

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários de origem natural são de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, alimentos, cosméticos e agroquímicos [PHILLIPSON, 1998]. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos que movimentam por ano cerca de 50 bilhões de dólares.

Um levantamento recente identificou áreas do globo terrestre caracterizadas por excepcional concentração de espécies endêmicas e elevada degradação de *habitat*. Estas áreas estão sendo exploradas de forma irracional pelo homem e necessitam de ações urgentes a fim de se evitar a extinção em massa das espécies nelas existentes em um futuro próximo. Das 25 áreas identificadas no mundo, o Cerrado, o Pantanal e a Mata Atlântica foram reconhecidos como áreas de maior risco de extinção, o que reforça a importância de uma massa crítica consolidada de pesquisadores que estudem estes ecossistemas, visando não somente sua preservação e o conhecimento do seu perfil químico, mas também a descoberta de novas substâncias úteis ao homem [MYERS, 2000]. O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais [PINTO, 2002].

O Pantanal é um ecossistema com 250 mil km² de extensão, situado no sul de Mato Grosso e no noroeste de Mato Grosso do Sul, além de também englobar o norte do Paraguai e leste da Bolívia (que é chamado de chaco Boliviano), considerado pela UNESCO Patrimônio Natural Mundial e Reserva da Biosfera. No Brasil, sua área se divide em 65% no estado de Mato Grosso do Sul e 35% no Mato Grosso. A região é uma planície pluvial influenciada por rios que drenam a bacia do Alto Paraguai, onde se desenvolve uma fauna e flora de rara beleza e abundância, influenciada por quatro grandes biomas: Amazônia, Cerrado, Chaco e Mata Atlântica [<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml/shtm>].

Levando em consideração tudo o que as plantas têm para nos oferecer, a abundância e as riquezas que possuem esse ecossistema, bem como a crescente degradação desta

região, vem sendo desenvolvido no Laboratório de Pesquisas LP1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, o estudo químico de plantas do Cerrado e Pantanal de Mato Grosso do Sul, visando ao isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários com potenciais atividades biológicas. Inseridas nesta linha de pesquisa estão espécies de famílias selecionadas para estudo, dentre elas a Combretaceae. Esta família apresenta um grande número de espécies pouco ou ainda não investigadas quanto à sua composição química, como é o caso, por exemplo, das pertencentes ao gênero *Combretum*. O presente trabalho dá continuidade a esta linha de pesquisa de busca de substâncias potencialmente bioativas, agregando também conhecimento sobre o metabolismo e constituintes químicos de espécies vegetais que ocorrem no Pantanal Sulmatogrossense, através do estudo dos galhos e raízes de *Combretum laxum*.

2. OBJETIVO

Realizar a investigação química dos galhos e raízes de um espécime de *Combretum laxum* (Combretaceae) de ocorrência em Mato Grosso do Sul, visando ao isolamento e elucidação estrutural de seus metabólitos secundários. Submeter os extratos brutos, frações e/ou substâncias isoladas a ensaios de atividade biológica, particularmente os de atividade citotóxica, antifúngica, antibacteriana, mutagênica/antimutagênica e antioxidante.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE COMBRETACEAE

3.1 Aspectos botânicos da família Combretaceae

A família Combretaceae compreende 20 gêneros (*Anogeissus*, *Buchenavia*, *Bucida*, *Calopyxis*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Dansiea*, *Getonia*, *Guiera*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Macropteranthes*, *Meiostemon*, *Ptelepsis*, *Quisqualis*, *Ramatuela*, *Strephonema*, *Terminalia*, *Terminaliopsis* e *Thiola*) e cerca de 600 espécies, de distribuição tropical e subtropical na superfície terrestre, alguns dos quais com ocorrência em Mato Grosso do Sul [<http://www.rbgekew.org.uk/web.dbs/genlist.html>; JOLY, 1975] (figura 1, pág. 04).

São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alterna ou oposta e apresentando flores pequenas, reunidas em inflorescência às vezes vistosas, como por exemplo, em *Combretum*.

Algumas espécies arbóreas têm importância por sua madeira, enquanto que outras espécies têm frutos comestíveis e são consideradas medicinais ou são apenas utilizados com fins ornamentais por apresentarem belas flores [JOLY, 1975; CACERES, 2004].



Figura 01. Distribuição de Combretaceae por todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta [MABBERLEY, 1993].

3.2 O gênero *Combretum*

O gênero *Combretum*, largamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, compreende 250 espécies. As espécies deste gênero não costumam ser utilizadas na medicina popular do Brasil, porém cerca de 10% destas espécies são bastante utilizadas na medicina tradicional em países Africanos e Asiáticos para o tratamento de diversas doenças como câncer, lepra, febres tropicais, cólicas etc. [CASTLEDEN, 1985]. Na África, pelo menos 24 espécies de *Combretum* têm diversos tipos de usos para problemas que variam de remédios para o coração à limpeza de ferida. Muitas destas espécies são conhecidas por conter constituintes antimicrobianos, entretanto a natureza química dos princípios antimicrobianos ativos de muitas das espécies de *Combretum* usadas na medicina Africana tradicional ainda não é muito conhecida [BURAPADAJA 1995; SILVA 1996; BABA 1999; FYHRQUIST, 2002].

3.2.1 Atividades biológicas de metabólitos secundários isolados de algumas espécies do gênero *Combretum*

São descritas na literatura inúmeras substâncias isoladas de plantas do gênero *Combretum*. Em trinta anos, estudos referentes ao isolamento de substâncias com potencial atividade anticâncer, entre eles os realizados com espécies de maior ocorrência nos continente Africano e Asiático, vêm sendo feitos a fim de identificar os metabólitos secundários e suas respectivas atividades biológicas, destacando-se atividades; antiinflamatória, anticolinesterásica, antipirético, antielmíntico, hepatoprotetora, antifúngica, antimitótica, antineoplásica, antinociceptiva entre outras [CASTLEDEN, 1985; LIRA, 2002; FACUNDO, 2005; ADNYANA, 2001a; PETTIT, 1987a; PETTIT, 1987b, PETTIT, 2000; BROOKES, 1999]. Alguns exemplos de substâncias bioativas obtidas de espécies de *Combretum* são listados na Tabela 1, pág. 07.

As espécies mais estudadas são *C. quadrangulare*, *C. leprosum*, *C. caffrum*, *C. erythrophyllum*, *C. glutinosum*, *C. molle*, *C. imberbe*, *C. kraussii*. Estas produzem diversas

classes de metabólitos secundários, porém as de maior relevância são triterpenos ácidos e seus derivados glicosilados, fenantrenos e estilbenos (Tabela 1, pág. 07).

Isoladas de plantas deste gênero, notadamente de *C. caffrum*, as combretastatinas (derivados fenantrênicos, bibenzílicos e estilbênicos) são dignas de nota por apresentar atividade anticâncer com estudos avançados, em fase de testes pré-clínicos como é o caso da combretastatina A-4 [http://www1.unimed.com.br/nacional/bom_dia/saude_destaque.asp?nt=4614]. Esta substância inibe a angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos, desta forma impedindo que as células tumorais recebam sangue e oxigênio, levando à inibição do crescimento do tumor. Outras combretastatinas apresentam também atividades importantes como antineoplásica, antimitótica e citotóxica [PETTIT, 1989; PETTIT, 1995a; PETTIT, 1995b; BIBBY, 2002; CIRLA & MANN, 2003; DZIERZBICKA & KOLODZIEJCZYK, 2004; YOUNG & CHAPLIN, 2004; PETTIT, 1987a; PETTIT, 1987b; PETTIT, 2000; BROOKES, 1999; PETTIT, 1988a; SCHWIKKARD, 2000].

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários e suas respectivas atividades biológicas obtidos de plantas do gênero *Combretum*.

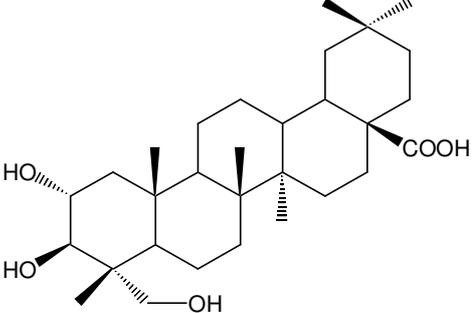
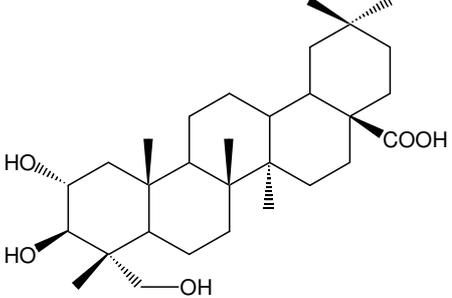
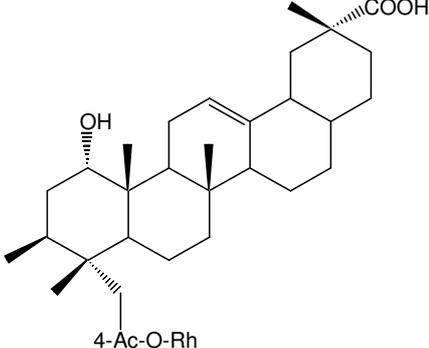
ESTRUTURAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	ATIVIDADES ENCONTRADAS	ESPÉCIE
 <p>Ácido arjunólico</p>	<p>Antiinflamatória, antinociceptiva, anticolinesterásica e antifúngica [LIRA, 2002; FACUNDO, 2005, MASOKO, 2008].</p>	<p><i>C. leprosum</i>, <i>C. nelsonii</i>.</p>
 <p>Ácido asiático</p>	<p>Antifúngica [MASOKO, 2008].</p>	<p><i>C. nelsonii</i>.</p>
 <p>Ácido-1α,23β-diidróxi-12-oleanen-29-óico-23β-O-α-4-acetilrhamnospiranosídeo</p>	<p>Antibacteriana [ANGEH, 2007].</p>	<p><i>C. padoides</i></p>

Tabela 1 (Continuação)

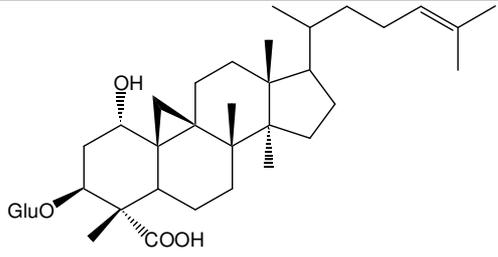
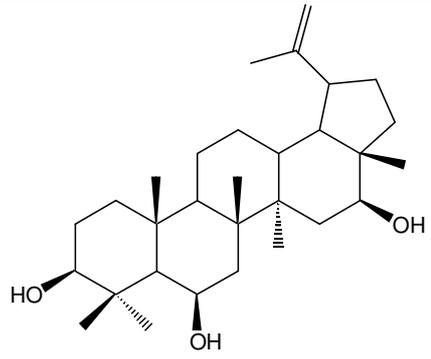
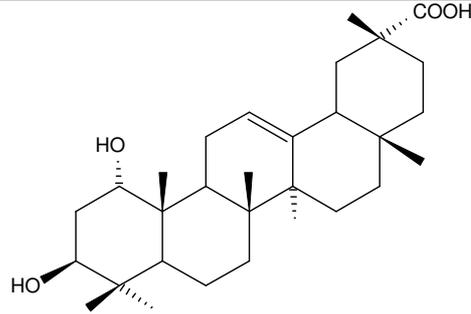
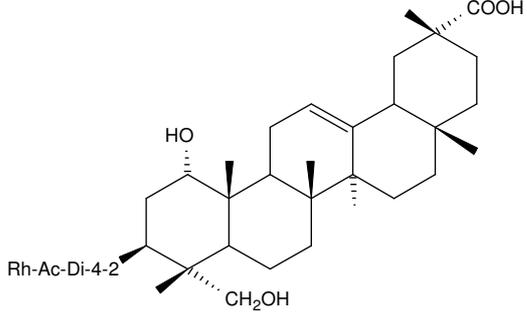
 <p>Ácido móllico</p>	<p>Analgésica e antiinflamatória [OJEWOLE, 2008].</p>	<p><i>C. molle</i></p>
 <p>3β,6β,16β-triidroxilup-20(29)-eno</p>	<p>Anti-séptica [PIETROVSKI, 2006].</p>	<p><i>C. leprosum</i></p>
 <p>Ácido 1,3-diidroxi-12-oleanan-29-óico</p>	<p>Antibacteriana [ANGEH, 2006].</p>	<p><i>C. imberbe</i></p>
 <p>Ácido 1,23-diidroxi-12-oleanen-29-óico-3-O-2,4-di-acetil-L-rhamnopiranosídeo</p>	<p>Antibacteriana, anti-proliferativa e citotóxica [ANGEH, 2006].</p>	<p><i>C. imberbe</i></p>

Tabela 1 (Continuação)

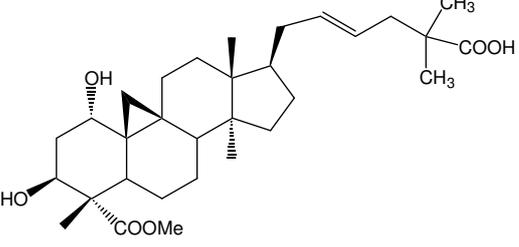
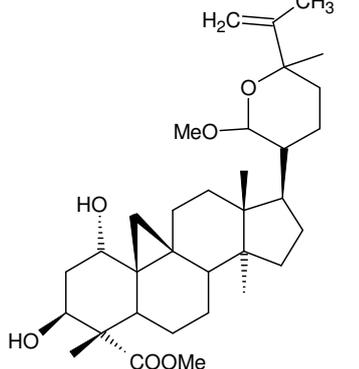
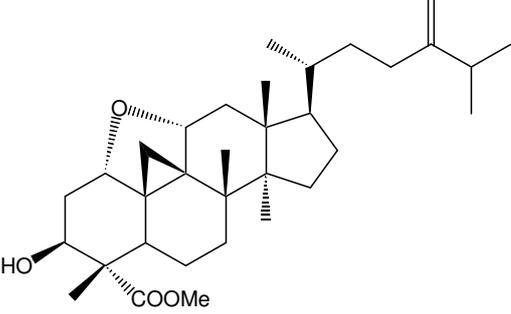
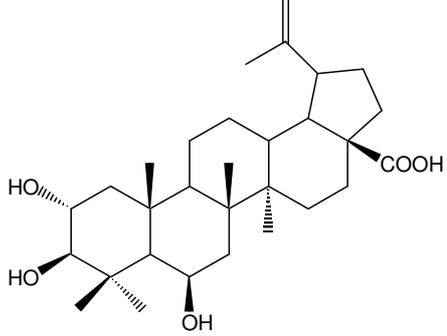
 <p>Quadrangularato de metila B</p>	<p>Citotóxica [BANSKOTA, 2000; TRAN, 1990].</p>	<p>C. <i>quadrangulare</i></p>
 <p>Quadrangularato de metila C</p>	<p>Citotóxica [BANSKOTA, 2000; TRAN, 1990].</p>	<p>C. <i>quadrangulare</i></p>
 <p>Quadrangularato de metila D</p>	<p>Citotóxica [BANSKOTA, 2000; TRAN, 1990].</p>	<p>C. <i>quadrangulare</i></p>
 <p>Ácido 2α,3β,6β-triidroxibetulínico</p>	<p>Hepatoprotetora [ADNYANA, 2001a; ADNYANA, 2001b].</p>	<p>C. <i>quadrangulare</i></p>

Tabela 1 (Continuação)

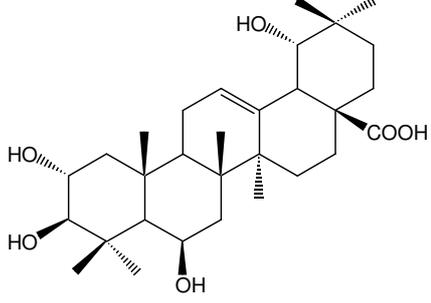
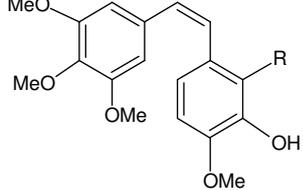
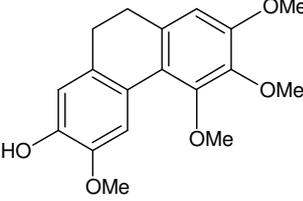
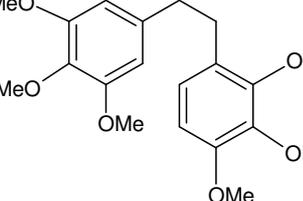
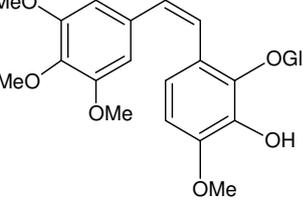
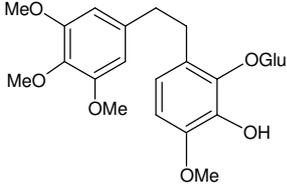
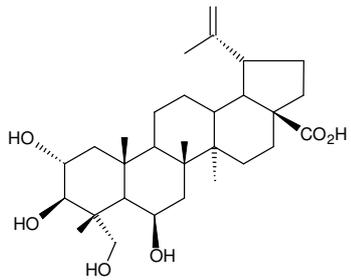
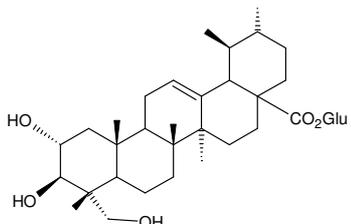
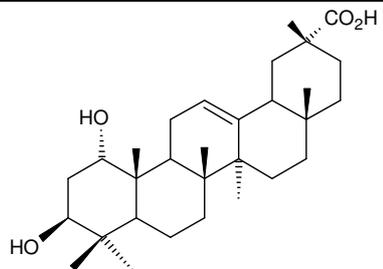
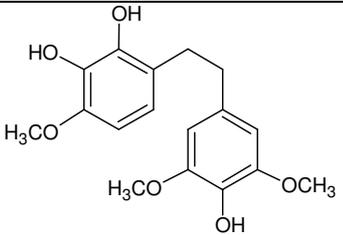
 <p>Ácido 6β-hidroxiarjúnico</p>	<p>Hepatoprotetora [ADNYANA, 2001a; ADNYANA, 2001b].</p>	<p><i>C. quadrangulare</i></p>
 <p>R= OH: Combretastatina A-1 R= H: Combretastatina A-4</p>	<p>Antimitótica e antineoplásica [PETTIT, 1987a; PETTIT, 1987b, PETTIT, 2000; BROOKES, 1999].</p>	<p><i>C. caffrum</i>, <i>C. Kraussii</i></p>
 <p>6,7-dihidroxi-2,3,4-trimetóxi-9,10 dihidroifenantreno</p>	<p>Inibe o crescimento de linhagens de células leucêmicas [PETTIT, 1988b].</p>	<p><i>C. caffrum</i></p>
 <p>Combretastatina B-1</p>	<p>Inibe o crescimento de linhagens de células cancerígenas [PETTIT, 1988a].</p>	<p><i>C. caffrum</i></p>
 <p>Combretastatina A-1 2'-β-D-glicose</p>	<p>Citotóxica [SCHWIKKARD, 2000].</p>	<p><i>C. erythrophyllum</i></p>

Tabela 1 (Continuação)

 <p>Combretastatina B-1-2'-β-D-glicose</p>	<p>Citotóxica [SCHWIKKARD, 2000].</p>	<p><i>C. erythrophyllum</i></p>
 <p>Ácido 6-β-hidroxihoivênico</p>	<p>Hepatoprotetora [ADNYANA, 2001a; ADNYANA, 2001b].</p>	<p><i>C. quadrangulare</i></p>
 <p>Arjunglucosídeo II</p>	<p>Antimicrobiana [ASRES, 2001].</p>	<p><i>C. molle</i></p>
 <p>Ácido imbérico</p>	<p>Antibacteriana [KATERERE, 2003].</p>	<p><i>C. imberbe</i></p>
 <p>Combretastatina B-5</p>	<p>Antibacteriana [COOMBES, 2002; ELOFF, 2005; BROOKES, 1999].</p>	<p><i>C. Kraussii</i>, <i>C. woodii</i></p>

3.3 A ocorrência e os estudos de plantas do gênero *Combretum* no Brasil

No Brasil são citadas algumas espécies do gênero *Combretum*, entre estas estão *C. anfractuosum*, *C. coccineum*, *C. formosum*, *C. lanceolatum*, *C. laxum*, *C. leprosum*, *C. leptestachyum*, *C. loeflingii*, *C. mellifluum*, *C. micropetalum*, *C. oxypetalum*, *C. purpureum* [POTT, 1994]

Combretum leprosum é a única espécie do gênero no Brasil com relato na literatura sobre estudo fitoquímico até o momento. É conhecida no Nordeste pelo nome popular de “mufumbo”, “mofumbo” ou “cipoaba”, cujas raízes são usadas na medicina popular para o tratamento de hemorragias, sendo também citadas propriedades analgésicas e sedativas [LIRA, 2002; LORENZI, 2002]. Do extrato etanólico das raízes foi descrito o isolamento do ácido arjunólico, que apresentou atividades; antiinflamatória e anticolinesterásica [FACUNDO, 2005;]. Há também na literatura o relato de atividade antinociceptiva em duas fases de dor, a partir de testes feitos com o extrato etanólico das raízes de *C. leprosum* [PIETROVSKI, 2006].

As cascas de *Combretum lanceolatum* são usadas na medicina popular no Brasil como adstringente e antitumoral [SAZIMA, 2001; SCHESSL, 1999].

4. A PLANTA E SEUS CONSTITUINTES QUÍMICOS

A espécie denominada *C. laxum* Jacq. (figura 2, pág. 13) é um arbusto lenhoso, que pode atingir de 15 a 35 m de altura. É conhecida popularmente como “pombeiro-branco” ou “pombeiro-preto” [POTT, 1994]. Produz flores com 4 a 5 mm de comprimento; de coloração amarelada e frutos com 4 alas, castanhos quando secos, de 2,5 a 2,8 cm de comprimento por 1,5 a 2,0 cm de largura [SILVA, 2005].

Esta espécie ocorre do México até a Argentina; sendo que no Brasil ocorre do Amazonas até o Paraná, em restinga, mata de tabuleiro, mata de galeria, brejo, varjão, capoeiras, campo-cerrado, cerrado, carrascos e caatinga; [PIO CORREA, 2005].



Figura 2: *Combretum laxum* Jacq.

Com relação a estudos químicos realizados com esta espécie, consta na literatura apenas um trabalho de investigação química em plantas que ocorrem na floresta Amazônica Venezuelana, o qual descreve o isolamento de grandes quantidades de trans-4-hidroxirolinbetaína de *C. laxum* [ADRIAN-ROMERO, 2007].

4.1 Triterpenos e saponinas triterpênicas

A classe dos triterpenos é largamente encontrada no gênero *Combretum*. No presente trabalho, triterpenos foram isolados ou obtidos em mistura principalmente dos galhos, estando presentes também nas raízes.

Dos galhos foram isolados e caracterizados onze triterpenos, incluindo saponinas: ácido betulínico (**I**), quadranosídeo I (**II**), ácido arjunólico (**III**), ácido asiático (**IV**), arjunglucosídeo II (**V**), quadranosídeo IV (**VI**), 2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-eno-28-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**VII**), 2 α ,3 β ,6 β -triidroxiolean-12-eno-28-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**VIII**), bellericosídeo (**IX**), 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxursan-12-eno-28-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**X**) e chebulosídeo II (**XI**). Das raízes foram isolados três triterpenos: ácido betulínico (**I**), ácido arjunólico (**III**) e ácido maslínico (**XII**).

As estruturas dos triterpenos obtidos dos galhos e raízes estão representadas na figura 3 (pág. 14).

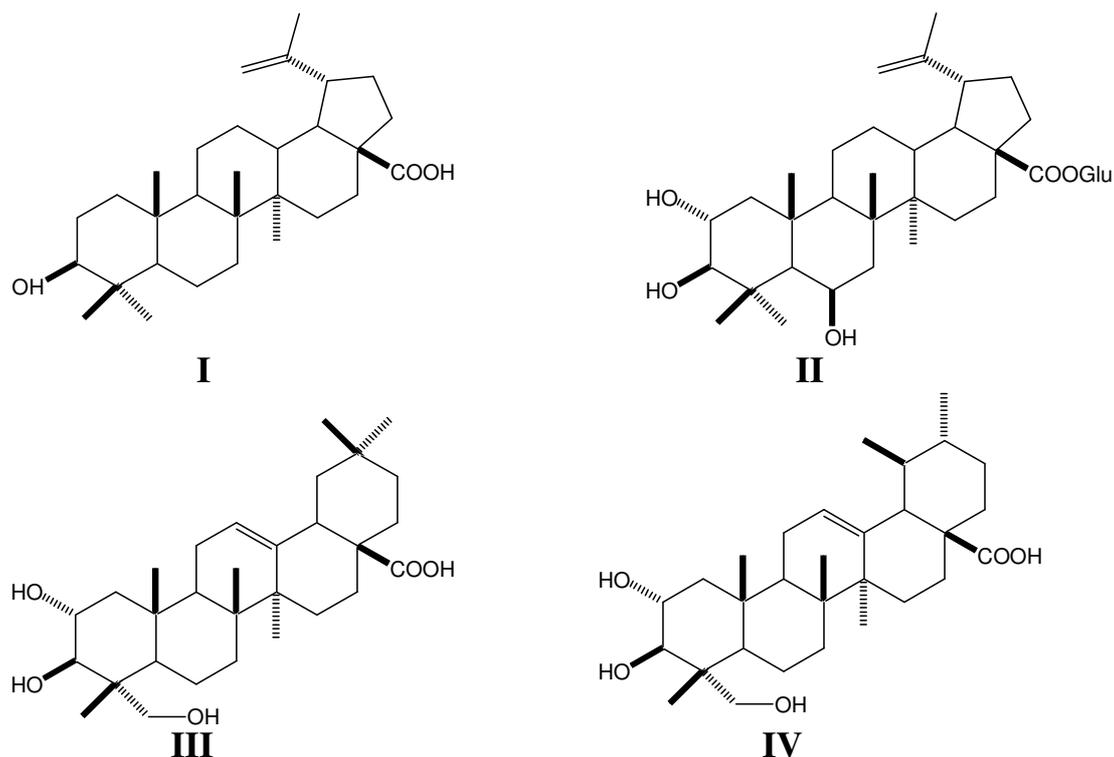


Figura 3. Estruturas dos triterpenos obtidos de *C. laxum* no presente trabalho.

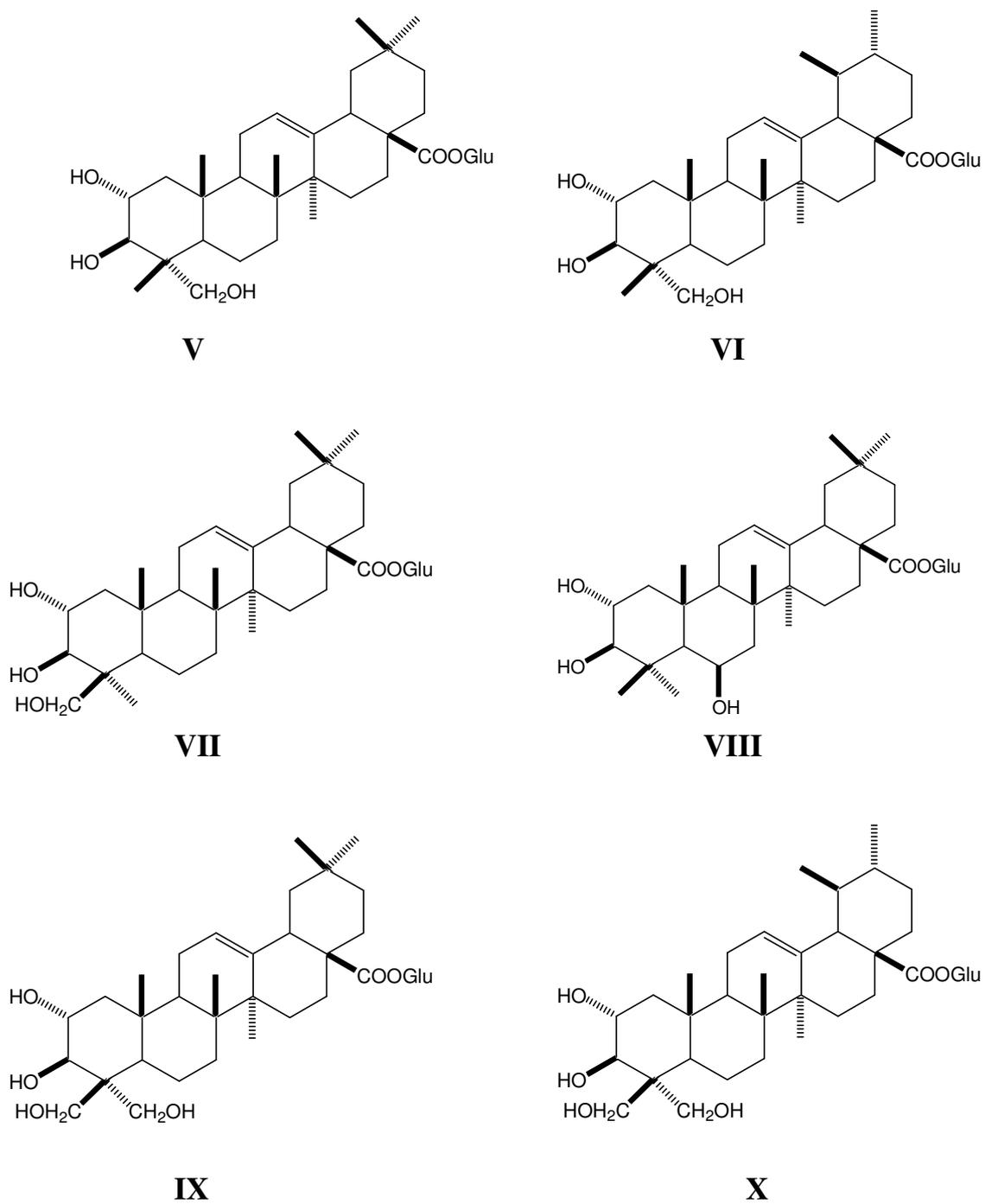


Figura 3 (continuação). Estruturas dos triterpenos obtidos de *C. laxum* no presente trabalho.

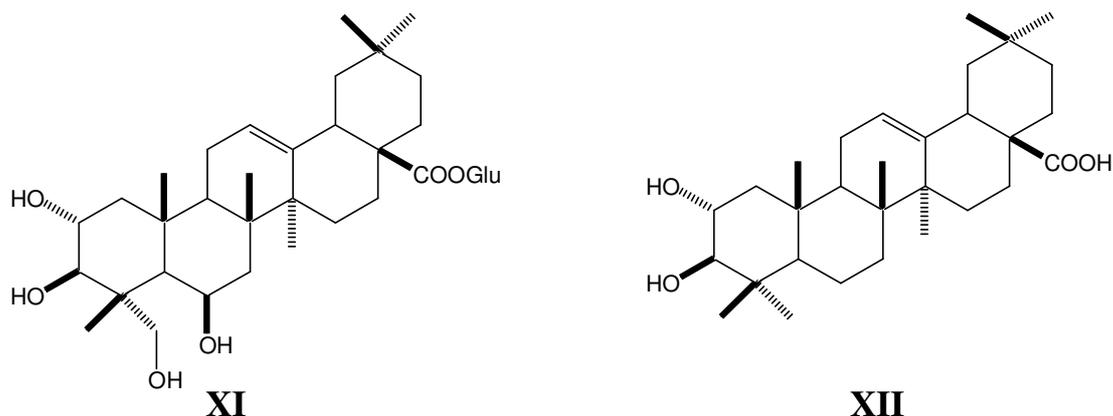


Figura 3 (Continuação). Estruturas dos triterpenos obtidos de *C. laxum* no presente trabalho.

4.2 Derivados fenantrênicos, lignana, naftoquinona, derivados do ácido benzóico e flavonóides.

A classe dos derivados fenantrênicos é também largamente encontrada no gênero *Combretum*. No presente trabalho estes metabólitos secundários foram isolados dos galhos e raízes de *C. laxum*. É importante ressaltar que esta classe é representada por compostos com atividade anti-cancerígena [PETTIT, 1987a].

Das raízes foram isolados e caracterizados dois fenantrenos: 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**) e 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (**XIV**); três diidrofenantrenos: 6-metoxicoelonina (**XV**), 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (**XVI**) e callosina (**XVII**); uma bibenzila: 3,4'-diidróxi-3',4,5-trimetoxibibenzila (**XVIII**) e uma lignana, siringaresinol (**XIX**) (figura 4, pág. 17).

Outros compostos aromáticos foram também obtidos dos galhos: uma naftoquinona, lapachol (**XX**), dois flavonóides, apigenina-5-metil-éter (**XXIII**) e sulfuretina (**XXIV**) e mais dois derivados do ácido benzóico, ácidos 3,4-dimetoxibenzóico (**XXI**) e 3-metóxi-4-hidroxibenzóico (**XXII**) (figura 4, pág. 17).

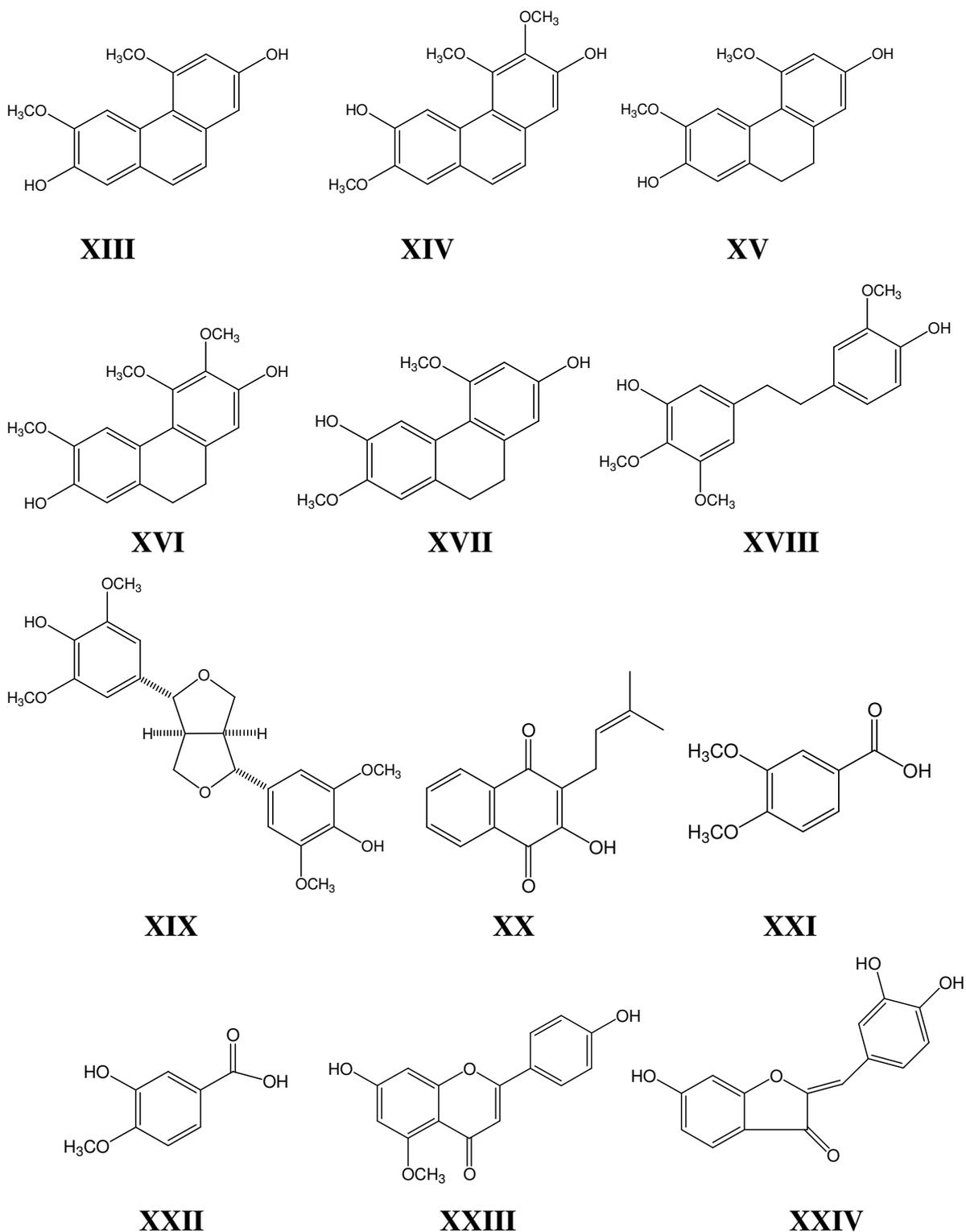


Figura 4. Estruturas dos derivados fenantrênicos, lignana, naftoquinona, derivado do ácido benzóico e flavonoides obtidos de *C. laxum* no presente trabalho.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Especificação dos materiais e equipamentos utilizados

Os galhos de *C. laxum* Jacq. foram moídos em moinho de facas da marca Willy.

Foram utilizadas para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas (com exceção CLAE) solventes do grau PA (Merck, Vetec, QM e Synth). No caso de CLAE, foram empregados solventes de grau cromatográfico (Merck).

Nos processos cromatográficos foram utilizados:

- Gel de sílica do tipo 60G e/ou 60GF₂₅₄ (de 5 a 40 µm da Merck) para CCDA.
- Gel de sílica do tipo 60, partículas 63 a 200 µm (Merck) e 40 a 63 µm (Merck) e Sephadex LH 20, partículas 25 a 100 µm (Sigma) para cromatografia em coluna.

A revelação dos cromatogramas em placas de camada delgada analítica foi feita empregando-se solução a 2% de sulfato cérico em H₂SO₄ 2N e através de inspeção à luz UV (monitor UV de mão, modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm) em câmara escura, utilizando-se sílica com indicador fluorescente.

Nas separações por CLAE foram utilizadas:

- Bomba ternária Shimadzu LC 6AD, com detector UV-Visível variável Shimadzu SPD 6 AV, para condições analíticas e semi-preparativas.
- Coluna de fase reversa C-18 (base de sílica derivatizada com octadecilsilano), com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 µm, dimensões de 4,6 mm x 250 mm (analítica) e 14 mm x 250 mm (semi-preparativa) [Phenomenex].
- Coluna de fase reversa C-18 (base de sílica derivatizada com octadecilsilano), com partículas de 60 Å de poro e diâmetro médio de 4 µm, dimensões de 3,9 Ø x 150 mm (analítica) e 14 Ø x 300 mm (semi-preparativa) [Waters].

Os espectros de RMN uni-e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-300, a 300 MHz e 75 MHz para RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ¹H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de ¹³C. As amostras foram solubilizadas em CDCl₃, Acetona d₆, Py-d₅ ou CD₃OD da marca Merck.

As medições de rotação óptica foram determinadas em polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 341 EM, com filtro de sódio (589) e cela de 1 dm.

O espectro de massa HRESIMS foi adquirido no modo negativo, em equipamento Bruker Daltonics, modelo UltrOTOF-Q.

5.2 Coleta do material vegetal, obtenção e partição do extrato.

5.2.1 Galhos e raízes

Os galhos de *C. laxum* foram coletados na Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no município de Corumbá – MS. A planta foi coletada pela primeira vez no dia 10/10/2004 e identificada por Msc. Ubirazilda Maria Resende e as exsiccatas foram depositadas no Herbário CGMS da UFMS, sob numeração 1802.

Os galhos de *C. laxum* foram secos, triturados e submetidos à extração com etanol durante cinco dias, à temperatura ambiente. O extrato etanólico obtido foi particionado de acordo com o fluxograma presente na figura 5 (pág. 21).

A segunda coleta dos galhos de *C. laxum* se deu no dia 09/07/2007 e o extrato etanólico obtido segundo o mesmo procedimento adotado no da primeira coleta foi particionado de acordo com o fluxograma na figura 6 (pág. 22). Esta segunda coleta foi realizada com a finalidade de se isolar os derivados fenantrênicos, os quais haviam sido detectados na fase diclorometânica, obtida na primeira coleta, mas que não puderam ser purificados em quantidade suficiente, por terem sofrido degradação durante os procedimentos experimentais empregados.

As raízes de *C. laxum* Jacq. também foram coletadas na Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em 09/07/2007.

As raízes de *C. laxum* (1.422,5 g) foram secas, trituradas e submetidas à extração com etanol durante cinco dias, à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi particionado de acordo com o fluxograma mostrado na figura 7 (pág. 23).

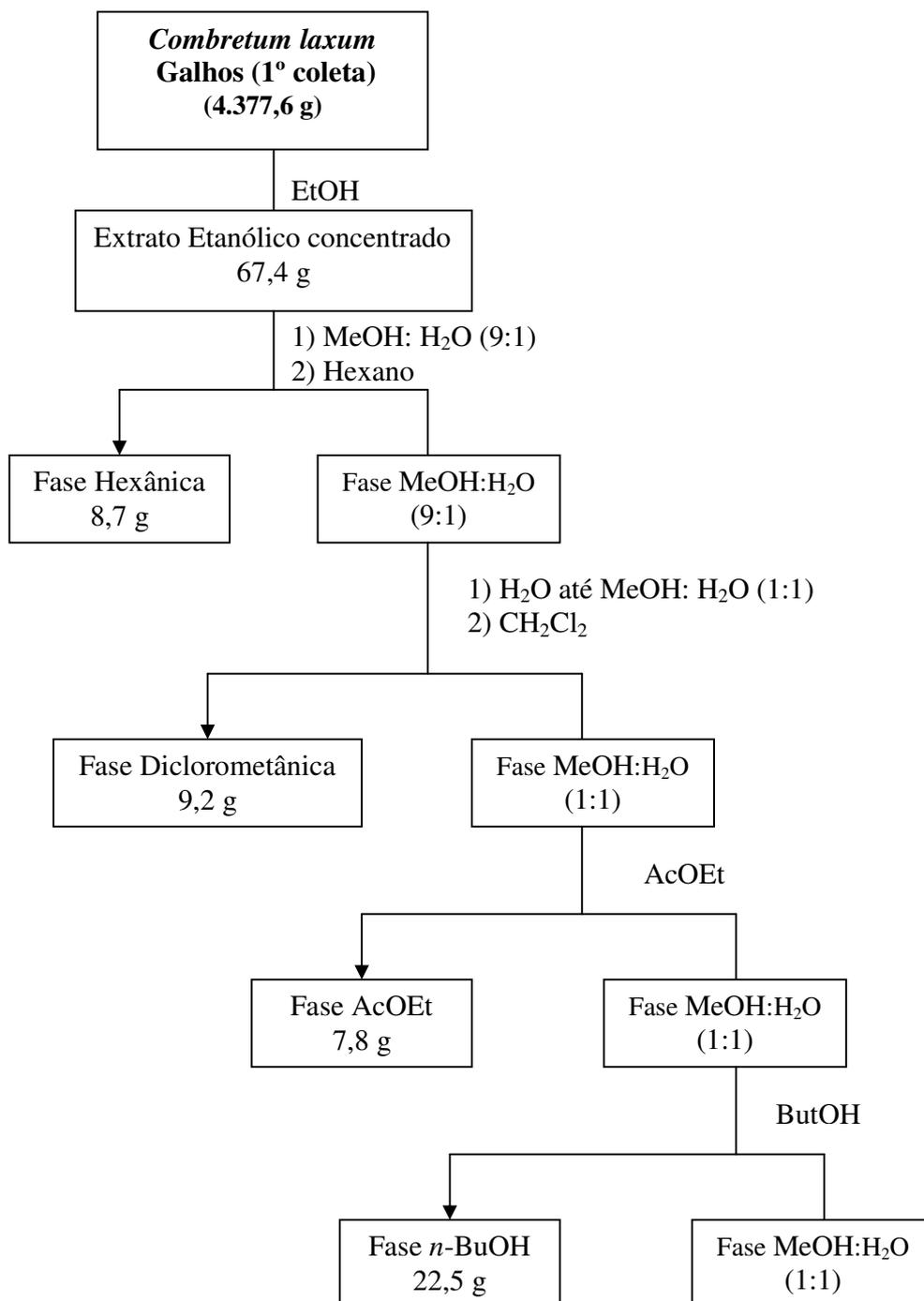


Figura 5: Obtenção e partição do extrato etanólico dos galhos da primeira coleta de *C. laxum*.

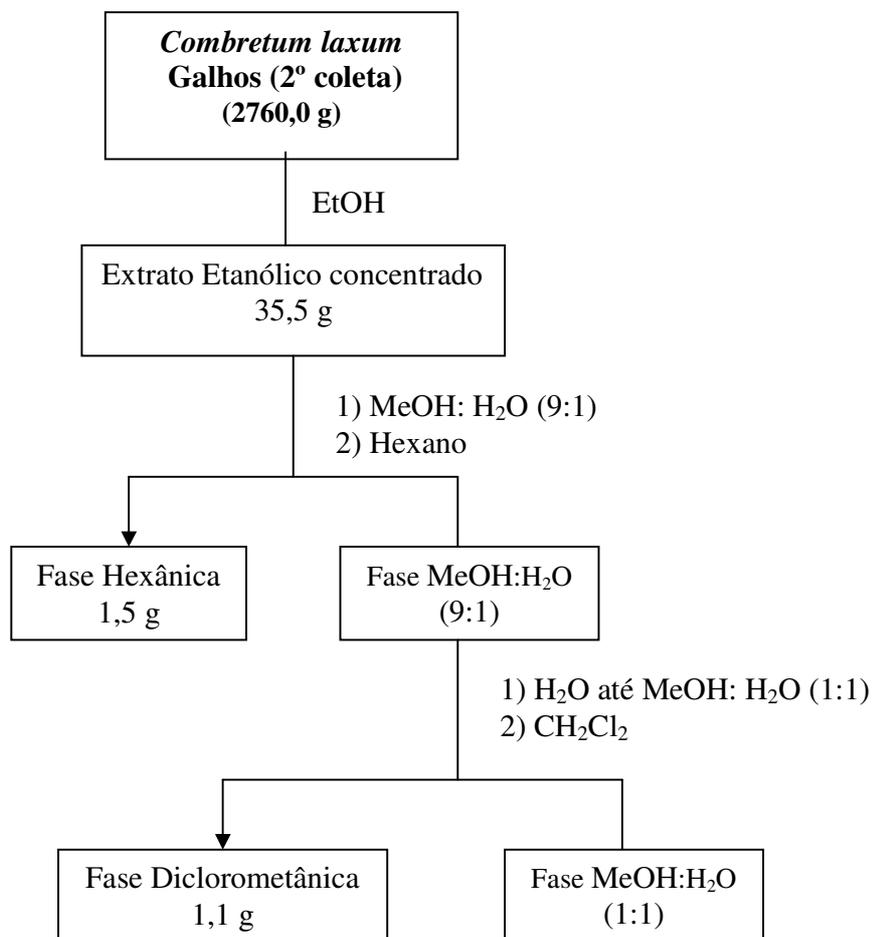


Figura 6: Obtenção e partição do extrato etanólico dos galhos da segunda coleta de *C. laxum*.

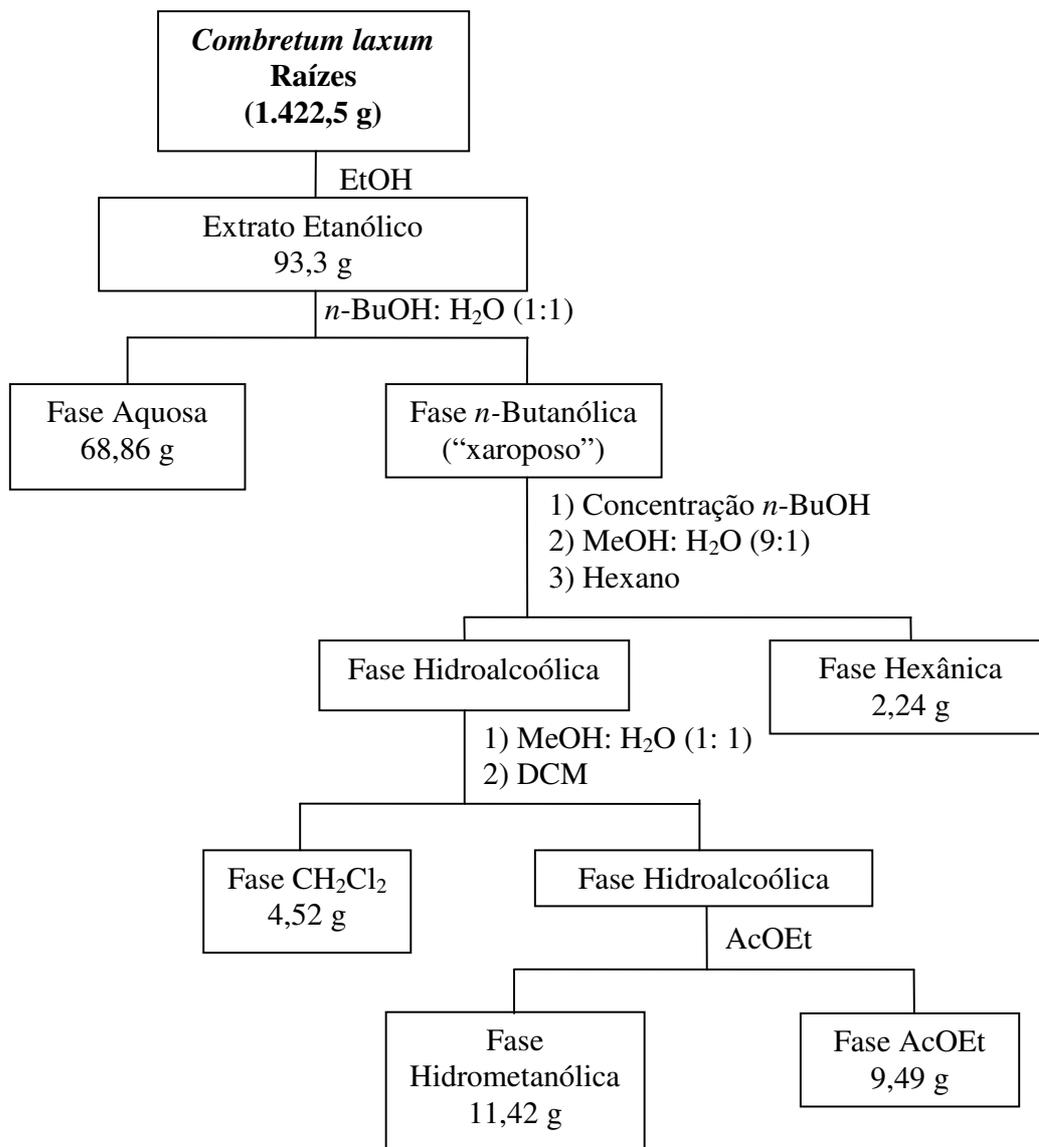


Figura 7: Obtenção e partição do extrato etanólico das raízes de *C. laxum*.

5.3 Estudo fitoquímico dos galhos de *C. laxum* (1ª coleta)

5.3.1 Fracionamento da fase diclorometânica

O material presente na fase diclorometânica (9,2 g) foi submetido inicialmente à cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 60 (70-230 Mesh) como suporte. O sistema foi eluído com gradiente de polaridade crescente como mostra a tabela 2 (pág. 24). Foram coletadas 13 frações de 250 mL cada, denominadas de CLGD, sendo todas concentradas em rota-evaporador e feita análise por CCDA de cada fração obtida.

Tabela 2. Frações obtidas da cromatografia da fase diclorometânica do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*.

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (mg)
Hexano	CLGD 1	70,5
Hexano	CLGD 2	325,3
Hexano: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLGD 3	2540,0
Hexano: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLGD 4	3130,0
CH ₂ Cl ₂	CLGD 5	985,3
CH ₂ Cl ₂	CLGD 6	514,2
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLGD 7	1289,5
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLGD 8	54,5
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLGD 9	24,2
AcOEt	CLGD 10	19,3
AcOEt	CLGD 11	38,8
AcOEt: MeOH (1:1)	CLGD 12	138,7
AcOEt: MeOH (1:1)	CLGD 13	32,3

Após avaliação por CCDA, foram reunidas as frações CLGD 3 e 4, as quais foram selecionadas para estudo.

A fração CLGD 3-4 foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna de sílica gel 60 (70-230 Mesh). O sistema foi eluído com gradiente de polaridade crescente (Tabela 3, pág. 25). Foram coletadas 54 frações, denominadas CLGDC, como descrito na figura 8 (pág. 26). Deste fracionamento foi obtido o ácido betulínico (I) na

fração CLGDC-11 e uma mistura de fenantrenos nas frações CLGDC 28-30 (figura 8, pág. 26).

Tabela 3. Frações obtidas da cromatografia em coluna de CLGD 3-4.

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (mg)
Hexano	CLGDC 1	317,4
Hexano: AcOEt (9: 1)	CLGDC 2	143,5
Hexano: AcOEt (9: 1)	CLGDC 3	315,3
Hexano: AcOEt (9: 1)	CLGDC 4	69,0
Hexano: AcOEt (8: 2)	CLGDC 5	32,3
Hexano: AcOEt (8: 2)	CLGDC 6-7	563,0
Hexano: AcOEt (8: 2)	CLGDC 8	18,8
Hexano: AcOEt (8: 2)	CLGDC 9	33,1
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 10	39,4
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 11	200,4
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 12	61,5
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 13	77,3
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 14	78,7
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 15-18	103,3
Hexano: AcOEt (7: 3)	CLGDC 19	45,0
Hexano: AcOEt (1: 1)	CLGDC 20	44,0
Hexano: AcOEt (1: 1)	CLGDC 21	67,0
Hexano: AcOEt (1: 1)	CLGDC 22-26	955,7
Hexano: AcOEt (1: 1)	CLGDC 27	38,2
Hexano: AcOEt (1: 1)	CLGDC 28	175,1
Hexano: AcOEt (1: 1)	CLGDC 29	45,6
Hexano: AcOEt (2,5: 7,5)	CLGDC 30	33,7
Hexano: AcOEt (2,5: 7,5)	CLGDC 31-34	114,2
Hexano: AcOEt (2,5: 7,5)	CLGDC 35	438,0
Hexano: AcOEt (2,5: 7,5)	CLGDC 36	154,2
AcOEt	CLGDC 37	103,1
AcOEt	CLGDC 38	156,3
AcOEt	CLGDC 39	102,5
AcOEt	CLGDC 40-43	106,0
AcOEt	CLGDC 44	50,1
AcOEt	CLGDC 45	33,3
AcOEt: MeOH (9,5: 0,5)	CLGDC 46	95,2
AcOEt: MeOH (9,5: 0,5)	CLGDC 47-49	605,8
AcOEt: MeOH (9: 1)	CLGDC 50	118,5
AcOEt: MeOH (8: 2)	CLGDC 51-54	98,6

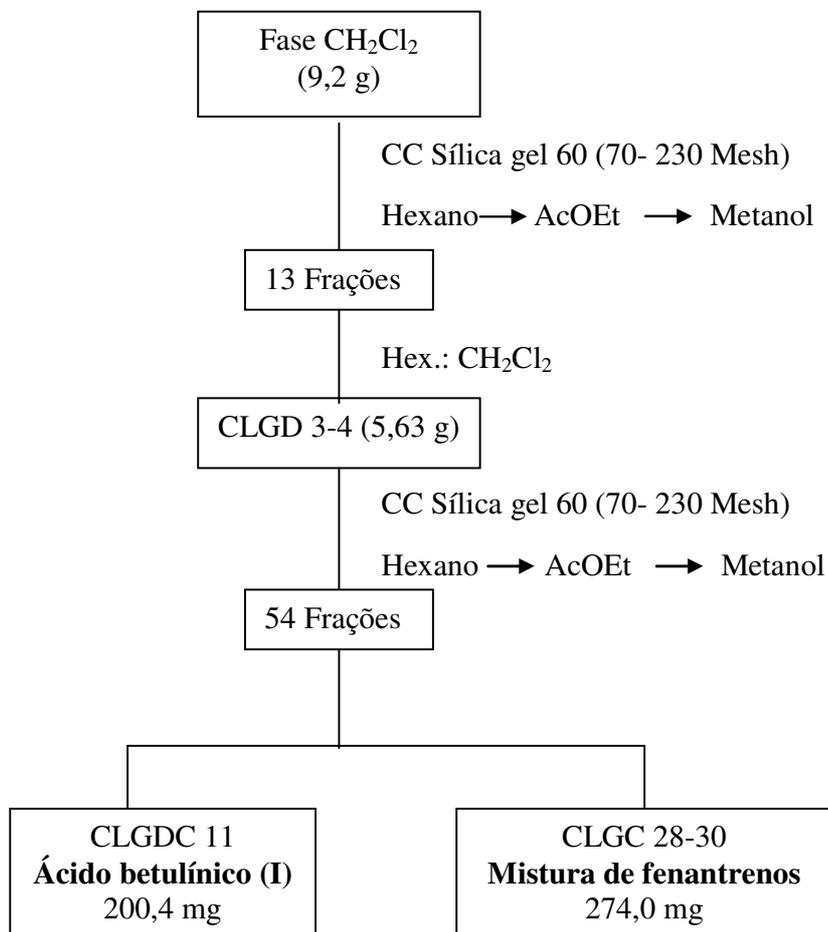


Figura 8: Fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica proveniente do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*: obtenção de I.

5.3.2 Fracionamento da fase acetato de etila

O material presente na fase acetato de etila (7,8 g) foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna, utilizando-se para tal 260,1 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram coletadas 30 frações de 250 mL cada, denominadas de CLX, sendo todas concentradas em rota-evaporador e feita análise por CCDA de cada fração obtida (Tabela 4, pág. 27).

Tabela 4. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fase acetato de etila proveniente do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*.

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (mg)
Hexano	CLX 1	30,0
Hexano: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLX 2	73,0
Hexano: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLX 3	117,6
Hexano: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLX 4	57,7
CH ₂ Cl ₂	CLX 5	563,0
CH ₂ Cl ₂	CLX 6	64,1
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLX 7	136,7
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLX 8	204,0
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLX 9	120,7
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (1:1)	CLX 10	88,1
AcOEt	CLX 11	137,5
AcOEt	CLX 12-15	1203,5
AcOEt: MeOH (9,5:0,5)	CLX 16	429,7
AcOEt: MeOH (9,5:0,5)	CLX 17	1106,5
AcOEt: MeOH (9,5:0,5)	CLX 18	453,5
AcOEt: MeOH (9:1)	CLX 19	460,1
AcOEt: MeOH (9:1)	CLX 20	245,3
AcOEt: MeOH (9:1)	CLX 21-22	369,7
AcOEt: MeOH (8:2)	CLX 23	116,5
AcOEt: MeOH (8:2)	CLX 24	278,7
AcOEt: MeOH (8:2)	CLX 25	174,9
AcOEt: MeOH (1:1)	CLX 26	545,4
AcOEt: MeOH (1:1)	CLX 27	639,1
AcOEt: MeOH (1:1)	CLX 28	72,9
AcOEt: MeOH (1:1)	CLX 29	52,8
MeOH	CLX 30	58,8

Após avaliação por CCDA, foram reunidas e selecionadas para estudo as frações CLX 12 a 15.

5.3.2.1 Fracionamento cromatográfico de CLX 12-15

O estudo prévio por CCDA da fração CLX 12-15 (1203,5 mg) resultou em um cromatograma em que as substâncias apresentaram Rfs muito semelhantes, após eluição em CHCl_3 /metanol (8,5: 1,5) e revelação em sulfato cérico.

Para a separação destes componentes foi utilizada a cromatografia em coluna de sílica “flash” (230- 400 Mesh ASTM.), empregando-se CHCl_3 /metanol (9: 1) como eluente. Foram coletadas 76 frações de aproximadamente 5mL cada, as quais foram intituladas de CLXA. Foi feita análise por CCDA, podendo-se assim agrupar as frações que apresentavam perfil cromatográfico semelhante.

As frações CLXA 3-8 reunidas foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C e foram identificadas como uma mistura de ácido arjunólico (III) e ácido asiático (IV) (Figura 10, pág. 29).

5.3.2.2 Fracionamento cromatográfico de CLXA 15-28

Em análise prévia da fração CLXA 15-28 (409,6 mg) por CCDA em CHCl_3 /MeOH e revelação com sulfato cérico foi possível observar uma única mancha roxa, porém, seu espectro de RMN de ^1H e ^{13}C indicava a presença de pelo menos quatro diferentes triterpenos. Assim, utilizou-se como alternativa para a separação destes a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa em fase reversa (C-18). O ajuste da fase móvel nas etapas envolvendo CLAE semi-preparativa foi realizado previamente em coluna analítica. O cromatograma resultante da eluição em coluna semi-preparativa desta fração (figura 9, pág. 28) apresentou vários picos sendo coletadas 4 frações, denominadas CLXB 2-6-3, CLXB 2-6-4, CLXB 2-6-6 e CLXB 2-6-7, as quais foram identificadas como arjunglucosídeo II e quadranosídeo IV (V e VI), quadranosídeo I (II), $2\alpha,3\beta,6\beta$ -triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VIII) e $2\alpha,3\beta,24$ -triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VII), respectivamente (figura 10, pág. 30).

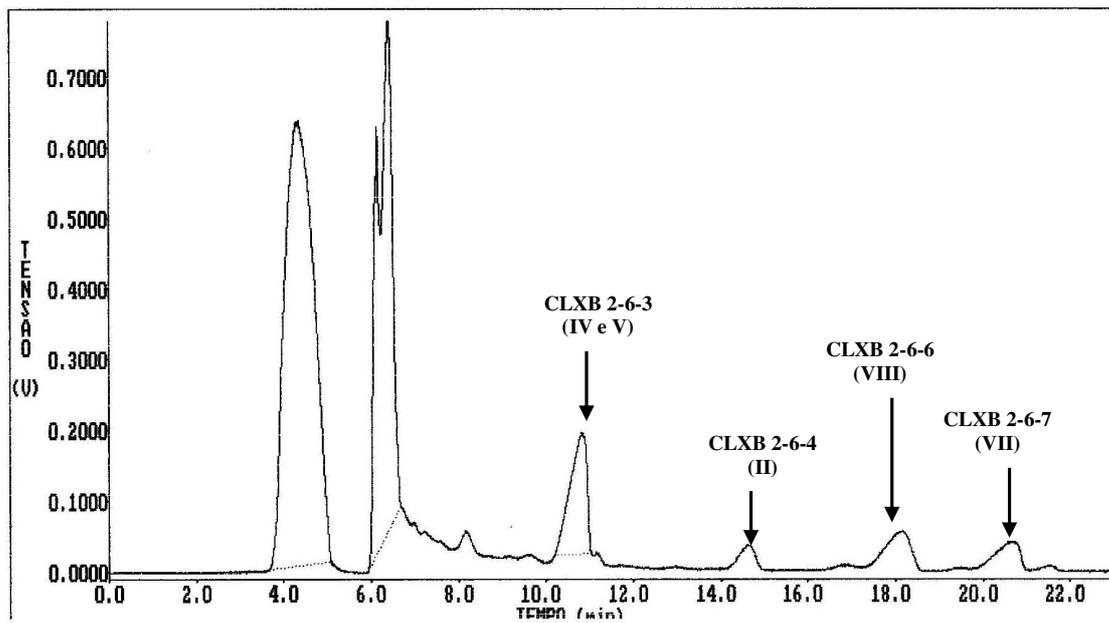


Figura 9. Cromatograma semi-preparativo da fração CLXB 2-6 (Figura 10). Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μ m, 14 mm x 250 mm; eluente MeCN: H₂O (38: 62); 10 mL/min; detector UV, 210 nm.

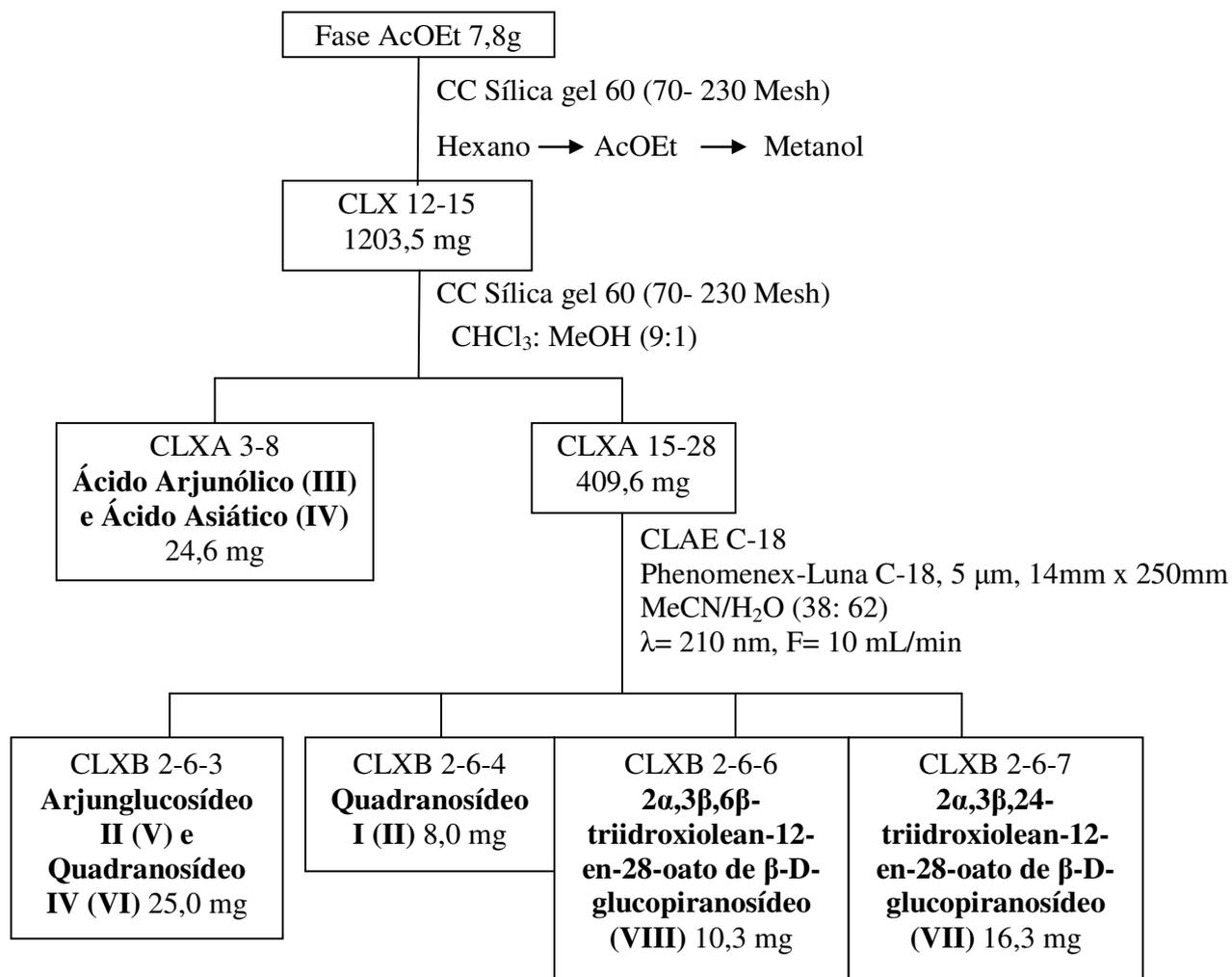


Figura 10: Esquema do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt proveniente do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*: obtenção de II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

5.3.3 Fracionamento da fase *n*-butanólica

O material presente na fase *n*-butanólica (6,75 g) foi submetido inicialmente a uma filtração em sílica, utilizando-se para tal sílica de fase reversa C-18, um funil de vidro sinterizado e bomba de sucção. O sistema foi eluído com MeOH/H₂O (2:8), MeOH/H₂O (4:6), MeOH/H₂O (6:4), MeOH/H₂O (8:2), MeOH, AcOEt e Hexano. Foram coletadas 7 frações (Tabela 5, pág. 31), denominadas CLBU, sendo todas concentradas em rota- evaporador. A fração selecionada inicialmente para estudo foi CLBU-4 (500,0 mg) por apresentar perfil cromatográfico adequado para separação.

Tabela 5. Frações obtidas da cromatografia de fase reversa da fase *n*-butanólica proveniente do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*.

ELUENTE	FRAÇÃO	V. COLETADO (ML)	MASSA (MG)
MeOH: H ₂ O (2:8)	CLBU-1	500	1730,0
MeOH: H ₂ O (4:6)	CLBU-2	500	2580,0
MeOH: H ₂ O (6:4)	CLBU-3	500	1660,0
MeOH: H ₂ O (8:2)	CLBU-4	500	500,0
MeOH	CLBU-5	700	183,8
AcOEt	CLBU-6	700	35,1
Hexano	CLBU-7	250	8,0

5.3.3.1 Estudo da fração CLBU-4

A fração CLBU-4 foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (1,5m x 0,03m) tendo como eluente MeOH e desta coluna foram coletadas 95 frações de 8 mL cada, denominadas CLBU-S. Após análise por CCDA foram reunidas e selecionadas para estudo as frações 45-51 (CLBUS 45-51) (70 mg), com manchas de Rf muito próximos na placa cromatográfica. Assim, utilizou-se CLAE como alternativa para a separação destes componentes. O ajuste da fase móvel para CLAE semi-preparativa foi realizado previamente em coluna analítica. O cromatograma resultante da eluição em coluna semi-preparativa desta fração (figura 11, pág. 32) apresentou 5 picos principais, cujos componentes foram coletados e denominados CLB51-3 (não identificado), CLB51-4 (chebulosídeo II (XI)), CLB51-5 (bellericosídeo (IX) e $2\alpha,3\beta,23,24$ -tetraidroxiursan-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosídeo (X)), CLB51-6 (bellericosídeo (IX)) e CLB51-7 (arjunglucosídeo II (V) e quadranosídeo IV (VI)), (figura 11, pág. 32 e figura 12, pág. 33).

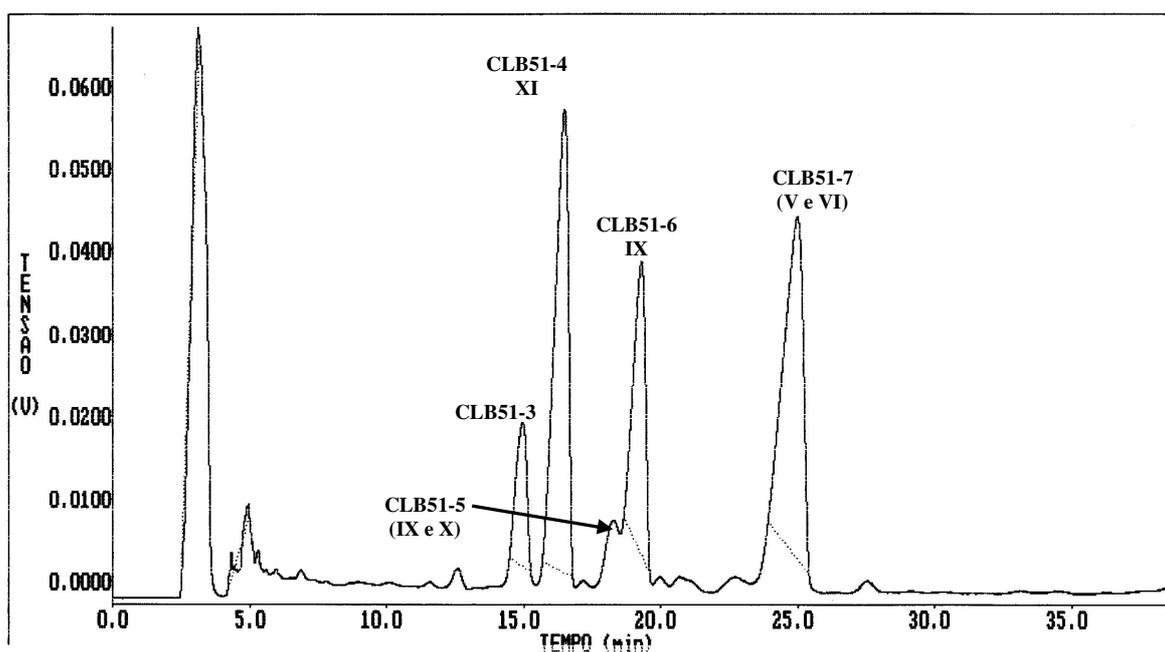


Figura 11: Cromatograma semi-preparativo da fração CLBUS 45-51. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μ m, 14 mm x 250 mm; eluente MeCN/H₂O (30: 70); fluxo de 14 mL/min; detector UV, 210 nm.

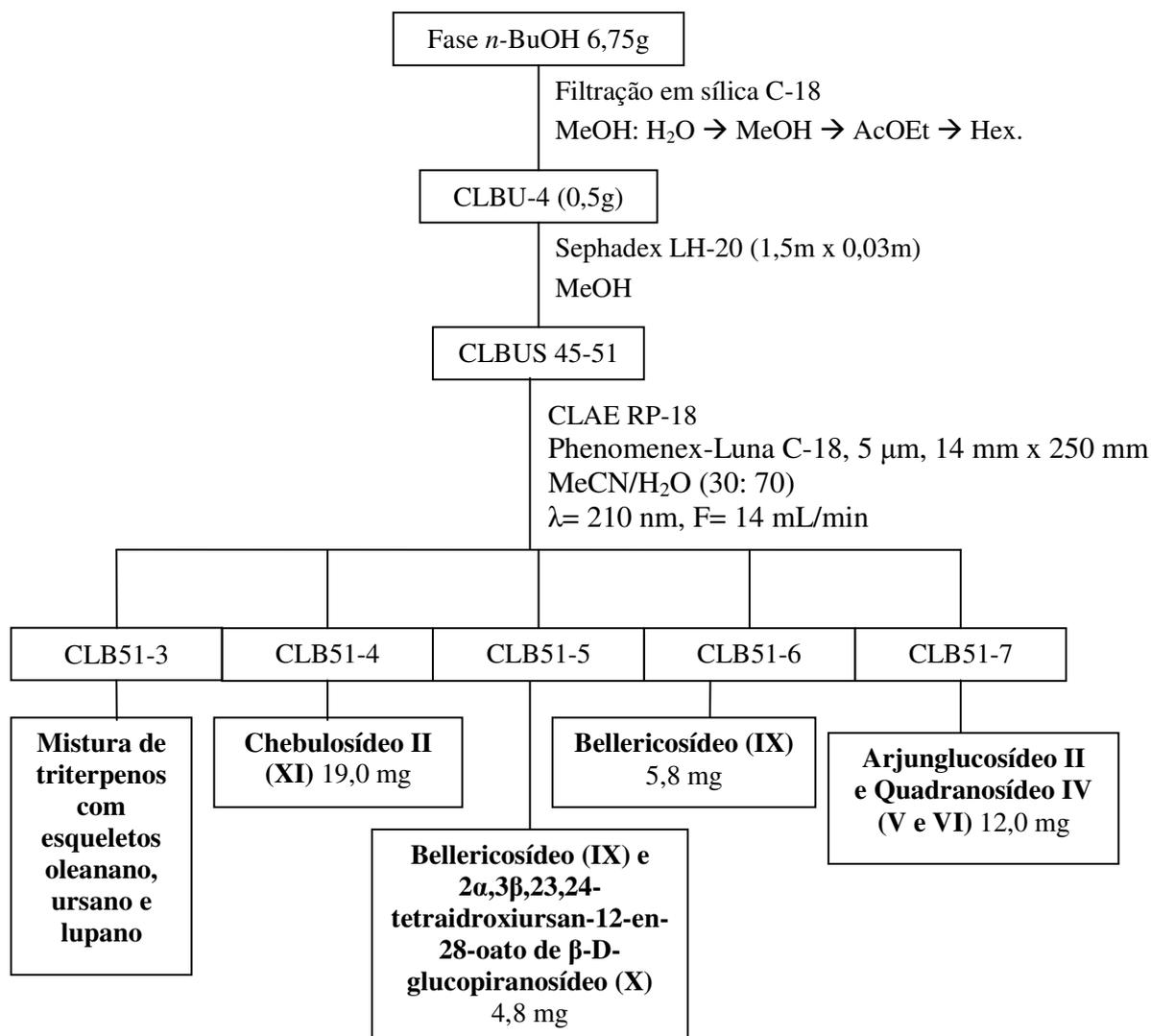


Figura 12. Esquema do fracionamento cromatográfico da fase *n*-BuOH proveniente do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*: obtenção de V, VI, IX, X e XI.

5.4 Estudo fitoquímico dos galhos de *C. laxum* (2ª coleta)

5.4.1 Fracionamento da fase diclorometânica

A fase diclorometânica resultante da segunda coleta (1,1 g) foi submetida a uma filtração em coluna de sílica gel (70-230 Mesh). Foi utilizado um gradiente de polaridade crescente como solvente, começando com hexano e subsequentemente diclorometano, acetato de etila até chegar a metanol (tabela 6, pág. 34). Foram coletadas 16 frações, denominadas de CLG, sendo todas concentradas em rota-evaporador e feita análise por CCDA de cada fração obtida.

Tabela 6. Frações obtidas da filtração em sílica gel da fase diclorometano proveniente do extrato etanólico da segunda coleta dos galhos de *C. laxum*.

ELUENTE	VOL. DE ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (mg)
Hexano	250	CLG 1	0,0
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (3:1)	200	CLG 2	11,0
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	200	CLG 3	10,1
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:3)	50	CLG 4	8,1
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:3)	50	CLG 5	7,0
CH ₂ Cl ₂	100	CLG 6	10,5
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (3:1)	200	CLG 7	47,3
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (3:1)	50	CLG 8	129,2
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:1)	150	CLG 9	92,3
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:3)	150	CLG 10	104,9
AcOEt	200	CLG 11	41,6
AcOEt/MeOH (9:1)	100	CLG 12	262,5
AcOEt/MeOH (9:1)	100	CLG 13	150,6
AcOEt/MeOH (3:1)	200	CLG 14	180,2
AcOEt/MeOH (1:1)	100	CLG 15	80,6
AcOEt/MeOH (1:1)	100	CLG 16	19,2

Na CCDA da fração CLG-4 (8,1 mg) foi possível observar uma única mancha de cor alaranjada bastante intensa, após eluição em hexano/AcOEt (1:1) e revelação em sulfato cérico. CLG-4 foi então analisada por RMN de ¹H e ¹³C e seu componente foi identificado como sendo lapachol (XX) (Figura 15, pág. 37).

5.4.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração CLG-10

A análise por CCDA da fração CLG-10 (104,9 mg) mostrou que esta continha pelo menos 4 substâncias, a opção foi submetê-la à cromatografia líquida de alta eficiência. Assim, a condição de eluição ideal para separação das substâncias foi estabelecida por CLAE no modo analítico com uma proporção de MeCN/H₂O (28: 72), utilizando-se uma coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 µm, 0,7Ø x 250 mm, detector UV 210 nm e um fluxo de 0,6 mL/min. Após obter a condição para a separação, esta fração foi submetida à CLAE no modo semi-preparativo (figura 13, pág. 35), sendo coletadas 4 frações, denominadas CLGH-1, CLGH-4, CLGH-5 e CLGH-6. Após análise por RMN de ¹H e de ¹³C, verificou-se que a fração CLGH-4 continha o ácido-3,4-dimetoxibenzóico (**XXI**, 6,5 mg), a fração CLGH-5 continha a sulfuretina (**XXIV**, 3,0 mg), enquanto que a fração CLGH-1 era composta por uma mistura de duas substâncias (figura 14, pág. 36).

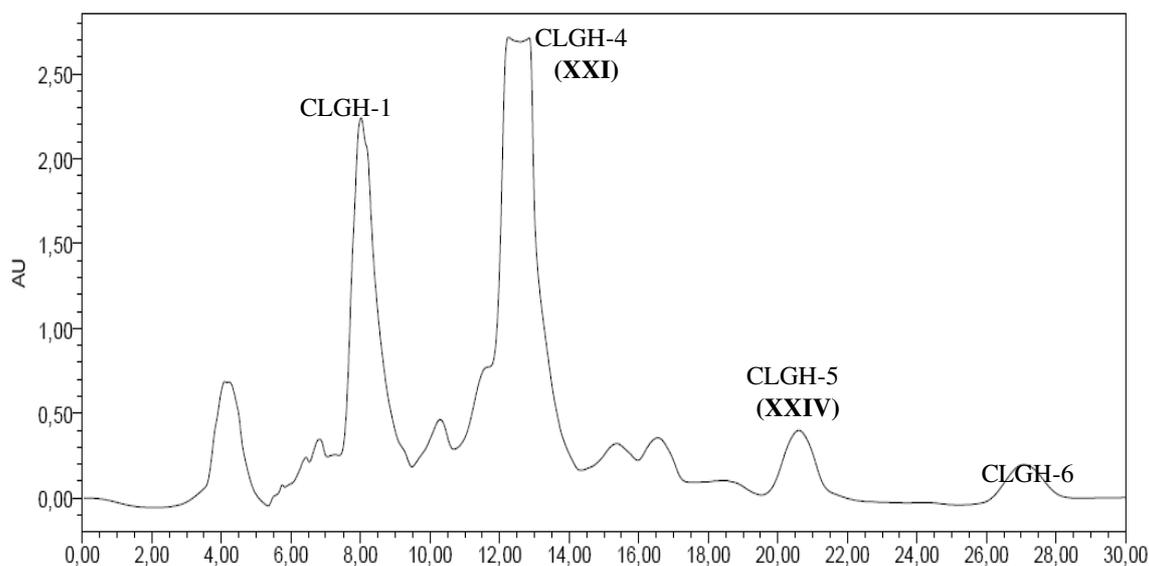


Figura 13. Cromatograma semi-preparativo da fração CLG-10. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 µm, 14 mm x 250 mm; eluente CH₃CN/H₂O (28:72); f= 12 mL/min; λ= 210 nm.

A fração CLGH-1 foi então submetida a uma nova CLAE, sendo as condições de separação estabelecidas através de CLAE-analítica, como MeCN/H₂O (13: 87), coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 µm, 0,7Ø x 250 mm, detector UV 230 nm e um fluxo de 0,7

mL/min. Posteriormente foi feita a separação das substâncias por CLAE semi-preparativa. Uma única substância pode ser identificada, o ácido-3-metóxi-4-hidroxibenzoico (**XXII**, 2,3 mg) (Figura 15, pág. 37), enquanto que a outra foi obtida em quantidade insuficiente para possibilitar a sua identificação.

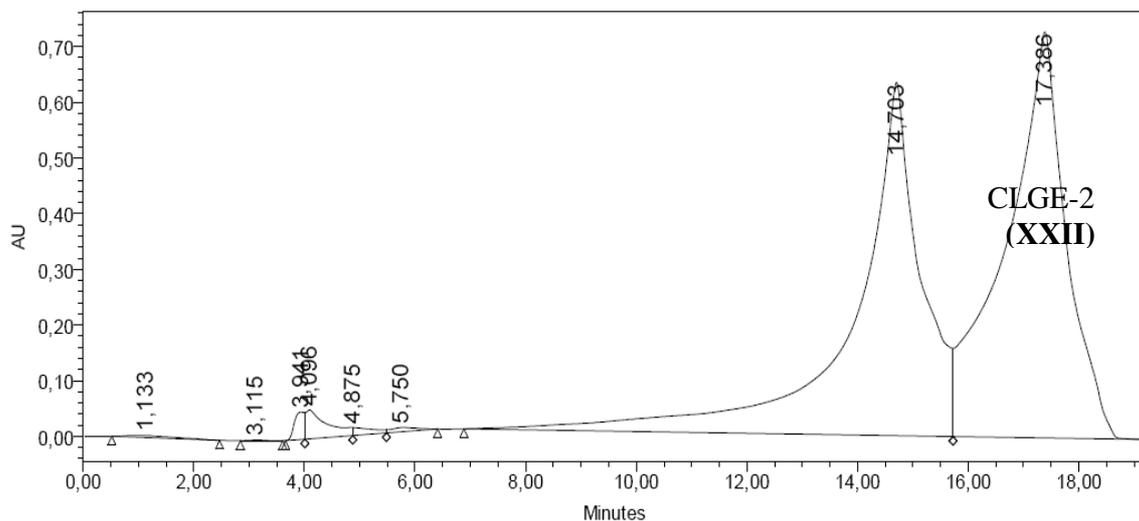


Figura 14. Cromatograma semi-preparativo da fração CLGH-1. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μ m, 14 mm x 250 mm; eluente MeCN/H₂O (13:87); f= 14 mL/min; λ = 230 nm.

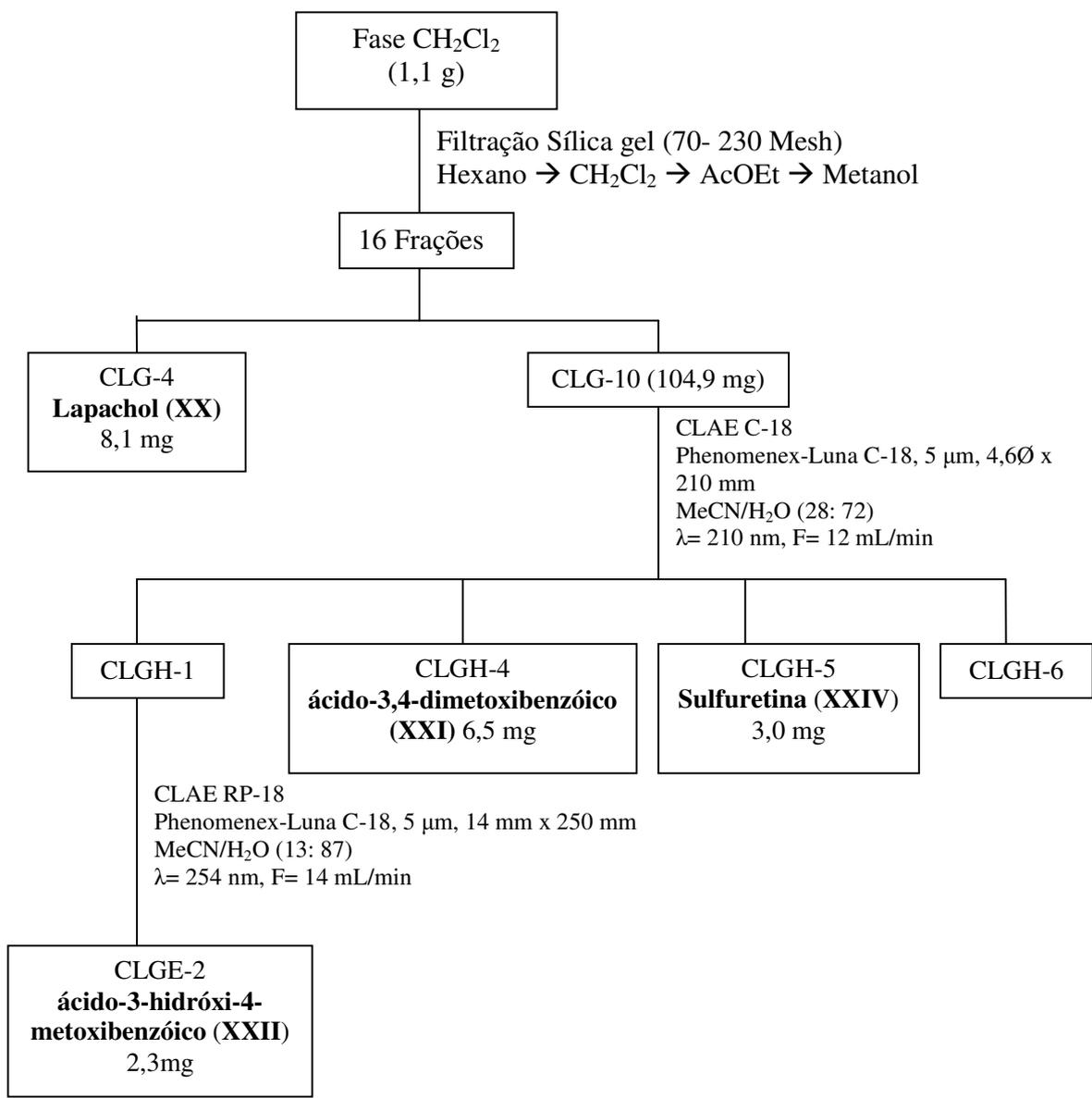


Figura 15. Esquema do fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica proveniente da segunda coleta do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*: obtenção de **XXI**, **XXII** e **XXIV**.

5.4.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração CLG-13

A fração CLG-13, proveniente da filtração em sílica da fase CH_2Cl_2 da segunda coleta dos galhos, foi submetida a uma separação em coluna utilizando-se Sephadex LH-20, com dimensões 42,0 x 2,0 cm. Foi utilizado como eluente metanol e foram coletadas 28 frações de aproximadamente 6 mL cada fração, as frações foram codificadas como CLGV de 1 a 28.

Após análise por RMN de ^1H e ^{13}C verificou-se que a fração CLGV 6-8 continha o ácido arjunólico (**III**, 33,8 mg) e que a fração CLGV-17-21 se tratava de uma mistura com um componente majoritário (figura 17, pág. 39), para a purificação desta substância foi utilizado CLAE, na qual teve suas condições estabelecidas no modo analítico e posteriormente realizado a separação no modo semi-preparativo com eluente: $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (62: 38); fluxo: 12,0 mL/min.; foi utilizado detector de UV com comprimento de onda fixo igual a 254 nm; a coluna utilizada foi Phenomenex-Luna C-18, 5 μm , 14 mm x 250 mm. Foram coletadas duas frações e apenas a fração majoritária (CLGV-21-2) foi identificada como apigenina-5-metil-éter (**XXIII**, 2,5 mg) (figura 16, pág. 38).

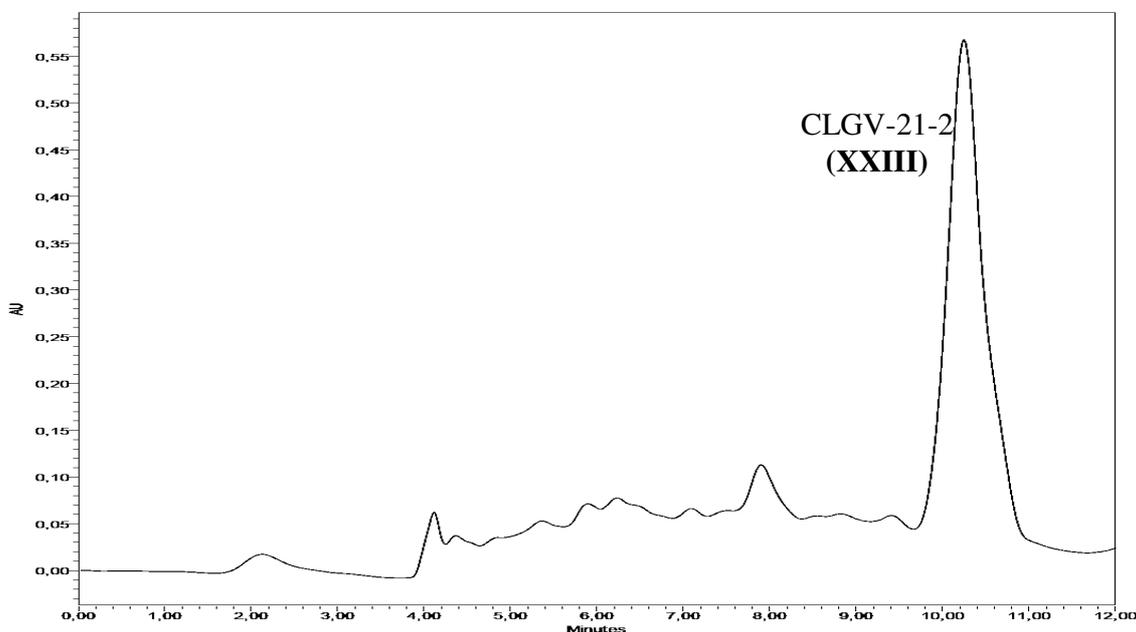


Figura 16. Cromatograma semi-preparativo da fração CLGV 17-21. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μm , 14 mm x 250 mm; eluente $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (62:38); $f=$ 12 mL/min; $\lambda=$ 254 nm.

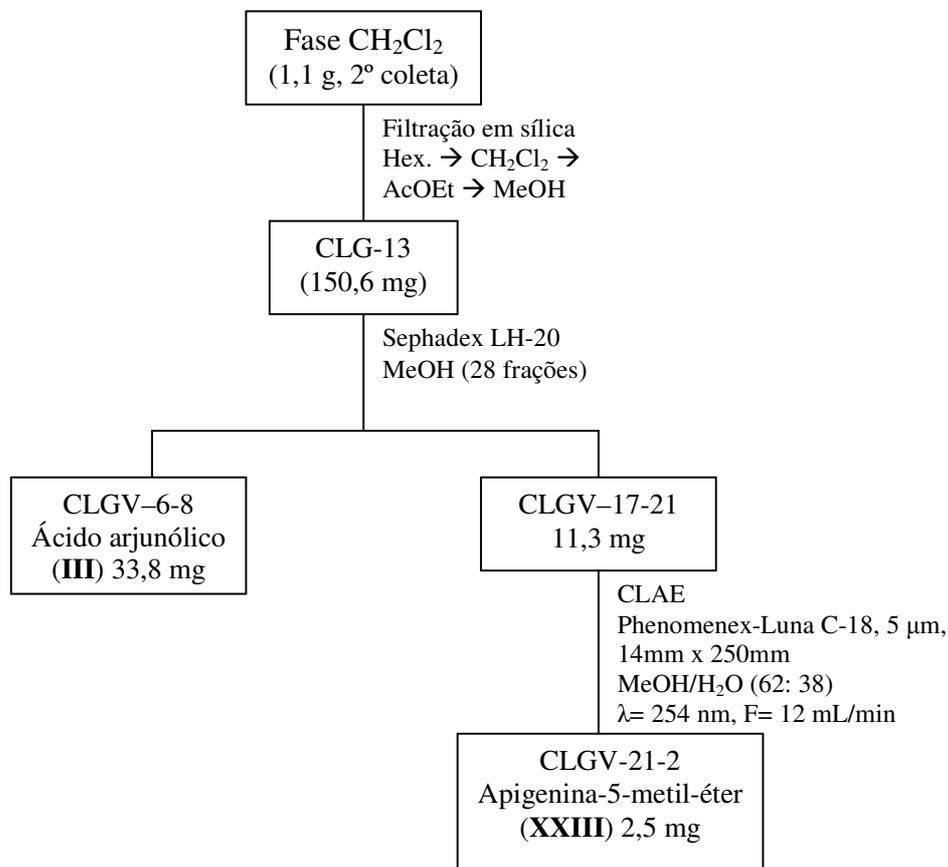


Figura 17. Esquema do fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica proveniente da segunda coleta do extrato etanólico dos galhos de *C. laxum*: obtenção de **III** e **XXIII**.

5.5 Estudo fitoquímico das raízes de *C. laxum*

5.5.1 Fracionamento da fase diclorometânica

O material contido na fase diclorometânica (4,52 g) foi submetido inicialmente a uma filtração em sílica, utilizando-se para tal sílica gel 60 (70 – 230 Mesh), um funil de vidro sinterizado e bomba de sucção. O sistema foi eluído com hexano, hexano/CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), AcOEt. Foram coletadas 13 frações (Tabela 7, pág. 40), denominadas CLDCM, sendo todas concentradas em rota-evaporador e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sob as condições de eluição CHCl₃/MeOH/H₂O (74: 24: 2) e revelação com sulfato cérico. Desta forma, as frações selecionadas inicialmente para estudo foram CLDCM-6 (232,0 mg) e CLDCM-8 (1,359g), devido ao número de manchas e a separação apresentadas em placa cromatográfica.

Tabela 7. Frações obtidas da cromatografia em coluna da fase diclorometânica proveniente do extrato etanólico das raízes de *C. laxum*

ELUENTE	FRAÇÃO	V. COLETADO (ML)	MASSA (MG)
Hexano	CLDCM-1	250	84,3
Hexano	CLDCM-2	250	24,0
Hex/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLDCM-3	250	115,9
Hex/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CLDCM-4	250	26,9
CH ₂ Cl ₂	CLDCM-5	250	215,2
CH ₂ Cl ₂	CLDCM-6	250	232,2
CH ₂ Cl ₂	CLDCM-7	250	171,2
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:1)	CLDCM-8	125	1159,0
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:1)	CLDCM-9	125	1039,0
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:1)	CLDCM-10	250	602,8
AcOEt	CLDCM-11	125	724,7
AcOEt	CLDCM-12	125	88,4
AcOEt	CLDCM-13	250	25,3

5.5.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração CLDCM-6

A fração CLDCM-6 (232,2 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 tendo como eluente MeOH. Desta coluna foram coletadas 38 frações de aproximadamente 5 mL cada, denominadas CLDS. Após análise por CCDA, foram reunidas e selecionadas para estudo as frações CLDS 23-28 e CLDS 30-31. Após análise por RMN de ^1H foi possível observar que CLDS 30-31 tratava-se de 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**, 33,1 mg) (figura 23, pág. 47). Utilizou-se como alternativa para a separação dos componentes de CLDS 23-28 a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa em fase reversa (C-18). O ajuste da fase móvel para CLAE semi-preparativa foi realizado previamente em coluna analítica. O cromatograma resultante da eluição em coluna semi-preparativa desta fração (figura 18, pág. 41) apresentou 3 picos sendo as frações correspondentes coletadas e denominadas CLDH-1, a qual continha 6-metoxicoelonina (**XV**, 4,5 mg), CLDH-2, composta por uma mistura não identificada e CLDH-3, que correspondia ao 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (**XIV**, 3,2 mg) (Figura 23, pág. 47).

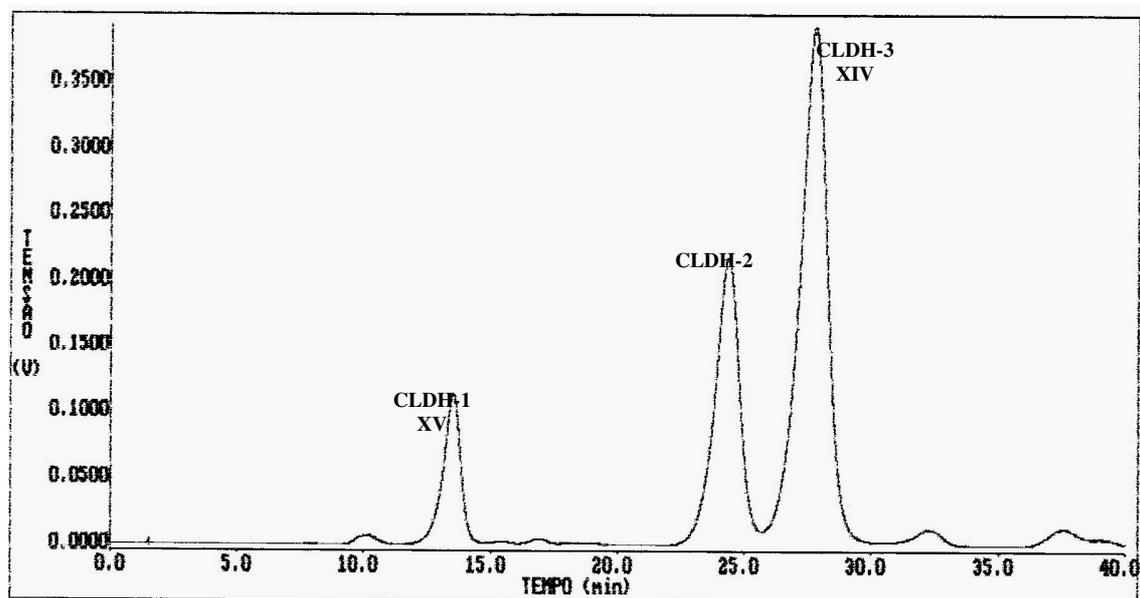


Figura 18. Cromatograma semi-preparativo da fração CLDS 23-28 (Figura 16). Coluna Waters C-18, 5 μm , 14 mm x 150 mm; eluente MeOH: H₂O (40: 60); fluxo de 4 mL/min; detector UV, 254 nm.

5.5.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração CLDCM-8

O material presente na fração CLDCM-8 (1,159 g) foi submetido inicialmente a uma filtração em sílica, utilizando-se para tal sílica de fase reversa C-18, um funil de vidro sinterizado e bomba de sucção. Foram coletadas 5 frações (Tabela 8, pág. 42) de 100 mL cada, denominadas CLDC, sendo todas concentradas em rota-evaporador e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sob as condições de eluição $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80: 20: 1) e revelação com sulfato cérico. Desta forma, a fração selecionada inicialmente para estudo foi CLDC-3 (338,4 mg), devido ao número e complexidade de manchas apresentadas na placa cromatográfica. Em seguida foram selecionadas para estudo as frações CLDC-1 e CLDC-4.

Tabela 8. Frações obtidas da filtração em sílica da fração CLDCM-8 proveniente da fase diclorometânica do extrato etanólico das raízes de *C. laxum*.

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (mg)
MeOH/H ₂ O (4:6)	CLDC-1	152,3
MeOH/H ₂ O (6:4)	CLDC-2	262,3
MeOH/H ₂ O (8:2)	CLDC-3	358,4
MeOH	CLDC-4	350,3
MeOH/AcOEt (1:1)	CLDC-5	31,5

5.5.1.2.1 Fracionamento cromatográfico de CLDC-3

Utilizou-se para a separação dos componentes de CLDC-3 a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa em fase reversa (C-18). O ajuste da fase móvel para CLAE semi-preparativa foi realizado previamente em coluna analítica. O cromatograma resultante da eluição em coluna semi-preparativa desta fração (figura 19, pág. 43) apresentou vários picos, sendo coletadas 12 frações codificadas como CLDCH. Após análise por RMN de ¹H e de ¹³C foi possível observar que CDLCH-6 estava pura e se tratava do ácido arjunólico (**III**, 40,8 mg) (Figura 23, pág. 47).

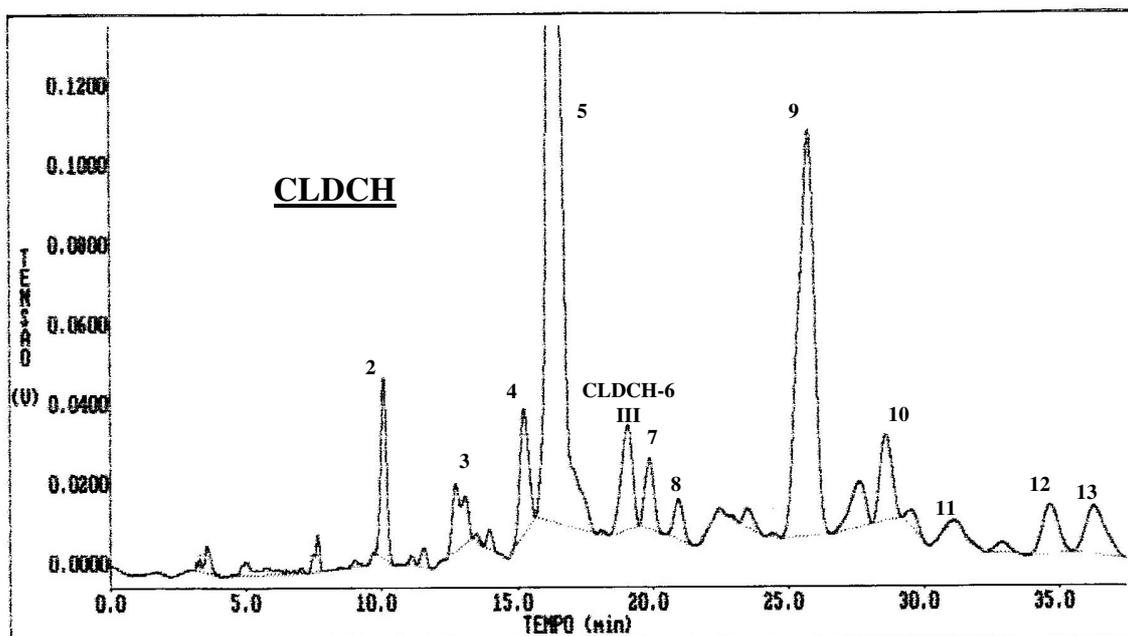


Figura 19. Cromatograma semi-preparativo. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μm , 14 mm x 250 mm; eluente MeCN/H₂O (48: 52); fluxo de 14 mL/min; detector UV, 254 nm.

5.5.1.2.2 Fracionamento cromatográfico de CLDC-1

Após análise por CCDA da fração CLDC-1 foi possível observar manchas roxas e avermelhadas muito próximas de difícil separação por métodos cromatográficos convencionais. Desta forma, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo semi-preparativo foi o método mais indicado para a separação desta mistura. O ajuste da fase móvel para CLAE semi-preparativa foi realizado previamente em coluna analítica. O cromatograma de eluição resultante apresentou seis picos principais, os quais foram coletados e codificados como CLDCP (figura 20, pág. 44). Analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135° e demais experimentos bidimensionais as frações CLDCP-5, CLDCP-8, CLDCP-10, CLDCP-11 e CLDCP-13 continham, respectivamente: 4'-hidróxi-3,3',4-trimetóxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila (**XVIII**, 3,1 mg), 6-metoxicelonina (**XV**, 4,5 mg), calosina (**XVI**, 6,9 mg), (+)-Siringaresinol (**XIX**, 6,9 mg) e 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (**XVII**, 14,2 mg) respectivamente (Figura 23, pág. 47).

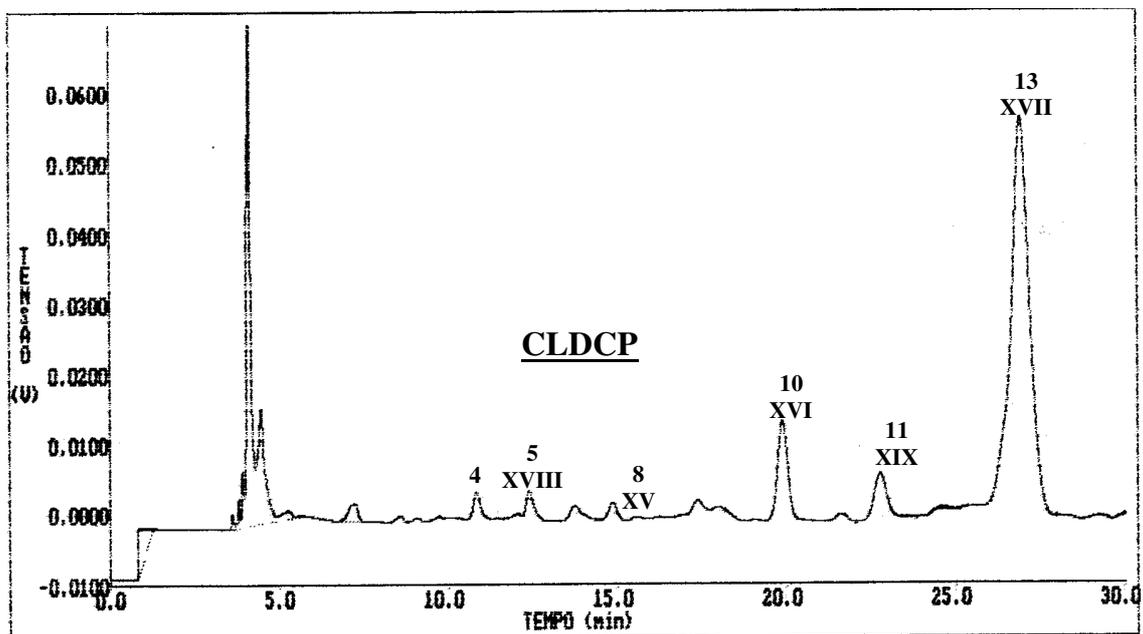


Figura 20. Cromatograma semi-preparativo da fração CLDC-1. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μm , 14 mm x 250 mm; eluente MeCN/H₂O (28: 72); fluxo de 14 mL/min; detector UV, 254 nm.

5.5.1.2.3 Fracionamento cromatográfico de CLDC-4

A fração CLDC-4 (350,3 g) apresentou-se como um sólido branco-esverdeado, em análise por CCDA foi possível observar manchas roxas e marrons espalhadas por toda placa após revelação com sulfato cérico. Por apresentar essa característica, a fração foi submetida novamente a uma filtração em sílica de fase reversa (C-18) com gradiente decrescente de polaridade, como pode ser observado na tabela 9, pág. 45. A separação ocorrida foi eficiente e assim avaliada por CCDA onde a fração CLDC-M apresentou um número mais compacto de manchas de cor roxa, sendo então selecionada para estudo. A técnica escolhida para fracionamento da fração foi a CLAE e o ajuste da fase móvel para CLAE semi-preparativa foi realizado previamente em coluna analítica. Foram coletadas cinco frações, codificadas como CLDCM, concentradas em rota-evaporador e avaliadas por RMN uni- e bidimensionais. As substâncias correspondentes aos picos CLDCM-1 e CLDCM-4 foram identificadas como ácido betulínico (**I**, 8,5 mg) e ácido maslínico (**XII**, 5,5 mg), respectivamente (figura 21, pág. 44; Figura 22, pág. 46).

Tabela 9. Frações obtidas da filtração em sílica da fração CLDC-4 proveniente da fase diclorometânica das raízes de *C. laxum*.

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (mg)
MeCN/H ₂ O (6:4)	CLDC-S	72,3
MeCN/H ₂ O (8:2)	CLDC-C	98,4
MeOH	CLDC-M	140,0
AcOEt (1:1)	CLDC-D	38,5

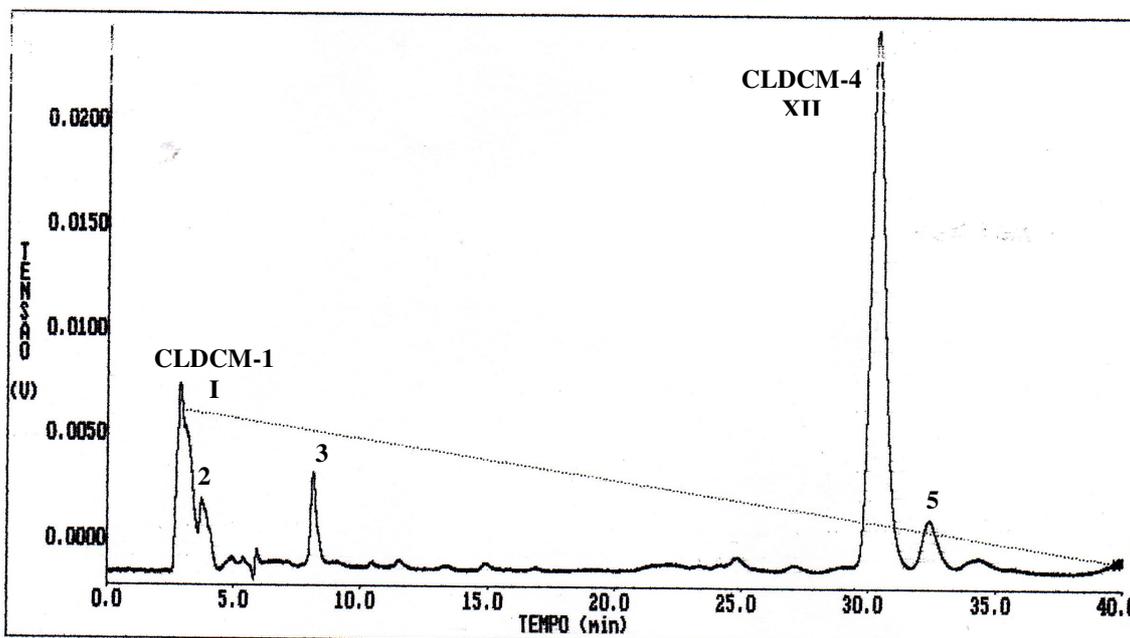


Figura 21. Cromatograma semi-preparativo. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μ m, 14 mm x 250 mm; eluente MeCN/H₂O (60: 40); fluxo de 14 mL/min; detector UV, 210 nm.

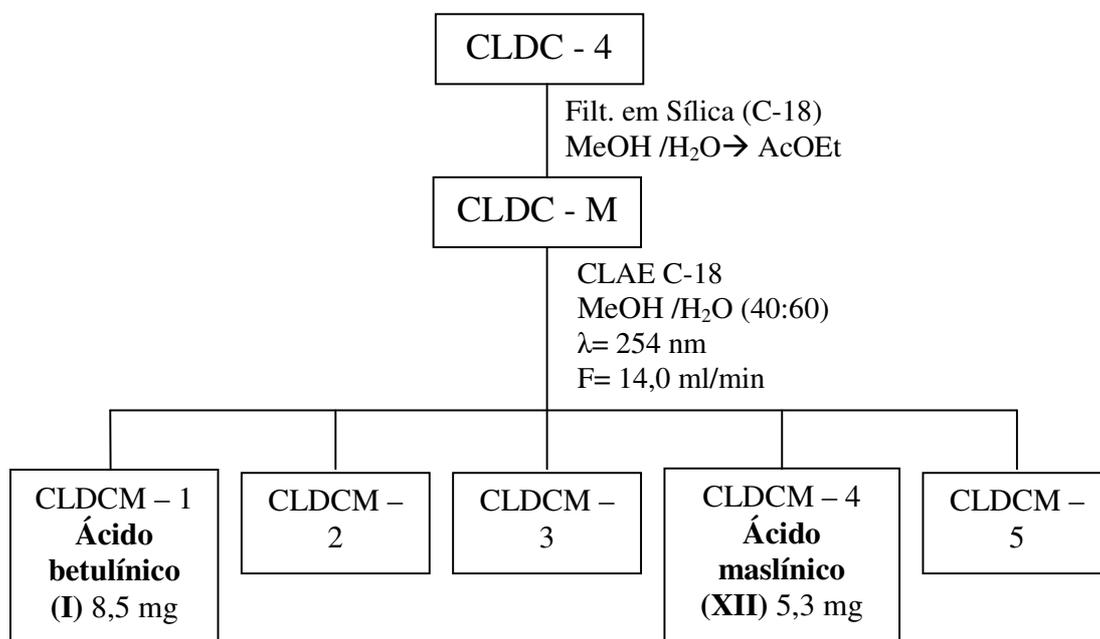


Figura 22. Esquema do fracionamento cromatográfico da fração CLDC-4 proveniente da fase diclorometânica dos galhos de *C. laxum*: obtenção de **I** e **XII**.

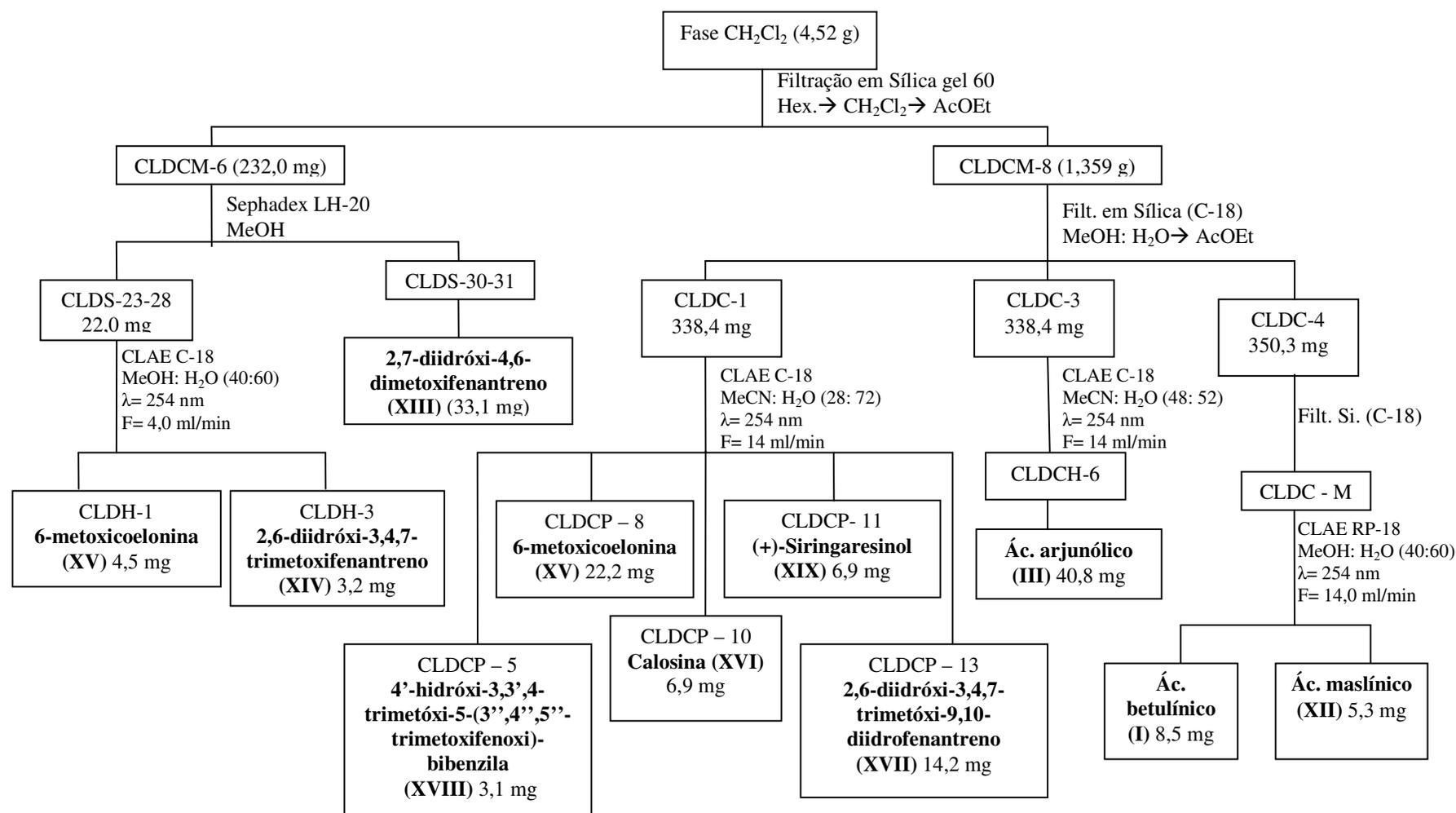


Figura 23. Esquema do fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica proveniente do extrato etanólico das raízes de *C. laxum*: obtenção de **III**, **XII**, **XIII**, **XIV**, **XV**, **XVI**, **XVII**, **XVIII** e **XIX**.

5.6 Atividades biológicas dos extratos, frações de partição e metabólitos secundários isolados de *C. laxum*.

Os extratos brutos de galhos e raízes, frações provenientes da partição dos extratos e/ou substâncias puras obtidas foram submetidos aos seguintes bioensaios: atividades antifúngica e antibacteriana, toxicidade para *Artemia salina*, atividade citotóxica em linhagens de células tumorais e atividade mutagênica/antimutagênica (teste SMART), além de serem avaliadas suas atividades antioxidantes (tabela 10, pág. 49).

Tabela 10. Testes de atividade biológica realizados.

TESTE	FRAÇÕES/SUBSTÂNCIAS TESTADAS	PESQUISADOR RESPONSÁVEL
Antifúngica		
<i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Ac. arjunólico/Ác. asiático, 2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-eno-28-O- β -D-glucopiranosídeo, 2 α ,3 β ,6 β -triidroxi-olean-12-eno-28-O- β -D-glucopiranosídeo, quadranosídeo I, bellericosídeo, ácido arjunólico, 2,6-diidroxi-1,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno, 2 α ,3 β ,23,24-tetra-idroxiursan-12-eno-28-O- β -D-glucopiranosídeo	Lidilhone Hamerski
Citotóxica		
<i>Artemia salina</i>	Extrato etanólico de galhos e de raízes.	Lidilhone Hamerski
Antineoplásica em Cultura de Células	Extrato etanólico de galhos e de raízes; 2,7-diidroxi-4,6-dimetoxifenantreno; 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno; 6-metoxicoelanina; 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno; callosina; 4'-hidroxi-3,3',4-triidroxi-5-(3,4,5-trimetoxifenoxi)-bibenzila e siringaresinol.	Maria de Fátima Cepa Matos
Antioxidante		
DPPH	Extrato etanólico de galhos e raízes e suas fases de partição; substâncias puras: 2,7-diidroxi-4,6-dimetoxifenantreno; 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno; 6-metoxicoelanina; 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno; calosina; 4'-hidroxi-3,3',4-triidroxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila; siringaresinol.	Lidilhone Hamerski
β -caroteno	Extrato etanólico de galhos e raízes.	Lidilhone Hamerski
Mutagênica/ Antimutagênica		
<i>Drosophila melanogaster</i>	Extrato etanólico de galhos e raízes; substâncias puras: ácido arjunólico e ácido betulínico.	Zaira Guterres
Antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i>	Extrato etanólico de galhos e raízes, as frações de partição em acetato de etila, butanólica e hidrometanólica dos galhos; fase butanólica, aquosa e em acetato de etila das raízes e também a substância pura ácido arjunólico.	Lidilhone Hamerski

5.6.1 Ensaios de atividade antioxidante

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo aluno Eder Bisoli, sob a coordenação da Professora Dra. Lidilhone Hameski.

5.6.1.1 Ensaio com β -caroteno/ácido linoléico

O ensaio com β -caroteno/ácido linoléico no método da microdiluição foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Miller com algumas modificações [MILLER, 1971; BOUAZIZ, 2005]. Adicionou-se 25 μ L de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40, 500 μ L de solução de β -caroteno (0,5mg/mL em CHCl_3) em erlenmeyer. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio sob nitrogênio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se cerca de 100 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 60 minutos e agitou-se vigorosamente. As concentrações dos extratos e do controle positivo (BHT) foram de 200 μ g/mL. Em cada poço da microplaca foram adicionados 150 μ L da mistura reativa (β -caroteno/ácido linoléico) e 50 μ L de etanol (controle negativo) ou o mesmo volume para os extratos e para o controle positivo (BHT), todos em triplicata. A placa foi incubada a 40°C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descolorimento do β -caroteno. As leituras das absorbâncias foram realizadas imediatamente e com intervalos de 30 min em 430nm, durante 240 min, em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate – TP-Reader. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle negativo de acordo com a fórmula: $I(\%) = [(\Delta\text{absorção controle negativo} - \Delta\text{absorção amostra}) / \Delta\text{absorção controle negativo}] / 100$.

Foram testados os extratos etanólicos de galhos e raízes de *C. laxum* (tabela 10, pág. 49).

5.6.1.2 Ensaio com DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) pelo método da microdiluição com algumas modificações [MATSUKAWA, 1997; XUE ZHANG, 2007]. A solução de DPPH foi preparada em etanol com a concentração de 200µM para o teste com as substâncias puras e a 200 µg/mL para o teste com os extratos. As substâncias puras foram preparadas em etanol nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25µM e os extratos nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25µg/mL. Primeiramente, em uma placa de 96 poços foram adicionados em triplicata 100µl das substâncias puras/extratos nas várias concentrações, o controle positivo (BHT) e o controle negativo (etanol). Em seguida, foram adicionados 100µl da solução de DPPH. Em cada poço a concentração das substâncias foi diluída 1:1 assim como a concentração do DPPH. A placa foi incubada por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, efetuou-se a leitura em 517nm em espectrofotômetro de microplaca Thermo Plate – TP-Reader. A atividade seqüestradora de radical (RSA) foi determinada de acordo com a fórmula $RSA (\%) = [(absorbância\ do\ controle\ negativo - absorbância\ da\ amostra) / absorbância\ do\ controle\ negativo] / 100$. A IC₅₀ foi determinada de acordo com o método de regressão linear.

Foram testados os extratos etanólicos de galhos e raízes de *C. laxum* e também as substâncias puras: 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**) e 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (**XIV**), 6-metoxicoelanina (**XV**), 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (**XVI**) e calosina (**XVII**); 4'-hidroxi-3,3',4-triidroxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila (**XVIII**) e lignana: siringaresinol (**XIX**) (tabela 10, pág. 49).

5.6.2 Ensaio de atividade antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado no laboratório de microbiologia do LAC do Departamento de farmácia Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela aluna Caroline Tieppo, sob a coordenação da professora Dra. Lidilhone Hameski.

Para avaliação da atividade antifúngica dos compostos isolados foram utilizadas cepas padronizadas de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045), disponíveis no Núcleo do Hospital Universitário, Divisão de Farmácia-Bioquímica, Seção de Análises Clínicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Como meios de cultura foram utilizados os meios de Sabouraud e RPMI-1640 líquido (com glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de vermelho de fenol). O meio RPMI-1640 foi tamponado a pH $7,0 \pm 0,1$, em temperatura de 25 °C, com uma solução tampão de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico], numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0. A padronização do inóculo foi realizada de acordo com o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica. Para avaliação da atividade antifúngica foi adotado o ensaio sem alvo específico, utilizando-se a técnica da microdiluição, de acordo com metodologia descrita na literatura [CLSI M27-A2, 2002]. Os testes (diluições) foram realizados em triplicata, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) estabelecida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. Como controle padrão utilizou-se o antimicrobiano anfotericina B.

Foram testadas as substâncias puras: ácido betulínico (I), quadranosídeo I (II), ácido arjunólico (III), ácido asiático (IV), arjunglucosídeo II (V), quadranosídeo IV (VI), 2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosídeo (VII), 2 α ,3 β ,6 β -triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosídeo (VIII), bellericosídeo (IX), 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxiursan-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosídeo (X) e chebulosídeo II (XI) (tabela 10, pág. 49).

5.6.3 Ensaio de atividade citotóxica

5.6.3.1 Ensaio de toxicidade para *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade para *Artemia salina* foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da UFMS, pelo aluno Eder Bisoli, sob a coordenação da professora Dra. Lidilhone Hameski e de acordo com a metodologia descrita na literatura [MEYER, 1982].

Preparou-se uma solução salina (3,8 g/L) e a ela foram adicionados ovos de *A. salina*. Após 48 horas os ovos eclodiram. As amostras foram preparadas nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL, todas em triplicata. A cada amostra foram adicionados 5mL da solução salina contendo 10 larvas dos microcrustáceos (*A. salina*). Após 24 horas registrou-se o número de sobreviventes. Os dados obtidos foram analisados no programa Probitos e calculada a DL₅₀ (dose necessária para provocar a morte de 50% dos indivíduos submetidos à análise). Foram testados os extratos etanólicos de galhos e raízes de *C. laxum* (tabela 10, pág. 49).

5.6.3.2 Ensaio de atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas

O ensaio de atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas foi realizado pela doutoranda Renata Trentin no laboratório de culturas celulares do Departamento de Farmácia Bioquímica da UFMS sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos.

A avaliação da atividade antineoplásica foi realizada com o corante sulforrodamina B (SRB). O princípio deste método é a coloração das proteínas de membrana celular [SKEHAN, 1991]. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 em incubadora de CO₂, até o alcançarem o crescimento exponencial. Para o teste, as células foram contadas (10.000 células/cavidade) e semeadas em placas de 96 cavidades. Após exposição dos extratos e substâncias puras (amostras-teste) em triplicata nas concentrações

de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL (cada uma em triplicata), durante 48h, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 40% por 30 minutos e submetidas ao protocolo da SRB.

Na ultima etapa foi adicionado o tampão Tris Base 10mM para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. O resultado óptico foi obtido em 540nm em leitor de microplacas. O controle positivo utilizado foi o agente antineoplásico Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)] da Sigma. A inibição de crescimento- IC (%) -de cada amostra-teste foi calculada conforme Monks et al. (1991).

Foram testados os extratos etanólicos de galhos e raízes de *C. laxum* e também as substâncias isoladas: 2,7-diidroxi-4,6-dimetoxifenantreno (XIII) e 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (XIV), 6-metoxicoelonina (XV), 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (XVI) e calosina (XVII); 4'-hidroxi-3,3',4-triidroxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila (XVIII) e a lignana siringaresinol (XIX) (tabela 10, pág. 49).

5.6.4 Ensaio de atividade Mutagênica/ Antimutagênica

O ensaio de atividade mutagênica/ antimutagênica foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da UFMS, pelos alunos Liliane Fernandes e Felipe Garcez, sob a coordenação da Professora Dra. Zaira Guterres.

O bioensaio “Somatic Mutation And Recombination Test – SMART” (Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* foi executado de acordo com metodologia descrita na literatura [GRAF, 1984] e baseia-se em mutações encontradas nos tricomas que revestem as asas de *D. melanogaster*, após as larvas das moscas terem sido expostas a agentes mutagênicos. Os indivíduos foram previamente reproduzidos e no estágio de larvas foram transferidos para frascos de vidros contendo meio alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®) e tratado com três concentrações dos extratos brutos de raiz e galho e dos metabólitos secundários ácido arjunólico (III) e ácido betulínico (I). Como controle positivo foi utilizado o cloridrato de doxorubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL e como controle negativo – solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol).

Este ensaio tem como base o princípio de que durante as sucessivas mitoses das células que originarão as asas, podem ocorrer alterações genéticas causadas por agentes mutagênicos, levando ao aparecimento de manchas (tricomas ou pelos) mutantes. Estas regiões são detectadas ao se analisar as diferentes formas dos pêlos presentes nas asas das moscas adultas que expressam fenotipicamente os genes *mwh* ou *flr*³. Na análise das lesões induzidas pelo agente mutagênico, pode-se contabilizar o número total de manchas ou o tipo de mancha encontrada, sendo que o primeiro aspecto fornece dados quantitativos, enquanto que o segundo elucida o tipo de lesão ocorrida [GRAF, 1984]. Logo, este ensaio permite detectar agentes causadores de mutações pontuais, alterações cromossômicas, recombinações, deleções, rearranjos, aneuploidias, entre outros.

Foram testados os extratos etanólicos de galhos, raízes e folhas de *C. laxum* e também as substâncias puras ácido arjunólico (III) e betulínico (I) (tabela 10, pág. 49).

5.6.5 Ensaio de atividade antibacteriana

O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado no laboratório de microbiologia do LAC da UFMS, pela doutoranda Ana Lúcia Batista, sob a coordenação da professora Dra. Lidilhone Hamerski.

A bactéria empregada foi a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O teste foi realizado usando-se a técnica de microdiluição em microplaca de 96 poços com clado Müller-Hinton de acordo com as normas do protocolo CLSI/NCCLS M-7-A6. A leitura das placas foi realizada depois de 20h de incubação em estufa a 35° C.

Os testes foram realizados em triplicata, sendo calculada a Concentração Mínima Inibitória (CIM), a qual variou de 1000 µg/mL a 8,32 µg/mL para os extratos e de 200 µg/mL a 0,78 µg/mL para a substância pura. Como referência foi usado o clorafenicol (32,0 µg/mL a 0,25 µg/mL).

Foram testados os extratos etanólicos de galhos e raízes, as fases de partição das raízes: em acetato de etila, butanólica e aquosa; as fases de partição dos galhos: em acetato de etila, butanólica e metanol/água e também a substância pura ácido arjunólico (III) (tabela 10, pág. 49).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

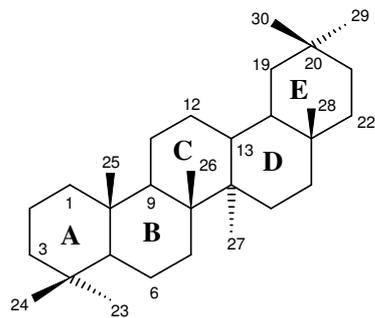
A determinação estrutural das substâncias foi efetuada com base nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT – 135°, DEPT – 90°, HSQC, HMBC, COSY e NOESY. Foram utilizados também comparação com dados espectrais de modelos existentes na literatura. Neste item será discutida a elucidação estrutural das substâncias obtidas e para facilitar o entendimento, as mesmas foram reunidas em grupos de acordo com a sua classificação, independente da parte vegetal da qual foram extraídas.

Neste item também serão apresentados os resultados obtidos nas avaliações das atividades biológicas realizadas com os extratos bem como com as substâncias puras.

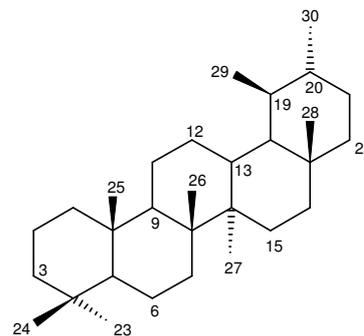
6.1 Triterpenos pentacíclicos e seus derivados glicosilados presentes nos galhos e raízes de *C. laxum*

Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos, segundo seu esqueleto, em vários grupos, dentre eles os com esqueletos dos tipos oleanano, ursano e lupano. Os triterpenos de esqueleto oleanano apresentam, dentre outras características, duas metilas em C-20 enquanto que os de esqueleto ursano apresentam uma metila com orientação α em C-20 e outra com orientação β em C-19. Nestes esqueletos, a estereoquímica referente à junção dos anéis A/B, B/C e C/D é *trans*, e entre D/E é *cis*. Já o esqueleto do tipo lupano difere dos anteriores na estereoquímica *trans* entre os anéis D/E. Além disso, o anel E é pentagonal [DEWICK, 1997; AHMAD, 1994] (Figura 24, pág. 57).

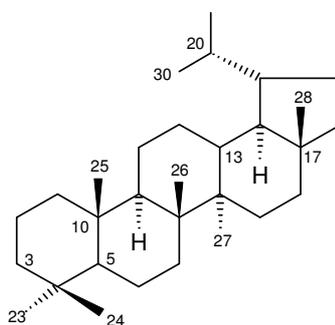
Estes esqueletos terpênicos ocorrem com frequência em plantas do gênero *Combretum*. A literatura aponta a ocorrência de tais triterpenos pentacíclicos na forma livre, bem como na forma de éter, éster e glicosídeos. As saponinas terpênicas geralmente apresentam unidades de açúcar como a D-glucose.



Esqueleto oleanano



Esqueleto ursano



Esqueleto lupano

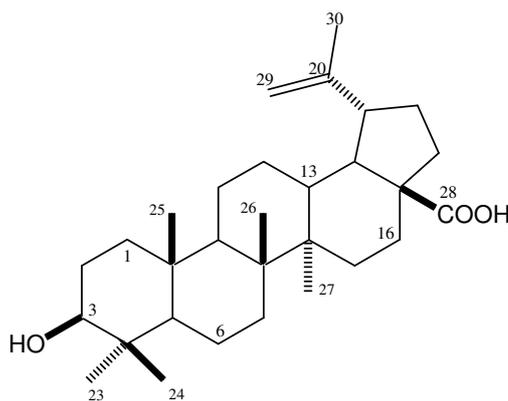
Figura 24: Exemplos de esqueletos de triterpenos pentacíclicos

As misturas de triterpenos com estruturas semelhantes são de difícil separação frente a técnicas cromatográficas convencionais. Uma metodologia para a identificação dos esqueletos triterpênicos consiste na análise dos deslocamentos químicos dos sinais presentes na região de carbonos olefínicos. A observação do número e intensidade dos sinais nesta região permite definir, também, o número e a abundância relativa dos componentes da mistura. Assim, os triterpenos que possuem esqueleto do tipo olean-12-eno podem ser identificados pelos sinais em torno de 121,7 δ e 145,1 δ , relativos aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente, enquanto que triterpenos que possuem esqueleto urs-12-eno identificados pelos sinais em torno de 127,5 δ de C-12 e 139,3 δ de C-13. Já os triterpenos com esqueleto do tipo lup-20(29)-eno podem ser identificados pelos sinais na região de 109,0 δ (C-29) e 150,0 δ (C-20) [OLEA & ROQUE 1990; AHMAD & RAHMAN, 1994].

6.1.1 Triterpeno obtido da fase diclorometânica dos galhos

O estudo realizado com a fase diclorometânica proveniente do extrato etanólico dos galhos levou ao isolamento do triterpeno com esqueleto lupano ácido betulínico (**I**).

6.1.1.1 Identificação do ácido betulínico (**I**)



I

A substância **I** foi obtida da fração CLGD 3-4, de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados no item 5 (sub-item 5.3.1, pág. 23).

O espectro de RMN de ^1H do composto **I** (espectro 1, pág. 61) apresentou singletos em δ 1,24, 1,08, 1,07, 1,02 e 0,83 referentes a 5 grupos metilas sugerindo ser um triterpeno pentacíclico. Reforçando essa proposta, os singletos largos a δ 4,96 e δ 4,78, referentes a hidrogênios olefínicos, juntamente com um singlete relativo a uma metila vinílica a δ 1,80 foram sugestivos da presença do esqueleto lup-20(29)-eno e atribuídos aos hidrogênios H-29 e à metila 30. Um sinal em δ 3,47 (t, $J= 7,7$ Hz) foi indicativo da presença de um hidrogênio carbinólico em C-3 [AHMAD & RAHMAN, 1994].

O espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° de **I** (espectro 2 e 3, pág. 61 e 62) apresentou sinais para carbonos vinílicos a δ 110,0 (CH_2) e δ 151,4 (C) indicativos dos carbonos olefínicos do esqueleto em questão e atribuídos a C-29 e C-20, respectivamente. O sinal relativo ao carbono metínico C-3 ligado à hidroxila com orientação β foi observado em δ 78,2, enquanto que a metila vinílica C-30 foi caracterizada pelo sinal a δ 19,5. Foi verificada também a presença de um grupo carboxila, caracterizado pelo sinal a δ 178,9. Estes dados, aliados à presença de sinais atribuídos a outras cinco metilas e aos demais

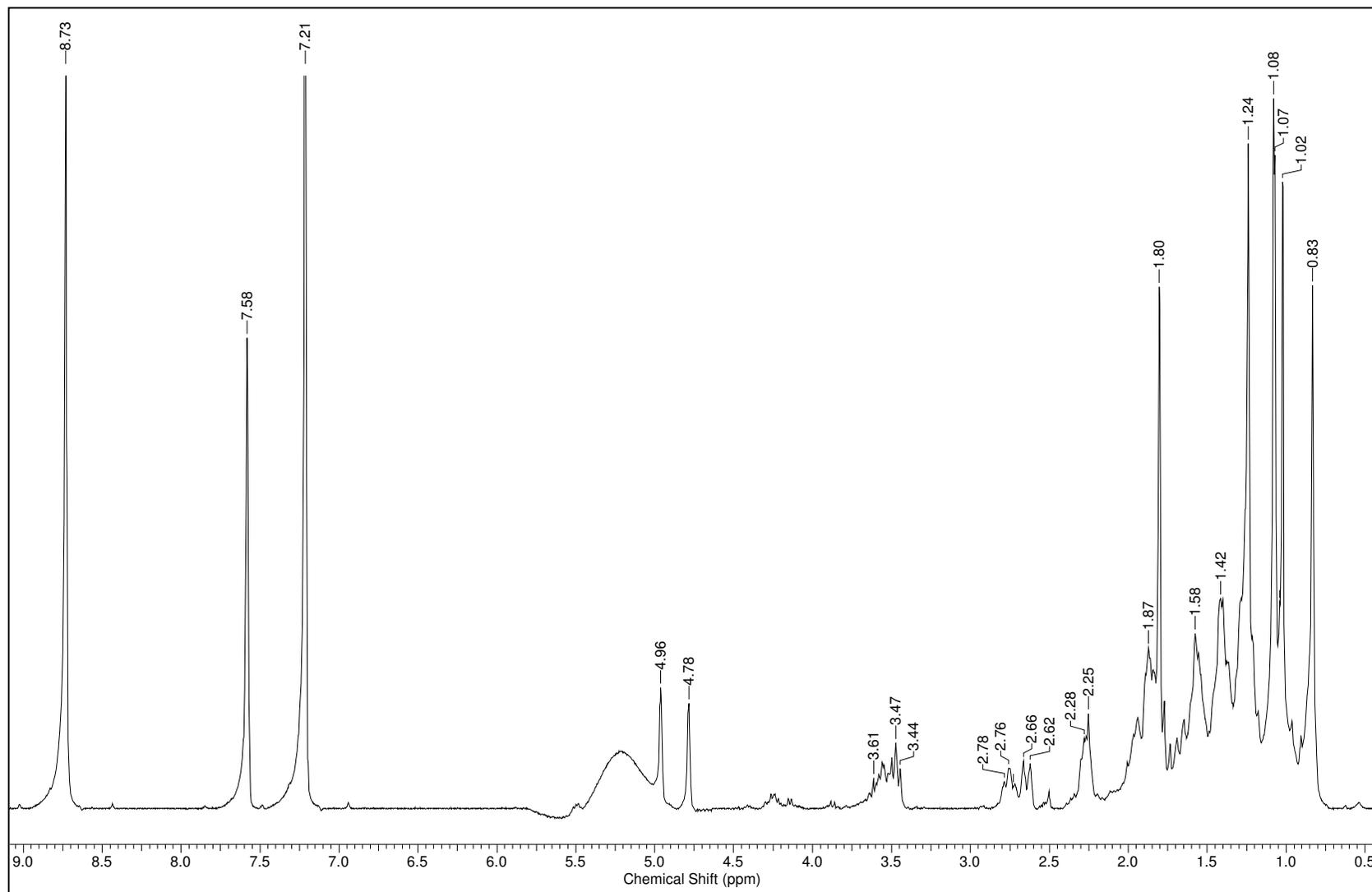
valores de deslocamento químico observados no espectro de RMN de ^{13}C de **I**, definiram sua estrutura como sendo correspondente à do ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico, também conhecido por ácido betulínico [AHMAD & RAHMAN, 1994] e são apresentados na tabela 11, pág. 60.

Este triterpeno, embora já relatado em várias espécies vegetais, só foi descrito em apenas uma espécie de *Combretum* (*C. quadrangulare*) [BANSKOTA, 2000].

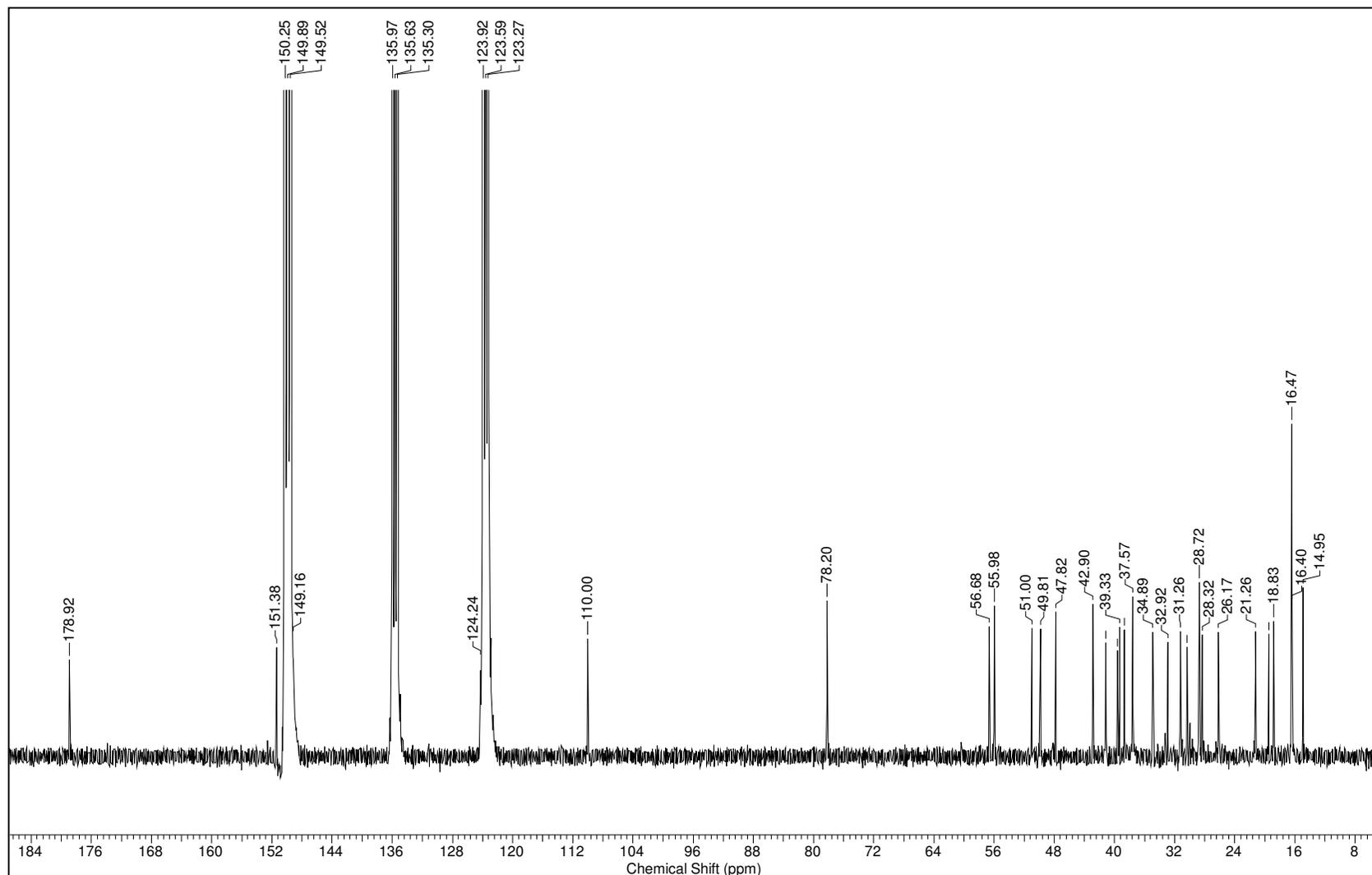
Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C do triterpeno **I** obtido de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C	(I) <i>C. laxum</i>		(I) literatura
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	# $\delta^{13}\text{C}$
1	39,3	-	38,7
2	28,3	-	27,4
3	78,2	3,47 (m, 7,7)	78,9
4	39,6	-	38,8
5	56,0	-	55,3
6	18,8	-	18,3
7	34,9	-	34,3
8	41,2	-	40,7
9	51,0	-	50,5
10	37,6	-	37,2
11	21,3	-	20,8
12	26,2	-	25,5
13	38,7	-	38,4
14	42,9	-	42,4
15	31,3	-	30,5
16	32,9	-	32,1
17	56,7	-	56,3
18	47,8	3,55 (m)	46,8
19	49,8	-	49,2
20	152,5	-	150,3
21	30,3	-	29,7
22	37,6	-	37,0
23	28,7	1,24 (s)	27,9
24	16,4	1,02 (s)	15,3
25	16,5	0,83 (s)	16,0
26	16,5	1,07 (s)	16,1
27	15,0	1,08 (s)	14,7
28	178,9	-	180,5
29	110,0	Ha 4,78 sl; Hb 4,96 sl	109,6
30	19,5	1,80 (s)	19,4

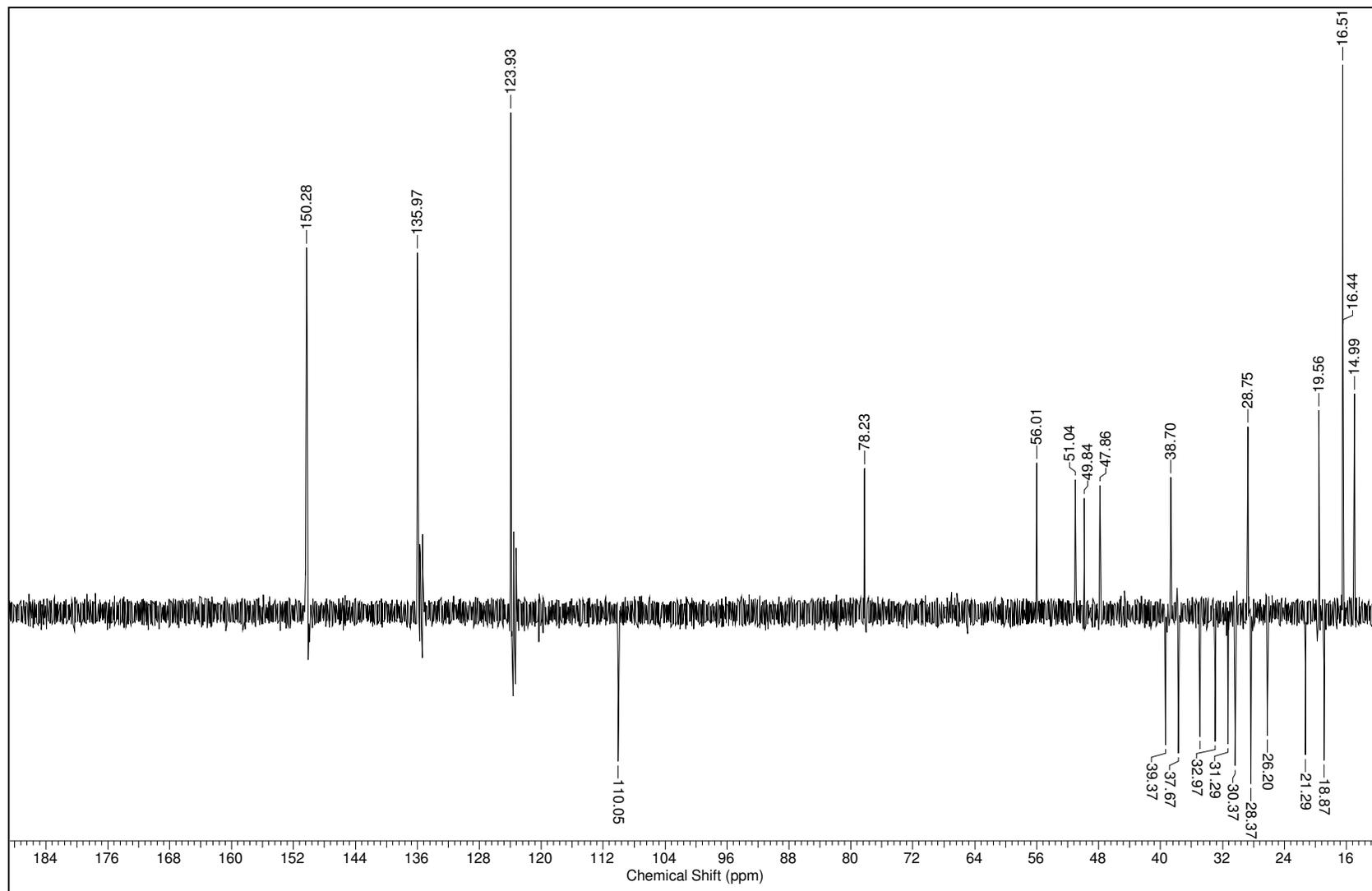
*Py- d_5 75 MHz e 300 MHz; #CDCl₃, [AHMAD & RAHMAN, 1994].



Espectro 1: RMN de ^1H do triterpeno I (300 MHz, Py-d_5).



Espectro 2: RMN de ^{13}C do triterpeno **I** (75 MHz, Py-d_5).

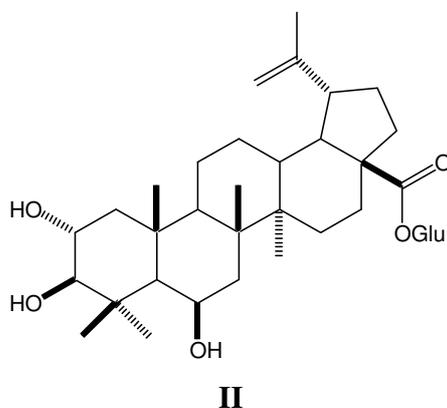


Espectro 3: DEPT 135° do triterpeno **I** (75 MHz, Py-*d*₅).

6.1.2 Triterpenos obtidos da fase acetato de etila dos galhos

O estudo da fase acetato de etila proveniente da partição do extrato etanólico do agalhos forneceu os triterpenos quadranosídeo I (**II**), ácido arjunólico (**III**), ácido asiático (**IV**), arjunglucosídeo II (**V**), quadranosídeo IV (**VI**), 2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (**VII**) e 2 α ,3 β ,6 β -triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (**VIII**).

6.1.2.1 Identificação do quadranosídeo I (**II**)



A substância **II** foi isolada a partir da fração CLX 12-15, tendo sido obtida como o composto majoritário da fração CLXB 2-6-4 (item 5, sub-item 5.3.2.2, pág. 27).

O espectro de RMN ^1H de **II** (espectro 4, pág. 67 e tabela 12, pág. 66) apresentou, da mesma forma que **I**, sinais relativos a 6 grupos metila a δ 1,00; 1,45; 1,55; 1,76 (2 x CH_3); 1,78 e dois singletos largos a δ 4,76 e 4,90 atribuíveis aos hidrogênios olefínicos H-29 de um esqueleto lup-20(29)-eno. Foram também observados neste espectro sinais correspondentes a um resíduo de açúcar, identificados pelos multipletos na região de δ 4,15 a 4,40 e pelo dubleto a δ 6,42 ($J = 8,1$ Hz) este atribuído ao hidrogênio anomérico.

A presença de hidrogênios carbinólicos no esqueleto de **II** foi sugerida pelos sinais a δ 4,81 (sl), 4,25 (m) e 3,43 (d, $J = 9,6$ Hz).

No espectro de RMN ^{13}C de **II** (espectro 5, pág. 67 e tabela 12, pág.66) foram observados 35 sinais predominantes (sendo um deles correspondente a dois carbonos cada) os quais, com o auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (espectro 6,

pág. 68), foram atribuídos a 7 carbonos quaternários (sendo um deles olefínico e um carbonílico), 13 metínicos (sendo 8 oxigenados), 10 metilênicos (sendo um oxigenado e um olefínico) e 6 metílicos. Os valores de deslocamento químico para os carbonos olefínicos a 110,0 (CH) e 150,9 (C) confirmaram a proposta do esqueleto lup-20(29)-eno para **II**. Os sinais dos carbonos metínicos a δ 69,0; 84,1 δ e 67,9, aliados aos sinais de hidrogênios carbinólicos no espectro de RMN de ^1H a δ 4,25; 3,43; 4,81 e também por comparação com dados de outros triterpenos obtidos de Combretaceae [GARCEZ, 2006; GARCEZ, 2003b; AHMAD & RAHMAN, 1994] mostraram-se compatíveis com a presença de 3 grupos hidroxila no esqueleto de **II**, localizados respectivamente, em C-2, C-3 e C-6 e possuindo orientações α , β e β .

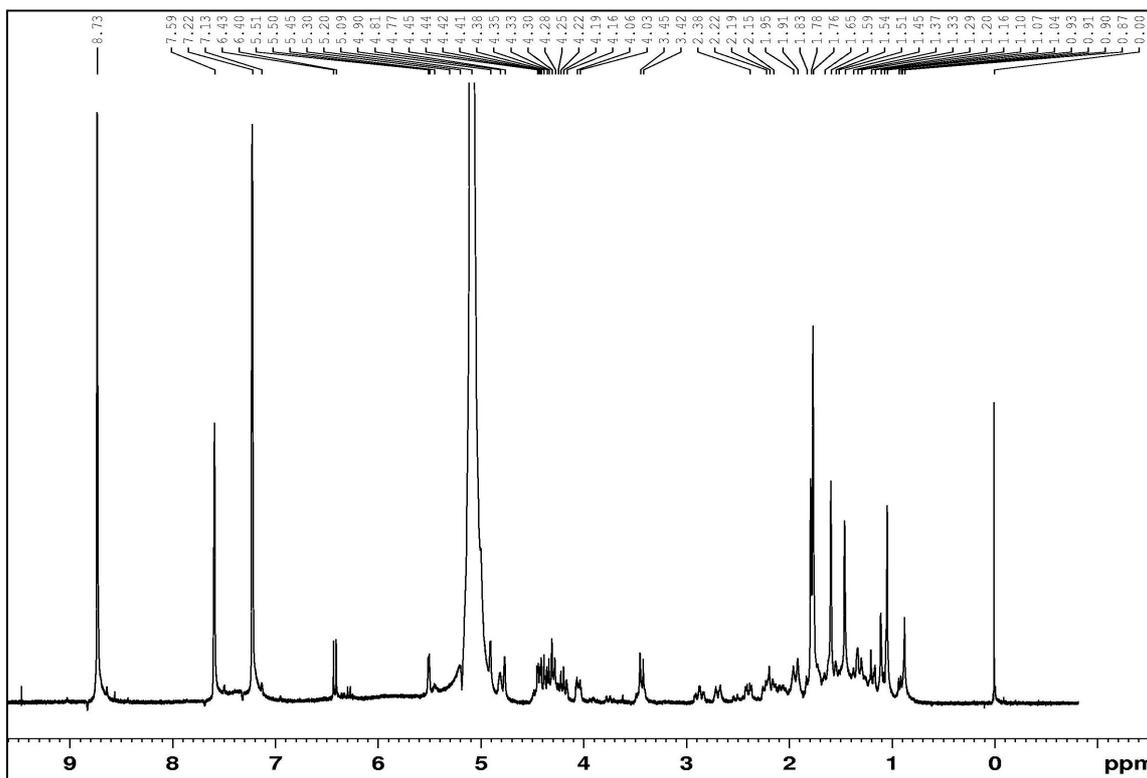
A presença de um sinal a δ 174,9 atribuível a uma carbonila de éster, em conjunto com um sinal a δ 57,0 (C-17) e o sinal do carbono anomérico do resíduo de açúcar a δ 95,4 indicaram a existência de um grupo carboxila em C-28 esterificado com o resíduo de açúcar. De acordo com dados da literatura, este açúcar foi identificado como sendo o da β -D-Glucose [GARCEZ, 2006].

Assim, a estrutura de **II** foi identificada como sendo o glucosídeo em C-28 do ácido $2\alpha,3\beta,6\beta$ -trihidroxibetulínico, substância isolada anteriormente apenas de *C. quadrangulare* e *Vochysia pacifica* (Vochysiaceae) e denominada quadranosídeo I, (tabela 12, pág. 61) [ADNYANA, 2000; WENIGER, 2005].

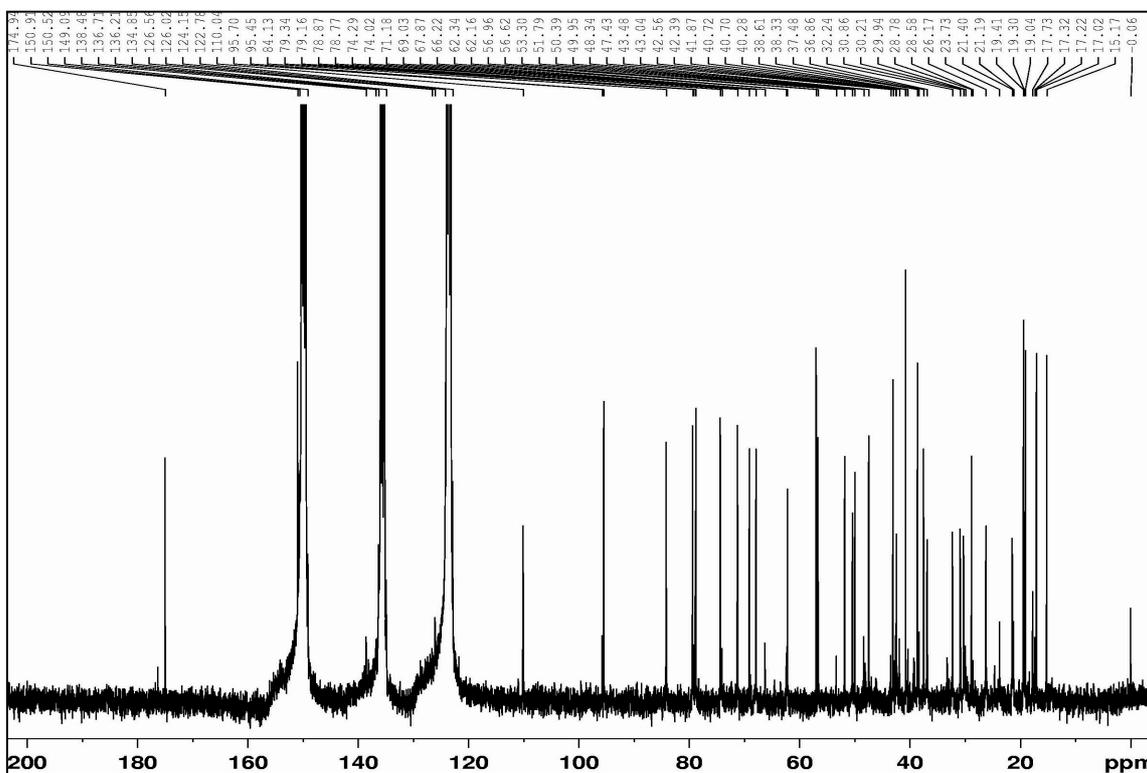
Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do triterpeno **II** obtido de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura

C/H	(II) <i>C. laxum</i>		(II) literatura ^{**}	
	* $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	50,4	-	50,4	-
2	69,0	4,25 m	69,0	4,27 m
3	84,1	3,43 d (9,6)	84,2	3,41 d (9,5)
4	40,7	-	40,8	-
5	56,6	-	56,7	-
6	67,9	4,81 sl	67,9	4,80 s
7	42,4	-	42,4	-
8	40,7	-	40,8	-
9	51,8	-	51,8	-
10	38,6	-	38,7	-
11	21,2	-	21,4	-
12	26,2	-	26,2	1,93 m
13	37,5	-	37,5	2,87 td (12,0 e 3,5)
14	43,0	-	43,1	-
15	30,2	-	30,3	2,20 m
16	32,2	-	32,3	2,68 td (12,5, 3,0)
17	57,0	-	57,0	-
18	49,9	-	50,0	-
19	47,4	3,41 m	47,5	3,46 m
20	150,9	-	150,9	-
21	30,8	2,15 m	30,8	2,13 m
22	36,8	-	36,9	-
23	28,8	1,76 s	28,8	1,74 s
24	19,0	1,45 s	19,1	1,44 s
25	19,3	1,58 s	19,4	1,59 s
26	17,0	1,78 s	17,1	1,78 s
27	15,2	1,04 s	15,2	1,04 s
28	174,9	-	174,9	-
29	110,0	Ha 4,76 sl; Hb 4,90 sl	110,1	4,75 s, 4,89 d
30	19,4	1,76 s	19,5	1,76 s
1'	95,4	6,42 d (8,1)	95,5	6,40 (7,9)
2'	74,3	4,22 m	74,3	4,16 dd (8,9, 7,9)
3'	78,8	4,27 m	78,8	4,27 dd (9,0, 8,9)
4'	70,9	4,35 m	71,2	4,36 dd (10,0, 9,0)
5'	79,3	4,06 m	79,4	4,02 ddd (10,0, 5,0, 2,4)
6'	62,2	4,39 – 4,45 m	62,2	4,38 dd (12,0, 5,0), 4,44 dd (12,0, 2,4)

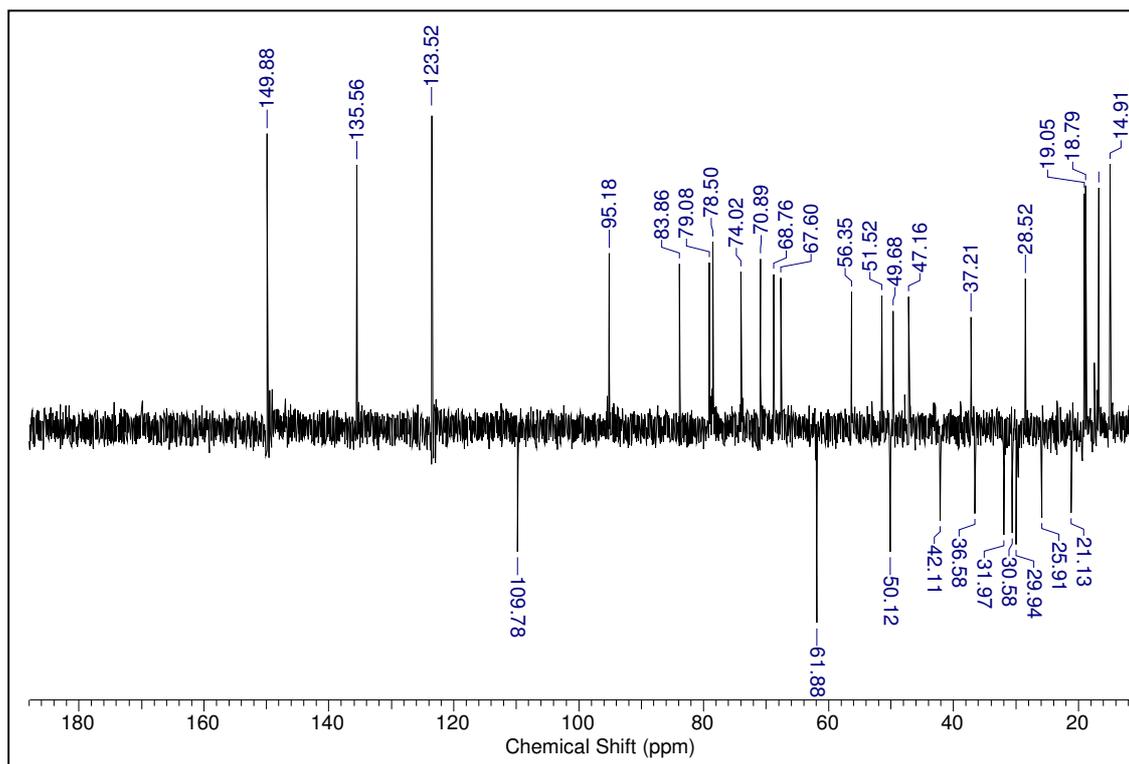
*Py- d_5 75 MHz; # Py- d_5 75 MHz; •Py- d_5 300 MHz; ■ Py- d_5 300 MHz, **[ADNYANA, 1999]



Espectro 4: RMN de ^1H do triterpeno II (300 MHz, $\text{Py}-d_5$).

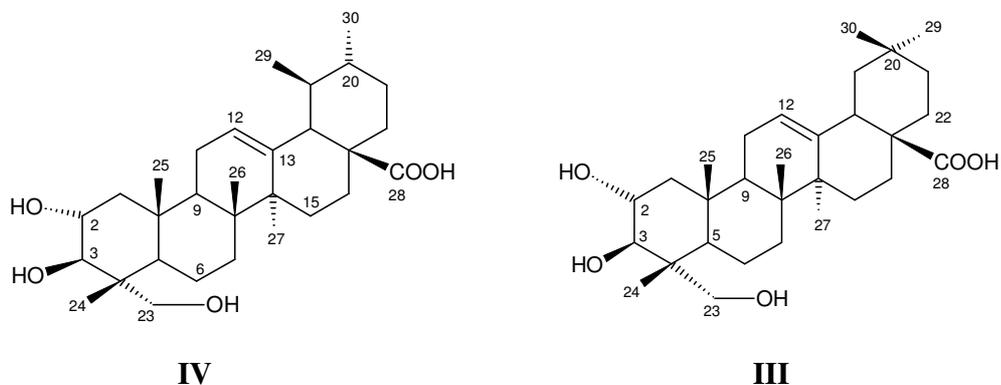


Espectro 5: RMN de ^{13}C do triterpeno II (75 MHz, $\text{Py}-d_5$).



Espectro 6: DEPT – 135° do triterpeno **II** (75 MHz, Py-*d*₅).

6.1.2.2 Identificação do ácido arjunólico (III) e ácido asiático (IV)



As substâncias **III** e **IV** foram obtidas em mistura a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração CLX 12-15, descrito no item 5 (sub-item 5.3.2.1, pág.26).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 7, pág. 71) apresentava uma grande complexidade de picos, sugerindo que o material da amostra era uma mistura de triterpenos.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 8, pág. 72) apresentava muitos sinais. Na região de olefinas foram observados sinais em δ 122,4, 144,8 e 125,5, e 139,2 indicativos de que os principais componentes da mistura seriam dois triterpenos com esqueleto olean-12-eno e urs-12-eno respectivamente (**III** e **IV**).

Na região de carbonos oxigenados foram observados sinais para carbonos metínicos a δ 68,8, 78,2, (correspondentes a 2 carbonos cada) e um sinal para carbono metilênico δ 66,4 (correspondente a 2 carbonos). Estes dados mostraram-se compatíveis com a presença de grupos hidroxilas no anel A em ambos os triterpenos, localizados em C-2, C-3 e C-23, possuindo orientações α , β e α respectivamente. Foram também observados no espectro de RMN ^{13}C sinais atribuídos a duas carboxilas a δ 180,2 e 180,6. Estes dados aliados aos valores de deslocamento químico de triterpenos comumente encontrados na família Combretaceae indicaram que **III** e **IV** tratavam-se dos ácidos arjunólico e asiático, respectivamente [AHMAD & RAHMAN, 1994; GARCEZ, 2003; GARCEZ, 2006a].

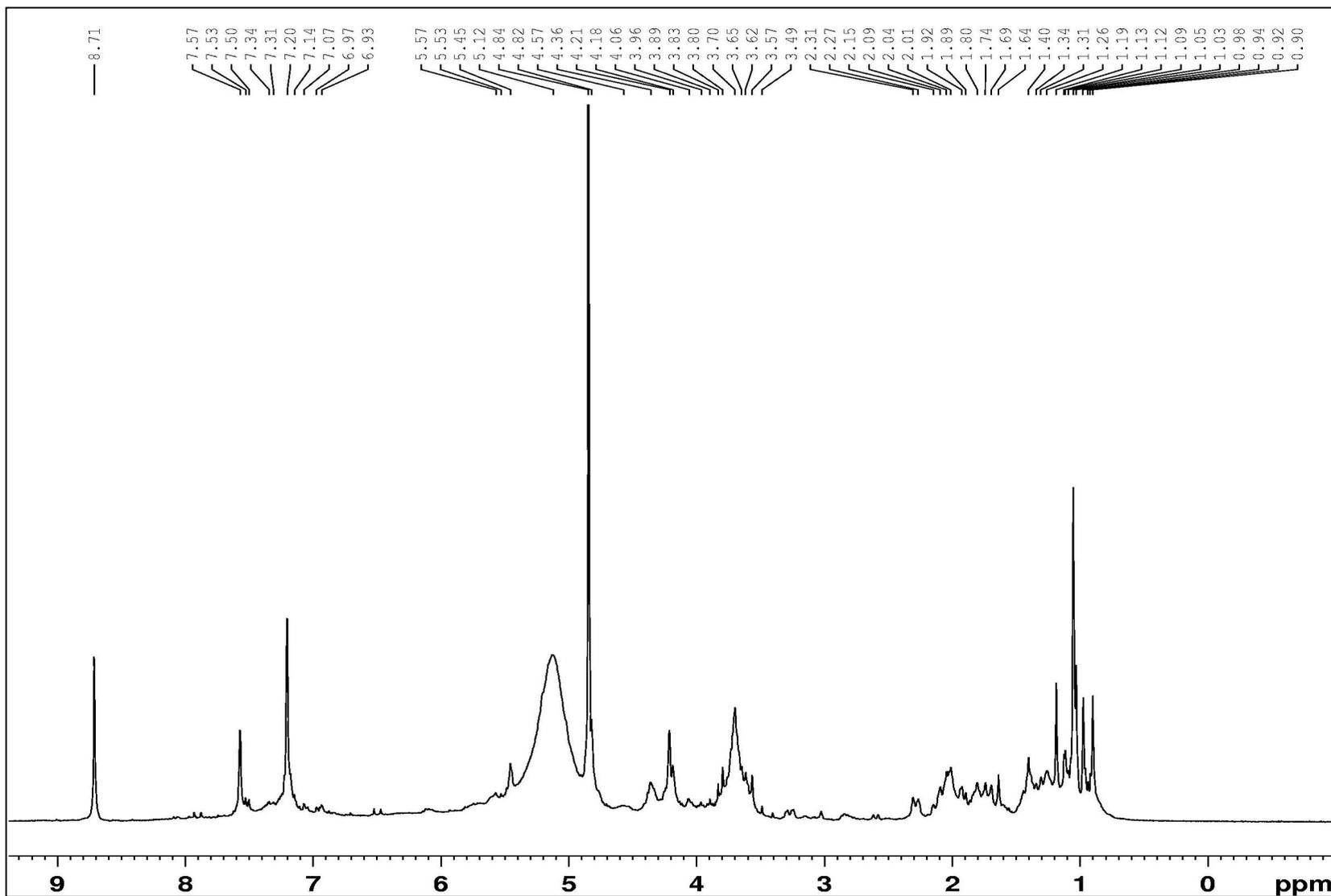
Os dados de RMN de ^{13}C de **III** e **IV** mostraram-se compatível com os dos ácidos arjunólico e asiático descritos na literatura (tabela 13, pág. 70).

O ácido asiático (IV), segundo busca na literatura, nunca foi relatado em espécies de plantas do gênero *Combretum*. O ácido arjunólico (III) é descrito em *C. leprosum* [FACUNDO, 2005].

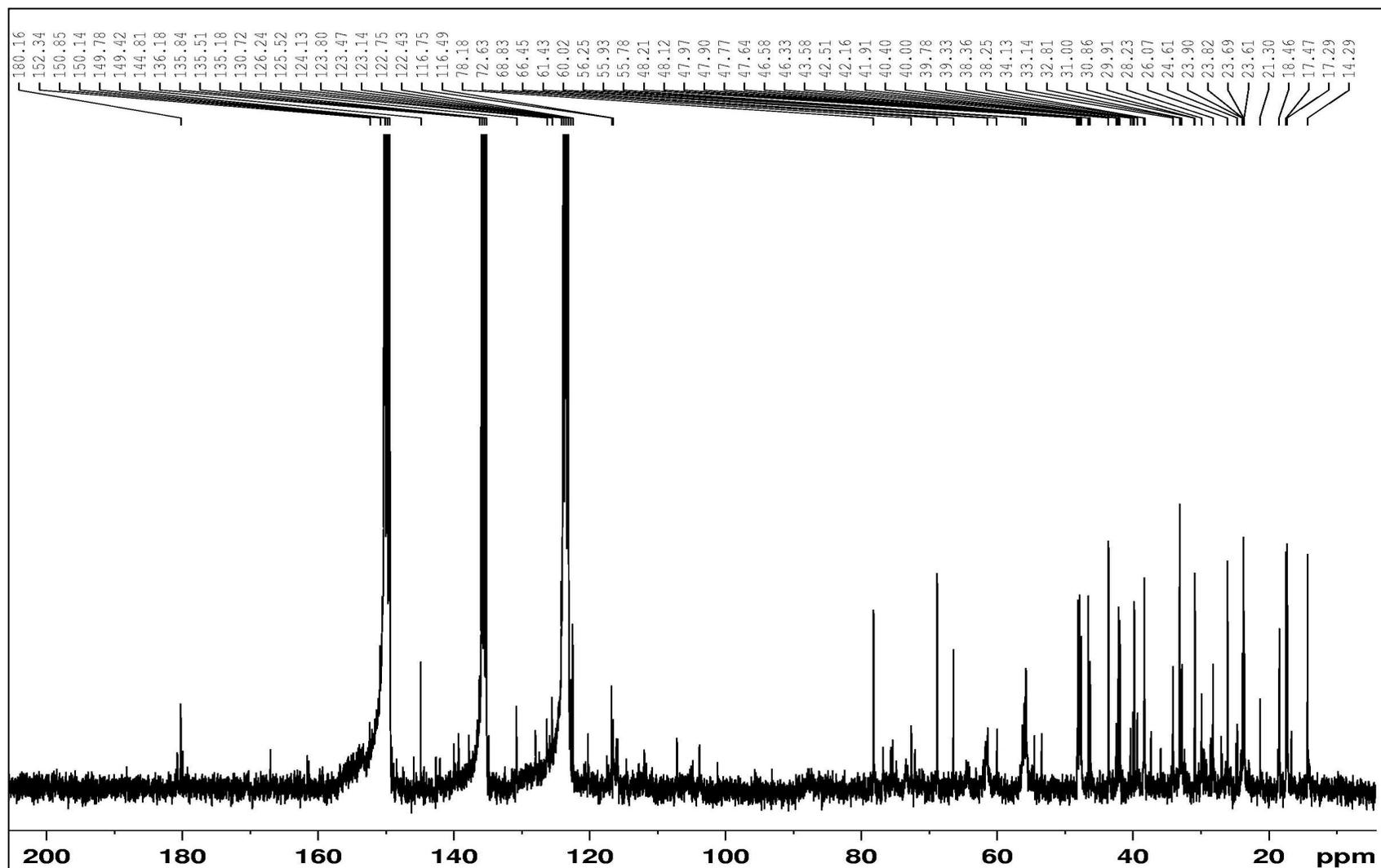
Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C dos triterpenos III e IV obtidos de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C	(III) <i>C. laxum</i> * δ ^{13}C	(III) literatura [†] δ ^{13}C	(IV) <i>C. laxum</i> [‡] δ ^{13}C	(IV) literatura [§] δ ^{13}C
1	47,6	47,6	47,6	46,5
2	68,8	68,8	68,8	68,9
3	78,2	78,2	78,2	80,5
4	43,6	43,6	43,6	42,7
5	47,9	48,0	48,2	49,2
6	18,5	18,5	18,5	18,5
7	32,8	32,9	32,8	32,8
8	39,8	39,8	40,0	39,7
9	48,1	48,1	47,6	47,6
10	38,4	38,4	38,3	38,3
11	23,6	23,7	23,6	23,5
12	122,4	123,2	125,5	125,4
13	144,8	144,9	135,2	138,4
14	42,2	42,2	42,2	42,3
15	28,2	28,3	28,6	28,2
16	23,9	23,9	24,8	24,4
17	46,6	47,6	48,0	48,2
18	41,9	42,0	53,5	53,0
19	46,3	46,4	39,4	39,2
20	30,9	30,9	39,3	39,0
21	34,1	34,1	31,0	30,8
22	33,2	33,2	37,4	36,8
23	66,4	66,6	66,4	70,4
24	14,3	14,2	14,3	13,0
25	17,3	17,3	17,4	17,1
26	17,5	17,5	17,4	17,2
27	26,1	26,1	23,8	23,9
28	180,2	180,0	180,6	178,2
29	33,2	33,2	17,3	17,3
30	23,7	23,7	21,3	21,3

*Py- d_5 75 MHz; [†]Py- d_5 75 MHz; [‡]Py- d_5 75 MHz; [§]CDCl₃, 68 ou 25 MHz [AHMAD & RAHMAN, 1994]

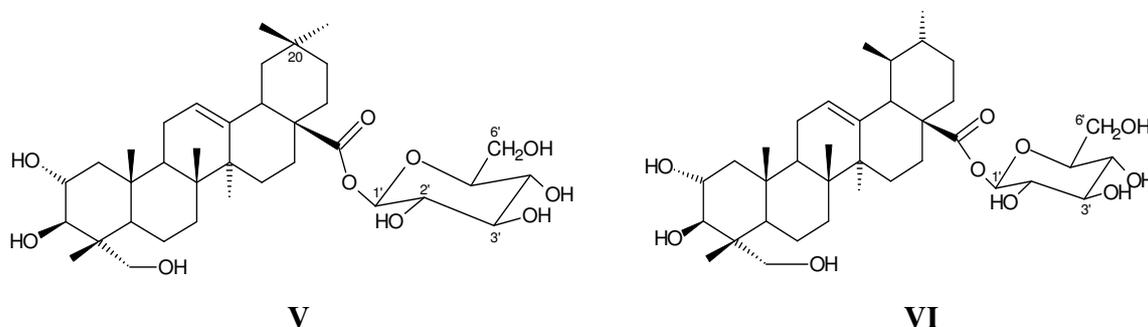


Espectro 7: RMN de ^1H dos triterpenos **III** e **IV** (300 MHz, Py-d_5).



Espectro 8: RMN de ^{13}C dos triterpenos **III** e **IV** (75 MHz, Py-d_5).

6.1.2.3 Identificação do arjunglicosídeo II (V) e quadranosídeo IV (VI)



As substâncias **V** e **VI** foram obtidas a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração CLXA 15-28, esta proveniente de CLX 12-15 descrito no item 5 (sub-item 5.3.2.2, pág. 26).

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração CLXB 2-6-3 (espectro 9, pág. 76) mostrou que era constituída por uma mistura de 2 triterpenos (**V** e **VI**). Os sinais presente na região de δ 4,15 a 4,42 e os dubletos a δ 6,31 e 6,25 indicaram que **V** e **VI** seriam glicosilados.

Ao serem comparados os dados de RMN de ^{13}C de **V** e **VI** (espectro 10, pág. 77) com os de **III** e **IV** (item 6, sub-item 6.1.2.2, pág. 69) observou-se uma grande semelhança entre os sinais relativos aos carbonos dos anéis A e B de **III** e os atribuídos a **V**, como também uma grande semelhança entre os sinais de carbono destes mesmos anéis referente à **IV** e os atribuídos a **VI**. As diferenças nos valores de deslocamento químico entre **III** e **V**, **IV** e **VI** foram observadas principalmente nos carbonos relativos aos anéis D e E e em C-28 e pelos sinais atribuídos a um resíduo de açúcar presente em **V** e **VI**. De acordo com valores da literatura, este resíduo foi identificado como sendo da β -D-Glucose em ambos os casos. Sua localização nos esqueletos de **V** e **VI** foram definidas como sendo em C-28 em função dos deslocamentos químicos observados para as carbonilas (176,1 δ e 176,4 δ), para os carbonos anoméricos (95,6 δ em **V** e **VI**) (tabela 14, pág. 75).

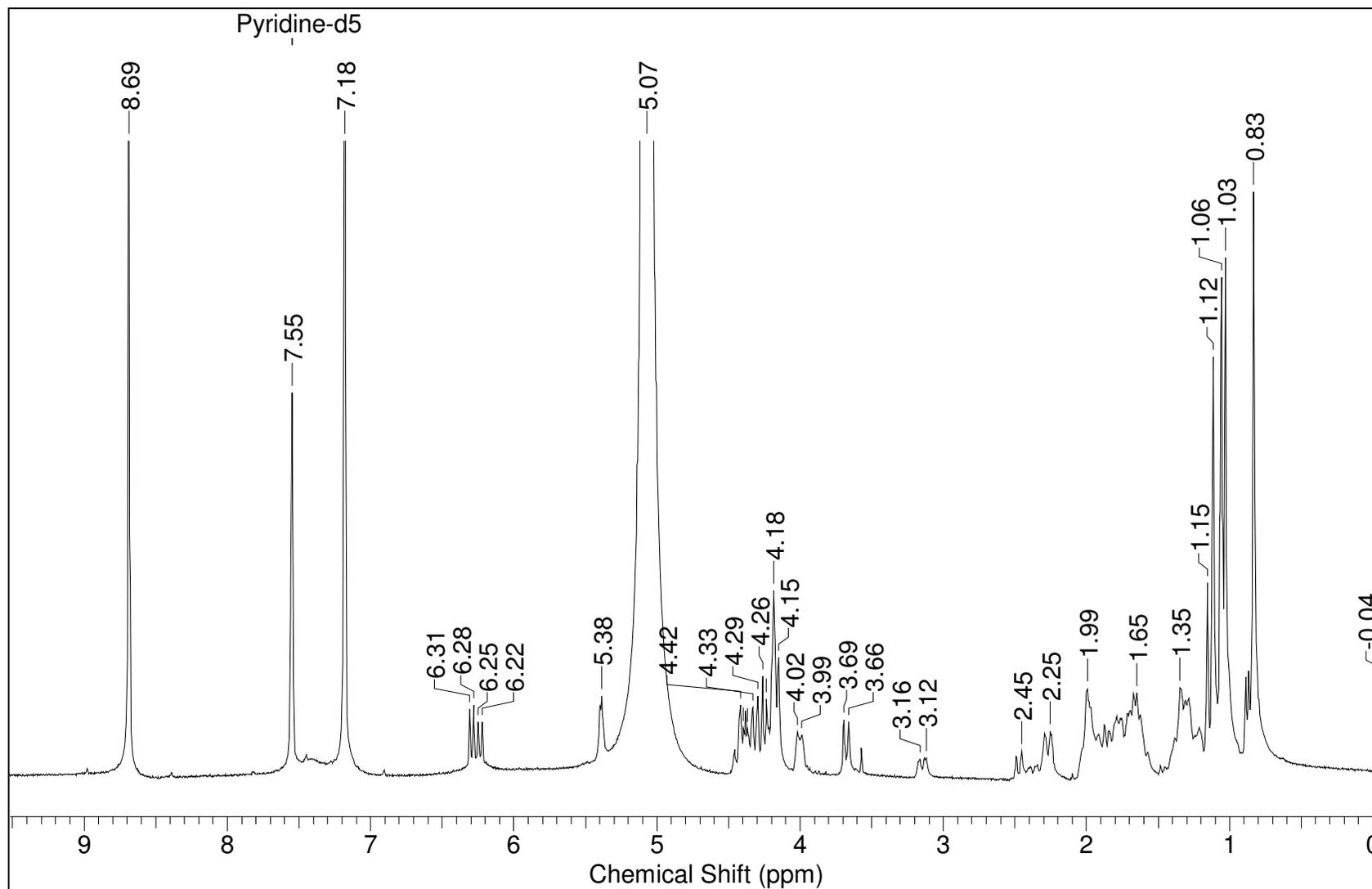
Assim, **V** e **VI** foram caracterizados como os glucosídeos em C-28 do ácido arjunólico e do ácido asiático, respectivamente.

Estes glucosídeos já haviam sido obtidos de *C. molle* (V) e *C. quadrangulare* (VI) e denominados respectivamente arjunglucosídeo II e quadranosídeo IV [ASRES, 2001; ADNYANA, 1999]. Seus dados espectrais apresentaram uma boa correlação com os apresentados por V e VI (tabela 14, pág. 75).

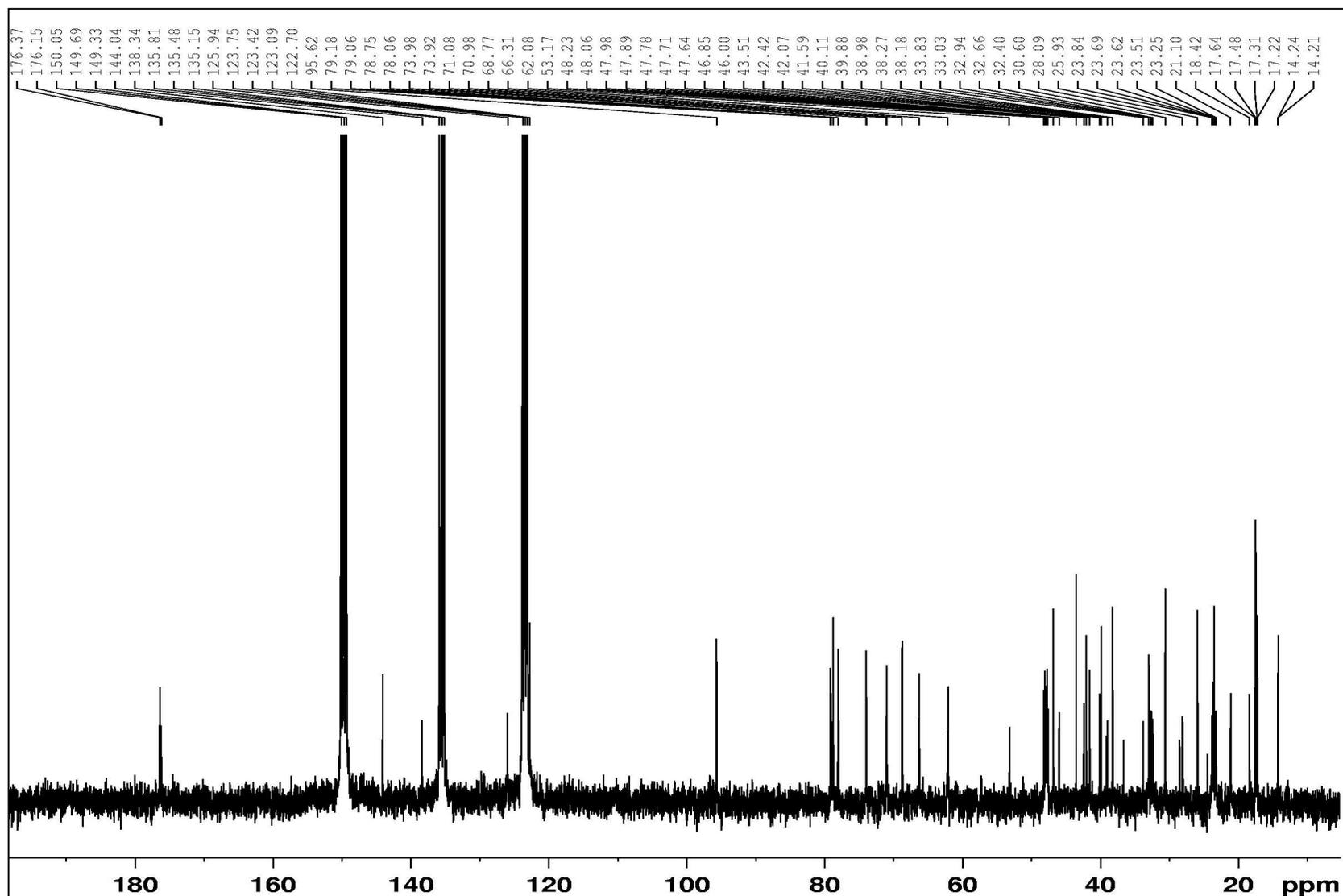
Tabela 14. Dados de RMN de ^{13}C dos triterpenos V e VI obtidos de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C	(V) <i>C. laxum</i> * $\delta^{13}\text{C}$	(VI) literatura \dagger $\delta^{13}\text{C}$	(V) <i>C. laxum</i> \diamond $\delta^{13}\text{C}$	(VI) literatura \ddagger $\delta^{13}\text{C}$
1	47,6	47,5	47,9	48,0
2	68,8	68,7	68,8	68,9
3	78,1	78,0	78,1	78,2
4	43,5	43,4	43,5	43,6
5	48,0	48,0	48,1	48,1
6	18,4	18,3	18,4	18,5
7	32,7	32,7	33,0	33,2
8	39,9	39,8	40,1	40,2
9	47,7	47,7	47,8	47,9
10	38,3	38,2	38,2	38,3
11	23,8	23,6	23,7	23,8
12	122,7	123,9	126,9	126,1
13	144,0	144,0	138,3	138,5
14	42,1	42,0	42,4	42,5
15	28,1	28,0	28,5	28,6
16	23,2	32,2	24,5	24,6
17	46,9	46,8	47,7	48,3
18	41,6	41,5	53,2	53,3
19	46,0	45,9	39,2	39,3
20	30,6	30,5	39,0	39,1
21	33,8	33,7	30,7	30,8
22	32,4	32,3	36,6	36,8
23	66,3	66,2	66,3	66,5
24	14,2	14,1	14,2	14,4
25	17,5	17,6	17,3	17,6
26	17,6	17,4	17,5	17,8
27	25,9	25,9	23,6	23,8
28	176,4	176,4	176,1	176,2
29	32,9	32,9	17,2	17,4
30	23,5	23,4	21,1	21,3
1'	95,6	95,0	95,6	95,7
2'	74,0	73,8	73,9	74,0
3'	78,8	78,6	78,8	78,9
4'	71,0	70,9	71,1	71,2
5'	79,2	79,1	79,1	79,2
6'	62,1	62,0	62,1	62,3

*Py- d_5 75 MHz; \dagger Py- d_5 75 MHz; \diamond Py- d_5 75 MHz; \ddagger CDCl_3 , 68 ou 25 MHz [GARCEZ, 2006; ADNYANA, 1999]

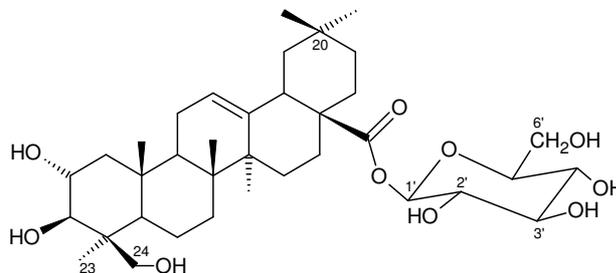


Espectro 9: RMN de ¹H dos triterpenos **V** e **VI** (300 MHz, Py-d₅).



Espectro 10: RMN de ^{13}C dos triterpenos V e VI (75 MHz, Py-d_5).

6.1.2.4 Elucidação estrutural do 2 α ,3 β ,24-triidroiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VII)



VII

A substância **VII** foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração CLXA 15-28, esta proveniente de CLX 12-15 (item 5, sub-item 5.3.2.2, pág. 26). Esta foi obtida como um sólido branco e amorfo e exibiu um íon pseudo-molecular de 685,3755 [M+ Cl]⁻ no HRESIMS, condizente com a fórmula molecular C₃₆H₅₈O₁₀ (o valor calculado para C₃₆H₅₈O₁₀-Cl foi de 685,37204) (espectro 11, pág. 81).

Seu espectro de RMN de ¹H (espectro 12, pág. 82) apresentou seis singletos característicos de metilas alifáticas a δ 0,85; 0,87; 0,97; 1,06; 1,18 e 1,54 e um singlete largo em δ 5,38 característico de hidrogênio olefínico.

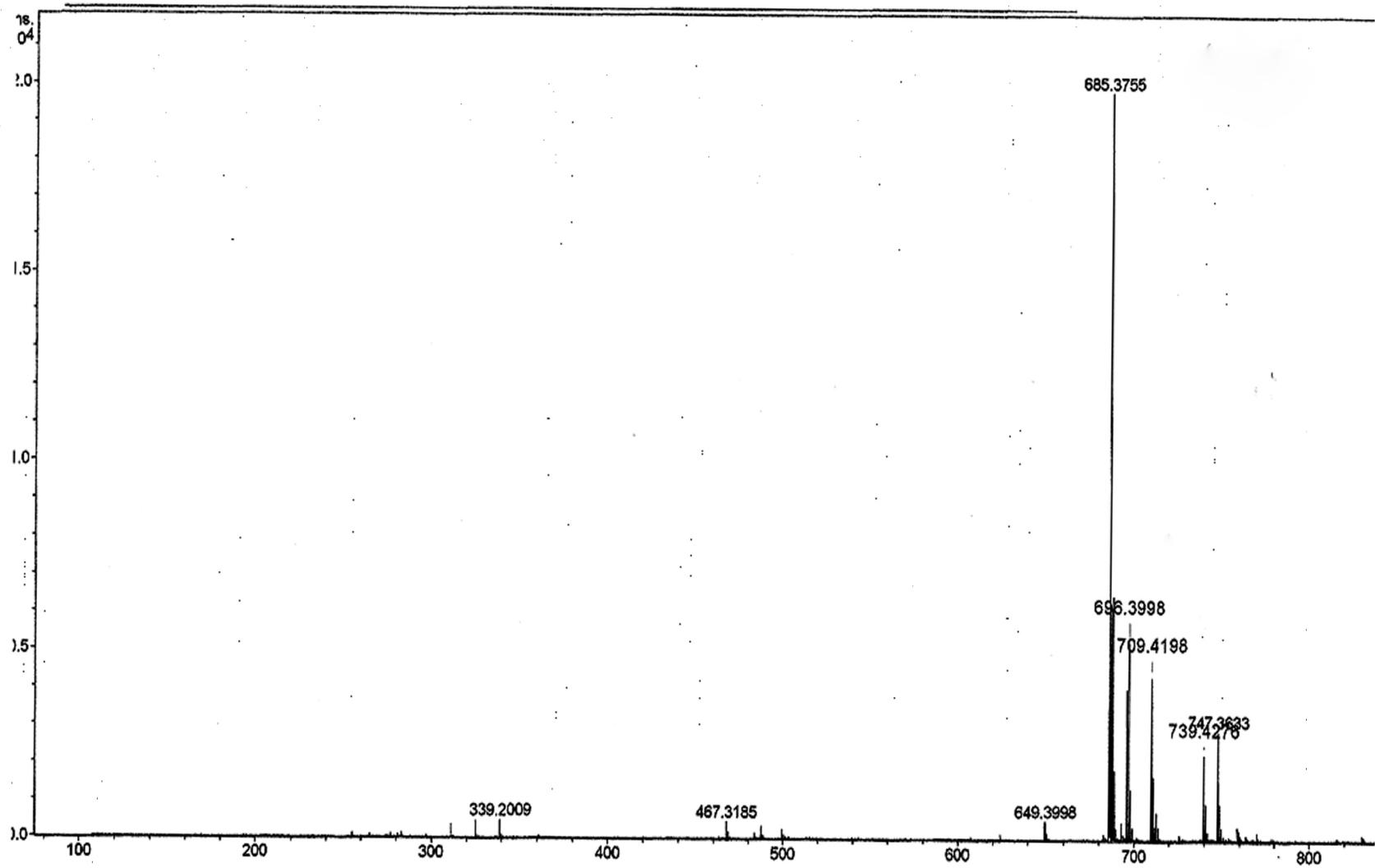
O espectro de RMN de ¹³C (espectro 13, pág. 83) e DEPT 135° (espectro 14, pág. 84) exibiu sinais de carbono para seis metilas, onze metilenos (dois oximetilenos), onze metinos (um olefínico e sete oximetinos) e oito quaternários (um olefínico e uma carbonila de éster), dos quais seis foram atribuídos a uma unidade de açúcar e 30 estavam condizentes com um resíduo triterpênico. A presença de uma ligação dupla, já sugerida pelo singlete largo em δ 5,38 no espectro de RMN de ¹H, foi corroborada pelos sinais em δ 122,7 e 144,0 no espectro de RMN de ¹³C, atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente, e definindo um esqueleto do tipo olean-12-eno [AHMAD & RAHMAN, 1994]. A presença de hidroxilas ligadas aos carbonos C-2 e C-3 foi evidenciada pelos deslocamentos químicos e valores de *J* dos hidrogênios atribuídos a H-2 (δ 4,33, m) e H-3 (δ 3,54, d, *J*= 9,3 Hz), os quais apresentaram correlações no espectro de HSQC (espectro 15, pág. 85) com os carbonos oximetínicos a δ 68,6 e 85,7, respectivamente. O valor da constante de acoplamento (9,3 Hz) entre H-2 e H-3 indicou disposição axial entre eles e deste modo, os

grupos hidroxila estavam equatorialmente (2 α , 3 β) orientados. O espectro de RMN de ^1H revelou ainda dois dubletos (1H cada) a δ 3,69 e 4,42 ($J= 11,0$ Hz) sugerindo ser hidrogênios diastereotópicos que apresentaram por sua vez correlação com um carbono a δ 65,7 no espectro de HSQC. Esta informação, associada a uma redução no valor de deslocamento do carbono C-23 (δ 24,1) e uma desproteção do carbono quaternário C-4 (δ 44,0) indicou que esta terceira hidroxila estava ligada ao carbono C-24 [AHMAD & RAHMAN, 1994]. Esta proposta pôde ser confirmada pelas correlações observadas no espectro de HMBC (espectro 16, pág. 86) entre este carbono e H-3 (δ 3,54) e a metila-23 (δ 1,54). Os dados de RMN de ^{13}C também permitiram definir o açúcar como D-glucose [AGRAWAL, 1992], enquanto que a magnitude da constante de acoplamento no espectro de RMN de ^1H do dubleto a δ 6,29 ($J= 7,9$ Hz) indicou uma orientação α para o hidrogênio anomérico do resíduo glucosila, estabelecendo, assim, a configuração β para a unidade glucopiranosila. O valor do deslocamento químico do carbono anomérico (δ 95,8) confirmou o fato de que o composto **VII** se tratava de um éster glicosilado, uma vez que carbonos anoméricos de *O*-glucosídeos são observados aproximadamente em 100 ppm, independentemente da natureza do resíduo de açúcar [BOYD & TURVEY, 1978]. Esta informação, associada com o valor de deslocamento químico da carbonila de éster (δ 176,4) e os restantes dos carbonos do esqueleto triterpênico indicaram a provável localização do açúcar no carbono C-28. Com base nos dados acima citados foi possível estabelecer que **VII** é o derivado éster glicosilado na posição C-28 do ácido-2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-en-28-óico, cuja aglicona conhecida como ácido hiptático-A, isolada anteriormente de *Hyptis capitata* (Labiatae) [AHMAD & RAHMAN, 1994] e também obtido por transformação química do ácido maslínico [GARCÍA-GRANADOS, 2007]. Os dados espectrais de **VII** se assemelharam muito com os do triterpeno ácido [GARCÍA-GRANADOS, 2007; AHMAD & RAHMAN, 1994], exceto pela ausência de sinais atribuídos à unidade de açúcar em **VII**. A substituição do sinal da carboxila C-28 observado na aglicona triterpênica em δ 181,8 [GARCÍA-GRANADOS, 2007] por um sinal relativo a um carbono protegido de carbonila de éster a δ 176,4, juntamente com o acoplamento no espectro HMBC entre este carbono e o hidrogênio anomérico do açúcar (δ 6,29) confirmou a ligação da unidade de D-glucose no carbono C-28. Assim a estrutura de **VII** foi definida como sendo 2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila.

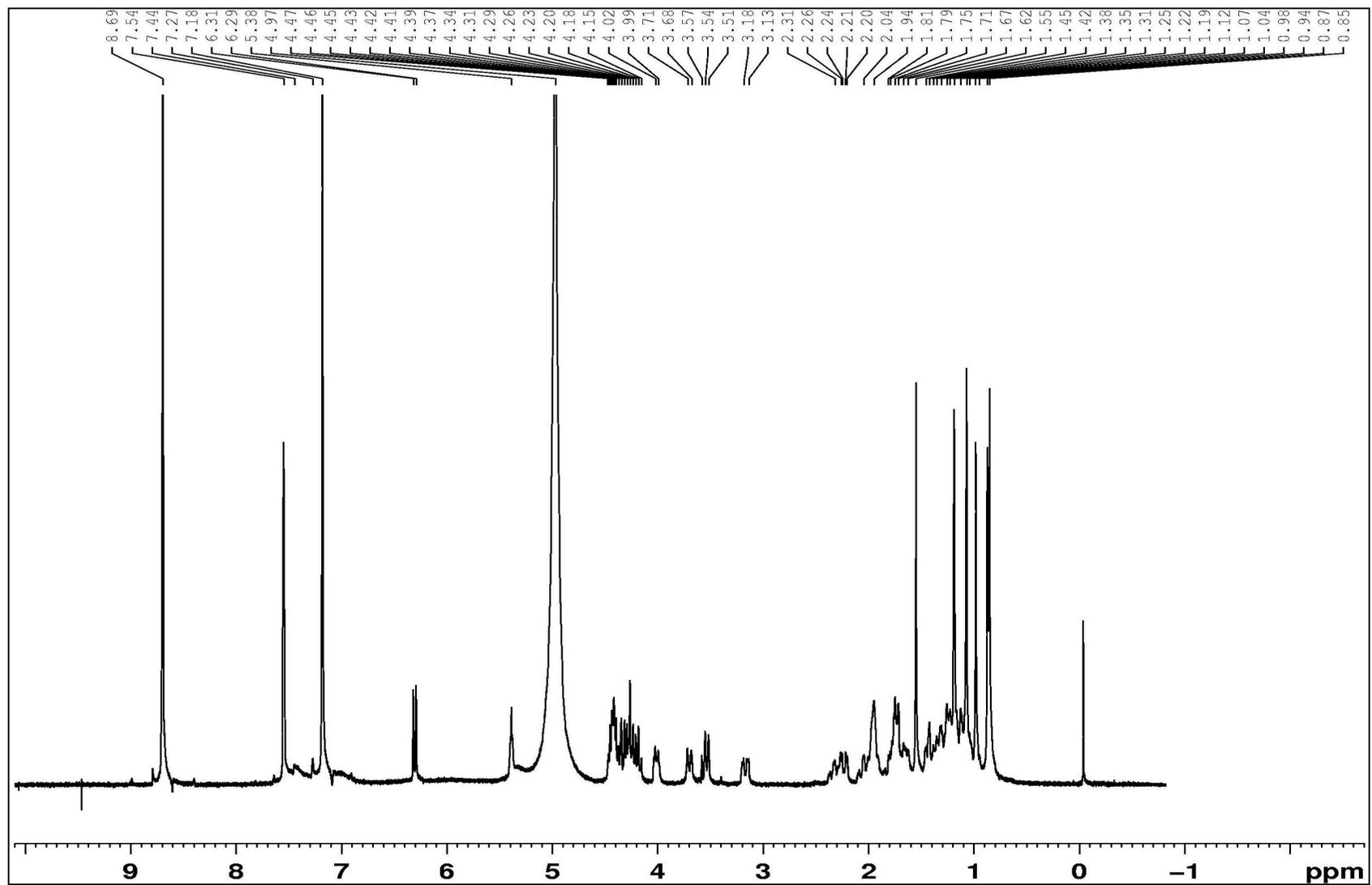
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do triterpeno VII obtidos de *C. laxum*.

(VII) <i>C. laxum</i>		
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	47,8	-
2	68,6	4,33 m
3	85,7	3,54 d (9,3)
4	44,0	-
5	56,5	-
6	19,3	-
7	33,4	-
8	40,0	-
9	48,3	-
10	38,3	-
11	24,1	-
12	122,7	5,38 sl
13	144,1	-
14	42,1	-
15	28,2	-
16	23,4	-
17	47,0	-
18	41,7	3,16 dd (14,3, 3,8)
19	46,2	-
20	30,7	-
21	34,0	-
22	32,5	-
23	24,1	1,54 s
24	65,7	Ha 3,69 d (11,0); Hb 4,42 d (11,0)
25	17,3	0,97 s
26	17,4	1,06 s
27	26,0	1,18 s
28	176,4	-
29	33,1	0,87 s [#]
30	23,6	0,85 s [#]
1'	95,8	6,29 d (7,9)
2'	74,1	4,18 – 4,45 m
3'	78,9	4,18 – 4,45 m
4'	71,1	4,18 – 4,45 m
5'	79,3	4,0 m
6'	62,3	4,18 – 4,45 m

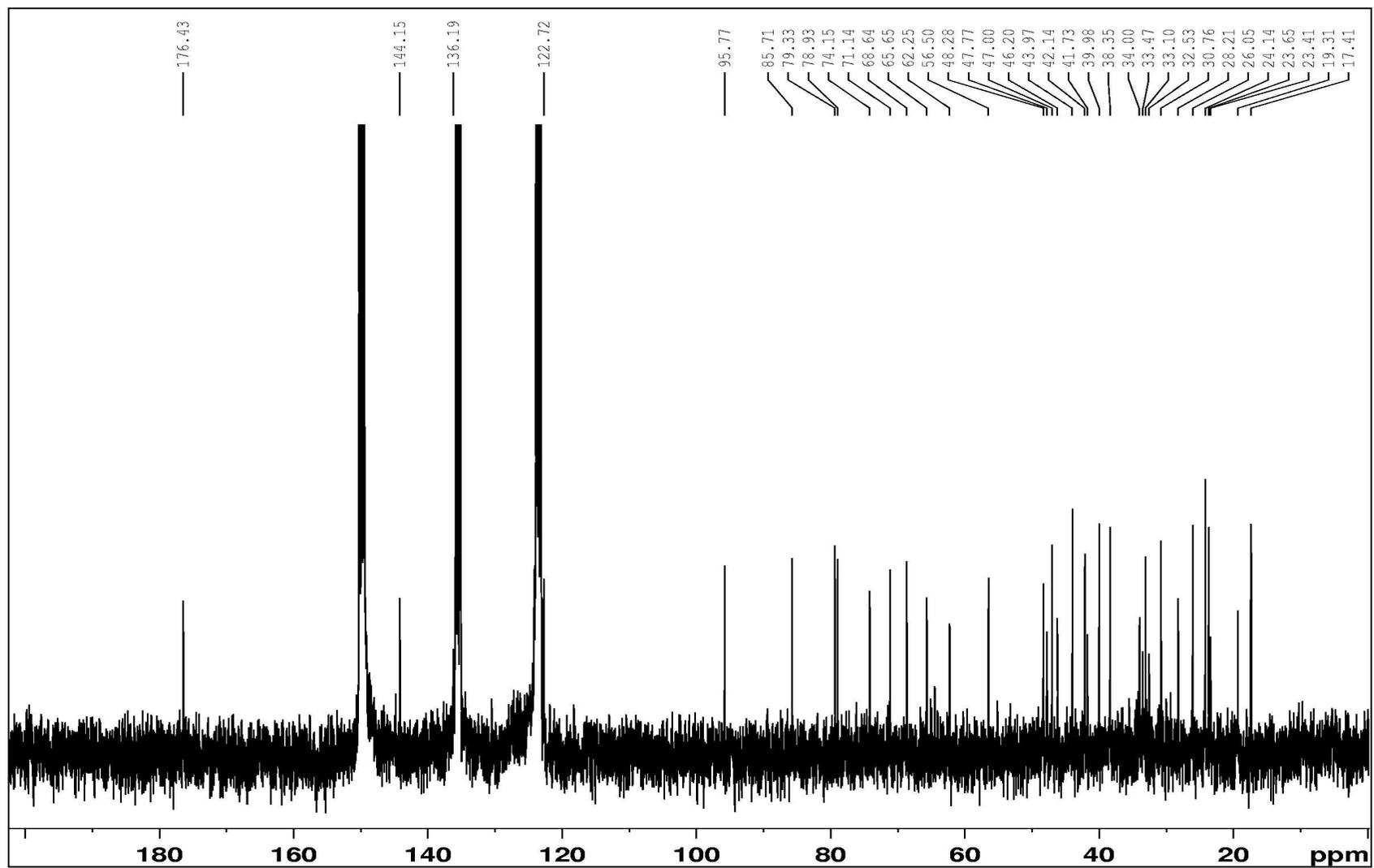
*Py-d5 75 MHz; *Py-d5 300 MHz; [#] valores que podem estar trocados



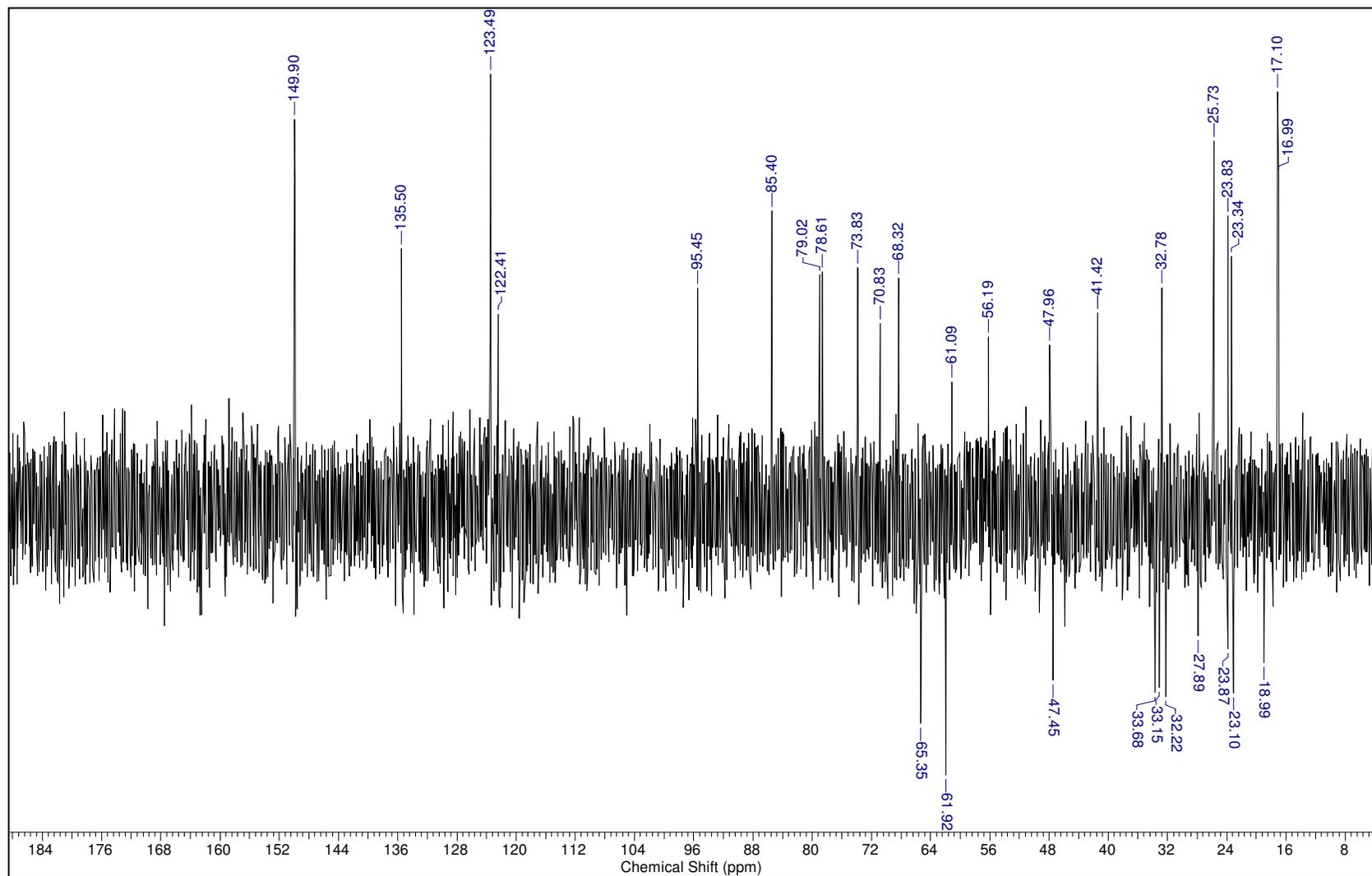
Espectro 11: Espectro de massa HRESIMS de VII adquirido no modo negativo.



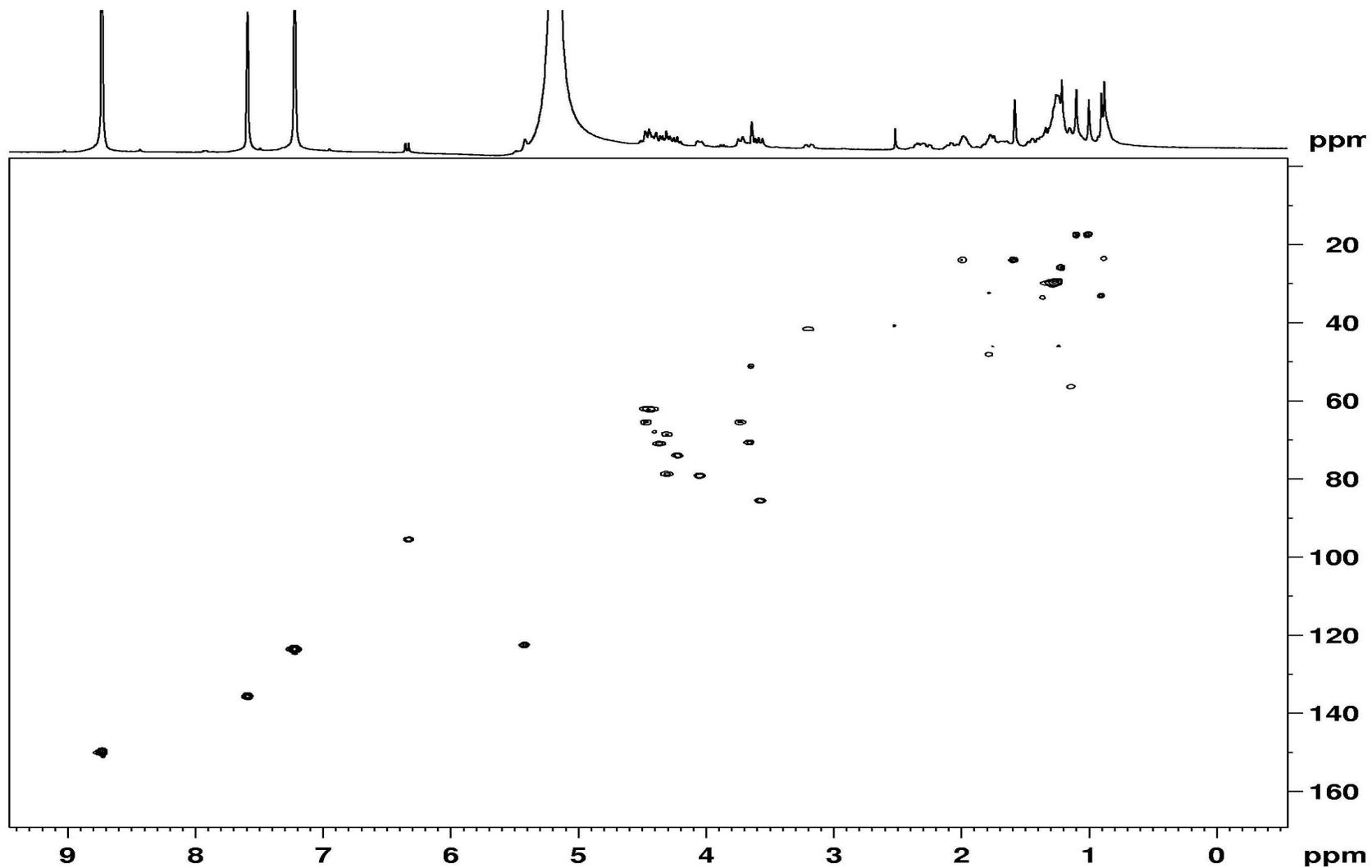
Espectro 12: RMN de ^1H do triterpeno **VII** (300 MHz, Py-d_5).



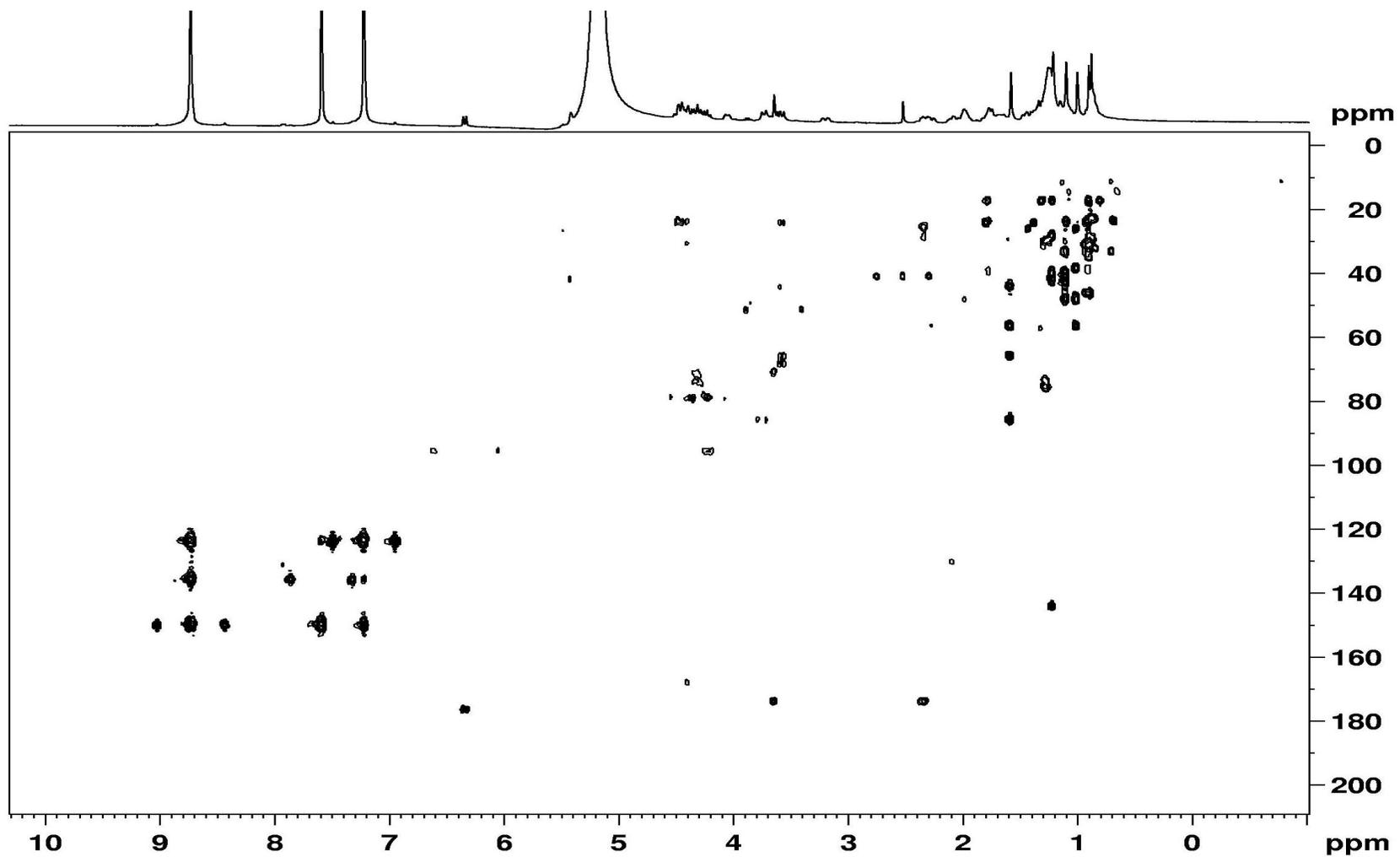
Espectro 13: RMN de ^{13}C do triterpeno **VII** (75 MHz, Py-d_5).



Espectro 14: DEPT – 135° do triterpeno **VII** (75 MHz, Py-*d*₅).

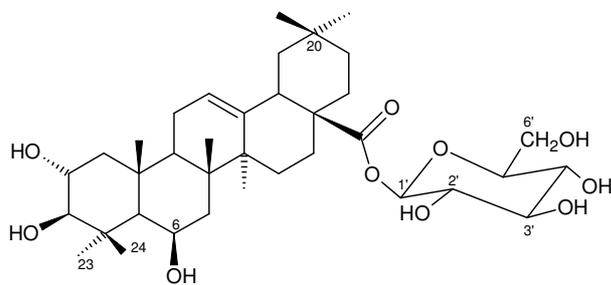


Espectro 15: HSQC do triterpeno **VII** (75MHz, Py-*d*₅).



Espectro 16: HMBC de **VII** (75MHz, Py-*d*₅).

6.1.2.5 Elucidação estrutural do 2 α ,3 β ,6 β -triidroiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VIII)



VIII

A substância **VIII** foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração CLXA 15-28, esta proveniente de CLX 12-15 (item 5.3.2.2, pág. 26).

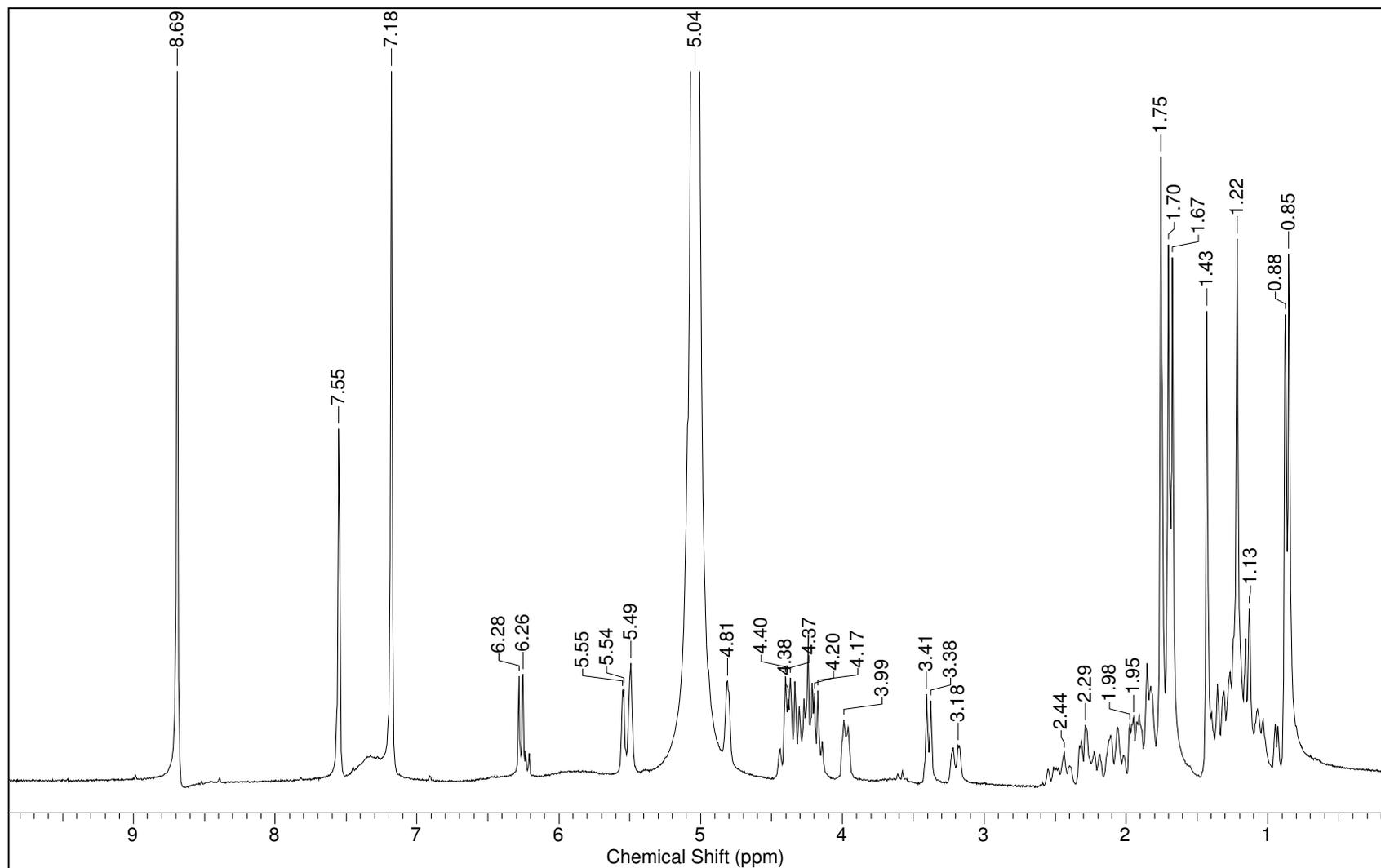
O espectro de RMN de ^1H de **VIII** (espectro 17, pág. 89 e tabela 16, pág. 88) revelou que esta substância tratava-se, da mesma maneira que **V** e **VII**, de um triterpeno com esqueleto oleanano contendo hidrogênios carbinólicos e um resíduo de açúcar. A presença de singletos, atribuídos a sete grupos metila, aliada a um singlete largo a δ 4,82 (este já observado no espectro de **II**) e a um dubleto a 3,38 δ ($J = 9,0$ Hz) em conjunto com um multipletto na região de δ 4,30 (já observados em espectros de **V** e **VII**) sugeriram que **VIII** possuía grupos hidroxila em C-2 α , C-3 β e C-6 β . Esta proposta foi confirmada pelos sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT – 135 $^\circ$ (espectros 18 e 19 pág. 90 e 91) a δ 68,7 (CH); 84,0 (CH); e 67,5 (CH), atribuídos a C-2, C-3 e C-6, respectivamente. Os sinais referente a C-5 (56,5 δ) e C-7 (41,2 δ) bem como a presença de sinais de grupos metila a δ 29,1 (C-23) e 18,5 (C-24) reforçaram a proposta.

Os demais sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C de **VIII**, referentes aos carbonos dos anéis C, D e E e ao resíduo de açúcar mostraram-se bastante semelhantes aos existentes nos espectros de **V** e **VII** e assim, a estrutura de **VIII** foi definida como sendo 2 α ,3 β ,6 β -triidroiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila. Esta substância que havia sido obtida anteriormente apenas de uma espécie de Myrtaceae (*Siphoneugena densiflora*) é, portanto, inédita na família Combretaceae (tabela 16, pág. 88) [GALLO, 2006].

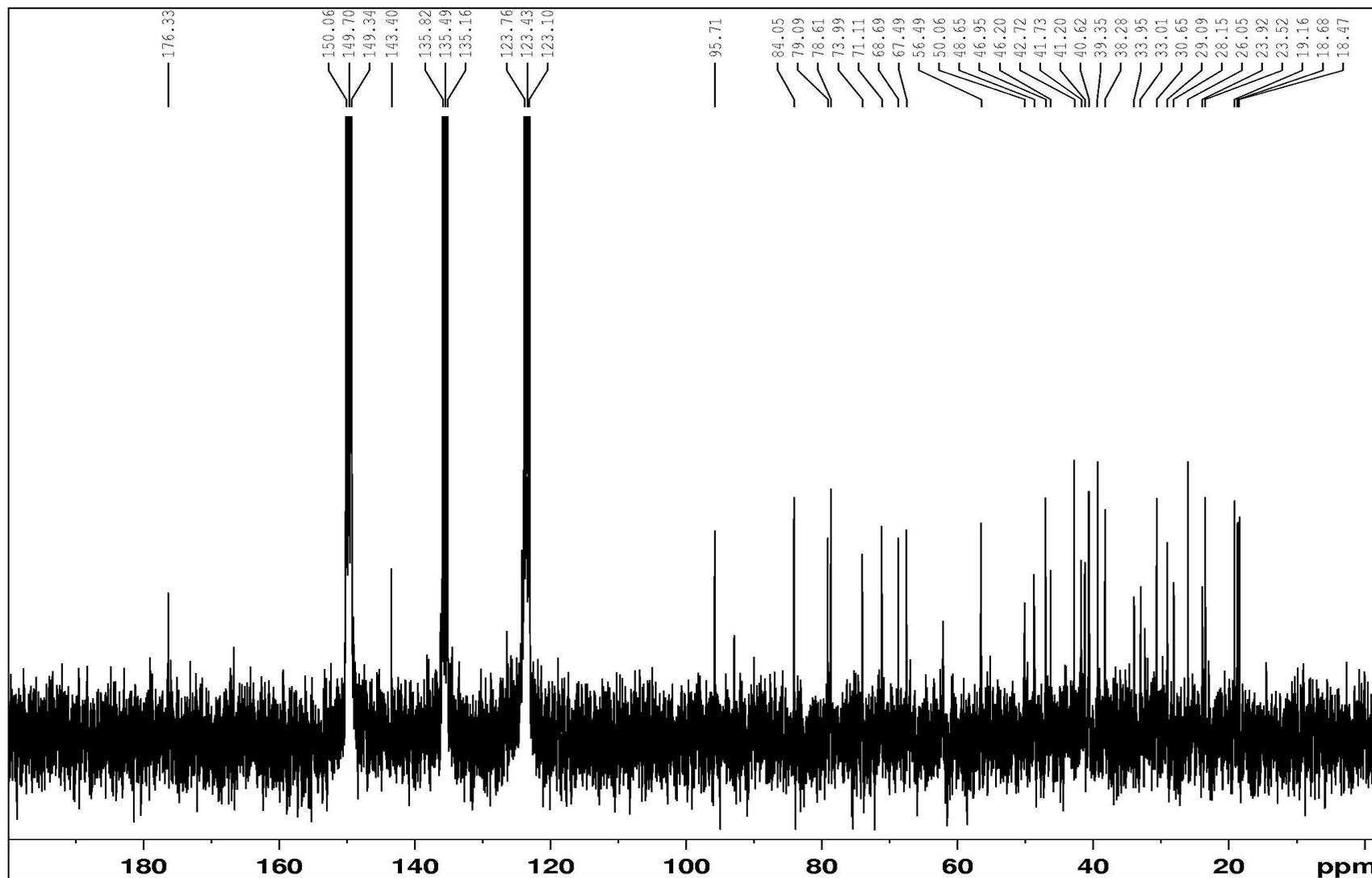
Tabela 16. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do triterpeno **VIII** obtidos de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C/H	(VIII) <i>C. laxum</i>		(VIII) Literatura**	
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	° $\delta^{13}\text{C}$	▪ $\delta^1\text{H}$ [m; J (Hz)]
1	50,0	-	50,4	2,30 (m) 1,39 (m)
2	68,7	4,30 m	69,2	4,29 (m)
3	84,0	3,40 d (9,0)	84,4	3,43 (d; 9,4)
4	39,5	-	39,7	-
5	57,0	-	56,9	1,16 (m)
6	67,5	4,82 sl	67,9	4,39 (m)
7	41,2	2,50 m	32,8	2,50 (m) 1,23 (m)
8	40,6	-	41,1	-
9	48,6	-	49,1	-
10	38,3	-	38,7	-
11	23,9	-	24,4	2,14 (t; 3,8)
12	123,2	5,50 sl	123,5	5,52 (sl)
13	143,5	-	143,9	-
14	42,7	-	43,2	-
15	28,1	-	28,6	-
16	23,4	-	24,4	-
17	46,9	-	47,4	-
18	41,7	3,19 dd (13,5, 4,1)	42,2	3,19 (dd; 4,1;13,2)
19	46,2	-	46,7	1,30 (m) 1,78 (m)
20	30,6	-	31,1	-
21	34,0	-	34,4	-
22	32,4	-	28,6	-
23	29,1	1,44 s	29,0	1,46 (s)
24	18,5	1,76 s	19,6	1,79 (s)
25	18,7	1,71 s	19,2	1,72 (s)
26	19,1	1,68 s	19,6	1,70 (s)
27	26,0	1,23 s	26,5	1,25 (s)
28	176,3	-	176,9	-
29	33,0	0,92 s	33,5	0,92 (s)
30	23,5	0,88 s	24,1	0,88 (s)
OH-6	-	5,54 sl	-	-
1'	95,7	6,27 d (9,0)	96,2	6,28 (d 8,0)
2'	74,0	4,18 – 4,45	74,4	4,21 (t 8,3)
3'	78,6	4,18 – 4,45	78,9	4,27 (m)
4'	71,1	4,18 – 4,45	71,5	4,35 (d 9,4)
5'	79,1	4,0 m	79,5	4,01 (m)
6'	62,0	4,18 – 4,45	62,5	4,45 (dd 2,1; 11,7) 4,39 (m)

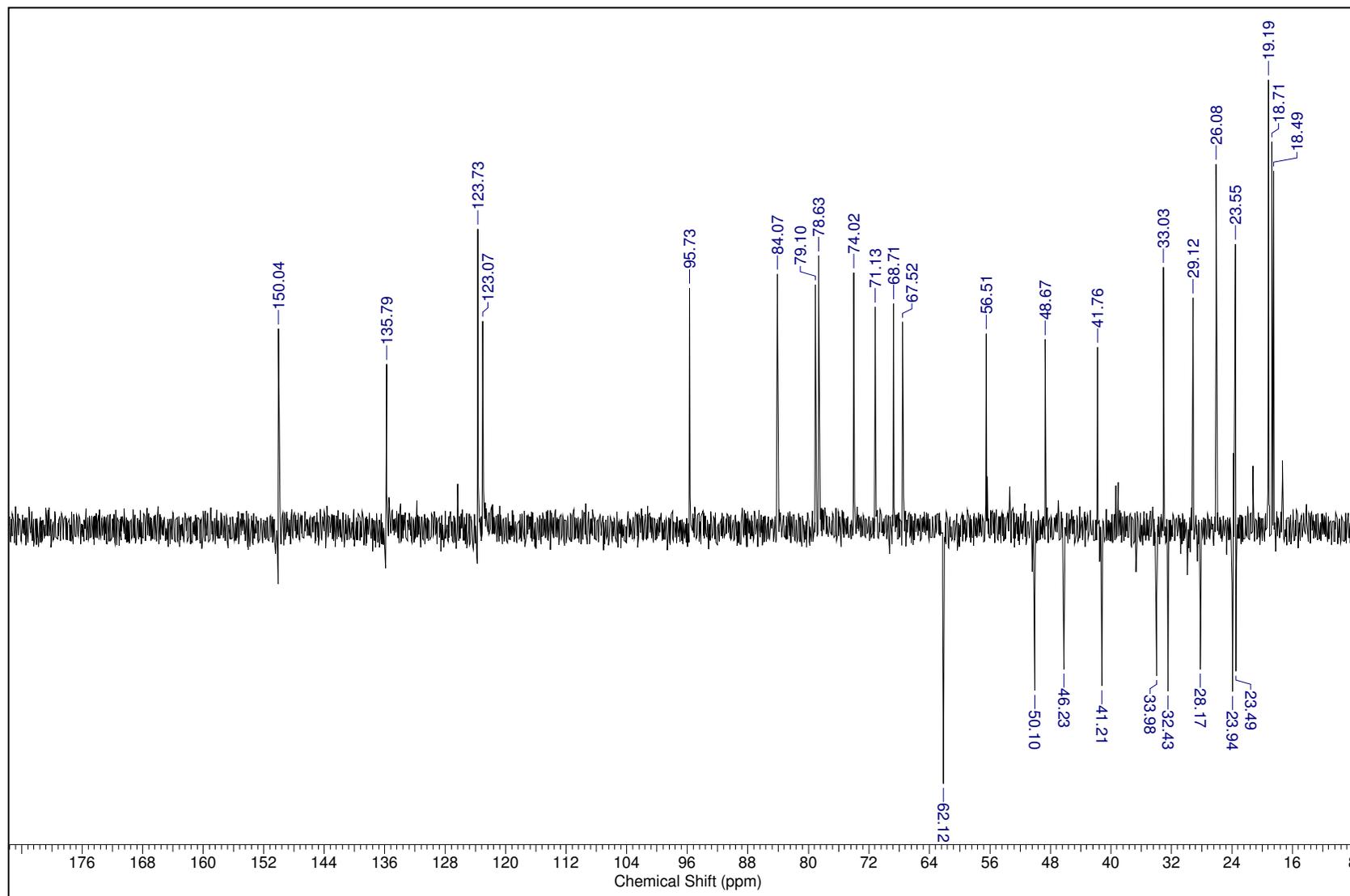
*Py- d_5 75 MHz; *Py- d_5 300 MHz; ° Py- d_5 50 MHz; ▪ Py- d_5 400MHz; ** [GALLO, 2006]



Espectro 17: RMN de ^1H do triterpeno **VIII** (300 MHz, Py-d_5).



Espectro 18: RMN de ^{13}C do triterpeno **VIII** (75 MHz, $\text{Py}-d_5$).



Espectro 19: DEPT – 135° do triterpeno **VIII** (75 MHz, Py-*d*₅).

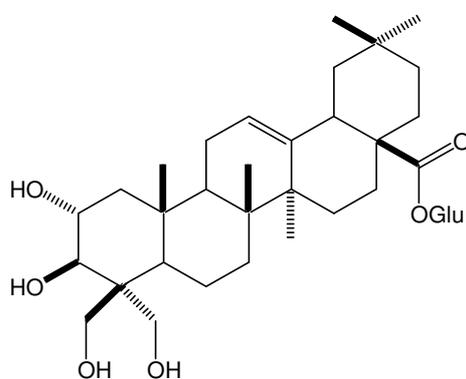
6.1.3 Triterpenos obtidos da fase *n*-butanólica dos galhos

O estudo da fase *n*-butanólica proveniente da partição do extrato etanólico dos galhos resultou na obtenção de cinco triterpenos: arjunglicosídeo II (V), quadranosídeo IV (VI), bellericosídeo (IX), 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxiursan-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (X) e chebulosídeo II (XI).

6.1.3.1 Obtenção de V e VI

Os triterpenos arjunglicosídeo II (V), quadranosídeo IV (VI) foram isolados a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração CLBU-4 (item 5.3.3.1, pág. 30). Estas substâncias já haviam sido obtidas da fase acetato de etila (sub-item 5.2.2.2, pág. 26), proveniente de fracionamentos de CLXA 15-28.

6.1.3.2 Identificação do bellericosídeo (IX)



IX

A substância IX foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos da fração CLBUS 45-51, esta proveniente de CLBU 4 (sub-item 5.3.3.1, pág. 30).

O espectro de RMN de ¹H (espectro 20, pág. 95) de IX apresentou uma grande complexidade de sinais, além de singletos em δ 0,87 (2x CH₃), 1,13, 1,14 e 1,16 referentes a 5 grupos metila, sugerindo ser um triterpeno pentacíclico, como os demais já obtidos da fase acetato de etila. Os sinais presentes na região de δ 4,00 a 4,45 e o dubleto a δ 6,30 indicaram ainda que IX seria um triterpeno glicosilado.

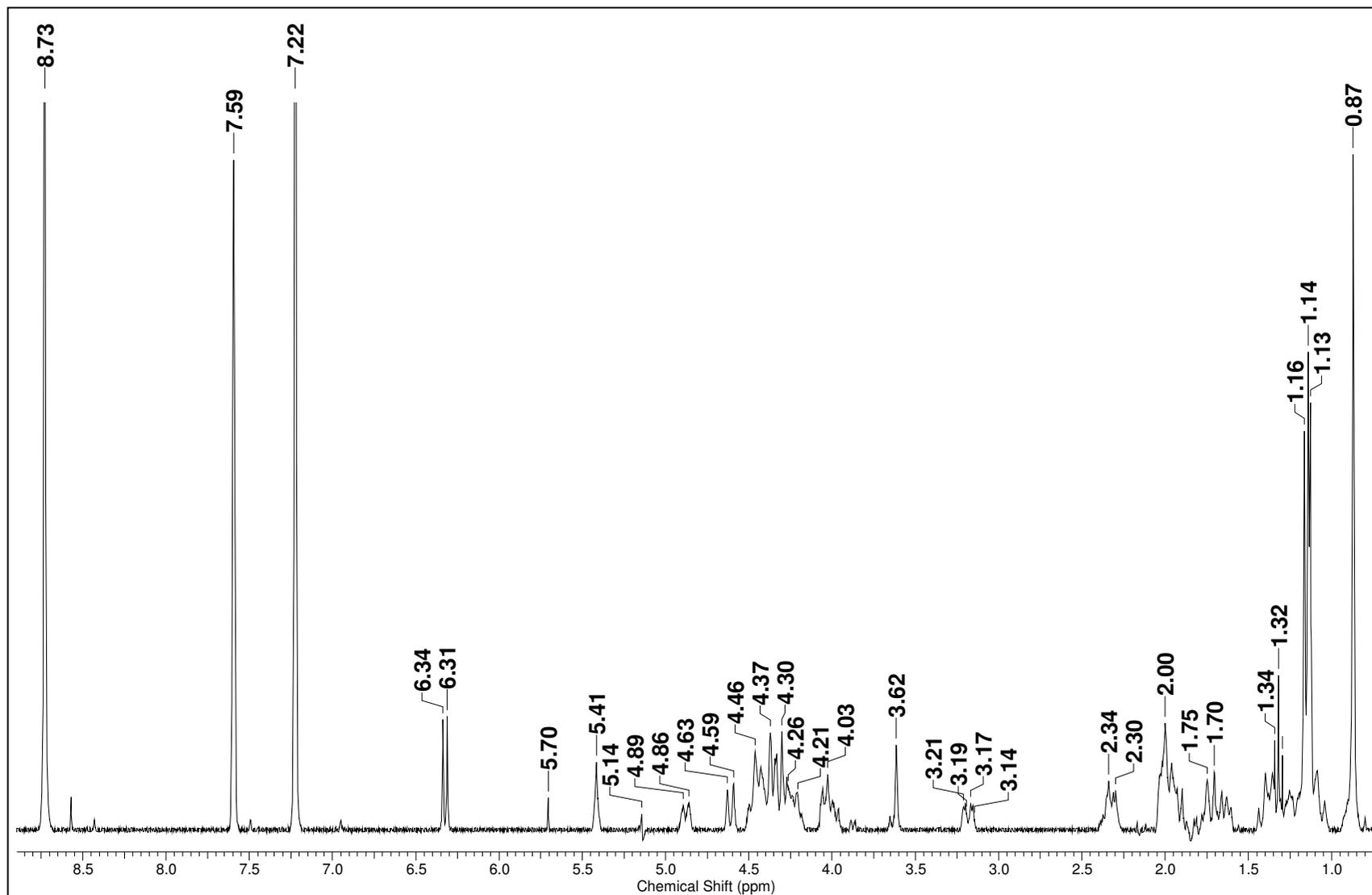
No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 21, pág. 96), os sinais nas regiões de olefinas a δ 122,7 e 144,1 indicaram, como no caso de **III**, **V**, **VII** e **VIII**, que se tratava de um triterpeno com esqueleto do tipo olean-12-eno. Na região de carbonos oxigenados, foram observados sinais para carbonos metínicos a δ 69,0 e 79,7, sinais estes compatíveis com a presença de grupos hidroxila no anel A localizados em C-2 e C-3, possuindo orientações α e β respectivamente [MAHATO & KUNDU, 1994; AHMAD, 1994]. Também foram observados sinais para carbonos oxigenados metilênicos a δ 64,3 e 62,8, os quais sugeriram a presença de hidroxilas nos carbonos C-23 e C-24, respectivamente [MAHATO & KUNDU, 1994; AHMAD, 1994]. O sinal a 176,5 δ , atribuível a uma carbonila de éster, em conjunto com um sinal a δ 46,9 (C-17) e o sinal do carbono anomérico de um resíduo de açúcar a δ 95,7 foram indicativos da presença, da mesma maneira que nos compostos **V**, **VII** e **VIII**, de um grupo carboxila em C-28 esterificado com o resíduo de açúcar.

De acordo com os dados da literatura e também por comparação com os dados espectrais de **V**, **VII** e **VIII**, o açúcar presente em **IX** foi identificado como sendo β -D-Glucose [GARCEZ, 2006]. Assim, a estrutura de **IX** foi identificada como sendo a do bellericosídeo, substância isolada anteriormente de *Terminalia bellerica*, cujos dados espectrais mostraram-se bastante semelhantes aos apresentados por **IX** (tabela 17, pág. 94) [NANDY, 1989].

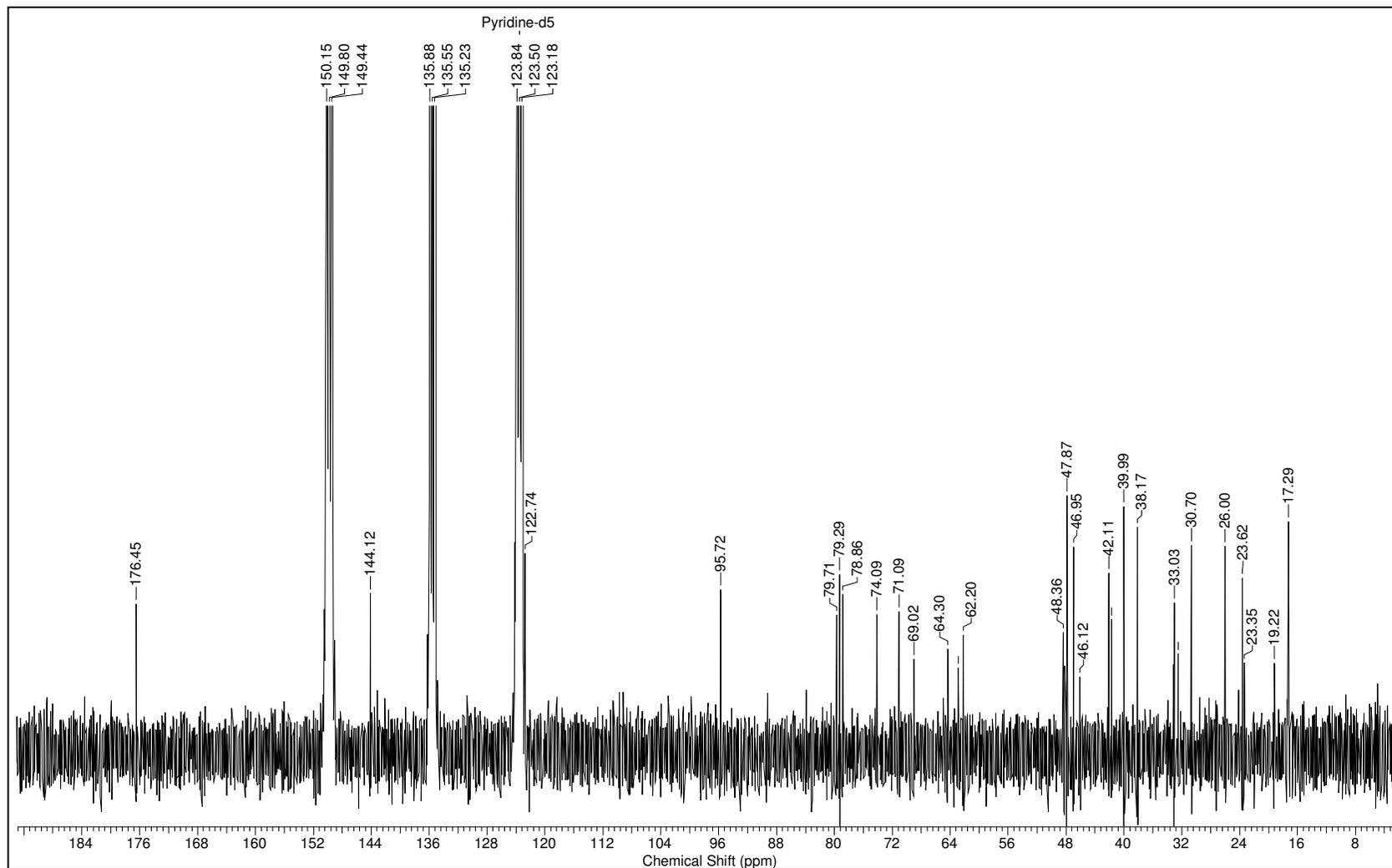
Tabela 17. Dados de RMN de ^{13}C do triterpeno **IX** obtido de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C	(IX) <i>C. laxum</i>		(IX) literatura**
	* $\delta^{13}\text{C}$	† $\delta^1\text{H}$	# $\delta^{13}\text{C}$
1	47,8	-	46,9
2	69,0	4,07 m	69,0
3	79,7	4,30 [†] m	79,9
4	47,8	-	47,0
5	48,2	-	48,3
6	19,2	-	19,2
7	32,5	-	33,0
8	40,0	-	40,0
9	48,3	-	48,8
10	38,1	-	38,2
11	23,3	-	24,2
12	122,7	5,42 sl	123,5
13	144,1	-	144,1
14	42,1	-	42,2
15	28,1	-	28,2
16	24,1	-	23,5
17	46,9	-	47,0
18	41,7	3,18 dd (13,1, 3,7)	41,8
19	46,1	-	46,3
20	30,7	-	30,7
21	33,7	-	34,1
22	33,0	-	33,3
23	64,3	Ha 4,24 d (10,8) Hb 4,86 d (10,8)	64,0
24	62,8	Ha 3,97 d (11,0) Hb 4,61 d (11,0)	63,6
25	17,3	1,13 s	17,4
26	17,4	1,14 s	17,2
27	26,0	1,16 s	26,0
28	176,5	-	176,3
29	33,0	0,87 s	33,3
30	23,6	0,87 s	23,8
1'	95,7	6,32 d (9,0)	95,6
2'	74,1	4,20 m	73,9
3'	78,8	4,25 – 4,44 [†] m	78,8
4'	71,1	4,25 – 4,44 [†] m	71,3
5'	79,3	4,02 m	78,7
6'	62,2	4,25 – 4,44 [†] m	62,5

*Py- d_5 75MHz; † 300 MHz; # Py- d_5 25,05MHz; † Valores sobrepostos; **[NANDY, 1989]

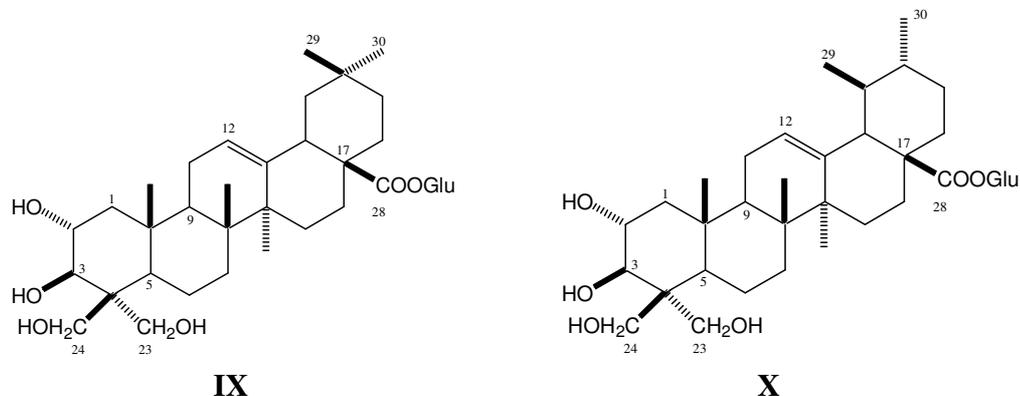


Espectro 20: RMN de ^1H do triterpene **IX** (300 MHz, Py-d_5).



Espectro 21: RMN de ¹³C do triterpeno **IX** (75 MHz, Py-d₅).

6.1.3.3 Identificação do bellericosídeo (IX) em mistura com 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxiursan-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (X)



Os triterpenos **IX** e **X** foram obtidos em mistura a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLBUS 45-51, esta proveniente de CLBU 4 descrito no item 5 (sub-item 5.2.3.1, pág. 30).

A análise do espectro de RMN de ^1H (espectro 22, pág. 100) da fração CLB 51-5 mostrou que esta era constituída de uma mistura de dois triterpenos glicosilados (**IX** e **X**), pela complexidade e duplicidade de sinais. A presença da unidade de açúcar no espectro foi evidenciada pelos dois dubletos em δ 6,32 ($J= 6,0$ Hz) e δ 6,30 ($J= 6,0$ Hz) característicos para hidrogênios anomérico, além de um conjunto de sinais entre δ 4,00 e 4,45 atribuídos aos hidrogênios carbinólicos. No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 23, pág. 101) os sinais em δ 95,7; 79,3; 78,8; 74,1; 71,1; 62,2 confirmaram a presença de uma unidade de açúcar nas substâncias.

O espectro de RMN de ^{13}C , na região de olefinas apresentou 2 pares de sinais característicos da presença de um triterpene de esqueleto oleanano [δ 122,7 (C-12) e 144,1 (C-13)] e outro de esqueleto ursano [δ 125,9 (C-12) e 138,4 (C-13)] [OLEA, 1990]. No espectro de RMN de ^{13}C , os sinais atribuídos para os carbonos da substância majoritária apresentaram valores de deslocamento químico semelhantes aos observados para a substância **IX** já descrita neste trabalho (pág. 91, sub-item 6.1.3.2). Assim foi possível determinar que o triterpene bellericosídeo era a substância majoritária presente na fração CLBU-4. Os sinais relativos à substância minoritária, **X**, mostraram grande semelhança

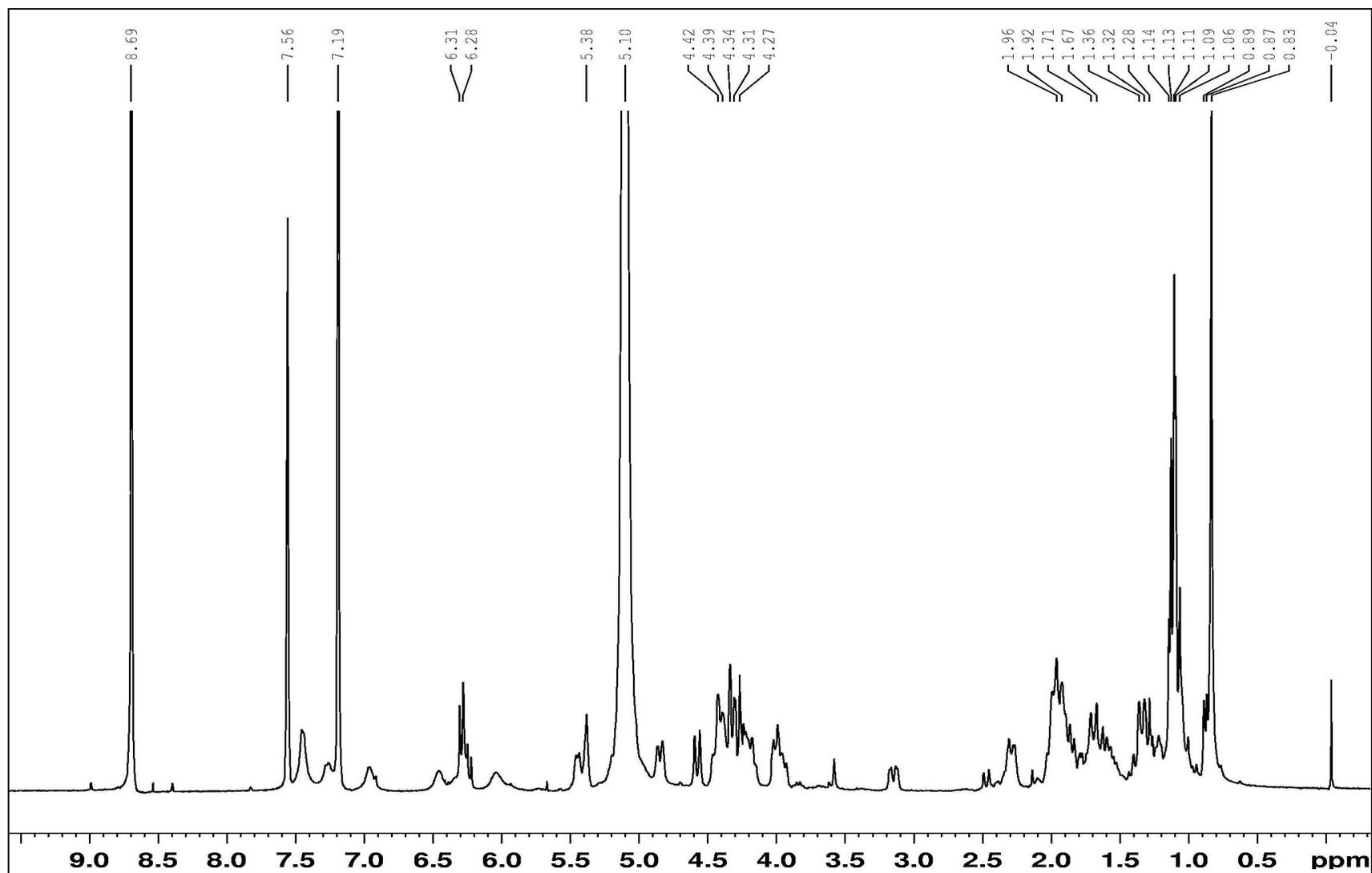
com os de **XI**, sugerindo que **X** seria o derivado urs-12-eno análogo a **IX**. Assim, foi possível observar a presença de sinais característicos atribuíveis aos carbonos do anel E do esqueleto ursano a δ 53,2 (C-18), 39,3 (C-19), 39,1 (C-20), 30,7 (C-21) e 36,7 (C-22), assim como os das metilas 29 e 30 (δ 17,5 e 21,2, respectivamente) além dos carbonos olefinicos C-12 e C-13 já mencionados. Estes sinais, por sua vez, mostraram-se muito semelhantes aos já observados no espectro de **VI**.

Estes dados permitiram definir a estrutura de **X** como sendo 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxursan-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (tabela 18, pág. 99). Este glicosídeo triterpênico foi previamente relatado como um componente da estrutura das castanopsininas A-H, elagitaninos do tipo galoil e hexaidroxidifenoil que possuem misturas de glicosídeos triterpênicos com esqueletos olean-12-eno e ursan-12-eno em suas estruturas, isolados de *Castanopsis cuspidate* var. *sieboldii* (Fagaceae) [AGETA, 2005].

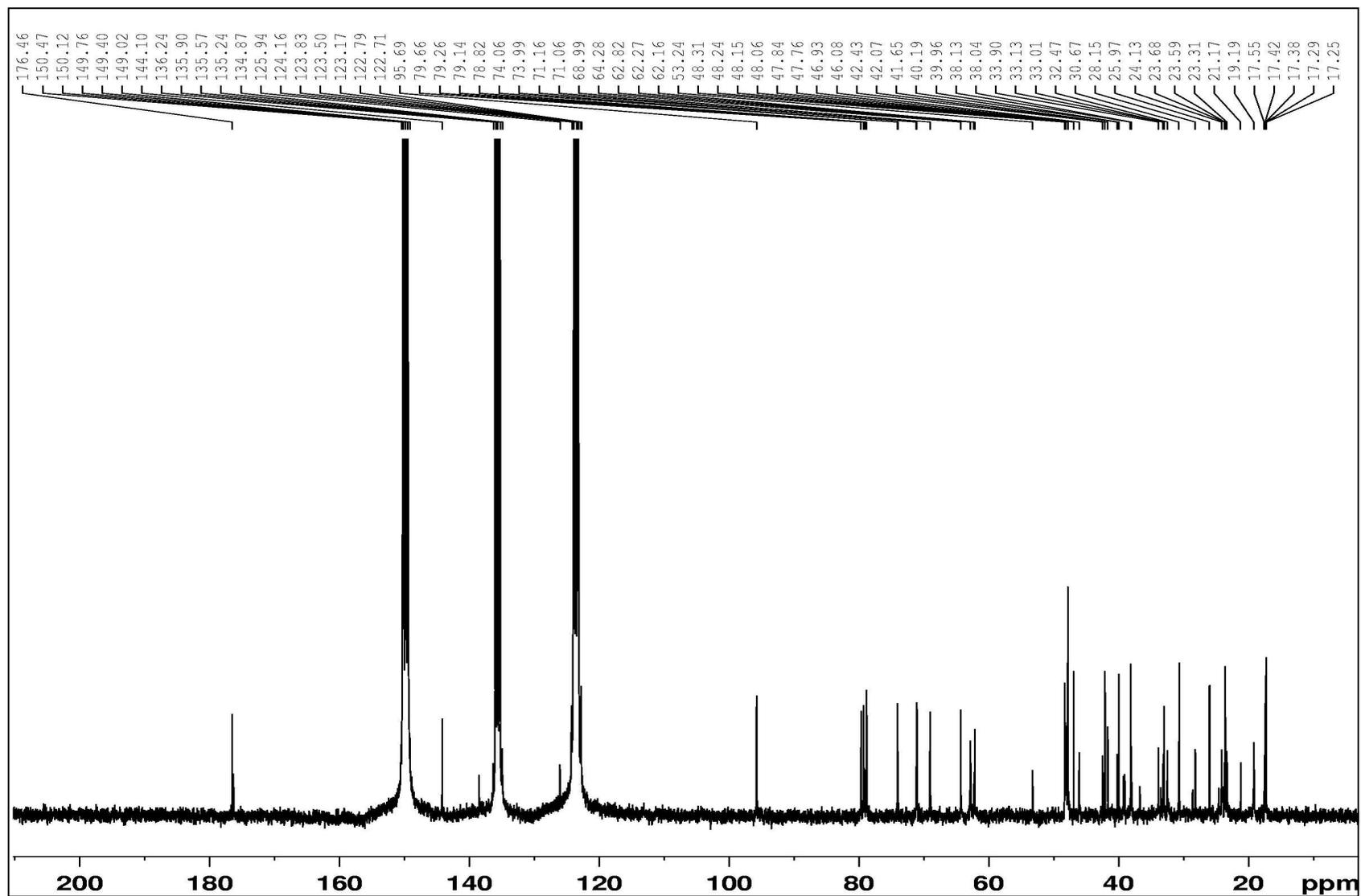
Tabela 18. Dados de RMN de ^{13}C dos triterpenos IX e X obtidos de *C. laxum* e do referente ao IX citado na literatura.

C/H	(IX) <i>C. laxum</i>		(IX) literatura	(X) <i>C. laxum</i>	
	* $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	47,8	-	46,9	47,4	-
2	69,0	4,07 m	69,0	69,0	4,05 m
3	79,7	4,30 [*] m	79,9	79,7	4,30 [#] m
4	47,8	-	47,0	47,8	-
5	48,2	-	48,3	48,0	-
6	19,2	-	19,2	19,2	-
7	32,5	-	33,0	33,5	-
8	40,0	-	40,0	40,2	-
9	48,3	-	48,8	48,2	-
10	38,1	-	38,2	38,0	-
11	23,3	-	24,2	23,9	-
12	122,7	5,42 sl	123,5	125,9	5,45 sl
13	144,1	-	144,1	138,4	-
14	42,1	-	42,2	42,4	-
15	28,1	-	28,2	28,6	-
16	24,1	-	23,5	24,6	-
17	46,9	-	47,0	47,8	-
18	41,7	3,18 dd (13,1, 3,7)	41,8	53,2	3,18 dd (13,0, 3,5)
19	46,1	-	46,3	39,3	-
20	30,7	-	30,7	39,1	-
21	33,7	-	34,1	30,7	-
22	33,0	-	33,3	36,7	-
23	64,3	Ha 4,24 d (10,8) Hb 4,86 d (10,8)	64,0	64,3	Ha 4,24 d (10,8); Hb 4,90 d (10,8)
24	62,8	Ha 3,97 d (11,0) Hb 4,61 d (11,0)	63,6	62,9	Ha 3,95 d (11,0); Hb 4,62 d (11,0)
25	17,3	1,13 s	17,4	17,3 [#]	1,15 s
26	17,4	1,14 s	17,2	17,4 [#]	1,19 s
27	26,0	1,16 s	26,0	23,7	1,10 s
28	176,5	-	176,3	176,2	-
29	33,0	0,87 s	33,3	17,5 [#]	0,91 s
30	23,6	0,87 s	23,8	21,2	0,87 s
1'	95,7	6,32 d (9,0)	95,6	95,7	6,30 d (9,0)
2'	74,1	4,20 m	73,9	74,0	4,20 m
3'	78,8	4,25 – 4,44 [*] m	78,8	78,8	4,25 – 4,44 [#] m
4'	71,1	4,25 – 4,44 [*] m	71,3	71,2	4,25 – 4,44 [#] m
5'	79,3	4,02 m	78,7	79,1	4,02 m
6'	62,2	4,25 – 4,44 [*] m	62,5	62,3	4,25 – 4,44 [#] m

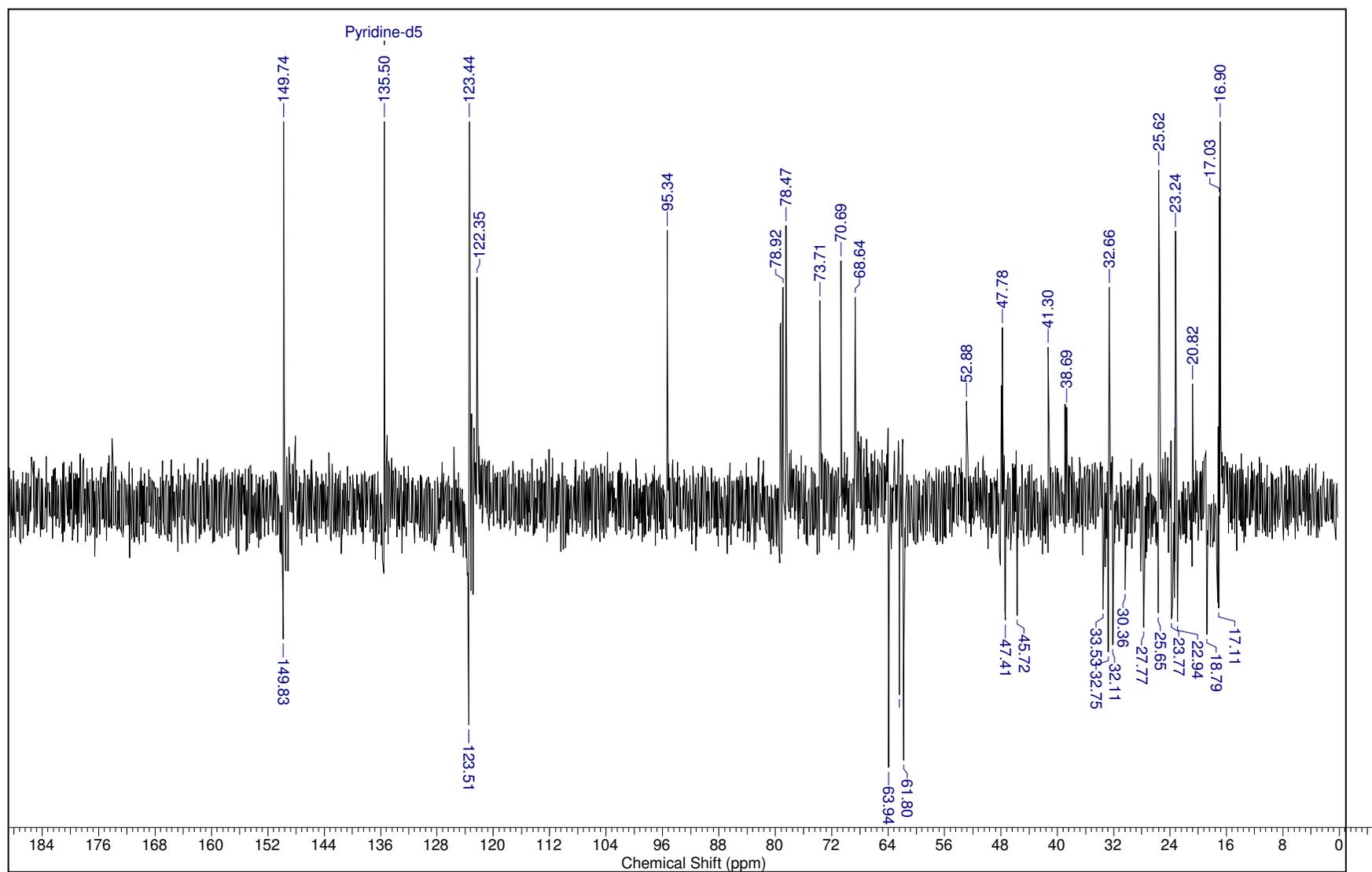
Py- d_5 75 MHz; ^{}Py - d_5 300 MHz ^{*}Py- d_5 25,05MHz [NANDY, 1989] [#]Sinais que podem estar trocados, ^{*} Sinais sobrepostos.



Espectro 22: RMN de ¹H dos triterpenos **IX** e **X** (300 MHz, Py-*d*₅).

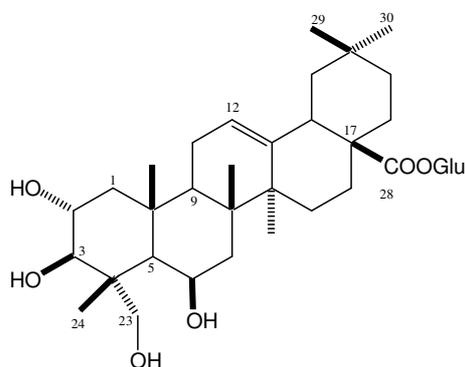


Espectro 23: RMN de ^{13}C dos triterpenos **IX** e **X** (75MHz, Py-d_5).



Espectro 24: DEPT – 135° dos triterpenos **IX** e **X** (75 MHz, Py-d₅).

6.1.3.4 Identificação do chebulosídeo II (XI)



XI

A substância **XI** foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLBUS 45-51, esta proveniente de CLBU 4 (sub-item 5.2.3.1, pág. 30).

O espectro de RMN de ^1H de **XI** (espectro 25, pág. 106) apresentou vários sinais na região entre δ 0,85 e 2,50, entre eles cinco singletos, referentes a grupos metila, sendo um destes (δ 0,85) com integração para duas metilas. Estes sinais aliados ao singlete largo em δ 5,50 sugeriram o isolamento de mais um triterpeno pentacíclico contendo um hidrogênio olefínico. Assim como nos espectros de triterpenos **V** a **X**, o dubleto em δ 6,28 (d, $J=9,0$ Hz) e o conjunto de sinais na região de δ 4,00 a 4,40 evidenciaram uma unidade de açúcar ligada ao triterpeno.

Da mesma forma, o esqueleto triterpênico oleanano para a substância **XI** foi definido em virtude da presença no espectro de RMN de ^{13}C (espectro 26, pág. 106) dos sinais observados em δ 122,8 (CH) e 143,5 (C) referentes aos carbonos C-12 e C-13, respectivamente, enquanto que o sinal em δ 176,4 sugeriu a presença de uma carbonila de éster, atribuída ao carbono C-28. Este estaria, como nos compostos anteriores, esterificado com uma unidade de β -D-Glucose (C-1' em δ 95,7).

Além dos sinais atribuídos aos carbonos carbinólicos da β -D-glucose o espectro de RMN de ^{13}C continha outros quatro sinais para carbonos carbinólicos; δ 78,2; 69,0; 67,5 e 66,1 sendo este último um carbono hidroximetilênico, como pode ser observado no espectro de DEPT – 135° (espectro 27, pág. 108).

Os sinais no espectro de RMN ^1H em δ 4,43 (m), 4,25 (d, $J= 9,0$ Hz), 4,04 (d, $J= 10,8$ Hz) e 4,40 (d, $J= 10,8$ Hz) mostraram-se compatíveis com os dos hidrogênios H-1, H-3, H-23a e H-23b, respectivamente de um anel A $2\alpha,3\beta,23$ -trioxigenado [AHMAD & RAHMAN, 1994]. No espectro de HSQC (espectro 28, pág. 108), as correlações observadas entre estes sinais de hidrogênios e os de carbono em δ 69,0, 78,2 e 66,1 confirmaram a proposta.

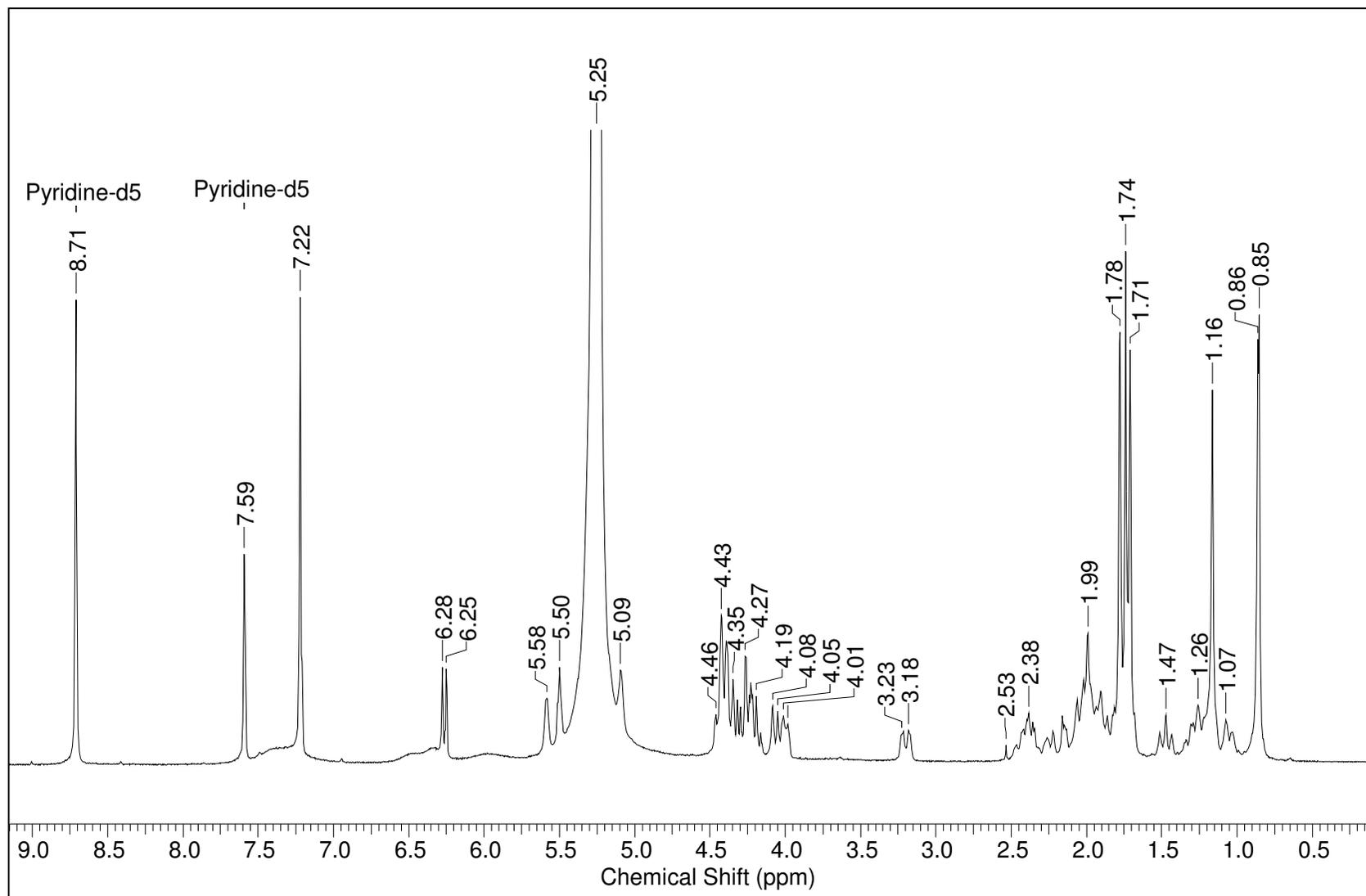
O singlete largo em δ 5,10, que no espectro HSQC mostrou correlação com o sinal do carbono carbinólico a δ 67,5, foi atribuído a H-6. A localização do grupo hidroxila em C-6 foi confirmada pela desproteção ocorrida em C-5 e C-7, quando os valores de deslocamento destes carbonos (δ 48,7 e 41,0) foram comparados com os de V (δ 48,0 e 32,7) triterpeno semelhante a **XI**, porém sem o grupo hidroxila em C-6. A multiplicidade do sinal de C-6 (singlete largo) definiu a orientação equatorial (α) deste hidrogênio e consequentemente, a estereoquímica β para a hidroxila.

Os dados espectrais de **XI** mostraram-se bastante semelhantes aos existentes na literatura para o chebulosídeo II (tabela 19, pág. 105), substância isolada anteriormente de *Terminalia chebula* [KUNDU & MAHATO, 1993] e em uma única espécie de *Combretum* (*C. quadrangulare*) [ADNYANA, 2000].

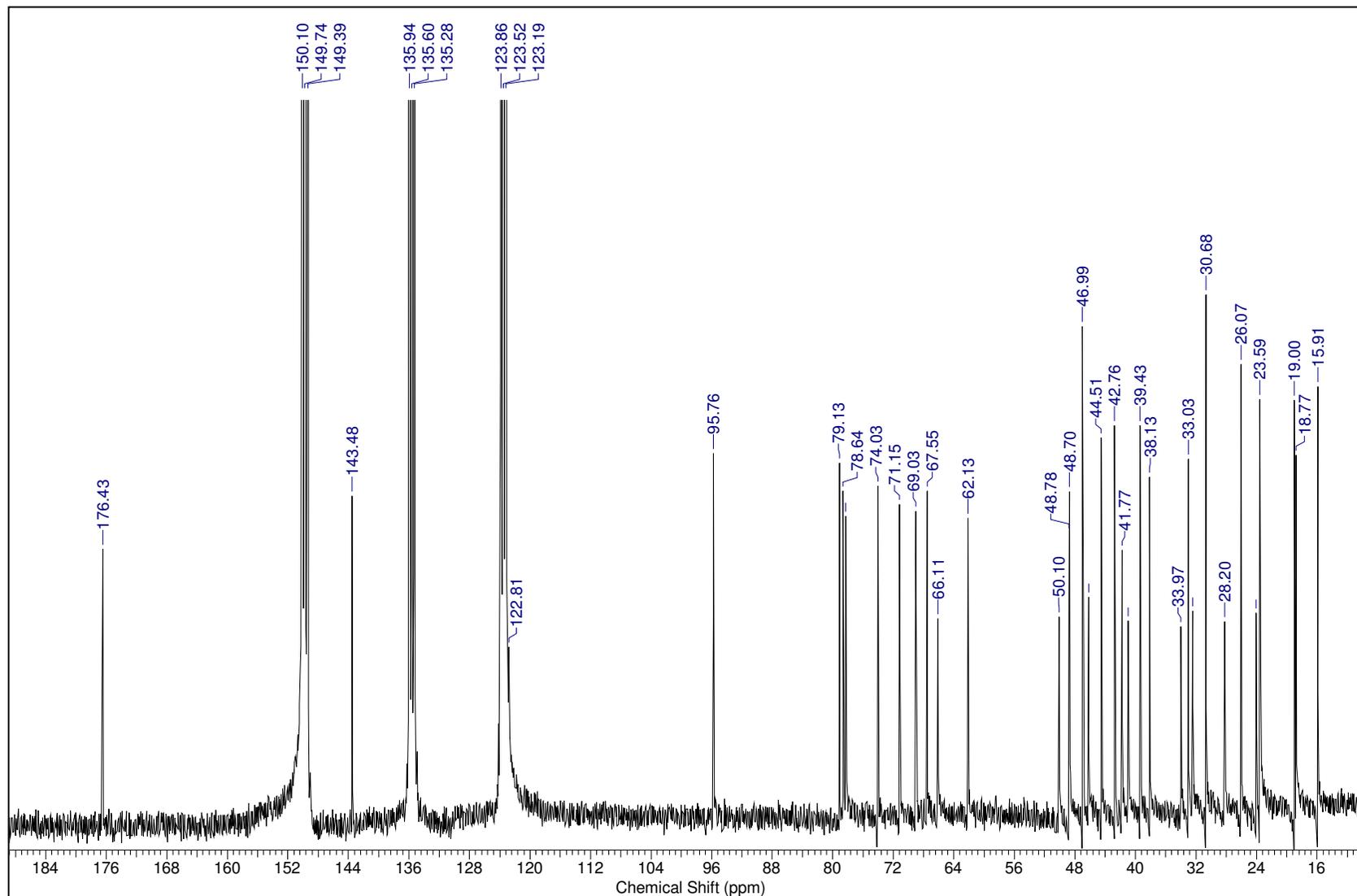
Tabela 19. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do triterpeno **XI** obtido de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C/H	(XI) <i>C. laxum</i>		(XI) literatura**
	* $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$
1	50,1	-	50,0
2	69,0	4,43 m	69,0
3	78,2	4,25 d (9,0)	78,3
4	44,5	-	42,8
5	48,7	-	48,8
6	67,5	5,10 sl	67,6
7	41,0	-	41,0
8	39,4	-	41,0
9	48,8	-	48,8
10	38,1	-	38,1
11	24,0	-	22,6
12	122,8	5,50 sl	123,5
13	143,5	-	143,5
14	42,7	-	42,8
15	28,2	-	28,2
16	23,4	-	24,0
17	47,0	-	47,0
18	41,8	3,17 dd (13,8, 3,7)	41,8
19	46,2	-	47,0
20	30,7	-	30,7
21	33,9	-	34,0
22	32,0	-	32,5
23	66,1	Ha 4,04 d (10,8) Hb 4,40 d (10,8)	66,1
24	15,9	1,74 s	15,9
25	18,8	1,78 s	18,8
26	19,0	1,71 s	19,0
27	26,0	1,16 s	26,1
28	176,4	-	176,4
29	33,0	0,86 s	33,1
30	23,6	0,85 s	23,6
1'	95,7	6,28 d (9,0)	95,6
2'	74,0	4,20 m	74,0
3'	78,6	4,28 m	79,1
4'	71,1	4,30 m	71,1
5'	79,1	4,00 m	78,6
6'	62,1	4,40 m, 4,45 m	62,1

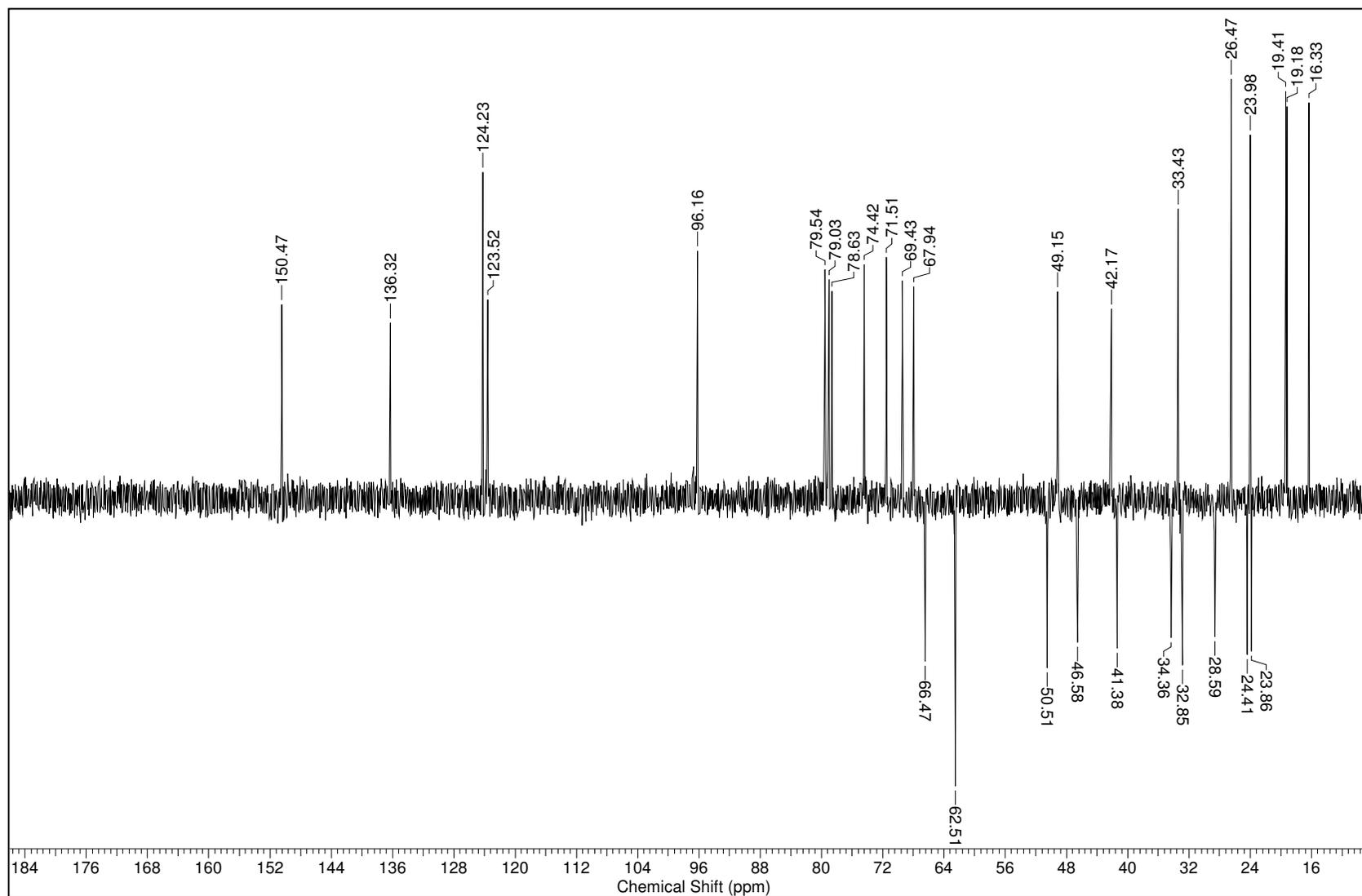
* Py-d₅ 75MHz; # Py-d₅ 100MHz $\delta^1\text{H}$ Py-d₅ 300 MHz; **[KUNDU, 1993]



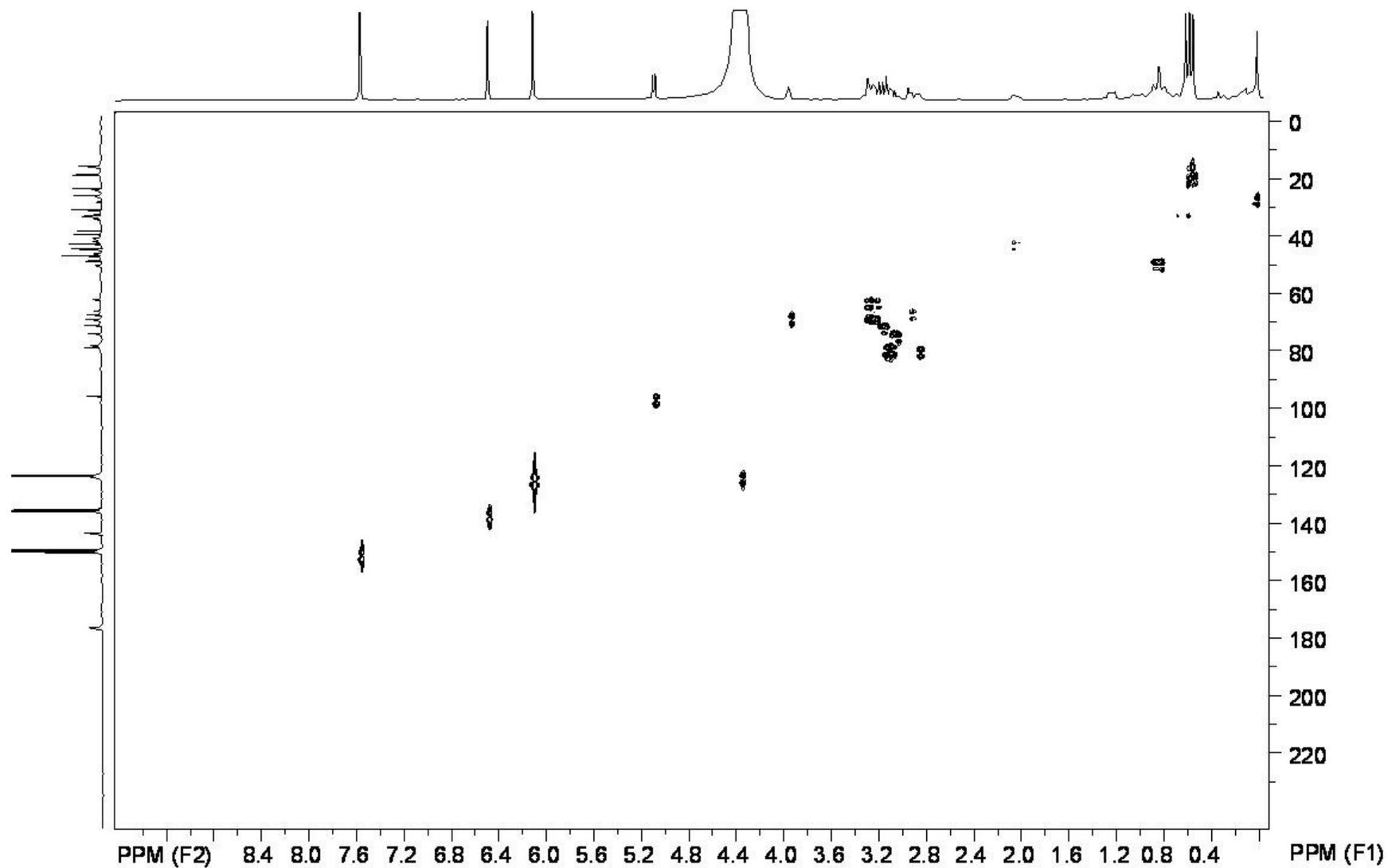
Espectro 25: RMN de ^1H do triterpeno **XI** (300 MHz, Py- d_5).



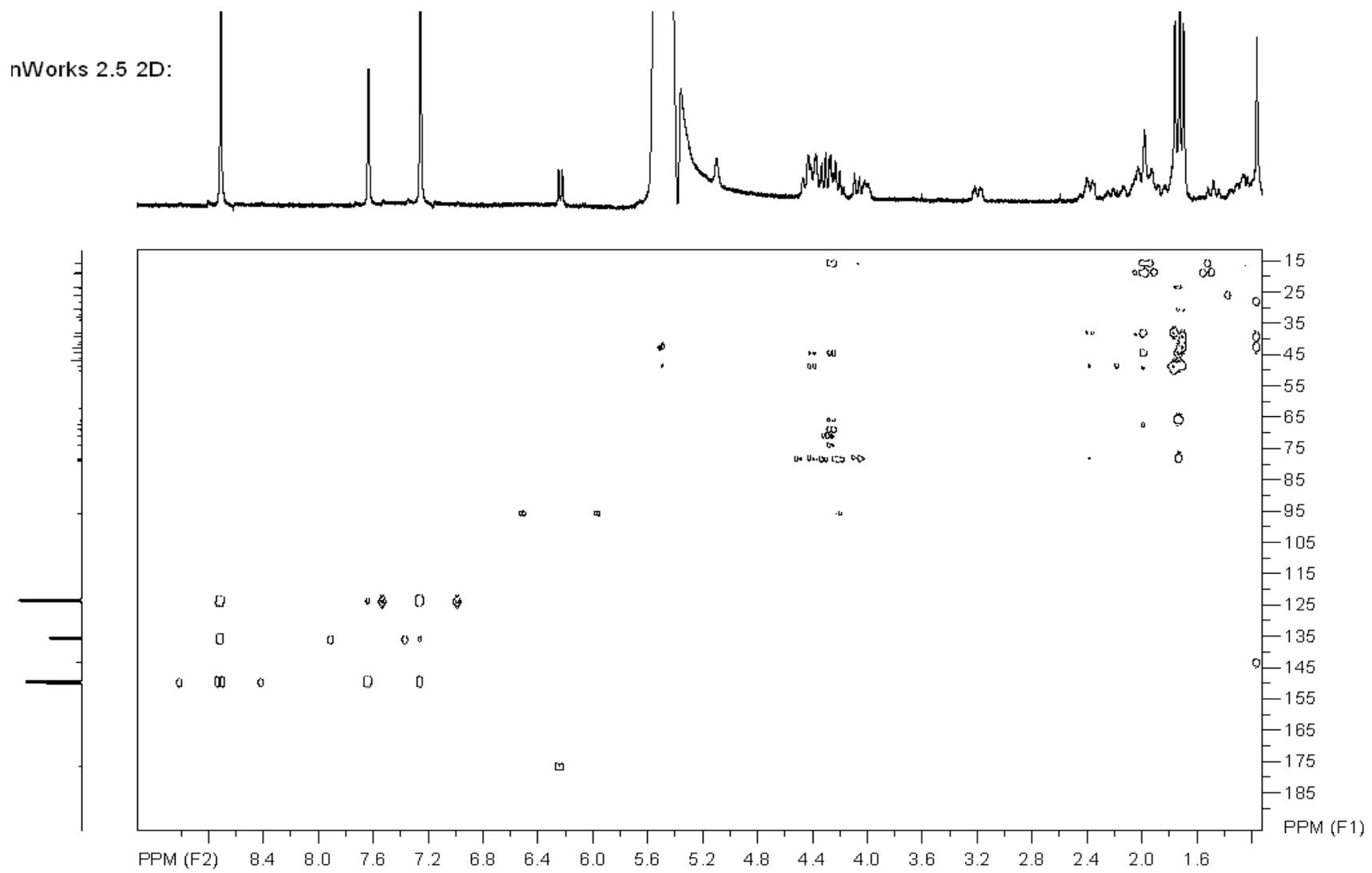
Espectro 26: RMN de ^{13}C do triterpeno **XI** (75 MHz, Py-d_5).



Espectro 27: DEPT – 135° do triterpeno **XI** (75 MHz, Py-*d*₅).



Espectro 28: HSQC do triterpeno **XI** (75MHz, Py-*d*₅).

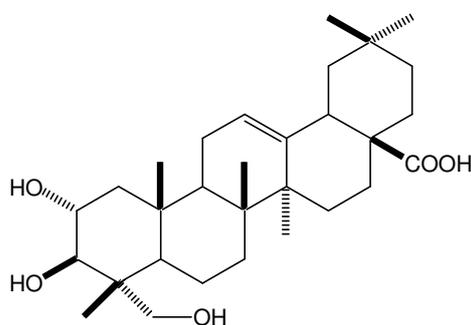


Espectro 29: HMBC do triterpeno **XI** (75MHz, Py-*d*₅).

6.1.4 Identificação dos triterpenos presentes nas raízes de *C. laxum*

Estudo da fase diclorometânica resultante da partição das raízes levou à obtenção de três triterpenos: ácido arjunólico (**III**) (sub-item 5.4.1.2.3, pág. 40), ácido betulínico (**I**) e ácido maslínico (**XII**) (sub-item 5.4.1.2.1, pág. 43).

6.1.4.1 Identificação do ácido arjunólico (**III**)



III

A substância **III** foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLDC 3, proveniente de CLDCM 8 (sub-item 5.4.1.2.3, pág. 40).

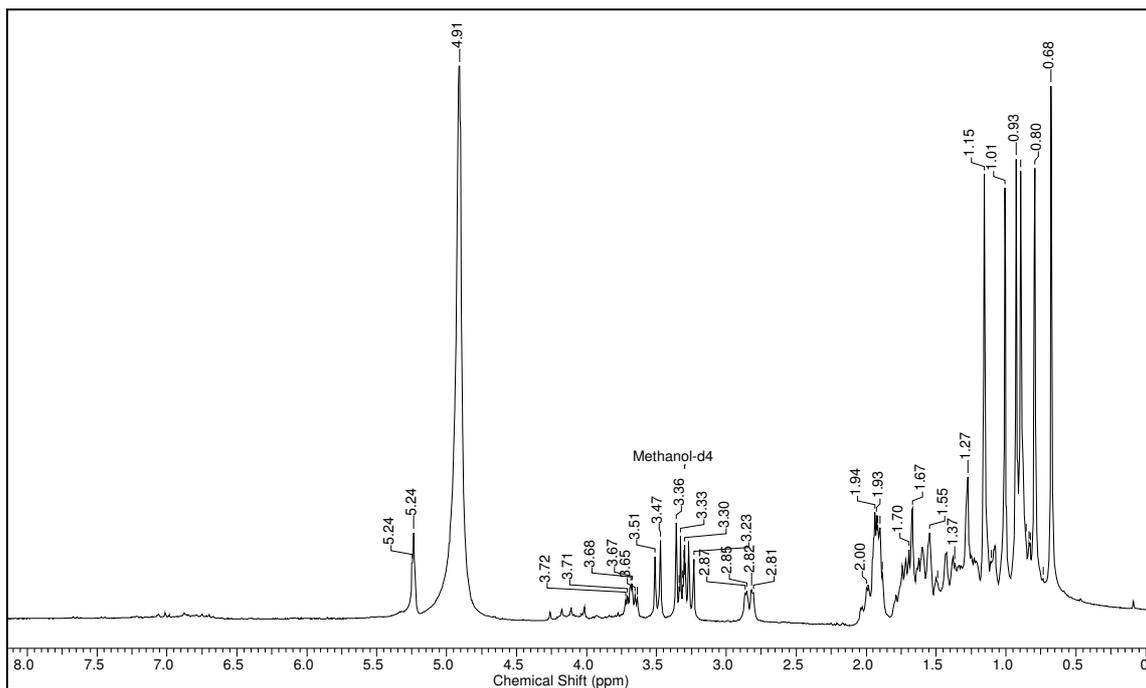
Este triterpeno, obtido dos galhos de *C. laxum* em mistura com **IV** (sub-item 6.1.2.2, pág. 69) foi isolado puro das raízes. (espectros 30, 31 e 32, págs. 113 e 114).

Os dados de RMN de ^{13}C (espectro 30, pág. 113) de **III** em CD_3OD são apresentados na tabela 20, pág. 112 em conjunto com os deste triterpeno em $\text{Py}-d_5$ isolado dos galhos.

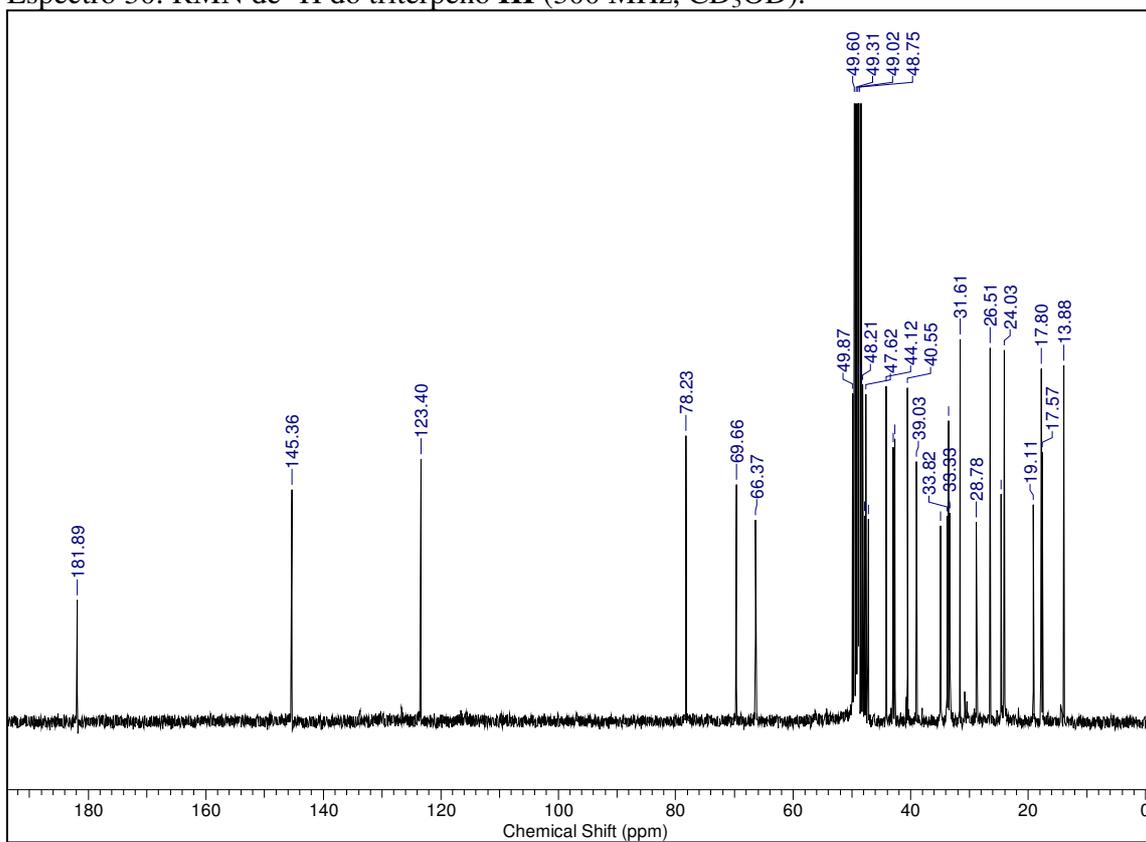
Tabela 20. Dados de RMN de ^{13}C do triterpeno **III** obtidos de *C. laxum* (galhos) e do mesmo isolado das raízes.

C	(III) <i>C. laxum</i> $\delta^{13}\text{C}$	
	(galhos) *	(raízes) *
1	47,6	47,8
2	68,8	69,6
3	78,2	78,2
4	43,6	44,1
5	48,2	48,2
6	18,5	19,1
7	33,1	33,8
8	39,8	40,5
9	47,9	48,9
10	38,2	39,0
11	23,8	24,2 [#]
12	122,7	123,4
13	145,8	145,4
14	42,2	43,0
15	28,2	28,9
16	24,8	24,6 [#]
17	46,6	47,6
18	42,0	42,7
19	46,3	47,2
20	30,8	31,6
21	34,1	34,9
22	32,4	33,3
23	66,4	66,3
24	14,3	13,9
25	17,5	17,8
26	17,4	17,5
27	23,7	26,5
28	180,1	181,9
29	33,1	33,6
30	21,3	24,0

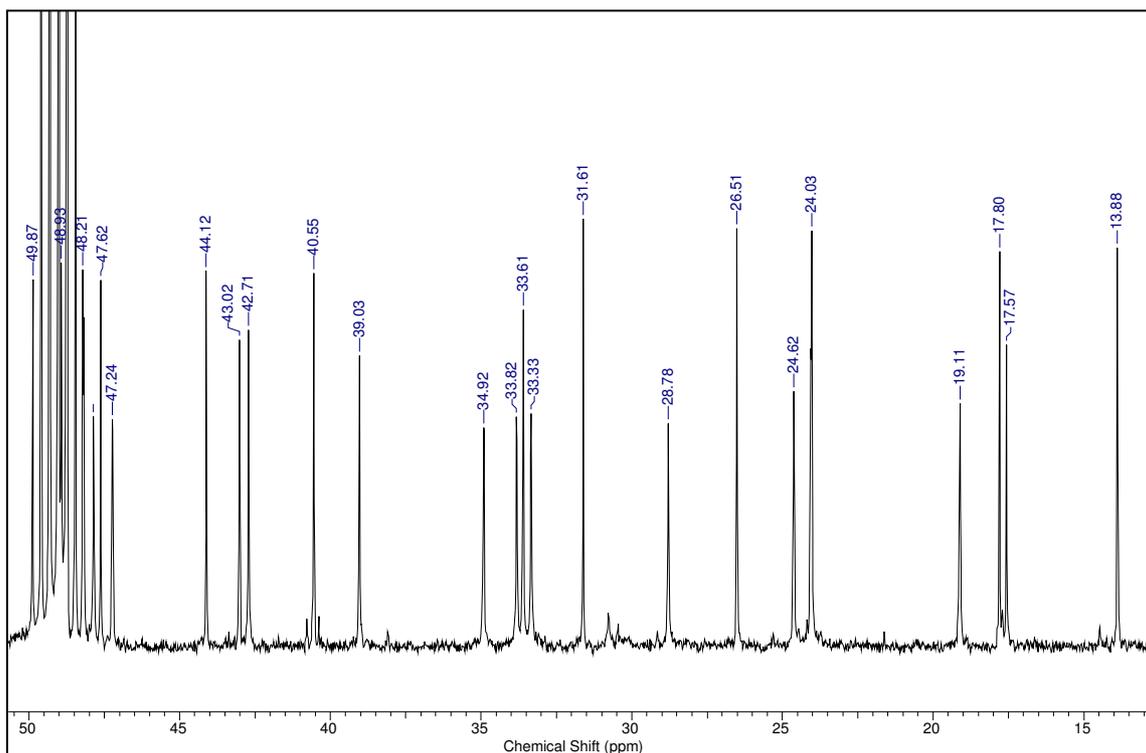
*Py-*d*₅ 75 MHz; † CD₃OD 75 MHz; # Valores que podem estar trocados



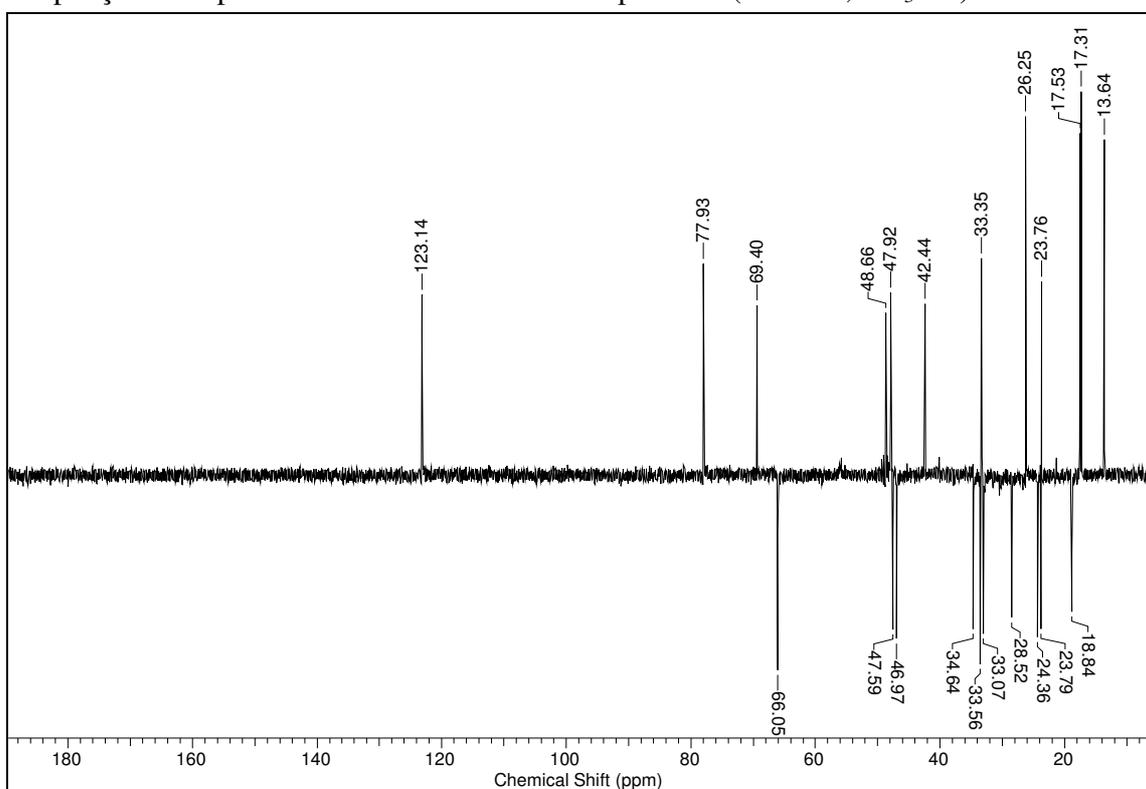
Espectro 30: RMN de ^1H do triterpeno **III** (300 MHz, CD_3OD).



Espectro 31: RMN de ^{13}C do triterpeno **III** (75 MHz, CD_3OD).



Ampliação do espectro 31: RMN de ^{13}C do triterpeno **III** (75 MHz, CD_3OD).

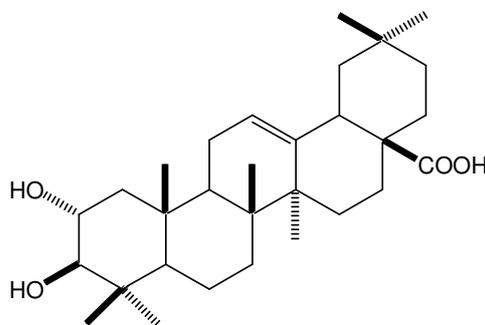


Espectro 32: DEPT – 135° do triterpeno **III** (75 MHz, CD_3OD).

6.1.4.2 Obtenção do ácido betulínico (I)

O triterpeno ácido betulínico (I) foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLDC – 4 (sub-item 5.4.1.2.1, pág. 43). Esta substância já havia sido obtida da fase diclorometânica dos galhos (item 5.2.1, pág. 21), proveniente do fracionamento de CLGD 3-4.

6.1.4.3 Identificação do ácido maslínico (XII)



XII

A substância **XII** foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLDC – 4 (sub-item 5.4.1.2.1, pág. 43).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 33, pág. 118) de **XII** apresentou o mesmo padrão de triterpeno ácido observado em **III** com singletos atribuíveis a sete metilas em δ 0,93; 0,97; 0,98; 1,00; 1,06; 1,25; 1,26. Além destes sinais, o espectro também mostrou um singlete largo em δ 5,45 atribuível a hidrogênio olefínico H-12, de triterpeno com esqueleto oleanano ou ursano, além de 2 conjuntos de sinais em δ 3,40 (d, $J= 10,0$ Hz) e 4,11 (ddd, $J= 13,0, 9,0, 3,0$ Hz), caracterizando a presença de hidrogênios carbinólicos no esqueleto triterpênico.

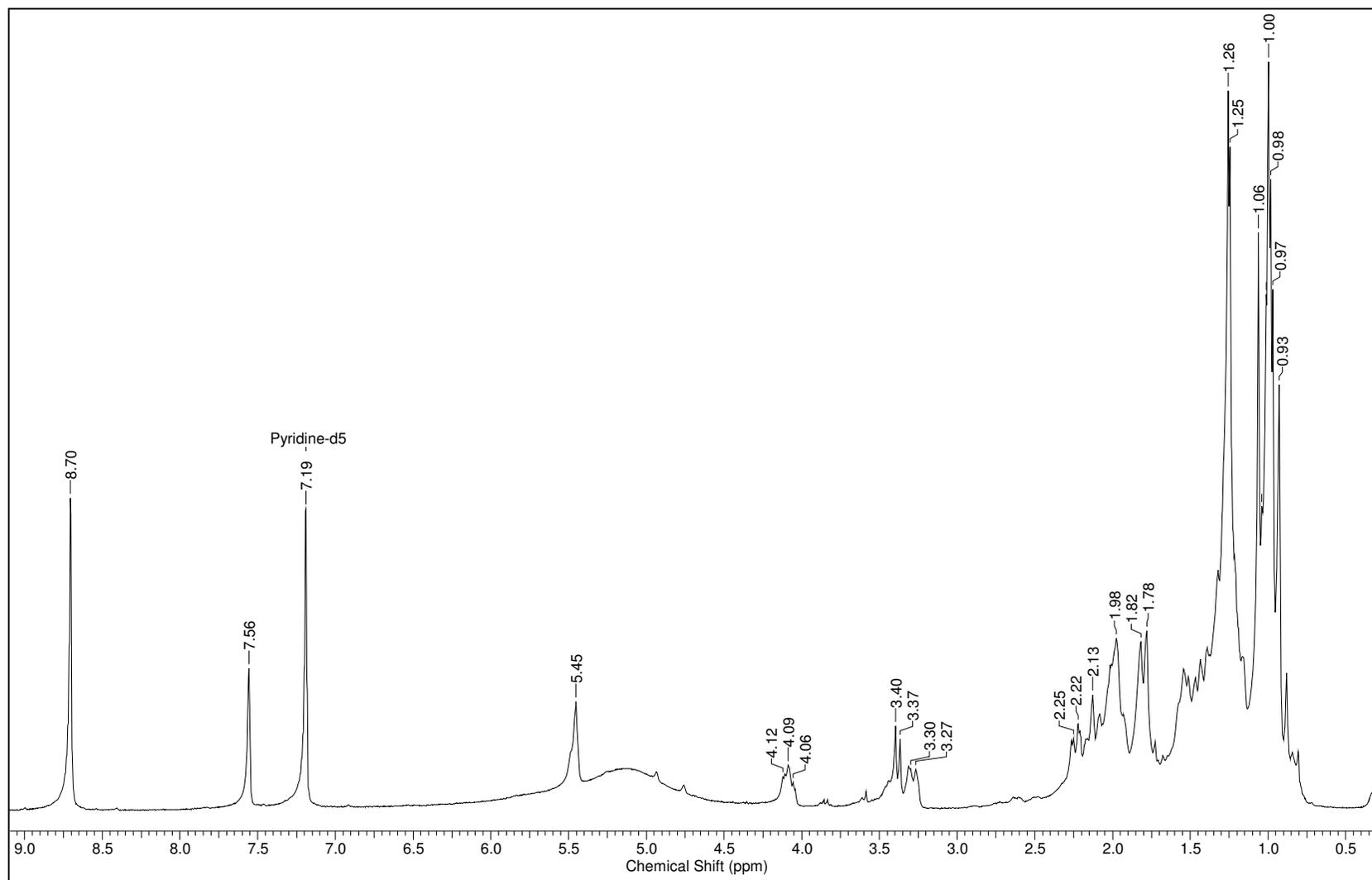
O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 34, pág. 119) confirmou algumas informações fornecidas pelo espectro de RMN de ^1H , como a presença de 30 sinais, dentre eles um em δ 180,2, indicativo de uma grupo carboxila e outros dois em δ 122,2 (C-12) e 144,6 (C-13), o que evidenciou um triterpeno ácido de esqueleto oleanano [OLEA & ROQUE, 1990; AHMAD & RAHMAN, 1994]. Além disso, os sinais observados em δ 68,3

e 83,5 atribuídos a dois carbonos oximetínicos com auxílio do espectro de DEPT – 135° (espectro 35, pág. 120) corroboram a presença dos hidrogênios carbinólicos supracitados. Os valores de deslocamento químico e as multiplicidades apresentadas mostraram-se compatíveis com os de H-2/C-2 (δ 4,11/68,3) e H-3/C-3 (δ 3,40/83,5) de um anel A 2,3-diidroxilado e com orientação *trans-diaxial* de H-2 e H-3, com base no valor de J (10,0 Hz) apresentado por H-3 [AHMAD & RAHMAN, 1994] e, portanto, os grupos hidroxila em posição equatorial (C-2 α e C-3 β). Os demais sinais de ^{13}C se mostraram característicos de um triterpeno de esqueleto oleanano contendo um resíduo de ácido em C-28. Assim, a estrutura de **XII** foi definida como sendo ácido-2 α ,3 β -diidroxiolean-12-en-28-óico, cujos dados espectrais mostraram-se semelhantes aos do mesmo triterpeno já relatado na literatura e denominado ácido maslínico (tabela 21, pág. 117) [AHMAD & RAHMAN, 1994].

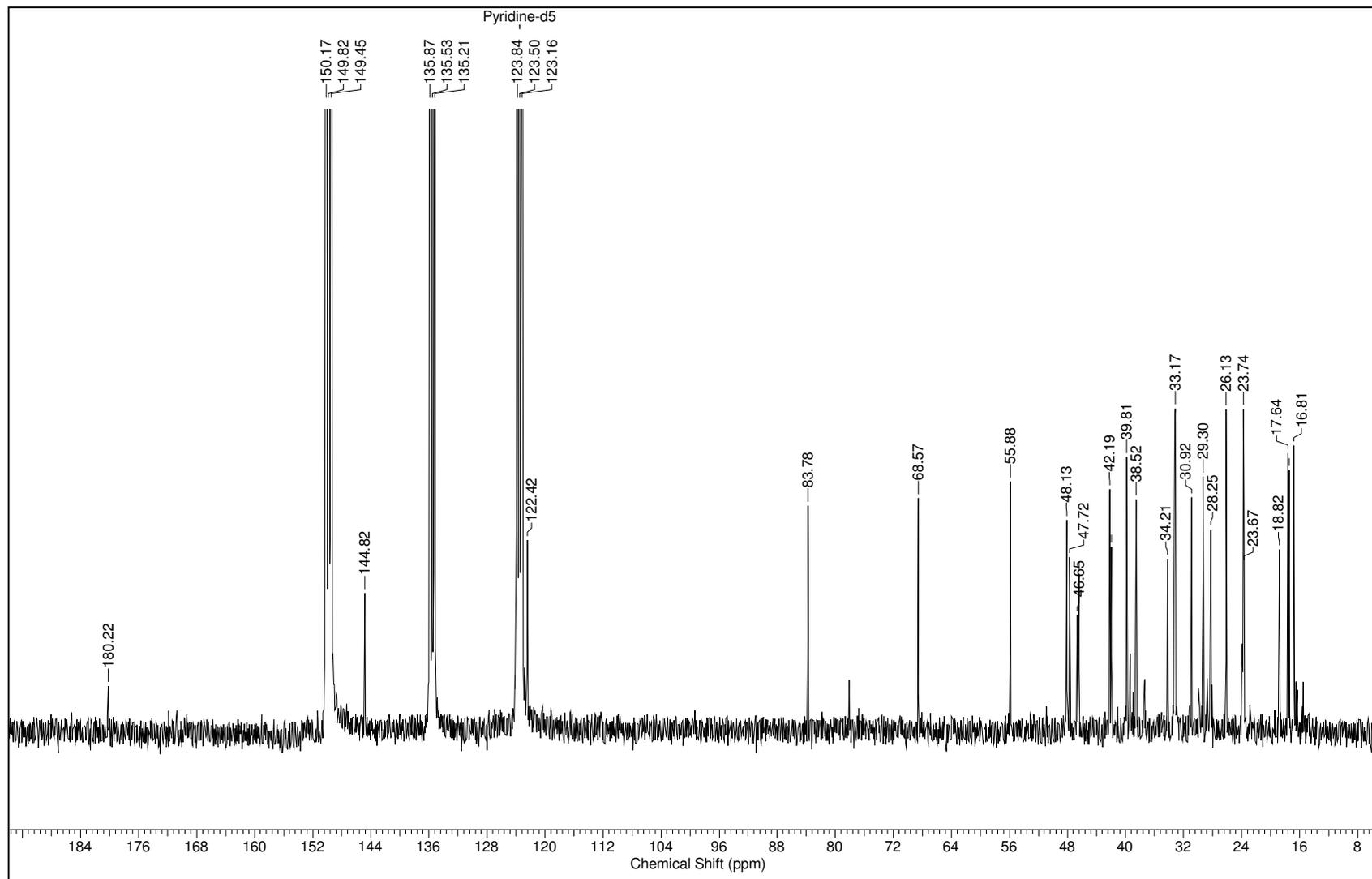
Tabela 21. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do triterpeno **XII** obtidos das raízes de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C/H	(XII) <i>C. laxum</i>		(XII) literatura **
	* $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$
1	47,5	-	46,4
2	68,3	4,11 ddd (13,0, 9,0, 3,0)	68,8
3	83,5	3,40 d (10,0 Hz)	83,8
4	38,3	-	39,1
5	55,5	-	55,3
6	18,6	-	18,3
7	32,9	-	32,6
8	39,6	-	39,1
9	47,9	-	47,5
10	39,6	-	38,3
11	23,5	-	23,5
12	122,2	5,45 sl	122,0
13	144,6	-	143,6
14	42,0	-	41,7
15	28,0	-	27,6
16	23,7	-	23,1
17	46,4	-	46,6
18	41,7	3,30 m	41,3
19	46,2	-	45,8
20	30,7	-	30,7
21	34,0	-	33,8
22	32,9	-	32,3
23	29,1	1,00 s	28,6
24	17,4	1,26 s	16,8
25	16,6	0,98 s	16,8
26	17,2	1,06 s	16,8
27	25,9	1,25 s	26,0
28	180,2	-	178,0
29	33,0	0,97 s	33,1
30	23,4	0,93 s	23,5

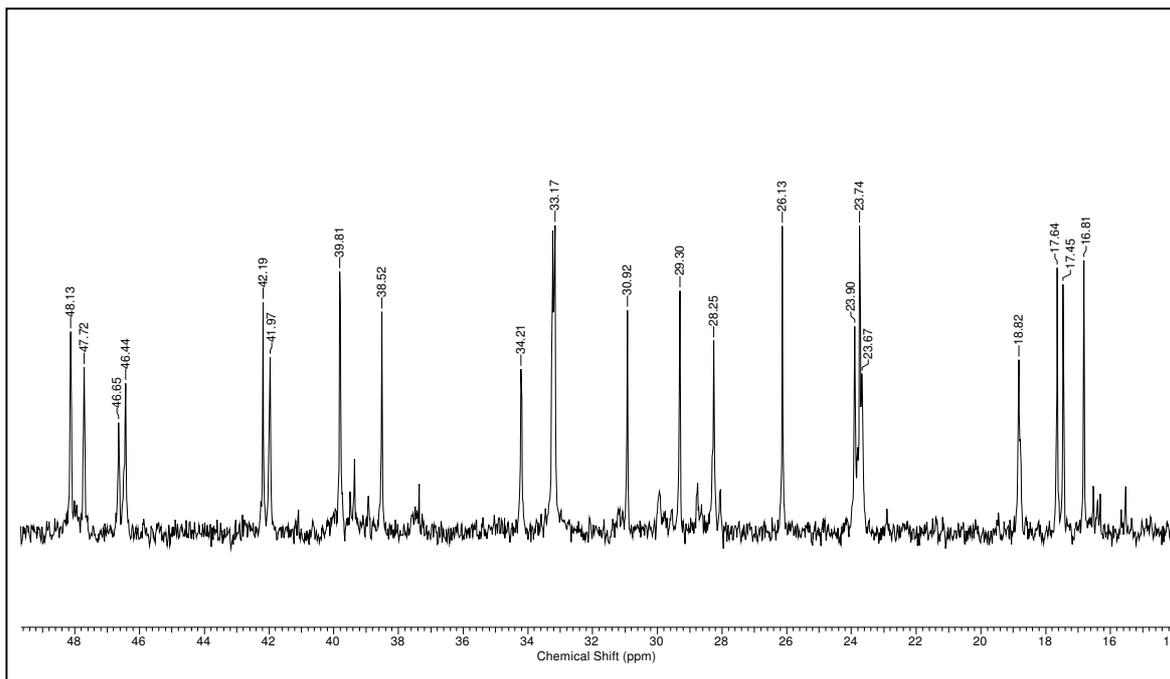
* Py-d₅ 75MHz; *Py-d₅ 300 MHz; #Py-d₅ 75 MHz; ** [AHMAD & RAHMAN, 1994].



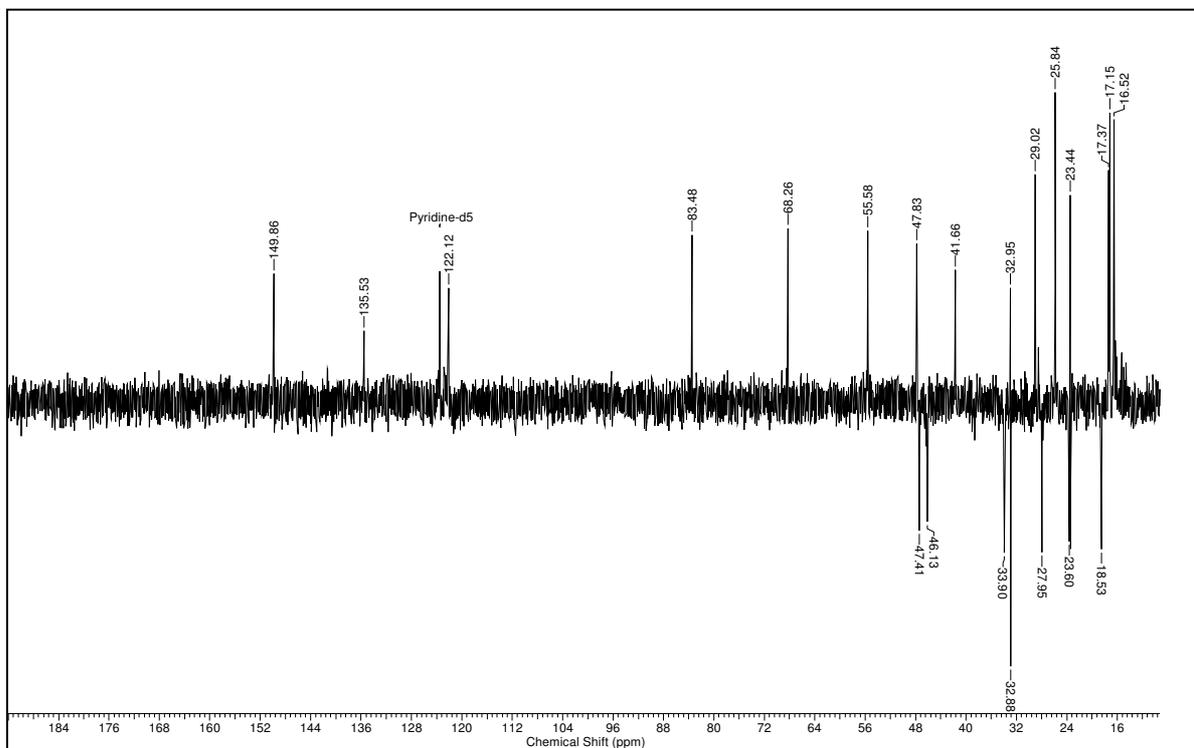
Espectro 33: RMN de ^1H do triterpeno **XII** (300 MHz, Py- d_5).



Espectro 34: RMN de ^{13}C do triterpeno **XII** (75 MHz, Py- d_5).



Ampliação do espectro 34: RMN de ^{13}C do triterpeno **XII** (75 MHz, Py-d_5).



Espectro 35: DEPT – 135° do triterpeno **XII** (75 MHz, Py-d_5).

6.2 Derivados fenantrênicos e diidroestilbênicos presentes nas raízes de *C. laxum*

Os fenantrenos são de ocorrência pouco comum no reino vegetal e podem ser considerados como oriundos do acoplamento oxidativo de precursores estilbênicos, compostos de origem biogenética mista (ácido chiquímico/acetato) [KOVÁCS, 2008; DEWICK, 1997].

Os fenantrenos podem ser substituídos em todos os carbonos de 1 a 10. Apresentam grande semelhança com os estilbenos, diferindo apenas pela ligação entre os anéis A e C (figura 25, pág. 121).

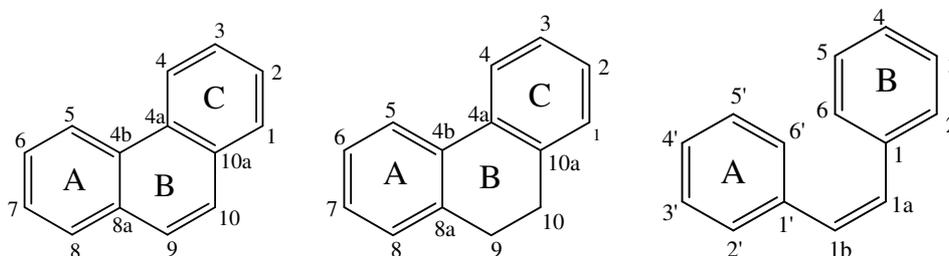


Figura 25: Esqueletos básicos de fenantreno, diidrofenantreno e estilbeno.

Um grande número de fenantrenos substituídos tem sido relatado como metabólitos secundários isolados de plantas superiores, os quais possuem varias atividades biológicas. No entanto, são encontrados principalmente em Orchidaceae e poucos representantes desta classe são encontrados em outras famílias, por exemplo, Hepaticae, Dioscoreaceae, Betulaceae e Combretaceae [KOVÁCS, 2008].

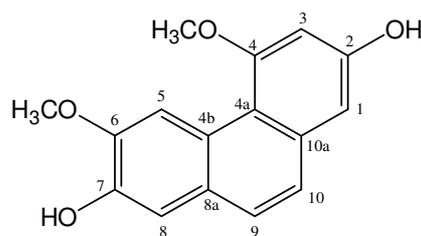
Na família Combretaceae, são relatados fenantrenos possuindo substituintes hidroxila e/ou metoxila, assim como 9,10-diidrofenantrenos, estilbenos e diidroestilbenos (figura 25, pág. 121) [KOVÁCS, 2008; referências presentes na tabela 1, pág. 7].

Conforme numerado no sub-item 3.2.1, pág. 5 grande destaque é dado a estas classes de compostos, tendo em vista as atividades citotóxicas potentes apresentados por muitos de seus representantes [KOVÁCS, 2008; referencias citadas na tabela 1, pág. 7].

6.2.1 Fenantrenos, 9,10-diidrofenantrenos e diidroestilbeno obtidos da fase diclorometânica das raízes

O estudo da fase diclorometânica proveniente da partição do extrato etanólico das raízes resultou na obtenção de dois fenantrenos; 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**) e 2,7-diidróxi-3,4,6-trimetoxifenantreno (**XIV**), três 9,10-diidrofenantrenos; 6-metoxicoelonina (**XV**), 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (**XVI**) e calosina (**XVII**) e um diidroestilbeno; 4'-hidroxi-3,3',4-triidróxi-5-(3,4,5-trimetoxifenoxi)-bibenzila (**XVIII**).

6.2.1.1 Identificação do 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**)



XIII

A substância **XIII** foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLDCM 6 descrito no item 5 (sub-item 5.4.1.1, pág. 38).

O espectro de RMN de ^1H de **XIII** (espectro 36, pág. 125) revelou uma molécula pouco hidrogenada apresentando sinais, em sua maioria, relativos de hidrogênios de anel aromático, com exceção de dois singletos intensos a δ 4,02 e 4,12 atribuíveis a duas metoxilas. Com o auxílio do espectro de RMN de ^{13}C (espectro 37, pág. 126) foi possível confirmar a presença de uma substância de caráter aromático, apresentando sinais para 14 carbonos nesta região do espectro, além de sinais a δ 55,9 e 56,1 atribuídos aos carbonos dos grupos metoxila. Dos 14 sinais observados, 8 deles eram quaternários (observação feita com auxílio do espectro de DEPT – 135° [espectro 38, pág. 127]), sugerindo a presença de anéis aromáticos condensados como os de um fenantreno (figura 4, pág. 81). No espectro de RMN de ^1H , um par de dubletos a δ 7,56 ($J=9,0$ Hz) e 7,44 ($J=9,0$ Hz), característicos de

H-9 e H-10, respectivamente de um derivado fenantrênico, reforçaram esta proposta. Estes se correlacionaram no espectro HSQC (espectro 39, pág. 127) com os sinais referentes a C-9 (δ 127,9) e C-10 (δ 125,5).

De acordo com a literatura, o valor do deslocamento químico para o singlete a δ 9,11 no espectro de RMN de ^1H é característico para os hidrogênios desprotegidos H-5 ou H-4 [MALAN, 1993]. A presença de apenas um sinal nesta região e por se tratar de um singlete sugeriu que, se este sinal fosse atribuído a H-5, as posições C-4, C-6 e C-7 estariam substituídas. Assim, o outro singlete observado no espectro a δ 7,24 foi atribuído a H-8.

No espectro de HSQC os sinais de H-5 e H-8 apresentaram correlação, respectivamente, com os sinais a δ 109,6 e δ 112,2, enquanto que no espectro de HMBC (espectro 40, pág. 128) foram acoplamentos a longa distância entre estes hidrogênios e os carbonos oxigenados C-6/C-7 (δ 148,3/ 145,8) e o carbono atribuído a C-4b (δ 125,5). Neste espectro também foram observadas correlações entre H-8 (δ 7,24) e C-9 (δ 127,9) e entre H-9 (δ 7,56) e C-8 (δ 112,2), assim como entre H-10 (δ 7,44) o carbono quaternário atribuído a C-10a (δ 135,7). Desta forma a substância **XIII** foi caracterizada como sendo um derivado fenantrênico 2,4,6,7-tetraoxigenado. A definição da localização dos dois grupos metoxila no espectro de **XIII** foi obtida com base nas correlações observadas:

- a) No espectro HMBC entre os sinais a δ 4,12 e 160,2, o que permitiu localizar uma das metoxilas em C-4 e a outra em C-6 ou C-7, pela correlação entre os sinais a δ 4,02 e 148,3 (C-6 ou C-7).
- b) No experimento NOESY (espectro 41, pág. 129). Neste espectro foram observadas correlações entre H-3 e a metoxila a δ 4,12 (O-Me-4') e entre H-5 e a metoxila a δ 4,02 (O-Me-6'), o que definiu a localização desta em C-6 e conseqüentemente, a atribuição de δ 148,3 a C-6 e δ 145,8 a C-7.

Os sinais a δ 6,89 (d, $J= 3,0\text{Hz}$) e δ 6,79 (d, $J= 3,0\text{Hz}$), cujo valor de J indicou um acoplamento *meta*, sugeriu a presença de hidrogênios no anel C em C-1 e C-3, únicas posições capazes de possuir hidrogênios com esse tipo de acoplamento, assim como a presença de um substituinte oxigenado em C-2. No espectro HSQC estes hidrogênios apresentaram correlações com os carbonos a δ 105,4 e 100,0, respectivamente. No espectro de HMBC foram observadas as correlações destes dois átomos de hidrogênio com os

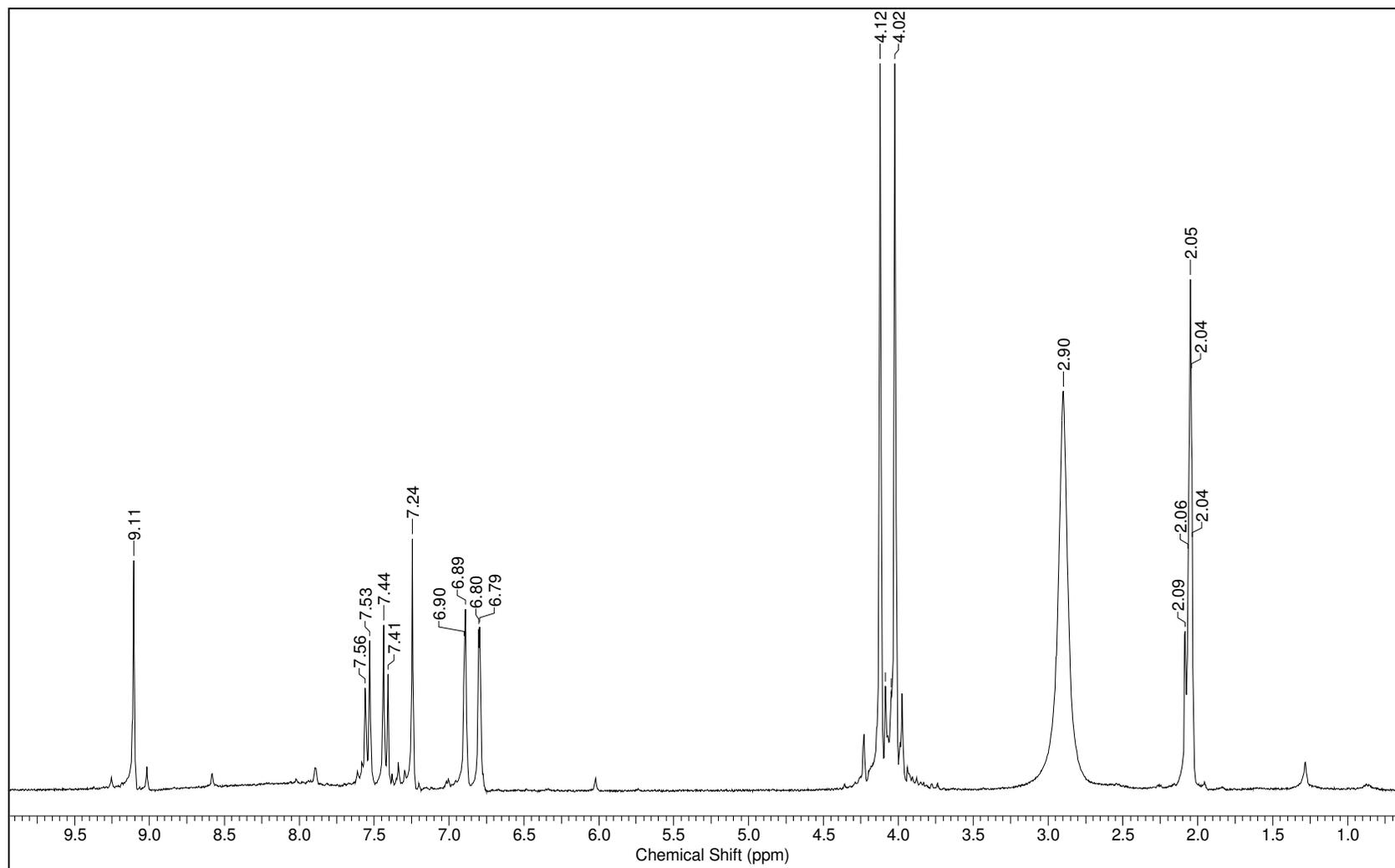
carbonos quaternários a δ 156,0 (C-2) e 115,5 (C-4a). O sinal de H-3 (δ 6,79) apresentou ainda uma correlação de longa distância (2J) com o sinal do carbono a δ 160,2 atribuído a C-4 enquanto que o sinal de H-1 (δ 6,89) mostrou uma correlação com o sinal de C-10 (125,5, 3J) (tabela 22, pág. 124).

Assim, a estrutura de **XIII** foi caracterizada como sendo 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno, cujos dados espectrais mostraram-se bastante semelhantes aos existentes na literatura (tabela 22, pág. 124) para o fenantreno isolado anteriormente de *Bulbophyllum vaginatum* (Orchidaceae) [LEONG, 1997]. Trata-se, portanto do primeiro relato deste derivado fenantrênico em uma espécie de Combretaceae.

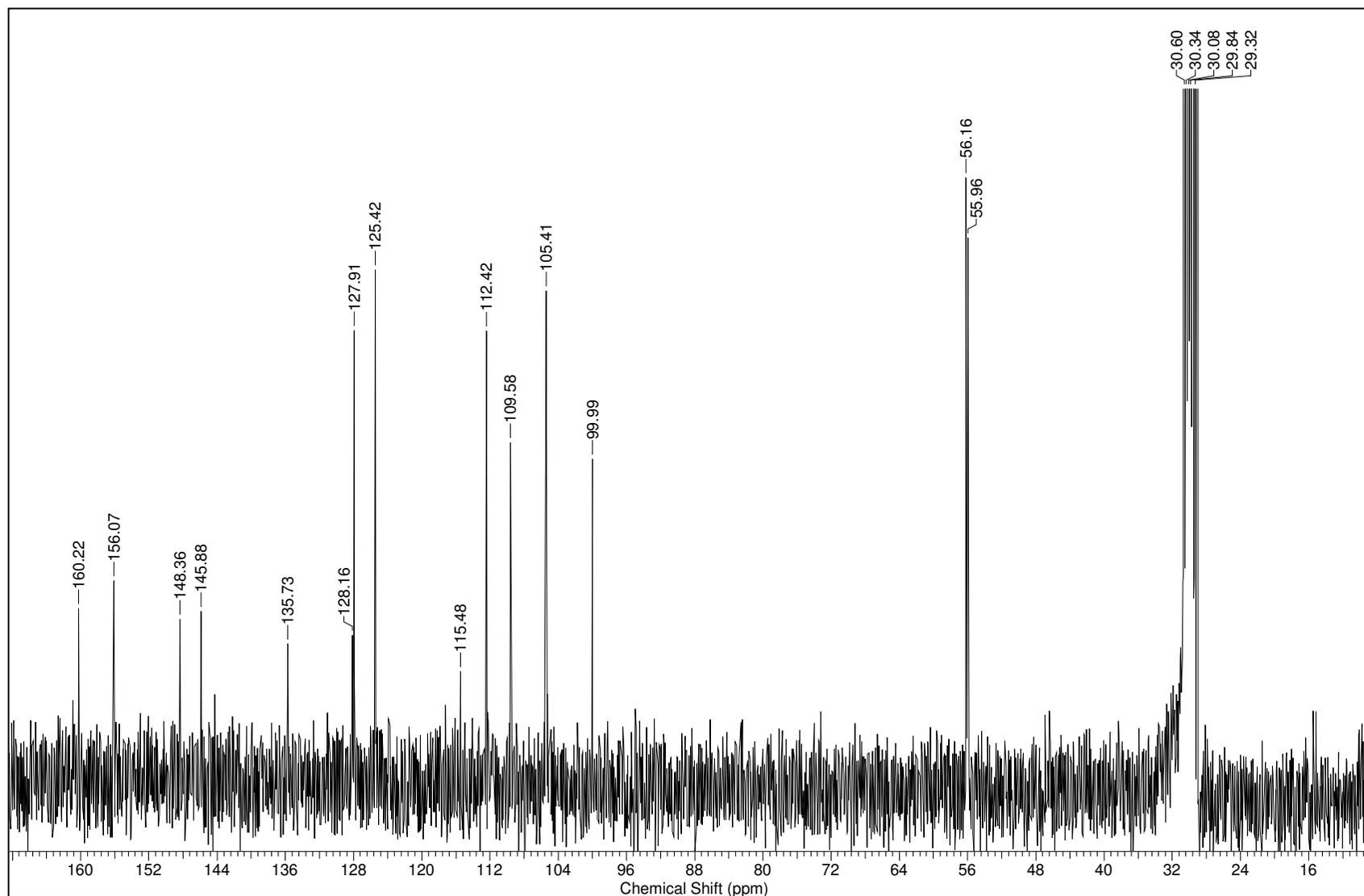
Tabela 22. Dados de RMN do fenantreno **XIII** obtido das raízes de *C. laxum* e dos mesmos citados na literatura.

C / H	(XII) C. <i>laxum</i> * δ ^{13}C	(XII) Literatura [†] ^{13}C	(XII) C. <i>laxum</i> [#] ^1H [m; J (Hz)]	(XII) Literatura [‡] ^1H [m; J (Hz)]	Correlações no HMBC dos ^1H C \rightarrow H (δ ; nJ)
1	105,4	104,9	6,89 (d; 3,0)	6,84 (d; 2,5)	H-3 (6,79; 3J)
2	156,1	153,2	-	-	H-1 (6,89; 2J), H-3 (6,79; 2J)
3	100,0	98,8	6,79 (d; 3,0)	6,71 (d; 2,5)	H-1 (6,89; 3J)
4	160,2	159,5	-	-	H-3 (6,79; 2J), H-OMe4' (4,12; 3J)
4a	115,5	115,6	-	-	H-1 (6,89; 3J), H-3 (6,79; 3J), H-5 (9,11; 3J)
4b	125,5	124,8	-	-	H-5 (9,11; 2J), H-8 (7,24; 3J)
5	109,6	108,3	9,11 (s)	9,04 (s)	-
6	148,3	146,5	-	-	H-5 (9,11; 2J), H-8 (7,24; 3J), H-OMe6' (4,02; 3J)
7	145,8	144,1	-	-	H-5 (9,11; 3J), H-8 (7,24; 2J)
8	112,2	111,2	7,24 (s)	7,30 (s)	H-9 (7,56; 3J)
8a	128,2	127,6	-	-	H-5 (9,11; 3J), H-9 (7,56; 2J)
9	127,9	127,7	7,56 (d; 9,0)	7,56 (d; 8,7)	H-8 (7,24; 3J), H-10 (7,44; 2J)
10	125,4	124,7	7,44 (d; 9,0)	7,43 (d; 8,7)	H-9 (7,56; 2J), H-1 (6,89; 3J)
10a	135,7	134,7	-	-	H-10 (7,44; 2J)
OMe-4'	55,9	55,8	4,12 (s)	4,10 (s)	-
OMe-6'	56,1	55,9	4,02 (s)	4,08 (s)	-

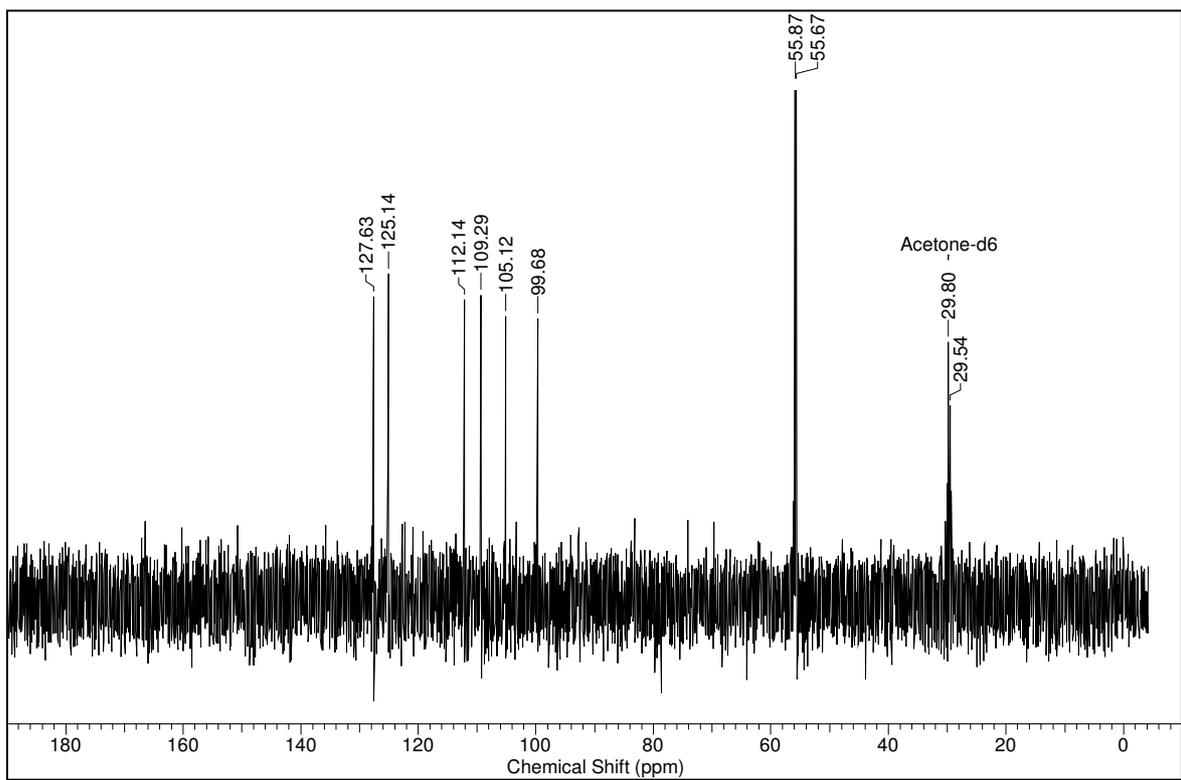
*Acetona- d_6 75 MHz, [†] CDCl₃ 125 MHz (valores de deslocamento não atribuído aos respectivos carbonos), [#] Acetona- d_6 300 MHz, [‡] CDCl₃ 500 MHz [LEONG, 1997].



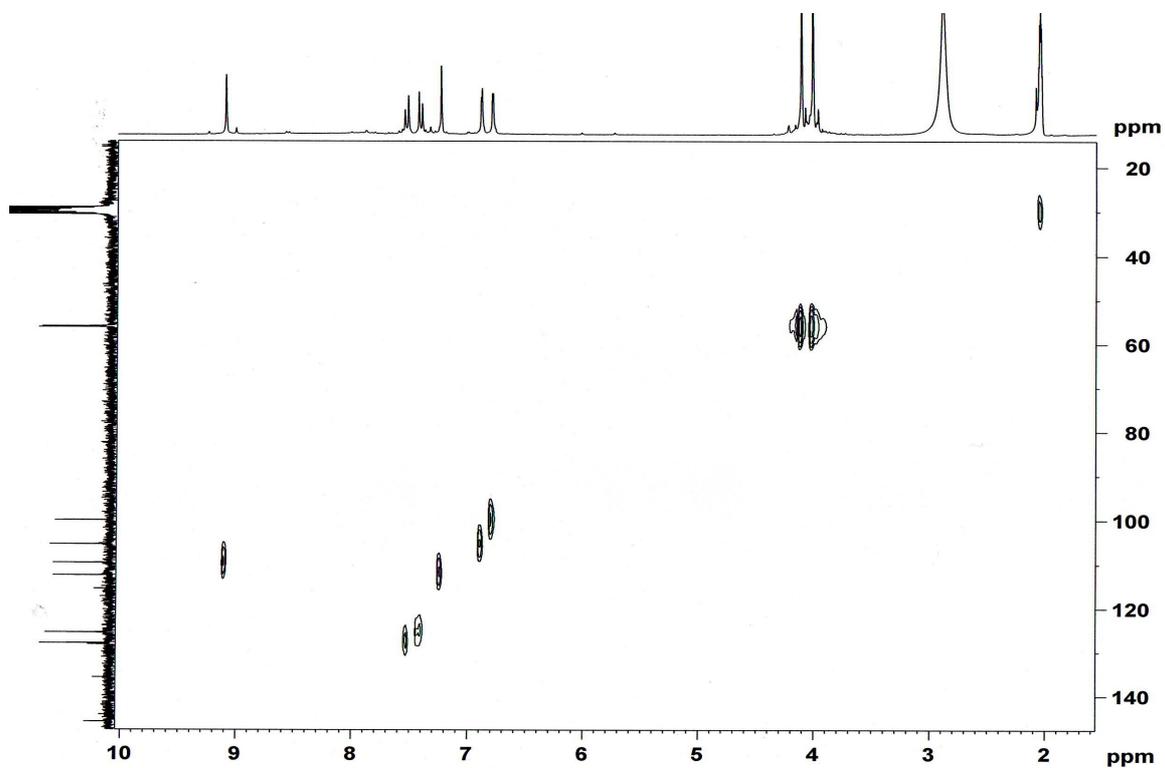
Espectro 36: RMN de ^1H do fenantreno **XIII** (300 MHz, Acetona- d_6).



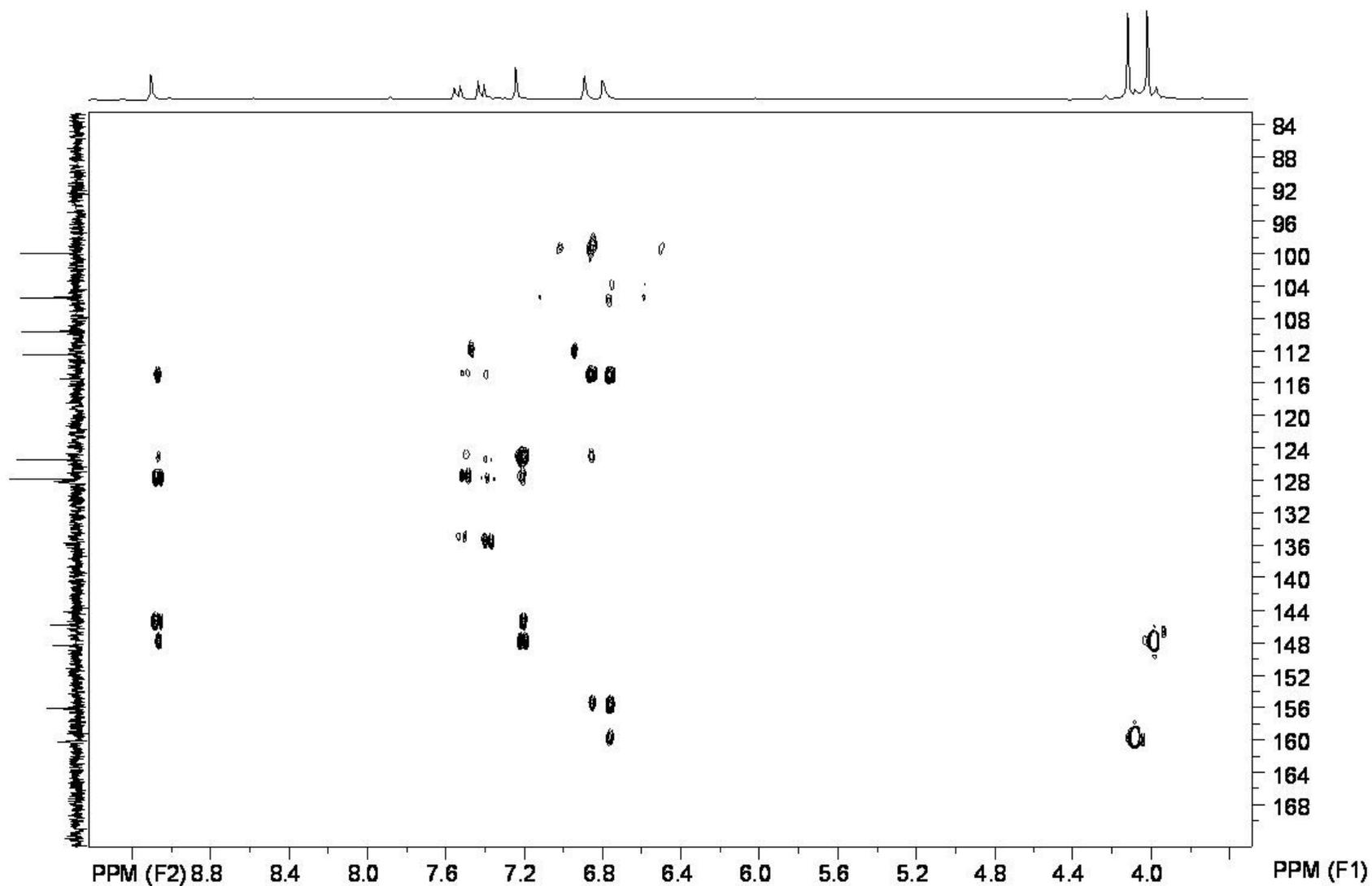
Espectro 37: RMN de ^{13}C do fenantreno **XIII** (75 MHz, Acetona- d_6).



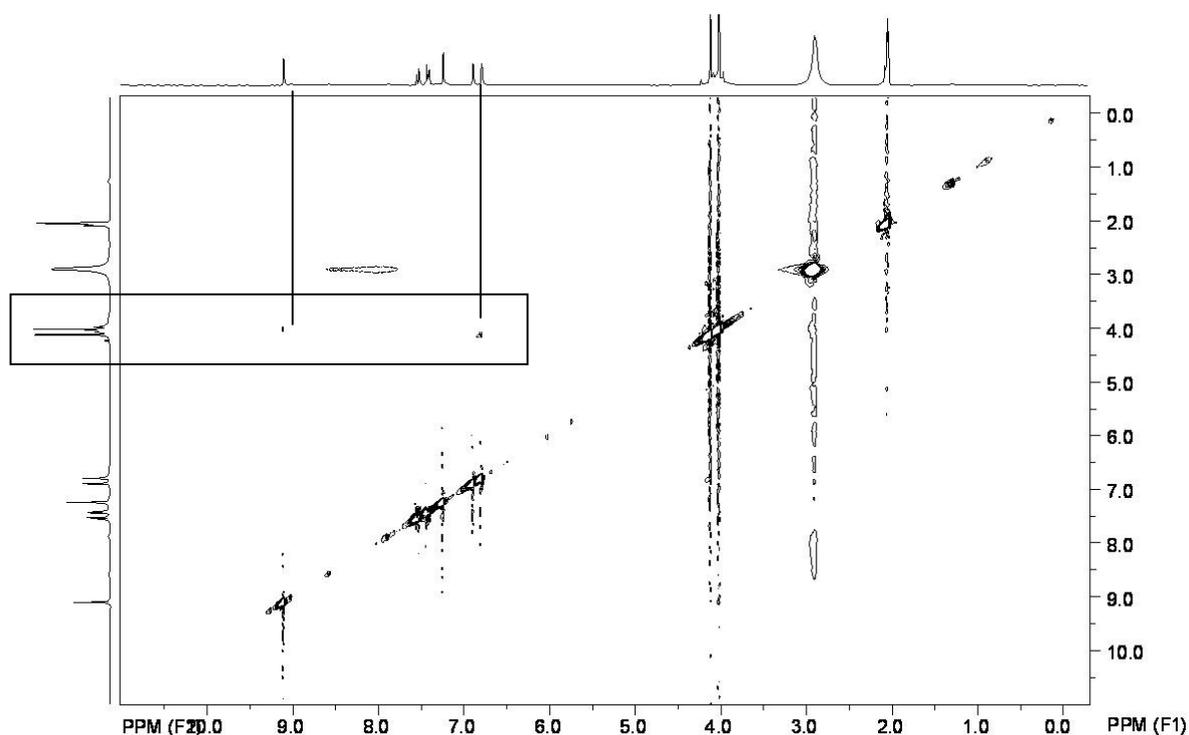
Espectro 38: DEPT – 135° do fenantreno **XIII** (75 MHz, Acetona- d_6).



Espectro 39: HSQC do fenantreno **XIII** (75 MHz, Acetona- d_6).

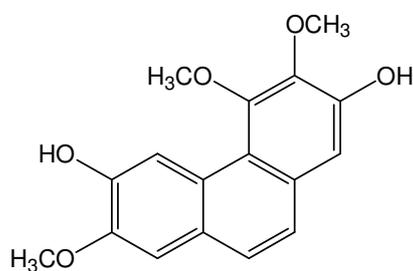


Espectro 40: HMBC do fenantreno **XIII** (75 MHz, Acetona- d_6).



Espectro 41: NOESY do fenantreno **XIII** (300 MHz, Acetona- d_6).

6.2.1.2 Identificação do 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (**XIV**)



XIV

A substância **XIV** foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da fração CLDS 23-28, proveniente de CLDCM 6 descrito no item 5 (sub-item 5.4.1.1, pág. 38).

O espectro de RMN de ^1H de **XIV** (espectro 42, pág. 132) mostrou-se bastante semelhante ao da substância **XIII** indicando tratar-se também de um fenantreno.

O singlete característico para H-5 foi observado em δ 8,90 estando novamente substituídas as posições C-4, C-6 e C-7, sendo igualmente observado o singlete relativo a H-8 em δ 7,27. No espectro de HSQC (espectro 44, pág. 134) os sinais de hidrogênios H-5

e H-8 se correlacionaram com seus respectivos carbonos sinais de carbonos a δ 112,4 e δ 109,5.

No espectro de HMBC (espectro 45, pág. 135) da substância **XIV** os hidrogênios H-5 e H-8 apresentaram correlações com os carbonos C-4b (δ 126,0), C-8a (δ 128,0), C-6 (δ 147,3) e C-7 (δ 148,4). O hidrogênio H-5 apresentou ainda uma correlação com o carbono a δ 118,9 atribuído a C-4a.

O espectro de RMN de ^1H apresentou ainda um par de dubletos referentes a H-9 e H-10 (δ 7,49 e 7,33, $J= 9,0$ Hz), sinais atribuídos a três metoxilas a δ 3,98; 3,99 e 4,00 e um singlete a δ 7,04. Estes dados aliados às informações adicionais obtidas pelos espectros de RMN de ^{13}C (espectro 43, pág. 133) indicaram que a estrutura de **XIV** diferia da de **XIII** por possuir cinco substituintes oxigenados, estando três destes localizados no anel C pentassubstituído. Assim, o singlete a δ 7,04, que no espectro HSQC mostrou correlação com o sinal a δ 109,8 poderia ser atribuído a H-1 ou H-3, no entanto os valores deslocamento químico observados (δ_{H} 7,04 e δ_{C} 109,8) mostraram-se compatíveis com os de H-1/C-1 em um anel C 2,3,4-trioxigenado e não com os de H-3 em um anel 1,2,4-trioxigenado. Assim, no espectro de HMBC, as correlações do singlete a δ 7,04 com os sinais a δ 118,8 (C-4a), 124,9 (C-10), 142,9 (C-3) e 150,4 (C-2) confirmaram esta proposta.

Da mesma forma que em **XIII**, as posições das metoxilas foram estabelecidas pelas correlações observadas nos espectros dos experimentos HMBC e NOESY (espectro 46, pág. 134). No espectro de HMBC os hidrogênios da metoxila a δ 3,98 mostraram correlação com o carbono a δ 152,8. Como não foram observadas correlações deste carbono com outros hidrogênios, este foi atribuído a C-4, o que também confirmou a localização da metoxila nesta posição. Os valores de deslocamento químico observados para duas das três metoxilas foram acima de 60 ppm, o que indicou a sua localização estericamente impedida em C-3 e C-4 e conseqüentemente, a presença de um grupo hidroxila em C-2. Desta forma, a terceira metoxila estaria situada no anel A, em C-6 ou C-7. Através do experimento NOESY foi observada correlação entre a metoxila e os hidrogênios H-5 e H-8, o que indicou a localização da metoxila.

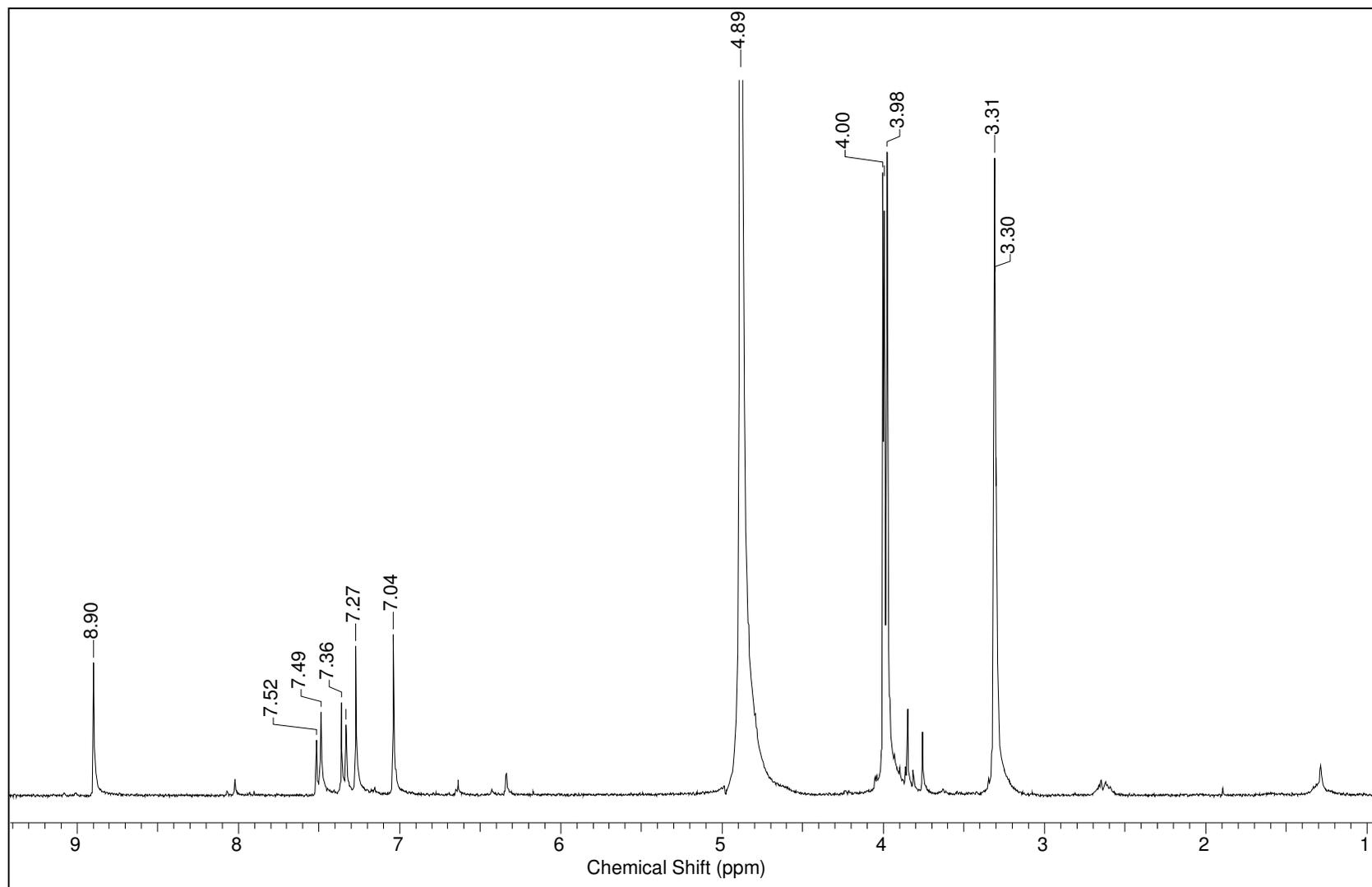
Esta substância já havia sido isolada de *C. molle*, porém os dados de RMN de ^1H e ^{13}C não haviam sido relatados [LETCHER, 1972]. Os dados de RMN de **XIV** estão

apresentados na tabela 23 (pág. 131) e esta substância foi definida como sendo a 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno.

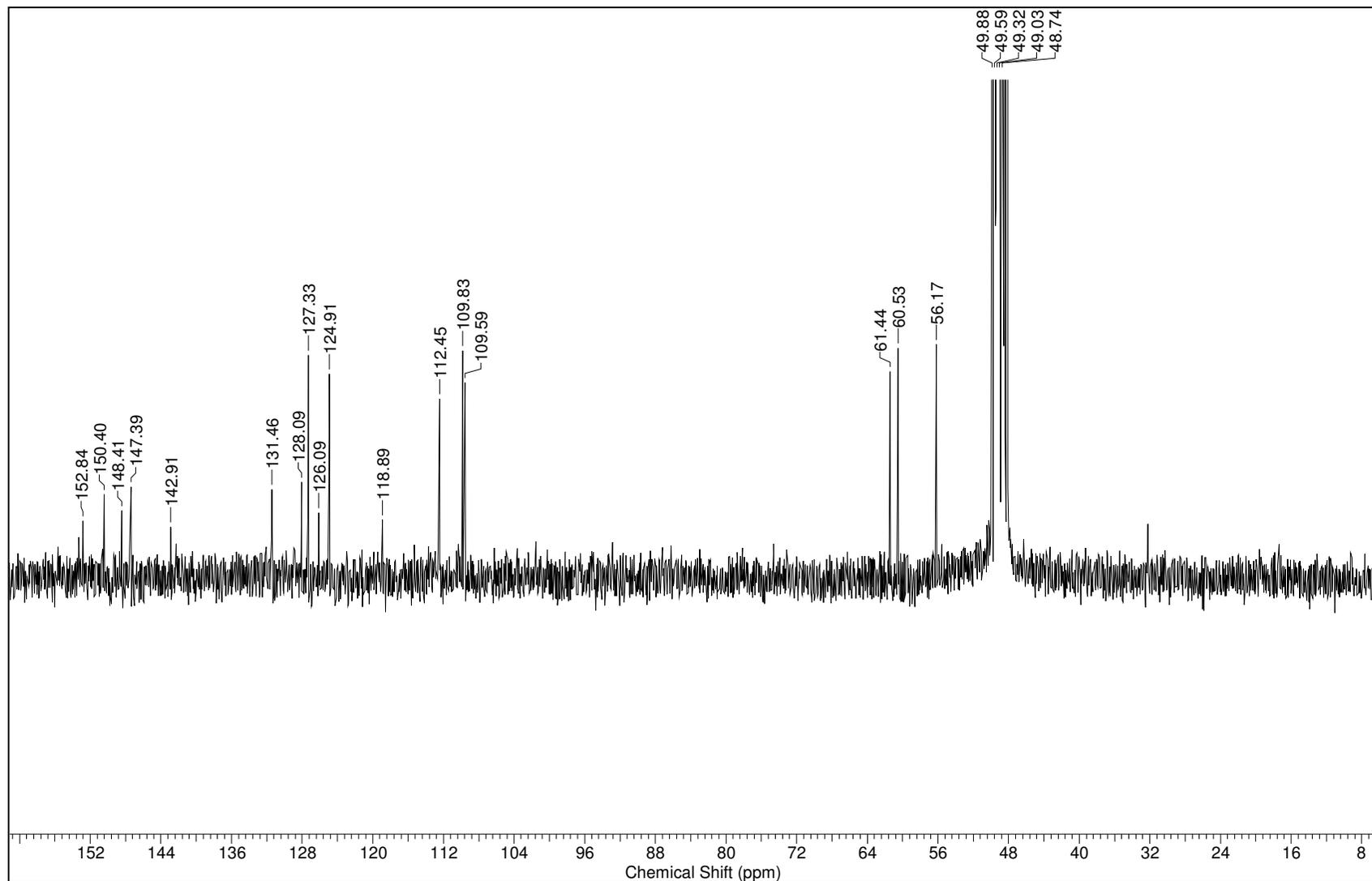
Tabela 23. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do fenantreno **XIV** obtido das raízes de *C. laxum*.

C	(XIV) <i>C. laxum</i> * $\delta^{13}\text{C}$	(XIV) <i>C. laxum</i> [#] $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; ^nJ)
1	109,8	7,04 s	H-10 (7,33; ^3J)
2	150,4	-	H-1 (7,04; ^2J)
3	142,9	-	H-1 (7,04; ^3J), -OCH ₃ (4,00; ^3J)
4	152,8	-	-OCH ₃ (3,99; ^3J)
4a	118,9	-	H-10 (7,33; ^3J), H-1 (7,04; ^3J), H-5 (8,90; ^3J)
4b	126,1	-	H-5 (8,90; ^2J), H-9 (7,49; ^3J), H-8 (7,27; ^3J)
5	112,4	8,90 s	-
6	147,4	-	H-5 (8,90; ^2J), H-8 (7,27; ^2J), -OCH ₃ (3,98; ^3J)
7	148,4	-	H-5 (8,90; ^3J), H-8 (7,27; ^2J), OCH ₃ (3,99 ^3J)
8	109,5	7,27 s	H-9 (7,49; ^3J)
8a	128,1	-	H-5 (8,90; ^2J), H-9 (7,49; ^2J), H-10 (7,33; ^3J)
9	127,3	7,49 d (9)	H-8 (7,27; ^3J), H-10 (7,33; ^2J)
10	124,9	7,33 d (9)	H-9 (7,49; ^2J), H-1 (7,04; ^2J)
10a	131,4	-	H-9 (7,49; ^3J), H-10 (7,33; ^2J)
OMe-3'	61,4	4,00 s	
OMe-4'	60,5	3,98 s	
OMe-7'	56,1	3,99 s	

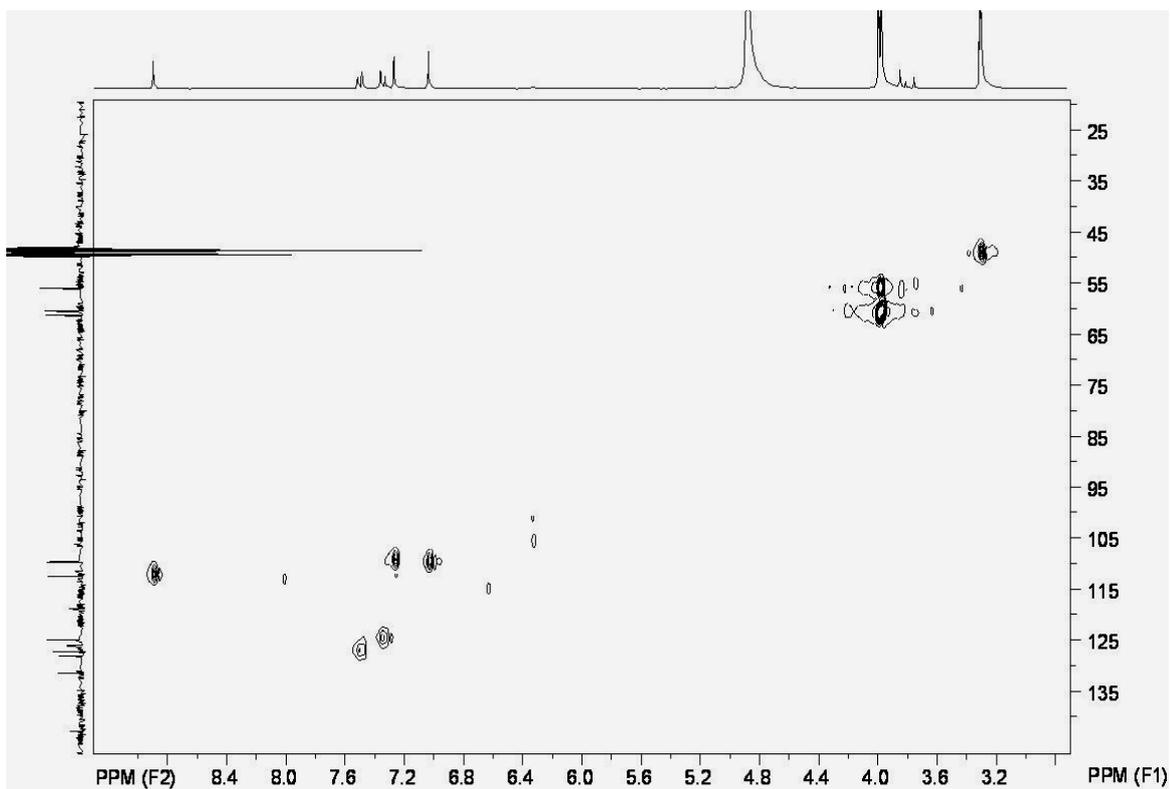
*CD₃OD 75 MHz, [#]CD₃OD 300 MHz



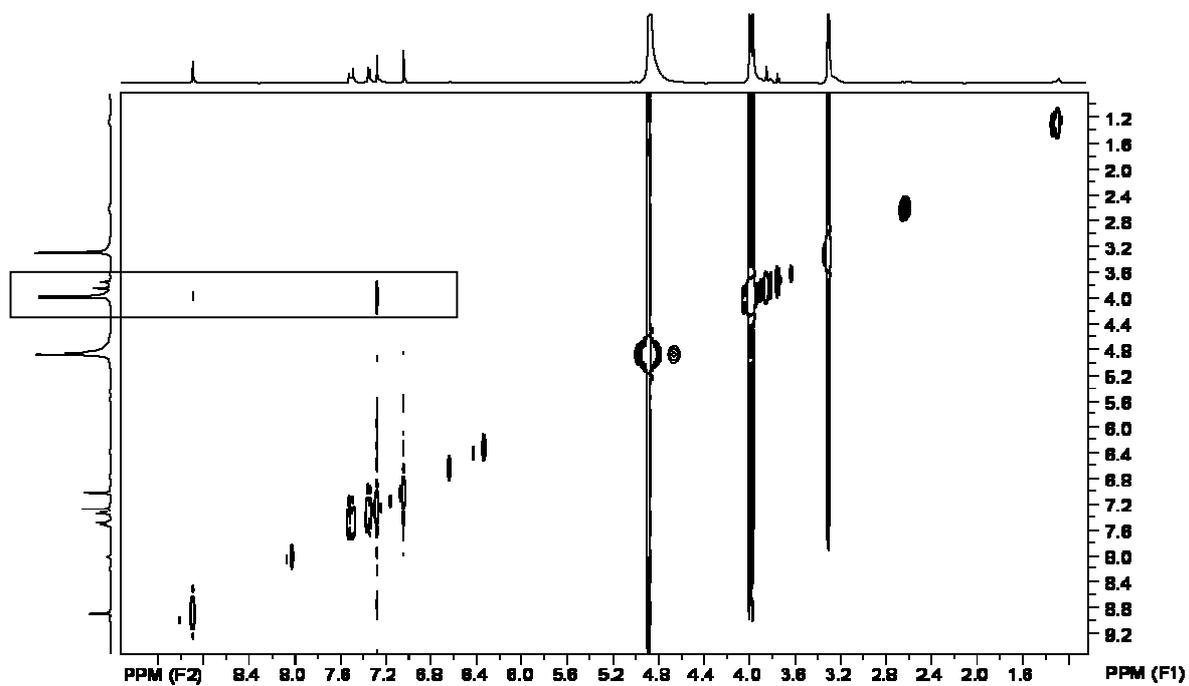
Espectro 42: RMN de ^1H do fenantreno **XIV** (300 MHz, CD_3OD).



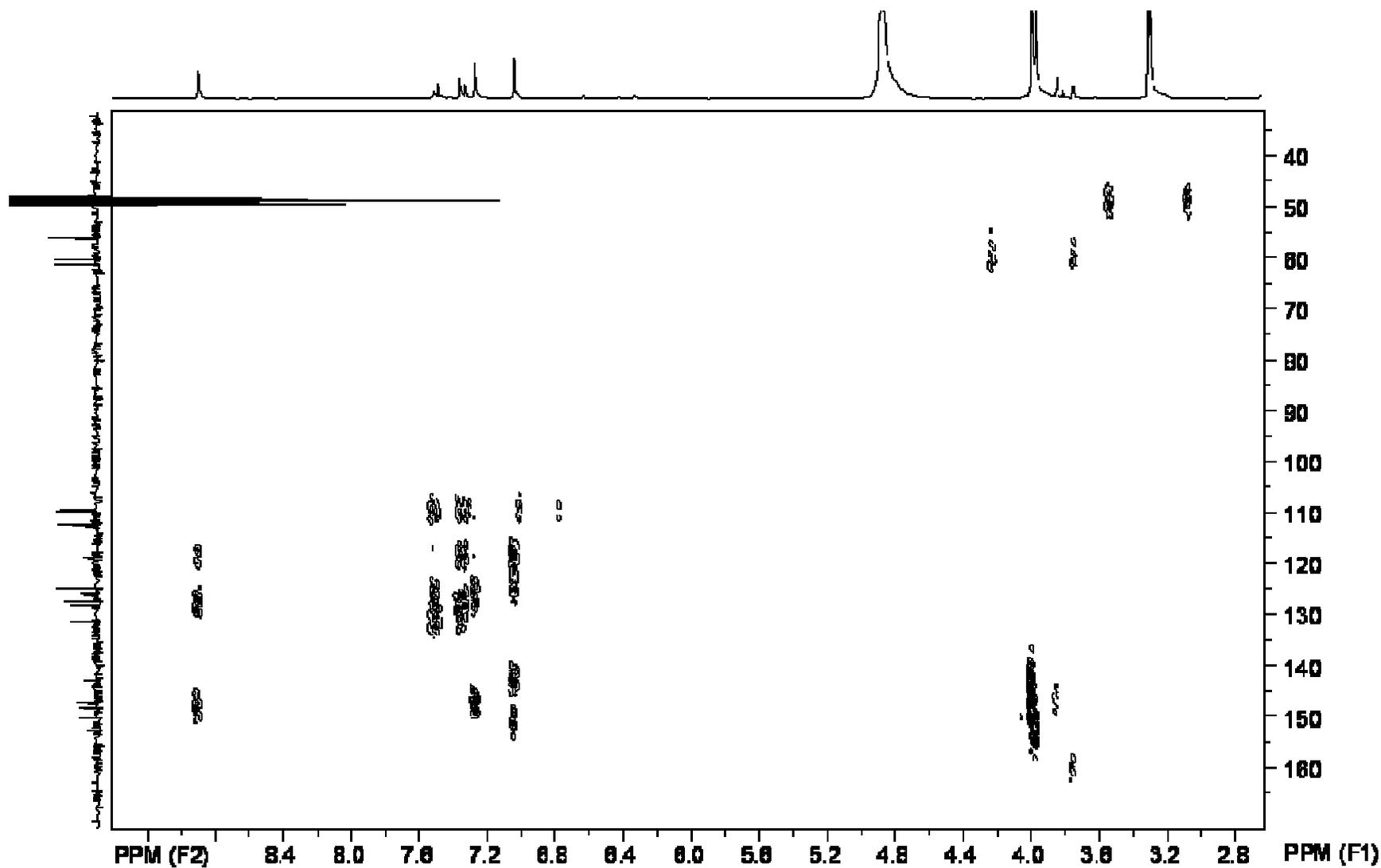
Espectro 43: RMN de ^{13}C do fenantreno **XIV** (75 MHz, CD_3OD).



Espectro 44: HSQC do fenantreno **XIV** (75 MHz, CD₃OD).

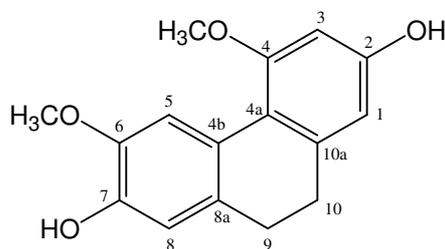


Espectro 46: NOESY do fenantreno **XIV** (300 MHz, CD₃OD).



Espectro 45: HMBC do fenantreno **XIV** (75 MHz, CD₃OD).

6.2.1.3 Identificação da 6-metoxicoelonina (XV)



XV

A substância **XV** foi obtida na fração CLDH-1 proveniente do fracionamento cromatográfico da fração CLDCM 6 (sub-item 5.4.1.1, pág. 38) e também na fração CLDCP-8 proveniente do fracionamento cromatográfico da fração CLDC-1, ambas descritas no item 5 (sub-item 5.4.1.2.2, pág. 41).

O espectro de RMN de ^1H de **XV** (espectro 47, pág. 139) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos e um sinal em δ 3,85 com integração para duas metoxilas, bastante semelhantes aos do espectro de RMN de ^1H da substância **XIII**. No entanto, não foi observado o par de dubletos atribuído aos hidrogênios H-9 e H-10 do espectro fenantrênico presente em **XIII**, tendo sido substituído por um multipletto na região de δ 2,58 a 2,60 proporcional a quatro hidrogênios.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 48, pág. 140) confirmou a presença de duas metoxilas em δ 56,0 e 56,1, revelando 12 sinais para carbonos aromáticos e mais dois sinais em δ 30,2 e 32,0 de carbonos metilênicos, assim identificados pelo espectro de DEPT – 135° (espectro 49, pág. 141). Estes sinais apresentaram correlações no espectro HSQC (espectro 50, pág. 141) com o multipletto supracitado e substituíram aqueles atribuídos a C-9 e C-10 do esqueleto fenantrênico presentes no espectro de **XIII**. Estes dados indicaram que **XV** tratava-se de um 9,10 diidrofenantreno, uma classe de substâncias de ocorrência comum em espécies do gênero *Combretum*, possuindo o mesmo padrão de substituição apresentado por **XIII** [PETTIT,1986; MALAN & AWINNY, 1993; LETCHER & NAHMO, 1972].

Assim o espectro de HSQC apresentou as correlações dos hidrogênios atribuídos a H-5 (δ 7,84, s) e H-8 (δ 6,63, s) com os carbonos C-5 (δ 113,6) e C-8 (δ 115,3). Tais atribuições foram confirmadas no espectro de HMBC (espectro 51, pág. 142), o qual

apresentou as correlações de H-5 com os carbonos C-4a (δ 116,8), C-4b (δ 124,8), C-8a (δ 132,2), C-7 (δ 145,2) e C-6 (δ 146,6). Também foram observadas neste espectro correlações de H-8 com C-4b, C-6 e C-7.

O espectro de HMBC também confirmou a atribuição feita para H-9 (δ 2,58, m), pelas correlações deste com C-10; C-8; C-4b; C-8a e C-10a, assim como a atribuição de H-10 (δ 2,60, m) pelas correlações deste com C-9, C-1, C-4a, C-8a e C-10a.

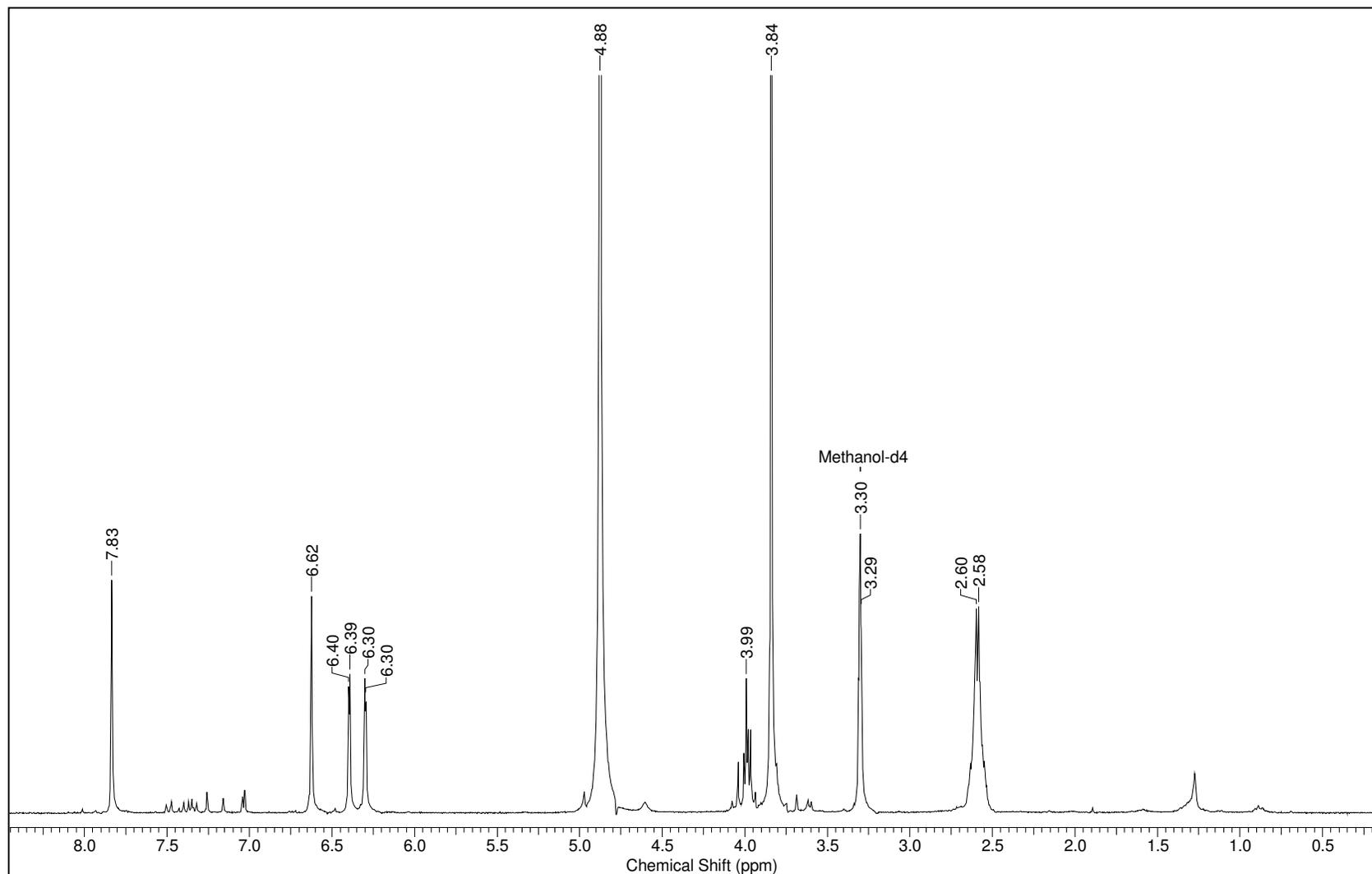
As posições das metoxilas foram definidas através dos espectros de HMBC e NOESY (espectro 52, pág. 143). No espectro de HMBC, o sinal das duas metoxilas (um único sinal) correlacionou-se com o sinal a δ 158,9 (C-4) definindo uma metoxila na posição C-4 e com o sinal a δ 146,6 (C-6), definindo a segunda metoxila na posição C-6. No espectro de NOESY, as correlações entre os hidrogênios das metoxilas e H-3 e H-5 confirmaram a proposta.

Desta forma, a substância **XV** foi caracterizada como 2,7-diidróxi-4,6-dimetóxi-9,10-diidrofenantreno cujos dados espectrais mostraram-se bastante semelhantes aos existentes na literatura, para substância, obtida anteriormente de *Agrostophyllum callosum* (Orchidaceae) e denominada de 6-metoxicoelonina [MAJUNDER, 1996] (tabela 24, pág. 138). Esta substância está sendo descrita pela primeira vez em Combretaceae.

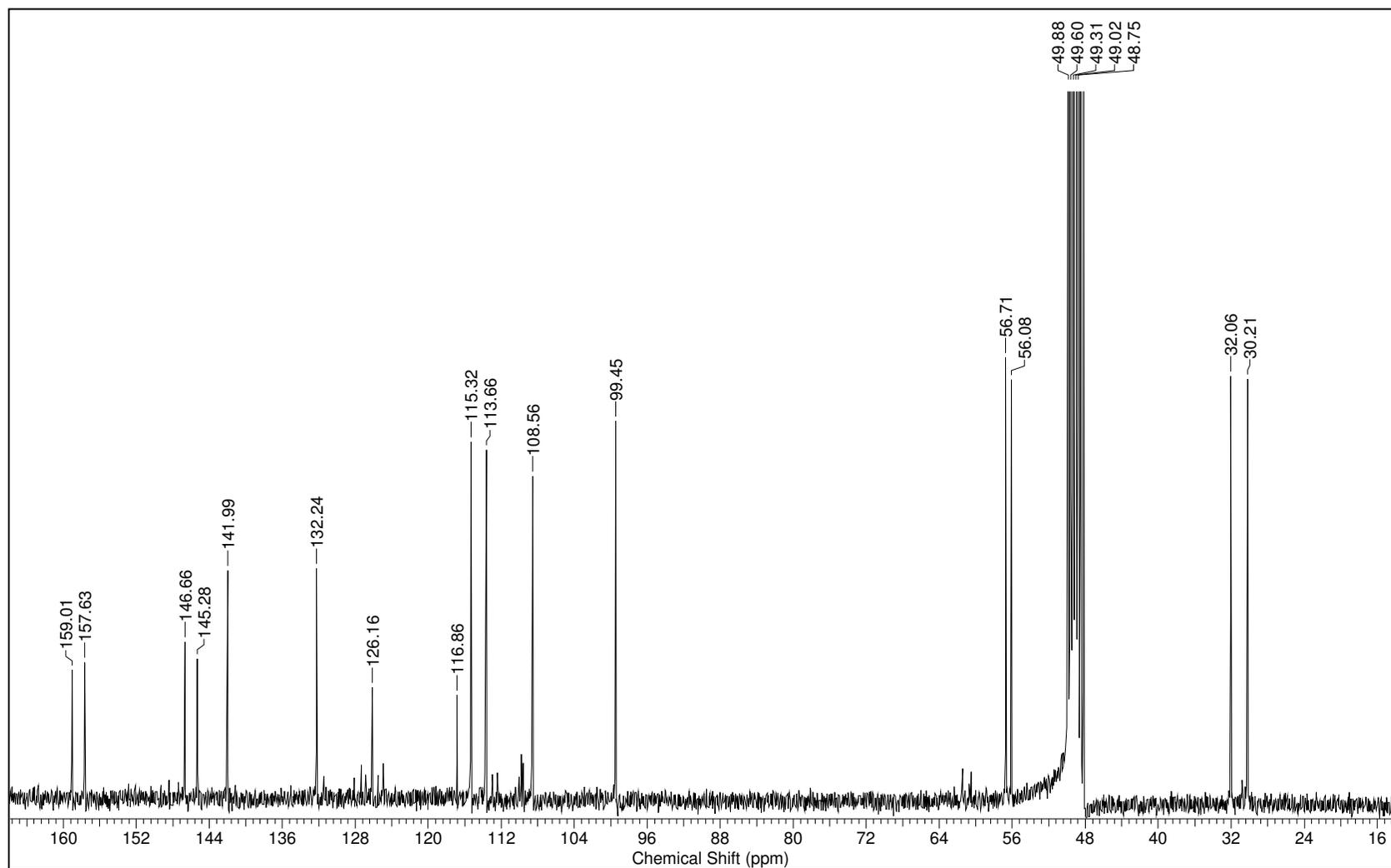
Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do 9,10-diidrofenantreno **XV** obtido das raízes de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C	(XIV) <i>C. laxum</i> * $\delta^{13}\text{C}$	(XIV) literatura# $\delta^{13}\text{C}$	(XIV) <i>C. laxum</i> * $\delta^1\text{H}$ (m, J (Hz))	Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; nJ)
1	108,5	108,5	6,30 (d, 3,0)	H-3 (6,40; 3J), H-10 (2,60; 3J)
2	157,6	157,4	-	H-3 (6,40; 2J), H-1 (6,30; 2J)
3	99,4	99,4	6,40 (d, 3,0)	H-1 (6,30; 3J)
4	158,9	158,7	-	H-3 (6,40; 3J), -OCH ₃ (3,84; 3J)
4a	116,8	115,3	-	H-3 (6,40; 3J), H-5 (7,85; 3J), H-10 (2,60; 3J)
4b	125,5	125,6	-	H-5 (7,85; 2J), H-8 (6,75; 3J), H-9 (2,58; 3J)
5	113,6	113,4	7,84 (s)	-
6	146,6	146,1	-	H-5 (7,85; 2J), H-8 (6,75; 3J), -OCH ₃ (3,84; 3J)
7	145,2	145,3	-	H-5 (7,85; 3J), H-8 (6,75; 2J)
8	115,3	114,9	6,49 (s)	H-9 (2,58; 3J)
8a	132,2	131,7	-	H-5 (7,85; 3J), H-9 (2,58; 2J)
9	32,0	31,6	2,58 (m)	H-8 (6,75; 3J), H-10 (2,60; 2J)
10	30,2	30,1	2,60 (m)	H-1 (6,30; 3J), H-9 (2,58; 2J)
10a	141,9	141,4	-	H-10 (2,60; 2J), H-9 (2,58; 3J)
OMe-4'	56,1	55,9	3,84 (s)	-
OMe-6'	56,7	56,6	3,84 (s)	-

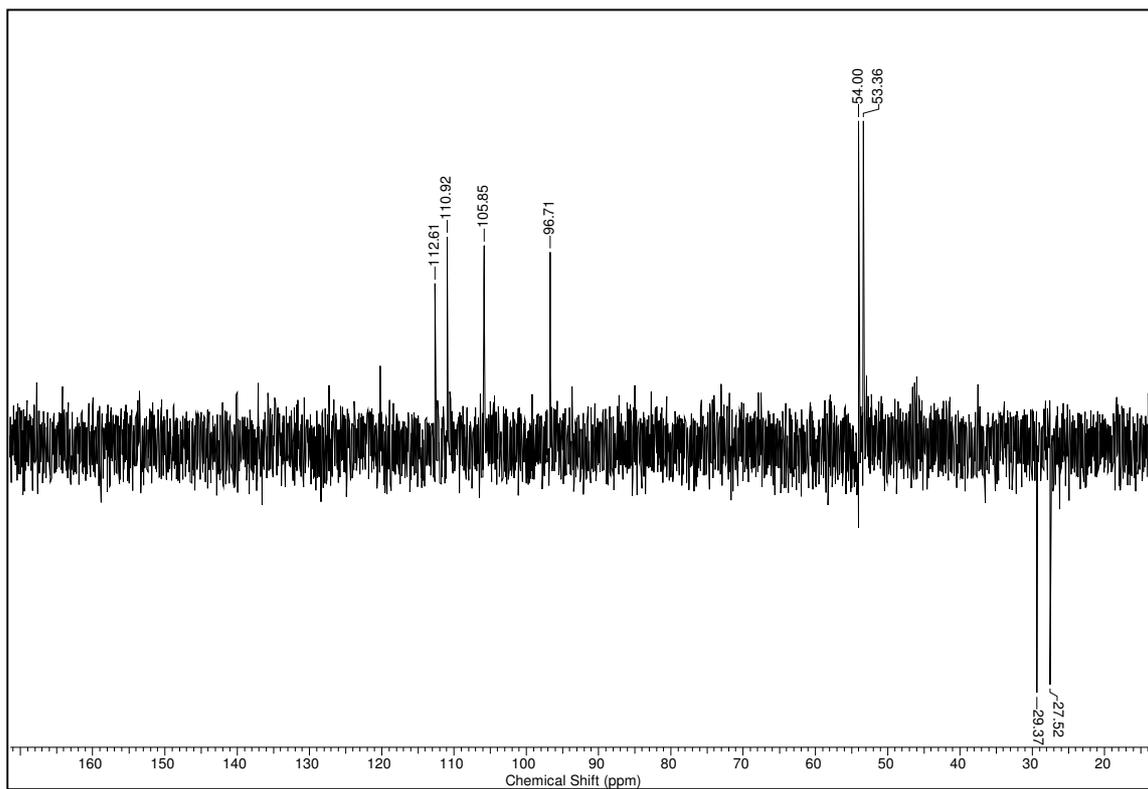
* CD₃OD 75 MHz; # Acetona-*d*₆ 75 MHz [MAJUNDER, 1996], *CD₃OD 300 MHz.



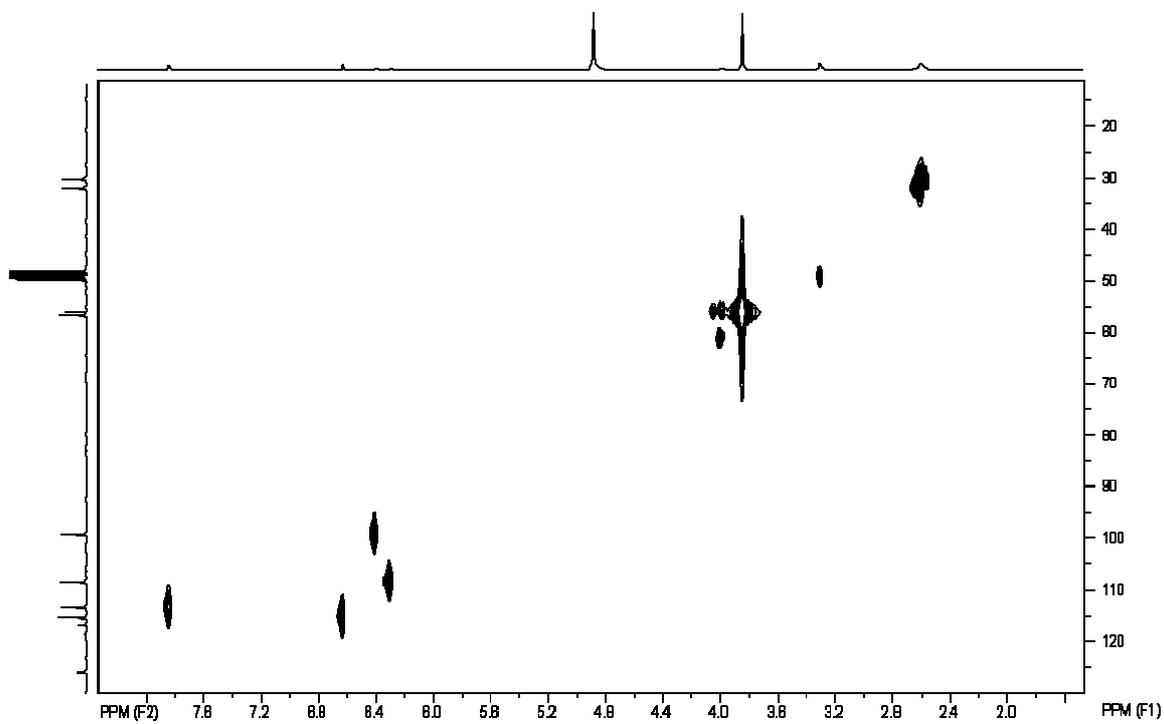
Espectro 47: RMN de ¹H do 9,10-diidrofenantreno XV (300 MHz, CD₃OD).



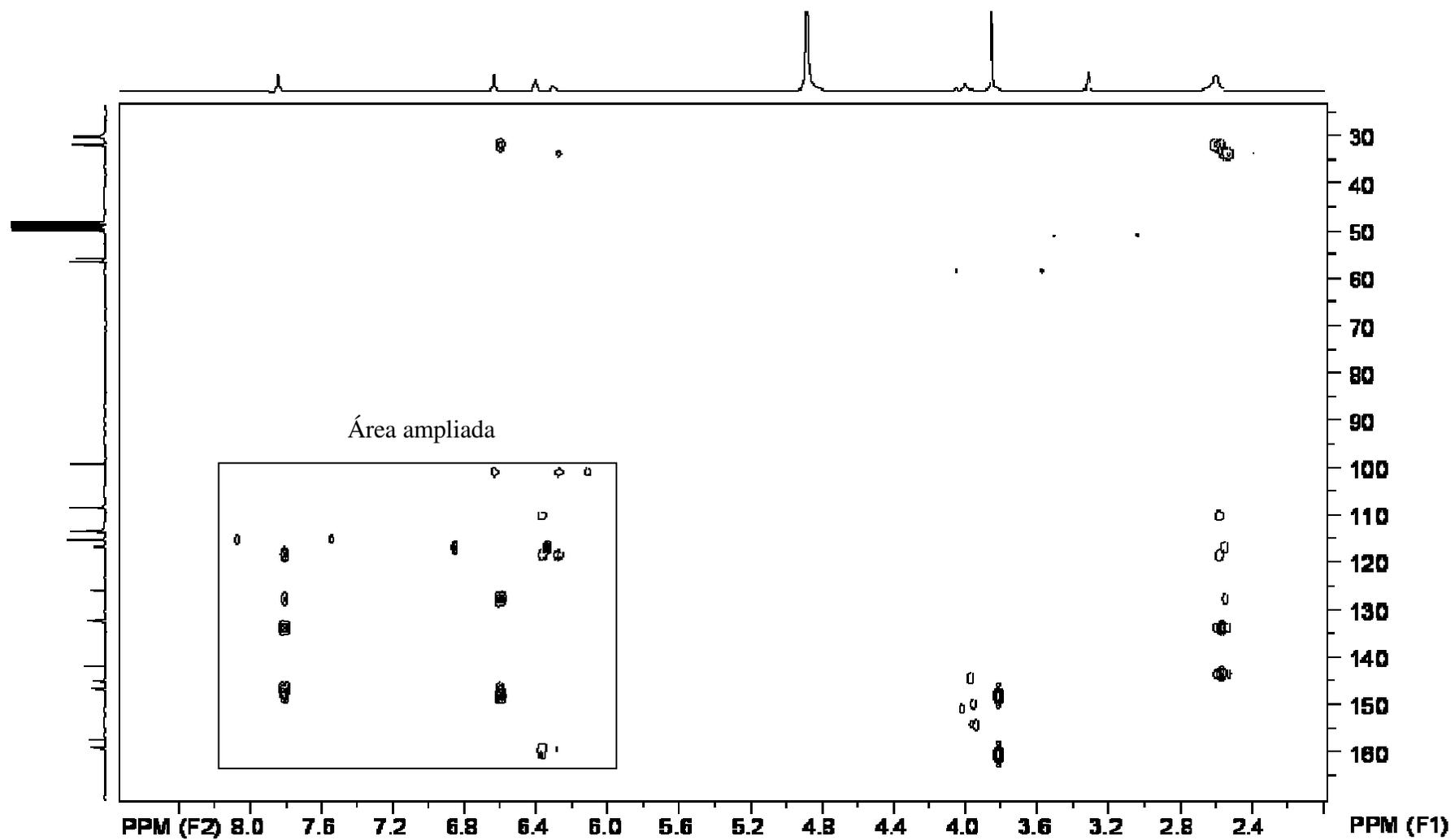
Espectro 48: RMN de ^{13}C do 9,10-diidrofenantreno XV (75 MHz, CD_3OD).



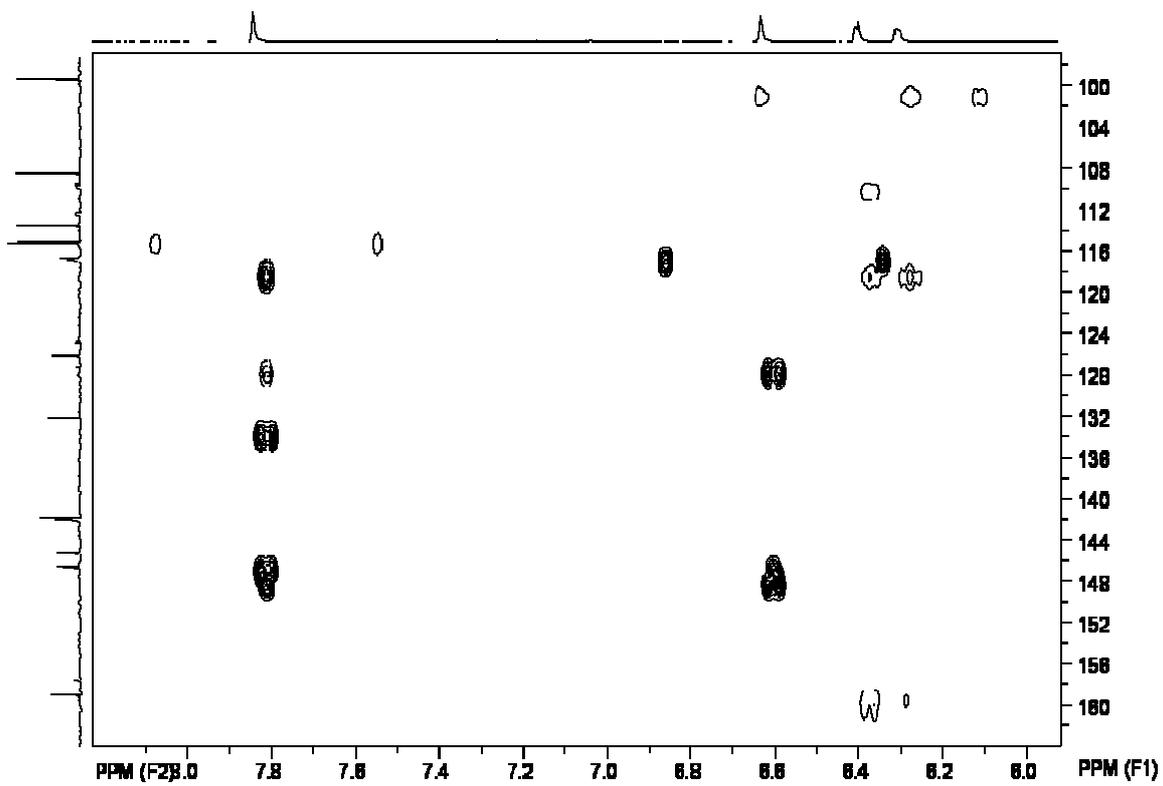
Espectro 49: DEPT – 135° do 9,10-diidrofenantreno **XV** (75 MHz, CD₃OD).



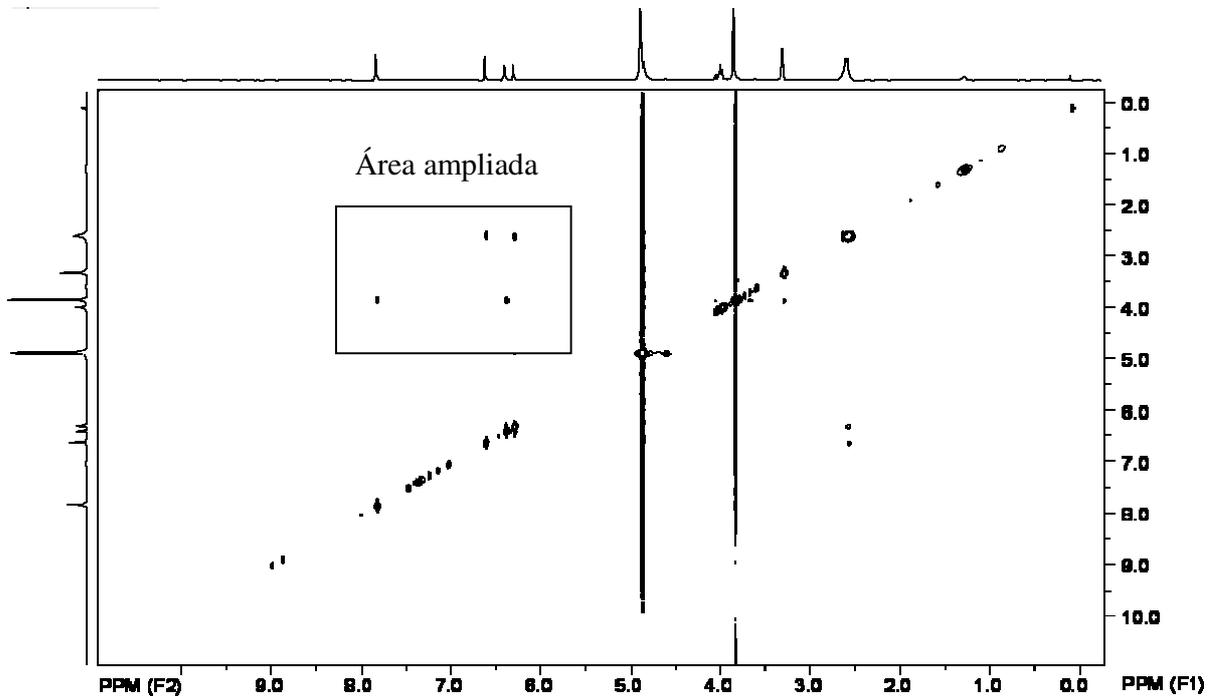
Espectro 50: HSQC do 9,10-diidrofenantreno **XV** (75 MHz, CD₃OD).



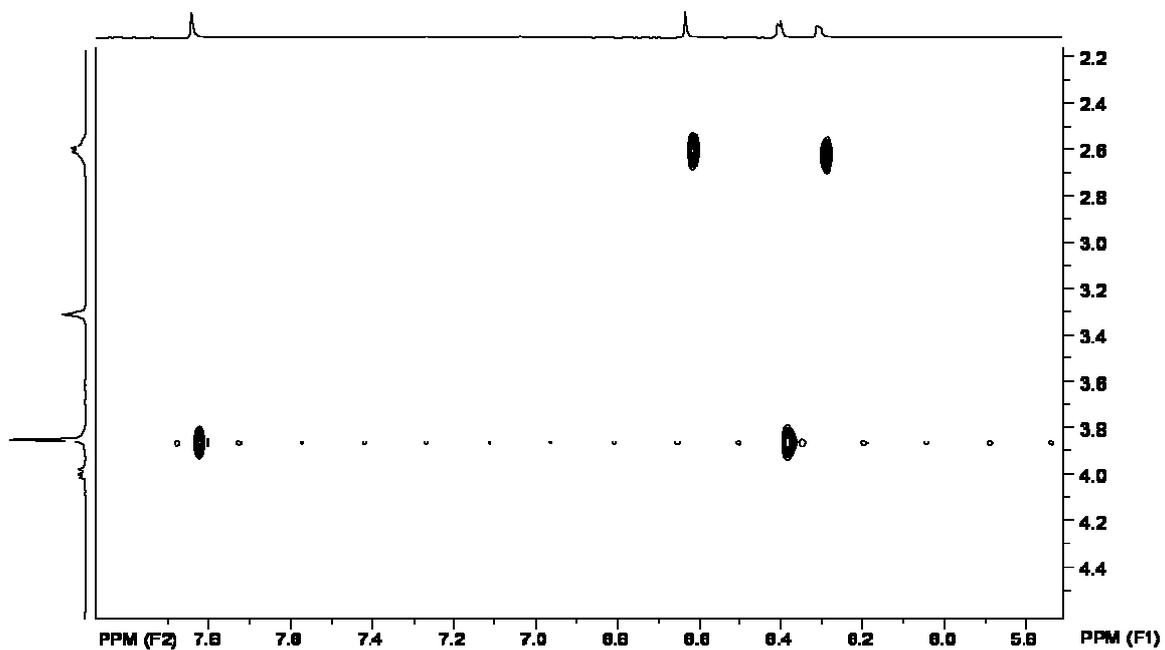
Espectro 51: HMBC do 9,10-diidrofenantreno XV (75 MHz, CD₃OD).



Ampliação do espectro 51: HMBC do 9,10-diidrofenantreno XV (75 MHz, CD₃OD).

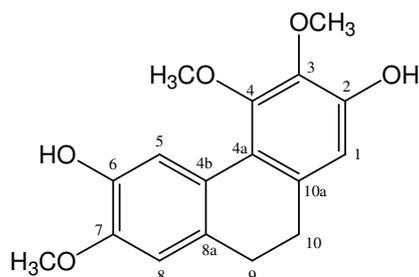


Espectro 52: NOESY do 9,10-diidrofenantreno XV (300 MHz, CD₃OD).



Ampliação do espectro 52: NOESY do 9,10-diidrofenantreno **XV** (300 MHz, CD₃OD).

6.2.1.4 Identificação do 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (XVI)



XVI

A substância **XVI** foi obtida da fração CLDCP-13 proveniente do fracionamento cromatográfico da fração CLDC-1 da fase diclorometano das raízes, descrito no item 5 (sub-item 5.4.1.2.2, pág. 41).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 53, pág. 148) de **XVI** apresentou semelhança com os espectros de RMN de ^1H dos fenantrenos e diidrofenantrenos anteriores revelando sinais na região aromática (três singletos a δ 6,50; 6,76 e 7,78), sinais para metoxilas (δ 3,84; 3,85; 3,70) e assim como **XV**, sinal para hidrogênios alifáticos a δ 2,60 (m). O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 54, pág. 149) confirmou a presença de um composto aromático metoxilado e ainda apresentou sinais em δ 30,4 e δ 31,5 o que o caracterizou como um 9,10 diidrofenantreno.

Da mesma maneira que nos compostos anteriores, o singlete em δ 7,78, no espectro de RMN de ^1H , foi atribuído a H-5 e seu padrão mais uma vez revelou substituições nas posições C-4, C-6 e C-7. O singlete em δ 6,76, por sua vez, foi atribuído a H-8. O espectro de HSQC (espectro 56, pág. 150) revelou que o sinal em δ 112,3 era correspondente a C-8 e que o sinal em δ 115,6 pertencia a C-5. O espectro de HMBC (espectro 57, pág. 151) auxiliou nas atribuições dos valores de deslocamento químico dos carbonos do anel A. Ambos os hidrogênios, H-5 e H-8, apresentavam correlações com δ 126,9 (C-4b), 130,9 (C-8a), 145,4 (C-6) e 147,2 (C-7). A correlação entre H-5 e o carbono a δ 120,8 definiu a atribuição de C-4a.

No espectro de RMN de ^1H , o singlete a δ 6,50 foi atribuído ao H-1, sendo o sinal de seu respectivo carbono observado em δ 112,2 como mostrou o espectro de HSQC. As

correlações no espectro HMBC entre o sinal de H-1 e os sinais em δ 120,8 (C-4a), δ 141,2 (C-3), δ 150,1 (C-2) e δ 31,5 (C-10) confirmaram sua atribuição.

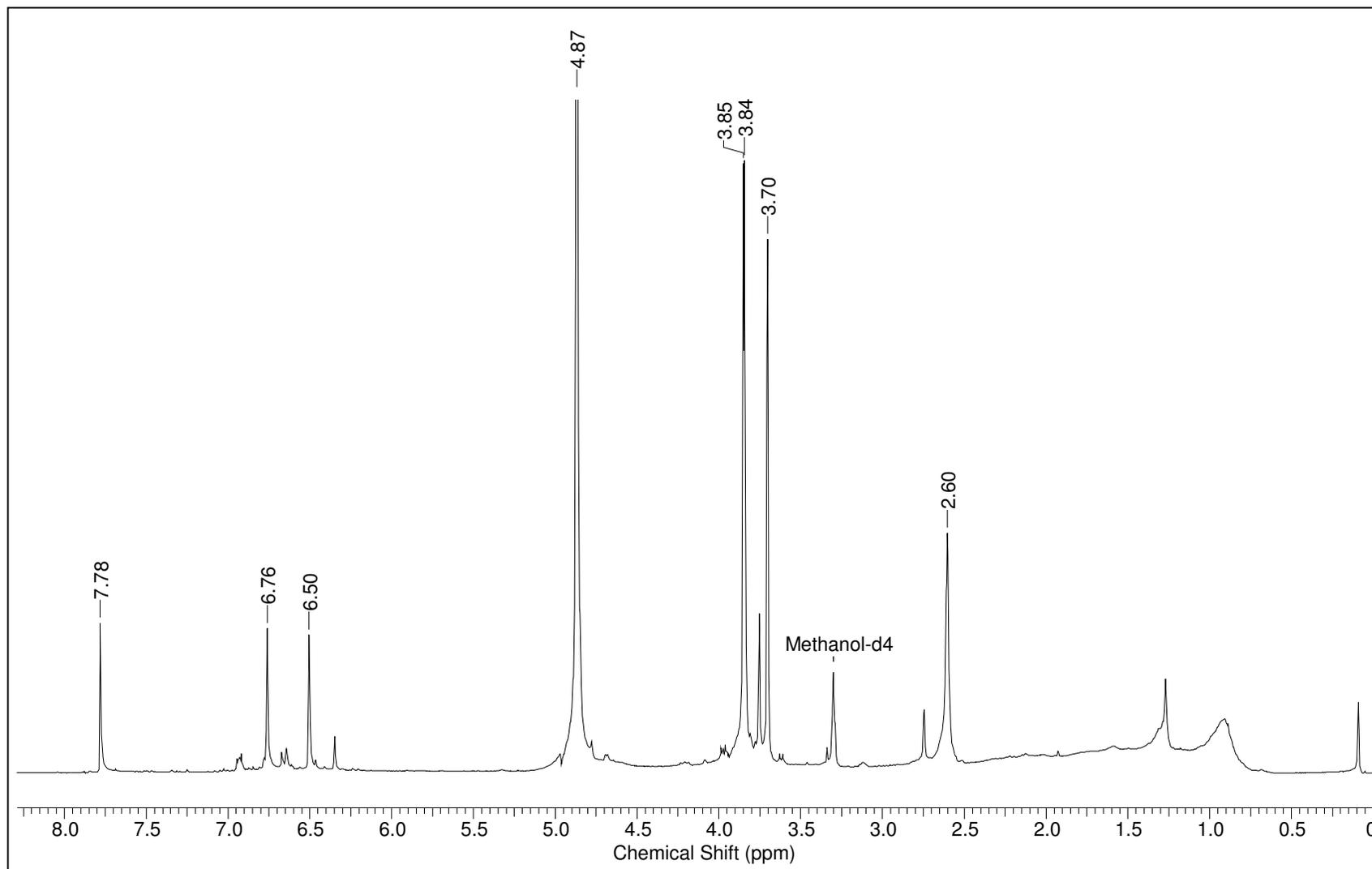
Os sinais para metoxilas observadas no espectro de RMN de ^1H em δ 3,70; 3,84; e 3,85 apresentaram correlação no espectro de HSQC respectivamente com os sinais em δ 60,6; 56,4; e 61,3. No espectro de HMBC o sinal da metoxila em δ 3,70 correlacionou-se com o carbono em δ 152,6 (C-4), a metoxila em δ 3,84 com o sinal a δ 147,2 (C-7) e a metoxila em δ 3,85 com δ 141,2 (C-3), indicando, da mesma forma que em **XIV**, a localização destas metoxilas em C-3, C-4 e C-7. O espectro de NOESY (espectro 57, pág. 152) confirmou a proposta, pois foram observadas correlações entre o singlete relativo a H-8 e o sinal a δ 3,84 e entre o sinal de H-5 com o da metoxila a δ 3,70 (tabela 21, pág. 115).

Assim, a estrutura de **XVI** foi estabelecida como sendo 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno, substância descrita anteriormente em *C. molle* [LETCHER, 1972] e *C. apiculatum* [LETCHER & NAHMO, 1971]. Os dados de RMN de ^{13}C de **XVI** estão sendo relatados pela primeira vez (tabela 25, pág. 147).

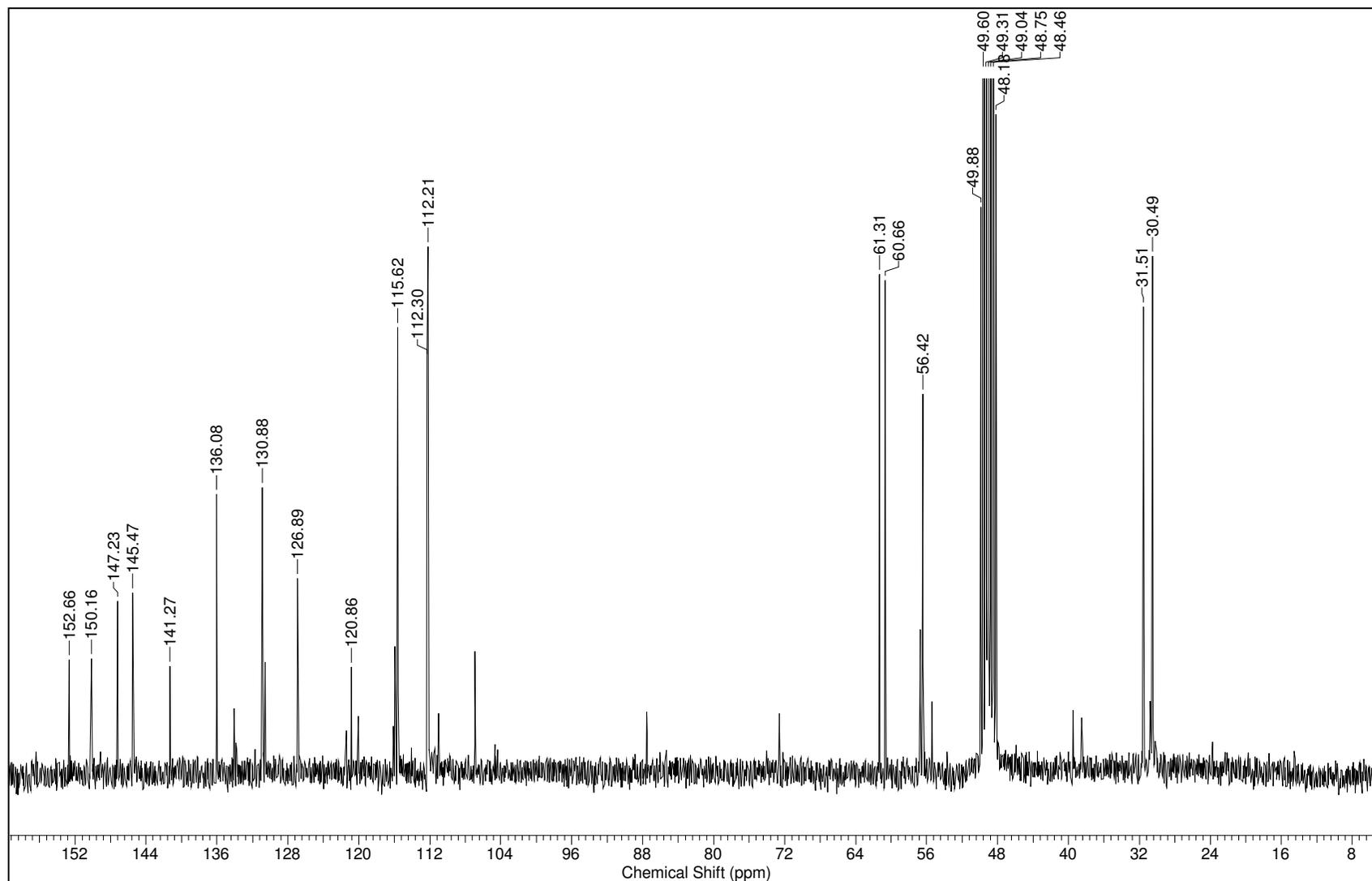
Tabela 25. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do 9,10-diidrofenantreno **XVI** obtido das raízes de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

(XIV) <i>C. laxum</i>			
C	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; nJ)
1	112,2	6,50 (s)	H-10 (2,60; 3J)
2	150,1	-	H-1 (6,50; 2J)
3	141,2	-	H-1 (6,50; 3J), OMe-3 (3,85; 3J)
4	152,6	-	OMe-4 (3,70; 3J)
4a	120,8	-	H-1 (6,50; 3J), H-5 (7,78; 3J), H-10 (2,60; 3J)
4b	126,9	-	H-5 (7,78; 2J), H-8 (6,76; 3J), H-9 (2,60; 3J)
5	115,6	7,78 (s)	-
6	145,4	-	H-5 (7,78; 2J), H-8 (6,76; 3J)
7	147,2	-	H-5 (7,85; 3J), H-8 (6,76; 2J), OMe-7 (3,84; 3J)
8	112,3	6,76 (s)	H-9 (2,60; 3J)
8a	130,9	-	H-5 (7,78; 3J), H-8 (6,76; 2J) H-9/10 (2,60; $^{2,3}J$)
9	30,4	2,60 (s)	H-8 (6,76; 3J), H-10 (2,60; 2J)
10	31,5	2,60 (s)	H-1 (6,50; 3J), H-9 (2,60; 2J)
10a	136,1	-	H-10/9 (2,60; $^{2,3}J$)
OMe-3	61,3	3,85 (s)	-
OMe-4	60,6	3,70 (s)	-
OMe-7	56,4	3,84 (s)	-

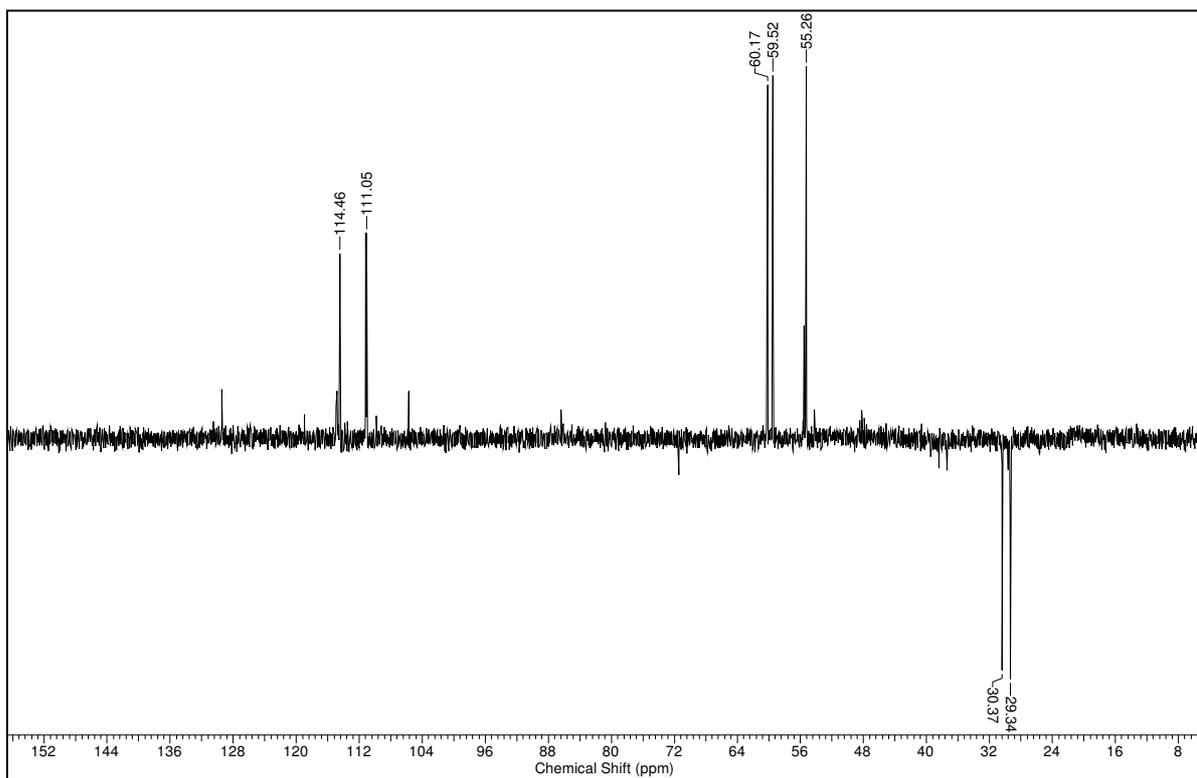
* CD_3OD 75 MHz; * CD_3OD 300 MHz



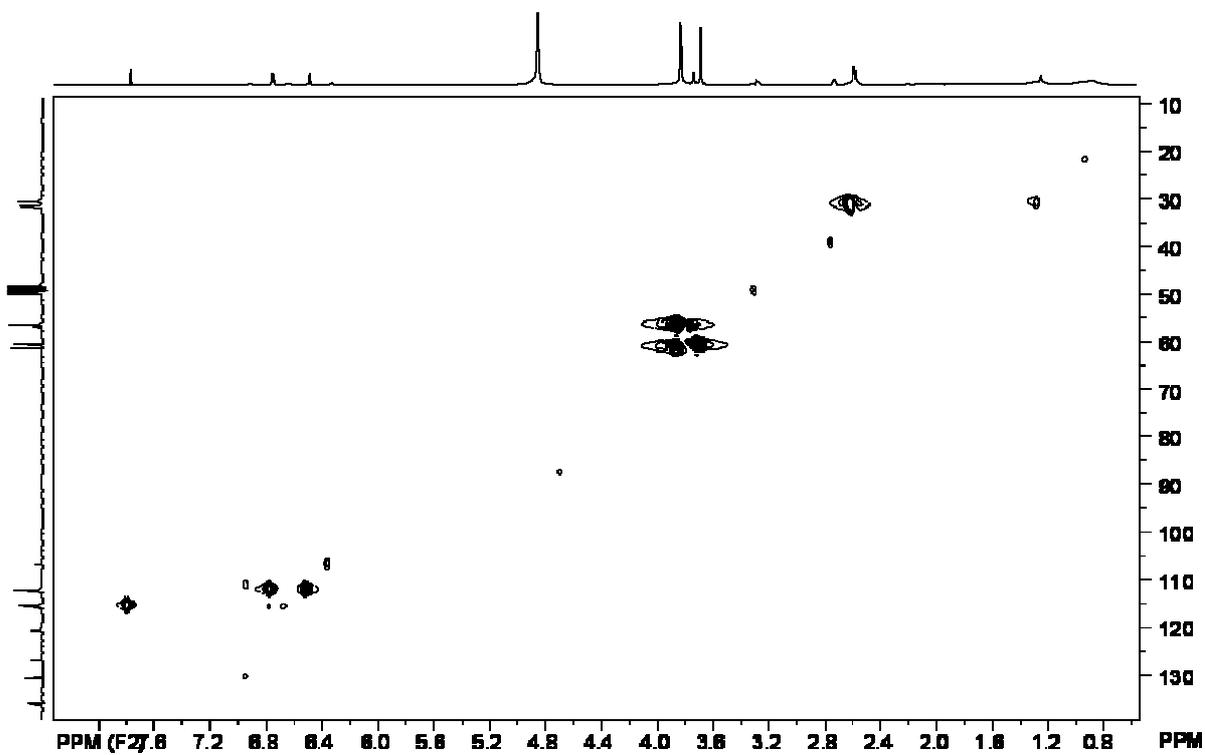
Espectro 53: RMN de ^1H do 9,10-diidrofenantreno **XVI** (300 MHz, CD_3OD).



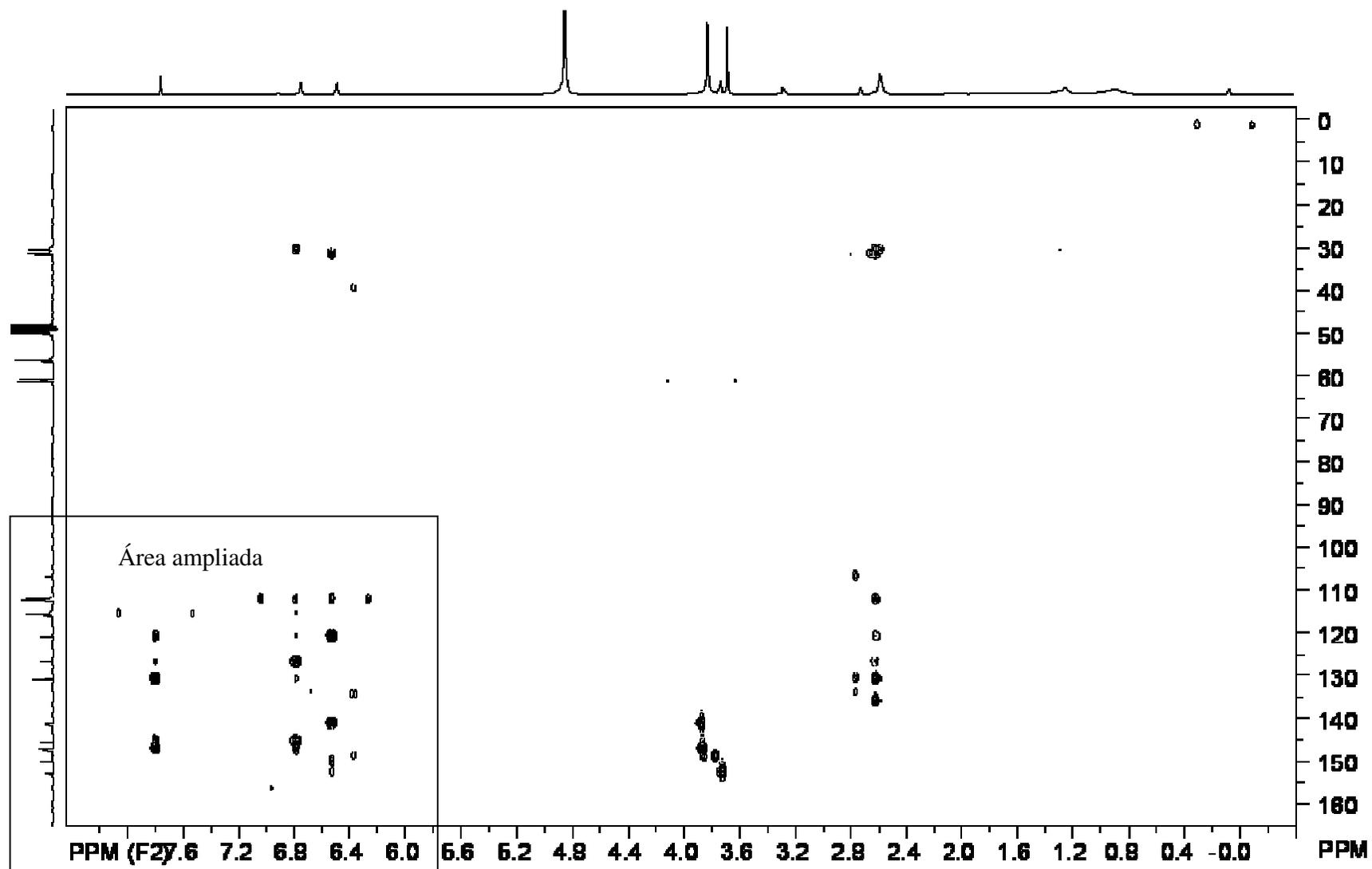
Espectro 54: RMN de ^{13}C do 9,10-diidrofenantreno **XVI** (75 MHz, CD_3OD).



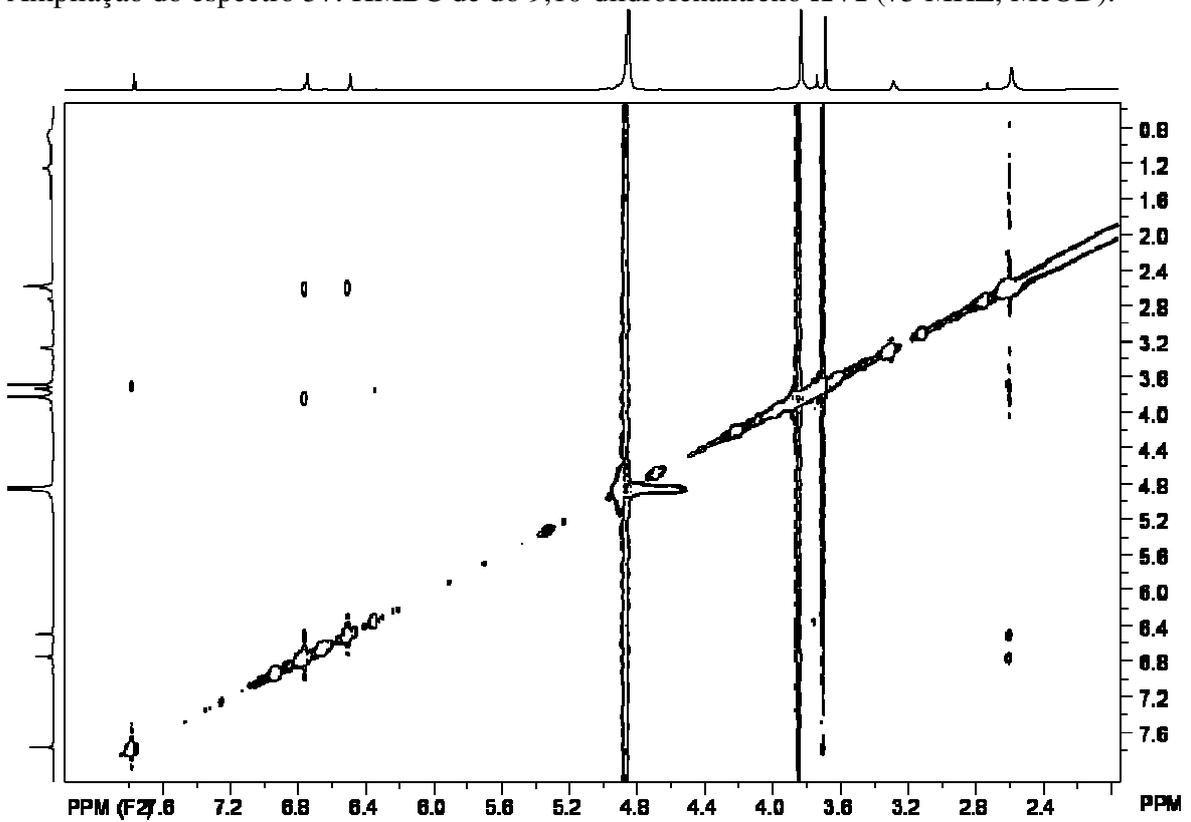
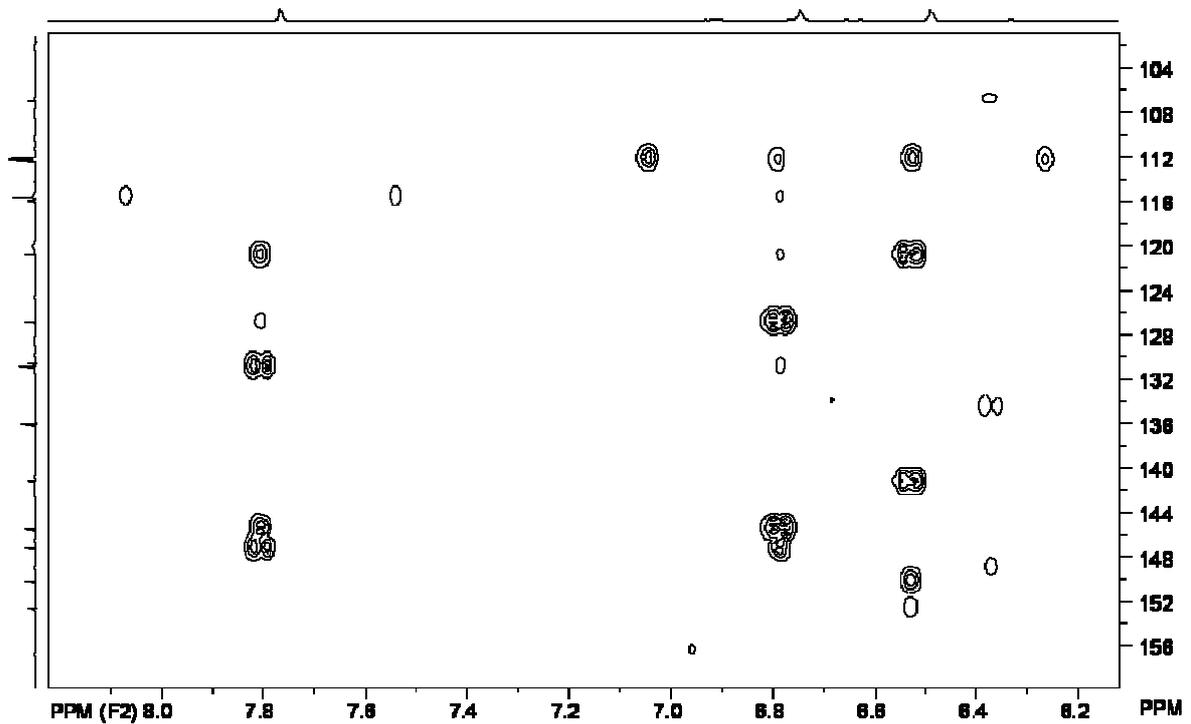
Espectro 55: DEPT – 135° do 9,10-diidrofenantreno XVI (75 MHz, CD₃OD).



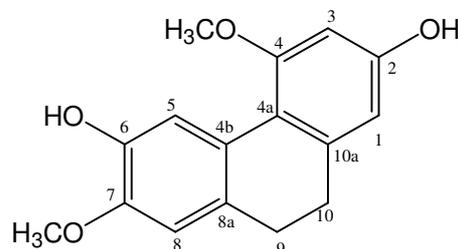
Espectro 56: HSQC do 9,10-diidrofenantreno XVI (75 MHz, CD₃OD).



Espectro 57: HMBC do 9,10-diidrofenantreno XVI (75 MHz, CD₃OD).



6.2.1.5 Identificação da callosina (XVII)



XVII

A substância **XVII** foi obtida da fração CLDCP-10 proveniente do fracionamento cromatográfico da fração CLDC-1 da fase diclorometano das raízes, descrito no item 5 (sub-item 5.4.1.2.2, pág. 41).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **XVII** (espectros 59 e 60, págs. 155 e 156) mostraram-se praticamente idênticos aos de **XV** no que diz respeito aos valores de deslocamento químico, número e multiplicidade de sinais, sugerindo, portanto que a diferença estrutural entre os dois compostos seria na localização dos grupos metoxila.

Assim, o espectro de RMN de ^1H de **XVII** apresentou dois singletos em δ 7,75 e δ 6,75 que foram atribuídos a H-5 e H-8 respectivamente, e dois dubletos em δ 6,30 e δ 6,39 ($J= 3,0$ Hz) atribuídos a H-1 e H-3 respectivamente. Foram observados ainda dois singletos intensos típicos de metoxilas (δ 3,84 e 3,83) e um singlete com integração para 4 hidrogênios alifáticos em δ 2,56 atribuído a H-9 e H-10.

No espectro de RMN de ^{13}C os sinais dos carbonos metínicos a δ 99,27; δ 108,44; δ 112,0 e δ 116,5 foram atribuídos aos carbonos C-3, C-1, C-8 e C-5, respectivamente, com auxílio das correlações observadas no espectro HSQC (espectro 62, pág. 157). Este espectro mostrou também a correlação entre a metoxila em δ 3,83 com o sinal a δ 55,9 e a metoxila em δ 3,84 com o sinal a δ 56,4.

Para os carbonos C-9 e C-10 foram atribuídos os sinais a δ 30,4 e δ 32,1, respectivamente, com base nas correlações presentes no espectro de HMBC (espectro 63, pág. 158) entre H-8 e C-9 e entre H-1 e C-10. O sinal em δ 159,2 foi caracterizado como sendo relativo a C-4 por apresentar correlação apenas com H-3 e com a metoxila a δ 3,84, o que também definiu a localização de uma metoxila em C-4. O sinal referente a outra

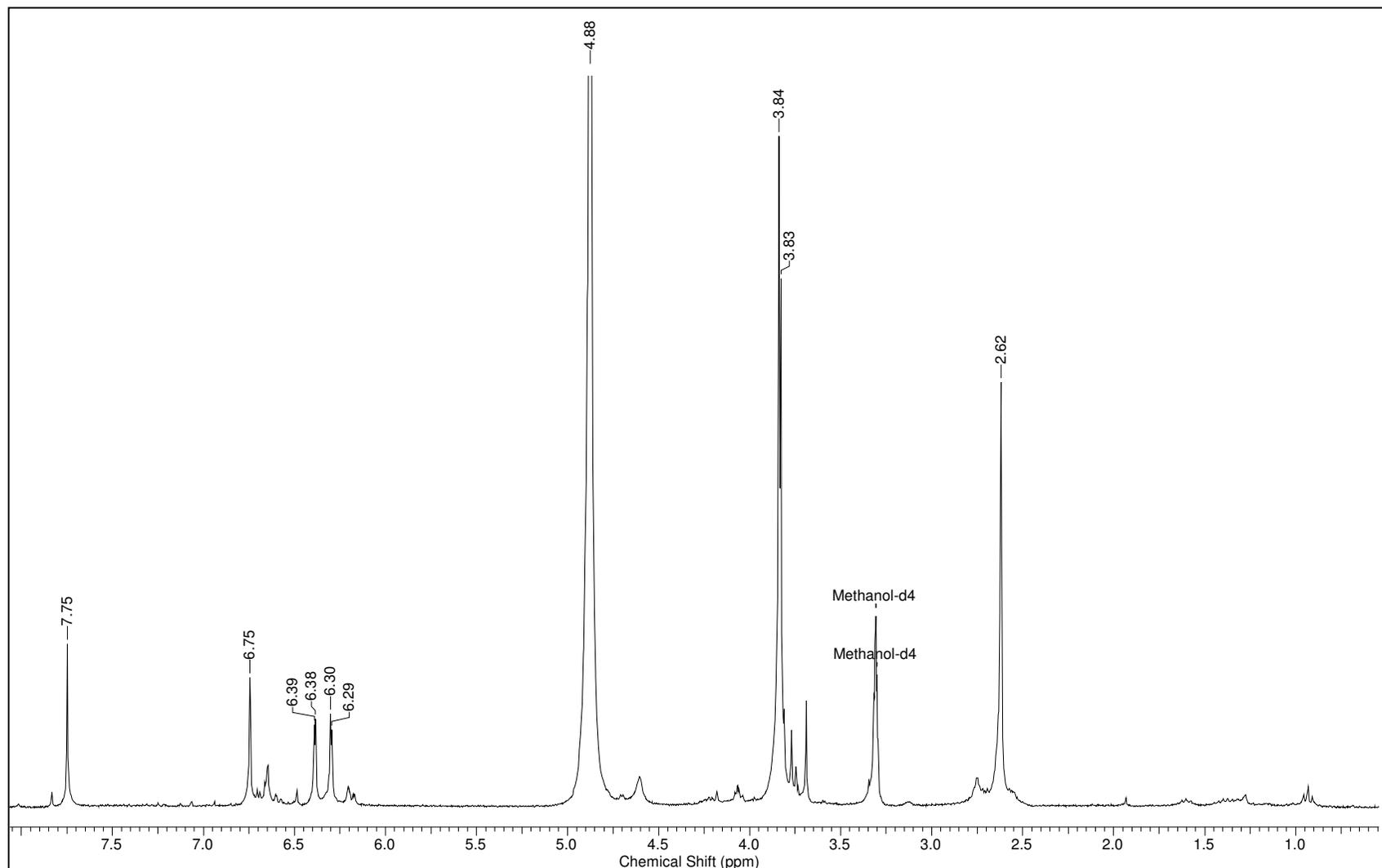
metoxila (δ 3,83) apresentou neste espectro correlação com o sinal a δ 146,6. Este sinal e o em δ 144,8 apresentaram ambos correlações, com os sinais de H-5 e H-8, sendo relativos, portanto a C-6 e C-8, enquanto que o sinal em δ 157,7 foi atribuído a C-2, pela correlação com H-3 e H-1. com base nestas informações, a estrutura de **XVII** diferia da de **XV** pela localização da metoxila do anel A em C-7 (ao invés de C-6). Esta proposta pode ser confirmada ao ser observada a correlação entre H-8 e uma das metoxilas no espectro NOESY (espectro 64, pág. 159) de **XVII**.

Assim, estes dados definiram a estrutura do composto **XVII** como 2,6-diidróxi-4,7-dimetóxi-9,10-diidrofenantreno e mostraram-se concordantes com os da calosina, substância obtida anteriormente de *A. callosum* (Orchidaceae) (tabela 26, pág. 154) [MAJUMDER, 1996]. Esta substância também está sendo sendo descrita pela primeira vez em Combretaceae.

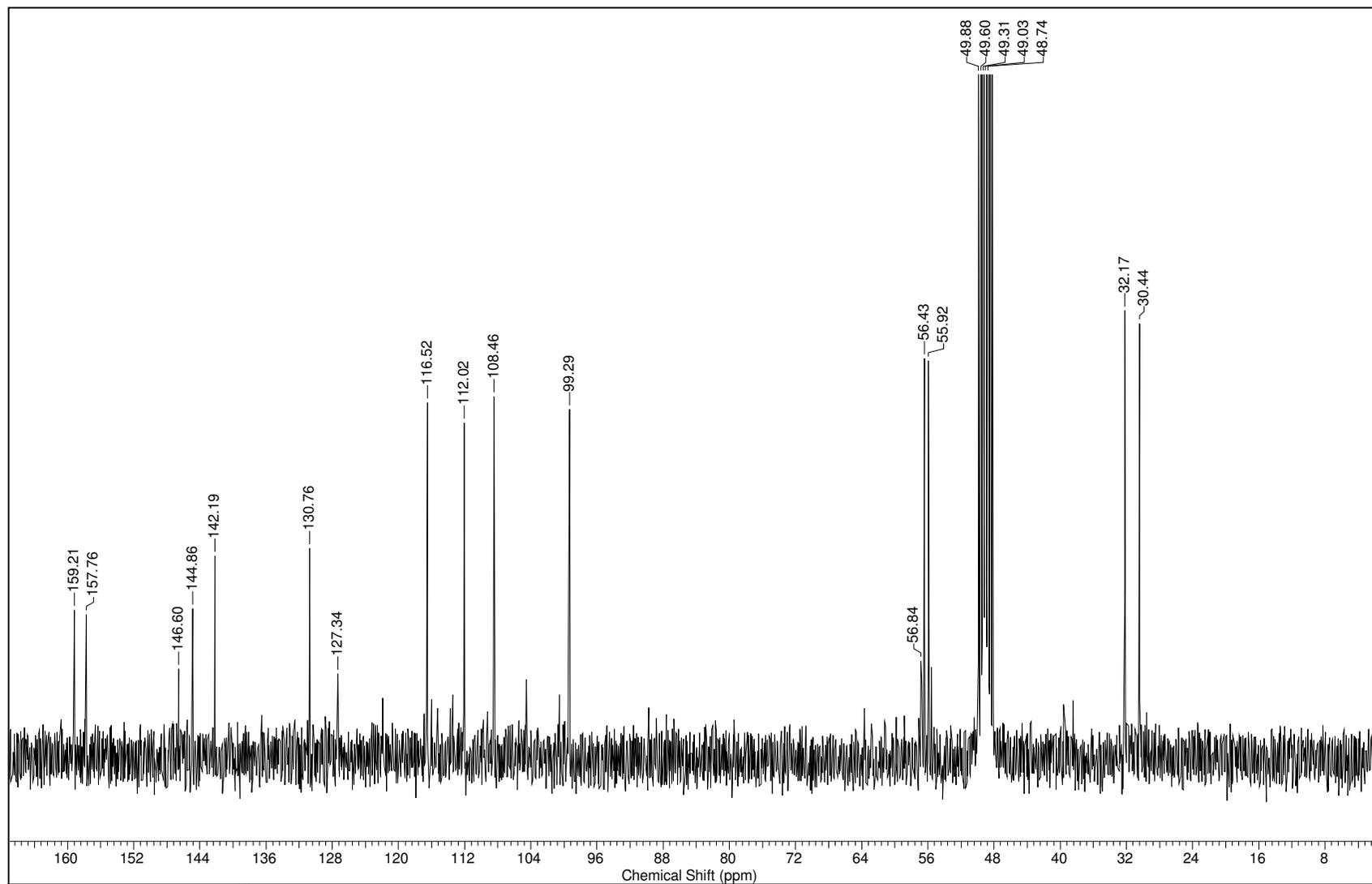
Tabela 26. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do 9,10-diidrofenantreno **XVII** obtido das raízes de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C	(XVII) <i>C. laxum</i> * $\delta^{13}\text{C}$	(XIV) <i>C. laxum</i> * $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	(XIV) literatura# $\delta^{13}\text{C}$	Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; ^nJ)
1	108,4	6,30 (d, 3,0)	107,3	H-3 (6,39; ^3J), H-10 (2,62; ^3J)
2	157,7	-	154,9	H-3 (6,39; ^2J), H-1 (6,30; ^2J)
3	99,3	6,39 d (d, 3,0)	99,1	H-1 (6,30; ^3J)
4	159,2	-	158,0	H-3 (6,39; ^3J), OMe-4 (3,84; ^3J)
4a	116,5	-	117,8	H-1 (6,30; ^2J), H-3 (6,39; ^3J), H-5 (7,75; ^3J), H-9/10 (2,62; $^{2,3}\text{J}$)
4b	127,3	-	124,0	H-5 (7,75; ^2J), H-8 (6,75; ^3J), H-9 (2,62; ^3J)
5	116,5	7,75 (s)	114,5	-
6	144,8	-	145,7	H-5 (7,75; ^2J), H-8 (6,75; ^3J)
7	146,6	-	143,3	H-5 (7,75; ^3J), H-8 (6,75; ^2J), OMe- (3,83; ^2J)
8	112,0	6,75 (s)	110,1	H-9 (2,62; ^3J)
8a	130,7	-	129,9	H-5 (7,75; ^3J), H-8 (6,75; ^2J) H-9/10 (2,62; $^{2,3}\text{J}$)
9	32,1	2,62 (s)	29,6	H-8 (6,75; ^3J), H-10 (2,62; ^2J)
10	30,4	2,62 (s)	29,5	H-1 (6,30; ^3J), H-9 (2,62; ^2J)
10a	142,1	-	141,2	H-10/9 (2,62; $^{2,3}\text{J}$)
OMe-4	56,4	3,84 (s)	55,5	-
OMe-7	55,9	3,83 (s)	56,0	-

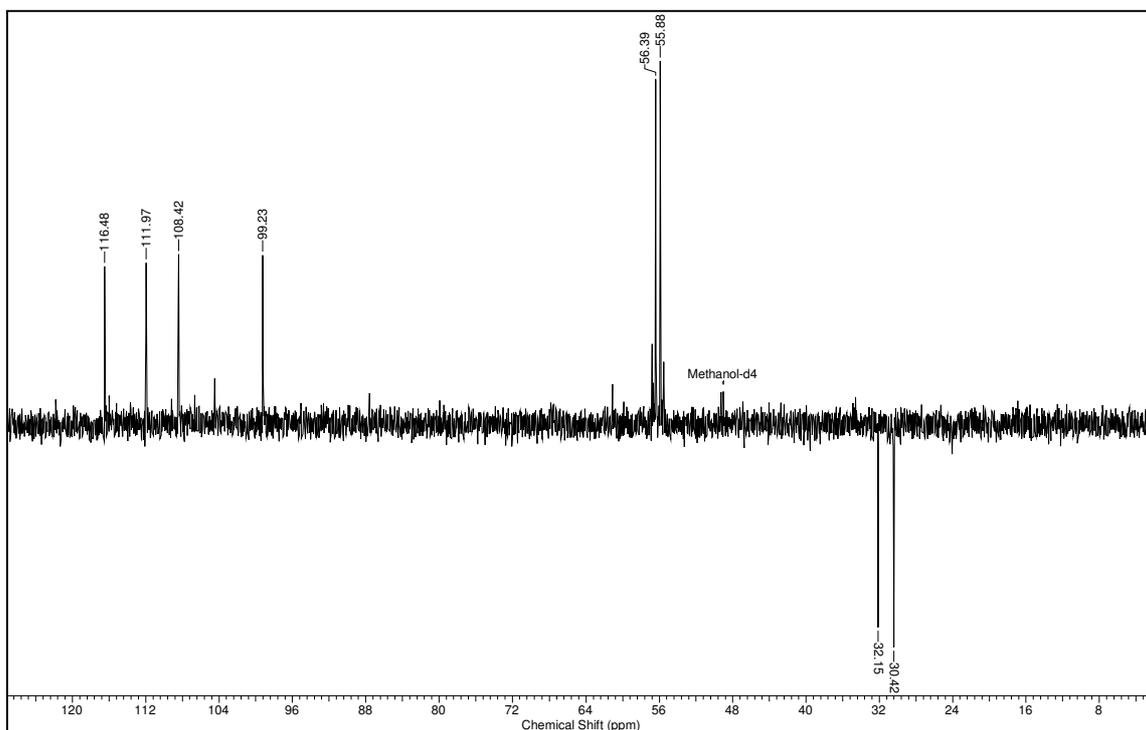
* CD_3OD 75 MHz; # CDCl_3 75 MHz [MAJUMDER, 1996], * CD_3OD 300 MHz



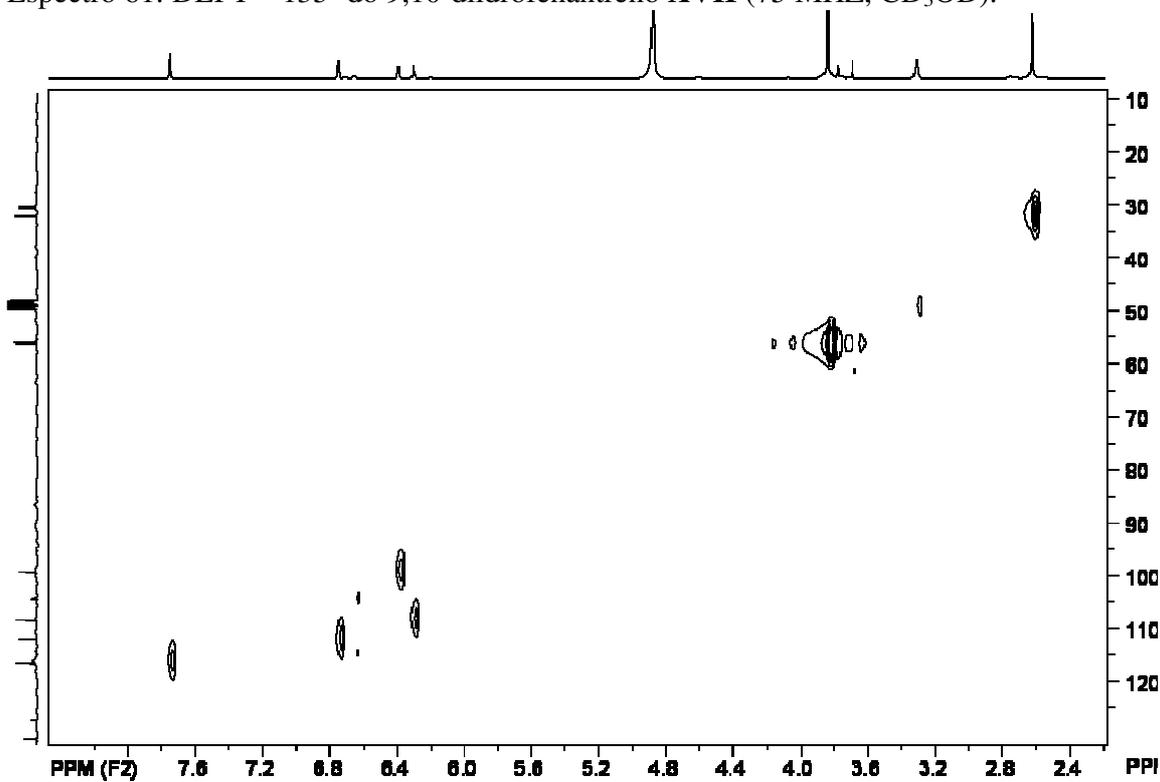
Espectro 59: RMN de ^1H do 9,10-diidrofenantreno **XVII** (300 MHz, CD_3OD).



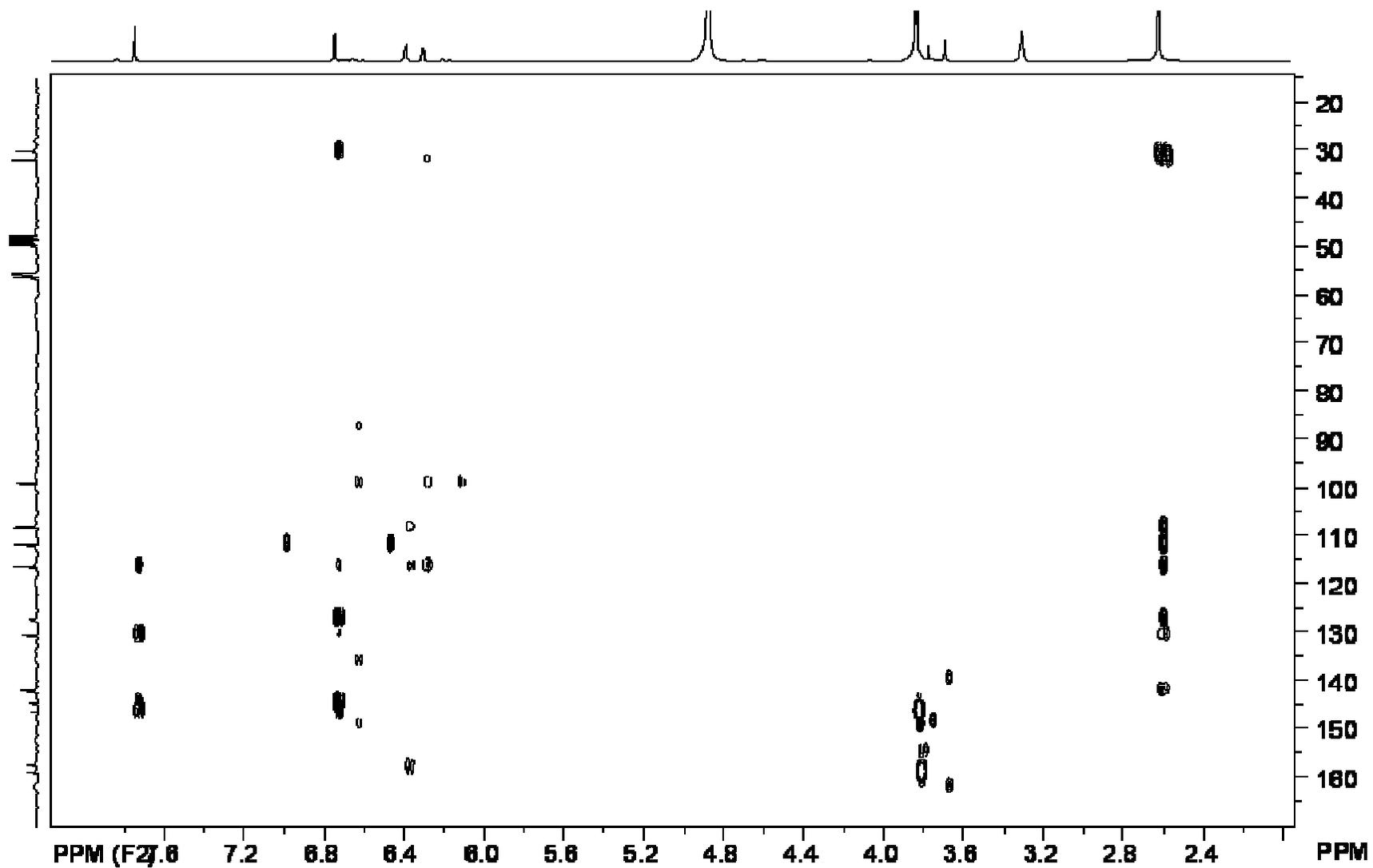
Espectro 60: RMN de ^{13}C do 9,10-diidrofenantreno **XVII** (75 MHz, CD_3OD).



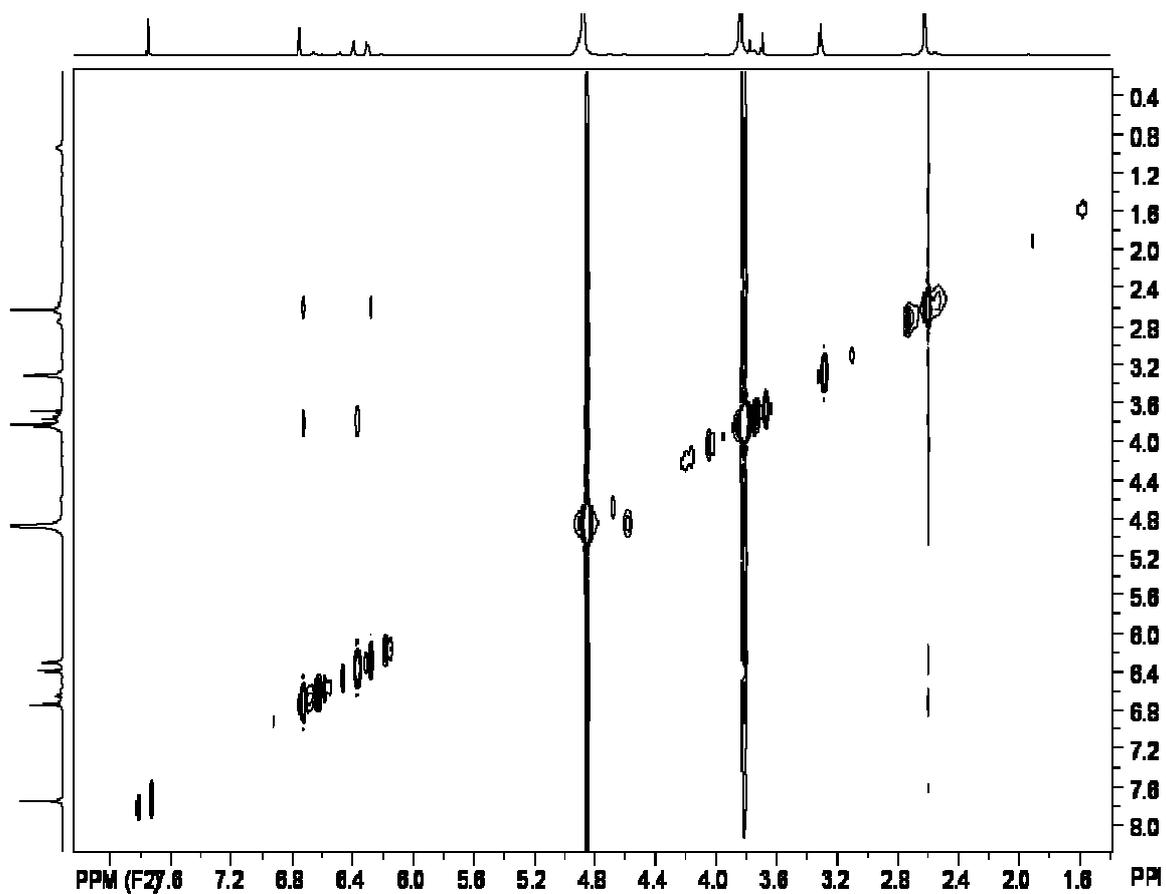
Espectro 61: DEPT – 135° do 9,10-diidrofenantreno **XVII** (75 MHz, CD₃OD).



Espectro 62: HSQC do 9,10-diidrofenantreno **XVII** (75 MHz, CD₃OD).

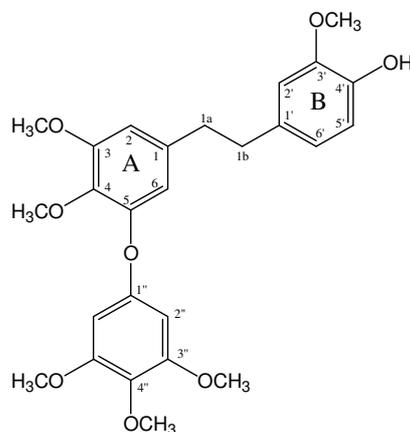


Espectro 63: HMBC do 9,10-diidrofenantreno XVII (75 MHz, CD₃OD).



Espectro 64: NOESY do 9,10-diidrofenantreno XVII (300 MHz, CD₃OD).

6.2.1.6 Identificação de 4'-hidróxi-3,3',4-trimetóxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila (XVIII)



XVIII

A substância **XVIII** foi resultado do fracionamento cromatográfico de CLDC-1 (item 5, sub-item 5.4.1.2.2, pág. 41).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 65, pág. 164) de **XVIII** revelou que se tratava também de um composto de natureza aromática e contendo uma porção alifática, pelo multipletto na região de δ 2,70 a 2,80 além de possuir seis metoxilas, em razão dos sinais a δ 3,73, δ 3,75, δ 3,77 (2 x $-\text{OCH}_3$) e 3,67.

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 66, pág. 165) mostrou 16 sinais para carbonos aromáticos (sendo 2 deles relativos a 2 carbonos cada), 2 para carbonos alifáticos e mais 6 característicos de metoxilas, sendo um deles referente a 4 metoxilas. O padrão de sinais observado nestes espectros se apresentou muito semelhante ao de um 9,10-diidrofenantreno. No entanto em função da quantidade e multiplicidade dos sinais de hidrogênios aromáticos, do número de carbonos sp^2 quaternários e metínicos seus deslocamentos químicos correspondentes, observados com auxílio do espectro de DEPT – 135° (espectro 67, pág. 166), foi possível propor que **XVIII** se tratava de um derivado bibenzílico portando um substituinte contendo um anel aromático.

Os sinais a δ 154,2; 151,2; 148,7; 145,6 e 135,8 sugeriram a presença de cinco carbonos quaternários oxigenados no esqueleto bibenzílico. Os dubletos em δ 6,26 e 6,31, observados no espectro de RMN de ^1H , e que apresentaram uma constante de acoplamento

de 3,0 Hz, típica de acoplamento *meta*, foram então atribuídos aos hidrogênios do anel A, H-2 e H-6, respectivamente, possuindo as posições C-3, C-4 e C-5 oxigenadas. Os sinais em δ 105,5 e δ 110,3 foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-6, respectivamente, pela suas correlações no espectro de HSQC (espectro 68, pág. 166) com H-2 e H-6. No espectro de HMBC (espectro 69, pág. 167) estas atribuições foram confirmadas pelas correlações de H-2 com C-6 e de H-6 com C-2. A correlação de H-2 e H-6 com o sinal em δ 135,8 indicou ser este C-4, sendo também observadas correlações entre H-6 e C-5 (δ 151,2, 2J) e o H-2 com C-3 (δ 154,2, 2J).

O conjunto de sinais entre δ 6,50 e 6,70, no espectro de RMN de 1H , era correspondente aos hidrogênios do anel B. O dubleto em δ 6,65 apresentou constante de acoplamento de 3,0 Hz (acoplamento *meta*), e foi atribuído a H-2'. O sinal em δ 6,61 se tratava de um duplo dubleto com $J= 9,0$ e 3,0 Hz e o dubleto a δ 6,70 tinha $J= 9,0$ Hz, e, portanto o primeiro foi correspondente a H-6' e o segundo correspondente a H-5'. O espectro de HMBC confirmou as atribuições e também definiu: C-1' (δ 134,7) pelas correlações com H-5' e H-2'; C-4' (δ 145,6) pelas correlações com H-5', H-2' e H-6'; e C-3' (δ 148,7) pelas correlações com H-5' e H-2'. No espectro de HSQC as correlações destes hidrogênios com seus respectivos carbonos definiram δ 113,5 como C-2', δ 122,0 como C-6' e δ 116,0 como C-5'.

As correlações observadas no espectro de HMBC dos hidrogênios H-2 e H-6 com o sinal em δ 39,4 definiram este como C-1a apresentando um acoplamento tipo 3J . Da mesma forma, H-2' e H-6' apresentaram acoplamento no espectro de HMBC com o sinal em δ 38,6 definindo-o como C-1b. Pelo espectro de HSQC o sinal em δ 2,77 se tratava de H-1b, pois se correlacionava com δ 38,6 (C-1b). O sinal em δ 2,74 era referente a H-1a pela correlação no espectro de HSQC com δ 39,4 (C-1a).

Pelo espectro de HMBC foram também estabelecidas as posições das metoxilas pelas correlações de δ 3,74 com δ 135,8 (C-4), δ 3,76 com δ 154,2 (C-3) e δ 3,77 com δ 148,7 (C-3'). Através das correlações observadas no espectro HSQC foram atribuídos os valores de deslocamento químico para os carbonos das metoxilas como segue: δ 56,3 (C-3 e C-3') e δ 61,0 (C-4). O espectro de NOESY (espectro 70, pág. 168) confirmou estas atribuições pelas correlações dos hidrogênios da metoxila OCH₃-3' com H-2' e também da OCH₃-3 com H-2.

Através destas informações, foi possível definir que **XVIII** tratava-se de um derivado bibenzílico com uma estrutura parcial apresentada abaixo (figura 26, pág. 162):

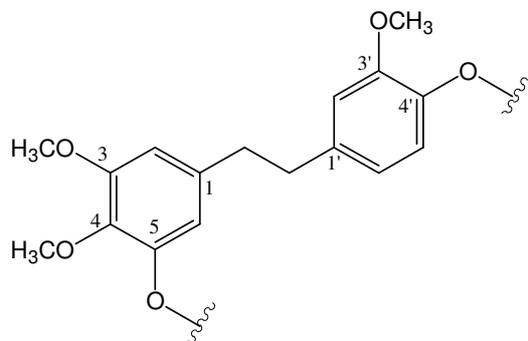


Figura 26: Estrutura parcial da bibenzila **XVIII**

O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda um singlete a δ 6,09 proporcional a dois hidrogênios e sinais para três metoxilas a δ 3,67; 3,77 (2).

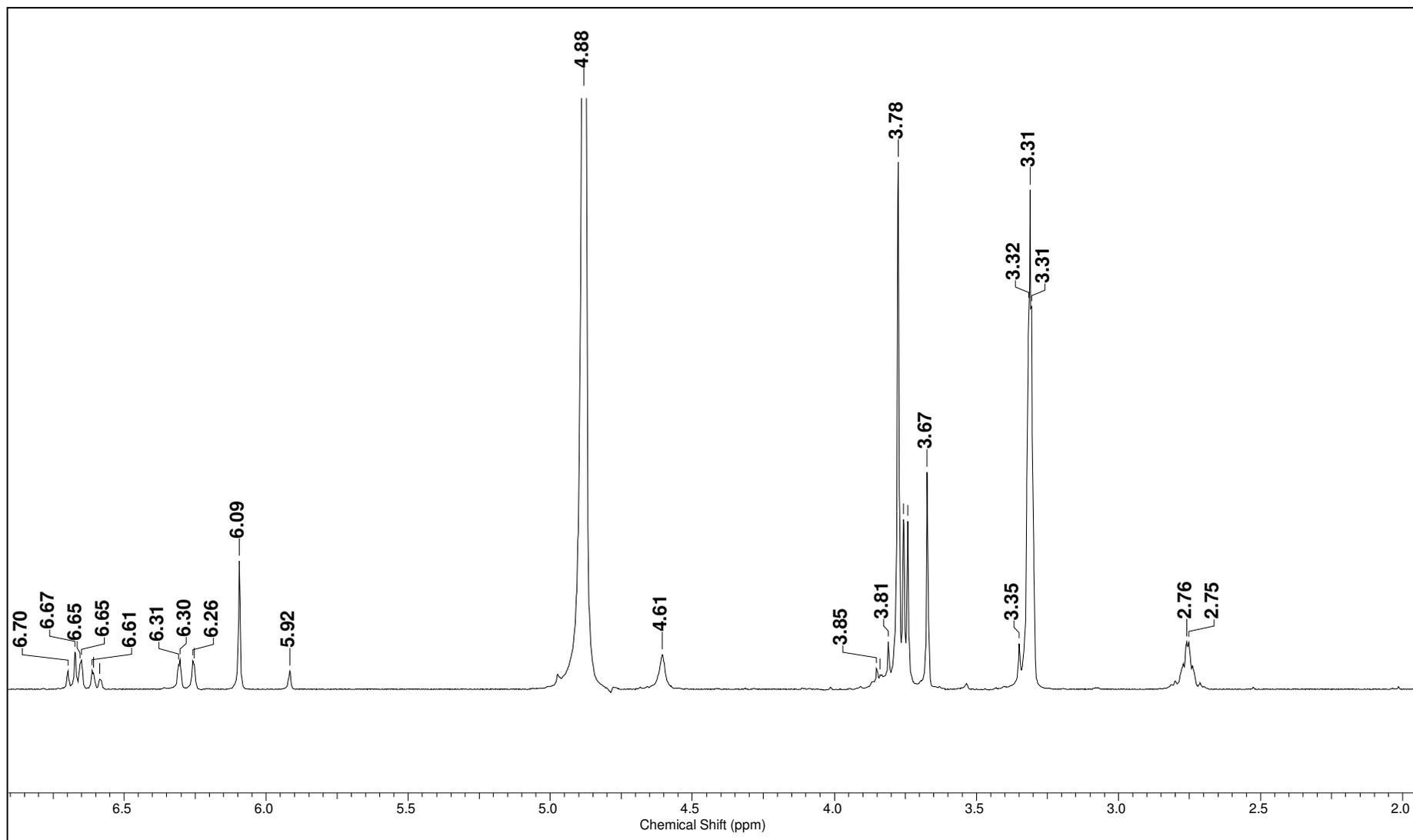
No espectro de HSQC o sinal relatado aos hidrogênios em δ 6,09 apresentaram uma correlação com o sinal a δ 94,0, enquanto que as metoxilas apresentaram com os sinais a δ 61,3; 56,3; 56,3, respectivamente. Estes dados foram compatíveis com a presença de um substituinte 3,4,5-trimetoxilafenila no oxigênio ligado a C-4' ou C-5. No espectro de RMN de ^{13}C , os demais sinais relativos aos carbonos do anel aromático foram observados a δ 155,4 (C-1''); 155,0 (C-3'', 5'') e 132,2 (C-4''). No espectro de HMBC, as correlações entre H-2'', 6'' (δ 6,09) e C-1'', C-3'', C-5'' e C-4'' confirmaram esta proposta. Os valores de deslocamento químico de C-5 (δ 151,2) e C-4' (δ 145,6) sugeriram que este substituinte estaria ligado ao oxigênio localizado em C-5 (tabela 27, pág. 163).

Assim, foi proposta para **XVIII** a estrutura correspondente a 4'-hidróxi-3,3',4-triidróxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila, substância inédita na literatura.

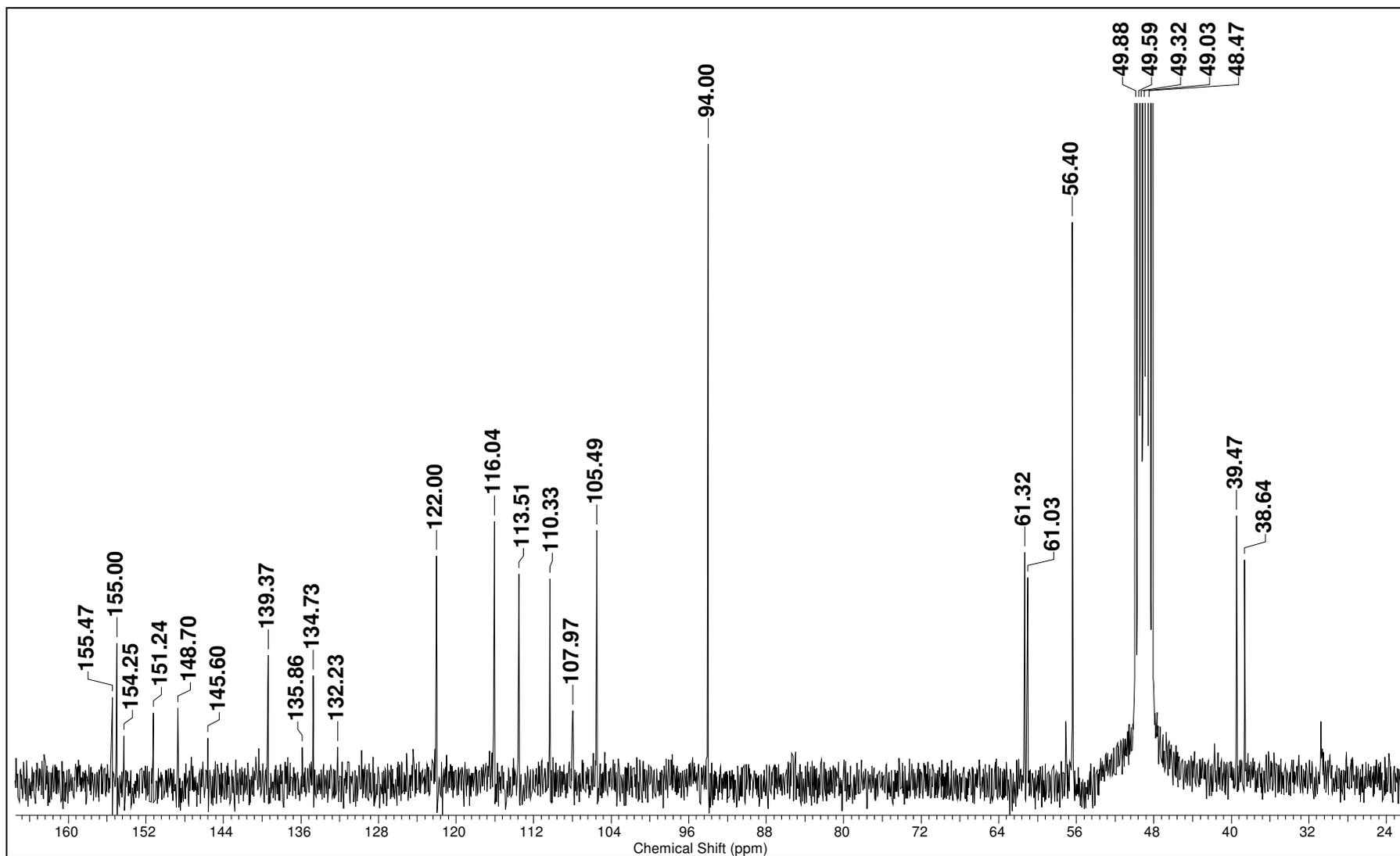
Tabela 27. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do diidroestilebeno **XVIII** obtido das raízes de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C	(XVIII) <i>C. laxum</i> * $\delta^{13}\text{C}$	(XVIII) <i>C. laxum</i> * $\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; ^nJ)
1	139,4	-	H-1a (3,74; ^2J), H-1b (2,76; ^3J)
2	105,5	6,25 (d, 3,0Hz)	H-1a (3,74; ^3J), H-6 (6,30; ^3J)
3	154,2	-	H-2 (6,25; ^2J)
4	135,8	-	H-2 (6,25; ^3J), H-6 (6,30; ^3J), H-OMe-4 (3,73; ^3J)
5	151,2	-	H-6 (6,30; ^2J), H- (7,75; ^3J), H-OMe-5 (3,75; ^3J)
6	110,3	6,30 (d, 3,0Hz)	H-2 (6,25; ^3J), H-1a (2,74; ^3J)
1a	39,4	2,74 (m)	H-1b (2,76; ^2J), H-2 (2,25; ^3J), H-6 (6,30; ^3J)
1b	38,6	2,76 (m)	H-1a (2,74; ^2J), H-2' (6,64; ^3J), H-6' (6,60; ^3J)
1'	134,7	-	H-5 (6,69; ^3J), H-2' (6,64; ^2J), H-1a (3,74; ^2J), H-1b (2,76; ^3J)
2'	113,5	6,64 (d, 2,0Hz)	H-6' (6,60; ^3J), H-1b (2,76; ^3J)
3'	148,7	-	H-2' (6,64; ^2J), H-5' (6,69; ^3J)
4'	145,6	-	H-OMe-3' (3,77; ^3J)
5'	116,0	6,69 (d, 9,0Hz)	H-2' (6,64; ^2J), H-5' (6,69; ^3J), H-6' (6,60; ^3J)
6'	122,0	6,60 (dd, 2,0Hz; 9,0Hz)	H-2' (6,64; ^3J), H-1b (2,76; ^3J)
OMe-4	61,0	3,73 (s)	-
OMe-3	56,3	3,75 (s)	-
OMe-3'	56,3	3,77 (s)	-
1''	155,4	-	H-2''/6'' (6,09 ^2J)
2'', 6''	94,0	6,09 (s)	-
3'', 5''	155,0	-	OMe-3'/5'' (3,77, ^3J), H-2''/6'' (6,09, ^2J)
4''	132,2	-	OMe-4'' (3,67, ^3J), H-2''/6'' (6,09, ^3J)
OMe-3'', 5''	56,3	3,77 (s)	-
OMe-4''	61,3	3,67 (s)	-

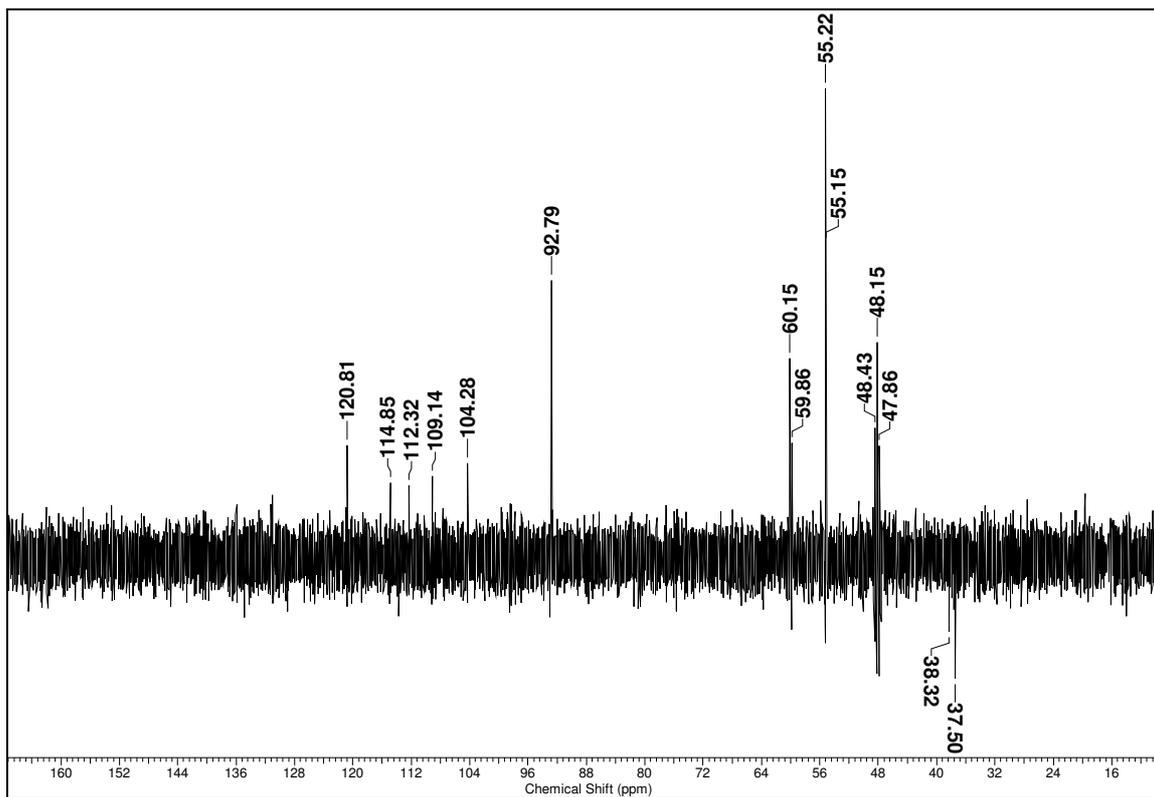
* CD₃OD 75 MHz; * CD₃OD 300 MHz



Espectro 65: RMN de ¹H da bibenzila XVIII (300 MHz, CD₃OD).

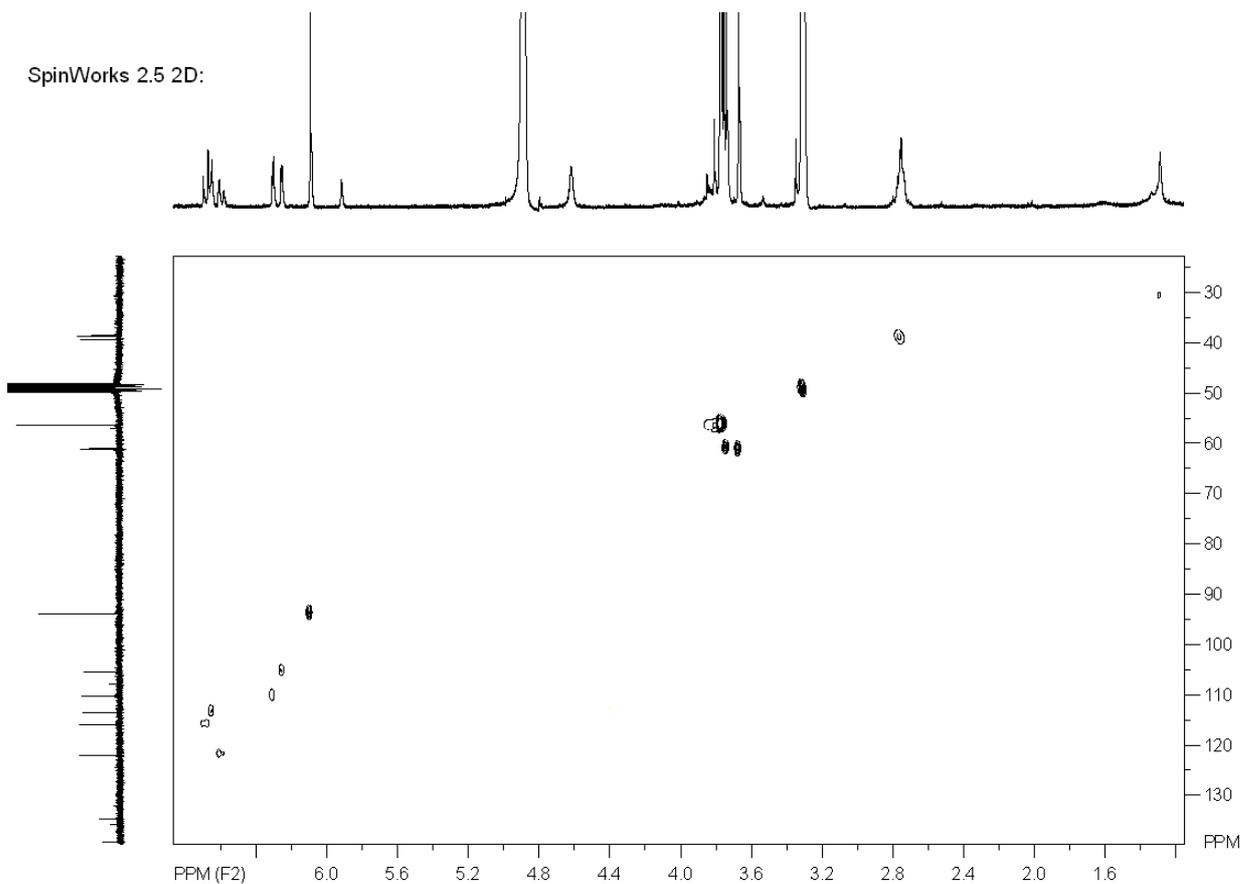


Espectro 66: RMN de ^{13}C da bibenzila **XVIII** (75 MHz, CD_3OD).



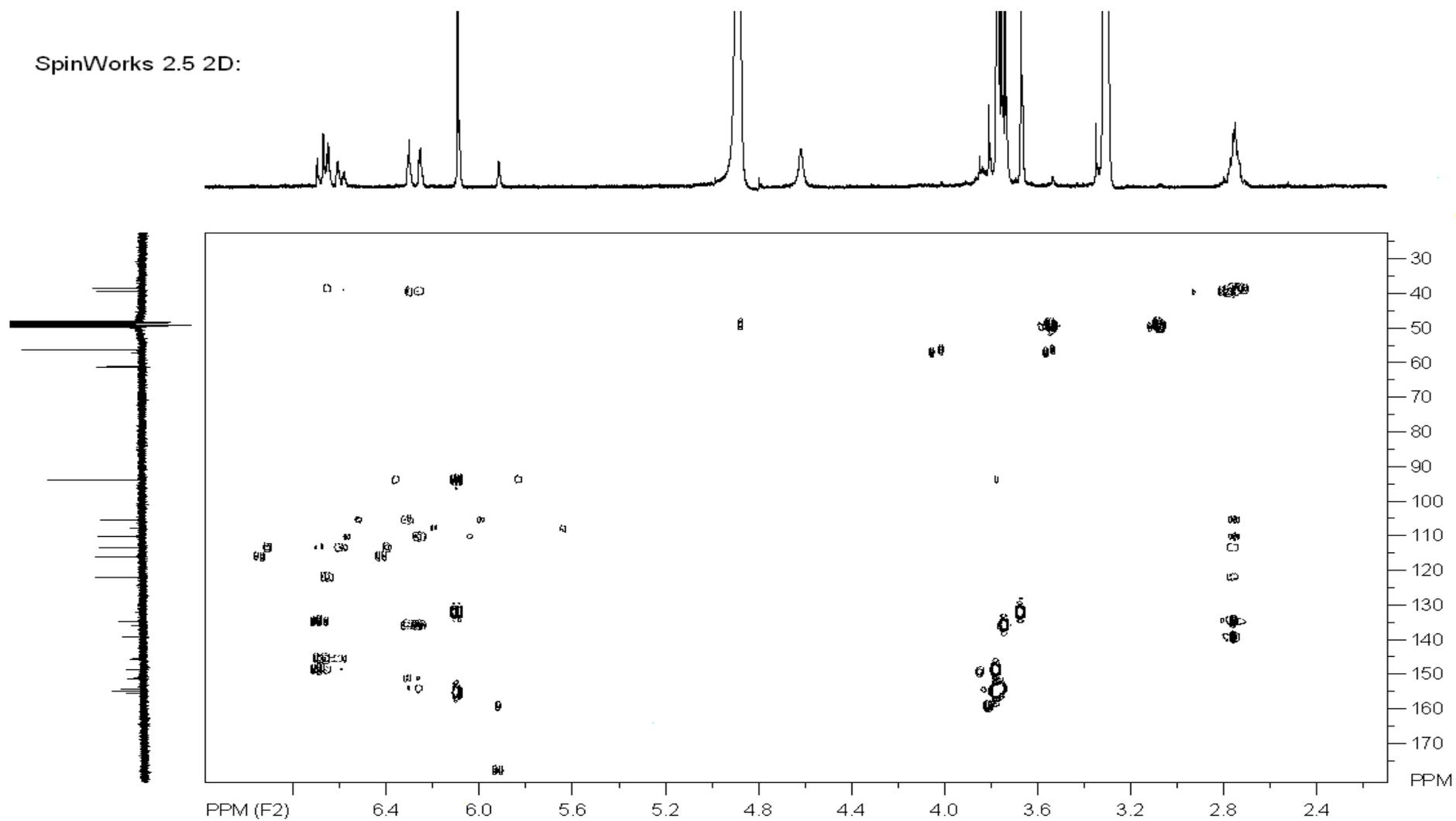
Espectro 67: DEPT – 135° da bibenzila XVIII (75 MHz, CD₃OD).

SpinWorks 2.5 2D:

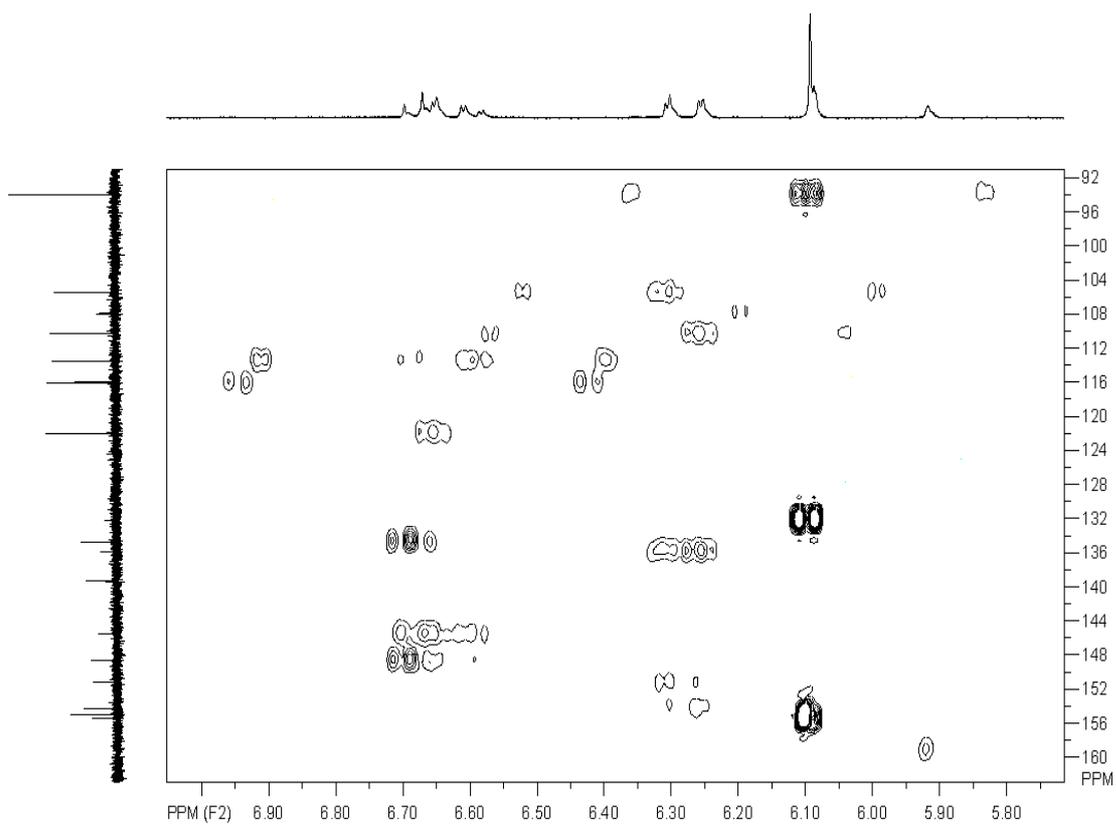


Espectro 68: HSQC da bibenzila XVIII (75 MHz, CD₃OD).

SpinWorks 2.5 2D:

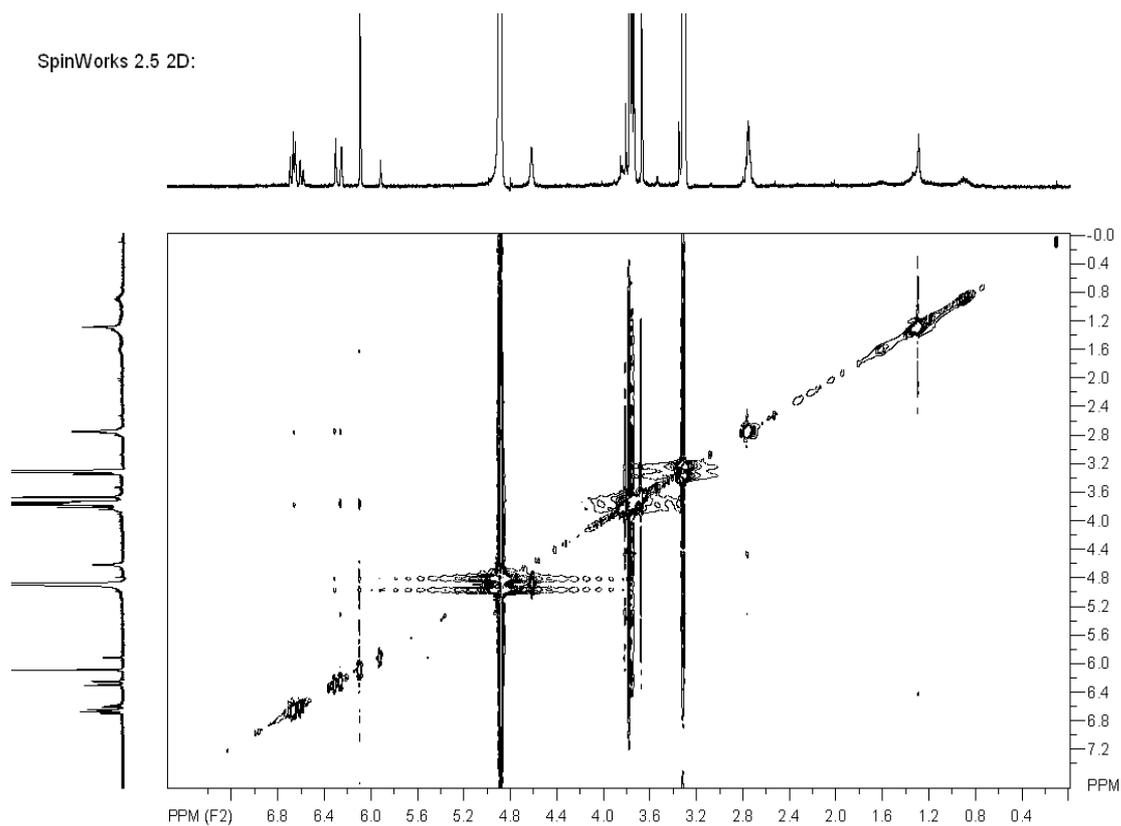


Espectro 69: HMBC da bibenzila **XVIII** (75 MHz, CD₃OD).



Ampliação do espectro 69: HMBC da bibenzila XVIII (75 MHz, CD₃OD).

SpinWorks 2.5 2D:



Espectro 69: NOESY da bibenzila XVIII (300 MHz, CD₃OD).

6.3 Lignana presente nas raízes de *Combretum laxum*

As lignanas são formadas pelo acoplamento oxidativo do álcool cinâmico e/ou ácido cinâmico. As lignanas têm atraído a atenção de pesquisadores por muitos anos, pois elas estão distribuídas na natureza e por sua extensa gama de atividades biológicas; entre elas anticâncer, hipertensivo, sedativo, antibacteriana, antifúngica, entre outras [DEWICK, 1997; AGRAWAL, 1985].

Há uma grande variedade de estruturas e de acordo com a maneira pela qual o oxigênio é incorporado ao esqueleto, quatro grupos estruturais de lignanas podem ser reconhecidos: derivados de butano (**A**), lignanolídeos ou derivados de butanolídeos (**B**), monoepoxi lignanas ou derivados de tetraidrofurano (**C**) e bisepoxilignanas ou derivados de 3,7 dioxabicyclo (3.3.0) octano (**D**) (figura 27, pág. 1170) [LEWIS, 1995].

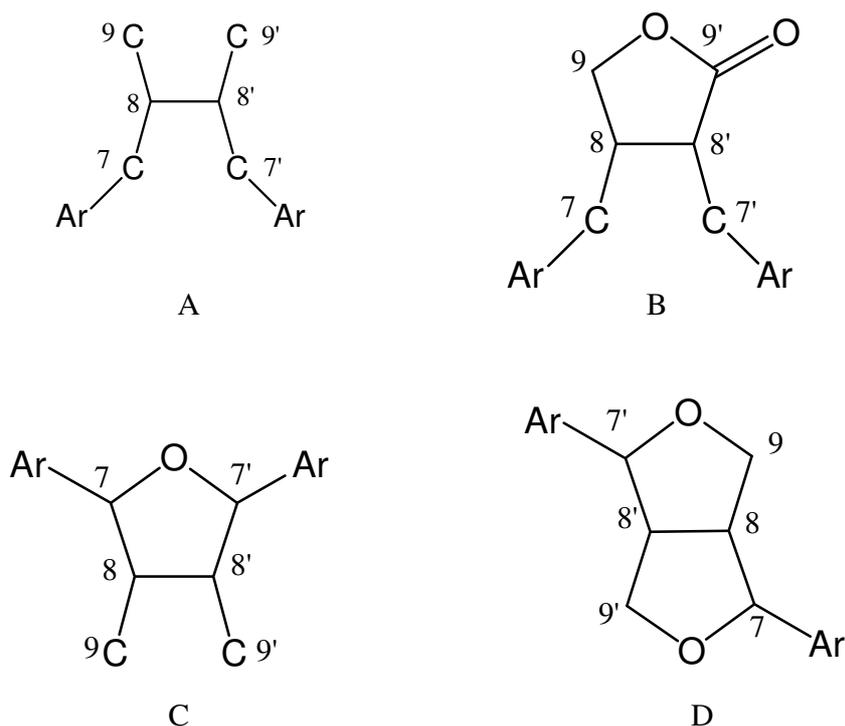
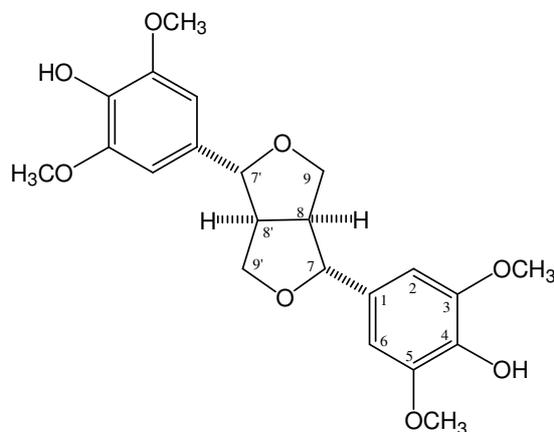


Figura 27. Esqueletos característicos de lignanas

O estudo da fase diclorometânica proveniente da partição do extrato etanólico das raízes resultou no isolamento da lignana **XIX** (siringaresinol).

6.3.1 Identificação do (+)-siringaresinol (XIX)



XIX

Da fração CLDCP-11 proveniente do fracionamento cromatográfico de CLDC-1, foi obtida a substância designada por **XIX** (sub-item 5.4.1.2.2, pág. 41). Em seu espectro de RMN de ^1H (espectro 71, pág. 175) foi observado um singlete largo em δ 6,65, bastante intenso, com integração proporcional a dois átomos de hidrogênio indicativo de hidrogênios aromáticos. O valor do deslocamento químico, associado ao desdobramento do sinal, sugeriu um anel aromático tetrassubstituído, com disposição meta dos hidrogênios, ocorrendo substituintes oxigenados dispostos de tal forma que o anel possuísse um eixo ou plano de simetria (figura 28, pág. 171). O espectro também mostrou um singlete intenso em δ 3,84, proporcional a seis hidrogênios, característico de metoxila. Além disso, foram observados sinais de baixa intensidade, todos com integração para um átomo de hidrogênio cada um. Tratavam-se de: um singlete largo em δ 3,13, dois multipletos; um em δ 3,70-3,80 outro em δ 4,18-4,24 e um dubleto em δ 4,70 ($J= 3,0$ Hz). Estes sinais sugeriam um sistema alifático na molécula.

No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 72, pág. 176) foram observados 8 sinais apenas. O sinal em δ 56,8, com um deslocamento químico característico para metoxila, foi confirmado pela correlação no HSQC (espectro 75, pág. 178) com o sinal de hidrogênio a δ 3,84. Dos sete sinais restantes quatro deles eram relativos a um anel aromático simétrico sendo dois carbonos metínicos a δ 104,5 atribuídos a C-2 e C-6, dois carbonos quaternários a δ 149,4, um carbono quaternário a δ 133,1 e um carbono quaternário δ 136,2 estando de

acordo com o observado no espectro de RMN de ^1H e com as informações fornecidas pelo espectro de DEPT – 135° (espectro 73, pág. 177), no espectro de HMBC (espectro 76, pág. 179) foi observada a correlação dos hidrogênios da metoxila com o sinal em δ 149,4 e este foi designado aos carbonos C-3 e C-5. O carbono C-1 a δ 133,1 estava ligado à porção alifática da molécula, pela correlação no HMBC com o hidrogênio em δ 4,78. Desta forma o anel aromático se apresentou como mostrado pela figura 28, pág. 172, abaixo.

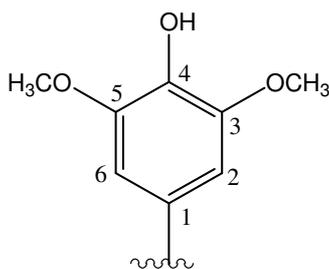


Figura 28. Estrutura parcial de **XIX**.

Estes dados em conjunto com os três sinais remanescentes no espectro de RMN ^{13}C , a δ 55,5 (CH), δ 87,6 (CH) δ 72,7 (CH₂), sugeriram que **XIX** tratava-se de uma lignana do tipo bistetraidrofurânica com substituição simétrica dos grupos arila. Estes sinais apresentaram, respectivamente, no espectro de HSQC correlações com o singlete largo a δ 3,31 (H-8, 8'), o duplete a δ 4,70 ($J= 3,0$ Hz, H- 7, 7') e com os multipletos a δ 3,70-3,80 e 4,18-4,24 (H-9a, H-9'a, H-9b, H-9'b), o que confirmou a proposta [MARTINS, 2004]

Os valores de deslocamento químico de C-7/C-7', C-8/C-8' e C-9/C-9' de lignanas do tipo 3,7-dioxabicyclo-[3.3.0]-octano são características para a definição da estereoquímica dos anéis aromáticos do sistema diidrofurânico. Segundo a literatura, no caso da orientação pseudoequatorial dos grupos arila, estes carbonos são observados respectivamente, na região de 85,3-85,9; 53,7-54,4 e 71,3-72,0, enquanto que no caso pseudoaxial eles tornam-se mais protegidos [AGRAWAL, 1985]. Uma vez que os sinais observados no espectro de **XIX** foram δ 87,6, 55,5 e 72,7, a orientação dos anéis aromáticos foi definida como pseudoequatorial.

A diferenciação entre as duas formas isoméricas **A** e **B** abaixo (figura 29, pág. 173) pode ser feita com base no valor de deslocamento químico de C-7/C-7'. No caso de lignanas pertencente à série **B**, estes carbonos são mais desprotegidos, possuindo valores de

deslocamento químico da ordem de δ 87,0 +/- 0,2 [AGRAWAL, 1985]. Estes dados levaram à proposta da estrutura A para **XIX**.

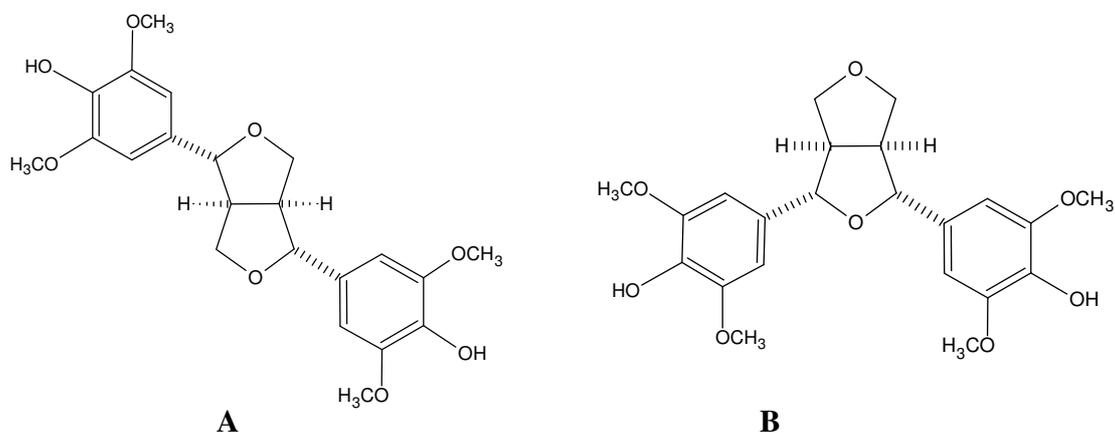


Figura 29. Formas A e B de uma lignana do tipo bistetraidrofurânica.

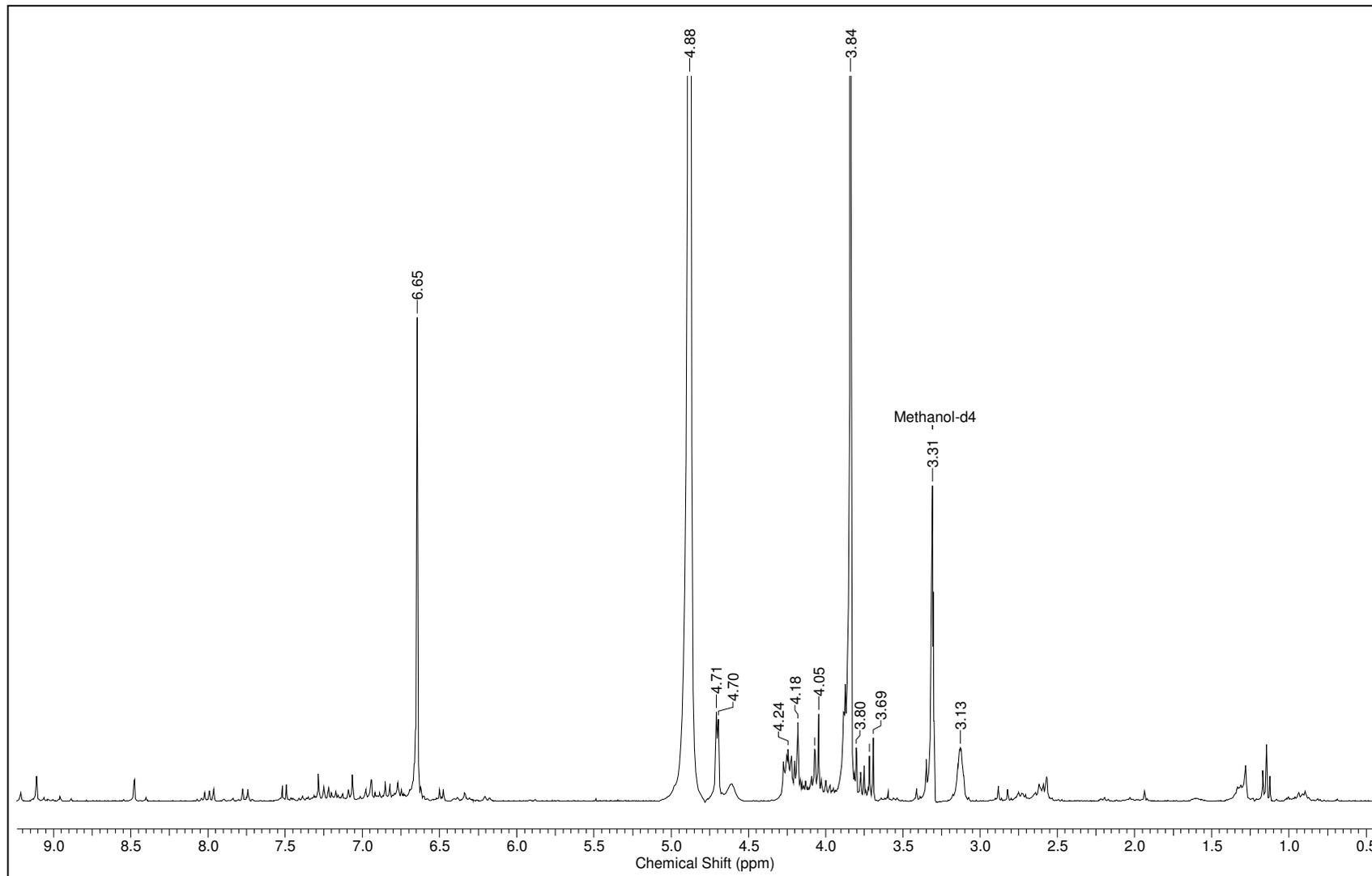
Os seus dados espectroscópicos se mostraram semelhantes aos da lignana siringaresinol existentes na literatura (tabela 28, pág. 173) [NAWWAR, 1982]. O valor positivo da rotação óptica apresentado por **XIX**, em CH_3OH e a uma concentração de $2,3 \times 10^{-3}$ mg/100mL, $[\alpha]_{20}^{20} = +11,1$, definiu a estereoquímica de **XIX** como a mostrada na figura 29-A. A literatura relata valores de $[\alpha]_{\text{D}}$ em CHCl_3 para (+)-siringaresinol que variam de $+2,4^\circ$ a $+44,0^\circ$ [RYU, 2004; WANG, 2004; PARK, 2003].

As lignanas são comuns em espécies de Lauraceae, contudo, são raros os relatos deste tipo de substâncias em Combretaceae (apenas três) sendo este o primeiro no gênero *Combretum*.

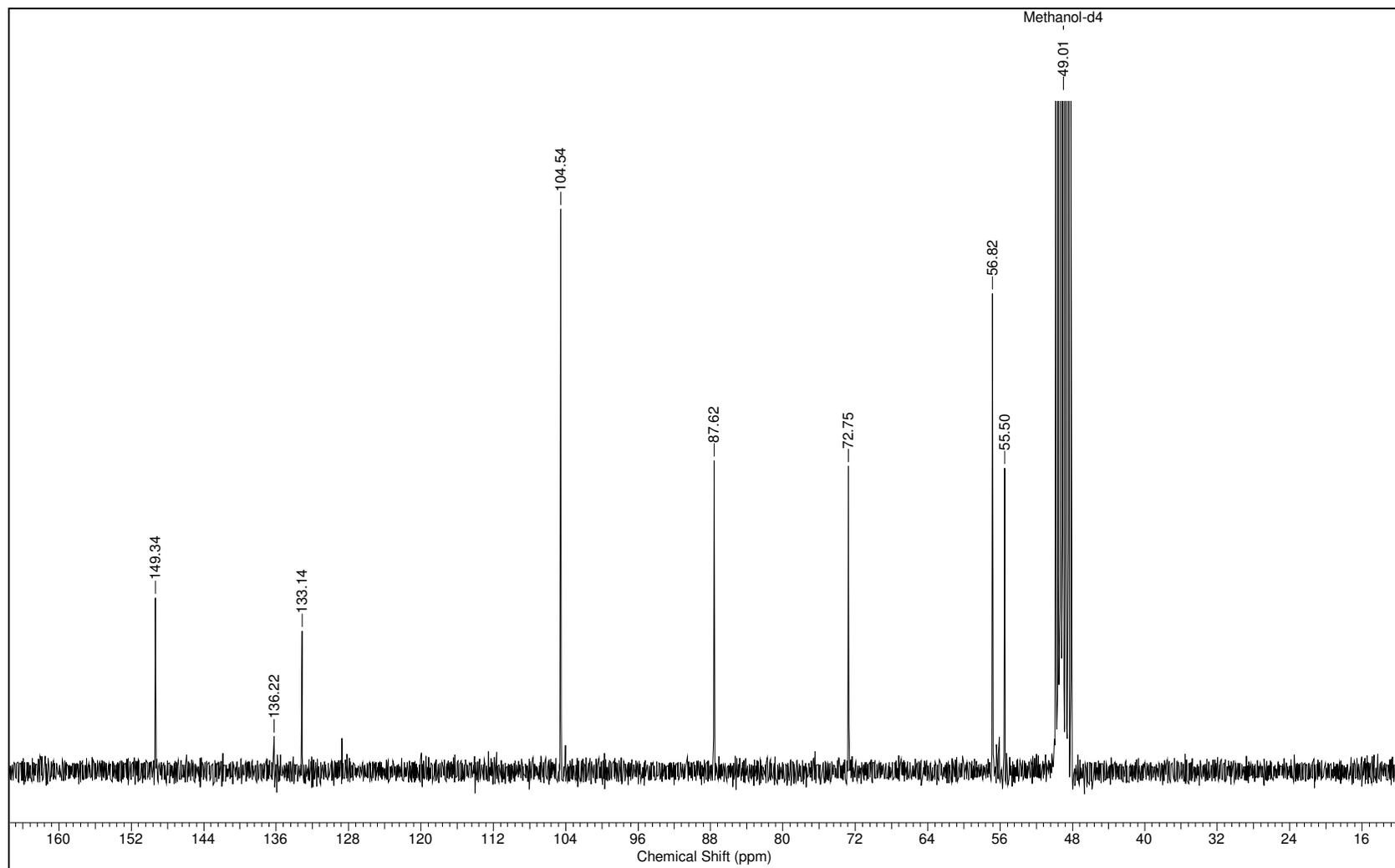
Tabela 28. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da lignana **XIX** obtido das raízes de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C	(XIX) <i>C. laxum</i>		(XIX) literatura	
	* $\delta^{13}\text{C}$	† $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$	# $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1, 1'	133,1	-	132,2	-
2, 2'	104,5	6,65 s	103,7	6,67 s
3, 3'	149,3	-	148,4	-
4, 4'	136,2	-	135,4	-
5, 5'	149,3	-	148,4	-
6, 6'	104,5	6,65 s	103,7	6,67 s
7, 7'	87,6	4,70 d (3,0)	86,6	4,80 d (4,0)
8, 8'	55,5	3,13 sl	54,5	3,14 m
9a, 9'a	72,5	3,70-3,80 m	71,7	3,64 dd (3,6 e 9,0)
9b, 9'b	-	4,18-4,24 m	-	4,34 dd (9,0; 6,9)
OMe-3, 3', 5, 5'	56,8	3,84 s	55,9	3,86 s

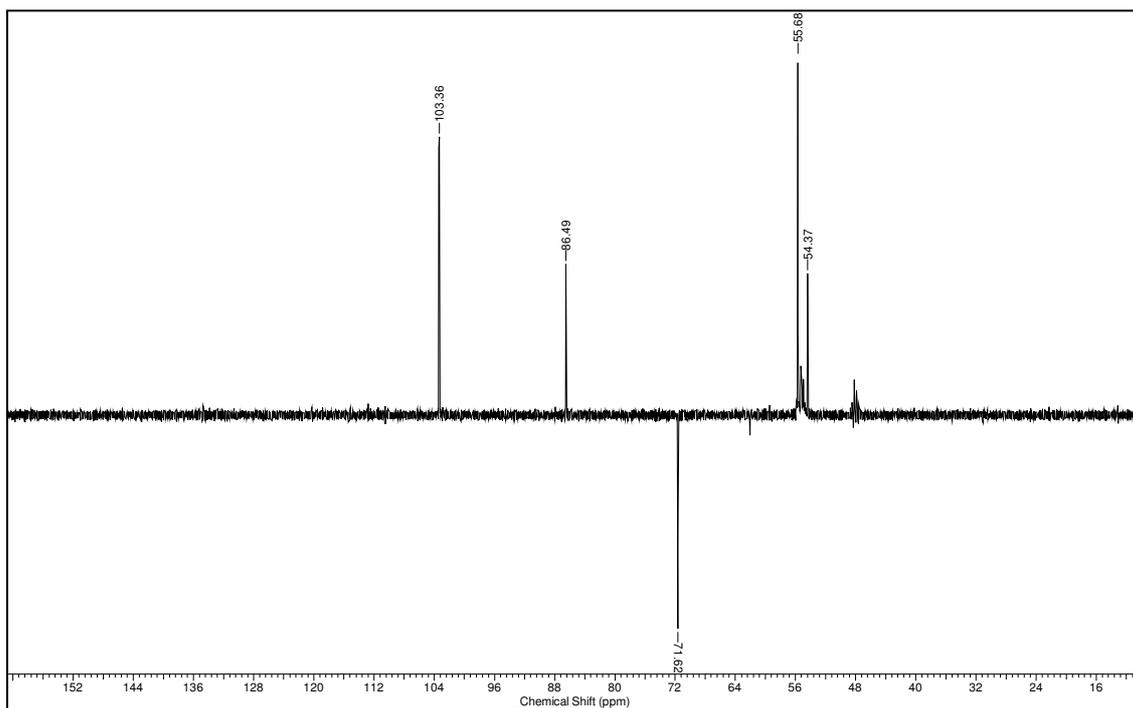
* CD_3OD 75 MHz; † CD_3OD 300 MHz # CD_3OD 75 MHz [RYU, 2004].



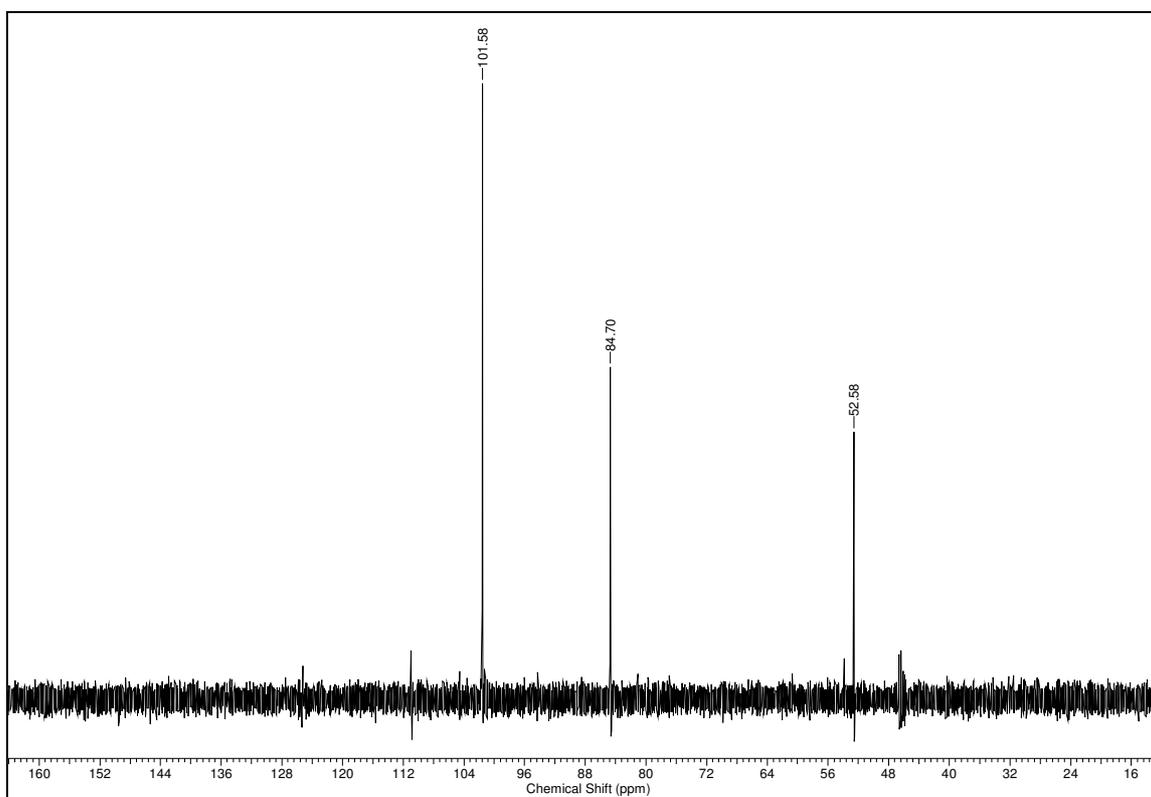
Espectro 71: RMN de ^1H da lignana **XIX** (300 MHz, CD_3OD).



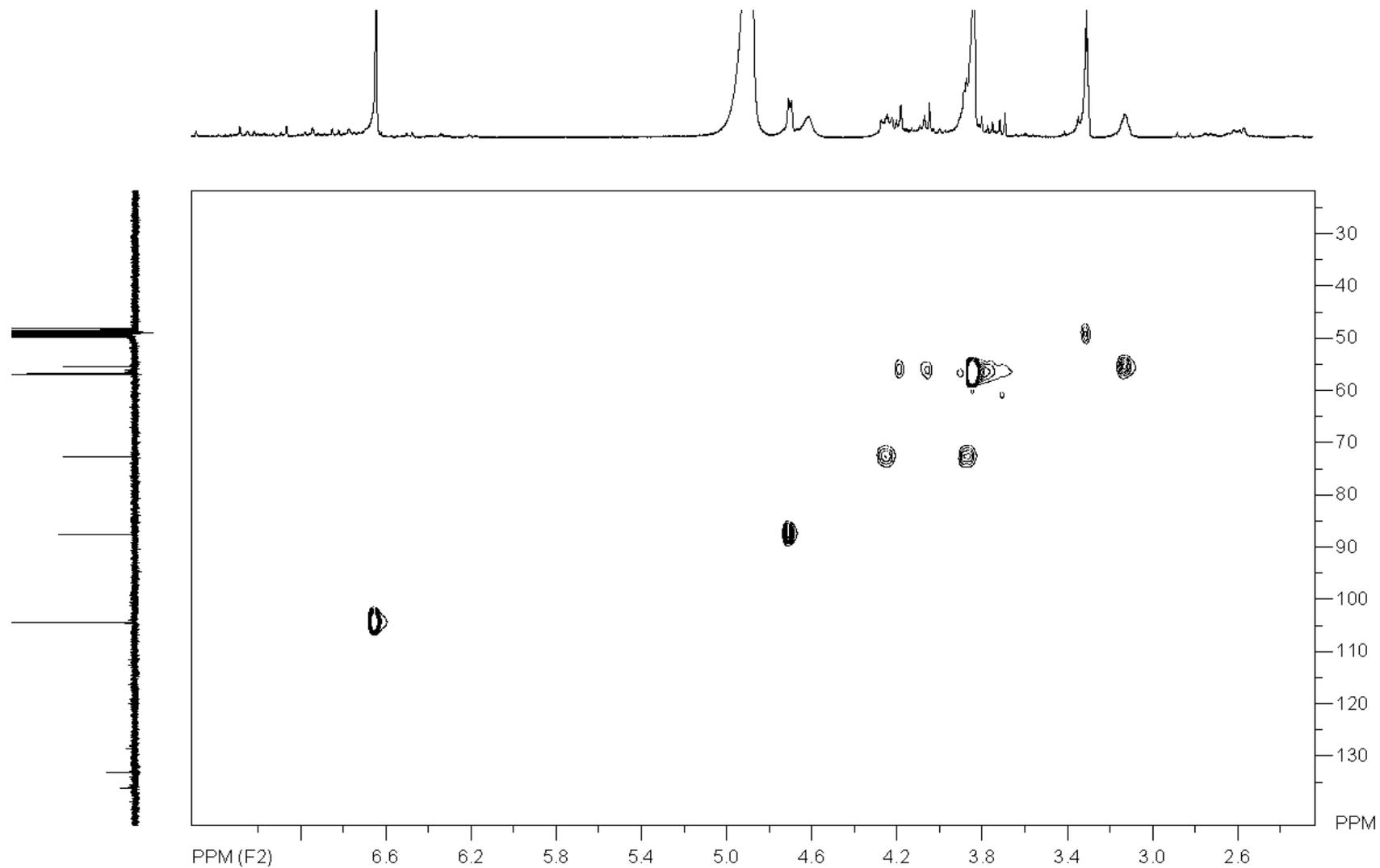
Espectro 72: RMN de ^{13}C da lignana **XIX** (75 MHz, CD_3OD).



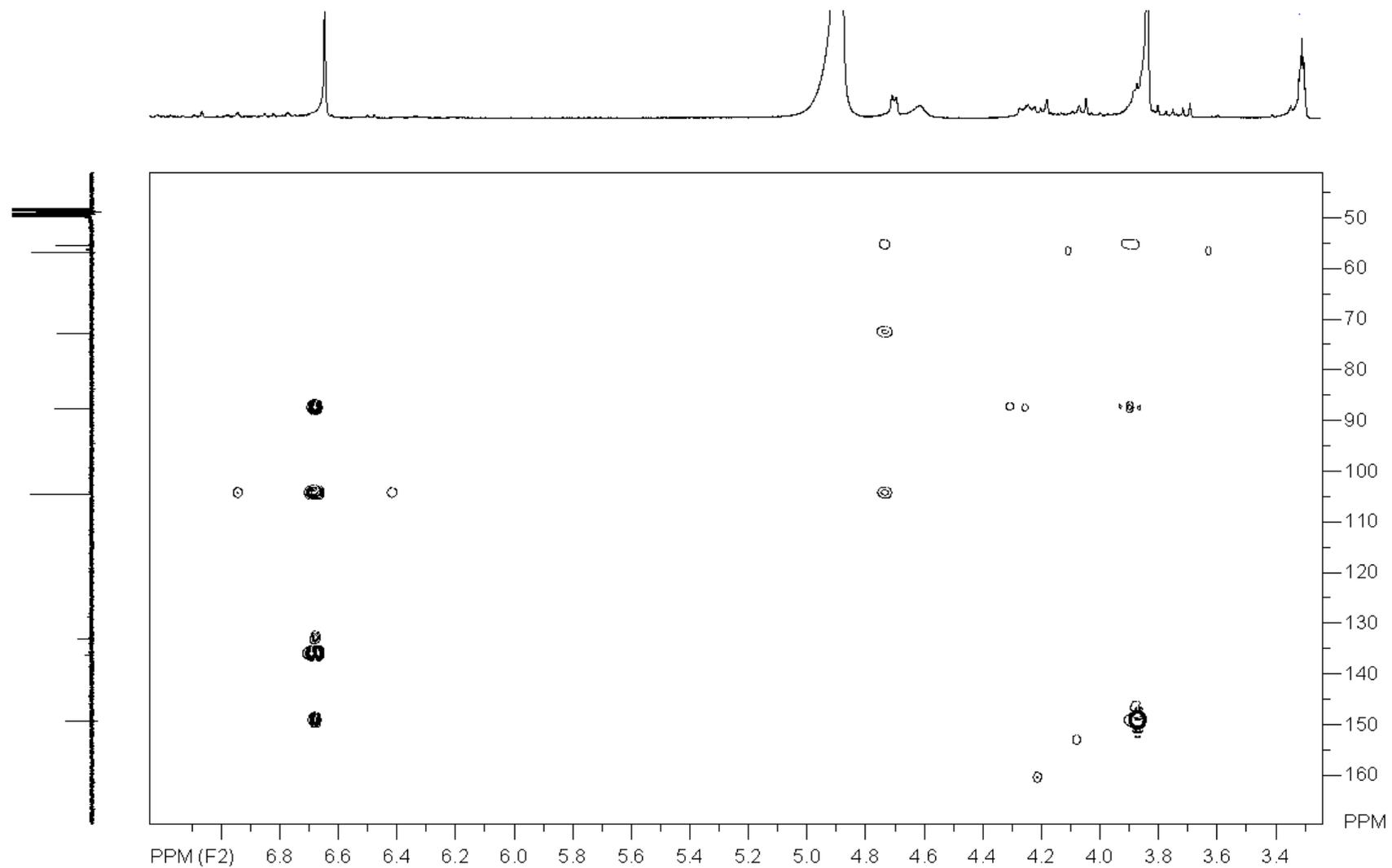
Espectro 73: DEPT – 135° da lignana **XIX** (75MHz, CD₃OD).



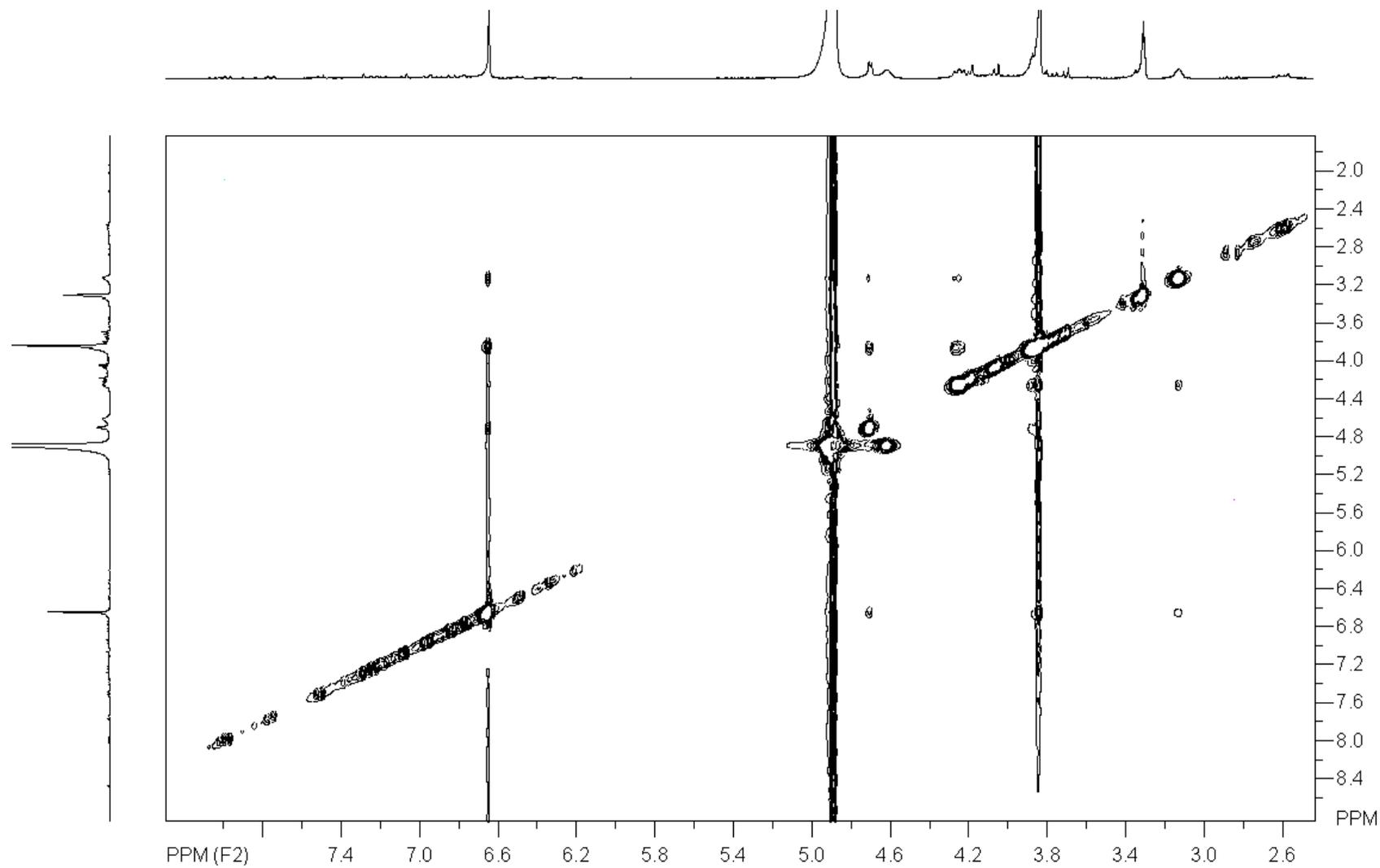
Espectro 74: DEPT – 90° da lignana **XIX** (75MHz, CD₃OD).



Espectro 75: HSQC da lignana **XIX** (75MHz, CD₃OD).



Espectro 76: HMBC da lignana **XIX** (75MHz, CD₃OD).



Espectro 77: NOESY da lignana **XIX** (300 MHz, CD₃OD).

6.4 Naftoquinona e derivados do ácido benzóico presentes nos galhos de *C. laxum*

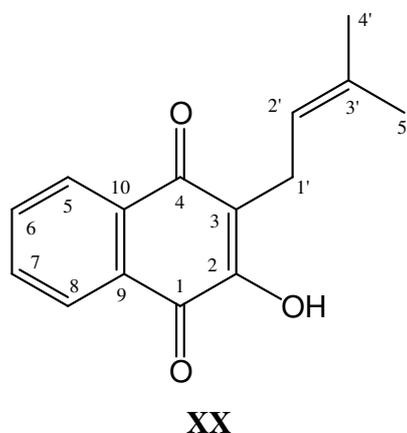
As quinonas são muitas vezes derivadas da oxidação de compostos fenólicos, dando origem às *orto* e *para*-quinonas. As quinonas de ocorrência na natureza podem ser formadas de sistemas fenólicos gerados pela rota do acetato ou pela rota do chiquimato [DEWICK, 2002].

Uma gama de derivados de quinona é relatada contendo um fragmento terpênico ou uma porção de derivado do chiquimato. Muitos destes compostos têm importantes funções bioquímicas nos sistemas de transporte de elétrons para a respiração ou fotossíntese [DEWICK, 2002].

Os ácidos hidroxibenzóicos simples (compostos C₆C₁) podem ser formados diretamente a partir de intermediários da rota do chiquimato, mas rotas alternativas existem como, por exemplo, quando derivados do ácido cinâmico (compostos C₆C₃) são clivados na ligação dupla e perdem dois carbonos da cadeia lateral [DEWICK, 2002]. Estes compostos podem sofrer hidroxilação em qualquer uma das posições do anel aromático dando origem a alguns tipos de diferentes de ácidos hidroxibenzóicos.

Da fase diclorometânica proveniente da partição do extrato etanólico dos galhos foram obtidos uma naftoquinona (lapachol, **XX**) e dois derivados do ácido benzóico (ácido-3,4-dimetoxibenzóico (**XXI**) e ácido-3-hidróxi-4-metoxibenzóico (**XXII**)).

6.4.1 Identificação do lapachol (XX)



No espectro de RMN de ^1H (espectro 78, pág. 185) de **XX**, o composto majoritário isolado da fração CLG-4 (sub-item 5.3.1, pág. 32), foram observados 2 singletos; um em δ 1,67 e outro em δ 1,77, ambos com integração para 3 átomos de hidrogênio cada, sugestivos para a existência de 2 metilas na sua estrutura. Estes sinais aliados ao dubleto a δ 3,29 ($J= 6,0$ Hz) e ao tripleto largo a δ 5,19 ($J= 6,0$ Hz), com integração para 2 e 1 hidrogênios respectivamente, foram sugestivos da presença de um grupo prenila. Ainda foi possível observar dois conjuntos de sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ 7,63 – 7,75 e δ 8,04 – 8,12, caracterizados como: dois dubletos a δ 8,10 e 8,05 ($J= 6,0$ Hz) e dois tripletos de dubletos a δ 7,73 e 7,66 ($J= 7,0$ e 1,5 Hz) indicativos de um anel aromático *orto*-dissubstituído.

O grupo prenila foi confirmado pelos sinais no espectro de RMN de ^{13}C (espectro 79, pág. 187), correspondentes a duas metilas a δ 25,7 e 17,7 (C-4' e C-5', respectivamente), um carbono metilênico (C1') a δ 22,6 e ainda os sinais de carbonos olefínicos em δ 133,8 (C-3') e 119,6 (C-2'). O sinal a δ 133,8 exibiu no HMBC (espectro 81, pág. 190) correlação com os sinais dos hidrogênios das metilas (2J) e com o sinal de H-1' (3J), confirmando assim a atribuição do carbono olefínico C-3'.

Os dez sinais restantes na região de δ 120,0 – 185,0 correspondentes a cinco carbonos metínicos e cinco carbonos quaternários foram compatíveis com a presença de dois anéis de seis membros unidos tais como um naftaleno (figura 30, pág. 183). Os valores de δ 181,7 e 184,5 relativos a dois destes carbonos quaternários, característicos de carbonila conjugada, indicaram que **XX** seria um derivado de 1,4-naftoquinona (figura 30, pág. 183).

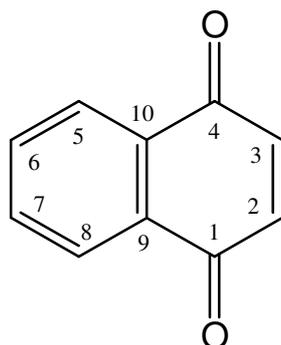


Figura 30. Estrutura parcial de **XX**

A localização do grupo prenila em C-3 foi definida pela correlação do sinal a δ 123,5 (C) no espectro HMBC com o dos hidrogênios H-1' (2J). Este mesmo hidrogênio apresentou também correlação com o carbono quaternário a δ 152,7 que foi atribuído a C-2, cujo valor de deslocamento químico indicou que se tratava de um carbono oxigenado. Os carbonos quaternários a δ 133,0 e 129,5 foram atribuídos a C-10 e C-9, respectivamente, de junções de anéis.

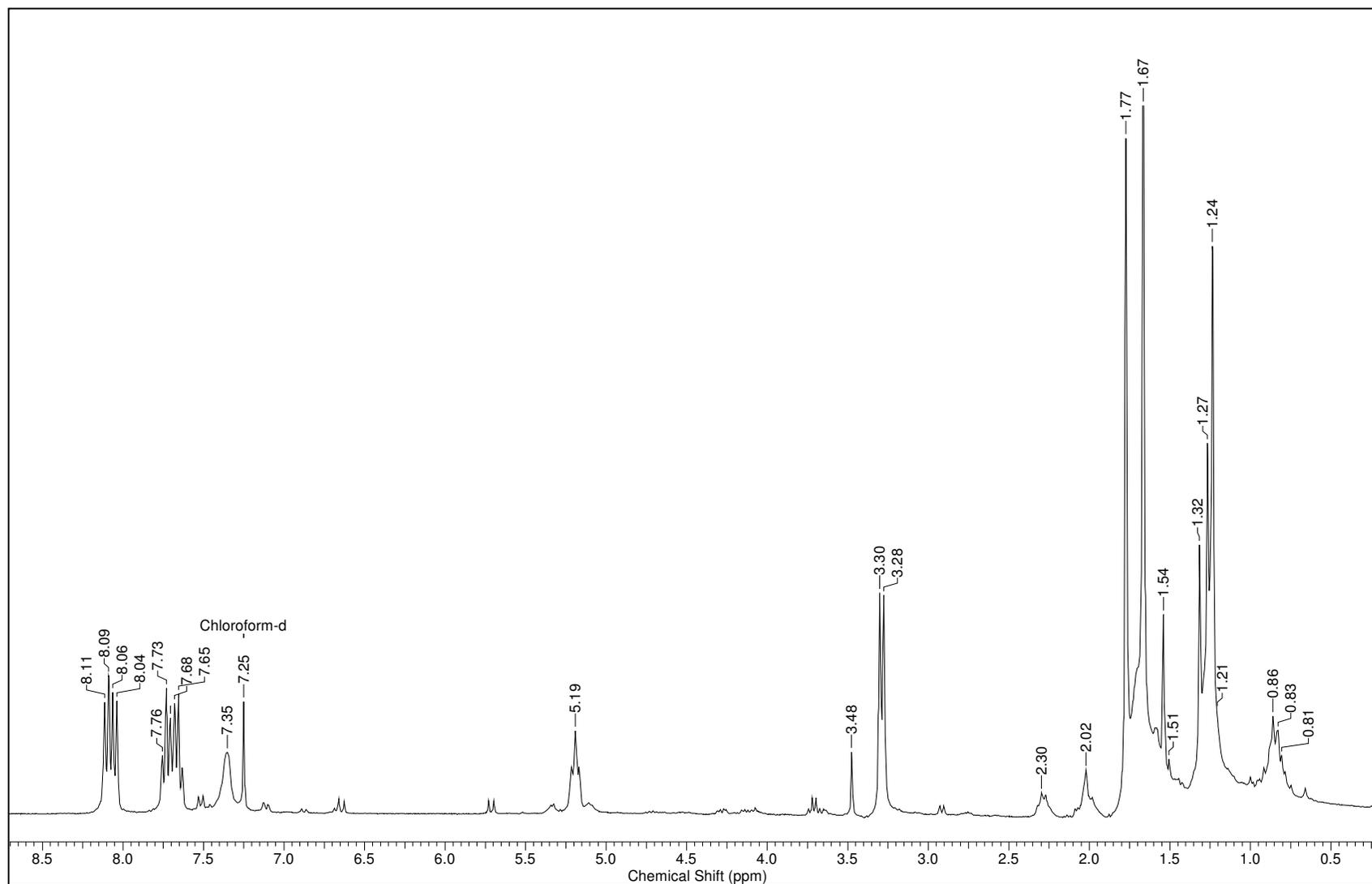
No espectro de RMN de ^1H os dois triplo dubletos em δ 7,66 e 7,73 ($J= 7,0$ Hz; 1,5Hz) foram atribuídos a H-7 e H-6 respectivamente, os quais foram correlacionados com os respectivos carbonos a δ 132,8 e 134,8 no espectro HSQC (espectro 80, pág. 189). Ainda neste espectro foram observadas as correlações de H-5 (δ 8,10, d, $J= 6,0$ Hz) com o sinal δ 126,8 e de H-8 (δ 8,05, d, $J= 6,0$ Hz) com o sinal δ 126,0. No espectro HMBC, as correlações entre a carbonila a δ 184,5 e os hidrogênios H-1' e H-5 e entre a carbonila a δ 181,7 e H-8 confirmaram as atribuições de C-4 e C-1, respectivamente.

Desta forma, **XX** foi caracterizada como 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, já descrita anteriormente na literatura e também chamada de lapachol, em espécies de *Tabebuia* (Bignoniaceae) [PARK, 2006] sendo esta a primeira ocorrência desta substância, bem como desta classe de substância, na família Combretaceae. Os dados espectrais de **XX** apresentaram uma boa correlação com os disponíveis na literatura (tabela 29, pág. 183).

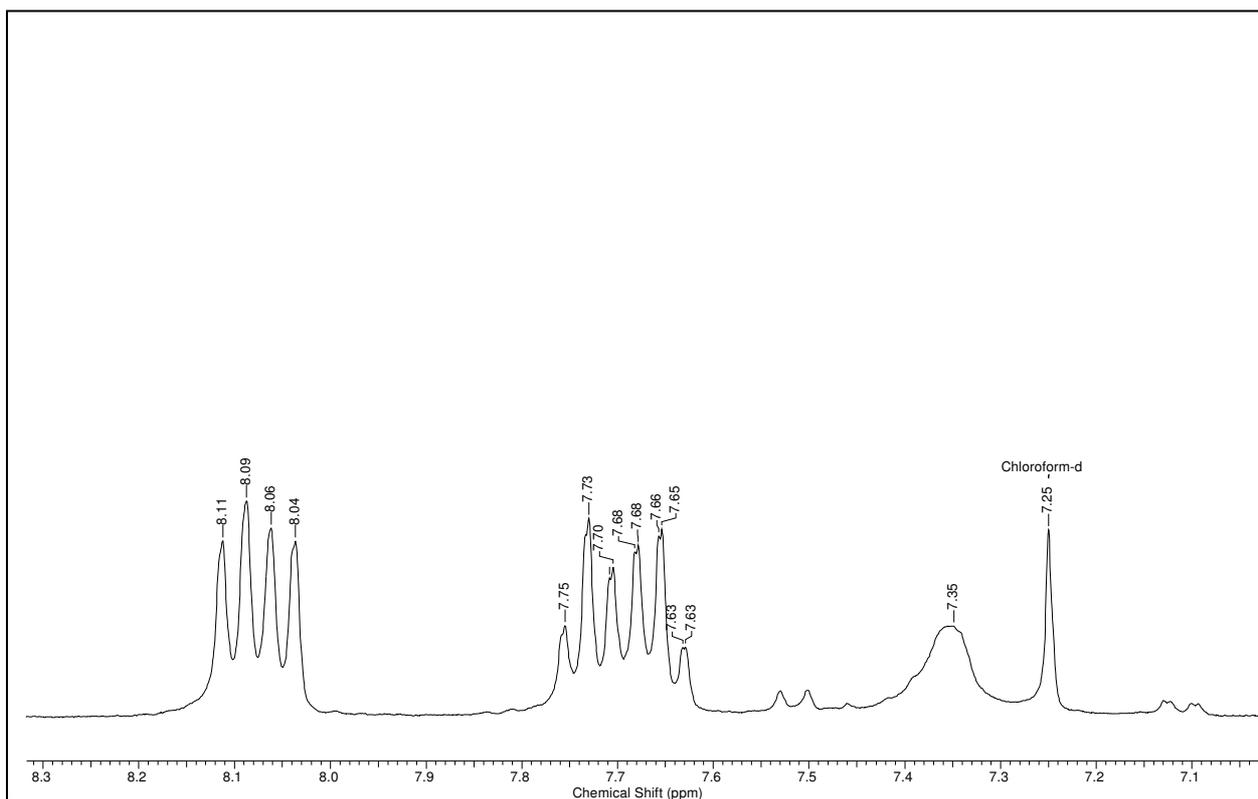
Tabela 29. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da naftoquinona **XX** obtido das raízes de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C/H	(XX) <i>C. laxum</i>		(XX) Literatura		Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; nJ)
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$	# $\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	
1	181,7	-	181,7	-	H-8 (8,05 3J)
2	152,7	-	152,7	-	H-1' (3,24 3J)
3	123,5	-	123,5	-	H-1' (3,24 3J)
4	184,5	-	184,5	-	H-1' (3,24 3J), H-5 (8,10 2J)
5	126,8	8,10 dl (6,0)	126,8	8,12 m	H-6 (7,73 2J), H-7 (7,66 3J)
6	134,8	7,73 td (7,0; 1,5)	134,8	7,74 m	H-5 (8,10 2J), H-7 (7,66 2J)
7	132,8	7,66 td (7,0; 1,5)	132,8	7,66 m	H-6 (7,73 2J), H-5 (8,10 3J), H-8 (8,05 2J)
8	126,0	8,05 dl (6,0)	126,1	8,06m	H-6 (7,73 2J), H-7 (7,66 2J)
9	129,4	-	129,5	-	H-7 (7,66 3J), H-8 (8,05 2J)
10	132,9	-	133,0	-	H-5 (8,10 2J), H-6 (7,73 2J)
1'	22,6	3,29 d (6,0)	22,6	3,31 d (7,2)	H-2' (5,19 2J)
2'	119,6	5,19 tl (6,0)	119,7	5,21 m	H-1' (3,29 2J)
3'	133,8	-	133,8	-	H-4' (1,67 2J), H-5' (1,67 2J)
4'	25,7	1,67 s	17,9	1,68 s	H-1' (3,29 3J)
5'	17,9	1,77 s	25,7	1,79 s	H-2' (5,19 3J)

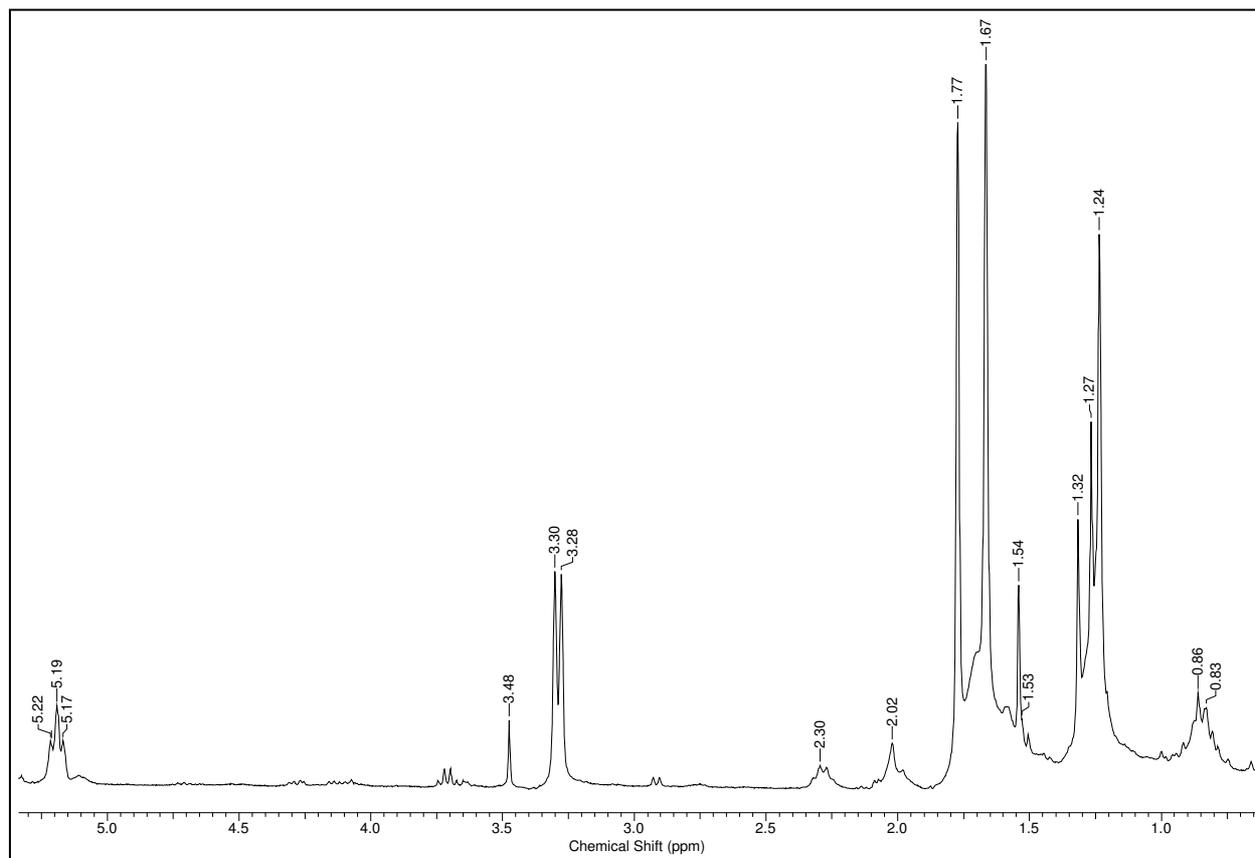
*CDCl₃ 300 MHz, *CDCl₃ 75 MHz; # CDCl₃ 400 e 100 MHz [PARK, 2006]



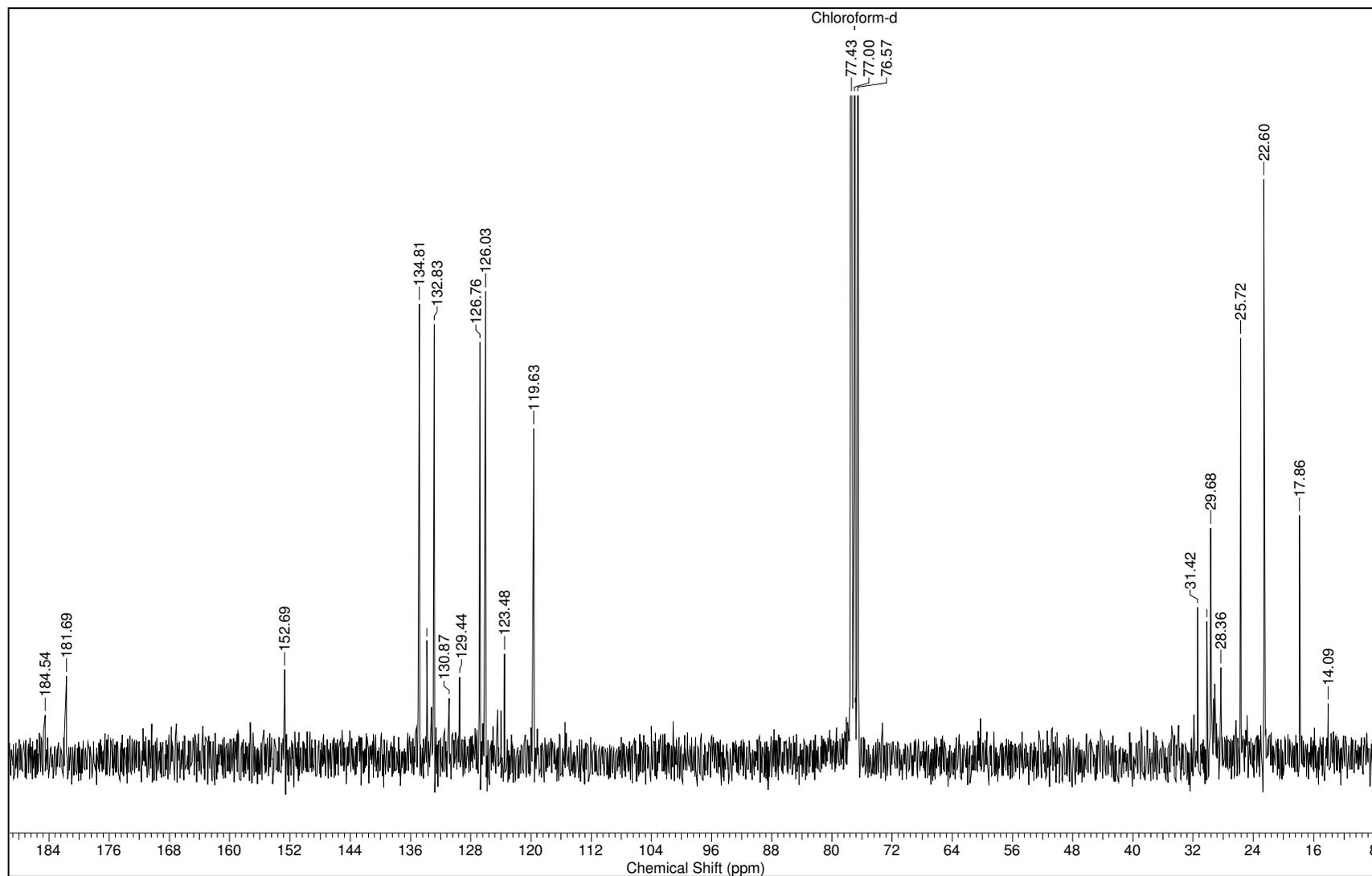
Espectro 78: RMN de ^1H da naftoquinona **XX** (300 MHz, CDCl_3).



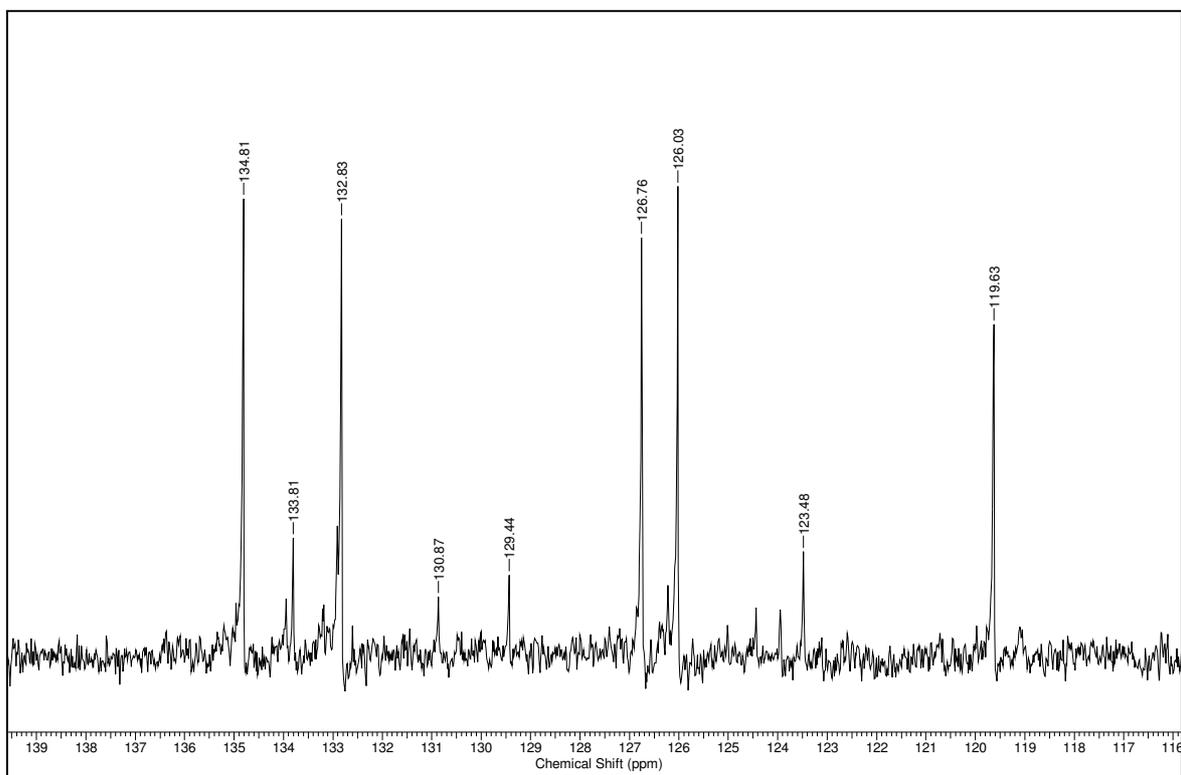
Ampliação do espectro 78: RMN de ^1H da naftoquinona **XX** (300 MHz, CDCl_3).



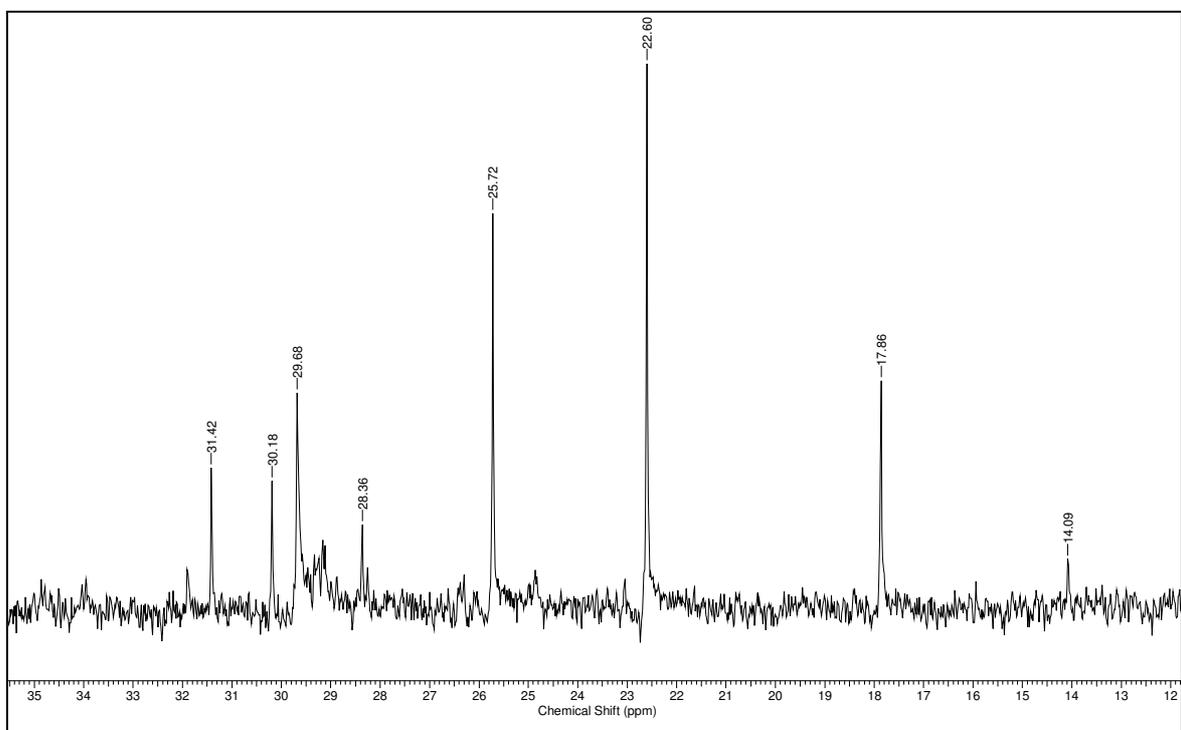
Ampliação do espectro 78: RMN de ^1H da naftoquinona **XX** (300 MHz, CDCl_3).



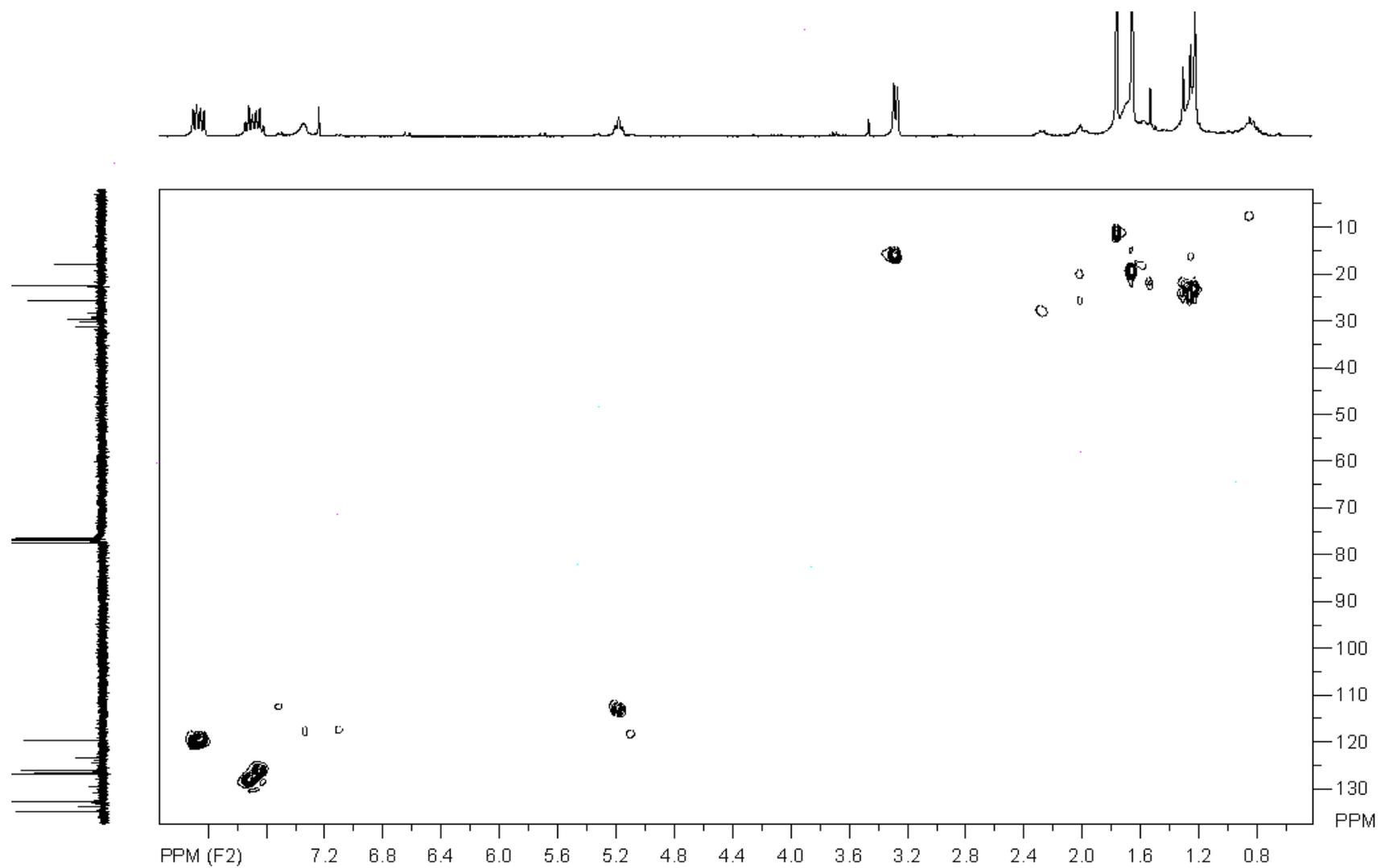
Espectro 79: RMN de ^{13}C da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl_3).



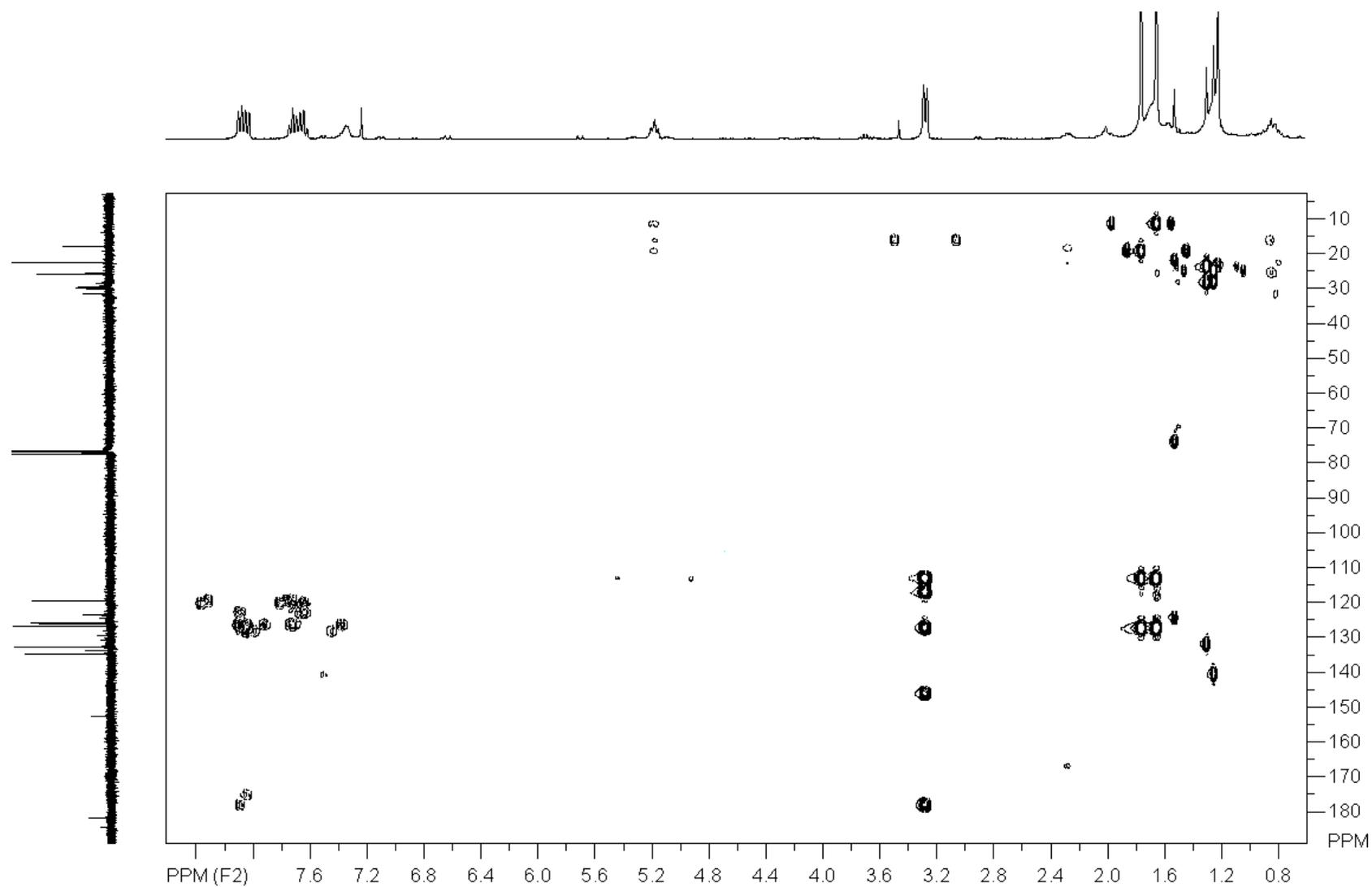
Ampliação do espectro 79: RMN de ^{13}C da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl_3).



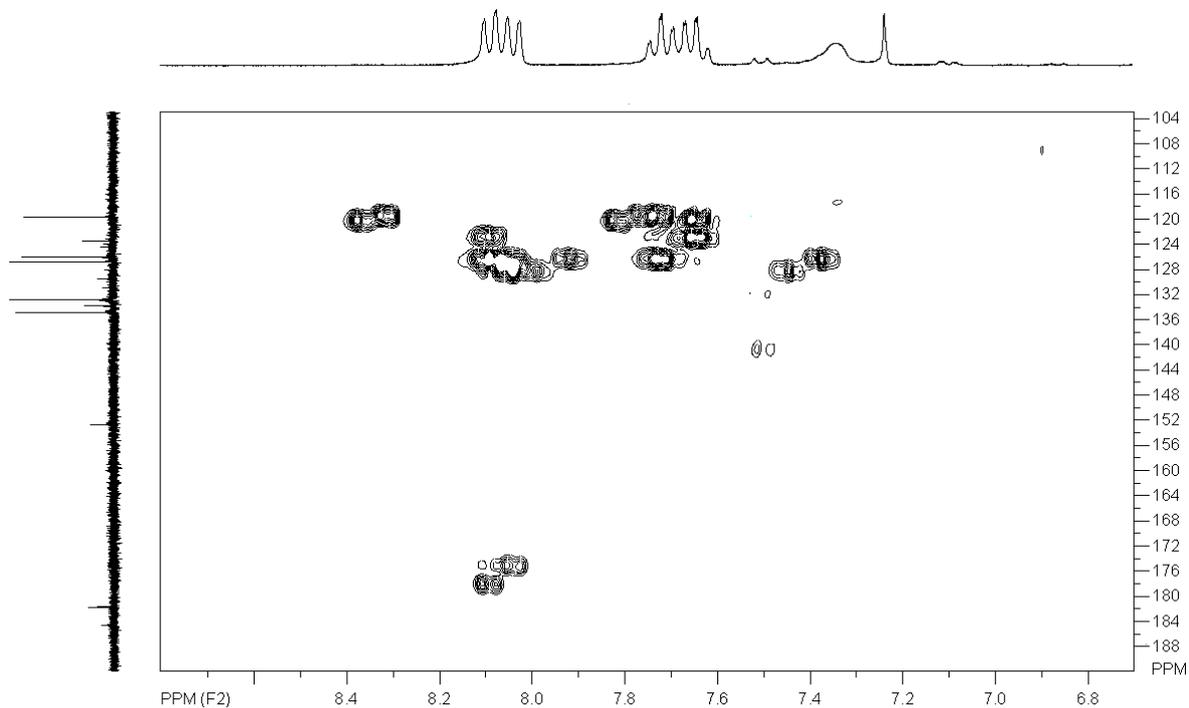
Ampliação do espectro 79: RMN de ^{13}C da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl_3).



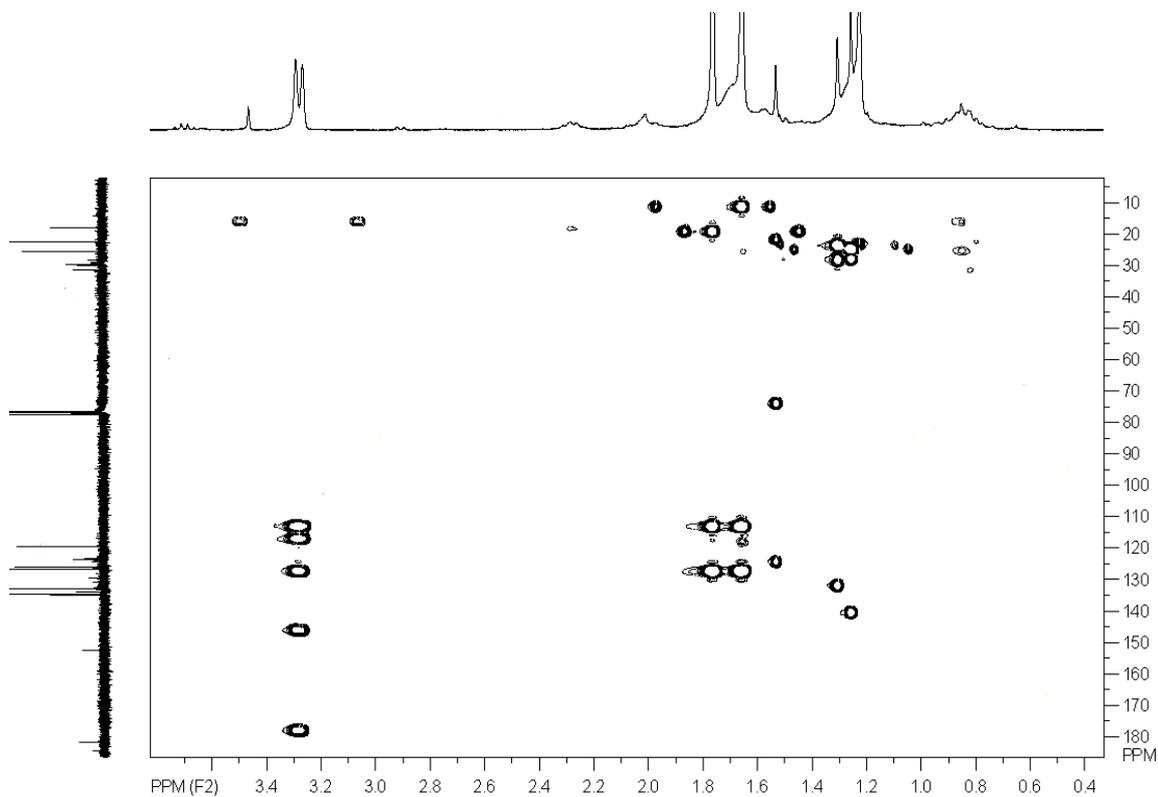
Espectro 80: HSQC da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl₃).



Espectro 81: HMBC da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl₃).

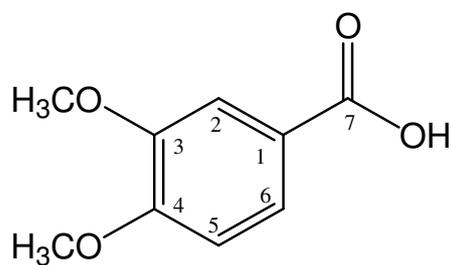


Ampliação do espectro 81: HMBC da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl₃).



Ampliação do espectro 81: HMBC da naftoquinona **XX** (75 MHz, CDCl₃).

6.4.2 Identificação do Ácido-3,4-dimetoxibenzóico (XXI)



XXI

A substância **XXI** foi obtida do fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica dos galhos (item 5.3.1.1, pág. 33).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 82, pág. 193) apresentou poucos sinais: dois singletos muito intensos em δ 3,86 e δ 3,88, com deslocamentos químicos e perfil característicos de metoxilas; um dubleto em δ 7,00 ($J= 9,0$ Hz), um singlete largo em δ 7,55 e um dubleto largo em δ 7,66 ($J= 9,0$ Hz) característico de hidrogênios em anel aromático 1,3,4-trissubstituído.

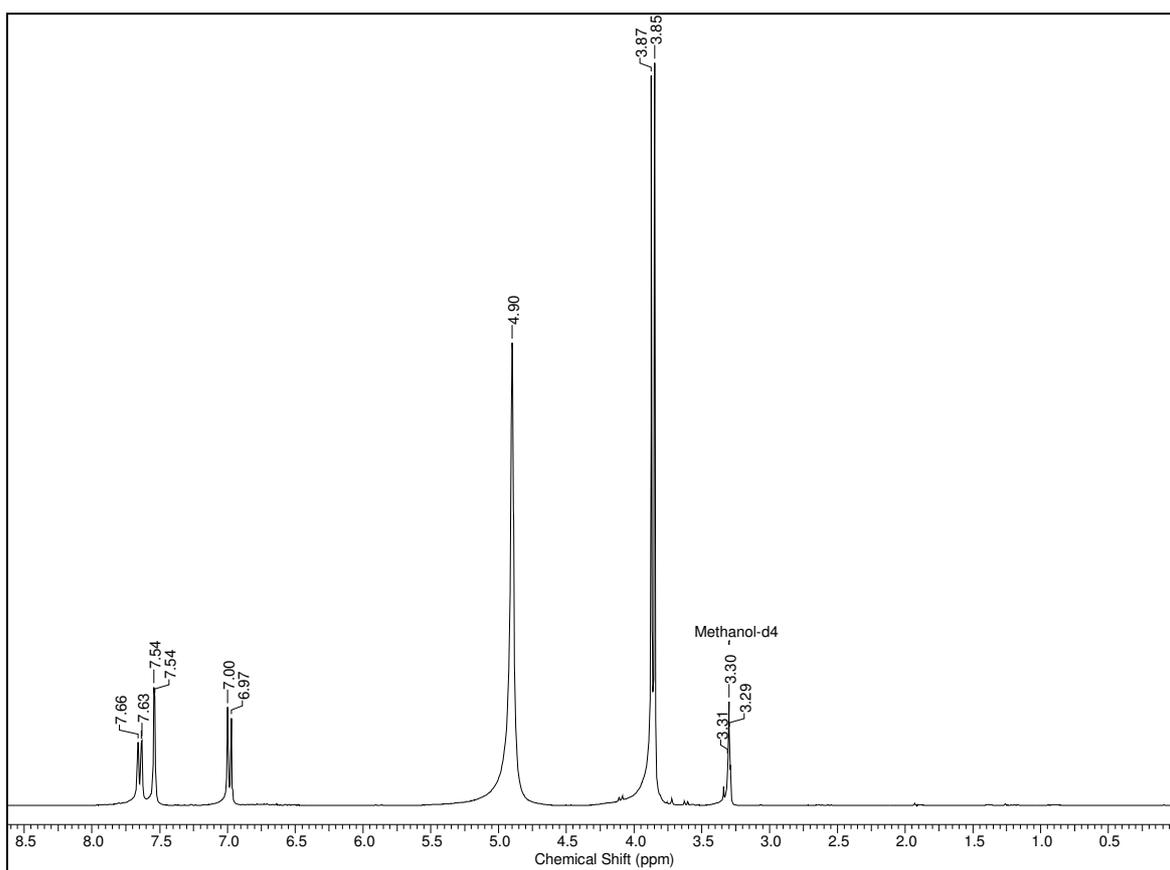
No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 83, pág. 194) dois sinais muito próximos em δ 56,4 e δ 56,5 confirmaram a presença das duas metoxilas. Além destes, o espectro apresentou outros sete sinais: δ 111,8 (CH); δ 113,6 (CH); δ 124,4 (C); δ 125,1 (CH); δ 150,0 (C); δ 154,6 (C); δ 169,9 (C), assim atribuídos como carbonos metínicos e carbonos tetrassubstituídos pelo espectro de DEPT – 135° (espectro 84, pág. 195). O sinal em δ 169,9 mostrou-se compatível com a presença de um grupo carboxila ligado ao anel aromático, enquanto que os sinais em δ 150,0 e δ 154,6 se tratavam de C-3 e C-4, respectivamente, os quais estariam metoxilados. O carbono quaternário em δ 124,4 foi atribuído a C-1 ligado à carboxila. Os três carbonos metínicos restantes foram atribuídos da seguinte forma; δ 111,8 – C-5 e δ 113,6 – C-2 sendo estes os carbonos mais protegidos do anel, pois estão *orto* em relação às metoxilas, enquanto que o sinal em δ 125,1 foi atribuído a C-6 *orto* à carboxila e *meta/para* às metoxilas.

A molécula **XXI** foi designada como ácido-3,4-dimetoxibenzóico e seus dados espectroscópicos estavam condizentes com os mesmos apresentados na literatura (tabela 30, pág. 193) [POUCHERT & BEHNKE, 1993].

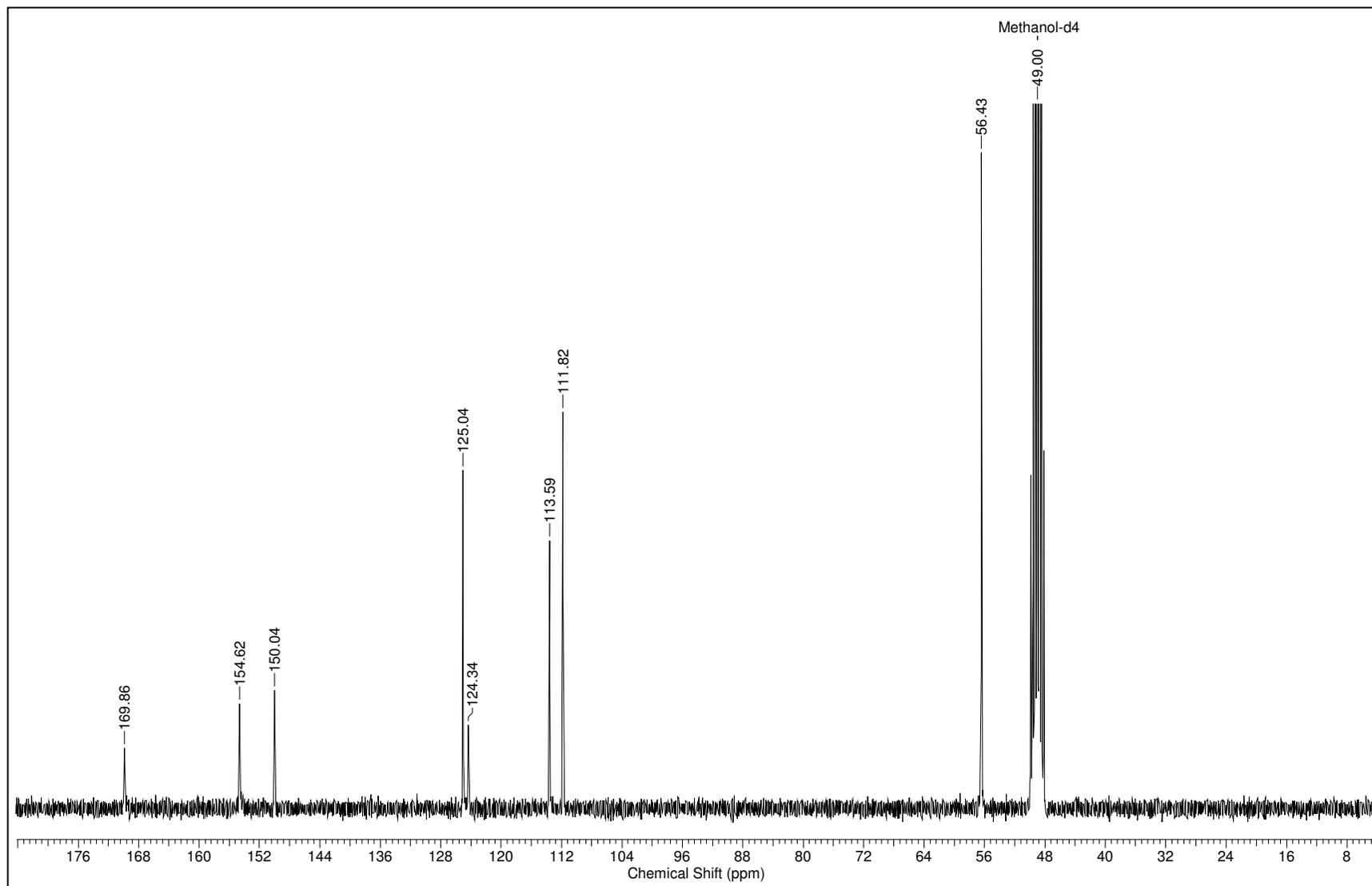
Tabela 30. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do derivado de ácido benzóico **XXI** obtido dos galhos de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C	(XXI) <i>C. laxum</i>		(XXI) literatura	
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	124,4	-	123,2	-
2	113,6	7,55 sl	112,0	7,5 d (2,0)
3	150,0	-	148,2	-
4	154,6	-	152,5	-
5	111,8	7,00 d (9,0)	110,5	6,95 d (9,0)
6	125,1	7,66 dl (9,0)	123,3	7,80 d (9,0)
7	169,9	-	167,3	-
OMe-3	56,4 [♦]	3,86 s [♦]	55,5 [♦]	3,85 s [♦]
OMe-4	56,5 [♦]	3,88 s [♦]	55,6 [♦]	3,88 s [♦]

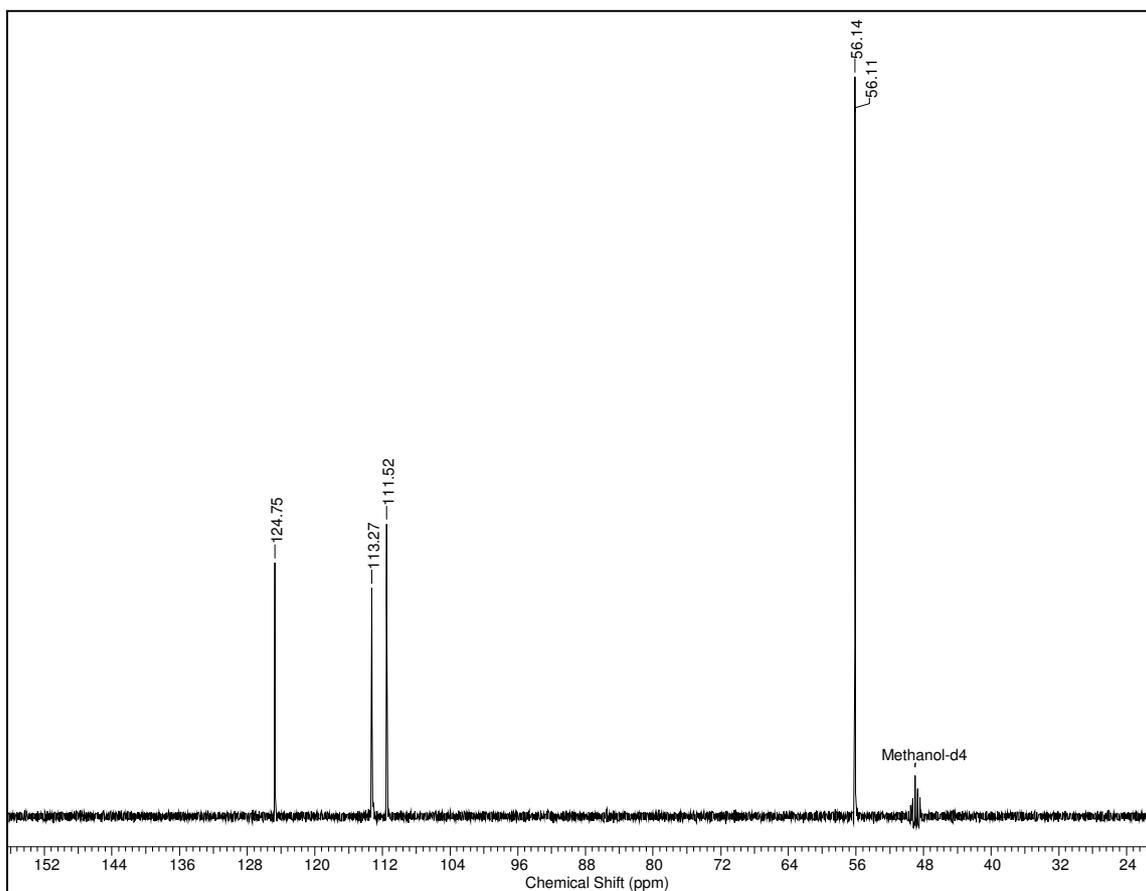
*MeOD, 300/75 MHz; # CDCl_3 + $\text{DMSO}-d_6$ [POUCHERT & BEHNKE, 1993] [♦] valores na mesma coluna que podem estar trocados.



Espectro 82: RMN de ^1H do derivado do ácido benzóico **XXI** (300 MHz, CD_3OD).

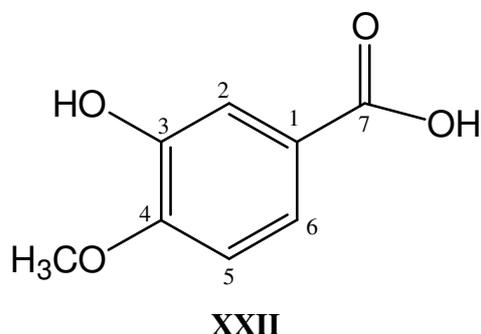


Espectro 83: RMN de ^{13}C do derivado do ácido benzóico **XXI** (75 MHz, CD_3OD).



Espectro 84: DEPT – 135° do derivado do ácido benzóico **XXI** (75 MHz, CD₃OD).

6.4.3 Identificação do ácido-3-hidróxi-4-metoxibenzóico (XXII)



A substância **XXII** foi obtida da fase diclorometânica dos galhos a partir do fracionamento de CLG-10 (sub-item 5.3.1.1, pág. 33).

Os espectros de RMN de ^1H (espectro 85, pág. 198) e ^{13}C (espectro 86, pág. 199) de **XXII** se assemelhavam muito com os de **XXI**. O espectro de RMN de ^1H de **XXII** exibiu um singlete característico de metoxila, a δ 3,89, um dubleto em δ 6,83 ($J= 9,0\text{Hz}$) e um sinal com integração para dois hidrogênios em δ 7,56 correspondendo a um dubleto e um singlete largo. Assim, a substância **XXII** diferenciava-se de **XXI** por possuir uma metoxila e uma hidroxila fenólica.

O espectro de RMN de ^{13}C de **XXII** apresentou sinal para a δ 56,4 confirmando a metoxila. O sinal da carboxila não estava distinguível no espectro de RMN de ^{13}C , porém, sua presença foi confirmada no espectro de HMBC (espectro 88, pág. 199) pela correlação com H-2 (δ 7,56).

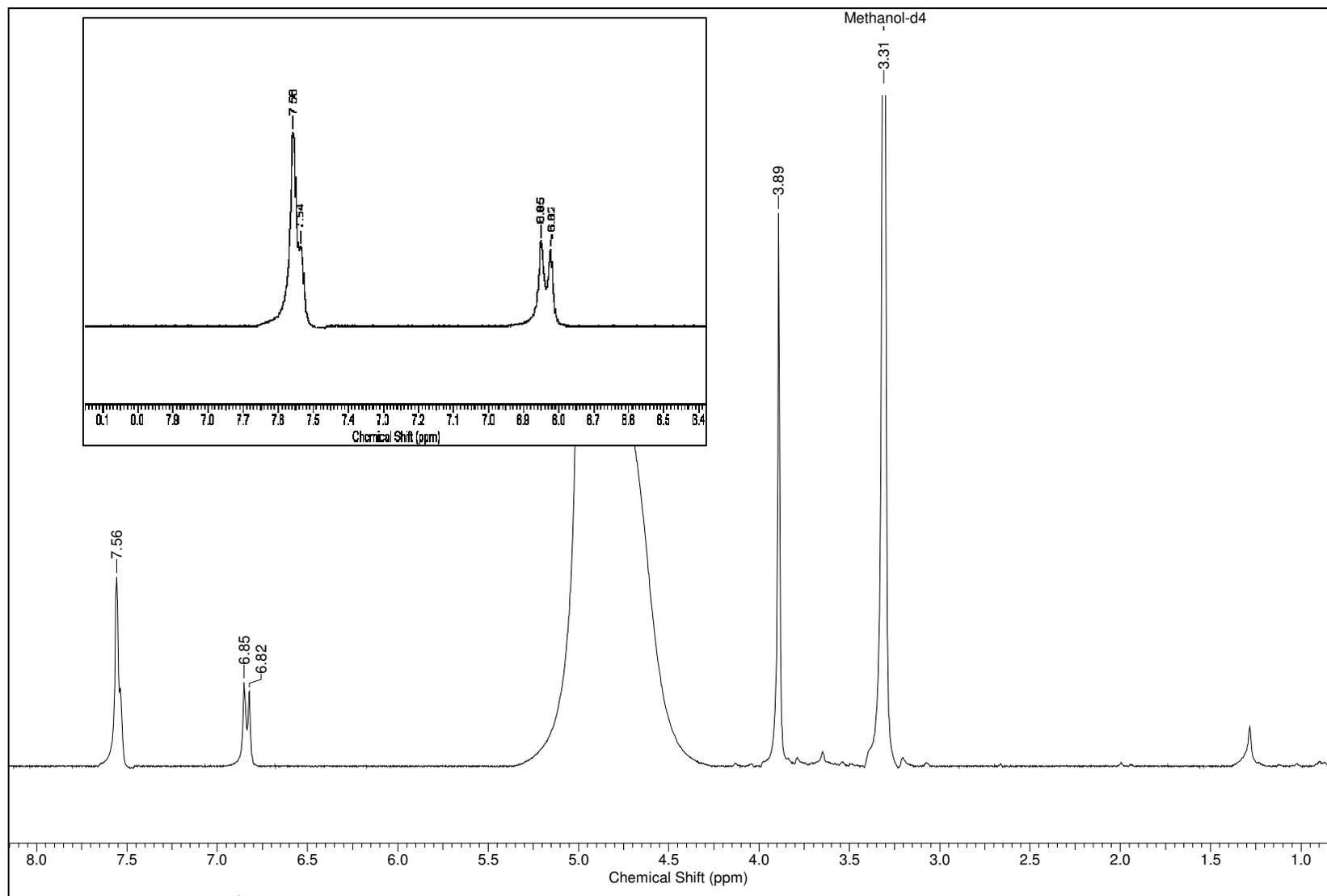
Assim, os sinais δ 152,4 e 148,6 no espectro de RMN de ^{13}C foram atribuídos a C-3 e C-4, respectivamente. O espectro de HSQC (espectro 87, pág. 200) auxiliou na atribuição de C-2 (δ 113,8) pela correlação com δ 7,56 (H-2), de C-5 (δ 115,8) pela correlação com δ 6,83 (H-5) e de C-6 (δ 125,2) pela correlação com δ 7,56 (H-6). Ao carbono C-1 foi atribuído o sinal em δ 123,6, com o auxílio do espectro de HMBC (espectro 88, pág. 200), pela correlação deste sinal com os dos três hidrogênios aromáticos.

A estrutura proposta para **XXII** apresentou sinais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C condizentes com os do ácido-3-hidróxi-4-metoxibenzóico apresentados na literatura (tabela 31, pág. 197) [POUCHERT & BEHNKE, 1993].

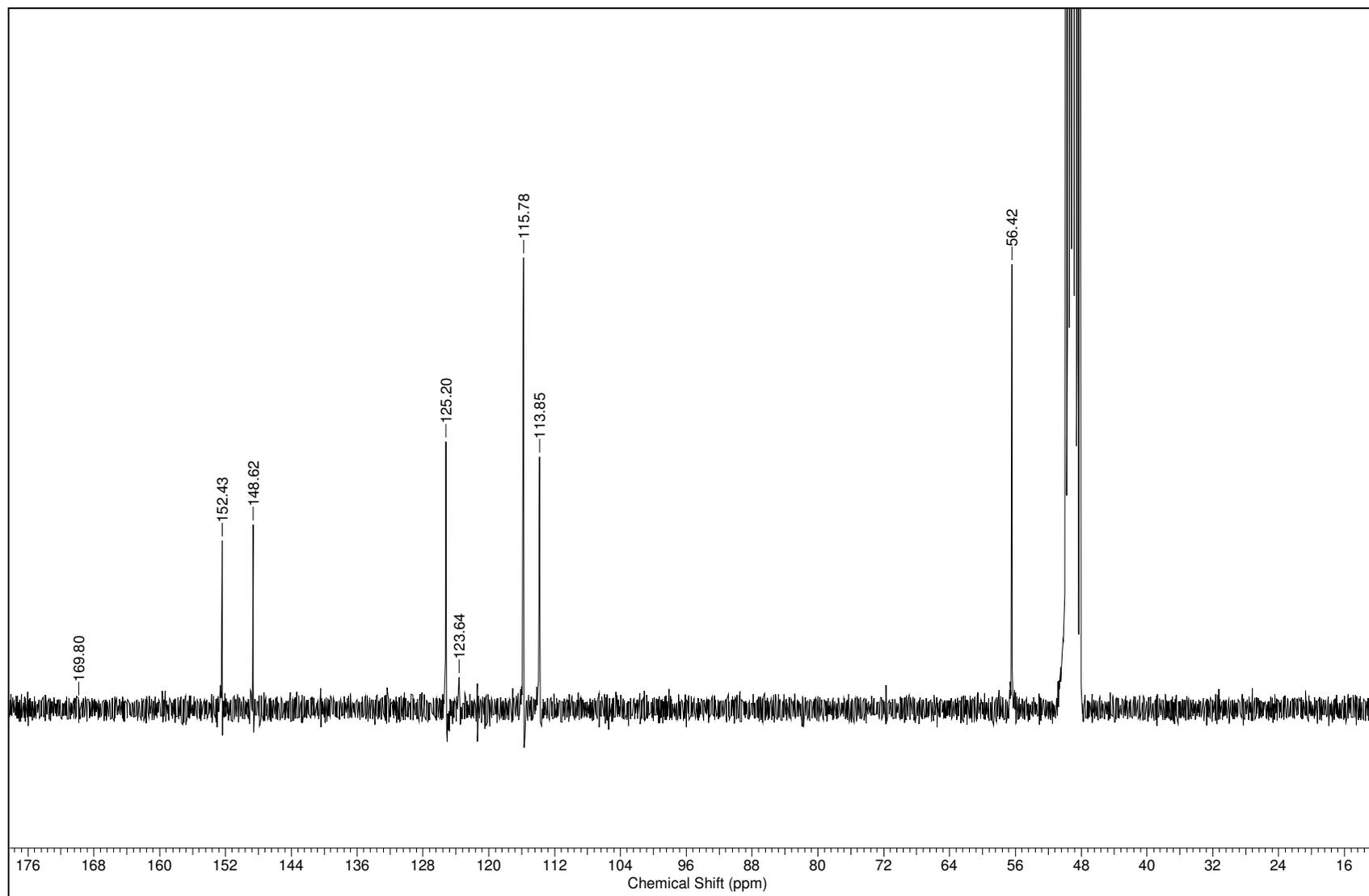
Tabela 31. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do derivado de ácido benzóico **XXII** obtido dos galhos de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C	(XXII) <i>C. laxum</i>		(XXII) literatura	
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$ [m, J (Hz)]	# $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	123,6	-	123,2	-
2	113,8	7,56 sl	112,0	7,52 d (2,0)
3	152,4	-	152,2	-
4	148,6	-	149,5	-
5	115,8	6,82 dl (9,0)	115,5	6,90 d (9,0)
6	125,2	7,54 d (9,0)	125,3	7,50 d (9,0)
7	169,8	-	168,3	-
OMe-4	56,4	3,89 s	55,6	3,88 s

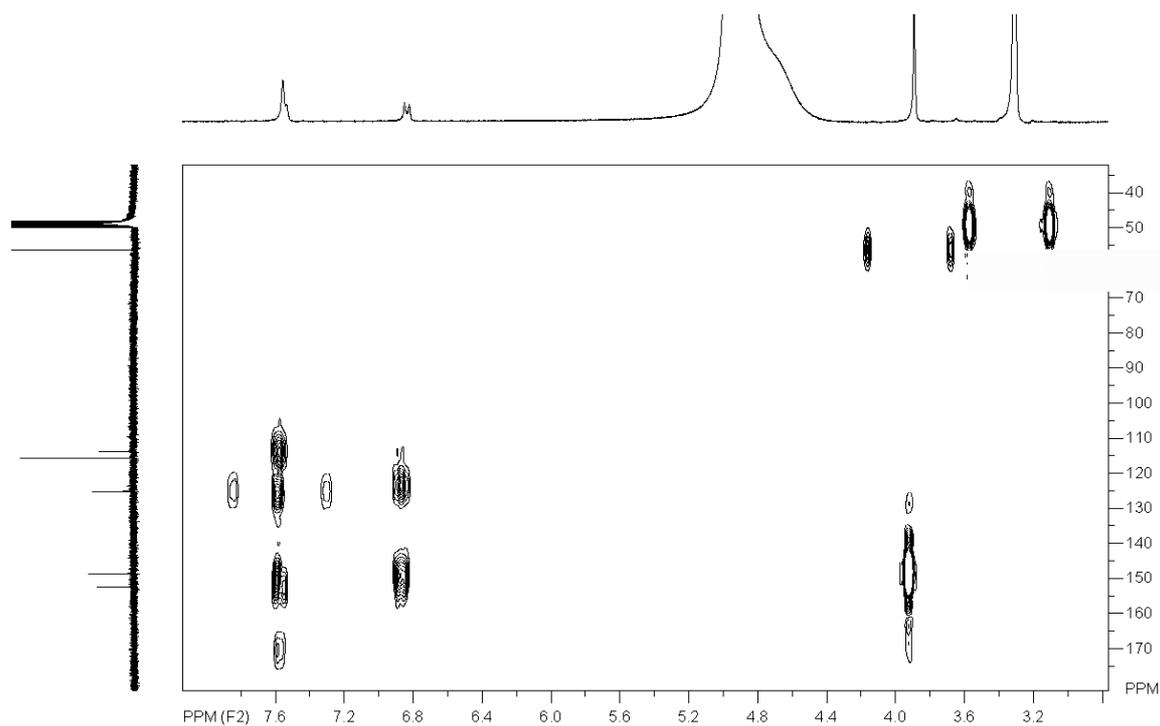
*CD₃OD, 300/75 MHz; # CDCl₃ + DMSO-*d*₆ [POUCHERT & BEHNKE, 1993]



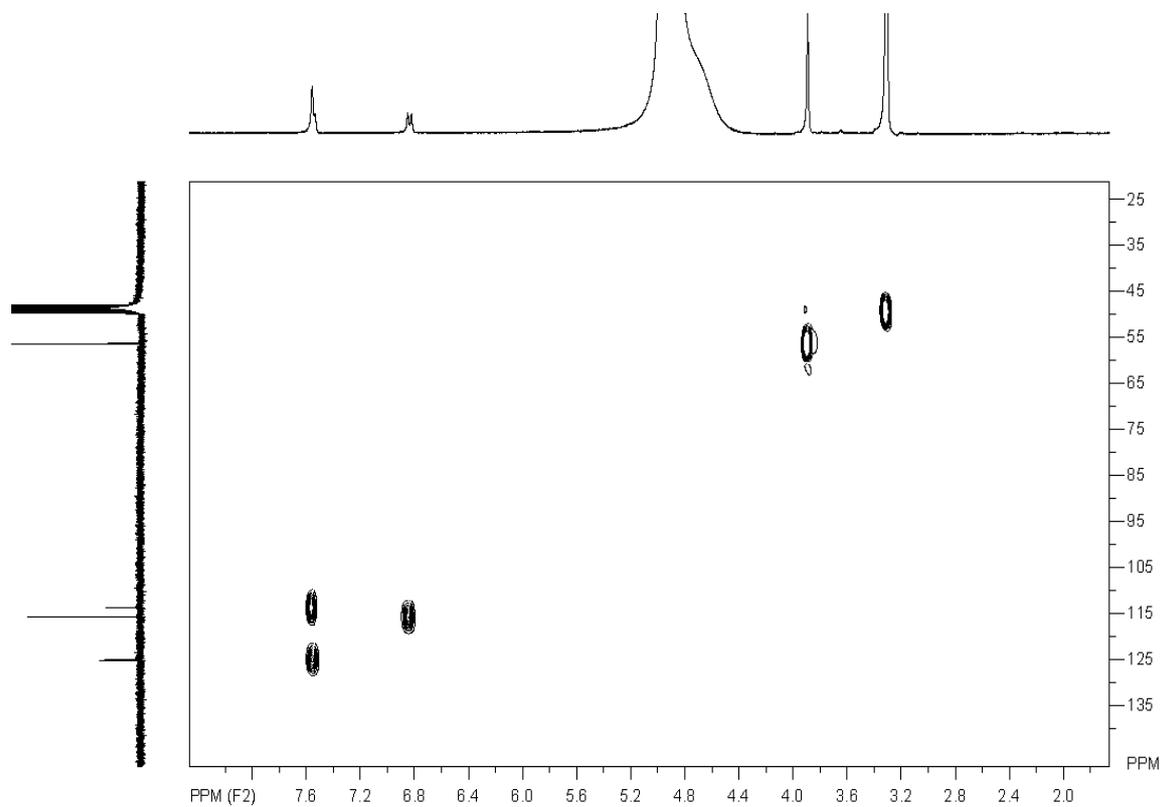
Espectro 85: RMN de ¹H do derivado de ácido benzóico **XXII** (300MHz, CD₃OD).



Espectro 86: RMN de ¹³C do derivado de ácido benzóico **XXII** (75 MHz, CD₃OD).



Espectro 87: HSQC do derivado de ácido benzóico **XXII** (75 MHz, CD₃OD).



Espectro 88: HMBC do derivado de ácido benzóico **XXII** (75 MHz, CD₃OD).

6.5 Flavonóides presente nos galhos de *Combretum laxum*

Os flavonóides são uma classe de produtos naturais bastante ampla e diversificada ocupando uma posição importante entre os fenóis naturais [HARBONE, 1975; SIMÕES, 2000].

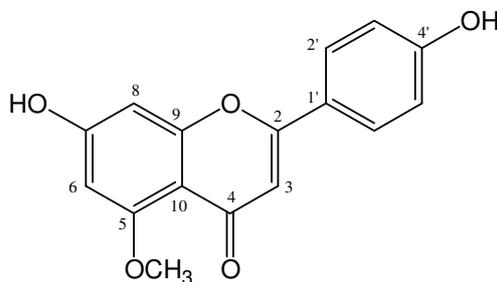
O termo flavonóide engloba um grupo de compostos que apresenta uma estrutura comum caracterizada por 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), em dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos (acíclica ou heterocíclica). Esta classe é formada por mais de 4000 compostos fenólicos, e inclui vários subgrupos como flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, flavanas, chalconas, auronas, diaril propanóides e outros [HARBONE, 1975].

As diferenças entre os subgrupos resultam em modificações na cadeia de três carbonos (entre dois anéis aromáticos) que podem ser: acíclica ou heterocíclica, saturada ou insaturada, podendo ou não apresentar grupos funcionais, tais como –OH ou =O. Já as diferenças individuais dentro de cada subgrupo resultam de uma variação no número e posição de substituintes, tais como grupos hidroxila, como também pelo grau de metilação, glicosilação e prenilação.

Os flavonóides são considerados benéficos para a saúde atuando como antioxidantes [RATTY & DAS, 1988], protegendo contra doenças cardiovasculares e certas formas de câncer [DEWICK, 2002; RAMANATHAN, 1992].

Apesar de não serem tão comuns quanto triterpenos e fenantrenos, os flavonóides estão presentes na família Combretaceae. No gênero *Combretum* é descrita a ocorrência de apenas poucos representantes desta classe (6 flavonóis e 7 flavonas) [FACUNDO, 1993; MARTINI, 2004; BASSENE, 1987].

6.5.1 Identificação da apigenina-5-metil-éter (XXIII)



XXIII

A substância **XXIII** foi obtida da fase diclorometânica dos galhos a partir do fracionamento de CLG-13 (sub-item 5.3.1.2, pág. 36).

A análise dos espectros de RMN de ^1H (espectro 89, pág. 204) e de ^{13}C (espectro 90, pág. 205) de **XXIII** mostrou que se tratava de um composto aromático, pela presença de sinais na região de δ 6,33 a 7,78 e de δ 97,1 a 163,5, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H de **XXIII** apresentou dois singletos largos em δ 6,33 (1H) e em δ 6,46 (1H), indicativos da presença de dois hidrogênios com orientação meta em um anel aromático tetrassubstituído e vizinhos a carbonos oxigenados e mais dois dubletos em δ 6,89 (2H, $J= 9,0$ Hz), e em δ 7,78 (2H, $J= 9,0$ Hz) compatíveis com a presença de um outro anel aromático, sendo este dissubstituído (padrão de substituição *para*). Estes dados, aliados presença de um singlete em δ 6,47 (1 H), sugeriram que **XXIII** tratava-se de uma flavona, sendo este último sinal atribuído a H-3 [MABRY, 1970]. O espectro de RMN de ^{13}C , que apresentou sinais a δ 161,6, 106,2 e 180,2, atribuídos aos carbonos do anel C de uma flavona (C-2, C-3 e C-4, respectivamente) corroboraram com a proposta [AGRAWAL, 1989].

O espectro de RMN de ^1H apresentou ainda um singlete a δ 3,85 característico de metoxila (cuja presença foi confirmada no espectro de RMN de ^{13}C pelo sinal a δ 56,3), a qual estaria ligada no carbono C-5 do anel A desta flavona, como pode ser observado pela correlação no espectro de HMBC (espectro 92, pág. 207), onde os hidrogênios desta metoxila correlaciona-se com o sinal de carbono a δ 162,4, atribuível a C-5. A localização do grupo metoxila em C-5 foi confirmada pela correlação observada no espectro de NOESY (espectro 93, pág. 207) entre os hidrogênios da metoxila e H-6 (δ 6,34). O espectro

de HMBC apresentou também as correlações entre C-7 (δ 163,5) e os hidrogênios vizinhos H-6 e H-8 (δ 6,34 e 6,46, respectivamente).

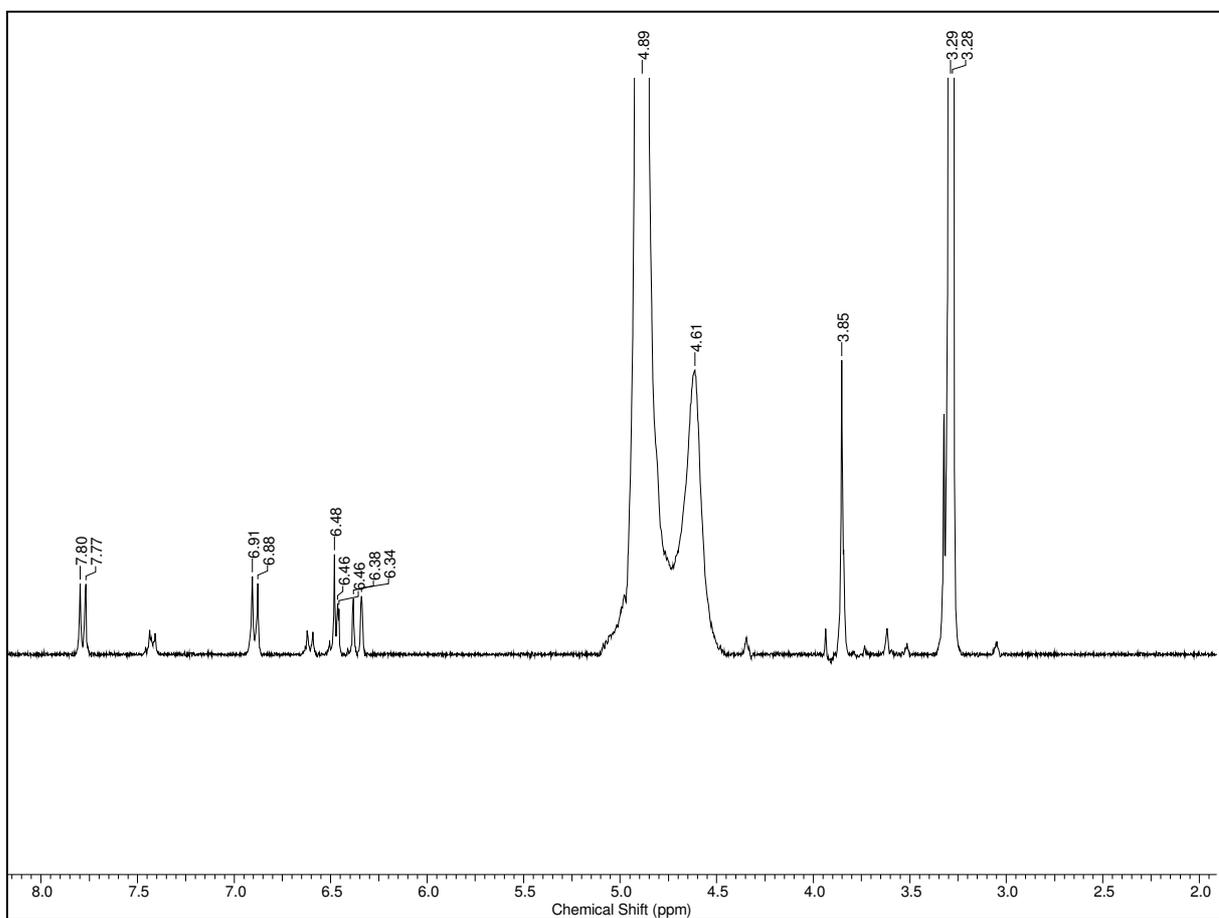
Para os carbonos do anel “B” deste flavonóide, com padrão de substituição *para*, foram atribuídos os sinais a δ 123,3 e 162,3 relativos C-1’ e C-4’ e a δ 129,0 e 117,0 referentes a C-2’, 6’ e C-3’, 5’ respectivamente, os quais no espectro de HSQC (espectro 91, pág. 206) apresentaram correlação com δ 7,77 (H-2’, 6’) e δ 6,88 (H-3’, 5’).

Os sinais para os carbonos C-9 e C-10, quaternários, que apresentaram maior tempo de relaxamento, não podendo ser observados no espectro de RMN de ^{13}C . A substância **XXIII** foi então definida como apigenina-5-metil-éter (tabela 32, pág. 202).

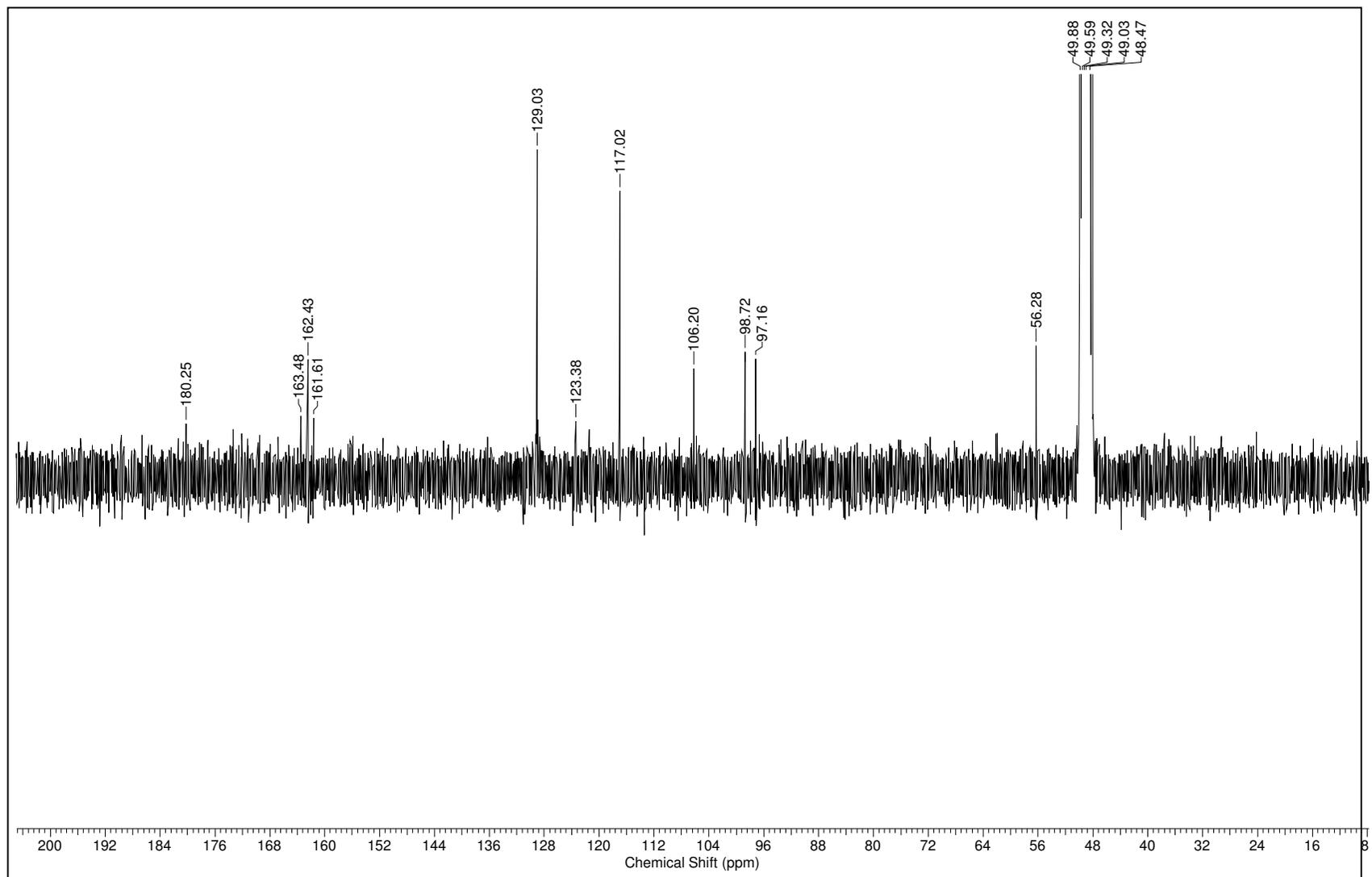
Tabela 32. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da flavona **XXIII** obtido dos galhos de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C/H	(XXIII) <i>C. laxum</i>		Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; nJ)
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	
2	161,6	-	H-3 (6,47 2J)
3	106,6	6,47 s	-
4	180,2	-	H-3 (6,47 2J)
5	162,4	-	OMe-5 (3,85 3J),
6	98,7	6,33 sl	H-8 (6,46 3J)
7	163,5	-	H-8 (6,46, 2J)
8	97,2	6,46 sl	H-6 (6,34 3J)
9	-	-	-
10	-	-	-
1’	123,3	-	H-5’ (6,89 3J), H-3 (6,47 3J)
2’	129,0	7,78 d (9,0)	H-2’ (7,78, 2J)
3’	117,0	6,88 d (9,0)	-
4’	162,3	-	H-2’ (7,78 3J), H-5’ (6,89 2J)
5’	117,0	6,89 d (9,0)	-
6’	129,0	7,78 d (9,0)	-
OMe-5	56,3	3,85 s	-

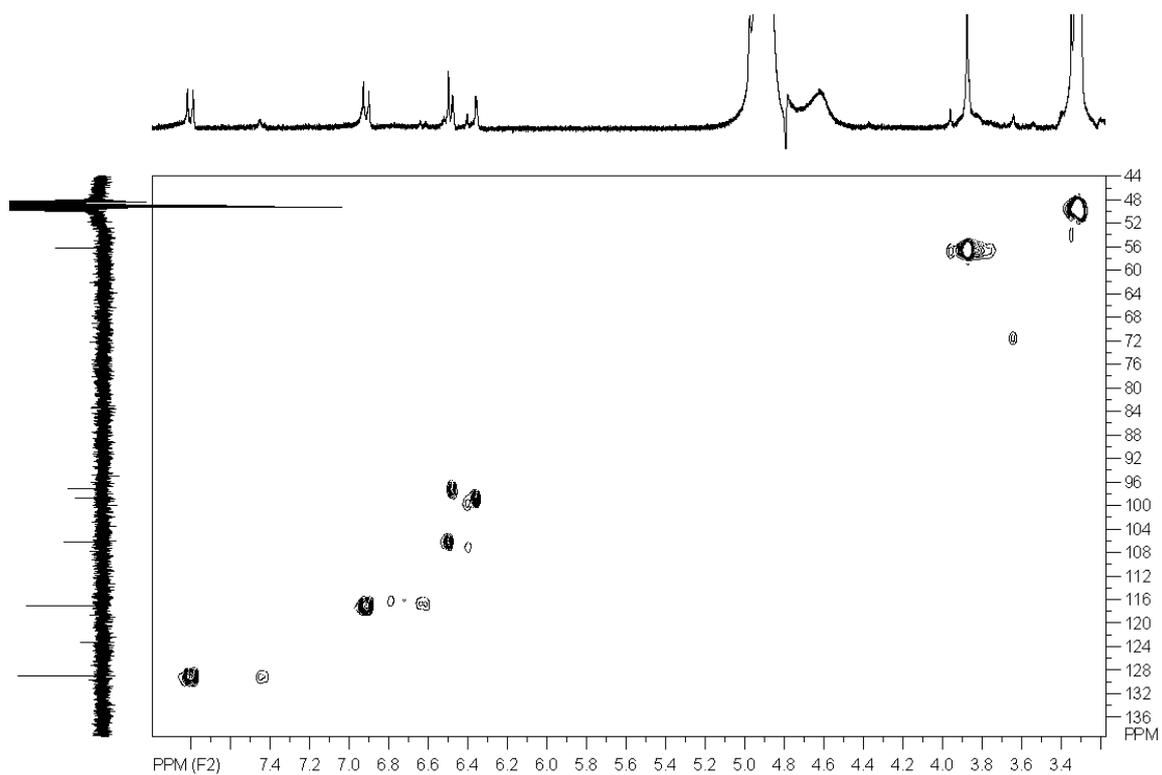
*CD₃OD, 300/75 MHz;



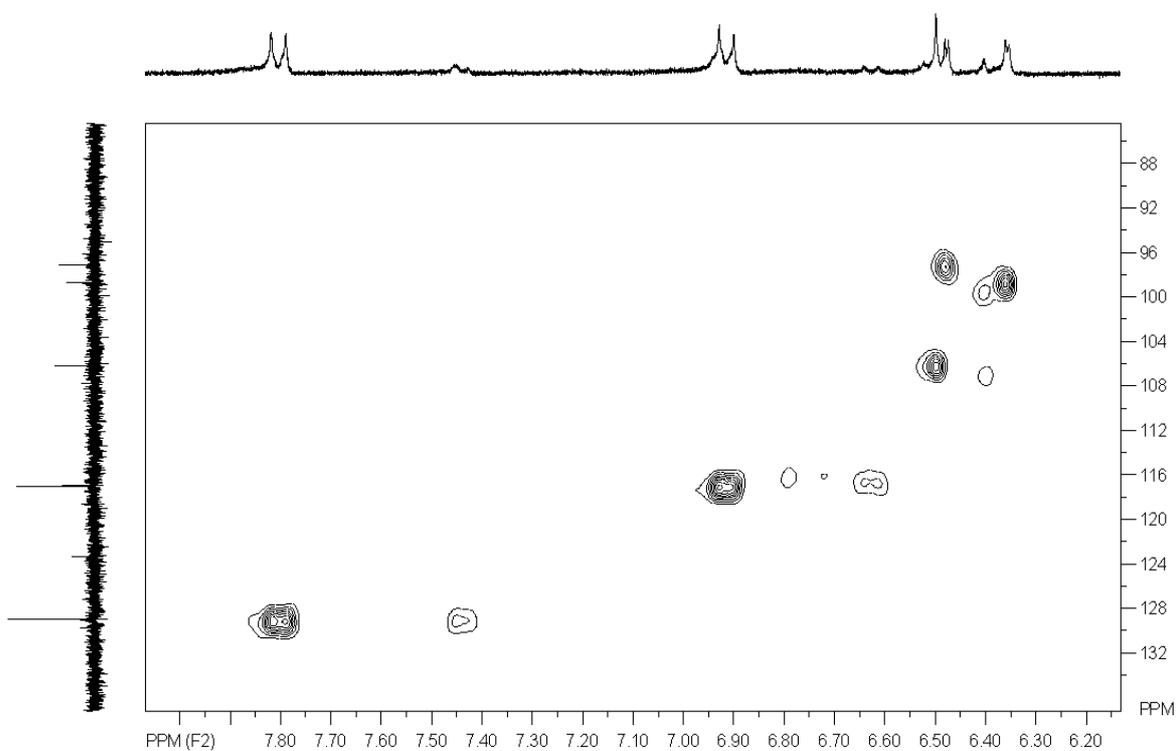
Espectro 89: RMN de ^1H do flavonóide **XXIII** (CD_3OD , 300 MHz).



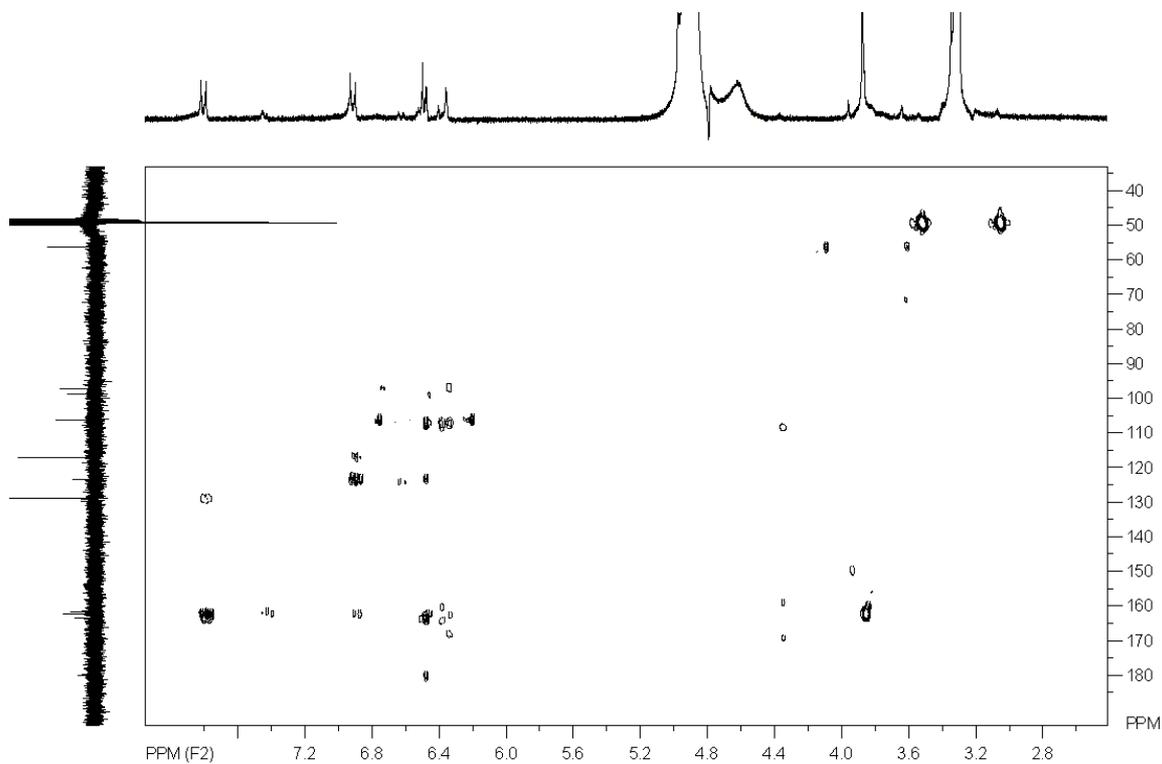
Espectro 90: RMN de ^{13}C do flavonóide **XXIII** (CD_3OD , 75 Mz).



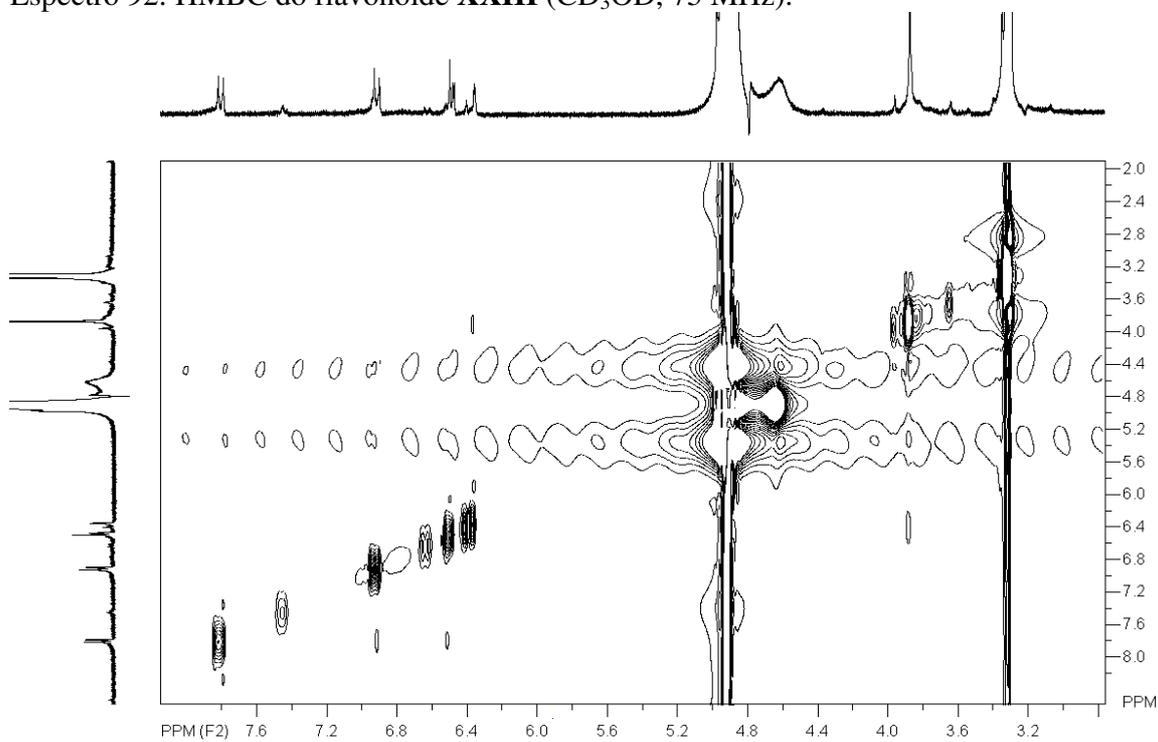
Espectro 91: HSQC do flavonóide **XXIII** (CD₃OD, 75 Mz).



Ampliação do espectro 91: HSQC do flavonóide **XXIII** (CD₃OD, 75 Mz).

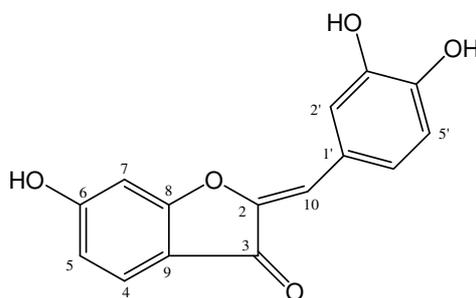


Espectro 92: HMBC do flavonóide **XXIII** (CD₃OD, 75 MHz).



Espectro 93: NOESY do flavonóide **XXIII** (CD₃OD, 300 Mz).

6.5.2 Identificação da sulfuretina (XXIV)



XXIV

A substância **XXIV** foi obtida da fase diclorometânica dos galhos através do fracionamento cromatográfico da fração CLG-10 (sub-item 5.3.1.1, pág. 33).

Assim como a substância **XXIII**, os espectros de RMN de ^1H (espectro 94, pág. 210) e ^{13}C (espectro 95, pág. 211) de **XXIV** mostraram que se tratava de um composto aromático, pela presença de sinais essencialmente na região de δ 6,58 a 7,57 e de δ 99,4 a 182,5, respectivamente. A presença de 15 sinais de carbono no espectro de RMN de ^{13}C sugeriu que **XXIV** tratava-se de um flavonóide, considerando também as poucas diferenças que este espectro apresentou quando comparado com o mesmo da substância **XXIII**.

No espectro de RMN de ^1H , o conjunto de sinais a δ 6,72 (1H, dd, $J= 8,5$ e $1,7$ Hz); 6,78 (1H, d, $J= 1,7$ Hz) e 7,56 (1H, d, $J= 8,5$ Hz) foi compatível com a presença de um anel A 1,2,4-trissubstituído e dioxigenado [MABRY, 1970]. Os sinais relativos aos hidrogênios do anel B foram identificados como um dubleto a δ 6,89 ($J= 8,3$ Hz), um dubleto largo a δ 7,53 ($J= 1,9$ Hz) e um duplo dubleto a δ 7,29 ($J= 8,3$ e $1,9$ Hz), indicando também um anel 1,2,4-trissubstituído e dioxigenado. Ainda neste espectro destacou-se um singlete a δ 6,58 (1H).

No espectro de RMN de ^{13}C , a presença de um sinal referente a uma carbonila a δ 182,5, associada a sinais de carbonos olefinicos a δ 146,4 (C) e 112,4 (CH), foi sugestiva de um esqueleto do tipo aurona para **XXIV** [AGRAWAL, 1989]. A correlação no espectro de HSQC (espectro 97, pág. 212) entre o singlete a δ 6,58 e o relativo ao carbono olefínico trissubstituído a δ 112,4 em conjunto com as correlações no espectro de HMBC (espectro 98, pág. 212) entre este carbono e os hidrogênios do anel aromático B (δ 7,27 e 7,53) e entre o carbono carbonílico a δ 182,5 e o hidrogênio olefínico corroboraram com a proposta.

A localização dos grupos hidroxila no anel A em C-6 e no anel B em C-3' e C-4' foi confirmada pelas correlações no espectro HMBC entre o carbono do anel A a δ 169,1 e entre o hidrogênio do anel A a δ 7,56 e os carbonos a δ 167,7 e 169,1 e entre os hidrogênios do anel B a δ 7,27 (H-6') e o carbono a δ 148,6, a δ 6,89 (H-5') e o carbono a δ 146,4 e a δ 7,53 (H-2') e os carbonos a δ 147,2 e 148,6.

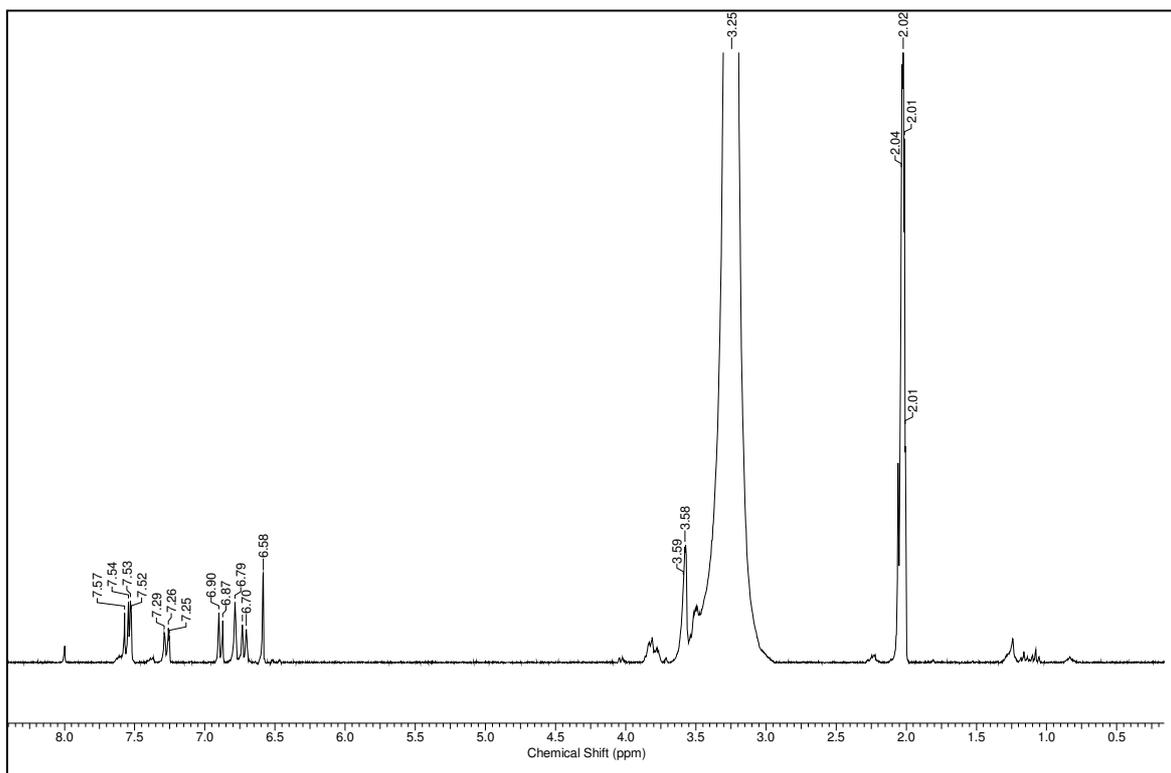
Estes dados, aliados às demais correlações presentes nos espectro HSQC e HMBC apresentadas na tabela 33 (pág. 208) definiram a estrutura de **XXIV** como sendo 6,3',4'-trihidroxiaurona. Seus dados espectrais apresentaram uma boa correspondência com os da mesma substância obtida de *Bidens parviflora* (Asteraceae) e denominada sulfuretina [LI, 2008].

Apesar de já ter sido isolada anteriormente, a sulfuretina é inédita na família Combretaceae, bem como a ocorrência desta classe de flavonóide (aurona).

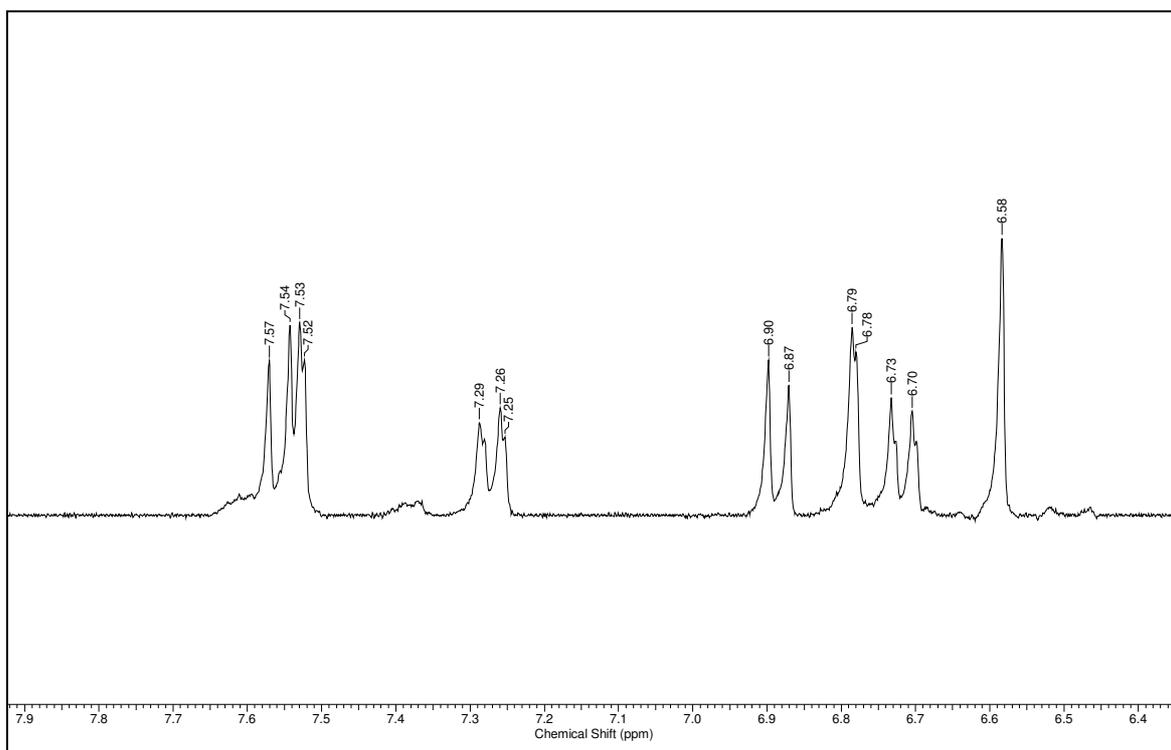
Tabela 33. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da aurona **XXIV** obtido dos galhos de *C. laxum*, e dos mesmos obtidos na literatura.

C/H	(XXIV) <i>C. laxum</i>		(XXIV) Literatura		Correlações no HMBC dos ^1H (δ ; ^nJ)
	* $\delta^{13}\text{C}$	* $\delta^1\text{H}$ [m , J (Hz)]	# $\delta^{13}\text{C}$	# $\delta^1\text{H}$ [m , J (Hz)]	
2	147,2	-	147,2	-	H-10 (6,58 ^2J), H-2' (7,53 ^2J)
3	182,5	-	182,5	-	H-10 (6,58 ^3J)
4	126,3	7,56 d (8,5)	114,4	7,56 d (8,5)	-
5	113,7	6,72 dd (8,5, 1,5)	113,7	6,72 dd (8,5, 1,7)	H-7 (6,79 ^3J)
6	167,7	-	167,7	-	-
7	99,4	6,79 d (1,5)	99,4	6,78 d (1,7)	H-5 (6,72 ^3J)
8	169,0	-	169,0	-	H-7 (6,79 ^2J)
9	114,4	-	144,4	-	H-5 (6,72 ^3J), H-7 (6,79 ^3J)
10	112,4	6,58 s	112,4	6,58 s	H-2' (7,53 ^2J), H-6' (7,27 ^3J)
1'	125,2	-	125,2	-	H-6' (7,27 ^2J)
2'	118,7	7,53 d (2,2)	118,7	7,53 d (1,9)	H-10 (6,58 ^3J), H-6' (7,27 ^3J)
3'	146,4	-	146,4	-	H-5' (6,89 ^2J)
4'	148,6	-	148,6	-	H-2' (7,53 ^3J), H-6' (7,27 ^3J)
5'	116,5	6,89 d (8,3)	116,5	6,89 d (8,3)	-
6'	125,4	7,27 dd (8,3, 2,2)	125,4	7,27 dd (8,3, 1,9)	H-10 (6,58 ^3J), H-5' (6,89 ^2J), H-2' (7,53 ^3J)

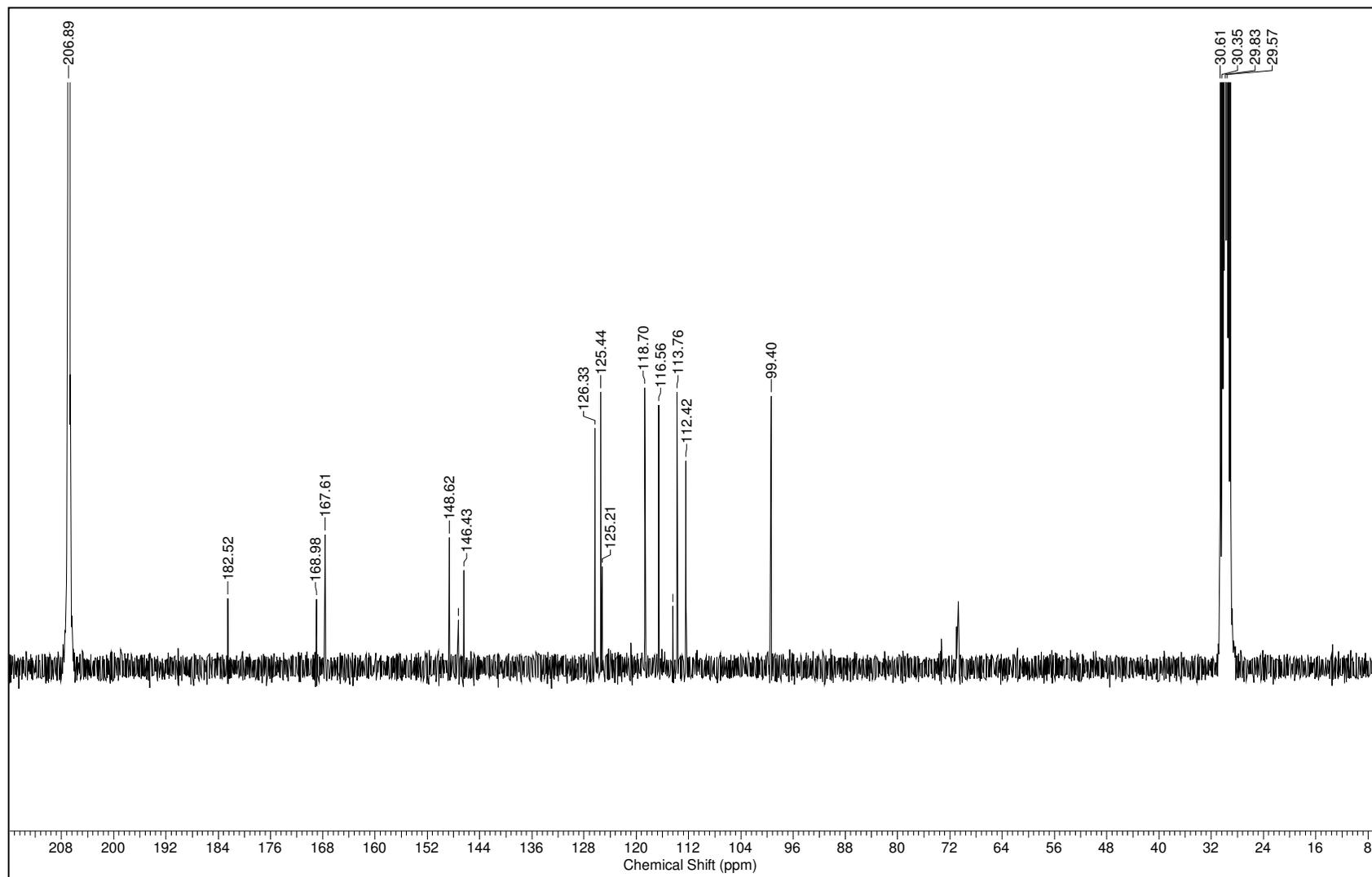
*Acetona- d_6 , 300/75 MHz; #DMSO- d_6 , 100/25 MHz [LI, 2008]



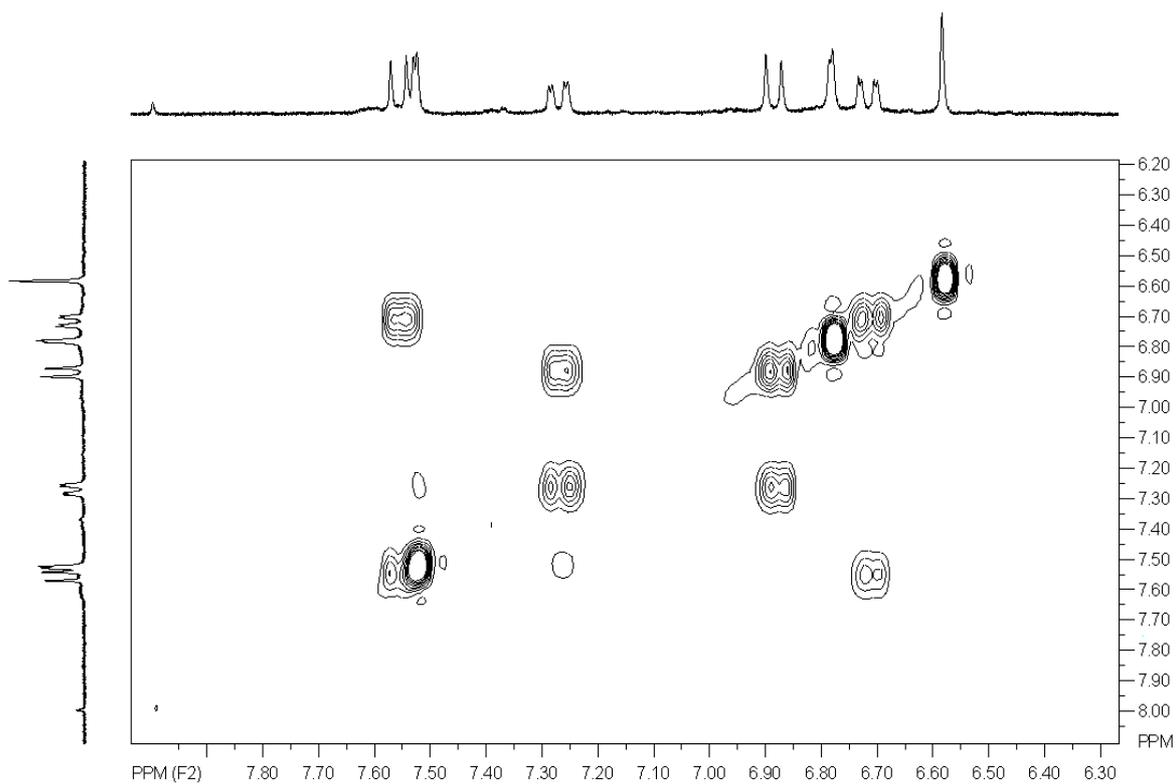
Espectro 94: RMN de ^1H do flavonóide **XXIV** (Acetona $-d_6$, 300 MHz).



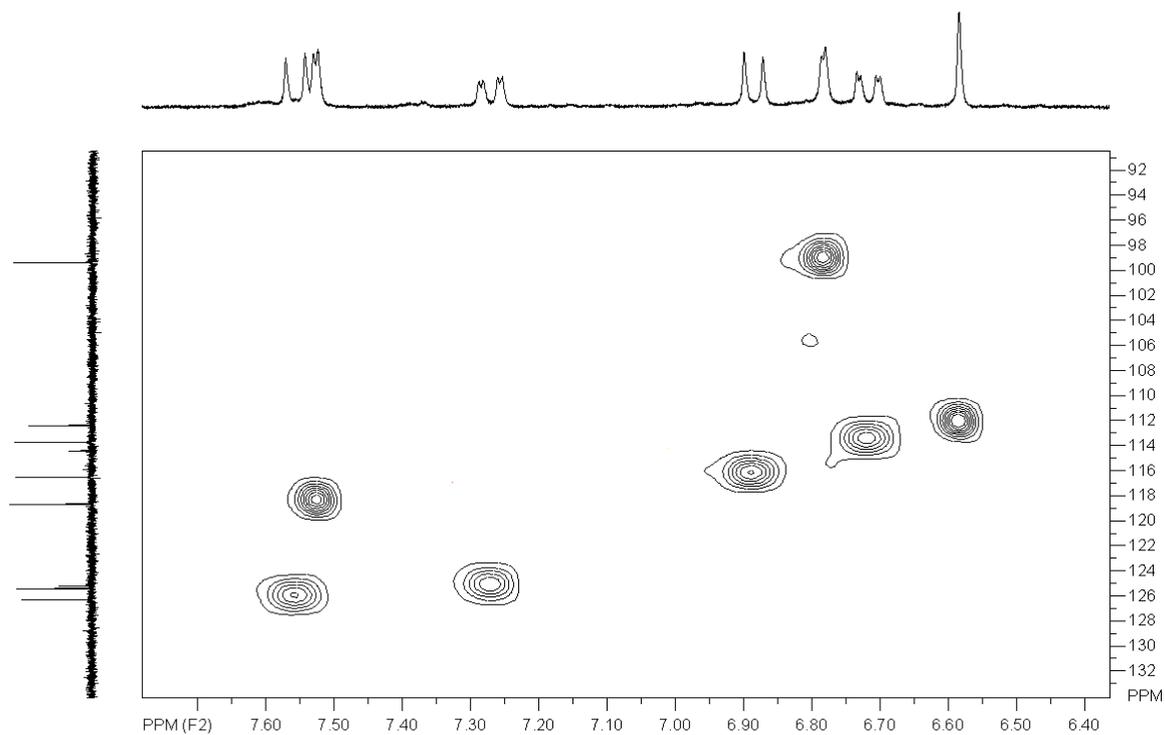
Ampliação do espectro 94: RMN de ^1H do flavonóide **XXIV** (Acetona $-d_6$, 300 MHz).



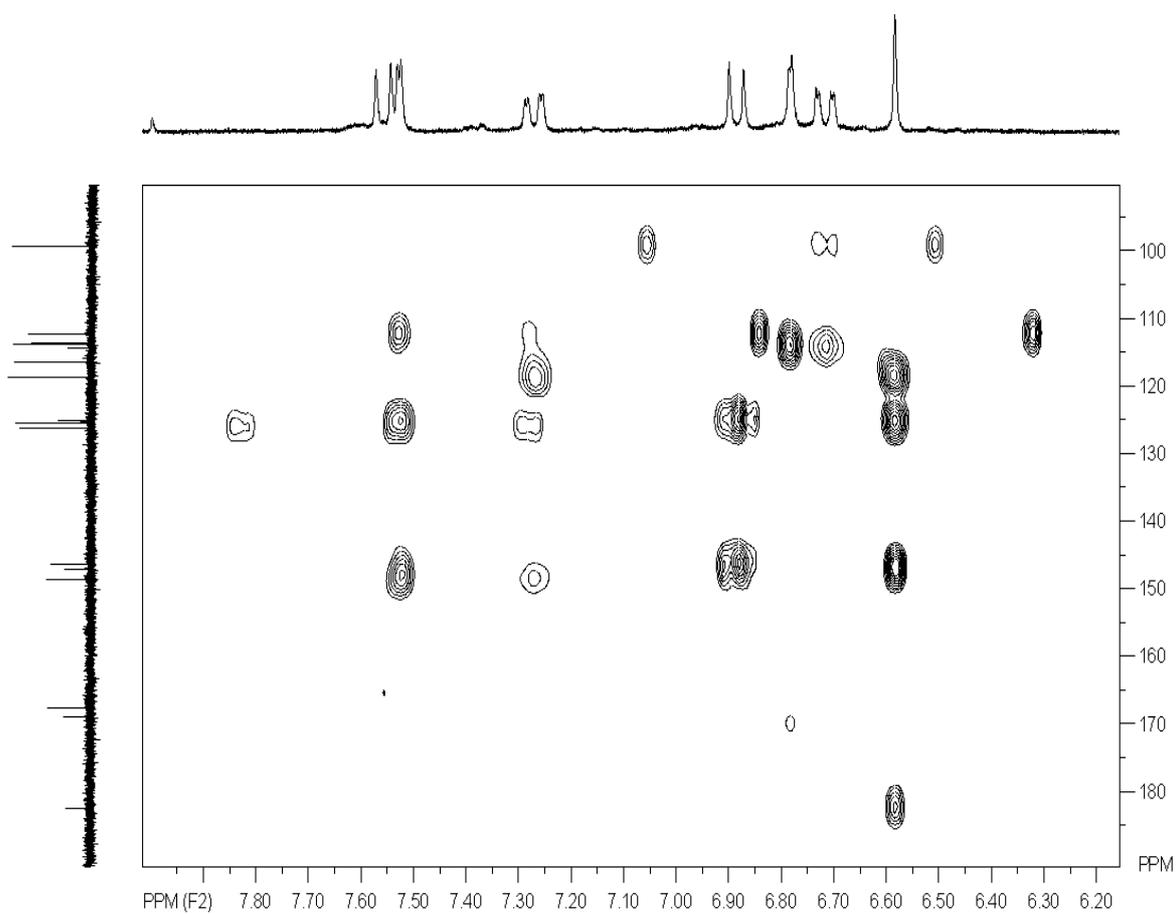
Espectro 95: RMN de ^{13}C do flavonóide **XXIV** (Acetona $-d_6$, 75 MHz).



Espectro 96: COSY do flavonóide **XXIV** (Acetona $-d_6$, 300 MHz).



Espectro 97: HSQC do flavonóide **XXIV** (Acetona $-d_6$, 75 MHz).



Espectro 98: HMBC do flavonóide **XXIV** (Acetona $-d_6$, 75 MHz).

6.6 Ensaios de atividade biológica

Foram realizados os ensaios de atividade antioxidante (β -caroteno/ácido linoléico e DPPH), antifúngica, citotóxica (frente *Artemia salina* e linhagens celulares), mutagênica/antimutagênica e antibacteriana.

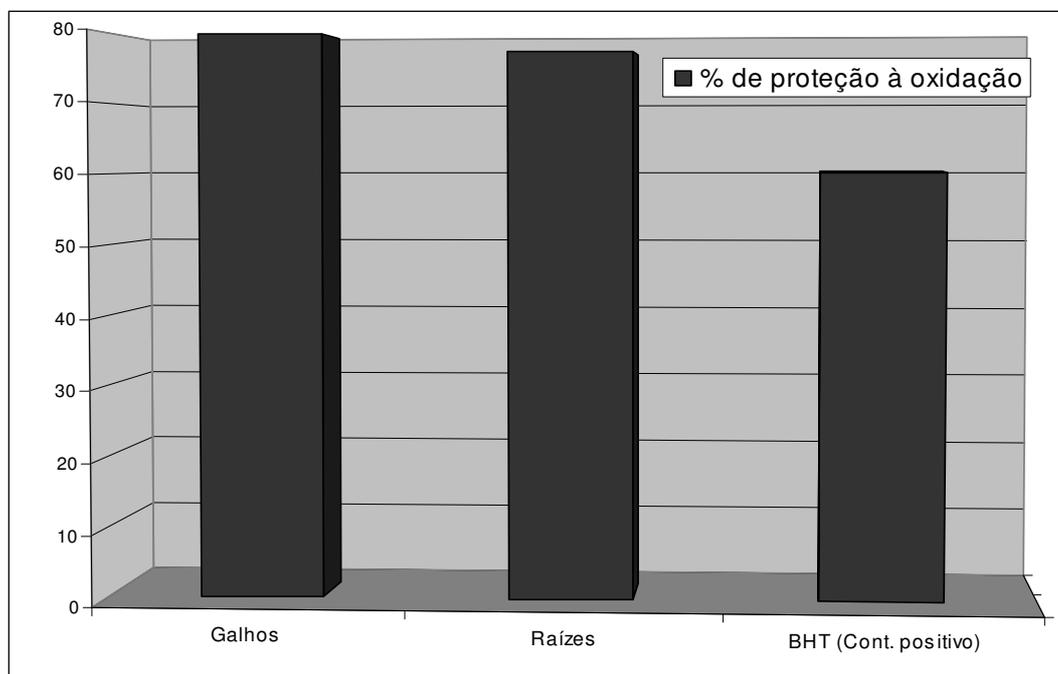
6.6.1 Ensaio de atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados dois ensaios, β -caroteno/ácido linoléico e DPPH, com mecanismos de ação diferentes, de tal forma que foi possível confirmar através de ambos os ensaios o potencial antioxidante das amostras testadas (tabelas 34 e 35, págs. 215 e 216, gráfico 1, pág. 217).

6.6.1.1 Ensaio com β -caroteno/ácido linoléico

Para o ensaio utilizando o método do β -caroteno/ácido linoléico foram testados os extratos dos galhos e raízes de *C. laxum* sendo estes apresentados no gráfico 1, pág. 215. Este ensaio avalia a capacidade da substância de prevenir ou impedir a oxidação do β -caroteno.

Gráfico 1. Atividade antioxidante avaliada através da inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.



Os resultados estão expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle negativo de acordo com a fórmula: $I(\%) = [(\Delta\text{absorção controle negativo} - \Delta\text{absorção amostra}) / \Delta\text{absorção controle negativo}] / 100$ (sub-item 5.6.1.1, pág. 45). O que se observa é uma atividade protetora da ação oxidante no β -caroteno, a qual está superior a 77% para os extratos de galhos e raízes, sendo inclusive mais efetiva do que o controle positivo.

6.6.1.2 Ensaio com DPPH

No ensaio com DPPH é avaliada a capacidade de uma substância em sequestrar o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. As substâncias com atividade antioxidante frente ao DPPH são em geral compostos fenólicos, como os flavonóides [BRAHMACHARI, 2006].

Através deste ensaio, foi avaliada a capacidade antioxidante dos extratos brutos de galhos e raízes, de fases obtidas da partição destes extratos, assim como de algumas substâncias aromáticas obtidas das raízes.

Os extratos dos galhos e das raízes apresentaram uma forte atividade antioxidante, sendo capazes de inibir 50% da oxidação a uma concentração de 5,68 e 9,02 µg/mL, respectivamente e de forma mais acentuada do que o controle positivo. Algumas fases obtidas dos processos de partição dos extratos também apresentaram atividade antioxidante neste ensaio, como por exemplo, a fase butanólica dos galhos que apresentou uma inibição da oxidação maior do que a do controle positivo. As fases hidrometanólica e em acetato de etila também forneceram bons resultados (11,96 e 14,51, respectivamente) (tabela 34, pág. 216).

Tabela 34. Atividade antioxidante avaliada pelo ensaio com DPPH dos extratos e fases de partição.

Amostras	IC₅₀ (µg/mL)	Desvio Padrão (±)
Extrato Galhos	14,38	0,48
Extrato Raízes	18,90	0,53
Fase CH₂Cl₂ (Raiz)	48,53	0,42
Fase AcOEt (Raiz)	13,57	0,50
Fase BuOH (Raiz)	8,89	0,46
Fase Hidrometanólica (Raiz)	59,94	0,40
Fase CH₂Cl₂ (Galho)	45,85	0,33
Fase AcOEt (Galho)	14,51	0,35
Fase BuOH (Galho)	8,30	0,31
Fase Hidrometanólica (Galho)	11,96	0,35
Ácido Cafeico (controle positivo)	10,90	0,14

Todas as substâncias puras testadas apresentaram atividade antioxidante significativa, com valores próximos ao obtido para o controle positivo (tabela 35, pág. 217). A atividade antioxidante destas substâncias já era esperada, pelo fato de todas apresentarem hidroxilas fenólicas. As substâncias puras calosina (**XVII**), 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**) e siringaresinol (**XIX**) foram as mais ativas, estando em uma concentração com 50% de inibição da oxidação abaixo de 23,0 µM (tabela 35, pág. 217).

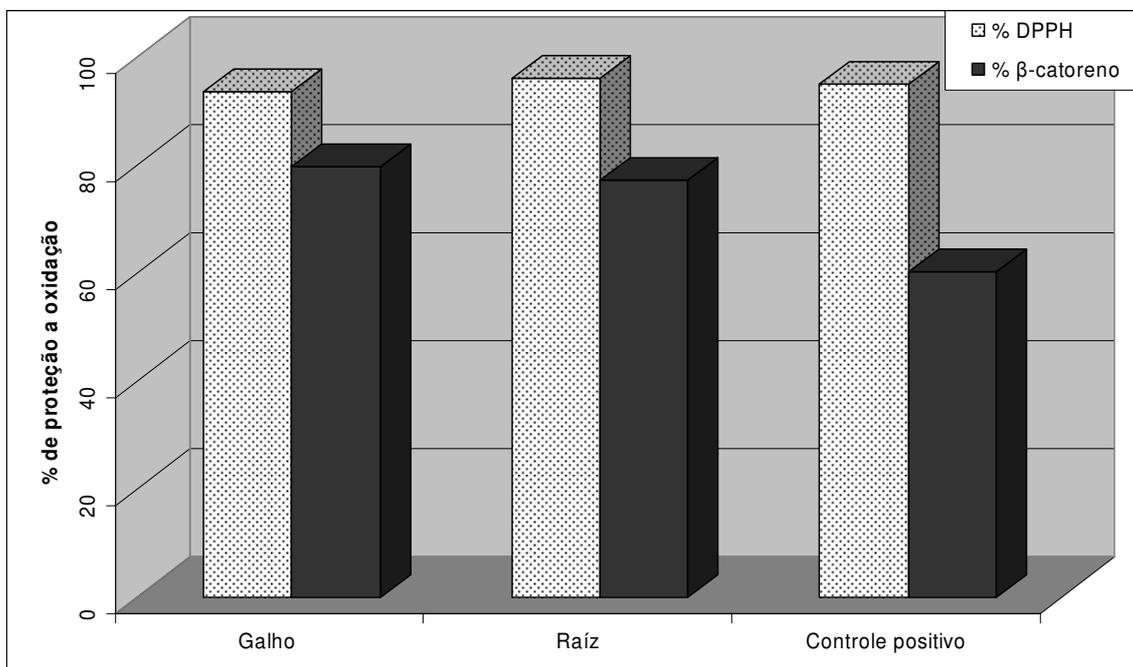
Tabela 35. Atividade antioxidante avaliada pelo ensaio com DPPH das fases obtidas dos processos de partição.

Amostras	IC₅₀ (µM)	Desvio Padrão (±)
2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (XIII)	20,44	0,27
2,6-diidróxi-3,4,7-dimetoxifenantreno (XIV)	45,64	0,35
6-metoxicoelonina (XV)	55,62	0,37
Callosina (XVII)	17,70	0,25
2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (XVI)	32,93	0,25
4'-hidroxi-3,3',4-triidroxi-5-(3,4,5-trimetoxifenoxi)-bibenzila (XVIII)	56,47	0,29
Seringaresinol (XIX)	22,62	0,21
Ácido Cafeico (controle positivo)	10,90	0,14

6.6.1.3 Comparação entre os efeitos dos ensaios de atividade antioxidante

Foram comparadas as atividades antioxidantes pelo teste com DPPH e com β-caroteno/ácido linoléico dos extratos de galhos e raízes (gráfico 2, pág. 218). Nesta comparação foram utilizados os valores da porcentagem de proteção à oxidação via teste β-caroteno/ácido linoléico e os valores da porcentagem de inibição da oxidação do DPPH na maior concentração testada (200 µg/mL nos dois ensaios). Os resultados obtidos demonstram que a composição química dos extratos de galhos e raízes tem realmente uma boa capacidade de inibição da oxidação, pois em ambos os testes os resultados indicaram uma ação antioxidante potente dos dois extratos avaliados.

Gráfico 2. Comparativo da atividade antioxidante avaliada através da inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e do DPPH.



6.6.2 Ensaio de atividade antifúngica

Todos os triterpenos isolados dos galhos de *C. laxum* (I, II, III, VII, VIII, XI e as misturas de III e IV, V e VI e IX e X), exceto ácido maslínico (XII), foram testados com relação à atividade antifúngica frente às cepas padrão das leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (tabela 36, pág. 219), empregando-se o método da microdiluição. Os valores da concentração mínima inibitória (CIM) obtidos são apresentados na tabela 36, pág. 219.

Tabela 36. Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para as substâncias isoladas de *C. laxum* frente às cepas fúngicas de *Candida* e *Cryptococcus*.

Substâncias	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32045
Ácido Betulínico (I)	100	200	100
Quadranosídeo I (II)	200	200	200
Ácido Arjunólico (III)	50	50	50
Ácido Arjunólico (III) e Ácido Asiático (IV)	200	200	200
Arjunglucosídeo II (V) e Quadranosídeo IV (VI)	200	200	200
2 α ,3 β ,24-triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VII)	200	200	200
2 α ,3 β ,6 β -triidroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VIII)	200	200	200
Bellericosídeo (IX) e 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxiursan-12-en-28-oato de β -D-glucopyranosila (X)	200	200	200
Chebulosídeo II (XI)	200	200	100
Anfotericina B	0,25	0,50	0,50

Todas as amostras apresentaram atividade antifúngica contra as cepas testadas, sendo que o ácido arjunólico (III) foi o triterpeno mais ativo, pois apresentou uma inibição de crescimento fúngico a uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ frente às três cepas. O ácido betulínico (I) apresentou maior atividade contra *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* (CIM = 100 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que o chebulosídeo II (XI) apresentou uma atividade mais acentuada apenas para *C. neoformans* (MIC = 100 $\mu\text{g/mL}$).

Embora extratos brutos de várias plantas da família Combretaceae, a maioria ocorrendo no continente Africano, tenham apresentado propriedades antifúngicas contra leveduras e/ou fungos filamentosos [LIU, 2007; MASOKO, 2007; ASRES, 2006; BATAWILA, 2005; FYHRQUIST, 2004], apenas alguns trabalhos relatam as atividades antifúngicas de triterpenos pentacíclicos obtidos destas espécies, a maioria pertencente ao gênero *Terminalia* [SRIVASTAVA, 2001; CHOUKSEY, 2001; NANDY, 1997]. Recentemente, através de fracionamento bioguiado de extratos brutos de folhas de *Combretum nelsonii*, uma mistura de ácidos arjunólico e asiático apresentou forte atividade contra *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, sendo também ativa contra fungos filamentosos [MASOKO, 2008]. No entanto, estes triterpenos (III e a mistura de III e IV)

apresentaram fraca atividade contra as cepas de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* utilizadas utilizadas no presente trabalho.

6.6.3 Ensaio de atividade citotóxica

O ensaio de atividade citotóxica frente a *Artemia salina* é um ensaio preliminar a respeito da potencial toxicidade da amostra testada [MEYER e FERRIGNI, 1982]. O ensaio de atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas se constitui de um teste mais específico a fim de avaliar o potencial da substância para inibir o crescimento de células neoplásicas.

6.6.3.1 Ensaio de atividade citotóxica frente a *A. salina*

O ensaio de atividade citotóxica frente a *A. salina* foi realizado apenas com os extratos etanólicos de galhos e raízes de *C. laxum*. Estes extratos apresentaram valores de DL₅₀ próximos a 1000 µg/mL (tabela 37, pág. 219), indicativos de fraca toxicidade neste ensaio preliminar.

Tabela 37. Atividade citotóxica avaliada frente a *A. salina*

Amostra	DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de eficácia
Galhos	974,66	670,46 – 1416,89
Raízes	948,65	735,87 – 1222,95

6.6.3.2 Ensaio de atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas

Fenantrenos e derivados de ocorrência natural têm apresentado diversas atividades biológicas, particularmente propriedades citotóxicas, conforme mencionado nos itens 3.2.1 e 6.2.

No presente trabalho, foi avaliada a atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas dos extratos de galhos e raízes de *C. laxum* e também substâncias isoladas pela partição do extrato etanólico das raízes: 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (XIII); 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (XIV); 6-metoxicoelanina (XV); 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (XVI); calosina (XVII); 4'-hidróxi-3,3',4-triidróxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila (XVIII) e siringaresinol (XIX).

Foram empregados nos ensaios as linhagens 786-0 (ATCC – CRL-1932, carcinoma de rim), UACC (melanoma), PC-3 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata) e MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama), doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP.

Para a avaliação da atividade antineoplásica, o teste de citotoxicidade mais utilizado na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação de drogas anticâncer é o Teste da Sulforrodamina B (SRB) [SKEHAN, 1990]. Este teste constitui-se em um método simples, sensível, reprodutível e rápido [HOUGHTON, 2007].

Os extratos testados apresentaram bons resultados em pelo menos uma das linhagens testadas. O extrato dos galhos resultou na inibição de 50% do crescimento celular (PC-3) a uma concentração de 1,8 µg/ml, valor de atividade considerado muito forte, até mesmo quando comparado com o controle positivo (cisplatina). O extrato das raízes apresentou bom resultado frente a UACC-62 (IC₅₀= 8,3 µg/ml) e também frente a MCF7 (IC₅₀< 30,0 µg/ml) (tabela 38, pág. 222).

Tabela 38. Valores de IC₅₀ (µg/ml) obtidos para extratos de *C. laxum* frente às linhagens de células neoplásicas.

Amostras testadas	Linhagens de células testadas			
	786-0	UACC-62	PC-3	MCF7
Extrato de Folhas	30,0	116,9	97,8	73,4
Extrato de Galhos	NT	134,9	1,8	NT
Extrato de Raízes	>30,0	8,3	196,6	<30,0

786-0 (ATCC – CRL-1932, carcinoma de rim), UACC-62 (melanoma), PC-3 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata) e MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama).

As substâncias puras testadas foram isoladas das raízes de *C. laxum*. Resultados significativos foram obtidos com as substâncias **XIV**, **XV** e **XVI**. Dentre elas, apresentou um excelente resultado a 6-metoxicoelonina (**XV**), que inibiu o crescimento celular da UACC-62 em 50% em uma concentração de apenas 0,7 µg/ml, resultado considerado fortíssimo. Uma atividade moderada foi observada para esta substância frente à linhagem MCF7 (IC₅₀= 12,7 µg/ml). A substância 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (**XVI**) apresentou boa atividade frente à MCF7 em uma concentração de 12,7 µg/ml. Outras substâncias que apresentaram atividade em concentrações na faixa de 15,0 µg/ml a 30,0 µg/ml (e também consideradas moderadamente potentes) foram 2,7-diidroxi-4,6-dimetoxifenantreno (**XIII**) 2,6-diidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (**XIV**) e siringaresinol (**XIX**) frente à linhagem 786-0 (IC₅₀= 19,8, 19,3 e 24,2 µg/ml, respectivamente) (tabela 39, pág. 223).

Tabela 39. Valores de IC₅₀ obtidos para e substâncias puras isoladas de *C. laxum* frente à atividade citotóxica.

Amostras testadas	Linhagens de células testadas			
	786-0	UACC-62	PC-3	MCF7
4'-hidroxi-3,3',4-triidroxi-5-(3,4,5-trimetoxifenoxi)-bibenzila (XVIII)	53,1	NT	40,1	34,2
6-metoxicoelonina (XV)	>10,0	0,7	109,9	12,7
calosina (XVII)	69,5	NT	147,7	43,3
siringaresinol (XIX)	24,2	96,6	192,8	80,0
2,6-diidroxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (XVI)	60,3	67,0	NT	12,7
2,6-diidroxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (XIV)	19,3	NT	NT	67,9
2,7-diidroxi-4,6-dimetoxifenantreno (XIII)	19,8	NT	59,0	32,0
Cisplatina (cont. positivo)	3,9	2,1	>10,0	6,6

786-0 (ATCC – CRL-1932, carcinoma de rim), UACC-62 (melanoma), PC-3 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata) e MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama). NT: Não testado.

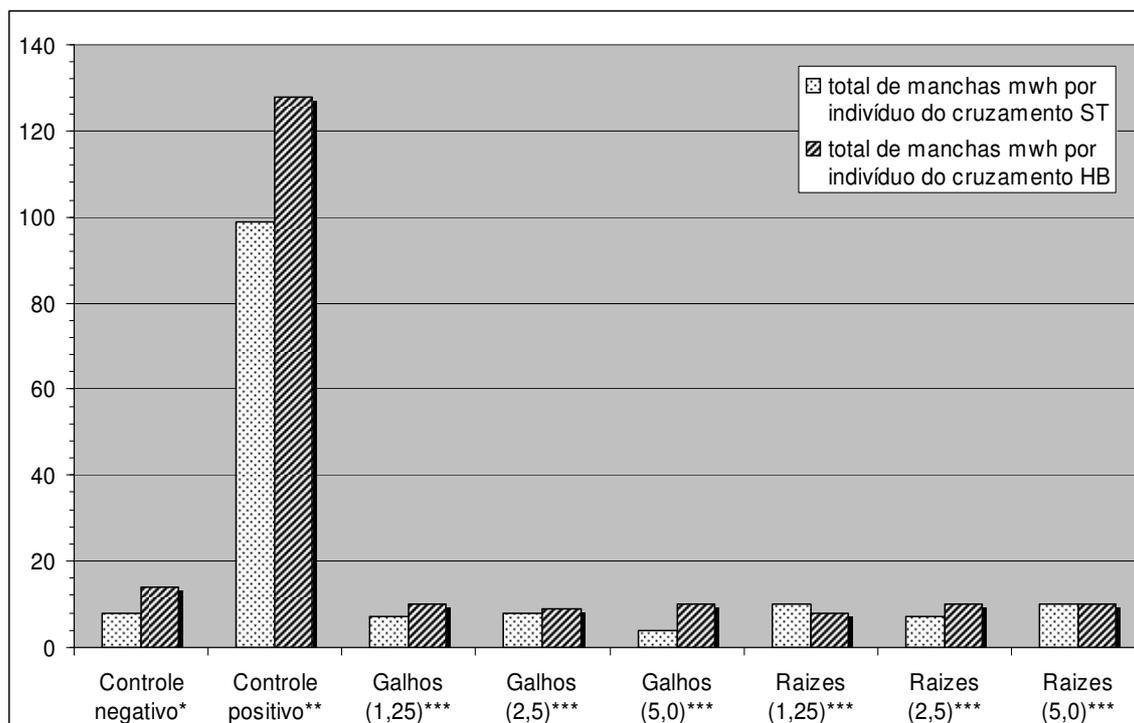
As informações sobre a atividade citotóxica das substâncias XIII, XIV, XVI, XVII e XVIII estão sendo fornecidas pela primeira vez, assim como sobre a atividade citotóxica de XV frente às linhagens 786-0 e UACC-62.

6.6.4 Ensaio de atividade Mutagênica/ Antimutagênica

A avaliação das atividades mutagênica/antimutagênica foi realizada através do ensaio SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) [GRAF, 1984]. Foram testados os extratos brutos de galhos e raízes de *C. laxum*, bem como as substâncias puras, ácido arjunólico (III) e ácido betulínico (I).

Os extratos de galhos e raízes foram testados frente a dois tipos de cruzamentos de *D. melanogaster*; cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB). Os resultados observados para ambos os extratos foram semelhantes aos do controle negativo em todas as concentrações testadas, ou seja, estes extratos não têm efeito mutagênico, nas concentrações avaliadas, tanto para o cruzamento ST como para o cruzamento HB (gráfico 3, pág. 224).

Gráfico 3. Frequências totais de manchas *mwh* observada em células de asas de *D. melanogaster*, após tratamento crônico com extrato etanólico de galhos e raízes.



* água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol

** Cloridrato de Doxorubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL

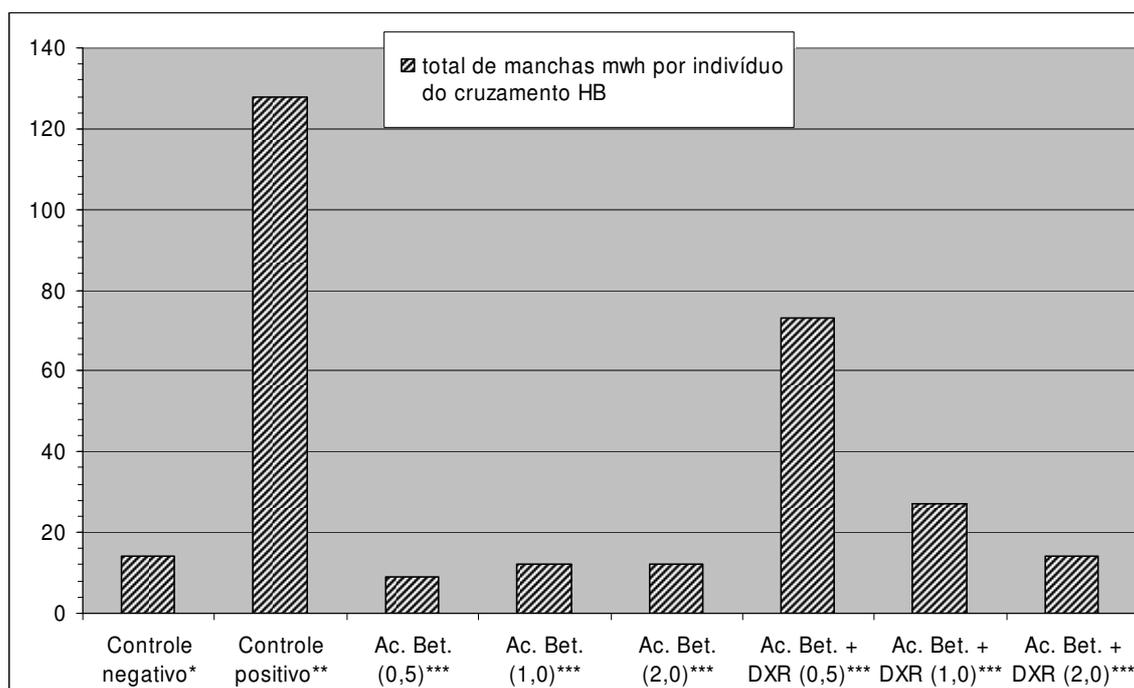
*** Concentração em mg/mL

Uma vez que os extratos não apresentaram atividade mutagênica, foi avaliada não só a atividade mutagênica como também a antimutagênica (ou seja, a capacidade de proteção contra agentes mutagênicos) de duas das substâncias isoladas no presente trabalho: ácido arjunólico (III) e ácido betulínico (I).

O ácido betulínico foi testado com indivíduos do cruzamento HB nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL. Os resultados obtidos indicam que a substância não apresentou atividade mutagênica, sendo observado um número de manchas próximo aos do controle negativo. No protocolo de antimutagenicidade, o ácido betulínico nas concentrações (0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL) foi associado ao agente mutagênico cloridrato de doxorubicina (DXR). Os resultados obtidos, quando comparados com os do controle positivo (DXR), indicam que na concentração de 0,5 mg/mL o ácido betulínico inibiu a atividade mutagênica do DXR em (43%), na concentração de 1,0 mg/mL em 78% e na concentração 2,0 mg/mL, o

número de manchas foi igual ao obtido para o controle negativo. Os resultados obtidos com o SMART indicam que esta substância apresenta uma pronunciada atividade antimutagênica (gráfico 4, pág. 225).

Gráfico 4. Freqüências totais de manchas *mwh* observada em células de asas de *D. melanogaster*, após tratamento crônico com ácido betulínico.



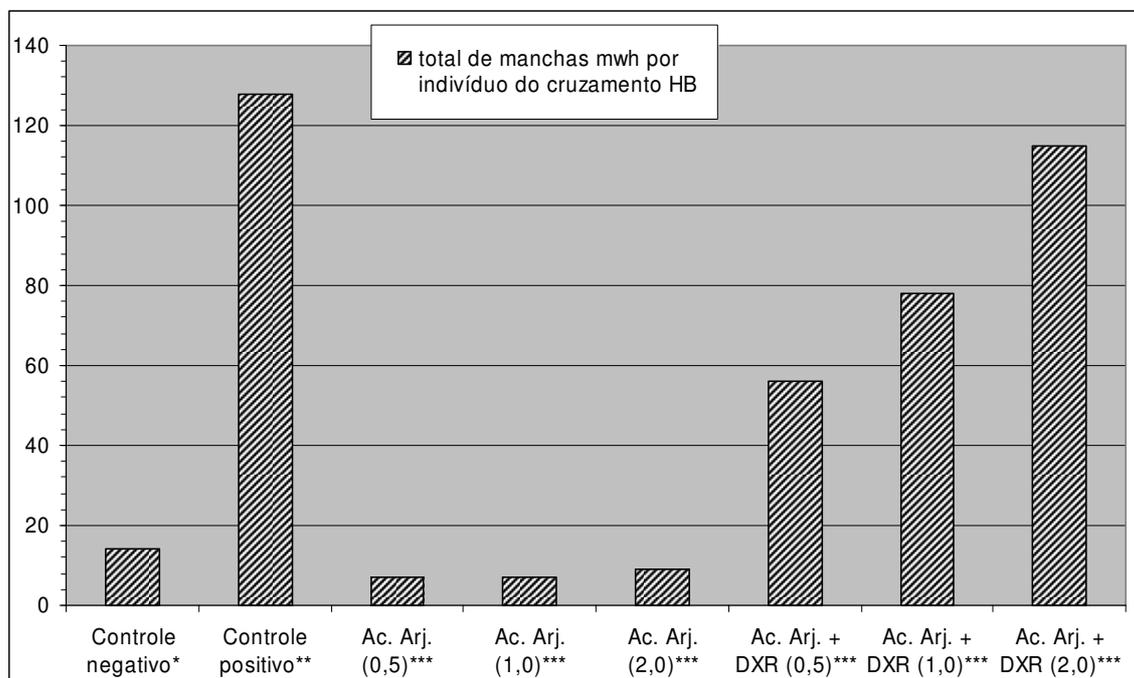
* água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol

** Cloridrato de Doxorubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL

*** Concentração em mg/mL

O ácido arjunólico foi testado apenas com indivíduos do cruzamento HB, nas concentrações (0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL). Os resultados obtidos, quando comparados com os do controle negativo, indicam que o ácido arjunólico, não apresentou atividade mutagênica. No entanto, quando foi associado com DXR, verificou-se que na concentração de 0,5 mg/mL, o ácido arjunólico inibiu a atividade mutagênica do DXR em 56%, na concentração de 1,0 mg/mL em 39% e na concentração 2,0 mg/mL em 10%. O número de manchas diminuiu, quando comparadas com o DXR puro, caracterizando efeito de antimutagênico (gráfico 5, pág. 226).

Gráfico 5. Frequências totais de manchas *mwh* observada em células de asas de *D. melanogaster*, após tratamento crônico com ácido arjunólico.



* água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol

** Cloridrato de Doxorubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL

*** Concentração em mg/mL

6.4.5 Ensaio de atividade antibacteriana

No presente trabalho foram também avaliadas as atividades antibacterianas dos extratos etanólicos de galhos e raízes de *C. laxum*, das fases de partição do extrato das raízes: em acetato de etila, butanólica e aquosa; das fases de partição do extrato dos galhos: em acetato de etila, butanólica e metanol/água; e também de uma substância pura: ácido arjunólico (III) frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os resultados são apresentados na tabela 40 (pág. 227).

Os extratos brutos de galhos e raízes forneceram tiveram um resultados satisfatórios, com potencial atividade antibacteriana, especialmente o extrato de raiz (CIM= 250 µg/mL. Para as fases de partição, apenas as fases em acetato de etila, butanólica e aquosa das raízes apresentaram potencial atividade antibacteriana, apresentando valores de concentração inibitória mínima entre 125 e 250 µg/mL. A substância pura, ácido arjunólico

(III), apresentou uma atividade contra *S. aureus* pouco significativa (CIM= 200 µg/ml) valor considerado moderado para uma substância pura.

Tabela 40. Valores da CIM (µg/mL) obtidos para os extratos, frações e ácido arjunólico (III) obtidos de *C. laxum* frente a *S. aureus*.

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Extrato de Galhos	500
Extrato de Raízes	250
Fase AcOEt dos galhos	1000
Fase BuOH dos galhos	500
Fase MeOH/H₂O dos galhos	1000
Fase AcOEt das raízes	250
Fase BuOH das raízes	250
Fase aquosa das raízes	125
Ácido arjunólico	200
Clorafenicol (controle positivo)	1,0

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico dos galhos e raízes de *C. laxum* resultou no isolamento e caracterização de vinte e quatro substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários, incluindo:

- doze triterpenos pentacíclicos, sendo dois com esqueleto lupano, ácido betulínico (I) e quadranosídeo I (II), sete com esqueleto oleanano, ácido arjunólico (III), ácido asiático (IV), arjunglucosídeo II (V), quadranosídeo IV (VI), 2 α ,3 β ,24-triidroiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VII), 2 α ,3 β ,6 β -triidroiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (VIII), bellericosídeo (IX) e ácido maslínico (XII), e dois com esqueleto ursano, 2 α ,3 β ,23,24-tetraidroxiursan-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila (X) e chebulosídeo II (XI);

- dois fenantrenos, 2,7-diidróxi-4,6-dimetoxifenantreno (XIII) e 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetoxifenantreno (XIV), três 9,10-diidrofenantrenos, 6-metoxicoelonina (XV), 2,6-diidróxi-3,4,7-trimetóxi-9,10-diidrofenantreno (XVI) e calosina (XVII) e uma bibenzila, 4'-hidróxi-3,3',4-triidroxi-5-(3'',4'',5''-trimetoxifenoxi)-bibenzila (XVIII);

- uma lignana, siringaresinol (XIX);

- uma naftoquinona, lapachol (XX);

- dois derivados do ácido benzóico, ácido-3,4-dimetoxibenzóico (XXI) e ácido-3-hidróxi-4-metoxibenzóico (XXII);

- dois flavonóides, apigenina-5-metil-éter (XXIII) e sulfuretina (XXIV).

Dentre os triterpenos isolados, VII e X são inéditos na literatura, VIII é descrito pela primeira vez em Combretaceae e IV e IX são inéditos no gênero *Combretum*, enquanto XI foi descrito em apenas uma espécie de *Combretum* e II relatado em apenas duas espécies vegetais, sendo uma delas *Combretum quadrangulare*.

Com relação aos compostos aromáticos obtidos, a bibenzila XVIII é inédita, o fenantreno XIII, os diidrofenantrenos XV e XVII, a lignana XIX, a naftoquinona XX, os derivados do ácido benzóico XXI e XXII e os flavonóides XXIII e XXIV são de ocorrência inédita em Combretaceae, enquanto que o fenantreno XIV foi descrito uma

única vez em *Combretum apiculatum* e **XVI** relatado apenas em *Combretum molle* e *C. apiculatum*.

O isolamento de derivados fenantrênicos, diidrofenantrênicos e bibenzílicos de *Combretum laxum* é digno de nota, pois embora estas classes de metabólitos secundários sejam de comum ocorrência em espécies de *Combretum* Africanas, nunca haviam sido descritas em uma espécie deste gênero no continente Americano.

Embora alguns flavonóides tenham sido obtidos de espécies de Combretaceae, o relato da ocorrência de auronas nesta família era, até o presente trabalho, inexistente. O mesmo pode ser afirmado para a ocorrência de naftoquinonas em Combretaceae, enquanto que são raros os relatos de lignanas nesta família.

Dentre os resultados obtidos com os ensaios de atividade biológica realizados com algumas das substâncias isoladas, destacaram-se: as atividades citóxicas significativas de **XV** contra células UACC e MCF7, de **XVI** frente a células MCF7 e de **XIII**, **XIV** e **XIX** frente a células 786-0; a atividade antimutagênica do triterpeno **I**; as atividades antioxidantes de **XIII**, **XVII** e **XIX** no ensaio com DPPH e a atividade antifúngica moderada do triterpeno **III**.

Os resultados relativos ao isolamento, caracterização e avaliação de atividade antifúngica dos triterpenos obtidos dos galhos de *C. laxum* foram motivo de recente publicação [BISOLI, 2008].

Além da relevância dos resultados citados, pode-se ressaltar ainda neste trabalho a contribuição dada para o conhecimento da composição química de espécies de Combretaceae, particularmente as do gênero *Combretum*, que ocorrem em Mato Grosso do Sul, bem como fornecimento de dados que poderão nortear futuramente a execução de novos trabalhos relativos ao isolamento, elucidação estrutural e avaliação de atividades biológicas de substâncias afins.

8. BIBLIOGRAFIA

ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. *Journal of Natural Products*, **64**, 360-363, 2001a.

ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. 1-*O*-Galloyl-6-*O*-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy)benzoyl- β -D-glucose, a New Hepatoprotective Constituent from *Combretum quadrangulare*. *Planta Medica*, **67**, 370-371, 2001b.

ADRIAN-ROMERO, M.; BLUNDEN, G.; PATEL, A. V.; ARMSTRONG, N.; MELENDEZ, P.; CUERVO, A. C. Betaines and N-methylprolines from Venezuelan plants. *Natural Product Communications*, **2**, 863-868, 2007.

AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R. S. ^{13}C MNR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **23**, 389-418, 1985.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam, Elsevier, 1989.

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, **31**, 3307-3330, 1992.

ANGEH, J. E.; HUANG, X.; SATTLER, I.; SWAN, G. E.; DAHSE, H.; A. HARTL, A.; ELOFF, J. N. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, 56-60, 2007.

ANGEH J.E.; HUANG X.; SWAN G.E.; MOLLMAN U.; SATTLER I.; ELOFF J.N. Novel antibacterial triterpenoid from *Combretum padoides* (Combretaceae). *ARKIVOC* 113-120, Part 9, 2007.

AHMAD, V. U.; RAHMAN, A. V. *Pentacyclic triterpenóids*. In: *Handbook of Natural Products Data*. Elsevier, v.2, 1994.

ASRES, K.; BUCAR, F.; KNAUDER, E.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H.; CROFT, S. L. *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytotherapy Research*, **15**, 613-617, 2001.

ASRES, K.; MAZUMDER, A.; BUCAR, F. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Combretum molle*. *Ethiopian Medical Journal*, **44**, 269-277, 2006.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **66**, 335-338, 1999.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Methyl Quadrangularates A—D and Related Triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **48**, 496-504, 2000.

BATAWILA, K.; KOKOU, K.; KOUMAGLO, K.; GBEASSOR, M.; DE FOUCAULT, B.; BOUCHET, PH.; AKPAGANA, K. Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolese traditional medicine. *Fitoterapia*, **76**, 264-268, 2005.

BIBBY, M. C. Combretastatin anticancer drugs. *Drug of the Future*, **27**, 475, 2002.

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

- BOUAZIZ, M.; SAYADI, S.; DAMAK, M.; GRAYER, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 236, 2005.
- BOYD, J.; TURVEY, J. R. Identification by N.M.R.-C-13 spectroscopy of oligosaccharides derived from alginic acid. *Carbohydrate Research*, **61**, 223-226, 1978.
- BRAHMACHARI, G.; GORAI, D. Progress in the research on naturally occurring flavones and flavonols: An overview. *Current Organic Chemistry*, **10**, 873-898, 2006.
- BROOKES, K. B.; DOUDOUKINA, O. V.; KATSOULIS, L. C.; VEALE, D. J. H. Uteroactive constituents from *Combretum kraussii*. *South African Journal of Chemistry-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Chemie*, **52**, 127-132, 1999.
- BURAPADAJA, S.; BUNCHOO, A. Antimicrobial Activity of Tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica*, **61**, 365-366, 1995.
- CÁCERES, J. M. S. L. <http://www.arboresornamentales.com/combretaceae.htm>, 2004
- CAMPOS, M. D.; ESPINOSA, J. F. P.; RAMIREZ, A. R.; MATA, R. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **114**, 161-168, 2007.
- CASTLEDEN, I. R.; HALL, S. R.; NIMGIRAWATH, S. THADANITI, S. WHITE, A. H. The flavonoids of *combretum-quadrangulare* - crystal-structures of the polymorphic forms of 5-hydroxy-2-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyphenyl)-3,7-dimethoxy-h-4-1-benzopyran-4-one. *Australian Journal of Chemistry*, **38**, 1177-1185, 1985.

CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug discovery. *Natural Product Reports*, **20**, 558-554, 2003.

CHOUKSEY, B. K.; SRIVASTAVA, S. K. New constituent from the roots of *Terminalia arjuna*: antifungal agent. *Indian Journal Chemistry*, **40B**, 354-356, 2001.

CLSI- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada 2ed. Norma M27-A2 do NCCLS, v.22, n.15, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

CLSI /NCCLS M-7-A6, Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard – Sixth edition. Wayne, 2005.

COOMBES, P. H.; ROGERS, C. B. Methyl Gardenolate A, A Novel Cycloartenoid Ester from the Leaves of *Combretum Woodii* (Combretaceae). *Natural Product Letters*, **16**, 301-304, 2002.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, **14**, 111-144, 1997.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products, a biosynthetic approach, 2^a ed., John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DZIERZBICKA, K.; KOLODZIEJCZYK, A. M. Combretastatin A-4 and its analogues as antineoplastic agents. *Polish Journal of Chemistry*, **78**, 323-341, 2004.

ELOFF, J. N.; FAMAKIN, J. O.; KATERERE, D. R. P. Isolation of an antibacterial stilbene from *Combretum woodii* (Combretaceae) leaves. *African Journal of Biotechnology*, **4**, 1167-1171, 2005.

FACUNDO, V. A.; RIOS, K. A.; MEDEIROS, C. M.; MILITÃO, J. S. L. T.; MIRANDA, A. L. P.; EPIFANIO, R. A.; CARVALHO, M. P.; ANDRADE, A. T.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16**, 1309-1312, 2005.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, C. A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 169-177, 2002.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HÆGGSTRÖM, C.-A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Antifungal activity of selected species of *Terminalia*, *Pteleopsis* and *Combretum* (Combretaceae) collected in Tanzania. *Pharmaceutical Biology*, **42**, 308-317, 2004.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; MURPHY, C.; ADLERCREUTZ, H. Preliminary antiproliferative effects of some species of *Terminalia*, *Combretum* and *Pteleopsis* collected in Tanzania on some human cancer cell lines. *Fitoterapia*, **77**, 358-366, 2006.

GALLO, M. B. C.; SILVA, F.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17**, 279-288, 2006.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MIGUEL, D. L. S.; SEREA, A. A. T.; PRADO, F. C. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14**, 461-465, 2003.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. ; SANTANA, A. L. B. D. ; ALVES, M. M., MATOS, M. F. C., SCALIANTE, A. M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17**, 1223-1228, 2006a.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; BISOLI, E. Triterpenos de *Combretum laxum*. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN 052, 2006b.

GARCÍA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P. E.; MELGUIZO, E.; PARRA, A.; SIMEÓ, Y. Remote hydroxylation of methyl groups by regioselective cyclopalladation. Partial synthesis of hyptatic acid-A. *Journal Organic Chemistry*, **72**, 3500-3509, 2007.

GRAF, U., WÜRGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUON, H., HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v.6, p. 153-188, 1984.

HARBONE, J. B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. The flavonoids. New York, Academic Press, 1975.

HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**, 33-38, 2004.

JOLY, A. B. *Botânica, Introdução à Taxonomia Vegetal*, São Paulo, editora EDUSP, 1975.

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

KOVÁCS, A.; VASAS, A.; HOHMANN, J. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*, **69**, 1084–1110, 2008.

KUNDU, A. P.; MAHATO, S. B. Triterpenoids and their glycosides from *Terminalia chebula*. *Phytochemistry*, **32**, 999- 1002, 1993.

LETCHER, R. M.; NHAMO, L. R. M. Chemical constituents of the Combretaceae. Part 1. Substituted phenanthrenes and 9,10-dihydrophenanthrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. *Journal of the Chemical Society*, **18**, 3070-3076, 1971.

LETCHER, R. M.; NHAMO, L. R. M. Chemical Constituents of the Combretaceae. Part 111.1 Substituted Phenanthrenes, 9,1 O-Dihydrophenanthrenes, and Bibenzyls from the Heartwood of *Combretum psidioides*. *Journal Chemical Society*, **23**, 2941- 2946, 1972.

LETCHER, R. M.; NHAMO, L. R. M. Structure of orchinol, loroglossol, and hircinol. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, **12**, 1263-1265, 1973.

LEWIS, N. G.; KATO, M. J.; LOPES, N.; DAVIN, L.B. Lignans: diversity, biosynthesis and function. In: chemistry of the Amazon. American Chemical Society, 1^a ed. Washington DC, **1**, 135 – 167, 1995.

LIMA, S. G.; SILVEIRA, E. R. 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN – 155, 2000.

LIRA, S. R. D.; ALMEIDA, R. N.; ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S.; DUARTE, J.C. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *Combretum leprosum*. *Pharmaceutical Biology*, **40**, 213–215, 2002.

LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*, **42**, 325-329, 2007.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Instituto Plantarum de Estudos e da Flora LTDA. São Paulo, v.2, p. 96, 2002.

MABRY, T. J.; MARKITAM, K. R.; THOMAS, M.B. *The Systematic Identification of flavonoids*. Berlin, Springer-Verlag, 1970.

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

MAJUNDER, P. L.; BANERJEE, S.; SEN, S. Three stilbenoids from the orchid *Agrostophyllum callosum*. *Phytochemistry*, **42**, 847-852, 1996.

MALAN, E.; SWINNY, E. Substituted bibenzyls, phenanthrenes and 9,10-dihydrophenanthrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. *Phytochemistry*, **34**, 1139-1142, 1993.

MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). *South Africa Journal Botanical*, **73**, 173-183, 2007.

MASOKO, P.; MDEE, L. K.; MAMPURU, L. J.; ELOFF, J. N. Biological activity of two related triterpenes isolated from *Combretum nelsonii* (Combretaceae) leaves. *Natural Product Research*, **22**, 1074-1084, 2008.

MARTINS, M. Estudo químico da raiz, caule subterrâneo e folhas de *Aioeia trinervis*. Campo Grande, 2004. Dissertação (Mestrado em química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. A comparison

of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal Applied Phycology*, **9**, 29-35, 1997.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp – a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica*, **45**, 31-34, 1982.

MILLER, H.E. Simplified method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **48**, 91, 1971.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAU, K.; VISTICA, D.; CURTIS, H.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 11, 1991.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858, 2000.

NANDY, A. K.; PODDER, G.; SAHU, N. P.; MAHATO, S. B. Triterpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. *Phytochemistry*, **28**, 2769-2772, 1989.

NANDY, A. K.; CHAKRABORTY, A.; PODDER, G. Antimicrobial activity of *Terminalia bellerica* triterpenoids. *Fitoterapia*, **68**, 178-180, 1997.

NAWWAR, M. A. M.; BUDDRUS, J.; BAUER, H. Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*; *Phytochemistry*, **21**, 1755-1758, 1982.

OJEWOLE, J.A.O. Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1 alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) leaf. *Phytotherapy Research*, **22**, 30-35, 2008.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. *Química Nova*, **13**, 278-281, 1990.

PARK, B. S.; LEE, H. K.; LEE, S. E.; PIAO, X. L.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHN, Y. J.; KIM, J. H.; Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, **105**, 255–262, 2006.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; NIVEN, M.L.; HAM EL, E.; SCHMIDT, J. M. Antineoplastic agents .124. Isolation, structure, and synthesis of combretastatin-a-1 and combretastatin-b-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from combretum-caffrum. *Journal of Natural Products*, **50**, 119-131, 1987a.

PETTIT, G. R.; CRAAG, G. M.; SINGH, S. B. Antineoplastic agents .122. Constituents of *Combretum caffrum*. *Journal of Natural Products*, **50**, 386-391, 1987b.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; SCHMIDT, J. M.; NIVEN, M. L.; HAMEL, E.; LIN, C. M. Antineoplastic agents .131. Isolation, structure, synthesis, and antimitotic properties of combretastatins b-3 and b-4 from *Combretum caffrum*. *Journal of Natural Products*, **51**, 517-527, 1988a.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; NIVEN, M. L.; SCHMIDT, J. M. Cell growth inhibitory dihydrophenanthrene and phenanthrene constituents of the African tree *Combretum caffrum*. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie*, **66**, 406-413, 1988b.

PETTIT, G. R., SINGH, S. B., HAMEL, E., LIN, C. H., ALBERTS, D. S., GARCIA-KENDALL, D. Antineoplastic agents .145. Isolation and structure of the strong cell-growth and tubulin inhibitor combretastatin-A-4. *Experientia*, **45**, 209-211, 1989.

PETTIT, G. R., SINGH, S. B., BOYD, M. R., HAMEL, E., PETTIT, R. K., SCHMIDT, J. M., HOGAN, F. Antineoplastic agents .291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6. *Journal of Medicinal Chemistry*, **38**, 1666-1672, 1995a.

PETTIT, G. R., TEMPLE, C. Jr., NARAYANAN, V. L., VARMA, R., SIMPSON, M. J., BOYD, M. R., REUER, G. A., BANSAL, N. Antineoplastic agents-322 - synthesis of combretastatin A-4 prodrugs. *Anti-Cancer Drug Design*, **10**, 299-309, 1995b.

PETTIT, G. R.; LIPPERT III, J. W.; HERALD, D. L.; HAMEL, E.; PETTIT, R. K. Antineoplastic agents 440. Asymmetric synthesis and evaluation of the combretastatin A-1 SAR probes (1S,2S)- and (1R,2R)-1,2-dihydroxy-1-(2',3'-dihydroxy-4'-methoxyphenyl)-2-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl)-ethane. *Journal of Natural Products*, **63**, 969-974, 2000.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C. Ethnopharmacology and western medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **25**, 61-72, 1998.

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

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, **25**, 45-61, 2002.

PIO CORREA, M. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*, v.5, 364, 2005.

POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J. The aldrich library of ^{13}C and ^1H NMR, v. 2, edition I, 1993.

RAMANATHAN, R.; TAN, C. H.; DAS, N. P. Cytotoxic effects of plant polyphenols and fat-soluble vitamins on malignant human culture cells. *Cancer Letters*, **62**, 217, 1992.

SAZIMA, M.; VOGEL, S.; DO PRADO, A. L.; DE OLIVEIRA, D. M.; FRANZ, G.; SAZIMA, I. The sweet jelly of *Combretum lanceolatum* flowers (Combretaceae): a cornucopia resource for bird pollinators in the Pantanal, western Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, **227**, 195-208, 2001.

SCHWIKKARD, S.; ZHOU, B. N.; GLASS, T. E.; SHARP, J. L.; MATTERN, M. R.; JOHNSON, R. K.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive compounds from *Combretum erythrophyllum*. *Journal of Natural Products*, **63**, 457-460, 2000.

SCHESSL, M. Floristic composition and structure of floodplain vegetation in the northern Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Phyton-Annales Rei Botanicae* **39**, 303-336, 1999.

SILVA, O.; DUARTE, A.; CABRITA, J.; PIMENTEL, M.; DINIZ, A.; GOMES, E. Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, **50**, 55-59, 1996.

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

http://www.welrbraga.cjb.net/publica/rodriguesia/Rodrig56_86/02_04_combretaceae.pdf#search=%22arbusto%20escandente%22

SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 2ª ed. Ver. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.

SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAU, K.; VISTICA, D.; CURTIS, H.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of Natural Cancer Institute*, **83**, 11, 1991.

SRIVASTAVA, S. K.; SRIVASTAVA, S. D.; CHOUKSEY, B. K. New antifungal constituents from *Terminalia alata*. *Fitoterapia*, **72**, 106-112, 2001.

TRAN, K. *et al.*, Medicinal Plants in Vietnam *Science and Technology Publishing House*, p.119, 1990.

XUE ZHANG; JIE-KUN XU; WANG, J.; WANG, N.; KURIHARA, H.; KITANAKA, S.; YAO, X.; *Journal of Natural Products*, **70**, 24, 2007.

YAMAGISHI, T.; ZHANG, D. C.; CHANG, J.J.; MCPHAIL, D. R.; MCPHAIL, A. T.; LEE, K. H. Antitumour agents .94. The cyto-toxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and acid-B. *Phytochemistry*, **27**, 3213-3216, 1988.

YOUNG, S. L.; CHAPLIN, D. J. Combretastatin A4 phosphate: background and current clinical status. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **13**, 1171-1182, 2004.

WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM B. H.; VONTHRON-SENECHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochisia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytotherapy Research*, **19**, 75-77, 2005.

http://www1.unimed.com.br/nacional/bom_dia/saude_destaque.asp?nt=4614, Acessado em novembro de 2006.

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml/shtm>, acessado em setembro de 2008.