

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA
E ANTIOXIDANTE DE *Paullinia weinmanniaefolia***

GRAZIELLA PENHA CLAUDINO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

SETEMBRO - 2005



ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE *Paullinia weinmanniaefolia*

GRAZIELLA PENHA CLAUDINO

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

Orientadora: Professora Doutora Leda Mathias

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
SETEMBRO - 2005



ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE *Paullinia weinmanniaefolia*

GRAZIELLA PENHA CLAUDINO

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

Comissão Examinadora:

Prof. Ivo José Curcino Vieira (Doutor, Química orgânica) - UENF

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Doutor, Química orgânica) - UENF

Prof^a. Laura Jane Moreira Santiago (Doutora, Ciências Biológicas) - UNIRIO

Prof^a. Leda Mathias (Doutora, Química de Produtos Naturais) - UENF
(Orientadora)

Pedi, e dar-se-vos-à; buscai, e encontrareis; batei, e abrir-se-vos-à.

(Mateus,7:7)

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais que sempre apóiam e confiam nos meus projetos.



AGRADECIMENTOS

Á Deus em primeiro lugar.

Aos meus pais e meu irmão por todo incentivo e paciência.

Ao Acássio por todo apoio e incentivo.

A professora Dra. Leda Mathias pelos valiosos ensinamentos, sugestões, apoio, confiança e principalmente pela amizade.

Ao professor Dr. Ivo José Curcino Vieira pela inestimável ajuda e valiosas sugestões.

Ao professor Carlos Roberto Ribeiro Matos pela contribuição e sugestões.

Ao professor Dr. Raimundo Braz-Filho pela importante colaboração na determinação estrutural das substâncias isoladas.

A professora Dra. Laura Jane Santiago Moreira pelas contribuições e sugestões.

Á Tânia e Maristela pela gentileza e atenção.

Aos técnicos Roberto e Wallace pela obtenção dos espectros de RMN, IV e CG-EM.

Aos estagiários Maylline, Luiz e Juliana pelo apoio e colaboração.

Ao diretor do CCT professor Dr. Paulo Roberto Nagipe pela concessão do carro para coleta da planta.

Ao Dr. Jorge Assumpção pela importante contribuição na coleta e identificação da planta estudada.

Aos demais professores do curso de pós-graduação em Ciências Naturais que contribuíram para o trabalho desta tese.

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciência e Tecnologia (CCT) pelo oferecimento do curso de Mestrado em Ciências Naturais e pela bolsa concedida.

A todos os colegas de laboratório que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, pelas sugestões e pelo ótimo convívio no laboratório.

Ao Ildomar pela importante ajuda, paciência e pelas palavras de encorajamento.

As amigas Ana Brígida e Jalile pelo apoio, amizade e convívio harmonioso.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e símbolos	
Lista de Esquemas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Abstract	
1.0 – Introdução	1
2.0 - Revisão de Literatura	8
2.1 - A Família Sapindaceae	8
2.1.2 - A fitoquímica da família Sapindaceae	17
2.2 -O gênero <i>Paullinia</i>	40
2.2.1- A fitoquímica do gênero <i>Paullinia</i>	40
2.3 - A espécie <i>Paullinia weinmanniaefolia</i>	42
3.0 - Objetivos gerais	43
3.1 - Objetivos específicos	43
4.0 - Materiais e métodos	44
5.0 - Parte Experimental	45
5.1 - Coleta da planta	45
5.2 - Preparação dos extratos	45
5.3 - Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>P. weinmanniaefolia</i>	46
5.4 - Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico das folhas de <i>P. weinmanniaefolia</i>	48
5.5 - Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico do caule de <i>P. weinmanniaefolia</i>	49

5.6 - Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de <i>P. weinmanniaefolia</i>	50
5.7 - Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico do caule de <i>P. weinmanniaefolia</i>	52
6.0 - Constituintes químicos isolados da espécie <i>P. weinmanniaefolia</i>	54
6.1 - Triterpenos	54
6.2 - Esteróides	55
6.3 - Ciclitóis	55
7.0 - Resultados e discussões	56
7.1 - Triterpenóides	56
7.1.1 - Algumas características dos metabólitos encontrados em <i>P. weinmanniaefolia</i>	57
7.1.2 - Biossíntese de triterpenóides	57
7.1.3. - Determinação estrutural da substância PW-01	61
7.1.4. - Determinação estrutural da substância PW-02	76
7.1.5. - Determinação estrutural da substância PW-03	100
7.1.6. - Determinação estrutural das substâncias PW-04, PW-05 e PW-06	113
7.1.7. - Determinação estrutural da substância PW-07	129
7.1.8. - Determinação estrutural da substância PW-08	137
7.2 - Esteróides	147
7.2.1 - Determinação estrutural das substâncias PW-09 e PW-10	147
7.3 - Ciclitóis	157
7.3.1 - Propriedades biológicas dos ciclitóis	158
7.3.2 - Determinação estrutural da substância PW-11	159
7.3.3 - Determinação estrutural da substância PW-12	170
8.0 - Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante dos extratos brutos de <i>P. weinmanniaefolia</i>	189

8.1 - Ensaio de citotoxicidade frente as larvas de <i>Artemia salina</i>	189
8.1.1 - Introdução	189
8.1.2 - Metodologia	190
8.2 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos de <i>P. weinmanniaefolia</i>	192
8.2.1 - Introdução	192
8.2.2 - Metodologia	193
9.0 - Conclusões	198
10.0 - Constantes físicas e dados espectrométricos	199
11.0 - Referências bibliográficas	205

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de Onda no Máximo de Absorção
δ	Deslocamento químico (ppm)
AA	Atividade antioxidante
Ac	Acetila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido Acético
Api	Apiose
APT	Attached Proton Test
Ara	Arabinose
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada preparativa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de
COSY	COrrrelation Spectroscopy
D	Dextrógira
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
DL ₅₀	Dose letal mínima responsável pela morte de 50% dos
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2-2-difenil-picril-hidrazil
EC ₅₀	Concentração efetiva responsável pela morte de 50% dos espécimes testados
EM	Espectro de massas
Gal	Galactose
Glc	Glicose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em Hertz)
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
Me	Metil
MeOH	Metanol
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation spectroscopy
OMe	Metoxila
pf	Ponto de fusão
ppm	Parte por milhão
Pr	Propila

RDA	Rearranjo do tipo Diels-Alder
Rf	Fator de Retenção
Rha	Ramnose
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
s/	Singleto largo
t	Tripleto
Xyl	Xilose

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01 - Preparação dos extratos das folhas de <i>P. weinmanniaefolia</i>	45
Esquema 02 - Preparação dos extratos do caule de <i>P. weinmanniaefolia</i>	46
Esquema 03 - Fracionamento do extrato hexânico das folhas	47
Esquema 04 - Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas	48
Esquema 05 - Fracionamento do extrato hexânico do caule	49
Esquema 06 - Fracionamento do extrato diclorometânico do caule	51
Esquema 07 - Partição do extrato metanólico do caule	52
Esquema 08 - Fracionamento de uma alíquota acetilada do extrato metanólico do caule	53
Esquema 09 - Precursores e classes de terpenos	56
Esquema 10 - Ciclização do epóxido esqualeno	57
Esquema 11 - Formação dos curcubitanos e cicloartanos	58
Esquema 12 - Rotas biossintéticas para alguns esqueletos triterpênicos	59
Esquema 13 - Principais rearranjos do tipo Wagner-Merwein para formação do esqueleto friedelano	60
Esquema 14 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-01	65
Esquema 15 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-02	80
Esquema 16 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-03	103
Esquema 17 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-04, PW-05 e PW-06	116
Esquema 18 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-07	132
Esquema 19 - Biossíntese de ciclitóis	157
Esquema 20 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-11	162
Esquema 21 - Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-12	173

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - <i>Paullinia weinmanniaefolia</i>	03
Figura 02 - Vista panorâmica do complexo Lagunar Grussaí-IQUIPARÍ	04
Figura 03 - Constituintes químicos isolados de <i>P. weinmanniaefolia</i>	07
Figura 04 - Substâncias isoladas de espécies da família Sapindaceae	19
Figura 05 - Euforcinol (a), friedelina (b) e epifriedelanol (c)	62
Figura 06 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-01	66
Figura 07 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-01 (Expansão da região entre 0,71 - 1,28 ppm)	67
Figura 08 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-01	68
Figura 09 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-01 (Expansão da região entre 5,0 - 24,0 ppm)	69
Figura 10 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-01 (Expansão da região entre 25,0 - 47,0 ppm)	70
Figura 11 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-01 (Expansão da região entre 48,0 - 66,0 ppm)	71
Figura 12 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-01	72
Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-01 (Expansão da região entre 47,0 - 67,0 ppm)	73
Figura 14 - Espectro de Massas de PW-01	74
Figura 15 - Espectro de Infravermelho de PW-01	75
Figura 16 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-02	81

Figura 17 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-02 (Expansão da região entre 0,89 - 1,18 ppm)	82
Figura 18 - Mapa de correlação COSY ^1H x ^1H de PW-02	83
Figura 19 - Mapa de correlação NOESY ^1H x ^1H de PW-02	84
Figura 20 - - Mapa de correlação NOESY ^1H x ^1H de PW-02	85
Figura 21 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-02	86
Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-02 (Expansão da região entre 8,0 - 23,0 ppm)	87
Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-02 (Expansão da região entre 37,0 - 63,0 ppm)	88
Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-02	89
Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-02 (Expansão da região entre 27,0 - 44,0 ppm)	90
Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-02 (Expansão da região entre 39,0 - 61,0 ppm)	91
Figura 27 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) de PW-02	92
Figura 28 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) de PW-02	93
Figura 29 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMQC) de PW-02	94
Figura 30 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMBC) de PW-02	95
Figura 31 - Mapa de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C (HMBC) de PW-02	96

Figura 32 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-02	97
Figura 33 - Espectro de massas de PW-02	98
Figura 34 - Espectro de Infravermelho de PW-02	99
Figura 35 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-03	105
Figura 36 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-03 (Expansão da região entre 2,1 - 2,5 ppm)	106
Figura 37 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-03 (Expansão da região entre 3,5 - 5,4 ppm)	107
Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-03	108
Figura 39 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-03 (Expansão da região entre 5,0 - 24,0 ppm)	109
Figura 40 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-03 (Expansão da região entre 27,0 - 36,0 ppm)	110
Figura 41 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-03 (Expansão da região entre 37,0 - 68,0 ppm)	111
Figura 42 - Espectro de massas de PW-03	112
Figura 43 - Deslocamentos químicos observados para hidroxilas β e α do epifriedelanol	114
Figura 44 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-04 , PW-05 e PW-06	117
Figura 45 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-04 , PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 0,66 - 1,7 ppm)	118
Figura 46 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-04 , PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 2,2 - 4,0 ppm)	119
Figura 47 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-04 , PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 5,0 - 5,8 ppm)	120

Figura 48 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06	121
Figura 49 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 14,0 - 17,5 ppm)	122
Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 80,0 - 160,0 ppm)	123
Figura 51 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06	124
Figura 52 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 10,0 - 34,0 ppm)	125
Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06 (Expansão da região entre 31,0 - 65,0 ppm)	126
Figura 54 - Espectro de massas de PW-04, PW-05 e PW-06	127
Figura 55 - Espectro de infravermelho de PW-04, PW-05 e PW-06	128
Figura 56 - Friedelina (a) e epifiredelanol (c)	130
Figura 57 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-07	133
Figura 58 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-07 (Expansão da região entre 1,7 - 2,5 ppm)	134
Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-07	135
Figura 60 - Espectro de massas de PW-07	136
Figura 61 - Ácido oleanóico e PW-08	138
Figura 62 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-08	140
Figura 63 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-08 (Expansão da região entre 2,6 - 5,2 ppm)	141

Figura 64 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-08	142
Figura 65 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-08 (Expansão da região entre 0,0 - 150,0 ppm)	143
Figura 66- Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-08 (Expansão da região entre 11,0 - 42,0 ppm)	144
Figura 67 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-08 (Expansão da região entre 40,0 - 70,0 ppm)	145
Figura 68 - Espectro de infravermelho de PW-08	146
Figura 69 - Cromatograma de PW-09 e PW-10	148
Figura 70 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-09 e PW-10	150
Figura 71 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-09 e PW-10	151
Figura 72 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-09 e PW-10 (Expansão da região entre 27,0 - 44,0 ppm)	152
Figura 73 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-09 e PW-10 (Expansão da região entre 45,0 - 74,0 ppm)	153
Figura 74 - Espectro de massas de PW-09	154
Figura 75 - Espectro de massas de PW-10	155
Figura 76 - Estereoisômeros do inositol	158
Figura 77 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-11	163
Figura 78 - Mapa de correlação COSY ^1H x ^1H de PW-11	164
Figura 79 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-11	165
Figura 80 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-11 (Expansão da região entre 56,0 - 69,0 ppm)	166

Figura 81 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-11	167
Figura 82 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PW-11	168
Figura 83 - Espectro de massas de PW-11	169
Figura 84 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-12	174
Figura 85 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-12 (Expansão da região entre 0,7 - 1,5 ppm)	175
Figura 86 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-12 (Expansão da região entre 3,3 - 4,4 ppm)	176
Figura 87 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-12 (Expansão da região entre 4,9 - 5,8 ppm)	177
Figura 88 - Mapa de correlação COSY de PW-12	178
Figura 89 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-12	179
Figura 90 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-12 (Expansão da região entre 19,0 - 32,0 ppm)	180
Figura 91 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-12 (Expansão da região entre 57,0 - 76,0 ppm)	181
Figura 92 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-12 (Expansão da região entre 164,0 - 176,0 ppm)	182
Figura 93 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PW-12	183
Figura 94 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PW-12	184
Figura 95 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PW-12	185
Figura 96 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PW-12	186

Figura 97 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PW-12	187
Figura 98 - Espectro de massas de PW-12	188
Figura 99 - Gráficos da porcentagem de atividade antioxidante x concentração dos extratos brutos das folhas	197
Figura 100 - Gráficos da porcentagem de atividade antioxidante x concentração dos extratos brutos do caule	198
Figura 101 - Gráficos da porcentagem de atividade antioxidante x concentração obtido para a rotina	199

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Uso etnobotânico de algumas espécies de plantas de restinga	04
Tabela 02 - Ordem Sapindales	08
Tabela 03 - Distribuição geográfica das famílias da ordem Sapindales	09
Tabela 04 - Relação de algumas espécies catalogadas pelo levantamento etnobotânico de espécimes da família Sapindaceae	11
Tabela 05 - Atividades biológicas de algumas espécies da família Sapindaceae	16
Tabela 06 - Ocorrência de saponinas e outras substâncias da família Sapindaceae	17
Tabela 07 - Classificação botânica	42
Tabela 08 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-01 , comparados com dados da literatura para a friedelina.	64
Tabela 09 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-02 , comparados com dados da literatura para a friedelona.	79
Tabela 10- Efeitos α , β e γ verificado para o canofilol em relação a friedelina	101
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-03 , comparados com dados da literatura para o canofilol.	102
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-4 , PW-05 e PW-06 ; comparados com dados da literatura para o lupeol, β -amirina e α -amirina.	115
Tabela 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-07 , comparados com dados da literatura para o epifriedelanol.	131

Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-08 , comparados com dados da literatura para o acetato do ácido oleanóico.	139
Tabela 15 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-09 e PW-10 , comparados com dados da literatura para o acetato do ácido oleanóico.	149
Tabela 16 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-11 , comparados com dados da literatura para o 1-O-metil-inositol.	161
Tabela 17 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância PW-12 , comparados com dados da literatura para o 1-O-metil-inositol.	172
Tabela 18 - Dose letal mínima responsável pela morte de 50% dos espécimes analisados	192
Tabela 19 - EC_{50} dos extratos de <i>P. weinmanniaefolia</i> frente ao radical livre DPPH	197

RESUMO

O presente trabalho relata o estudo fitoquímico do caule e folhas de *Paullinia weinmanniaefolia*. A espécie foi coletada no Complexo Lagunar Grussaí-Iquipará no município de São João da Barra-RJ em fevereiro de 2003.

O isolamento dos metabólitos secundários dos extratos hexânico, diclorometânico, metanólico e metanol-água de folhas e caule, foi realizado através de técnicas cromatográficas e resultou na identificação de oito triterpenos: **PW-01** (friedelina), **PW-02** (friedelanona), **PW-03** (canofilol); **PW-04** (lupeol), **PW-05** (β -amirina); **PW-06** (α -amirina); **PW-07** (epifriedelanol); **PW-08** (acetato do ácido oleanólico); dois esteróides: **PW-09** (β -sitosterol); **PW-10** (estigmasterol) e dois ciclitóis: **PW-11** [1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-O-metil-*L*-quiro-inositol e **PW-12** [1-1'-4-4'-5-5'-6-6'-tetra-O-acetil-1-O-metil-*L*-quiro-inositol. As substâncias **PW-01** a **PW-10** estão sendo citadas pela primeira vez no gênero e a substância **PW-12** pelo melhor do nosso conhecimento está sendo citada pela primeira vez na literatura.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através da obtenção e interpretação de espectros na região do infravermelho (IV), espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) a uma (1D) e duas (2D) dimensões bem como através de informações obtidas no espectro de massas dos produtos detectados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e comparação com dados da literatura.

Os extratos brutos tiveram sua atividade antioxidante avaliada utilizando o método DPPH como radical livre. O potencial citotóxico foi avaliado através do bioensaio com *Artemia salina* Leach.

ABSTRACT

The present work reports a phytochemical study of the stem and leaves of *Paullinia weinmanniaefolia*. The specimen was collected in Complexo Lagunar Grussaí-Iquipará in São João da Barra-RJ on february 2003. The isolation of secondary metabolites from the leaves and stem was carried out from hexane extracts, dicloromethane, methanol and methanol-water extracts. Chromatographic techniques resulted in the identification of eight triterpenes: **PW-01** (friedelin), **PW-02** (friedelanane), **PW-03** (canophyllol); **PW-04** (lupeol), **PW-05** (β -amirin); **PW-06** (α -amirin); **PW-07** (epifriedelinol); **PW-08** (acid 3-acetyl-3-oxoolean-12-en-28-oic); two steroids: **PW-09** (β -sitosterol); **PW-10** (stigmasterol) and two ciclitols: **PW-11** [1,3,4,5,6-penta-O-acetyl-2-O-methyl-L-chiro-inositol and **PW-12** [1-1'-4-4'-5-5'-6-6'-tetra-O-acetyl-1-O-methyl-L-chiro-inositol. This is the first report of compounds **PW-01** to **PW-10** in the genus *Paullinia*, while compound **PW-12** is now reported for the first time in the literature, to the best of our knowledge.

The structure of the compounds were determined using infrared data, one-and-two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, as well from information gathered from the mass spectra recorded using a spectrometer coupled to a gas chromatograph, wich were compared with the literature data.

The crude extracts were evaluated as antioxidants using the DPPH free radical method and assays with *Artemia salina* Leach were used to evaluate their citotoxic potential.

1.0 - INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (Maciel *et al.*, 2002) e dentro deste contexto as substâncias naturais têm atuado como fonte ou modelo de vários agentes medicinais, sendo que as plantas superiores sem dúvida constituem a principal fonte. Essas têm sua significância histórica como importante fonte de novas substâncias, podendo ser utilizadas diretamente como agente medicinal, ou como substâncias-modelo para síntese completa ou semi-síntese objetivando o aprimoramento de suas propriedades biológicas e/ou farmacológicas (Montanari e Bolzani, 2001).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (Maciel *et al.*, 2002).

A biodiversidade das florestas tropicais é um foco para a descoberta de novas plantas medicinais. A interação de plantas tropicais e seus predadores naturais podem servir como suporte para descoberta de novas substâncias ativas (Braz-Filho, 1994).

Segundo Pimm, *et al.* (1995), a natureza tem desenvolvido uma enorme diversidade durante vários bilhões de anos de evolução, estima-se que há pelo menos 250.000 espécies diferentes de plantas, e acima de 30 milhões de espécies de insetos; 1,5 milhões de espécies de fungos e número semelhante de algas e procariontes. Considerando o número de organismos existentes e as inúmeras interações possíveis não é surpresa a enorme variedade de metabólitos secundários envolvidos nestes organismos. Assim, a natureza apresenta um enorme potencial para a descoberta de novas substâncias bioativas (Verpoorte, 1998). Deste modo, os produtos naturais continuam sendo uma das estratégias de maior sucesso para a descoberta de novas drogas comercialmente viáveis (Harvey, 2000).

Várias substâncias isoladas de plantas foram estudadas, dentre elas destacamos: os agentes anticancerígenos, taxol (paclitaxel) e camptotecina, a droga antimalárica artemisina e a forskolina que apresenta acentuada atividade inotrópica e vasodilatadora. Esses entre outros exemplos servem para ilustrar que os metabólitos secundários derivados de plantas continuam a ter importância histórica,

sendo viável os seus estudos para o desenvolvimento e aplicação em novas drogas modernas (Kinghorn e Balandrin, 1993).

O potencial químico dos organismos vivos estimula o interesse das indústrias farmacêuticas como fonte de fármacos, agroquímica pelo fornecimento de inseticidas e fungicidas naturais, alimentícias para a obtenção de substâncias naturais utilizadas para dar cor e sabor aos alimentos e indústria de cosméticos.

O estudo desses metabólitos bioproduzidos pelas plantas nos últimos anos, ganhou uma importância expressiva e atualmente mais de um milhão de substâncias naturais tiveram sua estrutura elucidada quimicamente, graças ao advento e modernização das técnicas de isolamento e determinação estrutural, porém, muitos desses metabólitos encontram-se ainda sem nenhuma investigação com relação ao seu potencial farmacológico. A adequada avaliação dessas substâncias pode proporcionar a descoberta de novos produtos naturais bioativos, tais como: antibióticos reguladores do crescimento vegetal, herbicidas, antivirais, antitumorais, imunoestimulantes, antimaláricos, amebicidas, inseticidas, moluscicidas etc. (Montanari e Bolzani, 2001).

Dentro deste contexto, a família Sapindaceae possui várias espécies com diversificadas utilizações tais como: diurético, estimulante mental e muscular, tônico, no tratamento de úlceras entre outros (Neto *et al.*, 2000). *Paullinia weinmannifolia* (Figura 01, p.3) é uma das muitas espécies do gênero *Paullinia* que habitam principalmente as restingas, regiões arbustivas e campos. Esta espécie é nativa das regiões litorâneas podendo ser encontradas no litoral do Brasil nas seguintes áreas:

- Pernambuco.(http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast.- 12/11/2004).
- Brejo Pernambucano, Bonito, Médio Capibaribe, São Vicente Ferrer, Vale do Ipojuca e Caruaru .(<http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/pnechk/taxa/5507.html>- 12/11/2004).
- Sergipe (www.scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.detail_list)
- Bahia - Parque Nacional Monte Pascoal (<http://www.nybg.org/bsci/res/bahia/MP-chkl.html> - 12/11/2004).
- Rio de Janeiro - Complexo Lagunar Grussaí-Iquiparí em São João da Barra (Figura 02, p. 4) (Assumpção e Nascimento, 2000)



Figura 1 - *Paullinia weinmanniaefolia*

O espécime *P. weinmanniaefolia* foi coletado na restinga do complexo lagunar Grussaí-Iquiparí no município de São João da Barra - RJ.

O solo da região foi identificado como areias quartzosas marinhas associadas à podzol hidromórfico (Radambrasil, 1983) têm origem flúvio-marinha, formado sobre cordões litorâneos paralelos, com estratificação plano-paralela com 1-3 m de altura. Ainda segundo Radambrasil o clima da região é caracterizado como tropical sub-úmido a semi-árido, com precipitação pluviométrica média anual variando de 800 a 1200 mm, apresentando as maiores taxas de precipitação durante os meses de verão, e os menores, nos meses de inverno. O vento predominante tem a direção nordeste atingindo as maiores velocidades nos meses de agosto a dezembro (Assumpção e Nascimento, 2000).

No Brasil, as restingas são encontradas ao longo do litoral desde a costa leste do Pará até a costa do Rio Grande do Sul, perfazendo um total de aproximadamente 9.000 Km de extensão. (www.guiaguaruja.com.br/meioambiente/restinga.htm-05/09/2004)

O conceito geográfico de restinga refere-se aos cordões arenosos que depositados pelas correntes marinhas, fecham ou tendem a fechar uma reentrância na linha da costa. Alí se estabelecem comunidades vegetais e animais com características marcantes em função das condições físicas do meio. (www.jornaldapaisagem.br/artigos/art_tabacow4.htm-05/09/2004).



Figura 2 - Vista Panorâmica do Complexo Lagunar Grussaí-Iquipari

As formas de vida diversificada (arbustos, ervas, trepadeiras e epífitas) dão ao conjunto uma estrutura de mata baixa, mais rica e complexa. A região de restinga apresenta grande importância econômica, dentre elas podemos destacar: ornamental e paisagística, industrial, alimentícia, arqueológica, ecológica e medicinal. Vale a pena destacar a importância medicinal, uma vez que no Brasil e em vários países do mundo têm se comprovado o que diz a tradição popular sobre o valor medicinal de várias espécies da restinga (Tabela - 01) (Maraschin, 2004).

Tabela 01 – Uso etnobotânico de algumas espécies de plantas de restinga

Espécie	Uso popular	Referência
<i>Trema micrantha</i> (Ulmaceae)	Doenças de pele, Sífilis, Reumatismo.	(Frimmel <i>et al.</i> , 2000)
<i>Schinus molle</i> (Anacardiaceae)	Problemas de pele: antifúngica e antibacteriana. Tratamento de tumores.	(Schmourlo <i>et al.</i> , 2005) (Rufa <i>et al.</i> , 2002)
<i>Dodonaea viscosa</i> (Sapindaceae)	Antifúngica, Antiviral, Antiinflamatória.	(Getie <i>et al.</i>, 2003)

Na restinga o solo não constitui a principal fonte de nutrientes, mas é, sobretudo, a vegetação o suporte vital desse ecossistema. Os solos arenosos extremamente permeáveis e pobres em nutrientes, a constante ação do vento e a salinidade exigem uma especificação de certos órgãos das plantas para que possam

sobreviver num ambiente inóspito. Encontra-se um sistema radicial profundo e bem ramificado, que garante a fixação da planta, além de fornecer mais água e nutrientes, pela área maior de solo que pode ser explorada. As folhas são geralmente pequenas e coriáceas para diminuir a perda de água e como proteção contra dilaceração pelo vento. Há caules rastejantes, flutuando sobre a areia e acompanhando as modificações da superfície. Também há caules subterrâneos (rizomas) e folhas carnosas com a finalidade de retenção de água (Joly, 1983).

Essas observações induziram a seleção da espécie *Paullinia weinmanniaefolia* (nativa de região de restinga) visando como meta principal deste trabalho o isolamento e identificação de seus metabólitos secundários e possíveis avaliações da atividade citotóxica e antioxidante.

O estudo fitoquímico desta espécie relata neste trabalho o isolamento e identificação de doze substâncias: sendo oito triterpenos: Friedelina (**PW-01**); friedelona (**PW-02**); canofilol (**PW-03**); [lupeol (**PW-04**), β - amirina (**PW-05**), α -amirina (**PW-06**)] como mistura ternária, epifriedelanol (**PW-07**), acetato do ácido oleanólico (**PW-08**), dois esteróides: [β - sitosterol (**PW-09**) e estigmasterol (**PW-10**)] como mistura binária e dois ciclítóis: 1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-O-metil-*L*-*quiro*-inositol (**PW-11**) e [1-1'-4-4'-5-5'-6-6'-tetra-O-acetil-1-O-metil-*L*-*quiro*-inositol] (**PW-12**). As substâncias **PW-01** a **PW-10** estão sendo citadas pela primeira vez no gênero e a substância **PW-12** pelo melhor do nosso conhecimento está sendo citada pela primeira vez na literatura. (Figura 03, p. 7)

Foram realizados também o ensaio de citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina* e o teste de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH dos extratos brutos de folhas e caule.

Diferentes técnicas foram utilizadas na caracterização dos metabólitos secundários isolados, entre elas: Espectrometria de massas, Espectrometria de infravermelho, Espectrometria de RMN ^1H e ^{13}C envolvendo técnicas bidimensionais como $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY, HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) com detecção no canal de hidrogênio.

Este trabalho está constituído dos seguintes capítulos: Capítulo **1.0** - Introdução. Capítulo **2.0** - Revisão de Literatura. Capítulo **3.0** - Objetivos. Capítulo **4.0** - Materiais e Métodos. Capítulo **5.0** - Parte Experimental. Capítulo **6.0** - Constituintes Químicos isolados de *P. weinmanniaefolia*. Capítulo **7.0** - Resultados e Discussões. Capítulo **8.0** - Avaliação da Atividade citotóxica e antioxidante dos

extratos brutos. Capítulo **9.0** -. Conclusões. Capítulo **10.0** - Constantes físicas dos constituintes químicos isolados. Capítulo **11.0** - Referências Bibliográficas.

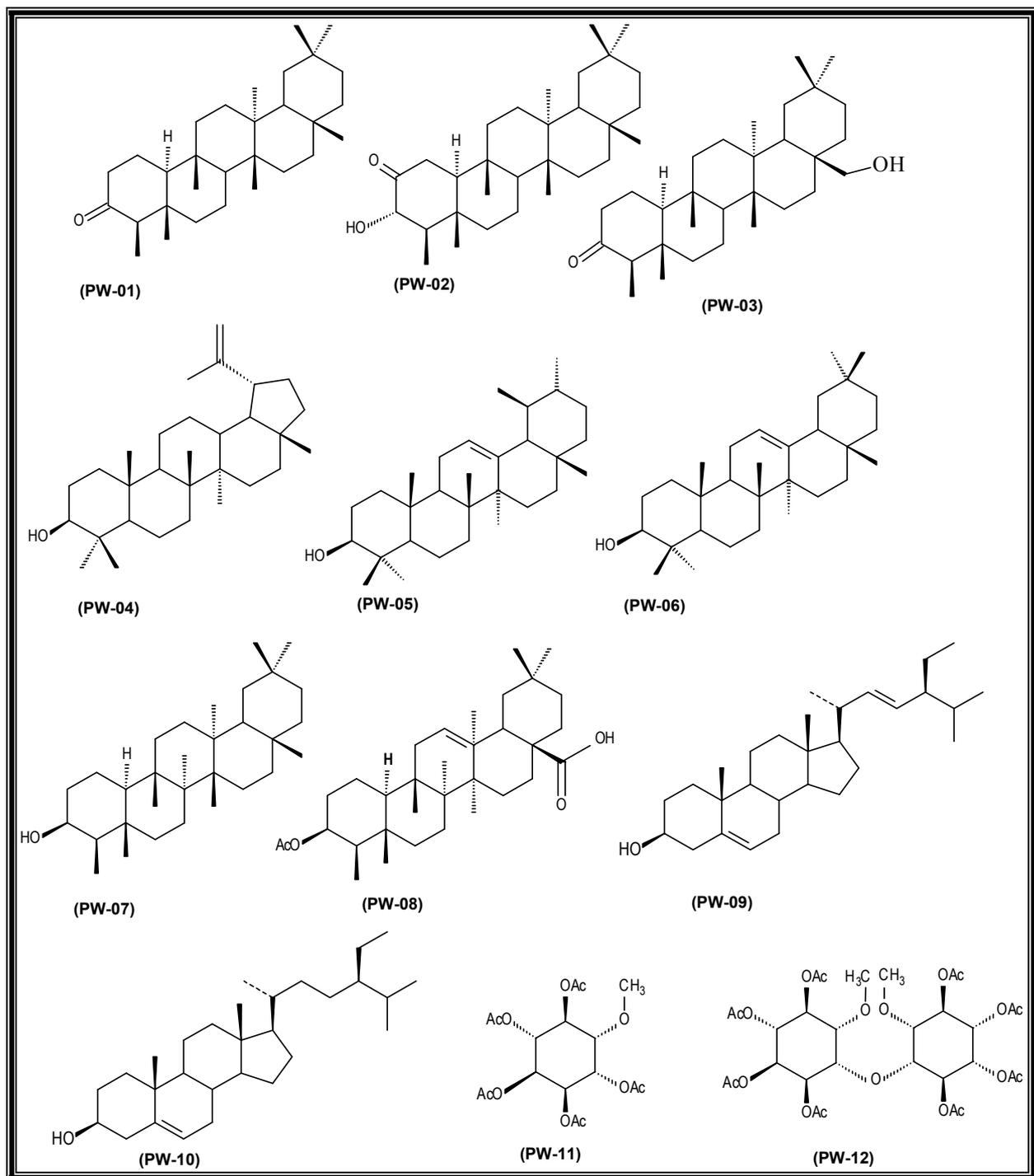


Figura 03 - Constituintes químicos isolados de *Paullinia weinmanniaefolia*

2.0 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A Família Sapindaceae

A família Sapindaceae está representada por aproximadamente 140 a 150 gêneros e cerca de 2000 espécies, na maioria tropicais, ocorrendo raramente nas regiões temperadas, sendo que estão registrados, na flora brasileira 22 gêneros, com cerca de 380 espécies, na maioria amazônicas. Esta família pertence à ordem Sapindales, que compreende 11 famílias. As famílias que compõem a ordem Sapindales possuem um grande número de gêneros e espécies, a maioria delas ocorrem no Brasil (Tabela 2 e 3; Barroso *et al.*, 1991).

Tabela 02 - Ordem Sapindales (Barroso *et al.*, 1991)

Famílias	Gêneros	Espécies	Gêneros indígenas e subespontâneos	Espécies indígenas e subespontâneos
<i>Connaraceae</i>	24	300-400	4	70
<i>Surianaceae</i>	1	1	1	1
<i>Sapindaceae</i>	150	2000	22	380
<i>Burseraceae</i>	17	560	6	58
<i>Rhabdodendraceae</i>	1	3	1	3
<i>Meliaceae</i>	51	1400	6	58
<i>Zigophyllaceae</i>	26	250	1	2
<i>Sabiaceae</i>	4	90	3	8
<i>Anacardiaceae</i>	80	600	13	68
<i>Simaroubaceae</i>	24	160	6	48
<i>Rutaceae</i>	150	1600	29	182

Tabela 03- Distribuição geográfica das famílias da Ordem Sapindales (Barroso et al., 1991)

Famílias	Predominância no mundo	Predominância no Brasil
<i>Connaraceae</i>	Pantropical	Em todo o Brasil predominando na Amazônia e Nordeste
<i>Surianaceae</i>	Trópicos	-----
<i>Sapindaceae</i>	Em regiões tropicais de todo o mundo, raro em regiões temperadas.	Em todo o Brasil Predominando na Amazônia
<i>Burseraceae</i>	Em todos os continentes tropicais, predominando na África.	Norte e Sudeste
<i>Rhabdodendraceae</i>	Norte da América do Sul até a Bahia	Guianas, Amazônia e Bahia.
<i>Meliaceae</i>	Trópicos e subtropicais de ambos hemisférios.	Em todo o Brasil
<i>Zigophyllaceae</i>	Trópicos da América, África e Ásia, rara na Zona temperada.	Nordeste
<i>Sabiaceae</i>	Trópicos principalmente na Ásia e na África	AM, PA, ES, RJ, SP, PA, SC.
<i>Anacardiaceae</i>	Pantropical, mais raro em regiões temperadas.	Abundante em todo o Brasil.
<i>Simaroubaceae</i>	Pantropical,	Norte do Brasil e em ecossistemas florestais
<i>Rutaceae</i>	Trópicos, subtropicais e regiões temperadas.	Em todo o Brasil

A maioria das plantas da família Sapindaceae é constituída por trepadeiras com gavinhas e caule de crescimento em espessura anômalo, ou também arbustos e até mesmo árvores com folhas alternas, compostas, sem estípulas ou vezes inteiras (Barroso *et al.*, 1991). A família Sapindaceae possui várias espécies com diversificada utilização (Tabela 04) (Neto *et al.*, 2000).

Tabela 04 - Relação de algumas espécies catalogadas pelo levantamento etnobotânico de espécimes da família Sapindaceae (Neto *et al.*, 2000)

<i>Espécies</i>	Nome vulgar	Partes usadas	Formas de uso	Distribuição
<i>Allophylus edulis</i>	Pau-pombo	Madeira, frutos	Jardins, marcenaria, esteios, lenha, carvão, frutos comestíveis. É bastante ornamental, podendo ser empregada com sucesso na arborização.	Brasil. Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Amazonas e Ceará.
<i>Allophylus guaraniticus</i>	Fruta de pavão	Madeira, frutos	Esteios, lenha, preparação de bebidas.	Brasil: Ceará, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso.
<i>Cardiospermum grandiflorum</i>	Ensacadinha	Raízes e folhas	Chás, ornamental. As raízes e folhas são tidas como remédio contra a tosse.	África tropical, Austrália, do México ao Chile, Argentina e Uruguai e Brasil: Mato Grosso.
<i>Cupania castaneifolia</i>	Camboatá	Frutos	Comestíveis e ornamental.	Brasil: Mato Grosso
<i>Cupania rugosa</i>	Tabotão	Madeira	Construção de casas.	Brasil: Distrito Federal, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais.
<i>Cupania tenuivalvis</i>	Camboatá-de-folha-miúda	Madeira, frutos	Fabricação de tamancos, frutos comestíveis por arapongas.	Brasil: Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso.

Tabela 04 - Continuação

<i>Diatenopterux sorbifolia</i>	Maria-preta	Madeira	Confecção de chapas ou laminas, molduras, lambris, pisos.	Brasil: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal.
<i>Diplokeleba floribinda</i>	Canela-de-cotia , farinheira	Árvore e madeira.	Ornamental e arborização, lenha.	Argentina, Paraguai, Bolívia, Brasil: Mato Grosso do Sul, Mato Grosso.
<i>Dodonaea viscosa</i>	Faxinha-vermelha, vassoura-vermelha	Madeira, casca.	Ripas, tabuados de forros, bengalas, lenha e carvão, banhos adstringentes.	Peru, Brasil: Rio Grande do Sul.
<i>Litchi chinensis</i>	Lichia	Frutos	Comestíveis, ao natural	Índia, África do Sul, Estados Unidos da América, China. No Brasil é cultivada em São Paulo, e encontrada em outros estados atingindo elevados preços.
<i>Magonia pubescens</i>	Timbó, timbó-cerrado	Casca, seiva, madeira, sementes, caule e frutos	Chás, ictiotóxicas, lenha, ornamental; é apícola, mas dá mel tóxico. É considerado ótimo carvão siderúrgico. As sementes são empregadas na fabricação local de sabão e sua madeira é empregada na construção civil.	Paraguai, Bolívia, Brasil: Ceará, Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Distrito Federal, São Paulo.

Tabela 04 - Continuação

<i>Mataya elaeagnoides</i>	Cragoatm-branco	Árvore, madeira	Paisagismo, caibros, vigas, ripas, lenha e carvão.	Brasil: Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso.
<i>Matayba jugandifolia</i>	Caxuá-branca	Casca	Medicamentos	Brasil: Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo.
<i>Melicocca bijuca</i>	Papa-mundo	Casca	Chás	América do Sul.
<i>Paullinia alata</i>	Vejuco-de-três-quinias	Madeira	Flechas	Equador e Brasil: Amazônica.
<i>Paullinia cupana</i>	Guaraná	Frutos, sementes	Refresco, medicinal, artesanal, tem excelente efeito diurético, é usada nas diarreias de sangue, dores de cabeça e doenças de urina. É usada no artesanato encontrada no comércio da Amazônia.	Brasil: Amazônia, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso.
<i>Paullinia cururu</i>	Cururu	Ramos	Tingui	Brasil: Amazônia
<i>Paullinia elegans</i>	Cipó-timbó	Frutos	O arilo é comestível (aves). Tóxica para peixes, suspeita de tóxica para bovinos.	Colômbia, Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia. Brasil: Nordeste (Ceará e Pernambuco) ao Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso.

Tabela 04 - Continuação

<i>Paullinia pinnata</i>	Cururu-apé	Sementes, raízes e cascas, fibras.	Ictiotóxicas, venenos, chapéus, balaios, laços, arapucas, arcos de barris. Os escravos africanos extraíam das raízes, cascas e sementes uma substância venenosa usada nos inimigos e senhores escravagista.	África: Congo, Madagascar, Senegal, Zâmbia; México, Argentina e Brasil.
<i>Paullinia trigonia</i>	Tingui-cipó	Caules, folhas e frutos	Tinguijar	Brasil: São Paulo.
<i>Paullinia caracasana</i>	Tingui-da-mata	Cipó (caule e ramos)	Confecção de cestos e cordas rústica, apícola, com potencial ornamental. Tóxica para peixes	Venezuela, México, Argentina, Paraguai, Brasil: Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso.
<i>Pseudima frutescens</i>	Fruta-de-anel	Frutos	Sabão	África, Ásia, Brasil: Maranhão, Amazônia.
<i>Sapindus arborescens</i>	Sabonete	Cascas e raízes	Adstringentes e tônicos amargos.	Brasil: Amazônia
<i>Sapindus divaricatus</i>	Saboeiro	Sementes, frutos, cascas e raízes.	Veneno, artesanato, sabão, adstringentes e tônicos.	Brasil: Pernambuco e São Paulo.
<i>Sapindus marginatus</i>	Saponária	Árvore	Arborização	Estados Unidos da América.

Tabela 04 - Continuação

<i>Sapindus saponaria</i>	Saboneteira	Madeira, frutos, árvore e sementes.	Ornamentação e arborização. A madeira é empregada na construção civil e fabricação de brinquedos. O fruto possui saponinas e triturado serve de sabão. As sementes são usadas como inseticida e tem óleo usado para a preparação de sabonetes.	Estados Unidos da América, México, Argentina, Brasil: Amazônia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.
<i>Serjania erecta</i>	Cinco-folhas	Folhas e raízes	Preparação de chás com as folhas para auxiliar o tratamento de úlceras. A raiz serve para o combate da hipertensão. Tem potencial ornamental.	Brasil: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal.
<i>Serjania ovalifolia</i>	Timbó-amarelo	Folhas	O macerado das folhas é utilizado com ictiotóxico	Brasil: Goiás e região do norte do país.
<i>Talísia acutifolia</i>	Pau-de-espeto-vermelho, pitombeira	Frutos	Comestíveis, chás, ornamentais.	Brasil: Amazônia
<i>Tripterodendron filicifolium</i>	Farinha-seca	Arvore	Ornamental.	Brasil: Minas Gerais, rio de Janeiro.

Algumas plantas pertencentes à família Sapindaceae são utilizadas na medicina popular com diversas utilidades. Representantes das espécies consagradas pelo uso popular passaram por testes biológicos para verificação das suas atividades biológicas como se pode observar na Tabela 05.

Tabela 05 - Atividades biológicas de algumas espécies na Família Sapindaceae

Espécies	Atividade biológica	Referência
<i>Dodonaea viscosa</i>	Antimicrobiana, antidiarréica, antiinflamatória, problemas de pele, estomatites.	Getie <i>et al.</i> , 2003.
<i>Filicium decipiens</i>	Antifúngica, bactericida e moluscicida.	Jayasinghe <i>et al.</i> , 2001.
<i>Harpullia ramiflora</i>	Veneno para peixes, Antirreumatismo.	Khan <i>et al.</i> , 2001.
<i>Harpullia petiolaris</i>	Veneno para peixes, antirreumatismo.	Khan e Omoloso, 2002.
<i>Litchi chinensis</i>	Antiinflamatório, problemas intestinais e neurológicos.	Besra <i>et al.</i> , 1996.
<i>Paullinia cupana</i>	Estimulante, rejuvenescedor, afrodisíaco.	Santa Maria <i>et al.</i> , 1998.
<i>Paullinia yoco</i>	Estimulante.	Weckerle <i>et al.</i> , 2003.
<i>Paullinia pachycarpa</i>	Estimulante.	Weckerle <i>et al.</i> , 2003.
<i>Sapindus saponaria</i>	Antiúlceras.	Albiero <i>et al.</i> , 2002.
<i>Sapindus trifoliatus</i>	Problemas estomacais e espermicida.	Arulmozhi <i>et al.</i> , 2004.

2.1.2- A fitoquímica da família Sapindaceae

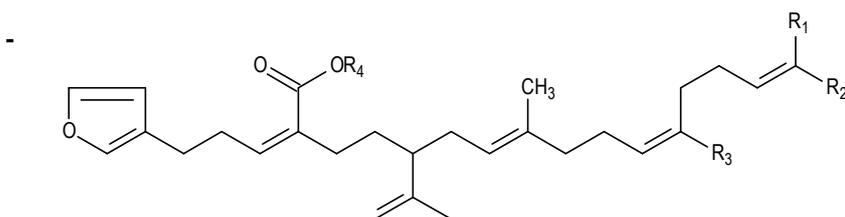
Do ponto de vista fitoquímico, a família Sapindaceae está caracterizada pela presença de saponinas sendo por este motivo chamada de "fruta-sabão". Porém, outras classes de substâncias foram isoladas de várias de suas espécies tais como: alcalóides, proantocianidinas, flavonas, poliisoprenos, sesquiterpenos e esteróides. (Tabela 06 e Figura 04)

Tabela 06 - Ocorrência de saponinas e outras substâncias da família Sapindaceae

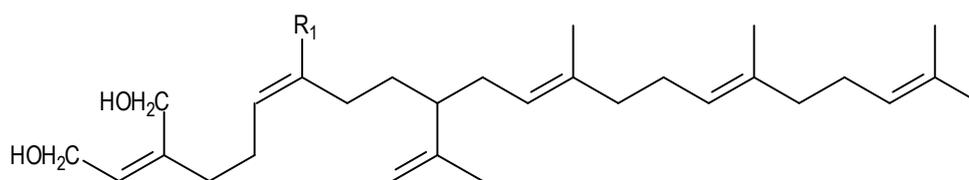
Espécies	Fonte	Substâncias	Referência
<i>Cupaniopsis azantha</i>	Casca	1-4	Bousserouel <i>et al.</i> , 2005.
<i>Cupaniopsis phallacrocarpa</i>	Casca	5-6	Bousserouel <i>et al.</i> , 2005.
<i>Cupaniopsis Trigonocarpa</i>	Casca	7-10	Bousserouel <i>et al.</i> , 2005.
<i>Dimocarpus fumatus</i>	Casca do caule	11-18	Voutquenne <i>et al.</i> , 1999.
<i>Dodonaea viscosa</i>	Folhas	19 -25	Ortega <i>et al.</i> , 2001.
<i>Elattostachys apetala</i>	Casca do caule e folhas	26 - 36	Lavaud <i>et al.</i> , 2001.
<i>Filicium decipiens</i>	Casca do caule	37 - 44 45	Lavaud <i>et al.</i> , 1997. Jayasinghe <i>et al.</i> , 2001.
<i>Lepisantes rubiginosa</i>	Folhas e casca do caule	46	Adesanya <i>et al.</i> , 1999.
<i>Harpullia austro-caledonica</i>	Casca do caule	47 - 52	Voutquenne <i>et al.</i> , 2002.
<i>Harpullia austro-caledonica</i>	Casca do caule	53 - 61	Voutquenne <i>et al.</i> , 2002.

Tabela 06 - Continuação

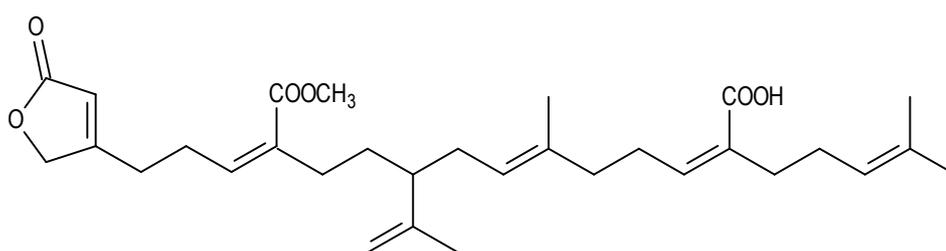
<i>Harpullia cupanioides</i>	Casca do caule	62 - 66	Voutquenne <i>et al.</i> , 1998
<i>Litchi chinensis</i>	Fruto	67 - 70	Sarni-Manchado <i>et al.</i> , 2000.
<i>Nephelium maingayi</i>	Casca	71 - 79	Ito <i>et al.</i> , 2004.
<i>Paullinia cupana</i>	Folhas, casca e flores	80 - 82	Mattei <i>et al.</i> , 1998.
<i>Paullinia pachycarpa</i>	Casca do caule	80 - 81	Weckerle <i>et al.</i> , 2003.
<i>Paullinia pinnata</i>	Folhas	83 - 84	Abourashed <i>et al.</i> , 1999.
<i>Paullinia yoco</i>	Casca do caule	80 - 81	Weckerle <i>et al.</i> , 2003.
<i>Pometia eximia</i>	Caule	85 - 94	Jayasinghe <i>et al.</i> , 1995.
<i>Pometia ridleyi</i>	Casca do caule	95 - 102	Voutquenne <i>et al.</i> , 2003.
<i>Sapindus emarginatus</i>	Pericarpo	103 - 113	Kanchanapoom <i>et al.</i> , 2001.
<i>Sapindus mukurossi</i>	Pericarpo	114 -122	Kasai <i>et al.</i> , 1986.
<i>Stocksia brahuica</i>	Planta inteira	123 - 128	Zulfqar <i>et al.</i> , 1998.



Substâncias	Δ	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1)	Z	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
(2)	Z	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	H
(3)	Z	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H
(5)	Z	CH ₃	CH ₃	COOH	CH ₃
(7)	E	CH ₃	CH ₃	COOH	H
(8)	Z	CH ₃	CH ₃	COOH	H
(9)	E	CH ₃	CH ₃	COOH	CH ₃



(4)	$\Delta = Z$	R ₁ = COOH
(10)	$\Delta = E$	R ₁ = CH ₂ OH



(6)

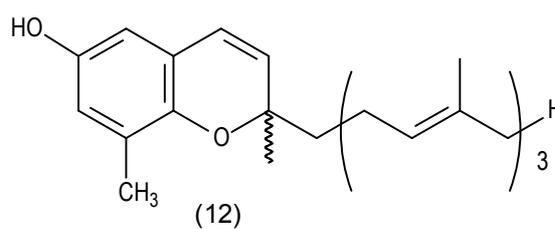
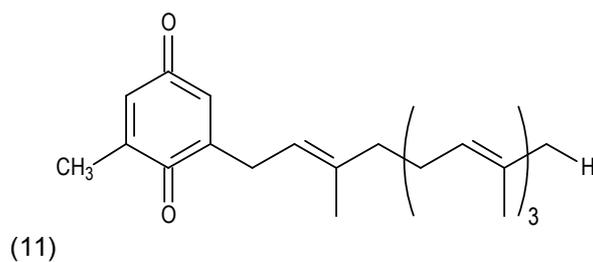


Figura 04 - Substâncias Isoladas de Espécies da Família Sapindaceae

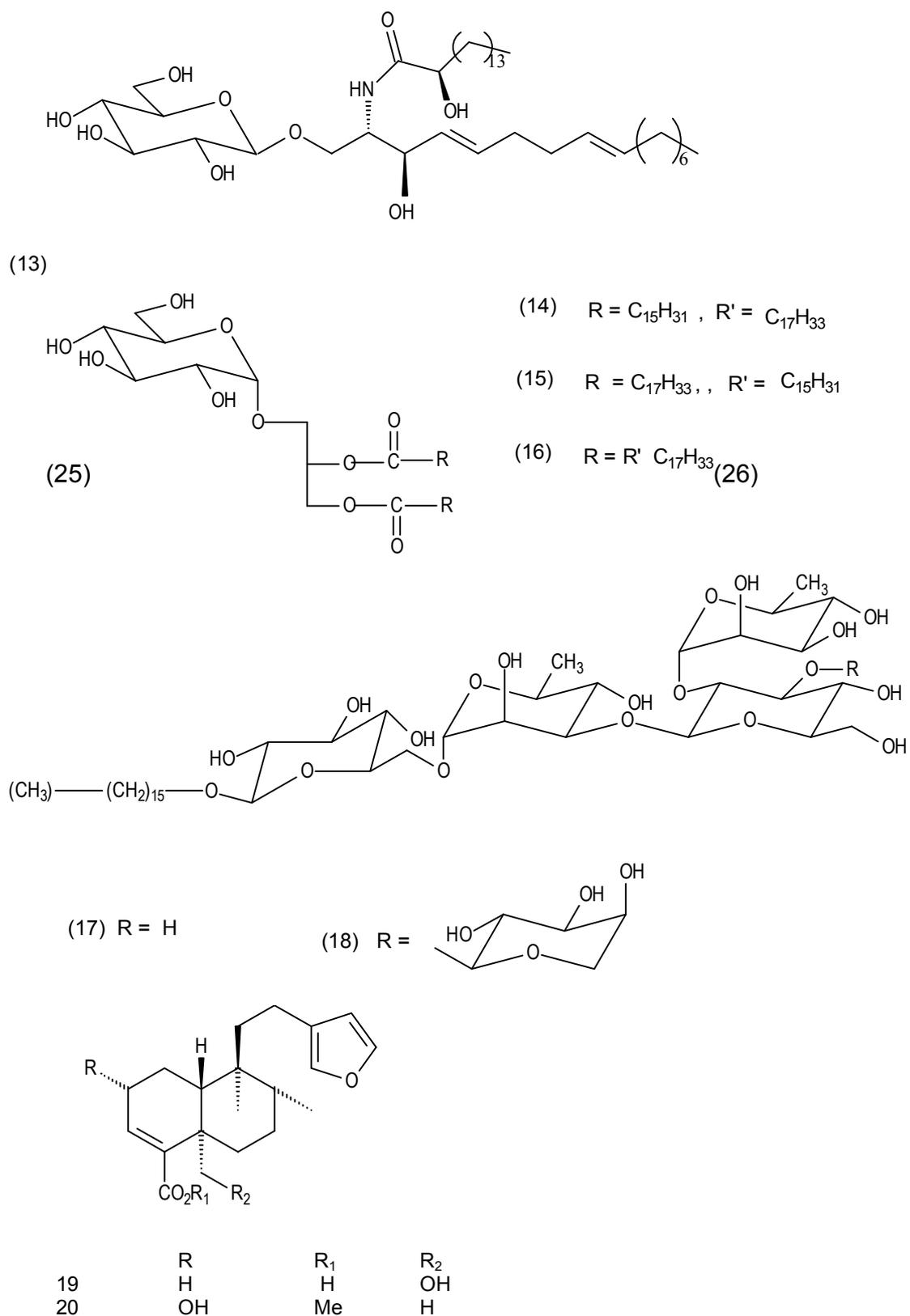


Figura 04- Continuação

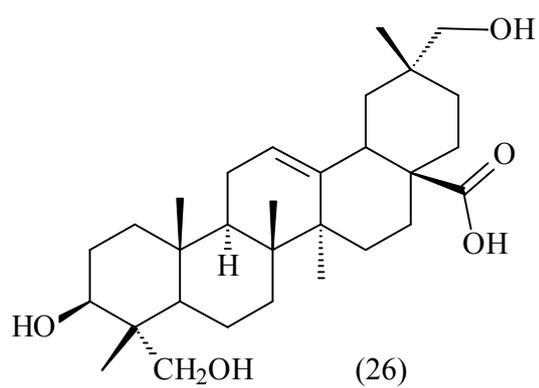
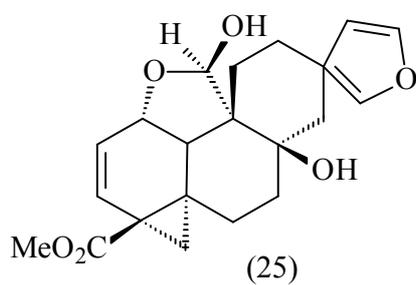
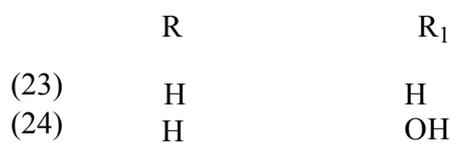
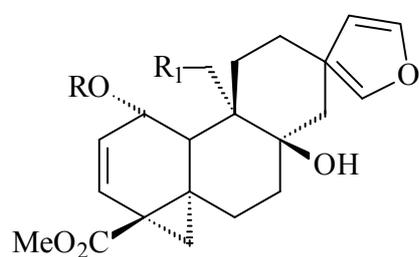
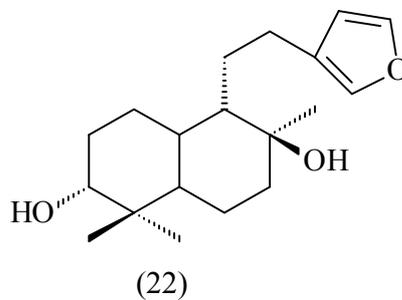
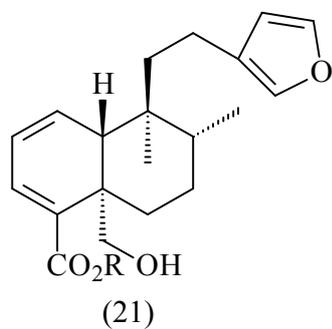


Figura 04- Continuação

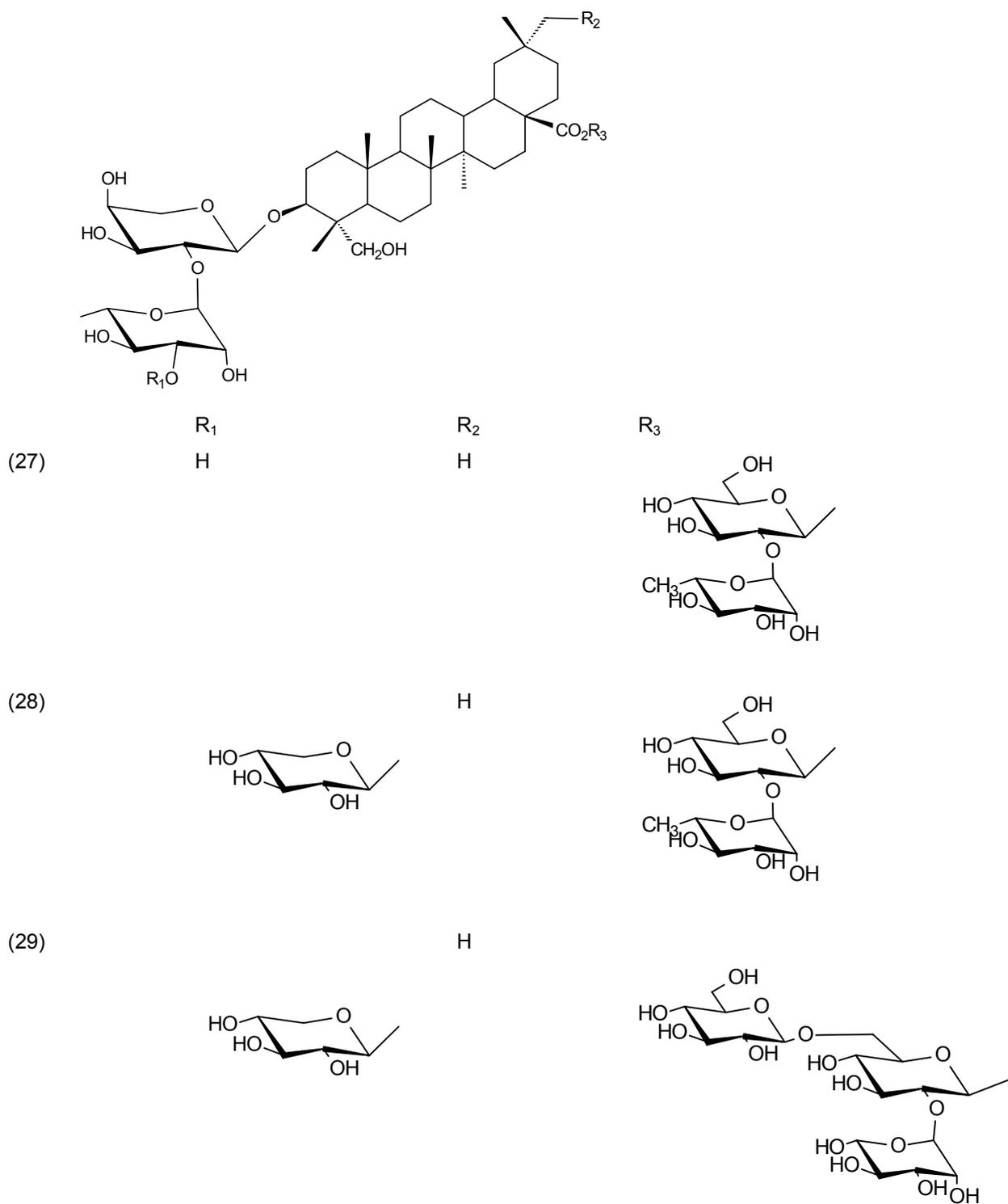


Figura 04- Continuação

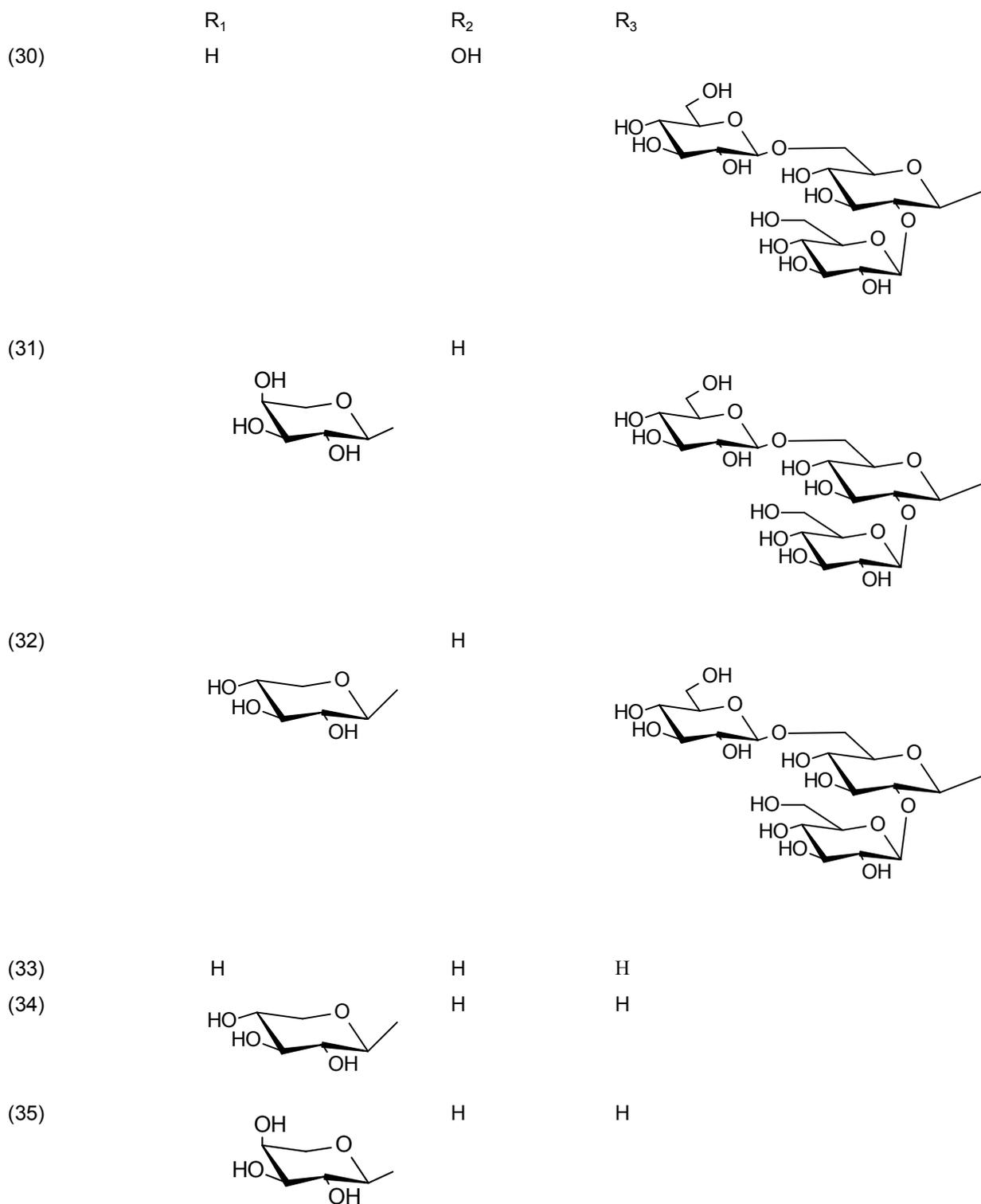


Figura 04- Continuação

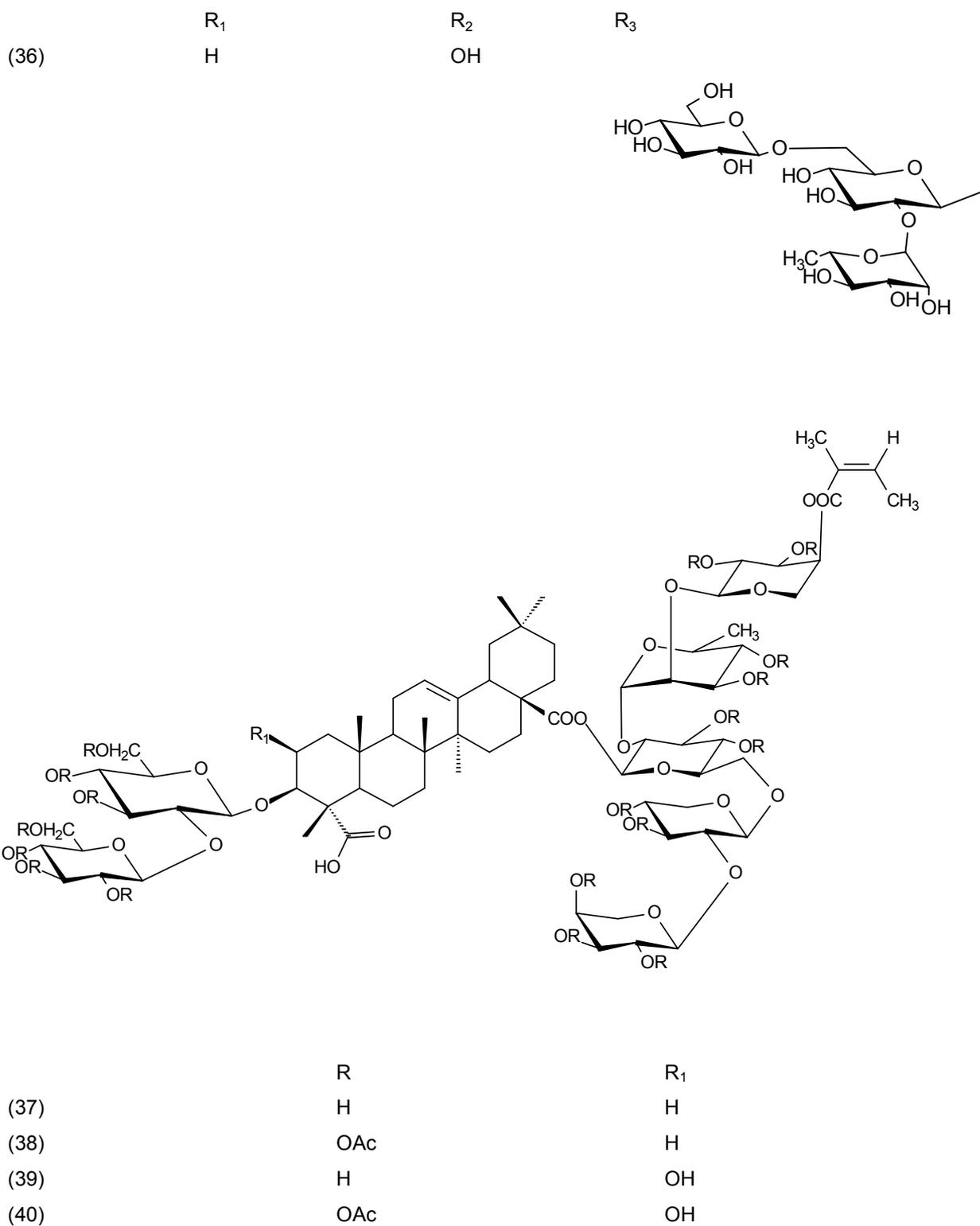


Figura 04- Continuação

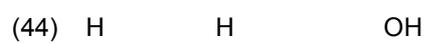
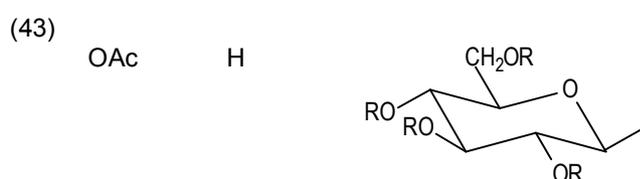
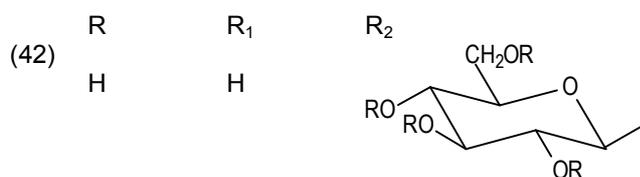
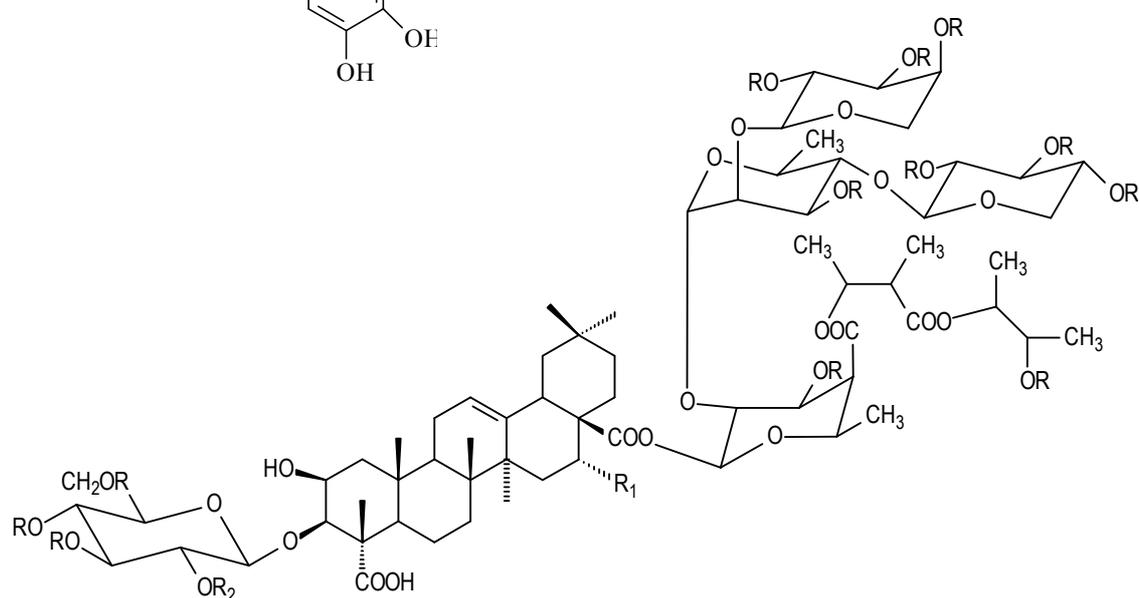
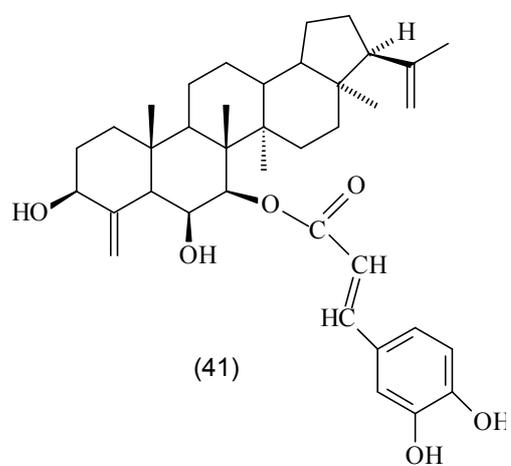
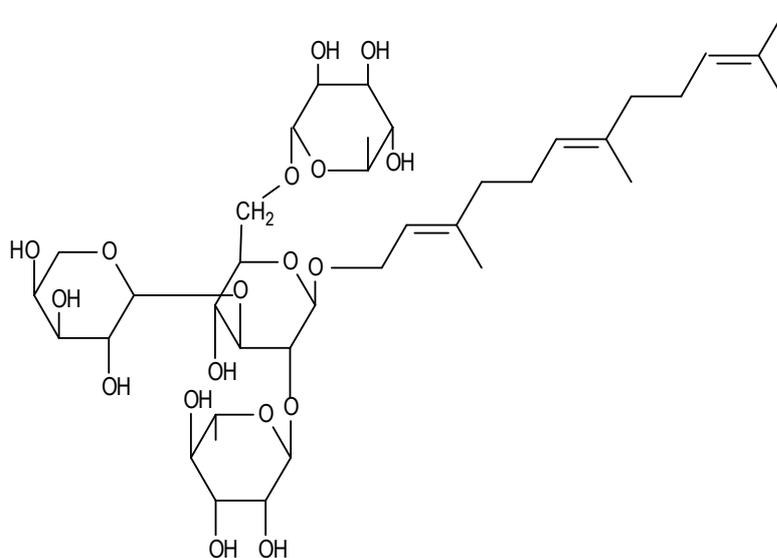
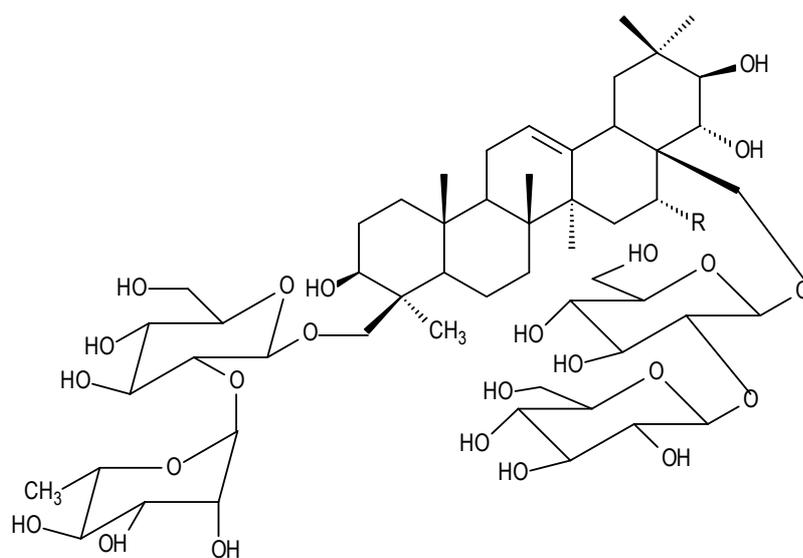


Figura 04 – Continuação



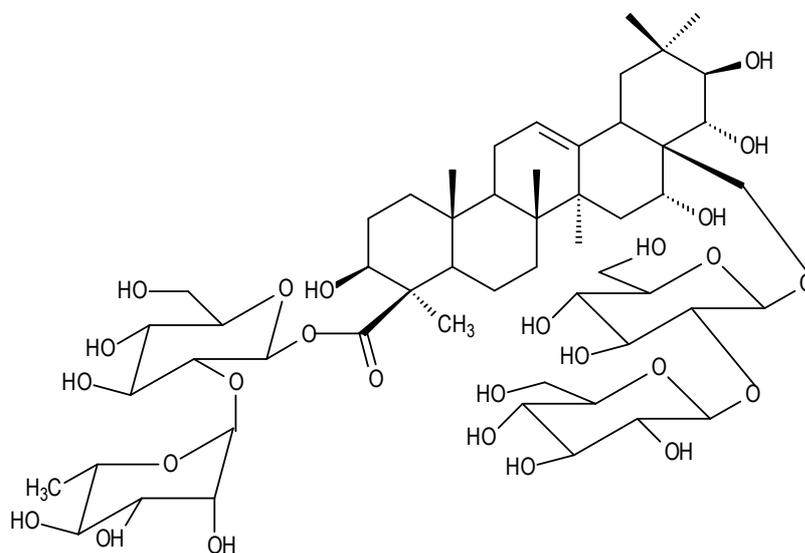
(46)



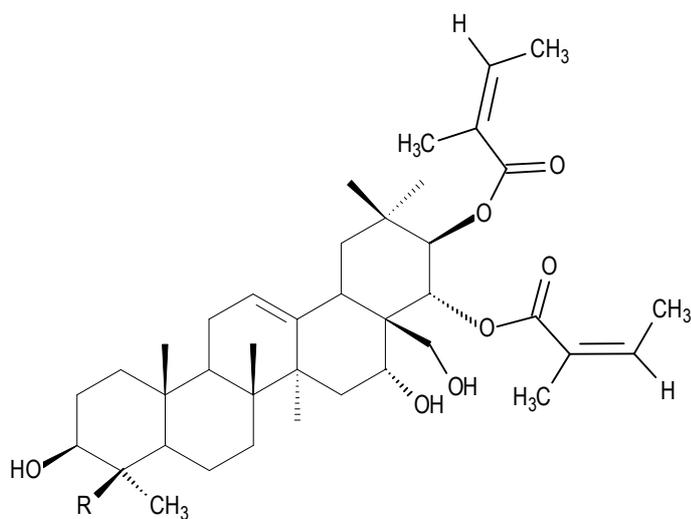
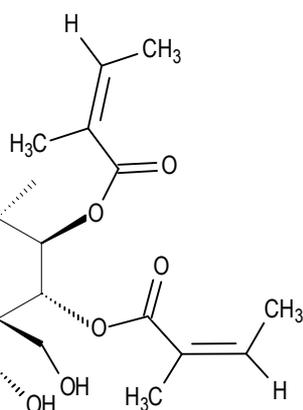
(47) R = OH

(48) R = H

Figura 04 - Continuação



(49)

(50) R = CH₂OH(51) R = CH₃

(52) R = CHO

Figura 04 - Continuação

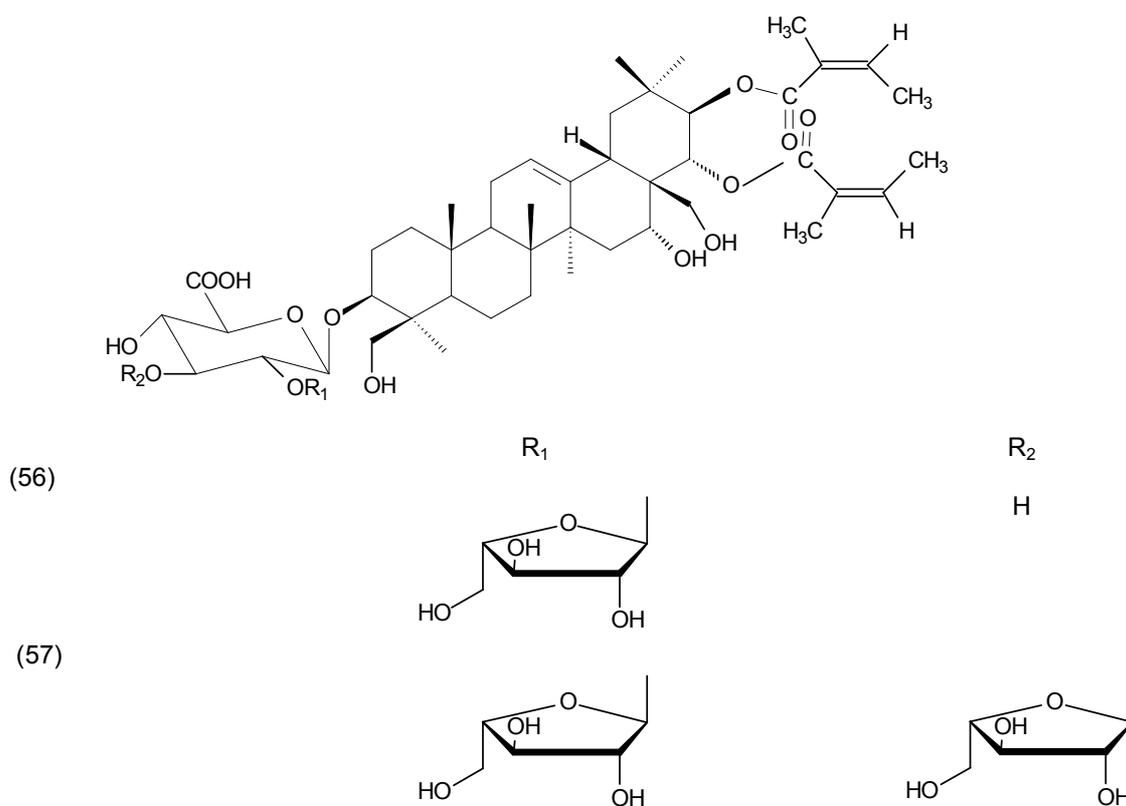
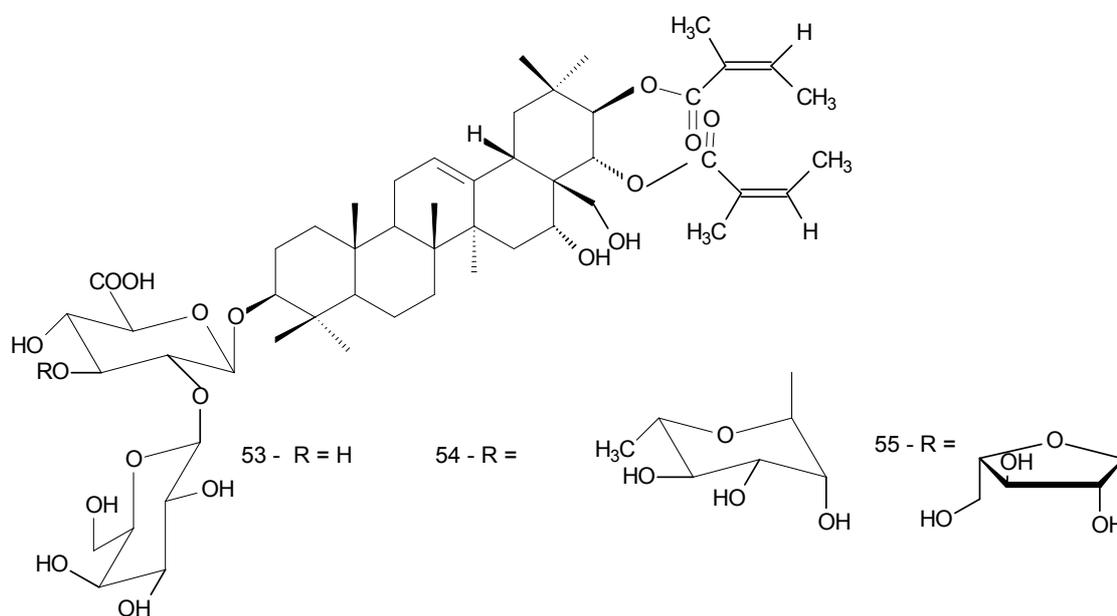
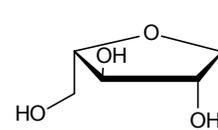
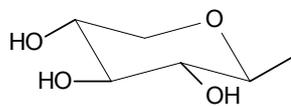
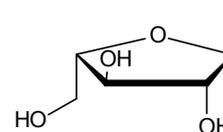
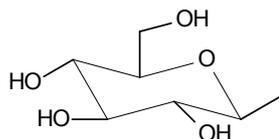


Figura 04 – Continuação

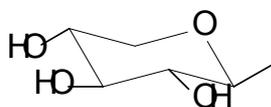
(58)



(59)

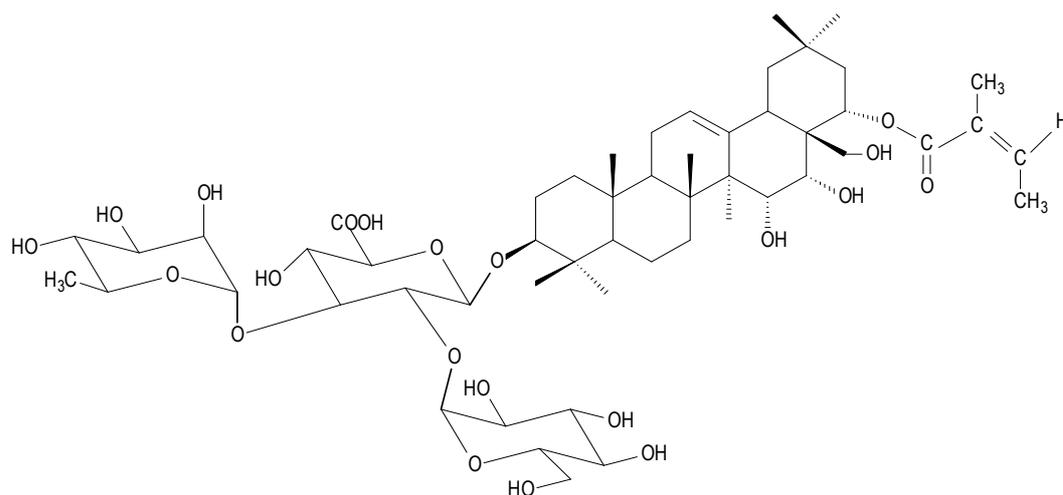
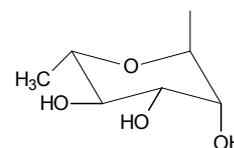
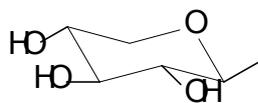


(60)



H

(61)



(62)
Figura 04 – Continuação

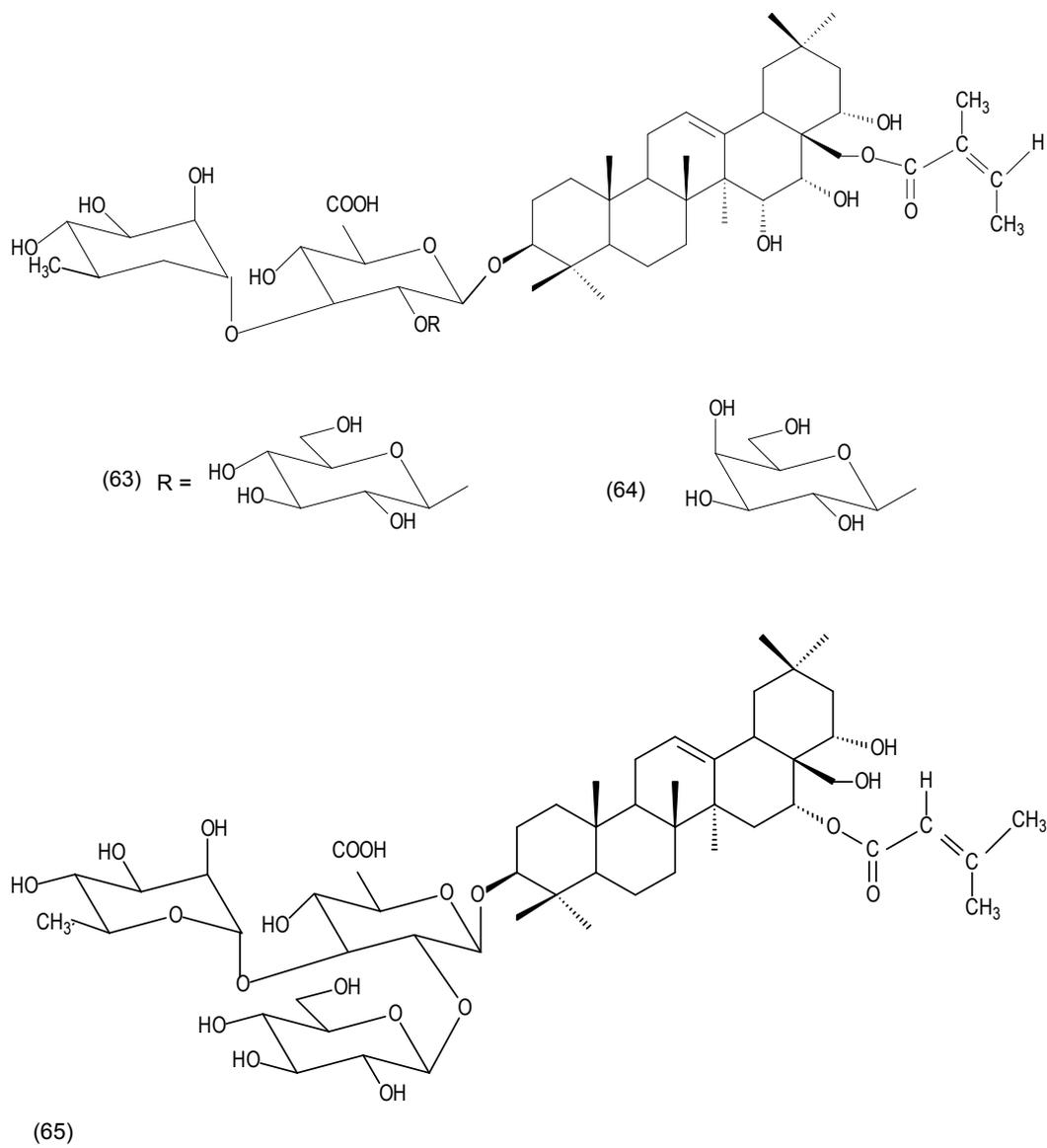


Figura 04 – Continuação

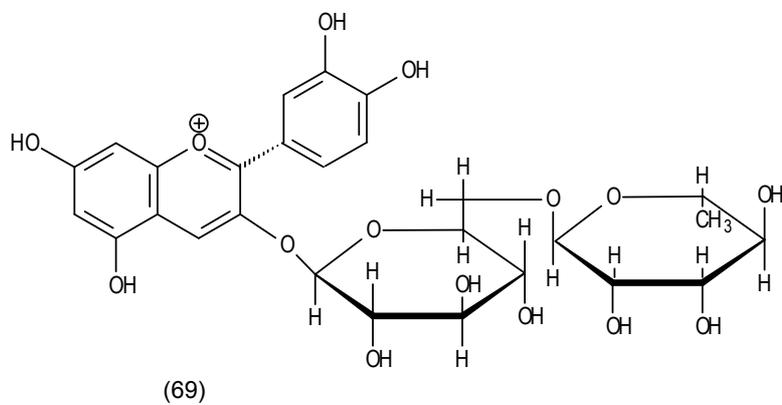
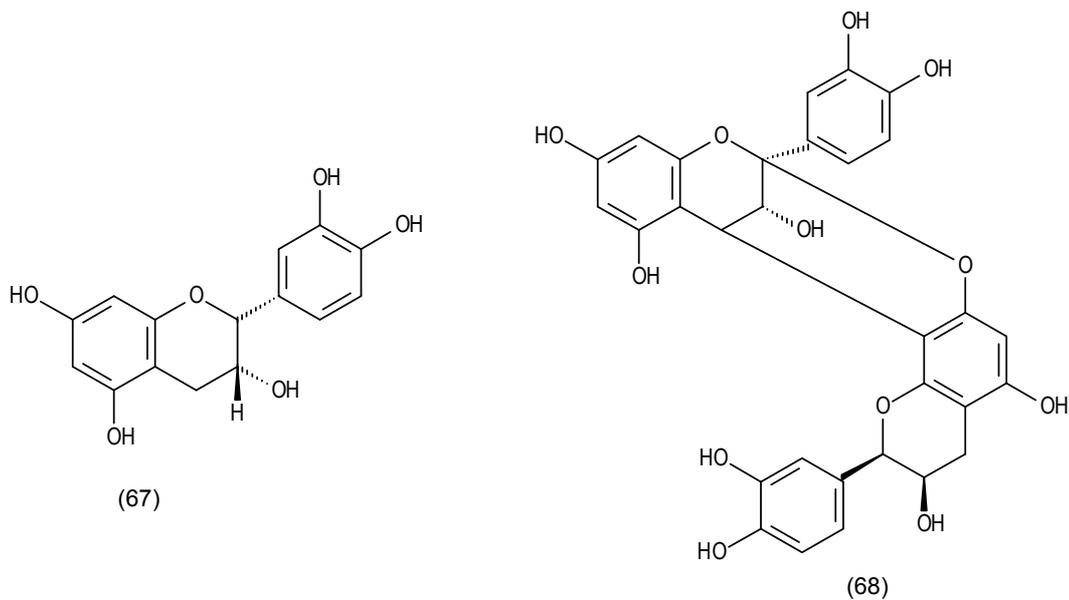
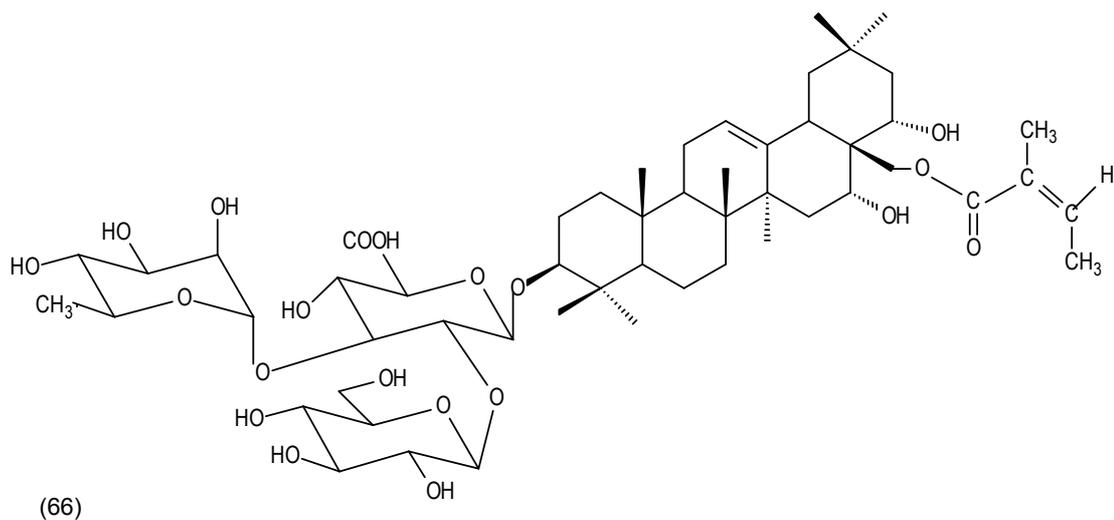


Figura 04 - Continuação

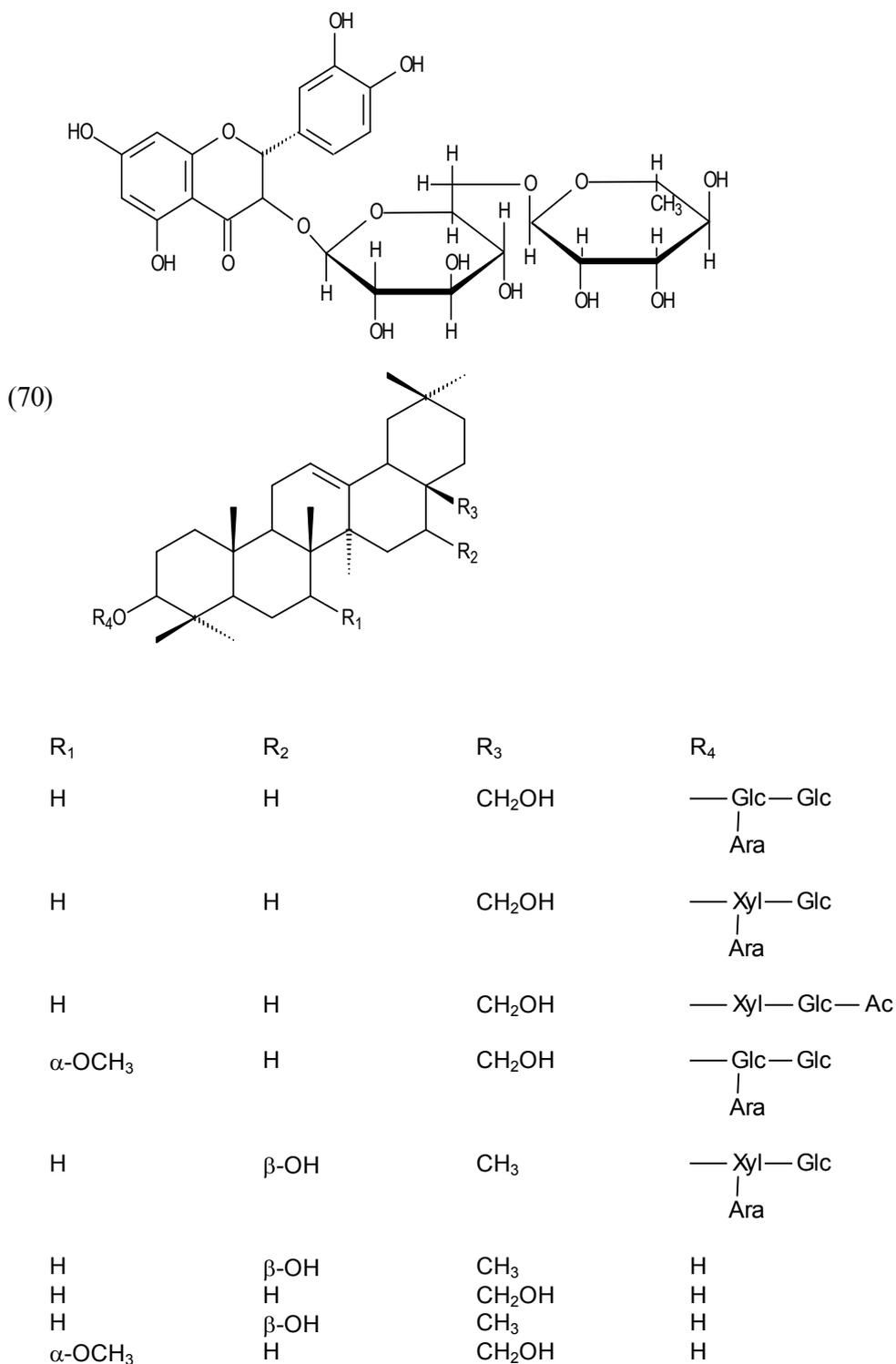
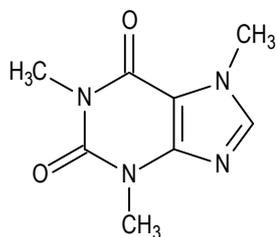
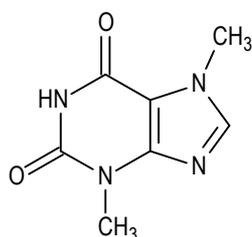


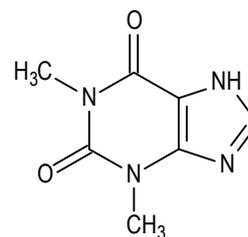
Figura 04 - Continuação



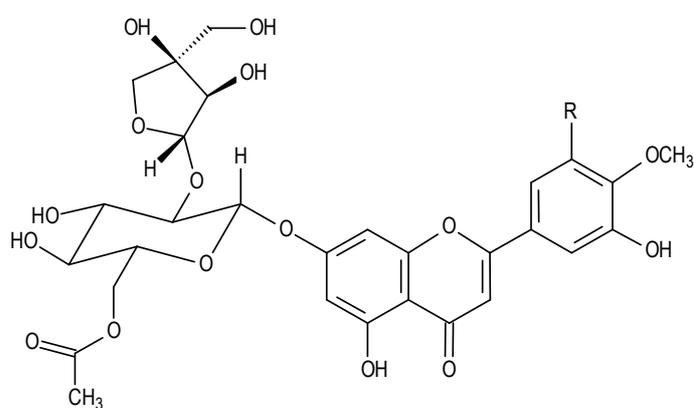
(80)



(81)

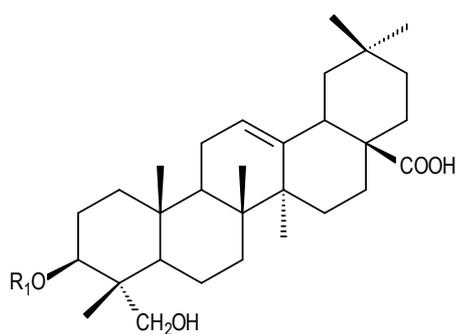


(82)



(83) R = H

(84) R = OH



(85)

(86)

(87)

(88)

(89)

(90)

R₁

H

Ara—

— Xyl— Ara

— Rha— Xyl

|
Ara

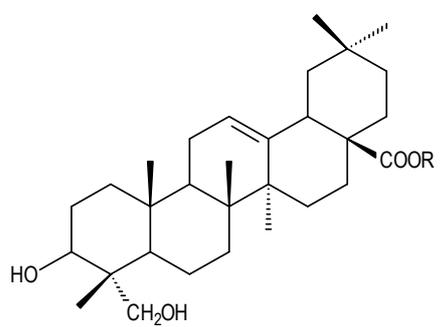
— Rha— Glu

|
Api

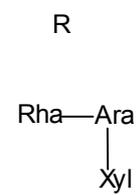
— Rha— Ara

|
Ara

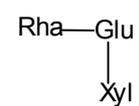
Figura 04 - Continuação



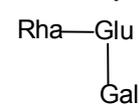
(91)



(92)



(93)



(94)

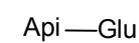
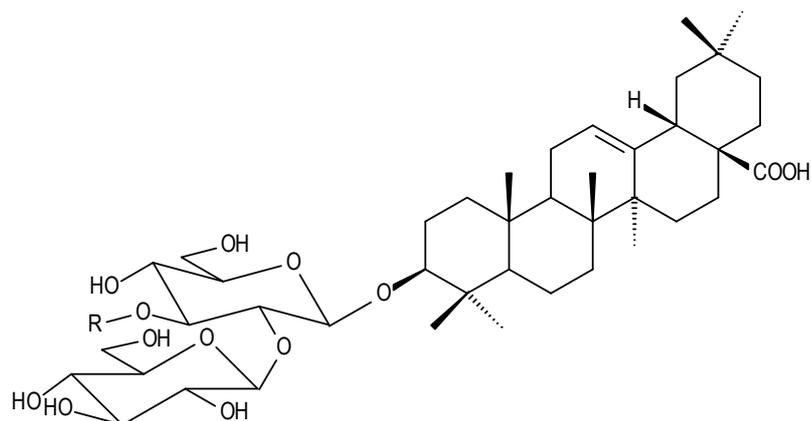


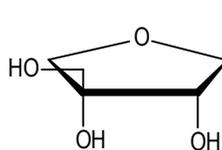
Figura 04 - Continuação



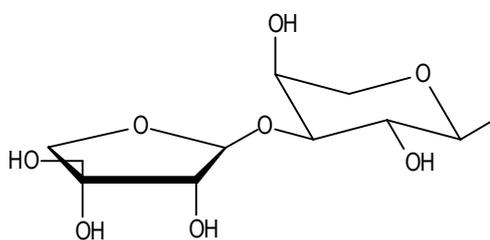
(95)

R
H

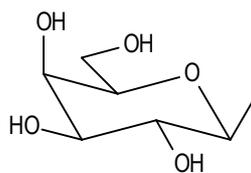
(96)



(97)



(98)



(99)

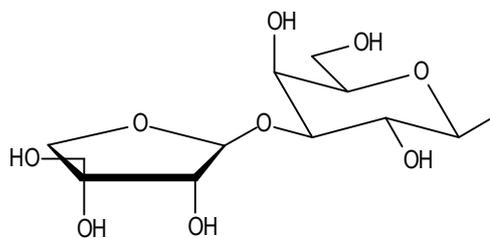


Figura 04- Continuação

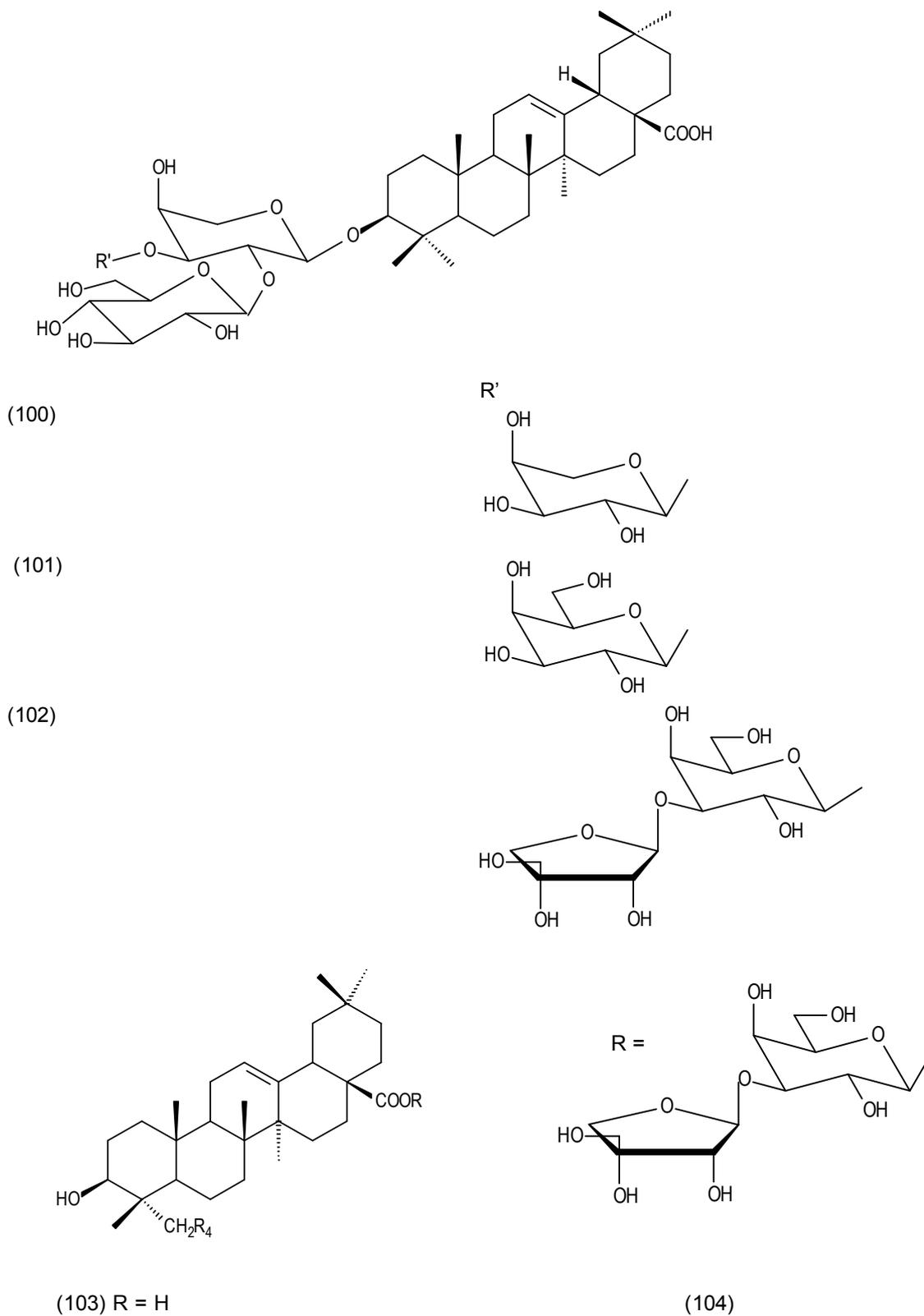
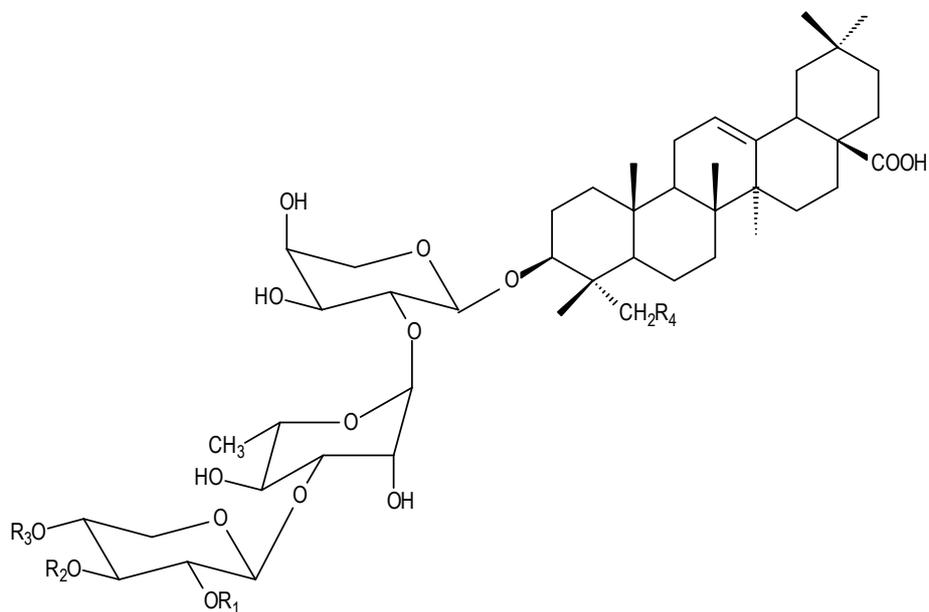
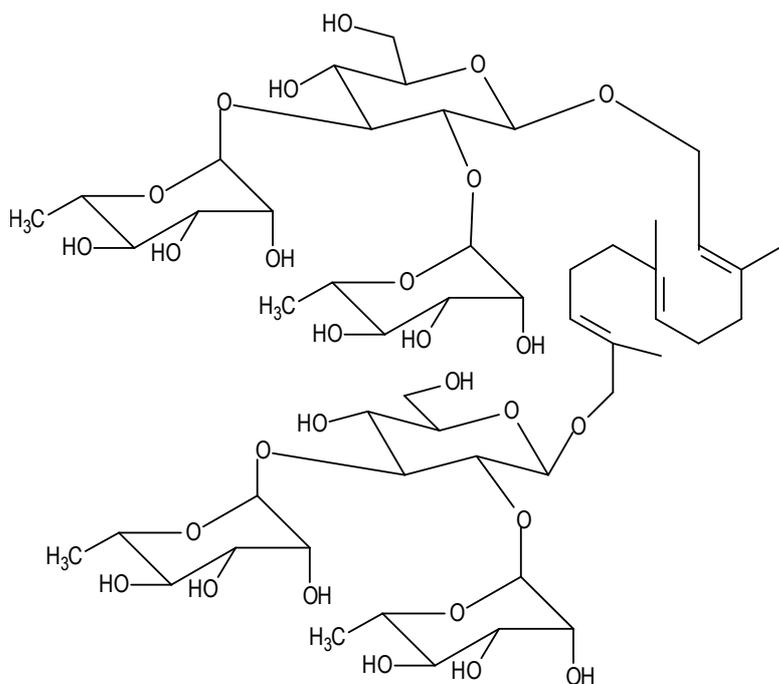


Figura 04 – Continuação

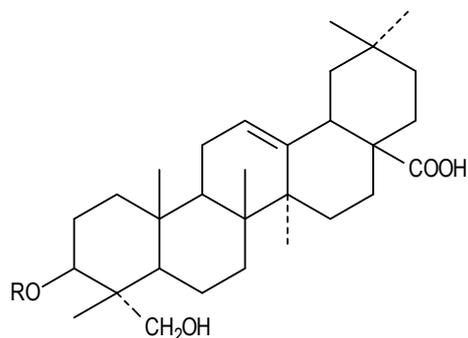


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(105)	H	H	H	OH
(106)	Ac	H	H	OH
(107)	H	H	Ac	OH
(108)	H	Ac	Ac	OH
(109)	H	H	Ac	OAc
(110)	H	H	H	H
(111)	H	H	Ac	H

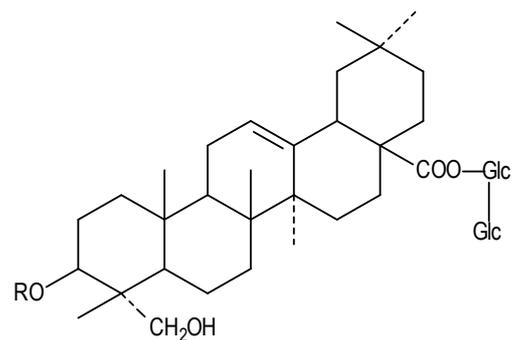


(110)

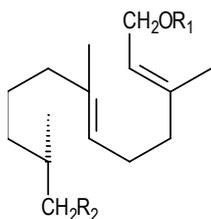
Figura 04 - Continuação



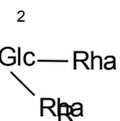
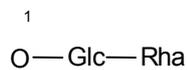
- (113) -Ara(p)-Rha(p)-Ara
R
- (114) -Ara(p)-Rha-Xyl-Ara
- (115) Ara(p)-Rha(p)-Ara
- (116) Ara(p)-Rha



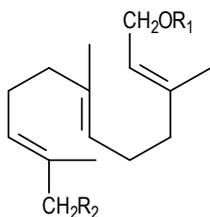
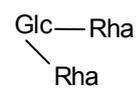
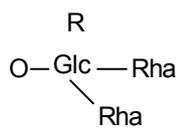
- (117) R
-Ara(p)-Rha-Xyl
- (118) -Ara(p)-Rha-Xyl



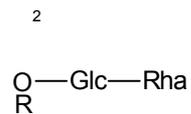
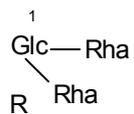
(119)



(120)



(121)



(122)

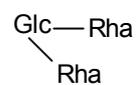
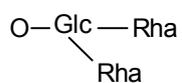
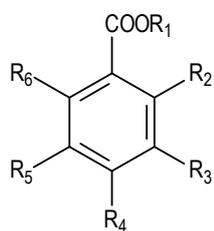


Figura 04- Continuação



(123)	Et	H	OH	OCH ₃	OH	H
(124)	H	OH	Et	H	H	H
(125)	H	H	OH	OH	OH	H
(126)	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
(127)	OCH ₃	H	H	OH	H	H
(128)	n-Pr	H	H	OH	H	H

Figura 04- Continuação

2.2. - O gênero *Paullinia*:

O gênero *Paullinia* compreende mais de 180 espécies, todas são lianas neotropicais com exceção de *P. pinnata* que também ocorre nos trópicos africanos (Weckerle *et al.*, 2003).

Paullinia é um gênero freqüentemente encontrado nas matas, algumas são venenosas, podendo inclusive envenenar o mel produzido por abelhas. Os representantes do gênero destacam-se por apresentar propriedades diversas: *P. cupana* conhecida como “guaraná” utilizado como tônico estimulante muscular e mental (Espínola *et al.*, 1997). *Paullinia pinnata* utilizada no combate a malária (Chabra *et al.*, 1991) e algumas espécies dentro deste gênero são utilizadas na pesca primitiva (Kinghorn e Balandrin, 1993).

2.2.1 - A fitoquímica do Gênero *Paullinia*

O gênero *Paullinia* possui um grande número de espécies, sendo a maioria ainda não estudada fitoquimicamente.

A espécie *Paullinia pinnata* L. é uma espécie de trepadeira usada na medicina tradicional para o tratamento da malária (Chabra *et al.*, 1991). A investigação fitoquímica desta espécie tem mostrado a presença de saponinas (terpenoidais e cardiotônicas) e flavonóides (Aboyurashed *et al.*, 1999).

Dentre as diversas espécies que compõem o gênero podemos citar ainda uma espécie nativa da região amazônica bastante conhecida, *Paullinia cupana* (guaraná), muito utilizada na medicina popular brasileira. Seu consumo também se faz presente na América e Europa na preparação de bebidas não alcoólicas. O guaraná também foi usado por vários séculos como estimulante pelos índios Saterê-Maué que viveram na Região Amazônica (Heman, 1982). O guaraná ainda é utilizado popularmente com diversos outros propósitos: tônico (devido ao efeito rejuvenescedor e afrodisíaco (Mattei, 1998; Henman, 1982; Santa-Maria *et al.*, 1998; Galvão *et al.*, 2002), estimulante do sistema nervoso, antidiarréico, diurético e agente antineural (Mattei *et al.*, 1998).

Outra espécie pertencente ao gênero, *P. yoco* é uma planta muito consumida pelos povos indígenas do sul da Colômbia e Norte do Equador, que a ingerem tradicionalmente pela manhã entre as 5:00 e 6:00 horas uma vez que é costume da população local ficar em jejum até as 12:00h, o que segundo eles diminui a sensação de fome e age como estimulante muscular (Schultes, 1942).

Outras espécies (*P. caracasana*, *P. pinnata*, *P. grandiflora*, *P. alata* e *P. spicata*) são utilizadas no envenenamento de flechas pelos índios, e também na pescaria primitiva mergulhando-se a planta na água (timbó).

“Timbó é uma designação popular empregada, em todo o Brasil, para um grande número de plantas utilizadas por populações primitivas na pesca, através do envenenamento e tem sido adotada desde os tempos pré-colombianos até os dias atuais. Na prática, coloca-se a planta previamente esmagada no rio, o veneno difundido na água é levado pela correnteza, e após algum tempo produz-se o efeito desejado: muitos peixes vêm à tona, geralmente flutuando de ventre para cima e estonteados. Neste estado podem ser facilmente apanhados e consumidos sem nenhum prejuízo a saúde humana, pois, a substância tóxica está presente em pequenas porcentagens”. Diversas outras plantas podem ser utilizadas com esta finalidade, sendo que as mais conhecidas na América do Sul, são espécies dos gêneros *Serjania* e *Magonia* (Sapindaceae), *Derris* e *Thephrosia* (Fabaceae) e *Baillieria*, *Clibadium* e *Lchthyothere* (Asteraceae), sendo que as plantas desta última família são simplesmente esmagadas e espalhadas na água como as demais, porém, incorporadas em iscas que os peixes ingerem. Dependendo da família varia-se à parte da planta utilizada, no caso da Asteraceae são as folhas, da Sapindaceae as cascas, da Teofrastaceae as sementes e da Fabaceae as raízes. Em alguns casos, as substâncias ativas são conhecidas, por exemplo: Na Fabaceae, o princípio ativo mais importante é a rotenona, ao lado de outros isoflavonóides de estrutura semelhante denominados rotenóides. Porém, eles não agem isoladamente, é provável que as saponinas que os acompanham, promovam a suspensão das substâncias no meio, ajudando assim a exercer sua ação tóxica (Kinghorn e Balandrin, 1993).

2.3. - A espécie *Paullinia weinmanniaefolia*

Paullinia weinmanniaefolia descrita por Mart. é conhecida popularmente como "cipó-sangue", devido ao exsudato de coloração vermelha que é produzido quando a planta é lesada. Pelo melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato do estudo fitoquímico da espécie.

Tabela 07 - Classificação Botânica

(www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/.0133/fo1657.htm - 29/09/04)

Classificação Botânica	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Sapindaceae
Gênero	<i>Paullinia</i>
Espécie	<i>Paullinia weinmanniaefolia</i>

3.0 – Objetivos

3.1 – Objetivos Gerais

O principal objetivo deste trabalho visou o isolamento, purificação e identificação estrutural dos constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo secundário especializado de um espécime de *Paullinia weinmanniaefolia*, coletada no Complexo Lagunar Grussaí-Iquiparí, São João da Barra-RJ.

3.2 - Objetivos específicos

- Aprendizado de técnicas cromatográficas de isolamento e purificação de substâncias;
- Aprendizado da interpretação de espectros IV, Massas e RMN de metabólitos secundários;
- Aprendizado da metodologia básica de avaliação de citotoxicidade de extratos e sua aplicação na rotina do laboratório;
- Aprendizado da metodologia básica de avaliação da atividade antioxidante dos extratos frente ao radical livre DPPH.

4.0 - Materiais e Métodos

- A concentração dos extratos e frações foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Buchi B-480 e Fisatom 802.
- As cromatografias em camada delgada (CCDA) foram feitas em cromatofolhas de sílica gel 60 GF₂₅₄, RP-18 F_{254s} e Celulose (Merck). As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 e 365nm e/ou borrifação com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica e solução alcoólica de cloreto férrico hexaidratado).
- Os critérios de pureza adotados foram a observação de uma única mancha em cromatografia em camada delgada (CCDA), variando-se a fase móvel.
- Os pontos de fusão, foram obtidos em aparelho MQAPF - 301 da Microquímica. (Sem correção)
- Nas separações cromatográficas em coluna, foram utilizados dois tipos de sílica: sílica gel 60G (0,063-0,200mm; 70-230 mesh ASTM) Merck e Vetec e sílica gel 60G (0,04-0,063mm; 230-400 mesh ASTM e MERCK).
- Agente dessecante: Na₂SO₄ anidro.
- Nos procedimentos cromatográficos e nas reações de derivatização foram utilizados solventes analiticamente puros das marcas VETEC, SYNTH e MERCK.
- Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer FT-IR 1600, em pastilhas de KBr.
- Os espectros de massas (EM) foram obtidos no aparelho GC/EM - QP-5050 (Shimadzu) a 70 eV.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em espectrômetro Jeol Eclipse, operando a uma frequência de 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. Os solventes utilizados foram: Clorofórmio deuterado (CDCl₃), metanol deuterado (CD₃OD) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d₆), puros da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

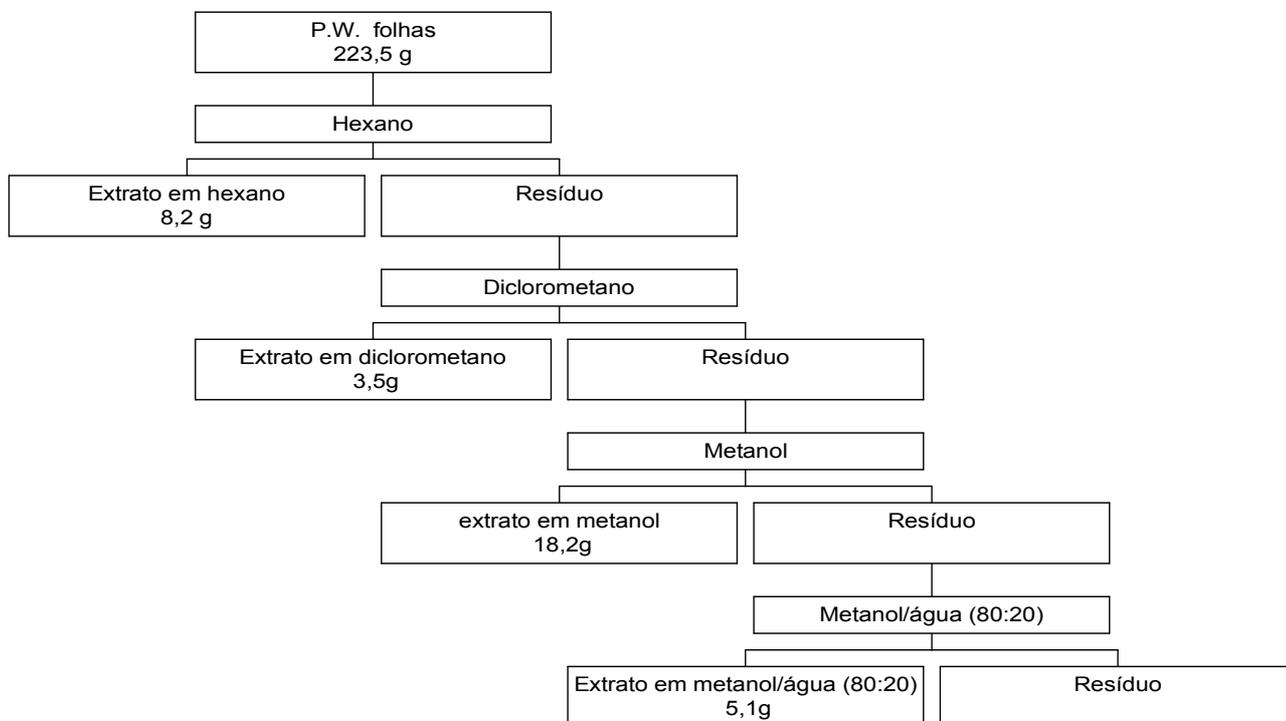
5.0 - PARTE EXPERIMENTAL

5.1 - Coleta da Planta

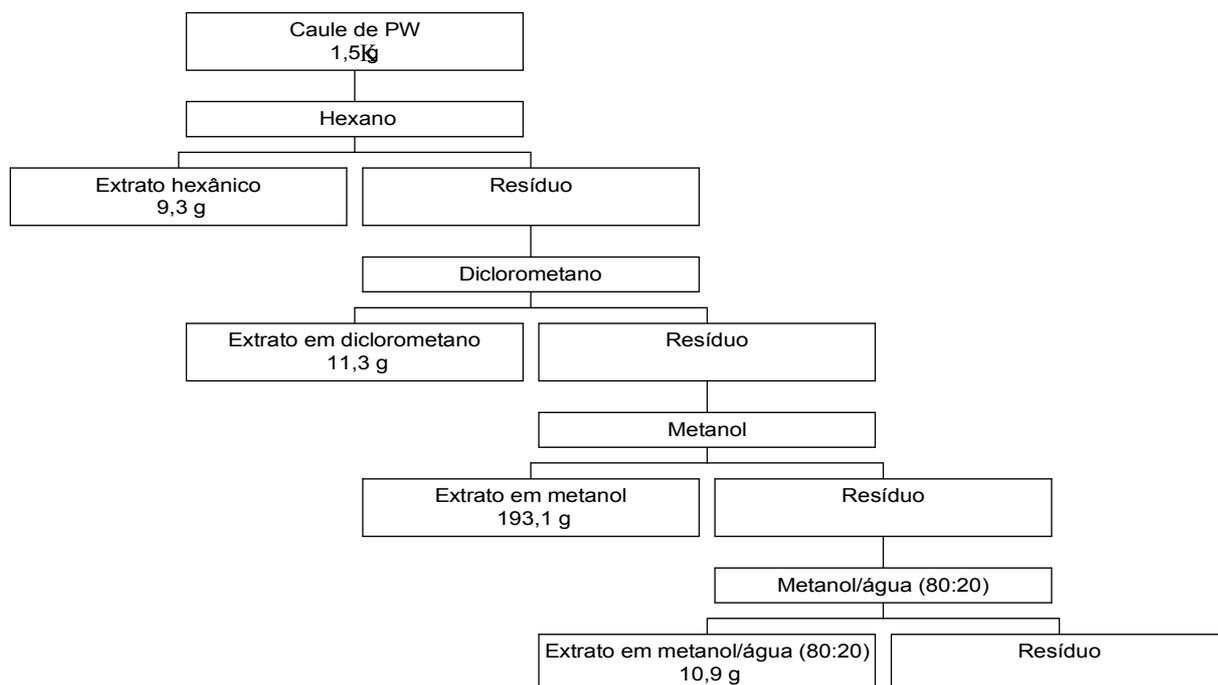
O espécime *P. weinmanniaefolia* foi coletado na restinga do complexo lagunar Grussaí-Iquiparí no município de São João da Barra, (21° 44'S; 41°02'O), região norte do estado do Rio de Janeiro em fevereiro de 2003. O rio Paraíba do Sul é citado como importante fator na formação dessa região (Lamego, 1974; Dias e Silva, 1984; Flexor *et al.*, 1984; Suguio e Tessler 1984).

5.2 - Preparação dos Extratos

As folhas e o caule de um espécime de *P. weinmanniaefolia* foram secos a temperatura ambiente e reduzidas a pó em moinho de martelo. O material moído foi submetido a sucessivas extrações com hexano, diclorometano, metanol e metanol-água. Os extratos foram concentrados a pressão reduzida em evaporador rotatório como mostrado no Esquema 01 e 02.



Esquema 01 - Preparação dos extratos das folhas de *P. weinmanniaefolia*



O conceito geográfico de restinga refere-se aos cordões arenosos que depositados pelas correntes marinhas, fecham ou tendem a fechar uma reentrância na linha da costa. Ali se estabelecem comunidades vegetais e animais com características marcantes em função das condições físicas do meio. (www.jornaldapaisagem.br/artigos/art_tabacow4.htm- 05/09/ 2004).

Esquema 02- Preparação dos extratos do caule de *P. weinmanniaefolia*

5.3 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexânico das Folhas de *P. weinmanniaefolia*

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *P. weinmanniaefolia* produziu as seguintes substâncias: **PW-01**, **PW-4**, **PW-05** e **PW-06**.

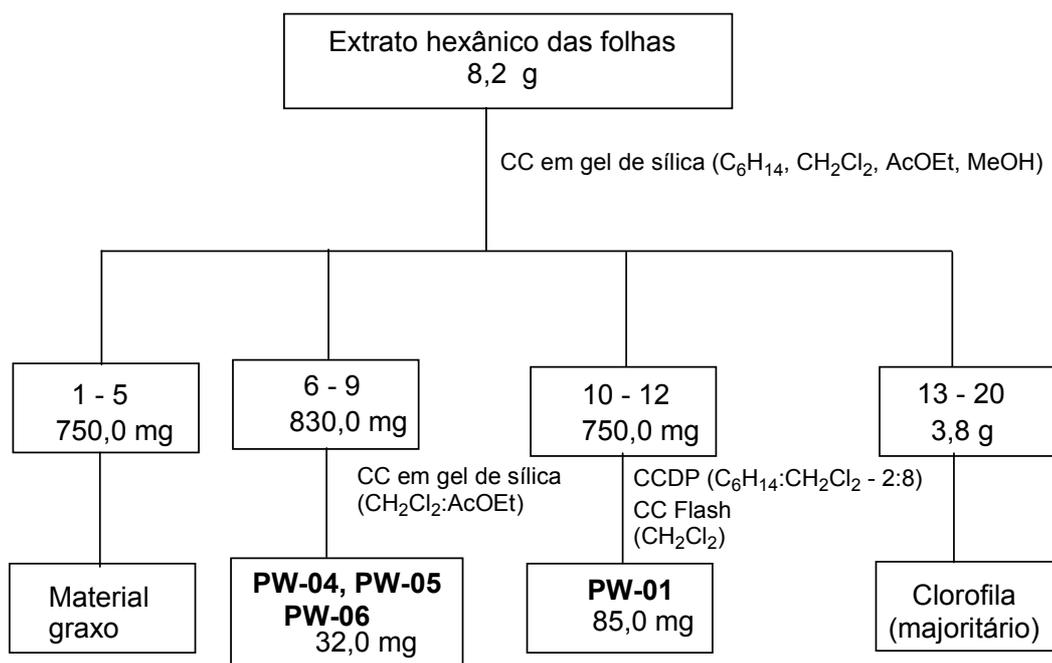
Uma alíquota de 8,2 g do extrato foi submetido a CC em gel de sílica utilizando como eluente (C_6H_{14} , CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH) em gradiente crescente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com a semelhança de Rf.

As frações de nº 1 - 5 (750 mg) apresentaram grande quantidade de material graxo e não foram trabalhadas.

As frações de nº 6 - 9 (830 mg) foram submetidas a CC em gel de sílica utilizando como eluente ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$) em gradiente crescente de polaridade, as subfrações resultantes foram analisadas através de CCDA com vários sistemas de eluentes ($\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$; CH_2Cl_2) e revelou-se como uma única mancha que após análise espectral mostrou-se tratar de uma mistura contendo os seguintes triterpenos: **PW-04, PW-05 e PW-06**.

As frações 10 - 12 (750 mg) foram submetidas a CCDP ($\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -20:80) seguida de CC flash utilizando CH_2Cl_2 como eluente, levando ao isolamento adicional do triterpeno **PW-01**.

As frações de 18 - 20 (3,8 g) apresentaram grande quantidade de clorofila e não foram trabalhadas.

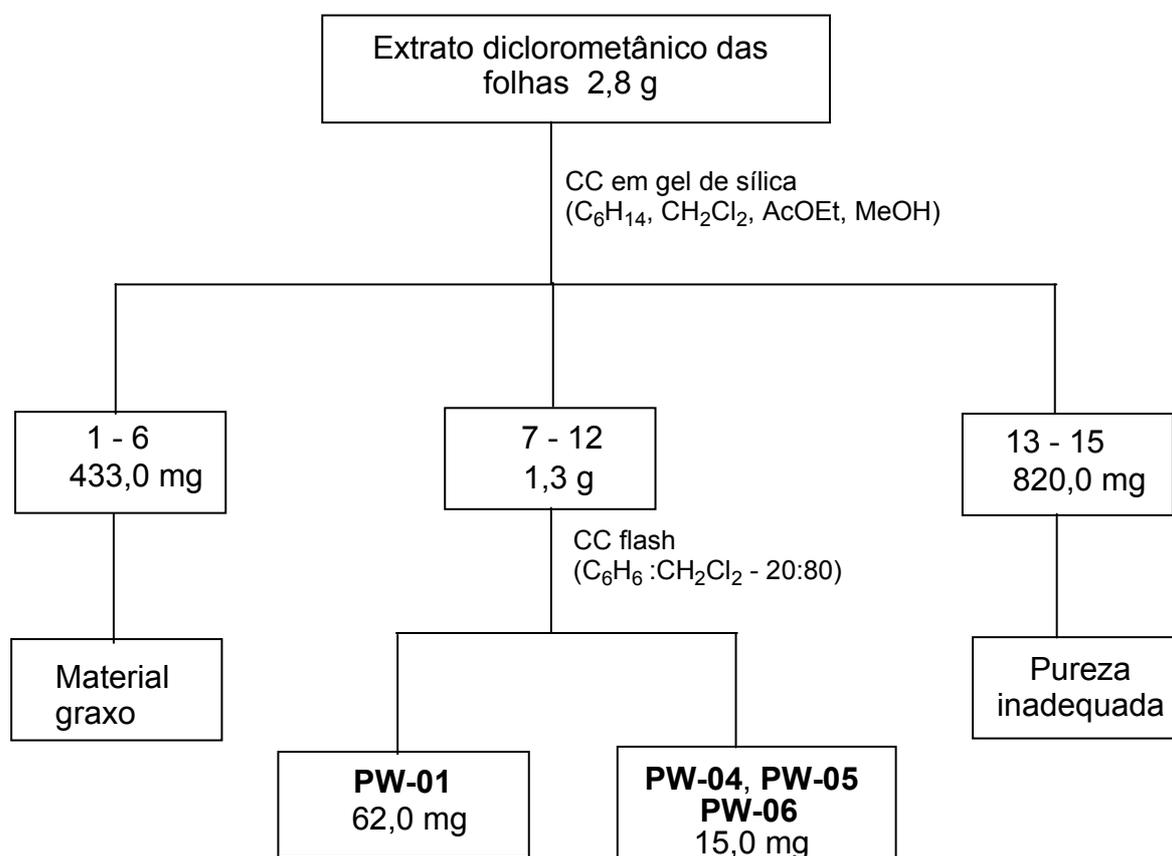


Esquema - 03 - Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *P. weinmanniaefolia*

5.4 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Diclorometânico das folhas de *P. weinmanniaefolia*

Uma alíquota de 2,8 g do extrato diclorometânico das folhas foi submetida a CC em gel de sílica utilizando como eluente (C_6H_{14} , CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH) em gradiente crescente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com a identidade de Rf.

As frações de 7 - 12 (1,3 g) foram submetidas a CC flash utilizando como eluente $C_6H_{14} : CH_2Cl_2$ - 20:80) resultando no isolamento adicional dos triterpenos: **PW-01**, **PW-04**, **PW-05** e **PW-06**. (Esquema 04)



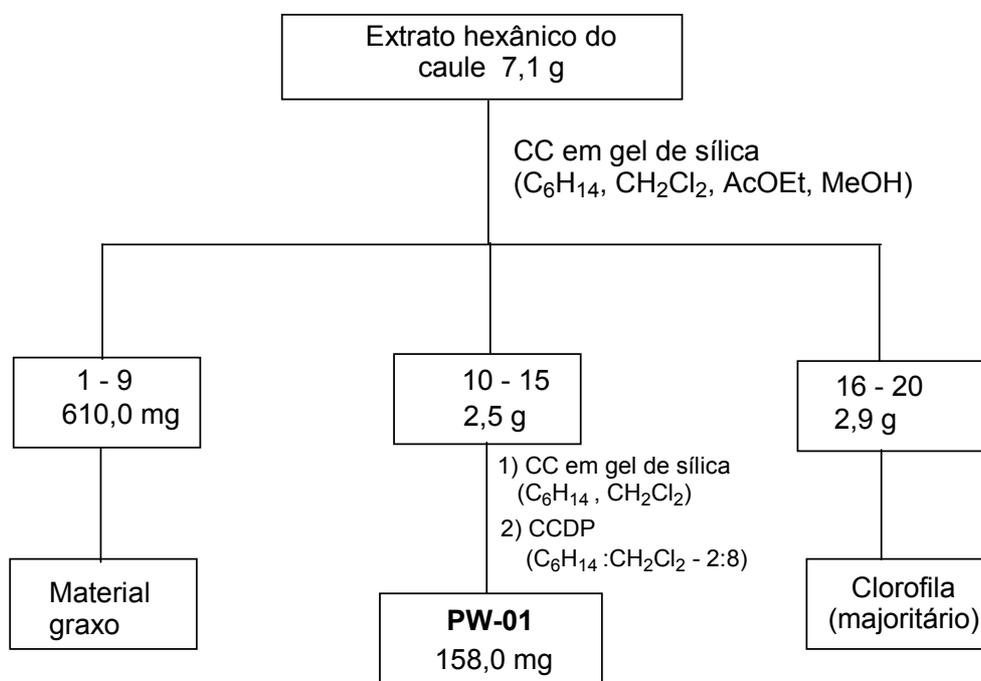
Esquema - 04 - Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de *P. weinmanniaefolia*

5.5 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexânico do Caule de *P. weinmanniaefolia*

O fracionamento das substâncias iniciou-se durante o processo de evaporação do solvente do extrato hexânico obtendo-se um material cristalino, que foi submetido à cromatografia em coluna (CC) de gel de sílica, resultando em quantidade adicional da substância **PW-01**. Uma alíquota deste extrato (7,1 g) foi submetido a CC em gel de sílica utilizando como eluente (C_6H_{14} , CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH) em ordem de polaridade crescente após análise por CCDA as frações foram reunidas de acordo com a identidade de Rf.

As frações de 1 - 9 (610 mg) apresentaram material graxo e portanto não foram trabalhadas. As frações de 10 - 15 (2,50 g) foram submetidas a CC em gel de sílica utilizando como eluente ($C_6H_{14}:CH_2Cl_2$) em ordem crescente de polaridade, seguida de CCDP utilizando como eluente ($C_6H_{14} : CH_2Cl_2 - 20:80$). Este procedimento resultou no isolamento da substância **PW-01**.

As frações de 16 - 20 (2,9 g) mostraram-se ricas em clorofila através de CCDA e portanto não foram trabalhadas.



Esquema - 05 - Fracionamento do extrato hexânico do caule de *P. weinmanniaefolia*

5.6 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Diclorometânico do caule de *P. weinmanniaefolia*

Uma alíquota de 9,2 g do extrato diclorometânico foi submetido a fracionamento cromatográfico em CC de gel de sílica eluída com (C₆H₁₄, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH) em gradiente crescente de polaridade. Após análise através de CCDA foram reunidas de acordo com a semelhança de Rf.

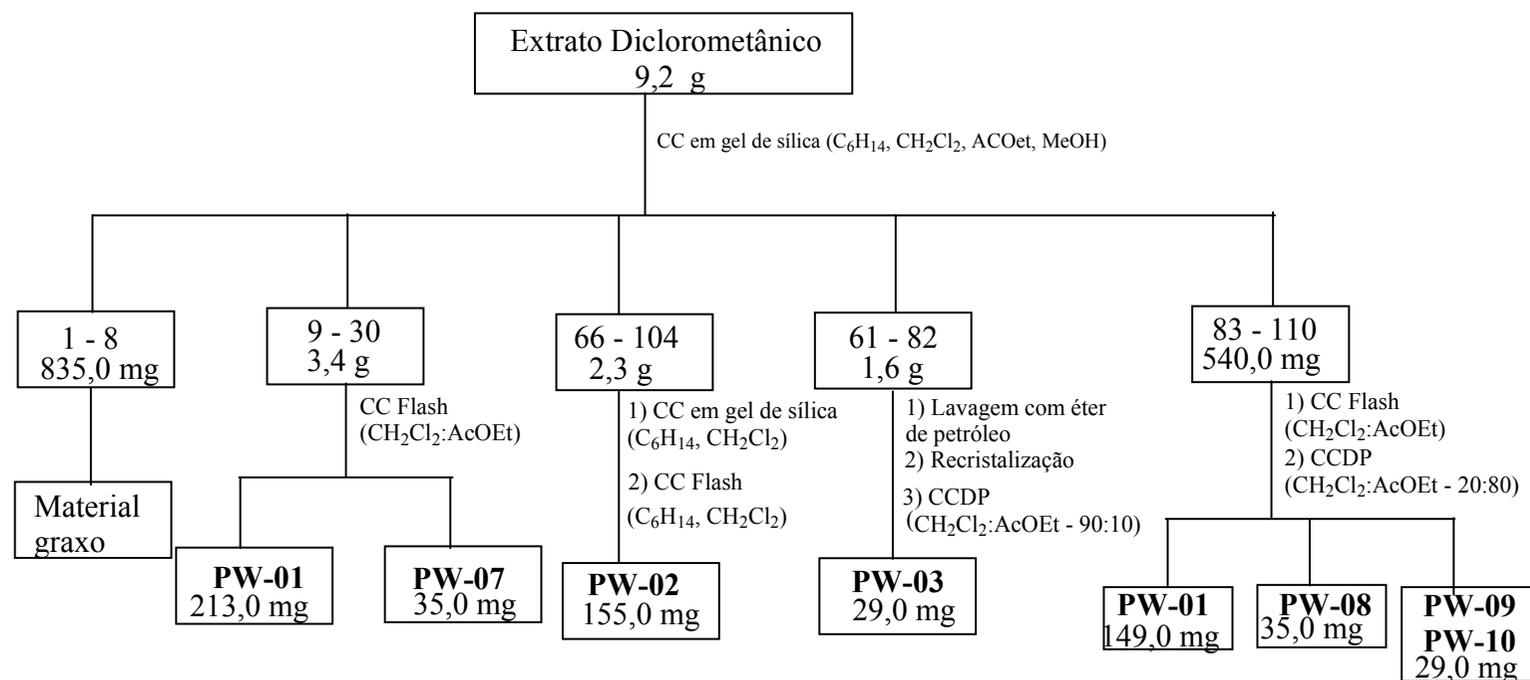
As frações de nº 1 - 8 (835 mg) por apresentarem grande quantidade de material graxo, não foram trabalhadas.

As frações de nº 9 - 30 (3,400 g) foram submetidas a cromatografia CC tipo flash utilizando como eluente (CH₂Cl₂:AcOEt - 20:80) o que resultou no isolamento de **PW-07** e quantidade adicional de **PW-01**.

As frações de nº 31 - 60 (2,3 g) foram submetidas a CC tipo flash utilizando como eluente (C₆H₁₄ : CH₂Cl₂ - 30:70) resultou no isolamento de **PW-02**.

As frações de nº 61 - 82 (1,6 g) foram submetidas a lavagem com éter de petróleo. O material sólido resultante foi recristalizado na mistura (C₆H₁₄:CH₂Cl₂) e posteriormente submetida a CCDP utilizando como sistema de eluente (CH₂Cl₂:AcOEt - 25:75) resultando no isolamento da substância **PW-03**.

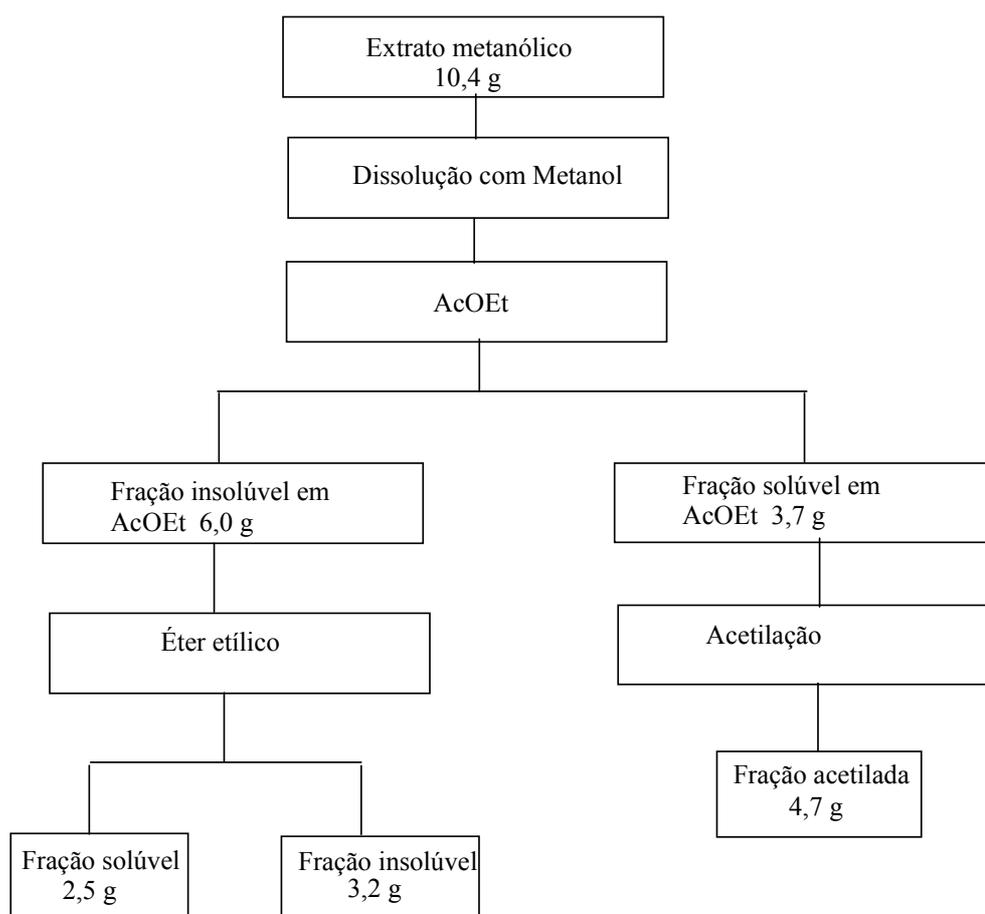
As frações de nº 83 - 110 (540 mg) foram submetidas a CC tipo flash utilizando como eluente (CH₂Cl₂ : AcOEt - 20:80), seguida de CCDP com o mesmo sistema de eluente, resultando no isolamento das substâncias **PW-08**, **PW-09** e **PW-10**.



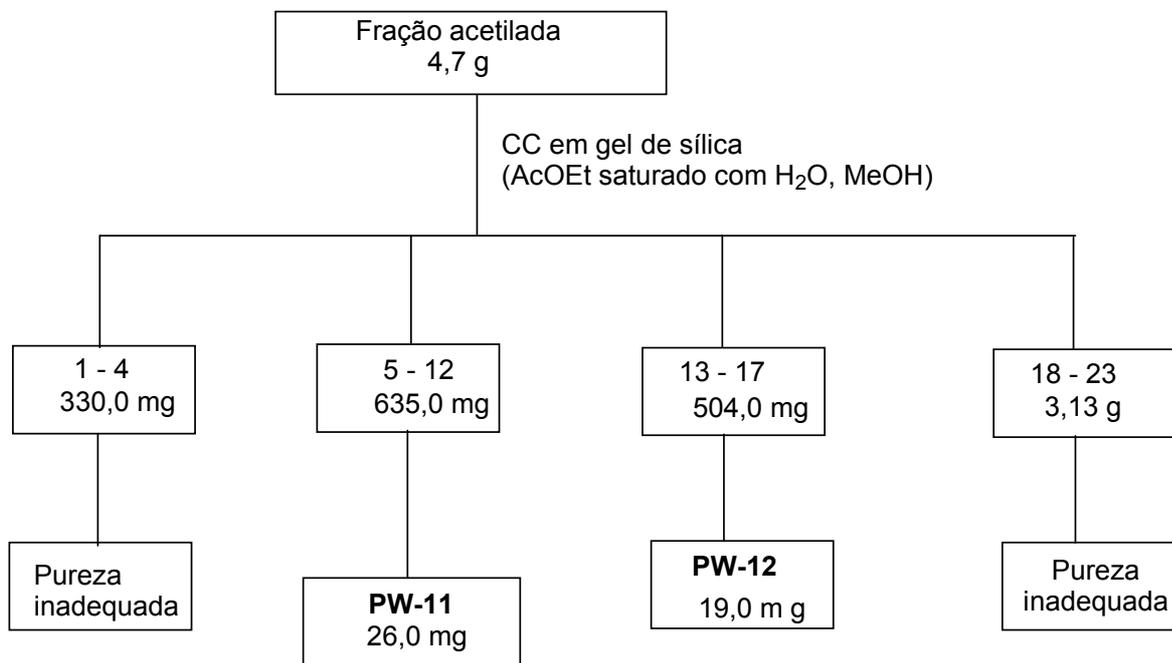
Esquema 06 - Fracionamento do extrato diclorometânico do caule de *P. weinmanniaefolia*

5.7 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Metanólico do caule de *P. weinmanniaefolia*

Uma alíquota de 10,4 gramas do extrato metanólico de *P. weinmanniaefolia* foi submetida a uma partição com AcOEt, éter etílico e metanol (Esquema 07). A fração solúvel em acetato de etila (3,7 g) foi seca em evaporador rotatório e submetida a acetilação com anidrido acético:piridina (9:1) (10mL), esta solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 24 horas. Após este período adicionou-se água e extraiu-se com acetato de etila (3x10 mL). Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi destilado obtendo-se depois de seco (4,7 g). Uma alíquota deste material acetilado foi submetido à CC em coluna de sílica gel utilizando como solventes: acetato de etila saturado com água e metanol em gradiente de polaridade crescente o que resultou no isolamento dos derivados acetilados **PW-11** e **PW-12** (Esquema 07).



Esquema 07 - Partição do extrato metanólico do caule de *P. weinmanniaefolia*

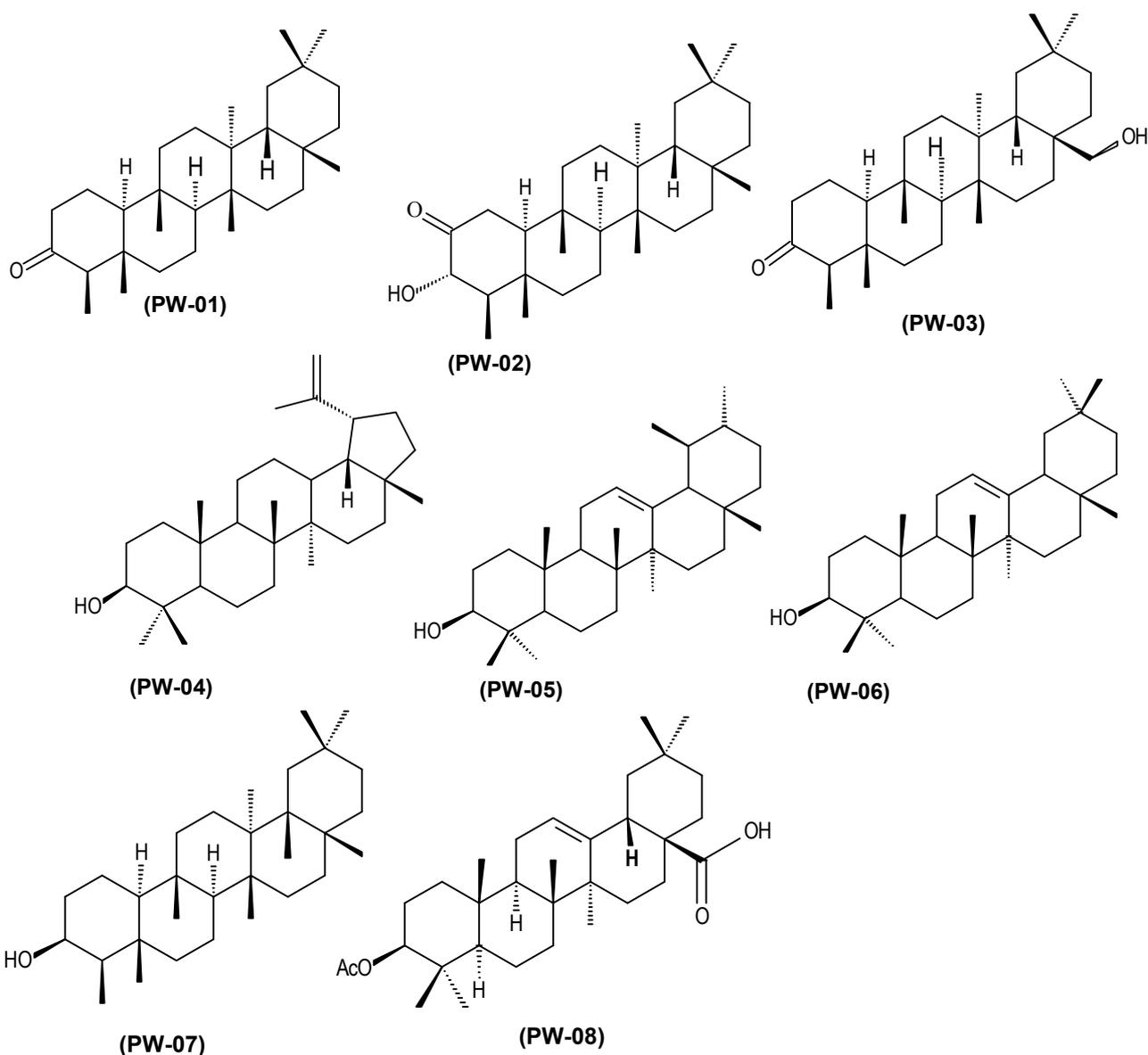


Esquema 08 - Fracionamento de uma alíquota acetilada do extrato metanólico do caule de *P. weinmanniaefolia*

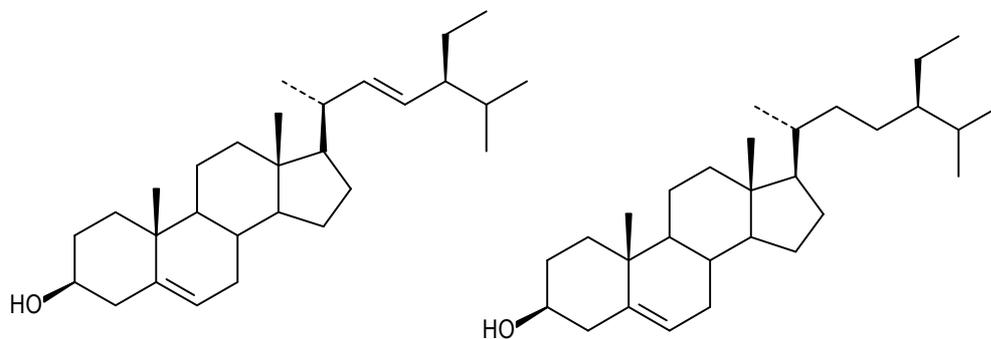
6.0 - Constituintes Químicos isolados da espécie *P. weinmanniaefolia*

O estudo fitoquímico das folhas e caule de um espécime *P. Weinmanniaefolia* permitiu o isolamento e a caracterização de oito triterpenos: **PW-01**, **PW-02**, **PW-03**, **PW-04**, **PW-05**, **PW-06**, **PW-07**, **PW-08**, dois esteróides: **PW-09** e **PW-10** e dois ciclitolis: **PW-11** e **PW-12**.

6.1 - Triterpenos



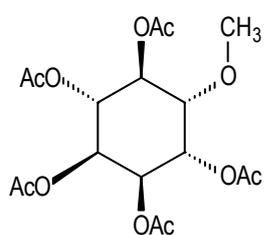
6.2 - Esteróides



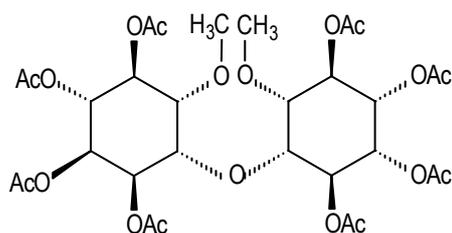
PW-09

PW-10

6.3 - Ciclitóis



(PW-11)



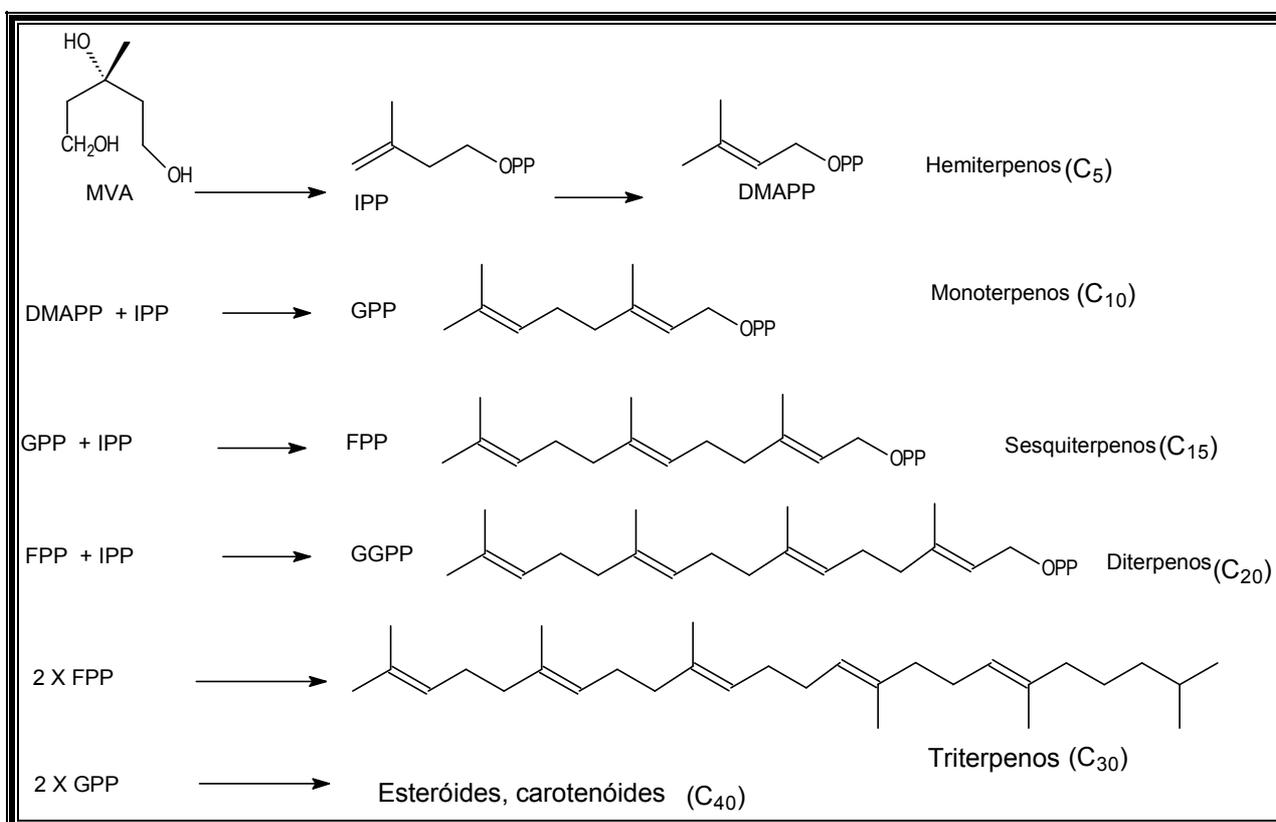
(PW-12)

7.0 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 - Triterpenóides

7.1.1 - Características gerais dos terpenóides

Os terpenóides formam uma diversificada classe de substâncias naturais que têm sua biogênese no ácido mevalônico o qual dá origem ao dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e isopentenilpirofosfato (IPP). A união dessas unidades isoprênicas através do encadeamento cabeça/cauda dá origem as diversas estruturas terpenoídicas (Esquema 09).



Esquema 09 - Precursores e classes de terpenos (Bruneton, 1995)

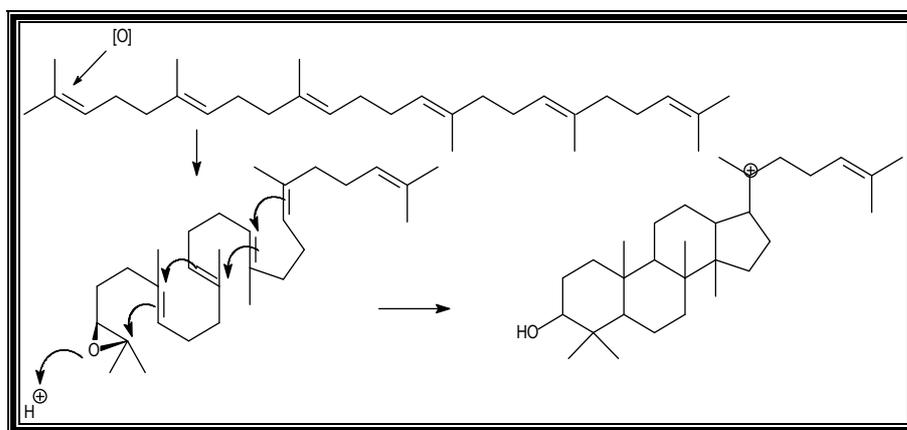
Triterpenos são metabólitos secundários não-esteroidais presentes em organismos da flora e fauna terrestre e marinha podendo ocorrer na forma livre ou na forma de éter, éster e glicosídeo. Embora há muitos anos o seu uso medicinal tenha sido considerado limitado, atualmente um número considerável de trabalhos tem anunciado o seu grande potencial (Viegas, 2003; Geetha e Varalakshmi, 2001; Itokawa *et al.*, 1991; Kundu *et al.*, 2000). Triterpenóides são isopentenóides compostos de trinta átomos de carbono e que podem apresentar esqueleto acíclico, mono, di, tri, tetra ou pentacíclicos. O esqueleto pentacíclico é o que predomina e que talvez por este motivo tem sido largamente investigado (Mahato e Kundu, 1994).

7.1.2 - Biossíntese de triterpenóides

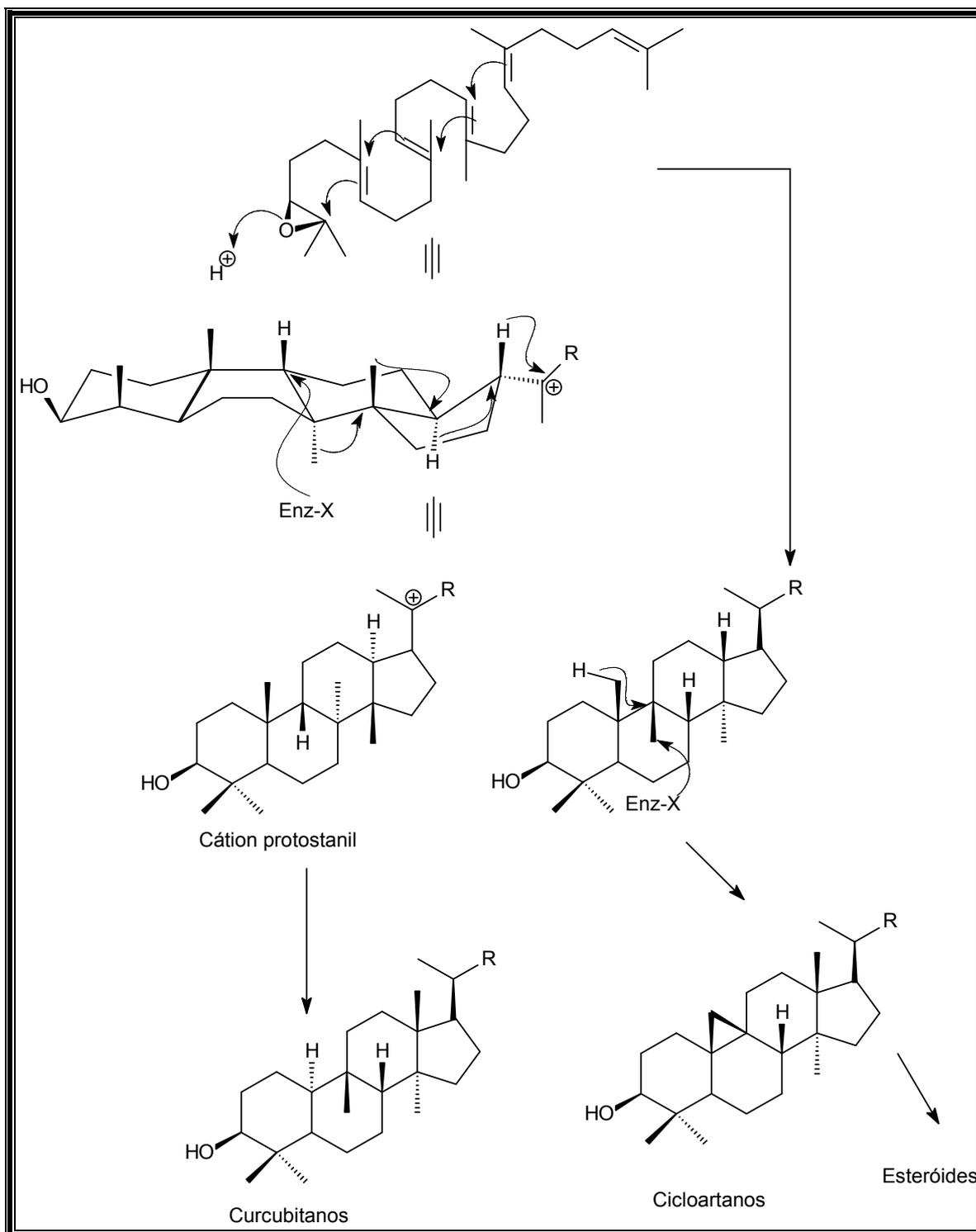
A biossíntese dos triterpenos inicia-se com a abertura do anel do epóxido esqualeno desencadeando a ciclização e a formação do cátion. É a conformação inicial do epóxido esqualeno que determinará a formação de esteróides ou triterpenos.

- Se o epóxido esqualeno se mantiver na conformação cadeira-bote-cadeira a ciclização leva ao cátion protostanil, precursor intermediário de cicloartanos e curcubitanos.
- Se o epóxido esqualeno se mantiver na conformação cadeira-cadeira-cadeira a ciclização levará ao cátion damaranil.

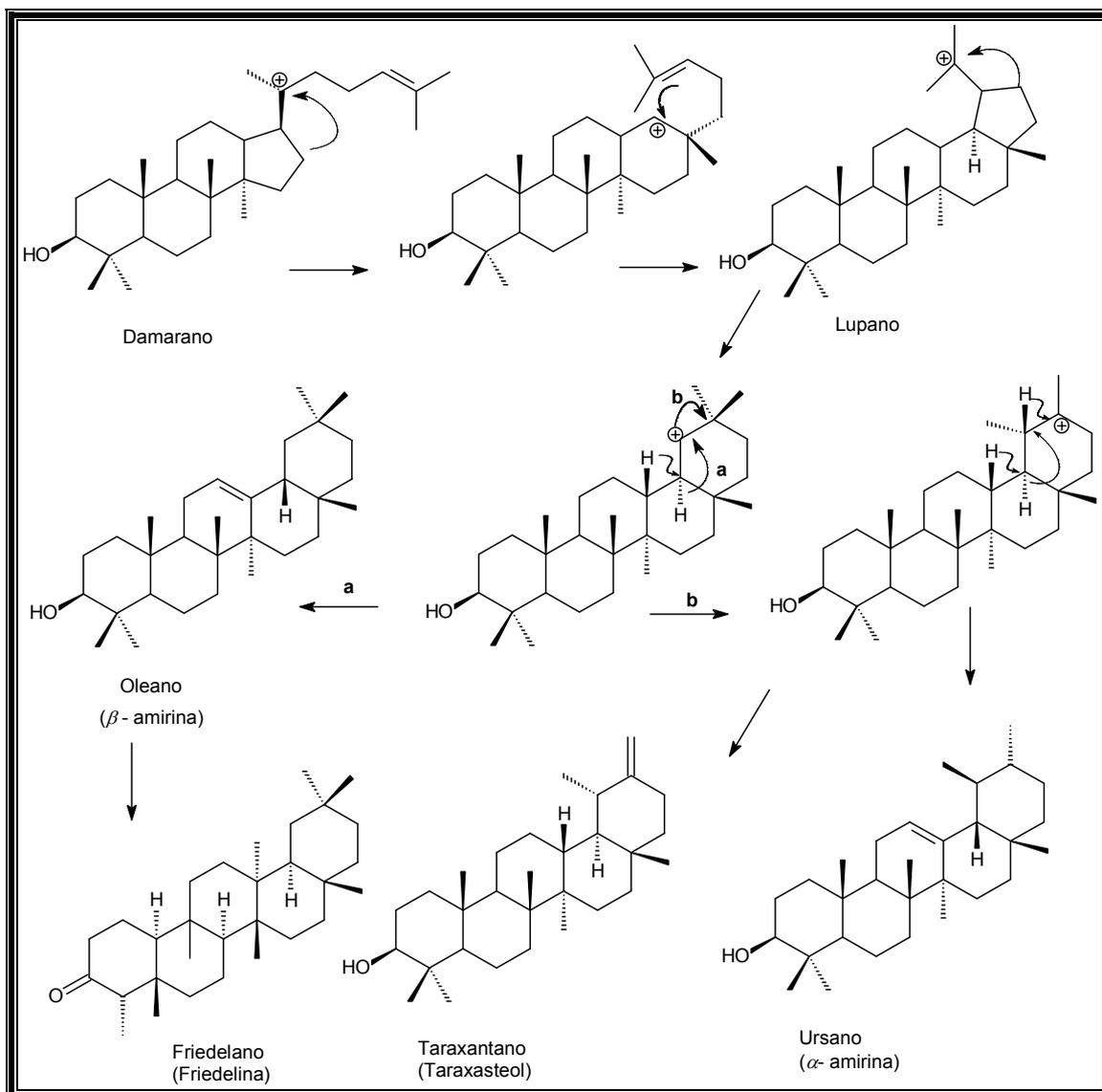
Alguns triterpenos não possuem o grupo hidroxila na posição 3. Estes geralmente são formados da ciclização direta do esqualeno.



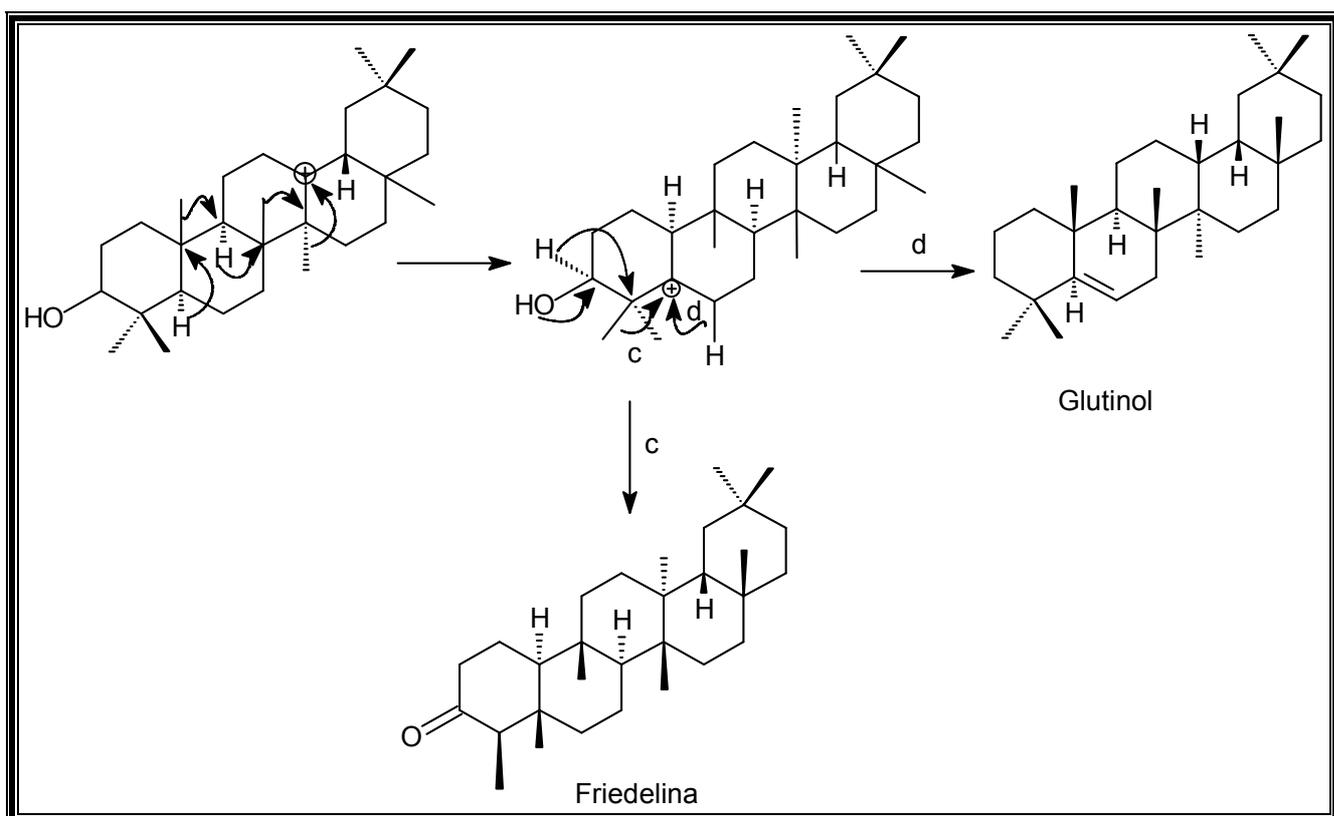
Esquema 10 - Ciclização do epóxido esqualeno (Bruneton, 1995)



Esquema 11 - Formação dos Curcubitanos e cicloartanos (Bruneton, 1995)

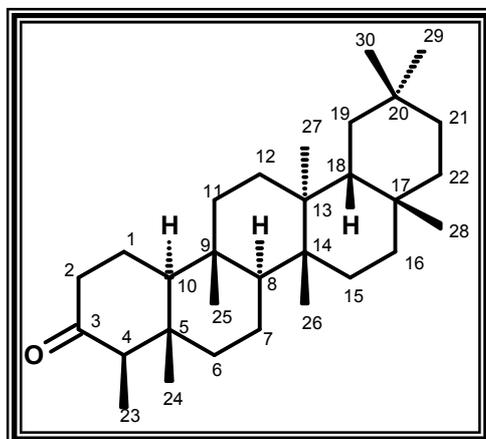


Esquema 12 - Rotas biossintéticas para alguns esqueletos triterpênicos (Bruneton, 1995)



Esquema 13 – Principais rearranjos do tipo Wagner-Merwein para formação do esqueleto friedelano

7.1.3 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PW-01



A substância **PW-01** foi obtida na forma de cristais incolores (P.F. 255,2 - 255,6°C). A fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ (seis insaturações) foi deduzida por análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C (trinta sinais simples) (Figura 08, p.68) dados de RMN ^{13}C (Figura 12, p. 72) [sete carbonos quaternários incluindo um sp^2 (δ_C 213,19); quatro CH; onze CH_2 ; oito CH_3] e espectro de massas [m/z 426 (M^+)] (Figura 13, p.73)

O espectro de RMN 1H de **PW-01** (Figura 06, p. 66) mostrou uma grande quantidade de sinais simples entre δ_H (0,71 - 1,16) relativos aos hidrogênios dos grupos metilas, dando ao espectro uma feição característica de triterpeno pentacíclico.

Pela análise do espectro de RMN ^{13}C observa-se a presença de um grupo carbonila (δ_C 213,19) o qual está de acordo com a absorção a $\nu_{m\acute{a}x}$ 1715 cm^{-1} típico de estiramento de carbonila de cetona cíclica, observado no espectro de infravermelho (Figura 15, p. 75), (Pavia *et al.*, 1995)

O espectro de infravermelho revela ainda a uma deformação axial de CH entre 2927 - 2846 cm^{-1} , deformação angular assimétrica de CH_3 em 1458 cm^{-1} , deformação angular assimétrica de CH_2 em 1363,3 e absorções moderadamente intensas entre 1100 - 1300 cm^{-1} de deformação axial e angular de C-C-C e do grupo C-CO-C. (Silverstein *et al.*, 2000).

Os deslocamentos químicos dos carbonos C-2 δ_C (41,51) e C-4 δ_C (58,47) foram atribuídos com base no efeito desprotetor causado pela carbonila C-3. A absorção referente a metila em C-23 δ_C (6,81) foi atribuída como devido ao efeito protetor exercido pela

carbonila nesta posição (Garcez *et al.*, 1981) e também através de dados biogênicos (Dewick, 1997).

Esses efeitos podem ser verificados através da comparação dos dados de RMN ^{13}C de **PW-01** com os dados de dois triterpenos o euforcinol (a) e o epifriedelanol (c) utilizados como modelo (Figura 05). Verifica-se que quando a posição C-3 não está oxidada o deslocamento químico dos carbonos adjacentes C-2 e da metila C-23 se apresentam mais desprotegidos em relação a friedelina onde C-3 encontra-se oxidado (Ahmad *et al.*, 1994).

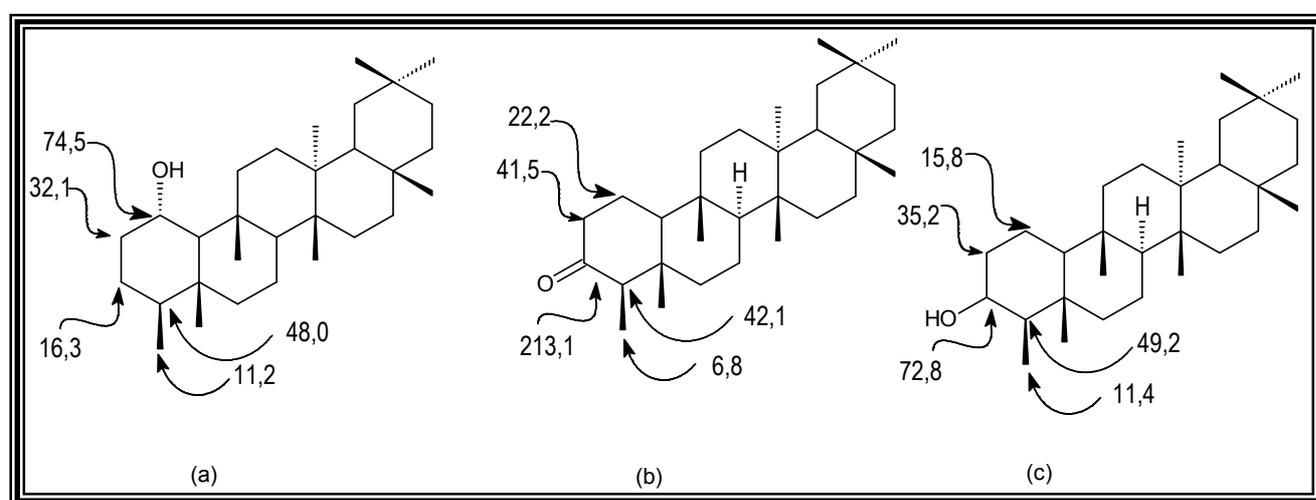


Figura 05 - Euforcinol (a), Friedelina (b) e Epifriedelanol (c)

A atribuição dos deslocamentos químicos dos grupos metílicos foi feita considerando-se as interações 1,3-*sin*-diaxiais existentes na molécula. Essas interações influenciam no deslocamento químico dos carbonos envolvidos, pois tendem a desprotegê-los. Esse efeito pode ser observado nas metilas C-24 δ_{C} (14,64) e C-25 δ_{C} (17,93); C-25 δ_{C} (17,93) e C-26 δ_{C} (20,24), (Garcez *et al.*, 1981).

A existência de impedimento estérico entre as metilas C-27 e C-29, força os anéis D e E a adotarem a conformação bote. O deslocamento químico em região de alta frequência observado para C-8 δ_{C} (53,09) é resultado deste tipo de conformação no anel D (Steskind *et al.*, 1995).

O número de insaturações (seis), o número de grupos metílicos (oito) e a ausência de sinais de absorção de dupla ligação (C=C) no espectro de RMN ^{13}C , além da

comparação com dados da literatura (Mahato e Kundu, 1994) nos sugerem para a substância **PW-01** a estrutura da friedelina.

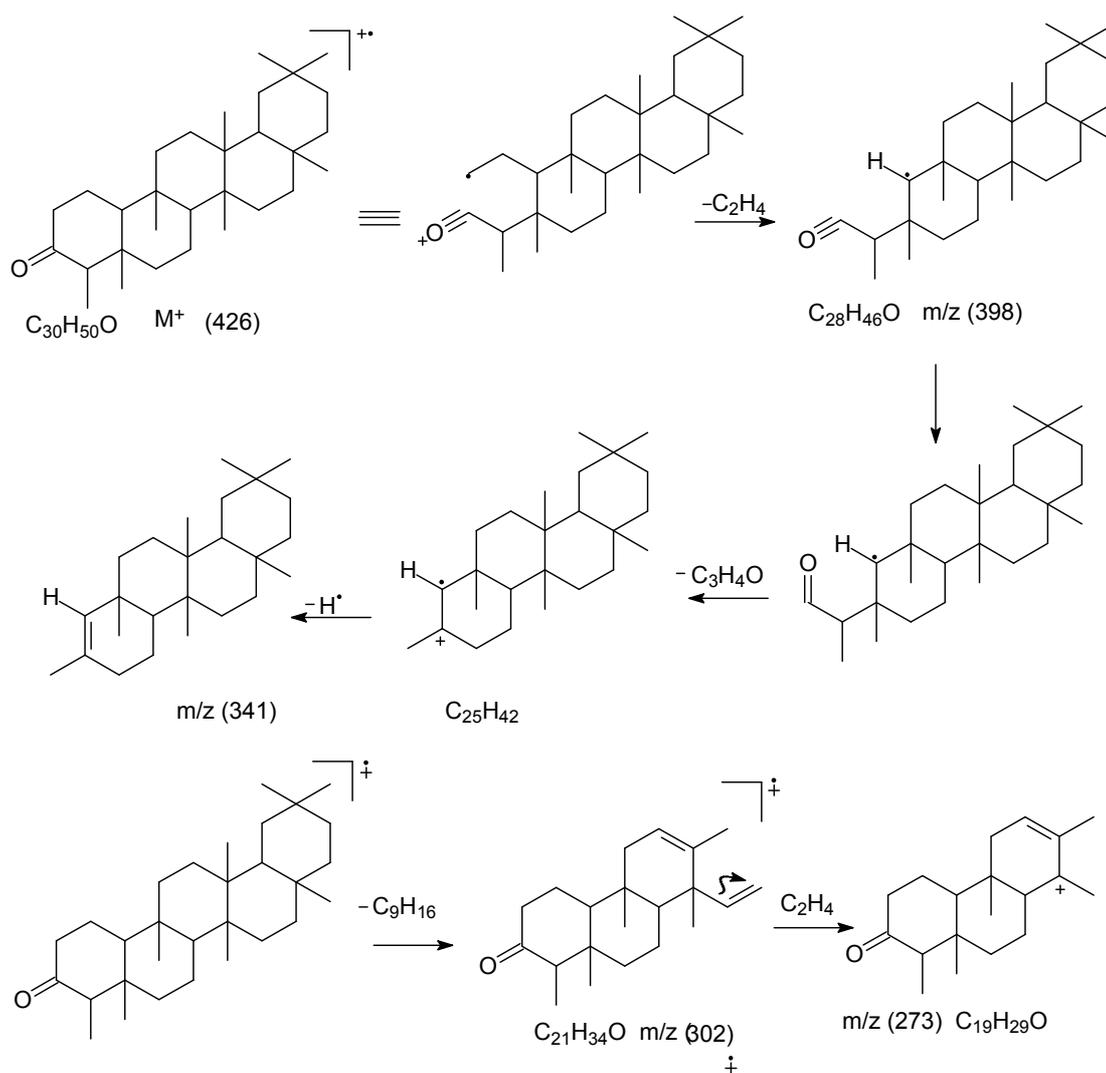
O assinalamento completo de RMN ^1H e ^{13}C do triterpeno pentacíclico **PW-01** foi determinado através de seus espectros de RMN ^1H , ^{13}C e comparação com dados da literatura (Mahato e Kundu, 1994) (Tabela 08, p. 64). Esses dados confirmam a estrutura da friedelina (3-oxofriedooleanona) para o triterpenóide isolado de *P. weinmanniaefolia*.

Tabela 08 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-01**, comparados com dados da literatura para a friedelina (Mahato e Kundu, 1994)^a

	PW-01	Friedelina	PW-01	Friedelina
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C				
<u>3</u>	--	--	213,19	213,0
<u>5</u>	--	--	42,13	42,0
9	--	--	37,43	37,3
13	--	--	39,69	39,5
14	--	--	38,28	38,1
17	--	--	29,98	29,8
20	--	--	28,16	28,0
CH		--		
4	2,23 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz H-4)	2,24 (<i>q</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz H-4)	58,47	58,0
8	1,38	1,38 (1H, <i>m</i> , H-18)	53,09	52,9
10	--	1,53 (1H, <i>m</i> , H-18)	59,47	59,3
18	--	1,54 (1H, <i>m</i> , H-18)	42,79	42,6
CH₂				
1	1,94 (1H, <i>m</i> , H-1)	1,94 (1H, <i>m</i> , H-1) 1,62 (1H, <i>m</i> , H-1)	22,27	22,1
2	2,36 (2H, <i>m</i> , H-2)	2,36 (2H, <i>m</i> , H-2)	41,51	41,4
6	--	--	41,28	41,1
7	--	--	18,23	18,0
11	--	--	35,61	35,5
12	--	--	30,49	30,3
15	--	--	32,41	32,3
16	--	--	36,00	35,9
19	--	--	35,33	35,2
21	--	--	32,76	32,6
22	--	--	39,24	39,1
CH₃				
23	0,86 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz, H-23)	0,87 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz, H-23)	6,81	6,7
24	0,71 (3H, <i>s</i> , H-24)	0,71 (3H, <i>s</i> , H-24)	14,64	14,5
25	0,86 (3H, <i>s</i> , H-25)	0,85 (3H, <i>s</i> , H-25)	17,93	17,8
26	0,99 (3H, <i>s</i> , H-26)	0,99 (3H, <i>s</i> , H-26)	20,24	20,1
27	1,03 (3H, <i>s</i> , H-27)	1,03 (3H, <i>s</i> , H-27)	18,65	18,5
28	1,16 (3H, <i>s</i> , H-27)	1,16 (3H, <i>s</i> , H-27)	32,08	32,0
29	0,94 (3H, <i>s</i> , H-29)	0,94 (3H, <i>s</i> , H-29)	35,01	34,9
30	0,99 (6H, <i>s</i> , H-30)	0,99 (6H, <i>s</i> , H-30)	31,77	31,7

^a RMN ^1H e ^{13}C (300,13 e 75,47 MHz; respectivamente; CDCl_3)

O espectro de massas (Figura 14, p. 74) mostrou, dentre outros o sinal: m/z 426 referente ao pico do íon molecular e outros íons fragmentários que são compatíveis com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ e com a estrutura da friedelina (Esquema 14).



Esquema 14 – Proposta de alguns fragmentos de massas de PW-01

I

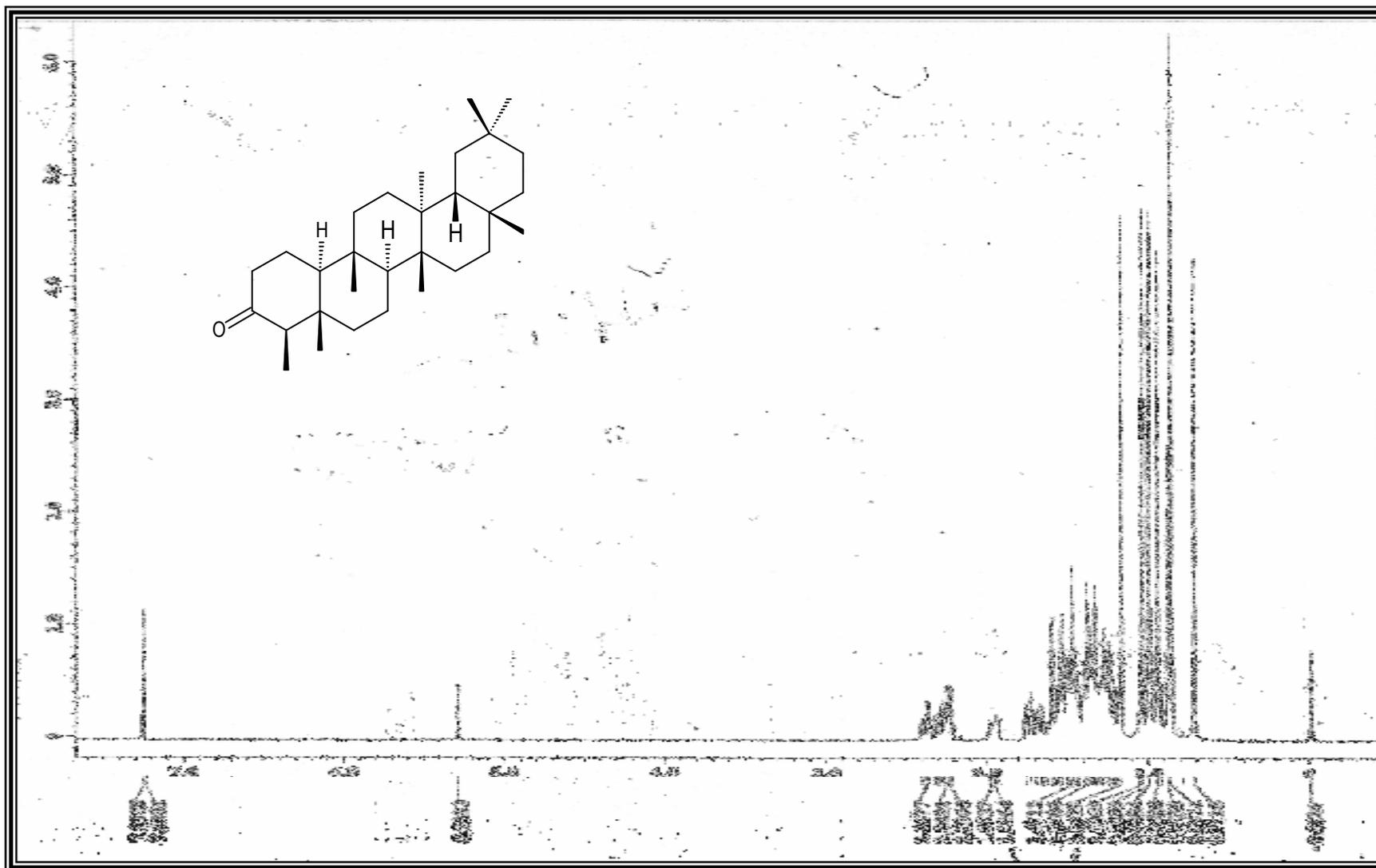


Figura 06 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-01

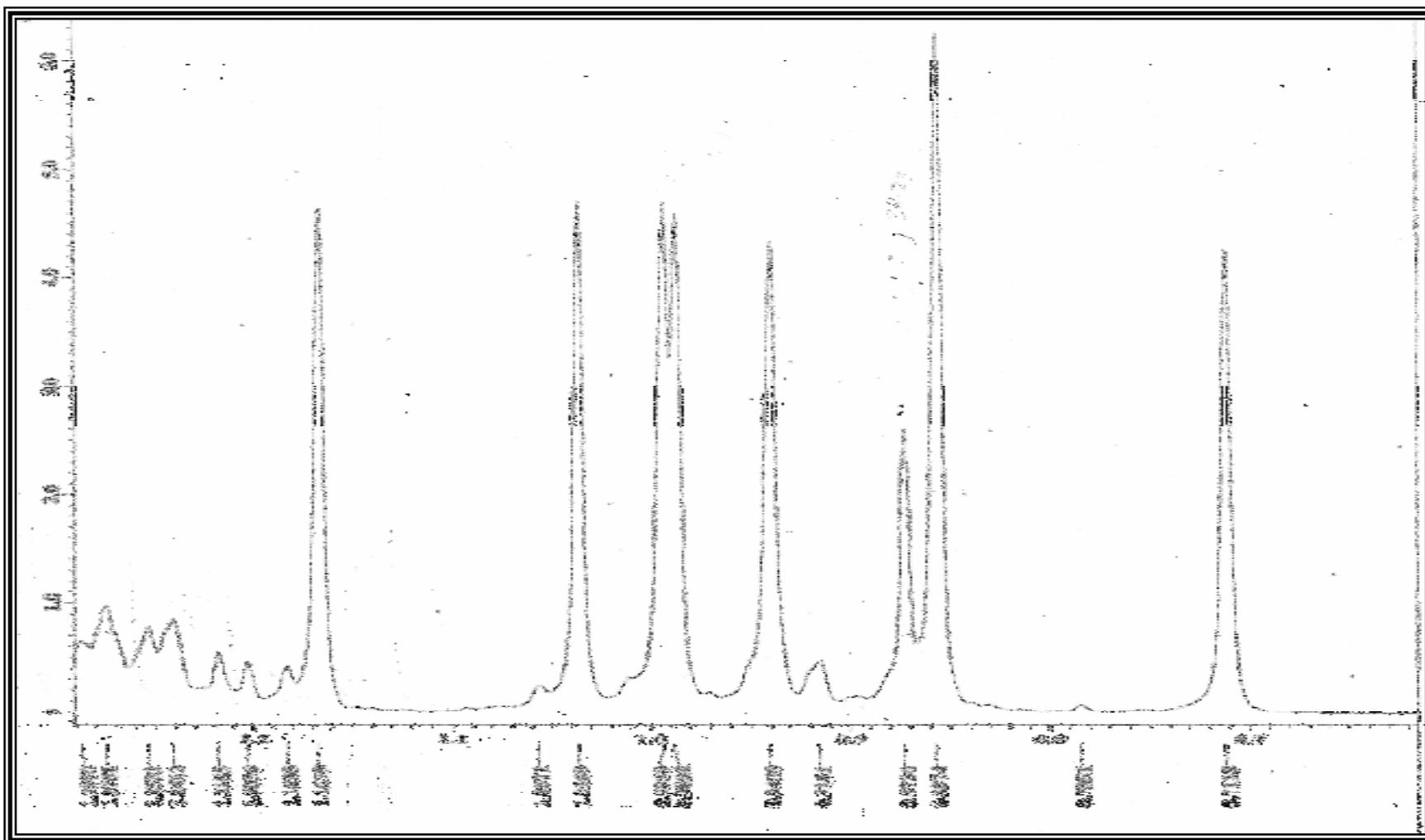


Figura 07 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,71 - 1,28 ppm) de PW-01



Figura 08 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-01

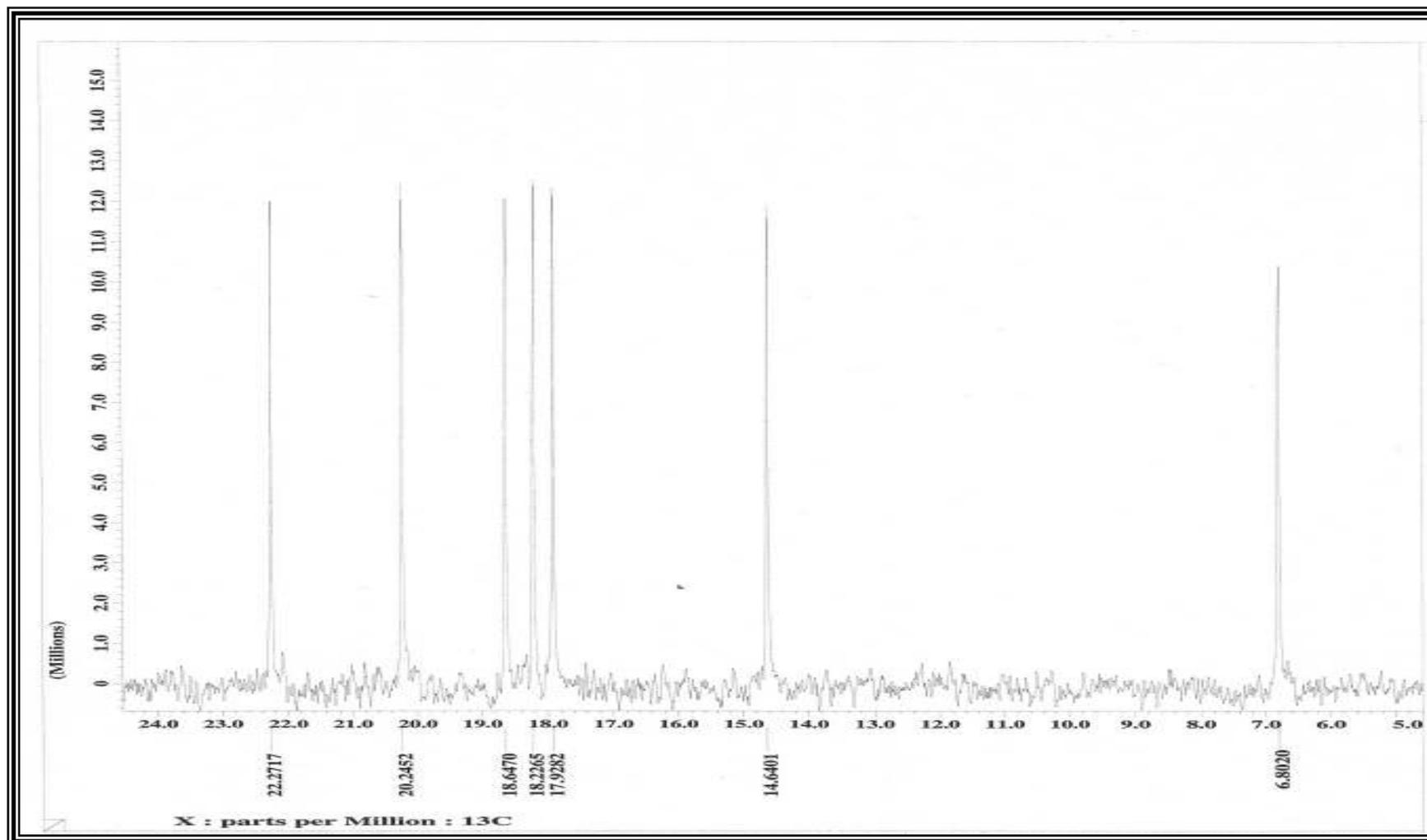


Figura 09 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 5,0 - 24,0 ppm) de PW-01

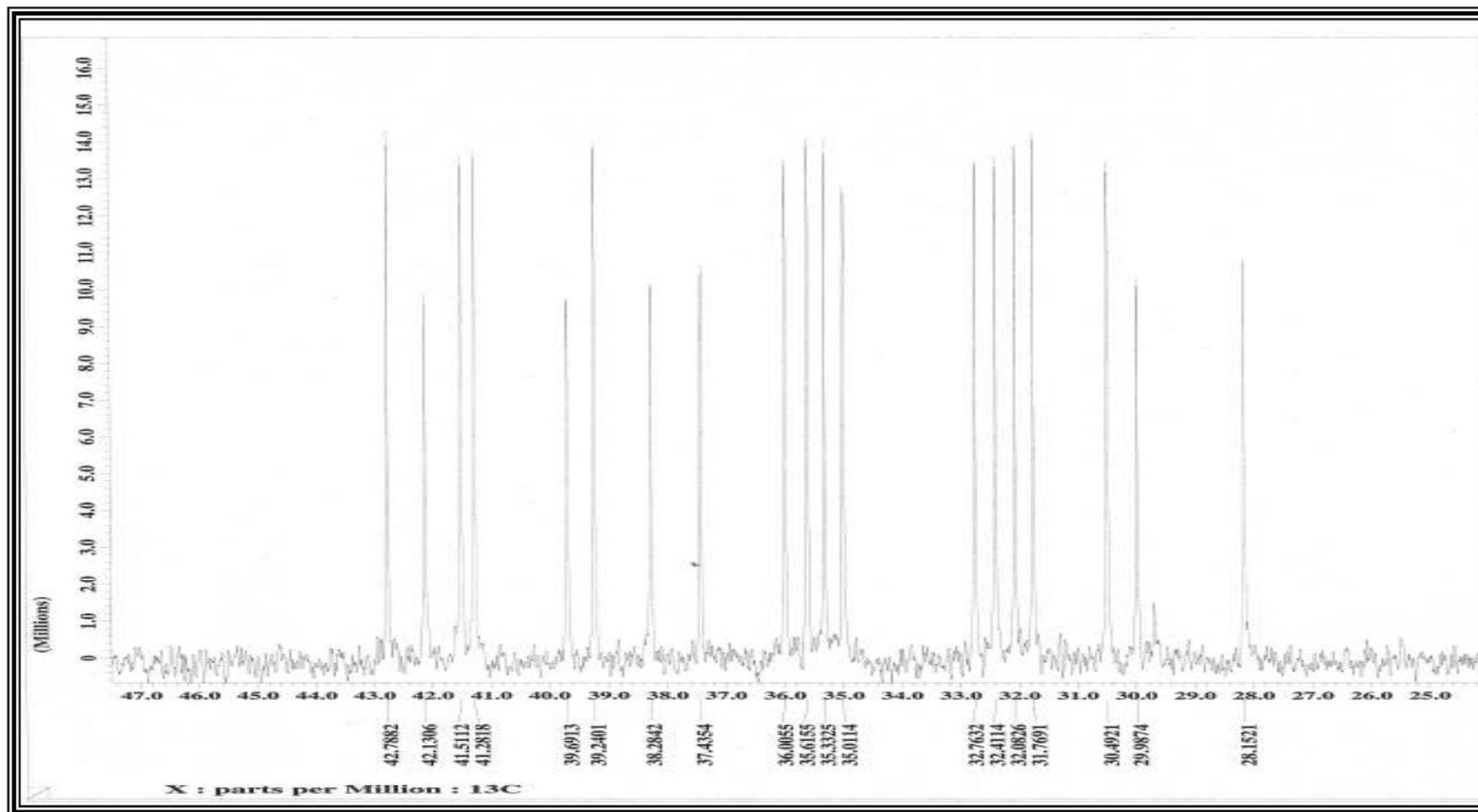


Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região de 25,0 – 47,0 ppm) de PW-01

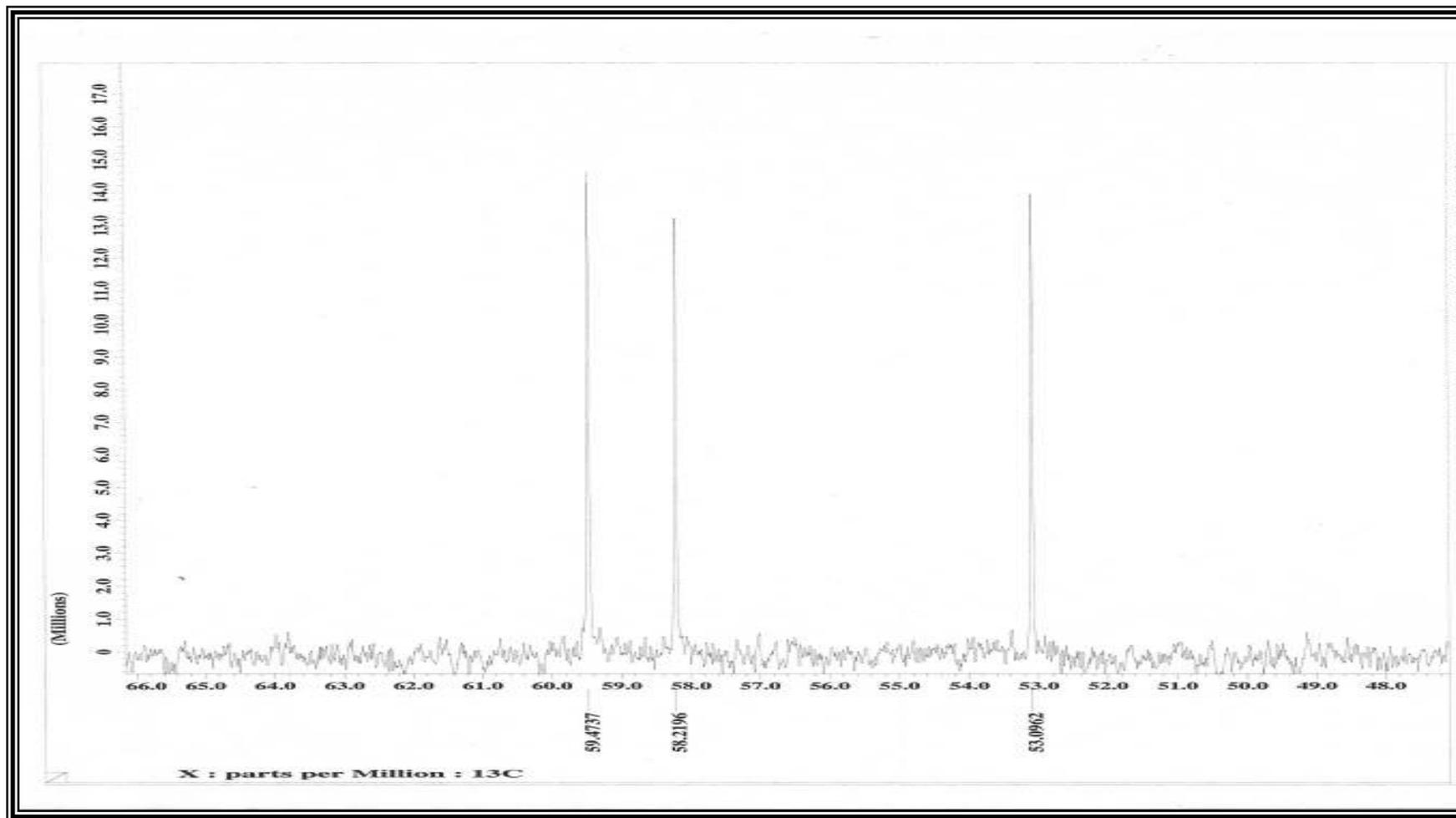


Figura 11 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região de 48,0 – 66,0 ppm) de PW-01

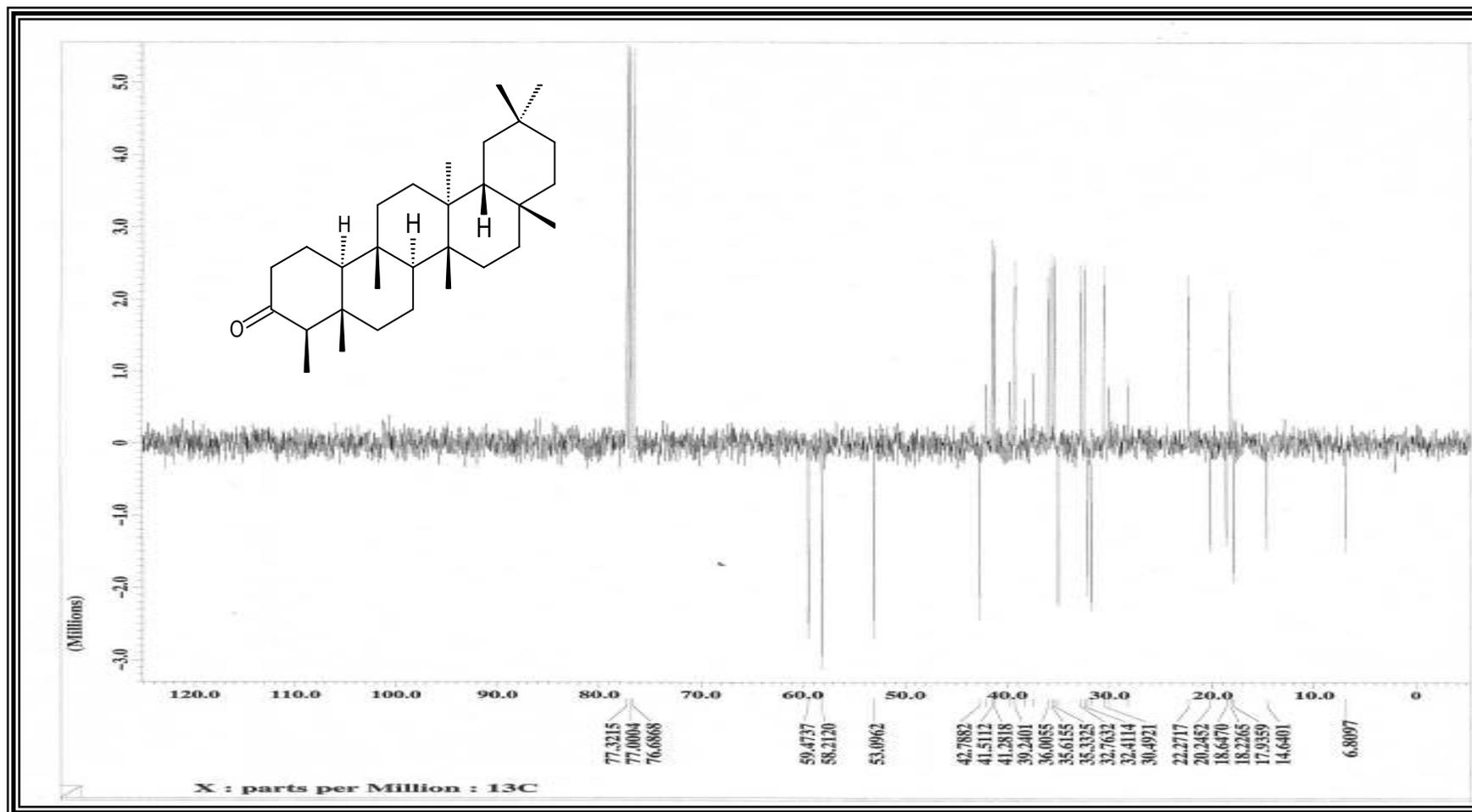


Figura 12 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-01

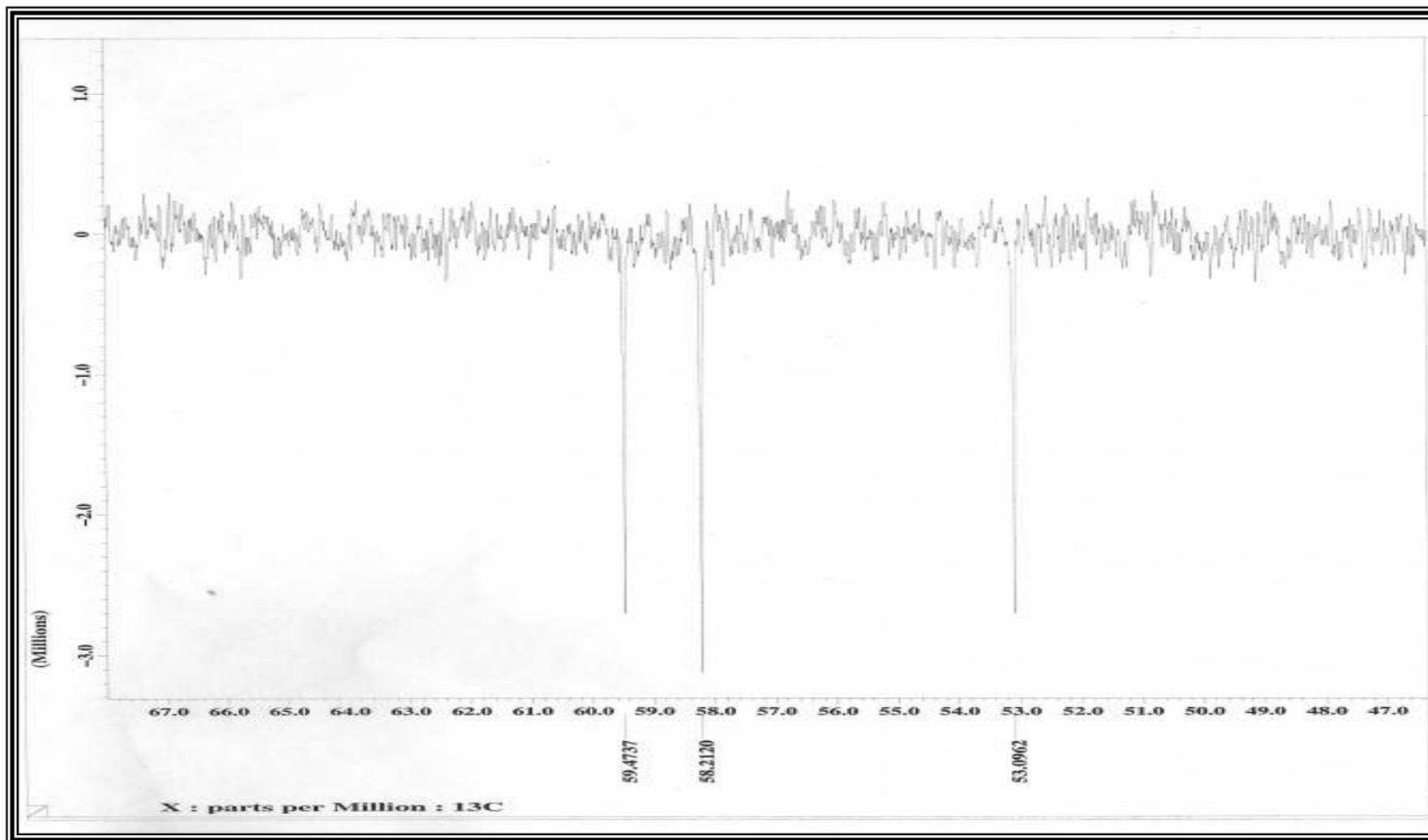


Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 47,0-67,0 ppm) de PW-01

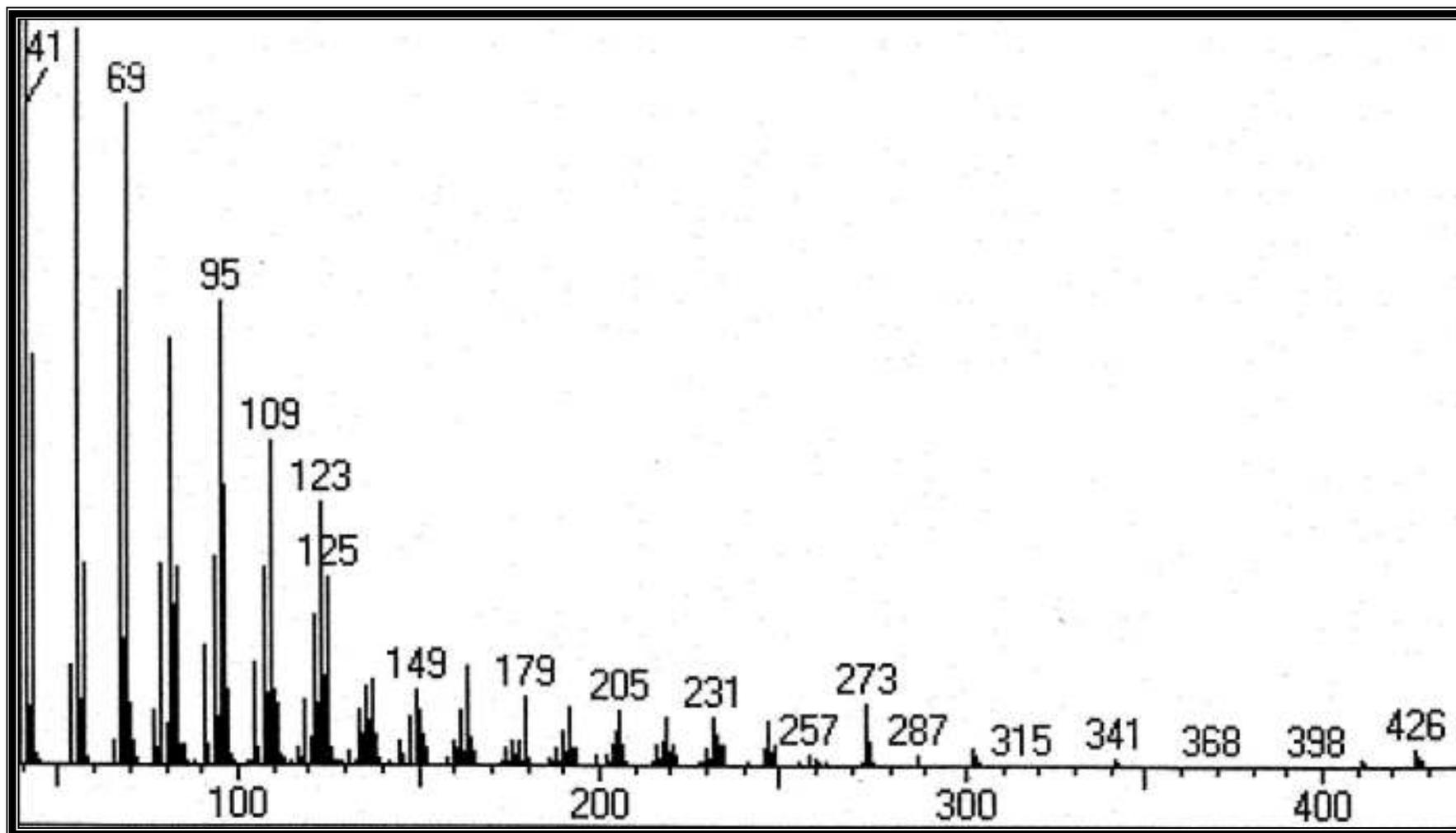


Figura 14 - Espectro de massas de PW-01

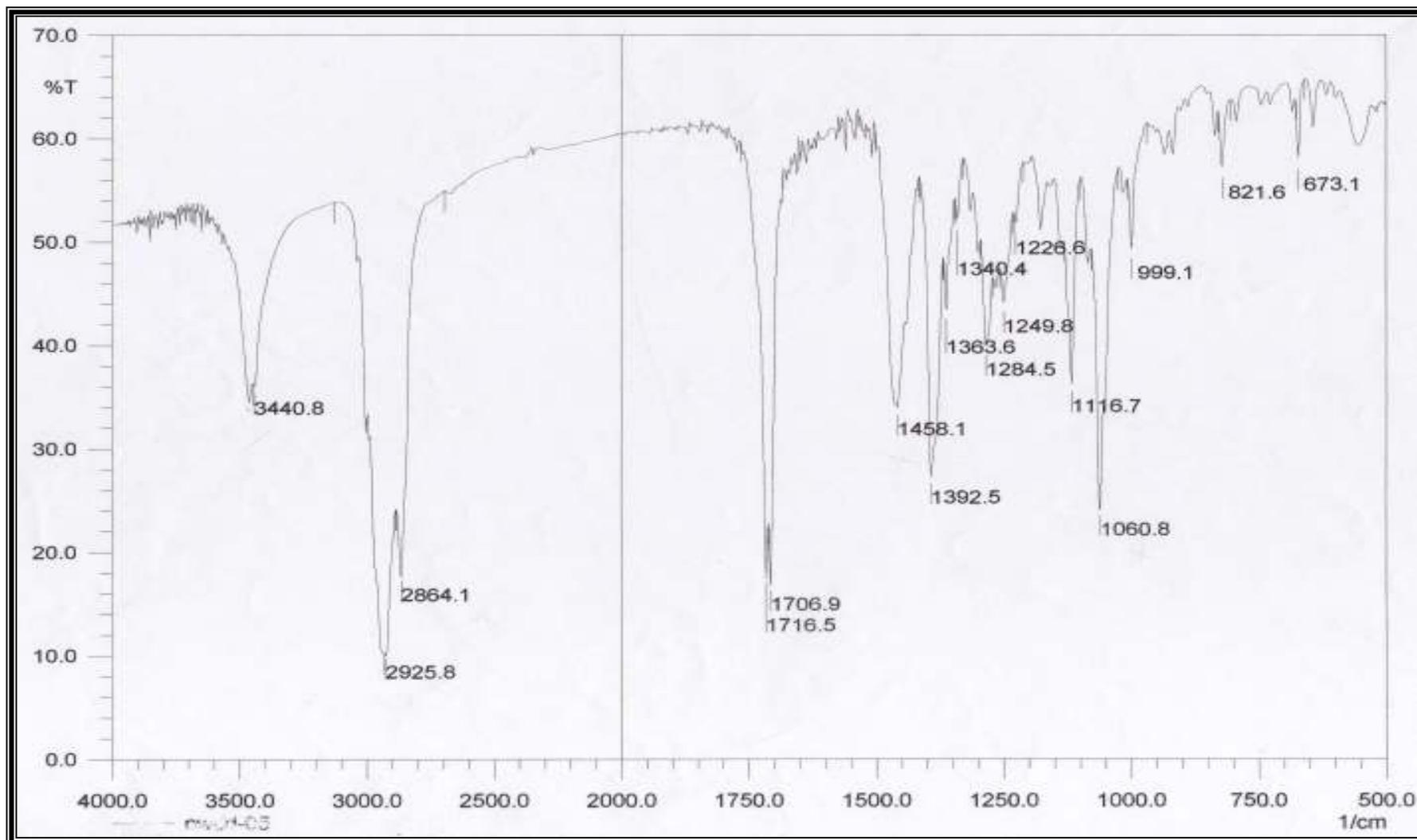
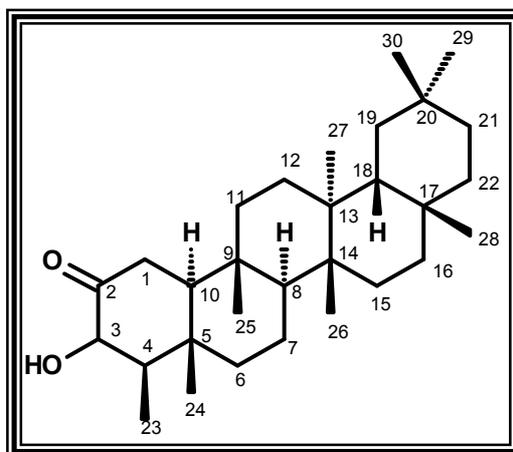


Figura 15 - Espectro de IV de PW-01

7.1.4 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PW-02



A substância **PW-02** foi obtida na forma de cristais incolores (P.F.: 263,5-264,8°C). A fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$ foi deduzida a partir da análise dos espectros de massas e RMN de 1H ^{13}C -HBBB, RMN ^{13}C -APT, e os experimentos bidimensionais, COSY, NOESY, HMQC e HMBC.

O espectro de RMN 1H de **PW-02** (Figuras 16 e 17, p.82 e 83) apresentou sete sinais simples e um sinal duplo relativos aos hidrogênios dos grupos metílicos na região de δ_H (0,89 - 1,17) o que revela o caráter triterpênico da substância. O espectro de RMN 1H mostrou ainda um sinal em δ_H [3,82; *dd*; $J=11,72$ e $3,64$ Hz (H-3)] cujos valores das constantes de acoplamento são compatíveis com acoplamentos geminal e axial-equatorial respectivamente, típicos de um sistema cicloexânico; um sinal em [3,54; *d*; $J=3,68$ Hz (OH)], um sinal a δ_C [2,54; *dd*; $J=13,6$; $3,3$ Hz (H-1)] cujos valores de J expressam o acoplamento geminal, axial-axial e axial-equatorial também característicos de um sistema cicloexânico; um sinal a δ_H (1,83; *dt*; $J=13,2$ e $2,9$ Hz) cujos valores de J são característicos de acoplamentos geminal, axial-axial e axial-equatorial (Pavia, 1995).

O espectro de RMN 1H apresentou um sinal duplo em δ_H [1,05; *d*, $J=6,24$ Hz (H-23)] referente ao hidrogênio da metila C-23 acoplado com H-4, que foi confirmado através da observação do mapa de correlação homonuclear 1H x 1H -COSY o qual mostra a correlação existente entre esses hidrogênios (Figura 18, p.84).

Através do número de linhas espectrais revelado pelo espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 21, p. 87), e do espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 24, p. 90), foi possível observar a presença de (30 sinais simples), sendo [7 carbonos quaternários incluindo um sp^2 δ_{C} (211,88; C-2); 5 CH [sendo um deles carbinólico δ_{C} (77,31)]; 10 CH_2 e 8 CH_3]. E ainda o sinal δ_{C} (77,31) referente a carbono ligado a hidroxila pode ser confirmado através da banda e 3440 cm^{-1} referente a vibração de deformação axial de OH.

O sinal δ_{C} (211,88) relativo a carbonila pode ser confirmado pelo espectro de infravermelho (Figura 34, p. 100), onde se observa os seguintes sinais: $1706 - 1716\text{ cm}^{-1}$ correspondente a estiramento da carbonila de cetona; 1458 cm^{-1} a deformação angular simétrica no plano de CH_2 ; 1060 cm^{-1} deformação axial de C-O de álcool primário; (Silverstein *et al.*, 2000); 1392 cm^{-1} deformação angular assimétrica de CH_3 e uma banda entre $1000 - 650\text{ cm}^{-1}$ de deformação fora do plano referente a carbono olefínico (Pavia *et al.*, 1995).

Comparando-se a absorção do grupamento C=O de **PW-02** com **PW-01** observa-se que este grupamento está mais protegido em torno de 1,40 ppm em relação a **PW-01**. Esta diferença é atribuída a presença da hidroxila na posição C-3 δ_{C} (77,31), confirmando desse modo as absorções observadas no espectro de infravermelho.

Outro carbono que mostra grande diferença em relação a **PW-01** na sua posição na escala de deslocamento químico é o carbono C-1 que se apresenta mais desprotegido em torno de 13,79 ppm, devido ao efeito de desproteção causado pela carbonila em C-2 (Garcez *et al.*, 1981). Esses dados sugerem que os grupos carbonila e hidroxila estão ligados respectivamente aos carbonos C-2 e C-3 no triterpeno **PW-02**.

Além das interações 1,3-*sin*-diaxiais também observadas em **PW-01**, foi considerado o efeito γ -gauche na atribuição dos deslocamentos químicos dos grupos metilas. A metila C-23 em **PW-02** encontra-se desprotegida cerca de 4,0 ppm em relação a **PW-01** devido a interação γ -gauche com a hidroxila em C-3 (equatorial) e a metila C-23 (equatorial) (Garcez *et al.*, 1981).

Pela interpretação do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 09, p. 81) aliado as informações obtidas na literatura nos permitiu concluir que **PW-02** se trata de um triterpeno pertencente a série friedelano.

Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 27 - 29, p. 93 - 95) foi possível confirmar as atribuições de deslocamentos químicos, permitindo associar de forma clara importantes correlações tais como: hidrogênio carbinólico δ_C 3,82 (*dd*; $J = 11,7$ Hz) com o átomo de carbono C-3 (77,31 ppm); hidrogênios metilênicos δ_C 2,40 (*t*; 13,6 Hz) com o átomo de carbono C-1 (36,12 ppm); hidrogênios metilênicos δ_H 1,83 (*dt*; 12,8 e 2,9 Hz) com o átomo de carbono C-6 (40,63 ppm); hidrogênios metilênicos δ_H (1,54 e 1,25) com C-15 (32,34 ppm); hidrogênios metilênicos δ_H (1,54 e 1,33) com o átomo de carbono C-16 (35,93 ppm); hidrogênios metilênicos δ_H (1,30 e 1,20) com C-19 (35,05 ppm); hidrogênios metilênicos δ_H (1,38 e 1,16) com o C-11 (35,32 δ); hidrogênios metilênicos δ_H (1,46 e 1,24) com o C-21 (32,73 ppm); hidrogênios metilênicos δ_H (1,46 e 0,92) com o carbono C-22 (39,21 ppm).

O mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 30 - 32, p. 96 - 98) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente os não hidrogenados, revelando de forma clara o acoplamento entre o átomo de carbono não hidrogenado (C-2) e os hidrogênios (2H-1, H-3 e OH-3); o carbono não hidrogenado (C-5) e os hidrogênios (3H-24, 2H-6, 3H-23); o carbono não hidrogenado (C-9) e os hidrogênios (3H-25, H-10, 2H-1); o carbono não hidrogenado (C-13) e os hidrogênios (3H-27, 2H-12, H-18); o carbono não hidrogenado (C-14) e os hidrogênios (3H-26, H-8, 2H-15); o carbono não hidrogenado (C-17) e os hidrogênios (3H-28, 2H-16, 2H-22, H-18); o carbono não hidrogenado (C-20) e os hidrogênios (3H-29, 3H-30, 2H-21, 2H-18).

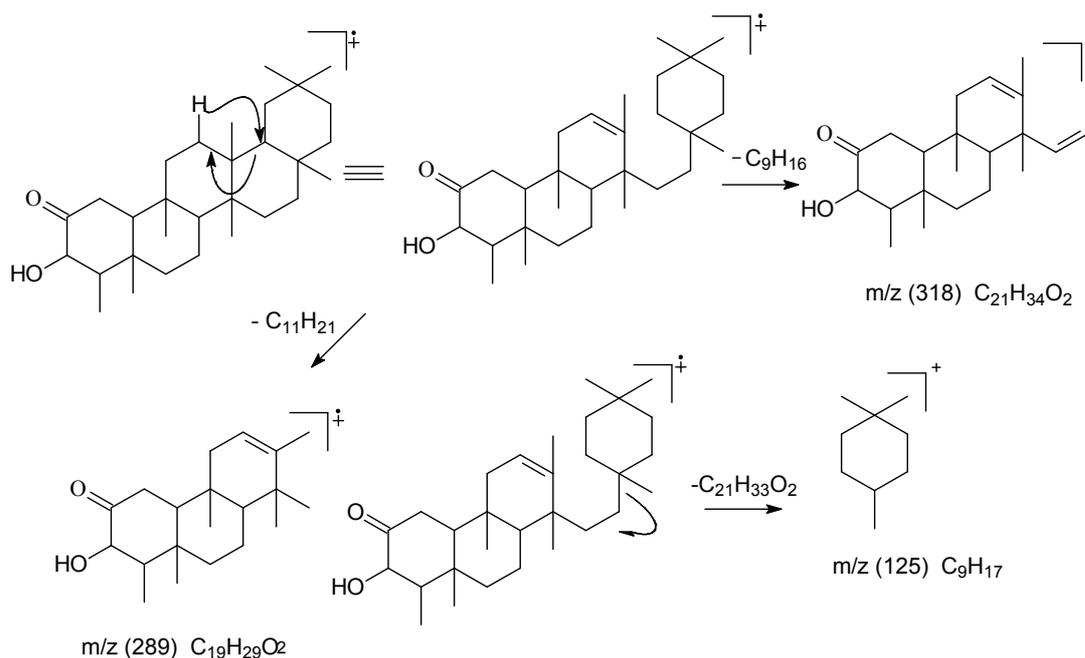
O mapa de correlação espacial NOESY (Figuras 19 e 20, p. 85 e 86) nos auxiliou nas atribuições resultantes da interação espacial entre os diferentes átomos de hidrogênios da molécula. A orientação da metila [C-24 (axial)] foi estabelecida devido a interação com o H-3 (axial); a orientação das metilas [C-24 (axial) e C-25 (axial)] foi estabelecida devido a interação com o H-1 (axial); a orientação das metilas [C-23 (equatorial) e C-24 (axial)] foi estabelecida devido a interação com o H-6 (equatorial); a orientação da hidroxila HO-3 (β) foi estabelecida a partir da interação espacial existente entre H-3 (axial) e os hidrogênios metílicos [3H-23 (equatorial) e 3H-24 (axial)]. A atribuição completa dos dados espectrais de RMN encontra-se na Tabela - 09).

Tabela 09 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-02**, comparados com dados da literatura para a friedelona (Mahato e Kundu, 1994)^b

	δ_{H} PW-02	δ_{H} Friedelona	PW-02	Friedelona
C				
2	--	--	211.82	211,6
5	--	--	37.577	38,0
9	--	--	38.03	37,6
13	--	--	39.58	59,6
14	--	--	38.25	38,2
17	--	--	29.62	29,9
20	--	--	28.08	28,1
CH				
3	3,82 (<i>dd</i> , 11,7; 2,6)	3,80 (1H, <i>dd</i> , $J = 12$ Hz, H-3)	77.25	76,9
4	1,30	1,83(<i>d</i> , $J = 12$, H-4)	54.48	54,4
8	1,28	--	53.07	53,1
10	1,30	--	60.35	60,3
18	1,59 (<i>sl</i>)	--	42.70	42,7
CH₂				
1	2,53 (<i>dd</i> , 13,6, 3,3) 2,40 (<i>t</i> , 13,6)	2,51 (<i>dd</i> , $J = 13,0$; 13,0 e 4,0 Hz; H-1) 2,38	36.06	36,0
6	1,85 (<i>td</i> , 12,8; 2,9) 1,05	--	40.57	40,6
7	1,50	--	17.53	17,5
11	1,38; 1,16	--	35.86	35,0
12	1,30	--	30.25	30,2
15	1,54; 1,25	--	32.27	32,3
16	1,54; 1,33	--	35.86	35,9
19	1,30; 1,20	--	35.25	35,2
21	1,46; 1,24	--	32.67	32,7
22	1,46; 0,92	--	39.15	39,1
CH₃				
23	1,05 (<i>d</i> , 6,6)	1,02 (3H, <i>d</i> , $J = 7,5$ Hz, H-23)	10.73	10,7
24	1,03 (<i>s</i>)	--	14.09	14,0
25	0,89 (<i>s</i>)	--	17.52	17,3
26	1,01 (<i>s</i>)	--	20.10	18,4
27	0,98 (<i>s</i>)	--	18.48	20,1
28	1,17 (<i>s</i>)	--	32.00	32,0
29	0,99 (<i>s</i>)	--	31.67	34,9
30	0,94 (<i>s</i>)	--	35.86	31,7
OH-3	3,54 (<i>d</i> ; 2,6)	3,55 (1H, <i>d</i> , $J = 4,0$ Hz, OH-3)		

^b RMN ^1H e ^{13}C (270 e 20,1 MHz, respectivamente; CDCl_3)

Através da interpretação dos espectros obtidos por espectrometria de massas (Figura 33, p. 98) foi possível observar o fragmento a $m/z= 442$ referente ao íon molecular e compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$. Porém, observou-se outros picos característicos como: $m/z= 318$, $m/z=289$, $m/z=95$ e $m/z=69$. Esses dados confirmam a estrutura química da Friedelona (3α -hidroxi - 2 - oxofriedooleanona) para **PW-02** (Ahmad *et al*; 1994).



Esquema 15 - Proposta de alguns fragmentos de massas para PW-02

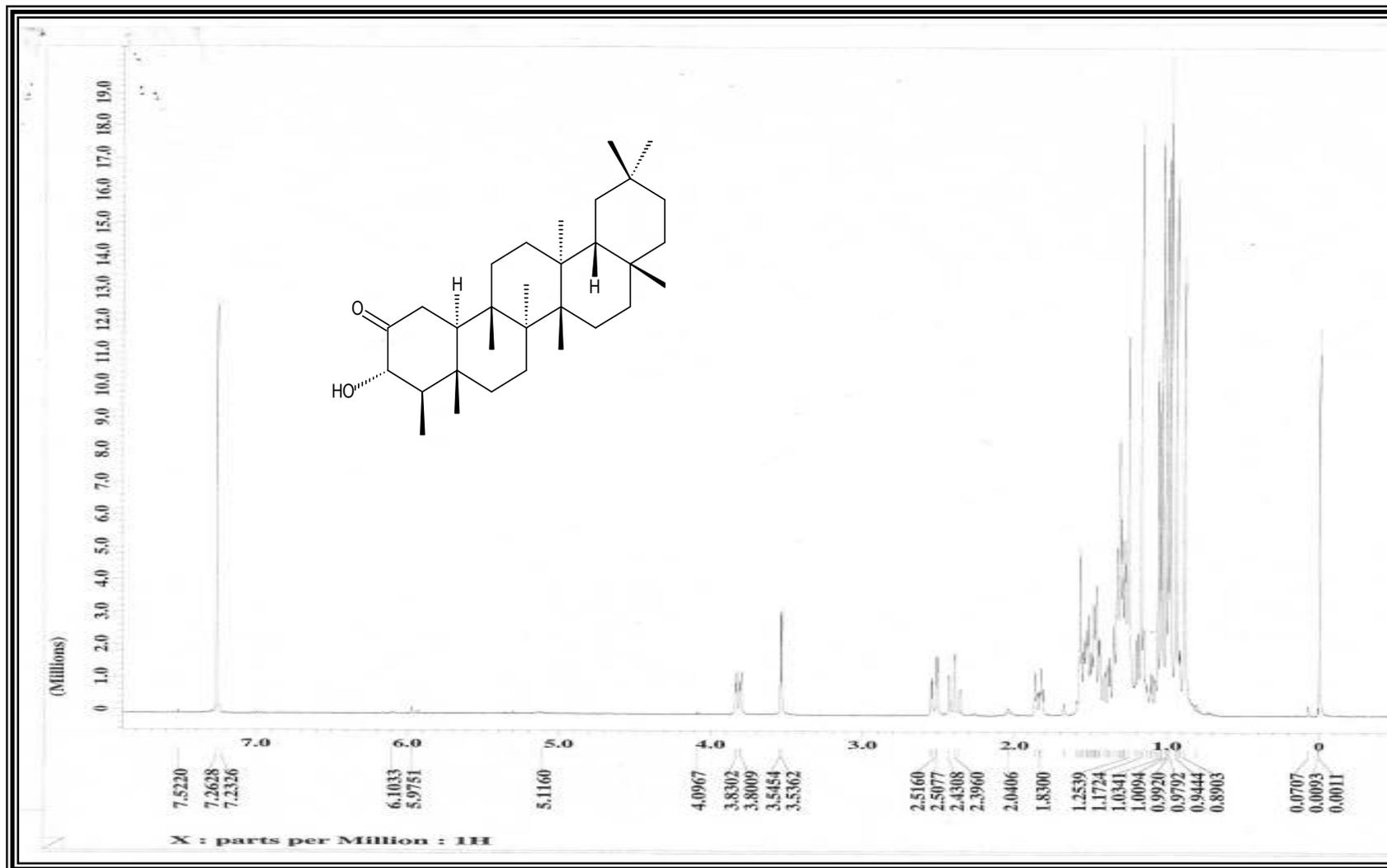


Figura 16 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-02

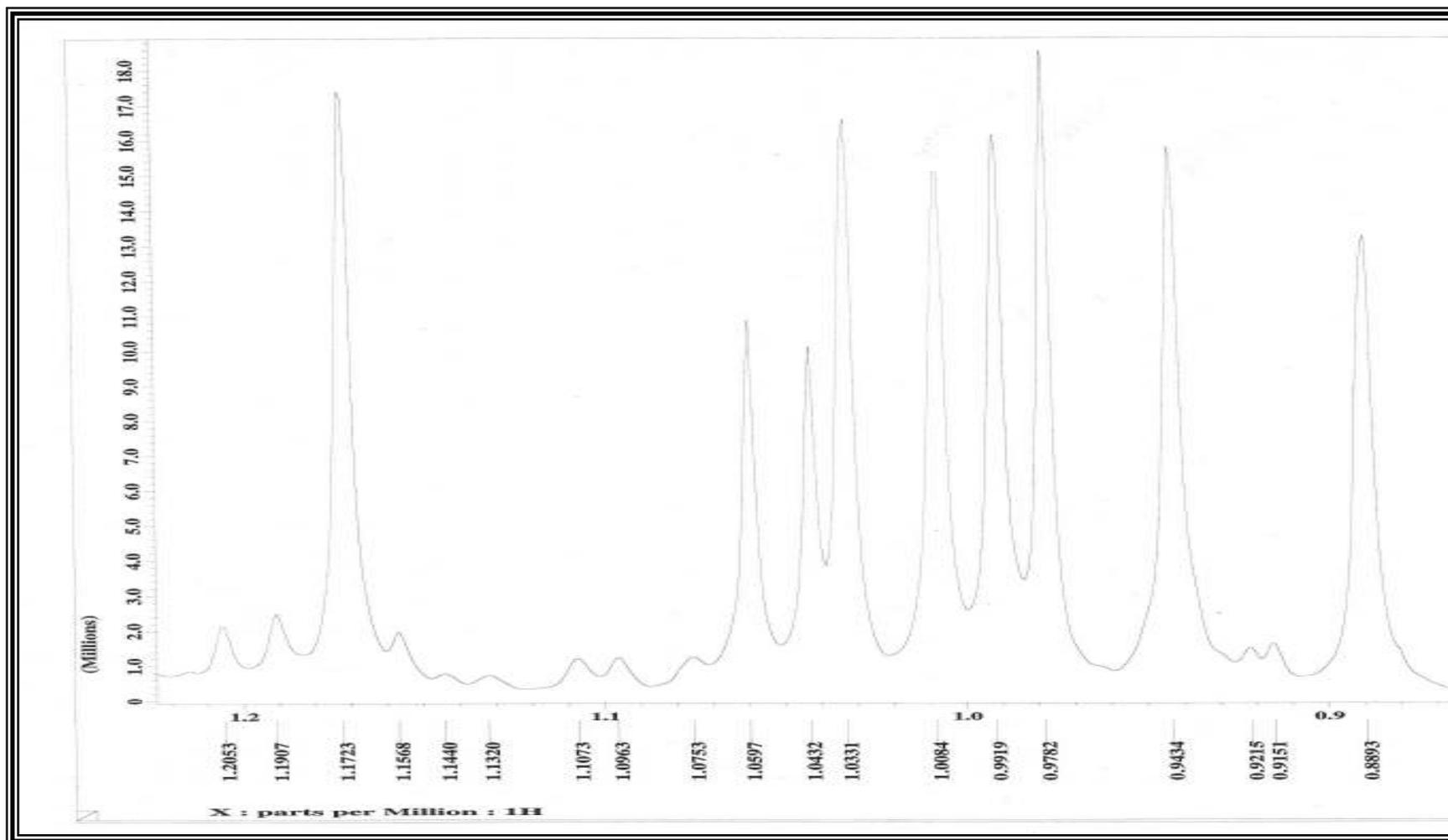


Figura 17 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,89 – 1,21ppm) de PW-02

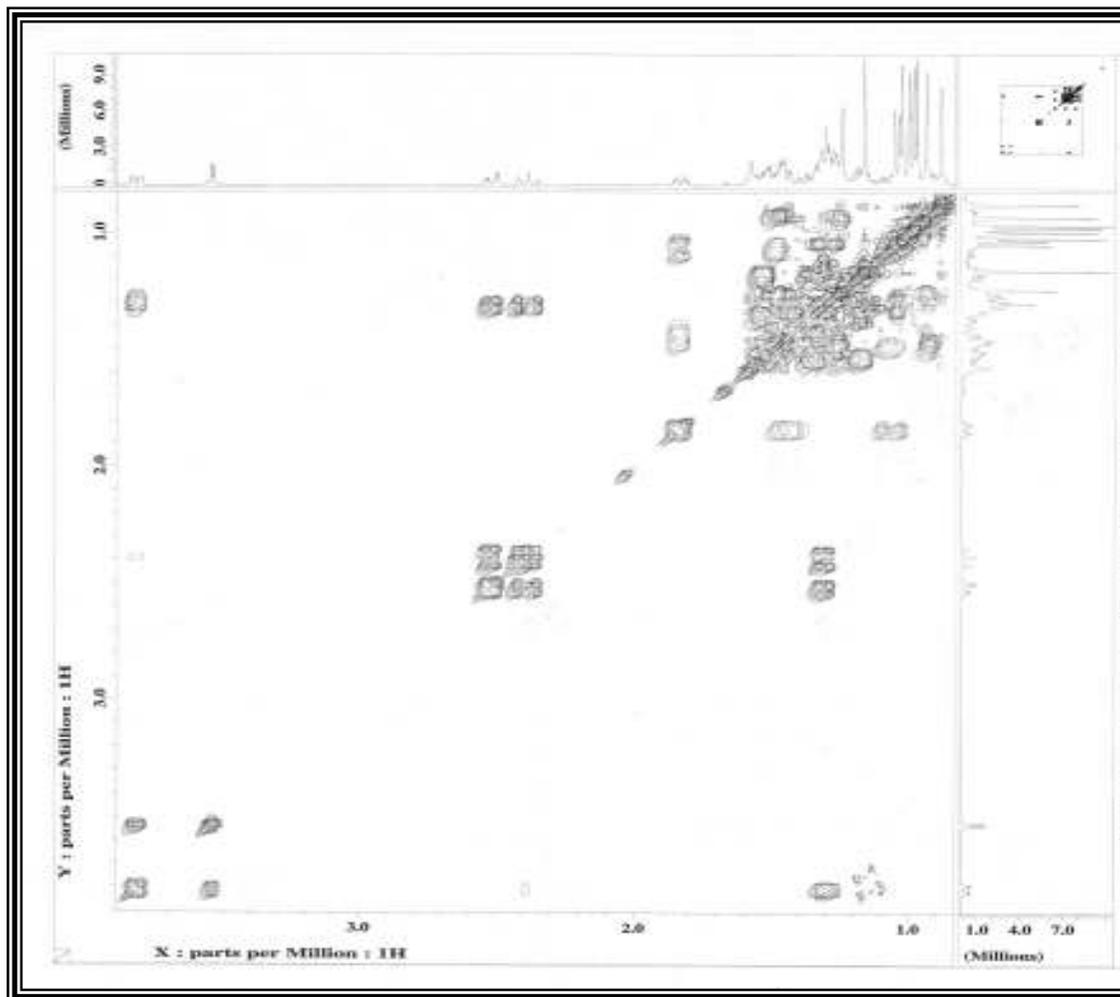


Figura 18 - Mapa de correlação COSY ¹H x ¹H de PW-02

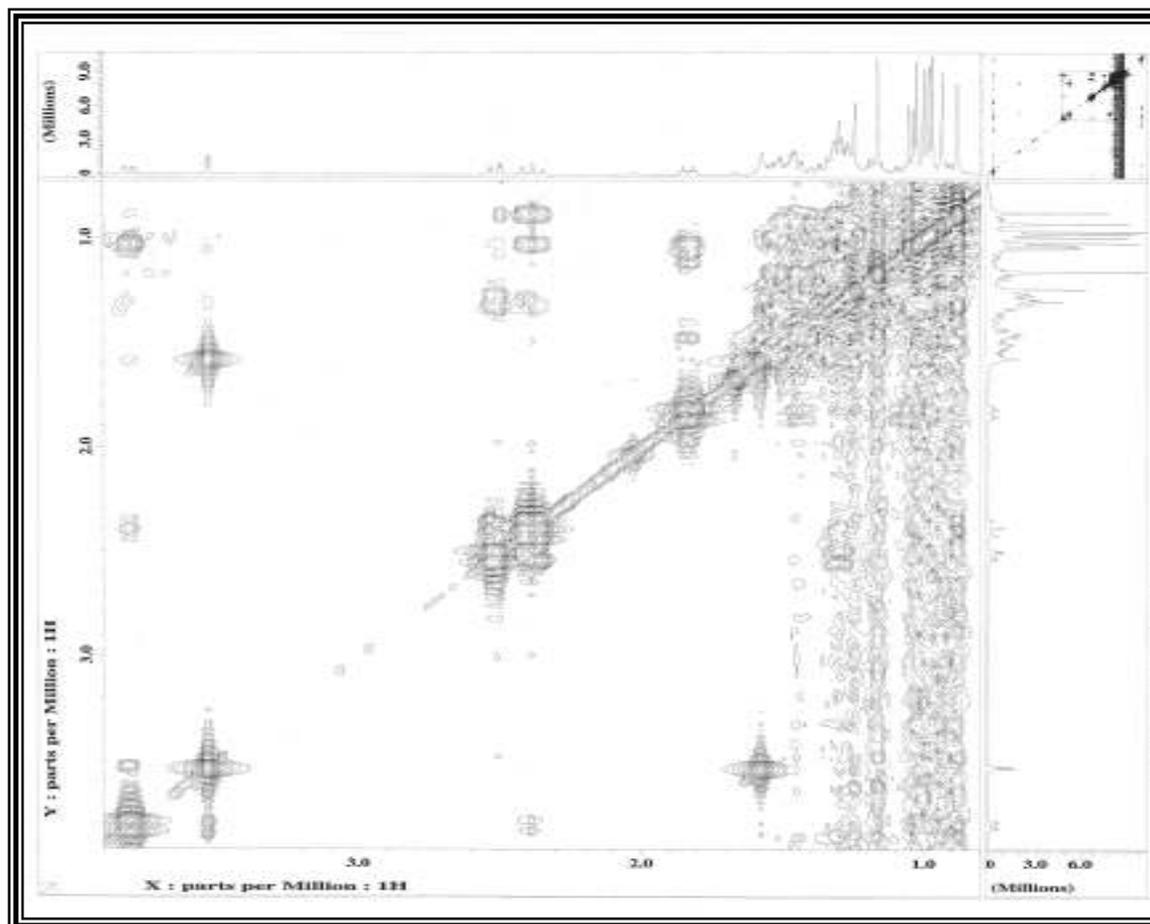


Figura 19 - Mapa de correlação NOESY ¹H x ¹H de PW-02

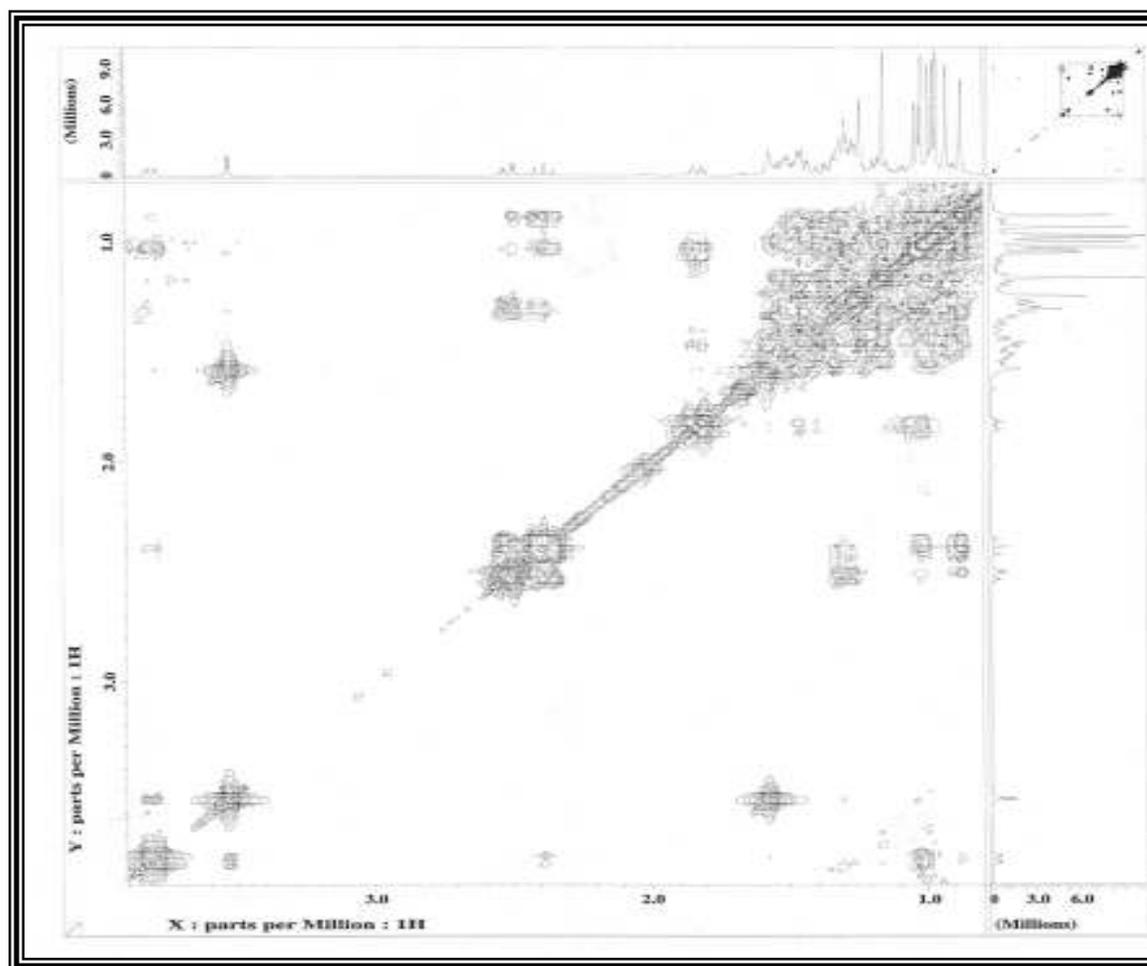


Figura 20 - Mapa de correlação NOESY ^1H x ^1H de PW-02

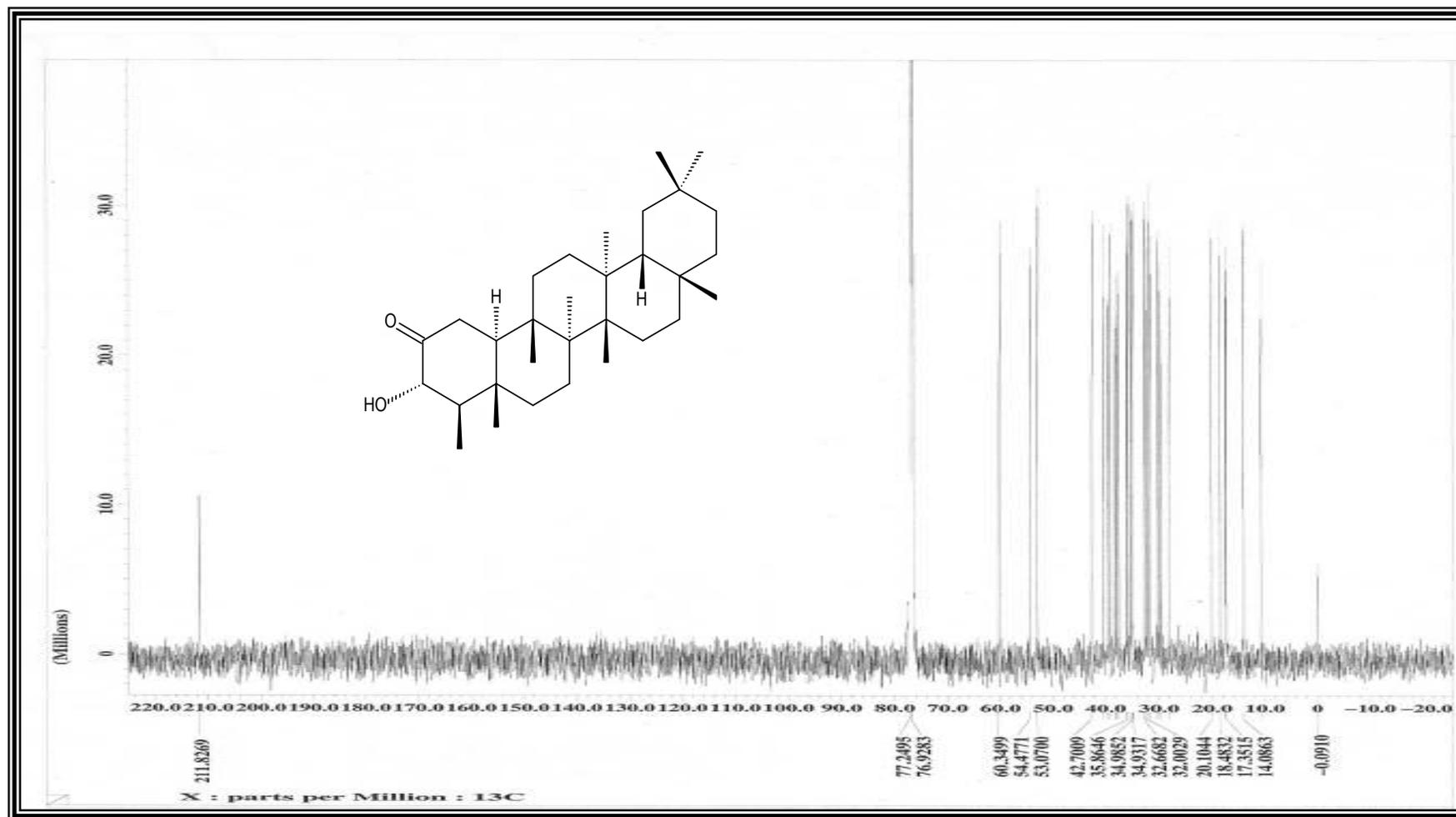


Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PW-02

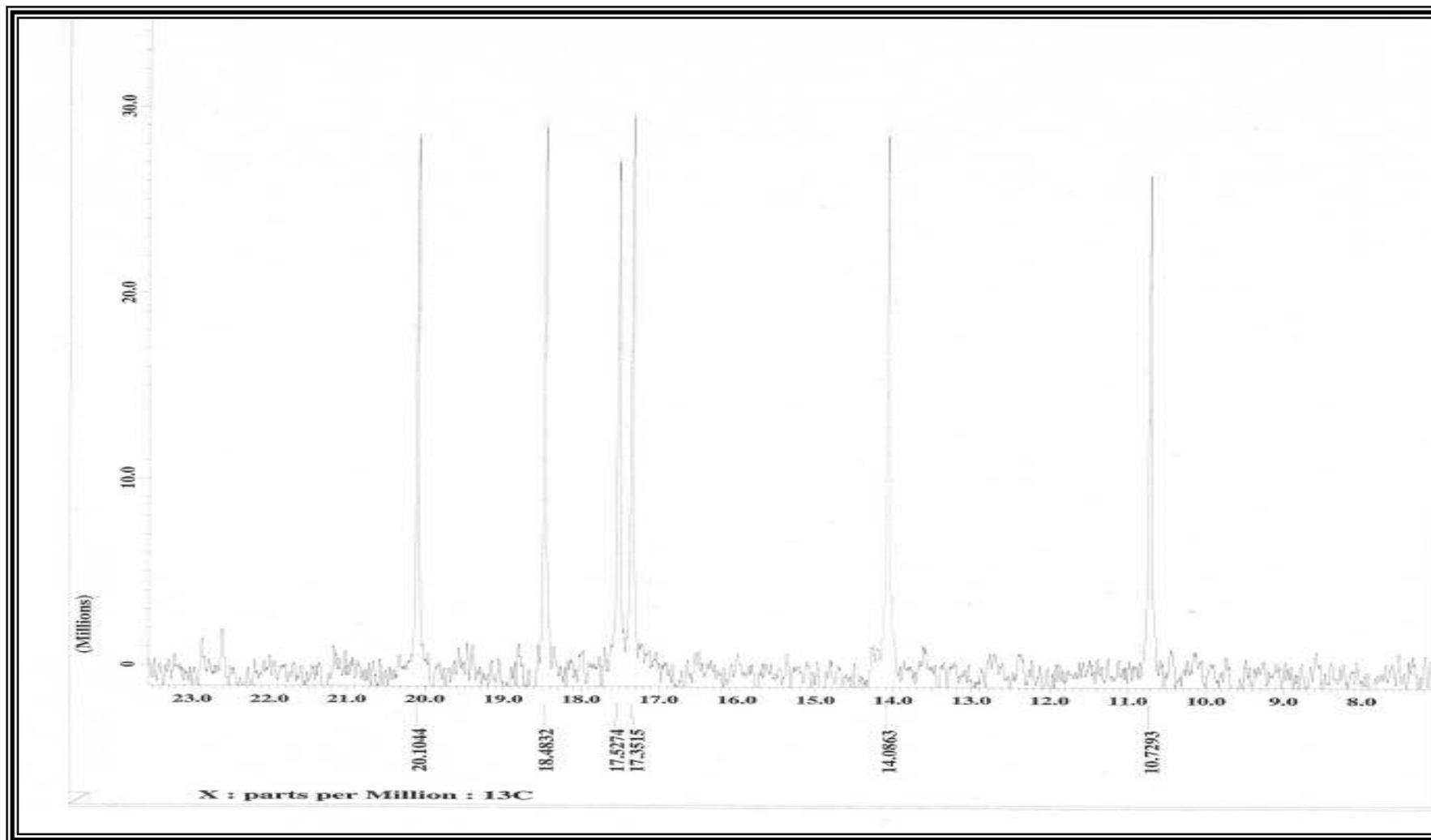


Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 8,0 – 23,0 ppm) de PW-02

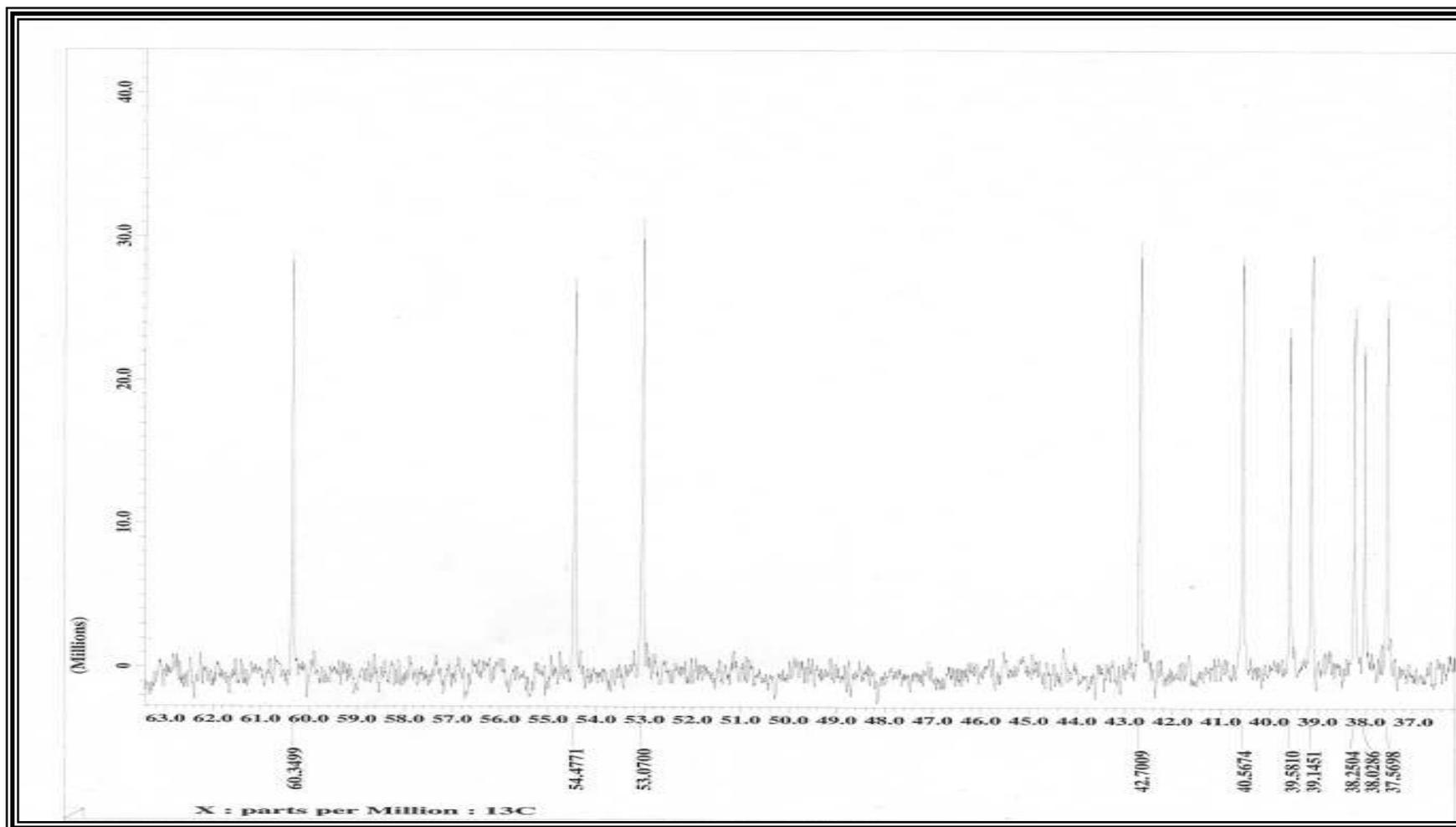


Figura 23 – Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 37,0 – 63,0 ppm) de PW-02

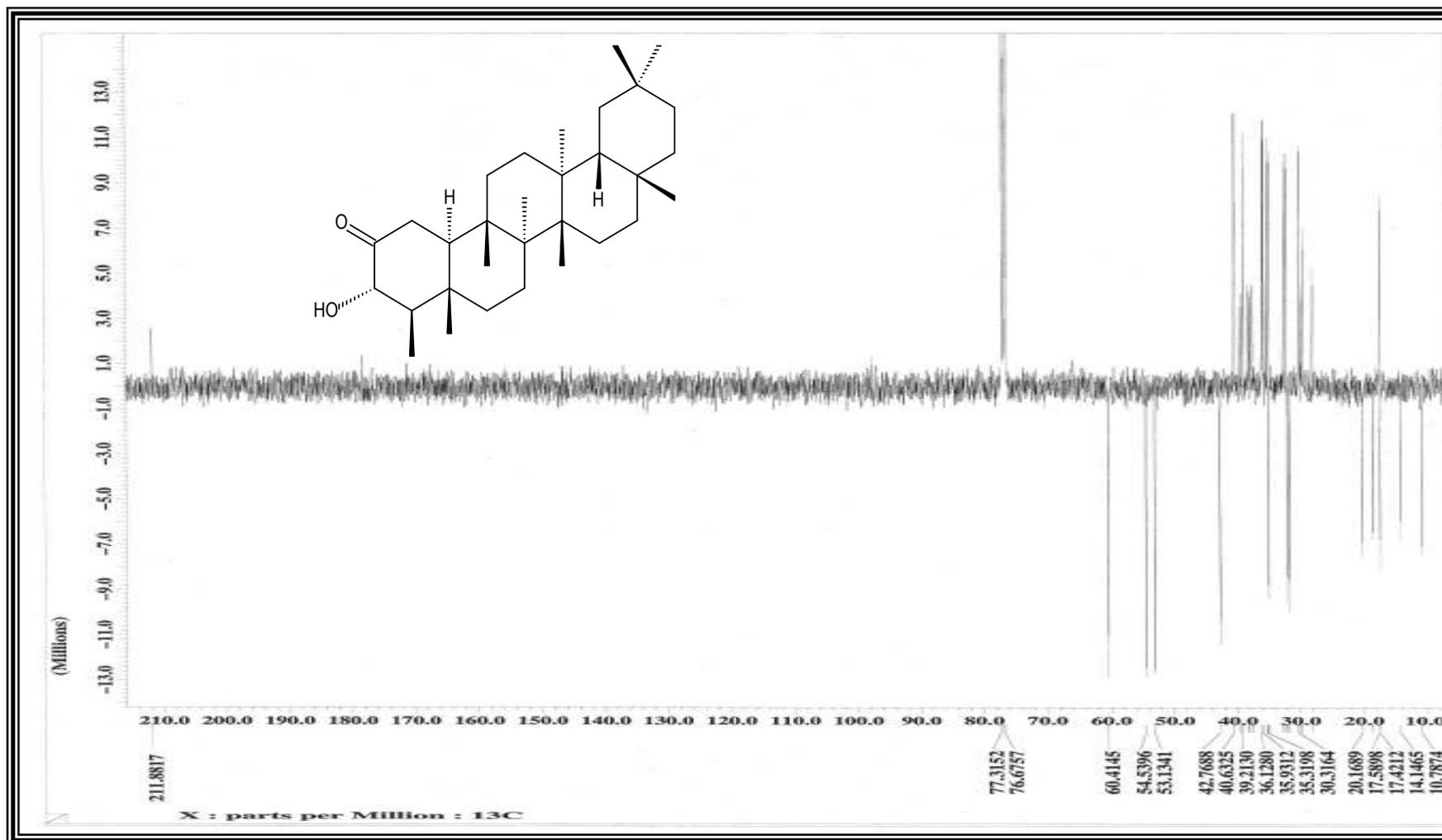


Figura 24 – Espectro de RMN ^{13}C - Apt (100 MHz, CDCl_3) de PW-02

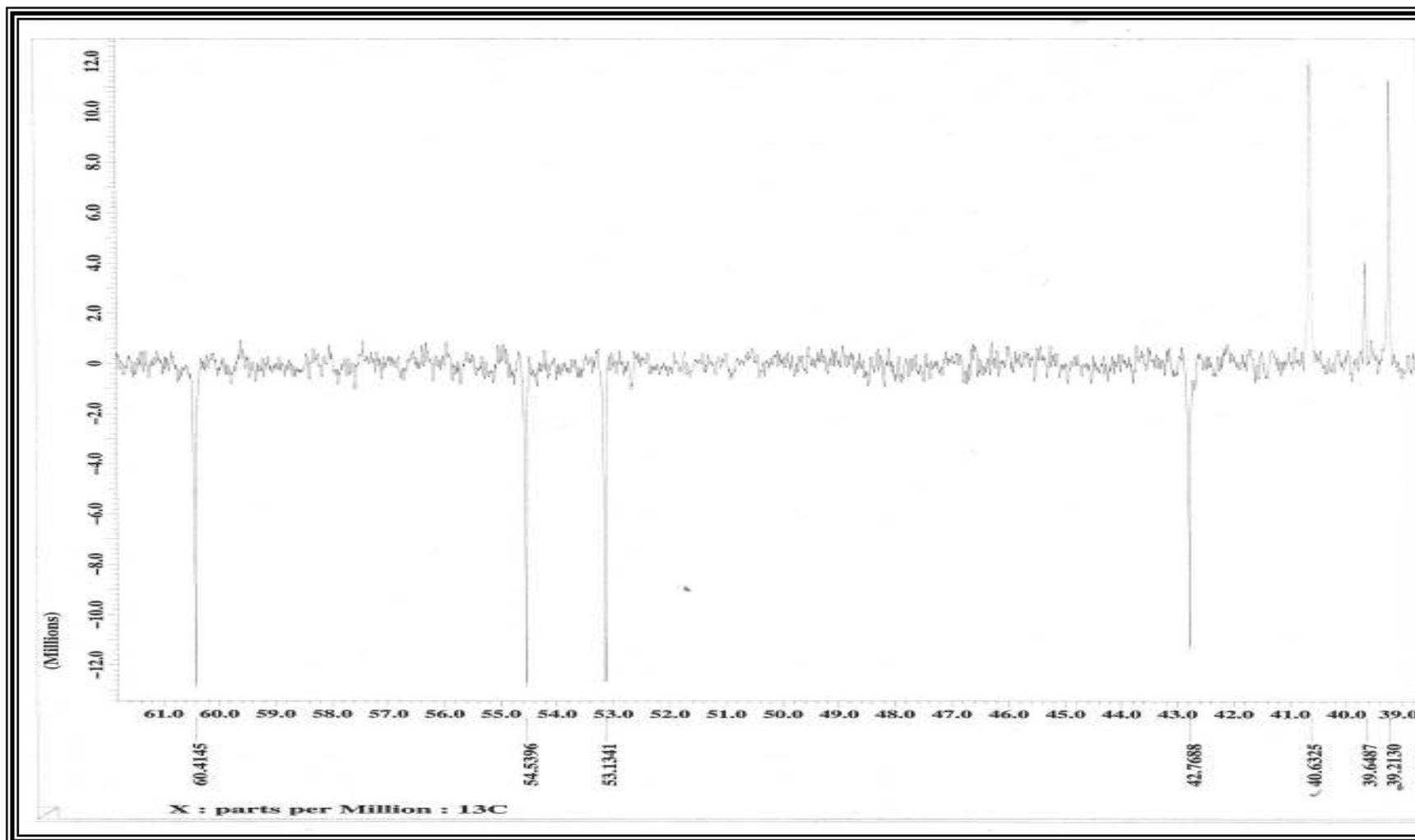


Figura 25 – Espectro de RMN ^{13}C - Apt (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 39,0 - 61,0ppm) PW-02

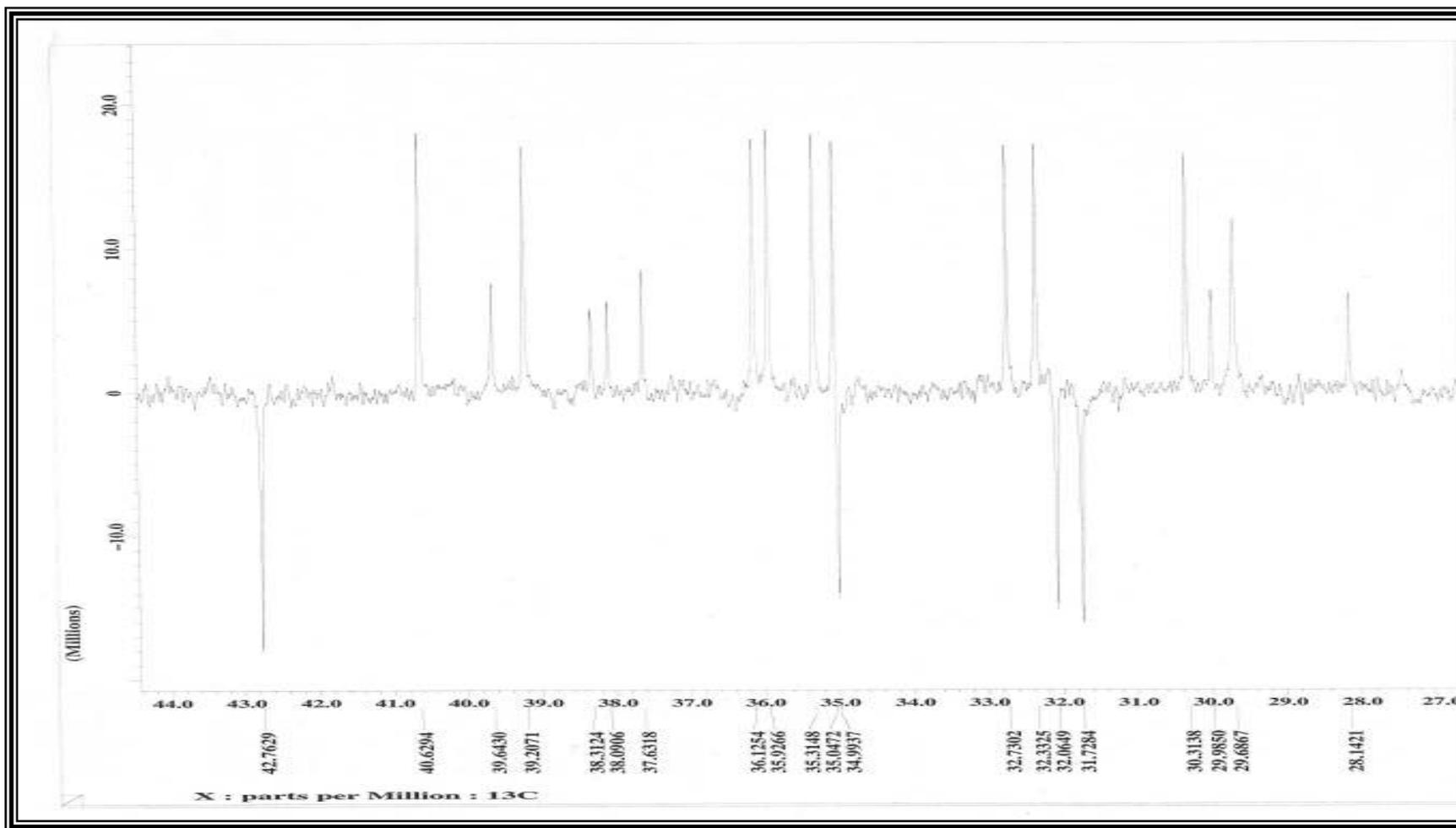


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C - Apt (100 MHz, CDCl_3) (27,0 - 44,0ppm) de PW-02

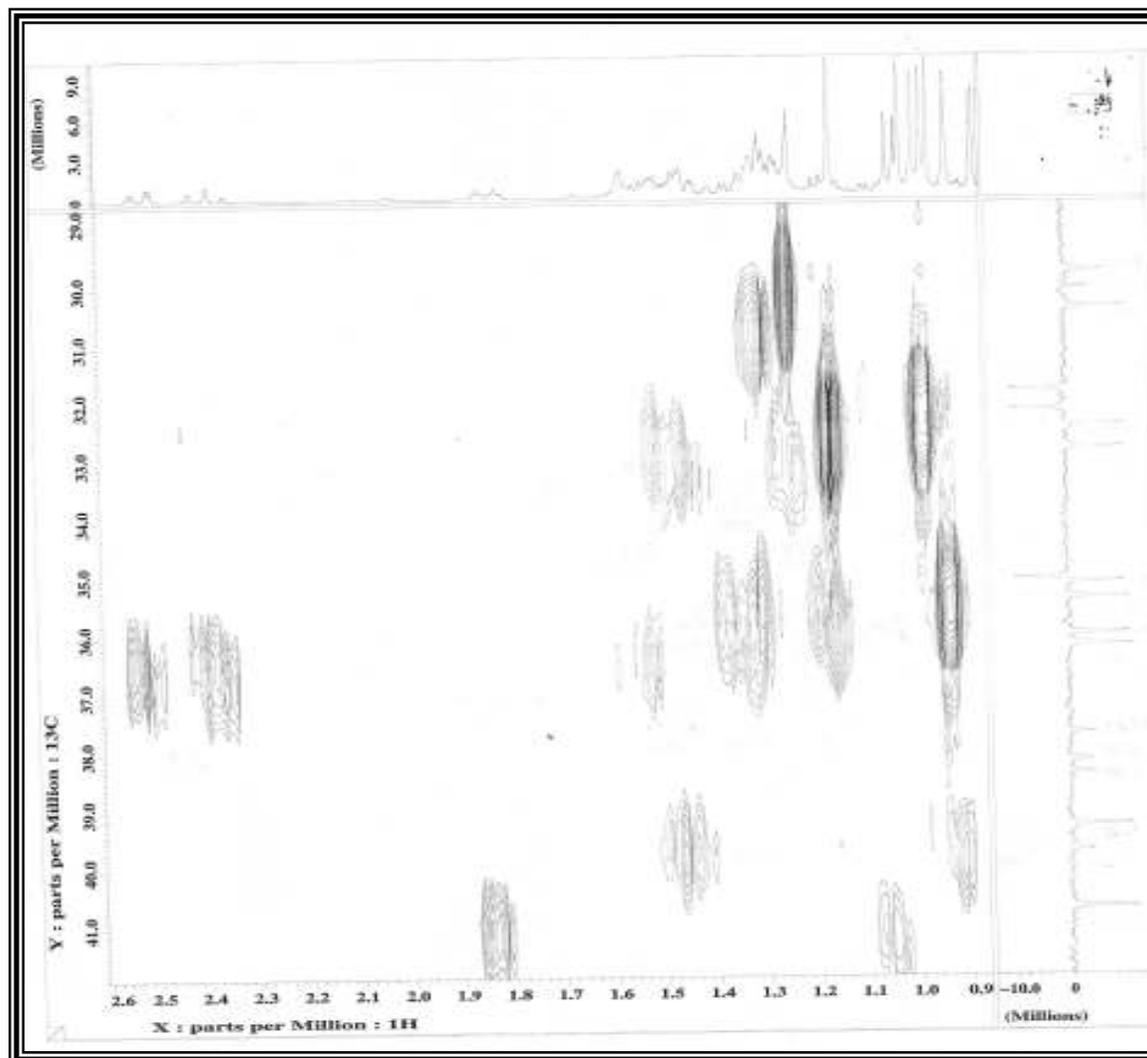


Figura 27 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-02

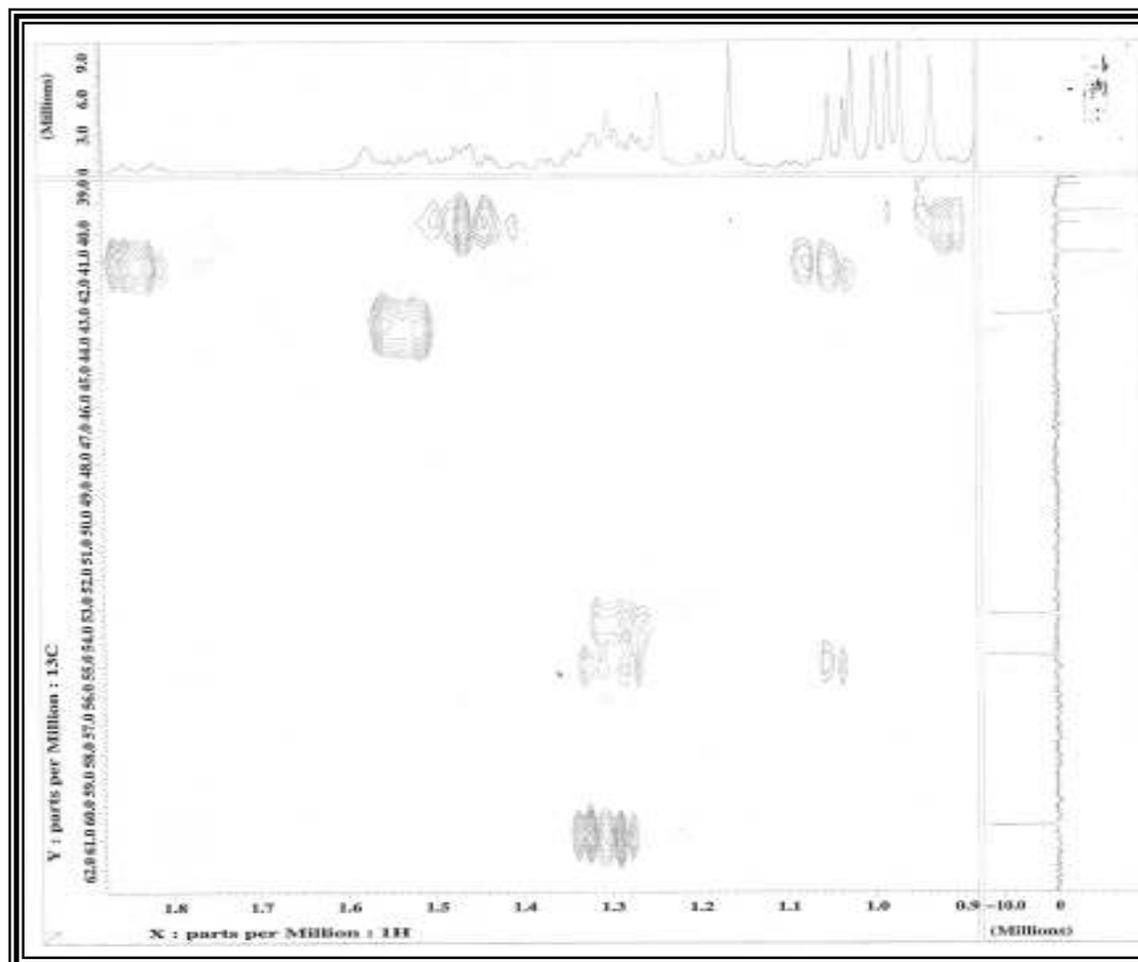


Figura 28 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-02

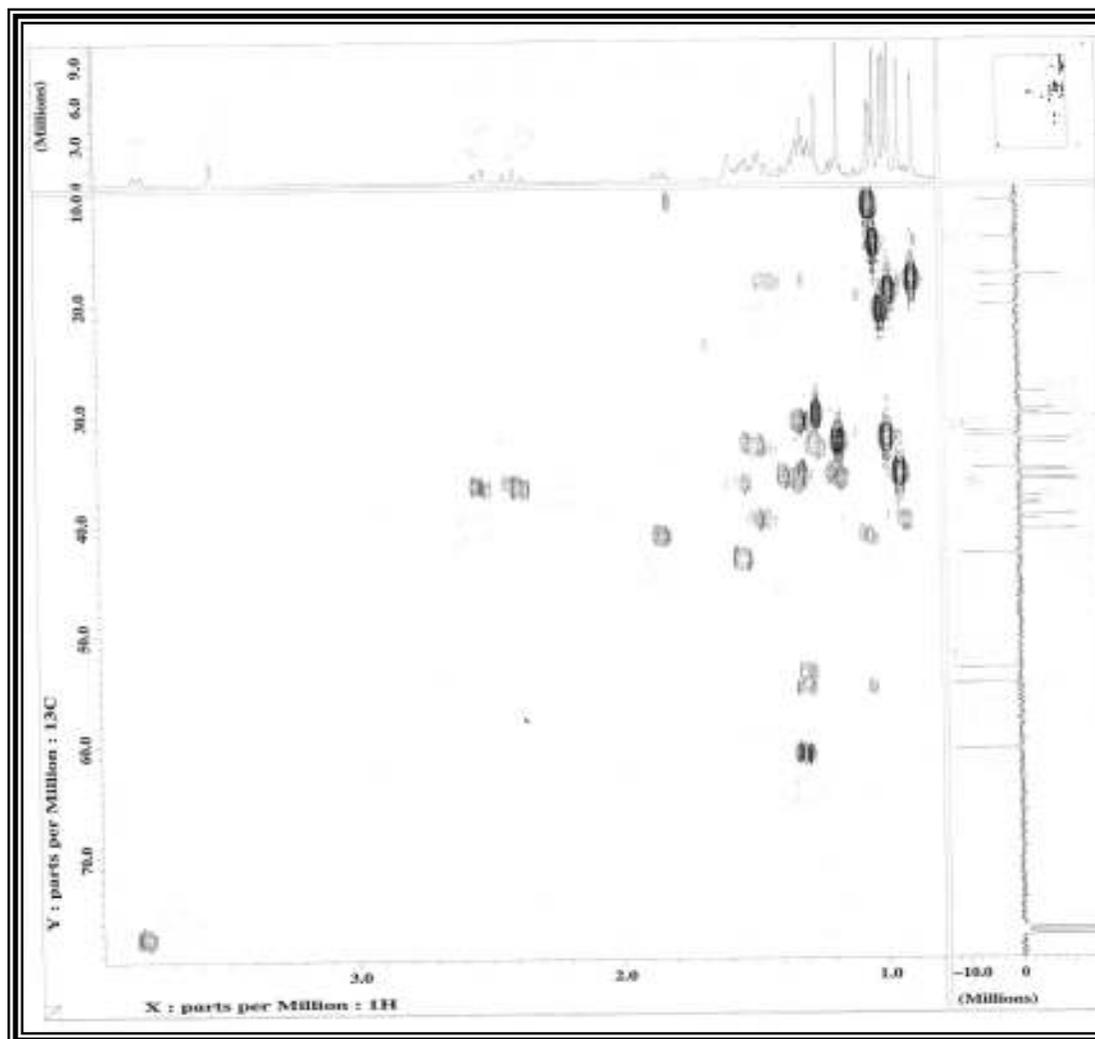


Figura 29 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PW-02

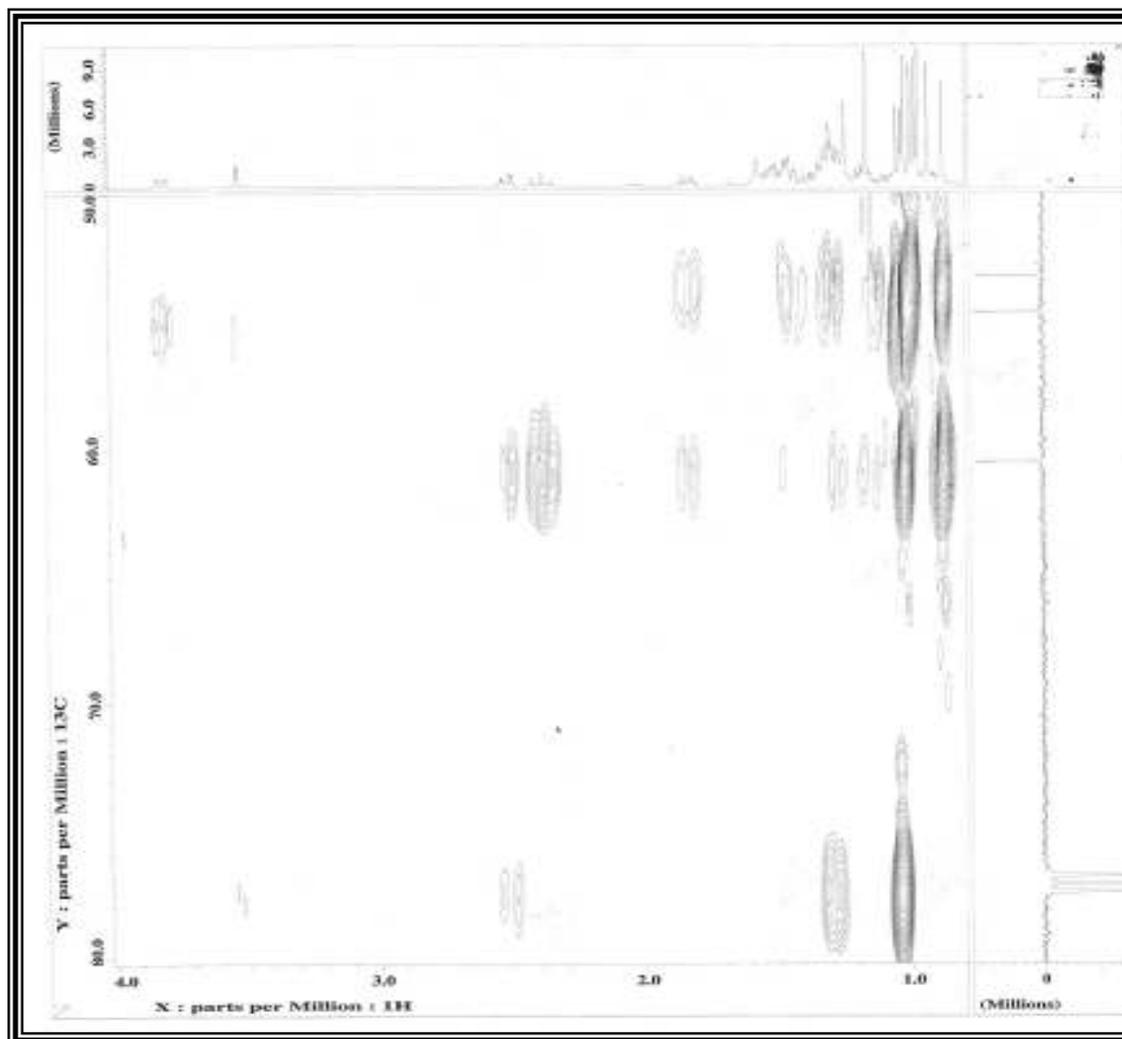


Figura 30 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-02

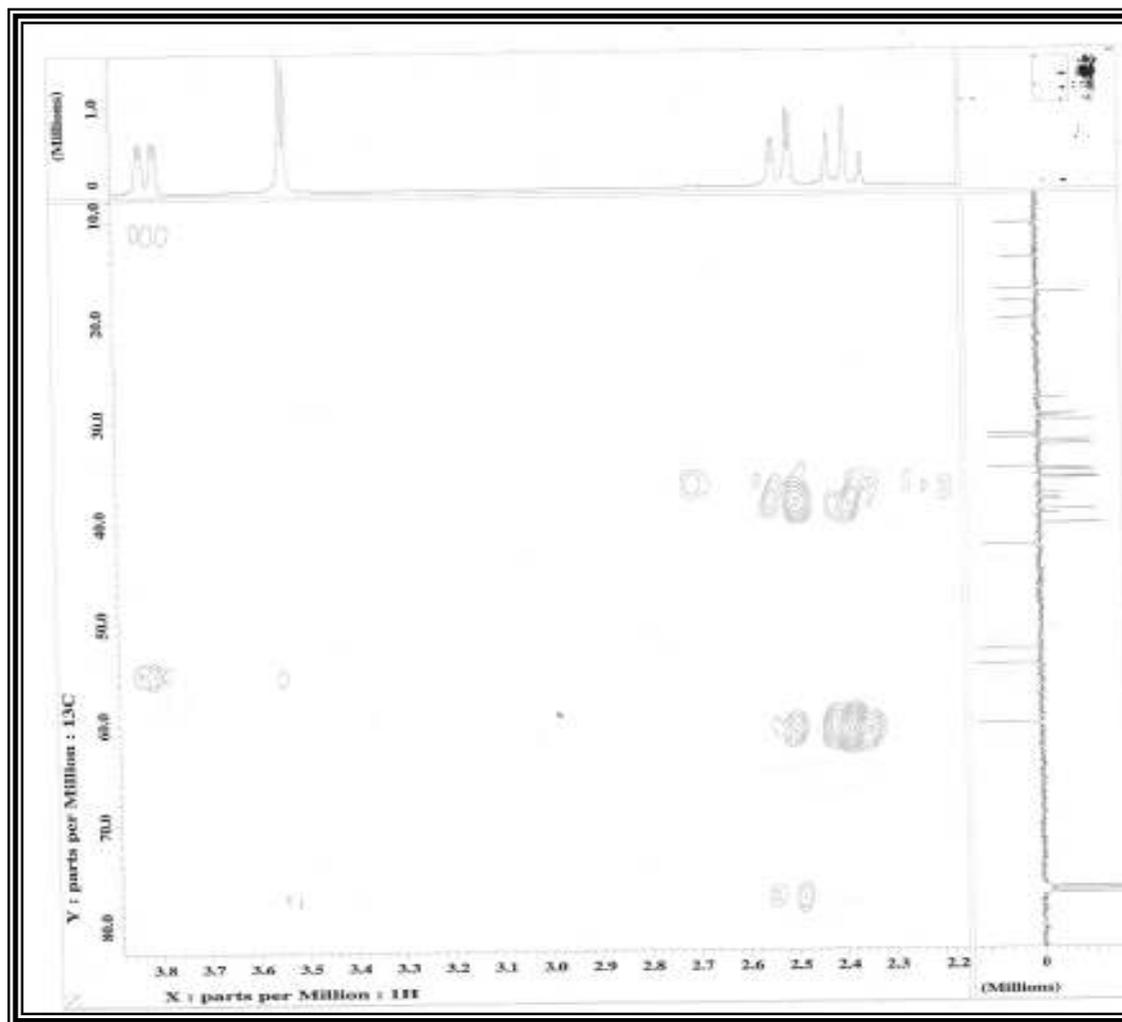


Figura 31 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-02

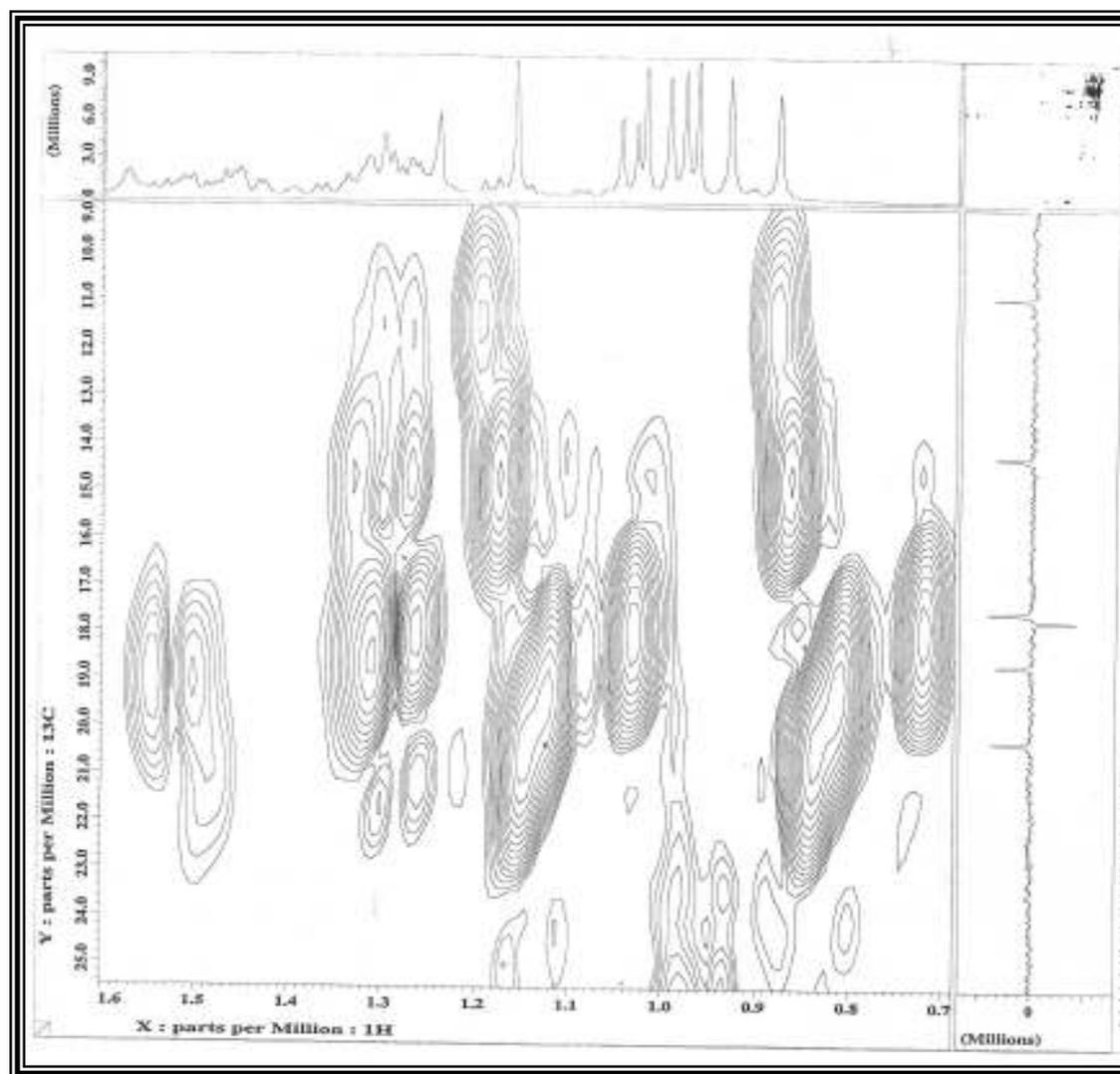


Figura 32 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-02

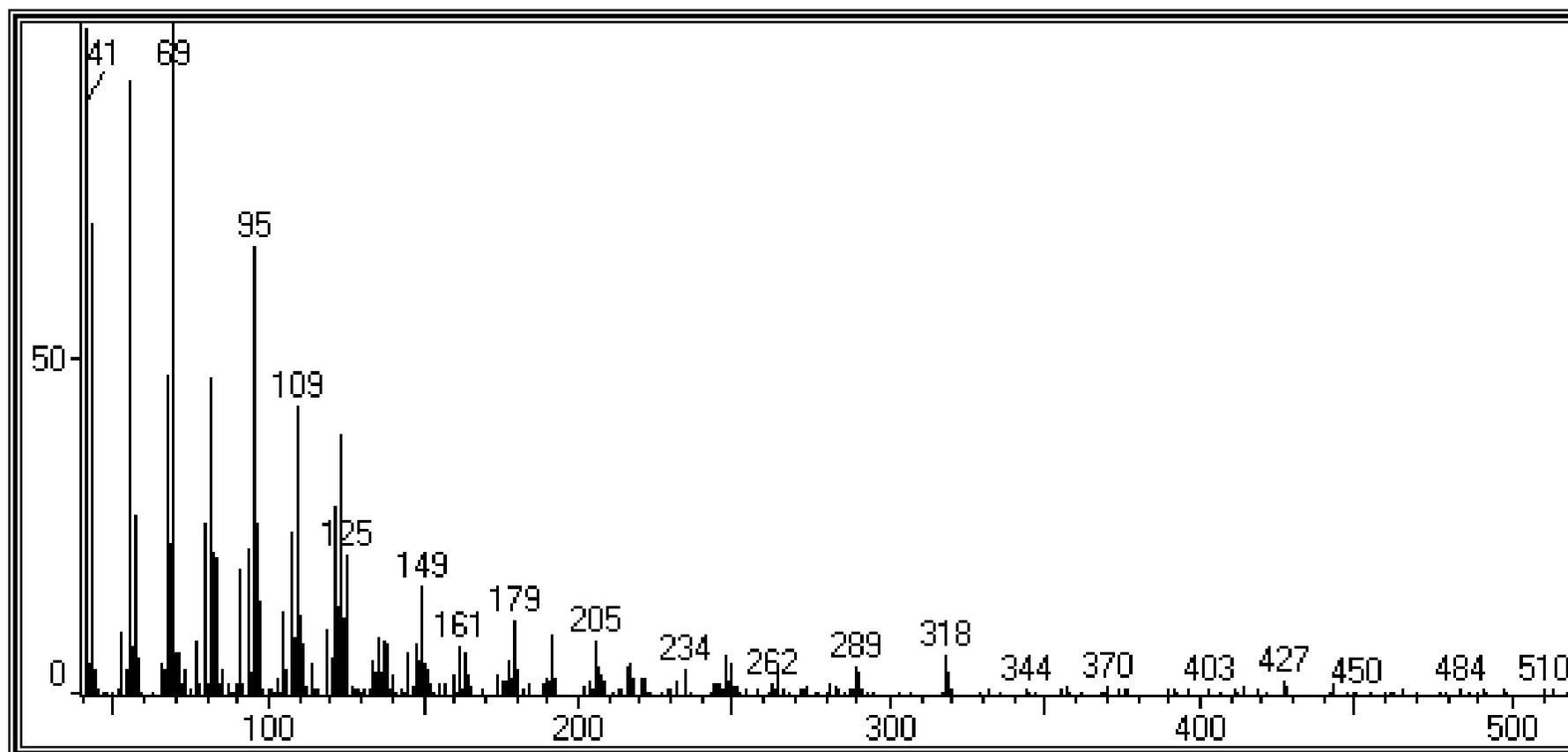


Figura 33 - Espectro de massas 70 eV de PW-02

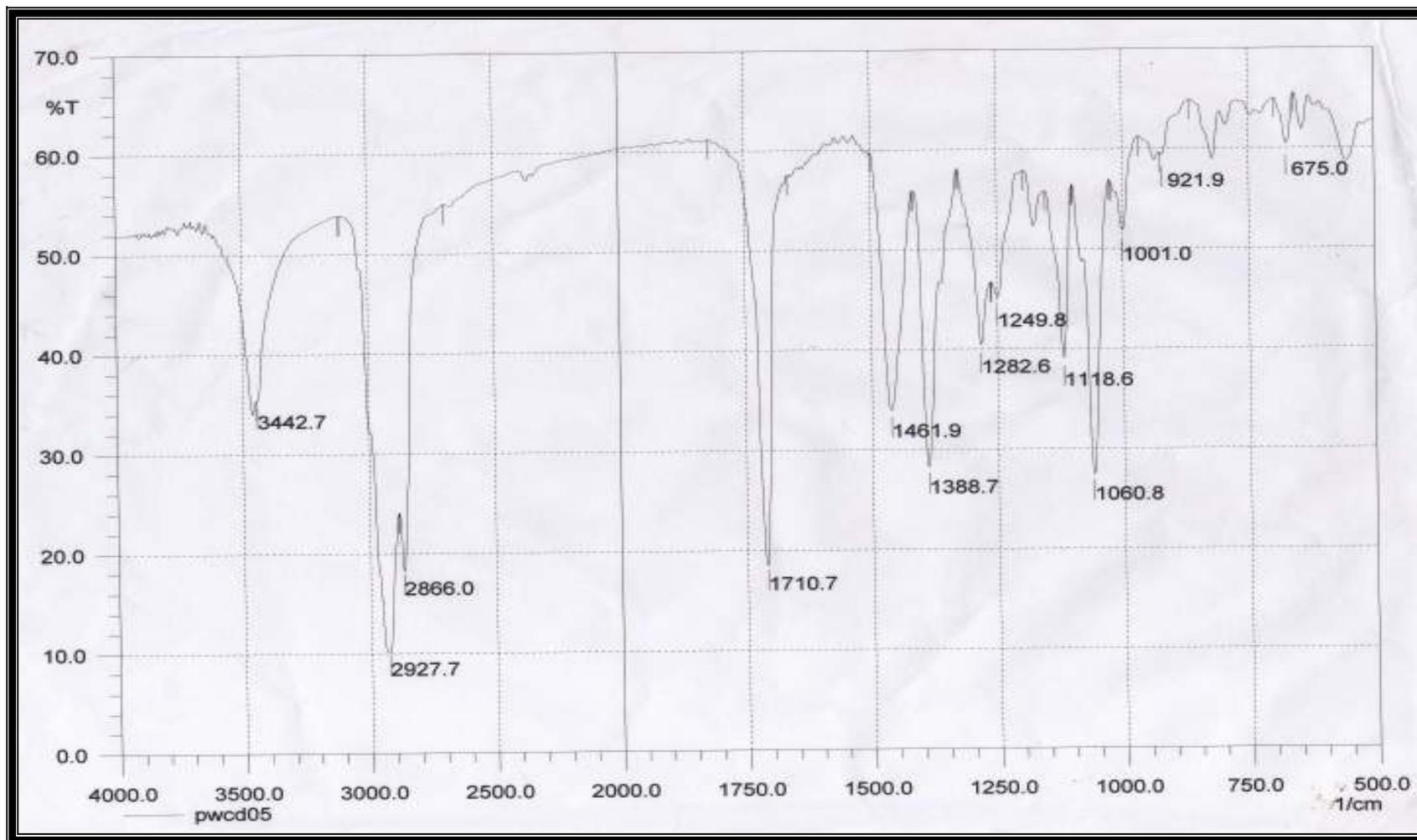
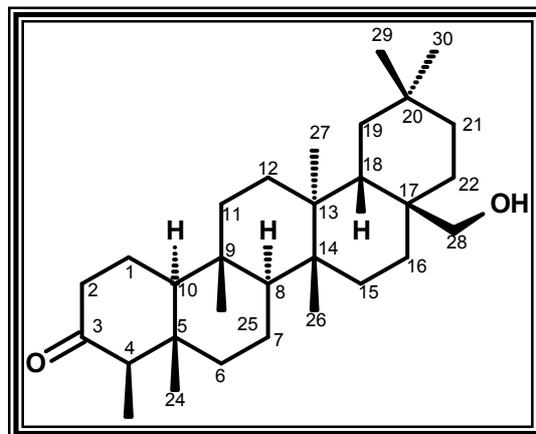


Figura 34 – Espectro de IV de PW-02

7.1.5 - TRITERPENO PW-03



A substância **PW-03** foi obtida na forma de cristais incolores (P.F.: 255,5 - 257,8°C), cuja fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$ (seis insaturações) deduzida por análise comparativa dos espectros de RMN 1H e dados de RMN ^{13}C - APT [trinta sinais simples, (sete carbonos quaternários sendo um deles mono oxigenado δ_C (213,11; C-3); quatro CH sendo um deles ligado a OH δ_C (68,04); doze CH_2 e sete CH_3] (Figura 38, p. 108).

O espectro de RMN 1H de **PW-03** (Figura 35, p. 107) mostrou uma grande quantidade de sinais simples entre δ_H (0,72 - 1,25) relativos aos grupos metilas. A proteção no sinal de deslocamento químico correspondente a metila C-23 δ_H (0,72) pode ser justificado pela presença da carbonila adjacente em C-3. Observou-se também um sinal singlete largo em δ_H (3,66) característico de hidrogênio carbinólico.

O espectro de RMN ^{13}C -APT indica a presença de um grupo carbonila δ_C [213,11; (C-3)] e também um sinal a δ_C (68,03) referente ao carbono C-28, que se encontra desprotegido cerca de 35,0 ppm quando comparado a **PW-01** sugerindo a presença da hidroxila na posição C-28, de acordo com os dados de RMN 1H e RMN ^{13}C .

A introdução de um grupo hidroxila na molécula resulta em um deslocamento químico cerca de 34 - 50 ppm mais desprotegido para o carbono- α , uma desproteção de 2 - 10 ppm para o carbono- β e um efeito

protetor da ordem de 0 - 9 ppm para o carbono- γ . (Tabela 10, P. 101) (Mahato e Kundu, 1994).

Esses dados também podem ser confirmados quando comparamos os deslocamentos químicos da friedelina e canofilol junto àqueles verificados na literatura (Ahmad *et al*; 1994) nos sugerindo a estrutura do canofilol para a substância **PW-03**.

Tabela 10 - Efeitos: α , β e γ verificado para o canofilol em relação a friedelina

C	Friedelina (δ_c)	Canofilol (δ_c)
28 (α)	32,0	68,0
17 (β)	29,8	35,0
16 (γ)	36,0	29,1
22 (γ)	39,1	33,0

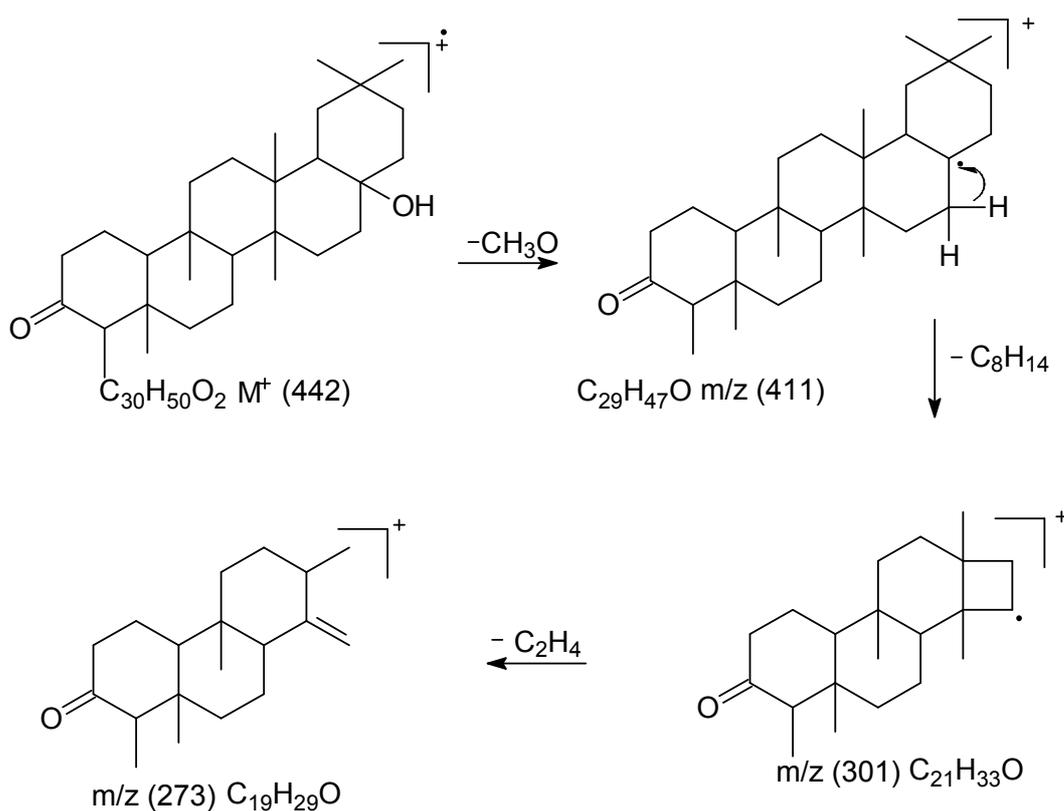
Assim como verificado em **PW-01** e **PW-02**, observa-se a conformação bote dos anéis D e E responsável pelo alto deslocamento químico em direção a alta frequência observado para C-8 δ_c (52,43) no triterpeno **PW-03** (Steskind *et al*, 1995). As demais atribuições podem ser observadas na Tabela 11, p. 104, cujos dados confirmam a estrutura do canofilol (3 α -hidroxi-3-oxofriedooleanona para a substância **PW-03** (Ahmad *et al*; 1994).

Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-03**, comparados com dados da literatura para a canofilol. (Mahato e Kundu, 1994)^c

	PW-03	Canofilol	PW-03	Canofilol
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C				
3	--	--	213,11	212,6
5	--	--	42,08	41,9
9	--	--	37,43	37,3
13	--	--	38,13	39,1
14	--	--	39,35	38,0
17	--	--	35,41	35,1
20	--	--	28,13	27,9
H				
4	(2,42 - 2,22)	2,50-2,20 (3H, <i>m</i> , H-4)	58,19	57,8
8	--	--	52,46	52,2
10	--	--	59,46	59,1
18	--	--	39,43	39,2
CH₂				
1	--	--	22,24	22,1
2	--	2,50-2,20 (3H, <i>m</i> , H-2)	41,48	41,3
6	--	--	41,22	41,0
7	--	--	18,22	18,1
11	--	--	34,47	35,3
12	--	--	31,37	29,9
15	--	--	31,22	31,3
16	--	--	29,11	29,0
19	--	--	33,34	34,4
21	--	--	30,07	31,4
22	--	--	33,34	33,2
28	3,63	3,62 (2H, <i>s</i> , H-28)	68,04	67,0
CH₃				
23	0,88	0,87 (3H, <i>d</i> , $J = 6,0$ Hz, H-23)	6,80	6,7
24	0,88	0,87 (3H, <i>s</i> , H-24)	14,65	14,5
25	0,72	0,72 (3H, <i>s</i> , H-25)	18,06	18,0
26	0,98	0,98 (3H, H-26)	19,18	18,9
27	0,91	0,91 (3H, H-27)	19,05	19,1
29	0,99	0,99 (3H, H-29)	34,24	34,2
30	1,13	1,14 (3H, H-30)	32,83	32,9

^cRMN ^1H e ^{13}C (100 e 20,1 MHz; respectivamente; CDCl_3)

Pela análise do espectro de massas verifica-se a ausência do pico do íon molecular, devido a perda do fragmento CH_3O ($m/z = 31$), porém, observa-se outros fragmentos característicos de esqueleto triterpênico $m/z = 275$, $m/z = 95$ e $m/z = 69$ (Esquema 16).



Esquema 16 - Proposta de alguns fragmentos de massas para PW-03

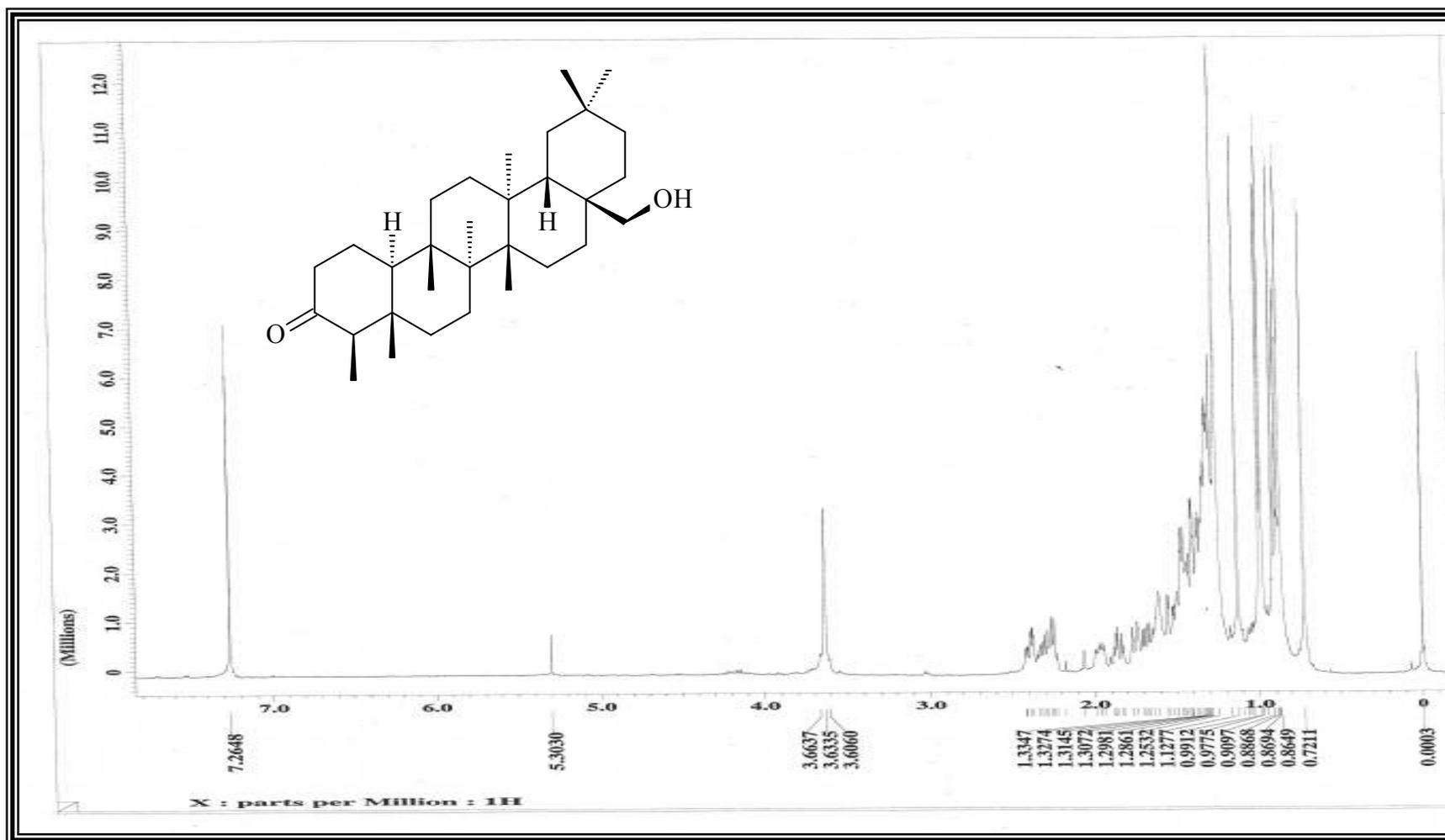


Figura 35 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-03

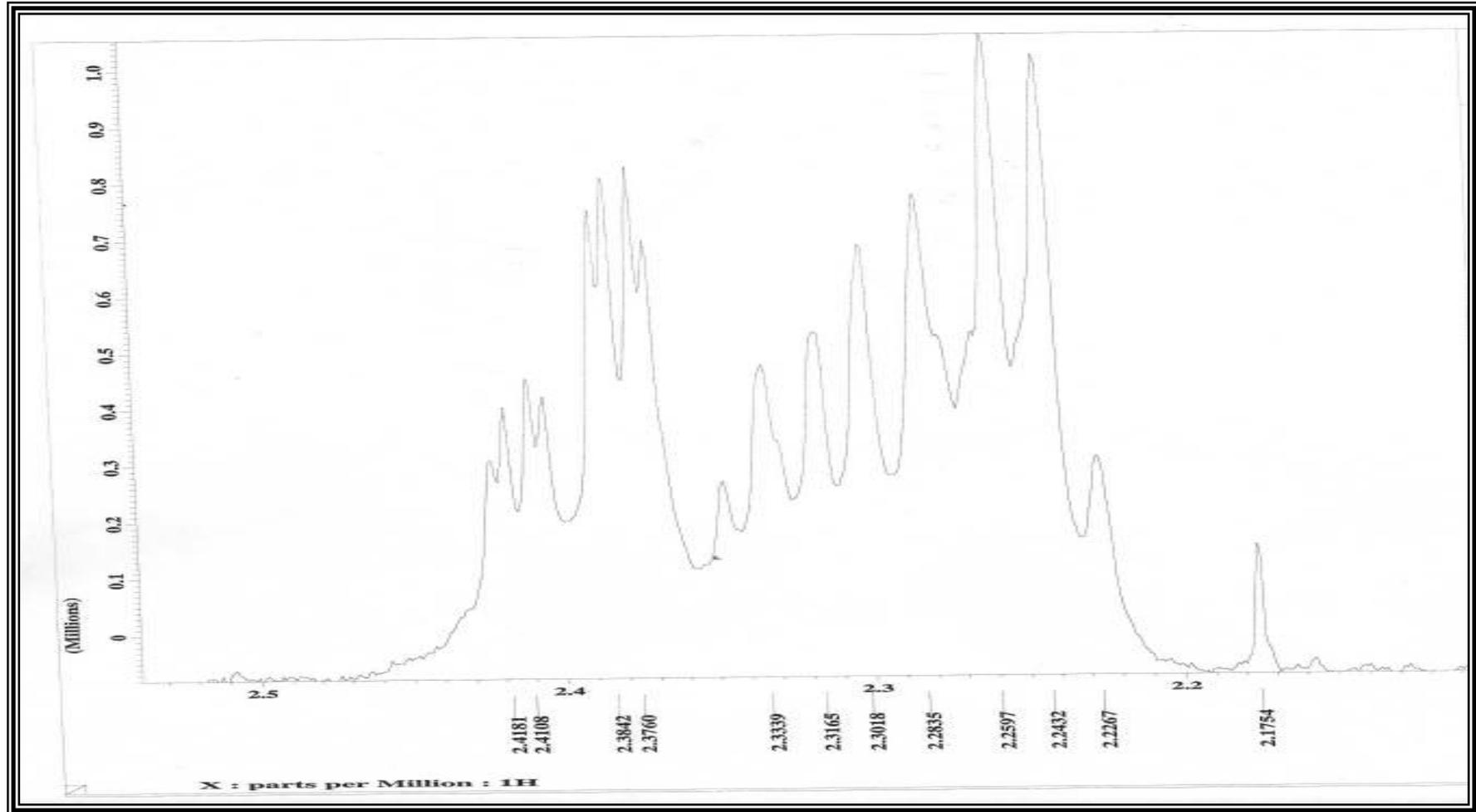


Figura 36 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,1 – 2,50ppm) de PW-03

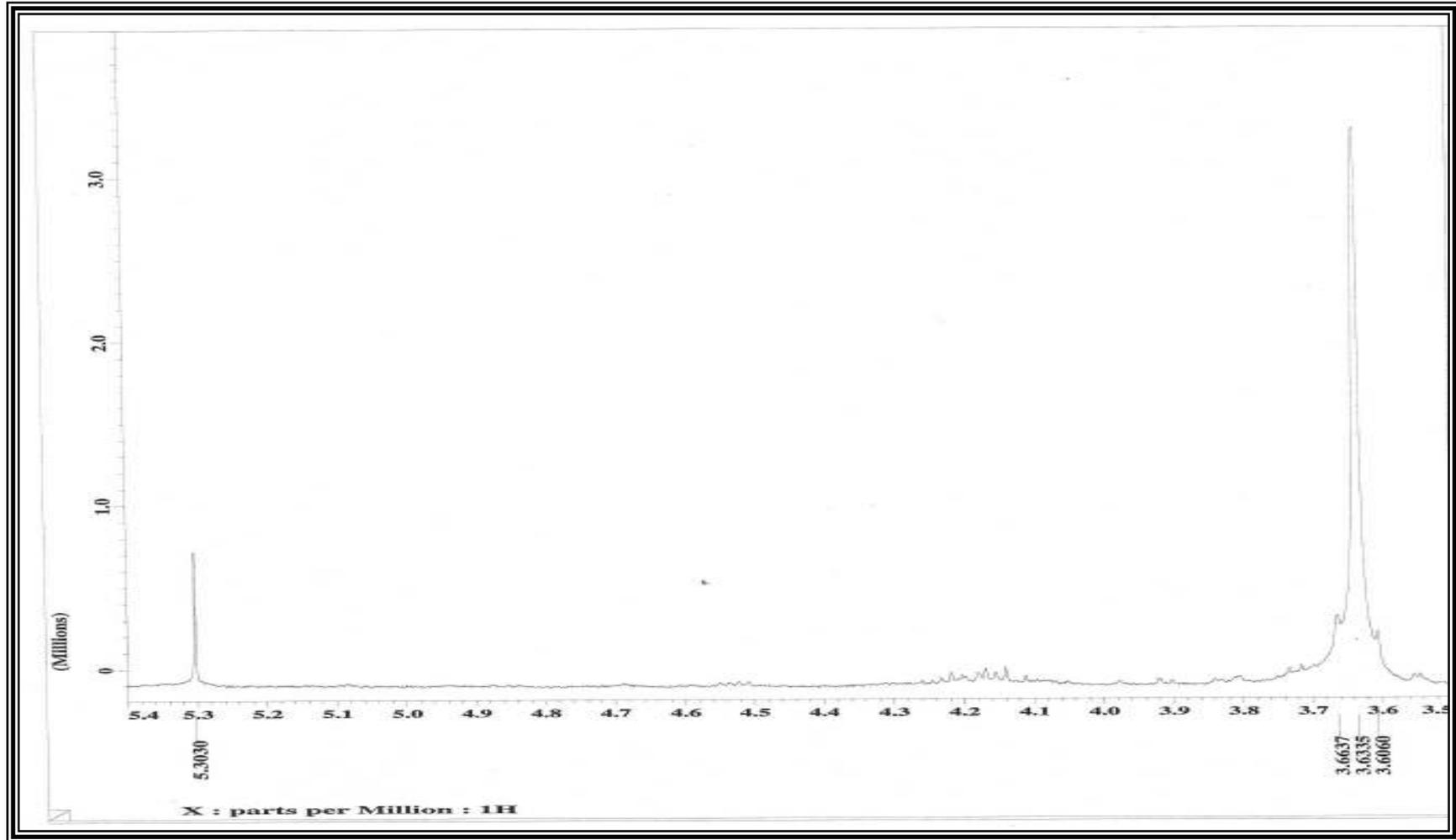


Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,5 - 5,40ppm) de PW-03

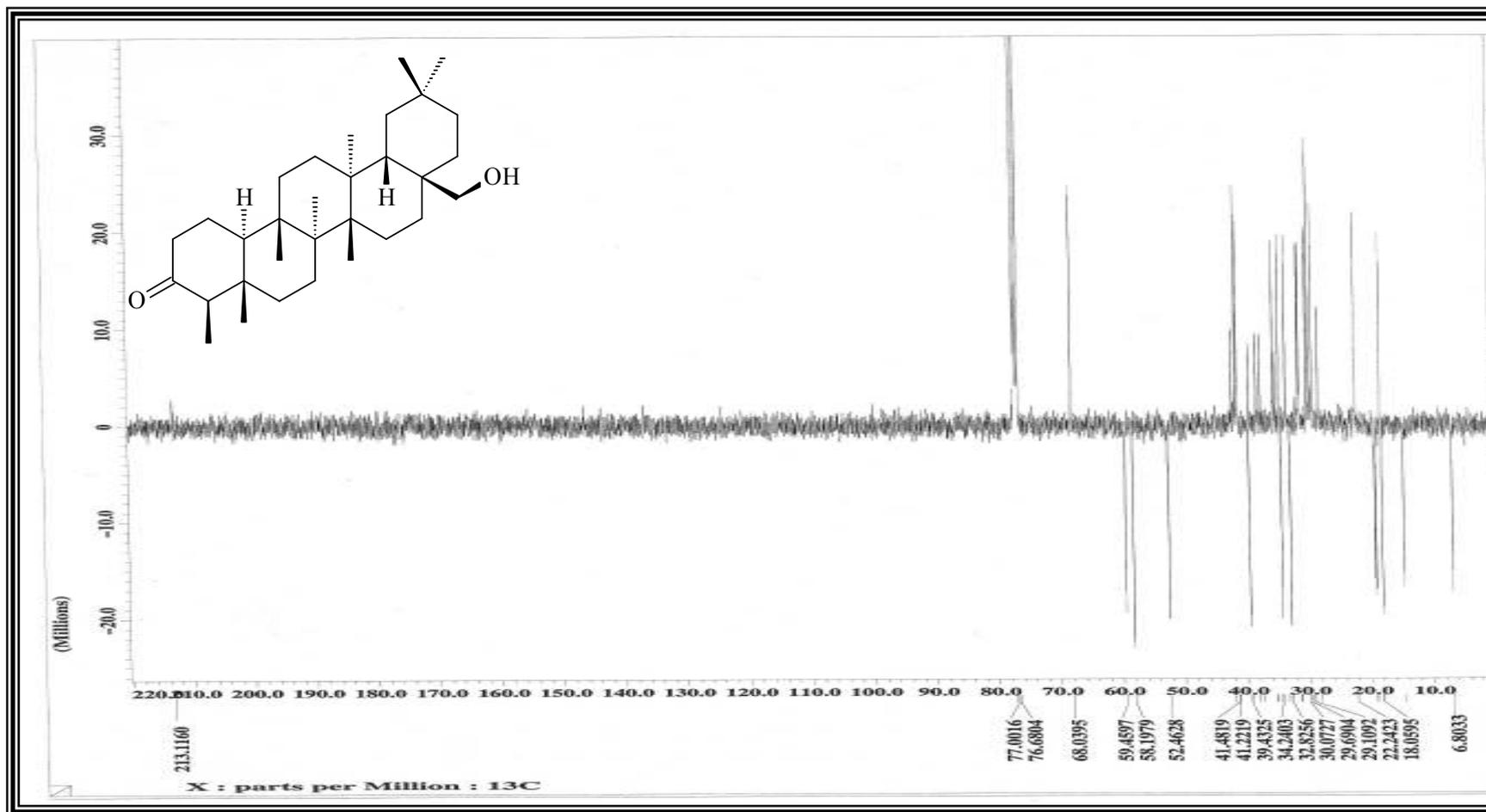


Figura 38 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-03

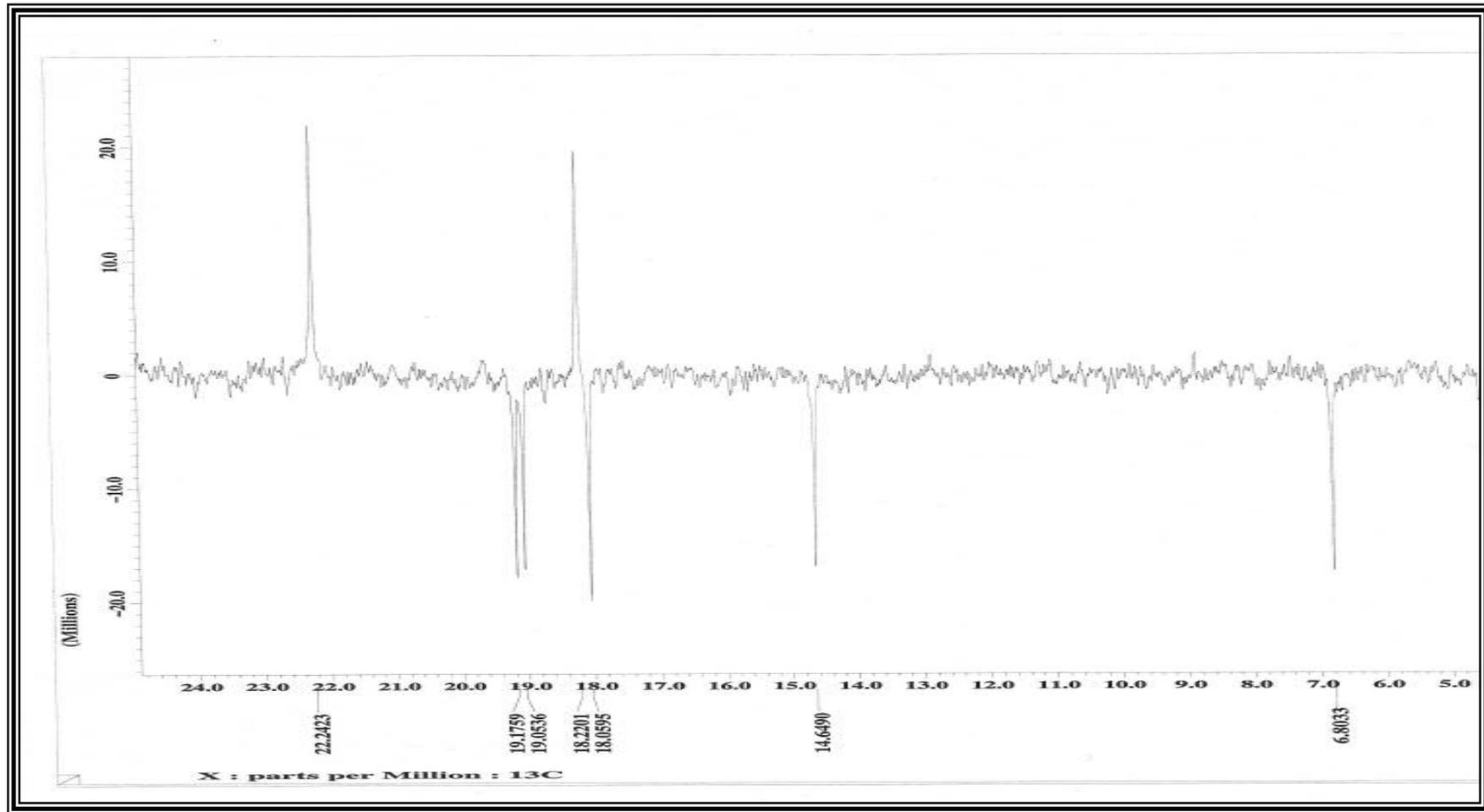


Figura 39 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 5,0 – 24,0ppm) de PW-03

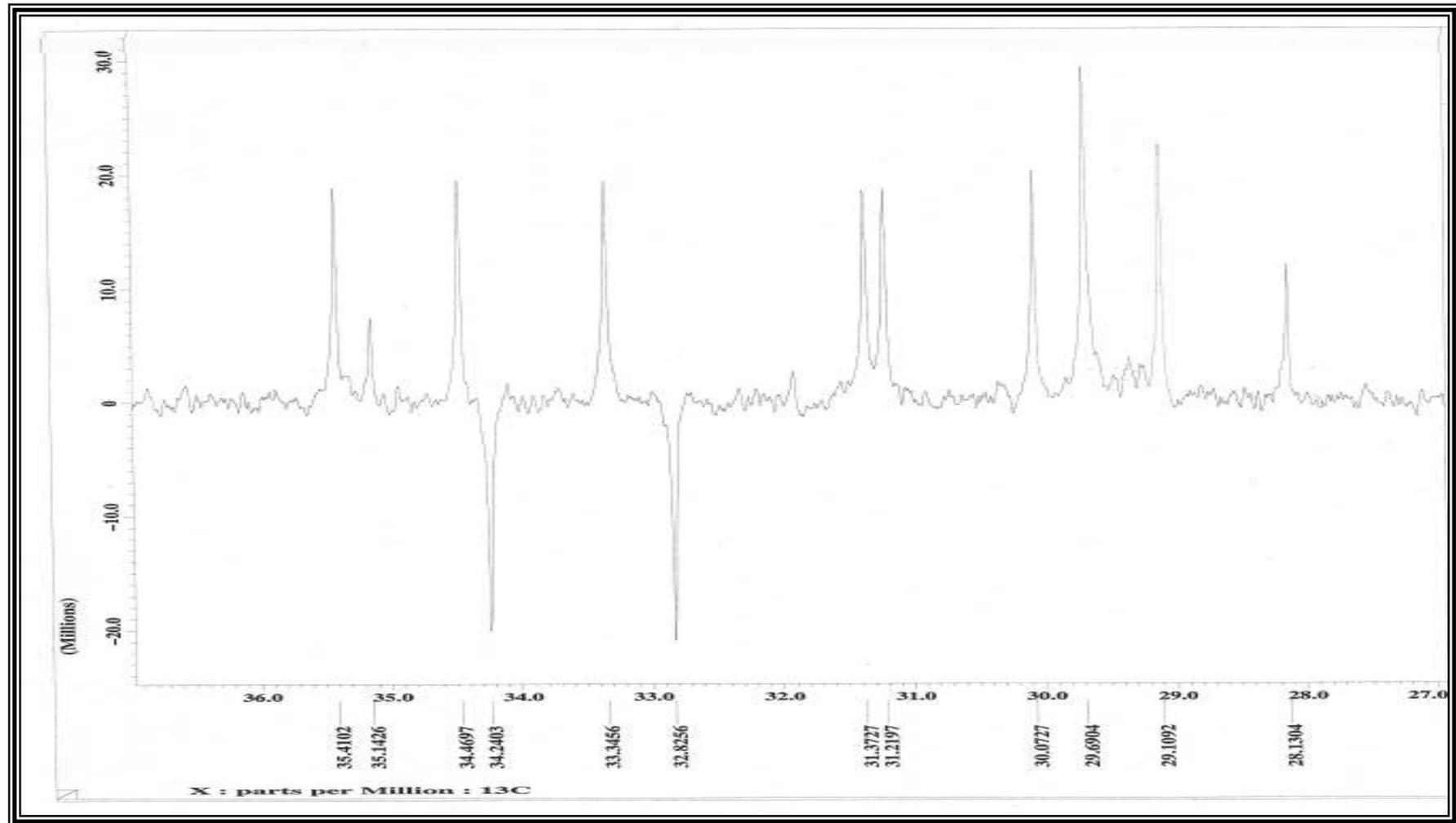


Figura 40 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 27,0 - 36,0ppm) de PW-03

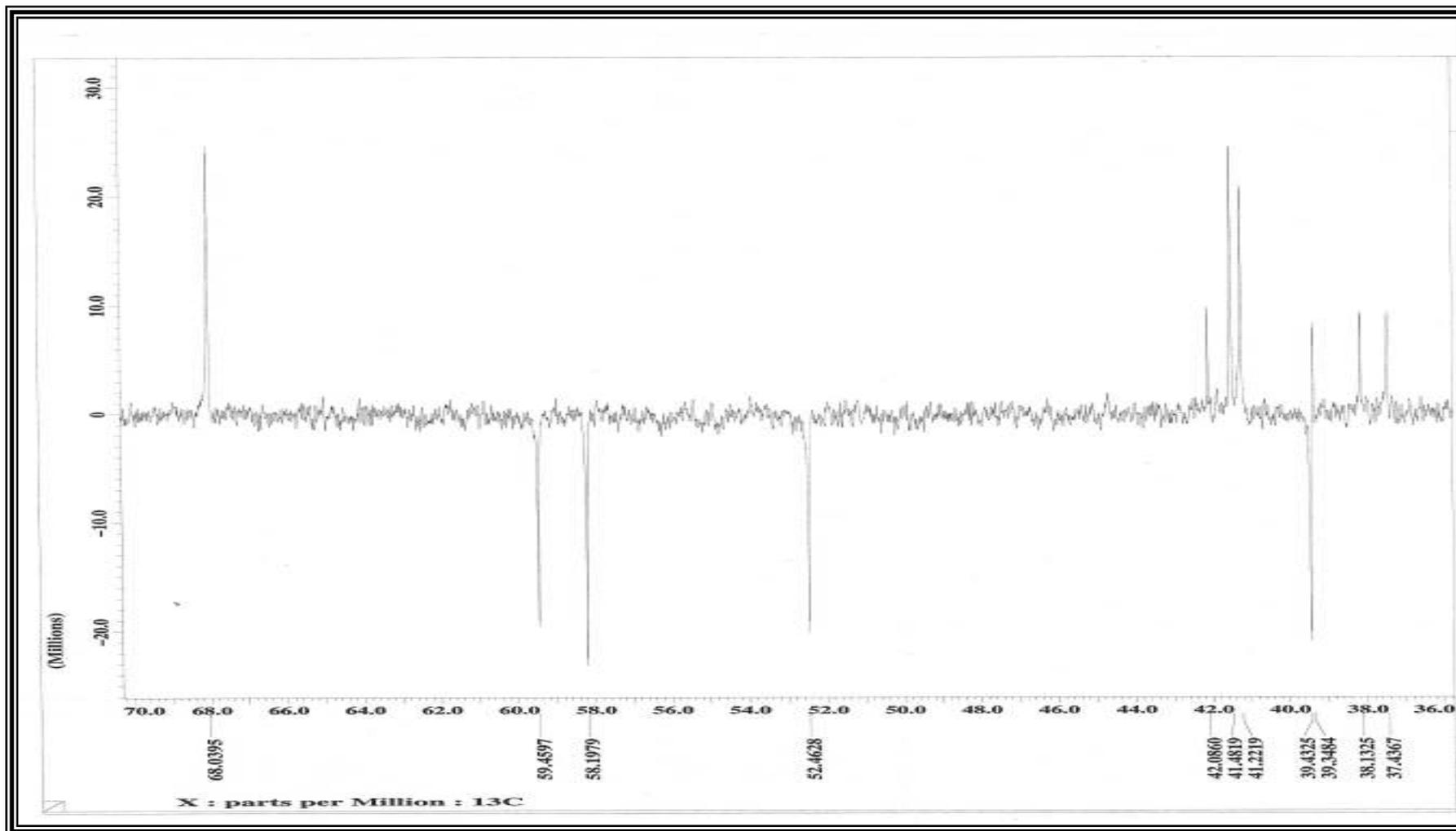


Figura 41 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, 100CDCl_3) (Expansão da região entre 37,0 - 68,0ppm) de PW-03

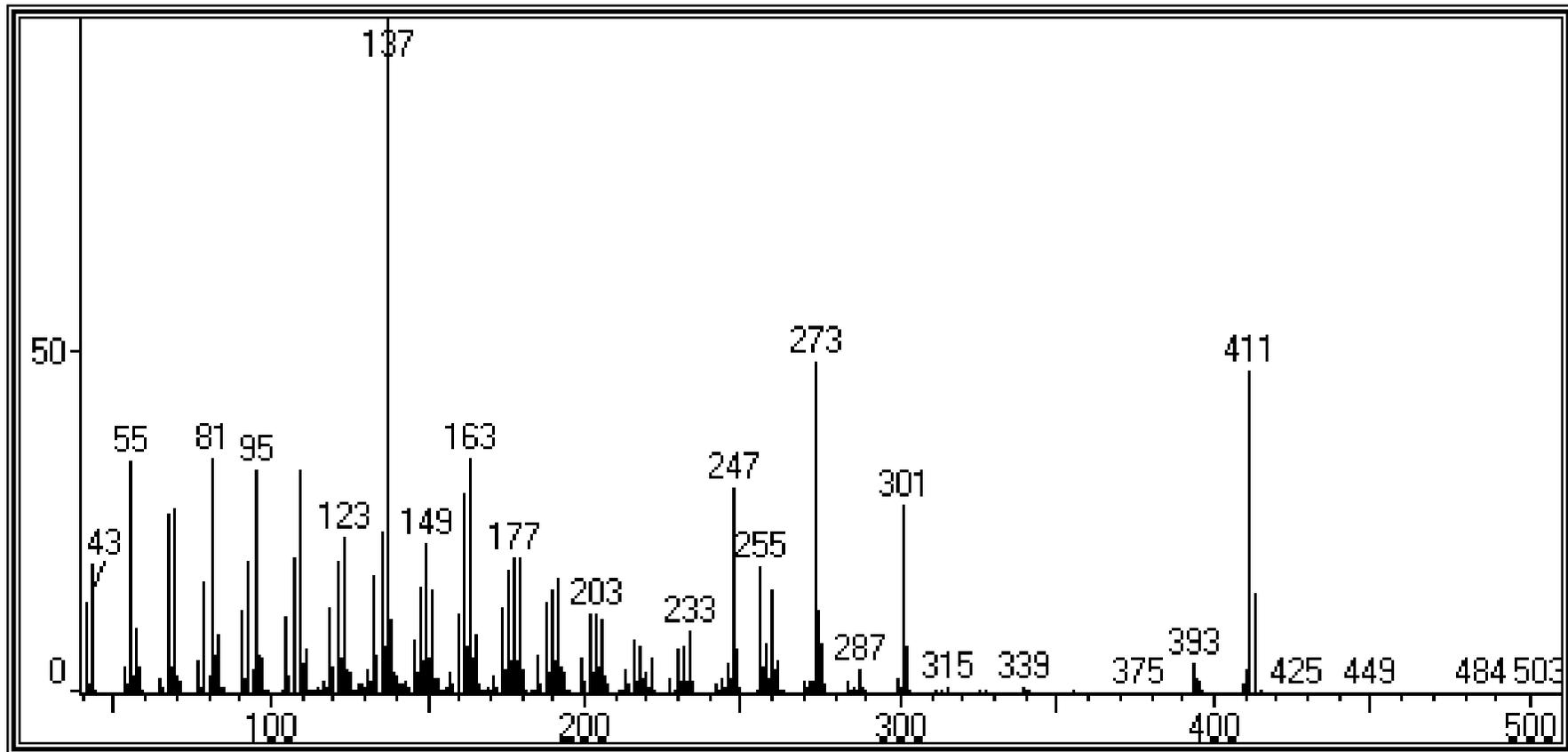
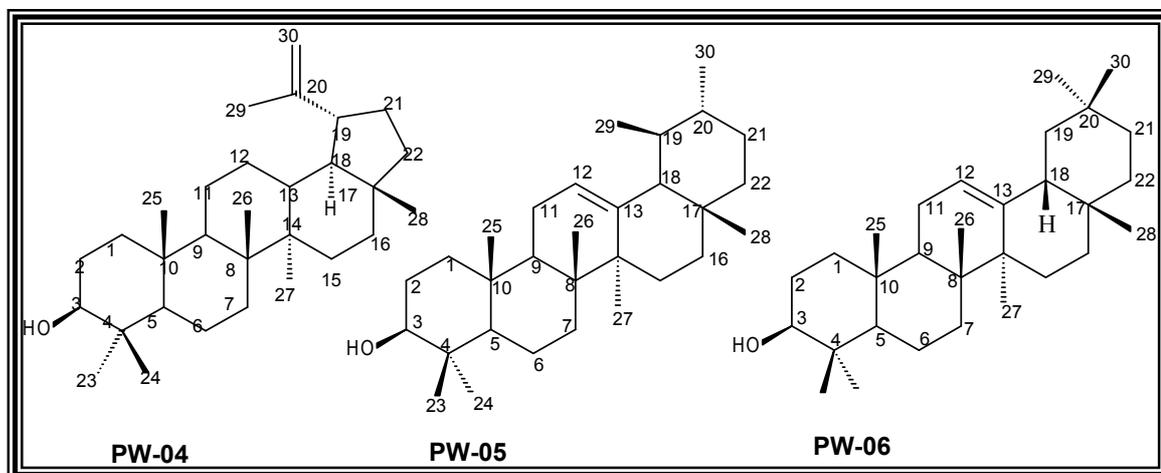


Figura 42 - Espectro de massa 70 eV de PW-03

7.1.6 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA MISTURA DAS SUBSTÂNCIAS PW-04, PW-05 e PW-06.



Do extrato hexânico e diclorometânico de folhas de *P. weinmanniaefolia*, foi isolado um material sólido cristalino, que após várias tentativas de purificação, e análise por CCDA com vários sistemas de eluentes, revelou-se como uma única mancha, que deu origem a uma mistura de substâncias, cujos dados espectrais mostraram tratar-se de três triterpenos **PW-04**, **PW-05** e **PW-06**.

O espectro de RMN ^1H (Figura 44, p.117) mostrou sinais simples entre δ_{H} (0,76 - 1,68) correspondentes aos grupos metilas, sendo que uma deles δ_{H} (1,68) pelo fato de se apresentar mais desprotegido foi atribuído ao grupo metila ligado a carbono sp^2 . Na região de hidrogênios olefínicos foram observados um sinal duplo δ_{H} (4,69 e 4,57) e um sinal triplo centrado em δ_{H} (5,17-5,19) e na região de hidrogênio carbinólico observou-se a presença de um duplo sinal duplo centrado em δ_{H} (3,16 - 3,21).

Pela interpretação do espectro de RMN ^{13}C -HBB (Figura 48, p. 121) pode-se constatar a presença de sessenta e dois sinais principais, além de outros sinais de baixa intensidade. O espectro de RMN ^{13}C - APT (Figura 51, p. 124) mostrou um sinal δ_{C} (78,98) atribuído a hidroxila. Esse grupamento foi confirmado através do espectro de infravermelho (Figura 55, p. 128) onde se observou a presença da banda de deformação axial de OH em ligação de

hidrogênio intermolecular em $3344,3\text{ cm}^{-1}$ e entre $2848 - 2918\text{ cm}^{-1}$ observa-se a banda de deformação axial de C-O de álcool primário a $1031,8\text{ cm}^{-1}$. Observou-se também a deformação angular e simétrica no plano de CH_2 e CH_3 em 1452 cm^{-1} , em 1379 cm^{-1} deformação angular no plano de OH; deformação angular assimétrica fora do plano de CH_2 e em $879,5\text{ cm}^{-1}$ deformação angular fora do plano de C-H (Silverstein *et al.*, 2000).

A posição da hidroxila presente em **PW-04**, **PW-05** e **PW-06** foi estabelecida a partir de comparação com dados da literatura (Ahmad, *et al.*, 1994), onde se verifica que para hidroxilas com estereoquímica (α) o valor de deslocamento químico se apresenta em torno de 76,0 ppm (Ahmad *et al.*, 1994; Olea e Roque, 1990) (Figura 43).

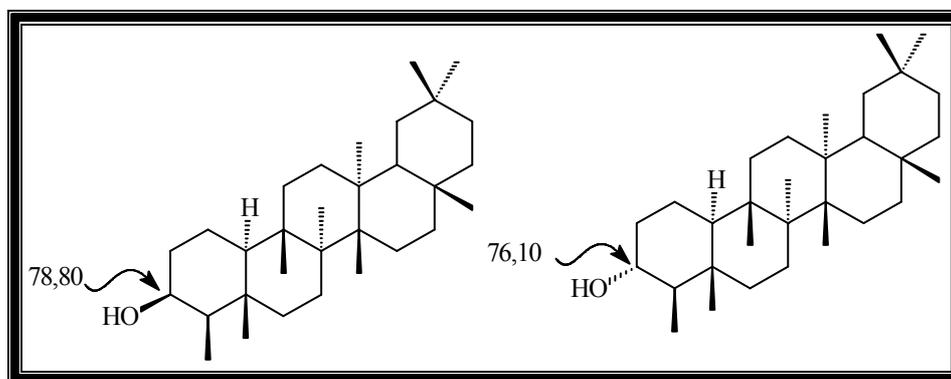


Figura 43 - Deslocamentos químicos para β -OH e para α -OH

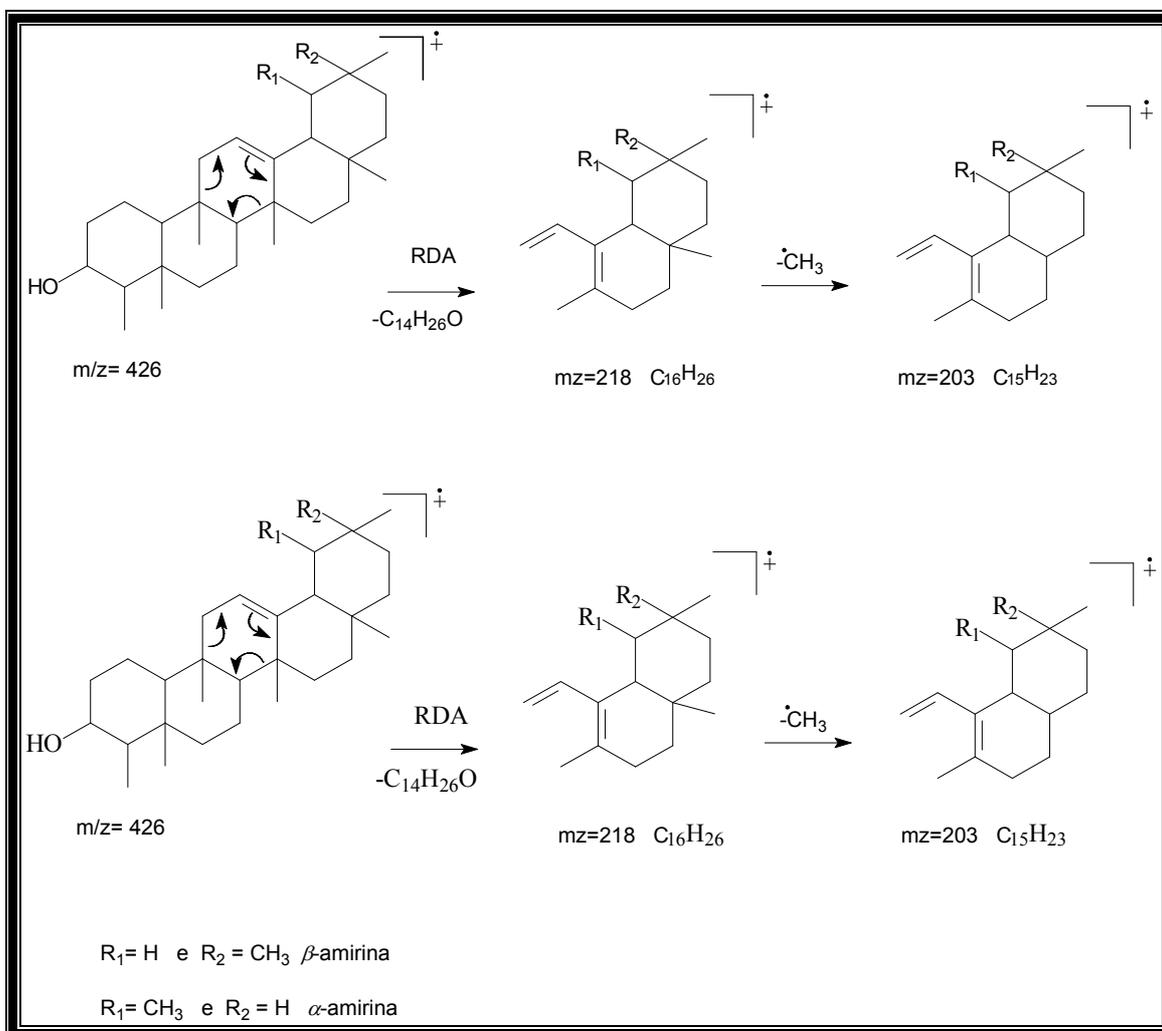
Observou-se também sinais correspondentes a carbonos sp^2 em $[\delta_C 109,3\text{ (C-29)}\text{ e }150,8\text{ (C-20)}]$ atribuídos ao triterpeno **PW-04** (Lupeol), seguidos dos sinais $[\delta_C 145,1\text{ (C-13)}\text{ e }121,7\text{ (C-12)}]$ característicos de β -amirina (**PW-06**), além do sinal em $\delta_C 125,01\text{ (C-12)}$ característico de posição C-12 de α -amirina (**PW-05**), confirmando desse modo os esqueletos Lup-20(29)-eno, olean-12-eno e urs-12-eno respectivamente. Esses dados estão de acordo com os valores de deslocamento químico registrados na literatura para Lupeol, α -amirina e β -amirina (Mahato e Kundu, 1994) (Tabela 12, p. 115).

Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias: **PW-04**, **PW-05** e **PW-06** comparados com dados da literatura para o Lupeol, β -amirina e α -amirina (Mahato e Kundu, 1994)^d

	PW-04	<i>Lupeol</i>	PW-05	β -amirina	PW-06	α -amirina
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
H						
4	38,84	38,8	38,84	38,8	38,71	38,7
8	40,83	40,7	38,05	38,7	39,99	40,0
10	37,15	37,1	37,73	37,6	36,94	36,9
14	42,82	42,7	41,71	41,8	42,83	42,0
17	42,99	42,9	32,47	32,5	33,69	33,7
20	150,92	150,8	31,06	31,1	39,79	39,6
CH						
3	79,08	78,9	78,98	79,0	78,98	78,8
5	55,18	55,2	55,31	55,3	55,18	55,2
9	50,44	50,3	47,73	47,7	47,63	47,7
13	38,05	38,0	145,17	145,17	140,04	139,3
18	48,31	48,2	47,23	47,3	--	58,9
19	47,97	47,9	46,83	46,9	39,79	39,6
CH₂						
1	38,84	38,6	38,71	38,7	38,71	38,7
2	27,44	27,3	27,4	27,3	27,4	27,2
6	18,31	18,2	18,31	18,5	18,31	18,3
7	34,28	34,2	32,8	32,8	32,8	32,9
11	21,29	20,9	23,4	23,6	17,98	17,4
12	21,14	25,0	121,72	121,8	125,01	124,3
15	27,44	27,4	26,14	26,2	26,14	26,7
16	35,58	35,5	27,40	27,0	26,14	26,6
21	29,85	29,8	34,73	34,8	31,91	31,2
22	39,99	39,9	37,16	37,2	41,31	41,5
29	109,31	109,3	33,33	33,3	23,40	23,3
CH₃						
23	28,08	27,9	28,38	28,2	28,08	28,1
24	16,07	15,3	15,96	15,5	15,97	15,6
25	16,79	16,1	15,96	15,6	15,35	15,6
26	15,45	15,9	16,10	16,9	16,10	16,8
27	14,54	14,5	26,15	26,0	23,4	23,3
28	17,99	17,9	28,38	28,4	28,08	28,1
30	19,30	19,2	23,68	23,68	21,29	21,3

^d Lupeol, α -amirina e β -amirina: RMN ^1H e ^{13}C (100,00; 15,09 e 22,63 MHz; respectivamente).

Através da análise dos espectros obtidos por cromatografia gasosa acoplada ao Massas (CG-EM) $m/z= 426$ foi possível propor a fórmula molecular para a substância: $C_{30}H_{50}O$ que concorda com os valores descritos na literatura para o Lupeol, α -amirina e β -amirina (Ahmad *et al*; 1994).



Esquema 17 – Proposta de alguns fragmentos de massas para **PW-04**, **PW-05** e **PW-06**

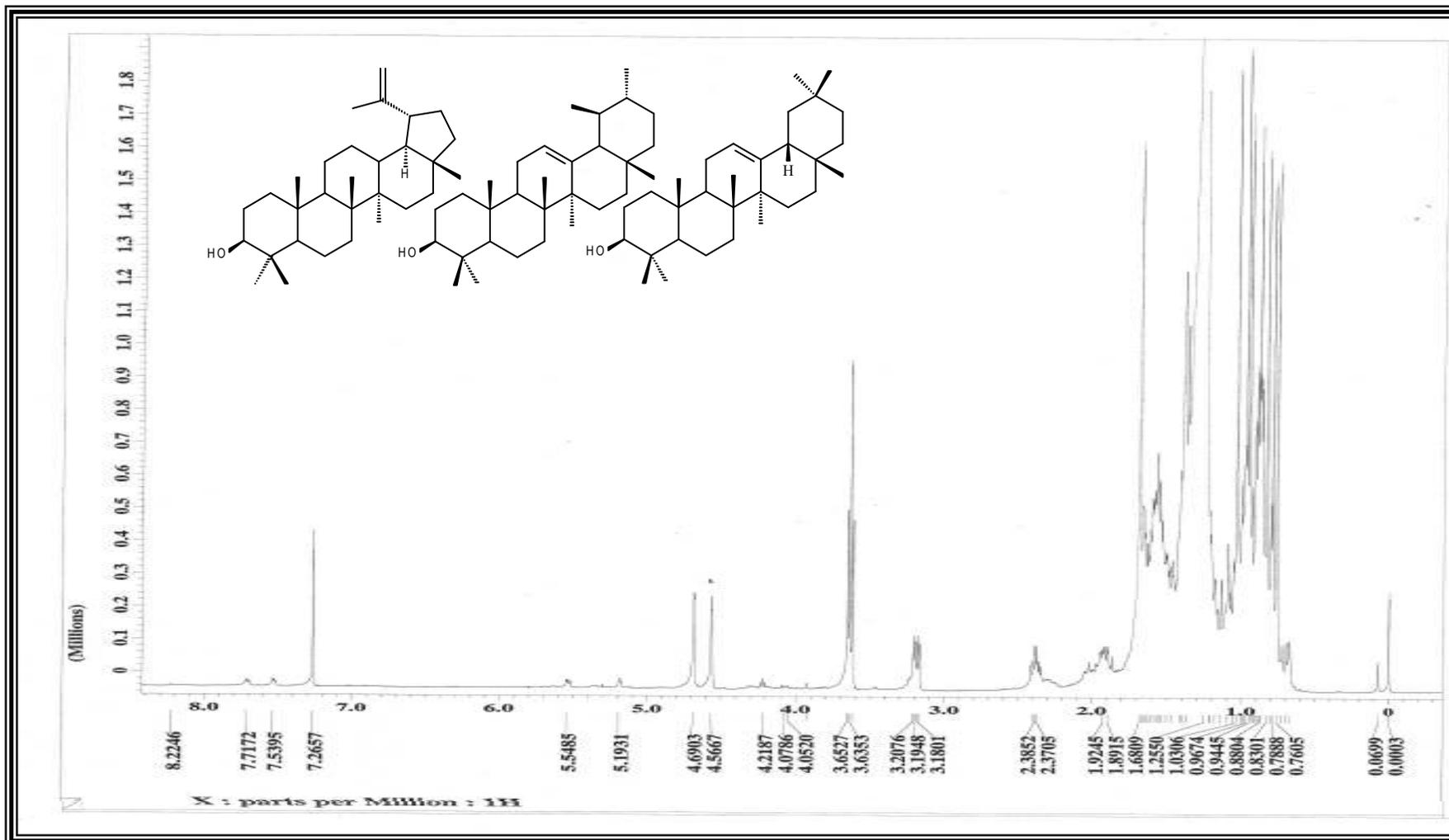


Figura 44 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06

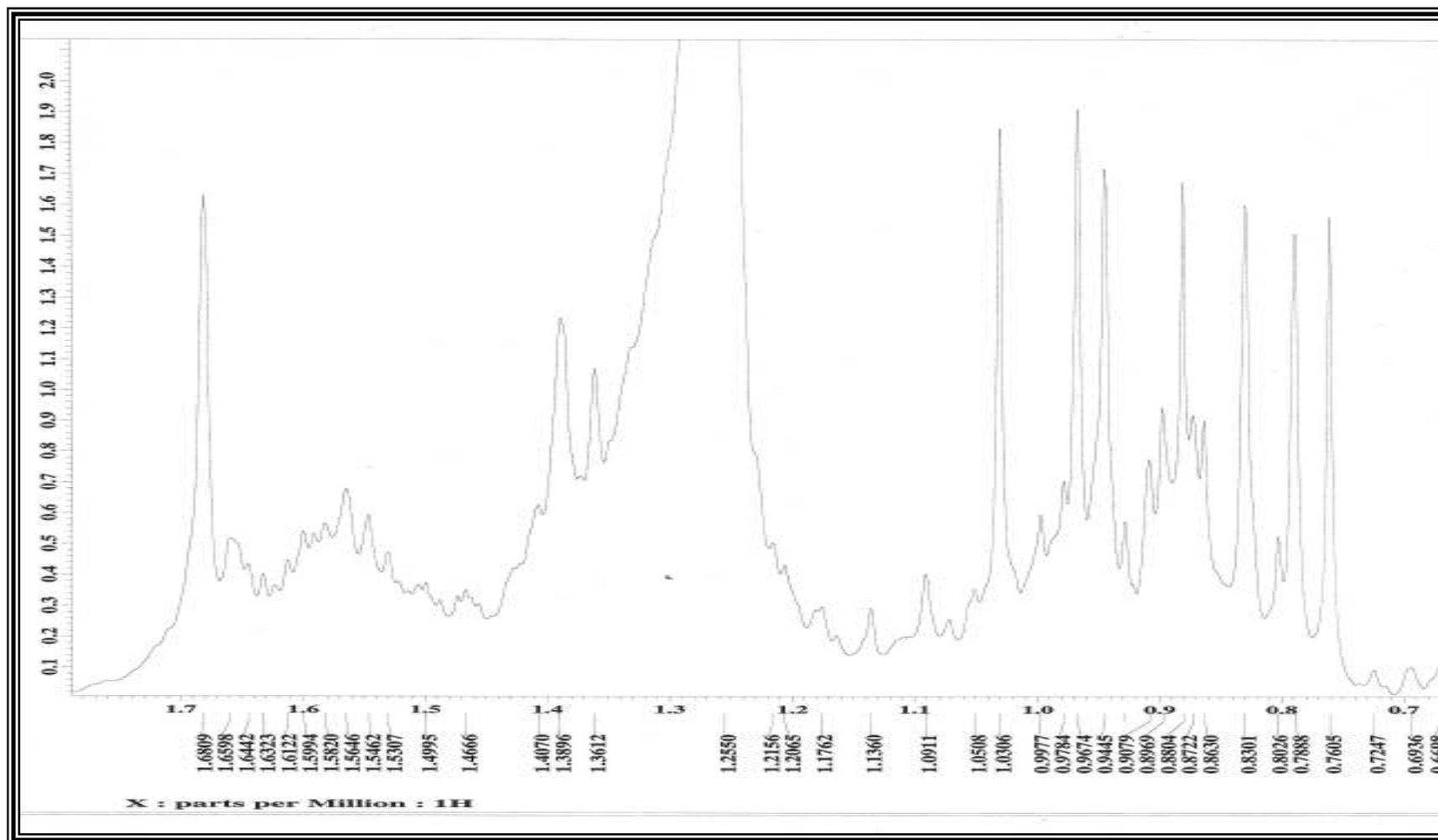


Figura 45 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,66 – 1,7ppm) de PW-04, PW-05 e PW-06

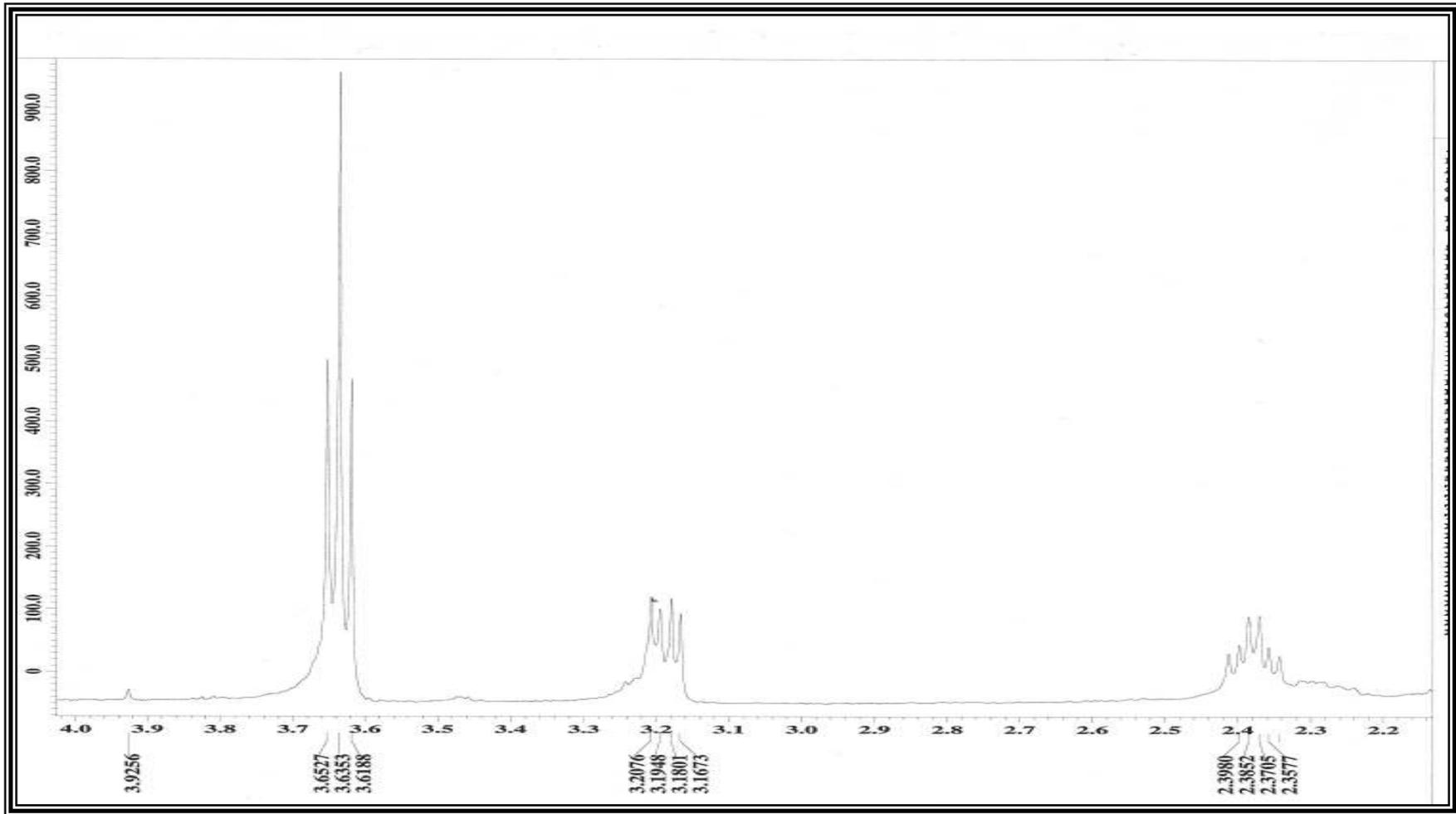


Figura 46 – Espectro de RMN ^1H - HBB (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,2 – 4,0 ppm) de PW-04, PW-05 e PW-06

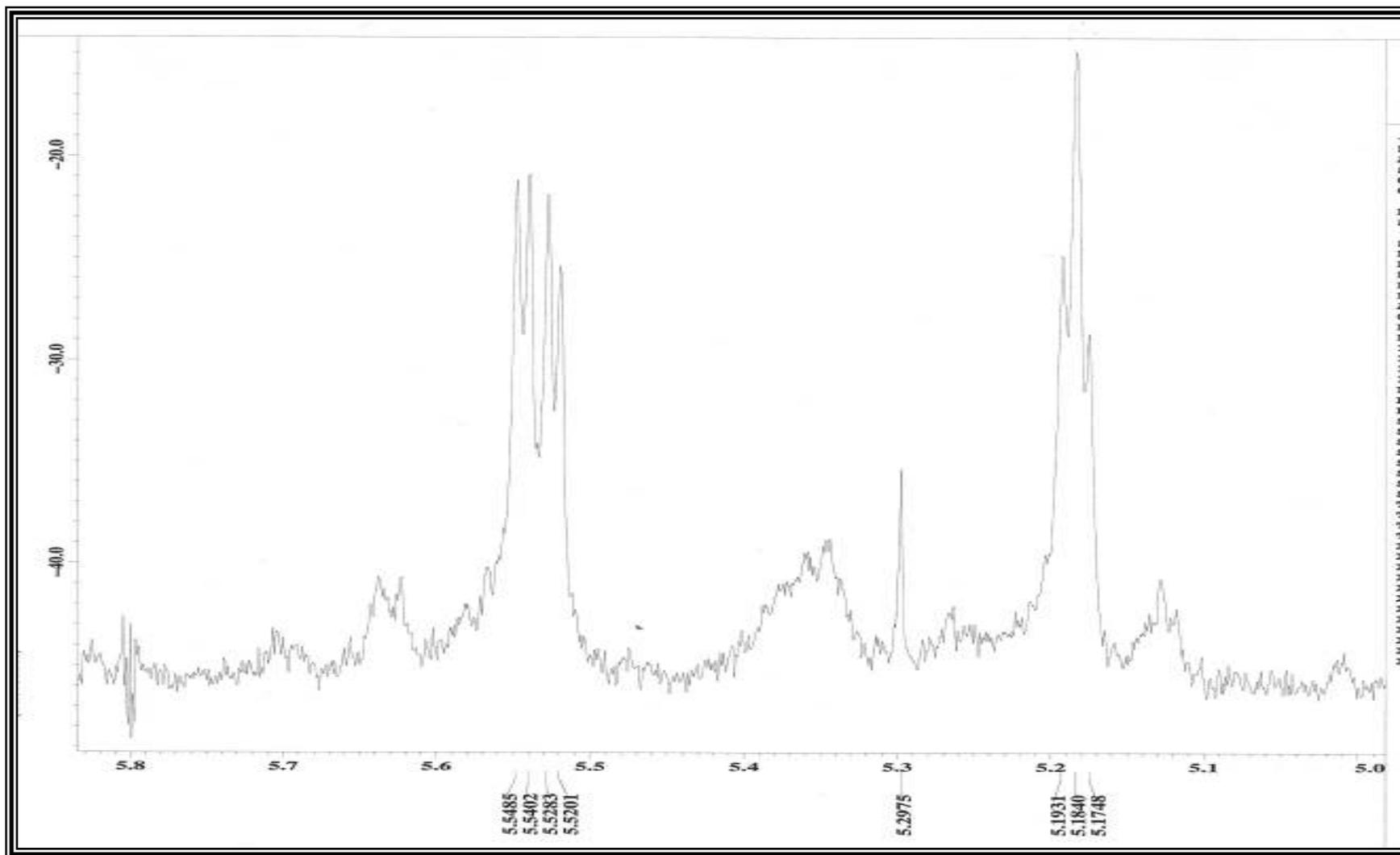


Figura 47 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 5,0 – 5,8ppm) de PW-04, PW-05

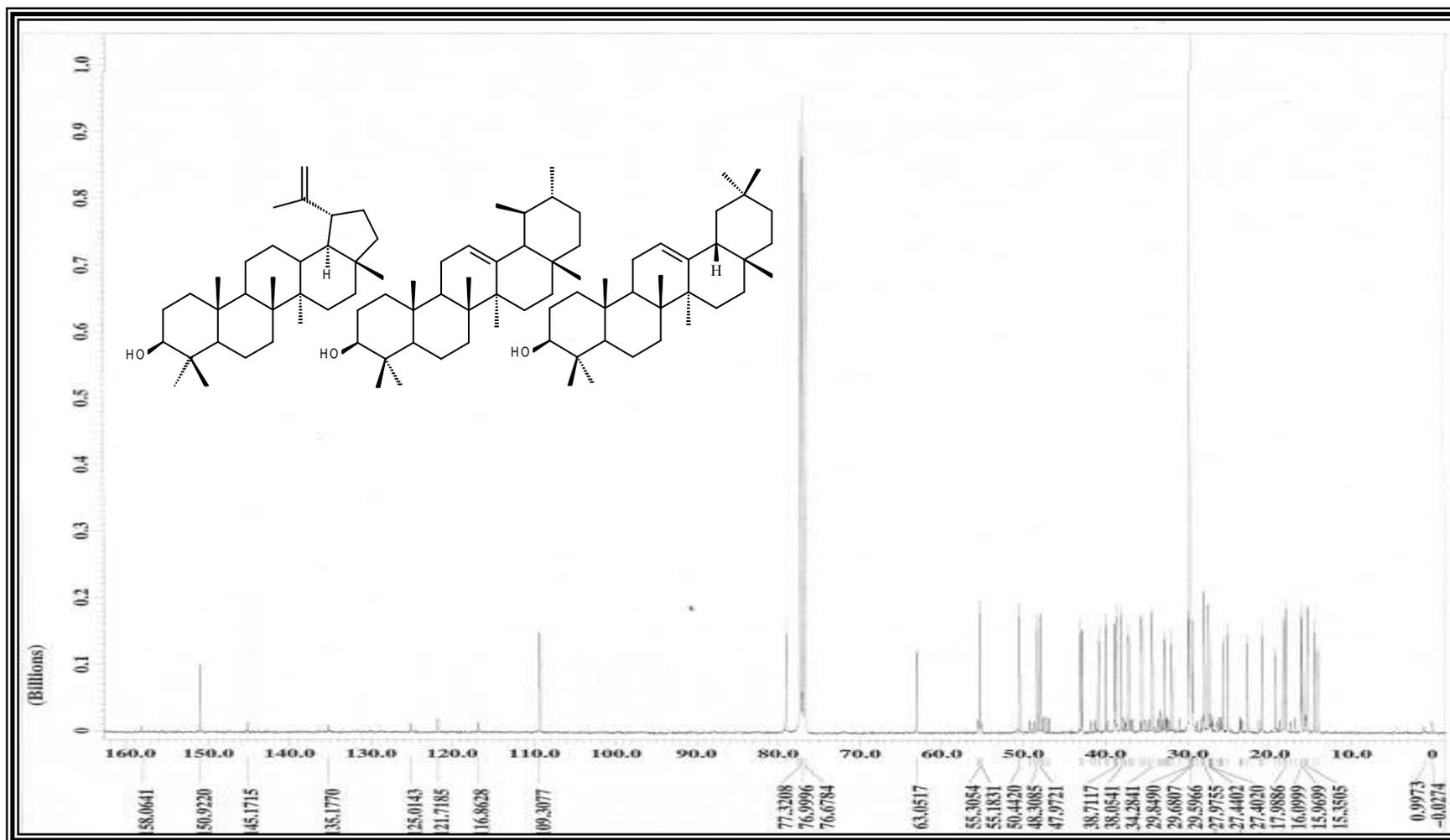


Figura 48 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) de PW-04, PW-05 e PW-06

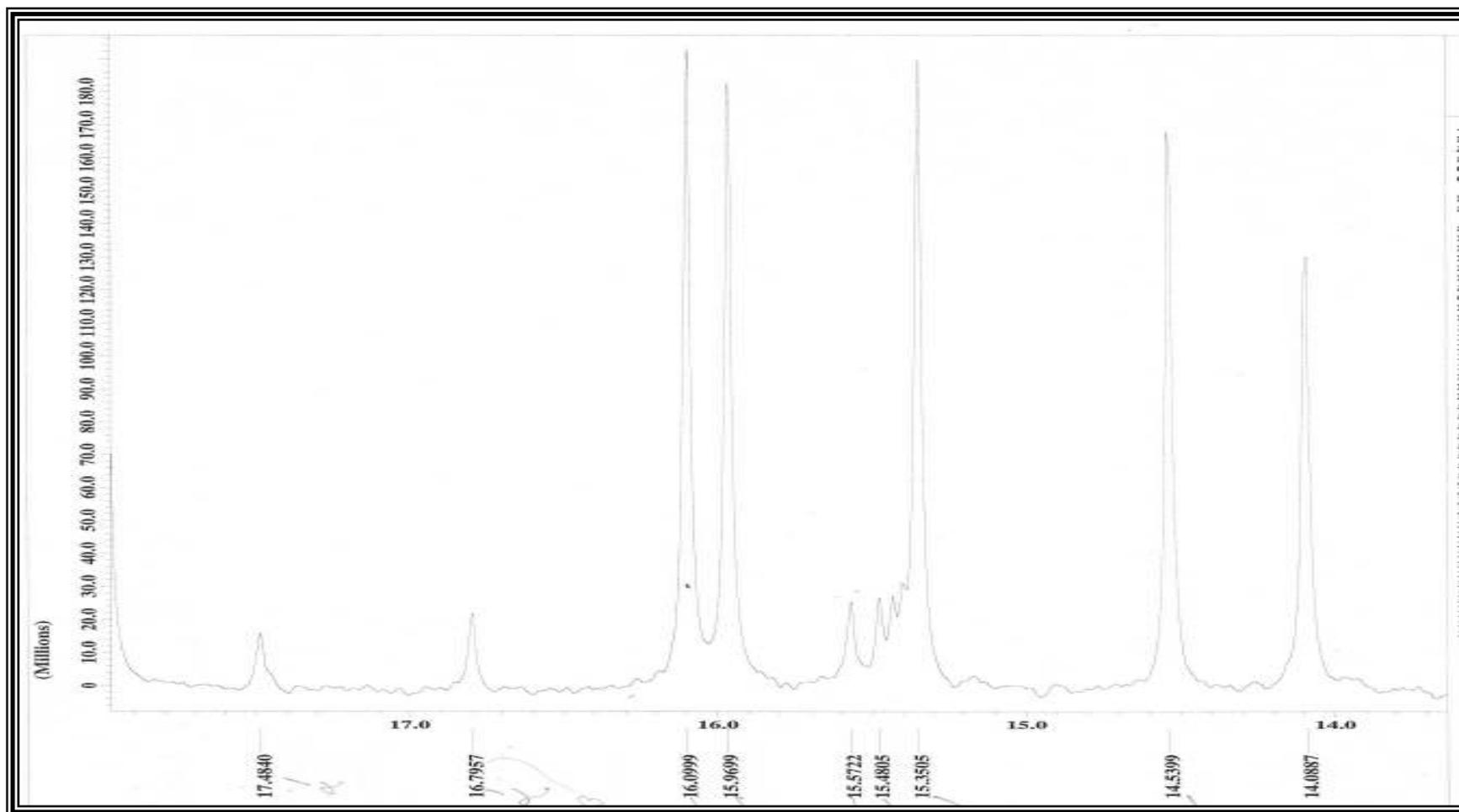


Figura 49 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 14,0 – 17,48ppm) de PW-04, PW-05 e PW-06

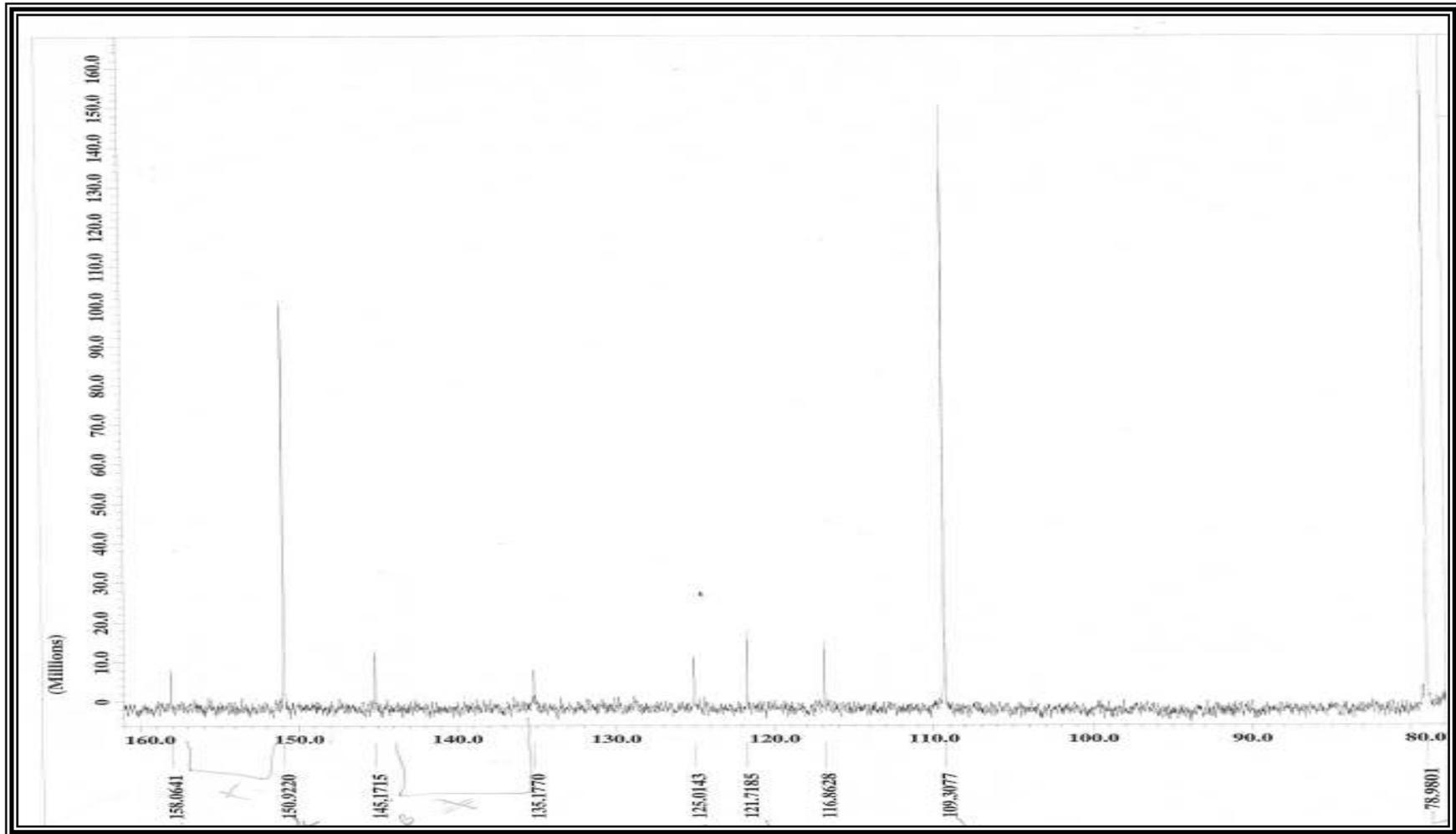


Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 80,0 – 160,0ppm) de PW-04, PW-05 e PW-06

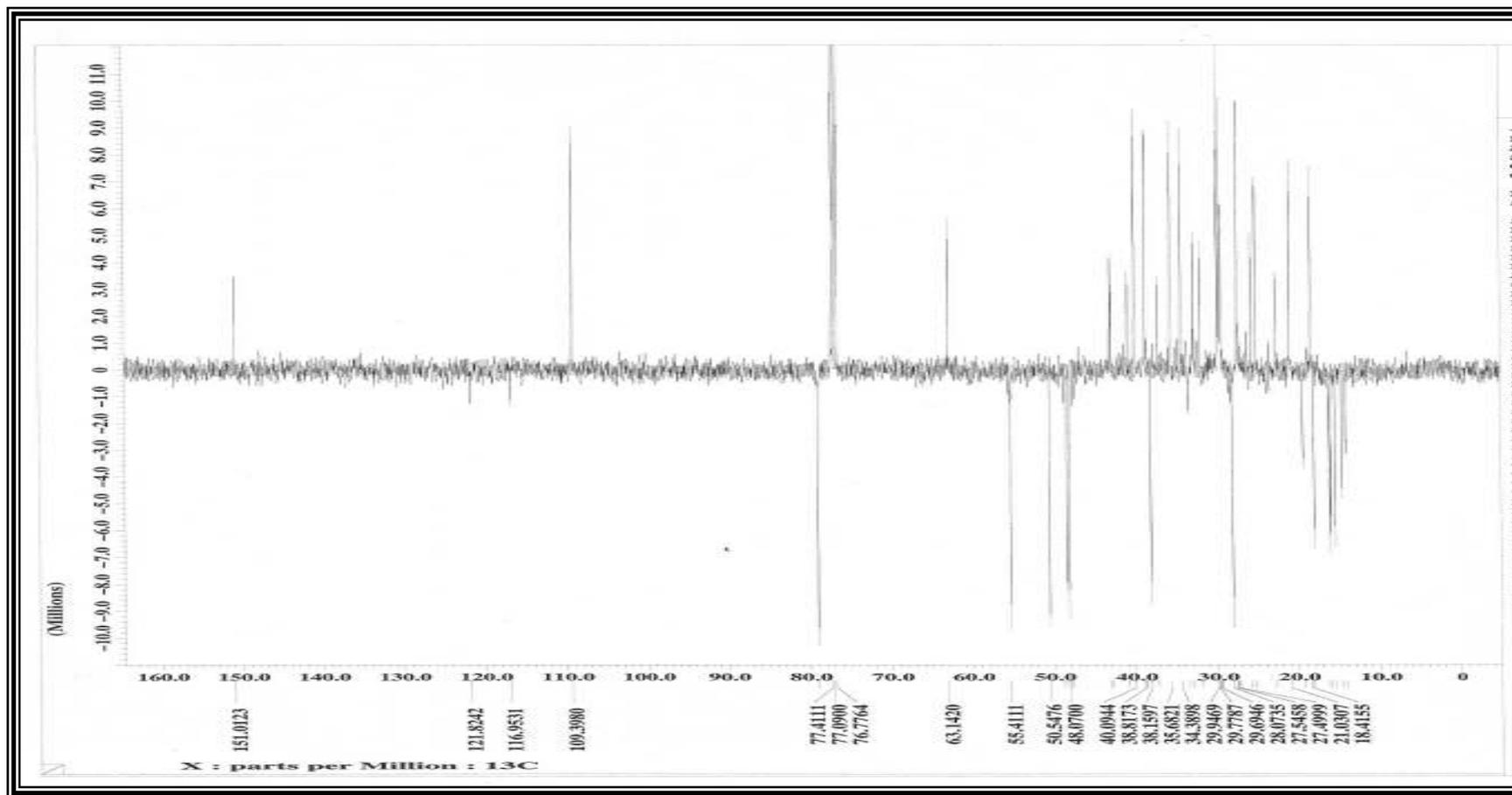


Figura 51 - Espectro de RMN ^{13}C – APT (400 MHz, CDCl_3) (de PW-04, PW-05 e PW-06

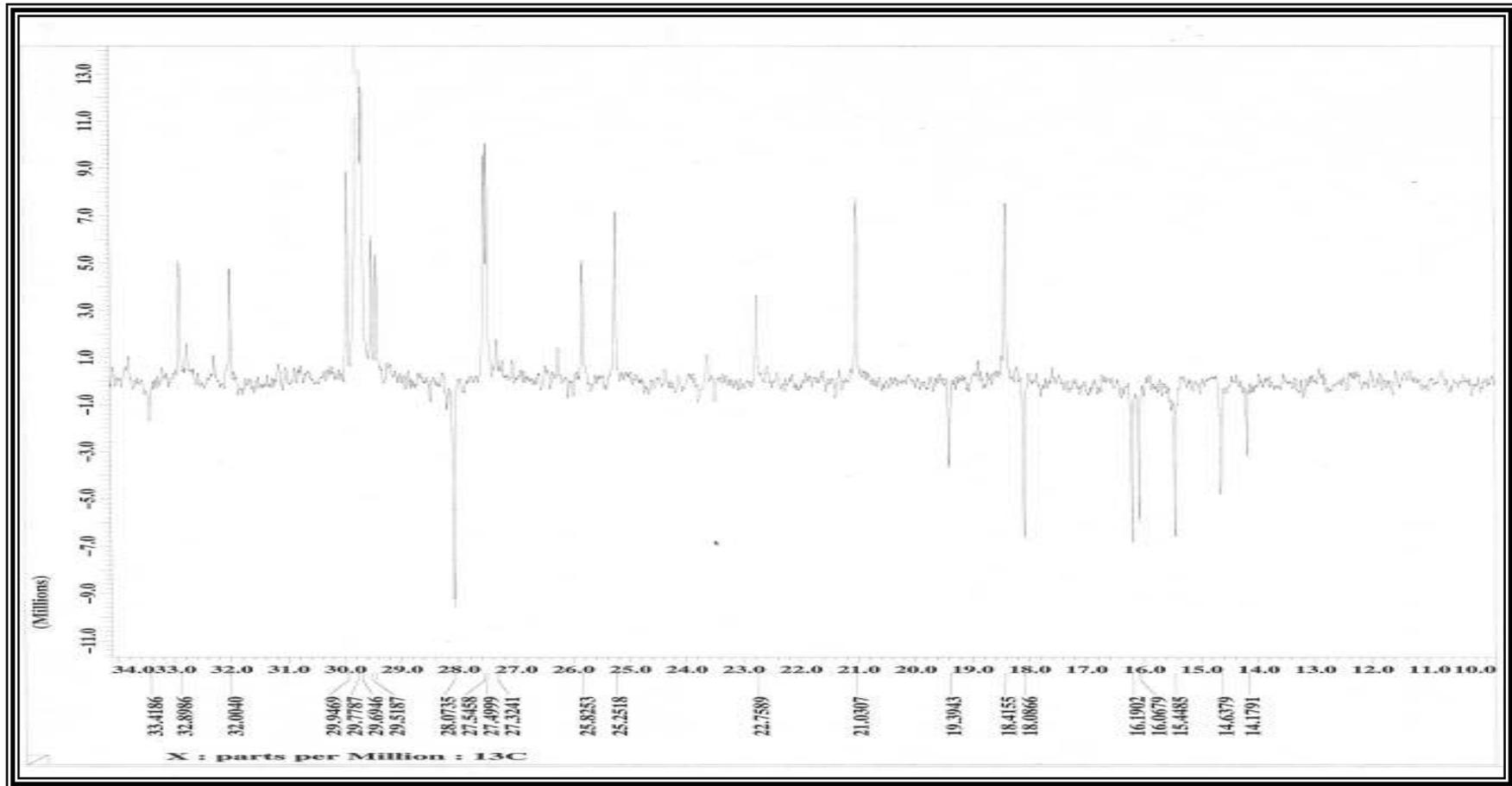


Figura 52 - Espectro de RMN ^{13}C – APT (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 10,0 – 34,0 ppm) de PW-04, PW-05 e PW-06.

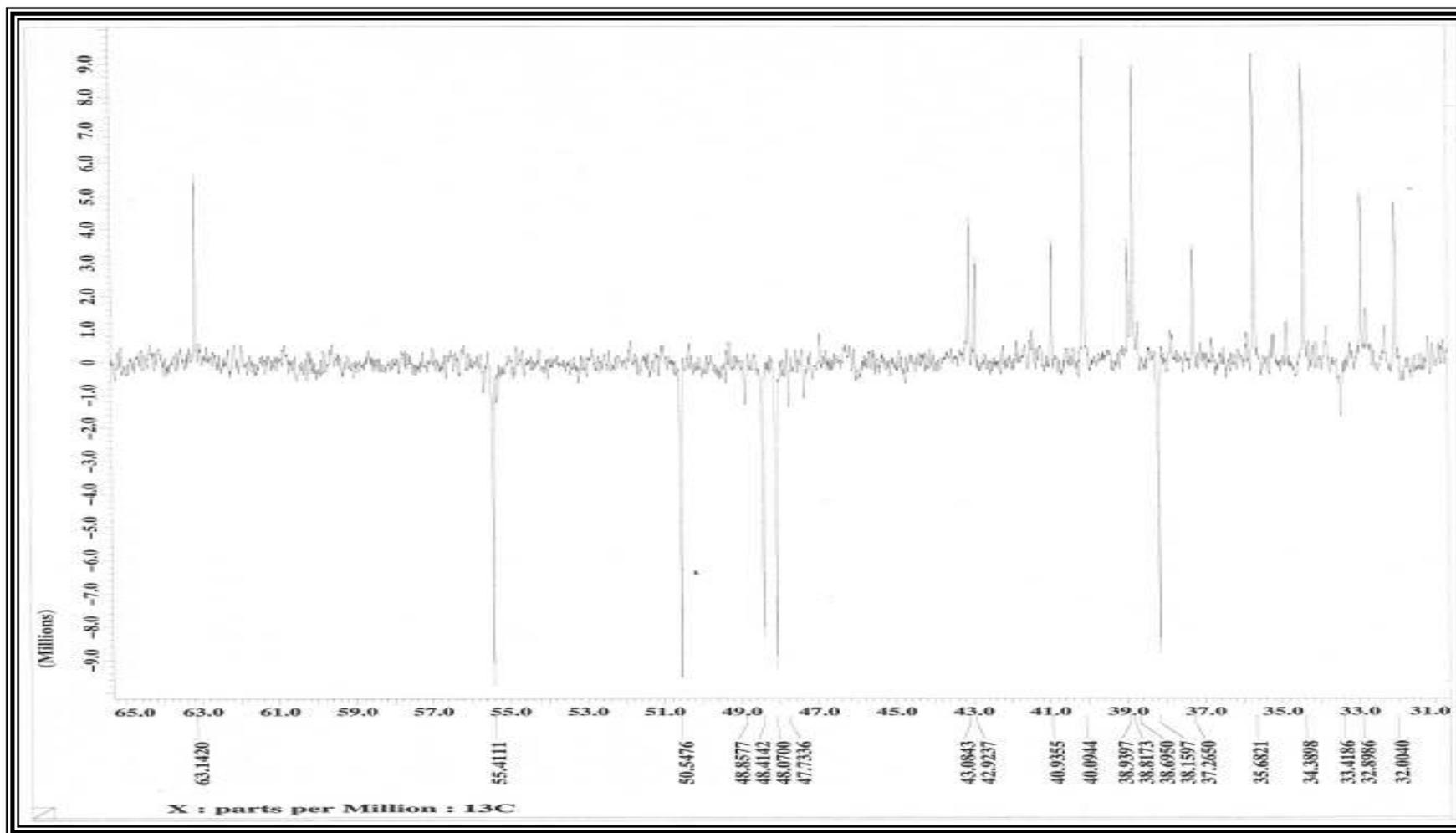


Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C – APT (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 31,0 – 65,0ppm) de PW-04, PW-05 e PW-06

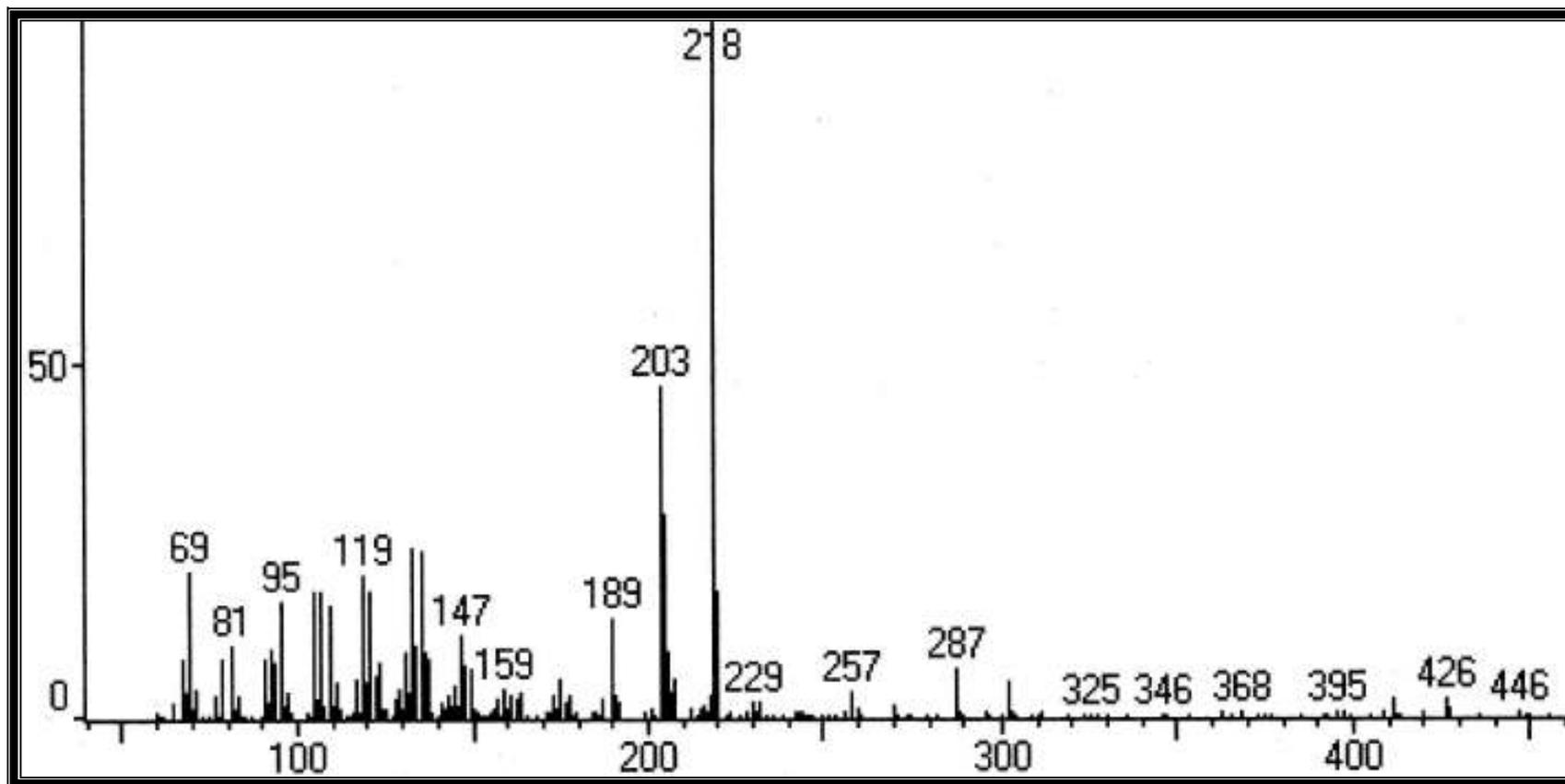


Figura 54 - Espectro de massas de PW-04, PW-05 e PW-06

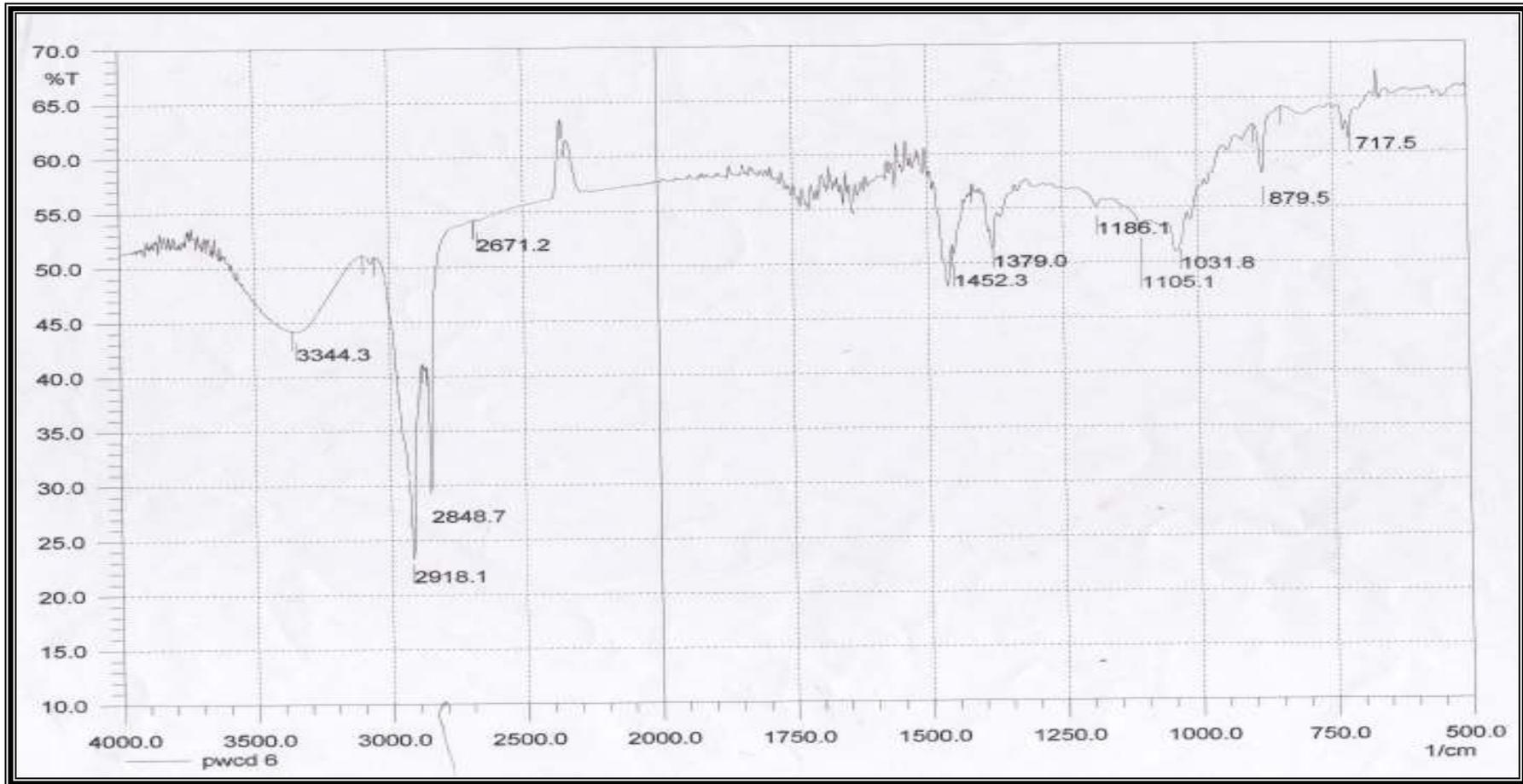
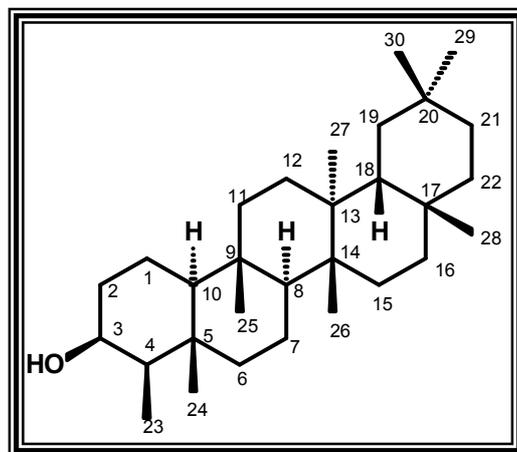


Figura 55 - Espectro de infravermelho de PW-04, PW-05 e PW-06

7.1.7 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA PW-07



A substância **PW-07** foi obtida como sólido cristalino (P.F: 215,1 - 218,9°C) de fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ (cinco insaturações) deduzida por análise comparativa dos espectros RMN ^{13}C APT [seis carbonos quaternários; cinco CH; onze CH_2 e oito CH_3] (Figura 59, p. 135) e espectro de massas [m/z 426 (M^+)] (Figura 60, p. 136).

O espectro de RMN 1H de **PW-07** (Figura 58, p. 134) apresentou oito sinais simples δ_H (0,72-1,04) referente aos oito grupos metilas, um sinal em δ_H (3,64) e um dubleto largo em δ_H (3,73) referente ao H-3.

A localização do grupo hidroxila em C-3 foi definida a partir de dados biogênicos e comparação com dados da literatura (Dewick *et al*, 1997). Os deslocamentos químicos dos carbonos adjacentes C-2, C-1 e C-4 e a metila C-23 foram atribuídos levando-se em consideração o efeito do grupo hidroxila no carbono o qual está ligado e aos carbonos (α , β e γ) e o efeito γ -gauche discutido anteriormente na seção 7.1.4.

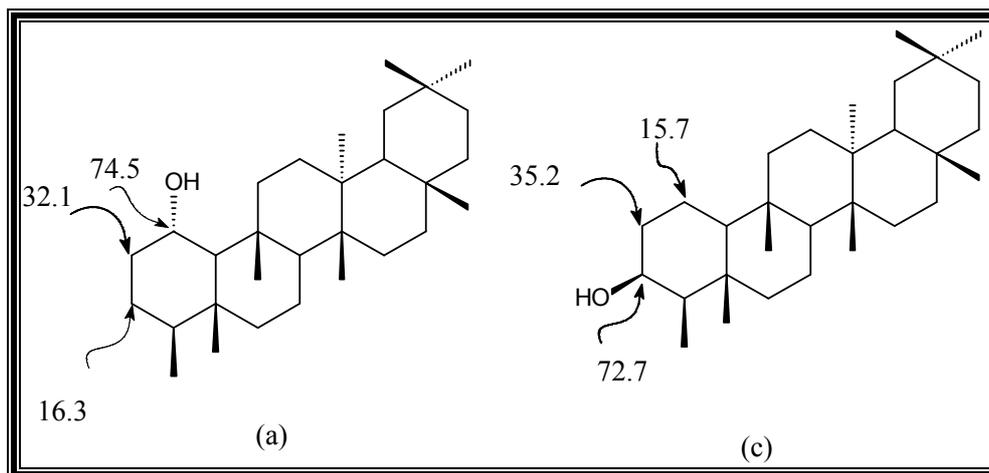


Figura 56 - Friedelina (a), epifriedelanol (c)

Além destes efeitos podemos citar as interações do tipo 1,3-*sin*-diaxiais existentes na molécula que influenciam o deslocamento químico dos carbonos envolvidos, pois tendem a desprotegê-los. Esse efeito pode ser observado nas metilas C-24 δ_C (16,38) e C-25 δ_C (18,20); C-25 δ_C (18,20) e 26 δ_C (18,64) (Garcez *et al.*, 1981).

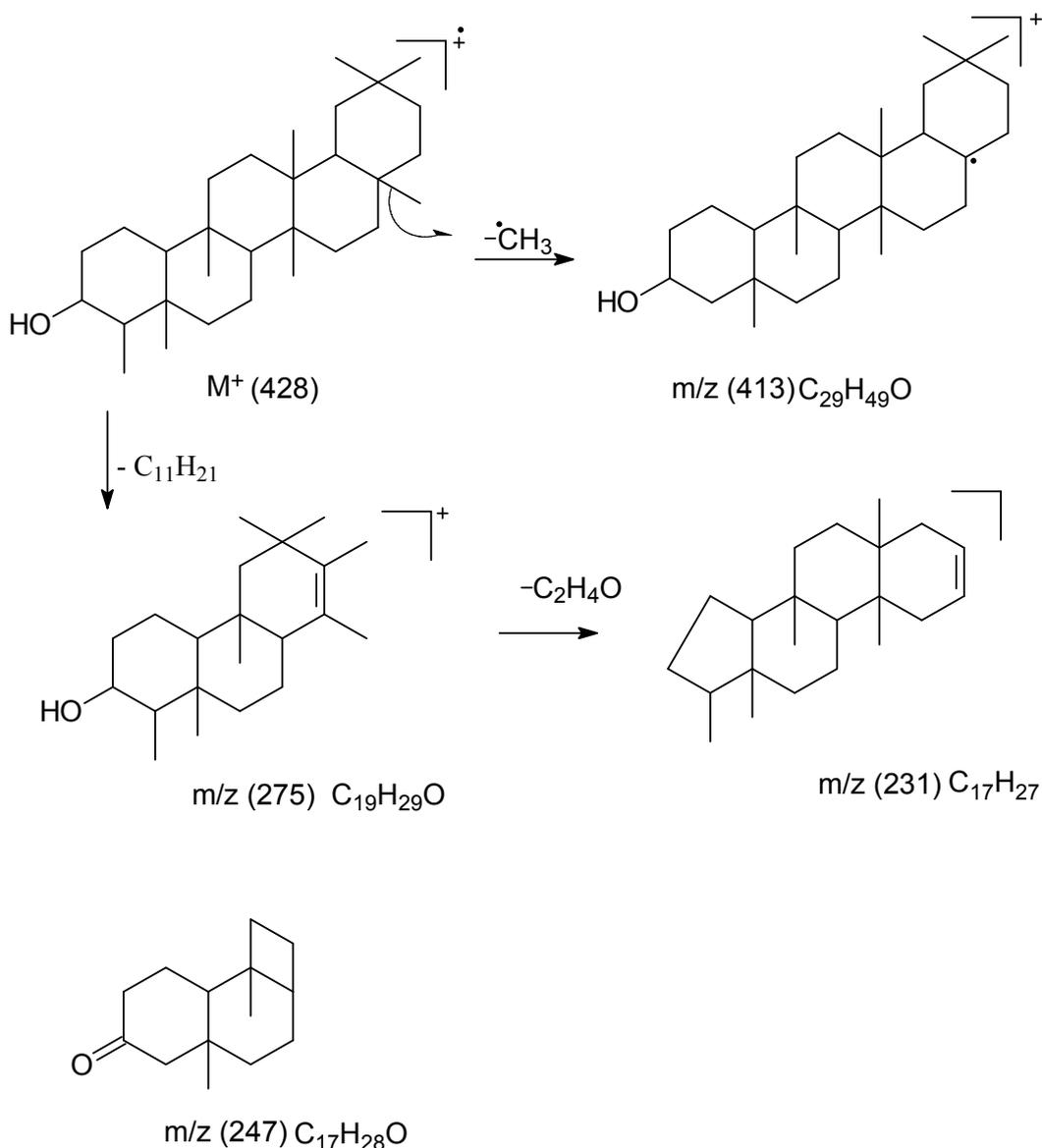
Aqui se observa também a conformação bote dos anéis D e E responsável pelo alto deslocamento químico observado para C-8 δ_C (53,17) (Steskind *et al.*, 1995). A Tabela 13 resume os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o triterpeno **PW-07**.

Tabela 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-07**, comparados com dados da literatura para ao Epifriedelanol (Kundu *et al.*, 2000)^e

	PW-07	Epifriedelanol	PW-07	Epifriedelanol
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
5	--	--	37,82	37,10
9	--	--	36,06	38,40
13	--	--	39,26	37,80
14	--	--	38,94	39,70
17	--	--	30,34	30,00
20	--	--	28,16	28,20
H				
3	3,73	3,73 (1H, <i>dl</i> , $J = 3,0$ Hz, H-3)	72,75	72,80
4	1,23	1,22 (1H, <i>m</i> , H-4)	49,15	49,20
8	1,26	1,25 (2H, <i>m</i> , H-8)	53,17	53,20
10	0,86	0,86 (1H, <i>m</i> , H-10)	61,32	61,40
18	1,50	1,50(1H, <i>m</i> , H-18)	42,80	42,80
CH₂				
1	1,41	1,41 (1H, <i>m</i> , H-1b)	15,77	15,80
2	1,86	1,86 (1H, <i>dt</i> , $J = 9,5; 3,0$ Hz, H-2a) 1,56 (1H, <i>m</i> , H-2b)	35,17	35,20
6	1,69 0,96	1,69 (1H, <i>m</i> , H-6a) 0,96 (1H, <i>m</i> , H-6b)	41,70	41,70
7	1,36	1,36 (2H, <i>m</i> , H ₂ -7)	17,53	17,60
11	1,34	1,34 (1H, <i>m</i> , H-11a)	35,33	35,30
12	1,29	1,28 (2H, <i>m</i> , 12)	30,62	30,60
15	1,27	1,27 (1H, <i>m</i> , H-15B)	32,38	32,30
16	1,51	1,52 (2H, <i>m</i> , H-1a, H-16a) 1,31 (1H, <i>m</i> , H-16b)	36,06	36,10
19	1,33	1,42 (1H, <i>m</i> , H-19a) 1,11 (1H, <i>m</i> , H-19b)	35,54	35,60
21	1,41 1,14	1,45(1H, <i>m</i> , H-21a) 1,25 (2H, <i>m</i> , H-8)	32,79	32,80
22	1,46	1,46 (2H, <i>m</i> , H-15a, H-22a)	39,26	39,27
CH₃				
23	0,91	0,91 (3H, <i>d</i> , $J = 7,0$ Hz, H-23)	11,61	11,40
24	0,93	0,93 (3H, <i>s</i> , H-24)	16,38	16,40
25	0,85	0,83 (3H, <i>s</i> , H-25)	18,20	18,20
26	0,99	0,98 (3H, <i>s</i> , H-26)	18,64	18,60
27	0,95	0,95(3H, <i>s</i> , H-27)	20,13	20,10
28	0,96	0,97N (3H, <i>s</i> , H-28)	31,78	31,80
29	0,92	0,92 (3H, <i>s</i> , H-29)	35,06	35,00
30	1,17	1,14 (3H, <i>s</i> , H-30)	31,78	32,10

^eRMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente; CDCl_3)

Através da análise do espectro de massas obtido por espectrometria de massas foi possível identificar o pico do íon molecular em $m/z= 428$ e alguns fragmentos característicos como: $m/z= 413$, $m/z= 275$, $m/z= 257$, $m/z= 191$, $m/z= 95$, $m/z= 69$ e $m/z= 55$ de acordo com a fórmula molecular $C_{30}H_{52}O$. Esses dados em conjunto com os de RMN confirmam a estrutura do epifriedelanol para o triterpeno **PW-07**



Esquema 18 – Proposta de alguns fragmentos massas para PW-07

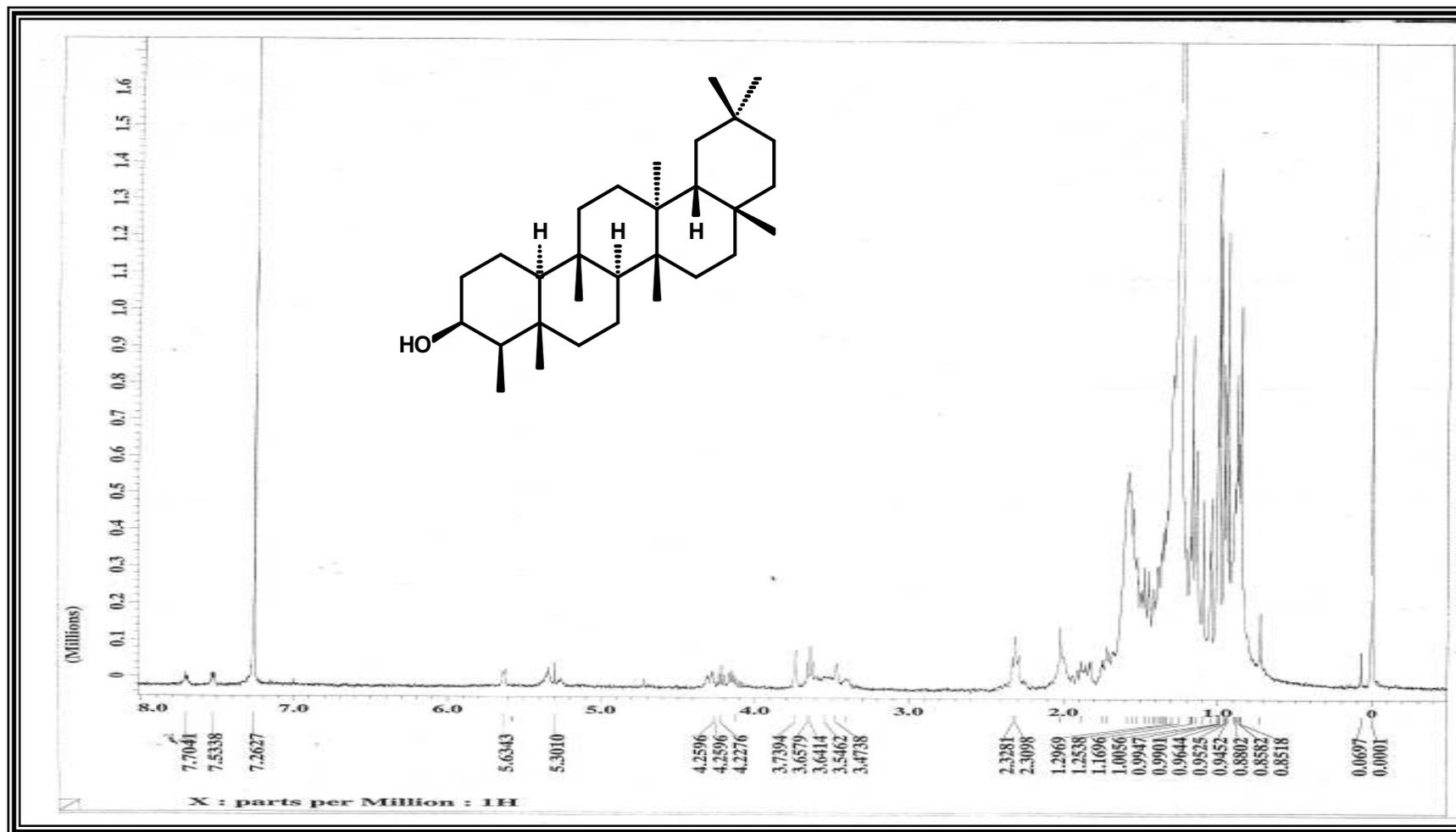


Figura 57 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-07

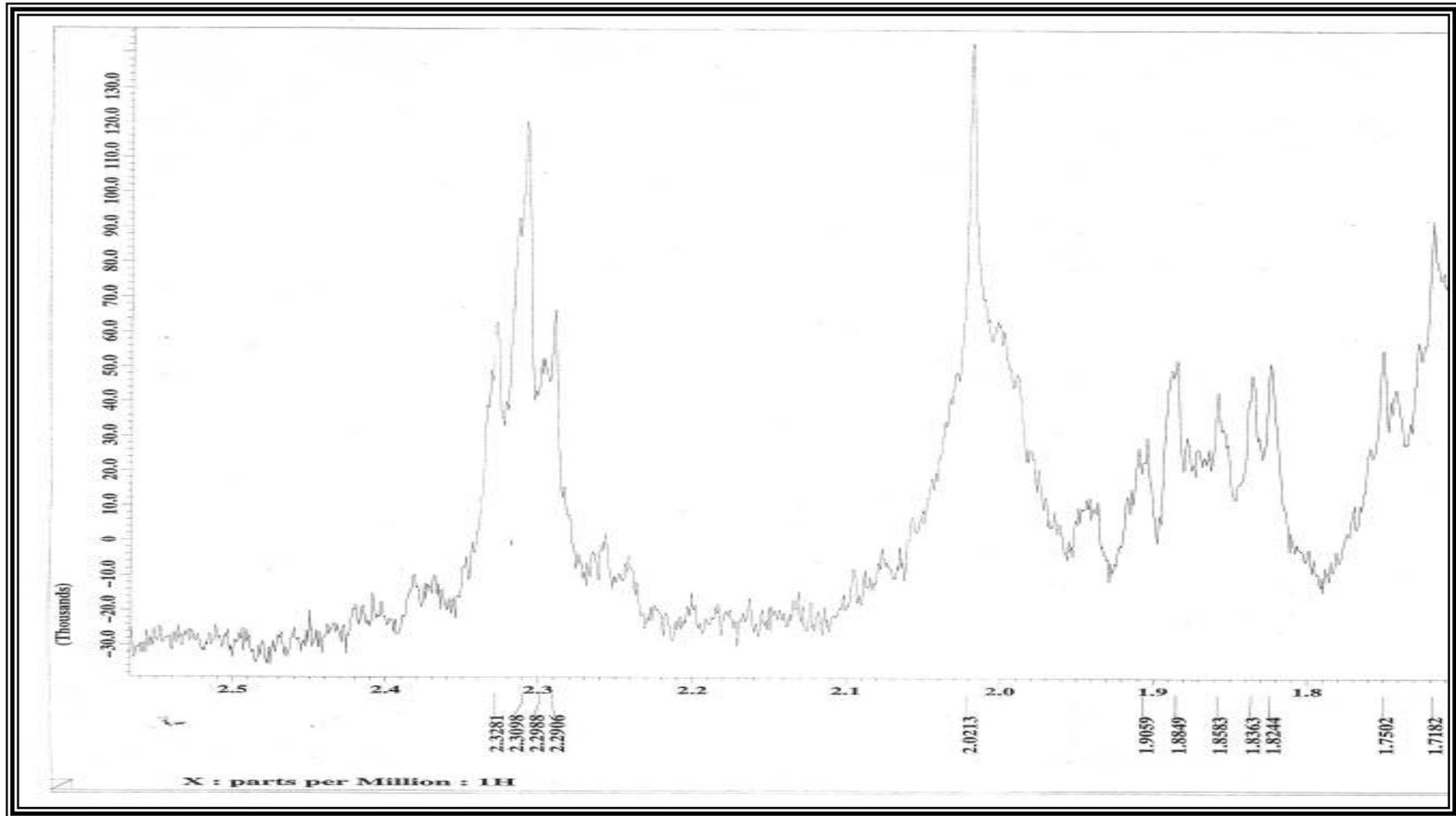


Figura 58 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,7 – 2,5ppm) de PW-07

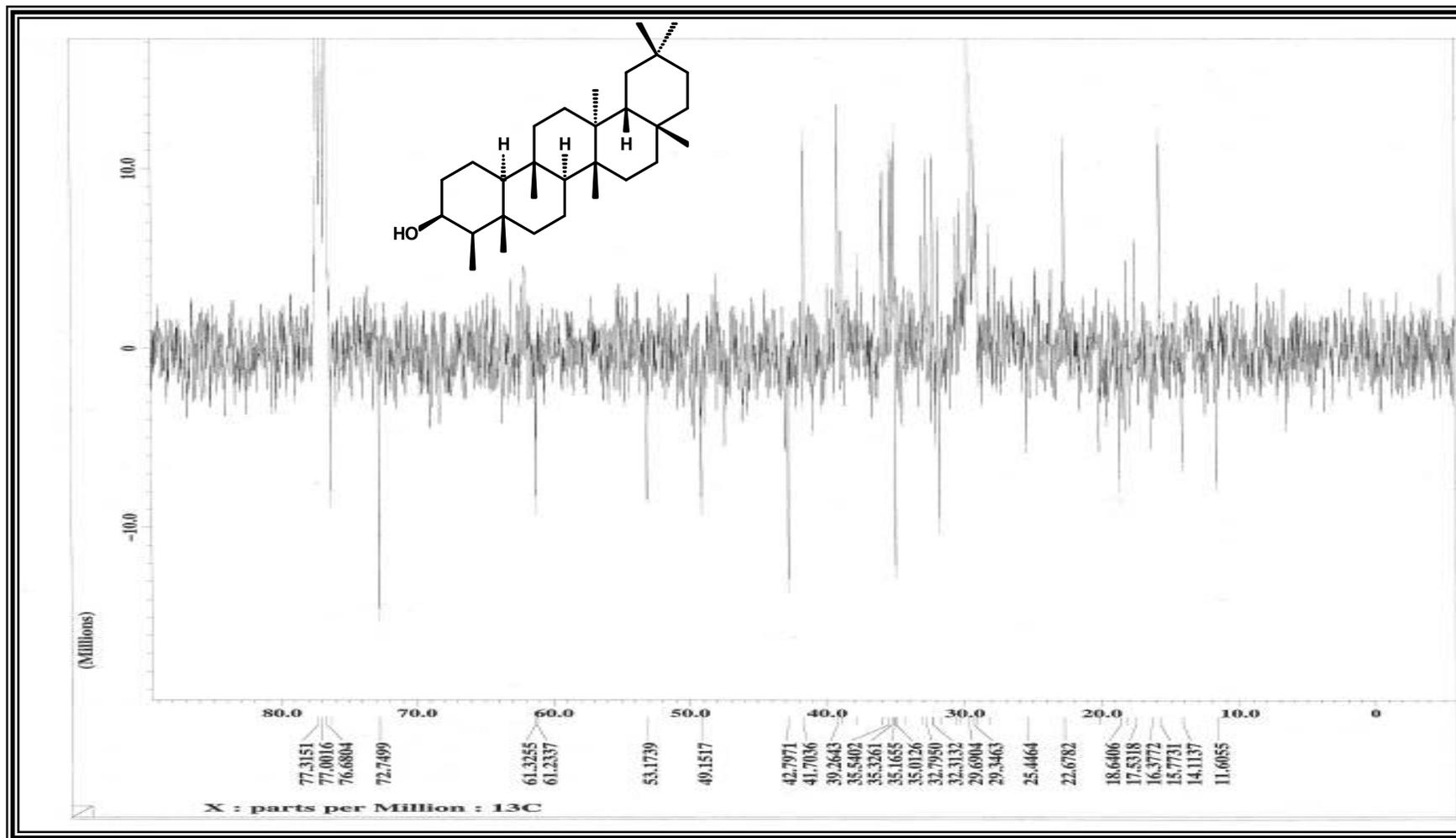


Figura 59 – Espectro de RMN ^{13}C - APT(100 MHz, CDCl_3) de PW-07

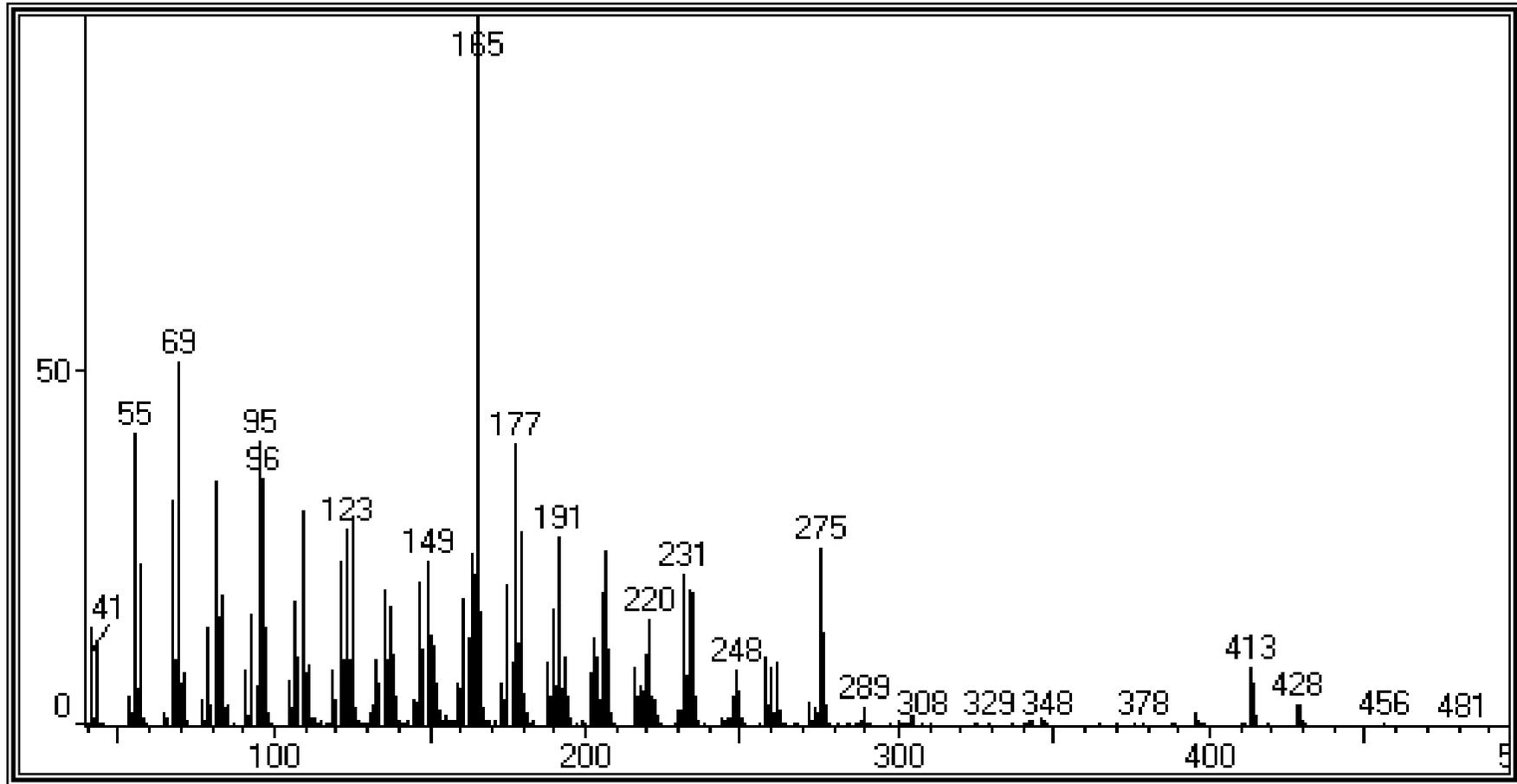
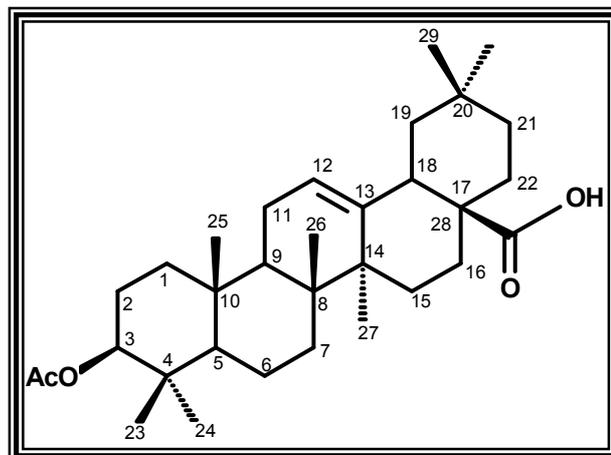


Figura 60 – Espectro de massas de PW-07

7.1.8 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA PW-08



O triterpeno **PW-08** foi obtido na forma de um sólido branco (PF= 119,9 -126,4°C) cuja fórmula molecular $C_{32}H_{50}O_4$ (oito insaturações) foi deduzida por análise dos espectros de RMN 1H , RMN ^{13}C APT e espectro de massas (M^+) 498.

Através da análise do espectro de RMN ^{13}C APT (Figura 64, p. 142) foi possível observar nove carbonos não hidrogenados incluindo três sp^2 [δ_C 182,04 (C-28) e δ_C 169,94 (OAc)]; cinco CH; dez CH_2 e oito CH_3 que devido ao número de insaturações (oito) e presença de sinais de dupla ligação no espectro de RMN ^{13}C (143,56) e δ_C (122,56) permitiu estabelecer para a substância a estrutura do triterpeno pentacíclico (Dewick, 1997).

O espectro de RMN 1H de **PW-08** (Figura 62, p. 140) mostrou sinais simples entre δ_C (0,76 - 1,25) referentes aos hidrogênios metílicos, e um sinal em δ_H (2,04) referente aos hidrogênios metílicos do grupo (OAc), um duplo sinal duplo em δ_H (4,5; J= 11,7 e 1,44 Hz) referente a H-3 e um sinal simples largo em δ_H (5,28) referente ao hidrogênio vinílico H-12.

Pela interpretação dos espectros de RMN ^{13}C (APT), observou-se também que C-3 apresenta δ_C (80,97) devido a presença do grupo (OAc) o que o torna mais desprotegido cerca de 2,97 ppm quando comparado ao ácido oleanóico (Figura 61, p. 138) δ_C (78,0) (Ahmad e Rahman, 1994). Também foram observados dois sinais relativos a carbono sp^2 em δ_C (122,57 e 143,56) correspondentes aos carbonos C-12 e C-13 respectivamente, o que corrobora classificá-lo na série dos oleananos.

Observa-se ainda a presença dos sinais δ_C (45,82) correspondente a C-19 da substância **PW-08** em δ_C (182,04 e 169,94) correspondentes a grupos carbonila de ácido e de éster respectivamente. Através do espectro de infravermelho (Figura 68, p. 146) uma vez que se verificou uma banda larga de 3300 - 3500 cm^{-1} característica de OH; em 2923 - 2852 cm^{-1} ; deformação axial referente ao grupo CH_2 ; 1689 cm^{-1} deformação axial de C=O referente a ácido carboxílico; em 1732 cm^{-1} a deformação axial da carbonila de éster; 1463 cm^{-1} deformação angular simétrica no plano de CH_2 ; em 1377 cm^{-1} a deformação angular no plano de OH; 1300 - 1000 cm^{-1} deformação axial de CO de éster; observa-se por fim em 985,6 cm^{-1} a deformação angular fora do plano de OH (Silverstein *et al.*, 1963).

O conjunto de dados obtidos pela análise dos espectros de RMN, IV e massas juntamente aos dados comparados na literatura (Hichri *et al.*, 2003), possibilitou atribuir a **PW-08** a estrutura do acetato do ácido oleanóico. Os sinais observados nos espectros de RMN estão listados na Tabela 14.

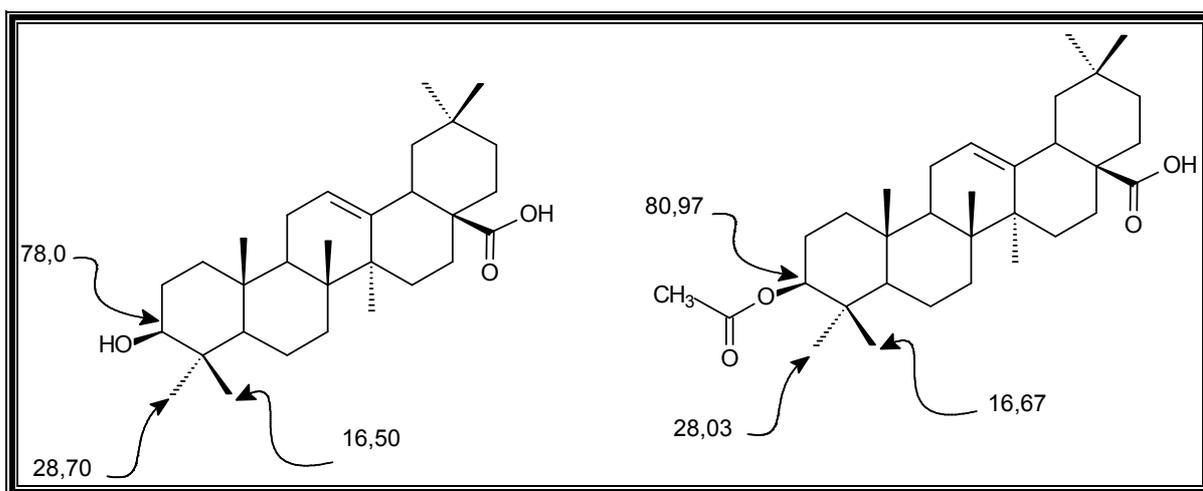


Figura 61 - Ácido oleanóico e PW-08

Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-08**, comparados com dados da literatura para o acetato do ácido oleanóico (Hichri et al., 2003)^f

	PW-08	Acetato do ácido oleanóico	PW-08	Acetato do ácido oleanóico
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C				
4	--	--	37,78	39,00
8	--	--	39,27	--
10	--	--	37,04	37,70
13	--	--	143,56	143,60
14	--	--	41,62	41,50
17	--	--	46,49	46,60
20	--	--	30,66	30,70
28	--	--	182,03	178,6
H				
3	--	4,42 (1H, <i>m</i> , H-3)	80,92	80,90
5	--	--	55,29	55,30
9	--	--	47,53	48,00
12	--	5,19 (1H, <i>m</i> , H-12)	122,56	122,50
18	--	2,78 (1H, <i>m</i> , H-18)	41,06	--
CH₂				
1	--	--	38,13	38,00
2	--	--	27,65	27,70
6	--	--	18,27	18,10
7	--	--	33,79	32,80
11	--	--	23,49	24,00
15	--	--	27,65	28,00
16	--	--	22,97	23,40
19	--	--	45,82	--
21	--	--	33,78	33,80
22	--	--	32,40	--
CH₃				
23	0,88	0,88 (3H, <i>s</i> , C-23)	28,03	29,70
24	0,87	0,87 (3H, <i>s</i> , C-23)	16,67	16,70
25	1,05	1,05 (3H, <i>s</i> , C-25)	15,38	15,50
26	0,85	0,67 (3H, <i>s</i> , C-26)	17,03	17,20
27	1,17	1,18 (3H, <i>s</i> , C-27)	25,86	-
29	0,72	0,79 (3H, <i>s</i> , C-29)	33,04	33,10
30	1,00	1,00 (3H, <i>s</i> , C-30)	23,52	23,60

^f RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente; CDCl_3)

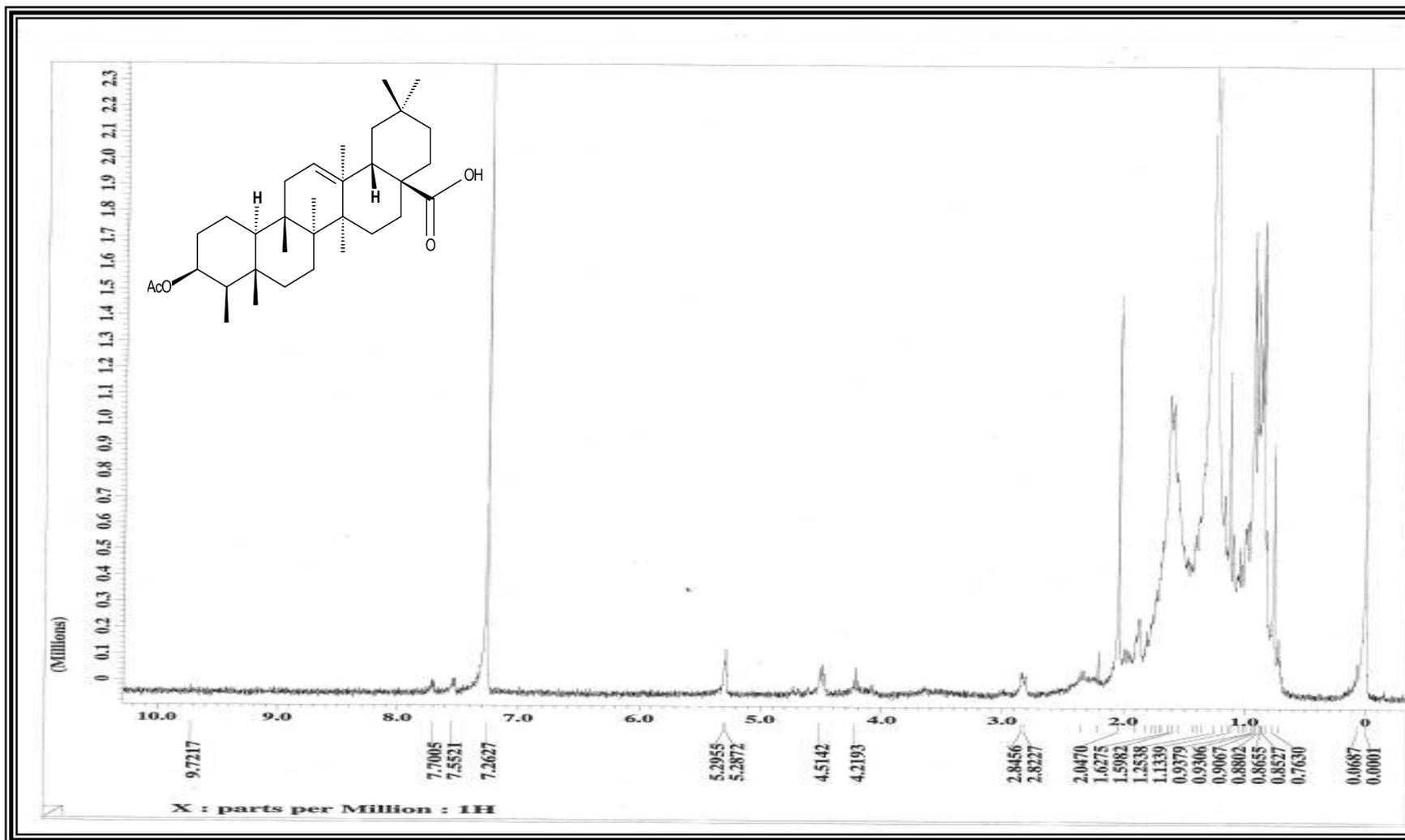


Figura 62 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW-08

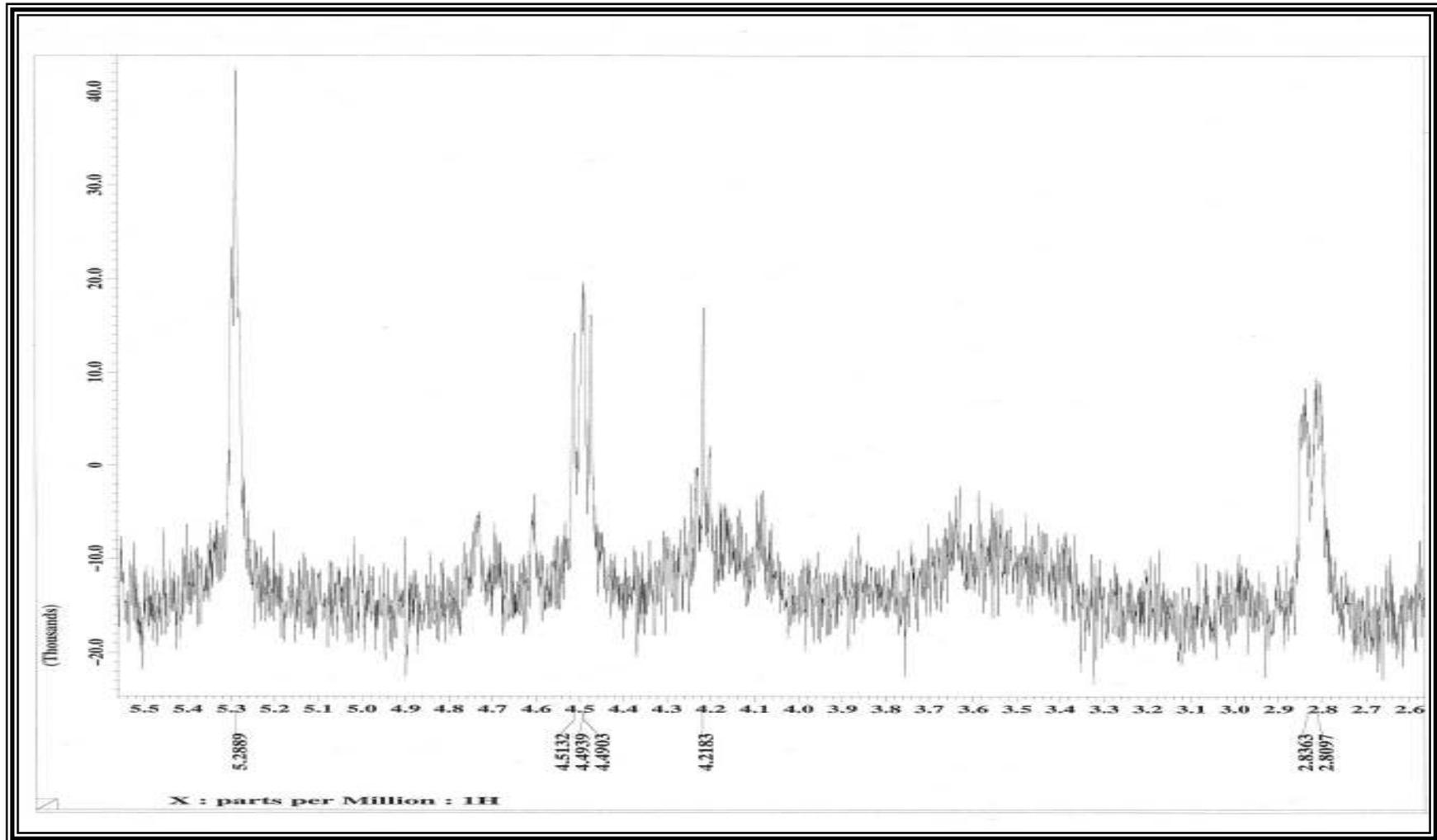


Figura 63 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 2,6 – 5,2ppm) de PW-08

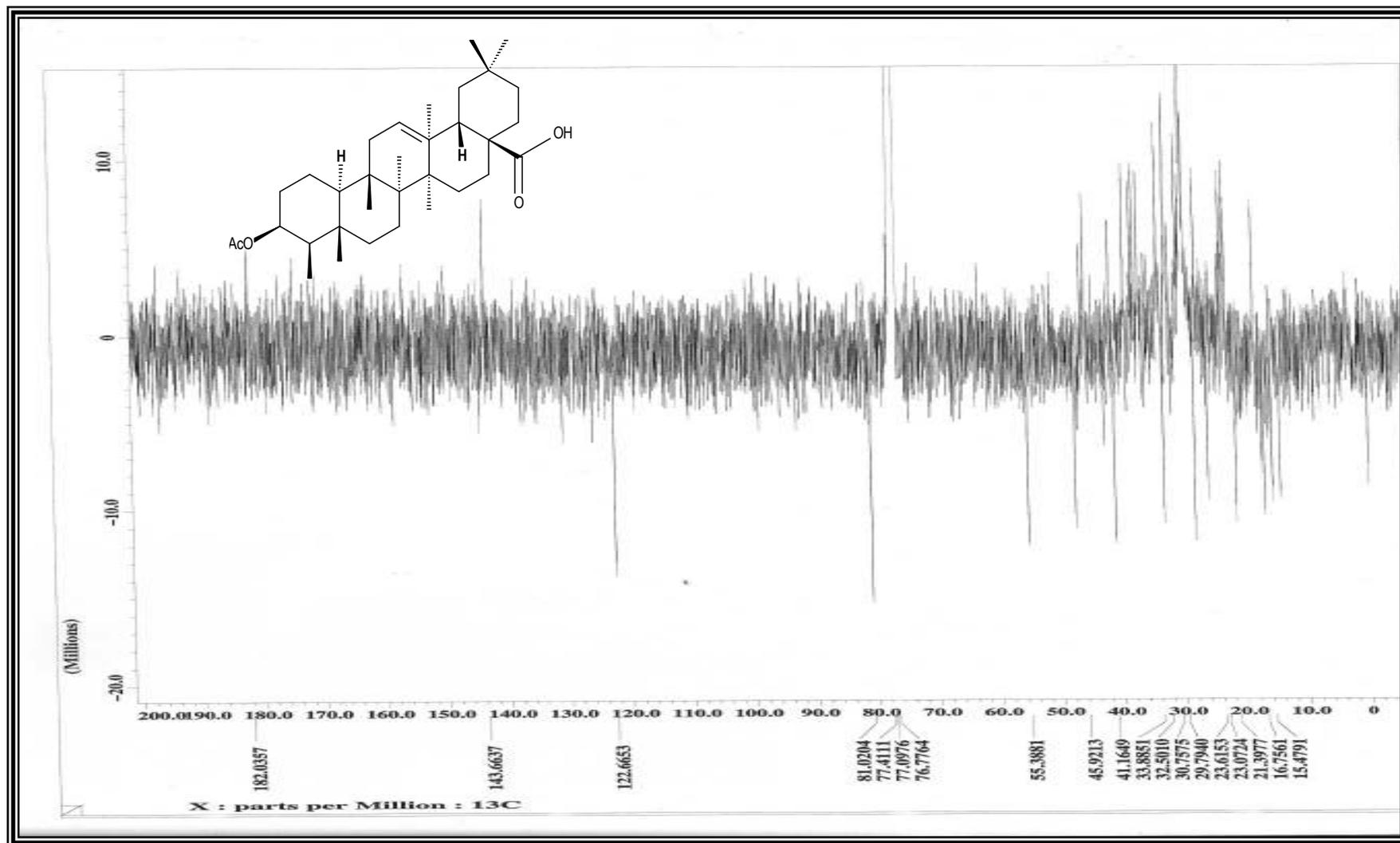


Figura 64 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 MHz, CDCl_3) de PW-08

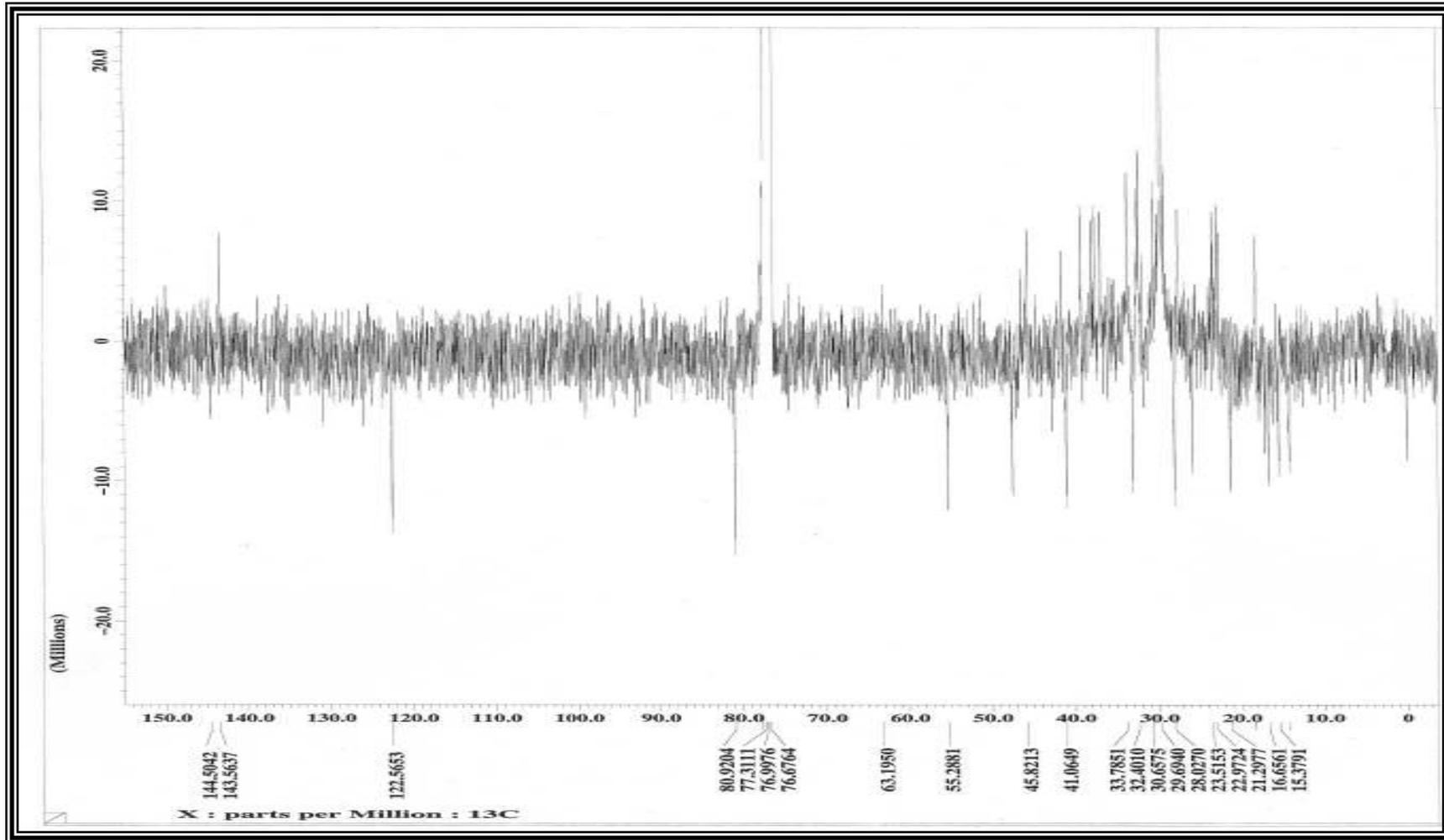


Figura 65 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,0 - 150,0ppm) de PW-08

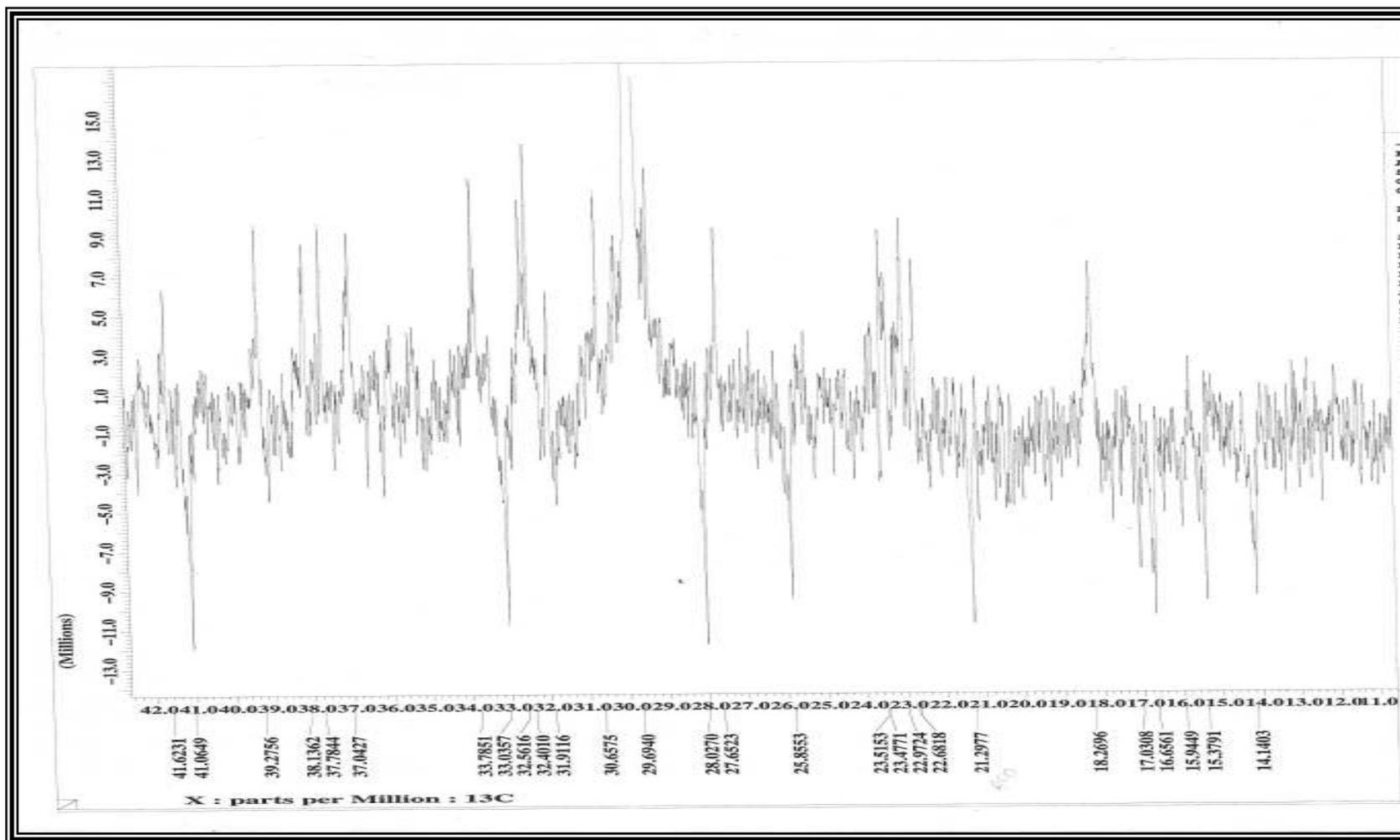


Figura 66 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 11,0 - 42,0ppm) de PW-08.

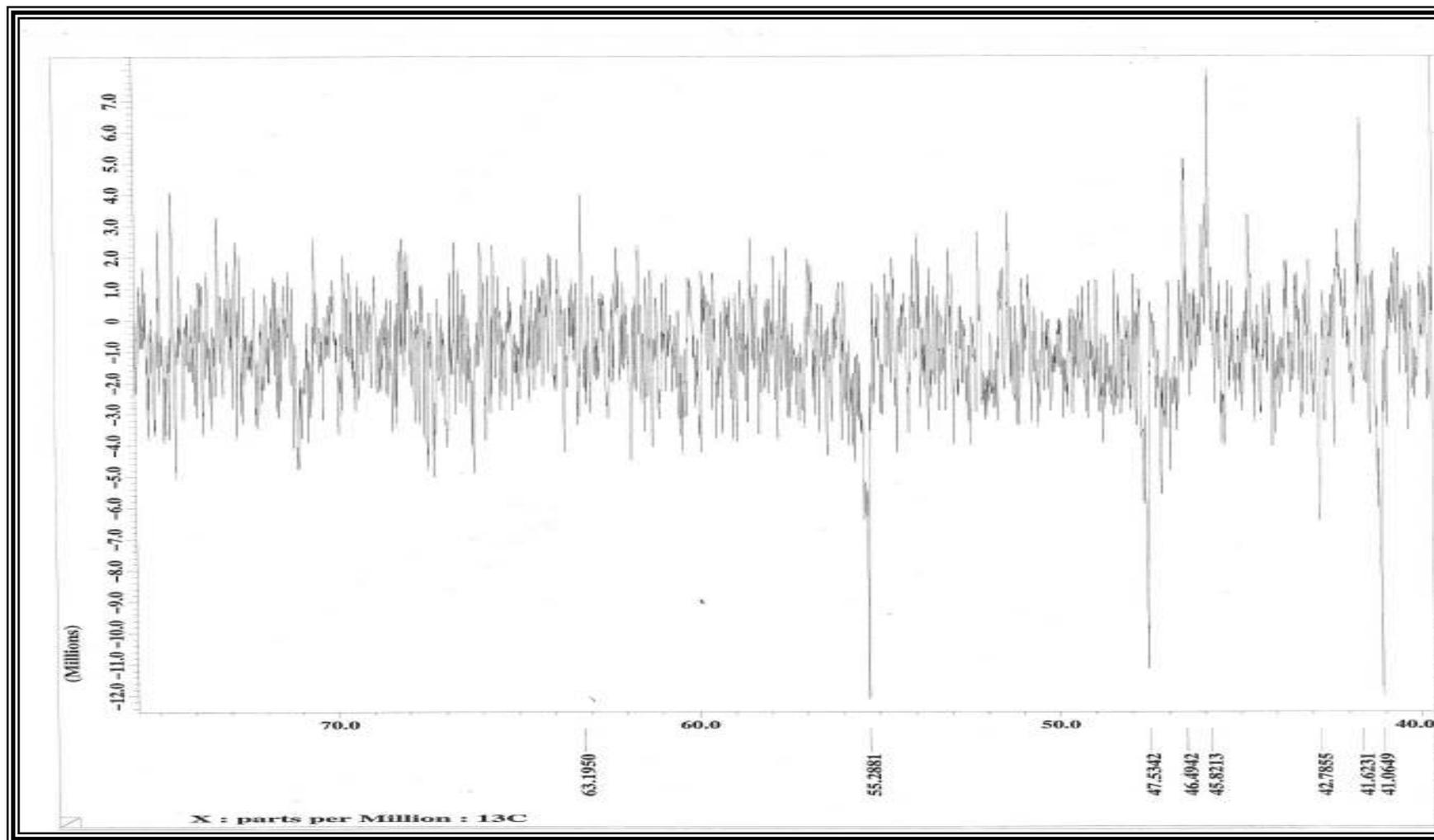


Figura 67 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 MHz, CDCl_3) (40,0 - 70,0ppm)de PW-08

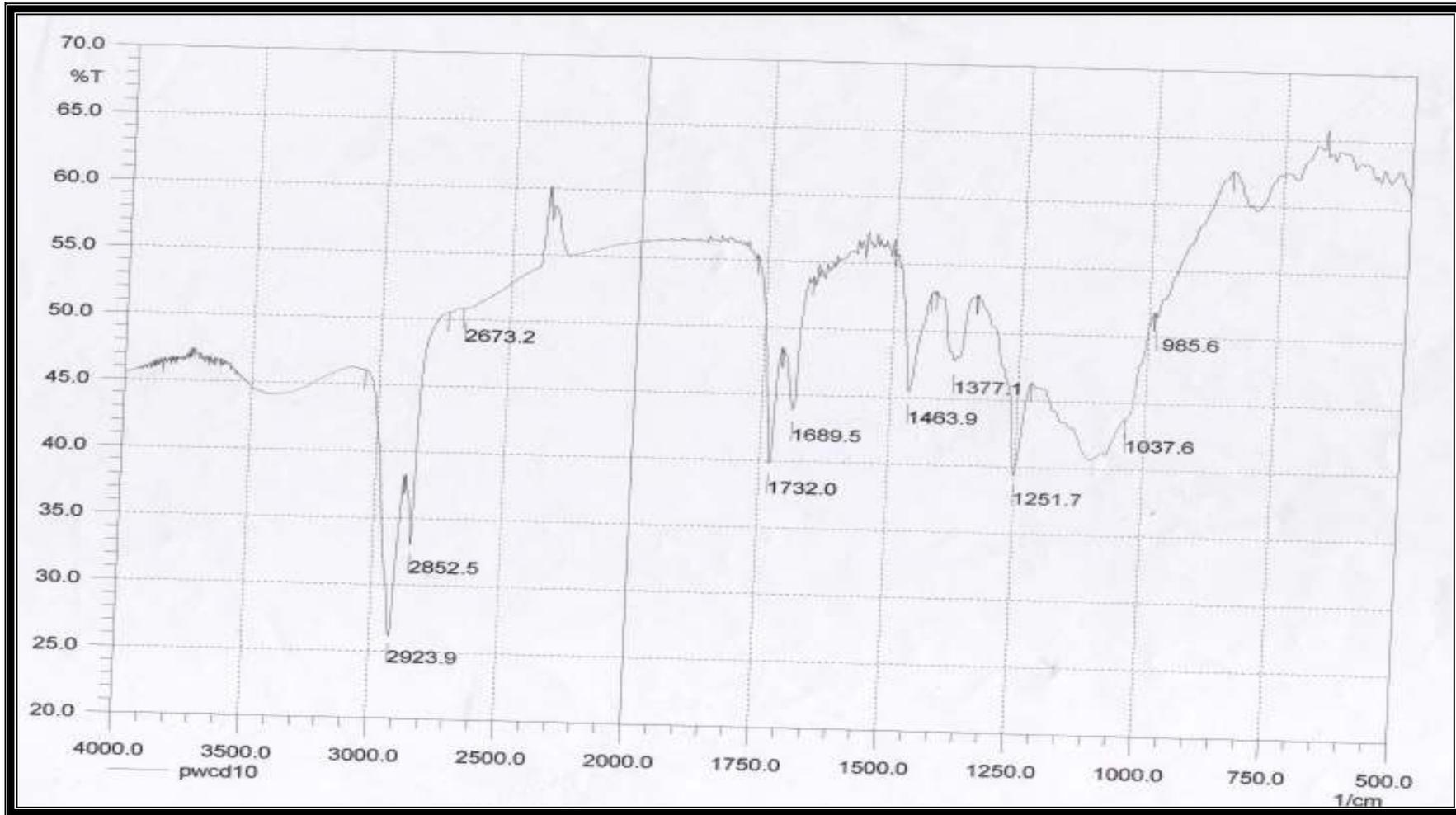
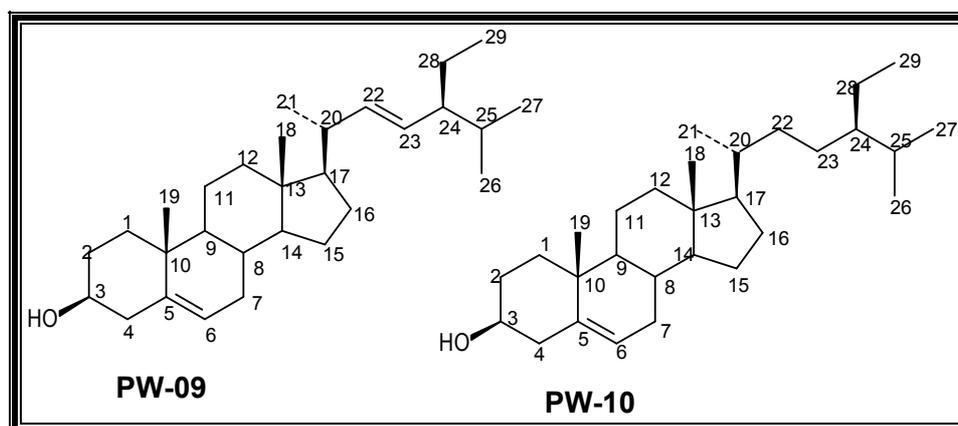


Figura 68 – Espectro de infravermelho de PW-08

7.2 - ESTERÓIDES

7.2.1- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA MISTURA DE ESTERÓIDES PW-09 E PW-10



Os esteróides são freqüentemente encontrados no reino vegetal, sendo que os mais comuns desta classe de substâncias compostas são o estigmasterol (**PW-09**) e o β -sitosterol (**PW-10**). No entanto, quase sempre estes compostos ocorrem em misturas devido as suas semelhanças estruturais, dificultando suas separações.

Através da análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 70, p. 150) da mistura de esteróides foi possível identificar um duplete largo em δ_{H} 5,35 indicativo de hidrogênio olefínico; um multiplete em δ_{H} 3,53 referente a um próton carbinólico, e ainda um grande acúmulo de sinais em δ_{H} em (0,68 - 2,27) relativos aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal.

A presença do estigmasterol na mistura foi confirmada pela presença das absorções dos hidrogênios vinílicos em δ_{H} (5,03 e 5,14).

Através da análise dos espectros de RMN ^{13}C - APT (Figura 71, p. 151) foi possível identificar sinais característicos que permitiram a distinção entre β -sitosterol e estigmasterol em δ_{C} 121,70 e 140,80 (C-6 e C-5) de ambas estruturas e em δ_{C} 129,30 e 138,29 (C-23 e C-22), presentes apenas no estigmasterol.

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 15, p.149) permitiram a completa atribuição dos sinais de cada esteróide. Esses dados aliados ao

da literatura para os dois esteróides (Breitmaier *et al.*, 1987) corroboram para a confirmação das propostas estruturais apresentadas.

O conjunto de dados citados acima aliados aqueles encontrados na literatura (Wright *et al.*, 1978) sugerem a presença do estigmasterol em menor proporção na mistura. Este fato também é justificado pela existência de um sinal a (M^+) 412 de menor intensidade no espectro de massa quando comparado ao sinal do íon molecular (M^+) 412; o que permitiu avaliar a proporção de cada fitoesteróide na mistura (34,96%) para estigmasterol e (65,04%) para o sitosterol (Figura 69).

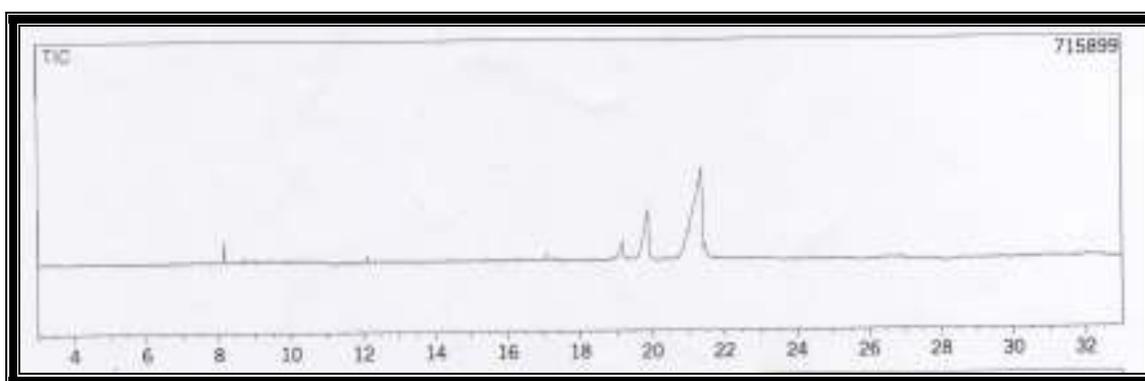


Figura 69 - Cromatograma para de PW-09 e PW-10

Tabela 15 - Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias: **PW-09** e **PW-10** comparados com dados da literatura para o β -sitosterol e estigmasterol (Breitmaier *et al.*, 1987)⁹

	PW-09	<i>β-Sitosterol</i>	PW-10	Estigmasterol
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
C				
5	140,74	140,80	140,74	140,80
10	36,49	36,54	36,13	36,16
13	42,28	42,35	42,28	42,35
25	29,69	29,68	31,64	31,70
CH				
3	71,79	71,83	71,79	71,83
6	121,70	121,70	121,70	121,70
8	31,89	31,94	31,89	31,94
9	50,12	50,20	50,12	50,20
14	56,76	56,81	56,76	56,81
17	56,05	56,12	56,05	56,12
20	39,76	39,82	39,76	39,82
24	45,83	45,90	50,12	50,20
CH₂				
1	37,24	37,29	37,24	37,29
2	31,90	31,94	31,90	31,94
34	42,28	42,35	42,28	42,35
7	33,93	34,00	33,93	34,00
11	21,07	21,10	21,07	21,10
12	39,76	39,82	39,76	39,82
15	24,29	24,32	24,29	24,32
16	28,90	28,90	28,90	28,90
22	31,90	31,94	138,29	138,29
23	26,07	26,19	129,27	129,30
26	19,80	19,80	21,20	21,20
28	23,06	23,12	25,39	25,40
CH₃				
18	11,96	11,99	11,96	11,99
19	19,38	19,39	19,38	19,39
21	18,76	18,79	19,02	19,06
27	19,80	19,80	19,80	19,80
29	11,84	11,87	11,96	11,99

⁹RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, 100 MHz, respectivamente CDCl_3).

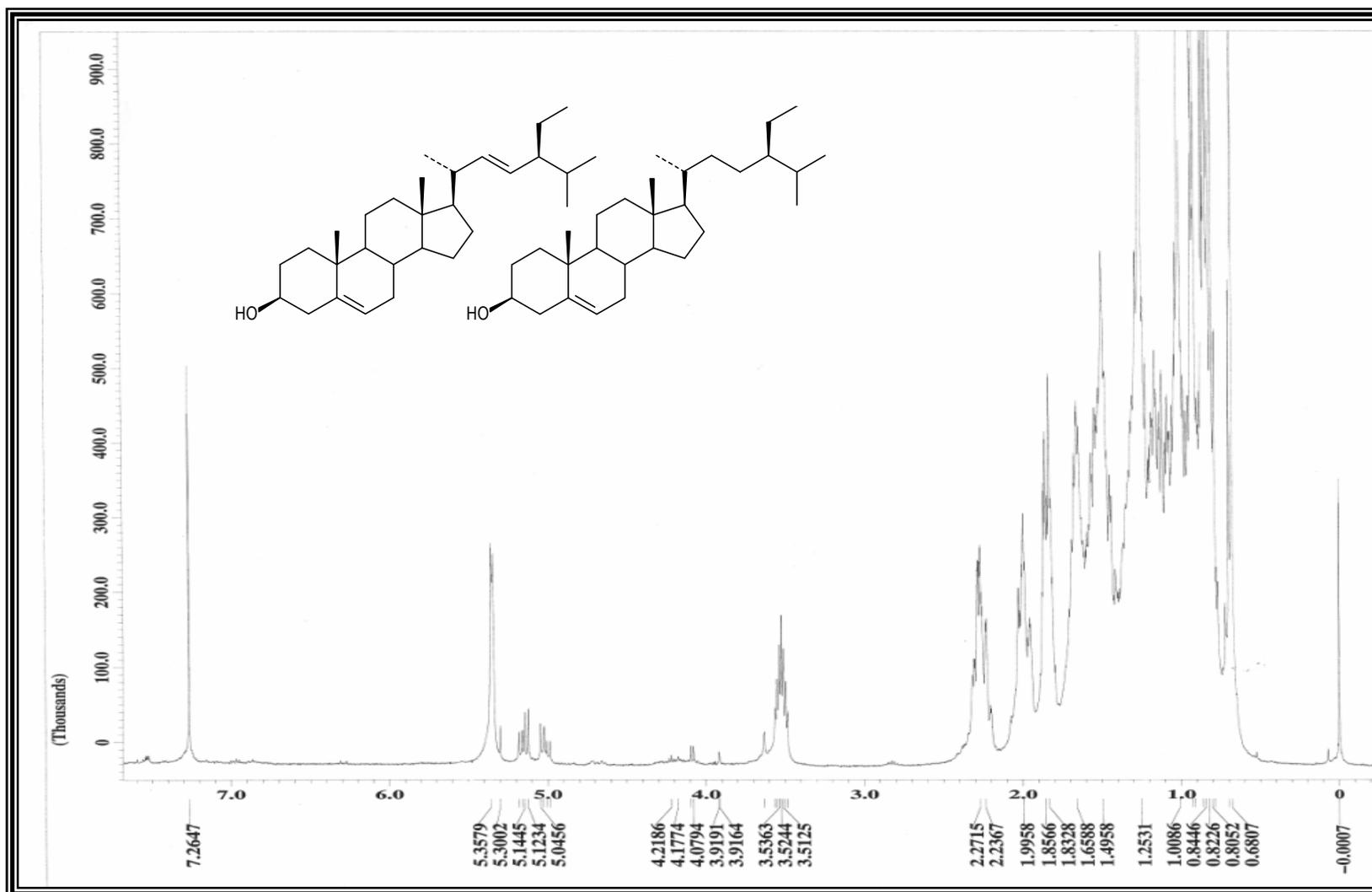


Figura 70 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PW- 09 e PW-10

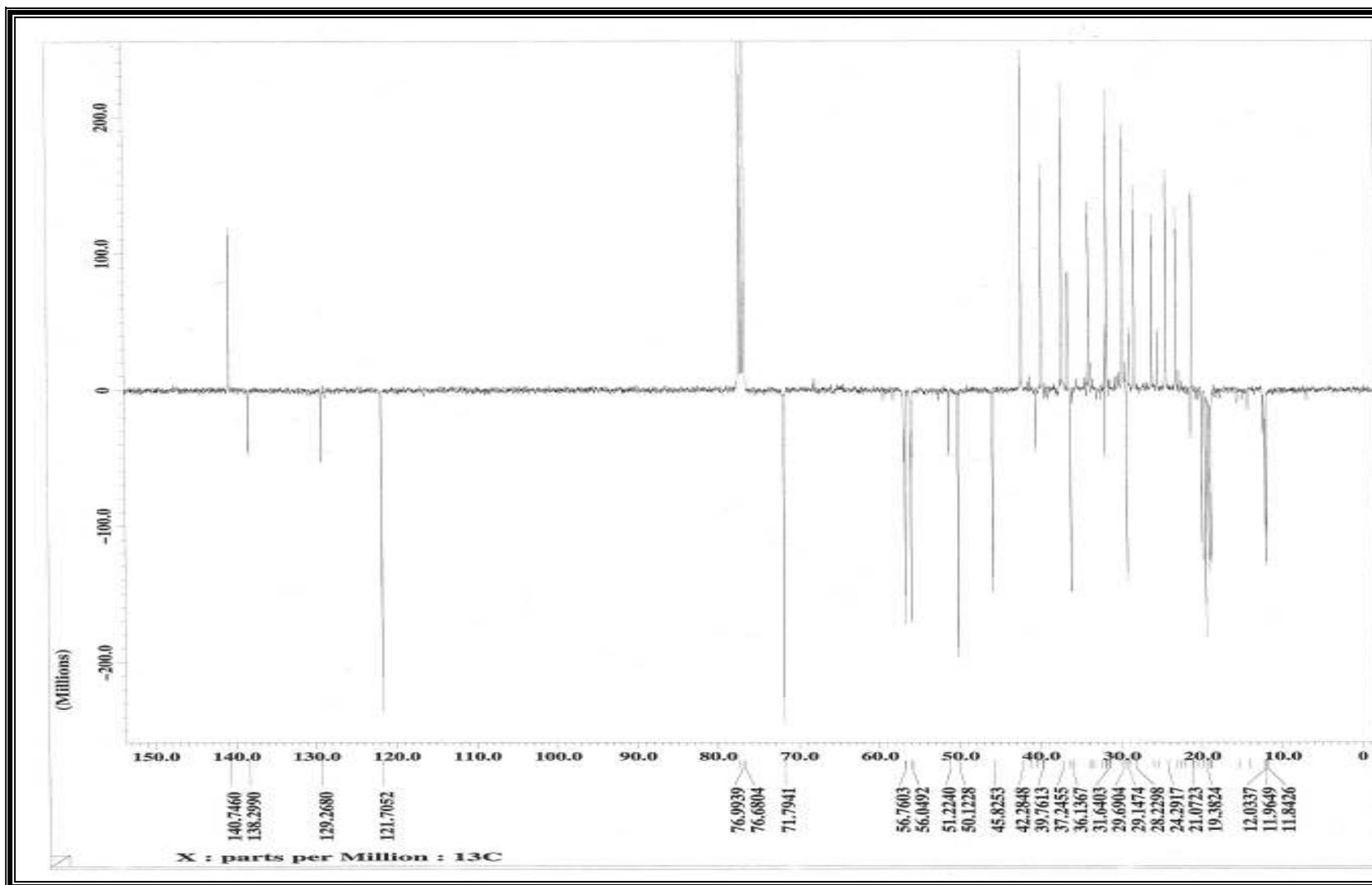


Figura 71 – Espectro de RMN ¹³C - APT (100 MHz, CDCl₃) de PW09 e PW-10

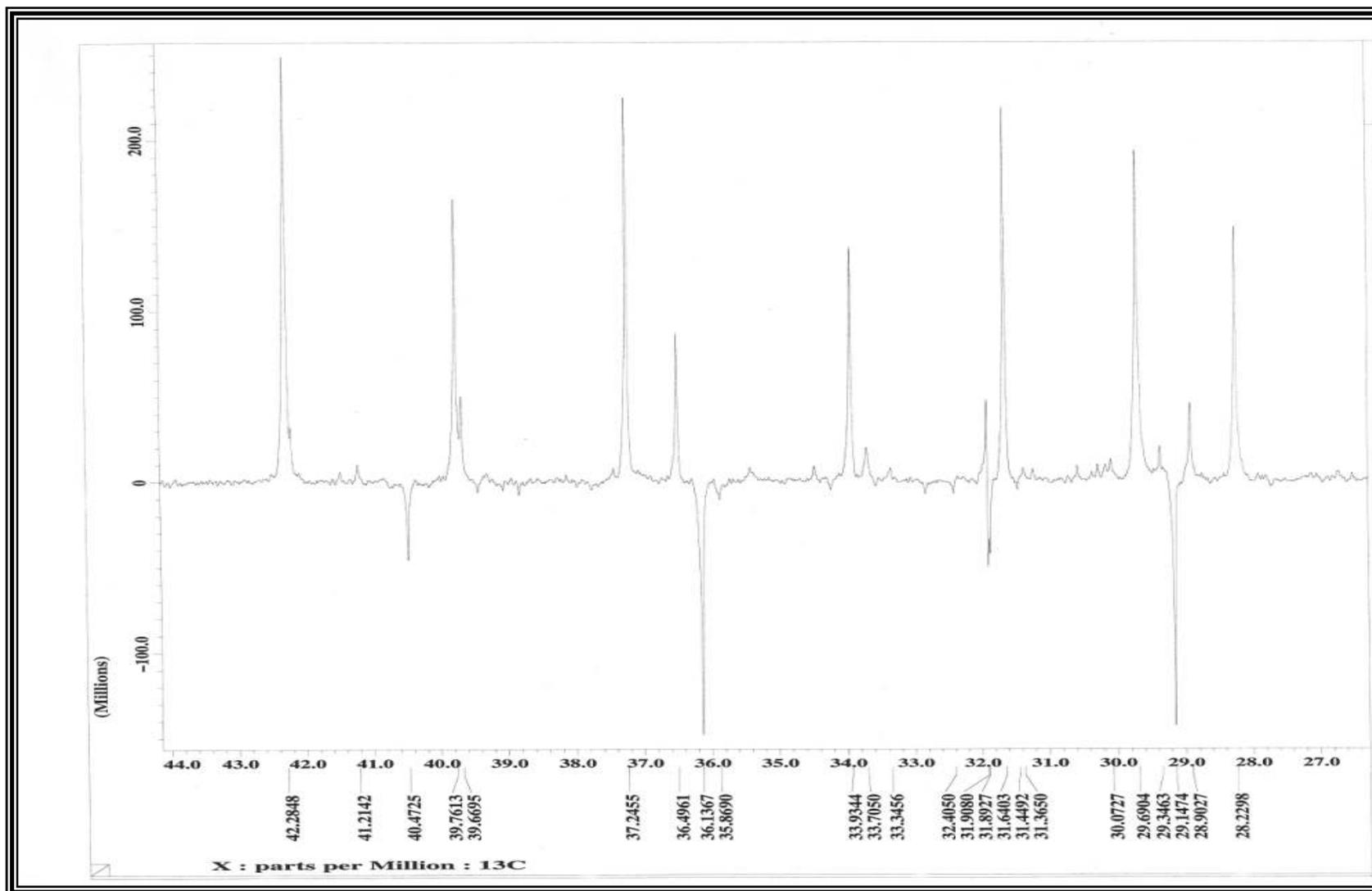


Figura 72 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 27,0 – 44,0ppm) de PW- 09 e PW-10

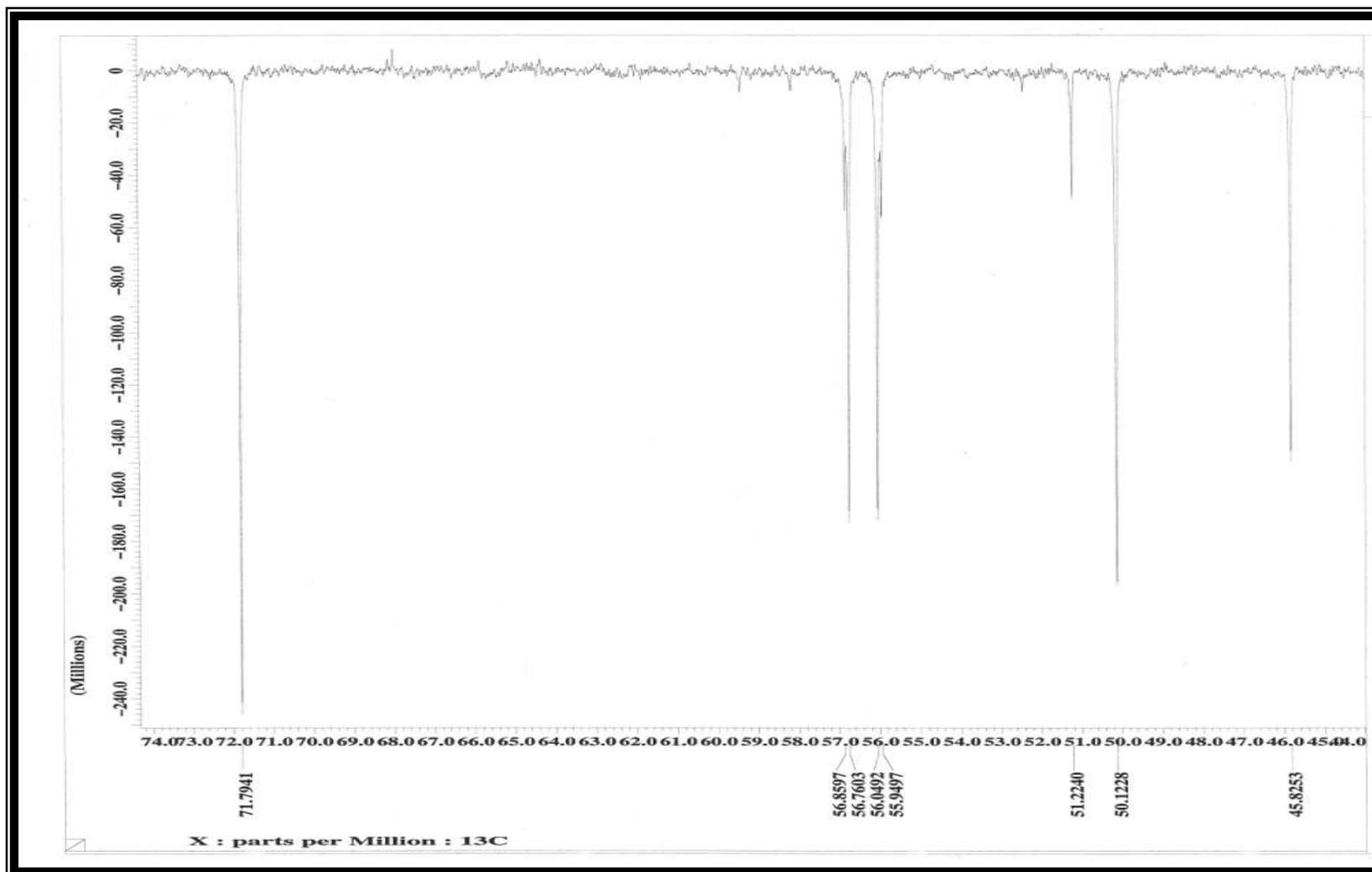


Figura 73 – Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 45,0 – 74,0ppm) de PW-09 e PW-10

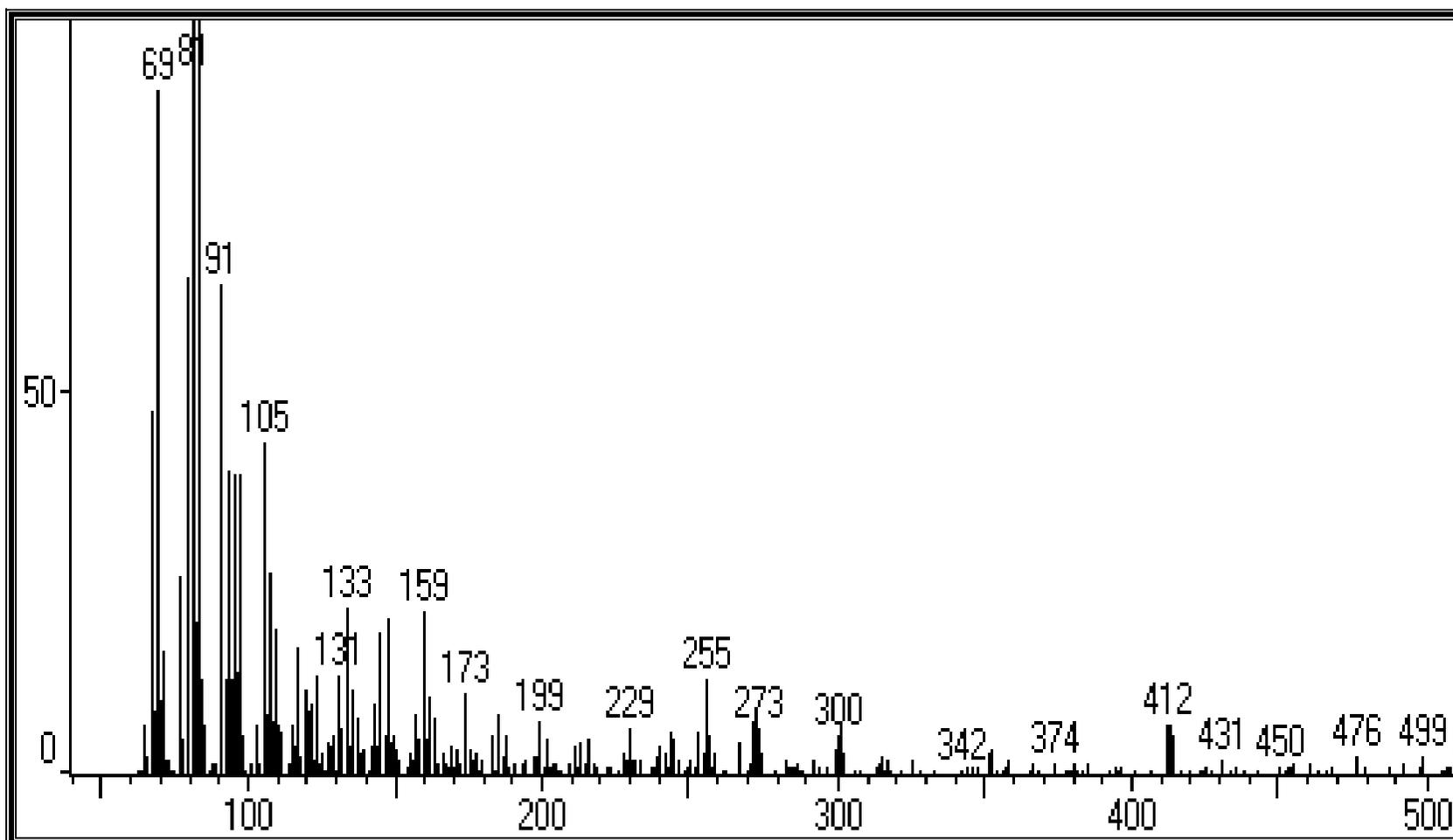


Figura 74 – Espectro de massas 70eV de PW- 09

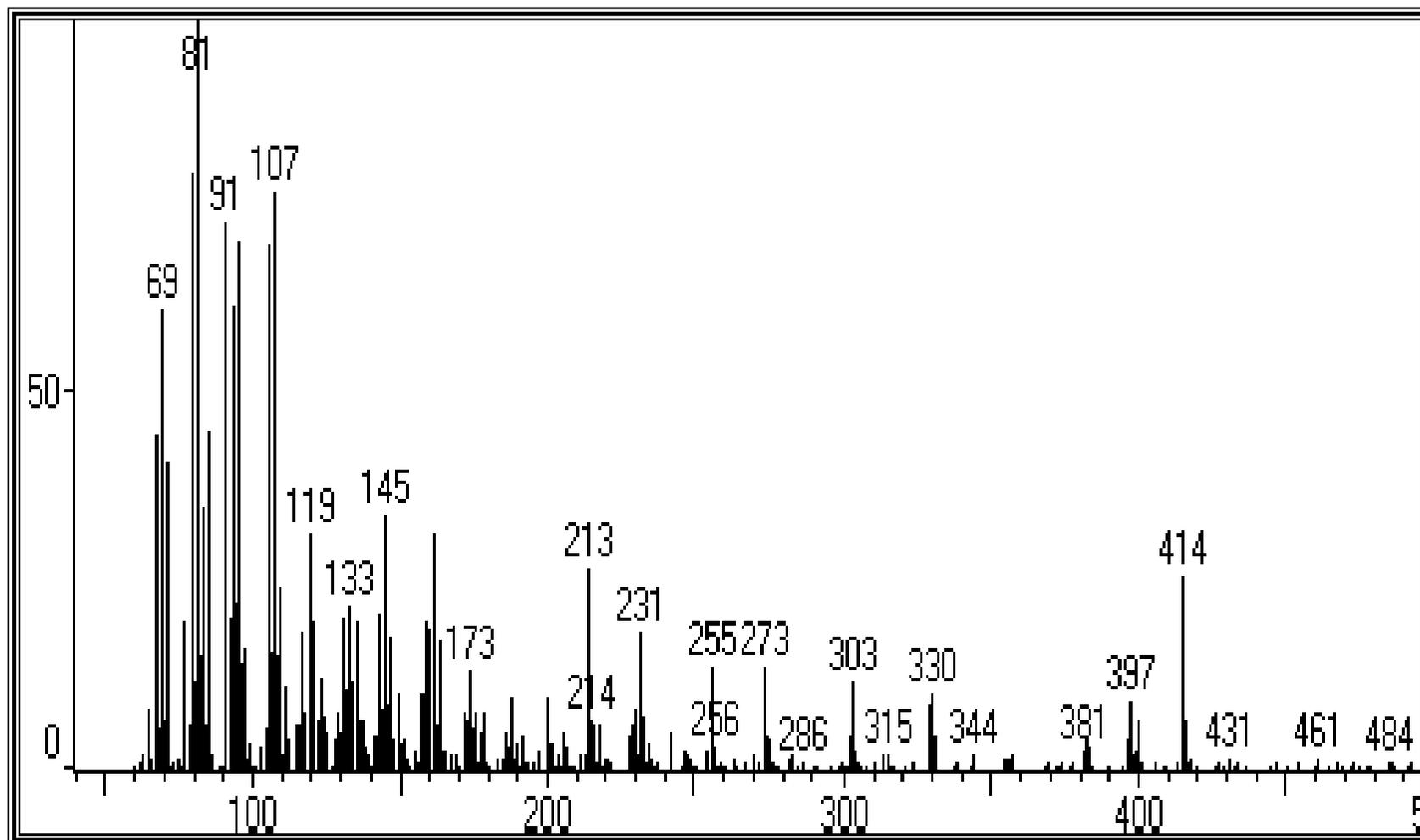
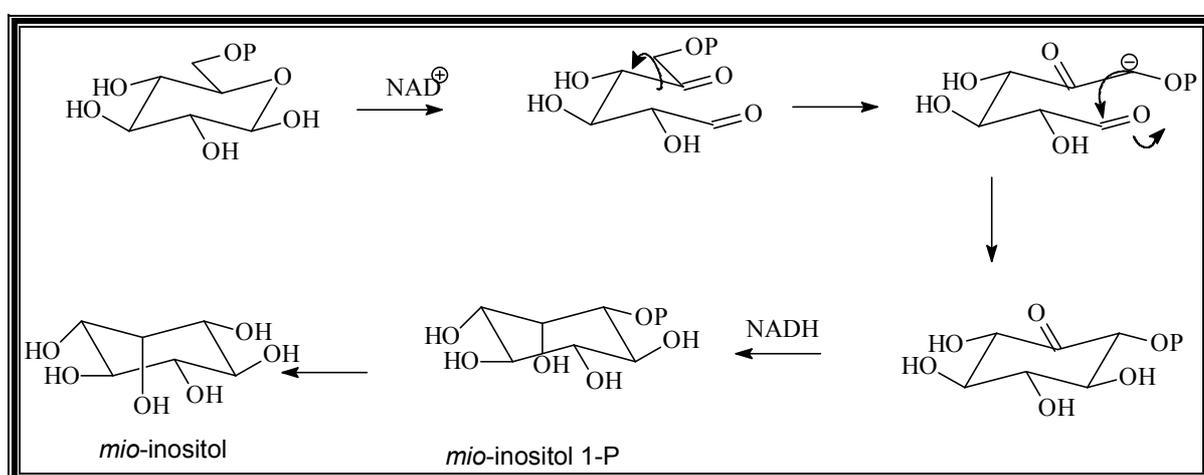


Figura 75 – Espectro de massas 70eV de PW- 10

7.3 – Ciclitóis

Ciclitóis são polialcoóis cíclicos contendo um anel carbocíclico de seis átomos de carbono e seis grupos OH (cicloexanopoliol). O membro mais importante desta classe de substâncias é o inositol que controla vários aspectos da química da vida sendo responsável pela comunicação entre a parte externa e interna da célula. Em mamíferos o inositol existe principalmente sob a forma de derivado fosforilado (inositol 1,4,5-trifostato), o qual participa da comunicação celular (Almeida *et al*, 2003; Clayden *et al*, 2001) .



Esquema 19 - Biossíntese de ciclitóis (Dewick, 1997)

Cicloexanoexol ou comumente inositol possui um total de nove estereoisômeros: *scylo*, *mio*, *neo*, *epi*, *D* e *L chiro*, *cis*, *muco* e *allo*-inositol. Sendo que seis desses estereoisômeros ocorrem naturalmente (Figura 76). Entre eles, o mio-inositol, é o mais abundante sendo produzido a partir da glicose (Almeida *et al*, 2003).

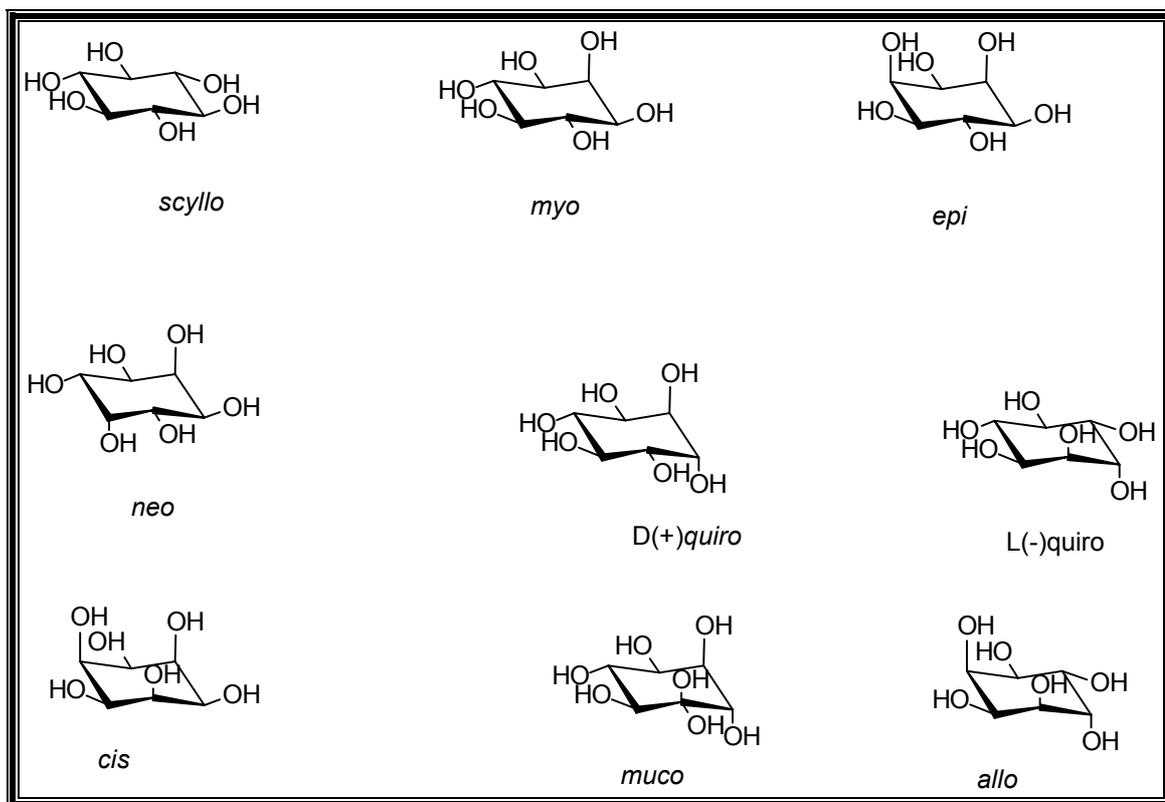
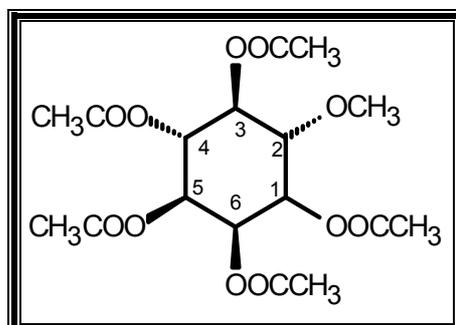


Figura 76 - Estereoisômeros do inositol (Almeida *et al*, 2003)

7.2.1 - Propriedades biológicas dos ciclitóis

Segundo Almeida *et al.* (2003) os inositóis fosfatos podem representar uma via para o tratamento das doenças maníaco-depressivas, Alzheimer e Síndrome de Down. Outra investigação mostra que o inositol hexafosfato apresenta atividade inibitória de carcinoma induzido em ratos (Wattenberg, 1995).

7.3.1 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA PW-11



A substância **PW-11** (25,0 mg), foi obtido como derivado peracetilado a partir de uma alíquota da partição do extrato metanólico do caule de *P. weinmanniaefolia*. A substância apresentou-se na forma de cristais incolores, bastante higroscópico.

O espectro de RMN ¹H de **PW-11** (Figura 77, p. 165) apresentou seis sinais simples sendo: cinco correspondentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetoxilas em δ_H (1,98; 2,03; 2,05 2,10 e 2,16) e um sinal referente aos hidrogênios do grupo metoxila em δ_H (3,37); três duplos sinais duplos em δ_H [(3,61, *dd*, *J*= 9,9 e 3,3 Hz), (5,39; *dd*; *J*=4,4 e 3,3 Hz) e (5,24; *dd*, *J*= 9,9 e 3,3 Hz)] e três sinais tripos em δ_H [(5,45; *t*; *J*=3,3 Hz), e (5,30, *t*, *J*= 9,9 Hz)].

Através da interpretação dos espectros RMN ¹H - COSY (Figura 78, p. 166) foi possível verificar os acoplamentos dos átomos de hidrogênio: H-1 [(axial) interagindo com H-6 [(axial), e com H-2 [(equatorial), δ_H (5,45; *t*; *J* = 3,3 Hz). O hidrogênio H-3 interagindo com H-4 [(axial), δ_H (5,24; *dd*; *J*=9,9 e 3,3 Hz). H-4 interagindo com H-5 [(axial), δ_H (5,37; *t*; *J*= 9,9 Hz)] e este por sua vez interage com H-6 [(axial), δ_H (5,30; *t*; *J* = 9,9)].

O sinal δ_H (3,61) foi atribuído inequivocamente a H-1 devido ao maior efeito de proteção do grupo metoxila quando comparado com a função acetoxila (maior efeito retirador de elétrons). A localização da metoxila em posição equatorial foi atribuída levando-se em consideração a constante de acoplamento de H-1 (*J*= 9,9 Hz). A mesma dedução foi feita para localizar o grupo acetoxila OAc-2 e OAc-3 em posição axial e os demais em posição equatorial.

A interpretação do espectros RMN de ^{13}C - APT (Figura 79, p. 167) permitiu reconhecer dezessete sinais, sendo cinco relativos a carbonos quaternários (C=O), seis carbonos metínicos oxigenados sendo cinco relativos as metilas do grupo (OAc) e um sinal referente a metila do (O-CH₃).

Os dados acima possibilitaram a classificação do derivado peracetilado como 1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-O-metil-*L-qui*ro-inositol e, conseqüentemente a substância natural como 1-O-metil-*L-qui*ro-inositol.

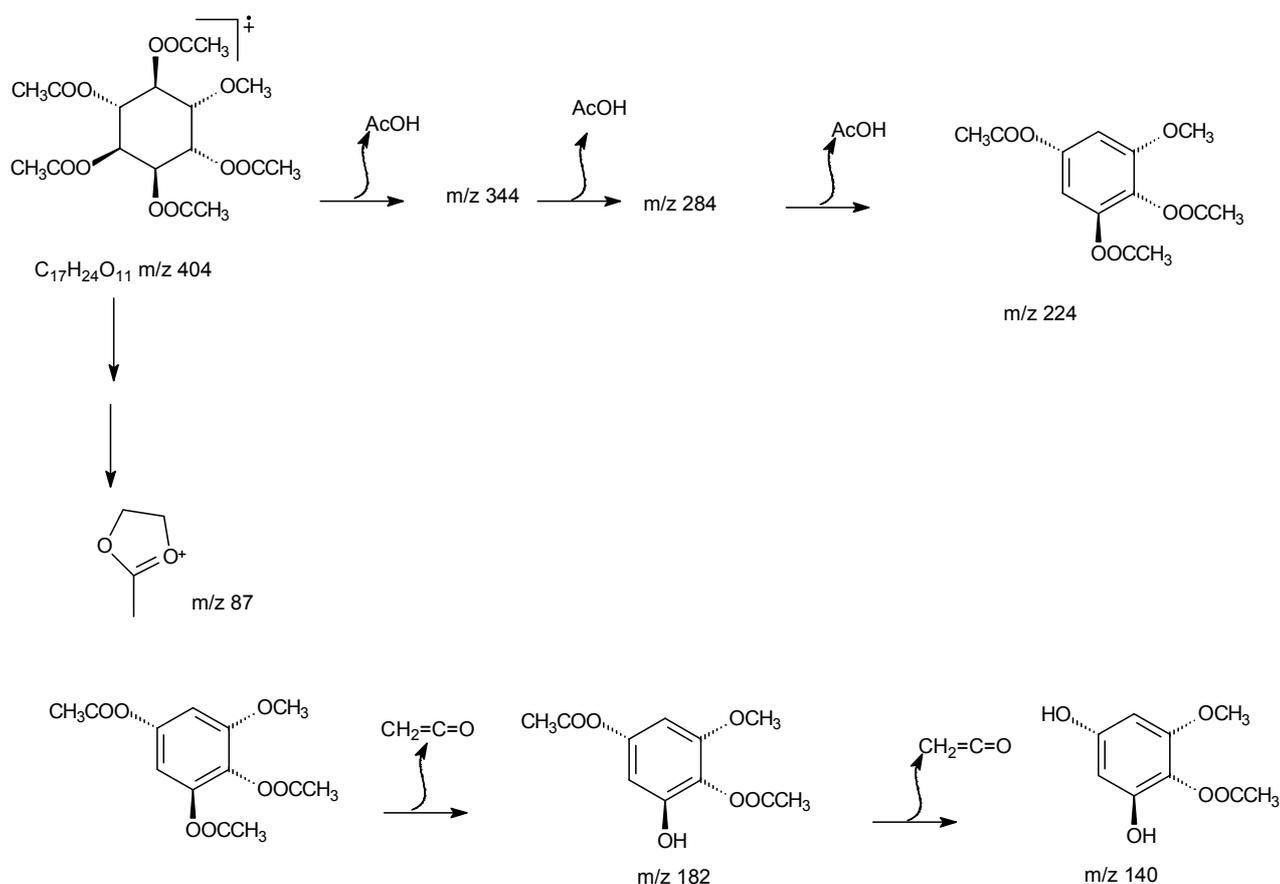
A análise do mapa de correlação heteronuclear HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 81, p. 169) possibilitou a confirmação das atribuições dos deslocamentos químicos, através da associação das absorções dos hidrogênios com os carbonos envolvidos. A correlação do carbono do grupo metoxila δ_{C} (58,50) e seus hidrogênios δ_{H} (3,54) , C-2 δ_{C} (65,71) correlacionando com H-2 δ_{H} (5,45), a correlação do C-3 (67,32) com H-3 δ_{H} (5,39), a correlação de C-4 δ_{C} (69,11) com o H-4 δ_{H} (5,24), e a correlação C-5 δ_{C} (69,75) e H-5 δ_{H} (5,37) e ainda a correlação de C-6 δ_{C} (71,36) com H-6 δ_{H} (5,30).

O mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^nJ_{\text{CH}}$, n=2 e n=3) (Figura 82, p.170) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono metínicos, revelando de forma clara o acoplamento dos átomos de carbono C-1 δ_{C} [3,61 (dd, $J= 9,9$ e $3,3$ Hz)] com os hidrogênios (H-2 e H-6); C-2 δ_{C} [5,45 (*t*, $J= 3,3$ Hz)] com os hidrogênios (H-1 e H-3); C-3 δ_{C} [5,39 (*dd*, $J= 4,4$ e $3,3$ Hz)] com os hidrogênios (H-2 e H-4); C-4 δ_{C} [5,24 (*dd*, $J= 9,9$ e $3,3$ Hz)] com os hidrogênios (H-5 e H-6); C-5 δ_{C} [5,37 (*t*, $J= 9,9$ Hz)] com os hidrogênios (H-6 e H-4) e finalmente de C-6 δ_{C} (77,25) com os hidrogênios (H-5 e H-6). A Tabela 17 mostra o assinalamento completo dos sinais dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da substância **PW-11**.

Tabela 16 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-11**, comparados com dados da literatura para o 1-O-metil-inositol (Araújo e Lemos, 1994).

	PW-09	1-O-metil-inositol	PW-09	1-O-metil-inositol
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C				
Ac	--	--	169,96	169,96
Ac	--	--	169,85	169,85
Ac	--	--	169,63	169,63
Ac	--	--	169,86	169,86
Ac	--	--	168,11	169,11
CH				
1	3,61 (<i>dd</i> , $J = 9,9$ e $3,3$ Hz)	5,41(<i>t</i> , $J = 3,2$ Hz)	77,25	65,62
2	5,45 (<i>t</i> , $J = 3,3$ Hz)	3,58 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e $3,2$ Hz)	65,69	77,20
3	5,39 (<i>dd</i> , $J = 4,4$ e $3,3$ Hz)	5,26(<i>t</i> , $J = 9,5$ Hz)	67,32	71,30
4	5,24 (<i>dd</i> , $J = 9,9$ e $3,3$ Hz)	5,34 (<i>t</i> , $J = 9,5$ Hz)	69,10	69,68
5	5,37 (<i>t</i> , $J = 9,9$ Hz)	5,21 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e $3,2$ Hz)	69,74	69,06
6	5,30 (<i>t</i> , $J = 9,9$ Hz)	5,36 (<i>t</i> , $J = 3,2$ Hz)	71,36	67,26
CH₃				
MeO-1	3,37 (<i>s</i>)	3,34	58,50	58,47
Ac	2,16 (<i>s</i>)	2,14	20,67	20,71
Ac	2,10 (<i>s</i>)	2,13	20,67	20,71
Ac	2,05 (<i>s</i>)	2,04	20,67	20,65
Ac	2,03 (<i>s</i>)	1,99	20,67	20,53
Ac	1,98 (<i>s</i>)	1,95	20,67	20,47

Os espectros obtidos por cromatografia gasosa acoplada ao Massas (CG-EM) permitiu a confirmação da fórmula molecular $C_{17}H_{24}O_{11}$, uma vez que foram observados alguns fragmentos bem característicos, por exemplo os fragmentos relativos a perdas do grupamento AcOH ($m/z=224$) e $CH_2=C=O$ gerando ($m/z=182$ e 140). Assim, o conjunto de dados acima nos permitiu confirmar a fórmula molecular proposta para **PW-11**.



Esquema 20 – Proposta de alguns fragmentos de massas para PW-11

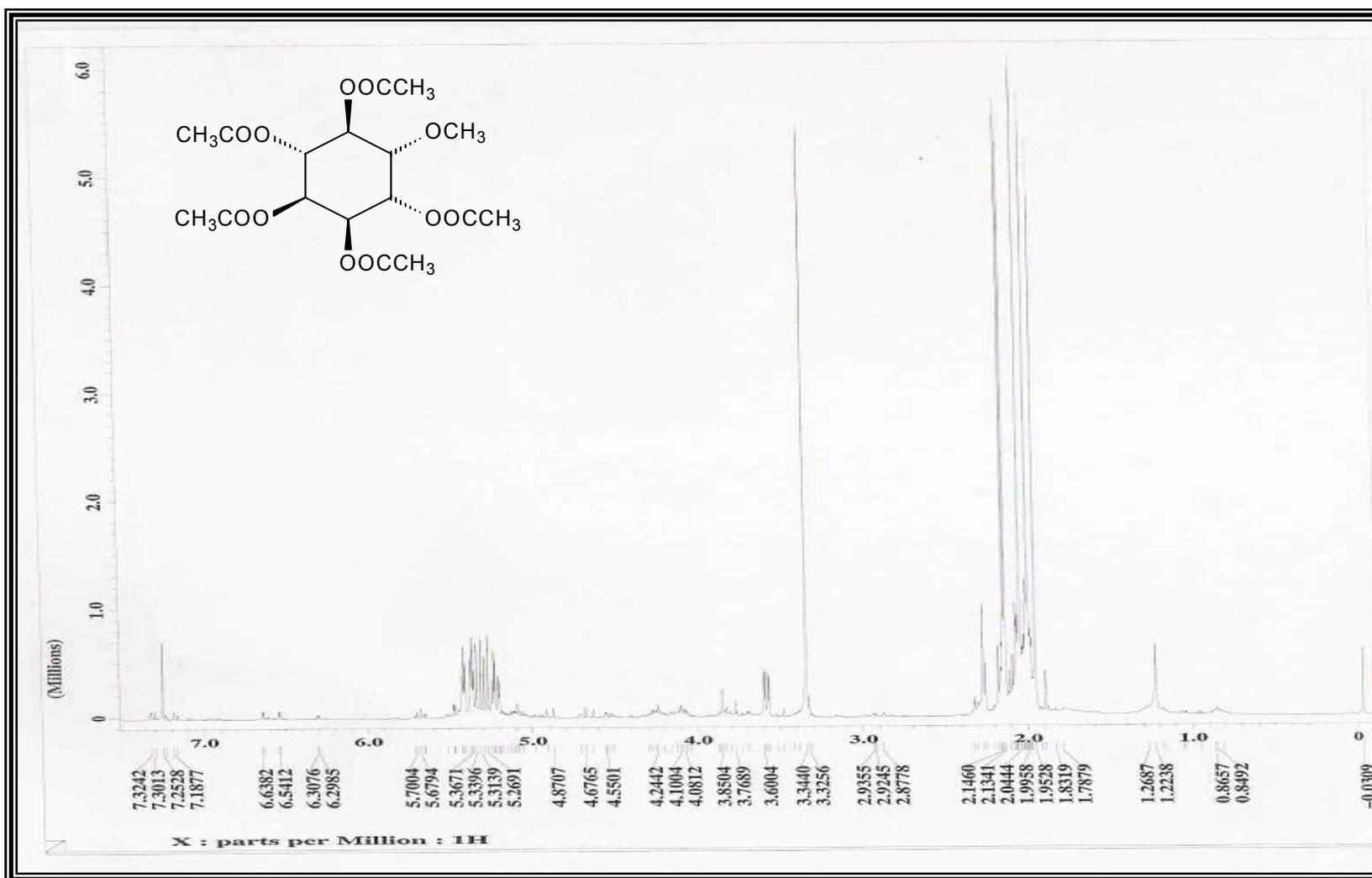


Figura 77 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 0,2 – 3,0ppm) de PW- 11

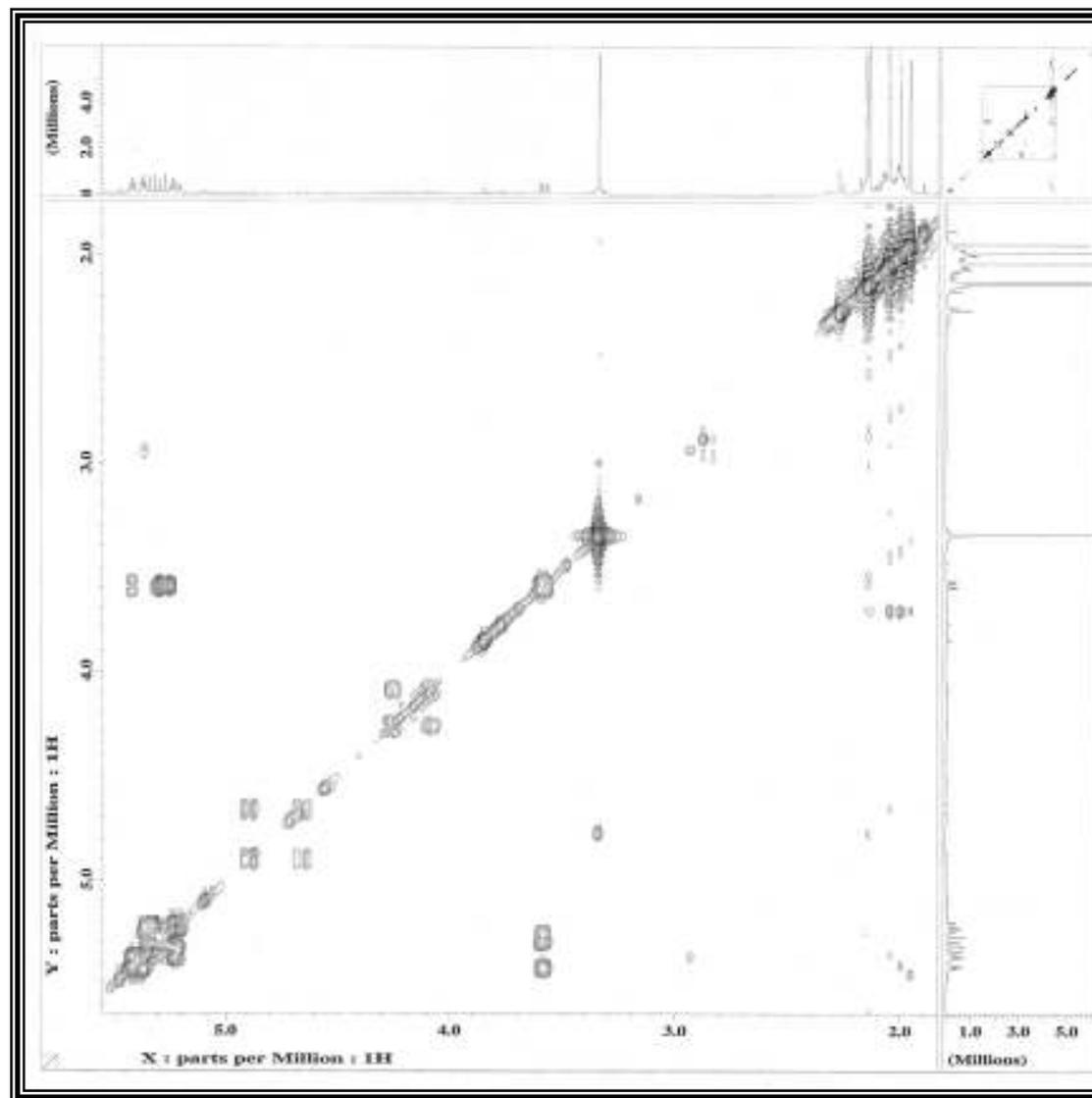


Figura 78 - Mapa de correlação Homonuclear COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$ de PW- 11

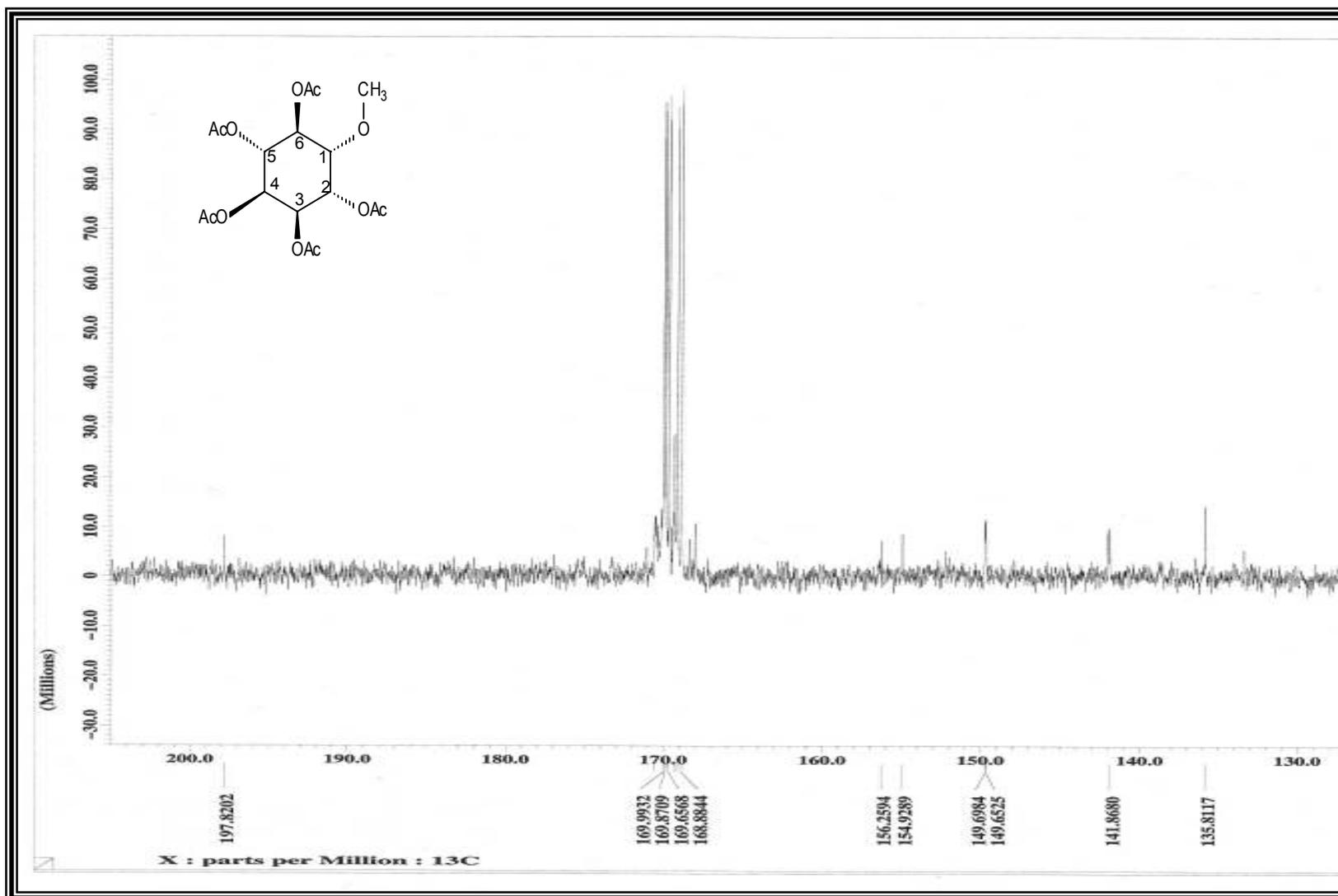
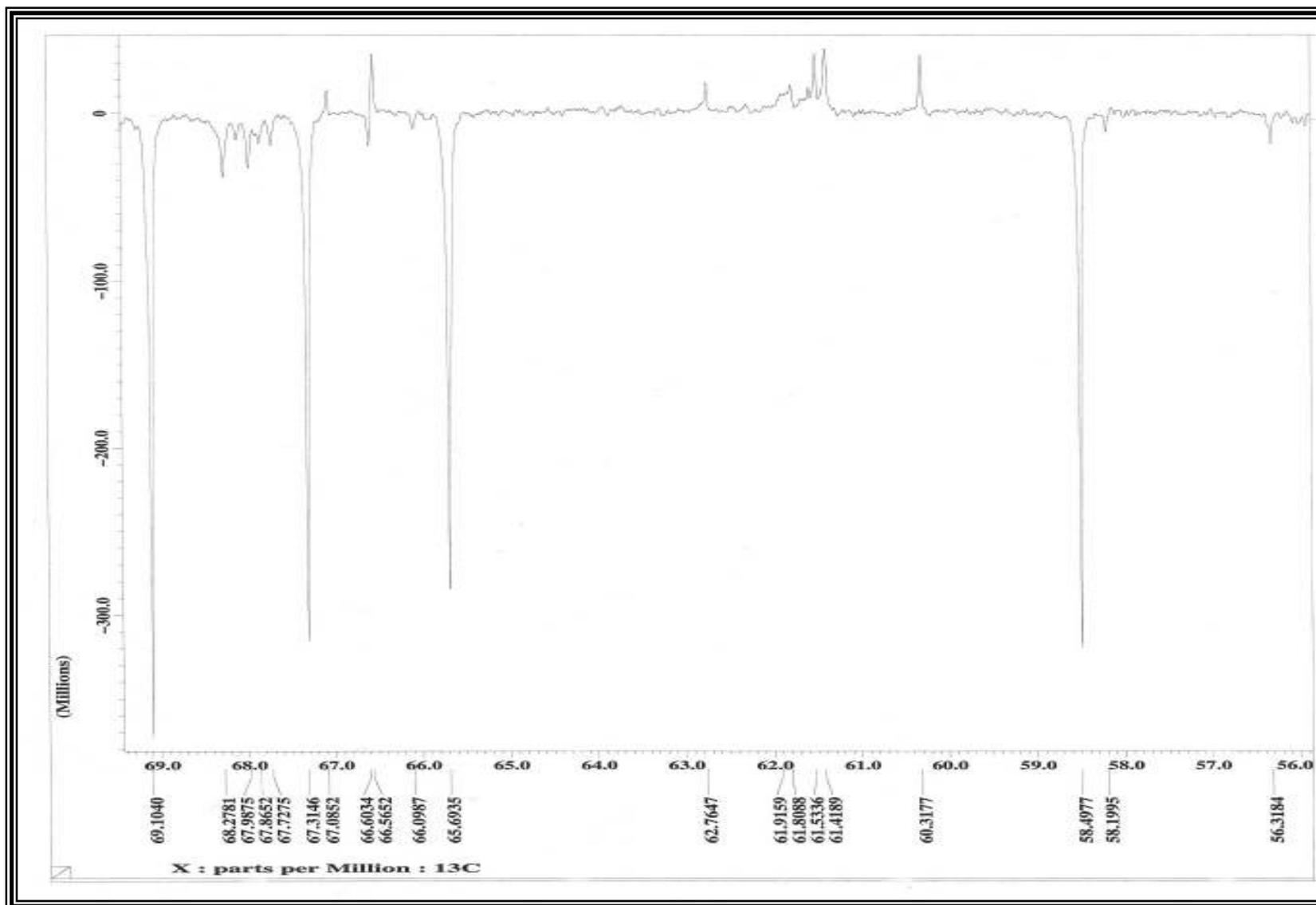


Figura 79 - Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 MHz, CDCl_3) de PW- 11

Fig. 29. ^{13}C NMR spectrum of compound 15b in CDCl_3 . The x-axis is labeled 'X : parts per Million : ^{13}C ' and ranges from 69.0 to 56.0. The y-axis is labeled '(Millions)' and ranges from 0 to -300.0. The spectrum shows several sharp peaks, with the most prominent ones at 69.1040, 67.3146, 66.6034, 66.5652, 66.0987, 65.6935, 62.7647, 61.9159, 61.8088, 61.5336, 61.4189, 60.3177, 58.4977, 58.1995, and 56.3184 ppm. A small peak is also visible at 68.2781 ppm.

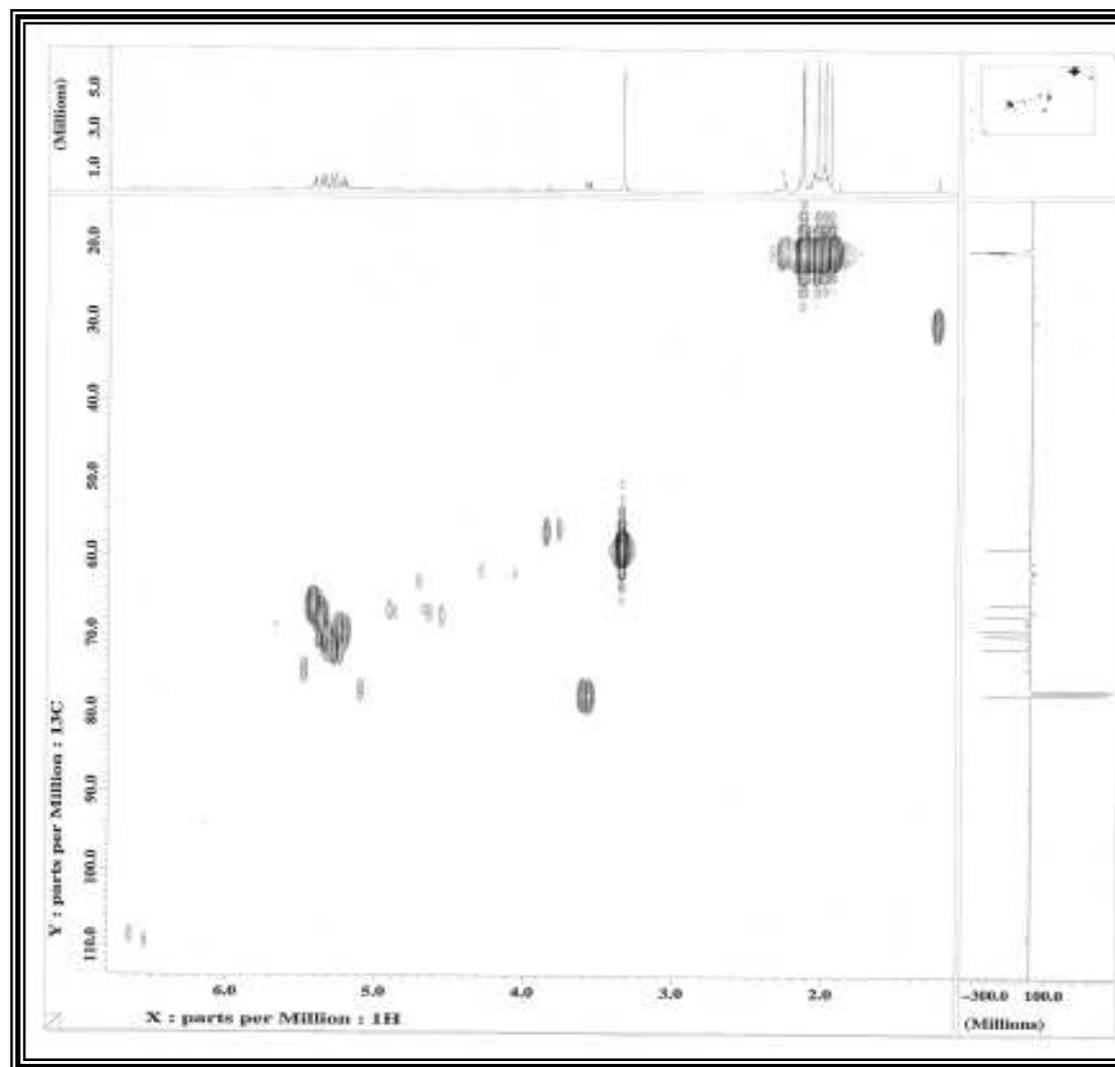


Figura 81 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-11

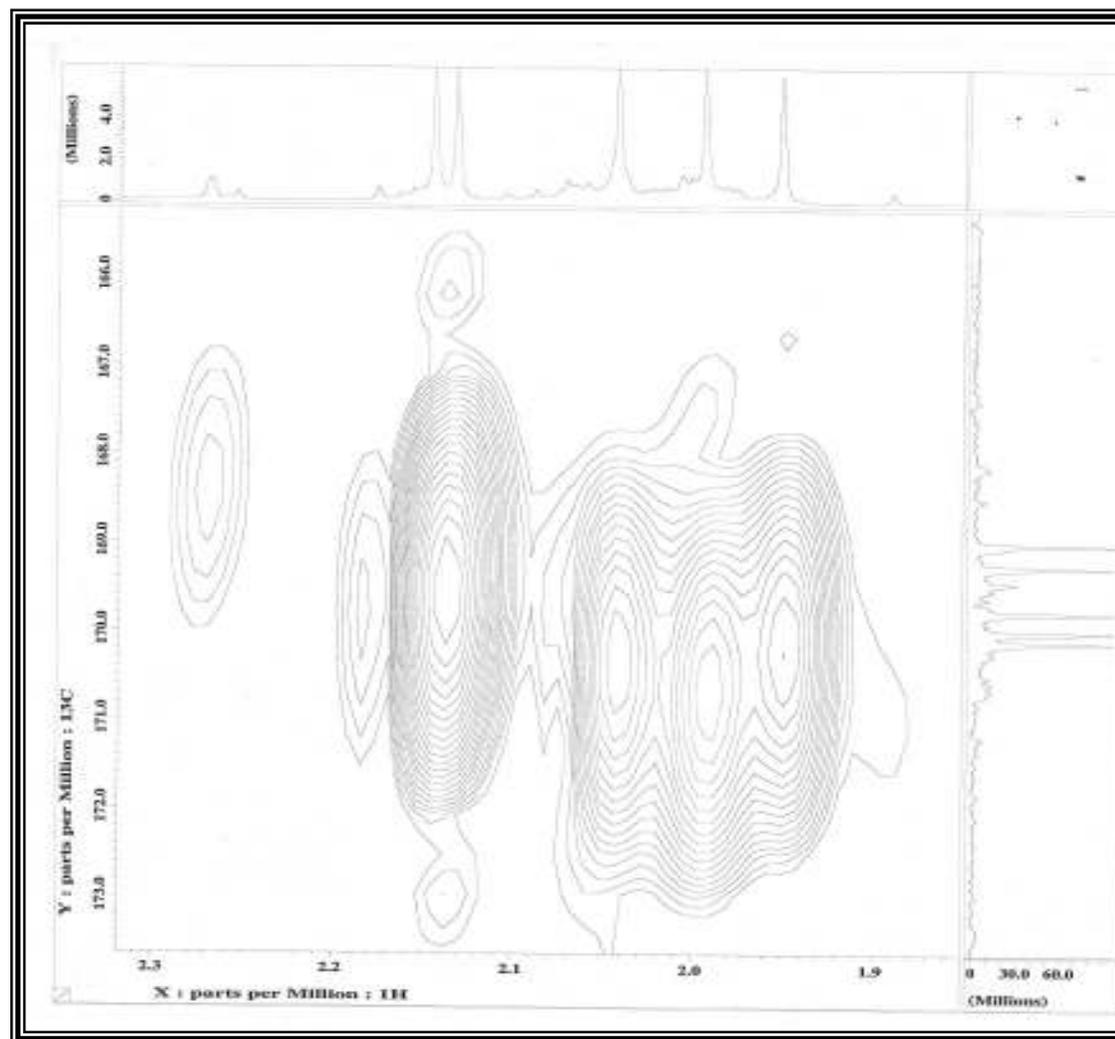


Figura 82 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-11

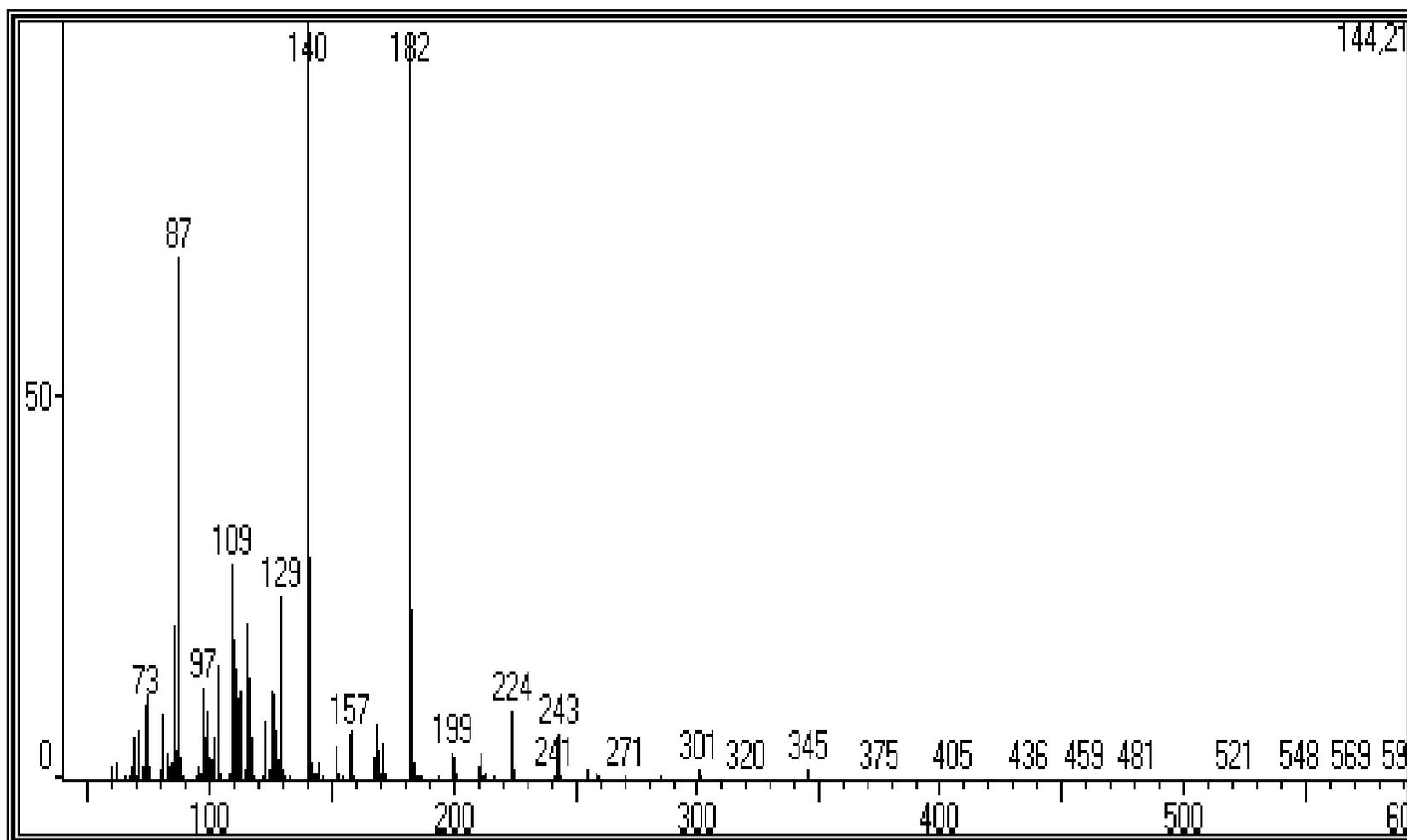
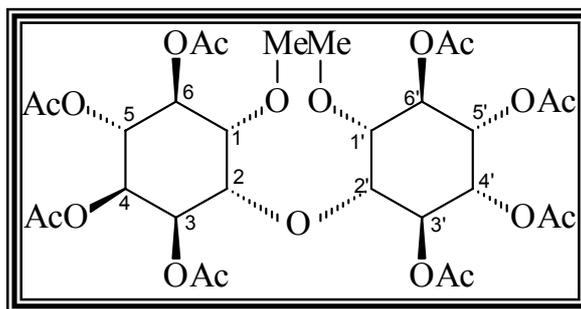


Figura - 83 Espectro de massas de PW-11

7.1.8 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA PW-12



A substância **PW-12** foi obtida a partir de uma alíquota do extrato metanólico acetilado do *P.weinmanniaefolia*. A substância apresentou-se na forma de cristais incolores bastante higroscópicos.

O espectro de RMN ^1H de **PW-12** (Figura 84, p. 176) evidencia a presença de 21 sinais, sendo seis simples: cinco correspondentes a hidrogênios metínicos de grupos acetoxilas em δ_{H} (2,02; 2,10; 2,13; 2,15; e 2,17), e um sinal referente aos hidrogênios do grupo metoxila em δ_{H} (3,45); um duplo - sinal - duplo em δ_{H} (3,54; $J= 9,9$ e $3,0$ Hz); dois sinais múltiplos em δ_{H} (4,13-4,19) e δ_{H} [(5,41 - 5,30)].

Através da interpretação dos espectros de RMN ^1H utilizando a seqüência COSY (Figura 88, p.180) foi possível verificar os acoplamentos dos átomos de hidrogênio: H-1 interagindo com H-6 e H-2; que por sua vez interage com H-3; H-3 interagindo com H-4, H-4 interagindo com H-5 e ainda H-5 interagindo com H-6.

A atribuição do sinal a δ_{H} (3,54) a H-1 teve como base a presença do grupamento metoxila em C-1, a presença deste grupamento neste carbono confere a H-1 um efeito de proteção maior do que aquele observado nos demais hidrogênios metínicos da molécula.

Os grupamentos metila dos grupos acetoxilas absorvem em região mais protegida do espectro δ_{H} (2,02 - 2,17) do que os hidrogênios da metoxila em δ_{H} (3,54).

A interpretação do espectro de RMN ^{13}C utilizando a seqüência APT (Figura 89, p. 181) permitiu reconhecer dezesseis sinais, sendo quatro relativos a carbonos quaternários (C=O), seis carbonos metínicos oxigenados [(OCH) $_6$],

um relativo a grupo metoxila (O-CH₃), quatro relativos aos grupos acetoxilas (OAc) e um sinal referente a carbono oxigenado.

A análise preliminar desses dados nos sugerem que a outra função oxigenada presente na molécula pertença a uma função éter, o que nos permitiu deduzir tratar-se de uma molécula simétrica, onde estão presentes os seguintes grupos: (OAc)₈, (O-CH₃)₂ e ([-O-]). Considerando-se a relação entre o número átomos de carbono e hidrogênios, podemos concluir que a substância tem uma estrutura dimérica cuja fórmula molecular é C₃₀H₄₂O₁₉.

Os dados espectrais da substância **PW-12** permitiram deduzir que ela é constituída por dois anéis ligados através de uma função éter em C-2. A literatura mostra a ocorrência de vários esqueleto de ciclitóis (Almeida *et al.*, 2003) e dentre as possibilidades o esqueleto do dímero do 2-O-metil-inositol aparece como sendo aquele que melhor acomoda as características estruturais para **PW-12**.

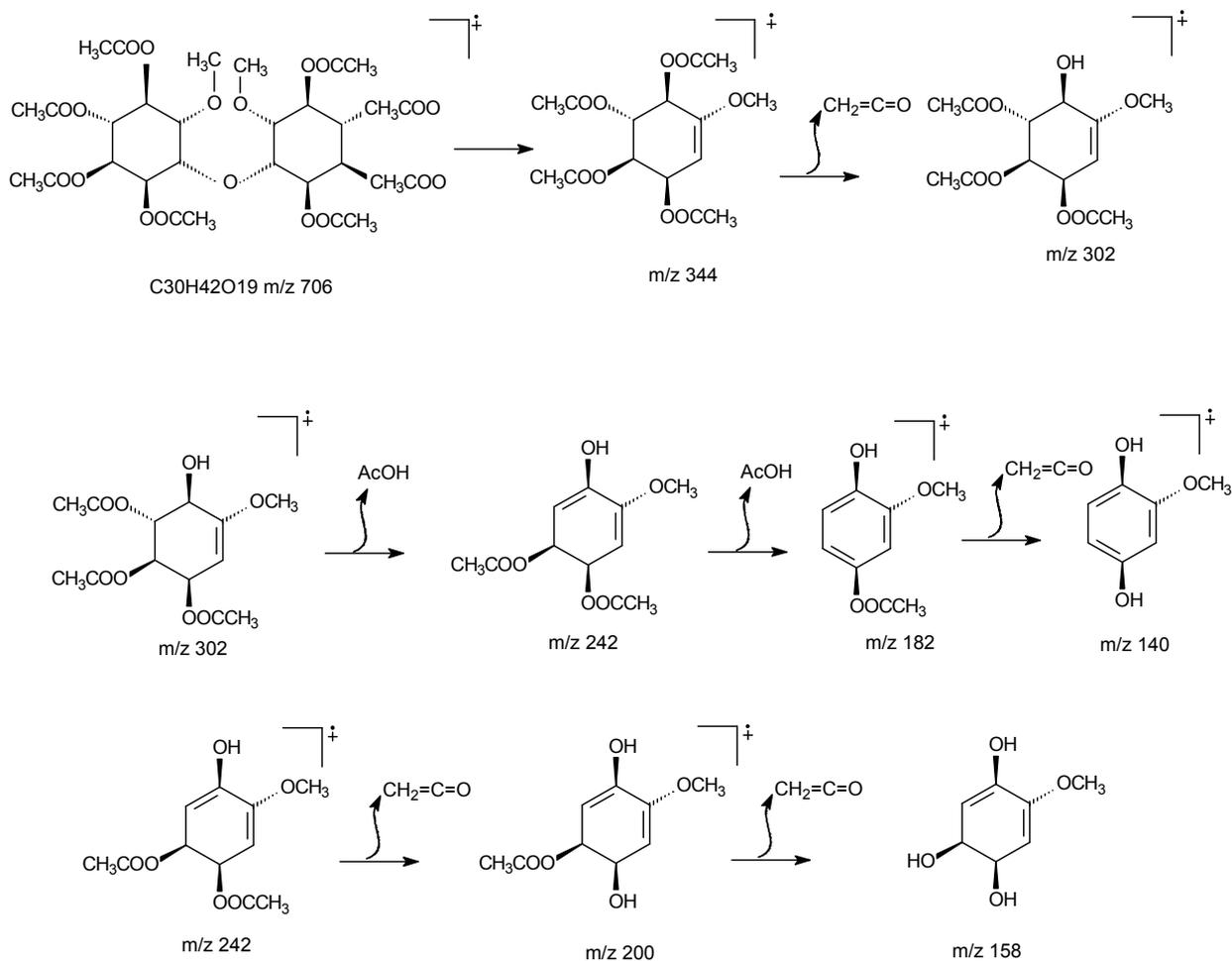
A análise do mapa de correlação heteronuclear HMQC (¹J_{CH}) (Figuras 93 - 95, p. 185 - 187) possibilitou a confirmação das atribuições de menor deslocamentos químicos, através das absorções dos hidrogênios com os respectivos carbonos envolvidos. Foi possível observar também os sinais de correlação entre o carbono da metoxila δ_C (58,50) e seus hidrogênios δ_H (3,45), a correlação de C-2 e C-2' δ_C (65,71) e H-2 e H-2' δ_H (4,13-4,19), a correlação de C-3 e C-3' δ_C (68,90) e H-3 e H-3' δ_H (5,52) e os demais carbonos C-4 e C-4', C-5 e C-5', C-6 e C-6' que se encontram correlacionados aos hidrogênios H-4 e 4', H-5 e 5' e H-6 e 6' cujas absorções aparecem em δ_H (5,41-5,30).

O mapa de correlação heteronuclear HMBC (ⁿJ_{CH}, n=2 e n=3) (Figuras 96 e 97, p. 188 e 189) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono metínicos revelando de forma clara o acoplamento dos átomos de carbono C-1 e C-1' δ_C (77,25) com os hidrogênios H-2 e 2' e H-6 e 6', o acoplamento de C-2 e 2' δ_C (65,71) com os hidrogênios H-1 e 1' e H-3 e 3', de C-3 e 3' δ_C (67,32) com os hidrogênios H-2 e 2' e H-4 e 4', o acoplamento de C-4 e 4' com os hidrogênios H-3 e 3' e H-5 e 5', o acoplamento de C-5 e 5' com H-4 e 4' e H-6 e 6' e finalmente de C-6 e 6' de δ_C (71,36) com os hidrogênios H-5 e 5' e H-6 e 6'. As atribuições completas de RMN ¹H e ¹³C estão descritos na Tabela 17.

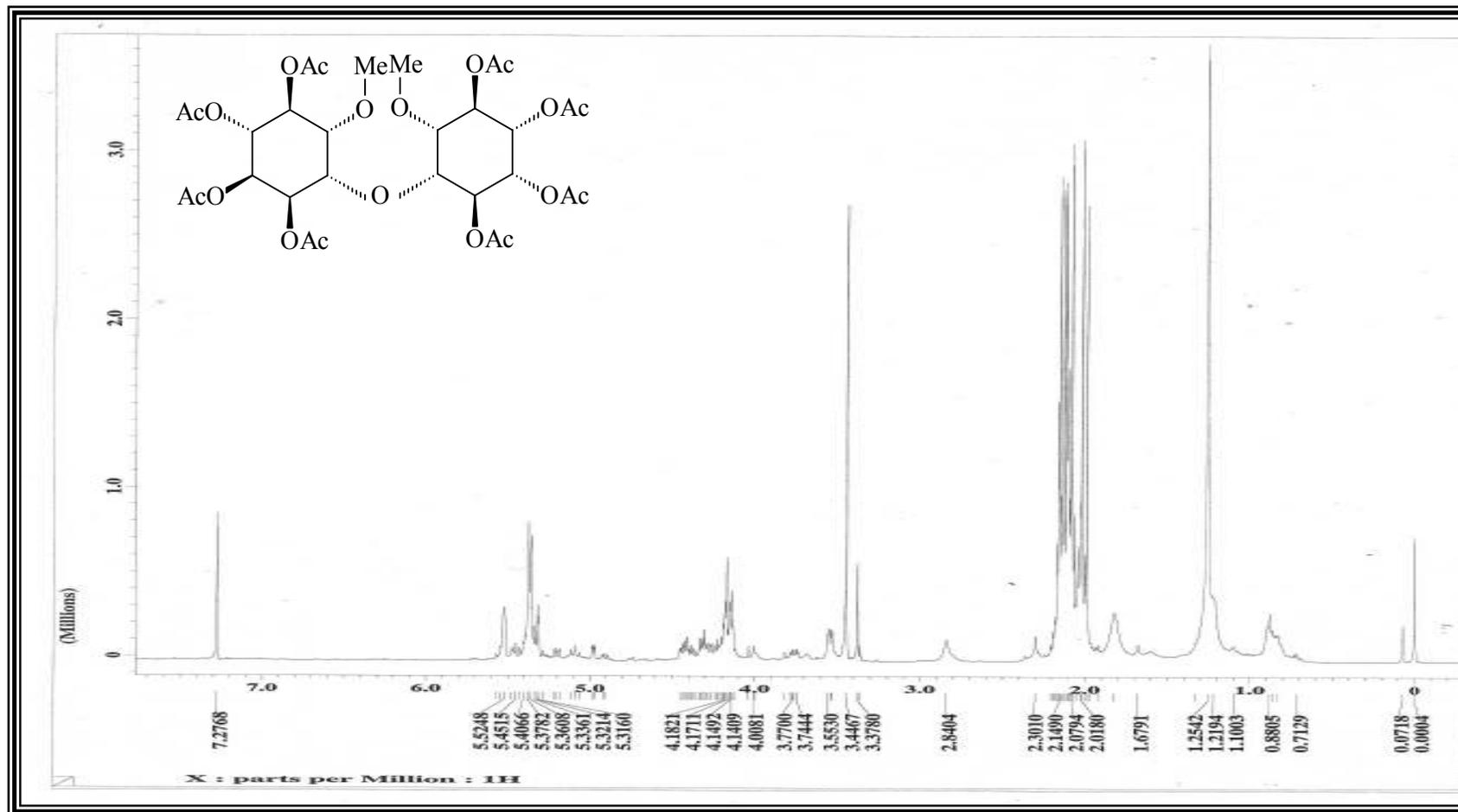
Tabela 17 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **PW-12**, comparados com dados da literatura para o 1-O-metil-inositol (Araújo e Lemos, 1994).

	PW-12	1-O-metil-inositol	PW-12	1-O-metil-inositol
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C				
Ac	-		170,20	169,96
Ac	-		169,95	169,85
Ac	-		169,95	169,63
Ac	-		169,61	169,86
Ac			169,33	169,11
H				
1	3,54 (<i>dd</i> , $J=9,9$ e $3,0$ Hz)	5,41(<i>t</i> , $J= 3,2$ Hz)	77,31	65,62
2	4,14 (<i>m</i>)	3,58 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e $3,2$ Hz)	66,62	77,20
3	5,52	5,26(<i>t</i> , $J = 9,5$ Hz)	68,91	71,30
4	5,41-5,30	5,34 (<i>t</i> , $J = 9,5$ Hz)	69,09	69,68
5	5,41-5,30	5,21 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e $3,2$ Hz)	69,83	69,06
6	5,41-5,30	5,36 (<i>t</i> , $J = 3,2$ Hz)	71,54	67,26
CH₃				
MeO-1	3,45 (<i>s</i>)	3,34	58,61	58,47
Ac	2,17 (<i>s</i>)	2,14	20,77	20,71
Ac	2,15 (<i>s</i>)	2,13	20,69	20,71
Ac	2,13(<i>s</i>)	2,04	20,6	20,65
Ac	2,10(<i>s</i>)	1,99	20,56	20,53
Ac	2,02 (<i>s</i>)	1,95	20,44	20,47

No espectro de massas de **PW-12** não foi possível observar o pico do íon molecular, mas em contrapartida, foi possível identificar alguns fragmentos interessantes tais como: ($m/z=242$, 200 , 158 e 158). (Figura 114, p.215)



Esquema 21 – Proposta de alguns fragmentos de massas para PW-12

Figura 84 – Espectro de RMN ^1H (400 Hz, CDCl_3) de PW- 12

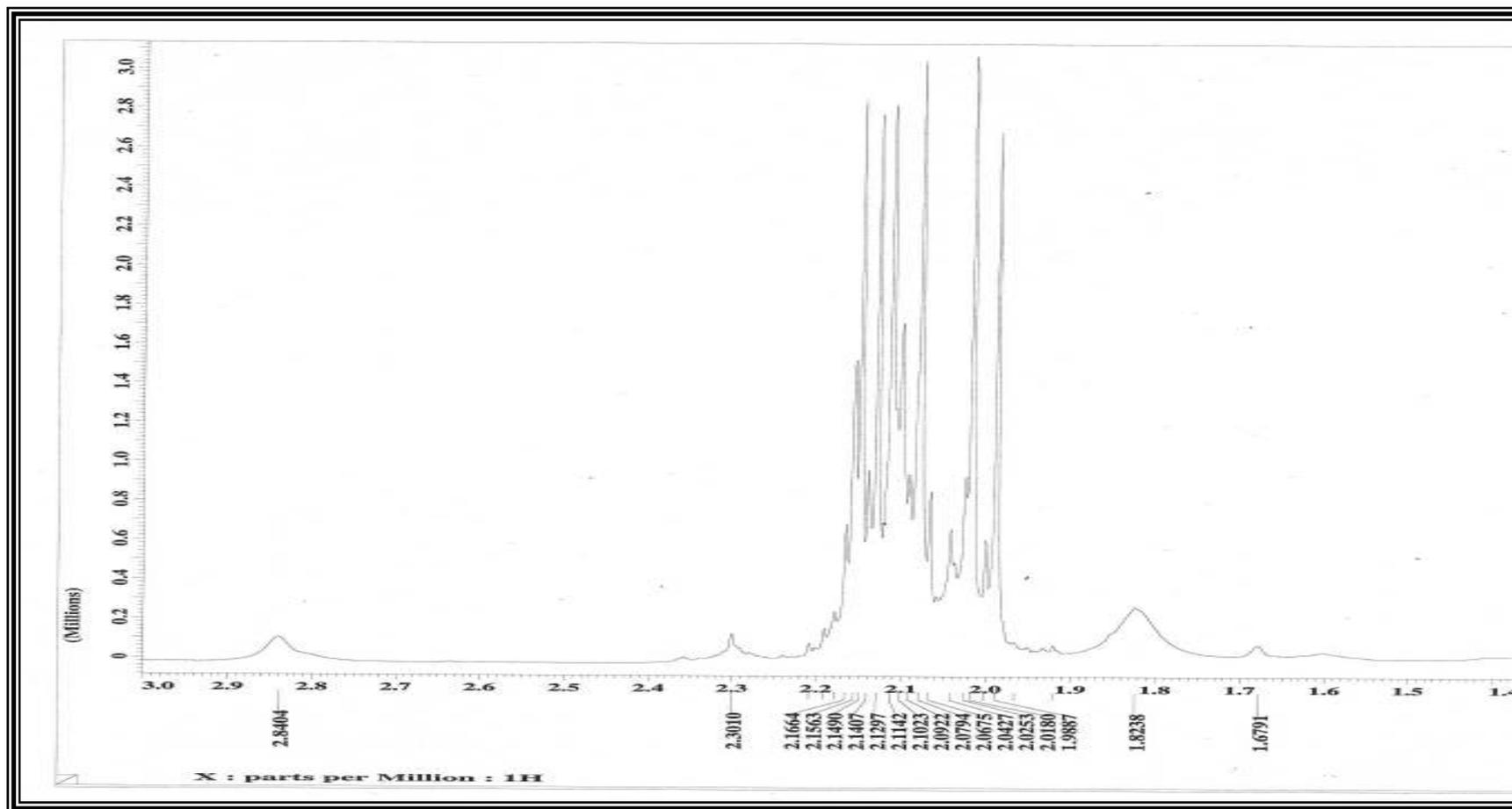


Figura 85 – Espectro de RMN ^1H (400 Hz, CDCl_3) (Expansão da região entre 1,4 – 3,0 ppm) de PW-12

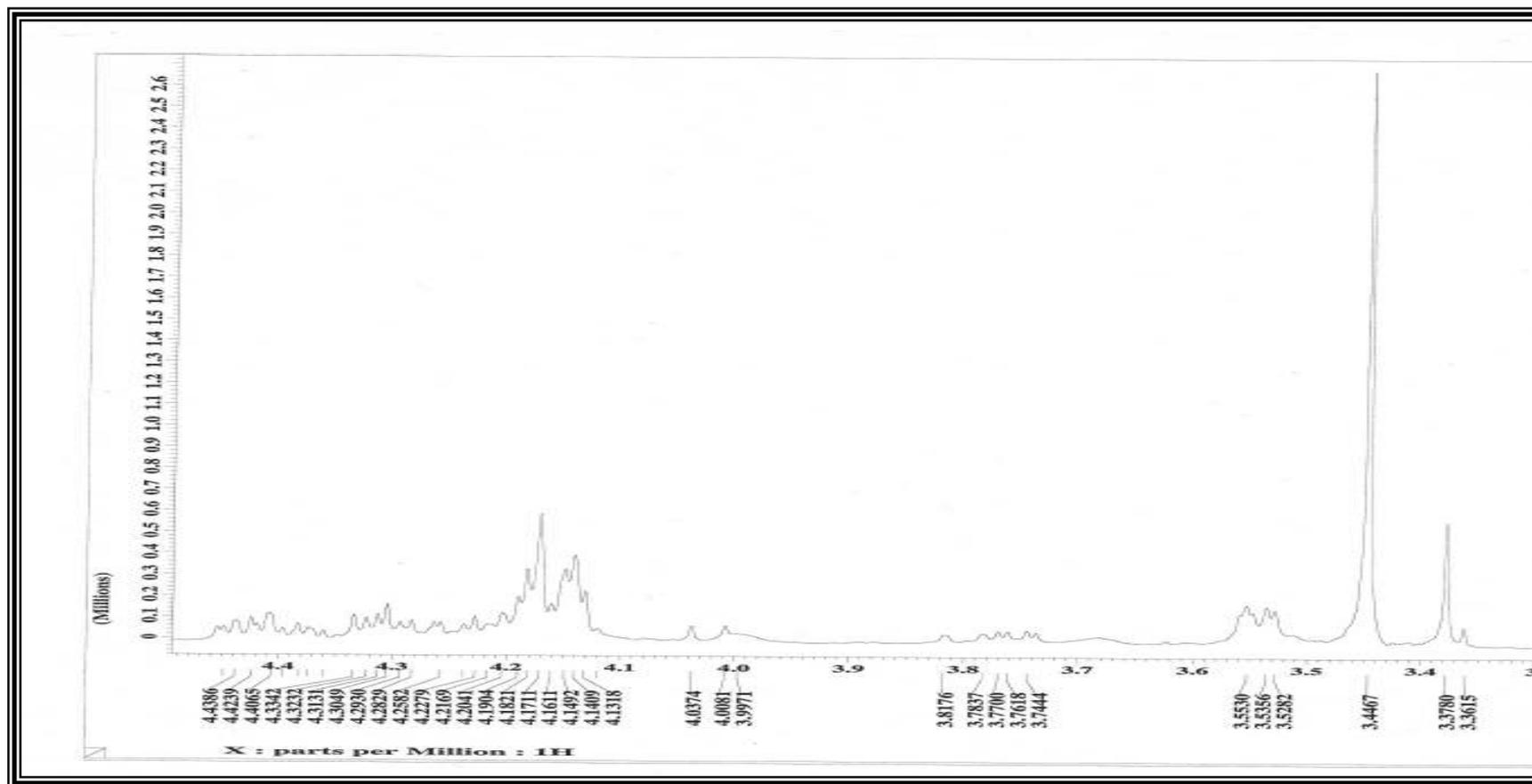


Figura 86– Espectro de RMN ^1H (400 Hz, CDCl_3) (Expansão da região entre 3,3 – 4,4 ppm) de PW-12

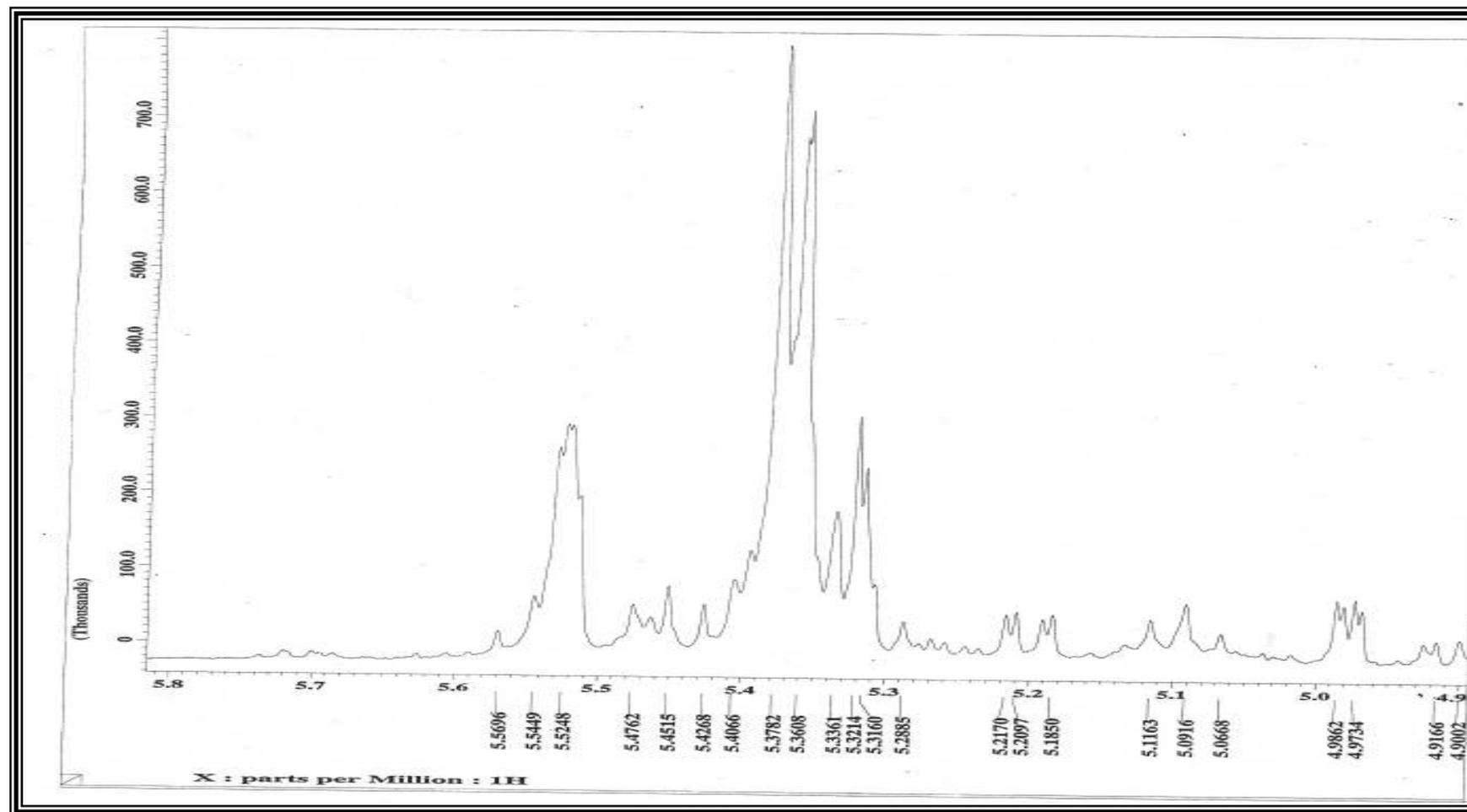


Figura 87 - Espectro de RMN ^1H (400 Hz, CDCl_3) (4,9 – 5,8ppm)de PW- 12

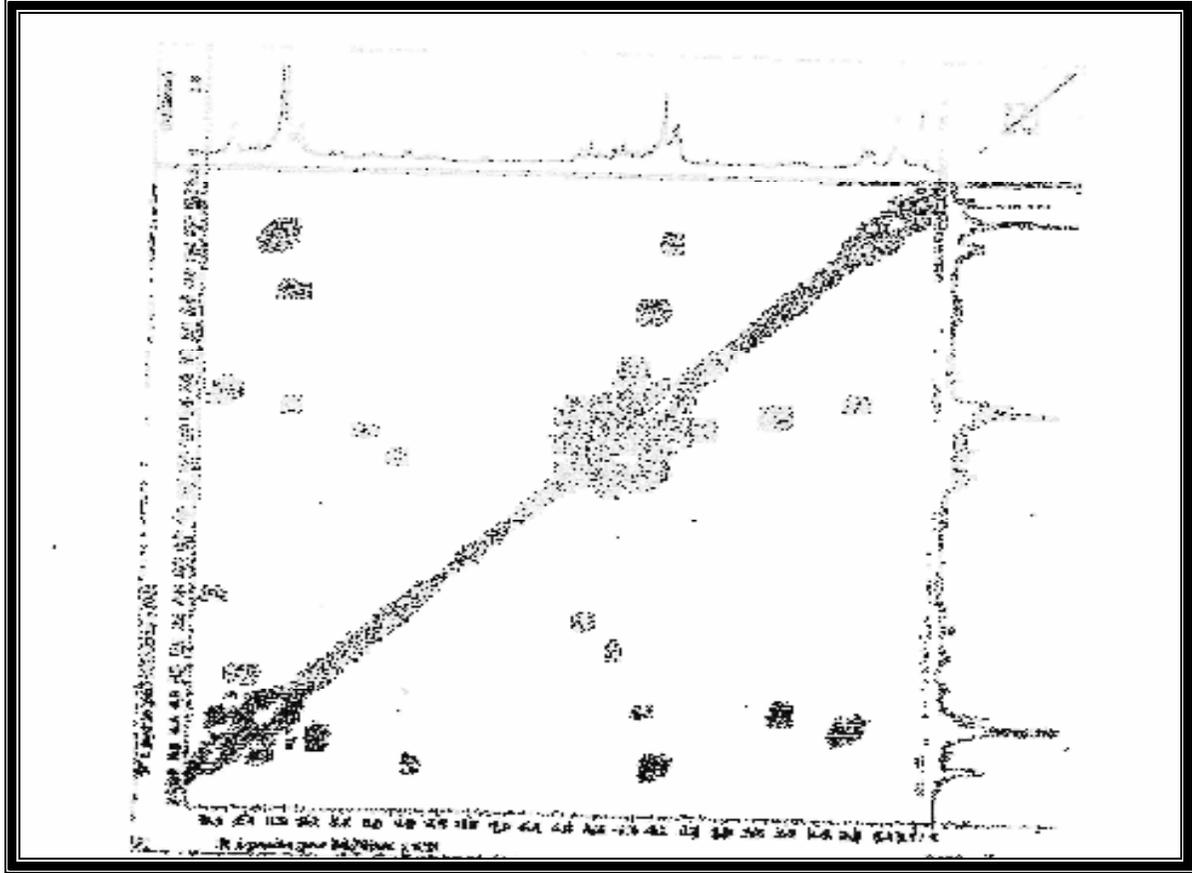


Figura 88 - Mapa de correlação COSY

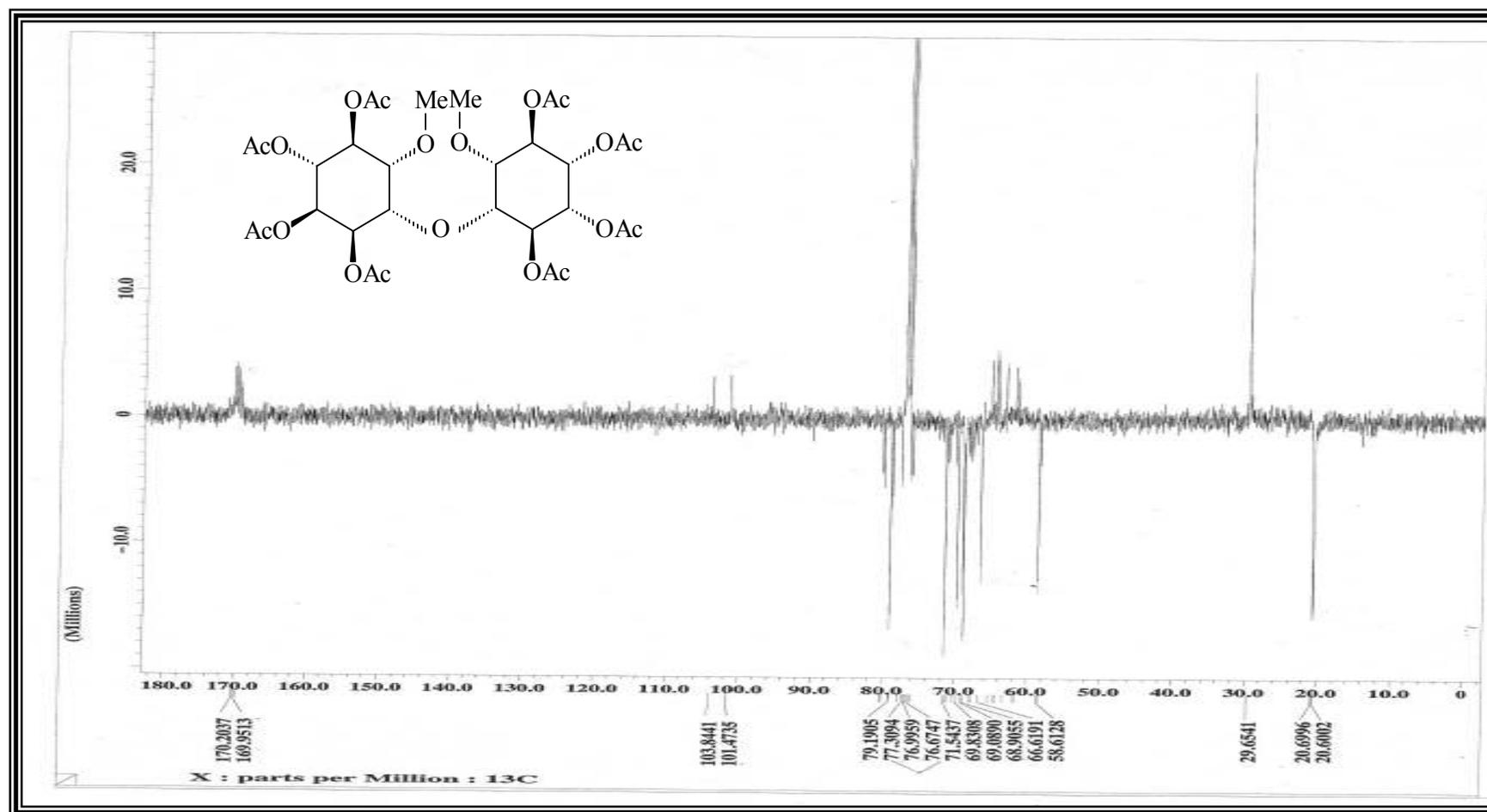


Figura 89 - Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 Hz, CDCl_3) de PW- 12

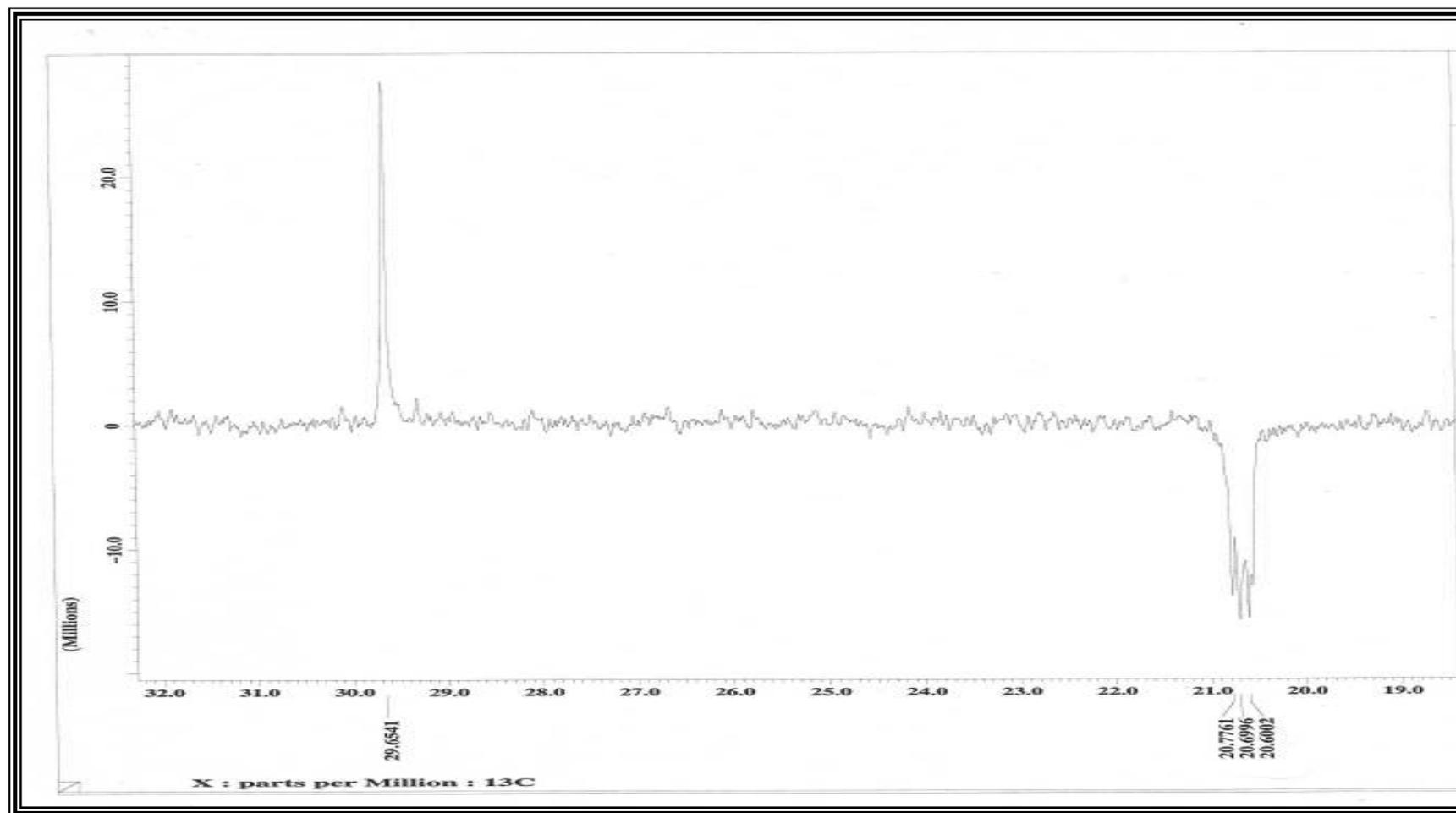


Figura 90 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 Hz, CDCl_3) (Expansão da região entre 19,0 – 32,0ppm)de PW-12

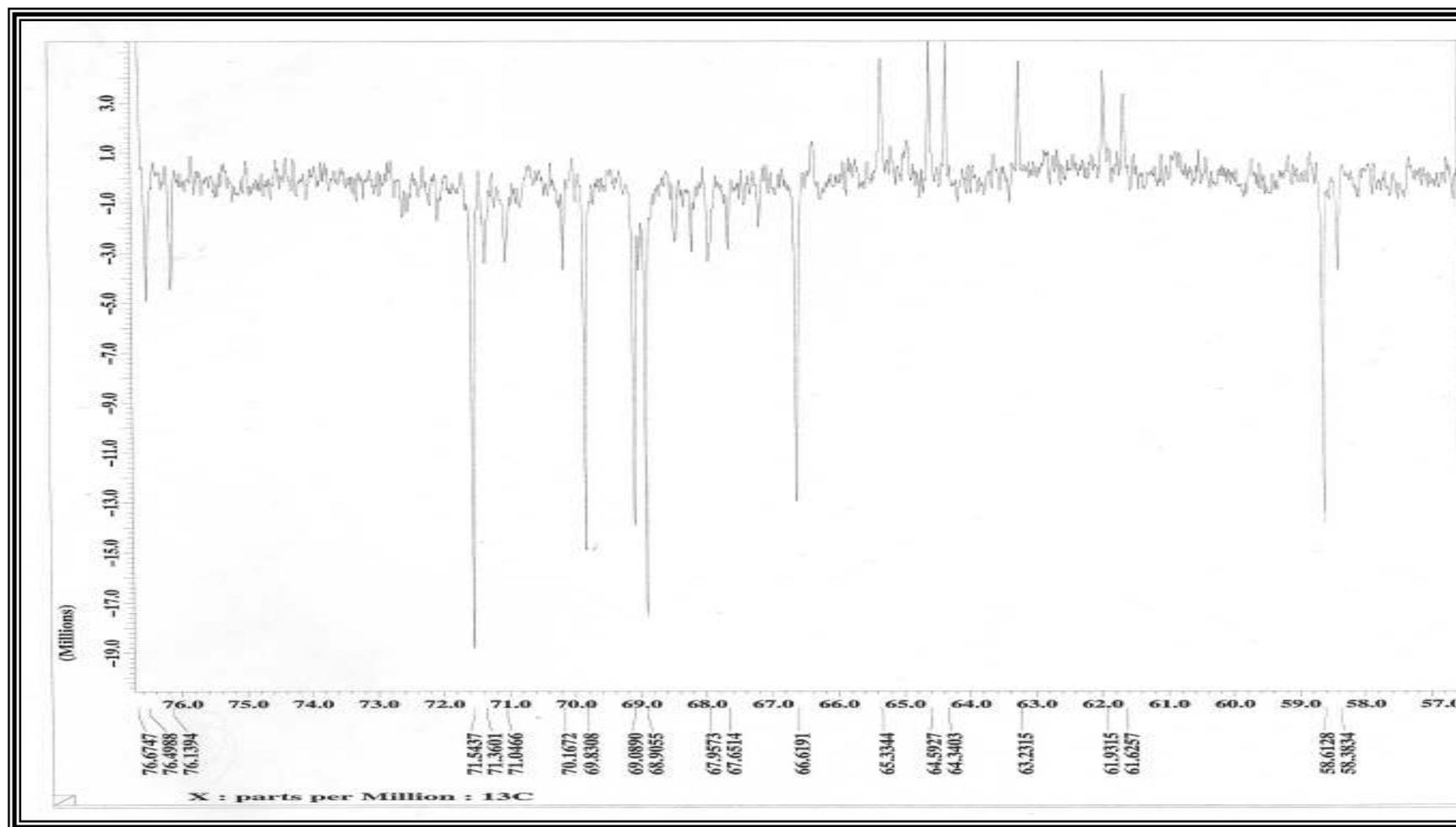


Figura 91 - Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 Hz, CDCl_3) (Expansão da região entre 57,0 – 76,0ppm)de PW-

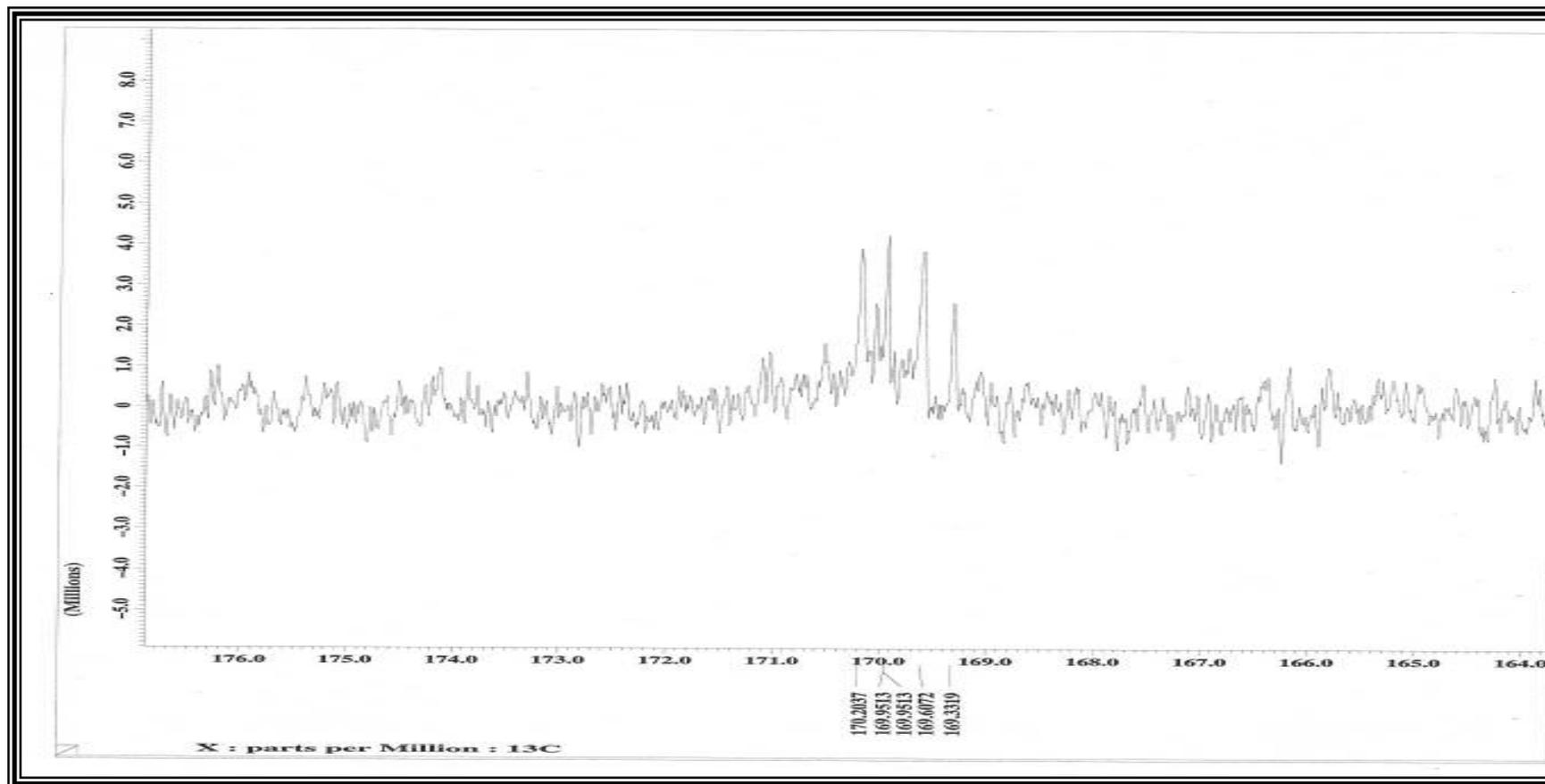


Figura 92 – Espectro de RMN ^{13}C – APT (100 Hz, CDCl_3) (Expansão da região entre 164,0 – 176,0ppm) de PW-12

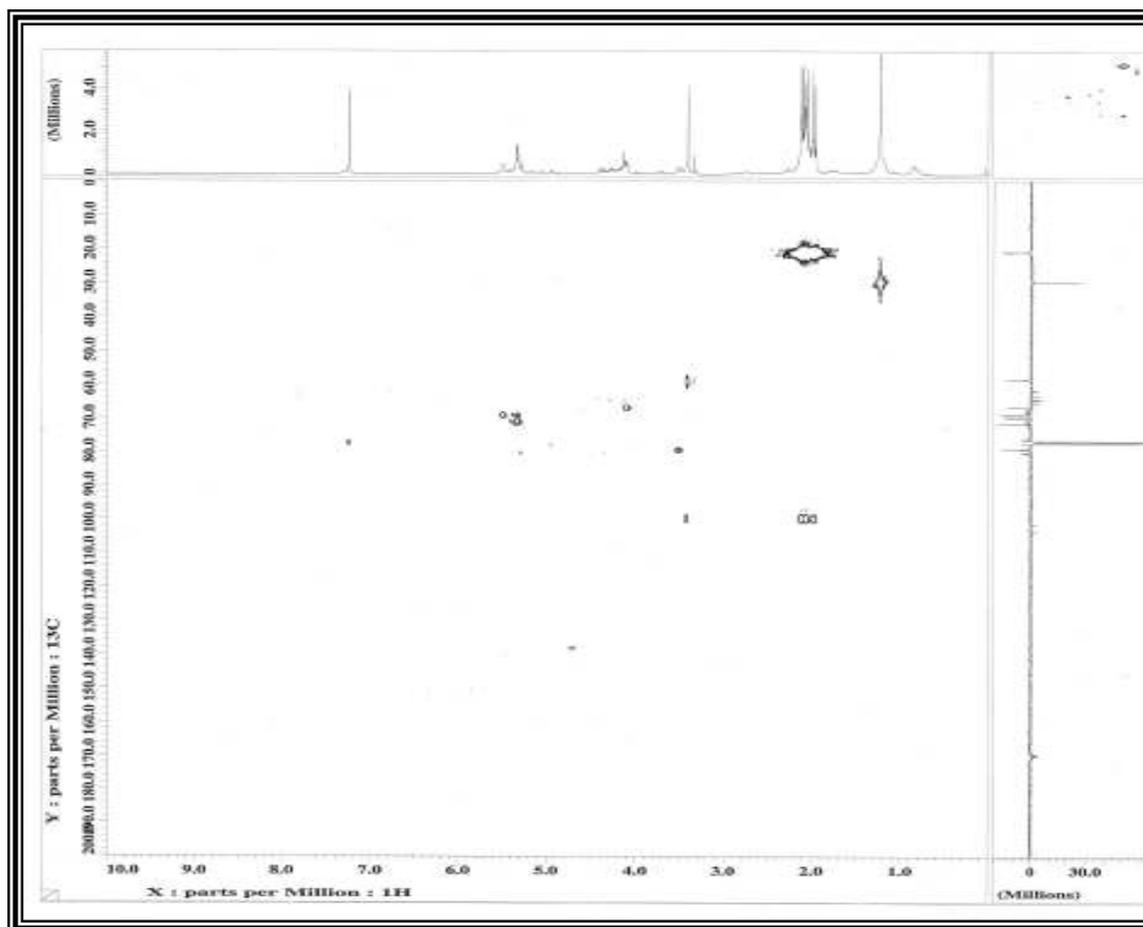


Figura 93- Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-12

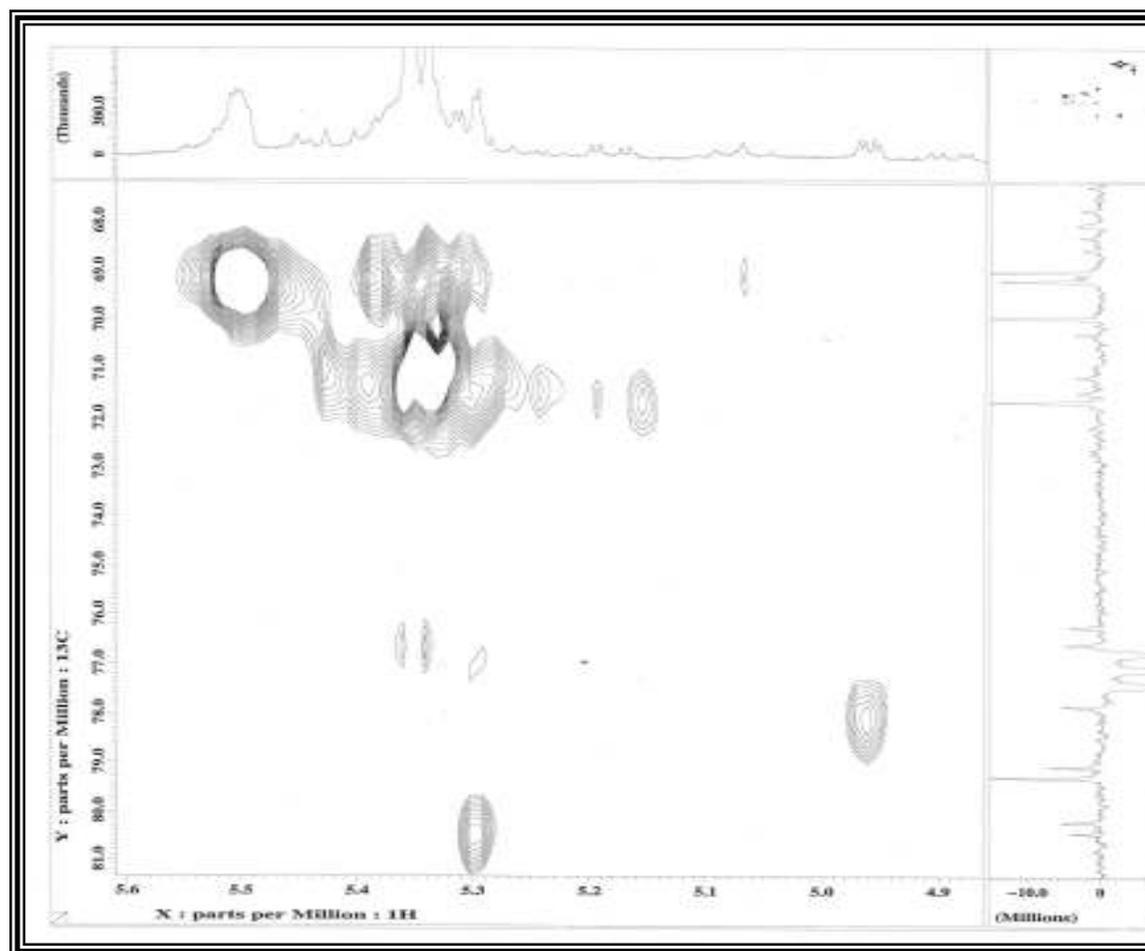


Figura 94 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-12

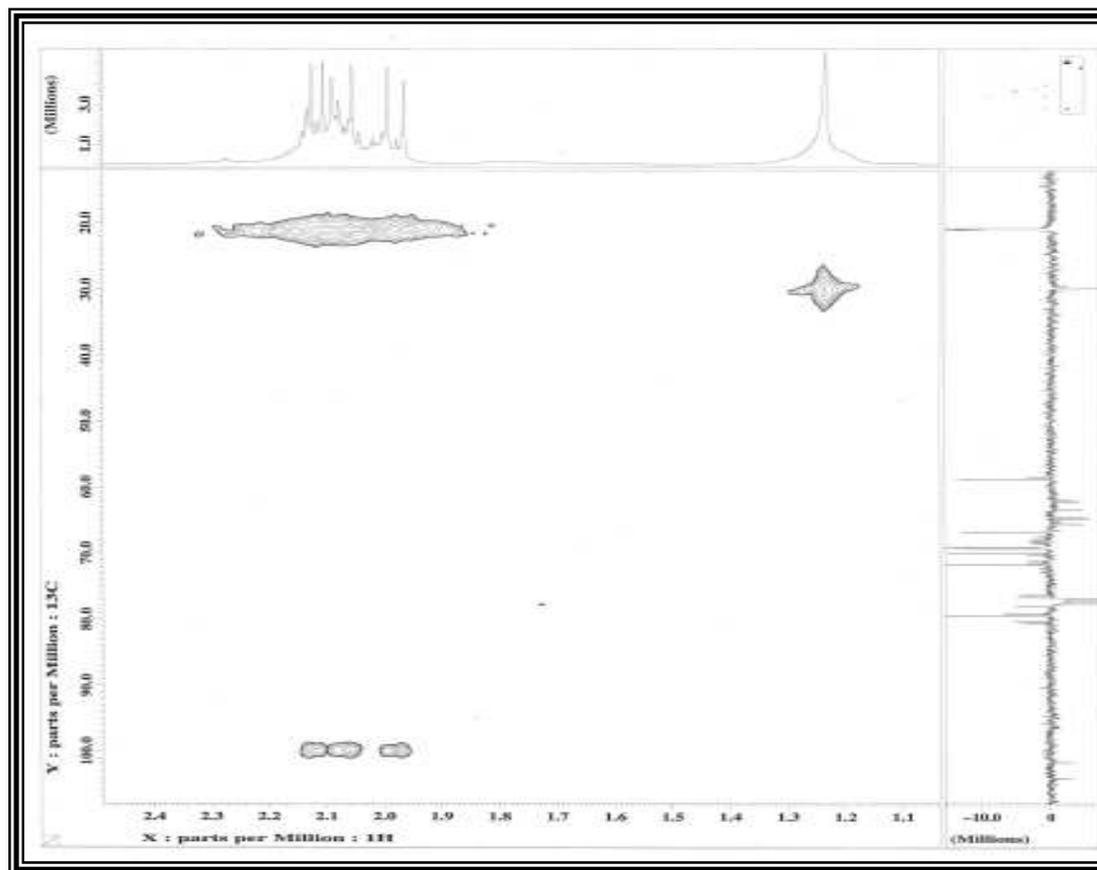


Figura 95 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de PW-12

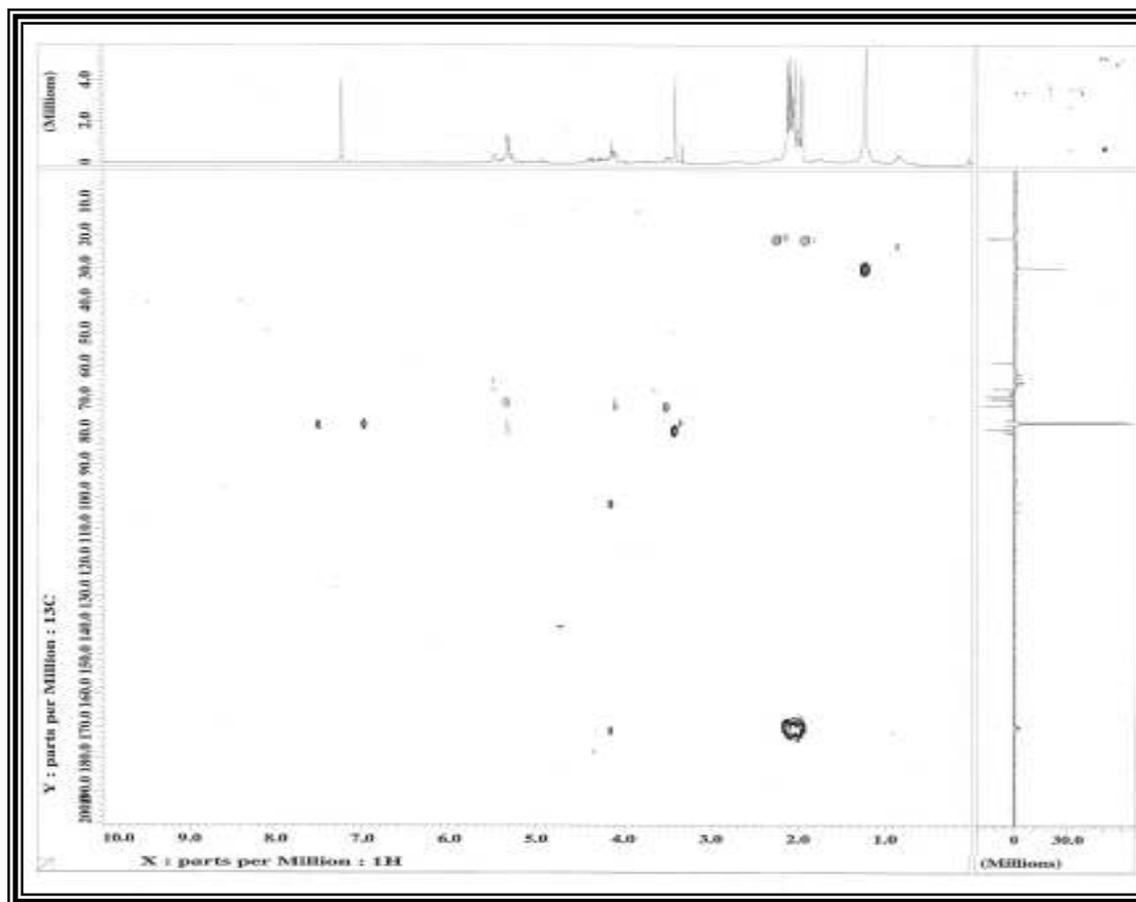


Figura 96 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-12

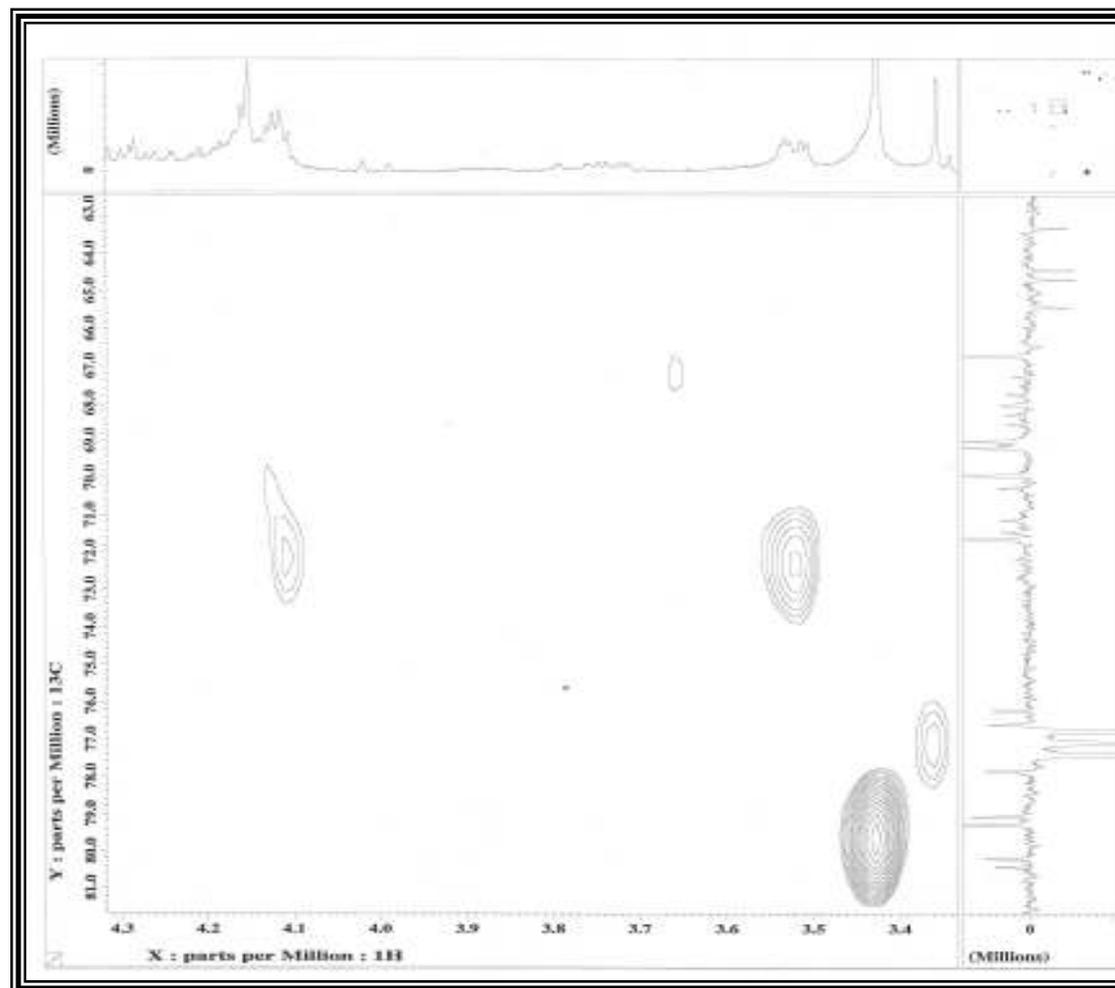


Figura 97 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de PW-12

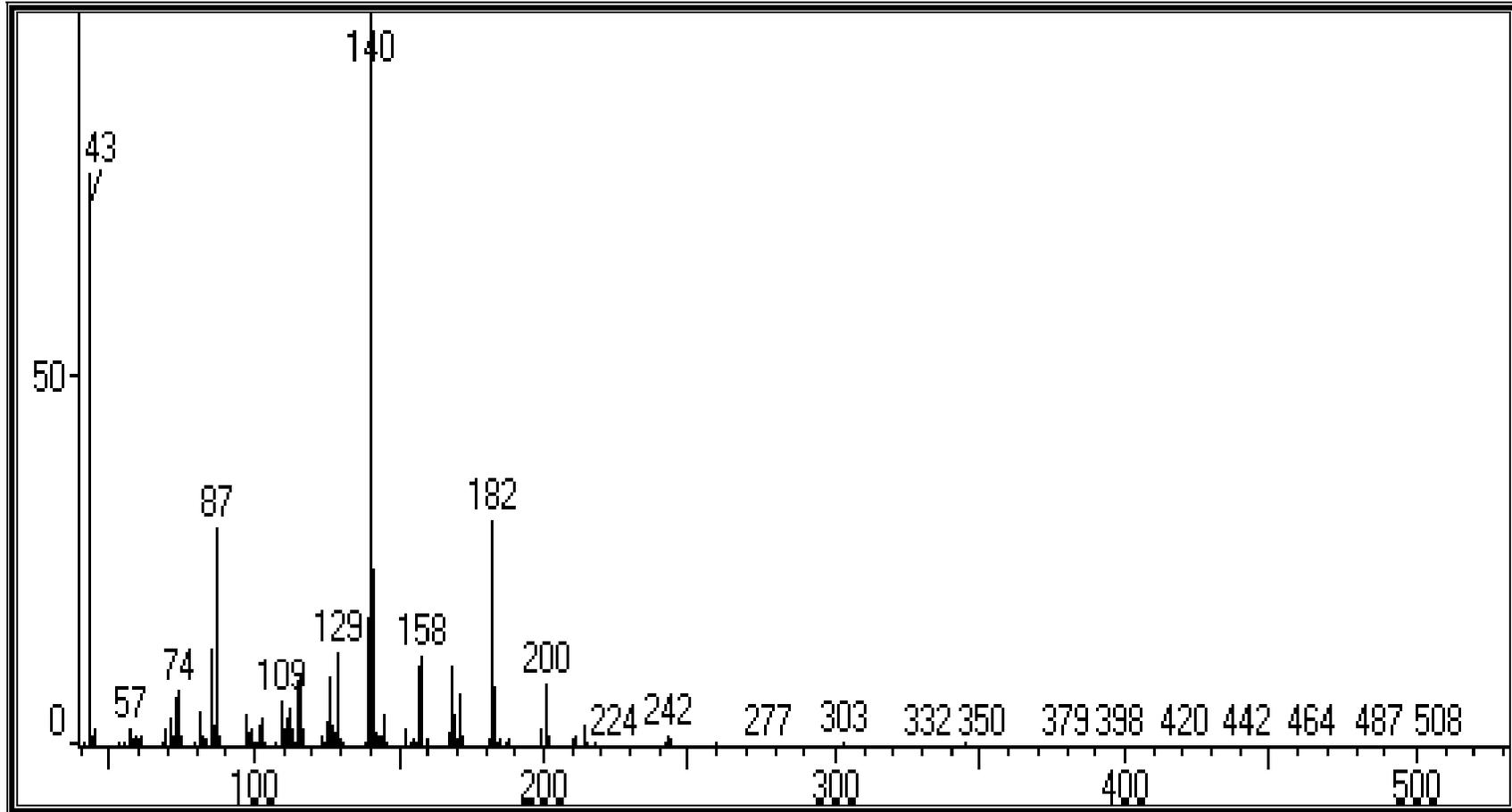


Figura 98 - Espectro de massas de PW-12

8.0 - Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante dos extratos brutos de *P. weinmanniaefolia*.

8.1 - Ensaio de citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina*

8.1.1 - Introdução

Embora seja importante o estudo fitoquímico das plantas, é interessante que se investigue também a atividade biológica dos extratos brutos, das frações e das substâncias puras através de testes preliminares.

Em vista disso resolveu-se inserir dentro das rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural um ensaio biológico simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico da espécie *P. weinmanniaefolia* com a finalidade de se identificar os extratos e frações com possíveis substâncias bioativas. O ensaio escolhido para este propósito foi o da citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina*.

Testes biológicos mais específicos, por exemplo, contra células cancerígenas, são caros e mais elaborados necessitando de uma infra-estrutura apropriada para sua realização. Por outro lado, instituições que dispõem de tais condições, requerem algum indício de que a substância possa ter alguma atividade biológica para a realização dos testes específicos, principalmente devido o alto custo das análises.

O bioensaio da citotoxicidade frente às larvas de *A. salina* caracteriza-se por ser de baixo custo, rápida e não exigir técnicas assépticas. A praticidade e simplicidade que o envolvem favorece sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa e vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para a avaliação da citotoxicidade de extratos ou substâncias puras isoladas. O bioensaio utiliza o microcrustáceo de água salgada (*A. salina*), que é utilizado como alimento para peixes e cujos ovos podem ser facilmente encontrados em lojas de piscicultura, foi proposto por McLaughlin, como um ensaio simples para determinar a DL₅₀ (µg/mL) para substâncias puras e extratos (McLaughlin *et al.*, 1982).

A técnica proposta baseia-se no princípio da toxicidade que as substâncias bioativas apresentam em altas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismo de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a bioatividade de

novas substâncias. O resultado funciona como uma avaliação preliminar de possível atividade biológica.

A literatura cita que várias substâncias bioativas foram testadas com *Artemia salina*, mostrando boa correlação entre citotoxicidade larval e atividade biológica (Holmans *et al.*, 1970; Siqueira *et al.*, 1998; Citó *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos correlacionam a citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, (Macrae *et al.* 1998) parasiticida (Sahpaz *et al.*; 1994), tripanossomicida (Zani *et al.*, 1995) e antitumoral (Citó *et al.*, 2003).

Devido a necessidade de encontrar substâncias anticancerígenas, McLaughlin e colaboradores têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais, e as frações ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. Substâncias submetidas ao ensaio que apresentarem DL₅₀ (µg/mL) menor que 1000 µg/mL são consideradas ativas (McLaughlin *et al.*, 1982; Siqueira *et al.*, 1998).

Testes biológicos *in vitro* utilizam culturas de células, e são extremamente importantes na pesquisa de anticancerígenos. Uma das primeiras etapas consiste em encontrar moléculas citotóxicas ou que inibem o crescimento de células tumorais de origem humana. Há um grande número de substâncias ativas *in vitro* que age sobre células cancerosas isoladas, porém não se tornam medicamentos utilizáveis em quimioterapia. De um modo geral, essas substâncias ou são bastante tóxicas para as células sadias ou não atingem o local onde deveriam agir, no caso o tumor (Hostettmann *et al.*, 2003). Este fato justifica a importância de se realizar testes de citotoxicidade seja com os extratos brutos de plantas e/ou com as substâncias puras.

8.1.2 - Metodologia

- Para o preparo de 2L de água do mar artificial foram utilizadas os seguintes reagentes: NaCl (48,0 g), CaCl₂.2H₂O (3,0 g), KBr (0,2 g), KCl (1,4 g); Na₂SO₄ (8,0 g), NaHCO₃ (0,4 g), MgCl.6H₂O (22,0 g) e água destilada.
- Para o controle positivo utilizou-se K₂Cr₂O₇, DMSO e Tween 80 (fornecido pela Farmácia Nascente de Manipulação LTDA);
- Utilizou-se para eclosão dos ovos de *A. salina* um aquário de plástico (7,5 x 14,0 cm) provido de uma peneira;

- Espátula, estantes com tubos de ensaios;
- Béqueres;
- Pipeta automática e pipeta Pasteur.

A metodologia utilizada no bioensaio consiste em diluir as amostras e o controle positivo e negativo pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa de sal marinho artificial com 1% de DMSO (V/V). Todas as etapas foram acompanhadas utilizando-se o dicromato de potássio como controle positivo e cada avaliação foi repetida em quadruplicata.

Para a realização do teste os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial, por um período de 48 horas. Foram utilizados um total de 28 tubos de ensaio contendo água do mar artificial e aproximadamente 15 larvas. Os extratos testados foram solubilizados em DMSO:H₂O (3:2) para 5 mL analisados nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 ppm e completados com água do mar artificial até o volume de 5 mL na presença de luz.

No branco foi utilizado 50 µg/mL de H₂O: DMSO (3:2) em quadruplicata. No controle positivo utilizou-se K₂Cr₂O₇ comparado com a massa e as concentrações da amostra analisadas.

Após 24 horas de contato a temperatura ambiente, o número de organismos sobreviventes e mortos foram contados e os dados obtidos foram submetidos a análise estatística através do programa Próbit para obtenção da DL₅₀ (µg/mL) (dose letal mínima para 50% da população) e respectivos intervalos de confiança.

Os extratos são considerados ativos quando apresentam uma DL₅₀ inferior a 1000 ppm. Os extratos metanólico e metanol-água do caule e o extrato diclorometânico das folhas foram os mais promissores. (Tabela - 18)

Tabela 18 - Dose Letal mínima responsável pela morte de 50% dos espécimes Analisados

<i>Extratos analisados</i>	DL₅₀ (ppm)
Caule - diclorometano	11619,94
Caule – metanol	375,38
Caule - metanol-água	620,30
Folhas - diclorometano	365,86
Folhas-metanol	1664,87
Folhas-metanol-água	32712,73

8.2 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos de *Paullinia weinmanniaefolia*

8.2.1 - Introdução

A literatura tem citado os radicais livres como coadjuvantes senão responsáveis pelo desencadeamento de doenças como câncer, arteriosclerose e também pelas reações que ocorrem no nosso organismo tendo uma grande participação nos processos de envelhecimento precoce ou natural. Desta forma, foi escolhido um teste simples para detectar a atividade antioxidante dos extratos brutos de *P. weinmanniaefolia*, com o intuito de investigar a atividade antioxidante de cada um dos extratos e com testes posteriores determinar a substância responsável pelo caráter antioxidante, utilizando para isso o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil).

Embora atualmente a etiologia de várias doenças humanas ainda permaneça desconhecida, varias linhas de pesquisa sugerem que a toxicidade de radicais livres tenha papel importante na origem destas patologias, assim, o interesse na descoberta de antioxidantes eficientes e seguros aumentou significativamente nos últimos anos (Halliwell *et al.*, 1990).

Espécies reativas de oxigênio estão envolvidos em um grande número de doenças como câncer, arteriosclerose, úlcera, entre outros, e a administração de antioxidantes como polifenóis têm sido eficiente na prevenção de doenças. Os

polifenóis pertencem a uma classe heterogênea de substâncias com uma grande variedade de efeitos, recentemente as funções fisiológicas de polifenóis têm recebido muita atenção. Muitos antioxidantes naturais já foram isolados de diferentes tipos de materiais provenientes de plantas. Sobre a ação de antioxidantes naturais pode -se citar os compostos fenólicos devido a sua capacidade supressora de radicais livres derivados de oxigênio por doação de átomo de hidrogênio ao elétron do radical livre. Também foi observado que substâncias fenólicas tem bloqueado radicais livres em vários sistemas modelos, incluindo vitaminas, pigmentos e flavonóides (Shon *et al.*, 2003).

Os radicais livres são definidos como moléculas que contem elétrons desemparelhados no seu orbital e são geralmente instáveis e altamente reativos, exemplos de radicais livres oxigenados: Superóxidos, hidroxila, peroxil (RO_2^-), alcóxil (RO^-), hidroxiperoxil (HO_2^-), óxido e dióxido de nitrogênio (Zhong *et al.*, 2002).

Os antioxidantes são substâncias capazes de adiar, retardar ou prevenir o processo de oxidação lipídica, permitindo assim, o armazenamento de produtos alimentícios por longos períodos sem os danos nutricionais, organolépticos e tóxicos já conhecidos. Com a aplicação destas substâncias em alimentos lipídicos é possível aumentar a vida útil destes em até 200% (Schirch *et al.*, 2000, Mc Carthy *et al.*, 2001).

8.2.2 - Metodologia

- Estantes com tubos de ensaios;
- Béqueres para descarte;
- Pipeta automática;
- Espectrofotômetro de luz Ultravioleta 482 FEMTO faixa espectral (240 - 1000nm);
- DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) (Aldrich);
- Álcool etílico PA (VETEC);
- Rutina (SIGMA);

No teste com DPPH a eficiência da atividade antioxidante é medida a temperatura ambiente o que elimina o risco de degradação térmica das moléculas testadas. Contudo, o mecanismo de reação entre o antioxidante e o DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante. Alguns compostos reagem muito rápido

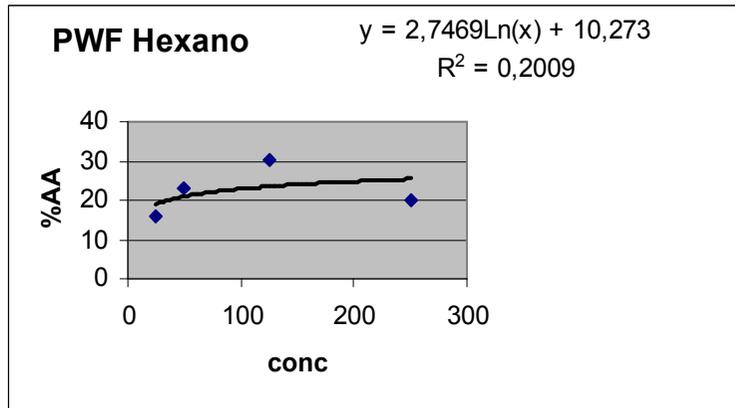
com DPPH reduzindo um numero de moléculas de DPPH igual ao numero de grupos hidroxilas disponíveis. No entanto, a maioria dos substâncias testadas, a reação é lenta e o mecanismo parece ser mais complexo (Bondet et al., 1997).

A metodologia utilizada para avaliar o potencial antioxidante dos extratos foi o método da atividade seqüestrante do radical livre DPPH (2.2-difenil-1-picril-hidrazil) como radical livre. As análises foram realizadas reagindo-se 1 mL de solução etanólica de DPPH 0,3 mM com 2,5 mL da amostra solubilizada em etanol nas seguintes concentrações 25,0; 50,0; 125,0; e 250,0 µg/mL. Após 30 minutos mediu-se os valores da absorbância em espectrofotômetro de luz ultravioleta no comprimento de onda de 518 nm, os valores da absorbâncias foram convertidos para porcentagem de atividade antioxidante (%AA) usando a seguinte formula:

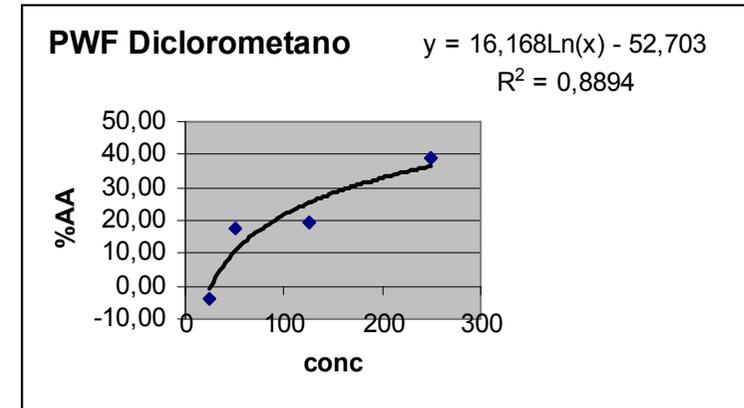
$$\text{AA\%} = \frac{100 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}}$$

Todas as análises foram realizadas em triplicata. O controle negativo foi feito com 1,0 mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura em branco foi realizada com 2,5 mL de solução das amostras mais 1,0 mL de etanol. A substância utilizada como padrão foi a rutina, um flavonóide com atividade antioxidante já descrita na literatura 14,16 ppm. (Mensor *et al.*, 2001).

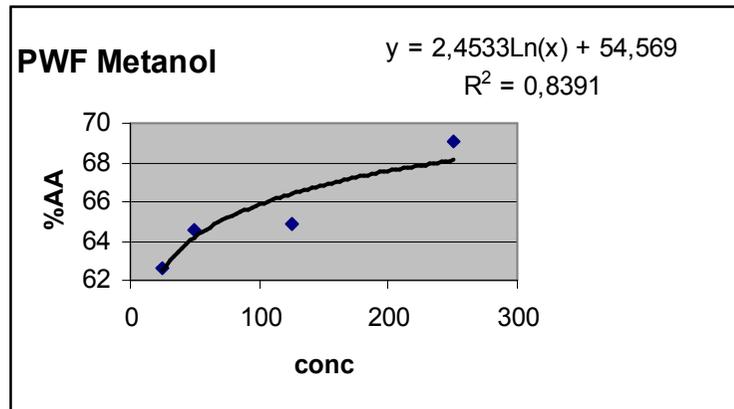
A AA% foi calculada através de média aritmética e o valor da EC₅₀ foi calculado através da equação da reta retirada do gráfico plotado, onde a abcissa representa as concentrações da amostra testada e a ordenada a porcentagem de atividade antioxidante (AA%). Obtendo-se os gráficos de cada um dos extratos testados, e após substituição do EC₅₀ na equação da reta obtém-se assim o EC₅₀ para cada um dos extratos testados (Figura - 99 e 100).



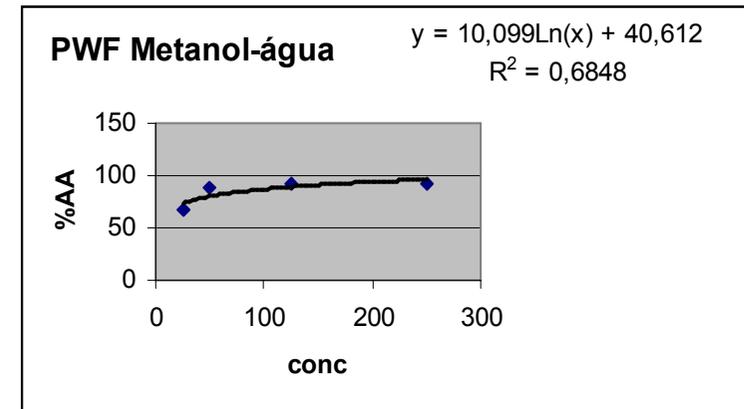
$$EC_{50} = 1909753,975$$



$$EC_{50} = 573,776$$

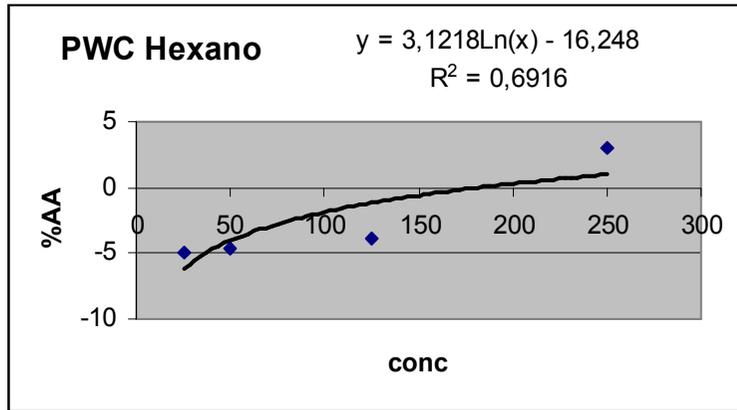


$$EC_{50} = 0,155$$

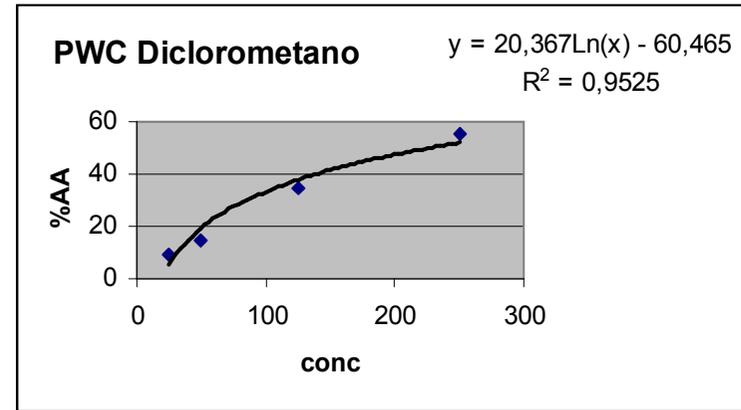


$$EC_{50} = 2,533$$

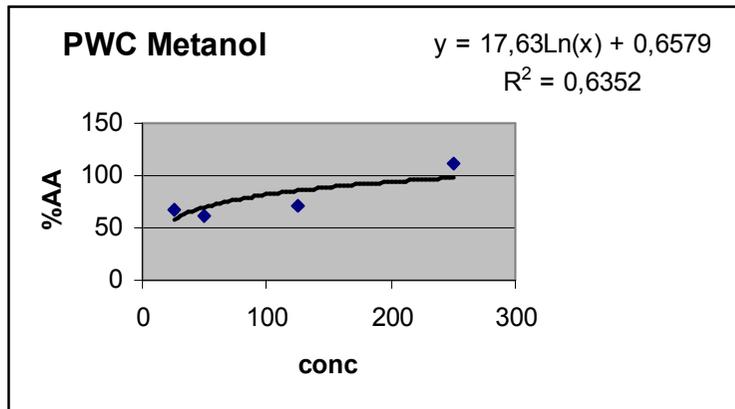
Figura 99 – Gráficos da percentagem de atividade antioxidante x concentração dos extratos brutos das folhas.



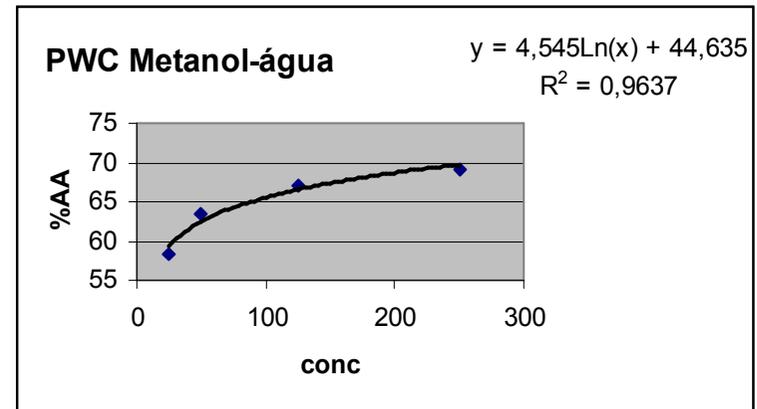
$$EC_{50} = 1645138474$$



$$EC_{50} = 226,945$$



$$EC_{50} = 16,42$$



$$EC_{50} = 3,256$$

Figura 100 – Gráficos da percentagem de atividade antioxidante x Concentração dos extratos brutos do caule.

Para comparação da atividade antioxidante dos extratos utilizamos a rutina (Figura - 101) como padrão de atividade antioxidante. Como pode ser observado no gráfico abaixo, a % AA da rutina é bem elevada.

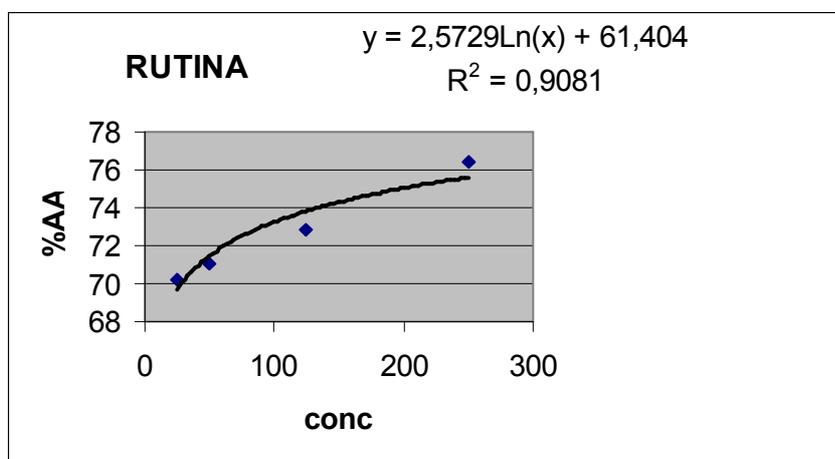


Figura 101 - Gráfico da porcentagem de atividade antioxidante x Concentração para a rutina

Todos os extratos foram comparados com a rutina $EC_{50} = 0,012 \mu\text{g/mL}$, após a análise final destes dados concluímos que os extratos metanólico e metanol-água das folhas e o extrato metanol-água do caule são os mais promissores em relação a atividade antioxidante de acordo com Tabela 19. Como era de se esperar, os extratos em hexano e diclorometano apresentaram as menores atividades uma vez que a %AA está ligada a presença de substâncias mais polares que não são facilmente encontradas nestes extratos.

Tabela 19 - EC_{50} dos extratos de *P. weinmanniaefolia* avaliados frente ao radical livre DPPH

Extrato	EC_{50}
PWF Hexano	1909753,978
PWF Diclorometano	573,78
PWF Metanol	0,160
PWF Metanol-água	2,530
OPWC Hexano	1645138474
PWC Diclorometano	226,950
PWC Metanol	16,420
PWC Metanol-água	3,260
Rutina	0,012

9.0 - CONCLUSÕES

A avaliação fitoquímica dos extratos do caule e das folhas de *Paullinia weinmanniaefolia* resultou no isolamento e/ou identificação de oito triterpenos: **PW-01** (friedelina), **PW-02** (friedelanona), **PW-03** (canofilol); **PW-04** (lupeol), **PW-05** (β -amirina); **PW-06** (α -amirina); **PW-07** (epifriedelanol); **PW-08** (acetato do ácido oleanólico), dois esteróides: **PW-09** (β -sitosterol); **PW-10** (estigmasterol) e dois ciclitóis: 1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-O-metil-L-*quiro*-inositol (**PW-11**) e [1-1'-4-4'-5-5'-6-6'-tetra-O-acetil-2-O-metil-L-*quiro*-inositol] (**PW-12**). Pelo melhor do nosso conhecimento as substâncias **PW-01** a **PW-10** estão sendo citadas pela primeira vez no gênero e a substância **PW-12** pela primeira vez na literatura.

A revisão bibliográfica da espécie mostrou que a espécie não havia sido estudada fitoquimicamente até o momento. Deste modo, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie *Paullinia weinmanniaefolia*, e também como um incentivo aos estudos biológicos mais específicos, pois, três dos seis extratos testados (extrato metanólico do caule; extrato metanol-água do caule e extrato diclorometânico das folhas) apresentaram resposta positiva frente ao teste de citotoxicidade contra *Artemia salina* Leach, e ainda, dos seis extratos testados frente ao radical livre DPPH, três extratos mostraram uma excelente atividade antioxidante (extrato metanólico de folhas, extrato metanol-água de folhas e o extrato metanólico do caule) quando comparada a atividade antioxidante da rutina (flavonóide reconhecido por sua comprovada atividade antioxidante).

Em vista dos resultados obtidos concluímos que os objetivos propostos neste trabalho de tese foram alcançados.

10.0 - CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Friedelina (PW-01)

F.M.: $C_{30}H_{50}O$

P.M = 426 u.m.a.

P.f = 255,2 - 255,6 °C

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (1,94, *m*, H-1); (2,36, *m*, H-2); (2,23, *q*, $J = 6,4$ Hz, H-4); (1,38, H-8); (0,86, *d*, $J = 6,7$ Hz, H-23); (0,86, *s*, H-25); (0,99, *s*, H-26); (1,03, *s*, H-27); (0,94, *s*, H-29); (0,99, *s*, H-30)

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (22,27; C-1); (41,51; C-2); (213,19; C-3); (58,47; C-4); (42,13; C-5); (41,28; C-6); (18,23, C-7); (53,09; C-8); (37,43; C-9); (59,47; C-10); (35,61; C-11); (30,49; C-12); (39,69; C-13); (38,28; C-14); (32,41; C-15); (36,00; C-16); (29,98, C-17); (42,79; C-18); (35,33; C-19); (28,16; C-20); (32,76; C-21); (39,24; C-22); (6,81; C-23); (14,64; C-24); (17,93; C-25); (20,24; C-26); (18,65; C-27); (32,08; C-28); (35,01; C-29); (31,77; C-30).

Espectrometria de Infravermelho(cm^{-1}): 2927,7; 2869,9; 2846,7; 1743; 1458,1; 1390,6; 1363,6; 1109,0.

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (426); m/z : (398; 341; 273; 125; 69; 55).

Friedelona (PW-02)

F.M.: $C_{30}H_{50}O_2$

P.M = 442 u.m.a.

P.f = 263,5 - 264,8 °C

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ [(2,53, *dd*, $J = 13,6$ e $3,3$ Hz) (2,40, *t*, $J = 13,6$ Hz); H-1]; (3,82, *dd*, $J = 12,8$ e $2,9$ Hz H-2); (1,30; H-4); (1,85, *td*, $J = 12,8$ e $2,9$ Hz, H-6); (1,50, H-7); (1,28; H-8); (1,30, H-10); (1,38, 1,16; H-11); (1,30, H-12); (1,54; 1,25; H-15); (1,54; 1,33; H-16); (1,59, *st*; H-18); (1,30; 1,20; H-19); (1,46; 1,24; H-21); (1,46; 0,92; H-22); (1,05; *d*; $J = 6,6$ Hz H-23); (1,03, *s*, H-24); (0,89, *s*, H-25); (1,01, *s*, H-26); (0,98, *s*, H-27); (1,17, *s*, H-28); (0,99, *s*, H-29); (0,94, *s*; H-30).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (36,06; C-1); (211,82; C-2); (77,25; C-3); (54,48; C-4); (37,57; C-5); (40,57; C-6); (17,53; C-7); (53,07; C-8); (38,03; C-9); (60,35; C-10); (35,86; C-11); (30,25; C-12); (39,58; C-13); (38,25; C-14); (32,27; C-15); (35,86; C-16); (29,62; C-17); (42,70; C-18); (35,25; C-19); (28,16; C-20); (32,67; C-21); (39,15; C-22); (10,73; C-23); (14,09; C-24); (17,52; C-25); (20,10; C-26); (18,48; C-27); (32,00; C-28); (31,67; C-29); (35,86; C-30).

Espectrometria de Infravermelho(cm^{-1}): 3440,8; 2925,8; 2864,1; 2846,7; 1716,5; 1706,9; 1458,1; 1392,5; 1363,6; 1060,8.

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (442); m/z: (318; 289; 125).

Canofilol (PW-03)

F.M.: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$

P.M = 442 u.m.a.

P.f = 255,5 - 257,8 °C

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (2,42 – 2,22; H-4); (3,63, H-28); (0,88; H-23); (0,88; H-24); (0,72; H-25); (0,98, H-26); (0,91; H-27); (0,99; H-128); (1,13, H-30).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (22,24; C-1); (41,48; C-2); (213,11; C-3); (58,19; C-4); (42,08; C-5); (41,22; C-6); (18,22, C-7); (52,46; C-8); (37,43; C-9); (59,46; C-10); (34,47; C-11); (31,37; C-12); (38,13; C-13); (39,35; C-14); (31,22; C-15); (29,11; C-16); (35,41 C-17); (39,43; C-18); (33,34; C-19); (28,13; C-20); (30,07; C-21); (33,34; C-22); (6,80; C-23); (14,65; C-24); (18,06; C-25); (19,18; C-26); (19,05; C-27); (68,04; C-28); (34,24; C-29); (32,83; C-30).

Espectrometria de massas (70 eV): m/z: (411; 301; 273; 247).

Lupeol (PW-04)

F.M.: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$

P.M = 426 u.m.a.

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (38,84; C-1); (27,44; C-2); (79,08; C-3); (38,84; C-4); (55,18; C-5); (18,31; C-6); (34,28, C-7); (40,83; C-8); (50,44; C-9); (37,15; C-10); (21,29; C-11); (21,14; C-12); (38,05; C-13); (42,82; C-14); (27,44; C-

15); (35,58; C-16); (42,99, C-17); (48,31; C-18); (47,97; C-19); (150,82; C-20); (29,85; C-21); (39,99; C-22); (28,08; C-23); (16,07; C-24); (16,79; C-25); (15,45; C-26); (14,54; C-27); (17,99; C-28); (109,31; C-29); (19,30; C-30).

Espectrometria de Infravermelho(cm^{-1}): 3344,3; 2918,1; 2848,7; 1452,3; 1379,0; 1363,6; 1031,8; 879,5; 717,5.

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (426); m/z: (218; 189; 147; 121).

β -amirina (PW-05)

F.M.: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$

P.M = 426 u.m.a.

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (38,84; C-1); (27,40; C-2); (78,98; C-3); (38,84; C-4); (55,31; C-5); (18,31; C-6); (32,80, C-7); (38,05; C-8); (47,73; C-9); (37,73; C-10); (23,40; C-11); (121,72; C-12); (145,17; C-13); (41,71; C-14); (26,14; C-15); (27,40; C-16); (32,47, C-17); (47,23; C-18); (46,83; C-19); (31,06; C-20); (34,73; C-21); (37,16; C-22); (28,38; C-23); (15,96; C-24); (15,96; C-25); (16,10; C-26); (26,15; C-27); (28,38; C-28); (33,33; C-29); (23,68; C-30).

Espectrometria de Infravermelho(cm^{-1}): 3344,3; 2918,1; 2848,7; 1452,3; 1379,0; 1363,6; 1031,8; 879,5; 717,5.

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (426); m/z: (218; 189; 147; 121).

α -amirina (PW-06)

F.M.: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$

P.M = 426 u.m.a.

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (38,71; C-1); (27,40; C-2); (78,98; C-3); (38,71; C-4); (55,18; C-5); (18,31; C-6); (32,80, C-7); (39,99; C-8); (47,70; C-9); (36,94; C-10); (17,98; C-11); (125,01; C-12); (140,04; C-13); (42,83; C-14); (26,14; C-15); (26,14; C-16); (33,69, C-17); (39,79; C-19); (39,79; C-20); (31,91; C-21); (41,31; C-22); (28,08; C-23); (15,97; C-24); (15,35,79; C-25); (16,10; C-26); (23,40; C-27); (28,08; C-28); (23,40; C-29); (21,29; C-30).

Espectrometria de Infravermelho(cm^{-1}): 3344,3; 2918,1; 2848,7; 1452,3; 1379,0; 1363,6; 1031,8; 879,5; 717,5.

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (426); m/z: (218; 189; 147; 121).

Epifriedelanol (PW-07)**F.M.:** $C_{30}H_{50}O$ **P.M** = 426 u.m.a.**P.f** = 215,1 - 218,9 °C**Aspecto:** sólido branco cristalino**Solubilidade:** clorofórmio

Espectrometria de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (1,41; H-1); (1,86, H-2); (3,73; H-3); (1,23; H-4); (1,69; 0,96; H-6); (1,36, H-7); (1,26; H-8); (0,86; H-10); (1,34, H-11); (1,29; H-12); (1,27; H-15); (1,51; H-16); (1,33; H-19); (1,41; 1,14; H-21); (1,46; H-22); (0,91; H-23); (0,93; H-24); (0,85; H-25); (0,99; H-26); (0,95; H-27); (0,96; H-28); (0,92; H-29); (1,17; H-30).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (15,77; C-1); (35,17; C-2); (72,75; C-3); (49,15; C-4); (37,82; C-5); (41,70; C-6); (18,22, C-7); (53,17; C-8); (36,06; C-9); (61,32; C-10); (35,33; C-11); (30,62; C-12); (39,26; C-13); (38,94; C-14); (32,38; C-15); (36,06; C-16); (30,34; C-17); (42,80; C-18); (35,54; C-19); (28,16; C-20); (32,79; C-21); (39,26; C-22); (11,61; C-23); (16,38; C-24); (18,20; C-25); (18,64; C-26); (20,13; C-27); (31,78; C-28); (35,06; C-29); (31,78; C-30).

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (428); m/z: (413; 275; 248; 231).

Acetato do ácido oleanólico (PW-08)**F.M.:** $C_{32}H_{50}O_4$ **P.M** = 442 u.m.a.**P.f** = 119,9 - 126,4 °C**Aspecto:** sólido branco cristalino**Solubilidade:** clorofórmio

Espectrometria de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (4,31; H-3); (5,36; H-12); (0,88; H-23); (0,87; H-24); (1,05; H-25); (0,85; H-26); (1,17; H-27); (0,72; H-29); (1,00; H-30).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (38,13; C-1); (27,65; C-2); (80,92; C-3); (37,78; C-4); (55,29; C-5); (18,27; C-6); (33,79, C-7); (39,27; C-8); (47,53; C-9); (37,04; C-10); (23,49; C-11); (122,56; C-12); (143,56; C-13); (41,62; C-14); (27,65; C-15); (22,97; C-16); (46,49, C-17); (41,06; C-18); (45,82; C-19); (30,66; C-20); (33,78; C-21); (32,40; C-22); (28,03; C-23); (16,67; C-24); (15,38; C-25); (17,03; C-26); (25,86; C-27); (182,03; C-28); (33,04; C-29); (23,52; C-30).

Espectrometria de Infravermelho(cm^{-1}): 3450; 2923,9; 2852,5; 1732,0; 1689,5; 1463,9; 1377,1; 1251,7; 1037,6; 985,6.

Estigmasterol (PW-09)

F.M.: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$

P.M = 412 u.m.a.

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (37,24; C-1); (31,90; C-2); (71,79; C-3); (42,28; C-4); (140,74; C-5); (121,70; C-6); (33,93; C-7); (31,89; C-8); (50,12; C-9); (36,13; C-10); (21,07; C-11); (39,76; C-12); (42,28; C-13); (56,76; C-14); (24,29; C-15); (28,90; C-16); (56,05; C-17); (11,96; C-18); (19,38; C-19); (39,76; C-20); (19,02; C-21); (138,29; C-22); (129,27; C-23); (50,12; C-24); (31,64; C-25); (21,20; C-26); (19,80; C-27); (25,39; C-28); (11,96; C-29).

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (412); m/z: (300; 233; 159; 103; 81).

β -sitosterol (PW-10)

F.M.: $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$

P.M = 414 u.m.a.

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (37,24; C-1); (31,90; C-2); (71,79; C-3); (42,28; C-4); (140,74; C-5); (121,70; C-6); (33,93; C-7); (31,89; C-8); (50,12; C-9); (36,49; C-10); (21,07; C-11); (39,76; C-12); (42,28; C-13); (56,76; C-14); (24,29; C-15); (28,90; C-16); (56,05; C-17); (11,96; C-18); (19,38; C-19); (39,76; C-20); (18,76; C-21); (31,90; C-22); (26,07; C-23); (45,83; C-24); (29,69; C-25); (19,80; C-26); (19,80; C-27); (23,06; C-28); (11,84; C-29).

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (414); m/z: (330; 221; 145; 107; 81).

2,3,4,5,6-acetil-1-O-metil-inositol (PW-11)

F.M.: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$

P.M = 404 u.m.a.

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (3,61, *dd*, *J*= 9,9 e 3,3 Hz; H-1); (5,45; *t*, *J*= 3,3 Hz; H-2); (5,39; *dd*; *J*= 4,4 e 3,3 Hz; H-3); (5,24; *dd*; *J*= 9,9 e 3,3 Hz; H-4); (5,37; *t*; *J*=9,9 Hz; H-5); (5,30; *t*; *J*= 9,9 Hz, H-6).

Espectrometria de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (77,25; C-1); (65,69; C-2); (67,32; C-3); (69,10; C-4); (69,74; C-5); (71,36; C-6); [AcO - C.(169,96; 169,85; 169,63; 169,86; 169,11)]; [Aço-C (20,71; 20,65; 20,53; 20,47)]; (CH₃O – 58,47)

Espectrometria de massas (70 eV): m/z: (224; 182; 140; 87).

3-3'-4-4'-5-5'-6-6'-acetil-1-O-metil-inositol (PW-12)

F.M: = C₃₀H₄₂O₁₉

P.M = 706 u.m.a.

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (3,54, *dd*, *J*= 9,9 e 3,0 Hz; H-1); (4,14; *m*; H-2); (5,52; H-3); (5,41 – 5,30; H-4); (5,41 – 5,30; H-5); 5,41 – 5,30; H-6);

Espectrometria de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (77,31; C-1); (66,62; C-2); (68,91; C-3); (69,09; C-4); (69,83; C-5); (71,54; C-6); [AcO - C.(170,20; 169,95; 169,61; 169,33)]; [AcO-C (20,77; 20,69; 20,60; 20,56; 20,44)]; (CH₃O – 58,61)

Espectrometria de massas (70 eV): m/z: (344; 302; 242; 200; 182; 158; 140).

11.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abourashed, E.A., Toyang, N.J., Choinski J.J., Ikhlas A.K (1999) Two new flavone glycosides from *Paullinia pinnata*. *Journal of Natural Products*, 62:1179 -1181.

Adesanya, A.S., Martín, M.T., Hill B.; Dumontet, V., Tri, V.M., Sévenet, T., Pais, M. (1999) Rubiginoside, a farnesyl glycoside from *Lepisanthes rubiginosa*. *Phytochemistry*, 51:1039-1041.

Ahmad, V.U., Rahman, U. (1994). Pentacyclic triterpenoids. *Handbook of natural products data*. Amsterdam-London-NewYork-Tokyo, 2, 1556 p.

Albiero, M.A.L., Sertié, J.A.A., Bacchi, E.M. (2002). Antiulcer activity of *sapindus saponaria* L. in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 82:41-44.

Almeida, M.V., Figueiredo, R.M., Dos Santos, H.F., Da Silva, A.D., De Almeida, W.B. (2001). Synthesis and theoretical study of azido and amino inositol derivatives from L-quebrachitol. *Tetrahedron Letters*, 42:2767-2769.

Almeida, M.V., da Silva, D.A., de Souza, N.N.V., Benício, A.A. (2003). A cascata dos fosfoinositídeos. *Química nova*, 26(1):105-111.

Araújo, F.W.L., Lemos T.G.L. (1994). 2-O-metilinositol e proantocianidina de *Magonia glabrata*. *Química nova*, 17(2):128-136.

Arulmozhi, D.K., Sridhar, N., Bodhankar, S.L., Veeranjanyulu, A, Arora, S.K. (2004). *In vitro* pharmacological investigation of *Sapindus trifoliatus* in various migraine targets. *Journal of Ethnopharmacology*, 95:239-245.

Assumpção, J., Nascimento, M.T. (2000) Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunas Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 14(3):301-315.

- Barroso, G.M., Peixoto, A.L., Ichaso C.L.F., Costa, C.G., Guimarães E.F. (1991) Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa-Br:Universidade Federal de Viçosa, 1ª ed., 2, 377p.
- Besra, S.E., Sharma, R.M., Gomes, A. (1996). Antiinflammatory effect of petroleum ether extract of leaves of *Litchi chinensis* Gaertn. (Sapindaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 54:1-6.
- Braz-Filho R. (1994). Contribuição das substâncias fito-orgânicas como agentes medicinais. *Revista Médica UFC*, 34(1-2):38-50.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm-Wiss u-technol.*, 30:509-615.
- Bousserouel, H., Litaudon, M., Morleo, B., Martin, M.T., Thoison, O., Nosjean, O., Boutin, J.A., Renard, P., Sévenet, T. (2005). New biologically active linear triterpenes from the bark of the new-caledonian *Cupaniopsis* species. *Tetrahedron*, 61:845-851.
- Breitmaier, E., Voelter, W. (1987). *Carbon-13 NMR spectroscopy: High resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*. 3.ed. VCH: Weinheim.
- Bruneton, J. (1995) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2.ed. Paris. Technique & Documentation. 895p.
- Chabra, S.C., Mahunnah, R.L.A., Mshiu, E.N. (1991). Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. V. angiosperms (Passifloraceae to Sapindaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 33:143-157.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. (2000). *Organic chemistry*. Oxford University. 1512 p.

Citó A.M.G.L., Souza, A.A., Lopes J.A.D., Chaves, M.H., Costa, F.B., Sousa, S.A.A., Amaral M.P.M. (2003) Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burceraceae): Composição Química do Óleo Essencial e Avaliação Citotóxica frente a *Artemia Salina* Leanch. *Anais da Associação Brasileira de Química*, 52(2):74-76.

Dewick, M. P. (1997). *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, 1997.466p.

Dias, G.T.M., Silva, C.G. (1984) Geologia de depósitos arenosos costeiros emersos - Exemplos ao longo do litoral fluminense . P.47-60 In:L.D.Lacerda, D.S.D Araújo, R.Cerqueira, B.Turcq (Eds.) Restingas: Origem, Estrutura e Processos. CEUFF, Niterói.

Espínola, E.B., Dias, R.F., Mattei, R., Carlini, E.A. (1997) Pharmacological Activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 55:223-229.

Flexor, J-M., Martin, L., Suguio, K., Dominguez, J.M.L. (1984) Gênese dos cordões litorâneos da parte central da costa brasileira.Pp.35-46In: L.D.Lacerda, D.S.Araújo, R.Cerqueira, B. Turcq (Eds.) Restingas: Origem, Estrutura e Processos. CEUFF, Niterói.

Frimmel, A.E., Peixoto, J.L.B., Sarragiotto, M.H., Vidotti, G.J. (2000). Vitexin, paprazine and terpenoids from *Trema micrantha*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28:495-496.

Galvão, S.M.P.; Marques, L.C.; Oliveira, M.G.M. & Carlini, E.A. (2002) *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 79:305-311.

Garcez, W.S., Pereira,A.L., Queiroz,P.S., Silva,R.S., Valente,L.M.M., Peixoto,E.M., Pinto,A.C. (1981). RMN ¹³C de diterpenos com esqueleto pimarano. *Química nova*, 4:116-127.

Geetha, T., Varalakshmi, P. (2001). Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 76:77-80

Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R., Hohne, C., Huschka, C., Schmidtke, M., Abate, A., Neubert, R.H.H. (2003) Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia*, 74:139-143.

Jayasinghe, U.L.B., Bandara, A.G.D., Hara, N., Fujimoto, Y. (2001). A new norneohopane caffeate from *Filicium decipiens*. *Fitoterapia*, 72:737-742.

Jayasinghe, L., Shimada, H., Hara, N., Fujimoto, Y. (1995). Hederagenin glycosides from *Pometia eximia*. *Phytochemistry*, 40(3):891-897.

Joly, A.B. *Botânica Introdução á taxonomia vegetal*.(1983).6.ed.National. 777p.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 291: 1-4.

Harvey A. (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural product. *Drug Discovery Today*, 5(7):294-300.

Henman, A. R. (1982). Guaraná (*Paullinia Cupana* var. *sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *Journal of Ethnopharmacology*, 6, 311-338.

Hichri, F., Jannet, H.B., Cheria A. J., Jegham, S., Mighri, Z. (2003). Antibacterial activities of a few prepared derivative of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *Revista de Chimie*, 6:473-483.

Holmans, A.L., Fuchs, A. (1970). Direct Bioautography on Thin-Layer Chromatograms as a Method for Detecting Fungitoxic Substances. *Journal of Chromatography*, 51:327-329.

Hostettemann, K.; Queiroz, E.F.; Vieira, P.C. (2003). Princípios ativos de plantas superiores. EdUFSCAR. 152 p.

Ito, A, Chai, H., Kardono, B.S., Setowati, F.M., Afriastini, J.J., Riswan, S., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A, Pezzuto, J.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D. (2004). Saponins from the bark of *Nephelium naingayi*. *Journal of Natural Products*, 67:201-205.

Itokawa, H., Shirota O., Ikuta, H., Morita, H., Takeya, K., Tomioka, N., Iltaks Y. (1991). Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, 30(11):3713-3716.

Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K. (2001) Acetylated Triterpene Saponins from the Thai Medicinal Plant, *Sapindus emarginatus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49 (9):1195 -1197.

Kasai, R., Fujino, H., Kuzuki, T., Wong Wu-Hsiung., G.C, Yata, N., Tanaka O., Yasuhara, F., Yamaguchi, S. (1986) Acyclic Sesquiterpene Oligoglycosides from pericarps of *sapindus mukurossi*. *Phytochemistry*, 25 (4): 871-876.

Khan, M.R., kihara M., Omoloso, A.D. (2001). Antimicrobial activity of *Harpullia ramiflora*. *Fitoterapia*, 72:298-300.

Khan, M.R., Omoloso, A.D. (2002). Antibacterial, antifungal activity of *Harpullia petiolaris*. *Fitoterapia*, 73:331-335.

Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F.(1993). Human Medicinal Agents from Plants. Califórnia: Editora American Chemical Society, p. 2-10.

Kundu, J.K., Rouf, A.S.S., Nazmul Hossain, M., Hasan, C.M., Rashid, M.A.(2000). Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. *Fitoterapia*, 71:577-579.

Lamêgo, A.R. (1974) *O homem e a restinga*.2.e.d.Editora Lidor, Rio de Janeiro.

Lavaud, C., Voutquenne, L., Massiot, G., Men-Oliver, L.M., Das, B.C., Lapr evote, O., Serani, L., Delaude, C., Becchi, M. (1997) Saponins from bark of *Filicium decipiens*. *Phytochemistry*, 47(3):441-449.

Lavaud, C.; Crublet, M.L.; Pouny, E.; Litadoun, M. & S evenet, T. (2001). Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elatostachys apetala*. *Phytochemistry*, 57:469-478.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C, Veiga Jr.,V.F.V. 2002. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, 25(3):429-438.

Macrae, W.D., Hudson, J.B., Towers, G.H.N. (1998) *Journal of Ethnopharmacology*, 22:143.

Mahato, S.H., Kundu, A.P. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6):1517-1575.

Mattei, R., Dias, R.F., Espínola, E.B., Carlini, E.A., Barros, S.B.M. (1998) Guaran  (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 60:111-116.

Mclaughlin, J.I., Meyer, B.N., Ferrigni, N.R, Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E (1982) Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.

McCarthy, T.L., Kerry, J.F., Lynch, P., Buckley, D.J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties, meat. *Science*, 57:177-184.

Maraschin-Silva, E.A (2004). Extra o aquosa de aleloquímicos e bioensaios laboratoriais de alelopatia. *Tese (Mestrado em botânica)-Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 87p.

Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Leitão, G.G.; Reis, A.S.; Dos Santos, T.C.; Coube, C.S.; Leitão, S.G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free Radical Method. *Phytotherapy Research*, 15:127-130.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. (2001). Planejamento Racional de Fármacos baseado em Produtos Naturais. *Química Nova*, 24(1):105-111.

Neto, G.G, Santana, S.R., Da Silva, J.V.B. (2000). Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. *Acta Botanica Brasílica*, 14(3):327-334.

Olea, R.S.G., Roque, N.F. (1990). Análise de misturas de triterpenos por RMN ¹³C. *Química nova*, 13(4):278-281.

Ortega, A, García, P.E., Cárdenas, J., Mancera, C., Marquina, S., Garduno, M.L.C., Maldonado, E. (2001). Methyl dodonates, a new type of diterpenes with a modified clerodane skeleton from *Dodonaea viscosa*. *Tetrahedron*, 57:2981-2989.

Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. (1995). *Introduction to Spectroscopy*. 2.ed., 509p.

Pimm, S.L.; Russell, J.L.; Gittleman, T.M., Brooks, T.M. The future of biodiversity. (1995). *Science* 269,347-350.

Radambrasil. 1983. Rio de Janeiro/Vitória; Geologia, Geomorfologia, Pedologia, Vegetação e Uso Potencial da Terra – SF. 23/24. Projeto RADAMBRASIL, Rio de Janeiro.

Ruffa, M.J., Ferraro, G., Wagner, M.L., Calcagno, M.L., Campos, R.H. (2002) Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of ethnopharmacology*, 79:335-339.

Santa-Maria, A., Lopez, A., Diaz, M. M., Mingarro, M. D., Pozuelo, J. M. (1998) Evaluation of the Toxicity of Guaraná with *in vitro* bioassays. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 39:164-167.

Saphaz, S., Boris, C., Loieau, P.M., Cortes, D., Hacquemiller, R., Laurens A., Cavé, A. (1994) *Planta Medica*, 60:538

Sarni-Manchado P., Roux, E.L., Guernevé, C.L., Lozano, Y., Cheynier, V. (2000) Phenolic Composition of *Litchi Fruit Pericarp*. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 48:5995-6002.

Schirch, D.T., Mancini-Filho, J. (2000). Avaliação da atividade antioxidante em extratos de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Anais XVII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de alimentos*. 2:5-15.

Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of ethopharmacology*, 96:563-568.

Schultes, R.H. 1942. *Plantae colombianaem* II, yoco, a stimulant of southern Colombia. *Bot.Mus.Ceas*, 10:301-324.

Sieskind, O., Kintzinger, J.P., Metz B., Albrecht, P. (1995). Structure determination of diascholestanes. Their geochemical significance. *Tetrahedron*, 51(7):2009-2022.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (2000). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6.ed.

Siqueira, J. M., Bomm, M. D., Pereira, N.F.G. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanh* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia Salina* Lench. *Química Nova*, 21(5):557-559.

Shon, M., Kim, T., Sung, N. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii*(*Phellinus* of *Hymenocyaetaceae*) extracts. *Food chemistry*, 82:593-597.

Suguio, k., Tessler, M.G. (1984) Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: Origem e nomenclatura.Pp.15-26.In: L.D.Lacerda, D.S.D Araújo, R. Cerqueira, B. Turcq (Eds.) Restingas: Origem, Estrutura e Processos. CEUFF, Niterói.

Verpoorte, R. (1998) Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3:232-238.

Viegas Jr, C. (2003) Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química nova*, 26 (3):390-400.

Voutquenne, L., Kokougan, C., Lavaud, C., Pouny, I., Litadoun, M. (2002) Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austro-caledônica*. *Phytochemistry*, 59:825-832.

Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Delaude, C. (1998) Saponinas from *Harpullia cupanioides*. *Phytochemistry*, 49 (7):2081-2085.

Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Sevenet, T., Hadi, H.A. (1999) Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. *Phytochemistry*, 50:63-69.

Watenberg, L.M.D. (1995). Chalcones, *myo*-inositol and other novel inhibitors of Pulmonary Carcinogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 22:162-168.

Weckerle, C., Stutz, M., Baumann, T.W. (2003). Purine alkaloids in *Paullinia*. *Phytochemistry*, 64:723-742.

Wright, I.L.C., McInnes, A.G., Shimizu, S., Smith, D.G, Walter,J.A. (1978). Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear spectroscopy. *Journal .Chemical.*; 56:1898

WWW.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/.0133/fo1657.htm-29/09/04

www.jornaldapaisagem.br/artigos/art_tabacow4.htm- 05/09/ 2004).

WWW.mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast - 12/11/2004.

www.nybg.org/bsci/res/bahia/MP-chkl.html – 12/11/2004.

www.guiaguaruja.com.br/meioambiente/restinga.htm- 05/09/2004

www.scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.detail_list -12/11/2004.

WWW.umbuzeiro.cnip.org.br/db/pnechk/taxa/5507.html- 12/11/2004.

Zani, C.L, Chaves, P.P.G., Queiroz R., Mendes, N.M., Oliveira A.B., Cardoso J.E., Anjos, A.M.G., Grandi, T.S. (1995) Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2:47-50.

Zhong-Yun, F., Yang, S., Wu, G. (2002). Regulation of physiological systems by nutrients: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*:18:872-879.

Zulfiqar, A., Viqar, U.A., Muhammad, Z., Rasool, B.T. (1998) Benzoic Acid derivatives from *Stocksia brahuica*. *Phytochemistry*, 48 (7):1271-1273.