladas de *Dracaena cinnabari* (**23** e **119-121**) produziu fortes efeitos de blindagem no carbono *ipso* e de desblindagem nos carbonos *orto* e *para*, da ordem de 4 -7 ppm (MASAOUD et al., 1995).

3.2.4 Glicosilação

Biflavonóides glicosilados são tipos estruturais de ocorrência muito rara, existindo poucos relatos sobre a existência de heterosídeos naturais: chimarrosideo (**116**)- *Chimarris turbinata* (CARDOSO et al., 2005), (*P*) e (*M*) –cupressuflavona-4'-*O*- β -glicosídeo (**114** e **115**)- *Juniperus communis* (INATOMI et al., 2005), ginkgetina e isoginkgetina-7-*O*- β -glicosídeo - *Ginkgo biloba* (**183** e **184**) (HYUN et al., 2005), 6'''-hidroxilofirona B-4'''-*O*- β -glicosídeo (**125**) - *Ochna integerrima* (KAEWAMATAWONG et al., 2002) e procianidina B-3, 3'-*O*- β -glicosídeo - *Potentilla viscosa* (**47**) (ZHANG et al., 1998). No sítio de glicosilação do chimarrosideo, localizado no C-3 do fragmento de campferol, foram evidenciadas as desblindagens do C-2 ($\Delta\delta$ +9) e C-4 ($\Delta\delta$ +2) e a blindagem do C-3 ($\Delta\delta$ -3), em relação aos valores encontrados para a aglicona (CARDOSO et al., 2005).

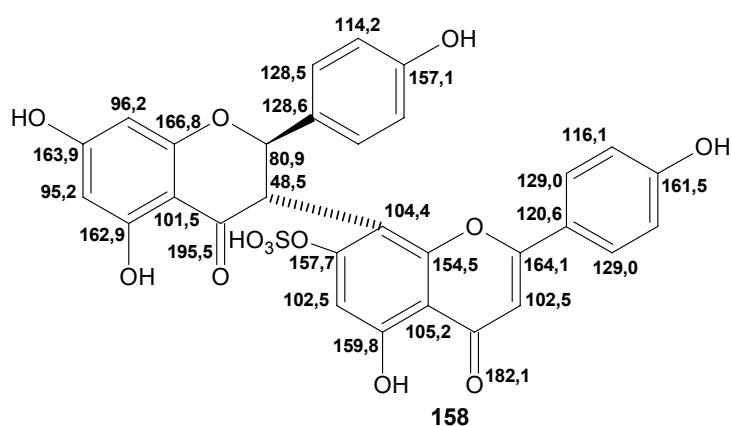
3.2.5 Conectividade

É sabido que a técnica de RMN bidimensional HMBC, quase sempre, fornece inequivocamente a informação da conectividade entre as unidades flavonoídicas, entretanto um simples espectro de RMN ^{13}C -CPD pode ser útil também para proposição da interligação. Como os carbonos C-6 e C-8 não substituídos, em biflavonóides 5,7-dioxigenados, apresentam absorções entre δ 90-100, deslocamentos químicos com incrementos de 6,0-9,6 ppm (CHARI, 1977 apud SI et al., 2001), são indícios de que a conexão entre os monômeros se faz através destes carbonos, respectivamente. Desta forma, Si et al. previram a conectividade de biflavonóides isolados de *Stephania tetrandia* (SI et al., 2001).

Além disso, a conectividade pode ser muitas vezes determinada pelo conhecimento prévio do tipo de ligação dos biflavonóides relatados no gênero da espécie estudada. Geralmente, espécies de *Selaginella* possuem biflavonóides interligados por carbonos C-3' \rightarrow C-6 ou C-8'' (**81-84**, **89**, **166-167**, **173-174**) (LIN et al., 1999).

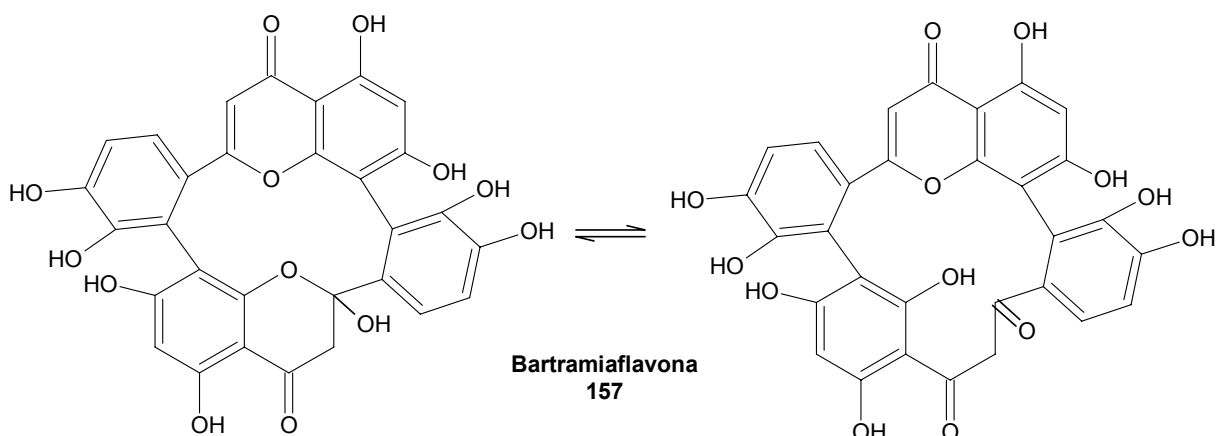
3.2.6 Sulfatação

O espectro de RMN ^{13}C de um biflavonóide sulfatado é muito similar ao de um análogo não-sulfatado, sendo quase superponíveis. No entanto, a identificação de um grupo sulfato é tranquilamente possível devido aos significativos efeitos do grupo aniônico sobre os carbonos *ipso*, *orto* e *para*. Morelloflavona-7-sulfato (**158**) e volkensiflavona-7-sulfato (**159**) exibiram diferenças de deslocamentos químicos no carbono *ipso* ($\Delta\delta$ -6), *orto* ($\Delta\delta$ +4) e *para* ($\Delta\delta$ +2) em relação aos seus congêneres hidroxilados no carbono C-7 (Li et al., 2002).



3.2.7 Biflavonóides atípicos

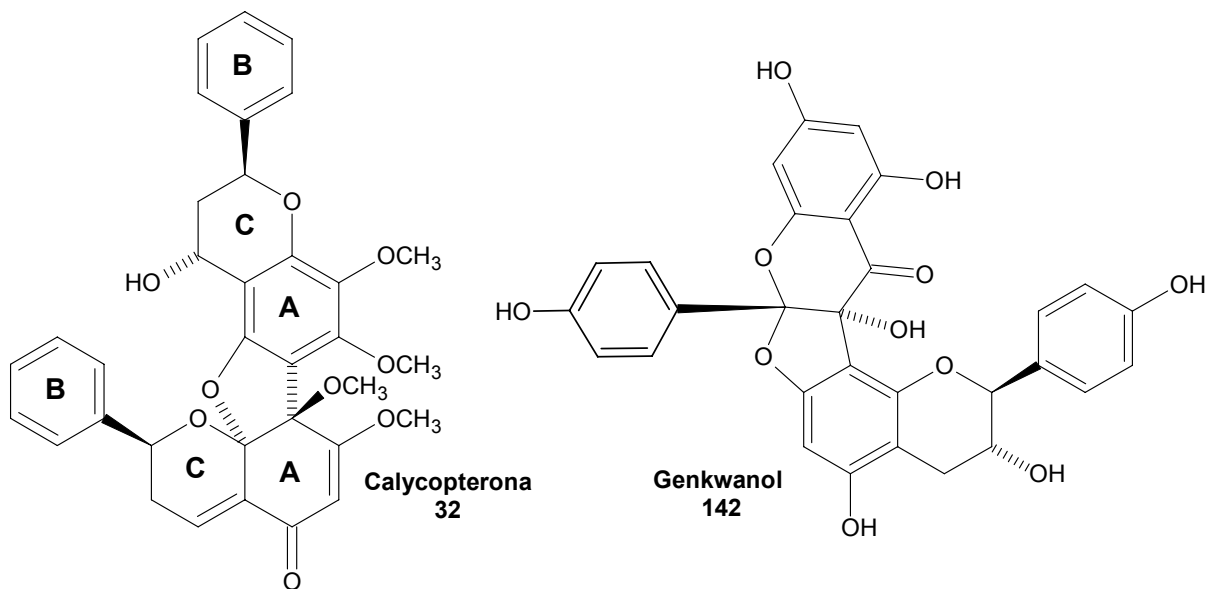
As bartramiaflavonas (**91 e 157**), biflavonóides isolados do musgo *Bartramia pomiformis* e *B. stricta*, chamam a atenção dos pesquisadores pela sua estrutura macrocíclica, inédita na natureza, a qual sob aquecimento a 250 °C ou solução fervente de H_2SO_4 20%, converte-se numa forma acetal (SEEGER et al., 1991).



As calycopteronas (**32-44**) exibem esqueleto original devido à existência de uma carbonila no anel A, implicando em perda de aromaticidade, e conectividade entre os monômeros por meio de um anel tetra-hidrofurano. Propriedades citotóxicas são atribuídas a

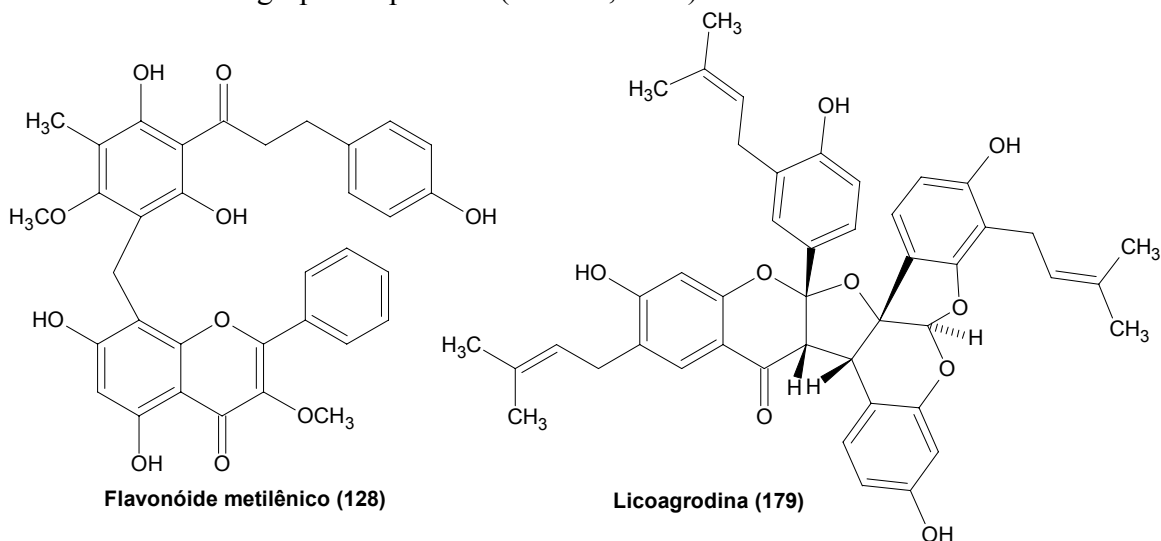
Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith 55

estas biflavanas, descritas apenas em *Calycopteris floribunda* (Combretaceae) (WALL et al., 1994). Substâncias semelhantes somente são encontradas na espécie *Daphne genkwa* (Thymelaeaceae), as quais recebem a denominação de genkwanois (**140-143**), todavia estes últimos são biflavonóides mistos (flavana + flavanonol) (BABA et al., 1993).



Comumente, os biflavonóides são interligados através de ligações diretamente entre os carbonos aromáticos (C-C) ou ligações éter (C-O-C). No entanto, há sete compostos (**117 e 126-131**), obtidos exclusivamente de *Pentagramma triangularis* (Pteridaceae), conectados por ponte metilênica (IINUMA et al., 1994 e 1997; ROITMAN et al., 1993).

Identificado em *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), a licoagrodina (**179**) é um biflavonóide de estrutura química singular em razão da presença de dois anéis tetra-hidrofuranos e três grupos isoprenilas (Li et al., 2000).



3.3. Atividade Biológica

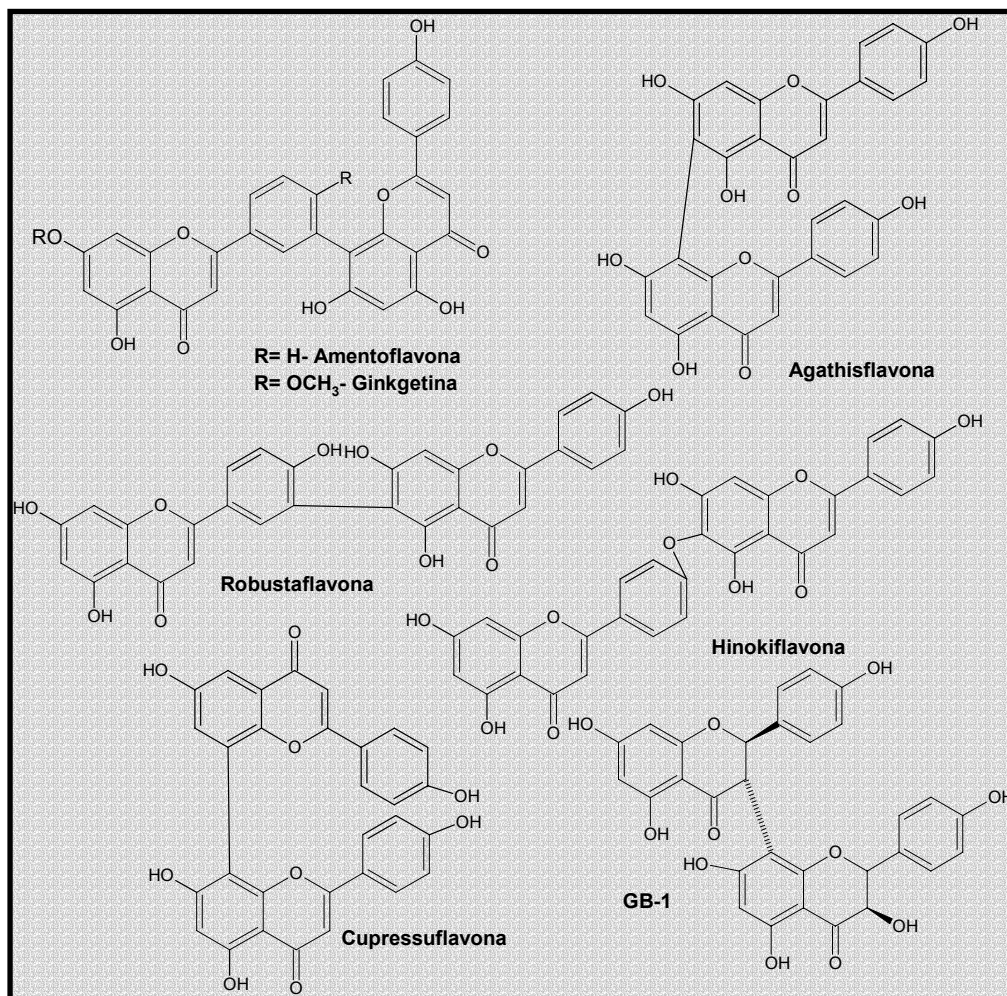
Os biflavonóides são substâncias reconhecidamente de alto valor farmacológico, conforme se pode verificar através da abundância de relatos de atividades biológicas atribuídas aos mesmos (**Tab. 2, p. 59**).

Dentre os biflavonóides farmacologicamente ativos, merecem destaque a amentoflavona, agathisflavona, ginkgetina, hinokiflavona, robustaflavona, rhusflavanona e GB-1 (**Quadro 2, p. 58**), em razão do expressivo número de trabalhos científicos que demonstram suas atividades farmacológicas.

A amentoflavona e agathisflavona apresentaram afinidade por receptores GABA_A/benzodiazepínicos, sendo fortes candidatos para o controle da epilepsia (SVENNINGSEN et al., 2006). Atividades antivirais foram determinadas para os compostos amentoflavona, agathisflavona, rhusflavanona e robustaflavona, em ensaios frente aos vírus *Myxovirus influenzae* (gripe), *Herpes simplex* (LIN et al., 1999) e HIV (LIN et al., 1997). A ação antiinflamatória da ginkgetina foi demonstrada por meio do seu mecanismo de inibição da fosfolipase A₂ e ciclooxigenase-2 (COX-2), representando uma alternativa promissora para o tratamento de dermatites crônicas (LIM et al., 2006).

Os efeitos antiaterogênico (ADARAMOYE et al., 2005) e antioxidante (FAROMBI; NWAOKAFAFOR, 2005) exibidos por GB-1 (**148**) sugerem eficácia deste biflavonóide na prevenção de distúrbios cardiovasculares. GB-1 mostrou atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (HAN et al., 2005), enquanto que seu derivado permetilado foi eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose (LIN et al., 2001).

O potencial antineoplásico destes biflavonóides e análogos já foi avaliado com sucesso, em testes de citotoxicidade frente a linhas de células tumorais (CHEN et al., 2005), (LIN et al., 2000), (SILVA et al., 1995), (LIN et al., 1989) e mediante ensaios de inibição da enzima DNA topoisomerase (GRYNBERG et al., 2002).



Quadro 2- Estruturas de flavonóides farmacologicamente ativos

Tabela 2- Relação das atividades biológicas demonstradas por biflavonóides.

Atividade Biológica	Referência
Antiaterogênica	ADARAMOYE et al, 2005
Antibacteriana	PEGNYEMB et al, 2005 HAN et al, 2005 TANG et al, 2003 MAJINDA et al, 1997 VERDI et al, 2004 BASILE et al, 1999
Anticonvulsivante	SVENNINGSEN et al, 2006
Antifúngica	K.-BARANOWSKA et al, 1999
Anti-HIV	LIN et al, Y. 1997
Antiinflamatória	SELVAM et al, 2004 LIM et al, 2006
Antimalárica	NUNOME et al, 2004 WENIGER et al, 2004 WENIGER et al, 2006
Antiosteoporose	LEE et al, 2006
Antioxidante	YAMAGUCHI et al, 2005 FAROMBI et al, 2005
Antituberculose	LIN, Y et al. 2001
Antitumoral	ITO et al, 1999 MURAKAMI et al, 1992
Antiviral	LIN, Y et al, 1999
Citotóxica	TANG et al, 2003 LIN, L.C et al, 2000 MAYER et al, 1999 SILVA et al, 1995 WALL et al, 1994 KUO et al, 2000 KUO et al, 2002 LIN, Y. et al1989
Inibidor de aflatoxina	FELICIO et al, 2001
Inibidor da aldose -redutase	FELÍCIO et al, 1995
Inibidor da DNA-topoisomerase	OLIVEIRA et al, 2005 GRYNBERG et al, 2002
Leishmanicida	WENIGER et al, 2004 WENIGER et al, 2006
Tripanocida	MBWAMBO et al, 2006 WENIGER et al, 2006

REFERÊNCIAS

- ABEGAZ, B. M.; NGADJUI, B. T.; DONGO, E.; NGAMENI, B.; NINDI, M. N.; BEZABIH, M. Chalcones and other constituents of *Dorstenia prorepens* and *Dorstenia zenkeri*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 877-883, 2002.
- ADARAMOYE, O. A.; NWANERI, V. O.; ANYANWU, K. C.; FAROMBI, E. O.; EMEROLE, G. O. Possible anti-atherogenic effect of kolaviron (a *Garcinia kola* seed extract) in hypercholesterolaemic rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, p. 40-46, 2005.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, 564 p.
- ANHUT, S.; SEEGER, T.; ZINSMEITER, H. D. New dihydrobiflavones from the moss *Plagiomnium cuspidatum*. **Z. Naturforsch.**, v. 44c, p. 189-192, 1989.
- ARIYASENA, J.; BAEK, S. H.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. Ether-linked biflavonoids from *Quintinia acutifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 4, p. 693-696, 2004.
- BABA, K.; TANIGUCHI, M.; Three biflavonoids from *Daphne odora*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1447-1453, 1996.
- BABA, K.; TANIGUCHI, M.; KOZAWA, M. A third spirobiflavonoid genkwanol C from *Daphne genkwa*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 4, p. 913-916, 1993.
- BABA, K.; TANIGUCHI, M.; KOZAWA, M. Three biflavonoids from *Wikstroemia sikokiana*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 3, p. 879-883, 1994.
- BABA, K.; YOSHIKAWA, M.; TANIGUCHI, M.; KOZAWA, M. Biflavonoids from *Daphne odora*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1021-1026, 1995.
- BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, 2005.
- BAI, H.; KOIKE, K.; DOU, D.; PEI, Y.; CHEN, Y.; NIKAIDO, T. A novel biflavonoid from roots of *Glycyrrhiza uralensis* cultivated in China. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 9, p. 1095-1097, 2003.
- BARBOSA, F. G. Contribuição ao Conhecimento Químico de Três Quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Cultivados no Horto de Plantas Medicinais da UFC. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 1983.
- BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Total NMR assignments of new [C₇O-C₇]-biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 334-338, 2005.
- BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J. A.; COBIANCHI, R.C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1479-1482, 1999
- BEKKER, R.; FERREIRA, D.; SWART, K. J.; BRANDT, E. V. Biflavonois. Part 5: structure and stereochemistry of the first bibenzofuranoids. **Tetrahedron**, v. 56, p. 5297-5302, 2000.
- BENNIE, L.; COETZEE, J.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Structure and stereochemistry of dimeric proteracacinidins possessing the rare C-4(C) → C-5(D) interflavanyl linkage. **Phytochemistry**, v. 59, p. 673-678, 2002.
- BENNIE, L.; MALAN, E.; COETZEE, J.; FERREIRA, D. Structure and synthesis of ether-linked proteracacinidin and promelacacinidin proanthocyanidins from *Acacia caffra*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 785-793, 2000.

- BOTHA, J. J.; FERREIRA, D.; ROUX, D. G. Condensed tannins: direct synthesis, structure, and absolute configuration of four biflavonoids from black wattle bark ('Mimosa') extract. **J. Chem. Soc. Chem. Comm.**, n. 1283, p. 700-702, 1978.
- BRINKMEIER, E.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D. Biflavonoids and 4,2'-epoxy-3-phenylcoumarins from the moss *Mnium hornum*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 297-302, 1999.
- BRINKMEIER, E.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D. The cooccurrence of different biflavonoid types in *Pilotrichella flexilis*. **Z. Naturforsch.**, v. 55c, p. 866-869, 2000.
- CAO, S. G.; SIM, K. Y.; GOH, S. H. Biflavonoids of *Calophyllum venulosum*. **J. Nat. Prod**, v. 60, n. 12, p. 1245-1250, 1997.
- CAO, S. G.; SIM K. Y.; GOH, S. H. Minor methylated pyranoamentoflavones from *Calophyllum venulosum*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 15, p. 291-297, 2001
- CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. New biflavonoid and other biflavonoids from leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6B, p. 1353-1359, 2005.
- CARNEIRO, F. J. C.; BORALLE, N.; SILVA, D. H. S.; LOPES, L. M. X. Bi- and tetraflavonoids from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 823-832, 2000.
- CARVALHO, M. G.; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 1, p. 146-149, 2004.
- CHARI, V. M.; ILYAS, M.; WAGNER, H.; NESZMELYI, A.; CHEN, F. C.; CHEN, L. K.; LIN, Y. C.; LIN, Y. M. ¹³C-NMR spectroscopy of biflavonoids. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1273-1278, 1977.
- CHEN, J. J.; DUH, C. Y.; CHEN, J. F. New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **Planta Med.**, v. 71, p. 659-665, 2005.
- DAS, B.; MAHENDER, G.; RAO, Y. K.; PRABHAKAR, A.; JAGADEES, B. Biflavonoids from *Cycas beddomei*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 1, p. 135-136, 2005.
- DORA, G.; EDWARDS, J. M. Taxonomic status of *Lanaria lanata* and isolation of a novel biflavone. **J. Nat. Prod**, v. 54, n. 3, p. 796-801, 1991.
- EL-DESOKY, S. K.; SHARAF, M. A new prenylated biflavone from *Origanum syriacum*. **Rev. Latinoamer. Quim.**, v. 32, n. 1, p. 21-24, 2004.
- ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; MANDER, L. N. **Stereochemistry of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1994, 1267 p.
- ELSOHLY, M. A.; CRAIG, J. C.; WALLER, C. W.; TURNER, C. E. Biflavonoids from fruit of poison ivy *Toxicodendron radicans*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 2140-2141, 1978.
- FAROMBI, E. O.; NWAOKAFAFOR, I. A. Anti-oxidant mechanisms of kolaviron: studies on serum lipoprotein oxidation, metal chelation and oxidative membrane damage in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, p. 667-674, 2005.
- FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; CONSTATINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. **Planta Med.**, v. 61, p. 217-220, 1995.
- FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; PARK, H. R.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; CORDEIRO, I. Biflavonoids from *Ouratea multiflora*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 453-455, 2001.

- FENG, B.; PEI, Y.; HUA, H.; WANG, T.; ZHANG, Y. Biflavonoids from *Stellera chamaejasme*. **Pharmac. Biol.**, v. 41, n. 1, p. 59-61, 2003.
- FERRARI, J.; TERREAUX, C.; KURTAN, T.; SZIKSZAI-KISS, A.; ANTUS, S.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line LC/CD analysis of 3,8"- linked biflavonoids from *Gnidia involucrata*. **Helv. Chim. Acta**, v. 86, p. 2768-2778, 2003.
- FONSECA, F. N.; FERREIRA, A. J. S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N. P.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; KATO, M. J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 575-580, 2000.
- FOO, L. Y. Isolation of [4-O-4]-linked biflavonoids from *Acacia melanoxylon*: first examples of a new class of single ether-linked proanthocyanidin dimmers. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, n. 20, 1989
- FOO, L. Y.; HELM, R.; KARCHESY, J. [5',5']- Bisdihydroquercetin: a B-ring linked biflavonoid from *Pseudotsuga menziesii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1444-1445, 1992.
- FOO, L. Y.; LU, Y.; WONG, H. Biphenyl-linked biflavonoids from grape pomace. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1137-1140, 1998.
- GEIGER, H.; BOKEL, M. Die biflavonoidausstattung von *Chimarrhis turbinata* (Hedw). **Z. Naturforsch.**, v. 44c, p. 559-562, 1989.
- FRIEBOLIN, H. **Basic one and two-dimensional NMR spectroscopy**. Weinheim: VCH, 1991, 344 p.
- GEIGER, H.; MARKHAM, K. R. Campylopusaurone, an auronoflavanone biflavonoid from the mosses *Campylopus clavatus* and *Campylopus holomitrium*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4325-4328, 1992.
- GEIGER, H.; VOIGT, A.; SEEGER, T.; ZINSMEISTER, H. D.; LÓPEZ-SAEZ, J. A.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGERÚELA, A. Cyclobartramiatriteolin, a unique triflavonoid from *Bartramia stricta*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 465-467, 1995.
- GOH, S. H. Neoflavonoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum inophylloide*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 10, p. 1415-1420, 1992.
- GÓMEZ-GARIBAY, F.; CALDERÓN, J. S.; QUIJANO, L.; TÉLLEZ, O.; OLIVARES, M.D.S.; RIOS, T. An unusual prenyl biflavanol from *Tephrosia tepicana*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1285-1287, 1997.
- GÓMEZ-GARIBAY, F.; CALDERÓN, J. S.; ARCINIEGA, M. L. O.; CÉSPEDES, L.; TÉLLES-VALDÉS, O.; TABOADA, J. An unusual isopropenyldihydrofuran biflavanol from *Tephrosia crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1159-1163, 1999.
- GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1453-1456, 2001.
- GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRÍA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 819-822, 2002.
- HAHN, H.; SEEGER, T.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D.; MARKHAM, K. R.; WONG, H. The first biaurone, a triflavone and biflavonoids from two *Aulacomnium* species. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 573-573, 1995.

- HAN, Q. B.; LEE, S. F.; QIAO, C. F.; HE, Z. D.; SONG, J. Z.; SUN, H. D.; XU, H. X. Complete NMR assignments of the antibacterial biflavonoid GB1 from *Garcinia kola*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 8, p. 1034-1036, 2005.
- HARBORNE, J. H.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HE, K.; TIMMERMANN, N.; ALADESANMI, A. J.; ZENG, L. A biflavonoid from *Dysoxylum lenticellare gillespie*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1199-1201, 1996.
- HYUN, S. K.; KANG, S. S.; SON, K. H.; CHUNG, H. Y.; CHOI, J. S. Biflavone glucosides from *Ginkgo biloba* yellow leaves. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 9, p. 1200-1201, 2005.
- IINUMA, M.; KAKUTO, Y.; TANIDA, N.; TANAKA, T.; LANG, F. A. Unusual biflavonoids in the farinose exudate of *Pentagramma triangularis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 4, p. 705-710, 1997.
- IINUMA, M.; TANAKA, T.; SUZUKI, K.; LANG, F. A. Two biflavonoids in the farinose exudate of *Pentagramma triangularis*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1043-1047, 1994.
- INATOMI, Y.; IIDA, N.; MURATA, H.; INADA, A.; MURATA, J.; LANG, F. A.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; NAKANISHI, T. A pair of new atropisomeric cupressuflavone glucosides isolated from *Juniperus communis* var. *depressa*. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, p. 6533-6535, 2005.
- ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y.; RAO, K. S.; TAKAYASU, J.; OKUDA, Y.; MUKAYANAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. A new biflavonoid from *Calophyllum panicflorum* with antitumor-promoting activity. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 12, p. 1668-1671, 1999.
- IWU, M.M.; IGBOKO, O.A. Biflavonoid constituents of *Garcinia kola* roots. **Fitoterapia**, v. LXI, n. 1, p. 178-181, 1990.
- JAYAPRAKASAM, B.; DAMU, A. G.; RAO, K. V.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. A biflavanone from *Cycas beddomei*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 515-517, 2000.
- JAYAPRAKASAM, B.; DAMU, A. G.; RAO, K. V.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. 7-O-Methyltetrahydrochonaflavone, a new biflavanone from *Ochna beddomei*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 4, p. 507-508, 2000.
- KAEWAMATAWONG, R.; LIKHITWITAYAWUID, K.; RUANGRUNGSI, N.; TAKAYAMA, H.; KITAJIMA, M.; AIMI, N. Novel Biflavonoids from the stem bark of *Ochna integerrima*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 7, p. 1027-1029, 2002.
- KAPADIA, G. J.; OGUNTINEIN, B.; SHUKLA, Y. N. High-speed counter-current chromatographic separation of biflavonoids from *Garcinia kola* seeds. **J. Chromatogr. A**, v. 673, p. 142-146, 1994.
- KASSEM, M.E.S.; EL-DESOKY, S.K.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from fruits of *Schinus terebentifolus*. **Chem. Nat. Comp.**, v. 40, n. 5, p. 447-450, 2004.
- KOŁODZIEJ, H. The first natural biflavonoid with flavanol and dihydroflavanol constituents units coupled at the B-ring. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, n. 1258, p. 205-206, 1987.
- KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W.; WIWART, M.; MADZIAR, B. Antifungal biflavones from *Cupressocyparis leylandii*. **Planta Med.**, v. 65, p. 512-573, 1999.

- KUMAR N.; SINGH, B.; BHANDARI, P.; GUPTA, A. P.; UNİYAL, S. K.; KAUL, V. K. Biflavonoids from *Lonicera japonica*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2740-2744, 2005.
- KUO, Y. H.; HWANG, S. Y.; KUO, L. M. Y.; LEE, Y. L.; LI, S. Y. SHEN, Y. C. A novel cytotoxic C-methylated biflavone, taiwanhomoflavone-B-from the twigs of *Cephalotaxus wilsoniana*. **Chem. Pharm. Bull.**,v. 50, n. 12, p. 1607-1608, 2002.
- KUO, Y. H.; LIN, C. H.; HWANG, S. Y.; SHEN, Y. C.; LEE, Y. L.; LI, S. Y. A novel cytotoxic C-methylated biflavone from the stem of *Cephalotaxus wilsoniana*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 48, p. 440-441, 2000.
- LEE, M. K.; LIM, S. W.; YANG, H.; SUNG, S. H.; LEE, H.; PARK, M. J.; KIM, Y. C. Osteoblast differentiation stimulating activity of biflavonoids from *Cephalotaxus koreana*. **Biorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 2850-2854, 2006.
- LI, S. H.; ZHANG, H. J.; NIU, X. M.; YAO, P.; SUN, H. D.; FONG, H. H. S. Chemical constituents from *Amentotaxus yunnanensis* and *Torreya yunnanensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1002-1005, 2003.
- LI, X. C.; JOSHI, A. S.; TAN, B.; ELSOHLY, H. N.; WALKER, L. A.; ZJAWIONY, J. K.; FERREIRA, D. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3→8"-)-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8703-8717, 2002.
- LI, W.; ASADA, Y.; YOSHIKAWA, T. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. **Phytochemistry**, v. 55, p. 447-456, 2000.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; RUNGSERICHAI, R.; RUANGRUNGSI, N.; PHADUNGCHAROEN, T. Flavonoids from *Ochna integerrima*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 353-357, 2001.
- LIM, H.; SON, H. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S.; KIM, H. P. Effects of Anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 5, p. 1046-1049, 2006.
- LIN, L. C.; KUO, Y. C.; CHOU, C. J. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **J. Nat. Prod.**,v. 63, n. 5, p. 627-630, 2000.
- LIN, Y.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. S. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **J. Nat. Prod.**,v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.
- LIN, Y.; CHEN, F. C.; LEE, K. Hinokiflavone, a cytotoxic principle from *Rhus succedanea* and the cytotoxic of the related biflavonoids. **Planta Med.**, v.55, p. 166-168, 1989.
- LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; CASSIDY, C. S.; MAR, A.; CHEN, F. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. **Biorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 2101-2104, 2001.
- LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; SCURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Med.**, v.65, p. 120-125, 1999.
- MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Chalcone-flavone tetramer and biflavones from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 669-674, 2005.
- MAJINDA, R. R. T.; MOTSWALEDI, M.; WAIGH, R. D.; WATERMAN, P. G. Phenolic and antibacterial constituents of *Vahlia capensis*. **Planta Med.**, v. 63, p. 268-270, 1997.

- MASAOUD, M.; RIPPERGER, H.; HIMMELREICH, U.; ADAM, G. Cinnabarone, a biflavonoid from dragon's blood of *Dracaena cinnabari*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 751-753, 1995.
- MASAOUD, M.; HIMMELREICH, U.; RIPPERGER, H.; ADAM, G. New biflavonoids from dragon's blood of *Dracaena cinnabari*. **Planta Med.**, v. 61, p. 341-344, 1995.
- MASESANE, I. B.; YEBOAH, S. O.; LIEBSCHER, J.; MUGGE, C.; ABEGAZ, B. M. A bichalcone from the twigs of *Rhus pyroides*. **Phytochemistry**, V. 53, p. 1005-1008, 2000.
- MAYER, R. Five biflavonoids from *Calycopteris floribunda* (Combretaceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 593-601, 2004.
- MAYER, R. Calycopterones and calyflorenones, novel biflavonoids from *Calycopteris floribunda*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 9, p. 1274-1278, 1999.
- MBING, J. N.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADÉ, A. T.; ALLOUCHI, H.; GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; MBAFOR, J. T.; THI, R. G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.; GUEIFFIER, A. Two flavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2666-2670, 2006.
- MBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; THI, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Two flavonoids from *Ouratea flava* stem bark. **Phytochemistry**, v. 63, p. 427-431, 2003.
- MBWAMBO, Z. K.; KAPINGUN, M. C.; MOSHI, M. J.; MACHUMI, F.; APERS, S.; COS, P.; FERRERA, D.; MARAIS, J. P. J.; BERGHE, D. V.; NAES, L.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiparasitic activity of some xanthenes and biflavonoids from root bark of *Garcinia livingstonei*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n.3, p. 369-372, 2006.
- MDEE, L. K.; YEBOAH, S. O.; ABEGAZ, B. M. Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from the root bark of *Rhus pyroides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 5, p. 599-604, 2003.
- MESSANGA, B.; TIH, G. R.; KIMBU, S.; SONDEGAM, B. L. Calodenone, a new isoflavonoid from *Ochna calodendron*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 2, p. 245-248, 1992.
- MESSANGA, B.; TIH, G. R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna calodendron*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 791-794, 1994.
- MURAKAMI, A.; TANAKA, S.; OHIGASHI, H.; HIROTA, M.; IRIE, R.; TAKEDA, N.; TATEMATSU, A.; KOSHIMIZU, K. Possible anti-tumor promotes: bi- and tetraflavonoids from *Lophira alata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2689-2693, 1992.
- NUNOME, S.; ISHIYAMA, A.; KOBAYASHI, M.; OTOGURO, K.; KIYOH HARA, H.; YAMADA H.; OMURA, S. In vitro antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica*. **Planta Med.**, v. 70, p. 72-76, 2004.
- OLIVEIRA, M. C.; CARVALHO, M. G.; GRYNBERG, N. F.; BRIOSO, P. S.; A biflavonoid from *Luxemburgia nobilis* as inhibitor of DNA topoisomerase. **Planta Med.**, v. 71, p. 563-566, 2005.
- OLIVEIRA, M. C.; CARVALHO, M. G.; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoid and other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 1, p. 119-123, 2002.
- PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADÉ, A. T.; THI, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1922-1926, 2005.

- PEGNYEMB, D. E.; THI, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna afzelii*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 579-582, 2001.
- RAMPENDAHL, C.; SEEGER, T.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D. The biflavonoids of *Plagiomnium undulatum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1621-1624, 1996.
- RANI, M. S.; RAO, C. V.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. A biflavonoid from *Cycas beddomei*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 319-321, 1998.
- RAO, K. V.; SREERAMULU, K.; RAO, C. V. GUNASEKAR, D. Two new biflavonoids from *Ochna obtusata*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 6, p. 632-634, 1997.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Colômbia: Editorial Premier, 1997, 352 p.
- ROITMAN, J. N.; WONG, R. Y.; WOLLENWEBER, E. Methylene bisflavonoids from frond exudates of *Pentagramma triangularis* ssp *triangularis*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 297-301, 1993.
- SAKASAI, M.; FUKUI, H.; YAMANE, H.; KYAW, A. N.; TAHARA, S. A new class of biflavonoids: 2'-hydroxygenistein dimmers from the roots of white lupin. **Z. Naturforsch.**, v. 55c, p. 165-174, 2000.
- SEEGER, T.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D. Bartramiaflavone, a macrocyclic biflavonoid from the moss *Bartramia pomiformis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1653-1656, 1991.
- SEEGER, T.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D. 3',3'''- Binaringenin, a new biflavonoid from *Pilotrichella cuspidata* (Meteoriaceae, Musci). **Z. Naturforsch.**, v. 47c, p. 667-669, 1992.
- SEEGER, T.; ZINSMEISTER, H. D. The biflavonoid pattern of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. **Z. Naturforsch.**, v. 45c, p. 583-586, 1990.
- SEEGER, T.; GEIGER, H.; ZINSMEISTER, H. D.; ROZDZINSKI, W. Biflavonoids from the moss *Homalothecium lutescens*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 295-296, 1993.
- SELVAM, C.; JACHAK, S. M. A cyclooxygenase (COX) inhibitory biflavonoid from the seeds of *Semecarpus anacardium*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 209-212, 2004.
- SI, D.; ZHONG, D.; SHA, Y.I., LI, W. Biflavonoids from aerial part of *Stephania tetrandra*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 563-566, 2001.
- SILVA, G. L.; CHAI, H. C.; GUPTA, M. P.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, D. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 129-134, 1995.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Eds. UFRGS e UFSC, 1999, 820 p.
- SVENNINGSEN, A. B.; MADSEN, K. D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J.; JAGER, A. K. Bioflavones from *Rhus* species with affinity for the GABA_A/benzodiazepine receptor. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 276-280, 2006.
- TANG, S.; BREMNER, P.; KORTENKAMP, A.; SCHLAGE, C.; GRAY, A. I.; GIBBONS, S.; HEINRICH, M. Biflavonoids with cytotoxic and antibacterial activity from *Ochna macrocalyx*. **Planta Med.**, v. 69, p. 247-253, 2003.

- TANIGUCHI, M.; BABA, K. Three biflavonoids from *Daphne odora*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1447-1453, 1996.
- TANIGUCHI, M.; FUJIWARA, A.; BABA, K.; WANG, H. N. Two biflavonoids from *Daphne acutiloba*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 863-867, 1988.
- TERASHIMA, K.; AQIL, M.; NIWA, M. Garcinianin, a novel biflavonoid from the roots of *Garcinia kola*. **Heterocycles**, v. 41, n. 10, p. 2245-2250, 1995.
- THI, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDEGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Minor biflavonoids from *Lophira alata* leaves. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 8, p. 1206-1208, 2006.
- THI, R.G.; THI, G.; SONDEGAM, M. T.; MARTIN, M. T.; BODO, B. A new chalcone dimer from *Lophira alata*. **Tetrahedron Lett.**, v. 29, n. 5, p. 5797-5800, 1988.
- THI, R. G.; SONDEGAM, M. T.; Lophirones D and E: two new cleaved biflavonoids from *Lophira lanceolata*. **J. Nat. Prod.**, v. 52, n. 2, p. 284-288, 1989.
- THI, R. G.; SONDEGAM, M. T.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimmers lophirone F, G and H from *Lophira lanceolata* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2289-2293, 1990.
- THI, R. G.; SONDEGAM, M. T.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of Lophirones B and C, biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 1557-1559, 1989.
- THI, R. G.; SONDEGAM, M. T.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structures of isombamichalcone and lophirochalcone, bi- and tetra-flavonoids from *Lophira lanceolata*. **Tetrahedron Lett.**, v. 30, n. 14, p. 1807-1810, 1989.
- VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; WERLE, A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 283-292, 2002.
- VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B. P.; BRIGHENTE, M. C. JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. F. A.; SIMIONATTO, E. L.; MONACHE, F. D. Antibacterial and brine shrimp lethality of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360-363, 2004.
- WALL, M. E.; WANI, M. C.; FULLAS, F.; OSWALD, J. B.; BROWN, D. M.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V.; MCPHAIL, A. T.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, D.; BESTERMAN, J. Plant antitumor agents. 31. The calycopterones, a new class of biflavonoids with novel cytotoxicity in a diverse panel of human tumor cell lines. **J. Med. Chem.**, v. 37, n. 10, p. 1465-1470, 1994.
- WENIGER, B.; SÉNÉCHEAU, C. V.; ARANGO, G. J.; KAISER, M.; BRUN, R.; ANTON, R. A bioactive biflavonoid from *Camptosperma panamense*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 764-767, 2004.
- WENIGER, B.; SÉNÉCHEAU, C. V.; KAISER, M.; BRUN, R.; ANTON, R. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. **Phytomedicine**, v. 13, p. 176-180, 2006.
- WOLLNWEBER, E.; KRAUT, L.; MUES, R.; External accumulation of biflavonoids on gymnosperm leaves. **Z. Naturforsch.**, v. 53c, p. 946-950, 1998.
- YAMAGUCHI, L. F.; VASSÃO, D. G.; KATO, M. J.; DI MASCIO, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247, 2005.

YU, L. L.; HUANG, R.; L. V, Y.; ZHAO, Y.; CHEN, Y. A New Biflavonoid from *Aristolochia contorta*. **Pharmazie**, v. 60, n. 10, p. 789-791, 2005.

ZHANG, B.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Potentillanin, a biflavonoid and a procyanidin glycoside from *Potentilla, viscosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3277-3280, 1988.

4. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Validação é o processo de certificação da credibilidade de um método analítico, tendo como finalidade a obtenção de evidência documentada de que o mesmo realiza a tarefa para o qual é indicado. A validação representa uma ferramenta imprescindível para o controle de qualidade de produtos industrializados ou *in natura*, para os quais espera-se que estejam em conformidade com a legislação e atendendo aos desejos e exigências do consumidor. Desta forma, faz-se necessária a adoção de metodologias analíticas que permitam a comparabilidade e rastreabilidade dos produtos e a confiabilidade dos resultados das medições, levando-se em consideração custo e praticidade (LEITE, 2002).

A validação requer a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção e exatidão (RIBANI et al., 2004).

4.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico de propiciar a separação e a detecção das substâncias de interesse, mesmo na presença de interferentes. Assim sendo, em cromatografia, um pico deve corresponder a um único componente sob investigação (RIBANI et al., 2004).

4.2. Linearidade

Um método apresenta linearidade quando produz respostas diretamente proporcionais às concentrações da substância em análise. Essa relação é observada através da construção de uma curva de calibração, a partir das áreas dos sinais e suas respectivas concentrações, sendo necessários no mínimo 5 pontos (não incluindo o ponto zero na curva). A curva gerada pode ser descrita por uma equação do tipo $y = ax + b$ (RIBANI et al., 2004).

4.3. Sensibilidade

A sensibilidade significa a capacidade do método de discriminar amostras contendo teores de analito próximos. Entre dois métodos, o mais sensível é aquele que possui a curva de calibração com maior inclinação (LEITE, 2002).

4.4. Precisão

A precisão é a avaliação do grau de dispersão dos resultados obtidos entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra. Sua aferição é feita através da determinação do desvio padrão absoluto (σ) ou de sua estimativa (s), em razão do pequeno

número de medições. Além disso, há a possibilidade de “s” ser expresso em termos percentuais, desvio padrão relativo (RSD%), também denominado de coeficiente de variação (CV).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{RSD (\%)} \text{ ou } CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Na validação de métodos, a precisão pode ser analisada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

- Repetitividade (INMETRO) ou repetibilidade (ANVISA)- concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições analíticas (procedimento, analista, instrumento, local), em um curto período. As medições da repetitividade são efetuadas a partir da mesma amostra, mas em preparações diferentes, sendo também denominada de precisão intra-ensaio ou intra-corrida. Entretanto, é comum a confusão com outro termo adotado em validação: a precisão instrumental, a qual é medida pela determinação do “s” das respostas de injeções repetitivas de uma mesma preparação (≥ 10) (RIBANI et al., 2004).
- Precisão intermediária- é a avaliação das variações percebidas de um dia de análise em relação a outro ou resultantes da troca de um analista, visando à garantia de que o método funciona satisfatoriamente, no laboratório.
- Reprodutibilidade- concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra efetuadas sob condições variadas (mudança de laboratório) A IUPAC recomenda que as análises sejam reproduzidas em pelo menos cinco laboratórios.

4.5. Limite de Detecção (LD)

Representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Na prática, é determinado como sendo a concentração que produz um sinal equivalente a três vezes o nível do ruído produzido por uma solução-controle (“branco” analítico) ou estimado por parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

$$LD = 3,3 \times s / S$$

Onde: s- estimativa do desvio padrão da resposta ou coeficiente linear da reta e S- inclinação da curva analítica.

4.6. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) refere-se ao menor valor de concentração determinado para a substância de interesse, respeitando-se a precisão e a exatidão do método (LEITE, 2004). A determinação do LQ pode ser feita através da relação sinal-ruído (influenciável por condições experimentais) e parâmetros da curva analítica (estatisticamente mais confiável) (RIBANI et al., 2004).

$$LQ = 10 \times s / S$$

Onde: *s*- estimativa do desvio padrão da resposta ou coeficiente linear da reta e *S*- inclinação da curva analítica.

4.7. Exatidão

A exatidão corresponde ao grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência, aceito como verdadeiro. A avaliação da exatidão pode ser realizada através do uso de material de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. As determinações são efetuadas em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), estando sempre associadas a valores de precisão (RIBANI et al., 2004).

REFERÊNCIAS

- LEITE, F. **Validação em análise química**. 4ª. ed. Campinas: Editora Átomo, 2002, 275 p.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

5.1. Amburanina A (ACCE-5)

Cromatografias em gel de sílica e Sephadex LH-20 da fração ACCE₁AM, obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas do caule de *A. cearensis*, forneceu 61 mg de um sólido amorfo amarelo (pf. > 300 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,2^\circ$, MeOH, c 0,05), denominado ACCE-5 (item 10.1.6.7, p. 278).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 9, p. 77) mostrou uma banda larga em 3335 cm⁻¹, correspondente à deformação axial de ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila; absorção em 1641 cm⁻¹ relativa à deformação axial C=O, evidenciando a existência de carbonila; bandas esqueléticas em 1512 e 1440 cm⁻¹ de C=C_{arom.}; absorção em 1252 e 1171 cm⁻¹ referentes às deformações axiais C-O e bandas em 955 e 829 cm⁻¹ relacionadas à deformação angular C_{arom}-H.

O espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, Fig. 10, p. 77) mostrou quatro dupletos em δ 7,25; 7,02; 6,72 e 6,62 (2H, $J = 8,4$ e $8,7$ Hz), compatíveis com dois sistemas aromáticos *para*-dissubstituídos. Dupletos em δ 5,95 (H-6) e 5,86 (H-8) (1H, $J = 2,0$ Hz) foram associados a hidrogênios *meta*-posicionados. Foram exibidos dois sinais como tripletos em δ 3,29 (H- α) e 2,87 (H- β) (2H, $J = 7,7$ Hz) e ainda sete sinais simples em δ 13,17; 11,70; 9,77; 9,17; 6,51; 5,96 (1H) e δ 11,02 (2H). O espectro gs-COSY (Fig. 11, p. 78) permitiu distinguir os hidrogênios pertencentes a cada anel benzênico *para*-dissubstituído, através dos acoplamentos entre os sinais δ 7,25 (H-2',6') e 6,72 (H-3',5') ($J = 8,4$ Hz), bem como entre os sinais em δ 7,02 (H-2''',6''') e 6,62 (H-3''',5''') ($J = 8,7$ Hz).

No espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, DMSO-*d*₆, Fig. 12, p. 78) foram observadas 26 linhas espectrais, quatro das quais, δ 130,0 (C-2''',6'''); 129,3 (C-2',6'); 115,9 (C-3''',5''') e 115,6 (C-3',5'), visivelmente mais intensas, foram associadas a carbonos quimicamente equivalentes de anéis benzênicos *para*-substituídos, totalizando 30 carbonos. Dois sinais em δ 203,7 (C- β') e 192,2 (C-4) foram atribuídos a carbonilas não-conjugadas (cetona ou aldeído), sugerindo a existência de duas unidades flavonoídicas. Além disso, oito sinais em δ 167,7 (C-7); 166,7 (C-4''); 164,0 (C-2''); 163,5 (C-5); 162,2 (C-6''); 161,3 (C-9); 159,5 (C-4') e 156,4 (C-4''') foram relacionados a carbonos sp² oxigenados. Como nenhum destes carbonos apresentava deslocamento químico no intervalo $144 \leq \delta_C \leq 148$, deduziu-se que a estrutura não possuía carbonos oxigenados *orto*-posicionados.

O espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, DMSO- d_6 , **Fig. 13, p. 79**) revelou a existência de dois carbonos metilênicos, ao exibir os sinais em δ 45,3 (C- α) e 30,3 (C- β) com amplitude negativa, em oposição às sete linhas espectrais de carbonos mono-hidrogenados: os quatro sinais mais intensos, além dos sinais em δ 98,5 (C-5''); 97,5 (C-6) e 95,5 (C-8). Os carbonos não-hidrogenados, reconhecidos por subtração dos espectros obtidos pelas duas técnicas de RMN ^{13}C , foram relacionados aos deslocamentos químicos em δ 131,8 (C-1'''); 124,5 (C-1'); 118,6 (C-2); 108,4 (C-3''); 101,9 (C-1''); 99,4 (C-10) e 80,5 (C-3), além daqueles referentes aos oito carbonos sp^2 oxigenados. A ausência dos sinais em δ 203,7 (C- β') e 192,7 (C-4) no DEPT135 confirma que estas absorções são referentes a carbonilas de cetonas.

A tabela 3 (**p. 76**) apresenta os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , correlacionando os hidrogênios aos seus respectivos carbonos, a partir de informações extraídas do espectro HMQC (**Fig. 14, p. 79**), através do qual se pôde notar que o singlete em δ 5,96 (H-5'') foi o único dos sinais simples a apresentar correlação com um sinal de carbono, δ 98,5 (C-5''). Em virtude da presença de carbonos aromáticos oxigenados, os demais singletos foram atribuídos a hidroxilas fenólicas, as quais tiveram suas posições determinadas através do espectro HMBC (**Fig. 15, p. 80**), segundo correlações dispostas na mesma tabela.

ACCE-5 apresentou o pico do íon molecular com m/z 558,4983 (calculado m/z 558,4891) no espectro de massa de alta resolução (EM-IE, **Fig. 16, p. 83**), correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (IDH=20), compatível com um esqueleto de biflavonóide composto por um fragmento de flavanonol e outro di-hidrochalconóide.

O espectro HMBC forneceu evidências de uma unidade de flavanonol, através das correlações entre os hidrogênios em δ 7,25 (H-2',6'), pertencentes a um dos sistemas *para*-substituído, com o sinal de carbono sp^3 dioxigenado em δ 118,6 (C-2), o qual se encontrava correlacionado ao hidrogênio hidroxílico do carbono HO-C-3 (δ 6,51). Este mesmo hidrogênio mostrou-se acoplado com o carbono carbonílico em δ 192,2 (C-4). O anel A do flavanonol foi identificado por meio das correlações entre o duplete em δ 5,86 (H-8) com os sinais de carbonos aromáticos oxigenados em δ_{C} 167,7 (C-7) e 161,3 (C-9), o duplete em δ 5,95 (H-6) com o sinal de carbono aromático oxigenado em δ 163,5 (C-5) e ambos os dupletos com o sinal de carbono não hidrogenado em δ 99,4 (C-10).

A presença de um fragmento di-hidrochalconoídico foi evidenciada pelos acoplamentos a longa distância dos hidrogênios metilênicos (δ 3,29 e 2,87; CH₂- α e CH₂- β) com a carbonila mais desblindada ($\delta_{C-\beta}$ 203,7; C- β'). Tal hipótese foi reforçada através das correlações dos hidrogênios de um dos sistemas *para*-substituídos (δ 7,02; H-2''',6''') com o carbono metilênico na posição β à carbonila (δ 30,3; C- β'). Também foi importante a correlação do sinal da hidroxila em δ 13,17 (HO-C-6'') com os sinais de carbonos aromáticos em δ_C 101,9 (C-1''); 98,5 (C-5'') e os carbonos aromáticos oxigenados em δ_C 162,2 (C6'') e 166,7 (C-4''), sendo este último através de um acoplamento em “W” (4J). O acoplamento entre o H-5'' (δ 5,96) com o C-4'' (δ 166,7) também foi observado.

Os dois fragmentos que formam a estrutura biflavonoídica de ACCE-5 correspondem aos resíduos dos flavonóides aromadendrina (**189**) e floretina (**190**) (AGRAWAL, 1989), cujos deslocamentos químicos de RMN ¹³C apresentam um alto grau de concordância com os registrados para ACCE-5 (**Tab. 3, p. 76**). No entanto, restando ainda uma insaturação para completar o IDH calculado, foi sugerida a formação de um anel di-hidrofurânico entre os carbonos C-2 (δ 118,6) e C-3 (δ 80,5) do fragmento aromadendrina com os carbonos C-3'' (δ 108,4) e C-4'' (δ 166,7) do fragmento floretina. O indício que apoiou esta hipótese foi o acoplamento em “W” (4J) entre o H-5'' (δ 5,96), pertencente ao fragmento da di-hidrochalcona floretina com o C-3 (δ_{C-3} 80,5), membro do fragmento do flavanonol aromadendrina.

A estrutura química de ACCE-5, inédita na literatura, mostrou-se nitidamente semelhante às estruturas exibidas pelas dafnodorinas (**132**, **133**, **142**, **143**) (BABA et al., 1995) (**136** e **137**) (TANIGUCHI et al., 1996), substâncias isoladas de *Daphne odora*. ACCE-5 foi denominada amburanina A (2'',3,4',4''',5,6'',7-heptahidroxi-2-O-4'':3-3''-flavanona-dihidrochalcona).

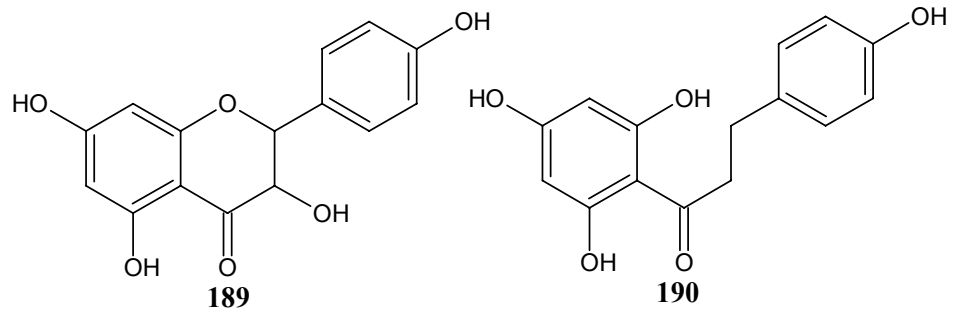
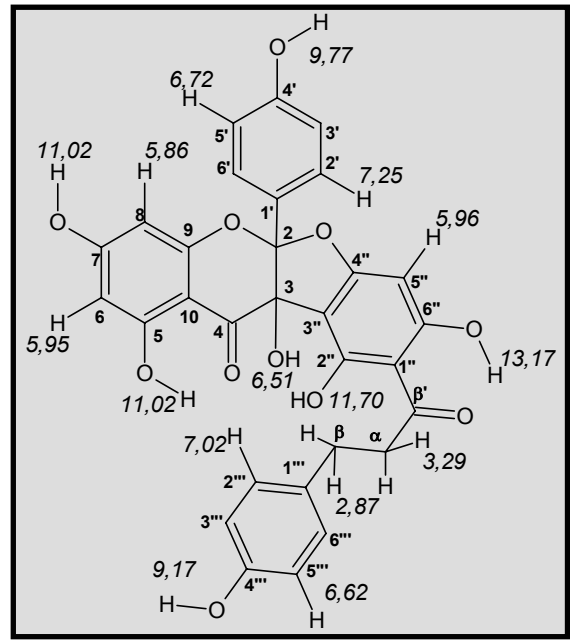
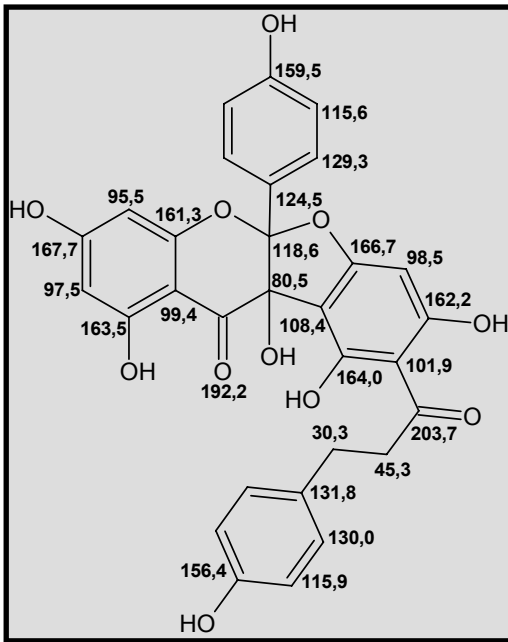


Tabela 3- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-5 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HMQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de aromadendrina e floretina, registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).

# C	Aromadendrina- Floretina* δ_{C} (ppm)	ACCE-5 δ_{C} (ppm) DMSO- d_6	HMQC* δ_{H} (ppm)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
2	85,0	118,6			7,25; 6,51
3	73,7	80,5		6,51	(5,96)
4	198,4	192,2			6,51
5	165,3	163,5		5,95	
6	97,5	97,5	5,95 (1H, d, 2,0 Hz)		5,86
7	168,8	167,7		5,86	
8	96,4	95,5	5,86 (1H, d, 2,0 Hz)		5,95
9	164,6	161,3		5,86	
10	101,9	99,4			5,95; 5,86
1'	129,4	124,5			6,72
2', 6'	130,4	129,3	7,25 (2H, d, 8,7 Hz)		
3', 5'	116,3	115,6	6,72 (2H, d, 8,7 Hz)		9,77
4'	159,2	159,5		9,77	
1''	105,3	101,9			13,17
2''	166,0	164,0		11,70	
3''	95,7	108,4			6,51
4''	165,8	166,7		5,96; 5,86	(13,17)
5''	95,7	98,5	5,96 (1H, s)		13,17
6''	166,0	162,2		13,17	
β'	206,5	203,7		3,29	2,87
α	47,1	45,3	3,29 (2H, t, 7,7 Hz)	2,87	
β	31,4	30,3	2,87 (2H, t, 7,7 Hz)		7,02
1'''	134,0	131,8		2,87	3,29
2''', 6'''	130,2	130,0	7,02 (2H, d, 8,4 Hz)		2,87
3''', 5'''	116,1	115,9	6,62 (2H, d, 8,4 Hz)		9,17
4'''	156,2	156,4			7,01
HO-C3				6,51	
HO-C5				11,02	
HO-C7				11,02	
HO-C2''				11,70	
HO-C6''				13,17	
HO-C4'				9,77	
HO-C4'''				9,17	

*CD₃OD

*(int., multip, J_{H,H})

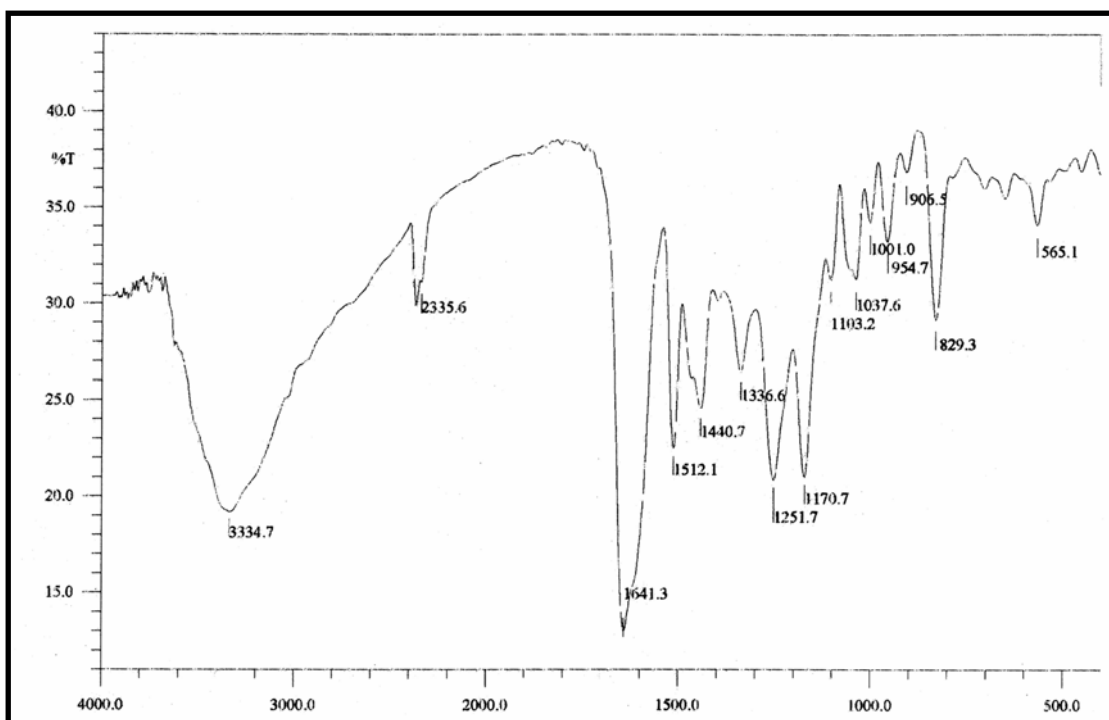


Figura 9- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACCE-5 (pastilhas de KBr)

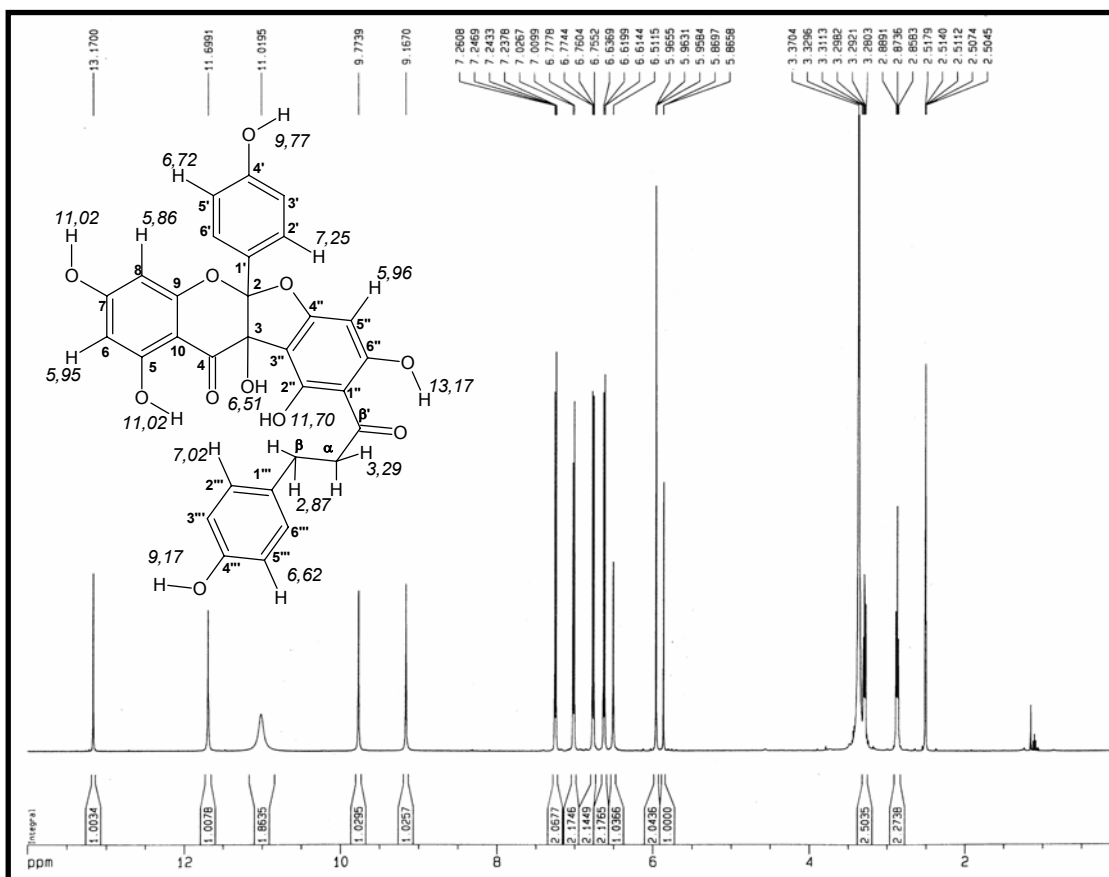


Figura 10- Espectro de RMN ^1H de ACCE-5 (DMSO- d_6 , 500 MHz)

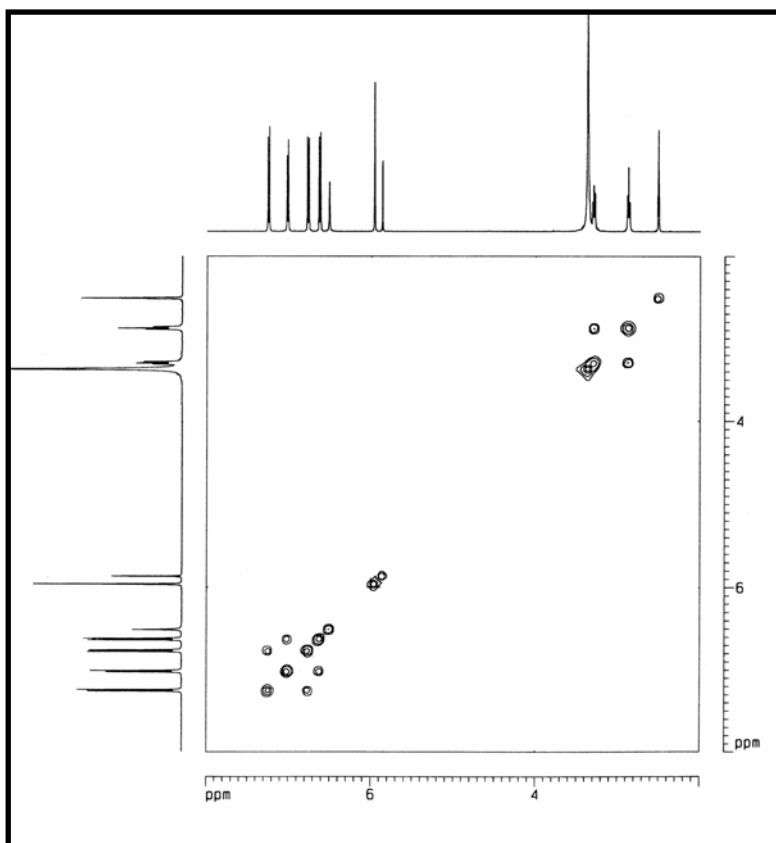


Figura 11- Espectro de RMN-COSY (DMSO- d_6 , 500 x 500 MHz) de ACCE-5

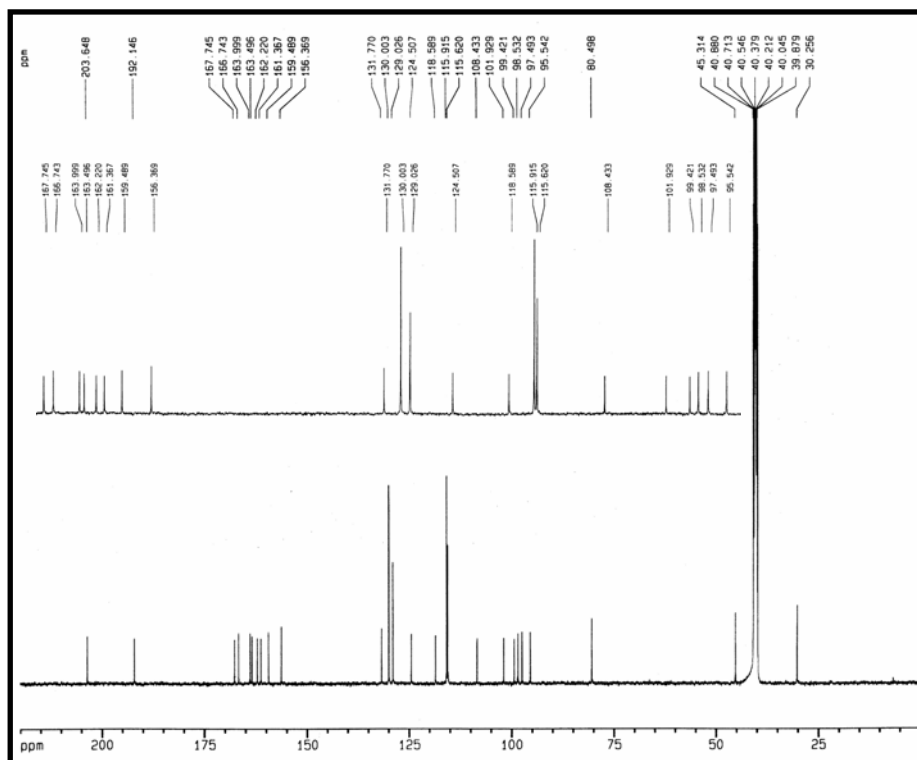


Figura 12- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-5 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

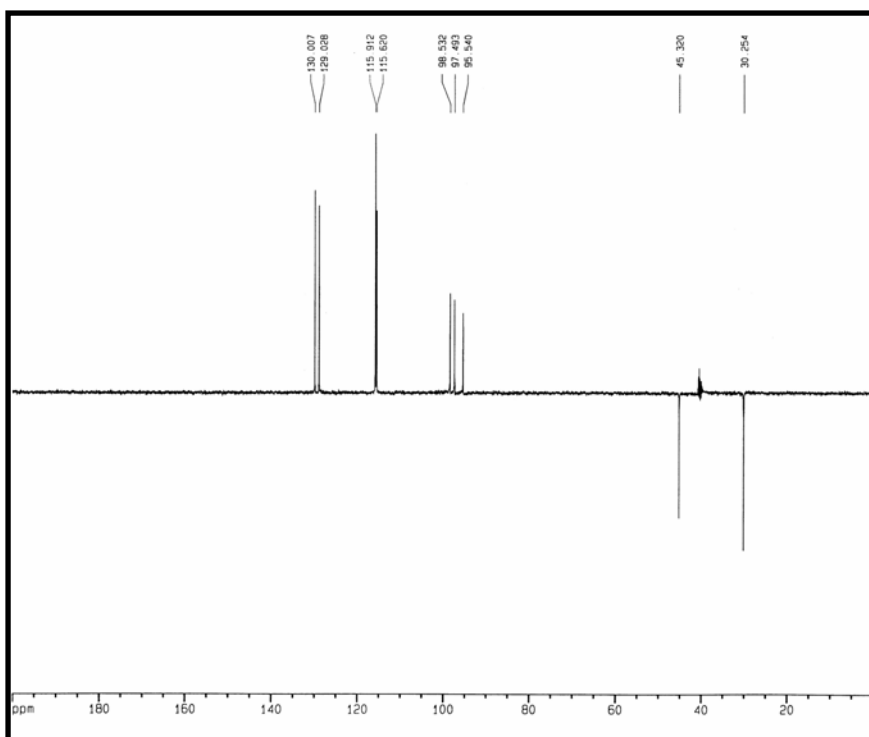


Figura 13- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACCE-5 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

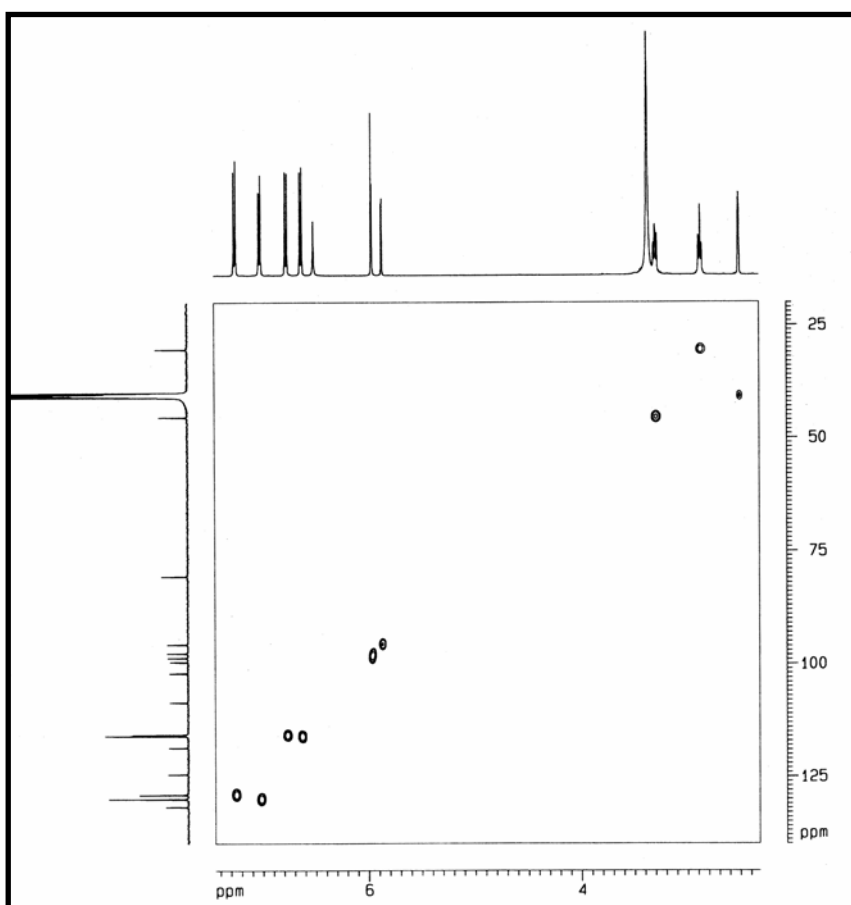


Figura 14- Espectro de RMN-HMQC (DMSO- d_6 , 125 x 500 MHz) de ACCE-5

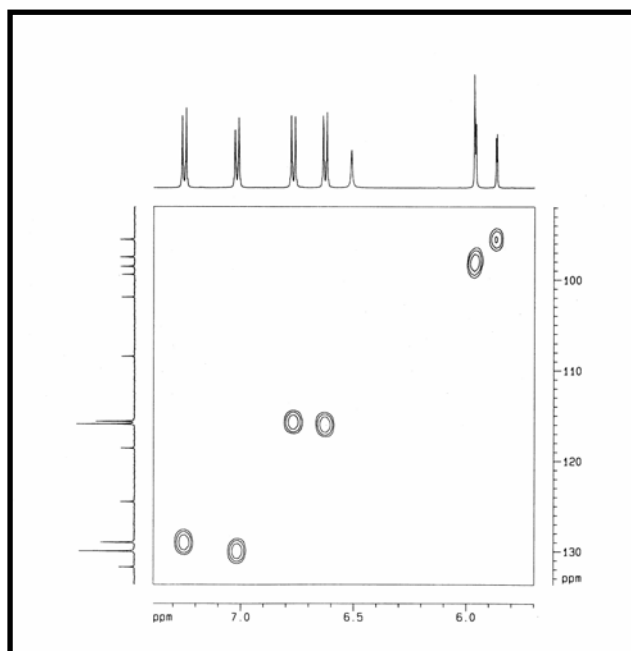


Figura 14a- Expansão da região δ 5,5-7,5 x 95,0-133 do espectro HMQC.

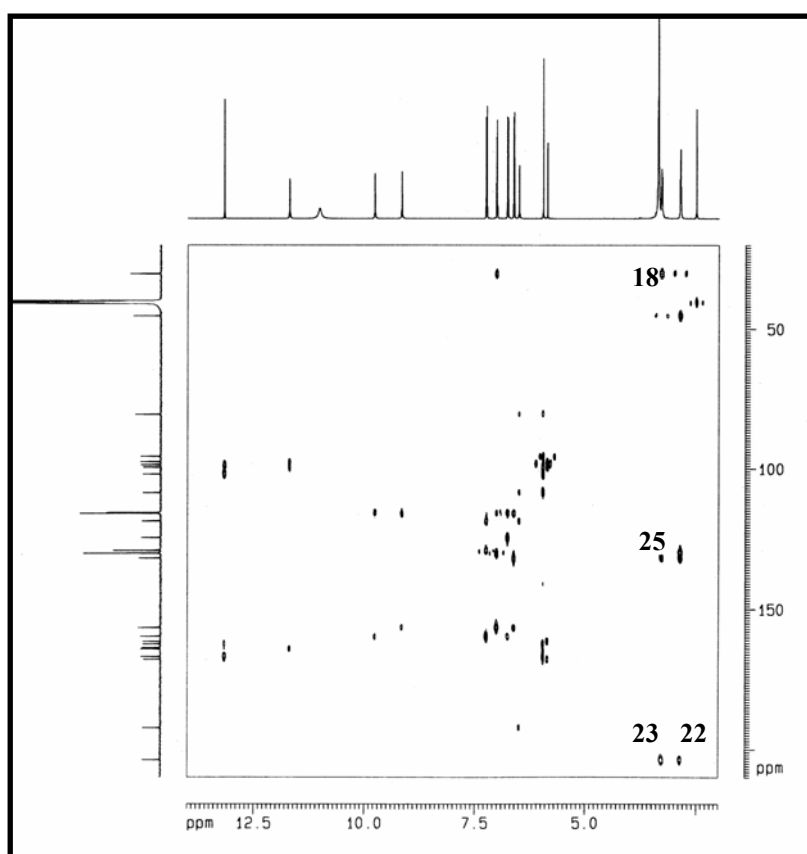


Figura 15- Espectro de RMN-HMBC (DMSO- d_6 , 125 x 500 MHz) de ACCE-5

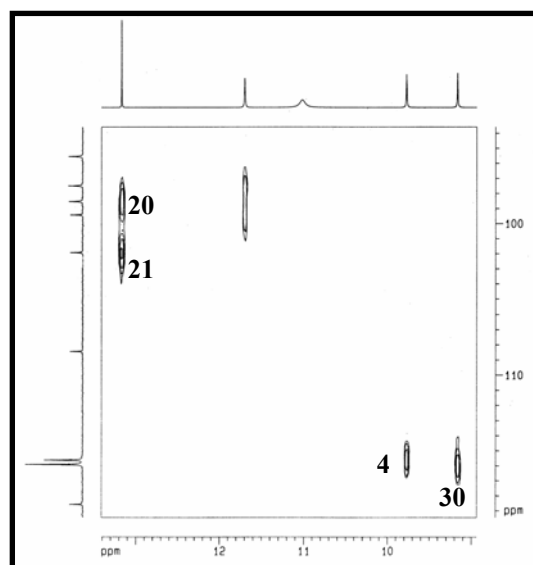
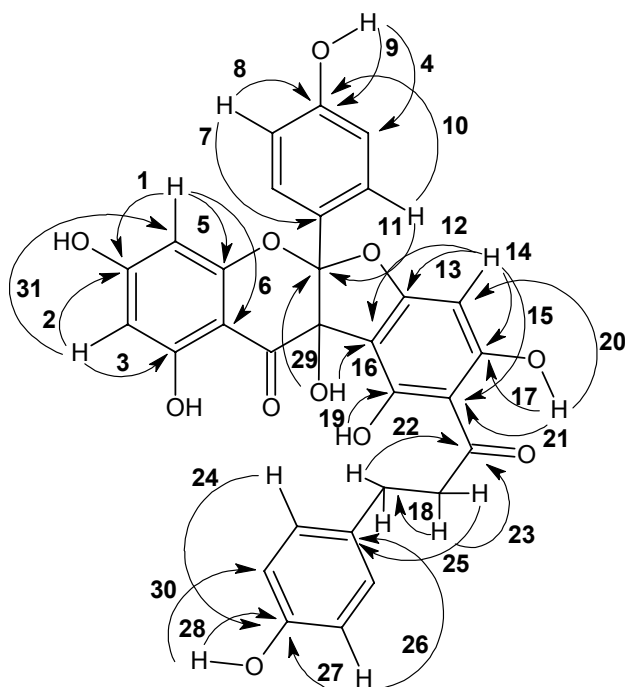
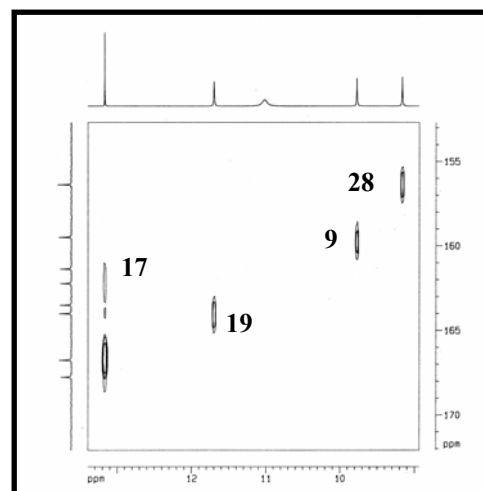
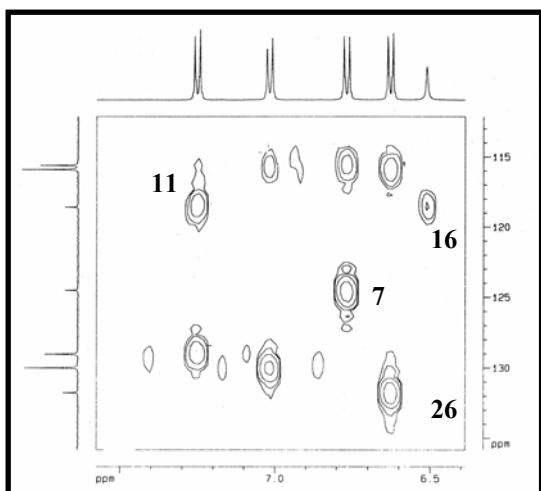


Figura 15a- Expansões do espectro HMBC de ACCE-5: **(I)** δ 6,4-7,6 x 112-131; **(II)** δ 9,0-13,4 x 153-172; **(III)** δ 9,0-13,4 x 103-120.

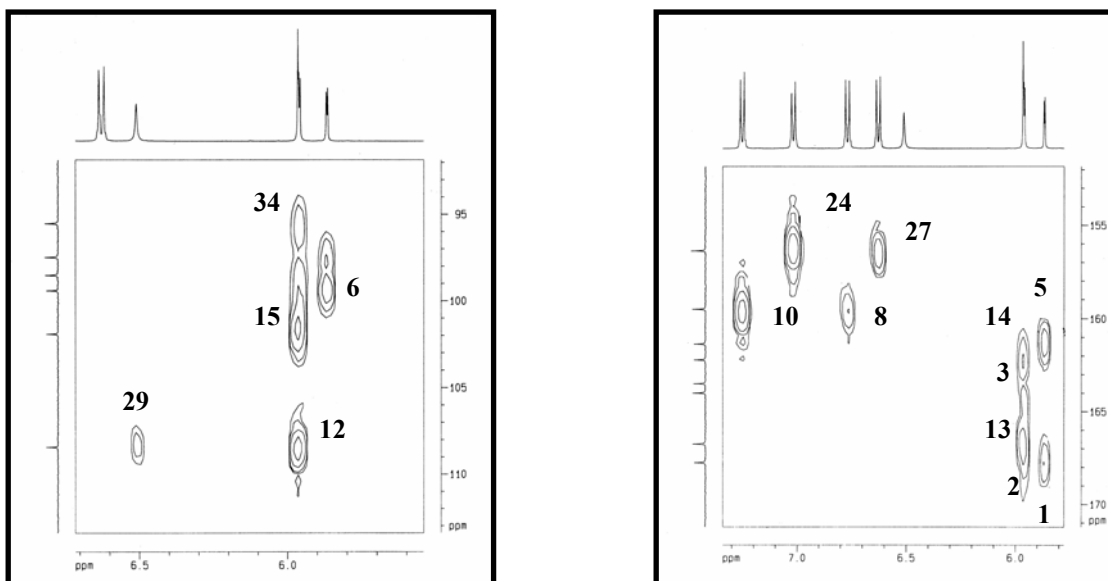
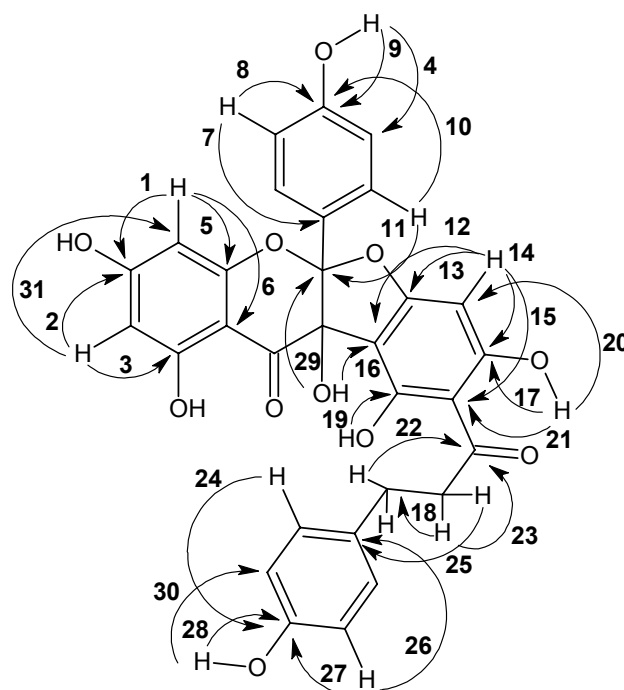


Figura 15b- Expansões do espectro HMBC de ACCE-5: (I) δ 5,5-7,5 x 95,0-133; (II) δ 5,8-7,4 x 152-171.



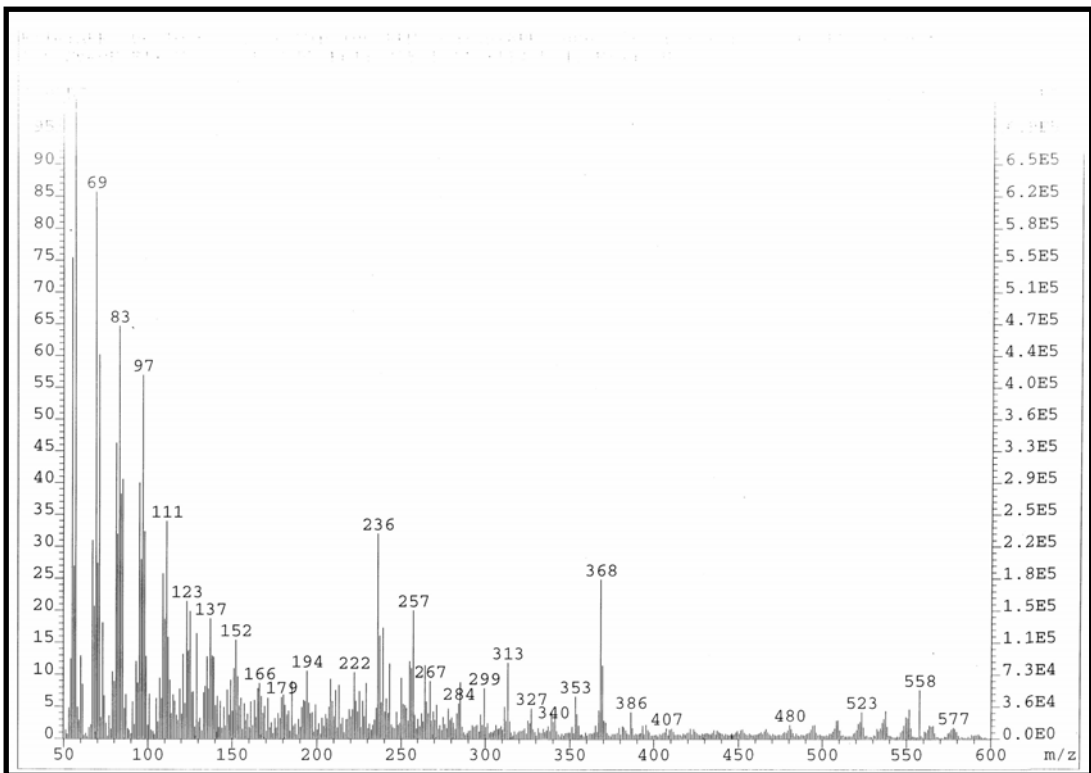


Figura 16- Espectro de massa de ACCE-5 (Ionização por Impacto Eletrônico)

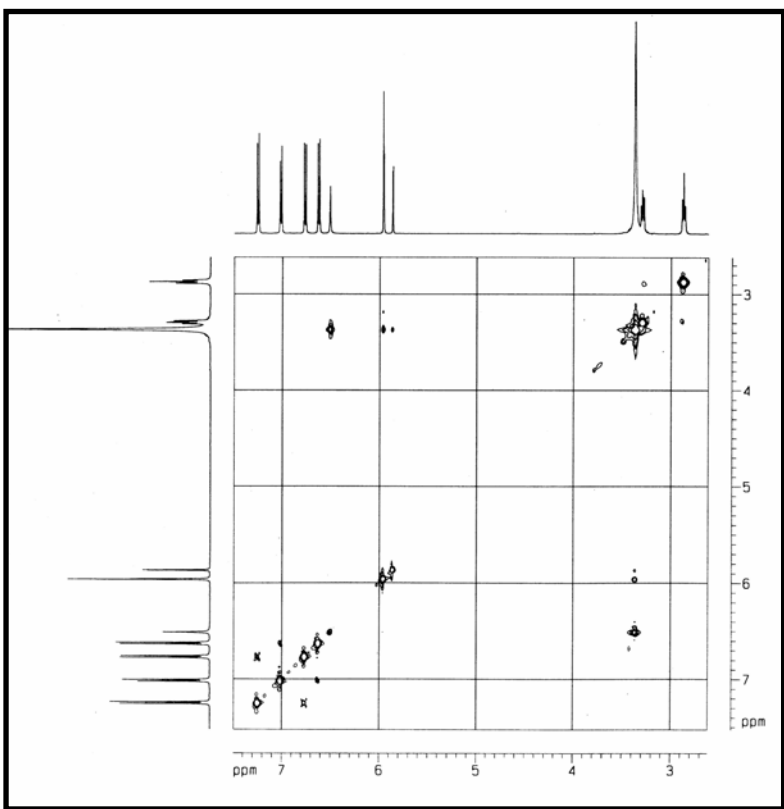


Figura 17- Espectro de RMN-NOESY (DMSO- d_6 , 500 x 500 MHz) de ACCE-5

5.2. Amburanina B (ACCE-6)

A fração ACCE₁AM, sólido marrom originado da partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas do caule, foi submetida a cromatografias de adsorção e exclusão e purificada em HPLC (fase reversa), resultando na obtenção de um sólido amarelo (23 mg) com $t_R = 8,82$ min, sendo denominado ACCE-6 (pf. > 300° C; $[\alpha]_D^{25} = +4,0^\circ$ - MeOH, c 0.05) (ítem 10.1.6.8, p. 278).

A notória similaridade observada entre os espectros de IV (Fig. 18, p. 89) de ACCE-5 e ACCE-6 sinalizou a uma estreita semelhança estrutural entre eles, confirmada pela identificação dos mesmos grupos funcionais: hidroxila (3433 cm^{-1}), carbonila (1640 cm^{-1}), anel aromático (1517 e 1473 cm^{-1}) e carbonos oxigenados de fenol, enol-éter e álcool (1329, 1258 e 1168 cm^{-1}).

O espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, Fig. 19, p. 89) de ACCE-6 apresentou um par de dupletos em δ 5,95 (H-6) e 5,92 (H-8) (1H, $J = 2,0$ Hz), associados a hidrogênios *meta*-posicionados, um conjunto de dupletos em δ 8,16; 7,28; 6,94 e 6,79 (2H, $J = 8,7$ Hz), relacionados a dois sistemas aromáticos *para*-dissubstituídos, e um conjunto de singletos em δ 13,30; 11,80; 10,20, 9,78; 9,66; 6,96 e 6,71, cujas integrações foram estimadas como equivalentes a um hidrogênio, cada sinal. Os dupletos com J_{ortho} foram agrupados segundo acoplamentos observados no espectro COSY (Fig. 20, p. 90), permitindo correlacionar os sinais de hidrogênio correspondentes a cada anel benzênico: δ 8,16 (H-2''',6''') com 6,94 (H-3''',5''') e δ 7,28 (H-2',6') com 6,79 (H-3',5'). O espectro de RMN ¹H de ACCE-6 demonstrou uma visível semelhança com o obtido para ACCE-5, exceto pela ausência dos hidrogênios metilênicos em δ 3,29 e 2,87.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, DMSO-*d*₆, Fig. 21, p. 90) de ACCE-6 também exibiu 26 linhas espectrais, sendo quatro delas mais intensas do que as demais: δ 131,0 (C-2''',6'''); 129,2 (C-2',6'); 116,3 (C-3''',5''') e 115,7 (C-3',5'). No entanto, a faixa de deslocamento químico tornou-se mais estreita (δ 191,8-80,8), devido à inexistência de carbonos metilênicos e o deslocamento do sinal referente à carbonila, δ 203,7 para 177,1 (C-4''), compatível com carbonila de cetona conjugada.

Desta forma, o espectro de DEPT135 (125 MHz, DMSO-*d*₆, Fig. 22, p. 91) tornou-se mais simples (somente sinais com amplitude positiva), fazendo-se útil apenas para a distinção entre os carbonos mono-hidrogenados daqueles não-hidrogenados, tendo passado a

contar com dois carbonos sp^2 a mais, δ 148,3 (C-2'') e 136,9 (C-3''), sendo ao menos um deles oxigenado.

Salvo o singlete em δ 6,71 (H-6'') que se correlacionou com o sinal de carbono em δ 95,6 (C-6''), o espectro de RMN-HMQC de ACCE-6 (**Fig. 23, p. 91**), tal qual o de ACCE-5, não mostrou qualquer correlação envolvendo os sinais de carbono e os demais singletos, sugerindo corresponderem a hidroxilas.

A fórmula molecular $C_{30}H_{18}O_{12}$ para ACCE-6 foi obtida a partir do íon molecular com m/z 570,5736 (calculado m/z 570,4567) no espectro de massa de alta resolução (EM-IE, **Fig. 24, p. 92**), correspondente a um Índice de Deficiência de Hidrogênio com duas insaturações a mais do que a calculada para ACCE-5.

Tendo em vista que as diferenças estruturais entre ACCE-6 e ACCE-5 foram resultantes de divergências verificadas no fragmento chalconoídico, foi proposta uma estrutura biflavonoídica, na qual flavanonol (aromadendrina) se encontrava ligado a um flavonol. Esta hipótese foi justificada através de uma suposta ciclização seguida de oxidação do aducto fletina, o qual foi convertido num resíduo de campferol (**vide proposta biogenética, p. 244**), ou resultante da condensação de duas moléculas de campferol, atendendo às seguintes evidências espectroscópicas: aumento do IDH, aparecimento de carbonos sp^2 oxigenados e a presença de carbonila conjugada.

O espectro de RMN-HMBC (**Fig. 25, p. 92**) corrobora com a proposição estrutural à medida que revela importantes acoplamentos a longa distância (**Tab. 5, p. 88**), entre eles, o acoplamento existente entre os hidrogênios H-2''',6''' (δ 8,16) e o carbono C-2'' (δ 148,3), através do qual se pôde inferir a substituição do carbono metilênico (δ 30,3; C- β), existente em ACCE-5, por um carbono sp^2 oxigenado.

É válido atentar para as maiores desblindagens sentidas pelos núcleos de hidrogênios H-2''',6''' e HO-C-4''' em ACCE-6 (δ 8,16; H-2''',6''' e δ 10,20; OH-4''') quando comparados aos de ACCE-5 (δ 7,01; H-2''',6''' e δ 9,17; OH-4'''), resultantes do efeito mesomérico retirador da carbonila C-4'' (conjugada com a dupla ligação α,β) exercido sobre o anel aromático que suporta estes hidrogênios, nas posições *orto* e *para*, respectivamente.

Além disso, os dados de deslocamento químico de ^{13}C do campferol descritos na literatura foram bem parecidos com os valores encontrados para ACCE-6 (AGRAWAL,

1989), exceto aqueles referentes aos carbonos (C-2, C-4, C-5'' e C-10'') situados próximos à junção dos dois fragmentos.

Em alusão à espécie botânica da qual foi isolada, a estrutura química inédita de ACCE-6 foi denominada amburanina B (3,3'',4',4'',5,5'',7-heptahidroxi-2-O-7'':3-8''-flavanona-flavona).

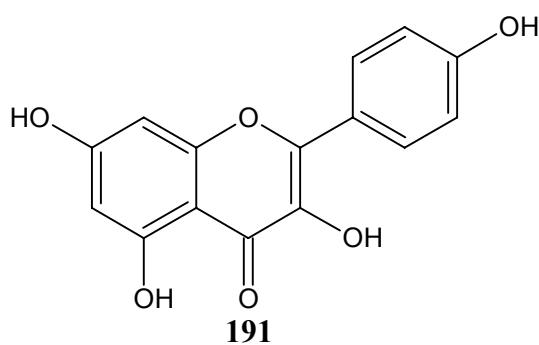
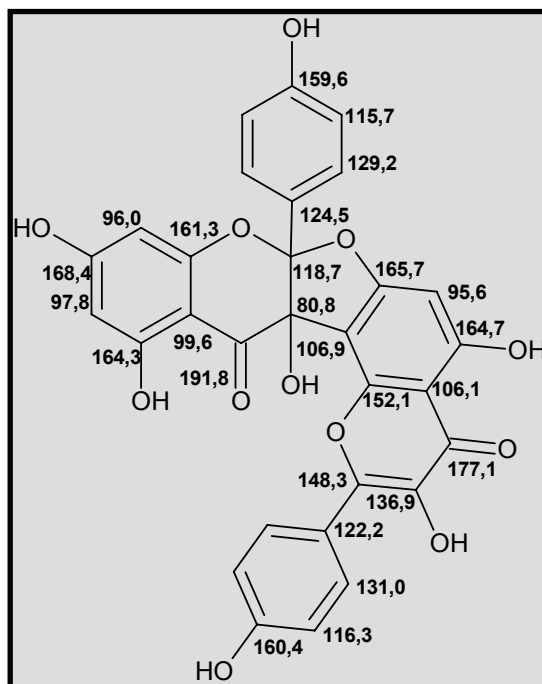
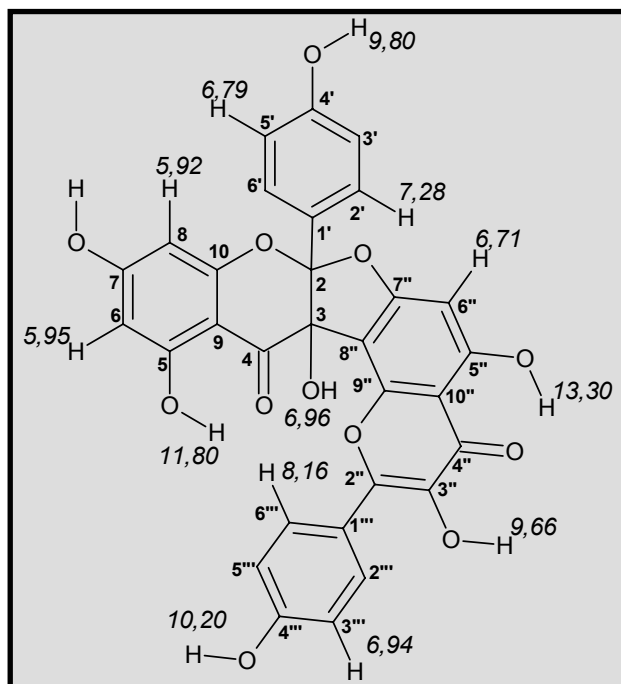


Tabela 4- Dados de RMN ¹³C de ACCE-5 e ACCE-6.

# C	ACCE-5 δ_c (ppm)-DMSO- <i>d</i> ₆	# C	ACCE-6 δ_c (ppm)-DMSO- <i>d</i> ₆
2	118,6	2	118,7
3	80,5	3	80,8
4	192,2	4	191,8
5	163,5	5	164,3
6	97,5	6	97,8
7	167,7	7	168,4
8	95,5	8	96,0
9	161,3	9	161,3
10	99,4	10	99,6
1'	124,5	1'	124,5
2', 6'	129,3	2', 6'	129,2
3', 5'	115,6	3', 5'	115,7
4'	159,5	4'	159,6
1''	101,9	2''	148,3
2''	164,0	3''	136,9
3''	108,4	4''	177,1
4''	166,7	5''	164,7
5''	98,5	6''	95,6
6''	162,2	7''	165,7
β'	203,7	8''	106,9
α	45,3	9''	152,1
β	30,3	10''	106,1
1'''	131,8	1'''	122,2
2''', 6'''	130,0	2''', 6'''	131,0
3''', 5'''	115,9	3''', 5'''	116,3
4'''	156,4	4'''	160,4
HO-C3		HO-C3	
HO-C5		HO-C5	
HO-C7		HO-C7	
HO-C2''		HO-C4'	
HO-C6''		HO-C3''	
HO-C4'		HO-C5''	
HO-C4'''		HO-C4'''	

Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HMQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de aromadendrina e campferol, registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).

# C	Aromadendrina- Campferol* δ_{C} (ppm)	ACCE-6 δ_{C} (ppm)	HMQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
2	85,0	118,7			7,28
3	73,7	80,8		6,96	
4	198,4	191,8			6,51
5	165,3	164,3			
6	97,5	97,8	5,95 (1H, d, 2,0 Hz)		11,80
7	168,8	168,4		5,95	
8	96,4	96,0	5,92 (1H, d, 2,0 Hz)		5,95
9	164,6	161,3		5,92	
10	101,9	99,6			5,92; 11,80
1'	129,4	124,5			6,72
2', 6'	130,4	129,2	7,28 (2H, d, 8,7 Hz)		
3', 5'	116,3	115,7	6,79 (2H, d, 8,7 Hz)		9,78
4'	159,2	159,6		9,78; 6,79	
2''	146,8	148,3			8,16
3''	135,6	136,9			
4''	175,9	177,1			
5''	160,7	164,7		13,30	
6''	98,2	95,6	6,71 (1H, s)		13,30
7''	163,9	165,7		6,71	
8''	93,5	106,9			
9''	156,2	152,1			
10''	103,1	106,1			13,30
1'''	121,7	122,2			6,94
2''', 6'''	129,3	131,0	8,16 (2H, d, 8,7 Hz)		
3''', 5'''	115,3	116,3	6,94 (2H, d, 8,7 Hz)		10,20
4'''	159,0	160,4			8,16
HO-C3				6,96	
HO-C5				11,80	
HO-C7				9,80	
HO-C4'					
HO-C3''				9,66	
HO-C5''				13,30	
HO-C4'''				10,20	

*CD₃OD

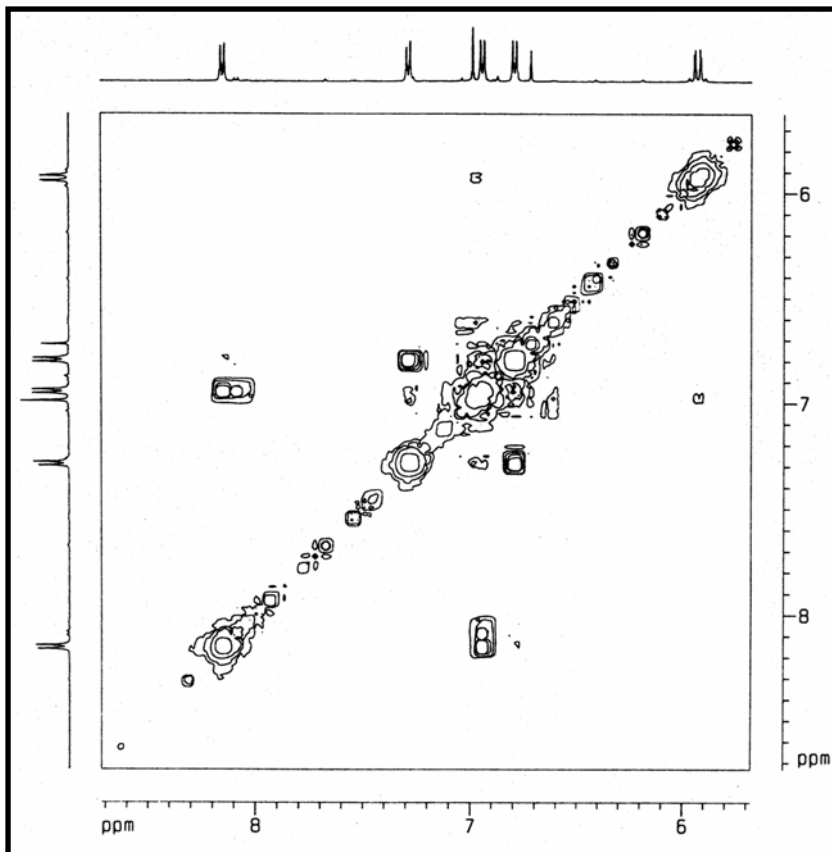


Figura 20- Espectro RMN-COSY (DMSO- d_6 , 500 x 500 MHz) de ACCE-6

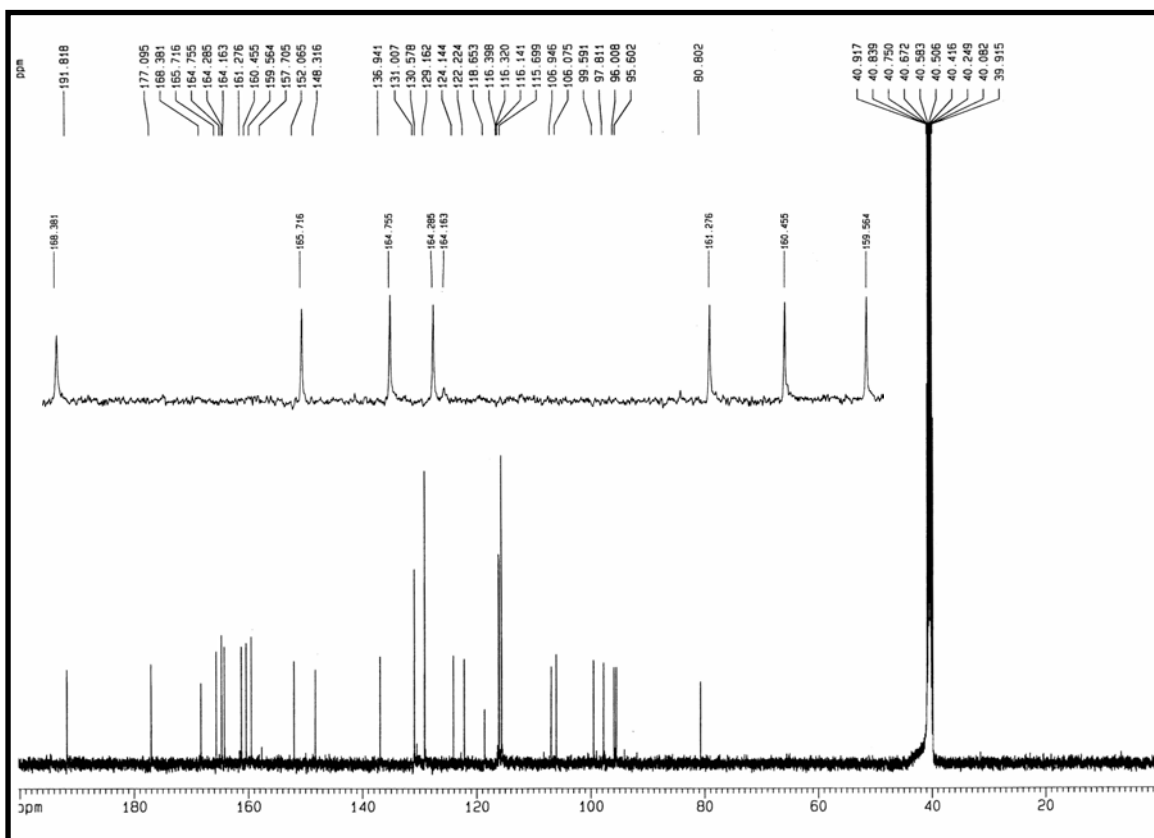


Figura 21- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-6 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

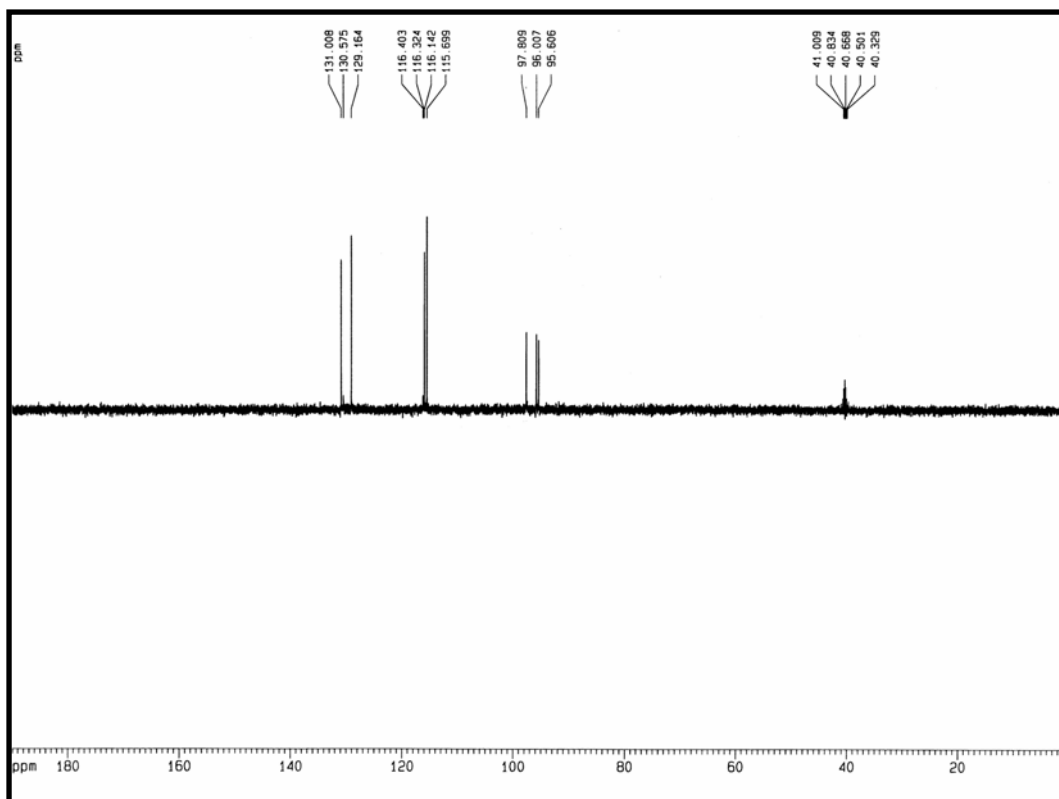


Figura 22- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACCE-6 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

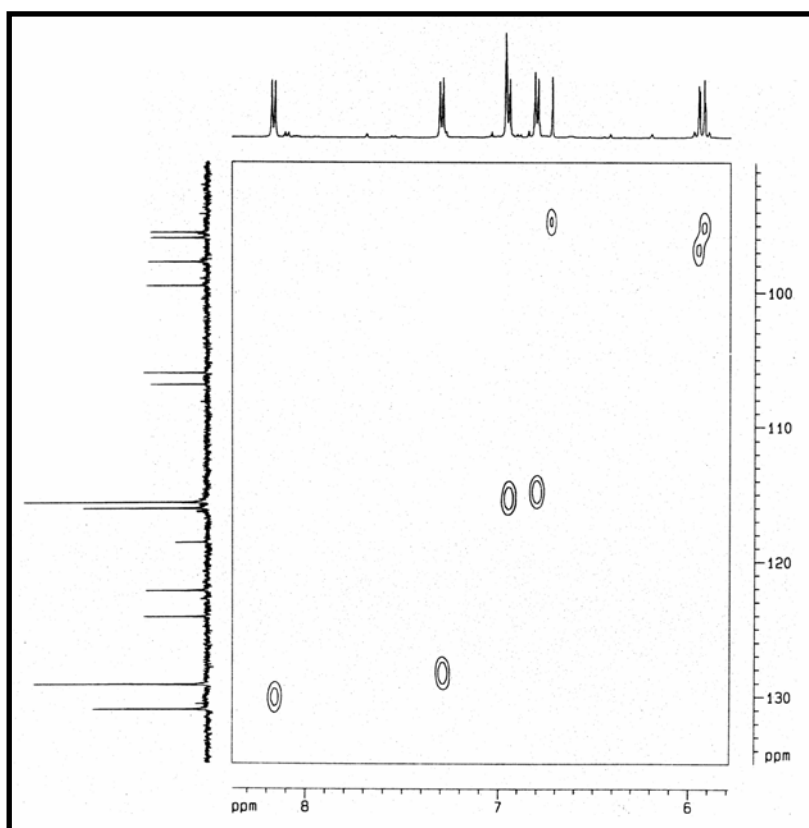


Figura 23- Espectro RMN-HMQC (DMSO- d_6 , 125 x 500 MHz) de ACCE-6

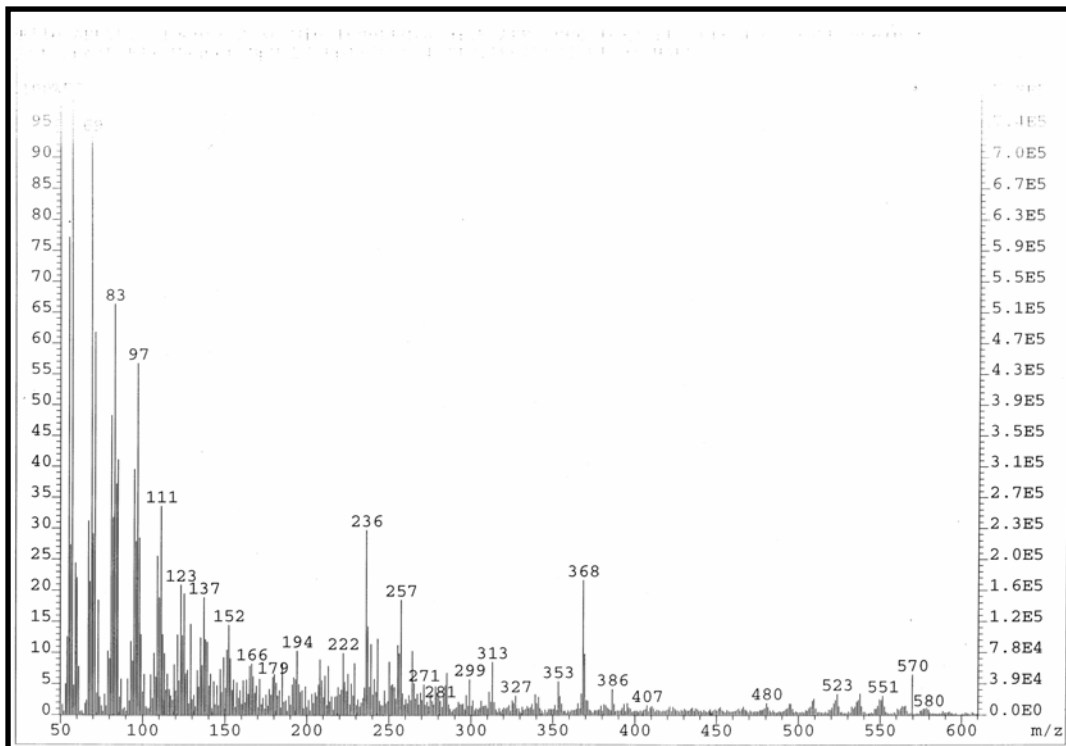
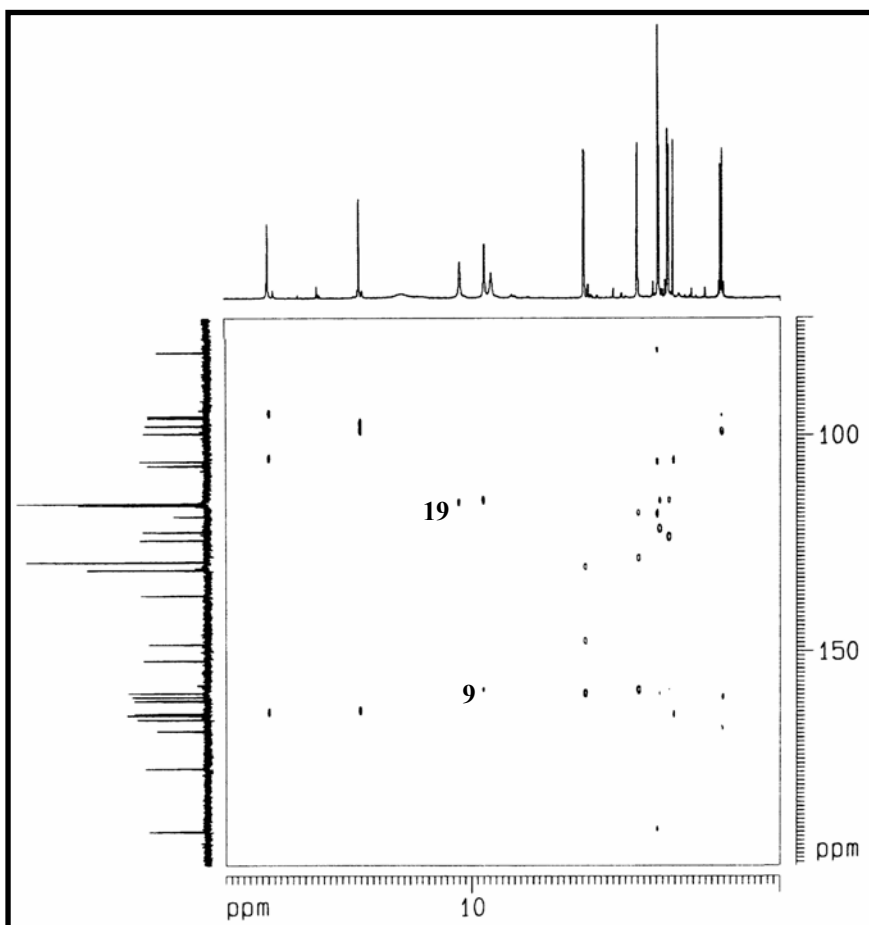


Figura 24- Espectro de massa de ACCE-6 (Ionização por Impacto Eletrônico)



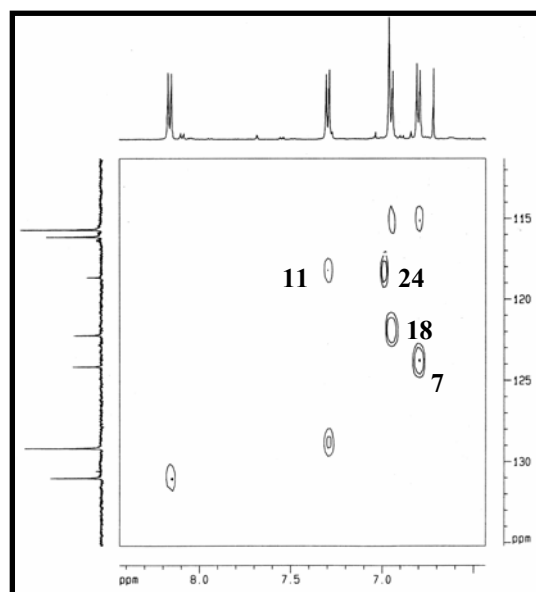
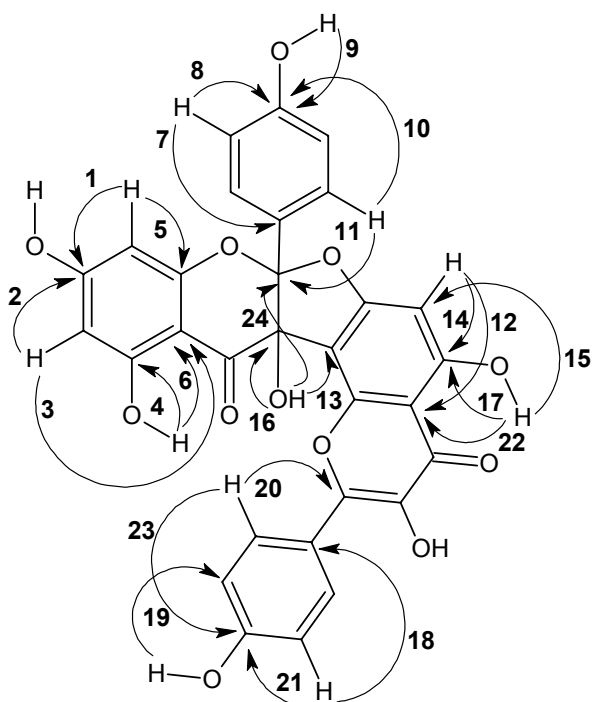
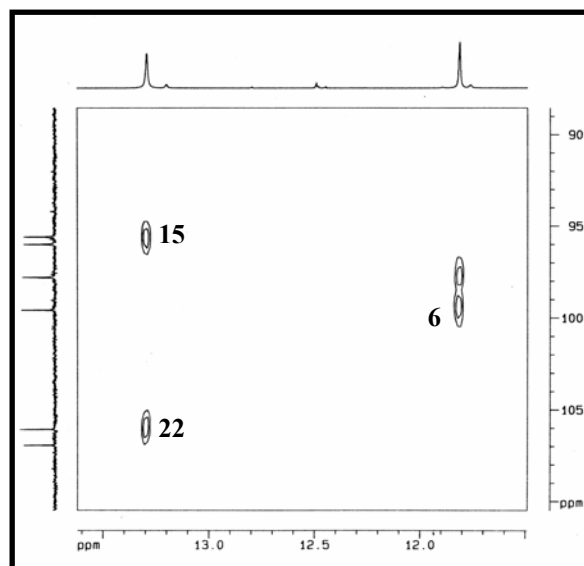
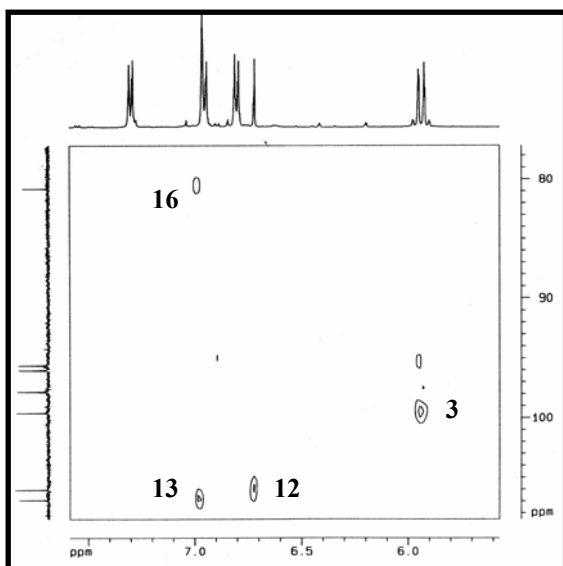


Figura 25a- Expansões do espectro HMBC de ACCE-6: **(I)** δ 5,5-7,6 x 77-108; **(II)** δ 11,5-13,6 x 89-110; **(III)** δ 6,4-8,4 x 111-135.

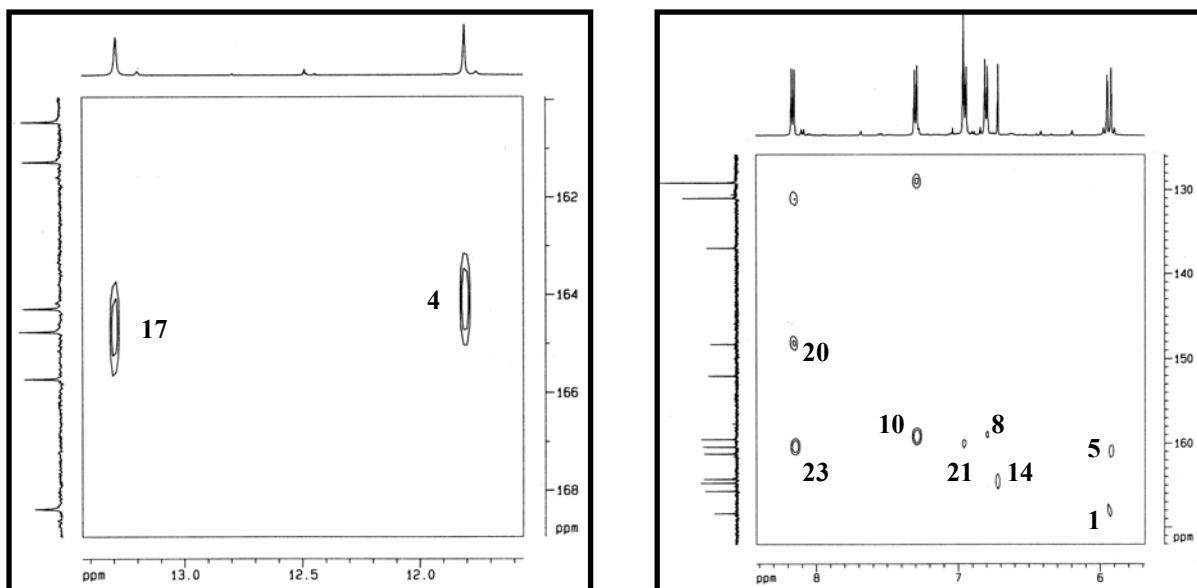
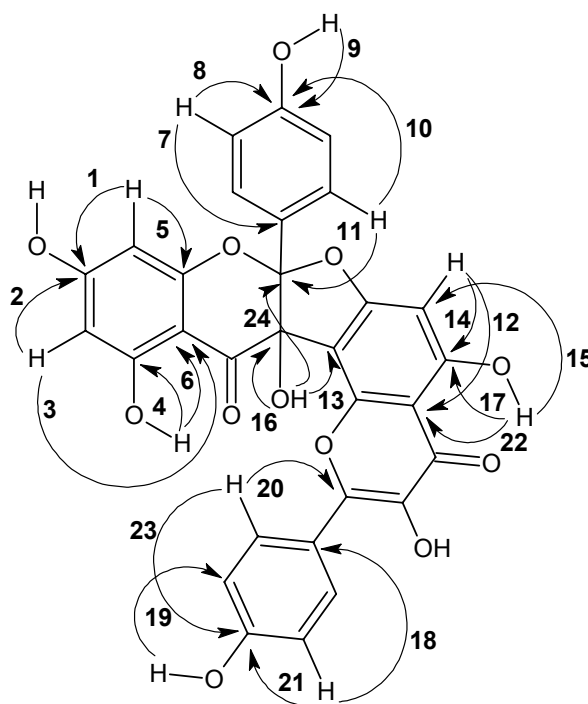


Figura 25b- Expansões do espectro HMBC de ACCE-6: (I) δ 11,4-13,4 x 160-169; (II) δ 5,7-8,4 x 126-172.



Amburosídeos

Cromatografias em gel de sílica e Sephadex LH-20 da fração ACSEA, gerada pela partição H₂O/AcOEt do extrato etanólico das sementes, conduziram à obtenção de um sólido marrom denominado ACSEA(2-11)(11-18)(18-20), o qual foi injetado em HPLC (fase reversa), resultando na separação de 5 picos: pico 1 ($t_R = 6,65$ min, ACS-7), pico 2 ($t_R = 9,36$ min, ACS-8), pico 3 ($t_R = 11,06$ min, ACS-9), pico 4 ($t_R = 12,50$ min) e pico 5 ($t_R = 13,57$ min, ACS-10). O pico 4 foi reinjetado e desdobrado em dois novos picos: pico 4.1. ($t_R = 11,69$ min, ACS-11) e pico 4.2 ($t_R = 13,54$ min, ACS-12). Este conjunto de picos foi caracterizado como uma série de amburosídeos e identificados como sendo os amburosídeos A, C-H.

5.3. Amburosídeo A (ACS-7)

A coleta do pico 1 da separação por HPLC forneceu um sólido rosado intitulado ACS-7 (p.f. 197,8-199,1 °C; $[\alpha]_D^{20} = -6,8^\circ$ MeOH, c 0,05) (item 10.1.6.6, p. 278).

O espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz, Fig. 26, p. 98) de ACS-7 apresentou dois sinais duplos em δ 7,37 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) em δ 7,11 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), associados a hidrogênios aromáticos pertencentes a um sistema *para*-substituído; um singleto em δ 5,22 (2H, s), atribuído a hidrogênios homotópicos de éster benzílico; sinais numa região característica de hidrogênios de açúcar (δ 4,93-3,37), bem como um sistema ABX formado pelos sinais em δ 7,44 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ 7,40 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,0$ Hz) e em δ 6,80 (1H, d, $J = 8,2$ Hz).

No espectro de RMN ¹³C-CPD de ACS-7 (75 MHz, CD₃OD, Fig. 27, p. 98), foram exibidas dezoito linhas espectrais, sendo uma delas atribuídas a carbonila de éster (δ 168,3, C-7'), três foram associadas a carbonos aromáticos oxigenados: δ 159,1 (C-4); 151,9 (C-4'); 146,3 (C-3'). O espectro de RMN ¹³C-DEPT135 (75 MHz, CD₃OD, Fig. 28, p. 99) revelou a presença de dez carbonos mono-hidrogenados, dos quais metade foi relacionada a carbonos aromáticos: δ 130,8 (C-2,6); 123,8 (C-6'); 117,9 (C-3,5); 116,0 (C-5'); e 117,6 (C-2'). O restante foi associado a carbonos de hexose, δ 102,3 (C-1''); 78,2 (C-5''); 78,1 (C-3''); 75,0 (C-2'') e 71,5 (C-4'') e 62,6 (C-6''), atribuídos como pertencentes a um resíduo de glicose, além de uma absorção em δ 67,3 (C-7), relacionada a carbonos metilênico oxigenado. As demais absorções de ¹³C em δ 131,8 (C-1) e 122,7 (C-1'), ausentes no espectro DEPT135, foram reconhecidas como pertencentes a carbonos aromáticos não-hidrogenados.

A fórmula molecular $C_{20}H_{22}O_{10}$, deduzida dos dados de RMN, foi compatível com a estrutura de um glicosídeo di-aromático, identificado como sendo o amburosídeo A (lit.: p.f. 195-197 °C; $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$, MeOH, c 0,76), confirmada por co-cromatografia com uma amostra autêntica em CCD e comparação com espectros de RMN 1H e ^{13}C (CD_3OD) (BRAVO et al., 1999) (Tab. 6, p. 97). O amburosídeo A (protocatecuato de 4-O- β -D-glicopiranosil-benzila) já havia sido isolado das cascas do caule de *A. cearensis* (BRAVO et al., 1999; CANUTO et al., 2006).

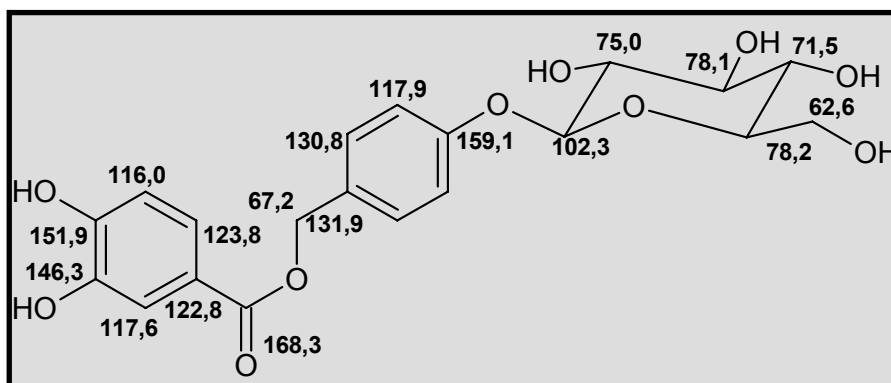
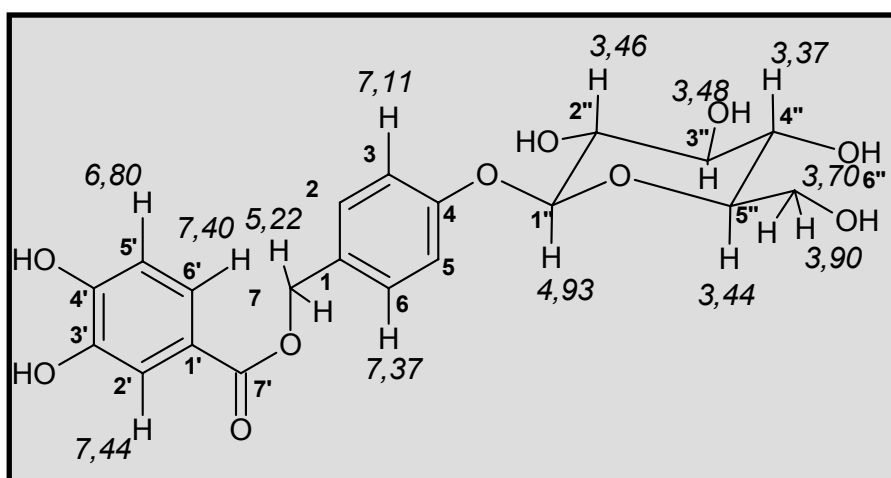


Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-7 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de amburosídio A, registrado na literatura (BRAVO et al., 1999).

# C	Amburosídio A δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	ACS-7 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	131,7	131,9	
2,6	130,7	130,8	7,37 (2H, d, 8,5 Hz)
3,5	117,7	117,9	7,11 (2H, d, 8,5 Hz)
4	158,9	159,1	
7	67,0	67,2	5,22 (2H, s)
1'	122,6	122,8	
2'	117,4	117,6	7,44 (1H, d, 2,0 Hz)
3'	146,1	146,3	
4'	151,7	151,9	
5'	115,9	116,0	6,80 (1H, d, 8,2 Hz)
6'	123,7	123,8	7,40 (1H, dd, 8,2; 2,0 Hz)
7'	168,1	168,3	
1''	102,1	102,3	4,93 (1H, d, 6,5 Hz)
2''	74,8	75,0	3,46 (1H, m)
3''	77,9	78,1	3,48 (1H, td)
4''	71,3	71,5	3,37 (1H, m)
5''	78,0	78,2	3,44 (1H, m)
6''	62,4	62,6	3,90 (1H,m); 3,70 (1H, m)

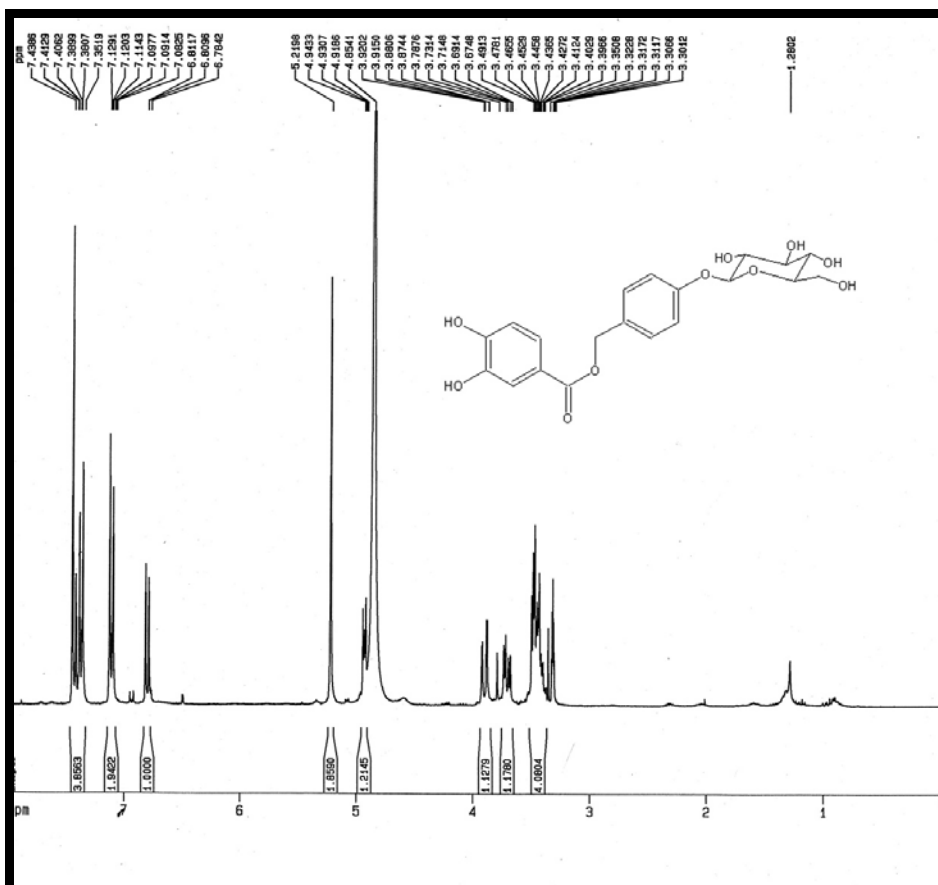


Figura 26- Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de ACS-7

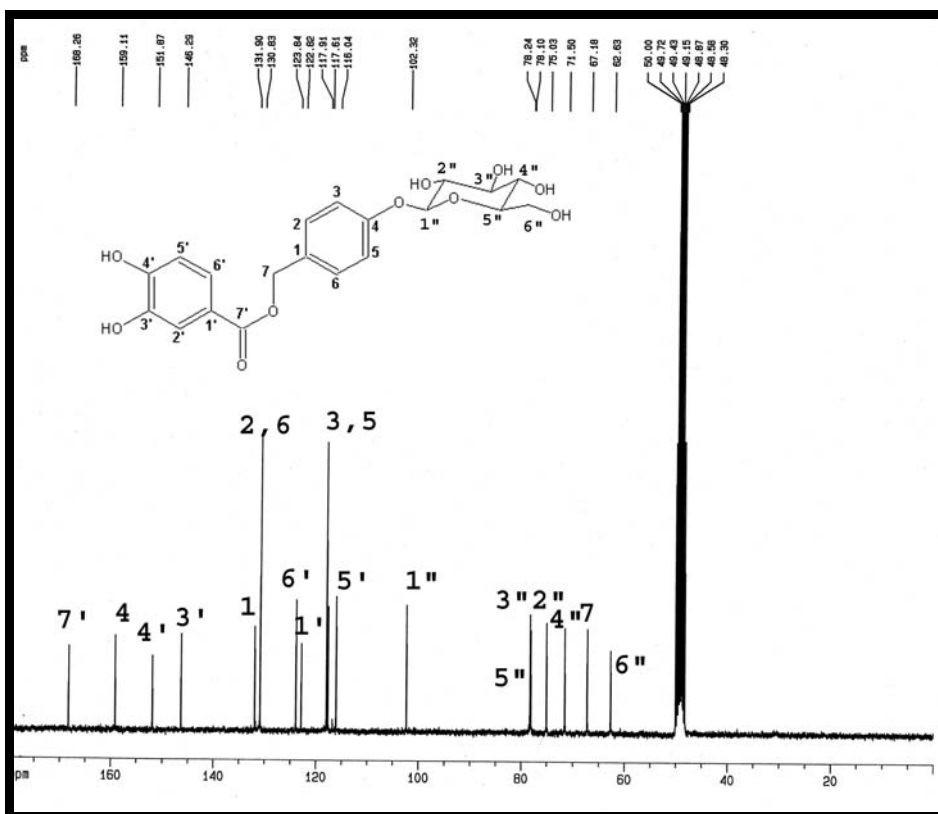


Figura 27- Espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 75 MHz) de ACS-7

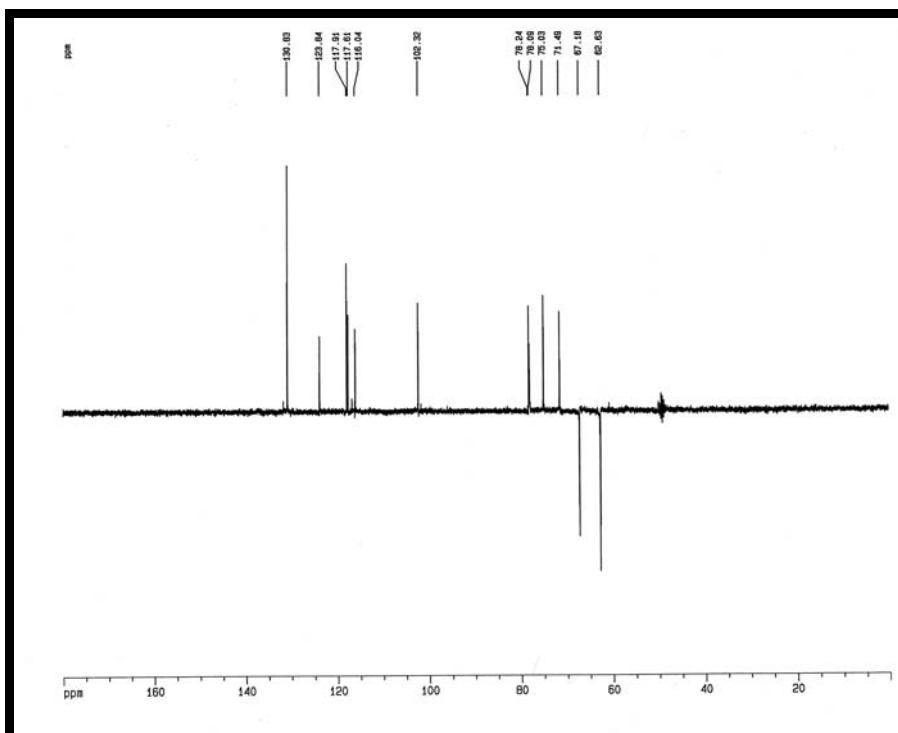


Figura 28- Espectro de RMN ¹³C-DEPT135 (CD₃OD, 75 MHz) de ACS-7

5.4. Acetato de 6''-amburosila- (ACS-8)

O pico 2 ($t_R = 9,36$ min) apresentou-se como um sólido marrom (pf. 110,2-114,3 °C; $[\alpha]_D^{25} = -34^\circ$, MeOH, c 0,22), denominado de ACS-8 (ítem 10.1.7.7, p. 286). No espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD , Fig. 29, p. 103) de ACS-8, foi caracterizada a presença de um anel aromático *para*-dissubstituído [δ 7,37 (H-2,6) e 7,08 (H-3,5); 2H, d, $J = 8,6$ Hz], um anel aromático trissubstituído [(δ 7,43; 1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'); (7,41; 1H, dd, $J = 8,4$ e 2,1 Hz, H-6'), (6,79; 1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5')], um grupo oximetilênico (δ 5,23; 2H, s, H-7), um resíduo de açúcar (δ 4,91-3,39) e um grupo acetila (δ 2,02; 3H, s, H-2''').

Vinte linhas espectrais foram exibidas no espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-8 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 30, p. 104), sendo duas delas atribuídas a carbonilas de éster, δ 172,9 (C-1''') e 168,3 (C-7') e três associadas a carbonos aromáticos oxigenados: δ 159,0 (C-4); 151,9 (C-4') e 146,3 (C-3').

O espectro RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-8 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 31, p. 105) revelou a presença de dez sinais atribuídos a carbonos mono-hidrogenados, dos quais metade foi relacionada a carbonos aromáticos: δ 130,8 (C-2,6); 123,9 (C-6'); 118,0 (C-3,5); 117,6 (C-2'); 116,1 (C-5'). O restante foi associado a carbonos glicosídicos, δ 102,3 (C-1''); 78,0 (C-3''); 75,6 (C-5''); 75,0 (C-2'') e 72,0 (C-4''), juntamente com o carbono metilênico oxigenado em δ 67,2 64,8 (C-6''). A absorção em δ 20,9 (C-2''') ratificou a existência de uma metila. As absorções de ^{13}C , δ 132,1 (C-1) e 122,9 (C-1'), ausentes no espectro DEPT 135, foram reconhecidas como pertencentes a carbonos aromáticos não hidrogenados.

No espectro de massa de ACS-8 (EM-IES, Fig. 32, p. 105) foi detectado o íon $[M+Na]^+$ em m/z 487,1322, correspondente à fórmula molecular $C_{22}H_{24}O_{11}$. O IDH, calculado como sendo igual a onze, sugere que as insaturações correspondem a três anéis (dois benzênicos e um glicosídico) e a duas carbonilas.

O espectro de RMN-HSQC (Fig. 33, p. 106) forneceu as correlações dos hidrogênios ligados diretamente aos seus carbonos, permitindo atribuir as absorções pertencentes a cada sistema aromático e à unidade de açúcar (Tab. 7, p. 102).

O espectro RMN-HMBC (Fig. 34, p. 107) demonstrou a posição de ligação do grupo acetila com o resíduo de glicose, através das correlações entre os hidrogênios metílicos H-2''' (δ 2,02) com o carbono C-6'' (δ 64,8), e entre os hidrogênios glicosídicos H-6'' (δ 4,39 e 4,24) com o carbono carbonílico C-2''' (δ 172,9).

ACS-8 foi identificada como sendo protocatecuato de 4-O- β -D-(6''-O-acetilglicopiranosil)-benzila também denominada amburosídio D. Esta substância inédita corresponde a um derivado acetilado do amburosídio A, glicosídeo fenólico já isolado das cascas do caule desta mesma espécie (BRAVO et al., 1999).

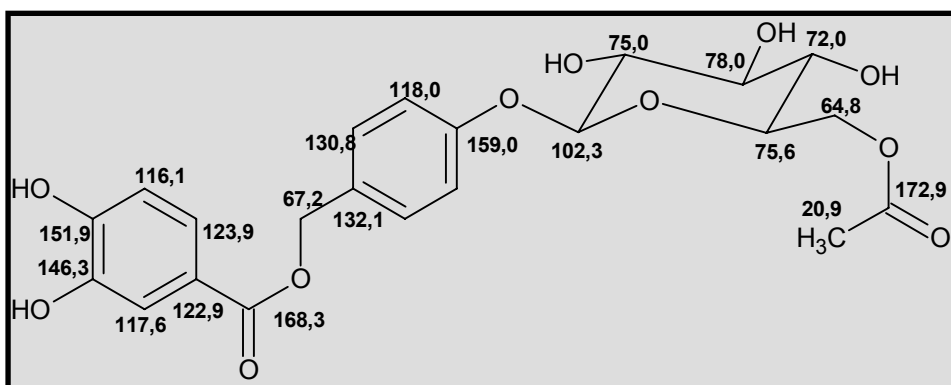
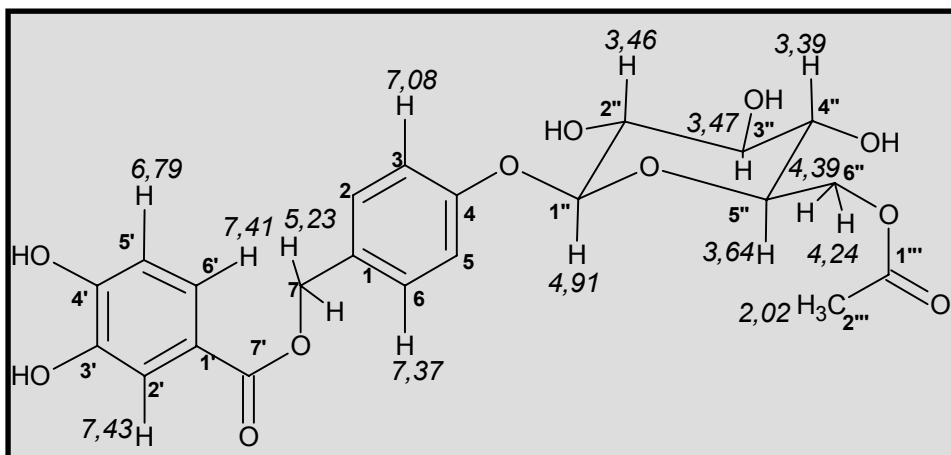


Tabela 7- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-8 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACS-8 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
1	132,1		5,23	7,08
2,6	130,8	7,37 (2H, d, 8,6 Hz)		5,23
3,5	118,0	7,08 (2H, d, 8,6 Hz)		
4	159,0		7,08	7,37
7	67,2	5,23 (2H, s)		7,37
1'	122,9			
2'	117,6	7,43 (1H, d, 2,1 Hz)		7,41
3'	146,3		7,43	6,79
4'	151,9		6,79	7,41
5'	116,1	6,79 (1H, d, 8,4 Hz)		
6'	123,9	7,41 (1H, dd, 8,4 e 2,1 Hz)		7,43
7'	168,3			7,43; 7,41; (6,79); 5,23
1''	102,3	4,91 (1H, d, 7,4 Hz)		
2''	75,0	3,46 (1H, m)		
3''	78,0	3,47 (1H, td)	3,46; 3,39	
4''	72,0	3,39 (1H, m)		4,39; 3,46
5''	75,6	3,64 (1H, m)	4,24	
6''	64,8	4,39 (1H, d); 4,24 (1H, dd)		3,39; 2,02
1'''	172,9		2,02	4,39; 4,24
2'''	20,9	2,02 (3H, s)		

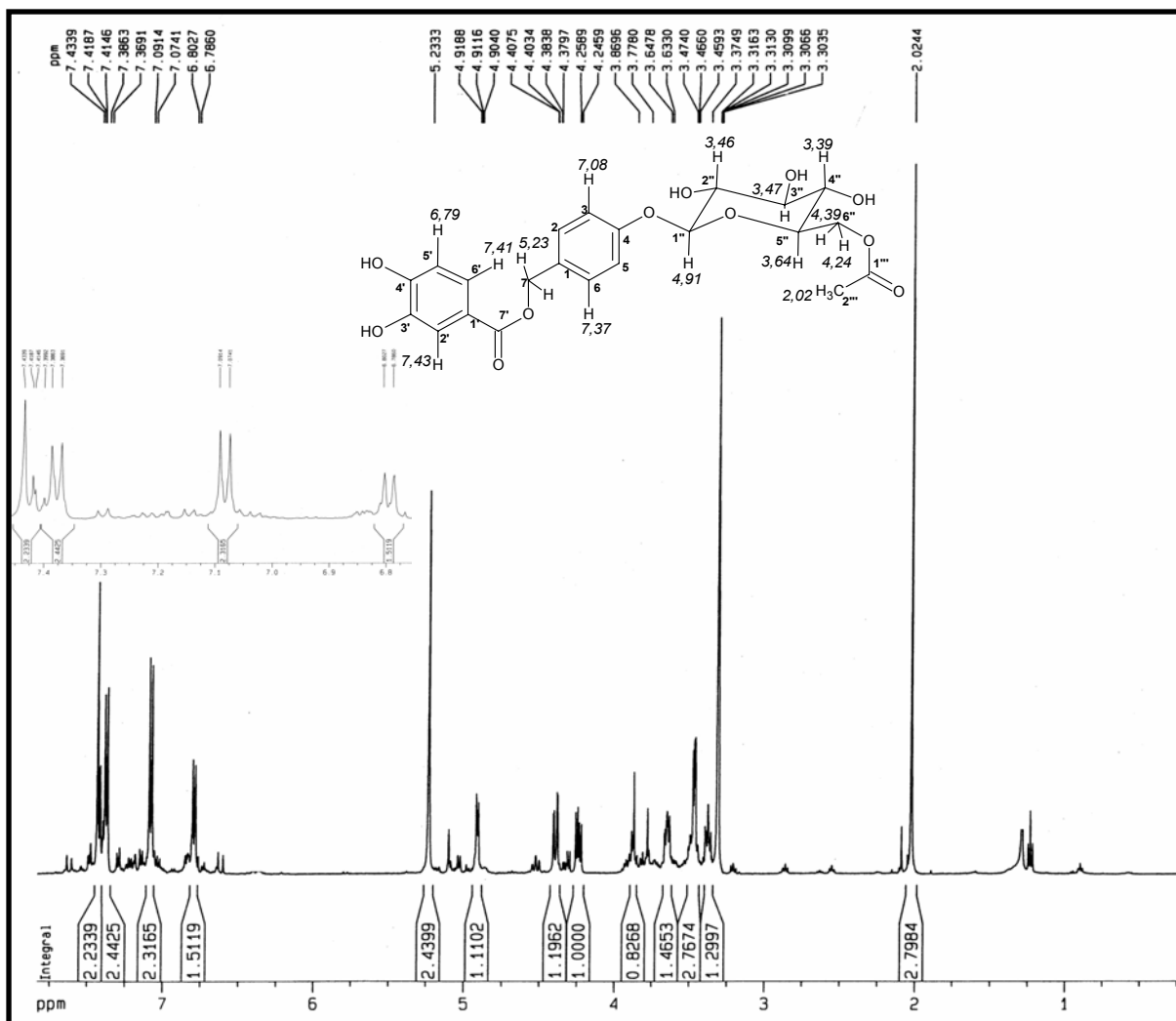


Figura 29- Espectro de RMN ¹H de ACS-8 (CD₃OD, 500 MHz)

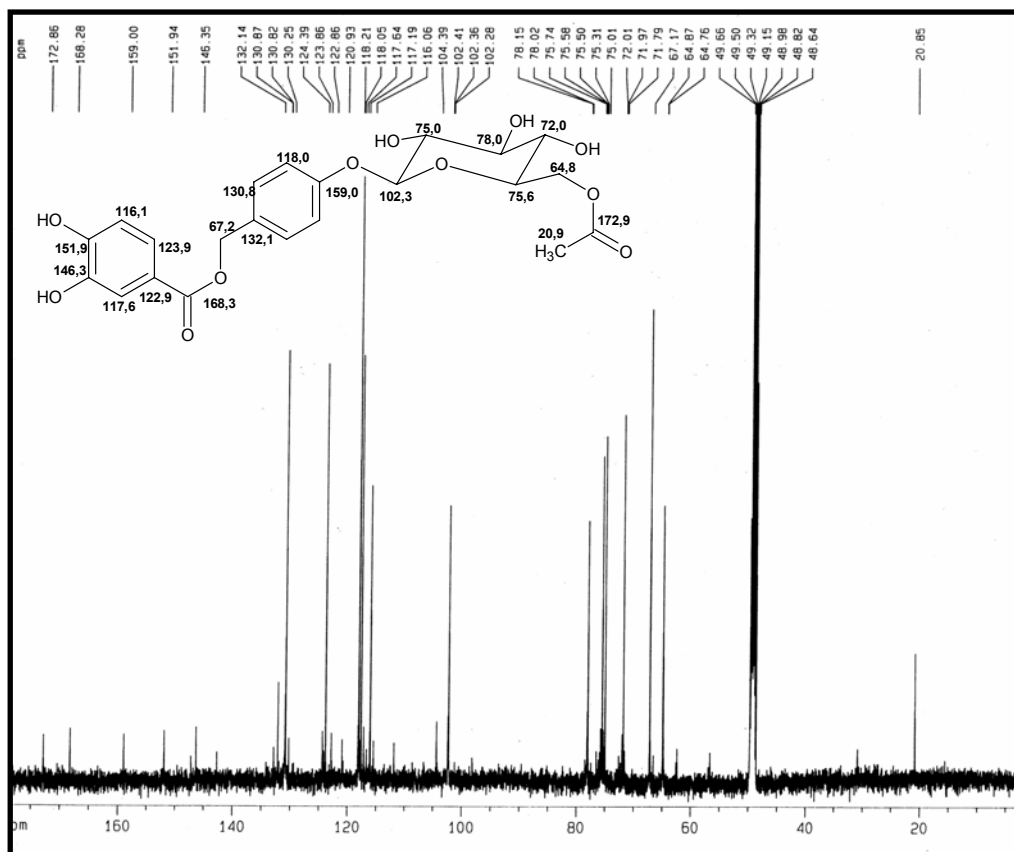


Figura 30- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-8 (CD_3OD , 125 MHz)

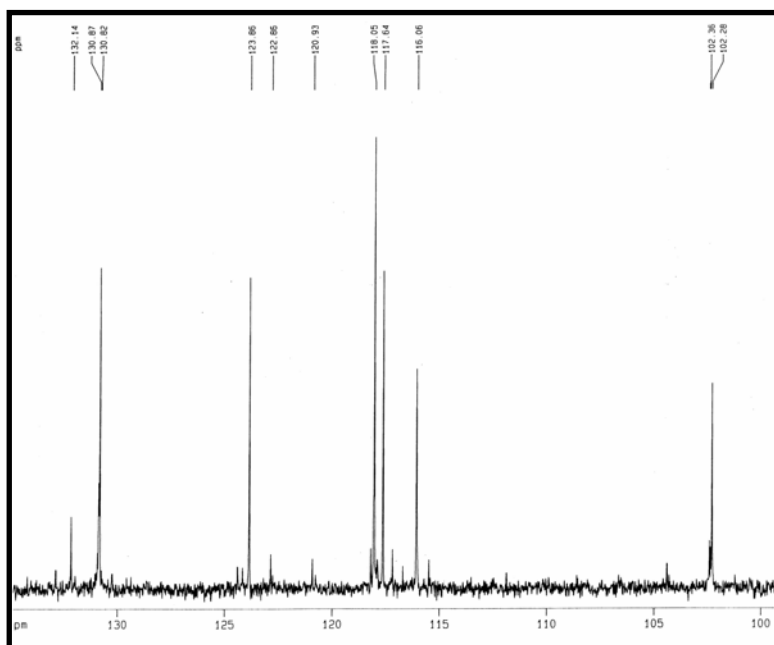


Figura 30a- Expansão da região δ 98-125 do espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-8

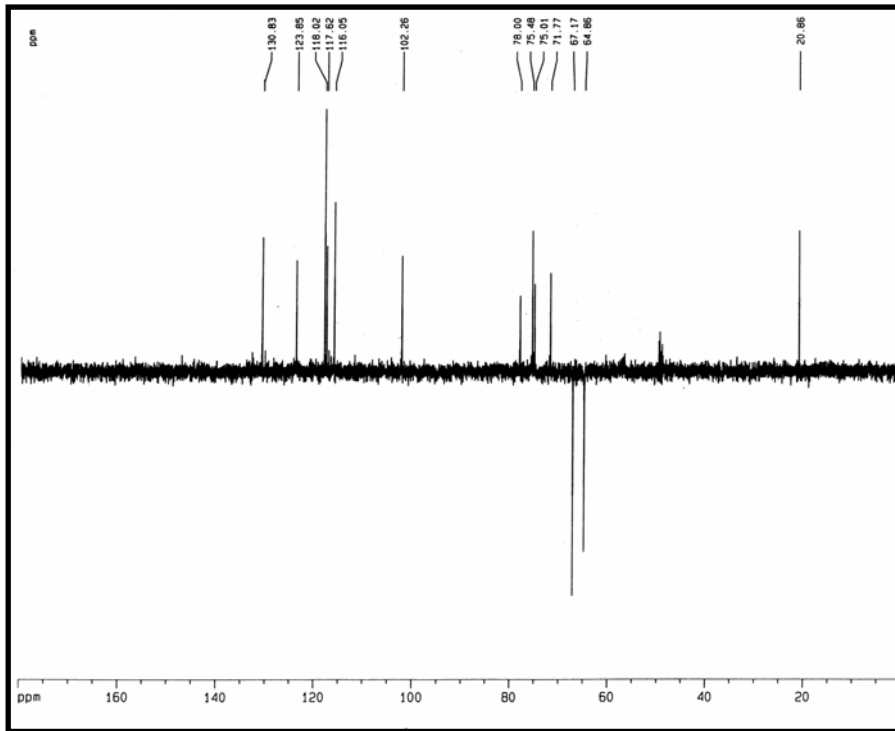


Figura 31- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-8 (CD_3OD , 125 MHz)

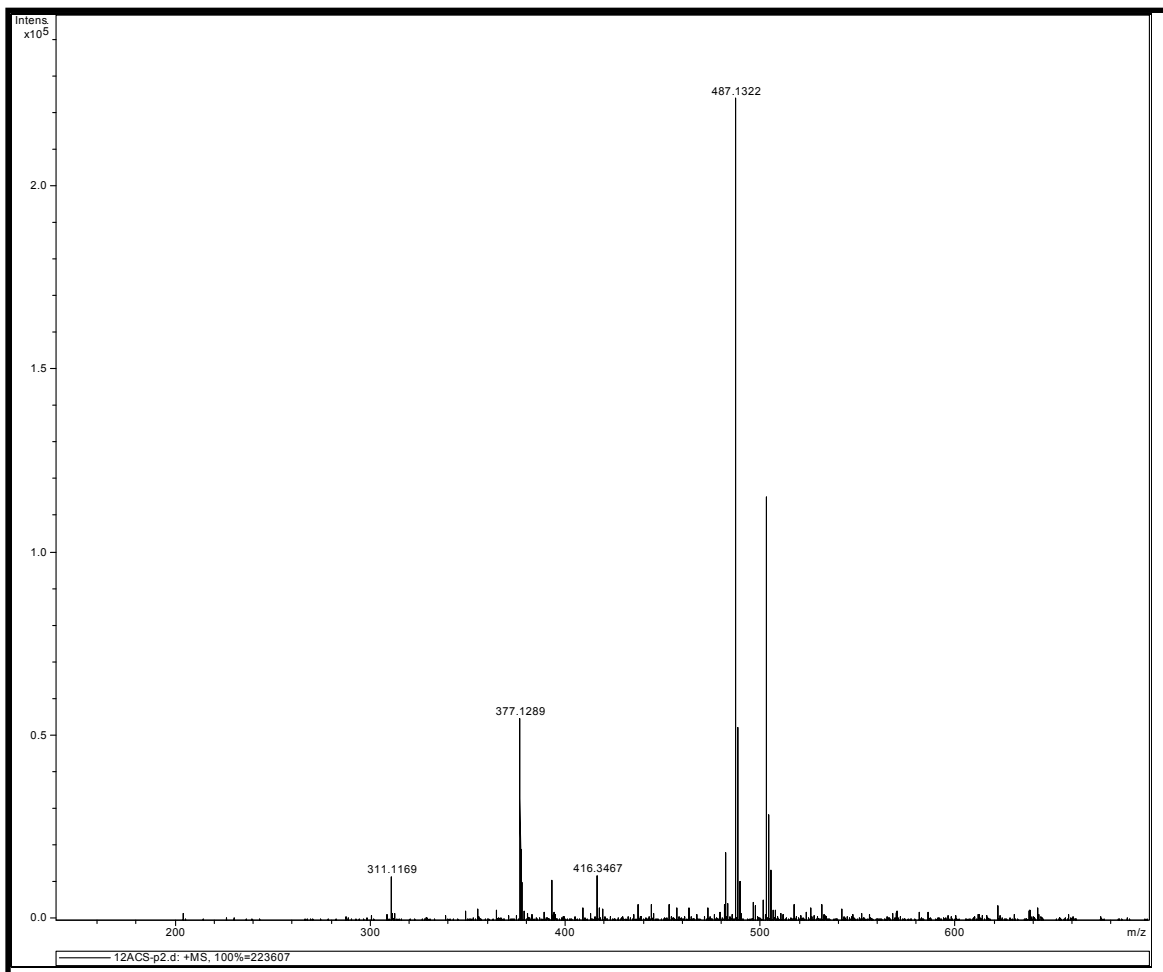


Figura 32- Espectro de massa de ACS-8 (Ionização por Electrospray)

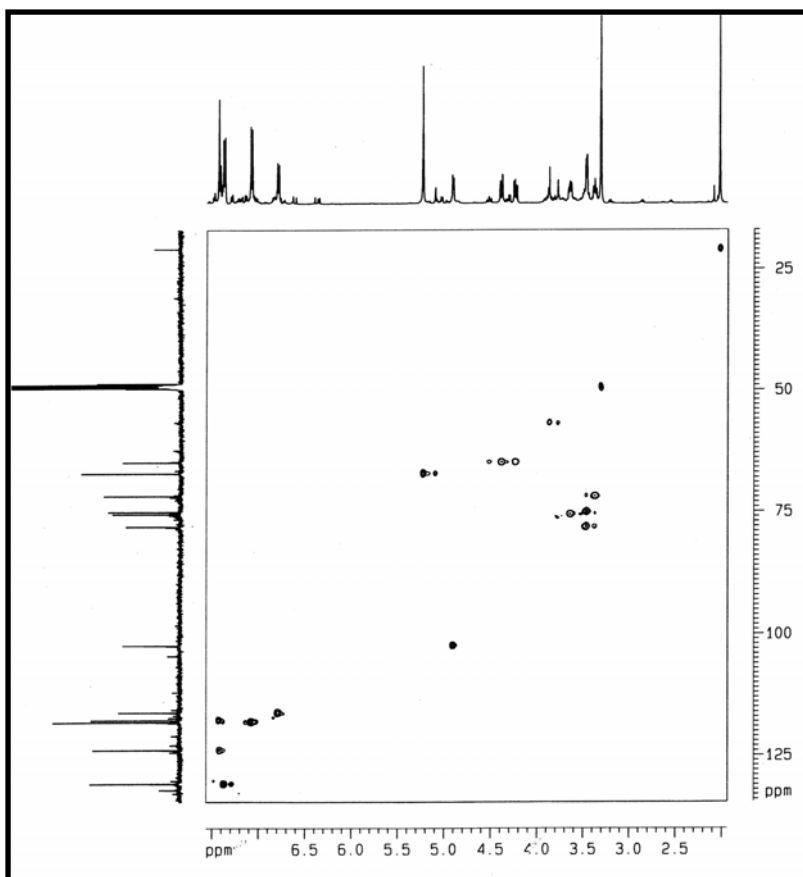


Figura 33- Espectro RMN-HSQC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-8

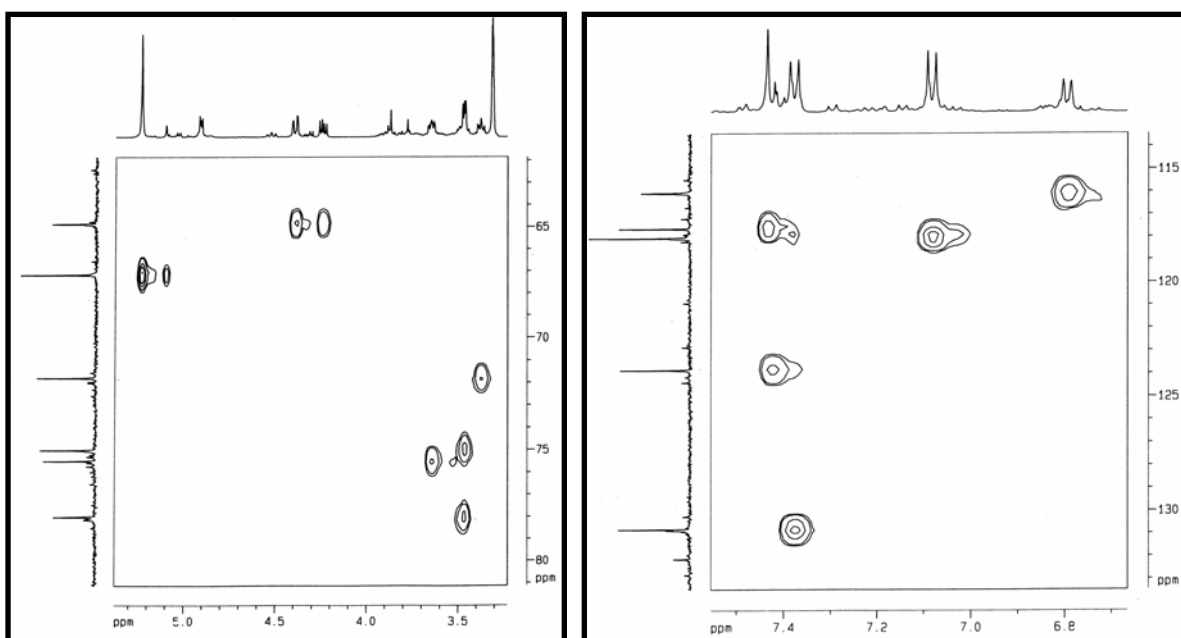


Figura 33a- Expansões do espectro HSQC de ACS-8: (I) δ 3,3-5,4 x 62-81; (II) δ 6,7-7,5 x 114-133.

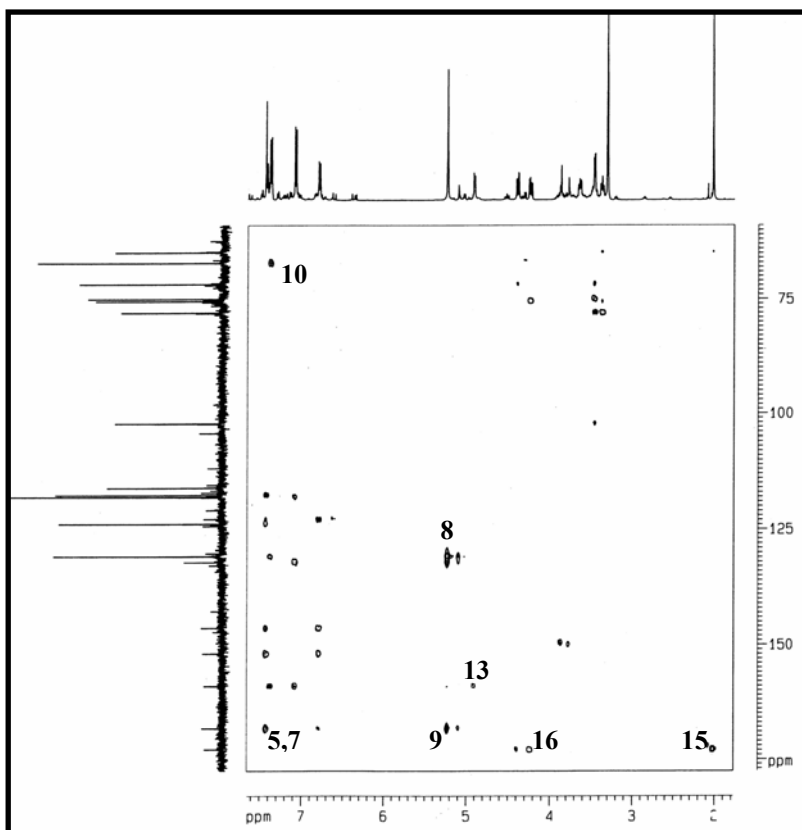


Figura 34- Espectro RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-8

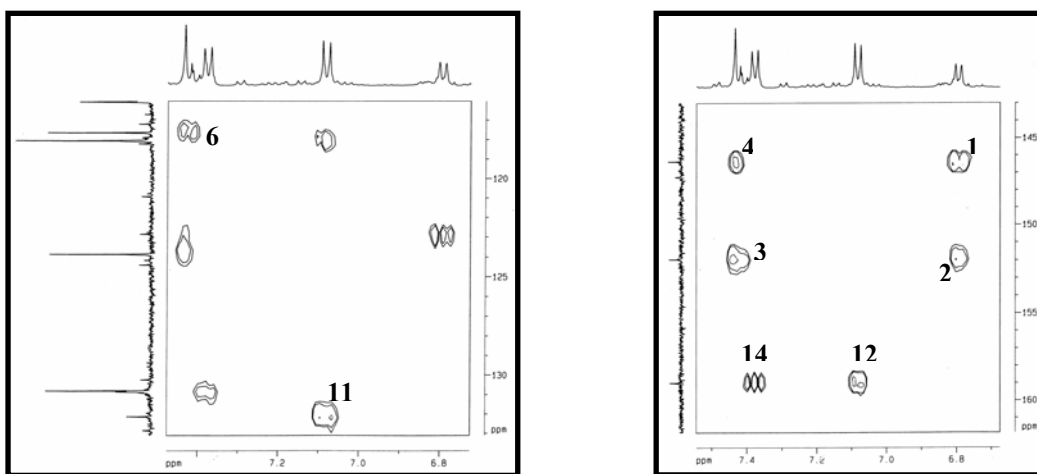
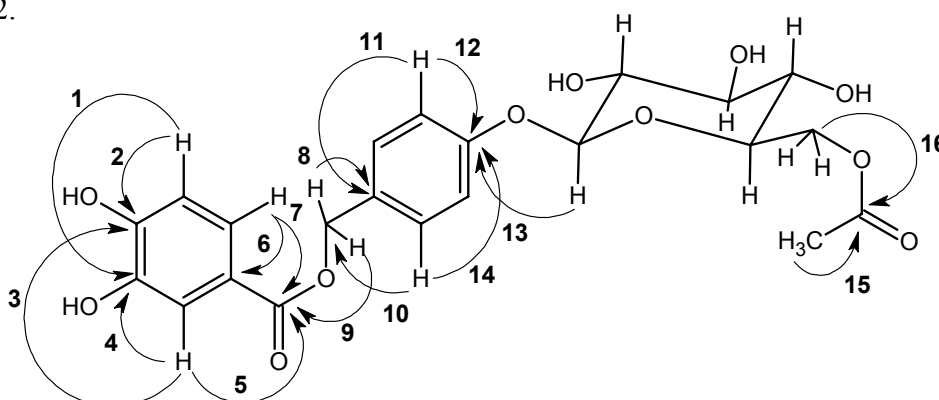


Figura 34a- Expansões do espectro HMBC de ACS-8: (I) δ 6,7-7,5 x 115-135; (II) δ 6,7-7,5 x 143-162.



5.5. Protocatecuato de 6''-amburosila (ACS-9)

Denominado ACS-9 (item 10.1.7.7, p. 286), o pico 3 ($t_R = 11,06$ min) correspondeu a um sólido marrom (pf. 126,1-129,0 °C; $[\alpha]_D^{25} = -26^\circ$, MeOH, c 0,12) cujo espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , Fig. 35, p. 112) mostrou um conjunto de sinais na faixa de δ 4,92-3,50, associados a hidrogênios glicosídicos, um singlete em δ 5,18 (2H, H-1), atribuído a hidrogênios de carbono oximetilênico. No espectro COSY (Fig. 36, p. 112), foram observadas correlações entre os sinais na região de aromáticos formando dois sistemas ABX [I- δ 7,43 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,41 (dd, $J = 8,1$ Hz; $J = 2,0$ Hz, H-6') e 6,79 (d, $J = 8,1$ Hz, H-5'); II-7,47 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2''), 7,45 (dd, $J = 8,2$ Hz; $J = 2,0$ Hz, H-6'') e 6,83 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5'')], todos os sinais com integração para um hidrogênio, e um sistema AA'BB' [δ 7,26 (H-2,6) e 7,06 (H-3,5) (2H, d, $J = 8,6$ Hz)].

No espectro de RMN ^{13}C de ACS-9 (CPD-125 MHz, CD_3OD , Fig. 37, p. 113) foram observadas 25 absorções, duas das quais associadas a carbonilas de éster, δ 168,3 (C-7') e 168,2 (C-7''), e cinco relacionadas a carbonos aromáticos oxigenados: δ 158,9 (C-4); 152,0 (C-4''); 151,9 (C-4'); 146,4 (C-3'') e 146,3 (C-3'), sendo os dois últimos deslocamentos químicos característicos de catecóis (FRIEBOLIN, 1991). O espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, MeOD, Fig. 38, p. 113) exibiu 13 linhas espectrais atribuídas a carbonos mono-hidrogenados, das quais oito foram relacionadas a carbonos aromáticos (δ 130,9; 124,0; 123,9; 118,0; 117,8; 117,6; 116,6 e 116,0) e cinco foram consideradas como pertencentes a carbonos oxigenados sp^3 : δ 102,3 (C-1''); 78,1 (C-3''); 75,8 (C-5''); 75,0 (C-2'') e 72,1 (C-4''). Outras duas linhas espectrais foram associadas a carbonos oximetilênicos δ 67,2 (C-7) e 65,0 (C-6''). Subtração dos espectros de RMN ^{13}C - CPD e DEPT135 permitiu associar as absorções em δ 131,9 (C-1); 122,8 (C-1') e 122,7 (C-1'') a carbonos aromáticos não-hidrogenados. Através da comparação dos dados de RMN ^{13}C do fragmento de açúcar com os descritos na literatura, foi possível confirmar a existência do resíduo de glicose na estrutura (BREITMAIER, 1974).

O espectro de RMN-HSQC (Fig. 39, p. 114) revelou as correlações dos hidrogênios ligados diretamente a seus respectivos carbonos, como o sinal de hidrogênio em δ 5,18 (H-7) com o sinal de carbono metilênico oxigenado em δ 67,2 (C-7) e o duplete em δ 4,92 (H-1'') com a absorção do carbono anomérico em δ 102,3 (C-1''), permitindo também atribuir os sinais de hidrogênios pertencentes a cada anel aromático (Tab. 8, p. 111).

A fórmula molecular $C_{27}H_{26}O_{13}$ foi deduzida através dos picos dos adutos moleculares $[M+Na]^+$ com m/z 581,1386 e $[M+K]^+$ com m/z 597,1115, observados no espectro de massas EM-IES (**Fig. 40, p. 114**), sendo compatível com uma estrutura formada pelos grupamentos identificados por RMN: três anéis aromáticos (um *para*-dissubstituído e dois catecóis), dois grupos ésteres, um carbono oximetilênico e uma glicose.

A presença de um fragmento benziloxi foi constatada a partir das correlações entre os hidrogênios aromáticos H-2,6 (δ_H 7,26) com o carbono oximetilênico (C-7) e reciprocamente entre os hidrogênios oximetilênicos H-7 (δ_H 5,18) com os carbonos aromáticos C-2,6 (δ_C 130,9), e C-1 (δ_C 131,9), verificados no espectro de RMN-HMBC (**Fig. 41, p. 115**).

As correlações entre os hidrogênios do grupo catecol H-2' e H-6' (δ_H 7,43 e 7,41) com a carbonila C-7' (δ_C 168,3) e os acoplamentos entre hidrogênios catecólicos H-2''' e H-6''' (δ 7,47 e 7,45) com a carbonila C-7''' (δ_C 168,2) revelaram a existência de dois fragmentos protocatecuóilas (3,4-di-hidroxi-benzoil). Esterificações envolvendo os fragmentos protocatecuóilas com o fragmento benziloxi e o resíduo de glicose (na posição 6'') foram deduzidas através das correlações entre os hidrogênios metilênicos H-7 (δ_H 5,18) com a carbonila C-7' (δ_C 168,3) e entre os hidrogênios glicosídicos H-6'' (δ_H 4,63 e 4,38) com a carbonila C-7''' (δ_C 168,2), respectivamente. Por fim, o acoplamento entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 4,92) e o carbono aromático oxigenado C-4 (δ_C 158,9) forneceu evidência irrefutável da ligação heterosídica entre o fragmento benziloxi e o resíduo de glicose, na posição 1.

A estrutura química de ACS-9 não tem precedentes de registro na literatura, justificando a designação comum de amburosídio E [protocatecuato de 4-*O*- β -D-(6''-*O*-protocatecuoilglicopiranosil)-benzila].

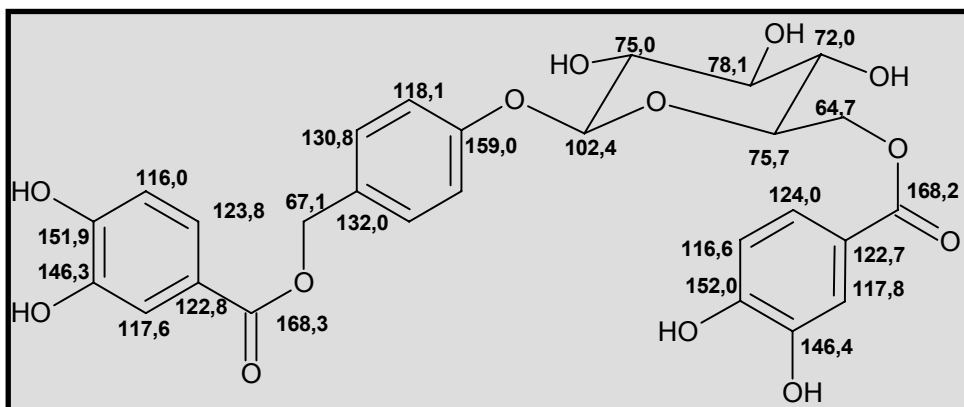
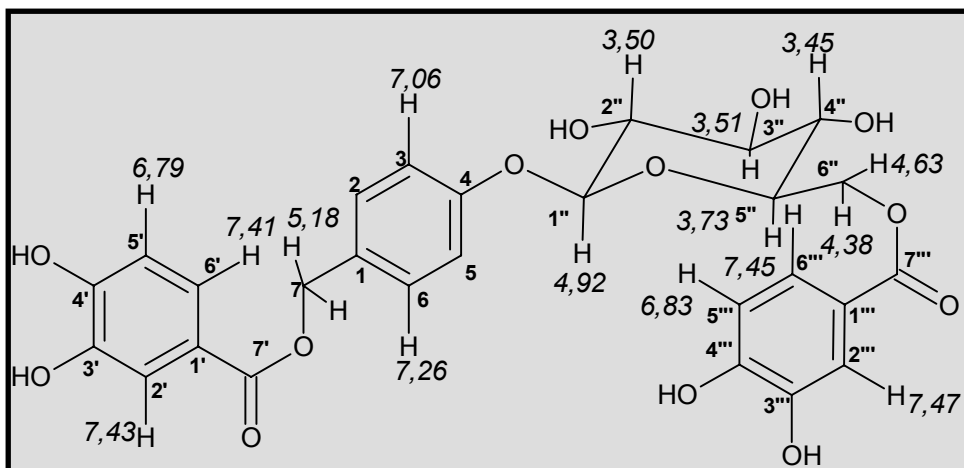


Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-9 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACS-9 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
1	131,9		5,18	7,06
2,6	130,9	7,26 (2H, d, 8,6 Hz)	7,06	5,18
3,5	118,0	7,06 (2H, d, 8,6 Hz)	7,26	
4	158,9		7,06	7,26; 4,92
7	67,2	5,18 (2H, s)		7,26
1'	122,8		7,43	6,79
2'	117,6	7,43 (1H, d, 2,0 Hz)		7,41
3'	146,3			6,79
4'	151,9			7,43; 7,41
5'	116,0	6,79 (1H, d, 8,1 Hz)		
6'	123,9	7,41 (1H, d, 8,1; 2,0 Hz)		7,43
7'	168,3			7,43; 7,41; 5,18; (6,79)
1''	102,3	4,92 (1H, d, 7,4)	3,50	3,77
2''	75,0	3,50 (1H, m)		
3''	78,1	3,51 (1H, td)	3,45	4,38
4''	72,1	3,45 (1H, m)		4,63; 4,38
5''	75,8	3,77 (1H, m)		4,92; 3,77
6''	65,0	4,63 (1H, m); 4,38 (1H, m)		3,45; 3,77
1'''	122,7			6,83
2'''	117,8	7,47 (1H, d, 2,0 Hz)		7,45
3'''	146,4			6,83
4'''	152,0			7,47; 7,45
5'''	116,6	6,83 (1H, d, 8,2 Hz)		
6'''	124,0	7,45 (1H, d, 8,2; 2,0 Hz)		7,47
7'''	168,2			7,47; 7,45 4,63; 4,38; (6,83)

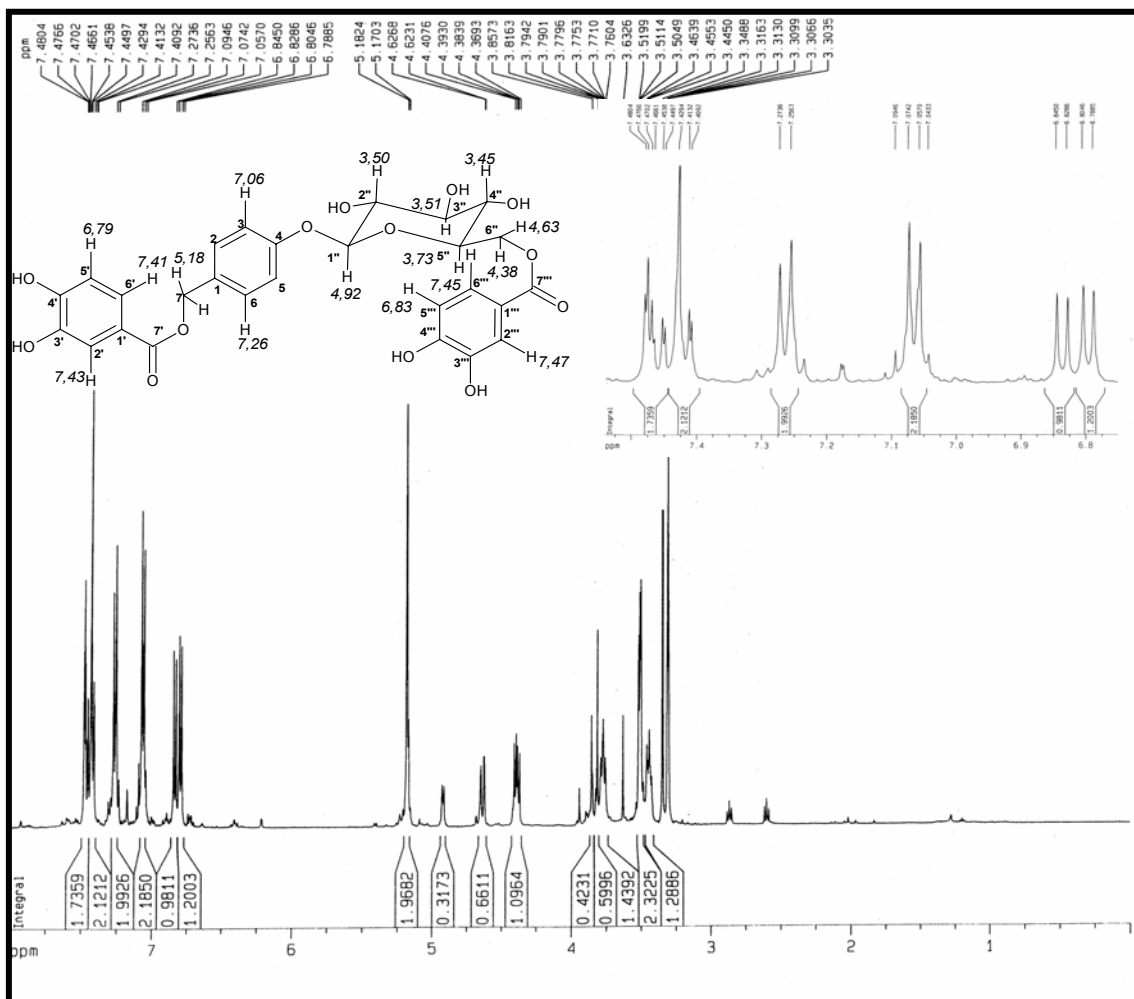


Figura 35- Espectro de RMN ^1H de ACS-9 (CD_3OD , 500 MHz)

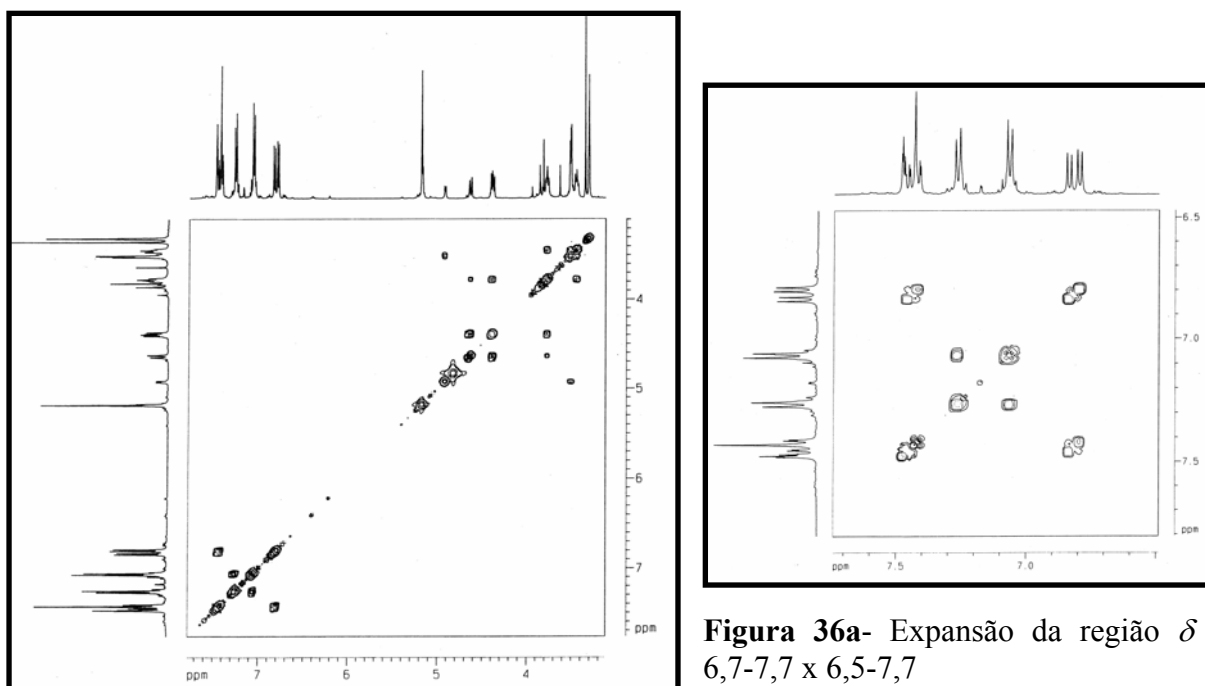


Figura 36a- Expansão da região δ 6,7-7,7 x 6,5-7,7

Figura 36- Espectro de RMN-COSY (CD_3OD , 500 x 500 MHz) de ACS-9.

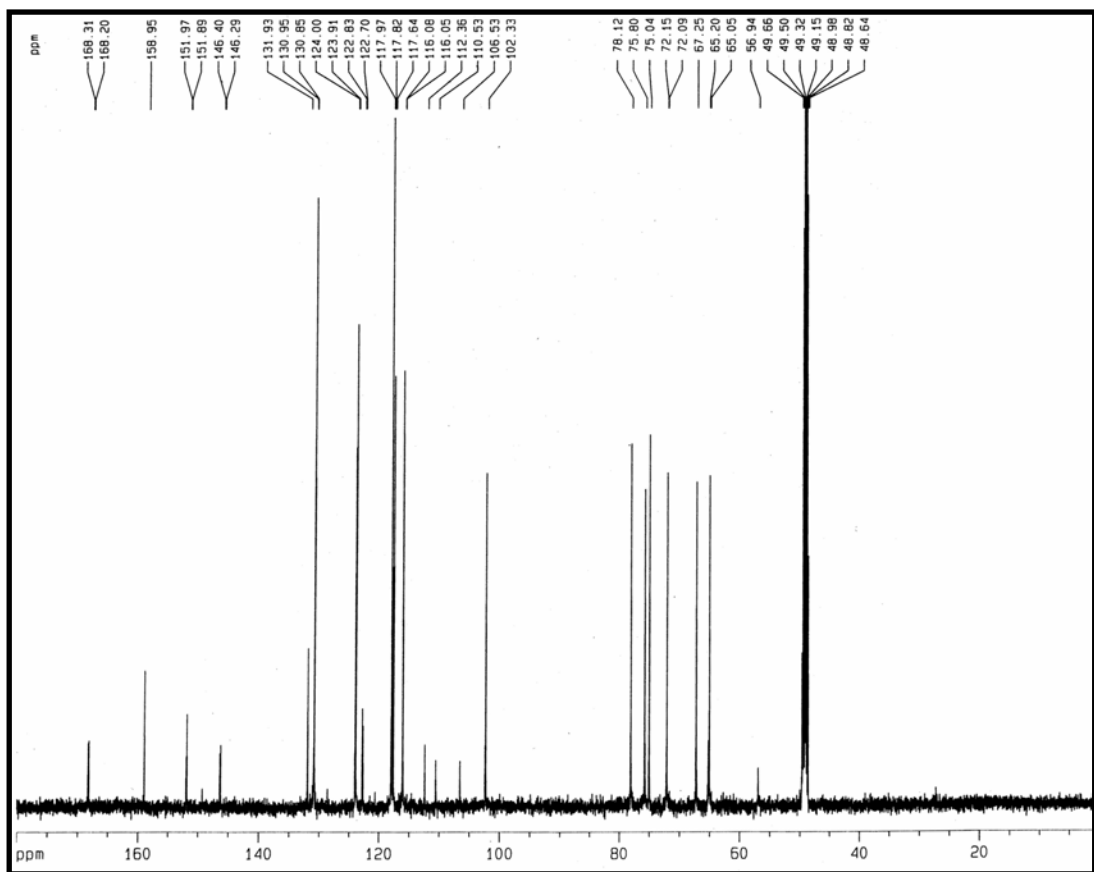


Figura 37- Espectro de RMN ^{13}C (CPD) de ACS-9 (MeOD, 125 MHz)

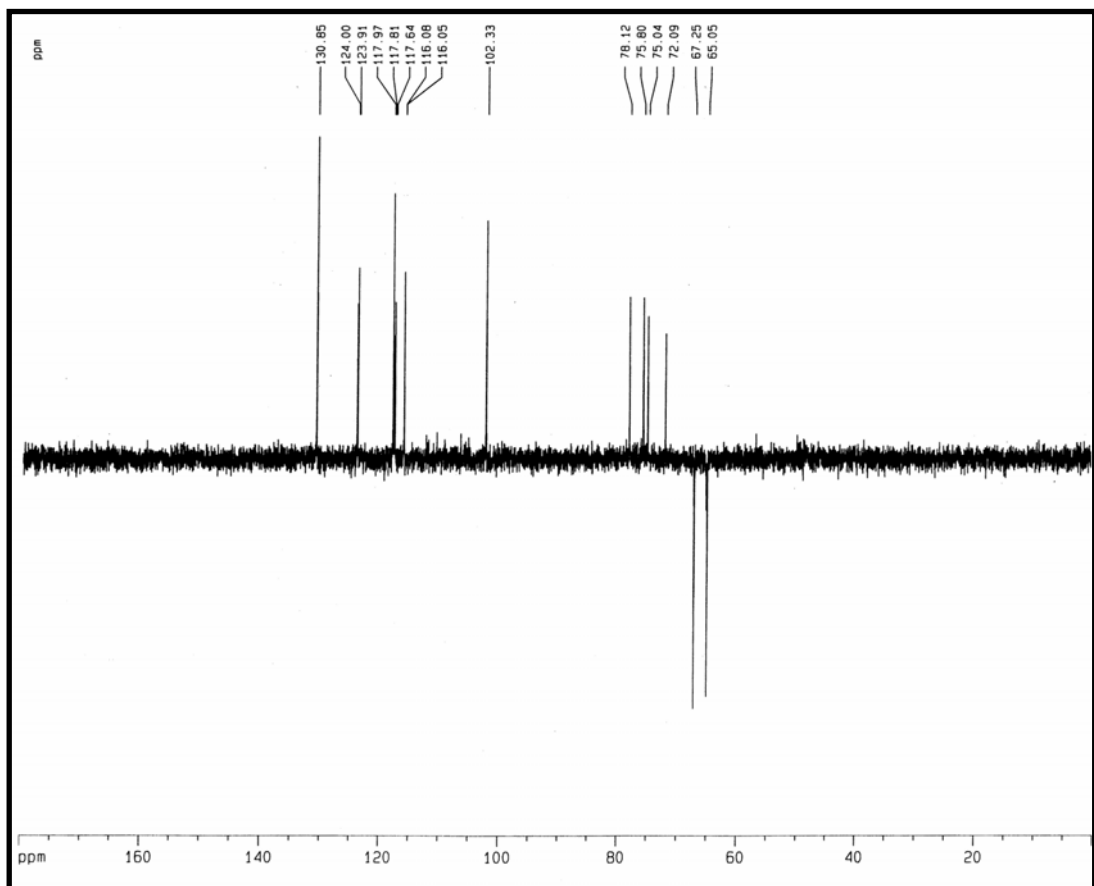


Figura 38- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-9 (CD_3OD , 125 MHz)

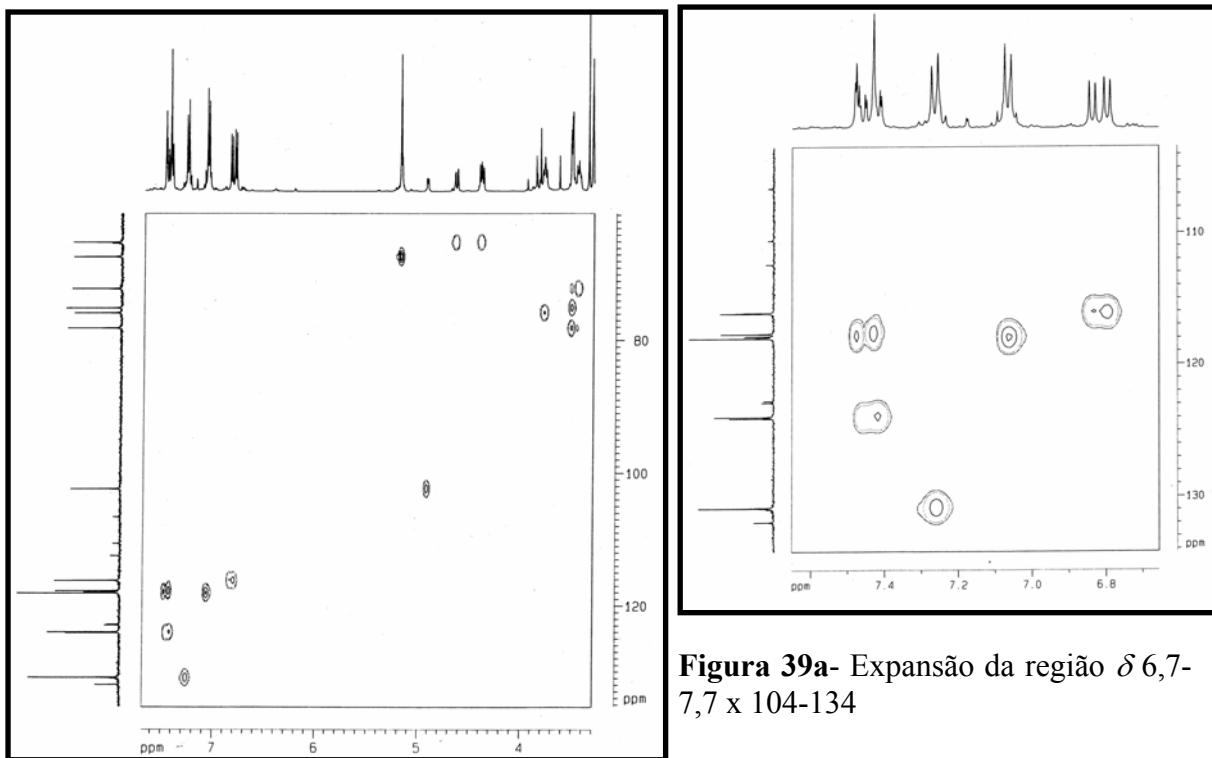


Figura 39a- Expansão da região δ 6,7-7,7 x 104-134

Figura 39- Espectro de RMN-HSQC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-9

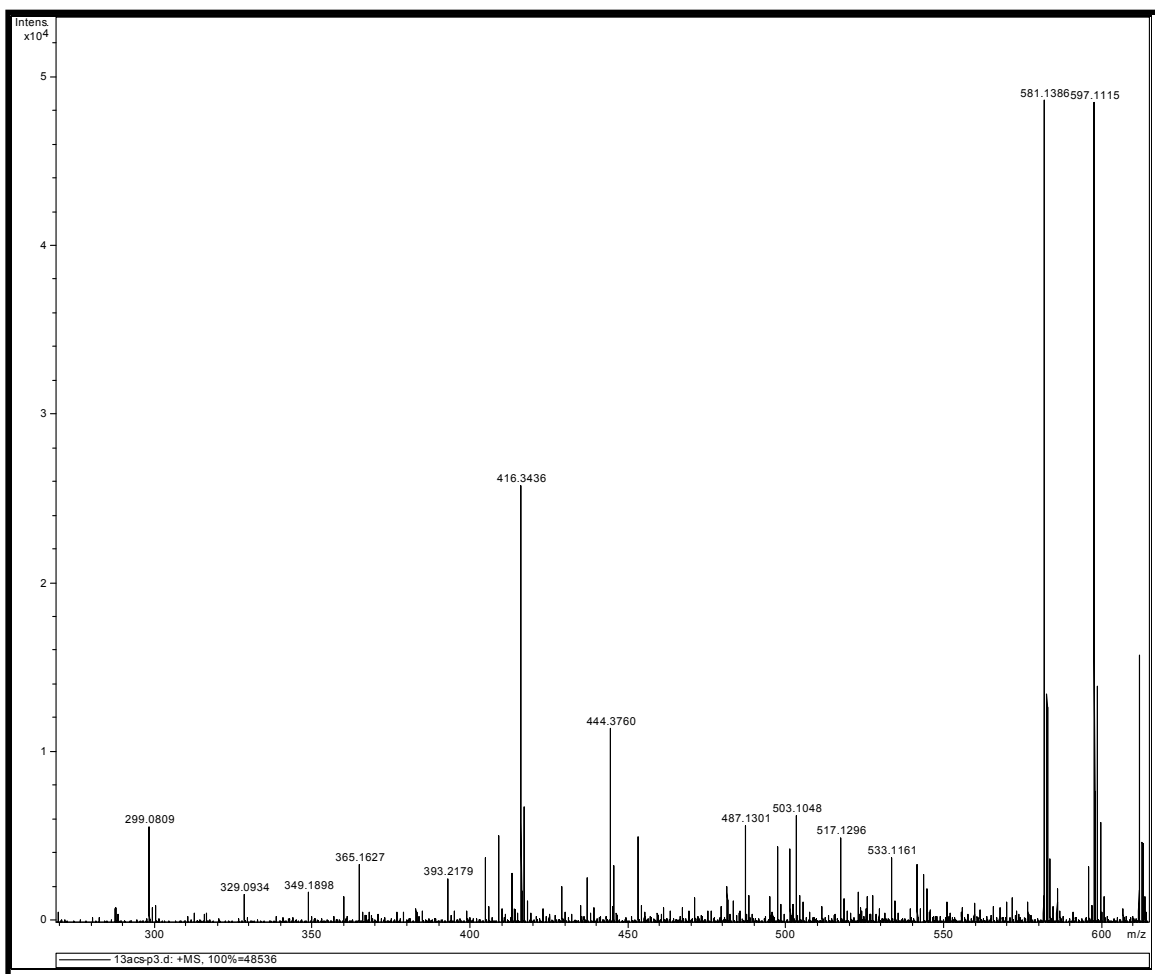


Figura 40- Espectro de massa de ACS-9 (Ionização por Electrospray)

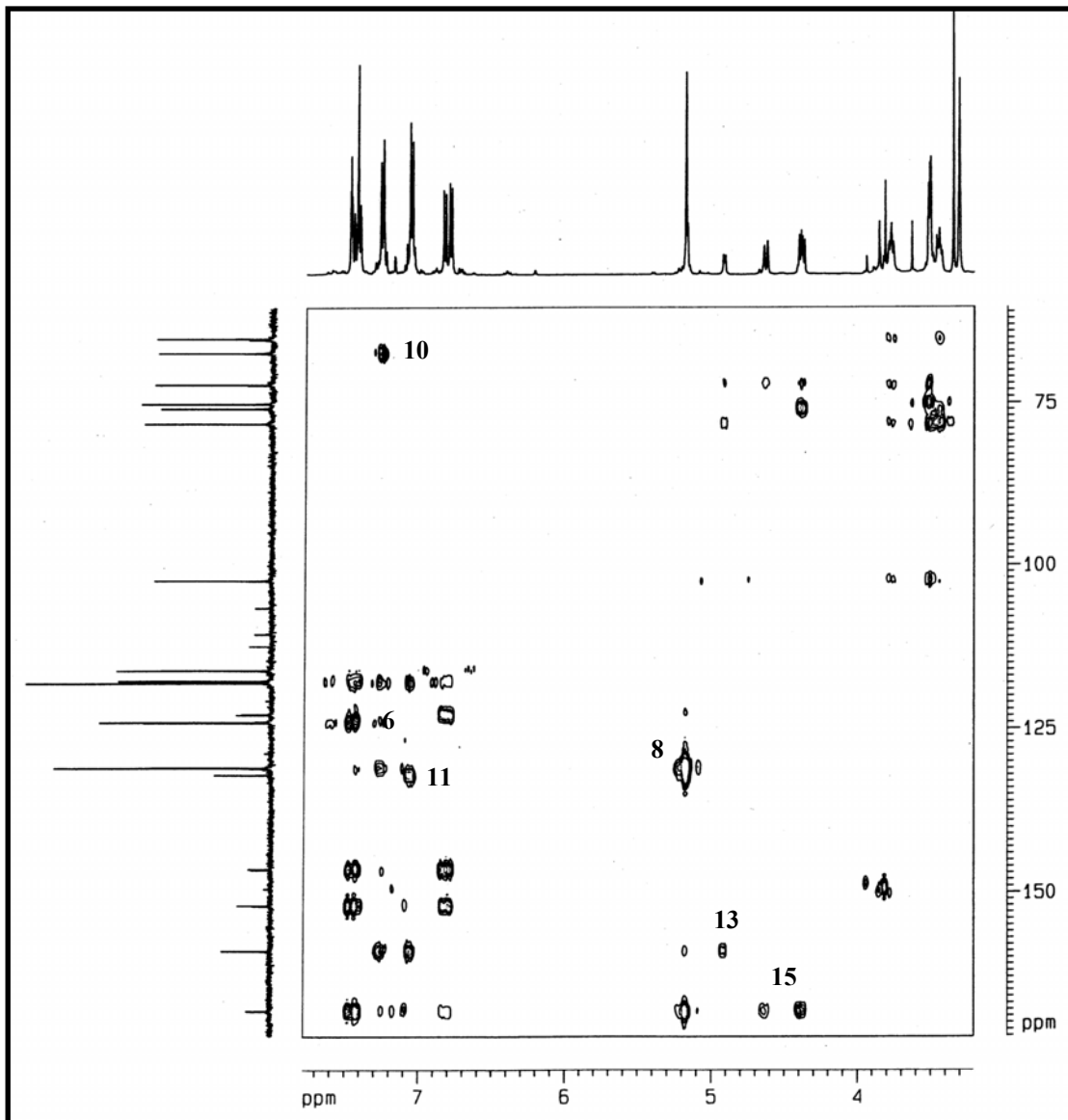
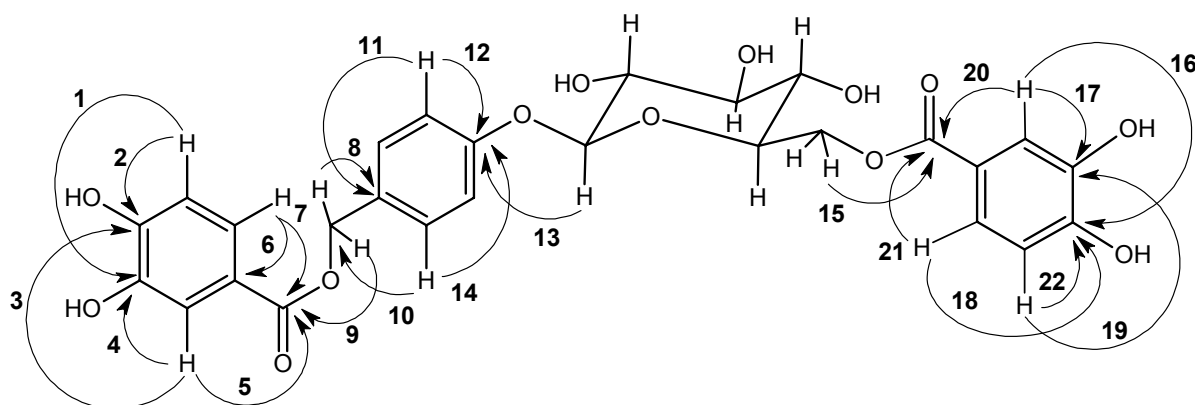


Figura 41- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-9



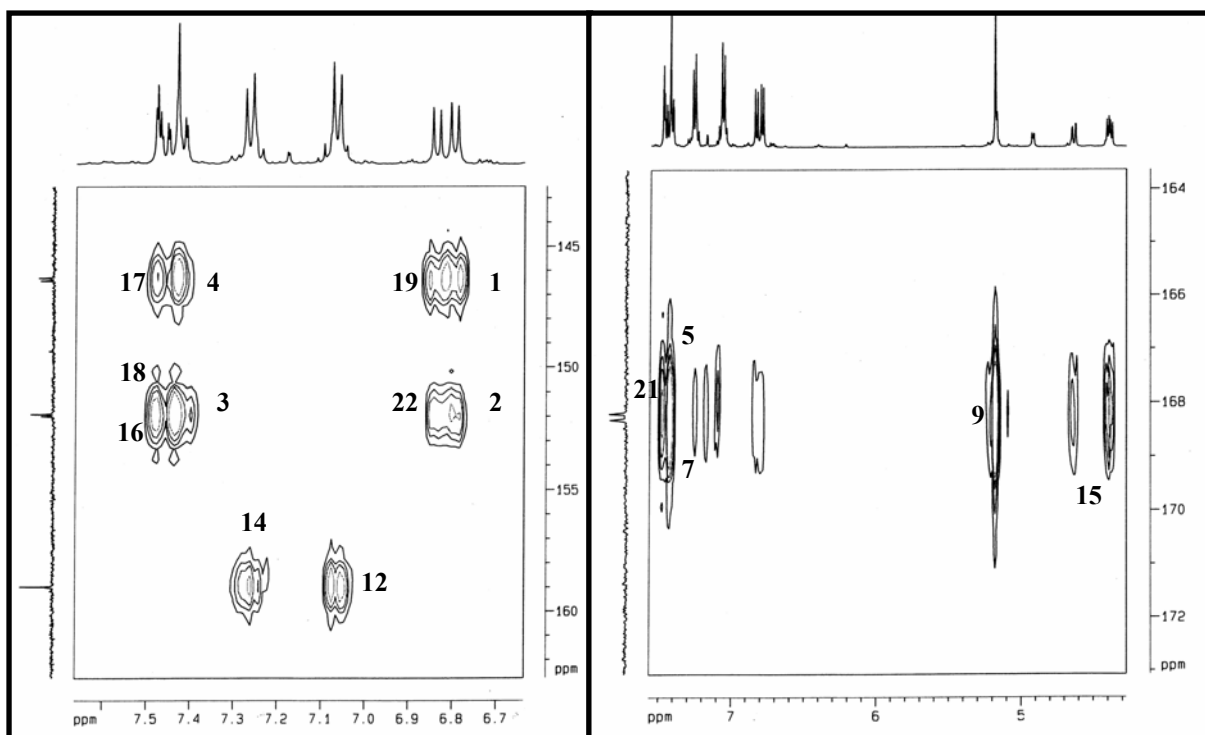
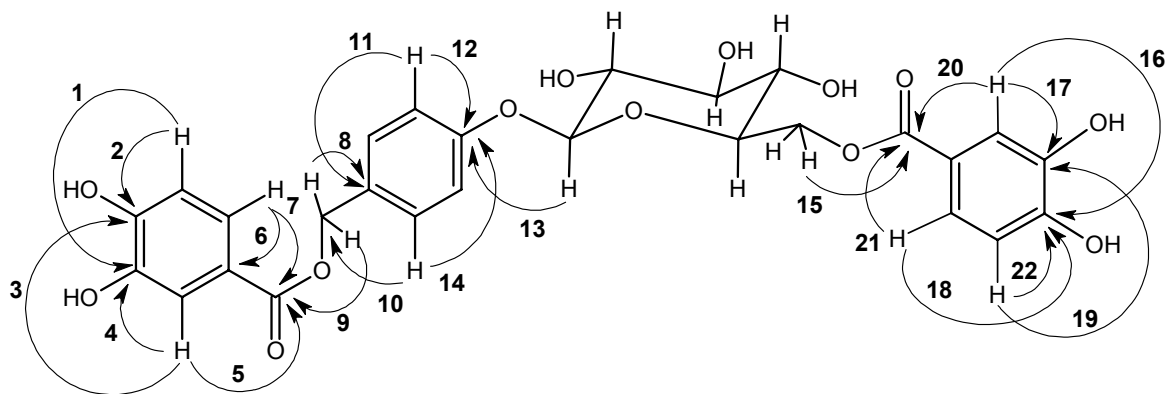


Figura 41a- Expansões do espectro HMBC de ACS-9: (I) δ 6,6-7,7 x 143-163; (II) δ 4,3-7,5 x 164-173.



5.6. Ferulato de 6''-amburosila (ACS-10)

Um sólido marrom (pf. 108,7-112,2 °C; $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ$ MeOH, c 0,60) denominado ACS-10 (**item 10.1.7.7, p. 286**), foi isolado por HPLC a partir da fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20), resultante de sucessivas cromatografias gravitacionais da fração acetato de etila do extrato etanólico das sementes, tendo sido o último pico a ser coletado ($t_R = 13,57$ min).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , **Fig. 42, p. 121**) de ACS-10 apresentou um par de dupletos em δ 7,61 (H-7'') e 6,37 (H-8'') (1H, $J = 16,0$ Hz), referentes a hidrogênios olefinicos com estereoquímica *trans*, outro par de dupletos em δ 7,28 (H-2,6) e 7,07 (H-3,5) (2H, $J = 8,7$ Hz), característicos de anel benzênico *para*-dissubstituído, dois singletos agudos em δ 5,09 (2H, H-7) e 3,86 (3H, H-3''), sendo este último compatível com hidrogênios metoxílicos, enquanto que o mais desblindado foi relacionado a hidrogênios ligados a carbono oxigenado. Foram ainda observados um conjunto de sinais numa região característica de hidrogênios de açúcar (δ 4,90-3,43) e duas tríades de sinais, atribuídos a hidrogênios pertencentes a anéis aromáticos 1,2,4-trissubstituídos: (A) δ 7,40; 7,37 e 6,77- (B) δ 7,16; 7,04 e 6,79, assim reunidos após análise do espectro COSY (**Fig. 43, p. 121**).

Vinte oito linhas espectrais foram exibidas no espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , **Fig. 44, p. 122**), sendo duas delas atribuídas a carbonilas de ésteres, δ 169,1 (H-9'') e 168,2 (C-7'') e cinco associadas a carbonos sp^2 oxigenados: δ 158,9 (C-4); 151,9 (C-4'); 150,8 (C-4''); 149,5 (C-3'') e 146,3 (C-3').

O espectro RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-10 (125 MHz, CD_3OD , **Fig. 45, p. 123**) revelou a presença de quinze carbonos mono-hidrogenados, dos quais dez foram relacionados a carbonos sp^2 (δ 147,3; 130,9; 124,4; 123,9; 118,0; 117,6; 116,6; 116,0; 115,4 e 111,8) e o restante foi associado a carbonos sp^3 oxigenados: δ 102,3 (C-1''); 78,1 (C-3''); 75,7 (C-5''); 75,0 (C-2'') e 72,0 (C-4''), confirmando uma estrutura heterosídica, tendo o carbono em δ 102,3 como provável carbono anomérico (C-1''). Absorções em δ 67,2 (C-7) e 64,7 (C-6'') foram atribuídas a carbonos metilênicos oxigenados, já a absorção em δ 56,6 (4''-OMe) ratificou a existência de uma metoxila. As demais absorções de ^{13}C em δ 131,9 (C-1); 127,8 (C-1'') e 122,8 (C-1'), ausentes no espectro DEPT135, foram reconhecidas como sendo de carbonos aromáticos não-hidrogenados.

O espectro de RMN-HSQC (**Fig. 46, p. 123**) mostrou correlações dos sinais de hidrogênios olefinicos em δ_H 7,61 (H-7'') e 6,37 (H-8'') com os sinais de carbono em δ_C

147,2 (C-7'') e 115,4 (C-8''), respectivamente, sugerindo que a olefina estivesse conjugada a uma das carbonilas, devido às significativas diferenças de deslocamentos químicos homonucleares ($\Delta\delta_{H7'',8''} = 1,24$ e $\Delta\delta_{C7'',8''} = 31,8$). A correlação entre as absorções δ 5,09 (H-7) e δ 67,2 (C-7) elucidou o caráter oxigenado do carbono metilênico, formando possivelmente um grupo éster. A atribuição feita ao carbono anomérico foi corroborada pela correlação entre as absorções em δ 4,90 (H-1'') e 102,3 (C-1''), sendo sua configuração determinada como β através da constante de acoplamento $J_{H,H} = 7,4$ Hz. O açúcar foi identificado como glicose, após comparação dos seus dados de RMN ^{13}C com os registrados na literatura (BREITMAIER, 1974).

O espectro de RMN-HMBC (Fig. 47, p. 124), através dos acoplamentos heteronucleares a longa distância (2J e 3J), forneceu as informações necessárias para a conexão de cada fragmento identificado (Tab. 9, p. 120): três anéis fenólicos (um *para*-dissubstituído e outros dois 1,2,4-trissubstituídos, sendo um deles metoxilado), dois grupos ésteres, um carbono oximetilênico, uma carbonila α,β -insaturada e um fragmento de glicose, resultando na fórmula molecular $C_{30}H_{30}O_{13}$, a qual foi ratificada pela presença dos picos dos adutos moleculares $[M+Na]^+$ m/z 621,1726 e $[M+K]^+$ m/z 637,1472, no espectro de massa de ACS-10 (EM-IES, Fig. 48, p. 126).

A correlação entre o singlete em δ_H 5,09 (H-7) com o sinal de carbono em δ_C 168,2 (C-7') reforçou a existência de um grupo éster ligado a um dos anéis fenólicos trissubstituídos, conforme evidências obtidas pelas correlações entre as absorções em δ_H 7,40 e 7,37 (H-2',6') com δ_C 168,2 (C-7'). Correlações entre o singlete em δ_H 5,09 (H-7) com os sinais de carbonos aromáticos em δ_C 131,9 (C-1) e 130,9 (C-2,6), bem como o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos em δ_H 7,28 (H-2,6) com o carbono metilênico em δ_C 67,2 (C-7) justificaram a ligação do anel benzênico *para*-dissubstituído à porção oximetilênica do éster.

Os sinais de hidrogênios olefínicos em δ_H 7,61 (H-7'') e 6,37 (H-8'') correlacionaram-se com a carbonila em δ_C 169,1 (C-9''), corroborando com a presença de uma carbonila α,β -insaturada. As correlações envolvendo os hidrogênios olefínicos H-7'' e H-8'' (δ_H 7,61 e 6,37) e o hidrogênio aromático H-5'' (δ_H 6,79) com o carbono aromático não-hidrogenado C-1'' (δ_C 127,8), além das correlações dos hidrogênios aromáticos H-2'' e H-6'' (δ_H 7,16 e 7,04) com o carbono olefínico C-7'' (δ_C 147,2) revelaram a existência de um fragmento cinamoíla. Como a metoxila foi posicinada no C-3'', devido ao acoplamento entre

Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith 118

os hidrogênios metílicos H-3''' (δ 3,86) e este carbono aromático C-3''' (δ 149,5), o fragmento cinamoíla foi caracterizado precisamente como sendo feruloíla.

O acoplamento entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ 4,90) com o carbono oxigenado do anel aromático *para*-dissubstituído C-4 (δ 158,9) definiu um dos pontos de ligação do resíduo de açúcar (glicose) com uma das agliconas, uma vez que também foram observadas correlações entre os hidrogênios glicosídicos H-6'' (δ 4,52 e 4,38) e a carbonila do fragmento feruloíla C-9''' (δ 169,1), justificando o desblindagem destes mesmos hidrogênios.

A substância ACS-10 é nova na literatura, merecendo a denominação trivial de amburosídeo F [protocatecuato de 4-*O*- β -D-(6''-*O*-feruloilglicopiranosil)-benzila].

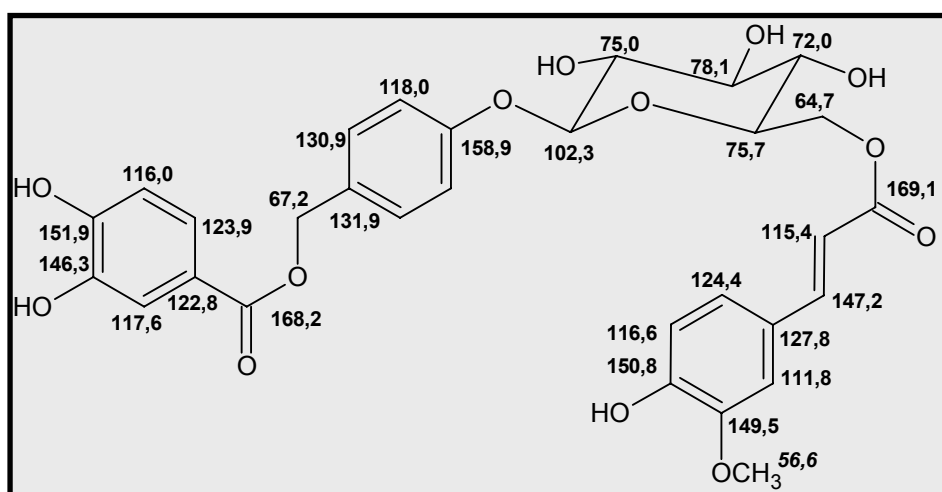
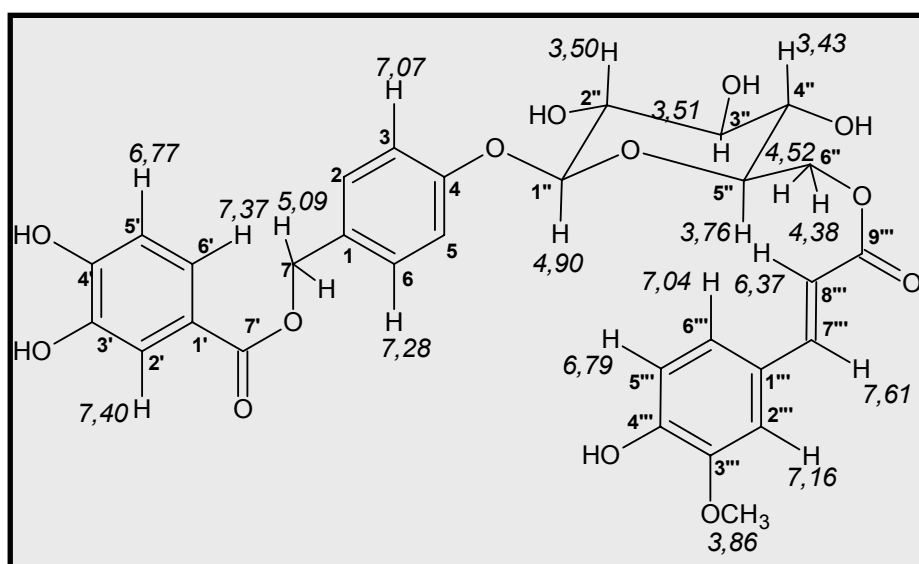


Tabela 9- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-10 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACS-10 δ_{C} (ppm) CD_3OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
1	131,9			7,07
2,6	130,9	7,28 (2H, d, 8,7 Hz)		5,09
3,5	118,0	7,07 (2H, d, 8,7 Hz)	7,28	
4	158,9		7,07	7,28; 4,90
7	67,2	5,09 (2H, s)		7,28
1'	122,8			6,77
2'	117,6	7,40 (1H, d, 2,0 Hz)		7,37
3'	146,3		7,40	6,77
4'	151,9			7,40; 7,37
5'	116,0	6,77 (1H, d, 8,2 Hz)		
6'	123,9	7,37 (1H, dd, 8,2 e 2,0 Hz)		7,40
7'	168,2		5,09	7,40; 7,37
1''	102,3	4,90 (1H, d, 7,4)	3,50	3,76
2''	75,0	3,50 (1H, m)		
3''	78,1	3,51 (1H, td)	3,50; 3,43	4,38
4''	72,0	3,43 (1H, m)	3,76	4,38; 3,50
5''	75,7	3,76 (1H, m)	3,43	
6''	64,7	4,52 (1H, d); 4,38 (1H, dd)		
1'''	127,8		7,61	6,79; 6,37
2'''	111,8	7,16 (1H, d, 1,8 Hz)		7,61; 7,04
3'''	149,5			6,79; 3,86
4'''	150,8			7,16; 7,04
5'''	116,6	6,79 (1H, d, 8,2 Hz)		
6'''	124,4	7,04 (1H, dd, 8,2 e 1,8 Hz)		7,61; 7,16
7'''	147,2	7,61 (1H, d, 16,0 Hz)		7,16; 7,04
8'''	115,4	6,37 (1H, d, 16,0 Hz)	7,61	
9'''	169,1		6,37	
3'''-OMe	56,6	3,86 (3H, s)		

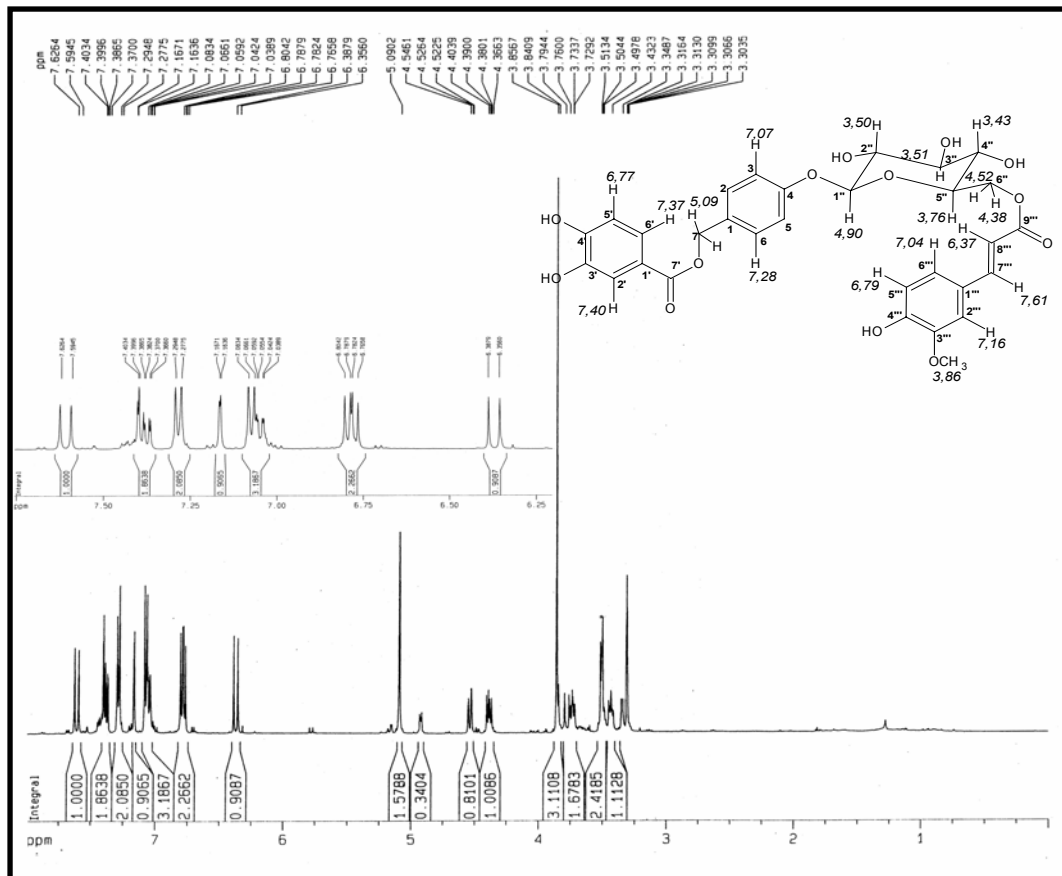


Figura 42- Espectro de RMN ^1H de ACS-10 (CD_3OD , 500 MHz)

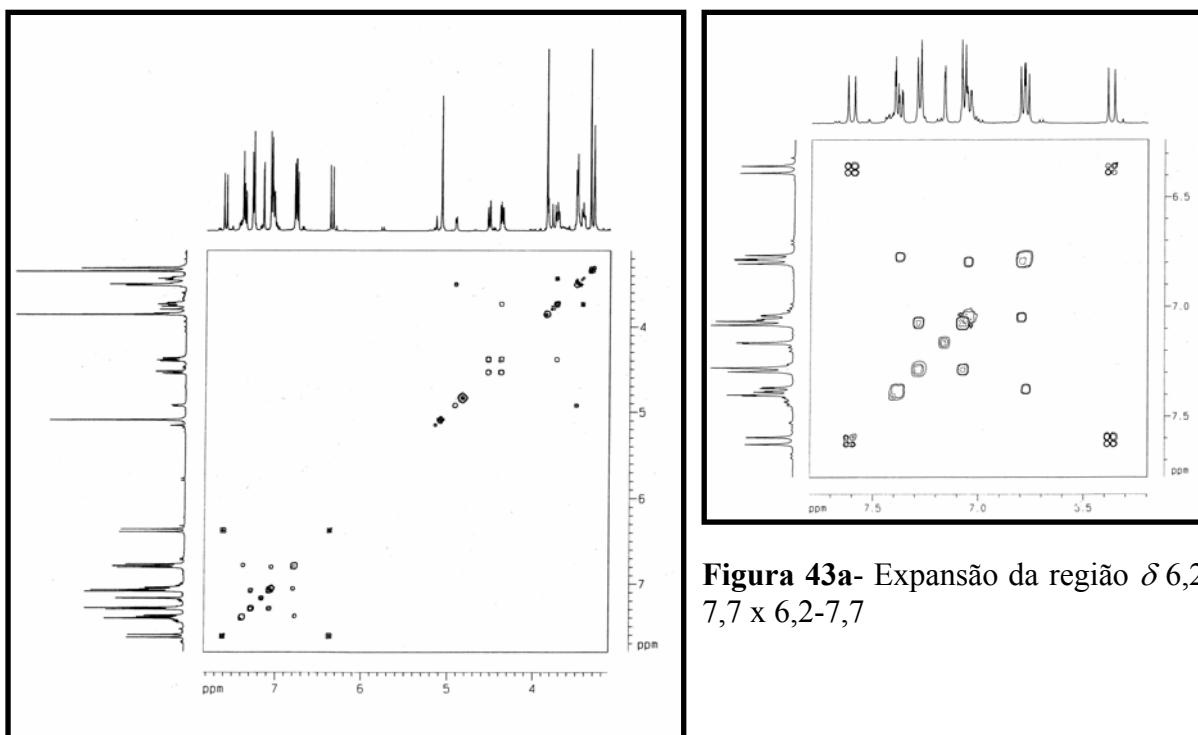


Figura 43a- Expansão da região δ 6,2-7,7 x 6,2-7,7

Figura 43- Espectro de RMN-COSY (CD_3OD , 500 x 500 MHz) de ACS-8

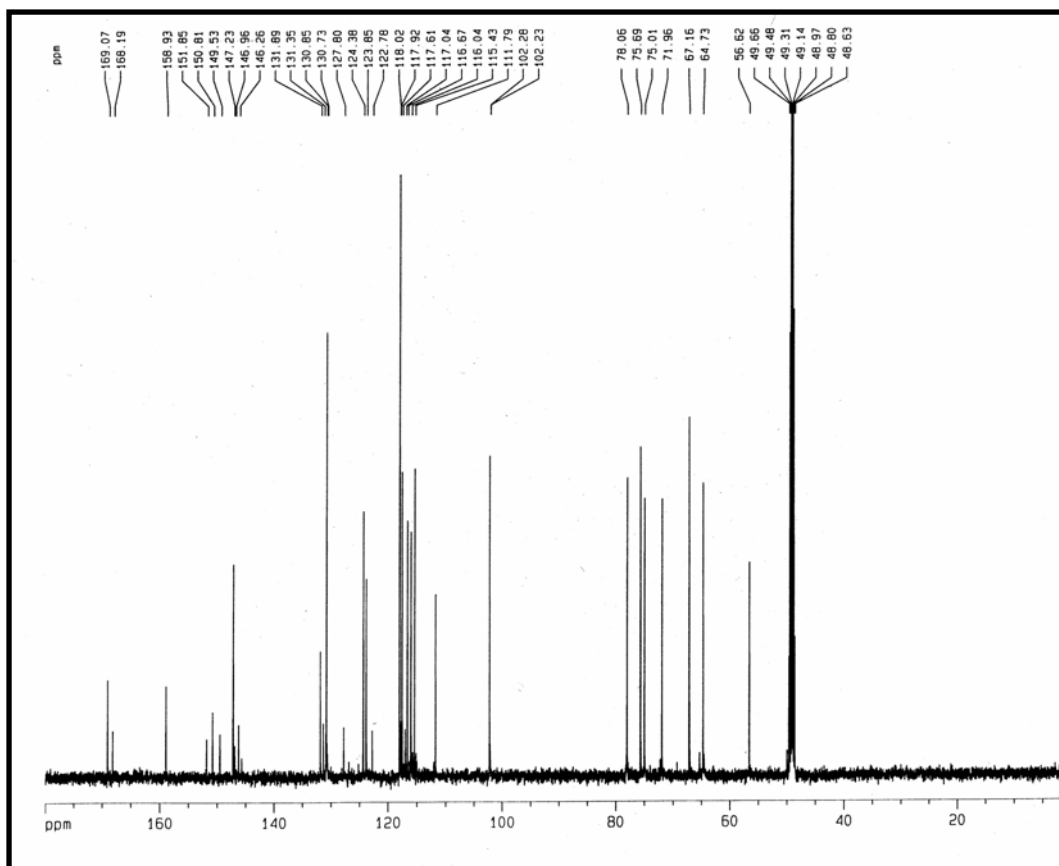


Figura 44- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-10 (CD_3OD , 125 MHz)

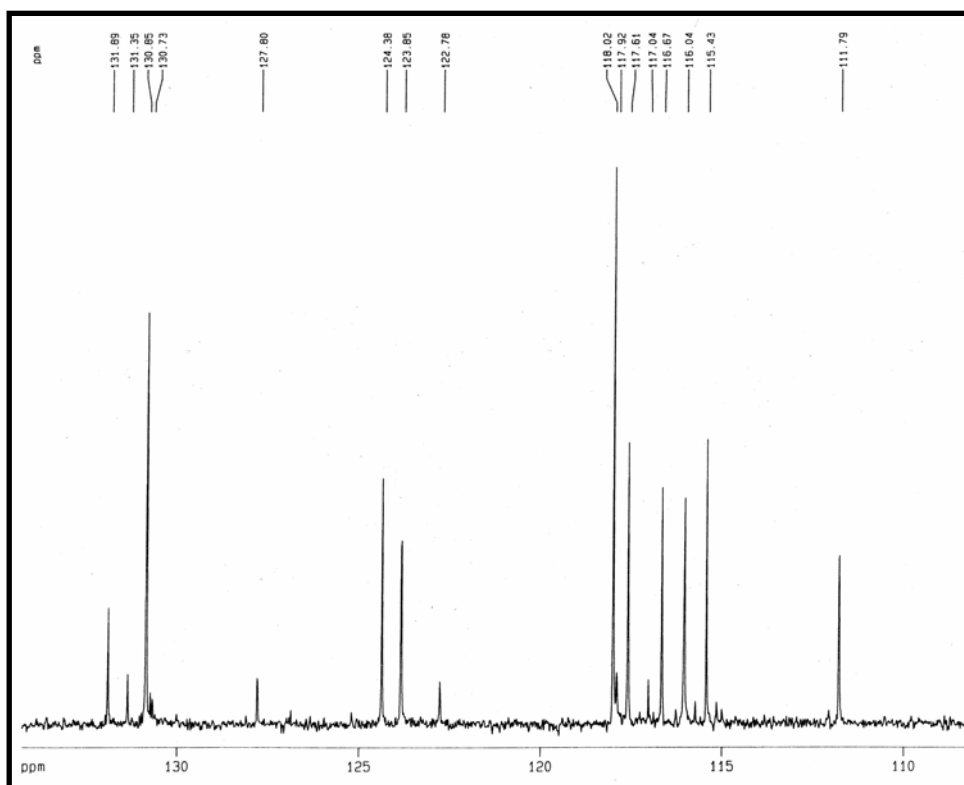


Figura 44a- Expansão da região δ 108-135 do espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-10 (CD_3OD , 125 MHz).

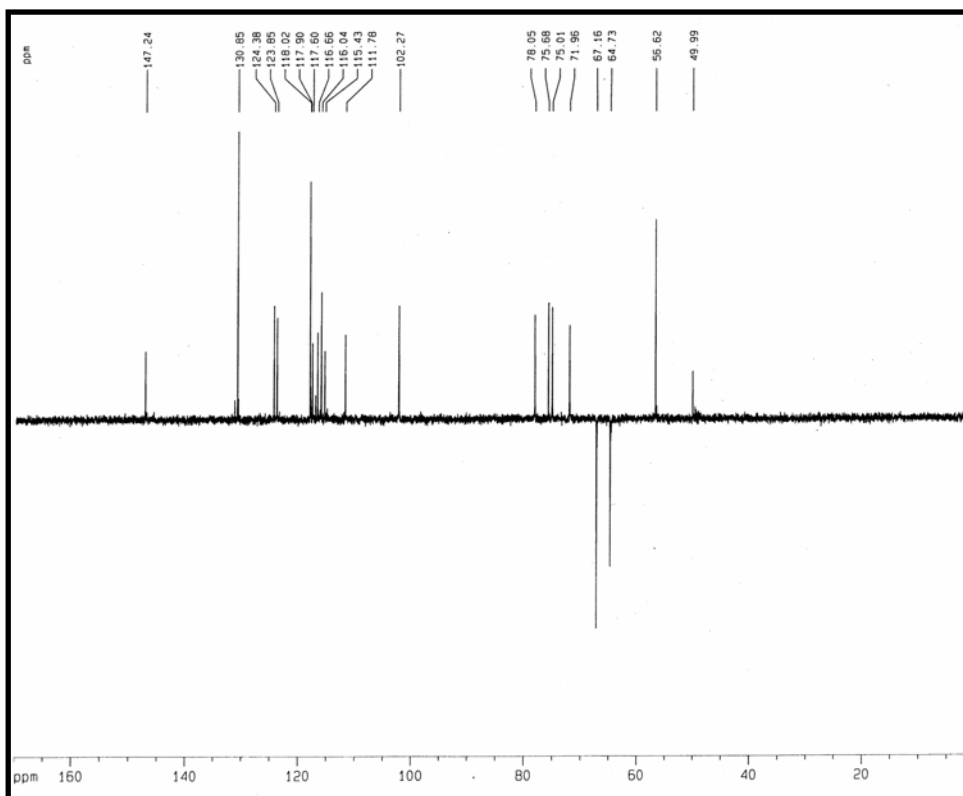


Figura 45- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-10 (CD_3OD , 125 MHz)

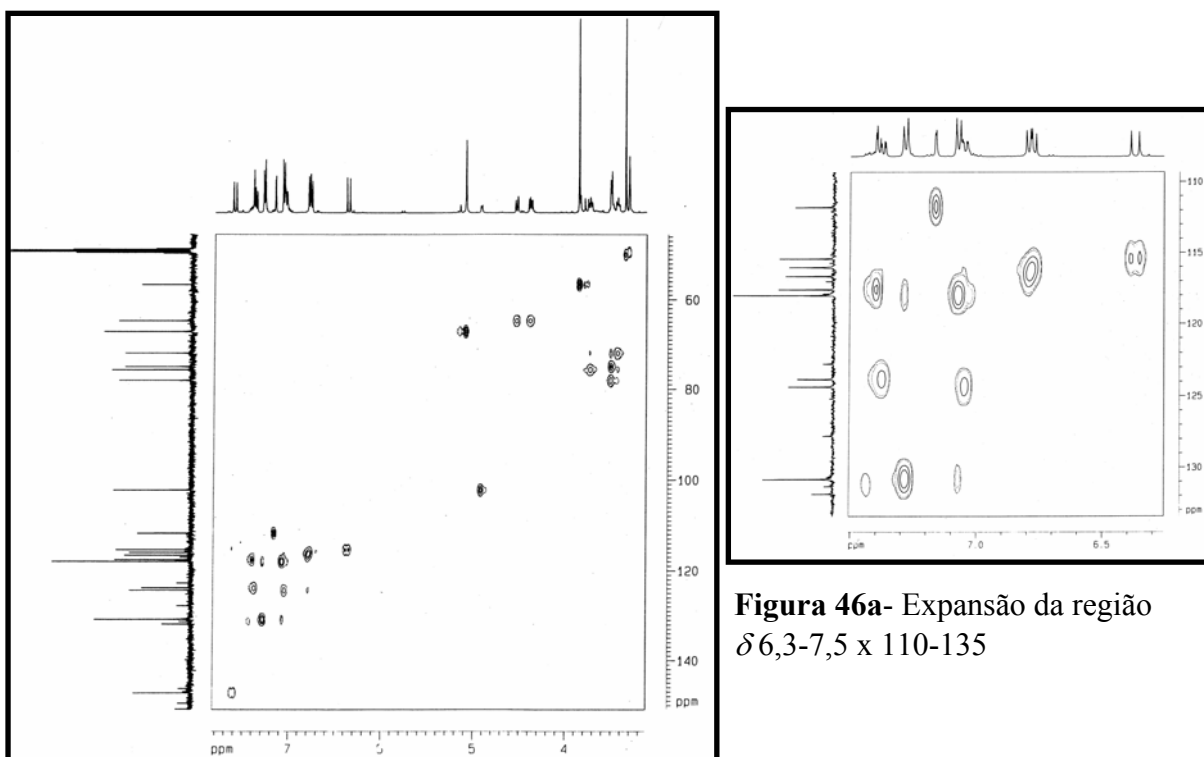


Figura 46a- Expansão da região $\delta 6,3-7,5 \times 110-135$

Figura 46- Espectro de RMN-HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de ACS-10

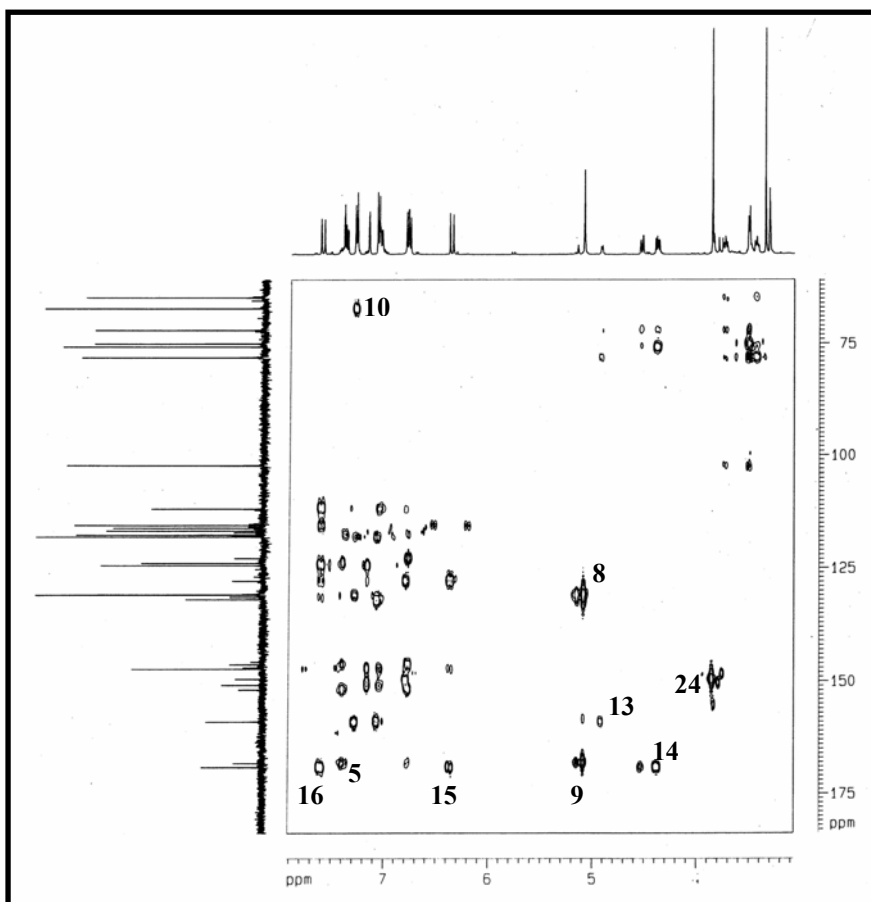
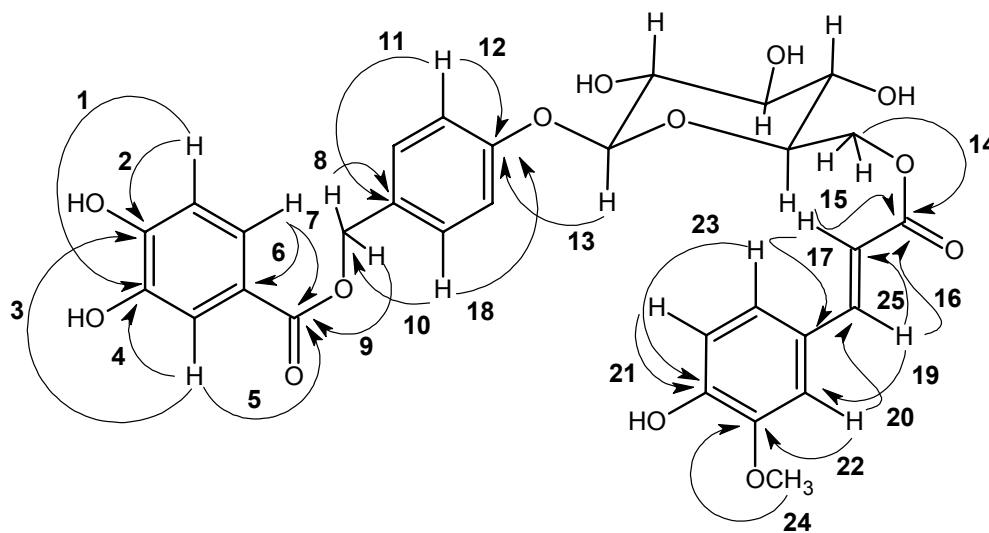


Figura 47- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-10



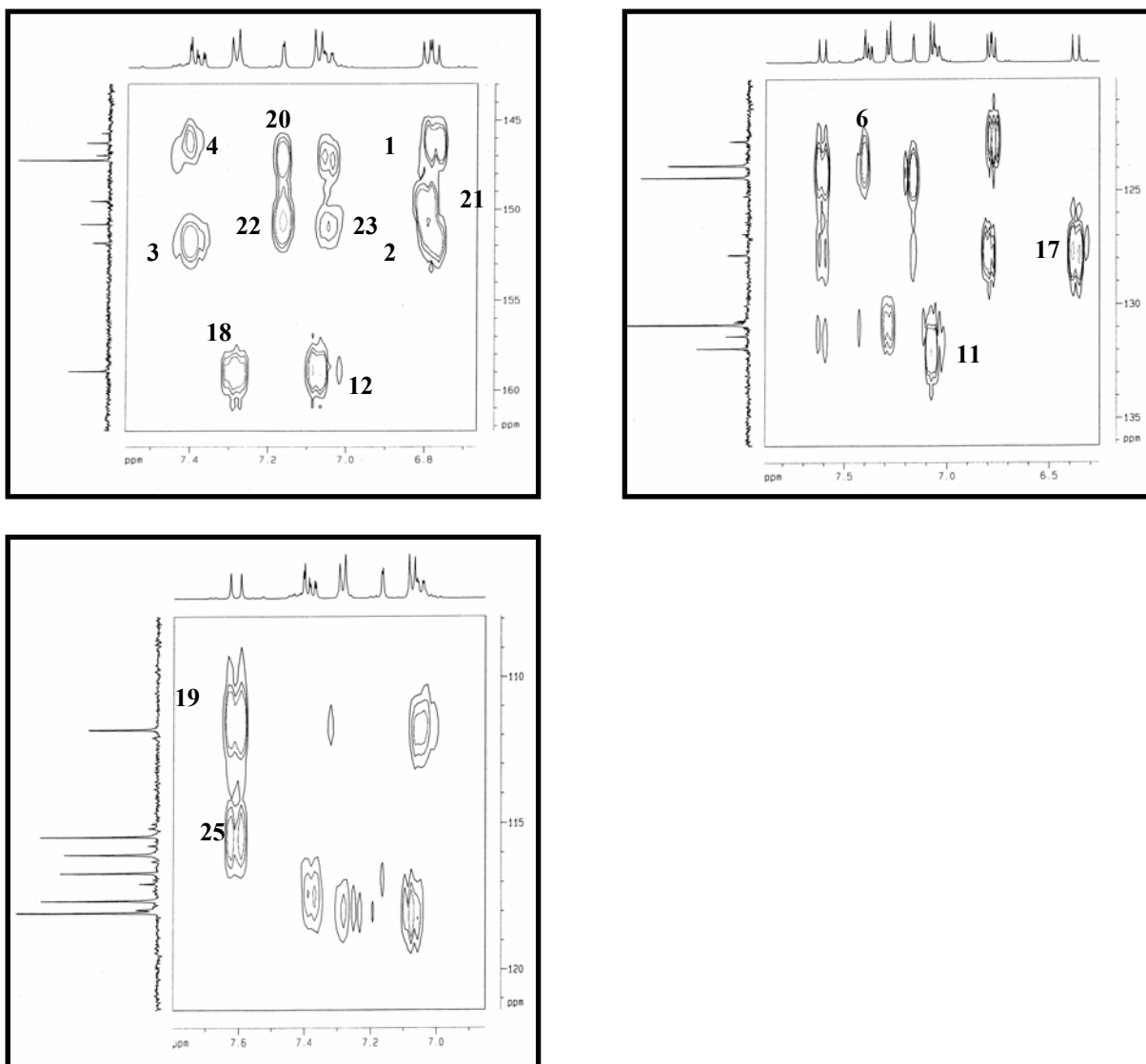
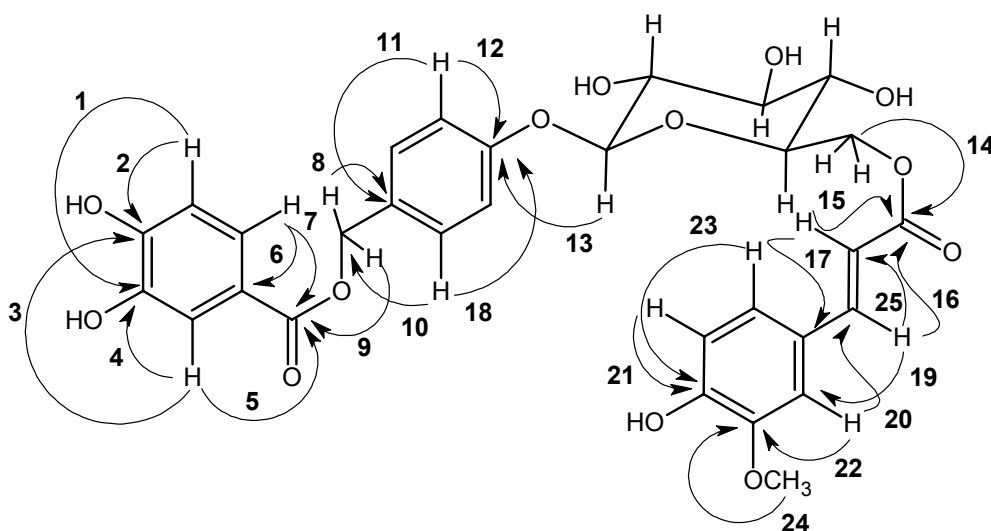


Figura 47a- Expansões do espectro HMBC de ACS-10: (I) δ 6,7-7,5 x 142-162; (II) δ 6,3-7,8 x 120-136; (III) δ 6,9-8,0 x 108-121.



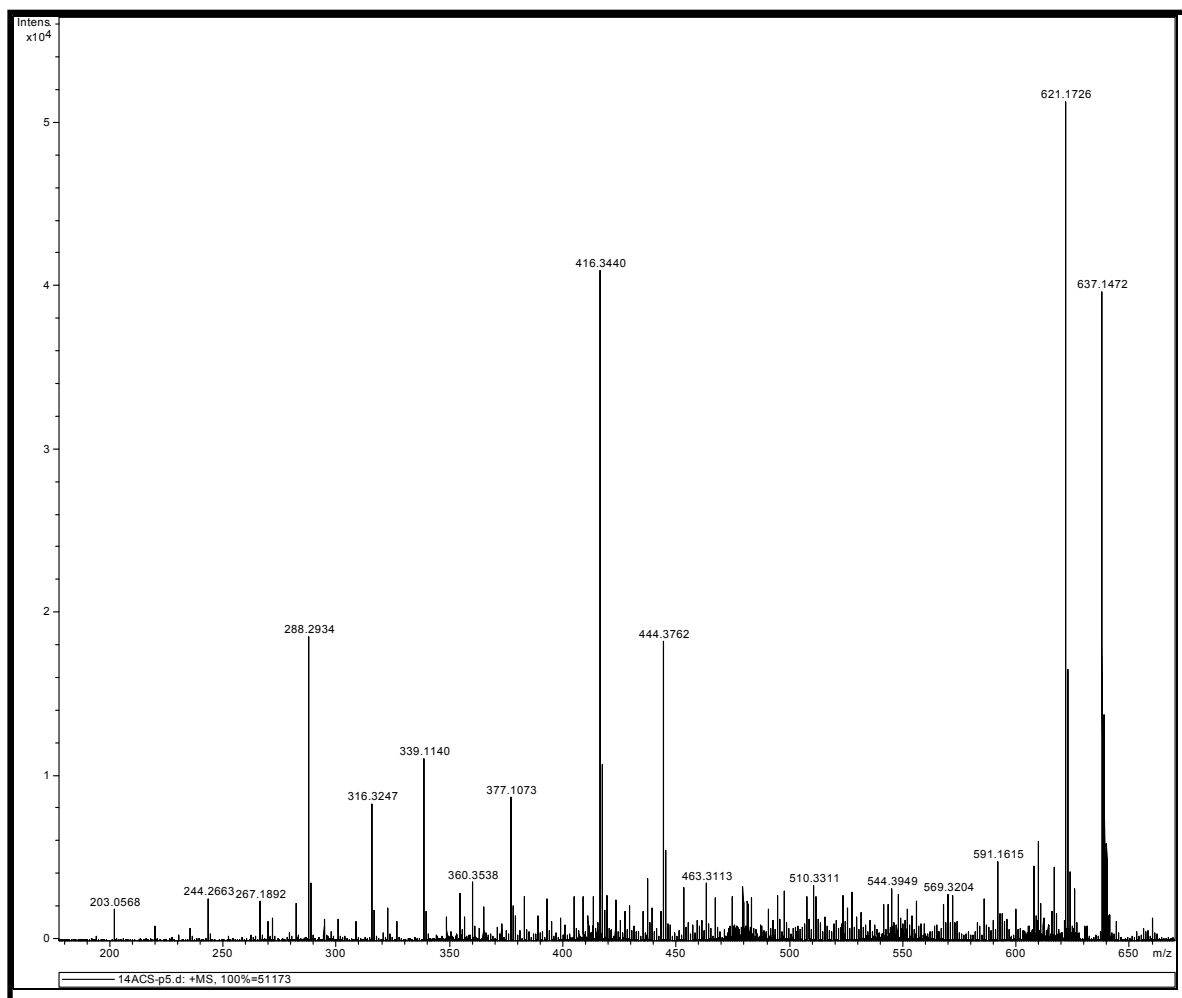


Figura 48- Espectro de massa de ACS-10 (Ionização por Electrospray)

5.7. Vanilato de 6''-amburosila (ACS-11)

A reinjeção do quarto pico ($t_R = 12,50$ min) da separação por HPLC de ACSEA(2-11)(11-18)(18-20), fração oriunda do extrato etanólico das sementes de *A. cearensis*, permitiu o isolamento do pico 4.1 ($t_R = 11,69$ min), o qual apresentou-se como um sólido marrom com pf. 102,6-106,9 °C e $[\alpha]_D^{25} = -27^\circ$, MeOH, c 0,22, sendo denominado ACS-11 (ítem 10.1.7.7, p. 286).

Os espectros de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , Fig. 49, p. 130) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , Fig. 50 e 51, p. 130 e 131) de ACS-11 mostraram-se nitidamente muito semelhantes aos espectros exibidos por ACS-9, exceto pela existência de sinais em δ_{H} 3,83 (3H, s, 3'''-OMe) e em δ_{C} 56,7 (3'''-OMe), os quais foram atribuídos a uma metoxila.

O espectro de RMN-COSY (Fig. 52, p. 131) permitiu a identificação de dois sistemas aromáticos ABX [I- δ 7,43 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,41 (dd, $J = 8,2$ Hz; $J = 2,0$ Hz, H-6') e 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5'); II-7,59 (dd, $J = 8,2$ Hz; $J = 1,8$ Hz, H-6'''), 7,54 (d, $J = 1,8$ Hz, 2'') e 6,87 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5''')] e um sistema AA'BB' (δ 7,21 e 7,05-2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2,6 e H-3,5).

Através do espectro de RMN-HSQC (Fig. 53, p. 132), foi possível correlacionar os hidrogênios pertencentes a cada anel aromático com seus respectivos carbonos (Tab. 10, p. 129), bem como confirmar a presença de glicose na estrutura, a partir dos acoplamentos entre os hidrogênios osídicos (δ_{H} 4,93-3,44) e os carbonos sp^3 oxigenados: 102,4 (C-1''); 78,1 (C-3''); 75,8 (C-5''); 75,0 (C-2''); 72,2 (C-4'') e 65,2 (C-6''). A correlação do singlete em δ_{H} 5,17 (2H, s, H-7) com o sinal de carbono em δ_{C} 67,2 (C-7) ratificou a existência de um grupo oximetilênico.

A metoxila foi posicionada no carbono C-3''', em virtude da correlação observada, no espectro HMBC (Fig. 54, p. 132), entre os hidrogênios metoxílicos (δ_{H} 3,83) e o carbono aromático C-3''' (δ_{C} 148,9).

Intitulada amburosídio G [protocatecuato de 4-*O*- β -D-(6''-*O*-vaniloilglicopiranosil)-benzila], ACS-11 representa um registro novo para a literatura científica.

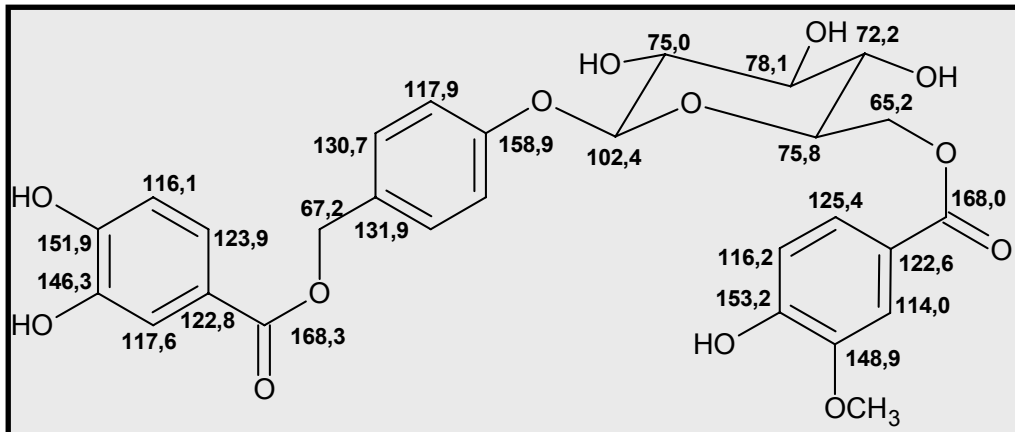
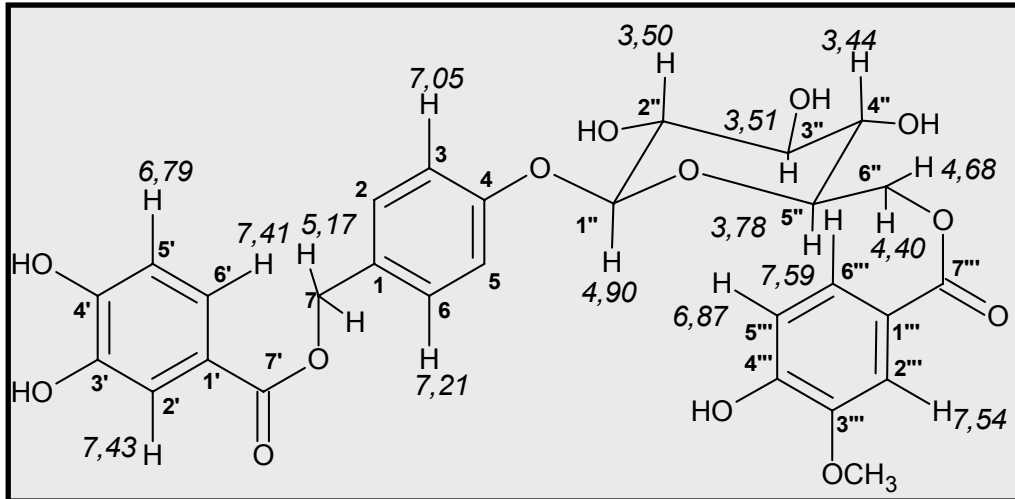


Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-11 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACS-11 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
1	131,9		5,17	
2,6	130,7	7,21 (2H, d, 8,6 Hz)	7,05	5,17
3,5	117,9	7,05 (2H, d, 8,6 Hz)		7,21
4	158,9		7,05	7,21; 4,93
7	67,2	5,17 (2H, s)		7,21
1'	122,8		7,43	6,79
2'	117,6	7,43 (1H, d, 2,0 Hz)		7,41; 6,79
3'	146,3		7,43	6,79
4'	151,9		6,79	7,43; 7,41
5'	116,1	6,79 (1H, d, 8,2 Hz)		
6'	123,9	7,41 (1H, dd, 8,2 e 2,0 Hz)		
7'	168,3		5,17	7,43; 7,41; (6,79)
1''	102,4	4,93 (1H, d, 7,4 Hz)		
2''	75,0	3,50 (1H, m)	3,49	
3''	78,1	3,51 (1H, td)	3,47; 3,45	
4''	72,2	3,44 (1H, m)		
5''	75,8	3,78 (1H, m)	4,40	
6''	65,2	4,68 (1H, m); 4,40 (1H, m)		
1'''	122,6		7,54	6,87
2'''	114,0	7,54 (1H, d, 1,8 Hz)		7,59
3'''	148,9		7,54	6,87; 3,83
4'''	153,2		6,87	7,59; 7,54
5'''	116,2	6,87 (1H, d, 8,2 Hz)		
6'''	125,4	7,59 (1H, dd, 8,2 e 1,8 Hz)		
7'''	168,0			7,59; 7,54; (6,87); 4,68
3'''-OMe	56,7	3,83 (3H, s)		

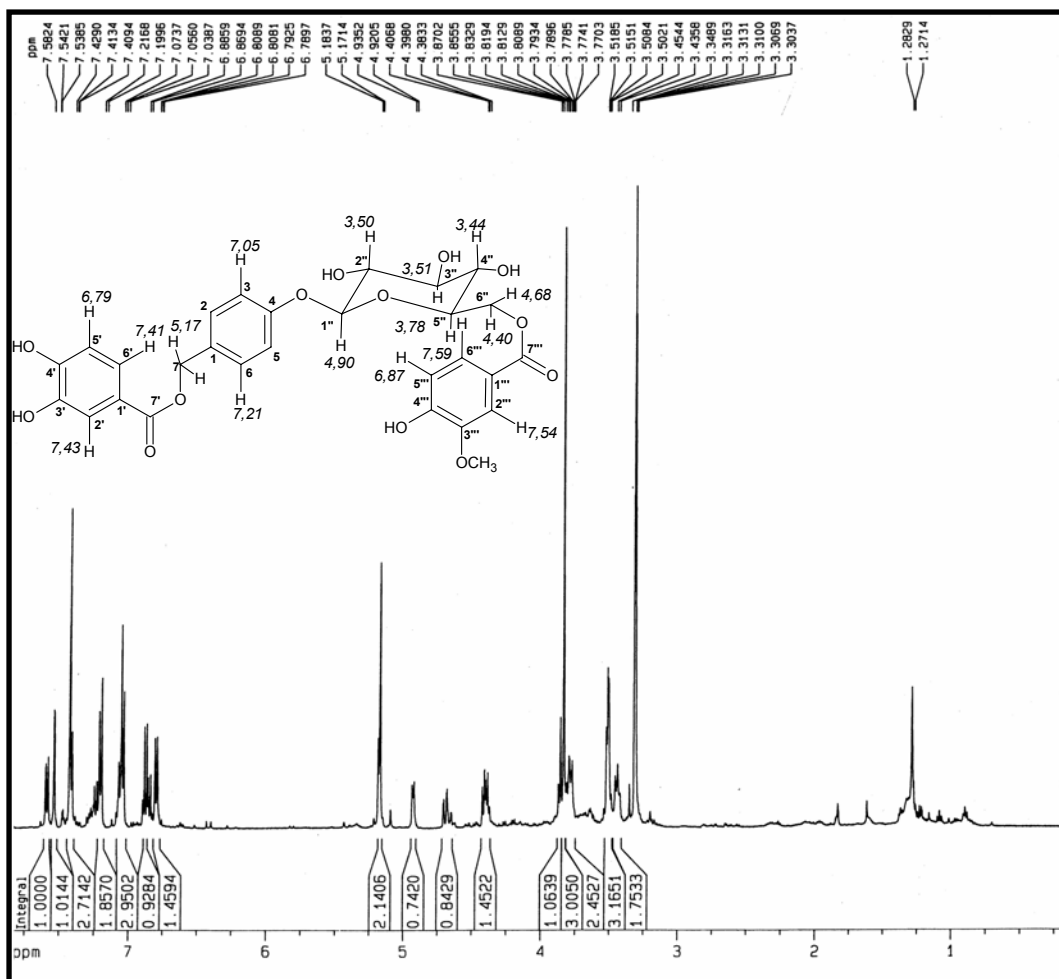


Figura 49- Espectro de RMN ^1H de ACS-11 (CD_3OD , 500 MHz)

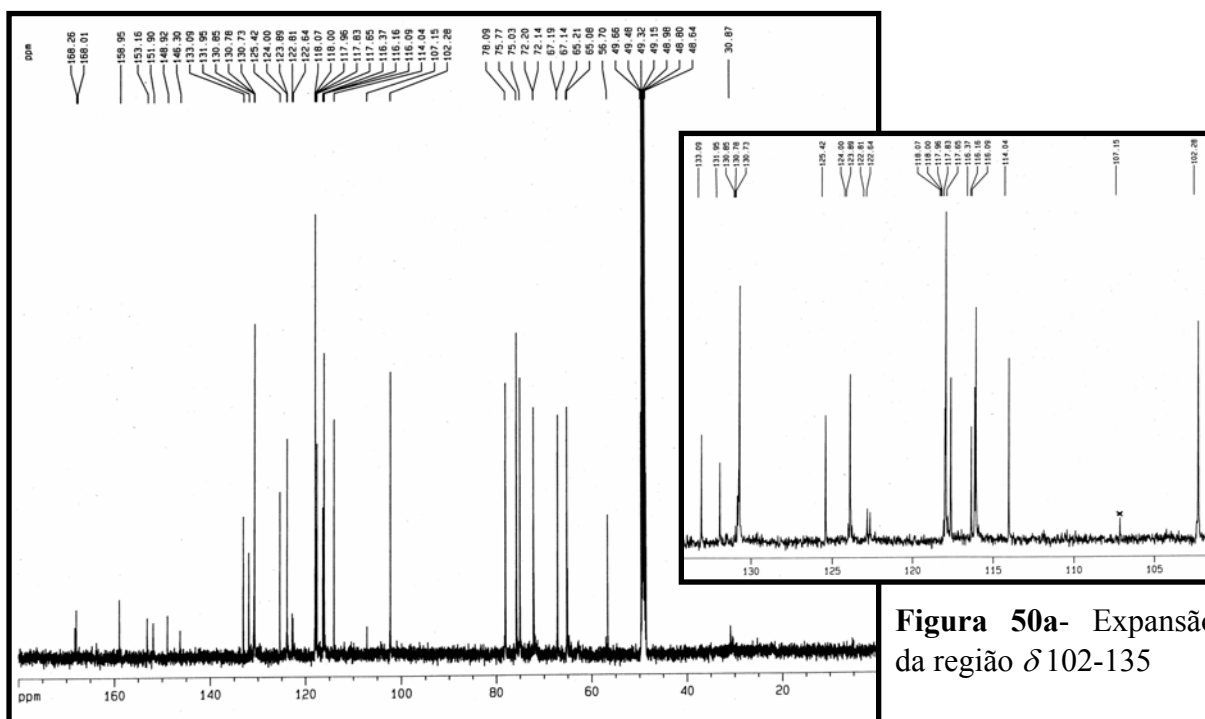


Figura 50a- Expansão da região δ 102-135

Figura 50- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-11 (CD_3OD , 125 MHz)

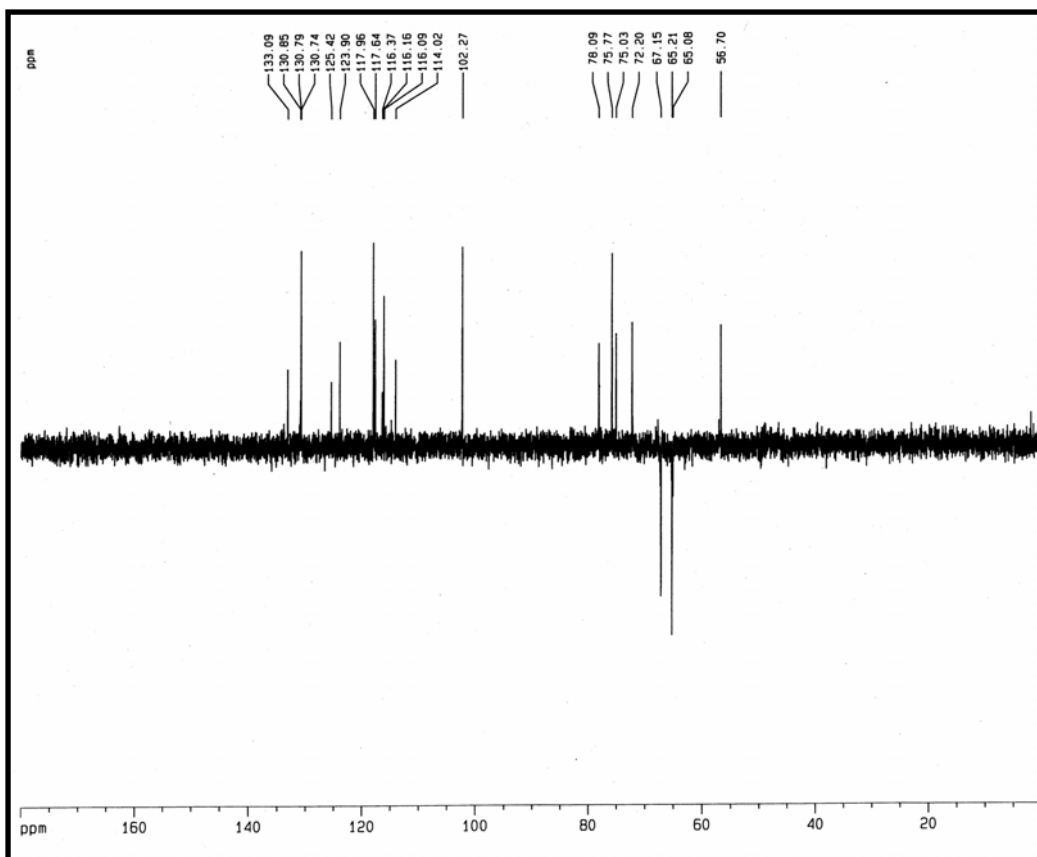


Figura 51- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-11 (CD_3OD , 125 MHz)

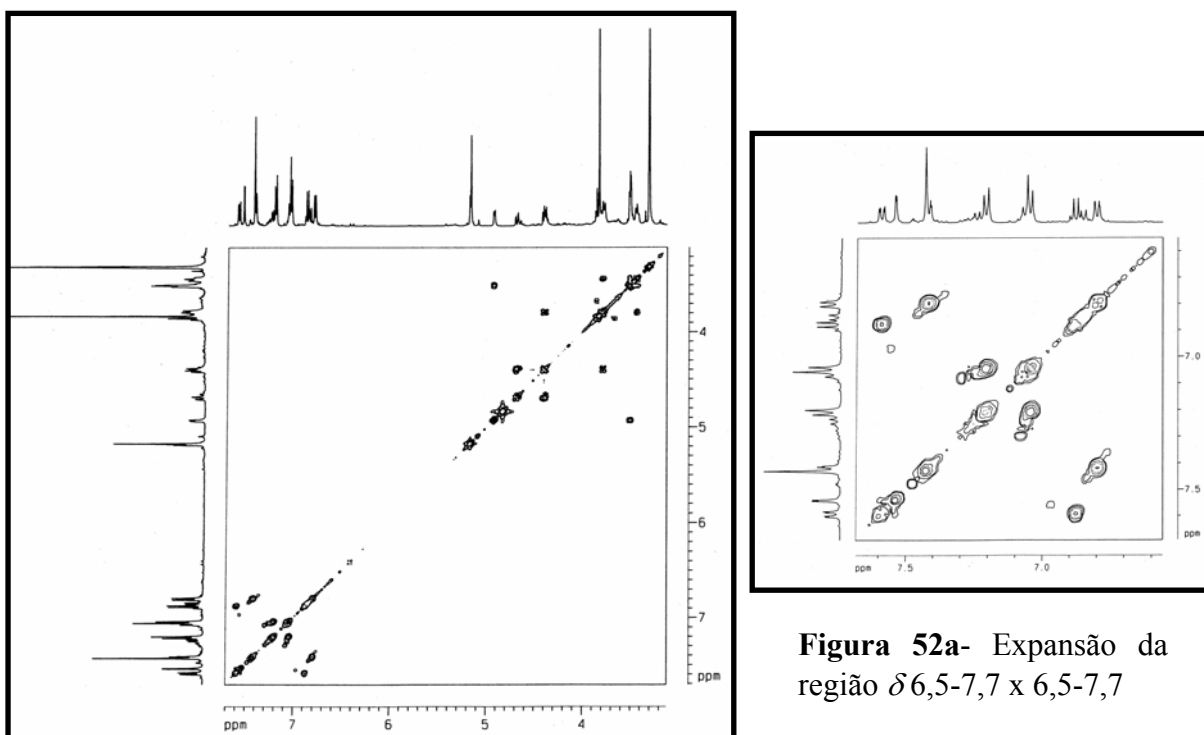


Figura 52a- Expansão da região δ 6,5-7,7 x 6,5-7,7

Figura 52- Espectro de RMN-COSY (CD_3OD , 500 x 500 MHz) de ACS-11

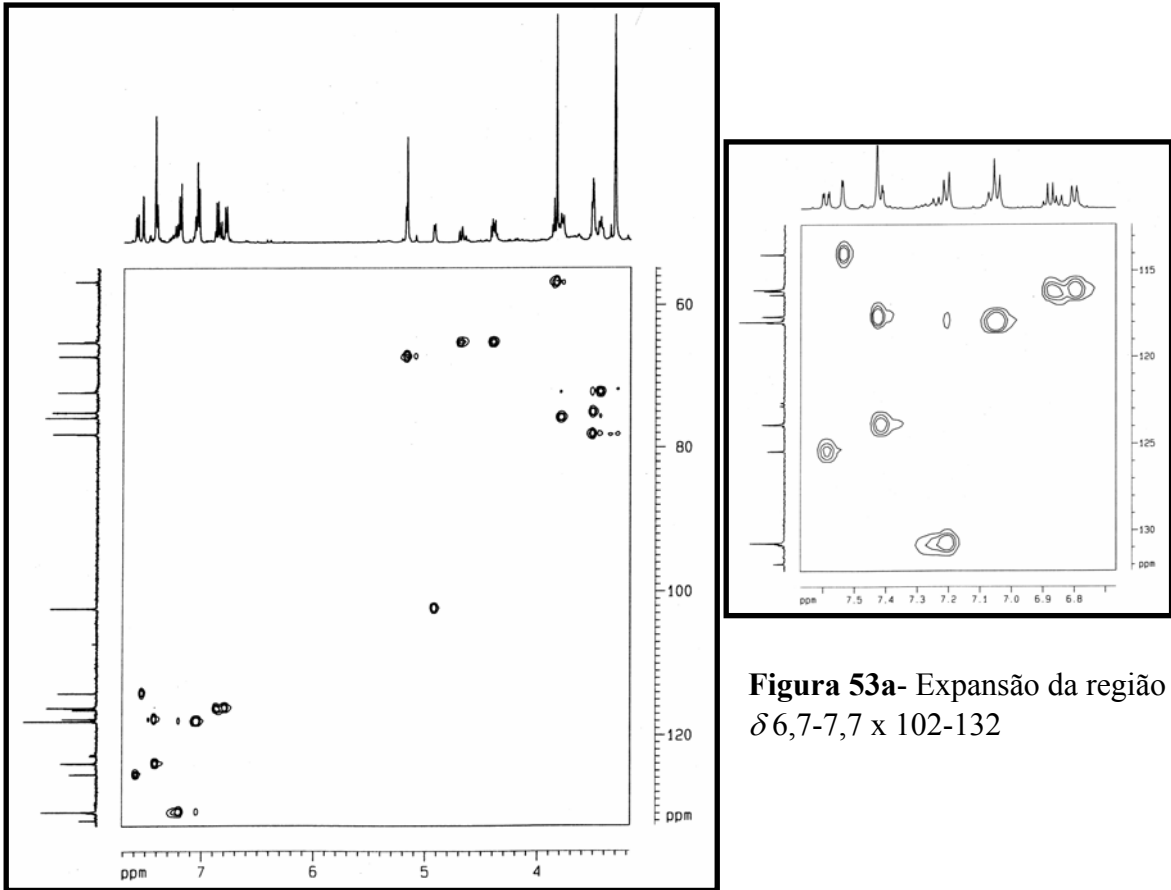


Figura 53a- Expansão da região δ 6,7-7,7 x 102-132

Figura 53- Espectro RMN-HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de ACS-11

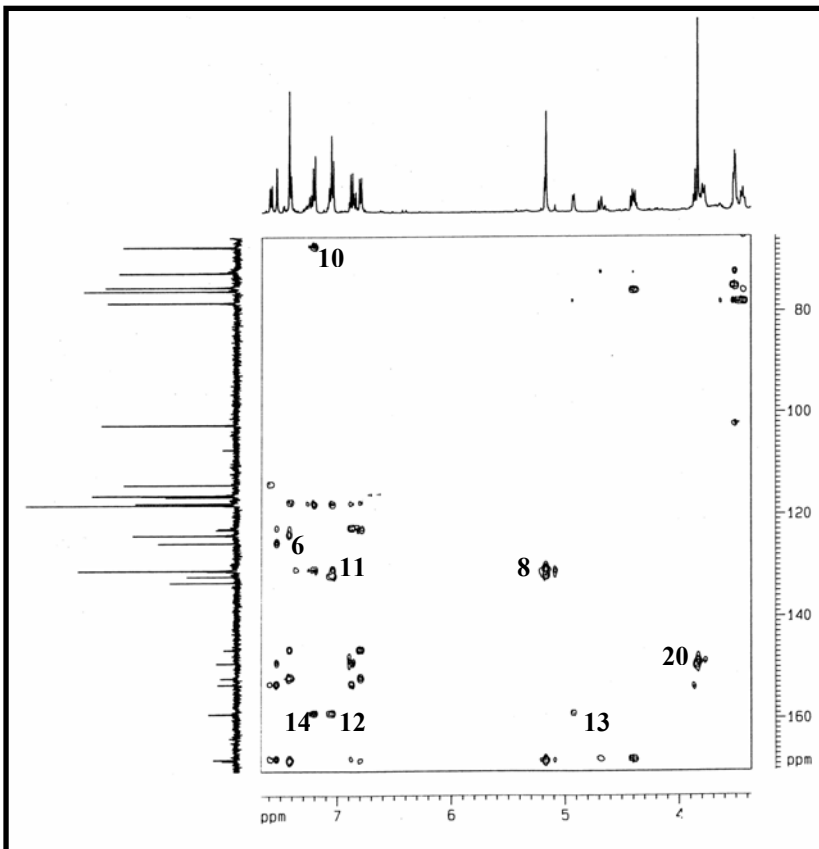


Figura 54- Espectro de RMN-HMBC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de ACS-11

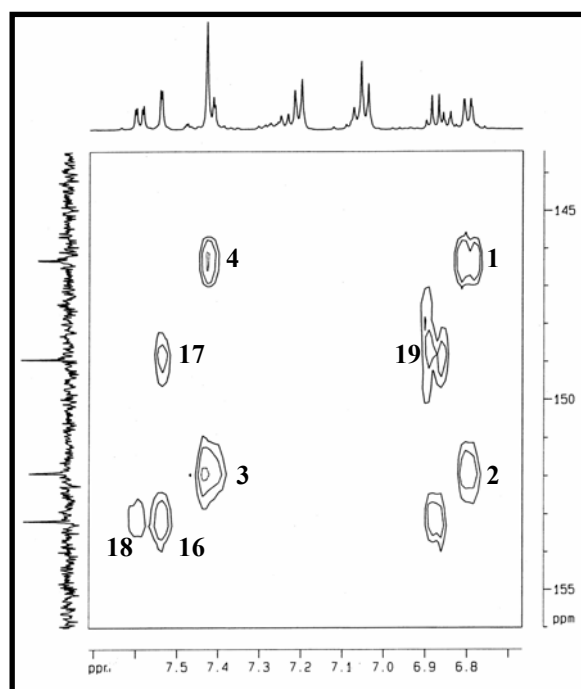
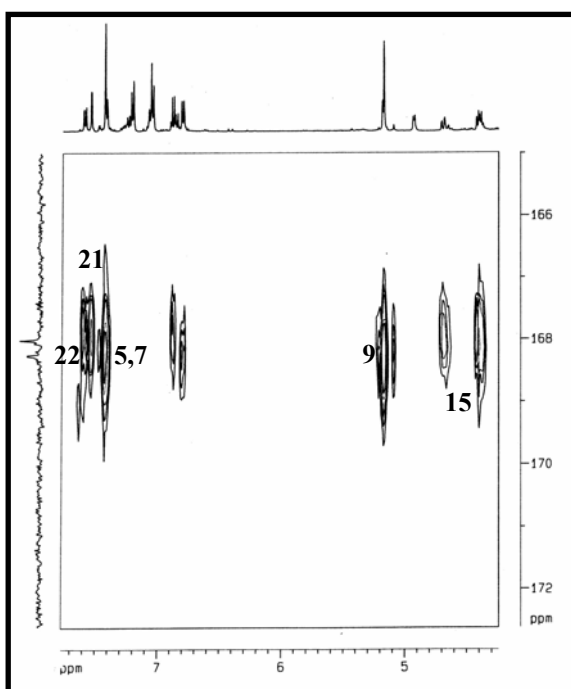
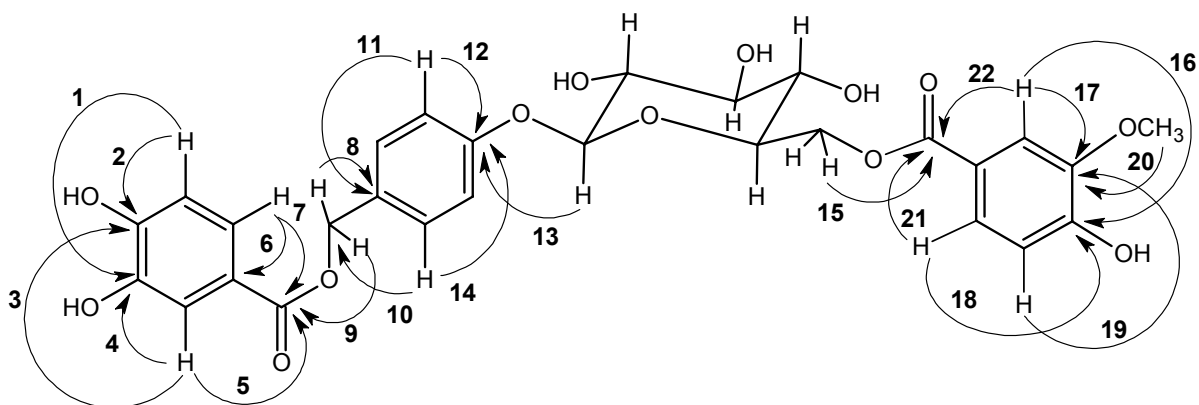


Figura 54a- Expansões do espectro HMBC de ACS-11: (I) δ 4,2-7,8 x 173-165; (II) δ 6,7-7,7 x 142-156.

5.8. Sinapato de 6''-amburosila (ACS-12)

O pico 4.2 ($t_R = 13,54$ min), obtido na segunda tentativa de isolamento dos componentes coletados no quarto pico do cromatograma de HPLC da fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20), rendeu um sólido marrom (pf. 126,9-131,4 °C; $[\alpha]_D^{25} = -27^\circ$, MeOH, c 0,20), intitulado ACS-12 (item 10.1.7.7, p. 286).

No espectro de RMN ^1H de ACS-12 (500 MHz, CD_3OD , Fig. 55, p. 138), foram observados sinais na região de hidrogênios glicosídicos (δ 4,93-3,45), um singleto em δ 5,10 (2H, s, H-7), relacionado a hidrogênio oximetilênico, um par de dupletos em δ 7,30 e 7,08 (2H, $J = 8,6$ Hz, H-2,6 e H-3,5), compatíveis com um anel benzênico *para*-dissubstituído, e uma tríade de sinais em δ 7,39 (H-2'); 7,36 (H-6') e 6,76 (H-5'), atribuídos a hidrogênios pertencentes a anel benzênico 1,2,4-trissubstituído, sendo todos os sinais característicos de um amburosídeo. O espectro COSY (Fig. 56, p. 139) ratificou o padrão de substituição. Em virtude da presença de um par de dupletos em δ 7,62 e 6,42 (1H, $J = 15,9$ Hz, H-7''' e H-8'''), referentes a hidrogênios olefínicos com estereoquímica *trans*, juntamente com o singleto em δ 6,90 (2H, s, H-2''',6'''), associado a hidrogênios de anel aromático tetrassubstituído, e δ 3,86 (6H, s, 3''',5'''-OMe), compatível com hidrogênios metoxílicos, foi sugerida uma estrutura de um derivado dimetoxi-cinâmico do amburosídeo.

Vinte seis linhas espectrais foram exibidas no espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-12 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 57, p. 139), sendo duas delas atribuídas a carbonilas de ésteres (δ 169,0, C-9''' e 168,2, C-7') e outras cinco foram associadas a carbonos sp^2 oxigenados: δ 159,0 (C-4); 151,9 (C-4'); 149,7 (C-3''',5''') 146,3 (C-3') e 140,0 (C-4'''), sendo esta última absorção característica de carbono aromático oxigenado de derivados do floroglucinol (FRIEBOLIN, 1991). O sinal em δ 57,1 (C-3''',5''') foi atribuído a metoxila. Os sinais em δ 102,4 (C-1''); 78,1 (C-3''); 75,7 (C-5''); 75,0 (C-2''); 72,0 (C-4'') e 64,7 (C-6'') foram associados ao resíduo de glicose. O espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 58, p. 140) mostrou apenas dois carbonos metilênicos (δ 67,1, C-7 e 64,7, C-6''), dos quais o mais desblindado foi relacionado ao carbono oximetilênico ligado ao anel *para*-dissubstituído (benziloxi). Subtração dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT135 revelou as linhas espectrais relativas aos carbonos aromáticos não-hidrogenados: δ 132,0 (C-1); 126,8 (C-1''') e 122,8 (C-1').

Através das correlações existentes no espectro de RMN-HSQC ($^1J_{\text{C,H}}$) (Fig. 59, p. 140), foram feitas as atribuições dos sinais de carbonos hidrogenados pertencentes a cada anel

Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith 134

aromático: anel *para*-dissubstituído (δ_C 130,7 e 117,9); anel 1,2,4-trissubstituído (δ_C 123,9; 117,6 e 116,1) e anel tetrassubstituído (δ_C 107,2). As correlações dos dupletos em δ_H 7,62 (H-7''') e 6,42 (H-8''') com os sinais de carbono em δ_C 147,5 (C-7''') e 115,9 (C-8'''), respectivamente, corroboraram a presença de uma olefina.

O espectro de RMN-HMBC (**Fig. 60, p. 141**) corroborou a existência de um fragmento cinâmico, ao revelar os acoplamentos dos hidrogênios olefínicos H-7''' e H-8''' com a carbonila C-9''' (δ_C 169,0) e com os carbonos aromáticos C-1''' (δ_C 126,8) e C-2''',6''' (δ_C 107,2).

As substituições do fragmento cinâmico nas posições 1''', 3''', 4''' e 5''' foram justificadas pelas correlações entre os hidrogênios aromáticos H-2''',6''' (δ_H 6,90) com o carbono olefínico C-7''' (δ_C 147,5) e com os carbonos aromáticos C-1''' (δ_C 126,8), C-3''',5''' (δ_C 149,7) e 4''' (δ_C 140,0), sendo este padrão de substituição reforçado pela presença de um singlete no espectro de RMN 1H , com integração para dois hidrogênios (**Tab. 11, p. 137**).

As metoxilas foram posicionadas nos carbonos C-3''',5''' devido à correlação do singlete agudo em δ_H 3,86 com o sinal de carbono em δ_C 149,7, resultando na caracterização estrutural do fragmento cinâmico sinapoíla.

A evidência do fragmento sinapoíla ligado ao resíduo de glicose, na posição 6'', foi fornecida pelas correlações entre os hidrogênios glicosídicos H-6'' (δ_H 4,51 e 4,40) e a carbonila C-9''' (δ_C 169,0).

ACS-12, denominada amburosídio H [protocatecuato de 4-*O*- β -D-(6''-*O*-sinapoilglicopiranosil)-benzila] é uma substância química original, pela primeira vez relatada na literatura.

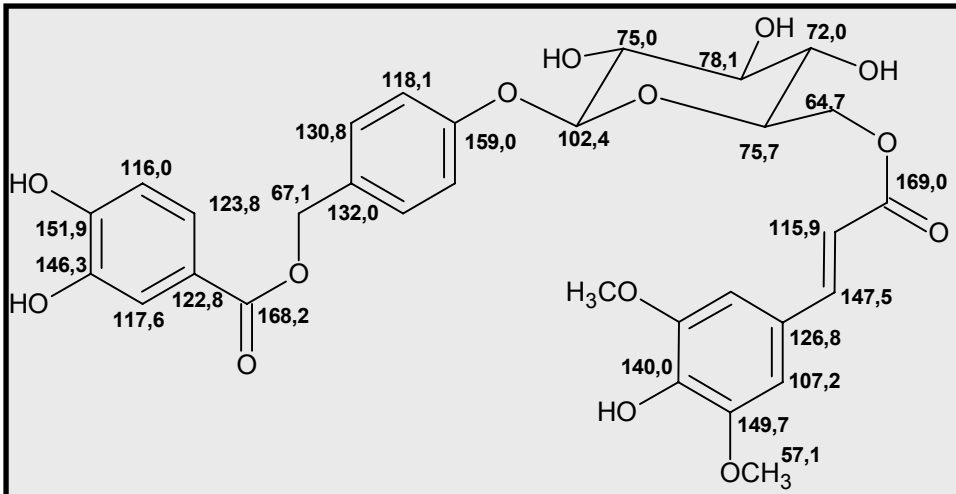
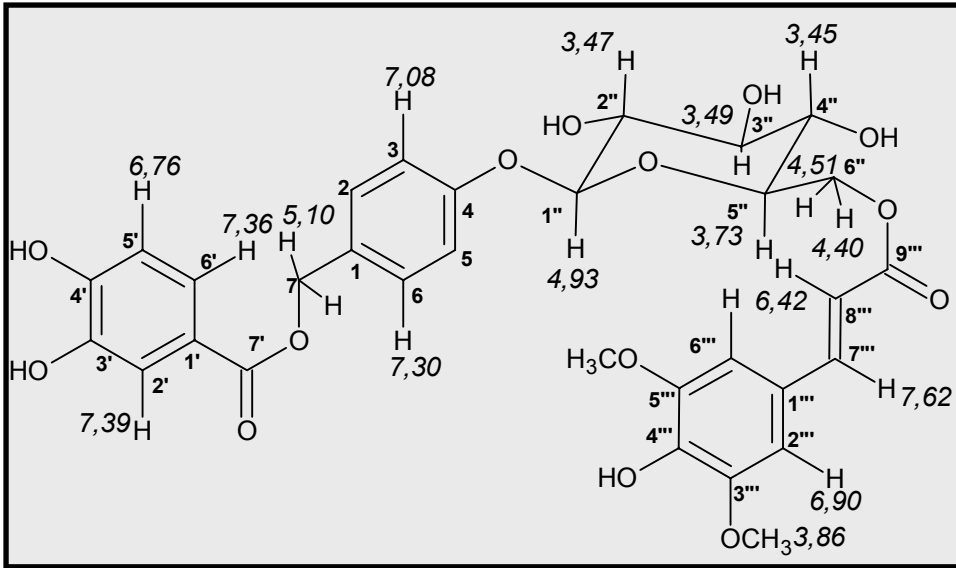


Tabela 11- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-12 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACS-12 δ_{C} (ppm) CD_3OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
1	132,0		5,10	7,30
2,6	130,8	7,30 (2H, d, 8,6 Hz)	7,08	5,10
3,5	118,1	7,08 (2H, d, 8,6 Hz)	7,30	
4	159,0		7,08	7,30; 4,93
7	67,1	5,10 (2H, s)		6,76
1'	122,8			7,36
2'	117,6	7,39 (1H, d, 1,9 Hz)	7,39	
3'	146,3		6,76	7,39; 7,36
4'	151,9		7,36	
5'	116,1	6,76 (1H, d, 8,2 Hz)		7,39
6'	123,8	7,36 (1H, dd, 8,2 e 1,9 Hz)		7,39; 7,36; 5,10; 4,51
7'	168,2			
1''	102,4	4,93 (1H, d, 7,4)		
2''	75,0	3,47 (1H, m)	3,49	
3''	78,1	3,49 (1H, td)	3,47; 3,45	
4''	72,0	3,45 (1H, m)		
5''	75,7	3,73 (1H, m)	4,40	
6''	64,7	4,51 (1H, m); 4,40 (1H, m)		
1'''	126,8		7,62	6,90; 6,42
2''' ,6'''	107,2	6,90 (2H, s)		(7,62)
3''' ,5'''	149,7		6,90	3,86
4'''	140,0			6,90
7'''	147,5	7,62 (1H, d, 15,9 Hz)		6,90
8'''	115,9	6,42 (1H, d, 15,9 Hz)	7,62	
9'''	169,0		6,42	7,62; 4,51; 4,40
3''' ,5'''-OMe	57,1	3,86 (6H, s)		

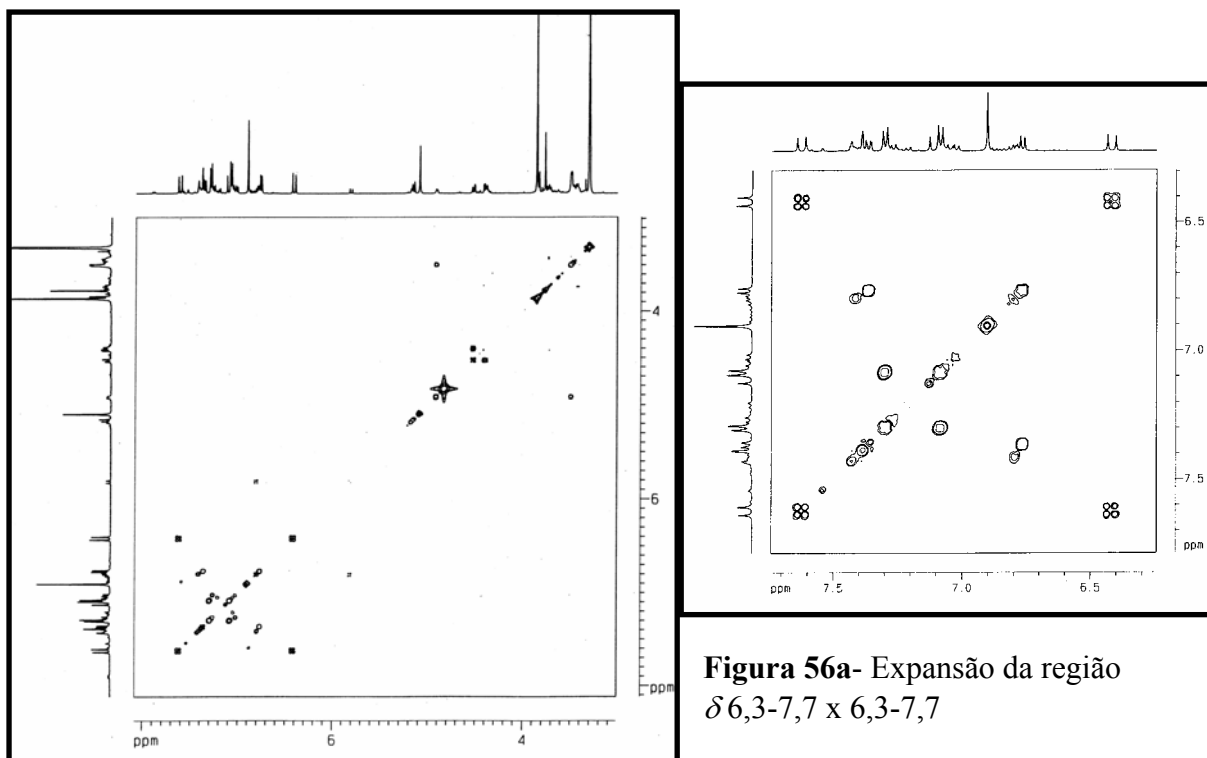
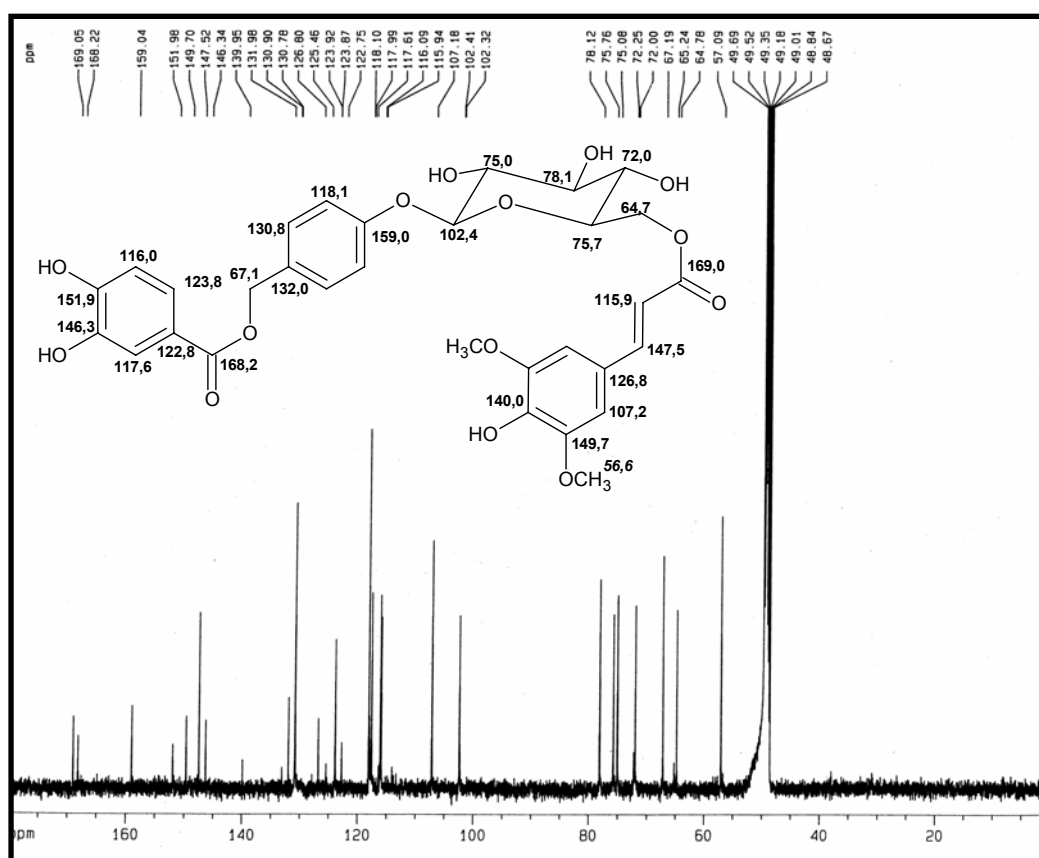


Figura 56- Espectro de RMN-COSY (CD_3OD , 500 x 500 MHz) de ACS-12



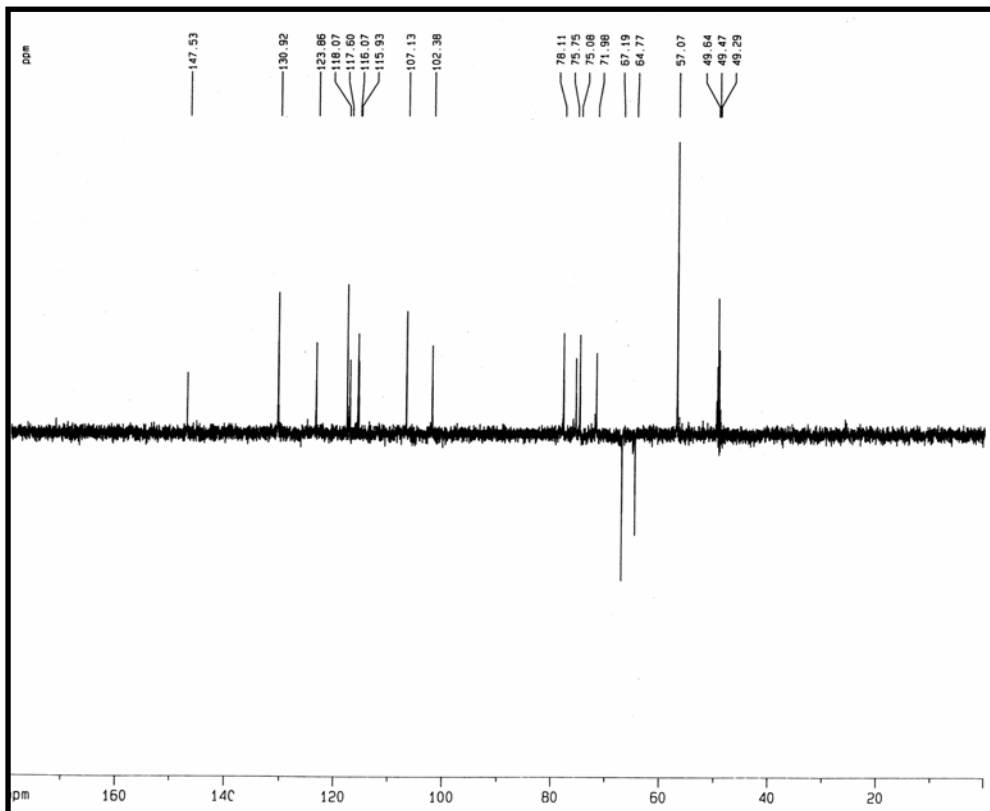


Figura 58- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-12 (CD_3OD , 125 MHz)

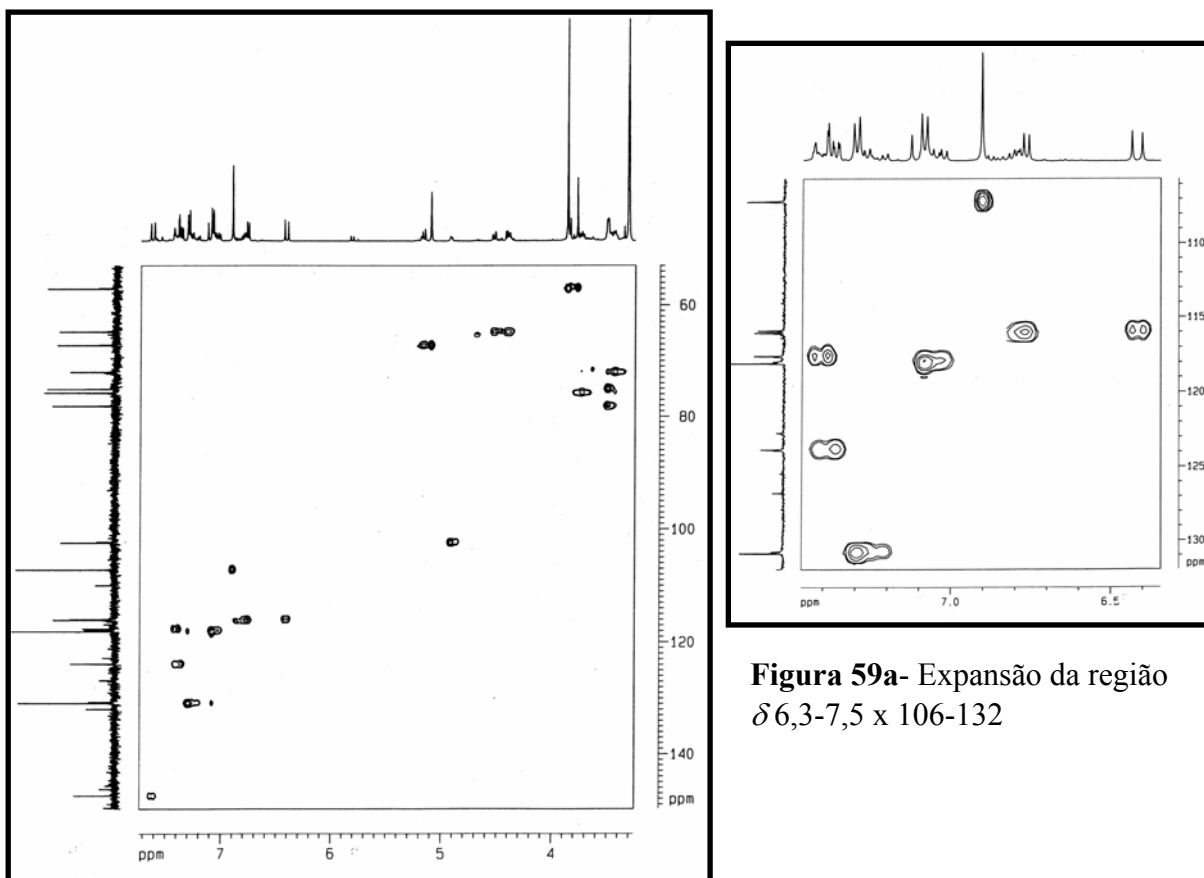


Figura 59a- Expansão da região $\delta 6,3-7,5 \times 106-132$

Figura 59- Espectro de RMN-HSQC (CD_3OD , 500 x 500 MHz) de ACS-12

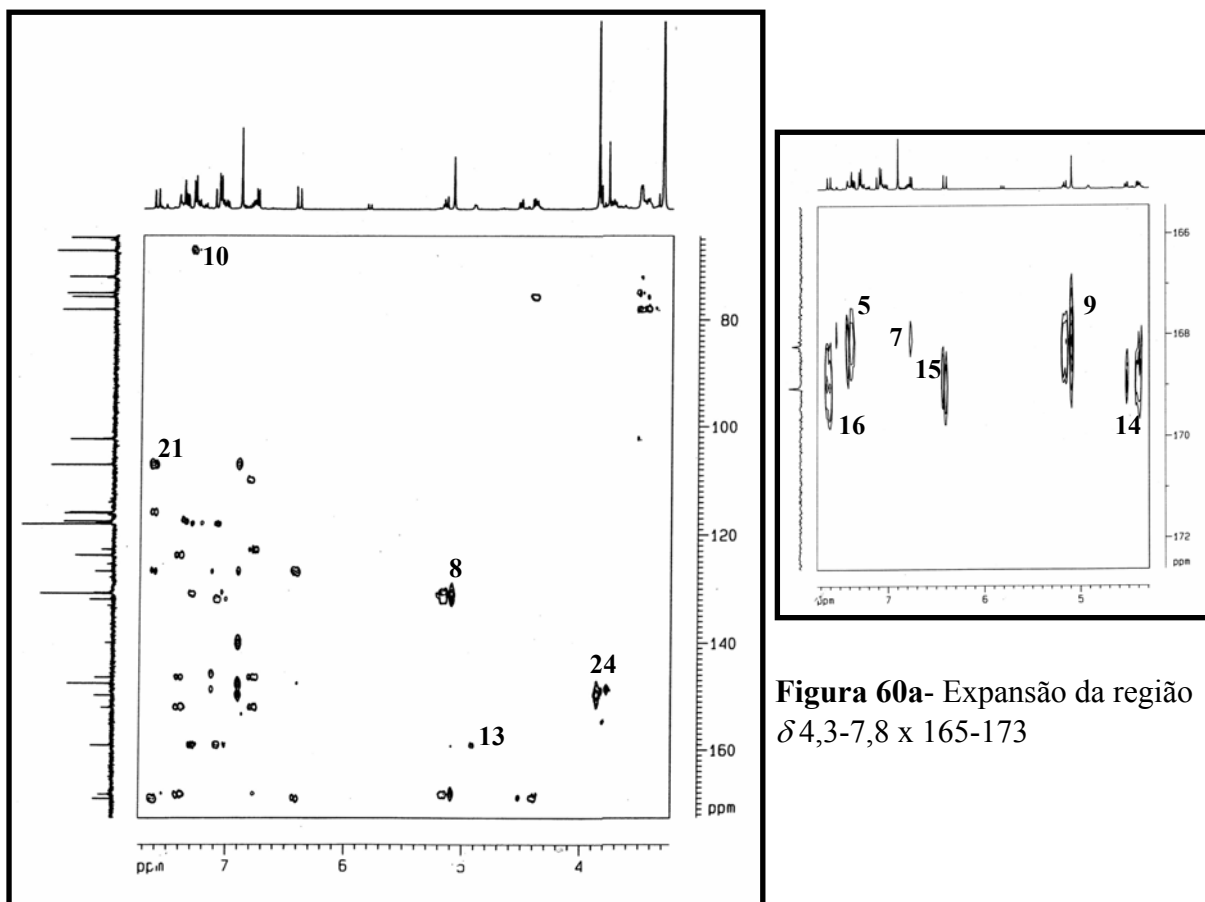
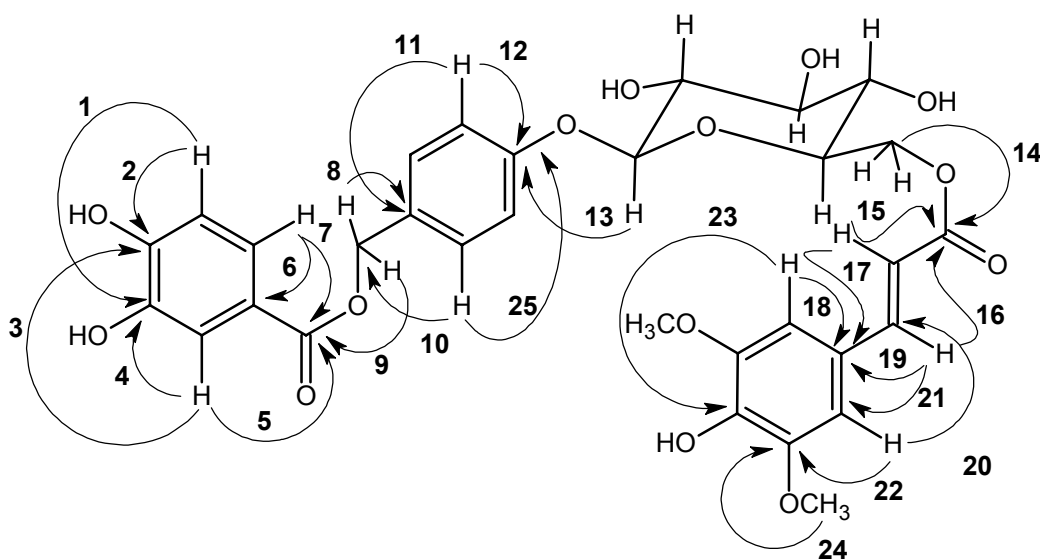


Figura 60a- Expansão da região δ 4,3-7,8 x 165-173

Figura 60- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-12



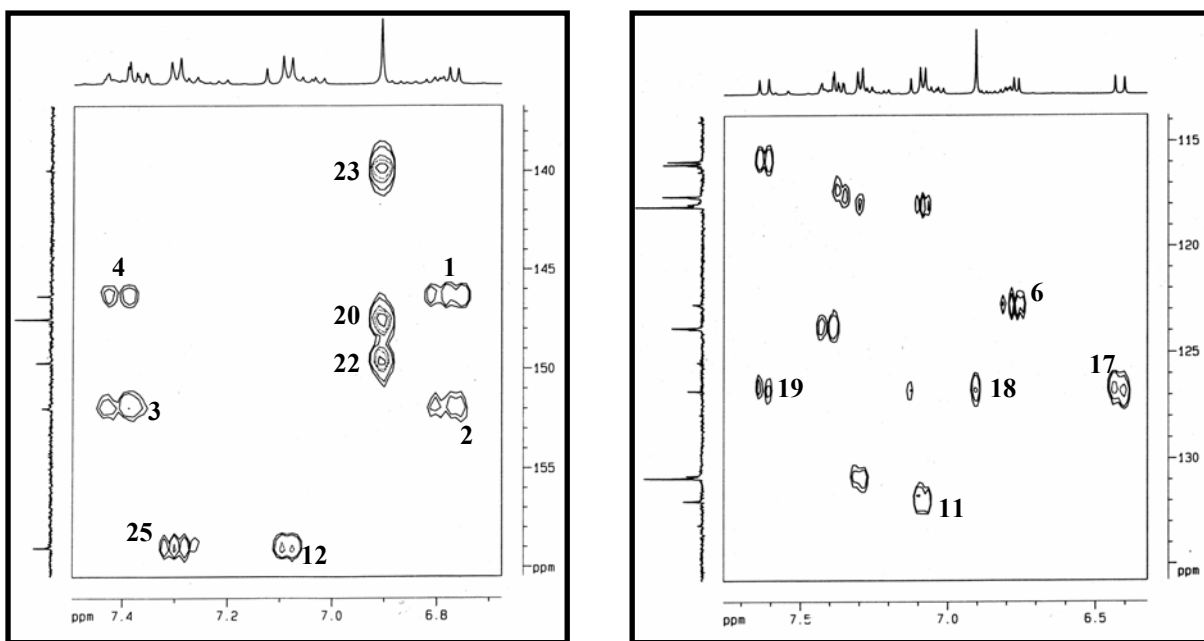
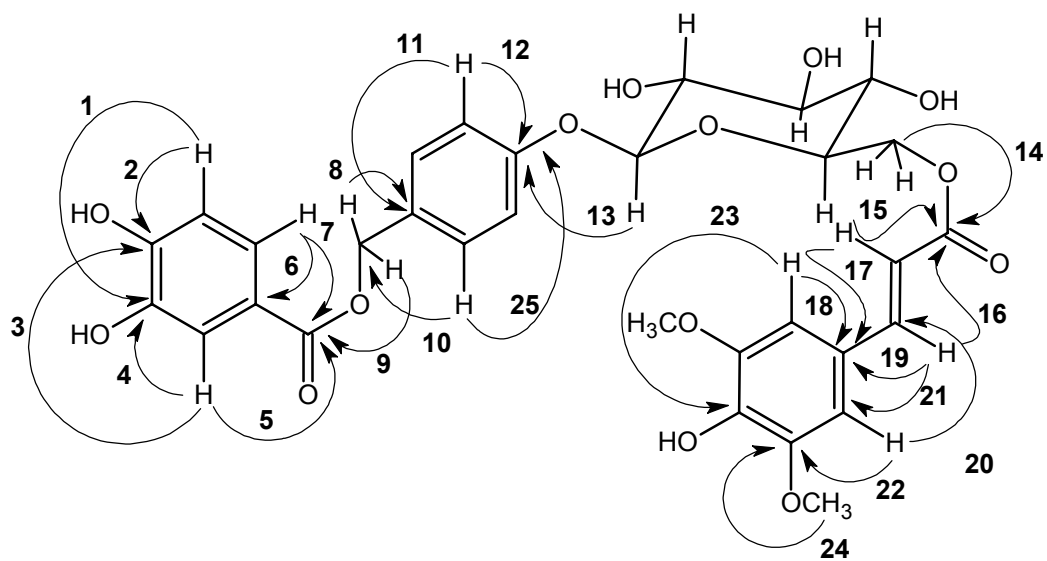


Figura 60b- Expansões do espectro HMBC de ACS-11: (I) δ 6,7-7,5 x 137-160; (II) δ 6,4-7,7 x 114-135.



5.9. Galato de 6''-amburosila (ACS-2)

Separações cromatográficas em Sephadex LH-20 e cartucho de SPE da fração acetato de etila do extrato etanólico das sementes (ACSEA) forneceram um sólido marrom viscoso (pf. 193,2-197,8 °C; $[\alpha]^{25}_D = -44^\circ$, MeOH, *c* 0,19), designado ACS-2 (ítem 10.1.7.4, p. 284).

No espectro de RMN ^1H de ACS-2 (500 MHz, CD_3OD , Fig. 61, p. 149), foram observados dupletos em δ 7,29 e 7,06 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2,6 e H-3,5), correspondentes a um sistema de spin AA'BB', e um conjunto de sinais em δ 7,43 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-2'); 7,41 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,7$ Hz, H-6') e 6,79 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), referentes a um sistema de spin ABX, cujas correlações homonucleares foram devidamente ratificadas pelo espectro COSY (Fig. 62, p. 150). Sinais na faixa de δ 4,90-3,45 foram atribuídos a hidrogênios osídicos, todavia a presença de duplos dupletos em δ 4,60 (1H, H-6'') e 4,40 (1H, H-6'') sugeriram um açúcar esterificado através da hidroxila metilênica. Foram encontrados singletos correspondentes a dois hidrogênios em δ 7,10 (2H, H-2''',6'''), sugerindo a presença de um anel aromático tetrassubstituído e simétrico, e em δ 5,19 (2H, H-7), referente a hidrogênios ligados a carbono oxigenado.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-2 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 63, p. 150) mostrou 23 linhas espectrais, sendo duas delas coincidentemente com os mesmos deslocamentos químicos (δ 168,3, C-7' e C-7'''), atribuídas supostamente a carbonilas de ésteres. Quatro linhas espectrais foram inicialmente associadas a carbonos aromáticos oxigenados, δ 159,0 (C-4); 151,9 (C-4'); 146,7 (C-3''',5''') e 146,3 (C-3'), das quais as duas últimas foram características de carbonos pertencentes a anéis *orto*-oxigenados.

O espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-2 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 64, p. 151) apresentou onze absorções atribuídas a carbonos monohidrogenados, sendo seis relacionadas a carbonos sp^2 (δ 130,9; 123,9; 117,9; 117,6; 116,1 e 110,4). As outras cinco absorções, atribuídas a carbonos sp^3 oxigenados δ 102,4 (C-1''); 78,1 (C-3''); 75,8 (C-5''); 75,1 (C-2'') e 72,0 (C-4''), juntamente com uma das duas absorções atribuídas a carbonos metilênicos oxigenados, δ 67,3 (C-7) e 65,0 (C-6''), foram compatíveis com um fragmento de açúcar. As absorções em δ 140,1 (C-4'''); 131,9 (C-1); 122,8 (C-1') e 121,6 (C-1'''), inexistentes no espectro DEPT135, foram relacionadas a carbonos aromáticos não-hidrogenados. Além disso,

a atribuição da absorção em δ 140,1 foi retificada, passando a ser associada a um carbono oxigenado, a fim de atender à evidência de existência de um anel aromático tetrassubstituído.

O pico do íon molecular cationizado $[M+Na]^+$ m/z 597,1356, observado no espectro de massa de ACS-2 (EM-IES, **Fig. 65, p. 151**), permitiu a dedução da fórmula molecular $C_{27}H_{26}O_{14}$, cuja diferença em relação à fórmula apresentada por ACS-9 foi de apenas um oxigênio, sugerindo um análogo estrutural com um dos fragmentos protocatecoíla convertido em galoíla.

A análise do espectro de RMN-HMBC (**Fig. 67, p. 152**) permitiu a caracterização do fragmento galoíla através das correlações entre o singlete em δ 7,10 (H-2''',6''') e os sinais dos carbonos aromáticos em δ_C 121,6 (C-1'''); 146,7 (C-3''',5'''), 140,1 (C-4''') e a carbonila em δ_C 168,3 (C-7'''). Os acoplamentos entre os hidrogênios glicosídicos H-6'' (4,60 e 4,40) e a carbonila C-7'' (δ_C 168,3) corroboraram a hipótese da glicose se encontrar esterificada com o fragmento galoíla. A presença de outro éster na estrutura foi justificada pelas correlações verificadas entre os hidrogênios oximetilênicos H-7 (δ_H 5,19) e os hidrogênios aromáticos H-2' (δ_H 7,43) e H-6' (δ_H 7,41) com a carbonila C-7' (δ_C 168,3), pertencente ao fragmento protocatecoíla (**Tab. 12, p. 146**).

As correlações entre o duplete em δ_H 7,29 (H-2,6) com o sinal de carbono oximetilênico em δ_C 67,3 (C-7), e o singlete em δ_H 5,19 (H-7) com o sinal de carbono aromático em δ_C 130,9 (C-2,6) definiram a ligação do anel benziloxi com o fragmento protocatecoíla.

A ligação heterosídica entre o anel benzênico *para*-dissubstituído e a glicose foi demonstrada através do acoplamento do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 4,90) com o carbono aromático oxigenado C-4 (δ_C 159,0).

O ineditismo de ACS-2 garantiu-lhe a denominação trivial amburosídeo C [protocatecuato de 4-*O*- β -D-(6''-*O*-galoilglicopiranosil)-benzila].

Os amburosídeos são quimicamente muito semelhantes aos litseaefolosídeos (**192-194**), glicosídeos fenólicos isolados de *Ilex litseaefolia* (Aquifoliaceae), diferindo apenas pela existência de uma hidroxila no fragmento benziloxi (C-3), implicando em diferenças significativas de deslocamento químico nos carbonos deste anel aromático, em razão dos efeitos eletrônicos exercidos pelo oxigênio adicional (efeito mesomérico doador- C-2, C-4 e C-6 e indutivo retirador- C-3), além de afetar a absorção do carbono glicosídico C-2'',

possivelmente devido à formação de ponte de H intramolecular (ZHANG et al., 2005) (Tab. 13, p. 147).

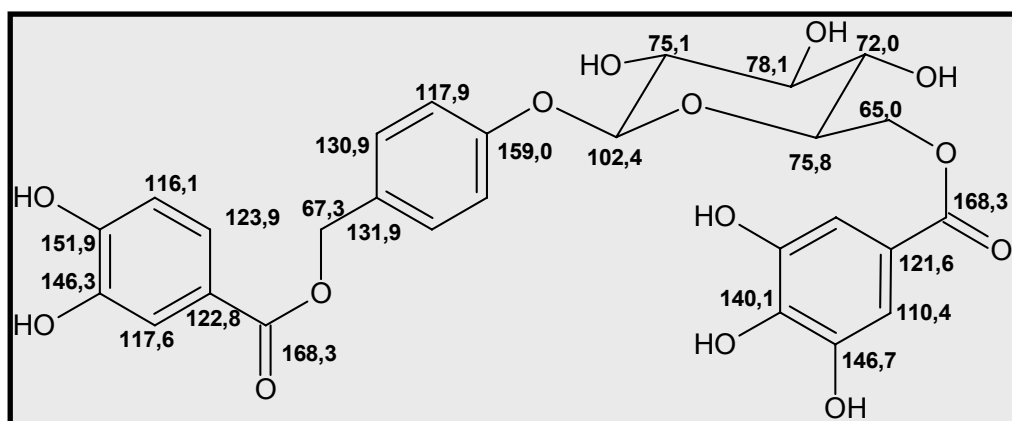
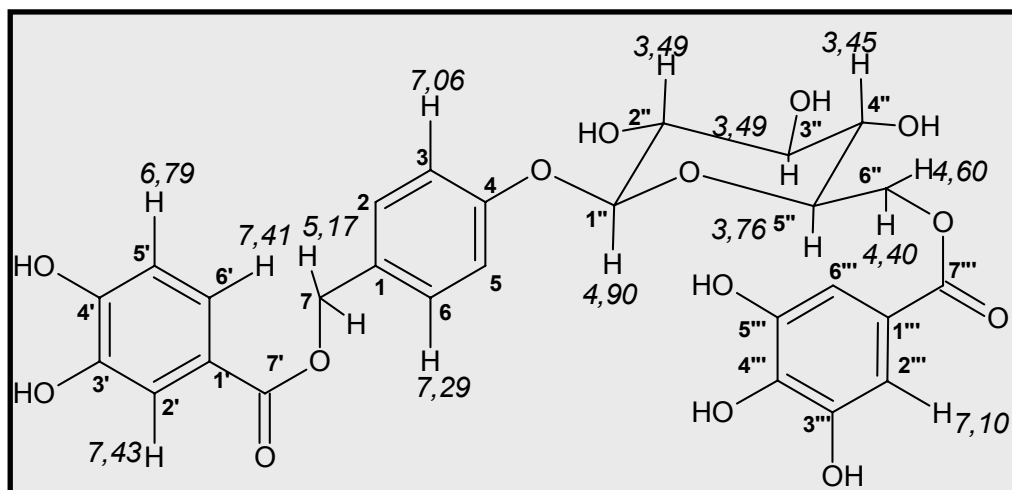


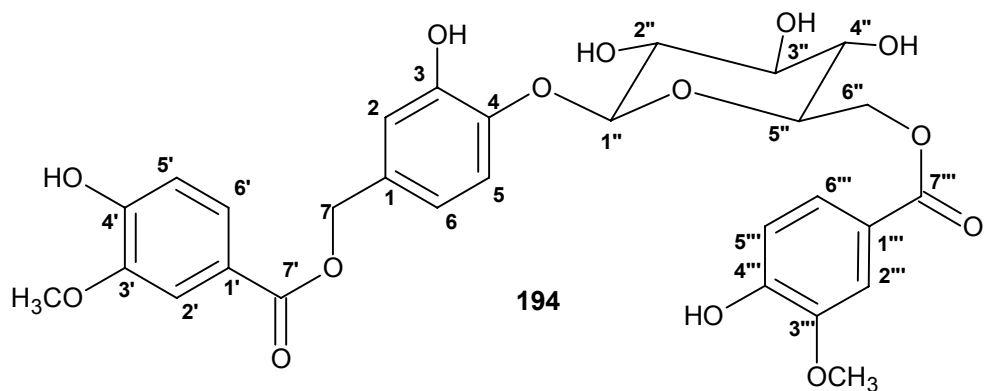
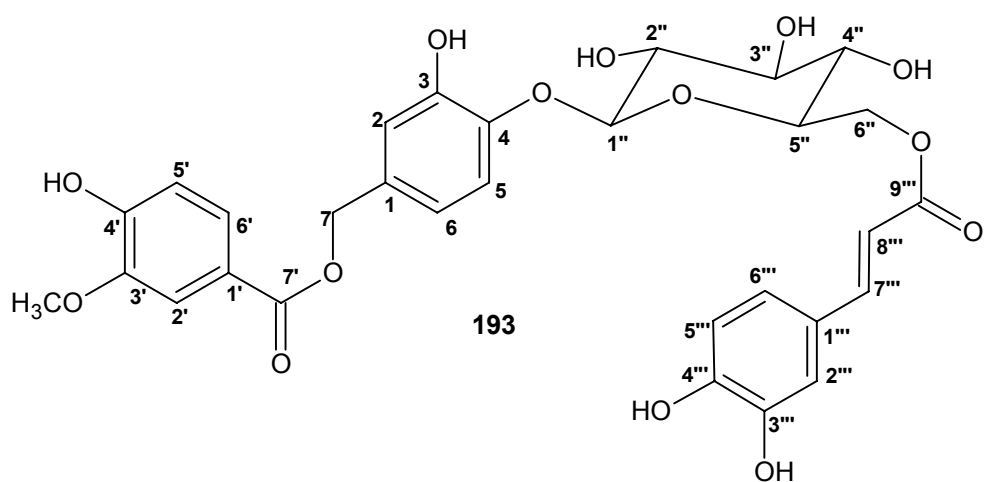
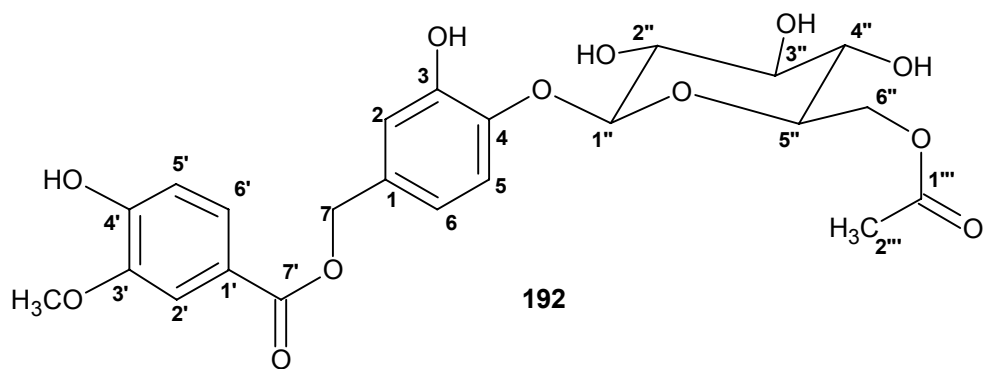
Tabela 12- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-2 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACS-2 δ_{C} (ppm) CD_3OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
1	131,9		7,29	
2,6	130,9	7,29 (2H, d, 8,6 Hz)	7,06	5,19
3,5	117,9	7,06 (2H, d, 8,6 Hz)	7,29	
4	159,0		7,06	7,29; 4,90
7	67,3	5,19 (2H, s)		7,29
1'	122,8			6,79
2'	117,6	7,43 (1H, d, 1,7 Hz)		7,41
3'	146,3		7,43	6,79
4'	151,9		6,79	7,41
5'	116,1	6,79 (1H, d, 8,0 Hz)		
6'	123,9	7,41 (1H, dd, 8,0; 1,7 Hz)		7,43
7'	168,3			7,43; 7,41; 5,19
1''	102,4	4,90 (1H, s, 7,4 Hz)		
2''	75,1	3,49 (1H, m)		
3''	78,1	3,49 (1H, m)	4,40	3,49
4''	72,0	3,45 (1H, m)	3,76	
5''	75,8	3,76 (1H, td)	3,45	
6''	65,0	4,60 (1H, m); 4,40 (1H, m)	3,76	
1'''	121,6		7,10	
2''', 6'''	110,4	7,10 (2H, s)		
3''', 5'''	146,7		7,10	
4'''	140,1			7,10
7'''	168,3			7,10; 4,60; 4,40

Tabela 13- Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ACS-8, 10 e 11 e substâncias análogas (192-194) isoladas de *Ilex litsaefolia* (ZHANG et al., 2005).

# C	192 δ_{C} (ppm)	ACS-8 δ_{C} (ppm)	193 δ_{C} (ppm)	ACS-10 δ_{C} (ppm)	194 δ_{C} (ppm)	ACS-11 δ_{C} (ppm)
1	132,2	132,1	132,0	131,9	131,9	131,9
2	115,8	130,8	115,7	130,9	115,7	130,7
3	147,1	118,0	147,0	118,0	146,9	117,9
4	145,1	159,0	145,1	158,9	145,1	158,9
5	117,3	118,0	117,2	118,0	117,1	117,9
6	119,4	130,8	119,6	130,9	119,3	130,7
7	65,7	67,2	65,7	67,2	65,7	67,2
1'	121,2	122,9	121,1	122,8	121,1	122,8
2'	112,2	117,6	112,1	117,6	112,1	117,6
3'	147,4	146,3	147,3	146,3	147,4	146,3
4'	151,6	151,9	151,5	151,9	151,7	151,9
5'	114,6	116,1	114,5	116,0	114,6	116,1
6'	123,7	123,9	123,7	123,9	123,7	123,9
7'	166,5	168,3	166,5	168,2	166,5	168,3
1''	102,6	102,3	102,5	102,3	102,5	102,4
2''	73,4	75,0	73,4	75,0	73,4	75,0
3''	76,0	78,0	76,1	78,1	76,1	78,1
4''	70,2	72,0	70,4	72,0	70,6	72,2
5''	74,1	75,6	74,4	75,7	74,4	75,8
6''	63,3	64,8	63,2	64,7	63,6	65,2
1'''	171,3	172,9	126,3	127,8	121,0	122,6
2'''	19,3	20,9	113,7	111,8	112,4	114,0
3'''	-	-	148,3	149,5	147,4	148,9
4'''	-	-	145,5	150,8	151,5	153,2
5'''	-	-	115,1	116,6	114,6	116,2
6'''	-	-	121,7	124,4	123,9	125,4
7'''	-	-	145,9	147,2	166,4	168,0
8'''	-	-	113,5	115,4	-	-
9'''	-	-	167,5	169,1	-	-
3'-OMe	55,0	-	55,0	-	55,0	-
3'''-OMe	-	-	-	56,6	55,1	56,7

Todas as substâncias foram solubilizadas em CD_3OD



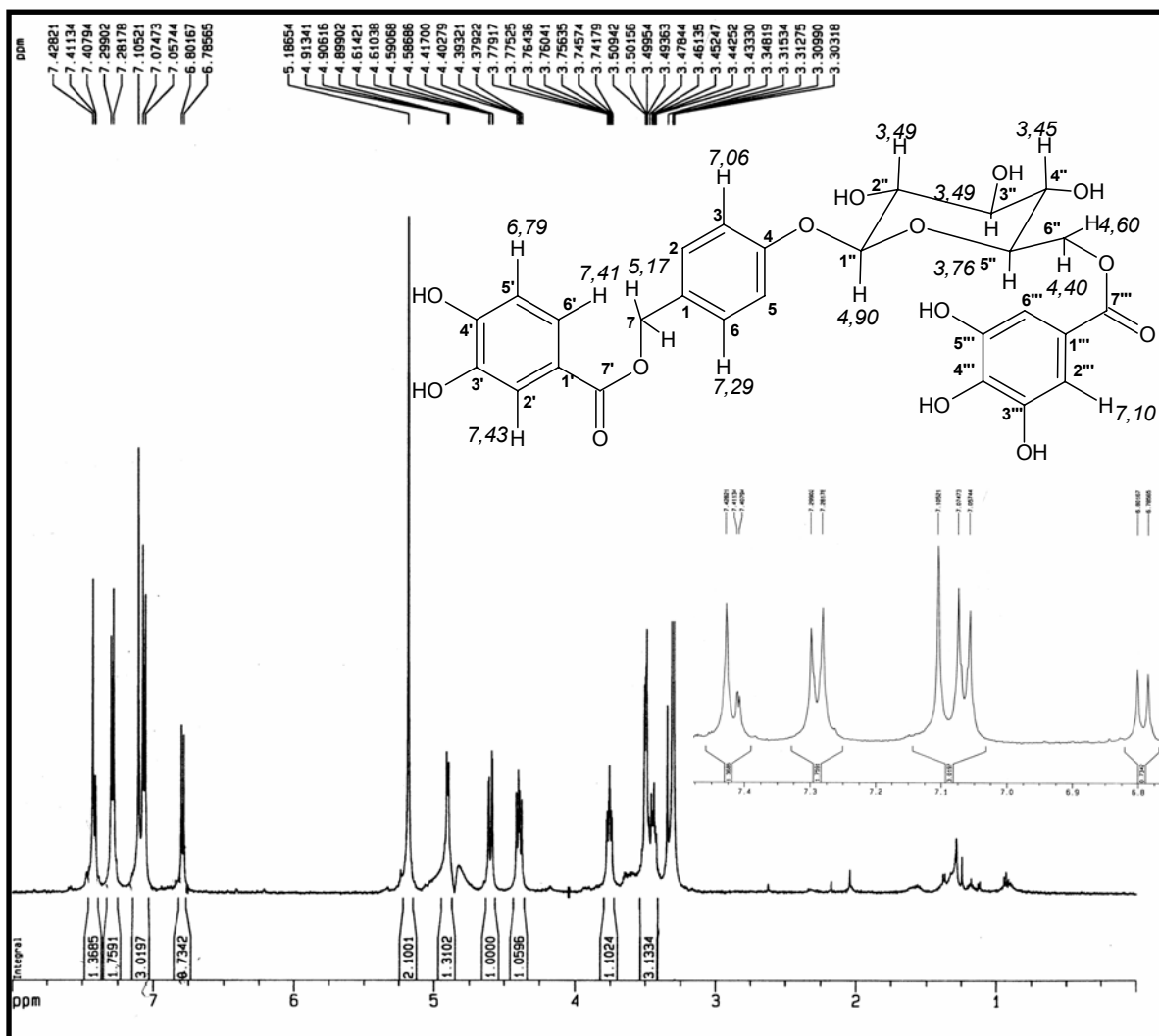


Figura 61- Espectro de RMN ^1H de ACS-2 (CD_3OD , 500 MHz)

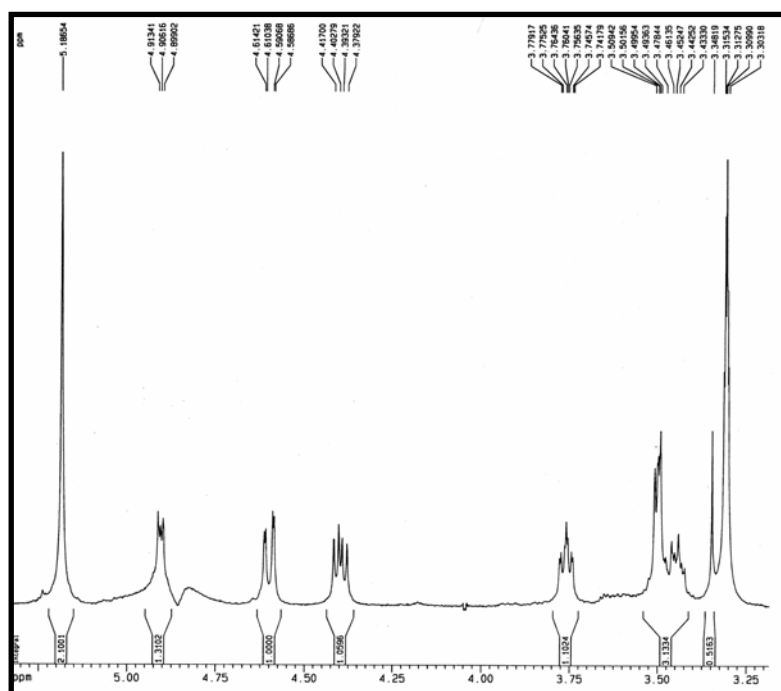


Figura 61a- Expansão do espectro de RMN ^1H de ACS-2: (I) δ 3,1-5,3

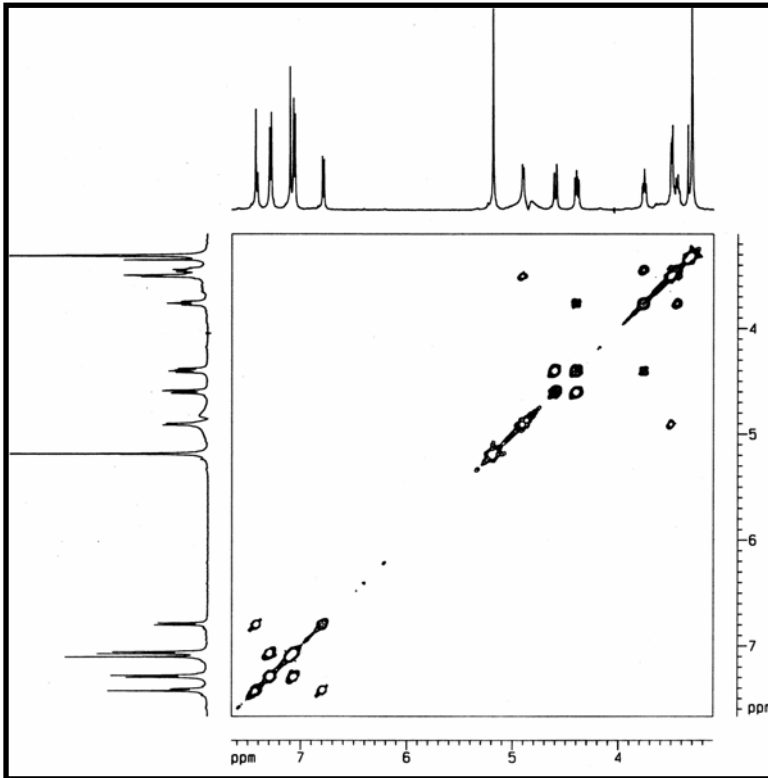


Figura 62- Espectro de RMN-COSY (CD₃OD, 500 x 500 MHz) de ACS-2

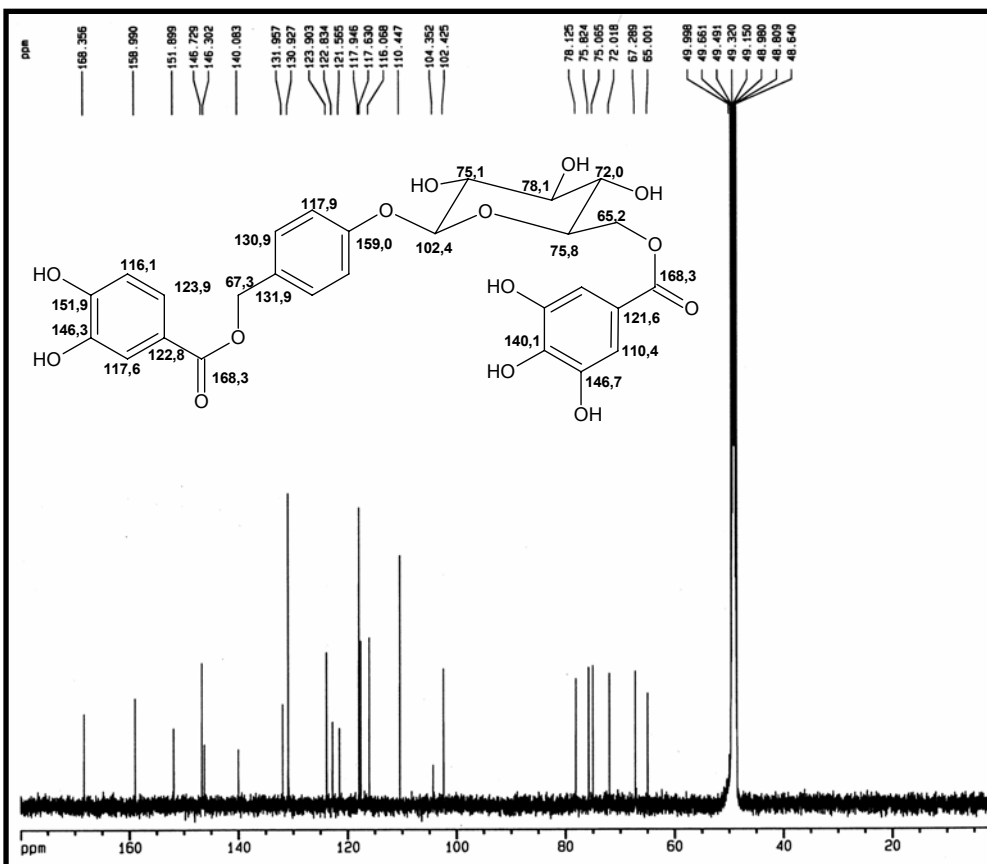


Figura 63- Espectro de RMN ¹³C-CPD de ACS-2 (CD₃OD, 125 MHz)

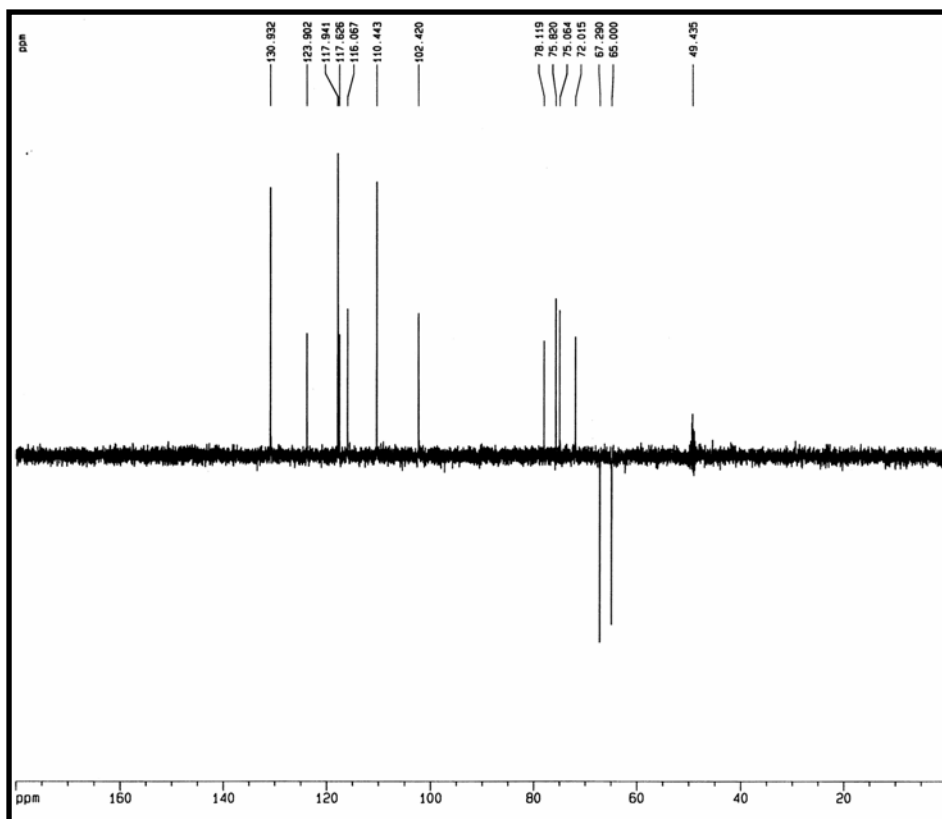


Figura 64- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (CD_3OD , 125 MHz)

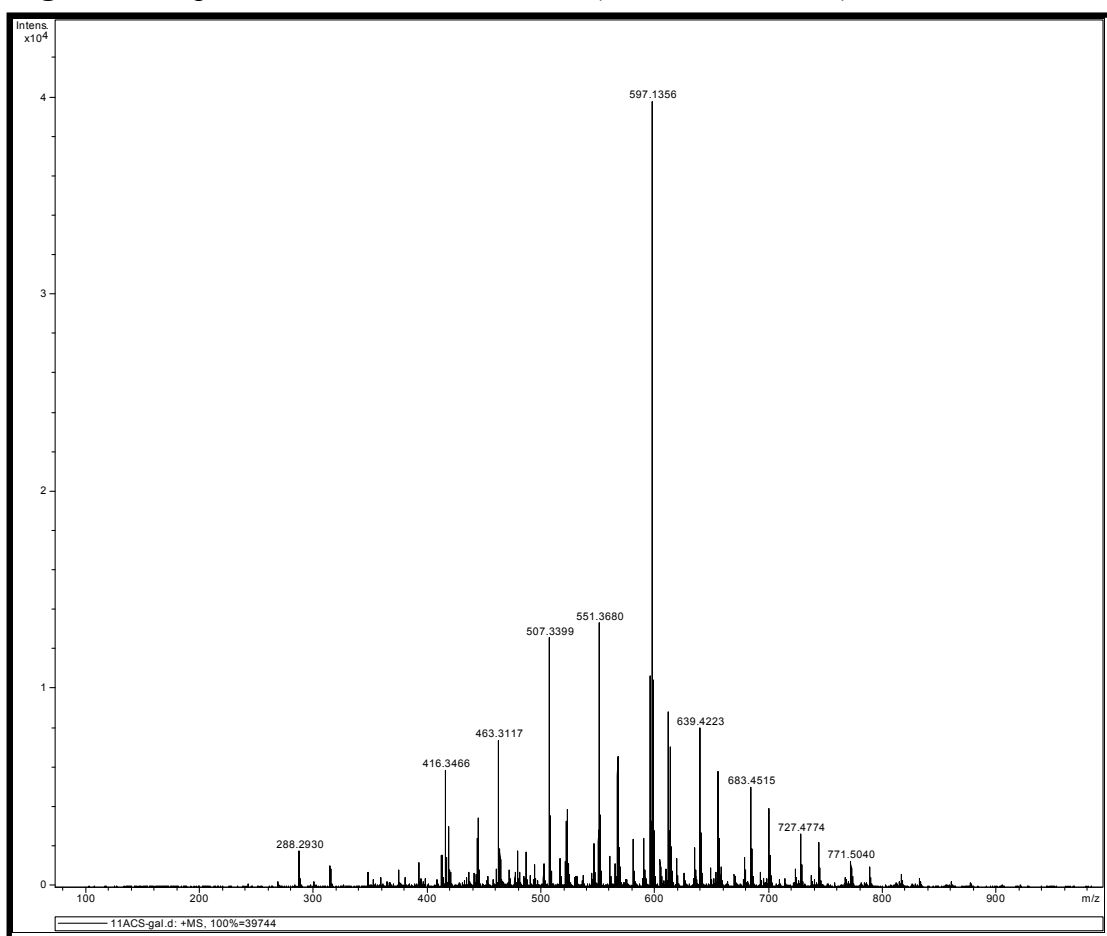


Figura 65- Espectro de massa de ACS-2 (Ionização por Electrospray)

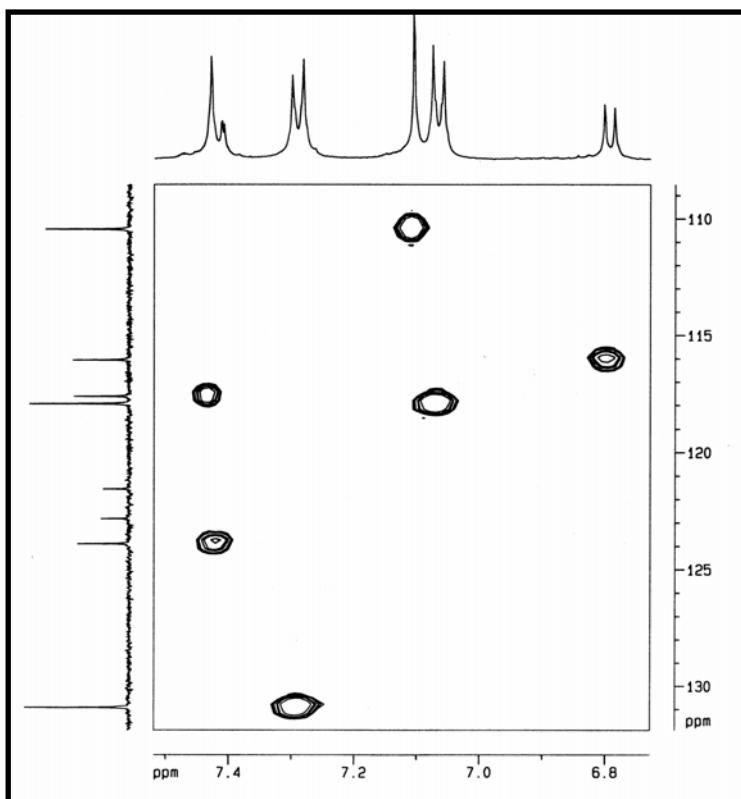


Figura 66- Espectro de RMN-HSQC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-2

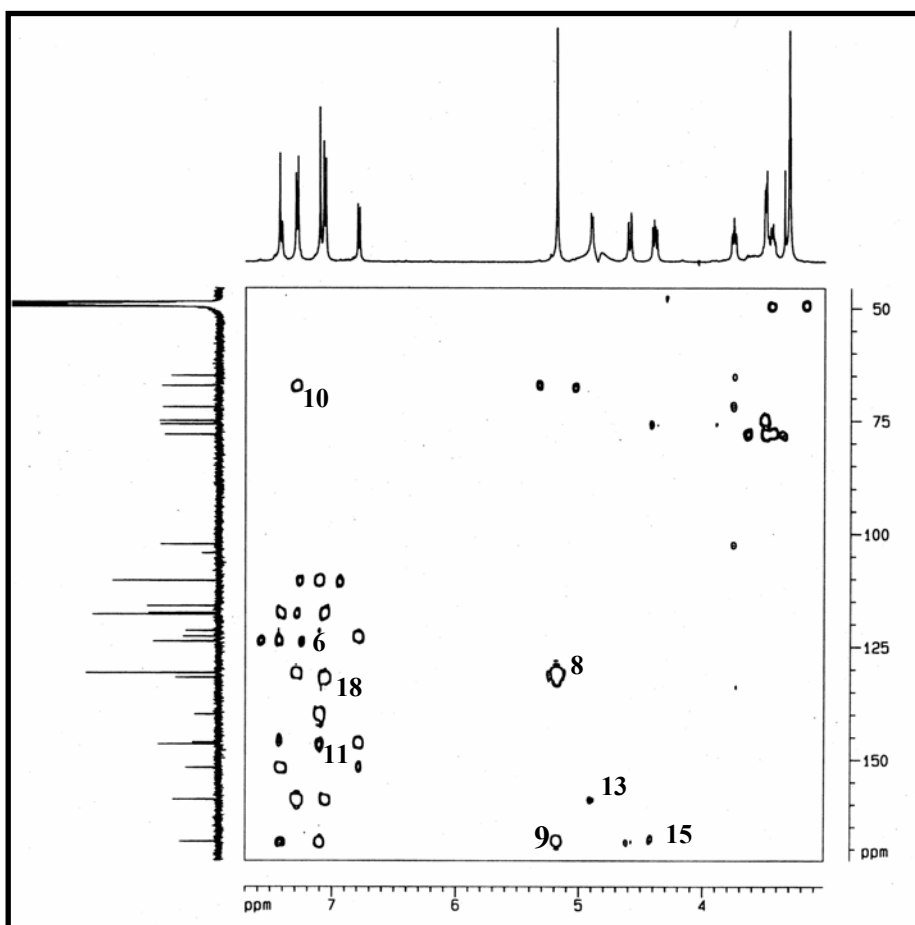


Figura 67- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACS-2

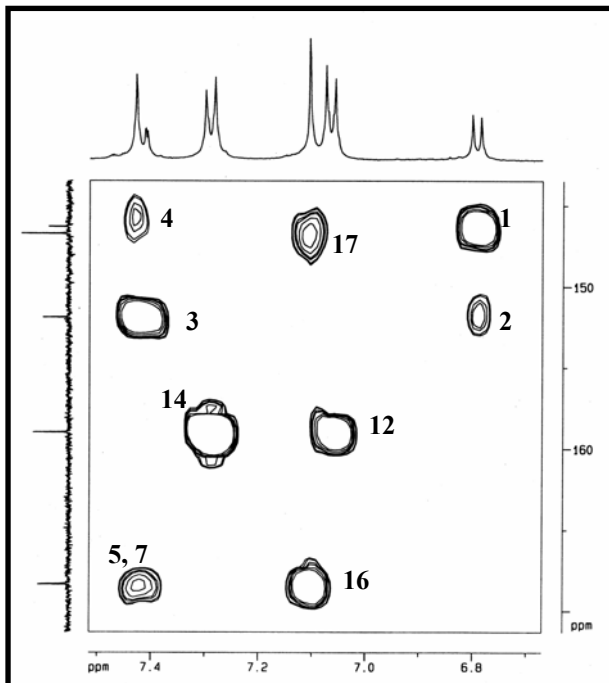
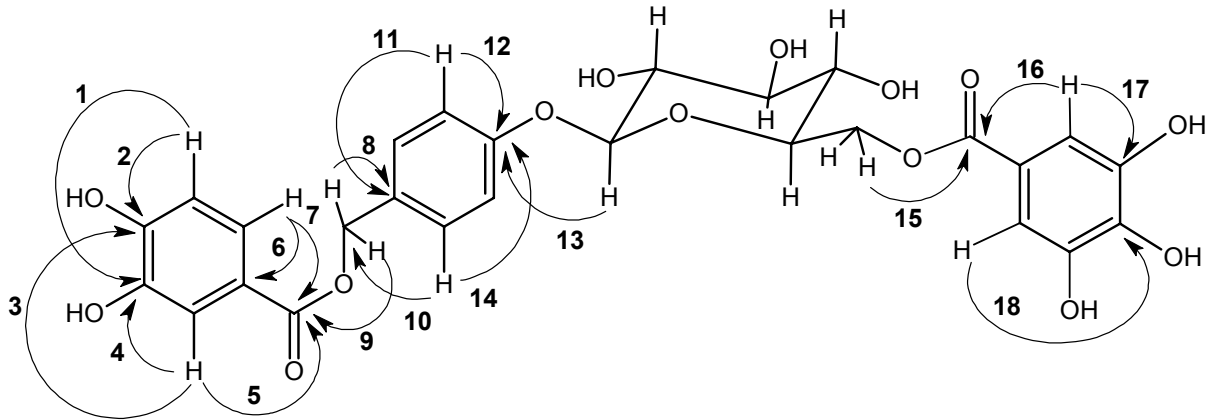


Figura 67a- Expansão da região δ 6,7-7,5 x 153-172

5.10. Amburosídio B (ACPa-6)

Um sólido marron resinoso (p.f. 132,6-135,4 °C; $[\alpha]_D^{25} = -35^\circ$, c 1,0, MeOH), intitulado ACPa-6 (**item 10.1.8.9, p. 295**), foi isolado da fração acetato de etila (E7- ACPaA), gerada pelo particionamento do extrato etanólico da parte aérea de espécimens jovens, através de tratamento cromatográfico em Sephadex LH-20 e cartucho de SPE.

O espectro de absorção na região do infravermelho (**Fig. 68, p. 158**) mostrou uma banda larga em 3403 cm^{-1} , correspondente à deformação axial da ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila; absorções intensas em 3065 e 2992 cm^{-1} , referentes a deformação axial C-H, absorção em 1705 cm^{-1} relativa à deformação axial C=O, evidenciando a existência de carbonila de éster; bandas esqueléticas em 1603 e 1515 cm^{-1} de C=C_{arom.}; absorção em 1285 , 1225 e 1073 cm^{-1} referentes às deformações axiais C-O.

ACPa-6 apresentou em seu espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD, **Fig. 69, p. 158**): dupletos em δ 7,37 (H-2,6) e 7,10 (H-3,5) (2H, d, $J = 8,5$ Hz), correspondentes a um anel aromático *para*-dissubstituído, sinais em δ 7,55 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6'); 7,53 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,0$ Hz, H-2') e 6,81 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5'), referentes a um anel aromático trissubstituído, um singleto em δ 5,24 (2H, s, H-7), referente a hidrogênios ligados a carbono oxigenado. Um conjunto de sinais na faixa de δ 4,93-3,45 foi atribuído a hidrogênios osídicos, exceto um singleto em δ 3,72 (3H, s, 3'-OMe), o qual foi compatível com hidrogênios metoxílicos.

Dezenove linhas espectrais foram exibidas no espectro de RMN ¹³C-CPD de ACPa-6 (125 MHz, CD₃OD, **Fig. 70, p. 159**), sendo uma delas atribuídas a carbonila de éster (δ 168,0, C-7') e três associadas a carbonos aromáticos oxigenados: δ 159,1 (C-4); 153,0 (C-4') e 148,8 (C-3').

O espectro RMN ¹³C-DEPT135 (125 MHz, CD₃OD, **Fig. 71, p. 159**) revelou a presença de dez carbonos mono-hidrogenados, dos quais metade foi relacionada a carbonos aromáticos: δ 130,9 (C-2,6); 125,2 (C-6'); 117,9 (C-3,5); 116,1 (C-5'); e 113,6 (C-2'). O restante foi associado a carbonos osídicos, δ 102,3 (C-1''); 78,2 (C-5''); 78,0 (C-3''); 75,0 (C-2'') e 71,5 (C-4''), juntamente com um dos dois carbonos metilênicos oxigenados, δ 67,3 (C-7) e 62,6 (C-6''). A absorção em δ 56,6 (3'-OMe) ratificou a existência de uma metoxila. As demais absorções de ¹³C em δ 131,8 (C-1) e 122,7 (C-1'), ausentes no espectro DEPT135, foram reconhecidas como pertencentes a carbonos aromáticos não-hidrogenados.

A fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_{10}$, fornecida pelos dados de RMN, foi compatível com a estrutura de um glicosídeo di-aromático monometilado.

O espectro de RMN-HSQC (**Fig. 72, p. 160**) revelou os carbonos correspondentes a cada um dos anéis benzênicos, a partir dos acoplamentos 1J com cada um dos hidrogênios aromáticos (**Tab. 14, p. 157**).

A correlação entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 4,93) e o carbono aromático C-4 (δ_C 159,1), registrada no espectro de RMN-HMBC (**Fig. 73, p. 160**), permitiu identificar a posição da ligação heterosídica. A existência de um fragmento benzílico foi demonstrada através dos acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos H-7 (δ_H 5,24) com os carbonos aromáticos C-1 (δ_C 131,8) e C-2,6 (δ_C 130,9), mas também entre os hidrogênios aromáticos H-2,6 (δ_H 7,37) e o carbono metilênico C-7 (δ_C 67,3).

Os dois anéis aromáticos foram ligados através de um grupo éster, devido às correlações dos hidrogênios aromáticos H-2' (δ_H 7,53) e H-6' (δ_H 7,55) e os hidrogênios metilênicos H-7 (δ_H 5,24) com a carbonila C-7' (δ_C 168,0). A correlação entre os hidrogênios metoxílicos (δ_H 3,72) com o carbono aromático C-3' (δ_C 148,8) justificou a posição da metoxila no carbono 3' do anel benzênico trissubstituído.

ACPa-6 (lit.: p.f. 130-132 °C) já havia sido identificado nas cascas do caule de *A. cearensis*, tendo recebido a denominação comum de amburosídeo B (vanilato de 4-*O*- β -D-glicopiranosil-benzila) (BRAVO et al., 1999).

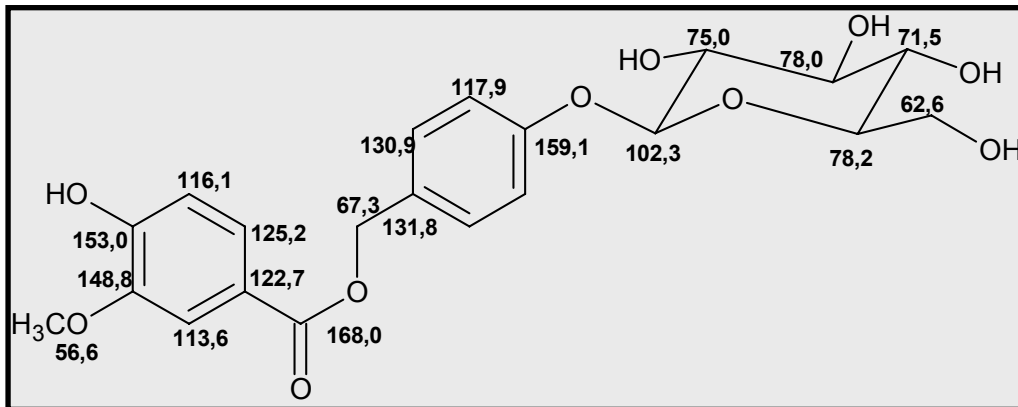
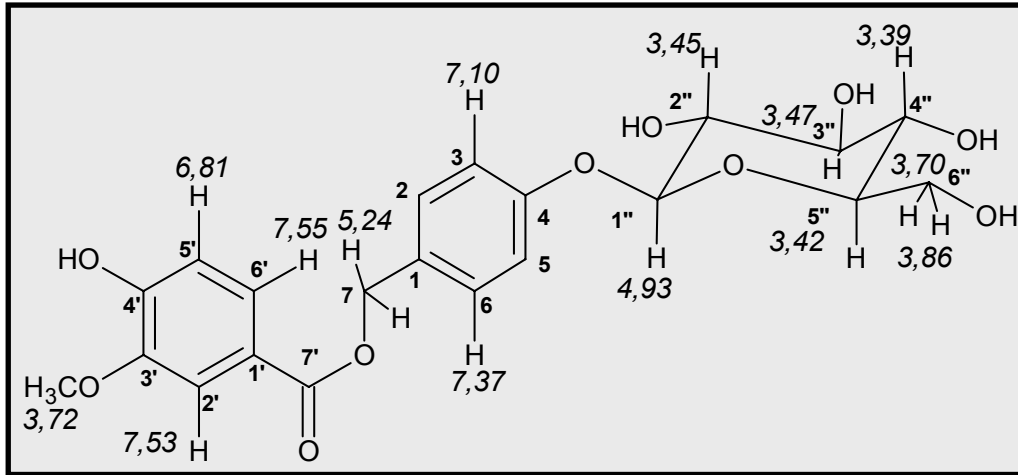


Tabela 14- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de amburosídio B, registrados na literatura (BRAVO et al, 1999).

# C	Amburosídio B δ_{C} (ppm) CD_3OD	ACPa-6 δ_{C} (ppm) CD_3OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
1	130,7	131,8		5,24	7,10
2,6	130,0	130,9	7,37 (2H, d, 8,5 Hz)		5,24
3,5	116,9	117,9	7,10 (2H, d, 8,5 Hz)	7,37	
4	157,5	159,1		7,10	7,37
7	66,4	67,3	5,24 (2H, s)		7,37
1'	121,7	122,7		7,53	6,81
2'	112,6	113,6	7,53 (1H, d, 2,0 Hz)		7,55
3'	147,4	148,8		7,53	3,72; 6,81
4'	151,3	153,0		6,81	7,55; 7,53
5'	114,9	116,1	6,81 (1H, d, 8,2 Hz)		
6'	124,4	125,2	7,55 (1H, dd, 8,2; 2,0 Hz)		7,53
7'	167,1	168,0			7,55; 7,53; 5,24
1''	101,0	102,3	4,93 (1H, d, 7,4 Hz)	3,45	
2''	73,6	75,0	3,45 (1H, m)	3,47	
3''	76,7	78,0	3,47 (1H, td)	3,39	
4''	70,1	71,5	3,39 (1H, m)	3,47	3,86; 3,70
5''	76,5	78,2	3,42 (1H, m)	3,70	
6''	61,8	62,6	3,86; 3,70 (1H, m)		
3'-OMe	56,1	56,6	3,72 (3H, s)		

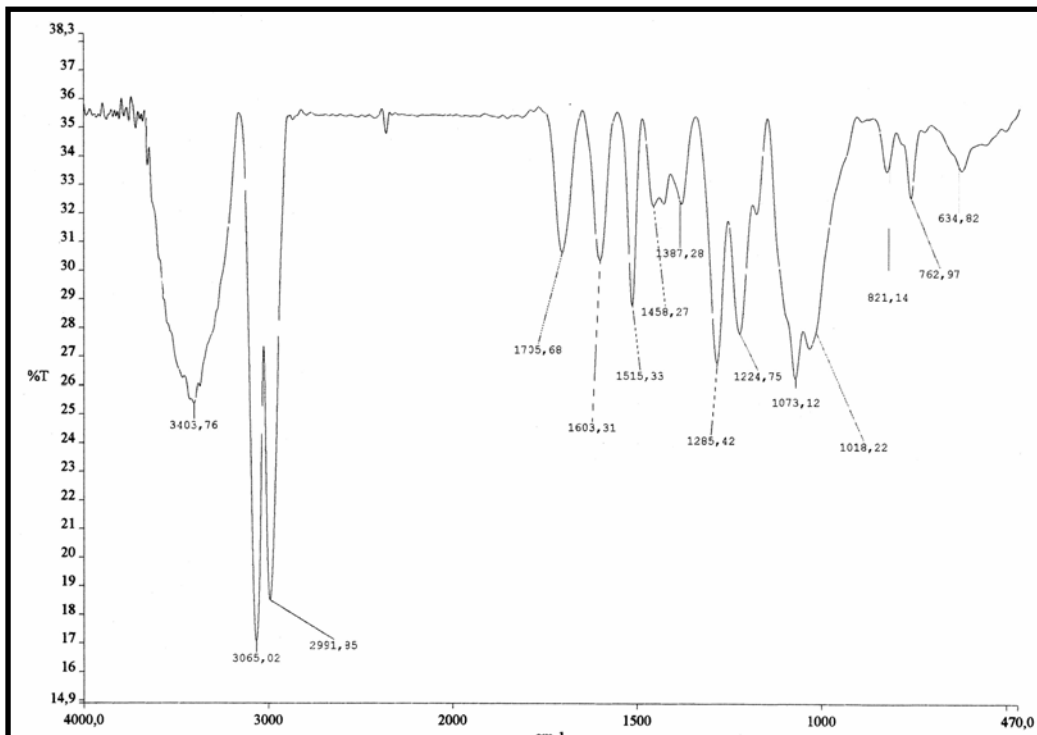


Figura 68- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACPa-6 (pastilha de KBr)

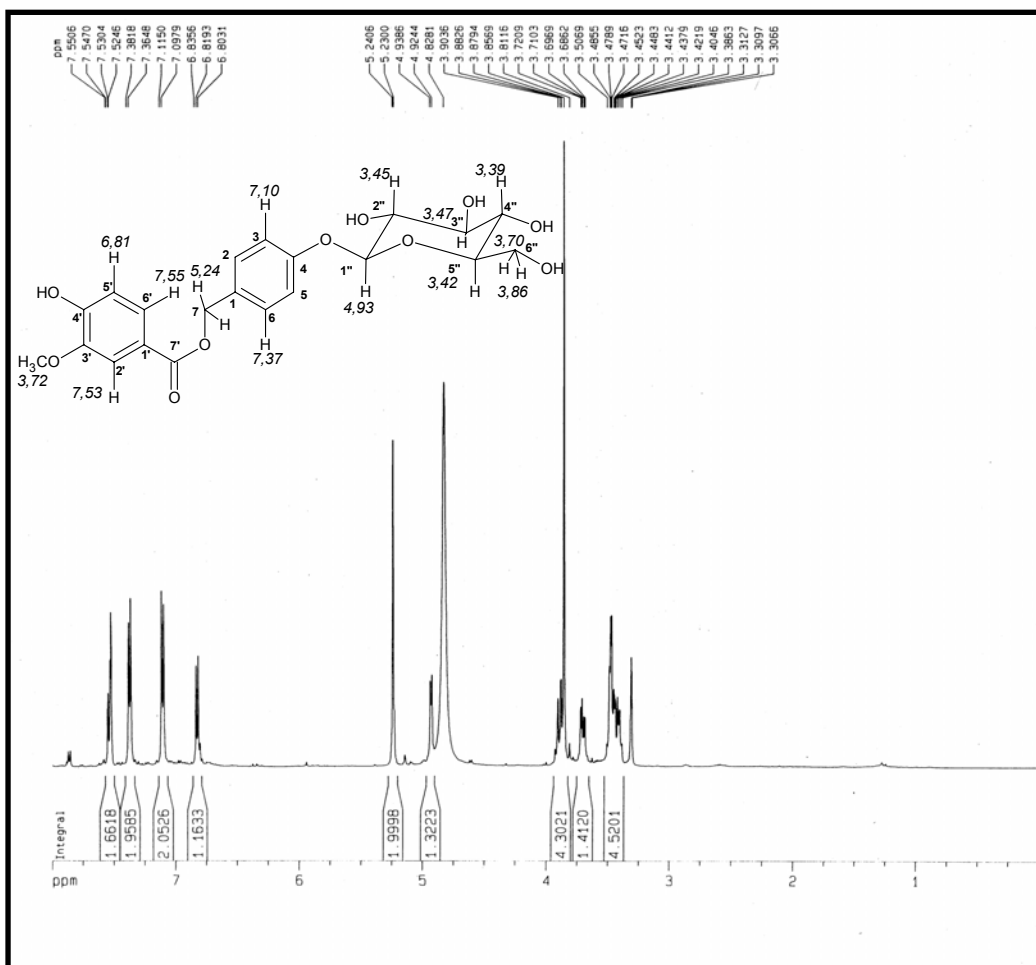


Figura 69- Espectro de RMN ^1H de ACPa-6 (CD_3OD , 500 MHz)

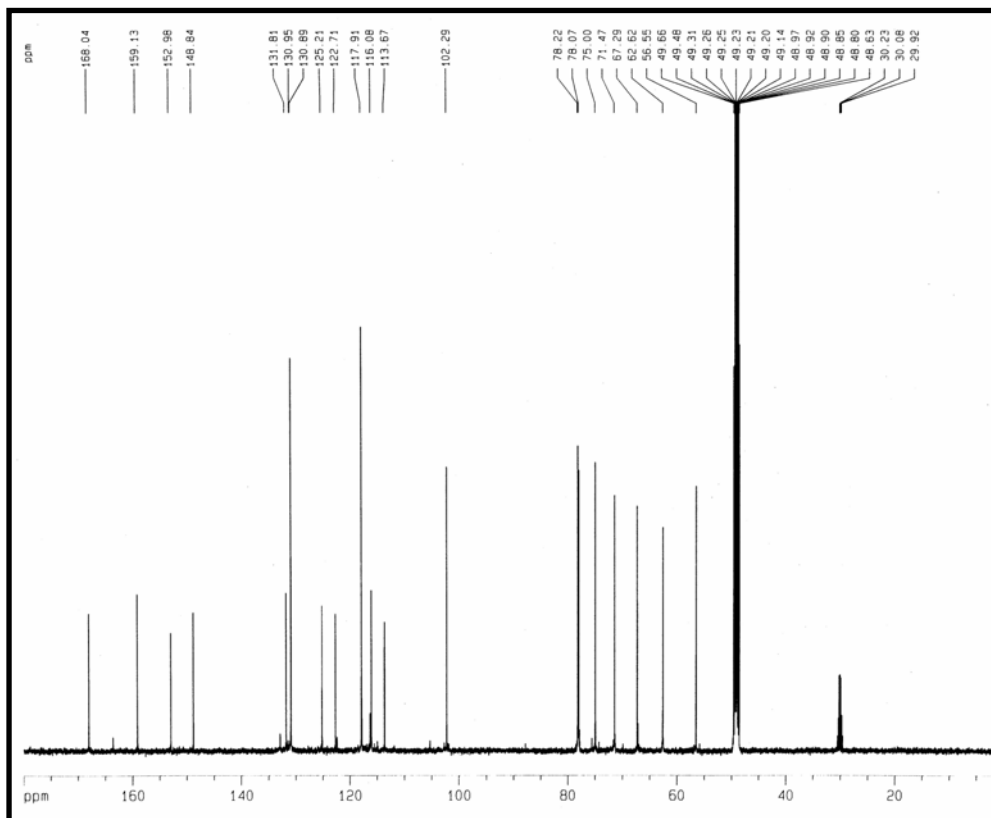


Figura 70- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACPa-6 (CD_3OD , 125 MHz)

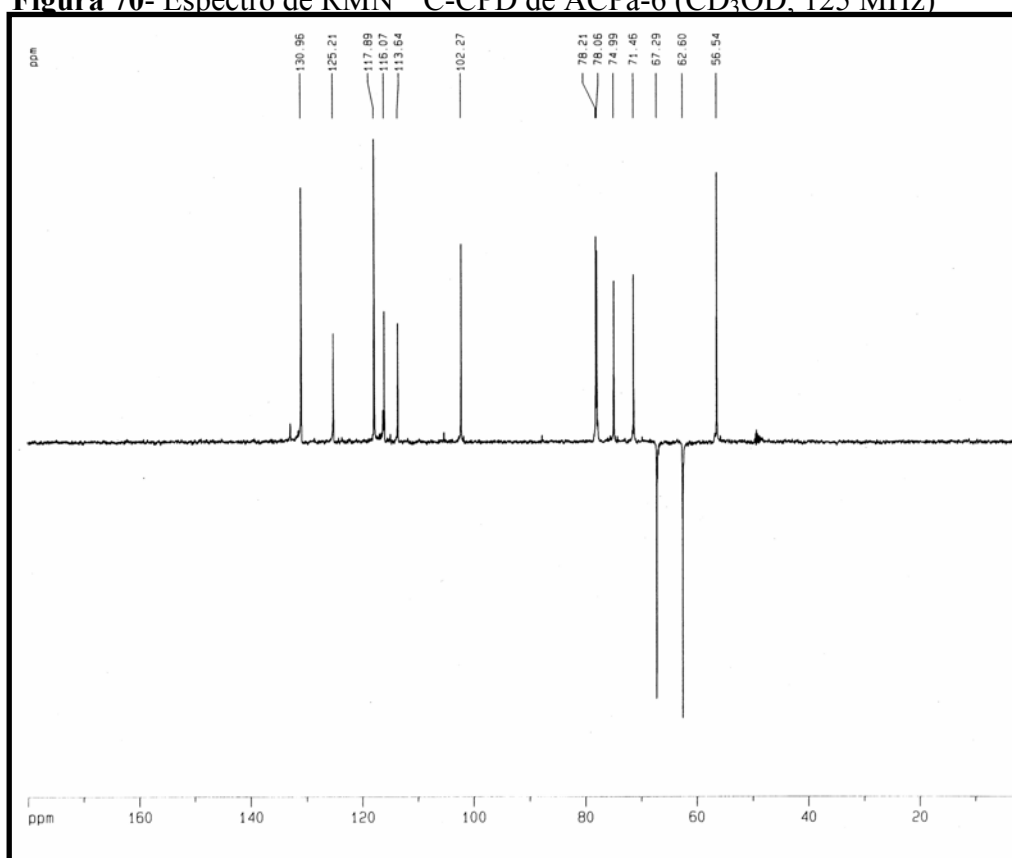


Figura 71- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-6 (CD_3OD , 125 MHz)

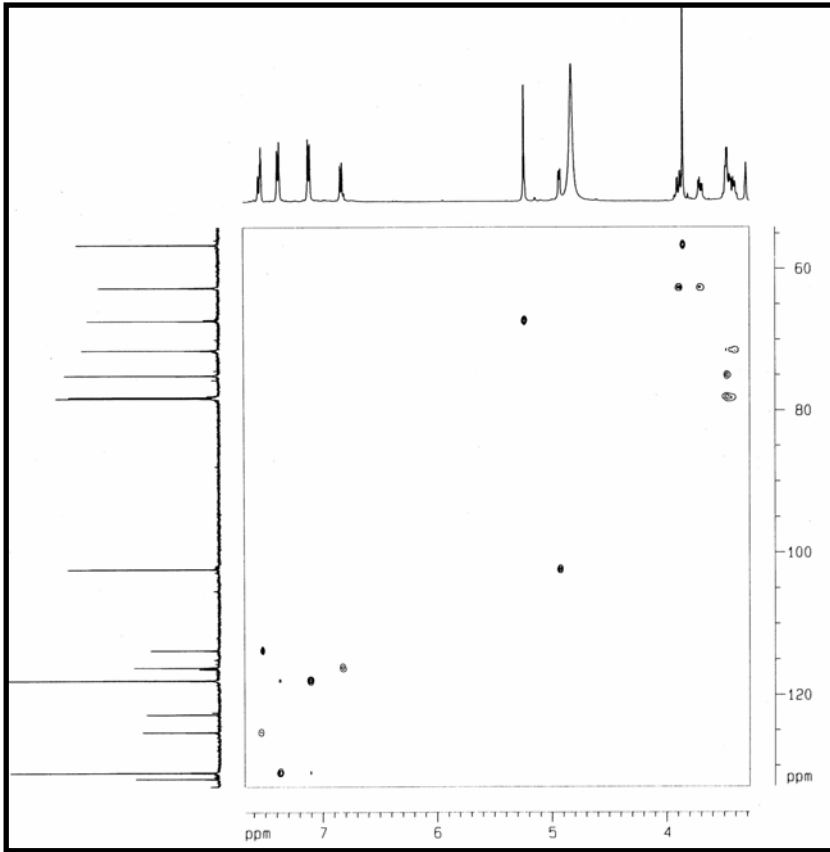


Figura 72- Espectro de RMN-HSQC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-6

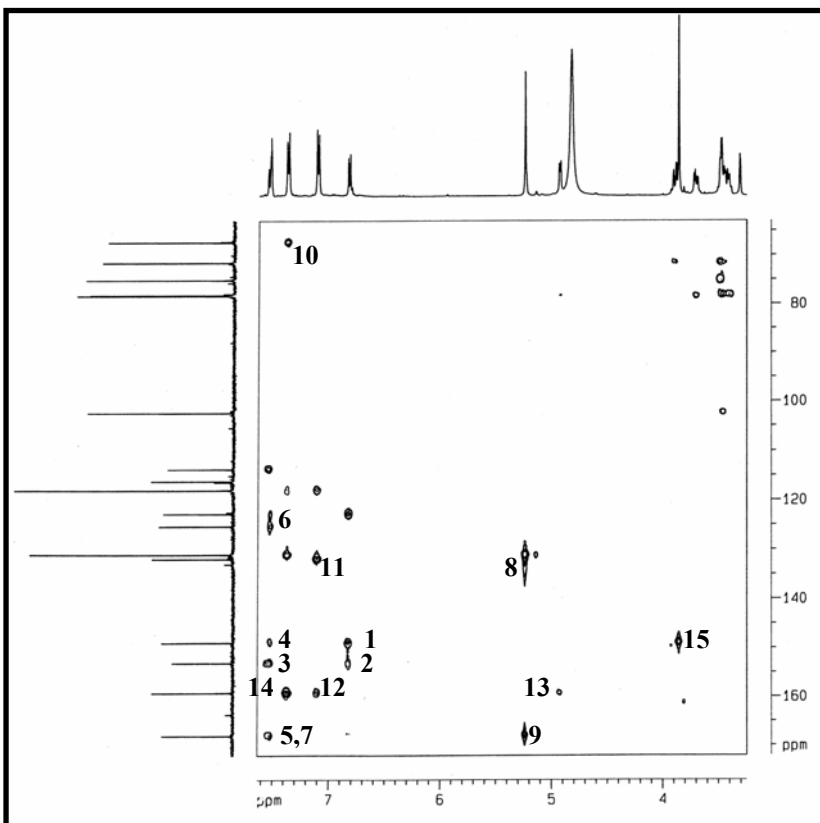
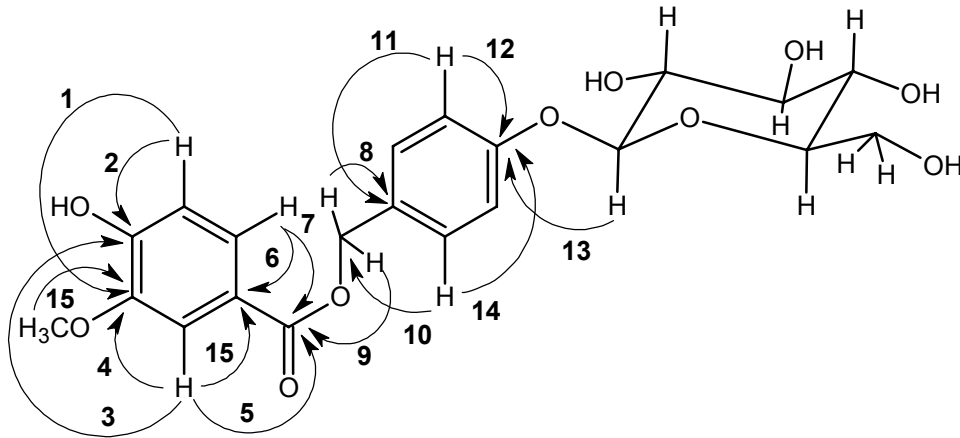


Figura 73- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-6



5.11. Ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado (ACPa-7)

Cromatografias em Sephadex LH-20 e em cartucho de SPE da fração E7-ACPaQ (fração aquosa do extrato etanólico da parte aérea de espécimens de 7 meses de cultivo) permitiram o isolamento de um sólido marrom ($t_R = 7,20$ min), o qual foi purificado por HPLC, resultando na obtenção de 24 mg de um sólido branco (pf. 234,6-236,1 °C; $[\alpha]_D^{25} = -61,7^\circ$, MeOH, c 0,78), designado ACPa-7 (**item 10.1.8.11, p. 296**).

O espectro de RMN ^1H de ACPa-7 (500 MHz, CD_3OD , **Fig. 74, p. 166**) demonstrou a presença de dois dupletos em δ 8,12 e 6,52 (1H, $J = 16,2$ Hz, H-7 e H-8), associados a hidrogênios olefínicos com estereoquímica *trans*, um sistema de dois dupletos em δ 7,61 e 7,24 (1H, $J = 7,9$ Hz, H-6 e H-3, não acoplados) e dois tripletos em δ 7,37 e 7,05 (1H, $J = 7,9$ Hz, H-4 e H-5), característico de anel aromático *orto*-dissubstituído, além de um conjunto de sinais numa faixa de deslocamento químico típica de açúcar (δ 5,00-3,43). No espectro de RMN-COSY (**Fig. 75, p. 167**), estes acoplamentos foram ratificados.

Quinze absorções foram observadas no espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , (**Fig. 76, p. 167**), das quais nove foram relacionadas a carbonos sp^2 (171,2; 157,6; 141,6; 133,0; 129,0; 125,5; 123,7; 119,7 e 117,1), sendo uma possivelmente pertencente à carbonila de ácido ou éster ($\delta_{\text{C-9}}$ 171,2) e uma referente a carbono aromático oxigenado ($\delta_{\text{C-2}}$ 157,6). As outras seis absorções foram associadas a carbonos sp^3 oxigenados, δ 102,5 (C-1'); 78,4 (C-5'); 78,3 (C-3'); 75,0 (C-2'); 71,4 (C-4') e 62,6 (C-6'), compatíveis com os deslocamentos químicos de glicose, relatados na literatura.

A comparação do espectro de RMN ^{13}C -CPD com o espectro DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , **Fig. 77, p. 168**) revelou a diferença de três linhas espectrais, δ 171,2 (C-9), 157,6 (C-2) e 125,5 (C-1), as quais foram relacionadas a carbonos sp^2 não-hidrogenados. No espectro DEPT135, todas as linhas espectrais foram associadas a carbonos mono-hidrogenados, exceto a absorção em δ 62,6 (C-6'), atribuída a carbono metilênico.

O espectro de RMN-HSQC (**Fig. 78, p. 168**) permitiu correlacionar os hidrogênios olefínicos H-7 e H-8 (δ_{H} 8,12 e 6,52) diretamente ligados aos seus respectivos carbonos (δ_{C} 141,6 e 119,7), sugerindo a presença de uma olefina adjacente à carbonila devido às significativas diferenças de deslocamentos químicos, provocadas pelo efeito mesomérico retirador da carbonila. As atribuições dos sinais de hidrogênios e carbonos aromáticos foram baseadas nas correlações observadas no espectro HSQC, todavia a multiplicidade e os

deslocamentos químicos, considerando principalmente os efeitos de blindagem do carbono oxigenado, foram decisivos para os inequívocos assinalamentos.

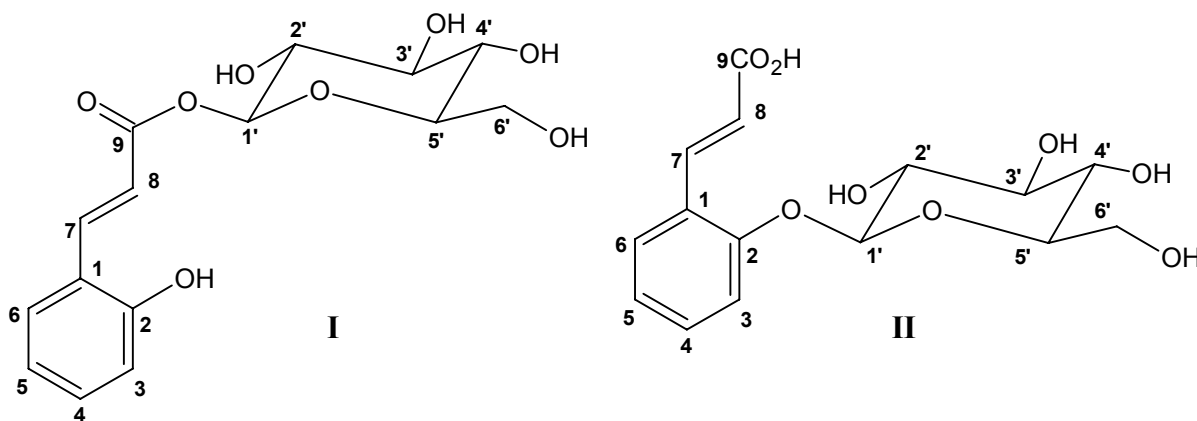
O espectro de massa de ACPa-7 (EM-IE, **Fig. 79**, p. 169) apresentou o pico íon-molecular apenas detectável (m/z 326) e fragmentos com m/z resultantes de quebras sequenciais sofridas pela aglicona: 164 (perda de glicose), 146 (desidratação do ácido *o*-cumárico, seguida de lactonização) e 118 (pico base, descarboxilação).

Os dados de RMN e EM forneceram a composição elementar $C_{15}H_{18}O_8$, correspondendo supostamente a um glicosídeo cinâmico, o qual poderia ser referente a um éster de glicose (*orto*-hidroxi-cinamato de glicosila, I) ou um ácido cinâmico *orto*-glicosilado (II).

O espectro de RMN-HMBC (**Fig. 81**, p. 170) demonstrou indubitavelmente a ligação da porção etilênica ao anel aromático através de diversas correlações como: acoplamentos do hidrogênios aromáticos H-3 (δ_H 7,24; 4J) e H-6 (δ_H 7,61) com o carbono olefínico C-7 (δ_C 141,6), acoplamentos dos hidrogênios olefínicos H-7 (δ_H 8,12) e H-8 (δ_H 6,52) com o carbono *ipso* C-1 (δ_C 125,5), além dos acoplamentos do hidrogênio H-6 (δ_H 7,61) com os carbonos aromáticos C-2 (δ_C 157,6) e C-6 (δ_C 129,0) (**Tab. 15**, p. 165).

A existência de uma carbonila α,β -insaturada foi ratificada através das correlações entre os hidrogênios olefínicos H-7 (δ_H 8,12) e H-8 (δ_H 6,52) com a carbonila (δ_C 171,2), observadas no espectro HMBC.

A correlação do hidrogênio anomérico H-1' (δ_H 5,00) com o carbono aromático oxigenado C-2 (δ_C 157,6) foi a prova insofismável de que a estrutura de ACPa-7 correspondia à proposta II, ou seja, o ác. (*E*)-cumárico glicosilado, substância nova no gênero.



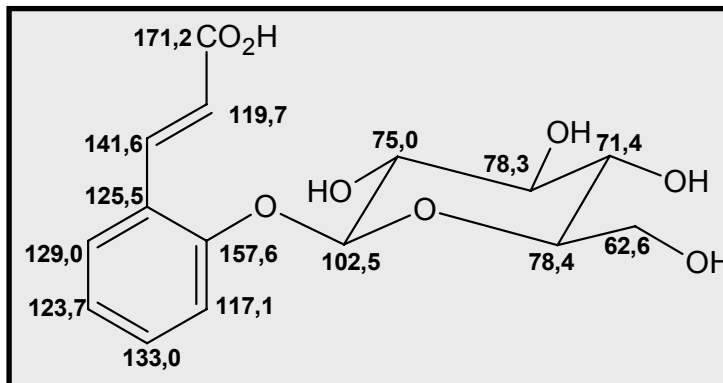
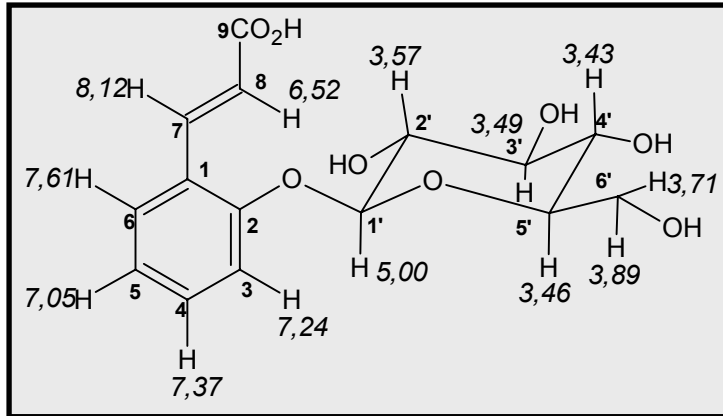


Tabela 15- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-7 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACPa-7 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
1	125,5			6,97; 5,97
2	157,6		7,24	8,12; 7,61; 7,37; 5,00
3	117,1	7,24 (1H, d, 7,9 Hz)	7,37	7,05
4	133,0	7,37 (1H, t, 7,9 Hz)	7,24; 7,05	7,61
5	123,7	7,05 (1H, t, 7,9 Hz)	7,37	7,24
6	129,0	7,61 (1H, d, 7,9 Hz)	7,05	8,12; 7,37
7	141,6	8,12 (1H, d, 16,2 Hz)	6,52	7,61; (7,24)
8	119,7	6,52 (1H, d, 16,2 Hz)	8,12	
9	171,2		6,52	7,31
1'	102,5	5,00 (1H, d, 7,8 Hz)		3,49
2'	75,0	3,57 (1H, m)		
3'	78,3	3,49 (1H, td)		4,94
4'	71,4	3,43 (1H, m)		
5'	78,4	3,46 (1H, m)		3,46
6'	62,6	3,89 (1H, m); 3,71 (1H, m)		

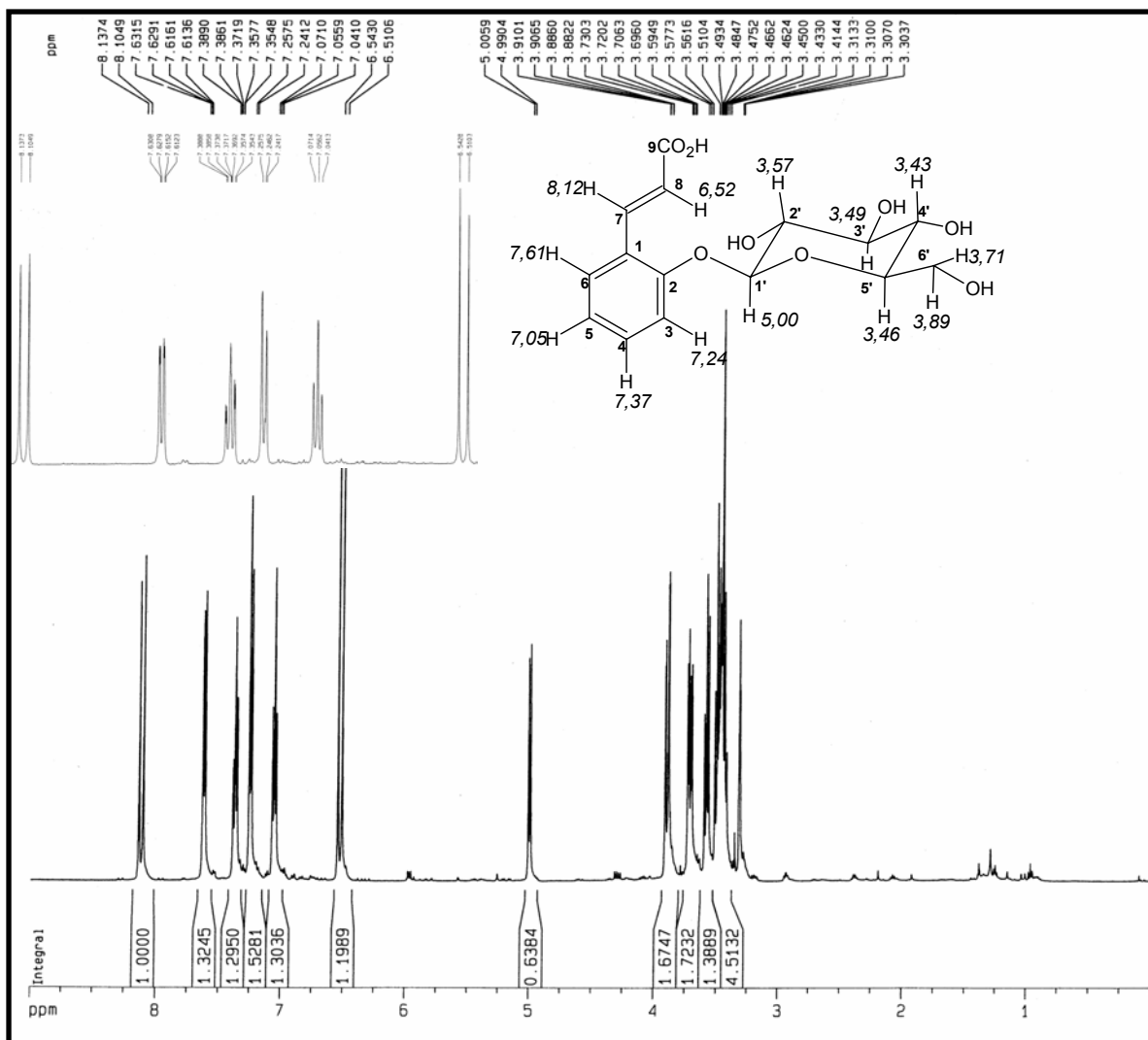


Figura 74- Espectro de RMN ^1H de ACPa-7 (CD_3OD), 500 MHz)

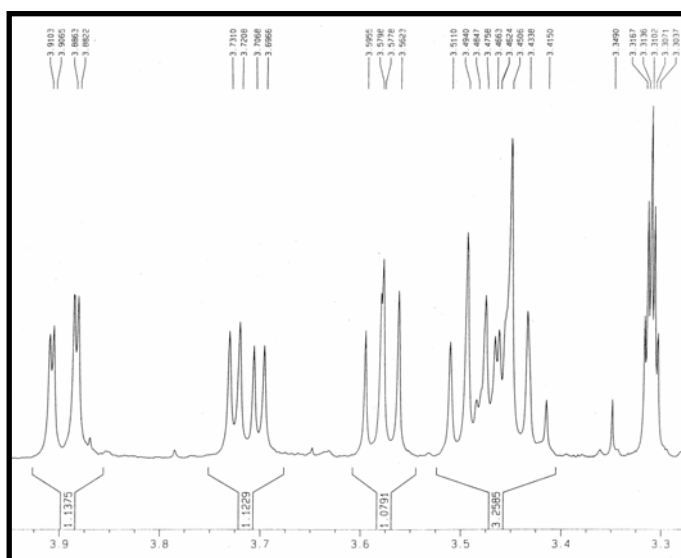


Figura 74a- Expansão do espectro de RMN ^1H de ACPa-7 da região de: (I) δ 3,2-4,0.

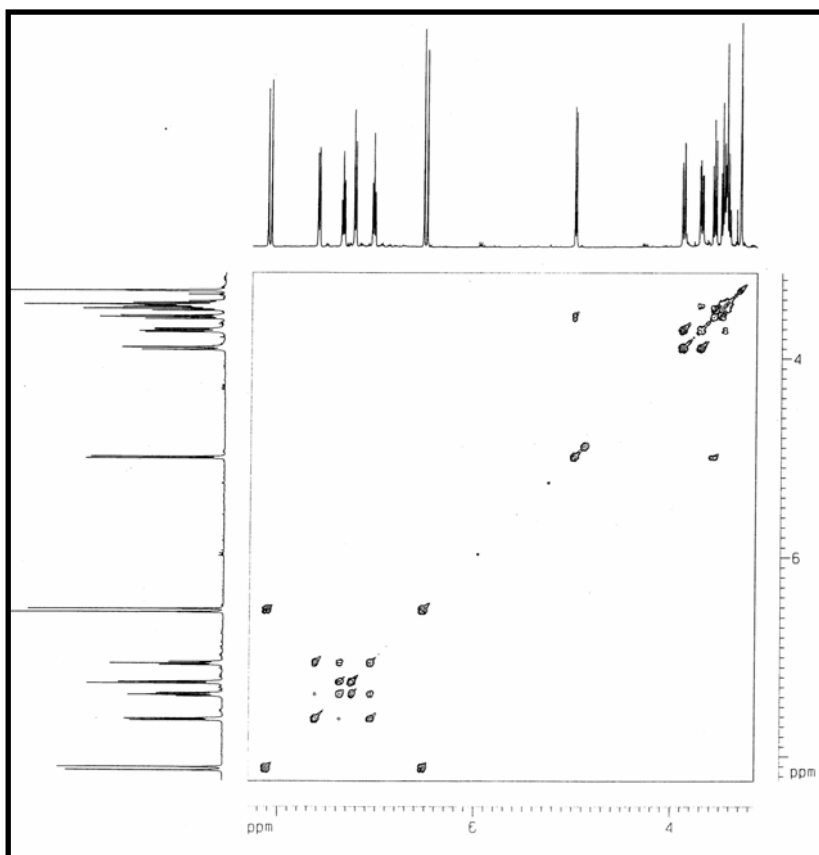


Figura 75- Espectro de RMN-COSY (CD₃OD, 500 x 500 MHz) de ACPa-7

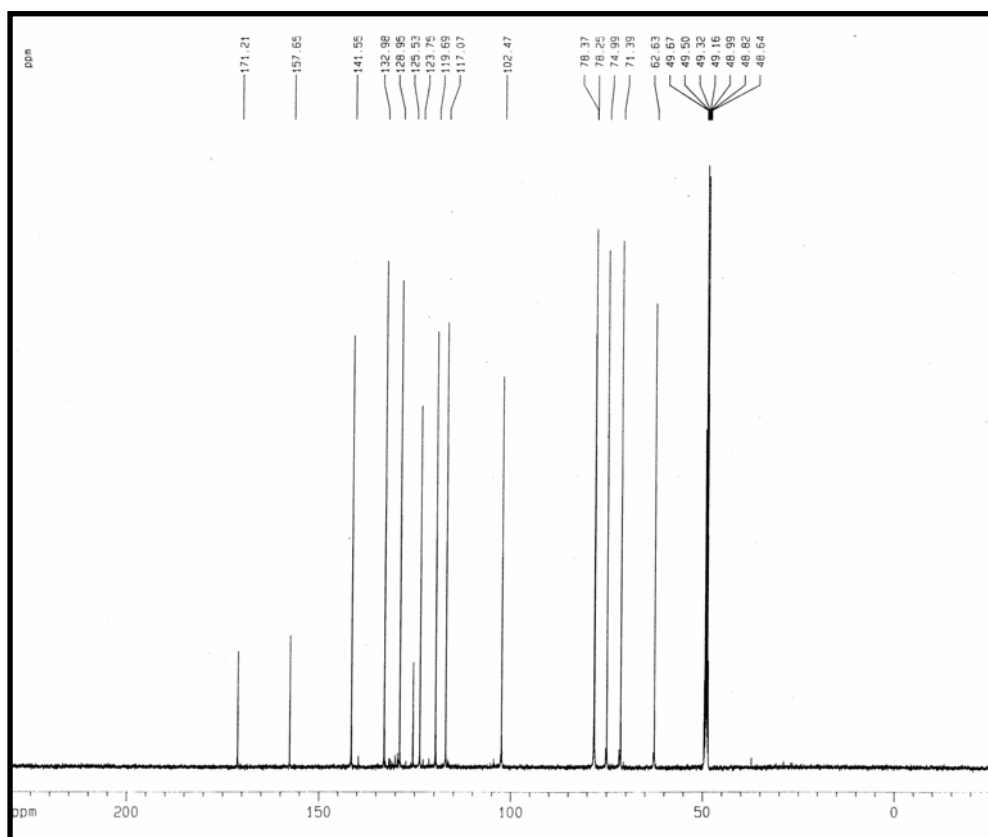


Figura 76- Espectro de RMN ¹³C-CPD de ACPa-7 (MeOD, 125 MHz)

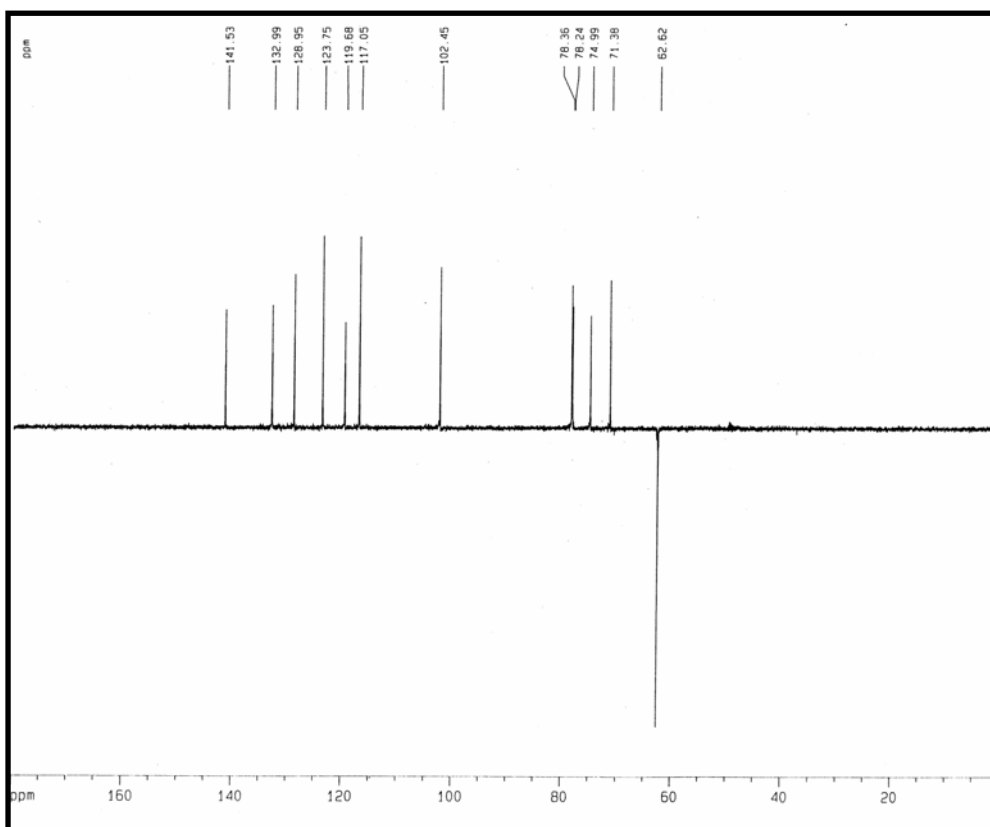


Figura 77- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-7 (CD_3OD , 125 MHz)

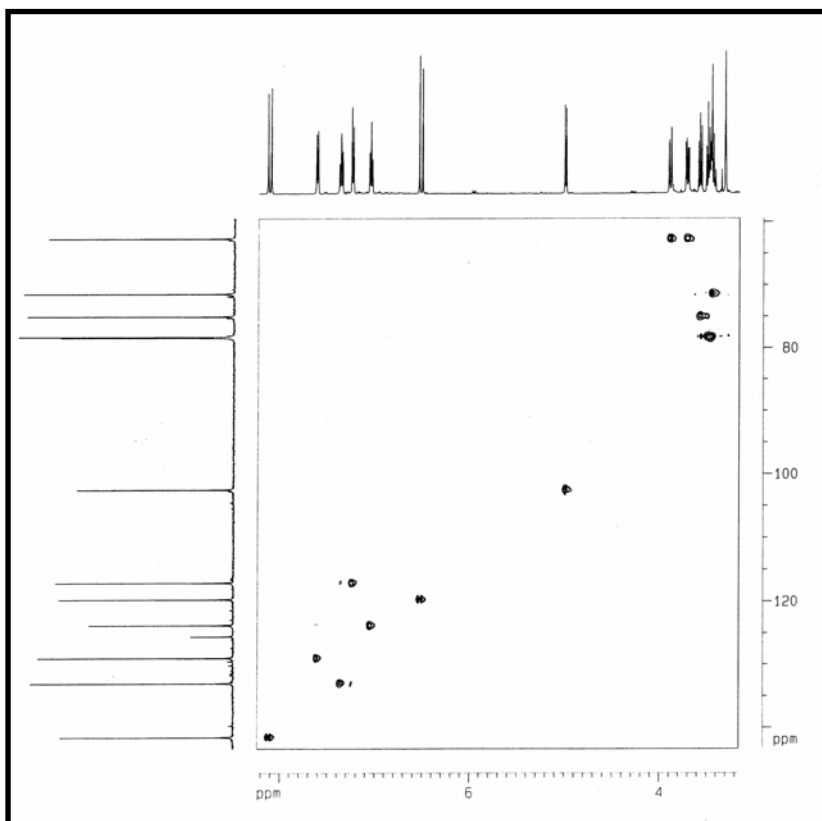


Figura 78- Espectro de RMN-HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de ACPa-7

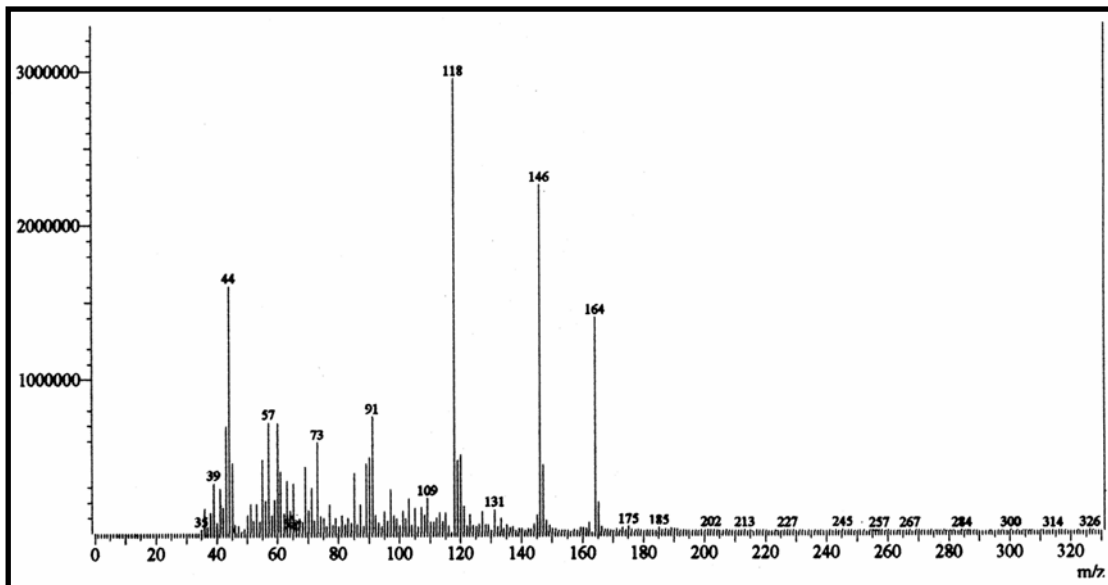


Figura 79- Espectro de massa de ACPa-7 (Impacto Eletrônico)

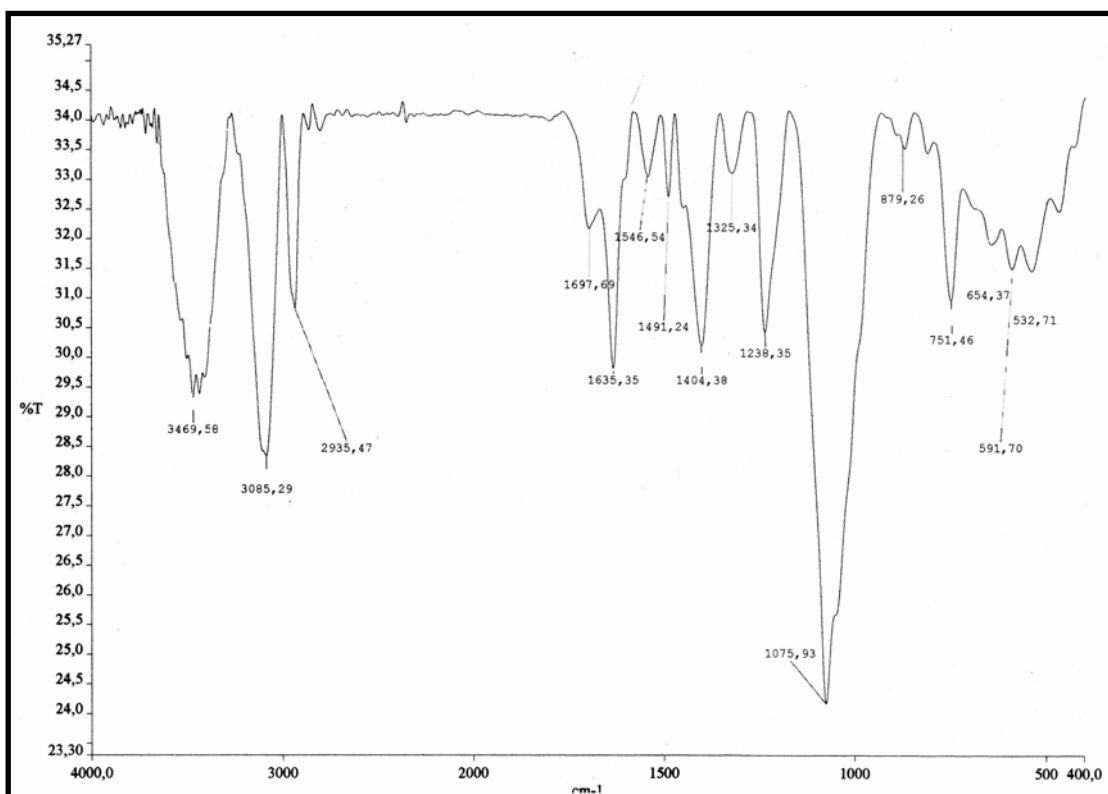


Figura 80- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACPa-7(pastilha de KBr)

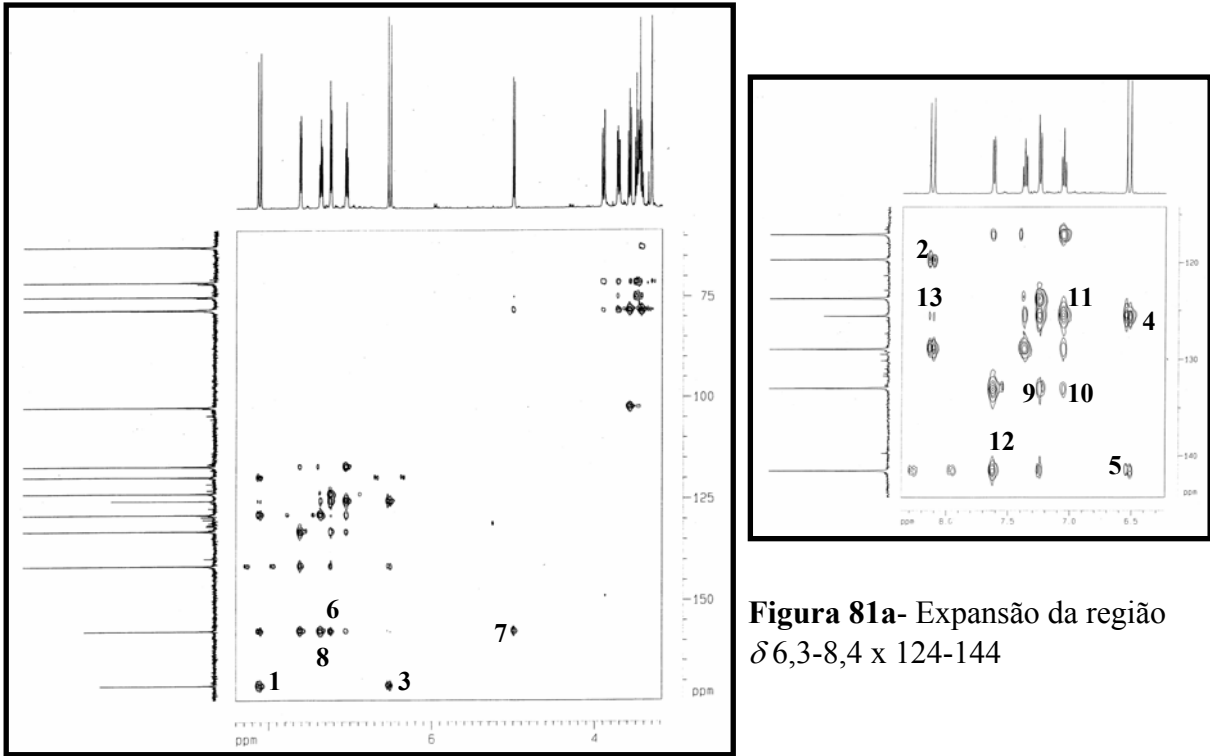
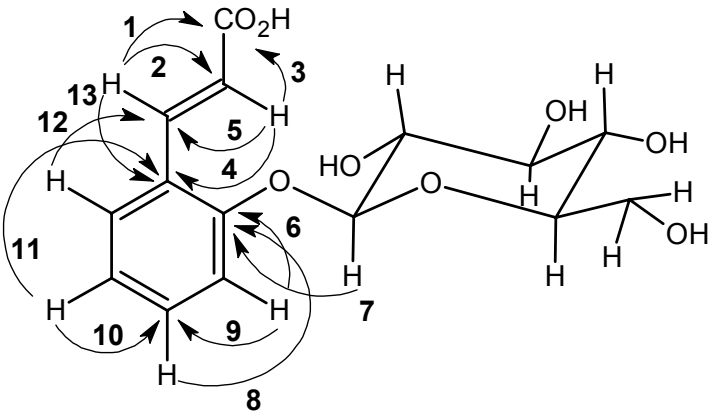


Figura 81a- Expansão da região δ 6,3-8,4 x 124-144

Figura 81- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACPa-7



5.12. Ácido (Z)-*o*-cumárico glicosilado (ACX-1)

A fração butanólica, originada de cromatografia em Sephadex LH-20 e partição líquido-líquido do extrato etanólico do xilopódio, rendeu um sólido resinoso amarelo (**item 10.1.8.3, p. 292**) denominado ACX-1 (pf. 98,7-100,0 °C; $[\alpha]_D^{25} = -43^\circ$, MeOH, c 0,32), após separação obtida por HPLC (fase reversa- $t_R = 7,87$ min).

A análise do espectro de RMN ^1H de ACX-1 (500 MHz, CD_3OD , **Fig. 82, p. 175**) permitiu a identificação de um anel aromático *orto*-dissubstituído, devido à presença de um sistema de dois dupletos em δ 7,53 e 7,19 (1H, $J = 7,9$ Hz, H-6 e H-3; não-acoplados) e dois tripletos em δ 7,30 e 6,97 (1H, $J = 7,9$ Hz, H-4 e H-5), um grupo etilênico com estereoquímica *cis* [δ 7,31 e 5,97 (1H, d, $J = 12,5$ Hz, H-7 e H-8)], e um açúcar, justificado pela existência de um conjunto de sinais na faixa de δ 4,94-3,40. Todos acoplamentos ^1H , ^1H foram constatados no espectro de RMN-COSY (**Fig. 83, p. 175**)

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , **Fig. 84, p. 176**) apresentou quinze linhas espectrais, cujos deslocamentos químicos foram muito próximos aos observados para ACPa-7, sendo idênticos os valores atribuídos ao resíduo de glicose: δ 102,7 (C-1'); 78,3 (C-5'); 78,2 (C-3'); 75,0 (C-2'); 71,4 (C-4') e 62,6 (C-6'). As absorções da aglicona foram relacionadas a nove carbonos sp^2 , das quais uma foi atribuída à carbonila de éster ou ácido (δ 170,4, C-9).

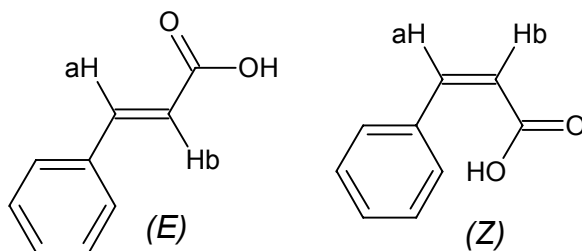
As outras oito absorções foram determinadas utilizando-se o espectro de RMN-HSQC (**Fig. 86, p. 177**), o qual permitiu identificar os quatro carbonos aromáticos hidrogenados, δ 116,6 (C-3); 131,5 (C-4); 122,9 (C-5) e 131,7 (C-6), e os dois carbonos olefinicos, δ 139,7 (C-7) e 121,4 (C-8), a partir das correlações diretas com seus respectivos hidrogênios δ 7,19 (H-3); 7,30 (H-4); 6,97 (H-5); 7,53 (H-6); 7,31 (H-7) e 6,52 (H-8). Os sinais em δ_c 156,7 (C-2) e 126,9 (C-1), desprovidos de correlação, foram atribuídos a carbonos aromáticos não hidrogenados, sendo o mais desprotegido associado a carbono oxigenado (**Tab. 16, p. 174**).

O espectro de RMN-HMBC (**Fig. 87, p. 177**) mostrou as correlações dos sinais de hidrogênios olefinicos em δ 7,31 (H-7) e δ 6,52 (H-8) com o sinal da carbonila em δ 170,4 (C-9), evidenciando a presença de uma carbonila α,β -insaturada. A olefina foi conectada ao anel aromático devido às correlações entre os sinais de hidrogênios olefinicos em δ 7,31 (H-7) e 6,52 (H-8) com os sinais de carbonos aromáticos em δ 126,9 (C-1), 156,7 (C-2) 131,7 (C-

6), e entre o sinal de hidrogênio aromático em δ 7,53 (H-6) e o sinal de carbono olefínico em δ 139,7 (C-7). O acoplamento do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 4,94) com o carbono aromático C-2 (δ_{C} 156,7) revelou a ligação heterosídica entre a glicose e o anel aromático, na posição *orto*.

Em virtude da nítida semelhança encontrada entre os dados espectrais de IV (**Fig. 88, p. 178**) e EM (**Fig. 89, p. 179**), inclusive resultando na mesma fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8$, ACX-1 e ACPa-7 foram considerados estereoisômeros, os quais foram distintos apenas pela configuração da ligação dupla (*E* e *Z*, respectivamente), fornecida pela constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos. Seus espectros de EM apresentam o mesmo padrão de fragmentação e os de IV exibem absorções semelhantes, sendo a identificação por estas técnicas inconclusiva. Comparação com dados de RMN ^{13}C disponíveis da literatura confirmou a proposta estrutural (Vasange et al, 1997)

Os deslocamentos químicos de RMN ^1H dos hidrogênios olefínicos de ACPa-7 e ACX-1, obtidos experimentalmente, foram muito parecidos com os calculados para os estereoisômeros, segundo a equação de predição de Pascual-Meier-Simon: $\delta_{\text{H}} = 5,25 + \delta_{\text{gem}} + \delta_{\text{cis}} + \delta_{\text{trans}}$, adotando-se como substituintes uma carboxila e um grupo fenila. Através desta equação, obteve-se a ratificação de que os hidrogênios olefínicos numa configuração *E* são mais desblindados do que aqueles com estereoquímica *Z*, devido aos menores efeitos estéricos (SILVERSTEIN, 1994).



Isômero (E)

$$\delta_{\text{H}} = 5,25 + \delta_{\text{gem}} + \delta_{\text{cis}} + \delta_{\text{trans}}$$

$$\delta_{\text{Ha}} = 5,25 + 1,35 + 1,35 + 0,0 = \mathbf{7,95}$$

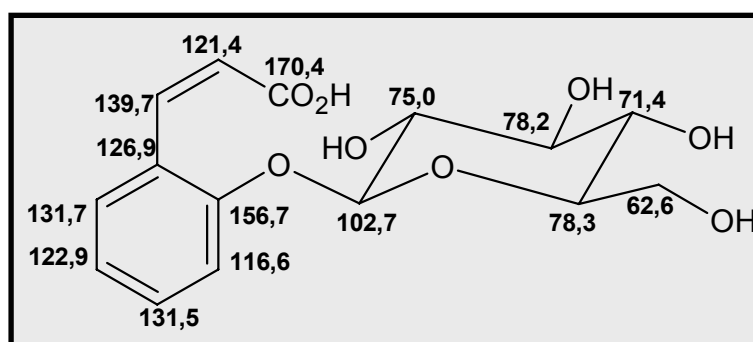
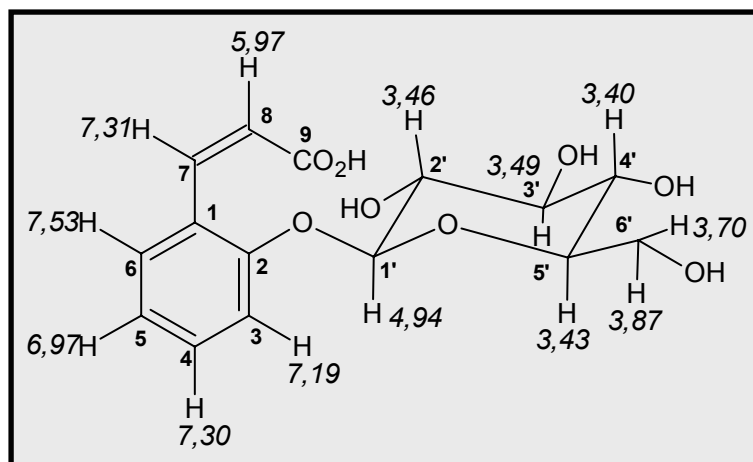
$$\delta_{\text{Hb}} = 5,25 + 1,0 + 0,37 + 0,0 = \mathbf{6,62}$$

Isômero (Z)

$$\delta_{\text{H}} = 5,25 + \delta_{\text{gem}} + \delta_{\text{cis}} + \delta_{\text{trans}}$$

$$\delta_{\text{Ha}} = 5,25 + 1,35 + 0,0 + 0,74 = \mathbf{7,34}$$

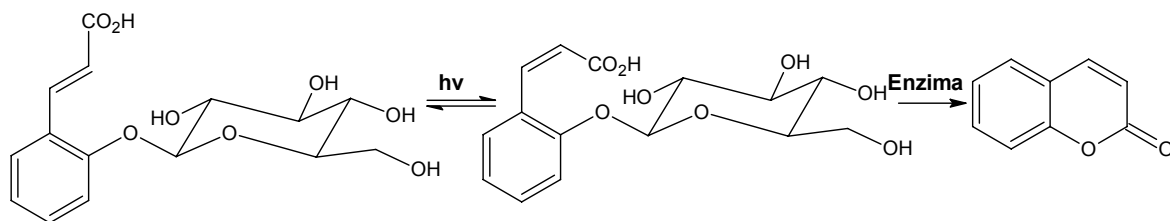
$$\delta_{\text{Hb}} = 5,25 + 1,00 + 0,0 - 0,10 = \mathbf{6,15}$$



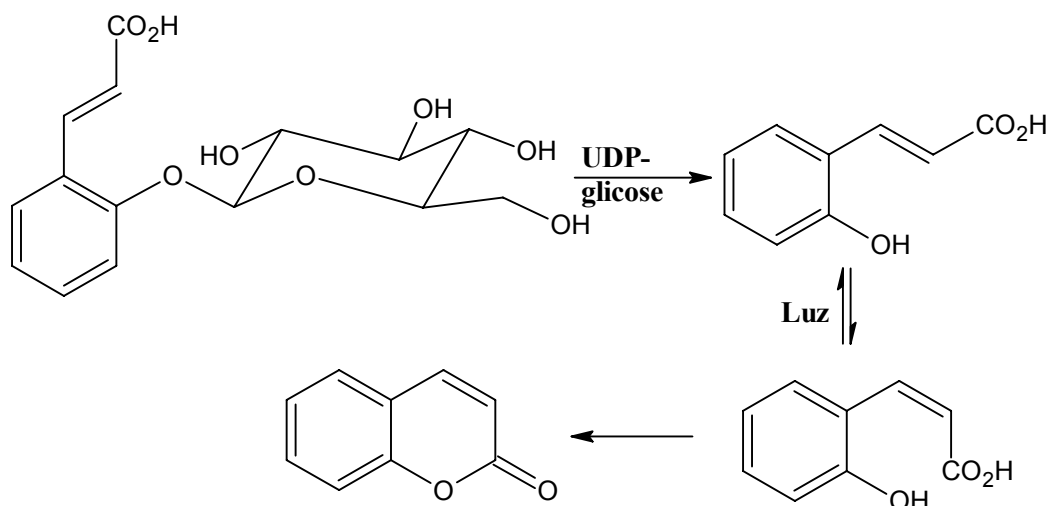
Os estereoisômeros do ácido *o*-cumárico glicosilado são possivelmente os precursores da cumarina, um dos constituintes majoritários de *A. cearensis*. É sabido que ácidos do tipo 2-hidroxi-cinâmico podem sofrer isomerização, ou seja, o estereoisômero (*E*) pode se converter na forma menos estável (*Z*), quando exposto à radiação UV. Embora seja geralmente desfavorável, este processo se desenvolve bem em sistemas completamente conjugados, pois a absorção de energia luminosa pela ligação dupla promove a transição de um elétron do orbital π para um estado de mais alta energia (π^* anti-ligante), transformando-a temporariamente em ligação simples, a qual possui livre rotação, resultando na formação do isômero (*Z*), após dissipação da energia recebida. O isômero (*Z*) pode sofrer uma lactonização enzimática e dar origem à cumarina (DEWICK, 2001).

A biossíntese da cumarina pode ocorrer a partir das agliconas ou dos heterosídeos de ambos os estereoisômeros, porque a lactonização pode ser precedida de hidrólise enzimática do glicosídeo. Em espécies de *Melilotus alba* (Fabaceae) atribui-se a presença de cumarina à hidrólise enzimática seguida de lactonização dos glicosídeos induzidas por danos aos tecidos da planta durante sua coleta e processamento (DEWICK, 2001).

1.



2.



Esquema 1- Biossíntese da cumarina a partir dos estereoisômeros do ácido *o*-cumárico glicosilado.

Tabela 16- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACX-1 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACX-1 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC $^3J/(^4J)$
1	126,9		7,31	6,97; 5,97
2	156,7		7,19	7,53; 7,31; 5,97 (4J); 4,94
3	116,6	7,19 (1H, d, 7,9 Hz)		(7,53); (7,31); 7,30
4	131,5	7,30 (1H, t, 7,9 Hz)	7,19	
5	122,9	6,97 (1H, t, 7,9 Hz)		7,19
6	131,7	7,53 (1H, d, 7,9 Hz)		7,30; (7,19); 6,97; (5,97)
7	139,7	7,31 (1H, d, 12,5 Hz)	5,97	7,53
8	121,4	5,97 (1H, d, 12,5 Hz)	7,31	
9	170,4		5,97	7,31
1'	102,7	4,94 (1H, d, 7,4 Hz)		3,49
2'	75,0	3,49 (1H, m)	4,94	
3'	78,2	3,46 (1H, td)		4,94
4'	71,4	3,40 (1H, m)	3,43	
5'	78,3	3,43 (1H, m)		3,46
6'	62,6	3,87 (1H, d); 3,70 (1H, dd)		

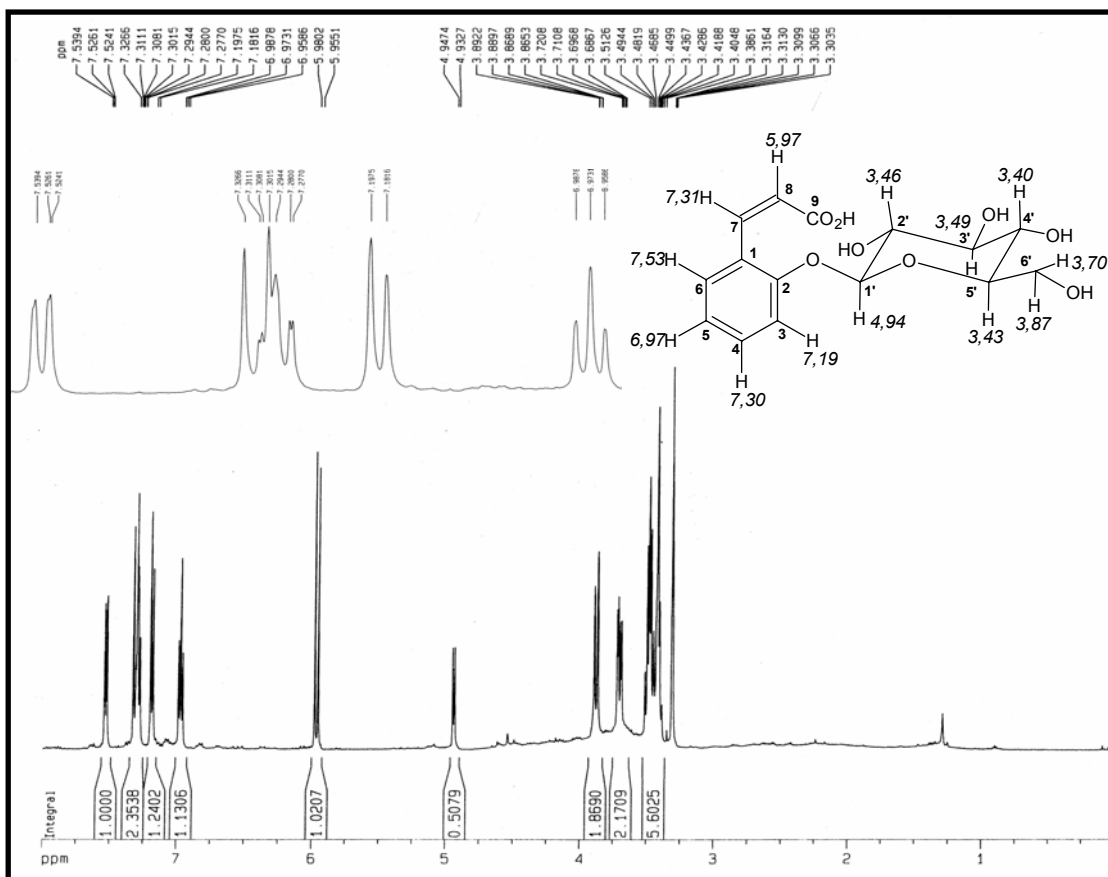


Figura 82- Espectro de RMN ^1H de ACX-1 (CD_3OD , 500 MHz)

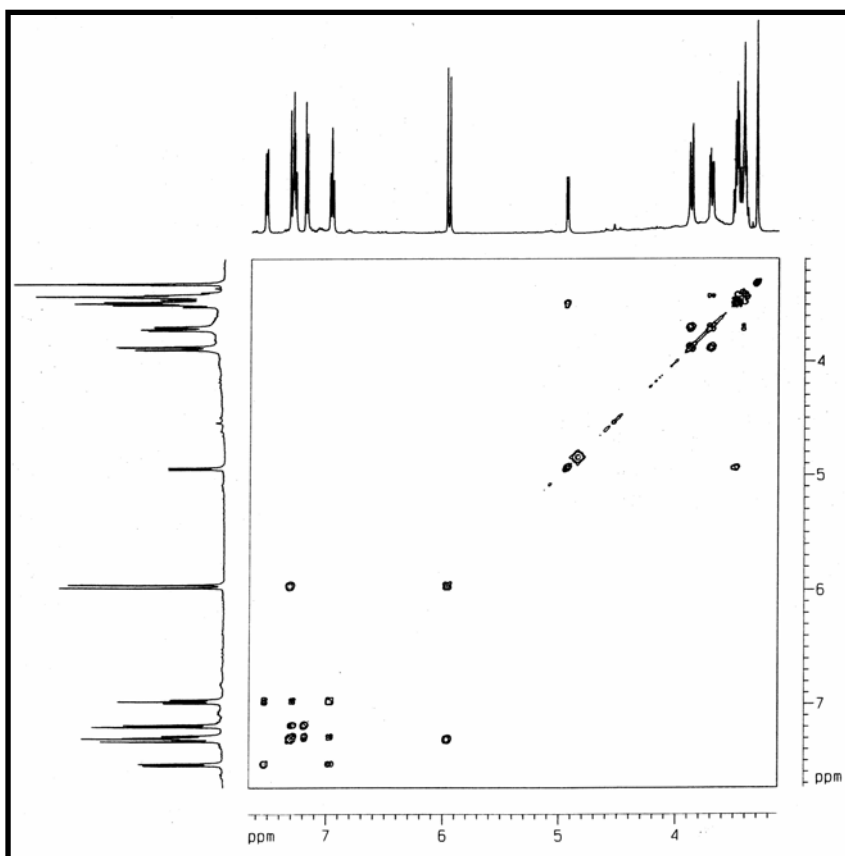


Figura 83- Espectro de RMN-COSY (CD_3OD , 500 x 500 MHz) de ACX-1

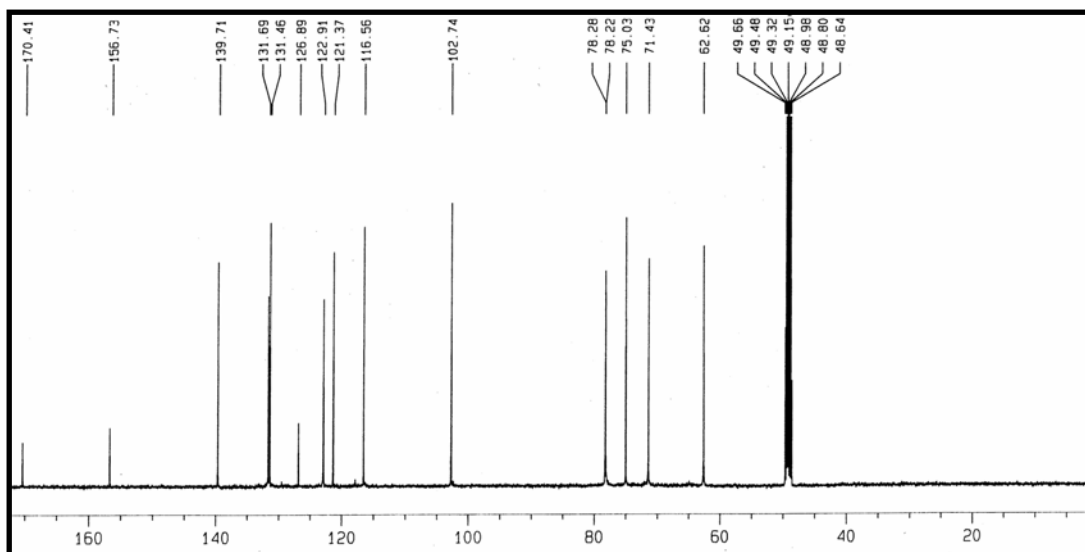


Figura 84- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACX-1 (CD_3OD , 125 MHz)

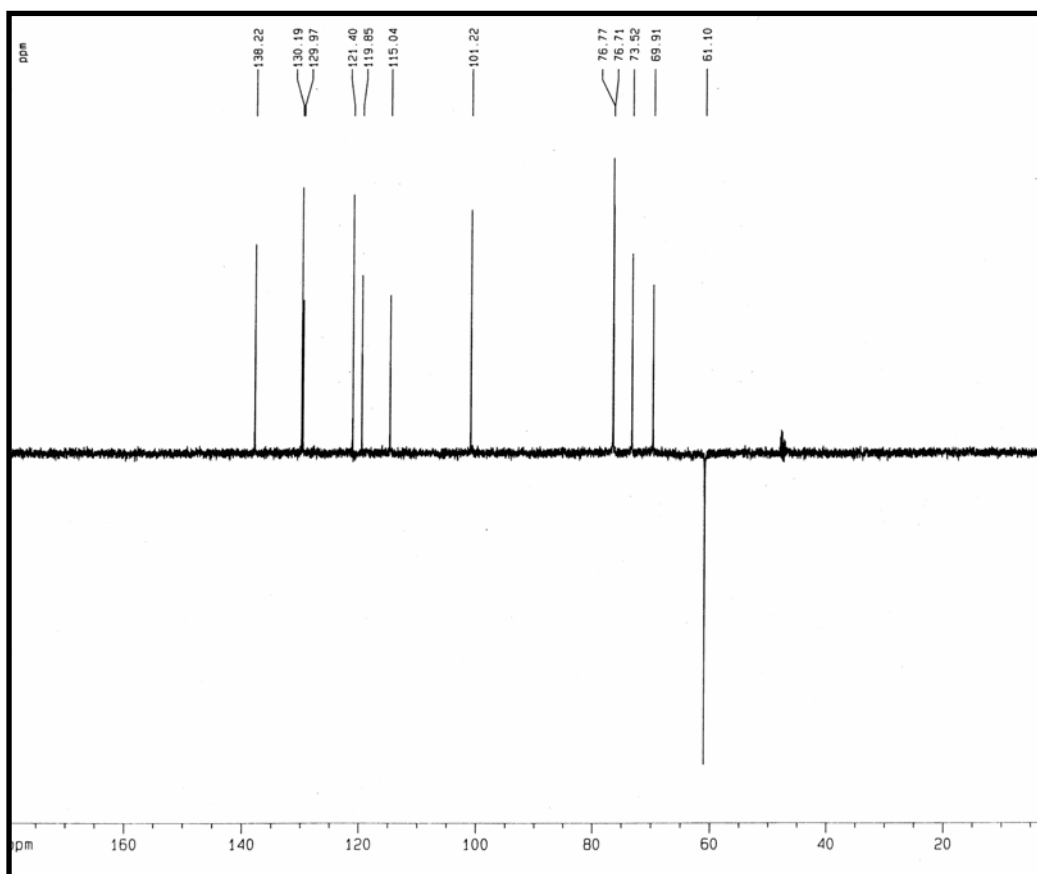


Figura 85- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (CD_3OD , 125 MHz) de ACX-1

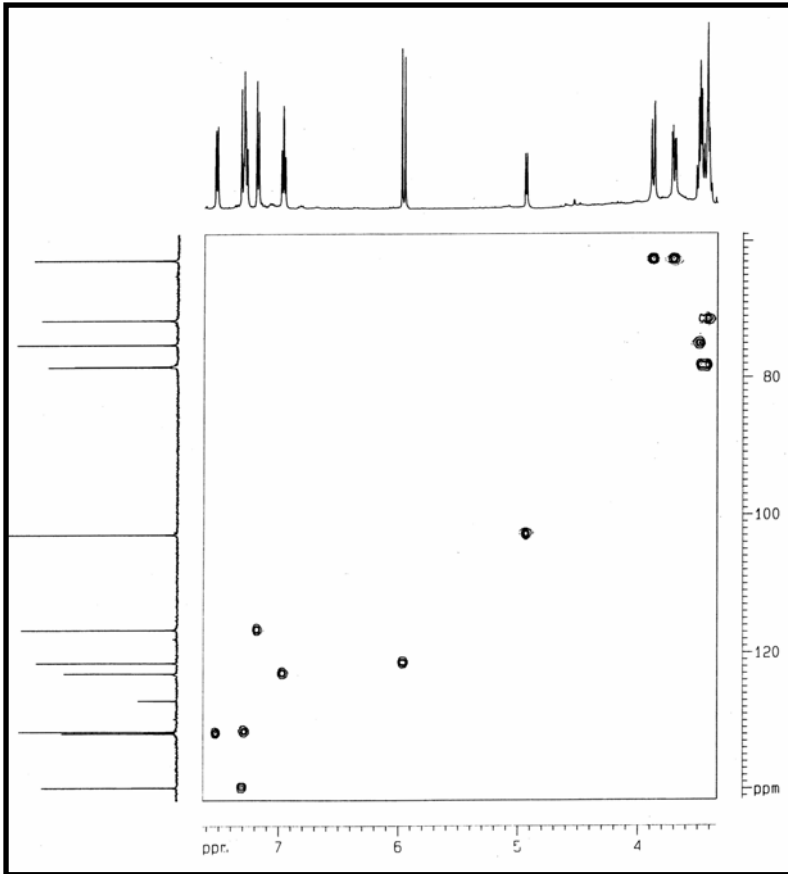


Figura 86- Espectro de RMN-HSQC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACX-1

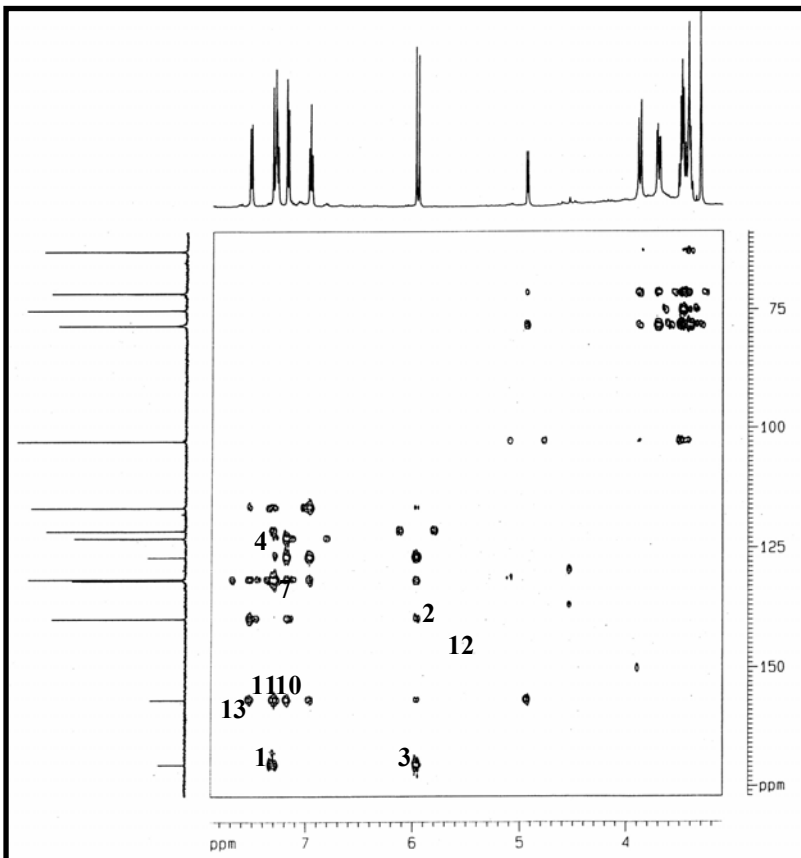


Figura 87- Espectro de RMN-HMBC (CD₃OD, 125 x 500 MHz) de ACX-1

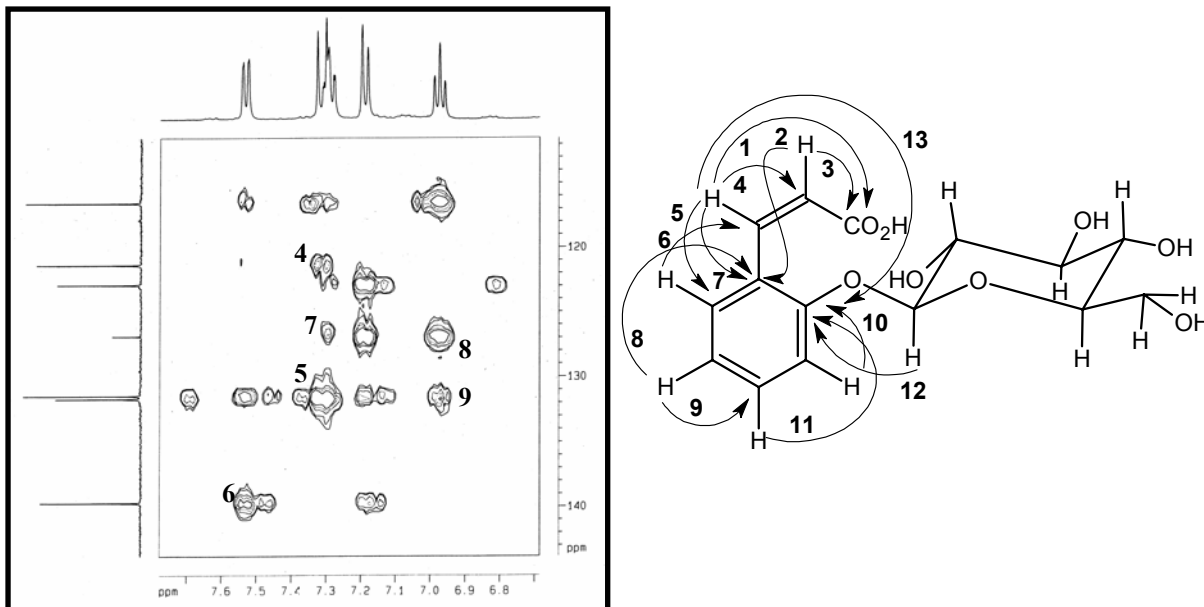


Figura 87a- Expansão do espectro HMBC de ACS-11: (I) δ 6,7-7,8 x 110-145.

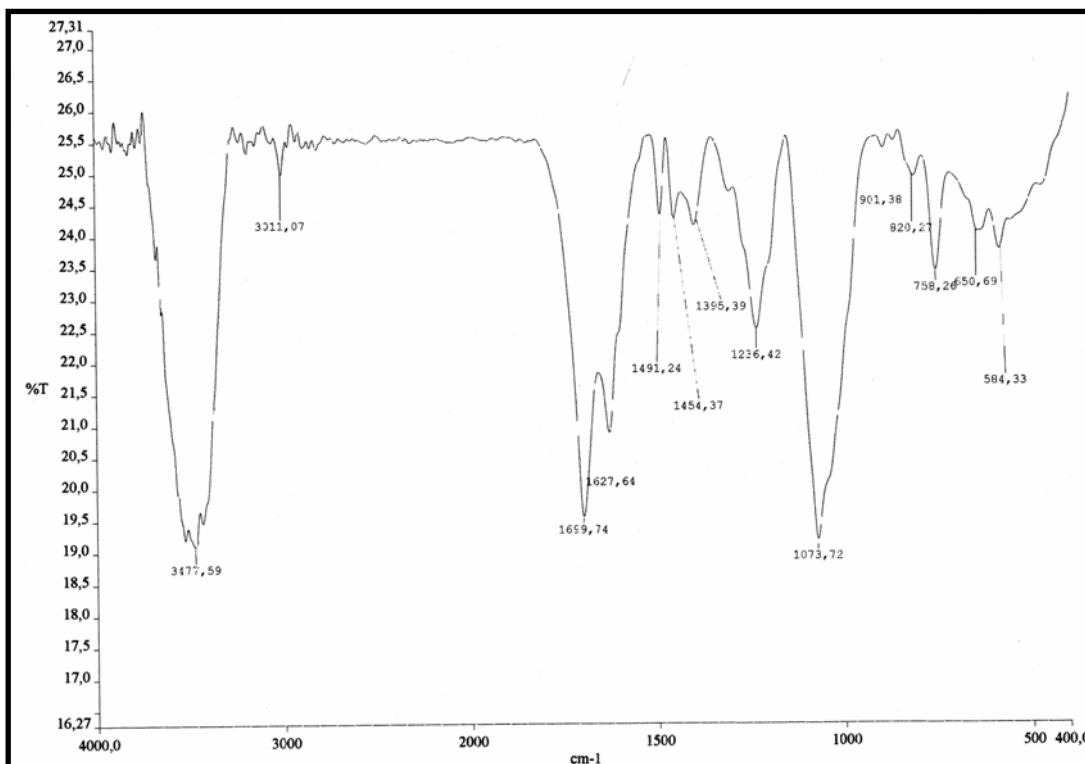


Figura 88- Espectro de absorção na região do infravermelho (pastilha de KBr) de ACX-1

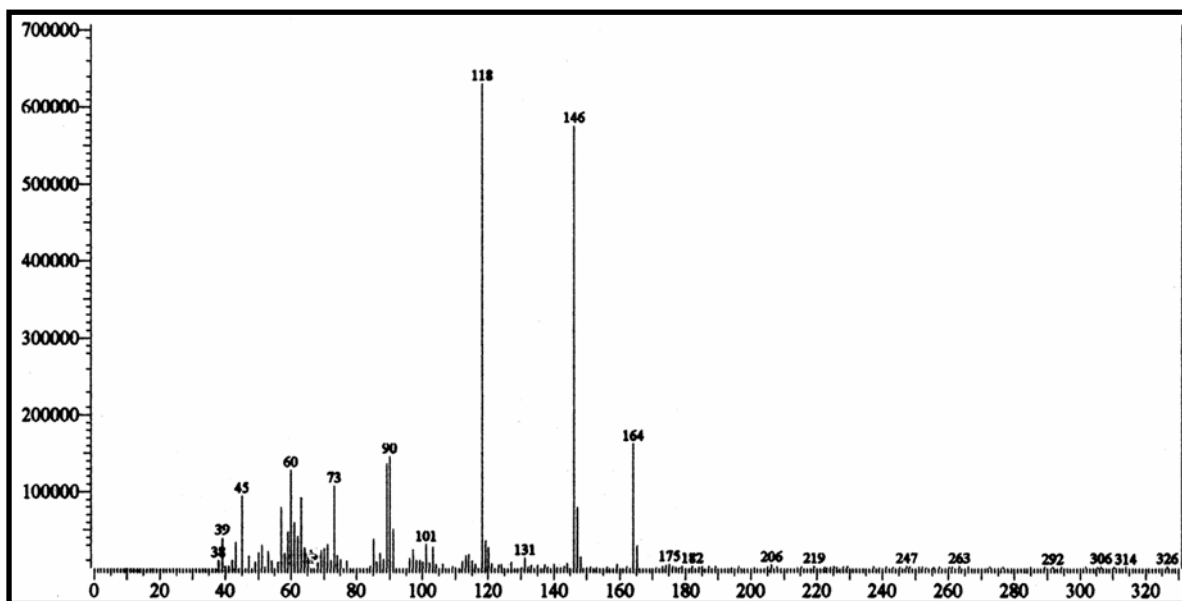


Figura 89- Espectro de massa de ACX-1 (Impacto Eletrônico)

5.13. Formononetina (ACCE-9)

A fração metanólica ACCE₁AM, obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas do caule (ACCE), foi submetida a cromatografias em gel de sílica e Sephadex LH-20, resultando num precipitado amarelado, que ao ser filtrado e tratado com MeOH, converteu-se num sólido branco puro (p.f. 240,2-242,9 °C), chamado de ACCE-9 (ítem 10.1.6.13, p. 281).

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, C₅D₅N, **Fig. 90, p. 183**) de ACCE-9 exibiu catorze linhas espectrais, sendo todas atribuídas a carbonos sp² (δ 176,2; 164,6; 160,5; 159,1; 153,3; 131,3; 128,7; 125,9; 125,1; 118,4; 116,4; 114,7 e 103,6), exceto a absorção em δ 55,7 (4'-OMe), relacionada a carbono sp³ oxigenado. A absorção em δ 176,2 (C-4) foi associada à carbonila de cetona conjugada e os sinais em δ 164,6 (C-7); 160,5 (C-4'); 159,1 (C-9) e 153,3 (C-2) foram associados a carbonos sp² oxigenados.

O espectro RMN ¹³C-DEPT135 de ACCE-9 (125 MHz, C₅D₅N, **Fig. 91, p. 183**) exibiu sete linhas espectrais, das quais seis relacionadas a carbonos mono-hidrogenados (δ 153,3; 131,3; 128,7; 116,4; 114,7 e 103,6) e uma pertencente à metoxila (δ 55,7). Subtração dos espectros de RMN ¹³C-CPD e DEPT135 permitiu a identificação dos carbonos sp² não-hidrogenados e não-funcionalizados: δ 125,9 (C-1'); 125,1 (C-3) e 118,4 (C-10). Considerando-se a existência de 16 carbonos, foi sugerida uma estrutura com esqueleto C₆-C₃-C₆.

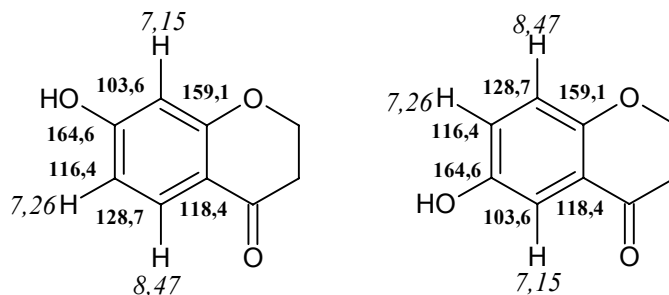
O espectro de RMN ¹H de ACCE-9 (500 MHz, C₅D₅N, **Fig. 92, p. 184**) mostrou um conjunto de sinais em δ 8,47 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-5); 7,26 (1H, dd, J = 8,8 e 2,2 Hz, H-6) e 7,15 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-8), referentes a um sistema aromático de spin ABX, dois dupletos em δ 7,80 e 7,10 (2H, J = 8,8 Hz, H-2',6' e H-3',5'), compatíveis com um sistema aromático de spin AA'BB', um sinal simples e agudo em δ 3,71 (3H, s, 4'-OMe), relacionado a hidrogênios metoxílicos e um singlete em δ 8,18, característico de hidrogênio olefínico de isoflavona.

O espectro de RMN-HSQC (**Fig. 93, p. 185**) reforçou a presença de um anel benzênico *para*-dissubstituído, através das correlações entre os dupletos em δ _H 7,80 (H-2',6') e 7,10 (H-3',5') e as absorções de carbono em δ _C 131,3 (C-2',6') e 114,7 (C-3',5'), justificando a maior intensidade dos seus sinais. A fórmula molecular obtida foi C₁₆H₁₂O₄, compatível com estruturas de isoflavonas dissubstituídas por uma hidroxila e uma metoxila.

A proposta estrutural de uma isoflavona foi justificada pelo acoplamento do hidrogênio olefínico H-2 (δ_H 8,18) com o carbono olefínico oxigenado C-2 (δ_C 153,3), observado no espectro HSQC, mas também pelos acoplamentos à longa distância (espectro HMBC) do mesmo hidrogênio olefínico (H-2) com o carbono olefínico C-3 (δ_C 125,1) e com a carbonila C-4 (δ_C 176,2) (Tab. 17, p. 182).

A metoxila foi posicionada no anel benzênico *para*-dissubstituído devido ao acoplamento 3J , observado no espectro de RMN-HMBC (Fig. 94, p. 186), entre os hidrogênios metoxílicos (δ_H 3,71) e o carbono aromático C-4' (δ_C 160,5).

Quanto ao posicionamento da hidroxila no anel A (trissubstituído), ela poderia ocupar as posições 6 ou 7, pois em ambas as proposições, o padrão de multiplicidade dos sinais de hidrogênio seria mantido.



No entanto, o acoplamento registrado no espectro HMBC, entre o hidrogênio aromático H-5 (δ_H 8,47) e a carbonila C-4 (δ_C 176,2), foi determinante para a definição da posição da hidroxila, no carbono C-7. Além disso, a absorção em δ_C 103,6 (C-8) é perfeitamente compatível com o deslocamento químico de um carbono posicionado entre dois carbonos aromáticos oxigenados, em virtude da significativa blindagem oferecida pelo efeito mesomérico doador dos oxigênios, *orto* a este carbono (FRIEBOLIN, 1991).

A formononetina é um conhecido fitoestrógeno encontrado na soja, sendo apontada como um de seus componentes alergênicos (PARK et al., 2005). Além disso, exibe atividade giardicida *in vitro* cinco vezes mais potente do que a do metronidazol, umas das drogas-referência (KHAN et al, 2000).

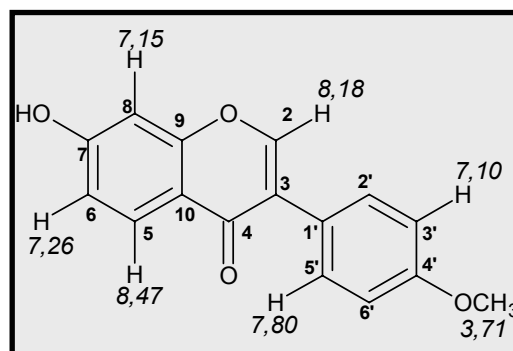
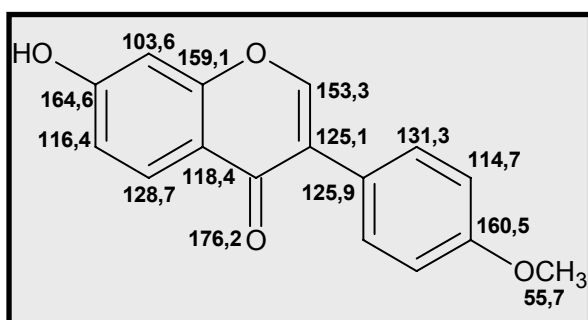


Tabela 17- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-9 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de formononetina, registrados na literatura (JHA et al., 1980).

# C	Formonetina δ_{C} (ppm) CDCl ₃ /DMSO	ACCE-9 δ_{C} (ppm) C ₅ D ₅ N	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
2	152,7	153,3	8,18 (1H, s)		
3	123,6	125,1		8,18	
4	174,9	176,2			8,47; 8,18
5	127,3	128,7	8,47 (1H, d, 8,8 Hz)		
6	115,1	116,4	7,26 (1H, dd, 8,8 Hz e 2,2)		7,15
7	162,7	164,6			8,47
8	102,2	103,6	7,15 (1H, d, 2,2 Hz)		7,26
9	157,7	159,1		7,15	8,47; 8,18
10	116,8	118,4			7,15
1'	124,4	125,9			8,18; 7,10
2',6'	130,0	131,3	7,80 (2H, d, 8,8 Hz)		
3',5'	113,6	114,7	7,10 (2H, d, 8,8 Hz)		
4'	159,1	160,5		7,10	7,80; 3,71
4'-OMe	-	55,7	3,71 (3H, s)		

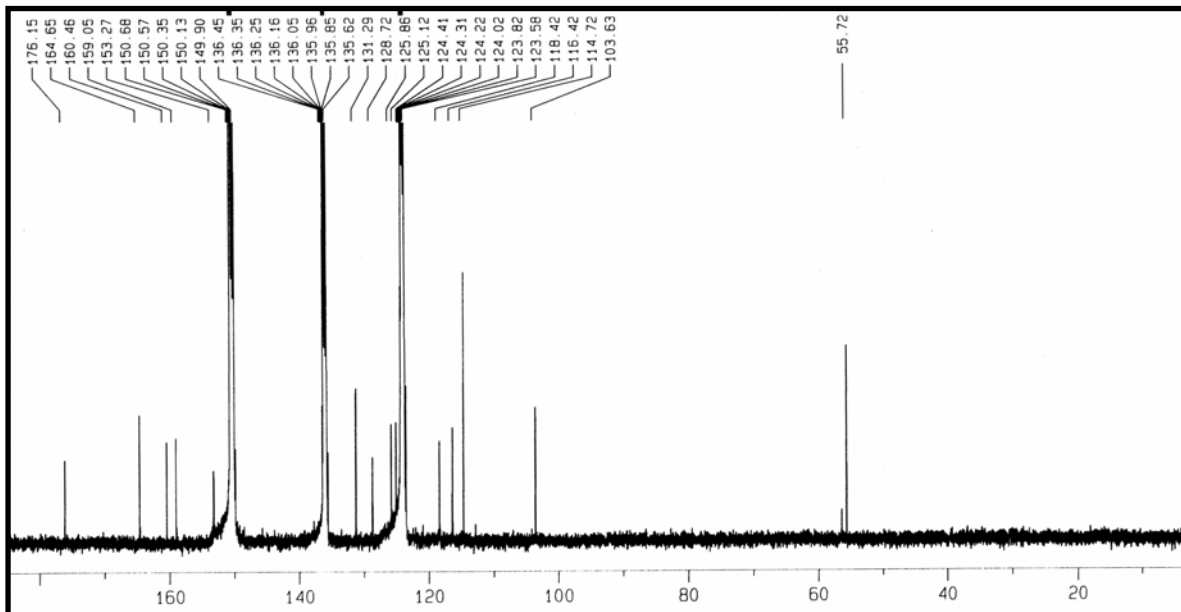


Figura 90- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-9 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

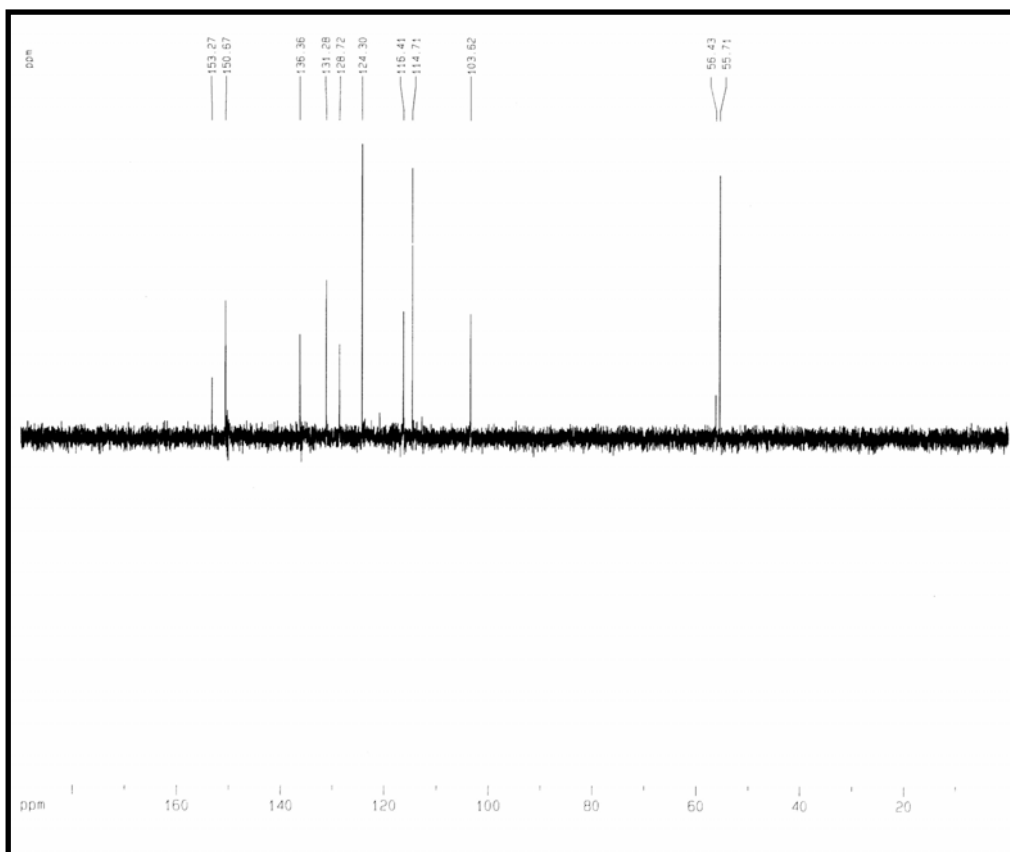


Figura 91- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de de ACCE-9 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

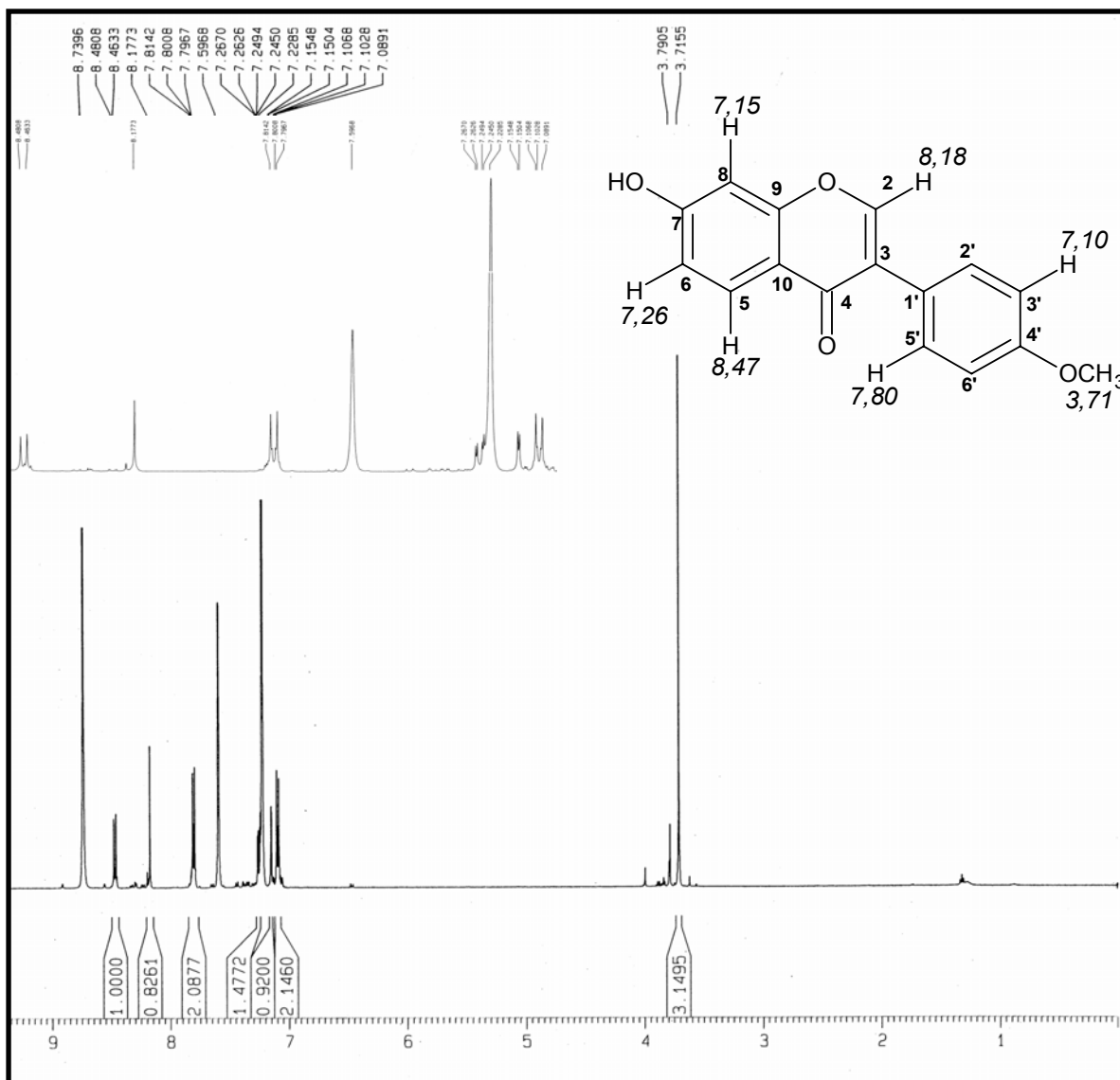


Figura 92- Espectro de RMN ^1H de ACCE-9 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

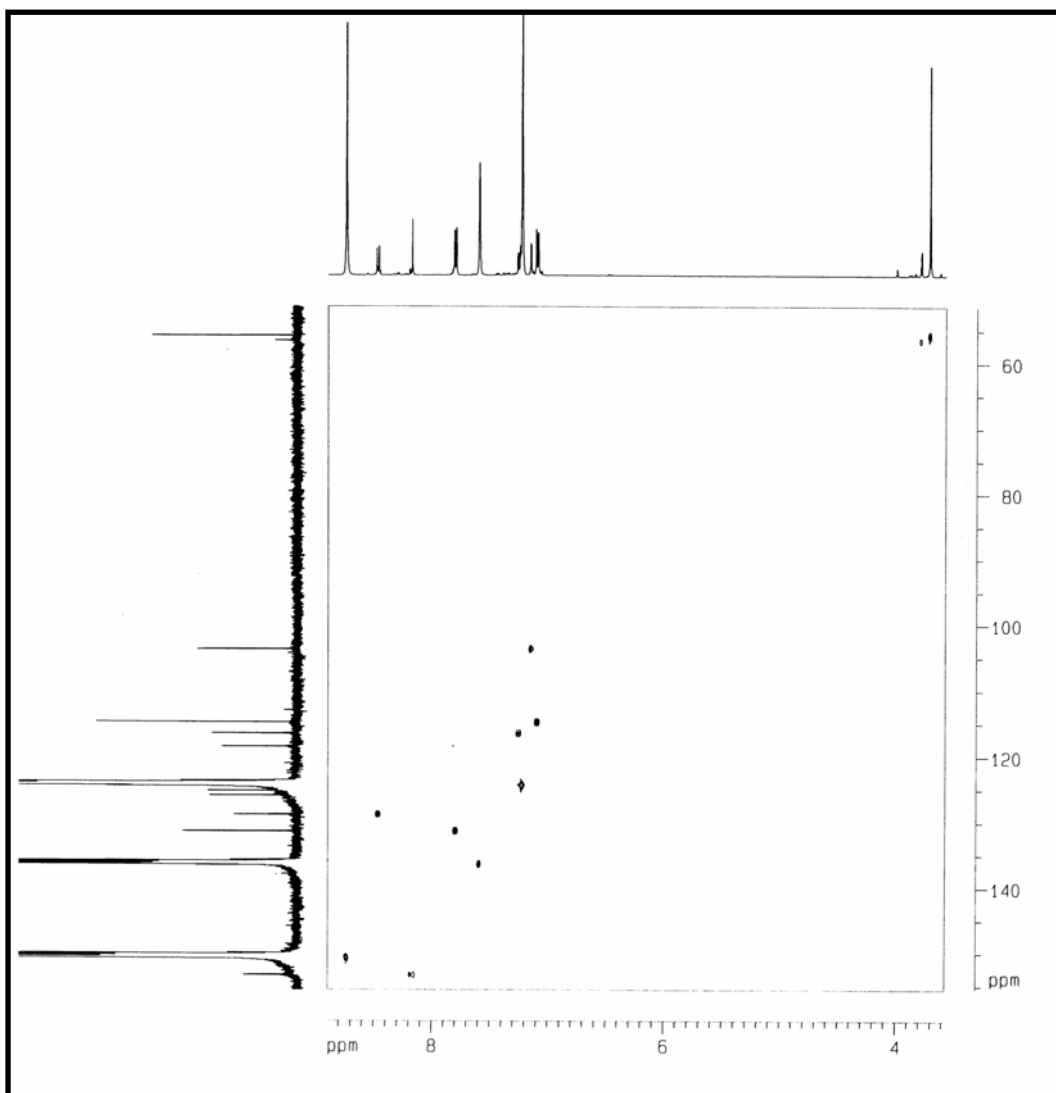


Figura 93- Espectro de RMN-HSQC (C_5D_5N , 125 x 500 MHz) de ACCE-9

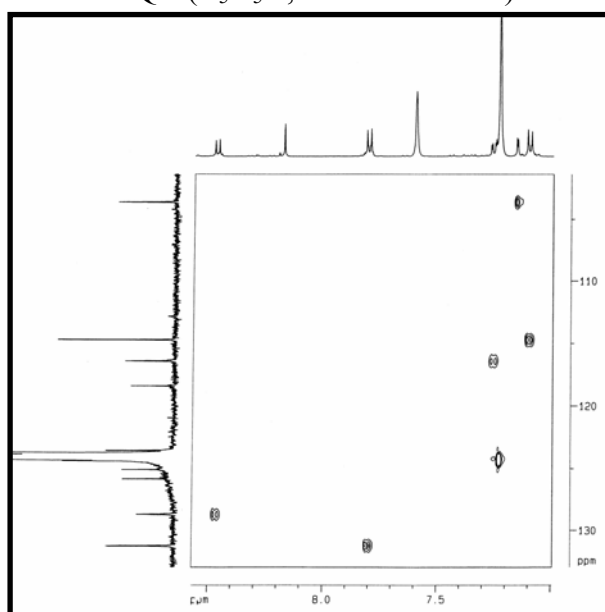


Figura 93a- Expansão do espectro HSQC de ACCE-9: δ 7,0-8,5 x 100-133

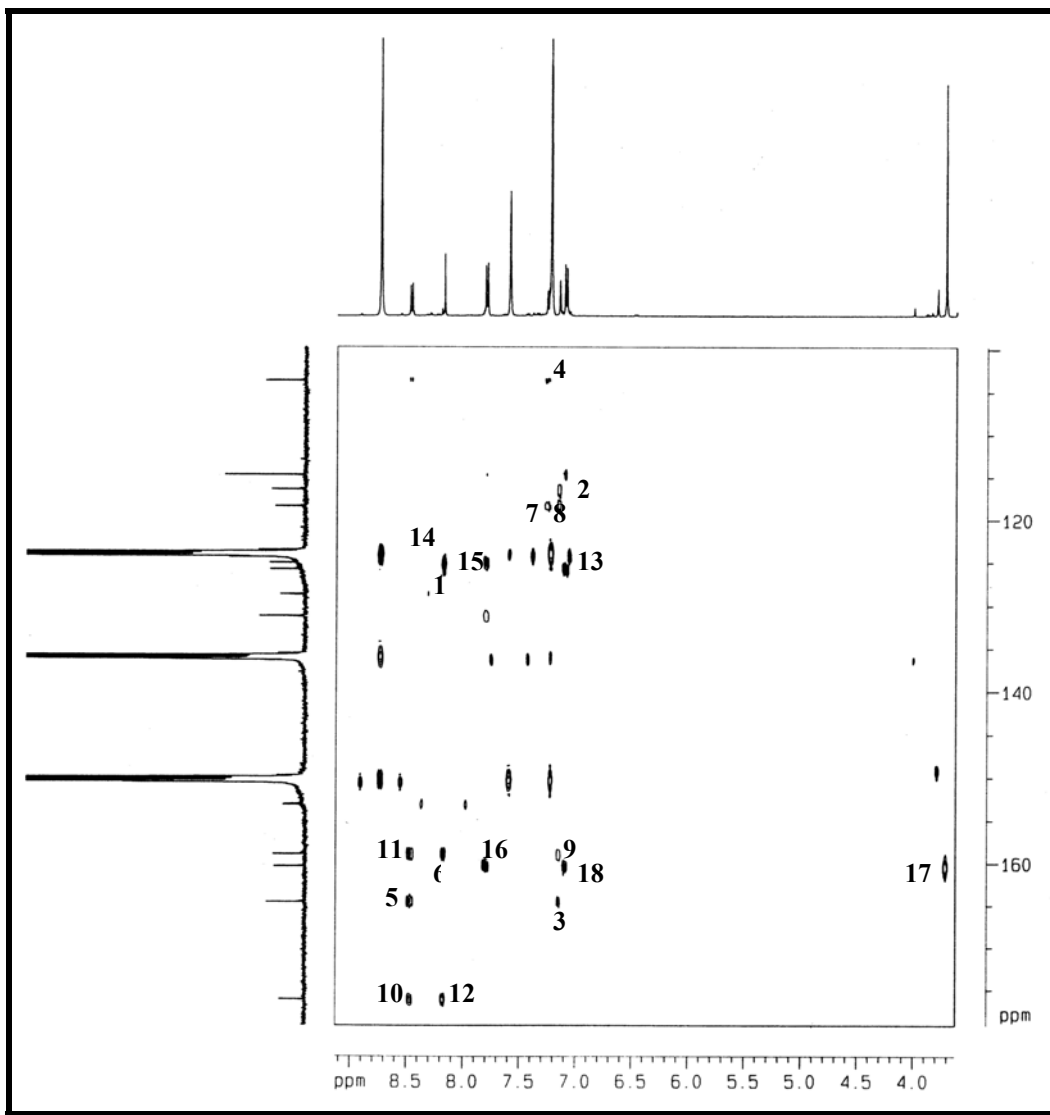
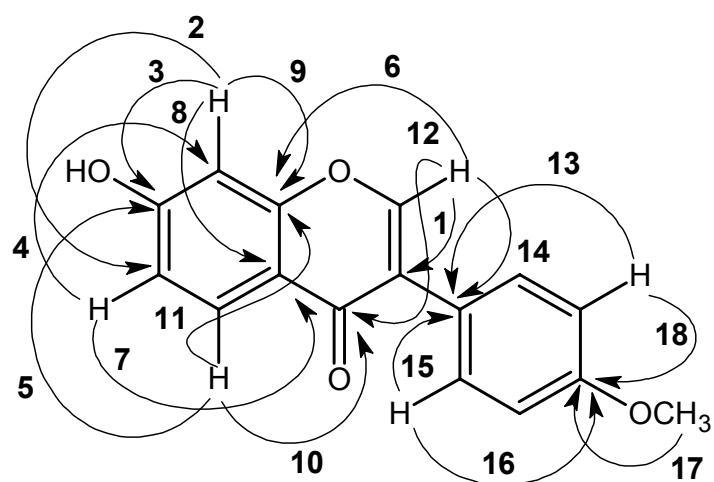


Figura 94- Espectro de RMN-HMBC (C_5D_5N , 125 x 500 MHz) de ACCE-9



5.14. Aiapina (ACPa-4)

Cromatografias em gel de sílica e Sephadex LH-20 permitiram a obtenção de cristais incolores (62,5 mg; p.f. 221-224 °C), denominados ACPa-4 (**ítem 10.1.8.8, p. 295**), a partir da fração acetato de etila (E7- ACPaA), resultante da partição H₂O/AcOEt do extrato etanólico da parte aérea de espécimens jovens.

Submetido à análise espectroscópica na região do infravermelho (**Fig. 95, p. 189**), ACPa-4 exibiu bandas esqueléticas em 1682, 1579 e 1498 cm⁻¹, referentes a deformações axiais C=C_{arom}, absorções em 1256 e 1224 cm⁻¹, associadas a deformações axiais C-O, bandas em 940, 881 e 836 cm⁻¹, relacionadas a deformações angulares C_{arom}-H. Absorção em 1705 cm⁻¹ foi atribuída a uma deformação axial C=O, característica de carbonila conjugada.

O espectro de RMN ¹H de ACPa-4 (500 MHz, CDCl₃, **Fig. 96, p. 189**) exibiu um par de dupletos em δ 7,58 e 6,28 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4 e H-3), associados a hidrogênios olefínicos com configuração *cis*, característicos de compostos cumarínicos, dois singletos, coincidentes, em δ 6,83 (2H, s, H-5 e H-8), relacionados a hidrogênios aromáticos isolados e um singletto em δ 6,08 (2H, s, 6,7-OCH₂O), atribuído à presença de um grupo metilenodioxi.

No espectro de RMN ¹³C-CPD de ACPa-4 (125 MHz, CDCl₃, **Fig. 97, p. 190**) foram visualizados dez sinais, dos quais um foi compatível com carbonila de lactona α,β -insaturada (δ 161,4, C-2), três foram atribuídos a carbonos aromáticos oxigenados, δ 151,5 (C-7); 151,5 (C-10) e 145,1 (C-6) e dois foram relacionados a carbonos olefínicos, δ 143,7 (C-4) e 113,6 (C-3). Tendo em vista que a absorção em δ 102,6 (6,7-OCH₂O) foi a única com amplitude negativa, no espectro de RMN ¹³C-DEPT135 de ACPa-4 (125 MHz, CDCl₃, **Fig. 98, p. 190**), este sinal foi atribuído ao carbono metilênico dioxigenado, enquanto que as linhas espectrais em δ 105,2 (C-5) e 98,6 (C-8) foram associadas a carbonos aromáticos hidrogenados. O sinal de carbono em δ 112,9 (C-9), presente apenas no espectro CPD, foi relacionado a um carbono aromático não-hidrogenado.

O espectro de massa (**Fig. 99, p. 191**) forneceu o pico íon molecular com m/z 190, a partir da qual se deduziu a fórmula molecular obtida C₁₀H₆O₄, correspondente à estrutura de uma cumarina dissustituída por um grupo metilenodioxi, nas posições 6 e 7, devido à ausência de acoplamento entre os hidrogênios aromáticos. As atribuições dos sinais δ_c 105,2 (C-5) e 98,6 (C-8) foram baseadas na análise dos efeitos eletrônicos dos substituintes do anel benzênico, os quais exercem uma maior blindagem no carbono localizado entre dois átomos

de oxigênio (C-8). Comparação com dados de RMN, já publicados para a cumarina aiapina (lit. 221-223 °C), confirmou a estrutura proposta (DEBENEDETTI et al., 1998) (**Tab. 18**).

Isolada pela primeira vez de *Eupatorium ayapana* (Asteraceae), a aiapina já foi também descrita em outras espécies da mesma família (*Helianthus annuus*, *Artemisia apiacea*, *Pterocaulon virgatum* e *P. polystachyum*) (MAES et al., 2005), sendo considerada uma fitoalexina em razão de sua propriedade fungitóxica (PRATS et al., 2006).

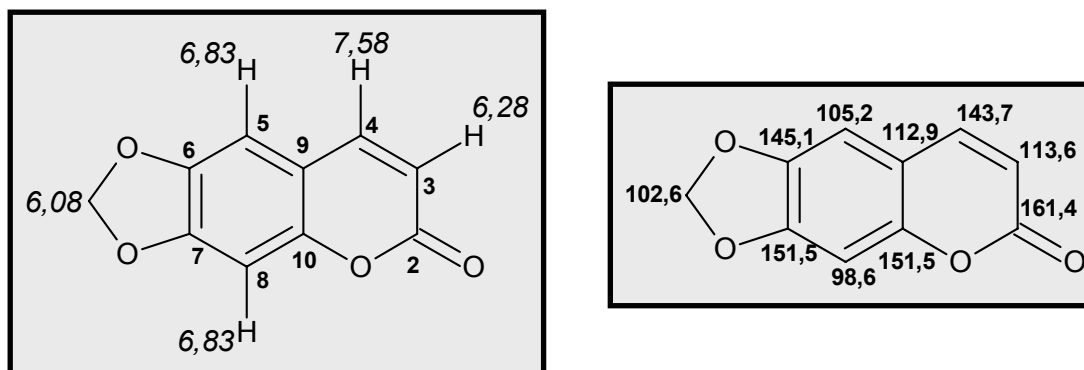


Tabela 18- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACPa-4 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de aiapina, registrados na literatura (DEBENEDETTI et al., 1998).

# C	Aiapina δ_{C} (ppm) CDCl_3	ACPa-4 δ_{C} (ppm) CDCl_3	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)
2	161,2	161,4	
3	113,4	113,6	6,28 (1H,d, 9,5 Hz)
4	143,4	143,7	7,58 (1H,d, 9,5 Hz)
5	105,0	105,2	6,83 (1H, s)
6	143,4	145,1	
7	151,3	151,5	
8	98,4	98,6	6,83 (1H, s)
9	112,7	112,9	
10	149,4	151,5	
6,7-OCH ₂ O	102,3	102,6	6,08 (2H, s)

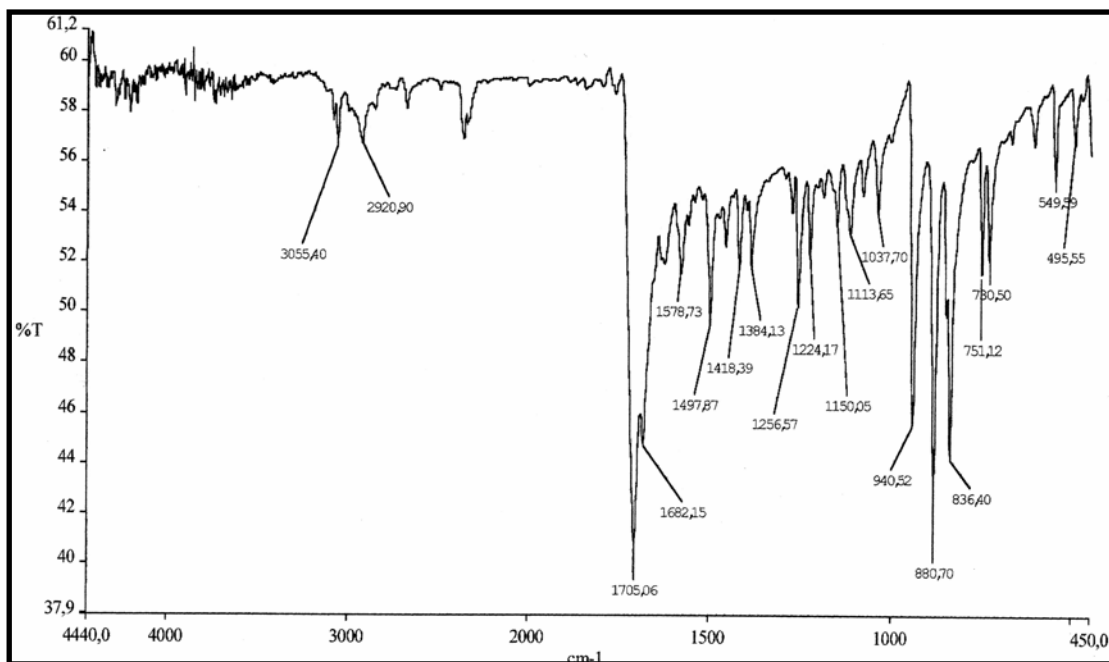


Figura 95- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACPa-4 (pastilha de KBr)

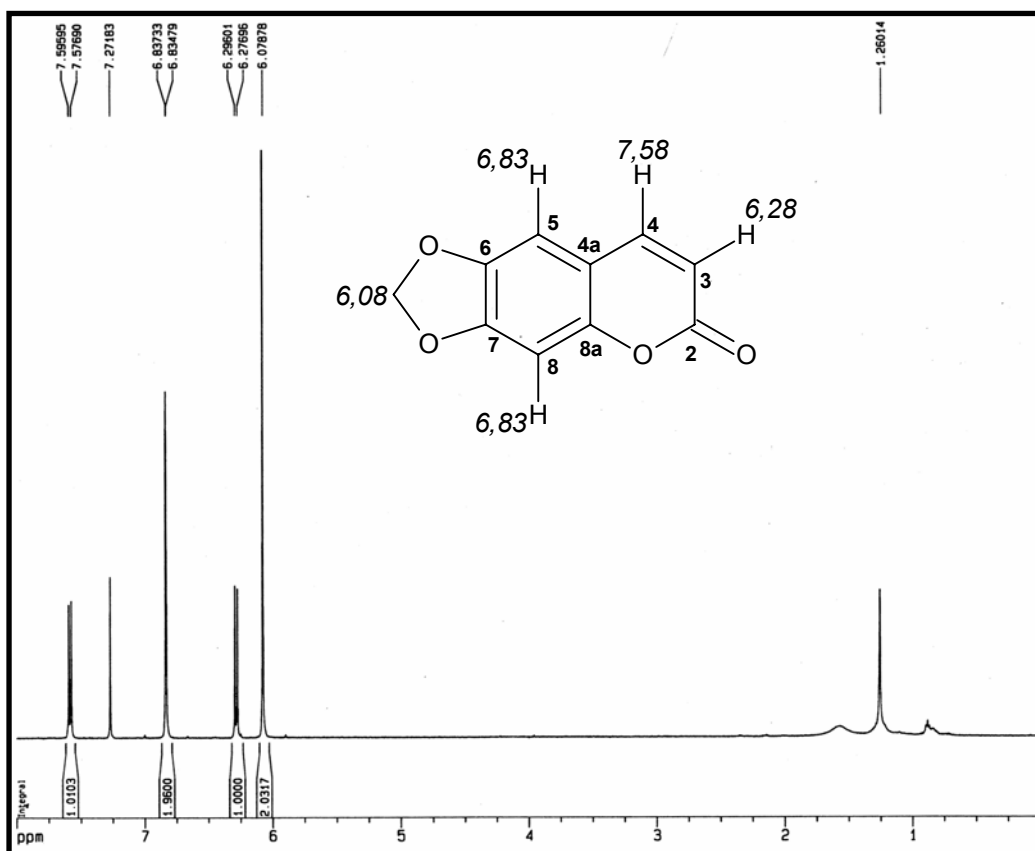


Figura 96- Espectro de RMN ^1H de ACPa-4 (CDCl_3 , 500 MHz)

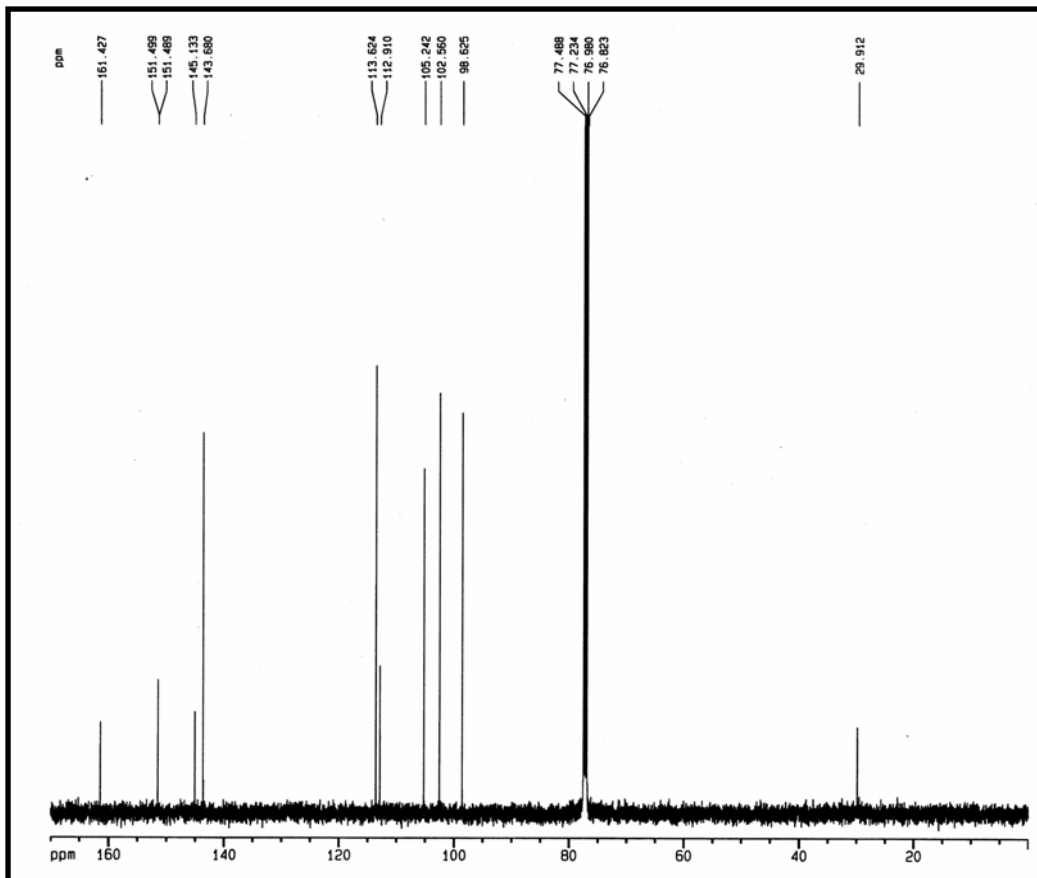


Figura 97- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACPa-4 (CDCl_3 , 125 MHz)

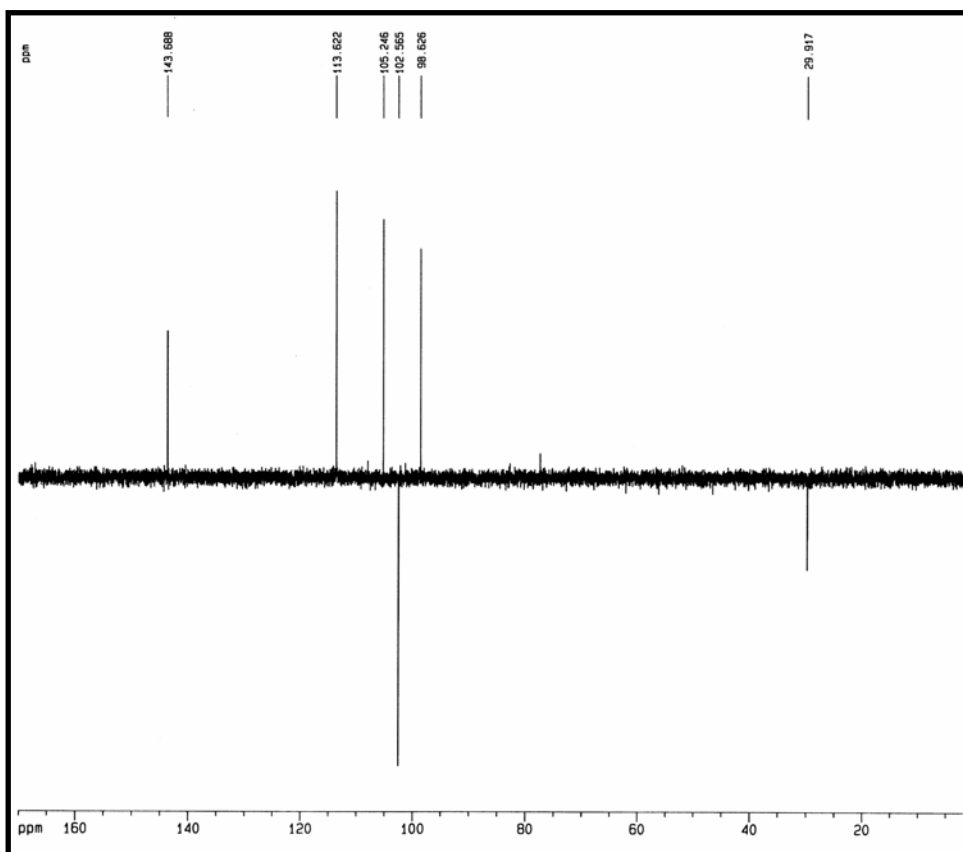


Figura 98- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-4 (CDCl_3 , 125 MHz)

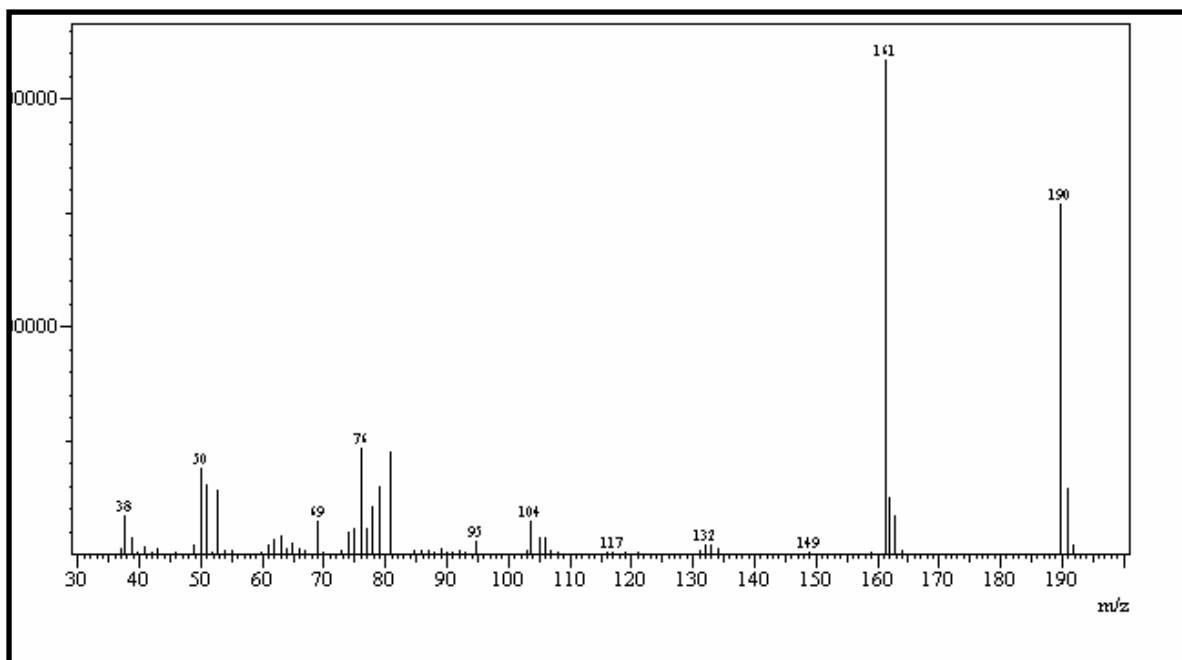


Figura 99- Espectro de massa de ACPa-4 (Impacto Eletrônico)

5.15. 6-hidroxi-cumarina (ACS-5)

ACS-5, um sólido branco (5 mg; pf. 221,7-222,9 °C, $t_R = 10,30$ min), foi isolado através de separação em HPLC da fração acetato de etila (ACSEA) do extrato etanólico das sementes (ítem 10.1.7.6, p. 285), previamente cromatografada em Sephadex LH-20 e gel de sílica.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3 , Fig. 100, p. 195) de ACS-5 exibiu um sistema de spin ABX [δ 7,19 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-8); 7,10 (1H, dd, $J = 8,9$ e 2,7 Hz, H-7) e 7,06 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H-5)] e um par de dupletos em δ 7,86 e 6,36 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4 e H-3), associados a hidrogênios olefínicos com estereoquímica *cis*, característicos de compostos cumarínicos.

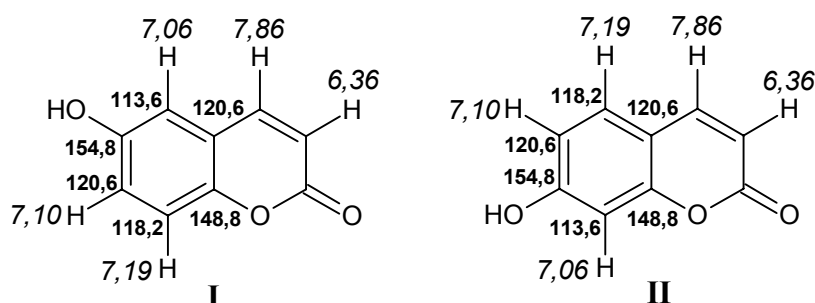
No espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-5 (125 MHz, CD_3COCD_3 , Fig. 101, p. 195) foram observados nove sinais, dos quais um foi compatível com carbonila de lactona α,β -insaturada (δ 161,0, C-2) e dois foram atribuídos a carbonos aromáticos oxigenados (δ 154,8, C-6 e 148,8, C-10). No espectro RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, CD_3COCD_3 , Fig. 102, p. 196), os cinco sinais existentes foram referentes a carbonos sp^2 monohidrogenados: δ 144,4 (C-4); 120,6 (C-7); 118,2 (C-8); 117,6 (C-3) e 113,6 (C-5). Comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT135 permitiu relacionar a outra absorção em δ 120,6 (C-9) a carbono não-hidrogenado e não-funcionalizado.

O espectro de RMN-HSQC (Fig. 103, p. 196) revelou as absorções correspondentes à olefina, através dos acoplamentos entre os dupletos em δ_H 7,86 (H-4) e 6,36 (H-3) com os sinais de carbono em δ_C 144,4 (H-4) e 117,6 (H-3), respectivamente. Além disso, os sinais de carbonos aromáticos em δ_C 120,6 (H-7); 118,2 (H-8) e 113,6 (H-5) foram correlacionados com seus respectivos sinais de hidrogênio em δ_H 7,10 (H-7); 7,19 (H-8) e 7,06 (H-5) (Tab. 19, p. 194).

Segundo o espectro de massa (EM-IE, Fig. 104, p. 197), ACS-5 possui uma massa molecular de 162 Da, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$ correspondendo à estrutura de uma cumarina monohidroxilada, na posição 6 ou 7 (umbeliferona), em virtude da presença de um sistema ABX. Além do pico íon-molecular (m/z 162), somente um fragmento com m/z 134, resultante da descarboxilação cumarínica, pareceu significativo.

O espectro de RMN-HMBC (Fig. 105, p. 197) exibiu as correlações do sinal de hidrogênio em δ 7,86 (H-4) com o sinal de carbono em δ 113,6 (C-5, 3J) e o acoplamento do

duplo duplete em δ 7,10 (H-7) com o sinal de carbono em δ 148,8 (C-10, 3J), justificando a escolha pela proposta I, em detrimento da proposta II cujos acoplamentos seriam ambos hipoteticamente 4J . Ainda que acoplamentos em “W” sejam observados em compostos cumarínicos. Além disso, absorções em torno de δ_C 162-163 e δ_C 102-103, ausentes no espectro de ACS-5, são características para os carbonos C-7 e C-8, respectivamente, em derivados da umbeliferona. No carbono oxigenado há uma desblindagem adicional devido à conjugação com a carbonila, enquanto que no outro carbono, a proteção ocorre em virtude do forte efeito mesomérico doador exercido pelos átomos de oxigênio *orto* a este carbono (POUCHERT, 1993). O espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3COCD_3 , **Fig. 106, p. 198**) de uma amostra autêntica de umbeliferona ratifica estas inferências.



Em termos cromatográficos, a 6-hidroxi-cumarina também apresenta comportamento diferente da umbeliferona (lit. 230-233 °C), conforme pode ser constatado pelos tempos de retenção nos respectivos cromatogramas de HPLC (**Fig. 107 e 108, p.198**): 11,7 e 13,10 min.

6-hidroxi-cumarina já foi isolada da parte aérea de *Bidens parviflora*-Asteraceae (TOMMASI et al., 1992), das raízes de *Paeonia suffruticosa*- Paeoniaceae (Wu et al., 2002) e *Hydrangea chinensis*-Hydrangeaceae (KHALIL et al, 2003), nesta última espécie foi identificada também umbeliferona, nas folhas (**Tab. 19, p. 194**).

Biossinteticamente, as substituições em cumarinas (incluindo hidroxilação) ocorrem preferencialmente na posição 7, resultando na formação da umbeliferona, devido ao precursor comum a esta classe de compostos: o ácido *p*-cumárico, gerado a partir da desaminação da tirosina ou hidroxilação do ácido cinâmico (ROBBERS, 1997).

Embora as cumarinas 6-monoxigenadas sejam raras na natureza, sendo a ocorrência delas restritas a um reduzido número de espécies, os dados espectroscópicos obtidos forneceram evidências incontestáveis de sua existência, mesmo levando a uma proposta estrutural contraditória à preconizada pela teoria biogenética.

Tabela 19- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-5 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de 6-hidroxi-cumarina, registrados na literatura (GOTTLIEB, 1979).

# C	6-OH-cum δ_{C} (ppm) CD_3COCD_3	ACS-5 δ_{C} (ppm) CD_3COCD_3	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
2	162,7	161,0		6,36	7,86
3	116,5	117,6	6,36 (1H, d, 9,6 Hz)	7,86	
4	144,7	144,4	7,86 (1H, d, 9,6 Hz)		7,06
5	112,8	113,6	7,06 (1H, d, 2,7 Hz)		7,86; 7,10
6	154,4	154,8		7,06	7,19
7	120,7	120,6	7,10 (1H, dd, 8,9 e 2,7 Hz)		7,19; 7,06
8	117,9	118,2	7,19 (1H, d, 8,9 Hz)		
9	119,9	120,6		7,06	6,36
10	147,9	148,8			7,86; 7,19; 7,10; 7,06

Tabela 20- Comparação dos dados de RMN ^{13}C de ACS-5 com dois registros de deslocamentos químicos de ^{13}C de 6-hidroxi-cumarina, encontrados na literatura (GOTTLIEB, 1979 e KHALIL et al., 2003).

# C	6-hidroxi-cumarina* δ_{C} (ppm) $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ (2:1)	ACS-5 δ_{C} (ppm) CD_3COCD_3	6-hidroxi-cumarina* δ_{C} (ppm) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	Umbeliferona δ_{C} (ppm) CD_3COCD_3
2	162,7	161,0	160,6	161,2
3	116,5	117,6	115,4	112,9
4	144,7	144,4	144,2	144,8
5	112,8	113,6	112,3	130,5
6	154,4	154,8	154,5	113,9
7	120,7	120,6	119,8	162,1
8	117,9	118,2	117,2	103,4
9	119,9	120,6	120,2	113,0
10	147,9	148,8	147,8	157,1

* GOTTLIEB, 1979. *KHALIL et al., 2003

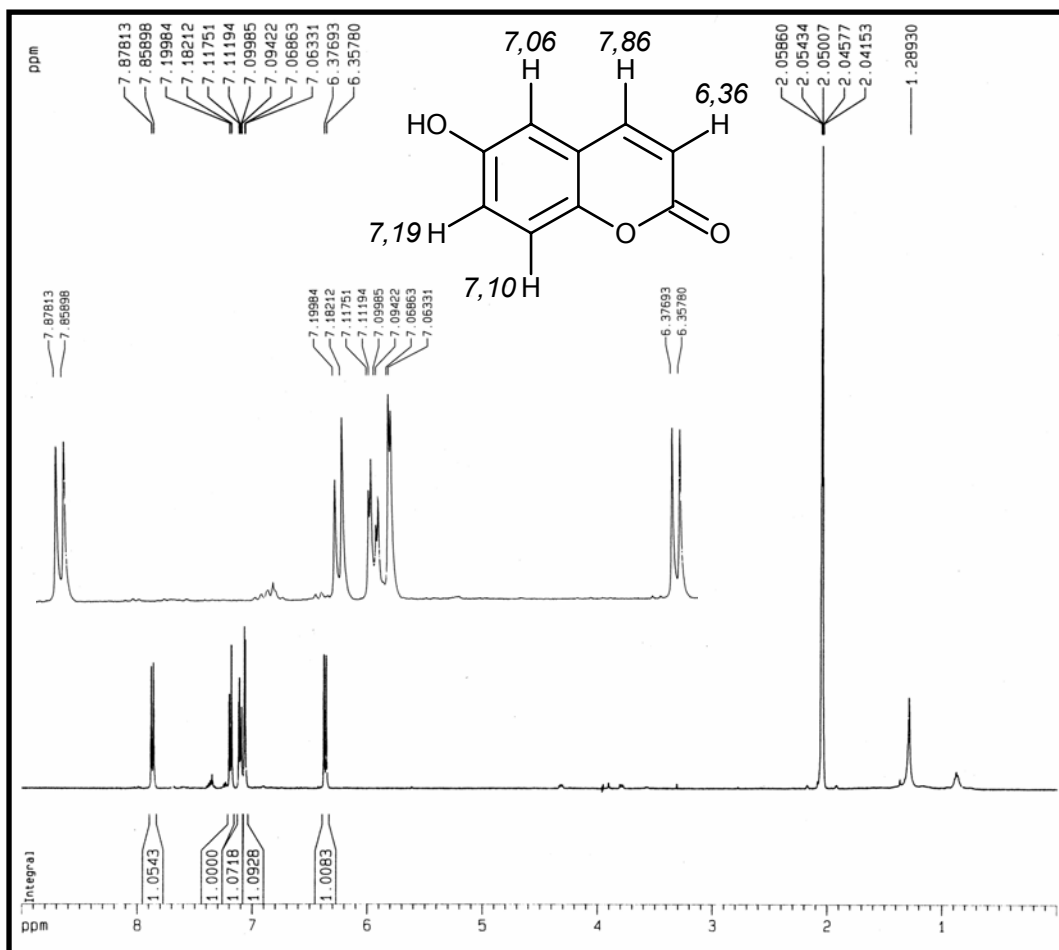


Figura 100- Espectro de RMN ^1H de ACS-5 (CD_3COCD_3 , 500 MHz)

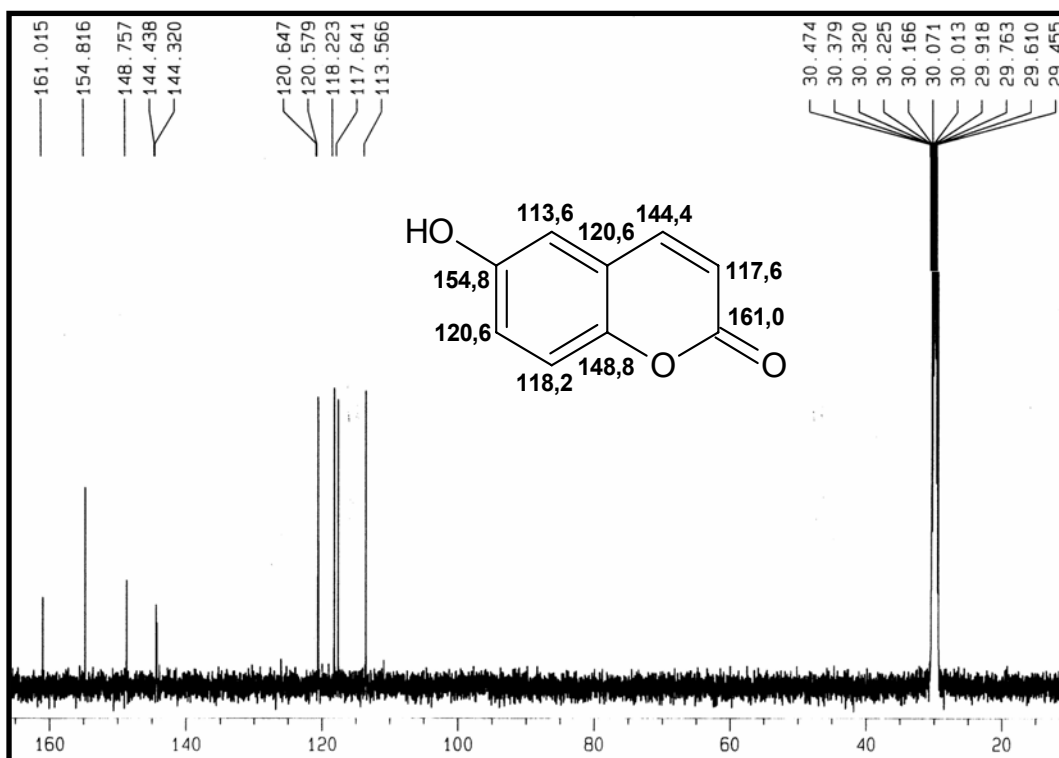


Figura 101- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-5 (CD_3COCD_3 , 125 MHz)

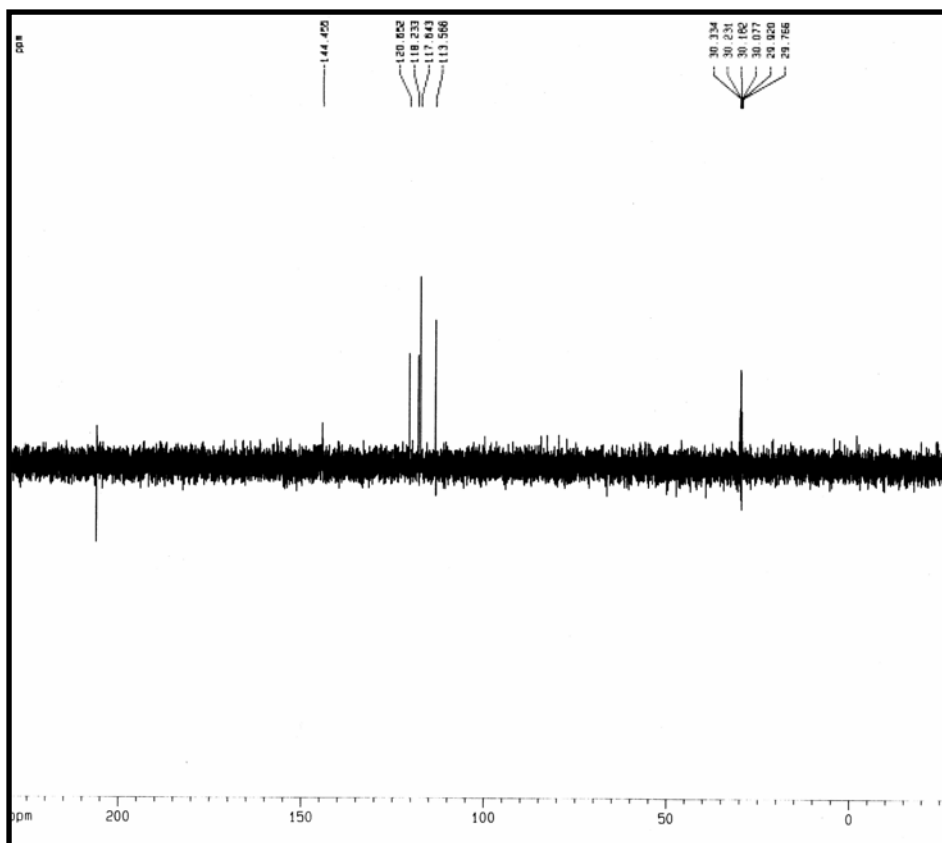


Figura 102- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-5 (CD_3COCD_3 , 125 MHz)

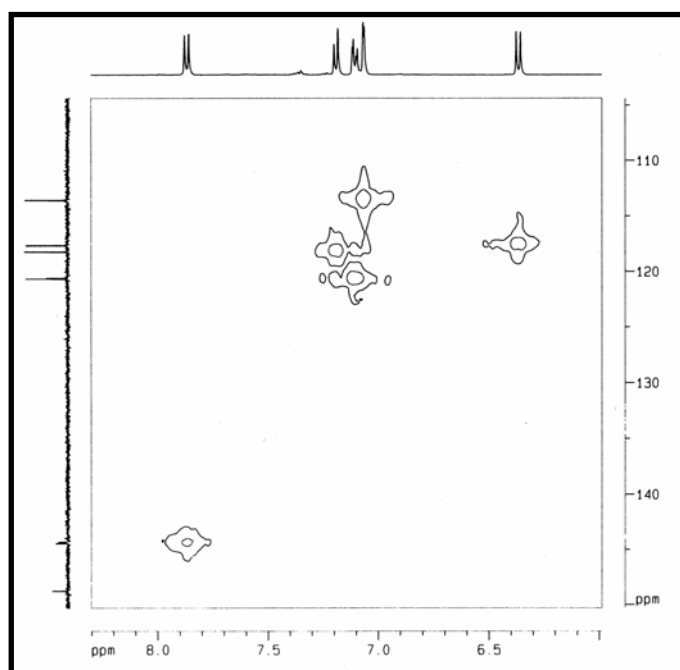


Figura 103- Espectro de RMN-HSQC (CD_3COCD_3 , 125 x 500 MHz) de ACS-5

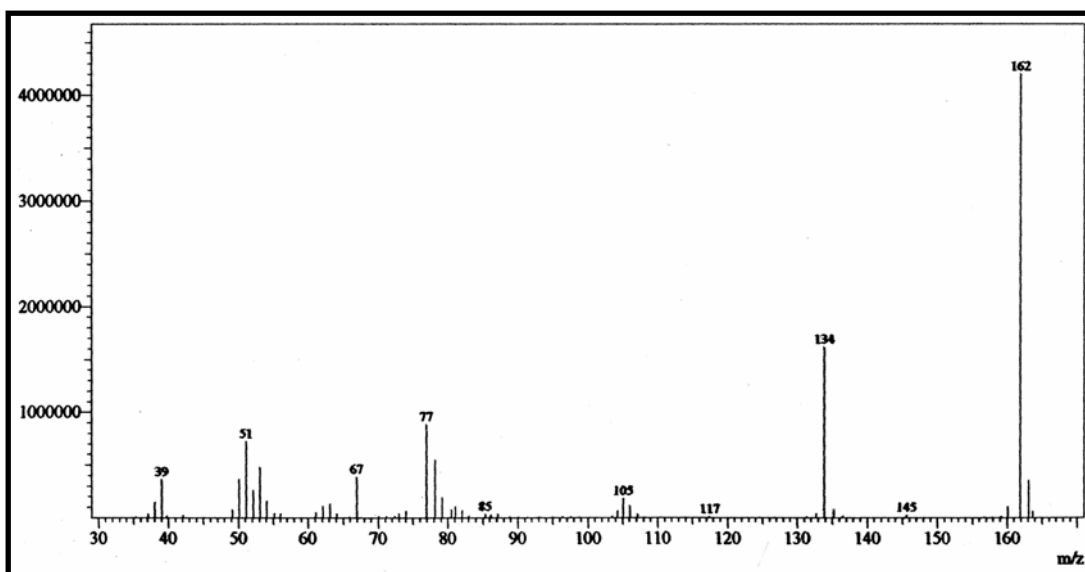


Figura 104- Espectro de massa de ACS-5 (Impacto Eletrônico)

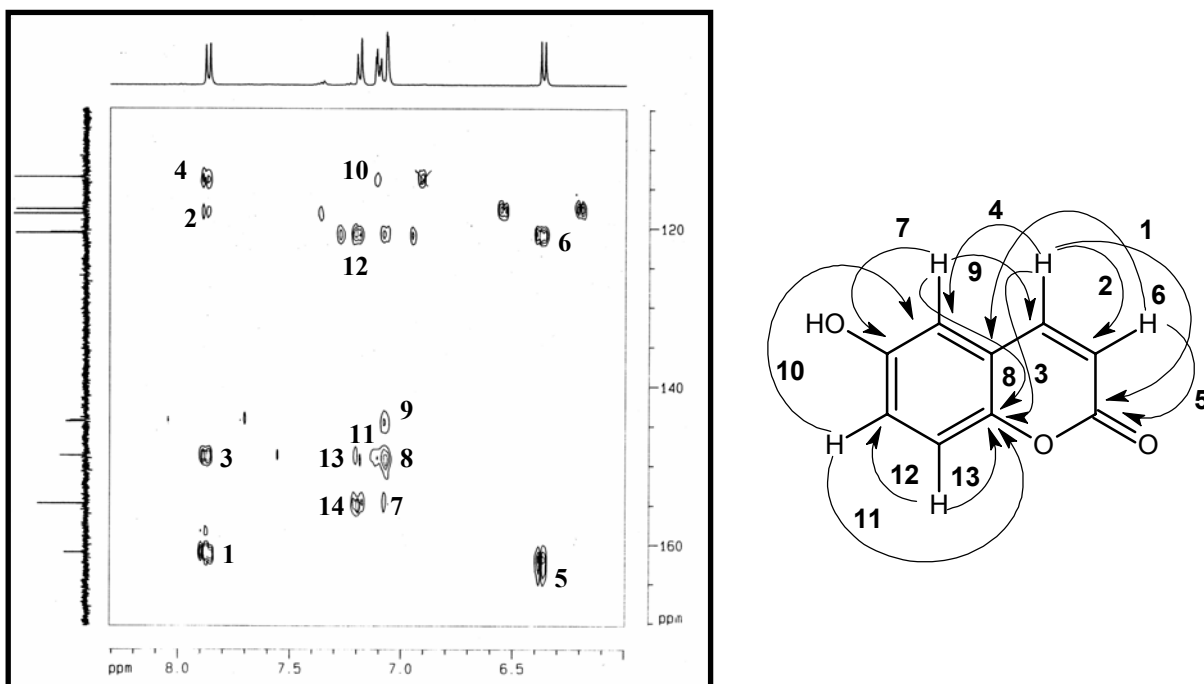


Figura 105- Espectro de RMN-HMBC (CD₃COCD₃, 125 x 500 MHz) de ACS-5

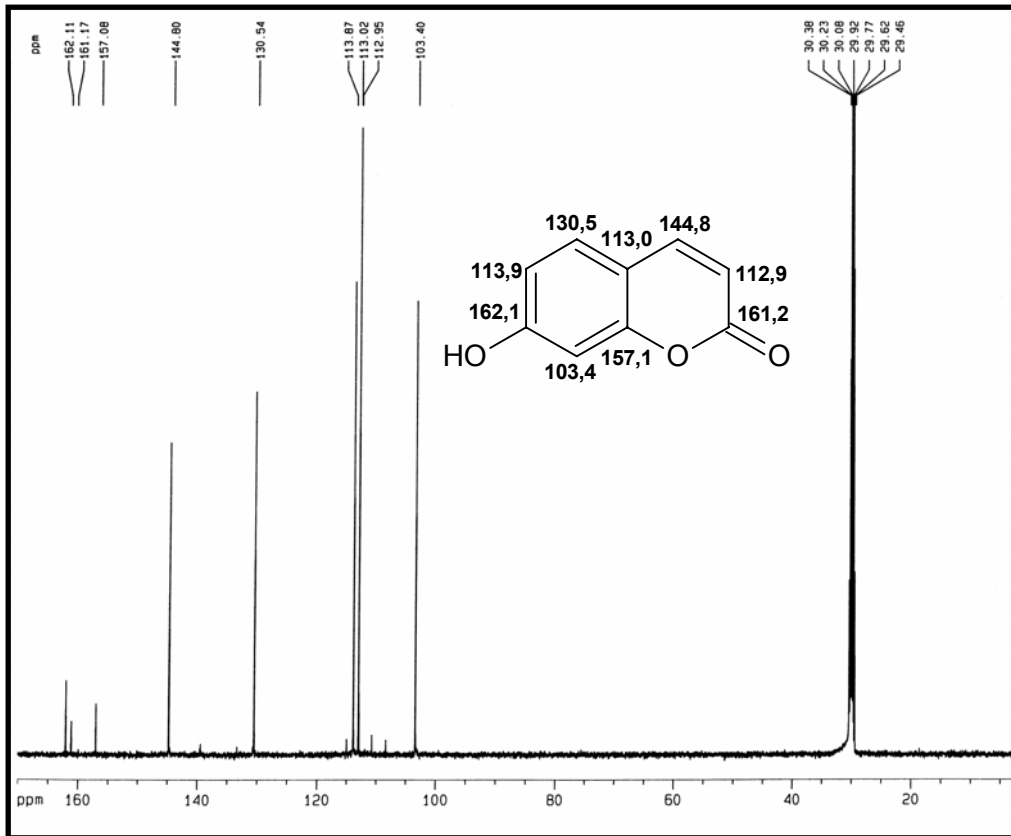


Figura 106- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de umbeliferona (CD_3COCD_3 , 125 MHz)

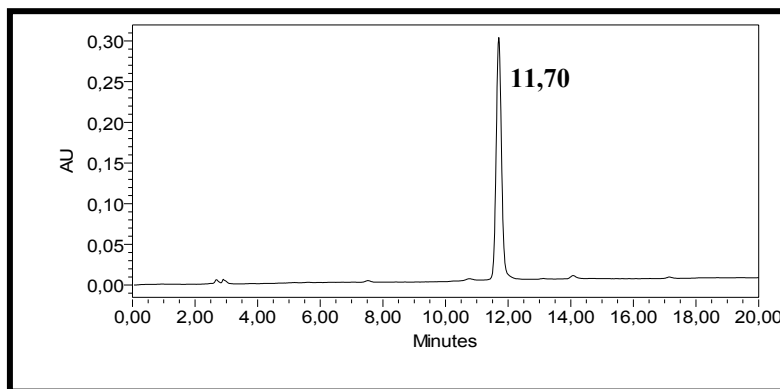


Figura 107- Cromatograma de HPLC de 6-hidroxi-cumarina (254 nm)

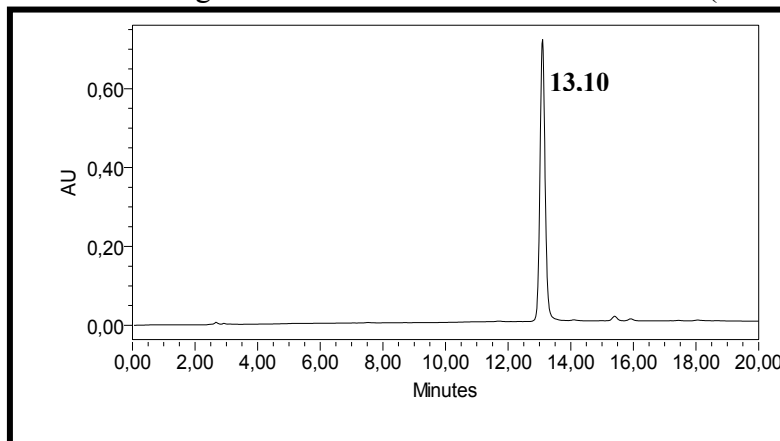


Figura 108- Cromatograma de HPLC de umbeliferona (7-hidroxi-cumarina: 254 nm)

5.16. Protocatecuato de- 6-cumarila (ACCE-8)

Sucessivas separações (3x) em Sephadex LH-20 da fração ACCE₂AM/CA, obtida por partições e cromatografias em gel de sílica do extrato etanólico das cascas do caule, conduziram ao isolamento de um sólido vermelho (pf. 257,6-258,3 °C), chamado de ACCE-8 (item 10.1.6.12, p. 281).

Análise do espectro de absorção na região do infravermelho (**Fig. 109, p. 203**) conduziu à identificação dos seguintes grupos funcionais: I- hidroxila, devido a uma banda larga em 3315 cm⁻¹; II- carbonila, evidenciada pela absorção em 1699 cm⁻¹; III- anel aromático, caracterizado pelas bandas esqueléticas em 1609, 1565, 1519 e 1440 cm⁻¹ (deformação axial C=C_{arom.}) e absorções em 936 e 826 cm⁻¹ (deformação angular C_{arom}-H), IV- carbonos oxigenados, reconhecidos através das absorções em 1305, 1259, 1224 e 1179 cm⁻¹.

No espectro de RMN ¹H de ACCE-8 (500 MHz, DMSO-*d*₆, **Fig. 110, p. 203**), foram observados dois dupletos δ 8,02 e 6,49 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-4 e H-3), típicos de hidrogênios olefinicos de cumarina, e dois sistemas de spin ABX: A-[δ 7,40 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-8); 7,25 (1H, dd, *J* = 9,0 e 2,9 Hz, H-7) e 7,21 (1H, d, *J* = 2,9 Hz, H-5)] e B-[δ 7,69 (1H, dd, *J* = 8,5 e 2,0 Hz, H-6'); 7,48 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2') e 7,06 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-5')], diferenciados após análise do espectro COSY (**Fig. 111, p. 204**).

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, DMSO-*d*₆, **Fig. 112, p. 204**) apresentou dezesseis linhas espectrais, sendo duas atribuídas a carbonilas de éster e de lactona (δ 166,6, C-7' e 160,0, C-2). No espectro RMN ¹³C-DEPT135 (125 MHz, DMSO-*d*₆, **Fig. 113, p. 205**), foram registradas oito linhas espectrais: δ 143,8 (C-4); 127,4 (C-6'); 122,3 (C-2'); 121,3 (C-7); 117,7 (C-8); 117,1 (C-5'); 116,8 (C-3) e 114,6 (C-5), as quais foram relacionadas a carbonos sp² monohidrogenados. Subtração dos espectros de RMN ¹³C-CPD e DEPT135 permitiu a identificação de sete carbonos não-hidrogenados: δ 153,6 (C-6); 153,5 (C-4'); 149,0 (C-10); 142,6 (C-3'); 122,3 (C-1') e 119,5 (C-9), sendo as quatro primeiras absorções referentes a carbonos aromáticos oxigenados. Através do espectro de RMN ¹³C-GATED (**Fig. 114, p. 205**), constatou-se que a absorção em δ 122,3 (C-1' e C-2') correspondia a dois carbonos, um CH e outro não-hidrogenado. O CH apresentou-se como um duplo duplete (¹*J*_{C,H} = 122,0 Hz; ³*J*_{C,H} = 7,2 Hz, C-2') e o carbono não-hidrogenado exibiu-se na forma de um duplete (³*J*_{C,H} = 7,2 Hz, C-1').

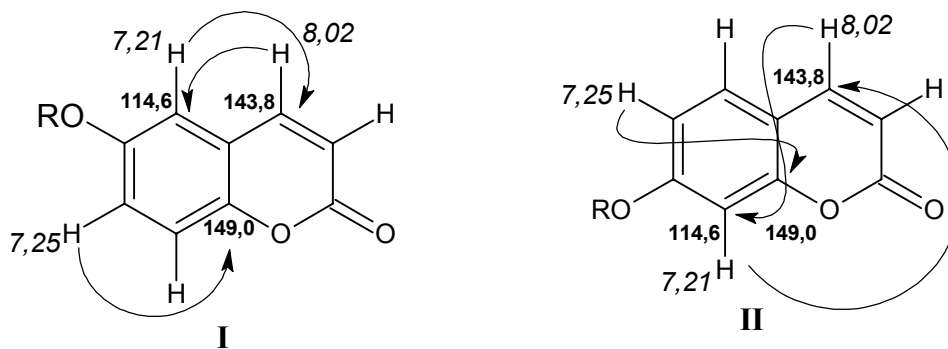
Os dados de RMN permitiram a dedução da fórmula molecular $C_{16}H_{10}O_6$, condizente com a massa molecular de 298 Da, obtida pelo espectro de massa (EM-IE, **Fig. 115, p. 206**), sugerindo uma cumarina esterificada, na posição 6 ou 7, com um fragmento protocatecuóila, o qual foi proposto devido às evidências de presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, provavelmente di-hidroxiado, e a existência de uma carbonila de éster na estrutura. Além disso, o ácido protocatecuico já havia sido isolado de *A. cearensis*. No espectro de EM-IE de ACCE-8 foram detectados picos com m/z : 298 (pico íon-molecular), 254 (eliminação de CO_2 da lactona), 146 (perda do fragmento de protocatecuato do composto original) e 118 (descarbonilação do cátion cumarínico).

O espectro de RMN-HSQC (**Fig. 116, p. 206**) revelou os carbonos referentes a cada anel benzênico, a partir de suas correlações com os hidrogênios pertencentes a cada sistema aromático (**Tab. 21, p. 202**). Os carbonos olefinicos foram correlacionados com seus hidrogênios, conforme os acoplamentos observados entre os sinais de carbono em δ_C 143,8 (C-4) e 116,8 (C-3) e os dupletos em δ_H 8,02 (C-4) e 6,49 (C-3), respectivamente.

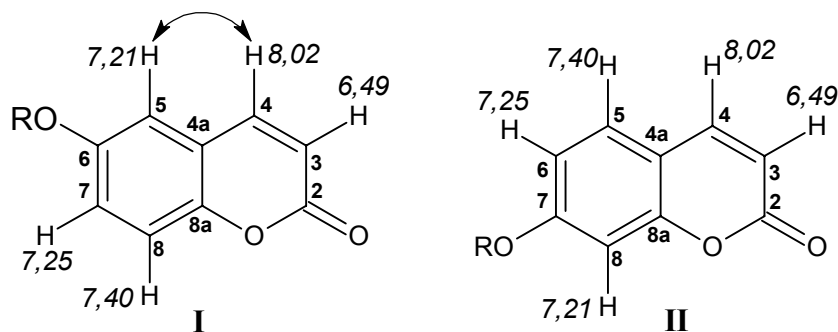
O espectro de RMN-HMBC (**Fig. 117, p. 207**) permitiu a caracterização do esqueleto cumarínico, por meio de correlações como as dos hidrogênios olefinicos H-3 (δ_H 6,49) e H-4 (δ_H 8,02) com a carbonila lactônica C-2 (δ_C 160,0), ou através dos acoplamentos dos hidrogênios aromáticos H-5 (δ_H 7,21), H-7 (δ_H 7,25) e H-8 (δ_H 7,40) e hidrogênios olefinicos H-3 (δ_H 6,49) e H-4 (δ_H 8,02) com os carbonos aromáticos C-9 (δ_C 119,5) e C-10 (δ_C 149,0).

A existência do fragmento protocatecuóila foi ratificada pelas correlações dos hidrogênios aromáticos H-2' (δ_H 7,48), H-5' (δ_H 7,06) e H-6' (δ_H 7,69) com os carbonos aromáticos não hydrogenados C-1' (δ_C 122,3), C-3' (δ_C 142,6) e C-4' (δ_C 153,5), mas também pelos acoplamentos dos hidrogênios aromáticos H-2' (δ_H 7,48) e H-6' (δ_H 7,69) com o carbono carbonílico C-7' (δ_C 166,6).

As correlações dos sinais de hidrogênio em δ_H 8,02 e 7,21 com os sinais de carbono em δ_C 114,6 e 143,8 (3J), respectivamente, e a correlação do duplo duplete em δ_H 7,25 com o sinal de carbono em δ_C 149,0 (3J) foram determinantes para a escolha da proposta de substituição da cumarina, na posição 6 (I), já que na posição 7 (II), estes acoplamentos seriam hipoteticamente 4J .



O espectro de RMN-NOESY (Fig. 118) corroborou a proposta I, ao mostrar o acoplamento homonuclear dipolar entre os dupletos em δ_H 8,02 (H-4) e 7,21 (H-5).



A estrutura química de ACCE-8, reconhecida como protocatecuato de 6-cumarila, é inédita na literatura.

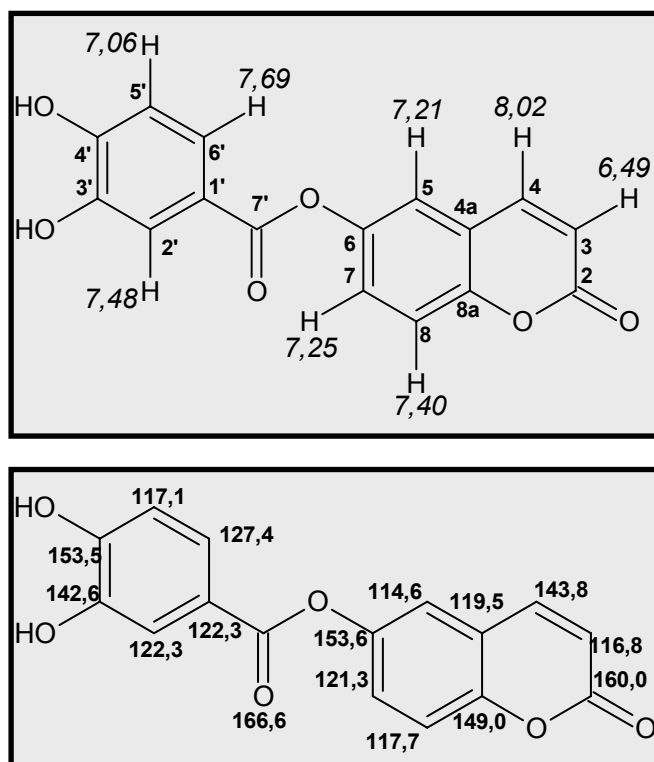


Tabela 21- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-8 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

# C	ACCE-8 δ_{C} (ppm) DMSO- d_6	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)	HMBC 2J	HMBC 3J
2	160,0		6,49	8,02
3	116,8	6,49 (1H, d, 9,6 Hz)		
4	143,8	8,02 (1H, d, 9,6 Hz)		7,21
5	114,6	7,21 (1H, d, 2,9 Hz)	8,02	7,25
6	153,6		7,25; 7,21	7,40
7	121,3	7,25 (1H, dd, 9,0 Hz; 2,9 Hz)		7,21
8	117,7	7,40 (1H, d, 9,0 Hz)		
9	119,5		8,02	7,40; 6,49
10	149,0		7,40	8,02; 7,25; 7,21,
1'	122,3		7,69; 7,48	7,06
2'	122,3	7,48 (1H, d, 2,0 Hz)		7,69
3'	142,6		7,48	7,06
4'	153,5		7,06	7,69; 7,48
5'	117,1	7,06 (1H, d, 8,5 Hz)		
6'	127,4	7,69 (1H, dd, 8,5 Hz; 2,0 Hz)		7,48
7'	166,6			7,69; 7,48

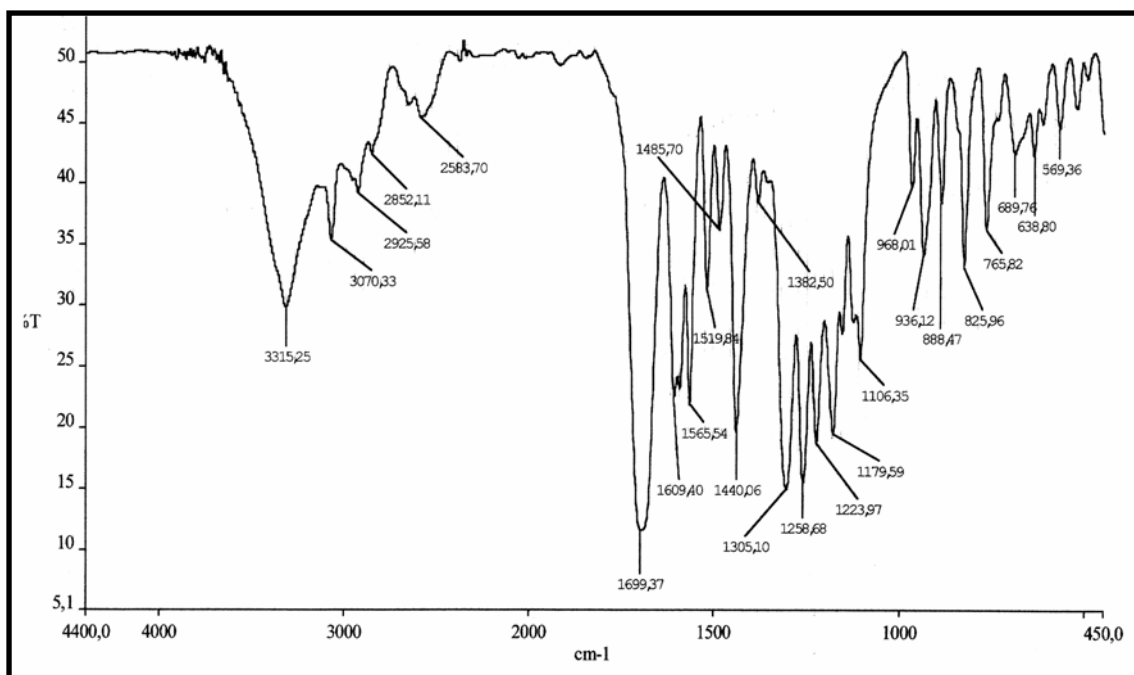


Figura 109- Espectro de absorção na região do infravermelho de ACCE-8 (pastilha de KBr)

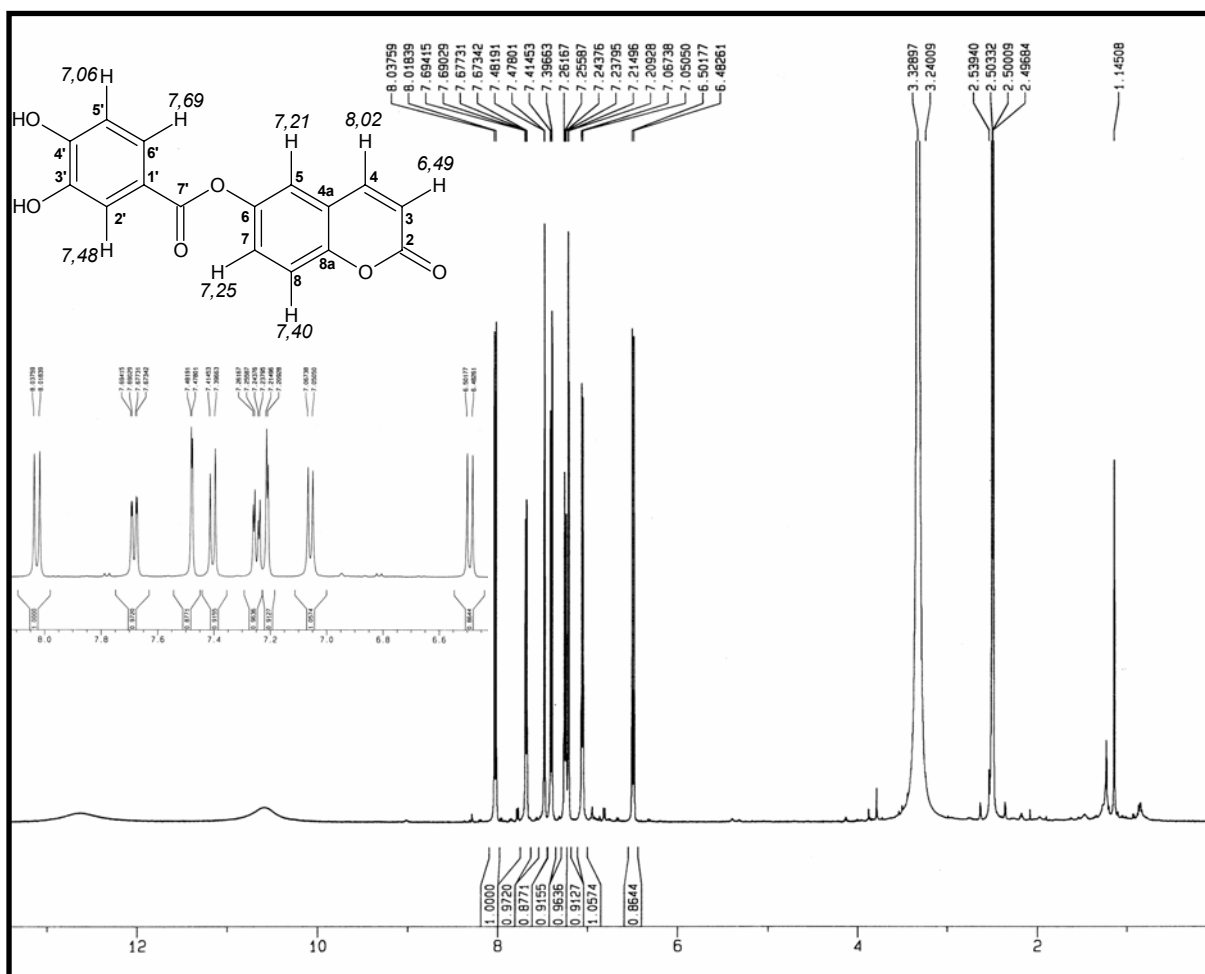


Figura 110- Espectro de RMN ¹H de ACCE-8 (DMSO-d₆, 500 MHz)

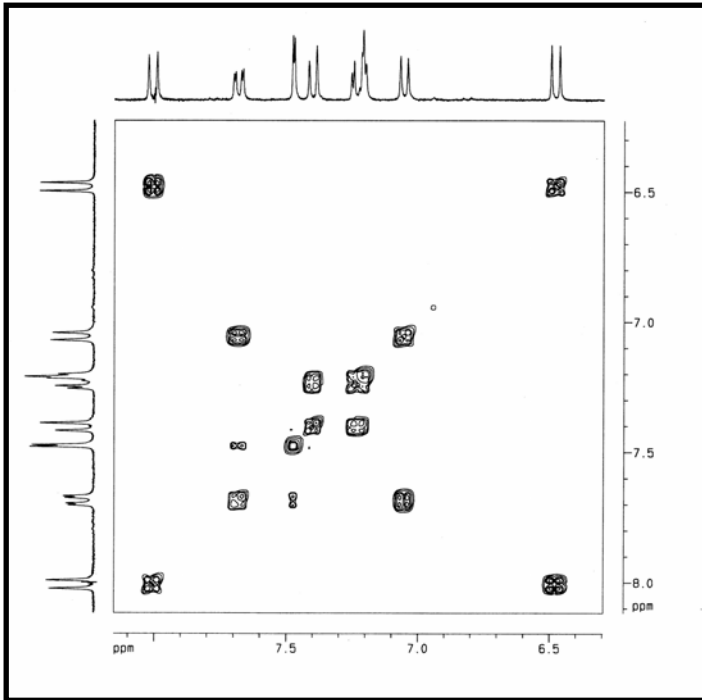


Figura 111- Espectro de RMN-COSY (DMSO- d_6 , 500 x 500 MHz) de ACCE-8

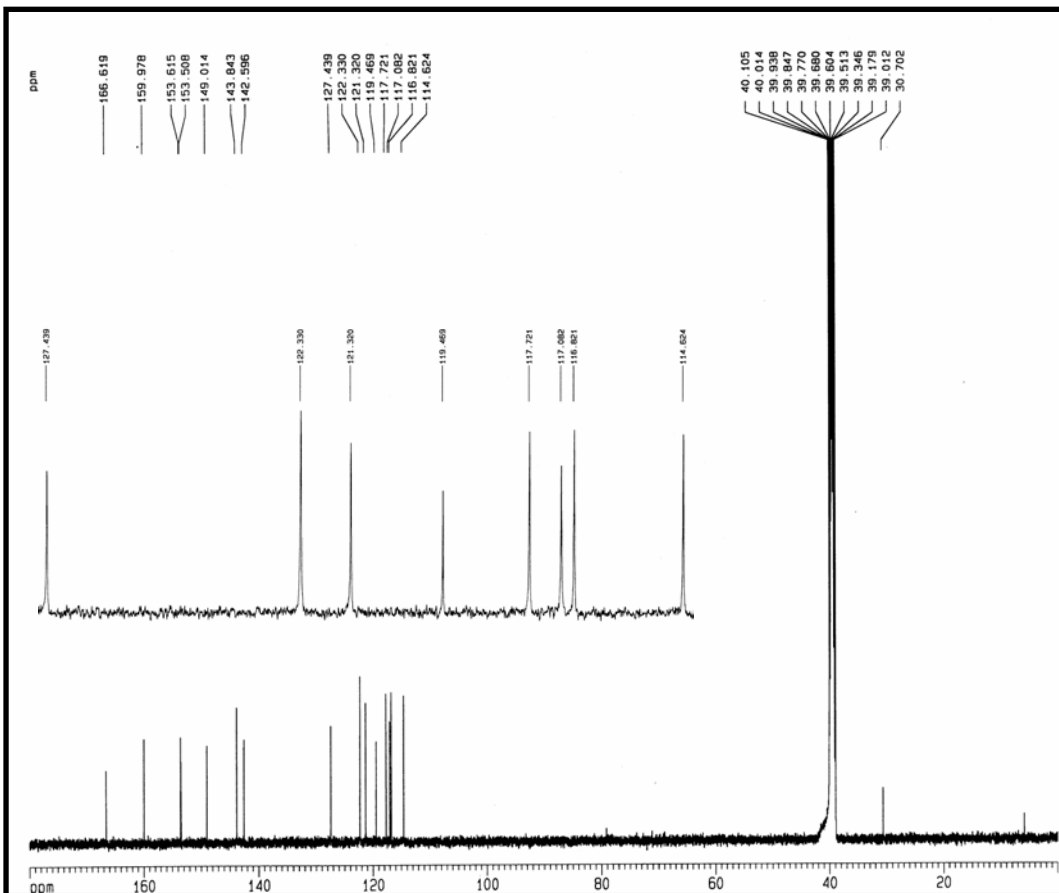


Figura 112- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-8 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

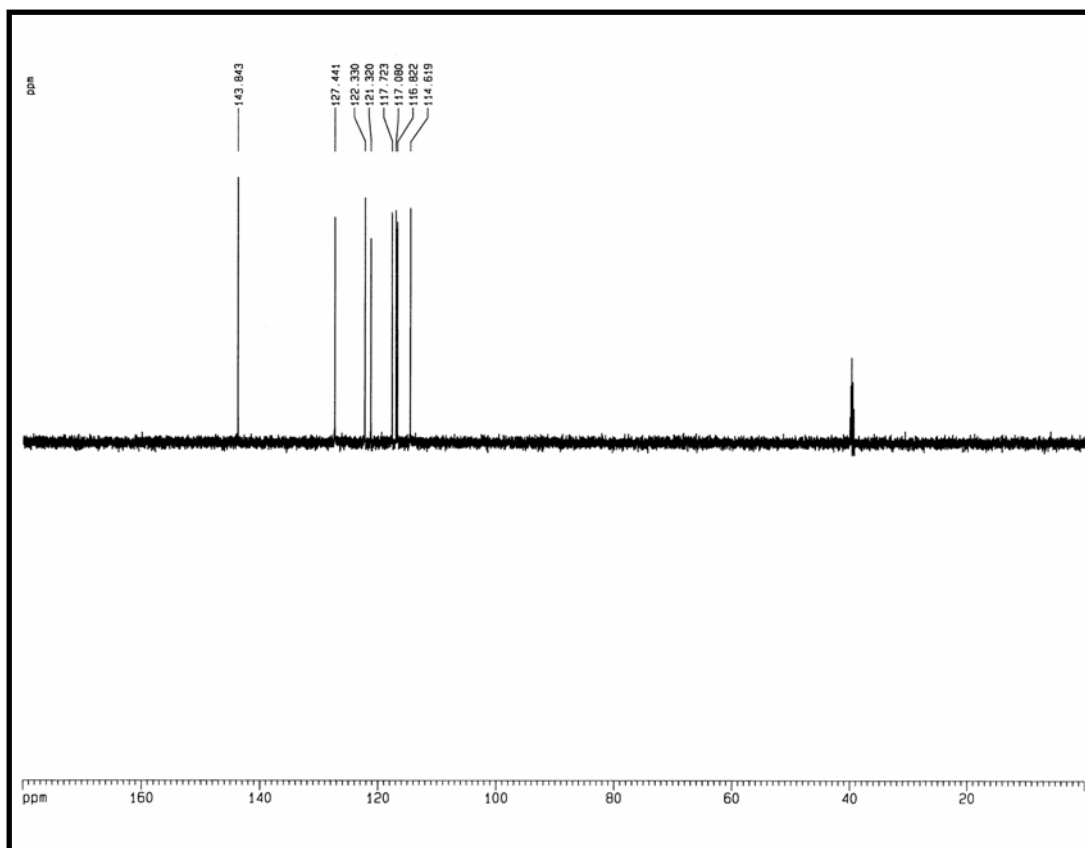


Figura 113- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACCE-8 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

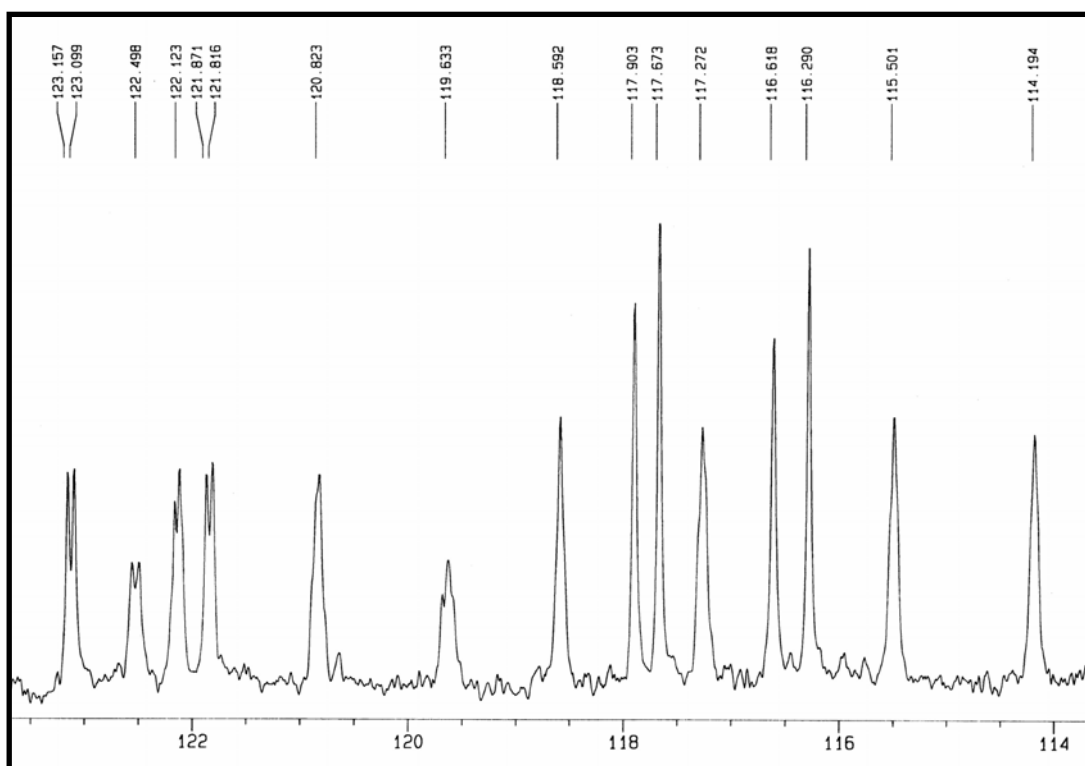


Figura 114- Espectro de RMN ^{13}C -GATED de ACCE-8 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

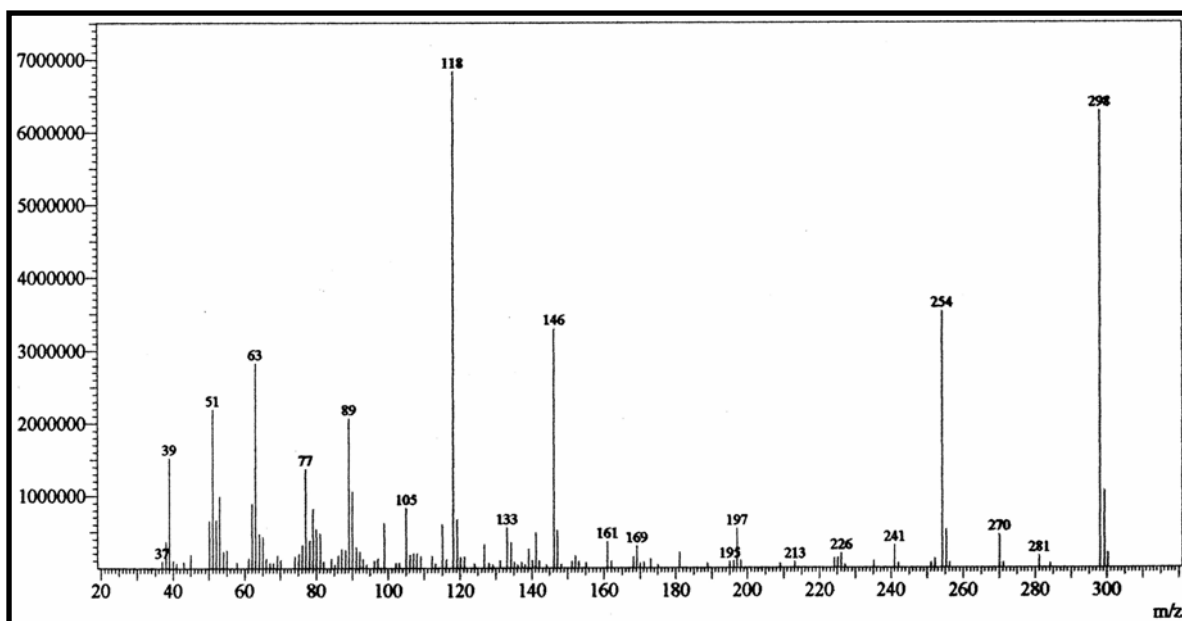


Figura 115- Espectro de massa de ACCE-8 (Impacto Eletrônico)

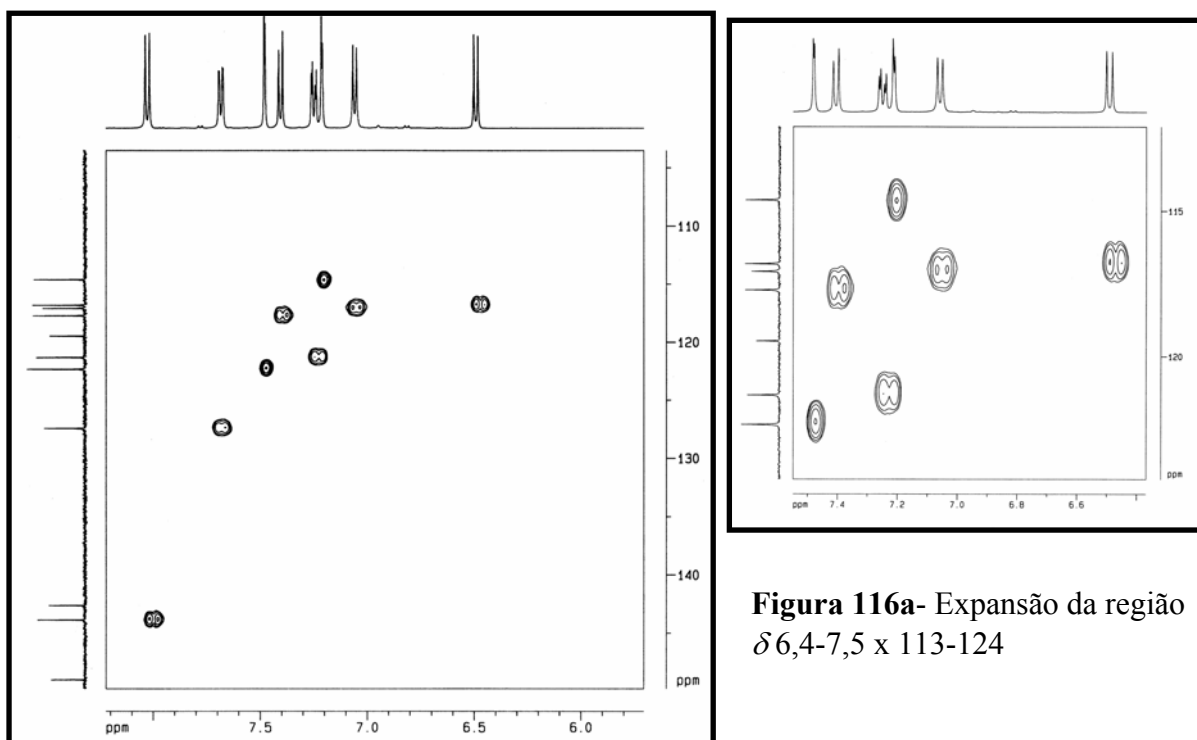


Figura 116a- Expansão da região δ 6,4-7,5 x 113-124

Figura 116- Espectro de RMN-HSQC (DMSO- d_6 , 125 x 500 MHz) de ACCE-8

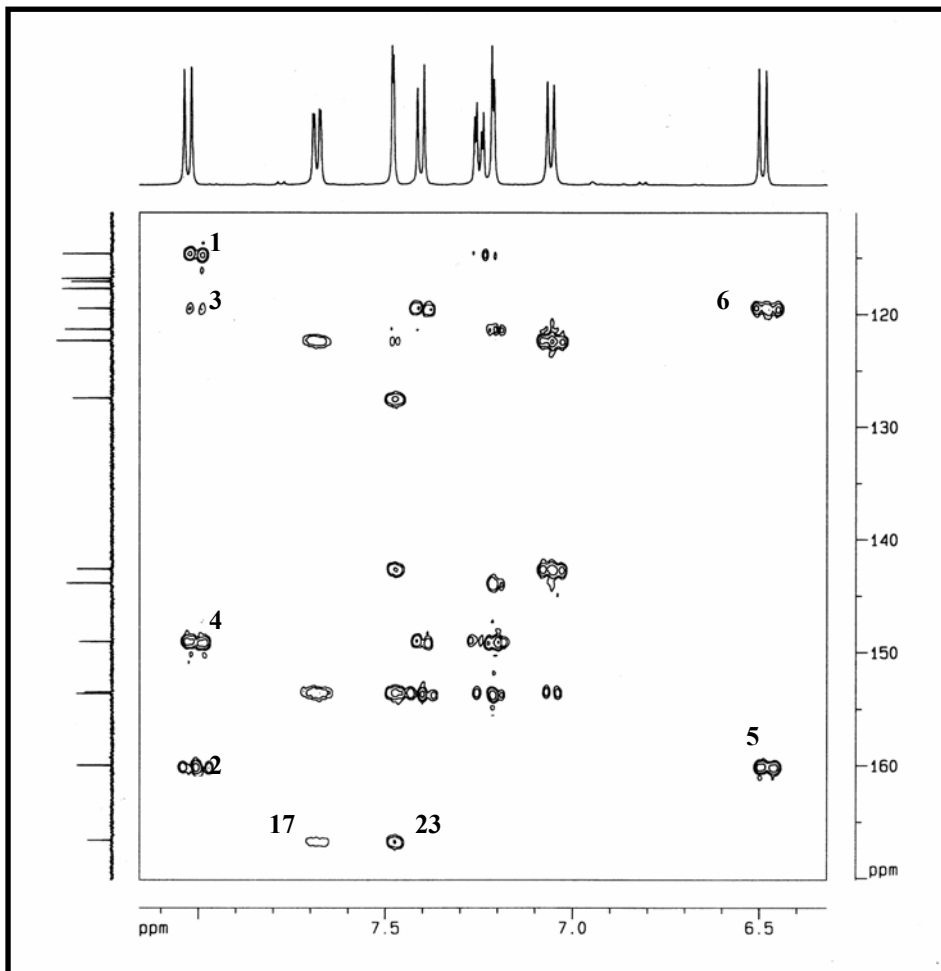
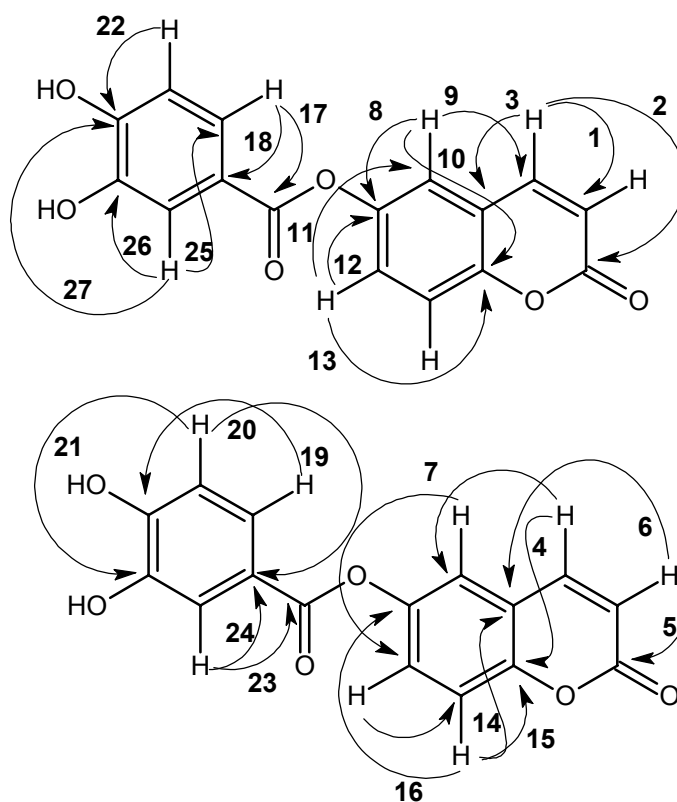


Figura 117- Espectro de RMN-HMBC (DMSO-*d*₆, 125 x 500 MHz) de ACCE-8



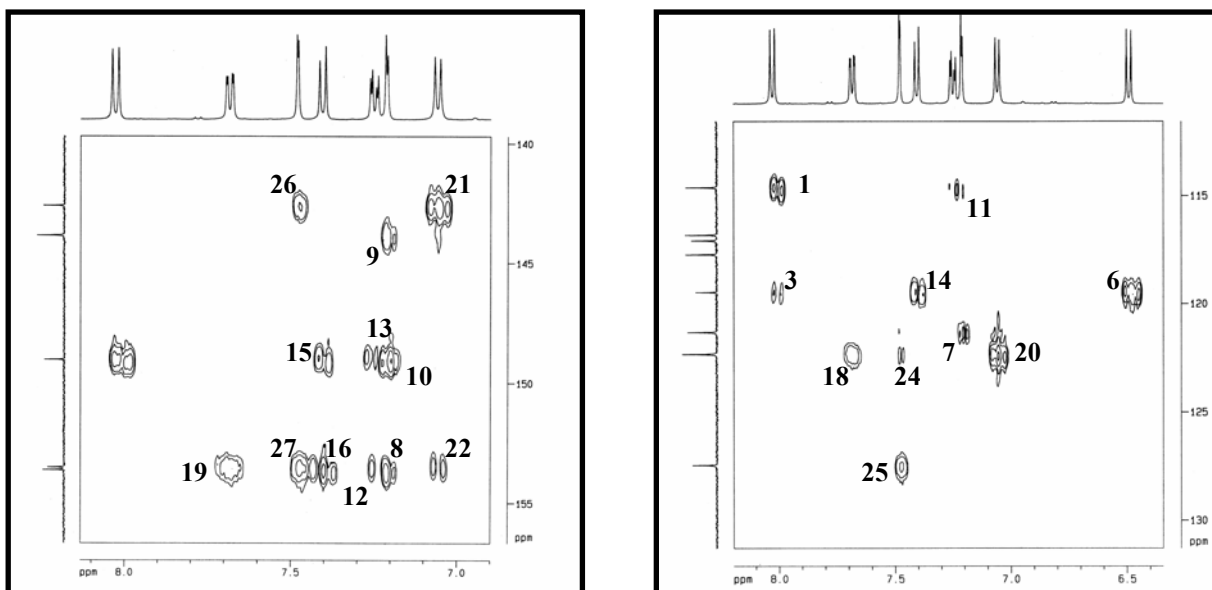


Figura 117a- Expansões do espectro HMBC de ACCE-8: (I) δ 6,9-8,1 x 140-157; (II) δ 6,4-8,2 x 113-132.

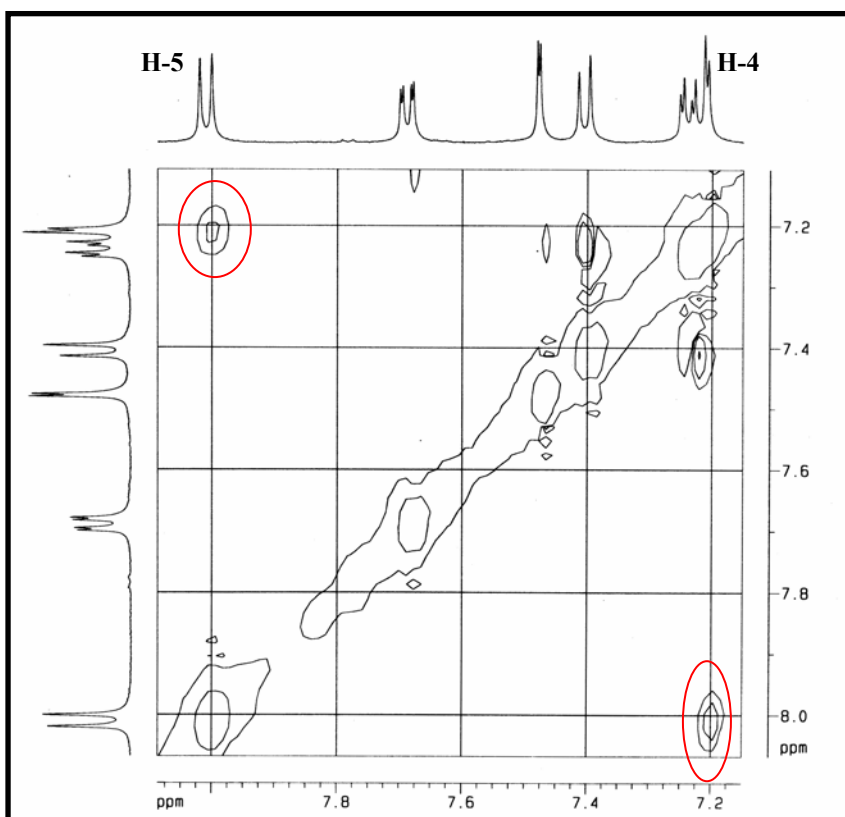


Figura 118- Espectro de RMN-NOESY (DMSO- d_6 , 500 x 500 MHz) de ACCE-8

5.17. Ácido protocatecuico (ACCE-2)

Tratamentos cromatográficos sucessivos em gel de sílica e Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, obtida de partição do extrato etanólico das cascas do caule de *A. cearensis*, conduziram ao isolamento de cristais aciculares amarelos (p.f. 199,2-200,7 °C), os quais foram denominados ACCE-4 (ítem 10.1.6.6, p. 278).

No espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , Fig. 119, p. 211) foram registradas oito linhas espectrais, sendo uma atribuída a carbonila de éster ou de ácido (δ 170,3, C-7) e duas relacionadas a carbonos aromáticos oxigenados (δ 151,5 C-4 e 146,0, C-3). Os carbonos hidrogenados foram identificados através da análise do espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 120, p. 211), no qual foram visualizados apenas três sinais, todos referentes a carbonos aromáticos hidrogenados (δ 123,9 C-2; 117,7 C-6; 115,7 C-5). A absorção em δ 123,0 (C-1), ausente no espectro DEPT135, foi atribuída a carbono aromático não-hidrogenado.

O espectro de RMN ^1H de ACCE-4 (500 MHz, CD_3OD , Fig. 121, p. 212) apresentou um sinal múltiplo em δ 7,46-7,43, correspondentes a dois hidrogênios, os quais, juntamente com um duplete em δ 6,81 (1H, $J = 8,7$ Hz, H-5), foram associados a um anel benzênico trissubstituído.

A fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, deduzida a partir da análise dos espectros de RMN, sugeriram a estrutura de um derivado do ácido benzóico trissubstituído, o qual foi identificado como sendo o ácido protocatecuico após comparação com dados RMN ^{13}C disponíveis na literatura (POUCHERT, 1993) (Tab. 22, p. 210).

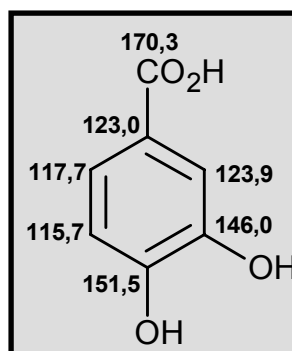
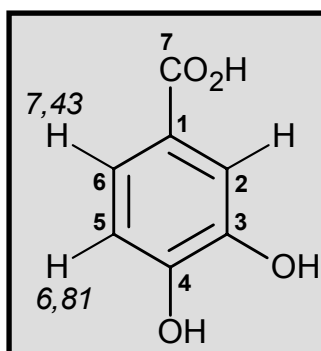


Tabela 22- Dados de RMN ^{13}C de ACCE-2 e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C do ácido protocatecuico, registrados na literatura (POUCHERT, 1993).

# C	Ác. protocatecuico δ_{C} (ppm) DMSO- d_6	ACCE-2 δ_{C} (ppm) CD $_3$ OD
1	121,6	123,0
2	121,9	123,9
3	144,7	146,0
4	149,9	151,5
5	115,1	115,7
6	116,5	117,7
7	167,2	170,3

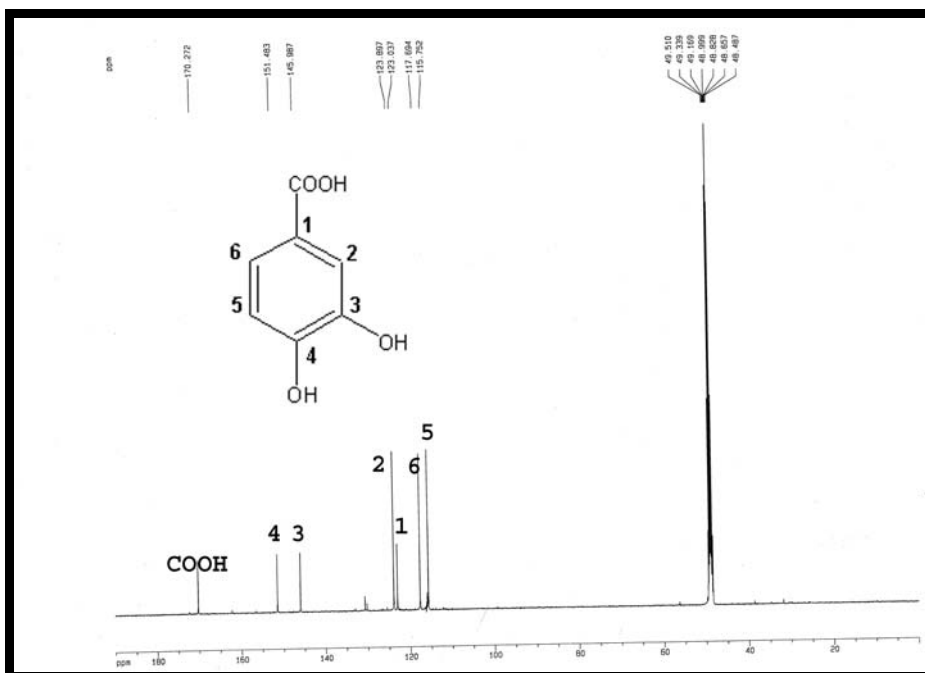


Figura 119- Espectro de RMN ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de ACCE-2

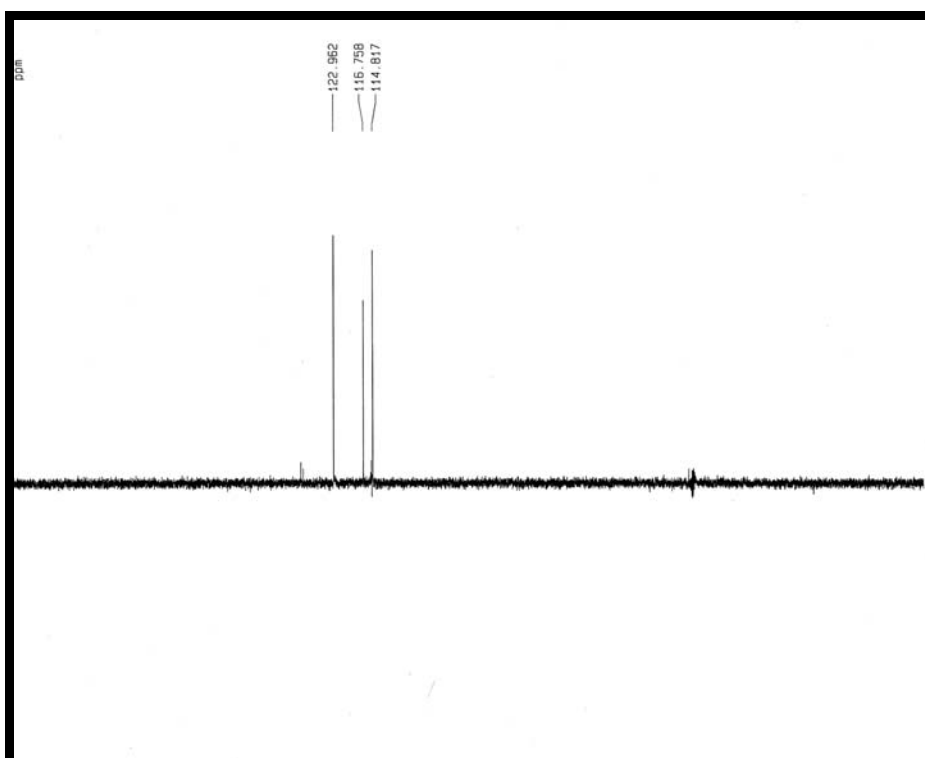


Figura 120- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (CD_3OD , 125 MHz) de ACCE-2

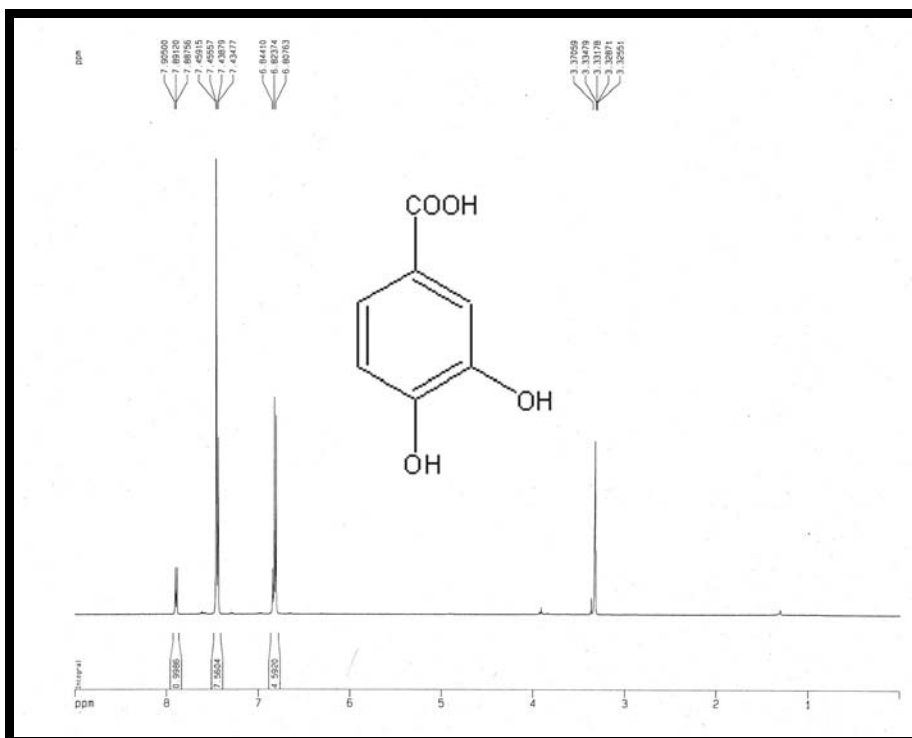


Figura 121- Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) de ACCE-2

5.18. Ácido vanílico (ACCE-4)

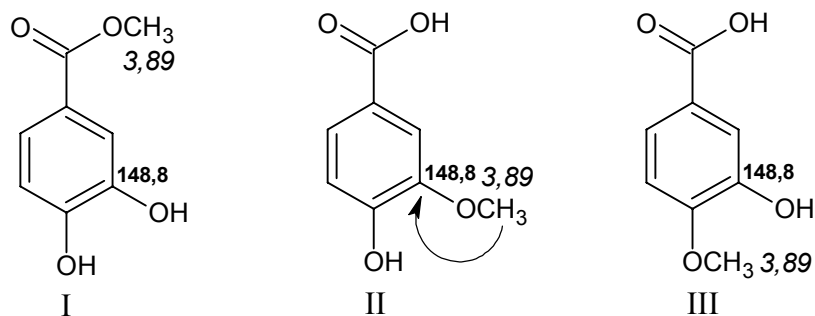
Gerada através de partições líquido-líquido do extrato etanólico das cascas do caule, ACCEAM foi submetida a cromatografias em gel de sílica e Sephadex LH-20, obtendo-se um sólido marrom escuro (f14-15), que após recristalização em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50%, foi convertido em cristais amarelados (p.f. 204,9-205,8 °C), designados ACCE-4 (**item 10.1.6.6, p. 278**). Esta mesma substância também foi isolada da fração acetato de etila do extrato etanólico das sementes.

Os grupos funcionais presentes na estrutura de ACCE-4 foram caracterizados pelas frequências das bandas observadas no espectro de absorção na região do infravermelho (**Fig. 122, p. 215**): 3484 cm^{-1} (hidroxila), 1683 cm^{-1} (carbonila conjugada), 1598, 1523 e 1434 cm^{-1} (anel aromático), e 1280, 1238, 1205 e 1111 cm^{-1} (carbonos oxigenados).

O espectro de RMN ^1H de ACCE-4 (500 MHz, CD_3OD , **Fig. 123, p. 215**) apresentou um sinal múltiplo em δ 7,57- 7,54, correspondentes a dois hidrogênios, os quais, juntamente com um duplete em δ 6,83 (1H, $J = 8,7$ Hz, H-5), foram associados a um anel benzênico trissubstituído, além de um singlete agudo em δ 3,89 (3H, s, 3-OMe), relacionado a hidrogênios metoxílicos .

No espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , **Fig. 124, p. 216**) foram registradas oito linhas espectrais, sendo uma atribuída a carbonila de éster ou de ácido (δ 170,2, C-7) e duas relacionadas a carbonos aromáticos oxigenados (δ 152,8 C-4 e 148,8, C-3). Os carbonos hidrogenados foram identificados através de análise do espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , **Fig. 125, p. 216**), no qual foram visualizados quatro sinais: três referentes a carbonos aromáticos hidrogenados (δ 125,4, C-6; 116,0, C-4 e 114,0, C-2) e um associado à presença de metoxila (δ 56,5, 3-OMe). A absorção em δ 123,2 (C-1), ausente no espectro DEPT135, foi atribuída a carbono aromático não-hidrogenado.

O espectro de massa de ACCE-4 (EM-IE, **Fig. 126, p. 217**) exibiu fragmentos com m/z 168 (pico íon molecular), 153 (desmetilação), 138 (perda de formaldeído da molécula original) e 121 (desidratação). A partir da composição elementar $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$, fornecida pelo pico íon-molecular, foram sugeridos três análogos metilados do ácido protocatecuico: um éster (I) e dois éteres metílicos, sendo um alquilado na posição 3 (II) e outro na posição 4 (III).



O espectro HMBC (**Fig. 127**) mostrou o acoplamento entre os hidrogênios metílicos (δ_H 3,89, 3-OMe) com o carbono aromático C-3 (δ_C 148,8), justificando a proposta II. Dados de RMN, disponíveis na literatura, reforçaram a estrutura proposta do ácido vanílico (lit.: 210 °C) (POUCHERT, 1993) (**Tab. 23**).

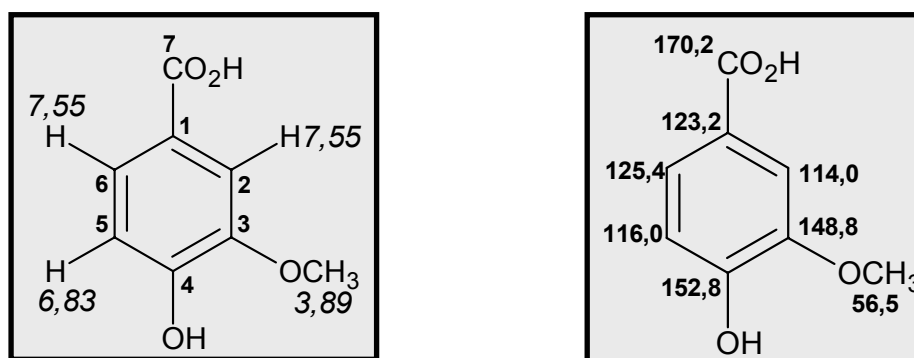


Tabela 23- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-4 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de ácido vanílico, registrados na literatura (POUCHERT, 1993).

# C	Ác. vanílico δ_C (ppm) DMSO- d_6	ACCE-4 δ_C (ppm) CD $_3$ OD	HSQC δ_H (ppm)(int., multip, $J_{H,H}$)
1	121,7	123,2	
2	112,6	114,0	7,55 (1H, m)
3	147,0	148,8	
4	151,0	152,8	
5	114,8	116,0	6,83 (1H, d, 8,7 Hz)
6	123,6	125,4	7,55 (1H, m)
7	167,5	170,2	
3-OMe	55,6	56,5	3,89 (3H, s)

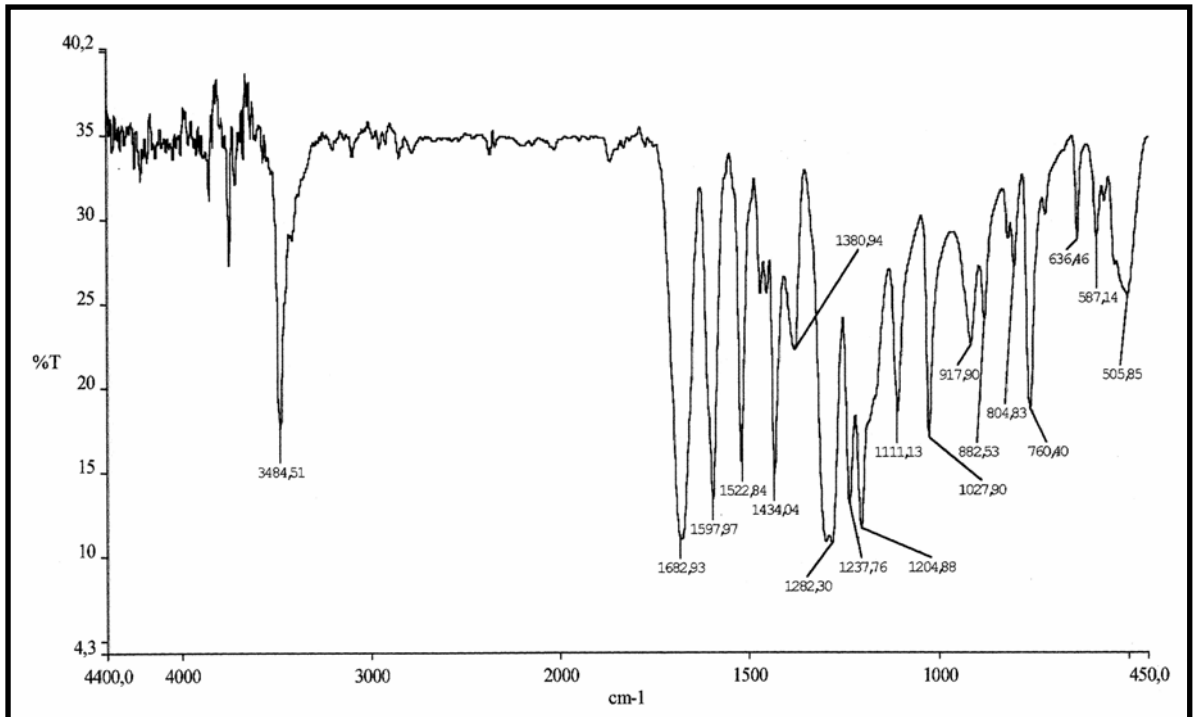


Figura 122- Espectro de absorção na região do Infravermelho de ACCE-4 (pastilha de KBr)

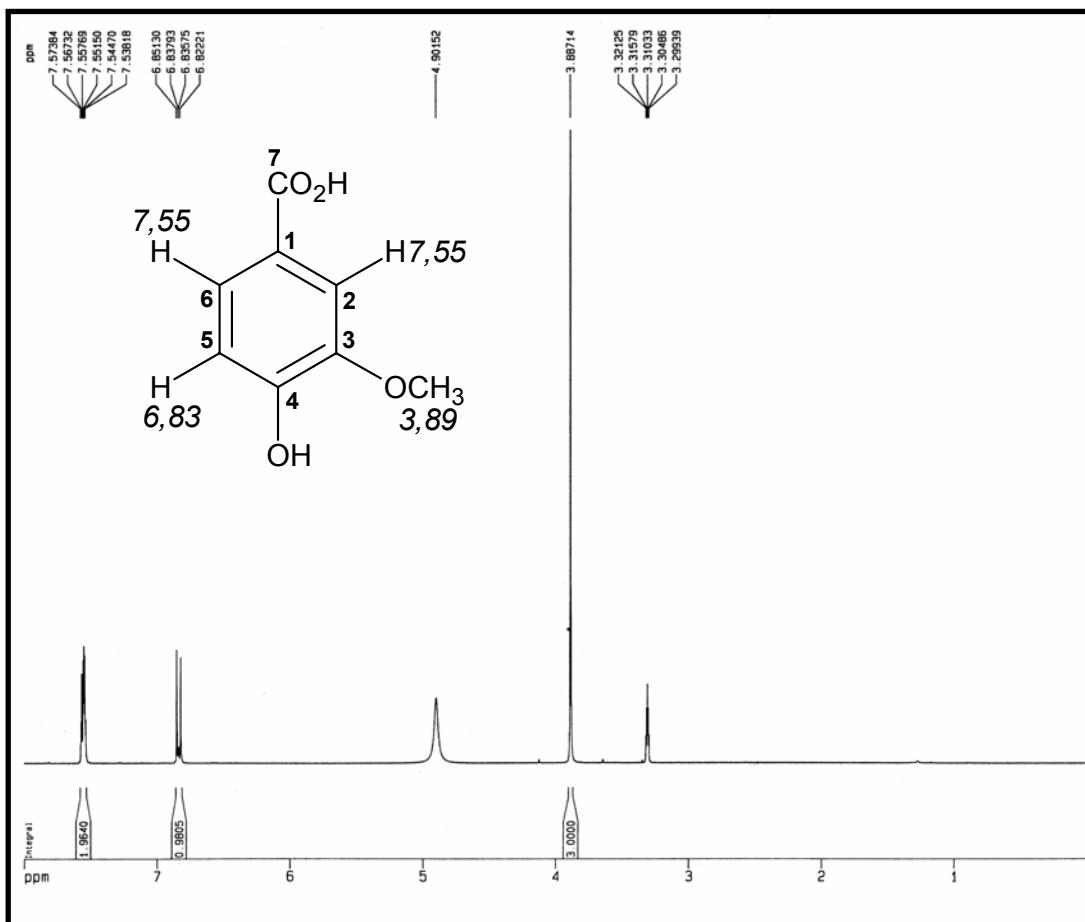


Figura 123- Espectro de RMN ^1H de ACCE-4 (CD_3OD , 500 MHz)

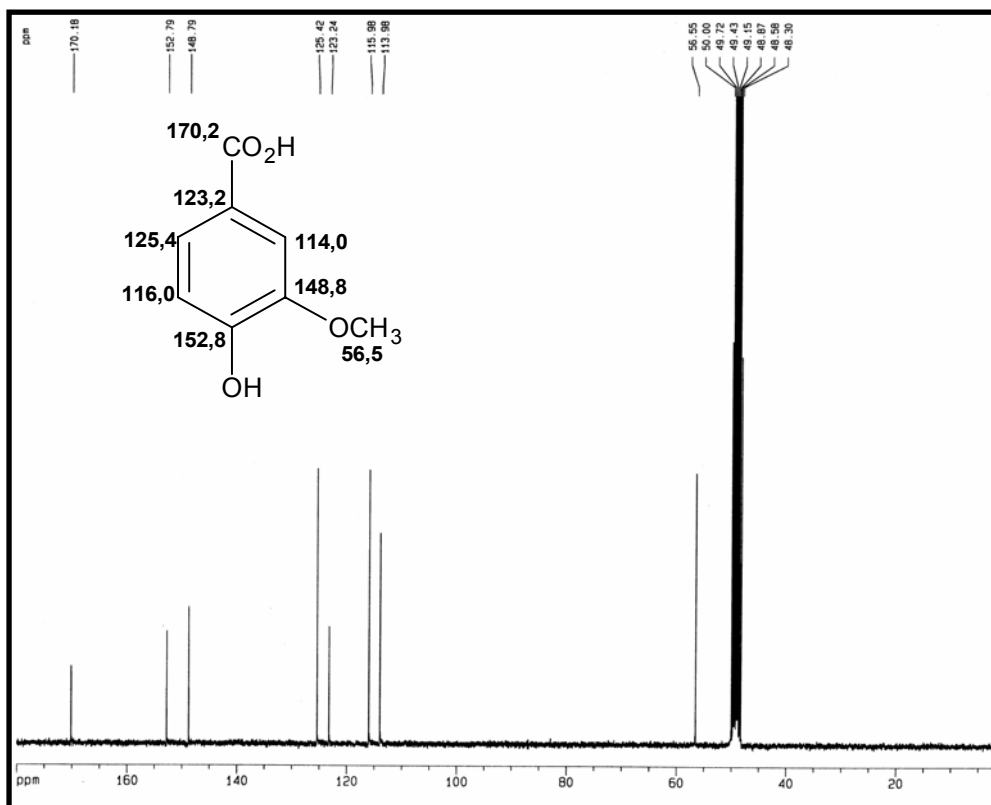


Figura 124- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-4 (CD_3OD , 125 MHz)

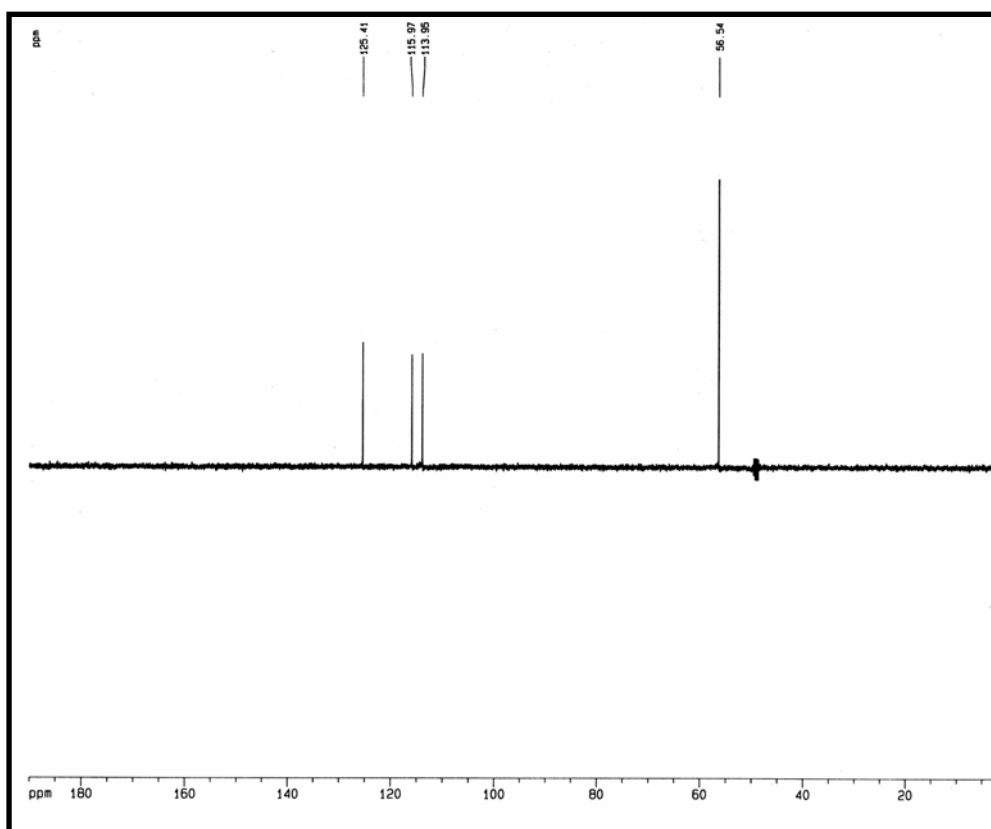


Figura 125- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACCE-4 (CD_3OD , 125 MHz)

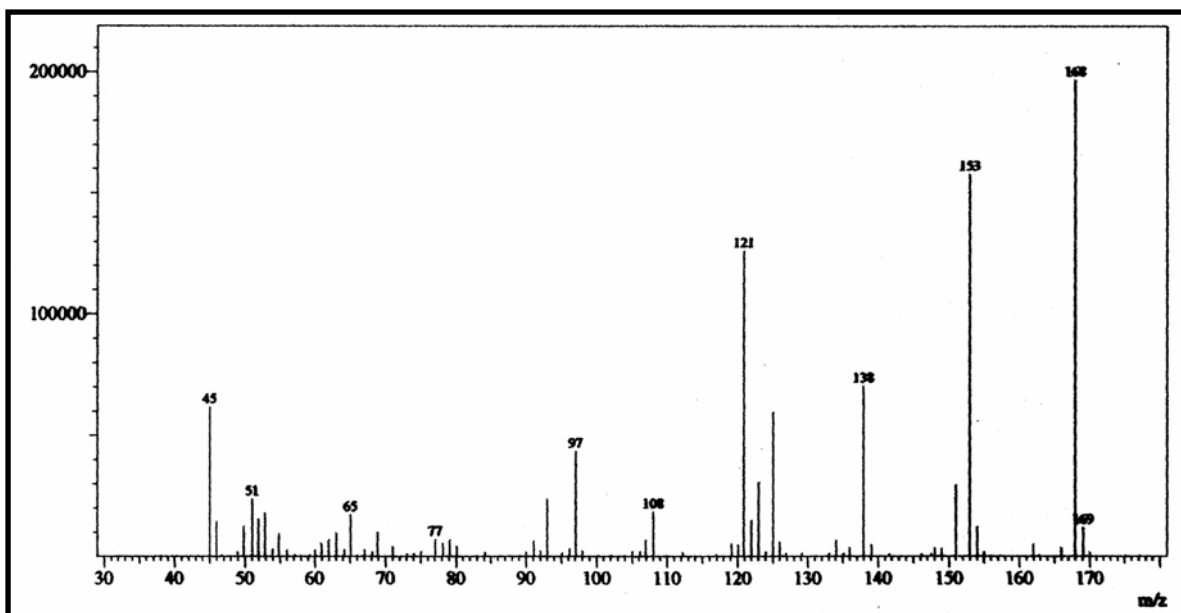


Figura 126- Espectro de massa de ACCE-4 (Impacto Eletrônico)

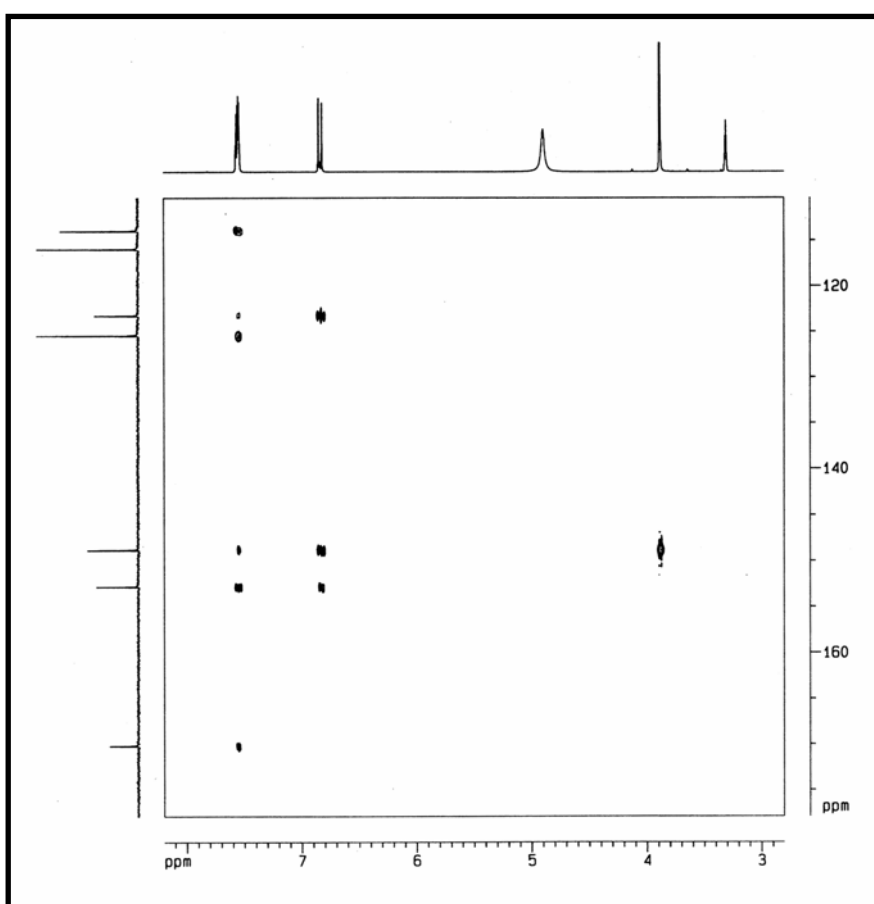


Figura 127- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC) de ACCE-4

5.19. Ácido *p*-hidroxi-benzóico (ACPa-5)

O extrato etanólico da parte aérea de espécimens jovens foi particionado com H₂O/AcOEt e cromatografado em Sephadex LH-20 e cartucho de SPE, produzindo um sólido marrom ACPa-5 (p.f. 176,1-179,2 °C) (ítem 10.1.8.9, p. 295).

No espectro de RMN ¹H de ACPa-5 (500 MHz, CD₃OD, Fig. 128, p. 219), foram observados apenas dois dupletos em δ 7,88 e 6,82 (2H, d, $J = 9,6$ Hz, H-2,6 e H-3,5), característicos de um sistema aromático *para*-dissubstituído.

O espectro de RMN ¹³C-CPD de ACPa-5 (125 MHz, CD₃OD, Fig. 129, p. 219) mostrou cinco linhas espectrais, das quais uma foi compatível com carbonila de ácido (δ 170,3, C-7) e as outras quatro foram associadas a carbonos aromáticos: δ 163,4 (C-4); 133,1 (C-2,6); 123,1 (C-1) e 116,2 (C-3,5). As absorções em δ 133,1 e 116,2. foram atribuídas a carbonos hidrogenados, após análise do espectro de RMN ¹³C-DEPT135. Por subtração dos espectros de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD, Fig. 130, p. 220), os sinais em δ 163,4 (C-4) e 123,1 (C-1) foram reconhecidos como pertencentes a carbonos não-hidrogenados, sendo a primeira absorção relacionada a carbono oxigenado.

ACPa-5 foi identificado como sendo o ácido *p*-hidroxi-benzóico, cujos dados de RMN foram concordantes com os registrados na literatura (POUCHERT, 1993) (Tab. 24).

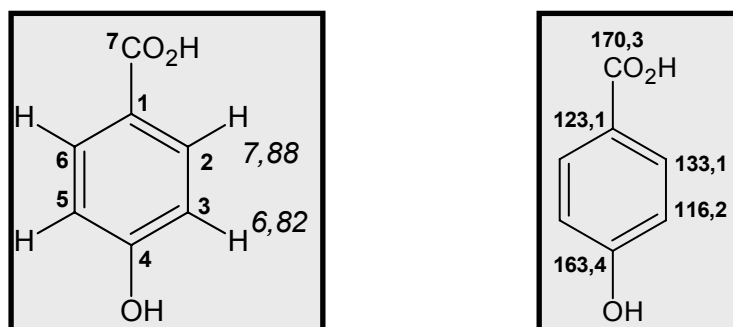


Tabela 24- Dados de RMN ¹H e ¹³C de ACPa-5 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ¹³C de ácido *p*-hidroxi-benzóico, registrados na literatura (POUCHERT, 1993).

# C	Ac. <i>p</i> -hidroxi-benzóico δ_C (ppm) DMSO- <i>d</i> ₆	ACPa-5 δ_C (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_H (ppm)(int., multip, $J_{H,H}$)
1	121,4	123,1	
2,6	131,5	133,1	7,88 (1H, d, 9,6 Hz)
3,5	115,0	116,2	6,82 (1H, d, 9,6 Hz)
4	161,6	163,4	
7	167,5	170,3	

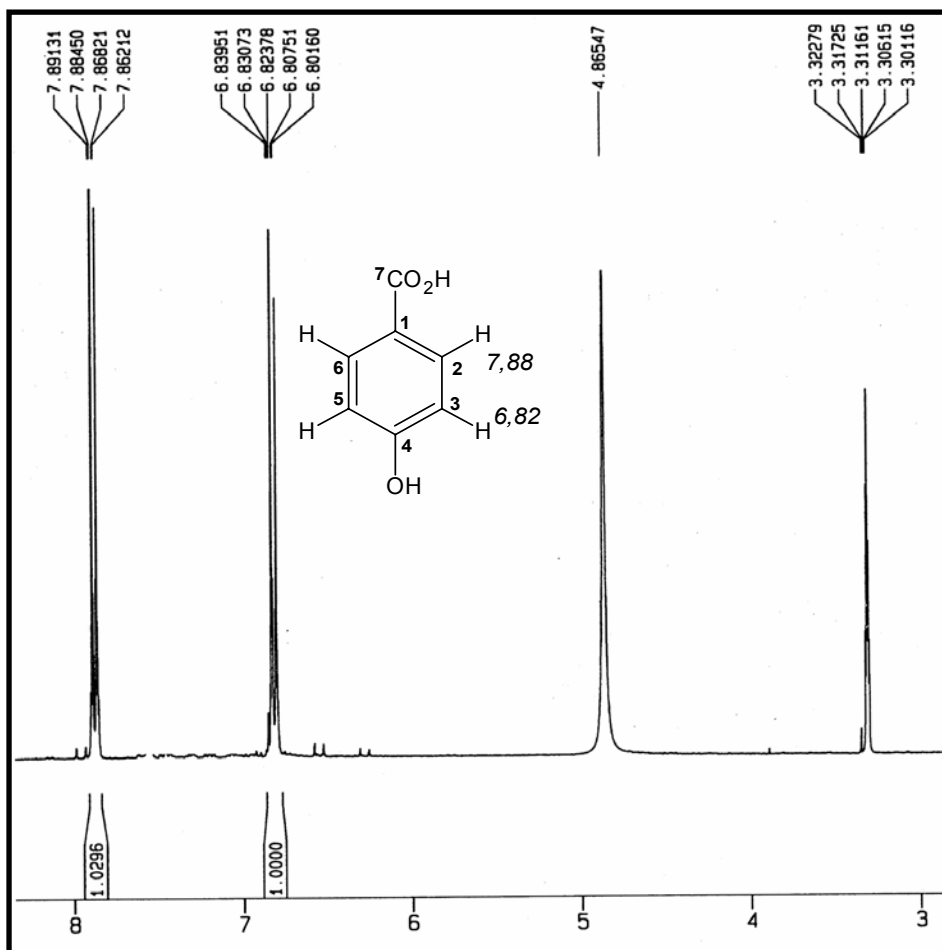


Figura 128- Espectro de RMN ¹H de ACPa-5 (CD₃OD, 500 MHz)

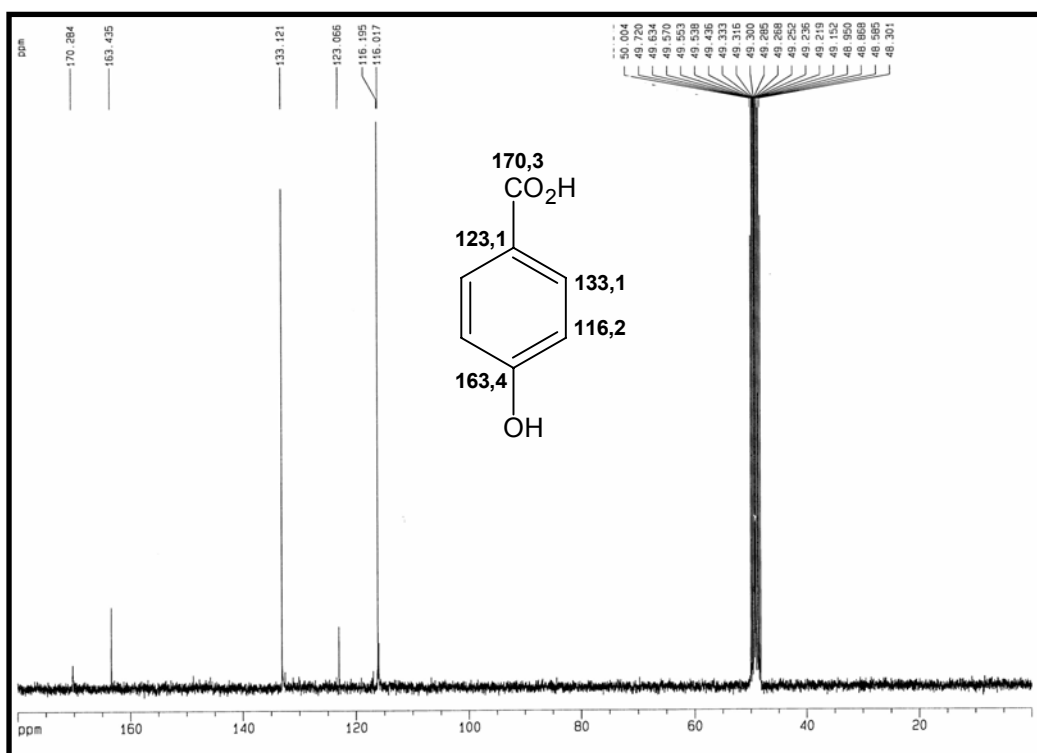


Figura 129- Espectro de RMN ¹³C-CPD de ACPa-5 (CD₃OD, 125 MHz)

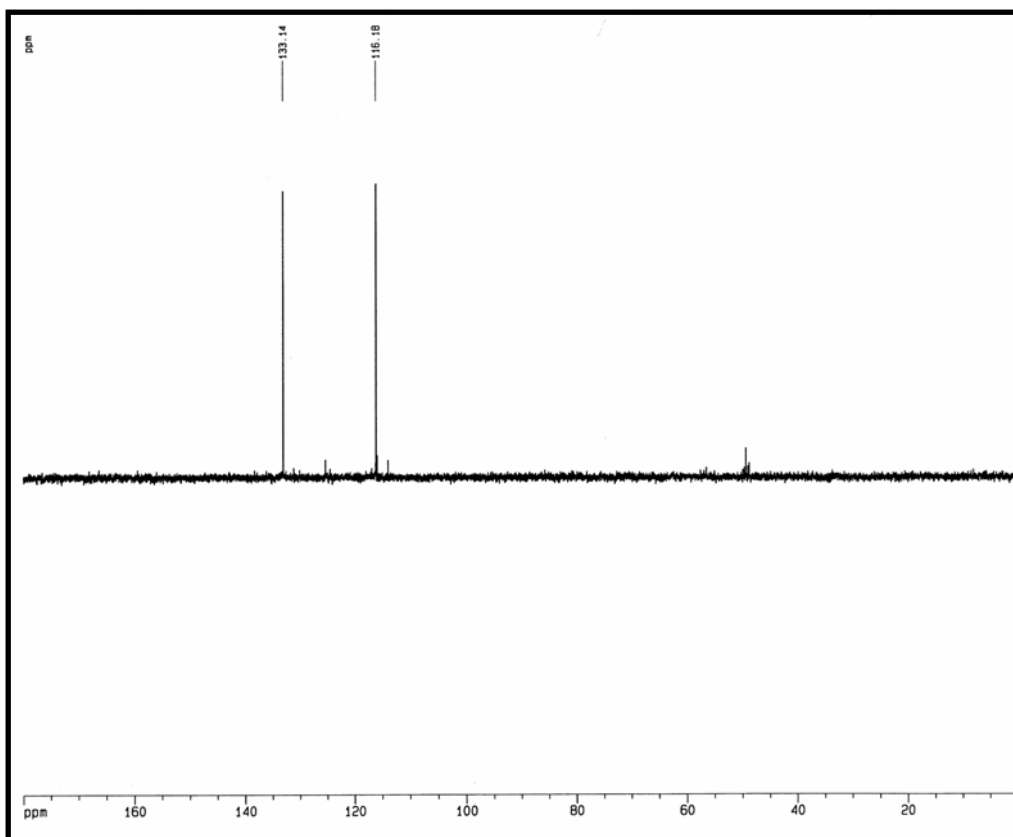


Figura 130- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACPa-5 (CD_3OD , 125 MHz)

5.20. Ácido (*E*)-*o*-cumárico (ACS-6)

Originada do particionamento do extrato etanólico das sementes, a fração acetato de etila ACSEA foi submetida a cromatografias convencionais (sílica e Sephadex LH-20) e moderna (HPLC), levando à obtenção do sólido branco ACS-6 (p.f. 213,6-215,9 °C, $t_R = 11,24$ min) (item 10.1.7.6, p. 285).

Análise do espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-6 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 131, p. 223) revelou a existência de nove carbonos sp^2 , identificados a partir de seus deslocamentos químicos (δ 171,6; 158,3; 142,4; 132,6; 130,1; 122,9; 120,9; 119,1 e 117,1). O sinal em δ 171,6 (C-9) foi atribuído à carbonila de ácido, enquanto que o sinal em δ 158,3 (C-2) foi associado a carbono oxigenado. O espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 132, p. 223) mostrou seis linhas espectrais (142,4; 132,6; 130,1; 120,9; 119,1 e 117,1), sendo todas pertencentes a carbonos monohidrogenados. Ausente no espectro DEPT135, o sinal em δ 122,9 (C-1) foi relacionado a carbono não-hidrogenado.

Submetida a uma análise por espectrometria na região do infravermelho (Fig. 133, p. 224), a amostra de ACS-6 apresentou uma banda larga em 3365 cm^{-1} , referente à deformação axial de O-H, bandas esqueléticas em 1564 e 1459 cm^{-1} e absorções em 1399 e 1252 cm^{-1} , relativas a deformações axiais C-O. Todavia, não foi verificada nenhuma banda que pudesse ser associada à carbonila.

Através do espectro de RMN ^1H de ACS-6 (500 MHz, CD_3OD , Fig. 134, p. 224), identificou-se a presença de um anel aromático *orto*-dissubstituído, caracterizado por dois dupletos em δ 7,48 e 6,84 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6 e H-3) e dois tripletos em δ 7,20 e 6,84 (1H, t, $J = 8,4$ Hz, H-4 e H-5), e uma olefina com configuração *trans*, devido à existência de dois dupletos em δ 7,94 e 6,54 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7 e H-8), sugerindo uma estrutura de um derivado cinâmico hidroxilado: ácido (*E*)-*o*-cumárico (lit. 210 °C- Catálogo Fluka, 2007).

A concordância entre os deslocamentos químicos de ^{13}C apresentados por ACS-6 e os descritos na literatura para o ácido *o*-cumárico reforçaram a proposta estrutural (POUCHERT, 1993) (Tab. 25, p. 222).

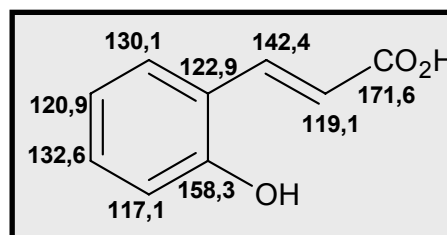
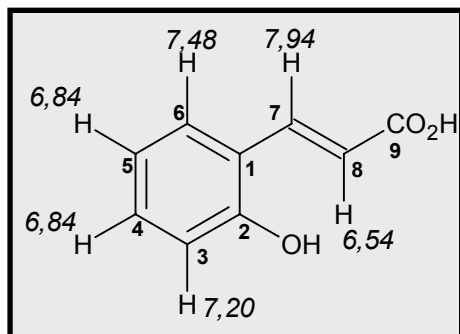


Tabela 25- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACS-6 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de ácido (*E*)-*o*-cumárico, registrados na literatura (POUCHERT, 1993).

# C	Ác. (<i>E</i>)- <i>o</i> -cumárico δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	ACS-6 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HSQC δ_{H} (ppm)(int., multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	120,8	122,9	
2,	156,5	158,3	
3	116,0	117,1	6,84 (1H, d, 8,0 Hz)
4	131,3	132,6	7,20 (1H, t, 8,4 Hz)
5	119,3	120,9	6,84 (1H, t, 8,4 Hz)
6	128,5	130,1	7,48 (1H, d, 8,0 Hz)
7	139,5	142,4	7,94 (1H, d, 16,0 Hz)
8	118,2	119,1	6,54 (1H, d, 16,0 Hz)
9	168,0	171,6	

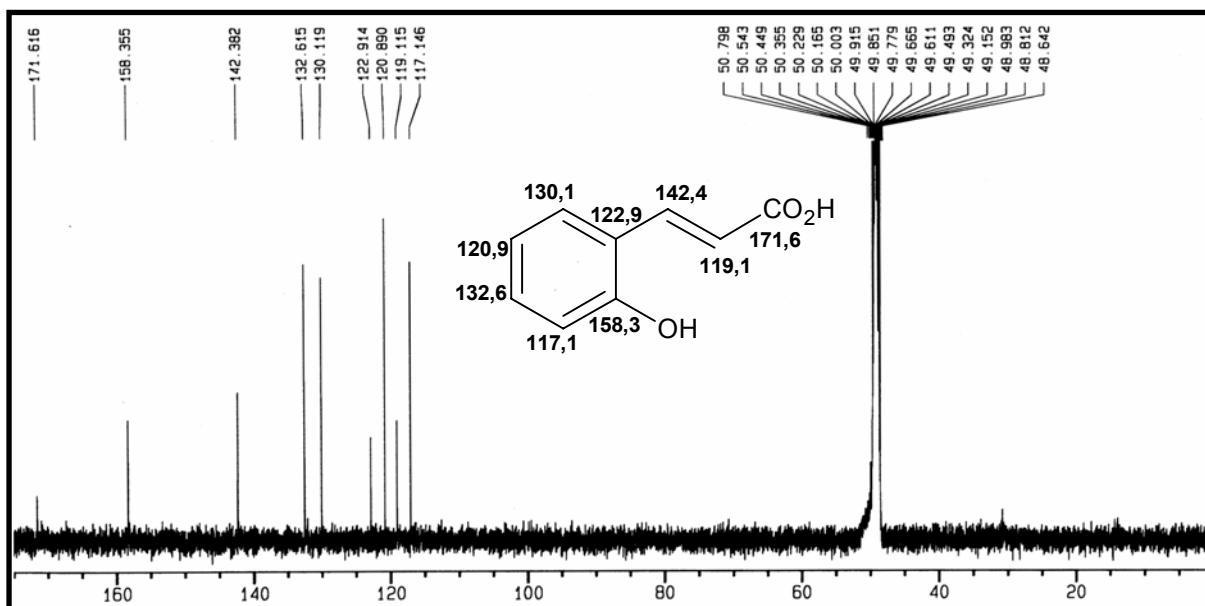


Figura 131- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACS-6 (CD_3OD , 125 MHz)

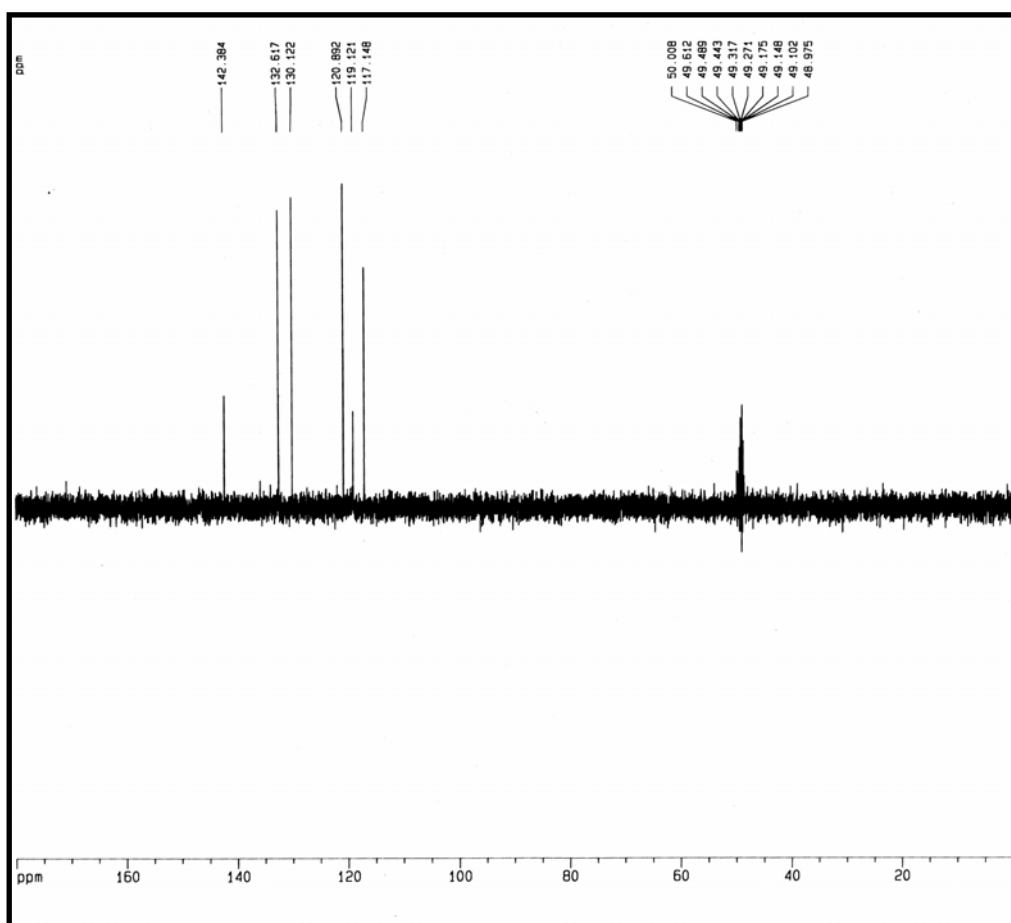


Figura 132- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de ACS-6 (CD_3OD , 125 MHz)

5.21. Quercetina (ACCE-1)

Cromatografias de adsorção (sílica) e exclusão (Sephadex LH-20) da fração metanólica ACCEAM, produzida por particionamento do extrato etanólico das cascas do caule, permitiram o isolamento de um sólido amarelo (p.f. > 300 °C), denominado ACCE-1 (ítem 10.1.6.5, p. 282), cujo espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , Fig. 135, p. 227) mostrou um conjunto de sinais em δ 7,67 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 7,53 (1H, dd, $J = 8,5$ e 2,1 Hz, H-6') e 6,88 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), referentes a um sistema aromático de spin ABX e dois dupletos em δ 6,41 e 6,18 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8 e H-6), compatíveis com hidrogênios aromáticos meta-posicionados.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-1 (125 MHz, DMSO- d_6 , Fig. 136, p. 227) exibiu quinze linhas espectrais, sendo todas pertencentes a carbonos sp^2 (δ 175,8; 163,9; 160,7; 156,2; 147,7; 146,8; 145,1; 135,7; 122,0; 120,0; 115,6; 115,1; 103,0; 98,2 e 93,4). A absorção em δ 175,8 (C-4) foi associada à carbonila de cetona conjugada, enquanto os sinais em δ 164,0 (C-7); 160,7 (C-5); 156,2 (C-9); 147,7 (C-2); 146,8 (C-4'); 145,1 (C-3') foram associados a carbonos oxigenados. Os carbonos hidrogenados foram identificados por RMN-HSQC (Fig. 137, p. 228), através das seguintes correlações: os dupletos em δ_{H} 6,41 (C-8) e 6,18 (C-6) com os sinais de carbono em δ_{C} 93,4 (C-8) e 98,2 (C-6) e o sistema ABX [$(\delta_{\text{H}}$ 7,67 (H-5'); 7,53 (H-6') e 6,88 (H-2'))] com os sinais de carbono em δ_{C} 115,6 (H-5'); 120,0 (H-6') e 115,1 (H-2'), respectivamente. Os dados espectroscópicos conduziram à dedução da fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, compatível com a estrutura de um flavonol pentahidroxiado, o qual foi sugerido corresponder à quercetina (lit. 314 °C). Referências de dados de RMN ^{13}C deram suporte à proposição estrutural (AGRAWAL, 1989) (Tab. 26, p. 226).

A quercetina é o flavonol mais comumente encontrado em alimentos, sendo sua ingestão diária estimada em até 38 mg, e a ela são atribuídas ações antioxidante, anticarcinogênica, antiinflamatória e efeitos antiagregante e vasodilatador (ERLUND, 2004).

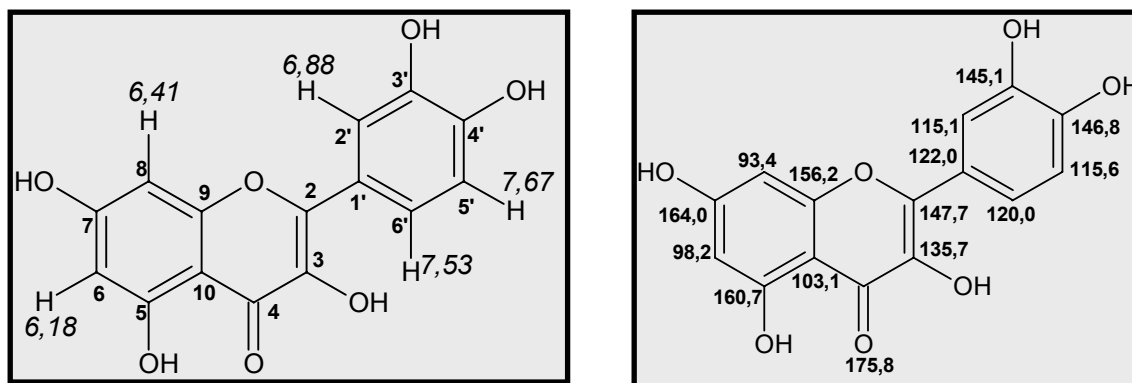


Tabela 26- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-1 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de quercetina, registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).

# C	Quercetina δ_{C} (ppm) CD_3OD	ACCE-1 δ_{C} (ppm) $\text{DMSO}-d_6$	HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)
2	147,5	146,8	
3	136,5	135,7	
4	176,5	175,8	
5	161,0	160,7	
6	99,5	98,2	6,18 (1H, d, 2,0 Hz)
7	166,0	164,0	
8	94,5	93,4	6,41 (1H, d, 2,0 Hz)
9	156,7	156,2	
10	104,0	103,1	
1'	123,0	122,0	
2'	116,0	115,1	6,88 (1H, d, 2,1 Hz)
3'	145,7	145,1	
4'	148,1	147,7	
5'	116,5	115,6	7,67 (1H, d, 8,5 Hz)
6'	121,0	120,0	7,53 (1H, dd, 8,5 Hz; 2,1 Hz)

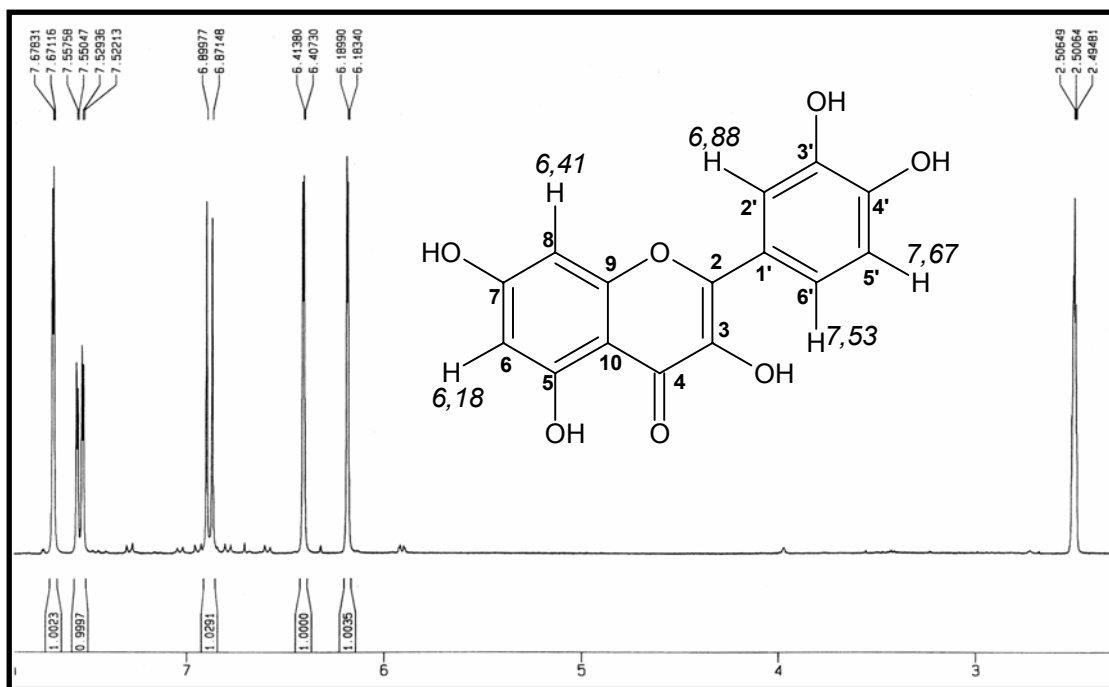


Figura 135- Espectro de RMN ^1H de ACCE-1 (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

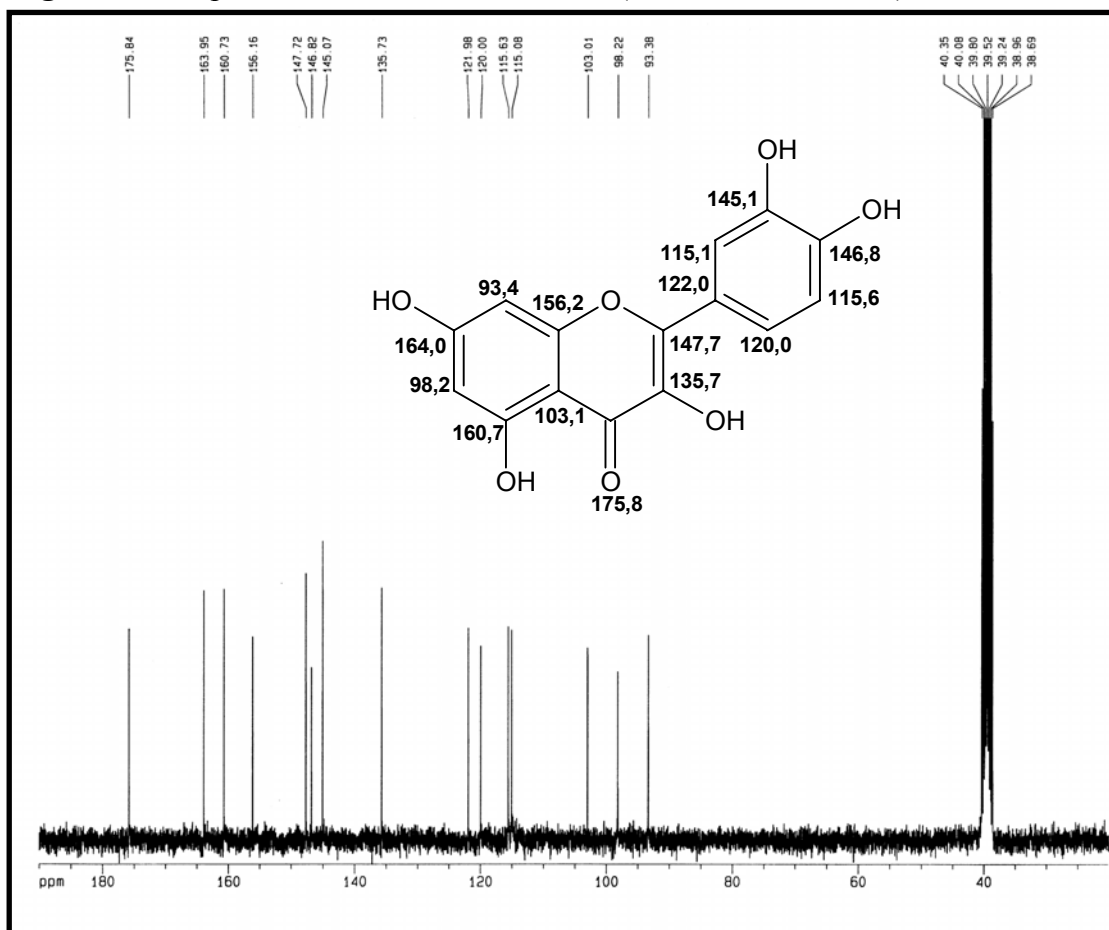


Figura 136- Espectro de RMN ^{13}C -CPD de ACCE-1 (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

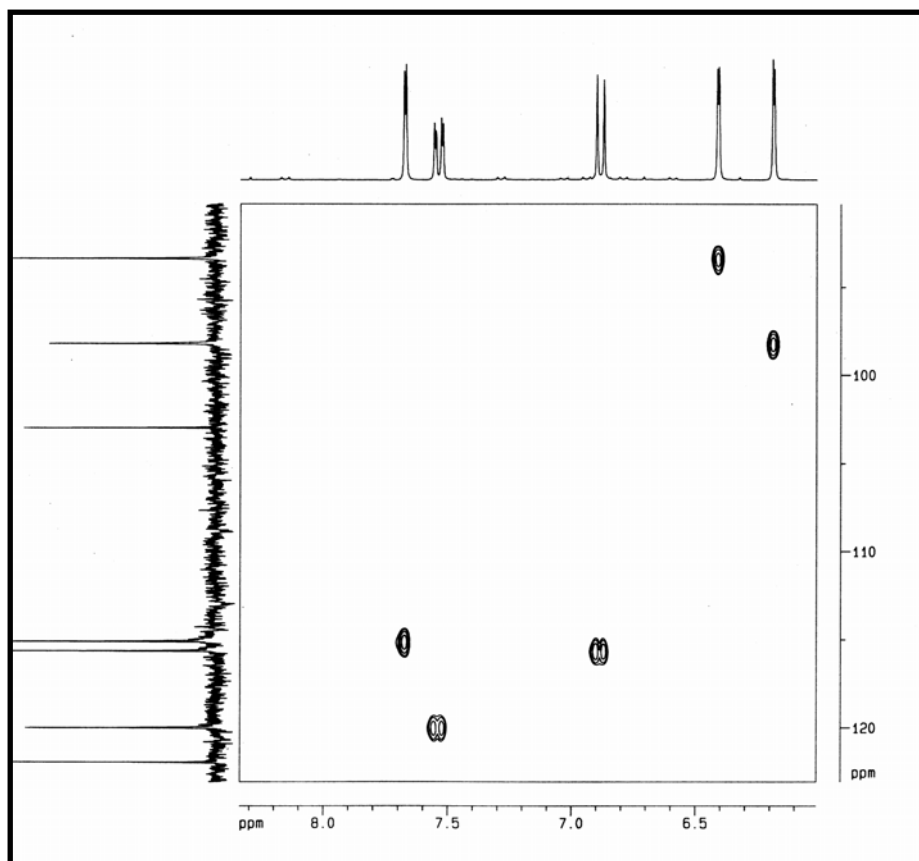


Figura 137- Espectro de RMN-HSQC (DMSO- d_6 , 125 x 500 MHz) de ACCE-1

5.22. Isocampferídio (ACCE-7)

A partir do particionamento do extrato etanólico das cascas do caule, obteve-se uma fração metanólica ACCEAM, que submetida a cromatografias em gel de sílica e Sephadex LH-20, resultou na obtenção de um sólido amarelo chamado ACCE-7 (p.f. 290,7-292,1 °C) (ítem 10.1.6.8, p. 278). Esta substância foi descoberta ser quimicamente semelhante ao sólido amarelo ACPa-3 (5,0 mg), isolado do extrato etanólico das parte aérea de plantas jovens, após análise por CCD.

Os espectros de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , Fig. 138, p. 231) de ACCE-7 e ACPa-3 mostraram dupletos em δ 7,93 e 6,89 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2',6') referentes a um anel aromático *para*-dissubstituído, dois dupletos em δ 6,35 e 6,15 (1H, $J = 2,0$ Hz, H-8 e H-6), atribuídos aos hidrogênios aromáticos *meta*-posicionados e um singlete em δ 3,77 (3H, s, correspondente à metoxila. O espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , Fig. 139, p. 231) exibiu catorze linhas espectrais, das quais uma foi atribuída a carbonila flavonoídica (δ 180,0) e outras cinco foram associadas a carbonos sp^2 oxigenados: δ 165,9 (C-7); 163,0 (C-5); 161,7 (C-4'); 158,4 (C-9); 158,0 (C-2) e 139,4 (C-3). No espectro de RMN ^{13}C DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , Fig. 140, p. 232), foram verificadas absorções associadas a carbonos sp^2 hidrogenados: δ 131,4 (C-2',6'); 116,5 (C-3',5'); 99,8 (C-6) e 94,8 (C-8). Da subtração dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT135, resultaram apenas as absorções relativas aos carbonos não-hidrogenados: δ 122,6 (C-1'); 105,9 (C-10).

A reunião dos dados espectroscópicos de ACCE-7 permitiu sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze, correspondente a um esqueleto flavônico tetrassubstituído, o qual foi identificado como sendo compatível à estrutura do isocampferídio (lit.: p.f. 299-302 °C) (Djerassi et al, 1994). Dados de RMN ^{13}C da literatura corroboraram a proposta (AGRAWAL, 1989) (Tab. 27, p. 230).

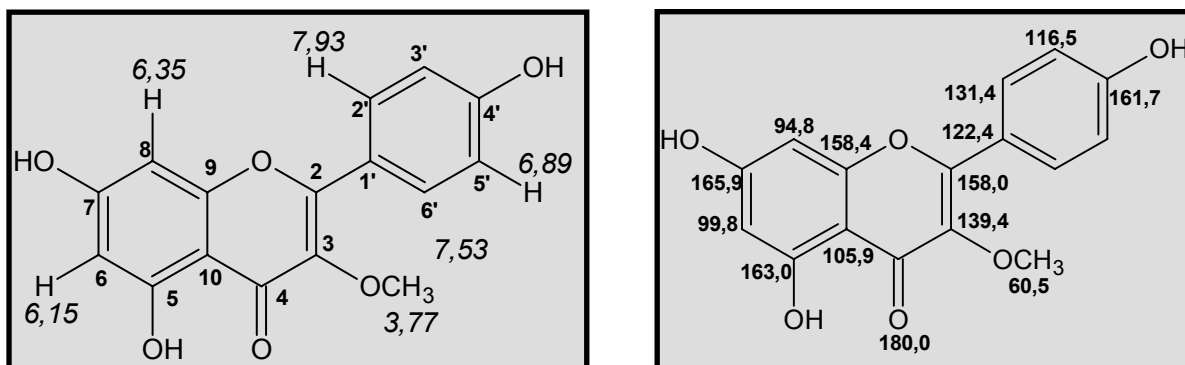


Tabela 27- Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ACCE-7 dispostos segundo as correlações obtidas através do espectro HMQC e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de isocampferídio, registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).

# C	Isocampferídio δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	ACCE-7 δ_{C} (ppm) CD ₃ OD	HMQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)
2	157,3	158,0	
3	139,4	139,4	
4	179,6	180,0	
5	163,1	163,0	
6	100,7	99,8	6,15 (1H, d, 2,0 Hz)
7	167,1	165,9	
8	95,7	94,8	6,35 (1H, d, 2,0 Hz)
9	158,3	158,4	
10	105,7	105,9	
1'	122,4	122,6	
2',6'	131,9	131,4	7,93 (2H, d, 8,5 Hz)
3',5'	117,5	116,5	6,89 (2H, d, 8,5 Hz)
4'	162,1	161,7	
3-OMe	61,9	60,5	3,77 (3H, s)

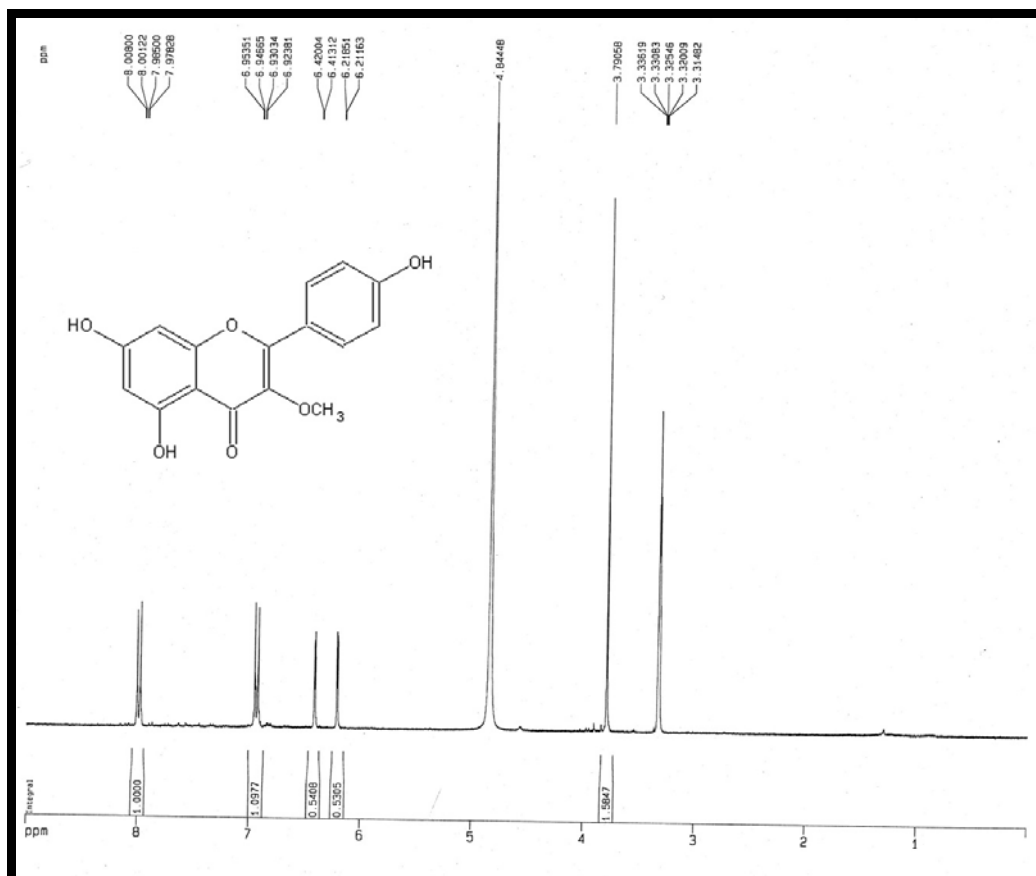


Figura 138- Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) de ACCE-7

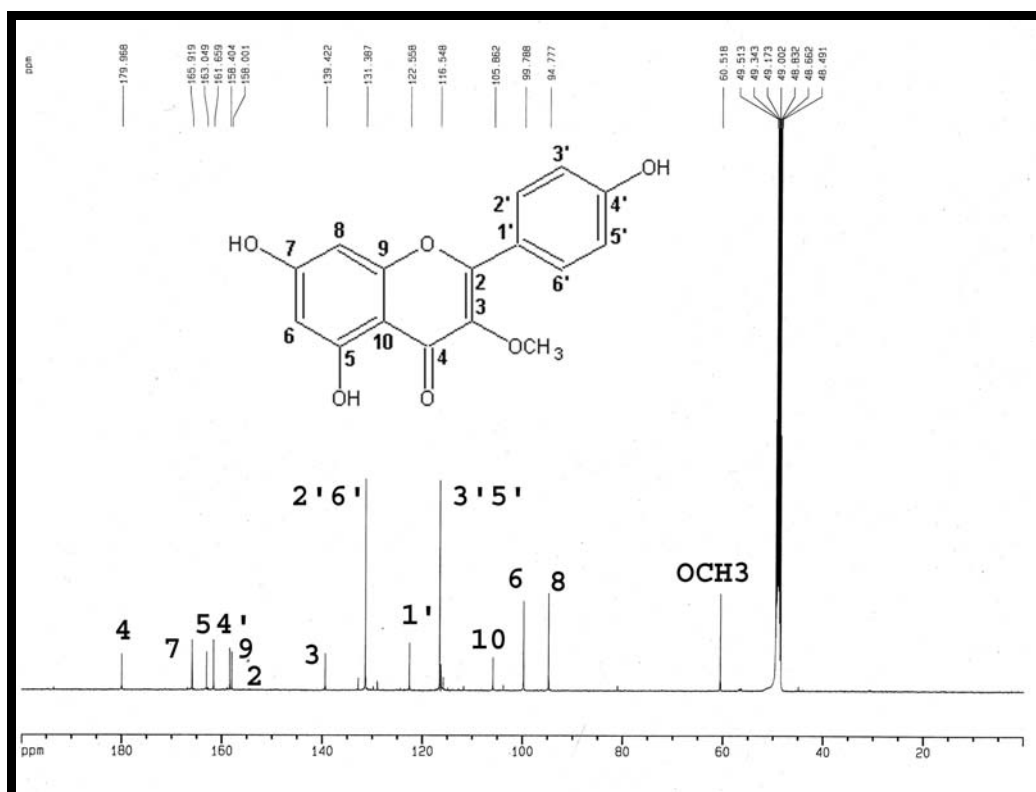


Figura 139- Espectro de RMN ¹³C-CPD (CD₃OD, 125 MHz) de ACCE-7

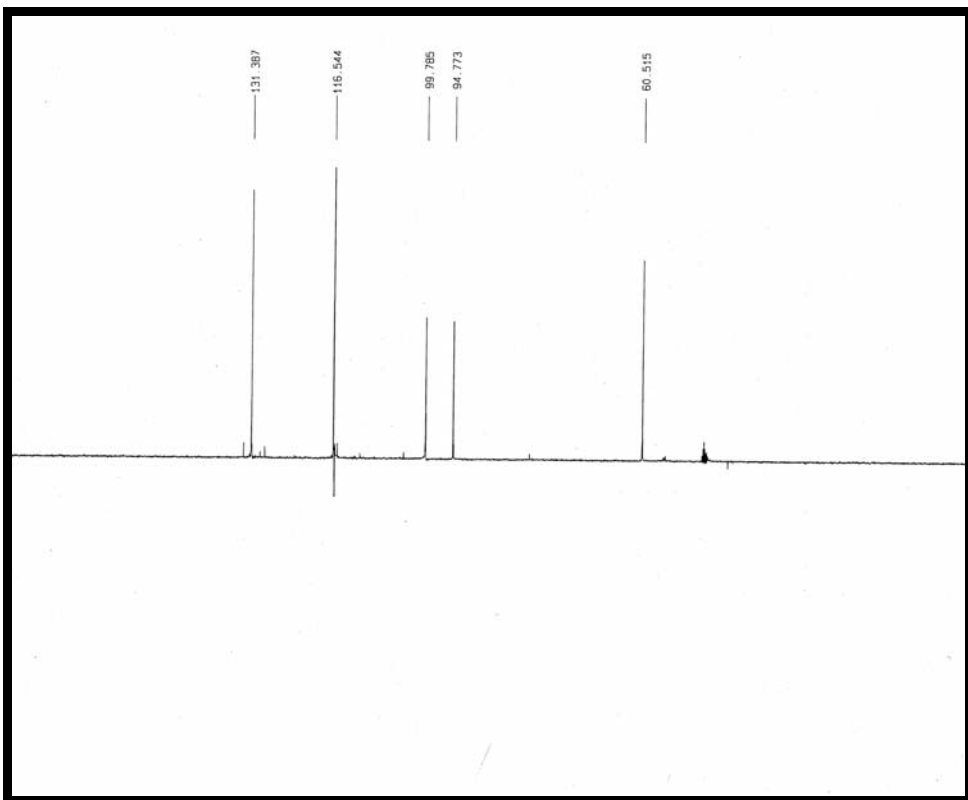


Figura 140- Espectro de RMN ¹³C-DEPT135 (CD₃OD, 125 MHz) de ACCE-7

5.23. Cumarina (ACS-1 e ACPa-2)

Cromatografia em gel de sílica da fração E7-ACPaAD(4-6) (380 mg) permitiu o isolamento de 104 mg de cristais brancos sublimáveis (p.f. 67,8-68,7 °C), com odor forte e peculiar de cumarina, denominados ACPa-2 e ACS-1 (item 10.1.7.1, p. 282).

O espectro de RMN ¹H de ACPa-2 e ACS-1 (300 MHz, CDCl₃, Fig. 141, p. 235) exibiu dois multipletos em δ 7,51 e 7,29 (2H, m), relacionados aos hidrogênios aromáticos e dois dupletos em δ 7,71 e 6,42 (1H, d, $J = 9,5$ Hz), associados aos hidrogênios *cis*-olefínicos.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (75 MHz, CDCl₃, Fig. 142, p. 235) apresentou nove linhas espectrais, sendo uma delas em δ 160,9 (C-2) compatível com a carbonila lactônica α,β -insaturada e as demais foram associadas aos carbonos sp² (δ 154,3 -116,9). A combinação dos espectros de RMN ¹³C-CPD e RMN ¹³C-DEPT135 (75 MHz, CDCl₃, Fig. 143, p. 236). revelaram a existência de seis carbonos monohidrogenados [δ 141,6 (C-4); 132,0 (C-7); 128,1 (C-5); 124,6 (C-6); 117,1 (C-3) e 116,9 (C-8)] e três carbonos não hidrogenados [δ 160,9 (C-2); 154,3 (C-10) e 119,0 (C-9)].

Dedução da fórmula molecular para ACS-1, C₉H₆O₂, foi feita a partir dos seus dados de RMN. Tendo o seu IDH = 7, foi proposta uma estrutura composta por um anel benzênico mais um anel lactônico α, β -insaturado, sugerindo tratar-se da cumarina (lit.: p.f. 68-70 °C). Os dados de RMN ¹³C descritos na literatura corroboraram a estrutura proposta para ACS-1 e ACPa-2 (POUCHERT, 1993) (Tab. 28, p. 234).

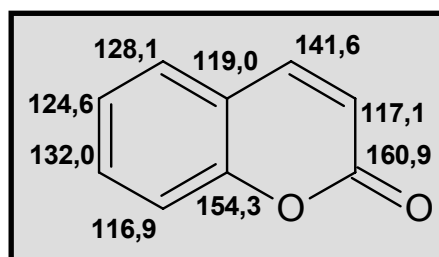
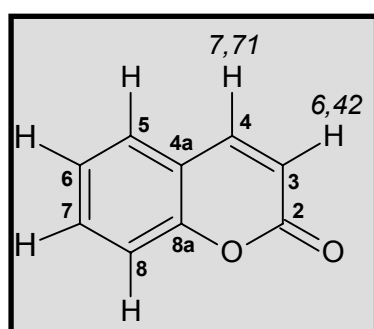


Tabela 28- Dados de RMN ^{13}C de ACS-1 e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C de cumarina, registrados na literatura (POUCHERT, 1993).

# C	Cumarina δ_{C} (ppm) CDCl_3	ACS-1 δ_{C} (ppm) CDCl_3
2	160,6	160,9
3	116,4	117,1
4	143,3	141,6
5	127,7	128,1
6	124,3	124,6
7	131,6	132,0
8	116,6	116,9
9	118,6	119,0
10	153,8	154,3

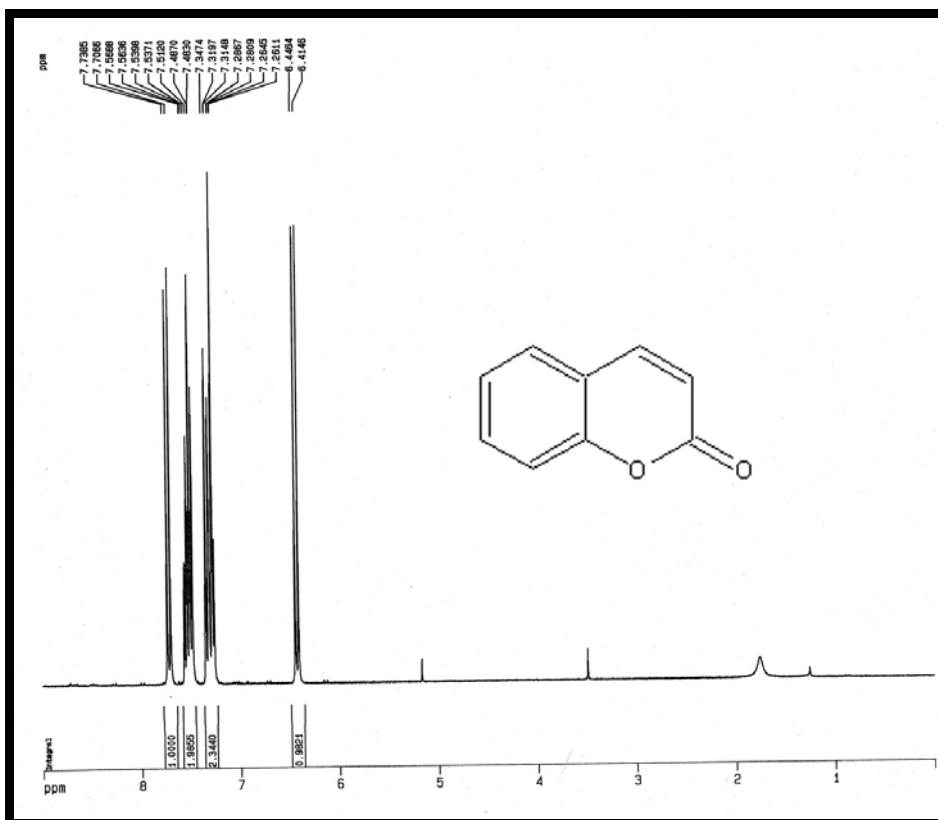


Figura 141- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de ACS-1

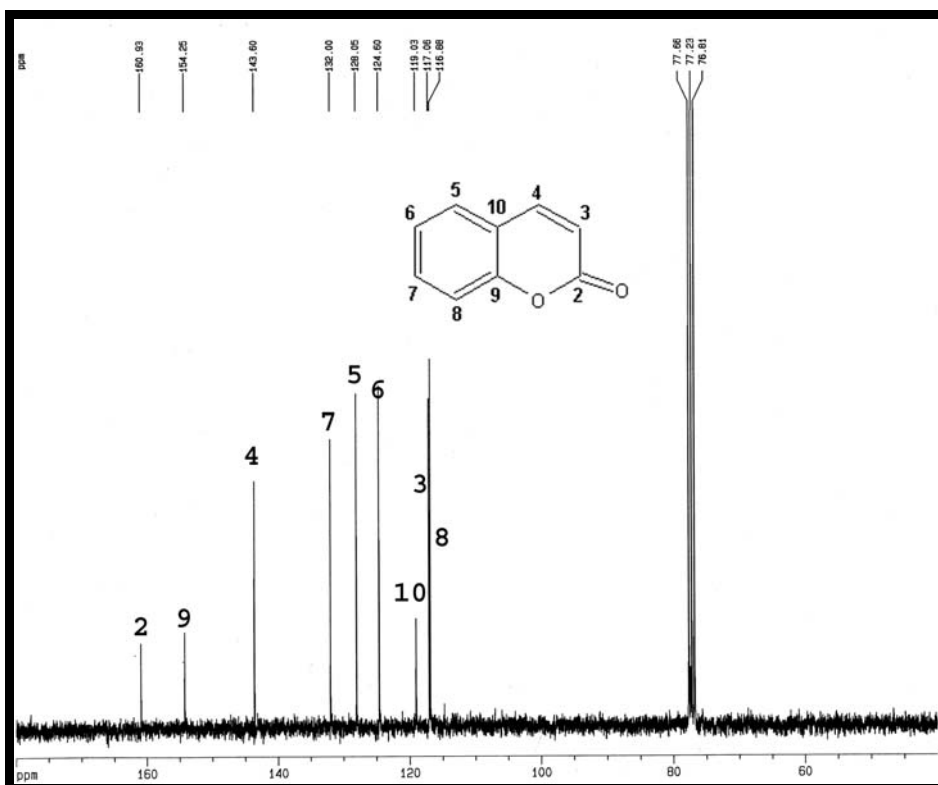


Figura 142- Espectro de RMN ^{13}C -CPD (CDCl_3 , 75 MHz) de ACS-1

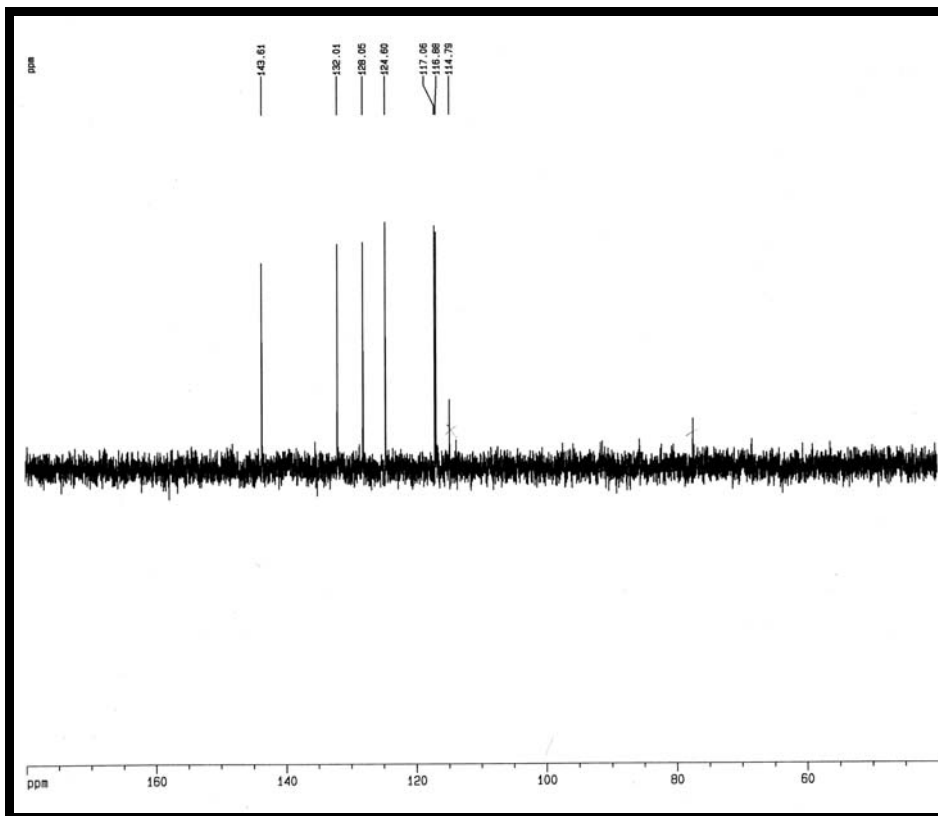


Figura 143- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (CDCl_3 , 75 MHz) de ACS-1

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, 564 p.
- BABA, K.; YOSHIKAWA, M.; TANIGUCHI, M.; KOZAWA, M. Biflavonoids from *Daphne odora*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1021-1026, 1995.
- BRAVO, J. A. B.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVIER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.
- BREITMAIER, E; VOELTER, W.; ¹³C NMR Spectroscopy: methods and applications. Düsseldorf: Verlag Chemie, 1974.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1241-1243, 2006
- CUSSANS, N. J.; HUCKERBY, T. N. Carbon-13 NMR of heterocyclic compounds (IV) A 20 MHz study of chemical shifts and carbon-proton coupling constants in a series of hydroxy, methoxy and glucosyl coumarins. **Tetrahedron**, v. 31, p.2719-2726, 1975.
- DEBENEDETTI, S. I.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; KIMPE, N.; BOCYKENS, M. Two 6,7-dioxigenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p.702-710, 1998.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002, 515 p.
- DJERASSI, C.; CONNOLY, J. D.; FAULKNER, D. J.; MORI, K.; NAKANISHI, K.; OURISSON, G.; RAPHAEL, R. A.; SHAMMA, M.; TAMM, C. H.; **Dictionary of Natural Products**, 1st ed., London: Chapman & Hall, 1994.
- ERLUND, I. A review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. **Nutrition Res.**, v. 24, p. 851-874, 2004.
- FRIEBOLIN, H. **Basic one and two-dimensional NMR spectroscopy**. Weiheim: VCH, 1991, 344 p.
- GOTTLIEB, H. E. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy o 6- and 7- substituted coumarins. Correlation with Hammett constants. **J. Chem. Soc. Perkins II**, v. 2, n.4, p. 435-437, 1979.
- JHA, H. C.; ZILLIKEN, F.; BREITMAIER, E. Carbon-13 chemical shift assignments of chromones and isoflavones. **Can. J. Chem.**, v. 58, p. 1211-1219, 1980.
- KHALIL, A. T.; CHANG, F.R.; LEE, Y. H.; CHEN, C. Y.; LIAW, C. C.; RAMESH, P.; YUAN, S. S. F., WU, Y. C. Chemical constituents from the *Hydrangea chinensis*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 26, n. 1, p. 15-20, 2003.
- KHAN, I. A.; AVERY, M. A.; BURANDT, C. L.; GOINS, D. K.; MIKELL, J. R.; NASH, T. E.; AZADEGAN, A.; WALKER, L. A. Antigiardial activity of isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 10, 1414-1416, 2000.
- MAES, D.; VERVISCH, S.; DEBENEDETTI, S. I.; DAVIO, C.; MANGELINCKX, S.; GIUBELLINA, N.; KIMPE, N. Synthesis and structural revision of naturally occurring derivatives. **Tetrahedron**, v. 61, n. 9, p. 2505-2511, 2005.
- POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J.; **The Aldrich Library of ¹³C, ¹H FT NMR spectra**, 1st ed., Milwaukee: Aldrich Chemical Company, v. 2, 1993.

PRATS, E.; BAZZALO, M. E.; LEON, A.; JOKKIN, J. V.; Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*- a way to overcome sunflower head rot. **Euphytica**, v. 147, n. 3, p. 451-460, 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocologia**. Colômbia: Editorial Premier, 1997, 352 p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 5ª. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

TANIGUCHI, M.; BABA, K. Three biflavonoids from *Daphne odora*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1447-1453, 1996.

TOMMASI, N.; FEO, V.; PIZZA, C.; ZHOU, Z. I. Constituents of *Bidens parviflora*. **Fitoterapia**, v. 63, n. 5, p. 470, 1992.

VASANGE, M.; LIU, BOLING; WELCH, C.J.; ROLFSEN, W.; BOHLIN, L. The flavonoid constituents of the polypodium species and their effect on the elastase release in human neutrophils. **Planta Medica**, v. 63, p. 511-17, 1997.

WU, S.; M. A; Y.; LUO, X.; HAO, X.; WU, D. Studies on chemical constituents in root bark of *Paeonia suffruticosa*. **Zhongcaoyao**, v. 33, n. 8, p. 679-680, 2002.

ZHANG, A. L.; YE, Q.; LI, B. G.; QI, H. Y.; ZHANG, G. L. Phenolic and triterpene glycosides from the stems of *Ilex litseaefolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 10, 2006.

6. BIOSÍNTESE DE FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

ISOLADAS DE *A. CEARENSIS*

A via chiquimato é a principal rota metabólica de gênese de compostos aromáticos, adotada por microorganismos e plantas. Os metabólitos desta rota não são biossintetizados por animais, todavia podem ser adquiridos pela dieta. O intermediário central desta via é o ácido chiquímico, substância isolada originalmente de plantas japonesas do gênero *Illicium*, o qual dá origem a dois aminoácidos aromáticos: L-fenilalanina e L-tirosina. A partir destes aminoácidos, são formados compostos com unidades C₆C₃ (fenilpropeno) como derivados cinâmicos, cumarinas, lignanas e flavonóides, os quais são amplamente encontrados em produtos naturais.

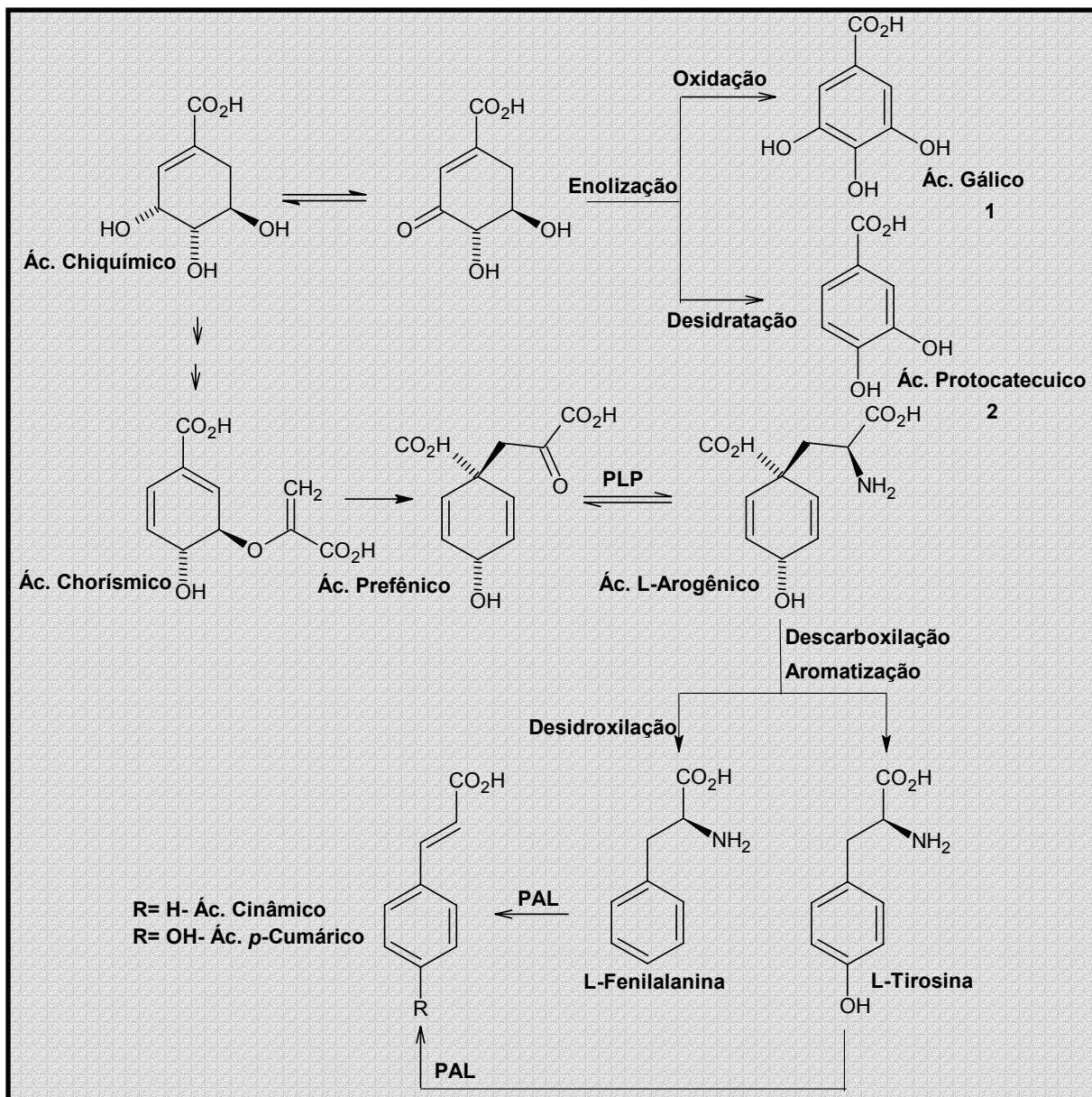
Principal precursor dos compostos fenólicos, O ácido chiquímico é gerado pelo acoplamento do fosfoenolpiruvato com D-eritose-4-fosfato, resultando no ácido 7-fosfato-3-desoxi-D-arabino-heptulosônico, o qual sofre eliminação de ácido fosfórico e reação aldólica intramolecular para produzir o ácido 3-de-hidroquínico. Este intermediário é convertido em ácido chiquímico após desidratação e redução com NADPH.

O ácido chiquímico pode seguir dois caminhos: dar origem a ácidos fenólicos simples (**ácido protocatecuico** e ácido gálico) ou ser convertido em ácido chorísmico, um intermediário-chave para a biossíntese de aminoácidos (Quadro 3, p. 240).

Os ácidos fenólicos obtidos pela via chiquimato se caracterizam pelo padrão de hidroxilação preferencialmente *para* em relação ao grupo da cadeia lateral, na primeira oxidação, e *orto* ao grupo hidroxila no caso de poli-hidroxilação. No entanto, através da via acetato, outra via formadora de compostos fenólicos, o padrão de substituição é tipicamente *meta*. Isto permite uma identificação segura da rota metabólica utilizada pela substância fenólica, na maioria das vezes.

Os aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina, diferenciados apenas por uma hidroxila da posição 4, são resultantes da descarboxilação sucedida de aromatização do ácido chorísmico seguida por transaminação, promovida por transaminase dependente de piridoxal-fosfato. Por sua vez, estes aminoácidos podem se transformar respectivamente em ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico, após eliminação de amônia da cadeia lateral. Todas as plantas são capazes de desaminar a fenilalanina, entretanto a degradação da tirosina ocorre de forma muito limitada em espécies gramíneas. Desta forma, o ácido *p*-cumárico é mais comumente produzido por hidroxilação do ácido cinâmico.

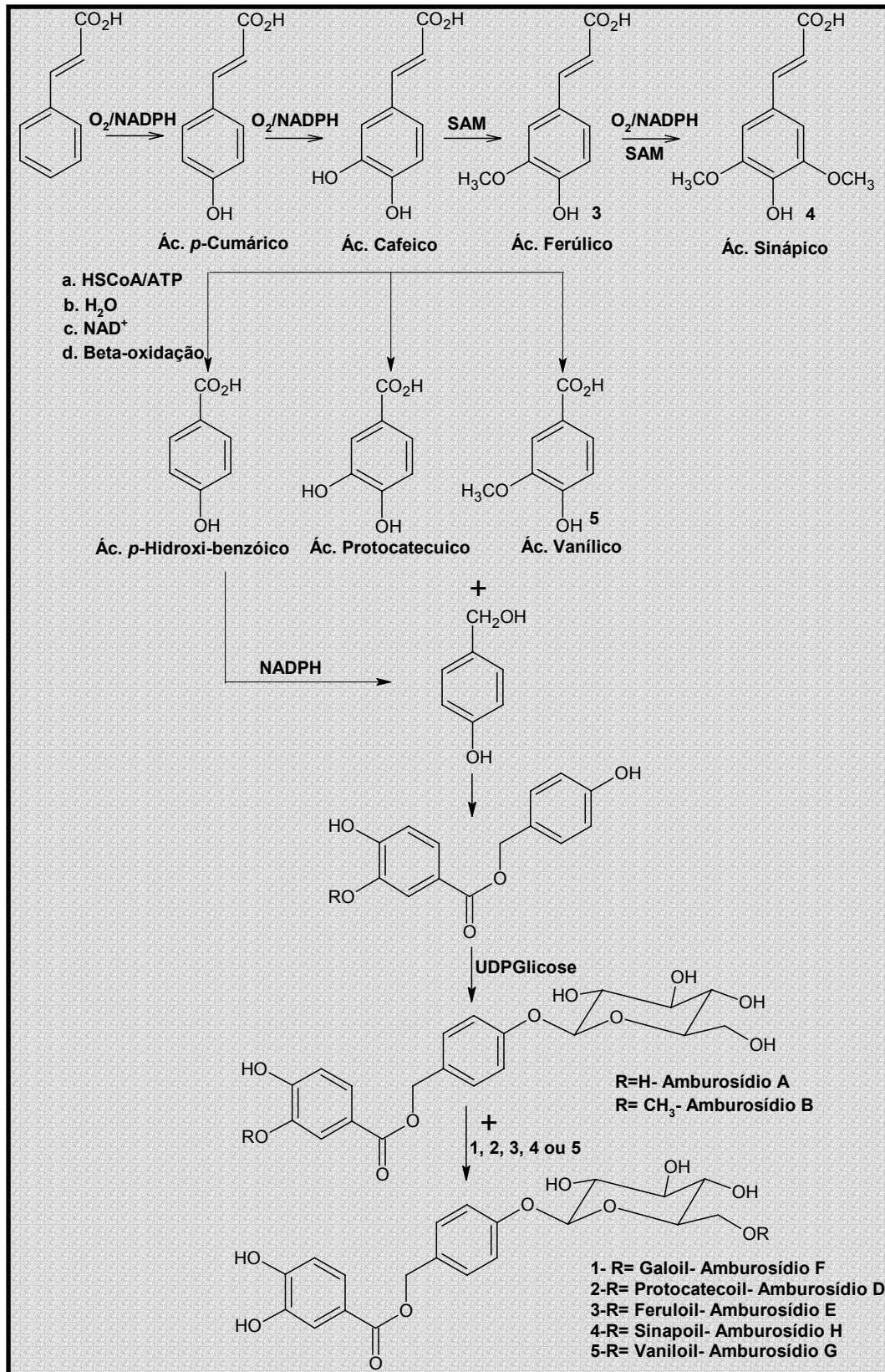
Abaixo, seguem propostas biogênicas para as substâncias isoladas de *A. cearensis*, baseadas em evidências biossintéticas descritas da literatura, portanto tratando-se de esquemas meramente especulativos.



Quadro 3- Rota biossintética de formação de ácidos fenólicos simples e aminoácidos aromáticos.

Através de uma série de reações de oxidação e metilação (promovida pela S-adenosil-metiltransferase), o ácido *p*-cumárico pode ser transformado em ácido cafeico, ácido ferúlico e sinápico. Estes derivados cinâmicos podem originar ácidos fenólicos simples, utilizando um mecanismo de β -oxidação, semelhante à sofrida por ácidos graxos. Nesta alternativa, um éster de coenzima A é incorporado aos ácidos cinâmicos e depois é eliminado na forma de acetilCoA, através de reação de Claisen reversa, para gerar os derivados do ácido

benzóico: ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido protocatecuico e ácido vanílico (Quadro 4, p. 245).



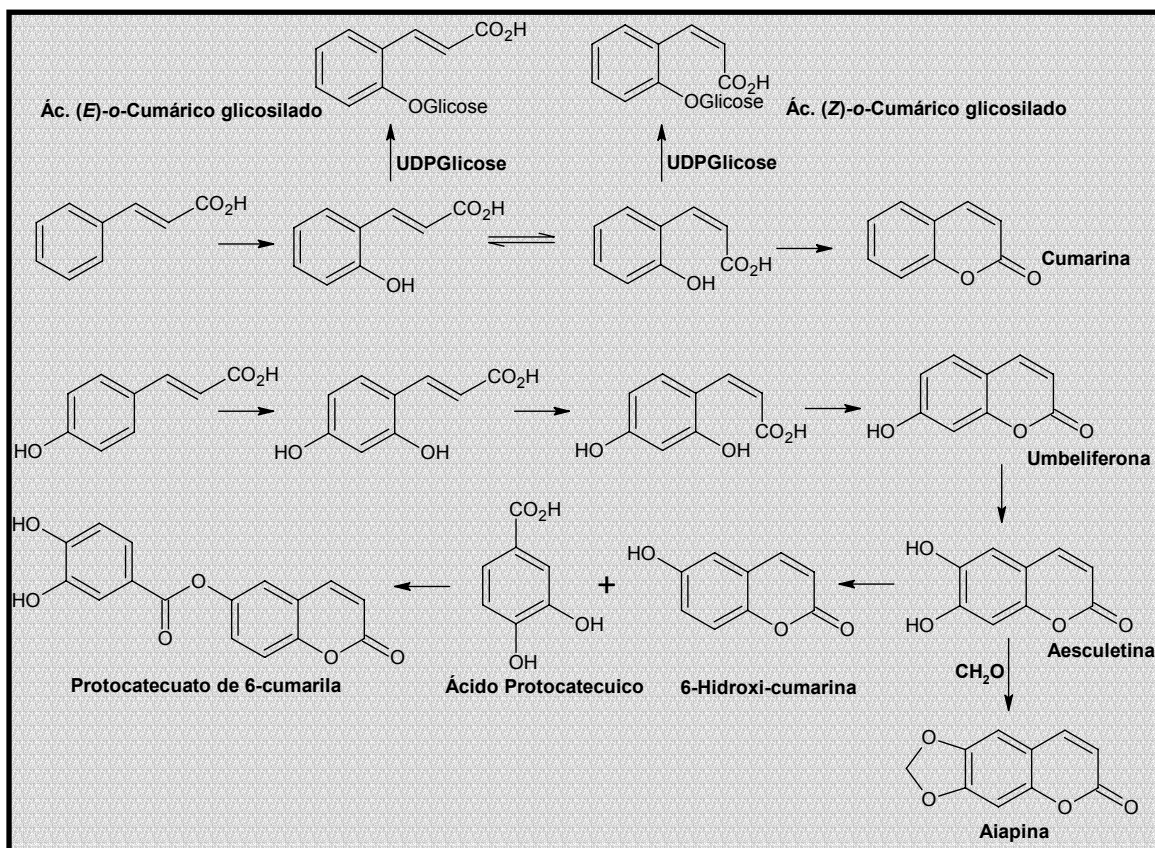
Quadro 4- Biogênese de formação de amburosídeos e derivados dos ácido benzóico e cinâmico.

6.1. Amburosídeos

Os amburosídeos são glicosídeos fenólicos encontrados, até o momento, exclusivamente em *A. cearensis*. Sua biogênese deve-se iniciar provavelmente com a redução do ácido *p*-hidroxi-benzóico a álcool *p*-hidroxi-benzílico, o qual pode ser esterificado por uma molécula de ácido protocatecuico, através da hidroxila alcoólica (nucleófilo mais forte do que a hidroxila fenólica), para render protocatecuato de *p*-hidroxi-benzila. A glicosilação do éster com UDPglicose leva à síntese do **amburosídeo A**. Caso a esterificação do álcool *p*-hidroxi-benzílico seja feita com ácido vanílico, o heterosídeo produzido será o **amburosídeo B**. Os demais amburosídeos isolados são produzidos pela conjugação do amburosídeo A com ácidos fenólicos: ácido ferúlico (**amburosídeo E**), ácido sinápico (**amburosídeo H**), ácido protocatecuico (**amburosídeo D**), ácido vanílico (**amburosídeo G**) e ácido gálico (**amburosídeo F**) (Quadro 4, p. 241).

6.2. Cumarinas

Reação de *orto*-hidroxilação do ácido (*E*)-cinâmico forma o ácido (*E*)-*o*-cumárico, o qual pode se interconverter no seu estereoisômero ácido (*Z*)-*o*-cumárico. A isomerização do ácido *o*-cumárico favorece sua lactonização, a partir da qual é obtida a **cumarina**. Se em vez de ácido cinâmico, o substrato for o ácido *p*-cumárico, o produto da lactonização é a umbeliferona. Portanto, a oxidação do carbono 7 é a posição biogeneticamente preferida, quando o anel benzênico da cumarina é monossustituído. Entretanto, a proposta de ocorrência de **6-hidroxi-cumarina** pode ser justificada supostamente pela formação inicial de aesculetina (6,7-dihidroxi-cumarina), seguida de desidroxilação seletiva da posição 7. A biossíntese de **protocatecuato de 6-cumarila** seria facilmente explicada pela esterificação da **6-hidroxi-cumarina** com **ácido protocatecuico**. A reação da aesculetina com formaldeído geraria **aiapina**, após desidratação (Quadro 5, p. 241).

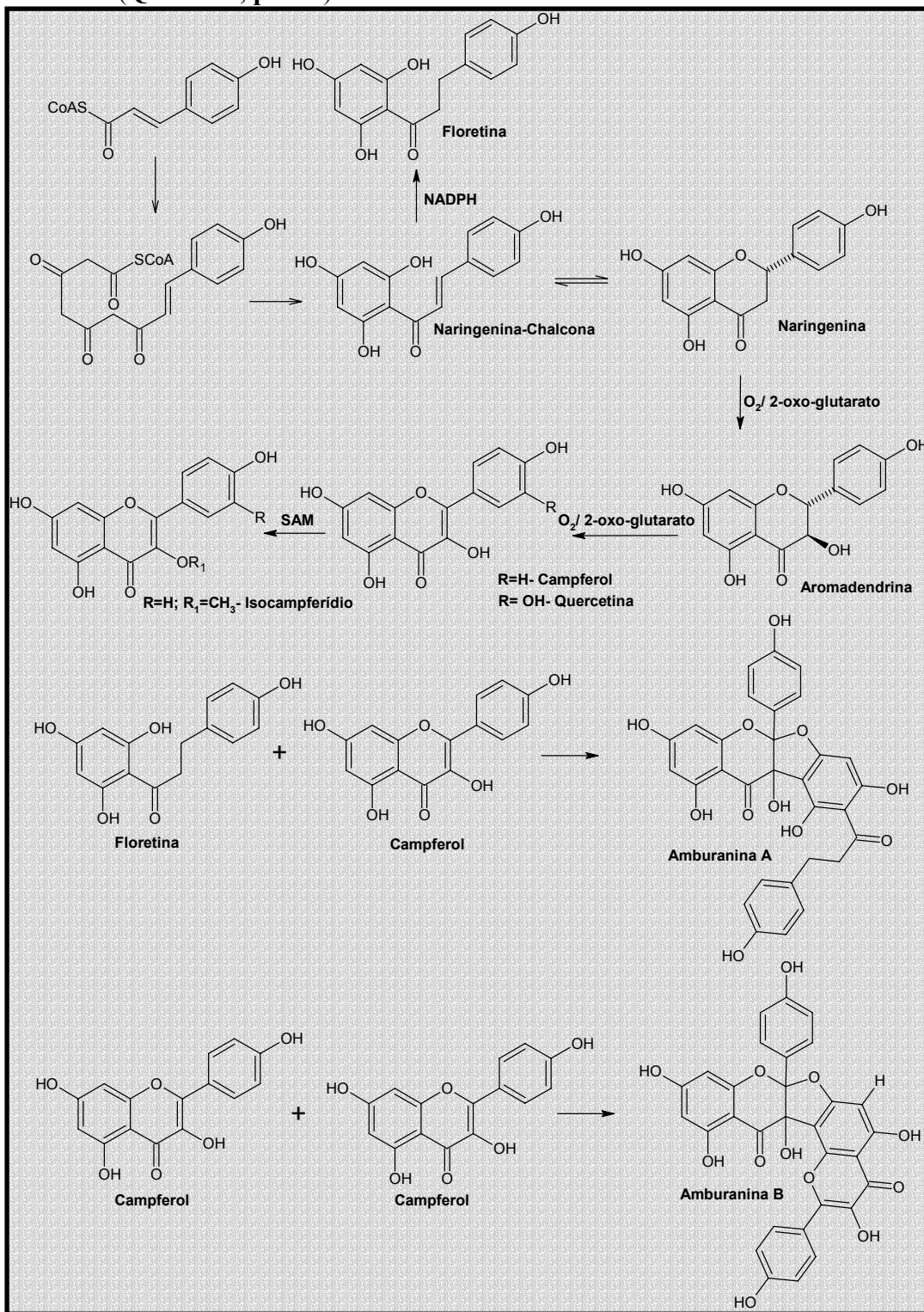


Quadro 5- Rota biossintética de formação de ácidos cumáricos glicosilados e biogênese de cumarinas 6-monossustituídas.

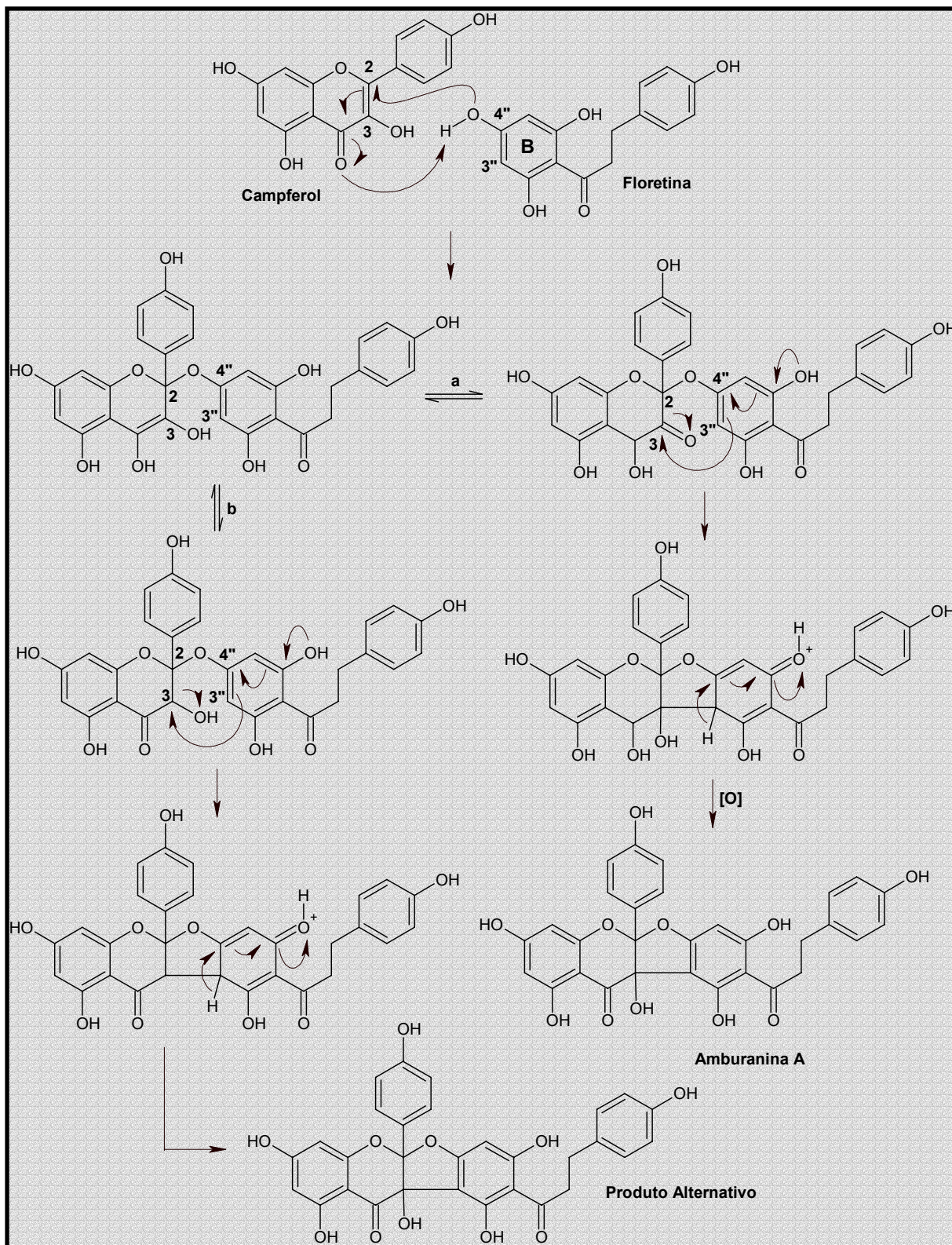
6.3. Flavonóides

A condensação de molécula de *p*-cumaroil-SCoa com mais três moléculas de malonil-SCoA produz um alongamento da cadeia lateral, a qual se aromatiza após enolização das carbonilas cetônicas. O produto gerado, a naringenina-chalcona, pode ser reduzida na porção olefínica para fornecer **floretina** ou converter-se na forma isomérica de flavanona, igualmente denominada naringenina. Sucessivas oxidações da naringenina com 2-oxo-glutarato geram **campferol** e **quercetina**. O **isocampferídio** é obtido através da metilação do campferol com S-adenosil metionina. O biflavonóide **amburanina A** é biossintetizado através da condensação de unidades simples de flavonóides pré-formados: uma molécula de floretina e outra de campferol (**Quadro 6, p. 244**). Mecanicamente, é possível propor que a formação desta substância seja desencadeada por uma adição de Michael da hidroxila do anel B da floretina (C-4'') ao carbono olefínico β à carbonila do campferol (C-2). Nesta reação é gerado um dienol susceptível a dois modos de tautomerização, por meio dos quais poderá ser formada uma carbonila no C-3 (**a**) ou no C-4 (**b**). Em ambas as alternativas, ocorrerá uma ciclização promovida pelo ataque nucleofílico do carbono aromático C-3'' ao carbono C-3, seguida por restauração da aromaticidade do anel B do fragmento da floretina. No entanto na

rota **a**, estas etapas são sucedidas por oxidação, dando origem à substância isolada (amburanina A). Enquanto que na rota **b**, o ataque é sucedido por desidratação, resultando na formação de um produto alternativo. O biflavonóide **amburanina B** é produzido pela dimerização de duas moléculas de campferol, seguindo o mesmo modelo mecânico da amburanina A. (**Quadro 7, p. 245**).



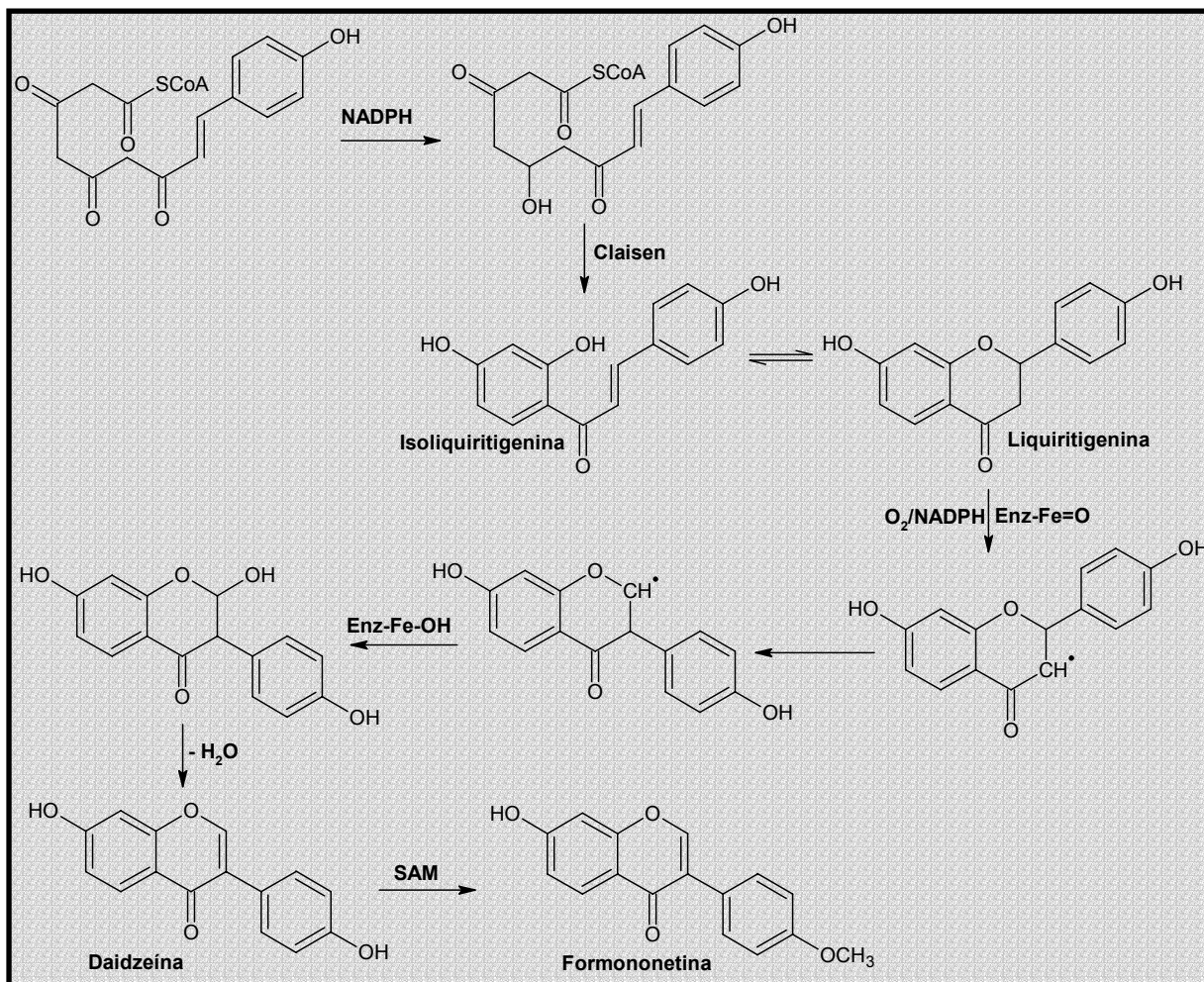
Quadro 6- Biogênese de formação de flavonóis e biflavonóides.



Quadro 7- Proposta mecânica de formação da amburanina A.

6.4. Isoflavonóides

A biogênese da formononetina é iniciada com a migração do anel B do carbono C-2 para o C-3 da liquiritigenina (flavanona), através de um mecanismo de oxidação radicalar promovido enzimaticamente por um átomo de ferro. Após desidratação, forma-se daidzeína, a partir da qual se obtém a isoflavona desejada por metilação regioseletiva da hidroxila do carbono C-4' (Quadro 8, p. 246).



Quadro 8- Rota biossintética de formação da isoflavona formononetina.

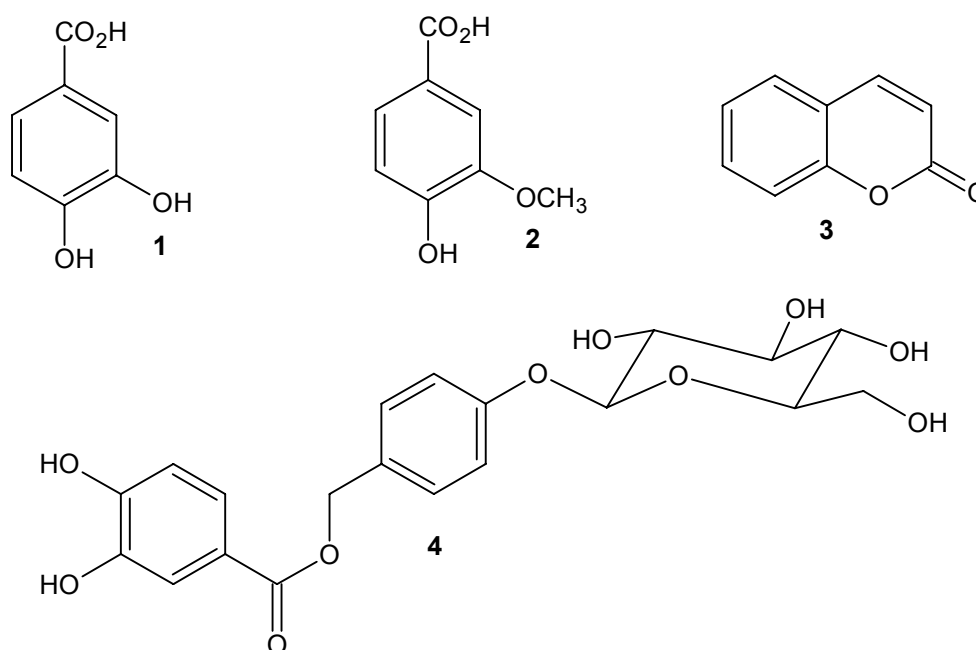
REFERÊNCIAS

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002, 515 p.

7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

7.1. Validação

O processo de validação da metodologia de quantificação dos quatro principais constituintes dos extratos de *A. cearensis* [(ácido protocatecuico (1), ácido vanílico (2), cumarina (3) e amburosídeo A (4)] consistiu na avaliação da maioria dos parâmetros de desempenho analítico requeridos pelas duas mais importantes agências reguladoras nacionais (ANVISA- Agência de Vigilância Sanitária e INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial): seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.



O método analítico aplicado para os diferentes extratos de *A. cearensis* foi desenvolvido num HPLC/DAD (Waters 1525/2996), munido de uma coluna de fase reversa (XTerra[®] 4,6 x 250 mm, 5 µm), utilizando-se um gradiente de eluição de 1mL/min de Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH, variando de 20% para 50% de MeOH em 15 min de corrida. O método cromatográfico empregado mostrou-se bastante seletivo para as substâncias de interesse, propiciando uma boa separação entre seus respectivos picos, além de isentos de interferentes, mesmo tratando-se de amostras quimicamente complexas.

As curvas de calibração analítica, construídas a partir de seis níveis de concentração dos quatro padrões externos e devidamente ajustadas por regressão linear, apresentaram as seguintes equações de regressão: $y_1 = 58116x + 30531$; $y_2 = 61426x + 36265$; $y_3 = 24400x +$

58945 e $y_4 = 27160x + 22275$. Os coeficientes de correlação ($r_1 = 0,9945$; $r_2 = 0,9944$; $r_3 = 0,9943$; $r_4 = 0,9933$) (Tab. 29, p. 247), obtidos das curvas analíticas, revelaram relações de proporcionalidade direta entre as concentrações das substâncias analisadas e as áreas dos picos, detectados a 254 nm. As linearidades exibidas estão em consonância com os valores de r recomendados pelo INMETRO ($> 0,90$) e pela ANVISA ($> 0,99$).

Tabela 29- Equações e coeficientes de correlação das retas dos quatro constituintes majoritários de *A. cearensis*: ác. protocatecuico, ác. vanílico, cumarina e amburosídio A.

Padrão	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
Ácido protocatecuico	$y_1 = 58116x + 30531$	0,9945
Ácido vanílico	$y_2 = 61426x + 36265$	0,9944
Cumarina	$y_3 = 24400x + 58945$	0,9943
Amburosídio A	$y_4 = 27160x + 22275$	0,9933

A precisão foi julgada pelo grau de repetitividade intradia e interdia dos ensaios, ou seja, por análises repetidas ao longo de um dia e realizadas em três dias não-consecutivos, respectivamente. Estatisticamente, este parâmetro foi determinado através dos coeficientes de variação das áreas dos picos dos quatro padrões, contidos em soluções de controle de qualidade em três níveis de concentração (baixa, alta e média). As determinações mais precisas foram obtidas nas análises de ácido protocatecuico, intradia ($> 2,6\%$) e interdia ($> 1,4\%$). Ácido vanílico, cumarina e amburosídio A apresentaram graus de concordância inferiores a 5,3; 5,6 e 3,6 %, em experimentos realizados no mesmo dia. Nesta mesma ordem, a repetitividade interdia foi estimada em 2,7; 4,5 e 3,0 %. Como a ANVISA sugere valores inferiores a 5 %, as medições do ácido vanílico e da cumarina, repetidas intra-corridas, foram ligeiramente acima do limite proposto (Tab. 30, p. 249).

A exatidão foi aferida através da comparação entre as concentrações determinadas experimentalmente e os valores de concentração tidos como verdadeiros (referência) dos quatro padrões, em três níveis de concentração (baixa, alta e média). Dentre as substâncias de interesse, os teores de amburosídio A foram os mais exatos, aproximadamente 99 %. Para os demais, os graus de concordância entre os valores práticos e os de referência foram variáveis com os níveis de concentração: ácido protocatecuico e ácido vanílico (95,3-102 %) e cumarina (86,2-95,0 %), sendo que neste último a exatidão foi maior nas soluções mais concentradas, diferentemente dos resultados observados para os ácidos fenólicos (Tab. 30, p. 249).

Tendo em vista que as amostras eram extratos brutos, os quais requeriam um tratamento prévio através de cartuchos de Extração de Fase Sólida (SPE), houve a necessidade de se mensurar as possíveis perdas decorrentes desta operação. Os fatores de recuperação dos quatro padrões foram determinados pela razão das respostas obtidas para soluções tratadas em relação às soluções não-tratadas, em três níveis de concentração (baixa, alta e média). Os melhores rendimentos de extração foram encontrados para a cumarina (95-99 %), seguida do amburosídeo A (90-97 %) e dos ácidos protocatecuico e vanílico (em torno de 91 %). Uma vez que uma faixa de recuperação entre 80-120 % é plenamente aceitável para procedimentos analíticos, foi possível constatar a eficiência do método de extração dos analitos.

A partir dos parâmetros de desempenho analítico investigados, pôde-se verificar que o método de validação desenvolvido possui seletividade, linearidade, precisão e exatidão consideradas satisfatórias e que sua aplicação pode gerar resultados confiáveis, visto que foram obtidos valores em conformidade com os rigorosos limites preconizados pela ANVISA e pelo INMETRO (**Tab. 30, p. 249**). O método cromatográfico desenvolvido poderá ser utilizado para determinação da autenticidade da matéria-prima, para quantificação dos princípios ativos e avaliação da estabilidade do produto formulado a partir da planta *A. cearensis*.

Tabela 30- Parâmetros de desempenho analítico dos quatro constituintes majoritários de *A. cearensis*: ácido protocatecuico, ácido vanílico, cumarina e amburosídeo A.

Padrão	Precisão				Exatidão	Recuperação
	CV (%) 1°.dia	CV (%) 2°.dia	CV (%) 3°.dia	CV (%) média	C _r /C _t (%)	C _r /C _i (%)
Ác. protocatecuico						
8	1,3	2,2	2,6	2,0	102,0	90,0
30	0,9	1,6	1,0	1,2	95,6	92,0
50	0,8	1,1	2,2	1,4	96,5	92,0
Ac. vanílico						
8	0,7	3,7	2,6	2,3	102,0	92,0
30	1,3	3,9	3,0	2,7	95,3	91,0
50	0,5	0,4	5,3	2,1	95,9	91,0
Cumarina						
8	3,4	5,6	4,6	4,5	86,2	95,0
30	1,5	5,2	4,3	3,5	91,0	96,0
50	1,3	1,8	5,1	2,7	95,0	99,0
Amburosídeo A						
8	2,7	3,6	2,7	3,0	98,7	90,0
30	1,4	1,0	3,0	1,8	98,7	96,0
50	0,6	1,1	1,9	1,2	99,0	97,0

7.2. Doseamento

O método validado foi adotado para quantificação dos quatro constituintes majoritários, presentes em diferentes extratos etanólicos de *A. cearensis*.

O estudo químico da planta adulta foi realizado com as cascas do caule (extrato etanólico) e com as sementes, devido ao emprego popular e comercial destas partes da planta. Independente do método de extração adotado para a casca do caule, sohxlet ou maceração, a ordem de concentração foi mantida: o amburosídeo A foi o componente majoritário, seguido por cumarina, ácido protocatecuico e ácido vanílico (**Gráf. 1**). A divergência residiu nos maiores níveis de concentração encontrados para a extração feita em sohxlet. Como o aumento de temperatura tende a favorecer a solubilização das substâncias, a extração num aparelho sohxlet geralmente produz maiores rendimentos por processar-se a quente, em detrimento da maceração que ocorre a frio. O extrato etanólico das sementes, gerado por maceração, apresentou níveis detectáveis apenas de cumarina (23520 mg/100g ext. ou 1411 mg/100g planta), correspondendo ao maior teor achado entre todos os extratos analisados (**Tab. 31, p. 254**).

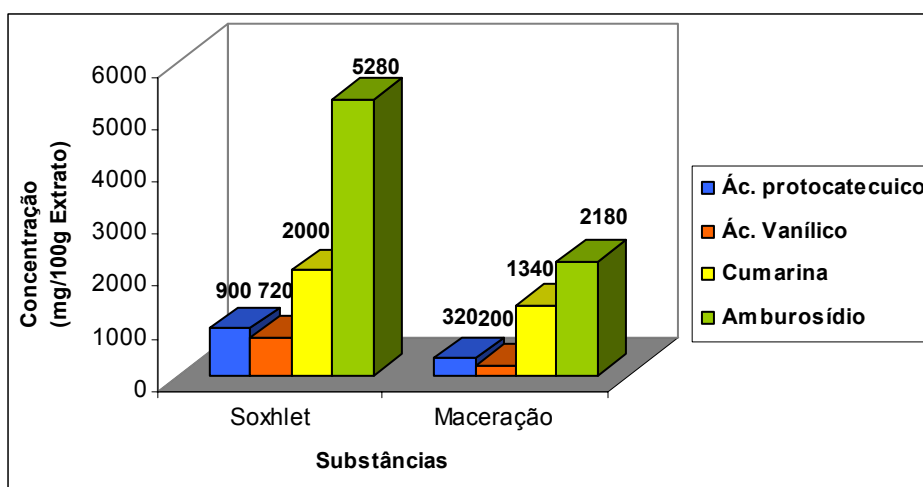


Gráfico 1- Concentração dos quatro constituintes majoritários em extratos etanólicos das cascas do caule de *A. cearensis*, obtidos por maceração e sohxlet.

As análises quantitativas dos espécimens jovens de cumaru foram realizados com extratos das plantas inteiras e extratos das partes aéreas e dos xilopódios (separadamente) de 2, 4, 7 e 9 meses de desenvolvimento.

Em extratos obtidos das plantas inteiras, foram possíveis apenas as determinações dos teores de ácido vanílico e cumarina. Através do **gráfico 2**, observou-se um crescimento linear nas concentrações de ácido vanílico e cumarina até o 7º mês, mês no qual ocorreu o

Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith 251

ápice da presença destas substâncias (3440 e 4060 mg/100g de extrato, respectivamente). Todavia no último mês (9^o), a concentração decaiu acintosamente, atingindo os níveis mais baixos determinados (1520 e 660 mg/100g ext.), respectivamente. Por outro lado, numa análise feita em relação à planta, notou-se que a produção de ácido vanílico foi sempre declinante ao longo do tempo (de 217 para 17 mg/100g de planta) e a de cumarina foi praticamente estável nos sete meses iniciais (em torno de 140 mg/100g de planta), apresentando uma queda abrupta no nono mês (7 mg/100g). O ácido protocatecuico e o amburosídeo foram detectados, porém não se encontravam em níveis quantificáveis, salvo no nono mês, no qual este último teve sua concentração estimada em 400 mg/100g ext.

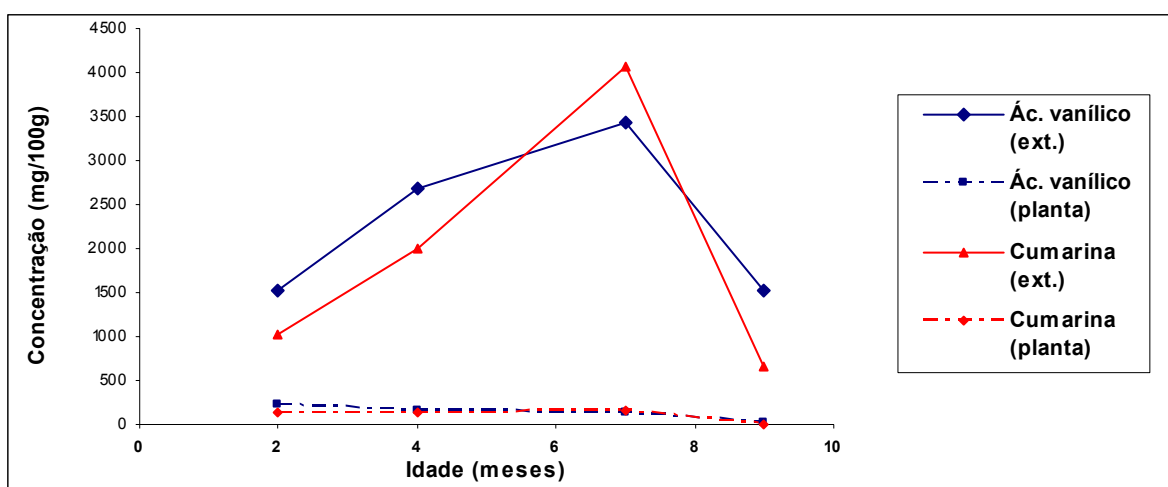


Gráfico 2- Concentrações de ácido vanílico e cumarina em extratos etanólicos de plantas jovens de *A. cearensis* (valores expressos em relação à massa de extrato e à biomassa).

Nos extratos das partes aéreas, o constituinte majoritário foi o ácido vanílico cuja maior concentração foi medida no 7^o mês (8520 mg/100g ext ou 452 mg/100g planta), enquanto que, no xilopódio, a cumarina foi o principal componente (4^o mês: 3760 mg/100g ext. ou 256 mg/100g planta), excetuando o último mês, no qual o amburosídeo foi o mais abundante (680 mg/100g ext. ou 5 mg/100g planta). Quanto ao ácido protocatecuico, sua presença só foi mensurada no extrato da parte aérea de espécimes de 4 meses (360 mg/100g ext. ou 20 mg/100g planta).

A concentração de ácido vanílico na parte aérea foi sempre superior à encontrada no xilopódio. Nos extratos, os teores máximos e mínimos foram encontrados, respectivamente, no 7^o (p. aérea: 8520 mg/100g ext. e xilopódio: 1380 mg/100g ext.) e 9^o mês (p. aérea: 3460 e xilopódio: 540 mg/100g ext). Entretanto, os platôs de produção ocorreram em períodos distintos: na parte aérea (7^o mês- 452 mg/100g planta) e no xilopódio (2^o mês- 146 mg/100g planta).

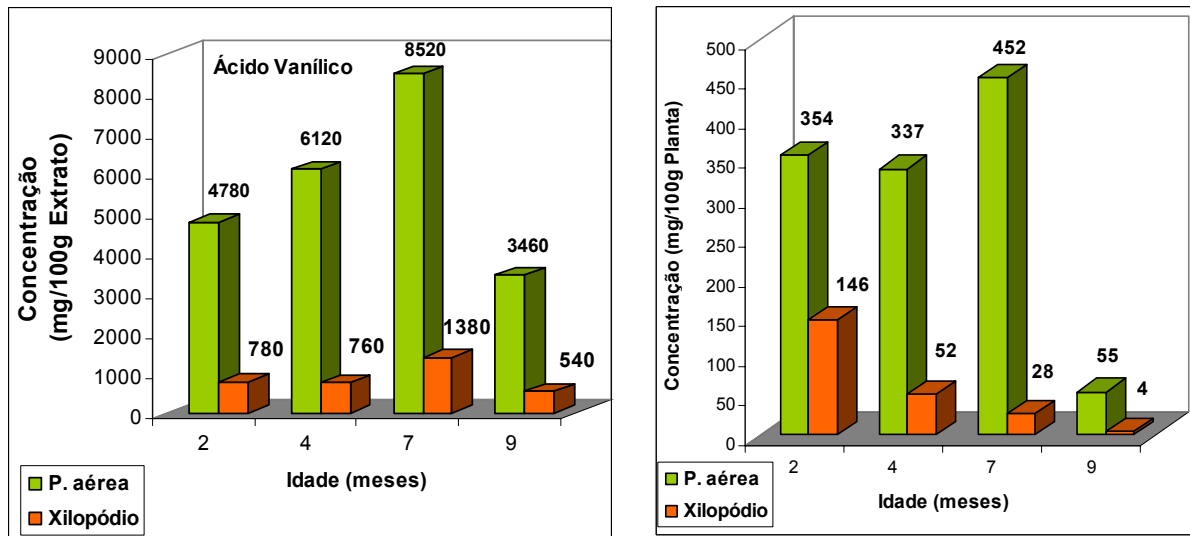


Gráfico 3- Concentração de ácido vanílico em extratos etanólicos de plantas jovens de *A. cearensis*, em diferentes estágios de desenvolvimento.

A presença de cumarina foi registrada majoritariamente nos extratos da parte aérea, em três dos quatro meses investigados, sendo o 7º mês o período de maiores rendimentos de extração e produção (6060 mg/100g ext. ou 324 mg/100g planta). A exceção foi o 4º mês, cujo extrato do xilopódio (3760 mg/100g ext. ou 256 mg/100g planta) apresentou um teor que excedeu ao dobro da concentração aferida para a parte aérea (1660 mg/100g ext. ou 91 mg/100g planta). Curiosamente no primeiro mês analisado (2º), embora a proporção de cumarina tenha sido maior no extrato da parte aérea (1540 mg/100g ext) do que no extrato obtido do xilopódio (1320 mg/100g ext), este metabólito foi biossintetizado em maior escala no xilopódio (247 mg/100g planta) do que na parte aérea (114 mg/100g planta).

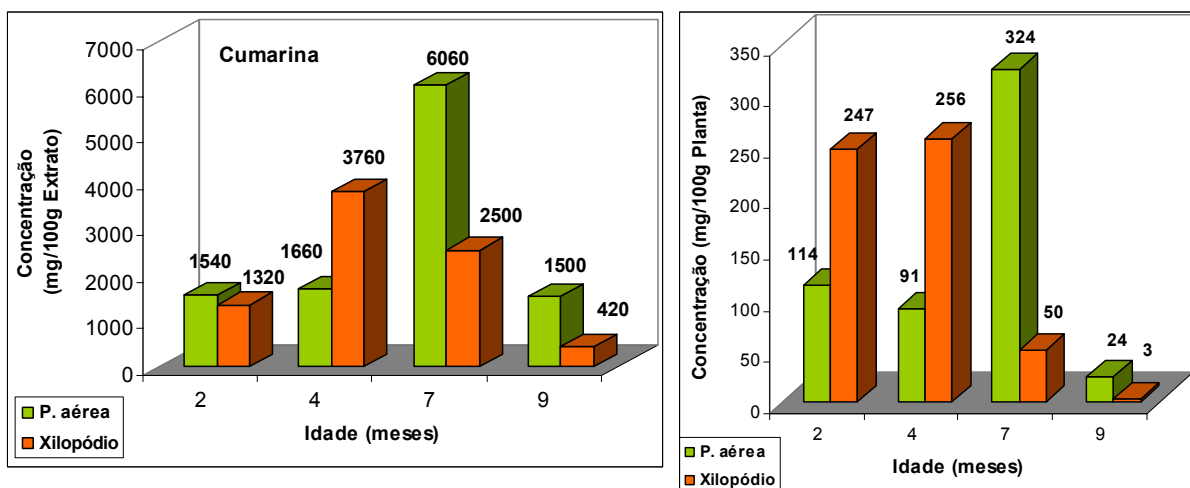


Gráfico 4- Concentração de cumarina em extratos etanólicos de plantas jovens de *A. cearensis*, em diferentes estágios de desenvolvimento.

Nas amostras investigadas, a ocorrência de amburosídeo A foi detectada exclusivamente numa das partes da planta, a cada mês: xilopódio (2, 7 e 9 meses de idade) e

parte aérea (4 meses de idade), na qual foi verificada a sua menor concentração (260 mg/100g ext.). No extrato de xilopódio de 9 meses de idade, foi medida a maior concentração de amburosídio A (680 mg/100g ext.), entretanto o máximo de produção desta substância ocorreu logo no 2º mês de cultivo (71 mg/100g planta).

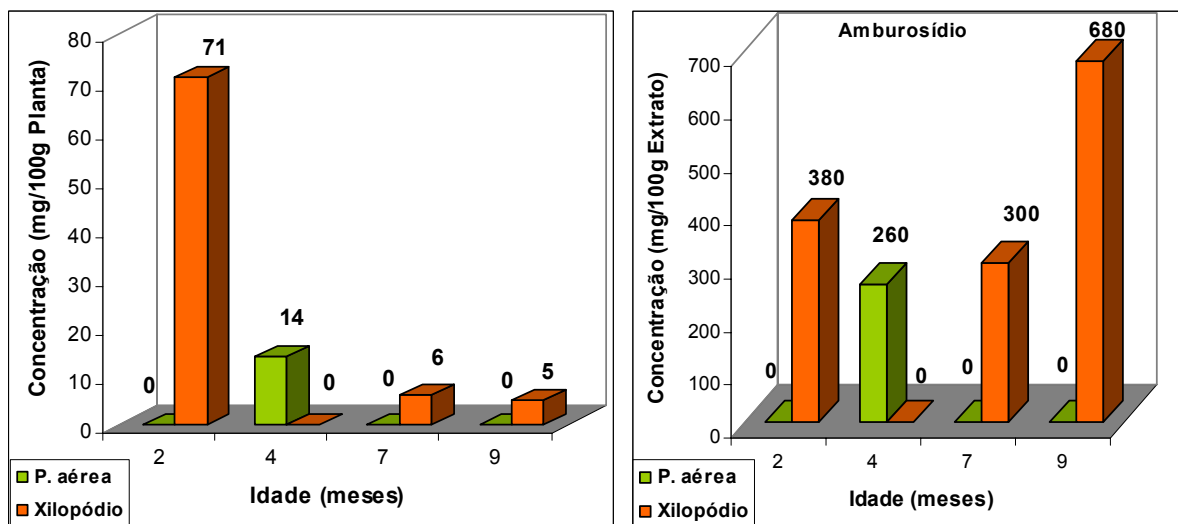


Gráfico 5- Concentração de amburosídio A em extratos etanólicos de plantas jovens de *A. cearensis*, em diferentes estágios de desenvolvimento.

Numa análise comparativa entre os extratos de plantas jovens e adultas, pôde-se observar que o extrato de xilopódio de 9 meses de idade (680 mg/100g de ext. ou 5 mg/100g de planta) foi a única amostra, obtida de espécimens cultivados, a conter o amburosídio como principal constituinte, tal qual foi encontrado no extrato da casca do caule da planta silvestre (maceração: 2180 mg/100g de ext. ou 11 mg/100g de planta). Ainda assim, numa proporção cerca de duas a três vezes menor.

O xarope apresentou teores de cumarina (298 mg/100g de planta) e amburosídio A (33 mg/100g de planta) semelhantes aos estimados para o extrato da parte aérea de 7 meses de idade (324 e 33 mg/100g de planta), embora isento de ácido vanílico, o mais importante constituinte desta amostra (452 mg/100g de planta). O xilopódio de 2 meses também exibiu composição química parecida com a do xarope: 247 e 71 mg/100g de planta de cumarina e amburosídio A, além de 146 mg/100g de planta de ácido vanílico.

A avaliação química dos extratos de *A. cearensis*, obtidos da planta adulta e de espécimens jovens, revelou que qualitativamente estes materiais foram muito parecidos, no entanto, os constituintes analisados apresentaram níveis de concentração muito distintos, em razão do método de extração, da idade e da parte da planta investigadas. Além disso, a forma de expressão dos resultados (mg/100g de extrato ou planta), fortemente influenciável pelos

rendimentos de extração, demonstrou ser um parâmetro relevante na comparação entre as concentrações estimadas.

Tabela 31- Concentração (mg/100g) dos quatro principais constituintes químicos detectados em diferentes extratos de *A. cearensis*, expressos em relação à massa de extrato e de material botânico.

Extrato	Concentração (mg/100g)– CV (%)							
	Ácido protocatecuico		Ácido vanílico		Cumarina		Amburosídio	
	Extrato	Planta	Extrato	Planta	Extrato	Planta	Extrato	Planta
Planta adulta <i>Silvestre</i>								
Casca do Caule (Sohxlet)	900 (2,5)	54	720 (6,5)	43	2000 (1,5)	120	5280 (6,4)	317
Casca do Caule (Maceração)	320 (6,3)	2	200 (5,6)	1	1340 (6,8)	7	2180 (5,5)	11
Xarope	ND*		ND		-	298 (5,1)	-	33 (6,1)
Sementes	ND		ND		23520 (3,9)	1411		ND
Planta jovem <i>Inteira</i>								
2 meses		ND	1520 (1,3)	217	1020 (5,7)	146		ND
4 meses		ND	2680 (13,4)	169	2000 (7,0)	126		ND
7 meses		ND	3440 (4,3)	127	4060 (6,5)	150		ND
9 meses		ND	1520 (6,1)	17	660 (1,8)	7	400 (5,7)	4
Parte aérea								
2 meses		ND	4780 (10,6)	354	1540 (3,0)	114		ND
4 meses	360 (3,3)	20	6120 (4,8)	337	1660 (2,0)	91	260 (8,7)	14
7 meses		ND	8520 (1,0)	452	6060 (7,9)	324		ND
9 meses		ND	3460 (6,3)	55	1500 (3,3)	24		ND
Xilopódio								
2 meses		ND	780 (5,3)	146	1320 (1,0)	247	380 (5,3)	71
4 meses		ND	760 (7,5)	52	3760 (0,9)	256		ND
7 meses		ND	1380 (2,9)	28	2500 (4,2)	50	300 (10,4)	6
9 meses		ND	540 (9,8)	4	420 (10,8)	3	680 (9,4)	5

*ND- nível de concentração não-determinado.

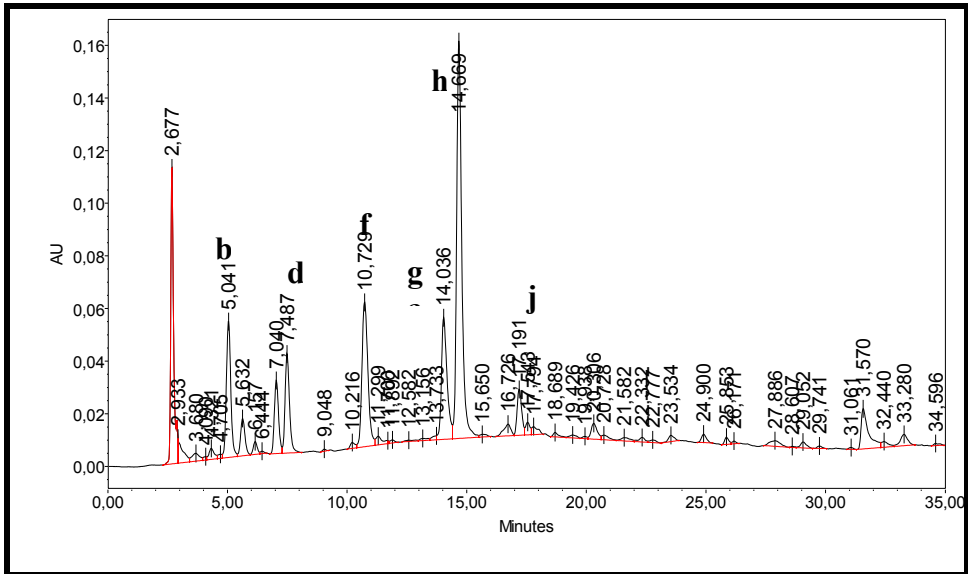


Figura 144- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da casca do caule (ACCE)- sohlet

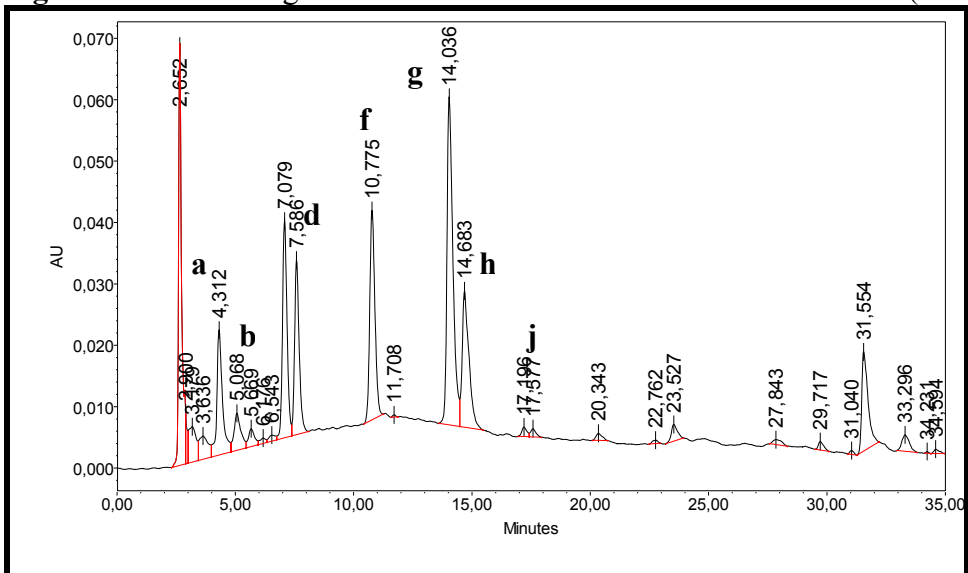


Figura 145- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do xilopódio da planta jovem (9 meses)

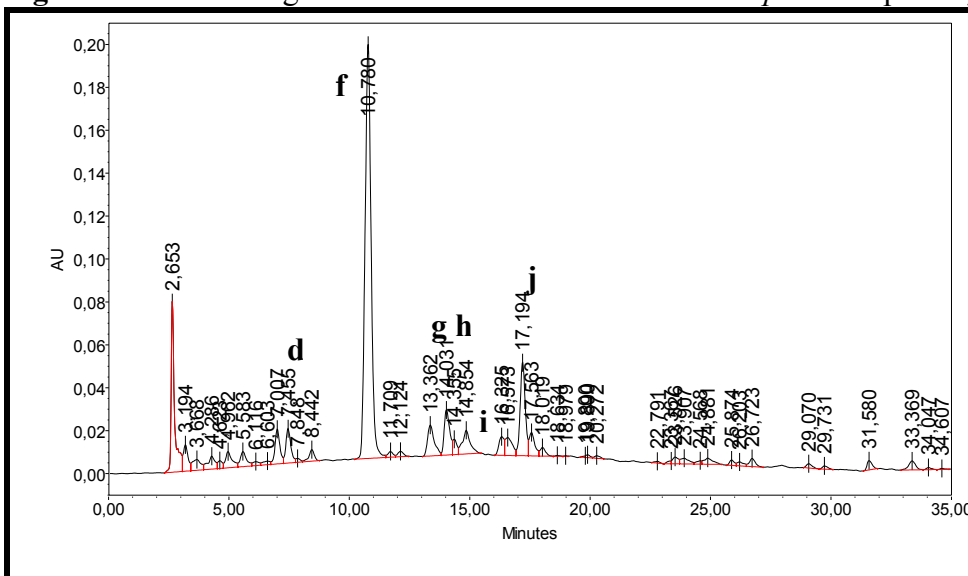


Figura 146- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da parte aérea da planta jovem (9 meses)

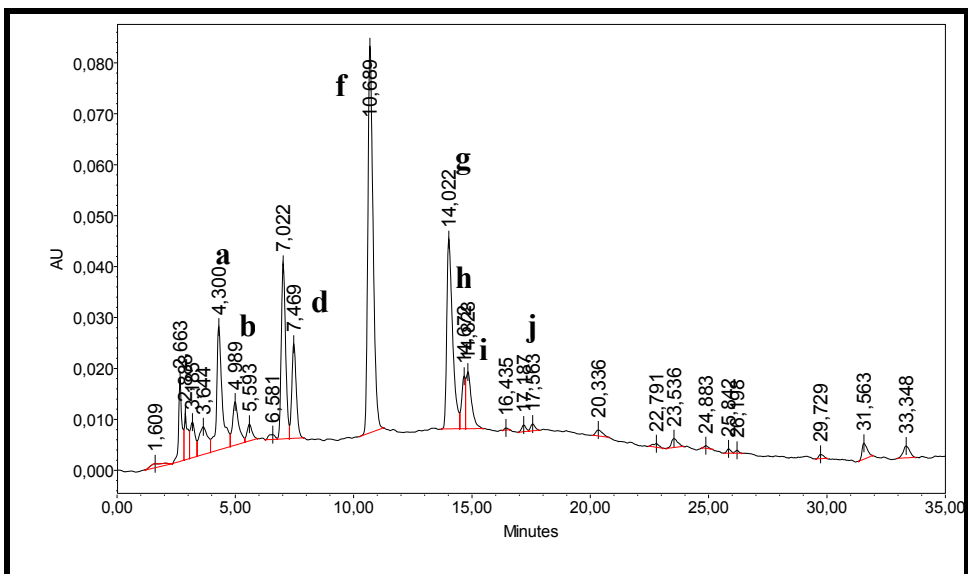


Figura 147- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do *xilopódio* da planta jovem (7 meses)

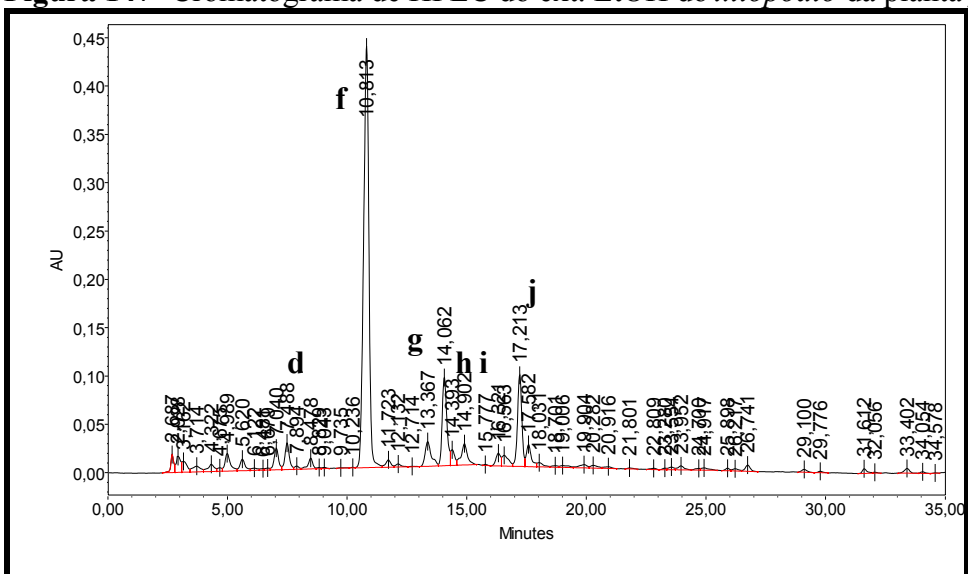


Figura 148- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da *parte aérea* da planta jovem (7 meses)

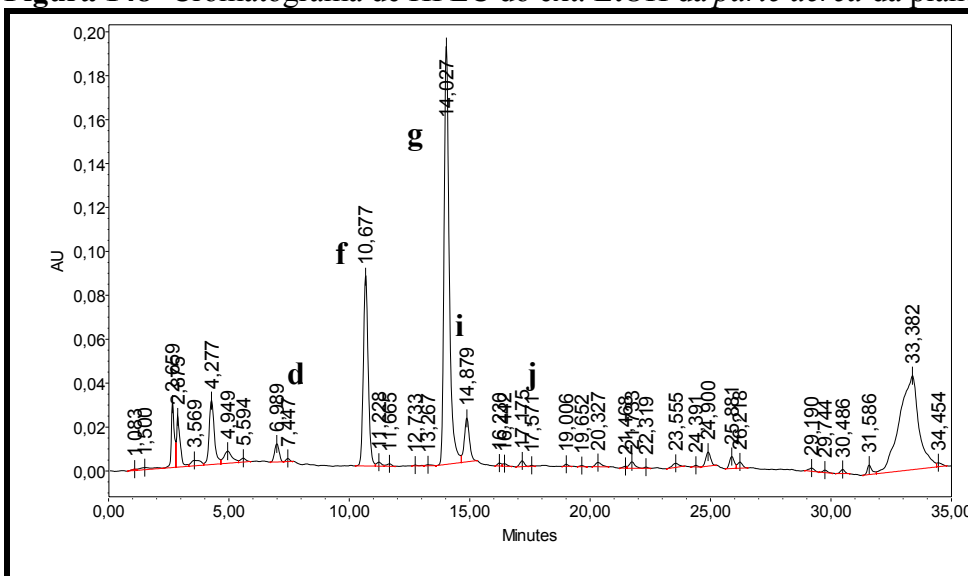


Figura 149- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do *xilopódio* da planta jovem (4 meses)

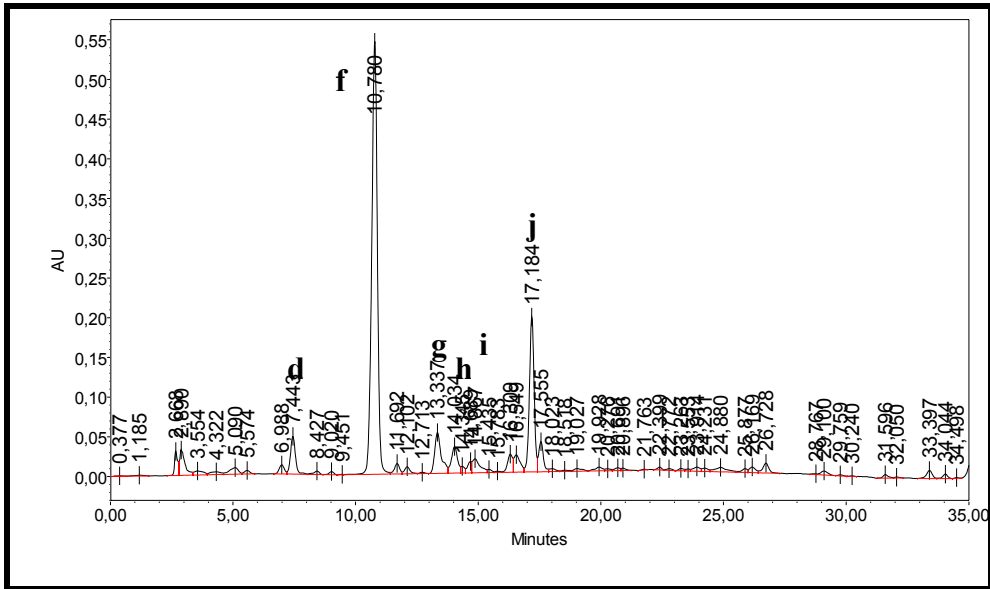


Figura 150- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da *parte aérea* da planta jovem (4 meses)

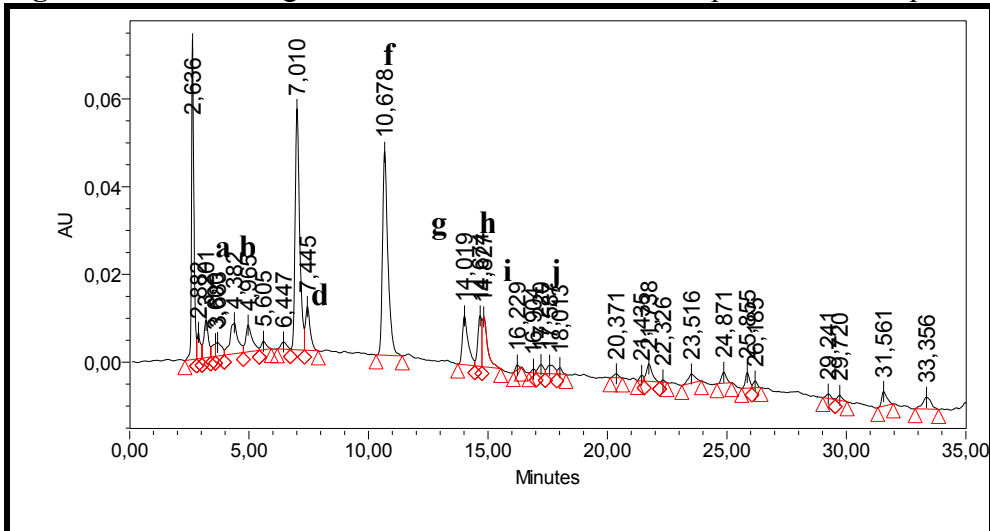


Figura 151- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH do *xilopódio* da planta jovem (2 meses)

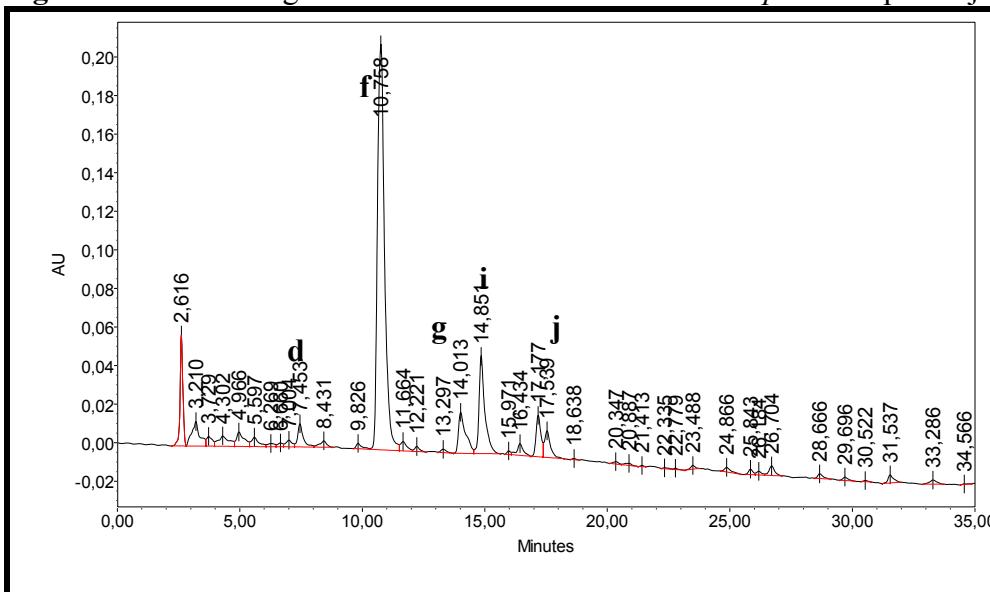


Figura 152- Cromatograma de HPLC do ext. EtOH da *parte aérea* da planta jovem (2 meses)

Tabela 32- Relação das substâncias químicas identificadas, segundo seus tempos de retenção registrados em análises por HPLC, nos extratos de *A. cearensis*: planta adulta (casca do caule) e espécimens jovens (xilopódio e parte aérea).

Substâncias Identificadas	t _R (min.)	ACCE	Xilopódio (meses)				Parte Aérea (meses)			
			2	4	7	9	2	4	7	9
a. Ác. (Z)-cumárico glicosilado	3,85		+	+	+	+				
b. Ác. 4-hidroxi-benzóico	4,99	+	+	+	+	+				
c. Ác. (E)-cumárico glicosilado	6,02									
d. Ác. protocatecuico	7,36	+	+		+	+	+	+	+	+
e. Ác. o-cumárico	9,22									
f. Ác. vanílico	10,87	+	+	+	+	+	+	+	+	+
g. Cumarina	13,98	+	+	+	+	+	+	+	+	+
h. Amburosídio A	14,65	+	+		+	+		+	+	+
i. Aiapina	14,85		+	+	+		+	+	+	+
j. Amburosídio B	17,17	+		+	+	+	+	+	+	+

Análises comparativas dos cromatogramas de nove extratos de *A. cearensis* com substâncias-padrão permitiram a identificação de onze constituintes químicos nestas amostras: ácido 4-hidroxi-benzóico (**Fig. 153, p. 259**), ácido o-cumárico (**Fig. 154, p. 259**), ácido (Z)-cumárico glicosilado (**Fig. 155, p. 259**), ácido (E)-cumárico glicosilado (**Fig. 156, p. 260**), aiapina (**Fig. 157, p. 260**), cumarina (**Fig. 158, p. 260**), ácido vanílico (**Fig. 159, p. 261**), , amburosídio B (**Fig. 160, p. 261**), amburosídio A (**Fig. 161, p. 261**), ácido protocatecuico (**Fig. 162, p. 262**) dispostos em ordem crescente de tempo de retenção (t_R). O método de identificação foi baseado no tempo de retenção e no espectro de ultravioleta extraído dos picos.

Cumarina e ácido vanílico foram as únicas substâncias presentes em todos os extratos de *A. cearensis*. O ácido protocatecuico foi encontrado em todos os extratos, exceto no extrato do xilopódio de 4 meses de idade, enquanto que o amburosídio B só não foi detectado no xilopódio de 4 meses. A aglicona e o glicosídeo do ácido (E)-o-cumárico não foram observados em nenhum dos extratos. Aiapina e os isômeros do ácido cumárico glicosilado foram encontrados somente nas plantas jovens, além disso, o estereoisômero Z foi identificado exclusivamente no xilopódio (**Tab. 32**).

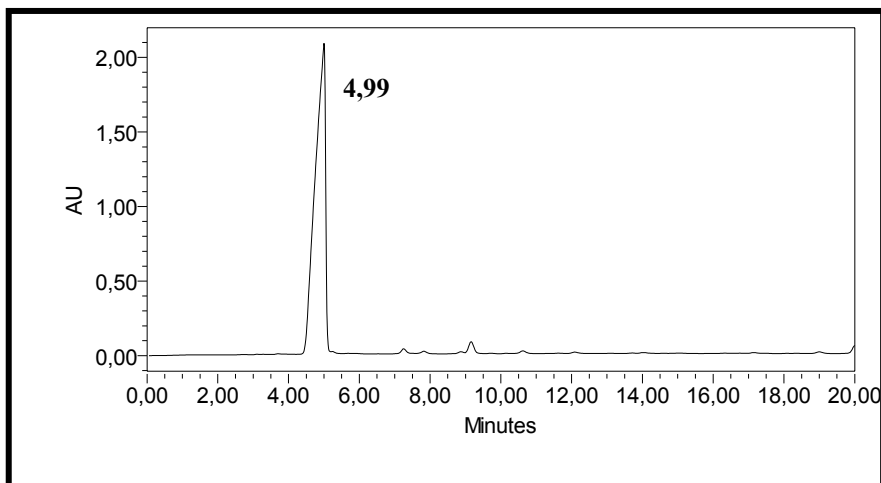


Figura 153- Cromatograma de HPLC do ácido *p*-hidroxi-benzóico

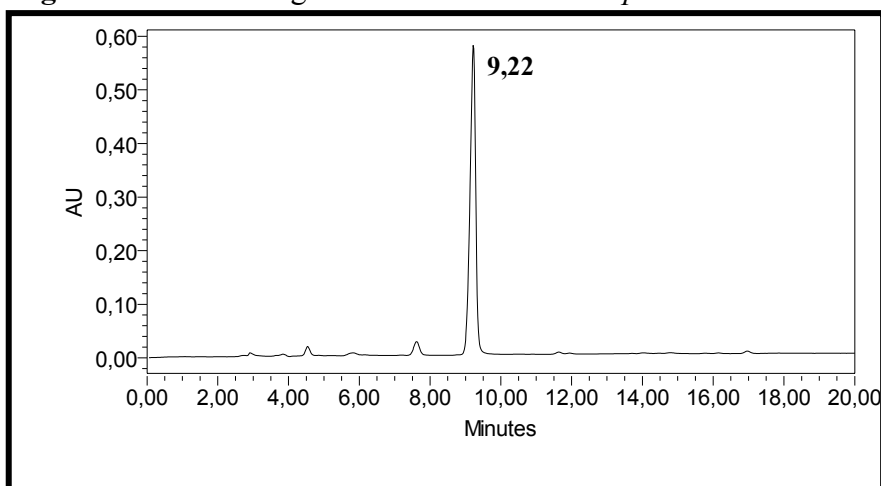


Figura 154- Cromatograma de HPLC do ácido (*E*)-*o*-cumárico

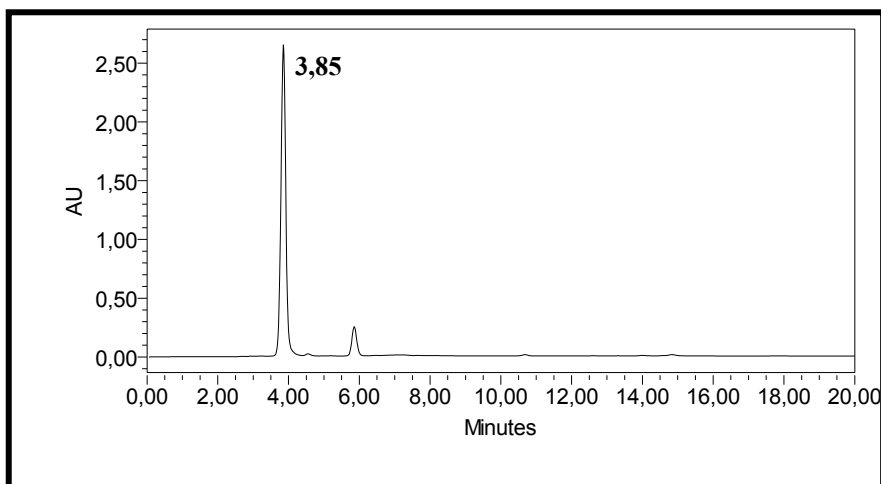


Figura 155- Cromatograma de HPLC do ácido (*Z*)-*o*-cumárico glicosilado

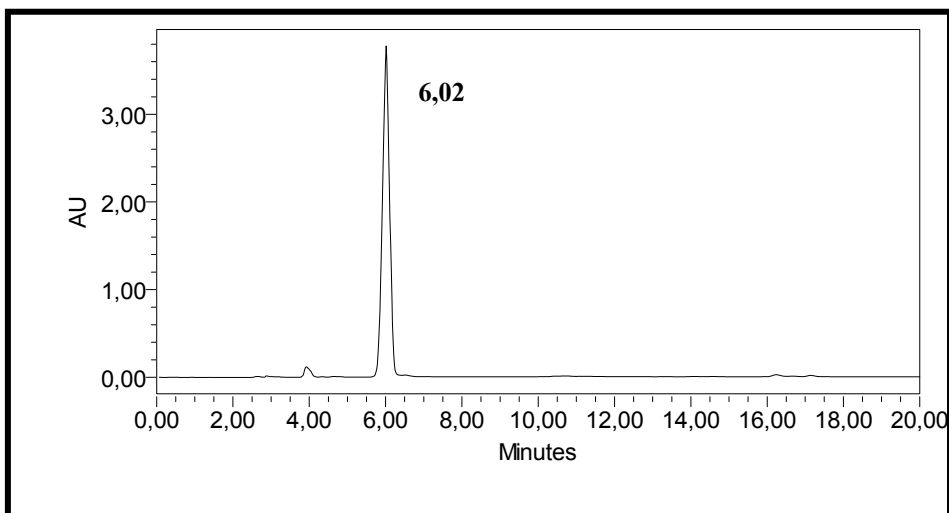


Figura 156- Cromatograma de HPLC do ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado

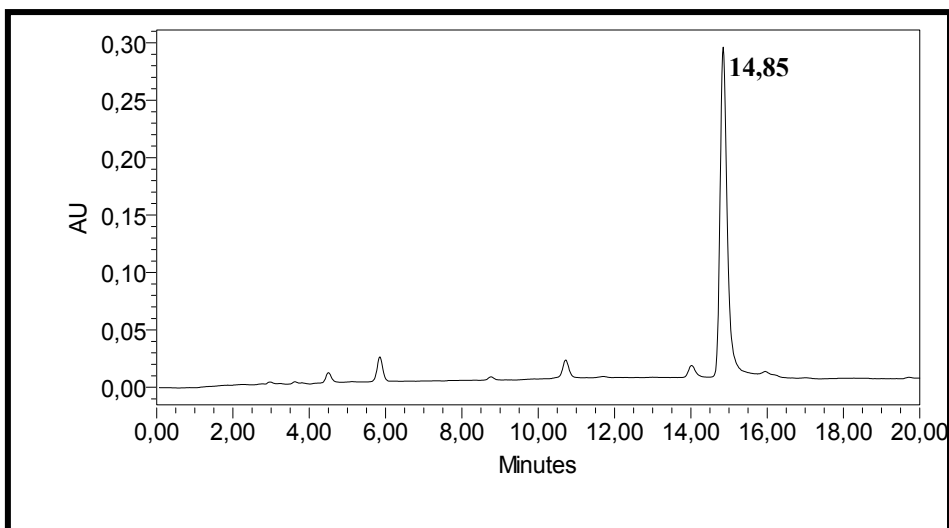


Figura 157- Cromatograma de HPLC da aiapina

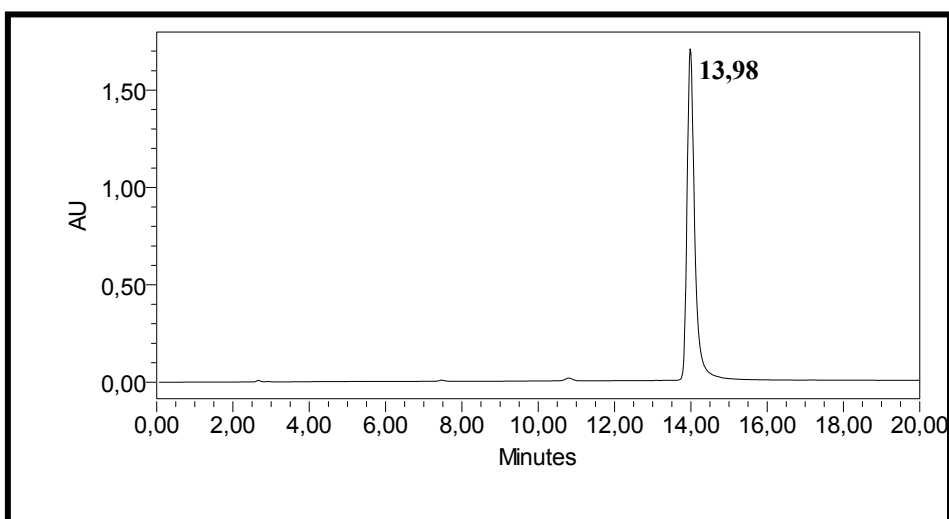


Figura 158- Cromatograma de HPLC da cumarina

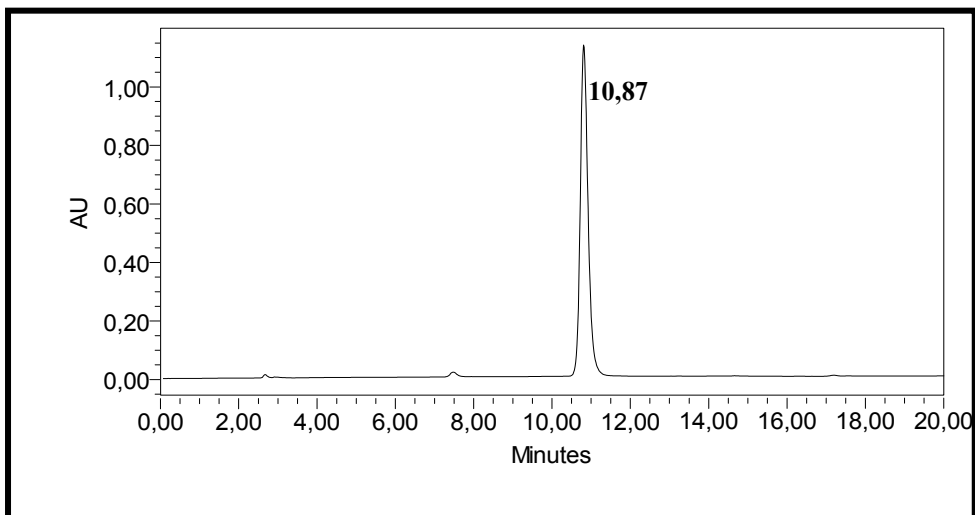


Figura 159- Cromatograma de HPLC do ácido vanílico

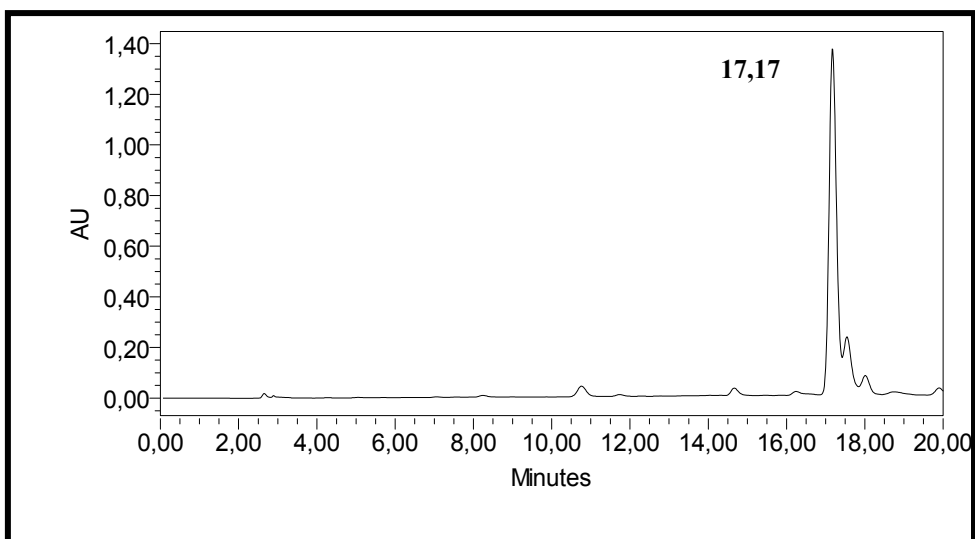


Figura 160- Cromatograma de HPLC do Amburoside B

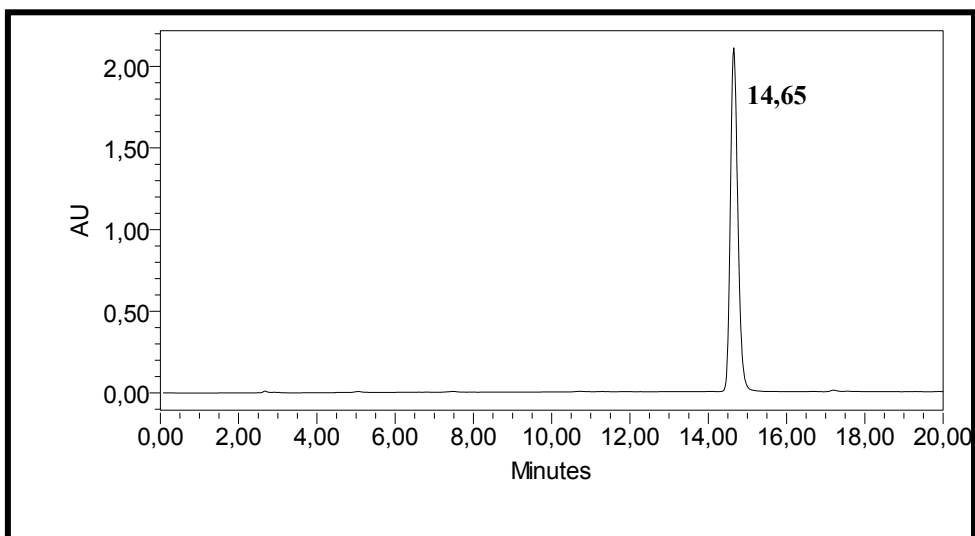


Figura 161- Cromatograma de HPLC do Amburoside A

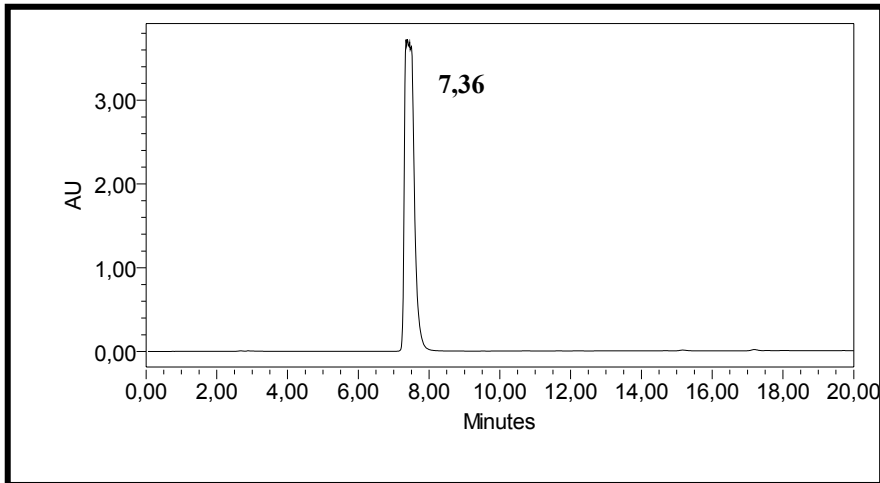


Figura 162- Cromatograma de HPLC do ácido protocatecuico

8. BREVE ABORDAGEM FARMACOLÓGICA DO ESTUDO INTERDISCIPLINAR DE *AMBURANA CEARENSIS*

8.1. Avaliação da atividade farmacológica dos extratos etanólicos de espécimens jovens

Os extratos etanólicos da parte aérea (PA) e do xilopódio (X) de espécimens jovens de *A. cearensis*, coletados aos 2, 4, 7 e 9 meses (m) de cultivo, foram avaliados em testes de nociceção (induzida por formalina) e edema de pata (induzida por carragenina), sendo seus resultados comparados aos efeitos demonstrados pelo extrato etanólico da casca do caule da planta silvestre adulta. Os extratos de xilopódio foram denominados EN-ACX e aqueles provenientes da parte aérea foram designados EN-ACPa, onde N refere-se à idade da planta (em meses de cultivo). A designação EN-ACPa+X corresponde ao extrato artificialmente reconstituído. Esta pesquisa foi desenvolvida pela Prof^a Luzia Kalyne de Almeida Moreira Leal (Departamento de Farmacologia e Fisiologia/UFC), como atividade do estudo integrado para a validação química-farmacológica de *A. cearensis*.

❖ Atividade antinociceptiva

Introduzido por Dubuisson e Dennis (DUBUISSON & DENNIS, 1977), o teste da formalina permite a avaliação dos possíveis mecanismos modulatórios envolvidos numa dor moderada e contínua, gerada pela lesão tecidual, sendo considerado como um dos modelos mais válidos para dor clínica (TJOLSEN et al., 1992). A resposta nociceptiva para a formalina ocorre de maneira bifásica: a 1^a fase (neurogênica) inicia-se imediatamente após a injeção de formalina com duração de até 10 min., sendo causada predominantemente pela ativação de nociceptores polinodais-C que liberam alguns neuropeptídios, incluindo glutamato e substância P. Após um curto período de remissão, inicia-se a 2^a fase, que ocorre 15-30 min após a injeção de formalina que persiste até 60 min. (TENG & ABBOTT, 1998), ocorrendo a liberação de vários mediadores, como serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas (HUNSKAAR & HOLE, 1987); (TJOLSEN et al., 1992). Fármacos narcóticos que atuam a nível central inibem as duas fases, mas fármacos que atuam periféricamente, como antiinflamatórios não-esteroidais e dexametasona, inibem apenas a segunda fase da nociceção induzida pela formalina (SHIBATA et al., 1989).

Dentre os extratos etanólicos da parte aérea avaliados, apenas o obtido após 2 meses de cultivo da planta, administrado por via oral (v.o.) na dose de 100mg/Kg, interferiu significativamente na 1^a fase do teste, observado pela redução do tempo gasto pelo animal lambendo a pata ($30,2 \pm 5,2$ seg.) em relação ao controle ($49,4 \pm 3,0$ seg.), correspondendo a

Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith 264

uma inibição de 38,9%. Por outro lado, os extratos de xilopódio coletados aos 2, 4 e 9 m de cultivo, nas doses de 100 e 200 mg/Kg (v.o.), causaram antinocicepção observada na 1ª fase (**2 m**: $36,6 \pm 4,3$ e $42,5 \pm 3,5$; **4 m**: $21,9 \pm 2,9$ e $21,4 \pm 2,8$; **9 m**: $21,4 \pm 2,9$ e $19,7 \pm 2,9$ seg. respectivamente), correspondendo a uma inibição de 32 a 64%, comparado ao controle ($54,2 \pm 3,1$ seg.); enquanto que na 2ª fase resultados significativos foram observados apenas para o E9-ACX na maior dose ($16,5 \pm 2,7$ seg.), com uma inibição de 51,0% em relação ao controle ($33,7 \pm 2,3$ seg.)

Na avaliação dos extratos etanólicos produzidos a partir de toda a planta (PA+X) aos 4, 7 e 9 m de cultivo (200 mg/Kg, v.o.), observamos inibições significativas nas duas fases do teste da formalina para os E7-ACPA+X (1ª fase: $20,8 \pm 2,3$; 2ª fase: $13,4 \pm 1,93$ seg.) e 9 m (1ª fase: $17,9 \pm 1,3$; 2ª fase: $10,8 \pm 1,5$ seg.) em relação ao controle (1ª fase: $40,2 \pm 2,3$; 2ª fase: $26,3 \pm 3,1$ seg.). E4-ACPA+X inibiu significativamente apenas a 1ª fase do teste ($21,5 \pm 2,7$ seg.).

O extrato etanólico da casca do caule de *A. cearensis* (ACCE) silvestre, coletadas na fase adulta da planta, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, v.o., promoveu uma antinocicepção observada pela redução do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, tanto na 1ª fase ($25,4 \pm 3,9$ e $22,8 \pm 2,4$ seg., respectivamente), correspondendo a uma inibição de 48 e 53% respectivamente em relação ao controle ($49,0 \pm 3,0$ seg.), quanto na 2ª fase ($12,1 \pm 21,8$ e $6,5 \pm 1,1$ seg., respectivamente), correspondendo a uma inibição dose-dependente de 47 e 71% respectivamente em relação ao controle ($22,8 \pm 2,5$ seg.).

Nos ensaios de avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos de *A. cearensis*, o EEtOH da casca do caule da planta adulta (200 mg/Kg, v.o.) na 1ª fase do teste da formalina foi equipotente em relação extratos compostos (PA+X) de 4, 7 e 9m. Por outro lado, na 2ª fase do teste a mesma mostrou-se mais potente que os referidos extratos.

Dos extratos etanólicos da planta cultivada avaliados, apenas os extratos E9-ACX e os extratos compostos (PA+X) de 4, 7 e 9 m foram capazes de inibir, à semelhança da planta adulta, as duas fases do teste da formalina. Os demais, na dose investigada, interferiram apenas a 1ª fase do teste (E2-ACPA e E4-PA+X). Dessa forma, os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo observado parece estar relacionado à atividade antiinflamatória dos extratos, além de uma possível ação central a ser confirmada com estudos posteriores.

❖ Atividade antiedematogênica

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular e infiltração celular levando à formação do edema, como resultado do extravasamento de fluido, proteínas e acumulação de leucócitos no sítio inflamatório. O modelo do edema de pata induzido por carragenina é largamente utilizado para determinar a atividade antiinflamatória de novos fármacos e tem sido bem caracterizado, compreendendo três fases distintas: a primeira fase envolve a liberação simultânea de histamina e serotonina, nas concentrações em que cada amina exerce seu efeito máximo na permeabilidade vascular; a segunda fase, por liberação de cininas como bradicinina, e a fase terminal por prostaglandinas, presente no exsudato, 4h após a injeção de carragenina. Contudo a ação desses mediadores parece ser dependente da presença do sistema complemento (DI ROSA et al., 1971). Mais recentemente foi demonstrado que a ciclooxigenase-2 atinge sua expressão máxima 1h após a injeção de carragenina. Outro mediador importante na inflamação aguda é o óxido nítrico que em condições fisiopatológicas é produzido por três distintas isoformas de óxido nítrico sintase (POSADAS et al., 2004).

Na avaliação da atividade antiedematogênica dos extratos ACPA investigados, apenas o de 9 m (200 mg/Kg, v.o.) reduziu significativamente o edema de pata na 3^a h ($79,8 \pm 6,9 \mu\text{L}$) e 4^a h ($64,3 \pm 8,4 \mu\text{L}$) após a injeção de carragenina, correspondendo a uma inibição de 37,4 e 41,3% respectivamente em relação ao controle (3^a h: $127,5 \pm 5,3$; 4^a h: $109,5 \pm 4,5\mu\text{L}$). Além disso, os grupos tratados com E-ACPA de 2 ou 7m, diferiram significativamente em relação a E9-ACPA .

E2-ACX (200mg/Kg, v.o.) foi capaz de inibir o edema na 1^a h ($48,0 \pm 7,0\mu\text{L}$) e 2^a h ($60,0 \pm 7,9\mu\text{L}$), apresentando uma inibição de 44,3 e 43,9% respectivamente em relação ao controle (1^a h: $86,2 \pm 12,7$ e 2^a h: $107,0 \pm 12,2\mu\text{L}$). Enquanto, os demais extratos (4, 7 e 9 m) na mesma dose não interferiram significativamente no edema, inclusive o tratamento com o EEtOH de 2m diferiu significativamente em relação ao EEtOH 9 m.

Na dose de 200 mg/Kg, v.o., dentre os extratos compostos E-ACPA+X investigados (4, 7 e 9 m e adulto), apenas o de 7 m foi capaz de inibir significativamente o edema na 3^a h após a injeção de carragenina, causando uma inibição de 34,3% em relação ao controle.

Porém, na dose de 400 mg/Kg, v.o., o extrato da planta adulta, silvestre, bem como os obtidos pelo cultivo foram capazes de inibir significativamente o edema de carragenina em diferentes períodos de avaliação, com inibições de 25 a 64%. Os extratos E7-ACPA+X e E9-Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith 266

ACPA+X foram equipotentes e apresentaram uma atividade antiedematogênica superior à da planta adulta silvestre.

O estudo demonstrou o potencial antinociceptivo e antiedematogênico dos EEtOH obtidos de *A. cearensis* cultivada, onde os extratos E7-ACPA+X e E9-ACPA+X apresentaram-se pelo menos equipotentes em relação à planta adulta.

8.2. Avaliação da atividade farmacológica de substâncias isoladas de *A. cearensis*

❖ Atividade Antiinflamatória

Em virtude do uso difundido de *A. cearensis* para o tratamento de doenças respiratórias (gripe, resfriado, bronquite e asma) e as evidências farmacológicas de atividade antiinflamatória mostradas pelo extrato hidroalcoólico de *A. cearensis* (LEAL et al., 2003), o isocampferídio e o amburosídio A, isolados em nossos estudos, foram submetidos a diferentes modelos de ensaios de inflamação, num estudo realizado pela Profa. Luzia Kalyne de Almeida Moreira Leal.

As atividades antiedematogênicas do isocampferídio e do amburosídio A foram observadas em modelos de edema de pata induzido por diversos agentes inflamatórios (carragenina, dextrano, prostaglandina E₂, histamina, serotonina), peritonite induzida por carragenina e determinação das atividades das enzimas mieloperoxidase e elastase, incluindo estudo histopatológico, avaliação morfométrica e avaliação da permeabilidade vascular de ratos e camundongos. Os mecanismos de ação destas substâncias estão possivelmente relacionados ao bloqueio da síntese, liberação e/ou ação de mediadores inflamatórios (prostaglandina E₂, histamina, e serotonina) e inibição parcial da degranulação de neutrófilos.

A ação antioxidante do amburosídio A foi evidenciada em modelos de hepatotoxicidade induzida por CCl₄, em fígado de ratos. A ação hepatoprotetora foi determinada através do monitoramento das concentrações enzimáticas da catalase e enzimas transaminases, dos níveis séricos de glutatona reduzida e substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico e análise histológica do fígado, sugerindo que o amburosídio possui ação sequestradora de radicais livres e inibidora da peroxidação lipídica (LEAL et al., 2006a).

❖ Atividade broncodilatadora

O isocampferídio apresentou efeito relaxante muscular em traquéias de cobaias, pré-contraídas com carbacol ou KCl, independente da presença de epitélio. Por isso acredita-se que este flavonóide seja capaz de mediar a ativação da via Óxido Nítrico Sintetase-Guanilato

Ciclase, promover a abertura de canais de K⁺ e interferir na liberação de neuropeptídios (substância P e neurocinina A) (LEAL et al., 2006b).

As atividades antiinflamatória e broncodilatadora apresentadas pelo isocampferídio e amburosídio A dão respaldo parcial ao uso tradicional da planta como alternativa terapêutica para o tratamento de patologias respiratórias.

❖ **Atividade neuroprotetora**

O amburosídio A teve sua ação neuroprotetora avaliada em modelos de neurotoxicidade provocada pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina, em células mesencefálicas de ratos. Sua ação neuroprotetora foi demonstrada por aferições dos níveis de óxido nítrico, nitrito e substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico, os quais revelaram uma suposta inativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e inibição da peroxidação lipídica como prováveis mecanismos. A atividade antioxidante exibida neste tipo de ensaio farmacológico sugere um potencial terapêutico do amburosídio A contra doenças neurodegenerativas como o Mal de Parkinson (LEAL et al., 2005).

❖ **Atividade Citotóxica**

Em pesquisa desenvolvida pela Profa. Leticia Veras Costa-Lotufo (Departamento de Farmacologia e Fisiologia/UFC) em busca de novos agentes citotóxicos, foram testados isocampferídio, campferol, ácido protocatecuico e amburosídio A.

Todavia apenas os flavonóides, isocampferídio e o campferol, exibiram significativos efeitos antiproliferativos contra ovos de ouriço-do-mar e cinco linhagens de células tumorais (dois tipos de células leucêmicas humanas, células cancerosas de mama, cólon e pele) em ensaios *in vitro*, sinalizando um potencial antineoplásico para estes compostos (COSTA-LOTTUFO et al., 2003).

REFERÊNCIAS

- COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith **Z. Naturforsch.**, v. 58c, p. 675-680, 2003.
- DI ROSA, M., GIROUD, J.P., WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v.104, p. 15-29, 1971.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. Formalin test - quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain-stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p.161-174, 1977.
- HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesic. **J. Neurosci. Methods.**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, A.T., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p.103-4, 1987.
- LEAL, L. K. A. M. **Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos de princípios bioativos, isocampferídio e amburosídeo A.** 2006. 189 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M.F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, v. 79, p. 98-104, 2006.
- LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R.A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Phytother. Res.**, v. 17, p.335-340, 2003.
- LEAL, L. K. A. M.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; CUNHA, G. M. A.; MORAES, M. O., PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B.; Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurosci. Lett.**, v. 388, p. 86-90, 2005.
- POSADAS, I., BUCCI, M., CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Brit. J. of Pharmacol.**, v. 142, p. 331-338, 2004.
- SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI H., INOKI, R. Modified formalin test:characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38, p.347-52, 1989.
- TENG, C. J.; ABBOTT, F. V. The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. **Pain**, v. 76, n. 3, p. 337-347, 1998
- TJOLSEN, A., BERGE, O. G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

9. ATIVIDADE ALELOPÁTICA

9.1. Alelopatia

Alelopatia foi definida por Molish em 1937 como a circunstância em que determinadas espécies de planta podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de outras por síntese e liberação de substâncias químicas específicas (aleloquímicos) no ambiente (ABENAVOLI et al., 2003). A principal rota biogenética produtora de aleloquímicos é a via chiquimato, sendo ácidos fenólicos e cumarinas os mais importantes (CHON et al., 2003).

A cumarina é conhecida por ser um forte inibidor da germinação de sementes e crescimento de raízes. É uma substância modulada pela luz capaz de reduzir a taxa de respiração e fotossíntese, em plantas intactas, por inibir o sistema de transporte de elétrons. Apresenta um efeito ambíguo (indução e inibição) sobre o crescimento dependendo da espécie e da concentração (ABENAVOLI et al., 2003).

9.2. Atividade alelopática do extrato aquoso das sementes de *A. cearensis*

A capacidade alelopática do extrato aquoso das sementes de *Amburana cearensis* (ACEAq) foi testada na inibição da germinação de *Lactuca sativa* (alface), pelo Prof. Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra (Departamento de Fitotecnia-UFC). No bioensaio, as sementes de *L. sativa* foram semeadas sobre discos de papel de filtro, previamente umedecidos com solução de ACEAq, e dispostos sobre placas de Petri, as quais foram mantidas num germinador (20 °C), com luz contínua, por 15 dias. Os procedimentos de contagens foram efetuados no 4º e 7º dia. No 11º dia, foi realizada a substituição dos discos de papel de filtro, o umedecimento dos mesmos com água destilada e a repicagem das sementes. Decorridos quatro dias, realizou-se a avaliação das sementes repicadas, classificando-as em plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas.

ACEAq mostrou atividade em todas as concentrações testadas, que variaram de 0,54 a 34,50 mg/mL. A inibição da germinação foi revertida nos tratamentos a baixas concentrações (0,54; 1,08; 2,16 e 4,32mg/mL) quando procedeu-se a troca dos discos de papel de filtro e a posterior repicagem das sementes, mas não para as outras (Fig. 163, p. 270). Partição líquido-líquido do ACEAq com clorofórmio, seguida da extração com acetato de etila, forneceu uma fração aquosa (isenta de cumarina) exercendo ainda efeito inibitório. Este resultado sugere que a cumarina não é a única responsável pela ação alelopática. Análise por RMN revelou a presença de cumarina livre, na porção apolar, e glicosídeos de cumarina e ácido (Z)-*o*-cumárico, na fração polar (BEZERRA, 2001).



Figura 163- Detalhe das plântulas normais (esquerda), anormais (centro) e sementes não germinadas (direita) observadas no bioensaio com extrato aquoso das sementes de cumaru.

A atividade alelopática demonstrada pelo extrato aquoso das sementes de *A. cearensis* é uma prova científica do potencial bio-herbicida desta planta, a qual poderá ser utilizada como uma arma química natural, de baixo custo e ecologicamente correta no combate a ervas daninhas, possibilitando aumento na produtividade agrícola sem provocar danos à saúde humana e ao meio-ambiente.

REFERÊNCIA

ABENAVOLI, M. R.; SORGONA, A.; SIDARI, M.; BADIANI, M.; FUGGI, A. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture. **J. Plant Physiol.**, v. 160, p. 227-237, 2003.

BEZERRA, A. M. E.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; FREITAS, J. B. S.; MEDEIROS-FILHO, S. Efeito do extrato aquoso das sementes de cumaru na germinação de alface. **Hortic. Bras.**, v. 19, n. 2, p.243, 2001.

CHON, S-U; KIM, Y. M.; LEE, J. C. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed Res.**, v. 43, p. 444-450, 2003.

10. PARTE EXPERIMENTAL

10.1. ESTUDO QUÍMICO DOS CONSTITUINTES DE *A. CEARENSIS*

10.1.1. MATERIAL BOTÂNICO

As sementes de *Amburana cearensis* foram adquiridas no comércio de Fortaleza pelo Prof. Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra, pesquisador responsável pelo cultivo de mudas desta espécie.

As cascas do caule de *A. cearensis* selecionadas para este estudo foram coletadas, em setembro de 2002, na fazenda São Vicente, no município de Quixeramobim-Ce, pela Prof^a. Luzia Kalyne Almeida M. Leal (Departamento de Farmácia-UFC), pesquisadora responsável pelos ensaios farmacológicos de extratos e substâncias isoladas desta planta.

A identificação botânica foi fornecida pelo Prof. Afrânio Gomes Fernandes, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As exsiccatas correspondentes à coleta encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra/UFC, com os números de inscrição 837 e 847.

10.1.2. METODOLOGIA AGRONÔMICA

Cultivo de mudas de *A. cearensis*

Sementes foram semeadas, diretamente, em quatro canteiros de dimensões de 1,20 m x 10,00 m cada, no Setor de Horticultura da UFC, os quais foram previamente adubados com *Bioadubo vitaemix*[®] (2,8 kg m⁻²). Cada parcela compunha-se de seis fileiras regularmente espaçadas de 20 cm, cuja densidade de semeadura foi de 50 sementes/fileira. Após o desbaste, realizado 45 dias depois da semeadura, preservaram-se 20 plantas por parcela. Os tratamentos, representados por oito épocas de colheita (60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 270 dias após a semeadura), foram distribuídos aleatoriamente segundo um delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos culturais dispensados foram duas capinas manuais (45 e 70 dias) e regas por microaspersão, exceto nos dias chuvosos. As partes aéreas foram manualmente separadas dos respectivos xilopódios.

10.1.3 Métodos cromatográficos

10.1.3.1. Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção foi empregada gel de sílica 60 da Merck ou da Vetec (\varnothing μm 63-200). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (\varnothing μm 2-25) sobre poliéster T-6145 da Sigma Chemical CO (com indicador de fluorescência na faixa de 254 ηm). Os eluentes utilizados foram: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros, ou combinados em proporções crescentes de polaridade.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366nm) realizada em aparelho Spectroline modelo ENF-240 C/F e/ou por aspersão com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), seguido de aquecimento em estufa a 100 $^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 5 minutos, ou ainda por exposição a vapores de iodo.

10.1.3.2. Cromatografia de exclusão

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro ou combinado com água ou clorofórmio como fase móvel.

10.1.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE \approx HPLC)

As soluções de calibração, os extratos e frações de *Amburana cearensis* foram analisados num aparelho de HPLC, constituído de uma bomba binária Waters-1525 e um detector DAD Waters-2996 a 254nm. As separações foram efetuadas em colunas XTerra[®] RP-18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) e XTerra[®] RP-18 (10 x 250 mm, 10 μm), mantidas num forno termostático a 35 $^{\circ}\text{C}$. As amostras foram eluídas com MeOH e solução aquosa de H_3PO_4 , puro ou tamponado com Et_3N (pH=3,0), adotando-se fluxos de 1mL/min (coluna analítica) e 4,5 mL/min (coluna semi-preparativa).

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (MeOH-Tedia e H_2O -Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 μm

(Phenomenex) e desgaseificados por sonicação a vácuo durante 5 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 µm (Waters).

10.1.3.4. Extração em Fase Sólida (EFS ≈ SPE)

As extrações em fase sólida de frações de *A. cearensis*, com fins de isolamento, foram realizadas em cartuchos de fase reversa (C₁₈) de 500 mg e 2g, fabricados pela Waters. Na etapa de preparo das amostras injetadas no HPLC (*clean-up*), foram empregados cartuchos de fase reversa de 100 mg, fabricados pela Varian. O uso dos cartuchos era precedido por ativação do adsorvente com metanol, seguida de acondicionamento em água Mili-Q, utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho.

10.1.4. Métodos espectroscópicos

10.1.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC), utilizando pastilhas de KBr para análise das amostras.

10.1.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

O espectrômetro Bruker Avance DRX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,046 T, foi operado nas frequências de 300,13 e 75,47 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. Nos experimentos realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram aplicadas frequências de 500,13 MHz (¹H) e 125,75 MHz (¹³C), sob

um campo magnético de 11,744 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: 1- sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais), 2- sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD), dimetilsulfóxido (DMSO- d_6), água (D_2O) ou piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de prótio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27), metanol (δ 3,31), DMSO (δ 2,50), piridina (δ 8,74; 7,58; 7,22), água (δ 4,80) e acetona (δ 2,05). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), metanol (δ 49,17), DMSO (δ 39,51) piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87) e acetona (δ 206,68 e 29,92).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

Nos experimentos unidimensionais de ^1H e de ^{13}C foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, tempo de relaxação de 1 s e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. Predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando necessária. O número de transientes variou de 8, para ^1H , a 16384, para ^{13}C , para os experimentos unidimensionais, e 2^n ($n \geq 2$) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram: ^1H (zg), ^{13}C -BB (zgp), ^{13}C -DEPT135 (dept135), COSY (cosygp), NOESY (noesygp), HSQC (hsqcgp), ^1H , ^{13}C -HMBC (hmbclpndqf).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , e 90° , somente

Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith 275

CH, foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico ou metilidênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135 do espectro BB.

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY e NOESY) e heteronuclear (HMQC, HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de J utilizados para os experimentos pertinentes foram $^1J_{\text{H,C}} = 145$, $^nJ_{\text{H,C}} = 7$, onde $n \geq 2$.

10.1.4.3. Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados num espectrômetro Shimadzu, modelo QP 5000/DI-50, através de impacto eletrônico a 70 eV ((DQOI/UFC).

Os espectros de alta resolução dos amburosídeos foram obtidos por ionização por elétron-*spray* (EM-IES), enquanto que os espectros de biflavonóides foram produzidos por impacto eletrônico (EM-IE). Os espectros por EM-IES foram registrados num espectrômetro de quadrupolo com analisador de tempo-de-vôo (UltrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, USA), pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massas da USP-Ribeirão Preto, sendo os scans adquiridos no modo positivo. Condições: voltagem capilar de 3400 V, temperatura e fluxo do gás seco: 180 °C e 4 L/h. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ foi empregado como padrão de calibração interna e externa. Os espectros de EM-IE foram obtidos num aparelho VG Autospec Fisons Instruments (Micromass, Manchester), pertencente à central analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

10.1.5. Métodos físicos

10.1.5.1. Determinação do ponto de fusão (pf)

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, composto por uma placa aquecedora FP82HT e uma unidade de processamento FP90, a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min.

10.1.5.2 Determinação da rotação óptica (α)

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 341, sendo as medidas realizadas a 589 nm (20 °C).

10.1.6. Estudo Fitoquímico da casca do caule de *A. cearensis*

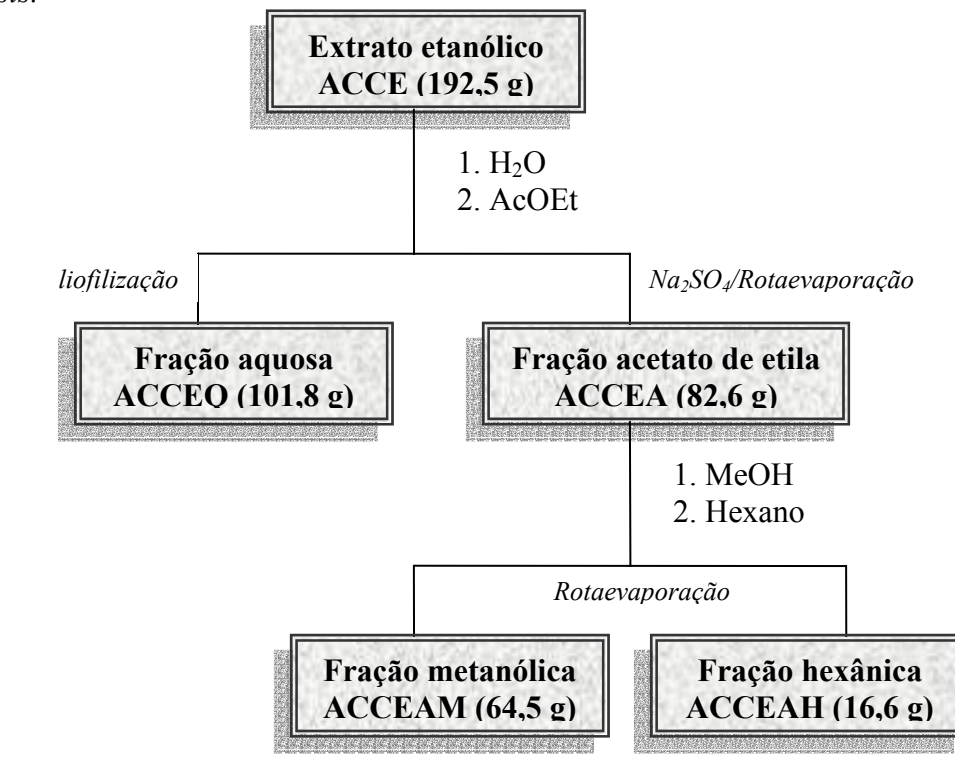
10.1.6.1. Obtenção do extrato etanólico da casca do caule (ACCE₁)

4,0 Kg de cascas do caule de planta adulta silvestre, trituradas mecanicamente, foram divididas em alíquotas de, aproximadamente, 200 g e submetidas à extração com etanol em aparelho Soxhlet, gerando 192,5 g (R= 4,8 %, p/p) de um sólido viscoso marrom, após destilação do solvente sob pressão reduzida. O extrato etanólico obtido foi denominado ACCE₁.

10.1.6.2. Partição líquido-líquido do extrato etanólico ACCE₁

O extrato etanólico ACCE₁ (192,5 g) foi suspenso em 350 mL de água e particionado com acetato de etila (3 x 150 mL), fornecendo 101,8 g de fração aquosa (ACCE₁A), após liofilização. A fração acetato de etila, previamente tratada com Na₂SO₄ anidro, foi destilada a vácuo, rendendo 82,6 g de um sólido marrom viscoso. Depois de seca, a fração acetato de etila (82,6 g) foi solubilizada com 200 mL de metanol e desengordurada através de partição com hexano (3 x 100 mL). As fases hexânica e metanólica foram rotaveaporadas e secas, gerando, respectivamente, 16,6 g de um sólido verde (ACCE₁AH) e 64,5 g de um sólido escuro (ACCE₁AM).

Fluxograma 1- Partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do caule de *A. cearensis*.



10.1.6.3. Fracionamento de ACCEAM₁

A fração ACCE₁AM (64,5 g) foi adsorvida com 65,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 48,7 g de gel de sílica numa coluna de vidro de 1000 mL. ACCE₁AM foi fracionada por eluição com os seguintes solventes, obedecendo esta ordem: CHCl₃ (0,5 L), CHCl₃/AcOEt (3,5 L), AcOEt (2,0 L) e MeOH (0,5 L). Após evaporação dos solventes, foram obtidas as frações correspondentes a cada eluente, seguindo a mesma seqüência: ACCE₁AM/C (2,1 g), ACCE₁AM/CA (22,7 g), ACCE₁AM/A (25,3 g) e ACCE₁AM/M (12,3 g).

10.1.6.4. Cromatografia em sílica de ACCE₁AM/CA

Numa coluna de 500 mL contendo 160,2 g de gel de sílica, acondicionou-se a fração ACCE₁AM/CA (22,7 g- sólido marrom), previamente adsorvida com 24,3 g de gel de sílica. ACCE₁AM/CA foi eluída com: CHCl₃ (f1-6), CHCl₃/AcOEt 10% (f7-18), CHCl₃/AcOEt 20% (f19-25), CHCl₃/AcOEt 40% (f26-29), CHCl₃/AcOEt 50% (f30-31), AcOEt (f32) e MeOH (f33), coletando-se alíquotas de 75 mL. Através de análise por CCD, reuniram-se as frações semelhantes: f3-7, f8-15, f16-19, f20-23, **f24-31**.

10.1.6.5. Cromatografia em Sephadex LH-20 de ACCE₁AM/CA(24-31)- Isolamento de ACCE-1 (quercetina)

A fração ACCE₁AM/CA(24-31) (4,0 g) foi dissolvida em 4 mL de MeOH e cromatografada em 60,0 g de Sephadex LH-20 ($\varnothing_{\text{int}} = 3,5$ cm). Foram coletadas 34 frações de 10 mL, utilizando-se metanol como eluente. Monitoramento por cromatoplasmas permitiu reunir as frações idênticas: **f2-8**, **f9-18** e **f19-33**. A cromatoplasma da fração 34 (40 mg) revelou a presença de apenas uma mancha amarelada, sendo então submetida à análise espectroscópica. Esta fração, um sólido amarelo, foi denominada ACCE-1 e identificada como sendo o flavonol quercetina.

10.1.6.6. Isolamento de ACCE-2 ACCE- 3 e ACCE-4 (ácido protocatecuico, amburosídeo A e ácido vanílico)

Uma nova cromatografia em Sephadex LH-20 (60 g; $\varnothing_{\text{int}} = 3,5$ cm) foi realizada para fração ACCE₁AM/CA(24-31)(2-8) (2,4 g), empregando-se condições idênticas às adotadas no procedimento anterior. As 20 frações obtidas foram submetidas à análise por CCD, resultando em 4 grupos de frações: **f4-6**, **f8-13** e **f14-15** e f16-20. Após secagem à temperatura ambiente, foi possível visualizar a presença de cristais aciculares amarelados na fração f4-6 (186 mg), chamada ACCE-2, e um sólido rosado na fração f8 -13 (954 mg), intitulada ACCE-3. A fração f14-15 (103 mg), sólido marrom escuro, foi recristalizada em CHCl₃/AcOEt 50%, obtendo-se 47 mg de cristais amarelados, designados ACCE-4. Todas as frações puras foram quimicamente caracterizadas através de comparação dos seus dados espectrais com os já descritos na literatura, revelando as seguintes substâncias químicas: ácido protocatecuico (ACCE-2), amburosídeo A (ACCE-3) e ácido vanílico (ACCE-4).

10.1.6.7. Isolamento de ACCE-5 (Amburanina A)

Após dissolução em 3 mL de MeOH, a fração ACCE₁AM/CA(24-31)(9-18) (1,5 g) foi submetida à cromatografia em Sephadex LH-20 (60 g- $\varnothing_{\text{int}} = 3,5$ cm), sendo eluída com MeOH. 26 frações de 5 mL foram coletadas e reunidas, ao serem comparadas por CCD: f3-5, f7-9 e **f10-26**.

A fração ACCE₁AM/CA(24-31)(9-18)(10-26) (260 mg) foi cromatografada novamente em Sephadex LH-20 (8 g- $\varnothing_{\text{int}} = 1,5$ cm), obtendo-se 15 frações de 1mL. As frações 6-12 apresentavam um sólido amarelo denominado ACCE-5 (61 mg) e identificado como o biflavonóide amburanina A por técnicas espectroscópicas.

10.1.6.8. Isolamento de ACCE-6 (Amburanina B)

Cromatografia em Sephadex LH-20 (8 g- \varnothing_{int} = 3,5 cm) de ACCE₁AM/CA(24-31)(19-33) (254 mg) rendeu um sólido amarelo nas frações 5 a 12, sendo então reunidas depois comparadas através de CCD. MeOH foi utilizado na solubilização da amostra (1,5 mL) e na eluição de 15 frações (alíquotas de 3mL).

A fração f5-12 (162 mg) foi purificada por HPLC, utilizando-se uma coluna de fase reversa e uma fase móvel composta por H₂O-MeOH. O gradiente de eluição variou de 60% para 75% de MeOH em 10 min, empregando-se um fluxo de 4,5 mL/min. O cromatograma (**Fig. 164**) exibiu dois picos a 284 nm, sendo o pico 2 (53 mg; t_R = 8,82 min), denominado ACCE-6, estruturalmente caracterizado através de técnicas espectroscópicas como amburanina B.

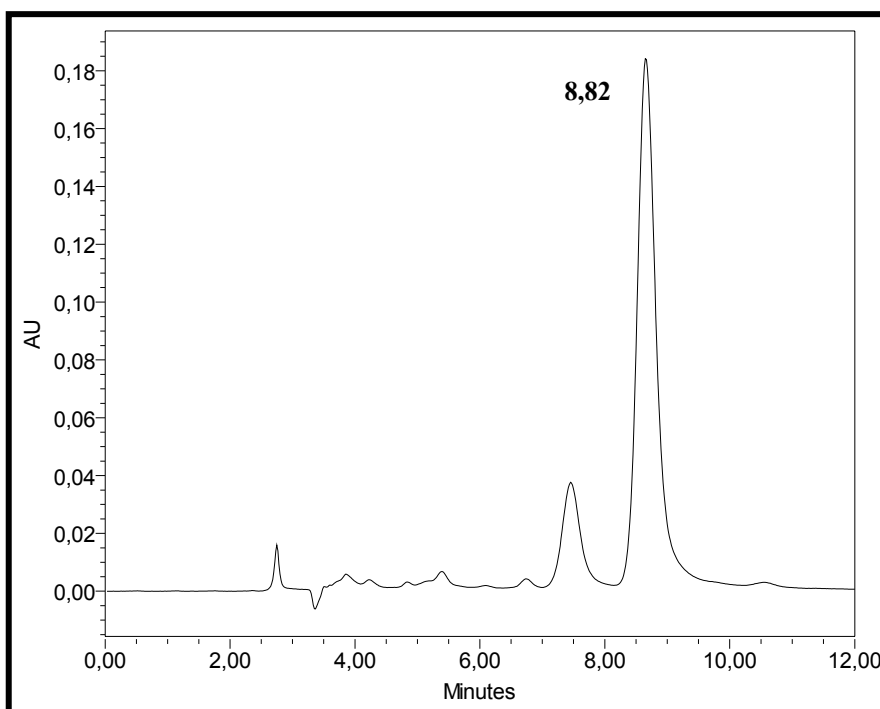
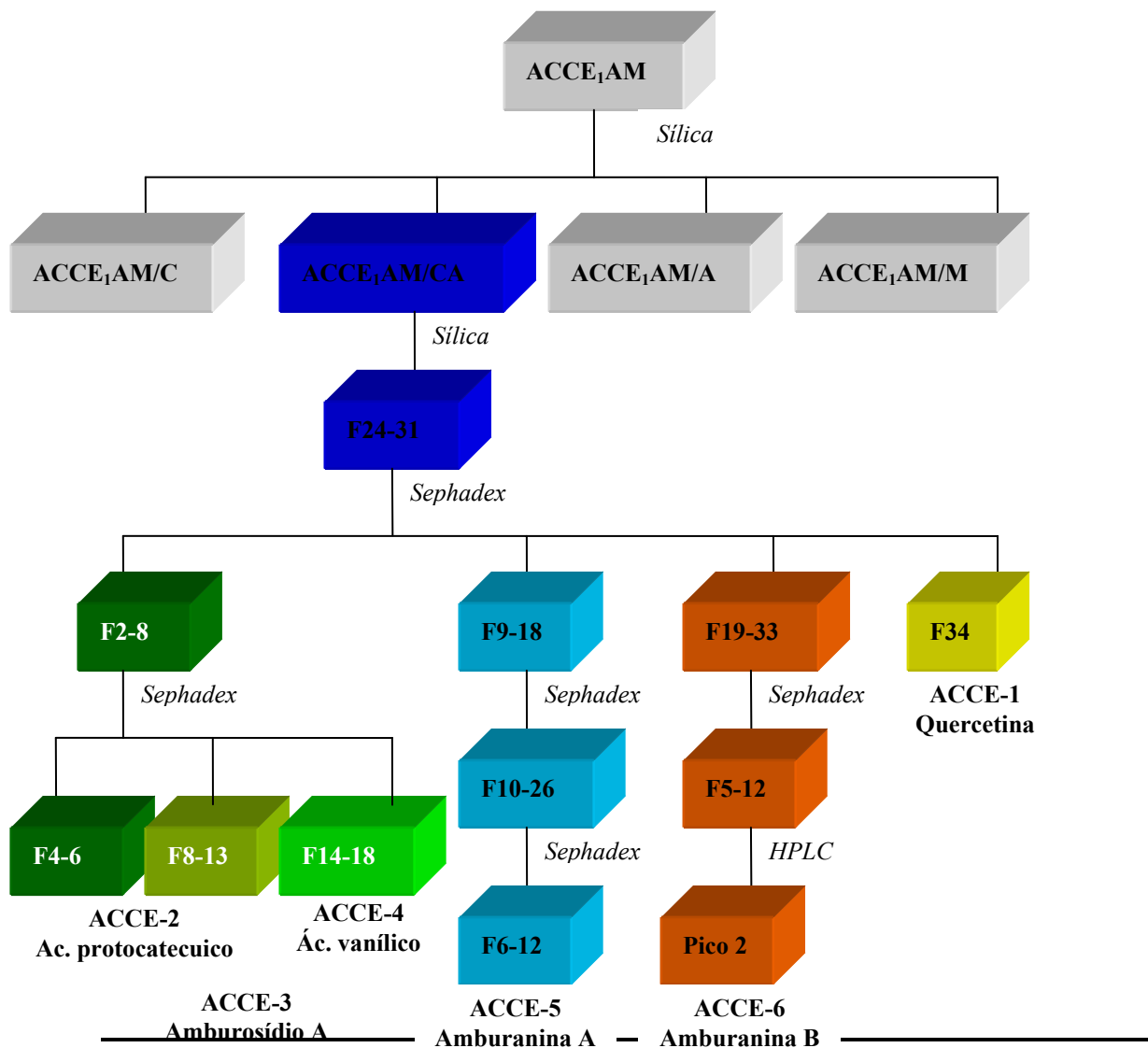


Figura 164- Cromatograma de HPLC da fração ACCE₁AM/CA(24-31)(19-33)(5-12)

Fluxograma 2- Metodologia de Isolamento de 6 substâncias obtidas do extrato etanólico da casca do caule de *A. cearensis*.



10.1.6.9. Obtenção e partição de ACCE₂

Em virtude da necessidade de maiores quantidades de substâncias de interesse farmacológico (amburosídio A e isocampferídio), repetiu-se a mesma metodologia de extração do **item 10.1.6.1.** Foram obtidos 228 g do extrato etanólico denominado ACCE₂ a partir de 4,2 Kg de casca do caule (R= 5,4 %, p/p), adquiridas nos mesmos local e período de coleta. O extrato ACCE₂ foi particionado com H₂O (350 mL)/AcOEt (3 x 150 mL) e posteriormente a fase acetato de etila foi seca e submetida à partição MeOH (180 mL)/Hexano (3 x 120 mL), resultando em 81,8 g e 14,4 g das frações metanólica (ACCE₂AM) e hexânica da fração (ACCE₂AH), respectivamente.

10.1.6.10. Fracionamento de ACCE₂AM

A fração ACCE₂AM foi adsorvida com 80 g de gel de sílica, sendo posteriormente acondicionada sobre 30 g de gel de sílica numa coluna de 1000 mL, e cromatografada com: CHCl₃ (1,7 L), CHCl₃/AcOEt (2,1 L), AcOEt (2,6 L) e MeOH (0,8 L), fornecendo as frações ACCE₂AM/C (12,7 g), ACCE₂AM/CA (15,7 g), ACCE₂AM/A (38,6 g) e ACCE₂AM /M (10,2 g), respectivamente.

10.1.6.11. Cromatografia em sílica de ACCE₂AM/CA

Adsorvida com 20,6 g de gel de sílica, a fração ACCE₂AM/CA (15,4 g) foi cromatografada numa coluna de 500 mL, contendo 102,1 g de gel de sílica. Para eluição, foram aplicadas as seguintes misturas de solventes: CHCl₃/AcOEt 10% (f1-3), CHCl₃/AcOEt 20% (f4-5), CHCl₃/AcOEt 50% (f6-19), além dos solventes puros AcOEt (f20-22) e MeOH (f23), sendo as frações recolhidas em porções de 75 mL. As frações f1-5, f6-12, f13-19 e f20-22 foram juntas depois de comparadas por CCD.

10.1.6.12. Isolamento de ACCE-7 e ACCE-8 (protocatecuato de 6-cumarila e isocampferídio)

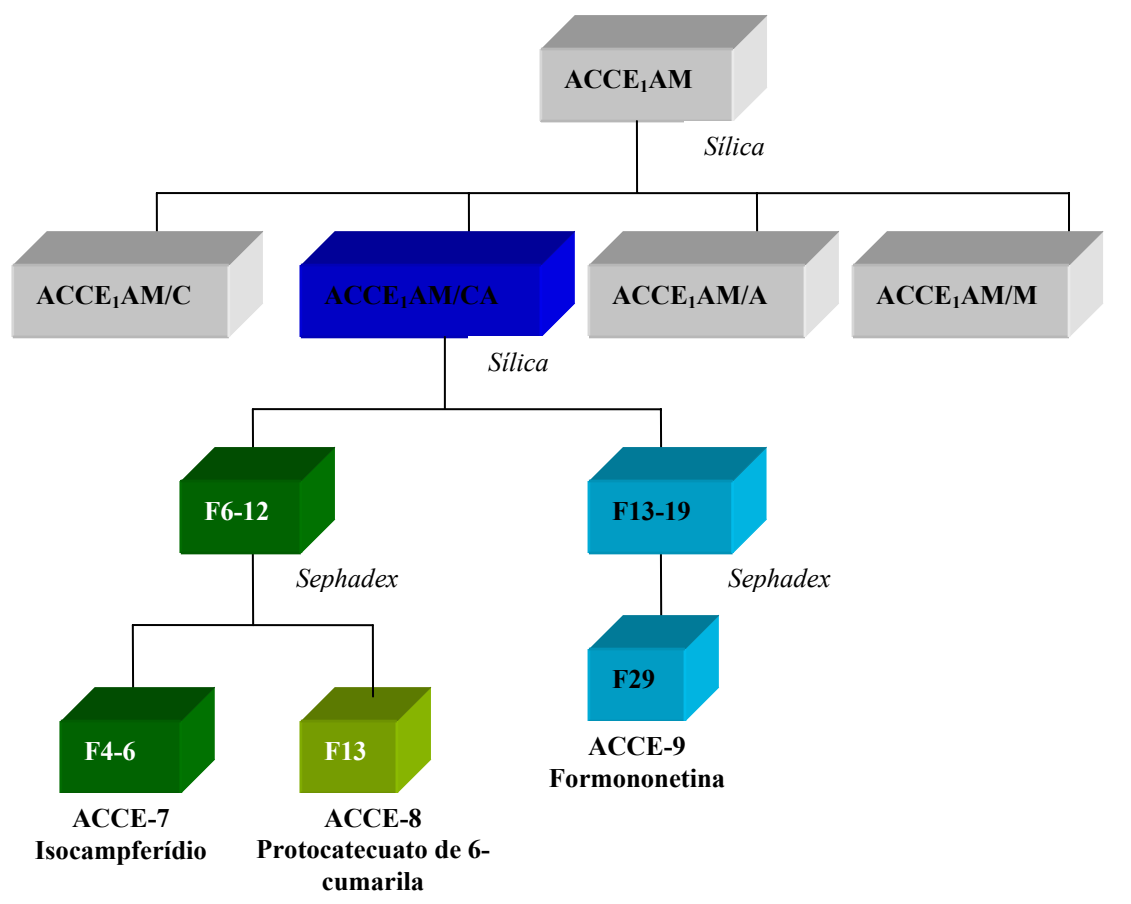
A fração ACCE₂AM/CA (6-12) (4,1 g- sólido marrom) foi três vezes submetida à cromatografia em 60 g de Sephadex LH-20 (Ø_{int}= 3,5 cm), adotando-se MeOH como eluente nas duas primeiras colunas cromatográficas e CHCl₃/MeOH 50%, na última. Foram coletadas 33 e 30 porções de 10 mL na primeira e segunda tentativas de isolamento, respectivamente, enquanto que, na terceira, recolheram-se 25 alíquotas de 5 mL. Em todas as colunas, as amostras foram aplicadas em volumes de 5 mL. Ao final desta série de separações, sempre monitoradas por CCD, chegou-se ao isolamento de 171,4 mg de ACCE-7, sólido amarelo obtido na fração f4-6, e 7 mg de ACCE-8, sólido vermelho encontrado na fração f13. Ambos tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectroscópicos como sendo o flavonóide isocampferídio e a cumarina protocatecuato de 6-cumarila, respectivamente.

10.1.6.13. Isolamento de ACCE-9 (formononetina)

A fração ACCE₂AM/CA(13-19) (2,9 g-sólido marrom) foi dissolvida em 4,6 mL de CHCl₃/MeOH 50 % e adicionada a uma coluna de Sephadex LH-20 (60 g- Ø_{int}= 3,5 cm), utilizando a mesma mistura de solventes como fase móvel. Foram recolhidos volumes de 5 mL, totalizando 30 frações. A fração 29 (8 mg) apresentava um sólido amarelo, o qual foi tratado com MeOH e filtrado, restando um sólido branco (3 mg) chamado de ACCE-9. A

determinação estrutural de ACCE-9 como sendo o isoflavonóide formononetina foi obtida somente por RMN.

Fluxograma 3- Metodologia de Isolamento de 3 outras substâncias obtidas do extrato etanólico da casca do caule de *A. cearensis*.

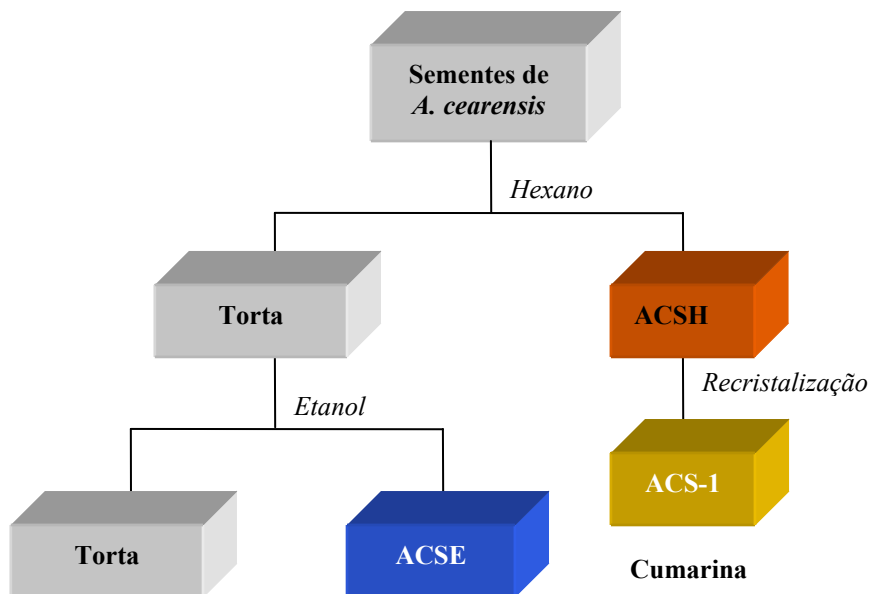


10.1.7. Estudo Fitoquímico das Sementes de *A. cearensis*

10.1.7.1. Obtenção do extrato etanólico das sementes (ACS)- Isolamento de ACS-1 (cumarina)

1,5 Kg de sementes moídas de *A. cearensis* foram maceradas em 1,8 L de CHCl₃ durante 24h. Após secagem do solvente, obteve-se um óleo amarelo (312 g) contendo um precipitado branco (53,5 g) o qual foi separado por remoção do líquido sobrenadante. Uma alíquota de 1,0 g do sólido branco foi tratada com 50 mL de água fervente, resultando no aparecimento de uma fase oleosa, removida por filtração simples. Depois de resfriada, a solução aquosa foi filtrada, gerando-se 240,5 mg de cristais brancos (ACS-1), identificados por RMN como cumarina. A torta, resíduo da extração, foi extraída com etanol em aparelho Soxhlet, fornecendo 144,0 g (R= 9,6 %, p_{ext.}/p_{semente}) de um sólido marrom, nomeado ACSE depois de evaporação do solvente a vácuo.

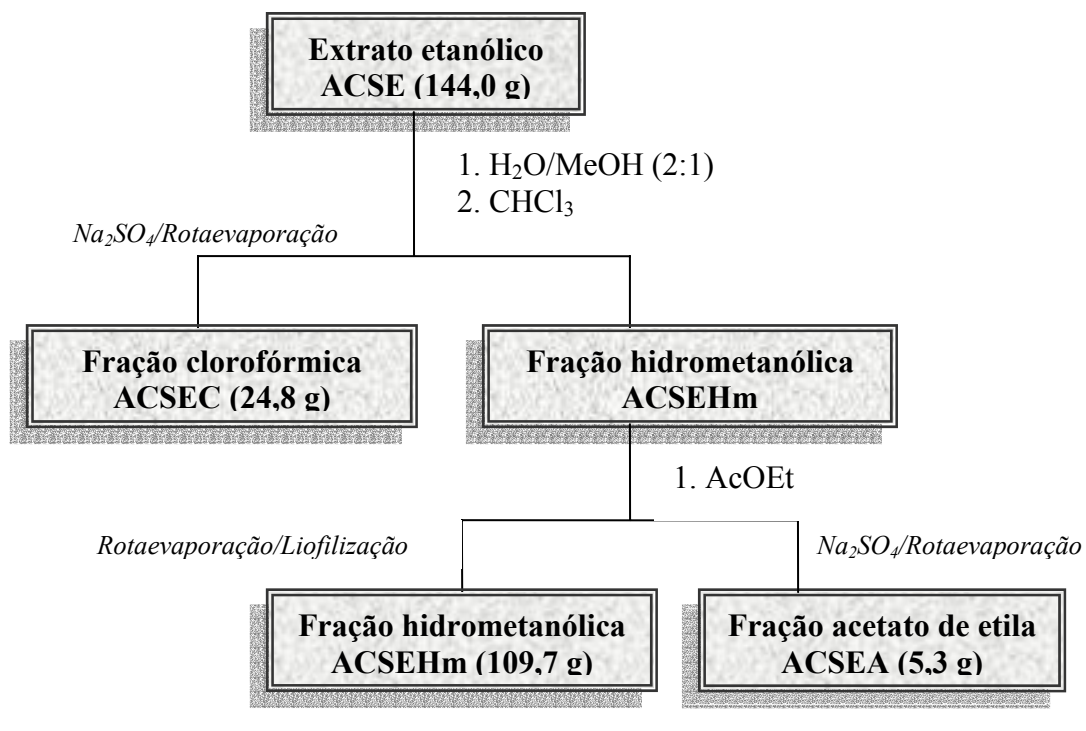
Fluxograma 4- Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das sementes de *A. cearensis*. Isolamento de ACS-1.



10.1.7.2. Partição do extrato etanólico ACSE

Em 300 mL de uma mistura H₂O-MeOH (2:1), o extrato ACSE (144,0 g) foi solubilizado e particionado com clorofórmio (3 x 100 mL), sendo imediatamente submetido à partição com AcOEt (3 x 100 mL). A fase hidrometanólica foi rotaevaporada, para remoção do metanol, e posteriormente liofilizada, rendendo 109,7 g de um sólido marrom (ACSEHm). As fases orgânicas, previamente tratadas com Na₂SO₄ anidro, foram concentradas e secas, resultando em 24,8 g de fração clorofórmica (ACSEC) e 5,3 g de fração acetato de etila (ACSEA).

Fluxograma 5- Partição do extrato etanólico das sementes de *A. cearensis*.



10.1.7.3. Cromatografia em Sephadex LH-20 de ACSEA

A fração ACSEA (5,3 g), sólido marrom dissolvido em 5 mL de MeOH, foi cromatografada em Sephadex LH-20 (60 g- $\varnothing_{int}= 3,5$ cm), gerando 30 frações de 10 mL, por eluição com MeOH. Depois de análise por CCD, reuniram-se as frações: **f2-11**, f12-15, **f16-18**, f19-25 e f20-28. Em virtude da baixa resolução alcançada na separação das frações iniciais, decidiu-se recromatografar a fração f2-11 (2,6 g), adotando-se as mesmas condições. Foram coletadas 20 frações de 10 mL, sendo reunidas as seguintes subfrações: f2-11(4-5), f2-11(6-10) e f2-11(**11-18**).

10.1.7.4. Isolamento de ACS-2 (galato de amburosila)

A fração ACSEA(16-18) (61,8 mg) foi solubilizada em 1 mL de H₂O/MeOH 50% e aplicada em um cartucho de SPE (500 mg), previamente ativado e equilibrado com a fase móvel. O cartucho foi eluído com 6 mL de H₂O/MeOH 50% e posteriormente com 6 mL de MeOH, sendo coletadas alíquotas de 1 mL. A fração 3 (9,3 mg), um sólido marrom viscoso, foi designada ACS-2 e submetida à análise espectroscópica, pela qual teve sua estrutura elucidada como galato de 6''-amburosila (amburosídio C).

10.1.7.5. Cromatografia em sílica de ACSEA(2-11)(11-18)-Isolamento de ACS-3 e ACS-4

Adsorvida com 2,0 g de gel de sílica, A fração ACSEA(2-11)(11-18) (1,6 g) foi depositada sobre 25,0 g deste mesmo adsorvente, numa coluna de 125 mL. A eluição da coluna foi efetuada inicialmente com Hexano/AcOEt 20% (f1-7), seguida de Hexano/AcOEt 25% (f8-16), Hexano/AcOEt 30% (f17-19), Hexano/AcOEt 40% (f20-22), Hexano/AcOEt 50% (f23-25), Hexano/AcOEt 75% (f26-27), AcOEt (f28), e finalmente MeOH (f29), recolhendo-se alíquotas de 50 mL. Cromatoplasacas expostas a vapores de iodo permitiram selecionar e agrupar as frações idênticas: f1-5, f6-7, f8-11, **f13-17, f18-20**, f21-23, f25-29. Análise por CCD revelou que as frações f21-23 (119 mg, ACS-3) e f12 (16 mg, ACS-4) eram quimicamente equivalentes às frações ACCE-3 (amburosídeo A) e ACCE-4 (ácido vanílico), respectivamente, isoladas das cascas do caule.

10.1.7.6. Separação por HPLC- Isolamento de ACS-5 e ACS-6 (6-hidroxi-cumarina e ácido (E)-o-cumárico)

Alíquotas de 200 µL de solução aquosa de H₃PO₄/MeOH 20% da fração ACSEA(2-11)(11-18)(13-17) (37 mg) foram injetadas num aparelho de HPLC, provido de coluna de fase reversa. A fase móvel, composta por H₃PO₄ (pH= 3,0)/MeOH, variou de 20 a 60% de MeOH em 20 min, adotando-se um fluxo de 4,7 mL/min. Selecionando-se a detecção de UV para 310 nm, obteve-se um cromatograma (**Fig. 165, p. 286**) exibindo 3 picos cujos tempos de retenção foram de 7,56 min (pico 1); 10,30 min (pico 2) e 11,24 min (pico 3). O primeiro pico (14,3 mg) foi reconhecido como sendo quimicamente idêntico a ACS-4 (ácido vanílico), após análise por RMN ¹H. Os picos 2 e 3, ambos sólidos brancos, passaram a ser referidos como ACS-5 (5,0 mg) e ACS-6 (9,7 mg), sendo estruturalmente caracterizados por RMN, IV e EM como 6-hidroxi-cumarina e ácido cumárico, respectivamente.

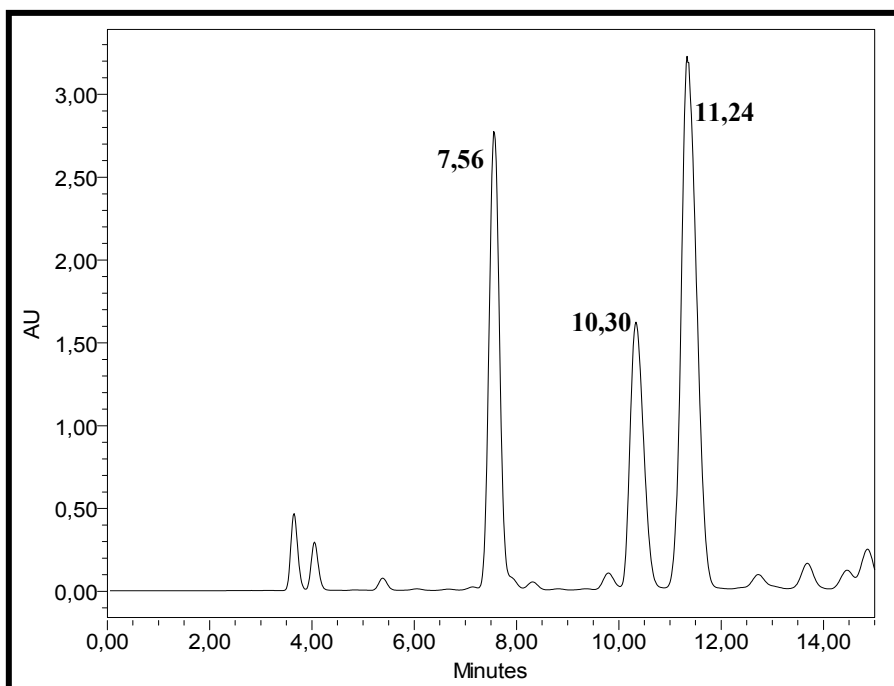


Figura 165- Cromatograma de HPLC da fração ACSEA(2-11)(11-18)(13-17)

10.1.7.7. Separação por HPLC- Isolamento de ACS-(7-12)

A fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20) (65,3 mg) foi analisada por HPLC numa coluna de fase reversa, empregando-se uma mistura de composição variável de H_3PO_4 (pH= 3,0)/MeOH. A concentração de MeOH variou de 40 para 80% ao longo de 20 min de corrida, mantendo-se um fluxo constante de 4,5 mL/min. As injeções foram realizadas através de alíquotas de 200 μL de solução filtrada da amostra, dissolvida na fase móvel inicial. A 254 nm, foram detectados e coletados 5 picos (**Fig. 166, p. 287**): pico 1 (t_R = 6,65 min, ACS-7), pico 2 (t_R = 9,36 min, ACS-8), pico 3 (t_R = 11,06 min, ACS-9), pico 4 (t_R = 12,50 min) e pico 5 (t_R = 13,57 min, ACS-10). O pico 4 foi reinjetado e desdobrado em dois novos picos: pico 4.1. (t_R = 11,69 min, ACS-11) e pico 4.2 (t_R = 13,54 min, ACS-12) (**Fig. 167, p. 287**). Este conjunto de picos foi caracterizado como uma série de amburosídeos denominados ACS- (7-12) e identificados como sendo os amburosídeos A, D-H.

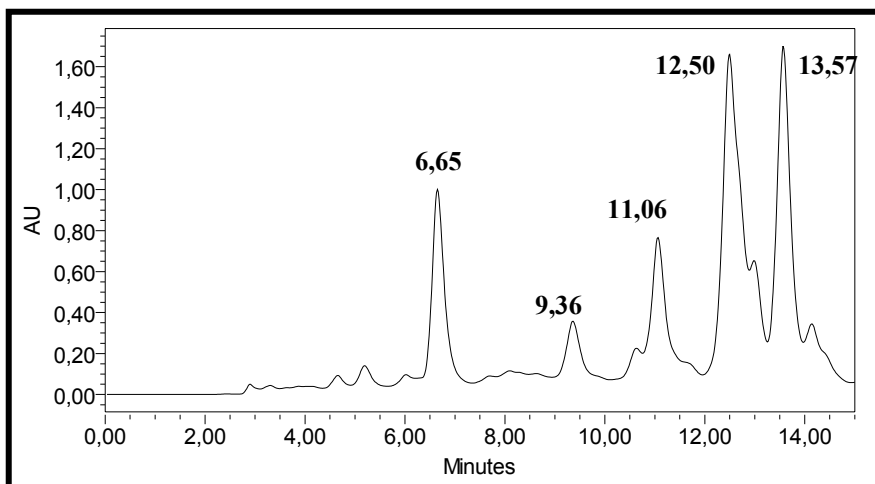


Figura 166- Cromatograma de HPLC da fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20)

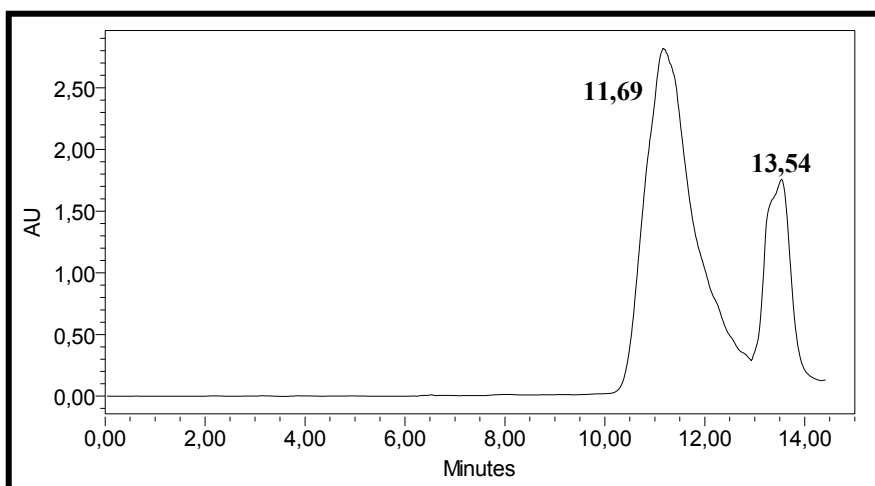
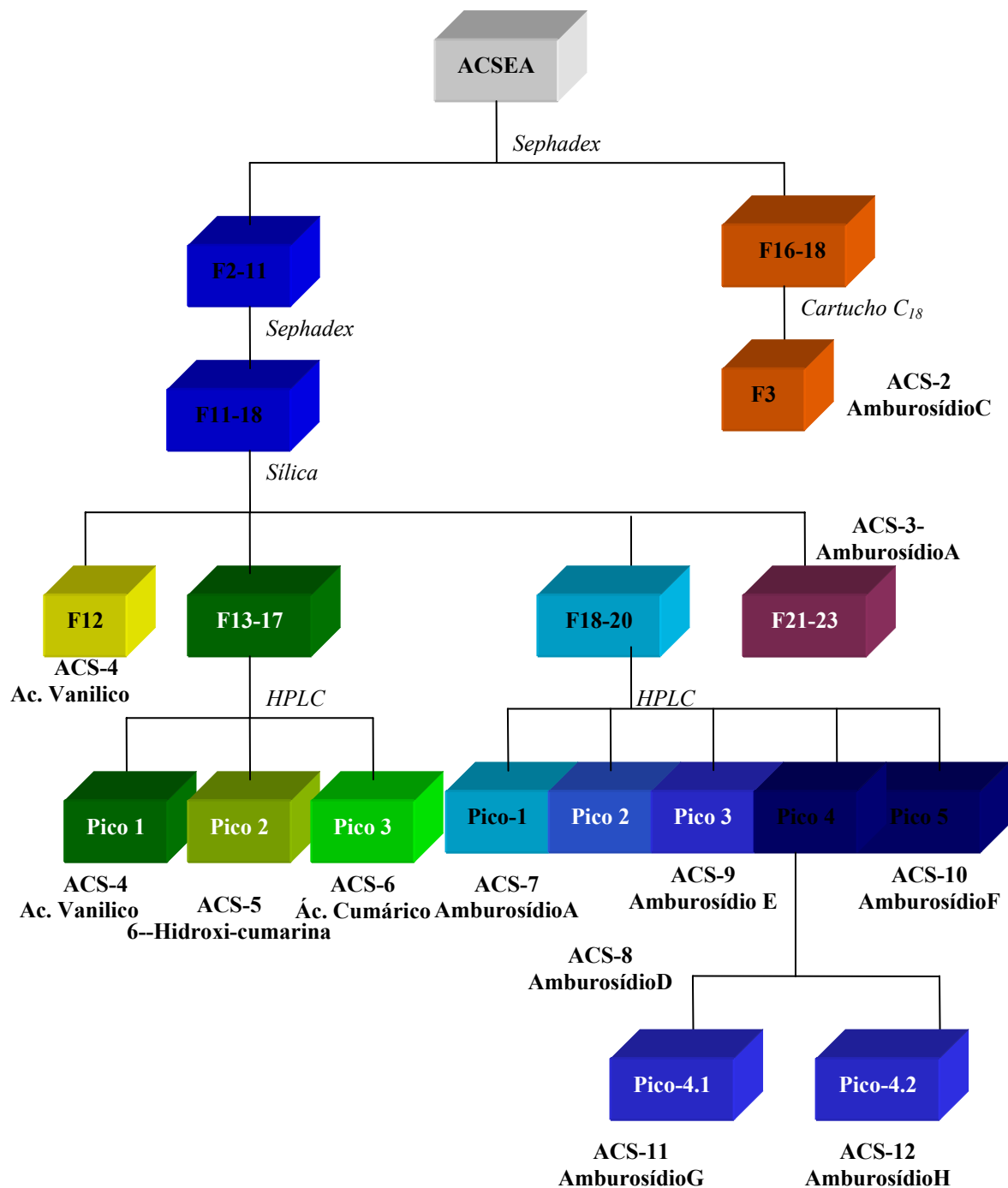


Figura 167- Cromatograma de HPLC do pico 4 da fração ACSEA(2-11)(11-18)(18-20)

Fluxograma 6- Metodologia de isolamento das 9 substâncias obtidas do extrato etanólico das sementes de *A. cearensis*.



10.1.8.Obtenção dos extratos etanólicos dos xilopódios e das partes aéreas de plantas cultivadas (ACX e ACPA)

As partes aéreas e os xilopódios moídos de espécimens jovens de *A. cearensis* (2-9 meses de desenvolvimento), cultivados por semeadura direta, foram extraídos por maceração com etanol durante 24 h. Os extratos foram obtidos em quadruplicata para fins estatísticos, perfazendo um total de 64, os quais foram assim denominados: EN-ACX, para aqueles oriundos do xilopódio, e EN-ACPa, para aqueles provenientes da parte aérea, sendo N referente à idade da planta (em meses de cultivo). Ao final, os extratos de mesma época foram reunidos por serem quimicamente idênticos, conforme análise realizada por RMN, resultando em 16 amostras (**Tab. 33, p. 290**).

Os extratos E2, E4, E7 e E9 do xilopódio e da parte aérea foram selecionados para serem submetidos a testes farmacológicos devido às diferenças observadas em seus perfis químicos, segundo análise espectroscópica por RMN (Ressonância Magnética Nuclear). A partir deste ponto, os estudos foram direcionados pelos resultados dos ensaios farmacológicos cujas respostas mais significativas foram observadas para o extrato E7 e E9.

10.1.8.1. Partição do extrato etanólico E7-ACX

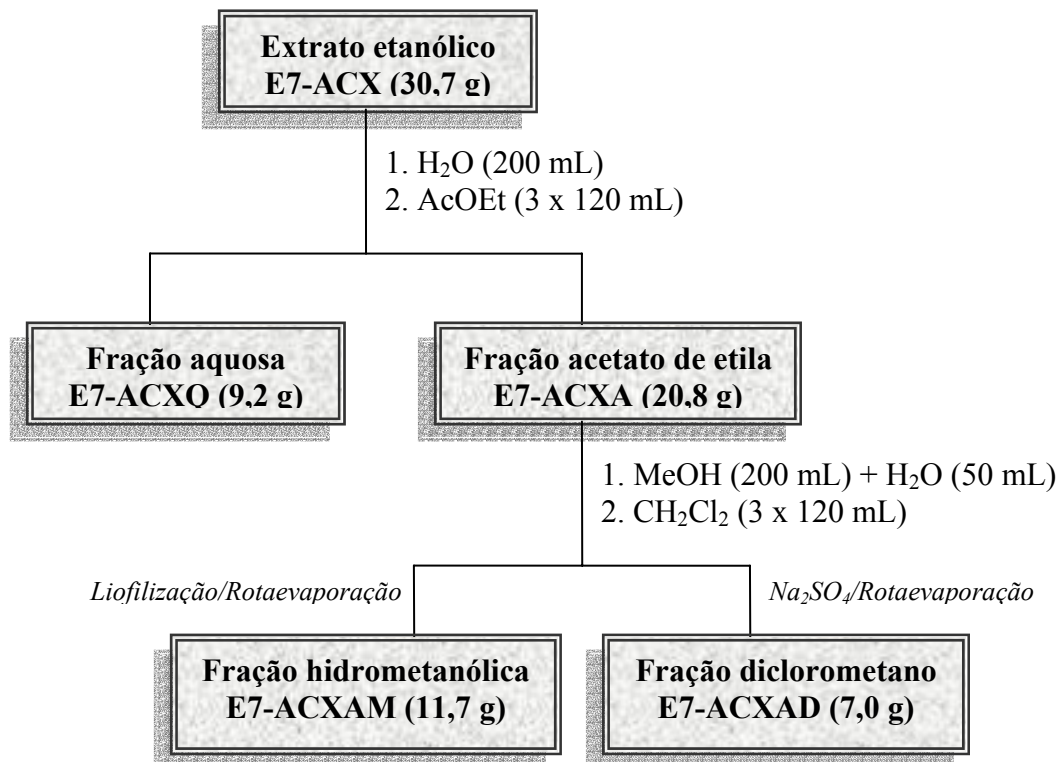
Uma alíquota de 30,7 g de extrato E7-ACX (sólido escuro), correspondente à metade da massa de extrato obtida, foi particionada com H₂O (200 mL)/AcOEt (3 x 120 mL). A fase aquosa foi liofilizada, gerando 9,2 g de um sólido marrom denominado **E7-ACXQ**. Tratada previamente com Na₂SO₄ anidro, a fase acetato de etila foi filtrada e seca, obtendo-se E7-ACXA (20,8 g), um sólido escuro. A fração E7-ACXA foi dissolvida em 200 mL de MeOH e misturada com 120 mL de CH₂Cl₂, contudo a separação de fases só foi observada após a adição de 50 mL de H₂O. A partição foi concluída com mais duas extrações com 120 mL de CH₂Cl₂, resultando em 11,7 g de fração hidrometanólica (E7-ACXAM) e 7,0 g da fração diclorometano (E7-ACXAD), após devido tratamento.

Tabela 33- Acompanhamento mensal das massas (g) e dos rendimentos (%) dos extratos etanólicos da parte aérea e do xilopódio de *A. cearensis*.

Mês	Extratos da parte aérea (canteiros)				
	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	Total
2	2,1 (7,0)	1,9 (8,0)	1,9 (7,1)	2,1 (7,6)	8,0
3	5,5 (8,0)	4,7 (8,5)	4,9 (8,8)	6,1 (12,9)	21,2
4	5,8 (4,5)	7,2 (7,0)	5,6 (4,4)	7,2 (6,0)	25,8
5	11,4 (3,4)	9,4 (3,6)	11,0 (3,8)	5,5 (1,6)	37,3
6	6,6 (2,8)	7,3 (2,9)	8,4 (2,9)	11,9 (5,6)	34,2
7	8,3 (4,0)	19,2 (5,8)	13,4 (4,0)	23,4 (7,4)	64,3
8	16,6 (5,6)	9,9 (2,90)	9,9 (6,7)	12,0 (3,7)	48,4
9	3,9 (0,8)	6,6 (1,6)	4,9 (1,1)	9,1 (2,8)	24,5

Mês	Extratos do xilopódio (canteiros)				
	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	Total
2	3,4 (16,0)	2,2 (21,4)	3,1 (19,6)	2,7 (17,9)	11,4 (19,4)
3	6,2 (7,3)	5,6 (10,2)	6,2 (9,7)	4,3 (11,8)	22,3 (43,5)
4	8,3 (4,5)	8,5 (8,4)	10,7 (6,6)	11,3 (7,6)	38,8 (64,6)
5	17,9 (10,0)	6,7 (2,4)	9,2 (3,9)	11,6 (6,2)	45,4 (82,7)
6	3,9 (0,7)	6,0 (1,0)	6,8 (1,1)	4,4 (0,8)	21,1 (55,3)
7	11,4 (1,8)	14,3 (1,6)	21,9 (1,9)	20,9 (2,5)	68,5 (132,8)
8	20,6 (1,9)	19,8 (1,7)	8,2 (1,3)	12,9 (1,1)	61,5 (109,9)
9	12,6 (1,2)	10,3 (0,6)	13,6 (0,7)	8,5 (0,6)	45,0 (69,5)

Fluxograma 7- Partição do extrato etanólico do xilopódio da planta jovem (7 meses) de *A. cearensis*.



10.1.8.2. Fracionamento de ACXQ

A fração E7-ACXQ (9,2 g) foi dividida em duas porções equitativas e cromatografada em Sephadex LH-20 (60 g- $\varnothing_{int}= 3,5$ cm) duas vezes, sob as mesmas condições. A amostra foi dissolvida e eluída com H₂O/MeOH 50%, obtendo-se 6 alíquotas de 30 mL em cada cromatografia. Em razão dos elevados teores de açúcares presentes nas frações, as cromatografias foram monitoradas por RMN ¹H. A fração f3 (3,9 g), resultante das duas colunas, foi selecionada para novo fracionamento, em virtude da presença de sinais na região de aromáticos no espectro de RMN ¹H. Objetivando-se extrair os constituintes heterosídicos, realizou-se uma partição H₂O (25 mL)/n-butanol (3 x 15 mL) resultando numa fração aquosa E7-ACXQ(3)Q (3,6 g) e outra butanólica E7-ACXQ(3)B (124 mg), sendo ambas sólidos viscosos marrons.

10.1.8.3. Separação por HPLC de ACXQ/B- Isolamento de ACX-1 (ác. cumarínico glicosilado)

Através de um *loop* de 200 μL , a fração ACXQ(3)B (124 mg) foi injetada sucessivas vezes num aparelho de HPLC, equipado com coluna de fase reversa. A amostra foi eluída com H_3PO_4 (pH= 3,0)/MeOH, empregando-se o gradiente de 20 para 50% de MeOH em 10 min de corrida. O cromatograma (**Fig. 168**), visualizado a 254 nm, mostrou a separação de 3 picos cujos tempos de retenção foram de 4,73 min (pico 1), 5,56 min (pico 2) e 7,87 min (pico 3). O pico 3 rendeu 12 mg de um sólido viscoso amarelo, denominado ACX-1, e quimicamente caracterizado como ácido cumarínico glicosilado.

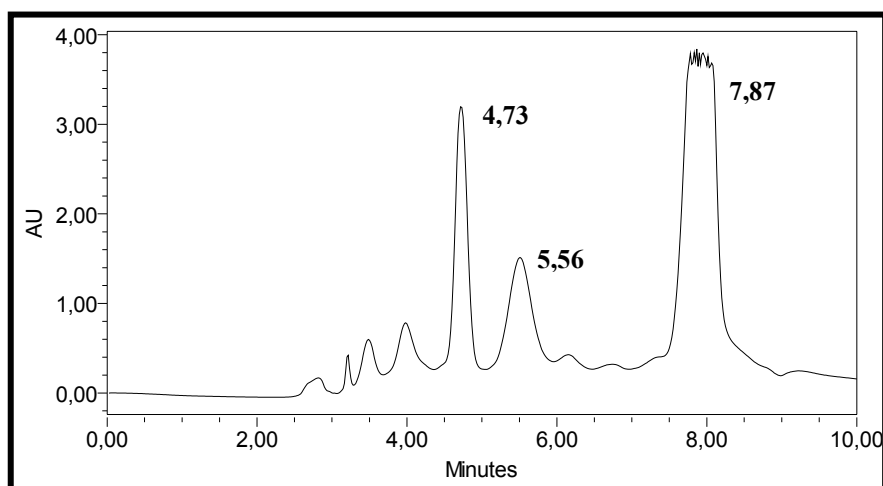


Figura 168- Cromatograma de HPLC da fração ACXQ(3)B

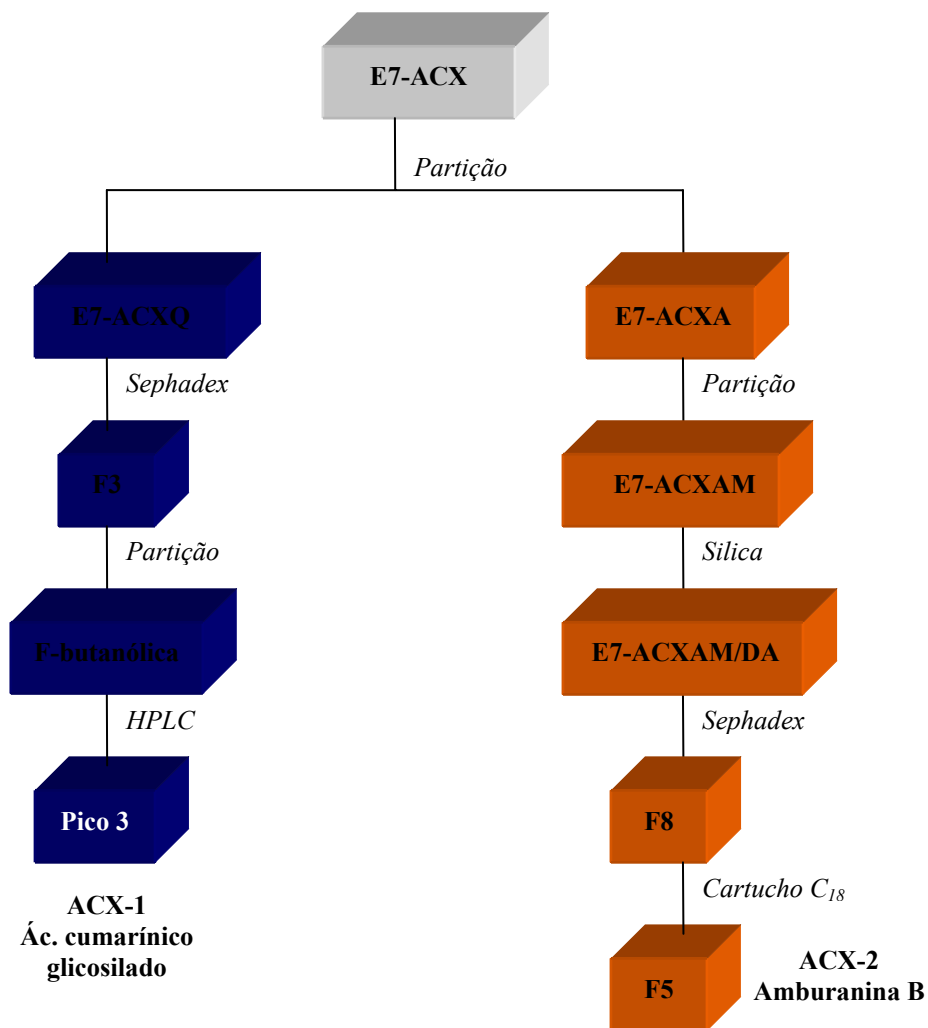
10.1.8.4. Tratamento cromatográfico de E7-ACXAM- Isolamento de ACX-2 (amburanina B)

A fração E7-ACXAM (11,7 g) foi adsorvida com 15,0 g de gel de sílica e eluída a vácuo com CH_2Cl_2 (150 mL), seguido de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (450 mL), AcOEt (800 mL) e MeOH (450 mL). Após evaporação dos solventes, foram obtidas as frações correspondentes a cada eluente, obedecendo a ordem de eluição: E7-ACXAM/D (1,0 g), E7-ACXAM/DA(1,7 g), E7-ACXAM/A (1,5 g) e E7-ACXAM/M (7,0 g).

A fração E7-ACXAM/DA(1,7 g) foi submetida à cromatografia em Sephadex LH-20 (60 g- $\varnothing_{\text{int}}= 3,5$ cm), após dissolução em 5 mL de MeOH. Foram geradas 15 frações de 10 mL utilizando-se MeOH como fase móvel. Monitoramento por CCD permitiu a reunião das frações semelhantes: f3-4, f5-7, f9-13. A fração f8 (120 mg) foi solubilizada em 1,0 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 20% e purificada através de um cartucho de SPE (500 mg). Foram coletadas

frações de 3 mL, eluídas com H₂O/MeOH 20% (f1-2), H₂O/MeOH 50% (f3-4), MeOH (f5). A subfração f8/5 (20,8 mg), sólido viscoso marrom denominado ACX-2, foi analisada por técnicas espectrométricas, a partir das quais se chegou à estrutura da amburanina B.

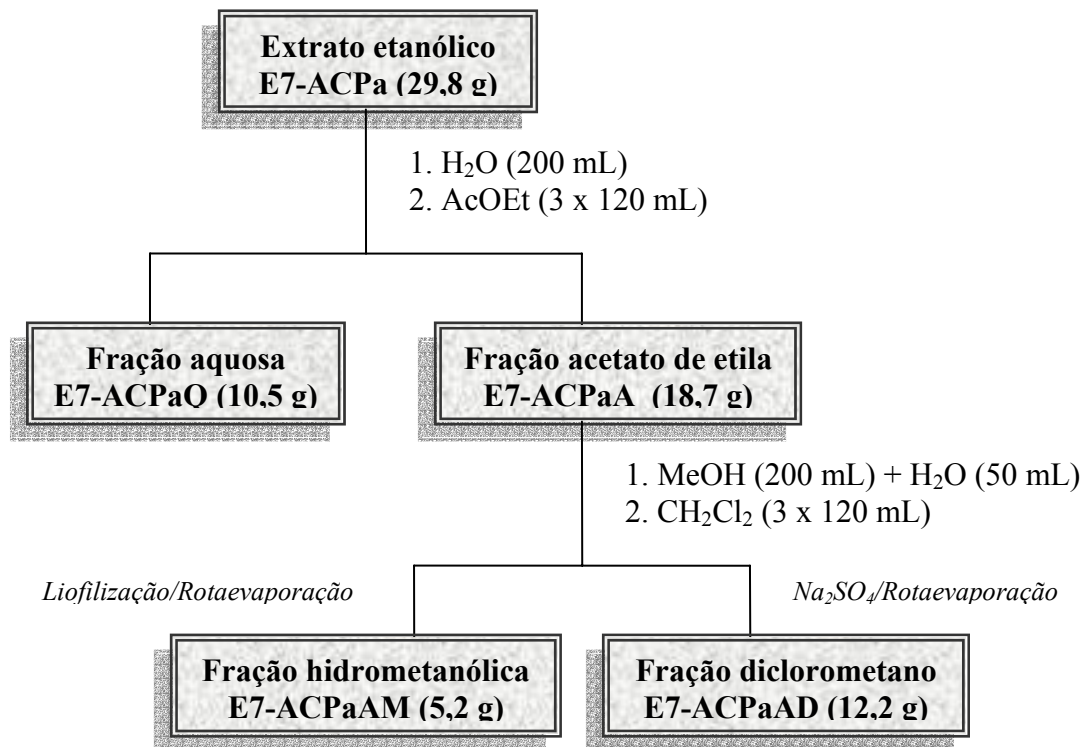
Fluxograma 8- Metodologia de isolamento de duas substâncias isoladas do xilopódio das plantas jovens de *A. cearensis* (7 meses).



10.1.8.5. Partição do extrato etanólico E7-ACPa

29,8 g do sólido verde-escuro E7-ACPa, aproximadamente metade da massa de extrato obtida, foi submetida a sucessivas partições com H₂O (200 mL)/AcOEt (3 x 120 mL), e posteriormente com MeOH (200 mL) + H₂O (50 mL)/ CH₂Cl₂ (3 x 120 mL), adotando-se metodologia semelhante à aplicada para o extrato E7-ACX. As frações aquosa e acetato de etila, oriundas da primeira partição, foram pesadas e denominadas E7-ACPaQ (10,5 g) e E7-ACPaA (18,7 g), respectivamente. A segunda partição forneceu 5,2 g de fração metanólica (E7-ACPaAM-sólido escuro) e 12,2 g de fração diclorometano (E7-ACPaAD-sólido verde).

Fluxograma 9- Partição do extrato etanólico da parte aérea da planta jovem (7 meses) de *A. cearensis*.



10.1.8.6. Cromatografia em sílica de E7-ACPaAD

A fração E7-ACPaAD (12,2 g) foi misturada com gel de sílica numa proporção 1:1 e pulverizada em gral de porcelana, sendo acondicionada sobre 20 g de gel de sílica numa coluna de 500 mL. Foram empregados os seguintes eluentes: hexano(f1- 100mL), hexano/ CH₂Cl₂ 10% (f2- 300 mL), hexano/ CH₂Cl₂ 25% (f3- 300 mL), hexano/ CH₂Cl₂ 50% (f4- 700 mL), hexano/ CH₂Cl₂ 75% (f5- 400 mL), CH₂Cl₂ (f6- 500 mL), CH₂Cl₂ /AcOEt 50% (f7- 500 mL), AcOEt (f8- 300 mL) e MeOH (f9- 200 mL). As frações f3 à f6 foram reunidas, após comparação por CCD.

10.1.8.7. Cromatografia em Sephadex LH-20 de E7-ACPaAD(3-6) (1,8 g)- Isolamento de ACPa-1 (ácido vanílico)

A fração E7-ACPaAD(3-6) (1,8 g), sólido verde-claro, foi dissolvida em 10 mL de MeOH e submetida à cromatografia em Sephadex LH-20 (60 g- Ø_{int}= 3,5 cm), resultando em 15 frações de 30 mL. A coluna, eluída com MeOH, foi monitorada por cromatoplaça, possibilitando a reunião das frações f2-3, **f4-6**, **f9-13**. A fração f2-3 foi tratada com CH₂Cl₂ e filtrada, resultando no isolamento de um sólido branco denominado ACPa-1 (258,8 mg), cujo rf em CCD foi idêntico ao de ACCE-4, embora que com aspecto físico distinto. No entanto, a

concordância dos sinais dos espectros de RMN ^1H das frações ACPA-1 e ACCE-4 permitiu identificá-las como sendo o ácido vanílico.

10.1.8.8. Cromatografia em sílica de E7-ACPaAD(4-6)-Isolamento de ACPA-2-4 (cumarina, e aiapina)

Numa coluna de 125 mL contendo 40,0 g de gel de sílica, a fração E7-ACPaAD(4-6) (380 mg) foi adsorvida com 1,5 g de gel de sílica e eluída com: hexano/ CH_2Cl_2 80% (f1), CH_2Cl_2 (f2-4), CH_2Cl_2 /AcOEt 10% (f5-7), CH_2Cl_2 /AcOEt 25% (f8-10), CH_2Cl_2 /AcOEt 40% (f11-12), CH_2Cl_2 /AcOEt 50% (f13-14), AcOEt 10% (f15), MeOH (f16). As frações foram coletadas em alíquotas de 100mL e reunidas após análise por CCD.

A fração f1 (104 mg), cristais brancos chamados ACPa-2, foi quimicamente identificada após co-eluição com a fração ACS-1 (cumarina) em cromatoplaça, na qual suas manchas apareceram superpostas.

Aplicando-se a mesma técnica para a fração f10 (5,4 mg), tendo ACCE-7 (isocampferídio) como padrão de referência, descobriu-se que as frações eram quimicamente idênticas. A fração f10, sólido amarelo, passou a ser chamada ACPa-3.

A cromatoplaça da fração f3-4 (62,5 mg) apresentou somente uma mancha (azul-fluorescente) ao ser visualizada sob UV, sendo intitulada ACPa-4 (cristais incolores). Análises espectroscópicas revelaram a estrutura da cumarina aiapina.

10.1.8.9. Isolamento de ACPa- 5 e ACPa-6 (ácido *p*-hidroxi benzóico e amburosídio B)

Dissolvida em 0,5 mL de H_2O , a fração E7-ACPaAD(3-6)(9-13) (52,2 mg) foi adicionada a um cartucho de SPE (500 mg), já ativado e equilibrado com a fase móvel. O cartucho foi eluído com H_2O (f1-2), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30% (f3-4) e MeOH (f5), recolhendo-se alíquotas de 2 mL. As frações f1 (5 mg) e f4 (23 mg), sólidos marrons viscosos, apresentaram apenas uma mancha na cromatoplaça, revelada por exposição a vapores de iodo. Ambas as frações, denominadas ACPa-5 (f1) e ACPa-6 (f4), foram identificadas por comparação dos seus dados espectrais com os já disponíveis na literatura, levando às proposições das estruturas referentes ao ácido *p*-hidroxi benzóico e ao amburosídio B, respectivamente.

10.1.8.10. Fracionamento de E7-ACPaQ

Uma alíquota de 5,0 g da fração E7-ACPaQ (10,5 g), solubilizada em 12 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 50%, foi aplicada numa coluna de Sephadex LH-20 (60 g- $\varnothing_{\text{int}}= 3,5$ cm) e eluída

com H₂O/MeOH 50%, resultando na obtenção de 10 frações de 20 mL. Foram reunidas as frações 1 a 4, totalizando 3,5 g de um material marrom viscoso, cujo espectro de RMN ¹H permitiu caracterizá-lo como sendo uma mistura de açúcares.

A fração f7 (137 mg) foi dissolvida em 1 mL de H₂O e cromatografada num cartucho de SPE (500 mg), utilizando-se como fase móvel H₂O (f7/1), seguida de H₂O/MeOH 20% (f7/2-3), H₂O/MeOH 30% (f7/4-5) e H₂O/MeOH 50% (f7/6). Colhidas em alíquotas de 3 mL, as frações da coluna foram monitoradas por CCD, através da qual verificou-se que a fração f7/4 (30 mg) era quimicamente equivalente à fração ACPa-6 (amburosídio B). As subfrações eluídas com H₂O/MeOH 20%, f7/2 e f7/3, foram reunidas e purificadas por HPLC, como descrito abaixo.

10.1.8.11. Purificação por HPLC- Isolamento de E7-ACPa-7 (ácido cumárico glicosilado)

A fração E7-ACPaQ(7)(2-3) (65 mg) foi purificada num aparelho de HPLC, injetando-se alíquotas de 200 µL de solução aquosa de H₃PO₄/MeOH 20%. A separação, realizada numa coluna de fase reversa, foi efetuada com um gradiente H₃PO₄/MeOH, variando de 30 para 50% em 10 min. Foram obtidos 2 picos (**Fig. 169**), detectados a 254 nm e registrados com tempos de retenção de 7,20 min (pico 1) e 9,07 min (pico 2). O pico 1 forneceu 24 mg de um sólido branco, denominado ACPa-7 e identificado por métodos espectrométricos como o ácido cumárico glicosilado.

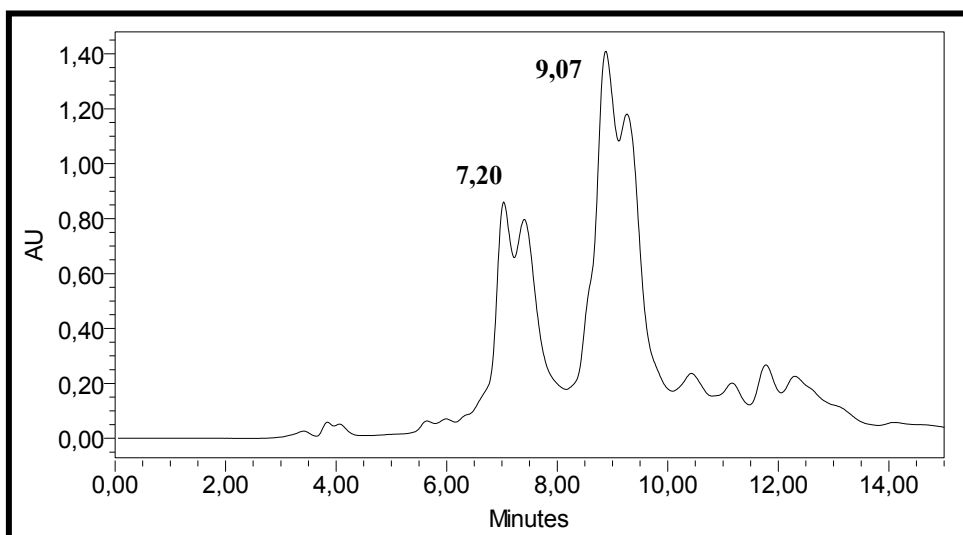
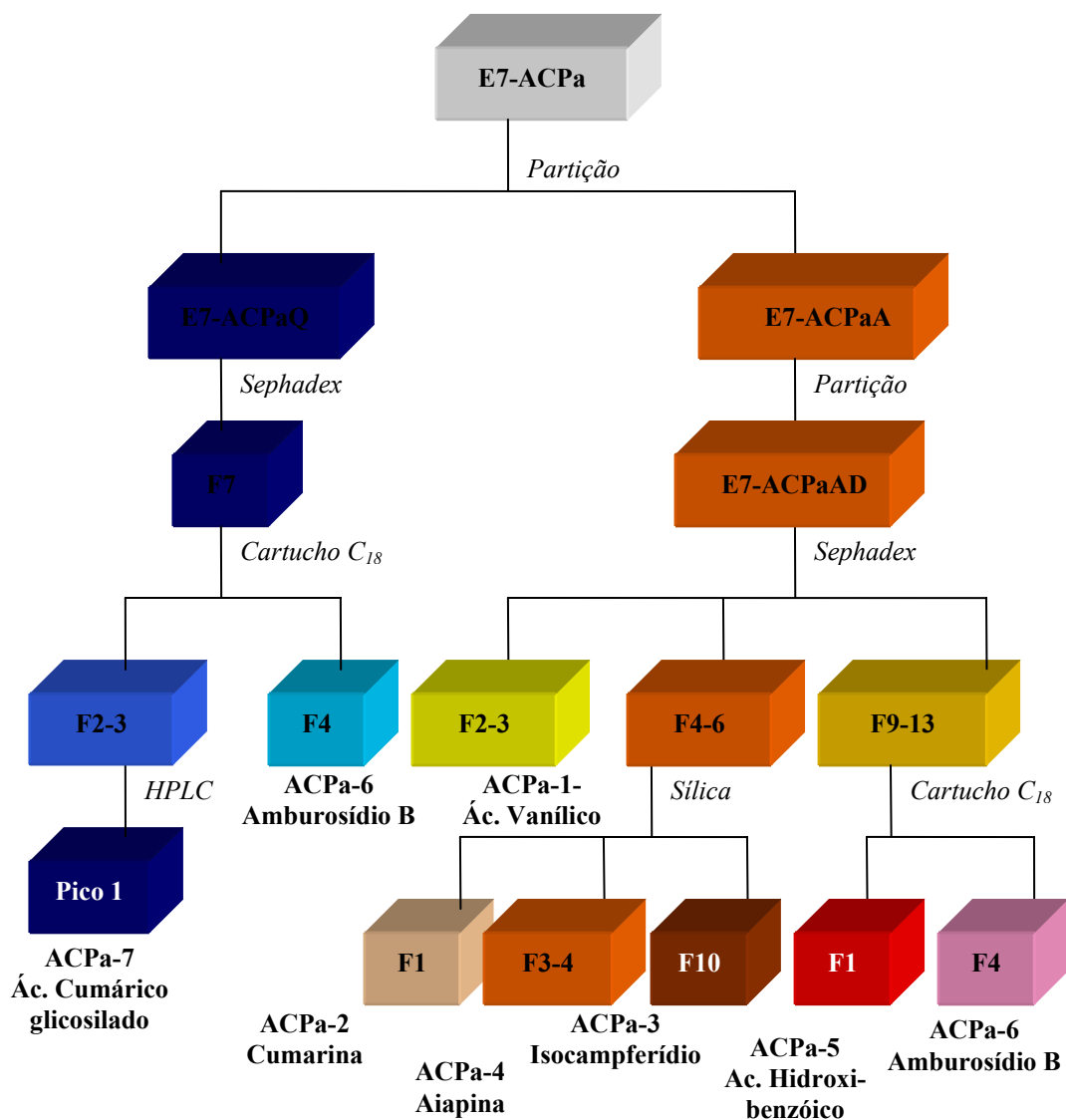


Figura 169- Cromatograma de HPLC da fração E7-ACPaQ(7)(2-3)

Fluxograma 10- Metodologia de isolamento das 7 substâncias isoladas da parte aérea das plantas jovens de *A. cearensis* (7 meses).



10.2. Validação do método de quantificação de 4 substâncias presentes nos extratos de *Amburana cearensis*

10.2.1. Preparo das Soluções

❖ Preparação da solução-estoque

A solução-estoque foi preparada, em triplicata, pela dissolução de 5,0 mg de quatro substâncias puras (ácido protocatecuico, ácido vanílico, cumarina e amburosídio), isoladas das cascas do caule de *A. cearensis*, em 10,0 mL de solução aquosa de Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH 20%, resultando numa concentração de 500 µg/mL. A solução-estoque foi filtrada através de membranas de teflon.

❖ Preparação das soluções padrões e soluções de controle de qualidade

A partir de cada solução-estoque, foram obtidas seis soluções padrões (60, 40, 20, 10, 5 e 1 µg/mL) e três soluções de controle de qualidade (50, 30 e 8 µg/mL), através de diluições com volumes apropriados, retirados apenas da primeira solução.

Alíquotas de 2,0 mL das soluções obtidas foram tratadas por cartuchos de SPE (100 mg) e eluídas com porções de 2,0 mL de solução aquosa de Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH 80%, mantendo-se as concentrações iniciais.

❖ Preparação das amostras

Foram preparadas três soluções de 500 µg/mL de cada um dos seguintes extratos etanólicos de *A. cearensis*: cascas do caule (ACCE); sementes (ACS); xilopódios de espécimens com 2 (E2-ACX), 4 (E4-ACX), 7 (E7-ACX) e 9 (E9-ACX) meses de idade, partes aéreas de espécimens com 2 (E2-ACPa), 4 (E4-ACPa), 7 (E7-ACPa) e 9 (E9-ACPa) meses de idade, e misturas artificialmente reconstituídas dos xilopódios com as partes aéreas de mesmas idades (E2-ACX+PA, E4-ACX+PA, E7-ACX+PA, E9-ACX+PA). Cada amostra foi produzida através da dissolução de 5,0 mg de extrato em 10,0 mL de solução aquosa de Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH 20%, totalizando 14 amostras, as quais foram posteriormente filtradas através de membranas de teflon.

Todas as amostras, em volumes de 2,0 mL, foram aplicadas em cartuchos de SPE e eluídas com alíquotas 2,0 mL de solução aquosa de Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH 80%. Exceto o extrato ACS, cujo volume aplicado foi de 500 µL, implicando numa concentração final correspondente a 1/4 da solução original.

Três amostras de xarope de cumaru, fitoterápico produzido com as cascas do caule de *A. cearensis*, foram preparadas pela aplicação de alíquotas de 400 µL do xarope num cartucho de SPE (100 mg). Eluições com 10 mL de H₂O, a fim de se remover a sacarose, foram sucedidas por adições de volumes de 2,0 mL de solução aquosa de Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH 80%, resultando em amostras diluídas a 1/5 da concentração inicial.

10.2.2. Condições analíticas

As soluções padrões e de controle de qualidade e as amostras (extratos e xarope) foram analisadas por HPLC (*loop*=20 µL, **Fig. 170, p. 300**), em triplicata. As separações foram realizadas através de uma coluna de fase reversa (4,6 x 250 mm, 5 µm), utilizando-se um fluxo de 1mL/min de um gradiente composto por Et₃N-H₃PO₄ (pH= 3)/MeOH, variando de 20% para 50% de MeOH em 15 min de corrida.

❖ Curva de calibração

A curva de calibração foi construída a partir das áreas dos picos obtidas pela injeção de soluções de padrões externos (ácido protocatecuico, ácido vanílico, cumarina e amburosídio), nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 40 e 60 µg/mL.

❖ Recuperação

A recuperação, na etapa de preparação das amostras, foi avaliada através da injeção das soluções de controle de qualidade, nas concentrações de 8, 30 e 50 µg/mL, em quintuplicata. Os fatores de recuperação de cada substância foram fornecidos pelas razões entre as áreas dos picos obtidas pelas soluções tratadas por cartucho de SPE e as áreas dos picos registradas pelas soluções não-tratadas.

❖ Precisão

A precisão do método foi examinada por comparação das concentrações obtidas para soluções de controle de qualidade em níveis baixos (8 µg/mL), médios (30 µg/mL) e altos (50 µg/mL), sendo a repetitividade determinada ao longo de um dia e durante três dias não-consecutivos.

❖ Exatidão

A exatidão do método foi mensurada através da comparação das concentrações fornecidas pela curva de calibração, para cada substância, em relação às concentrações, já

conhecidas, das soluções de controle de qualidade (valores de referência), em três níveis distintos (baixos- 8 µg/mL, médios- 30 µg/mL e altos- 50 µg/mL).

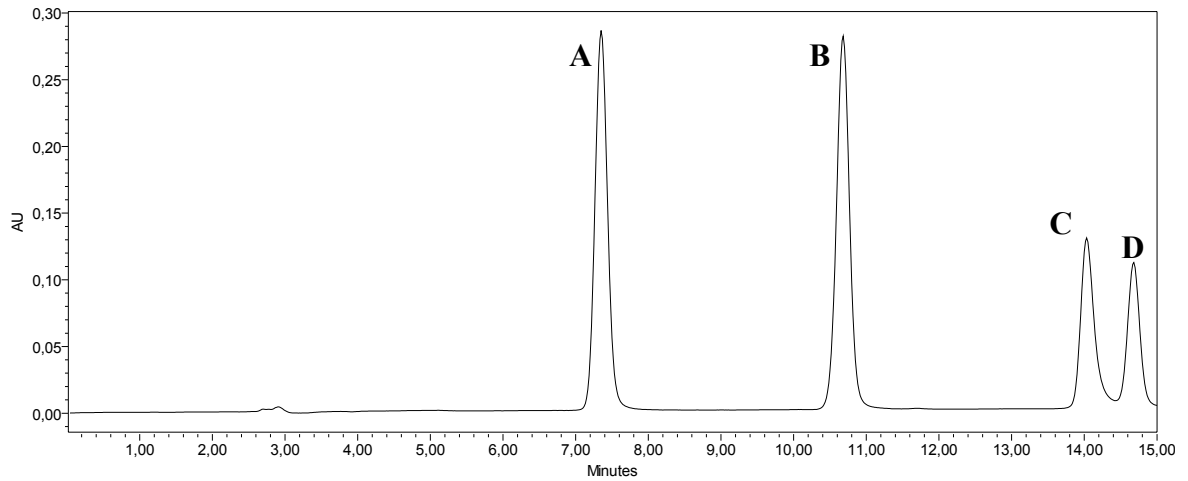


Figura 170- Cromatograma dos quatro padrões (conc.= 60 µg/mL) utilizados na validação de amostras de *A. cearensis*: **A-** ácido protocatecuico, **B-** ácido vanílico, **C-** cumarina e **D-** amburosídeo A.

11. CONCLUSÃO

❖ A pesquisa química de *A. cearensis* resultou no isolamento de:

1- Cumarina aiapina, dos ácidos fenólicos: ác. vanílico, ác. *p*-hidroxi-benzóico, ácido (*E*)-*o*-cumárico glicosilado, seu estereoisômero ácido (*Z*)-*o*-cumárico glicosilado e sua aglicona livre ácido (*E*)-*o*-cumárico.

2- Protocatecuato de 6-cumarila, substância inédita na literatura, e 6-hidroxi-cumarina representam uma relevante descoberta devido à rara ocorrência deste tipo de composto na natureza. Acredita-se que plantas, capazes de sintetizarem cumarinas oxigenadas apenas na posição 6, apresentam um intrigante caminho biogenético, alternativo à rota metabólica comumente encontrada nos organismos vivos.

3- Amburosídio A e B, já relatados anteriormente, e derivados do amburosídio A, inéditos na literatura: ferulato de 6''-amburosila, protocatecuato de 6''-amburosila, galato de 6''-amburosila, acetato de 6''-amburosila, sinapato de 6''-amburosila e vanilato de 6''-amburosila.

4- Por último, a prospecção química revelou uma abundante presença de flavonóides, substâncias que possuem comprovadas atividades farmacológicas: o flavonol quercetina, a isoflavona formononetina, e os biflavonóides amburanina A e B, registrados pela primeira vez na literatura.

❖ A metodologia desenvolvida nas análises por HPLC, devidamente validada, poderá ser adotada, no futuro, no controle de qualidade de produtos que utilizam *A. cearensis* em suas formulações, podendo ser aplicado para verificar a autenticidade da matéria-prima, estabilidade ou para quantificação dos princípios ativos. Este tipo de análise visa garantir a eficácia e segurança do produto ao usuário, além de funcionar como certificado de qualidade para a empresa fabricante.

❖ A atividade alelopática demonstrada pelo extrato aquoso das sementes de *A. cearensis* é uma prova científica do potencial bio-herbicida desta planta, a qual poderá ser utilizada como uma arma química natural, de baixo custo e ecologicamente correta no combate à ervas daninhas, possibilitando aumento na produtividade agrícola sem provocar danos à saúde humana e ao meio-ambiente.

Os notáveis avanços no conhecimento químico e farmacológico de *A. cearensis* são frutos de árduos esforços imprimidos por uma equipe multidisciplinar na pesquisa científica

desta espécie, ao longo de mais de uma década. Paulatinamente, estas descobertas estão contribuindo para agregar mais segurança e garantir eficácia ao fitoterápico de *A. cearensis*, cuja aceitação pela população se torna cada vez mais crescente.

No entanto, diante da ameaça de extinção de *A. cearensis* pelo extrativismo predatório, torna-se imprescindível a adoção de um modelo de exploração auto-sustentável para a espécie, tal como proposto em nossos estudos, no qual a planta adulta silvestre seja substituída por plantas jovens cultivadas, já que em testes farmacológicos pré-clínicos, extratos de plantas jovens com 7 e 9 meses de cultivo apresentaram tanto efeitos anti-edematosos (edema de pata induzido por carragenina) como antinociceptivos (nocicepção induzida por formalina) equivalentes aos do extrato da planta adulta. Isto significa que, a partir de 7 meses de cultivo, plantas jovens de *A. cearensis* já exibem atividades antiinflamatória e analgésica similares às da planta adulta silvestre. As evidências encontradas neste estudo garantem ser farmacologicamente viável a substituição da planta adulta por espécimens jovens.

Desta forma, a produção industrial do fitoterápico de *A. cearensis* seria economicamente viável, pois a indústria disporia de uma fonte de matéria-prima renovável e obtível a curto prazo, além de se assegurar a preservação da espécie. Os espécimens preservados poderiam fornecer sementes para o cultivo de novas mudas, as quais poderiam ser aproveitadas na Agricultura, na produção de um bio-herbicida eficiente e inofensivo à saúde humana e ao meio-ambiente.

A diversidade de aplicações de *A. cearensis* atesta a importância medicinal e econômica desta planta cujo aproveitamento racional poderá, no futuro, render vultosas divisas e empregos para o Estado do Ceará, através de investimento tecnológico.