



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

ISLAY LIMA MAGALHÃES

**Contribuição ao conhecimento Químico de
plantas do Nordeste: *Caesalpinia ferrea*
(Leguminosae)**

FORTALEZA

2014

ISLAY LIMA MAGALHÃES

**Contribuição ao conhecimento Químico de
plantas do Nordeste: *Caesalpinia ferrea*
(Leguminosae)**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial, para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração:
Química Orgânica

Orientador:
Prof. Dr. Francisco José de Queiroz
Monte

**FORTALEZA –CE
2014**

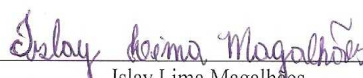
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M166c Magalhães, Islay Lima.
 Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Caesalpinia ferrea*
(Leguminosae) / Islay Lima Magalhães. – 2014.
 136 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento
de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Química Orgânica.
 Orientação: Prof. Dr. Francisco José de Queiroz Monte.
1. Compostos aromáticos. 2. Triterpenos. 3. *Caesalpinia ferrea*. I. Título.

ISLAY LIMA MAGALHÃES

**Contribuição ao conhecimento Químico de plantas do
Nordeste: *Caesalpinia ferrea* (Leguminosae)**

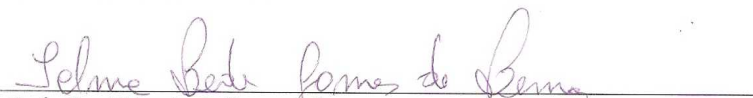
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/ UFC encontra-se à disposição dos interessados.



Islay Lima Magalhães

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 19/08/2014.

EXAMINADORES:


Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Á Deus e a minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida a mim concedida.

Aos meus Pais, Israel Pinto Magalhães e Maria Oberlândia Lima Magalhães pela dedicação, pelo apoio, pela atenção, pelo carinho e principalmente pelos ensinamentos em minha vida.

Ao meu irmão, Weverton Lima Magalhães, pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Francisco José de Queiroz Monte pela acolhida, amizade, atenção e conhecimento transmitido para o desenvolvimento deste trabalho e por todas as críticas e sugestões para o aprimoramento desta dissertação.

À técnica Sarah Sued Gomes de Souza, do Instituto de Biologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal da Bahia, pela identificação botânica da espécie estudada.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os meus colegas de bancada do LAFIPLAM I e II, pelo apoio constante e convivência alegre e divertida.

A Dra. Daniele Alves Ferreira pelo acompanhamento e dedicação a mim concedida.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais, pelo apoio.

Aos operadores dos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massa e Infravermelho, pela contribuição e comprometimento com a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento, principalmente a Raimunda, a Lana, ao Sr. Paulo, a Célia e o Orlando pelos serviços prestados.

Ao CNPq, CAPES, FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho descreve a investigação fitoquímica da espécie vegetal *Caesalpinia ferrea* (Leguminosae), conhecida como “jucá” e usada popularmente no nordeste do Brasil como antirreumático, antimicrobiano e entre outros usos. Os extratos de *C. ferrea* através da cromatografia em coluna tendo como fase estacionária gel de sílica e Sephadex LH-20 levaram ao isolamento de quatro substâncias do tipo polifenóis {ácido gálico (ácido-3,4,5-tri-hidróxi-benzóico), ácido elágico (4,4',5,5',6,6'-hexahidroxidifênico-2,6,2',6'-dilactona), amentoflavona (8-[5-(5,7-dihidroxi-4-oxocromeno-2-il)-2-hidroxi-fenil]-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromeno-4-one) e resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno)}; uma mistura constituída de um esteróide { β -sitosterol (24-etilcolest-5-en-3 β -ol) e de dois ácidos graxos [ácido palmítico (n-hexadecanóico) e esteárico (n-octadecanóico)]}; uma outra mistura constituída dos triterpenos [Lupeol (Lup-20(29)-en-3 β -ol) e β -amirina (olean-12-en-3 β -ol), do esteróide 24-metilenocicloartanol (3 β -9,19-Ciclolanostan-3-ol-24-metileno) e do álcool lignocérico (n-tetracosonol). A caracterização dos compostos envolveu o uso das técnicas de RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), IV, CG-EM-IE e CLAE-EM-IES. Os extratos brutos das vagens e algumas de suas frações foram submetidos a testes de atividades antiacetilcolinesterase e antioxidante com resultados promissores. O bi-flavonóide, a fitoalexina e os constituintes das misturas mencionadas são relatados pela primeira vez na literatura em *C. ferrea*.

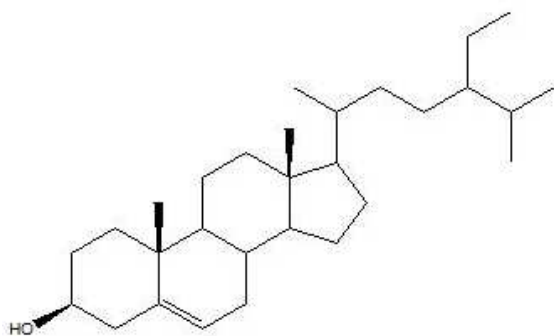
Palavras Chaves: *Caesalpinia ferrea*, Leguminosae, compostos aromáticos, triterpenos, estudos espectrais.

ABSTRACT

This work describe the phytochemical investigation of pods and stems of specie *Caesalpinia ferrea* (Leguminosae) known as “júcá”. Popularly, this plant is used as antirheumatic, antimicrobial and among other uses. The hexane and ethanol extracts to pods and stems of *C. ferrea* were submitted to column chromatography having silica gel and Sephadex LH-20 as stationary phase that led to the isolation of four compounds of the type polyphenol: {gallic acid (3,4,5-trihydroxy-benzoic acid), ellagic acid (4,4', 5,5', 6,6'-hexahydroxydifênico-2,6,2',6'-dilactone), amentoflavone (8-[5-(5,7-dihydroxy-4-oxo-chromene-2-yl)-2-hydroxyphenyl]-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)) chromen-4-one and resveratrol (trans-3,5,4' trihydroxystilbene)}; a mixture consisting of a steroid [β -sitosterol(24-etilcolest-5-en-3 β -ol) and two fatty acids [palmitic acid (n-hexadecanoic) and stearic acid (n-octadecanoic acid)]]; another mixture consisting of the triterpenes [Lupeol (Lup-20(29)-en-3 β -ol) and β -amyrin (olean-12-en-3 β -ol), steroid 24-metilenocicloartanol (3 β -9,19 Ciclolanostan-3-ol-24-methylene) and lignoceric alcohol (n-tetracosonol). The characterization of the chemical components involved the use ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D), IR, GC-MS-EI e HPLC-MS-ESI. The extracts of pods and some of its fractions were submitted in test of the antioxidant activities and antiacetylcholinesterase with promising results. The bi-flavonoid, phytoalexin and components of mixtures mentioned are first reported in the literature to *C. ferrea*.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*, Leguminosae, aromatic compounds, triterpene, spectral studies.

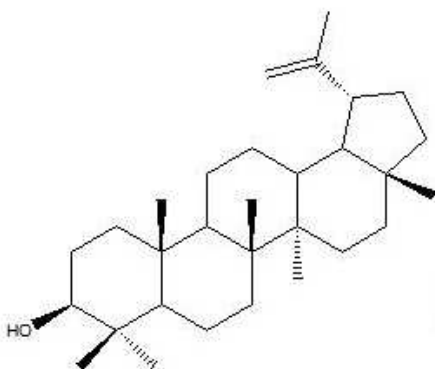
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS



β - sitosterol (24-etilcolest-5-en-3 β -ol)



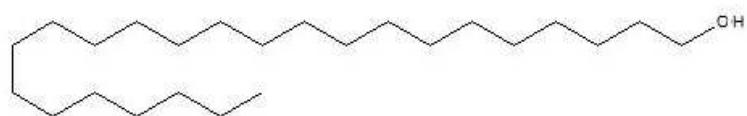
ácido palmítico (ácido n-hexadecanóico)



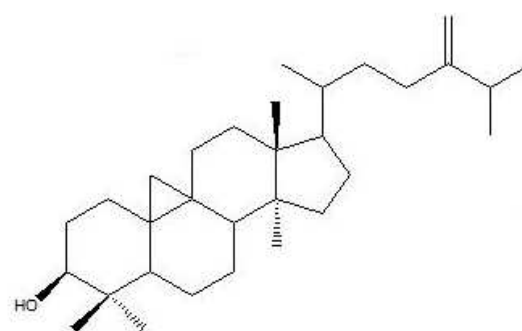
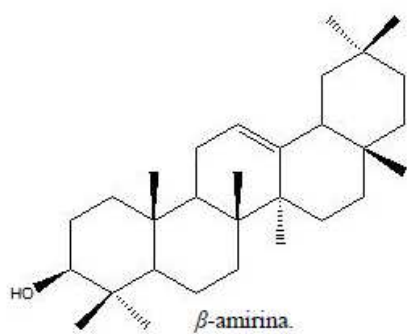
Lupeol (3 β -Lup-20(29)-en-3-ol)



ácido esteárico (ácido n-octadecanóico)

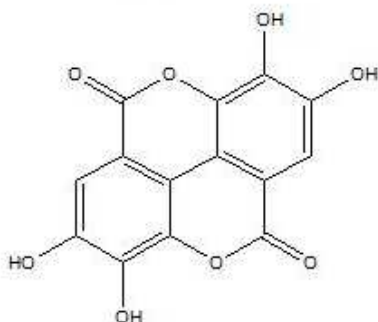


Álcool lignocérico (n-Tetracosonol)

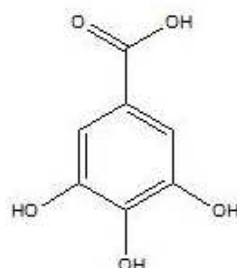


24-metylenocicloartanol (3 β -9,19 ciclolanostan-3-ol-24-metileno)

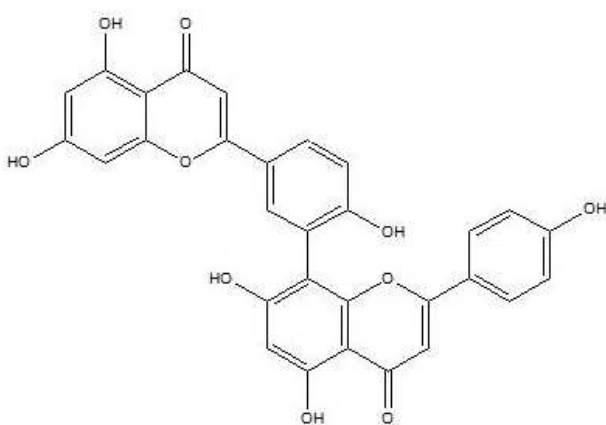
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E CARACTERIZADAS



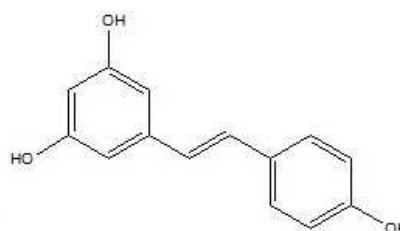
Ácido elágico (4,4', 5,5', 6,6'-hexahidroxidifênico -2, 6, 2', 6'-dilactona).



Ácido gálico (ácido-3,4,5-tri-hidróxibenzóico).



Amentoflavona 8-[5-(5,7-dihidroxi-4-oxo-cromeno-2-il)-2-hidroxi-fenil]-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxi-fenil) cromeno-4-one.



Resveratrol.(Trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno.)

PUBLICAÇÃO

MAGALHÃES, I. L.; PINTO, F. C. L.; FILHO, R. B.; FERREIRA, D. A.; LEMOS, T. L. G. de; MONTE, F. J. Q.: Chemical Constituents from *Caesalpinia ferrea*: Identification and ^1H and ^{13}C Resonance Assignment. **American Journal of Analytical Chemistry** Vol.5 No.10, Pub. Date: July 30, 2014.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Substâncias isoladas de <i>Caesalpinia ferrea</i> .	2
Figura 02	Cromatograma de M-1 obtido pela técnica CG-EM	9
Figura 03	Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de M-1	10
Figura 04	Expansão do espectro de RMN ^{13}C de M-1	11
Figura 05	Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° de M-1	12
Figura 06	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de M-1	13
Figura 07	Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de M-1	14
Figura 08	Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de M-1	15
Figura 09	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de M-1	16
Figura 10	Correlações de RMN bidimensional HMBC de M-1 . (a) M-1_A ; (b) M-1_B e M-1_C	16
Figura 11	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de M-1	17
Figura 12	Espectro de massas de M-1_A	18
Figura 13	Proposta de fragmentação de M-1_A	18
Figura 14	Estrutura de M-1_A , β - sitosterol (24-etilcolest-5-en-3 β -ol)	7
Figura 15	Espectro de massas de M-1_B	20
Figura 16	Espectro de massas de M-1_C	20
Figura 17	Mecanismo do rearranjo de McLafferty	21
Figura 18	Estruturas de M-1_B (ácido n-hexadecanóico) e M-1_C (ácido n-octadecanóico)	9
Figura 19	Cromatograma de M-2 obtido pela técnica CG-EM	28
Figura 20	Espectro de massas referente ao pico em 17,42 min. do cromatograma de M-2	28
Figura 21	Espectro de massas referente ao pico em 19,40 min. do cromatograma de M-2	29
Figura 22	Espectro de massas referente ao pico em 21,48 min. do cromatograma de M-2	29

Figura 23	Espectro de massa referente ao pico em 22,12 min. do cromatograma de M-2	30
Figura 24	Espectro de massas referente ao pico em 22,74 min. do cromatograma de M-2	30
Figura 25	Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de M-2	31
Figura 26	Expansão do espectro de RMN ^{13}C de M-2	32
Figura 27	Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de M-2	33
Figura 28	Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de M-2	34
Figura 29	Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de M-2	35
Figura 30	Espectro de RMN bidimensional HSQC de M-2	36
Figura 31	Espectro de RMN bidimensional HMBC de M-2	37
Figura 32	Correlações de HMBC para M-2_A	38
Figura 33	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de M-2	38
Figura 34	Estrutura química de M-2_A . Lupeol (3β -Lup-20(29)-en-3-ol)	24
Figura 35	Estrutura química de M-2_B . Álcool lignocérico (n-Tetracosonol)	25
Figura 36	Estrutura química de M-2_D . β -amirina (olean-12-en- 3β -ol)	26
Figura 37	Estrutura química de M-2_E . 24-metilenocicloartanol (3β -9,19 ciclolanostan-3-ol-24-metileno)	27
Figura 38	Proposta para o mecanismo reacional de obtenção do fragmento M-18 (m/z 336)	40
Figura 39	Espectro de absorção na região do infravermelho de S-8	43
Figura 40	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD_3OD) de S-8	44
Figura 41	Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz – CD_3OD) de S-8	45
Figura 42	Espectro de RMN ^1H (500 MHz – CD_3OD) de S-8	46
Figura 43	Propostas estruturais para S-8 ; (a) estrutura química do ácido-3,4,5-tri-hidróxi-benzóico e (b) estrutura química do ácido-2,4,6-tri-hidróxi-benzóico	47
Figura 44	Estrutura química do componente S-8 . Ácido gálico (ácido-3,4,5-tri-hidróxi-benzóico)	42
Figura 45	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz - $\text{DMSO } d^6$) de S-9	49

Figura 46	Espectro de RMN ^1H (500 MHz – DMSO d^6) de S-9	50
Figura 47	Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz – DMSO d^6) de S-9	51
Figura 48	Espectro de RMN bidimensional HSQC de S-9	52
Figura 49	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de S-9	53
Figura 50	Correlações HMBC de S-9	53
Figura 51	Estrutura química para S-9 . Ácido elágico (4,4', 5,5', 6,6'-hexahidroxi-difênico -2, 6, 2'' dilactona)	48
Figura 52	Espectro de absorção na região do infravermelho de S-10	56
Figura 53	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD ₃ OD) de S-10	57
Figura 54	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD ₃ OD) de S-10	58
Figura 55	Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz – CD ₃ OD) de S-10	59
Figura 56	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD ₃ OD) de S-10	60
Figura 57	Espectro de massas $[\text{M} + \text{H}]^+$ de S-10	61
Figura 58	Espectro de massas $[\text{M} + \text{H}]^-$ de S-10	61
Figura 59	Espectro de RMN ^1H (500 MHz – CD ₃ OD) de S-10	62
Figura 60	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz – CD ₃ OD) de S-10	63
Figura 61	Espectro de RMN bidimensional HSQC de S-10	64
Figura 62	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de S-10	65
Figura 63	Correlações de HMBC para S-10	65
Figura 64	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de S-10	66
Figura 65	Correlações de HMBC para S-10	66
Figura 66	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de S-10	67
Figura 67	Correlações de HMBC para S-10	67
Figura 68	Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de S-10	68

Figura 69	Correlações de HMBC para S-10	68
Figura 70	Espectro de RMN bidimensional COSY de S-10	69
Figura 71	Correlações de COSY para S-10	69
Figura 72	Estrutura de S-10 . Amentoflavona 8-[5-(5,7-dihidroxi-4-oxo-cromeno-2-il)-2-hidroxi-fenil] dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromeno	71
Figura 73	Espectro de absorção na região do infravermelho de S-11	73
Figura 74	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz – CD ₃ OD) de S-11	74
Figura 75	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz – CD ₃ OD) de S-11	75
Figura 76	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz – CD ₃ OD) de S-11	76
Figura 77	Espectro bidimensional HMBC de S-11	77
Figura 78	Correlações de HMBC para S-11	77
Figura 79	Espectro de RMN ¹³ C DEPT (75 MHz – CD ₃ OD) de S-11	79
Figura 80	Espectro de RMN bidimensional HSQC de S-11	80
Figura 81	Estrutura de S-11 . Resveratrol. <i>Trans</i> -3,4,4'-trihidroxiestilbeno	72
Figura 82	Fluxograma de obtenção de M-1 , M-2 , S-8 e S-9	89
Figura 83	Fluxograma de obtenção de S-10 e S-11	90
Figura 84	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para o extrato hexano	97
Figura 85	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração diclorometano	97
Figura 86	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração água/ metanol	98
Figura 87	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração acetato de etila	98
Figura 88	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração hexano	99
Figura 89	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração n-butanol	99
Figura 90	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para o trolox (padrão)	100
Figura 91	Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para vitamina C (padrão)	100
Figura 92	Avaliação da atividade antiacetilcolinesterase	101
Figura 93	Equação da reação de um composto fenólico e o radical DPPH	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para M-1_A em CDCl_3 .	19
Tabela 2	Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para M-1_B e M-1_C em CDCl_3 .	21
Tabela 3	Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para M-2_A	39
Tabela 4	Dados de RMN ^1H (300 MHz – CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz - CDCl_3) para M-2_B	40
Tabela 5	Dados de RMN de ^1H (500 MHz – MeOD), ^{13}C (125 MHz – CD_3OD) para S-8 .	47
Tabela 6	Dados de RMN ^1H (500 MHz – $\text{DMSO } d^6$), ^{13}C (125 MHz - $\text{DMSO } d^6$) e RMN HMBC para S-9 .	54
Tabela 7	Dados de RMN ^1H (500 MHz – CD_3OD), ^{13}C (125 MHz - CD_3OD), HMBC E COSY para S-10 .	70
Tabela 8	Dados de RMN de ^1H (500 MHz – CD_3OD), ^{13}C (125 MHz - CD_3OD) e HMBC para S-11 .	78
Tabela 9	Valores de porcentagem de inibição (%) e valores de CI^{50} (mg/mL).	95
Tabela 10	Valores para atividade antiacetilcolinesterase.	96

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AChE	Acetilcolinesterase
ATCI	iodeto de acetilcolina
CCD	Cromatografia de camada delgada
CENAUREMN	Centro nordestino de aplicação e uso de ressonância magnética nuclear
CF	Caesalpineia ferrea
CG	Cromatografia gasosa
CI⁵⁰	Concentração inibitória
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLS-A	Cromatografia líquido sólido-adsorção
CLS-EM	Cromatografia líquido sólido-exclusão molecular
CLS-flash	Cromatografia líquido sólido de média pressão
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement of polarisation transfer
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DQOI	Departamento de química orgânica e inorgânica
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EEC	Extrato etanólico do caule
EEV	Extrato etanólico das vagens
EHC	Extrato hexânico do caule
EHV	Extrato hexânico das vagens

EM-IE	Espectrometria de massas por ionização eletrônica
EM-IES	Espectrometria de massas por ionização de elétrons spray
FR	Fator de retenção
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IDH	Índice de deficiência de hidrogênio
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LCMS-IT-TOF	High-Speed Liquid Chromatograph Mass Spectrometer time-of-flight
NIST	National Institute of Standards and Technology
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
u.m.a	Unidade de medida atômica
UATR	Universal Attenuated Total Reflection
UV-VIS	Ultraviolet-visible spectroscopy
α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	2
2.1	Família <i>Leguminosae</i>	2
2.2	Subfamília <i>Caesalpinioideae</i>	3
2.3	Gênero <i>Caesalpinia</i>	3
2.4	Espécie <i>Caesalpinia ferrea</i>	3
3	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	4
3.1	Análise de M-1	4
3.1.1	Identificação de M-1 _A	4
3.1.2	Identificação de M-1 _B e M-1 _C	6
3.2	Análise de M-2	21
3.2.1	Identificação de M-2 _A	22
3.2.2	Identificação de M-2 _B e M-2 _C	23
3.2.3	Identificação de M-2 _D	25
3.2.4	Identificação de M-2 _E	25
3.3	Identificação de S-8	39
3.4	Identificação de S-9	46
3.5	Identificação de S-10	53
3.6	Identificação de S-11	70
4	PARTE EXPERIMENTAL	81
4.1	Coleta do material	81
4.2	Métodos cromatográficos	81
4.2.1	Cromatografia em coluna aberta Líquido-Sólido (CLS)	81

4.2.2	Cromatografia planar líquido-sólido	81
4.2.3	Cromatografia em coluna de média pressão Líquido-Sólido (CLS- <i>flash</i>)	82
4.2.4	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	82
4.2.5	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-EM)	82
4.3	Métodos físicos de análise orgânica	83
4.3.1	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)	83
4.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	83
4.3.3	Espectrofotometria de Ultravioleta (UV)	84
4.4	Estudo fitoquímico de <i>Caesalpinia ferrea</i>	84
4.4.1	Obtenção do extrato hexânico e etanólico das vagens (EHV-CF/ EEV-CF) e caule (EHC-CF/ EEC-CF) de <i>Caesalpinia ferrea</i>	84
4.4.2	Fracionamento cromatográfico do EHV-CF e obtenção das misturas M-1 e M-2	85
4.4.3	Fracionamento cromatográfico das frações do EEV-CF e obtenção das substâncias S-8 e S-9	86
4.4.3.1	Obtenção da substância S-8	86
4.4.3.2	Obtenção da substância S-9	87
4.4.4	Fracionamento cromatográfico das frações do EEC-CF e obtenção das substâncias S-10 e S-11	87
4.4.4.1	Obtenção da substância S-10	87
4.4.4.2	Obtenção da substância S-11	88
4.5	ESTUDOS <i>in vitro</i>	89
4.5.1	Teste de atividade antioxidante	89
4.5.2	Teste de atividade antiacetilcolinesterase	90
4.5.3	Resultados e discussão	91
5	CONCLUSÃO	100

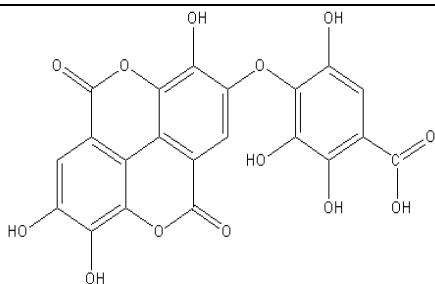
1. INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais tem por objetivo principal investigar o registro de constituintes químicos resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos. No campo da fitoquímica, a investigação direciona-se para o isolamento e elucidação das estruturas moleculares desses constituintes (MATOS, 2009). Estes constituintes, por sua vez, fornecem suporte para a utilização de recursos vegetais com fins medicinais através dos chamados “fitoterápicos”.

Vegetais, micro-organismos e, em menor escala animais, apresentam um metabolismo diferenciado (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular substâncias que, necessariamente, não estão relacionadas de forma direta a manutenção da vida do organismo produtor, mas que garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (RICARDO, 2011). Os metabólitos secundários são restritos a um número limitado de organismos que possuem uma bioquímica e um metabolismo específicos sendo elementos de diferenciação e especialização (SIMÕES *et al*, 2010).

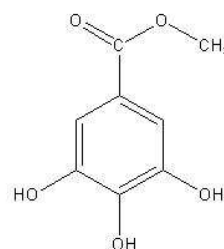
Plantas do gênero *Caesalpinia* são amplamente distribuídas por todo o mundo e diversas espécies deste gênero têm sido usadas na medicina popular. Algumas atividades biológicas de certas espécies desse gênero já foram avaliadas (WU *et al*, 2011): citotóxica em *C. sappan* e *C. pulcherrima*; antiproliferativa em *C. bonduc* e *C. ferrea*; antimicrobiana em *C. pulcherrima*; antimalárica em *C. crista* e *C. bonducella*; imunossupressora e anti-inflamatório em *C. pulcherrima* e *C. sappan*; antiviral em *C. minax* e *C. crista*. No Brasil, destaca-se a espécie *C. ferrea*, abundante na região Nordeste, onde é conhecida como “jucá” ou “pau-ferro” e usada popularmente como antirreumática (LIMA *et al*, 2012) e antimicrobiana (SAMPAIO *et al*, 2009).

Em pesquisa bibliográfica realizada no *Scifinder*® foi observado que o estudo fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* ainda é bastante limitado, sendo encontrado apenas três artigos (UEDA *et al*, 2001; NAKAMURA *et al*, 2002; NOZAKI *et al*, 2007) relatando a investigação de frações polares provenientes dos extratos das vagens e do caule. Ao todo, foram isoladas cinco substâncias (Figura 1, pág. 2) pertencentes à classe dos compostos fenólicos e que para os quais foi efetuado o estudo sobre inibição enzimática e atividade antitumoral.

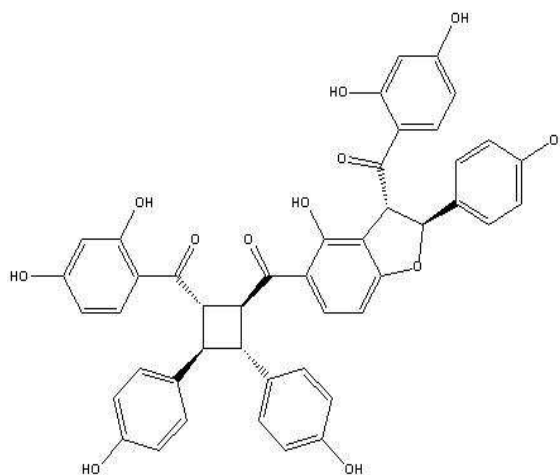


2-(2,3,6-tri-hidróxi-4-carboxifenil)

ácido elágico



Galato de metila



Paufferol

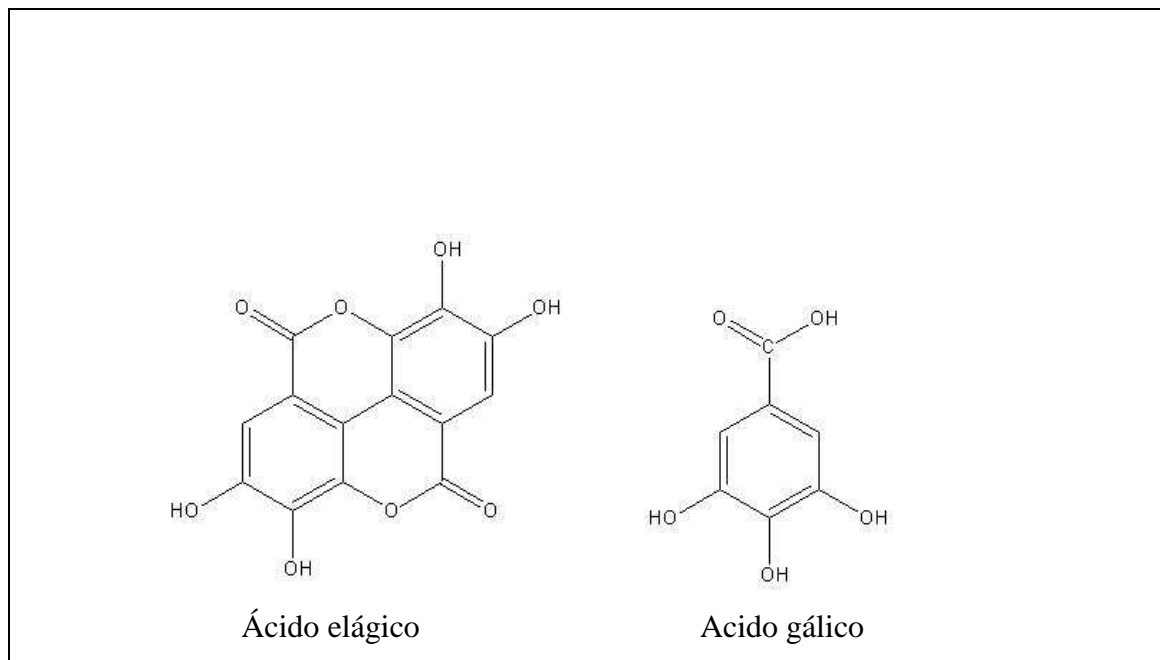


Figura 1: Substâncias isoladas de *Caesalpineia ferrea*.

Em geral, *Caesalpinia ferrea* é utilizada popularmente como antipirético e antireumático (LIMA *et al*, 2012), anti-inflamatório, analgésico e antitérmico (CAVALHEIRO *et al*, 2009), antimicrobiano (SAMPAIO *et al*, 2009; CAVALHEIRO *et al*, 2009), no tratamento de diabetes (LIMA *et al*, 2012; VASCONCELOS *et al*, 2011; LUCINDA *et al*, 2010; MENEZES *et al*, 2007) e em infecções orais (SAMPAIO *et al*, 2009).

Estudos biológicos usando extratos brutos e frações polares (aquosa, metanólica e etanólica) das cascas do caule, tronco, frutos, folhas e sementes de *C. ferrea* comprovaram seu potencial como: anti-inflamatório (LIMA *et al*, 2012; PEREIRA *et al*, 2012; CARVALHO *et al*, 1996), analgésico (LIMA *et al*, 2012, CARVALHO *et al*, 1996), antinociceptivo (LIMA *et al*, 2012), inibitório viral (LOPES *et al*, 2013); antimicrobiano (SAMPAIO *et al*, 2009), fungistático (JESUS *et al*, 2000), celulásico, amilásico, anticoagulante, larvicida (CAVALHEIRO *et al*, 2009), inibitório de proteases (CHEVREUIL *et al*, 2011), hipoglicêmico (VASCONCELOS *et al*, 2011), cardiovascular (MENEZES *et al*, 2007), antiúlcera (BACCHI *et al*, 1995), regulador

positivo da mielopioiese (QUEIROZ *et al*, 2001) e agente despigmentante/clareador da pele (Chemunion Química LTDA, 2009).

O pouco conhecimento sobre a composição química e as muitas citações literárias sobre atividades biológicas nos motivaram a estudar a espécie *Caesalpinia ferrea* buscando contribuir com o acervo fitoquímico das plantas medicinais do Ceará.

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Família *Leguminosae*

Leguminosae ou *Fabaceae* é uma das maiores famílias dentre as angiospermas, perdendo para *Orchidaceae* e *Asteraceae*, com cerca de 730 gêneros que reúnem mais de 19.325 espécies (LEWIS *et. al*, 2005). Ela pode ser dividida em três subfamílias *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae* (CRONQUIST, 1981). Economicamente, a *Leguminosae* é considerada a segunda maior família botânica em importância, perdendo para *Poaceae*, apresentando potenciais nas indústrias alimentícias, medicinais, madeireiras, ornamentais e na agricultura (WOJCIECHOWSKI, *et al* 2004).

2.2 Subfamília *Caesalpinioideae*

Caesalpinioideae é formada por 170 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies, sendo extremamente diversa em morfologia (TUCKER, 2003). Algumas espécies apresentam folhas bipinadas, pinadas, bifolioladas ou unifoliolada ; corola com prefloração imbricada ascendente, dificilmente papilionácea, cinco pétalas ou ausentes e sépalas geralmente livres entre si (LIMA e MANSANO, 2011).

Segundo Lee e Langenheim (1975), as espécies dessa subfamília, com importância na produção de resinas, estão presentes nos ecossistemas equatoriais da África e América do Sul.

2.3 Gênero *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia* é composto por aproximadamente 500 espécies vegetais, fontes de metabólitos bioativos, distribuídas em todo o mundo (ZANIN *et al*, 2012). Algumas espécies apresentam ramos inermes, folha com pecíolo, folíolos desenvolvidos e fruto não moniliforme (LIMA e MANSANO, 2011).

Os constituintes químicos relatados até o momento no gênero *Caesalpinia*, são em número de 280 e incluem terpenos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos (WU *et al*, 2011).

2.4 Espécie *Caesalpinia ferrea*

A espécie *Caesalpinia ferrea*, conhecida popularmente como jucá, madeira de ferro e pau de ferro, pertence à família *Leguminosae* e a sub-família *Caesalpinioideae* (SOUZA *et al*, 2011). É uma árvore amplamente distribuída, principalmente no Norte e Nordeste do Brasil (OLIVEIRA *et al*, 2010) sendo encontrada em quase todo o Estado do Ceará mais frequentemente nas serras do Araripe e Apodi (CAVALHEIRO *et al*, 2009).

C. ferrea apresenta flores pequenas, amarelas e em cachos; frutos de cor marrom, do tipo legume (vagem), com sementes escuras; folhas compostas; uma altura de 10-15 m e tronco curto (40 a 60 cm de diâmetro) com presença de manchas claras (LORENZI, 2002).

3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.1 Análise de M-1

O fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das vagens de *Caesalpineia ferrea* possibilitou a obtenção de um material resinoso branco (14,5 mg), codificado como **M-1**.

O cromatograma de **M-1** (Figura 2, pág. 9) obtido através de cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) apresenta três picos principais com tempos de retenção e porcentagens de área relativas em 11,36 min. (5,18 %), 12,38 min. (2,37 %) e 20,70 min. (74,76 %). Para cada pico foi obtido um espectro de massas e realizada a comparação com o perfil de fragmentação dos espectros disponibilizados pela biblioteca do equipamento e dados da literatura.

Os espectros de RMN ^{13}C de **M-1** (Figuras 3 e 4, págs. 10 e 11) registraram um total de 37 sinais, a grande maioria na região de carbonos alifáticos. Dentre esses sinais, aqueles em δ_{C} 141,00 e δ_{C} 121,00 são característicos de um componente esteróidal (C = C), enquanto, vários outros, em torno de δ_{C} 29,00 e δ_{C} 29,8 (com destacada intensidade relativa) juntamente com um sinal com deslocamento químico em δ_{C} 178,6, são compatíveis com a presença de dois ácidos graxos. Estas observações permitiram analisar **M-1** como uma mistura terciária (**M-1_A**, **M-1_B** e **M-1_C**).

3.1.1 Identificação de M-1_A

Os espectros de RMN ¹³C de **M-1** (Figuras 3 e 4, págs. 10 e 11, respectivamente) em comparação com o espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (Figura 5, pag. 12) permitiu verificar que os dois sinais na região de carbonos sp² em δ_C 141,0 e δ_C 121,0 são devidos a carbonos não hidrogenados e metínico, respectivamente, sendo esses sinais atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-5 e C-6 do componente esteróidal. A comparação entre os espectros, assim como, a comparação com dados da literatura (GOMES, 2012), permitiram ainda verificar diversos outros tipos de carbono, com destaque para um sinal em δ_C 72,0 de um carbono carbinólico metínico (C-3), conforme observado comumente em esteróides.

O espectro de RMN ¹H (Figura 6, pág 13) de **M-1** exibe um sinal em δ_H 5,34 (1H) atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 (d, *J* = 4,7 Hz); um sinal múltiplo em δ_H 3,53 (1H) correspondente ao átomo de hidrogênio carbinólico H-3 (sext., *J* = 5,8 e 10,5 Hz), além de sinais devidos a hidrogênios de grupos metila em δ_H 0,7 a 1,00.

Os espectros de HSQC (Figuras 7 e 8, págs.14 e 15) permitem observar algumas correlações que justificam átomos ou grupos característicos na estrutura esteróidal: hidrogênio vinílico no carbono C-6 (δ_H 5,34; δ_C 122,0); hidrogênio carbinólico no carbono C-3 (δ_H 3,53; δ_C 72,00); grupos metila no carbono C-18 (δ_H 0,69; s; δ_C 12,2) e C-19 (δ_H 1,00, s; δ_C 19,6), entre outros.

Os espectros de HMBC (Figuras 9 e 11, págs. 16 e 17), por sua vez, exibem algumas correlações que permitem identificar alguns átomos de carbonos, entre eles, carbonos quaternários. Por exemplo, os hidrogênios do grupo metila 3H-19 mostram correlações com os carbonos C-10 (δ_C 36,7), C-5 (δ_C 141,0), C-1 (δ_C 37,5) e C-9 (δ_C 50,4), conforme indicado na figura 10 (a; pág. 16).

O espectro de massa (Figura 12, pág. 18) referente ao pico do cromatograma com tempo de retenção 20,70 minutos apresenta o pico do íon molecular em m/z 414, compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ para **M-1_A**, com IDH = 5 justificado pelo núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno e a ligação dupla entre os carbonos C-5 e C-6. A fragmentação com perda da cadeia lateral do esteróide (Figura 13, pág. 18) justifica o pico em m/z 273 registrado no espectro de massa de **M-1_A**.

Os dados espectrométricos obtidos para **M-1_A** (Tabela 1, pág. 19) e comparação com dados da literatura (GOMES, 2012) indicam que **M-1_A** trata-se do β -sitosterol (24-etilcolest-5-en-3 β -ol; Figura 14, pág 7) ainda não registrado na espécie *Caesalpinia ferrea*, porém já isolado das partes aéreas de *Caesalpinia millettii* (CHEN, 2007).

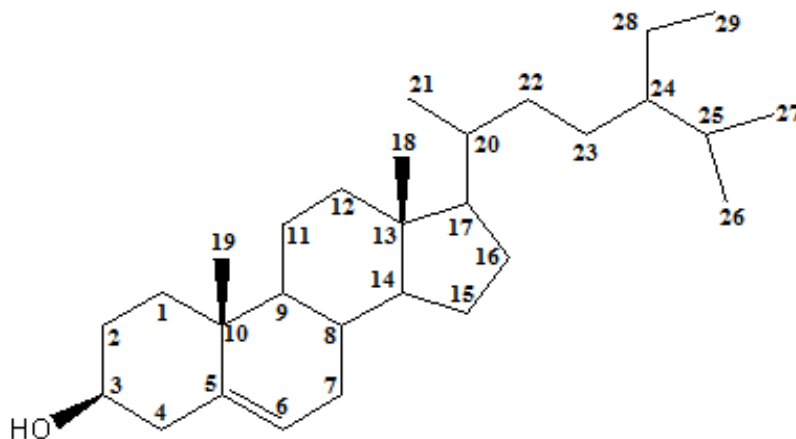


Figura 14: Estrutura de **M-1_A**, β - sitosterol (24-etilcolest-5-en-3 β -ol).

3.1.2. Identificação de M-1_B e M-1_C

O espectro de RMN ¹³C (Figura 3 e 4, págs. 10 e 11) de **M-1** através do sinal em δ_C 178,6 (CO₂H) em conjunto com um sinal acentuadamente intenso em δ_C 29,9 (além de outros em torno de δ_C 30,00; (CH₂)_n), sugere a presença de constituintes que apresentam grupo funcional ácido carboxílico em uma cadeia linear alifática longa. Os diversos sinais negativos (inclusive δ_C 29,9) no espectro de RMN ¹³C DEPT 135° (Figura 5, pág. 12) confirmam esta observação. Em adição, foram registrados dois sinais para carbonos metílicos terminais em torno de δ_C 14,0, correspondentes aos carbonos de grupos metila terminais associados à cadeias alifáticas. Esses dados indicam a existência de dois ácidos graxos como componentes de **M-1**, correspondentes aos picos no cromatograma (Figura 2, pág. 9) com os tempos de retenção em 11,36 e 12,38 min. (Figuras 14 e 15, pág. 19).

No espectro de RMN ¹³C DEPT 135° (Figura 5, pág. 12) o sinal em δ_C 34,04 é negativo (CH₂) e corresponde no espectro de HSQC (Figura 8, pág. 15) ao tripleto em δ_H 2,37, atribuídos aos hidrogênios metilênicos α à carboxila. Do mesmo modo, o sinal em δ_C 24,94 foi correlacionado ao multiplete em δ_H 1,62. Finalmente, vale ressaltar a correlação observada entre os hidrogênios em δ_H 2,37 e o carbono carboxílico em δ_C 178,6 no espectro de HMBC (Figura 9, pág. 16).

O espectro de RMN ¹H (Figura 6, pág. 13) de **M-1** exibe também sinais característicos e compatíveis com os sinais do espectro de RMN ¹³C (Figura 3 e 4, pág. 10 e 11).

Assim, foi observado um sinal simples e intenso em δ_H 1,26, típico de hidrogênios metilênicos alifáticos $[(CH_2)_n]$; um sinal tripleto em δ_C 2,37 ($J = 7,5$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metilênicos α ao grupo carboxila e, um multiplete em δ_H 1,62 que podem ser correlacionados aos hidrogênios metilênicos β ao grupo carboxila em ambos os constituintes.

Os espectros de massas referentes aos picos cromatográficos com os tempos de retenção em 11,36 e 12,38 minutos (Figuras 15 e 16, pág. 20) apresentam, respectivamente, picos com íons moleculares em m/z 256 ($C_{16}H_{32}O_2$) e 284 ($C_{18}H_{36}O_2$) (IDH = 1). Os picos nos dois espectros com razão massa/carga 60 podem ser justificados através de fragmentação tipo *McLafferty* (Figura 17, pág. 21).

Assim, os dados espectrométricos registrados (Tabela 2, pág. 21) como também, comparação com dados da literatura (SOUSA, 2005) permitem identificar **M-1_B** e **M-1_C** (Figura 18, pág. 9) como constituintes de uma mistura dos ácidos palmítico (n-hexadecanóico) e esteárico (n-octadecanóico) ainda não registrados em *Caesalpinia ferrea*. O ácido n-hexadecanóico já foi isolado do caule de *Caesalpinia sappan* (FU *et al.*, 2008).

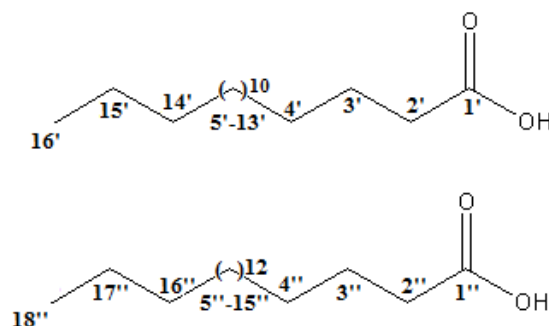


Figura 18: Estruturas de **M-1_B** (ácido n-hexadecanóico) e **M-1_C** (ácido n-octadecanóico).

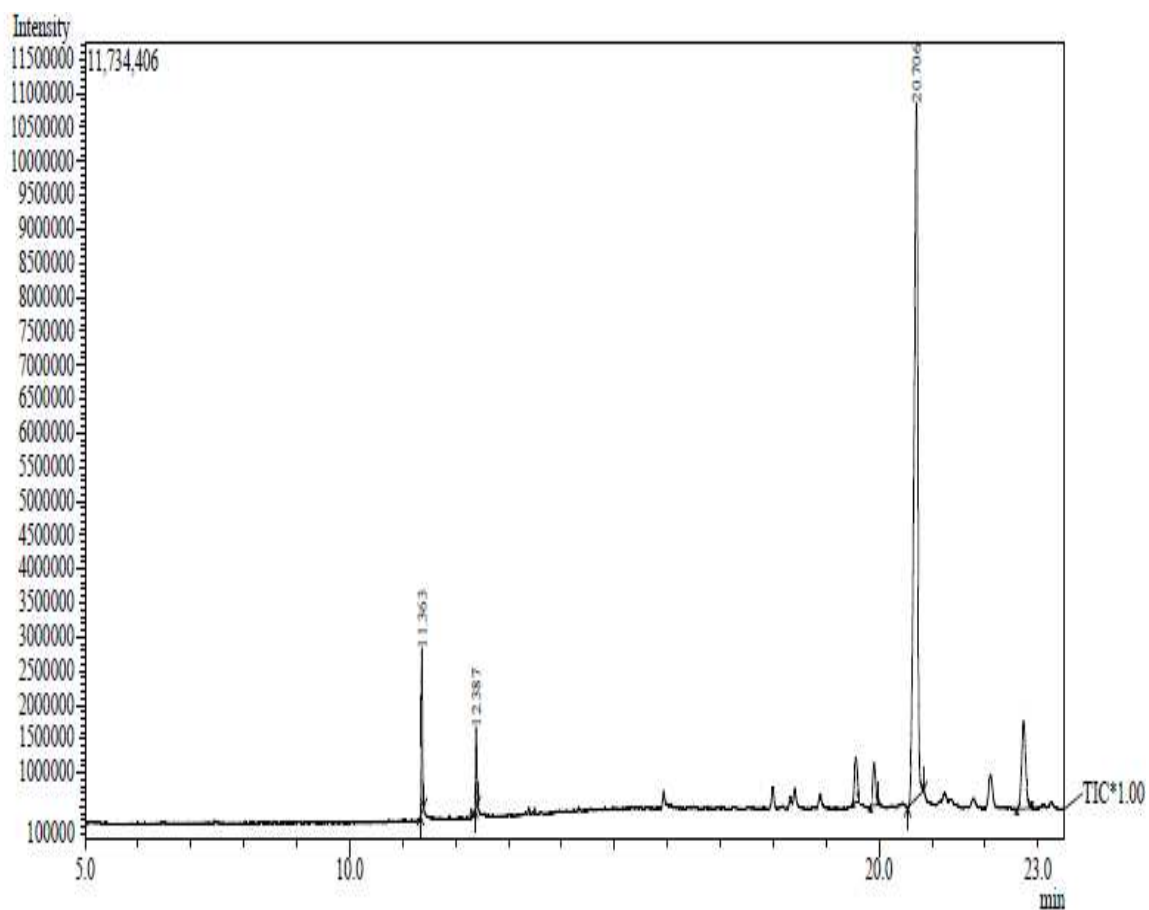


Figura 2: Cromatograma de M-1 obtido pela técnica CG-EM.

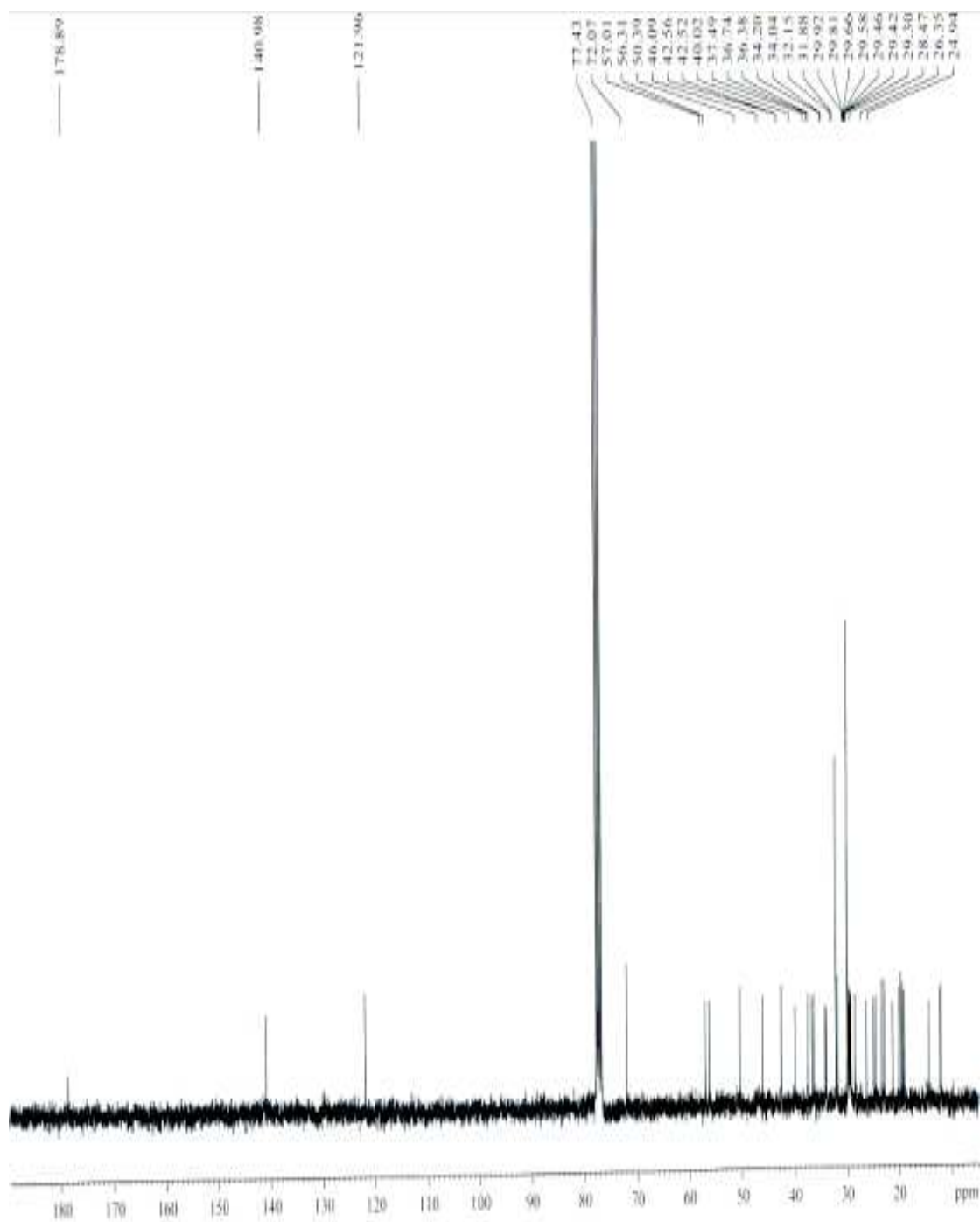


Figura 3: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **M-1**.

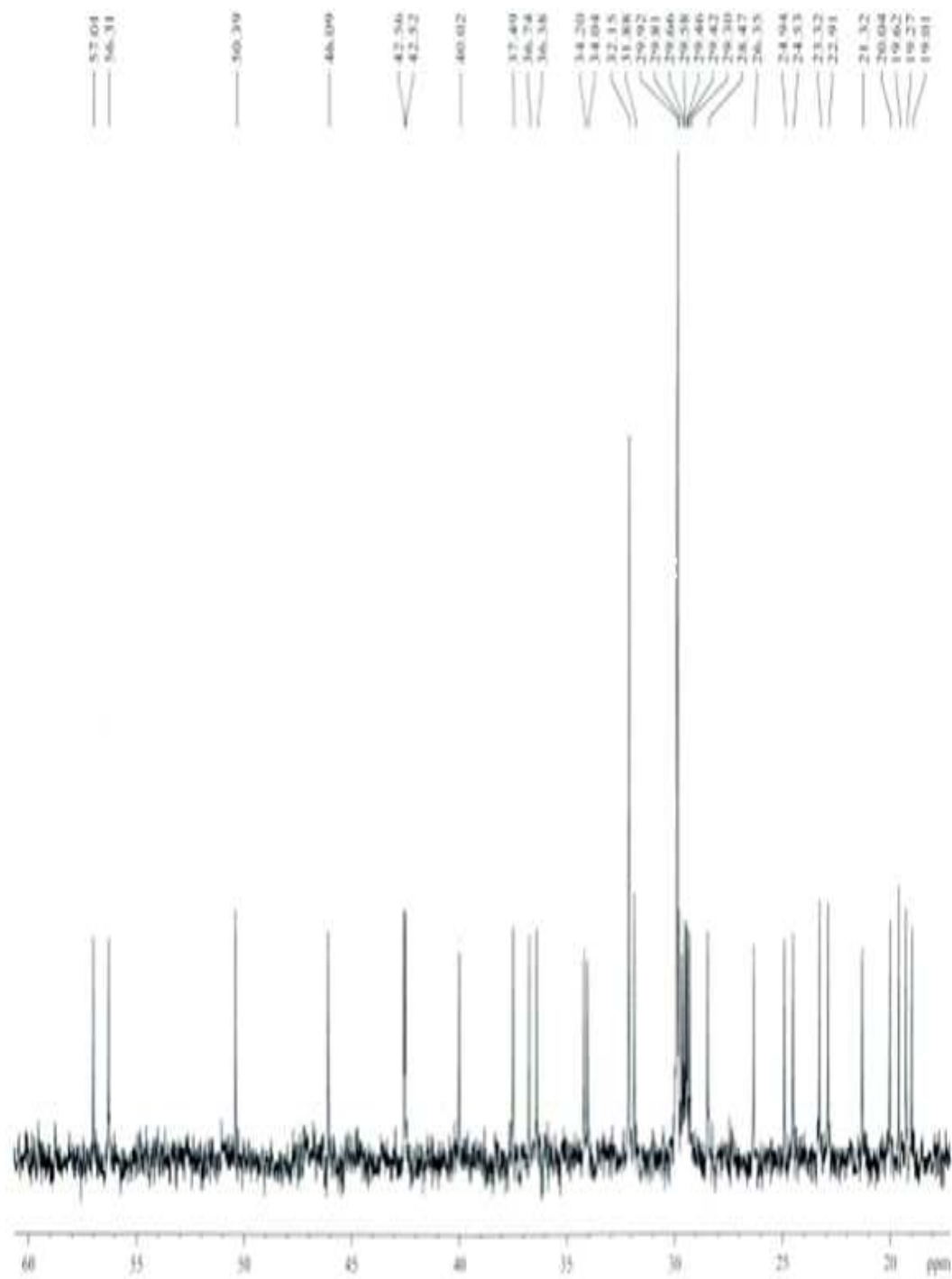


Figura 4: Expansão do espectro de RMN ¹³C de M-1.

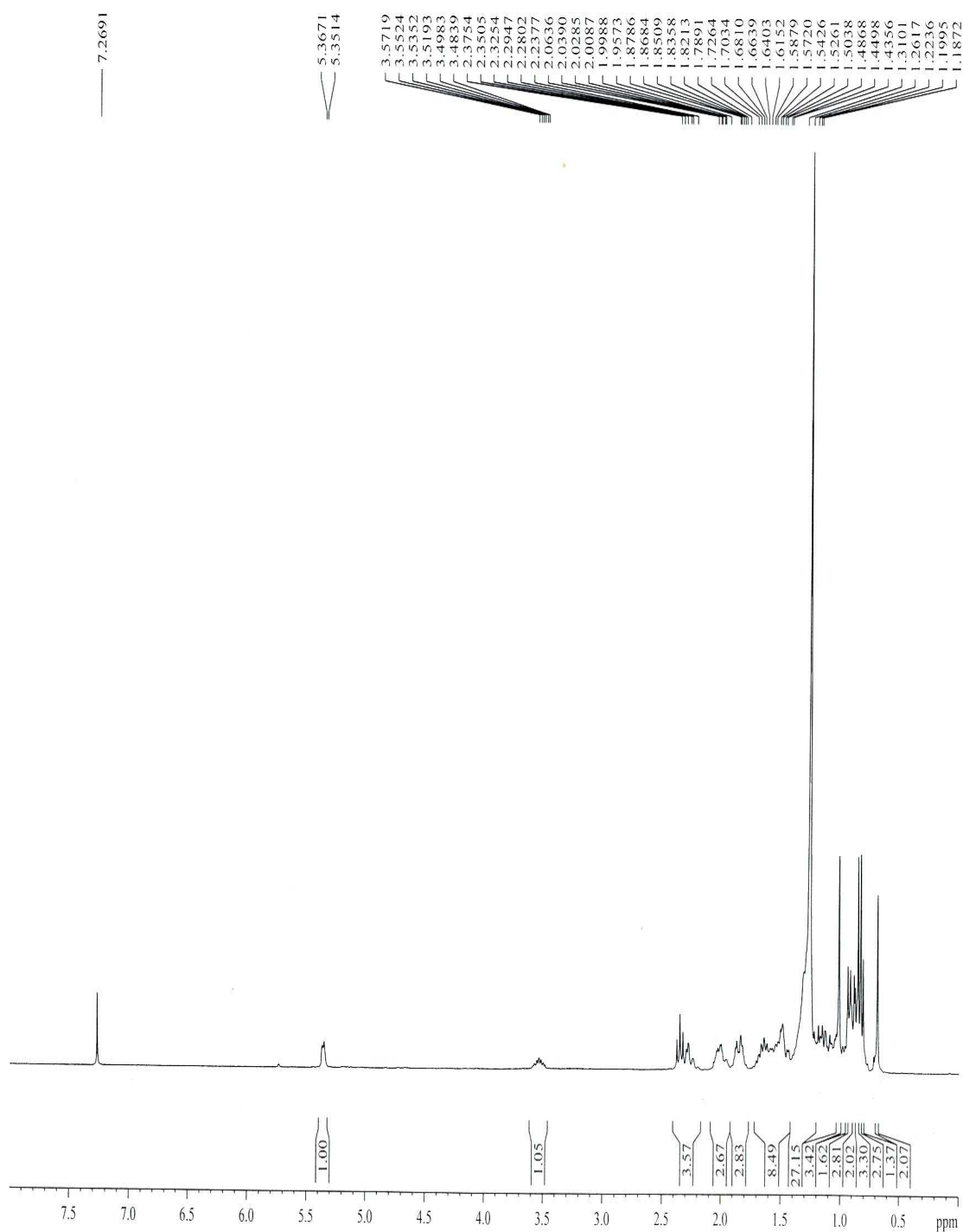


Figura 6: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **M-1**.

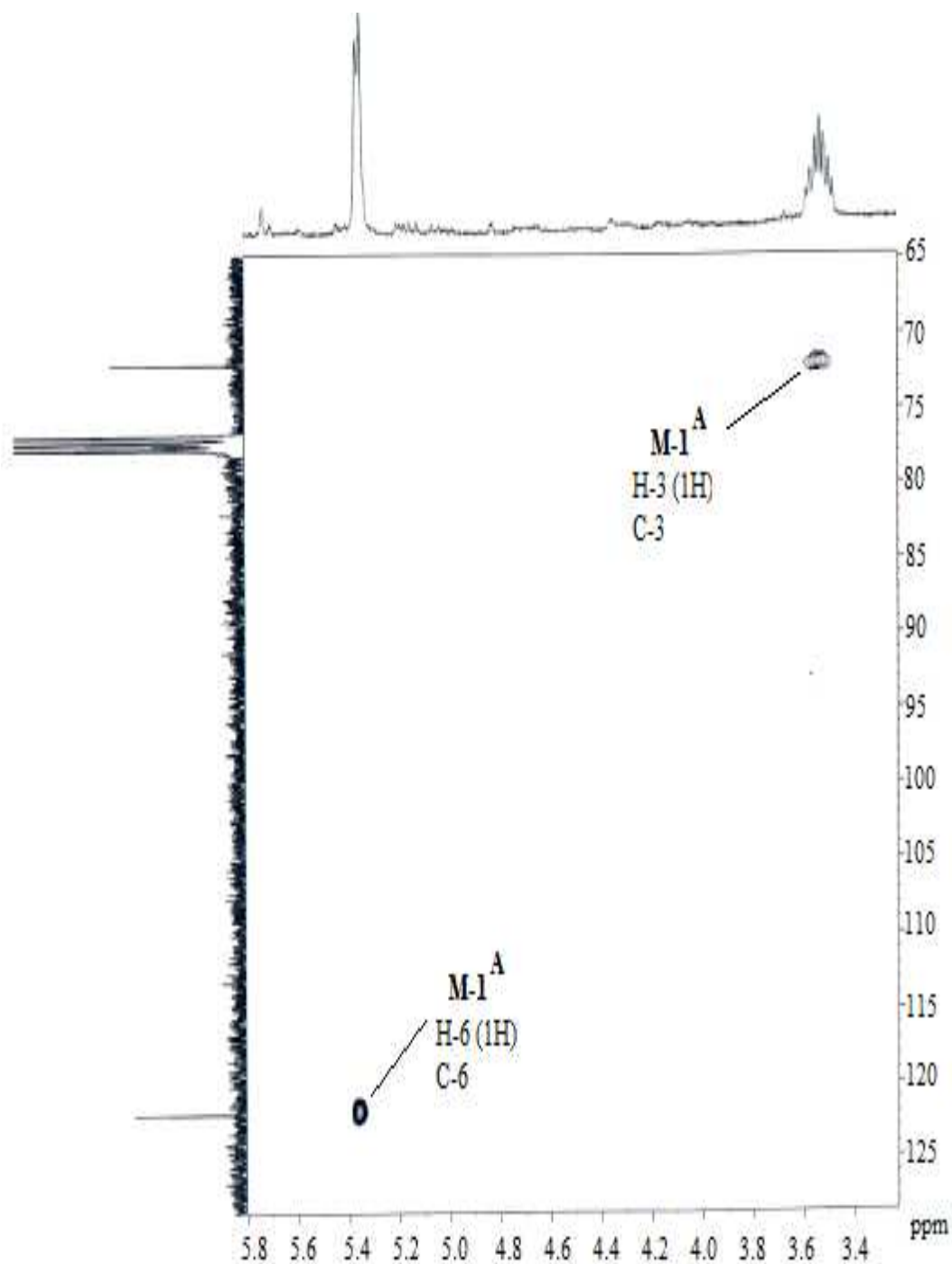


Figura 7: Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de M-1.

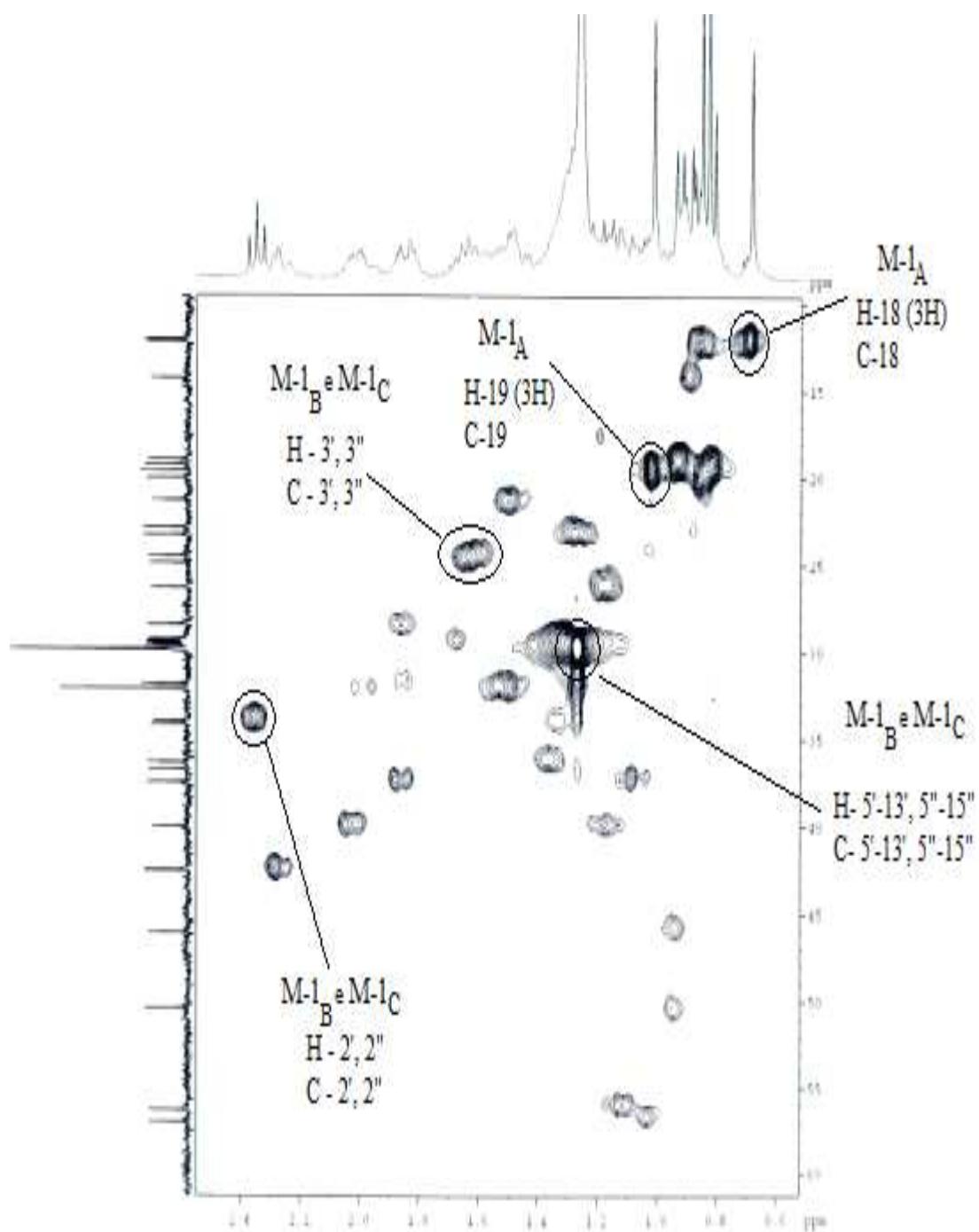


Figura 8: Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de M-1.

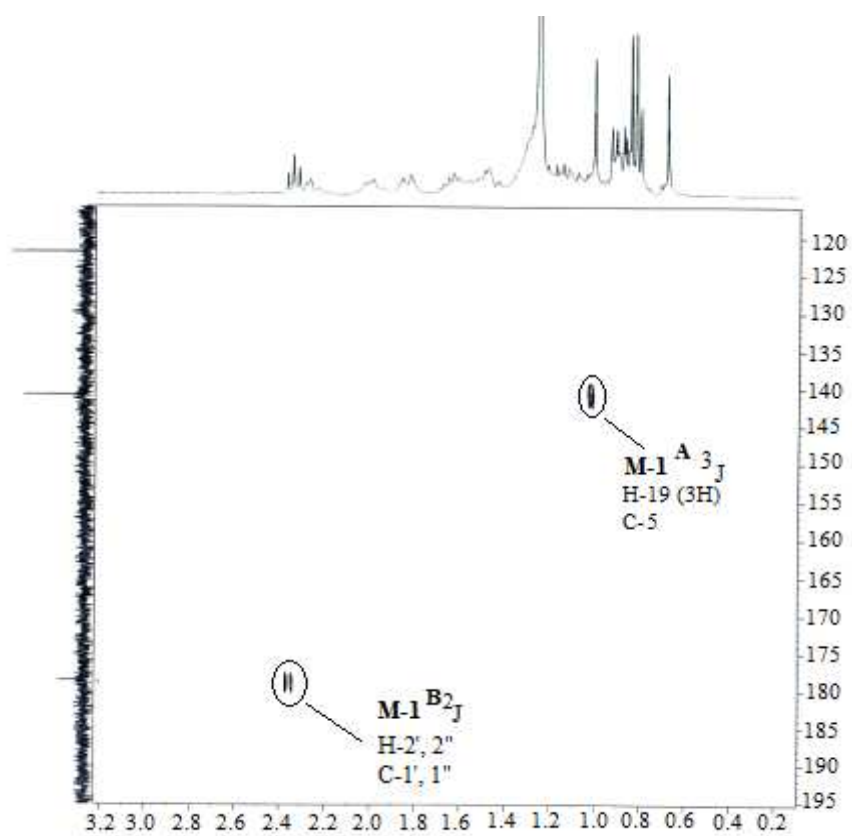


Figura 9: Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de M-1.

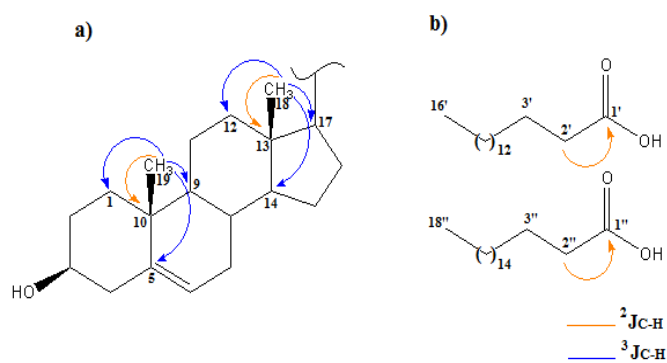


Figura 10: Correlações de RMN bidimensional HMBC de M-1. (a) M-1_A; (b) M-1_B e M-1_C.

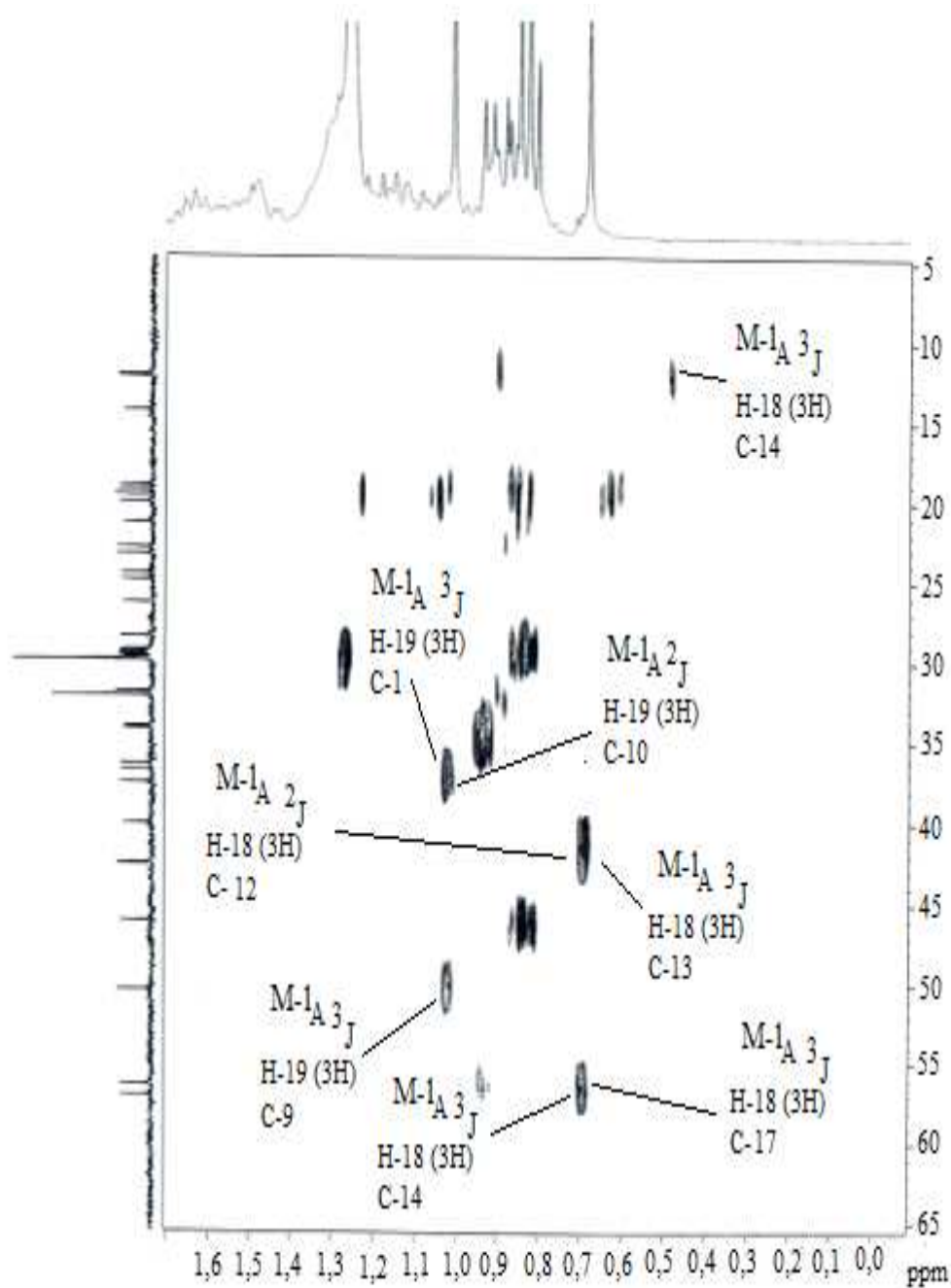


Figura 11: Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de M-1.

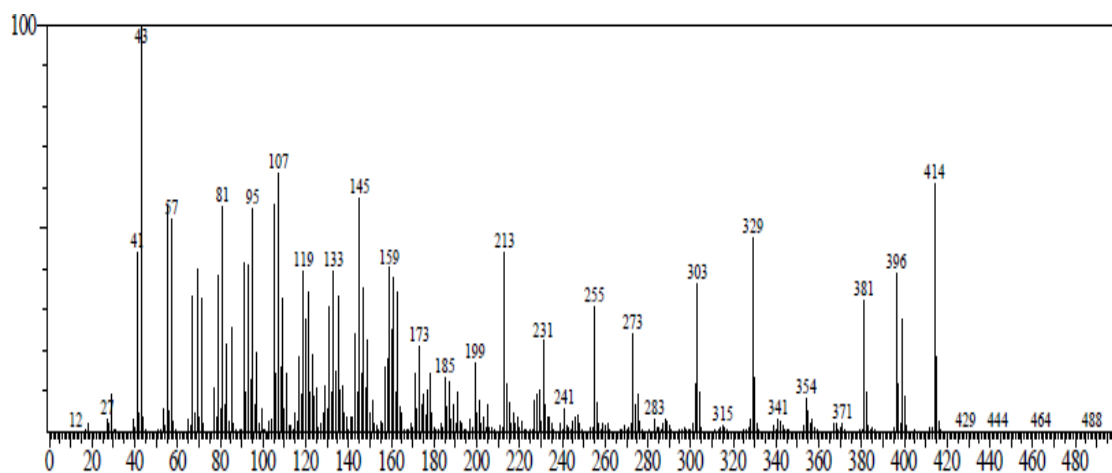


Figura 12: Espectro de massas de M-1_A.

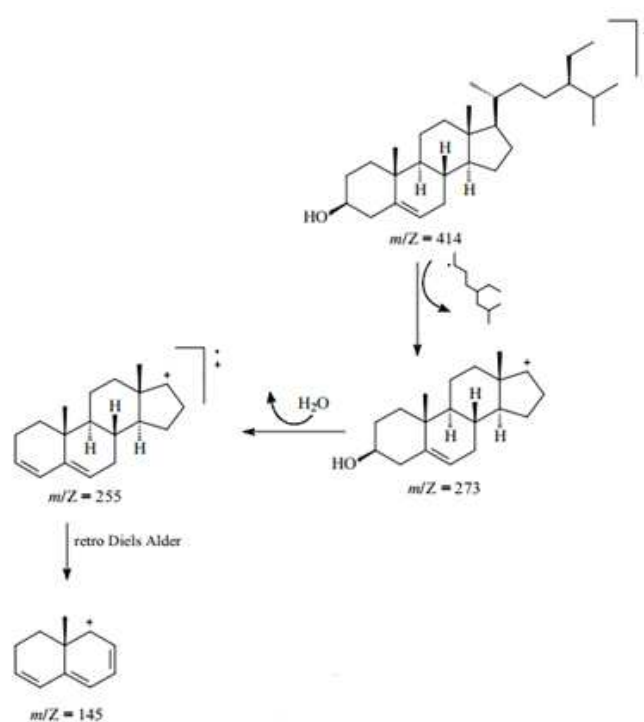


Figura 13: Proposta de fragmentação de M-1_A.

TABELA 1. Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para **M-1_A** em CDCl_3 .

		M-1^A		GOMES, 2012 *			
		HSQC		HMBC			
		^1H (δ)	^{13}C (δ)	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	CH₂		37,5		δ 1,02; 3H		37,5
2	CH₂		29,9				29,9
3	HC-O	3,53 (1H _{ax} , sept, 5,1; 5,3; 9,9 e 11,1 Hz)	72,1			3,53 (1H,m)	72,0
4	CH₂		42,7				42,6
5	=C	-	141,0		δ 1,02; 3H	-	141,0
6	=CH	5,34 (1H)	122,0			5,36 (1H)	121,9
7	CH₂		31,9				31,9
8	CH		32,2				32,2
9	CH		50,4		δ 1,02; 3H		50,4
10	C	-	36,7	δ 1,02; 3H		-	36,7
11	CH₂		21,3				21,3
12	CH₂		40,0		δ 0,69; 3H		40,0
13	C	-	42,5	δ 0,69; 3H		-	43,5
14	CH		57,0		δ 0,69; 3H		57,0
15	CH₂		24,5				24,5
16	CH₂		28,5				28,5
17	CH		56,3		δ 0,69; 3H		56,3
18	CH₃	0,69 (s)	12,2			0,69 (s)	12,2
19	CH₃	1,02 (s)	19,6			1,04 (s)	19,6
20	CH		36,4				36,4
21	CH₃		19,0				19,0
22	CH₂		34,2				34,2
23	CH₂		26,4				26,4
24	CH		46,1				46,1
25	CH		29,5				29,4
26	CH₃		20,0				20,0
27	CH₃		19,3				19,3
28	CH₂		23,3				23,3
29	CH₃		12,0				12,1

Fórmula Molecular C₂₉H₅₀O

(-) não existe; * referência da literatura.

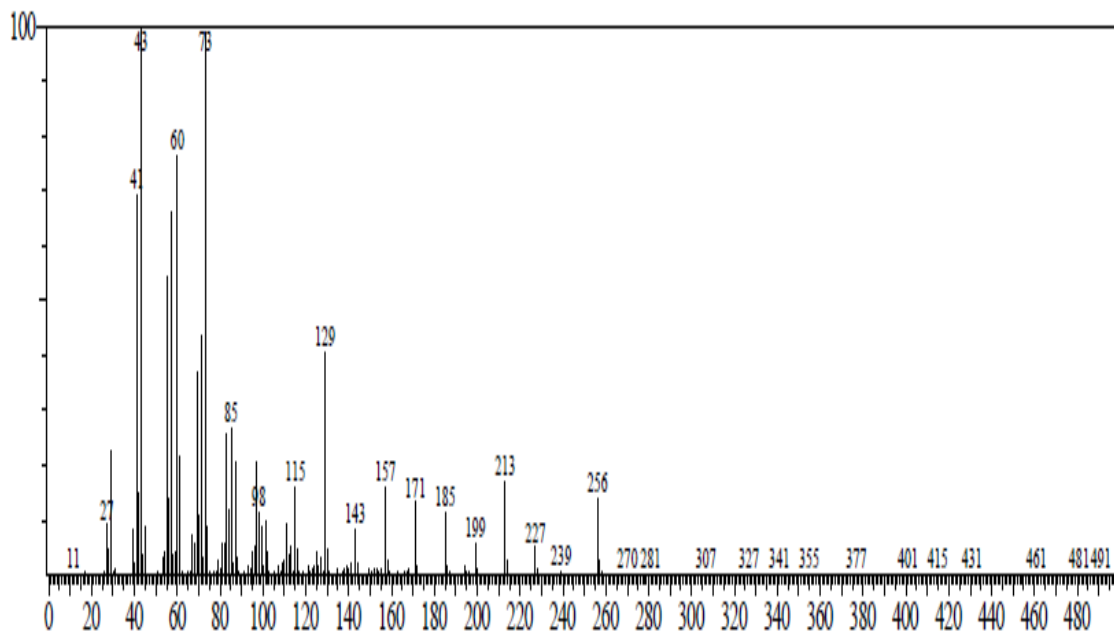


Figura 15: Espectro de massas de M-1_B.

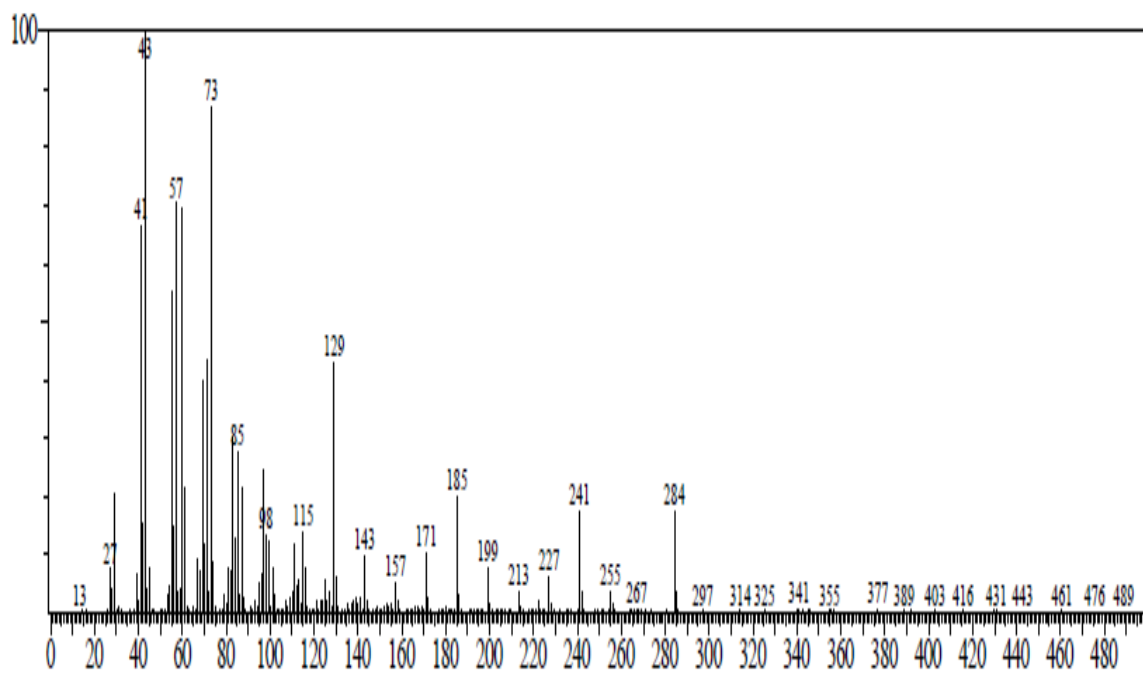


Figura 16: Espectro de massas de M-1_C.

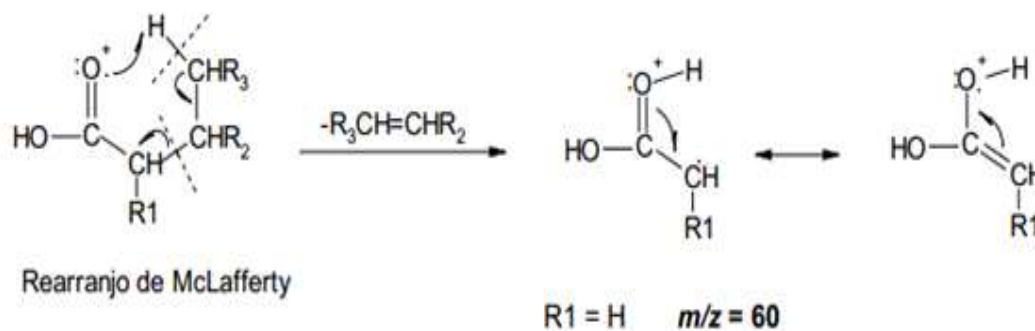


Figura 17: Mecanismo do rearranjo de McLafferty.

TABELA 2: Dados espectrais de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para **M-1_B** e **M-1_C** em CDCl_3 .

M-1 ^B e M-1 ^C					SOUZA, 2005 [*]	
		HSQC		HMBC	^1H (δ)	^{13}C (δ)
		^1H (δ)	^{13}C (δ)	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$		
1', 1''	C=O	-	178,89	δ 2,37; 2H	-	177,50
2', 2''	CH ₂	2,37 (t)	34,04		2,23	34,01
3', 3''	CH ₂	1,62 (quint.)	24,94		1,56	24,80
4', 4''	CH ₂		29,30		1,29	29,01
5'-13', 5''- 15''	CH ₂	1,26 (s)	29,92		1,29	29,70
14', 16''	CH ₂	1,26	32,15		1,29	31,90
15', 17''	CH ₂		22,91		1,33	22,80
16', 18''	CH ₃		14,01		0,85	14,01

(C₁₆H₃₂O₂) e (C₁₈H₃₆O₂)

(-) não existe; * referência da literatura

3.2. Análise de M-2

O fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das vagens de *Caesalpinia ferrea* possibilitou a obtenção de um material resinoso branco (5,30 mg), codificado como **M-2**.

O cromatograma (Figura 19, pág. 28) de **M-2** obtido através de CG-EM apresenta, entre outros, cinco picos principais com os tempos de retenção e percentagens de áreas relativas em 17,42 min. (7,21 %), 19,40 min. (3,28 %), 21,48 min. (14,79 %), 22,12 min. (54,67 %) e 22,74 min. (10,53 %), sinalizando que **M-2** representa uma mistura de pelo menos cinco componentes (**M-2_A**, **M-2_B**, **M-2_C**, **M-2_D** e **M-2_E**). Para cada um dos picos relacionados, foi obtido um espectro de massas (Figuras 20, 21, 22, 23 e 24, págs. 28, 29 e 30) onde foram comparados com o perfil de fragmentação dos espectros disponibilizados pela biblioteca do equipamento e dados da literatura.

Os espectros de RMN ¹³C (Figuras 25 e 26, págs. 31 e 32) e de RMN ¹H (Figuras 27 e 28, págs. 33 e 34) de **M-2**, conforme esperado, exibem sinais que confirmam a existência de uma mistura. O espectro de RMN ¹³C apresenta inúmeros sinais na região de carbonos saturados relativos a carbonos metílicos, metilênicos e metínicos; sinais de carbonos sp³ oxigenados em δ_C 79,3 e δ_C 63,3; sinal de destacada intensidade em δ_C 29,9; sinais na região de carbonos sp², aproximadamente, em δ_C 151,0 e δ_C 109,5. O espectro de RMN ¹H mostrou vários sinais na região de hidrogênios metílicos, com destaques para um singlete largo em δ_H 1,53 e um singlete de alta intensidade relativa em δ_H 1,26; um tripleto ($J = 6,6$ Hz) em δ_H 3,65; sinais de baixa intensidade relativa na região de hidrogênios olefínicos em δ_H 4,57 a δ_H 5,14. Assim, esses espectros indicam que a mistura representada por **M-2** é formada por constituintes de natureza triterpênica e de cadeias alifáticas longas.

3.2.1. Identificação de M-2_A

Os espectros de RMN ¹³C (Figuras 25 e 26, págs. 31 e 32) de **M-2** exibem vários sinais em δ_C 16,0 a δ_C 55,5 relativos a carbonos metílicos, metilênicos e metínicos, em acordo com compostos de natureza triterpênica. Os sinais em δ_C 151,2 (C) e δ_C 109,5 (CH₂) indicam para **M-2_A** um componente triterpeno contendo uma ligação dupla dissubstituída terminal (R₂C = CH₂; carbonos C-29 e C-20) típica de triterpenos da série lupano (FERREIRA, 2008), enquanto, o sinal em δ_C 79,3 é atribuído ao carbono metínico sp³ oxigenado (C-3), geralmente observado nesses compostos.

Os espectros de RMN ¹H (Figuras 27 e 28, págs. 33 e 34), além dos vários sinais entre δ_H 0,80 e 2,45, exibem dois singletos largos em δ_H 4,69 (1H) e δ_H 4,57 (1H) atribuídos aos hidrogênios olefínicos geminados da ligação dupla terminal; um dubleto de dubleto ($J = 10,8$ e $5,4$ Hz) em δ_H 3,22, característico do hidrogênio carbinólico H-3 e um tripleto de dubleto ($J = 10,0$ e $5,0$ Hz) centrado em δ_H 2,39 correlacionado a um hidrogênio alílico (H-19). Adicionalmente, o singlete em δ_H 1,69 é interpretado como sendo devido aos hidrogênios do grupo metila vinílico (3H-30).

Os espectros de HSQC (Figuras 29 e 30, págs. 35 e 36) exibem várias correlações, com destaque para as do hidrogênio H-3 (δ_H 3,22) com o carbono C-3 (δ_C 79,3), dos hidrogênios vinílicos 3H-30 (δ_H 1,69) com o carbono C-30 (δ_C 19,5), bem como, dos demais hidrogênios metílicos com seus respectivos carbonos (Tabela 3, pág. 39).

Os espectros de HMBC (Figuras 31, 32 e 33, pág. 37 e 38) também registram correlações que confirmam as atribuições de deslocamentos químicos.

Assim, foram registrados os acoplamentos dos hidrogênios metílicos 3H-30 (δ_H 1,69) com os carbonos C-19 (δ_C 48,2), C-20 (δ_C 151,2) e C-29 (δ_C 109,5), bem como, dos hidrogênios metílicos 3H-23 (δ_H 0,98) e 3H-24 (δ_H 0,77) com o carbono C-3 (δ_C 79,3), entre algumas outras.

O espectro de massa (Figura 23, pág. 30) referente ao pico do cromatograma com tempo de retenção em 22,12 minutos, apresenta o pico do íon molecular em m/z 426 ($C_{30}H_{50}O$) com IDH = 6, justificado pelo esqueleto pentacíclico (série lupano) e a ligação dupla (C₂₀ – C₂₉).

Assim, os dados espectrométricos obtidos (Tabela 3, pág. 39) e a comparação com dados da literatura (FERREIRA, 2008) permitem identificar **M-2_A** (Figura 34, pág. 24) como sendo o Lupeol (3β -Lup-20(29)-en-3-ol), ainda não registrado na espécie *Caesalpinia ferrea*, porém já isolado das folhas de *Caesalpinia decapetala* (KIEM *et al*, 2005).

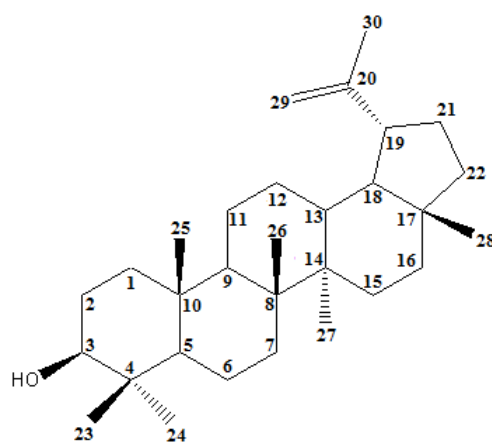


Figura 34: Estrutura química de **M-2_A**. Lupeol (3β -Lup-20(29)-en-3-ol).

3.2.2. Identificação de M-2_B e M-2_C

Nos espectros de RMN ¹³C (Figuras 25 e 26, págs. 31 e 32) de **M-2**, o sinal em δ_C 29,9 com alta intensidade relativa mostra a presença de grupos metilênicos característicos de cadeias carbônicas lineares longas. Este sinal, juntamente, com dois sinais em torno de δ_H 14,0 correspondentes aos carbonos metílicos terminais associados a essas cadeias e, também, o sinal em δ_C 63,3, atribuído a carbono metilênico oxigenado, foram consistentes com a existência de dois álcoois graxos na mistura.

Os espectros de RMN ¹H (Figuras 26 e 27, págs. 32 e 33) de **M-2** exibem também, sinais característicos e concordantes com aqueles registrados no espectro de RMN ¹³C. Assim, é observado um sinal intenso em δ_H 1,26, típico dos hidrogênios metilênicos alifáticos [(CH₂)_n] em cadeia longa e um sinal tripleto em 3,65 ($J = 6,6$ Hz) atribuído a hidrogênios metilênicos α ao grupo hidroxila.

Os espectros de HSQC (Figura 28, pág. 34) e de HMBC (Figura 30, pág. 36) exibem como destaques, as correlações entre o sinal dos hidrogênios em δ_H 3,65 (hidrogênios α -OH) e o sinal do carbono oxigenado em δ_C 61,3 ($^1J_{CH}$) e do sinal em δ_H 1,26 com os carbonos metilênicos na vizinhança ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$), respectivamente.

O espectro de massas (Figura 20, pág. 28) referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 19,40 minutos revela um padrão de fragmentação bastante informativo, interpretado como perda sequencial de 14 u.m.a. (fragmentos m/z 139, 125, 111, 97, 83, 71, 57, 43) a partir do íon molecular, coerente com uma cadeia carbônica linear. Em adição, um pico correspondente a um fragmento m/z 336 (M-18; Figura 37, pág. 27) permite propor a fórmula molecular C₂₄H₅₀O para **M-2_B**.

Esses dados espectrométricos (Tabela 4, pág. 40) em conjunto com a comparação com dados da literatura (SOUZA, 2005) identificam **M-2_B** como sendo o álcool lignocérico (n-tetracosanol; (Figura 34, pág. 24), inédito na espécie *Caesalpinia ferrea*.

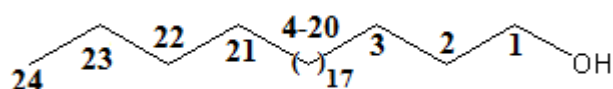


Figura 35: Estrutura química de **M-2_B**. Álcool lignocérico (n-Tetracosanol).

O espectro de massas (Figura 19, pág. 28) referente ao pico cromatográfico com tempo de retenção em 17,42 minutos exibe o mesmo padrão de fragmentação coerente com uma cadeia carbônica linear (fragmentos em m/z 153, 139, 125, 111, 97, 83, 71, 57, 43) semelhante ao espectro de massas de **M-2_B**, porém, não foi possível uma identificação para o álcool **M-2_C**. Um álcool de mesma natureza, o n-nonacosanol (C_{29}), foi isolado das partes aéreas de *Caesalpineia millettii* (CHEN, 2007).

3.2.3. Identificação de **M-2_D**

O espectro de massas (Figura 21, pág. 29) referente ao pico cromatográfico com o tempo de retenção em 21,48 minutos apresenta o pico do íon molecular em m/z 426 ($C_{30}H_{50}O$), como em **M-2_A**.

Considerando o índice de deficiência de hidrogênio (IDH = 6) e os picos de fragmentos principais no espectro de massa (m/z 218, 203 e 189), sobretudo, o pico base (m/z 218, resultante de um mecanismo *retro* Diels-Alder), este espectro sugere a presença do triterpeno β -amirina e/ou α -amirina (Figura 35, pág. 25) na mistura. A comparação com a base de dados de referência padrão do NIST, é em acordo com a presença deste metabólito, ainda não registrado em *C. ferrea*.

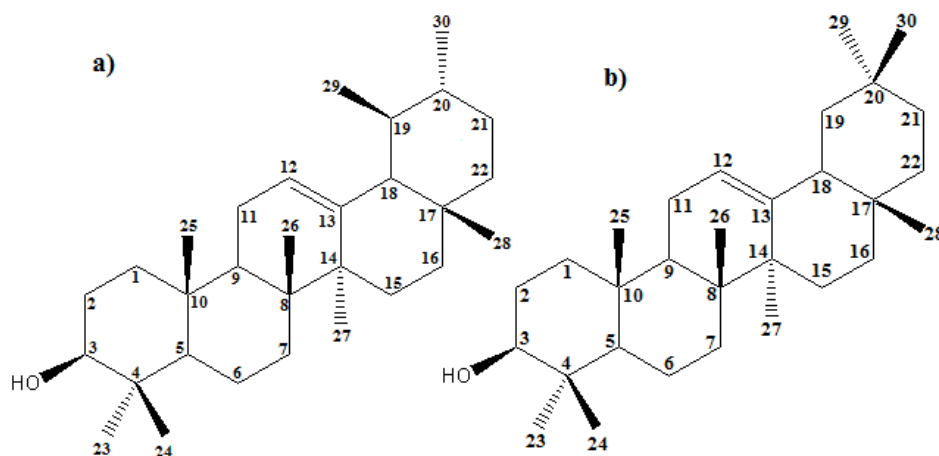


Figura 36: Estrutura química de **M-2_D**. (a) α -amirina e (b) β -amirina.

3.2.4 Identificação de M-2_E

O espectro de massas (Figura 23, pág. 30) referente ao pico cromatográfico com o tempo de retenção em 22,74 minutos apresenta o pico do íon molecular em m/z 440 ($C_{31}H_{52}O$) e picos principais de fragmentação em m/z 425 (M-15), 422, 407, 353, 300, 297, 175, 107, 95, 83, 81 e 69.

A comparação com a base de dados de referência padrão do NIST permite propor a presença do esteróide 24- metilenocicloartanol (3β -9,19-Ciclolanostan-3-ol-24-metileno) (Figura 36, pág. 26), com um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 6, justificado pela presença do esqueleto 9-cicloartanol e de uma insaturação no carbono C-24. Esse composto é relatado pela primeira vez em *C. ferrea*.

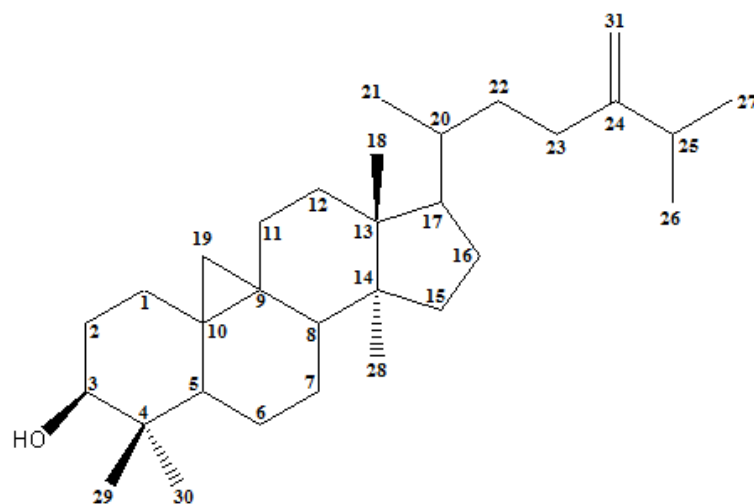


Figura 37: Estrutura química de **M-2E**. 24-metilenocicloartanol (3β -9,19 ciclolanostan-3-ol-24-metileno).

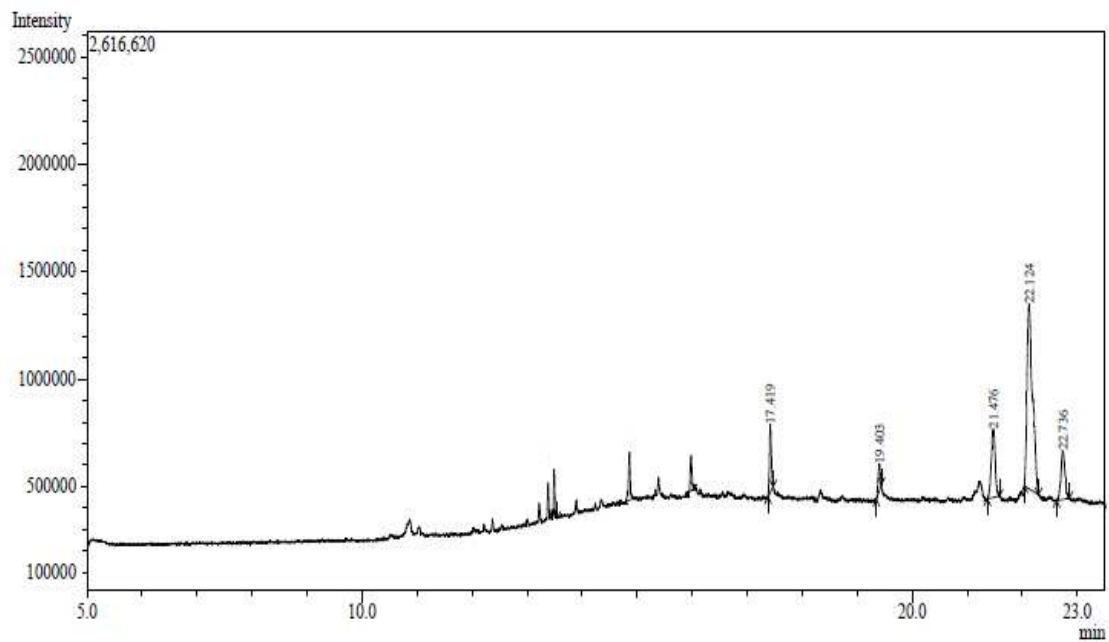


Figura 19: Cromatograma de M-2 obtido pela técnica CG-EM.

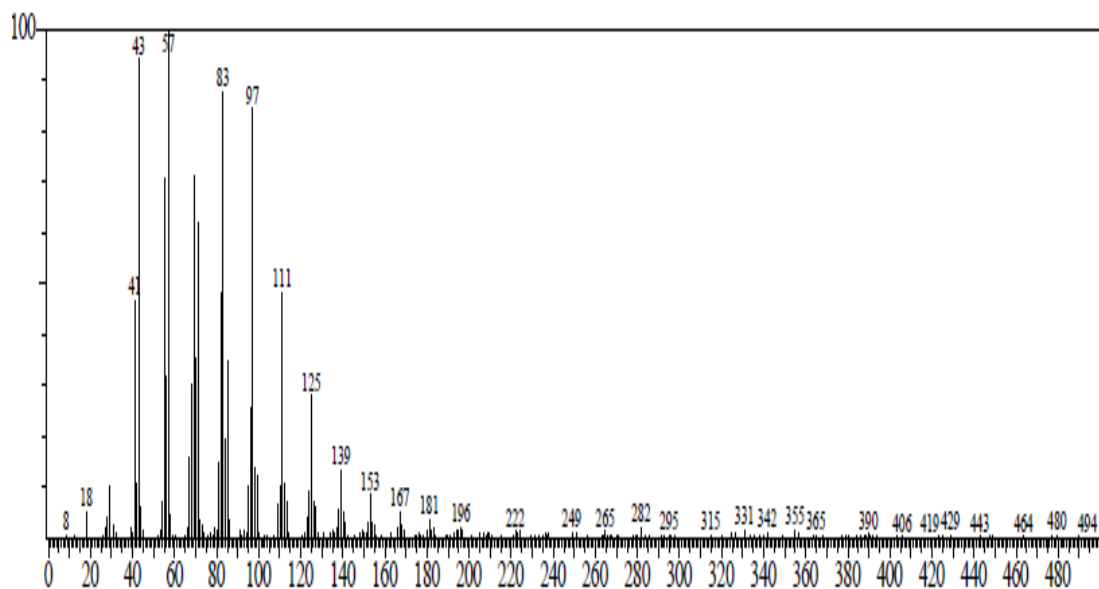


Figura 20: Espectro de massas referente ao pico em 17,42 min. do cromatograma de M-2

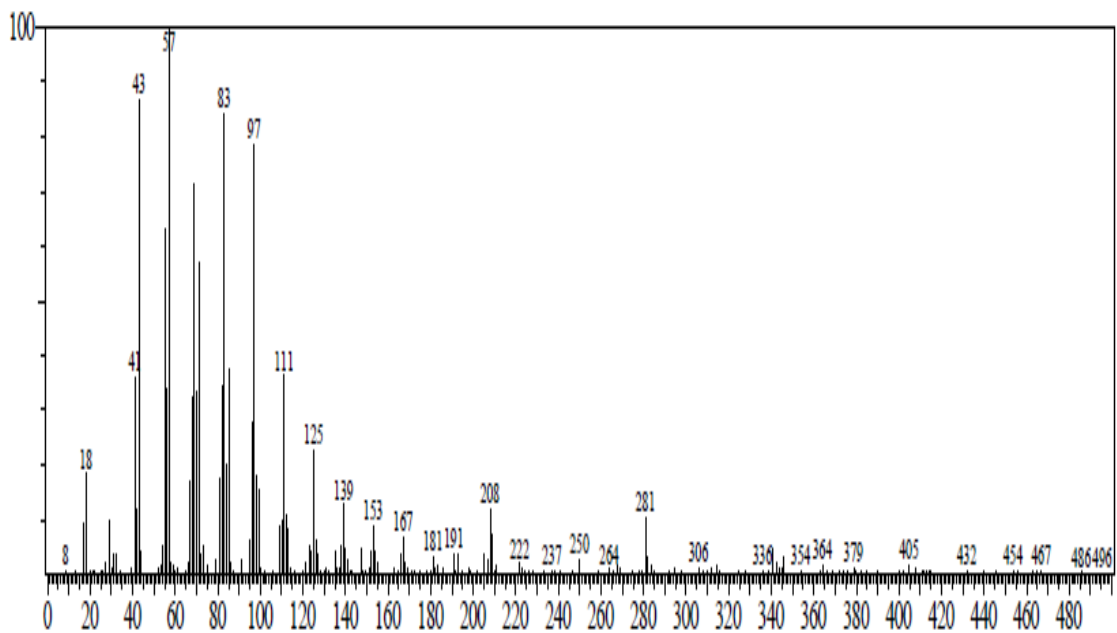


Figura 21: Espectro de massas referente ao pico em 19,40 min. do cromatograma de M-2.

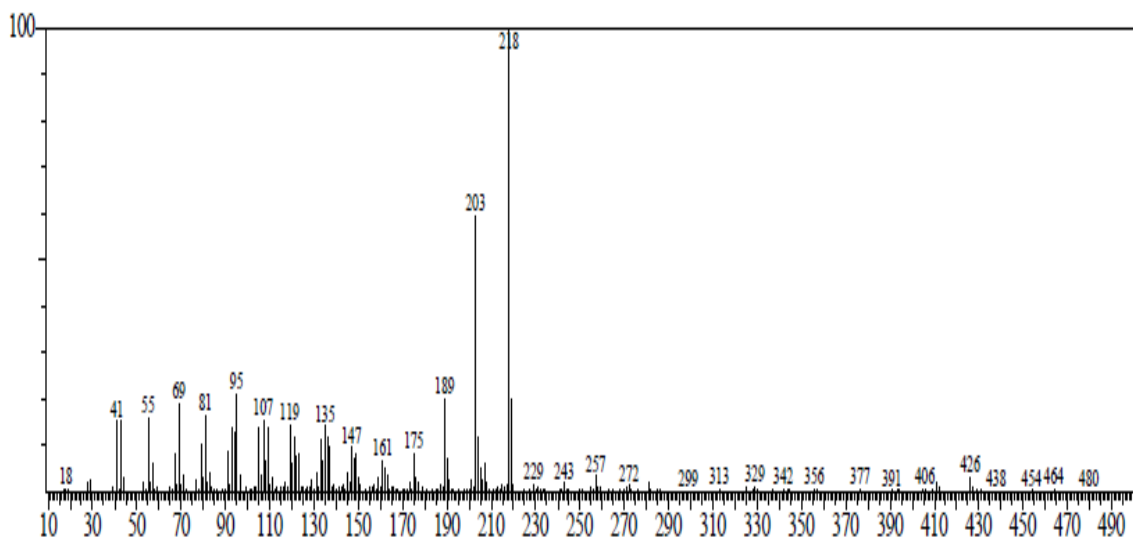


Figura 22: Espectro de massas referente ao pico em 21,48 min. do cromatograma de M-2.

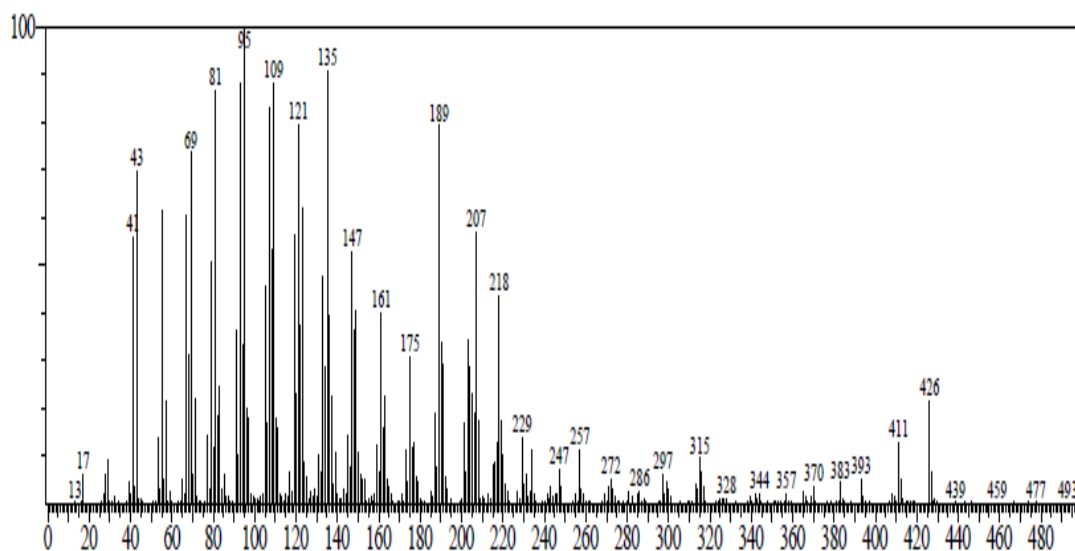


Figura 23: Espectro de massa referente ao pico em 22,12 min. do cromatograma de M-2.

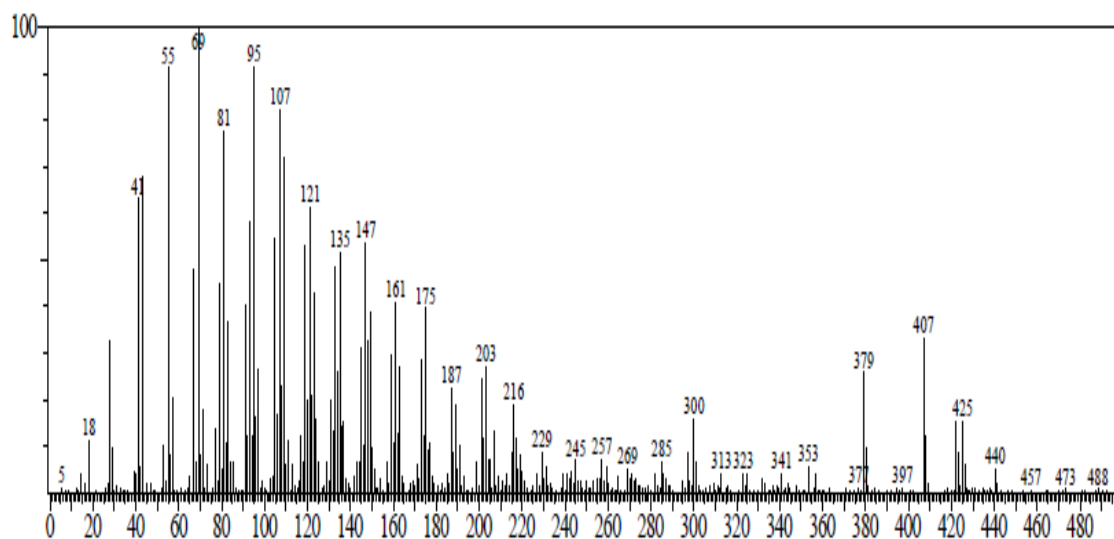


Figura 24: Espectro de massas referente ao pico em 22,74 min. do cromatograma de M-2.

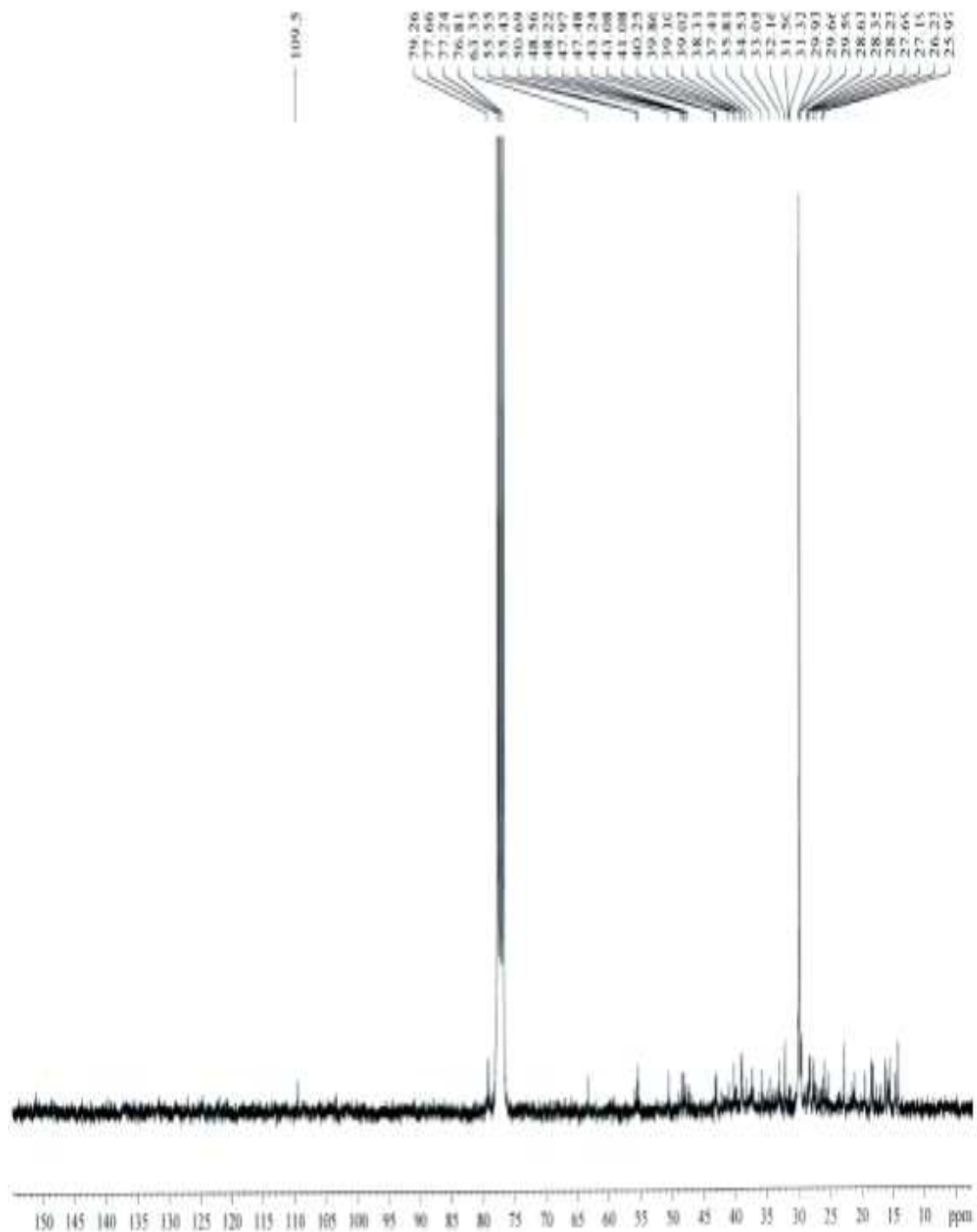


Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de M-2.

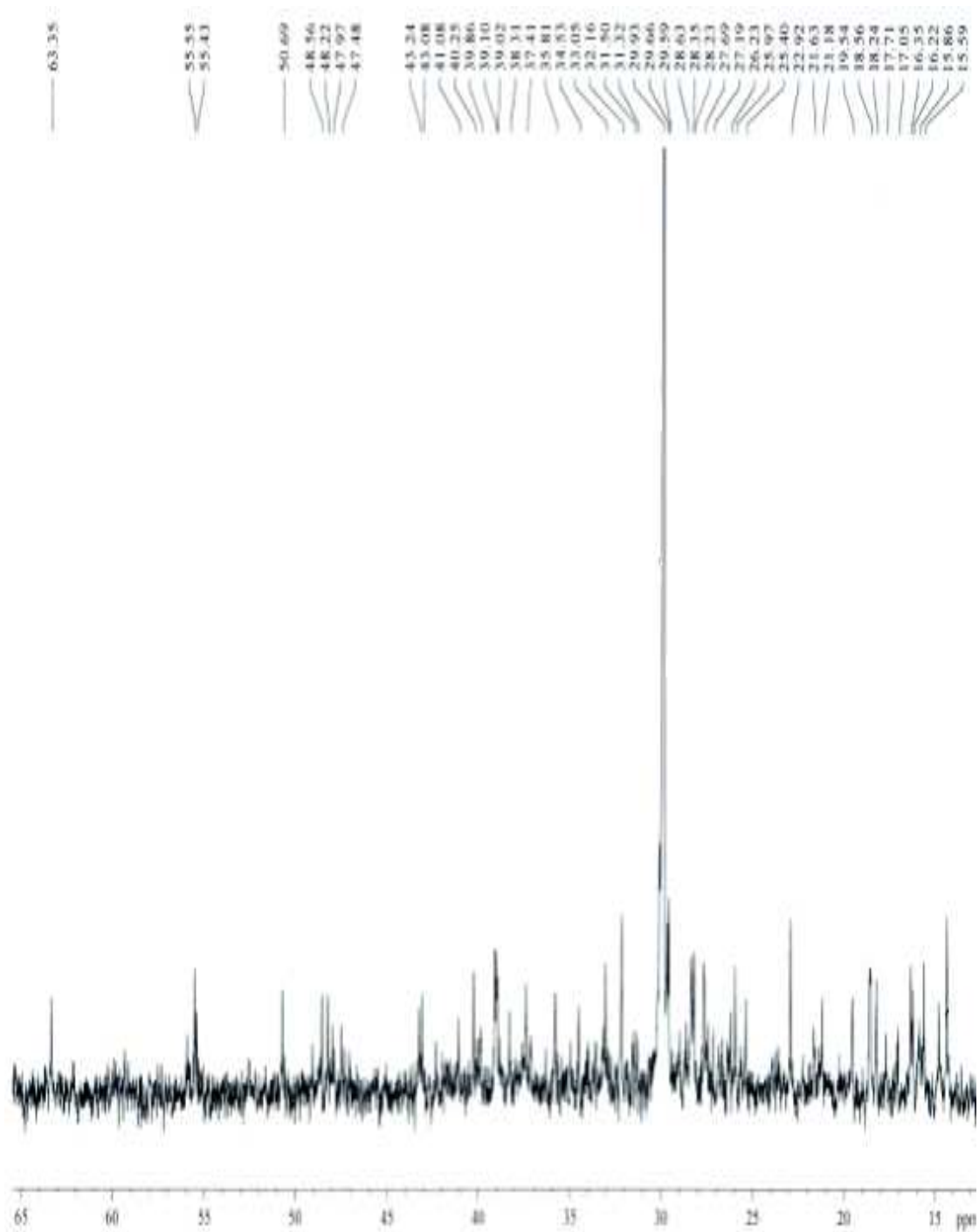


Figura 26: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de M-2.

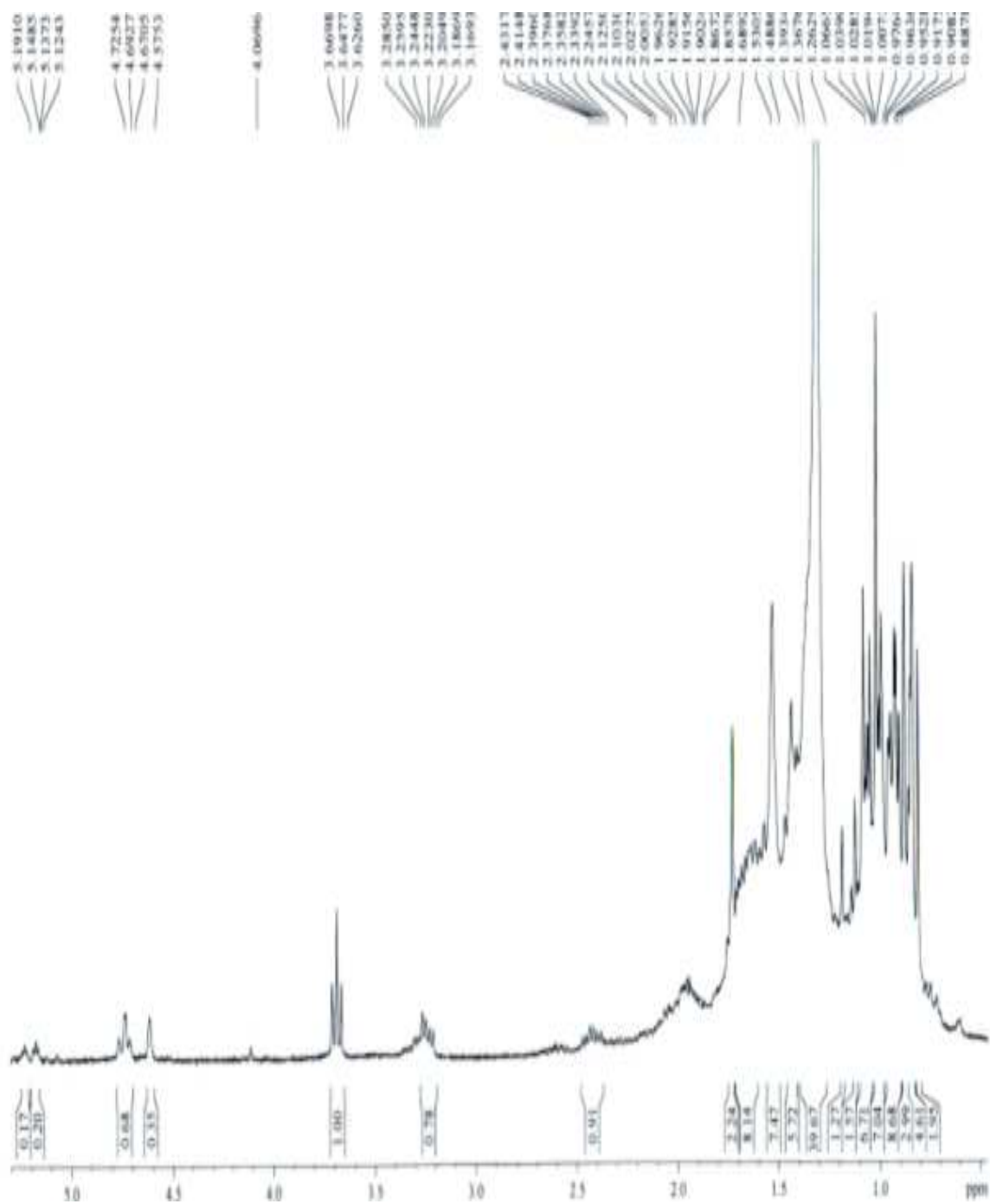


Figura 27: Expansão do espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de M-2.

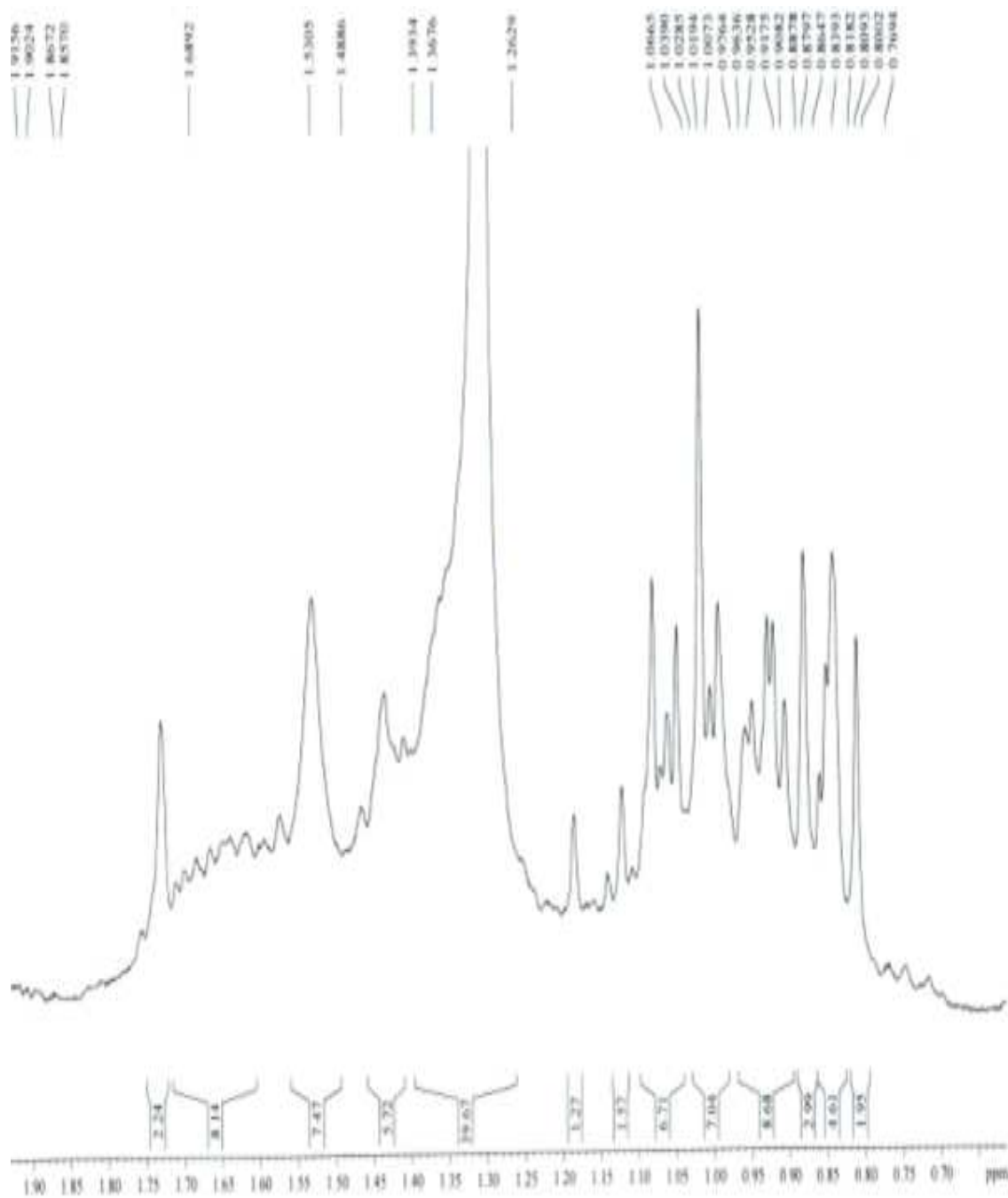


Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de M-2.

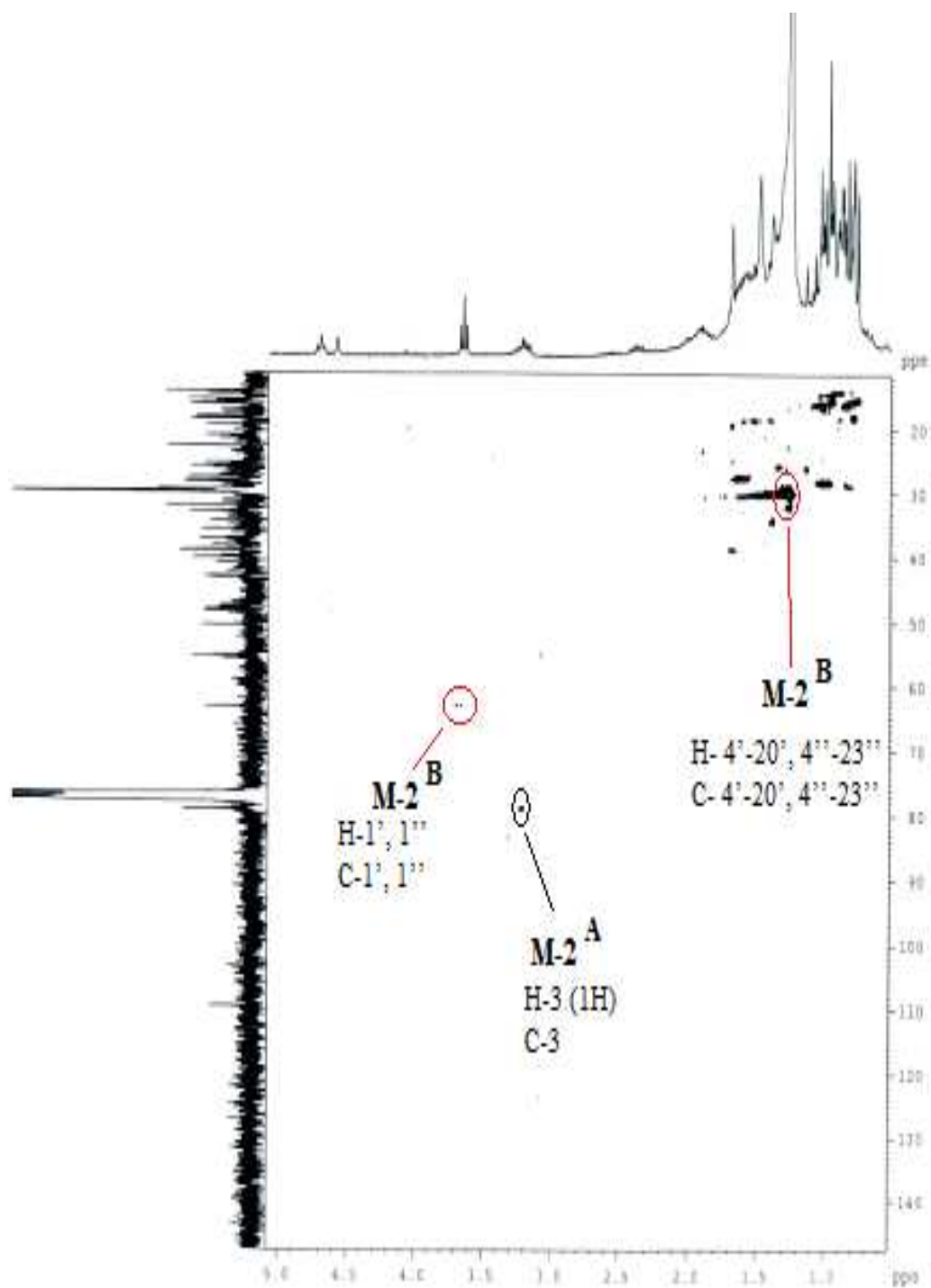


Figura 29: Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de M-2.

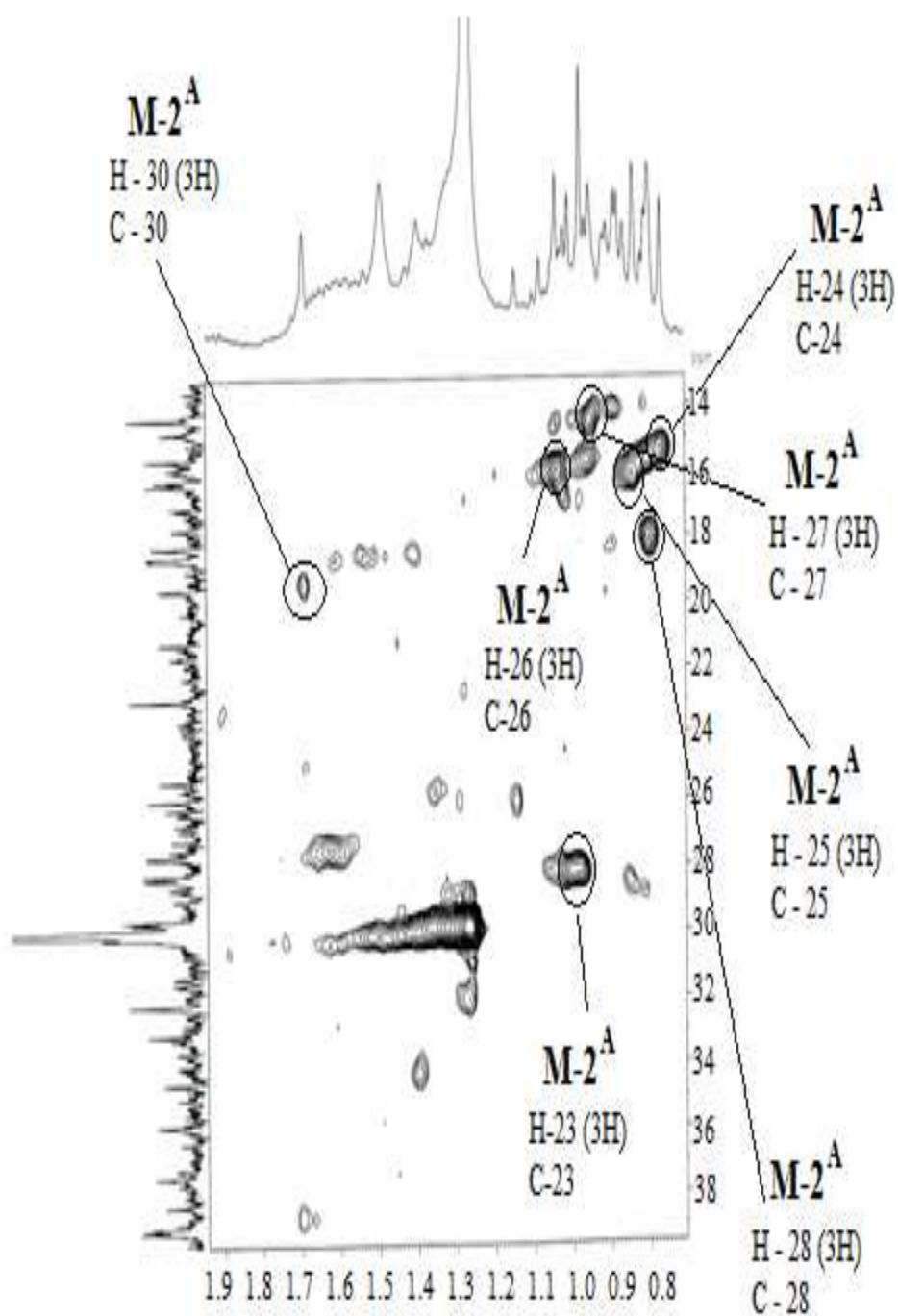


Figura 30: Espectro de RMN bidimensional HSQC de **M-2**.

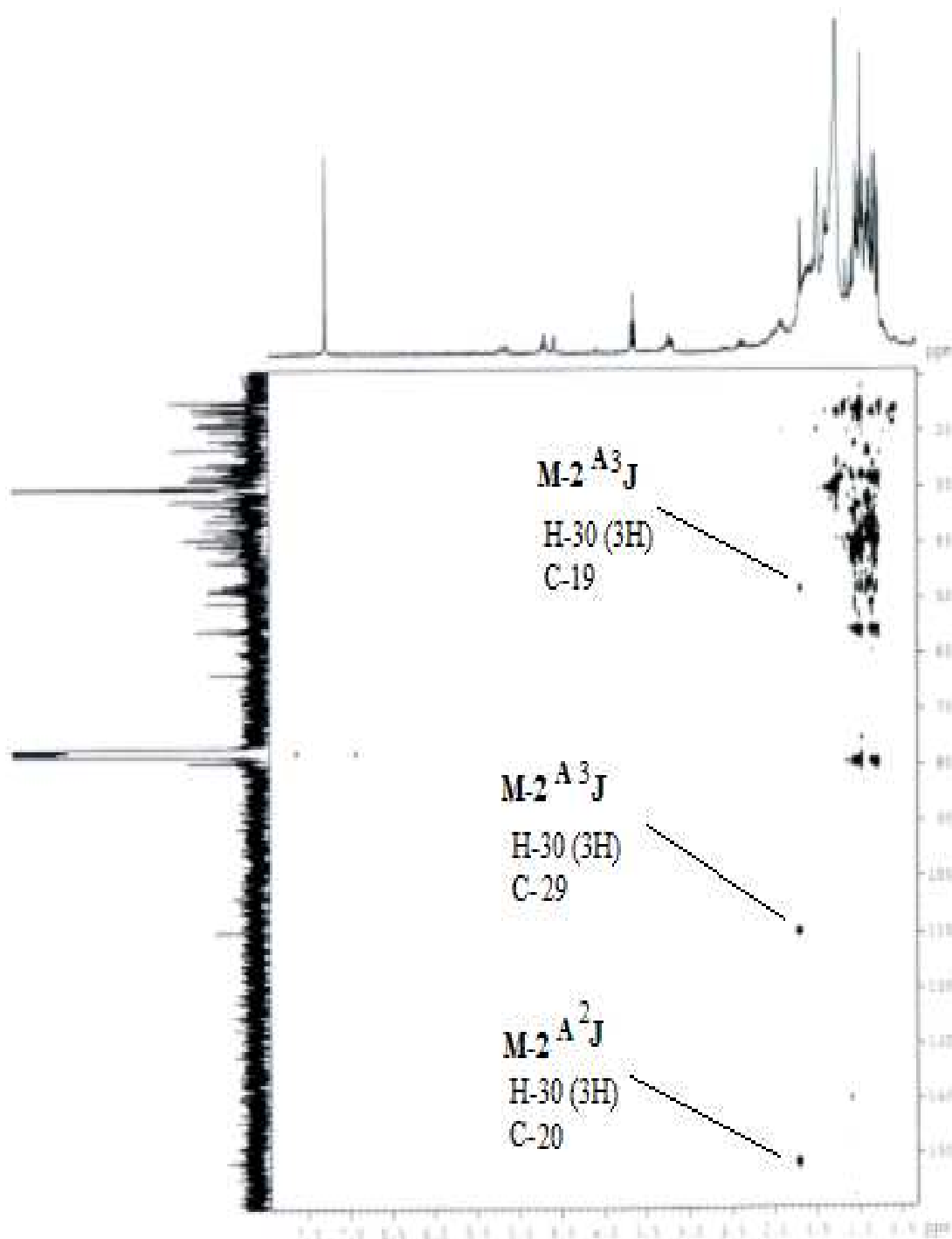


Figura 31: Espectro de RMN bidimensional HMBC de M-2.

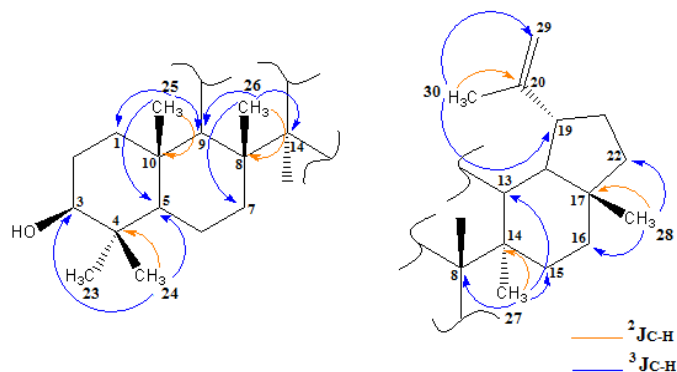


Figura 32: Correlações de HMBC de **M-2_A**.

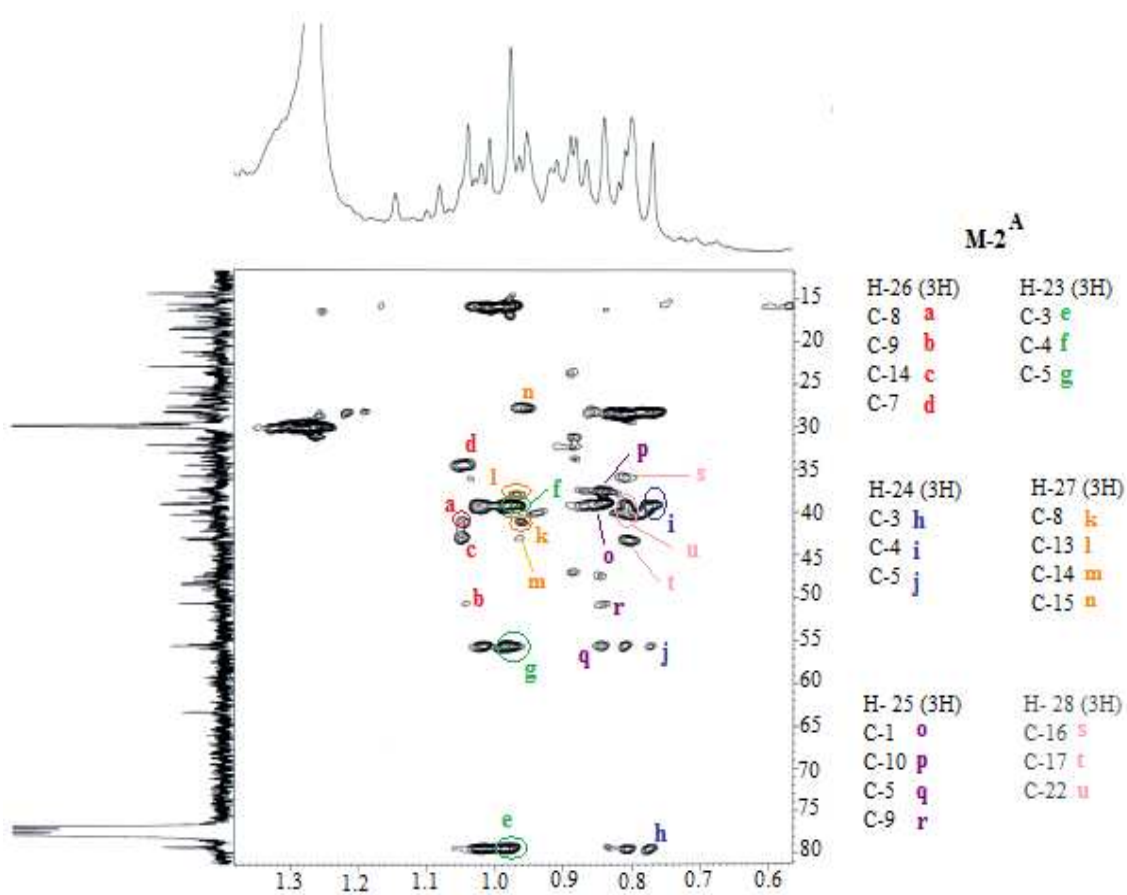


Figura 33: Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de **M-2**.

TABELA 3: Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para **M-2_A**.

		HSQC		M-2 _A	HMBC	FERREIRA, 2008 *	
		^1H (δ)	^{13}C (δ)	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	CH ₂		39,02		δ 0,84 (3H)		38,96
2	CH ₂		28,35				27,70
3	CH	3,22 (dd; 5,4 e 10,8 Hz)	79,26		δ 0,98 (3H) δ 0,77 (3H)	3,20	79,25
4	C	-	39,10	δ 0,98 (3H) δ 0,77 (3H)		-	39,09
5	CH		55,55		δ 0,98 (3H) δ 0,77 (3H)		55,56
6	CH ₂		18,24				18,56
7	CH ₂		34,53				34,54
8	C	-	41,08		δ 0,95 (3H)	-	41,09
9	CH		50,69		δ 0,84 (3H)		50,70
10	C	-	37,41	δ 0,84 (3H)		-	37,42
11	CH ₂		21,18				21,18
12	CH ₂		25,40				25,41
13	CH		38,31				38,32
14	C	-	43,08	δ 0,95 (3H)		-	43,08
15	CH ₂		27,19		δ 0,95 (3H)		27,66
16	CH ₂		35,81		δ 0,80 (3H)		35,83
17	C	-	43,24	δ 0,80 (3H)		-	43,23
18	CH		48,56				48,57
19	CH	2,38 (td, 5,0 e 10 Hz)	48,22		δ 1,69 (3H)	2,38	48,22
20	C	-	151,20	δ 1,69 (3H)		-	151,18
21	CH ₂		29,93				30,10
22	CH ₂		39,86		δ 0,80 (3H)		40,24
23	CH ₃	0,98 (s)	28,35			0,97 (s)	28,22
24	CH ₃	0,77 (s)	15,59			0,76 (s)	15,59
25	CH ₃	0,84 (s)	16,35			0,83 (s)	16,34
26	CH ₃	1,04 (s)	16,22			1,03 (s)	16,22
27	CH ₃	0,95 (s)	14,80			0,95 (s)	14,79
28	CH ₃	0,80 (s)	18,24			0,79 (s)	18,23
29	=CH ₂	4,69; 4,57	109,55		δ 1,69 (3H)	4,69; 4,57 (sl)	109,54
30	CH ₃	1,69 (s)	19,54			1,68 (s)	19,54

Fórmula molecular C₃₀H₅₀O

(-) não existe; * referência da literatura.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 38, pág. 40) de **S-8** exibe como destaques, bandas em $3600 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ [intensa e larga típica de deformação axial de grupo O-H (álcoois / fenóis / ácidos carboxílicos)], 1688 cm^{-1} (compatível com deformação axial de ligação C = O de ácido carboxílico conjugado), 1609 , 1542 e 1448 cm^{-1} (indicativas de deformação axial de ligações C = C em anel aromático) e 1300 , 1192 e 1023 cm^{-1} (absorções intensas compatíveis com deformação axial de ligações C – O).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 39, pág. 43) de **S-8** exibe apenas cinco sinais, todos na região de carbonos sp^2 , sendo um característico de carbono carbonílico. A análise comparativa com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 40, pág. 44) possibilita relacionar somente um sinal para carbono monohidrogenado em $\delta_{\text{C}} 110,5$ e quatro para carbonos não hidrogenados em $\delta_{\text{C}} 170,6$, $146,5$, $139,7$ e $122,2$. O sinal em $\delta_{\text{C}} 170,6$ é atribuído a um carbono carboxílico, tendo em vista a ausência de carbono sp^3 oxigenado, excluindo a possibilidade de uma carbonila de éster e em acordo com a banda larga em $\nu_{\text{OH}} 2600$ a 2500 cm^{-1} no espectro do IV (típica de ácido carboxílico). O deslocamento químico em $\delta_{\text{C}} 170,6$ é coerente com ácido carboxílico conjugado e, assim, **S-8** apresenta-se como um derivado do ácido benzóico. O sinal em $\delta_{\text{C}} 146,5$ é atribuído a carbono oxigenado e devido sua alta intensidade relativa é associado a dois átomos de carbono equivalentes. Igualmente, o sinal em $\delta_{\text{C}} 110,5$, com alta intensidade relativa, é associado a dois átomos de carbonos hidrogenados e equivalentes. Estas observações indicam a existência de sete átomos de carbono em **S-8**.

O espectro de RMN ^1H (Figura 41, pág. 45) de **S-8** mostra somente um singlete intenso em $\delta_{\text{H}} 7,06$ (s, 2H) na região de hidrogênios aromáticos. Assim, tendo em vista um total de sete átomos de carbono com somente cinco sinais no espectro de RMN ^{13}C e somente um singlete no espectro de RMN ^1H para dois hidrogênios equivalentes, é possível propor para **S-8** as alternativas estruturais **a** e **b** (Figura 42, pág. 46).

Na estrutura **b** os carbonos hidrogenados equivalentes são *orto* a dois grupos hidroxila e *meta* a carbonila o que ocasionaria um valor de deslocamento químico em torno de δ_C 95,0, menor que o valor apresentado no espectro de RMN ^{13}C (δ_C 110,5). Em adição, o carbono oxigenado (C-4) está *meta* a duas hidroxilas e *para* a carbonila e, assim, o deslocamento químico seria entre δ_C 150,0 e 160,0, maior que o valor presente no referido espectro (δ_C 139,70), argumentos que permitiram descartar a proposta **b**. Na estrutura da proposta **a**, o carbono C-4, embora oxigenado, é *orto* a dois grupos hidroxila, o que justifica o valor (δ_C 139,70) relativamente baixo.

Os dados espectroscópicos obtidos e comparados com dados registrados na literatura (Tabela 5, pág. 47) permitem identificar **S-8** como sendo ácido gálico (ácido-3,4,5-tri-hidróxi-benzóico; Figura 44, pág. 42) já registrado em *C. ferrea* (NAKAMURA *et al*, 2002).

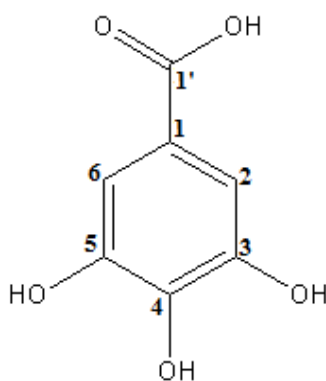


Figura 44: Estrutura química do componente **S-8**. Ácido gálico (ácido-3,4,5-tri-hidróxi-benzóico).

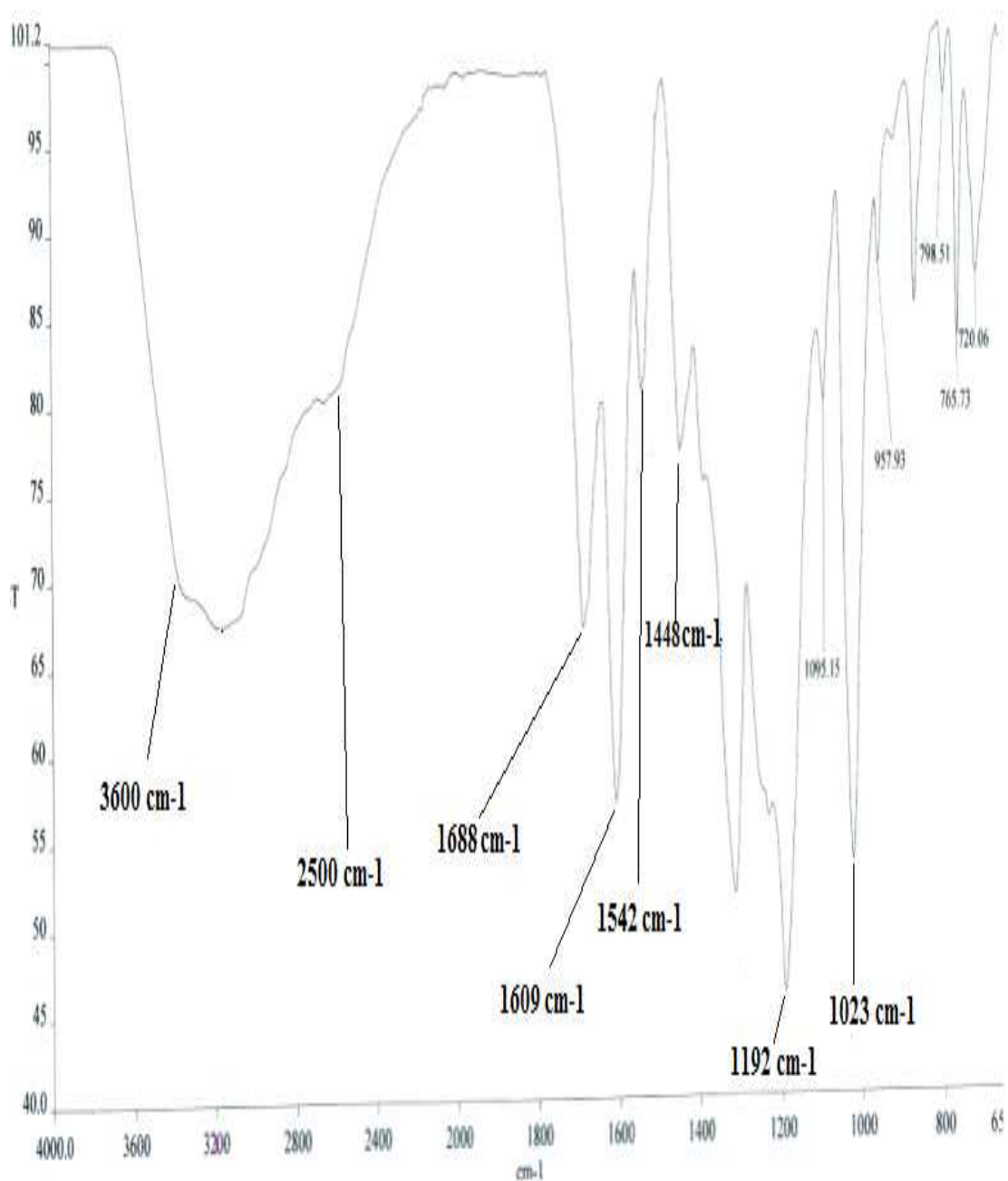


Figura 39: Espectro de absorção na região do infravermelho de S-8.

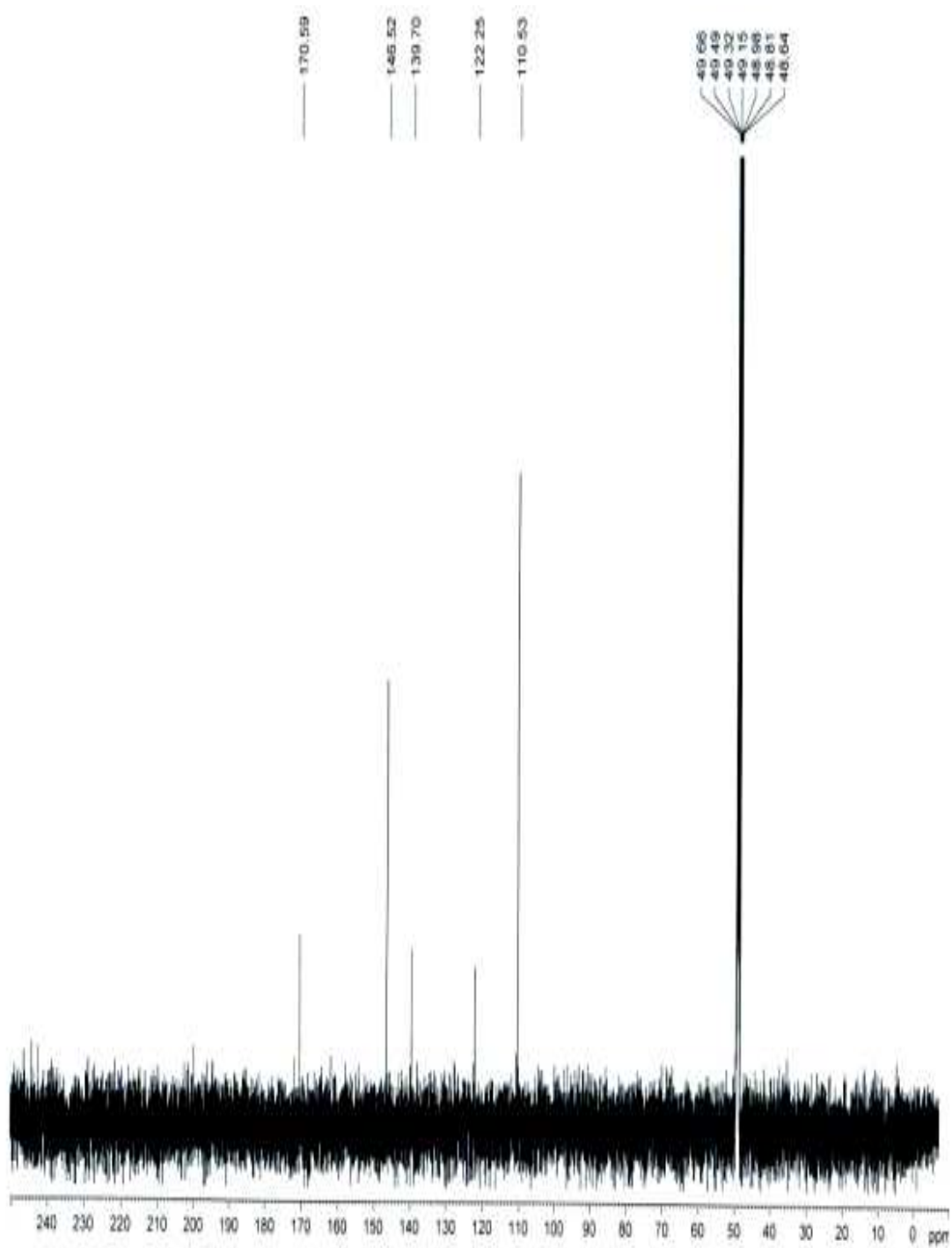


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD_3OD) de S-8.

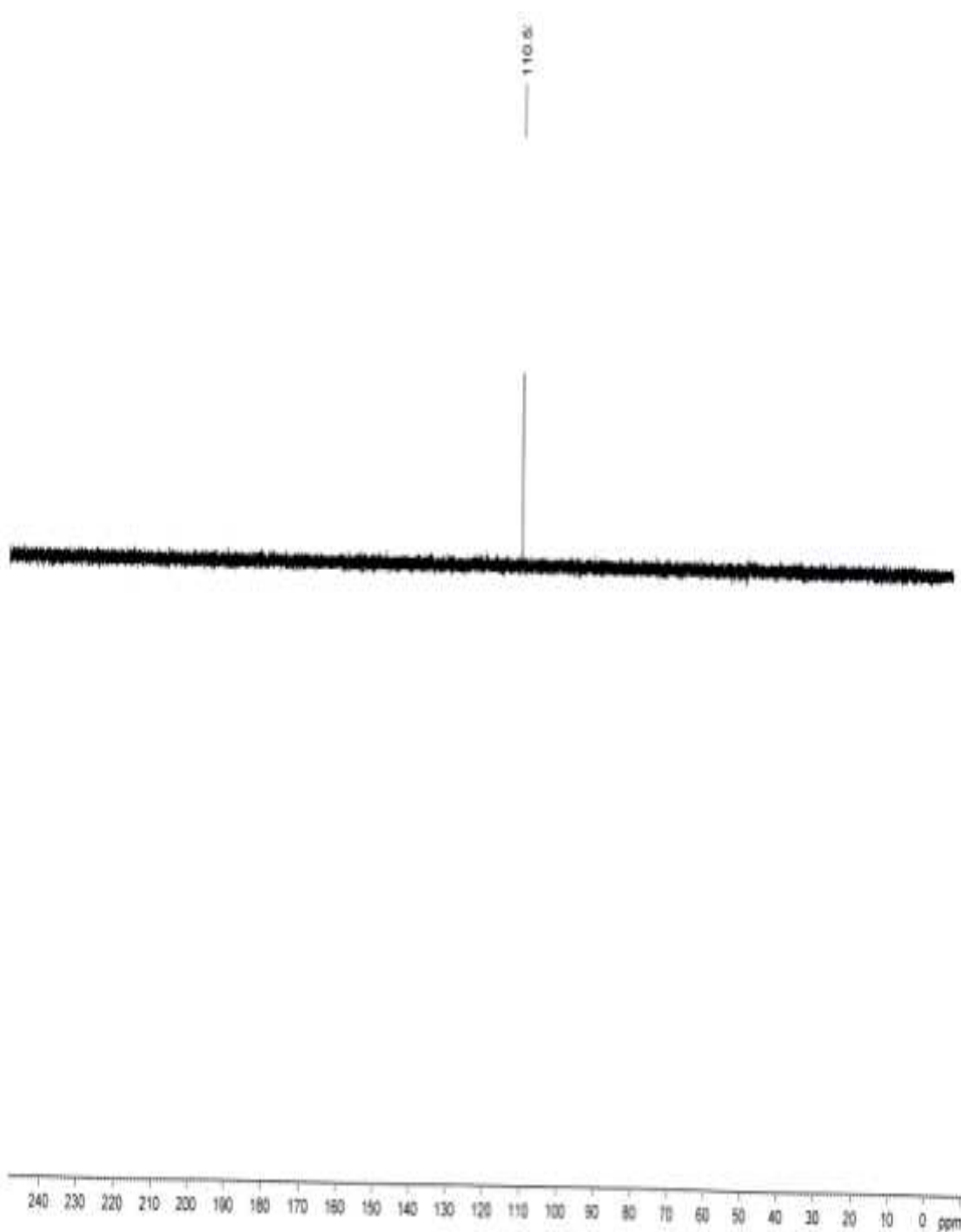


Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz – CD_3OD) de **S-8**.

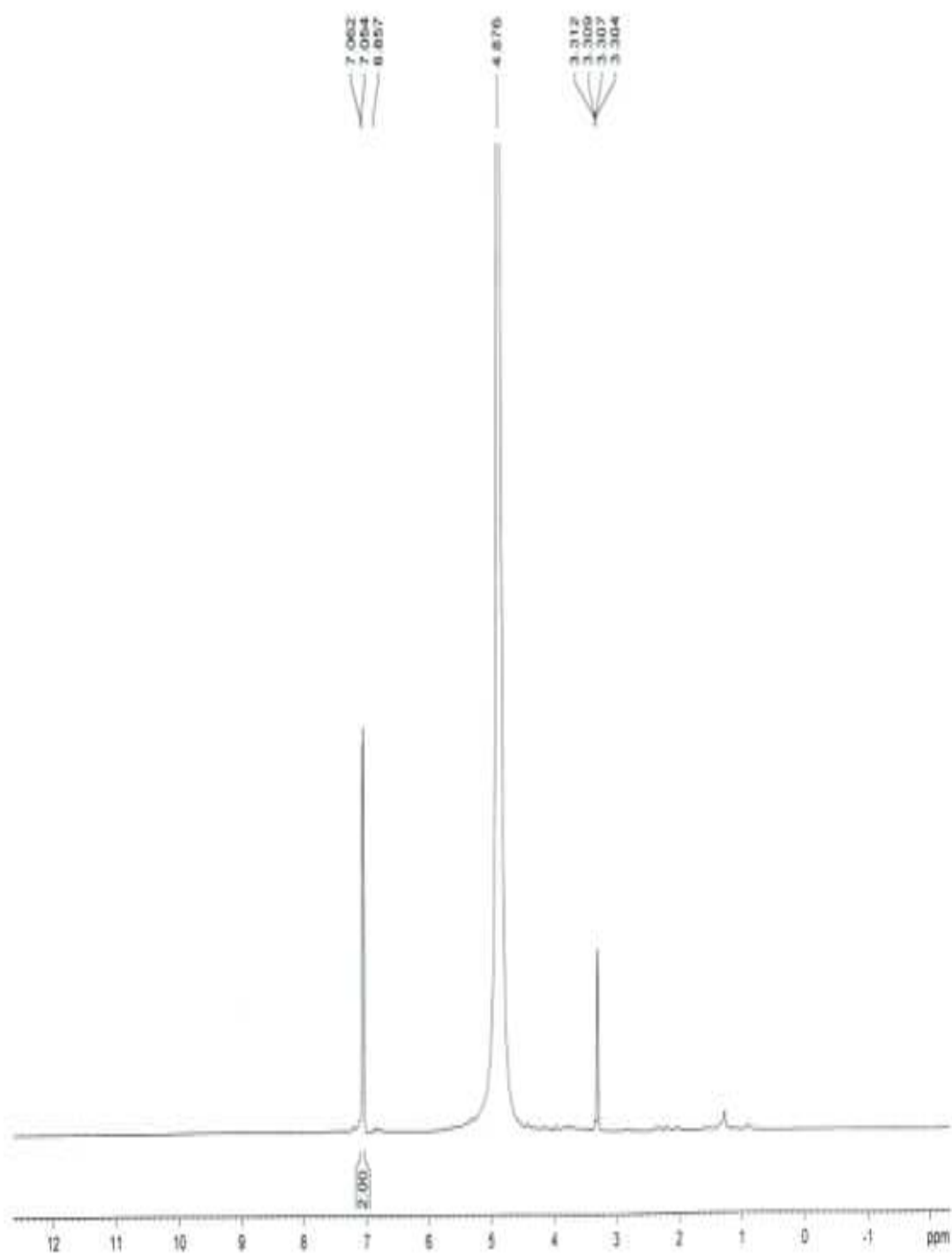


Figura 42: Espectro de RMN ^1H (500 MHz – CD_3OD) de **S-8**.

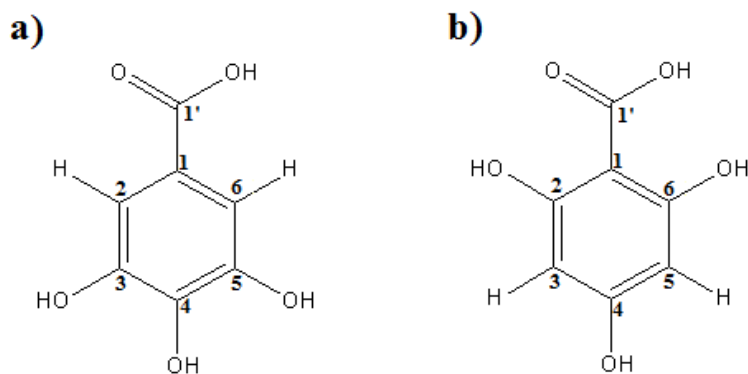


Figura 43: Propostas estruturais para **S-8**; **(a)** estrutura química do ácido-3,4,5-tri-hidróxi-benzóico e **(b)** estrutura química do ácido-2,4,6-tri-hidróxi-benzóico.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H (500 MHz – MeOD), ^{13}C (125 MHz – CD_3OD) para **S-8**.

		S-8		SOUZA FILHO et al, 2006 *	
		^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	C	-	122,25	-	121,9
2	CH	7,06 (s)	110,53	7,05 (s)	110,3
3	C	-	146,52	-	146,4
4	C	-	139,70	-	139,6
5	C	-	146,52	-	146,4
6	CH	7,06 (s)	110,53	7,05 (s)	110,3
1'	C=O	-	170,59	-	170,4

(-) não existe; * referência da literatura.

3.4. Identificação de S-9

A substância **S-9** foi isolada a partir do extrato etanólico das vagens de *C. ferrea* como um sólido amorfo amarelo através de cromatografia em coluna de gel de sílica.

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 45, pág. 49) e de RMN ^1H (Figura 46, pág. 50) de **S-9** exibem perfis semelhantes aos de **S-8**. O espectro de RMN ^1H registrou um único sinal simples e intenso em δ_{H} 7,46, o que indicou um anel aromático benzênico contendo dois hidrogênios equivalentes como em **S-8**. Por sua vez, o espectro de RMN ^{13}C exibe um total de sete sinais, sendo, um em δ_{C} 110,25 para carbono metínico, confirmado através do experimento DEPT 135° (Figura 47, pág. 51), e seis para carbonos sp^2 não hidrogenados.

No espectro de HSQC (Figura 48, pág. 52) o único sinal registrado correlaciona o sinal do átomo de carbono em δ_{C} 110,25 com o sinal singleto dos dois hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,46 e no espectro de HMBC (Figura 49, pág. 53) observa-se a correlação destes dois hidrogênios com os sinais dos carbonos em δ_{C} 107,61, 112,37, 139,71, 148,17 e 159,20 (Figura 50, pág. 53).

Assim, com base nesses dados espectrais (Tabela 6, pág. 54) e na interpretação dos espectros de RMN bidimensional e, ainda, por comparação com dados espectrais da literatura (SOLON, 2009), **S-9** é identificado como sendo um éster dimérico derivado do ácido gálico, conhecido como ácido elágico (3,3',4,4'-tetrahidroxidifênico-2,6, 2',6'-dilactona; Figura 51, pág. 48), já anteriormente isolado de *C. ferrea* (UEDA *et al*, 2001).

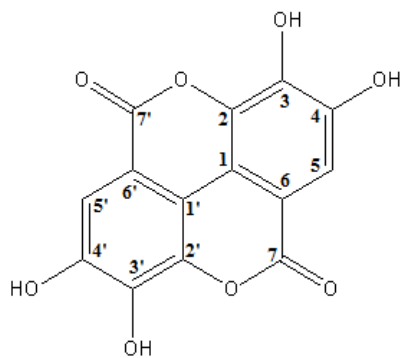


Figura 51: Estrutura química para **S-9**. Ácido elágico (4,4', 5,5', 6,6'-hexahidroxidifênico -2, 6, 2', 6'-dilactona).

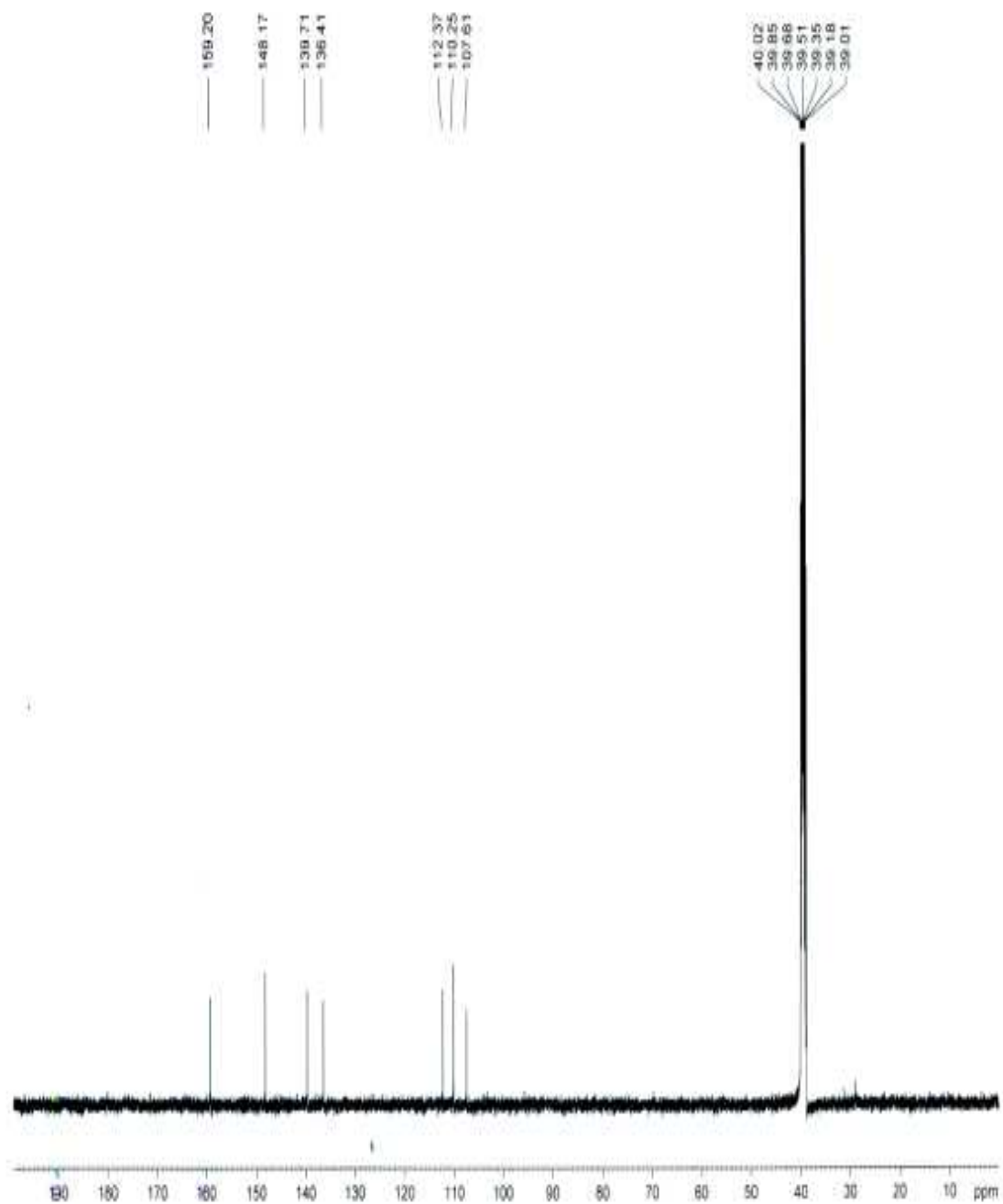


Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz - $\text{DMSO } d^6$) de S-9.

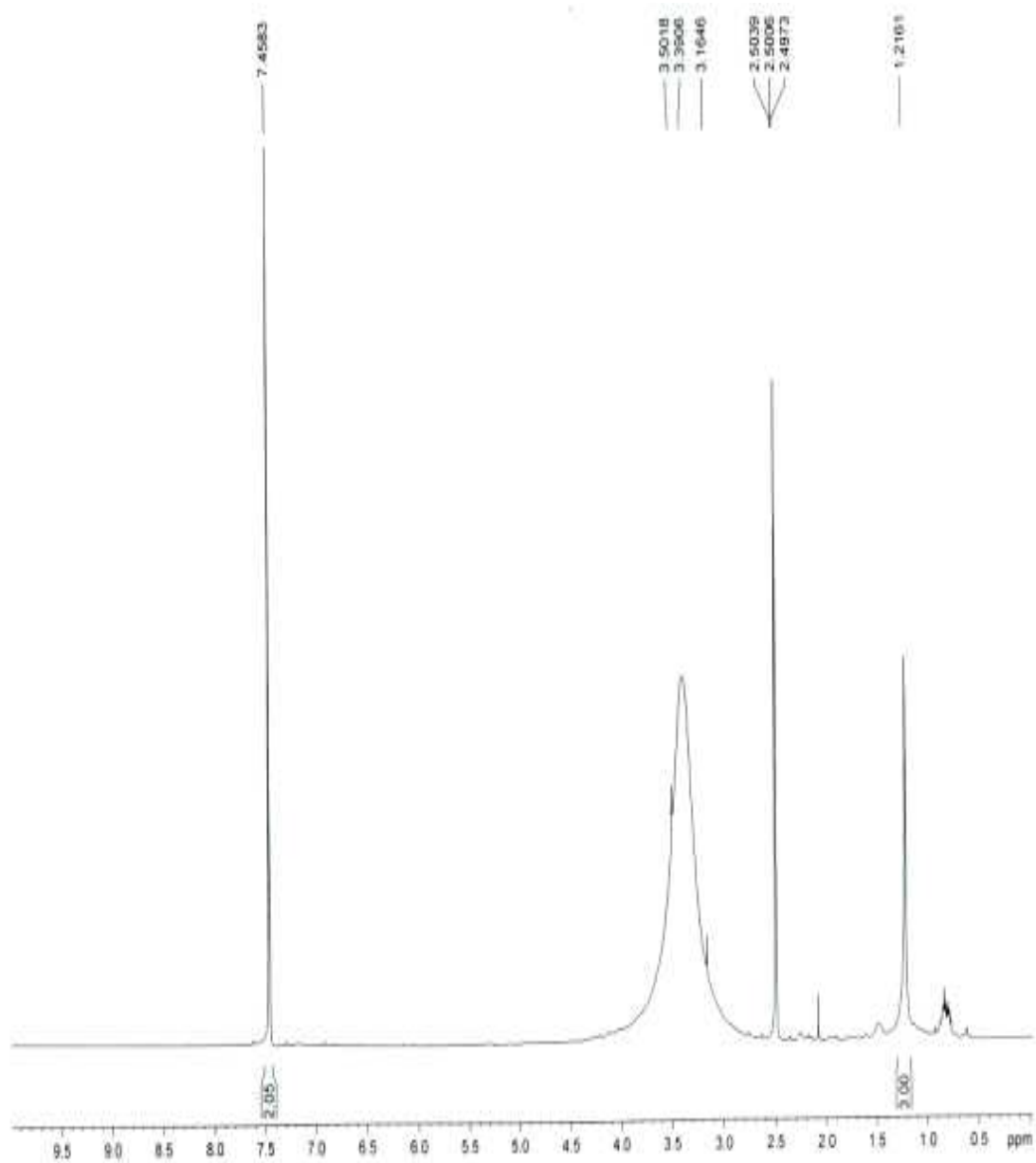


Figura 46: Espectro de RMN ^1H (500 MHz – DMSO d^6) de S-9.

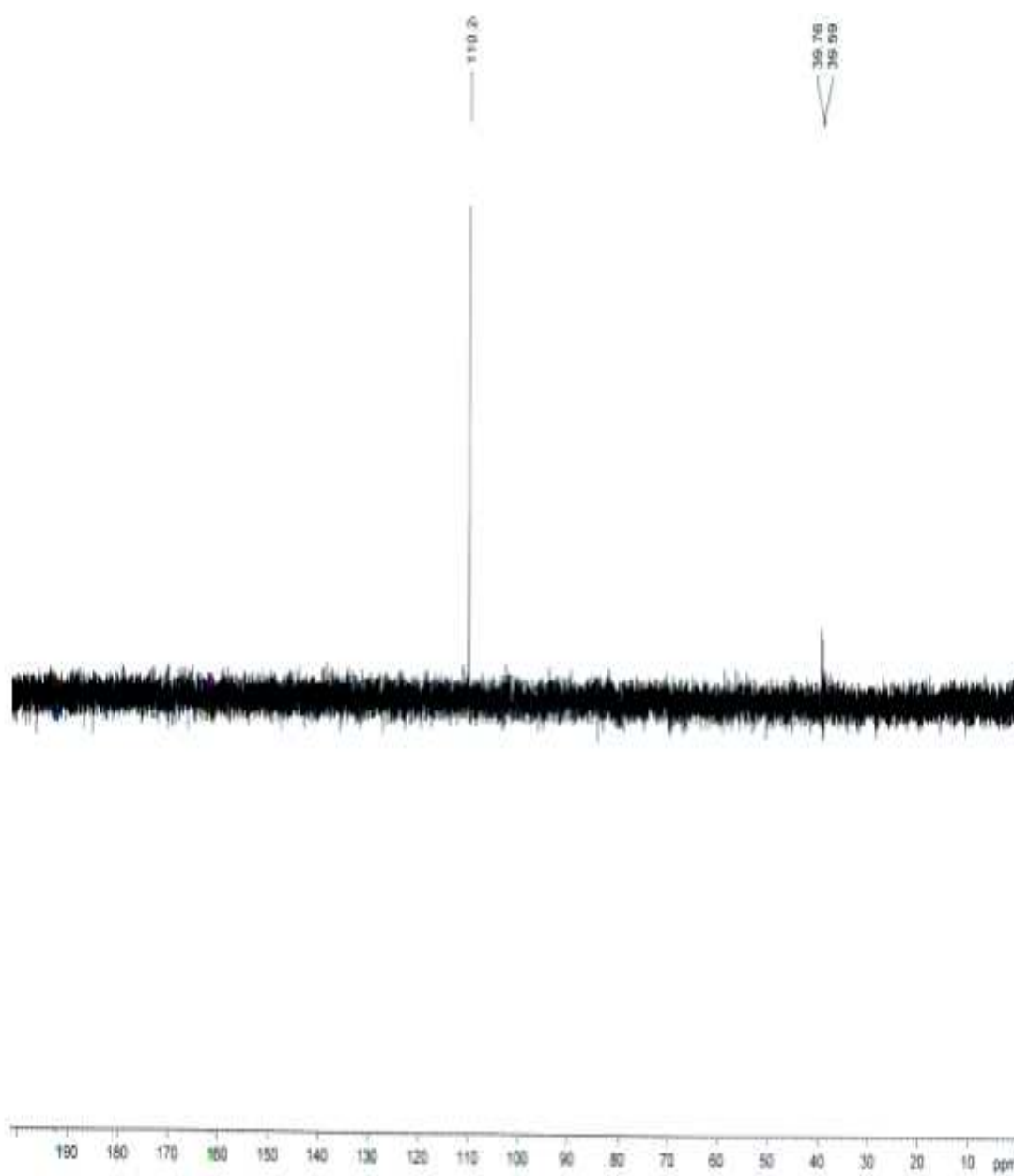


Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz – DMSO d^6) de **S-9**.



Figura 48: Espectro de RMN bidimensional HSQC de S-9.

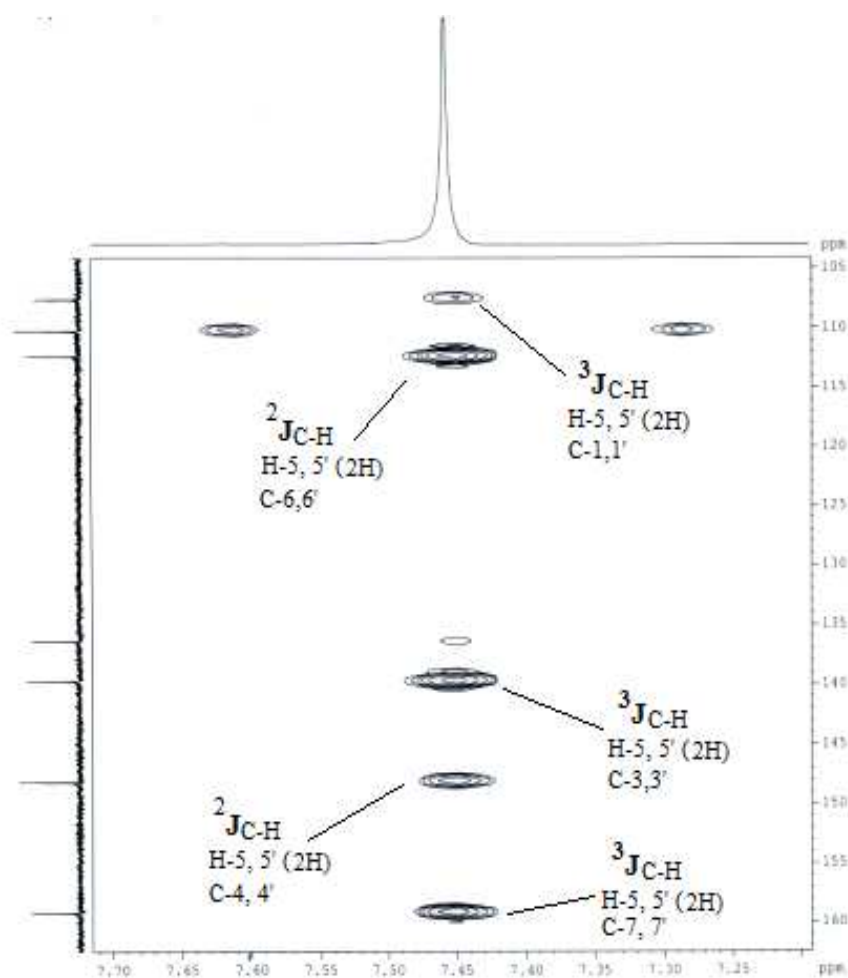


Figura 49: Expansão do espectro de RMN bidimensional de HMBC de S-9.

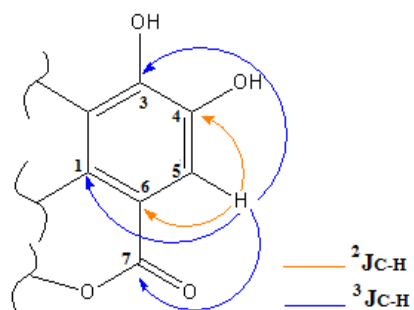


Figura 50: Correlações (HMBC) de S-9.

Tabela 6 : Dados de RMN ^1H (500 MHz – DMSO d^6), ^{13}C (125 MHz - DMSO d^6) e RMN HMBC para **S-9**.

	HSQC		S-2		HMBC		SOLON, 2009 *	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1, 1' C	-	107,61	-	δ 7,46 (s)	-	106,87	-	106,87
2, 2' C-O	-	136,41	-	-	-	136,33	-	136,33
3, 3' C-O	-	139,71	-	δ 7,46 (s)	-	140,49	-	140,49
4, 4' C-O	-	148,17	δ 7,46 (s)	-	-	148,27	-	148,27
5, 5' C-H	7,46 (s, 2H)	110,25	-	-	7,57 (s, 2H)	109,85	-	109,85
6, 6' C	-	112,37	δ 7,46 (s)	-	-	112,51	-	112,51
7, 7' C=O	-	159,20	-	δ 7,46 (s)	-	159,20	-	159,20

(-) não existe; * referência da literatura.

3.5. Identificação de S-10

A substância **S-10** foi isolada a partir do extrato etanólico do caule de *C. ferrea* como um sólido amorfo amarelo utilizando coluna de Sephadex LH-20 eluída com MeOH.

O espectro na região do IV (Figura 52, pág. 56) apresenta bandas em 3083 cm^{-1} (banda intensa e larga típica de deformação axial de um ou mais grupos OH em compostos fenólicos), 1618 cm^{-1} (deformação axial de grupo C = O quelado ou C = O / C = C conjugadas), 1571 , 1498 e 1420 cm^{-1} (deformação axila de anel aromático), 1233 , 1141 cm^{-1} (deformação axial de ligações C – O / C – C) e 820 cm^{-1} (deformação angular de ligação $\text{Csp}^2\text{-H}$).

Os espectros de RMN ^{13}C (Figuras 53, 54 e 56, págs. 57, 58 e 60) apresentam um total de 28 sinais, todos na região de carbonos sp^2 , sendo dois devidos a átomos de carbono carbonílico ($\delta_{\text{C}} 183,96$ e $\delta_{\text{C}} 184,24$).

A comparação com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 55 pág 59) revela 18 carbonos quaternários e 10 carbonos metínicos. Os sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 129,46 e δ_{C} 116,94 apresentam intensidades relativamente altas, sendo cada um deles correlacionado com dois átomos de carbono. Assim, o espectro indicou a presença de 30 átomos de carbonos, consistente com um composto do tipo bi-flavonóide com fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ em concordância com os picos em m/z 539 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 537 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (Figuras 57, 58, pág. 61) obtidos nos espectros de massas em alta resolução usando ionização por *eletrospray* (IES).

Nos espectros de RMN ^1H (Figuras 59 e 60, págs. 62 e 63) um sistema de acoplamento de spins AA'BB' em anel benzeno *para* substituído é inferido pelos sinais em δ_{H} 7,58 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz) e 6,67 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz) em concordância com os sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 129,46 (2 CH) e 116,94 (2 CH). O espectro de hidrogênio exibe também dois singletos em δ_{H} 6,61 e δ_{H} 6,59, cada sinal com integração para um átomo de hidrogênio, atribuídos no presente caso, a cada uma das duas unidades de flavonas do dímero [sinal singlete com este deslocamento químico (aprox. em 6,60 ppm) é característico do hidrogênio ligado ao carbono 3 no esqueleto de flavonas)]; sinais em δ_{H} 8,07 (1H, d, $J = 2,1$ Hz), 7,89 (1H, dd, $J = 8,6, 2,1$ Hz) e 7,10 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) que revelam um sistema de acoplamento AMX em 3''- 4'' no anel **B_I** dissustituído da unidade **I** de **S-10** indicando que C-3'' de **I** é a posição de ligação entre as duas unidades de flavonóides (HE *et al*, 1996); dois sinais de hidrogênios *meta* acoplados no anel **A_{II}** ocorreram em δ_{H} 6,17 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e 6,29 (1H, d, $J = 1,8$ Hz). Assim, os sinais dos átomos de hidrogênios da unidade **I** do bi-flavonóide foram: δ_{H} 6.61 (s, H-3''), 6.17 (d, H-6''), 6.29 (d, H-8''), 8.07 (d, H-2''), 7.89 (dd, H-6'') e 7.10 (d, H-5'').

Por outro lado, um sinal singlete para um hidrogênio em δ_H 6.32 (1H, s) foi atribuído ao hidrogênio H-6 (anel **A_{II}**) assumindo que o carbono C-8 na unidade **II** é na posição de ligação entre as duas unidades de flavonóides. Assim, os sinais dos átomos de hidrogênios da unidade **II** do bi-flavonóide foram: δ_H 6.59 (s, H-3), 6.32 (s, H-6), 7.58 (d, H-2'/H-6') e 6.67 (d, H-3'/H-5'). Todos os deslocamentos químicos dos átomos de carbono hidrogenados foram assinalados usando o experimento HSQC (Figura 61, pág. 64).

Os espectros de HMBC (Figuras 62, 64, 65, 66, 67, 68 e 69 págs. 65, 66, 67 e 68) mostram que os hidrogênios H-6 (δ_H 6,32, em **I**) e H-2''' (δ_H 8,07, em **II**) são acoplados ao átomo de carbono C-8 (δ_C 108,91) e que o hidrogênio H-5''' (δ_H 7,10) acopla com o carbono C-3''' (δ_C 122,59). Estas correlações são importantes para confirmar que a união entre as duas unidades flavonóides ocorre através dos anéis **B_{II}** (carbono C-3''') e **A_I** (carbono C-8).

A análise dos dados dos espectros (Tabela 7, pág. 70) de RMN 1H e de ^{13}C 1D em combinação com dados dos espectros de RMN 2D (HMBC, HSQC e COSY; Figuras 70 e 71, pág. 69) e, ainda, comparação com dados da literatura (BAHIA *et al*, 2010) permite identificar **S-10** (Figura 72, pág. 71) como um bi-flavonóide com as duas unidades interligadas em C-8 – C-3''' e pertencente a série conhecida como “amentoflavonas” (HE *et al*, 1996). Este é o primeiro relato de isolamento de **S-10** a partir de *C. ferrea*.

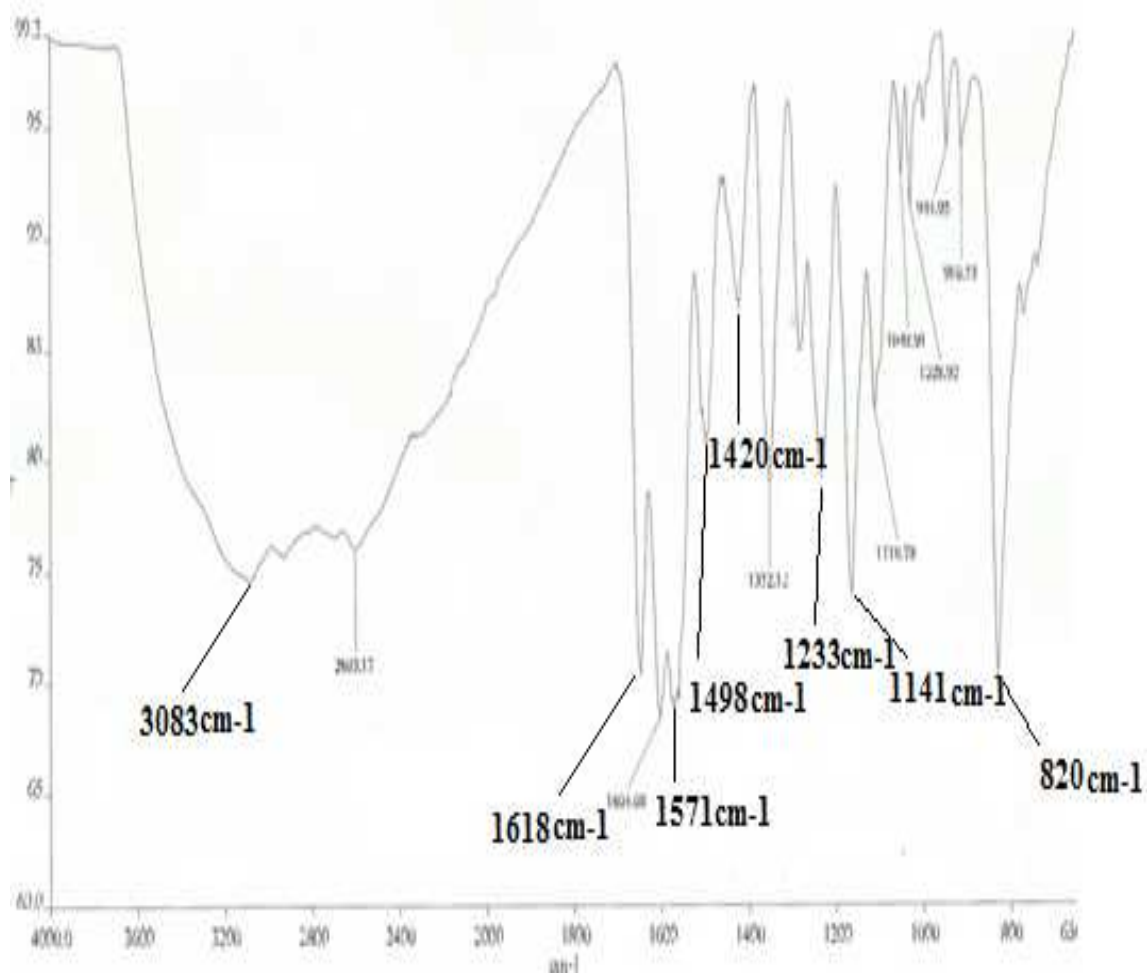


Figura 52: Espectro de absorção na região do infravermelho de S-10.

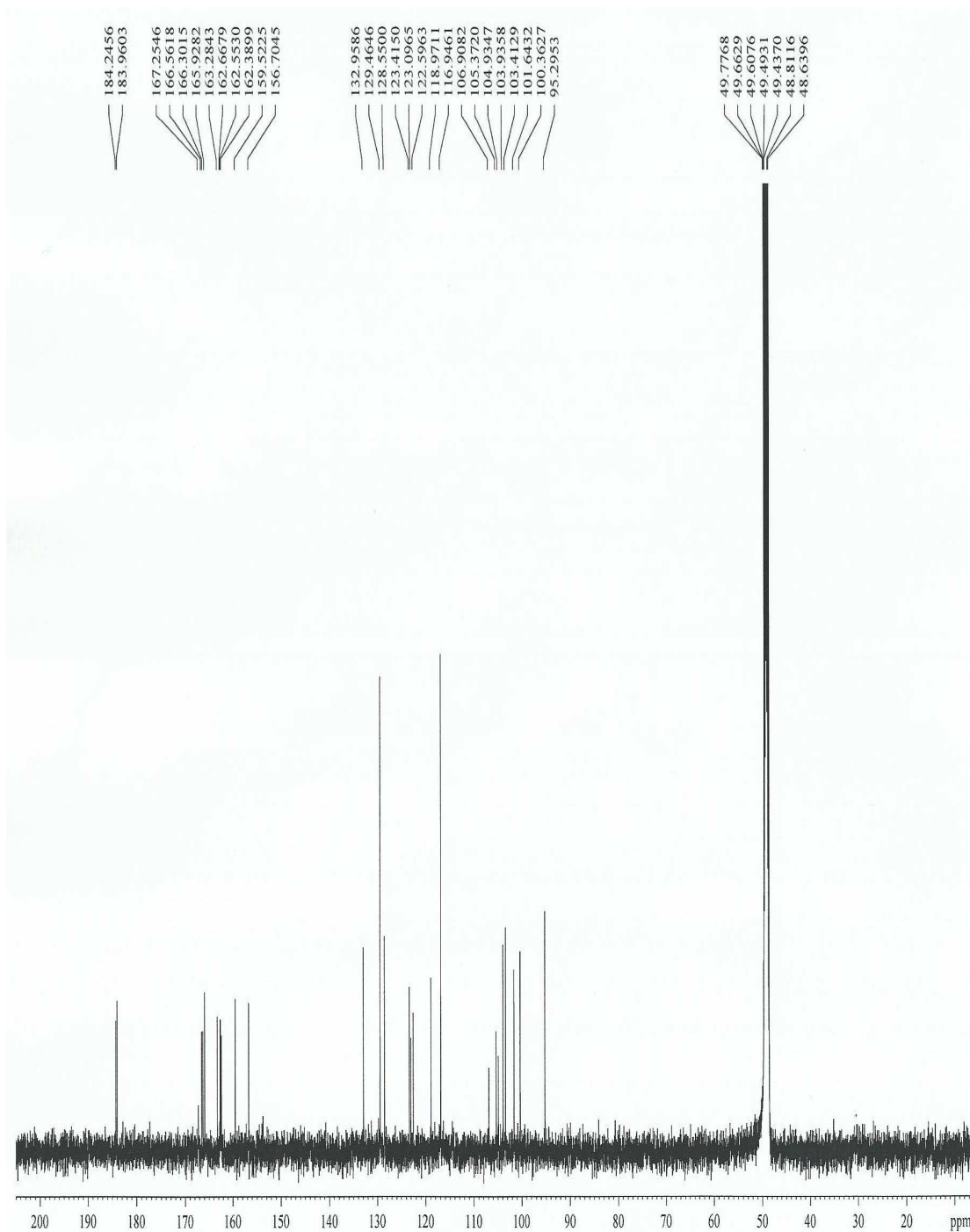


Figura 53: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD_3OD) de S-10.

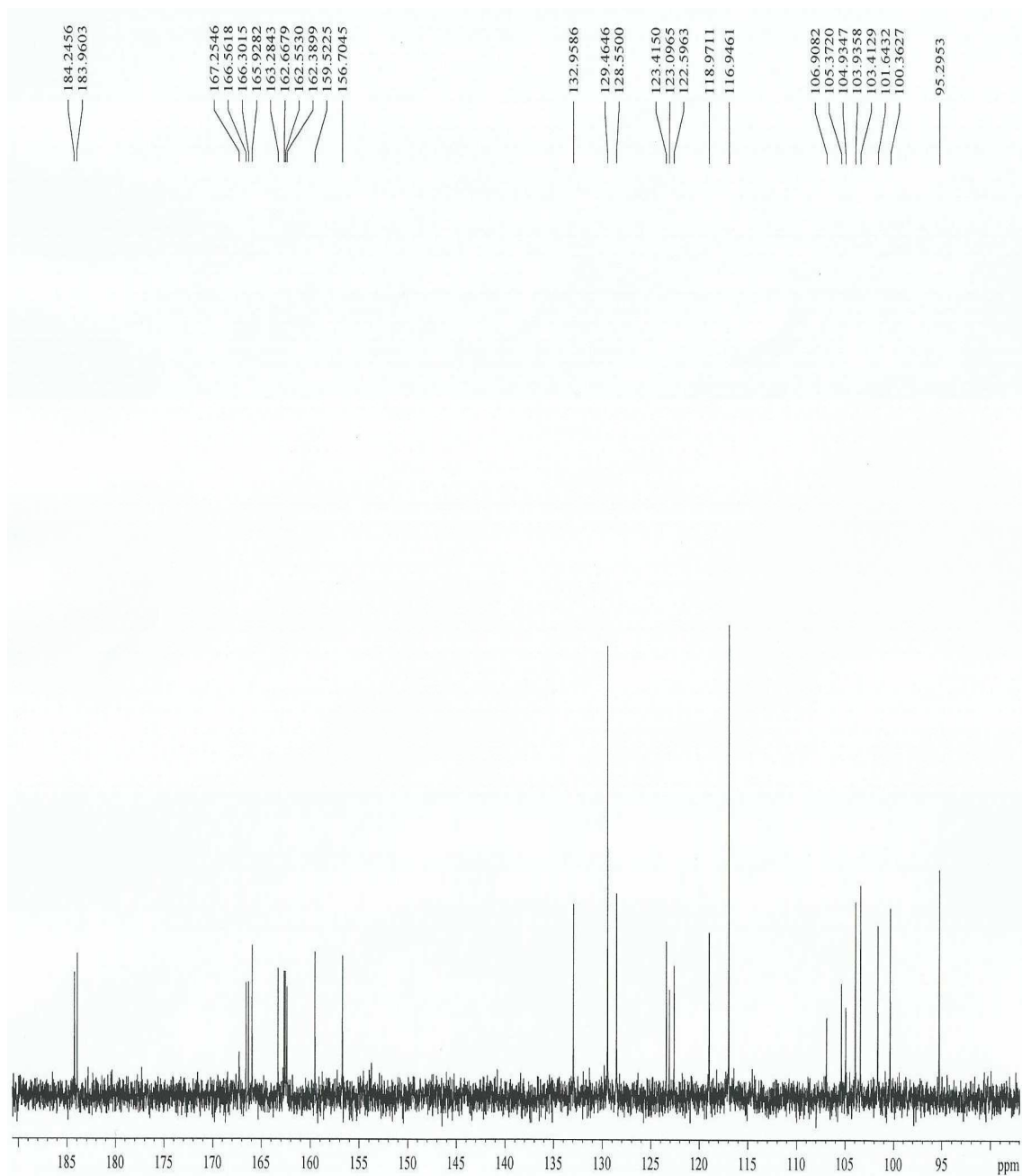


Figura 54: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz – CD_3OD) de S-10.

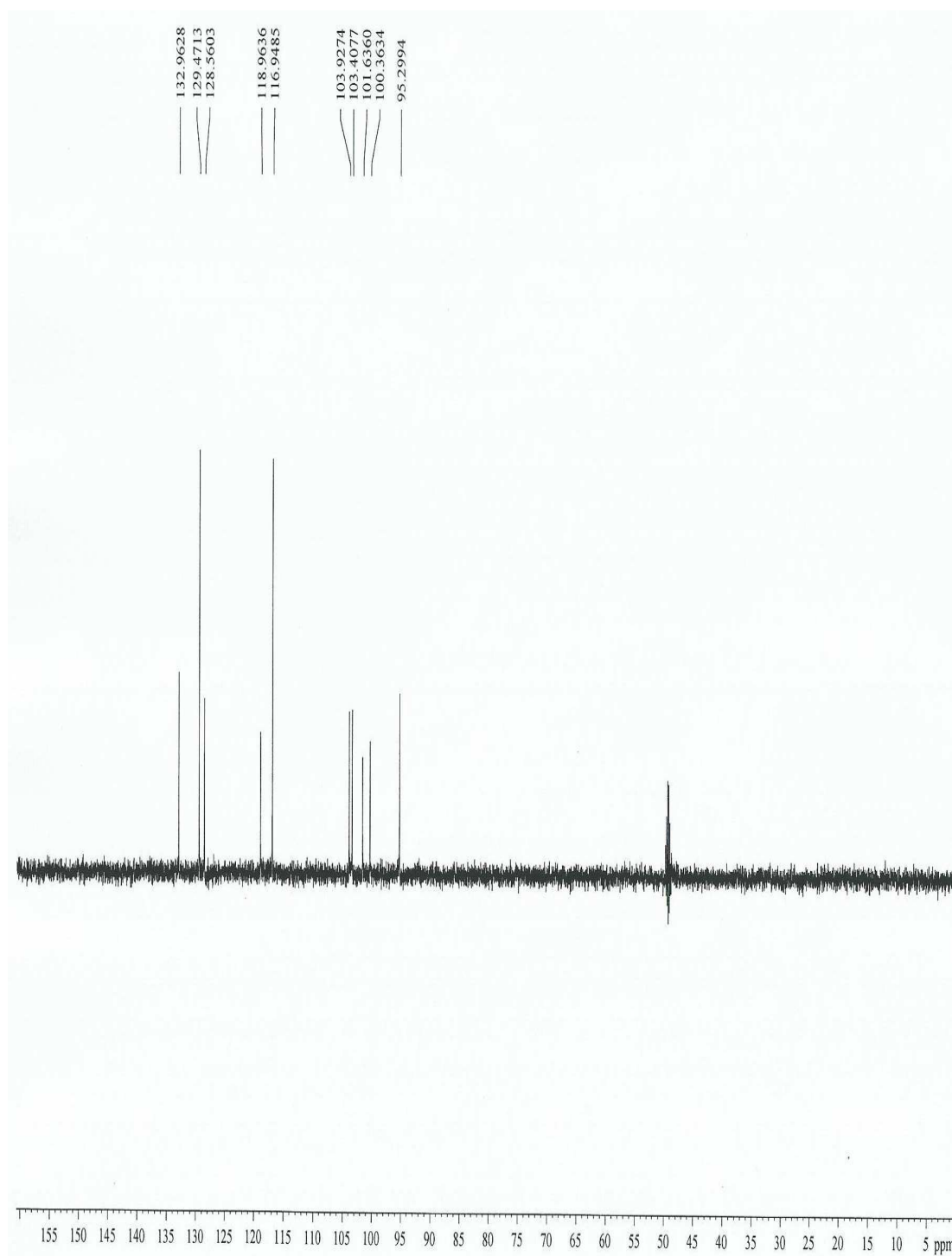


Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz – CD_3OD) de S-10.

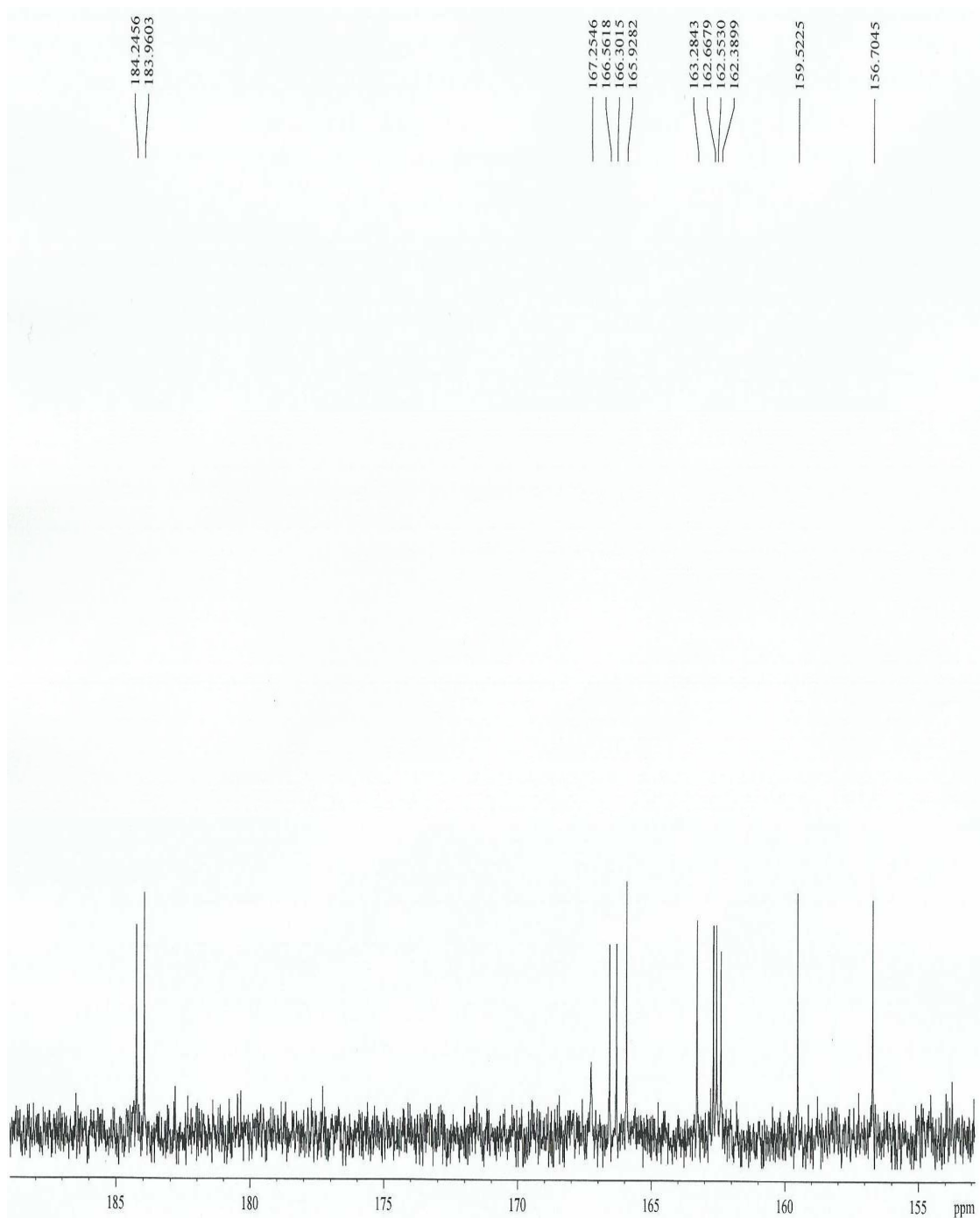


Figura 56: Expansão do espectro de RMN ¹³C (125 MHz – CD₃OD) de S-10.

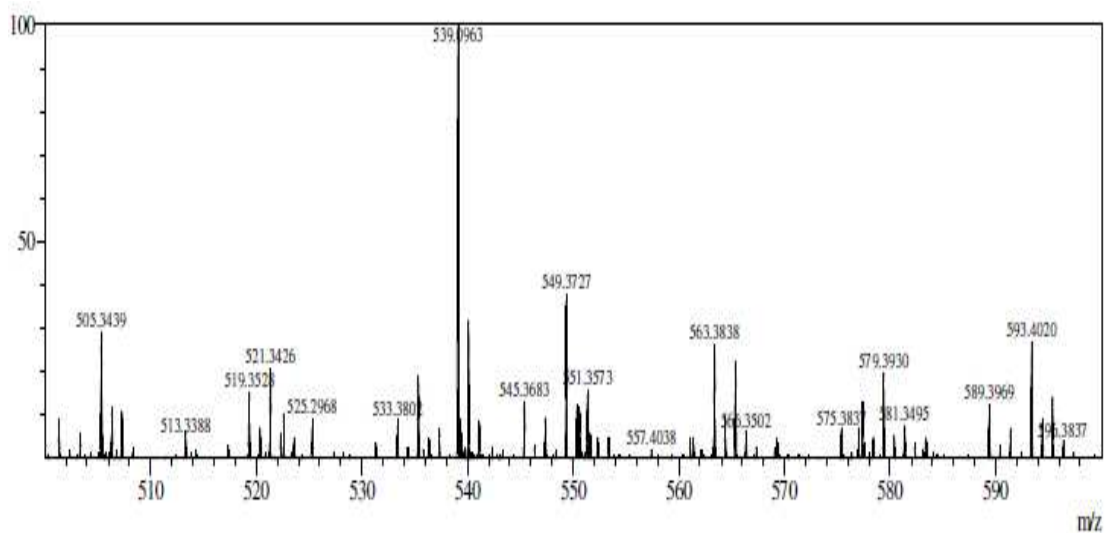


Figura 57: Espectro de massas $[M + H]^+$ de S-10.

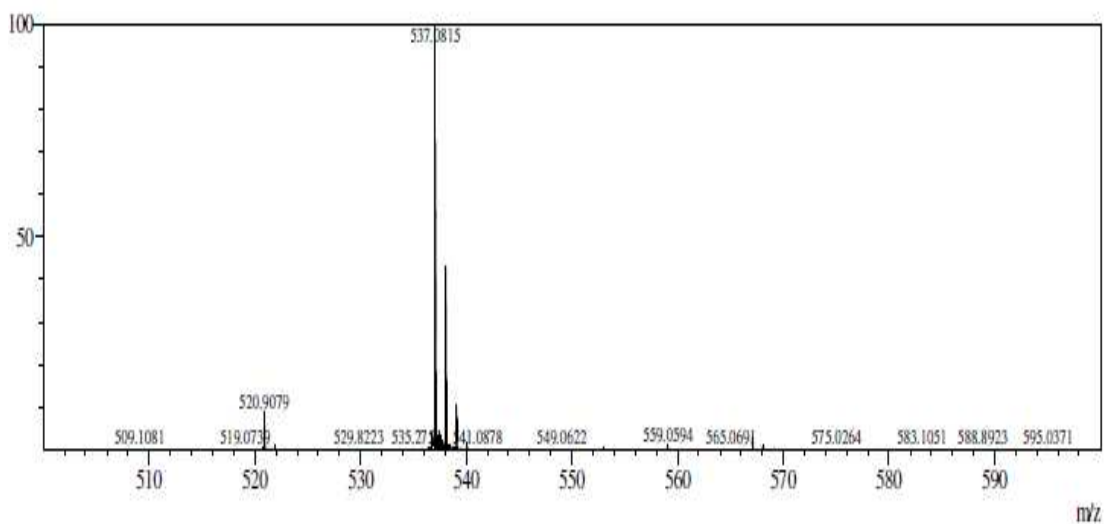


Figura 58: Espectro de massas $[M + H]^-$ de S-10.

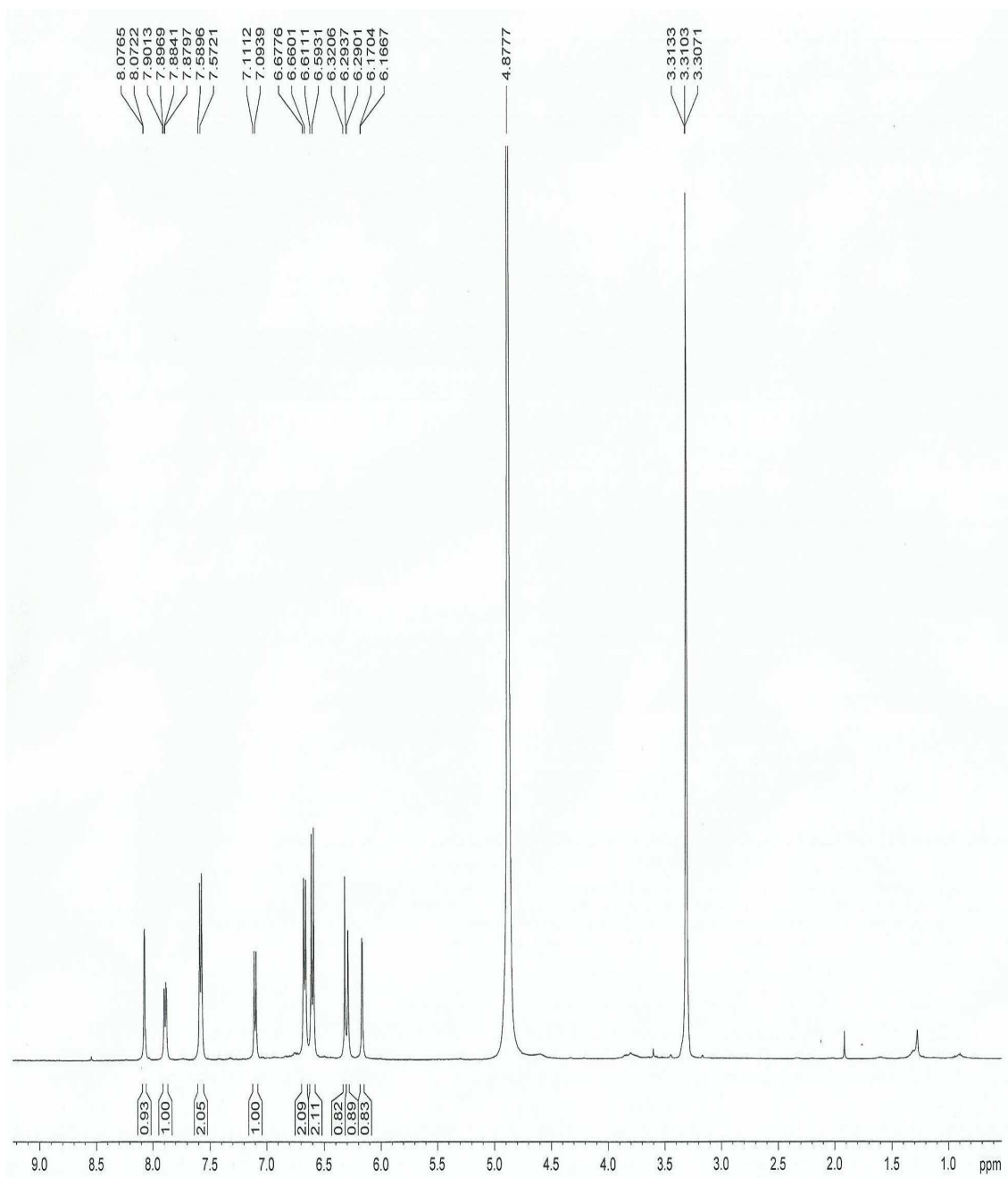


Figura 59: Espectro de RMN ^1H (500 MHz – CD_3OD) de S-10

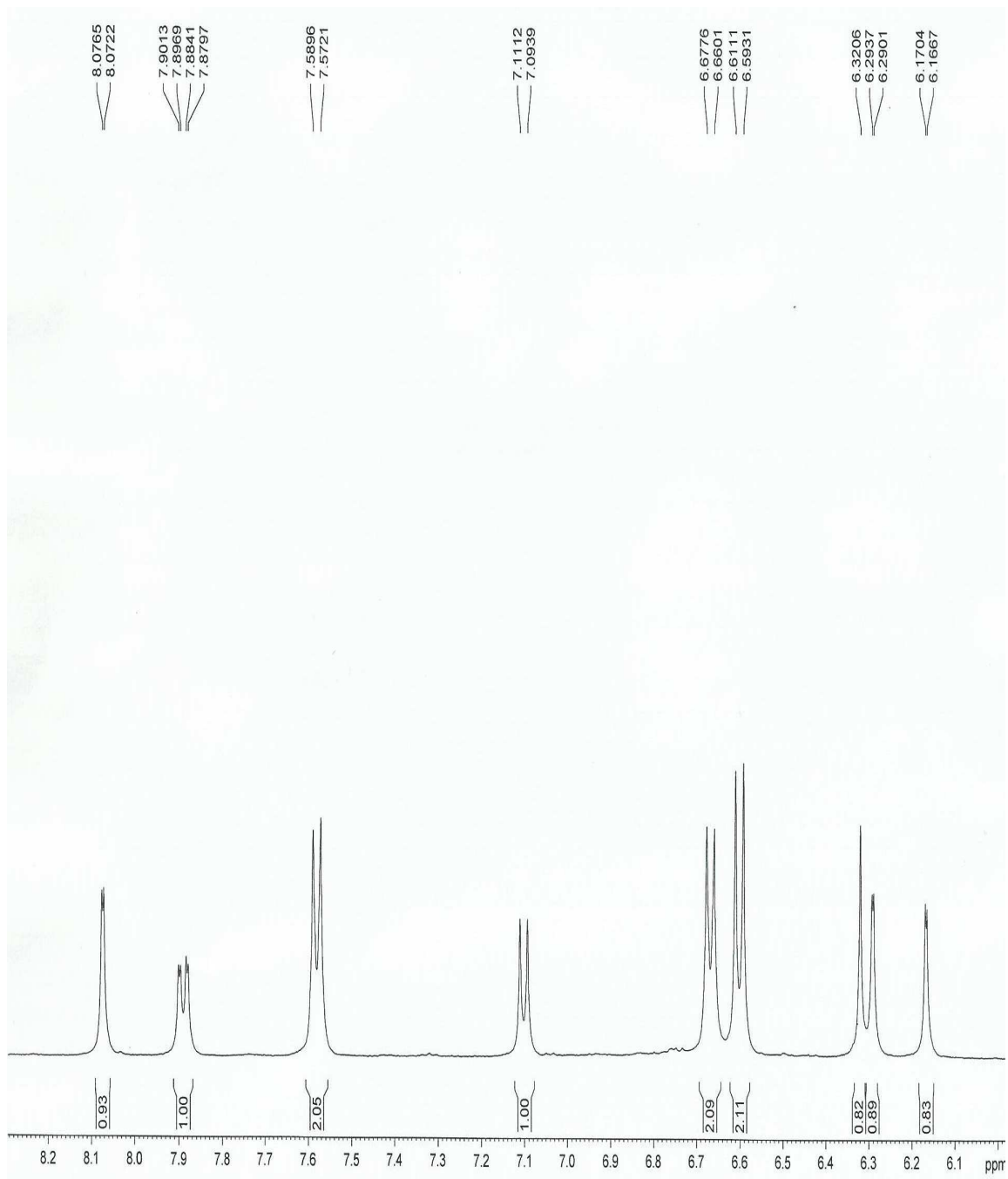


Figura 60: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz – CD_3OD) de S-10.

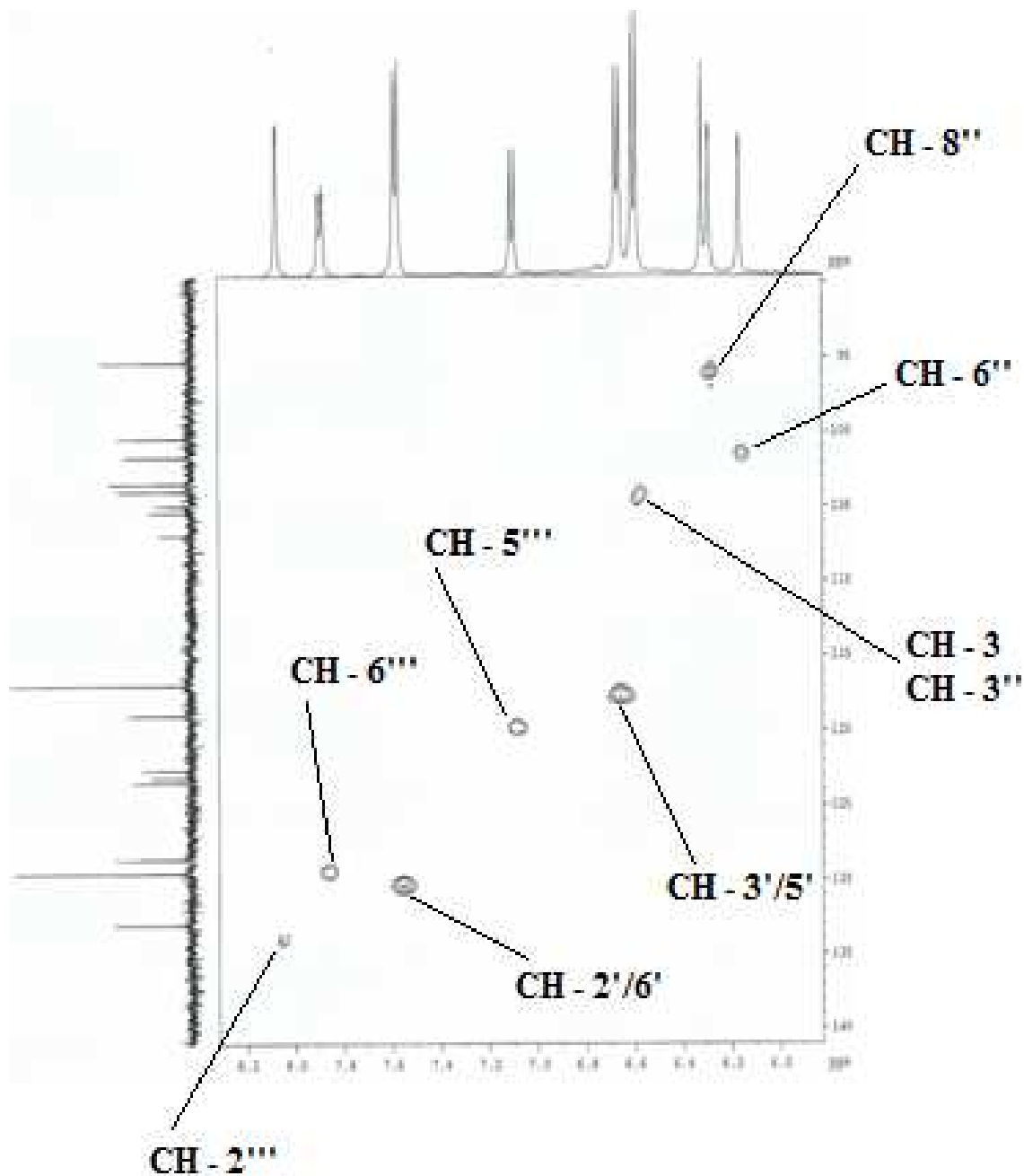


Figura 61: Espectro de RMN bidimensional (HSQC) de S-10.

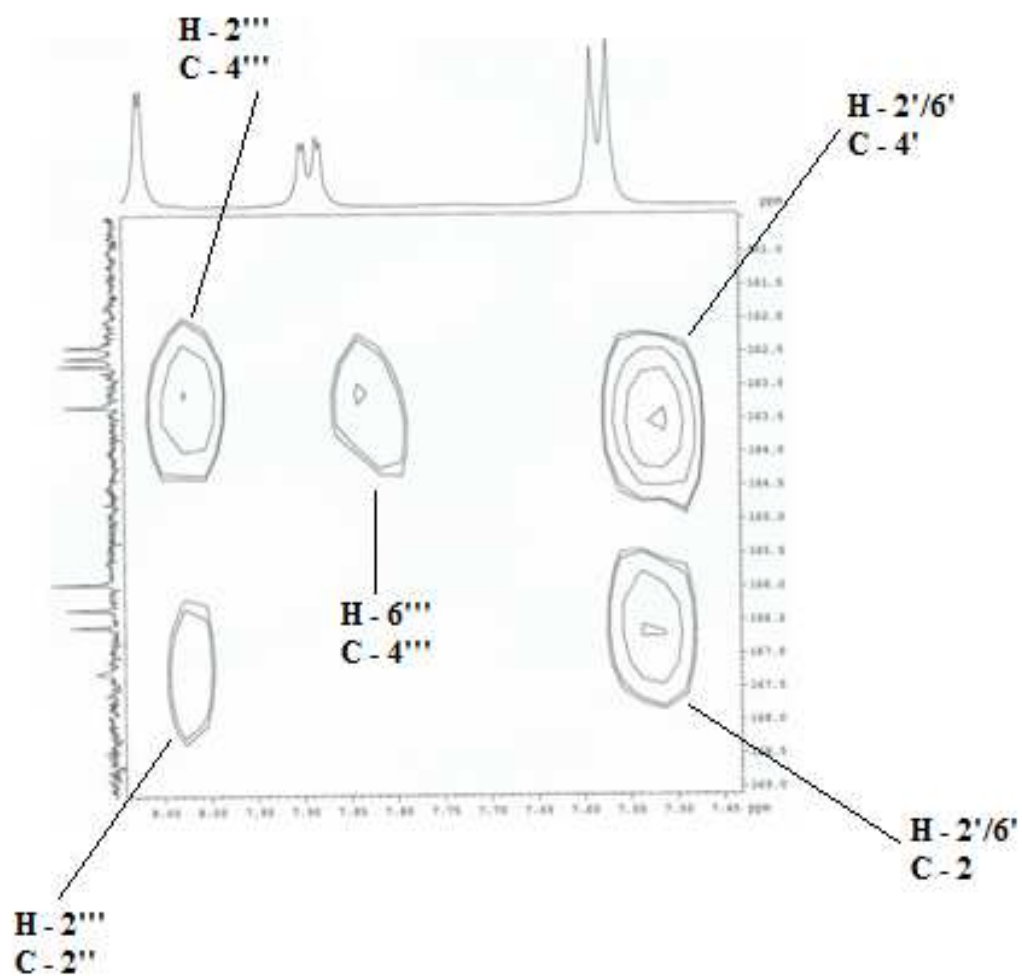


Figura 62: Expansão do espectro de RMN bidimensional (HMBC) de S-10.

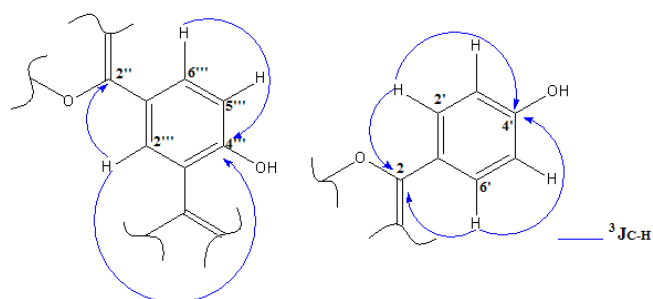


Figura 63: Correlações (HMBC) de S-10.

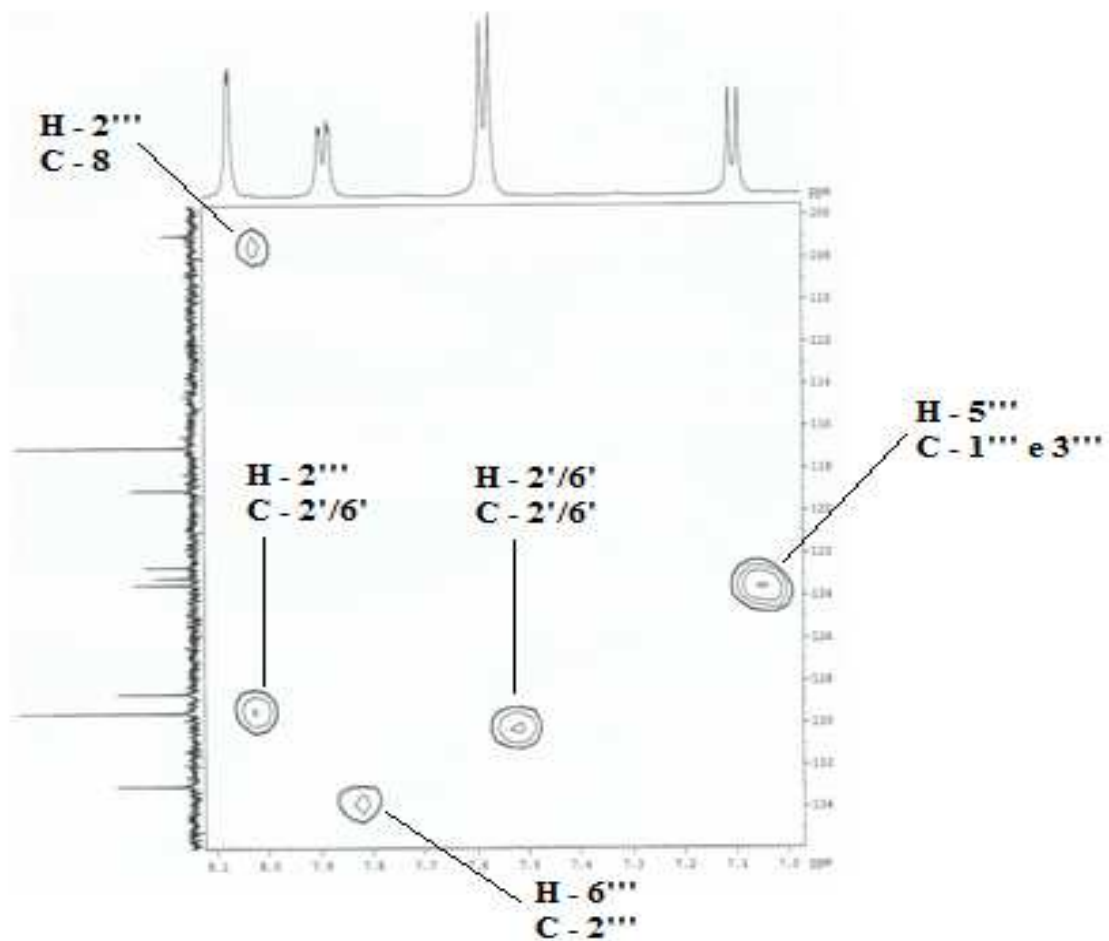


Figura 64: Expansão do espectro de RMN bidimensional (HMBC) de S-10.

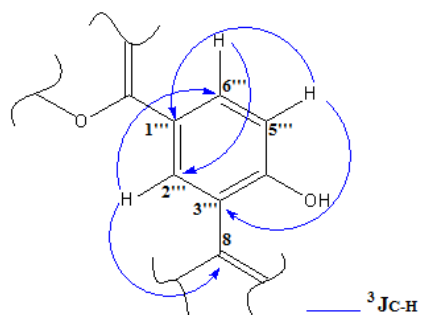


Figura 65: Correlações (HMBC) de S-10.

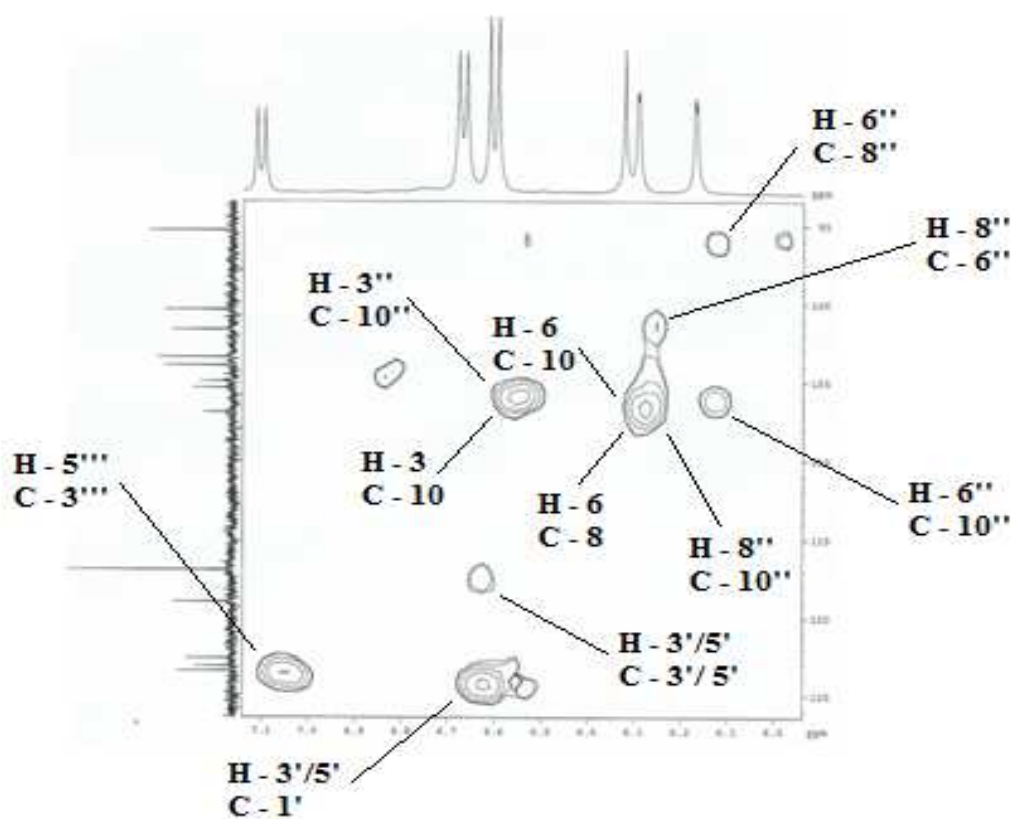


Figura 66: Expansão do espectro de RMN bidimensional (HMBC) de S-10.

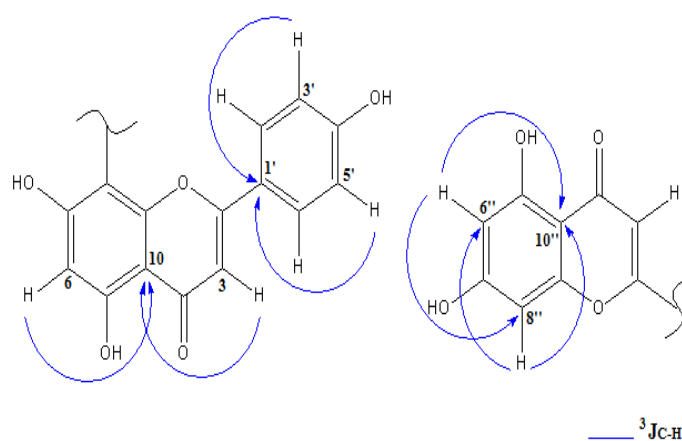


Figura 67: Correlações (HMBC) de S-10.

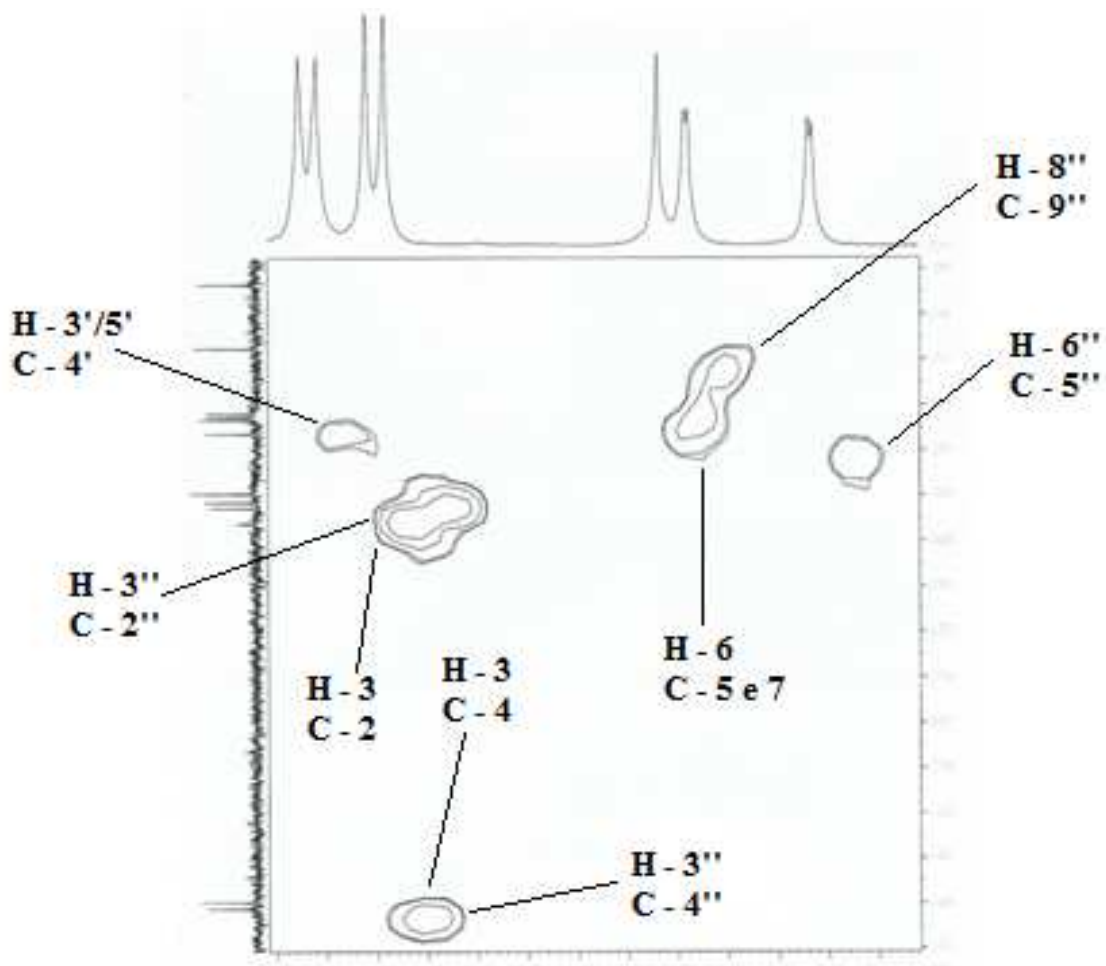


Figura 68: Expansão do espectro de RMN bidimensional (HMBC) de S-10.

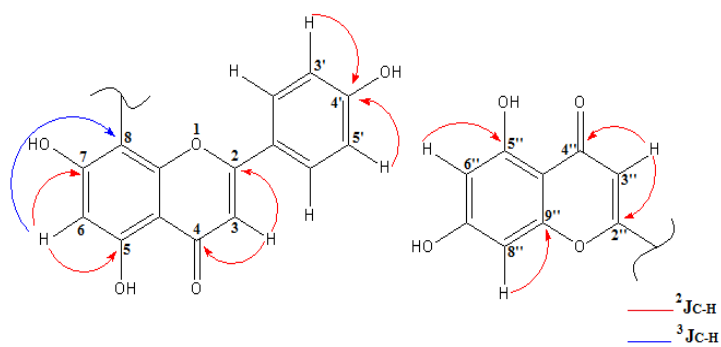


Figura 69: Correlações (HMBC) de S-10.

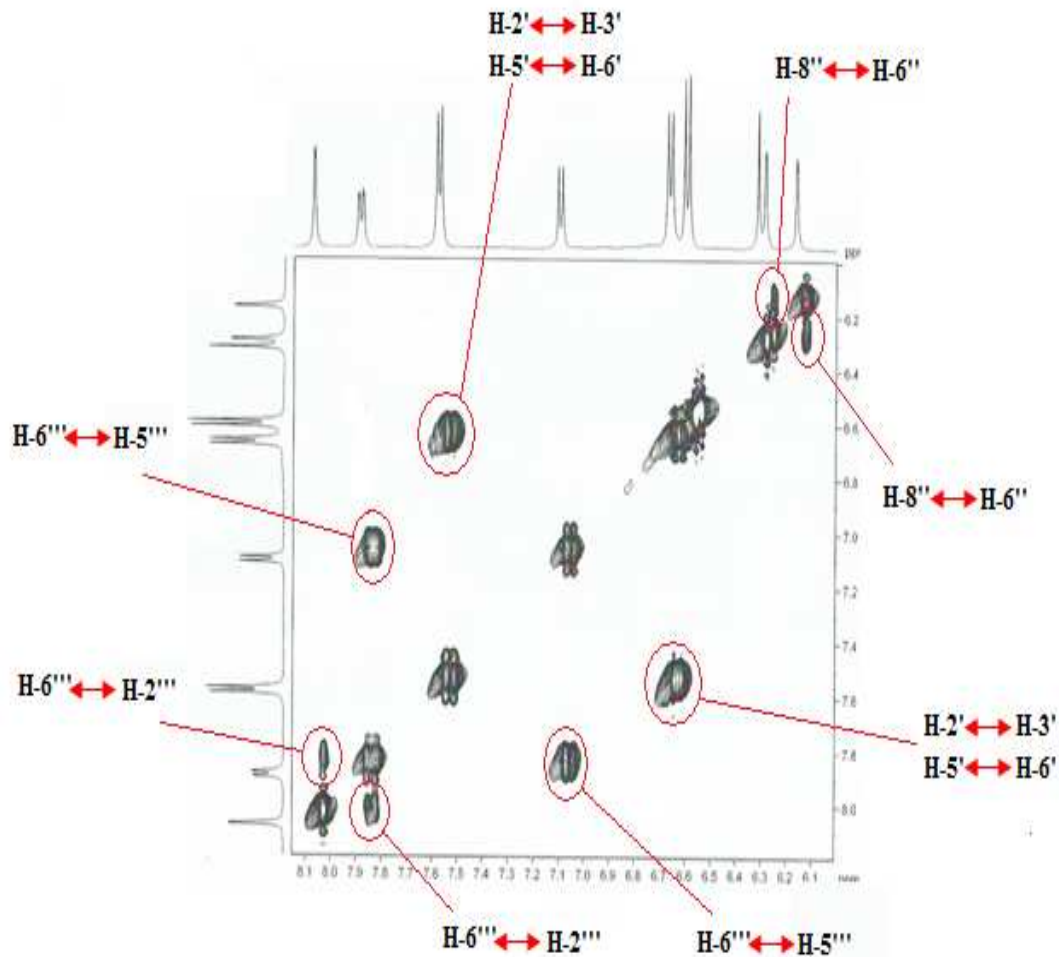


Figura 70: Espectro de RMN bidimensional (COSY) de S-10.

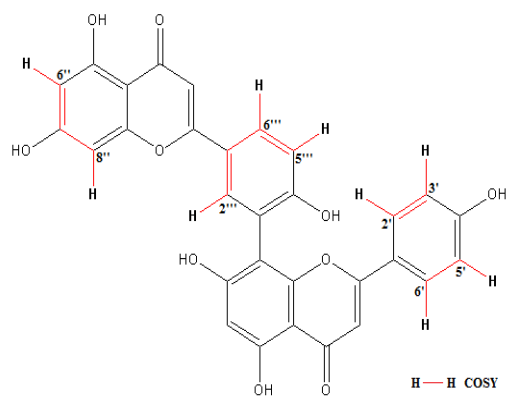


Figura 71: Correlações (COSY) de S-10

Tabela 7 : Dados de RMN ^1H (500 MHz – CD_3OD), ^{13}C (125 MHz - CD_3OD), HMBC E COSY para **S-10**.

		HSQC		S-10 HMBC		BAHIA et al, 2010		
		^1H (δ)	^{13}C (δ)	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$	$^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY	^1H (δ)	^{13}C (δ)
2	C	-	166,56	6,59 (H-3)	δ 7,58 (H-2'); δ 7,58 (H-6')		-	165.5
3	CH	6,59 (s)	103,41				6,56 (s)	102.7
4	C	-	183,96	6,59 (H-3)			-	182.8
5	C-O	-	162,38	6,32 (H-6)			-	162.4
6	CH	6,32 (s)	101,64				6,22 (s)	100.1
7	C-O	-	162,55	6,32 (H-6)			-	164.2
8	C	-	106,91		δ 8,07 (H-2'''); δ 6,32 (H-6)		-	108.5
9	C-O	-	156,70				-	156.6
10	C	-	104,93		δ 6,59 (H-3); δ 6,32 (H-6)		-	103.8
1'	C	-	123,09		δ 6,67 (H-3'); δ 6,67 (H-5')		-	121.9
2'/6'	CH	7,58 (d, 8,7 Hz)	129,46		δ 7,58 (H-6')	H-3'/H-5'	7,66 (d, 8,7 Hz)	129.3
3'/5'	CH	6,67 (d, 8,7 Hz)	116,95		δ 6,67 (H-5')	H-2'/H-6'	6,58 (d, 8,7 Hz)	115.1
4'	C-O	-	163,28	δ 6,67 (H-3'); δ 6,67 (H-5')	δ 7,58 (H-2'); δ 7,58 (H-6')		-	162.0
2''	C	-	167,25	6,61 (H-3'')	δ 8,07 (H-2''')		-	165.6
3''	CH	6,61 (s)	103,93				6,49 (s)	102.9
4''	C	-	184,24	6,61 (H-3'')			-	183.8
5''	C-O	-	165,92	6,17 (H-6'')			-	163.5
6''	CH	6,17 (d, 1,8 Hz)	100,36		δ 6,29 (H-8'')	H-8''	5,99 (d, 2,0 Hz)	99.9
7''	C-O	-	166,30				-	163.5
8''	CH	6,29 (d, 1,8 Hz)	95,29		δ 6,17 (H-6'')	H-6''	6,05 (d, 2,0 Hz)	94.8
9''	C-O	-	159,52	6,29 (H-8'')			-	156.6
10''	C	-	105,37		δ 6,61 (H-3''); δ 6,17 (H-6''); δ 6,29 (H-8'')		-	108.5
1'''	C	-	123,41		δ 7,10 (H-5''')		-	122.2
2'''	CH	8,07 (d, 2,1 Hz)	132,96		δ 7,89 (H-6''')	H-6'''	8,26 (d, 2,3 Hz)	132.3
3'''	C	-	122,59		δ 7,10 (H-5''')		-	123.1
4'''	C-O	-	162,67		δ 8,07 (H-2'''); δ 7,89 (H-6''')		-	161.9
5'''	CH	7,10 (d, 8,6 Hz)	118,97			H-6'''	7,09 (d, 8,7 Hz)	117.4
6'''	CH	7,89 (dd, 8,6; 2,1 Hz)	128,56		δ 8,07 (H-2''')	H-2'''; H-5'''	7,88 (dd, 8,7 e 2,3 Hz)	128.7

 Fórmula Molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$

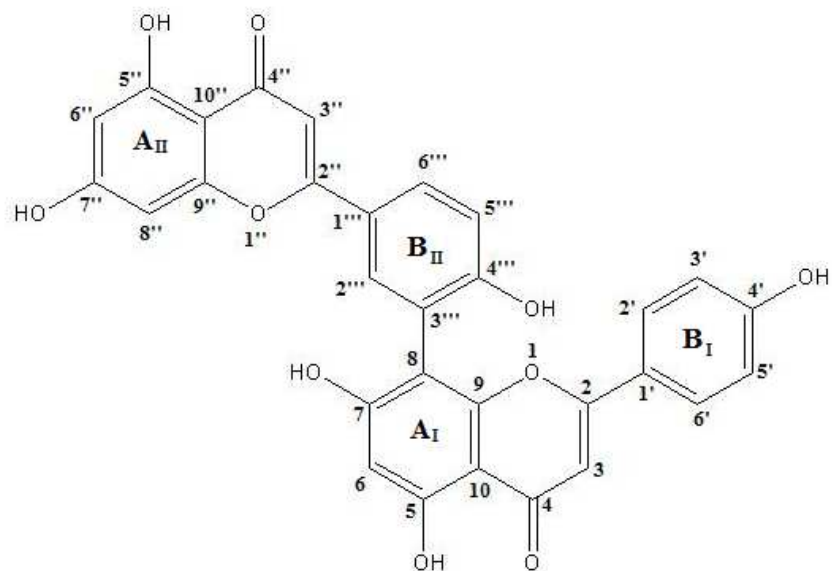


Figura 72: Estrutura de **S-10**. Amentoflavona 8-[5-(5,7-dihidroxi-4-oxo-cromeno-2-il)-2-hidroxi-fenil]-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromeno-4-one.

3.6. Identificação de S-11

A substância **S-11** foi isolada a partir do extrato etanólico do caule de *C. ferrea*, como um sólido cinza, utilizando colunas de Sephadex LH-20 e gel de sílica.

O espectro de IV (Figura 73, pág. 73) de **S-11** apresenta absorções em: 3204 cm^{-1} (banda larga e intensa de deformação axial de grupo O-H); 1584 cm^{-1} , 1509 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} (deformação axial de C = C de anel aromático); 1146 cm^{-1} , 986 cm^{-1} e 963 cm^{-1} (deformação axial de C – O / C – C) e 827 cm^{-1} (deformação angular de Csp² - H).

A análise geral dos dados dos espectros de RMN H⁻¹ (Figuras 74 e 75, págs. 74 e 75) mostra que **S-11** é constituído de dois anéis fenila conectados através de uma ligação dupla (C = C) dissubstituída. A constante de acoplamento ($J = 16,0$ Hz) para os hidrogênios olefínicos [δ_{H} 6,79 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) e 6,95 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)] indica uma configuração *trans* para a ligação dupla. Em adição, os sinais em δ_{H} 6,15 (1H, t, $J = 2,1$ Hz) e δ_{H} 6,44 (2H, d, $J = 2,1$ Hz) indicam que um dos anéis aromáticos é trissubstituído de maneira simétrica, enquanto que os sinais em δ_{H} 6,76 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) e δ_{H} 7,34 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) indicam que o segundo anel é dissubstituído nas posições 1 e 4.

O espectro de RMN ¹³C (Figura 76, pág. 76) registra dez sinais, todos devidos a átomos de carbono sp²: seis sinais de carbonos metínicos e quatro de quaternários; os carbonos quaternários com deslocamentos químicos em δ_{C} 159,80 e δ_{C} 158,51 são oxigenados, sendo que, o sinal em δ_{C} 159,80, devido sua alta intensidade relativa, é atribuído a dois átomos de carbonos equivalentes.

O espectro de HMBC (Figura 77, pág. 77) está em acordo com o padrão de substituição para os anéis aromáticos através das correlações dos hidrogênios H-2/H-6 (δ_{H} 6,44) com os carbonos C-3/C-5 (δ_{C} 159,80) e H-2'/H-6' (δ_{H} 7,34) e H-3'/H-5' (δ_{H} 6,76) com o carbono C-4' (δ_{C} 158,51), (Figura 78, pág. 77).

A Tabela 8 (pág. 78), mostra os deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C que foram confirmados através dos experimentos de DEPT 135° (Figura 79, pág. 79), HSQC (Figura 80, pág. 80), HMBC (Figura 77, pág. 77) e por comparação com dados da literatura (Park e Boo, 2013).

Esses dados são consistentes com a estrutura do *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno (Figura 81, pág. 72) conhecido como resveratrol. Este é o primeiro relato do isolamento de **S-11** a partir de *C. ferrea*.

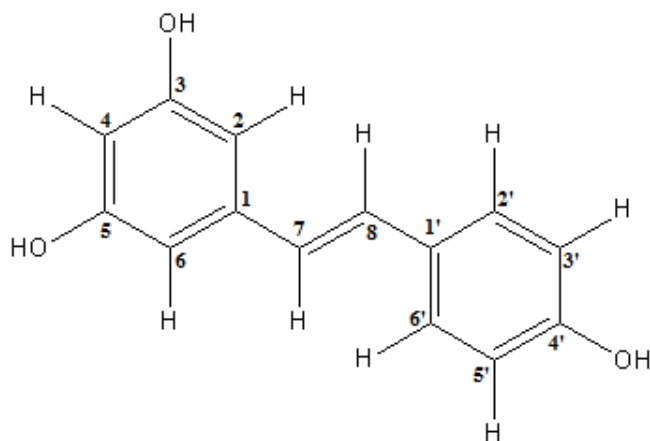


Figura 81: Estrutura de **S-11**. Resveratrol. *Trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno.

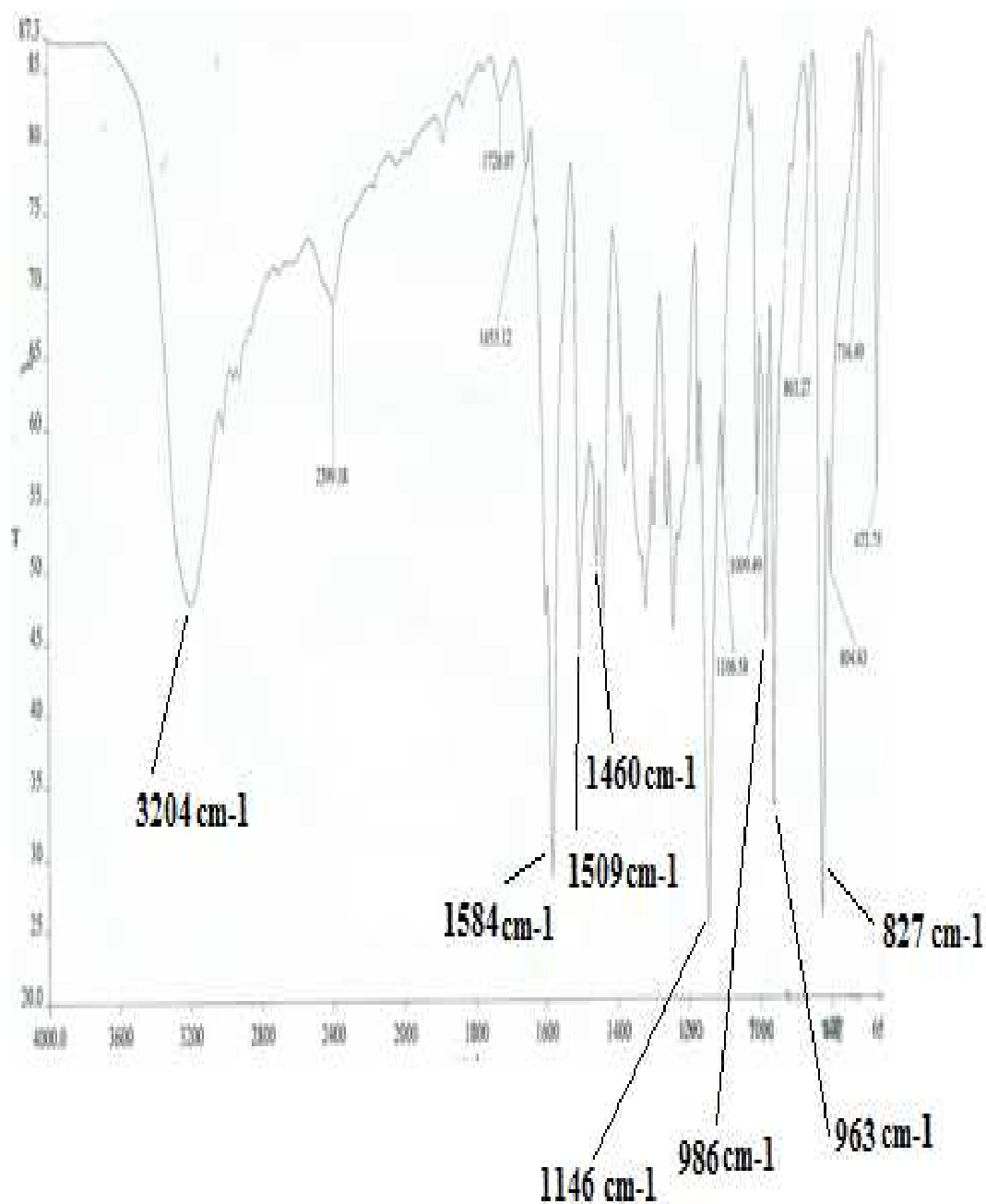


Figura 73: Espectro de absorção na região do infravermelho de S-11.

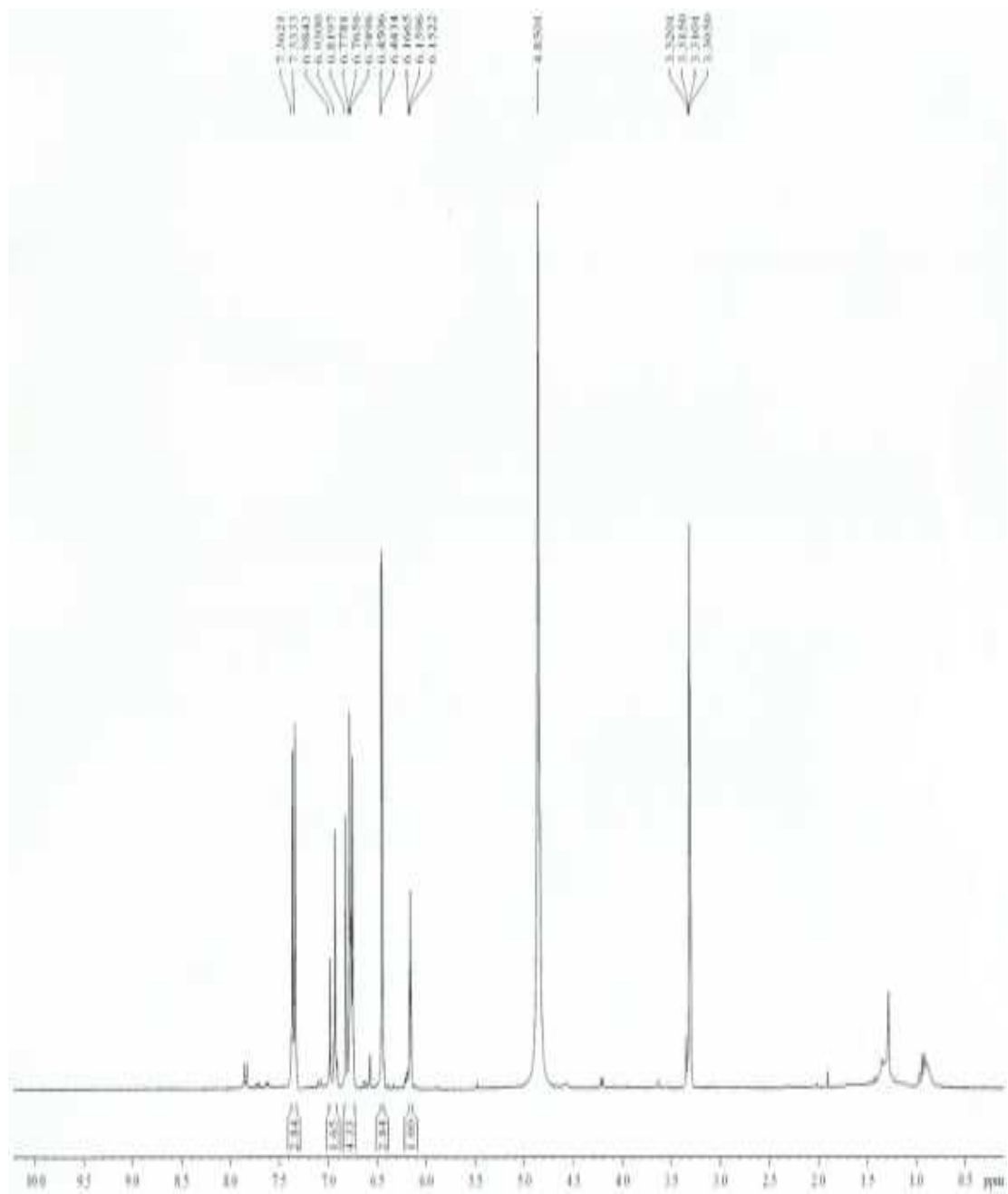


Figura 74: Espectro de RMN ^1H (300 MHz – CD_3OD) de S-11.

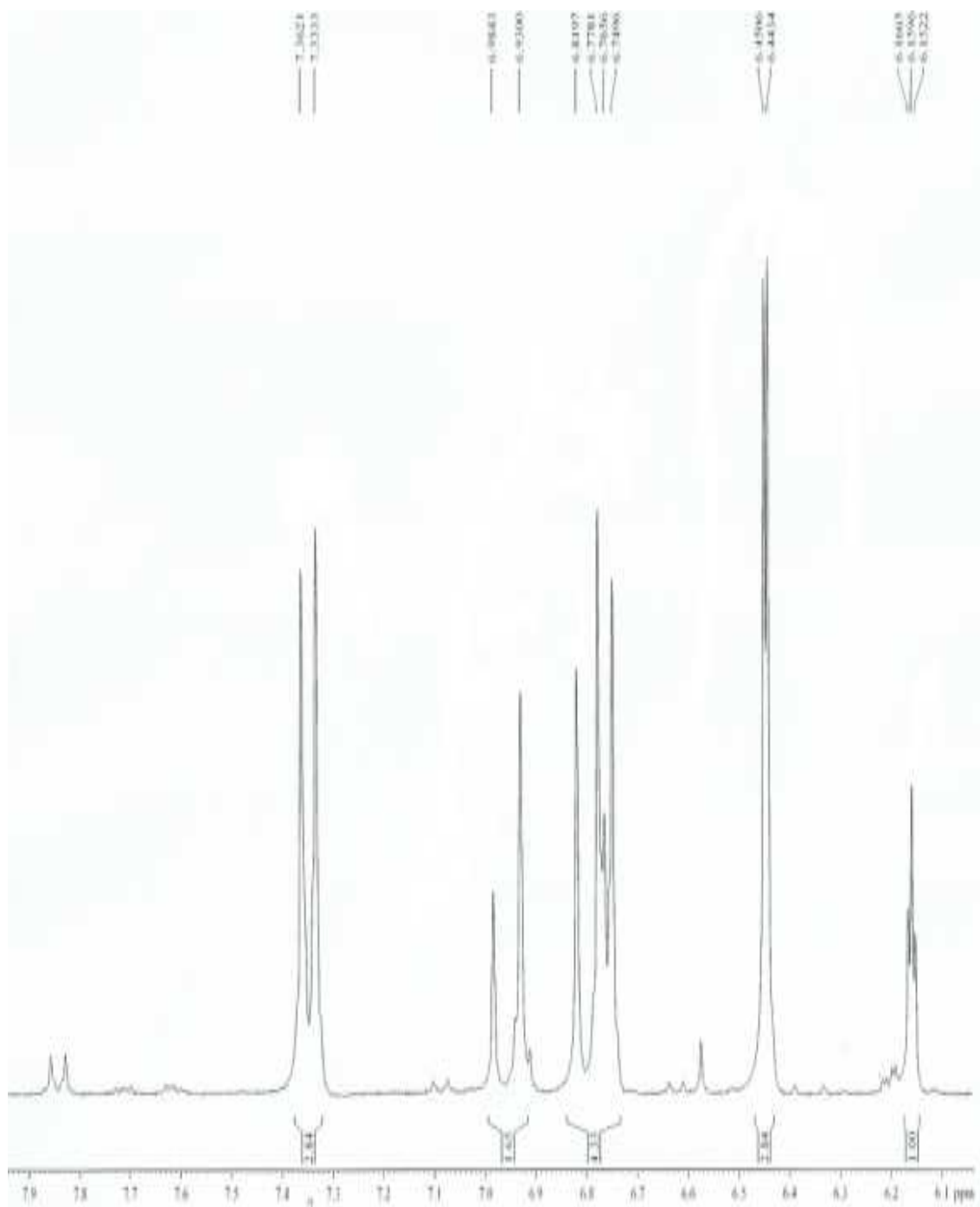


Figura 75: Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz – CD_3OD) de S-11.

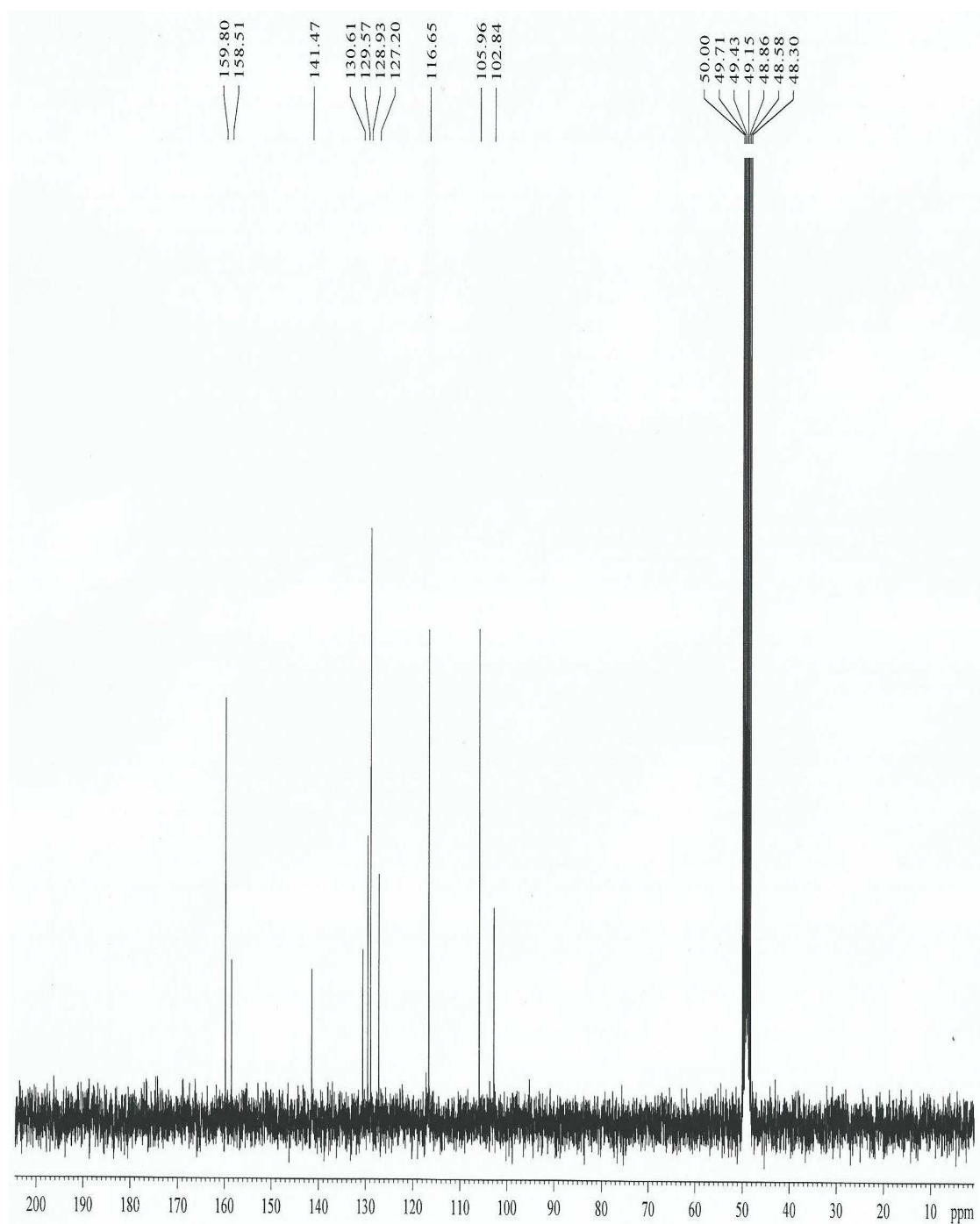


Figura 76: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz – CD_3OD) de S-11.

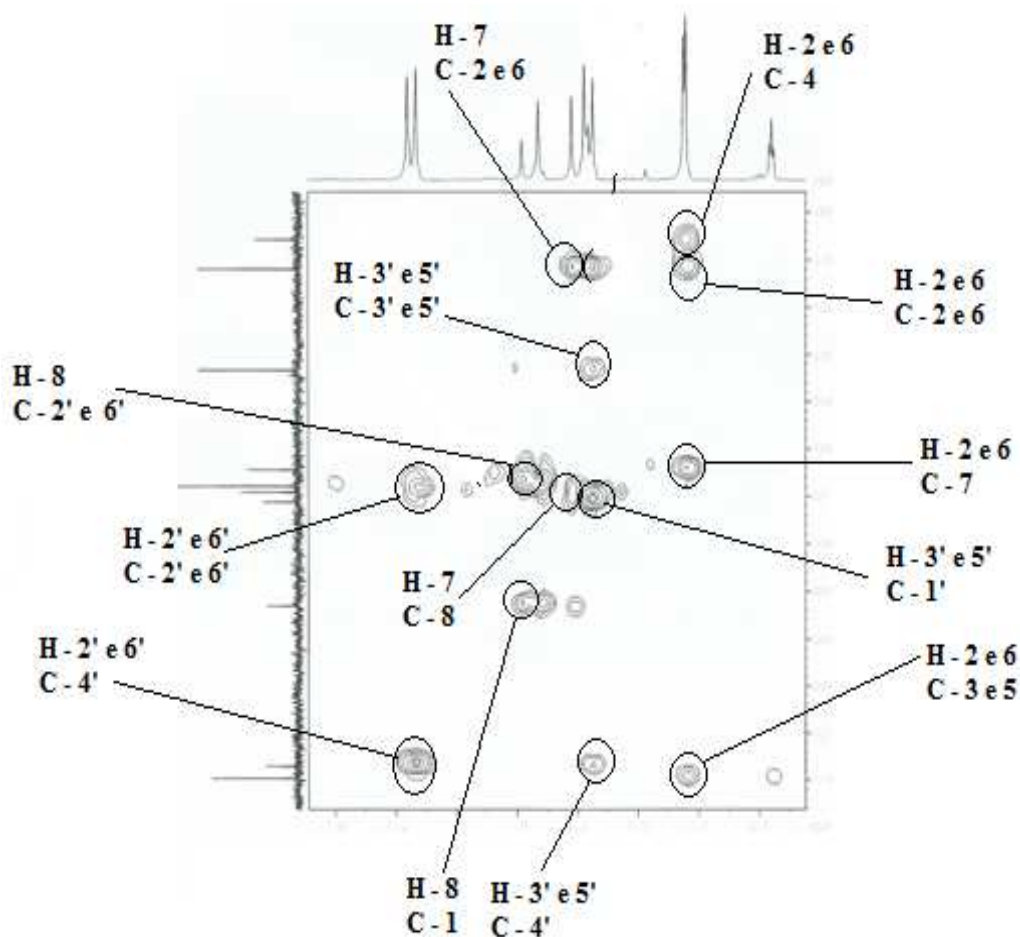


Figura 77: Espectro bidimensional (HMBC) de S-11.

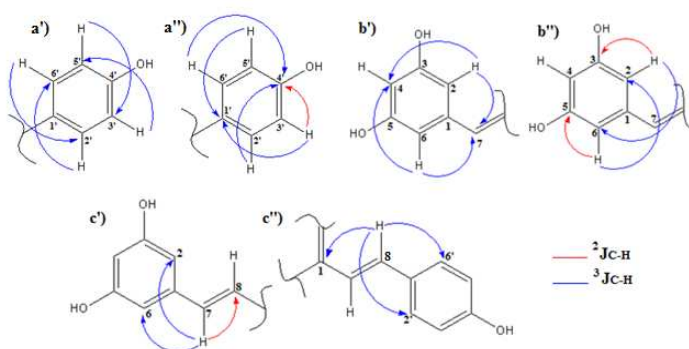


Figura 78: Correlações (HMBC) de S-11.

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H (500 MHz – CD_3OD), ^{13}C (125 MHz - CD_3OD) e HMBC para **S-11**.

		S-11				Park e Boo, 2013*	
		HSQC		HMBC			
		^1H (δ)	^{13}C (δ)	$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	C	-	141,47		δ 6,96 (H-8)	-	140,91
2/6	CH	6,45 (d, 2,2 Hz)	105,96		δ 6,45 (H-6) δ 6,79 (H-7)	6,56 (d, 2,0 Hz)	105,70
3/5	C-O	-	159,80	δ 6,45 (H-2)		-	159,59
4	CH	6,16 (t, 2,0 Hz)	102,84	δ 6,45 (H-2) δ 6,45 (H-6)		6,29 (t, 2,3 Hz)	102,69
7	CH	6,79 (d, 16,2 Hz)	127,20		δ 6,45 (H-2) δ 6,45 (H-6)	6,90 (d, 16,5 Hz)	126,86
8	CH	6,96 (d, 16,0 Hz)	129,56	δ 6,79 (H-7)		7,03 (d, 16,0 Hz)	129,99
1'	C	-	130,61		δ 6,76 (H-3') δ 6,76 (H-5')	-	129,13
2'/6'	CH	7,35 (d, 8,6 Hz)	128,93		δ 6,96 (H-8) δ 7,35 (H-6')	7,43 (d, 8,5 Hz)	128,74
3'/5'	CH	6,76 (d, 8,6 Hz)	116,65			6,85 (d, 9,0 Hz)	116,43
4'	C-O	-	158,51	δ 6,76 (H-3') δ 6,76 (H-5')		-	158,16

Fórmula Molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$

* Referência bibliográfica

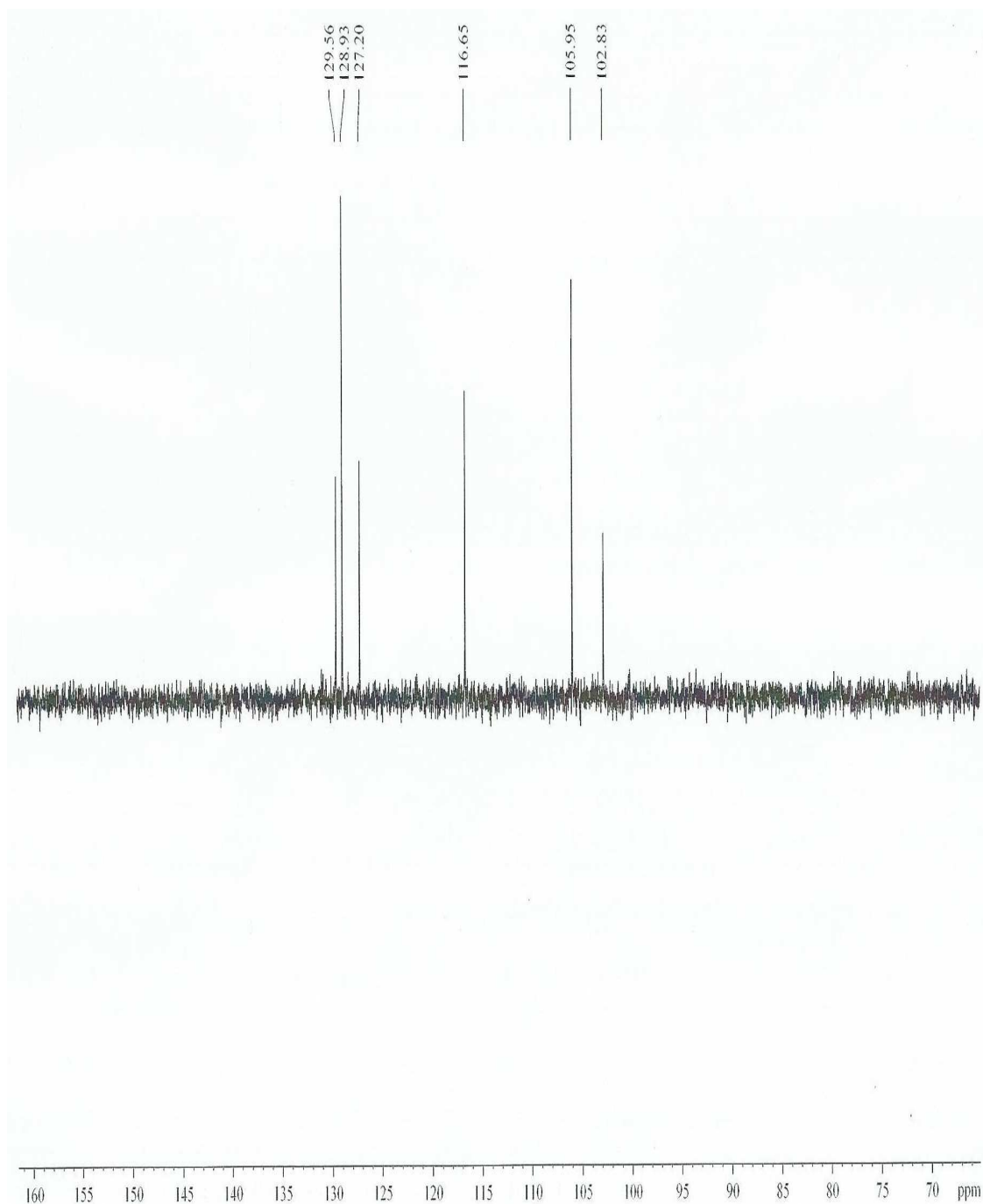


Figura 79: Espectro de RMN ^{13}C DEPT (75 MHz – CD_3OD) de S-11.

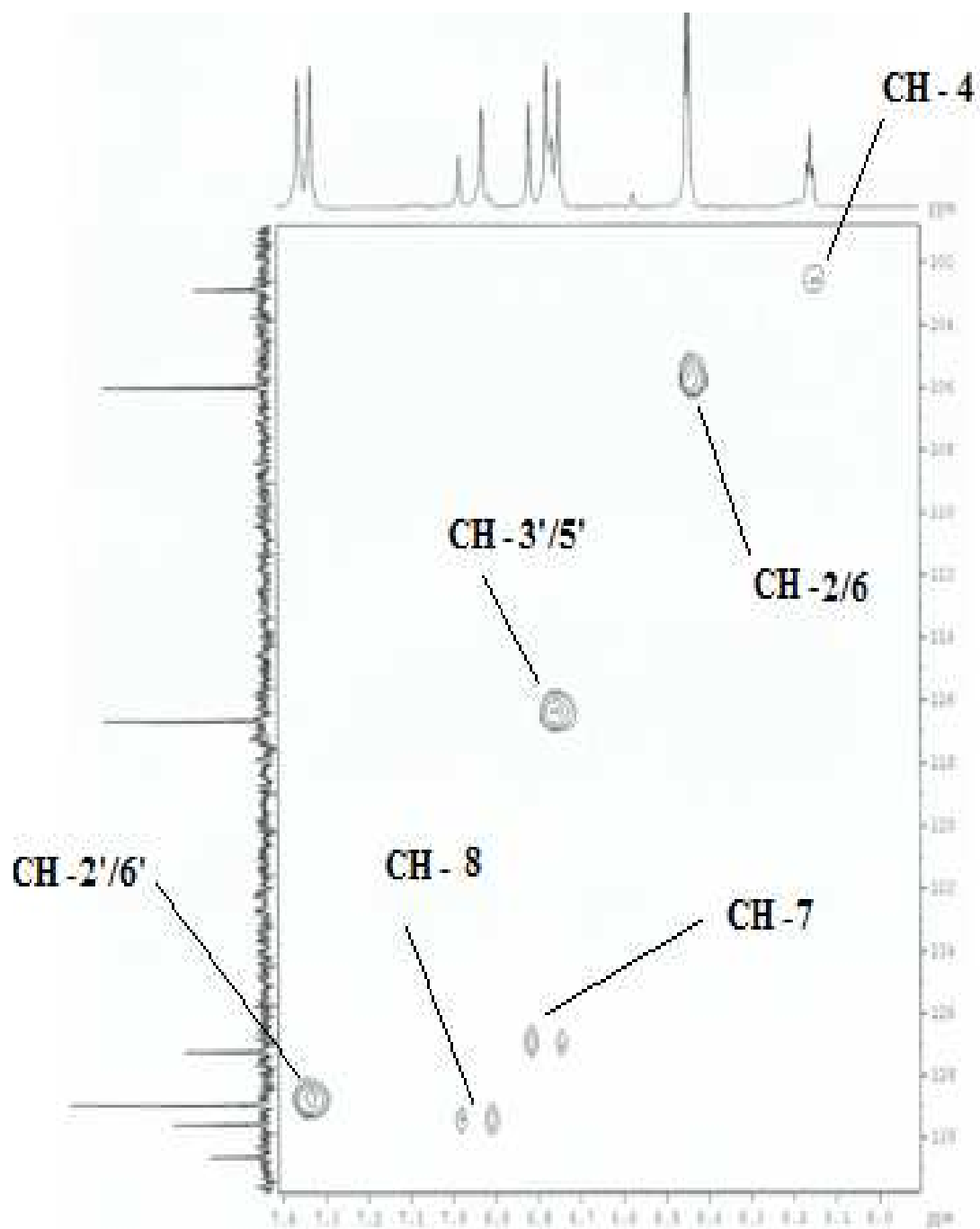


Figura 80: Espectro de RMN bidimensional (HSQC) de S-11.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta do material

O caule e as vagens de *Caesalpinia ferrea* - *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) - foram coletados no município de Acarape - CE, na localidade de Garapa durante a florada entre os meses de maio e junho de 2014, pelo prof. Francisco José Queiroz Monte da Universidade Federal do Ceará. A exsicata referente à coleta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o registro de número 55116.

4.2 Métodos cromatográficos

4.2.1 Cromatografia em coluna aberta Líquido-Sólido (CLS)

A cromatografia em coluna aberta líquido-sólido foi utilizada no fracionamento dos extratos brutos e frações, bem como na separação, purificação e no isolamento de substâncias.

Na cromatografia por adsorção (CLS-A) utilizou-se gel de sílica 60 como fase estacionária e n-hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol, metanol como fase móvel.

Na cromatografia por exclusão molecular (CLS-EM) utilizou-se gel de Sephadex LH-20 (dextrana modificada) como fase estacionária e metanol como fase móvel.

O diâmetro da coluna e a quantidade de fase estacionária e móvel variaram conforme a quantidade de fração. Os solventes orgânicos foram todos da marca SYNTH e VETEC.

4.2.2 Cromatografia planar líquido-sólido

A cromatografia planar líquido-sólido (CCD- cromatografia em camada delgada; gel de sílica 60 F₂₅₄ = 0,2 mm, folhas de alumínio da marca MERCK) foram utilizadas no monitoramento das frações obtidas após os fracionamentos cromatográficos. Como reveladores a radiação ultravioleta no comprimento de onda em 365 nm, solução etanólica de vanilina e vapores de iodo. As frações foram aplicadas nas placas de CCD por meio de tubo capilar a uma altura de 1,0 cm do inferior da placa e em média a uma distância de 0,2 cm uma das outras e eluidas em uma cubeta.

4.2.3 Cromatografia em coluna de média pressão Líquido-Sólido (CLS-*flash*)

Na cromatografia em coluna de média pressão líquido-sólido foi utilizada sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm; 230-400 mesh) da marca MERCK e bomba compressora do fabricante NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda, referência R-60. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram conforme as quantidades de frações e valores do Fator de Retenção (FR) em CCD.

4.2.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

A separação e identificação dos componentes das misturas **M-1** e **M-2** foram realizada em cromatógrafo de fase gasosa da marca SHIMADZU equipado com injetor *split/splitless* e detector de massas com analisador de massas quadrupolo. O injetor operou no modo *Split* à temperatura de 250 °C. Como gás de arraste utilizou-se hélio no fluxo de 0,79 mL/min e como fase estacionária a coluna capilar Rtx – 5MS com dimensões de 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

A temperatura da fonte de íons e da interface foi, respectivamente, de 260 °C e 320 °C. O intervalo da varredura de fragmentos foi de m/z 5,00 a 500,00, operando no modo *Scan*. O programa de temperatura do forno iniciou-se em 0-100 °C em 3 minutos, onde a taxa foi de 15,5 °C por minuto até atingir 310 °C e permaneceu por 10 minutos, totalizando 23,45 minutos de corrida.

4.2.5 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-EM)

Os espectros de massas de alta resolução da substância **S-10** foram obtidos no modo positivo e negativo usando um espectrômetro de massa modelo *LCMS-IT-TOF* (225-07100-34) da SHIMADZU equipado com fonte de ionização por electrospray. O cromatógrafo operou no modo isocrático: MeOH:H₂O 10% (0,1% ÁC. FÓRMICO) e o intervalo da varredura de fragmentos foi de m/z 500-600. O equipamento encontra-se no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste pertencente à Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC).

4.3 Métodos físicos de análise orgânica

4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho, obtidos numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , foram registrados em espectrômetro PERKIN-ELMER, modelo SPECTRUM 100 FT-IR usando o aparelho UATR ambos pertencentes à central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono 13 (RMN ^{13}C), unidimensionais e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros BRUKER, modelo ADVANCE DRX-500, operando nas frequências de 300 e 500 MHz para o hidrogênio e de 75 e 125 MHz para o carbono 13, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará.

Os solventes, deuterados, utilizados para obtenção dos espectros foram clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) comercializados pela empresa ACROS, CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, MERCK E ALDRICH.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados pelos picos dos hidrogênios das moléculas residuais não deuteradas nos solventes CDCl_3 (δ_{H} 7,25), CD_3OD (δ_{H} 4,84 e 3,30), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (δ_{H} 2,49) nos espectros de RMN ^1H e pelos picos centrais dos carbonos 13 nos solventes CDCl_3 (δ_{C} 77,0), CD_3OD (δ_{C} 49,0), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (δ_{H} 39,5) nos espectros de RMN ^{13}C (PAVIA *et al.*, 2001).

A multiplicidade dos sinais, nos espectros de RMN ^1H , foi indicada segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo de dubleto), t (triplete), td (triplete de dubleto), q (quarteto), m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado utilizando-se a técnica DEPT 135° (CH e CH_3 com amplitudes em oposição do CH_2) e foi descrito segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico), CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados através da subtração dos sinais nos espectros RMN ^{13}C - DEPT 135° e RMN ^{13}C .

Os experimentos bidimensionais de correlação heteronuclear (HSQC e HMBC) foram realizados em aparelho BRUCKER AVANCE DRX-500 e DRX-300.

4.3.3 Espectrofotometria de Ultravioleta (UV)

As medidas de absorvância, em triplicata, foram realizadas na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV-VIS VARIAN Cary calibrado com metanol.

4.4. Estudo fitoquímico de *Caesalpinia ferrea*.

4.4.1 Obtenção do extrato hexânico e etanólico das vagens (EHV-CF/ EEV-CF) e caule (EHC-CF/ EEC-CF) de *Caesalpinia ferrea*.

As vagens, com sementes, secas e trituradas (530 g) foram extraídas com hexano (2 L) por três dias em mariote com agitação ocasional. O extrativo obtido foi filtrado utilizando-se algodão e as menores partículas foram retidas em filtração a vácuo. O solvente foi rotaevaporado em pressão reduzida e reutilizado no mesmo material inicial por mais duas vezes obtendo-se um extrato com 1,481 g, identificado por EHV-CF. A torta resultante foi extraída com etanol (2 L) utilizando-se do mesmo procedimento anteriormente descrito e obteve-se um extrato com 121,15 g, identificado por EEV-CF (Figura 82, pág. 89).

4,410 kg do caule, triturados, foram extraídos com n-hexano (18 L) por três dias em mariote com agitação ocasional. O extrativo obtido foi filtrado utilizando-se papel de filtro.

O solvente foi rotaevaporado em pressão reduzida e reutilizado no mesmo material inicial por mais uma vez obtendo-se um extrato com 21,34 g, identificado por EHC-CF. A torta resultante foi extraída com etanol (18 L) utilizando-se do mesmo procedimento anteriormente descrito e obteve-se um extrato com 66,81 g, identificado por EEC-CF (Figura 83, pág. 90).

4.4.2 Fracionamento cromatográfico do EHV-CF e obtenção das misturas M-1 e M-2

M-1

1,481g do EHV-CF foram submetidos à cromatografia por adsorção, chamada de **CLS-A 1**, utilizando-se os eluentes hexano 100%, diclorometano 100%, acetato de etila 100% e metanol 100% obtendo-se 4 frações.

A fração diclorometano 100% (875,8 mg), proveniente da CLS-A 1, foi submetida à cromatografia por adsorção, chamada **CLS-A 2**, utilizando-se os eluentes hexano 100%, hexano:diclorometano 50%, diclorometano 100%, acetato de etila 100% e metanol 100% obtendo-se 97 frações que foram reunidas conforme o Fator de Retenção (FR) obtido na cromatografia líquida em camada delgada (CCD).

As frações 40-51 (192,6 mg), proveniente da CLS-A 2, foram submetidas à cromatografia por adsorção, chamada **CLS-A 4**, utilizando-se os eluentes hexano 100%, hexano:diclorometano 10%, 30%, 50%, 70%, diclorometano 100%, diclorometano:acetato de etila 30%, 60%, acetato de etila 100% e metanol 100% obtendo-se 120 frações que foram reunidas conforme FR obtidos na CCD.

As frações 54-59 (14,5 mg), proveniente da CLS-A 4, apresentaram-se como uma resina branca que foi denominada de **M-1** (Figura 82, pág. 89).

M-2

As frações 34-39 (28,5 mg), proveniente da **CLS-A 2**, foram submetidas à cromatografia por adsorção, chamada **CLS-A 3**, utilizando-se os eluentes hexano 100%, hexano:diclorometano 30%, 60%, 90%, diclorometano 100%, diclorometano:acetato de etila 50%, acetato de etila 100% e metanol 100% obtendo-se 54 frações que foram reunidas conforme FR obtido em CCD.

As frações 9-13 (17,50 mg), proveniente da CLS-A 3, foram submetidas à cromatografia por adsorção, chamada **CLS-A 5**, utilizando-se os eluentes hexano 100%, hexano:diclorometano 20%, 40%, 60%, 80%, diclorometano 100% e acetato de etila 100% obtendo-se 80 frações que foram reunidas conforme FR obtido em CCD .

As frações 50-53 (5,30 mg), proveniente da CLS-A 5, apresentaram-se como uma resina branca que foi denominada de **M-2** (Figura 82, pág. 89).

4.4.3 Fracionamento cromatográfico das frações do EEV-CF e obtenção das substâncias S-8 e S-9

O EEV-CF foi submetido a uma extração líquido-líquido onde foram dissolvidos 70,51g do extrato bruto em uma solução água:metanol 70% e então extraídos com hexano (n-Hex; 3x50 ml), diclorometano (DCM; 4x50 ml), acetato de etila (AcOEt; 4x50 ml) e n-butanol (n-BuOH; 3x50 ml) .Todas as frações obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente rotaevaporado em pressão reduzida (Figura 82, pág. 89).

4.4.3.1 Obtenção da substância S-8

500,06 mg da fração AcOEt foram submetidos à cromatografia por exclusão molecular, chamada **CLS-EM 1**, utilizando-se o eluente metanol obtendo-se 127 frações que foram reunidas conforme FR obtido em CCD . As sub-frações 23-25 (24,5 mg), apresentaram-se como um sólido em forma de agulhas na cor laranja que foi denominada de **S-8** (Figura 82, pág. 89).

4.4.3.2 Obtenção da substância S-9

200,06 mg da fração n-Hex foram submetidas à cromatografia por adsorção, chamada **CLS-flash 1**, utilizando-se os eluentes hexano : acetato de etila 50%, acetato de etila 100%, acetona 100% obtendo-se 3 frações. A fração acetona 100% (12,05 mg) apresentou-se como um sólido amorfo na cor amarelo que foi denominada de **S-9** (Figura 82, pág. 89).

4.4.4 Fracionamento cromatográfico das frações do EEC-CF e obtenção das substâncias S-10 e S-11.

O EEC-CF foi submetido a uma extração líquido-líquido onde foram dissolvidos 32,57 g do extrato bruto em uma solução água:metanol 70% e então extraídos com n-hexano (n-Hex; 5x50 ml) e diclorometano (DCM; 5x50 ml). As frações obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente rotaevaporado em pressão reduzida (Figura 83, pág. 90).

4.4.4.1 Obtenção da substância S-10

2,00 g da fração diclorometano foram submetidos à cromatografia por exclusão molecular (sephadex LH-20), chamada **CLS-EM 2**, utilizando-se o eluente metanol e obtendo-se 5 frações.

A fração 4 (64,4 mg), proveniente da CLS-EM 2, foi submetida à cromatografia por exclusão molecular (sephadex LH-20), chamada **CLS-EM 3**, obtendo-se 21 frações que foram reunidas conforme FR obtido em CCD. As sub-frações 18-21 (25,0 mg) foram submetidas à cromatografia por adsorção (sílica gel), chamada **CLS-grav.1**, utilizando-se os eluentes hexano:diclorometano 80%; diclorometano 100%; diclorometano: acetato de etila 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e acetato de etila 100% obtendo-se 17 frações que foram reunidas conforme FR obtido em CCD. As sub-frações 14-17 (20 mg), apresentou-se como um sólido branco que foi denominado de **S-10** (Figura 83, pág. 90).

4.4.4.2 Obtenção da substância S-11

A fração 2 (144,0 mg), proveniente da CLS-EM 2, foi submetida à cromatografia por exclusão molecular (sephadex LH-20) chamada **CLS-EM 4**, obtendo-se 24 frações que foram reunidas conforme FR obtido em CCD. As sub-frações 22-24 (15,0 mg) apresentaram-se como um sólido amarelo que foi denominado de **S-11**(Figura 83, pág. 90).

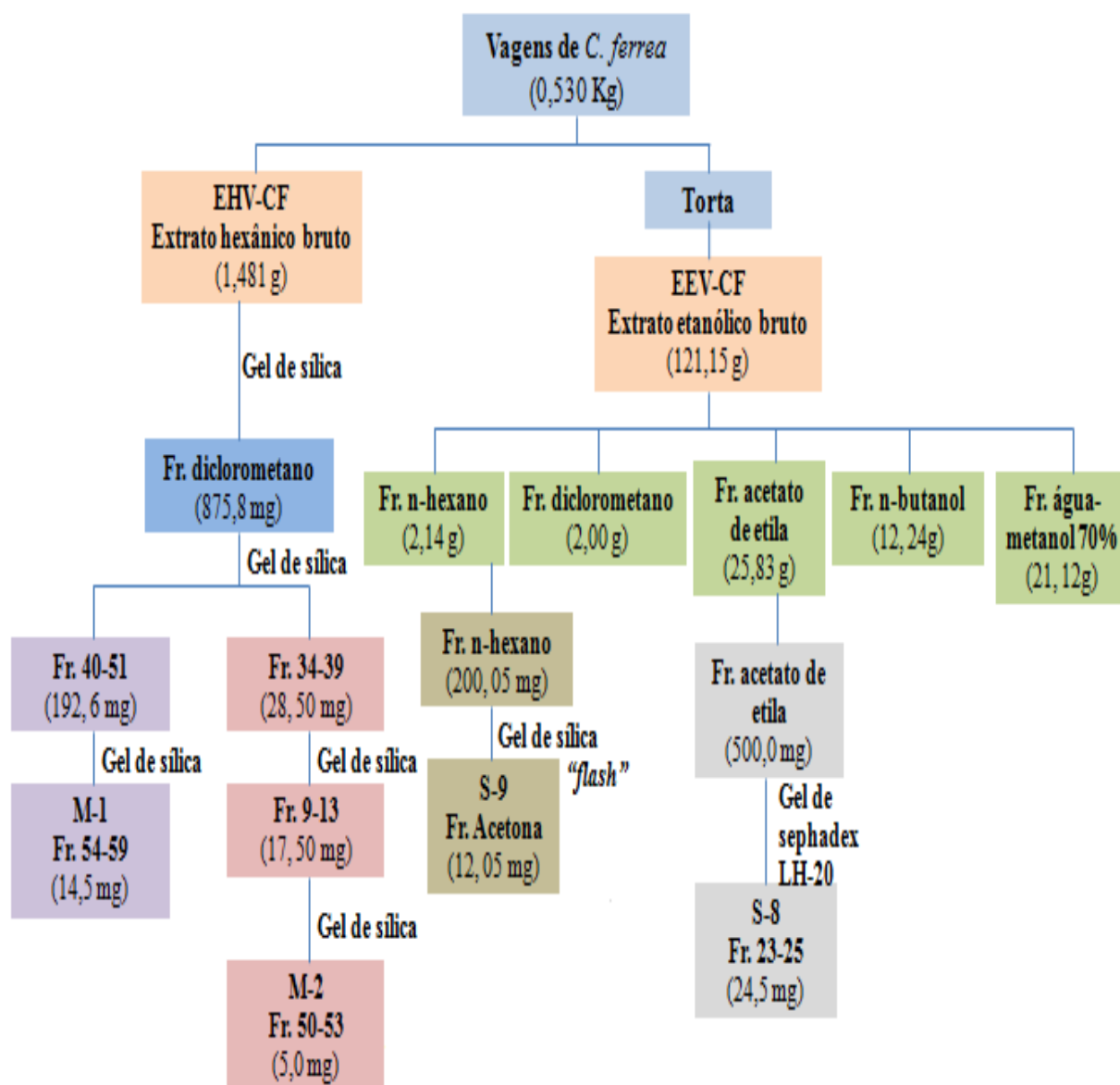


Figura 82: Fluxograma de obtenção de M-1, M-2, S-8 e S-9.

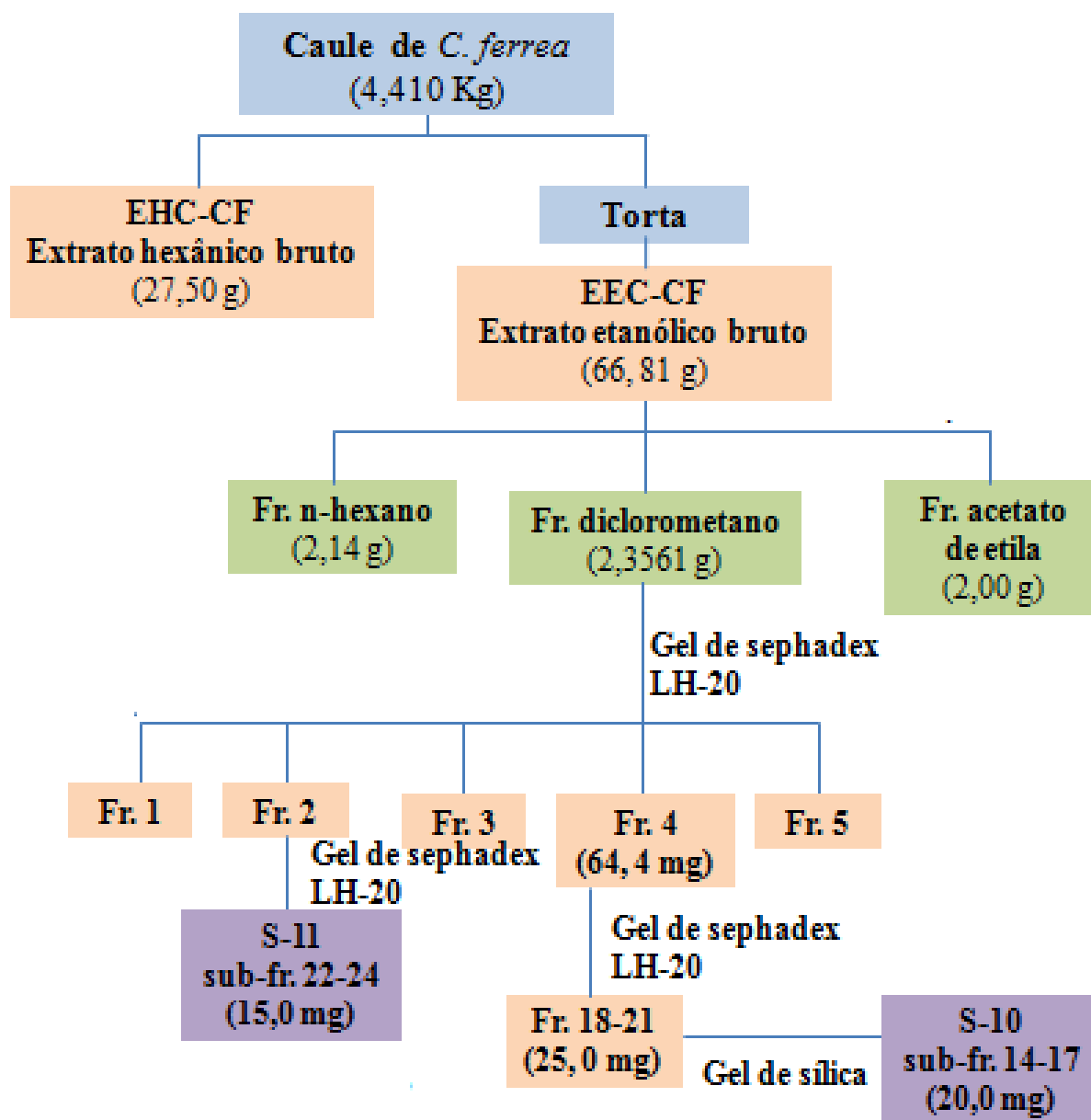


Figura 83: Fluxograma de obtenção de S-10 e S-11.

4.5 ESTUDOS *in vitro*

4.5.1 Teste de atividade antioxidante

Definição

A atividade antioxidante, por definição, é a capacidade que um composto tem de inibir a degradação oxidativa (ROGINSKY e LISSI, 2005). Ela pode ser avaliada através dos métodos ORAC- Oxygen Radical Absorbance Capacity (CAO *et al*, 1993); Autoxidação do Sistema β -caroteno/ácido linoléico (OLDONI, 2007); FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power (HUKKANEN, 2006); ABTS - 2,2'-azinobis-(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid (RE *et al*, 1999) e dentre esses podemos comentar o método doador de íon hidrogênio ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH; figura 93, pág. 101). Nesse método os radicais de DPPH, em solução metanólica, absorvem a 517 nm na região do ultravioleta. Na presença de substâncias antioxidantes ocorre uma mudança progressiva na cor da solução, de roxo para amarelo, sendo assim possível a quantificação dos radicais de DPPH remanescentes.

Experimento

A metodologia utilizada na avaliação da atividade antioxidante foi a do sequestro de radicais livres (HEGAZI *et at*, 2002) onde o radical utilizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) na concentração de $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

As amostras e os padrões foram submetidos a diluições (em metanol) para concentrações de 0,001 mg/mL, 0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1,0 mg/mL a partir de uma solução estoque com concentração conhecida. Em 1,0 ml, de cada diluição, foi adicionado 1,0 ml da solução metanólica de DPPH ($60 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Após 30 minutos foram realizadas medidas de absorbância.

A porcentagem de inibição (%) foi obtida pela razão entre a absorção da solução contendo amostra e a absorção da solução controle de DPPH sem amostra, subtraindo de um. Após o cálculo, foi construído um gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração (Figuras 84 à 91, págs. 97 à 100). Para o cálculo do CI_{50} foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH. Como padrões positivos de referência utilizaram-se Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e Vitamina-C (ácido ascórbico), adquiridos da *Sigma Aldrich*.

O teste foi realizado pela doutoranda Macia Cleane Soares de Almeida no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC

4.5.2 Teste de atividade antiacetilcolinesterase

Definição

A atividade antiacetilcolinesterase é a capacidade que um composto possui em inativar reversível e/ou irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase. Ela pode ser avaliada qualitativamente e quantitativamente.

No método do teste qualitativo da cromatografia em camada delgada da antiacetilcolinesterase (CCD/AChE) por Rhee (2001) são utilizadas soluções dos reagentes ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), iodeto de acetilcolina (ATCI) em tampão, enzima AChE e o padrão fisostigmina. Na presença da enzima AChE, em meio aquoso, o iodeto de acetilcolina é hidrolisado a ácido acético e tiocolina. Esse último, por sua vez, reage com o DTNB formando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato e o 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina. O ânion 5-tio-2-nitrobenzoato apresenta coloração amarela, sendo assim possível a comprovação da atividade enzimática, pois uma vez inibida a ação dela não ocorre a hidrólise do neurotransmissor, não é gerado a tiocolina e não se forma o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato. Portanto, a inibição enzimática é observada pela presença de halos brancos (ausência do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato) que são medidos e comparados com o halo branco do padrão (Figura 92, pág 101).

Experimento

A metodologia utilizada na avaliação da atividade antiacetilcolinesterase foi a do teste qualitativo da cromatografia em camada delgada da antiacetilcolinesterase descrita por (RHEE *et al*, 2001).

Amostra de 2 mg, de cada extrato e fração (provenientes das vagens), foi diluída em 1 mL de metanol. Uma alíquota de 1,5 mL, de cada diluição, foi aplicada em placa de cromatografia de camada delgada - CCD (plate, DC-Alufolien, Silica gel 60 F254, 0.2 mm Merck).

Uma mistura equimolecular das soluções 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico - DTNB (1mM) e iodeto de acetilcolina - ATCI (1mM) foi pulverizada na CCD e após 5 minutos a solução enzima acetilcolinesterase AChE (5 U/ml) também foi pulverizada na mesma placa. Passados 10 minutos uma coloração amarela surgiu. Onde houve inibição da enzima, halos brancos apareceram. Fisostigmina, um alcalóide, foi usado como resultado positivo.

O teste foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Ceará pela bolsista de iniciação científica Marina Maciel de Oliveira Silva sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Jane Eire Silva Alencar de Menezes e Prof^ª. Dr^ª. Maria da Conceição Tavares Cavalcanti Liberato.

4.5.3. Resultados e discussão

O extrato hexânico bruto e todas as frações testadas apresentaram atividade antioxidante com valores de CI_{50} de $2,09 \cdot 10^{-3}$ à $5,46 \cdot 10^{-3}$ sendo próximos ao valor referente ao padrão Trolox $2,6 \cdot 10^{-3}$ e menores do que o valor para o padrão vitamina C $4,3 \cdot 10^{-2}$, dando-se ênfase para as frações hexano, acetato de etila e n-butanol que obtiveram, respectivamente, $3,19 \cdot 10^{-3}$, $2,09 \cdot 10^{-3}$ e $2,37 \cdot 10^{-3}$ (Tabela 9, pág. 95).

O CI_{50} representa a concentração necessária para neutralização de 50% dos radicais de DPPH presentes na alíquota testada, logo quanto menor for esse valor mais eficaz será a amostra. Levando em consideração esse fato, verificamos a seguinte ordem, decrescente, de eficácia da amostra: Fr. AcOEt > Fr. n-BuOH > Fr. Hex > Fr. H₂O/MeOH > Fr. DCM > Ex. Hex.

Os valores de CI_{50} foram obtidos utilizando-se a equação da reta correspondente ao gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração analisada para cada fração e padrão (Figuras 84 a 91, págs 97 a 100).

As frações Fr. AcOEt, Fr. n-BuOH, Fr. Hex e os padrões foram avaliados nas concentrações de 0,002 e 0,004 mg/ml porque em 0,005 mg/ml essas frações e padrões já apresentaram uma elevada porcentagem de inibição, diminuição essa que deveria ter sido realizadas também com a fração Hex. e o padrão Trolox, em concentrações entre 0,005 e 0,1 mg/ml, e com o extrato Hex, em concentrações entre 0,1 e 1,0 mg/ml, visto serem intervalos grandes de concentração.

As frações AcOEt e n-BuOH foram as que obtiveram maior porcentagem de inibição em menor concentração, e também o menor valor de CI_{50} , se compararmos com os valores para as demais frações. Já a concentração, para cada fração, em que melhor apresentou atividade, em meio a todas as concentrações testadas.

Estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante nos vegetais (TIVERON, 2010).

O extrato hexânico e todas as frações avaliadas apresentaram atividade antiacetilcolinesterase. Os tamanhos dos halos de inibição variaram de 0,6 a 0,9 cm, onde o maior valor corresponde também ao padrão utilizado (Tabela 10, pág. 96). As frações Fr. H₂O/MeOH, MeOH e n-BuOH ocasionaram uma inibição de, respectivamente, 0,8, 0,8 e 0,9 cm, sendo os valores mais significativos. Observamos que a fração n-BuOH, além de apresentar a maior atividade inibitória da AChE, teve o segundo menor valor de CI_{50} ($2,37.10^{-3}$) e apresentou, em baixa concentração (0,005 mg/mL), uma porcentagem alta (98,0 %) de neutralização radicalar pressupondo, assim, uma relação entre as duas atividades avaliadas.

Algumas classes fitoquímicas podem levar a formação de falsos positivos quanto à degradação da enzima acetilcolinesterase, como a presença de taninos e compostos fenólicos, por promoverem a desnaturação da enzima (TREVISAN e

MACEDO, 2003), dessa forma o ácido gálico (ácido fenólico) e elágico (polifenol) não foram submetidos na avaliação da atividade antiacetilcolinesterase. Entretanto não podemos afirmar que os resultados de inibição enzimática obtidos para as frações Fr. AcOEt e n-Hex, onde foram isolados o ácido gálico e elágico, respectivamente, são justificados apenas pelo argumento da desnaturação, pois nas mesmas podem existir outras classes de metabólitos responsáveis pela inibição da AChE.

TABELA 9: Valores de porcentagem de inibição (%) e valores de IC_{50} (mg/mL).

CONC. / AMOSTRA E PADRÃO	0,001 (mg/mL)	0,005 (mg/mL)	0,01 (mg/mL)	0,05 (mg/mL)	0,1 (mg/mL)	1,0 (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)
Ex. HEX	1,39 %	6,47 %	8,38 %	35,6 %	64,0 %	93,9 % (*)	$7,61 \cdot 10^{-2}$ $\pm 2,6 \cdot 10^{-3}$
Fr. DCM	11,3 %	49,6 %	86,0 %	94,3 %	99,5 % (*)	99,6 %	$5,46 \cdot 10^{-3}$ $\pm 5,1 \cdot 10^{-4}$
Fr. HIDRO/ MEOH	9,97 %	54,9 %	85,7 %	97,0 %	99,5 % (*)	99,6 %	$5,31 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,1 \cdot 10^{-3}$
CONC. / AMOSTRA E PADRÃO	0,001 (mg/mL)	0,002 (mg/mL)	0,004 (mg/mL)	0,005 (mg/mL)	0,1 (mg/mL)	1,0 (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)
Fr. ACOET	26,9 %	49,7 %	87,9 %	98,7 % (*)	99,8 %	99,9 %	$2,09 \cdot 10^{-3}$ $\pm 9,8 \cdot 10^{-5}$
Fr. n-BUOH	21,8 %	43,8 %	82,3 %	98,0 % (*)	99,8 %	99,9 %	$2,37 \cdot 10^{-3}$ $\pm 7,3 \cdot 10^{-5}$
Fr. HEX	17,9 %	32,0 %	59,8 %	81,0 %	99,7 % (*)	99,8 %	$3,19 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,4 \cdot 10^{-4}$
TROLOX	24,5 %	41,8 %	51,8 %	86,5 %	99,8 % (*)	99,9 %	$2,6 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,3 \cdot 10^{-4}$
VITAM. C	3,25 %	17,8 %	19,0 %	19,3 %	92,8 % (*)	99,8 %	$4,3 \cdot 10^{-2}$ $\pm 1,9 \cdot 10^{-2}$

(*) Altas porcentagens de inibição do radical DPPH em menor concentração de fração e padrão testados.

TABELA 10: Valores para atividade antiacetilcolinesterase.

EXTRATO/ FRAÇÃO/ PADRÃO	CI ₅₀ (mg/mL)	MENOR CONC. (mg/ml)	
		TESTADA COM MAIOR % DE INIBIÇÃO RADICALAR	HALO DE INIBIÇÃO (cm)
(Fr. AcOEt)	$2,09. 10^{-3} \pm 9,8. 10^{-5}$	0,005 (98,7%)	0,7
(Fr. n-BuOH) *	$2,37. 10^{-3} \pm 7,3. 10^{-5}$	0,005 (98,0%)	0,9*
(Fr. Hex)	$3,19. 10^{-3} \pm 2,4. 10^{-4}$	0,1 (99,7%)	0,6
(Fr. H ₂ O/MeOH)	$5,31. 10^{-3} \pm 1,1. 10^{-3}$	0,1 (99,5%)	0,8
(Fr. DCM)	$5,46. 10^{-3} \pm 5,1. 10^{-4}$	0,1 (99,5%)	0,7
(Ex. Hex)	$7,61. 10^{-2} \pm 2,6. 10^{-3}$	1,0 (93,9%)	0,6
(Fr. MeOH)	-	-	0,8
TROLOX	$2,6. 10^{-3} \pm 2,3. 10^{-4}$	0,1 (99,8%)	-
VITAMINA C	$4,3. 10^{-2} \pm 1,9. 10^{-2}$	0,1 (92,8%)	-
FISOSTIGMINA	-	-	0,9

* Fração com o mesmo halo de inibição do padrão fisostigmina (0,9 cm);

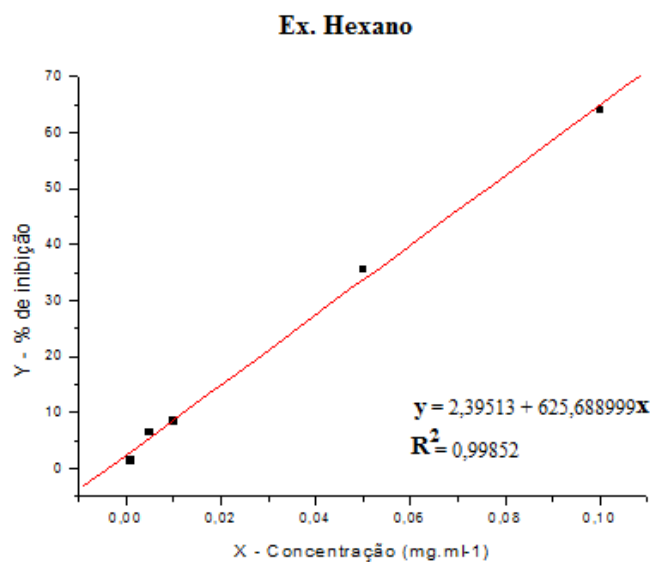


Figura 84: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para o extrato hexano.

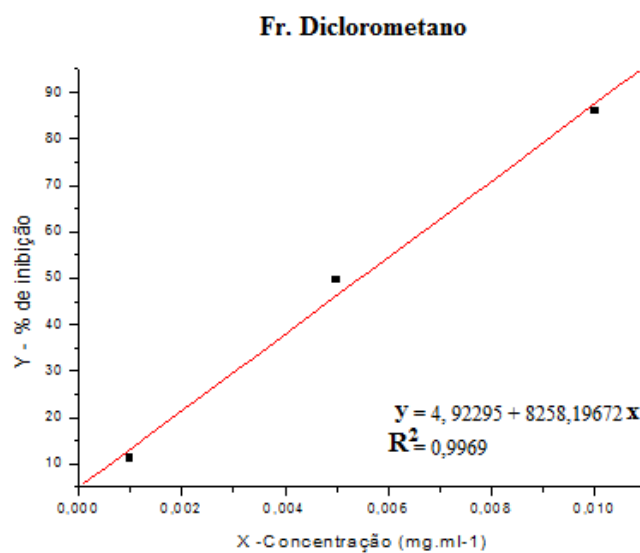


Figura 85: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração diclorometano.

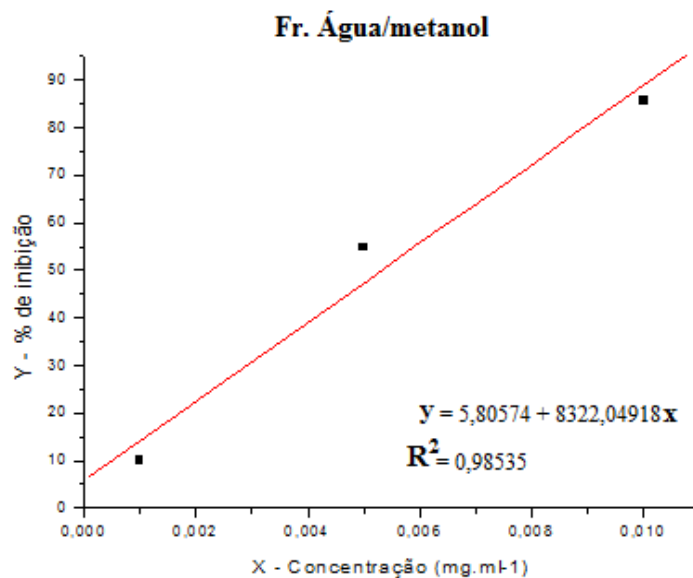


Figura 86: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração água/metanol.

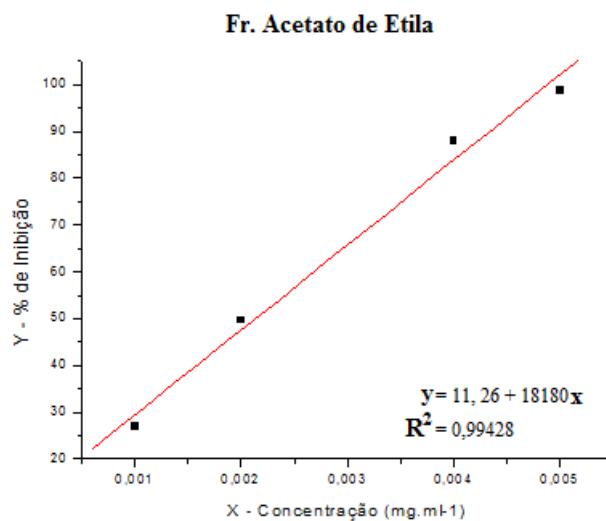


Figura 87: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração acetato de etila.

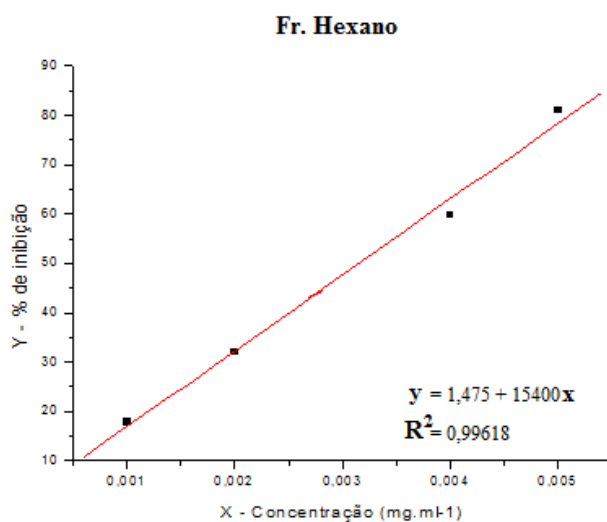


Figura 88: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração hexano.

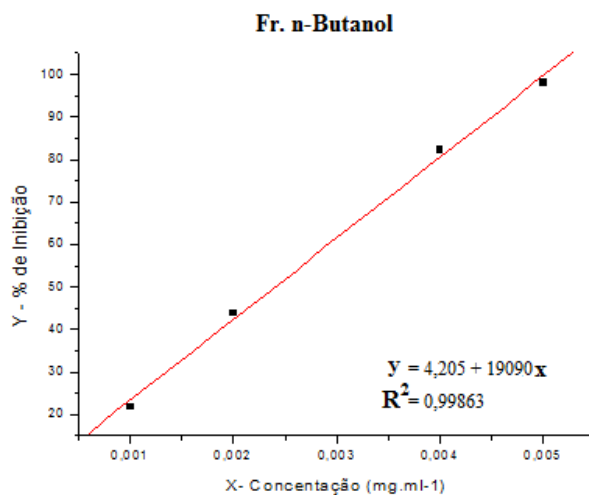


Figura 89: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para fração n-butanol.

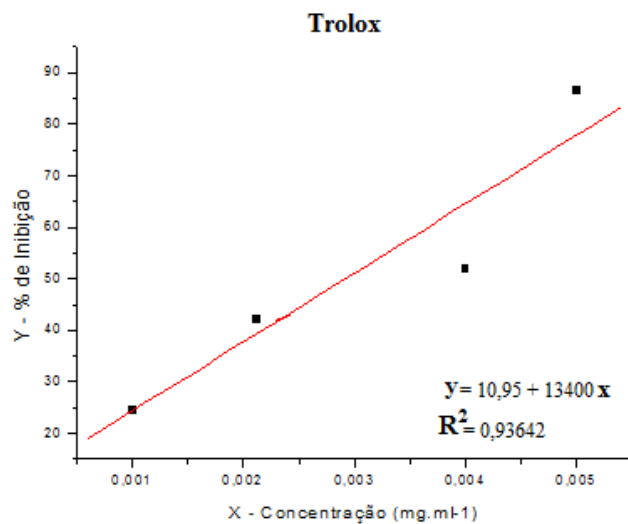


Figura 90: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para o trolox (padrão).

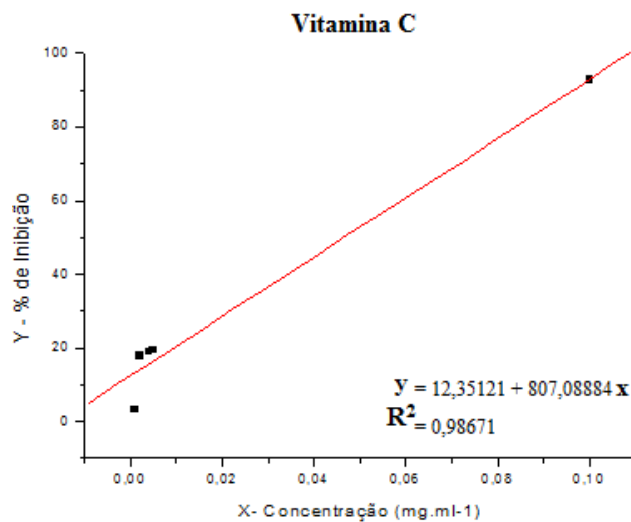


Figura 91: Gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração para vitamina C (padrão).

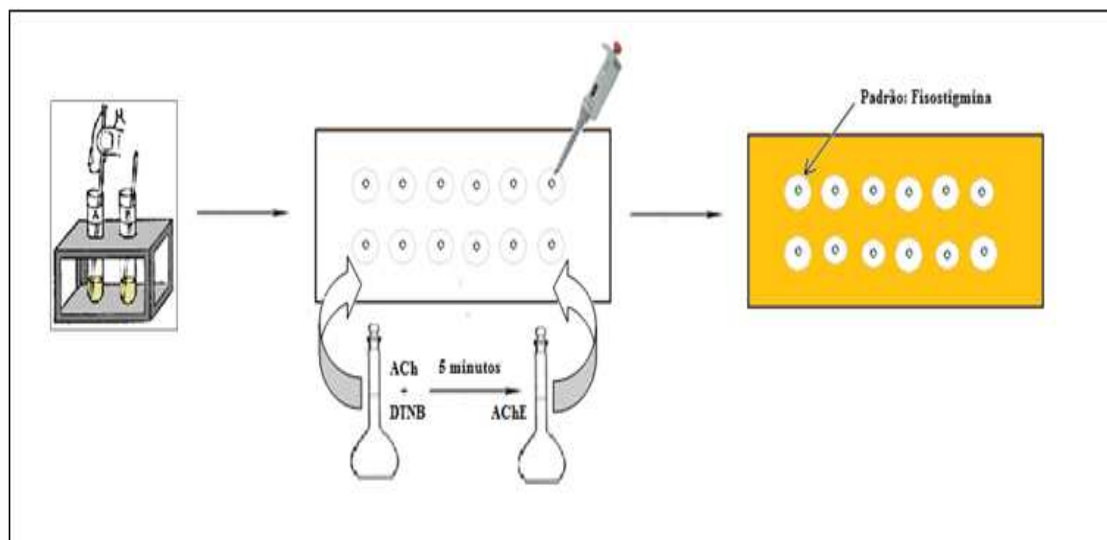


Figura 92: Avaliação da atividade antiacetilcolinesterase.

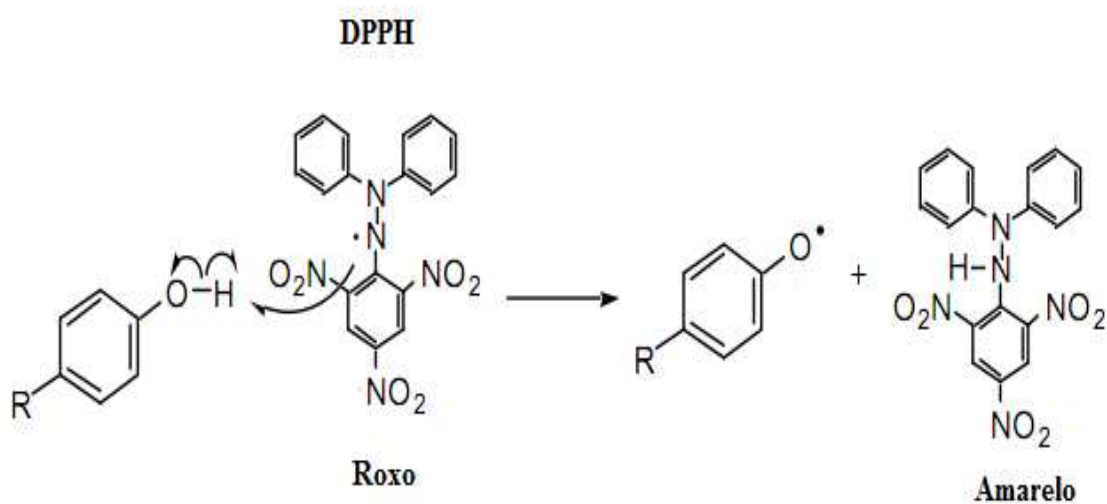


Figura 93: Equação da reação de um composto fenólico e o radical DPPH.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou uma aplicação prática das técnicas espectrométricas na identificação de produtos naturais. Assim, usando espectrometria de massa em alta resolução e, especialmente, espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional, dois componentes (S-10 e S-11) ainda não publicados a partir de *C.ferrea* foram caracterizados. Esses compostos são de importância potencial para saúde humana como antioxidante e também em alimentação.

Conforme citado anteriormente, esta espécie vegetal é bastante investigada sob o ponto de vista de atividades biológicas. O presente estudo, mostrou em adição, que as frações obtidas das vagens de *C. ferrea* apresentaram potencial terapêutico no que diz respeito às atividades antioxidantes e antiacetilcolinesterase.

Como a presente espécie é quimicamente pouco estudada, as frações obtidas a partir do caule precisam ser submetidas a teste de atividade antioxidante, bem como, a avaliação antiacetilcolinesterase.

REFERÊNCIA

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H.: Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, Jun;61(3):204-7, 1995.

BAHIA, M.V.; DAVID, J. P.; DAVID, J.M.: Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Quimica Nova**. v.33, p. 1297-1300. 2010.

CAO, G.H.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G.: Oxigen-radical absorbency capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and medicine**, New York, v.14, n.3,p. 303-311, 1993.

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

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U.: Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(2B): 586-591, 2009.

Chemunion Química LTDA: Uso do extrato de pau ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart) em formulações cosméticas e farmacêuticas como agente despigmente/clareador da pele. **Patentes online**, nº PI0705224-3A2, 2009.

CHEN, P.: Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 2007.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. de C.; SCHIMPL, F. C.; Souza, C. S. do C. R. de; Souza, L. A. G. de; Pando, S. C.; Prospecção de inibidores de serinoproteínases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. **Acta Amazonica**, v. 41(1): 163 – 170p. 2011

CRONQUIST, A.: *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press; New York, 1981.

FERREIRA, D. A.: Estudo fitoquímico de *Sclerolobium rugosum* (Leguminosae). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza , 2008; 115p.

GOMES, B. DE A.: **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae)**. Dissertação de mestrado em Química (área Orgânica) do departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012. 108 p.

HE, K.; TIMMERMANN, B.N.; ALADESANMI, A.J.; ZENG, L.: A Biflavonoid from *Dysoxylum lenticelare*. **Phytochemistry**, 42, 1199-1201, 1996.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 395-402, 2002.

HUKKNEN, A. T.; POLONEN, S.S.; KARENLAMPI, S. O.; KOKKO, H. I.: Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.1, p.112-119, 2006.

JESUS, A. de; WILLERDING, A. L.; SANTOS, M. dos; WOLTER, E. L. Atividade antifúngica de extratos obtidos de plantas medicinais amazônicas a fungos apodrecedores de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 24, n. 2, p. 223-228, 2000.

KIEM, P. V.; MINH, C. V.; HUONG, H. T.; LEE, J. J.; KIM, Y. H.: Caesaldecane, a cassane diterpenoid from the leaves of *Caesalpinia decapetala*. **Chem. Pharm. Bull.** 2005, 53, 428-30.

LEE, Y.; LANGENHEIM, J.H.: Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany**. v. 69, p. 1-36, 1975.

LEWIS GP. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew , 577p, 2005.

LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SITÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C. C.; MOURA, S. L.; CORREIA, M. T. S.; MALTA, D. J. N.; GONÇALVES-SILVA, T.: Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 22(1): 169-175, Jan./Feb. 2012.

LIMA, J. R.; MANSANO, V. de F.: A família *leguminosae* na serra de Baturité, Ceará: uma área de floresta atlântica no semiárido brasileiro. **Rodriguésia** 62(3): 563-613, 2011.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; PACHECO, A. C.; RICARDO, N. M.; LINHARES, R. E.; NOZAWA, C.: Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 60, September, p. 93-99. 2013.

LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; REBOREDO, M. M.; FARIA, V. C.; SÁ, R. C. S. : Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 82(4), 907-914p. 2010.

MATOS, F. J. A.: **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 3º Ed., 2009. 150 p.

MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, Í. J. A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V.: Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology** 47, 41–47p. 2007.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE Jr, F.: Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters** 177, pags.119–124, 2002.

NOZAKI, H.; HAYASHI, Ken-Ichiro; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMAE, M. and AKAO, Y.: Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters** 48 pags. 8290–8292, 2007.

OLDONI, T. L. C.: Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie de *Apis Mellifera*. 2007. 105p. **Dissertação**, (mestrado em ciências e tecnologia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PARK, J.; BOO, Y. C.: Isolation of Resveratrol from *Vitis Viniferae* Caulis and Its Potent Inhibition of Human Tyrosinase. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 11 pages, 2013.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S.: **Introduction to Spectroscopy**. 3^o ed. Thomson Learning. United States of America, 2001.

PEREIRA, L. de P.; SILVA, R. O. da ; BRINGEL, P. H. de S. F.; SILVA, K. E. S. da ; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. : Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology** 139, 2012. 642– 648p.

QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R.: Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and ehrlich ascites tumor. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 23(3), (2001) 367–382p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biological Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RHEE, I. K.; MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R.: Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J Chromatogr A**, [S.L.], 2001. *Produtos Naturais*, p. 217-223.

RICARDO, L. G. P. de S.: ESTUDOS ETNOBOTÂNICOS E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NA COMUNIDADE DO HORTO, JUAZEIRO DO NORTE (CE). **Dissertação** (Pós-Graduação em Ciências Florestais – Ecologia e Manejo dos Recursos Florestais). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), 2011.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A.: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. do S. V. ; DIAS, C. S. ; COSTA, V. C. O. ; CONDE, N. C. O. ; BUZALAF, M. A. R.: *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology** 124, 289–294p. 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º Ed., editora da UFSC 1º reimpressão, Florianópolis, Porto alegre, 2010.

SOLON, S. : **Análises fitoquímica e farmacognósticas da raiz de *Cochlospermum regium*** (Mart. Et Schr.) Pilger, *Cochlospermaceae*. Tese de doutorado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Campo Grande - MS, 2009. 99p

SOUZA, L. M. de : ESTUDO DAS BIOMOLÉCULAS ENCONTRADAS NA CIFOMEDUSA *Phyllorhiza punctata*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL. **Dissertação (mestrado)** em Bioquímica e Biologia Molecular. 2005.

TIVERON , A. P.: Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. **Dissertação de Mestrado** em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010. 103p.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.: Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova** 26(3):301-4, 2003.

TUCKER, S.C.: Floral development in legumes. **Plant Physiology**. v. 131, p. 911-926, 2003.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K. and ALVES, S. M.: Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, Vol. 8(5), pp. 377–381, 2001.

VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T. M. ; CARNEIRO, E. M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L. A. L.; SÁ, M. D. C.; SOUZA, T. P.; WANDERLEY, A. G.: Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology** 137 (2011) 1533– 1541.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M; SANDERSON, M.J.: A Phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid Matk gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**. V. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.

WU, M.; WANG, Yu-Fang; ZHANG, Man-Li; HUO, Chang-Hong; DONG, M.; SHI, Qing-Wen and KIYOTA, H.: Chemical Constituents of Plants from the Genus *Caesalpinia*. **Chemistry & Biodiversity** – Vol. 8. pags. 1370-1399, 2011.

ZANIN, J. L. B.; CARVALHO, B. A. de; MARTINELLI, P. S.; SANTOS, M. H. dos; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; JÚNIOR, C. V.; SOARES, M. G.: The Genus *Caesalpinia* L. (*Caesalpinaceae*): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules** 17, 7887-7902, 2012.