



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LARISSA CAVALCANTE DE REZENDE

NOVOS FENÓLICOS DO CAULE DE *CRATYLIA MOLLIS*

Salvador
2006

LARISSA CAVALCANTE DE REZENDE

NOVOS FENÓLICOS DO CAULE DE *CRATYLIA MOLLIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração-Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química - Área: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

Salvador
2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**.

Aos meus pais e meus familiares pelo constante amor, carinho, compreensão e pela minha formação moral.

Ao prof^o Dr. Jorge Maurício David pela orientação, incentivo e pela paciência.

A prof^a Dra. Juceni P. David pela co-orientação.

Agradeço a FAPESB pela bolsa e apoio financeiro.

A Prof^a Dionéia Camilo Rodrigues da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto, pelos espectros de RMN bidimensionais.

Aos professores do Instituto de Química, especialmente os de Química Orgânica, que contribuíram para a minha formação.

Aos grandes amigos Valfredo, Soraia, Luiz e Syleide pelo incentivo em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos do laboratório 110: Manuela, Everaldo, Luciano, Flávia, Rosa, Suzi, Marcus, Débora, Ilton, Aline, Simplícia, Jamile, Eliezer, Clayton e Lidiane pela amizade e momentos de alegria.

Aos amigos do Instituto de Química: Vânia, Pedro, Maria da Neves, Edson, Airam, Manuel, Rodrigo, Valéria, Isley, Caline, Ivoneide.

Aos funcionários do Instituto de Química, principalmente, Cristóvão, Paulo, Judith, Alice, Egídia e Ana.

A todos os funcionários, professores e colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. Introdução	1
1.1 A família Leguminosae	1
1.2 Espécies arbustivas	2
1.3 Descrição botânica, origem e distribuição	2
1.4 A espécie <i>Cratylia mollis</i>	4
1.5 Constituintes químicos isolados de <i>C. mollis</i>	5
1.6 Objetivos	8
1.6.1 Objetivos específicos	8
2. Parte Experimental	9
2.1 Coleta e Identificação da espécie	9
2.2 Materiais e Métodos	9
2.3 Preparação dos extratos do caule de <i>Cratylia mollis</i>	10
2.4 Separação e purificação dos constituintes químicos de <i>Cratylia mollis</i>	11
2.4.1 Fracionamento da fase clorofórmica	11
2.4.1.1 Fracionamento de constituintes da fração ECN 5	12
2.4.1.2 Fracionamento de constituintes da fração ECN 7	13
2.4.1.3 Fracionamento de constituintes da fração ECN 9	16
2.4.1.4 Fracionamento de constituintes da fração ECN 11	17
2.4.2 Fracionamento da fase acetato de etila	20
2.4.2.1 Fracionamento de constituintes da fração CMA 1-4	21
2.5 Acetilação da flavana	22
3. Identificação e Determinação estrutural	23
3.1 Identificação da mistura de CM1 e CM2	23
3.2 Identificação da 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana (CM3)	28
3.3 Determinação estrutural da 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxiflavana (CM4)	32
3.4 Identificação de pinosinol (CM5)	43
3.5 Identificação do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina) (CM6)	49
3.6 Determinação estrutural do 2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (CM7)	52
3.7 Elucidação estrutural de CM8 em mistura com CM7	61
4. Considerações Finais	70
5. Referências Bibliográficas	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vagens e sementes de <i>C. argentea</i>	3
Figura 2 - Espécie <i>Cratylia argentea</i> e flor de <i>Cratylia mollis</i>	4
Figura 3 - Espécie <i>Cratylia</i> utilizada como forragem para bovinos	5
Figura 4 - Fluxograma para obtenção dos extratos do caule de <i>C. mollis</i>	11
Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H da mistura CM1 e CM2 [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)]	25
Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C da mistura CM1 e CM2 [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)]	25
Figura 7 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura de CM1 e CM2	26
Figura 8 - Espectro de massas da mistura de CM1 e CM2 (APCI, modo negativo)	26
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM3	30
Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] de CM3	30
Figura 11 - Espectro de massas de CM3 (APCI, modo negativo)	31
Figura 12 - 7-hidroxi-6-metoxiflavana	33
Figura 13 - Correlações observadas no HMBC para o derivado diacetilado CM4a	34
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM4	35
Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM4	36
Figura 16 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de CM4	36
Figura 17 - Espectro de massas de CM4 (ESI, modo negativo)	37
Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM4 acetilada	37
Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM4 acetilada	38
Figura 20 - DEPT 135° [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM4 acetilada	38
Figura 21 - Espectro de HMQC de CM4 acetilada	39
Figura 22 - Ampliação do espectro de HMQC de CM4 acetilada	39
Figura 23 - Espectro de HMBC de CM4 acetilada	40
Figura 24 - Ampliação do espectro de HMBC de CM4 acetilada	40
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM5	46
Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM5	47
Figura 27 - DEPT 135° [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM5	47
Figura 28 - Espectro de massas de CM5 (APCI, modo negativo)	48
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM6	50
Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de CM6	50
Figura 31 - Espectro de massas de CM6 (APCI, modo positivo)	51
Figura 32 - Correlações observadas no espectro de HMBC para CM7	53
Figura 33 - Correlações para os grupos metoxílicos e hidroxílicos no espectro de HMBC	54

Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] de CM7	55
Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] de CM7	55
Figura 36 - Espectro de HMQC de CM7	56
Figura 37 - Ampliação do espectro de HMQC de CM7	56
Figura 38 - Espectro de HMBC de CM7	57
Figura 39 - Ampliação do espectro de HMBC de CM7	57
Figura 40 - Ampliação do espectro de HMBC de CM7	58
Figura 41 - Espectro de massas de CM7 (ESI, modo negativo)	58
Figura 42 - Correlações observadas no espectro de HMBC para CM7 e CM8	63
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] da mistura de CM7 e CM8	64
Figura 44 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da mistura de CM7 e CM8	64
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] da mistura de CM7 e CM8	65
Figura 46 - Espectro de HMQC da mistura de CM7 e CM8	65
Figura 47 - Ampliação do espectro de HMQC da mistura de CM7 e CM8	66
Figura 48 - Espectro de HMBC da mistura de CM7 e CM8	66
Figura 49 - Ampliação do espectro de HMBC da mistura de CM7 e CM8	67
Figura 50 - Espectro de massas da mistura de CM7 e CM8 (APCI, modo negativo)	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações obtidas da CC do extrato clorofórmico neutro	12
Tabela 2 - Frações obtidas da CCDP de ECN 5	12
Tabela 3 - Frações obtidas da CCDP de ECN 5B	13
Tabela 4 - Frações obtidas da CCDP de ECN 5B/E	13
Tabela 5 - Frações obtidas da CC de ECN 7	14
Tabela 6 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/4-17	14
Tabela 7 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/4-17 B	14
Tabela 8 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/4-17 B5	15
Tabela 9 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/18-34	15
Tabela 10 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/18-34G	16
Tabela 11 - Frações obtidas da CC de ECN 9	16
Tabela 12 - Frações obtidas da CCDP de ECN 9/9-15	17
Tabela 13 - Frações obtidas da CC de ECN 11	18
Tabela 14 - Frações obtidas da CC de ECN 11/38	19
Tabela 15 - Frações obtidas da permeação em gel de Sephadex LH-20 de ECN 11/38/49-59	19
Tabela 16 - Frações obtidas da CC de ECN 11/39	20
Tabela 17 - Frações obtidas da CC do extrato acetato de etila	21
Tabela 18 - Frações obtidas da CC de CMA 1-4	21
Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] da mistura de CM1 e CM2	27
Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de CM3	31
Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de CM4 , CM4a e 7-hidroxi-6-metoxiflavana	41
Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] do derivado diacetilado de CM4a e as correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMBC e HMQC)	42
Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de CM5	48
Tabela 24 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de CM6	51
Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, J (Hz), δ (ppm)] de CM7 e as correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMBC e HMQC)	59

Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, J (Hz), δ (ppm)] da mistura de CM7 e CM8	68
Tabela 27 - Correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC da mistura de CM7 e CM8	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substâncias isoladas do caule da <i>C.mollis</i>	6
Quadro 2 - Substâncias isoladas das folhas da <i>C.mollis</i>	7
Quadro 3 - Estruturas de flavanas com alguns exemplos de RMN de ^{13}C para o C-8	29
Quadro 4 - Ocorrência do pinoresinol no reino vegetal	44
Quadro 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para algumas catequinas e epicatequinas	60

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila

BB - Broad Band

CC - Cromatografia em coluna

CCDC - Cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa

δ - deslocamento químico

d - dubleto

dd - duplo dubleto

DEPT - Distortionless Enhancement Polarization Transfer

EM - Espectrometria de massas

EM-APCI - Espectrometria de massas por ionização química a pressão atmosférica

EM-ESI - Espectrometria de massas por eletrospray

H_{ax.} - hidrogênio em posição axial

H_{eq.} - hidrogênio em posição equatorial

HAc - Ácido acético

Hex - Hexano

HMBC - Heteronuclear Multi Bond Correlation

HMQC - Heteronuclear Multi Quantum Correlation

J - constante de acoplamento

LCMS - Cromatógrafo Líquido acoplado a Espectrômetro de Massa

m - multiplete

mult. - multiplicidade

MHz - Megahertz

MeOH - Metanol

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - singleto

t - tripleto

RESUMO

Este trabalho descreve o reestudo fitoquímico dos extratos em clorofórmio e em acetato de etila do caule de *Cratylia mollis* Mart. ex. Benth. *C. mollis* é um arbusto pertencente à família Leguminosae, subfamília Faboideae (Papilionoideae) de ocorrência na América do Sul. Esta é uma espécie forrageira e de incidência predominante na caatinga nordestina, onde é conhecida popularmente como “camaratu” ou “camaratuba”. A espécie é utilizada na dieta de bovinos, caprinos e ovinos especialmente em épocas de seca no Nordeste do Brasil. O objetivo deste trabalho é o estudo da composição química de *C. mollis* uma vez que, só existe descrito na literatura apenas um trabalho realizado com a espécie. Assim, o extrato metanólico foi particionado entre MeOH/H₂O:Hex, MeOH/H₂O:CHCl₃ e AcOEt:H₂O. Os extratos em clorofórmio e em acetato de etila foram submetidos a fracionamento cromatográfico em gel de sílica e em Sephadex LH20 e análise em camada delgada preparativa sob gel de sílica. As substâncias puras obtidas tiveram suas estruturas elucidadas através da análise dos dados de Ressonância Magnética Nuclear ¹H e ¹³C (BB, DEPT) e de experimentos bidimensionais (HMBC, HMQC), além de dados de EM das substâncias e de seus derivados acetilados. Deste modo, do extrato em clorofórmio foram isoladas a 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana e 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana, anteriormente isolada da espécie, além da nova flavana 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxiflavana, pinoresinol, vanilina e o novo flavanol 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol. Do extrato em acetato de etila foram isolados dois novos flavanóis, o 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol e o 2*R**,3*S**-7,2'-dihidroxi-6-metoxi-flavan-3-ol.

Palavras - chave: *Cratylia mollis*, Leguminosae, flavanas, flavonóis, vanilina e lignana.

ABSTRACT

This work describes the chemical investigation of chloroformic and ethyl acetate extracts from the stem of *Cratylia mollis* Mart ex. Benth, a specie belonging to Leguminosae family. This species is a small tree of the Faboidae subfamily (Papilionoideae) and occurs through South America. This is one of the most abundant plant of the Brazilian northeastern, especially the Semi-arid region and, it is popularly known as “camaratu” and “camaratuba”. In this region it is employed as substitute of cattle’s alimentation. Thus, the methanol extract of stem *C. mollis* was submitted to liquid:liquid partition between MeOH/H₂O:Hex, MeOH/H₂O:CHCl₃ e AcOEt:H₂O. The chloroformic and ethyl acetate extracts were submitted to CC and TLC over silica gel and gel permeation on Sephadex LH20. The identification and structural elucidation of pure compounds were based on analysis of the data obtained from the spectroscopic methods including NMR bidimensional experiments. From the chloroformic extract were isolated 2'-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavan and 7,2'-dihydroxy-6-methoxyflavan, besides of the new flavan 7,3'-dihydroxy-6,2'-dimethoxyflavan, pinoresinol, vanilin and the new flavanol 2*R**,3*S**-7,3'-dihydroxy-6,2'-dimethoxyflavan-3-ol. The ethyl acetate extract furnished the new flavanols named 2*R**,3*S**-7,3'-dihydroxy-6,2'-dimethoxyflavan-3-ol and 2*R**,3*S**-7,2'-dihydroxy-6-methoxyflavan-3-ol.

1. Introdução

1.1 A família Leguminosae

A família Leguminosae é constituída de plantas que possuem hábitos variados, podendo apresentar-se desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e muitas trepadeiras. O fruto é variado, mas em geral são legumes; suas sementes apresentam-se envoltas em mucilagem ou polpa doce ou com arilo.

Leguminosae pertence à divisão da Angiospermae, classe Dicotiledônea e ordem Rosales. Esta família consiste de 17500 espécies distribuídas em cerca de 670 gêneros. Pode ser dividida em três subfamílias importantes: Mimosoideae (5 tribos, 63 gêneros), Caesalpinoideae (5 tribos, 152 gêneros), e Faboideae (Papilionoideae) (31 tribos, 443 gêneros) (Lewis, 1987).

A subfamília Faboideae (Papilionoideae) é a maior dentre as três subfamílias e contém a maioria dos legumes conhecidos e utilizados pelo homem, tais como *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Vicia faba* L. (fava), *Pisum sativum* L. (ervilha), *Lens culinaris* Medik (lentilha), *Glycine max* L. (soja), *Cicer arietinum* L. (grão de bico) e *Arachis hypogaea* L. (amendoim), que são característicos por apresentarem grande quantidade de proteínas, óleos e carboidratos (Lewis, 1987). Destacam-se também devido a importância econômica, as forrageiras tais como as espécies *Melilotus* e *Medicago*, que são conhecidas popularmente por alfafa. Como produtora de madeira destaca-se a cabriúva ou bálsamo (*Myroxylum balsamum* L.), a caviúna (*Dalbergia brasiliensis* Vog.), jacarandá (*Machaerium acutifolium* Vog.), sucupira preta (*Bowdichia virgilioides* H.B.K.), angelim (*Andira bahiensis* N.) e o cumarú da Amazônia (*Dipteryx odorata* Aubl.). Muitas espécies são cultivadas para uso ornamental devido as suas lindas flores como, por exemplo, o *Lathyrus odoratus* L. (ervilha-de-cheiro), *Spartium junceum* L. (giesta), *Lupinus polyphyllus* Lindl. (lupino), *Erythrina verna* Vell. (saranduba, maçaranduba, suína, molungu) e certas espécies de *Phaseolus*. São cultivadas como plantas produtoras de sementes ornamentais as espécies *Ormosia arborea* (Vell.) Harms (olho de cabra) e *Abrus precatorius* (olho-de-cabra-miúdo), muito conhecida pela toxicidade de suas sementes (Joly, 1977). *Indigofera* spp. (anil) e *Astragalus* spp. (goma-arábica) destacam-se como plantas produtoras de substâncias utilizadas nas indústrias.

Devido a grande resistência à seca que apresentam alguns grupos de plantas desta família, as Leguminosae são vegetações predominantes da caatinga. Dentre estas, pode-se destacar *Cratylia mollis* (caramatuba), *Poecilanthe ulei* (carrancudo), *Piptadenia viridiflora* (surucucu), *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) e *Desmanthus virgatus* (desmanto), que são as mais freqüentes.

As espécies presentes na caatinga têm servido como suporte forrageiro para os rebanhos que delas dependem como principal e às vezes única fonte de alimento durante a época da seca. Este fato justifica o desenvolvimento, na área de agronomia, de extensivas pesquisas visando identificar espécies da caatinga com potencial para serem utilizadas como forragem para suplementação alimentar nos períodos de estiagem (Lima, 2005).

1.2 Espécies arbustivas

As leguminosas forrageiras arbustivas têm grande potencial para melhorar os sistemas de produção animal. Caracterizam-se por produzir maior biomassa que as plantas herbáceas e têm capacidade de rebrotar e oferecer forragem de boa qualidade em localidades de secas prolongadas. Muitas das leguminosas arbustivas conhecidas e investigadas amplamente, entre elas, *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* e *Erythina poeppigiana*, estão adaptadas a solos ácidos e regiões com época de seca prolongada. Em estudos recentes relatam-se que espécies dos gêneros *Cratylia* e *Morus* são promissoras para esta aplicação (Lascano e Argel, 2005).

1.3 Descrição botânica, origem e distribuição

O gênero *Cratylia* pertence à família Leguminosae, subfamília Faboideae (Papilionoideae), tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae. Cresce em forma de arbusto de 2m a 6m de altura e possui inflorescência ereta, flor com cálice acinzentado, com lobos verdes claros, corola de cor lilás na parte interna e alva externamente, filete alvos e anteras amarelas. O fruto é um legume deiscente que contém de 4 a 8 sementes em forma lenticular, circular ou elíptica (Queiroz e Coradín, s.f.) (Figura 1). As folhas são membranáceas, vilosas, discolor, verdes na face adaxial e acinzentada na face abaxial.



Figura 1: Vagens e sementes de *C. argentea*

Fonte: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99/Lascano.htm> acessado em 12.01.2006

A taxonomia do gênero *Cratylia* está ainda em processo de definição e a diferenciação entre espécies tem sido realizada a partir das características morfológicas vegetativas e da distribuição geográfica destas. As cinco espécies diferentes reconhecidas até o momento (Queiroz e Coradín, 1995) são:

- *Cratylia bahiensis* L. P. de Queiroz
- *Cratylia hypargyrea* Mart. Ex Benth. Sinônimo de *Cratylia nuda* Tul.
- *Cratylia intermedia* (Hassl) L. P. de Queiroz & R. Monteiro
- *Cratylia mollis* Mart.ex Benth.
- *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze. Sinônimo de *Dioclea argentea* Desv., *Cratylia nitens* Benth. e *Cratylia floribunda* Benth.

O gênero *Cratylia* é considerado como neotropical de origem recente, cuja distribuição natural está situada ao sul da bacia do rio Amazonas e ao leste da cordilheira dos Andes, abrangendo partes do Brasil, Peru, Bolívia e a bacia do rio Paraná ao nordeste da Argentina. As diferentes espécies têm sido descritas em vegetações da Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado brasileiros, em Matas do lado leste dos Andes e em bosques tropicais secos do Peru e Bolívia (Queiroz e Coradín, s.f.).

C. mollis e *C. argentea* têm crescimento similar e são espécies consideradas com potencial forrageiro (Figura 2). Em contraste, *C. bahiensis*, *C. hypargyrea* e

C. intermedia possuem pouco potencial como forrageiras devido ao fato de que são plantas de tipo emaranhado com pouca folhagem disponível. Considera-se que a distribuição de *C. mollis* está restrita principalmente a áreas de Caatinga do nordeste brasileiro nos estados da Bahia, Piauí e Ceará. Esta espécie tem bom potencial forrageiro em áreas semi-áridas (Sousa e Oliveira, 1995). *C. argentea* é a espécie de mais ampla distribuição na América do Sul e se estende no Brasil desde o Estado do Pará até os Estados de Mato Grosso e Goiás em direção norte-sul, e desde o Peru até o Estado do Ceará em direção leste-oeste.



Figura 2: Espécie *Cratylia argentea* e flor de *Cratylia mollis*

Fonte: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99/Lascano.htm> acessado em 12.01.2006

1.4 A espécie *Cratylia mollis*

A espécie *Cratylia mollis* Mart. ex Benth. é uma espécie forrageira e conhecida popularmente como “camaratu” ou “camaratuba” e tem sido recomendada para melhorar a dieta de bovinos, caprinos e ovinos (Figura 3), especialmente na época de seca, na região semi-árida do Nordeste brasileiro devido a sua grande resistência (Juck, 2003). Trabalhos realizados demonstraram que esta espécie é uma das mais adaptadas à caatinga, devido a grande capacidade de rebrotar ramos jovens relativamente macios e com poucos espinhos. Daí sua característica para o potencial forrageiro (Baracat, 1995).



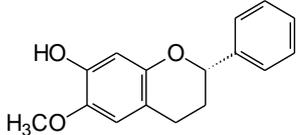
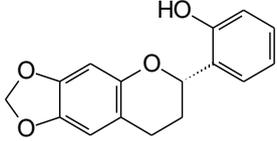
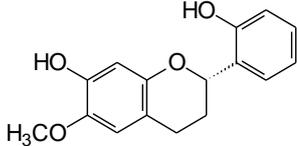
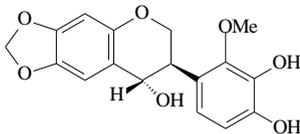
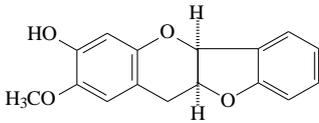
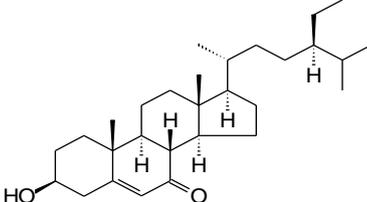
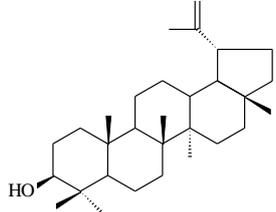
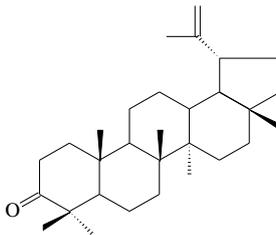
Figura 3: Espécie *Cratylia* utilizada como forragem para bovinos

Fonte: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99/Lascano.htm> acessado em 12.01.2006

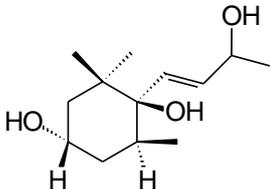
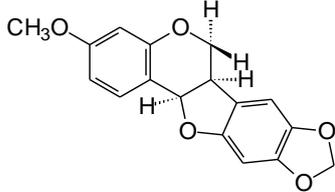
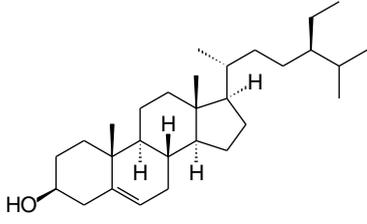
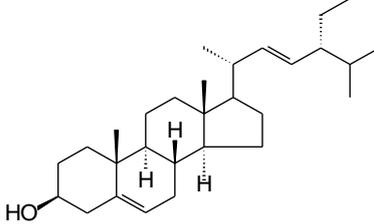
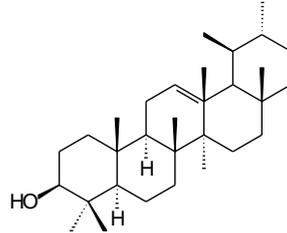
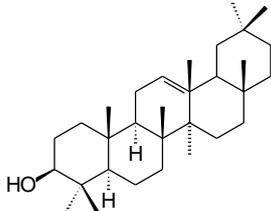
1.5 Constituintes químicos isolados de *C. mollis*

Estudos fitoquímicos anteriores realizados com esta espécie relataram a ocorrência de esteróides, flavanas, pterocarpana, bis-norsesquiterpeno e triterpenos. Foram isolados a partir do caule de *C. mollis* os novos flavonóides 7-hidroxi-6-metoxiflavana, 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana, 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana, 4,3',4'-trihidroxi-2'-metoxi-6,7-metilenodioxiflavana, 3*R**, 2*R**, 3,2'-oxi-7-hidroxi-6-metoxiflavana, o 3- β -hidroxi-7-oxo-estigmast-5-eno, além dos triterpenos lupeol e lupenona (Juck, 2003) e das folhas foram isolados α -amirina, β -amirina, lupeol, β -sitosterol, estigmasterol, 3,6-dihidroxi-5,6-dihidro- β -ionol e 3-metoxi-8,9-metilenodioxipterocarpana, também conhecida como pterocarpina (Lima, 2005). As estruturas das substâncias encontram-se representadas nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1: Substâncias isoladas do caule de *C. mollis*

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA
7-hidroxi-6-metoxiflavana	
2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana	
7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana	
4,3',4'-trihidroxi-2'-metoxi-6,7-metilenodioxiflavana	
3 <i>R</i> *, 2 <i>R</i> *, 3,2'-oxi-7-hidroxi-6-metoxiflavana	
3-β-hidroxi-7-oxo-estigmast-5-eno	
lupeol	
lupenona	

Quadro 2: Substâncias isoladas das folhas de *C. mollis*

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA
3,6-diidroxi-5,6-dihidro- β -ionol	
Pterocarpina	
β -sitosterol	
estigmasterol	
α -amirina	
β -amirina	

1.6 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo reestudar do ponto de vista químico o extrato em clorofórmio e iniciar o estudo do extrato em acetato de etila do caule de *Cratylia mollis* Mart. ex Benth. através do isolamento, purificação e elucidação estrutural dos seus constituintes.

1.6.1 Objetivos Específicos

- Isolar através de métodos cromatográficos as substâncias presentes nos extratos em clorofórmio e em acetato de etila;
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC, EM e comparação com dados espectrais da literatura;
- Contribuir para a quimiotaxonomia do gênero *Cratylia* e subfamília Faboideae;
- Contribuir para o conhecimento da composição química de espécies do semi-árido nordestino.

2. Parte Experimental

2.1 Coleta e Identificação da espécie

O caule da espécie *Cratylia mollis* foi coletado na região da caatinga do Estado da Bahia, pelo Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A identificação da espécie foi realizada pelo Dr. Luciano Paganucci de Queiroz e a excicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana sob número LP 5119.

2.2 Materiais e Métodos

Na moagem do caule foi utilizado moinho THOMAS WILEY LABORATORY MILL-MODEL 4 e na evaporação dos solventes foram utilizados evaporadores rotatórios à pressão reduzida.

Os solventes empregados na preparação dos extratos e nas análises por CCDC, CC, CCDP foram de grau analítico das marcas QUIMEX e MERCK.

O nitrogênio utilizado nas separações por cromatografia em coluna sob pressão foi das marcas AGA e ALPHAGAS, com grau de pureza de 99.9%.

Nas separações por CC foram empregadas como fases estacionárias gel de sílica 60 da MERCK (0,063-0,200 mm) e gel de sílica 60H da MERCK com diâmetro de partícula de 15µm, para colunas sob pressão, e Sephadex LH-20 da Pharmacia para permeação.

Nos procedimentos cromatográficos em camada delgada comparativa foram utilizadas gel de sílica G da MERCK. As placas foram preparadas a partir de suspensão da sílica em água destilada com auxílio de um espalhador mecânico na espessura de 0,5 mm ou manualmente e ativadas em estufa por 1h a 100°C. Também foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F₂₅₄ da MERCK.

Nas cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizadas placas de gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ e 1 mm de espessura da MERCK, e placas cromatográficas de alta resolução de gel de sílica fluorescente a 254nm com 200µm de espessura da Whatman.

Os métodos de revelação adotados nas cromatografias em camada delgada consistiram na exposição das placas à radiação empregando-se lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, vapores de iodo e/ou reagente de Liebermann-Burchard (Stahl et al., 1966).

O reagente de Liebermann-Burchard foi preparado a partir da adição cuidadosa da mistura de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético à 5 mL de etanol resfriado em banho de gelo. No procedimento de revelação, a placa eluída foi borrifada com este reagente e posteriormente aquecida a 100 °C. O resultado positivo para esteróides ou/e triterpenos consistiu na coloração azul ou rósea das substâncias eluídas.

No procedimento de acetilação a amostra foi submetida a tratamento com anidrido acético e piridina em presença de dimetilaminopiridina (DMAP) à temperatura ambiente por 24 horas (Junior *et al.*, 2005), com posterior tratamento de ácido clorídrico e bicarbonato de sódio e extraído com clorofórmio.

Os espectros de RMN ^1H (300/400 MHz) e RMN de ^{13}C (75/100 MHz) e bidimensionais foram obtidos em espectrofotômetro VARIAN GEMINI 2000/ Bruker AC 500 utilizando solvente deuterado como CDCl_3 e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, e tetrametilsilano como o sinal do solvente de referência interna.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho LCMS modelo 2010A da SHIMADZU.

2.3 Preparação dos extratos do caule de *Cratylia mollis*

Após a coleta da espécie, o caule foi seco e moído obtendo-se 1,82 Kg de material. O material seco e pulverizado foi submetido a três extrações consecutivas com metanol por 48 horas, seguida de concentração sob pressão reduzida. O extrato em metanol obtido foi redissolvido em MeOH/H₂O (6:4) e em seguida particionado com CHCl_3 , originando as fases clorofórmica e hidrometanólica.

A fase clorofórmica foi concentrada em rota evaporador e pesada (14,97g) e então submetida à partição entre hexano:metanol, originando as fases em hexano (3,75g) e em metanol (9,71g).

A fase hidrometanólica foi também concentrada e particionada com AcOEt originando as fases em acetato de etila (1,17g) e aquosa. O volume empregado nas

partições foi aproximadamente de 200mL, e o procedimento empregado encontra-se ilustrado na Figura 4.

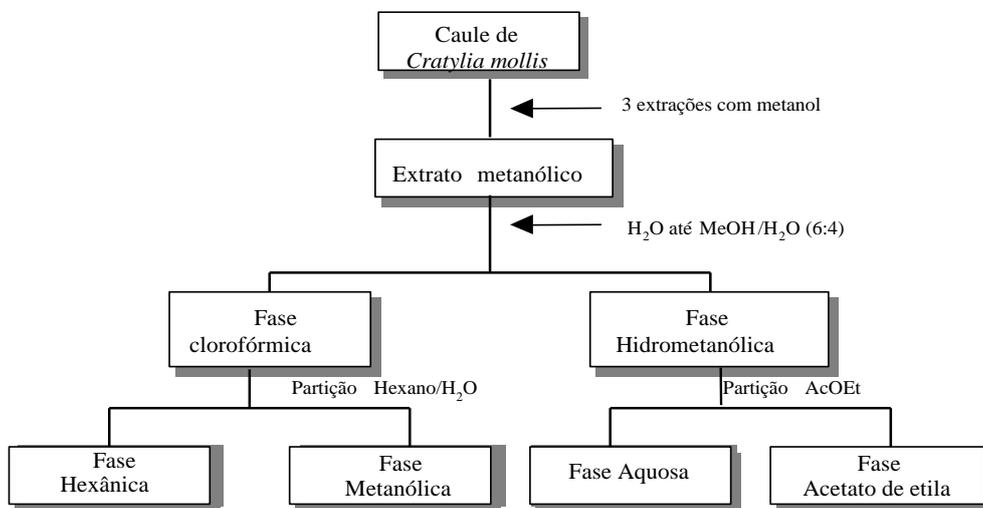


Figura 4: Fluxograma para obtenção dos extratos do caule de *C. mollis*

Uma amostra da fase em metanol, oriunda da fase em clorofórmio, foi submetida a testes específicos para alcalóides utilizando os reagentes de Mayer, Dragendorff e Bertrand. A fase em metanol demonstrou estar isenta de alcalóides e foi, portanto, denominada de extrato em clorofórmio neutro (ECN).

2.4 Separação e purificação dos constituintes químicos de *Cratylia mollis*

2.4.1 Fracionamento da fase clorofórmica

O extrato em clorofórmio neutro denominado de ECN (9,71g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) em gel de sílica 60, utilizando como fase móvel o sistema $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 13 frações (Tabela 1) de aproximadamente 100 mL cada e submetidas a agrupamento após análise em CCDC¹.

¹ A preparação dos extratos e fracionamento cromatográfico preliminar foi realizado pela doutoranda Débora F. Juck (Juck, 2003).

Tabela 1 - Frações obtidas da CC do extrato em clorofórmio neutro

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente
ECN 1-3	1-3	1,0	CHCl ₃ 100%
ECN 4	4	39,6	CHCl ₃ :AcOEt (9:1)
ECN 5	5	134,6	CHCl ₃ :AcOEt (8:2)
ECN 6	6	203,7	CHCl ₃ :AcOEt (8:2)
ECN 7	7	189,5	CHCl ₃ :AcOEt (7:3)
ECN 8	8	206,2	CHCl ₃ :AcOEt (1:1)
ECN 9	9	259,7	AcOEt 100%
ECN 10	10	247,6	AcOEt 100%
ECN 11	11	462,1	AcOEt:MeOH (8:2)
ECN 12	12	514,3	MeOH 100%
ECN 13	13	3978,2	MeOH:H ₂ O (1:1)

2.4.1.1 Fracionamento de constituintes da fração ECN 5

A fração ECN 5 (134,6 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ utilizando como eluente o sistema éter de petróleo:acetona (7:3) obtendo-se 5 frações (Tabela 2).

Tabela 2 - Frações obtidas da CCDP de ECN 5

Código	Massa (mg)
ECN 5A	13,2
ECN 5B	55,6
ECN 5C	4,7
ECN 5D	3,5
ECN 5E	56,5

ECN 5B (55,6 mg) foi purificada por meio de CCDP em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ em sistema eluente éter de petróleo:acetona (7:3) sendo recolhidas 6 frações (Tabela 3).

Tabela 3 - Frações obtidas da CCDP de ECN 5B

Código	Massa (mg)
ECN 5B/A	5,0
ECN 5B/B	4,8
ECN 5B/C	6,0
ECN 5B/D	17,0
ECN 5B/E	12,4
ECN 5B/F	9,4

A fração ECN 5B/E (12,4 mg) foi então submetida a novo fracionamento através de CCDP em sistema CHCl₃:MeOH (90:10) fornecendo 3 frações (Tabela 4).

Tabela 4 - Frações obtidas da CCDP de ECN 5B/E

Código	Massa (mg)
ECN 5B/E1	1,0
ECN 5B/E2	2,1
ECN 5B/E3	9,0

Análise por RMN ¹H e ¹³C revelou que ECN 5B/E3 tratava-se de uma mistura de duas substâncias de natureza flavonoídica, sendo denominadas de 7-hidroxi-6-metoxi-flavana (**CM1**) e 2'-dihidroxi-6,7-metilenodioxiflavana (**CM2**). As demais frações da preparativa foram desprezadas, pois os espectros de RMN ¹H destas indicaram que eram constituídas essencialmente de material de natureza graxa.

2.4.1.2 Fracionamento de constituintes da fração ECN 7

A fração ECN 7 (189,5 mg) foi submetida à CC em gel de sílica 60H sob pressão de N₂ e eluída em sistema éter de petróleo:acetona (8:2). Foram obtidas 35 subfrações de 100 mL que foram agrupadas após análise por CCDC (Tabela 5).

Tabela 5 - Frações obtidas da CC de ECN 7

Código	Fração da coluna	Massa (mg)
ECN 7/1-2	1-2	9,2
ECN 7/3	3	23,1
ECN 7/4-17	4-17	84,0
ECN 7/18-34	18-34	66,4
ECN 7/35	35	4,9

A análise dos espectros de RMN de ^1H das frações ECN 7/4-17 e ECN 7/18-34 indicou a presença de substâncias aromáticas em mistura com outras substâncias.

A fração ECN 7/4-17 (84 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ em sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5) sendo obtidas 4 frações (Tabela 6).

Tabela 6 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/4-17

Código	Massa (mg)
ECN 7/4-17 A	18,5
ECN 7/4-17 B	34,2
ECN 7/4-17 C	15,9
ECN 7/4-17 D	11,7

ECN 7/4-17 B (34,2 mg) foi então submetida à CCDP em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ em sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HAc}$ (98:2:1) resultando em 6 frações (Tabela 7).

Tabela 7 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/4-17 B

Código	Massa (mg)
ECN 7/4-17 B1	2,9
ECN 7/4-17 B2	2,7
ECN 7/4-17 B3	2,5
ECN 7/4-17 B4	4,8
ECN 7/4-17 B5	15,3
ECN 7/4-17 B6	5,0

A fração ECN 7/4-17 B5 (15,3 mg) foi purificada através de CCDP utilizando placa cromatográfica de alta resolução de gel de sílica fluorescente a 254nm eluindo duas vezes com sistema CHCl_3 :MeOH:HAc (98,5:1,5:1), obtendo-se 6 frações (Tabela 8).

Tabela 8 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/4-17 B5

Código	Massa (mg)
ECN 7/4-17 B5/1	1,0
ECN 7/4-17 B5/2	1,5
ECN 7/4-17 B5/3	7,1
ECN 7/4-17 B5/4	2,6
ECN 7/4-17 B5/5	2,2
ECN 7/4-17 B5/6	0,5

Análise por RMN ^1H e ^{13}C revelou que ECN 7/4-17 B5/3 tratava-se de uma flavana, denominada de 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana (**CM3**). As demais frações foram desprezadas, pois os espectros de RMN ^1H destas indicaram que eram constituídas essencialmente de material de natureza graxa.

A fração ECN 7/18-34 (66,4 mg) foi submetida à CCDP em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ em sistema CHCl_3 :MeOH (95:5) sendo obtidas 8 frações (Tabela 9).

Tabela 9 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/18-34

Código	Massa (mg)
ECN 7/18-34 A	3,1
ECN 7/18-34 B	4,3
ECN 7/18-34 C	2,3
ECN 7/18-34 D	2,5
ECN 7/18-34 E	3,0
ECN 7/18-34 F	5,0
ECN 7/18-34 G	38,3
ECN 7/18-34 H	6,5

A fração ECN 7/18-34G (38,3 mg) foi submetida à CCDP utilizando placa cromatográfica de alta resolução de gel de sílica fluorescente a 254 nm, eluindo duas vezes com sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5), sendo obtidas 7 frações (Tabela 10).

Tabela 10 - Frações obtidas da CCDP de ECN 7/18-34G

Código	Massa (mg)
ECN 7/18-34 G1	5,1
ECN 7/18-34 G2	4,0
ECN 7/18-34 G3	6,6
ECN 7/18-34 G4	9,5
ECN 7/18-34 G5	3,8
ECN 7/18-34 G6	3,6
ECN 7/18-34 G7	5,3

A substância presente na fração ECN 7/18-34 G3 (6,6 mg) teve sua estrutura determinada como sendo a nova flavana 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxiflavana (**CM4**). As demais frações foram desprezadas, pois continham apenas substâncias de natureza graxa.

2.4.1.3 Fracionamento de ECN 9

A fração ECN9 (259,7 mg) foi submetida à CC em gel de sílica 60H sob pressão de N_2 e eluída em sistema $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{AcOEt}$ (95:5). Foram recolhidas 38 frações, que posteriormente foram agrupadas em 6 subfrações após análise em CCDC (Tabela 11).

Tabela 11 - Frações obtidas da CC de ECN 9

Código	Fração da coluna	Massa (mg)
ECN9/1-8	1-8	12,4
ECN9/9-15	9-15	57,8
ECN9/16-18	16-18	65,2
ECN9/19	19	8,1
ECN9/20-29	20-29	28,9
ECN9/30-41	30-41	17,2

A subfração ECN9/9-15 (57,8 mg) foi purificada através de CCDP em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ eluindo com sistema Hex:AcOEt (6:4), sendo obtidas 6 frações (Tabela 12).

Tabela 12 - Frações obtidas da CCDP de ECN 9/9-15

Código	Massa (mg)
ECN 9/9-15 A	7,6
ECN 9/9-15 B	11,4
ECN 9/9-15 C	12,6
ECN 9/9-15 D	12,5
ECN 9/9-15 E	9,3
ECN 9/9-15 F	4,1

A análise dos espectros de ¹H da subfração ECN 9/9-15 B (11,4 mg) indicou a presença de natureza aromática e foi submetida à nova CCDP em gel de sílica 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ em sistema Hex:AcOEt (1:1) obtendo-se 4 frações. Análise dos dados de RMN ¹H das frações obtidas indicou que a fração ECN 9/9-15 B2 tratava-se de uma lignana denominada de pinosinol (**CM5**). As outras frações foram desprezadas, pois eram constituídas de material de natureza graxa.

2.4.1.4 Fracionamento de ECN 11

ECN 11 (462 mg) foi submetida a fracionamento em CC de gel de sílica 60 eluída com sistema CHCl₃:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 53 frações de 50 mL cada, que após análise por CCDC foram agrupadas em 13 subfrações (Tabela 13).

Tabela 13 - Frações obtidas da CC de ECN 11

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente
ECN 11/1-26	1-26	34,5	CHCl ₃ 100%
ECN 11/27-33	27-33	33,0	CHCl ₃ :MeOH (98:2)
ECN 11/34-37	34-37	26,1	CHCl ₃ :MeOH (98:2)
ECN 11/38	38	68,0	CHCl ₃ :MeOH (98:2)
ECN 11/39	39	79,4	CHCl ₃ :MeOH (98:2)
ECN 11/40	40	17,5	CHCl ₃ :MeOH (98:2)
ECN 11/41-42	41-42	62,8	CHCl ₃ :MeOH (95:5)
ECN 11/43-45	43-45	53,6	CHCl ₃ :MeOH (90:10)
ECN 11/46-47	46-47	26,8	CHCl ₃ :MeOH (80:20)
ECN 11/48	48	6,2	CHCl ₃ :MeOH (70:30)
ECN 11/49	49	5,4	CHCl ₃ :MeOH (60:40)
ECN 11/50	50	3,5	CHCl ₃ :MeOH (50:50)
ECN 11/51-53	51-53	8,5	MeOH 100%

Após monitoramento das frações por RMN ¹H, foram selecionadas para purificação de seus componentes as frações ECN 11/38 e ECN 11/39. Os espectros dessas frações indicaram a presença de substâncias de natureza aromática em mistura com outras substâncias.

A fração ECN 11/38 (68 mg) foi submetida à CC em sílica flash eluída com sistema CHCl₃:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 77 frações de 50mL cada, que foram reunidas em 12 subfrações após análise por CCDC (Tabela 14).

Tabela 14 - Frações obtidas da CC de ECN 11/38

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente CHCl ₃ :AcOEt
ECN 11/38/1-4	1-4	3,2	100:0
ECN 11/38/5-12	5-12	4,0	95:5
ECN 11/38/13-34	13-34	2,1	90:10
ECN 11/38/35-42	35-42	2,0	85:5
ECN 11/38/43-46	43-46	1,0	80:20
ECN 11/38/47	47	2,2	70:30
ECN 11/38/48	48	2,7	60:40
ECN 11/38/49-54	49-54	10,0	50:50
ECN 11/38/55-59	55-59	7,1	40:60
ECN 11/38/60-64	60-64	5,0	20:80
ECN 11/38/65-69	65-69	1,7	10:90
ECN 11/38/70-77	70-77	0,5	0: 100

A análise dos espectros de RMN de ¹H da fração ECN 11/38/49-59 indicou a presença de substância aromática em mistura com outras substâncias. Assim, ECN 11/38/49-59 (17,1 mg) foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20, sendo obtidas 30 frações que foram reunidas em 7 frações após acompanhamento por CCDC (Tabela 15).

Tabela 15 - Frações obtidas da permeação em gel de Sephadex LH-20 de ECN 11/38/49-59

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente
ECN 11/38/49-59 A	1-5	2,3	CH ₂ Cl ₂ :Hex (90:10)
ECN 11/38/49-59 B	6-12	4,9	CH ₂ Cl ₂ :Hex (90:10)
ECN 11/38/49-59 C	13-16	4,6	CH ₂ Cl ₂ :Acetona (80:20)
ECN 11/38/49-59 D	17-19	1,2	CH ₂ Cl ₂ :Acetona (80:20)
ECN 11/38/49-59 E	20-25	1,6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20)
ECN 11/38/49-59 F	26	1,0	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20)
ECN 11/38/49-59 G	27-30	1,5	MeOH

Análise dos dados espectrométricos das frações obtidas indicou que a fração ECN 11/38/49-59 D tratava-se da vanilina (**CM6**).

A fração ECN 11/39 (79,4 mg) foi submetida a fracionamento em CC de gel de sílica 60 (flash) eluída com sistema CH₂Cl₂:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 57 frações de 50mL cada, as quais foram agrupadas em 8 subfrações após análise por CCDC (Tabela 16).

Tabela 16 - Frações obtidas da CC de ECN 11/39

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente CH ₂ Cl ₂ :AcOEt
ECN 11/39/1-8	1-8	4,0	98:2
ECN 11/39/9-16	9-16	2,3	90:10
ECN 11/39/17-29	17-29	6,8	80:20
ECN 11/39/30-32	30-32	1,5	80:20
ECN 11/39/33-36	33-36	2,1	70:30
ECN 11/39/37-42	37-42	2,0	60:40
ECN 11/39/43-49	43-49	14,7	50:50
ECN 11/39/50-57	50-57	19,2	0:100

Análise dos dados espectrométricos das frações obtidas indicou que a fração ECN 11/39/17-29 tratava-se do flavanol 2*R**,3*S**- 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (**CM7**). As demais frações foram desprezadas, pois continham apenas substâncias de natureza graxa.

2.4.2 Fracionamento da fase acetato de etila

O extrato em acetato de etila, denominado CMA, (1,17 g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 e como eluente misturas de CHCl₃:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 27 frações de 100 mL cada que foram submetidas a CCDC para posterior agrupamento (Tabela 17).

Tabela 17 - Frações obtidas da CC do extrato acetato de etila

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente CHCl ₃ :MeOH
CMA 1-4	1-4	120,3	95:5
CMA 5-6	5-6	37,3	90:10
CMA 7-8	7-8	159,6	80:20
CMA 9	9	43,9	80:20
CMA 10	10	26,4	80:20
CMA 11-18	11-18	113,0	70:30
CMA 19-26	19-26	245,0	50:50
CMA 27	27	229,1	0:100

2.4.2.1 Fracionamento de constituintes da fração CMA 1-4

A fração CMA 1-4 (120,3 mg) foi submetida à CC em sílica flash e eluída em sistema CHCl₃:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 75 subfrações de 50 mL cada que foram agrupadas conforme resultados observados através de CCDC (Tabela 18).

Tabela 18 - Frações obtidas da CC de CMA 1-4

Código	Fração da coluna	Massa (mg)	Eluente CHCl ₃ :MeOH
CMA 1-4/1-26	1-26	4,6	100:0
CMA 1-4/27-30	27-30	9,9	99:1
CMA1-4/31-33	31-33	4,3	99:1
CMA1-4/34-36	34-36	6,0	99:1
CMA1-4/37-44	37-44	24,7	98:2
CMA1-4/45-49	45-49	14,3	95:5
CMA1-4/50	50	17,7	94:6
CMA1-4/51-52	51-52	3,8	92:8
CMA1-4/53-54	53-54	3,1	90:10
CMA1-4/55-56	55-56	2,9	90:10
CMA1-4/57-60	57-60	7,4	80:20
CMA1-4/61-62	61-62	5,1	70:30
CMA1-4/63-70	63-70	4,0	60:40
CMA1-4/71-75	71-75	8,3	50:50

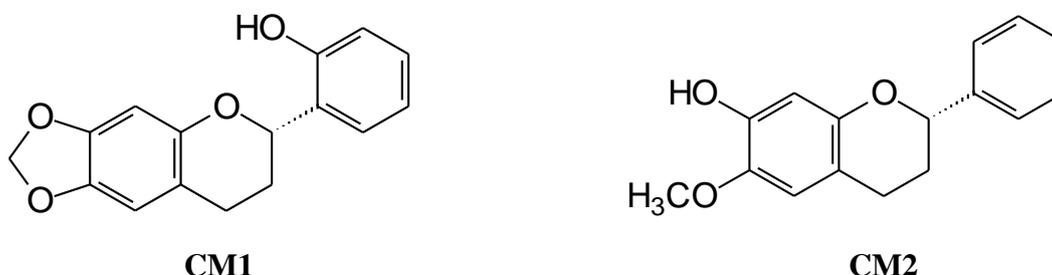
Análise por RMN ^1H e ^{13}C revelou que CMA1-4/34-36 tratava-se de uma mistura de os flavanóis $2R^*,3S^*-7,3'$ -dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (**CM7**) e $2R^*,3S^*-7,2'$ -dihidroxi-6-metoxi-flavan-3-ol (**CM8**). As demais frações não foram purificadas.

2.5 Acetilação da flavana

O derivado diacetilado da fração **CM4** foi preparado através do tratamento da amostra (5,5 mg) com 0,5 mL anidrido acético e 0,5 mL piridina em presença de diaminopiridina (DMAP), à temperatura ambiente por 24 horas (Junior et al., 2005), com posterior adição de ácido clorídrico e bicarbonato de sódio e extração com clorofórmio. Desta forma foram obtidos 6,4 mg de **CM4a** (91,1 %).

3. Identificação e Determinação estrutural

3.1 - Identificação da mistura de CM1 e CM2



A partir da análise dos dados espectrais aliados a comparação direta com dados da literatura (Juck, 2003) foi possível identificar a mistura com sendo as flavanas 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana (**CM1**) e 7-hidroxi-6-metoxiflavana (**CM2**), que já haviam sido isoladas no trabalho anterior desenvolvido com a espécie.

Devido a grandes semelhanças estruturais entre as flavanas da mistura, vários sinais do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C mostraram-se coincidentes. Entretanto a diferença na intensidade dos sinais dos carbonos sp^2 hidrogenados demonstrou que uma das flavanas predominava na mistura e deste modo, a 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana (**CM1**) encontrava-se em maior quantidade. Isto pode ser evidenciado também através do EM-APCI (Figura 8, p. 26), registrado no modo negativo, que mostrou somente um sinal referente ao íon molecular $[\text{M}-1]^-$ em m/z 269 correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ para **CM1**.

Análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 5, p. 25; Tabela 19, p. 27) da fração cromatográfica permitiu concluir que a mesma tratava-se de uma mistura de duas substâncias com características de flavonóides da classe das flavanas. Foi possível identificar neste espectro sinais característicos dos anéis C das flavanas, tais como dois duplos dubletos, com integração para um hidrogênio cada, referentes aos hidrogênios oximetínicos H-2. Além desse foi possível observar dois multipletos referentes aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-4 das flavanas **CM1** e **CM2**. Esses sinais que mostraram a presença de dois hidrogênios em C-2 e dois hidrogênios em C-3 são característicos de anel C de flavonóides não-substituído nestas posições.

Neste mesmo espectro pode ainda ser evidenciada a presença de dois singletos que foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos em posição *para*, H-5 e H-8, de **CM1**

e **CM2**. A presença destes sinais indicou a substituição em C-6 e C-7 no anel A de ambas as substâncias. Foi observado também um singlete (δ 5,90) correspondente ao grupo metilenodioxí, bem como o sinal em δ 3,85 correspondente ao grupo metoxílico.

Os hidrogênios ligados a carbonos aromáticos do anel B foram observados como multipletos em δ 6,89-7,21 para **CM1** e na faixa de δ 7,24-7,41 para **CM2**. Além disso, a integração dos sinais indicou a presença de um substituinte no anel B de **CM1** bem como a ausência de substituição no anel B de **CM2**.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6, p. 25; Tabela 19, p. 27) apresentou sinais que confirmaram que se tratava de flavanas devido ao registro dos deslocamentos químicos de carbono oximetínico C-2 na região de δ 74,8-78,7 e dos carbonos metilênicos C-3 em δ 28,6-31,3 e C-4 em δ 19,1-25,6 (Agrawal, 1989). Além disso, os sinais em δ 100,99 e em δ 56,55 confirmaram a presença dos grupos metilenodioxí em **CM1** e metoxílico em **CM2**.

A localização dos substituintes do anel B de **CM1** e do anel A de **CM2** foi estabelecida por comparação com dados de RMN de ^{13}C da literatura (Agrawal, 1989). Assim, a presença do sinal em δ 103,50 correspondente ao C-8 do anel A de **CM2** indicou que este anel encontrava-se substituído por grupo hidroxílico no C-7 e conseqüentemente o grupo metoxílico estava localizado no C-6.

A identificação desta mistura de flavanas (**CM1** e **CM2**), portanto foi realizada através de análise dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com os dados da literatura (Juck, 2003).

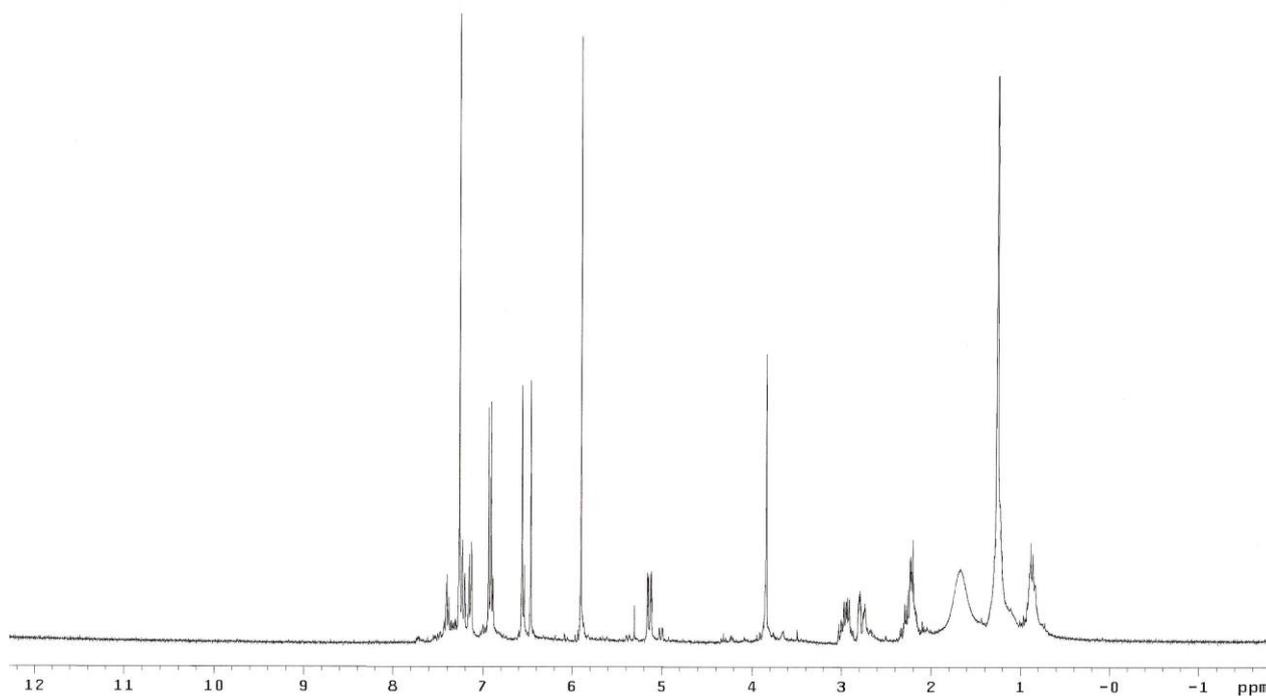


Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H da mistura **CM1** e **CM2** [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)]

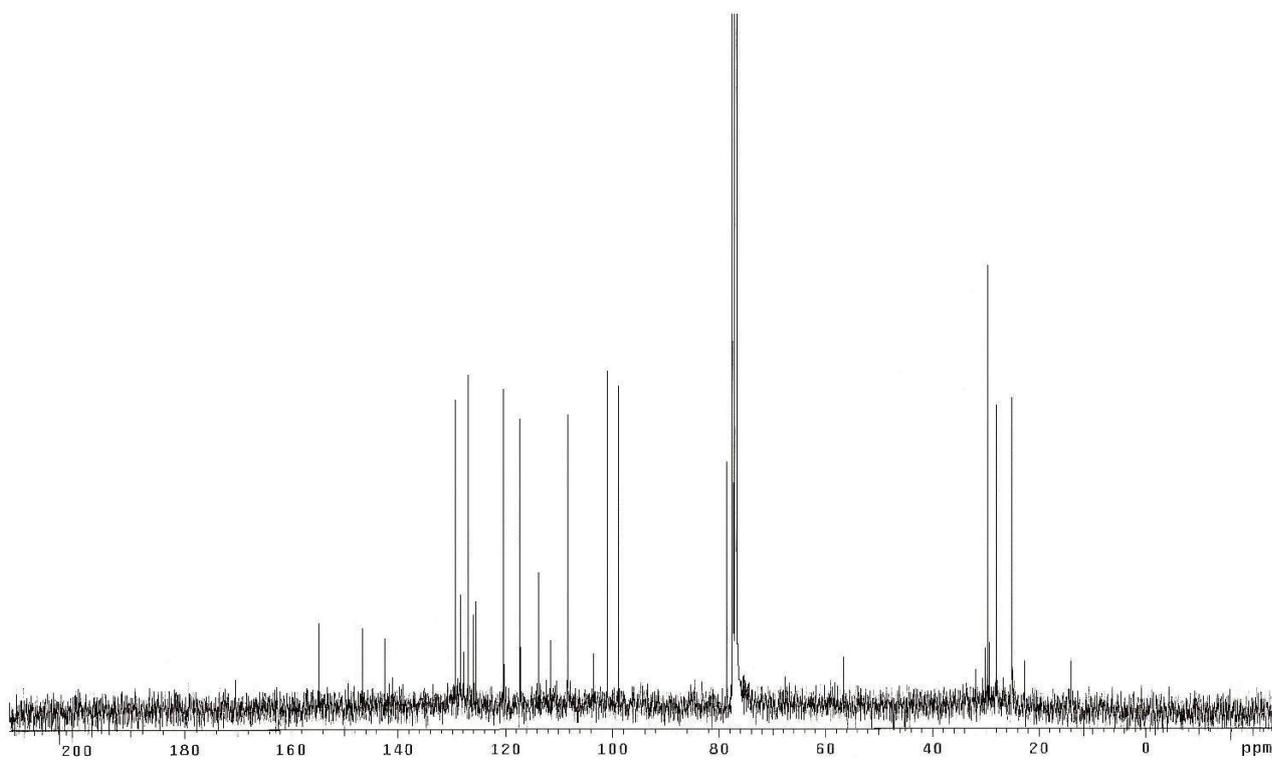


Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C da mistura **CM1** e **CM2** [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)]

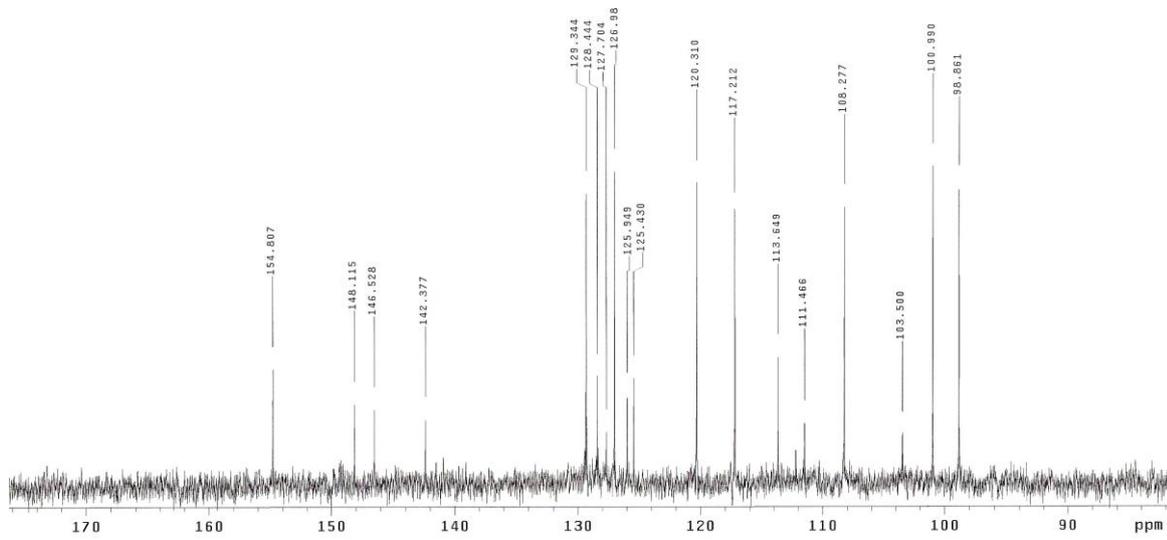


Figura 7 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura de **CM1** e **CM2**

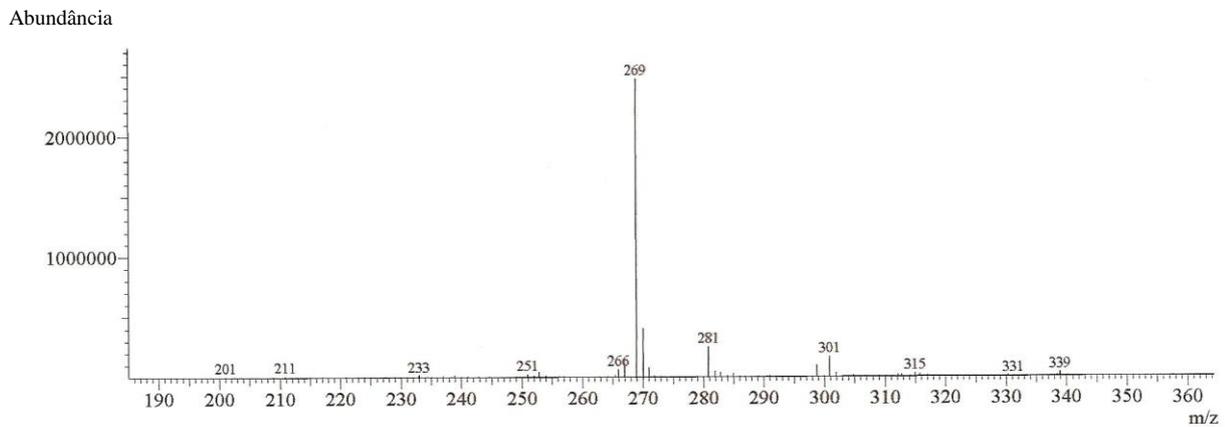
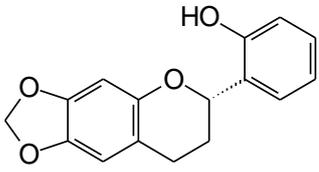
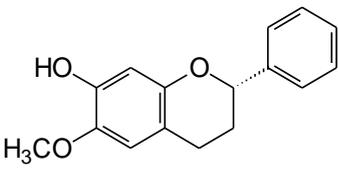


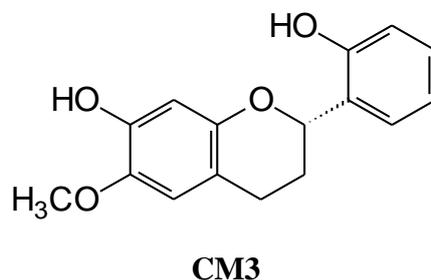
Figura 8 - Espectro de massas da mistura de **CM1** e **CM2** (APCI, modo negativo)

Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] da mistura de **CM1** e **CM2**

Estrutura	 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana (CM1)		 7-hidroxi-6-metoxiflavana (CM2)	
	Posição	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult.; J)
2	5,14 (dd; 10,2;3,0)	78,50	5,01 (dd; 9,6;2,4)	77,41
3	2,74-3,02 (m)	28,04	2,74-3,02 (m)	29,34
4	2,18-2,25 (m)	25,06	2,18-2,25 (m)	24,72
5	6,57 (s)	108,28	6,57 (s)	111,47
6	—	142,38	—	n.d
7	—	148,12	—	n.d
8	6,47 (s)	98,86	6,47 (s)	103,50
9	—	146,53	—	n.d
10	—	113,65	—	112,10
1'	—	125,43	—	n.d
2'	—	154,81	7,24-7,41 (m)	125,95
3'	6,89-7,21 (m)	117,21	7,24-7,41 (m)	128,44
4'	6,89-7,21 (m)	129,34	7,24-7,41 (m)	127,70
5'	6,89-7,21 (m)	120,31	7,24-7,41 (m)	128,44
6'	6,89-7,21 (m)	126,99	7,24-7,41 (m)	125,95
-OCH ₃	—	—	3,85 (s)	56,55
-O-CH ₂ -O	5,90 (s)	100,99	—	—
-OH	—	—	5,31 (s)	—

n.d: não detectado

3.2 - Identificação da 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana (CM3)



A identificação de **CM3** foi baseada na comparação dos seus dados espectrais com os dados registrados na literatura (Juck, 2003). Assim, os sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C estão de acordo com os dados espectrométricos da 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana, já isolada anteriormente do caule de *Cratylia mollis* (Juck, 2003). Estes dados aliados ao íon molecular $[\text{M-H}]^-$ em m/z 271 observado no EM-APCI (Figura 11, p. 31) no modo negativo permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ para **CM3**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 9, p. 30; Tabela 20, p. 31) mostrou sinais característicos de flavanas. Destaca-se neste espectro dois multipletos integrando para dois hidrogênios cada (δ 2,76-3,04 e δ 2,19-2,30) referentes aos H-3 e H-4, respectivamente, bem como o duplo dubleto em δ 5,15 referente ao H-2. Além desses sinais característicos do anel C de flavanas, foi possível identificar os sinais relativos aos hidrogênios do anel A (H-5 e H-8) que foram registrados como dois singletos em δ 6,54 e δ 6,59. A presença dos dois singletos indicou que o anel apresentava substituição em C-6 e C-7. Os sinais observados entre δ 6,92 e 7,26 foram referentes aos hidrogênios aromáticos do anel B e sugeriram a presença de apenas um substituinte neste anel.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 10, p. 30; Tabela 20, p. 31) apresentou 16 sinais, assinalados como um carbono oximetínico, dois carbonos metilênicos, um grupo metoxílico, seis carbonos metínicos e seis carbonos sp^2 não hidrogenados.

Pode ser observado em flavanas substituídas por hidroxila e/ou metoxila no anel A, que a presença do grupo hidroxílico no C-7 desloca o C-8 para campo mais baixo, em comparação com o C-7 substituído por grupo metoxílico (Quadro 3, p. 29). Esta maior proteção no C-8 deve-se ao maior efeito mesomérico observado para grupos metoxílicos (Agrawal, 1989).

Deste modo, através das comparações realizadas foi possível identificar **CM3** como sendo 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana.

Quadro 3: Estruturas de flavanas com alguns exemplos de RMN de ^{13}C para o C-8

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA
7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavana	
6,4'-dihidroxi-7-metoxiflavana	
7,3',4'-trihidroxi-flavan-3-ol (fisetinidol)	
7,3',4',5'-tetrametoxi-flavan-3-ol	
7-hidroxi-5-metoxiflavana	
5,7-dimetoxi-4'-hidroxiflavana	

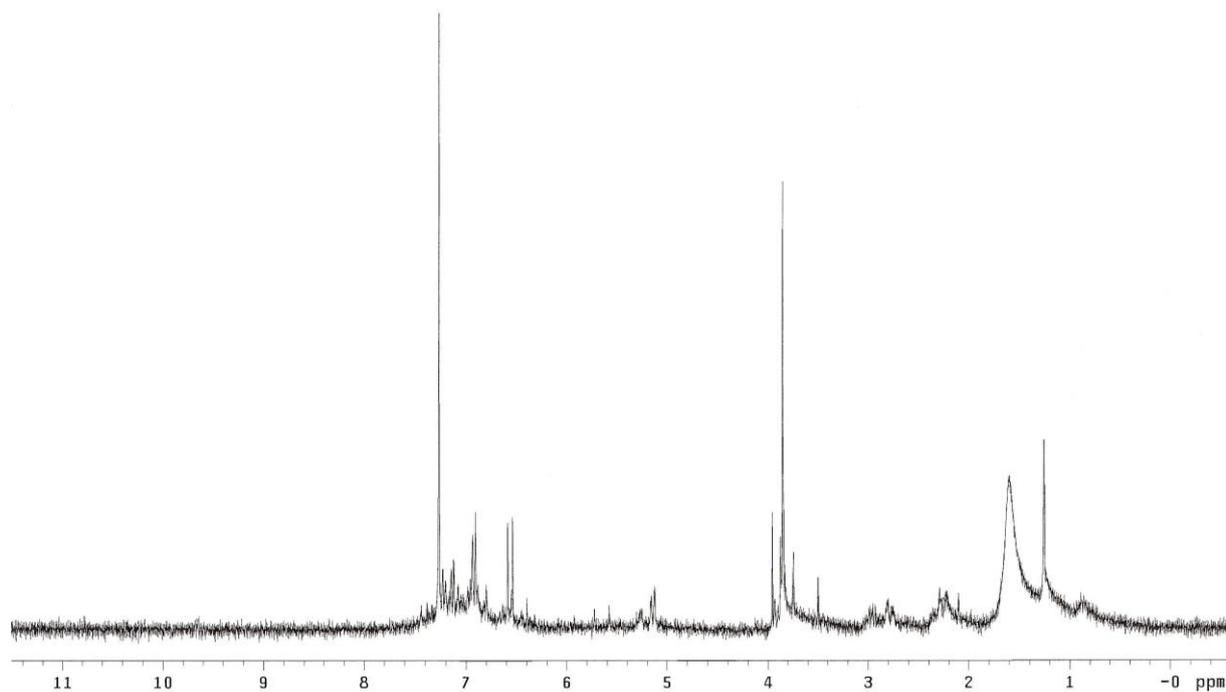


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM3**

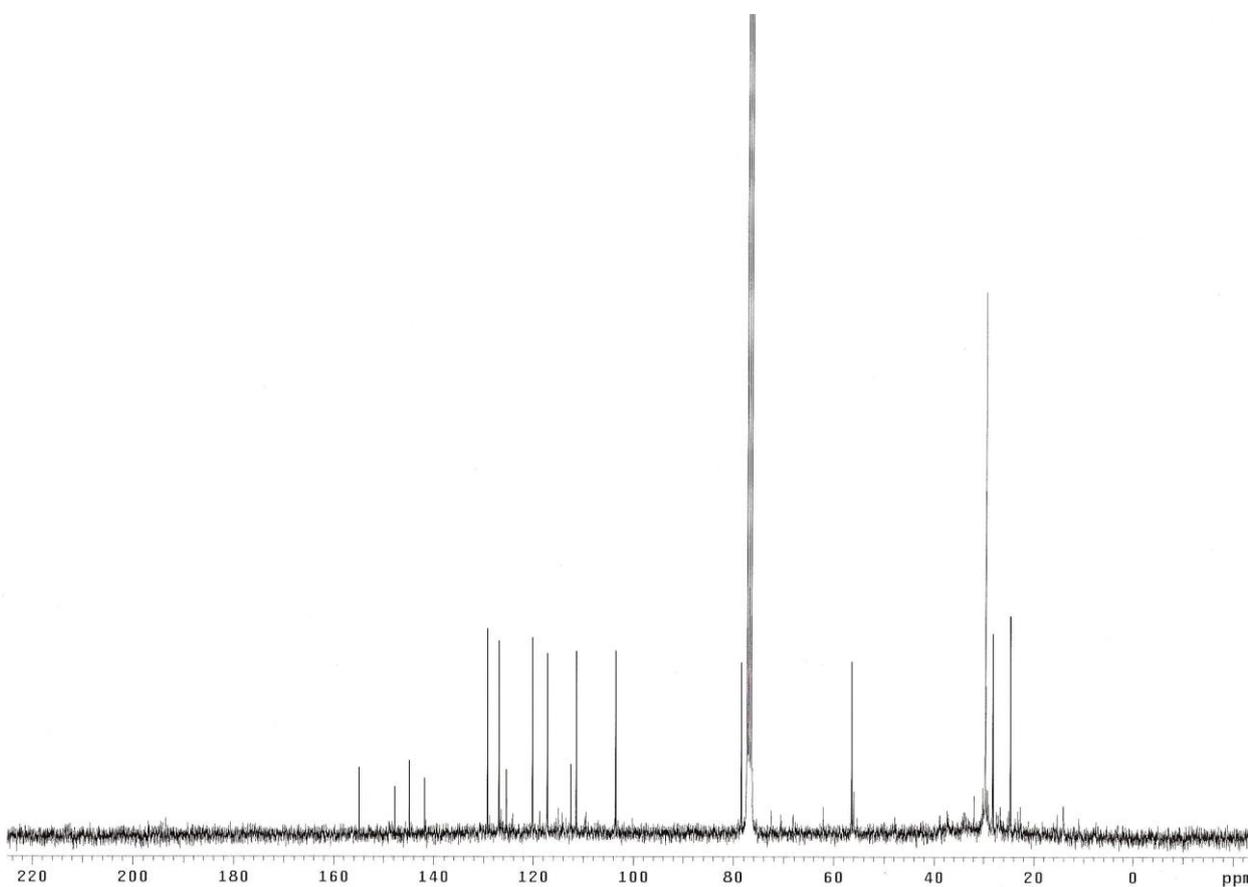


Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM3**

Abundância

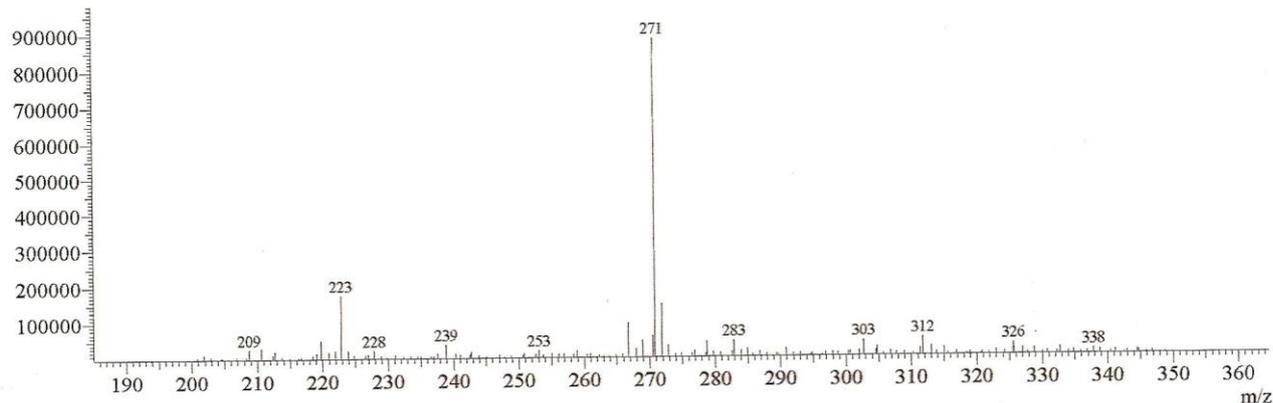


Figura 11 - Espectro de massas de **CM3** (APCI, modo negativo)

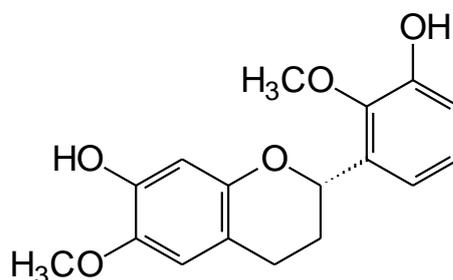
Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de

CM3

Posição	CM3		7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana*	
	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C
2	5,15 (dd; 10,5; 2,7)	78,52	5,18 (dd; 8,5; 2,8)	78,56
3	2,76-3,04 (m)	28,23	2,76-3,04 (m)	28,24
4	2,19-2,30 (m)	24,76	2,19-2,30 (m)	24,77
5	6,54 (s)	111,44	6,54 (s)	111,44
6	—	141,84	—	141,85
7	—	147,76	—	147,76
8	6,59 (s)	103,65	6,59 (s)	103,66
9	—	144,90	—	144,89
10	—	112,50	—	112,52
1'	—	125,50	—	125,51
2'	—	154,93	—	154,94
3'	6,92-7,26 (m)	117,27	6,94 (d; 8,0)	117,29
4'	6,92-7,26 (m)	129,31	7,16 (dd; 8,0, 2,0)	129,35
5'	6,92-7,26 (m)	120,25	7,26 (dd; 8,0, 8,0)	120,28
6'	6,92-7,26 (m)	127,00	7,30 (d; 11,0)	127,03
-OCH ₃	3,85 (s)	56,49	3,88 (s)	56,49
-OH	—	—	5,61 (s)	—

* Juck, 2003

3.3 - Determinação estrutural da 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxiflavana (CM4)



CM4

A determinação estrutural de **CM4** foi baseada na análise dos dados de EM, RMN de ^1H , ^{13}C (BB) da substância e correlações observadas em técnicas de RMN bidimensionais (HMQC e HMBC) de seu derivado diacetilado, além da comparação com dados da literatura.

Os sinais registrados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , aliados ao íon molecular $[\text{M}-1]^-$ em m/z 301 observado no EM-ESI, modo negativo (Figura 17, p. 37), permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$ para **CM4**.

O espectro de RMN de ^1H de **CM4** (Figura 14, p. 35; Tabela 21, p. 41) apresentou sinais característicos do anel C de flavanas. Ou seja, foi observado no espectro a presença de dois multipletos integrando para dois hidrogênios cada, referentes aos H-3 (δ 2,74 – δ 2,97) e H-4 (δ 2,10 – δ 2,16). Estes sinais indicaram a presença de dois grupos metilênicos (C-3 e em C-4) e o sinal em δ 5,24 (dd, $J=10,5$ e 2,1 Hz) foi indicativo da presença de hidrogênio oxibenzílico.

Nesse mesmo espectro também pode ser evidenciado a presença de sinais relativos aos hidrogênios do anel A. Dois singletos em δ 6,59 e δ 6,50, com integração para um hidrogênio cada, e que foram atribuídos aos H-5 e H-8, respectivamente. Deste modo, a presença dos dois singletos foi indicativa que o anel A apresentava substituição em C-6 e C-7.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 14, p. 35; Tabela 21, p. 41) na faixa de δ 6,94 – δ 7,10, referentes aos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, conjuntamente com as constantes de acoplamento observadas, foram indicativos que o anel B era 1,2,3-trissubstituído. Outra informação deste espectro foi o registro de dois singletos referentes a dois grupos metoxílicos ligados a carbonos sp^2 .

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15, p. 36; Tabela 21, p. 41) registrou a presença de 17 sinais sendo um carbono oximetínico, dois metilenos, dois grupos metoxílicos, cinco carbonos sp^2 hidrogenados e sete não hidrogenados. Este espectro também contribuiu para confirmar que **CM4** tratava-se de uma flavana principalmente devido os sinais observados para os C-2, C-3 e C-4 que foram característicos do anel C desta classe de substância (Tabela 21, p. 41). A atribuição dos valores de ^{13}C do anel A e C foi realizada através da comparação com dados da literatura (Juck, 2003) observados para a 7-hidroxi-6-metoxiflavana (Figura 12, p. 33; Tabela 21, p. 41).

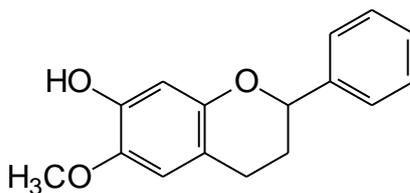


Figura 12: 7-hidroxi-6-metoxiflavana

O sinal em δ 62,11 observado no espectro de RMN de ^{13}C de **CM4**, referente a grupo metoxílico, era indicativo que o mesmo encontrava-se impedido estericamente. Deste modo pode-se propor que um dos grupos metoxílicos estava ligado ao C-2' do anel B.

Os dados de RMN de ^{13}C e as correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMBC e HMQC) do derivado diacetilado de **CM4** corroboraram para a elucidação e determinação estrutural desta substância. As correlações observadas no espectro de HMQC (Figura 21, p. 39; Tabela 22, p. 42) do derivado diacetilado (**CM4a**) permitiram correlacionar os sinais dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. Dentre as principais informações obtidas no espectro bidimensional HMQC pode-se destacar a correlação de H-5 (δ 6,70) com o C-5 (δ 113,2) e entre o H-8 (δ 6,61) com C-8 (δ 111,53). Estas correlações permitiram atribuir corretamente os hidrogênios e carbonos de **CM4** e contribuir para comprovação do padrão de substituição deste anel.

Análise do espectro bidimensional HMBC (Figura 23, p. 40) indicou que os hidrogênios H-5 e H-8 encontravam-se relacionados com os carbonos C-6 (δ 145,04), C-7 (δ 148,78), C-9 (δ 138,63) e C-10 (δ 119,58). Além dessas, outra importante correlação observada foi entre o H-5 (δ 6,70) e o C-4 (δ 25,43). Estes dados confirmaram as atribuições dos sinais do anel A da flavana e o padrão de substituição nas posições 6 e 7 deste anel. A localização do grupo metoxílico em C-6 foi definida

pela correlação observada no HMBC entre δ 3,78 e δ 145,04 (C-6) e pela comparação dos dados de RMN de **CM4** e seu derivado acetilado (**CM4a**) (Tabela 21, p. 41). Os sinais de C-6 e C-8 de **CM4a** em campo mais baixo ($\Delta\delta$ +4,0 e $\Delta\delta$ +8,0), quando comparado com valores de **CM4**, confirmaram o padrão de substituição do anel A.

Os espectros bidimensionais do derivado também revelaram importantes correlações para o anel B da flavana de modo a confirmar a estrutura proposta e permitir atribuir os dados de ^{13}C de modo inequívoco. No espectro HMBC, pode-se observar a correlação de H-4' (δ 7,06) com os carbonos C-2' (δ 148,88) e C-5' (δ 124,39), bem como do duplo dubleto em δ 7,36 (H-6') com os carbonos C-2' (δ 148,88), C-4' (δ 122,99) e C-2 (δ 72,54). Além dessas, pode-se observar a correlação entre os hidrogênios da metoxila (δ 3,85) com o carbono C-2'. Deste modo, foi possível confirmar que o anel B encontrava-se substituído nas posições 2' e 3', confirmando a localização da metoxila no C-2'.

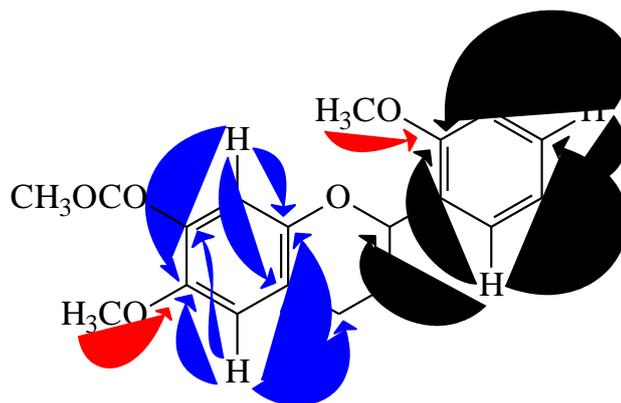


Figura 13: Correlações observadas no HMBC para o derivado diacetilado **CM4a**

A análise do espectro de RMN de ^1H do derivado **CM4a** também permitiu fixar os grupos hidroxilas nas posições 8 e 3'. Neste espectro pode-se observar a presença dos singletos em δ 2,30 e δ 2,36 correspondentes aos grupos acetila ligados ao anel A e anel B, respectivamente, e que os sinais dos H-8 (δ 6,61) e H-4' (δ 7,06) foram desprotegidos em $\Delta\delta$ 0,11 e $\Delta\delta$ 0,12, respectivamente quando comparados com os do **CM4**. No espectro de RMN de ^{13}C além da variação dos sinais referentes aos C-8 ($\Delta\delta$ 8,0) e C-5 ($\Delta\delta$ 1,7), foi observada desproteção de C-4' ($\Delta\delta$ 7,4) (Tabela 21, p. 41). Estas diferenças nos deslocamentos foram devidas a acetilação das hidroxilas em C-7 e em C-3', uma vez que a acetilação de grupo hidroxila fenólica pode causar proteção do carbono ipso e forte desproteção aos carbonos orto e para em anéis aromáticos. Esse efeito de desproteção dos C-8 e C-4' revela que os anéis A e B da flavana estão

substituídos por grupos hidroxílicos nos C-7 e C-3'. Portanto, as correlações obtidas através dos espectros bidimensionais foram importantes para realizar as atribuições dos deslocamentos químicos além de confirmar a estrutura da flavana.

Assim, através da análise dos dados espectrométricos do derivado diacetilado e comparação com dados da literatura foi possível propor que **CM4** é a 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxiflavana, que está sendo relatada pela primeira vez neste trabalho.

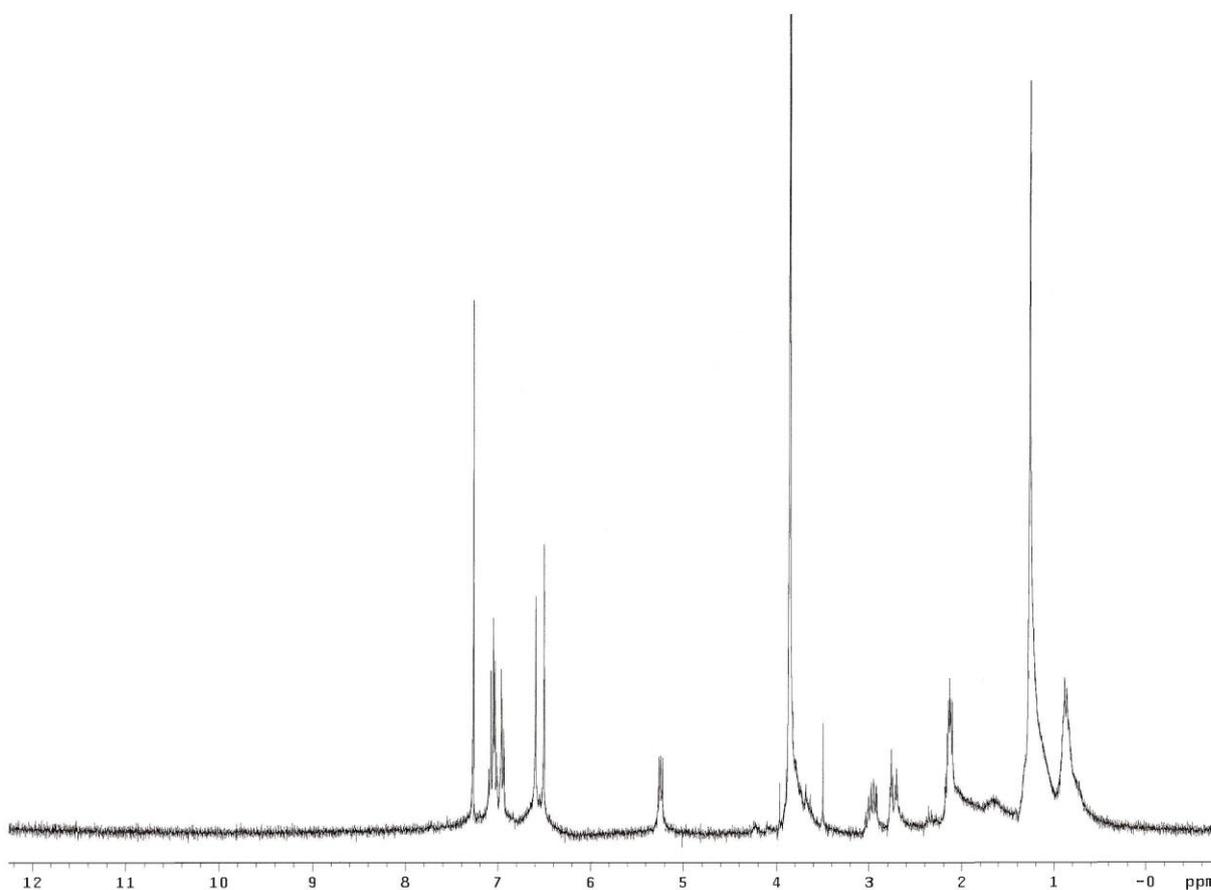


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM4**

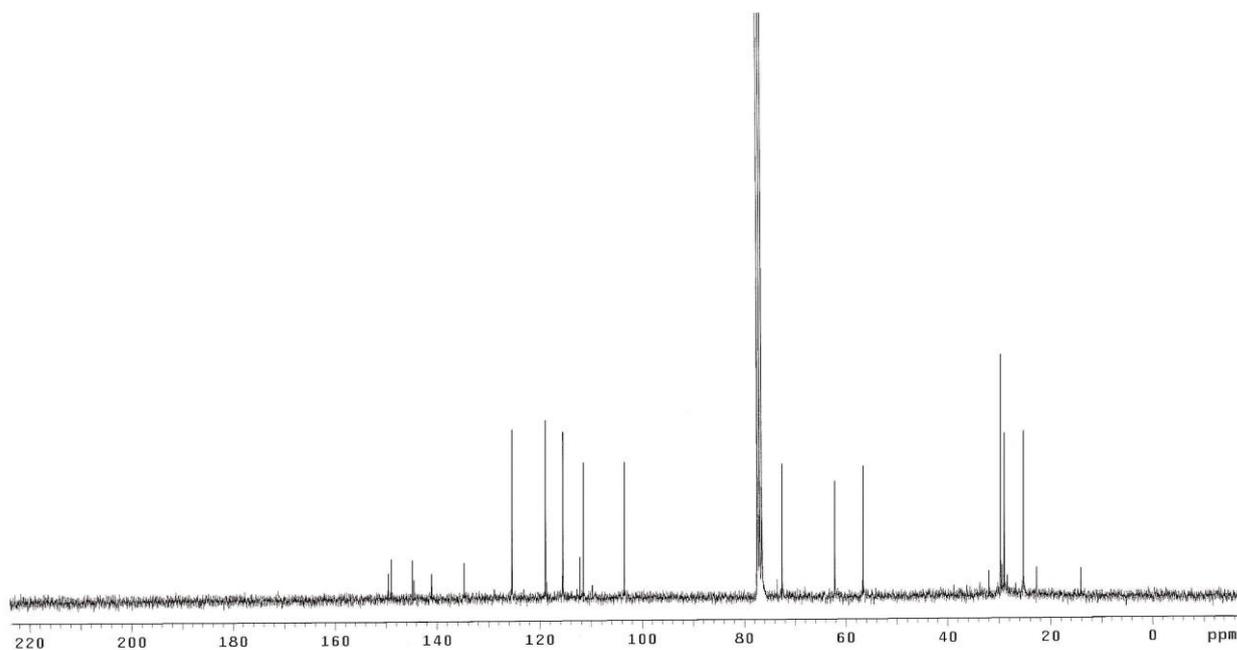


Figura 15 - Espectro de ^{13}C de RMN [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM4**

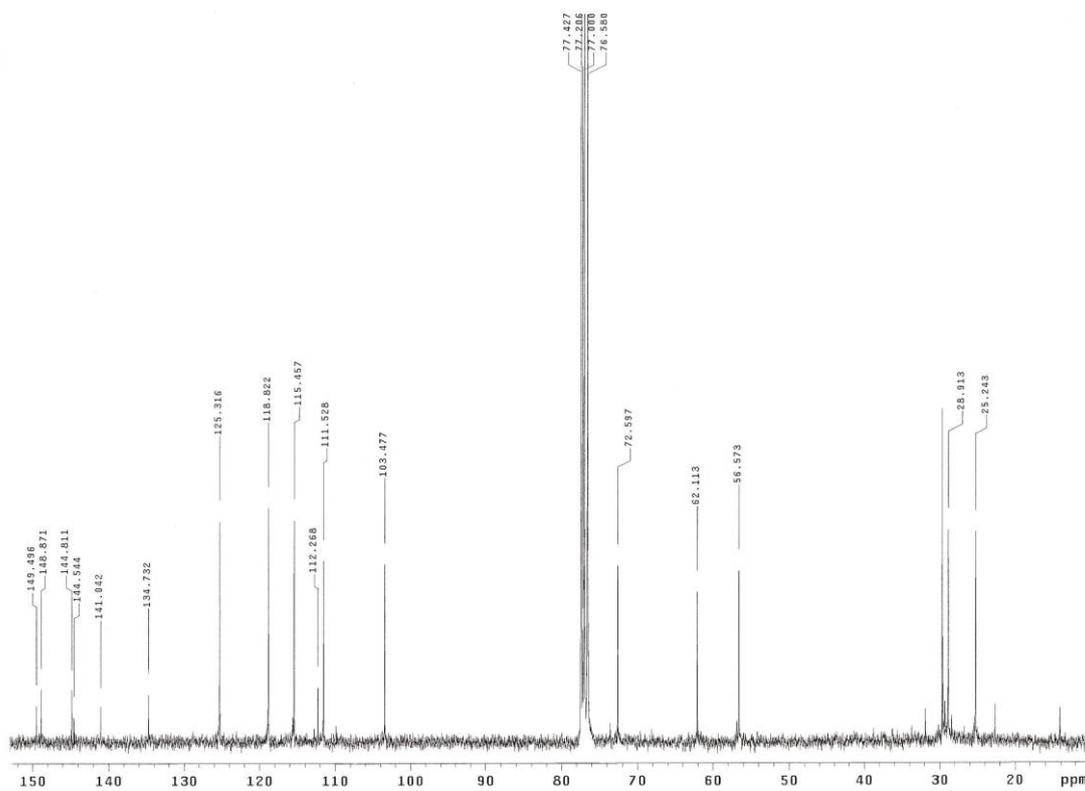


Figura 16 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **CM4**

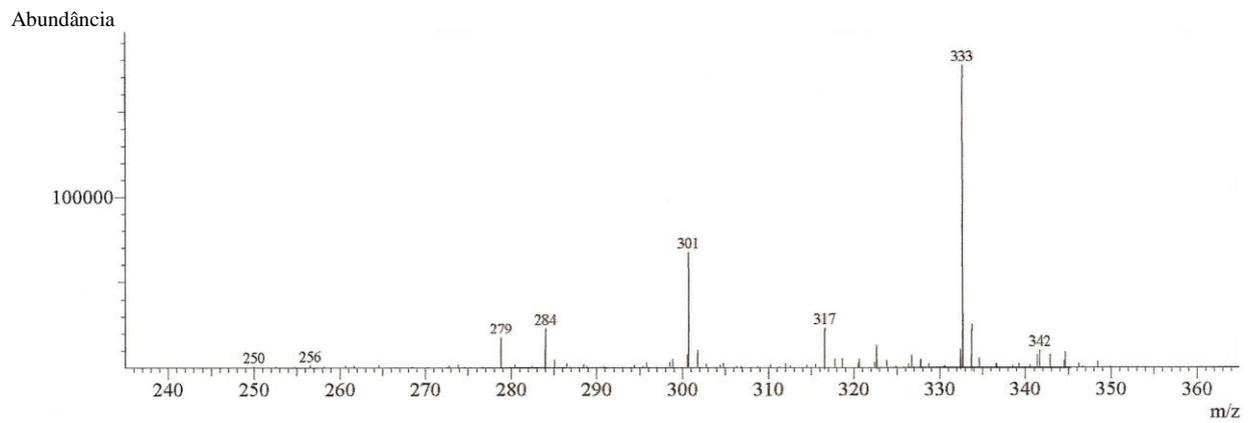


Figura 17 - Espectro de massas de **CM4** (ESI, modo negativo)

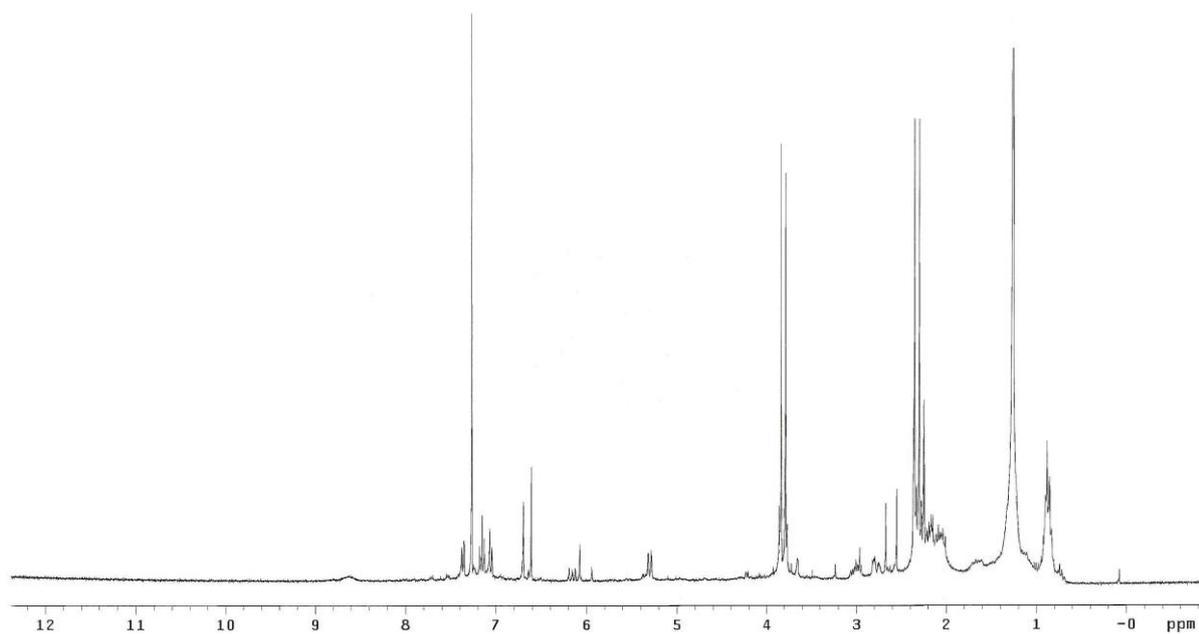


Figura 18 - Espectro de RMN de ¹H [300 MHz; CDCl₃; δ (ppm)] de **CM4** acetilada

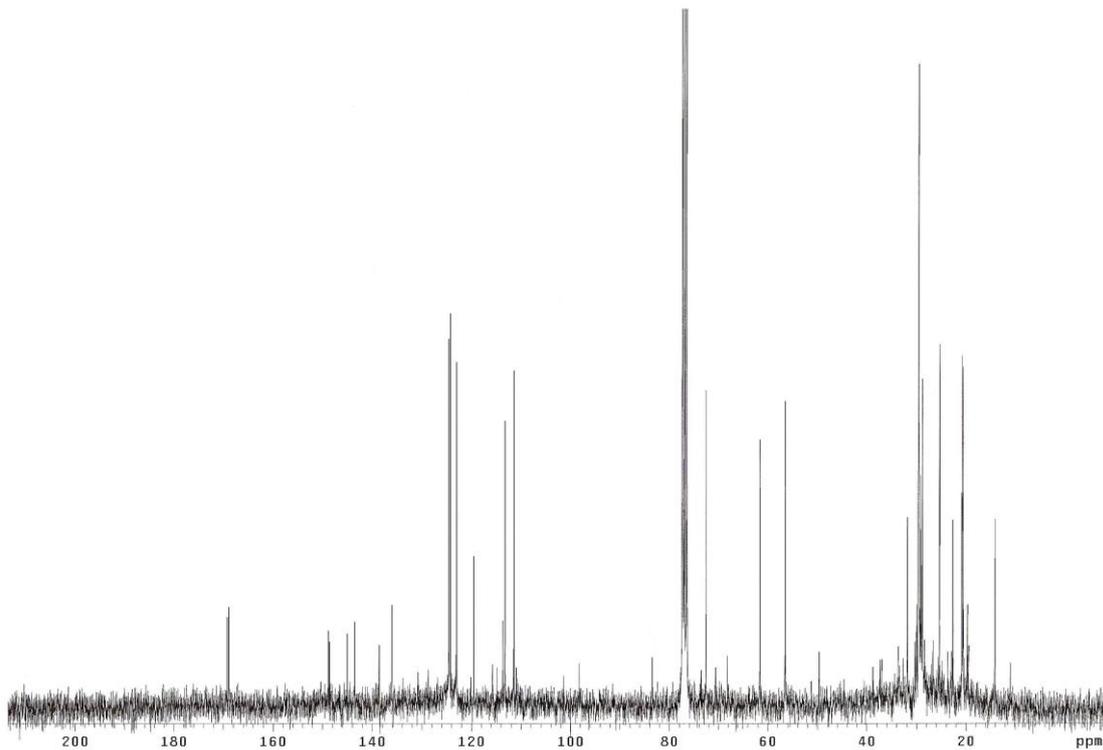


Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM4 acetilada**

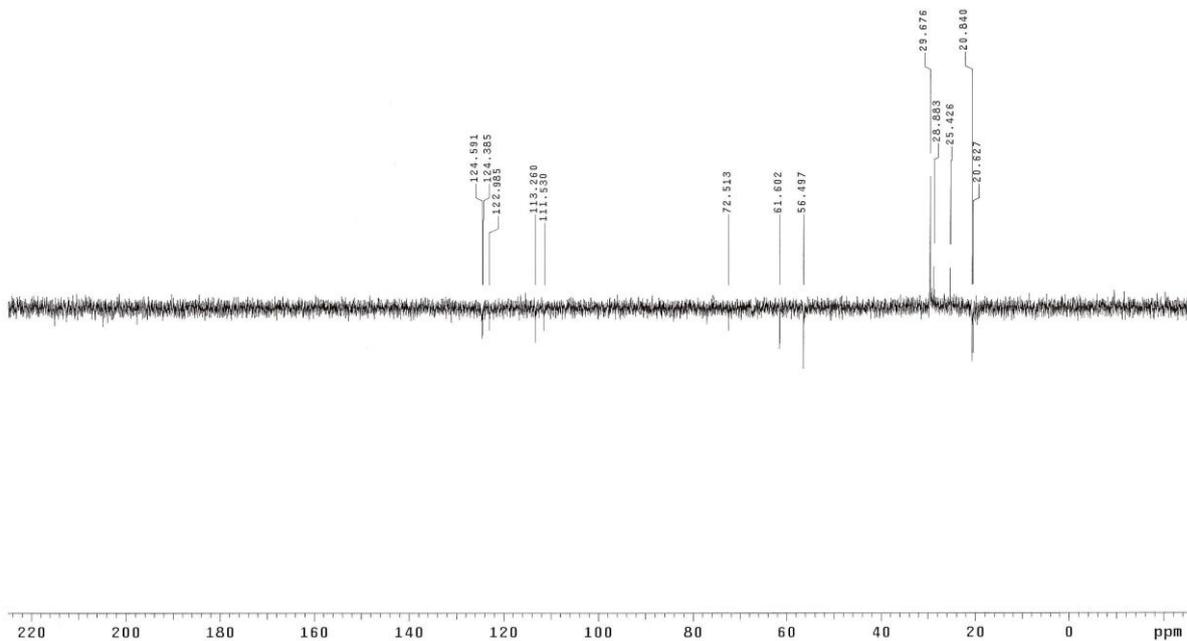


Figura 20 - DEPT 135° [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM4 acetilada**

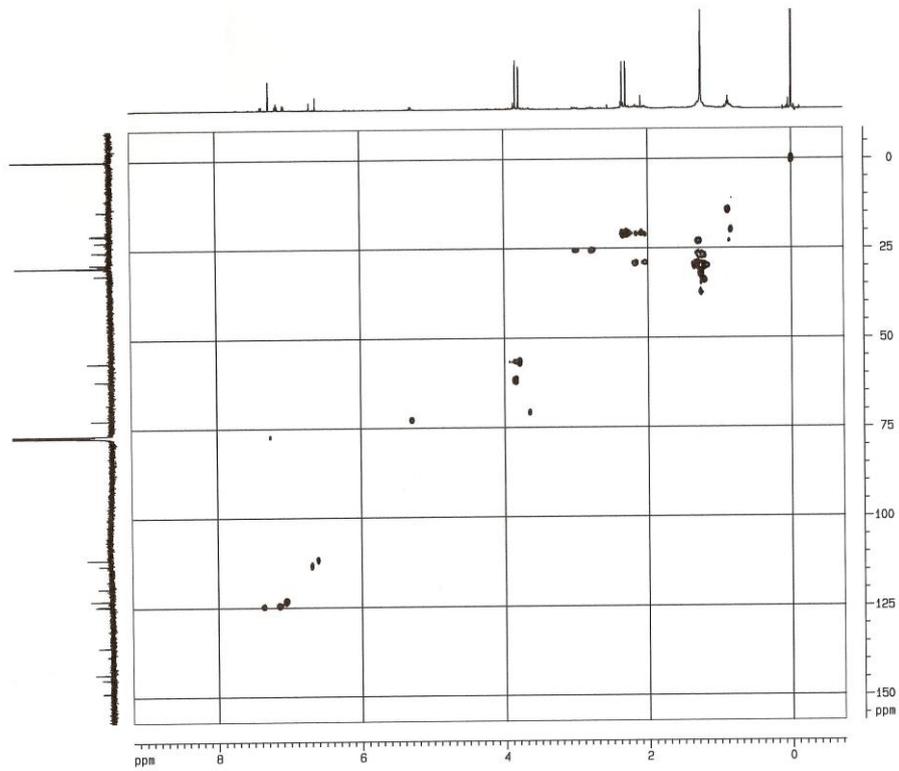


Figura 21 - Espectro de HMQC de CM4 acetilada

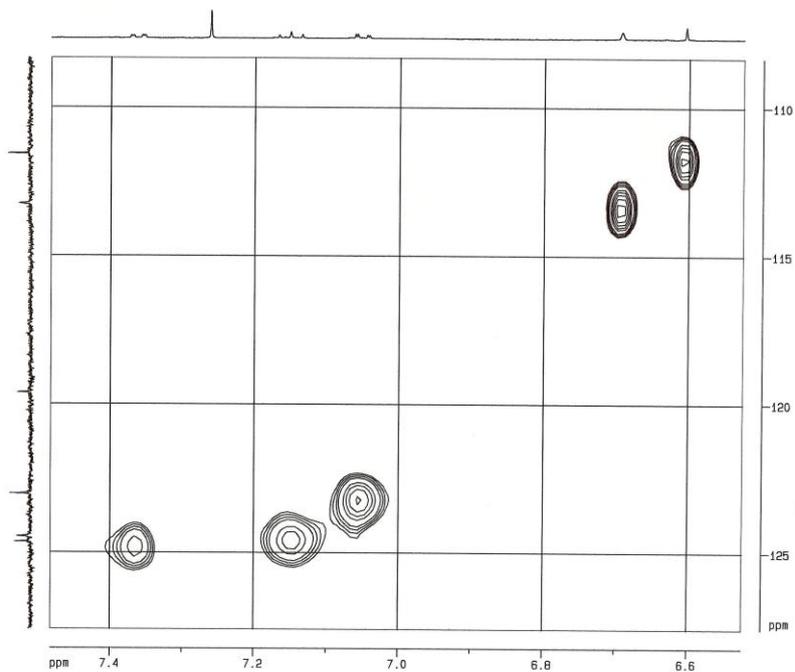


Figura 22 - Ampliação do espectro de HMQC de CM4 acetilada

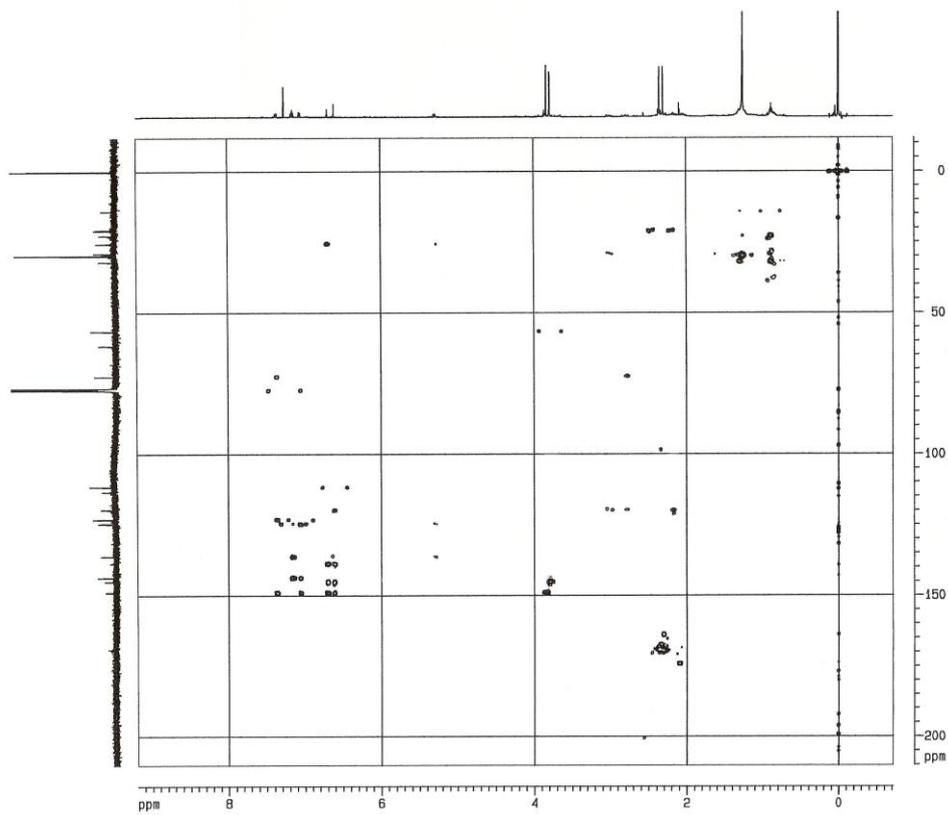


Figura 23 - Espectro de HMBC de **CM4 acetilada**

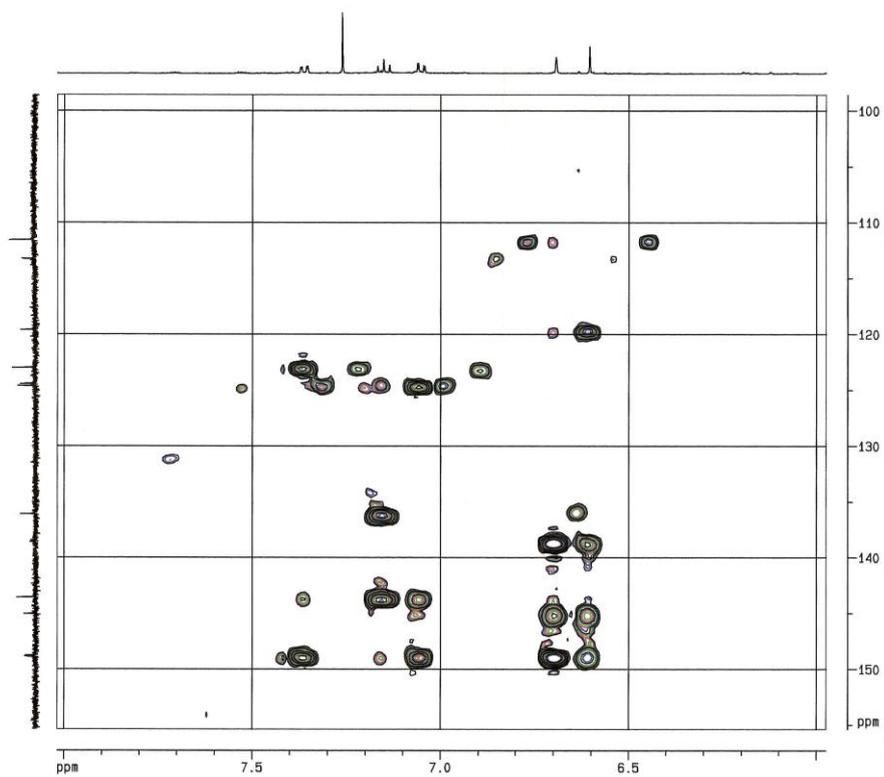


Figura 24 - Ampliação do espectro de HMBC de **CM4 acetilada**

Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)]
de **CM4**, **CM4a** e **7-hidroxi-6-metoxiflavana**

Posição	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	δ ^{13}C	δ ^{13}C
	CM4	CM4	CM4a	7-hidroxi-6-metoxiflavana*
2	5,24 (dd; 10,5; 2,1)	72,60	72,54	77,52
3	2,74 – 2,97 (m)	28,91	28,89	29,68
4	2,10 – 2,16 (m)	25,20	25,43	24,71
5	6,59 (s)	111,53	113,29	111,46
6	—	141,04	145,04	140,94
7	—	148,87	148,78	149,32
8	6,50 (s)	103,48	111,53	103,50
9	—	144,81	138,63	144,85
10	—	112,27	119,58	112,18
1'	—	134,73	136,08	141,80
2'	—	144,54	148,88	125,95
3'	—	149,50	143,55	128,44
4'	6,94 (dd; 8,0; 2,1)	115,46	122,99	127,70
5'	7,05 (m)	118,82	124,39	128,44
6'	7,05 (m)	125,32	124,60	125,95
-OCH ₃	3,85 (s)	56,57	56,52	56,53
-OCH ₃	3,86 (s)	62,11	61,61	—

*Juck, 2003

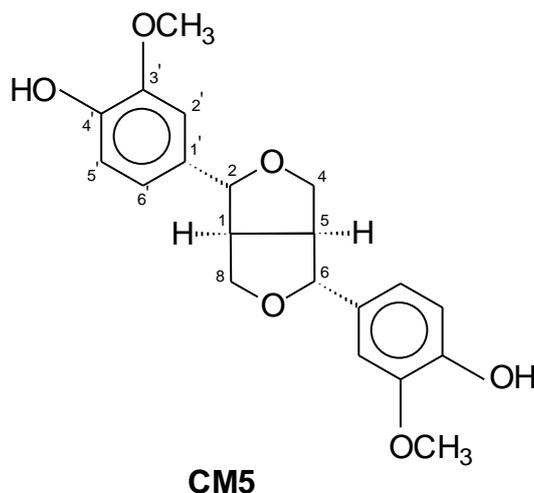
Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] do derivado diacetilado de **CM4a** e as correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMBC e HMQC)

Posição	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C *	Correlações ^{13}C - ^1H [#]
2	5,30 (dd; 10,5)	72,54	
3	2,95 – 3,04 (m)	28,89	
4	2,75 – 2,82 (m)	25,43	
5	6,70 (s)	113,29	C-6 (δ 145,04), C-7 (δ 148,78), C-9 (δ 138,63), C-10 (δ 119,58) e C-4 (δ 25,43)
6	—	145,04	
7	—	148,78	
8	6,60 (s)	111,53	C-6 (δ 145,04), C-7 (δ 148,78), C-9 (δ 138,63) e C-10 (δ 119,58)
9	—	138,63	
10	—	119,58	
1'	—	136,08	
2'	—	148,88	
3'	—	143,55	
4'	7,06 (dd; 8,0; 1,9)	122,99	C-2' (δ 148,88) e C-5' (δ 124,39)
5'	7,16 (t; 8,0)	124,39	
6'	7,36 (dd; 8,0; 1,9)	124,60	C-2 (δ 72,54), C-4' (δ 122,99) e C-2' (δ 148,88)
-OCH ₃	3,78 (s)	56,52	C-6 (δ 145,04)
-OCH ₃	3,84 (s)	61,61	C-2' (δ 148,88)
-OCOCH ₃	2,30 (s)	168,8; 20,6	
-OCOCH ₃	2,30 (s)	168,8; 20,6	

[#] Atribuído através do espectro HMBC

* Atribuído através do HMQC

3.4 - Identificação de pinoresinol (CM5)



A identificação de **CM5** foi baseada na análise de dados espectrométricos e comparação com dados descritos na literatura (El-Hassan *et al.*, 2003; Cruz, 2004). Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C (BB e DEPT) aliados ao íon molecular $[\text{M}-1]^-$ em m/z 357 registrado no EM-APCI, modo negativo, (Figura 28, p. 48) permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 25, p. 46; Tabela 23, p. 48) na faixa de δ 6,81 – δ 6,92, característicos de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, e a integração dos mesmos, foram indicativos da presença de anel 1,3,4-trissubstituído. Além desses, o dubleto em δ 4,75 foi indicativo da presença de hidrogênio oxibenzílico e, o singlete em δ 3,91 da presença de uma metoxila ligada a anel aromático.

Pode-se observar no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26, p. 47; Tabela 23, p. 48) a presença de seis sinais de carbonos sp^2 na região de aromático (δ 108 – 147). Os sinais em δ 145,2 e δ 146,6, característicos de carbonos sp^2 oxigenados, que confirmaram a presença dos grupos hidroxílicos e metoxílicos respectivamente. Além destes, os sinais em δ 108,6, δ 114,2 e δ 118,9 foram atribuídos aos carbonos metínicos enquanto o sinal em δ 132,8 foi atribuído ao carbono ligado ao núcleo tetraidrofurânico presente na estrutura.

A multiplicidade dos sinais registrados foi obtida através da análise do espectro de DEPT 135° (Figura 27, p. 47). Deste modo, o sinal em δ 55,9 foi atribuído à metoxila do anel, enquanto que os sinais em δ 54,1, δ 71,6 e δ 85,8 foram reconhecidos como valores de carbonos característicos dos anéis tetraidrofurânicos de lignanas.

A comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (El-Hassan et al, 2003; Cruz, 2004) para o pinoresinol permitiu a identificação de **CM5**. Esta lignana foi isolada anteriormente em várias espécies vegetais (Quadro 4).

Como pode ser observado no Quadro 4, a lignana pinoresinol tem ampla ocorrência em angiospermas e gimnospermas. Esta substância já foi isolada em Leguminosae, embora a ocorrência seja restrita a duas espécies de gêneros distintos (*Melilotus* e *Gliricidia*). Deste modo pode-se supor que esta lignana exerça algum papel fisiológico em vários vegetais.

Quadro 4: Ocorrência do pinoresinol no reino vegetal

Família	Espécie	Referência
Acanthaceae	<i>Justicia diffusa</i> Willd	Subbaraju e Pillai, 1996
Actinidiaceae	<i>Actinidia arguta</i>	Whang <i>et al.</i> , 2000
Amaryllidaceae	<i>Galanthus nivalis</i> L.	Kaya <i>et al.</i> , 2004
Apiaceae	<i>Pimpinella thellungiana</i> Wolff.	Shi <i>et al.</i> , 1998
Apocynaceae	<i>Himatanthus fallax</i>	Abdel-Kader <i>et al.</i> , 1997
	<i>Carissa spinarum</i> Linn.	Rao <i>et al.</i> , 2005
	<i>Strophanthus gratus</i>	Cowan <i>et al.</i> , 2001
Araceae	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Della Greca <i>et al.</i> , 1998
Araliaceae	<i>Aralia bipinnata</i>	Hsiao e Chiang, 1995
Araucariaceae	<i>Araucaria angustifolia</i>	Yamamoto <i>et al.</i> , 2004
Asclepiadaceae	<i>Leptadenia arborea</i>	El-Hassan <i>et al.</i> , 2003
Asteraceae	<i>Chiliotrichium rosmarinifolium</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1986
	<i>Centaurea orphanidea</i>	Gousiadou e Skaltsa, 2003
	<i>Cremanthodium ellisii</i>	Wang <i>et al.</i> , 2004
	<i>Saussurea medusa</i> Maxim	Xie <i>et al.</i> , 2005
	<i>Tessaria integrifolia</i>	Ono <i>et al.</i> , 2000
Atherospermataceae	<i>Laurelia novae-zelandiae</i>	Adjaye <i>et al.</i> , 1984
Avicenniaceae	<i>Avicennia germinans</i>	Sharp <i>et al.</i> , 2001
Cephalotaxaceae	<i>Torreya jackii</i>	Chen <i>et al.</i> , 1997
Cochlospermaceae	<i>Cochlospermum vitifolium</i>	Otilia <i>et al.</i> , 2005
Compositae	<i>Pluchea quitoc</i>	Guilhon e Muller, 1998
Convolvulaceae	<i>Cuscuta chinensis</i> Lam.	Yahara <i>et al.</i> , 1994
Cupressaceae	<i>Thuja occidentalis</i>	Kawai <i>et al.</i> , 1999
Dilleniaceae	<i>Doliocarpus dentatus</i>	Sauvain <i>et al.</i> , 1996
Dipsacaceae	<i>Morina chinensis</i>	Su <i>et al.</i> , 1999
Disynaphiinae	<i>Disynaphia multicrenulata</i>	De Gutierrez <i>et al.</i> , 2001
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pekinensis</i> Rupr.	Kong e Min, 1996
	<i>Alchornea davidii</i>	Cui e Tan, 2004
	<i>Phyllanthus oxyphyllus</i> Mig.	Sutthivaiyakit <i>et al.</i> , 2003

Fabaceae	<i>Gliricidia sepium</i>	Ragasa <i>et al.</i> , 2000
	<i>Melilotus messanensis</i>	Macias <i>et al.</i> , 1998
Icacinaceae	<i>Poraqueiba guianensis</i>	Goular <i>et al.</i> , 1995
Iridaceae	<i>Gladiolus segetum</i> Ker-Gawl	Mohamed, 2005
Linaceae	<i>Hugonia tomentosa</i>	Konuklugi, 1996
	<i>Linum flavum</i> var. <i>compactum</i>	Konuklugil, 1997
	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Sicilia <i>et al.</i> , 2003
Loganiaceae	<i>Fagraea racemosa</i> Jack ex Wall.	Okuyama <i>et al.</i> , 1995
Magnoliaceae	<i>Magnolia kobus</i> var. <i>borealis</i>	Kim <i>et al.</i> , 1996
	<i>Magnolia salicifolia</i> Maxim.	Kikuchi <i>et al.</i> , 1981
	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	Fujimoto <i>et al.</i> , 1977 Chen e Chang, 1978
	<i>Magnolia coco</i>	Yu <i>et al.</i> , 1998
	<i>Magnolia denudata</i>	Funayama <i>et al.</i> , 1995
Malvaceae	<i>Hibiscus cannabinus</i>	Seca <i>et al.</i> , 2001
Melastomataceae	<i>Henriettella fascicularis</i>	Calderon <i>et al.</i> , 2002
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i> L.	Carpinella <i>et al.</i> , 2005
Myoporaceae	<i>Eremophila maculata</i> var. <i>brevifolia</i>	Syah e Ghisalberti, 1996
Oleaceae	<i>Forsythia suspensa</i>	Leng <i>et al.</i> , 2003 Chen <i>et al.</i> , 1999 Nishibe <i>et al.</i> , 1977
	<i>Forsythia europaea</i> <i>Forsythia japonica</i> <i>Forsythia giraldiana</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 1988
	<i>Forsythia koreana</i> Nakai	Chiba, 1979
	<i>Ligustrum obtusifolium</i>	Zhou e Dind, 2000
	<i>Olea europaea</i>	Owen <i>et al.</i> , 2000
	Orchidaceae	<i>Bulbophyllum triste</i>
Pandanaceae	<i>Pandanus odoratissimus</i>	Jong e Chau, 1998
Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i>	Cruz, 2004
Pedaliaceae	<i>Sesamum indicum</i> L.	Nagashima <i>et al.</i> , 1999 Kato <i>et al.</i> , 1997
Pinaceae	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Dellus <i>et al.</i> , 1997
	<i>Picea glauca</i>	Kraus e Spiteller, 1996
	<i>Picea glehnii</i>	Nabeta <i>et al.</i> , 1994
	<i>Picea koraiensis</i>	Leont'eva <i>et al.</i> , 1974
	<i>Abies koreana</i> Wilson	Kim <i>et al.</i> , 1994
	<i>Abies sachalinensis</i>	Numata <i>et al.</i> , 1992 Sasaya e Ozawa, 1991
	<i>Picea abies</i> (L.) Karst	Artemkina e Roshchin, 2004
	<i>Pinus roxburghii</i>	El-Shaer, 2002
Potamogetonaceae	<i>Potamogeton pectinatus</i> L.	Waridel <i>et al.</i> , 2003
Ranunculaceae	<i>Coptis japonica</i> Makino	Cho <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pulsatilla chinensis</i>	Mimaki <i>et al.</i> , 1999
Rubiaceae	<i>Mitragyna speciosa</i>	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Scrophulariaceae	<i>Aptosimum spinescens</i> (Thunbg.)	Brieskorn e Huber, 1976
Stachyuraceae	<i>Stachyurus himalaicus</i>	Peng <i>et al.</i> , 2004
Symplocaceae	<i>Symplocos lancifolia</i>	Lin <i>et al.</i> , 1996

Taxaceae	<i>Taxus cuspidata</i>	Kawamura <i>et al.</i> , 2000
	<i>Taxus mairei</i>	Yang <i>et al.</i> , 1999
Thymelaceae	<i>Daphne oleoides</i>	Thusoo <i>et al.</i> , 1981
	<i>Daphne acutiloba</i>	Taniguchi <i>et al.</i> , 1998
	<i>Stellera chamaejasme</i> L.	Niwa <i>et al.</i> , 1985
	<i>Daphne tangutica</i>	Zhuang <i>et al.</i> , 1982
	<i>Wikstroemia viridiflora</i>	Tandon e Rastogi, 1976
	<i>Daphne giraldii</i>	Liao <i>et al.</i> , 2005
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i> L.	Schoettner <i>et al.</i> , 1997
Valerianaceae	<i>Valeriana officinalis</i>	Bodesheim e Holzl, 1997

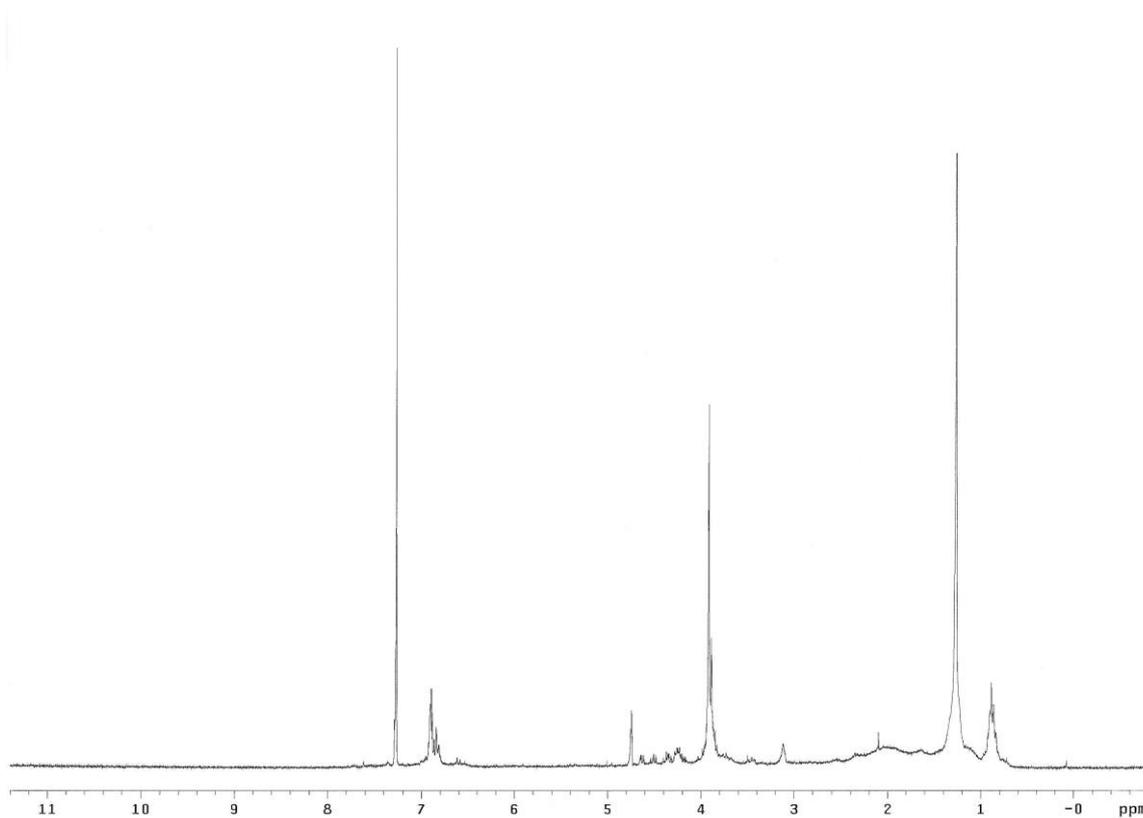


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM5**

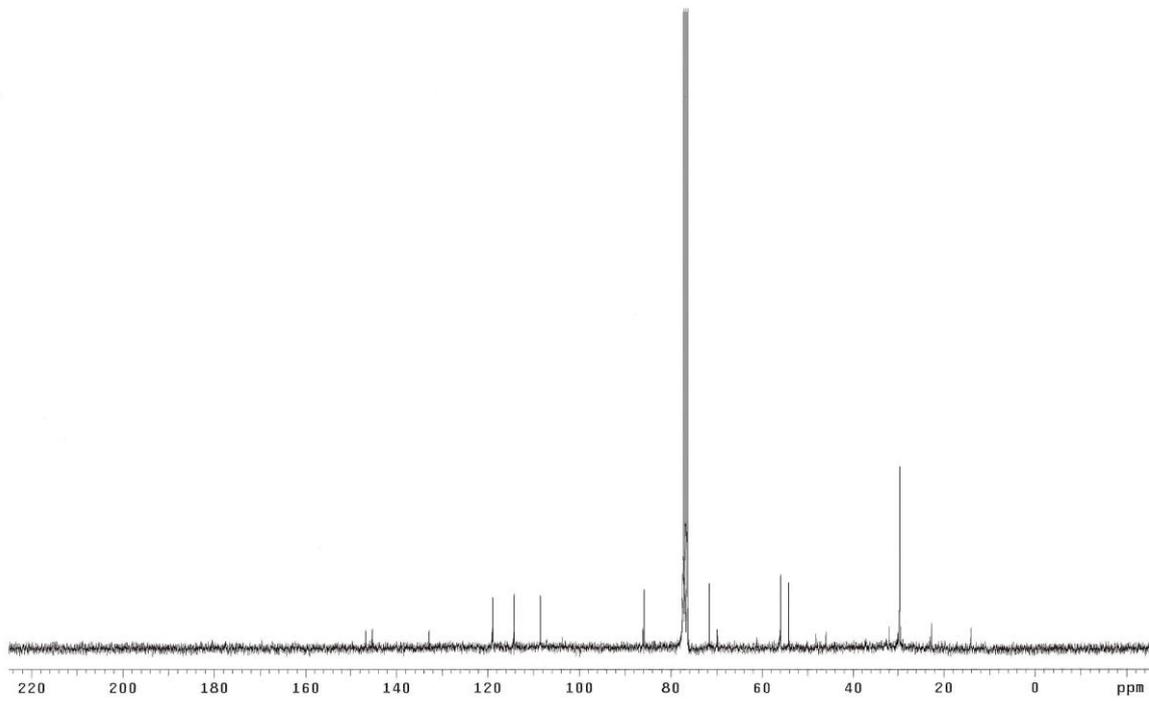


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM5**

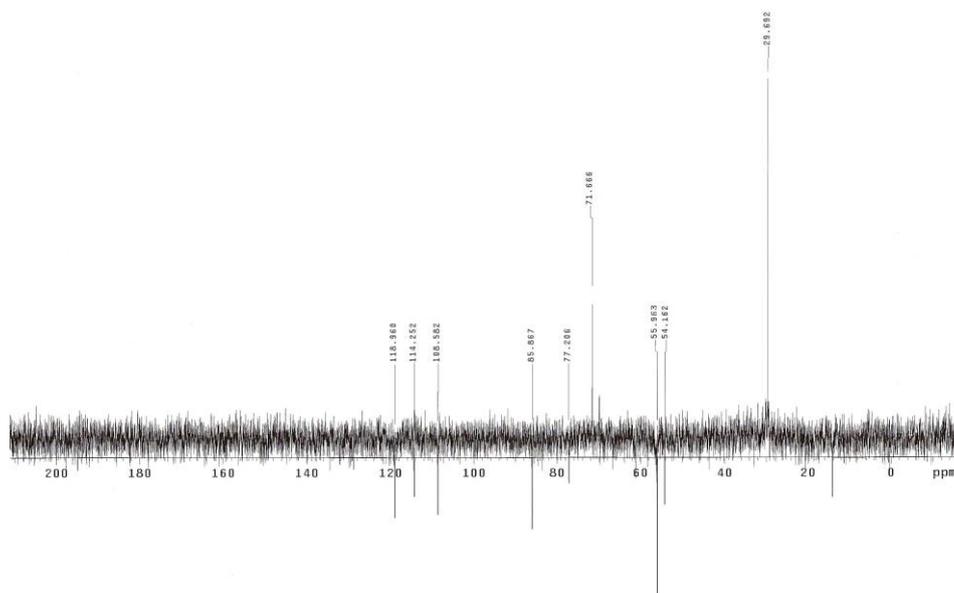


Figura 27 - DEPT 135° [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM5**

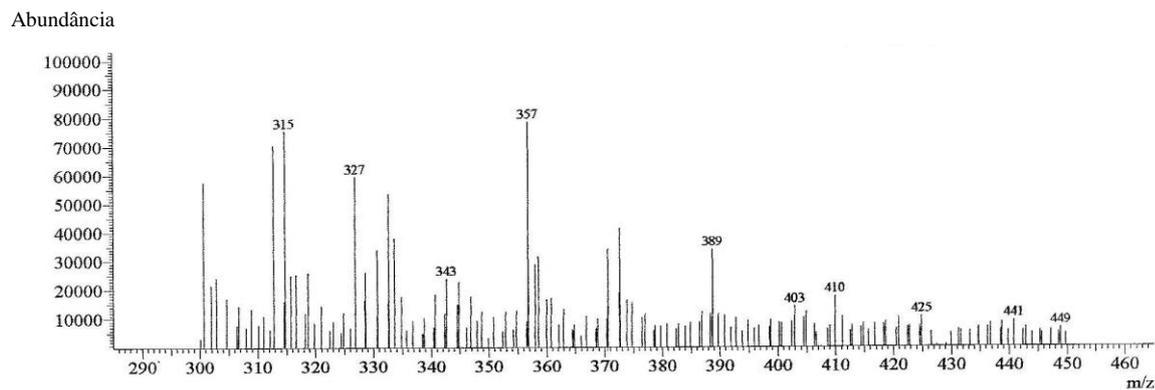


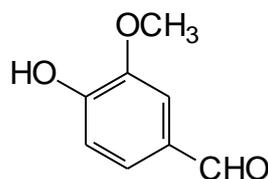
Figura 28 - Espectro de massas de **CM5** (APCI, modo negativo)

Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de **CM5**

Posição	<i>Cratylia mollis</i>		<i>Leptadenia arborea</i>	
	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C
1; 5	3,12 (m)	54,1	3,11 (m)	54,2
2; 6	4,75 (d; 2,1)	85,8	4,74 (d; 4,0)	85,8
4; 8	3,8 (dd; J^*) 4,27 (dd; J^*)	71,6	3,91 (dd; 8,8; 3,4) 4,25 (dd; 8,8; 6,7)	71,6
1'	—	132,8	—	132,9
2'	6,82 – 6,93 (m)	108,6	6,81 – 6,94 (m)	108,7
3'	—	146,6	—	146,8
4'	—	145,2	—	145,3
5'	6,82 – 6,93 (m)	114,2	6,81 – 6,94 (m)	114,3
6'	6,82 – 6,93 (m)	118,9	6,81 – 6,94 (m)	119,0
-OCH ₃	3,91 (s)	55,9	3,91 (s)	56,0

J^* Constante indeterminada

3.5 - Identificação do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina) (CM6)



A identificação de **CM6** foi realizada a partir da comparação dos dados espectrais com os dados registrados na literatura. Os dados espectrométricos de RMN são similares com os dados publicados (ALDRICH, 1998) para o 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído.

O EM (Figura 31, p. 51) mostrou um sinal referente ao íon $[M + H + \text{vanilina} + \text{CH}_3\text{OH}]^+$ em m/z 338. Vale ressaltar que neste caso a ionização química por pressão atmosférica produziu no modo positivo um sinal com 1 unidade adicional de deutério, proveniente do solvente empregado em RMN, e além disso o pico em m/z 338 foi observado para o “cluster” da molécula.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 29, p. 50; Tabela 24, p. 51) apresentou sinais para três hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. Deste modo foram observados dois dubletos em δ 7,05 e δ 7,14 atribuídos aos H-5 e H-2, respectivamente, e um duplo dubleto em δ 7,42 referente ao H-6. Além destes, um singleto em δ 3,94 (3H) foi indicativo de um grupo metoxílico aromático, enquanto o singleto em δ 9,85 indicou a presença de um hidrogênio de aldeído.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30, p. 50; Tabela 24, p. 51) mostrou, entre outros, sinais de carbonos sp^2 na região de aromático (δ 108 – 147) e de grupo metoxílico em δ 56,0.

A comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (ALDRICH, 1998) para o 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina) permitiu a identificação de **CM6**.

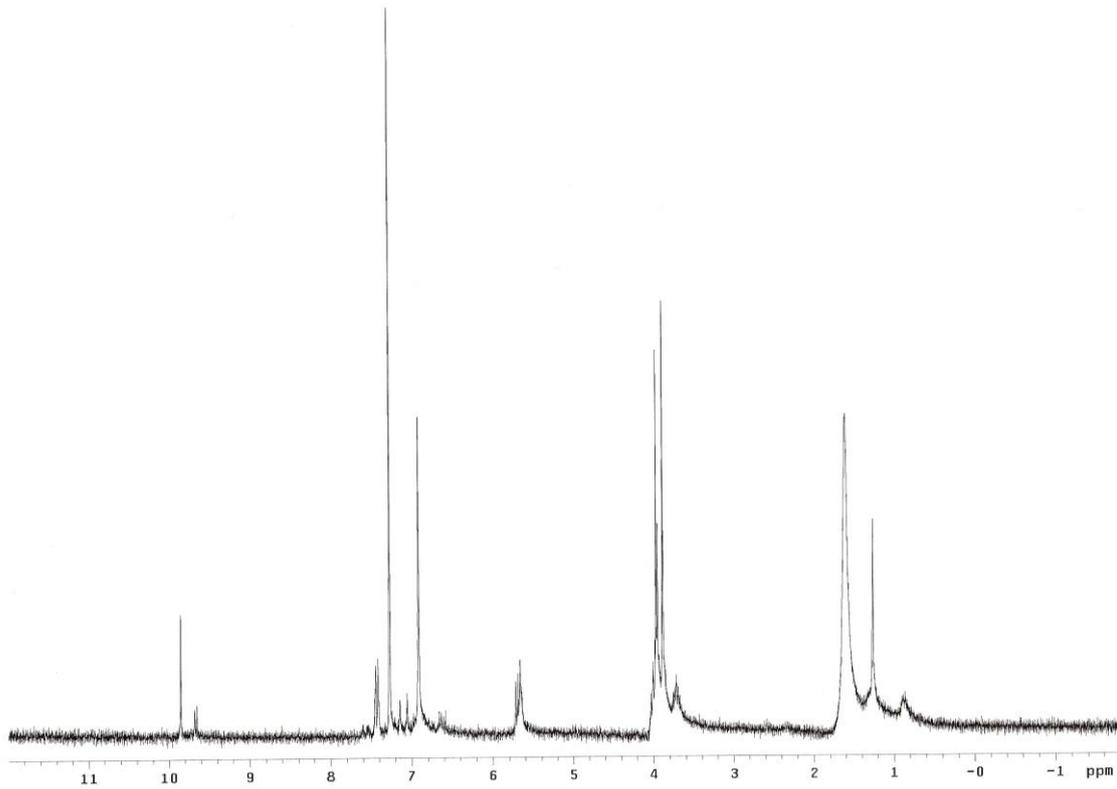


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H [300 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM6**

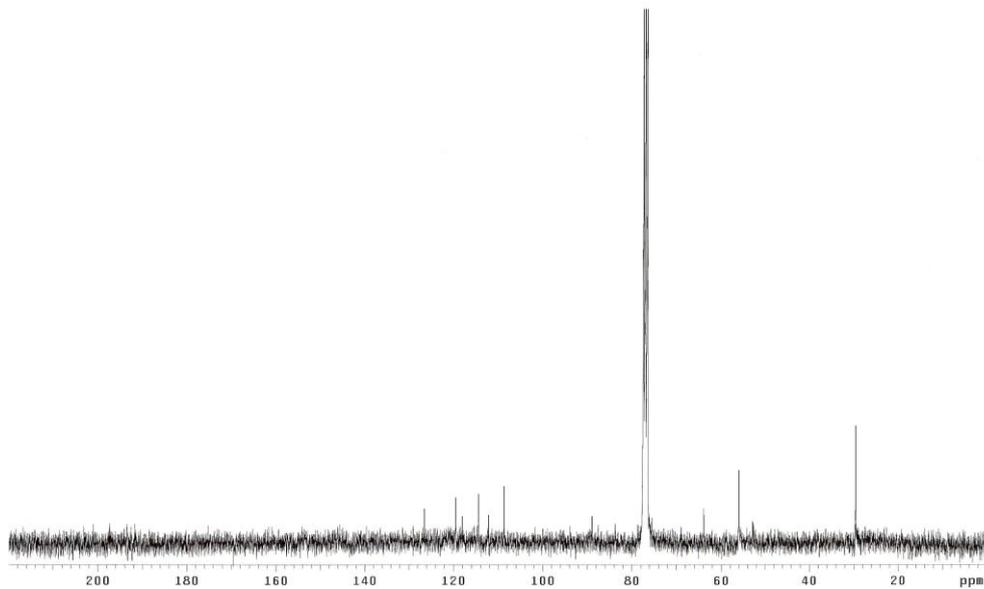


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C [75 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm)] de **CM6**

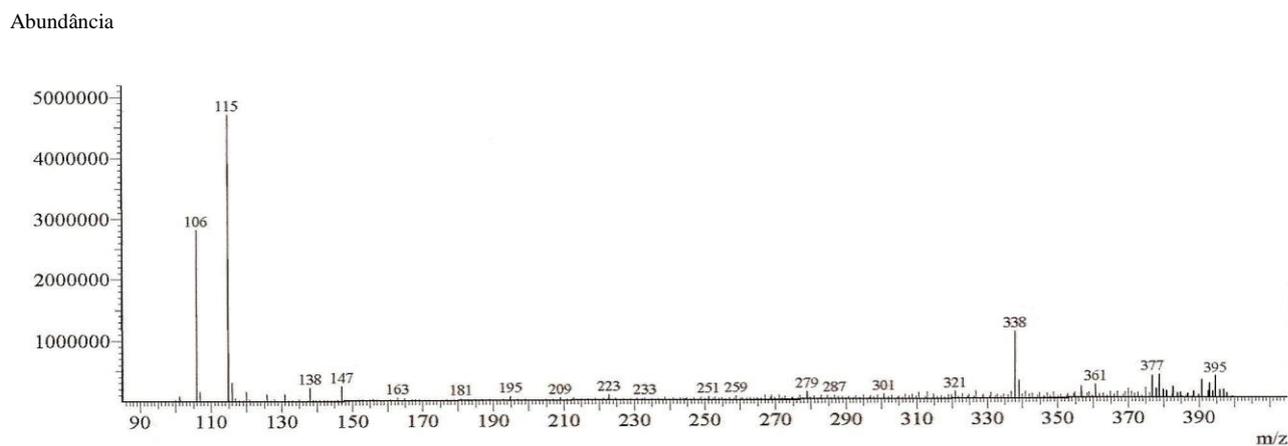


Figura 31 - Espectro de massas de CM6

Tabela 24 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) [CDCl_3 , J (Hz), δ (ppm)] de

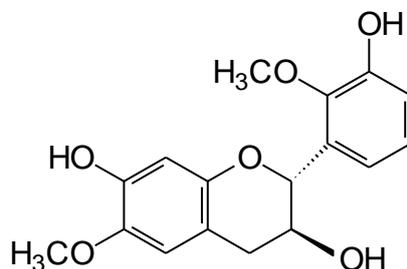
CM6

Posição	CM6		Vanilina	
	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	—	n.d	—	129,5
2	7,14 (d; J^*)	108,7	7,41	109,4
3	—	n.d	—	147,5
4	—	n.d	—	152,3
5	7,05 (d; J^*)	114,5	7,04	114,8
6	7,43 (dd; J^*)	126,5	7,43	127,4
7	9,85 (s)	n.d	9,81 (s)	191,3
8	3,94 (s)	56,0	3,94 (s)	56,0

J^* Constante indeterminada

n.d: não detectado

3.6 - Determinação estrutural do 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (CM7)



A determinação estrutural de **CM7** foi realizada a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , HMQC, HMBC e EM, e posterior comparação dos dados de flavonóides descritos na literatura.

Os sinais registrados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , aliados íon molecular $[\text{M}-1]^-$ em m/z 317 observado no EM-ESI (Figura 41, p. 58), registrado no modo negativo, permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

O espectro de RMN de ^1H de **CM7** (Figura 34, p. 55; Tabela 25, p. 59) mostrou sinais característicos do anel C de flavan-3-ol, sendo um dubleto em δ 5,10 referente ao H-2, um multiplete em δ 4,27-4,34 atribuído ao H-3 e dois duplos dubletos, referentes aos hidrogênios metilênicos H-4_{ax} e H-4_{eq} em δ 3,04 e δ 2,88, respectivamente. Além desses sinais, similarmente as flavanas descritas anteriormente, foram observados dois singletos em δ 6,68 e δ 6,30 relativos aos H-5 e H-8, respectivamente, indicando deste modo a presença de grupos substituintes em C-6 e C-7 do anel A. Os sinais dos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos do anel B observados entre δ 6,85 e 6,95 ppm aliados a integração dos mesmos, multiplicidade e constantes de acoplamento (Tabela 25) foram indicativo de anel 1,2,3-trissubstituído.

A análise dos dados de RMN de ^{13}C (Figura 35, p. 55; Tabela 25, p. 59) contribui para confirmar que se tratava de um flavan-3-ol devido aos valores característicos dos sinais de C-2, C-3 e C-4 desta classe de substância. Deste modo, a presença de carbonos metínicos em δ 77,58 e em δ 67,30 indicaram que esses estavam ligados a oxigênio e, portanto foram atribuídos ao C-2 e C-3, respectivamente, enquanto o sinal em δ 34,17 foi atribuído ao carbono metilênico C-4. Foi possível observar também dois sinais em δ 56,98 e δ 61,36 referentes a carbonos oximetílicos. O sinal

observado em δ 61,36 indica que o grupo metoxílico encontrava-se impedido estericamente e, deste modo, deve estar ligado ao C-2' do anel B.

O espectro de HMQC (Figura 36 e 37, p. 56) permitiu atribuir corretamente os hidrogênios e os carbonos dos anéis A e B de **CM7** através das correlações observadas entre os sinais dos hidrogênios com os respectivos carbonos (Tabela 25, p. 59). As principais atribuições foram feitas para os hidrogênios aromáticos H-5 e H-8 e para os carbonos C-5 e C-8, respectivamente, e para o anel B foram para os hidrogênios aromáticos H-4', H-5' e H-6' e seus respectivos carbonos C-4', C-5' e C-6'.

As principais informações obtidas no espectro bidimensional HMBC (Figura 38 e 39, p. 57) foram as correlações observadas entre os singletos em δ 6,68 e em δ 6,30 e os carbonos em δ 150,92 (C-9), δ 149,62 (C-7) e em δ 142,99 (C-6). Além dessas, pode-se observar as correlações entre H-8 (δ 6,30) com o C-10 (δ 111,44), entre H-5 (δ 6,68) com C-4 (δ 34,17) e, entre H-2 (δ 5,10) com C-3 (δ 67,30), C-4 (δ 34,17) e C-1' (δ 134,26). Assim, estas correlações confirmaram as atribuições dos sinais dos anéis A e C do flavan-3-ol bem como a substituição do anel A nas posições 6 e 7.

Através das correlações encontradas neste mesmo espectro foi possível também atribuir os valores dos deslocamentos para os hidrogênios do anel B. Destacam-se entre elas, as correlações entre H-4' (δ 6,90) com os carbonos C-2', C-3' e C-5'; o H-5' (δ 6,85) com C-3' e C-4'; e H-6' (δ 6,95) com o C-1' e C-5'. Estas correlações observadas foram importantes, pois permitiram uma atribuição completa e inequívoca dos dados de RMN de ^{13}C de **CM7** e corroboraram com a estrutura proposta. A figura 32 sumariza as correlações observadas para esta substância.

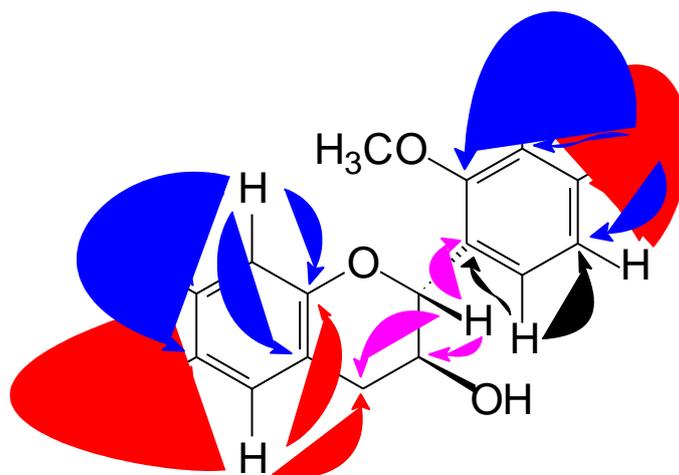


Figura 32: Correlações observadas no espectro de HMBC para **CM7**

Através da análise do espectro de HMBC (Figura 40, p. 58; Tabela 25, p. 59) foi possível observar também correlações para os grupos metoxílicos e hidroxílicos, que foram fundamentais na confirmação da posição destes substituintes nos anéis A e B. A localização da metoxila no anel A em C-6 foi proposta pela correlação observada entre o singlete em δ 3,80 e o C-6 (δ 142,99), enquanto a outra metoxila foi localizada no C-2' do anel B através da correlação observada entre o singlete em δ 3,88 e o C-2' (δ 146,92). Foram observadas as correlações das hidroxilas fenólicas a três ligações. Assim, a correlação observada entre o singlete em δ 7,60 com o C-8 (δ 103,94) e o singlete em δ 8,30 com o C-4' (δ 116,98) permitiu localizar as hidroxilas nos carbonos C-7 e C-3' dos anéis A e B, respectivamente.

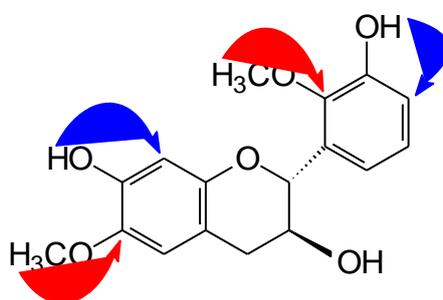


Figura 33: Correlações observadas para os grupos metoxílicos e hidroxílicos no espectro de HMBC

A configuração relativa do flavan-3-ol foi estabelecida através da comparação dos dados de RMN de catequinas e epicatequinas anteriormente isoladas (Quadro 5, p. 60) (Donovan *et al.*, 1999; Bilia *et al.*, 1996). Pode-se observar que nas catequinas o sinal de H-2 é registrado como um dubleto com constante de acoplamento igual a 8,0 Hz, enquanto nas epicatequinas este sinal apresenta-se como um singlete largo ou um dubleto com constante de acoplamento pequena ($J < 1$ Hz). Portanto, a configuração relativa de **CM7** foi estabelecida como *trans*, sendo confirmada através do valor da constante de acoplamento de 8,1 Hz observada para os hidrogênios H-2 e H-3, característico de hidrogênios nas posições pseudodiaxial.

Deste modo, com as informações obtidas dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , HMQC, HMBC, EM e comparação com dados da literatura foi possível propor a estrutura para **CM7** como sendo a de 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol.

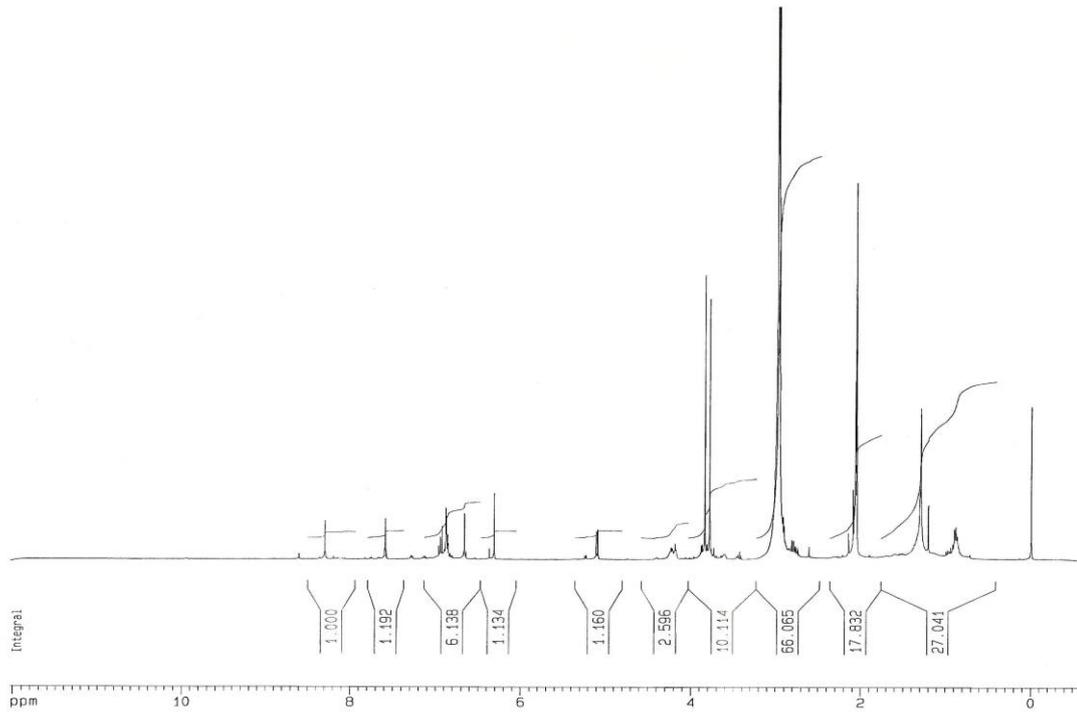


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] de **CM7**

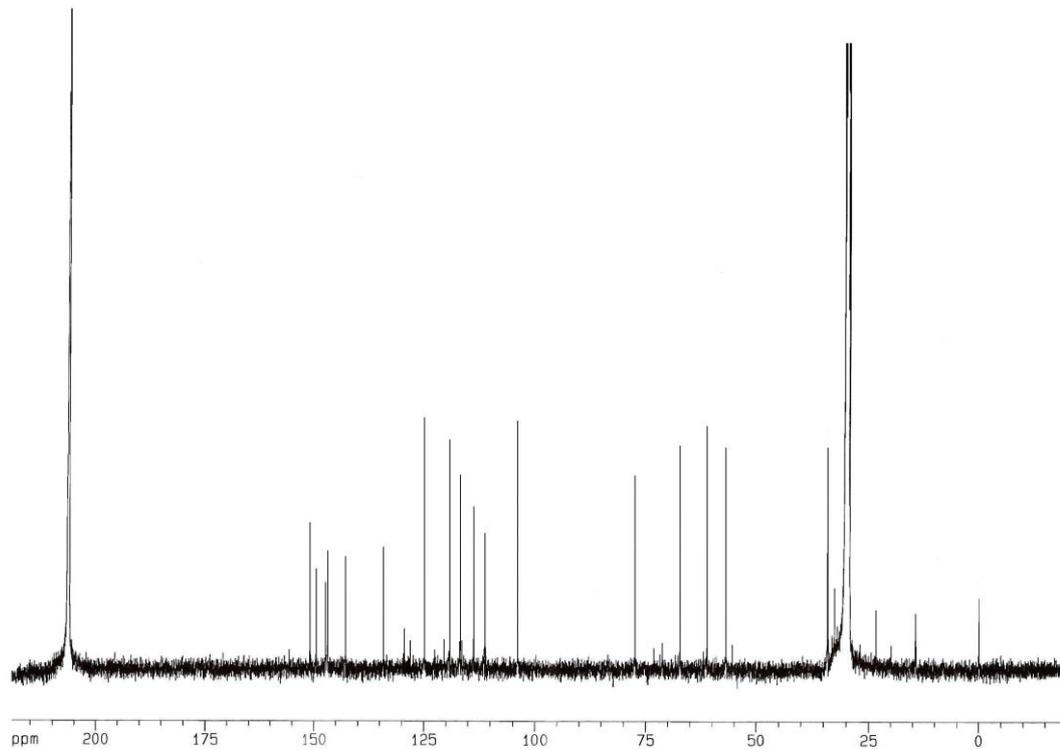


Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] de **CM7**

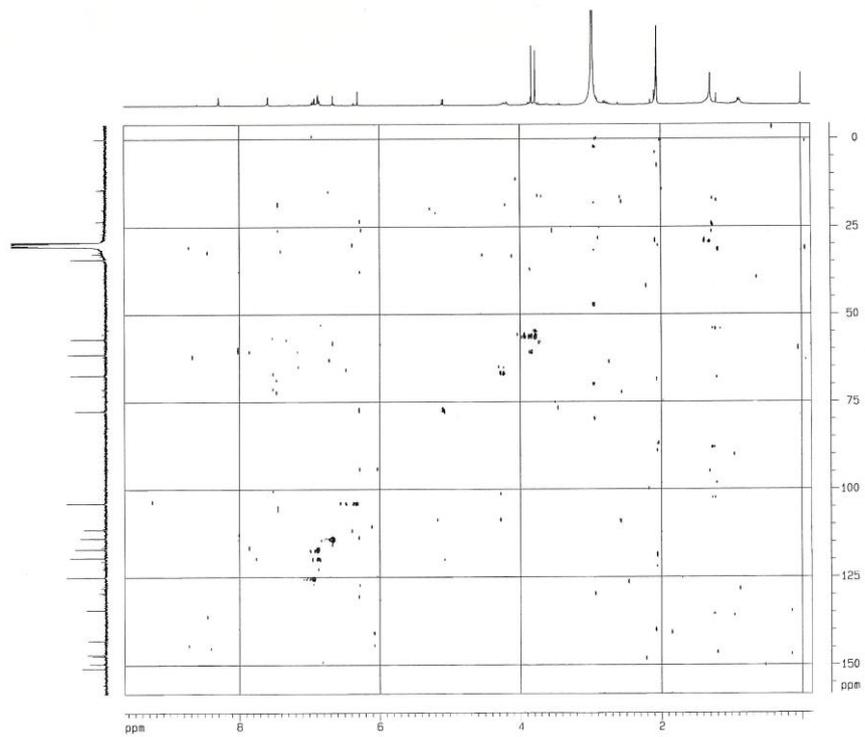


Figura 36 - Espectro de HMQC de CM7

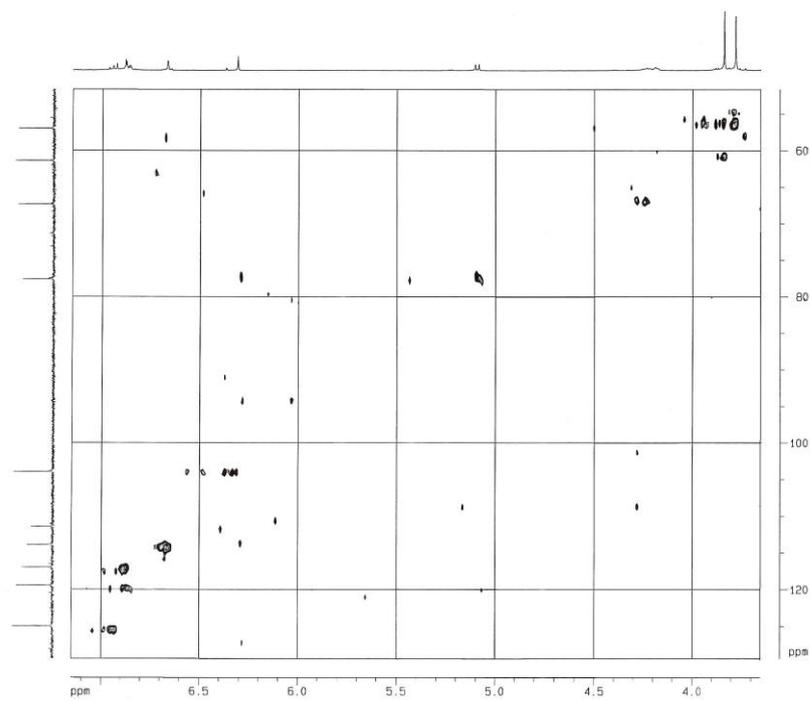


Figura 37 - Ampliação do espectro de HMQC de CM7

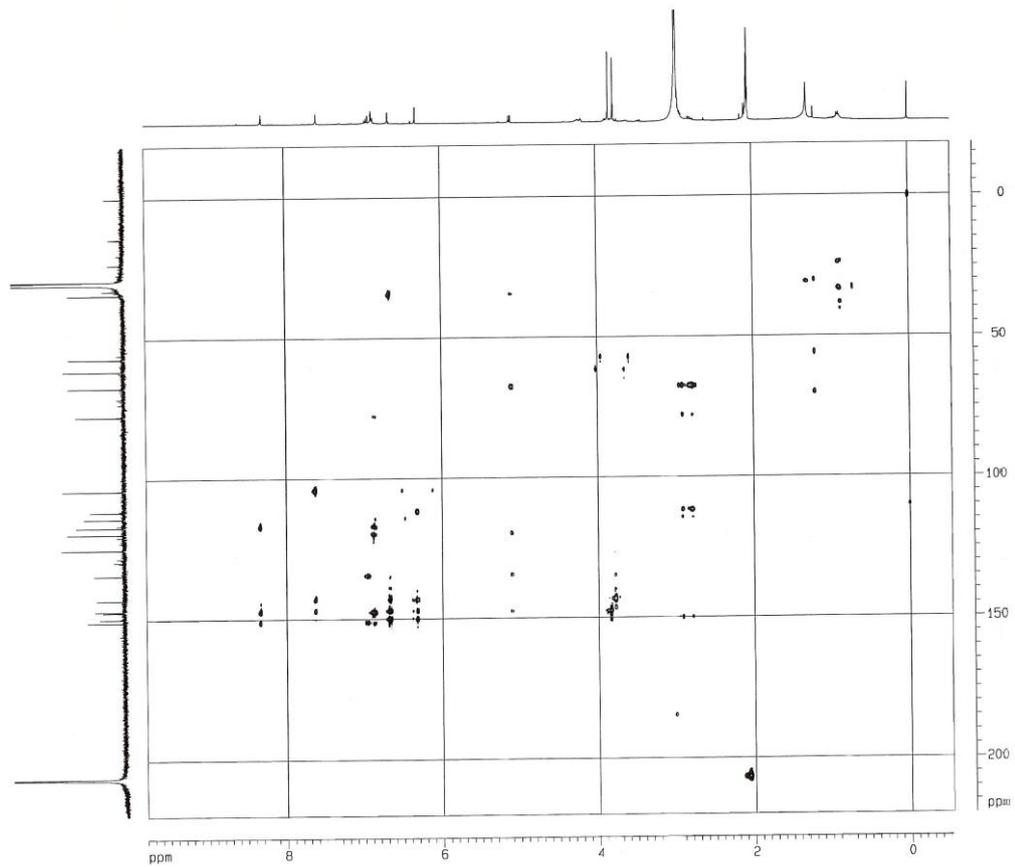


Figura 38 - Espectro de HMBC de **CM7**

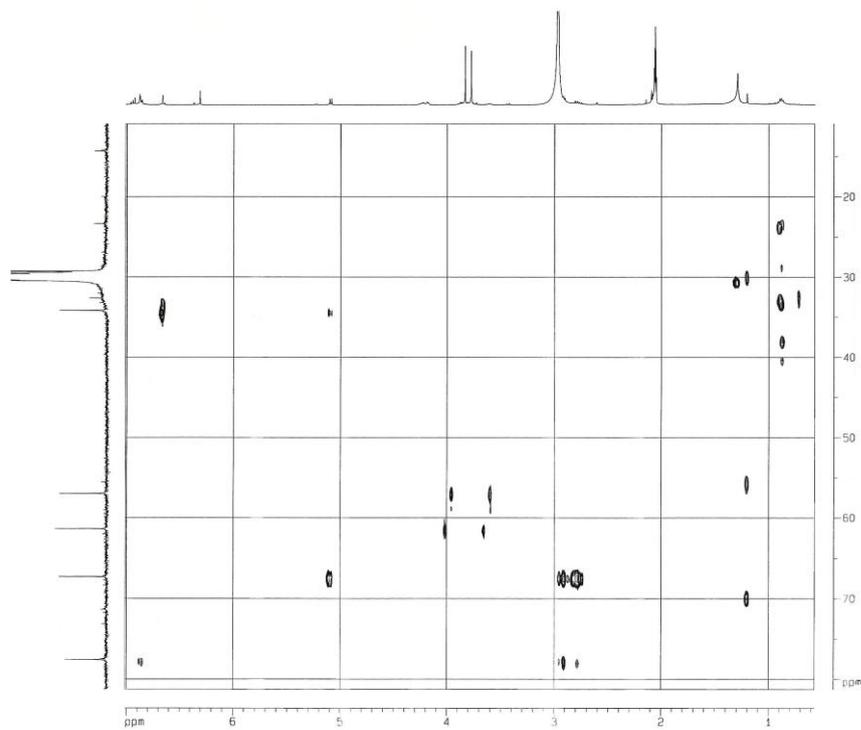


Figura 39 - Ampliação do espectro de HMBC de **CM7**

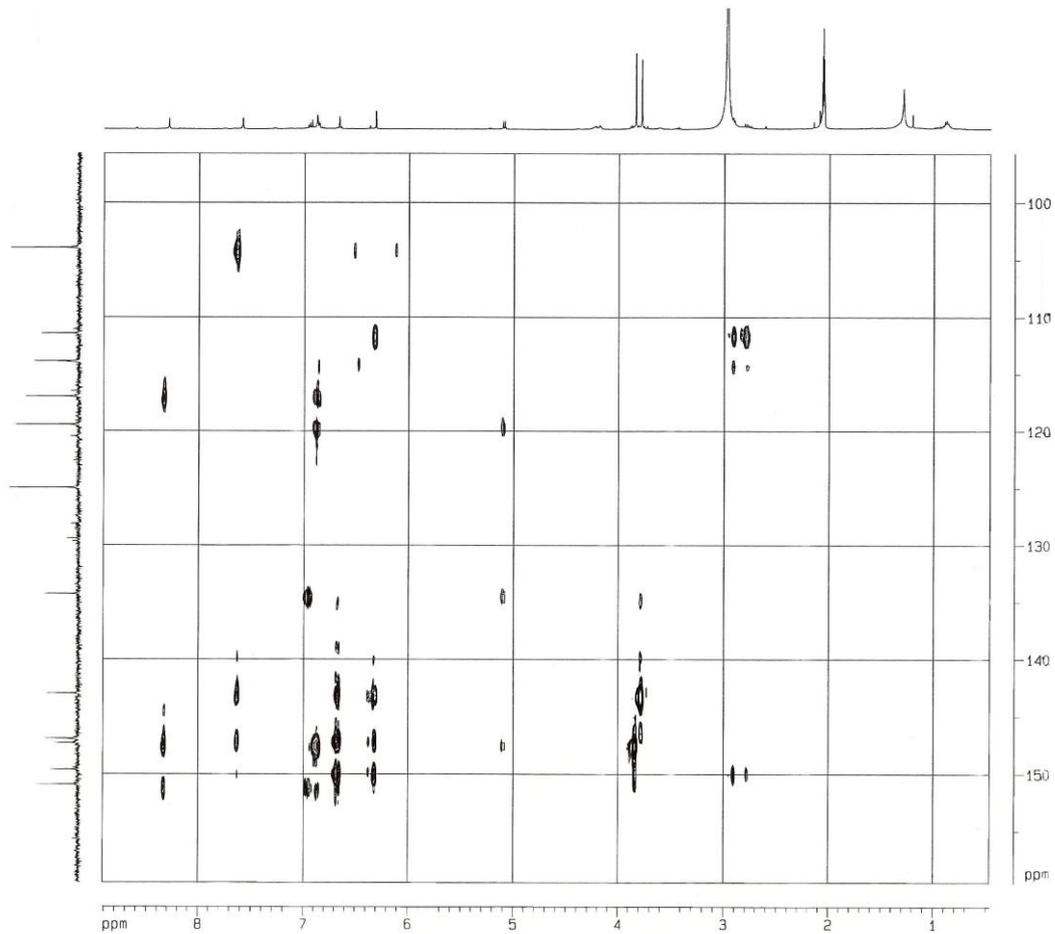


Figura 40 - Ampliação do espectro de HMBC de **CM7**

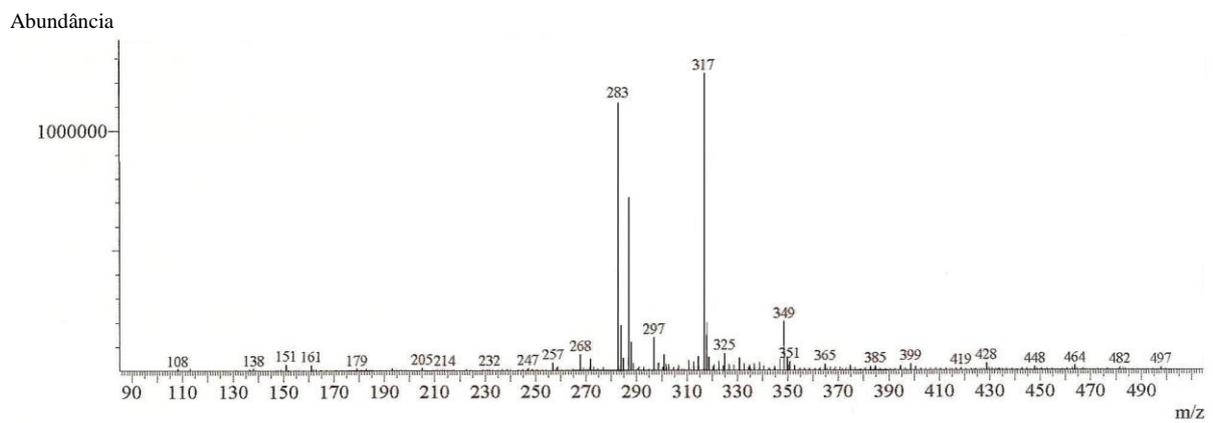


Figura 41 - Espectro de massas de **CM7** (ESI, modo negativo)

Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, J (Hz), δ (ppm)] de **CM7** e as correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMBC e HMQC)

Posição	δ ^1H (mult.; J)	δ $^{13}\text{C}^*$	Correlações ^{13}C - $^1\text{H}^\#$
2	5,10 (d; 8,1)	77,58	C-3 (δ 67,30), C-4 (δ 34,17) e C-1' (δ 134,26)
3	4,27-4,34 (m)	67,30	
4ax.	3,04 (dd; 5,4; 15,6)	34,17	
4eq.	2,88 (dd; 8,7; 15,6)		
5	6,68 (s)	113,88	C-4 (δ 34,17), C-6 (δ 142,99), C-7 (δ 149,62) e C-9 (δ 150,92)
6	—	142,99	
7	—	149,62	
8	6,30 (s)	103,94	C-6 (δ 142,99), C-7 (δ 149,62), C-9 (δ 150,92) e C-10 (δ 111,44)
9	—	150,92	
10	—	111,44	
1'	—	134,26	
2'	—	146,92	
3'	—	147,32	
4'	6,90 (dd; J^*)	116,98	C-2' (δ 146,92), C-3' (δ 147,32) e C-5' (δ 119,43)
5'	6,85 (t; J^*)	119,43	C-3' (δ 147,32) e C-4' (δ 116,98)
6'	6,95 (dd; J^*)	124,96	C-1' (δ 134,26) e C-5' (δ 119,43)
6-OCH ₃	3,80 (s)	56,98	C-6 (δ 142,99)
2'-OCH ₃	3,88 (s)	61,36	C-2' (δ 146,92)
7-OH	7,60 (s)	—	C-8 (δ 103,94)
3'-OH	8,30 (s)	—	C-4' (δ 116,98)

Atribuído através do espectro HMBC

* Atribuído através do HMQC

J^* Constante indeterminada

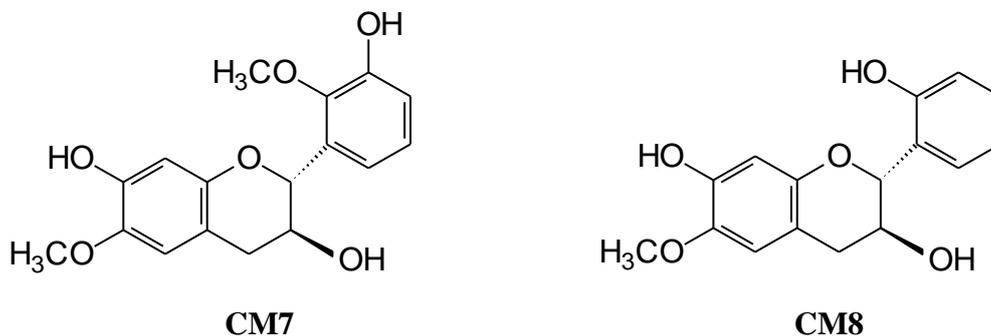
Quadro 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para algumas catequinas e epicatequinas

Estrutura								
	Posição	δ ^1H (mult.; J)	δ ^1H (mult.; J)	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult.; J)	δ ^{13}C	
2	4,53 (d; 8,0)	4,90 (s)	4,81 (d; J<1)	79,0	4,56 (d; 7,6)	82,7		
3	4,01 (m)	4,20 (m)	4,17 (m)	67,3	3,98 (m)	68,8		
4ax	2,95 (dd; 5,9;15,9)	2,86 (dd; 4,6;16,6)	2,88 (dd; 4,2;16,0)	29,2	2,84 (dd; 5,4;16,1)	28,4		
4eq	2,49 (dd; 8,9;15,9)	2,73 (dd; 3,2;16,6)	2,73 (dd; 2,9;16,0)		2,50 (dd; 8,2;16,1)			
5	—	—	—	157,9	—	157,0		
6	5,85 (d; 1,8)	5,90 (d; 2,2)	5,91 (d; 1,9)	96,9	5,85 (d; 1,9)	94,7		
7	—	—	—	158,2	—	160,8		
8	6,00 (d; 1,8)	6,00 (d; 2,2)	5,93 (d; 1,9)	96,5	5,97 (d; 1,9)	94,0		
9	—	—	—	157,6	—	156,9		
10	—	—	—	100,6	—	102,7		
1'	—	—	—	132,5	—	132,0		
2'	7,00 (d; 1,5)	7,16 (d; 1,5)	—	145,7	6,84 (d; 1,9)	115,1		
3'	—	—	6,77 (s)	115,3	—	145,1		
4'	—	—	6,77 (s)	115,6	—	145,1		
5'	6,78 (d; 8,1)	6,77 (d; 8,1)	—	145,7	6,74 (m)	115,8		
6'	6,86(dd; 1,5;8,0)	6,93 (dd; 1,5;8,1)	6,97 (s)	119,3	6,74 (m)	120,0		
-OCH ₃	3,82 (s)	3,81 (s)	—	—	3,96 (s)	55,0		

* Donovan *et al.*, 1999

§ Biblia *et al.*, 1996

3.7 - Elucidação estrutural de CM8 em mistura com CM7



Análise do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração cromatográfica indicou que a mesma se tratava de uma mistura de duas substâncias com sinais característicos de flavanóis. Esta informação pode ser obtida pelo número de sinais presentes nos espectros de RMN. Deste modo, a determinação estrutural de **CM7** e **CM8** foi realizada em mistura e as estruturas foram estabelecidas com base nos deslocamentos químicos e valores das constantes de acoplamento encontradas no espectro de RMN de ^1H , nos espectros de RMN de ^{13}C , HMQC e HMBC, e comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989). Além disso, os dados espectrais de **CM7** e **CM8** foram comparados com os obtidos para o flavan-3-ol isolado anteriormente neste estudo (**CM7**), possibilitando separar os sinais relativos ao flavanol **CM7** dos sinais referentes à **CM8** desta mistura.

O EM-APCI (Figura 50, p. 67) da mistura, registrado no modo negativo, mostrou sinais referentes ao íon molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 317 para **CM7** e m/z 287 para **CM8**. Estes dados aliados aos de RMN permitiram propor as fórmulas moleculares $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$ e $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ para **CM7** e **CM8**, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 43, p. 64; Tabela 26, p. 68) exibiu sinais característicos do anel C de flavan-3-ol para **CM7** e **CM8**, os quais foram registrados como dois dubletos em δ 5,10 e δ 5,20 referentes aos hidrogênios H-2; dois duplos dubletos em δ 2,90 e δ 3,10 referentes aos H-4_{eq} e H-4_{ax} respectivamente e dois multipletos em δ 4,28 referentes aos hidrogênios H-3. Neste mesmo espectro foi observado dois singletos em δ 6,68 e δ 6,63 correspondentes aos hidrogênios H-5 de **CM7** e **CM8**, respectivamente, bem como dois singletos em δ 6,30 e δ 6,35 referentes aos H-8 de **CM7** e **CM8**, respectivamente. A presença dos sinais H-5 e H-8 como singletos indicaram que o anel A apresentava substituição em C-6 e em C-7 para ambas

as substâncias. Além destes, pode-se observar um singlete em δ 3,76 integrando para 6H correspondente a dois grupos metoxílicos ligados a carbonos aromáticos, e ainda um singlete em δ 3,83 integrando para 3H que foi indicativo da presença do terceiro grupo metoxílico presente em ambiente químico distinto dos demais grupos metoxílicos.

Análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45, p. 65; Tabela 26, p. 68) da mistura confirmou a natureza do anel C de flavan-3-ol através dos sinais característicos registrados para os carbonos C-2, C-3 e C-4. Deste modo pela análise dos espectros, foram identificados três carbonos oximetínicos, dois carbonos metilênicos, nove carbonos sp^2 hidrogenados, dez carbonos não hidrogenados e três grupos metoxílicos.

A identificação da composição de um dos componentes da mistura de **CM7** e **CM8** foi baseada na comparação com dados espectrais obtidos para 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (**CM7**). A coincidência dos dados espectroscópicos para as duas substâncias em mistura, nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , indicou um mesmo padrão de substituição no anel A para ambas. No entanto, o anel B em **CM7** apresentou-se 1,2,3-trissubstituído, enquanto que em **CM8**, este anel apresentou-se como sendo 1,2-dissubstituído, o mesmo padrão de substituição observado para 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana (**CM3**). Isto foi evidenciado através da comparação com os dados de RMN de ^{13}C que foram semelhantes aos dados de **CM7**, isolado anteriormente, e aos dados de **CM3**.

A configuração relativa de **CM7** e **CM8** foi estabelecida como *trans* a partir da observação do sinal registrado em campo baixo no espectro de RMN de ^{13}C para o C-2, em δ 77,06 para **CM7** e em δ 76,89 para **CM8**, que também foi confirmado através das constantes de acoplamento de 8,1 Hz e 8,7 Hz observadas no espectro de RMN de ^1H para os H-2 e H-3 de **CM7** e **CM8**, respectivamente.

No espectro bidimensional HMQC (Figura 46, p. 65; Tabela 26, p. 68) foram observadas correlações entre os dubletos em δ 5,10 (H-2) e δ 5,20 (H-2) com os respectivos C-2 de **CM7** e **CM8**, e entre o multiplete em δ 4,28 (H-3) e o C-3 (δ 66,78). Os singletos referentes às metoxilas em δ 3,76 e δ 3,83 apresentaram correlação com os sinais em δ 56,45 e em δ 60,83, respectivamente. Além destas, os singletos em δ 6,30 e δ 6,35 relativos aos H-8 de **CM7** e **CM8** se correlacionaram com o C-8. Estas correlações foram importantes para atribuir os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-8 de ambas as substâncias, **CM7** e **CM8**.

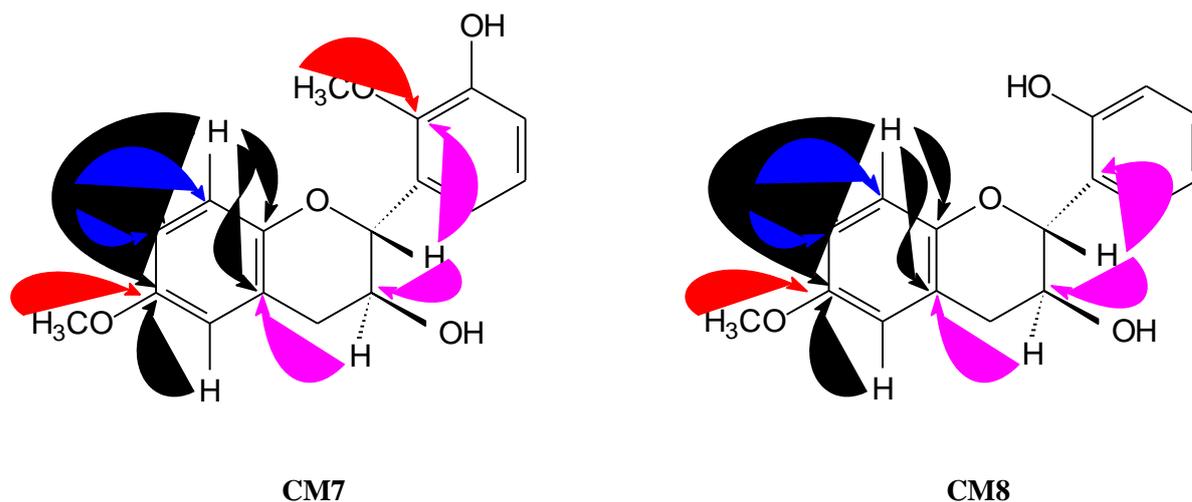


Figura 42: Correlações observadas no espectro de HMBC para **CM7** e **CM8**

O espectro de HMBC (Figura 48, p. 66; Tabela 27, p. 69) da mistura apresentou como principais informações as correlações observadas entre os singletos em δ 6,30 (**CM7**) e δ 6,35 (**CM8**) e os carbonos C-6, C-7, C-9 e C-10 e a correlação entre os H-5 com os C-6. Além dessas, pode-se observar correlações entre o singlete em δ 3,80 e o C-6 (δ 142,48) e o singlete em δ 3,87 com o C-2' (δ 146,4), referentes às metoxilas do anel A e B. As correlações da hidroxila fenólica do anel A foram observadas através da correlação entre o singlete em δ 7,65 e os carbonos C-7 (δ 148,92) e C-8 (δ 103,45). Neste mesmo espectro foi possível observar as correlações entre o H-3 com o C-10 e entre o H-2 com o C-3. Assim, as correlações observadas para os anéis A e C foram semelhantes para as duas substâncias em mistura e, quando comparadas àquelas registradas para **CM7** isolada anteriormente, confirmou um mesmo padrão de substituição para estes anéis. No entanto, foram observadas para o anel B as correlações entre o H-2 (δ 5,10) e o C-2' (δ 146,49) e entre o H-2 (δ 5,20) e o C-1' (δ 126,89) que foram atribuídas para **CM7** e **CM8**, respectivamente.

A partir das evidências espectrométricas, foi possível identificar a mistura desta fração como sendo os flavanóis $2R^*,3S^*$ -7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (**CM7**) e $2R^*,3S^*$ -7,2'-dihidroxi-6-metoxi-flavan-3-ol (**CM8**). Vale ressaltar que ambos os flavanóis foram isolados do extrato acetato de etila do caule e que o flavanol $2R^*,3S^*$ -7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol (**CM7**) foi isolado anteriormente de extrato clorofórmico do caule de *Cratylia mollis*.

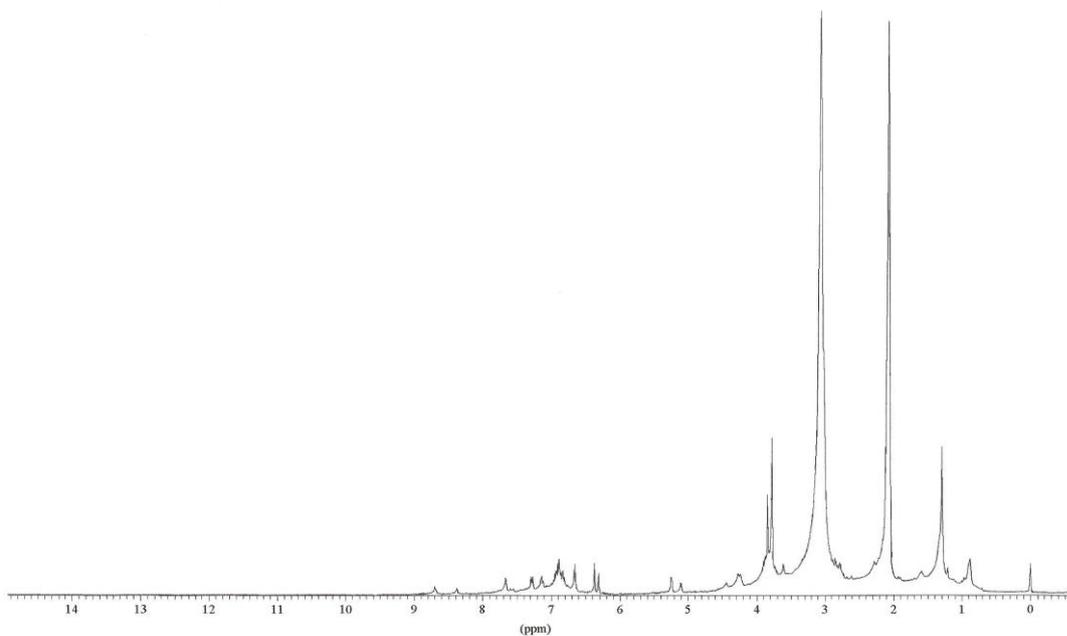


Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H [400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] da mistura de **CM7** e **CM8**

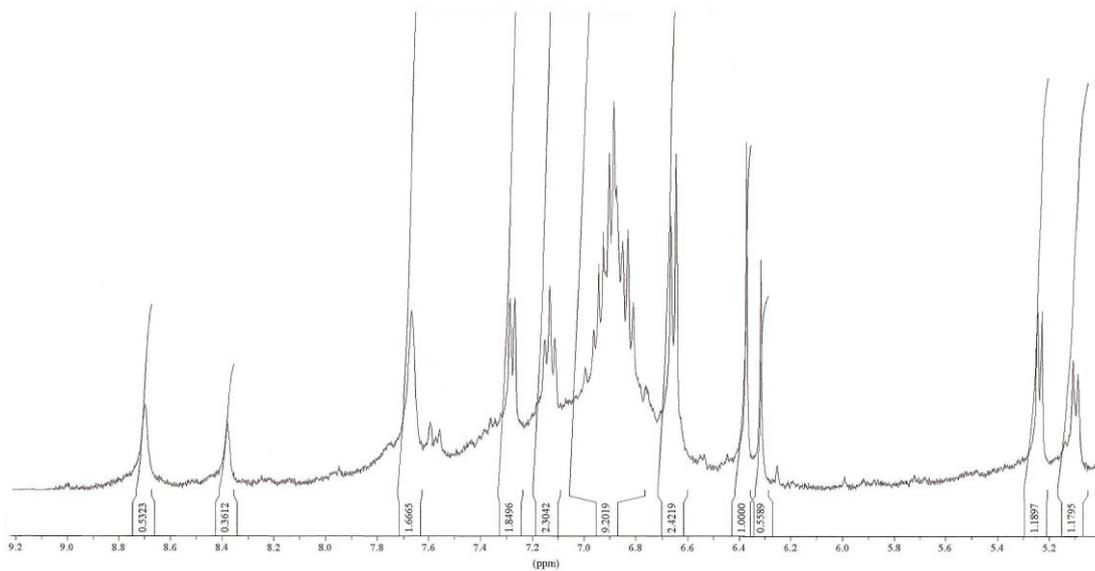


Figura 44 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da mistura de **CM7** e **CM8**

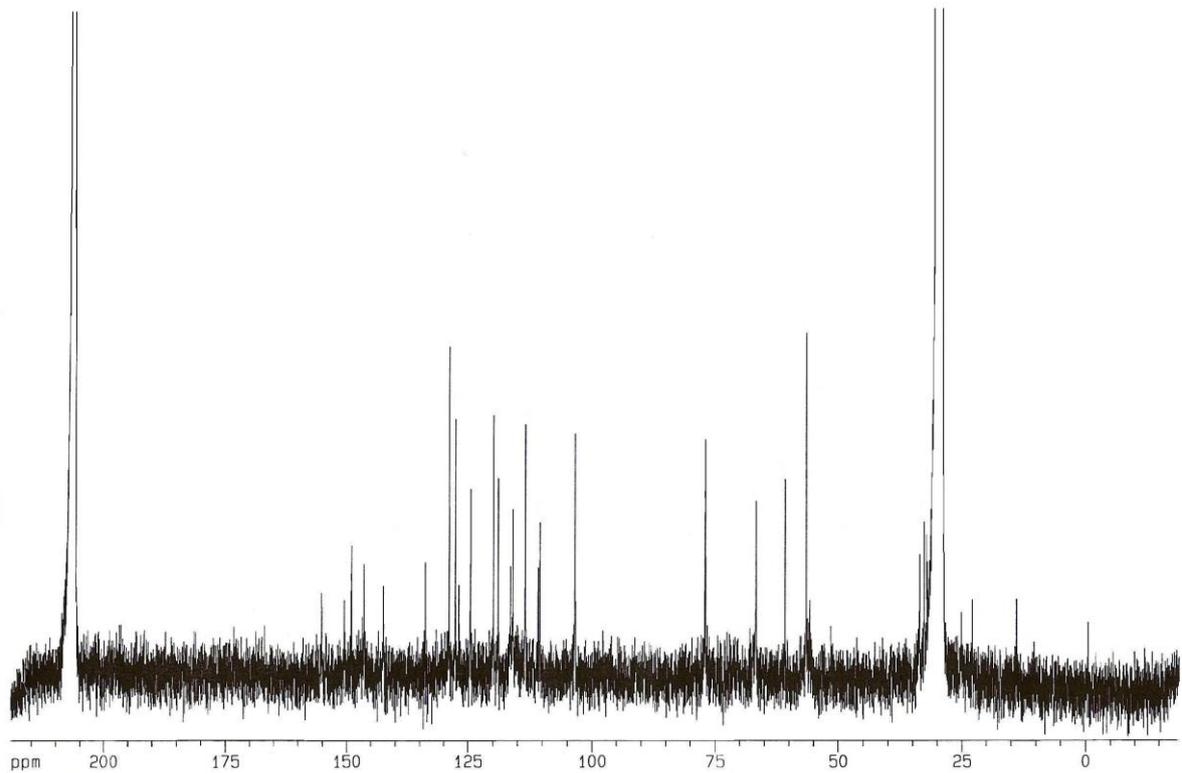


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C [100 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; δ (ppm)] da mistura de **CM7** e **CM8**

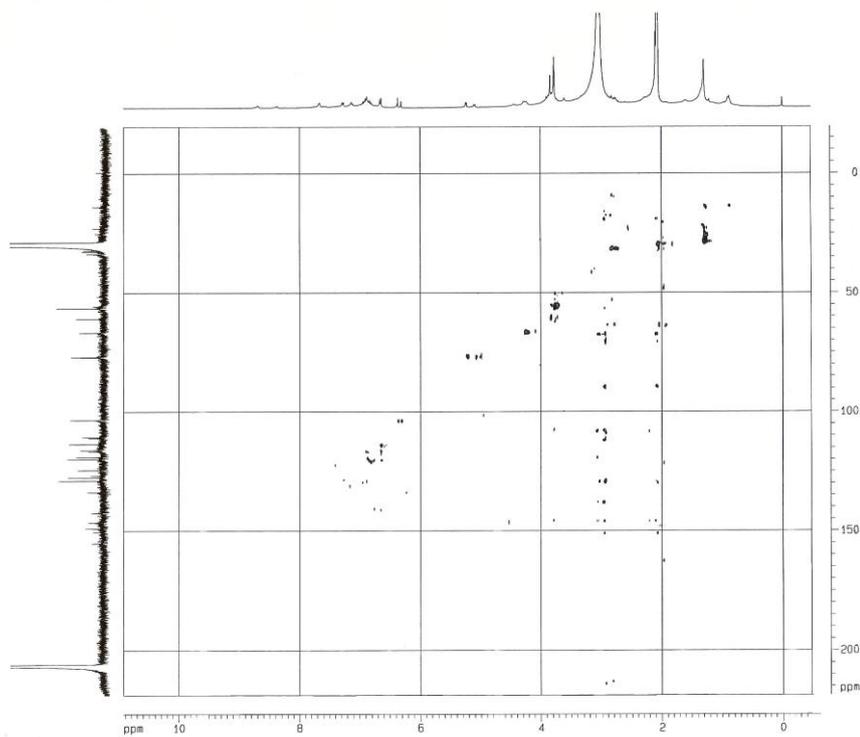


Figura 46 - Espectro de HMQC da mistura de **CM7** e **CM8**

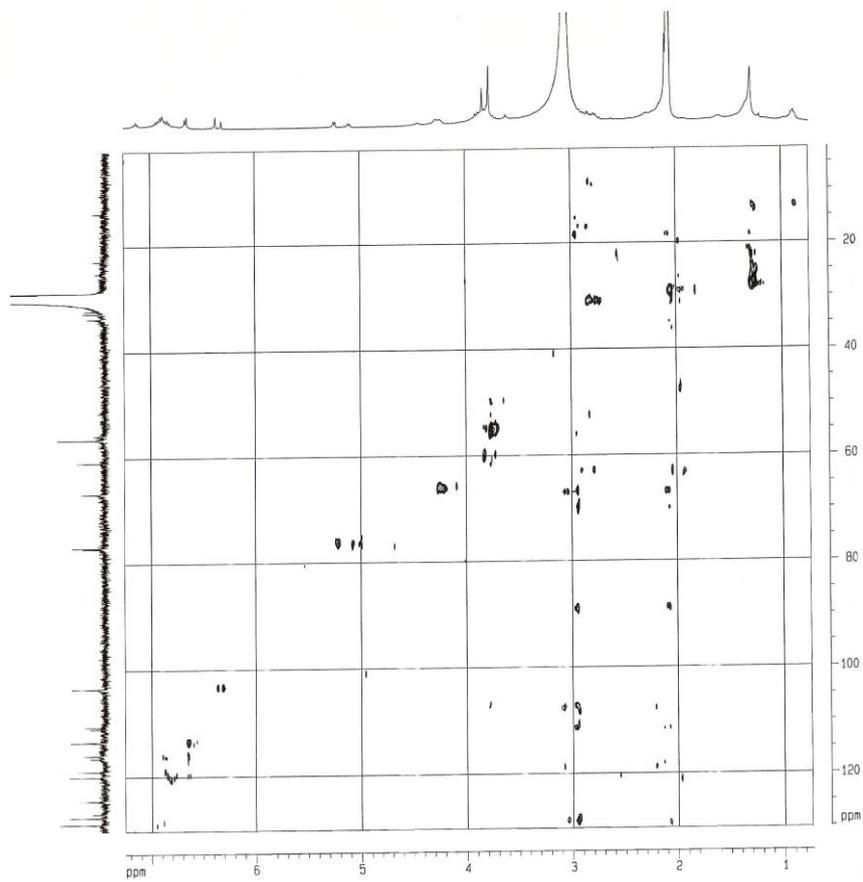


Figura 47 - Ampliação do espectro de HMQC da mistura de **CM7** e **CM8**

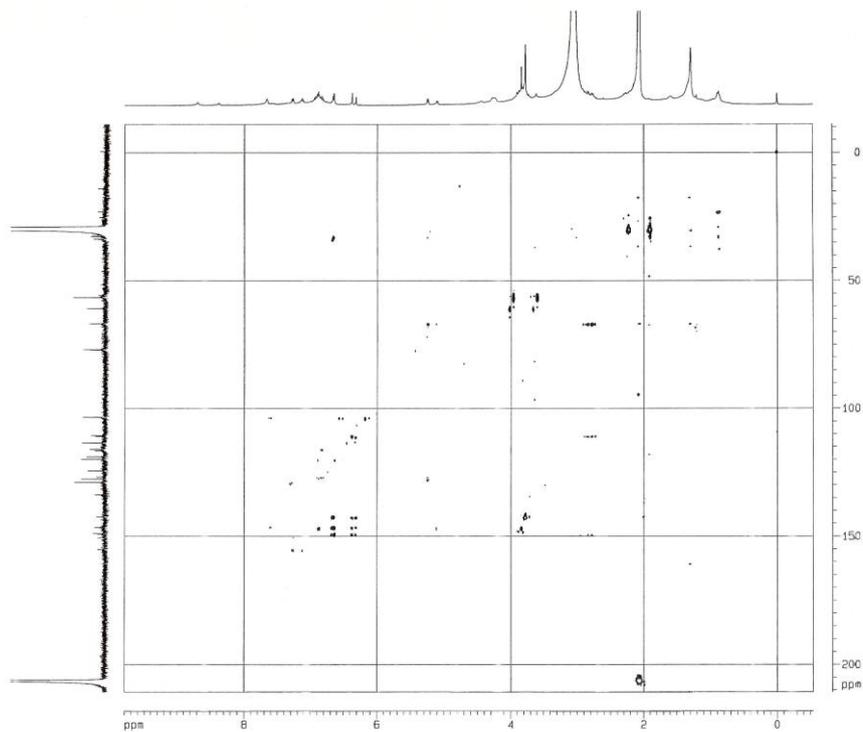


Figura 48 - Espectro de HMBC da mistura de **CM7** e **CM8**

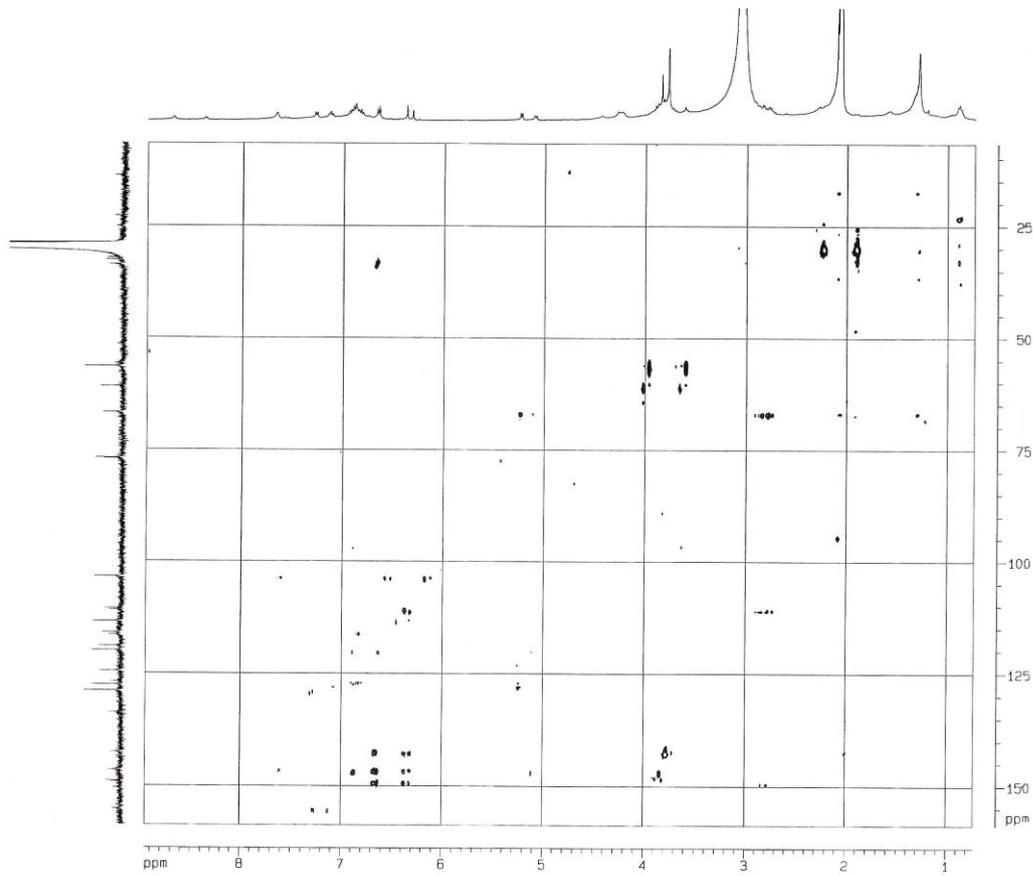


Figura 49 - Ampliação do espectro de HMBC da mistura de **CM7** e **CM8**

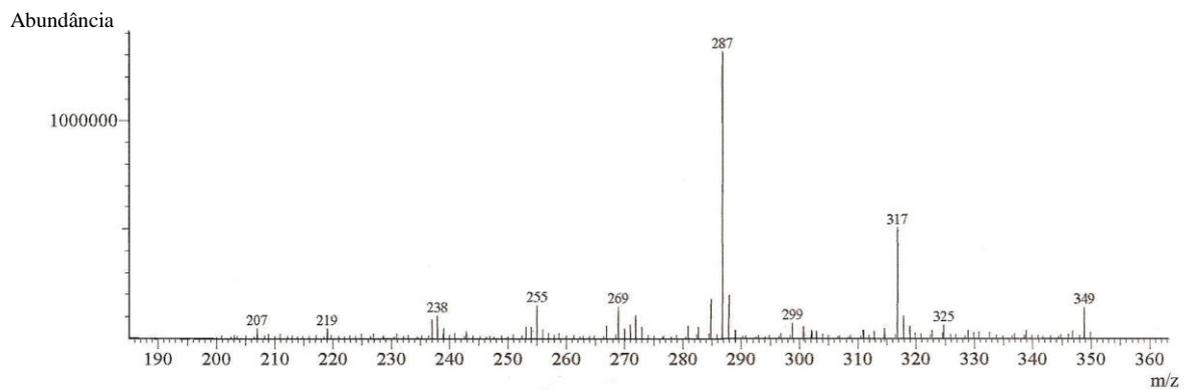


Figura 50 - Espectro de massas da mistura de **CM7** e **CM8** (APCI, modo negativo)

Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, J (Hz), δ (ppm)] da mistura de **CM7** e **CM8**

Posição	CM7		CM8	
	δ ^1H (mult.; J)	δ $^{13}\text{C}^*$	δ ^1H (mult.; J)	δ $^{13}\text{C}^*$
2	5,10 (d; 8,1)	77,06	5,20 (d; 8,7)	76,89
3	4,23-4,34 (m)	66,78	4,23-4,34 (m)	66,78
4ax	3,10 (dd; 6,0; 15,9)	33,65	3,10 (dd; 6,0; 15,9)	32,64
4eq	2,9 (dd; 9,0; 15,9)		2,9 (dd; 9,0; 15,9)	
5	6,68 (s)	113,47	6,63 (s)	113,47
6	—	142,48	—	142,48
7	—	148,92	—	148,92
8	6,30 (s)	103,45	6,35 (s)	103,45
9	—	150,44	—	150,44
10	—	110,92	—	110,57
1'	—	133,77	—	126,89
2'	—	146,49	—	155,15
3'	—	149,10	—	115,97
4'	6,80-7,30 (m)	118,90	6,80-7,30(m)	128,90
5'	6,80-7,30 (m)	119,92	6,80-7,30 (m)	126,89
6'	6,80-7,30 (m)	124,46	6,80-7,30 (m)	127,59
6-OCH3	3,80 (s)	56,45	3,80 (s)	56,45
2'-OCH3	3,87 (s)	60,83	—	—
7-OH	7,65 (s)	—	7,65 (s)	—
2'-OH	—	—	8,70 (s)	—
3'-OH	8,38 (s)	—	—	—

* Atribuído através do HMQC

Tabela 27 - Correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC da mistura de **CM7** e **CM8**

Posição	δ ¹ H (mult.)	HMBC δ ¹³ C	δ ¹ H (mult.)	HMBC δ ¹³ C
	CM7		CM8	
2	5,10 (d)	C-3 (66,78) e C-2' (146,4)	5,20 (d)	C-3 (66,78) e C-1' (126,8)
3	4,23-4,34 (m)	C-10 (110,92)	4,23-4,34 (m)	C-10 (110,57)
5	6,68 (s)	C-6 (142,48)	6,63 (s)	C-6 (142,48)
8	6,30 (s)	C-6 (142,48), C-7 (148,92) C-9 (150,44) e C-10 (110,92)	6,35 (s)	C-6 (142,48), C-7 (148,92) C-9 (150,44) e C-10 (110,57)
6-OCH ₃	3,80 (s)	C-6 (142,48)	3,80 (s)	C-6 (142,48)
2'-OCH ₃	3,87 (s)	C-2' (146,4)	—	—
7-OH	7,65	C-7 (148,92) e C-8 (103,45)	7,65 (s)	C-7 (148,92) e C-8 (103,45)

4. Considerações Finais

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da constituição química da espécie *Cratylia mollis* (Leguminosae), pois levou ao isolamento de novos constituintes químicos, bem como permitiu a elucidação das estruturas das substâncias através da comparação com dados da literatura.

A partir do estudo do extrato em clorofórmio do caule de *C. mollis* foram isolados os novos flavonóides 7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxiflavana e 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol; além da 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana, 7-hidroxi-6-metoxiflavana e 7,2'-dihidroxi-6-metoxiflavana, isoladas anteriormente; da lignana pinoresinol e do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina). Este é o primeiro estudo a relatar a ocorrência de lignana no gênero *Cratylia*.

O estudo fitoquímico parcial do extrato em acetato de etila levou ao isolamento dos flavanóis 2*R**,3*S**-7,3'-dihidroxi-6,2'-dimetoxi-flavan-3-ol, isolado do extrato clorofórmico anteriormente, e o 2*R**,3*S**-7,2'-dihidroxi-6-metoxi-flavan-3-ol.

Os flavonóides são considerados marcadores químicos do gênero *Cratylia*. Neste estudo os flavonóides constituíram a classe principal de metabólitos presentes na espécie e, portanto este fato está de acordo com a distribuição dessa classe no reino vegetal. Vale ressaltar que as catequinas apesar de serem amplamente distribuídas no reino vegetal, esta classe de substâncias tem pouca variedade estrutural e deste modo, este trabalho contribuiu com a descrição de duas novas catequinas.

Para a complementação do perfil fitoquímico desta espécie as demais frações do extrato acetato de etila deverão ser estudadas com posterior avaliação biológica, contribuindo assim para o conhecimento de espécies do semi-árido nordestino.

5. Referências

- ABDEL-KADER, M. S.; WISSE, J.; EVANS, R.; VAN DER WERFF, H.; KINGSTON, D. G. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v.60, n.12, p.1294-7, 1997.
- ADJAYE, A. E.; DOBBERSTEIN, R. H.; VENTON, D. L.; FONG, H. H. S. Phytochemical investigation of *Laurelia novae-zelandiae*. **Journal of Natural Products**, v.47, p.553-4 1984.
- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Ed. By P. K. Agrawal, 1989, 219 p.
- AGUIAR, R. M. Triterpenos, Catequinas e Derivados não usuais de Naftoquinonas do Extrato Clorofórmico de *Byrsonima microphylla*. 2003. 84f. **Dissertação de Mestrado** - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- ALDRICH/ACD LIBRARY OF FT-NMR SPECTRA. Aromatic Aldehydes. Milwaukee, USA: Aldrich/ACD, Catalog.N. V110-4, 1998. 1 **CD-ROM**
- ARTEMKINA, N. A.; ROSHCHIN, V. I. Extractive substances from needles and shoots of *Picea abies* (L.) Karst. 1. Phenolic compounds, their isolation and identification. **Rastitel'nye Resursy**, v.40, p.77-87, 2004.
- BARACAT, A. B. 1995 **Boletim Plantas do Nordeste**. Royal botanic gardens, kew Richmond surrey tw9 3AE. Acesso em: 20 de dez. 2005, England. Disponível em http://www.rbgekew.org.uk/scihort/pne/pne7_port.pdf.
- BARREIROS, A. L. B. Constituintes Químicos Bioativos de *Dioclea violacea*. 2005. 285f. **Tese** (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BIBLIA, A. R.; MORELLI, I.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Flavans and A-type proanthocyanidins from *Prunus prostrata*. **Phytochemistry**, v.43, n.4, p.887-892, 1996.
- BODESHEIM, U.; HOLZL, J. Isolation and receptor binding properties of alkaloids and lignans from *Valeriana officinalis*. **Pharmazie**, v.52, n.5, p.386-391, 1997.
- BRIESKORN, C. H.; HUBER, H. Four new lignans from *Aptosimum spinescens* (Thunbg.). **Tetrahedron Letters**, v.26, p.2221-4, 1976.
- CALDERON, A. I.; TERREAUX, C.; SCHENK, K.; PATTISON, P.; BURDETTE, J. E.; PEZZUTO, J. M.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Isolation and structure elucidation of an isoflavone and a sesterterpenoic acid from *Henriettella fascicularis*. **Journal of Natural Products**, v.65, n.12, p.1749-53, 2002.
- CARPINELLA, M. C.; FERRAYOLI, C. G.; PALACIOS, S. M. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.2922-7, 2005.
- CHEN, C-L.; CHANG, H-M. The chemistry of *Liriodendron tulipifera* L. Part 4. Lignans and aporphine alkaloids in bark of *Liriodendron tulipifera*. **Phytochemistry**, v.17, n.4, p.779-82, 1978.
- CHEN, C-C.; CHEN, H-Y.; SHIAO, M-S.; LIN, Y-L.; KUO, Y-H.; OU, J-C. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by tetrahydrofurofuran lignans from *Forsythia suspensa* and *Magnolia coco*. **Planta Medica**, 65, n.8, 709-711, 1999.

- CHEN, R.; ZHANG, Y.; FANG, S. Inhibitors of human DNA polymerase α isolated from Jack Horreya (*Torreya jackii*). **Zhongcaoyao**, v.28, n.12, p.707-710, 1997.
- CHIBA, M.; TSUKAMOTO, H.; HISADA, S.; NISHIBE, S. Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae fructus". IV. On the constituents of fruits of *Forsythia koreana* and forsythiae fructus from Korea on the market. **Shoyakugaku Zasshi**, v.33, n.3, p.150-4, 1979.
- CHO, J. Y.; KIM, A. R.; PARK, M. H. Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. **Planta medica**, v.67, n.4, p.312-6, 2001.
- CHO, J. Y.; PARK, J.; YOO, E. S.; YOSHIKAWA, K.; BAIK, K. U.; LEE, J.; PARK, M. H. Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* var dissecta on tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v.21, n.1, p.12-16, 1998.
- CHUNG, M-I.; LAI, M-H.; YEN, M-H.; WU, R-R.; LIN, C-N. Phenolics from *Hypericum geminiflorum*. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.943-947, 1997.
- COWAN, S.; STEWART, M.; ABBIW, D. K.; LATIF, Z.; SARKER, S. D.; NASH, R. J. Lignans from *Strophanthus gratus*. **Fitoterapia**, v.72, n.1, p.80-82, 2001.
- CREW, P; RODRÍGUEZ, J; JASPARS, M. **Organic Structure Analysis**. Ed. New York: Oxford University Press, 1998. 549p.
- CRUZ, FLÁVIA CAMANZI. Estudo Fitoquímico de *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). 2004. 85f. **Dissertação de Mestrado** - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- CUI, G. Y.; TAN, R. X. Lignans and tannins from *Alchornea davidii* (Euphorbiaceae) and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.99-102, 2004.
- DE GUTIERREZ, A. N.; BARDON, A.; CATALAN, C. A. N.; GEDRIS, T. B.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Disynaphia multicrenulata* from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.6, p.633-647, 2001.
- DELLA GRECA, M.; FERRARA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. **Phytochemistry**, v.49, n.5, p.1299-1304, 1998.
- DELLUS, V.; MILA, I.; SCALBERT, A.; MENARD, C.; MICHON, V.; DU PENHAOT, C. L. M. Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. **Phytochemistry**, v.45, n.8, p.1573-1578, 1997.
- DEWICK, P.M. Isoflavanoids. In: HARBORNE, J.B. **The flavanoids: Advances in research since 1988**. 1988. 1^a ed. Ed. Chapman and Hall, New York, 1988, p. 157-171.
- DONOVAN, J. L.; LUTHRIA, D. L.; STREMPLE, P. AND. WATERHOUSE, A. L. Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs: A comparison of sensitive methods. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.726, p.277-283, 1999.
- DU, J.; WANG, M-L.; CHEN, R-Y.; YU, D-Q. Chemical constituents from the leaves of *Magnolia denudata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.3, n.4, p.313-319, 2001.
- DURANGO, D.; QUINONES, W.; TORRES, F.; ROSERO, Y.; GIL, J.; ECHEVERRI, F. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules**, v.7, p.817-832, 2002.

EL-HASSAN, A.; EL-SAYED, M.; HAMED, A. I.; RHEE, I. K.; AHMED, A. A.; ZELLER, K. P.; VERPOORTE, R. Bioactive constituents of *Leptadenia arborea*. **Fitoterapia**, v.74, p.184-187, 2003.

EL-SHAER, N. S. Lignan and phenolic acids from oleoresin of *Pinus roxburghii* (chir pine). **Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.16, n.1, p.31-35, 2002.

FUJIMOTO, H; HIGUCHI, T. Lignans from the bark of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). **Mokuzai Gakkaishi**, v.23, v.8, p.405-10, 1977.

FUNAYAMA, S.; ADACHI, M.; AOYAGI, T.; NOZOE, S. Cytocidal principles of *Magnolia denudata*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.33, n.1, p.21-4, 1995.

GOUSIADOU, C.; SKALTSA, H. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, n.4, p.389-396, 2003.

GOULAR, M. O. F.; BENTO, E. De S.; TRAINOTTI, A.; ALVES, R. J.; MAIA, J. G. S.; DE OLIVEIRA, G. G.; DE OLIVEIRA, A. B. Sesquiterpenoid emmotins from two *Poraqueiba* species. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.835-8, 1995.

GUILHON, G. M. S. P.; MULLER, A. H. Eudesmanolides and epoxycauthemones from *Pluchea quitoc*. **Phytochemistry**, v.49, n.5, p.1347-1351, 1998.

HSIAO, J-J.; CHIANG, H-C. Lignans from the wood of *Aralia bipinnata*. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.899-902, 1995.

<http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99/Lascano.htm> acessado em 12.01.2006

<http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/index.html> acessado em 12.01.2006

IINUMA, M; OHYAMA, M.; TANAKA, T. Flavonoids in roots of *Sophora prostrata*. **Phytochemistry**, v.38, n.2, p.539-543, 1995.

JAKUPOVIC, J.; BANERJEE, S.; BOHLMANN, F.; KING, R. M.; ROBINSON, H. New diterpenes from *Chiliotrichium rosmarinifolium* and *Nardophyllum lanatum*. **Tetrahedron**, v.42, n.5, p.1305-13, 1986.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 4ª ed, 1977, 777p.

JONG, T-T.; CHAU, S-W. Antioxidative activities of constituents isolated from *Pandanus odoratissimus*. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p.2145-2148, 1998.

JUCK, D.B.F. Estudo dos Constituintes Químicos de *Cratylia mollis* e de *Bowdichia virgilioides* (LEGUMINOSAE). 2003.160f. **Tese** (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

JUNIOR, G.M.V.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p.183-187, 2005.

KARASAWA, H.; KOBAYASHI, H.; TAKIZAWA, N.; MIYASE, T.; FUKUSHIMA, S. Studies on the constituents of *Cistanchis herba*. VIII. Isolation and structure of a new phenylethanoid glycoside, cistanoside G. **Yakugaku Zasshi**, v.106, v.8, p.721-4, 1986.

- KATO, M. J.; CHU, A.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. **Phytochemistry**, v.47, n.4, p.583-591, 1997.
- KAWAI, S.; SUGISHITA, K.; OHASHI, H. Identification of *Thuja occidentalis* lignans and its biosynthetic relationship. **Phytochemistry**, v.51, n.2, p.243-247, 1999.
- KAWAMURA, F.; KIKUCHI, Y.; OHIRA, T.; YATAGAI, M. Phenolic constituents of *Taxus cuspidata* I: lignans from the roots. **Journal of Wood Science**, v.46, n.2, p.167-171, 2000.
- KAYA, G. I.; UNVER, N.; GOZLER, B.; BASTIDA, J. (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. Cilicicus. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.1059-1062, 2004.
- KIKUCHI, T.; KADOTA, S.; YANADA, K.; WATANABE, K.; YOSIZAKI, M.; KIMURA, M. Studies on the constituents of crude drug "Shin-i" (dried buds of *Magnolia salicifolia* Maxim.). **Wakanyaku Shinpojumu**[Kiroku], v.14, p.101-4, 1981.
- KIM, Y-G.; LEE, H.; OZAWA, S.; SASAYA, T.; MOON, C-K. Lignans of *Abies koreana* Wilson. **Mokuzai Gakkaishi**, v.40, n.4, p.414-18, 1994.
- KIM, Y-G.; OZAWA, S.; SANO, Y.; SASAYA, T. Extractives of kitakobushi (*Magnolia kobus* DC. var. *borealis* Sarg.). II.: Distribution in tree and seasonal variation in leaves of lignans. **Enshurin Kenkyu Hokoku (Hokkaido Daigaku Nogakubu)**, v.53, n.1, p.29-43, 1996.
- KITAGAWA, S.; NISHIBE, S.; BENECKE, R.; THIEME, H. Phenolic compounds from *Forsythia* leaves.II.**Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.9, p.3667-70, 1988.
- KONG, L. Y.; MIN, Z. D. Studies on chemical constituents of roots of *Euphorbia pekinensis*. **Acta pharmaceutica Sinica**, v.31, n.7, p.524-9, 1996.
- KONUKLUGI, B. Lignans from *Hugonia tomentosa*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.34, n.5, p.390-392, 1996.
- KONUKLUGIL, B. Lignans from *L. flavum* var. *compactum* (Linaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.25, n.1, p.75, 1997.
- KRAUS, C.; SPITELLER, G. Comparison of phenolic compounds from galls and shoots of *Picea glauca*. **Phytochemistry**, v.44, n.1, p.59-67, 1997.
- LASCANO, C. E.; ARGEL, P.J. *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze: Una nueva leguminosae arbustiva para suelos ácidos en zonas subhúmedas tropicales. **Pasturas Tropicales**, v.20, n.1, p.1-5,1998.
- LENG, G.; WANG, H.; MING, D. Identification and content determination of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspense*. **Shanxi Yike Daxue Xuebao**, v.34, p.227-228, 2003.
- LEONTEVA, V. G.; MODONOVA, L. D.; TYUKAVKINA, N. A. Lignans from *Picea koraiensis* wood. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, v.3, p.399-400, 1974.
- LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia**. England: Royal Botanic Gardens Kew, p.1-3, 1987.
- LIAO, S-G.; ZHANG, B-L.; WU, Y.; YUE, J-M. New phenolic components from *Daphne giraldii*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, p.2873-2878, 2005.

- LIMA, L. DA S. Estudo fitoquímico das folhas de *Cratylia mollis*: isolamento e elucidação estrutural de bis-norsesquiterpeno, terpenos e pterocarpana. 2005. 69f. **Dissertação de Mestrado** - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- LIN, L-C.; TSAI, W-J.; CHOU, C-J. Studies on the constituents of *Symplocos lancifolia*. **Chinese Pharmaceutical Journal** (Taipei), v.48, n.6, p.441-449, 1996.
- MACIAS, F. A.; SIMONET A. M.; GALINDO, C.G. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, v.50, p.35-46, 1999.
- MAJUMDER, P. L.; LAHIRI, S.; PAL, S. Occurrence of lignans in the Orchidaceae plants *Lusia volucris* and *Bulbophyllum triste*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v.71, n.1, p.645-7, 1994.
- MEAGHER, L. P.; BEECHER, G. R.; FLANAGAN, V. P.; LI, B. W. Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.47, n.8, p.3173-80, 1999.
- MIMAKI, Y.; KURODA, M.; ASANO, T.; SASHIDA, Y. Triterpene saponins and lignans from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells. **Journal of Natural Products**, v.62, n.9, p.1279-1283, 1999.
- MOHAMED, K.M. Chemical constituents of *Gladiolus segetum* Ker-Gawl. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v.28, p.71-78, 2005.
- NABETA, K.; HIRATA, M.; OHKI, Y.; ANANDA, S. W.; SAMARAWEERA, S. W. A.; OKUYAMA, H. Lignans in cell cultures of *Picea glehnii*. **Phytochemistry**, v.37, n.2, p.409-13, 1994.
- NAGASHIMA, M.; FUKUDA, Y.; ITO, R. Antioxidative lignans from industrial wastewater in cleaning of black sesame seed. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.46, n.6, p.382-388, 1999.
- NISHIBE, S.; CHIBA, M.; HISADA, S. Studies on the Chinese crude drug "forsythiae fructus." I. Constituents of Forsythiae fruits on the market. **Yakugaku Zasshi**, v.97, n.1), p.1134-7, 1977.
- NIWA, M.; TATEMATSU, H.; LIU, G.; CHEN, X.; HIRATA, Y. Constituents of *Stellera chamaejasme* L. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**, 27th, p.734-41, 1985.
- NKENGFACK, A.E.; VARDAMIDES, J.C.; FOMUM, Z.T.; MEYER, M. Phenolic metabolites from *erythrina* species. **Phytochemistry**, v.46, n.3, p.573-578, 1997.
- NUMATA, A.; KAWAI, K.; TAKAHASHI, C.; MIYAMOTO, T. Occurrence of epijuvaione-type sesquiterpenoids in *Abies sachalinensis*. **Phytochemistry**, v.31, p.3773-80, 1992.
- OKUYAMA, E.; SUZUMURA, K.; YAMAZAKI, M. Pharmacologically active components of Todopon Puok (*Fagraea racemosa*), a medicinal plant from Borneo. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.43, n.1, p.2200-4, 1995.
- ONO, M.; MASUOKA, C.; ODAKE, Y.; IKEGASHIRA, S.; ITO, Y.; NOHARA, T. Antioxidative constituents from *Tessaria integrifolia*. **Food Science and Technology Research**, v.6, n.2, p.106-114, 2000.

- OWEN, R. W.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. **Clinical Chemistry**, v.46, n.7, p.976-988, 2000.
- PAN, H.; LUNDGREN, L. N. Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*. **Phytochemistry**, v.39, n.6, p.1423-8, 1995.
- PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. L. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society Perkin**, v.23, p.2475-2483, 1976.
- PENG, F.; YANG, J.; DAI, Y.; ZHAO, J.; LUO, S.; LI, L. Studies on chemical constituents of *Stachyurus himalaicus*. **Zhongcaoyao**, v.35, p.618-619, 2004.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary Occurrence And Biochemical Activity. **Nutrition Research**, v.18, p.1995-2018, 1998.
- QUEIROZ, L. P. DE; CORADIN, L. Biogeografia de *Cratylia* e Areas Prioritárias para Coleta. En: Potencial del Género *Cratylia* como Leguminosa Forrajera. Pizarro, E. A. y Coradin, L. (eds.). EMBRAPA, CENARGEN, CPAC y CIAT, Memorias Taller sobre *Cratylia* realizado del 19 al 20 de julio de 1995 en Brasilia, Brasil. p. 1-28, 1995.
- RAGASA, C. Y.; HOFILENA, J. G.; RIDEOUT, A. Lignans from *Gliricidia sepium*. **ACGC Chemical Research Communications**, v.10, p.52-60, 2000.
- RAMADAN, M. A.; KAMEL, M. S.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs. **Phytochemistry**, v.54, p.891-896, 2000.
- RAO, R. J.; KUMAR, U. S.; REDDY, S. V.; TIWARI, A. K.; RAO, J. M. Antioxidants and a new germacrane sesquiterpene from *Carissa spinarum*. **Natural Product Research**, v.19, p.763-769, 2005.
- SASAYA, T.; OZAWA, S. Distribution and accumulation of extractives in tree trunk. III. Lignans in the wood of *Abies sachalinensis* Masters. **Enshurin Kenkyu Hokoku (Hokkaido Daigaku Nogakubu)**, v.48, n.1, p.247-57, 1991.
- SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J-C.; GAYRAL, P.; DEDET, J-P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). **Phytotherapy Research**, v.10, n.1, p.1-4, 1996.
- SCHOETTNER, M.; GANSSER, D.; SPITELLER, G. Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). **Planta Medica**, v.63, n.6, p.529-532, 1997.
- SECA, A. M. L.; SILVA, A. M. S.; SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DOMINGUES, F. M. J.; PASCOAL-NETO, C. Phenolic constituents from the core of Kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Phytochemistry**, v.56, n.7, p.759-767, 2001.
- SHARP, H.; THOMAS, D.; CURRIE, F.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, S. D.; NASH, R. J. Pinoresinol and syringaresinol: two lignans from *Avicennia germinans* (Avicenniaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.325-327, 2001.
- SHI, H.; MI, C.; QIAO, B.; LI, F.; WANG, C.; LIU, Z.; TAKESHIMA, J. Studies on the chemical constituents of the root of *Pimpinella thellungiana*. **Journal of Chinese medicinal materials**, v.21, n.5, p.236-7, 1998.

SICILIA, T.; NIEMEYER, H. B.; HONIG, D. M.; METZLER, M. Identification and Stereochemical Characterization of Lignans in Flaxseed and Pumpkin Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.5, p.1181-1188, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: 6ed. Ed. Livros Técnicos Científicos, p.460, 2000.

SKALTSA, H.; GOUSIADOU, C. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.389-396, 2003.

SOUSA, F. B. DE; OLIVEIRA, M. C. DE. Avaliação Agronômica do Genero *Cratylia* na Região Semi-Árida do Brasil. En: Potencial del Género *Cratylia* como Leguminosa Forrajera. Pizarro, E. A. y Coradin, L. (eds.). EMBRAPA, CENARGEN, CPAC y CIAT, Memorias Taller sobre *Cratylia* realizado del 19 al 20 de julio de 1995 en Brasilia, Brasil. p. 50-52, 1995.

STAHL, E. **Layer chromatography**. New York: 2ed. Ed. Trad. Por M. R. F. Ashworth, p. 1024, 1966.

SU, B-N.; TAKAISHI, Y.; KUSUMI, T. Morinols A-L, twelve novel sesquieolignans and neolignans with a new carbon skeleton from *Morina chinensis*. **Tetrahedron**, v.55, n.51, p.14571-14586, 1999.

SUBBARAJU, G. V.; PILLAI, K R. Lignans from *Justicia diffusa* Willd. **Indian Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, v.35B, n.11, p.1233-1234, 1996.

SUTTHIVAIYAKIT, S.; NAKORN, N. N.; KRAUS, W.; SUTTHIVAIYAKIT, P. A novel 29-nor-3,4-seco-friedelane triterpene and a new guaiane sesquiterpene from the roots of *Phyllanthus oxyphyllus*. **Tetrahedron**, v.59, p.9991-9995, 2003.

SYAH, Y. M.; GHISALBERTI, E. L. Biologically active cyanogenetic, iridoid and lignan glycosides from *Eremophila maculata*. **Fitoterapia**, v.67, n.5, p.447-451, 1996.

TAKAYAMA, H.; KURIHARA, M.; KITAJIMA, M.; SAID, I. M.; AIMI, N. New indole alkaloids from the leaves of Malaysian *Mitragyna speciosa*. **Tetrahedron**, v.54, n.29, p.8433-8440, 1998.

TANDON, S.; RASTOGI, R. P. Wikstromol, a new lignan from *Wikstroemia viridiflora*. **Phytochemistry**, v.15, n.11, p.1789-91, 1976.

TANIGUCHI, M.; FUJIWARA, A.; BABA, K.; WANG, N-H. Chemical studies on the constituent of thymelaeaceous plants: two biflavonoids from *Daphne acutiloba*. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.863-867, 1998.

THUSOO, A.; RAINA, N.; MINHAJ, N.; AHMED, S. R.; ZAMAN, A. Crystalline constituents from *Daphne oleoides*. **Indian Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, v.20B, n.10, p.937-8, 1981.

WANG, A-X.; ZHANG, Q.; JIA, Z-J. Phenylpropanosides, lignans and other constituents from *Cremanthodium ellisii*. **Pharmazie**, v.59, p.889-892, 2004.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; LACHAVANNE, J-B.; HOSTETTMANN, K. ent-Labdane diterpenes from the aquatic plant *Potamogeton pectinatus*. **Phytochemistry**, v.64, p.1309-1317, 2003.

WHANG, J. I.; MOON, H. I.; ZEE, O. P. Phytochemical constituents of *Actinidia arguta*. **Saengyak Hakhoechi**, v.31, n.3, p.357-365, 2000.

XENOFONTE DE ALMEIDA, S. C.; GOMES DE LEMOS, T. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Volatile and non-volatile chemical constituents of *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Quimica Nova**, v. 28, p.57-60, 2005.

XIE, H.; WANG, T.; MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M.; TANI, T. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XV. Inhibitory effect on aldose reductase and structures of saussureosides A and B from *Saussurea medusa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.53, p.1416-1422, 2005.

YAHARA, S.; DOMOTO, H.; SUGIMURA, C.; NOHARA, T.; NIIHO, Y.; NAKAJIMA, Y.; ITO, H. An alkaloid and two lignans from *Cuscuta chinensis*. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1755-7, 1994.

YAMAMOTO, S.; OTTO, A.; SIMONEIT, B. R. T. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v.39, n.11, p.1337-47, 2004.

YANG, S-J.; FANG, J-M.; CHENG, Y-S. Lignans, flavonoids and phenolic derivatives from *Taxus mairei*. **Journal of the Chinese Chemical Society** (Taipei), v.46, n.5, p.811-818, 1999.

YU, H-J.; CHEN, C-C.; SHIEH, B-J. Chemical constituents of the stems of *Magnolia coco* (Lour.) DC. **Chinese Pharmaceutical Journal** (Taipei), v.50, n.4, p.215-224, 1998.

YU, H-J.; CHEN, C-C.; SHIEH, B-J. The constituents from the leaves of *Magnolia coco*. **Journal of the Chinese Chemical Society** (Taipei), v.45, n.6, p.773-778, 1998.

ZHOU, L. X.; DIND, Y. Studies on chemical constituents of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v.25, n.9, p.541-3, 2000.

ZHUANG, L.; SELIGMANN, O.; JURCIC, K.; WAGNER, H. Constituents of *Daphne tangutica*. **Planta Medica**, v.45, n.3, p.172-6, 1982.