



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

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS
DO NORDESTE DO BRASIL: *Cordia piauhiensis* Fresen e *Triphasia*
***trifolia* (Burm. f.) P. Wils**

RENATA PAIVA DOS SANTOS

FORTALEZA-CEARÁ

2007

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS
DO NORDESTE DO BRASIL: *Cordia piauhiensis* Fresen e *Triphasia
trifolia* (Burm. f.) P. Wils**

**Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Química
Orgânica, como requisito para obtenção do título de Doutor.**

RENATA PAIVA DOS SANTOS

FORTALEZA-CEARÁ

2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Azevedo U. Melo CRB-3/572

S238c Santos, Renata Paiva dos

Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil:
Cordia piauhiensis Fresen e *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wils / Renata Paiva
dos Santos.

220 f., il. color., enc.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Área de Concentração : Química de Produtos Naturais

Orientadora: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa Cavalcante

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Arnaldo Viana

1.Saponinas 2. Cumarinas 3. Acetilcolinesterase 4. RM¹H 5. RMN¹³C
I. Cavalcante, Otilia Deusdênia Loiola Pessoa (orient.) II. Viana, Francisco
Arnaldo (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em
Química Orgânica IV. Título

CDD 547

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Dra. **Otília Deusdênia
Loiola Pessoa Cavalcante** do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro
de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

O amor é paciente, é benigno, o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece;

Não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo sofre tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”

1 Coríntios, 13, 1-7.

A Deus, pela essência da vida e o
prazer de poder ser chamada sua “filha”.

Ao meu marido, Ricardo,
Meu filho, Caio Augusto;
Meus pais, Gilberto e Áurea Helena
e meus irmãos Roberta e Rodrigo

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Otília Deusdênia, pela grande dedicação, competência e amizade durante todo esse tempo, a quem considero responsável pela minha formação e crescimento, tanto profissional como pessoal.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica, que no decorrer de todo esse tempo, a quem pedi auxílio, me acolheram com muito prazer, especialmente a profa. Telma Lêda pelo carinho e amizade.

Ao Dr. Raimundo Braz Filho, meu querido conterrâneo “pacatubano”, com muito prazer, pela determinação estrutural das saponinas, além de sua amizade, serenidade e atenção para conosco, o meu muito obrigado.

Ao prof. Edilberto Rocha Silveira pela valiosa colaboração na coleta das plantas, além das fotografias cedidas.

A profa. Teresa Trevisan, pela realização do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase feito com as cumarinas.

Ao prof. Francisco Arnaldo Viana, pela grande participação no isolamento das saponinas.

A profa. Lígia e o prof. Edson de Paula Nunes do Departamento de Biologia, pelo auxílio na descrição botânica das plantas estudadas.

Aos operadores do CENAUREMN (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da RMN) pela obtenção dos espectros, em especial ao Daniel, pela sua grande “paciência” comigo.

Aos funcionários Célia, Lana, Mundinha e Seu Paulo, pela grande amizade que foi plantada e semeada durante todo esse tempo, e por serem competentes e responsáveis em seus trabalhos.

A todos os colegas de laboratório pelos momentos de descontração e solidariedade: Grazielle, Mônica, Jacqueline, Rosa, Renata Mendonça, Isabel, Rose Jane, Leopoldina, Andreza, Lobinha, Gustavo, Max, Hércio, Artur, João Henrique, Luciana, Ayla, Allana e Luiz Cláudio.

Ao CNPq pela bolsa de estudo, FUNCAP e CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FLUXOGRAMA	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS PLANTAS ESTUDADAS	3
1.1. Considerações gerais sobre a família Boraginaceae.....	4
1.2. Considerações gerais sobre o gênero <i>Cordia</i>	5
1.3. Considerações gerais sobre a espécie <i>Cordia piauhiensis</i>	6
1.4. Considerações gerais sobre a família Rutaceae.....	8
1.5. Considerações gerais sobre o gênero <i>Triphasia</i>	9
CAPÍTULO 2 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	11
2.1. Levantamento bibliográfico sobre o gênero <i>Triphasia</i>	12
2.1.1. Considerações gerais sobre o gênero <i>Triphasia</i>	12
2.2. Levantamento bibliográfico de triterpenos e saponinas da família Boraginaceae.....	16
2.2.1. Considerações gerais sobre triterpenos e saponinas.....	16
CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	30
3.1. Determinação dos constituintes fixos dos frutos e folhas de <i>Triphasia trifolia</i>	31
3.1.1. Determinação estrutural de TFR-1.....	31
3.1.2. Determinação estrutural de TFR-2.....	37
3.1.3. Determinação Estrutural de TFR-3.....	41
3.1.4. Determinação Estrutural de TFL-1.....	46
3.1.5. Determinação Estrutural de TFL-2.....	52
3.1.6. Determinação estrutural de TFL-3.....	59

3.1.7.	Determinação estrutural de TFL-4.....	66
3.1.8.	Determinação estrutural de TFL-5.....	70
3.2.	Determinação dos constituintes fixos do caule de <i>Cordia</i> <i>piauhiensis</i> Fresen.....	76
3.2.1	Determinação estrutural de CCP-1.....	76
3.2.2.	Determinação estrutural de CCP-2.....	89
3.2.3.	Determinação estrutural de CCP-3.....	104
3.2.4.	Determinação estrutural de CCP-4.....	119
3.2.5.	Determinação estrutural de CCP-5.....	133
3.3.	Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>T. trifolia</i>	147
3.4.	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>T. trifolia</i>	156
3.5.	Resultado da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para as cumarinas isoladas de <i>T. trifolia</i>	157
CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL.....		158
4.1.	Métodos de análise.....	159
4.1.1.	Métodos cromatográficos.....	159
4.2.	Métodos físicos.....	160
4.2.1.	Ponto de fusão.....	160
4.2.2.	Espectrometria de massa (EM).....	160
4.2.3.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	161
4.2.4.	Espectroscopia na região de absorção do infravermelho.....	161
4.2.5.	Rotação óptica.....	162
4.3.	Material vegetal.....	162
4.4.	Método de obtenção dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>T. trifolia</i>	162
4.5.	Isolamento dos constituintes não voláteis de <i>T. trifolia</i>	163
4.5.1.	Obtenção dos extratos.....	163
4.5.1.1.	Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila da partição	

do decocto dos frutos (FAE-DFr) de <i>T. trifolia</i> e isolamento de TFR-1, TFR-2 e TFR-3.....	164
4.5.1.2. Fracionamento cromatográfico do extrato éter de petróleo/acetato 1:1 das folhas de <i>T. trifolia</i> (EFTT).....	167
4.5.1.2.1. Fracionamento cromatográfico da fração hexano (EFTT-H) do extrato éter de petróleo/acetato 1:1 e isolamento de TFL-1 e TFL-2...	167
4.5.1.2.2. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (EFTT-H/D) da fração hexano (EFTT-H) do extrato éter de petróleo/acetato 1:1 e isolamento de TFL-3.....	168
4.5.1.3. Tratamento do extrato etanólico das folhas de <i>T. trifolia</i> (EEFT).....	169
4.5.1.3.1. Partição de EEFT/SC.....	169
4.5.1.3.2. Fracionamento cromatográfico da fração EEFT/SC-D e isolamento de TFL-4.....	170
4.5.1.3.3. Fracionamento cromatográfico da fração EEFT/SC-A e isolamento de TFL-5.....	172
4.6. Isolamento dos constituintes não voláteis de <i>C. piauhiensis</i> Fresen.....	174
4.6.1. Obtenção do extrato etanólico da madeira do caule de <i>C. piauhiensis</i> e fracionamento cromatográfico.....	174
4.6.2. Partição de EECCP-Ace e isolamento de CCP-1.....	174
4.6.3. Partição de EECCP-M e isolamento de CCP-2, CCP-3, CCP-4 e CCP-5.....	175
4.7. Ensaio antibacteriano dos óleos essenciais das folhas de <i>T. trifolia</i>	177
4.8. Ensaio da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para as cumarinas isoladas de <i>T. trifolia</i>	178
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	180
CAPÍTULO 6 – CONSTANTES FÍSICAS	182
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Fotografia ilustrando folhas, flores e frutos de <i>C. piauhiensis</i>	7
Fig. 2 - Fotografia ilustrando folhas e frutos de <i>T. trifolia</i>	10
Fig. 3 - Espectro de RMN ^1H de TFR-1.....	34
Fig. 4 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de TFR-1.....	34
Fig. 5 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de TFR-1.....	35
Fig. 6 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de TFR-1.....	35
Fig. 7 - Espectro de RMN HMQC de TFR-1.....	36
Fig. 8 - Espectro de RMN HMBC de TFR-1.....	36
Fig. 9 - Espectro de absorção na região do infravermelho de TFR-2.....	39
Fig. 10 - Espectro de RMN ^1H de TFR-2.....	39
Fig. 11 - Espectro de RMN ^{13}C - BB de TFR-2.....	40
Fig. 12 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de TFR-2.....	40
Fig. 13 - Espectro de absorção na região do infravermelho de TFR-3.....	43
Fig. 14 - Espectro de RMN ^1H de TFR-3.....	43
Fig. 15 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de TFR-3.....	44
Fig. 16 - Espectro de RMN - HSQC de TFR-3.....	44
Fig. 17 - Espectro de RMN - HMBC de TFR-3.....	45
Fig. 18 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - NOESY de TFR-3.....	45
Fig. 19 - Espectro de absorção na região do infravermelho de TFL-1.....	48
Fig. 20 - Espectro de RMN ^1H de TFL-1.....	48
Fig. 21 - Espectro de RMN ^{13}C - BB de TFL-1.....	49
Fig. 22 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de TFL-1.....	49
Fig. 23 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de TFL-1.....	50
Fig. 24 - Espectro de RMN - HMQC de TFL-1.....	50
Fig. 25 - Espectro de RMN - HMBC de TFL-1.....	51
Fig. 26 - Espectro de absorção na região do infravermelho de TFL - 2.....	55
Fig. 27 - Espectro de RMN ^1H de TFL-2.....	55
Fig. 28 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de TFL-2.....	56
Fig. 29 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de TFL-2.....	56
Fig. 30 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de TFL-2.....	57

Fig. 31 - Espectro de RMN - HSQC de TFL-2.....	57
Fig. 32 - Espectro de RMN - HMBC de TFL-2.....	58
Fig. 33 - Espectro de absorção na região do infravermelho de TFL – 3.....	62
Fig. 34 - Espectro de RMN ^1H de TFL-3.....	62
Fig. 35 - Espectro de RMN ^{13}C - BB de TFL-3.....	63
Fig. 36 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de TFL-3.....	63
Fig. 37 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de TFL-3.....	64
Fig. 38 - Espectro de RMN-HMQC de TFL-3.....	64
Fig. 39 - Espectro de RMN-HMBC de TFL-3.....	65
Fig. 40 - Espectro de RMN ^1H de TFL-4.....	68
Fig. 41 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de TFL-4.....	68
Fig. 42 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de TFL-4.....	69
Fig. 43 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de TFL-4.....	69
Fig. 44 - Espectro de RMN ^1H de TFL-5.....	73
Fig. 45 - Espectro de RMN ^1H de TFL-5.....	73
Fig. 46 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de TFL-5.....	74
Fig. 47 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de TFL-5.....	74
Fig. 48 - Espectro de RMN-HMQC de TFL-5.....	75
Fig. 49 - Espectro de RMN-HMBC TFL-5.....	75
Fig. 50 - Espectro de absorção na região do infravermelho de CCP-1.....	81
Fig. 51 - Espectro de RMN ^1H de CCP-1.....	82
Fig. 52 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de CCP-1.....	83
Fig. 53 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CCP-1.....	84
Fig. 54 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de CCP-1.....	85
Fig. 55 - Espectro de RMN-HMQC de CCP-1.....	86
Fig. 56 - Espectro de RMN-HMBC de CCP-1.....	87
Fig. 57 - Espectro de RMN-NOESY de CCP-1.....	88
Fig. 58 - Espectro de absorção na região do infravermelho de CCP-2.....	95
Fig. 69 - Espectro de massa de CCP-2.....	95
Fig. 60 - Espectro de RMN ^1H de CCP-2.....	96
Fig. 61 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de CCP-2.....	97

Fig. 62 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CCP-2.....	98
Fig. 63 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de CCP-2.....	99
Fig. 64 - Espectro de RMN-HMQC de CCP-2.....	100
Fig. 65 - Espectro de RMN-HMBC de CCP-2.....	101
Fig. 66 - Espectro de RMN-NOESY de CCP-2.....	102
Fig. 67 - Espectro de RMN-TOCSY de CCP-2.....	103
Fig. 68 - Espectro de absorção na região do infravermelho de CCP-3.....	110
Fig. 69 - Espectro de massa de CCP-3.....	110
Fig. 70 - Espectro de RMN ^1H de CCP-3.....	111
Fig. 71 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de CCP-3.....	112
Fig. 72 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CCP-3.....	113
Fig. 73 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de CCP-3.....	114
Fig. 74 - Espectro de RMN-HMQC de CCP-3.....	115
Fig. 75 - Espectro de RMN-HMBC de CCP-3.....	116
Fig. 76 - Espectro de RMN-NOESY de CCP-3.....	117
Fig. 77 - Espectro de RMN-TOCSY de CCP-3.....	118
Fig. 78 - Espectro de absorção na região do infravermelho de CCP-4.....	124
Fig. 79 - Espectro de massa de CCP-4.....	124
Fig. 80 - Espectro de RMN ^1H de CCP-4.....	125
Fig. 81 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de CCP-4.....	126
Fig. 82 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CCP-4.....	127
Fig. 83 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de CCP-4.....	128
Fig. 84 - Espectro de RMN-HMQC de CCP-4.....	129
Fig. 85 - Espectro de RMN-HMBC de CCP-4.....	130
Fig. 86 - Espectro de RMN-NOESY de CCP-4.....	131
Fig. 87 - Espectro de RMN-TOCSY de CCP-4.....	132
Fig. 88 - Espectro de absorção na região do infravermelho de CCP-5.....	139
Fig. 89 - Espectro de massa de CCP-5.....	139
Fig. 90 - Espectro de RMN ^1H de CCP-5.....	140
Fig. 91 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de CCP-5.....	141
Fig. 92 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de CCP-5.....	142

Fig. 93 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY de CCP-5.....	143
Fig. 94 - Espectro de RMN-HSQC de CCP-5.....	144
Fig. 95 - Espectro de RMN-HMBC de CCP-5.....	145
Fig. 96 - Espectro de RMN-NOESY de CCP-5.....	146
Fig. 97 - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de <i>T. trifolia</i> coletada em janeiro de 2005.....	149
Fig. 98 - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de <i>T. trifolia</i> coletada em janeiro de 2006.....	149
Fig. 99 - Cromatograma do óleo essencial obtido dos frutos de <i>T. trifolia</i> coletada em janeiro de 2005.....	150
Fig. 100 - Cromatograma do óleo essencial obtido dos frutos de <i>T. trifolia</i> coletada em janeiro de 2006.....	150
Fig. 101 - Espectro de massa do α -tujeno.....	151
Fig. 102 - Espectro de massa do α -pineno.....	151
Fig. 103 - Espectro de massa do sabineno.....	151
Fig. 104 - Espectro de massa do β -pineno.....	151
Fig. 105 - Espectro de massa do mirceno.....	152
Fig. 106 - Espectro de massa do δ -careno.....	152
Fig. 107 - Espectro de massa do <i>p</i> -cimeno.....	152
Fig. 108 - Espectro de massa do limoneno.....	152
Fig. 109 - Espectro de massa do γ -terpineno.....	153
Fig. 110 - Espectro de massa do terpinoleno.....	153
Fig. 111 - Espectro de massa do 4-terpineol.....	153
Fig. 112 - Espectro de massa do <i>n</i> -decanal.....	154
Fig. 113 - Espectro de massa do <i>n</i> -dodecanal.....	154
Fig. 114 - Espectro de massa do <i>trans</i> -cariofileno.....	154
Fig. 115 - Espectro de massa do α -bergamoteno.....	155
Fig. 116 - Espectro de massa do β -curcumeno.....	155
Fig. 117 - Espectro de massa do hidrato de sesquisabineno.....	155

LISTA DE TABELAS

Tab. 1 - Constituintes químicos isolados de plantas do gênero <i>Triphasia</i>	13
Tab. 2 - Saponinas e triterpenos isolados de plantas da família Boraginaceae...	17
Tab. 3 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H de TFR-1 e comparação com dados registrados na literatura para a biakangelicina.....	33
Tab. 4 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de TFR-2 e comparação com dados registrados na literatura para a isopimpinelina.....	38
Tab. 5 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de TFR-3 e comparação com dados registrados na literatura para a (-)mexoticina.....	42
Tab. 6 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de TFL-1 e comparação com dados registrados na literatura para o aurapteno.....	47
Tab. 7 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de TFL-2.....	54
Tab. 8 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de TFL-3.....	61
Tab. 9 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de TFL-4 e comparação com dados da literatura para a isomerazina.....	67
Tab. 10 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H de TFL-5 e comparação com dados registrados na literatura para a vitexina.....	72
Tab. 11 - Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-1.....	77
Tab. 12 - Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da aglicona de CCP-1.....	79
Tab. 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da unidade osídica de CCP-1.....	80
Tab. 14 - Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-2.....	90
Tab. 15 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da aglicona de CCP-2.....	93
Tab. 16 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da unidade osídica de CCP-2.....	94
Tab. 17 - Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados,	

metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-3.....	105
Tab. 18 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da aglicona de CCP-3.....	108
Tab. 19 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da unidade osídica de CCP-3.....	109
Tab. 20 - Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-4.....	120
Tab. 21 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da aglicona de CCP-4.....	122
Tab. 22 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da unidade osídica de CCP-4.....	123
Tab. 23 - Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-5.....	134
Tab. 24 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da aglicona de CCP-5.....	137
Tab. 25 - Dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H da unidade osídica de CCP-5.....	138
Tab. 26 - Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>T. trifolia</i>	148
Tab. 27 - Atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>T. trifolia</i>	156
Tab. 28 - Inibição da enzima acetilcolinesterase apresentada pelas cumarinas isoladas de <i>T. trifolia</i>	157
Tab. 29 - Dados referentes à obtenção dos extratos dos frutos e folhas de <i>T. trifolia</i>	163
Tab. 30 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FAE-DFr.....	164
Tab. 31 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 79-100..	165
Tab. 32 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de EFTT.....	167
Tab. 33 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de EFTT-H.....	167
Tab. 34 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EFTT-H/D.....	169
Tab. 35 - Dados resultantes da partição de EEFT/SC.....	170

Tab. 36 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEFT/SC-D.....	171
Tab. 37 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 5-7 de EEFT/SC-D.....	171
Tab. 38 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEFT/SC-Ap...	172
Tab. 39 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de EECCP.....	174
Tab. 40 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AcOEt...	175

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Método de extração dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>Triphasia trifolia</i>	163
Fluxograma 2 - Isolamento de TFR-1, TFR-2 e TFR-3 a partir do decocto dos frutos de <i>T. trifolia</i> , oriundo do processo de extração do seu óleo essencial.....	166
Fluxograma 3 - Isolamento de TFL-1, TFL-2, TFL-3, TFL-4 e TFL-5 a partir dos extratos éter de petróleo/acetato de etila 1:1 e etanólico das folhas de <i>T. trifolia</i>	173
Fluxograma 4 - Isolamento dos compostos CCP-1, CCP-2, CCP-3, CCP-4 e CCP-5 a partir do extrato etanólico do caule de <i>C. piauhiensis</i> (EECCP).....	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ - Deslocamento químico

AchE - Enzima acetilcolinesterase

BB – Broad Band Decoupling

CC – Coluna cromatográfica

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCP-1 – Composto 1 isolado do caule de *C. piauhiensis*

CCP-2 - Composto 2 isolado do caule de *C. piauhiensis*

CCP-3 - Composto 3 isolado do caule de *C. piauhiensis*

CCP-4 - Composto 4 isolado do caule de *C. piauhiensis*

CCP-5 - Composto 5 isolado do caule de *C. piauhiensis*

CG – Cromatografia gasosa

CGL – Cromatografia Gás-Líquido

CGL/EM – Cromatografia Gás-Líquido acoplado à Espectrometria de Massas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY – COrrelation SpectroscopY

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

EECCP-Ace – Fração acetona do extrato etanólico do caule de *C. piauhiensis*

EECCP - Extrato etanólico do caule de *C. piauhiensis*

EECCP-M - Fração metanol do extrato etanólico do caule de *C. piauhiensis*

EEFT - Extrato etanólico das folhas de *T. trifolia*

EEFT/SC - Extrato etanólico das folhas de *T. trifolia* sem clorofila

EFTT - Extrato éter de petróleo/acetato das folhas de *T. trifolia*

EFTT-A – Fração acetato de etila do extrato éter de petróleo/acetato das folhas de *T. trifolia*

EFTT-D – Fração diclorometano do extrato éter de petróleo/acetato das folhas de *T. trifolia*

EFTT-H – Fração hexânica do extrato éter de petróleo/acetato das folhas de *T. trifolia*

EFTT-M – Fração metanol do extrato éter de petróleo/acetato das folhas de *T. trifolia*

ESIMS – Electron Spray Ionization Mass Spectroscopy

FAE-DFr - Fração acetato de etila do decocto frutos de *T. trifolia*

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IK – Índice de Kovats

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

p-PCCP-nb – Precipitado da partição com n-butanol da fração metanol do extrato etanólico do caule de *C. piauhiensis*

p.f. – Ponto de fusão

RMN ¹³C- – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TFL-1 - Composto 1 isolado das folhas de *T. trifolia*

TFL-2 - Composto 2 isolado das folhas de *T. trifolia*

TFL-3 - Composto 3 isolado das folhas de *T. trifolia*

TFL-4 - Composto 4 isolado das folhas de *T. trifolia*

TFL-5 - Composto 5 isolado das folhas de *T. trifolia*

TFR-1 – Composto 1 isolado do decoto oriundo do processo de hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia*

TFR-2 - Composto 2 isolado do decoto oriundo do processo de hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia*

TFR-3 - Composto 3 isolado do decoto oriundo do processo de hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia*

TOCSY – TOfally Correlated Spectroscopy

RESUMO

A composição química do óleo essencial das folhas e frutos de *Triphasia trifolia* (Rutaceae) foi analisada por CG- DIC e CG-MS. Os constituintes majoritários identificados para os óleos obtidos das folhas foram sabineno (39,2 e 33,8%) e mirceno (21,9 e 33,6%), enquanto os compostos majoritários para o óleo dos frutos foram sabineno (35,5 e 22,8%), β -pineno (21,2 e 29,9%) e γ -terpineno (18,4 e 12,9%). Os óleos das folhas apresentaram moderada atividade antimicrobiana. O decocto dos frutos também foi investigado levando ao isolamento das cumarinas isopimpinelina, (*R*)-biakangelicina e (*S*)-mexoticina. Das folhas foram isoladas as cumarinas (*R*)-biakangelicina, aurapteno, (*S*)-mexoticina, isosibiricina, isomerazina e coumurraina e, o flavonóide vitexina. Todas cumarinas em CCD, mostraram atividade frente à enzima acetilcolinesterase.

De *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae), cinco saponinas triterpênicas foram isoladas. Suas estruturas foram caracterizadas como ácido 3β -O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] pomólico, pomolato de 3β -O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila, ursolato de 3β -O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila, pomolato de 3β -O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-glicopiranosila e oleanolato de 3β -O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila. As estruturas foram estabelecidas usando uma combinação das técnicas de RMN 1D e 2D (1 H-COSY, HMQC, HMBC, TOCSY e NOESY), ESIMS, além de evidências químicas.

ABSTRACT

The chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Triphasia trifolia* were analyzed by GC-FID and GC-MS. The major constituents identified for oils obtained from leaves were sabinene (39.2 and 33.8%) and myrcene (21.9 and 33.6%), while the prevalent compounds detected in fruit oils were sabinene (35.5 and 22.8%), β -pinene (21.2 and 29.9) and γ -terpinene (18.4 and 12.9%). The leaf oils showed moderate antimicrobial activity. The fruit decoction was also investigated leading to the isolation of the coumarins isopimpinelin, (*R*)-byakangelicin and (*S*)-mexoticin. From the leaves the coumarins (*R*)-byakangelicin, aurapten, (*S*)-mexoticin, isosibiricin, isomerazin and coumurrayin and, the flavonoid vitexina were isolated. All coumarins showed cholinesterase inhibition on TLC test.

From *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae), five triterpenoid saponins were isolated. Their structures were characterized as 3β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl pomolic acid, 3β -O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] pomolic acid 28-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester, 3β -O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] ursolic acid 28-O-[β -D-xilopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] ester, 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl pomolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester and 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester. The structures were established using a combination of 1D and 2D (^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC, TOCSY and NOESY) NMR techniques, ESIMS and chemical evidences.

INTRODUÇÃO

Este trabalho descreve o estudo químico de *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wils pertencente a família Rutaceae e *Cordia piauhiensis* Fresen pertencente a família Boraginaceae. Para a primeira espécie consta a identificação dos constituintes químicos do óleo essencial oriundo dos seus frutos e folhas e ainda o isolamento e caracterização de outros metabólitos secundários das duas partes. De *Cordia piauhiensis* foi dado continuidade ao estudo químico do extrato etanólico das folhas.

T. trifolia (Burm. f.) P. Wils., também conhecida pelas sinonímias *T. trifoliata*, *T. aurantiola* e *Limonia trifolia* é uma planta de origem asiática, que devido suas características ornamentais foi introduzida em vários países, especialmente naqueles de clima tropical, onde melhor se adapta.

Como conseqüência da ampla ramificação e dos muitos espinhos, pontiagudos e resistentes, a planta é largamente cultivada em jardins, especialmente aos pés de muros, constituindo cercas vivas intransponíveis. Todas as suas partes são aromáticas e a fragrância exalada, é agradável e típica dos citros. Os frutos, por exemplo, quando macerados exalam o aroma do limão, enquanto as folhas liberam o aroma da laranja. Em medicina popular, a infusão das folhas é empregada como vermífida (Abaul, 1994). *T. trifolia* tem sido objeto de várias investigações fitoquímicas, revelando ser uma rica fonte de cumarinas, particularmente de cumarinas preniladas (Abaul, 1994; De Silva, 1981). Alcalóides (Abaul, 1994) e carotenóides (Yokoyama, 1970; Yokoyama, 1970; Yokoyama, 1968) também têm sido isolados a partir da espécie.

Cordia piauhiensis, popularmente conhecida como genipapinho, é uma planta bastante difundida nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, encontrada principalmente nos estados do Ceará, Bahia, Paraná e São Paulo. A referida espécie já havia sido objeto de estudo e mostrou ser uma rica fonte de saponinas triterpênicas.

Este trabalho tem como objetivo dar continuidade ao estudo fitoquímico de *C. piauhiensis* e investigar a composição química volátil e não-volátil de *T. trifolia*, visando conhecer o perfil químico da espécie cultivada no estado do Ceará.

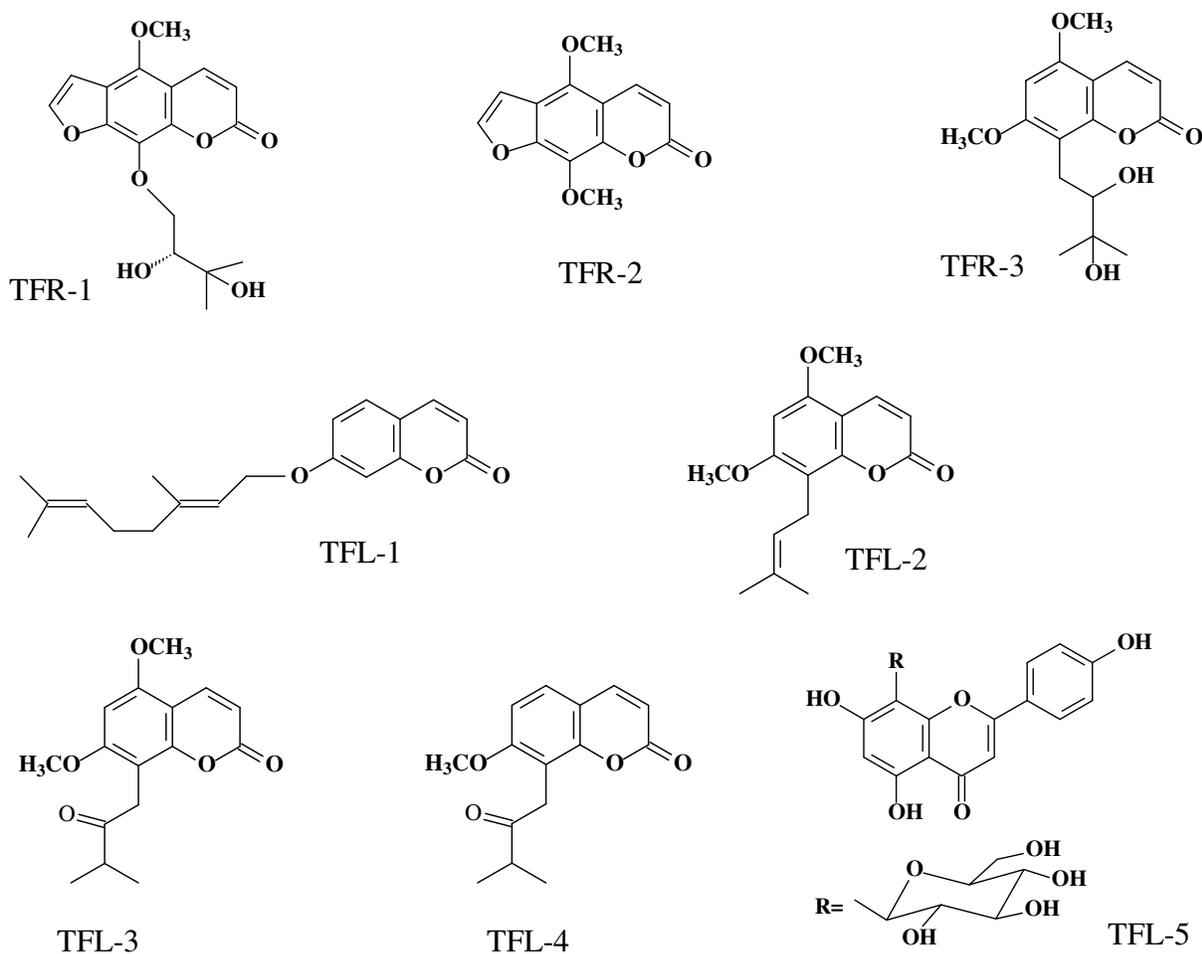
Durante o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas técnicas cromatográficas como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada, utilizando sílica gel, e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Técnicas espectrométricas como

Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo técnicas bidimensionais como ^1H , ^1H -COSY, HMQC, HMBC, NOESY e TOCSY foram utilizadas na elucidação estrutural dos metabólitos secundários isolados.

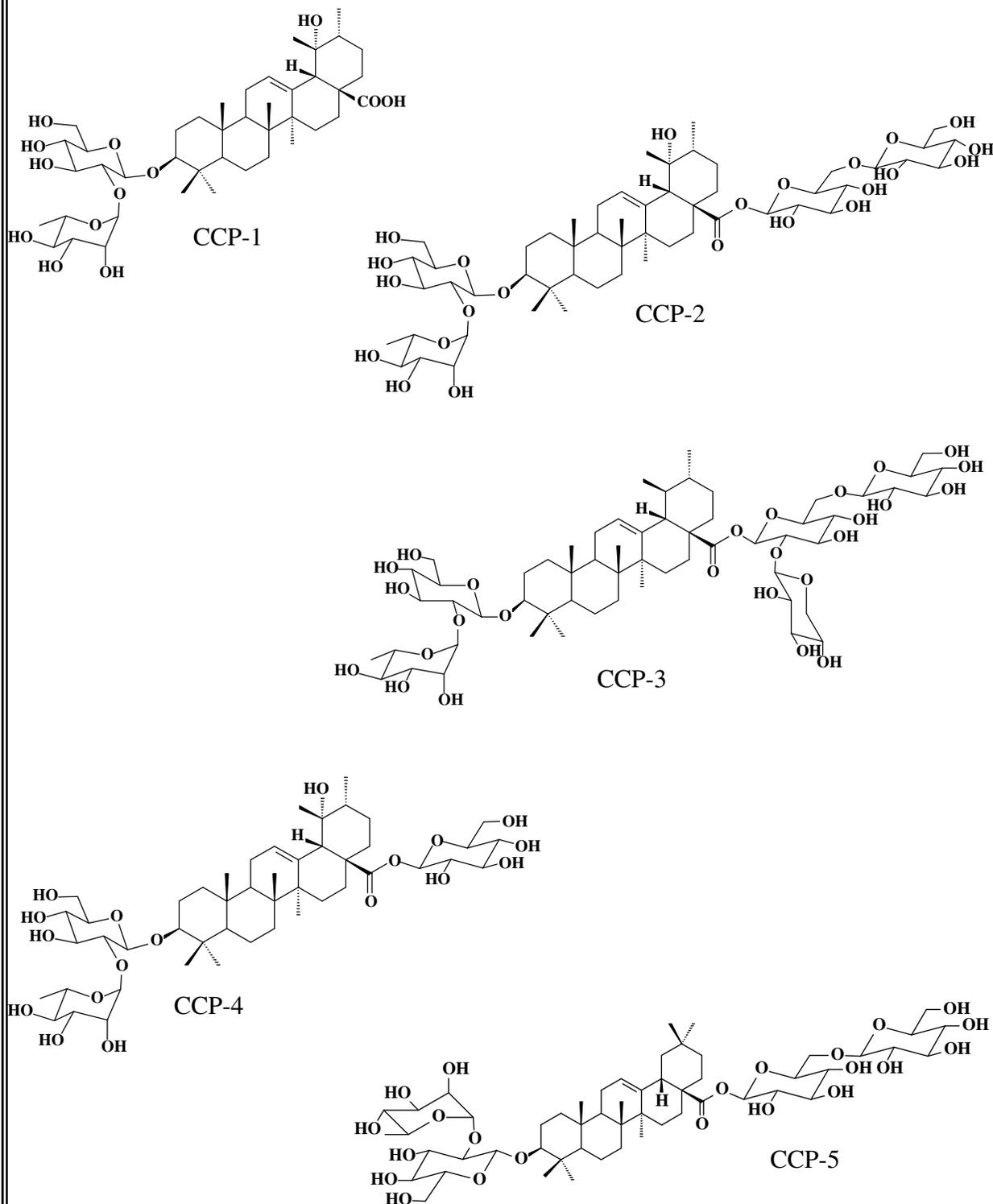
O presente trabalho encontra-se dividido em: Introdução; Considerações gerais sobre as espécies estudadas – Capítulo 1; Levantamento Bibliográfico – Capítulo 2; Determinação Estrutural – Capítulo 3; Parte Experimental – Capítulo 4; Conclusões – Capítulo 6; Constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas – Capítulo 7 e finalmente, as referências bibliográficas utilizadas na elaboração deste trabalho, as quais foram descritas segundo as normas da ABNT.

Os quadros 1 e 2 ilustram os constituintes químicos isolados neste trabalho.

QUADRO 1 - Constituintes químicos isolados de *T. tifolia*



QUADRO 2 - Constituintes químicos isolados de *C. piauhiensis*





*CONSIDERAÇÕES GERAIS
SOBRE AS PLANTAS
ESTUDADAS*

*C
A
P
Í
T
U
L
O
1*

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Considerações gerais sobre a família Boraginaceae

A família Boraginaceae constitui uma grande família de plantas predominantemente arbóreas ou arbustivas (Cronquist, 1970) e possui cerca de 130 gêneros distribuídos em 2600 espécies difundidas nos trópicos, subtropicais, regiões temperadas e árticas, com centros de dispersão maiores localizados nas regiões mediterrâneas e nos Estados Unidos da América (Brummitt, 1992).

No Brasil a Família Boraginaceae é representada pelos gêneros *Cordia* L., *Auxemma*, *Patagonula*, *Lepidocordia*, *Rotula*, *Tournerfortia*, *Borago*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Symphytum* L., *Thaumatocaryum* e *Moritzia* (Barroso, 1986).

Vários gêneros são reconhecidos mundialmente por sua importância econômica, alguns por apresentarem frutos comestíveis, outros por apresentarem folhas, raízes ou flores com propriedades medicinais, e ainda aquelas que se destacam por serem produtoras de madeira de boa qualidade. Os povos egípcios, por exemplo, há muito tempo faziam uso extensivo de madeiras de espécies de *Cordia*, para construção civil (Joly, 1977).

Segundo Barroso (1986), as plantas que compõem esta família possuem as seguintes características botânicas:

São ervas, subarbustos, arbustos rasteiros ou árvores, com folhas simples, alternas, opostas ou verticiladas, sem estípulas, inflorescências, predominantemente de tipos cimosos. As flores são andrógenas ou unissexuadas, por aborto, diclamídeas, actinomorfas ou zigomorfas. Cálice gamossépalo, tubuloso, com lobos curtos mais ou menos profundos, ou, em determinados gêneros, o cálice, com sépalas só unidas na base, tem forma radial. Corola tubulosa, infundibuliforme, campanulada, hipocrateriforme ou rotácea, com ou sem apêndices fauciais, com bordos regular ou irregularmente lobados. Os apêndices da corola podem apresentar-se como saliências carnosas, de vários tipos, originados de dobras ou invaginações do tecido das pétalas, e localizar-se na face, ou constituir campos pilosos formados de cerdas uncinadas ou retas. Androceu geralmente formado de cinco estames livres, exsertos ou não, com filetes curtos ou longos, filiformes mais ou menos robustos, com ou sem

apêndices, anteras biloculares, rimosas, com lóculos globosos, ovóides e oblongos. Gineceu composto de dois a quatro carpelos, constituindo ovário súpero, com dois a quatro lóculos, uniovulados, ou, raramente, uniloculares, com quatro óvulos. O óvulo anátropo, pêndulo do ápice do lóculo; estilete terminal ou ginobásico dividido em dois a quatro ramos ou lobos ou dois estiletos. Fruto indeiscente, carnosos, constituindo uma drupa com dois a quatro lóculos ou unilocular por aborto ou um esquizocarpo dissolvido em quatro núculas livres ou concrecidas duas a duas, com estrutura drupácea; raramente o fruto é seco, unilocular, com pericarpo tênue. Semente com ou sem endosperma. Embrião reto ou curvo, com cotilédones planos ou dobrados.

1.2. Considerações gerais sobre o gênero *Cordia*

O gênero *Cordia*, representado por árvores, arbustos e sub-arbustos, é constituído por aproximadamente 250 espécies. De distribuição pantropical, possui o maior centro de diversidade taxonômica no novo mundo, sendo particularmente bem representado no Brasil, onde são encontradas aproximadamente um quarto do total (Taroda, 1986).

Este gênero é composto por três subgêneros: *Varronia* (L), *Cordia* e *Mixa* Taroda, sendo este último, subdividido em três seções: seção *Mixa* (Endl.) D.C., seção *Gerascanthus* (Brousne) Don. e seção *Superbiflorae* Taroda (Taroda, 1987). No Brasil, o subgênero *Varronia* é representado por trinta espécies, o subgênero *Mixa* é representado por trinta e cinco espécies, enquanto *Cordia* não possui nenhuma espécie nativa (Taroda, 1986).

Apesar da importância econômica e etnofarmacológica apresentada por algumas espécies do gênero *Cordia* e do crescente número de trabalhos em fitoquímica, pouco se conhece sobre as ações farmacológicas, embora várias espécies sejam bastante utilizadas na medicina popular de várias partes do mundo.

O gênero *Cordia* tem demonstrado ser uma rica fonte de metabólitos secundários estruturalmente diversos, tendo sido isolados esteróides, flavonóides, sesquiterpenos, triterpenos, cromenos, carboidratos, alcalóides, arilpropanóides, quinonas e hidroquinonas. Pela frequência com que foram isolados, as duas últimas classes de compostos, seguidos

pelos triterpenos são as substâncias que caracterizam o gênero, particularmente as quinonas.

Segundo Reitz (Reitz, 1970), o gênero *Cordia* apresenta as seguintes características:

Inflorescência de cimas e bractesdas, geralmente carimbosas, mas às vezes espigardas ou capitadas, mas nunca escorpióides. Flores em regra pentâmeras; sépalas alto-conatos; branca, amarela, cor de laranja ou vermelha; estilete delgado, aforquilhado duas vezes com quatro estigmas. Fruto como drupa, em regra arredondado pelo ápice. Arbustos na maior parte das espécies, mas às vezes árvores, lianas ou ervas subfrutescentes. Apresenta como área de dispersão as regiões tropicais do mundo.

1.3. Considerações gerais sobre a espécie *Cordia piauhiensis*

A espécie *C. piauhiensis* (Syn. *Cordia rufescens* A. DC.) é uma planta bastante difundida nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, de porte arbustivo, é encontrada principalmente nos estados do Ceará, Bahia, Paraná e São Paulo.

De acordo com a flora de Martius (1857), *Cordia piauhiensis* é descrita como:

Ramos sulcados com ramificações da inflorescência vilosa; folhas com 7,5-10 cm de comprimento, 2,5 cm até mais de largura, elíptica e algumas vezes oblongo- cuneadas, brevemente acuminadas, terminando com ápice mais ou menos mucronado-dentado, página superior escabra e inferiormente tomentoso-pubescente; pecíolo 6-10 mm de comprimento; cálice tubuloso cilíndrico 10-12 mm de comprimento, lanuginoso-pubescente interiormente glabro sutilmente extriado, tridentado com dentes ovais mais curtos que o ovário; corola branca 2,5-3,0 cm de comprimento e infundibuliforme; estames inseridos na parte média do tubo da corola dirigido para cima, filamentos vilosos na base.



Figura 1. Fotografia ilustrando folhas, flores e frutos de *C. piauhiensis**.

*Fotos cedidas pelo prof. Edilberto Rocha Silveira

1.4. Considerações gerais sobre a família Rutaceae

A família Rutaceae constitui cerca de 150 gêneros e 2000 espécies largamente distribuída nas regiões tropicais e temperadas do mundo, mas é bastante abundante na América tropical, sul da África e Austrália. No Brasil está representada por aproximadamente 32 gêneros e 150 espécies.

Do ponto de vista econômico, destaca-se o gênero *Citrus*, um complexo gênero, com inúmeros híbridos, que inclui as laranjas, limões, limas, tangerinas e as cidras. Diversas espécies produtoras de madeira de boa qualidade também estão incluídas nesta família, como pau-marfim (*Balfourodendron riedelianum*) e o guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*). Também pertencem a esta família a arruda (*Ruta graveolens*), uma planta fortemente aromática, à qual se atribuem poderes mágicos contra “mau-olhado” (Souza; 2005).

Segundo Souza (Souza; 2005), a família Rutaceae apresenta as seguintes características:

Arbustos ou árvores, raramente ervas ou lianas, freqüentemente com espinhos; folhas alternas ou menos freqüentemente opostas, compostas ou raramente simples, sem estípulas, margem inteira ou serrada, com pontuações translúcidas. Inflorescência cimosa, raramente racemosa, às vezes reduzida a uma única flor; flores geralmente pouco vistosas, bisexuadas ou unisexuadas, geralmente actinomorfas, diclamídeas; cálice (3-)4-5(-8)- mero, gamossépalo ou dialissépalo, prefloração geralmente imbricada; corola (3-)4-5(-8)- mera, gamopétala ou dialipétala, prefloração valvar ou imbricada; estames em número igual ou duplo ao das pétalas ou menos freqüente em número inferior, geralmente livres entre si, anteras rimosas, estaminódios às vezes presentes; disco nectarífero presente; gineceu gamocarpelar ou dialicarpelar, ovário súpero. Fruto drupa, baga, folículo ou cápsula.

1.5. Considerações gerais sobre o gênero *Triphasia* e a espécie *T. trifolia*

O gênero *Triphasia* (família: Rutaceae, tribo: Citreae, subtribo: Triphasiinae), restringe-se a apenas sete espécies (www.inpi.org). O termo *Triphasia* origina-se do grego, onde “tripha” significa triplo, referindo-se a disposição das folhas. *T. trifolia* (Burm. f.) P. Wils., também conhecida pelas sinonímias *T. trifoliata*, *T. aurantiola* e *Limonia trifolia* é uma planta de origem asiática, que devido suas características ornamentais foi introduzida em vários países, especialmente naqueles de clima tropical, onde melhor se adapta. Todas as suas partes são aromáticas e a fragrância exalada, é agradável e típica dos citros. Os frutos, por exemplo, quando macerados exalam o aroma do limão, enquanto as folhas liberam o aroma da laranja. Em medicina popular, a infusão das folhas é empregada como vermífida (Abaul, 1994).

Segundo Bailey, (Bailey, 1954), *T. trifolia* possui as seguintes características:

Ocorre como arbusto perene extremamente ramificado, algumas vezes pequenas árvores, e com muitos espinhos aos pares na axila da folha. Apresenta folhas de coloração verde-escura com pecíolo curto e pubescentes, ovada e retusa, crenada, aromáticas; flores brancas e frutos vermelhos brilhantes, quando completamente maduros.

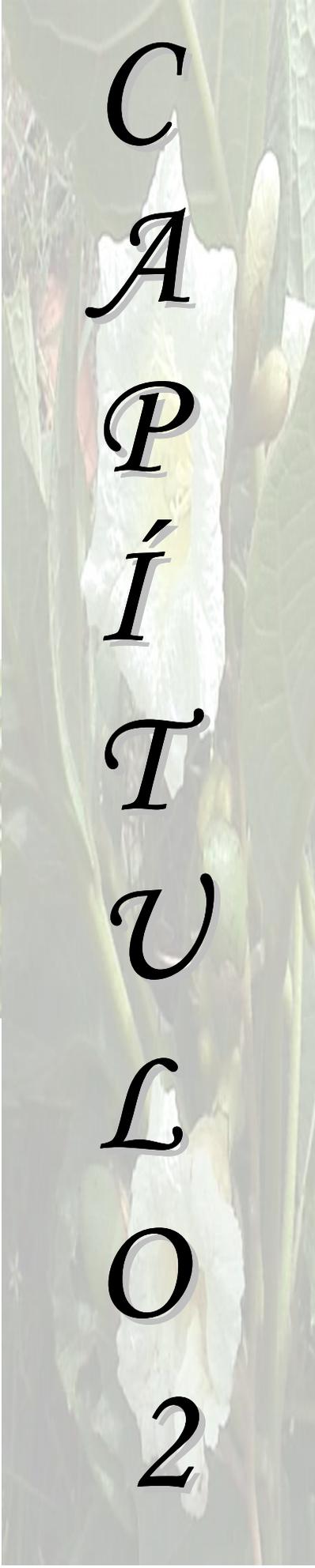


Figura 2. Fotografia ilustrando folhas e frutos de *Triphasia trifolia**.

*Fotos cedidas pelo prof. Edilberto Rocha Silveira



*LEVANTAMIENTO
BIBLIOGRÁFICO*



*C
A
P
Í
T
U
L
O
2*

2.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O GÊNERO *TRIPHASIA*

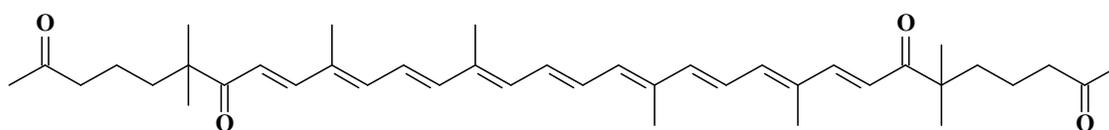
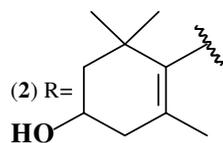
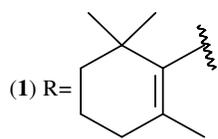
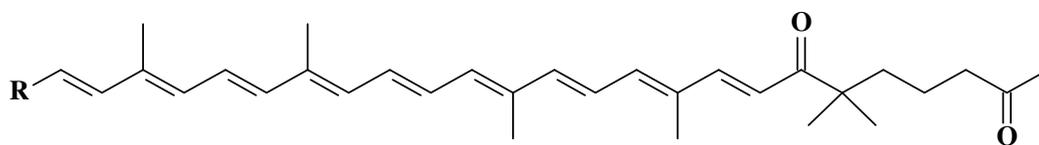
2.1.1. Considerações gerais sobre o gênero *Triphasia*

O termo *Triphasia* origina-se do grego, onde “tripha” significa triplo, referindo-se a disposição das folhas. *T. trifolia* (Burm. f.) P. Wils., também conhecida pelas sinonímias *T. trifoliata*, *T. aurantiola* e *Limonia trifolia* é uma planta de origem asiática, que devido suas características ornamentais foi introduzida em vários países, especialmente naqueles de clima tropical, onde melhor se adapta. Todas as suas partes são aromáticas e a fragrância exalada, é agradável e típica dos citros. Os frutos, por exemplo, quando macerados exalam o aroma do limão, enquanto as folhas liberam o aroma da laranja. Em medicina popular, a infusão das folhas é empregada como vermífica (Abaul, 1994). *T. trifolia* tem sido objeto de várias investigações fitoquímicas, revelando ser uma rica fonte de cumarinas, particularmente de cumarinas preniladas. (Abaul, 1994; De Silva, 1981), alcalóides (Abaul, 1994) e carotenóides (Yokoyama, 1970; Yokoyama, 1968) também têm sido isolados a partir da espécie.

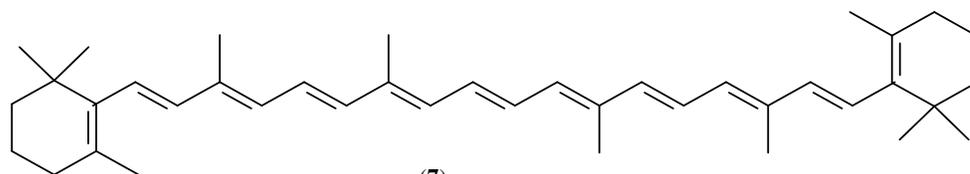
Na Tabela 1, encontra-se o nome dos constituintes químicos isolados de *T. trifolia*, incluindo referências bibliográficas. Um total de 21 metabólitos secundários foram isolados de *T. trifolia*, a única espécie do gênero investigada.

Tabela 1. Constituintes químicos isolados de *T. trifolia*.

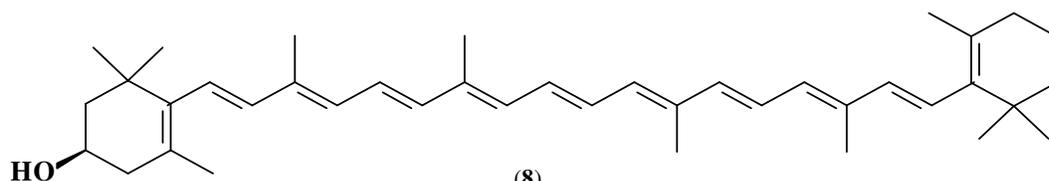
Parte Estudada	Substância Isolada/Identificada	Referências
Frutos	Semi- β -carotenona (1)	Yokoyama, 1970
	Triphasiaxanthina (2)	"
Folhas	Umbeliferona (3)	De Silva, 1981
	Isomeranzina (4)	"
	Triphasiol (5)	"
Frutos	β -Carotenona (6)	Yokoyama, 1968
	β -Caroteno (7)	"
	Criptoxantina (8)	Yokoyama, 1970
Sementes	Limonina (9)	Dreyer, 1972
Folhas	3-5	Abaul, 1994
	3''-desidroxí-3''-clorotriphasiol (10)	"
	O-metilhalfordinol (11)	"
	Isopimpineline (12)	"
	Hidrato de desoxipeucedanina (13)	"
	Heraclenol (14)	"
	Biakangelicina (15)	"
	Cinquema (16)	"
	Aurapteno (17)	Ruangrungsi, 1994
	Murrangatina (18)	"
	Mexoticina (19)	"
	Hidrato de meranzina (20)	"
Bicumarina (21)	Dondon, 2006	



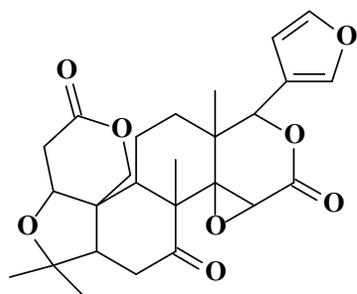
(6)



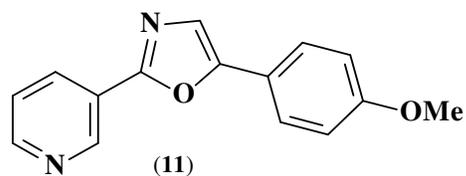
(7)



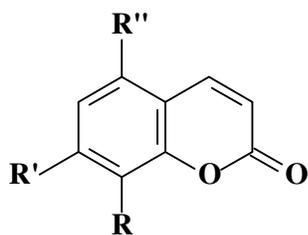
(8)



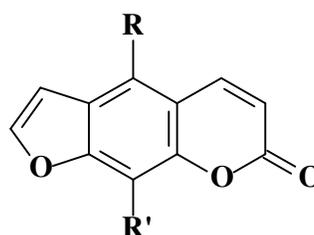
(9)



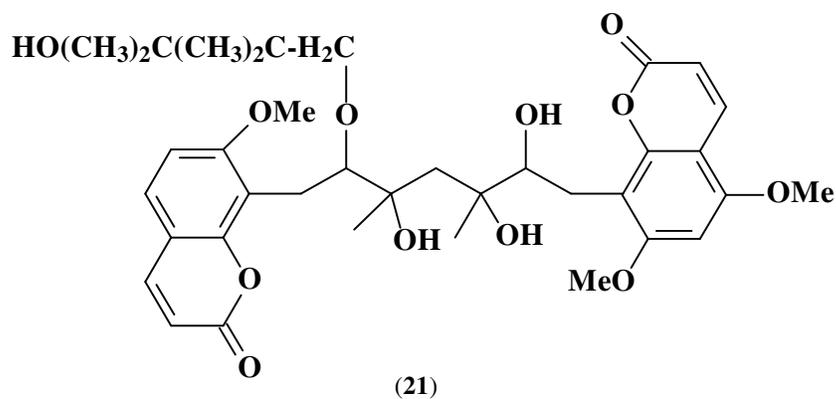
(11)



- (3) R=H; R'=OH; R''=H
 (4) R=CH₂-CO-CH(Me)₂; R'=OMe; R''=H
 (5) R=CH₂-CO-CH(Me)₂; R'=OCH₂-CHOH-C(Me)₂OH; R''=H
 (10) R=CH₂-CO-CH(Me)₂; R'=OCH₂-CHOH-C(Me)₂Cl; R''=H
 (17) R=H; R'=OCH₂-CH=C(CH₃)-CH₂-CH₂-CH=C(CH₃)₂; R''=H
 (18) R=CHOH-CHOH-C(CH₃)=CH₂; R'=OMe; R''=H
 (19) R=CH₂-CHOH-C(Me)₂OH; R'=OMe; R''=OMe
 (20) R=CH₂-CHOH-C(Me)₂OH; R'=OMe; R''=H



- (12) R=R'=OMe
 (13) R=O-CH₂-CHOH-C(Me)₂OH; R'=H
 (14) R=H; R'=O-CH₂-CHOH-C(Me)₂OH
 (15) R=OMe; R'=O-CH₂-CHOH-C(Me)₂OH
 (16) R=OMe; R'=O-CH₂-CHOH-C(Me)₂Cl



2.2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DE TRITERPENOS E SAPONINAS DA FAMÍLIA BORAGINACEAE

2.2.1. Considerações gerais sobre triterpenos e saponinas

O estudo fitoquímico de *C. piauhiensis* resultou no isolamento de saponinas, nas quais as agliconas são triterpenos de esqueleto ursano e oleanano, levando-nos então a realizar um levantamento bibliográfico sobre a ocorrência destes metabólitos secundários em todas as espécies da família Boraginaceae. Como resultado foram encontrados 72 compostos isolados de 15 espécies da família, distribuídos entre triterpenos e saponinas, onde as agliconas mais comuns foram triterpenos de esqueleto oleanano, ursano e lupano. Das espécies mais produtoras destes metabólitos destacam-se *Anchusa officinalis* L., *Cordia multispicata* Cham., *Microula sikkimensis* e *Symphytum officinale*.

Triterpenos são metabólitos secundários, não esteroidais, encontrados na flora e na fauna marinha e terrestre, ocorrendo sob várias formas, como álcool, éster e glicosilado. Como o próprio nome traduz, triterpenos são isopentenóides compostos por trinta átomos de carbonos e seus esqueletos podendo ser acíclicos, mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacíclicos. Triterpenos pentacíclicos são os constituintes majoritários desta classe e são os mais investigados do ponto de vista químico e farmacológico.

Saponinas são geralmente conhecidas como compostos não-voláteis, distribuídos principalmente no reino vegetal. O nome saponina é derivado do latim, onde o termo “sapo” significa sabão, devido este metabólito secundário formar espuma semelhante a de sabão quando misturado com água. São moléculas estruturalmente diversas atribuídas a triterpenos e esteróides glicosilados, as quais consistem em uma aglicona menos polar unida a uma ou mais unidades monossacarídicas. Esta combinação de elementos não polar e polar em sua molécula explica o comportamento semelhante a do sabão, gerando espuma em solução aquosa.

As saponinas possuem uma série de propriedades, como propriedade espumante e emulsificante, além de medicinal, hemolítica, antimicrobiana, inseticida e moluscicida. Elas são encontradas em uma série de aplicações como em bebidas, artigos de confeitaria e também em cosméticos e produtos farmacêuticos (Vincken, 2007).

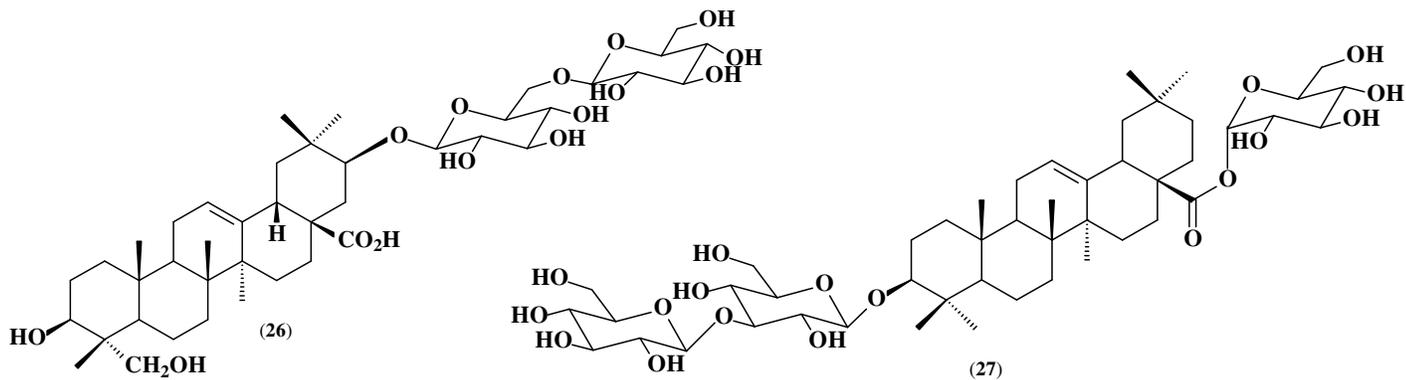
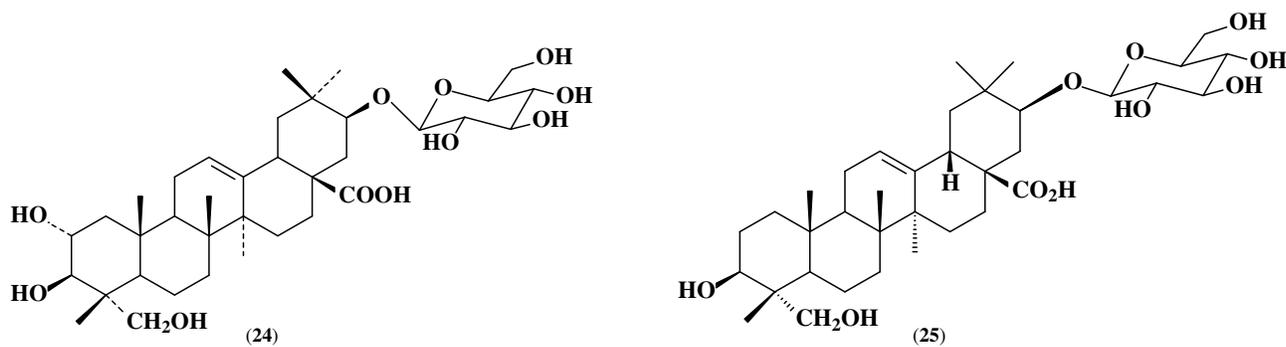
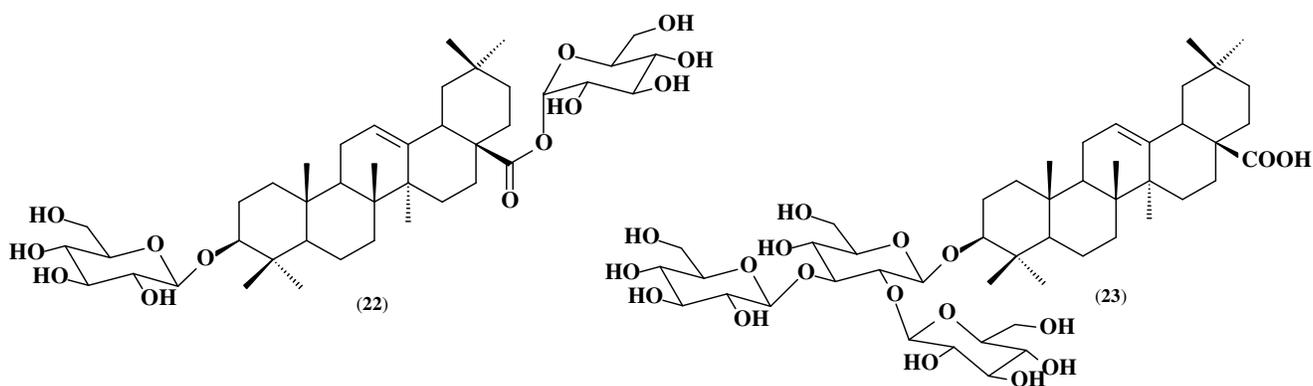
Tabela 2. Saponinas e triterpenos isolados de plantas da família Boraginaceae

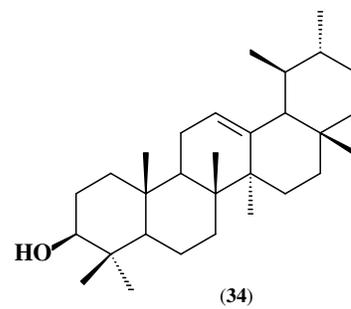
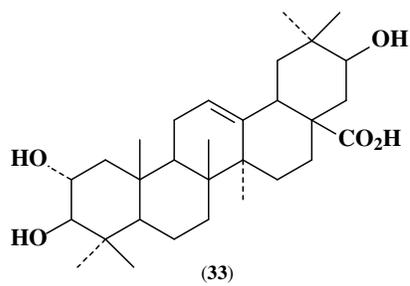
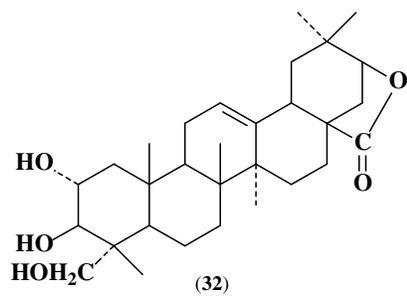
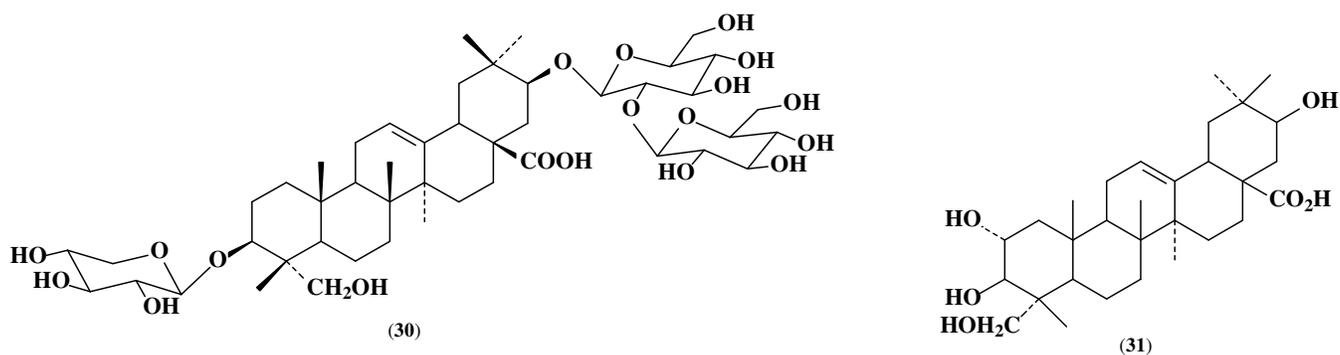
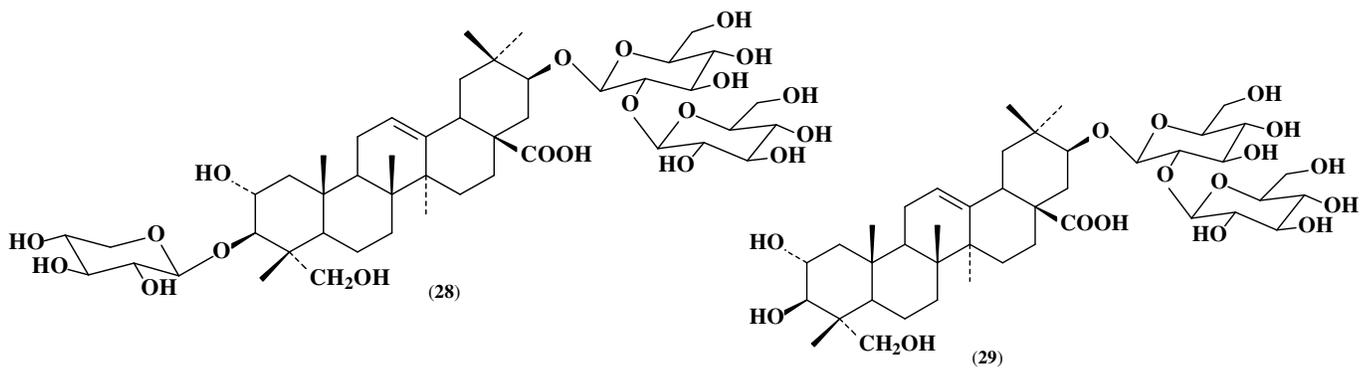
Espécie	Parte Estudada	Substância Isolada/Identificada	Referências
<i>Anchusa officinalis</i> L.	Folhas	Anchusoside-1 (22) Anchusoside-2 (23) Anchusoside-3 (24) Anchusoside-4 (25) Anchusoside-5 (26) Anchusoside-7 (27) Anchusoside-8 (28) Anchusoside-9 (29) Anchusoside-11 (30)	Romussi, 1979 " Romussi, 1983 Romussi, 1985 Romussi, 1986 Romussi, 1979 Romussi, 1984 " Romussi, 1988
<i>Caccinia glauca</i>	Folhas	Cacigenina (31) Cacigenina lactona (32) 23-Dexoxicacigenina (33)	Tewari, 1970 " "
<i>Carmona retusa</i>	Folhas	α -Amirina (34) β -Amirina (35) Bauerenol (36)	Villasenor, 2004 " "
<i>Cordia alliodora</i>	Folhas	Ácido 3 α -hidroxiolean-12-en-27-óico (37) Ácido 3 α -oxoolean-12-en-27-óico(38) Ácido 3,29-dioxoolean-12-en-27-óico(39) Ácido 3 α -hidroxi-29-oxoolean-12-en-27-óico(40) Ácido 3 α ,29-diidroxiolean-12-en-27-óico(41) Ácido 3 α -hidroxiolean-12-en-27,29-dióico(42)	Chen,1983 " " " " "
<i>Cordia globosa</i> (Jacq.) Kunth	Raiz	Acetato do ácido 3 α -hidroxiolean-12-en-27-óico (43)	Menezes, 2002
<i>Cordia multispicata</i> Cham.	Folhas " "	Cordianol A (44) Cordianol B (45) Cordianol C (46)	Kuroyanagi, 2003 " "

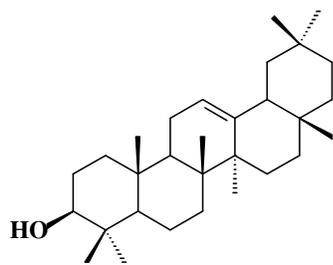
	"	Cordianol D (47)	"
	"	Cordianol E (48)	"
	"	Cordianol F (49)	"
	"	Cordianol G (50)	"
	"	Cordianol H (51)	"
	"	Cordianol I (52)	"
	"	Cordiacetal A (53)	Kuroyanagi, 2001
	"	Cordiacetal B (54)	"
	"	Cordianal A (55)	"
	"	Cordianona (56)	"
	"	Cordianal B (57)	"
	"	Cordianal C (58)	"
<i>Cordia obliqua</i> Willd.	Sementes	(34)	Srivastava, 1987
	Raiz	Lupa-20,29-ene-3-O-β-D-Maltosídeo (59)	Chauhan, 1978
	Raiz	Lupa-20,29-ene-3-O-α-L-Ramnopiranosídeo (60)	Srivastava, 1983
<i>Cordia rothii</i> Roem e Schult	Frutos	(35)	Verma, 1978
<i>Cordia spinescens</i> L.	Folhas	3α,6β,25-triidroxi-20(S),24(S)-epoxidamarano (61) 3α-acetoxi-6β,25-triidroxi-20(S),24(S)-epoxidamarano (62) Cabraleadiol (63)	Nakamura, 1997 " "
<i>Ehretia laevis</i>	Caule	34 e 36 Acetato de bauerenol (64) Lupeol (65) Betulina(66) Ác. betulínico(67)	Dan, 1982 " " " "
<i>Lithospermum caroliniense</i> MacMill.	Folhas e madeira	Ácido 1α,3β,23-triidroxiolean-12-en-28-óico (68) Ácido 3α,19β,21α,23-tetraidroxitaraxast-12-en-28-	Fullas, 1996 "

		óico (69)	
<i>Microula sikkimensis</i>	Sementes	(41-42) Nomilina(70) Rutaevina (71) Cicloartanol (72) Cicloartenol (73) 24-metilenocicloartanol (74) Ciclobranol (75) Damaradienol (76) Tirucalla-7,24-dienol (77) Butirospermol (78) (35) Germanicol (79) 4-Taraxasterol (80)	Li, 2000 " " " " " " " " " " "
<i>Onosma limitaneum</i>	Folhas	Bauerenona (81)	Ahmad, 2005
<i>Sericostoma pauciflorum</i>	Folhas	Acetato de sericostinila (82) Acetato de pauciflorinila (83) Acetato de pauciflorol (84)	Ayatollahi,1991 Majidayatollahi,1992 Ayatollahi,1992
<i>Symphytum officinale</i>	Raízes	3-O-[β-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosil-(1→4)-α-L-arabinopiranosil]-ácido oleanólico (85) Leontosídeo A (86) Leontosídeo B (87) 3-O-[β-D-glicopiranosil-(1→4)-α-L-arabinopiranosil]-hederagenina 28-O-[β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil] éster (88) Symphytoxide A (89) 3-O-[α-L-arabinopiranosil]-hederagenina 28-O-[β-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil] éster (90)	Ahmad, 1993 Ahmad, 1993 " Ahmad, 1993 Ahmad, 1993

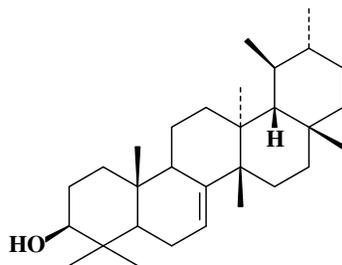
		<p>Caulosídeo D (91)</p> <p>Leontosídeo D (92)</p> <p>3-O-[β-D-glicopiranosil-(1→4)-[β-D-glicopiranosil-(1→4)-α-L-arabinopiranosil]-hederagenina 28-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil] éster (93)</p>	<p>Noorwala, 1994</p> <p>Mohammad, 1995</p> <p>"</p> <p>Mohammad, 1995</p>
--	--	--	--



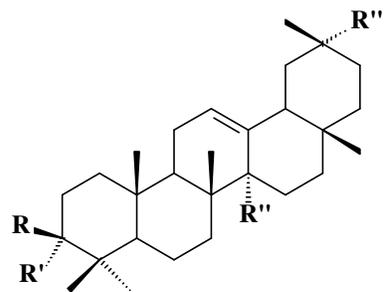




(35)



(36)

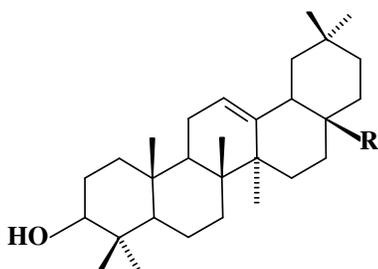
(37) R=H; R'=OH; R''=COOH; R'''=CH₃(38) R=R'=O; R''=COOH; R'''=CH₃

(39) R=R'=O; R''=COOH; R'''=CHO

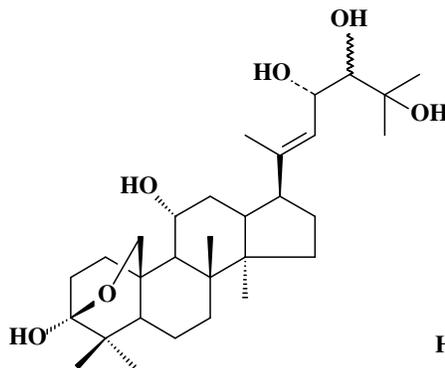
(40) R=H; R'=OH; R''=COOH; R'''=CHO

(41) R=H; R'=OH; R''=COOH; R'''=CH₂OH

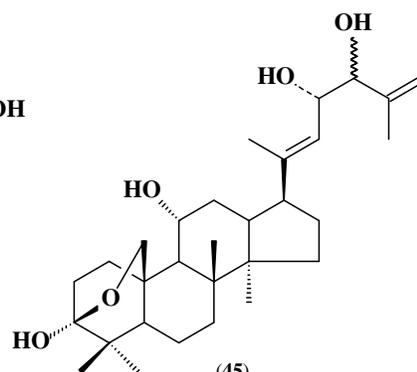
(42) R=H; R'=OH; R''=COOH; R'''=COOH



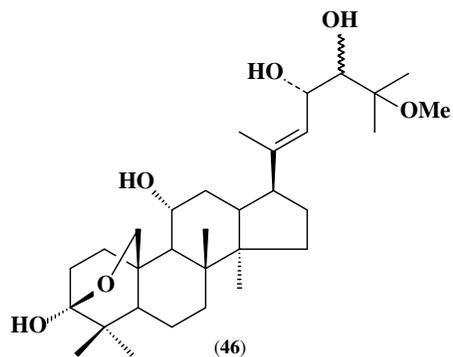
(43) R=COOAc



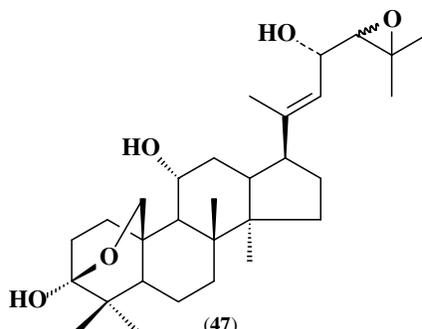
(44)



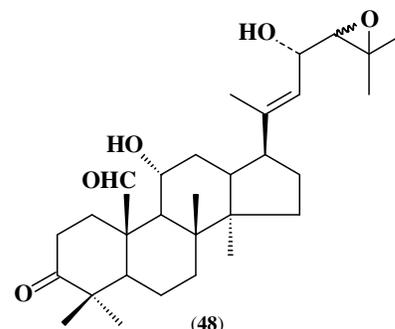
(45)



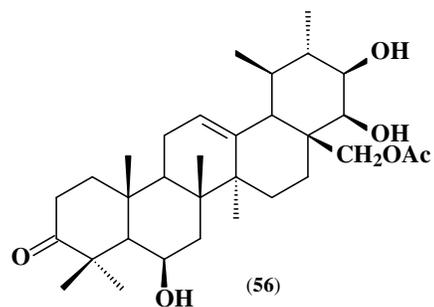
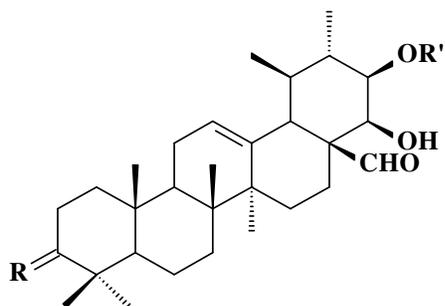
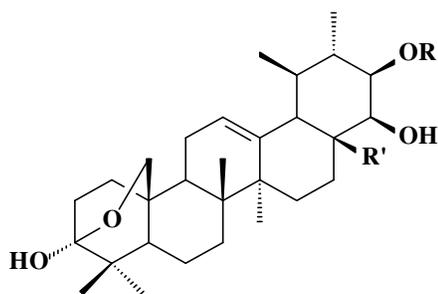
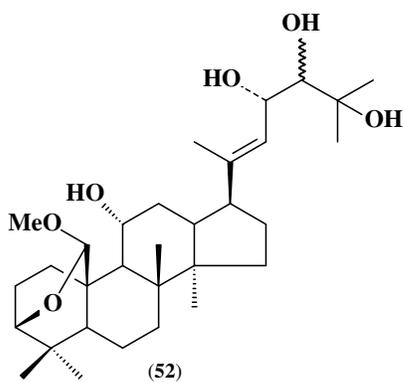
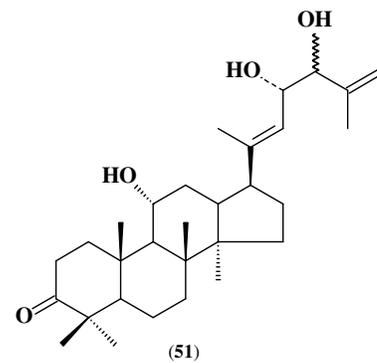
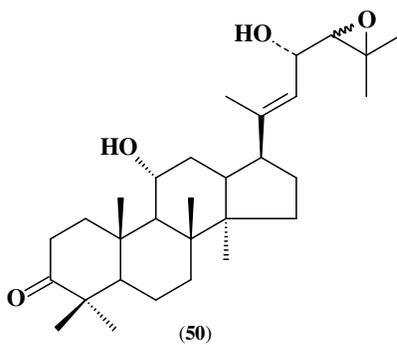
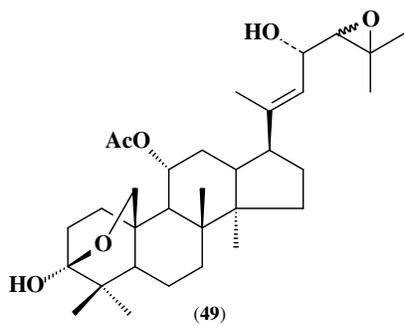
(46)

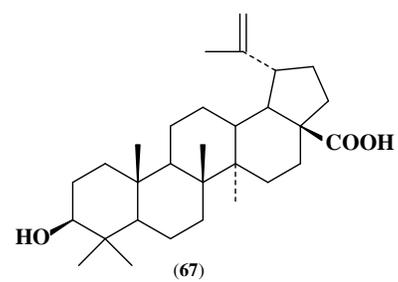
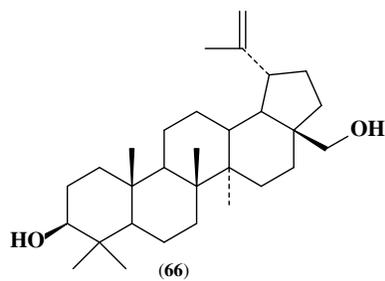
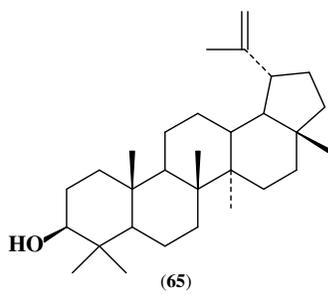
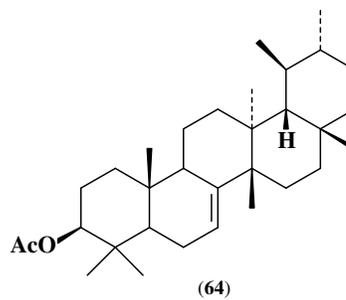
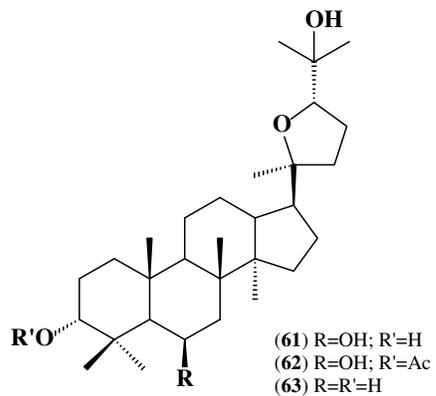
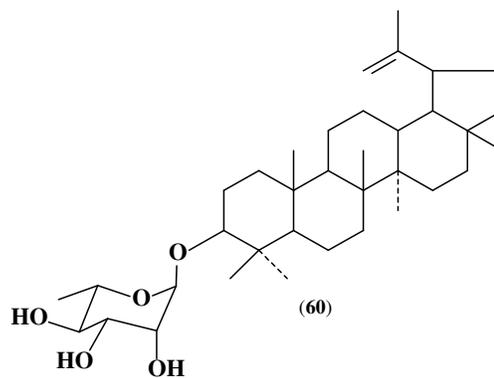
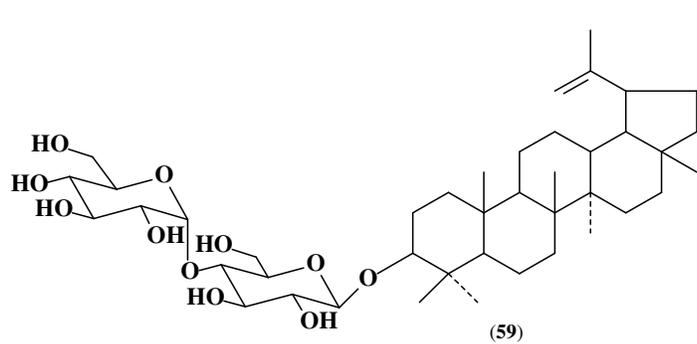


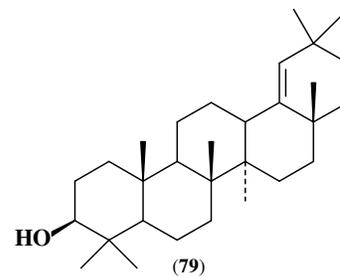
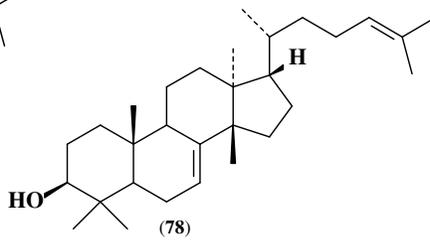
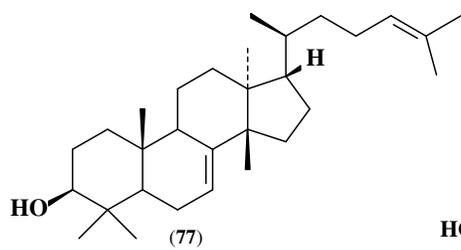
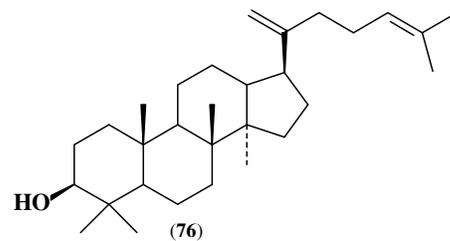
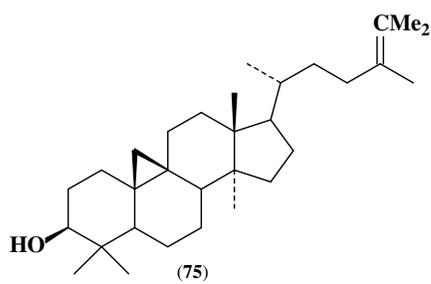
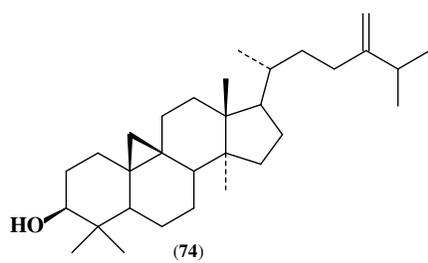
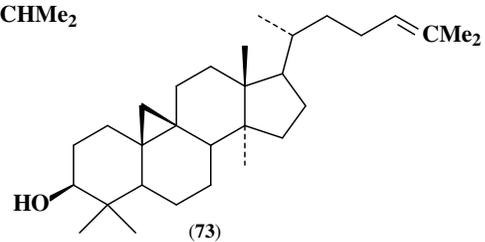
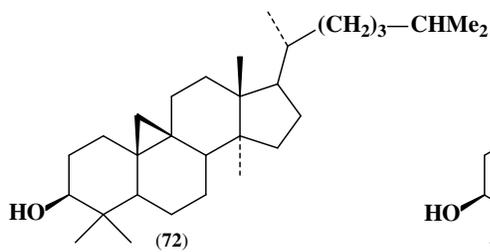
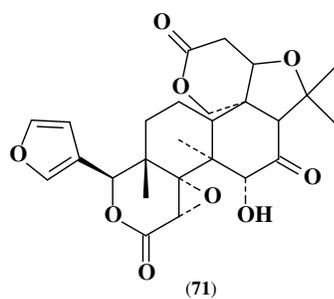
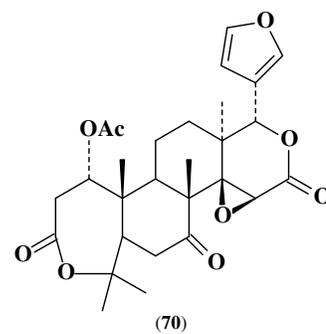
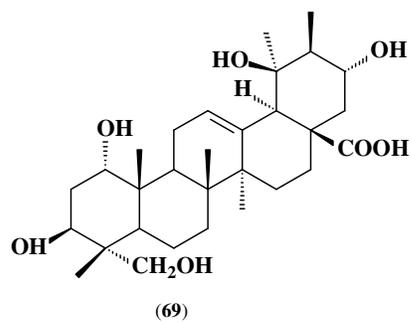
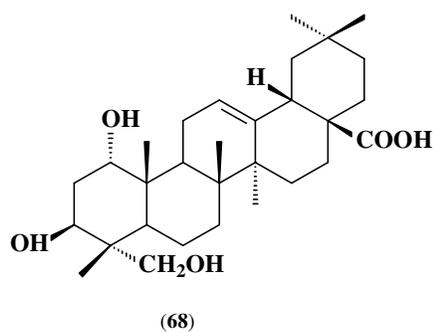
(47)

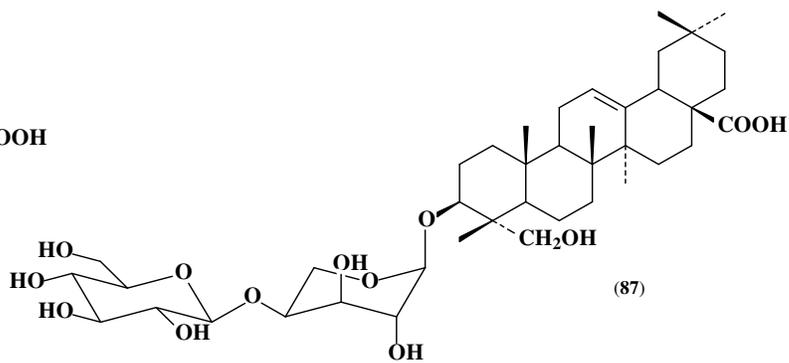
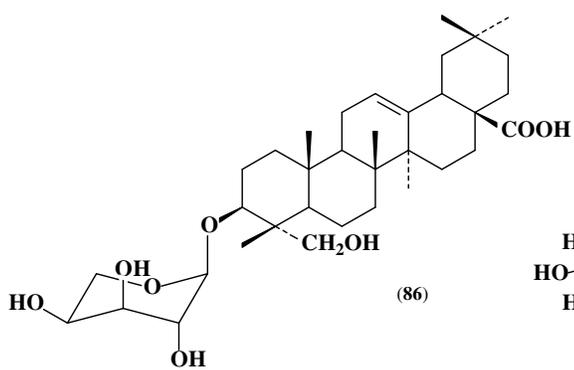
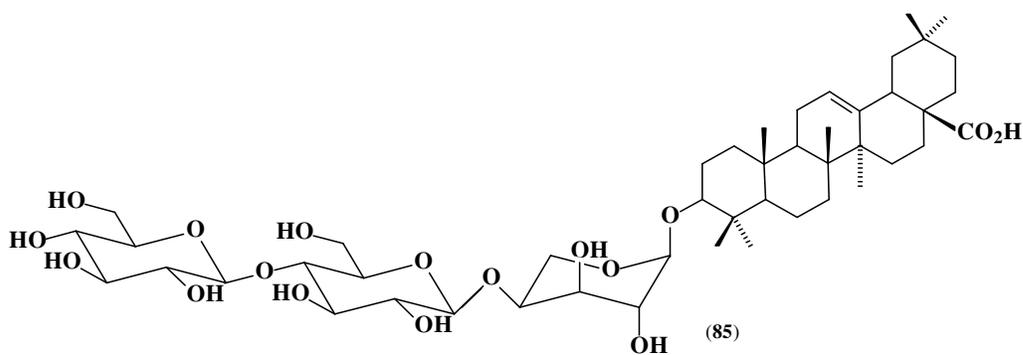
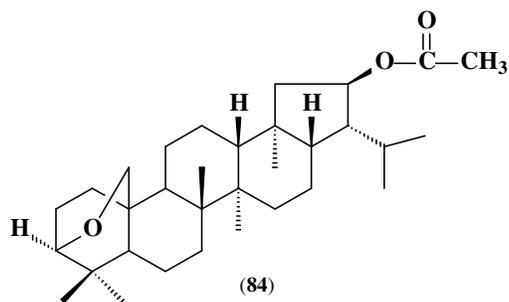
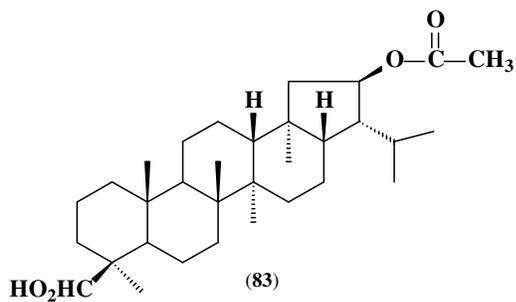
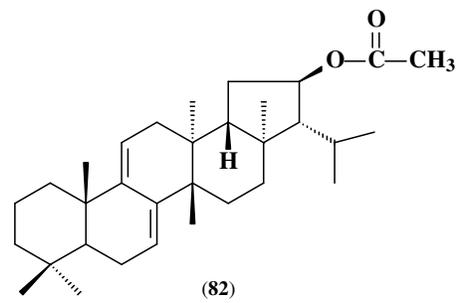
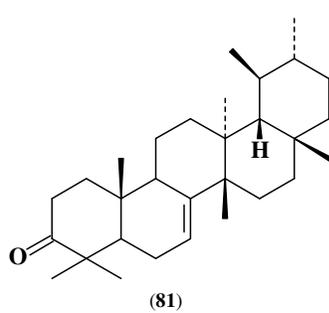
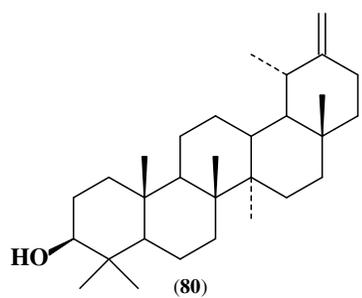


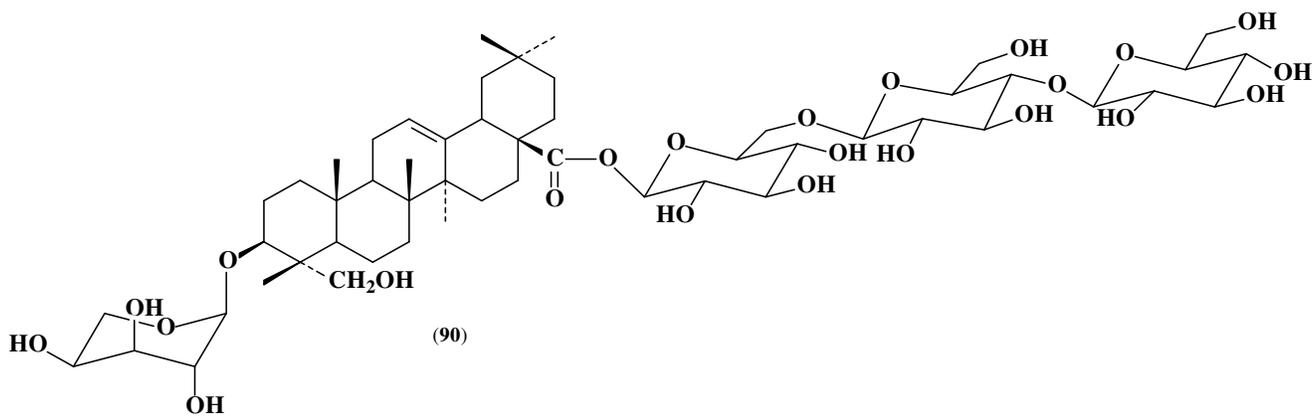
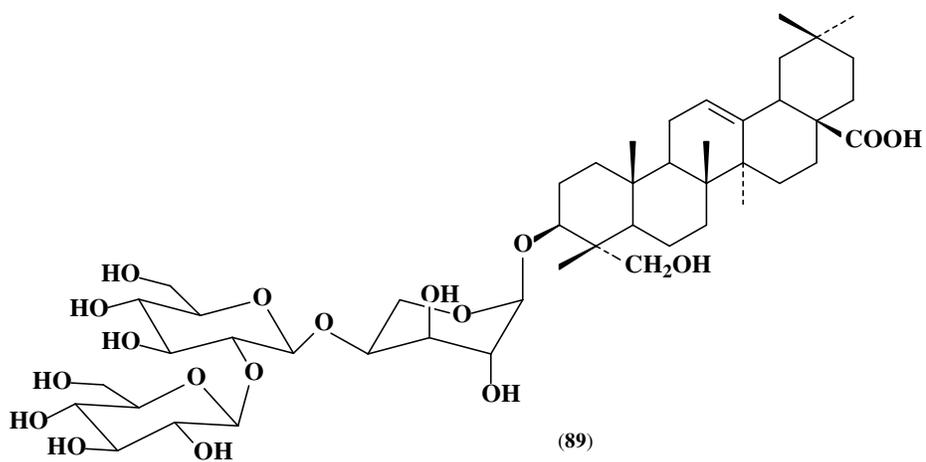
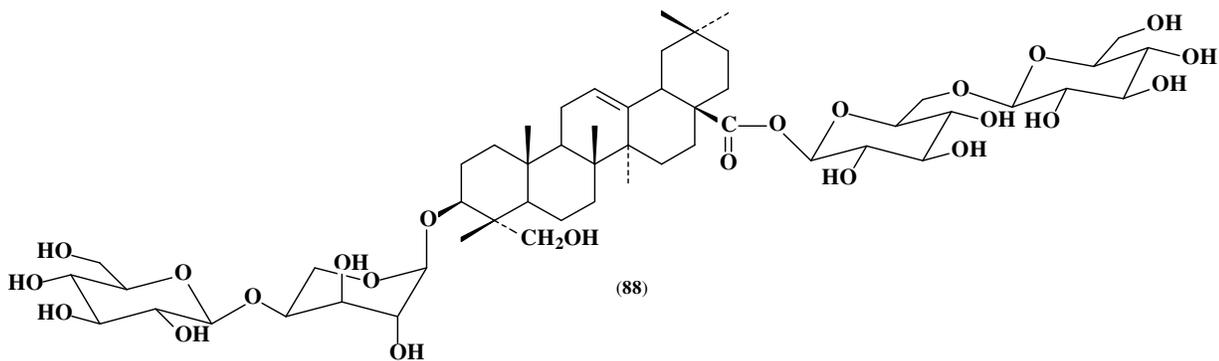
(48)

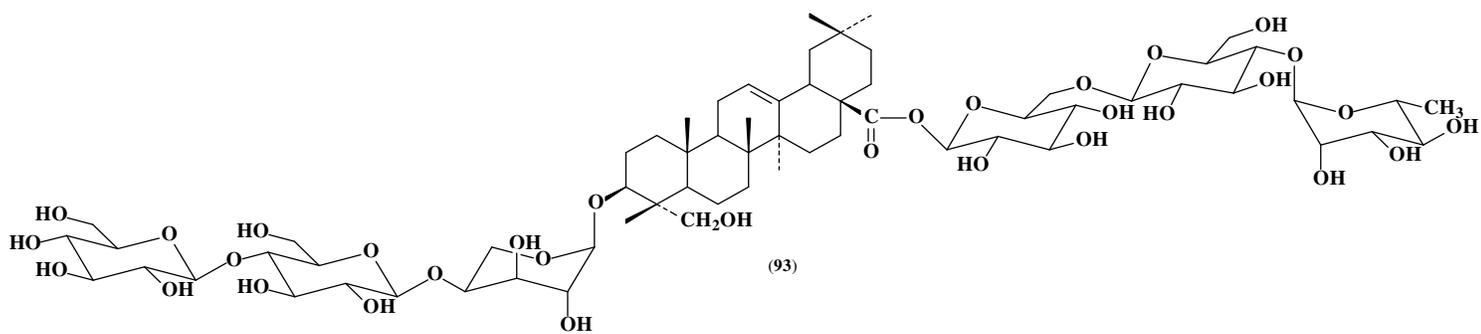
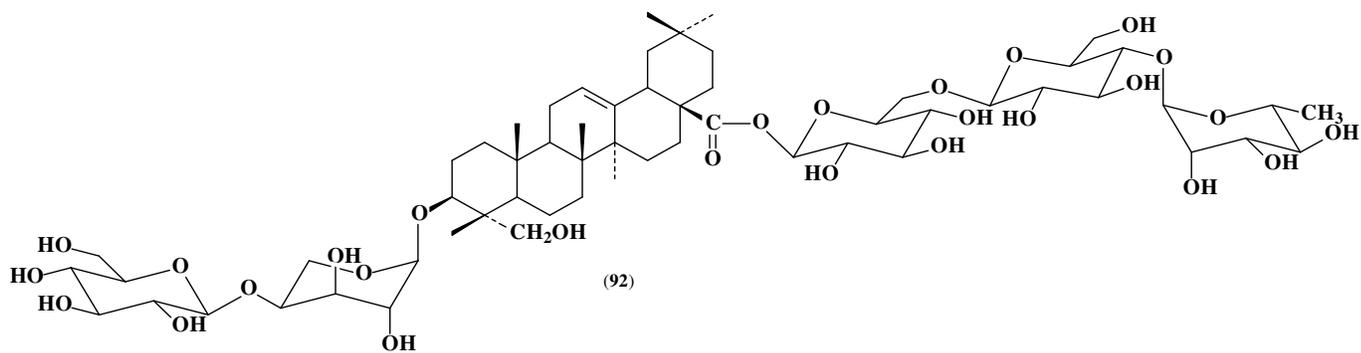
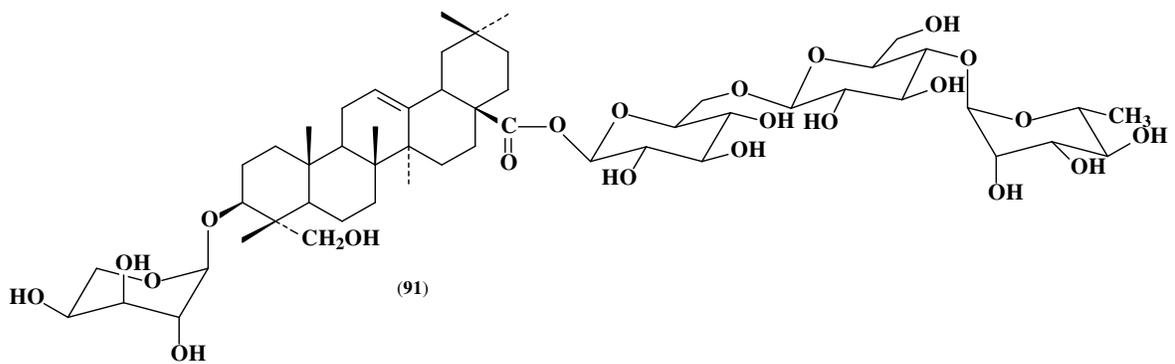






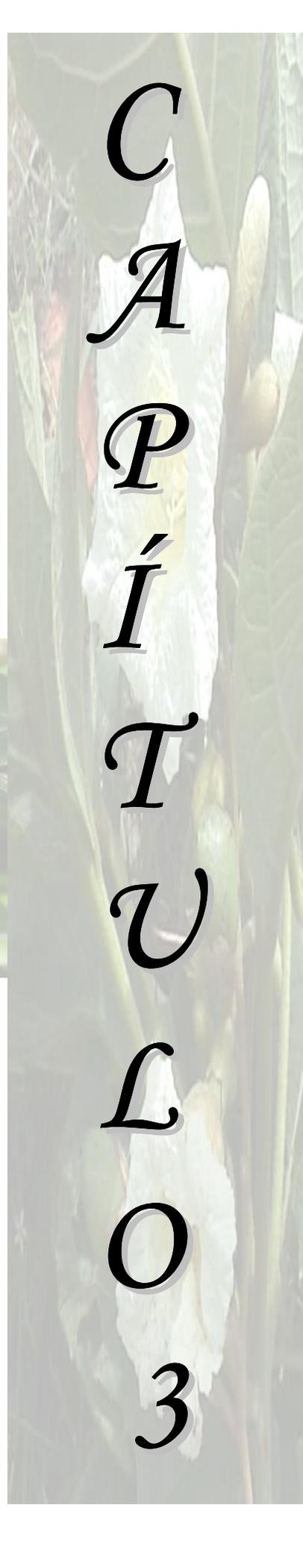








*DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL*



*C
A
P
Í
T
U
L
O
3*

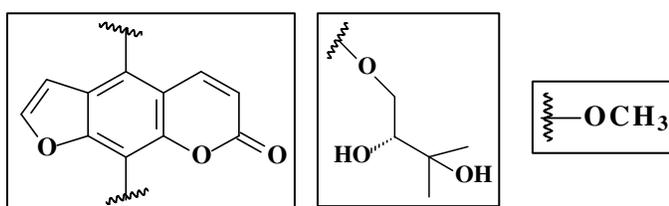
3.1. Determinação dos constituintes fixos dos frutos e folhas de *Triphasia trifolia*

3.1.1. Determinação estrutural de TFR-1

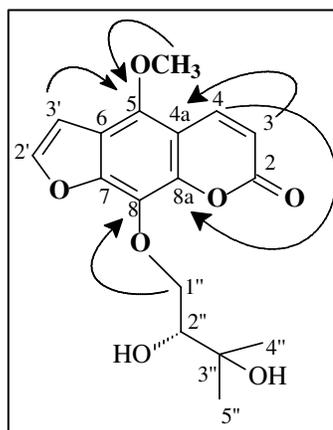
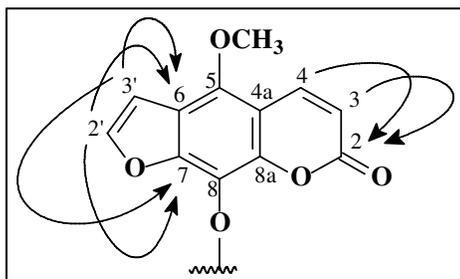
TFR-1 foi isolada do decocto oriundo do processo de hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia* (Item 4.5.1.1, pág. 164), apresentando-se como cristais amarelados, com faixa de fusão entre 116-117,3 °C e $[\alpha]_D^{20}$ -12° (c. 0.05, MeOH). Sob luz ultravioleta, TFR-1 em CCD, mostrou-se como uma intensa fluorescência azul, um forte indicativo de cumarinas.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 3, pág. 34) apresentou quatro sinais na região de hidrogênios olefínicos e/ou aromáticos. Os sinais em δ_{H} 6,27 (d, 9,7 Hz, H-3) e 8,21 (d, 9,7 Hz, H-4) foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos α e β de um anel lactônico, característico de cumarinas. Os outros dois sinais em δ_{H} 7,21 (d, 2,3 Hz) e 7,81 (d, 2,3 Hz) foram atribuídos a hidrogênios de um anel furânico. Observou-se ainda sinais em δ_{H} 1,22 (s) e 1,27 (s) referentes a dois grupos metilas, sinais em δ_{H} 3,82 (dd, 8,0 e 2,7 Hz), 4,27 (dd, 10,3 e 8,0 Hz) e 4,55 (dd, 10,3 e 2,7 Hz), os quais foram inferidos a uma prenila contendo grupos hidroxilas, além de um sinal simples e intenso em δ_{H} 4,19 atribuído a um grupo metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 4, pág. 34) apresentou 17 linhas espectrais e com o auxílio da técnica DEPT 135° (Fig. 5, pág. 35) foi possível determinar o padrão de substituição correspondente a cada átomo de carbono e ainda, por diferença, o número de carbonos não-hidrogenados. Foram identificados três carbonos metílicos, incluindo um grupo metoxila δ_{C} (23,9; 25,3; 61,6), um carbono oximetilênico δ_{C} (76,9), cinco carbonos monohidrogenados δ_{C} (78,4; 106,5; 113,2; 141,6; 147,1) e oito carbonos não-hidrogenados δ_{C} (72,9; 108,8; 116,4; 128,5; 145,0; 146,2; 151,8; 162,9). O espectro de RMN bidimensional HMQC (Fig. 7, pág. 36) possibilitou correlacionar os sinais de carbono e hidrogênios diretamente ligados (Tabela 3, pág. 33). Com base nos dados descritos pode-se deduzir as seguintes sub-estruturas:



O experimento HMBC (Fig. 8, pág. 36) mostrou correlação a duas ($^2J_{CH}$) e a três ($^3J_{CH}$) ligações entre os átomos de hidrogênio dos carbonos metínicos do anel furânico CH-3' e CH-2' com o carbono C-6 (δ_C 116,4), e a três ligações, com o carbono C-7 (δ_C 151,8). Observou-se também correlações a duas e a três ligações entre o carbono carbonílico C-2 (δ_C 162,9) e os hidrogênios dos carbonos CH-3 e CH-4, os quais correlacionam também com os carbonos C-4a e C-8a, respectivamente. A posição do substituinte $-OCH_3$ foi determinada através da correlação a três ligações entre os hidrogênios da metoxila (δ_H 4,19) e H-3' (δ_H 7,21) com o carbono C-5 (δ_C 146,2), enquanto a posição do substituinte $OCH_2CHOHCOH(CH_3)_2$ foi deduzida através da correlação entre os hidrogênios do carbono metilênico oxigenado CH-1'' com o carbono C-8 (δ_C 128,5).



Análise comparativa dos dados físicos {Lit.: p.f. 117-118°C, $[\alpha]_D^{22} -19^\circ$ (MeOH)} e espectroscópicos com àqueles registrados na literatura (Adebajo, 2000), permitiu a confirmação do metabólito em questão como sendo a furanocumarina biakangelicina, a qual já havia sido isolada das folhas de exemplares da referida espécie originária do Parque Nacional de Guadalupe (Abaul, 1994).

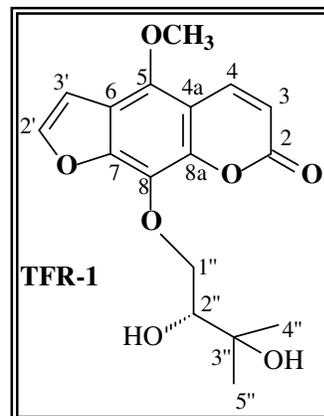


Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 500 MHz, CD_3OD) de TFR-1 e comparação com dados registrados na literatura para a biakangelicina (Ruangrunsi, 1994).

HMQC			HMBC		Lit.
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
2	162,9	-	H-3	H-4	160,1
3	113,2	6,27 (d, 9,7)	-	-	113,2
4	141,6	8,21 (d, 9,7)	-	-	140,0
4a	108,8	-	-	H-3	108,0
5	146,2	-	-	3H-OCH ₃ , H-4	145,3
6	116,4	-	H-3'	H-2'	115,3
7	151,8	-	-	H-2', H-3'	150,9
8	128,5	-	-	Hb-1''	127,8
8a	145,0	-	-	H-4	144,6
2'	147,1	7,81 (d, 2,3)	H-3'	-	146,4
3'	106,5	7,21 (d, 2,3)	-	-	106,1
1''	76,9	4,27 (dd, 10,3; 8,0- Hb) 4,55 (dd, 10,3; 2,7 - Ha)	-	-	76,6
2''	78,4	3,82 (dd, 8,0 e 2,7)	-	3H-4'', 3H-5''	77,4
3''	72,9	-	3H-4'', 3H-5''	-	71,6
4''	25,3	1,22 (s)	-	3H-5''	26,5
5''	23,9	1,27 (s)	-	3H-4''	25,4
OCH ₃	61,6	4,19 (s)	-	-	61,1

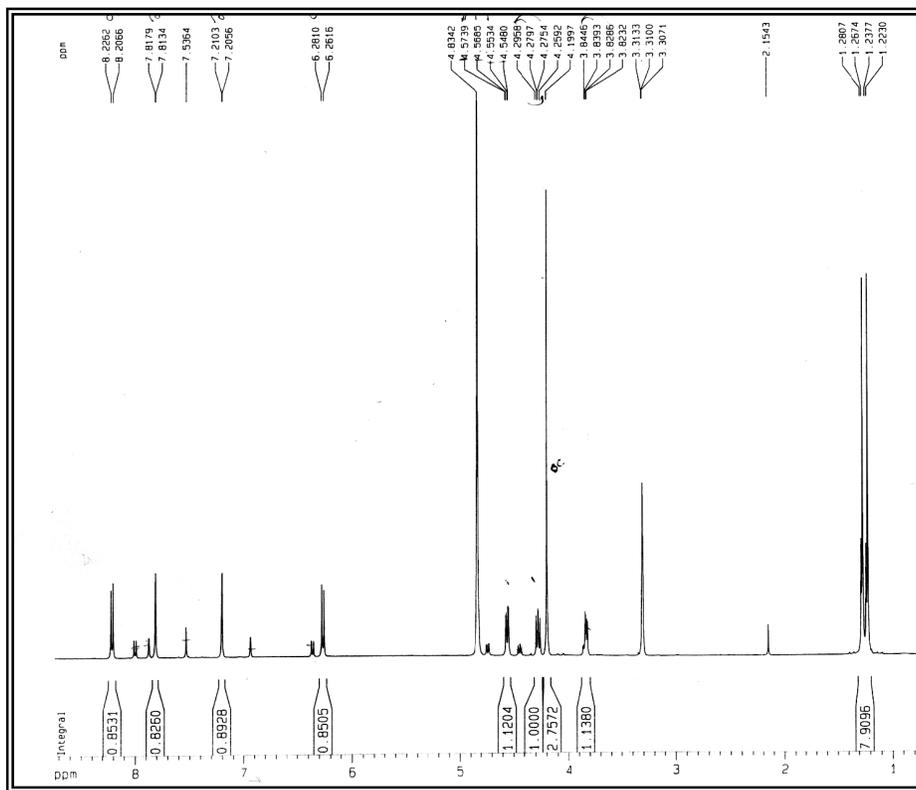


Figura 3. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de TFR-1.

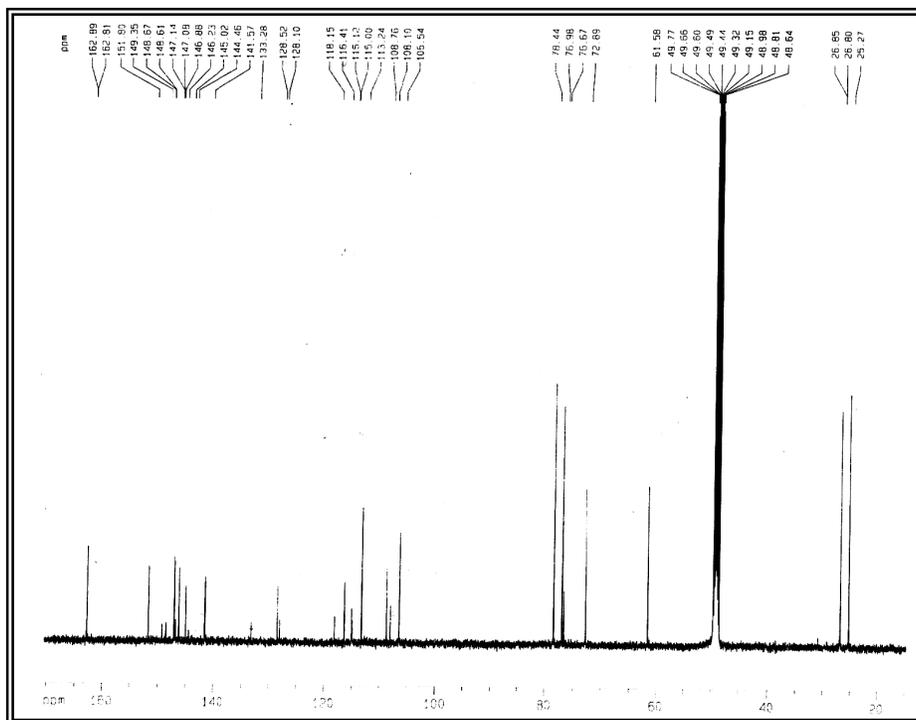


Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de TFR-1.

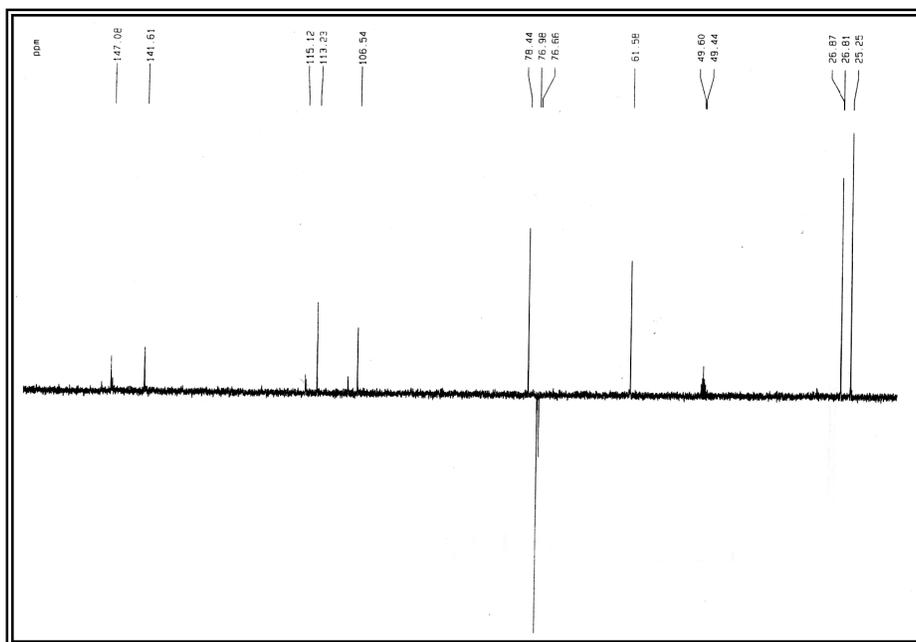


Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de TFR-1.

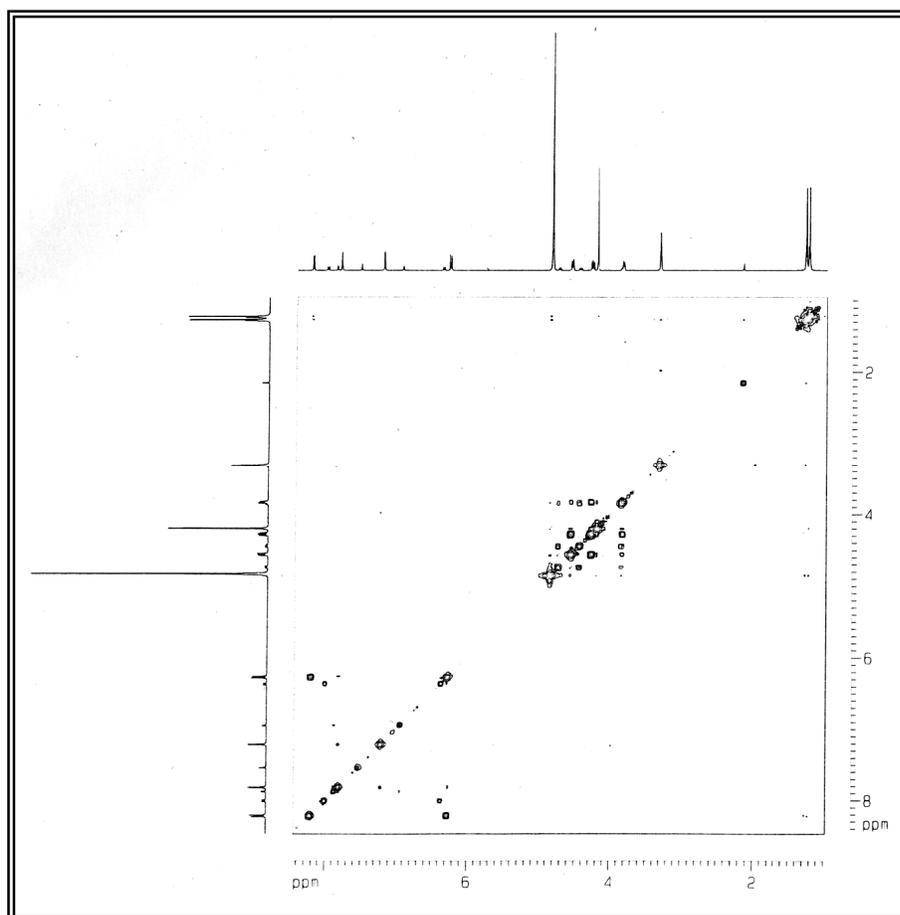


Figura 6. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CD_3OD) de TFR-1.

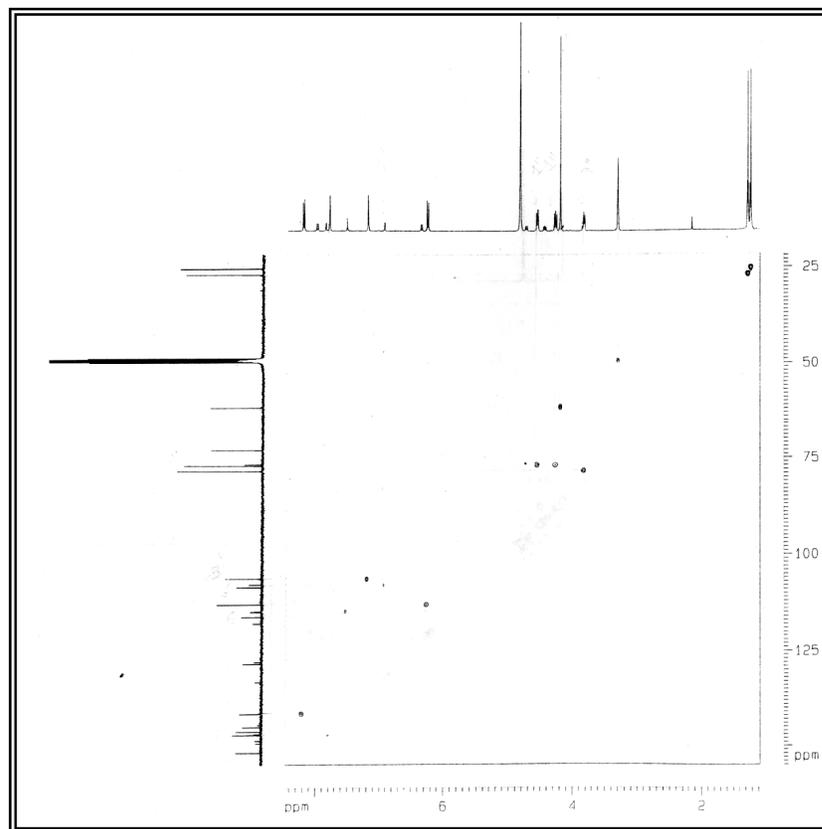


Figura 7. Espectro de RMN HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de TFR-1.

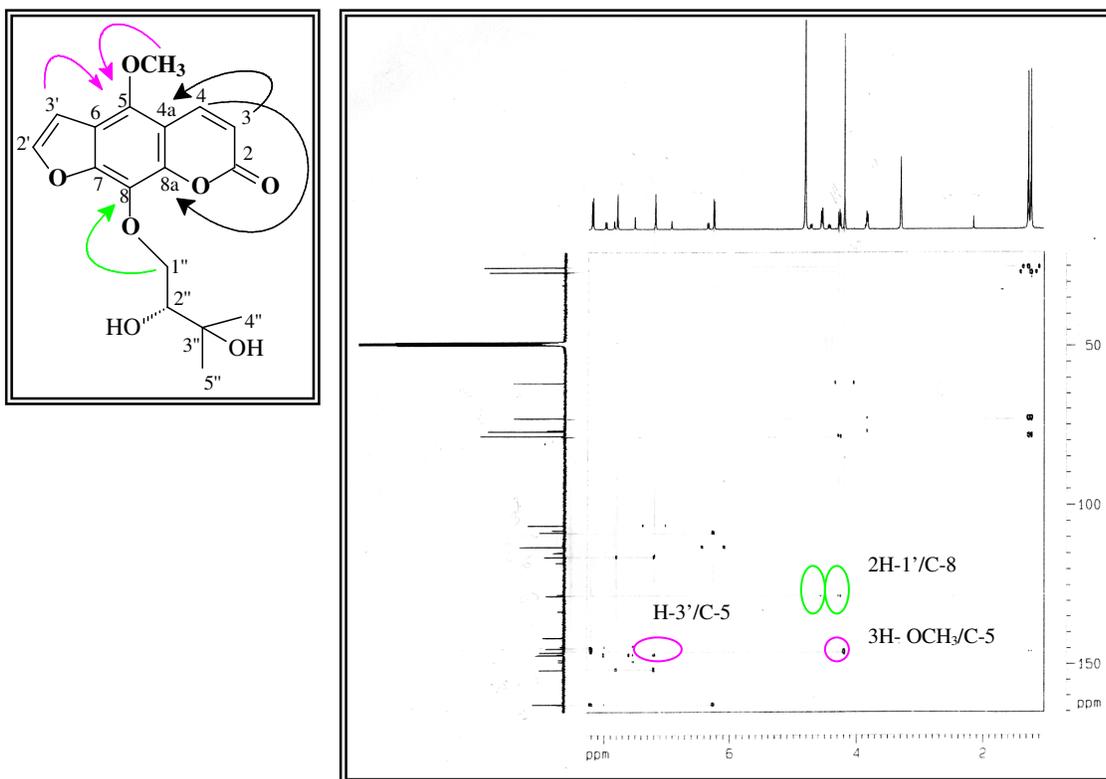


Figura 8. Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de TFR-1.

3.1.2. Determinação estrutural de TFR-2

A substância denominada TFR-2, isolada também do decocto proveniente da hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia* (Item 4.5.1.1, pág. 164), mostrou-se como um sólido amorfo amarelo, com faixa de fusão entre 144-145,2 °C. Sob luz ultravioleta, TFR-2 em CCD, revelou também uma intensa fluorescência azul, um indicativo de cumarina.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 9, pág. 39) revelou absorções referentes a estiramentos de ligações C=O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1716 cm^{-1}) e de C-O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1204-1070 cm^{-1}), compatível com a existência de um anel lactônico sugerindo também a existência de cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 10, pág. 39) apresentou quatro sinais na região de hidrogênios olefínicos e/ou aromáticos, semelhante a TFR-1. Os sinais em δ_{H} 6,29 (d, 9,8 Hz, H-3) e 8,12 (d, 9,8 Hz, H-4) foram caracterizados como os hidrogênios dos carbonos α e β do anel lactônico das cumarinas, enquanto os sinais em δ_{H} 7,0 (d, 2,3 Hz, H-3') e 7,63 (d, 2,3 Hz, H-2') foram atribuídos a hidrogênios de anel furânico. O espectro mostrou ainda dois sinais simples e intensos em δ_{H} 4,16 e 4,17 referentes a duas metoxilas.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 11, pág. 40) apresentou 13 linhas espectrais. Com o auxílio do espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 12, pág. 40) foi possível definir os carbonos metílicos, monohidrogenados e ainda os não-hidrogenados. Os sinais em δ_{C} 145,3; 139,6; 113,0; 105,3 foram relacionados a carbonos monohidrogenados, com hibridização sp^2 , enquanto os sinais em δ_{C} 61,9 e 61,0 foram relacionados a carbonos metílicos referentes a grupos metoxilas. Os demais sinais foram relacionados a carbonos não-hidrogenados δ_{C} (160,7; 150,2; 144,5; 143,9; 128,4; 115,0; 107,8).

Com base nos dados descritos, pode-se dizer que TFR-2 trata-se de uma furanocumarina contendo duas metoxilas ligadas no anel benzênico da molécula.

Análise comparativa dos dados físicos {Lit.: p.f. 147-148°C} e espectroscópicos com àqueles registrados na literatura (Elgamal, 1979), permitiu identificar o metabólito em questão como sendo a furanocumarina isopimpinellina, a qual já havia sido isolada das folhas da referida espécie, originária do Parque Nacional de Guadalupe (Abaul, 1994).

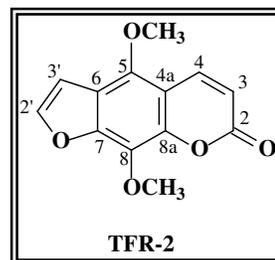


Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 500 MHz, CDCl_3) de TFR-2 e comparação com dados registrados na literatura para a isopimpinellina (Elgamal, 1979).

HMQC			Lit.
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	160,7	-	160,5
3	113,0	6,29 (d, 9,8)	112,8
4	139,6	8,12 (d, 9,8)	139,5
4a	107,8	-	107,7
5	144,5	-	144,4
6	115,0	-	114,9
7	150,2	-	149,9
8	128,4	-	128,3
8a	143,9	-	143,7
2'	145,3	7,63 (d, 2,3)	145,3
3'	105,3	7,00 (d, 2,3)	105,3
OCH_3	61,9	4,17 (s)	61,7
OCH_3	61,0	4,16 (s)	60,9

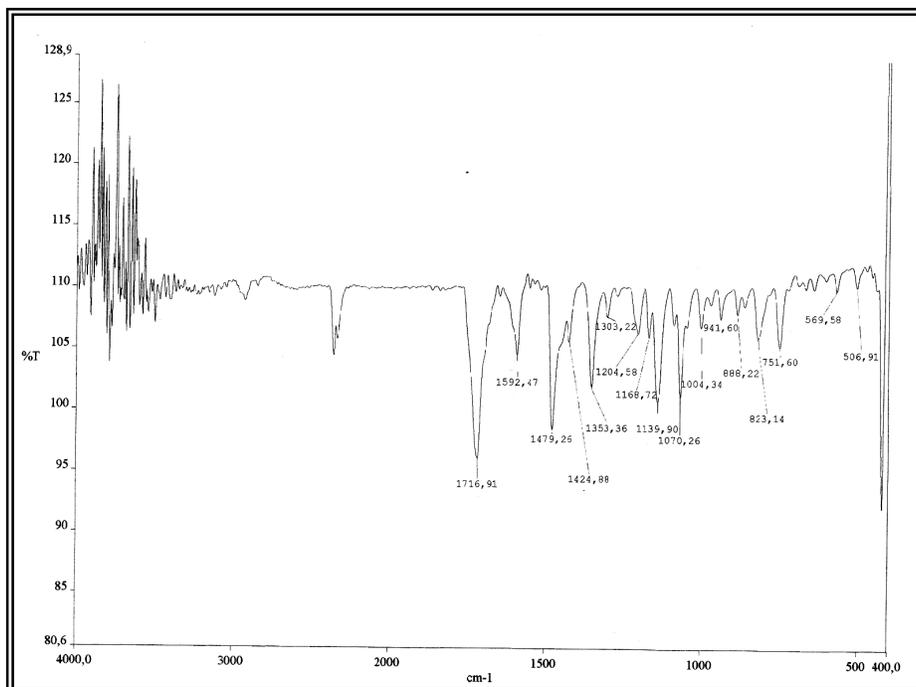


Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de TFR-2

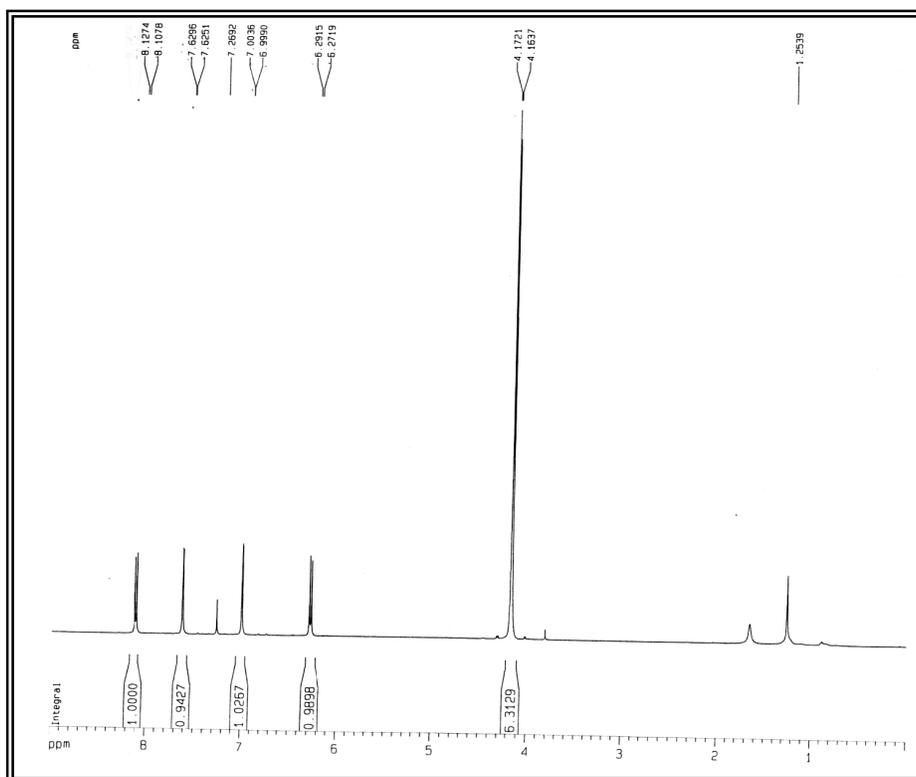


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TFR-2.

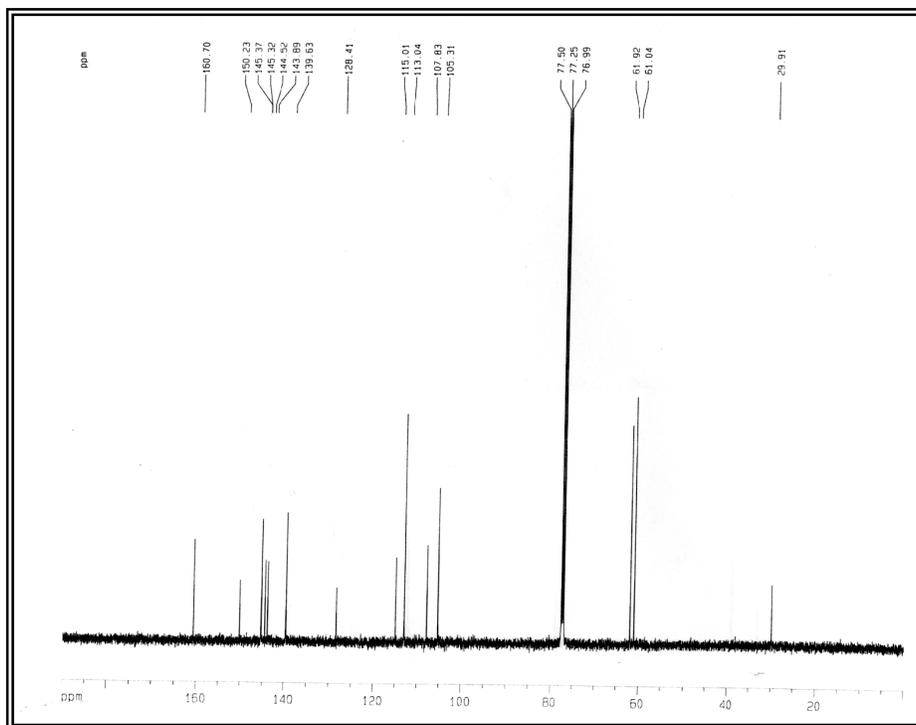


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C - BB (125 MHz, CDCl_3) de TFR-2.

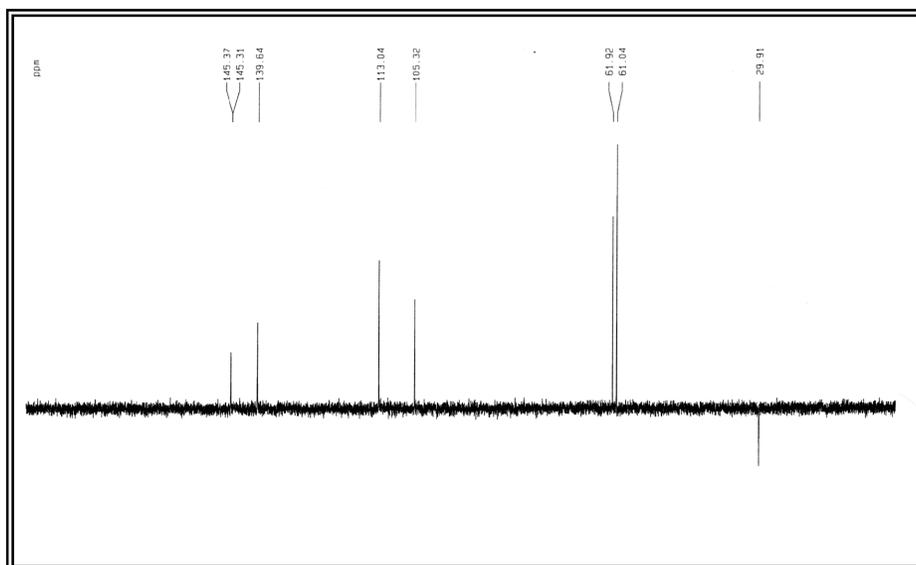


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TFR-2.

3.1.3. Determinação Estrutural de TFR-3

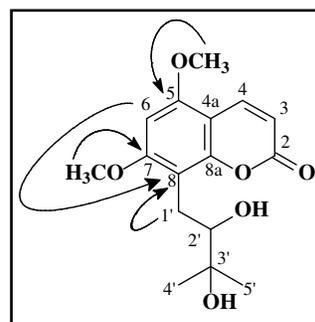
O metabólito denominado TFR-3 também foi obtido do decocto oriundo do processo de hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia* (Item 4.5.1.1, pág. 164). Esta substância apresentou-se como cristais incolores, faixa de fusão entre 176,8-178,1 °C e $[\alpha]_{20}^D -22^\circ$ (c. 0.05, CHCl_3). Sob luz ultravioleta, TFR-3 em CCD, também revelou uma intensa fluorescência azul, característica de cumarinas.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 13, pág. 43) apresentou uma banda em $\lambda_{\text{máx}} 3445 \text{ cm}^{-1}$, compatível com a presença de grupo hidroxila, além de absorções referentes a estiramentos de ligações C=O ($\lambda_{\text{máx}} 1714 \text{ cm}^{-1}$) e C-O ($\lambda_{\text{máx}} 1252 - 1103 \text{ cm}^{-1}$), condizente com a existência de um anel lactônico.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 14, pág. 43) apresentou três sinais na região de hidrogênios olefínicos e/ou aromáticos. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 6,11$ (d, 9,6 Hz) e 8,10 (d, 9,6 Hz) foram facilmente identificados como hidrogênios de anel lactônico das cumarinas, enquanto o sinal em $\delta_{\text{H}} 6,59$ (s) foi atribuído a um hidrogênio de anel aromático, sugerindo que as demais posições estejam substituídas. Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se dois sinais intensos em $\delta_{\text{H}} 3,95$ e 3,96 referentes a duas metoxilas, e ainda sinais em $\delta_{\text{H}} 1,27$ (s), 1,27(s), 2,93 (d, 5,9 Hz) e 3,6 (dd, 7,0 e 6,0 Hz), compatíveis com a existência de um grupo prenila oxigenado.

Através do espectro HSQC (Fig. 16, pág. 44), foi possível correlacionar os sinais de hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tab. 5, pág. 42), podendo-se confirmar a presença de um grupo prenila dioxigenado.

A posição dos substituintes foi determinada com base no experimento HMBC (Fig. 17, pág. 45), o qual revelou correlação a três ligações entre os carbonos C-5 $\delta_{\text{C}} (156,1)$ e C-7 $\delta_{\text{C}} (162,4)$ e os hidrogênios dos grupos metoxilas. Observou-se ainda a correlação a duas ligações entre o carbono em $\delta_{\text{C}} 107,9$ (C-8) e os hidrogênios do carbono metilênico C-1' ($\delta_{\text{H}} 2,93$) e a três ligações com o hidrogênio do carbono C-6 ($\delta_{\text{H}} 6,59$).



De acordo com os dados discutidos acima e ainda com base na análise comparativa entre os dados de RMN do composto em questão com os descritos na literatura, chegou-se a

conclusão de que TFR-3 tratava-se da cumarina prenilada (-)mexoticina, a qual já havia sido isolada da folhas da referida espécie coletada no Parque Nacional de Guadalupe (Ruangrunsi, 1994).

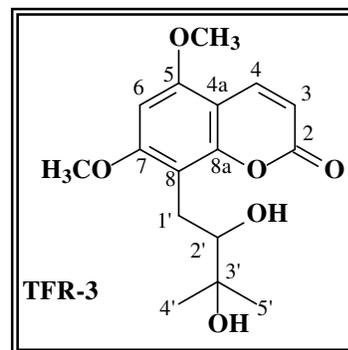


Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 500 MHz, CD_3OD) de TFR-3 e comparação com dados registrados na literatura para a (-)mexoticina (Dondon, 2006).

HMQC			HMBC		Lit.
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
2	162,9	-	H-3	H-4	161,3
3	109,4	6,11 (d, 9,6)	-	-	110,9
4	139,9	8,10 (d, 9,6)	-	-	138,9
4a	103,4	-	-	H-3, H-6	104,0
5	156,1	-	-	3H-OCH ₃ , H-4	155,8
6	90,9	6,59 (s)	-	-	90,4
7	162,4	-	H-6	3H-OCH ₃ , 2H-1'	161,3
8	107,9	-	Hb-1'	H-6	107,6
8a	154,2	-	-	H-4	154,2
1'	24,2	2,93 (d, 5,9)	-	-	25,2
2'	77,4	3,6 (dd, 7,0 e 6,0)	-	3H-4', 3H-5'	78,5
3'	72,7	-	3H-4', 3H-5'		73,0
4'	24,2	1,27 (s)	-	3H-5'	23,9
5'	24,2	1,27 (s)	-	3H-4'	26,2
OCH ₃	55,4	3,95 (s)	-	-	56,0
OCH ₃	55,4	3,95 (s)	-	-	56,2

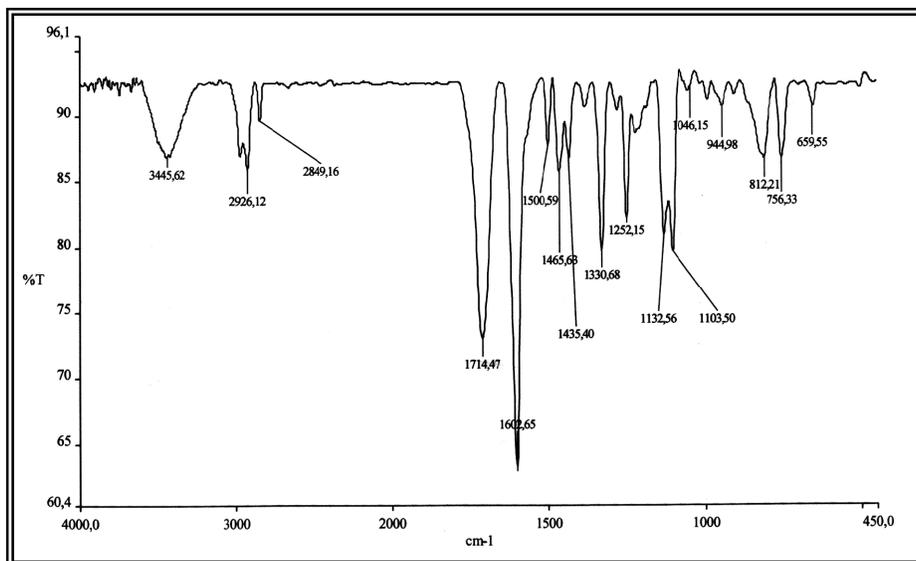


Figura 13. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de TFR-3

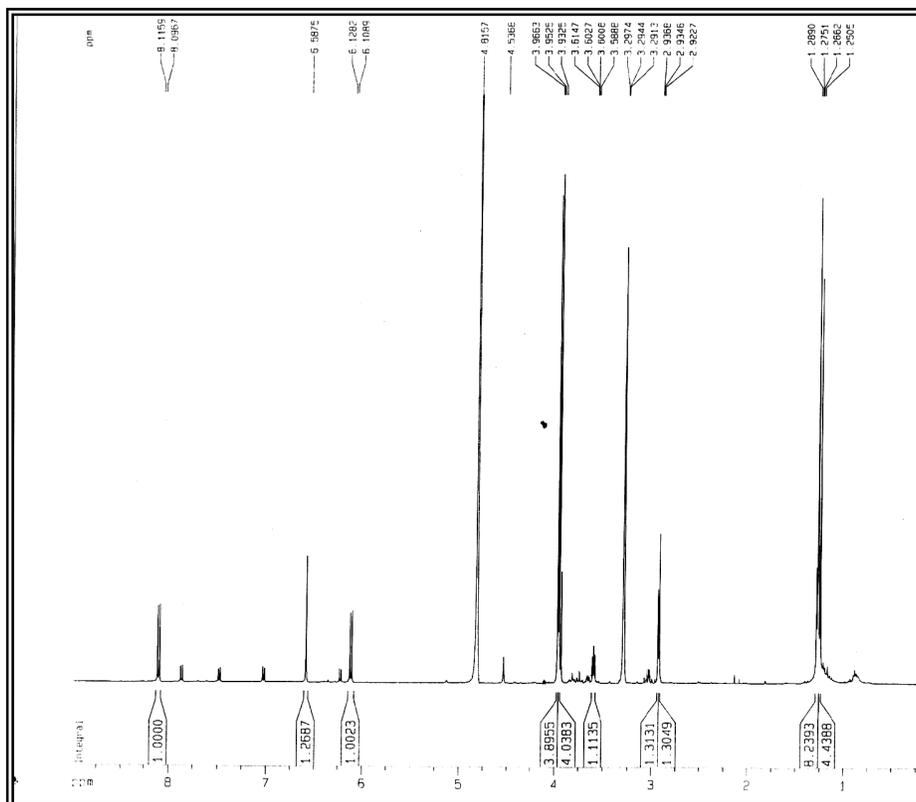


Figura 14. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de TFR-3.

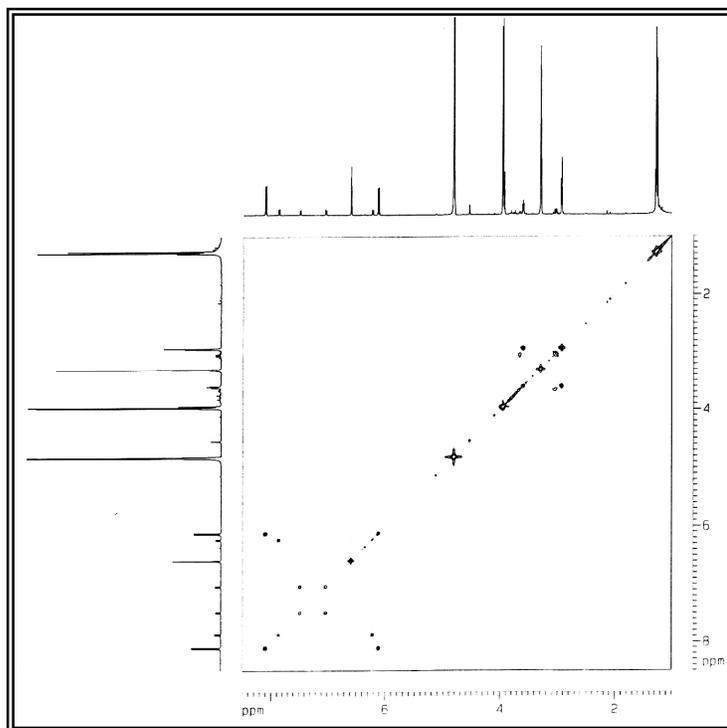


Figura 15. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CD_3OD) de TFR-3.

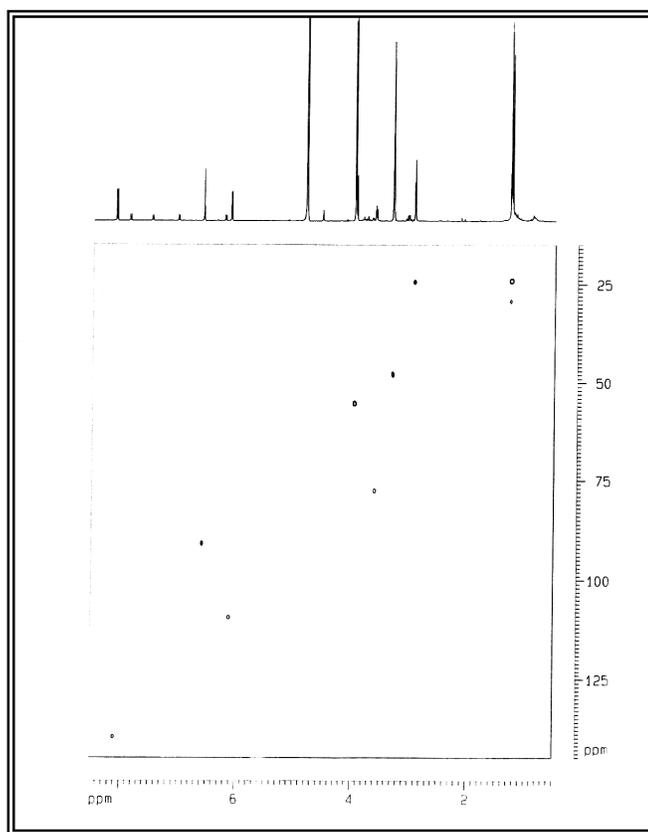


Figura 16. Espectro de RMN - HSQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de TFR-3.

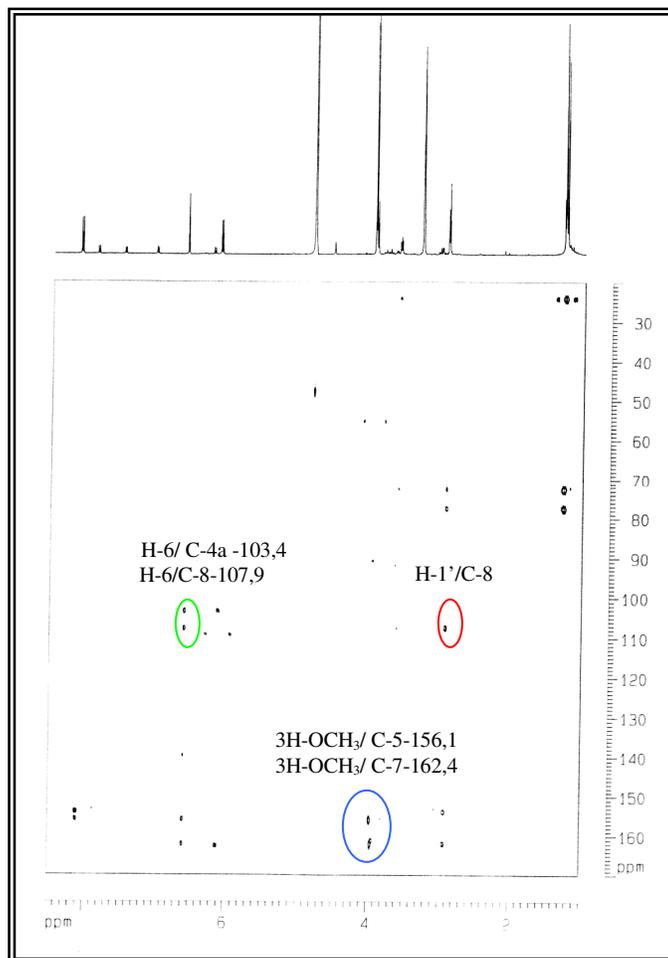
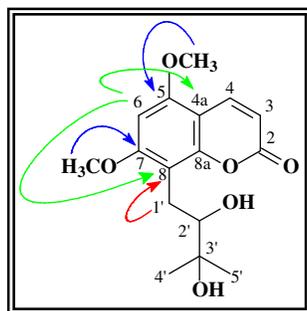


Figura 17. Espectro de RMN - HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de TFR-3.

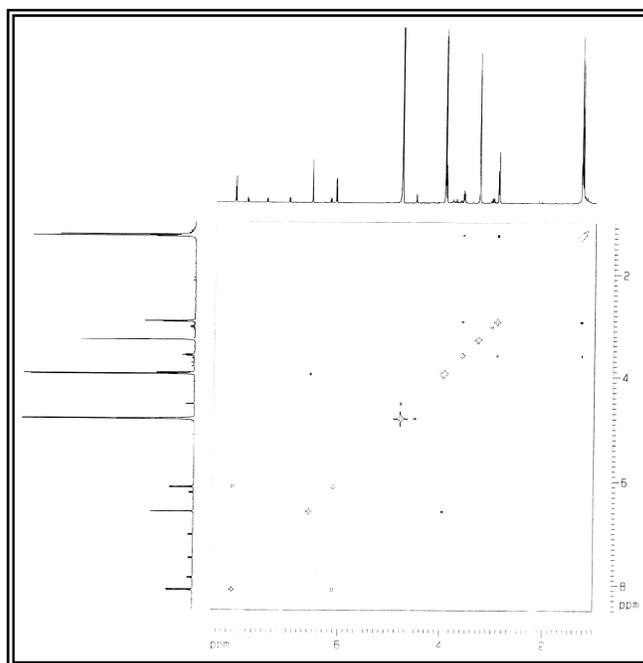


Figura 18. Espectro de RMN ¹H, ¹H - NOESY (500 MHz, CD₃OD) de TFR-3.

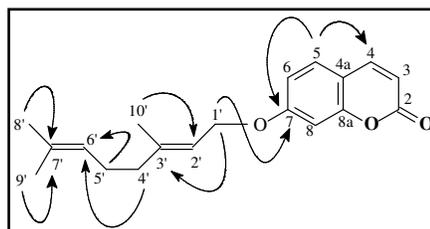
3.1.4. Determinação Estrutural de TFL-1

TFL-1 foi isolada do extrato éter de petróleo/ acetato de etila 1:1, obtido das folhas de *T. trifolia* (Item 4.5.1.2.1, pág. 167). TFL-1 apresentou-se como cristais incolores em forma de agulhas, com faixa de fusão entre 63,2-64,9 °C. Em CCD e sob luz ultravioleta, TFL-1 apresentou uma intensa fluorescência azul, indicativo de cumarinas.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 19, pág. 48) revelou absorções referentes a estiramentos referentes a ligações C=O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1721 cm^{-1}) e C-O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1235-1014 cm^{-1}), sugerindo a existência de um anel lactônico. Absorções referentes a dupla ligação (C=C) foram observadas na faixa de $\lambda_{\text{máx}}$ 1616 a 1507 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H (Fig. 20, pág. 48) apresentou cinco sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Os sinais em δ_{H} 6,20 (d, 9,4 Hz, H-3) e 7,60 (d, 9,4 Hz, H-4) foram inferidos aos hidrogênios ligados aos carbonos α e β de um anel lactônico, característico de cumarinas, enquanto os sinais em δ_{H} 7,32 (d, 8,6 Hz, H-5), 6,80 (dd, 2,4 e 8,6 Hz, H-6) e 6,78 (d, 2,4 Hz, H-8), foram atribuídos a três hidrogênios aromáticos acoplando entre si. Estes dados sugerem a presença de uma cumarina monossubstituída. Adicionalmente foram observados sinais referentes a três grupos metilas δ_{H} (1,57; 1,64 e 1,73), três grupos metilênicos δ_{H} (2,08; 2,08 e 4,57) e dois hidrogênios olefínicos δ_{H} (5,44 e 5,06)

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 21, pág. 49) apresentou 19 linhas espectrais compatíveis com uma cumarina biprenilada. Através da análise comparativa deste espectro e do espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 22, pág. 49) foi possível definir o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono. Sete sinais foram relacionados a carbonos metínicos sp^2 δ_{C} (143,5; 128,7; 123,6; 118,4; 113,3; 112,9; 101,6), três a carbonos metilênicos δ_{C} (65,5; 39,5; 26,3) e três sinais referentes a carbonos metílicos δ_{C} (25,7; 17,7; 16,8), restando portanto, seis carbonos não-hidrogenados δ_{C} (162,2; 161,3; 155,9; 142,4; 131,9; 112,5). O espectro de RMN bidimensional HMQC (Fig. 24, pág. 50) possibilitou correlacionar os sinais de carbono aos seus respectivos hidrogênios (Tab. 6; pág. 47).



Através do espectro bidimensional HMBC (Fig. 25, pág. 51) observou-se a correlação entre o hidrogênio em δ_H (4,57; H-1') com o carbono sp^2 oxigenado em δ_C 162,2 (C-7) e com C-3' (δ_C 142,4). A correlação entre o sinal em δ_H (2,08; H-4') e o carbono sp^2 CH-6' (δ_C 123,6), confirma assim o substituinte como sendo duas unidades isoprênicas encadeadas, bem como sua posição na molécula.

Com base nos dados descritos acima e por comparação com os descritos na literatura, foi possível concluir que o metabólito em questão tratava-se da cumarina conhecida como aurapteno, a qual já havia sido isolada previamente das folhas da referida espécie (Ruangrunsi, 1994).

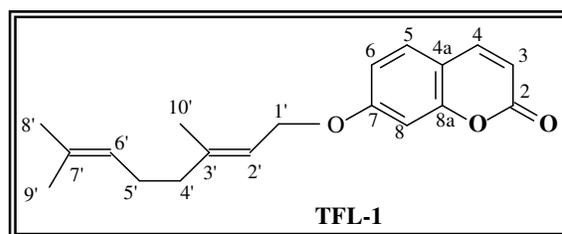


Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e 1H (125 e 500 MHz, $CDCl_3$) de TFL-1 e comparação com dados registrados na literatura para o aurapteno (Abulrob, 2004).

HMQC		HMBC		Lit.	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C
2	161,4	-	H-3	H-4	161,7
3	112,9	6,20 (d, 9,4)	-	-	113,3
4	143,5	7,60 (d, 9,4)	-	-	143,9
4a	112,5	-	H-4, H-5	H-3, H-6, H-8	112,8
5	128,7	7,32 (d, 8,6)	-	H-4	129,1
6	113,3	6,80 (dd, 2,4 e 8,6)	-	H-8	113,7
7	162,2	-	H-6, H-8	H-5, 2H-1'	162,6
8	101,6	6,78 (d, 2,4)	-	H-6	102,0
8a	155,9	-	-	H-4	152,3
1'	65,5	4,57 (d, 6,5)	H-2'	-	65,9
2'	118,4	5,44 (dt, 1,0 e 6,5)	-	H-4', 3H-10'	118,8
3'	142,4	-	2H-4', 3H-10'	2H-1', 2H-5'	142,8
4'	39,5	2,08 (m)	-	-	30,1/39,9
5'	26,3	2,08 (m)	-	-	30,1/39,9
6'	123,6	5,06 (m)	H-5'	3H-9', 3H-10', H-4'	124,0
7'	132,0	-	3H-9', 3H-10'	H-5'	132,4
8'	25,7	1,64 (s)	-	-	18,1/29,8
9'	17,7	1,57 (s)	-	-	18,1/29,8
10'	16,8	1,73 (s)	-	H-2'	17,2

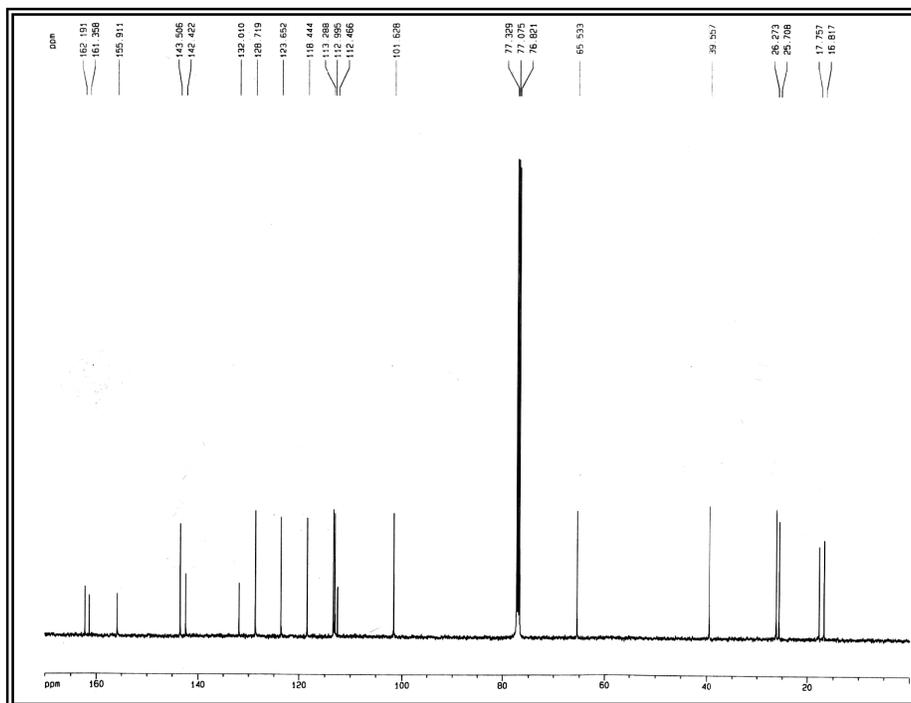


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C - BB (125 MHz, CDCl_3) de TFL-1.

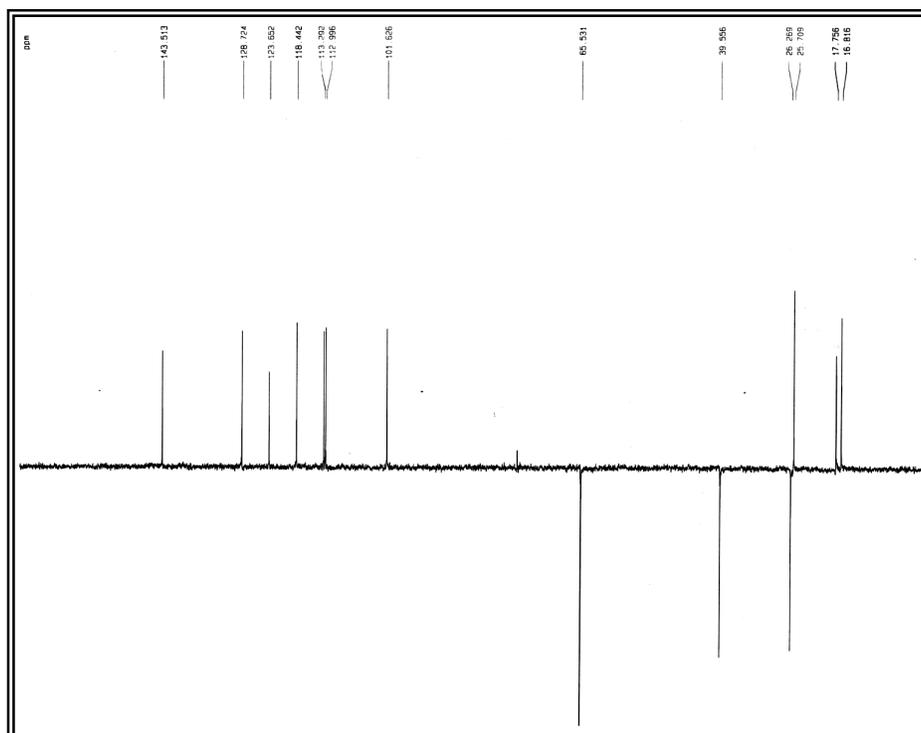


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TFL-1.

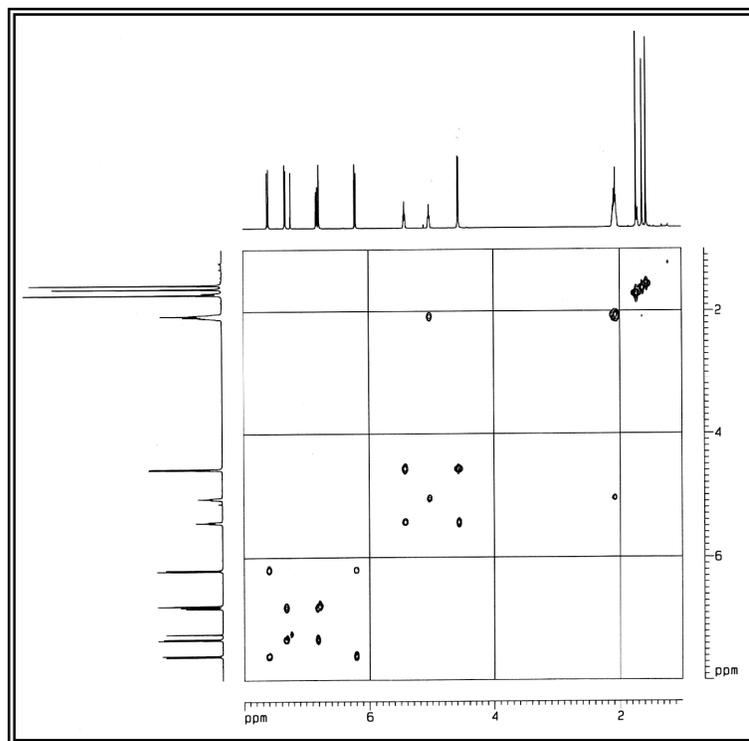


Figura 23. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CDCl_3) de TFL-1.

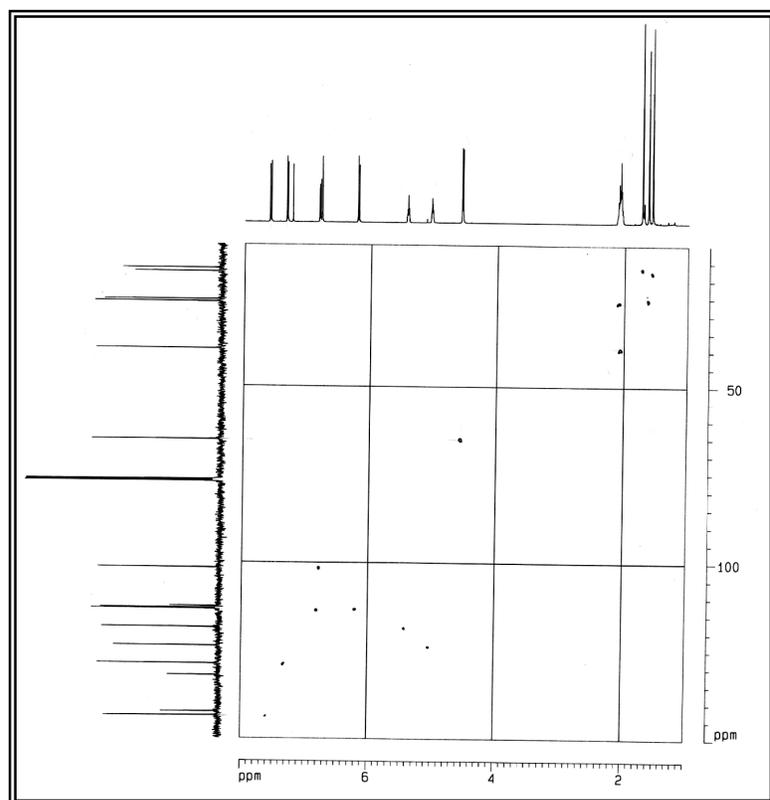


Figura 24. Espectro de RMN - HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de TFL-1.

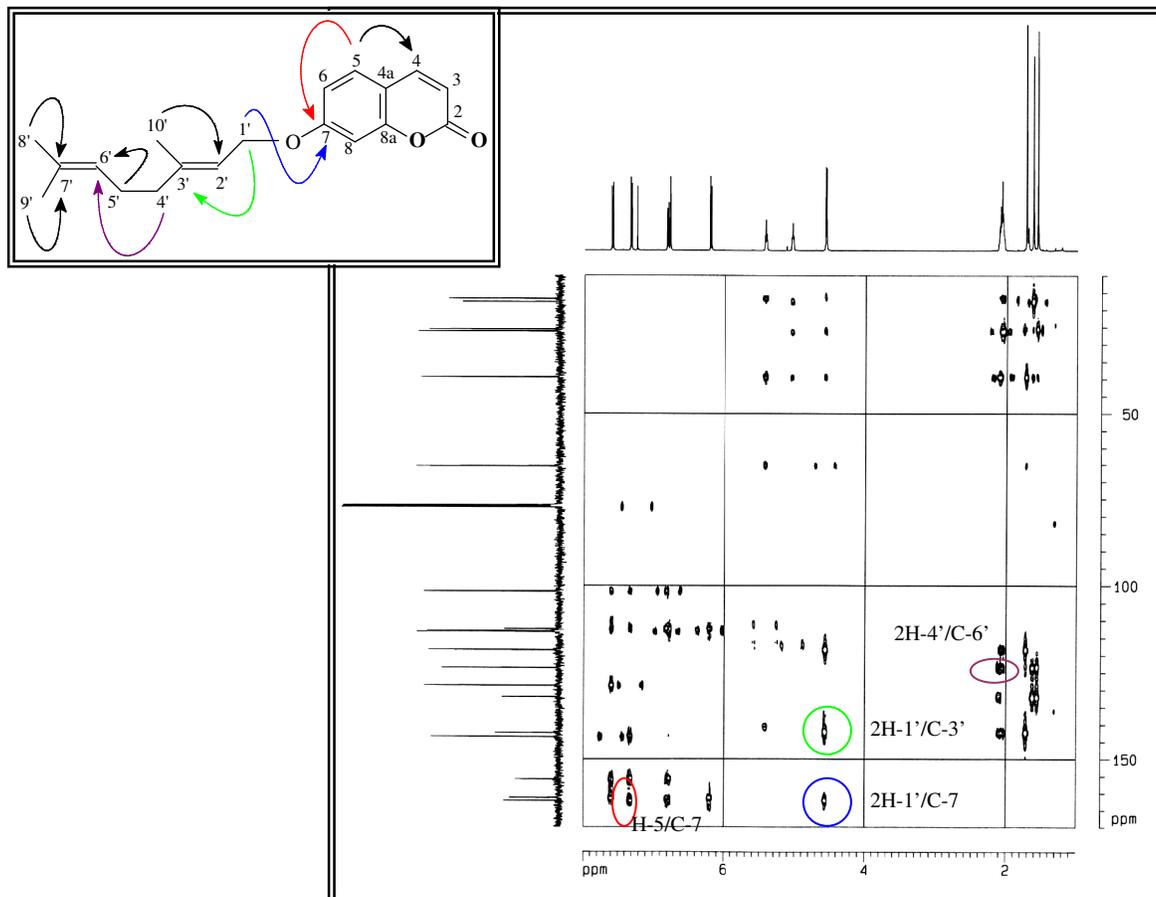


Figura 25. Espectro de RMN - HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de TFL-1.

3.1.5. Determinação Estrutural de TFL-2

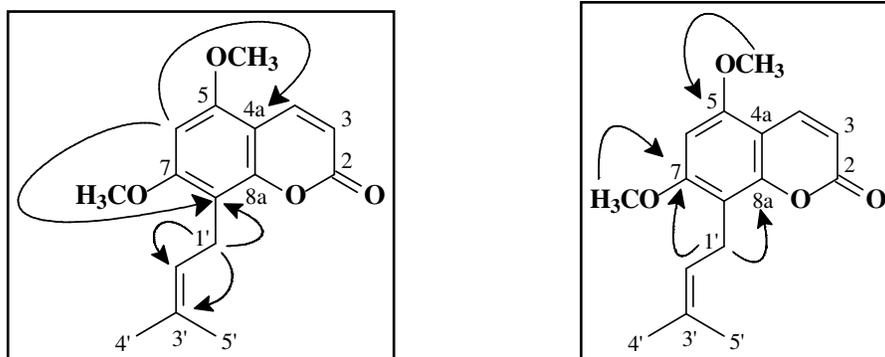
A substância denominada TFL-2, obtida a partir do extrato éter de petróleo/ acetato de etila 1:1 das folhas de *T. trifolia* (Item 4.5.1.2.1, pág. 167), mostrou-se como um sólido amorfo branco, com faixa de fusão entre 147,9-149,0 °C. Este metabólito, em CCD, revelou uma forte fluorescência azul ao ser exposto a luz ultravioleta, uma característica das cumarinas.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 26, pág. 55) revelou absorções referentes a estiramentos de ligações C=O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1712 cm^{-1}) e C-O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1251-1096 cm^{-1}), caracterizando a existência de um anel cumarínico, bem como a natureza oxigenada de TFL-2.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 27, pág. 55) apresentou sinais na região de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,13 (d, 9,7 Hz, H-3) e 7,97 (d, 9,5 Hz, H-4) característicos de hidrogênios de um anel lactônico, atribuído a cumarinas. O sinal em δ_{H} 6,32 (s, H-6) foi caracterizado como um hidrogênio aromático, enquanto o sinal em δ_{H} 5,20 (m, H-2') como um hidrogênio de um sistema olefínico. Observou ainda um sinal intenso em δ_{H} 3,92, que com base na intensificação são referentes a dois grupos metoxilas; dois sinais em δ_{H} 1,82 e 1,66 referentes a grupos metilas, além de um dubleto em δ_{H} 3,44 (7,2 Hz). Como base neste experimento foi possível sugerir um anel cumarínico com três substituintes, sendo dois deles grupos metoxilas, os quais foram *meta*-posicionados.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 28, pág. 56) apresentou 16 linhas espectrais. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 29, pág. 56) permitiu determinar o padrão de substituição correspondente a cada átomo de carbono, inclusive o número de carbonos não-hidrogenados. Foram identificados quatro carbonos metílicos, incluindo dois grupos metoxilas δ_{C} (18,1; 25,9; 56,1; 56,2), um carbono metilênico δ_{C} (21,6), quatro carbonos monohidrogenados δ_{C} (90,6; 110,9; 122,0; 138,9) e sete carbonos não-hidrogenados δ_{C} (104,0; 110,4; 132,3; 153,7; 155,4; 161,1; 161,8). O espectro HSQC (Fig. 31, pág. 57) possibilitou correlacionar de forma inequívoca, os sinais de carbono e hidrogênios diretamente ligados (Tab. 7, pág. 54).

Através do experimento HMBC (Fig. 32, pág. 58), o substituinte ligado ao carbono C-8, trata-se de uma prenila contendo uma dupla ligação e foi posicionada orto a um grupo metoxila, justificada através das correlações entre os sinais de hidrogênios em δ_H 3,92 (OCH₃-7) e 3,44 (2H-1') com o sinal de carbono em δ_C 161,1 (C-7). Outras correlações importantes estão sumarizadas abaixo.



Com base nos dados discutidos acima pode-se concluir que TFL-2 trata-se da cumarina denominada coumurraina, a qual já havia sido isolada de *Murraya paniculata* (Wu, 1980), no entanto, não existem relatos na literatura sobre o isolamento deste composto para a planta em estudo.

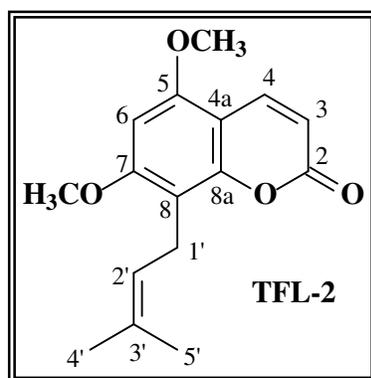


Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 500 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	161,9	-	H-3	H-4
3	110,9	6,13 (d, 9,7)	-	-
4	138,9	7,97 (d, 9,5)	-	-
4a	104,0	-	-	H-3, H-6
5	155,4	-	H-6	3H-OCH ₃ , H-4
6	90,6	6,32 (s)	-	-
7	161,1	-	H-6	3H-OCH ₃ , 2H-1'
8	110,4	-	2H-1'	H-6
8a	153,7	-	-	H-4, 2H-1'
1'	21,6	3,44 (d, 7,2)	-	-
2'	122,0	5,20 (m)	2H-1'	3H-4', 3H-5'
3'	132,3	-	3H-4', 3H-5'	2H-1'
4'	25,9	1,66 (s)	-	3H-5'
5'	18,1	1,83 (s)	-	3H-4'
OCH ₃	56,1	3,92 (s)	-	-
OCH ₃	56,2	3,92 (s)	-	-

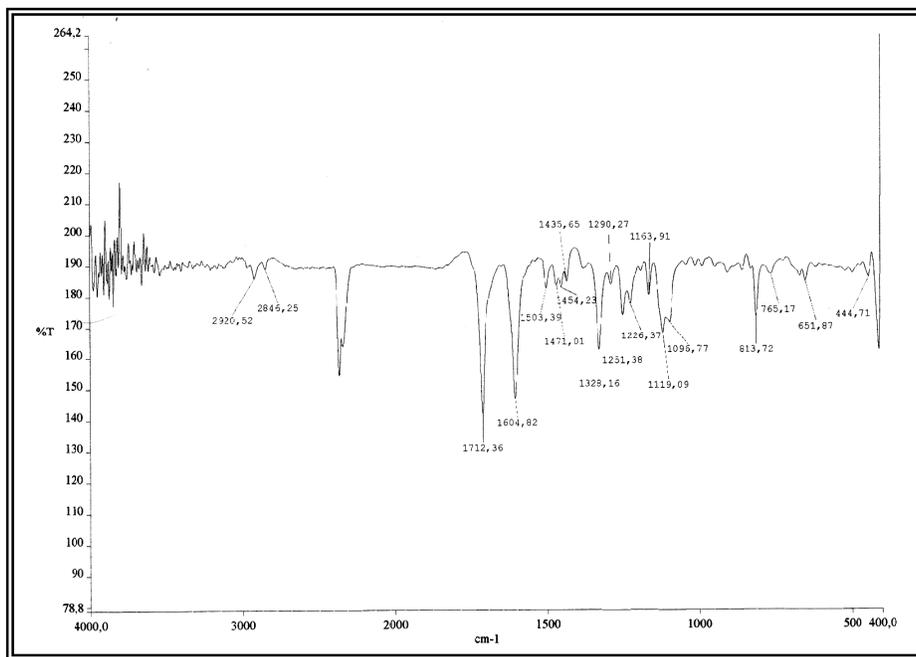


Figura 26. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de TFL - 2

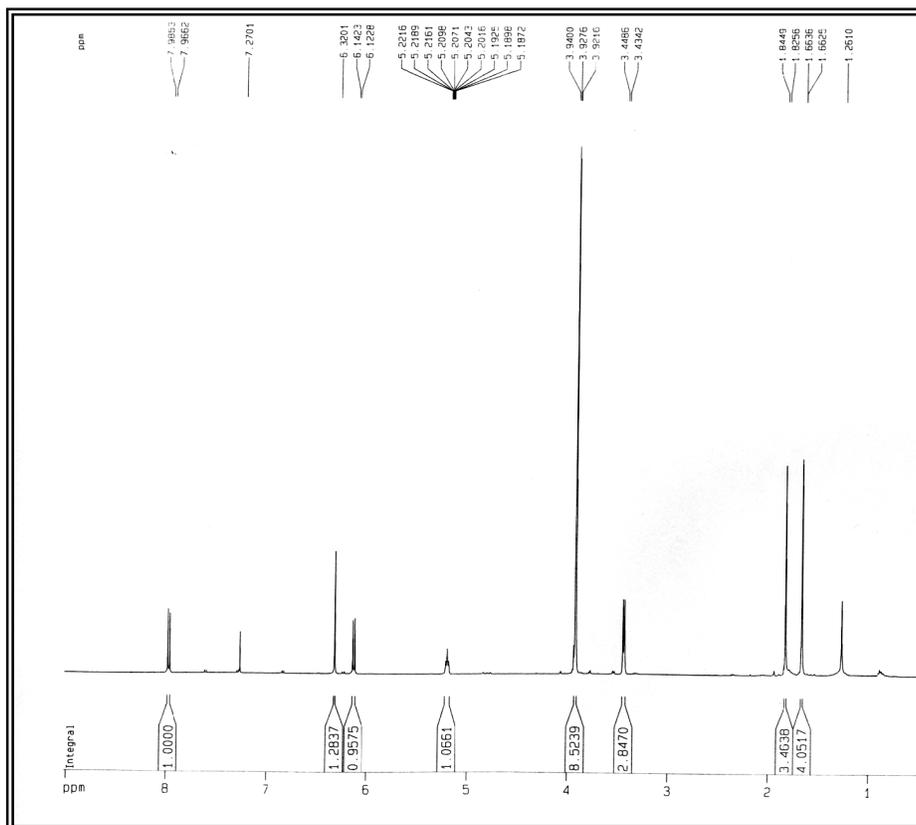


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

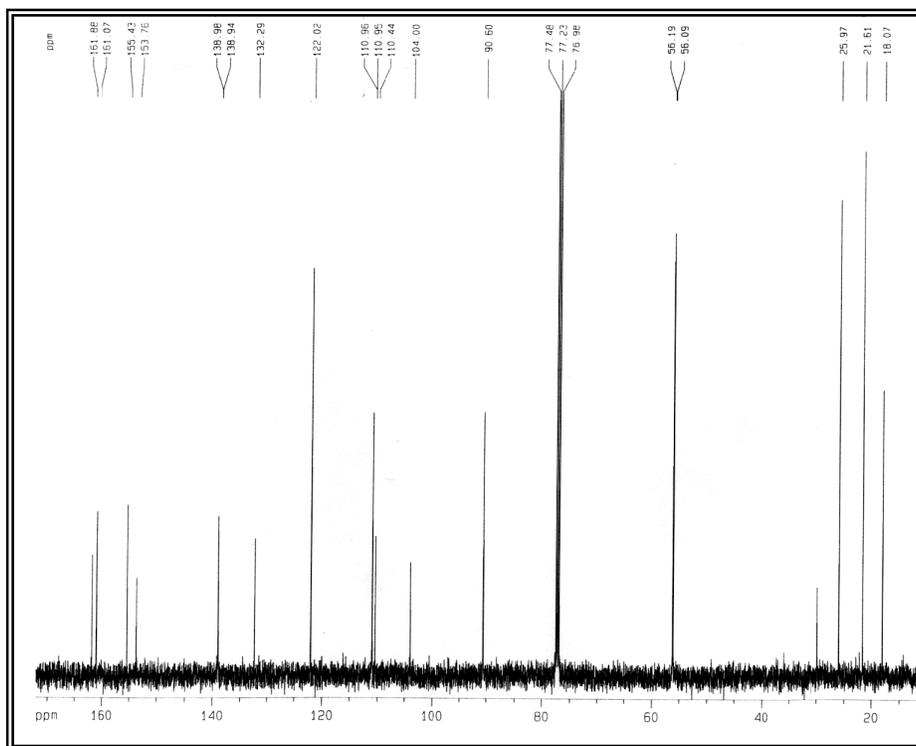


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

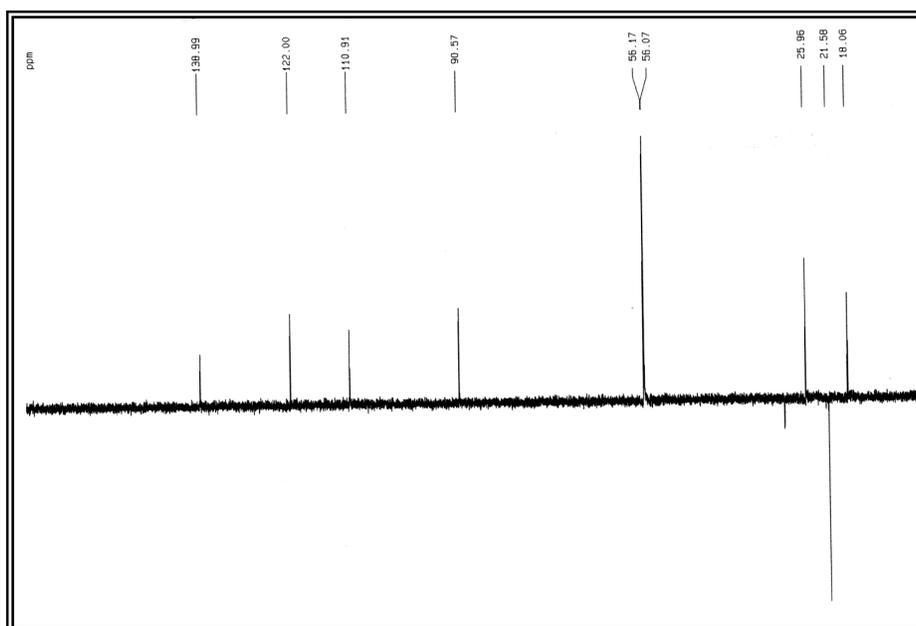


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

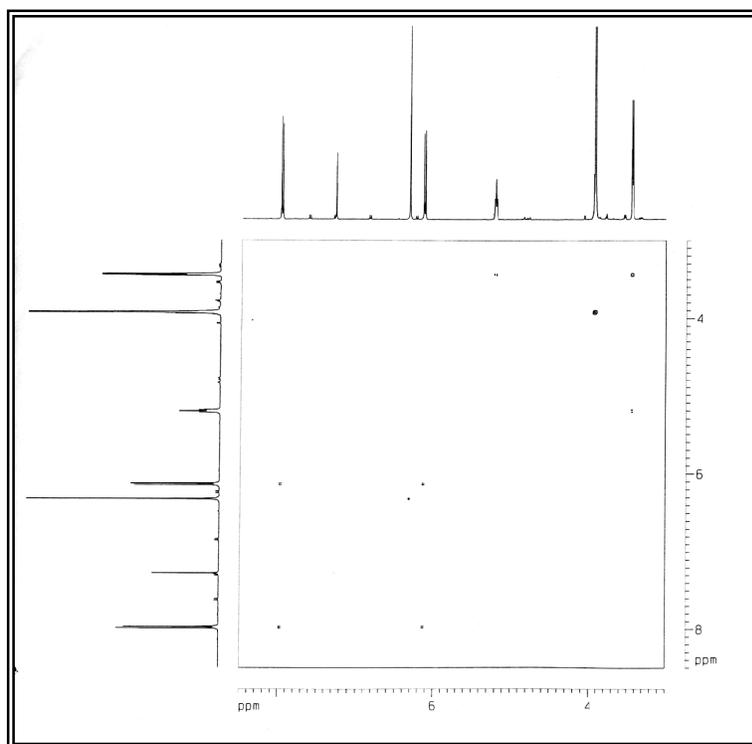


Figura 30. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

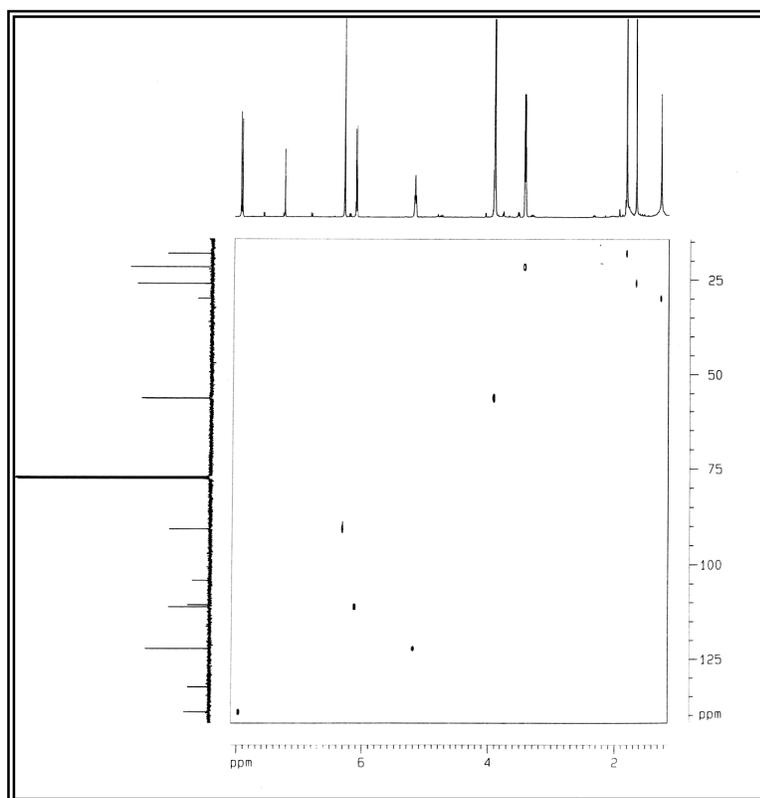


Figura 31. Espectro de RMN - HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

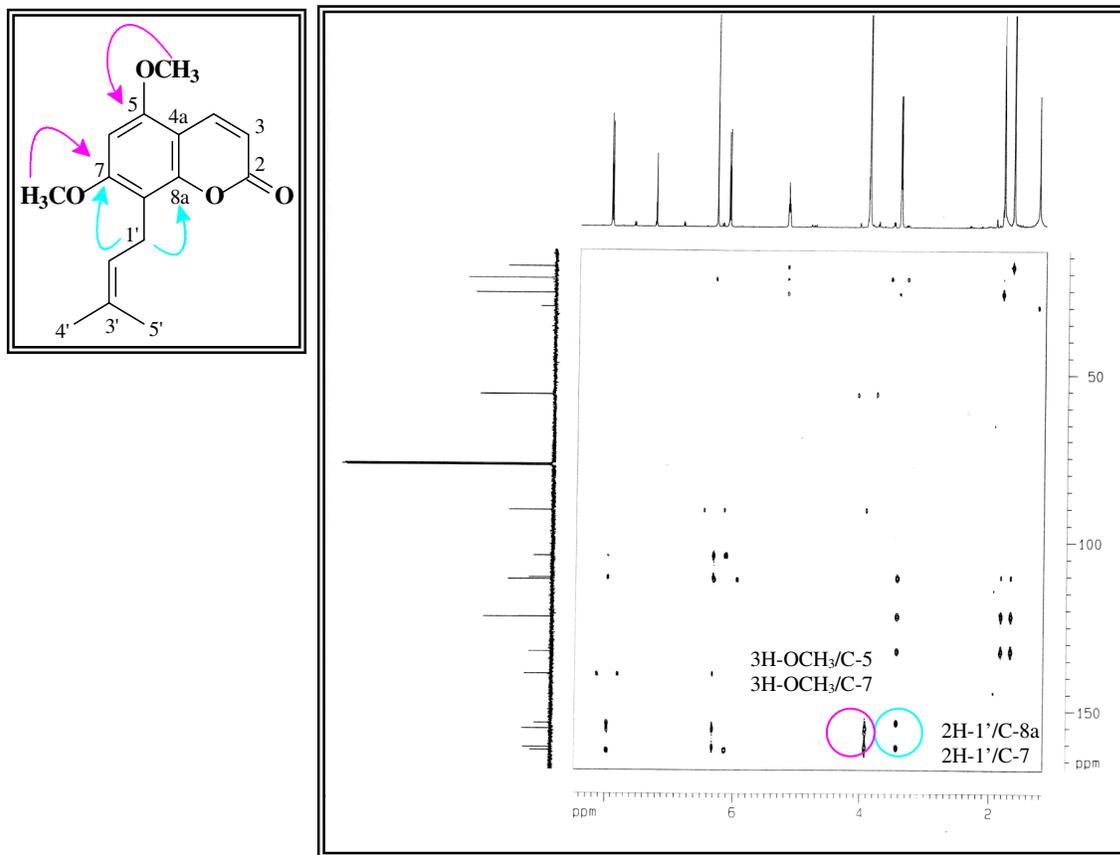


Figura 32. Espectro de RMN - HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de TFL-2.

3.1.6. Determinação estrutural de TFL-3

TFL-3 foi isolada do extrato éter de petróleo/ acetato de etila 1:1 das folhas de *T. trifolia* (Item 4.5.1.2.2, pág. 168), apresentando-se como sólido branco, com faixa de fusão entre 108,1-110,2°C. Em CCD e sob luz ultravioleta, TFL-3 mostrou-se como uma forte fluorescência azul.

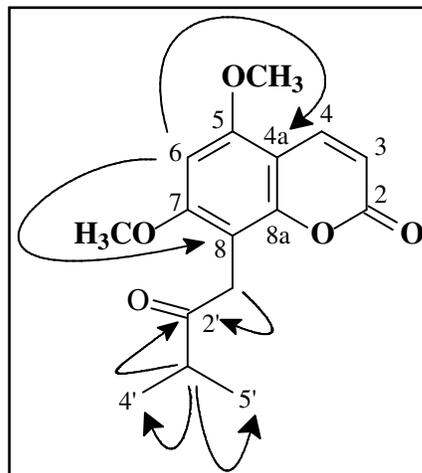
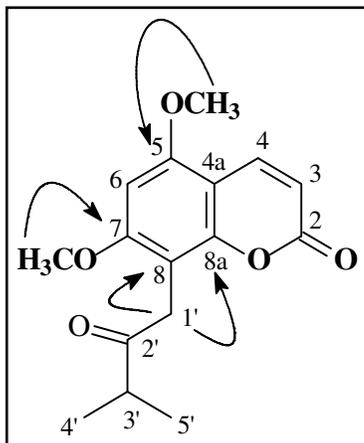
O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 33, pág. 62) revelou absorções referentes a estiramentos de ligações C=O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1723 cm^{-1}) e C-O ($\lambda_{\text{máx}}$ 1252-1030 cm^{-1}), característico da existência de um anel cumarínico.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 34, pág. 62) apresentou sinais na região de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,12 (d, 9,6 Hz, H-3) e 7,97 (d, 9,6 Hz, H-4) característicos de hidrogênios do anel lactônico das cumarinas, enquanto o sinal em δ_{H} 6,33 (s) foi compatível com um hidrogênio de anel aromático, *orto* a função oxigenada. Ainda no espectro de hidrogênio pode-se observar dois sinais intensos em δ_{H} 3,93 e 3,87 referentes a duas metoxilas, sinais em δ_{H} 3,91 (s, H-1') referentes a um grupo metilênico e sinais em δ_{H} 2,79 (hept, 6,9 Hz, H-3') e 1,19 (d, 6,9 Hz, H-4' e H-5') evidenciando a presença de um grupo isopropila.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 35, pág. 63) apresentou linhas espectrais correspondentes a 16 átomos de carbono, que com o auxílio da técnica DEPT-135° (Fig. 36, pág. 63) foi possível determinar a presença de quatro carbonos metílicos δ_{C} (56,2; 56,3; 18,6; 18,6), sendo duas metoxilas; um carbono metilênico δ_{C} (34,5) e quatro carbonos monohidrogenados δ_{C} (138,9; 111,1; 90,6; 40,9). Por subtração dos referidos espectros, constatou-se a presença de sete carbonos não-hidrogenados δ_{C} (211,3; 161,5; 161,4; 156,5; 154,2; 104,5; 104,1), dos quais dois foram compatíveis com carbonilas, uma de anel lactônico de cumarina δ_{C} (161,5) e outra referente a uma cetona δ_{C} (211,3). O espectro bidimensional HMQC (Fig. 38, pág. 64) possibilitou correlacionar carbonos e hidrogênios diretamente ligados (Tab. 8, pág. 61).

O experimento HMBC (Fig. 39, pág. 65) possibilitou confirmar a posição dos substituintes, por exemplo, a correlação entre os hidrogênios das metoxilas (δ_{H} 3,92) com os carbonos em δ_{C} 156,5 (C-5) e 161,4 (C-7), e também a correlação a duas e a três ligações entre os hidrogênios 2H-1' (δ_{H} 3,91) e os carbonos C-8 (δ_{C} 104,5) e C-8a (δ_{C}

154,2), respectivamente. Observou-se ainda a correlação a três ligações entre o hidrogênio H-6 (δ_H 6,33) e os carbonos C-8 e C-4a.



Levando em consideração todos os dados acima discutidos, o referido composto foi caracterizado como sendo a isosibiricina, cumarina isolada anteriormente de *Murraya paniculata* (Wu, 1980). Apesar de conhecida não existem relatos na literatura em relação ao isolamento deste composto na planta em estudo.

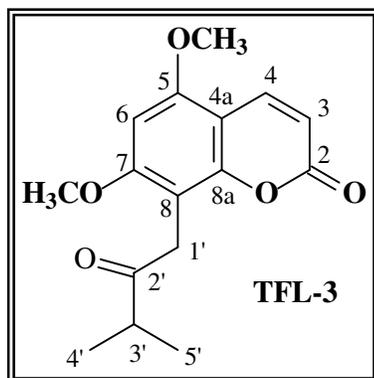


Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 500 MHz, CDCl_3) de TFL-3.

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	161,5	-	H-3	H-4
3	111,1	6,12 (d, 9,6)	-	-
4	138,9	7,97 (d, 9,6)	-	-
4a	104,1	-	-	H-3, H-6
5	156,5	-	- H-6	3H-OCH ₃ , H-4,
6	90,6	6,33 (s)	-	-
7	161,4	-	H-6	3H-OCH ₃ , 2H-1'
8	104,5	-	2H-1'	H-6
8a	154,2	-	-	H-4, 2H-1'
1'	34,5	3,91 (s)	-	-
2'	211,3	-	2H-1', H-3'	3H-4', 3H-5'
3'	40,9	2,79 (hept, 6,9)	3H-4', 3H-5'	-
4'/5'	18,6	1,19 (d, 6,9)	H-3'	3H-4', 3H-5'
OCH ₃	56,2	3,92 (s)	-	-
OCH ₃	56,3	3,92 (s)	-	-

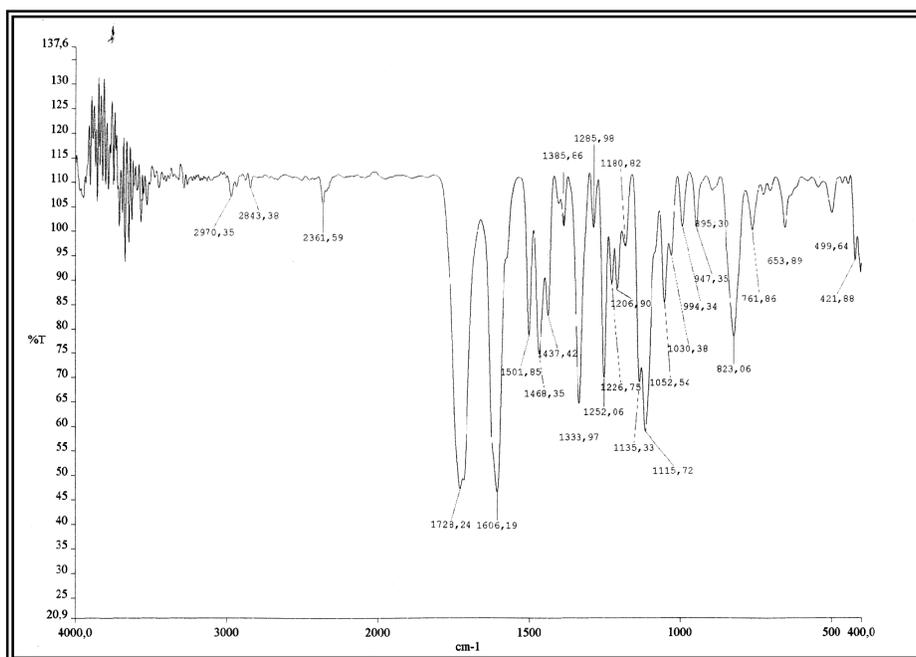


Figura 33. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de TFL - 3

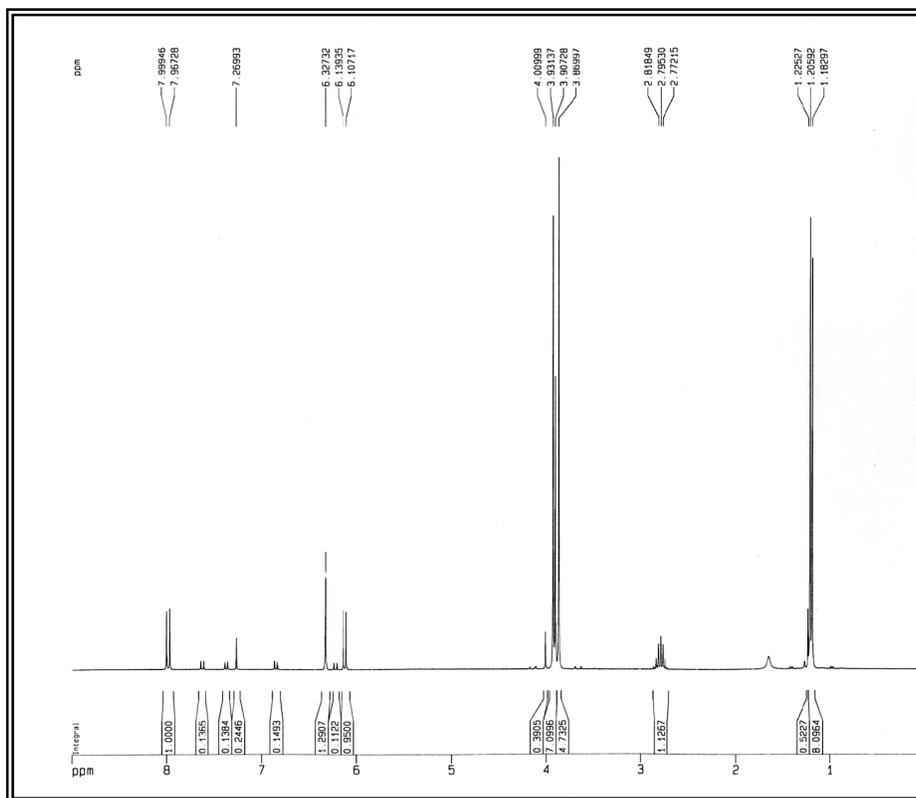


Figura 34. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de TFL-3.

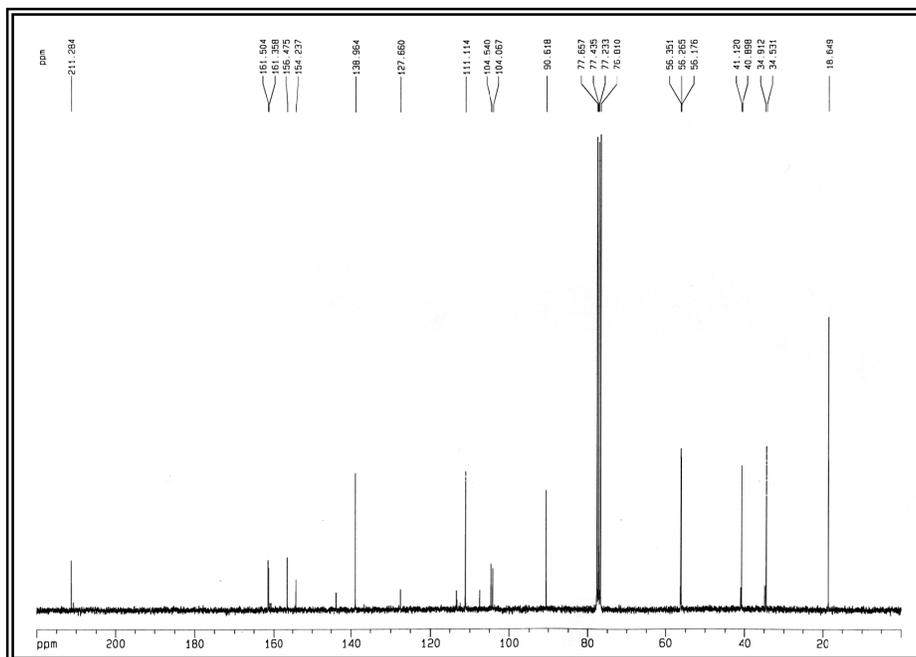


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C - BB (75 MHz, CDCl_3) de TFL-3.

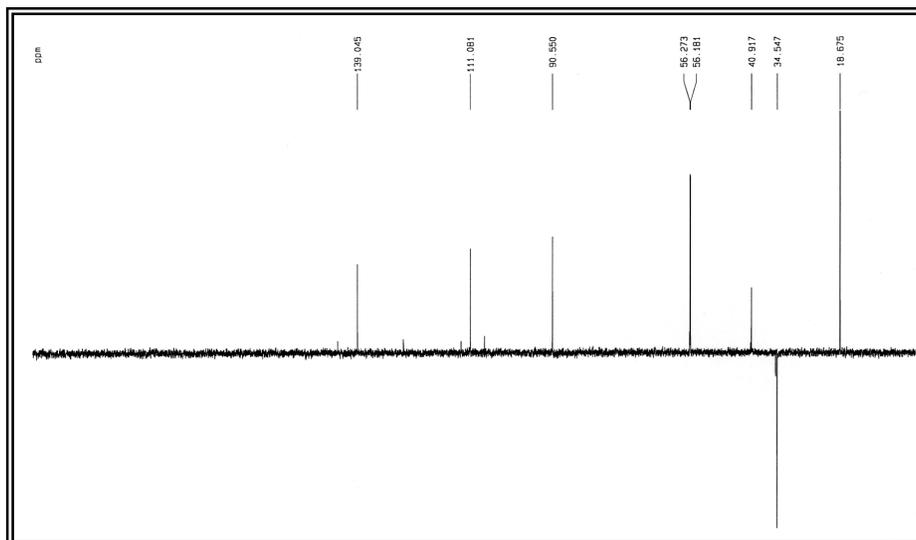


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de TFL-3.

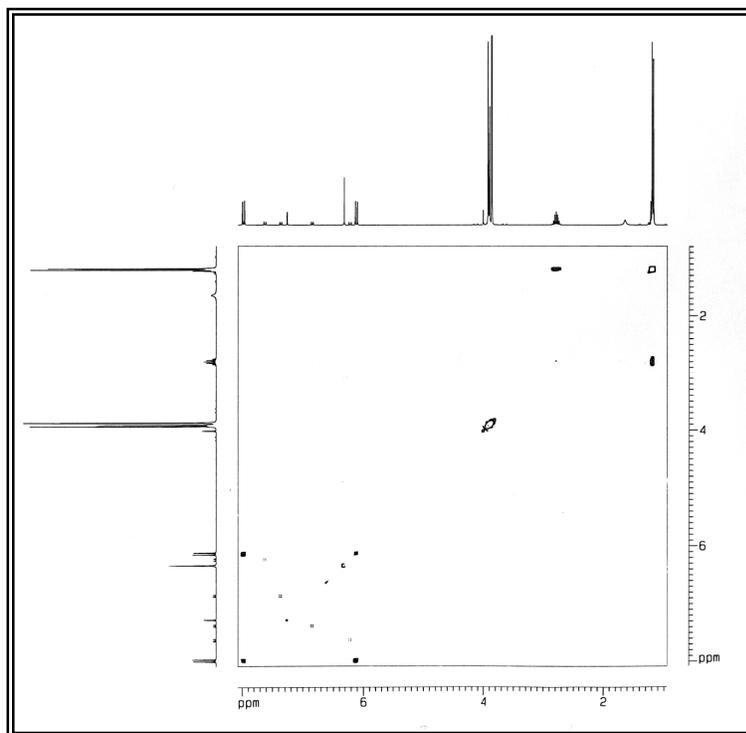


Figura 37. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (300 MHz, CDCl_3) de TFL-3.

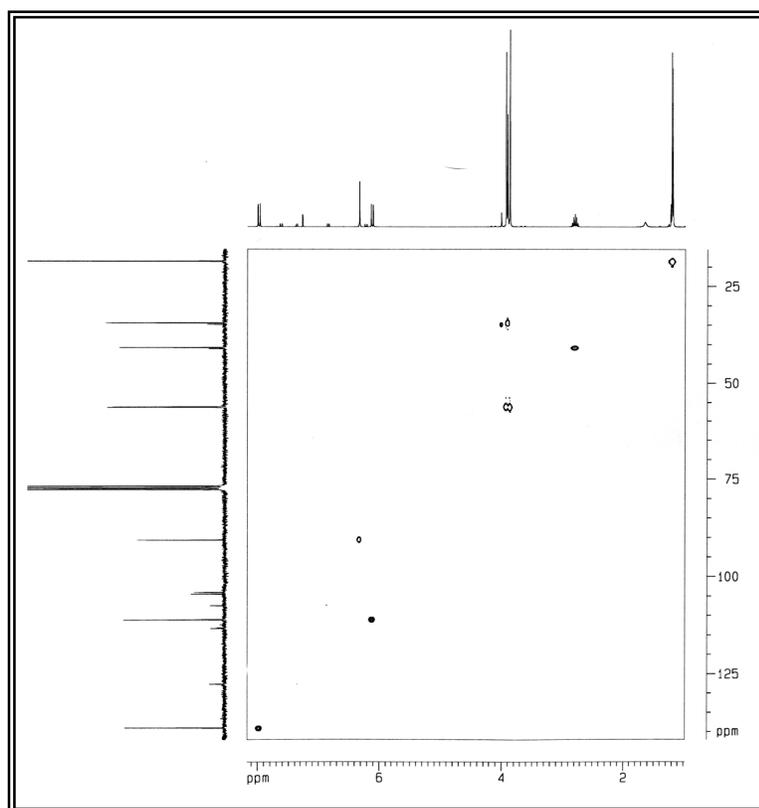


Figura 38. Espectro de RMN-HMBC (300 e 75 MHz, CDCl_3) de TFL-3.

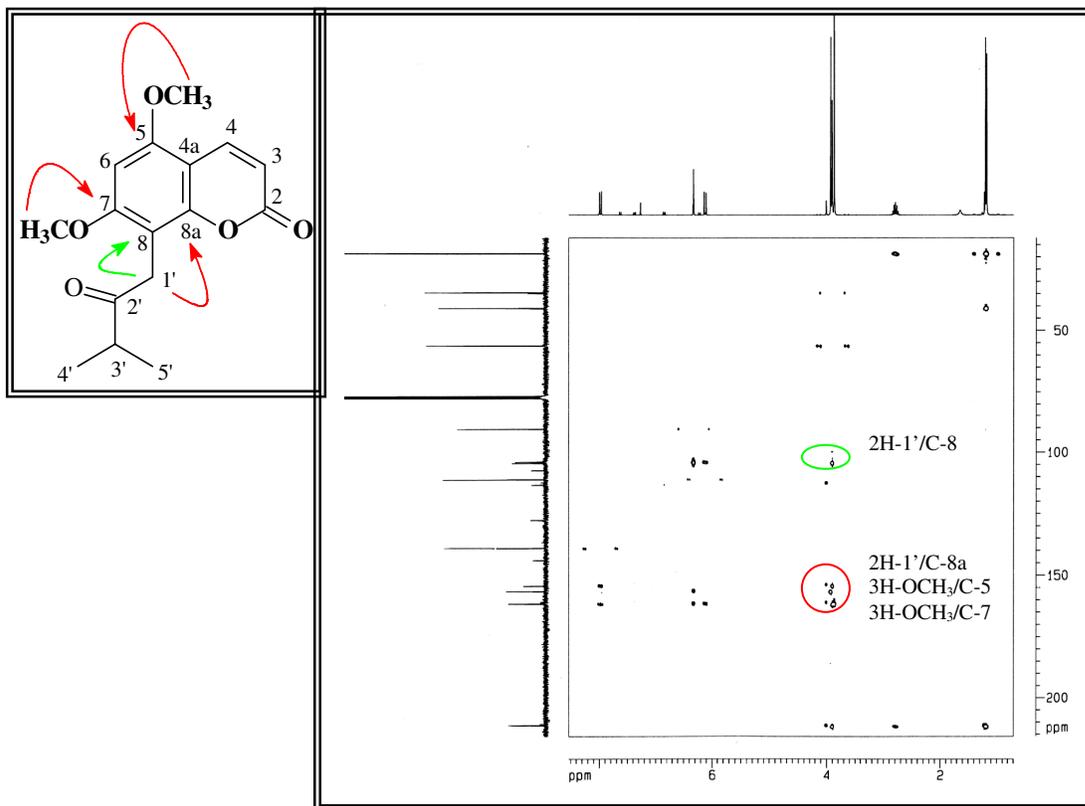


Figura 39. Espectro de RMN-HMBC (300 e 75 MHz, CDCl₃) de TFL-3.

3.1.7. Determinação estrutural de TFL-4

A substância denominada TFL-4 foi isolada do extrato etanólico das folhas de *T. trifolia* (Item 4.5.1.3.2, pág. 134). Este metabólito secundário apresentou-se como resina amarela e sob luz ultravioleta, em CCD, revelou também uma intensa fluorescência azul.

A exemplo dos outros compostos isolados, o espectro de RMN ^1H (Fig. 40, pág. 68) apresentou sinais na região de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,12 (d, 9,4 Hz, H-3) e δ_{H} 7,55 (d, 9,4 Hz, H-4) evidenciando a presença de anel lactônico de cumarinas. Os sinais em δ_{H} 7,29 (d, 8,6 Hz, H-5) e 6,77 (d, 8,6 Hz, H-6) foram compatíveis com hidrogênios de um sistema aromático *orto* posicionados. O sinal em δ_{H} 3,79, foi compatível com a presença de um grupo metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 41, pág. 68) apresentou 14 linhas espectrais compatíveis com uma cumarina prenilada contendo um grupo metoxila. Com o auxílio do espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 42, pág. 69) foi possível definir os cinco sinais δ_{C} (143,8; 127,6; 113,0; 107,2; 40,9) para carbonos monohidrogenados, um carbono metilênico (δ_{C} 34,7) e dois carbonos metílicos (δ_{C} 56,2; 18,5), sendo um referente a uma metoxila e o outro a dois grupos metilas. Por subtração dos espectros BB e DEPT 135° os demais sinais de carbono são portanto, referentes a seis carbonos não-hidrogenados δ_{C} (210,9; 161,1; 160,5; 153,2; 112,9; 111,9).

Análise comparativa dos dados de TFL-4 com àqueles registrados na literatura, permitiu identificar o metabólito secundário em discussão como sendo a isomerazina, a qual já havia sido isolada das folhas da referida espécie, coletada no Parque Nacional de Guadalupe (Abaul, 1994).

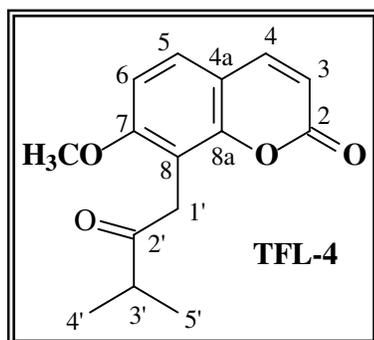


Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 300 MHz, CDCl_3) de TFL-4 e comparação com dados da literatura para a isomerazina (Abaul, 1994).

HMQC			Literatura	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	161,1	-	160,9	-
3	113,1	6,12 (d, 9,4)	112,9	6,17 (d, 9,0)
4	143,8	7,55 (d, 9,4)	143,8	7,60 (d, 9,0)
4a	112,9	-	111,9	-
5	127,5	7,29 (d, 8,6)	127,5	7,34 (d, 8,5)
6	107,3	6,77 (d, 8,6)	107,2	6,82 (d, 8,5)
7	160,5	-	160,4	-
8	111,9	-	112,9	-
8a	153,2	-	153,2	-
1'	34,7	3,93 (s)	34,7	3,98 (s)
2'	210,9	-	210,7	-
3'	40,9	2,75 (hept, 6,9)	40,8	2,81 (hept, 7,0)
4'/5'	18,5	1,14 (d, 6,9)	18,4	1,21 (d, 7,0)
OCH ₃	56,2	3,79 (s)	56,1	3,86 (s)

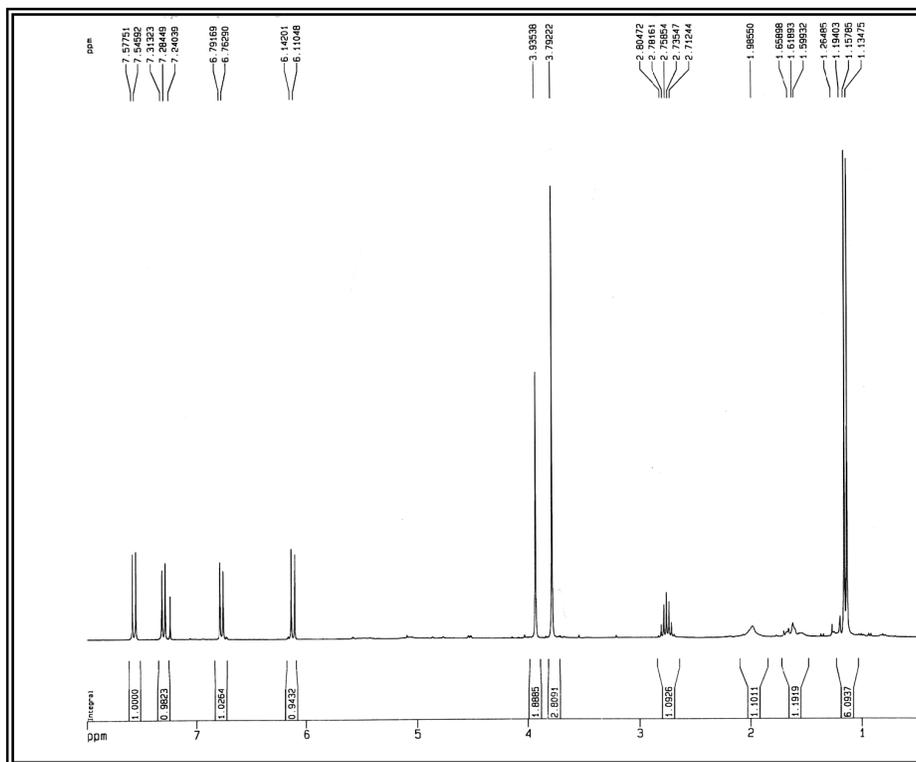


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de TFL-4.

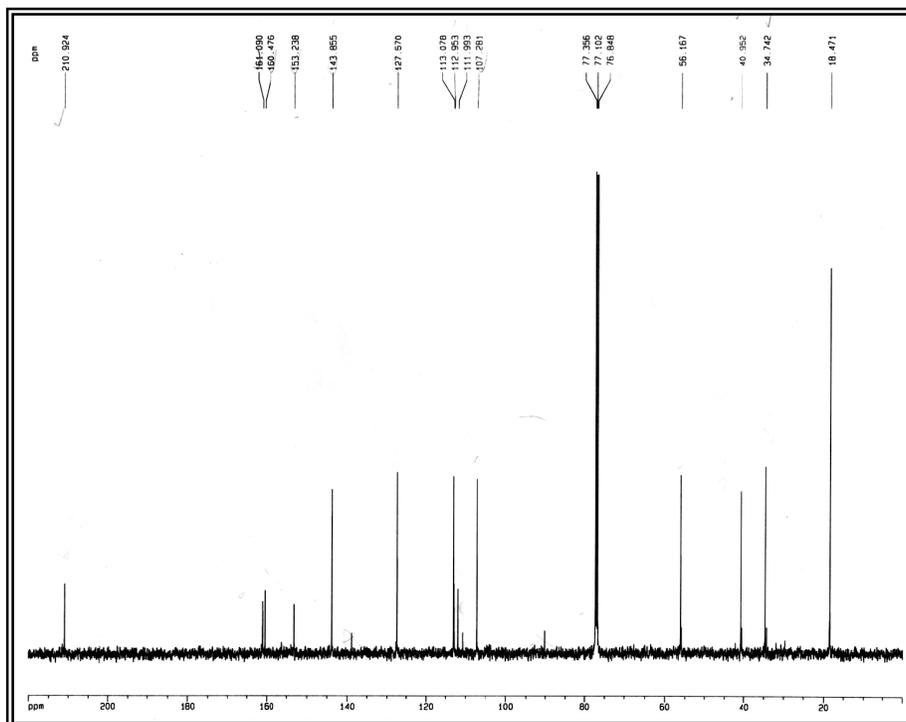


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de TFL-4.

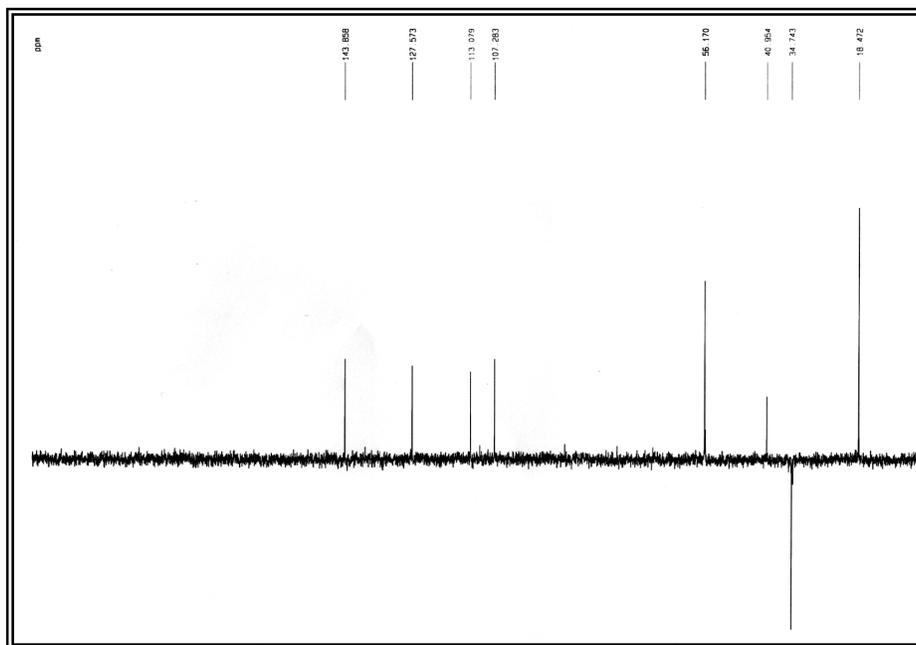


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de TFL-4.

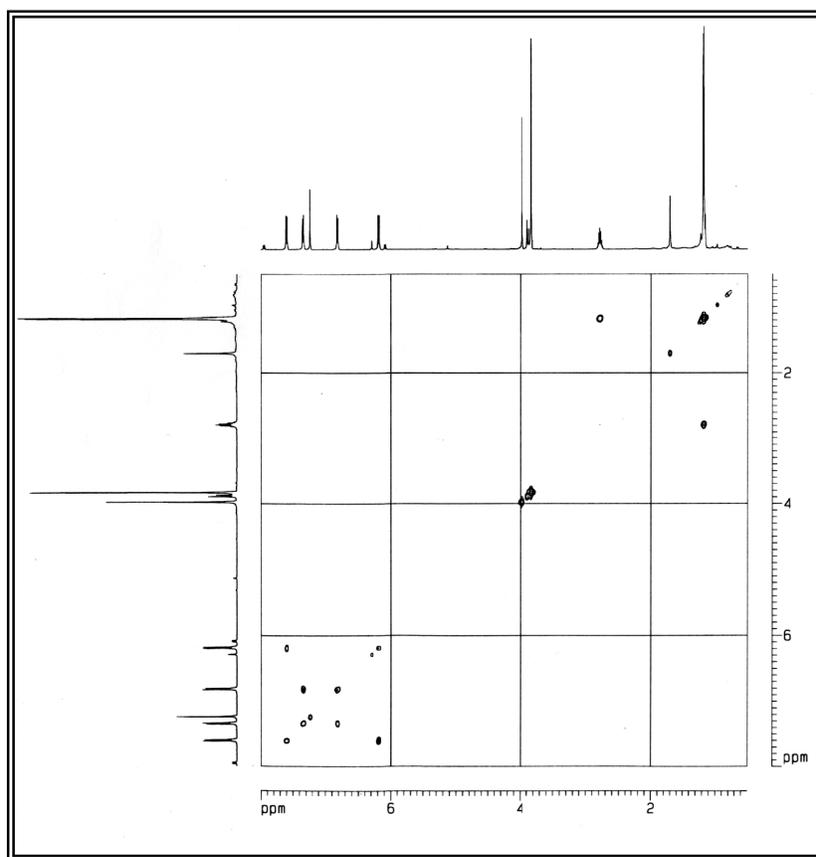


Figura 43. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (300 MHz, CDCl_3) de TFL-4.

3.1.8. Determinação Estrutural de TFL-5

A fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *T. trifolia* (Item 4.5.1.3.3, pág. 172) forneceu um precipitado de cor amarela, o qual foi purificado com adição de metanol e filtração. Ao final deste procedimento, TFL-5, mostrou-se como um sólido amorfo amarelo claro, com ponto de fusão 248,0-250,1 °C.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 44 e 45, pág. 73) apresentou dois singletos em δ_{H} 6,78 (H-3), 6,27 (H-6) e dois dubletos em δ_{H} 8,02 (8,7 Hz, H-2' e H-6') e 6,87 (8,7 Hz, H-3' e H-5'), cada um com integração para dois átomos de hidrogênios, compatíveis com hidrogênios aromáticos em anéis *para* substituídos. Observou-se também um sinal em δ_{H} 13,2 referente a uma hidroxila quelada, além de sinais na faixa de δ_{H} 4,68 a 3,23, característicos de uma unidade de açúcar.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 46, pág. 74) revelou a presença de dezenove linhas espectrais, entretanto as intensidades relativamente altas das linhas em δ_{C} 128,9 e 115,8 sugeriram que cada uma delas represente dois átomos de carbono. Esta suposição foi confirmada através do espectro HMQC (Fig. 48, pág.75), onde cada uma destas linhas foi correlacionada a sinais correspondentes cada um a dois átomos de hidrogênios. Desta forma, TFL-5 possui vinte e um átomos de carbono em sua composição (Tab. 10, pág. 72).

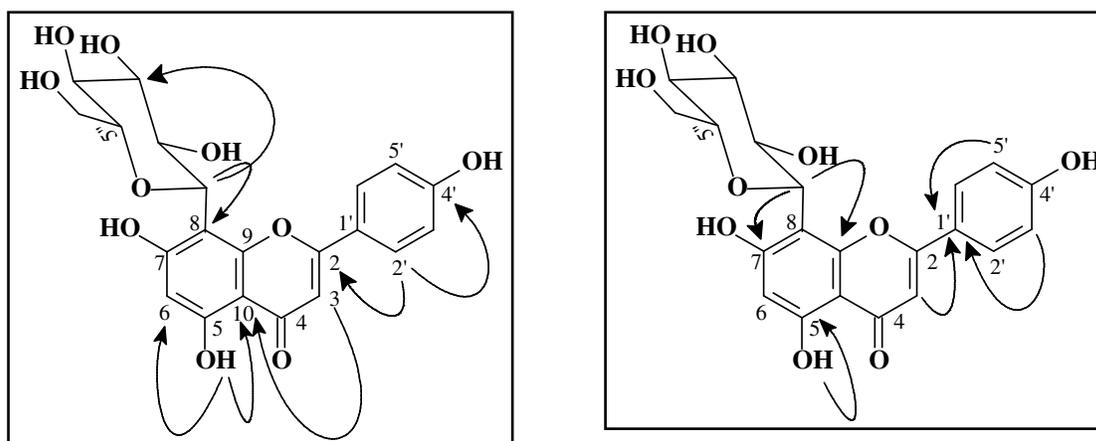
A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig. 47, pág. 74), revelou a presença de nove carbonos não-hidrogenados (δ_{C} 182,1; 163,9; 162,6; 161,1; 160,4; 156,0; 121,6; 104,6; 104,0), todos sp^2 , sendo seis desses, carbonos oxigenados, incluindo uma carbonila (δ_{C} 182,1); onze carbonos monohidrogenados (δ_{C} 128,9; 128,9; 115,8; 115,8; 102,4; 98,1; 81,8; 78,6; 73,4; 70,8; 70,5), dos quais seis são sp^2 e cinco são sp^3 e oxigenados, além de um carbono metilênico oxigenado (δ_{C} 61,3).

Com base nos dados acima discutidos pode-se dizer que TFL-5 trata-se de um composto flavonoídico C-glicosilado.

O experimento HMBC (Fig. 49, pág. 75) foi utilizado para definir o correto assinalamento dos átomos de carbono e hidrogênio, bem como as conectividades da unidade de açúcar e a posição dos demais substituintes.

Através deste experimento observou-se a correlação entre os hidrogênios ligados aos carbonos CH-2' e CH-6' (δ_{H} 8,02) com os carbonos C-4' (δ_{C} 161,1) e C-2 (δ_{C} 163,9) e

entre os hidrogênios dos carbonos CH-3' e CH-5' (δ_H 6,87) com o carbono C-1' (δ_C 121,6), além da correlação entre o hidrogênio do carbono CH-3 (δ_H 6,78) com o carbono C-1'. Verificou-se também a correlação entre o hidrogênio H-3 (δ_H 6,78) com o carbono C-10 (δ_C 104,0), o qual mostrou correlação com o hidrogênio da hidroxila HO-5 (δ_H 13,2), e este, por sua vez apresentou correlação com o carbono C-6 (δ_H 98,1). A posição da unidade de açúcar foi estabelecida através das correlações entre o hidrogênio H-1'' (δ_H 4,68) com os carbonos C-7 (δ_C 162,6), C-8 (δ_C 104,6) e C-9 (δ_C 156,0).



Após análise dos dados espectrais e comparação com dados descritos na literatura (Palme, 1994), pode-se concluir que TFL-5 trata-se de uma flavonóide glicosilado denominado vitexina, que apesar de já ter sido isolado anteriormente de *Cotoneaster thymaefolia* (Palme, 1994), está sendo relatado pela primeira vez a partir da espécie.

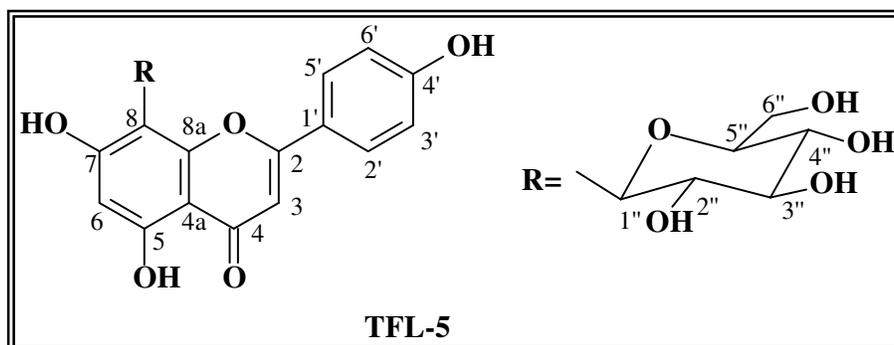


Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (125 e 500 MHz, DMSO e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TFL-5 e comparação com dados registrados na literatura para a vitexina (Palme, 1994).

HMQC			HMBC		Lit.
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
2	163,9	-	H-3	H-2', H-6'	165,3
3	102,5	6,78 (s)	-	-	102,6
4	182,1	-	H-3	-	182,8
5	160,4	-	H-6	-	160,8
6	98,1	6,27 (s)	-	OH-5	99,0
7	162,6	-	-	H-1''	162,1
8	104,6	-	H-1''	H-6	104,3
9	156,0	-	-	H-1''	160,9
10	104,0	-	-	H-3, H-6, OH-5	104,3
1'	121,6	-	-	H-3, H-3', H-5'	121,9
2'	128,9	8,02 (d, 8,7)	-	H-6'	128,9
3'	115,8	6,87 (d, 8,7)	-	H-5'	115,9
4'	161,1	-	H-3'	H-2', H-6'	161,1
5'	115,8	6,87 (d, 8,7)	-	H-3'	115,9
6'	128,9	8,02 (d, 8,7)	-	H-2'	128,9
1''	73,4	4,68 (d 9,5)	H-2''	-	73,6
2''	70,8	3,83(t, 8,8)	H-1''	-	71,0
3''	78,6	3,27(t, 8,8)	H-2''	H-1''	78,7
4''	70,5	3,37(t, 8,8)	H-5''	-	71,5
5''	81,8	3,23	-	-	81,9
6''	61,3	3,76 (d, 11)	-	-	61,2
		3,52 (dd, 11,7 e 5,1)			

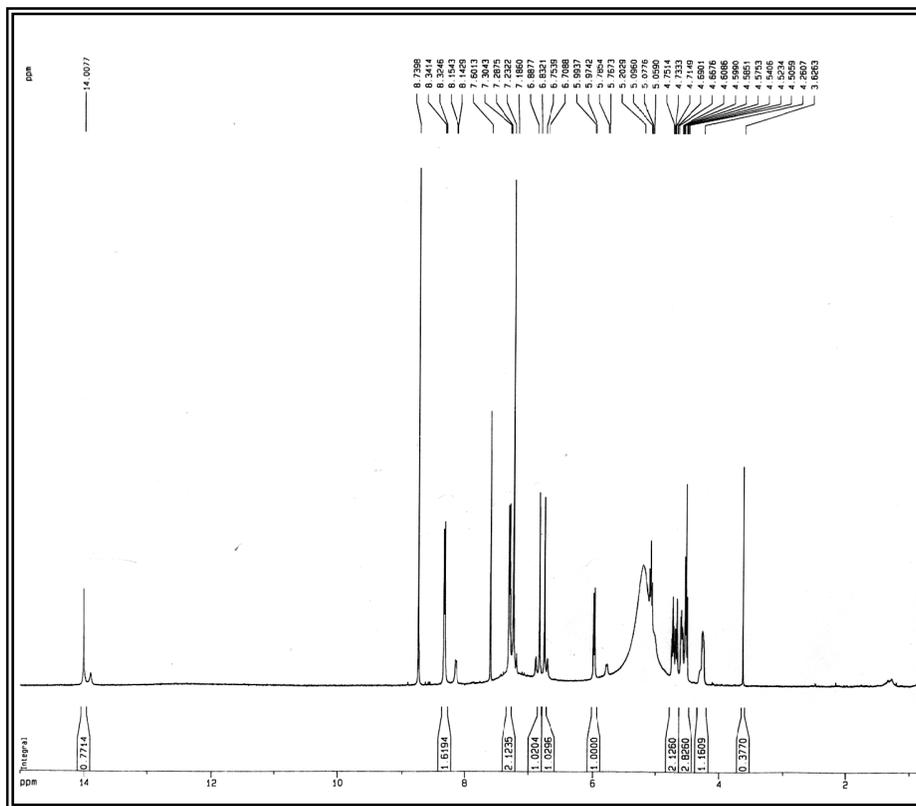


Figura 44. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de TFL-5.

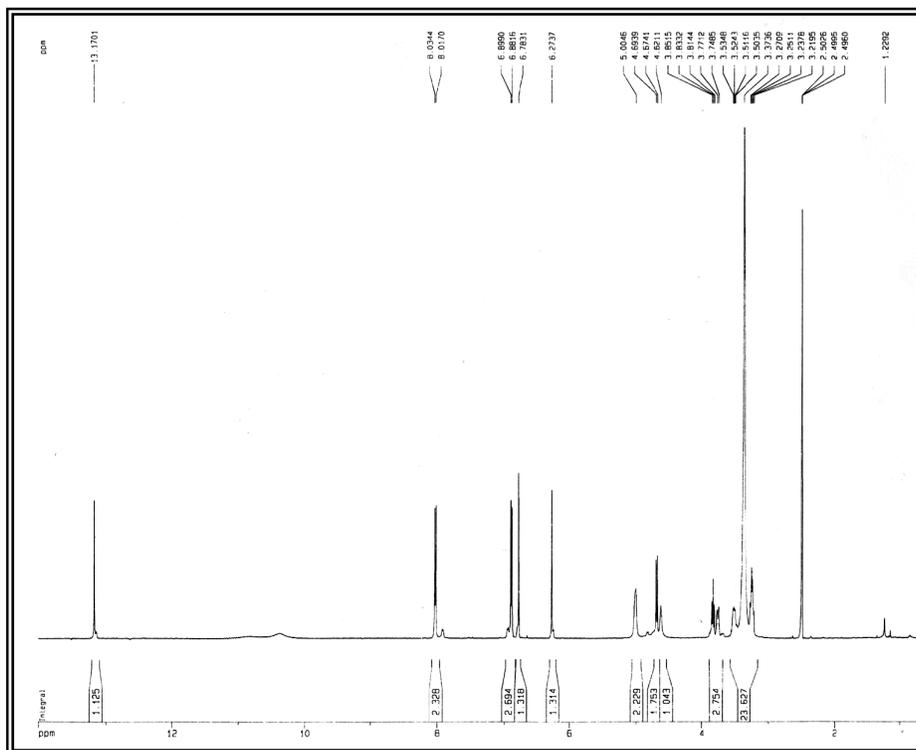


Figura 45. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) de TFL-5.

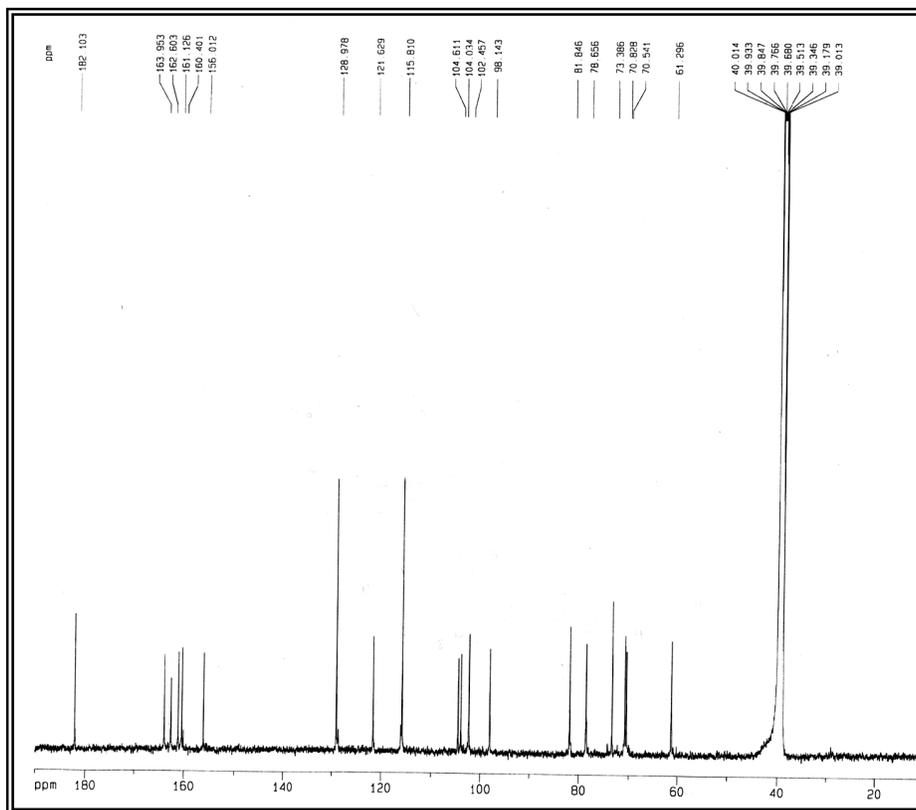


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO) de TFL-5.

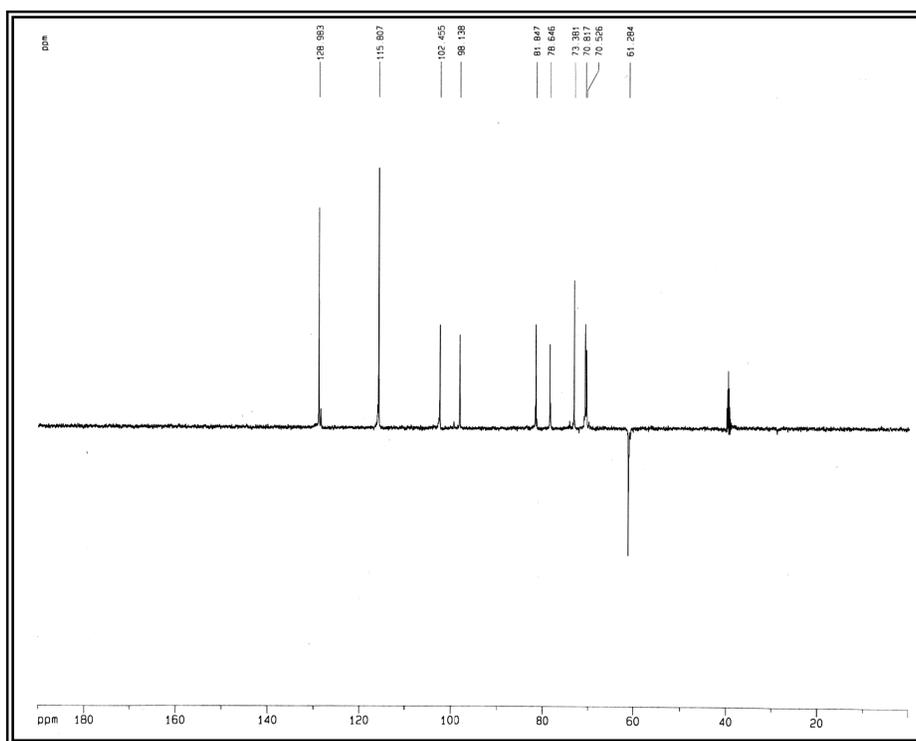


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, DMSO) de TFL-5.

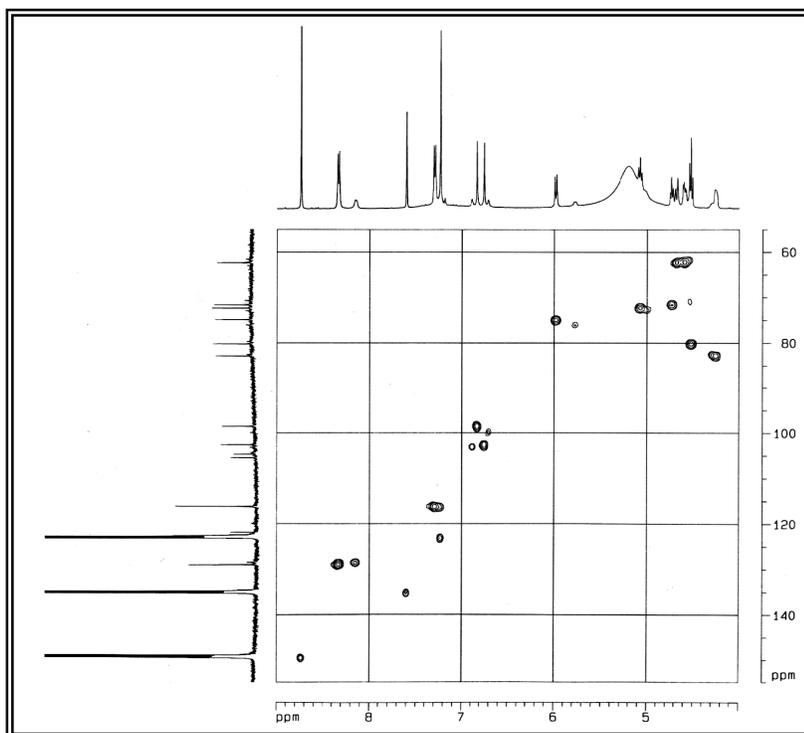


Figura 48. Espectro de RMN-HMQC (500 e 125 MHz, C₅D₅N) de TFL-5.

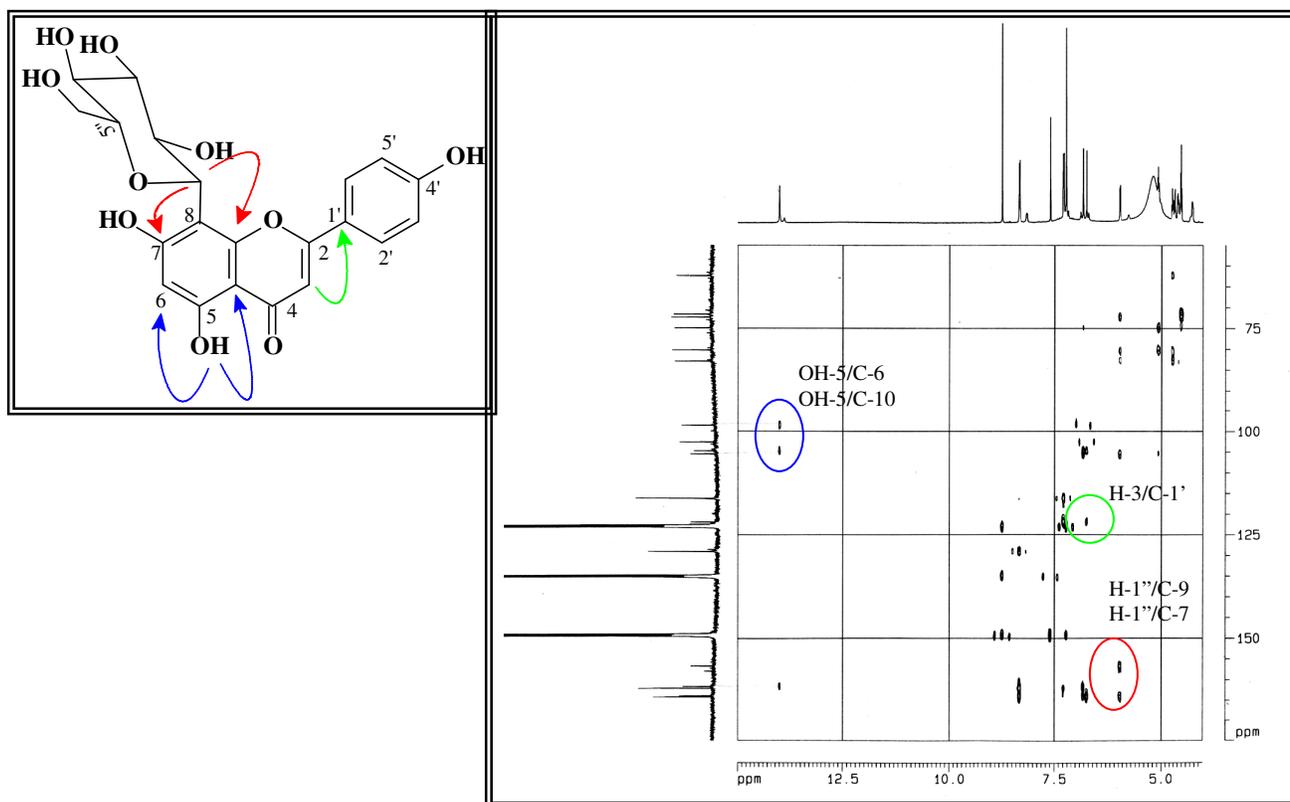


Figura 49. Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, C₅D₅N) de TFL-5.

3.2. Determinação dos constituintes químicos isolados do caule de *Cordia piauhiensis* Fresen.

3.2.1 Determinação estrutural de CCP-1

CCP-1 foi isolada a partir da fração acetona oriunda do extrato etanólico do caule de *C. piauhiensis* (Item 4.6.2, pág. 174), utilizando cromatografia por exclusão molecular (Sephadex). O composto apresentou-se como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão 219,2-220,8 °C, $[\alpha]_{20}^D -0,44^\circ$ (c. 0.05, MeOH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 50, pág. 81) apresentou uma banda larga centrada em $\lambda_{\text{máx}} 3428 \text{ cm}^{-1}$ característica de estiramento O-H de álcoois, uma banda em $\lambda_{\text{máx}} 1695 \text{ cm}^{-1}$ característica de ligação C=O, e ainda absorções em $\lambda_{\text{máx}} 1131$ e 1050 cm^{-1} características de deformações axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 52, pág. 83) indicou a presença de 42 átomos de carbonos, que após comparação com o espectro DEPT 135° (Fig. 53, pág. 84) foi possível inferir a presença de 16 carbonos metínicos, sendo 11 oxigenados; 10 carbonos metilênicos (um deles oxigenado), 8 carbonos monohidrogenados e 8 não-hidrogenados, onde um deles foi referente a uma carbonila de ácido em $\delta_c 182,6$. Ainda com base no espectro de RMN ^{13}C , os sinais em $\delta_c 140,1$ e $129,6$ são compatíveis com a presença de uma dupla ligação carbono-carbono, a qual de acordo com o padrão de substituição determinado através do experimento DEPT 135° corresponde a uma dupla ligação trissubstituída.

A análise dos dados extraídos dos espectros de IV, RMN ^{13}C e DEPT 135° forneceu dados para sugerir a composição molecular descrita na Tabela 11 (pág. 77), e assim chegar à fórmula molecular $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$, a qual apresenta nove graus de insaturação. Estes dados sugerem que CCP-1 tratava-se de uma saponina triterpênica, com duas unidades de açúcar.

Tabela 11. Atribuições dos sinais de átomos de carbono não-hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-1

C	CH	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
182,6	129,6	105,7	62,9	28,7	
140,1	90,5	102,0	40,2	27,3	
73,9	57,5	79,6	39,2	25,0	
49,2	55,2	79,1	34,4	18,1	
42,7	48,7	77,7	29,7	17,7	
41,2	43,2	74,1	27,4	17,3	
40,3		73,8	27,3	16,8	
37,9		72,3	26,8	16,2	
		72,1	24,8		
		70,1	19,6		
$\text{C}_8\text{O}_3^{\text{a}}$	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}^{\text{b}}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_8^{\text{c}}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}^{\text{d}}$	C_8H_{24}	$\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_{13} + 8\text{H}^{\text{e}} = \text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$

^a Oxigênios pertencentes ao grupo carboxila e a uma hidroxila

^b Oxigênio da ligação aglicona-monossacarídeo

^c Oxigênios pertencentes aos monossacarídeos

^d Oxigênio pertencente ao carbono metilênico das unidades de açúcar

^e Hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxila (OH)

Levando-se em consideração os valores dos sinais no espectro de RMN ^{13}C correspondentes a dupla ligação carbono-carbono δ_{C} (129,6 e 140,1) e a presença de sete grupos metilas em δ_{C} 28,7; 27,3; 25,0; 17,7; 17,3; 16,8 e 16,2, os quais com base no experimento HMQC (Fig. 55, pág. 86), foram relacionados aos sinais de hidrogênio em δ_{H} 1,06 (s), 1,19 (s), 1,33 (s), 0,79 (s), 0,86 (s), 0,93 (d) e 0,95 (s), respectivamente, levou a conclusão que CCP-1 possui em sua estrutura uma aglicona triterpênica da série ursano (Mahato, 1994). Após análise do experimento HMBC (Fig. 56, pág. 87), o qual revelou correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 1,19 (s, 3H-29) e 0,93 (d, 6,8, 3H-30) com o carbono oxigenado em δ_{C} 73,9 (C-19), concluiu-se que a aglicona em questão tratava-se do ácido pomólico.

Os sinais observados em δ_C 105,7 e 102,0 através do experimento HMQC, foram correlacionados com seus respectivos sinais de hidrogênios e são característicos de absorções de carbonos anoméricos, indicando portanto, a existência de duas unidades monossacarídicas, como sugerido anteriormente. A existência de um grupo metilênico oxigenado em δ_C 62,9 e um grupo metila em δ_C 18,1, observado no experimento DEPT 135°, aliado aos valores dos deslocamentos químicos relativos aos carbonos anoméricos, bem como o valor de J calculado para os hidrogênios referente ao grupo metila em 1,21 (d, 6,1, 3H-6'') foram compatíveis com a presença de uma unidade de glicose e uma de ramnose. Esta informação foi evidenciada através do espectro 1H - 1H COSY (Fig. 54, pág. 85), o qual revelou acoplamento dos hidrogênios daquele grupo metila com o hidrogênio em δ_H 3,99 (m, H-5''), característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado.

O experimento HMBC foi essencial para a confirmação da estrutura da aglicona, e ainda foi possível observar a correlação a três ligações entre o hidrogênio ligado ao carbono anomérico em δ_H 5,36 (H-1'') com o carbono C-2' em δ_C 79,1.

Através do experimento NOESY (Fig. 57, pág. 88) observou-se a correlação entre os hidrogênios H-1' em δ_H 4,41 e H-3 em 3,18, possibilitando estabelecer a posição das unidades de açúcar.

Levando-se em consideração os dados acima discutidos, o referido composto trata-se de uma saponina monodesmosídica, ou seja, com duas unidades de açúcar ligadas ao carbono C-3 através de uma ligação éter, caracterizada como sendo ácido 3β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] pomólico.

De acordo com levantamento bibliográfico realizado no *Chemical abstracts* este é o primeiro relato de CCP-1 na literatura.

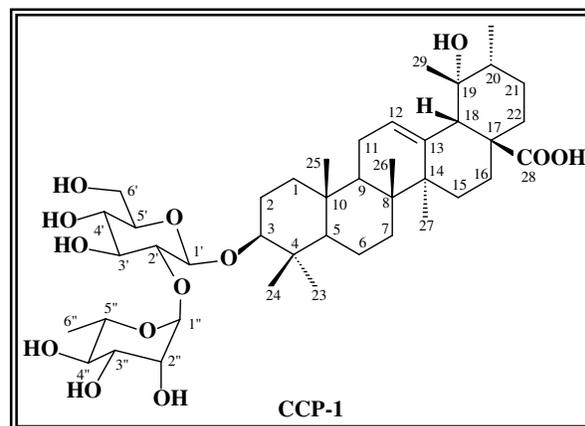
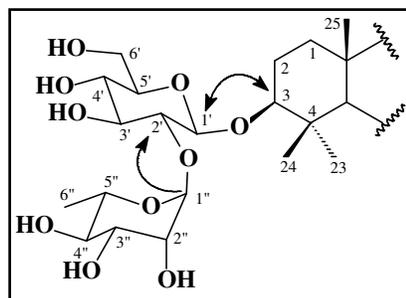


Tabela 12. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) da aglicona de CCP-1

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	40,2	1,05		3H-25
2	26,8	1,85		
3	90,4	3,18 (dd, 12,3, 4,3)		H-1', 3H-23, 3H-24
4	40,4	-	3H-23, 3H-24	
5	57,5	0,83		3H-23, 3H-24, 3H-25
6	19,6	1,97		
7	34,4	1,23		3H-26
8	41,2	-	3H-26	3H-27
9	48,7	1,67	3H-25, 3H-26	
10	38,0	-	3H-25	
11	24,8	1,98		
12	129,6	5,28 (t)		
13	140,1	-	H-18	
14	42,7	-	3H-27	3H-26
15	29,8	1,03		3H-27
16	27,3	1,65		
17	49,2	-	H-18	
18	55,2	2,52 (sl)		3H-29
19	73,9	-	3H-29	3H-30
20	43,2	1,37	3H-30	3H-29
21	27,4	1,70		
22	39,1	1,72		
23	28,7	1,06 (s)		3H-24
24	17,3	0,86 (s)		3H-23
25	16,2	0,95 (s)		
26	17,7	0,79 (s)		
27	25,0	1,33 (s)		
28	182,6	-		
29	27,3	1,19 (s)		
30	16,8	0,93 (d, 6,8)		

Tabela 13. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da unidade osídica de CCP-1.

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1'	105,7	4,41 (d; 7,2)		
2'	79,1	3,41 (t; 7,3)	H-3'	H-1''
3'	79,6	3,47 (t; 8,8)	H-4'	
4'	72,1	3,30		
5'	77,7	3,20 (m)		
6'	62,9	3,83 (d; 11,6)		
		3,66 (dd; 11,6; 5,1)		
1''	102,0	5,36 (d; 1,3)		
2''	73,8	3,96 (sl)		
3''	72,3	3,75 (dd; 9,5; 3,3)		
4''	74,1	3,39 (t; 9,5)		3H-6''
5''	70,1	3,99 (m)	3H-6''	
6''	18,1	1,21 (d; 6,2)		

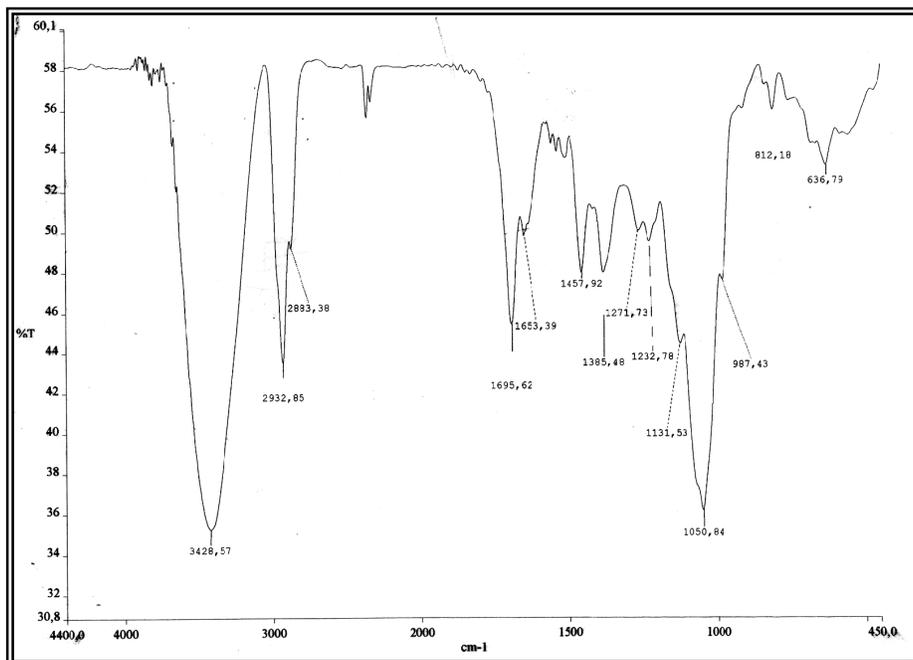


Figura 50. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CCP-1

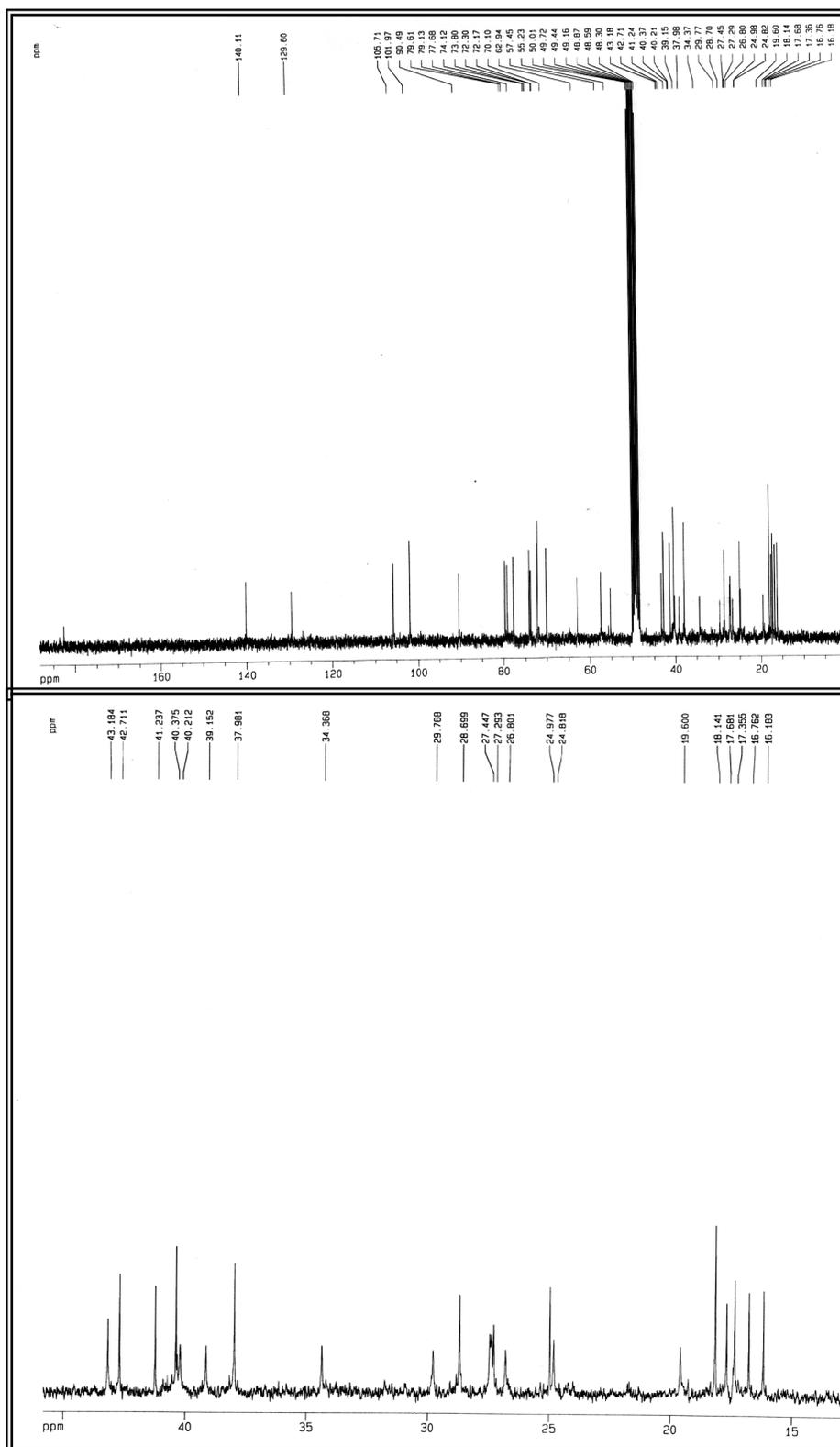


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) e expansão de CCP-1.

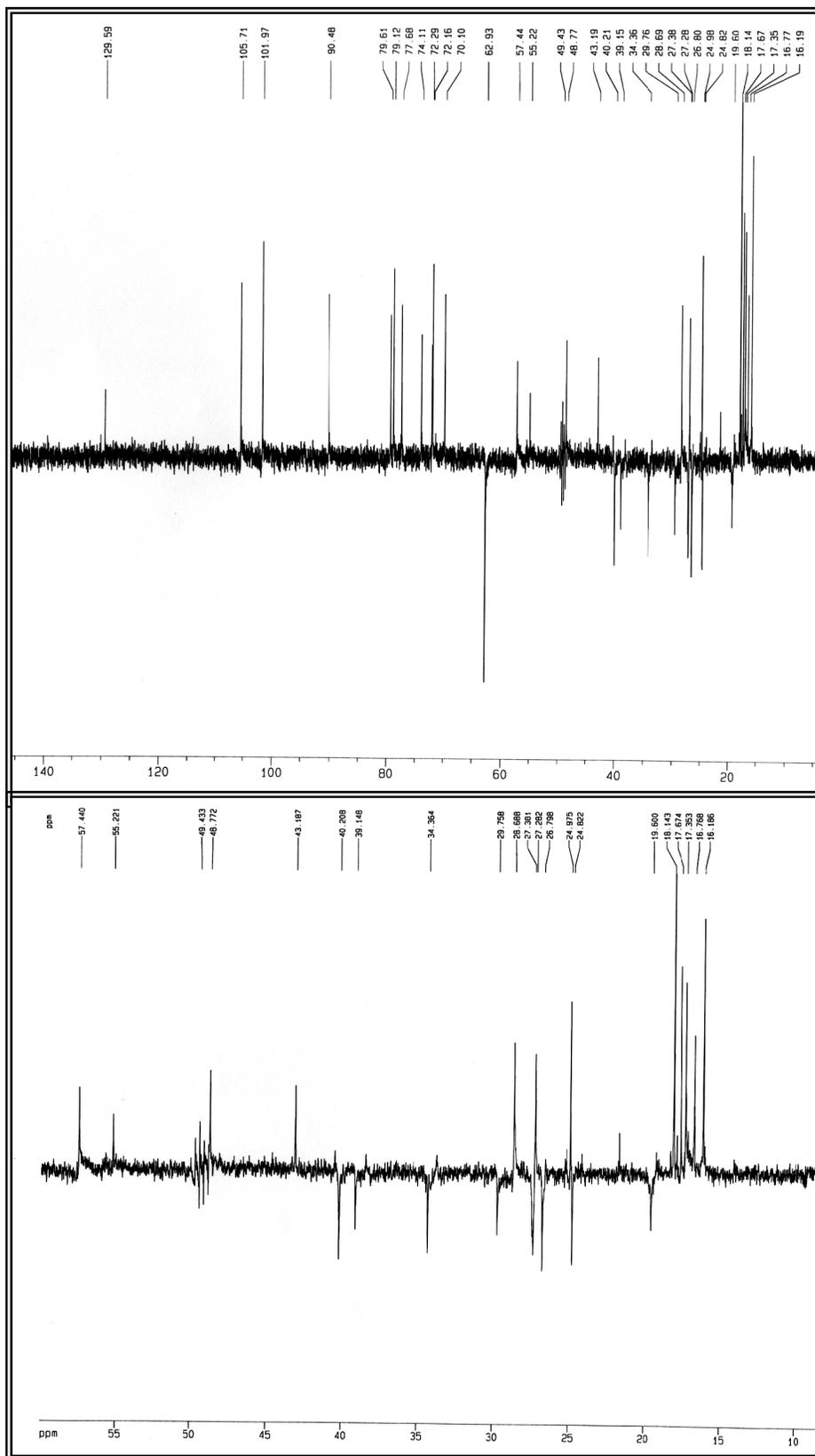


Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) e expansão de CCP-1.

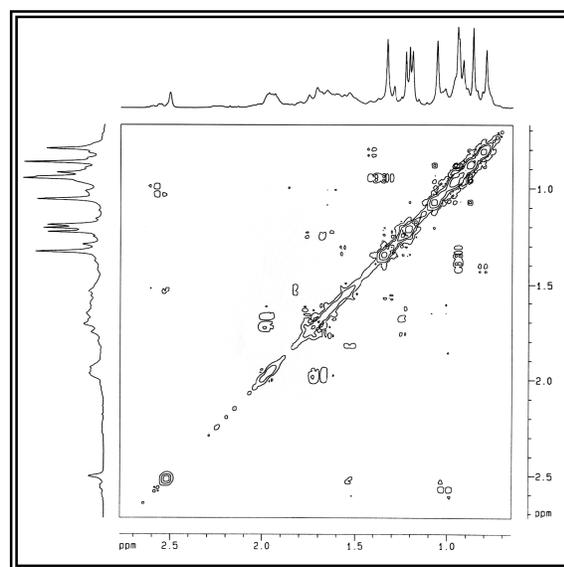
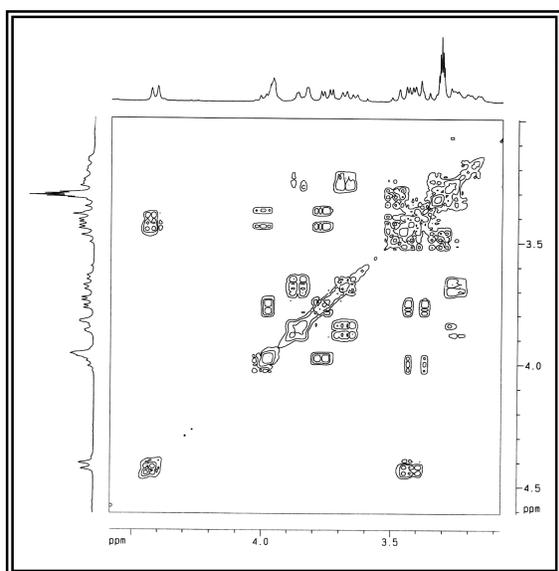
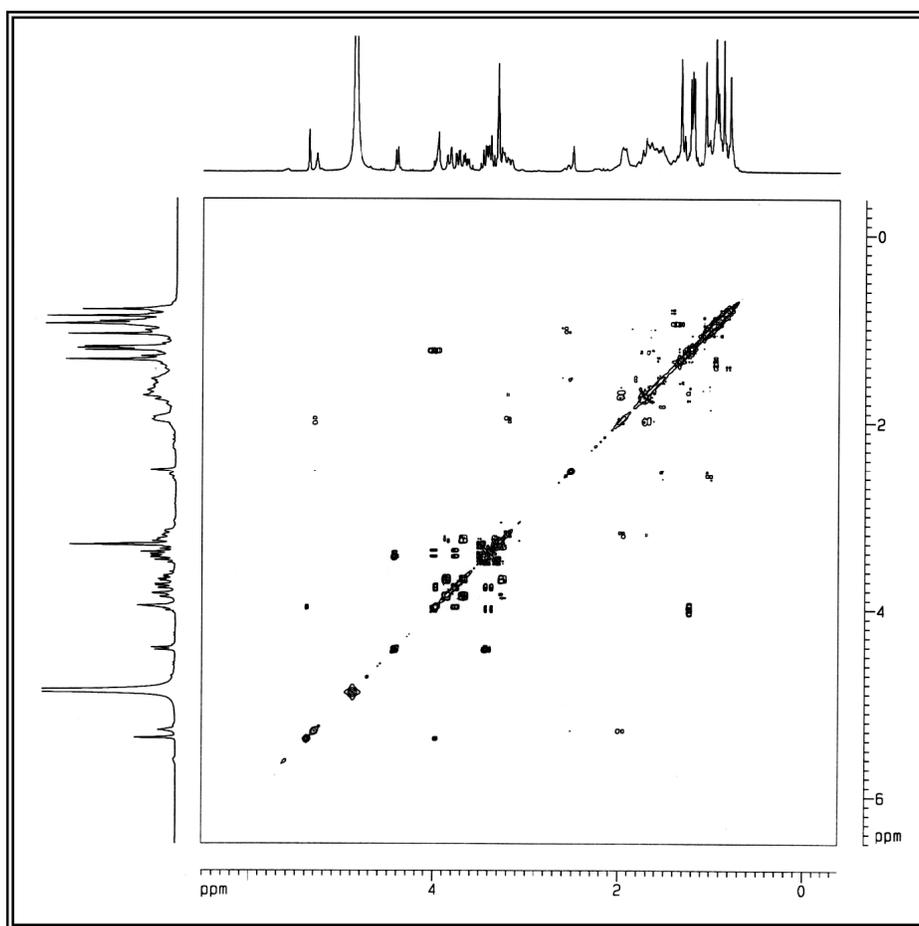


Figura 54. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CD_3OD) e expansões de CCP-1.

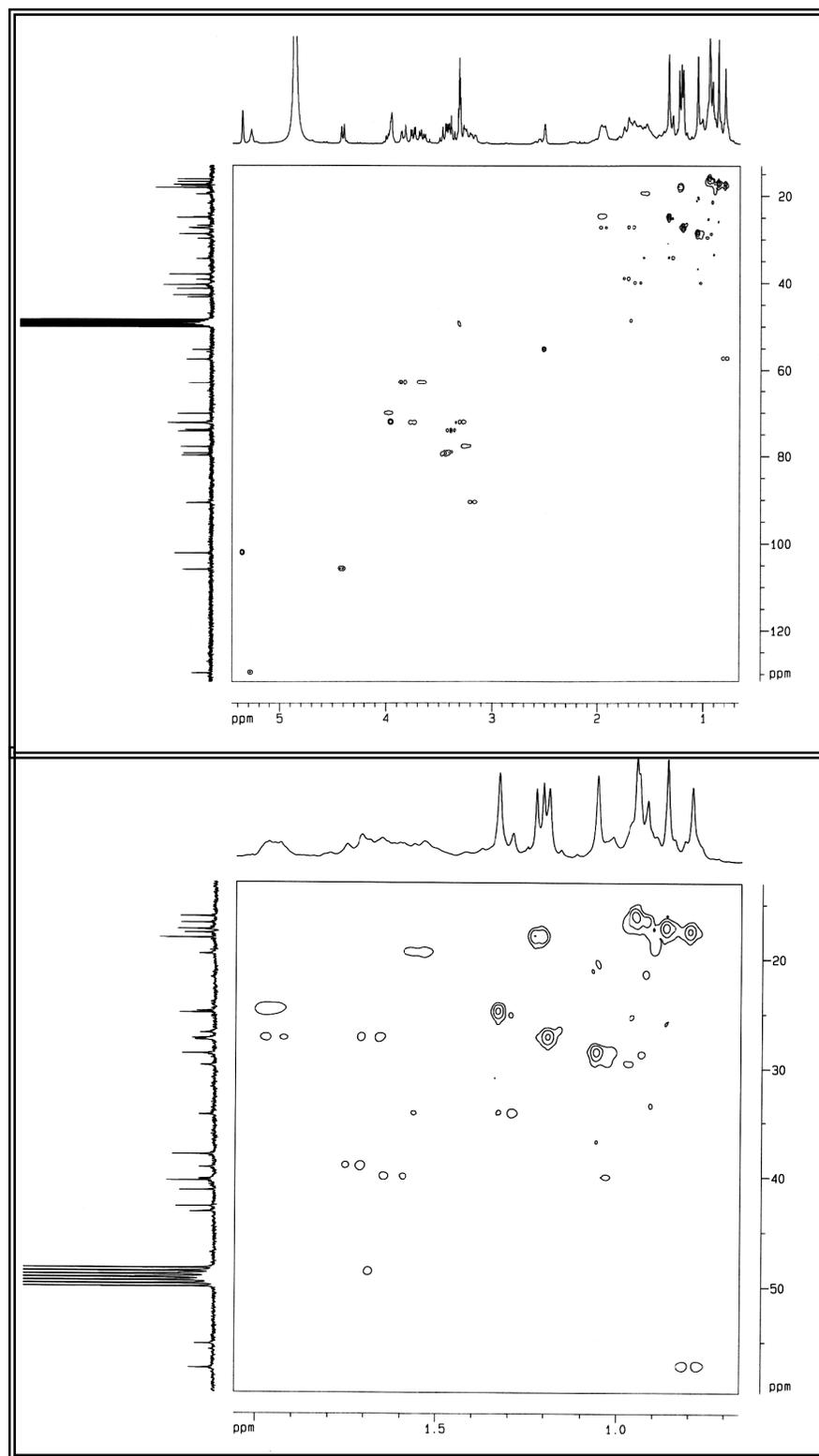


Figura 55. Espectro de RMN-HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) e expansão de CCP-1.

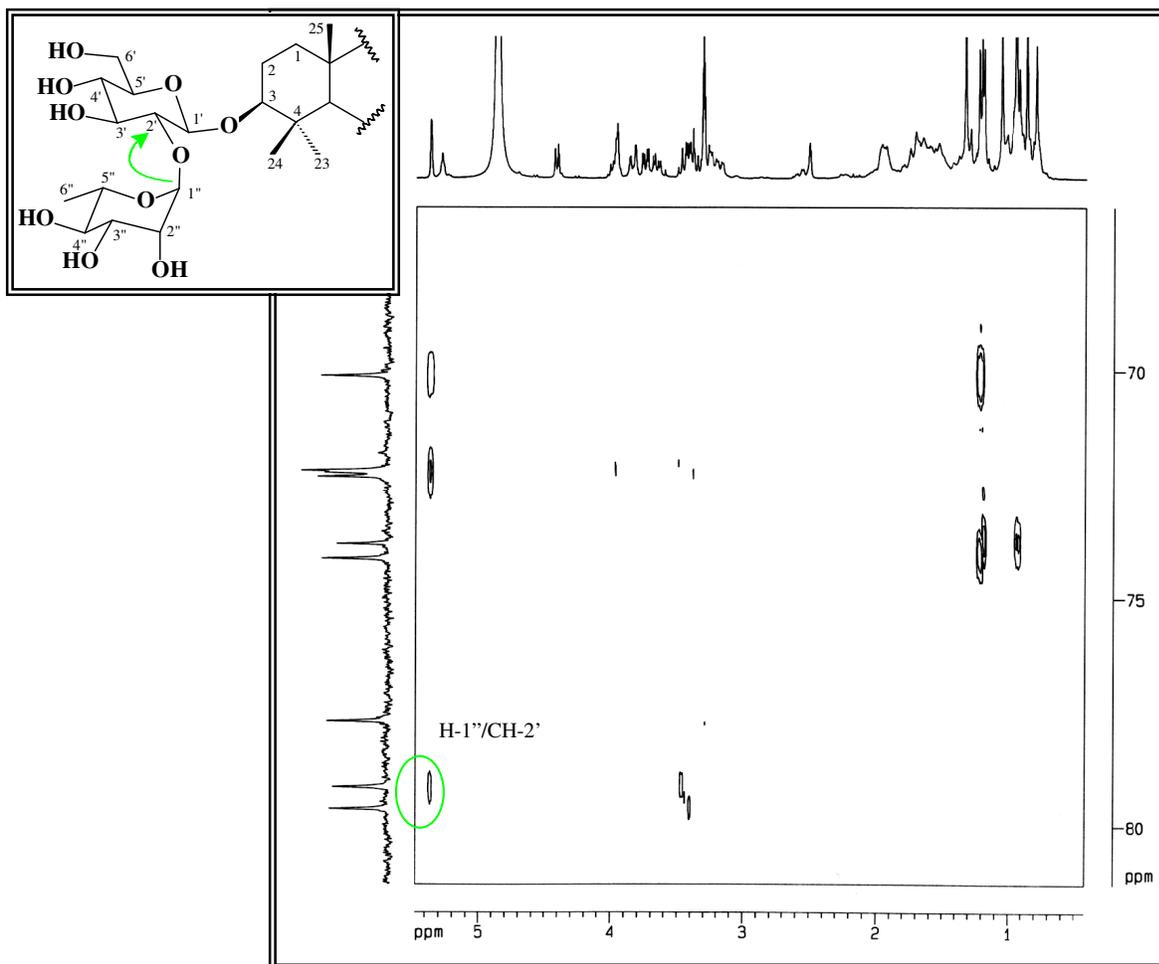


Figura 56. Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de CCP-1.

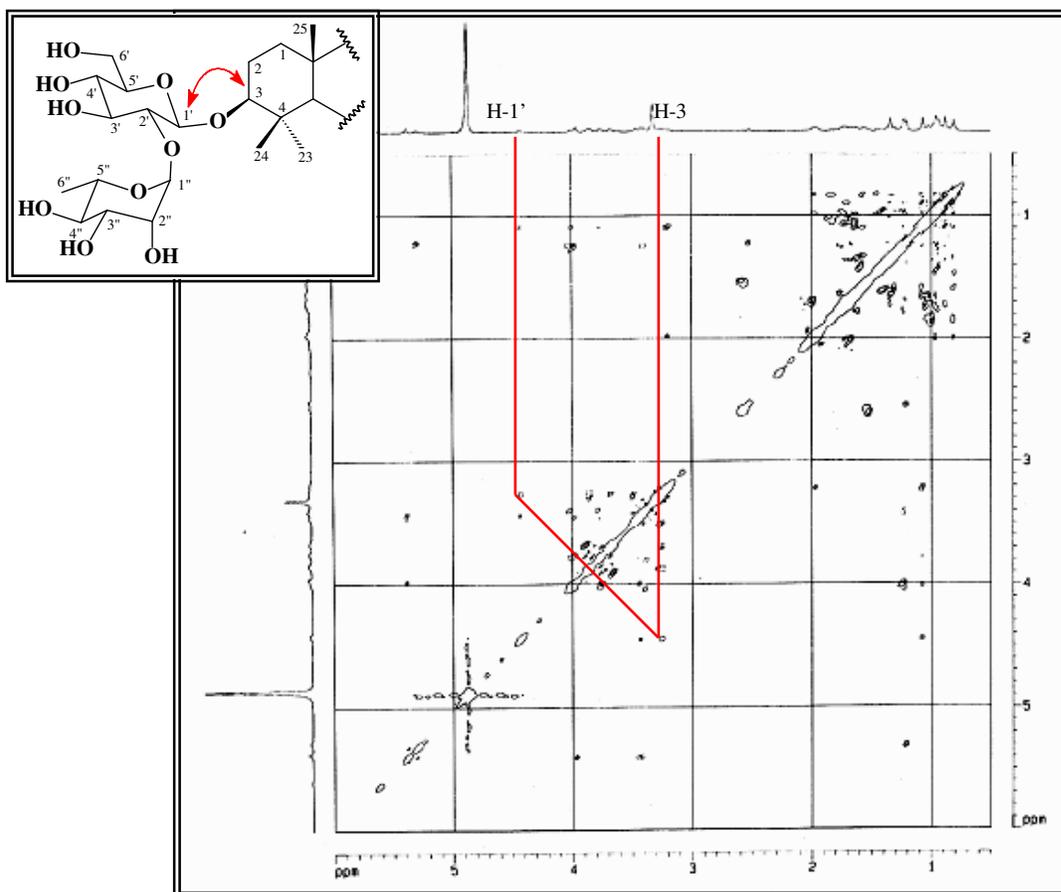


Figura 57. Espectro de RMN-NOESY (500 MHz, C_5D_5N) de CCP-1.

3.2.2. Determinação estrutural de CCP-2

O metabólito denominado CCP-2 foi isolado a partir do precipitado oriundo da fração n-butanol (Item 4.6.3, pág. 175), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este composto apresentou ponto de fusão 217,9-219,7 °C, $[\alpha]_{20}^D -1,38^\circ$ (c. 0.05, C₅H₅N).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 58, pág. 95) apresentou uma banda larga acentuada em $\lambda_{\text{máx}} 3403 \text{ cm}^{-1}$ característica de estiramento O-H de álcoois, uma banda em $\lambda_{\text{máx}} 1654 \text{ cm}^{-1}$ característica de grupo carbonila e ainda uma absorção intensa em $\lambda_{\text{máx}} 1059 \text{ cm}^{-1}$, característica de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-BB (Fig. 61, pág. 97) apresentou 54 linhas espectrais, que após análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 62, pág. 98), revelou a presença de vinte e seis carbonos monohidrogenados (vinte e um deles oxigenado); doze carbonos metilênicos, dos quais três são oxigenados e oito carbonos metílicos. Por subtração dos referidos espectros, constatou-se a presença de oito carbonos não-hidrogenados, que com base na teoria do deslocamento químico, um foi compatível com uma carbonila de éster em $\delta_c 177,4$. Ainda com base no espectro de RMN ¹³C, os sinais em $\delta_c 139,6$ e $128,7$ são compatíveis com a presença de uma dupla ligação carbono-carbono, a qual de acordo com o experimento DEPT 135° corresponde a uma dupla ligação trissubstituída.

O espectro de massa (Fig. 59, pág. 95), com ionização por elétron-spray (ESIMS), apresentou um pico correspondente ao íon quasi-molecular de $m/z 1128$ ($[M + Na]^+$), compatível com a fórmula molecular C₅₄H₈₈O₂₃, conforme descrita na Tabela a seguir.

Tabela 14. Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-2.

C	CH	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
177,7	128,7	105,8	75,6	69,9	28,4
139,6	89,3	105,7	74,5	63,2	27,3
72,9	56,5	102,1	74,1	62,9	24,3
49,0	54,7	96,1	72,8	39,5	19,0
42,5	48,0	80,2	72,7	38,0	17,7
40,8	42,4	79,1	72,5	33,8	17,5
39,8		78,8	71,8	29,6	17,0
37,3		78,7	71,4	27,2	16,1
		78,5	69,9	27,0	
		78,3		26,4	
		78,1		24,3	
				19,0	
$\text{C}_8\text{O}_3^{\text{a}}$	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}^{\text{b}}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{16}^{\text{c}}$	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_3^{\text{d}}$	C_8H_{24}	$\text{C}_{54}\text{H}_{74}\text{O}_{23} + 14\text{H}^{\text{e}} = \text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{23}$

^a Oxigênios pertencentes ao grupo carboxila e a uma hidroxila

^b Oxigênio da ligação aglicona-monossacarídeo

^c Oxigênios pertencentes aos monossacarídeos

^d Oxigênios pertencentes aos carbonos metilênicos das unidades de açúcar

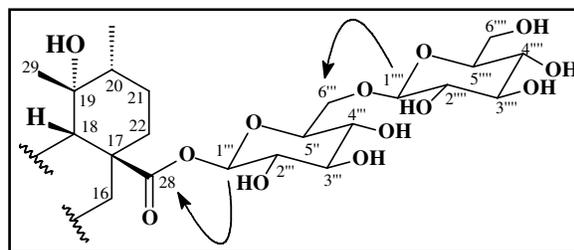
^e Hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxila (OH)

Considerando-se os valores dos sinais em δ_{C} 128,7 e 139,6 no espectro de RMN ^{13}C correspondentes a dupla ligação carbono-carbono e a presença de sete grupos metilas em δ_{C} 28,4; 27,3; 24,3; 17,7; 17,5; 17,0 e 16,0, os quais com base no experimento HMQC (Fig. 64, pág. 100), foram relacionados aos sinais de hidrogênio em δ_{H} 1,25 (s), 1,37 (s), 1,69 (s), 1,18 (s), 1,22(s), 1,04 (d) e 0,92 (s), respectivamente, levou-nos a concluir que CCP-2 possui em sua estrutura um triterpeno da série ursano (Mahato, 1994). De fato, a análise comparativa dos espectros de CCP-1 e CCP-2 mostrou semelhanças, particularmente quanto a aglicona, a qual foi caracterizada como sendo o ácido pomólico, assim como em CCP-1.

Os sinais observados em δ_C 105,8; 105,6; 102,1 e 96,1 através do experimento HMQC, foram correlacionados aos seus respectivos sinais de hidrogênios (δ_H 4,99; 5,08; 6,85 e 6,24), os quais são característicos de absorções de carbonos anoméricos, indicando portanto, a existência de quatro unidades monossacarídicas. A existência de três grupos metilênicos oxigenados em δ_C 69,9; 63,2 e 62,9, observados no experimento DEPT 135°, aliados aos valores dos deslocamentos químicos relativos aos carbonos anoméricos sugerem a presença de três unidades de glicose. O quarto monossacarídeo foi atribuído a ramnose, a qual foi identificada principalmente através da absorção em 1,72 (d, 3H-6'') referente a um grupo metila, cujo valor de J (6,1 Hz) é compatível com acoplamento vicinal. Esta informação foi evidenciada através do espectro 1H - 1H COSY (Fig. 63, pág. 99), o qual revelou acoplamento dos hidrogênios daquele grupo metila com o hidrogênio em δ_H 4,81 (m, H-5'''), característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado.

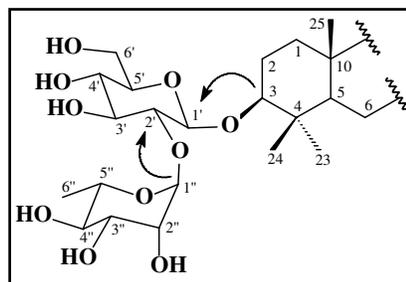
As informações obtidas neste último experimento aliadas àquelas obtidas através da técnica TOCSY (Fig. 67, pág. 103) foram de fundamental importância para os assinalamentos das absorções dos átomos de hidrogênio de cada unidade de açúcar, partindo-se de cada unidade monossacarídica, do hidrogênio ligado ao carbono anomérico.

O experimento HMBC (Fig. 65, pág. 101) foi essencial para a confirmação da estrutura da aglicona, particularmente para determinar a localização das unidades monossacarídicas. Inicialmente observou-se correlação a três ligações entre o carbono carbonílico em δ_C 177,4 (C-28) com o hidrogênio em δ_H 6,24 (H-1''') e do sinal em δ_H 5,08 (H-1''') com o sinal de carbono em δ_C 69,9 (C-6'''). Desta forma, conclui-se que uma unidade osídica, constituída de unidades de glicose, encontrava-se ligada ao carbono carbonílico C-28.



Vale ressaltar que, o valor do deslocamento químico do carbono C-28 de CCP-1 (δ_C 182,6) é mais elevado que o de CCP-2 (δ_C 177,4), provavelmente devido à interação com as unidades monossacarídicas, deixando este carbono mais protegido.

As outras duas unidades monossacarídicas devem-se encontrar portanto, ligadas ao carbono carbinólico em δ_C 89,3 (C-3). A confirmação desta suposição foi evidenciada através da correlação a três ligações deste hidrogênio (H-3) em δ_H 3,36 e o carbono anomérico em δ_H 105,8 (C-1'). Observou-se ainda, a correlação a três ligações entre o hidrogênio em δ_H 6,58 (H-1'') com o carbono em δ_C 80,2 (C-2').



A técnica NOESY (Fig. 66, pág. 100) também auxiliou na determinação destas posições, quando observou-se a correlação entre o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (C-3) e o hidrogênio ligado ao carbono anomérico (H-1'), e ainda, a correlação entre o hidrogênio H-2' e o hidrogênio ligado ao carbono anomérico (H-1'').

Além das técnicas utilizadas, a comparação com dados descritos na literatura (Santos, 2003; Santos 2005) também foi de fundamental importância para a determinação estrutural deste composto. Desta maneira, pode-se concluir que CCP-2 denominada 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] pomolato de 28-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila trata-se de uma saponina triterpênica bidesmosídica, ou seja, possui duas unidades osídicas, onde uma delas está ligada ao carbono C-3 através de uma ligação do tipo éter, e outra, em C-28.

De acordo com levantamento bibliográfico realizado no *Chemical abstracts* trata-se do primeiro relato deste metabólito na literatura.

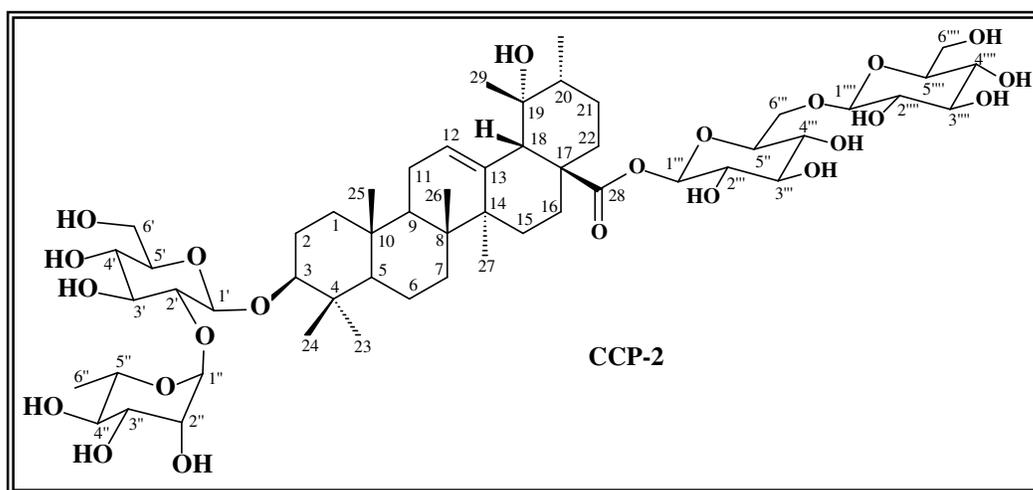


Tabela 15. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da aglicona de CCP-2

C	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	39,5	1,40; 0,89		H-3; 3H-25
2	27,2	2,28 (dl); 1,85 (m)		
3	89,3	3,36 (dd, 11,6; 3,4)		3H-23; 3H-24; H-1'
4	39,8	-	H-5; 3H-23; 3H-24	
5	56,5	0,79 (d, 11,2)		3H-23; 3H-24; 3H-25
6	19,0	1,70; 1,40	H-7a	
7	33,8	1,57; 1,38		3H-26
8	40,8	-	3H-26	3H-27
9	48,0	1,76		3H-25; 3H-26
10	37,3	-	H-5; 3H-25	
11	24,3	1,90		
12	128,7	5,56 (sl)		H-18
13	139,6	-	H-18	3H-27
14	42,5	-	3H-27	H-18; 3H-26
15	29,6	2,44 (tl, 12,1); 1,17		3H-27
16	26,4	3,11 (dt); 1,92		
17	49,0	-	H-18	
18	54,7	2,93 (s)		3H-29
19	72,9	-	3H-29	3H-30
20	42,4	1,32	3H-30	3H-29
21	27,0	1,90; 1,27		3H-30
22	38,0	2,10; 1,90		
23	28,4	1,25 (s)		H-3; 3H-24
24	17,5	1,22 (s)		H-3; 3H-23
25	16,0	0,92 (s)		H-5
26	17,7	1,18 (s)		
27	24,3	1,69 (s)		
28	177,4	-		H-16a; H-18; H-1''''
29	27,3	1,37 (s)		H-18
30	17,0	1,04 (d, 6,4)		

Tabela 16. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da unidade osídica de CCP-2.

C	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1'	105,8	4,99 (d, 6,5)		
2'	80,2	4,30		
3'	78,3	4,17		
4'	72,5	4,18		
5'	78,5	3,97 (m)		
6'	63,2	4,58 (d, 11,0); 4,35		
1''	102,1	6,58 (s)		
2''	72,7	4,88 (sl)		
3''	72,8	4,70 (m)		H-1''
4''	74,5	4,34	H-3''	
5''	70,0	4,81 (m)	H-4''	H-1''
6''	19,0	1,72 (d, 6.1)		
1'''	96,1	6,24 (d, 8,0)		
2'''	74,1	4,15	H-3'''	
3'''	78,1	4,30		
4'''	71,4	4,14	H-3'''	
5'''	79,1	4,18		
6'''	69,9	4,74 (dl, 10,3); 4,35		H-1'''
1''''	105,6	5,08 (d, 7,5)		
2''''	75,6	4,03 (dd)		
3''''	78,8	4,25	H-2''''	
4''''	71,8	4,20	H-3''''	
5''''	78,7	3,92 (m)		
6''''	63,0	4,57(d, 10,0); 4,35		

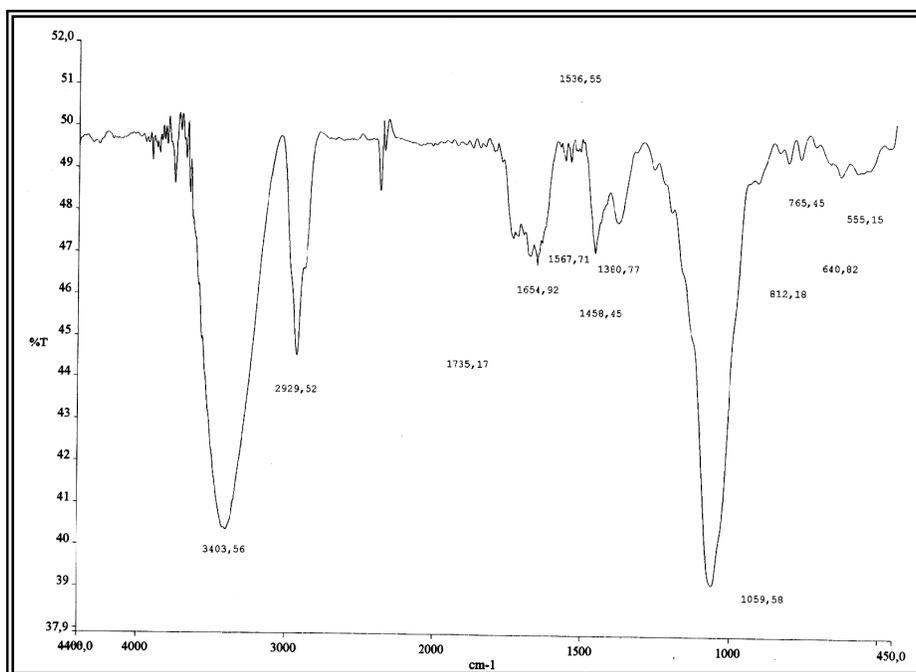


Figura 58. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CCP-2

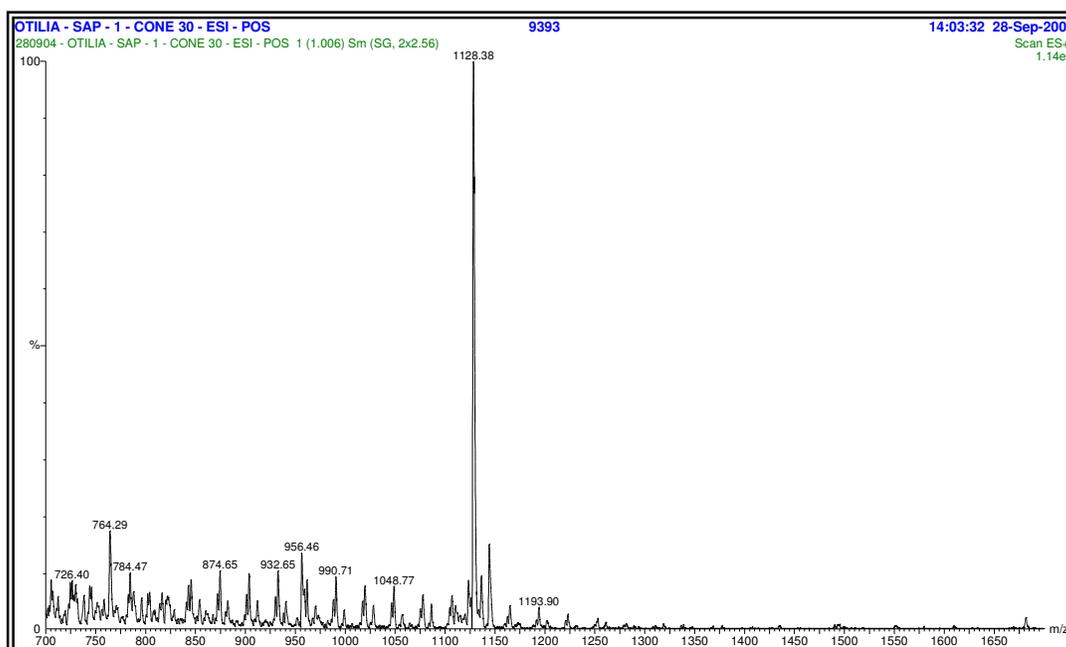


Figura 59. Espectro de massa com ionização por elétron-spray (ESIMS) de CCP-2

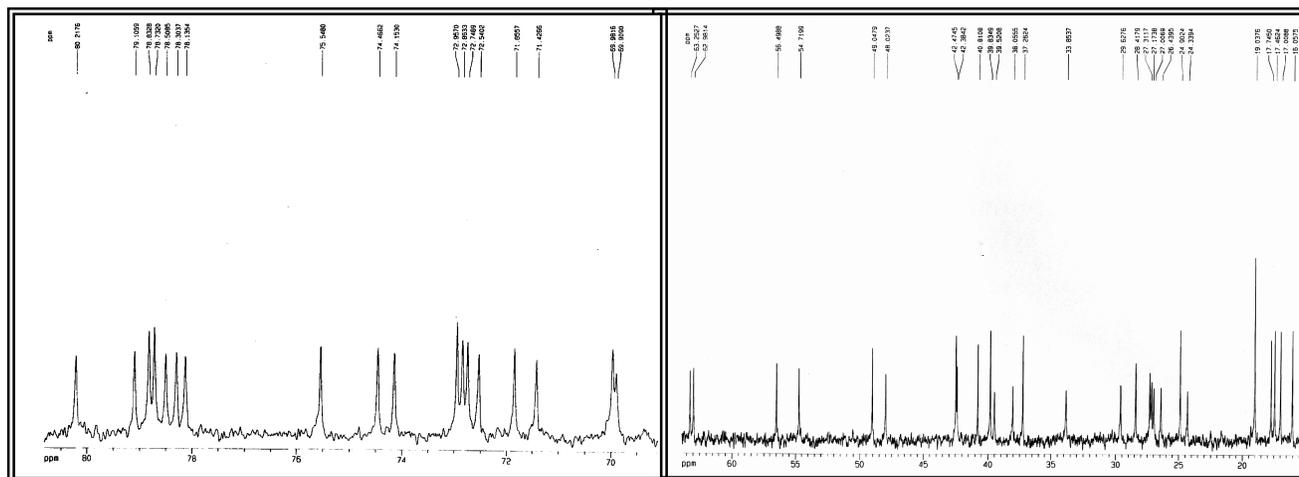
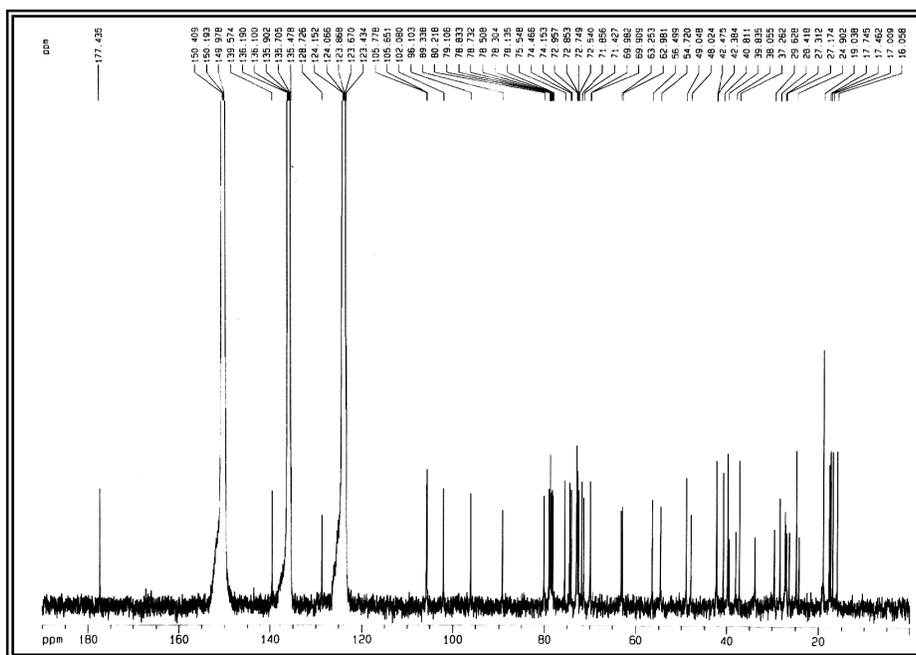


Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansões de CCP-2.

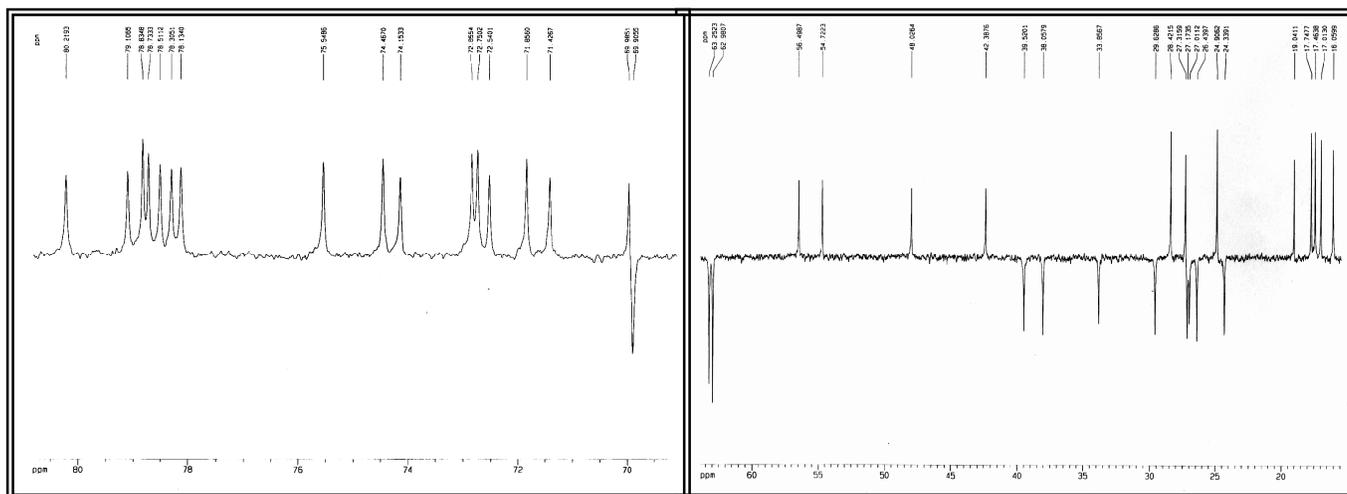
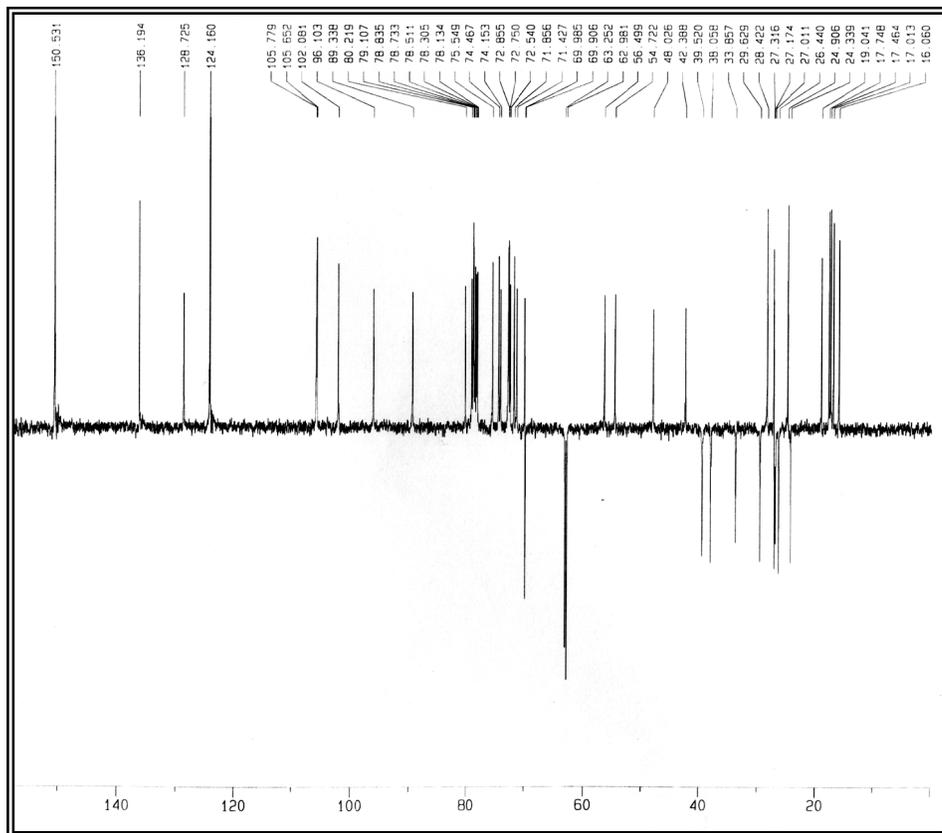


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansões de CCP-2.

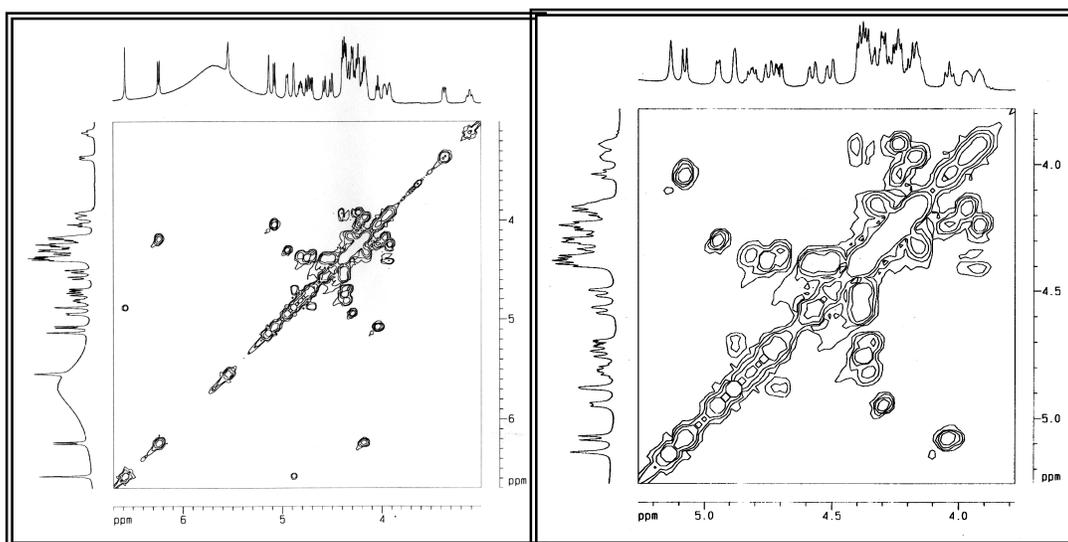
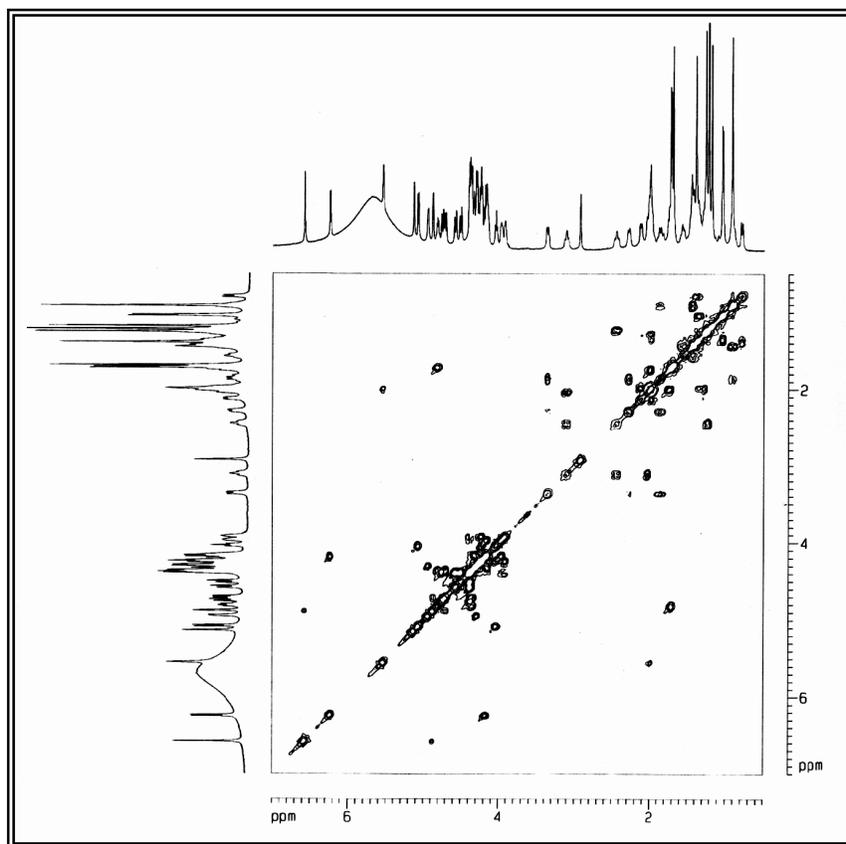


Figura 63. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansões de CCP-2.

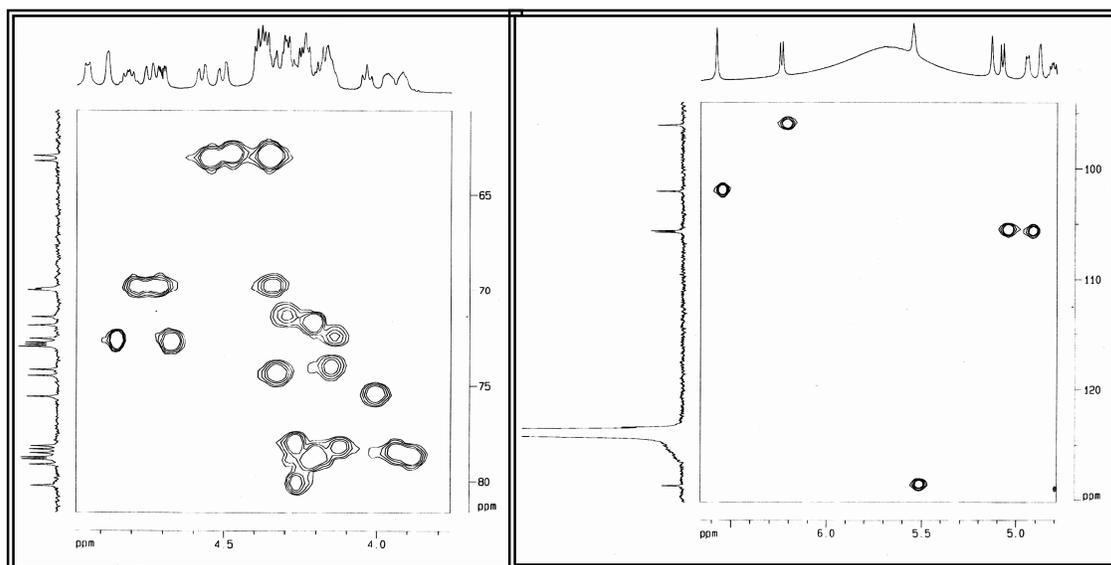
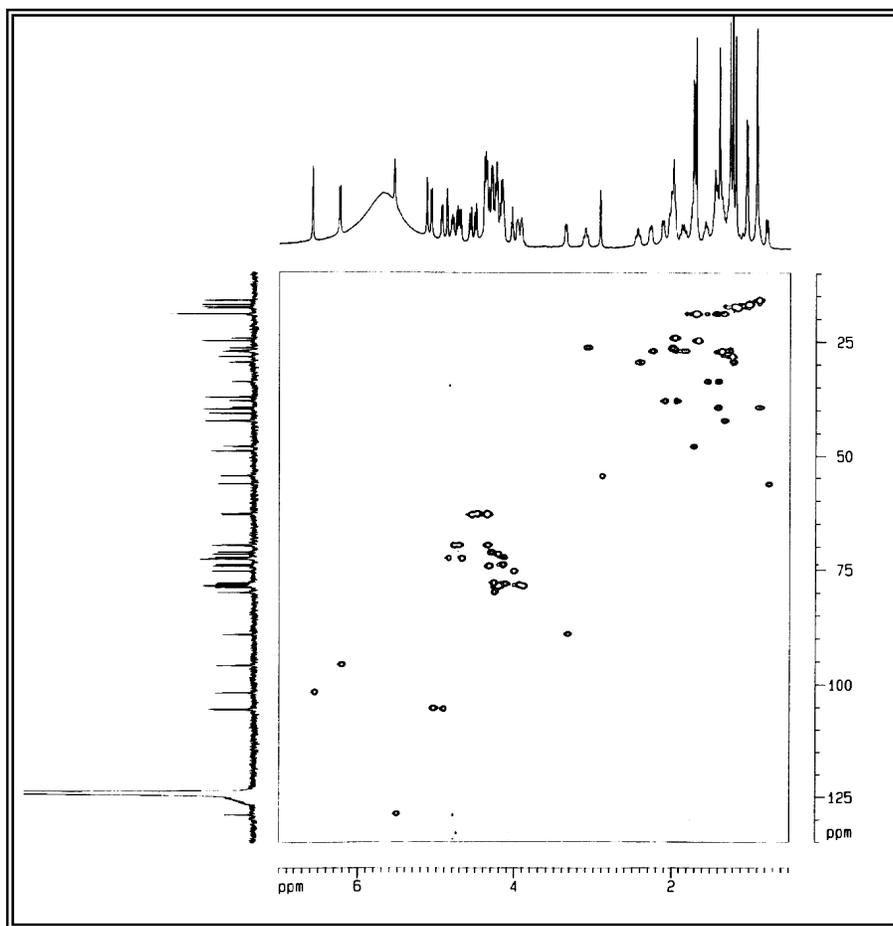


Figura 64. Espectro de RMN-HMQC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) e expansões de CCP-2.

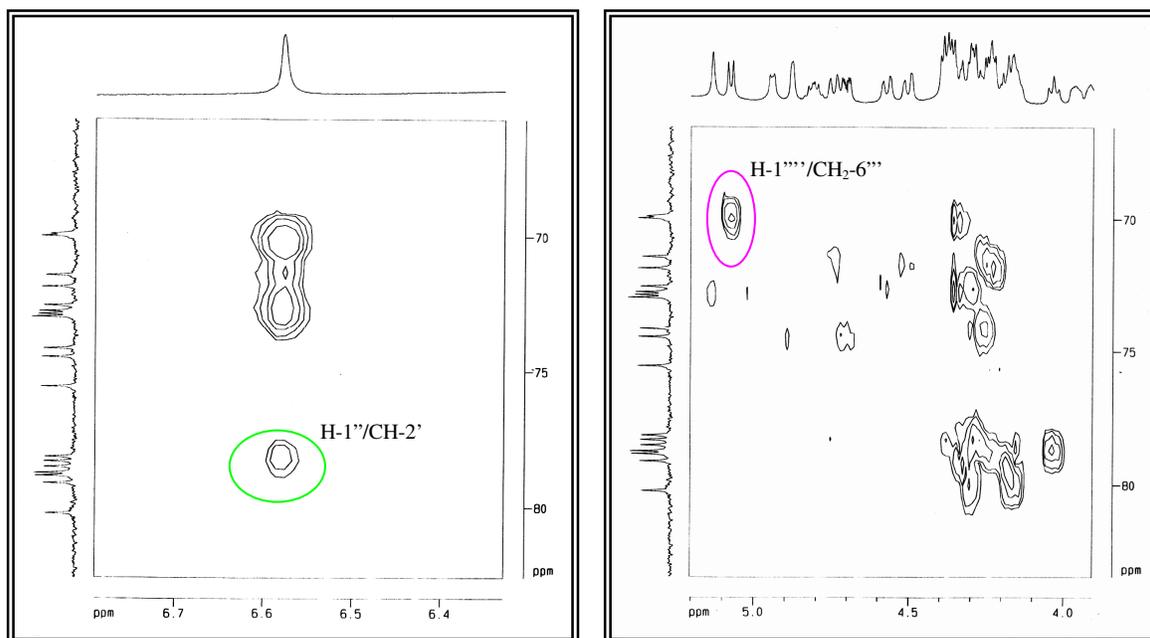
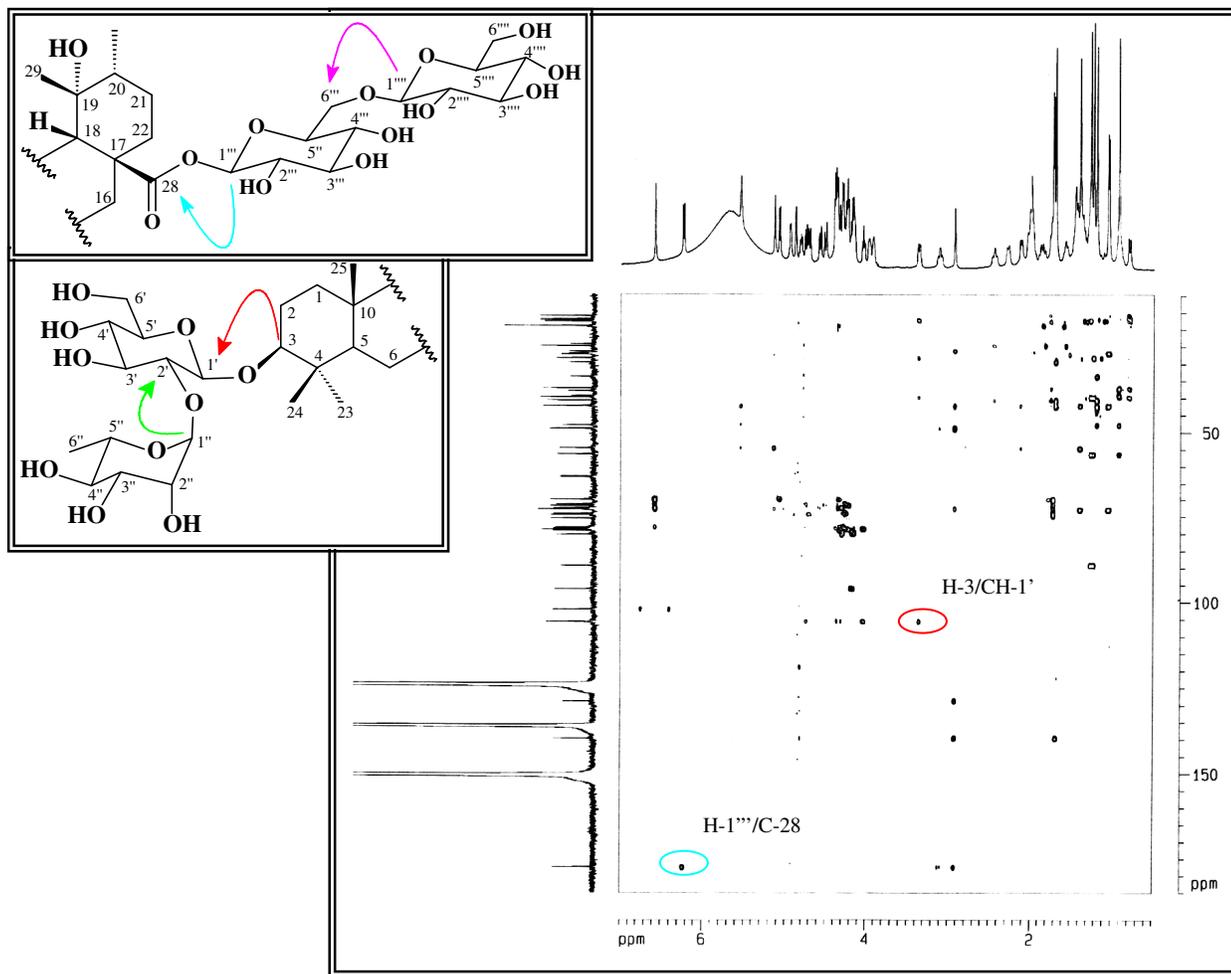


Figura 65. Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, C₅D₅N) e expansões de CCP-2.

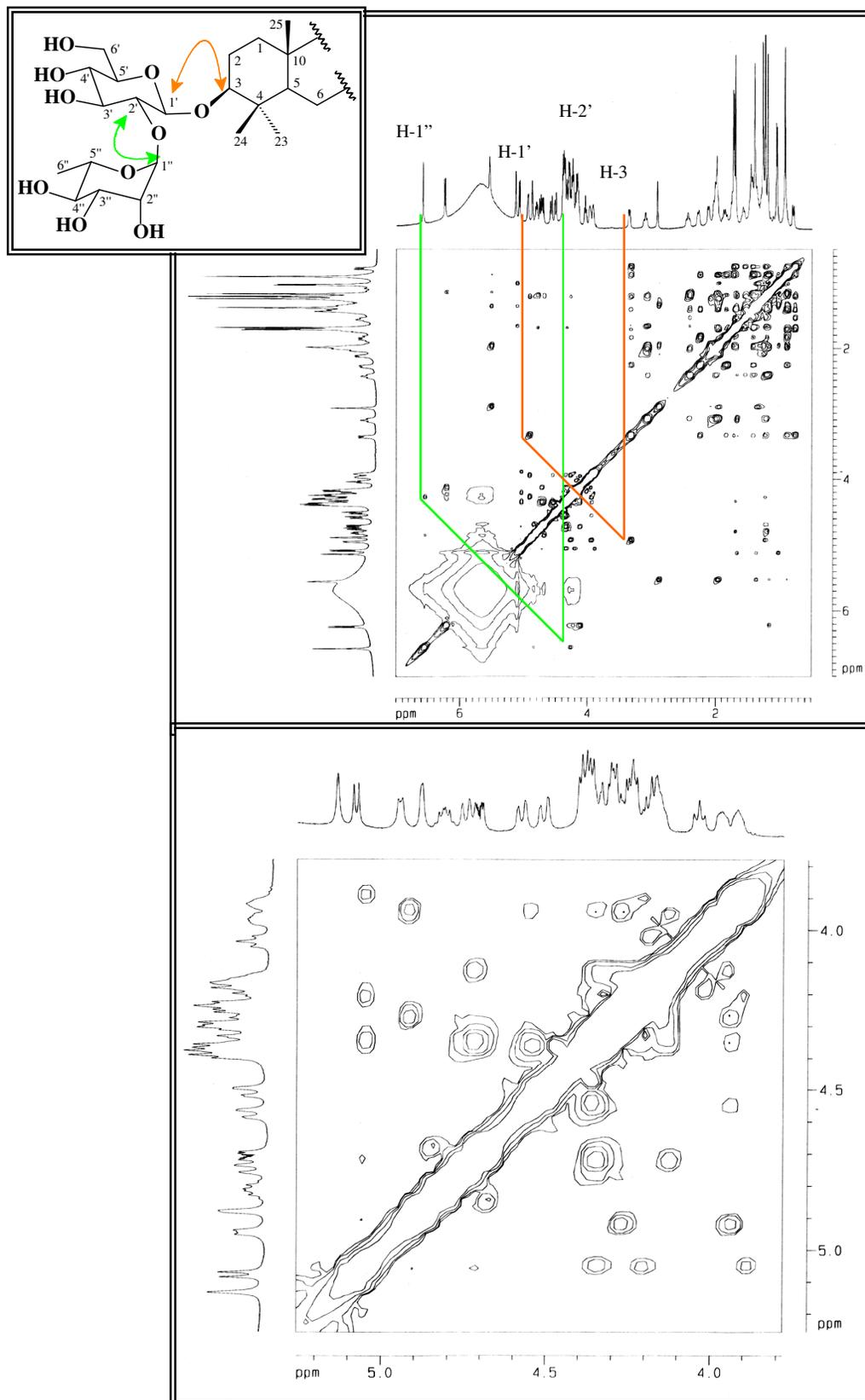


Figura 66. Espectro de RMN-NOESY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansão de CCP-2.

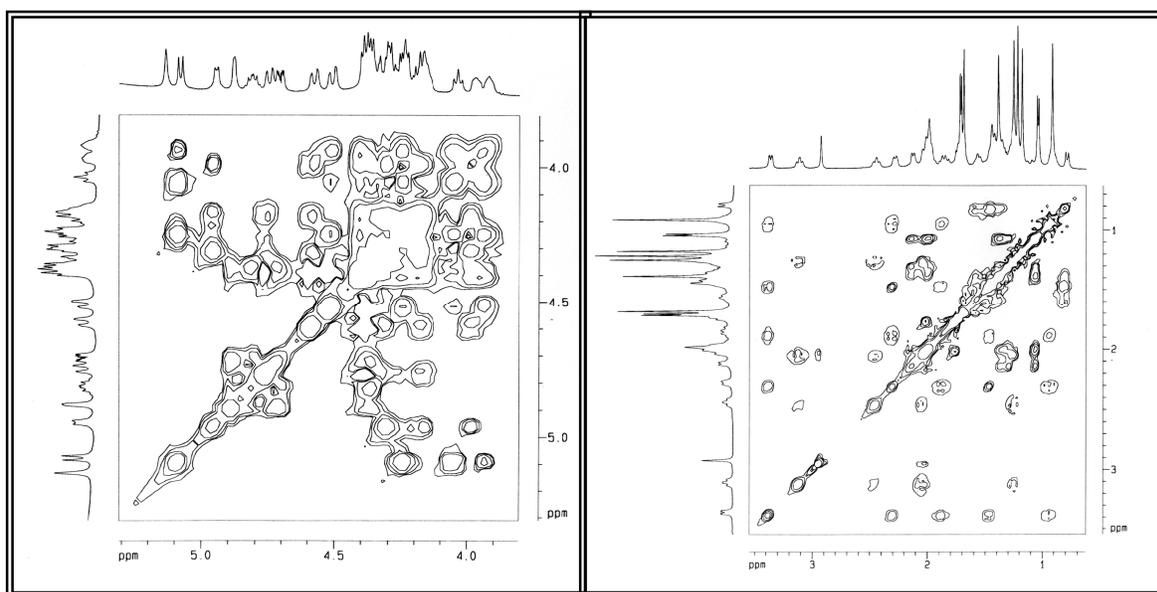
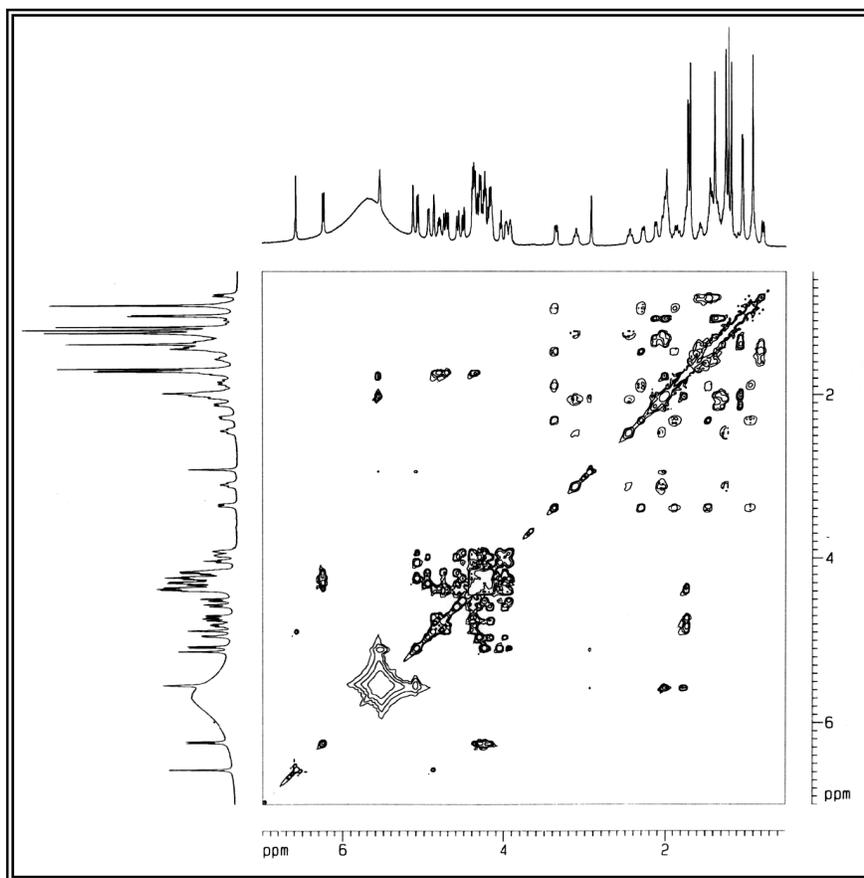


Figura 67. Espectro de RMN-TOCSY (500 MHz, C_5D_5N) e expansão de CCP-2.

3.2.3. Determinação estrutural de CCP-3

Assim como CCP-2, o metabólito CCP-3 foi isolado a partir da fração n-butanol (Item 4.6.3, pág. 175), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual apresentou ponto de fusão 229-230 °C, $[\alpha]_D^{20} -0,22^\circ$ (c. 0.05, C₅H₅N).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 68, pág. 110) apresentou uma banda larga acentuada centrada em $\lambda_{\text{máx}} 3414 \text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento O-H de álcoois, uma banda em $\lambda_{\text{máx}} 1633 \text{ cm}^{-1}$ característica de grupo carboxila e uma absorção intensa em $\lambda_{\text{máx}} 1072 \text{ cm}^{-1}$, característica de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-BB (Fig. 71, pág. 112) apresentou 59 linhas espectrais, e após análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 72, pág. 113), revelou a presença de 31 carbonos monohidrogenados (25 deles oxigenados); 13 carbonos metilênicos, dos quais 4 são oxigenados e 8 carbonos metílicos. Por subtração dos referidos espectros, constatou-se a presença de 7 carbonos não-hidrogenados, onde um foi compatível com uma carbonila de éster em $\delta_c 176,5$. Ainda com base nos espectros de RMN ¹³C – BB e DEPT 135°, os sinais em $\delta_c 138,9$ e $125,9$ estão em acordo com uma dupla ligação carbono-carbono trissubstituída.

O espectro de massa (Fig. 69, pág. 110) com ionização por elétron-spray (ESIMS) apresentou um pico correspondente ao íon quasi-molecular de $m/z 1244$ ($[M + Na]^+$), compatível com a fórmula molecular C₅₉H₉₆O₂₆, a qual apresenta 12 graus de insaturação.

A análise dos dados extraídos dos espectros de IV, RMN ¹³C e DEPT 135° forneceu dados para sugerir a composição molecular descrita na Tabela 17 justificando a fórmula molecular obtida através do espectro de massa.

Tabela 17. Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-3

C	CH	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
176,5	125,9	106,2	75,9	69,4	28,3
138,9	89,2	105,7	75,4	67,5	24,0
48,6	56,3	105,5	74,3	63,2	21,5
42,5	53,4	101,8	72,7	62,8	18,9
40,3	48,2	93,6	72,6	39,5	17,6
39,5	39,5	80,2	72,4	36,9	17,5
37,0	39,3	80,2	71,7	33,6	17,3
		78,7	71,4	31,0	16,0
		78,7	70,7	29,3	
		78,6	69,7	27,0	
		78,5		24,4	
		78,4		23,1	
		78,0		18,6	
		77,6			
$\text{C}_7\text{O}_2^{\text{a}}$	$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}^{\text{b}}$	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_{19}^{\text{c}}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_4^{\text{d}}$	C_8H_{24}	$\text{C}_{59}\text{H}_{81}\text{O}_{26} + 15\text{H}^{\text{e}} = \text{C}_{59}\text{H}_{96}\text{O}_{26}$

^a Oxigênios pertencentes ao grupo carboxila

^b Oxigênio da ligação aglicona-monossacarídeo

^c Oxigênios pertencentes aos monossacarídeos

^d Oxigênios pertencentes aos carbonos metilênicos das unidades de açúcar

^e Hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxila (OH)

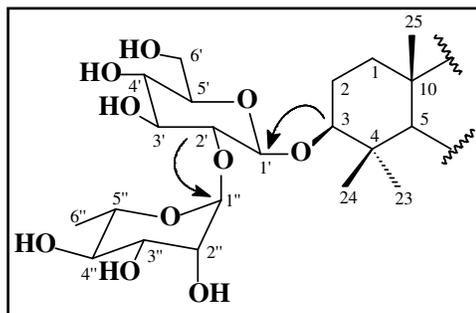
Os sinais em δ_{H} 126,0 e 138,9 no espectro de RMN ^{13}C correspondentes a dupla ligação carbono-carbono juntamente com a presença de sete grupos metilas em δ_{C} 28,3; 24,0; 21,5; 17,6; 17,5; 17,3 e 16,0, os quais com base no experimento HMQC (Fig. 74, pág. 115), foram correlacionados aos sinais de hidrogênio em δ_{H} 1,16 (s), 1,16 (s), 0,85 (sl), 0,93 (d), 1,02 (s), 1,10 (d) e 0,79 (s), respectivamente, possibilitou determinar que a aglicona triterpênica de CCP-3 pertence também a série ursano (Mahato, 1994).

Após análise do experimento HMBC (Fig. 75, pág. 116), o qual revelou a correlação entre os hidrogênios em δ_H 0,93 (d, 6,1, 3H-29) e 0,85 (sl 3H-30) com o carbono metínico em δ_C 39,5 (C-19), mostrou que o triterpeno em questão tratava-se do ácido ursólico.

Ao comparar a fórmula molecular de CCP-2 e CCP-3, bem como a análise dos espectros uni- e bidimensionais, pode-se observar a semelhança entre eles, sugerindo que este metabólito tratava-se também de uma saponina triterpênica bidesmosídica, entretanto, com uma unidade monossacarídica a mais.

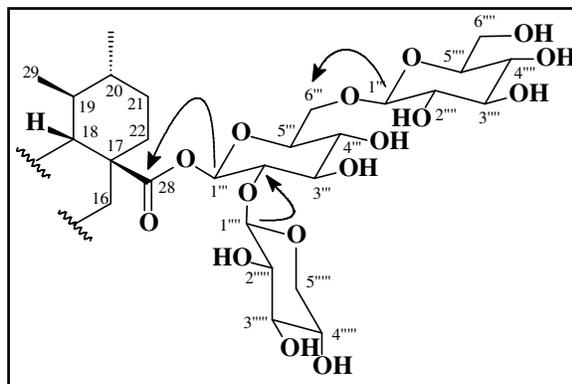
A confirmação desta informação foi evidenciada pela presença de cinco sinais observados do espectro HMQC em 106,2, 105,7, 105,5, 101,8 e 93,6, os quais foram correlacionados aos sinais de hidrogênios em δ_H 5,35; 4,92; 4,99; 6,60 e 6,05, característicos de absorções de carbonos anoméricos, indicando portanto, a existência de cinco unidades de monossacarídicas. Assim como em CCP-2, observou a presença de três grupos metilênicos oxigenados em δ_C 69,4; 63,2 e 62,8, em acordo com o experimento DEPT 135°, que aliados aos valores dos deslocamentos químicos sugerem a presença de três unidades de glicose. Observou-se ainda a presença de um quarto grupo metilênico que, com o auxílio das técnicas bidimensionais COSY (Fig. 73, pág. 114), NOESY (Fig. 76, pág. 117) e TOCSY (Fig. 77, pág. 118), possibilitou relacioná-lo a uma pentose (C₅H₈O₄), a qual foi caracterizada como sendo a xilose. O monossacarídeo restante foi atribuído a ramnose, a qual foi identificada principalmente através da absorção em δ_H 1,69 (d, 3H-6'') referente a um grupo metila, cujo valor de *J* (6,0 Hz) é compatível com acoplamento vicinal.

As posições das unidades de açúcar foram estabelecidas, principalmente através do espectro HMBC, onde observou-se inicialmente a correlação a três ligações entre o hidrogênio H-3 em δ_H 3,32 e carbono anomérico CH-1' (δ_C 105,7), assim como a correlação entre o carbono anomérico da ramnose em δ_C 101,8 (CH-1'') e o hidrogênio em δ_H 4,30 (H-2'), indicando assim, que duas unidades de açúcar estão ligadas ao carbono carbinólico CH-3 (δ_C 98,2).



As três outras unidades monossacarídicas, considerando o deslocamento químico de C-28 (δ_C 176,5) encontram-se ligadas a este carbono carbonílico. A confirmação desta

proposição foi confirmada através da correlação a três ligações entre este carbono e o hidrogênio em δ_H 6,05 (H-1'''), ligado ao carbono anomérico em δ_C 93,6 (CH-1''') de uma unidade de glicose. Observou-se também correlação a três ligações entre o hidrogênio em δ_H 4,99 ligado ao carbono anomérico (H-1''') de uma outra unidade de glicose e o carbono metilênico em δ_C 69,4 (CH₂-6'''), bem como a correlação observada foi entre o hidrogênio ligado ao carbono anomérico da xilose em δ_H 5,35 (H-1''''') e o carbono em δ_C 80,2 (CH-2''''').



A comparação dos dados espectroscópicos de CCP-2 também foi de fundamental importância para a elucidação estrutural de CCP-3. Desta forma conclui-se que o metabólito em discussão trata-se de uma saponina triterpênica bidesmosídica denominada 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] ursolato de 28-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila, a qual também está sendo registrado pela primeira vez na literatura.

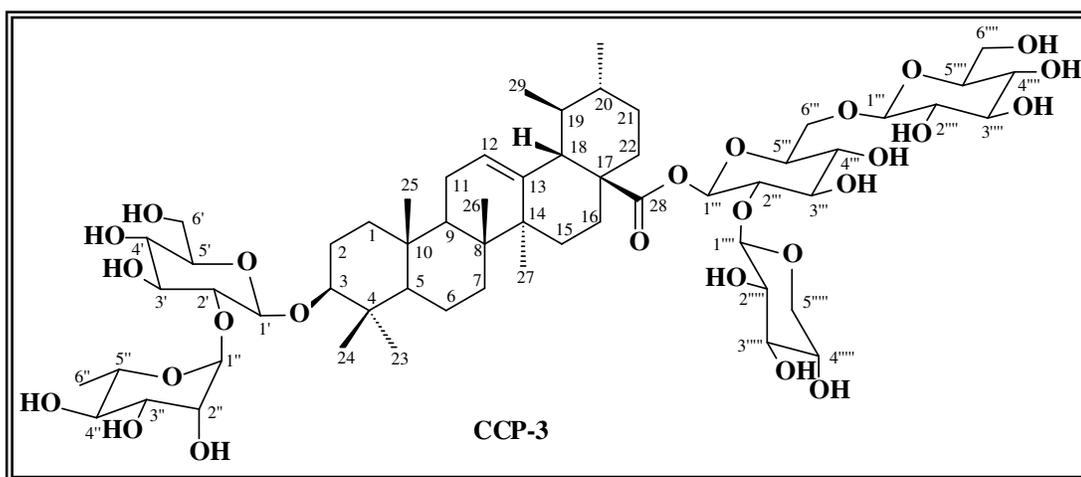


Tabela 18. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da aglicona de CCP-3

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	39,4	1,40; 0,98		H-3; 3H-25
2	27,0	2,30; 1,95		
3	89,2	3,32 (dd)		H-1'
4	39,5	-	H-5; 3H-23; 3H-24	
5	56,3	0,69 (d; 11,9)		3H-23; 3H-24; 3H-25
6	18,6	1,45		
7	33,6	1,58; 1,40		3H-26
8	40,3	-	H-9; 3H-26	3H-27
9	48,1	1,52		3H-25; 3H-26
10	37,0	-	H-5; H-9; 3H-25	
11	23,1	1,90	H-9	
12	126,0	5,40 (sl)		H-18
13	138,9	-	H-18	3H-27
14	42,6	-	3H-27	H-18; 3H-26
15	29,3			3H-27
16	24,4			H-18
17	48,6	-	H-18	
18	53,4	2,47 (d; 11,1)		3H-29
19	39,5	1,40	H-18; 3H-29	3H-30
20	39,3	1,40	3H-30	H-18; 3H-29
21	31,0			3H-30
22	36,9	1,99; 1,80		
23	28,2	1,16 (s)		H-3; H-5; 3H-24
24	17,3	1,10 (s)		H-3; H-5; 3H-23
25	16,0	0,79 (s)		H-5; H-9
26	17,6	1,02 (s)		H-9
27	24,0	1,16 (s)		
28	176,5	-		H-18; H-1''''
29	17,5	0,93 (d; 6,1)		H-18
30	21,5	0,85		

Tabela 19. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da unidade osídica de CCP-3

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1'	105,7	4,92 (d; 6,7)		H-1
2'	80,2	4,30	H-3'	
3'	78,7	4,18		
4'	72,4	4,15		
5'	78,4	3,95 (m)		
6'	63,2	4,55 (l, 11,3); 4,37		
1''	101,8	6,60 (s)		
2''	72,7	4,84 (sl)		
3''	72,7	4,67 (m)	H-2''	
4''	74,31	4,38	H-3''	H-2''
5''	69,8	4,78 (m)		
6''	18,9	1,69 (d; 6,0)		H-4''
1'''	93,6	6,05 (d; 7,9)	H-2'''	
2'''	80,2	4,20	H-3'''	
3'''	77,6	4,32	H-2'''	
4'''	70,7	4,28		H-6'''a
5'''	78,0	4,05		
6'''	69,4	4,64 (dl; 11,0); 4,32		H-1''''
1''''	105,5	4,99 (d; 7,7)	H-2''''	2H-6''''
2''''	75,4	4,00		
3''''	78,7	4,25		
4''''	71,7	4,20		
5''''	78,7	3,87 (m)		
6''''	62,8	4,47 (dl; 10,1); 4,37		
1'''''	106,2	5,35 (d; 7,6)	H-2'''''	H-2''''; 2H-5'''''
2'''''	76,0	4,05	H-3'''''	
3'''''	78,5	4,20	H-2'''''	2H-5'''''
4'''''	71,4	4,25	H-5'''''	
5'''''	67,5	4,45; 3,70 (t; 10,0), H-ax		

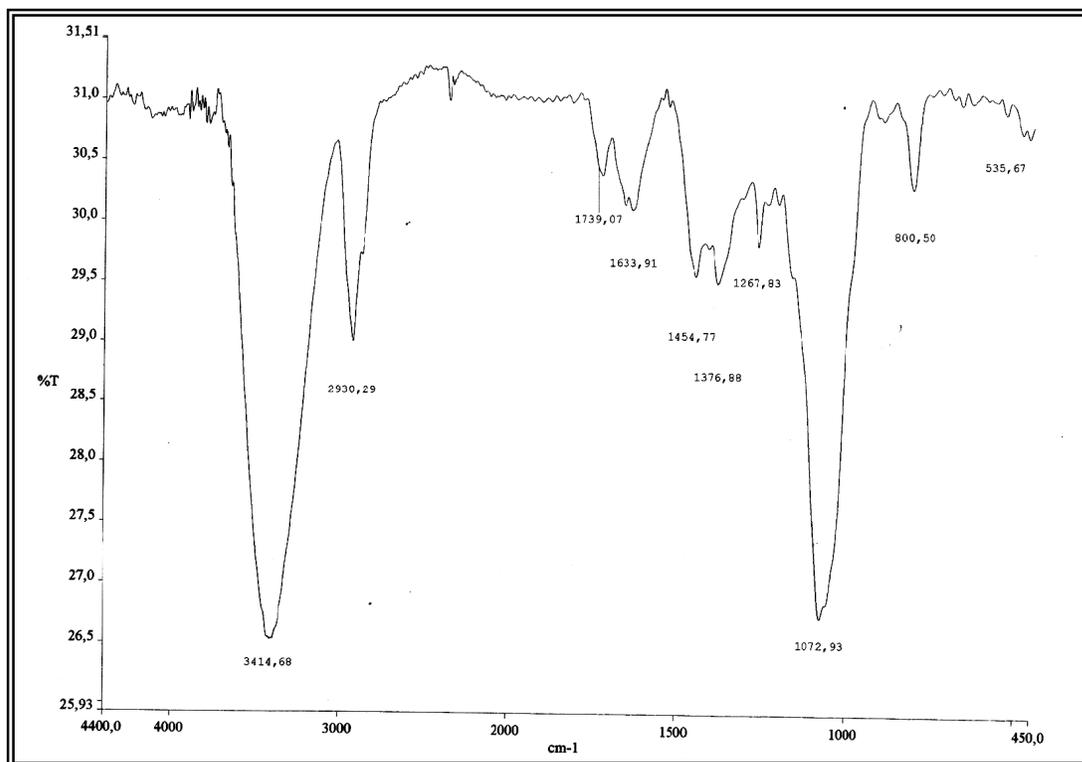


Figura 68. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CCP-3

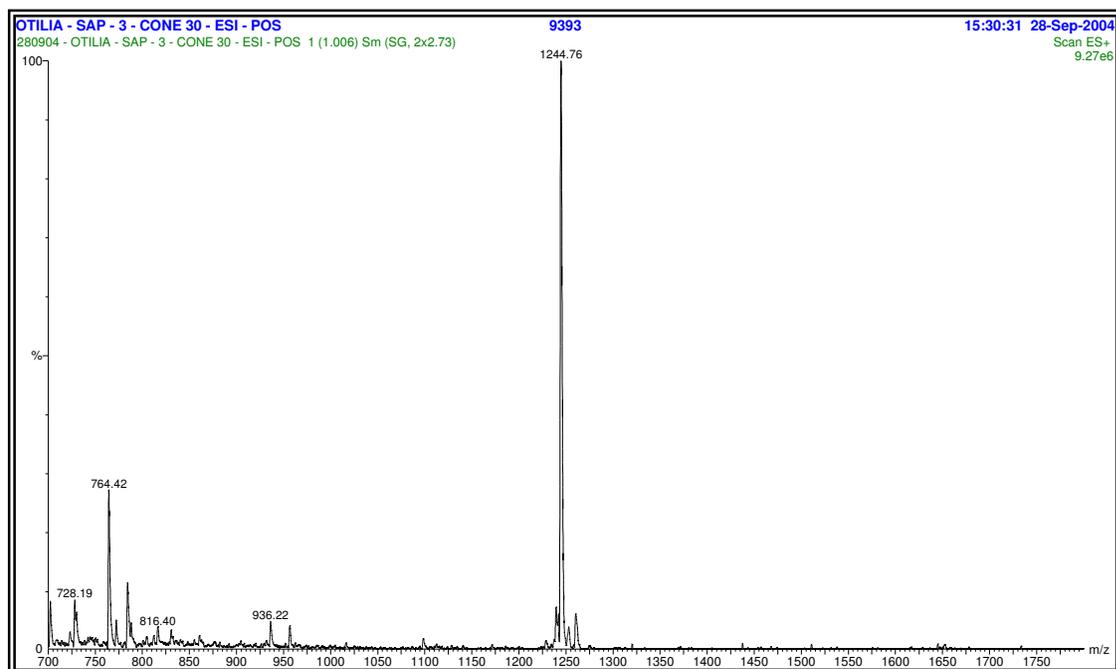


Figura 69. Espectro de massa com ionização por elétron-spray (ESIMS) de CCP-3

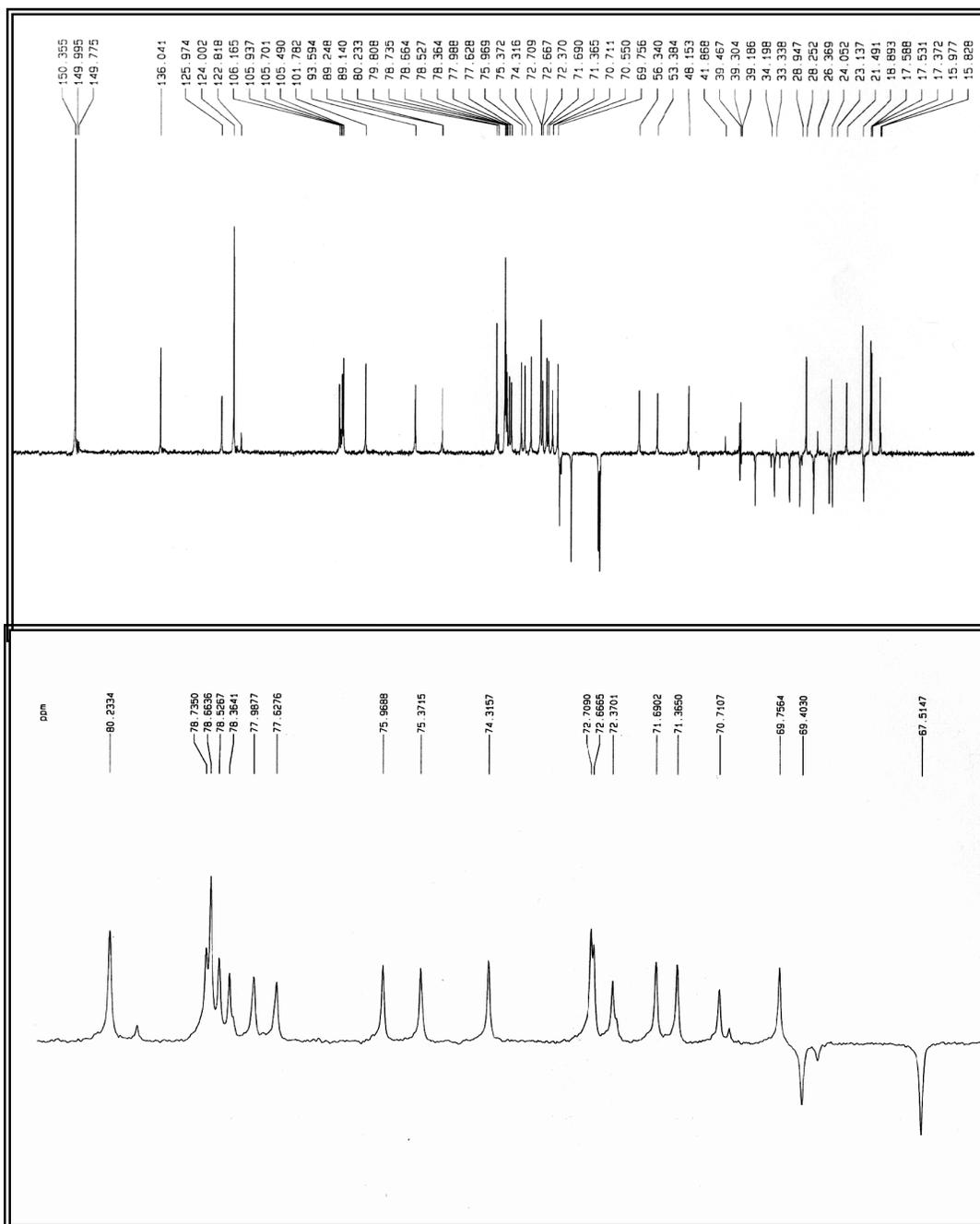


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansão de CCP-3.

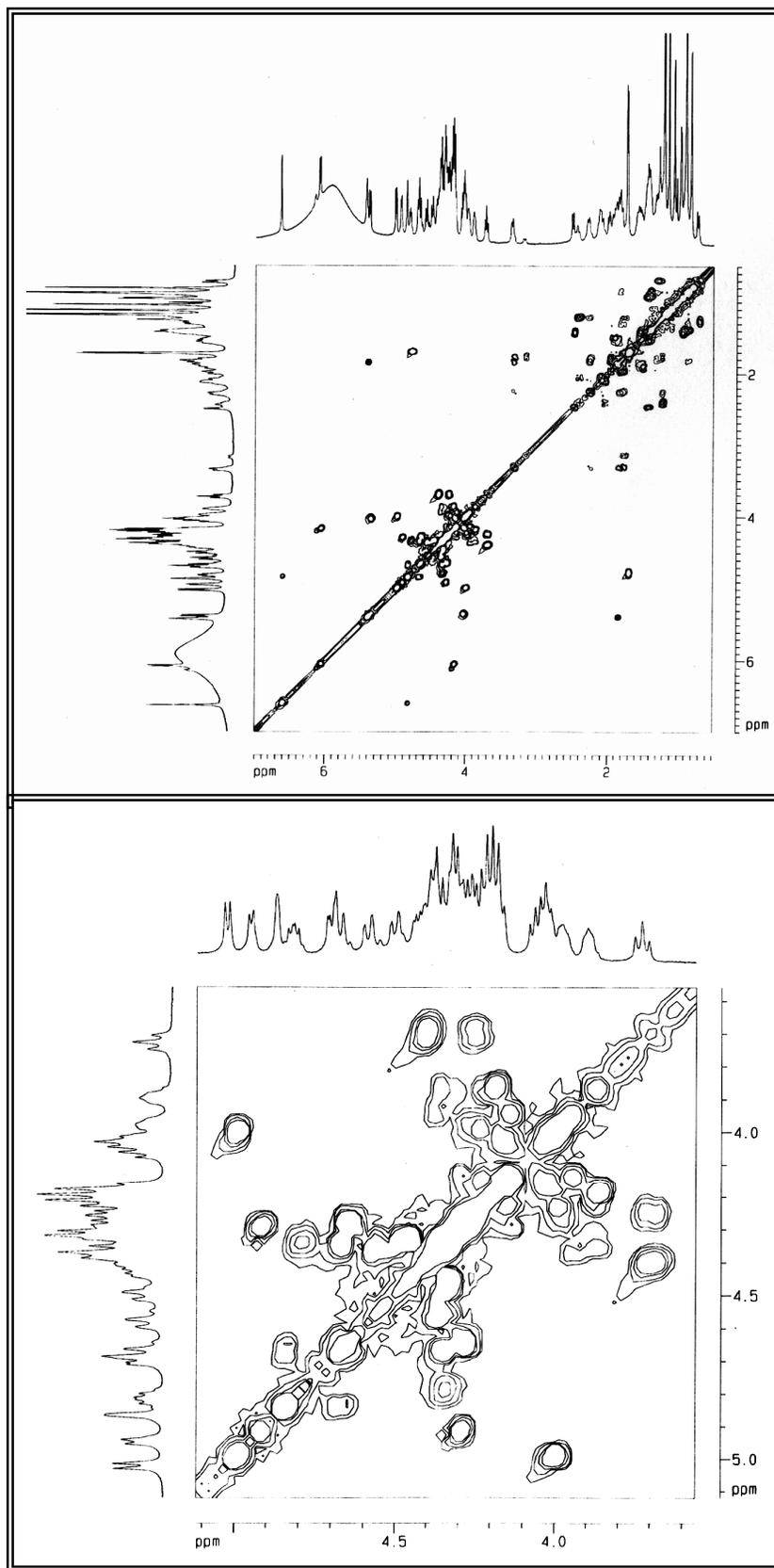


Figura 73. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansão de CCP-3.

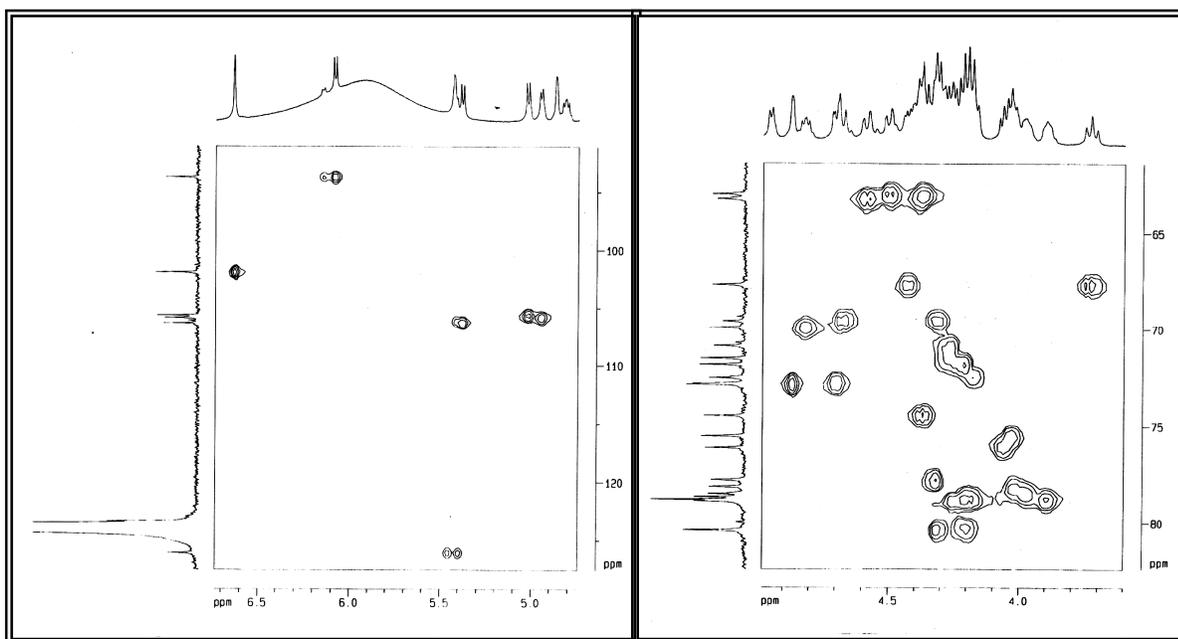
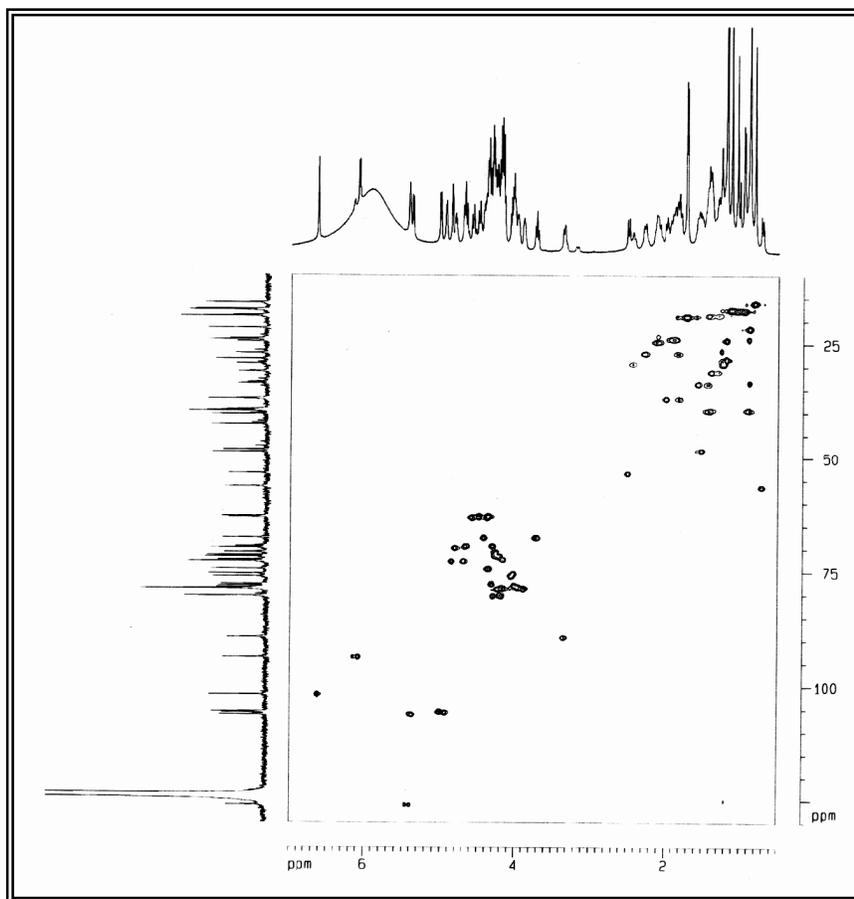


Figura 74. Espectro de RMN-HMQC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) e expansões de CCP-3.

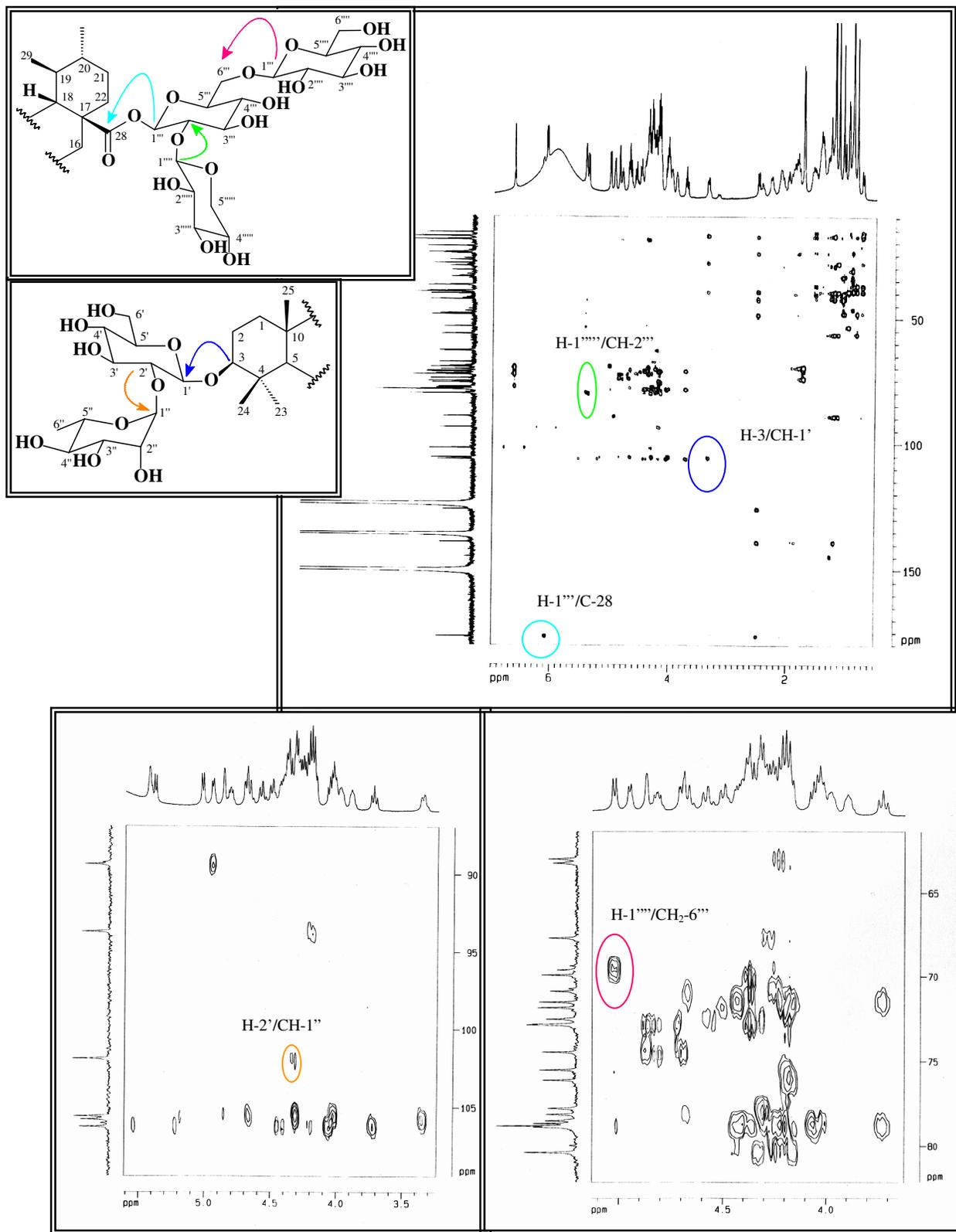


Figura 75. Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, C₅D₅N) e expansões de CCP-3.

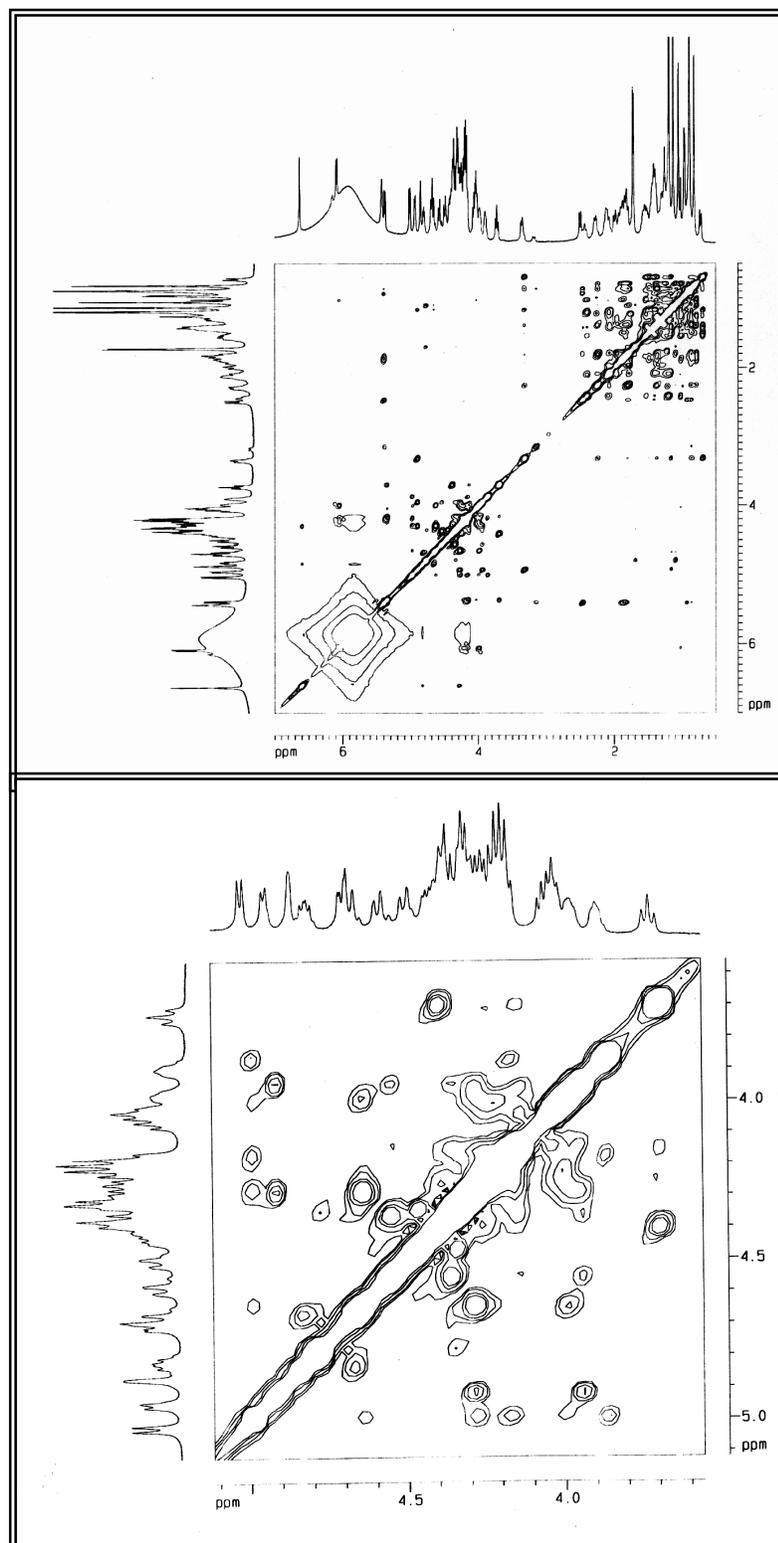


Figura 76. Espectro de RMN-NOESY (500 MHz, C₅D₅N) e expansão de CCP-3.

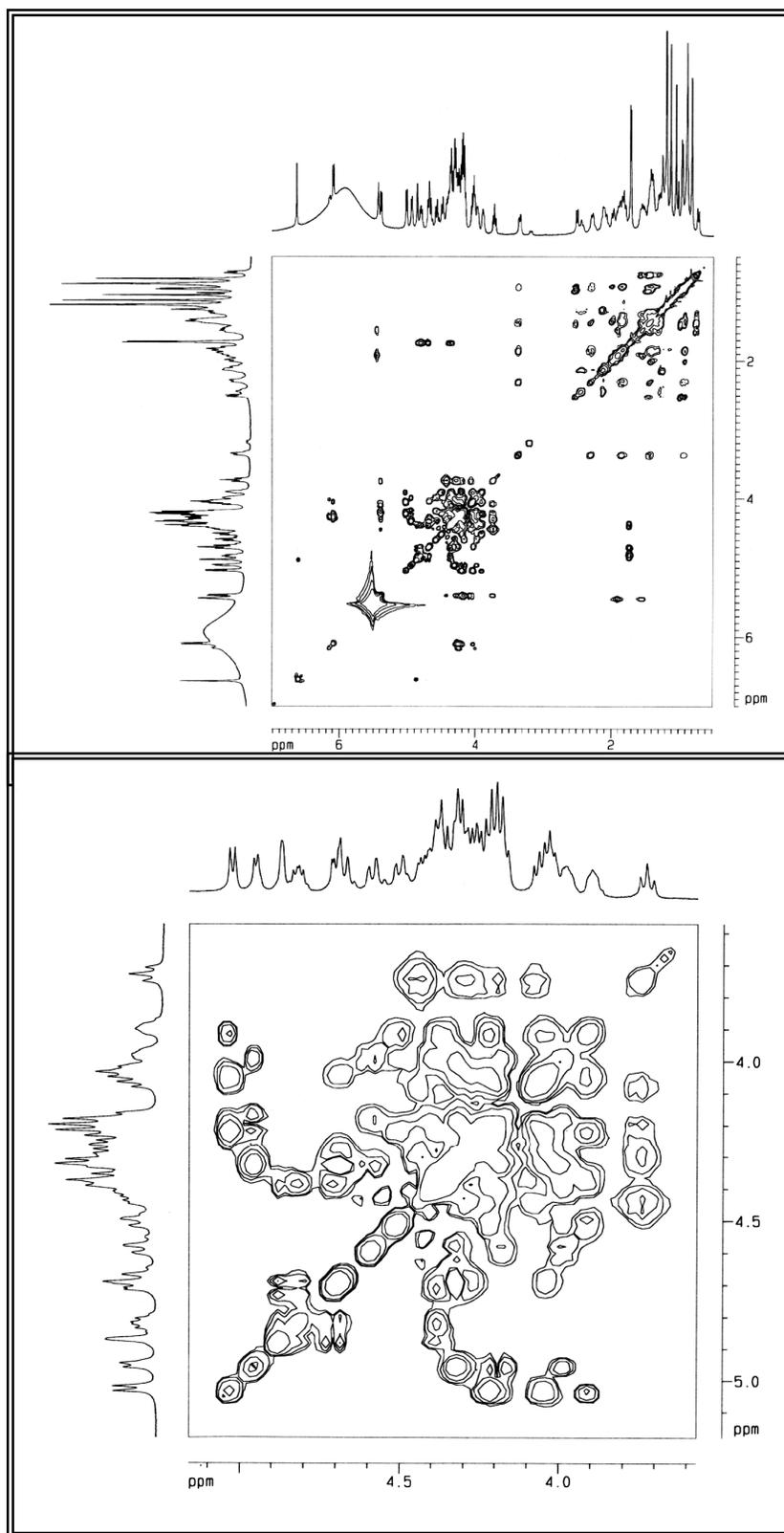


Figura 77. Espectro de RMN-TOCSY (500 e 125 MHz, C₅D₅N) e expansão de CCP-3.

3.2.4. Determinação estrutural de CCP-4

CCP-4 também foi isolado a partir da fração n-butanol (Item 4.6.3, pág. 175), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Tal composto apresentou ponto de fusão 227-229 °C e $[\alpha]_D^{20} -26^\circ$ (c. 0.05, C₅H₅N).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 78, pág. 124) apresentou uma banda larga acentuada em $\lambda_{\text{máx}} 3424 \text{ cm}^{-1}$ característica de estiramento O-H de álcoois, uma banda em $\lambda_{\text{máx}} 1639 \text{ cm}^{-1}$ característica de ligação C=O e ainda absorções na faixa de $\lambda_{\text{máx}} 1201$ a 1069 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-BB (Fig. 81, pág. 126) apresentou 48 linhas espectrais, seis a menos que no espectro de CCP-2. Após análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 82, pág. 127), identificou-se a presença de vinte e um carbonos monohidrogenados (dezesseis deles oxigenado); onze carbonos metilênicos, dos quais dois eram oxigenados e oito carbonos metílicos. Por subtração dos referidos espectros, constatou-se a presença de oito carbonos não-hidrogenados, um dos quais compatível com uma carbonila de éster em $\delta_c 177,3$. Ainda com base no espectro de RMN ¹³C, os sinais em $\delta_c 139,6$ e $128,8$ foram compatíveis com a presença de uma dupla ligação carbono-carbono, a qual de acordo com o experimento DEPT 135° correspondia a uma dupla ligação trissubstituída.

O espectro de massa (Fig. 79, pág. 124) com ionização por elétron-spray (ESIMS) apresentou um pico relativo ao íon quasi-molecular de $m/z 941$ ($[M - H]^-$), que em corroboração com os espectros de RMN ¹³C – BB e DEPT 135° foi compatível com a fórmula molecular C₄₈H₇₈O₁₈, a qual apresenta 10 graus de insaturação, como descrita na Tabela 20, a seguir.

Tabela 20. Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-4

C	CH	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
177,3	128,8	105,8	72,8	62,7	28,4
139,6	89,4	102,1	71,6	63,3	27,3
72,6	56,5	96,2	70,0	39,5	24,9
49,0	54,8	80,3		38,1	19,1
42,5	48,0	79,6		33,9	17,7
40,9	42,5	79,3		29,6	17,5
39,9		78,5		27,2	17,1
37,3		78,1		27,1	16,0
		74,5		26,5	
		74,4		24,4	
		73,0		19,0	
		72,9			
$\text{C}_8\text{O}_3^{\text{a}}$	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}^{\text{b}}$	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_{12}^{\text{c}}$	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2^{\text{d}}$	C_8H_{24}	$\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{O}_{18} + 11\text{H}^{\text{e}} = \text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$

^a Oxigênios pertencentes ao grupo carboxila e a uma hidroxila

^b Oxigênio da ligação aglicona-monossacarídeo

^c Oxigênios pertencentes aos monossacarídeos

^d Oxigênios pertencentes aos carbonos metilênicos das unidades de açúcar

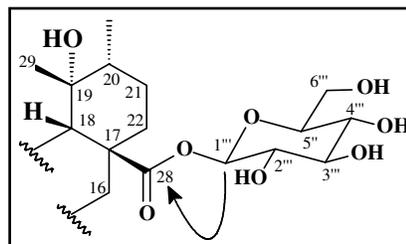
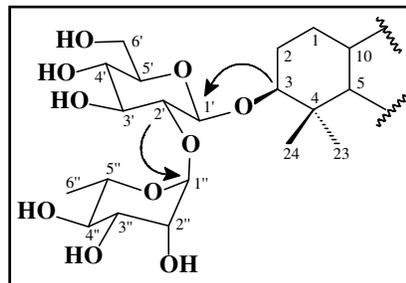
^e Hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxila (OH)

Os dados espectroscópicos de CCP-4 apresentaram-se bastante semelhantes aos dados de CCP-2. A análise dos dados de RMN deste metabólito levou a concluir que também se tratava de uma saponina triterpênica, onde a aglicona seria o ácido pomólico, assim como em CCP-2.

A presença de três unidades monossacarídicas foi confirmada através dos sinais observados em δ_{C} 105,8; 102,1 e 96,2 no experimento HMQC (Fig. 84, pág. 129), os quais foram correlacionados aos seus respectivos sinais de hidrogênios em δ_{H} 4,95; 6,59 e 6,32 que considerando os valores dos deslocamentos químicos são característicos de hidrogênios ligados a carbonos anoméricos. Duas destas unidades foram caracterizadas como sendo

glicose, evidenciadas pela presença de dois carbonos metilênicos oxigenados (δ_C 63,3 e 62,7). A terceira unidade foi caracterizada como sendo a ramnose, identificada principalmente através da absorção em 1,72 (d, 6,1, 3H-6'') referente a um grupo metila.

A posição destas unidades monossacarídicas foi determinada através do espectro bidimensional HMBC (Fig. 85, pág. 130), onde foi observada correlação a três ligações entre o carbono anomérico da glicose CH-1' (δ_C 105,8) e o hidrogênio do carbono carbinólico CH-3 (δ_H 3,36). Outra correlação observada foi entre o carbono anomérico da ramnose em δ_C 102,1 (CH-1'') e o hidrogênio (δ_H 4,32) ligado ao carbono CH-2' da glicose ligada ao CH-3. Assim concluiu-se que duas das três unidades de açúcar estavam ligadas ao carbono carbinólico CH-3. Verificou-se ainda correlação a três ligações entre o carbono carbonílico C-28 e o hidrogênio ligado ao carbono anomérico da terceira unidade de açúcar (glicose) CH-1''' (δ_C 96,2).



Com base nos dados discutidos acima, bem como comparação com dados espectroscópicos de CCP-2, conclui-se que CCP-4 trata-se de uma saponina triterpênica bidesmosídica denominada 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] pomolato de 28-O- β -D-glicopiranosila, a qual também está sendo registrada pela primeira vez na literatura.

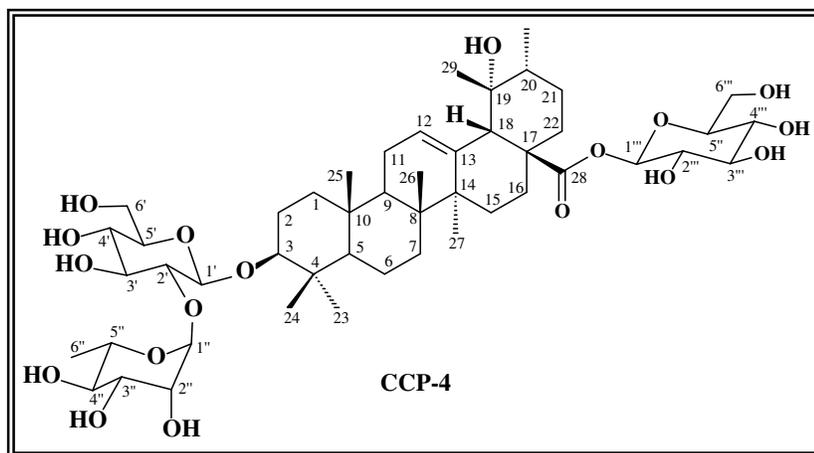


Tabela 21. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da aglicona de CCP-4

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	39,5	1,45; 0,90		3H-25
2	27,2	2,28 (dl; 10,2); 1,85		
3	89,4	3,36 (dd; 11,5; 3,6)		3H-23; 3H-24
4	39,9	-	H-3; 3H-23; 3H-24	
5	56,5	0,80 (d; 11,4)		3H-23; 3H-24; 3H-25
6	19,0	1,70; 1,45	H-7a	
7	33,9	1,59; 1,45		3H-26
8	40,9	-	3H-26	3H-27
9	48,0	1,75		3H-25; 3H-26
10	37,3	-	3H-25	
11	24,4	2,01		
12	128,8	5,60 (sl)		H-18
13	139,6	-	H-18	3H-27
14	42,5	-	3H-27	H-18; 3H-26
15	29,6	2,48 (dt); 1,23		3H-27
16	26,5	3,12 (dt; 13,0; 3,4); 2,06		H-18
17	49,0	-	H16a; H-18	
18	54,8	2,94 (s)		3H-29
19	72,6	-	3H-29	3H-30
20	42,5	1,38 (m)	3H-30	H-18; 3H-29
21	27,1	2,06; 1,27		3H-30
22	38,0	2,08; 1,90		
23	28,4	1,26 (s)		H-3; 3H-24
24	17,5	1,22 (s)		H-3; 3H-23
25	16,0	0,91 (s)		
26	17,7	1,19 (s)		
27	24,9	1,70 (s)		
28	177,3	-		H-1'''; H-18
29	27,3	1,46 (s)		
30	17,1	1,08 (d; 6,4)		

Tabela 22. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da unidade osídica de CCP-4

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1'	105,8	4,95 (d; 6,6)	H-2'	H-3
2'	80,3	4,32	H-3'	H-4'
3'	78,1	4,30	H-2'	
4'	72,8	4,17 (t; 8,9)		
5'	78,5	3,97 (m)		
6'	63,3	4,57 (dl; 10,3); 4,40		
1''	102,1	6,59 (s)		H-2'
2''	72,9	4,88 (sl)	H-1''	
3''	73,0	4,70 (dd; 9,2; 3,0)	H-2''; H-4''	
4''	74,5	4,37	H-3''	H-2''; 3H-6''
5''	70,0	4,82 (m)	H-4''; 3H-6''	H-1''; H-3''
6''	19,1	1,72 (d; 6,1)		
1'''	96,2	6,32 (d; 8,0)	H-2'''	
2'''	74,4	4,25 (t; 8,0)	H-3'''	
3'''	79,3	4,33	H-2'''; H-4'''	H-1'''
4'''	71,6	4,40	H-3'''	
5'''	79,6	4,08 (m)	H-4'''; 2H-6'''	H-1'''
6'''	62,7	4,50 (dl; 10,2) 4,43 (dd; 10,2; 4,2)		

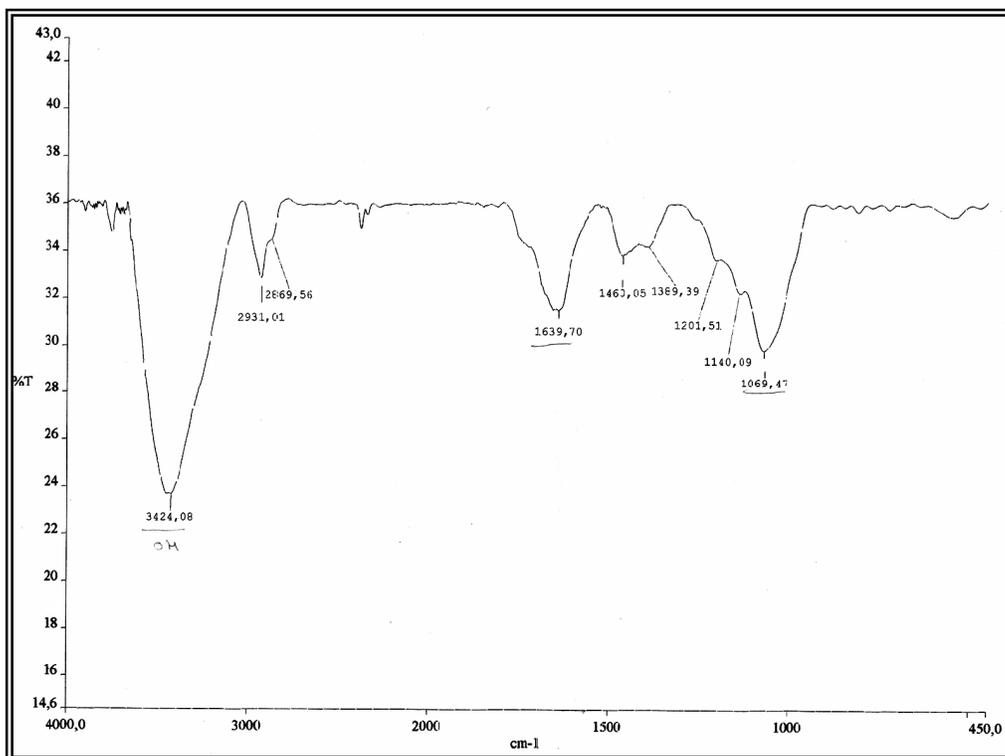


Figura 78. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CCP-4

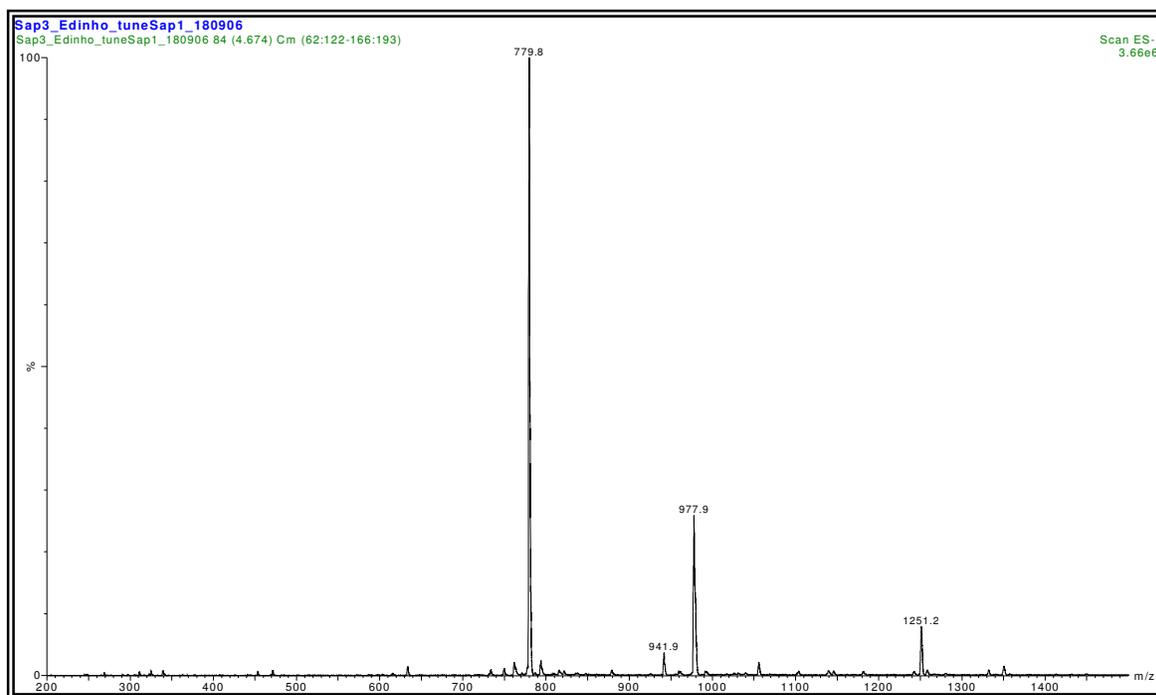


Figura 79. Espectro de massa com ionização por elétron-spray (ESIMS) de CCP-4

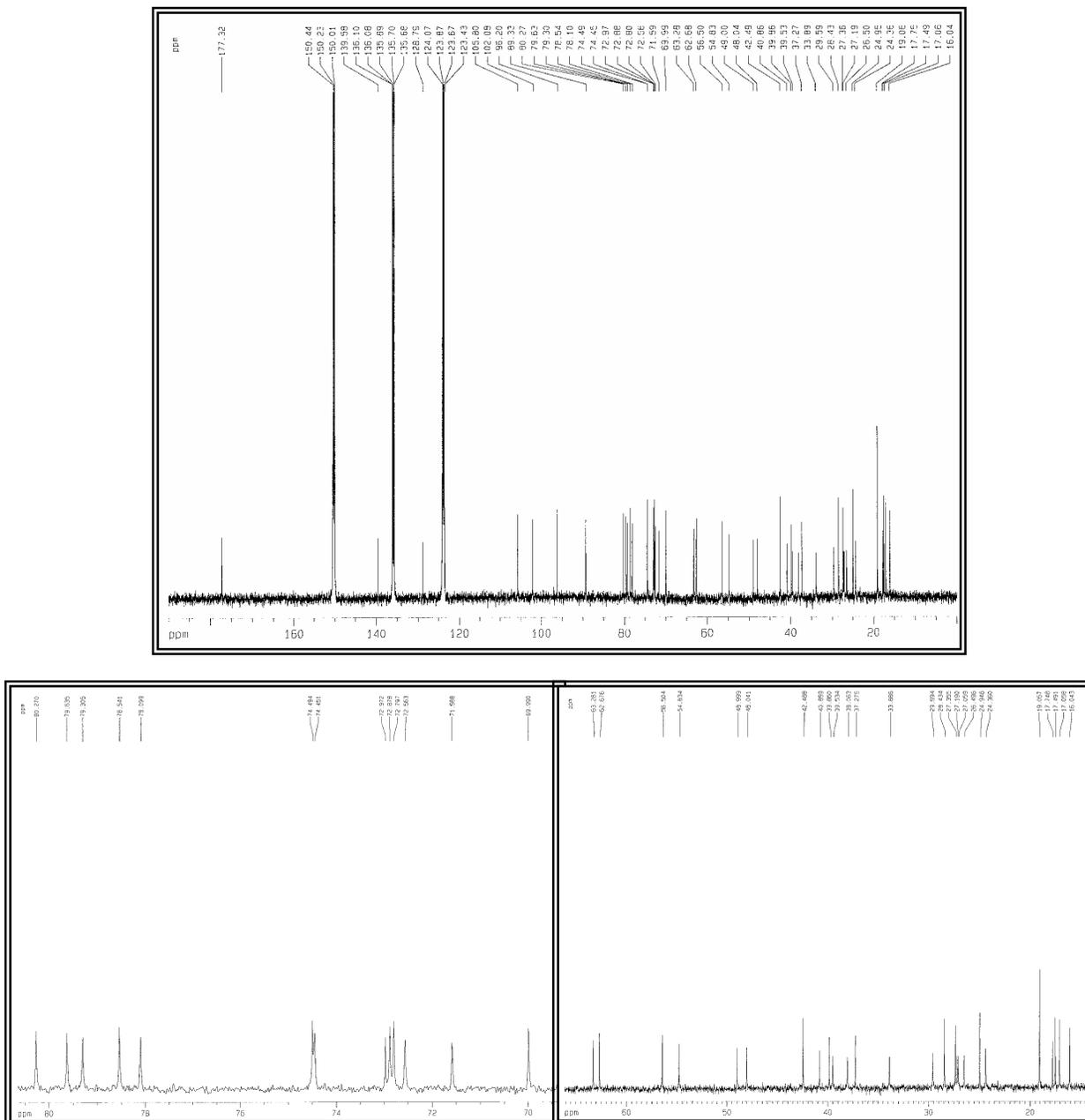


Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansões de CCP-4.

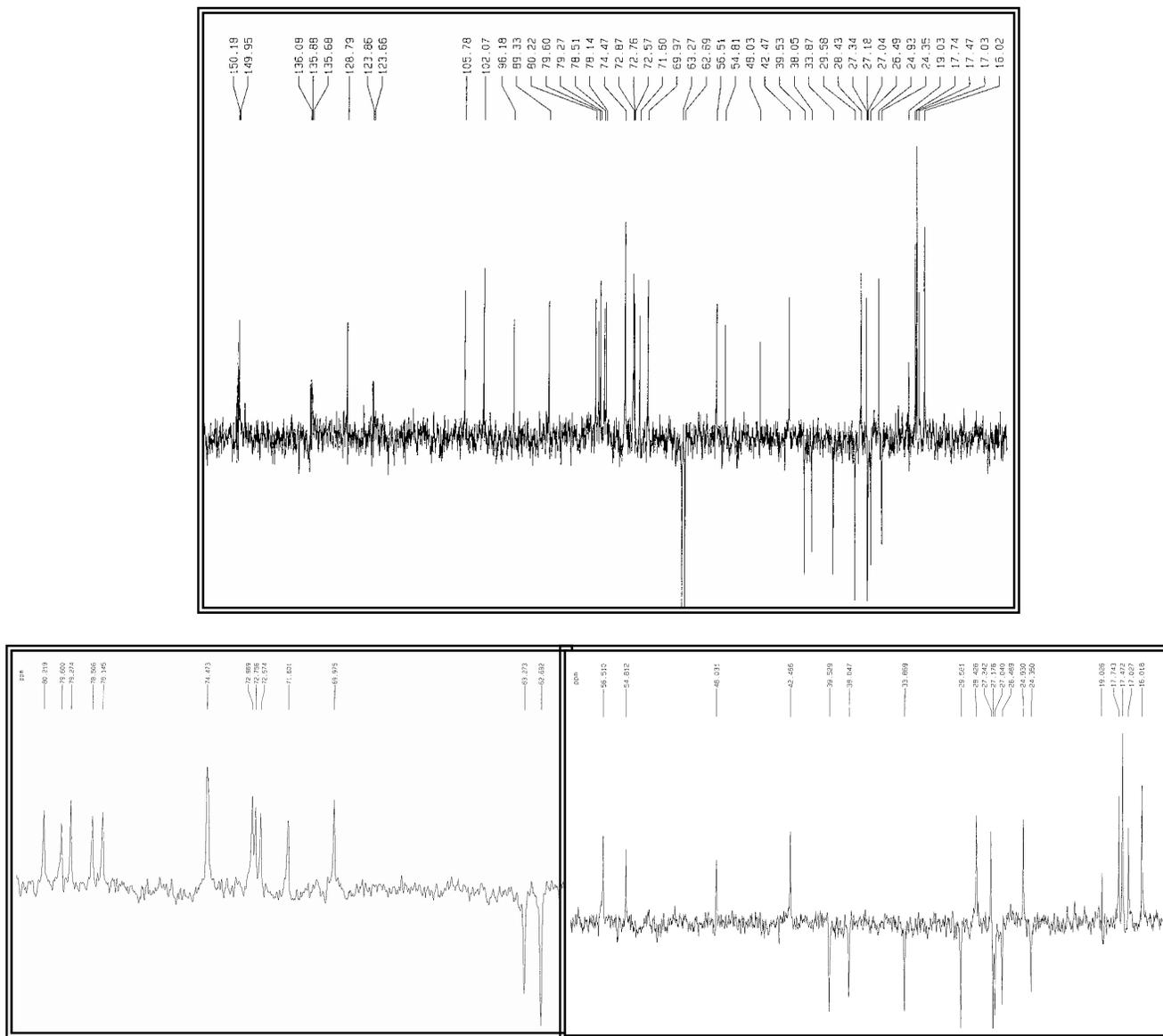


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansões de CCP-4.

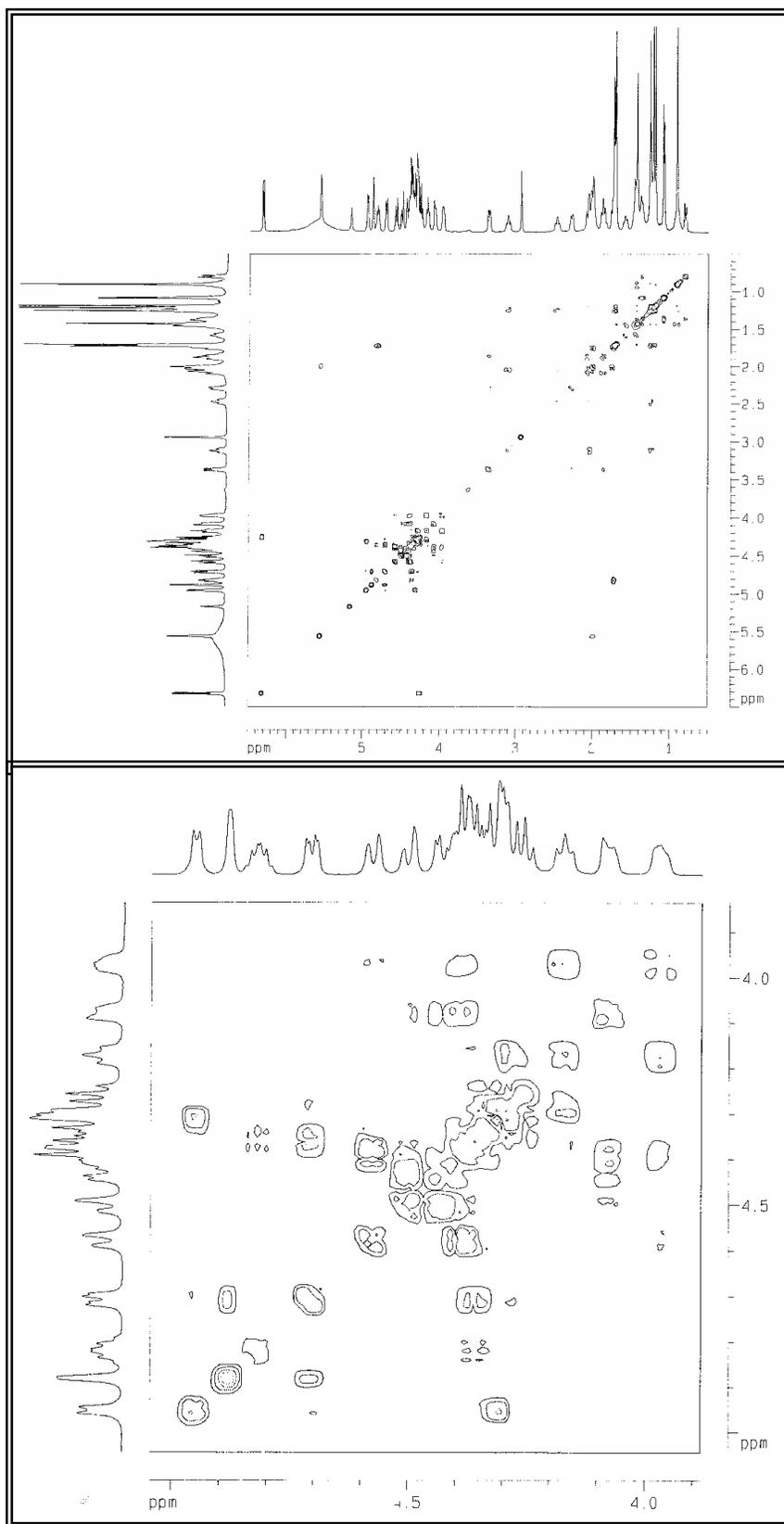


Figura 83. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansão de CCP-4.

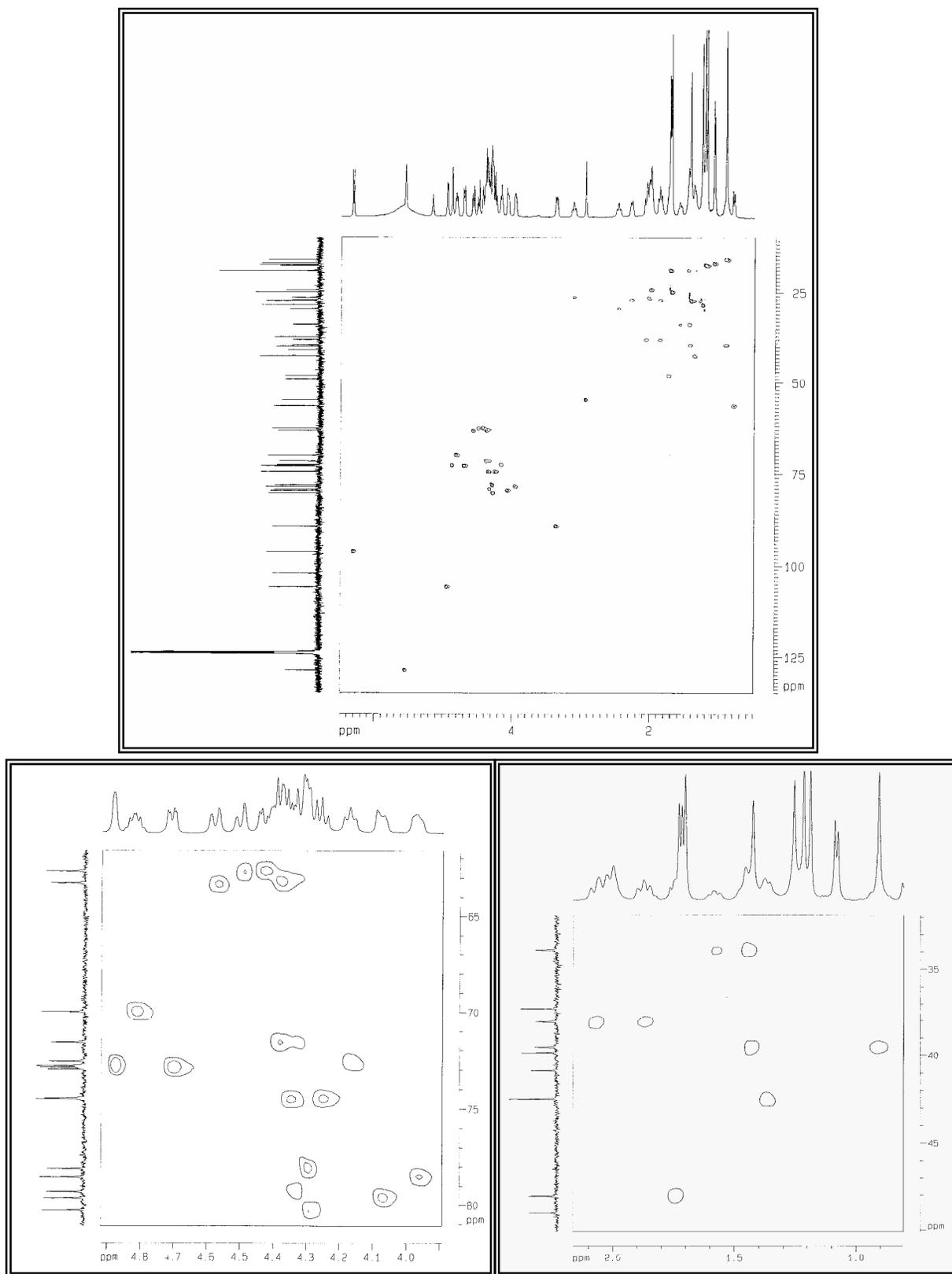


Figura 84. Espectro de RMN-HMQC (500 e 125 MHz, C₅D₅N) e expansões de CCP-4.

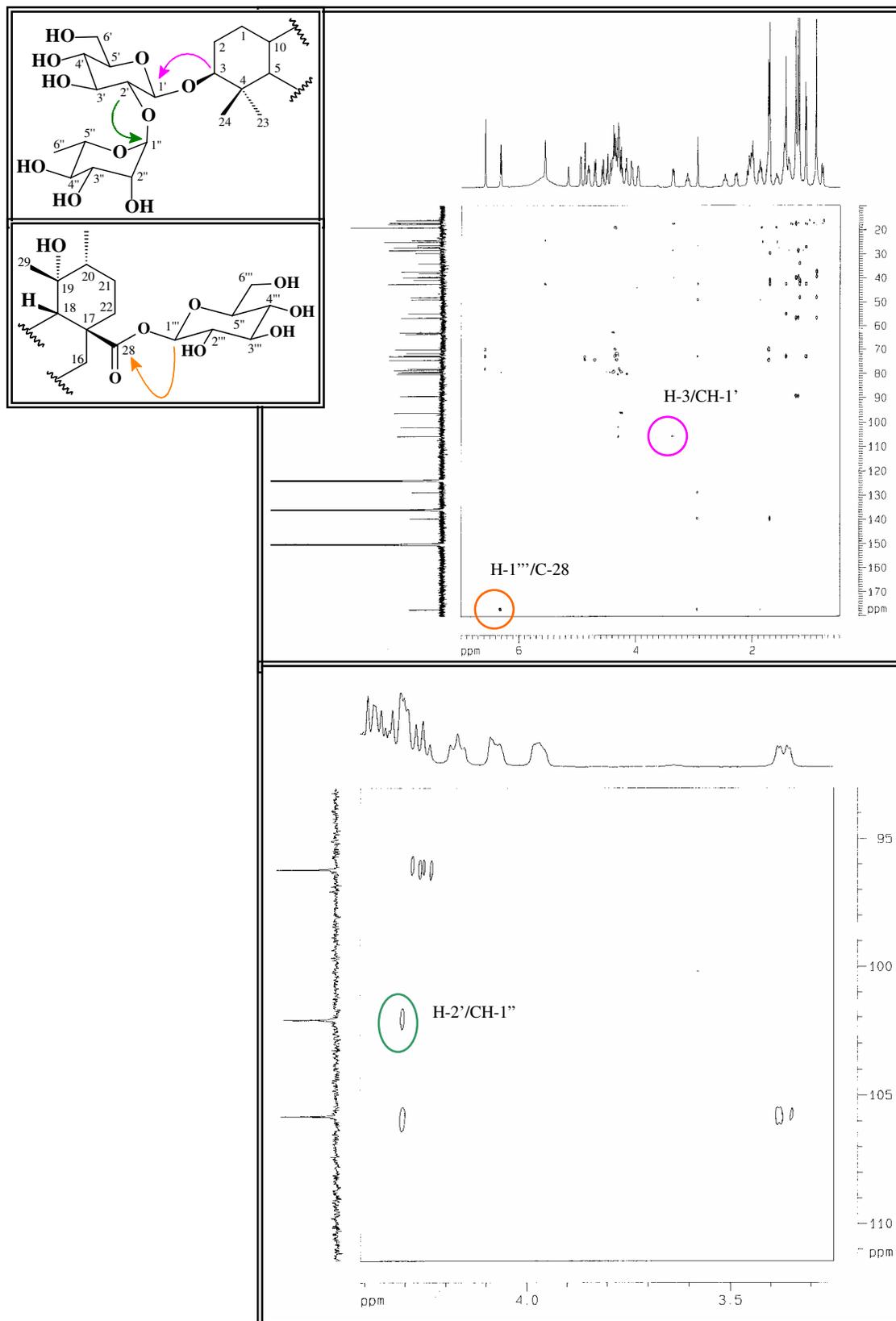


Figura 85. Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) e expansão de CCP-4.

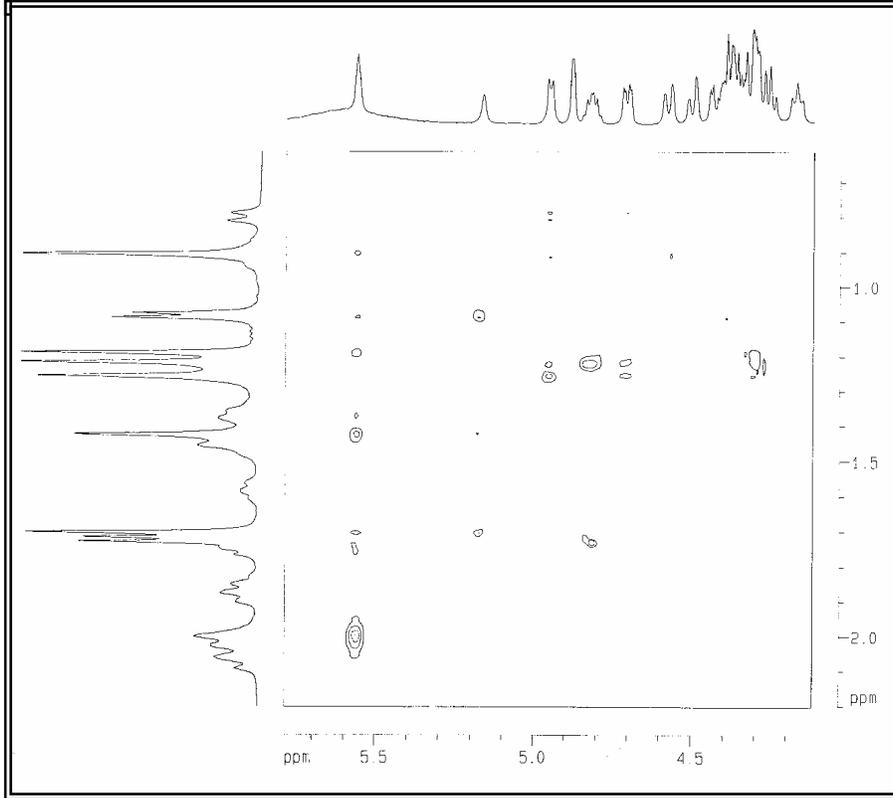
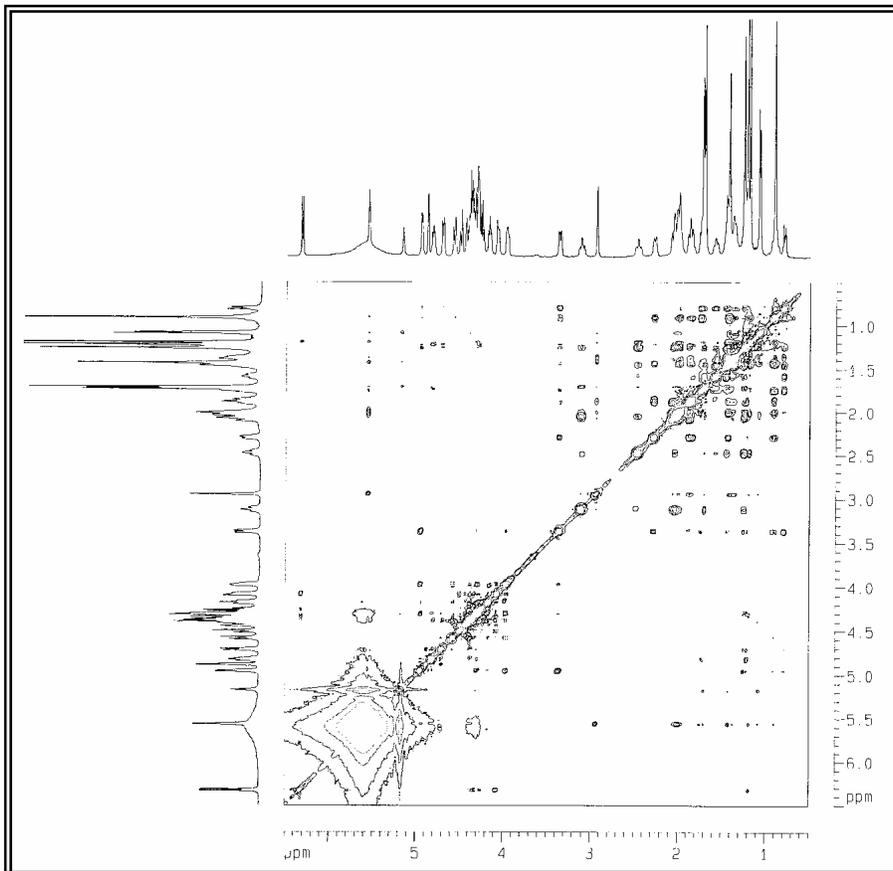


Figura 86. Espectro de RMN-NOESY (500 MHz, C₅D₅N) e expansão de CCP-4.

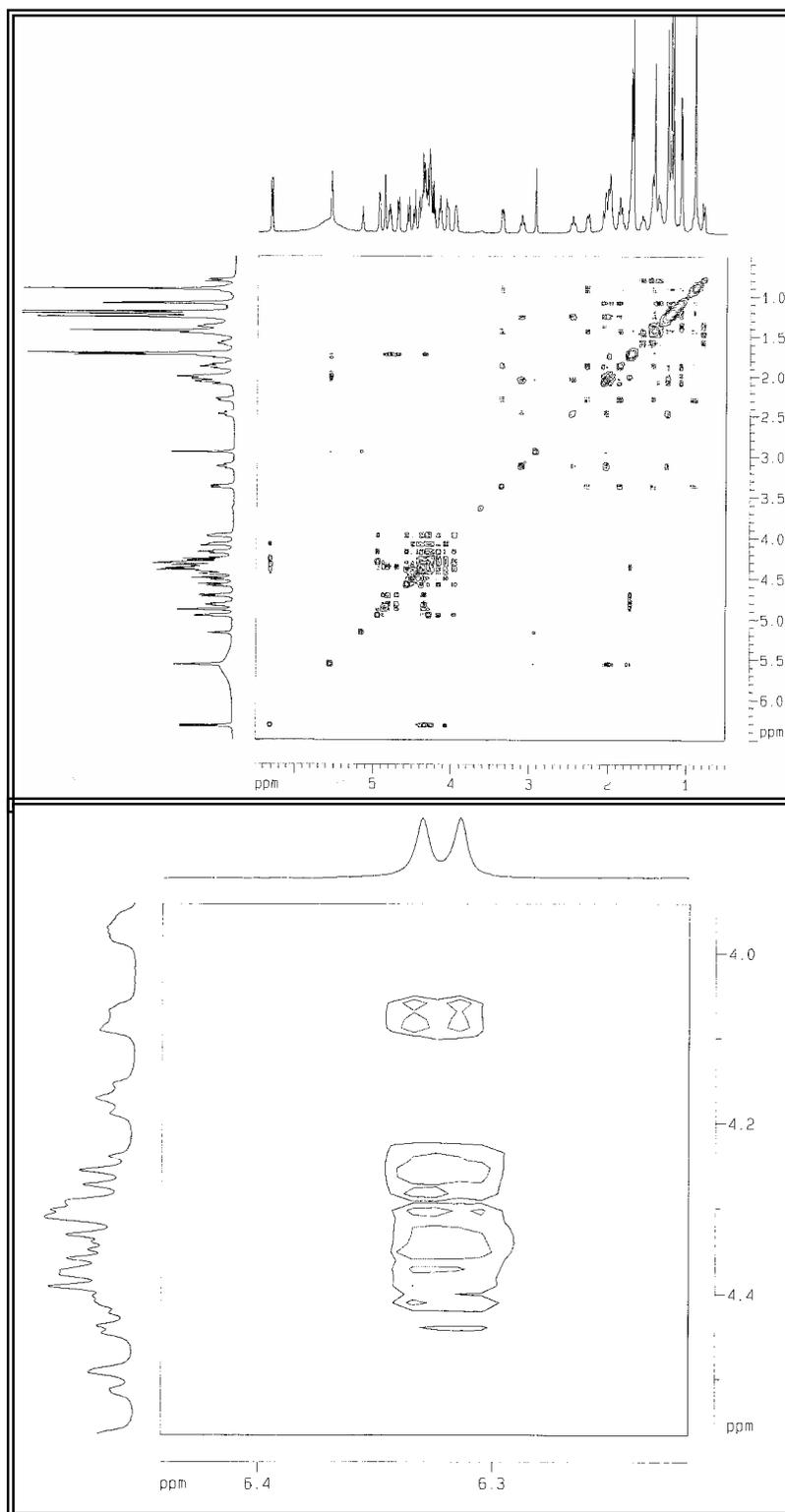


Figura 87. Espectro de RMN-TOCSY (500 MHz, C₅D₅N) e expansão de CCP-4.

3.2.5. Determinação estrutural de CCP-5

Assim como os quatro metabólitos secundários isolados de *C. piauhiensis*, CCP-5 também foi isolado a partir da fração n-butanol (Item 4.6.3, pág. 175), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este composto apresentou ponto de fusão 218,6-220,6 °C e $[\alpha]_{20}^D -3^\circ$ (c. 0.05, C₅H₅N).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 88, pág. 139) apresentou uma banda larga em $\lambda_{\text{máx}}$ 3422 cm⁻¹ característica de estiramento O-H de álcoois, uma banda em $\lambda_{\text{máx}}$ 1638 cm⁻¹ característica da ligação C=O e uma absorção intensa em $\lambda_{\text{máx}}$ 1062 cm⁻¹, característica de deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ¹³C-BB (Fig. 91, pág.141) apresentou 54 linhas espectrais, que após análise comparativa com o espectro DEPT 135° (Fig. 92, pág. 142), determinou-se a presença de 25 carbonos monohidrogenados (21 deles oxigenados); 13 carbonos metilênicos, dos quais 3 são oxigenados e 8 carbonos metílicos. Por subtração dos referidos espectros, constatou-se a presença de 8 carbonos não-hidrogenados, onde um foi compatível com uma carbonila de éster (δ_c 176,9). Ainda com base no espectro de RMN ¹³C, os sinais em δ_c 144,5 e 123,2 foram condizentes com uma dupla ligação carbono-carbono, a qual de acordo com o experimento DEPT 135° representa uma dupla ligação trissubstituída.

O espectro de massa (Fig. 89, pág. 139) com ionização por elétron-spray (ESIMS) apresentou um pico correspondente ao íon quasi-molecular de m/z 1087 ([M - H]⁻), que juntamente com os dados de RMN ¹³C foi compatível com a fórmula molecular C₅₄H₈₈O₂₂, como mostrado na Tabela 23.

Tabela 23. Atribuições dos sinais de átomos de carbono não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos com base na análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° , para dedução da fórmula molecular de CCP-5

C	CH	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
176,9	123,2	105,7	74,2	69,7	33,4
144,5	89,2	105,6	72,8	63,2	28,4
42,5	56,4	102,1	72,7	62,9	26,4
42,4	48,3	96,0	72,5	46,6	24,0
40,2	42,0	80,2	71,8	39,4	19,0
39,8		79,0	71,2	34,4	17,8
37,3		78,8	70,0	33,4	17,5
31,1		78,7		32,8	16,0
		78,5		28,6	
		78,3		27,1	
		78,1		24,1	
		75,5		23,7	
		74,4		18,9	
$\text{C}_8\text{O}_2^{\text{a}}$	$\text{C}_5\text{H}_5\text{O}^{\text{b}}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{16}^{\text{c}}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_3^{\text{d}}$	C_8H_{24}	$\text{C}_{54}\text{H}_{75}\text{O}_{22} + 13\text{H}^{\text{e}} = \text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{22}$

^a Oxigênios pertencentes ao grupo carboxila

^b Oxigênio da ligação aglicona-monossacarídeo

^c Oxigênios pertencentes aos monossacarídeos

^d Oxigênios pertencentes aos carbonos metilênicos das unidades de açúcar

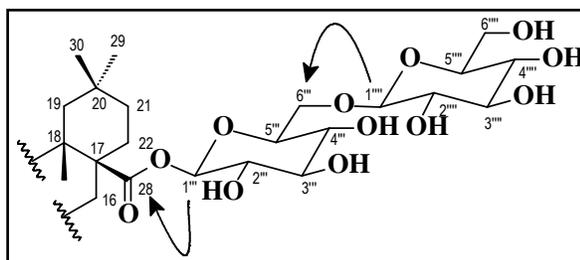
^e Hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxila (OH)

Com base na literatura, os valores dos sinais em δ_{C} 123,2 e 144,5 no espectro de RMN ^{13}C correspondentes a dupla ligação carbono-carbono e a presença de sete grupos metilas em δ_{C} 33,4, 28,4, 26,4, 24,0, 17,8, 17,5 e 16,0, os quais com base no experimento HSQC (Fig. 94, pág. 144), foram correlacionados aos sinais de hidrogênio em δ_{H} 0,87 (s), 1,23 (s), 1,23 (s), 0,87 (s), 1,07 (s), 1,18 (s) e 0,85 (s), respectivamente, CCP-5 possui uma aglicona triterpênica da série oleanano (Mahato,1994). Após análise do experimento

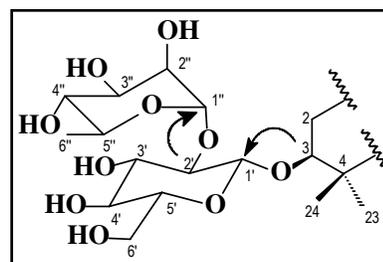
HMBC (Fig. 95, pág. 145), observou-se a correlação entre os hidrogênios em δ_H 0,87 (s, 3H-29 e 3H-30) com o carbono metilênico em δ_C 46,6 (C-19), indicando que a aglicona tratava-se do ácido oleanólico.

Os sinais observados em δ_C 105,7; 105,6; 102,1 e 96,0 através do experimento HSQC, foram correlacionados com seus respectivos sinais de hidrogênios em δ_H 4,92; 5,02; 6,55 e 6,24 característicos de hidrogênios ligados a carbonos anoméricos, indicando portanto, a existência de quatro unidades monossacarídicas. A existência de três grupos metilênicos oxigenados em δ_C 69,7; 63,2 e 62,9, observados no experimento DEPT 135°, aliados aos valores dos deslocamentos químicos relativos aos carbonos anoméricos sugerem a presença de três unidades de glicose. O quarto monossacarídeo foi atribuído a ramnose, a qual foi identificada principalmente através da absorção em 1,70 (d, 5,7, 3H-6'') referente a um grupo metila. Ao comparar os dados espectroscópicos das unidades monossacarídicas de CCP-2 e CCP-5 observou-se que tratava-se de unidades semelhantes, facilitando assim sua determinação.

O experimento HMBC foi essencial para a confirmação da estrutura da aglicona, bem como para determinar a localização inequívoca das unidades monossacarídicas. A correlação a três ligações entre o carbono carbonílico em δ_C 176,9 (C-28) com o hidrogênio em δ_H 6,24 (H-1'''), bem como a correlação entre o sinal de hidrogênio em δ_H 5,02 (H-1''') a três ligações com o carbono em δ_C 69,7 (CH₂-6'') foi suficiente para determinar a unidade osídica ligada ao carbono carbonílico C-28, constituída de duas unidades de glicose.



A exemplo das saponinas isoladas anteriormente, as outras duas unidades monossacarídicas provavelmente encontram-se ligadas ao carbono carbinólico em δ_C 89,2 (CH-3). A confirmação desta suposição foi evidenciada através do acoplamento a três ligações entre o hidrogênio H-3 em δ_H 3,33 e o carbono CH-1' (105,7), assim como a correlação a três ligações entre o hidrogênio em δ_H 4,27 (H-2') com o carbono anomérico (CH-1'') em δ_C 102,1.



Baseado nos dados espectroscópicos apresentados, bem como comparação com os dados espectroscópicos de CCP-2 para as unidades monossacarídicas, concluiu-se que CCP-5 tratava-se também de uma saponina triterpênica bidesmosídica denominada 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] oleanolato de 28-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila, a qual, de acordo com um minucioso levantamento bibliográfico está sendo registrada pela primeira vez na literatura.

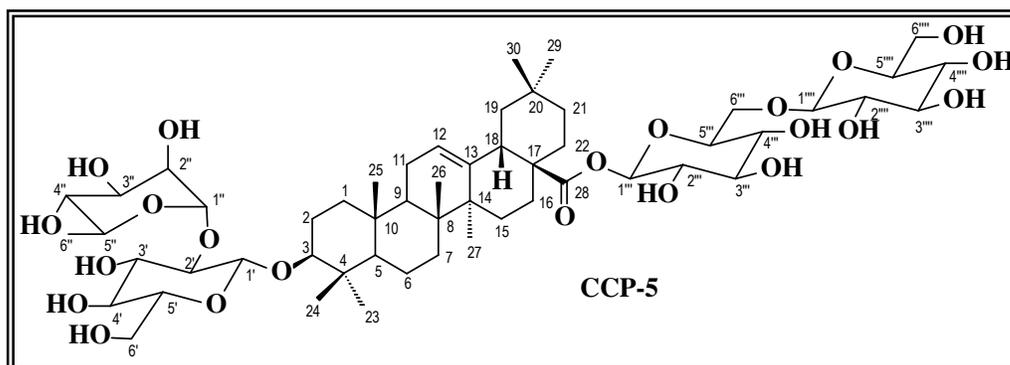


Tabela 24. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da aglicona de CCP-5

C	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	39,3	1,40; 0,90		3H-25
2	27,1	2,22; 1,80		
3	89,2	3,33 (dl; 11,2)		3H-23; 3H-24
4	40,2	-	3H-23; 3H-24; H-3	
5	56,4	0,74 (d; 10,4)		3H-23; 3H-24; 3H-25
6	18,8	1,45; 1,32	H-7a	
7	32,8	1,92; 1,80		3H-26
8	39,8	-	3H-26	3H-27
9	48,3	1,58 (tl; 6,9)		3H-25; 3H-26; H-12
10	37,3	-	3H-25	
11	24,1	1,96		
12	123,2	5,40 (sl)		
13	144,5	-		3H-27
14	42,5	-	3H-27	3H-26; H-12
15	28,6	2,28; 1,15		3H-27
16	23,7	2,06; 1,95		
17	42,4	-	H-18	
18	42,0	3,17 (dl; 13,1)		
19	46,6	1,75 (d; 13,7), 1,23	H-18	3H-29; 3H-30
20	31,1	-	3H-29; 3H-30; H-19	
21	34,4	1,30; 1,10		3H-29; 3H-30
22	33,4	1,42; 1,30		
23	28,4	1,23 (s)		3H-24; H-3
24	17,5	1,18 (s)		H-3; 3H-23
25	16,0	0,85 (s)		
26	17,8	1,07 (s)		
27	26,4	1,23 (s)		
28	176,9	-		H-1'''
29	33,4	0,87 (s)		3H-30
30	24,0	0,87 (s)		3H-29

Tabela 25. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e RMN ^1H (500 MHz) da unidade osídica de CCP-5

HMQC			HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1'	105,7	4,92 (dl; 3,6)	H-2'	H-3
2'	80,2	4,27		
3'	78,8	4,17		
4'	72,5	4,15		2H-6'; H-2'
5'	78,4	3,93	2H-6'	
6'	63,2	4,53 (d; 11,0); 4,35		
1''	102,1	6,55 (sl)		H-2'
2''	72,7	4,86 (sl)	H-1''	H-4''
3''	72,8	4,69 (dd; 9,5; 2,7)	H-2''; H-4''	H-1''
4''	74,4	4,34	H-3''	H-2''; 3H-6''
5''	69,9	4,78 (m)	3H-6''	H-1''
6''	19,0	1,70 (d; 5,7)		H-4''
1'''	96,0	6,24 (d; 7,9)	H-2'''	
2'''	74,2	4,14		
3'''	78,1	4,27		
4'''	71,2	4,34		
5'''	78,3	4,10	2H-6'''; H-4'''	H-3'''
6'''	69,7	4,46 (d; 11,6); 4,34		H-1''', H-4'''
1''''	105,6	5,02 (d; 7,7)	H-2''''	H-6b'''
2''''	75,5	3,99 (t; 7,7)		
3''''	79,0	4,20	H-4''''	
4''''	71,8	4,20		
5''''	78,7	3,87	2H-6''''; H-4''''	H-1''''
6''''	62,9	4,70 (d; 10,9); 4,34		

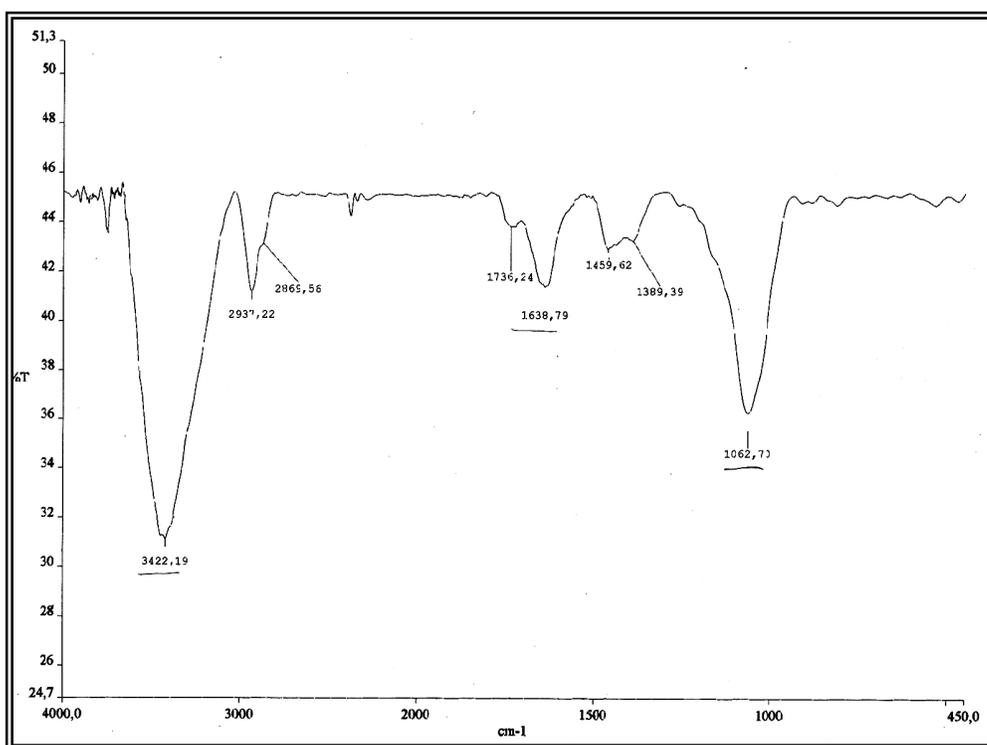


Figura 88. Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de CCP-5.

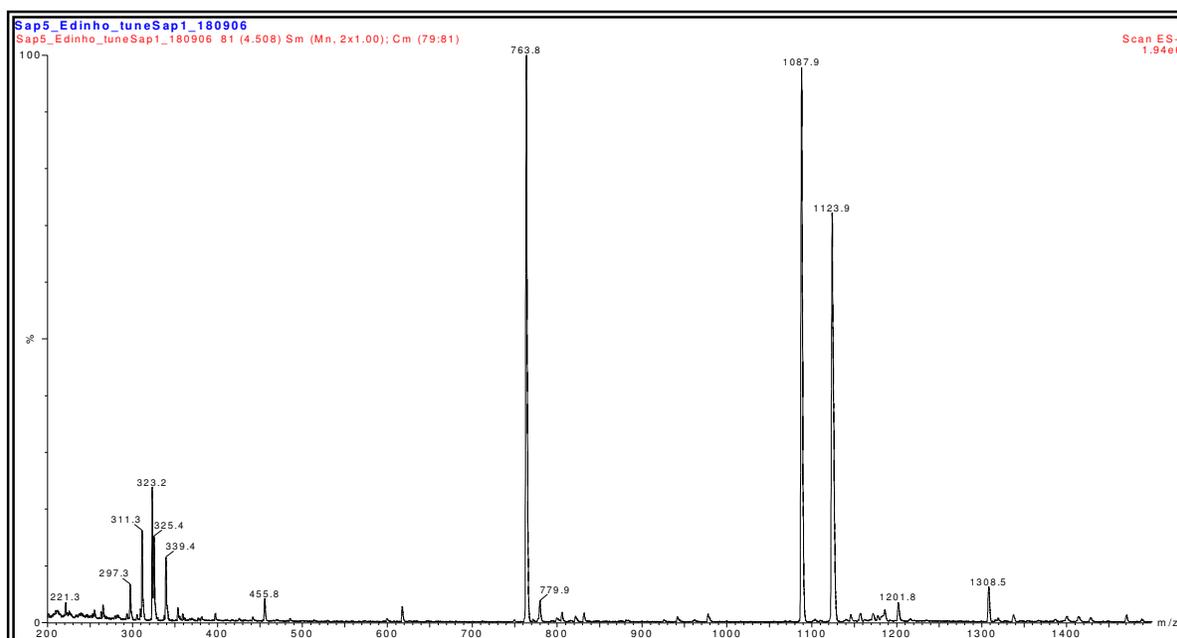


Figura 89. Espectro de massa com ionização por elétron-spray (ESIMS) de CCP-5.

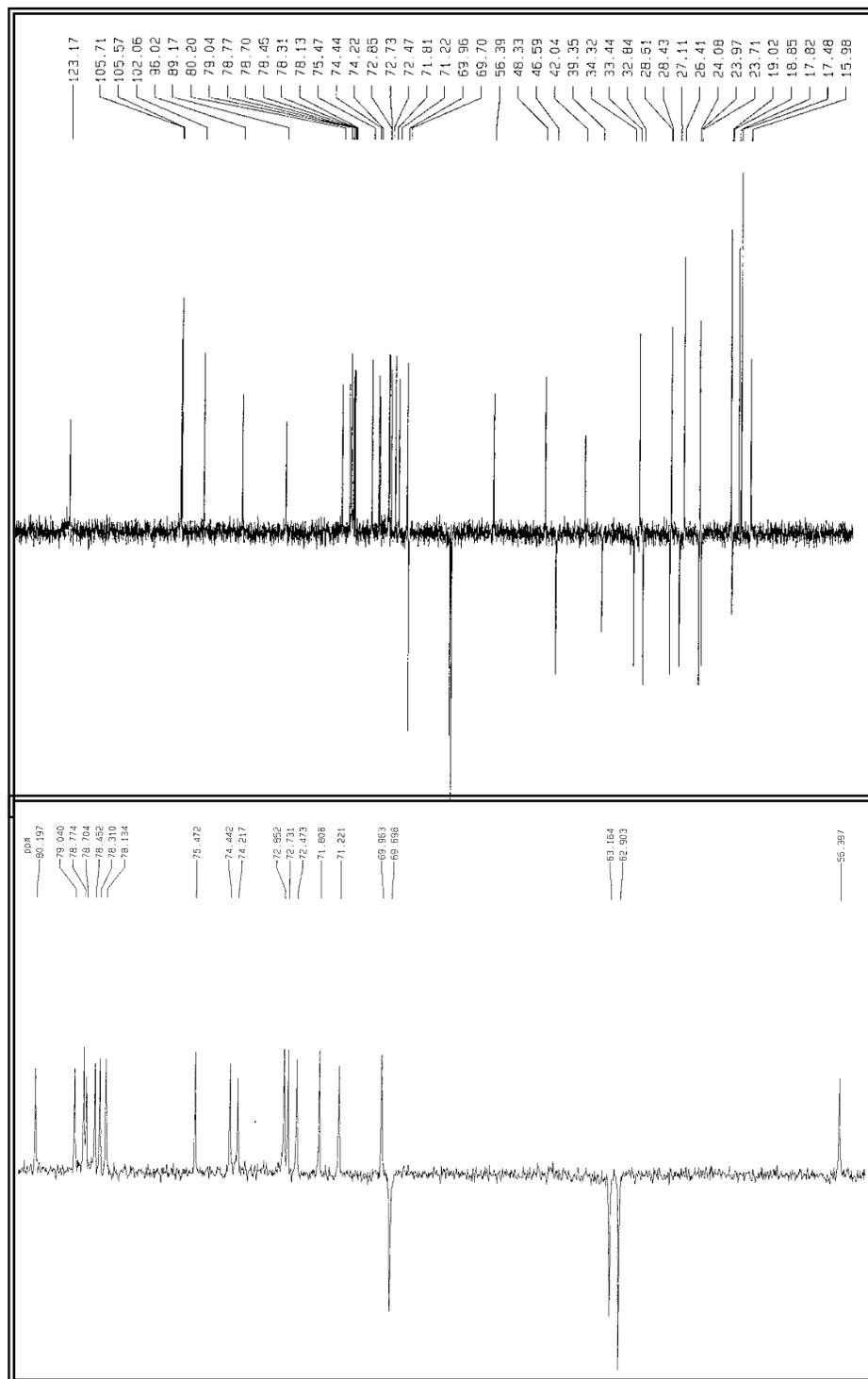


Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansão de CCP-5.

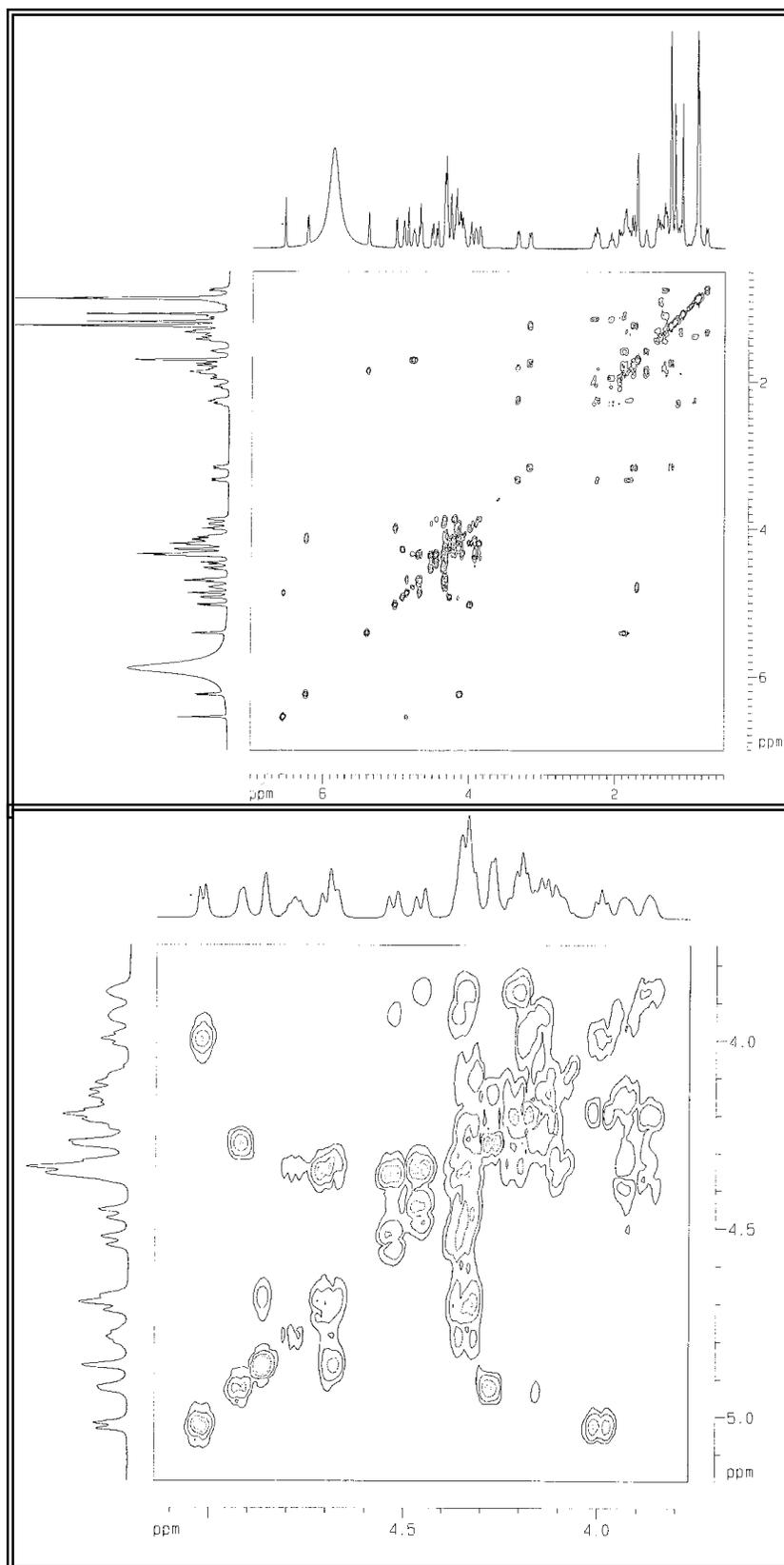


Figura 93. Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansão de CCP-5.

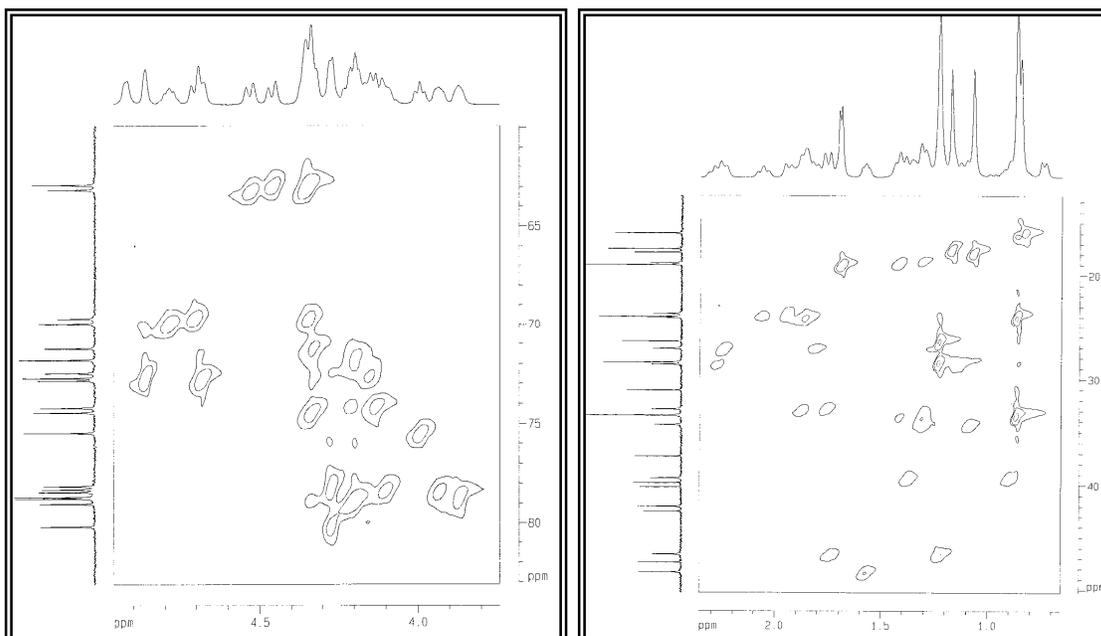
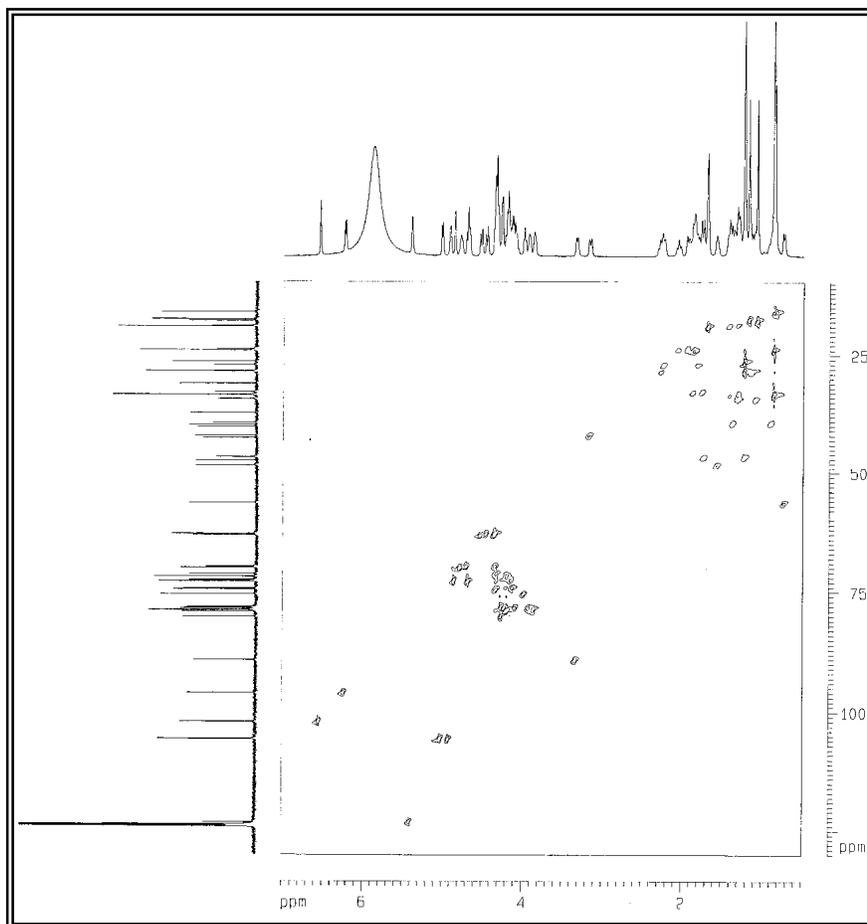


Figura 94 Espectro de RMN-HSQC (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e expansões de CCP-5.

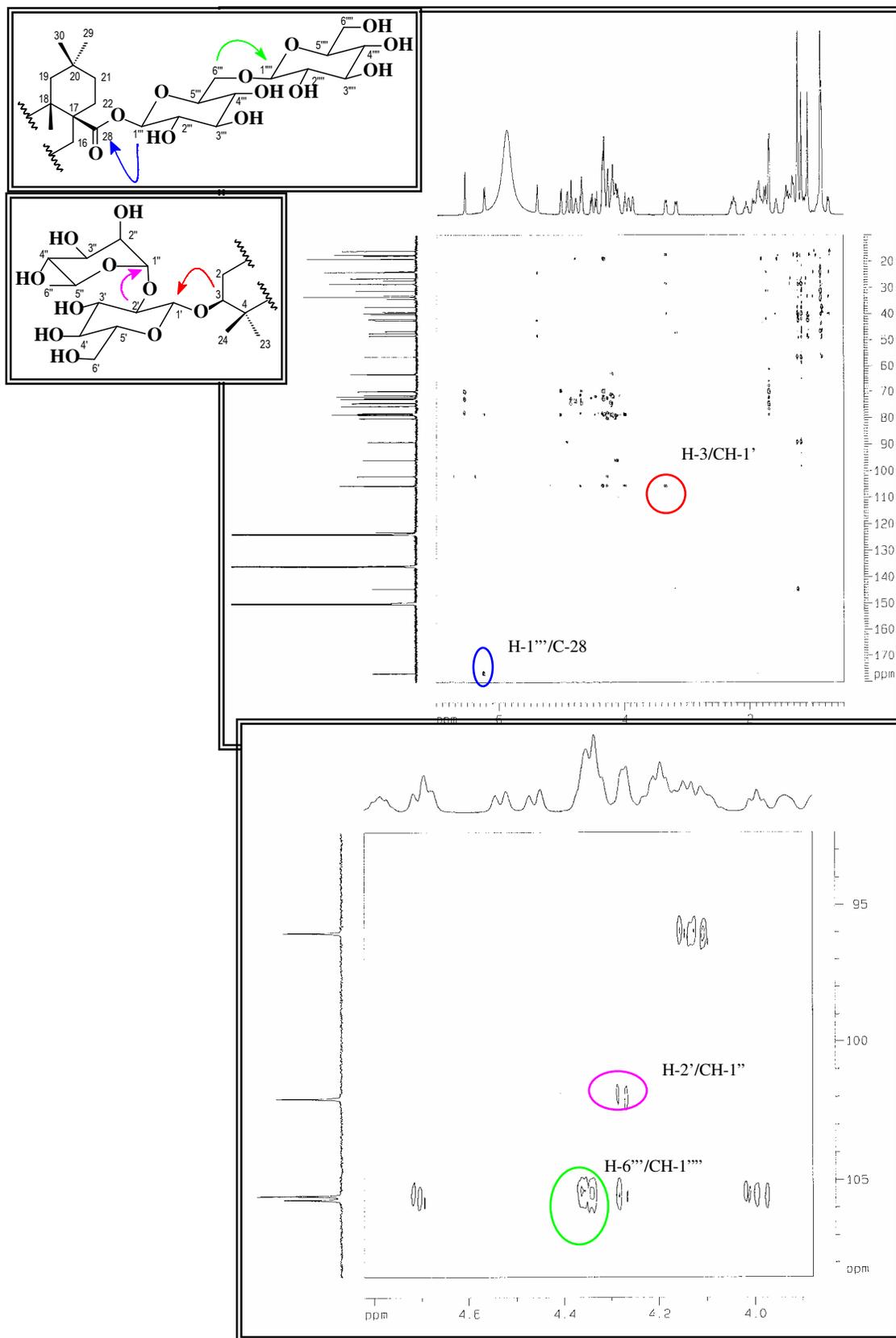


Figura 95. Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, C₅D₅N) e expansão de CCP-5.

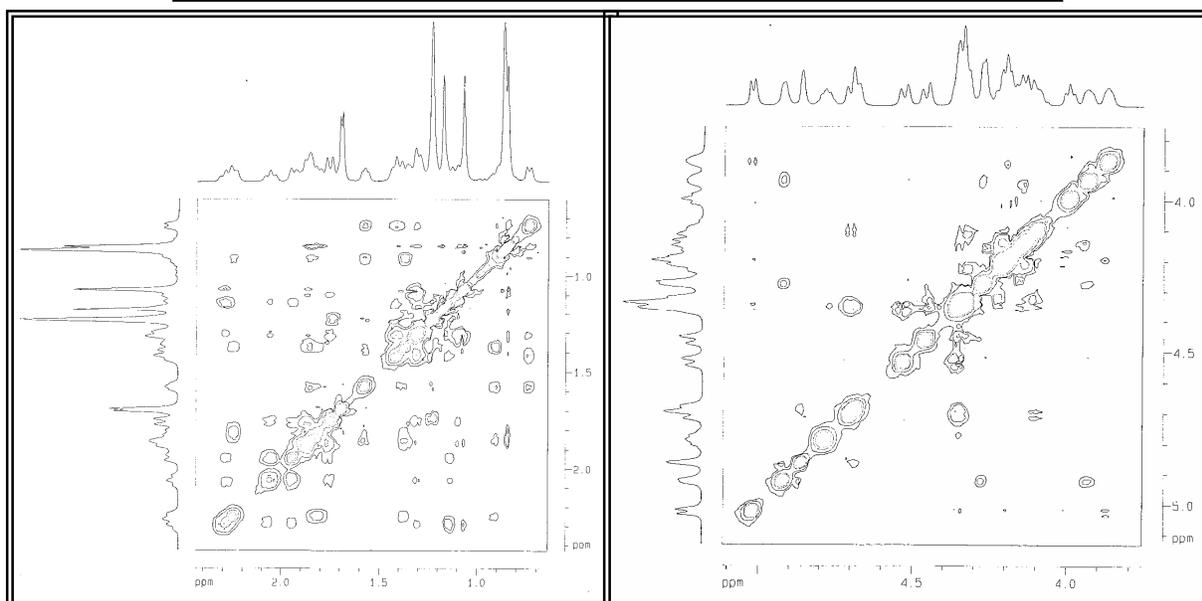
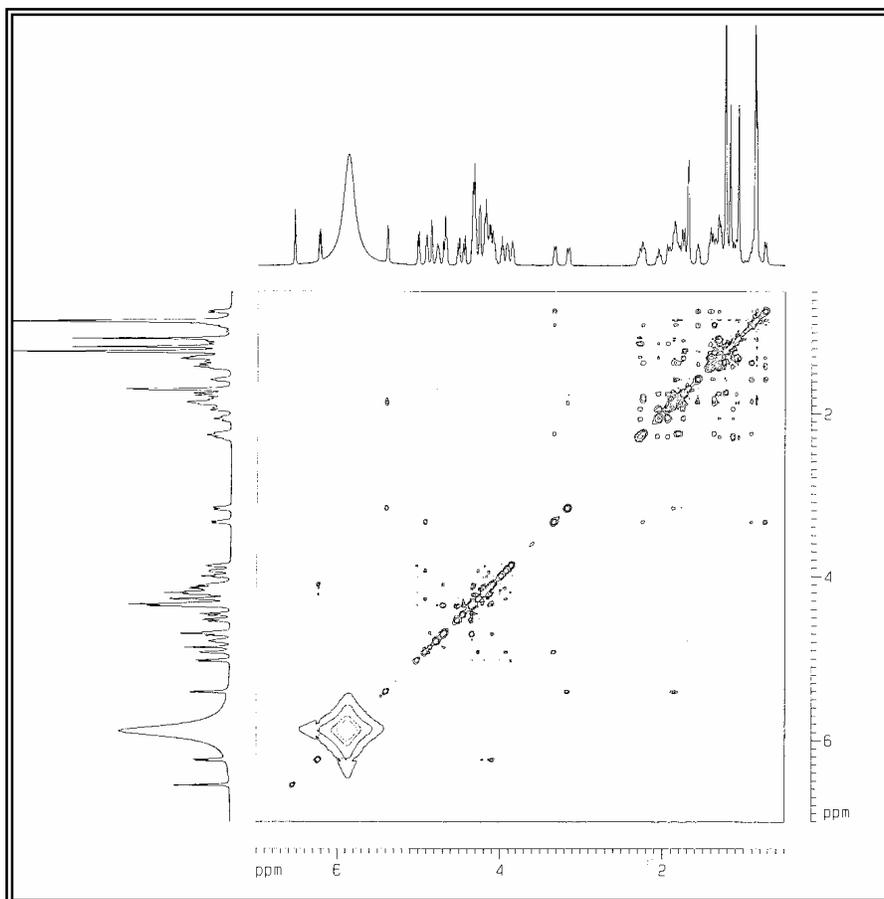


Figura 96. Espectro de RMN-NOESY (500 MHz, C_5D_5N) e expansões de CCP-5.

3.3. Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e frutos de *T. trifolia*

Os óleos essenciais das folhas e frutos de *T. trifolia* foram obtidos por hidrodestilação (Item 4.4, pág. 162). Os rendimentos dos óleos, calculados sobre a massa do material fresco, foram de 0,09% para as folhas e 0,07% para os frutos, em ambas as coletas. Os componentes químicos identificados nos óleos, incluindo seus respectivos índices de Kovat e porcentagens, estão sumarizados na Tabela 26 (pág. 148). Um elevado percentual da composição química dos óleos foi determinado (99,7 e 99,8% para as folhas e 99,9 e 99,7% para os frutos). Os óleos essenciais das folhas revelaram ser constituídos majoritariamente por monoterpenos (83,7-96,8%), dos quais sabineno (39,2 e 33,8%) e mirceno (21,9 e 33,6%) foram os principais componentes. Outros componentes identificados em teores significativos foram: hidrato de sesquisabineno (8,4%), γ -terpineno (6,9 e 6,4%), limoneno (5,3 e 4,3%) e 4-terpineol (4,9 e 6,9%). Da mesma forma, no óleo essencial dos frutos prevaleceram os monoterpenos, os quais representaram 93,8-97,5% do total do óleo. Os constituintes majoritários foram sabineno (35,5 e 22,8%), β -pineno (21,2 e 29,9%) e γ -terpineno (18,4 e 12,9%), seguido por limoneno (6,2 e 5,0%) e 4-terpineol (3,6 e 8,9%). Nos óleos das folhas uma pequena fração de sesquiterpenos, representando 1,6 a 11,9%, foi identificada, enquanto nos óleos dos frutos este percentual variou de 2,2 a 6,1%. Exceto pela presença do hidrato de sesquisabineno, o qual contribui com 8,4% do óleo das folhas e 1,3% do óleo dos frutos, nenhum outro sesquiterpeno foi identificado em teor significativo. Digno de nota foi a presença dos aldeídos alifáticos *n*-dodecanal e *n*-decanal no óleo das folhas, mesmo em pequenas proporções (1,9/0,6% e 2,2/0,8%, respectivamente).

A análise qualitativa e quantitativa dos componentes voláteis foi realizada por CG-EM e CG-DIC, respectivamente, enquanto a identificação de cada constituinte foi realizada comparando-se o espectro de massa de cada componente (pág. 151-155) com espectros de massa armazenados em um banco de dados digital (Alencar, 1984; Alencar, 1990), bem como por comparação com espectros de massa disponíveis na literatura (Stenhagen, 1974; Adams, 2001), considerando rigorosamente o padrão de fragmentação e o índice de Kovat.

Os cromatogramas obtidos dos óleos essenciais das folhas e frutos encontram-se nas páginas 149 e 150.

Tabela 26. Composição química (%) dos óleos essenciais das folhas e frutos de *T. trifolia*

Constituintes ^a	IK ^b	Folhas ^c	Frutos ^c	Folhas ^d	Frutos ^d
α -tujeno	932		1,1	1,0	1,2
α -pineno	938	2,9	4,1	2,9	3,5
sabineno	975	39,2	35,5	33,8	22,8
β -pineno	979		21,2	0,7	29,9
mirceno	991	21,9	1,1	33,6	1,5
δ -careno	1016	1,3	1,5	2,1	0,9
<i>p</i> -cimeno	1019	1,3		5,1	9,7
limoneno	1029	5,3	6,2	4,3	5,0
γ -terpineno	1059	6,9	18,4	6,4	12,9
terpinoleno	1089		1,1		1,2
4-terpineol	1174	4,9	3,6	6,9	8,9
<i>n</i> -decanal	1203	2,2		0,8	
<i>n</i> -dodecanal	1403	1,9		0,6	
<i>trans</i> -cariofileno	1419	2,1	1,3	1,6	0,6
α -bergamoteno	1435		3,5		1,6
β -curcumeno	1515	1,4			
hidrato de sesquisabineno	1551	8,4	1,3		
Total identificado		99,7	99,9	99,8	99,7

^a Constituintes químicos listados de acordo com a ordem de eluição em coluna DB-5.

^b Índice de retenção em coluna apolar DB-5. ^c Coleta realizada em janeiro de 2005.

^d Coleta realizada em janeiro de 2006, mesmo local.

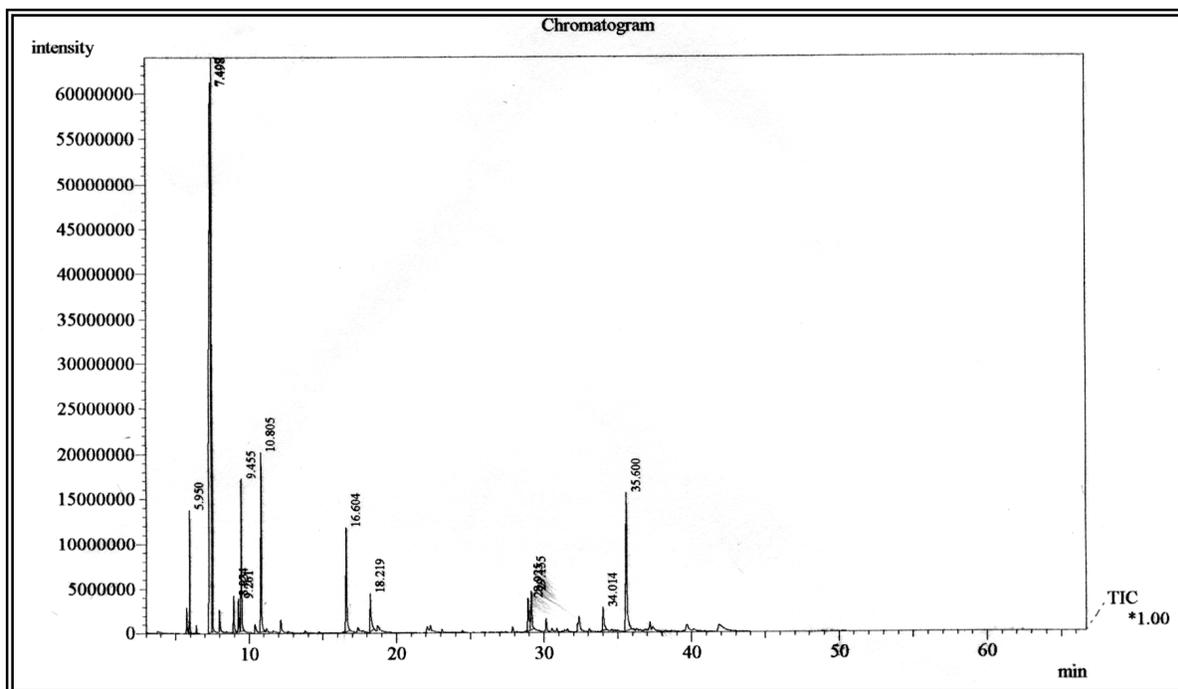


Figura 97. Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *T. trifolia* coletadas em janeiro de 2005.

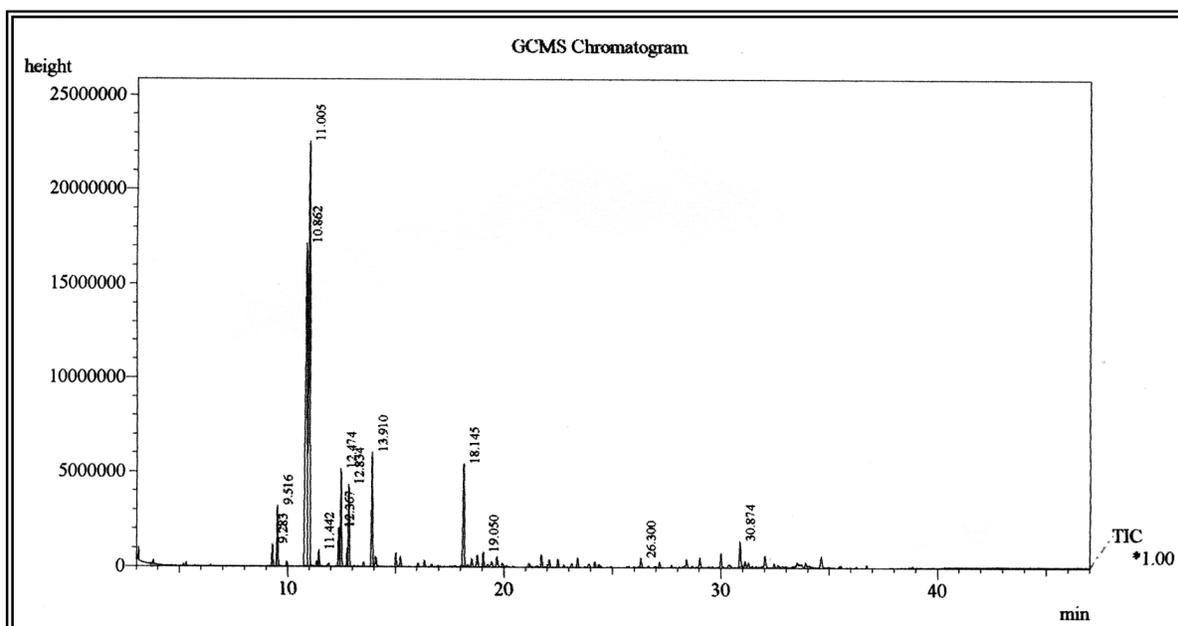


Figura 98. Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas de *T. trifolia* coletadas em janeiro de 2006.

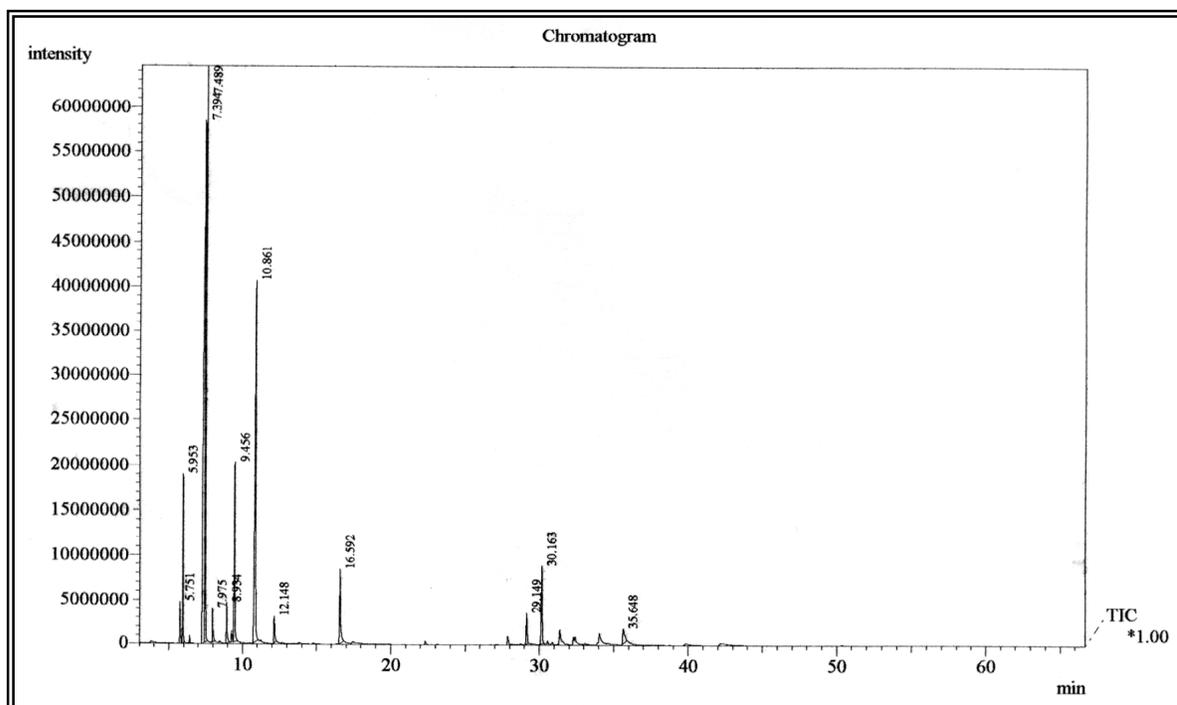


Figura 99. Cromatograma do óleo essencial obtido dos frutos de *T. trifolia* coletados em janeiro de 2005.

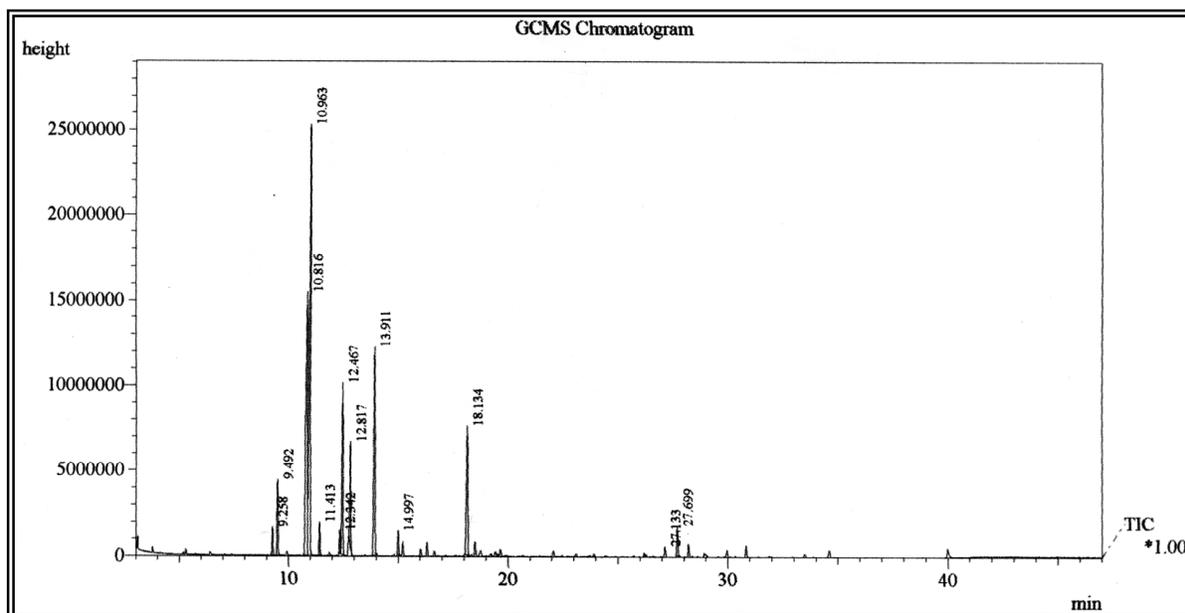


Figura 100. Cromatograma do óleo essencial obtido dos frutos de *T. trifolia* coletados em janeiro de 2006.

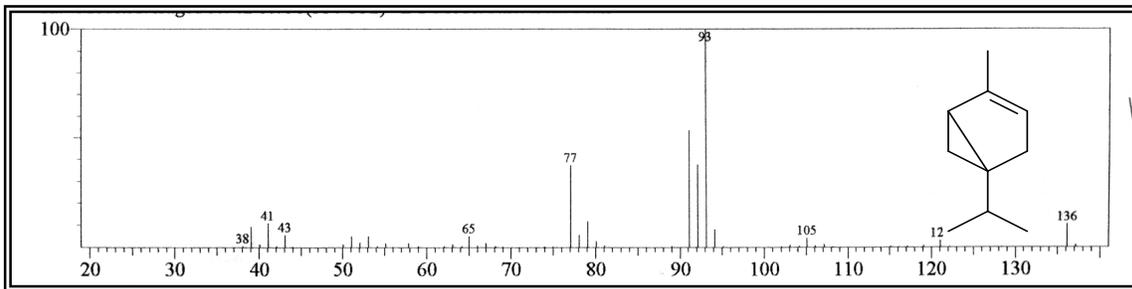


Figura 101. Espectro de massa do α -tujeno.

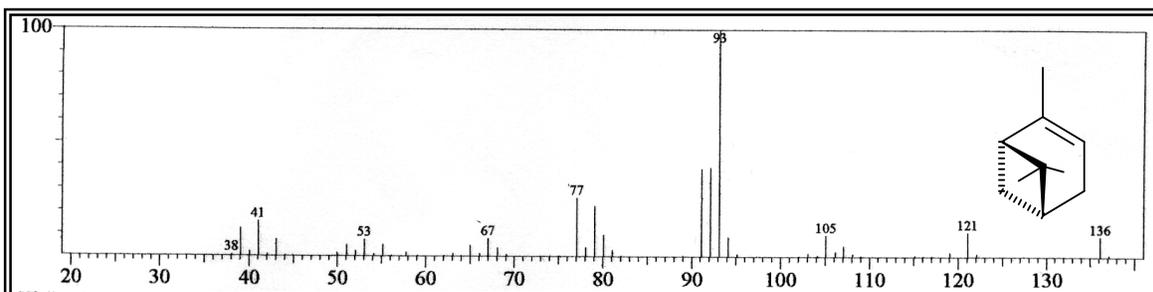


Figura 102. Espectro de massa do α -pineno.

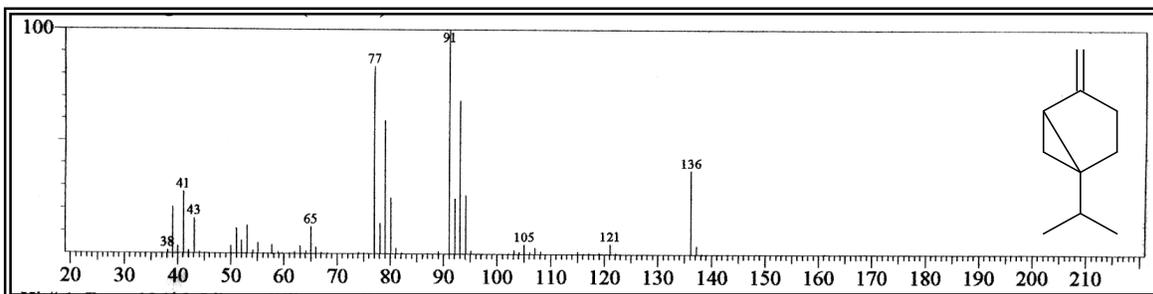


Figura 103. Espectro de massa do sabineno.

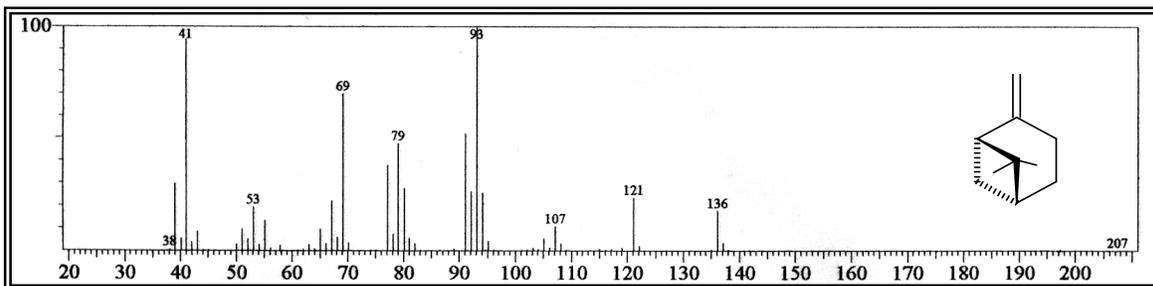


Figura 104. Espectro de massa do β -pineno.

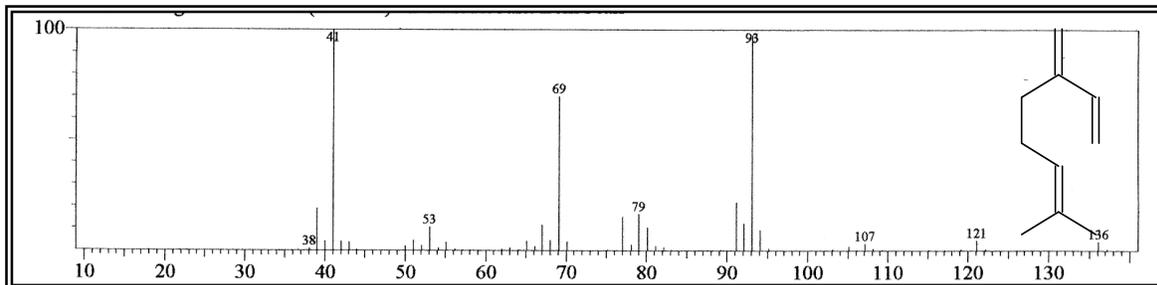


Figura 105. Espectro de massa do mirceno.

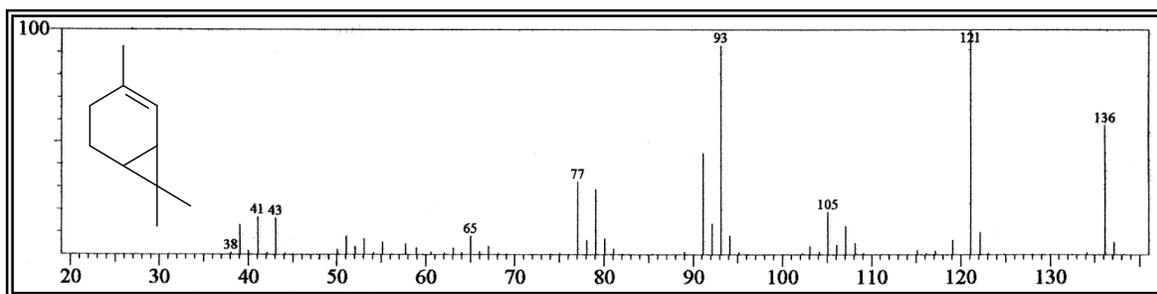


Figura 106. Espectro de massa do δ -careno.

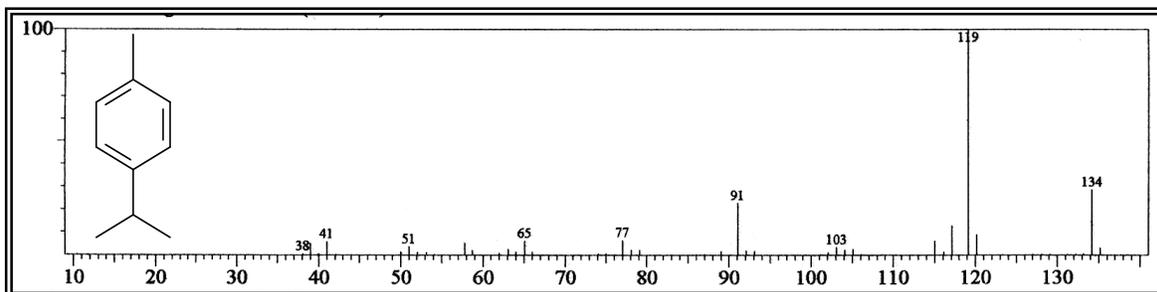


Figura 107. Espectro de massa do *p*-cimeno.

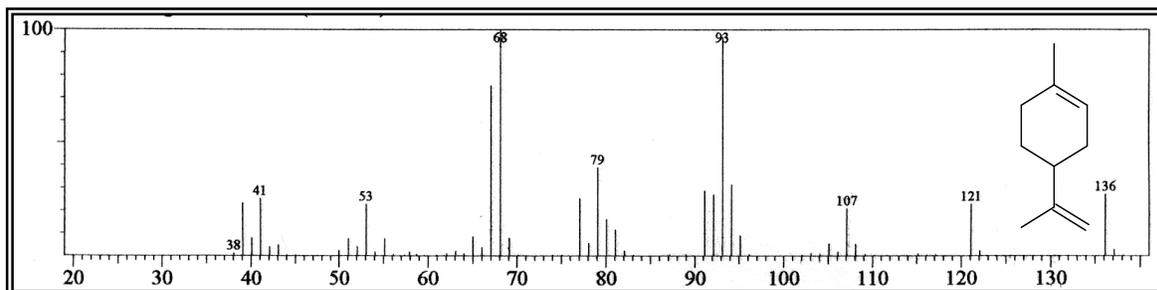


Figura 108. Espectro de massa do limoneno.

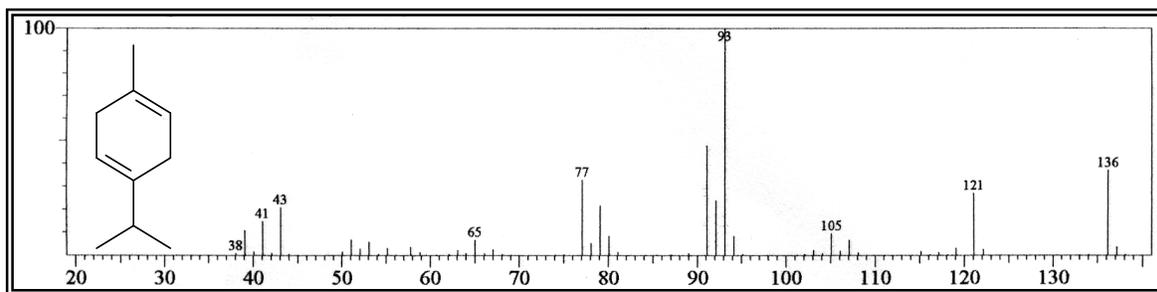


Figura 109. Espectro de massa do γ -terpineno.

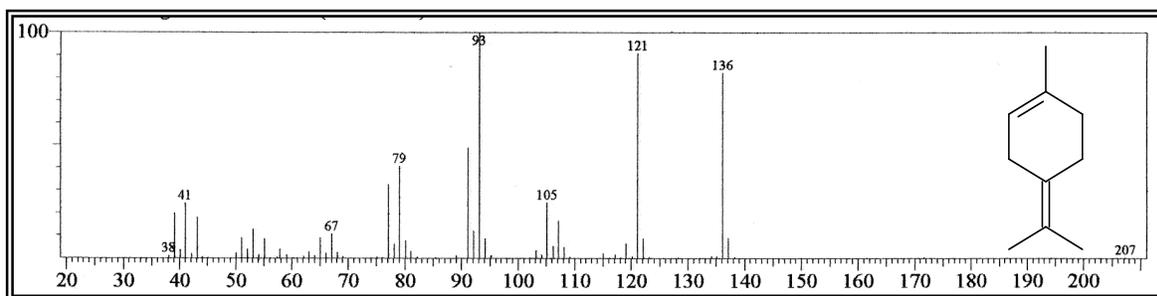


Figura 110. Espectro de massa do terpinoleno.

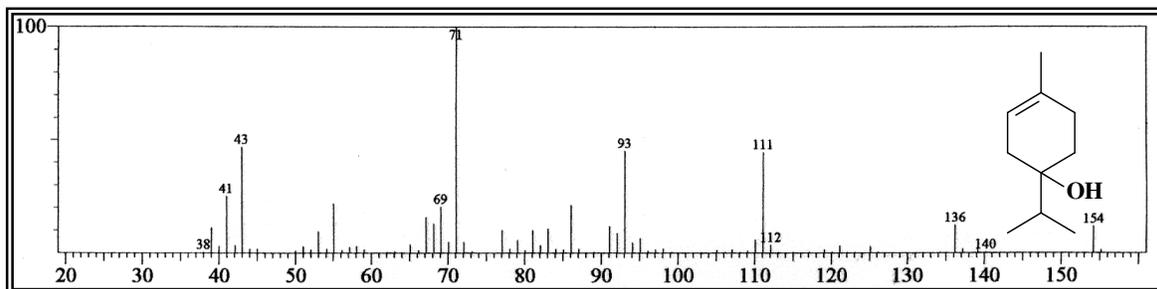


Figura 111. Espectro de massa do 4-terpineol.

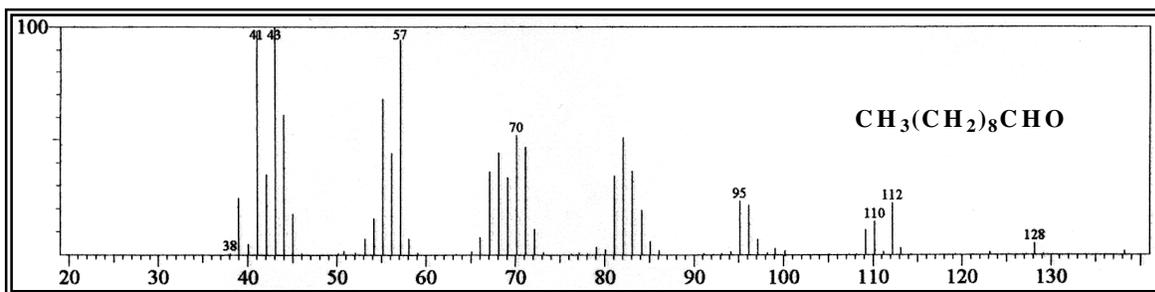


Figura 112. Espectro de massa do *n*-decanal.

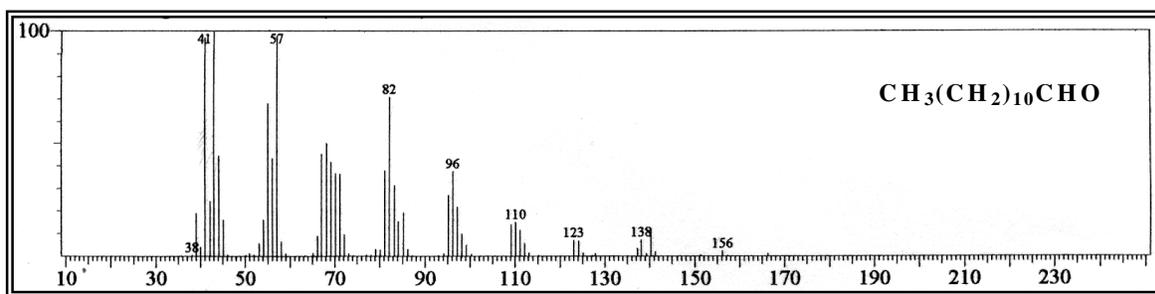


Figura 113. Espectro de massa do *n*-dodecanal.

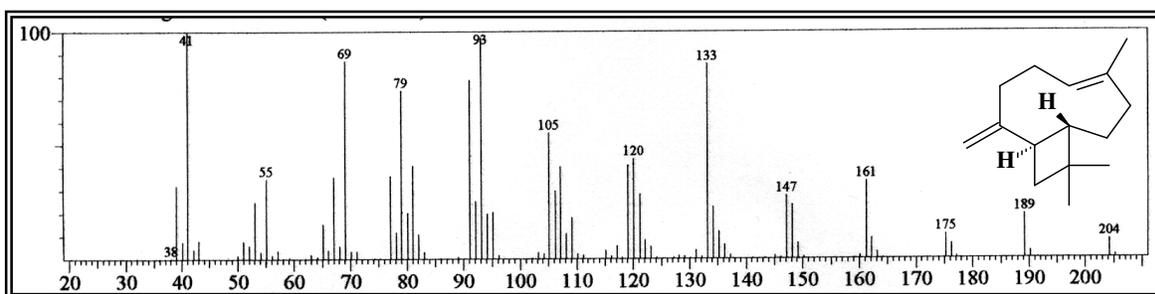


Figura 114. Espectro de massa do *trans*-cariofileno.

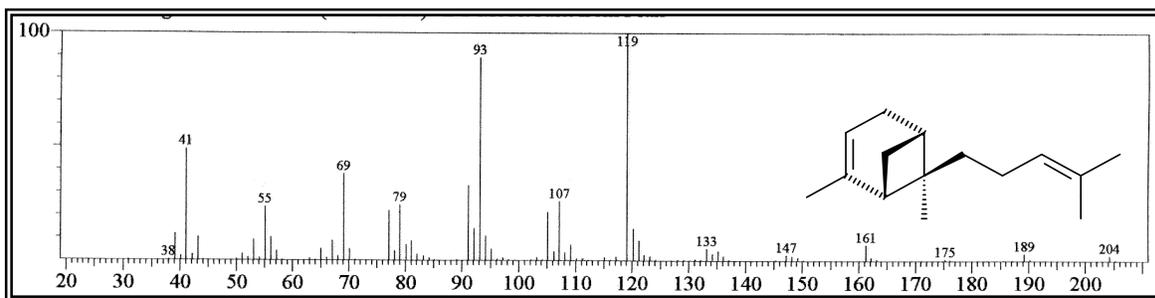


Figura 115. Espectro de massa do α -bergamoteno.

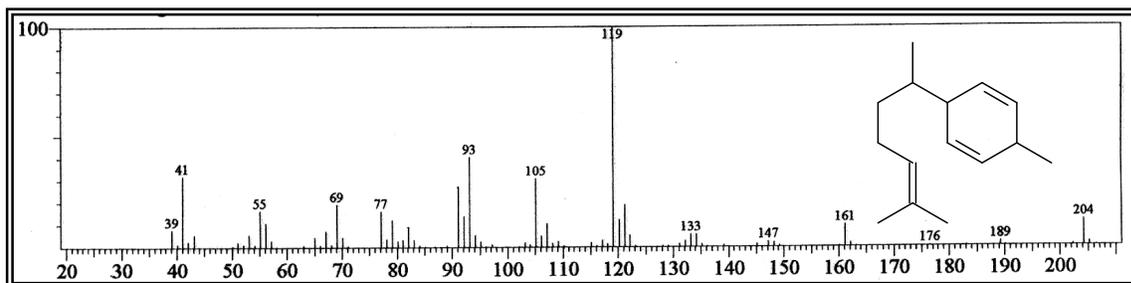


Figura 116. Espectro de massa do β -curcumeno

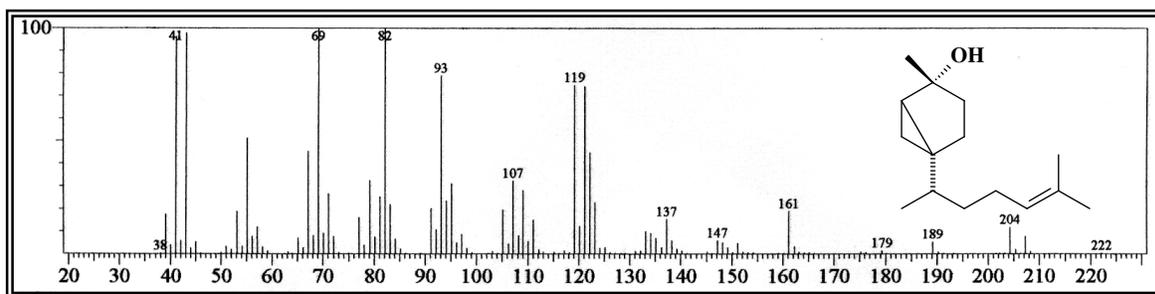


Figura 117. Espectro de massa do hidrato de sesquisabineno.

3.4. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e frutos de *T. trifolia*

O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais foi avaliado frente a um painel constituído de oito cepas de bactérias (Item 4.7, pág. 177), conforme disposto na Tabela 27. O óleo dos frutos mostrou-se ativo apenas contra dois tipos de bactérias, *Chromobacterium violaceum* e *Bacillus subtilis*. Por outro lado, o óleo das folhas mostrou eficácia contra todas as cepas testadas, embora moderadamente. A análise comparativa da composição química dos óleos revelou discretas diferenças qualitativa e quantitativa. Por exemplo, *p*-cimeno, *n*-decanal, *n*-dodecanal e β -curcumeno foram detectados apenas no óleo das folhas, entretanto, estes constituintes somam apenas 5,5% do total da constituição química daquele óleo. Deve-se notar que o monoterpene mirceno, presente em 21,9 e 33,6% no óleo das folhas, no óleo dos frutos está presente em apenas 1,1 e 1,5%. Desta forma, considerando que todos os demais constituintes do óleo das folhas são comuns ao óleo dos frutos, pode-se presumir que o mirceno tenha um importante papel na atividade expressada pelo óleo das folhas, sem, entretanto, desprezar uma possível ação sinérgica provocada pela associação de alguns componentes químicos.

Tabela 27. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas e frutos de *T. trifolia*

Bactérias Gram-negativas	Média dos halos de inibição (mm) ^a		
	Folhas	Frutos	Tobramicina
<i>Chromobacterium violaceum</i> (ATCC 12472) ^b	13,3	11,0	22,0
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	8,3	- ^c	17,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	8,0	-	18,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25319)	7,0	-	34,0
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC10708)	8,6	-	22,0
Bactérias Gram-positivas			
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	9,0	9,5	31,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P)	11,3	-	25,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	12,0	-	25,0

^a Os resultados expressam a média de 3 experimentos. ^b ATCC, American Type Culture Collection. ^c (-) = Ausência de halo de inibição na dose testada. ^d Concentração dos óleos = 60 µg, do antibiótico = 10 µg.

3.5. Resultado da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para as cumarinas isoladas de *T. trifolia*

A atividade anticolinesterase apresentada pelos extratos das folhas de *T. trifolia* (Trevisan, 2003) motivou a investigação destes extratos visando o isolamento de metabólitos secundários responsáveis por tal atividade. Deste modo, todas as cumarinas isoladas de *T. trifolia* foram avaliadas em CCD, frente à enzima acetilcolinesterase (Item 4.8, pág. 177). O resultado deste bioensaio encontra-se descrito na Tabela abaixo, e como pode ser observado, todos os compostos mostraram atividade. Aurapteno (**TFL-1**), foi o mais ativo, com um halo de inibição de 8 mm, em seguida, isopimpineline (**TFR-2**), (*R*)-biakangelicina (**TFR-1**) e isomerazina (**TFL-4**), foram as cumarinas mais ativas, todas com halos de inibição igual a 7 mm. Ambas, mexotocina (**TFR-3**) e isosibiricina (**TFL-3**), apresentaram halos de inibição de 6 mm, enquanto coumurraina (**TFL-2**) foi a cumarina com menor atividade. Estes dados reforçam o potencial anticolinesterásico das cumarinas (Brühlmann, 2001; Kang, 2001) e incluem plantas ricas neste tipo de compostos como promissoras candidatas a elaboração de drogas naturais que possam vir a auxiliar no tratamento da doença de Alzheimer.

Tabela 28. Inibição da enzima acetilcolinesterase apresentada pelas cumarinas isoladas de *T. trifolia*

Compostos	Halos de inibição (mm)	Compostos	Halos de inibição (mm)
TFR-2	7	TFL-2	5
TFR-1	7	TFL-3	6
TFR-3	6	TFL-4	7
TFL-1	8	carbachol	11

Concentração = 4 mg/mL



PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MÉTODOS DE ANÁLISE

4.1.1. Métodos cromatográficos

As cromatografias foram realizadas utilizando-se gel de sílica, com granulometria de 70-230, da marca Vetec (cromatografia gravitacional), 230-400 mesh da Merck (cromatografia sobre pressão) e Sephadex LH-20 (cromatografia por exclusão molecular). O comprimento e o diâmetro das colunas, assim como as quantidades de adsorventes variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem comatografadas. Para as comatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se gel de sílica 60, 5-40 μm , com indicador de fluorescência na faixa de 254 ηm (F_{254}) sobre cromatofolha de poliéster, MERCK.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram realizadas através de exposição destas em lâmpada de irradiação na faixa do ultravioleta (UV), Mineral Ligh, modelo UVSL-25, em dois comprimentos de onda 254 e 366 ηm ; pela aspensão com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$)/ácido perclórico (HClO_4)/etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), seguido de aquecimento em estufa à aproximadamente 100 °C, por um período de aproximadamente cinco minutos; ou ainda pela exposição em câmara saturada com vapores de iodo.

Nas comatografias realizadas ao longo deste trabalho foram utilizados os eluentes éter de petróleo, hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, puros ou como misturas binárias de solventes, em ordem crescente de polaridade. Todos os solventes utilizados para a realização deste trabalho foram de qualidade P.A da marca Synth ou Vetec ou previamente destilados.

A destilação dos solventes dos extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório BUCHI.

4.2. MÉTODOS FÍSICOS

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

4.2.1. Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min e não foram corrigidas.

4.2.2. Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa dos óleos essenciais foram obtidos em espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A, série II (CG/EM), provido de coluna capilar apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 4°C/min de 50 a 180 °C e 20 °C/min de 180 a 280 °C, sendo a temperatura do injetor de 250°C e a do detector 200 °C.

A análise quantitativa dos óleos foi realizada em espectrômetro Shimadzu GC-17A, equipado com um detector de ionização de chama e coluna capilar apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25µm), utilizando gradiente crescente de temperatura de 4 °C/min de 35 a 180 °C, e 17 °C/min até atingir 280 °C e mantida nesta temperatura por 10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C.

Os espectros de massa dos constituintes não voláteis foram medidos em um instrumento Micromass Quatro LC com ionização por Eletrospray, realizados no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – SP pelo professor Edson Rodrigues-Filho.

4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C), uni- e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-300 e DPX-500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio e 75 e

125 MHz para carbono-13. Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl_3), acetona ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), metanol (CD_3OD), dimetilsulfóxido ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}-d_6$) e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}-d_5$).

A multiplicidade das absorções foi indicada segundo a convenção; s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), dd (duplo dubleto), ddd (triplo dubleto), t (triplete), dt (duplo triplete), q (quarteto), dq (duplo quarteto), quint. (quinteto) e m (multiplete).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio (δ_{H} 7,27), acetona (δ_{H} 2,05), metanol (δ_{H} 4,87; 3,31), dimetilsulfóxido (δ_{H} 2,50), e piridina (δ_{H} 8,74; 7,58; 7,22), enquanto nos espectro de carbono-13 utilizou-se tetrametil-silano como referência interna.

O padrão de substituição dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de ntação de 135° (CH e CH_3 com amplitude em oposição aos CH_2). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro BB (Broad Band) e DEPT 135° e segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

4.2.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho, foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) para amostras sólidas ou ainda dissolvendo-as em clorofórmio, caso estas fossem solúveis e filmes para substâncias líquidas.

4.2.5. Rotação óptica

A determinação da rotação óptica foi realizada utilizando Polarímetro digital da Perkin-Elmer 341 à temperatura de 25°C e concentração de 1 mg para 2 mL de solvente.

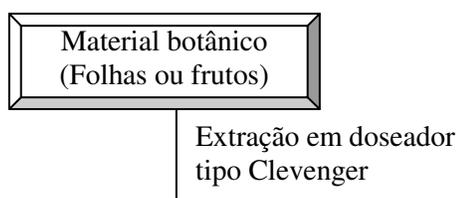
4.3. MATERIAL VEGETAL

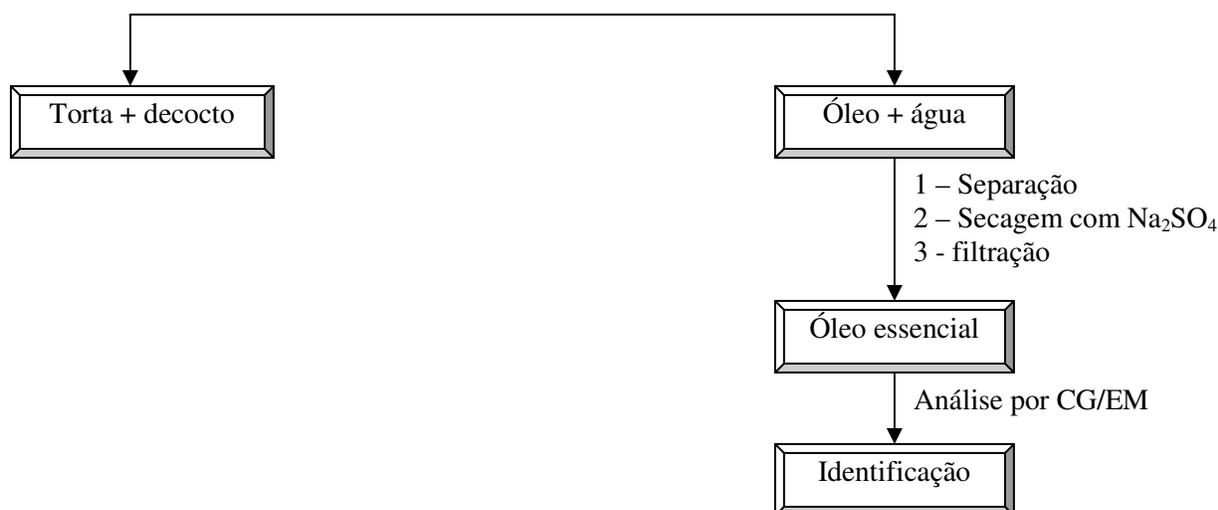
Foram utilizadas para a concretização deste trabalho, duas espécies de diferentes famílias, *Triphasia trifolia* pertencente à família Rutaceae e *Cordia piauhiensis* pertencente à família Boraginaceae, em continuidade ao estudo, que resultou em uma dissertação de mestrado (Santos, 2003). As coletas foram realizadas em janeiro de 2005, na praia de Icaraí, litoral oeste do Estado do Ceará e em agosto de 1999, na localidade de Barreiro Grande/Crato – Ceará, respectivamente. A identificação das plantas foi realizada pelo professor Edson de Paula Nunes do Departamento de Biologia – UFC e as exsicatas representando as plantas estudadas (*Triphasia trifolia* - 27245 e *Cordia piauhiensis* - 29104) encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra daquele departamento.

4.4. MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE *Triphasia trifolia*

Amostras, recém coletadas de folhas (620 g) e frutos completamente maduros (900 g), foram submetidas a hidrodestilação, utilizando doseador tipo Clevenger. O processo consistiu em colocar o material em um balão de vidro de 5 L, com aproximadamente 2 L de água destilada, mantendo-se em ebulição por um período de duas horas. Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e pesados, resultando em 1,0 mL (541,5 mg - 0,09%) e 1,2 mL (632,3 mg - 0,07%), respectivamente. Os óleos foram armazenados em frascos de vidro, vedados e mantidos sob refrigeração para posterior análise (Fluxograma 1, pág. 163).

Fluxograma 1. Método de extração dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Triphasia trifolia*





4.5. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES NÃO VOLÁTEIS DE *Triphasia trifolia*

(Fluxograma 2, pág. 166)

4.5.1. Obtenção dos extratos

O decocto dos frutos, oriundo do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação, foi filtrado e submetido à partição com acetato de etila. As folhas (6,04 Kg) foram secas à temperatura ambiente e trituradas, e em seguida foram submetidas à extração exaustiva com uma mistura binária de éter de petróleo/ acetato de etila 1:1, seguida de etanol. As soluções obtidas foram destiladas sob pressão reduzida, resultando nos extratos descritos na Tabela a seguir.

Tabela 29. Dados referentes à obtenção dos extratos dos frutos e folhas de *T. trifolia*

	SIGLA	PESO (g)
Fração acetato de etila do decocto frutos	FAE-DFr	0,77
Extrato éter de petróleo/acetato das folhas	EFTT	260,3
Extrato etanólico das folhas	EEFT	501,5

4.5.1.1. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila da partição do decocto dos frutos (FAE-DFr) de *T. trifolia* e isolamento de TFR-1, TFR-2 e TFR-3.

770 mg da fração acetato de etila da partição do decocto dos frutos (FAE-DFr) foi adsorvida em 880 mg de gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre

13 g de gel de sílica em coluna de 500 mL. O fracionamento foi realizado com uma mistura binária de hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt em escala crescente de polaridade, fornecendo um total de 48 frações de 50 mL, como disposto na Tabela abaixo. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com suas semelhanças. A fração F-17, obtida por eluição com hexano/CH₂Cl₂ 1:1, mostrou ser constituída por uma única substância (5,5 mg), apresentando-se como sólido amorfo amarelo, a qual foi denominada **TFR-2**.

Tabela 30. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FAE-DFr

ELUENTE	FRAÇÕES (50 mL)
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 10%	1
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 20%	2-6
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 30%	7-10
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 40%	11-15
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 50%	16-18*
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 60%	19-25
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 70%	26-31
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 80%	32-34
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 90%	35-35
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 10%	36-41
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 30%	42-43
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%	44-45*
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 70%	46-47*
AcOEt 100%	48

*Frações cromatografadas

As frações 44 e 45 (264,4 mg), extraídas com CH₂Cl₂/AcOEt 50% foram adsorvidas em 22 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 250 mL e eluída com CH₂Cl₂/AcOEt 10%, 20%, 30% e 40%. Foram obtidas 105 frações de 10 mL e, após monitoramento em CCD, reuniram-se as frações 79 a 100 obtidas por eluição com CH₂Cl₂/AcOEt 20% e 30%, fornecendo 153,5 mg de material.

A fração 79-100 (153,5 mg) foi pulverizada com 183 mg de gel de sílica, em grau de porcelana e acondicionada sobre 15 g de gel de sílica em coluna de 125 mL e eluída com misturas de hexano-AcOEt em ordem crescente de polaridade, de acordo com a Tabela 31, abaixo. Um total de 90 frações de 10 mL foram coletadas e analisadas por CCD. As frações 69 a 78, solúvel em metanol, constituídas de cristais amarelados mostraram-se puras (9,0 mg) e foi denominada **TFR-1**.

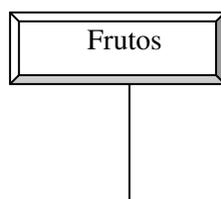
Tabela 31. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 79-100

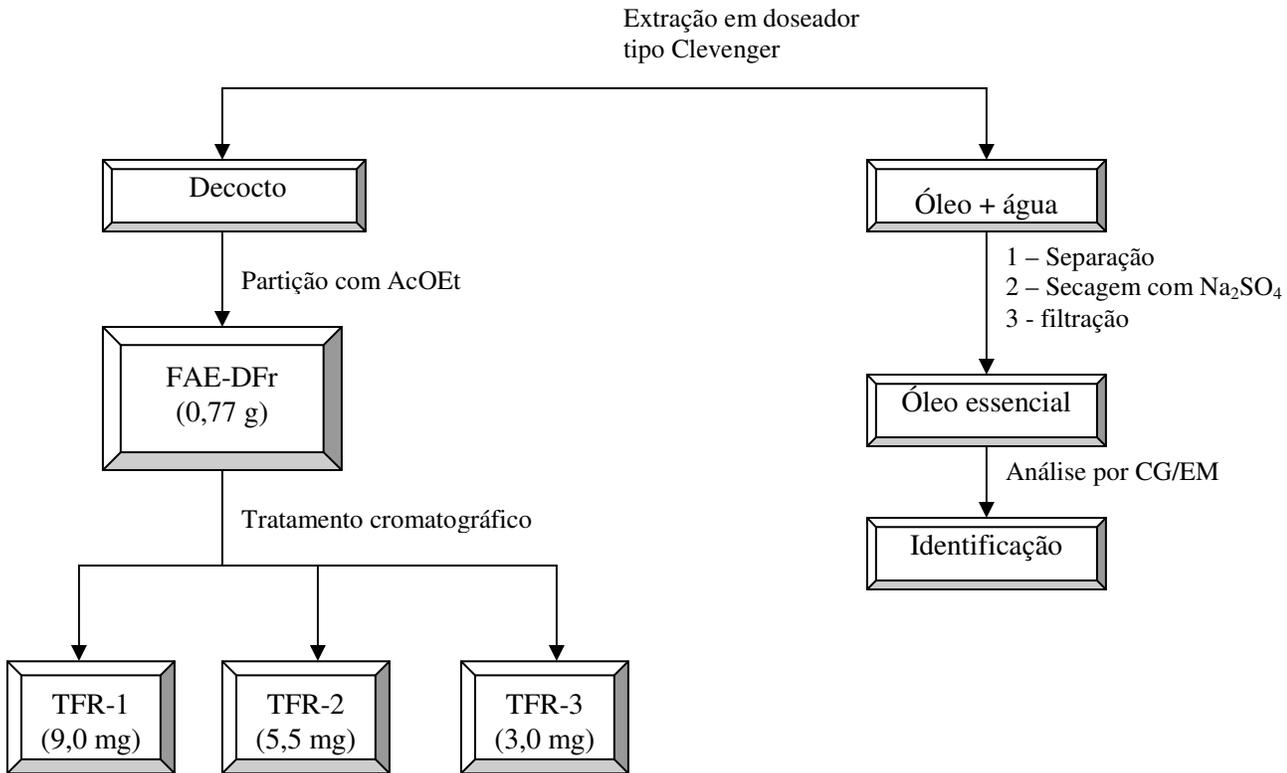
ELUENTE	FRAÇÕES (10 mL)
Hexano/AcOEt 40%	1-45
Hexano/AcOEt 50%	46-70*
Hexano/AcOEt 70%	71-85*
AcOEt 100%	86-90

*Frações cromatografadas

As frações 46 e 47 (30 mg) extraídas com CH₂Cl₂/AcOEt 70%, obtidas do fracionamento cromatográfico de FAE-DFr, foram reunidas após análise comparativa por CCD e submetidas a uma cromatografia sob pressão (cromatografia flash) utilizando 32 mg de sílica gel para pulverizar o material e 9,0 mg para empacotá-lo, em coluna de 125 mL. O sistema de eluentes utilizado foi a mistura hexano/AcOEt 80%, obtendo-se 40 frações de 10 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com suas semelhanças. A fração 11-20 constituída de cristais incolores apresentou-se pura (3,0 mg) e foi denominada **TFR-3**.

Fluxograma 2. Isolamento de TFR-1, TFR-2 e TFR-3 a partir do decocto dos frutos de *T. trifolia*, oriundo do processo de extração do seu óleo essencial.





4.5.1.2. Fracionamento cromatográfico do extrato éter de petróleo/acetato 1:1 das folhas de *T. trifolia* (EFTT).

260,3 g do extrato EFTT foram misturados a 380,8 g de gel de sílica, pulverizados em grau de porcelana e acondicionados sobre 74 g de gel de sílica em funil de decantação

de 2000 mL. Fracionamento cromatográfico por eluições sucessivas com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, resultou nas frações constantes na Tabela abaixo.

Tabela 32. Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de EFTT

ELUENTE	FRAÇÃO	PESO (g)
Hexano	EFTT-H	135,4
CH ₂ Cl ₂	EFTT-D	88,1
AcOEt	EFTT-A	25,3
MeOH	EFTT-M	9,7

4.5.1.2.1. Fracionamento cromatográfico da fração hexano (EFTT-H) do extrato éter de petróleo/acetato 1:1 e isolamento de TFL-1 e TFL-2 (Fluxograma 3, pág. 173).

Parte da fração EFTT-H (40,2 g), foi pulverizada em grau de porcelana utilizando 50 g de gel de sílica e acondicionada, em coluna de 1000 mL, sobre 60 g de gel de sílica. A eluição foi realizada com éter de petróleo, hexano, hexano/CH₂Cl₂ 50%, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, concentrada em evaporador rotativo, obtendo-se as frações sumarizadas na Tabela abaixo.

Tabela 33. Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de EFTT-H

ELUENTE	FRAÇÃO	PESO (g)
Éter de petróleo	EFTT-H/EP	11,0
Hexano	EFTT-H/H	7,3
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 50%	EFTT-H/HD	13,8
CH ₂ Cl ₂	EFTT-H/D	3,1
AcOEt	EFTT-H/A	1,8
MeOH	EFTT-H/M	1,2

A fração Hexano/CH₂Cl₂ 50% (EFTT-H/HD – 14,5 g) foi submetida a uma cromatografia sob pressão (cromatografia flash) utilizando 17,8 g de sílica gel para pulverizar o material e 200,3 g de sílica gel para empacotar em uma coluna de 1000 mL. Utilizou-se hexano/AcOEt 20% como eluente, obtendo-se um total de 30 frações de 10 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com suas semelhanças. Na

fração 3-4, após a evaporação do solvente, observou-se a presença de um precipitado, o qual foi dissolvido com metanol à quente que, após resfriá-lo forneceu 198,2 mg de um material na forma de cristais incolores, denominado **TFL-1**.

A fração 5-9 (1,0 g) resultante da cromatografia flash acima foi submetida ao mesmo procedimento, utilizando 1,1 g de sílica gel para pulverizá-la e 68,8 g para empacotar em uma coluna de 250 mL. Os solventes utilizados para eluição foram hexano/AcOEt 10%, obtendo-se um total de 90 frações de 10 mL cada, e em seguida reunidas após um processo de comparação por CCD. A fração 75-90 (41,6 mg) foi recromatografada sob pressão (cromatografia flash) com hexano/AcOEt 15% como eluente, resultando em 50 frações de 10 mL cada, que após comparação por CCD foram reunidas de acordo com as semelhanças de Rf. Na fração 6-17, após evaporado o solvente, observou-se a presença de um material na forma de cristais incolor, o qual, após análise em CCD, apresentou-se puro (12,4 mg) e foi denominado **TFL-2**.

4.5.1.2.2. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (EFTT-H/D) da fração hexano (EFTT-H) do extrato éter de petróleo/acetato 1:1 e isolamento de TFL-3 (Fluxograma 3, pág. 173).

3,2 g de EFTT-H/D foram pulverizados em grau de porcelana com 5,3 g de gel de sílica e acondicionados em 10,6 g de gel de sílica em uma coluna de 250 mL, procedendo eluições sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias de polaridade crescente. Foram obtidas 60 frações de 50 mL cada, conforme descrito na Tabela a seguir.

Tabela 34. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EFTT-H/D

ELUENTE	FRAÇÕES (50 mL)
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 30%	1-15
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 50%	16-25*

Hexano/CH ₂ Cl ₂ 70%	26-37*
CH ₂ Cl ₂ 100%	38-45
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 30%	46-50
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%	51-54
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 70%	55-58
AcOEt 100%	59-60

*Frações cromatografadas

As frações 17 a 37 eluídas com hexano/CH₂Cl₂ 50 e 70% foram reunidas após análise comparativa por CCD. Este material (198,2 mg) foi submetido a uma cromatografia sob pressão (cromatografia flash) em uma coluna de 250 mL, utilizando hexano/AcOEt 30% como eluente. Obteve-se um total de 43 frações de 10 mL, que após análise comparativa por CCD, foram reunidas. A fração 15-23 foi recristalizada com metanol resultando em 14,3 mg de um material na forma de cristais incolor, denominado **TFL-3**.

4.5.1.3. Tratamento do extrato etanólico das folhas de *T. trifolia* (EEFT).

Para que fosse possível a realização do fracionamento cromatográfico de EEFT sem a interferência da clorofila, foi necessário um tratamento com água/metanol na proporção de 2:1 para a retirada da mesma. Para realização de tal procedimento, foi utilizado somente parte do material (249,3 g de EEFT) que, após o tratamento resultou em 157 g de extrato sem a presença de clorofila (EEFT/SC).

4.5.1.3.1. Partição de EEFT/SC

Ao extrato EEFT/SC (157 g) foi adicionado 140 mL de metanol e 60 mL de água e em seguida particionado com os solventes diclorometano, acetato de etila e n-butanol, resultando nas frações constantes na Tabela a seguir.

Tabela 35. Dados resultantes da partição de EEFT/SC

ELUENTE	FRAÇÃO	PESO (g)
CH ₂ Cl ₂	EEFT/SC-D	33,4
AcOEt	EEFT/SC-A	11,7

n-butanol	EEFT/SC-nB	79,9
-----------	------------	------

4.5.1.3.2. Fracionamento cromatográfico da fração EEFT/SC-D e isolamento de TFL-4 (Fluxograma 3, pág. 173)

33,4 g da fração diclorometano (EEFT/SC-D) oriunda da partição de EEFT/SC foi adsorvida em 37,2 g de gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e disposta sobre 22 g de gel de sílica em coluna de 1000 mL. O fracionamento foi realizado com uma mistura binária de hexano, AcOEt e MeOH em escala crescente de polaridade, fornecendo um total de 20 frações de 100 mL cada, como disposto na Tabela 36. As frações foram concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD. Na fração eluída com hexano/AcOEt 70% (13-14) observou-se a presença de um precipitado, que após filtração obteve-se 30 mg de cristais amarelados em forma de agulha e foi identificado como sendo a biakangelicina (**TFR-1**), a qual já havia sido isolada anteriormente do decocto oriundo do óleo essencial dos frutos. A fração 16-19 eluída com acetato de etila 100% foi submetida a sucessivas cromatografias, resultando no isolamento de 11,3 mg de **TFR-3** que foi identificada como sendo a mexoticina, a qual também já havia sido isolada do decocto oriundo do óleo essencial dos frutos.

Tabela 36. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEFT/SC-D

ELUENTE	FRAÇÕES (100 mL)
Hexano/AcOEt 10%	1
Hexano/AcOEt 20%	2

Hexano/AcOEt 30%	3-4
Hexano/AcOEt 40%	5-8*
Hexano/AcOEt 50%	9-10
Hexano/AcOEt 60%	11-12
Hexano/AcOEt 70%	13-14*
Hexano/AcOEt 80%	15
AcOEt 100%	16-19*
AcOEt/MeOH 20%	20

*Frações cromatografadas

As frações 5 a 8 (7,1 g) eluídas com hexano/AcOEt 40% foram reunidas após análise comparativa por CCD. Este material foi adsorvido em 9,3 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 500 mL e eluída com hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 50 frações de 50 mL, as quais foram analisadas por CCD.

Tabela 37. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 5-7 de EEFT/SC-D

ELUENTE	FRAÇÕES (50 mL)
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 20%	1-3
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 40%	4-8
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 50%	9-15*
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 60%	16-31*
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 70%	32-37
Hexano/CH ₂ Cl ₂ 80%	38-41
CH ₂ Cl ₂ 100%	42-45
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%	46-48
AcOEt 100%	49-50

As frações 13 a 31 eluídas com hexano/CH₂Cl₂ 50 e 60% foram reunidas após análise comparativa por CCD. Este material (2,2 g) foi submetido a uma cromatografia sob pressão (cromatografia flash), utilizando-se 2,8 g de sílica gel para pulverizá-lo e 12,3 g para empacotar, em uma coluna de 500 mL. Como eluente, foi utilizado uma mistura

binária de hexano/ CH₂Cl₂/AcOEt 5:3:2. Obteve-se um total de 53 frações de 10 mL, que após análise comparativa por CCD, foram reunidas. Na fração 11-17, após evaporação do solvente, observou-se a presença de uma resina amarela (726 mg), a qual apresentou-se pura e foi denominada **TFL-4**.

4.5.1.3.3. Fracionamento cromatográfico da fração EEFT/SC-A e isolamento de TFL-5 (Fluxograma 3, pág. 173).

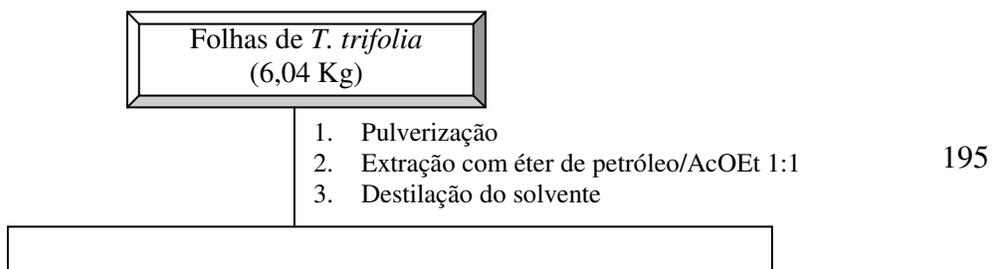
A fração EEFT/SC-A (11,7 g) foi pulverizada em grau de porcelana com 18,3 g de sílica gel e acondicionada em 13,6 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 1000 mL. O fracionamento foi realizado com CH₂Cl₂/AcOEt 20%, 40%, 60%, 80%, AcOEt 100% e MeOH 100%, onde na fração AcOEt observou-se a presença de um precipitado (EEFT/SC-Ap), o qual foi recristalizado com clorofórmio e metanol e submetido novamente a cromatografia. 250 mg de EEFT/SC-Ap foram pulverizados em 145 mg de gel de sílica, em grau de porcelana e dispostos sobre 9,5 g de gel de sílica desativada com etanol, em coluna de 250 mL. O fracionamento foi realizado com uma mistura de CH₂Cl₂, acetona e metanol em ordem crescente de polaridade, conforme a Tabela 38, fornecendo um total de 90 frações de 10 mL cada, as quais foram analisadas e reunidas por comparação em CCD. A fração 41-60 (35 mg) revelou-se pura, apresentando-se como um sólido amorfo amarelo, denominada **TFL-5**.

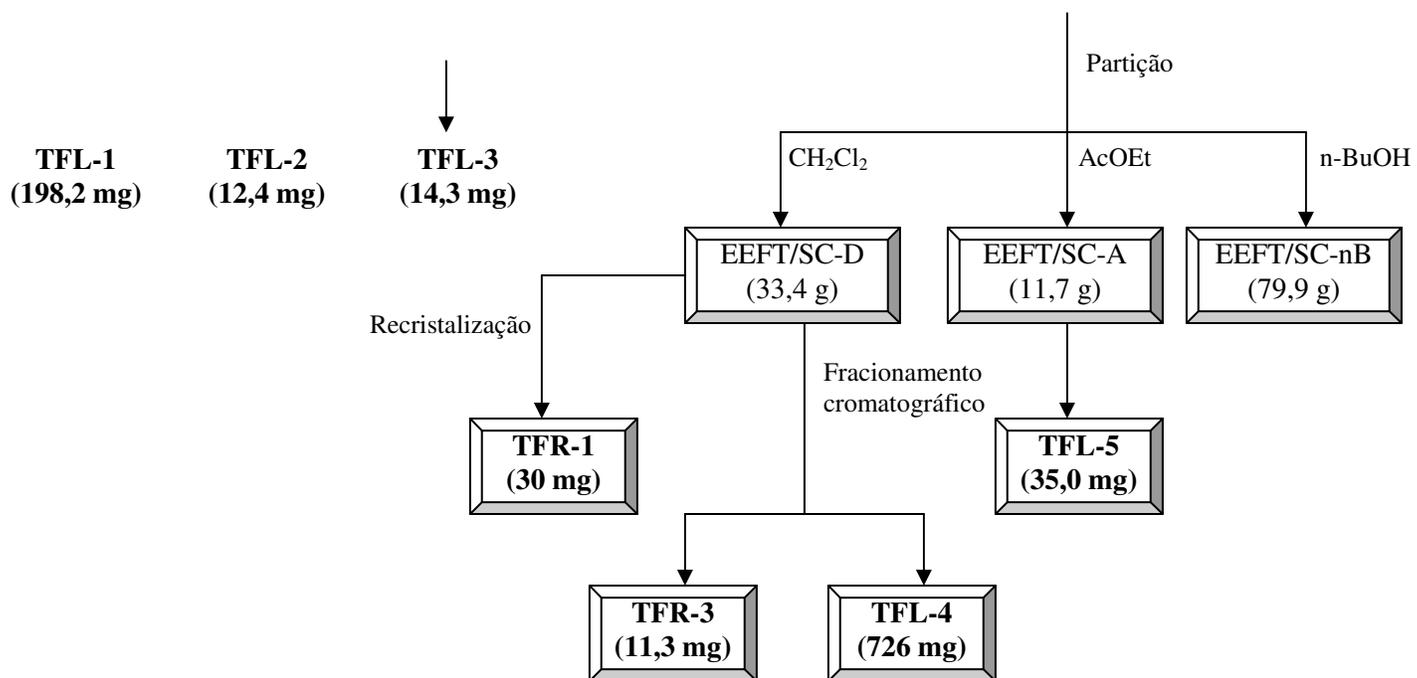
Tabela 38. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEFT/SC-Ap

ELUENTE	FRAÇÕES (10 mL)
CH ₂ Cl ₂ /acetona 50%	1-36
CH ₂ Cl ₂ /acetona 70%	37-60*
CH ₂ Cl ₂ /acetona 80%	61-70
Acetona 100%	71-80
Acetona/MeOH 50%	81-86
MeOH 100%	87-90

*Frações cromatografadas

Fluxograma 3. Isolamento de TFL-1, TFL-2, TFL-3, TFL-4 e TFL-5 a partir dos extratos éter de petróleo/acetato de etila 1:1 e etanólico das folhas de *T. trifolia*.





4.6. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES NÃO VOLÁTEIS DE *Cordia piauhiensis* Fresen

4.6.1. Obtenção do extrato etanólico da madeira do caule de *C. piauhiensis* e fracionamento cromatográfico.

1,7 Kg da madeira do caule de *C. piauhiensis*, seca à temperatura ambiente e triturada mecanicamente, foi submetida à extração exaustiva com etanol a frio resultando, após a destilação do solvente em 103,4 g de material, denominado EECCP. Este material foi misturado a 113,2 g de gel de sílica, pulverizados em grau de porcelana e acondicionados em 53 g de gel de sílica em coluna de 1000 mL, utilizando para eluição os solventes clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol. O fracionamento cromatográfico resultou nas frações constantes na Tabela abaixo.

Tabela 39. Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de EECCP (103,4 g).

ELUENTE	FRAÇÃO	PESO (g)
CHCl ₃	EECCP-C	1,8
AcOEt	EECCP-Ac	8,1
Acetona	EECCP-Ace	39,7
Metanol	EECCP-M	40,1

4.6.2. Partição de EECCP-Ace e isolamento de CCP-1

À fração EECCP-Ace (39,7 g) foi adicionada 25 mL de água e, em seguida, particionada com acetato de etila e n-butanol. A fração AcOEt (10,9 g) foi acondicionada em 10 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 1000 mL. O fracionamento foi realizado com uma mistura de AcOEt/MeOH em ordem crescente de polaridade, descrito na Tabela 40. Foram obtidas 28 frações de 50 mL, as quais foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com suas semelhanças.

Tabela 40. Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AcOEt

ELUENTE	FRAÇÕES (50 mL)
AcOEt/MeOH 30%	1-10
AcOEt/MeOH 50%	11-20*

*Frações cromatografadas

As frações 12 a 16, eluídas com AcOEt/MeOH 50%, foram reunidas após análise comparativa por CCD. Este material (590 mg) foi submetido duas vezes a cromatografia por exclusão molecular (Sephadex LH-20) utilizando MeOH como eluente, resultando em 15 frações de 10 mL cada, as quais foram analisadas e reunidas após monitoramento em CCD. Observou-se nas frações 25-40 a presença de um sólido amorfo branco, o qual se mostrou puro (43 mg), solúvel em metanol e foi denominado **CCP-1**.

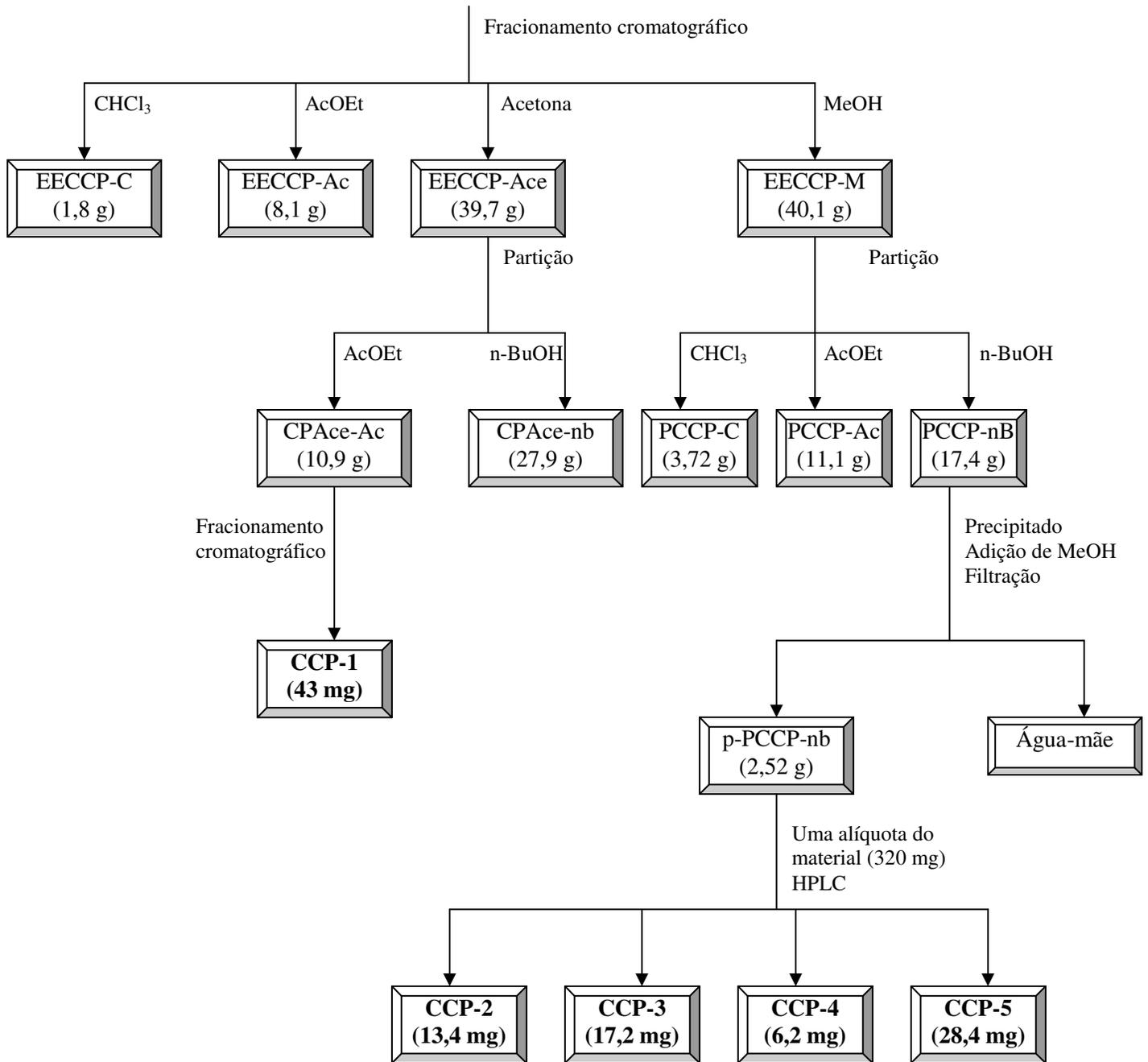
4.6.3. Partição de EECCP-M e isolamento de CCP-2, CCP-3, CCP-4 e CCP-5 (Fluxograma 4, pág. 175).

A fração metanol (EECCP-M – 40,1 g) também foi submetida a partição com CHCl_3 , AcOEt e n-BuOH. Nesta última fração foi observada a presença de um precipitado, o qual após adição de metanol seguida de filtração, resultou em 2,52 g de um material denominado p-PCCP-nb. Uma alíquota deste material (140 mg) foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna semipreparativa (5 μm , 10 x 250 mm) Supercosil LC-C8. O desenvolvimento das corridas cromatográficas com um sistema linear utilizando MeOH/H₂O de 30:70 a 38:62 v/v por 22 min, forneceu 13,4 mg de **CCP-2** (t_R 7,5 min) e 17,2 mg de **CCP-3** (t_R 15,3 min), ambos solúveis em piridina.

Uma alíquota de 320 mg de p-PCCP-nb foi novamente submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em uma coluna semipreparativa (5 μm , 10 x 250 mm) Supercosil LC-C8, eluída com MeOH/H₂O em um gradiente linear de 30:70 a 38:62 v/v por 30 minutos, obtendo-se 6,2 mg de **CCP-4** (t_R 13 min) e 28,4 mg de **CCP-5** (t_R 24,1 min), além de **CCP-2** e **CCP-3**, novamente.

Fluxograma 4. Isolamento dos compostos CCP-1, CCP-2, CCP-3, CCP-4 e CCP-5 a partir do extrato etanólico do caule de *C. piauhiensis* (EECCP)

Extrato etanólico
(EECCP – 103,4 g)



4.7. ENSAIO ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *T. TRIFOLIA*

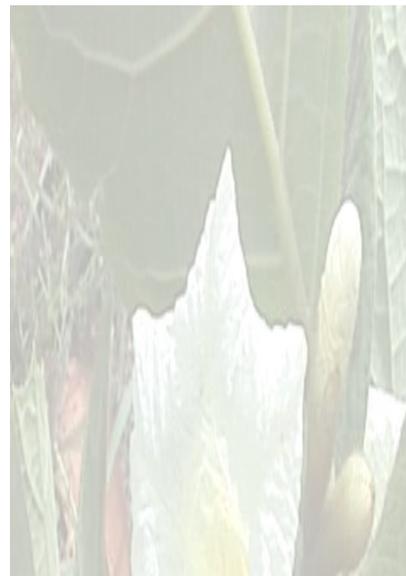
Os óleos essenciais das folhas e frutos de *T. trifolia* foram diluídos em clorofórmio (40 mg/mL) e submetidos a ensaios de atividade antibacteriana pelo método de difusão em

disco como descrito por Bauer e colaboradores (Bauer, 1966). Para tanto, culturas de bactérias, provenientes da American Type Culture Collection, em fase exponencial de crescimento [10^7 - 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL] foram semeadas em placas de agar Müller-Hinton (Difco, USA), em duplicata, utilizando *swabs* estéreis. Discos de papel de filtro da Whatman AA (6 mm de diâmetro) esterilizados foram distribuídos em placas de Petri esterilizadas e separadamente embebidos com 15 μ L de cada óleo ou com 15 μ L de clorofórmio, controle negativo. Após completa evaporação do clorofórmio, os discos contendo 60 μ g de óleo foram colocados sobre as superfícies das placas previamente semeadas com as bactérias. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e então examinadas quanto à presença de zonas de inibição do crescimento. Discos do antibiótico comercial Tobramicina (10 μ g; Cecon, São Paulo) foram usados como controle positivo para todas as bactérias testadas. O resultado deste ensaio encontra-se descrito na Tabela 27 (pág. 156).

4.8. ENSAIO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE PARA AS CUMARINAS ISOLADAS DE *T. TRIFOLIA*

A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), através de CCD, pôde ser avaliada seguindo a metodologia descrita por Elmann (Ellman, 1961), a qual foi posteriormente

adaptada por Rhee et al (Rhee, 2001). Este bioensaio consiste na aplicação da amostra em CCD, seguida da pulverização da placa com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico, DTNB) e uma solução de iodeto de acetiltiocolina (ATICI) em tampão. Após este procedimento, pulveriza-se a placa com a enzima AChE (3 U/mL). Decorridos alguns minutos (~3), a inibição enzimática pode ser constatada pela ausência da cor amarela, e concomitante surgimento de um halo branco. O ensaio enzimático em CCD é um teste puramente qualitativo, mas de sensibilidade significativa. Para a realização do teste foi necessário a preparação das seguintes soluções: (1) 50 mM Tris/HCl pH 8 (solução tampão); (2) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0.1% de albumina sérica bovina (BSA) fração V; (3) 1 mM do reagente de Ellman e (4) 1 mM de ACTI. A enzima AChE liofilizada foi dissolvida na solução tampão (1) para fazer uma solução estoque de 1000 U/mL. Para a diluição da enzima utilizou-se a solução tampão (2). Inicialmente, alíquotas de 5 µL das cumarinas, na concentração de 4 mg/mL, foram aplicados em CCD (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck). Em seguida pulverizou-se a placa com as soluções (3) e (4). Após 3 min, tempo necessário para a completa secagem das soluções, pulverizou-se a placa com a enzima AChE (3 U/mL). Decorridos aproximadamente 3 min, observou-se o desaparecimento da cor amarela e o aparecimento de halos brancos, cujos diâmetros foram imediatamente medidos. Como controle positivo foi usado o carbachol. O resultado deste ensaio encontra-se descrito na Tabela 28 (pág. 157).





CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Neste trabalho investigou-se a composição química volátil e não-volátil de *Triphasia trifolia* (Rutaceae), bem como a composição química de *Cordia piauhiensis* (Boraginaceae).

A análise do óleo essencial das folhas de *T. trifolia* permitiu a identificação de aproximadamente 99,0% de seus constituintes químicos. Constituído

majoritariamente de monoterpenos (83,7-96,8%), os principais componentes foram sabineno (39,2 e 33,8%) e mirceno (21,9 e 33,6%).

Do óleo dos frutos, foram identificados aproximadamente 99,0% da composição química. Da mesma forma, no óleo essencial dos frutos prevaleceram os monoterpenos, os quais representaram 93,8 a 97,5% do total do óleo. Os constituintes majoritários foram sabineno (35,5 e 22,8%), β -pineno (21,2 e 29,9%) e γ -terpineno (18,4 e 12,9%), seguido por limoneno (6,2 e 5,0%) e 4-terpineol (3,6 e 8,9%).

O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais foi avaliado frente a um painel constituído de oito cepas de bactérias. O óleo dos frutos mostrou-se ativo apenas contra dois tipos das bactérias testadas, *Chromobacterium violaceum* e *Bacillus subtilis*. Por outro lado, o óleo das folhas mostrou moderada eficácia contra todas as cepas testadas: *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus*.

A prospecção química do decocto, oriundo do processo de hidrodestilação dos frutos de *T. trifolia*, resultou no isolamento de três cumarinas, cujas estruturas foram determinadas como sendo isopimpinellina, (*R*)-biakangelicina e (*S*)-mexoticina.

A investigação química dos extratos das folhas, culminou no isolamento das cumarinas (*R*)-biakangelicina, (*S*)-mexoticina, aurapteno, coumurraina, isosibiricina e isomerazina, além do flavonóide vitexina. Estes resultados mostram que *T. trifolia* é uma rica fonte de cumarinas, independente do local de cultivo.

As cumarinas isoladas de *T. trifolia* foram avaliadas em CCD, frente à enzima acetilcolinesterase. O resultado deste bioensaio mostrou que todos os compostos mostraram atividade, onde aurapteno, isopimpinellina, (*R*)-biakangelicina e isomerazina foram as cumarinas mais ativas. Ambas, mexoticina e isosibiricina apresentaram moderada atividade em relação às anteriores. Estes dados reforçam o potencial anticolinesterásico das cumarinas e incluem, plantas ricas neste tipo de compostos, como promissoras candidatas a elaboração de drogas naturais que possam vir a auxiliar no tratamento da doença de Alzheimer.

A prospecção química do extrato etanólico do caule de *C. piauiensis* conduziu ao isolamento e caracterização de cinco saponinas triterpênicas: ácido 3β -O- $[\alpha$ -L-

ramnopiranosil-(1→2)- β -D-glicopiranosil] pomólico, pomolato de 3β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-glicopiranosil-(1→6)- β -D-glicopiranosila, ursolato de 3β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-xilopiranosil-(1→2)- β -D-glicopiranosil-(1→6)- β -D-glicopiranosila, pomolato de 3β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-glicopiranosila e oleanolato de 3β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-glicopiranosil] 28-O- β -D-glicopiranosil-(1→6)- β -D-glicopiranosila. Todas as saponinas aqui isoladas, de acordo com o melhor do nosso conhecimento, ainda não tinham sido citadas na literatura.

De acordo com a literatura, triterpenos glicosilados (saponinas), são bastante raros no gênero *Cordia*, entretanto, verifica-se que os trabalhos fitoquímicos envolvendo plantas do gênero são na grande maioria, relacionados aos extratos apolares.

C

A

P

Í

T

V

L

O

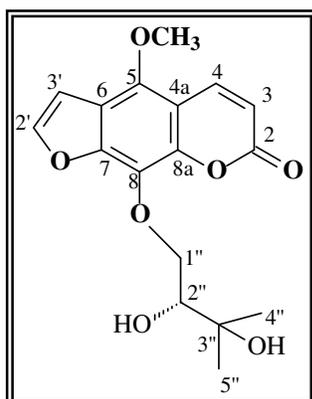
6



CONSTANTES FÍSICAS

6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

6.1. TFR-1



F.M.: C₁₈H₂₁O₇

Aspecto: cristais amarelados

Ponto de fusão: 116-117 °C

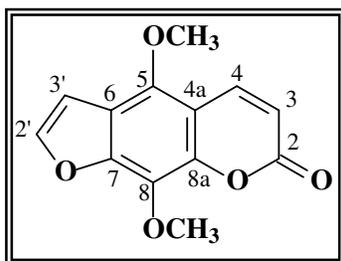
$[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ (c. 0.05, MeOH)

(R)-biakangelicina

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 3, pág. 33.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 3, pág. 33.

6.2. TFR-2



F.M.: C₁₃H₁₀O₅

Aspecto: sólido amorfo amarelo

Ponto de fusão: 144-145,2 °C

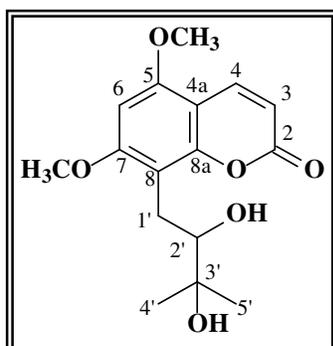
isopimpinellina

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm⁻¹):1716, 1204, 1160, 1139, 1070.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 4, pág 38.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 4, pág 38.

6.3. TFR-3



F.M.: C₁₆H₂₀O₆

Aspecto: cristais incolores

Ponto de fusão: 176,8-178,1 °C

[α]_D²⁰ = -22° (c. 0.05, CHCl₃)

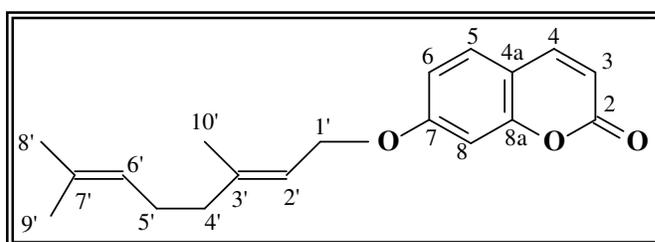
(-)-mexoticina

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm^{-1}): 3445, 2926, 1714, 1602, 1330, 1252, 1132, 1103.

Espectroscopia de RMN^1H (500 MHz, CD_3OD) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 5, pág. 42.

Espectroscopia de RMN^{13}C (125 MHz, CD_3OD) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 5, pág. 42.

6.4. TFL-1



F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_3$

Aspecto: cristais incolores

Ponto de fusão: 63,2-64,9°C

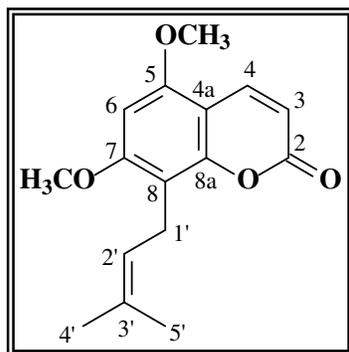
aurapteno

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm^{-1}): 1720, 1616, 1235, 1205, 1163, 1128, 1014.

Espectroscopia de RMN^1H (500 MHz, CDCl_3) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 6, pág 47.

Espectroscopia de RMN^{13}C (125 MHz, CDCl_3) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 6, pág 47.

6.5. TFL-2



F.M.: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 147,9-149,0°C

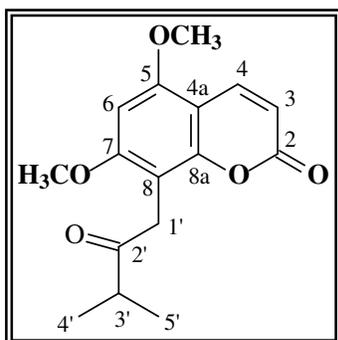
coumurraina

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm^{-1}): 1712, 1604, 1251 1226, 1163, 1119, 1096.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 7, pág. 54.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 7, pág. 54.

6.6. TFL-3



F.M.: C₁₆H₁₈O₅

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 108,1-110,2°C

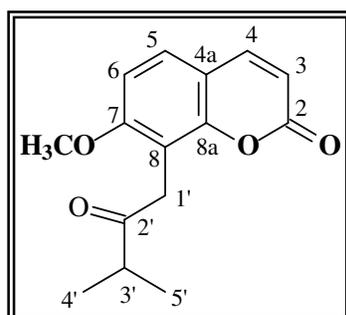
isosibiricina

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm^{-1}): 1723, 1252, 1226, 1206, 1180, 1135, 1115, 1052.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 8, pág. 61.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 8, pág. 61.

6.7. TFL-4



F.M.: C₁₅H₁₆O₄

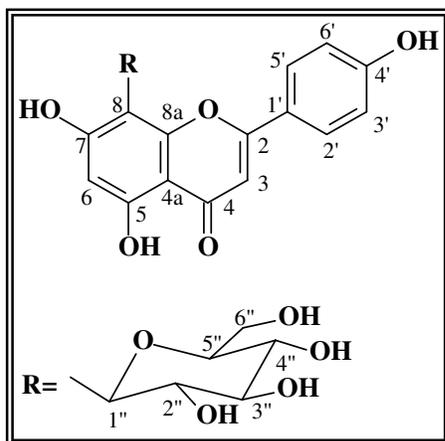
Aspecto: resina amarela

isomerazina

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 9, pág 67.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 9, pág 67.

6.8. TFL-5



F.M.: C₂₂H₂₄O₁₀

Aspecto: sólido amorfo amarelo

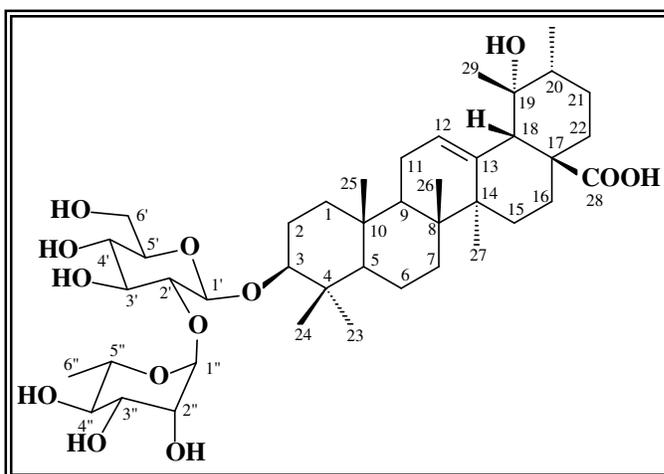
Ponto de fusão 248,0-250,1 °C

vitexina

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, DMSO) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 10, pág. 72.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, DMSO) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 10, pág. 72.

6.9. CCP-1



F.M. = C₄₂H₆₈O₁₃

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 219,2-220,8 °C

[α]_D²⁰ = -0,44° (c. 0.05, MeOH)

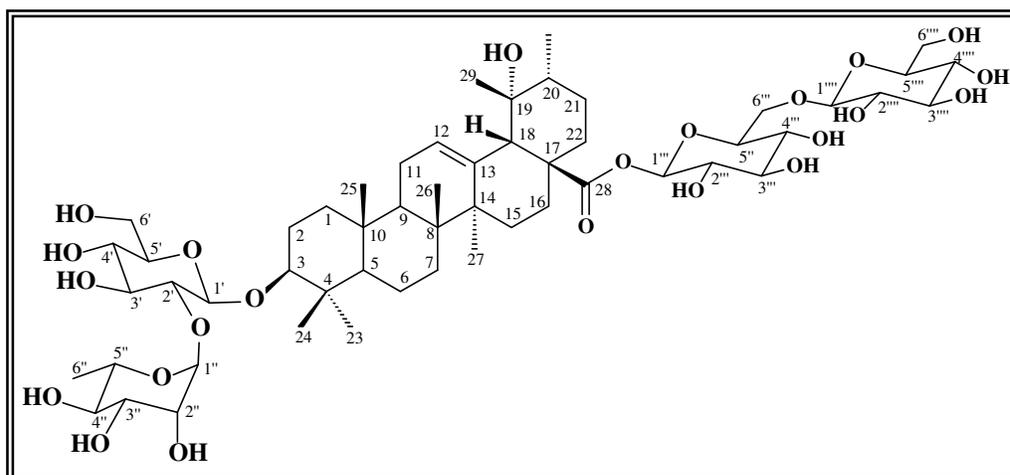
ácido 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] pomólico

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm^{-1}): 3428, 1695, 1131, 1050

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 12 e 13, pág 79 e 80.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 12 e 13, pág 79-80.

6.10. CCP-2



pomolato de 3 β -O-[α -L-rannopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila

F.M.= C₅₄H₈₈O₂₃

m/z = 1128 ([M + Na]⁺)

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 217,9-219,7 °C

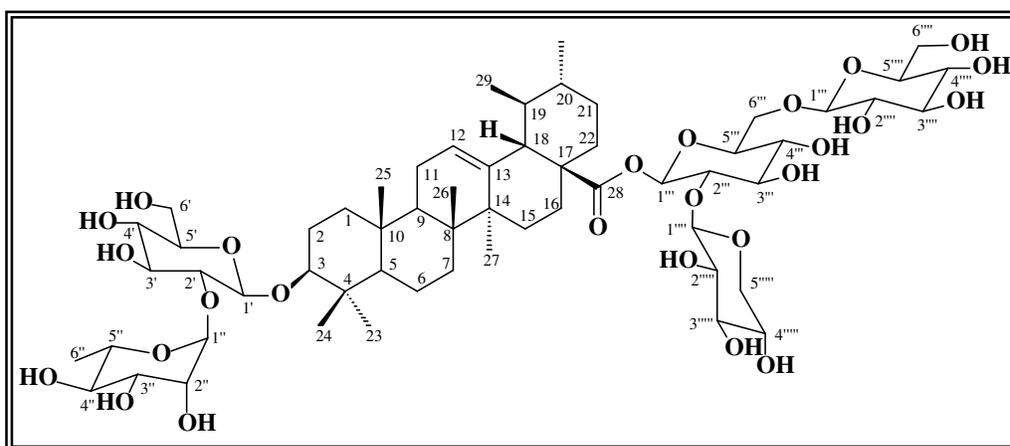
$[\alpha]_D^{20}$ = -1,38° (c. 0.05, C₅H₅N)

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm⁻¹): 3403, 1654, 1059.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, C₅D₅N) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 15 e 16, pág. 93 e 94.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, C₅D₅N) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 15 e 16, pág. 93-94.

6.11. CCP-3



ursolato de 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila

F.M.= C₅₉H₉₆O₂₆

m/z = 1244 ([M + Na]⁺)

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 229-230 °C

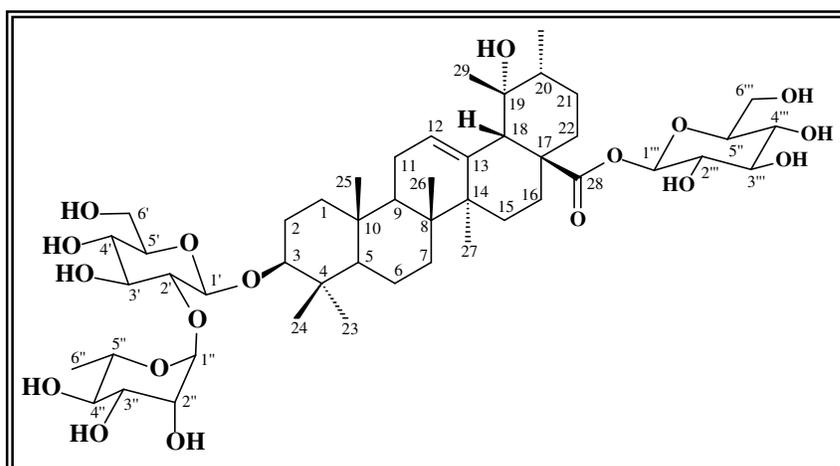
[α]_D²⁰ = -0,22° (c. 0.05, C₅H₅N)

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm⁻¹): 3414, 1633, 1072.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, C₅D₅N) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 18 e 19, pág. 108 e 109.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, C₅D₅N) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 18 e 19, pág. 108 e 109.

6.12. CCP-4



pomolato de 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O-[β -D-glicopiranosila

F.M.= C₄₈H₇₈O₁₈

m/z = 941 [M + Na]⁺

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 227-229 °C

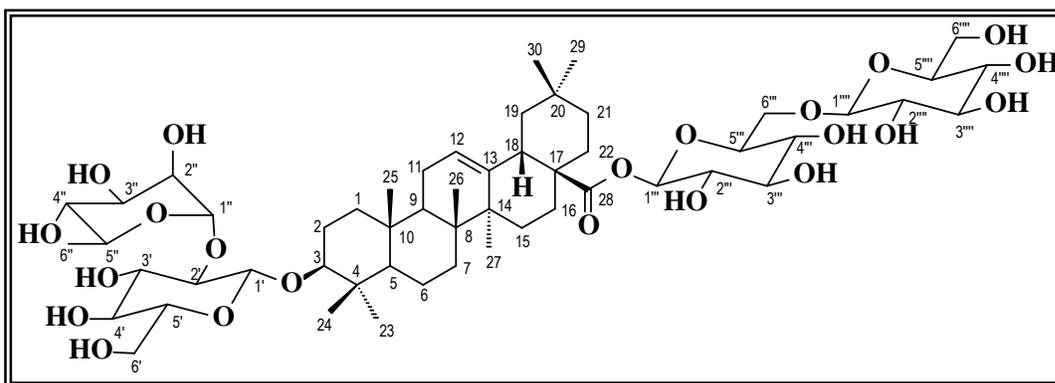
[α]_D²⁰ = -26° (c. 0.05, C₅H₅N)

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm⁻¹): 3424, 1639, 1140, 1069.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, C₅D₅N) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 21 e 22, pág 122 e 123.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, C₅D₅N) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 21 e 22, pág 122 e 123.

6.13. CCP-5



oleanolato de 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil] 28-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila

F.M.= C₅₄H₈₈O₂₂

m/z = 1087 [M + Na]⁺

Aspecto: sólido amorfo branco

Ponto de fusão: 218,6-220,6 °C

[α]_D²⁰ = -3° (c. 0.05, C₅H₅N)

Espectroscopia na região do IV (ν_{\max} cm⁻¹): 3422, 1638, 1062.

Espectroscopia de RMN¹H (500 MHz, C₅D₅N) – δ (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, correlação estrutural): Tabela 24 e 25, pág 137 e 138.

Espectroscopia de RMN¹³C (125 MHz, C₅D₅N) – δ (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): Tabela 24 e 25, pág 137 e 138.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAUL, J.; PHILOGÊNESE, E.; BOURGEOIS, P.; POUPAT, C.; AHOND, A.; POTIER, P.; Contribution à la connaissance des Rutacées américaines: étude des feuilles de *Triphasia trifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 846-848, 1994.

ABULROB, A. N.; SULLER, M. T. E.; GUMBLETON, M.; SIMONS, C.; RUSSELL, A. D.; Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel

efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3021-3027, 2004.

ADAMS, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.

ADEBAJO, A. C.; REISCH, J.; Minor furocoumarins of *Murraya koenigii*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 334-337, 2000.

AHMAD, V. U.; KOUSAR, F.; KHAN, A.; ZUBAIR, M.; IQBAL, S.; TAREEN, R. B.; A new ketone and a known anticancer triterpenoid from the leaves of *Onosma limitaneum*. **Helv. Chim. Acta.**, v. 88, n. 2, p. 309-311, 2005.

AHMAD, V. U.; NOORWALA, M.; MOHAMMAD, F. V.; SENER, B.; A new triterpene glycoside from the roots of *Symphytum officinale*. **J. Nat. Prod.**, v. 56, p. 329-334, 1993.

AHMAD, V. U.; NOORWALA, M.; MOHAMMAD, F. V.; AFTAB, K.; Triterpene saponins from the roots of *Symphytum officinale*. **Fitoterapia**, v. 64, p. 478-479, 1993.

AHMAD, V. U.; MOHAMMAD, F. V.; NOORWALA, M.; SENER, B.; A new bidesmosidic triterpenoidal saponin from the roots of *Symphytum officinale* **Planta Medica**, v. 59, p. 461-464, 1993.

AHMAD, V. U.; NOORWALA, M.; MOHAMMAD, F. V.; SENER, B.; GILANI, A. H.; AFTAB, K.; Symphytoxide A, a triterpenoid saponin from the roots of *Shymphytum officinale*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1003-1006, 1993.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; Kovats' indexes as a preselection routine in mass spectra library searches of volatiles. **J. Nat. Prod.**, v. 47, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; Kovats índices simulation in essential oils analysis. **Quimica Nova**, v. 13, p. 282-284, 1990.

AYATOLLAHI, A. M.; AHMED, Z.; MALIK, A.; A fernane-type triterpene from *Sericostoma pauciflorum*. **J. Nat. Prod.**, v. 54, p. 570-572, 1991.

AYATOLLAHI, A. M.; AHMED, Z.; AFZA, N.; MALIK, A.; A triterpene from *Sericostoma pauciflorum*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2899-2901, 1992.

BAILEY, L.H.; Manual of Cultivated Plants: Most commonly grown in the Continental United States and Canada. The Macmillan Company: New York, 1954.

BARROSO, G. M.; Sistemática de Angiospermas do Brasil. Imprensa universitária (1ª ed.) Universidade Federal de Viçosa, MG, 1986.

BAUER, A. W.; KIRB, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M.; Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Amer. J. Clinic Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BRÜHLMANN, C.; OOMS, F.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B.; CATTO, M.; LEONETTI, F.; ALTOMARE, C.; CARROTTI, A.; Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. **J. Med. Chem.**, v. 44, n.19, p. 3195-3198, 2001.

BRUMMITT, R. K.; Vascular Plant Families and Genera. Royal Botanic Garden, Kew, 1992.

CHAUHAN, J. S.; SRIVASTAVA, S. K.; Lupa-20(29)-ene-3-O- β -D-maltoside from the roots of *Cordia obliqua*. **Phytochemistry**, v. 17, p.1005-1006, 1978.

CHEN, T. K.; ALES, D. C.; BAENZIGER, N. C.; WIEMER, D. F.; Ant-repellent from *Cordia alliodora*. **J. Org. Chem.**, v. 48, p. 3525-3531, 1983.

CRONQUIST, A.; The evolution and classification of flowering plants, 2^a ed, The New York Botanical Garden, 1970.

DAN, S.; DAN, S. S.; Triterpenoids of the bark of *Ehretia laevis*. **Fitoterapia**, v 53, n. 3, p 51-52, 1982.

DE SILVA, L. B.; HERATH, W. H. M. W.; JENNINGS, R. C.; MAHENDRAN, M.; WANNIGAMA, G. P.; Coumarins from *Triphasia trifoliata*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2776-2778, 1981.

DONDON, R.; BOURGEOIS, P.; FORGUES, S. F.; A new bicoumarin from the leaves and stems of *Triphasia trifolia*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 129-133, 2006.

DREYER, D. L.; PICKERING, M. V.; COHAN, P.; Distribution of limonoids in the Rutaceae. **Phytochemistry**, v. 11, p. 705-713, 1972.

ELLMAN, G.L.; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FULLAS, F.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; TUCKER, J. C.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, A. D.; Triterpenes from the combined leaf and stem of *Lithospermum caroliniense*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1303-1305, 1996.

IMAI, F.; ITOH, K.; KISHIBUCHI, N.; KINOSHITA, T.; SANKAWA, U.; Constituents of the root bark of *Murraya paniculata* collected in Indonesia. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, n. 1, p. 119-123, 1989.

JOLY, A. B.; Botânica: Introdução a Taxonomia Vegetal, 1ª ed., Companhia Editora Nacional, SP, 1977.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; SUNG, S. H.; PARK, M. J.; KIM, Y. C.; Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 683-685, 2001.

KUROYANAGI, M.; SEKI, T.; HAYASHI, T.; NAGASHIMA, Y.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plants, *Cordia multispicata*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n.8, p. 954-957, 2001.

KUROYANAGI, M.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; HAYASHI, T.; TAKASE, Y.; MASUDA, K.; Dammarane-type triterpenes from the Brazilian medicinal plants, *Cordia multispicata*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p.1307-1312, 2003.

LI, J.; HO, C. T.; LI, H.; TAO, H.; LIU, L.; Separation of sterols and triterpene alcohols from unsaponifiable fractions of three plant seed oils. **J. Food Lipid.**, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2000.

LIU, R.; FENG, L.; SUN, A.; KONG, L.; Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) *Cusson* by high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1055, p. 71-76, 2004.

MACIAS, F. A.; MASSANET, G. M.; RODRIGUEZ-LUIS, F.; Carbon-13 NMR of coumarins. III. Simple coumarins. **Magn. Reson. in Chem.**, v. 27, n. 9, p. 892-984, 1989.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.; ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 3, p. 1517-1575, 1994.

MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G.; URBAN, I.; Flora Brasiliensis, v. 3, 1857-1896.

MAJIDAYATOLLAHI, S. A.; AHMED, Z.; MALIK, A.; AFZA, N.; BADAR, Y.; A hopane-type triterpene from *Sericostoma pauciflorum*. **Fitoterapia**, v. 63, n. 4, p. 304-307, 1992.

MENEZES, J. E. S. A.; MACHADO, F. E. A.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; **Resumos do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Cuiabá, Brasil, 2002.

MOHAMMAD, F. V.; NOORWALA, M.; AHMAD, V. U.; SENER, B.; Bidesmosidic triterpenoidal saponins from the roots of *Symphytum officinale*. **Planta Medica**, v. 61, p. 94, 1995.

MOHAMMAD, F. V.; NOORWALA, M.; AHMAD, V. U.; SENER, B.; A bidesmosidic hederagenin hexasaccharide from the roots of *Symphytum officinale*. **Phytochemistry**, v. 40, 213-218, 1995.

NAKAMURA, N.; KOJIMA, S.; LIM, Y. A.; MESELHY, M. R.; HATTORI, M.; GUPTA, M. P.; CORREA, M.; Dammarane-type triterpenes from *Cordia spinescens*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1139-1141, 1997.

NOORWALA, M.; MOHAMMAD, F. V.; AHMAD, V. U.; SENER, B.; A bidesmosidic triterpene glycoside from roots of *Symphytum officinale*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 439-443, 1994.

PALME, E.; BILIA, A. R.; FEO, V.; MORELLI, I.; Flavonoid glycosides from *Cotoneaster thymaefolia*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p.1381-1382, 1994.

REITZ, P. R.; **Flora Ilustrada Catarinense**, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento florestal, Herbário Barbosa Rodrigues, 1970.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V. D. INGKANINA, K.; VERPOORTE, R.; Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J. Chromatogr. A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

ROMUSSI, G.; CIARALLO, G.; Constituents of Boraginaceae. Triterpene saponins from *Anchusa officinalis*. **Liebigs Ann. Chem.**, v. 12, p. 2028-2035, 1979.

ROMUSSI, G.; FALSONE, G.; CREA, A. E. G.; Constituents of Boraginaceae IV: Anchusoside-3, a new triterpene saponin from *Anchusa officinalis* L. **Archiv. Pharmazie**, v. 316, n. 6, p. 499-504, 1983.

ROMUSSI, G.; FALSONE, G.; Constituents of Boraginaceae 7. Anchusoside-8 and -9: two new triterpene saponins from *Anchusa officinalis* L. **Liebigs Ann. Chem.**, v. 11, 1869-1872, 1984.

ROMUSSI, G.; FALSONE, G.; Constituents of Boraginaceae VI: Anchusoside-4, a new triterpene saponin from *Anchusa officinalis* L. **Archiv. Pharmazie**, v. 318, n. 3, p. 219-221, 1985.

ROMUSSI, G.; FALSONE, G.; Constituents of Boraginaceae VIII: Anchusoside-5, a new minor saponin from *Anchusa officinalis* L. **Archiv. Pharmazie**, v.319, n. 6, p. 549-552, 1986.

- ROMUSSI, G.; CAFAGGI, S.; Constituents of Boraginaceae IX. Anchusoside-11, a new minor saponin from *Anchusa officinalis* L. **Archiv. Pharmazie**, v. 321, n. 10, p. 753-754, 1988.
- RUANGRUNGSI, N.; LANGE, G. L.; ORGAN, M. G.; Coumarins from the leaves of *Triphasia trifolia*. **Fitoterapia.**, v. 65, n. 2, p. 179-180, 1994.
- SANTOS, R. P.; Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil – *Cordia piauhiensis* Fresen. **Dissertação de Mestrado (Química Orgânica)**, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2003.
- SANTOS, R. P.; VIANA, F. A.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L.; Structure elucidation and total assignment of ^1H and ^{13}C NMR data for a new bisdesmoside saponin from *Cordia piauhiensis*. **Magn. Reson. Chem.**, v. 41, 735-738, 2003.
- SANTOS, R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO, E.; VIANA, F. A.; SILVEIRA, E. R.; Chemical constituents of *Cordia piauhiensis* – Boraginaceae. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 3B, p. 662-665, 2005.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; Botânica sistemática, Nova Odessa, SP; Instituto Plantarum, 2005.
- SRIVASTAVA, S. D.; NIGAM, S. S.; Lupa-20(29)-ene-3-O- α -L-rhamnopyranoside from the roots of *Cordia obliqua*. **J. Indian. Chem. Soc.**, v. 60, n. 2, p. 202, 1983.
- SRIVASTAVA, S. K.; Constituents from the seeds of *Cordia obliqua* as potential anti-inflammatory agents. **Ind. J. Pharm. Scienc.**, v. 49, n. 2, p. 66-69, 1987.
- STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON S.; MCLAFFERTY, F. W.; Registry of Mass Spectra Data, J. Wiley & Sons: New York, 1974.
- TARODA, N., GIBBS, P. E.; A revision of the brasilian species of *Cordia* subgenus *Varronia* (Boraginaceae). **Notes RGB Edinb.**, v. 44, n. 1, p. 105, 1986.
- TARODA, N., GIBBS, P. E.; Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil 2. An outline taxonomic revision of subgenus *Myxa* Taroda. **Hoehnea**, v. 14, p. 31-52, 1987.
- TARODA, N., GIBBS, P. E.; Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil 1. A new infrageneric classification and conspectus. **Rev. Bras. Bot.**, v. 9, p. 31-42, 1986.

TEWARI, N. C.; AYENGAR, K. N. N.; RANGASWAMI, S.; Structure of saponins of *Caccinia glauca*: Caccigenin, Caccigenin Lactone e 23-deoxycaccigenin. **Ind. J. Chem.**, v. 8, p. 593-597, 1970.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; MEENT, M.; RHEE, K.; VERPOORTE, R.; Screening of plants with anticholinesterase activity for treatment of Alzheimer disease. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

VERMA, Y. S.; SAXEMA, V. K.; NIGAN, S. S.; Unsaponifiable matter of *Cordia rothii* Roem and Schult (fruits). **J. Indian. Chem. Soc.**, v. 55, n. 4, p. 419-420, 1978.

VILLASENOR, I. M.; CANLAS, A. P.; FAUSTINO, K. M.; PLANA, K. G.; Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 92, n. 1, p. 53-56, 2004.

VINCKEN, J. P.; HENG, L.; GROOT, A.; GRUPPEN, H.; Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, p. 275-297, 2007.

WU, T. S.; TIEN, H. J.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; MORITA, N.; Coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2227-2228, 1980.

YOKOYAMA H.; GUERRERO, H. C.; Triphasiaxanthin, a new carotenone. **J. Org. Chem.**, v. 35, n. 6, p. 2080-2081, 1970.

YOKOYAMA H.; WHITE, M. J.; Carotenone formation in *Triphasia trifolia*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 1795-1797, 1970.

YOKOYAMA, H.; WHITE, M. J.; Citrus carotenoids-VIII. The isolation of semi- β -carotenone and β -carotenone from *Citrus* relatives. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1031-1034, 1968.