

# UFAL



INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E QUANTIFICAÇÃO POR  
RMN  $H^1$  DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DO EXTRATO DAS  
FOLHAS DE *Zeyheria tuberculosa* (VELL) BUREAU  
(BIGNONIACEAE)**

**Maria Amélia Lima dos Santos**

**Universidade Federal de Alagoas**

*Campus A. C. Simões*  
Tabuleiro dos Martins  
57.072-970 – Maceió-AL

 <b>UFAL</b>	<p align="center"><b>Universidade Federal de Alagoas</b>  Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p align="center"><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i>  PPGQB</p>	 <b>IQB</b>
--	---	---

# **ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E QUANTIFICAÇÃO POR RMN H<sup>1</sup> DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Zeyheria tuberculosa* (VELL) BUREAU (BIGNONIACEAE)**

Maria Amélia Lima dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento  
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió – Alagoas  
Novembro de 2009

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo, pelo seu infinito amor e pela sua presença e providência em todas as minhas alegrias e aflições;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) do Governo Brasileiro por ter fomentado a nossa pesquisa e por ter fornecido uma bolsa de mestrado;

Aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana e Prof. Dr. Edson de Souza Bento, exemplos de dedicação à ciência e ao trabalho, pela orientação, oportunidade, confiança e incentivo durante o mestrado;

Ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pelo Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, responsável pela minha qualificação profissional;

À Coordenação do Programa de Pós-graduação de Química e Biotecnologia pelo apoio e dedicação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) pelo cuidado com a excelência dos Cursos de pós-graduação stricto sensu e pelo acesso aos Periódicos da Capes;

Ao Instituto do Milênio do Semi-Árido pelo material vegetal fornecido pelo projeto IMSEAR;

Aos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais e de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas onde foram desenvolvidos os experimentos e análises;

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela avaliação da atividade farmacológica;

Ao Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, pelos ensinamentos e pela contribuição prestada durante a parte experimental deste trabalho;

Aos Professores Doutores Lucia Maria Conserva, Lúcia Maria Cunha Rebouças, Marcia Pletsch, Marília Oliveira Fonseca Goulart e Nivaldo Alves Soares pelos excelentes cursos ministrados;

Aos meus queridos Ruy Albuquerque Tenório e Yuri Cavalcante Albuquerque Tenório, pelos ensinamentos, pela ajuda na formatação desta dissertação, enfim, por terem contribuído de forma significativa para a conclusão deste trabalho.

A minha querida MsC. Natália Velásquez, pela significativa contribuição a este trabalho, pelo apoio constante e pelos bons momentos juntas.

Aos técnicos Aldy Santos e Margarida Teodoro que sempre estiveram disponíveis e muito contribuíram para este trabalho;

Aos colegas de laboratório MsC. Daniel de Melo, MsC. Edjane Vieira, MsC. Alan John, MsC. Cristiane Omena e MsC. Roberta Costa por terem contribuído de forma significativa para a realização deste trabalho;

Ao técnico MsC. Marcos Sá pela dedicação nas análises de RMN e a técnica MsC. Cenira Monteiro pela contribuição para o bom andamento deste trabalho;

Aos alunos de iniciação científica (IC) Maria dos Prazeres Menezes, Leandro Duarte e Tainá Tenório pelas contribuições prestadas durante a parte experimental deste trabalho;

À Raquel Ferreira (IC), Ísis Torres (IC) e aos demais colegas dos laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear e de Pesquisa em Recursos Naturais pelas contribuições neste trabalho.

Aos colegas de sala de aula que de alguma forma contribuíram para a minha formação durante o Curso de Mestrado e também pelos bons momentos juntos;

Aos meus queridos pais, Erivaldo Soares dos Santos e Maria Lúcia Lima dos Santos, e aos meus irmãos, Camila Maria Lima dos Santos, Erivaldo Soares dos Santos Júnior, pelo amor, apoio e pelas orações;

Aos servidores da UFAL responsáveis pela higienização dos ambientes de estudo e trabalho.

***Dedico este trabalho:***

***Aos meus amados pais, Erivaldo Soares dos Santos e Maria Lúcia Lima dos Santos, por todo o amor, o cuidado, a entrega e os sacrifícios.***

***Aos meus amados irmãos, Camila Maria Lima dos Santos e Erivaldo Soares dos Santos Júnior, pelo apoio e companheirismo.***

***Aos meus amados Ruy Albuquerque Tenório e Yuri Cavalcanti Albuquerque Tenório, pelo amor, os cuidados constantes e as orações.***

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE FLUXOGRAMAS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1 Objetivo Geral.....	6
1.2 Objetivos Específicos.....	6
1.3 Justificativa.....	6
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
2.1 A Espécie <i>Zeyheria tuberculosa</i> (Vell.) Bureau.....	8
2.2 Linfoproliferação.....	12
2.3 Considerações Gerais sobre Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	13
<b>3. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>18</b>
3.1 Local de Realização do Trabalho.....	18
3.2 Material Botânico.....	18
3.3 Material, Equipamento, Método de Extração e Purificação.....	19
3.3.1 Solventes.....	19
3.3.2 Análise Cromatográfica.....	19
3.3.3 Reveladores.....	19
3.3.4 Método de Extração.....	20
3.3.5 Método de Purificação.....	20
3.3.6 Espectrômetros.....	20
3.3.7 Polarímetro.....	21
3.4 Etapas de Isolamento do Princípio Ativo.....	21
3.4.1. Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	21
3.4.2. Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	21
3.4.3. Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB.....	22

3.4.4. Filtração da Fração ZTF3 Proveniente da Fração ZTP2.....	23
3.4.5. Filtração da Fração ZTF3.3 Proveniente da Fração ZTF3.....	24
3.4.6. Fracionamento Cromatográfico I, Cristalização e Recristalização das Frações Reunidas da Filtração da ZTF3.3.....	25
3.4.7. Fracionamento Cromatográfico II, Cristalização e Recristalização da Subfração (48 - 78) Proveniente da Coluna I.....	26
3.4.8. Fracionamento Cromatográfico III, Cristalização e Recristalização da Fração ZTF3.2.....	28
3.5 Prospecção Fitoquímica.....	29
3.5.1. Teste para Fenóis e Taninos.....	29
3.5.2. Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides.....	29
3.5.3. Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas.....	30
3.5.4. Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas.....	31
3.5.5. Teste para Esteroides e Triterpenoides.....	31
3.5.6. Teste para Saponinas.....	31
3.5.7. Teste para Alcalóides.....	32
3.5.8. Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas.....	32
3.6 Ensaio Biológico.....	32
3.7 Resultado da Prospecção Fitoquímica do Extrato ZTB das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	34
3.8 Resultado do Bioensaio.....	35
3.8.1 Atividade Citotóxica do Extrato e Frações das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	35
3.8.2 Atividade Inibitória da Linfoproliferação <i>in vitro</i> , da Fração Clorofórmica das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	35
3.9 Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas da Fração ZTP2.....	36
3.10 Identificação Estrutural da Substância Codificada como ZTC9.....	36
3.11 Identificação Estrutural da Substância Codificada como ZTC10.....	58
3.12 Metodologia das Quantificações da ZTC9 e ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) da Folha de <i>Z. tuberculosa</i> pelo Método de RMN $H^1$ .....	79
3.13 Resultados das Quantificações da ZTC9 e ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) da Folha de <i>Z. tuberculosa</i> pelo Método de RMN $H^1$ .....	82
3.13.1 Resultado da Quantificação da Substância ZTC9 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	85

3.13.2 Resultado da Quantificação da Substância ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	94
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	104
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	105



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> <i>Zeyheria tuberculosa</i> ; <b>(a)</b> Folhas e Flores, <b>(b)</b> Frutos, <b>(c)</b> Sementes, <b>(d)</b> Casca, <b>(e)</b> Madeira.....	8
<b>Figura 02.</b> Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais <b>(a)</b> , Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear <b>(b)</b> .....	18
<b>Figura 03.</b> Espectro da Substância ZTC9 na Região do Infravermelho [Y=Transmitância/X=número de ondas (cm <sup>-1</sup> )].....	36
<b>Figura 04.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC9 com Expansão, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	38
<b>Figura 05.</b> Expansão do Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	38
<b>Figura 06.</b> Espectro de RMN C <sup>13</sup> de ZTC9 com Expansão, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	39
<b>Figura 07.</b> Expansão do Espectro de RMN C <sup>13</sup> de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	40
<b>Figura 08.</b> Espectro de RMN DEPT 90° de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	40
<b>Figura 09.</b> Expansão do Espectro de RMN DEPT 90° de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	41
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN DEPT 135° de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	41
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	43
<b>Figura 12.</b> Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1 .....	43
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	45
<b>Figura 14.</b> Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	45
<b>Figura 15.</b> Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	46
<b>Figura 16.</b> Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	46
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	47
<b>Figura 18.</b> Expansão do Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	48
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	48

<b>Figura 20.</b> Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC9, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	49
<b>Figura 21.</b> Montagem Estrutural da ZTC9.....	50
<b>Figura 22.</b> Correlações Observadas no Espectro HMBC de ZTC9 (a) <sup>2-4</sup> J <sub>C,H</sub> ; (b) <sup>2</sup> J <sub>C,H</sub> ; (c) <sup>3</sup> J <sub>C,H</sub> ; (d) <sup>4</sup> J <sub>C,H</sub> .....	51
<b>Figura 23.</b> Correlações Observadas no Espectro COSY de ZTC9.....	52
<b>Figura 24.</b> Correlações Observadas no Espectro NOESY de ZTC9.....	52
<b>Figura 25.</b> Estrutura do (+)-Ácido Ursólico (ZTC9).....	55
<b>Figura 26.</b> Espectro de Massas (m/z) do Ácido Ursólico (ZTC9).....	57
<b>Figura 27.</b> Fragmentação do Ácido Ursólico do Tipo Retro-Diels-Alder.....	57
<b>Figura 28.</b> Espectro da Substância ZTC10 na Região do Infravermelho [Y=Transmitância/X=número de ondas (cm <sup>-1</sup> )].....	58
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC10 com Expansão, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	59
<b>Figura 30.</b> Expansão do Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	60
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN C <sup>13</sup> de ZTC10 com Expansão, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	61
<b>Figura 32.</b> Expansão do Espectro de RMN C <sup>13</sup> de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	61
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN DEPT 90° de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	62
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN DEPT 135° de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	62
<b>Figura 35.</b> Expansão do Espectro de RMN DEPT 135° de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	63
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	64
<b>Figura 37.</b> Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	65
<b>Figura38.</b> Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	66
<b>Figura 39.</b> Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	67
<b>Figura 40.</b> Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	67
<b>Figura 41.</b> Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	68
<b>Figura 42.</b> Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC10,	

Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	69
<b>Figura 43.</b> Expansão (1) do Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	69
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	70
<b>Figura 45.</b> Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	70
<b>Figura 46.</b> Expansão (2) do Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC10, Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	71
<b>Figura 47.</b> Montagem Estrutural da ZTC10.....	72
<b>Figura 48.</b> Correlações Observadas no Espectro HMBC de ZTC10 <b>(a)</b> <sup>2-4</sup> J <sub>C,H</sub> ; <b>(b)</b> <sup>2</sup> J <sub>C,H</sub> ; <b>(c)</b> <sup>3</sup> J <sub>C,H</sub> ; <b>(d)</b> <sup>4</sup> J <sub>C,H</sub> .....	73
<b>Figura 49.</b> Correlações Observadas no Espectro COSY de ZTC10.....	74
<b>Figura 50.</b> Correlações Observadas no Espectro NOESY de ZTC10.....	74
<b>Figura 51.</b> Estrutura do (+)-Ácido Oleanólico (ZTC10) .....	76
<b>Figura 52.</b> Espectro de Massas (m/z) do Ácido Oleanólico (ZTC10).....	78
<b>Figura 53.</b> Fragmentação do Ácido Oleanólico do Tipo Retro-Diels-Alder.....	78
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC9 (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC9), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	82
<b>Figura 55.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> da Fração Clorofórmio (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC9), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	83
<b>Figura 56.</b> Expansão do Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC9 (A), ZTC10 (B) e Fração Clorofórmica (C), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	83
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC10 (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC10), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	84
<b>Figura 58.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> da fração clorofórmio (Deslocamentos dos picos escolhidos para a quantificação de ZTC10), solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	84
<b>Figura 59.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> de ZTC9, ZTC10 e Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	85
<b>Figura 60.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN H <sup>1</sup> (Amostra 1), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	88
<b>Figura 61.</b> Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN H <sup>1</sup> (Amostra 1), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	88
<b>Figura 62.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN H <sup>1</sup> (Amostra 2), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	89
<b>Figura 63.</b> Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN H <sup>1</sup> (Amostra 2), Solvente CDCl <sub>3</sub> /MeOD 3:1.....	89

<b>Figura 64.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 3), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	90
<b>Figura 65.</b> Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 3), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	90
<b>Figura 66.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 4), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	91
<b>Figura 67.</b> Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 4), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	91
<b>Figura 68.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 5), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 1:1.....	92
<b>Figura 69.</b> Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 5), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 1:1.....	92
<b>Figura 70.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 6), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 1:1.....	93
<b>Figura 71.</b> Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 6), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 1:1.....	93
<b>Figura 72.</b> Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 1-6), solvente $CDCl_3/MeOD$ 1:1.....	94
<b>Figura 73.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 1), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	97
<b>Figura 74.</b> Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 1), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	97
<b>Figura 75.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 2), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	98
<b>Figura 76.</b> Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 2), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	98
<b>Figura 77.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 3), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	99
<b>Figura 78.</b> Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 3), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	99
<b>Figura 79.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 4), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	100
<b>Figura 80.</b> Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 4), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	100
<b>Figura 81.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 5), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	101
<b>Figura 82.</b> Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 5), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	101
<b>Figura 83.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 6), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	102
<b>Figura 84.</b> Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro	

de RMN $H^1$ (Amostra 6), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	102
<b>Figura 85.</b> Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN $H^1$ (Amostra 1-6), Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB .....	23
<b>Tabela 02.</b> Filtração da Fração ZTF3 Proveniente da ZTP2.....	24
<b>Tabela 03.</b> Filtração da Fração ZTF3.3 Proveniente da Fração ZTF3.....	24
<b>Tabela 04.</b> Fracionamento Cromatográfico das Frações Reunidas da Filtração da Fração ZTF3.3.....	26
<b>Tabela 05.</b> Fracionamento Cromatográfico da Subfração (48 - 78) .....	27
<b>Tabela 06.</b> Fracionamento Cromatográfico da Fração ZTF3.2.....	28
<b>Tabela 07.</b> Variação de Coloração Observada nos Tubos (I).....	30
<b>Tabela 08.</b> Variação de Coloração Observada nos Tubos (II).....	30
<b>Tabela 09.</b> Resultado da Prospeção Fitoquímica do Extrato ZTB da Folha de <i>Z. tuberculosa</i> .....	34
<b>Tabela 10.</b> Apresentação dos Resultados Obtidos Neste Trabalho Acerca da Atividade Inibitória da Linfoproliferação da Fração Ativa ZTP2 da Partição da Folha de <i>Z. tuberculosa</i> .....	35
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN $H^1$ , $C^{13}$ (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra ZTC9. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente $CDCl_3/MeOD$ .....	56
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN $H^1$ , $C^{13}$ (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra ZTC10. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente $CDCl_3/MeOD$ 3:1.....	77
<b>Tabela 13.</b> Quantificação da ZTC9.....	86
<b>Tabela 14.</b> Quantificação da ZTC10.....	95

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1.</b> Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de <i>Z. tuberculosa</i> .....	22
<b>Fluxograma 2.</b> Esquema Geral das Etapas Experimentais.....	33
<b>Fluxograma 3.</b> Metodologia das Quantificações da ZTC9 e ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) da Folha de <i>Z. tuberculosa</i> pelo Método de RMN $H^1$ .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento Químico
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
COSY	“Correlation Spectroscopy”
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
EtOH	Etanol
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HSQC	“Heteronuclear Single Quantun Coherence”
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
IMSEAR	Instituto do Milênio do Semi-árido
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol Deuterado
m	Multipleto
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
NOE	“Nuclear Overhauser Effect”
OC	Onda Contínua
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN $C^{13}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN $H^1$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
TF	Transformada de Fourier
$\mu$ L	Microlitros



## RESUMO

Desde os tempos antigos, os produtos naturais são utilizados como fonte de medicamentos, para prevenir e tratar doenças. Embora os extratos vegetais continuem a ser utilizados como remédios, estes estão sendo substituídos pelos compostos ativos isolados dos extratos brutos e seus derivados sintéticos. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e a identificação estrutural dos princípios ativos do extrato das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau e suas quantificações por RMN  $H^1$ . O extrato etanólico de *Z. tuberculosa* foi ativo no ensaio de inibição da linfoproliferação. O extrato etanólico desta planta foi submetido à análise cromatográfica e o isolamento guiado pelo ensaio da linfoproliferação indicou que a fração em clorofórmio era a mais ativa. A partir desta fração clorofórmica, dois principais compostos foram isolados, ZTC9 e ZTC10. Estes compostos foram analisados por RMN visando à elucidação estrutural e quantificação. A elucidação estrutural detalhada destes dois compostos foi feita com base na análise espectral de RMN, incluindo experimentos 1D ( $H^1$ ,  $C^{13}$ , DEPT 90°, DEPT 135°) e 2D (COSY, HSQC, HMBC e NOESY). Para o estudo da quantificação, uma série de cinco soluções foi preparada para cada composto, variando a concentração de ZTC9 e ZTC10. Cada uma das soluções foi submetida a um experimento de RMN  $H^1$ . A partir dos espectros de RMN  $H^1$  obtidos, alguns sinais selecionados foram integrados e suas intensidades foram utilizadas para quantificar os compostos presentes no extrato ( $\delta$  5,39 e  $\delta$  2,33 para ZTC9;  $\delta$  5,38 e  $\delta$  2,96 para ZTC10). Os dados de RMN  $H^1$  foram processados e analisados utilizando os softwares TOPSPIN (Bruker) e SpinWorks. A análise dos espectros de RMN 1D e 2D identificou as estruturas químicas de ZTC9 e ZTC10, como sendo, respectivamente, Ácido Ursólico e Ácido Oleanólico. Os estudos da quantificação de Ácido Ursólico e Ácido Oleanólico indicaram, respectivamente, os valores de 43% e 45,9%, em massa, e concentrações de  $4,71 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $5,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Palavras-chave: RMN, Ácido Ursólico, Ácido Oleanólico, Quantificação.

## ABSTRACT

Since ancient times, vegetables are used as source of medicine, to prevent and treat disease. Although plants extracts continue to be used as medicine, it has been replaced by the actives compounds isolated from crude extracts and its synthetic derivatives. This study aimed at the isolation and the structural identification of the actives principles extract of the leaves of *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau and its quantification by  $^1\text{H}$  NMR. The ethanolic extract of *Z. tuberculosa* was active in the tests tripanossida of inhibition of  $\cdot\text{NO}$  generation and lymphoproliferation. The ethanol extract of this plant was submitted to chromatographic analysis and the isolation process, guided by lymphoproliferation test, indicated that the fraction in chloroform was the most active. From this chloroform fraction, two major compounds were isolated, ZTC9 and ZTC10. These compounds were analyzed by NMR aiming its structural elucidation and quantification. The detailed structural elucidation of these two compounds was done on the basis of NMR spectral analysis, including 1D experiments ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90 and DEPT135) and 2D (COSY, HSQC, HMBC and NOESY). For the quantification studies, a series of five solutions were prepared for each compound by varying the concentration of ZTC9 and ZTC10. Each one of these solutions was submitted to a  $^1\text{H}$  NMR experiment. From the NMR  $^1\text{H}$  spectra obtained, some selected signals were integrated and its intensities used to quantify the compounds present in the extract ( $\delta$  5,38 and  $\delta$  2,33 for ZTC9;  $\delta$  5,38 and  $\delta$  2,96 for ZTC10). The NMR  $^1\text{H}$  data had been processed and analyzed using the TOPSPIN (Bruker) and SpinWorks softwares. The analysis of the spectra of 1D and 2D NMR identified the chemical structures of ZTC9 and ZTC10, as, respectively, Ursolic Acid and Oleanolic Acid. The quantification studies of Ursolic Acid and Oleanolic Acid showed, respectively, the values of 43% and 45,9%, in mass, and concentration of  $4,71 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  and  $5,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Key-words: NMR, Ursolic Acid, Oleanolic Acid, Quantification.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos primitivos os vegetais são necessários à existência da sociedade como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, construção de casas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como instrumento de trabalhos artísticos, culturais e religiosos, no controle de pragas e ainda com fins medicinais, para prevenção, tratamento e cura de doenças (PINTO et al., 2002; SIMÕES et al., 2003).

Dentro desse campo vasto de utilização dos vegetais será focado neste trabalho apenas o seu potencial medicinal. Porém nem todos os vegetais possuem propriedades medicinais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos” (TÔRRES et al., 2005; VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

As substâncias que podem ser usadas na terapêutica são conhecidas como metabólitos secundários, não sendo comuns à maioria das plantas, mas são característicos de grupos taxonômicos como família e gênero, possuindo funções específicas que podem ser de defesa, atração, entre outras, e são classificados de acordo com a sua rota biossintética (HARBORNE, 1999; MACEDO JÚNIOR, 2007).

Dentre os metabólitos secundários existe a família dos terpenóides conhecidos pelas suas funções fisiológicas e biológicas, sendo usados como anti-inflamatórios, analgésicos, anti-tumorais e ações no sistema cardiovascular, tendo os triterpenos como um grupo importante (NIERO e MALHEIROS, 2007; PINTO et al., 2008).

Os triterpenos (C<sub>30</sub>) originam-se da ciclização do esqualeno, a exemplo do Ácido Oleanólico e seu isômero, o Ácido Ursólico. Estes compostos triterpênicos encontrados nas plantas apresentam efeitos hipoglicêmico, antioxidante e anti-hipertensivo. Este último foi atribuído a um potente efeito diurético e natriurético desses compostos (SOMOVA et al., 2003).

Até a década de 1950, houve pouco progresso na caracterização dos princípios ativos e elucidação desses compostos secundários presentes nas espécies vegetais, por isso as plantas medicinais *in natura* e seus extratos constituíam a maioria dos remédios, que naquela época eram de uso quase

exclusivo na terapêutica medicamentosa, os quais paulatinamente vêm sendo substituídos por medicamentos contendo as substâncias ativas deles extraídos ou seus derivados sintéticos (SOUZA et al., 2007; SIMÕES et al., 2003).

A falta de progresso deveu-se às inúmeras limitações existentes como os métodos químicos de análise que consistiam no uso de reações para degradar, derivatizar e identificar grupos funcionais, e a necessidade de grandes quantidades da substância a ser analisada, que na maioria das espécies são isoladas na ordem de miligramas (SOUZA et al., 2007).

Foi a partir do advento dos métodos físicos de purificação e de análise, como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), a espectroscopia na região do Visível, Ultravioleta e Infravermelho, além da Ressonância Magnética e Espectrometria de Massas, que a área dos produtos naturais pôde se desenvolver (SOUZA et al., 2007).

O desenvolvimento da química analítica, designadamente, através dos modernos métodos cromatográficos, espectrométricos, e radioimunológicos, apoiados em aparelhos cada vez mais sofisticados, possibilitou um melhor conhecimento da composição química dos fármacos vegetais e da estrutura dos seus componentes ativos (PEREIRA et al., 2005).

Também foram desenvolvidos bioensaios simplificados, que podem ser utilizados em bancadas de laboratórios de química e são úteis para direcionar a seleção de extratos, frações e substâncias a serem isoladas (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; MCLAVGHLIN et al., 1993).

Todas essas novas possibilidades analíticas permitem rapidez no isolamento e identificação de substâncias ativas inéditas e na aquisição de informações sobre constituintes em amostras complexas como os extratos vegetais, além do reconhecimento de moléculas já conhecidas, que de outro modo requereriam investimentos em tempo e recursos materiais para os processos de isolamento e identificação.

Frente a todo esse progresso, a substituição progressiva das plantas medicinais e dos seus extratos pelos compostos reconhecidos como responsáveis pela sua ação farmacológica, não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (TÔRRES et al., 2005; SIMÕES et al., 2003).

O principal motivo para essa substituição é o difícil controle de qualidade química, física, farmacológica ou toxicológica dos extratos vegetais. Contudo, apesar destas mudanças, a diversidade genética vegetal é bastante expressiva e poucas espécies (15 a 17%) têm sido cientificamente estudadas para a avaliação de suas qualidades, eficácia clínica e segurança (TEIXEIRA et al., 2003; CALIXTO, 2007; SOARES et al., 2006).

No Brasil, a Resolução RDC 17, propõe o estudo das espécies para comercialização, mas independente disso, as feiras livres e ervanários, algumas pequenas indústrias e farmácias continuam comercializando tais espécies desconhecidas cientificamente (TOLEDO et al., 2003).

Apesar dos riscos, a crescente comercialização é prova clara de que a maioria da população de baixa e média renda continua recorrendo às plantas medicinais como único alívio para seus males (IMS, 1992; SIMÕES et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2007). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 – 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; BAGATINI et al., 2007).

No Brasil, até 1996, a estimativa do consumo de medicamentos sintéticos era em torno de 63%, adquiridos por apenas 20% da população. O restante utilizava os produtos de origem natural, principalmente as plantas medicinais e seus extratos, como a principal ou a única opção terapêutica. Atualmente, 82% da população brasileira aproximadamente, utiliza produtos à base de ervas (AQUINO, 2007).

A recorrência é devido ao fato de que, mesmo com a grande evolução da medicina convencional a partir da segunda metade do século XX, ainda existem dificuldades básicas na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimentos hospitalares à obtenção de exames e medicamentos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

Além disso, a facilidade na aquisição de plantas, o baixo custo, a eficiência na prevenção e no tratamento de doenças, e a tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para a grande utilização desses produtos naturais pelas populações dos países em desenvolvimento (SIMÕES et al., 2003).

Observa-se assim, a importância e a necessidade de se chegar não apenas ao fitoterápico (simples preparação tradicional a partir de partes de uma espécie

medicinal que tenha avaliada sua eficácia, inocuidade e qualidade), mas também ao farmacoterápico (composto quimicamente definido e com atividade farmacológica determinada). Tudo isso de acordo com as exigências da legislação em vigor e considerando os aspectos de preservação das reservas naturais dentro da perspectiva do desenvolvimento sustentável (DI STASI, 1996; TOLEDO et al., 2003).

Neste contexto social em que as plantas medicinais adquirem importância como agentes terapêuticos, faz-se necessário não só a busca de provas científicas quanto à segurança e eficácia terapêutica destas plantas, mas também o apoio governamental com o objetivo de aproximar grupos de pesquisadores interdisciplinares, multifuncionais e interinstitucionais, privilegiando aquelas pesquisas que compreendem toda a cadeia de produção de determinada espécie de interesse até a determinação de doses e ensaios clínicos, contribuindo desta forma, para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e farmacoterápicos (BRESOLIN e CECHINEL FILHO, 2003; TOLEDO et al., 2003).

### **1.1 Objetivo Geral**

Contribuir para o estudo fitoquímico, guiado pelo bioensaio de inibição da linfoproliferação *in vitro*, da espécie *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau.

### **1.2 Objetivos Específicos**

Determinação e quantificação por RMN  $H^1$  dos princípios ativos do extrato das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bureau.

### **1.3 Justificativa**

O nosso grupo faz parte do projeto do Milênio do Semi-Árido para o estudo da biodiversidade do Semi-Árido nordestino, cabendo ao grupo realizar o estudo fitoquímico (determinação do princípio ativo) de cinco espécies de plantas escolhidas pelo IMSEAR (INSTITUTO DO MILÊNIO DO SEMI-ÁRIDO), com base em um trabalho de seleção de plantas ativas quanto à atividade tripanocida, linfoproliferação, inibição de  $\cdot NO$  e atividade antibiótica. Entre estas cinco espécies

encontra-se a *Zeyheria tuberculosa*, cuja fração clorofórmica da partição do extrato bruto das folhas, feita pelo IMSEAR, apresentou-se ativa quanto à inibição da linfoproliferação e por isso a planta nos foi enviada para o isolamento do(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) por esta atividade.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A espécie *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau

A espécie *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau (Figura 01), de acordo com a linha filogenética de Arthur Cronquist (BASTOS, 2008) apresenta a seguinte classificação sistemática:

**Domínio:** Eukaryota

**Reino:** Plantae

**Sub reino:** Viridaeplantae

**Filo:** Tracheophyta

**Sub filo:** Euphylllophytina

**Infra filo:** Radiatopses

**Classe :** Magnoliopsida

**Sub classe :** Lamiidae

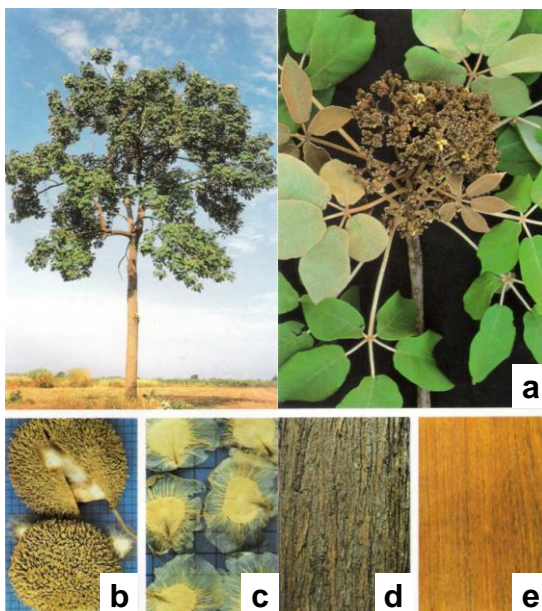
**Super ordem:** Lamianae

**Ordem:** Scrophulariales

**Família:** Bignoniaceae

**Gênero:** *Zeyheria*

**Espécie:** *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau



**Figura 01.** *Zeyheria tuberculosa*; **(a)** Folhas e Flores, **(b)** Frutos, **(c)** Sementes **(d)** Casca **(e)** Madeira.

**Fonte:** [http://www.achetudoeregiao.com.br/Arvores/Zeyheria\\_tuberculosa.htm](http://www.achetudoeregiao.com.br/Arvores/Zeyheria_tuberculosa.htm), acessado em novembro de 2007.



A família Bignoniaceae, é representada por mais de 100 gêneros e 800 espécies com distribuição pantropical, sendo o maior número de espécies desta família encontradas no Neotrópico (MACHADO et al., 2006).

O gênero *Zeyheria* é composto pelas espécies *Z. barbata* Miq., *Z. digitata* Miq., *Z. fluvialis* Miq., *Z. hamburiana* Corr. Mello, *Z. kuntzei* K. Shum., *Z. surinamensis* Miq., *Z. velloziana* Miers, *Z. montana* Mart., *Z. digitalis* (Vell.) Hoehne e *Z. tuberculosa* (Vell) Bureau (BASTOS, 2008).

A espécie *Z. tuberculosa* recebe vários nomes populares como ipê-tabaco, ipê-felpudo, bucho-de-carneiro, bucho-de-boi, ipê branco, bucho de bode e ocorre no Brasil em área de mata atlântica a florestas decíduas de São Paulo a Pernambuco, em altitudes de 50-1000 m (ZIDKO, 2002; LUCCHESI, 2006).

A árvore é de médio a grande porte, atinge mais de 30 m de altura. Possui folhas em tufos terminais, opostas cruzadas, pentadigitadas, grandes (40-60 cm de comprimento x 25-40 cm de largura), com pecíolo longo (15-30 cm), grosso, roliço e felpudo. A folha inteira, assim como o resto da planta, é recoberta por um tomento espesso, semelhante a um veludo, pulverulento, sendo desta característica a origem do nome felpudo (FERREIRA e LUZ, 1985).

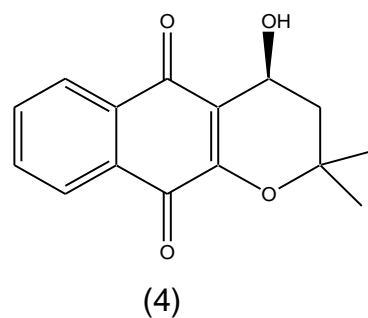
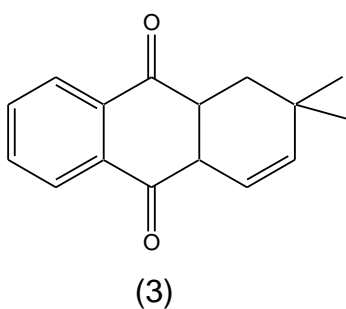
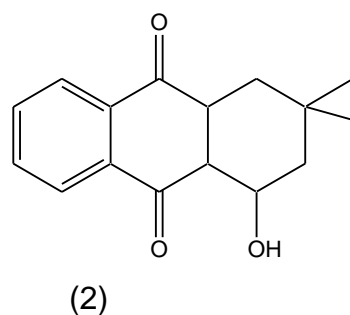
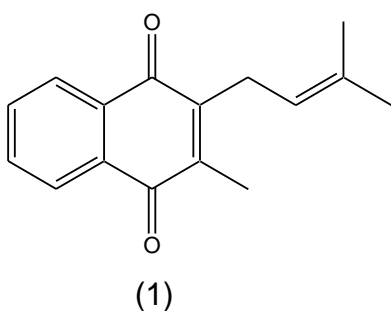
A inflorescência surge após a brotação das folhas, em panícula terminal com 20-30 cm, densa, ereta, piramidal, felpuda, com dezenas de pequenas flores (menos de 2 cm) pouco vistosas. O fruto possui cápsula do tipo siliqua, lenhosa, grande (desde 13x10 cm até 20x15 cm), achatada, oval a oblonga e externamente muricada, isto é, revestida de densas expansões semelhantes a um pêlo grosso, com 1-2 cm de espessura, pulverulentas, sendo esta a razão do nome da espécie, *Z. tuberculosa*, termo alusivo a pequenas saliências; pelo mesmo motivo, vulgarmente também é conhecida por bucho-de-boi (FERREIRA e LUZ, 1985).

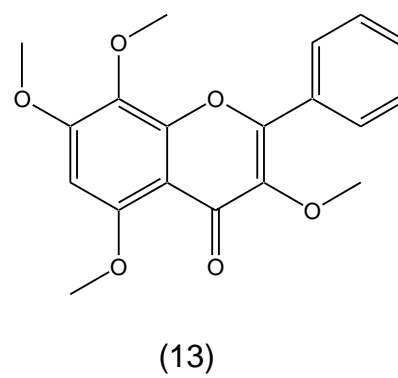
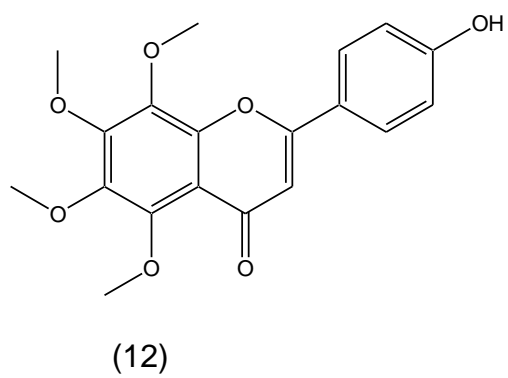
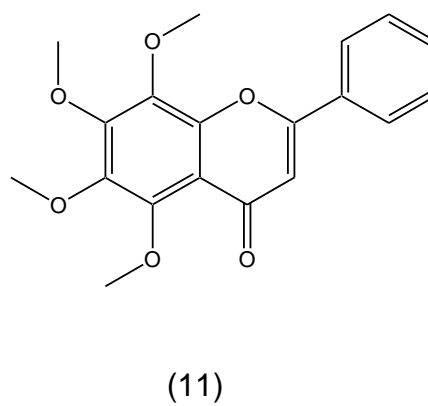
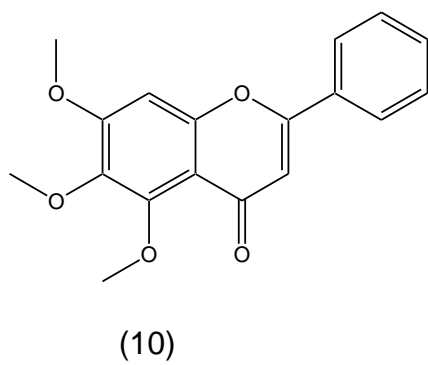
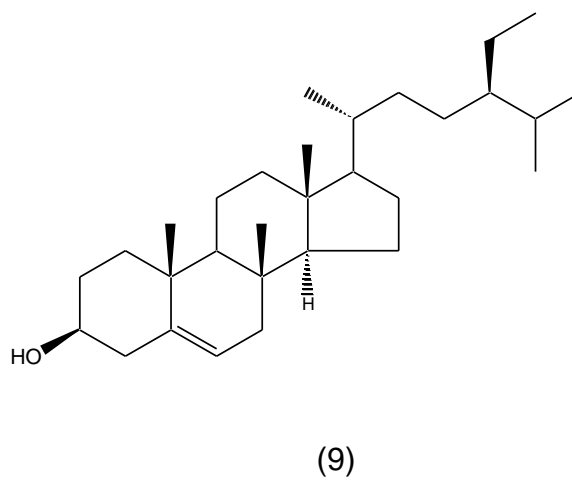
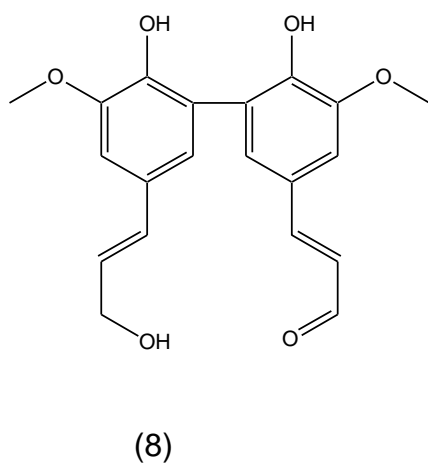
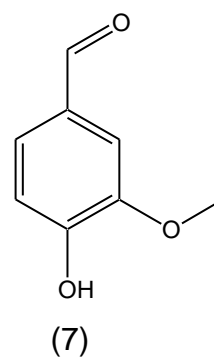
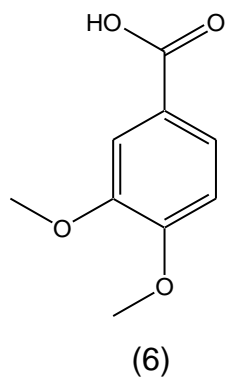
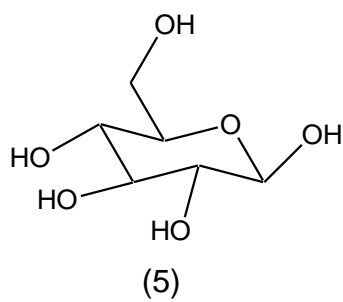
As sementes são aladas, achatadas; núcleo cordiforme, branco-amarelado, felpudo, com 2 cm ou menos de diâmetro e não possuem dormência, germinando facilmente entre 1 e 2 semanas quando colocadas sob uma fina camada de solo ou palha umidoso (FERREIRA e LUZ, 1985).

Espécies pertencentes à família Bignoniaceae (*Jacaranda micranta* Cham., *Tabebuia caraiba* Bur., *Tecoma sambucifolia* Kunth e *T. stans* L.) foram bastante utilizadas como anestésico, antiinflamatório, anticoncepcional, antisifilítico e antireumático por culturas indígenas da América do Sul (BASTOS, 2008).

Quanto às espécies do gênero *Zeyheria*, as raízes da *Z. montana* são bastante usadas na medicina popular contra as doenças de pele. Há indicação de que o extrato aquoso da *Z. tuberculosa* seja utilizado no tratamento do câncer, e estudos biológicos realizados com o caule desta espécie revelou atividade antimicrobiana (BASTOS, 2008; SILVEIRA et al., 1975; WEINBERG et al., 1976). A fração clorofórmica desta espécie apresentou-se ativa quanto à inibição da linfoproliferação, em testes feitos pelo IMSEAR.

A literatura descreve o estudo fitoquímico de três espécies do gênero *Zeyheria*: a *Z. Montana* M., onde da madeira (extratos benzênico e etanólico) foi isolada uma naftoquinona, o Lapachol (1), e das raízes os quinóides  $\alpha$ -Lapachona (2), o Desidro- $\alpha$ -Lapachona (3) e o 4-hidroxi- $\alpha$ -Lapachona (4) (JÁCOME et al., 1999; MAGANHA et al., 2006); a *Z. digitalis* (Vell.), de onde foi isolado a D-glicose (5), o Ácido Verátrico (6), a Vanilina (7), o Lapachol (1), a lignana Zeyherol (8) e o  $\beta$ -Sitosterol (9) (SILVEIRA et al., 1975; FACCIONE et al., 2004); e a *Z. tuberculosa* (Vell) Bureau, onde do extrato da folha foram isolados a lignana Zeiherol (8), os flavonóides 5,6,7-Trimetoxiflavona (10), 5,6,7,8-Tetrametoxiflavona (11), 4'-Hidroxi-5,6,7,8-Tetrametoxiflavona (12) e 3,5,7,8-Tetrametoxiflavona (13), o Lapachol (1),  $\alpha$ -Lapachona (2), o Desidro- $\alpha$ -Lapachona (3) o 4-Hidroxi- $\alpha$ -Lapachona (4) e o  $\beta$ -Sitosterol (9) (BASTOS, 2008; GRAHAM et al., 2000; KUTNEY e HANSSEN, 1971; WEINBERG et al.; 1976).





## 2.2 Linfoproliferação

A Linfoproliferação está relacionada à imunomodulação, que é um mecanismo fisiológico de regulação da resposta imunológica, que estimula ou suprime esta resposta. Portanto, a imunomodulação divide-se em imunoestimulação e imunossupressão (RUBEL, 2006).

A imunoestimulação implica diretamente na estimulação do sistema imune e potencialização da resposta de defesa. Ao contrário, a imunossupressão implica principalmente no decréscimo da atividade do sistema imune, ocorrendo devido a vários fatores genéticos, ambientais e terapêuticos, favorecendo o estabelecimento de infecções, mas sendo, porém, de suma importância no sucesso dos transplantes (PATWARDHAN et al., 1990; MAKARE et al., 2001).

A imunossupressão pode ser não-específica, como na administração de agentes imunossupressores (medicamentos, radiação) ou pela diminuição de linfócitos, ou pode ser específica como na dessensibilização ou administração simultânea de antígenos e drogas imunossupressivas, sendo uma das principais causas da imunossupressão a administração de fármacos para impedir a rejeição de um órgão transplantado ou o transplante de medula óssea (SILVA e FIGUEIREDO, 1998).

Nas últimas décadas, o aumento do número de órgãos transplantados levou a um incremento e aperfeiçoamento da terapêutica imunossupressora, objetivando a preservação do órgão transplantado com um mínimo de efeitos colaterais para o doente. Mais de 40 doenças decorrentes de respostas imunológicas são passíveis de tratamento com agentes inibidores da resposta imune (STITES et al., 2000).

As respostas imunes e inflamatórias podem ser modificadas por certas classes de fármacos: Os corticosteróides, com ação moduladora da ativação de macrófagos (essa ativação leva à produção de  $\cdot\text{NO}$  entre outros mediadores imunológicos) e linfócitos, que suprimem as respostas imunes e reduzem a inflamação; e os imunossupressores não corticosteróides que impedem a rejeição de órgãos transplantados e podem ser utilizados no tratamento da doença auto-imune (RUDNICK, 2003).

Considerando as necessidades de controle e equilíbrio entre as duas atividades (a imunoestimulação e a imunossupressão) para o funcionamento

imunológico normal, a busca por novos medicamentos com baixa toxicidade e mais eficazes no tratamento das imunopatologias, e o fato da grande diversidade vegetal do nosso planeta poder ser uma importante fonte de substâncias com atividade imunomoduladora, desde a década de 80 a identificação e caracterização de compostos naturais com atividade imunomodulatória tem se apresentado como área de interesse científico (COSTA et al., 2008; PHILLIPSON, 2003).

A linfoblastogênese, ou ensaio de proliferação de linfócitos, é um dos modelos *in vitro* empregados para avaliar o efeito desses compostos naturais sobre a proliferação celular (DEVI et al., 2003).

### **2.3 Considerações Gerais sobre Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A espectroscopia de RMN foi desenvolvida no final da década de 1940 objetivando-se o estudo das propriedades de núcleos atômicos. Em 1951, os químicos perceberam que a espectroscopia de RMN também poderia ser usada para determinar as estruturas de substâncias orgânicas (SILVERSTEIN, 1998).

Segundo esse estudo, os núcleos de alguns elementos, como  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , comportam-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Desta forma, se um composto contendo  $\text{H}^1$  ou  $\text{C}^{13}$  for colocado em um campo magnético muito forte e irradiado simultaneamente com energia eletromagnética, os seus núcleos podem absorver energia através de um processo chamado de ressonância magnética. Nesse contexto, “ressonância” refere-se à transição do spin nuclear entre os níveis de energia  $\alpha$  e  $\beta$  em resposta à radiação de radiofrequência (KOSKELA, 2005; SILVERSTEIN, 1998).

Essa absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para o composto, sendo a absorção medida em espectrômetros de RMN. Para isso dois tipos de espectrômetros podem ser utilizados: os de Onda Contínua (OC) e os de Transformada de Fourier (TF) (BENTO, 1997; GIL e GERALDES, 1987).

- **Método de Onda Contínua (CO):**

No espectrômetro de onda contínua utiliza-se um ímã que gera um campo magnético e um oscilador de frequência de rádio. A condição de ressonância pode

ser obtida de duas maneiras: irradiando a amostra com energia eletromagnética de frequência variável, enquanto que o campo magnético é mantido constante, ou ainda irradiá-la com frequência constante, enquanto a força do campo magnético é variada (KOSKELA, 2005).

Estas duas abordagens são chamadas de frequência varrida e campo varrido, respectivamente, e nas duas técnicas, a amostra está em contínua irradiação da radiofrequência transmitida. Cada núcleo é excitado individualmente, levando-se vários minutos para ser fornecido o espectro, originado diretamente como uma função da frequência (BENTO, 1997; WILLIAMS e FLEMING, 1987).

- Método de Transformada de Fourier (TF)

Ao contrário do método OC, no qual cada núcleo é irradiado com frequências consecutivas, a amostra é irradiada por um pulso curto e poderoso de rádio frequência, que excita todos os núcleos simultaneamente. Quando os núcleos relaxam, produzem um sinal complexo chamado decaimento livre da indução (FID) (GIL e GERALDES, 1987; SILVA, 2002).

Um computador converte as informações que são fornecidas como uma função do tempo (FID) para um formato em função da frequência, através de uma operação matemática chamada Transformada de Fourier, produzindo um espectro em poucos segundos. Neste espectro podem ser explorados, entre outras características, o deslocamento químico (posição do sinal), os acoplamentos (interações) mostrados pelos sinais desdobrados e a área do pico (integração) (HOLLER et al., 2002).

- Deslocamento Químico ( $\delta$ ) em ppm

Em uma determinada molécula alguns núcleos estão em regiões de maior densidade eletrônica do que os outros e, como resultado, os núcleos absorvem energia em forças de campos magnéticos ligeiramente diferentes. Conseqüentemente, os sinais para esses prótons ocorrem em posições diferentes no espectro de RMN. A posição na qual um sinal aparece no espectro de RMN é chamada deslocamento químico, e esse deslocamento depende do ambiente

magnético de cada núcleo, do efeito anisotrópico, do efeito do solvente e das ligações de hidrogênio (GIL e GERALDES, 1987; SILVERSTEIN, 1998).

Os deslocamentos químicos são medidos em uma escala de ( $\delta$ ). Diz-se que os sinais à esquerda do espectro aparecem em campo baixo (alta frequência) e aqueles à direita aparecem em campo alto (baixa frequência). Uma característica observada é a relação entre o número de sinais no espectro e o número de diferentes tipos de núcleos de hidrogênio no composto (PARELLA, 1998; WILLIAMS e FLEMING, 1987).

- Acoplamento (J) em Hz

A multiplicidade de um sinal em um espectro de RMN aparece como uma consequência das interações magnéticas entre núcleos com spin ( $I \neq 0$ ) transmitido através das ligações da molécula e isto é conhecido como acoplamento escalar (spin-spin). O sinal de RMN de um núcleo acoplado para “n” núcleos equivalentes com spin I será dividido em um multipletto com  $(2nI+1)$  linhas (KOSKELA, 2005).

À distância, em hertz (Hz), entre duas linhas, ou seja, entre dois picos adjacentes de um sinal de RMN desdobrado, é chamado de constante de acoplamento (J). No caso do acoplamento a três ligações em fragmentos H-C-C-H, o J irá depender do ângulo diedro, no qual a relação de Karplus correlaciona o valor da constante de acoplamento com o ângulo diedro (SILVA, 2002; MACKIN, 1996).

- Integração

No cálculo das áreas de cada sinal, o mais importante não é a sua altura, mas a área abaixo deste sinal. Esta área é proporcional ao número de hidrogênios que deram origem ao sinal. O programa que gera o espectro mede essas áreas automaticamente e constrói curvas de integração sob cada sinal (SHOOLERY, 1972; SILVERSTEIN, 1998).

- Relaxação Nuclear

Existem dois tipos principais de processos de relaxação em RMN: a relaxação spin-rede (ou longitudinal) e a relaxação spin-spin (ou transversal). A relaxação

longitudinal é um decaimento exponencial de primeira ordem, caracterizado por um tempo de relaxação  $T_1$  (tempo de vida médio dos núcleos no estado de maior energia). A relaxação transversal também é um processo de primeira ordem, que pode ser caracterizada por um tempo de relaxação  $T_2$ , sendo a causa do alargamento das linhas de RMN (MACKIN, 1996; HOLLER et al., 2002).

- RMN de  $^{13}\text{C}$

Os espectros de  $\text{C}^{13}$  são normalmente menos complexos e mais fáceis de interpretar do que os espectros de RMN  $\text{H}^1$ . Um aspecto dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  que simplifica o processo de interpretação é que cada núcleo de carbono em uma molécula orgânica produz apenas um pico de RMN de  $\text{C}^{13}$ , isto por que os efeitos do acoplamento carbono-carbono, responsáveis pelo desdobramento de sinais em picos múltiplos, são cancelados (HOLLER et al., 2002; PARELLA, 1998).

Os núcleos de  $\text{C}^{13}$  são de baixa abundância, de pequena razão giromagnética e de sensibilidade baixa. Os espectros de RMN de  $\text{C}^{13}$  só podem ser obtidos por espectrômetros de pulso de RMN TF, onde se torna possível o acúmulo de FIDs (HOLLER et al., 2002; REIF et al., 1996).

- DEPTs

Na interpretação de um espectro de RMN de  $\text{C}^{13}$  é de grande utilidade identificar quais sinais pertencem ao núcleo de C (quaternário), CH (metínico),  $\text{CH}_2$  (metilênico) e  $\text{CH}_3$  (metila). Para as aplicações de rotina, os experimentos DEPT 90 e DEPT 135, são suficientes. O DEPT 90 gera somente os sinais dos grupos CH, enquanto que o DEPT 135 gera sinais negativos para os núcleos de carbono em grupos  $\text{CH}_2$  e sinais positivos para os grupos CH e  $\text{CH}_3$  (SILVA, 2002).

- Experimentos de RMN Bidimensionais

- COSY (Homonuclear Correlation Spectroscopy)



Um dos experimentos de RMN 2D aplicado ao  $^1\text{H}$  é chamado de espectroscopia de correlação  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (COSY). No espectro COSY, sinais de correlação são observados quando dois núcleos interagem um com o outro através de um acoplamento escalar. Com esta técnica é possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por  $^{2-3}J_{\text{H,H}}$  (acoplamentos geminais e vicinais), discernindo a multiplicidade dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (PARELLA, 1998; KAISER, 2000).

- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Através dessa técnica, que depende dos acoplamentos  $^1J_{\text{C,H}}$ , pode-se distinguir os carbonos que contêm os hidrogênios já anteriormente assinalados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , ou vice-versa. O espectro apresenta um eixo horizontal, dimensão  $F_2$ , que corresponde ao  $\delta_{\text{H}}$  e um eixo vertical, dimensão  $F_1$ , correspondente ao  $\delta_{\text{C}}$  (KAISER, 2000; SILVA et al., 2005).

- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

O experimento HMBC, normalmente realizado para a caracterização estrutural de moléculas orgânicas naturais e sintéticas, é uma técnica de correlação heteronuclear que fornece informações sobre as interações escalares entre prótons e carbonos a longa distância e separados por duas, três ou quatro ligações covalentes (SILVA et al., 2005; RICCIO et al., 2003).

- NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)

O NOESY tem o aspecto de um COSY e a sua utilização permite que correlações espaciais, estreitamente espaçadas, entre núcleos sejam observadas simultaneamente em uma única experiência. Assim, esta técnica mostra as correlações que envolvem interações devidas ao NOE entre hidrogênios que estão espacialmente próximos, estabelecendo a configuração de cada hidrogênio na molécula, podendo definir a geometria molecular do composto em estudo (BENTO, 1997; KAISER, 2000).

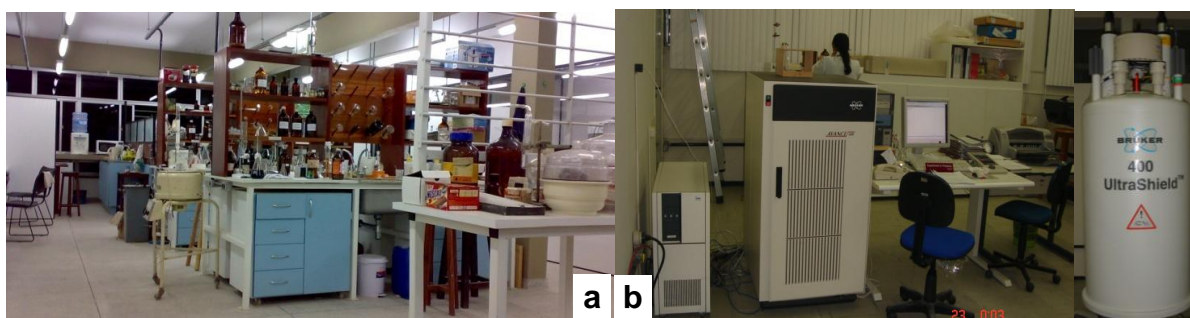
### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1 Local de Realização do Trabalho

A coleta do material botânico foi realizada em Salinas (MG) pelo grupo de botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), dentro do projeto do Milênio de estudo da biodiversidade nordestina (IMSEAR).

Os procedimentos de preparação do extrato e de isolamento, purificação e identificação estrutural dos constituintes químicos do extrato etanólico das folhas de *Z. tuberculosa* foram realizados nos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais (Figura 02-a), e de Ressonância Magnética Nuclear (Figura 02-b), do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

Os ensaios de atividades biológicas (inibitória da linfoproliferação) dos extratos e frações de *Z. tuberculosa* foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz em Salvador-BA.



**Figura 02.** Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais **(a)**, Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear **(b)**

#### 3.2 Material Botânico

A espécie *Z. tuberculosa* foi coletada em agosto de 2006, na cidade de Salinas (MG), pela Dra. Tânia Ribeiro, e selecionada no projeto do Milênio de estudo da biodiversidade nordestina – IMSEAR. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário de Plantas Medicinais da UEFS em Feira de Santana (BA), com o n° 186.

### **3.3 Material, Equipamento, Método de Extração e Purificação**

**3.3.1 Solventes** - Os solventes utilizados foram: etanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e água destilada, sendo que na preparação do extrato bruto, nas partições, filtrações e colunas cromatográficas os solventes utilizados foram destilados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, enquanto que nas cristalizações e recristalizações foram utilizados solventes de grau PA (Merck).

**3.3.2 Análise cromatográfica** - O adsorvente utilizado nas filtrações e separações cromatográficas em coluna foi o gel de sílica G 60 (70-230 Mesh ASTM, Merck, Darmstadt - Alemanha) e nas análises feitas através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se como adsorvente a sílica gel 60 PF254 da Merck (Darmstadt - Alemanha). Na preparação das placas de CCD foi utilizado um espalhador mecânico com espessura de 0,25 mm, para a distribuição da suspensão de sílica com água destilada (10 mL) sobre as placas de vidro, que foram ativadas em estufa a 100° por uma hora. Também foram utilizadas placas de CCD da Merck (Merck, Darmstadt - Alemanha); o comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas variaram conforme as quantidades das amostras e de gel de sílica utilizados. A quantidade da sílica foi de 20 a 25 vezes a quantidade da amostra.

**3.3.4 Reveladores** - Os cromogramas nas cromatoplasmas foram visualizados por irradiação com Luz na região do Ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, por imersão em cuba com Iodo, seguindo-se por borrifação com Sulfato Cérico, ou Anisaldeído, ou solução de Ácido Fosfomolibdico 5% ou solução de Liebermann-Burchard. As placas após borrifação foram aquecidas em estufa por 5 minutos, a 100 °C.

- Para a solução de Sulfato Cérico dissolveu-se 2,1 g de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  em uma solução contendo 21 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 50 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se mais água destilada completando o volume da solução para 300 mL.

- Para a solução de Anisaldeído foi preparada uma mistura de 3 mL de Anisaldeído com 150 mL de Ácido Acético Glacial, a qual foi adicionada a uma solução de 6 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 141 mL de água destilada.

- Para a solução de Ácido Fosfomolibdico 5% dissolveu-se 5 g de Ácido Fosfomolibdico em 100 ml de Álcool Etílico a quente (80-90°C), por 5 minutos.
- Para a solução de Liebermann-Burchard misturou-se 50 mL de Anidrido Acético com 10 gotas de Ácido Sulfúrico concentrado.

**3.3.5 Método de Extração** - Na preparação do extrato etanólico utilizou-se uma forrageira para trituração das folhas (Nogueira, Itapia - São Paulo) e um extrator de aço inoxidável para extração (Fabra - São Paulo). As concentrações das soluções contendo grandes volumes de solventes foram efetuadas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, enquanto que as soluções contendo pequenos volumes foram concentradas à temperatura ambiente em capela de exaustão.

**3.3.6 Método de Purificação** - O procedimento de isolamento do princípio ativo do extrato etanólico envolveu um conjunto de técnicas seqüenciais como: a partição líquido-líquido, a coluna filtrante de sílica, a cromatografia em coluna de sílica e cristalização. Esse conjunto de técnicas fez-se necessário por que o extrato bruto da planta utilizada é rico em diversos componentes e sua análise cromatográfica direta seria extremamente trabalhosa, por isso o uso prévio da partição líquido-líquido e da coluna filtrante permitiu o fracionamento do extrato etanólico bruto em misturas menos complexas e em número pequeno, facilitando o trabalho de isolamento. A pureza das substâncias isoladas foi visualizada pela obtenção de uma só mancha na placa cromatográfica, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes.

**3.3.7 Espectrômetros** - Os espectros de RMN unidimensionais ( $H^1$ ,  $C^{13}$ , DEPT 135, DEPT 90) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) foram realizados em espectrômetro BRUKER AVANCE (400 MHz para  $H^1$  e 100 MHz para  $C^{13}$ ). Os deslocamentos químicos dos sinais dos carbonos dos solventes deuterados utilizados foram expressos em escala de  $\delta$  (delta). A espectrometria de massas foi realizada em aparelho Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A acoplado ao cromatógrafo gasoso. Foram obtidos os espectros de massas por ionização química com isobutano no modo positivo. Os espectros na região do Infravermelho da substância ZTC9, foram feitos em solução de KBr na forma de pastilhas.

**3.3.8 Polarímetro** - A rotação óptica foi realizada em polarímetro Rudolph Research Analytical (AUTOPOL IV, Automatic Polarimeter), em cubeta de 10 cm, utilizando-se o comprimento de onda de 589 nm a temperatura de 26,6 °C.

### **3.4 Etapas de Isolamento do Princípio Ativo**

#### **3.4.1 Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Folhas de *Z. tuberculosa***

As folhas secas de *Z. tuberculosa* (5400 g) foram trituradas a pó em uma forrageira (Nogueira, Itapira – São Paulo). O material depois de pulverizado foi submetido à extração com 20 L de Etanol a 90 % a temperatura ambiente ( $26 \pm 1$  °C) por 3 dias e filtrado. O procedimento de extração com o resíduo foi repetido por três vezes. Após evaporação do solvente por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório a 50 °C e remoção da água residual em dessecador obteve-se o respectivo extrato bruto (600,45 g), identificado como ZTB.

#### **3.4.2 Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de *Z. tuberculosa***

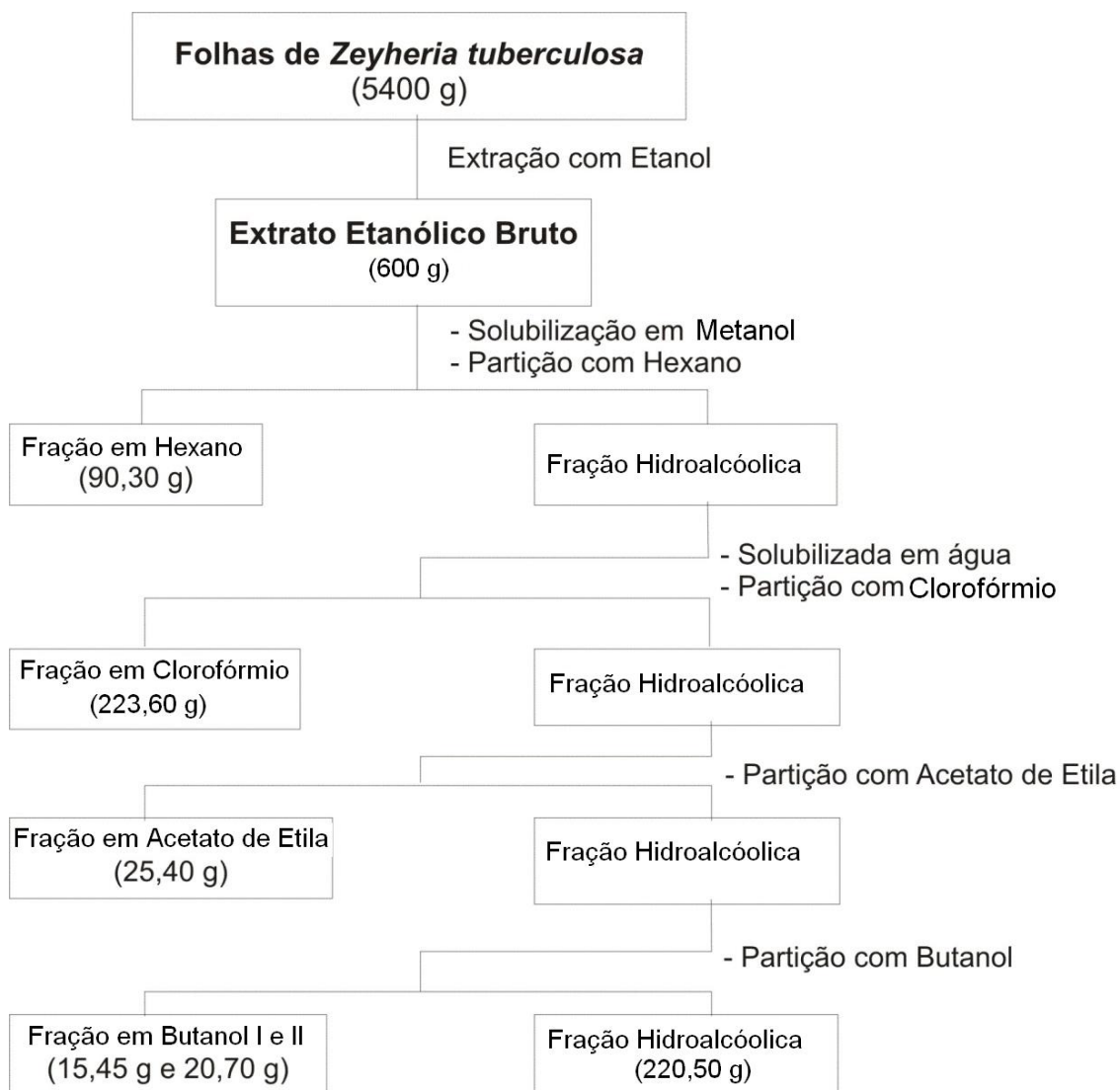
Uma suspensão de 100 g do extrato etanólico bruto em uma solução de Água/Metanol (3:2) foi extraída sucessivamente com Hexano (4 x 500 mL), Clorofórmio (4 x 500 mL), Acetato de Etila (4 x 500 mL) e Butanol (4 x 500 mL). O processo foi realizado seis vezes. Após remoção do solvente por destilação a pressão reduzida foram obtidas seis frações em Hexano (ZTP1) (90,30 g; 13,59 %), Clorofórmio (ZTP2) (223,60 g; 33,65 %), Acetato de Etila (ZTP3) (25,40 g; 3,82 %), Butanol I (ZTP4) (15,45 g; 2,33 %), Butanol II (ZTP5) (20,70 g; 3,11 %) e Hidroalcolica (ZTP6) (220,5 g; 20,39 %) (Fluxograma 1, p. 22).

A partição com Butanol deu origem a duas frações: ZTP4 e ZTP5. Isto aconteceu porque à medida que a fase butanólica foi sendo concentrada as primeiras coletas apresentaram-se como sendo um concentrado oleoso, já as últimas coletas quando concentradas mostraram-se sólidas, por isso a fase foi separada em duas frações, butanólica I (oleosa) e butanólica II (sólida).

No projeto do Milênio do Semi-Árido estas frações já tinham sido preparadas e submetidas aos ensaios de atividade inibitória da linfoproliferação, na

FIOCRUZ/BA. A fração clorofórmica apresentou-se ativa quanto à inibição da linfoproliferação. Por isso, a ZTP2 também foi a fração escolhida, nesta nova partição, para dar continuidade ao processo de isolamento do princípio ativo.

**Fluxograma 1.** Partição Líquido-Líquido do Extrato ZTB das Folhas de *Z. tuberculosa*.



### 3.4.3 Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB

Após solubilização em Clorofórmio, a fração ZTP2 (215,0 g) foi incorporada em gel de sílica ativada utilizando como solvente: Hexano, Clorofórmio, Metanol e mistura dos mesmos, fornecendo nove frações identificadas conforme mostra a

tabela 01, as quais foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com Anisaldeído, Sulfato Cérico e/ou vapores de Iodo.

A análise das frações provenientes da ZTP2 em CCD serviu de suporte para esta próxima cromatografia, onde foi selecionada para fracionamento a fração em clorofórmio identificada por ZTF3. Esta fração foi escolhida porque estava mais pura a olho nu.

**Tabela 01.** Filtração da Fração ZTP2 Proveniente do Extrato ZTB

<b>Fração da Filtração</b>	<b>Peso da Amostra</b>
Hexano (ZTF1)	0,40 g
Hexano/Clorofórmio 1:1 (ZTF2)	105,80 g
Clorofórmio (ZTF3)	10,80 g
Clorofórmio/Metanol 2% (ZTF4)	15,75 g
Clorofórmio/Metanol 5% (ZTF5)	12,25 g
Clorofórmio/Metanol 10% (ZTF6)	21,25 g
Clorofórmio/Metanol 20% (ZTF7)	24,50 g
Clorofórmio/Metanol 1:1 (ZTF8)	13,25 g
Metanol (ZTF9)	9,00 g

#### **3.4.4 Filtração da Fração ZTF3 Proveniente da Fração ZTP2**

A fração ZTF3 (10,50 g) de cor verde-escura, após solubilização em clorofórmio, foi incorporada em sílica gel ativada e submetida a cromatografia em uma coluna de sílica (200 g). Foram utilizados como solventes: Hexano, Clorofórmio, Metanol e mistura dos mesmos, fornecendo oito frações, conforme mostra a tabela 02 (p. 24).

Essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com Anisaldeído, Sulfato Cérico e/ou vapores de Iodo.

**Tabela 02.** Filtração da Fração ZTF3 Proveniente da Fração ZTP2

<b>Fração da Filtração</b>	<b>Peso da Amostra</b>
Hexano/Clorofórmio 1:1 (ZTF3.1)	0,06 g
Clorofórmio (ZTF3.2)	2,55 g
Clorofórmio/Metanol 2% (ZTF3.3)	5,25 g
Clorofórmio/Metanol 5% (ZTF3.4)	1,80 g
Clorofórmio/Metanol 10% (ZTF3.5)	0,50 g
Clorofórmio/Metanol 20% (ZTF3.6)	0,16 g
Clorofórmio/Metanol 1:1 (ZTF3.7)	0,07 g
Metanol (ZTF3.8)	0,03 g

#### **3.4.5 Filtração da Fração ZTF3.3 Proveniente da Fração ZTF3**

Após a análise das frações da filtração da ZTF3 através de cromatografia em camada delgada (CCD) e revelação com Sulfato Cérico, foi realizada então uma filtração com a fração identificada como ZTF3.3 (5,0 g) de maior massa. Esta fração foi solubilizada em Clorofórmio e incorporada em gel de sílica ativada utilizando como solventes: Hexano, Clorofórmio, Metanol e mistura dos mesmos, fornecendo cinco frações, identificadas como mostra a tabela 03.

Essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD usando Sulfato Cérico como revelador. Todas as frações desta filtração mostraram ser iguais na CCD e por isso foram reunidas e fracionadas em uma coluna cromatográfica.

**Tabela 03.** Filtração da Fração ZTF3.3 Proveniente da Fração ZTF3

<b>Fração da Filtração</b>	<b>Peso da Amostra</b>
Hexano/Clorofórmio 30 % (ZTF3.3.1)	2,20 g
Hexano/Clorofórmio 30 % (ZTF3.3.2)	1,30 g
Hexano/Clorofórmio 1:1 (ZTF3.3.3)	1,15 g
Hexano/Clorofórmio 1:1 (ZTF3.3.4)	0,10 g
Clorofórmio (ZTF3.3.5)	0,05 g



### **3.4.6 Fracionamento Cromatográfico I, Cristalização e Recristalização das Frações Reunidas da Filtração da ZTF3.3**

O material obtido após a reunião das frações da filtração da ZTF3.3 (4,80 g), foi solubilizado em Clorofórmio, incorporado em sílica (8 g) e submetido a uma cromatografia em coluna de sílica gel. Foram utilizados como fase móvel os seguintes solventes: Hexano, Clorofórmio, Metanol e misturas destes. Foram coletadas 85 subfrações com um volume de 5 mL cada. Essas subfrações, após análise comparativa através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes e revelação com ácido fosfomolibídico e sulfato cérico, foram reunidas conforme a Tabela 04 (p. 26).

As subfrações, na análise comparativa através de CCD, mostravam uma grande quantidade de clorofila. O trabalho de isolamento de constituintes de extratos de folhas normalmente apresenta como problema a remoção da clorofila, pois a sua natureza química e cor forte se torna um problema na purificação dos compostos.

Para a remoção da clorofila, as frações foram lavadas com acetona. O processo foi satisfatório, possibilitando a cristalização de um sólido de cor branca, que foi separado de sua água-mãe de cor verde por filtração em funil de buckman.

O sólido foi solubilizado com Etanol (P. A.), a quente, a seguir submetido a ultrassom e após 24 h, foi filtrado em um funil de Büchner. Seguiram-se recristalizações de cada subfração e análise em CCD. A subfração (48 – 78) mostrou dois pontos na placa e devido à quantidade foi selecionada para fracionamento em coluna (II).

As subfrações (1), (2 - 4) e (79 - 85) não foram trabalhadas devido à pequena quantidade e complexidade demonstrada em CCD. As demais subfrações codificadas conforme mostra a Tabela 04 (p. 26) demonstraram em CCD apenas um ponto na placa, e apesar da semelhança entre si receberam códigos diferentes e foram levadas para análise de RMN.

**Tabela 04.** Fracionamento Cromatográfico das Frações Reunidas da Filtração da Fração ZTF3.3

<b>Subfrações Reunidas</b>	<b>Condição de Eluição</b>	<b>Massa (g) das Subfrações</b>	<b>Substâncias Isoladas</b>
(1)	Clorofórmio/Hexano 1:1	0,12	
(2 – 4)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,08	
(5 – 9)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,59	ZTC1
(10 – 19)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,68	ZTC2
(20 – 21)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,24	ZTC3
(22 – 31)	Clorofórmio/Hexano 2:1	1,04	ZTC4
(32 – 34)	Clorofórmio	0,53	ZTC5
(35 – 47)	Clorofórmio	1,98	ZTC6
(48 – 78)	Clorofórmio/Metanol 5 %	4,55	
(79 – 85)	Clorofórmio/Metanol 10 %	0,04	

#### **3.4.7 Fracionamento Cromatográfico II, Cristalização e Recristalização da Subfração (48 – 78) Proveniente da Coluna I**

A subfração (48 – 78) (4,00 g), proveniente da coluna I foi solubilizada em Clorofórmio/Metanol 5%, incorporada em gel de sílica e submetida a uma cromatografia em coluna de sílica (100 g). Foram coletadas 56 subfrações com um volume médio de 5 mL cada, utilizando-se como fase móvel Hexano, Clorofórmio, Metanol e mistura destes. Essas subfrações, após análise comparativa através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes e revelação com Ácido Fosfomolibídico e Sulfato Cérico, foram reunidas em 8 grupos (Tabela 05, p 27).

**Tabela 05.** Fracionamento Cromatográfico da Subfração (48 – 78)

Subfrações Reunidas	Condição de Eluição	Massa(g)	Substâncias Isoladas
(1 – 3)	Hexano/Clorofórmio (30%, 40%, 50%)	0,81	
(4 – 12)	Hexano/Clorofórmio (60%, 80%)	0,31	
(13 – 19)	Clorofórmio e Clorofórmio/Metanol (2%, 5%)	0,41	ZTC7
(20 – 26)	Clorofórmio/Metanol (5%, 10%)	0,18	ZTC8
(27 – 31)	Clorofórmio/Metanol (10%, 20%)	0,17	ZTC9
(32 – 34)	Clorofórmio/Metanol (20%)	0,30	
(35 – 42)	Clorofórmio/Metanol (20%, 50%)	0,79	
(43 – 56)	Metanol	0,39	

As subfrações (1 - 3) e (4 - 12) são oleosas e mostraram-se complexas em CCD, As subfrações (32 - 34), (35 - 42) e (43 - 56) demonstraram, após análise comparativa em CCD, possuírem o mesmo sólido encontrado na subfração (27 - 31), além de várias outras substâncias, e por isso não foram trabalhadas. As subfrações (13 - 19), (20 -26) e (27 - 31), apresentaram um único ponto em CCD, foram solubilizadas com Etanol (P. A.) a quente, a seguir submetido a ultrassom. Após 24 h, foram filtradas em um funil de Büchner.

Após recristalizações sucessivas em Etanol, obteve-se um produto sólido de cor branca, para cada uma das três amostras codificadas como mostra a Tabela 05. Estas três subfrações foram submetidas à análise de RMN.

### 3.4.8 Fracionamento Cromatográfico III, Cristalização e Recristalização da Fração ZTF3.2

A fração ZTF3.2, tabela 02 (p. 24), (2,30 g) foi lavada com acetona, seguindo-se cristalização de grande quantidade de um sólido de cor branca, que foi separado de sua água-mãe de cor verde com o auxílio de uma pipeta. O sólido foi então recristalizado em Etanol (PA). A análise em CCD mostrou mais de um ponto na placa, sendo necessário o seu fracionamento cromatográfico.

A fração ZTF3.2 (2,30 g) foi solubilizada em Clorofórmio, incorporada em gel de sílica e submetida a uma cromatografia em coluna de gel de sílica (50 g). Foram coletadas 35 subfrações com um volume médio de 5 mL cada, utilizando-se como fase móvel Hexano, Clorofórmio e mistura destes.

Essas subfrações, após análise comparativa através de CCD, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes e revelação com ácido fosfomolibídico e sulfato cérico, mostraram-se puras e semelhantes às subfrações (ZTC 1 - 6) já isoladas da coluna I. Apesar da semelhança, as frações 10, 19 e 27, escolhidas de forma aleatória, receberam códigos diferentes como ZTC10, ZTC11 e ZTC12 (Tabela 06), sendo então enviadas para identificação e posterior comparação com as subfrações isoladas da coluna I.

**Tabela 06.** Fracionamento Cromatográfico da Fração ZTF3.2

Subfrações	Condição de Eluição	Massa (g)	Substâncias Isoladas
(10)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,06	ZTC10
(19)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,11	ZTC11
(27)	Clorofórmio/Hexano 2:1	0,09	ZTC12

### 3.5 Prospeção Fitoquímica

Foram realizados os testes de prospecção fitoquímica com o extrato ZTB das folhas da *Zeyheria tuberculosa*, seguindo-se a descrição de Matos, 1997. Os métodos utilizados nesta abordagem são apenas qualitativos. Para os testes foram utilizados sete tubos de ensaio, numerados de 1 a 7. Em cada tubo foram colocados 3 mg do extrato solubilizados em 4 mL de Etanol.

#### 3.5.1. Teste para Fenóis e Taninos

Para esse teste foram utilizadas duas soluções que já estavam preparadas:

- Solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) – Adicionou-se 9 g de  $\text{FeCl}_3$  em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico 3 mol.L<sup>-1</sup>. Em seguida completou-se o volume para 100 mL com etanol, em um balão volumétrico.

- Solução de HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> – Adicionou-se 33,3 mL de HCl concentrado em água destilada suficiente para 100 mL de solução, em um balão volumétrico.

No tubo de ensaio de número 1 foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup>. Agitou-se bem e observou-se a variação de cor e a formação de precipitado verde escuro abundante. Este resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e  $\text{FeCl}_3$ . A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis). A cor verde indica a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

#### 3.5.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides

Para este teste foi preparada um solução de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> dissolvendo-se 4 g deste reagente em água destilada para 100 mL de solução em balão volumétrico. O tubo de número 2 foi acidulado com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> a pH 3 e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados com NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> a pH 8,5 e 11, respectivamente. A observação de

qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado na tabela 07.

**Tabela 07.** Variação de Coloração Observada nos Tubos (I)

Constituintes	Cor		
	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
	Ácido pH = 3	Alcalino pH = 8,5	Alcalino pH = 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul – Púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas Vermelha	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

### 3.5.3 Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas

O tubo 5 foi acidulado por adição de HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> até pH 1 - 3 e o tubo 6 foi alcalinizado com NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> até pH 11. Os tubos foram cuidadosamente aquecidos. Foi observada modificação na coloração por comparação com os tubos com pH correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado na tabela 08.

**Tabela 08.** Variação de Coloração Observada nos Tubos (II)

Constituintes	Cor	
	Tubo 5	Tubo 6
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos Catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

#### **3.5.4 Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas**

No tubo de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da reação indicado pelo fim da efervescência. Comparou-se a cor dos tubos 5 e 7 (acidificados). O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

#### **3.5.5 Teste para Esteroides e Triterpenoides**

Adicionou-se 10 mL de uma solução etanólica do extrato em um béquer e deixou-se secar em banho-maria. Extraíu-se o resíduo seco do béquer com três porções de 2 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com um pouco de algodão, coberta com uma pequena quantidade de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Juntou-se cuidadosamente três gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Tornou-se a agitar suavemente, e foi observado se havia o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

#### **3.5.6 Teste para Saponinas**

Os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, foram solubilizados em água destilada e a solução foi filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por três minutos e observou-se a formação da espuma. Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

### 3.5.7 Teste para Alcalóides

O extrato foi colocado em um tubo de ensaio, solubilizado com metanol e submetido à CCD. Após eluição, a placa foi revelada com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcaloides.

- Preparação do reagente de Dragendorff – 5 g de Subnitrato de Bismuto foram solubilizados em 50 mL de água, seguido da adição de 12 mL de HCl. Em seguida, adicionou-se lentamente e sob agitação, 25 g de Iodeto de Potássio. Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada para 100 mL de solução em balão volumétrico. A 25 mL desta solução foram adicionados 18 mL de Ácido Acético glacial e completou-se o volume para 100 mL com água destilada, obtendo-se o reagente de Dragendorff.

### 3.5.8 Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas

Foram marcados pontos com o extrato em uma placa cromatográfica, a qual foi eluída em clorofórmio. A placa foi borrifada com uma solução de Hidróxido de Potássio a 10%. Observou-se a presença das cores indicativas com luz na região do UV a 365nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica cumarina.

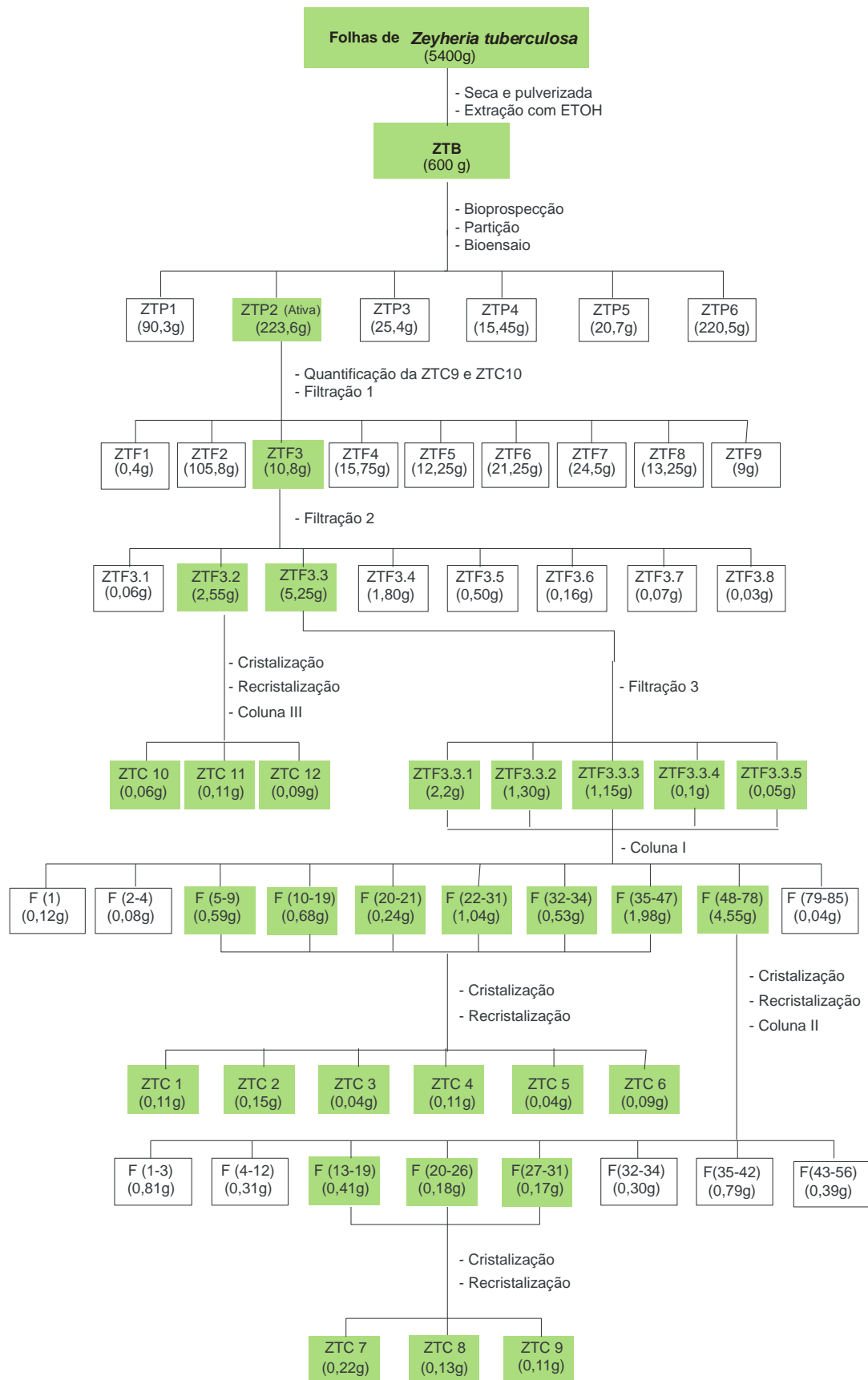
## 3.6 Ensaio Biológico

As folhas de *Z. tuberculosa* foram submetidas aos bioensaios de citotoxicidade, sendo utilizadas células de baço de camundongos isogênicos, inibição da linfoproliferação e atividade tripanocida *in vitro*. Os bioensaios foram executados pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares. A metodologia seguida foi publicada por Costa, 2004.

Todas as etapas experimentais, desde a preparação do extrato etanólico bruto até o isolamento das substâncias, estão representadas no fluxograma 2 (p. 33).



## Fluxograma 2. Esquema geral das etapas experimentais



### 3.7 Resultado da Prospeção Fitoquímica do Extrato ZTB das Folhas de *Z. tuberculosa*

A prospeção fitoquímica teve como objetivo conhecer os constituintes químicos e/ou avaliar sua presença no extrato da planta. Esta metodologia é importante quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse.

A análise fitoquímica preliminar indica os grupos de metabólitos secundários relevantes. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação será direcionada para o isolamento e elucidação estrutural das substâncias desejadas (ESTEVAM, 2006).

A prospeção fitoquímica do extrato etanólico (ZTB) obtido da folha de *Z. tuberculosa* sugeriu os seguintes constituintes químicos: taninos, flavononas, flavonóis, xantonas, esteroides, triterpenos e saponinas (Tabela 09). Sendo que das frações da partição do ZTB que foram submetidas aos ensaios biológicos, a fração que mostrou atividade foi a clorofórmica (ZTP2), e desta somente foram isolados triterpenos, em grande quantidade.

**Tabela 09.** Resultado da Prospeção Fitoquímica do Extrato ZTB da Folha de *Z. tuberculosa*

Constituintes Químicos	Extrato ZTB da Folha de <i>Z. tuberculosa</i>
1- Fenóis	-
2- Taninos	+
1- Antocianinas	-
2- Antocianidinas	-
3- Flavonoides	-
1- Leucoantocianidinas	-
2- Catequinas	-
3- Flavononas	+
1- Flavonóis	+
2- Flavanonóis	-
3- Xantonas	+
1- Esteroides	+
2- Triterpenos	+
1- Saponinas	+
1- Alcaloides	-
1- Antraquinonas	-
2- Antronas	-
3- Cumarinas	-

(+) - Presente; (-) - Ausente.

### 3.8 Resultado do Bioensaio

#### 3.8.1 Atividade Citotóxica do Extrato e Frações das Folhas de *Z. tuberculosa*

Foi feita uma avaliação da citotoxicidade com o objetivo de escolher as concentrações do extrato e frações a serem utilizados no bioensaio de atividade inibitória da linfoproliferação. As concentrações escolhidas foram aquelas que apresentaram uma toxicidade de até 30%. Para a fração clorofórmica, da partição do extrato bruto das folhas de *Z. tuberculosa*, que foi a fração ativa e por isso a escolhida para fracionamento neste trabalho, foi determinada a concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 3.8.2 Atividade Inibitória da Linfoproliferação *in vitro*, da Fração Clorofórmica das Folhas de *Z. tuberculosa*

A fração clorofórmica (ZTP2) da partição do extrato ZTB das folhas da espécie *Z. tuberculosa* apresentou 99,28% de atividade inibidora da linfoproliferação (Tabela 10). Sendo que desta fração ZTP2 foram isolados dois triterpenos pentacíclicos, em grande quantidade.

**Tabela 10.** Apresentação dos Resultados Obtidos Neste Trabalho Acerca da Atividade Inibitória da Linfoproliferação da Fração Ativa ZTP2 da Partição da Folha de *Z. tuberculosa*.

Parte da planta	Fração	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	% Inibição da Linfo. ConA <sup>1</sup>	% Tripanocida <sup>2</sup>
Folha	Clorofórmio (ZTP2)	0,1	99,28	Em teste

<sup>(1)</sup> % Inib. Linfo. ConA: Frações com inibição ≥ 80% são consideradas ativas;

<sup>(2)</sup> % Tripanocida: Frações com redução ≥ 50% são consideradas ativas.

Sendo assim, apesar da ausência de resultados do ensaio da fração clorofórmica quanto à atividade tripanocida e de não terem sido feitos os bioensaios com os compostos isolados da fração ZTP2, os dados são promissores para esta fração.

### 3.9 Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas da Fração ZTP2

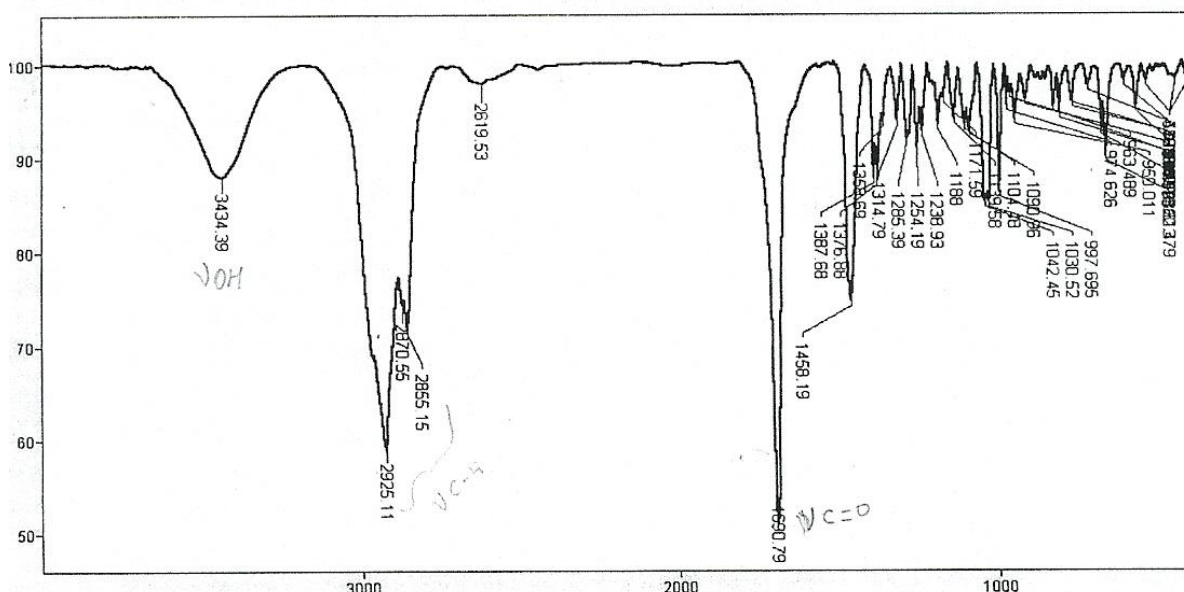
Da fração ativa ZTP2 da partição do extrato ZTB (Fluxograma 1, p. 21) foram isoladas doze substâncias em quantidades significativas. Dessas isolados, seis vieram do fracionamento cromatográfico (coluna I) das frações reunidas da filtração da ZTF3.3, três vieram do fracionamento cromatográfico (coluna II) da subfração (48 – 78) e três vieram do fracionamento cromatográfico (coluna III) da fração ZTF3.2.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dessas amostras comprovaram que as substâncias codificadas como ZTC1, ZTC2, ZTC3, ZTC4, ZTC5, ZTC6, ZTC10, ZTC11 e ZTC12, são iguais entre si, e aquelas codificados como ZTC7, ZTC8, ZTC9 também são iguais entre si, por isso foram tomadas para dar continuidade à identificação apenas as substâncias ZTC9 e ZTC10.

### 3.10 Identificação Estrutural da Substância Codificada como ZTC9

- Infravermelho (IV)

A carbonila carboxílica ( $1690,79\text{ cm}^{-1}$ ) e o grupo hidroxila ( $3434,39\text{ cm}^{-1}$ ) da ZTC9 foram confirmados por análise do espectro do composto na região do Infravermelho (IV) (Figuras 03), (MAHATO e KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

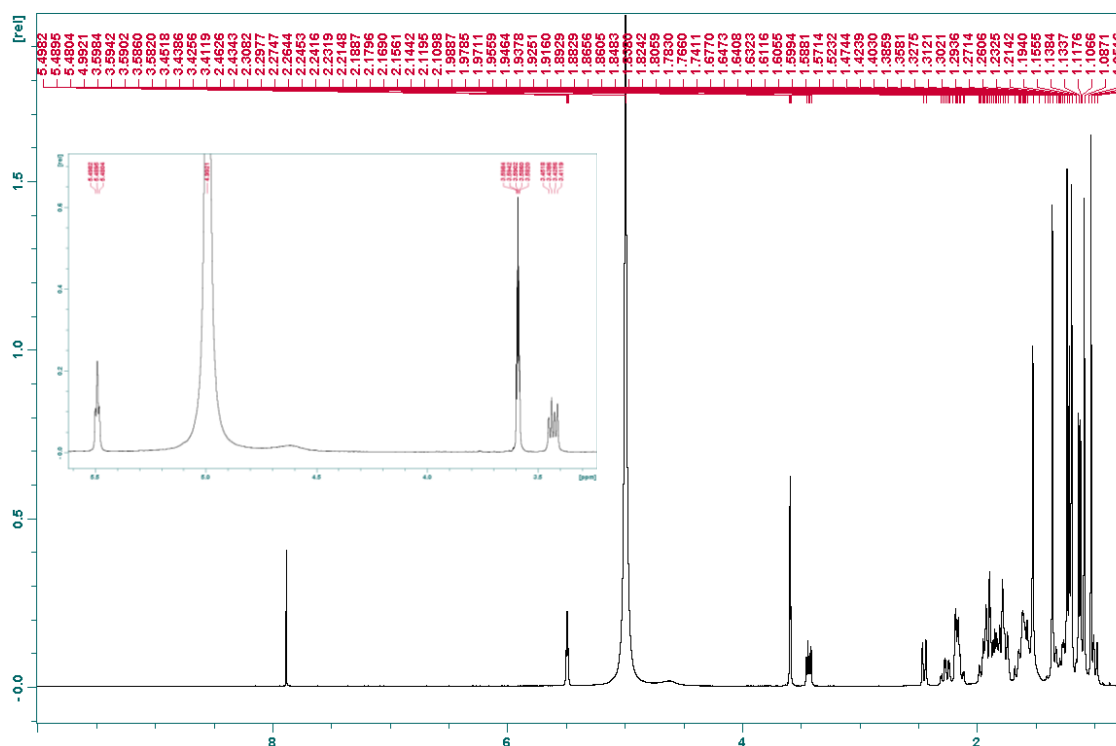


**Figura 03.** Espectro da Substância ZTC9 na Região do Infravermelho [Y=Transmitância/X=número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )]

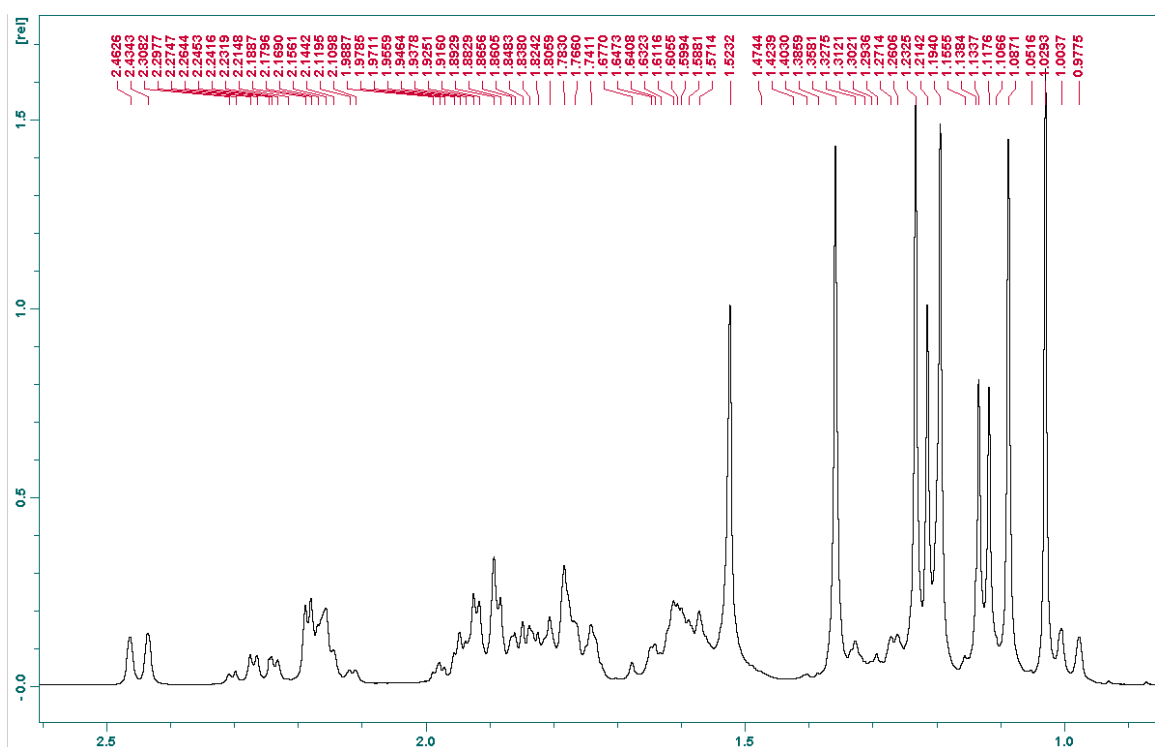
- RMN 1D  $H^1$

A análise do espectro de RMN  $H^1$  da substância codificada como ZTC9, obtido a 400 MHz em  $CDCl_3/MeOD$  (3:1) (Figura 04, p. 38), mostrou 7 sinais na região mais blindada entre  $\delta$  1,03 e 1,36; sendo 5 simpletos (s) ( $\delta$  1,03; 1,09; 1,19; 1,23; 1,36) atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados e 2 dupletos (d) ( $\delta$  1,13;  $J = 6,4$  Hz e  $\delta$  1,20;  $J=8,0$  Hz) relativos aos prótons de metilas ligadas a carbonos monohidrogenados (Figura 05, p. 38); um sinal em  $\delta$  3,43 na forma de um duplo duplete (dd) com constantes de acoplamento ( $J$ ) ( 5,20 Hz e 10,80 Hz), relativo ao hidrogênio carbinólico que está orientado em posição axial; um sinal em  $\delta$  5,49 triplete (t) com  $J = 3,60$  Hz, relativo ao hidrogênio olefínico (Figura 04, p. 38) (ARAÚJO e CHAVES, 2005; JUNGES et al., 2000).

A análise conjunta do espectro de  $H^1$  com os espectros DEPTs, HSQC e COSY, permitiu a identificação de 19 sinais na forma de multipletos (m), sendo 18 relativos aos prótons de grupos metilênicos H ( $\delta$  1,27; 1,91), H ( $\delta$  1,26; 1,85), H ( $\delta$  1,64; 1,80), H ( $\delta$  1,61; 1,79), H ( $\delta$  1,33; 2,17), H ( $\delta$  1,79; 2,18), H ( $\delta$  1,90; 2,27), H ( $\delta$  1,60; 1,75), H ( $\delta$  1,88; 1,94) e um sinal relativo a um próton de grupo metínico H ( $\delta$  1,78), e 4 sinais, sob a forma de dupletos, relativos aos hidrogênios metínicos em  $\delta$  0,99 ( $J=10,48$  Hz),  $\delta$  2,45 ( $J=11,4$  Hz),  $\delta$  1,21 ( $J=8,1$ Hz) e  $\delta$  1,12 ( $J=6,44$ ), referentes a prótons de grupos metínicos. Todos os deslocamentos químicos dos sinais do espectro de  $H^1$  encontram-se na tabela 11 (p. 56).



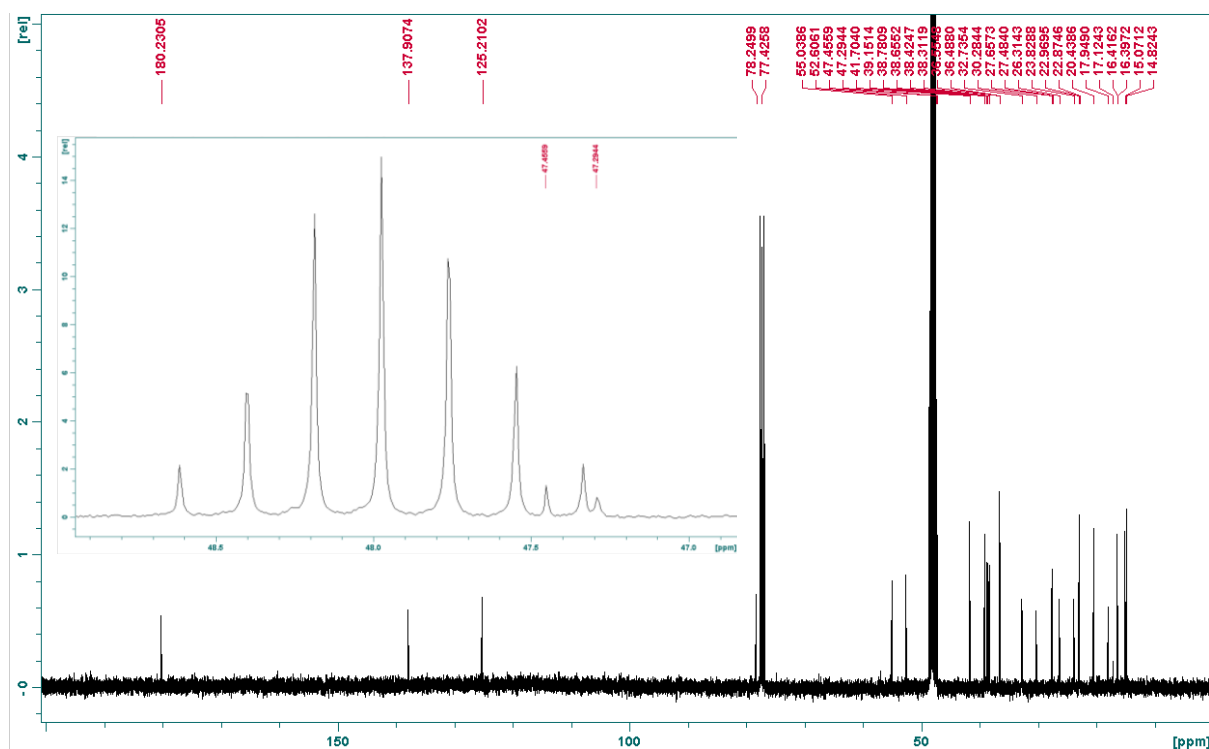
**Figura 04.** Espectro de RMN  $H^1$  de ZTC9 com Expansão, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



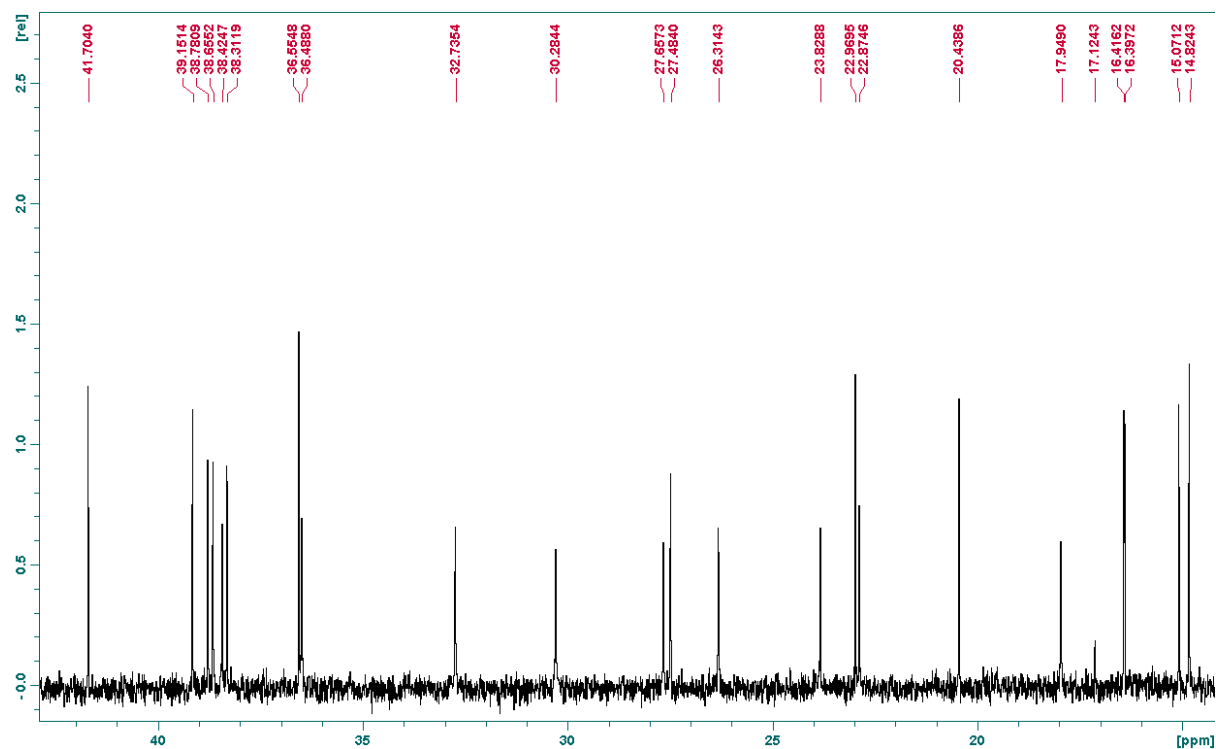
**Figura 05.** Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  de ZTC9, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1

A análise comparativa dos espectros de  $^{13}C$  (Figuras 06 e 07, p. 39-40), DEPT  $90^\circ$  (Figuras 08 e 09, p. 40-41) e DEPT  $135^\circ$  (Figura 10, p. 41) da substância ZTC9 evidenciou uma molécula com um total de 30 átomos de carbonos: sendo 7

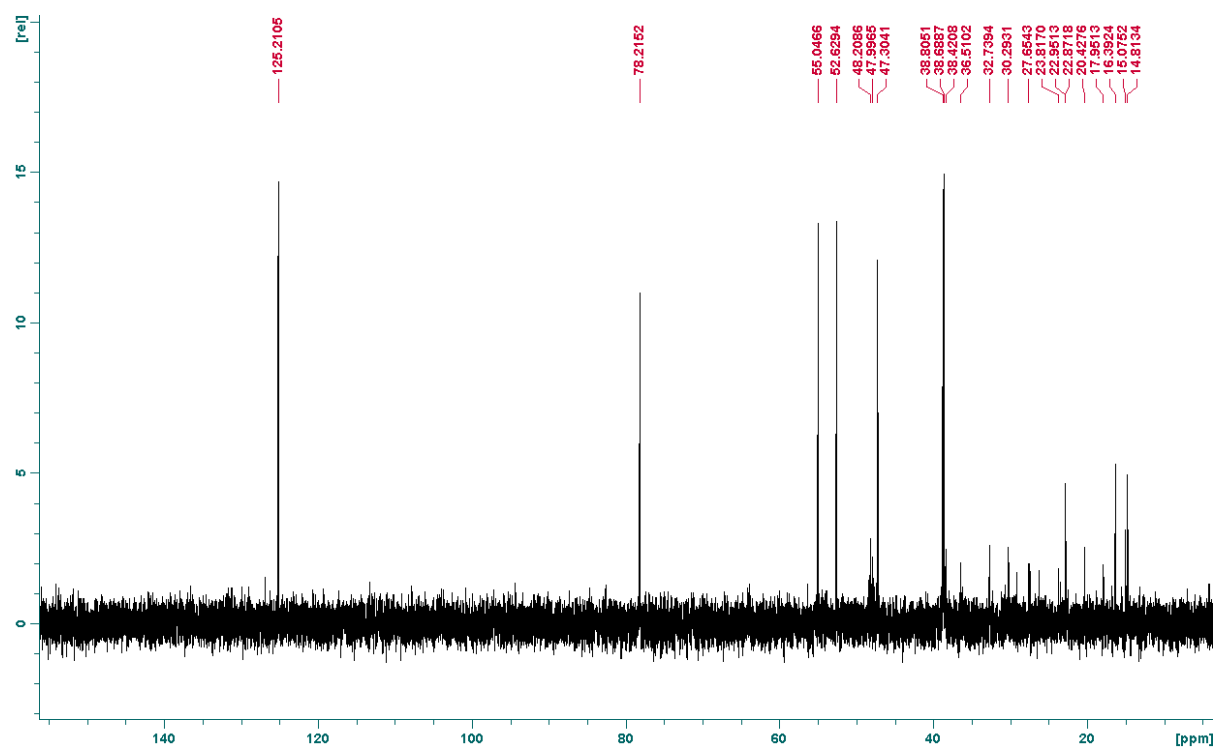
carbonos metílicos ( $\delta$  14,75; 15,00; 16,31; 16,34; 20,36; 22,28; 27,39) e 9 carbonos metilênicos ( $\delta$  17,88; 22,80; 23,76; 26,22; 27,58; 30,22; 32,66; 36,43; 38,35), segundo o DEPT de  $135^\circ$ , 7 carbonos metínicos ( $\delta$  38,60; 38,72; 47,22; 52,54; 54,96; 78,15; 125,13), conforme o DEPT de  $90^\circ$  e 7 carbonos não hidrogenados ( $\delta$  36,48; 38,24; 39,07; 41,63; 47,45; 137,85; 180,26), sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro  $^{13}\text{C}$  por diferença com os DEPTs de  $90^\circ$  e  $135^\circ$  (SILVA, 2006; SOLOMONS e FRYHLE, 2005), conferindo a molécula a indicação de um esqueleto ursânico.



**Figura 06.** Espectro de RMN  $\text{C}^{13}$  de ZTC9 com Expansão, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

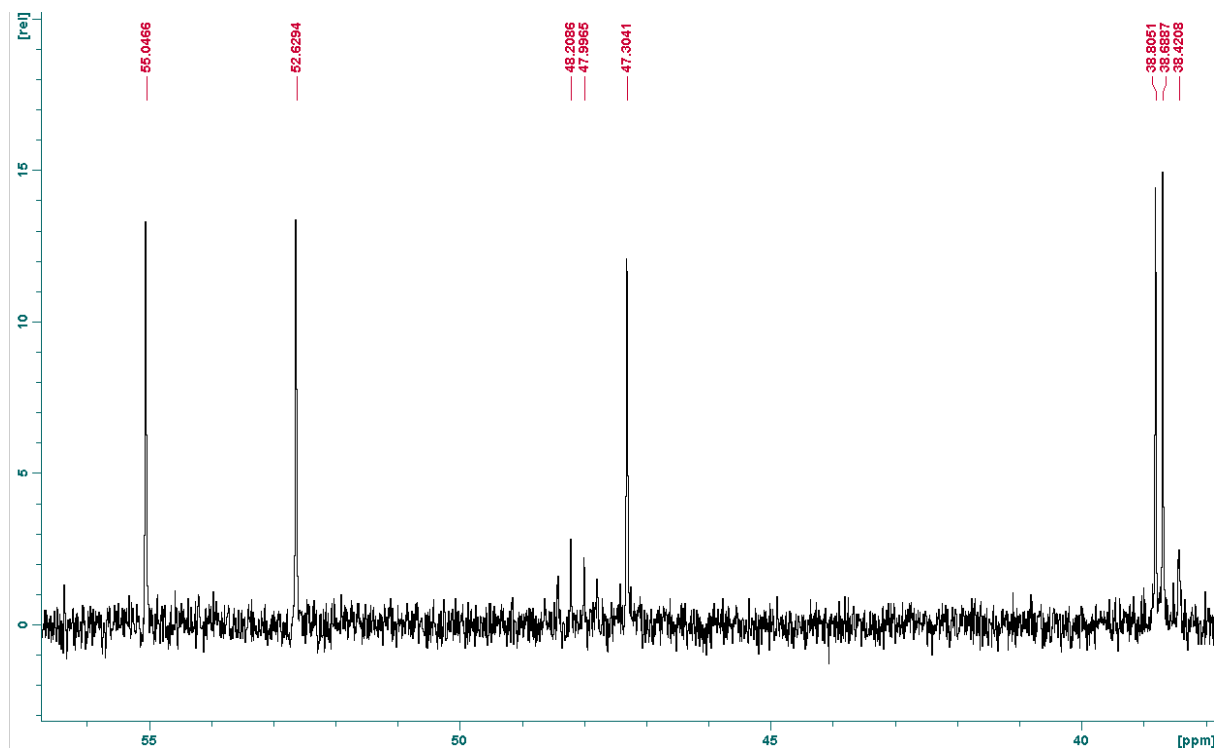


**Figura 07.** Expansão do Espectro de RMN  $C^{13}$  de ZTC9, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1

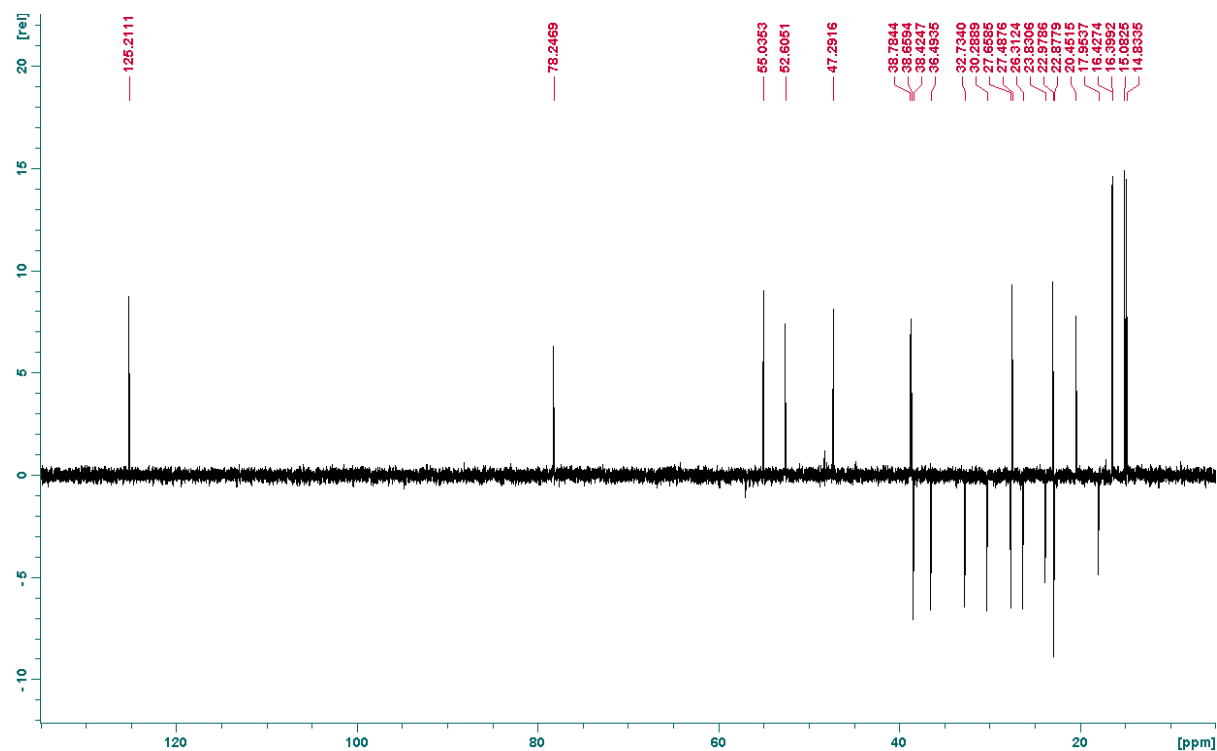


**Figura 08.** Espectro de RMN DEPT  $90^\circ$  de ZTC9, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1





**Figura 09.** Expansão do Espectro de RMN DEPT 90° de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



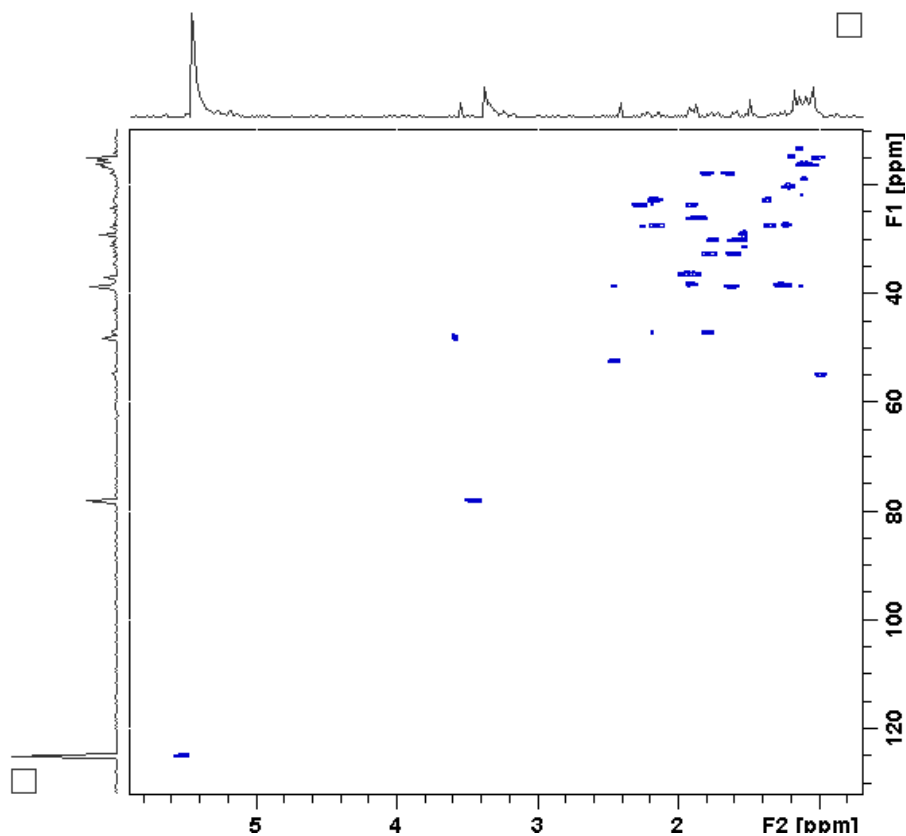
**Figura 10.** Espectro de RMN DEPT 135° de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

Os valores de deslocamento químico sugerem a presença de uma carbonila de um grupo ácido em  $\delta$  180,26. O sinal em  $\delta$  78,15 indica a presença de um carbono carbinólico e os sinais em  $\delta$  125,13 e  $\delta$  137,86 indicam a existência na molécula de uma ligação dupla do tipo trissubstituída, ligação esta característica dos esqueletos ursânicos e oleanânicos (MAHATO e KUNDU, 1994). A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN  $^{13}\text{C}$  encontra-se na tabela 11 (p. 56).

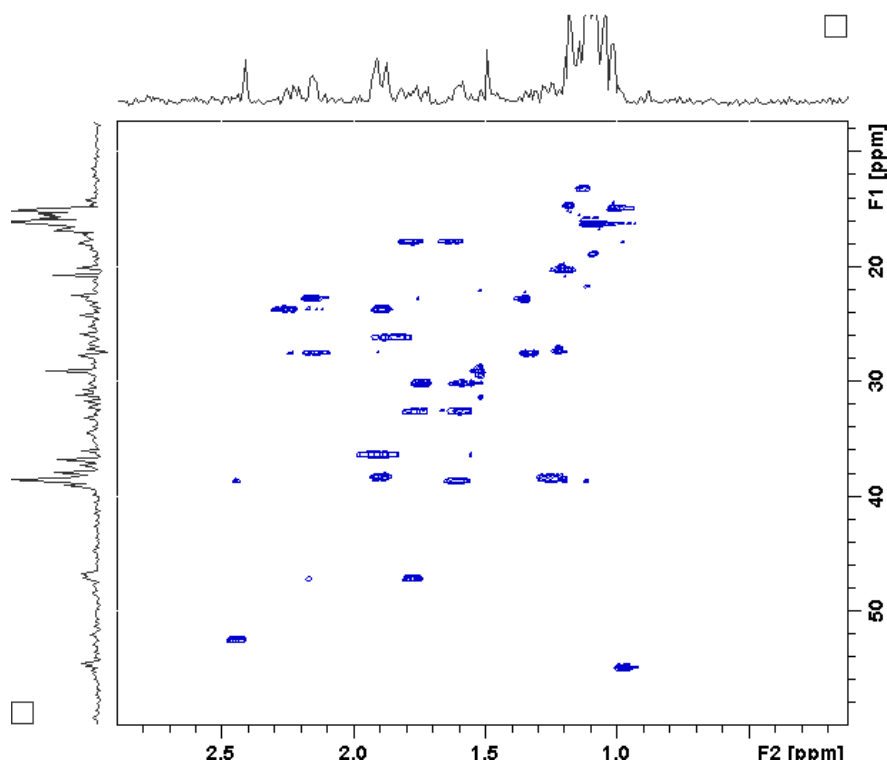
- RMN 2D

Para se obter um mapeamento estrutural mais preciso do composto, do que utilizando somente as técnicas unidimensionais e dados de possíveis compostos similares da literatura, foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ( $^nJ_{\text{H,H}}$ ;  $^nJ_{\text{C,H}}$ ) ou espacial (H,H- ou H,C –NOE) entre si (CARVALHO e BRAZ FILHO, 1992; KAISER, 2000; MALHEIROS et al., 1996).

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância codificada como ZTC9 demonstraram a natureza dos prótons e dos carbonos. Os espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPTs de  $90^\circ$  e  $135^\circ$  possibilitaram a identificação dos sinais dos carbonos quanto aos grupos metila, metileno, metínico e quanto aos carbonos não hidrogenados, mas a numeração dos sinais de carbono foi feita através dos espectros de RMN COSY e HMBC. A identificação dos hidrogênios dos grupos foi feita via RMN HSQC (Figuras 11 e 12, p. 43), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 11, p. 56).



**Figura 11.** Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



**Figura 12.** Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

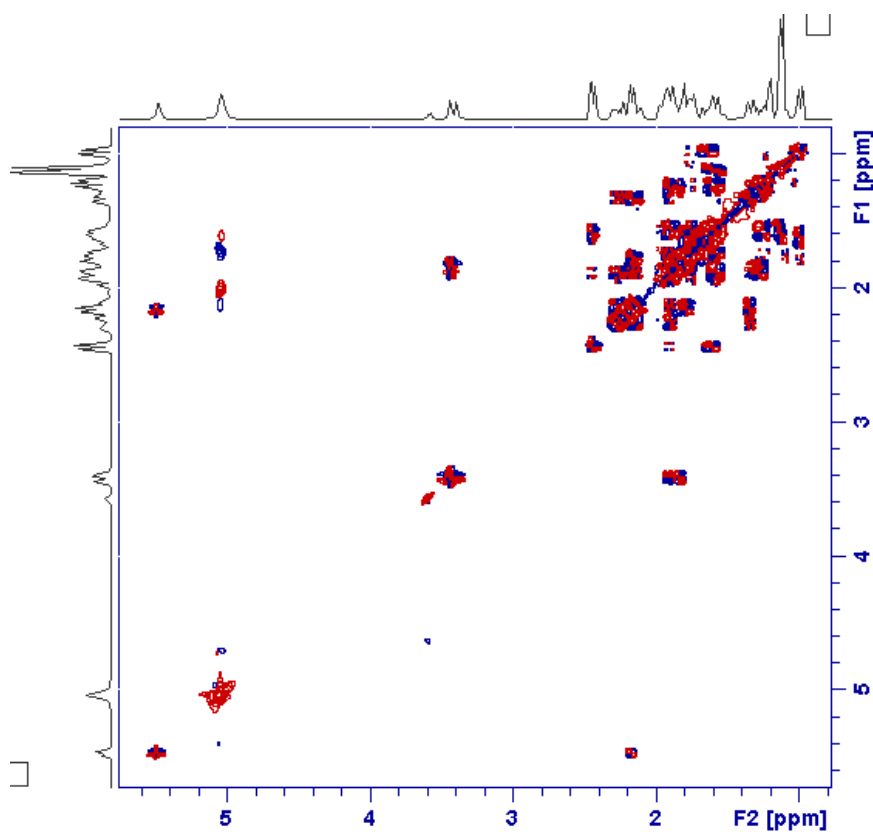
Através do espectro de HSQC observou-se todas as correlações diretas C-H como indicado na tabela 11 (p.56). Este espectro confirma as correlações do hidrogênio carbinólico ( $\delta$  3,43) com o carbono  $\delta$  78,15; do hidrogênio vinílico ( $\delta$  5,49) com carbono  $\delta$  125,13 e dos hidrogênios metílicos ( $\delta$  1,03; 1,09; 1,13; 1,19; 1,20; 1,23; 1,36) com os seus respectivos carbonos ( $\delta$  15,00; 16,31; 16,34; 14,75; 20,36; 27,39; 22,88).

O espectro de RMN de COSY (Figuras 13 a 16, p. 45-46) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por  $^2\text{-}^3J_{\text{H,H}}$  (acoplamentos geminais e vicinais) e ainda por  $^4\text{-}^6J_{\text{H,H}}$ , permitindo assim a montagem de microfragmentos da estrutura.

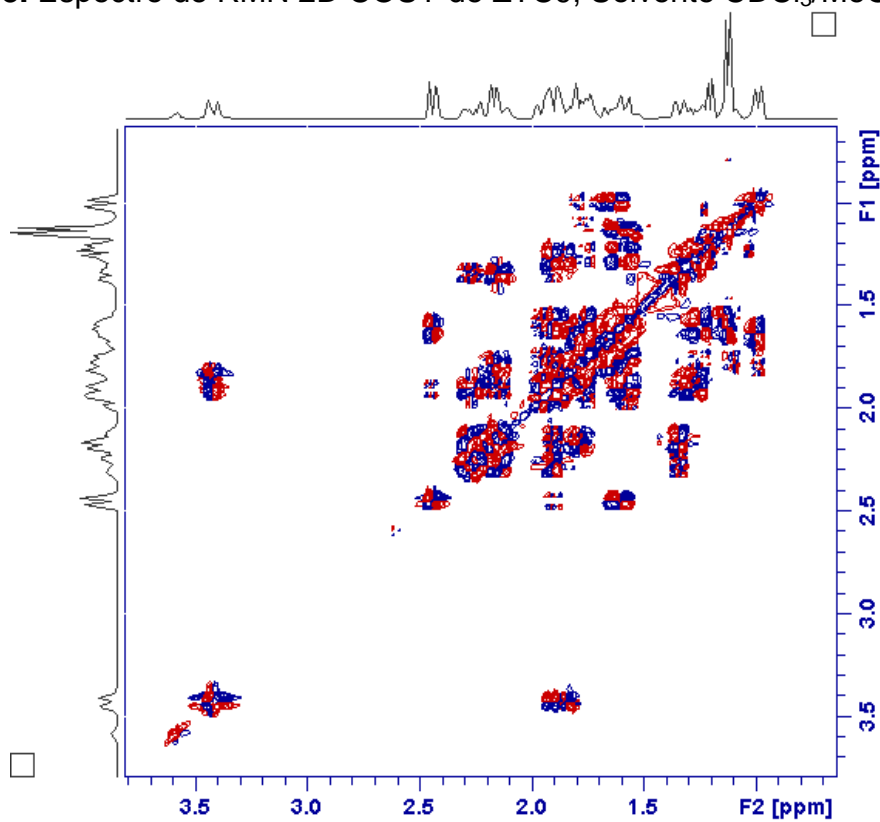
Acoplamentos geminais:  $\text{H}_{1\text{A}}$  ( $\delta$  1,27) e  $\text{H}_{1\text{B}}$  ( $\delta$  1,91),  $\text{H}_{2\text{A}}$  ( $\delta$  1,26) e  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  1,85),  $\text{H}_{6\text{A}}$  ( $\delta$  1,64) e  $\text{H}_{6\text{B}}$  ( $\delta$  1,80),  $\text{H}_{7\text{A}}$  ( $\delta$  1,61) e  $\text{H}_{7\text{B}}$  ( $\delta$  1,79),  $\text{H}_{11\text{A}}$  ( $\delta$  1,33) e  $\text{H}_{11\text{B}}$  ( $\delta$  2,17),  $\text{H}_{15\text{A}}$  ( $\delta$  1,79) e  $\text{H}_{15\text{B}}$  ( $\delta$  2,18),  $\text{H}_{16\text{A}}$  ( $\delta$  1,90) e  $\text{H}_{16\text{B}}$  ( $\delta$  2,27),  $\text{H}_{21\text{A}}$  ( $\delta$  1,60) e  $\text{H}_{21\text{B}}$  ( $\delta$  1,75),  $\text{H}_{22\text{A}}$  ( $\delta$  1,88) e  $\text{H}_{22\text{B}}$  ( $\delta$  1,94).

Acoplamentos vicinais:  $\text{H}_{1\text{A}}$  ( $\delta$  1,27) e  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  1,85),  $\text{H}_{1\text{B}}$  ( $\delta$  1,91) e  $\text{H}_{2\text{A}}$  ( $\delta$  1,26),  $\text{H}_{1\text{B}}$  ( $\delta$  1,91) e  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  1,85),  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  1,85) e  $\text{H}_3$  ( $\delta$  3,43),  $\text{H}_{2\text{A}}$  ( $\delta$  1,26) e  $\text{H}_3$  ( $\delta$  3,43),  $\text{H}_5$  ( $\delta$  0,99) e  $\text{H}_{6\text{A}}$  ( $\delta$  1,64),  $\text{H}_5$  ( $\delta$  0,99) e  $\text{H}_{6\text{B}}$  ( $\delta$  1,80),  $\text{H}_{6\text{A}}$  ( $\delta$  1,64) e  $\text{H}_{7\text{B}}$  ( $\delta$  1,79),  $\text{H}_{6\text{B}}$  ( $\delta$  1,80) e  $\text{H}_{7\text{A}}$  ( $\delta$  1,61),  $\text{H}_9$  ( $\delta$  1,78) e  $\text{H}_{11\text{A}}$  ( $\delta$  1,33),  $\text{H}_9$  ( $\delta$  1,78) e  $\text{H}_{11\text{B}}$  ( $\delta$  2,17),  $\text{H}_{11\text{A}}$  ( $\delta$  1,33) e  $\text{H}_{12}$  ( $\delta$  5,49),  $\text{H}_{11\text{B}}$  ( $\delta$  2,17) e  $\text{H}_{12}$  ( $\delta$  5,49),  $\text{H}_{15\text{B}}$  ( $\delta$  2,18) e  $\text{H}_{16\text{A}}$  ( $\delta$  1,90),  $\text{H}_{15\text{B}}$  ( $\delta$  2,18) e  $\text{H}_{16\text{B}}$  ( $\delta$  2,27),  $\text{H}_{18}$  ( $\delta$  2,45) e  $\text{H}_{19}$  ( $\delta$  1,21),  $\text{H}_{20}$  ( $\delta$  1,12) e  $\text{H}_{21\text{A}}$  ( $\delta$  1,60),  $\text{H}_{20}$  ( $\delta$  1,12) e  $\text{H}_{21\text{B}}$  ( $\delta$  1,75),  $\text{H}_{21\text{A}}$  ( $\delta$  1,60) e  $\text{H}_{22\text{A}}$  ( $\delta$  1,88),  $\text{H}_{21\text{A}}$  ( $\delta$  1,60) e  $\text{H}_{22\text{B}}$  ( $\delta$  1,94).

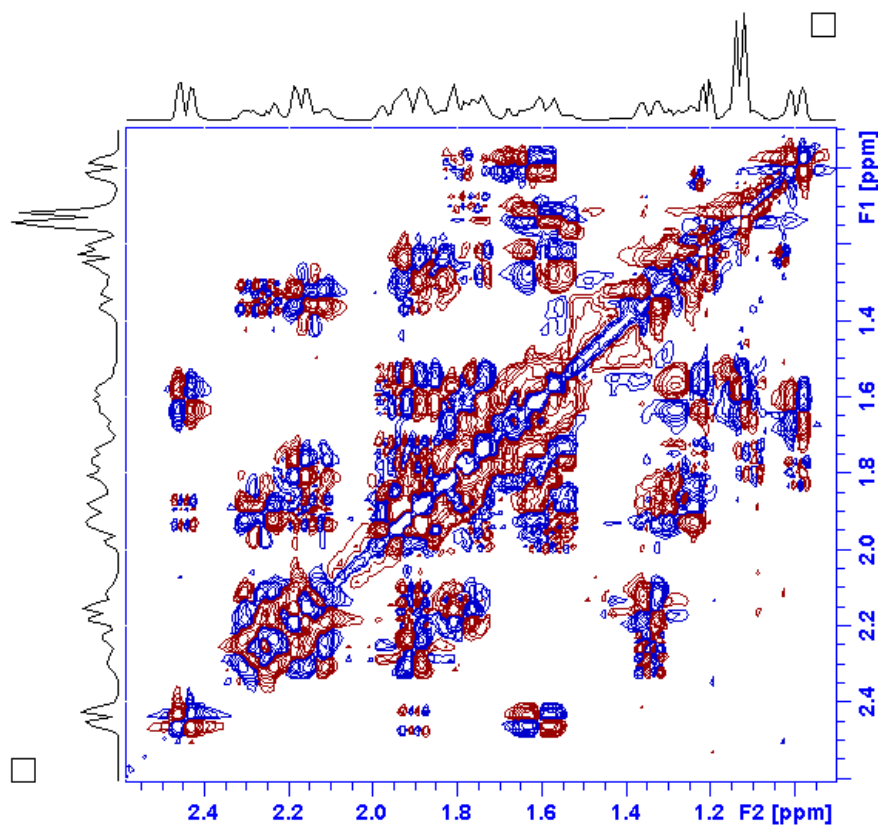
Hidrogênios acoplados por  $^4\text{-}^6J_{\text{H,H}}$ :  $\text{H}_{23}$  ( $\delta$  1,23) e  $\text{H}_{24}$  ( $\delta$  1,03),  $\text{H}_9$  ( $\delta$  1,78) e  $\text{H}_{26}$  ( $\delta$  1,09),  $\text{H}_{12}$  ( $\delta$  5,49) e  $\text{H}_{18}$  ( $\delta$  2,45),  $\text{H}_{18}$  ( $\delta$  2,45) e  $\text{H}_{21\text{A}}$  ( $\delta$  1,60),  $\text{H}_{18}$  ( $\delta$  2,45) e  $\text{H}_{22\text{A}}$  ( $\delta$  1,88).



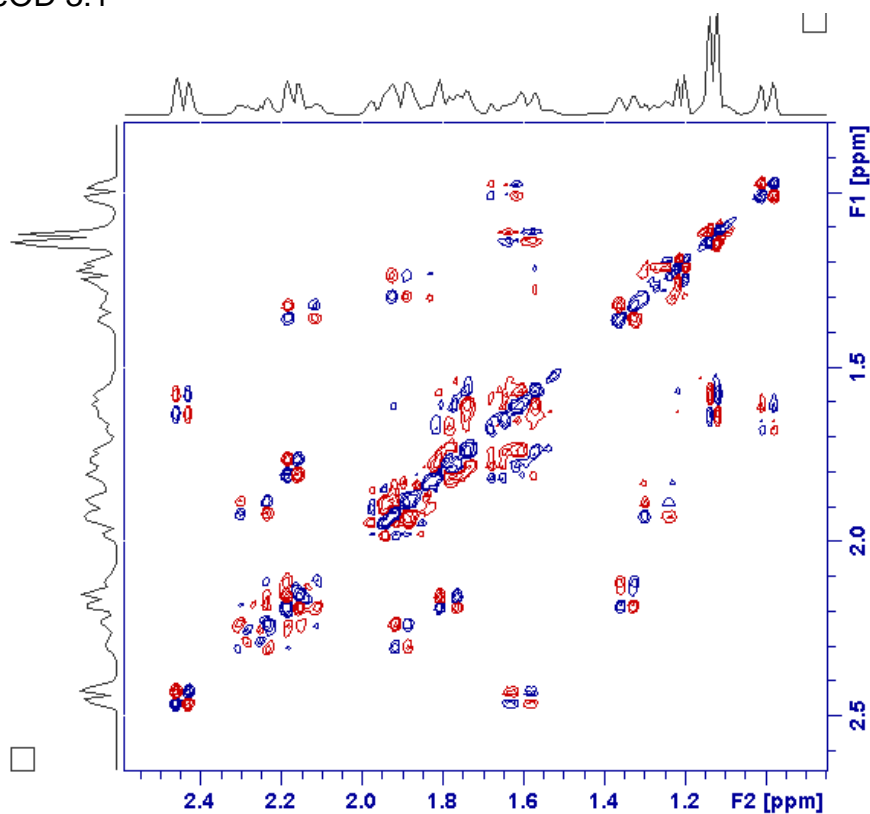
**Figura 13.** Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



**Figura 14.** Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

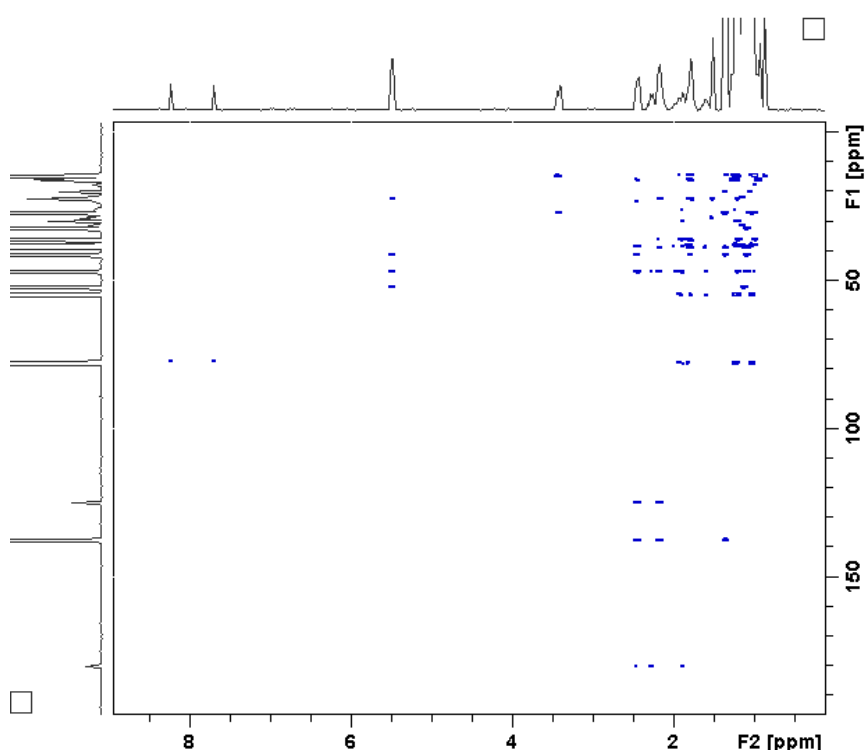


**Figura 15.** Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

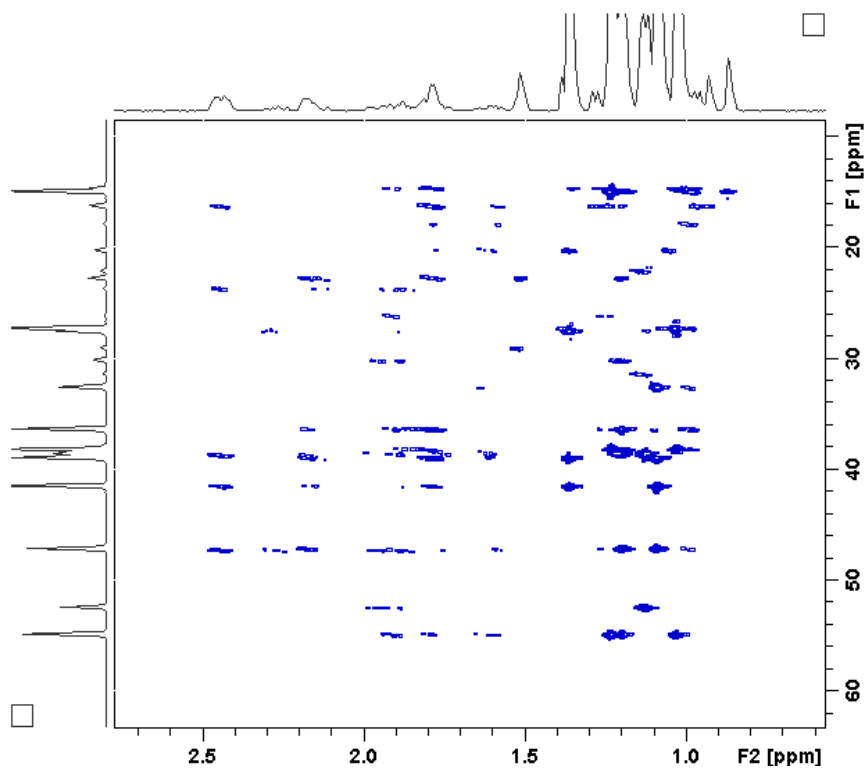


**Figura 16.** Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

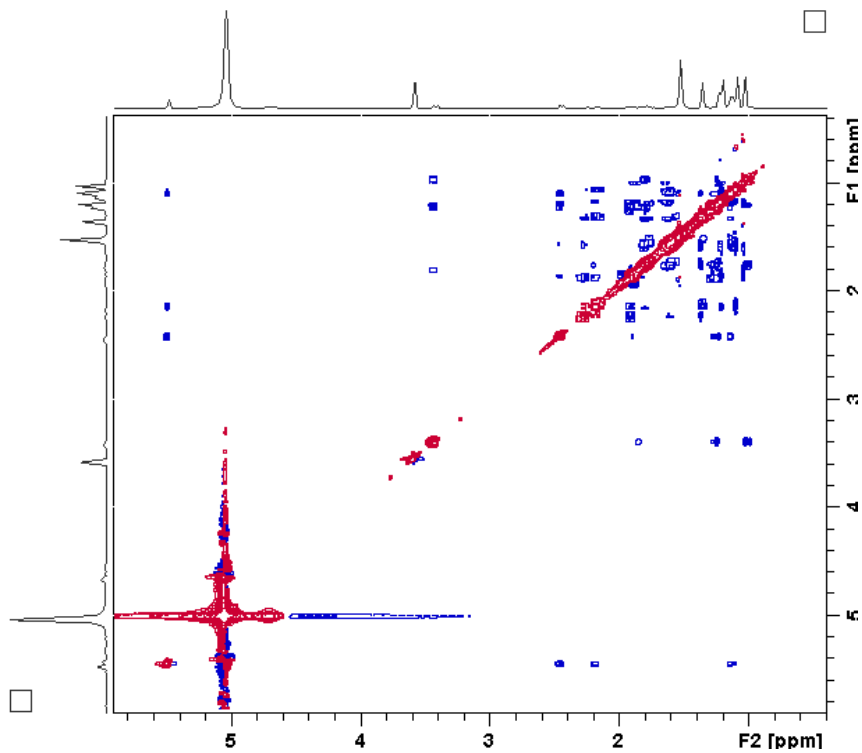
A análise do espectro HMBC (Figuras 17 e 18, p. 47-48) (correlação H-C a longa distância) foi responsável pela união dos fragmentos definidos pela análise do espectro COSY, devido às interações observadas entre átomos de carbono não hidrogenados. A análise do espectro NOESY (Figuras 19 e 20, p. 48-49) (correlação H-H espacial) permitiu extrair informações relacionadas com a estereoquímica da molécula. A montagem completa da estrutura da ZTC9 está descrita na figura 21 (p. 50).



**Figura 17.** Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

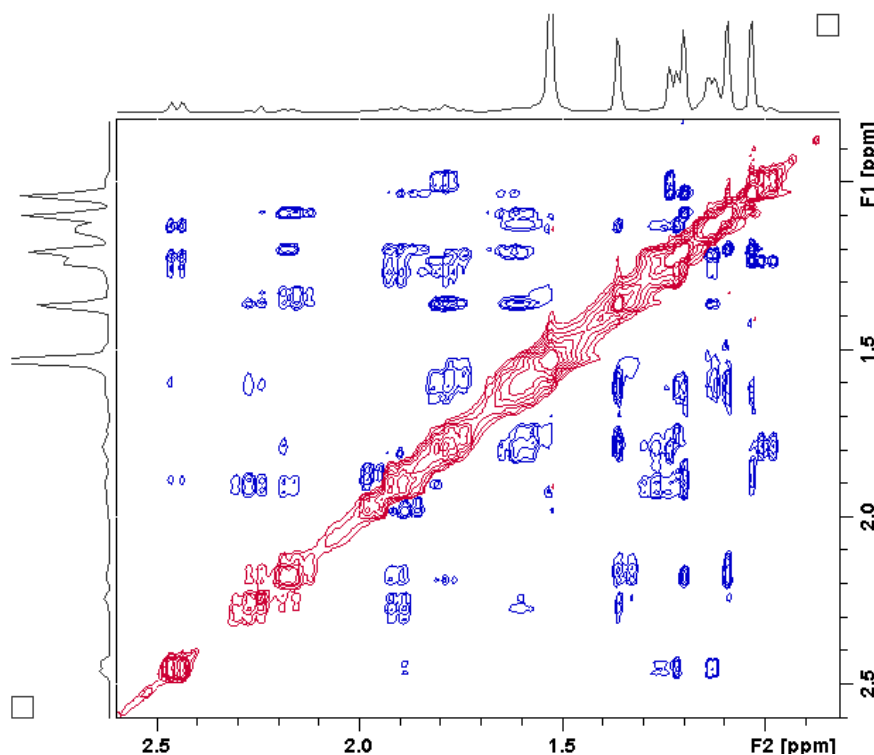


**Figura 18.** Expansão do Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



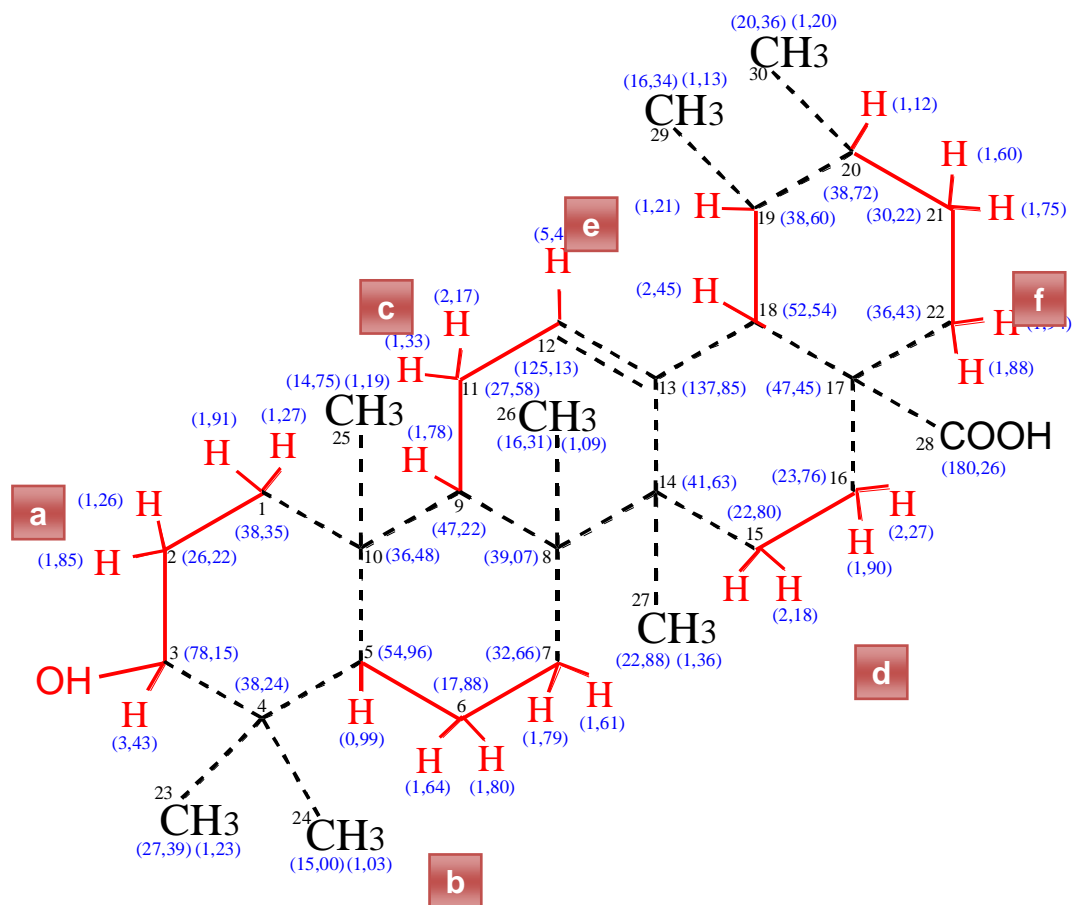
**Figura 19.** Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



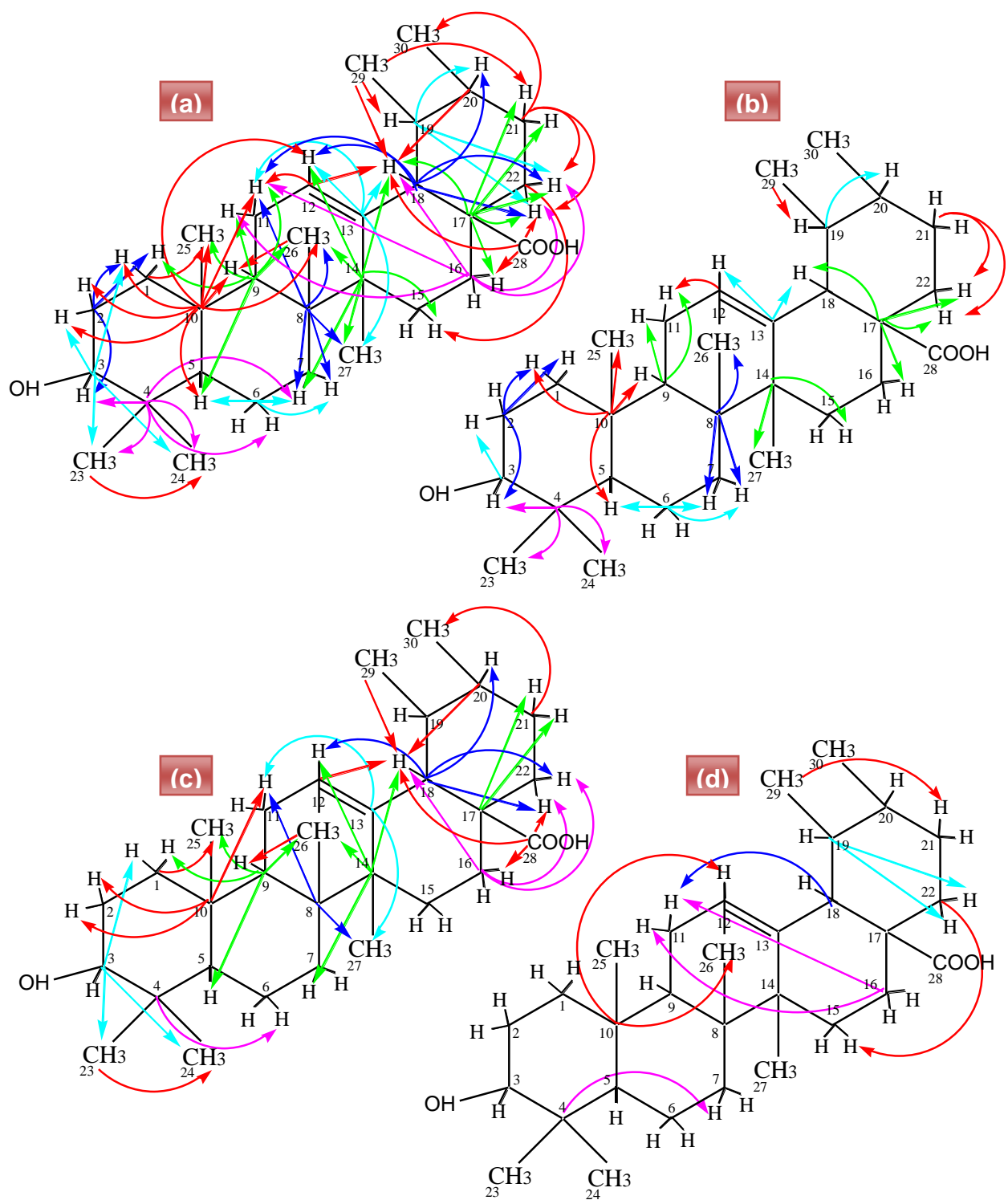


**Figura 20.** Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC9, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

A figura 21 (p. 50) refere-se à montagem estrutural do composto ZTC9 através de dados de RMN bidimensionais e mostra alguns fragmentos (a-f) em vermelho montados com base nas correlações observadas no espectro COSY (Figura 23, p. 52) e a ligação destes em linhas pontilhadas, sugeridas através das correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY (Figuras 22 e 24, p. 51-52), e com base nos principais valores de  ${}^{2-3}J_{\text{H,H}}$  e  ${}^{4-6}J_{\text{C,H}}$ .

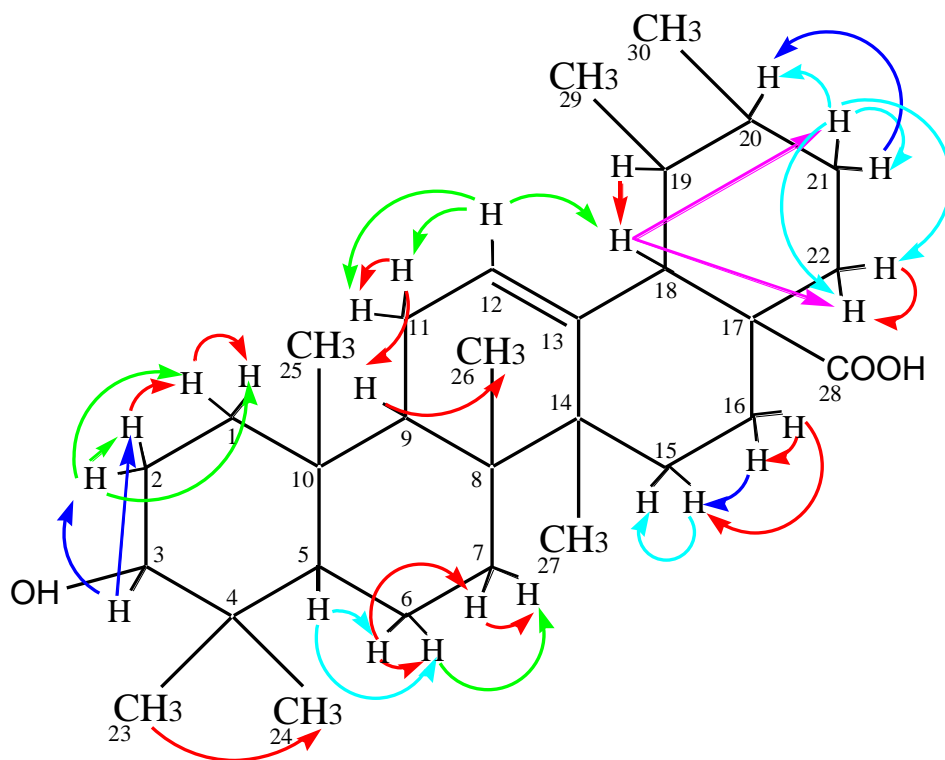


**Figura 21.** Montagem Estrutural da ZTC9

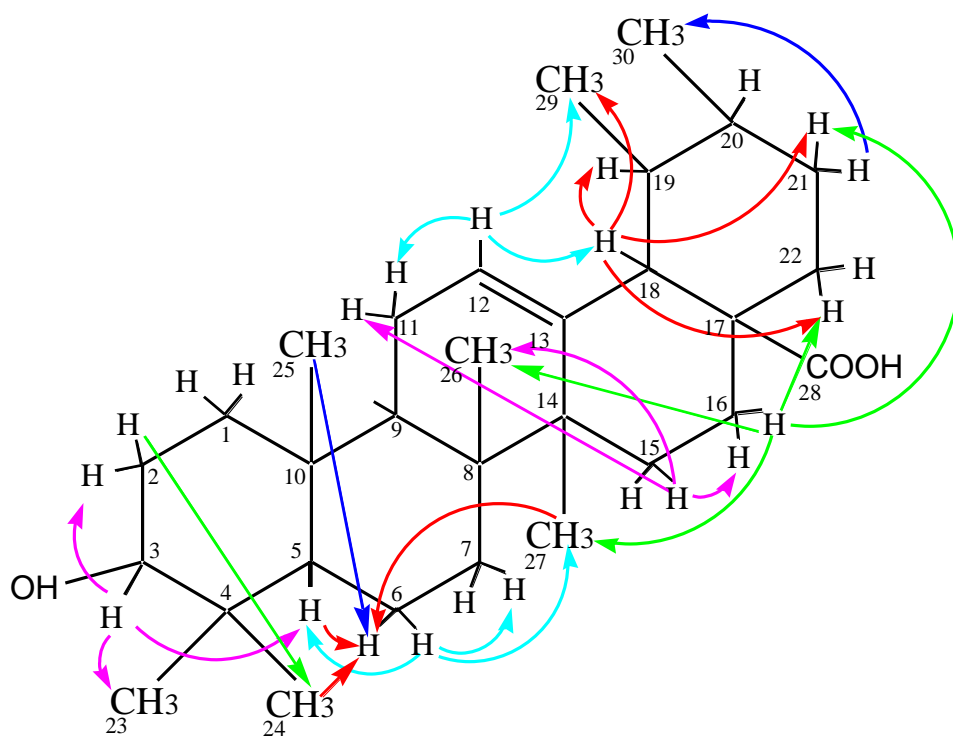


**Figura 22.** Correlações Observadas no Espectro HMBC de ZTC9.

(a)  $^2-4 J_{C,H}$ ; (b)  $^2 J_{C,H}$ ; (c)  $^3 J_{C,H}$ ; (d)  $^4 J_{C,H}$ .



**Figura 23.** Correlações Observadas no Espectro COSY de ZTC9



**Figura 24.** Correlações Observadas no Espectro NOESY de ZTC9

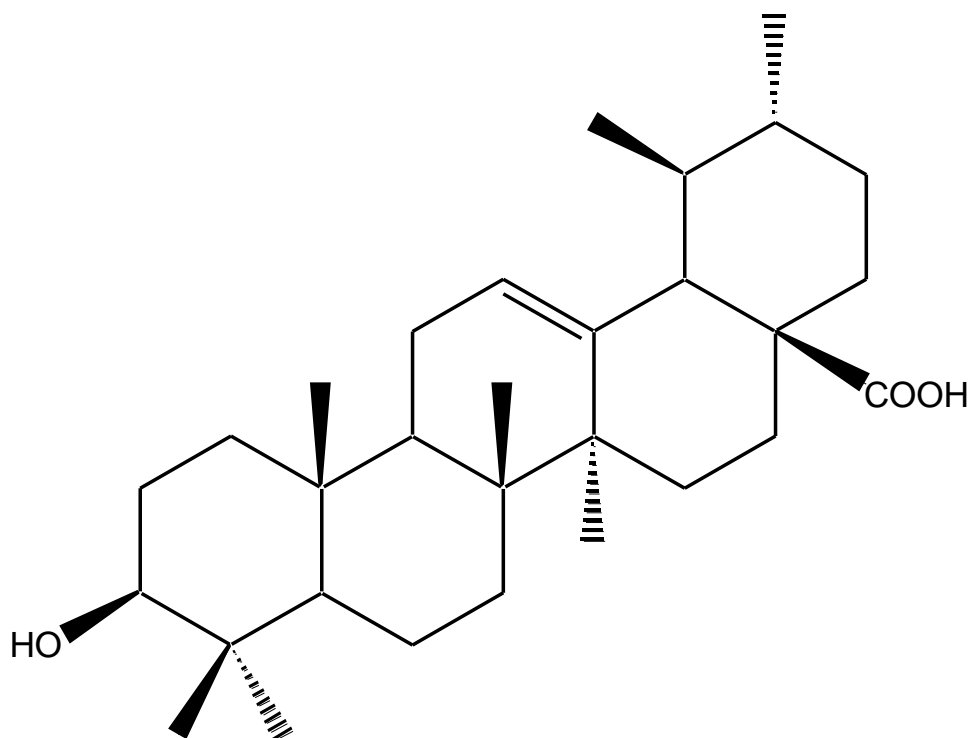
Determinados os fragmentos a-f (Figuras 21 e 23, p. 50-52), partiu-se para definição de como estes estão interligados através dos carbonos não hidrogenados, sendo utilizado para isso as correlações observadas no espectro HMBC (Figuras 21 e 22, p. 50-51),  $^{2-3}J_{C,H}$ : Partindo-se do fragmento **a** observa-se que o C<sub>3</sub> (δ 78,15) está correlacionado com os hidrogênios das metilas C<sub>23</sub> (δ<sub>H</sub> 1,23) e C<sub>24</sub> (δ<sub>H</sub> 1,03) e que o C<sub>4</sub> (δ 38,24) quaternário correlaciona com o H-3 (δ 3,43) e, com os hidrogênios das duas metilas C<sub>23</sub> (δ<sub>H</sub> 1,23) e C<sub>24</sub> (δ<sub>H</sub> 1,03), que estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no espectro COSY), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono, α à hidroxila; o espectro NOESY mostra ainda que a metila C<sub>23</sub> (δ<sub>H</sub> 1,23) está espacialmente próxima ao hidrogênio carbinólico H-3 (δ 3,43), pois há correlação do H-3 (δ 3,43) carbinólico, que se encontra na posição axial conforme definido pelo espectro de RMN H<sup>1</sup>, com o H-23 (δ 1,23), na posição equatorial o H-5 (δ 0,99), está correlacionado com o C<sub>10</sub> (δ 36,48) quaternário, o qual mostra ainda correlação com o H-1 (δ 1,91) e com os hidrogênios do C<sub>2</sub> (δ 26,22) e da metila C<sub>25</sub> (δ 14,75) [cujos hidrogênios também correlacionam com o C<sub>1</sub> (δ 38,35) e C<sub>9</sub> (δ 47,22)]. O espectro NOESY mostra ainda a correlação do hidrogênio do C<sub>3</sub> (δ 78,15) com o H-5 (δ 0,99), confirmando que realmente o C<sub>5</sub> (δ 54,96) é o carbono monohidrogenado que está ligado ao C<sub>4</sub> (δ 38,24). Logo, tem-se que o fragmento **a** está ligado através do C<sub>3</sub> (δ 78,15) ao C<sub>4</sub> (δ 38,24), que por sua vez está ligado às duas metilas C<sub>23</sub> (δ 27,39) e C<sub>24</sub> (δ 15,00) e ao C<sub>5</sub> (δ 54,96), que está ligado ao C<sub>10</sub> (δ 36,48), que se liga a metila C<sub>25</sub> (δ 14,75) e ao C<sub>1</sub> (δ 38,35), fechando o primeiro ciclo.

Partindo do fragmento **b**, observa-se que os hidrogênios do C<sub>7</sub> (δ 32,66) correlacionam com o C<sub>8</sub> (δ 39,07) quaternário, que mostra correlação com os hidrogênios do C<sub>11</sub> (δ 27,58) e das metilas C<sub>26</sub> (δ 16,31) e C<sub>27</sub> (δ 22,88), sendo que o C<sub>14</sub> (δ 41,63) quaternário também mostra correlação com estas mesmas metilas e ainda com um dos hidrogênios do C<sub>7</sub> (δ 32,66), porém observa-se que o carbono C<sub>7</sub> (δ 32,66) está ligado ao C<sub>8</sub> (δ 39,07) e não ao C<sub>14</sub> (δ 41,63), porque o C<sub>14</sub> (δ 41,63) mostra correlação com hidrogênios mais distantes, os H dos carbonos C<sub>15</sub> (δ 22,80) e C<sub>18</sub> (δ 52,54), que pertencem ao quarto ciclo, enquanto que todas as correlações do C<sub>8</sub> (δ 39,07) restringem-se aos segundo e terceiro ciclos. Tem-se ainda que o C<sub>9</sub> (δ 47,22) está correlacionado com os hidrogênios das metilas C<sub>25</sub> (δ 14,75) e C<sub>26</sub> (δ 16,31) e também com os hidrogênios do C<sub>11</sub> (δ 27,58), C<sub>1</sub> (δ 38,35) e C<sub>5</sub> (δ 54,96)

comprovando que ele é o carbono monohidrogenado pertencente ao segundo e terceiro ciclos. Considerando que o C<sub>10</sub> (δ 36,48) é o único carbono quaternário que correlaciona com a metila C<sub>25</sub> (δ 14,75), cujos hidrogênios correlacionam com o carbono C<sub>1</sub> (δ 38,35) e C<sub>9</sub> (δ 47,22), confirma-se que esta metila está ligada ao C<sub>10</sub> (δ 36,48), e este está ligado ao C<sub>9</sub> (δ 47,22) [O C<sub>10</sub> (δ 36,48) também está correlacionado com o H-9 (δ 1,78). Conseqüentemente, confirma-se que o fragmento **b** está ligado através do C<sub>7</sub> (δ 32,66) ao carbono C<sub>8</sub> (δ 39,07), que está ligado à metila C<sub>26</sub> (δ 16,31) e ao C<sub>9</sub> (δ 47,22), que se liga a C<sub>10</sub> (δ 36,48) fechando o segundo ciclo.

Considerando agora o fragmento **c**, observa-se que os hidrogênios do C<sub>11</sub> (δ 27,58) estão correlacionados com o C<sub>9</sub> (δ 47,22) e com o C<sub>8</sub> (δ 39,07), e que o H-12 (δ 5,49) mostra correlação com o C<sub>13</sub> (δ 137,85), altamente desprotegido, e com o carbono quaternário C<sub>14</sub> (δ 41,63), sendo que este mostra correlação com os hidrogênios das metilas C<sub>26</sub> (δ 16,31) e C<sub>27</sub> (δ 22,88). Logo, tem-se que o fragmento **c** está ligado através do C<sub>9</sub> (δ 47,22) ao C<sub>8</sub> (δ 39,07), que está ligado à metila C<sub>26</sub> (δ 16,31) e ao C<sub>14</sub> (δ 41,63), o qual se liga ao C<sub>13</sub> (δ 137,85), que se funde ao fragmento **c** através do C<sub>12</sub> (δ 125,13), fechando o terceiro ciclo.

Os outros fragmentos e as demais ligações estão mostradas na figura 22 (p. 51). Todas as correlações observadas nos espectros HMBC, COSY e NOESY, que proporcionaram a determinação estrutural da substância ZTC9, identificada como sendo um triterpeno da classe ursânica conhecido como Ácido Ursólico (rotação específica  $[\alpha]_D^{26,6} = +242^\circ$ , CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1) (Figura 25, p. 55), estão demonstradas nas figuras 22 (p. 51), 23 (p. 52) e 24 (p. 52), respectivamente.



**Figura 25.** Estrutura do (+)-Ácido Ursólico (ZTC9)

Os valores dos deslocamentos dos sinais mostrados nos espectros unidimensionais e bidimensionais e suas respectivas correlações podem ser vistas na tabela 11 (p. 56).

Segundo Silva, 2006, das frações ativas da folha da *Mansoa hirsuta*, com atividade tripanocida, foi isolado um triterpeno pentacíclico conhecido como Ácido Ursólico. O Ácido Ursólico foi testado contra as cepas Y e CL de *Trypanossoma cruzi*, e apresentou  $CL_{100} = 0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  para cepa CL (MAFEZOLI et al., 2000), além de demonstrar atividade significativa na concentração de 1,2 e  $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  contra formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi* (LEITE et al., 2001).

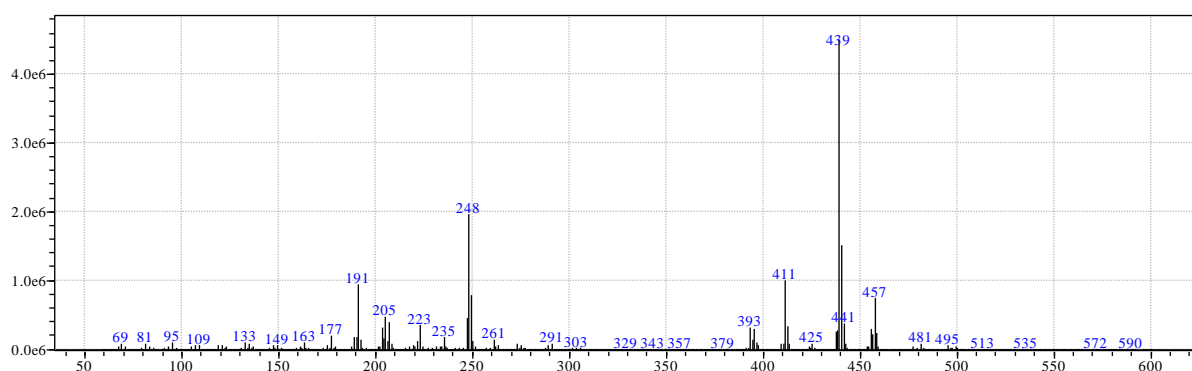
**Tabela 11.** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra ZTC9. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1.

	C13 Carbon	$\delta\text{C}^{13}$	$\text{H}^1$ $\delta\text{H}^1$	HMBC $\delta\text{H}^1$	$\delta\text{H}_a$	COSY		$\delta\text{H}_a$	NOESY	
						$\delta\text{H}_b$	$\delta\text{H}_b$		$\delta\text{H}_b$	$\delta\text{H}_b$
1	$\text{CH}_2$	38,35	1,27m; 1,91m	1,19 (H-25)	1,27 (H-1); [1,91 (H-1)]	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); [1,27 (H-1); 1,26 (H-2); 1,85 (H-2)]				
2	$\text{CH}_2$	26,22	1,26m; 1,85m	1,27 (H-1); 1,91 (H-1); 3,43 (H-3)	1,26 (H-2); [1,85 (H-2)]	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); 3,43 (H-3); [1,27 (H-1); 1,91 (H-1); 1,26 (H-2); 3,43 (H-3)]	1,26 (H-2)		1,03 (H-24)	
3	CH	78,15	3,43dd ( $J=5,20$ e $10,80$ Hz)	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); 1,23 (H-23); 1,03 (H-24)	3,43 (H-3)	1,26 (H-2); 1,85 (H-2)	3,43 (H-3)	1,85 (H-2); 0,99 (H-5); 1,23 (H-23)		
4	C	38,24		3,43 (H-3); 1,80 (H-6); 1,79 (H-7); 1,23 (H-23); 1,03 (H-24)						
5	CH	54,96	0,99d		0,99 (H-5)	1,64 (H-6); 1,80 (H-6)	0,99 (H-5)		1,64 (H-6)	
6	$\text{CH}_2$	17,88	1,64m; 1,80m	0,99 (H-5); 1,61 (H-7); 1,79 (H-7)	1,64 (H-6); [1,80 (H-6)]	1,80 (H-6); 0,99 (H-5); 1,79 (H-7); [0,99 (H-5); 1,64 (H-6); 1,61 (H-7)]	1,80 (H-6)	0,99 (H-5); 1,61 (H-7); 1,36 (H-27)		
7	$\text{CH}_2$	32,66	1,61m; 1,79m		1,61 (H-7); [1,79 (H-7)]	1,79 (H-7); 1,80 (H-6); [1,61 (H-7); 1,64 (H-6)]				
8	C	39,07		1,61 (H-7); 1,79 (H-7); 2,17 (H-11); 1,09 (H-26); 1,36 (H-27)						
9	CH	47,22	1,78m	1,27 (H-1); 0,99 (H-5); 1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 1,19 (H-25); 1,09 (H-26)	1,78 (H-9)	1,09 (H-26); 1,33 (H-11); 2,17 (H-11)				
10	C	36,48		1,91 (H-1); 1,26 (H-2); 1,85 (H-2); 0,99 (H-5); 1,78 (H-9); 2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 1,19 (H-25); 1,09 (H-26)						
11	$\text{CH}_2$	27,58	1,33m; 2,17m		1,33 (H-11); [2,17 (H-11)]	1,78 (H-9); 2,17 (H-11); 5,49 (H-12); [1,78 (H-9); 1,33 (H-11); 5,49 (H-12)]				
12	CH	125,13	5,49t ( $J=3,60$ Hz)	2,17 (H-11); 2,45 (H-18)	5,49 (H-12)	1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 2,45 (H-18)	5,49 (H-12)	2,17 (H-11); 2,45 (H-18); 1,13 (H-29)		
13	C	137,85		2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 2,45 (H-18); 1,36 (H-27)						
14	C	41,63		1,79 (H-7); 5,49 (H-12); 2,18 (H-15); 2,45 (H-18); 1,09 (H-26); 1,36 (H-27)						
15	$\text{CH}_2$	22,80	1,79m; 2,18m		1,79 (H-15); [2,18 (H-15)]	2,18 (H-15); [1,79 (H-15); 1,90 (H-16); 2,27 (H-16)]	2,18 (H-15)	1,33 (H-11); 1,90 (H-16); 1,09 (H-26)		
16	$\text{CH}_2$	23,76	1,90m; 2,27m	1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 2,45 (H-18); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)	1,90 (H-16); [2,27 (H-16)]	2,18 (H-15); 2,27 (H-16); [1,90 (H-16); 2,18 (H-15)]	2,27 (H-16)	1,88 (H-22); 1,36 (H-27); 1,60 (H-21); 1,09 (H-26)		
17	C	47,45		2,27 (H-16); 2,45 (H-18); 1,60 (H-21); 1,75 (H-21); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)						
18	CH	52,54	2,45d	2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 1,12 (H-20); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)	2,45 (H-18)	1,60 (H-21); 1,88 (H-22); 5,49 (H-12); 1,21 (H-19)	2,45 (H-18)	1,21 (H-19); 1,60 (H-21); 1,88 (H-22); 1,13 (H-29)		
19	CH	38,60	1,21d	1,12 (H-20); 1,88 (H-22); 1,94 (H-22)	1,21 (H-19)	2,45 (H-18)				
20	CH	38,72	1,12d	2,45 (H-18)	1,12 (H-20)	1,60 (H-21); 1,75 (H-21)				
21	$\text{CH}_2$	30,22	1,60m; 1,75m	1,88 (H-22); 1,95 (H-22); 1,20 (H-30)	1,60 (H-21); [1,75 (H-21)]	1,12 (H-20); 1,75 (H-21); 1,88 (H-22); 1,94 (H-22); [1,60 (H-21); 1,12 (H-20)]	1,75 (H-21)		1,20 (H-30)	
22	$\text{CH}_2$	36,43	1,88m; 1,94m	2,18 (H-15)	1,88 (H-22); [1,94 (H-22)]	1,60 (H-21); 1,88 (H-22); [1,94 (H-22); 1,60 (H-21)]				
23	$\text{CH}_3$	27,39	1,23s	1,03 (H-24)	1,23 (H-23)	1,03 (H-24)				
24	$\text{CH}_3$	15,00	1,03s		1,03 (H-24)	1,23 (H-23)	1,03 (H-24)		1,64 (H-6)	
25	$\text{CH}_3$	14,75	1,19s				1,19 (H-25)		1,64 (H-6)	
26	$\text{CH}_3$	16,31	1,09s	1,78 (H-9)	1,09 (H-26)	1,78 (H-9)				
27	$\text{CH}_3$	22,88	1,36s					1,36 (H-27)		1,64 (H-6)
28	C	180,26		2,27 (H-16); 2,45 (H-18); 1,88 (H-22)						
29	$\text{CH}_3$	16,34	1,13d ( $J=6,4$ Hz)	2,45 (H-18); 1,21 (H-19); 1,60 (H-21)						
30	$\text{CH}_3$	20,36	1,20d ( $J=8,0$ Hz)							

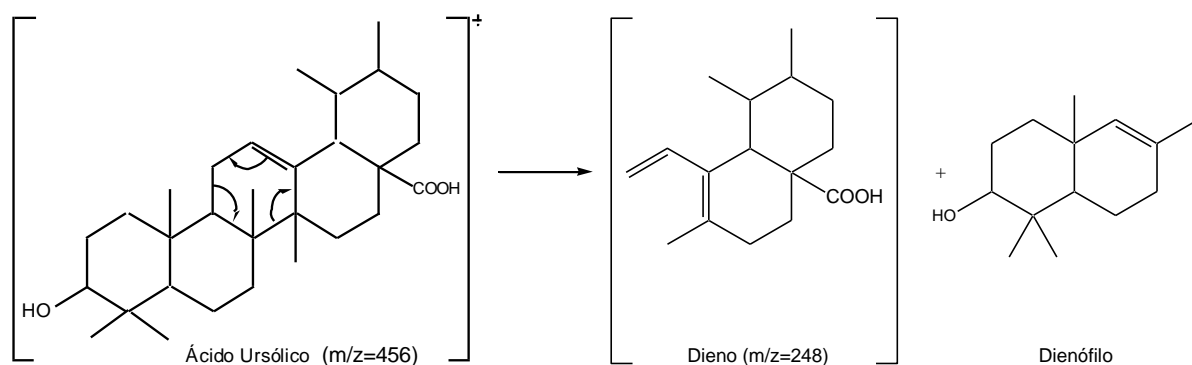


- Espectrometria de Massas (EM)

O espectro de massas (Figura 26) da substância codificada como ZTC9, identificada como Ácido Ursólico, obtido por ionização química no modo positivo, indicou o peso molecular de  $M = 456$  u com fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ . O espectro mostra o pico  $M+1 = 457$  u. O íon molecular sofre uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder (Figura 27), sendo mostrado no espectro o pico  $M-208 = 248$  u, que é característico dessa classe de compostos (BUDZIKIEWICZ et al., 1964).



**Figura 26.** Espectro de Massas ( $m/z$ ) do Ácido Ursólico (ZTC9)

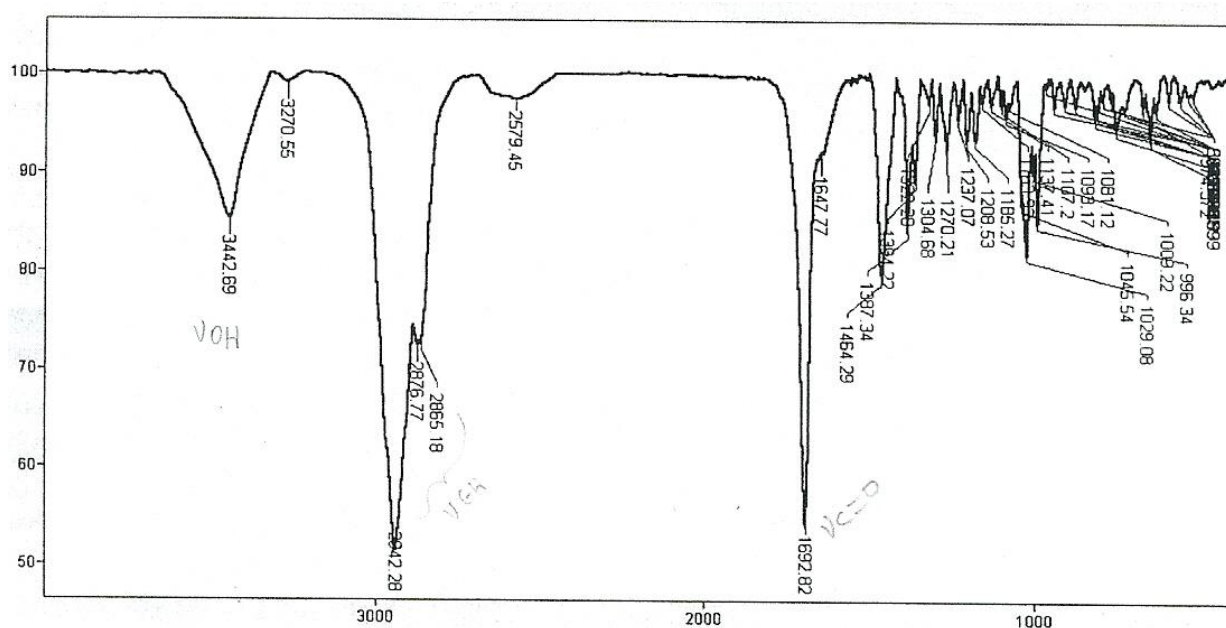


**Figura 27.** Fragmentação do Ácido Ursólico do Tipo Retro-Diels-Alder.

### 3.11 Identificação Estrutural da Substância Codificada como ZTC10

- Infravermelho (IV)

A carbonila carboxílica ( $1692,82\text{ cm}^{-1}$ ) e o grupo hidroxila ( $3442,69\text{ cm}^{-1}$ ) da substância codificada como ZTC10 foram confirmados por análise do espectro do composto na região do infravermelho (IV) (Figuras 28), (MAHATO e KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

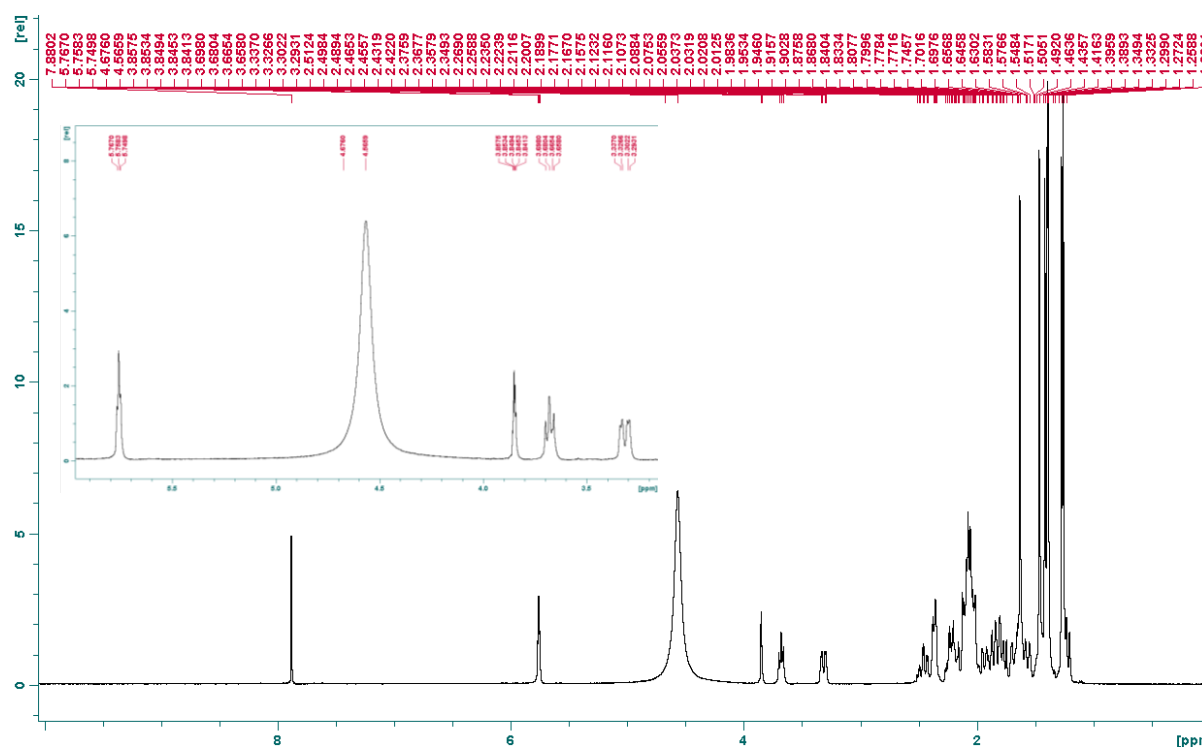


**Figura 28.** Espectro da Substância ZTC10 na Região do Infravermelho [Y=Transmitância/X=número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )]

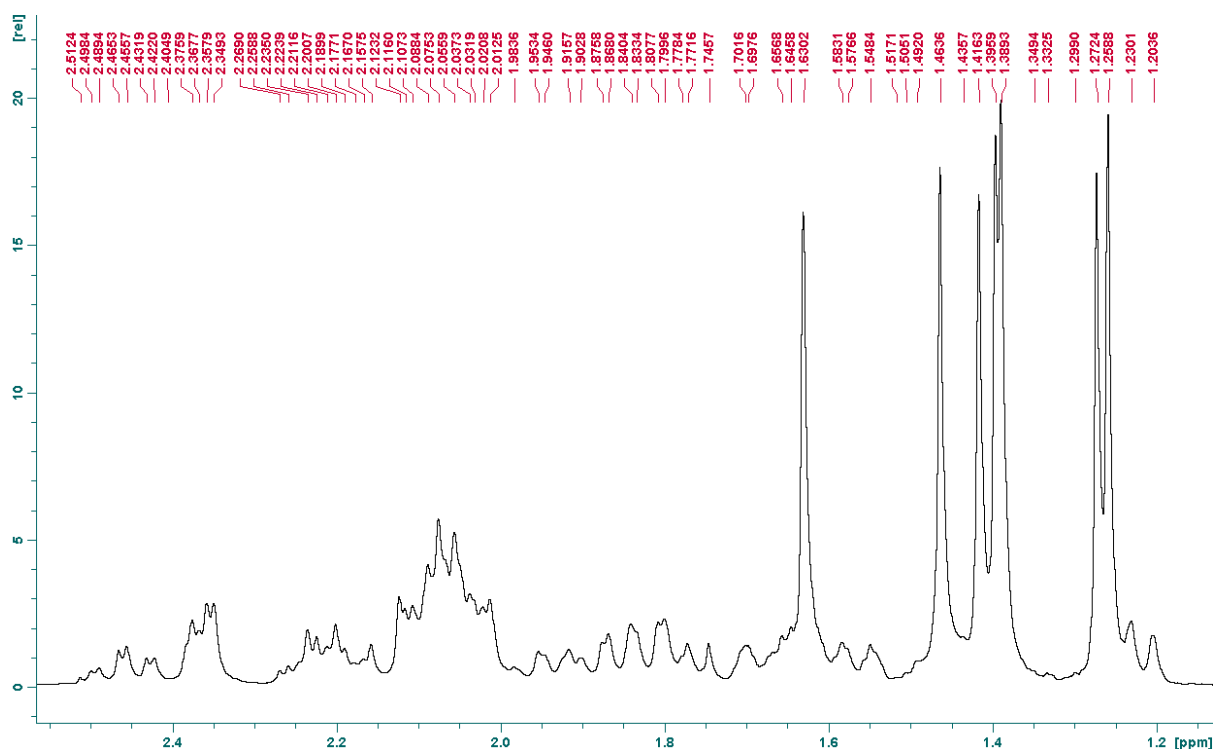
- RMN 1D

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância codificada como ZTC10, obtido a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  (3:1) (Figura 29, p. 59), mostrou 7 sinais na região mais blindada entre  $\delta$  1,26 e 1,63; todos simpletos (s) ( $\delta$  1,46;  $\delta$  1,26;  $\delta$  1,40;  $\delta$  1,27;  $\delta$  1,63;  $\delta$  1,39;  $\delta$  1,42) atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados (Figura 30, p. 60); um sinal em  $\delta$  3,67 na forma de um duplo duplete (dd) com constante de acoplamento ( $J$ ) ( $J = 7,20$  Hz e  $J = 13,20$  Hz) relativo ao hidrogênio carbinólico que está orientado em posição axial; um sinal em  $\delta$

A análise conjunta do espectro de  $^1\text{H}$  com os espectros DEPTs, HSQC e COSY, permitiu a identificação de 21 sinais na forma de multipletos (m), sendo 20 deles relativos aos prótons de grupos metilênicos H ( $\delta$  1,46; 2,11), H ( $\delta$  1,42; 2,07), H ( $\delta$  1,87; 2,02), H ( $\delta$  1,80; 1,95), H ( $\delta$  1,42; 2,36), H ( $\delta$  2,09; 2,45), H ( $\delta$  1,57; 2,20), H ( $\delta$  1,63; 2,12), H ( $\delta$  1,69; 1,83), H ( $\delta$  2,04; 2,22) e um sinal relativo a um próton de grupo metínico H ( $\delta$  2,05). Foram identificados ainda um sinal relativo ao hidrogênio H ( $\delta$  1,23;  $J=10,60$  Hz) na forma de um duplete (d) e um sinal relativo ao hidrogênio H ( $\delta$  3,33;  $J=4,16$  Hz e  $J=3,64$  Hz) na forma de um duplo duplete (dd), sendo estes sinais referentes a prótons de grupos metínicos. Todos os deslocamentos químicos dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  encontram-se na tabela 12 (p. 77).

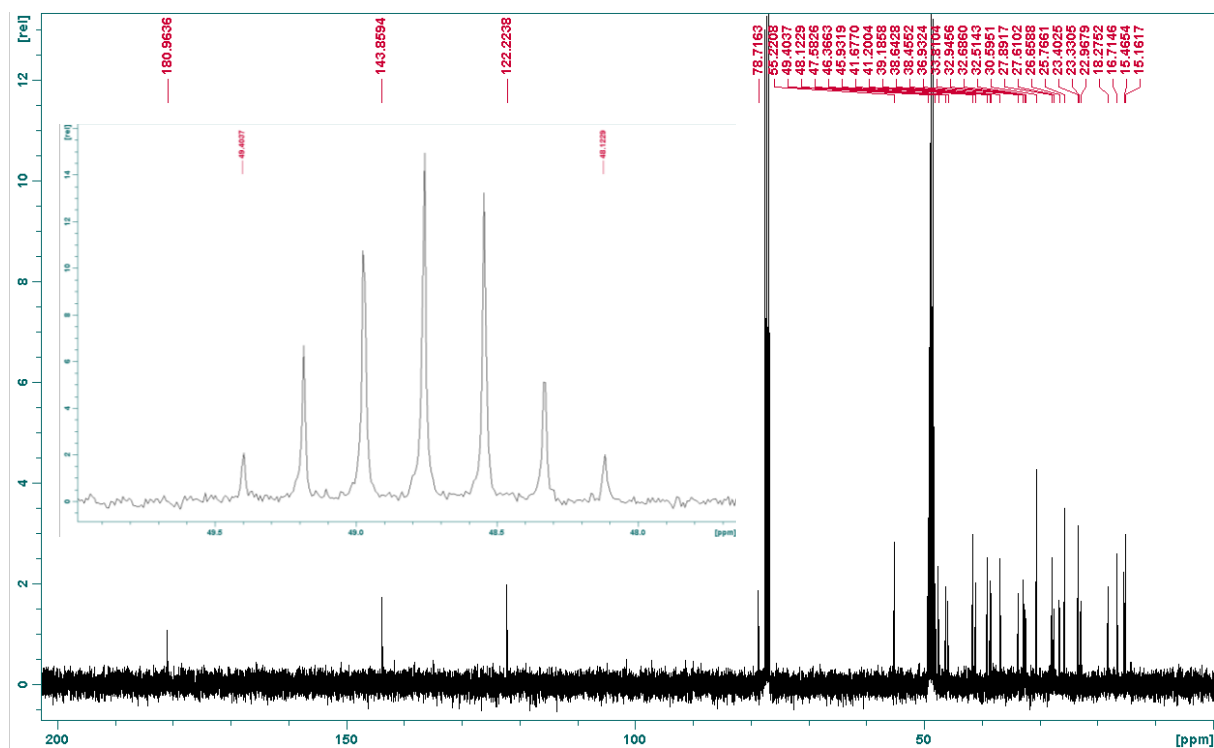


59

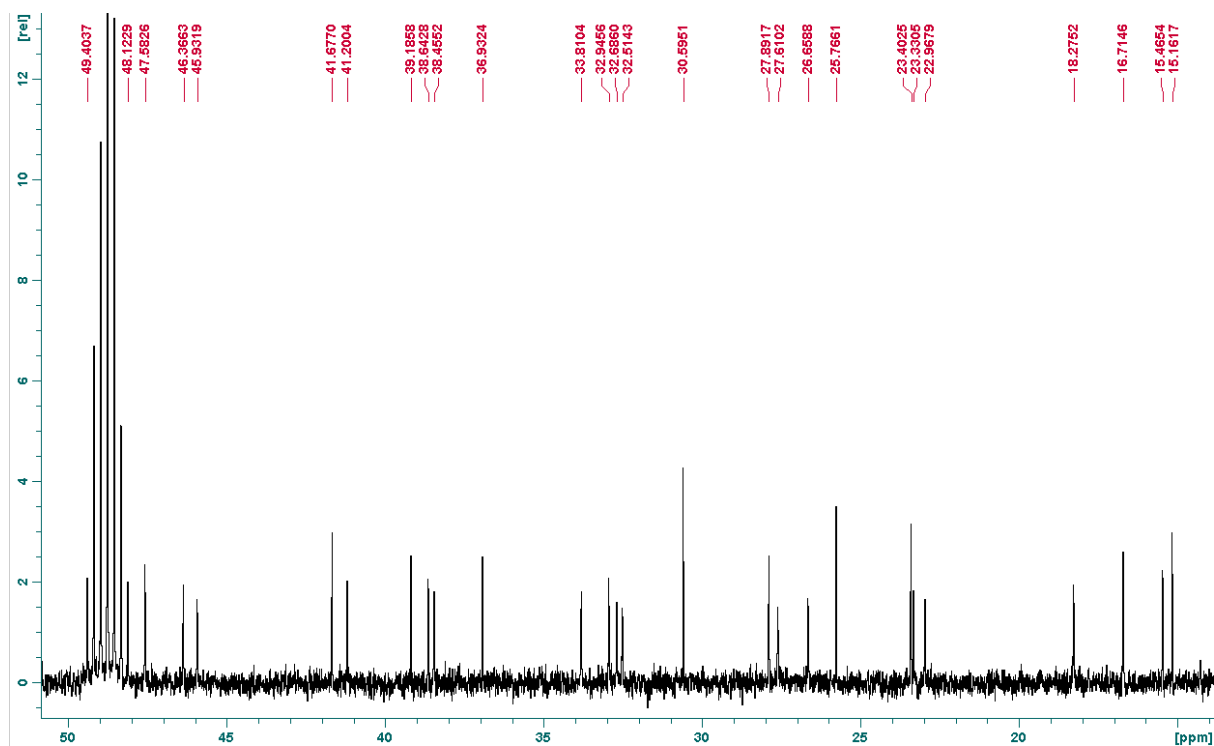


**Figura 30.** Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  de ZTC10, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1

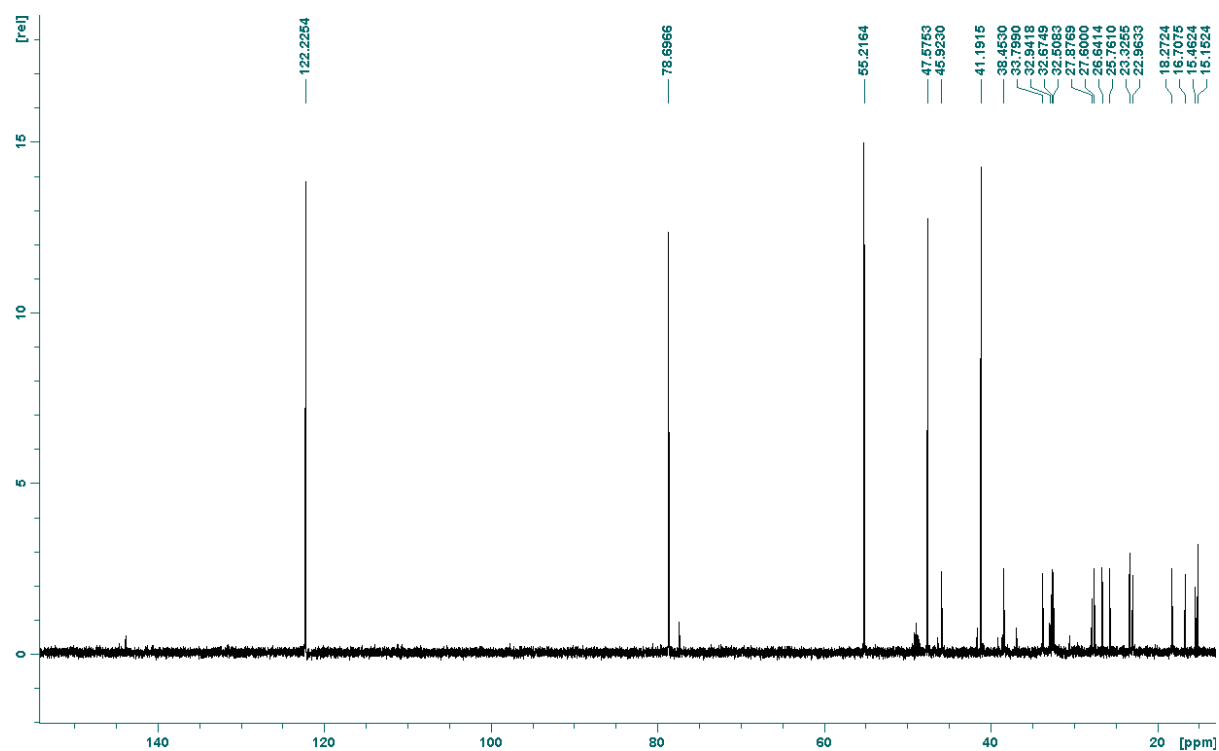
A análise comparativa dos espectros de  $^{13}C$  (Figuras 31 e 32, p. 61), DEPT 90 (Figura 33, p. 62) e DEPT 135° (Figuras 34 e 35, p. 62-63) da substância ZTC10 evidenciou uma molécula com um total de 30 átomos de carbonos: sendo 7 carbonos metílicos (15,16; 15,46; 16,71; 23,40; 25,77; 27,89; 32,95) e 10 carbonos metilênicos (18,27; 22,97; 23,33; 26,66; 27,61; 32,69; 32,51; 33,81; 38,45; 45,93), segundo o DEPT de 135°, 5 carbonos metínicos (41,20; 47,58; 55,22; 78,72; 122,22), conforme o DEPT de 90° e 8 carbonos não hidrogenados (30,59; 36,93; 38,64; 39,19; 41,68; 46,37; 143,86; 180,96), sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro  $C^{13}$  por diferença com os DEPTs de 90° e 135° (SILVA, 2006; SOLOMONS e FRYHLE, 2005), conferindo à molécula a indicação de um esqueleto oleanânico.



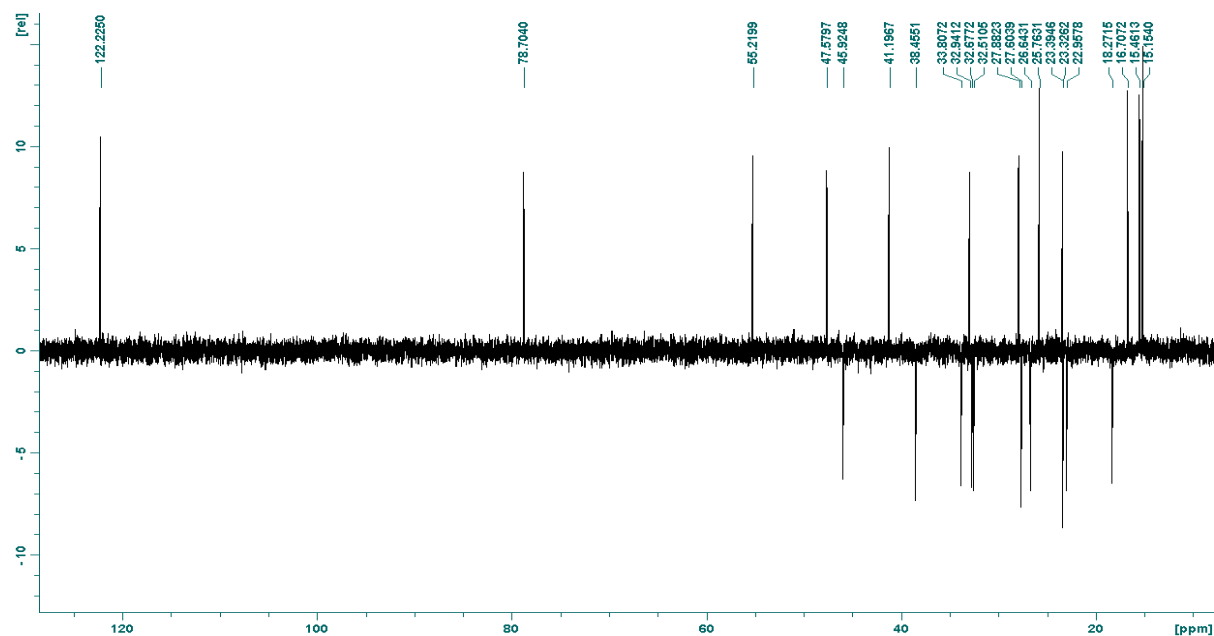
**Figura 31.** Espectro de RMN  $C^{13}$  de ZTC10 com Expansão, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



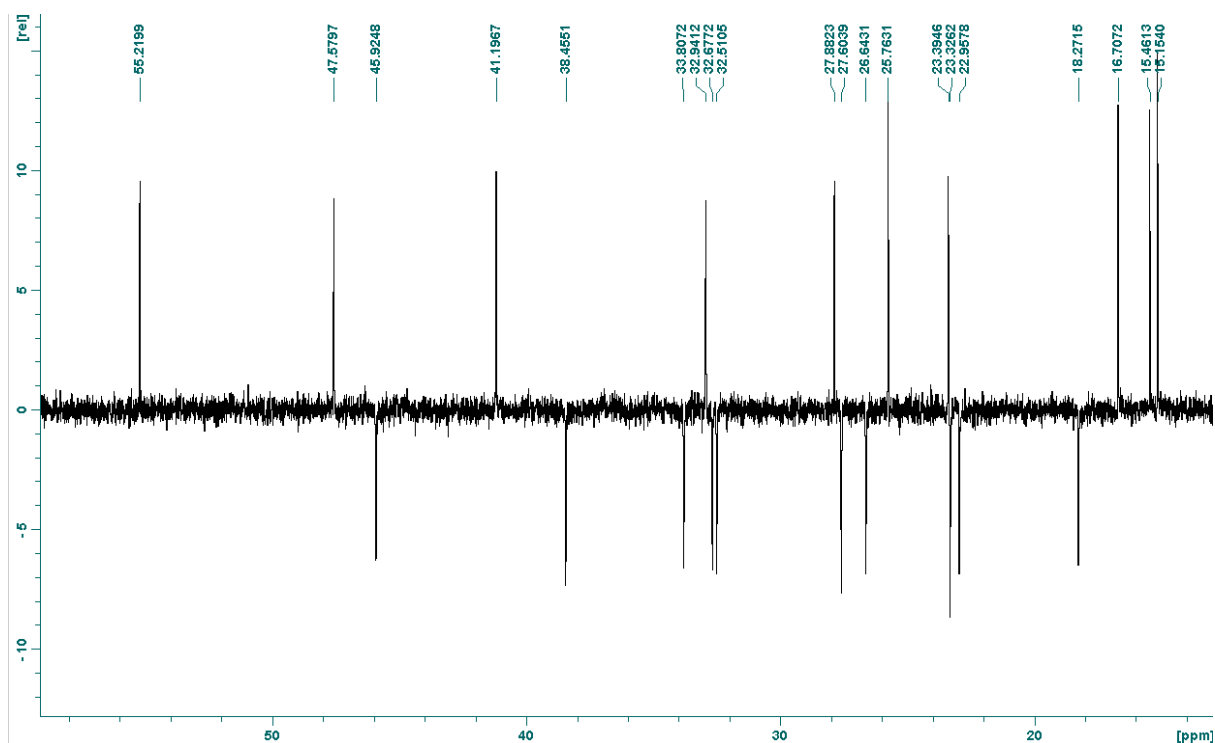
**Figura 32.** Expansão do Espectro de RMN  $C^{13}$  de ZTC10, Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



**Figura 33.** Espectro de RMN DEPT 90° de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



**Figura 34.** Espectro de RMN DEPT 135° de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



**Figura 35.** Expansão do Espectro de RMN DEPT 135° de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

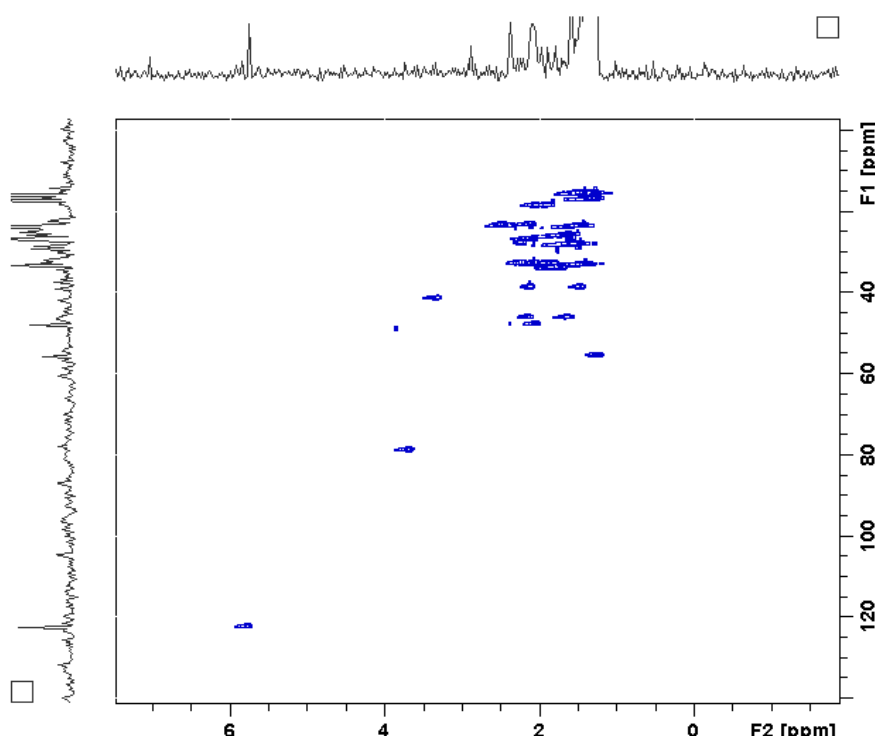
Os valores de deslocamento químico sugerem a presença de uma carbonila de um grupo ácido em  $\delta$  180,96. O sinal em  $\delta$  78,72 indica a presença de um carbono carbinólico e os sinais em  $\delta$  122,22 e  $\delta$  143,86 indicam a existência na molécula de uma ligação dupla do tipo trissubstituída, ligação esta característica dos esqueletos ursânico e oleanânico (JUNGES et al., 2000; MAHATO & KUNDU, 1994). A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN  $^{13}\text{C}$  encontra-se na tabela 12, p. 77.

- RMN 2D

Para se obter um mapeamento estrutural mais preciso do composto, do que utilizando somente as técnicas unidimensionais e dados de possíveis compostos similares da literatura, foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ( $^nJ_{\text{H,H}}$ ;  $^nJ_{\text{C,H}}$ ) ou espacial (H,H- ou H,C –NOE)

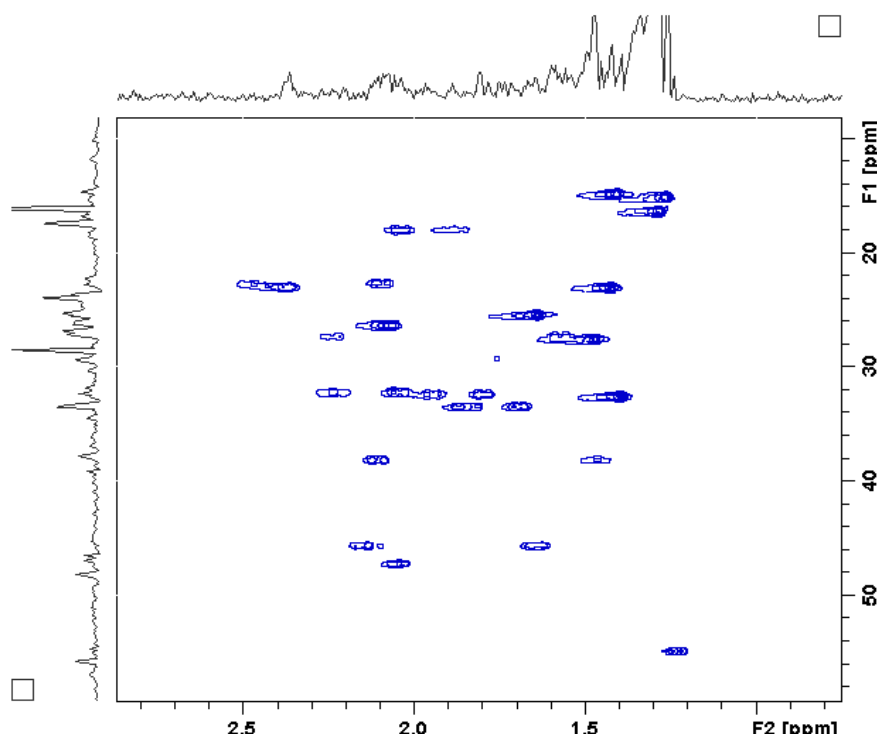
entre si (CARVALHO e BRAZ FILHO, 1993; KAISER, 2000; MALHEIROS et al., 1996).

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  demonstraram a natureza dos prótons e dos C-13. Os espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPTs de  $90^\circ$  e  $135^\circ$  possibilitaram a proposta de numeração dos sinais dos carbonos (Tabela 12, p. 77). Já a proposta de numeração dos sinais dos prótons foi feita via RMN HSQC (Figura 36 e 37), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 12, p. 77).



**Figura 36.** Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1





**Figura 37.** Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

Através do espectro de HSQC observou-se todas as correlações diretas C-H como indicado na tabela 12 (p.77). Este espectro confirma as correlações do hidrogênio carbinólico ( $\delta$  3,67) com o carbono  $\delta$  78,72; do hidrogênio vinílico ( $\delta$  5,76) com o carbono  $\delta$  122,22 e dos hidrogênios metílicos ( $\delta$  1,26; 1,27; 1,39; 1,40; 1,42; 1,46; 1,63) com os seus respectivos carbonos ( $\delta$  15,46; 16,71; 32,95; 15,16; 23,40; 27,89; 25,77).

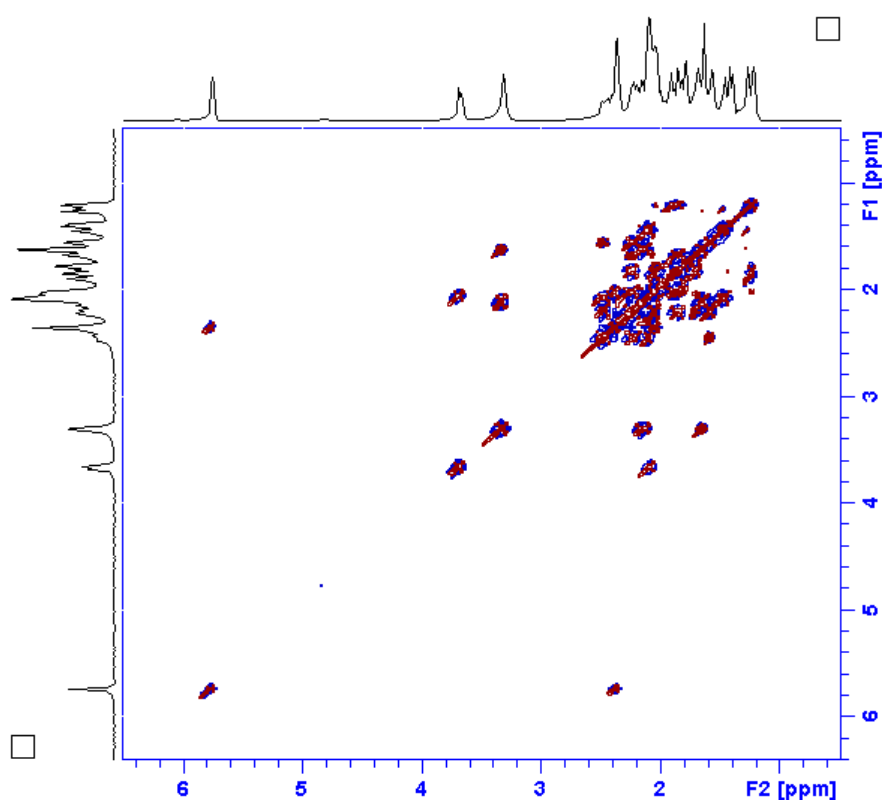
O espectro de RMN de COSY (Figuras 38 a 41, p. 66-68) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por  $^2\text{-}^3J_{\text{H,H}}$  (acoplamentos germinais e vicinais) e ainda por  $^4\text{-}^6J_{\text{H,H}}$ , permitindo assim a montagem de microfragmentos da estrutura.

Acoplamentos geminais:  $\text{H}_{1\text{A}}$  ( $\delta$  1,46) e  $\text{H}_{1\text{B}}$  ( $\delta$  2,11),  $\text{H}_{2\text{A}}$  ( $\delta$  1,42) e  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  2,07),  $\text{H}_{7\text{A}}$  ( $\delta$  1,80) e  $\text{H}_{7\text{B}}$  ( $\delta$  1,95),  $\text{H}_{15\text{A}}$  ( $\delta$  2,09) e  $\text{H}_{15\text{B}}$  ( $\delta$  2,45),  $\text{H}_{16\text{A}}$  ( $\delta$  1,57) e  $\text{H}_{16\text{B}}$  ( $\delta$  2,20),  $\text{H}_{19\text{A}}$  ( $\delta$  1,63) e  $\text{H}_{19\text{B}}$  ( $\delta$  2,12),  $\text{H}_{21\text{A}}$  ( $\delta$  1,69) e  $\text{H}_{21\text{B}}$  ( $\delta$  1,83),  $\text{H}_{22\text{A}}$  ( $\delta$  2,04) e  $\text{H}_{22\text{B}}$  ( $\delta$  2,22).

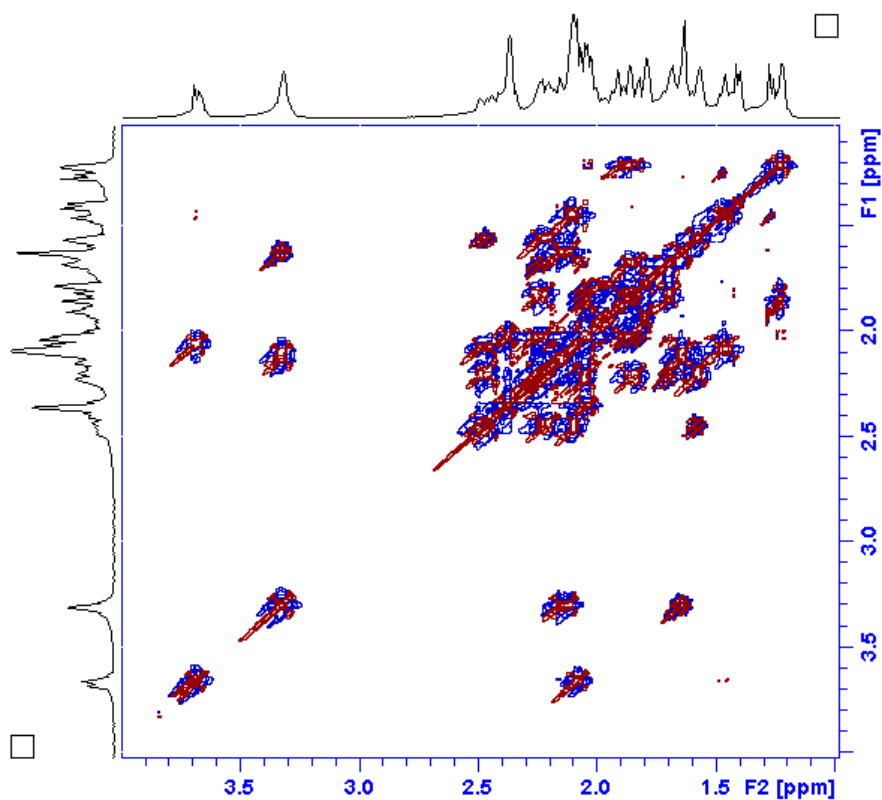
Acoplamentos vicinais:  $\text{H}_{1\text{A}}$  ( $\delta$  1,46) e  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  2,07),  $\text{H}_{2\text{B}}$  ( $\delta$  2,07) e  $\text{H}_3$  ( $\delta$  3,67),  $\text{H}_{2\text{A}}$  ( $\delta$  1,42) e  $\text{H}_3$  ( $\delta$  3,67),  $\text{H}_5$  ( $\delta$  1,23) e  $\text{H}_{6\text{A}}$  ( $\delta$  1,87),  $\text{H}_5$  ( $\delta$  1,23) e  $\text{H}_{6\text{B}}$  ( $\delta$  2,02),  $\text{H}_{6\text{B}}$  ( $\delta$  2,02) e  $\text{H}_{7\text{A}}$  ( $\delta$  1,80),  $\text{H}_{6\text{B}}$  ( $\delta$  2,02) e  $\text{H}_{7\text{B}}$  ( $\delta$  1,95),  $\text{H}_9$  ( $\delta$  2,05) e  $\text{H}_{11\text{A}}$  ( $\delta$  1,42),  $\text{H}_9$  ( $\delta$

2,05) e H<sub>11B</sub> (δ 2,36), H<sub>11A</sub> (δ 1,42) e H<sub>12</sub> (δ 5,76), H<sub>11B</sub> (δ 2,36) e H<sub>12</sub> (δ 5,76), H<sub>15B</sub> (δ 2,45) e H<sub>16A</sub> (δ 1,57), H<sub>15B</sub> (δ 2,45) e H<sub>16B</sub> (δ 2,20), H<sub>18</sub> (δ 3,33) e H<sub>19A</sub> (δ 1,63), H<sub>18</sub> (δ 3,33) e H<sub>19B</sub> (δ 2,12), H<sub>21A</sub> (δ 1,69) e H<sub>22A</sub> (δ 2,04), H<sub>21A</sub> (δ 1,69) e H<sub>22B</sub> (δ 2,22), H<sub>21B</sub> (δ 1,83) e H<sub>22A</sub> (δ 2,04), H<sub>21B</sub> (δ 1,83) e H<sub>22B</sub> (δ 2,22).

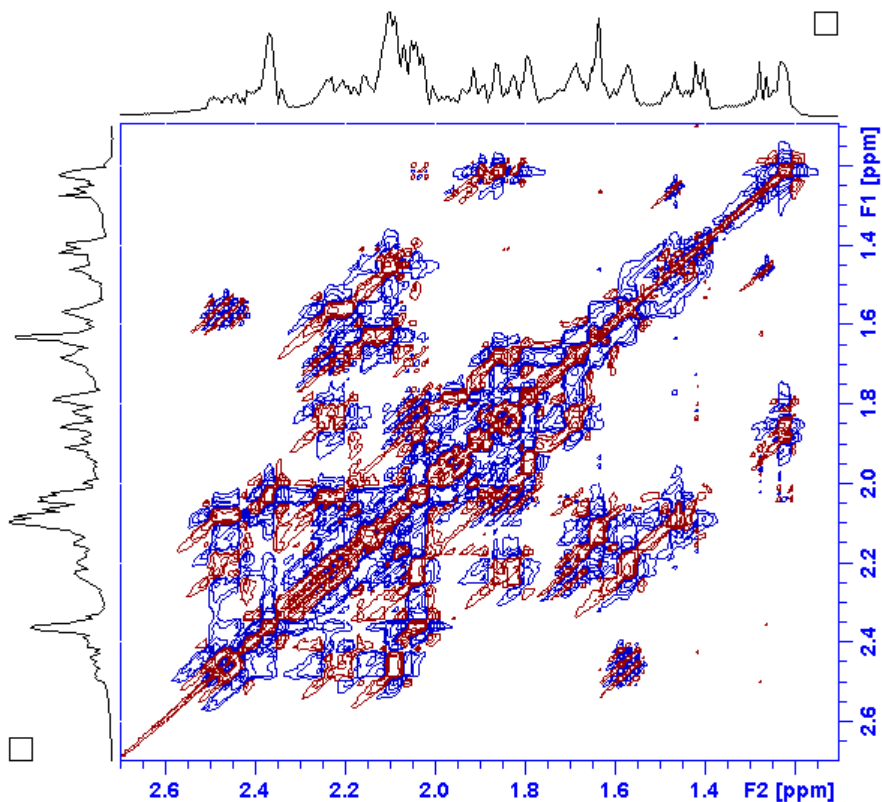
Hidrogênios acoplados por  $^4\text{-}^6J_{\text{H,H}}$ : H<sub>23</sub> (δ 1,46) e H<sub>24</sub> (δ 1,26), H<sub>12</sub> (δ 5,76) e H<sub>18</sub> (δ 3,33), H<sub>22B</sub> (δ 2,22) e H<sub>16A</sub> (δ 1,57)



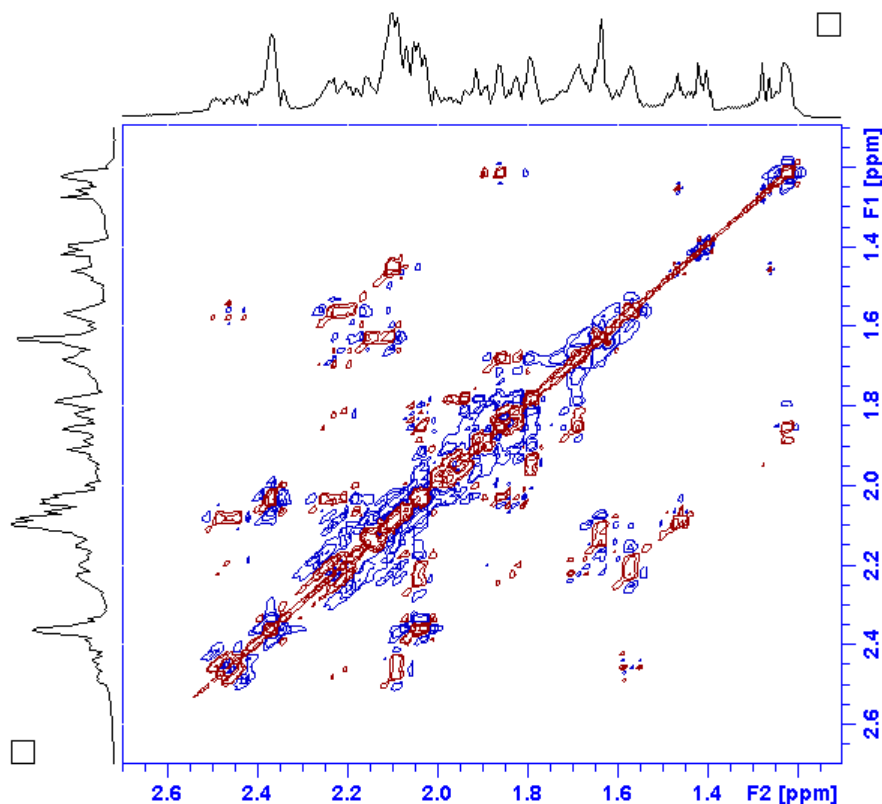
**Figura 38.** Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1



**Figura 39.** Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

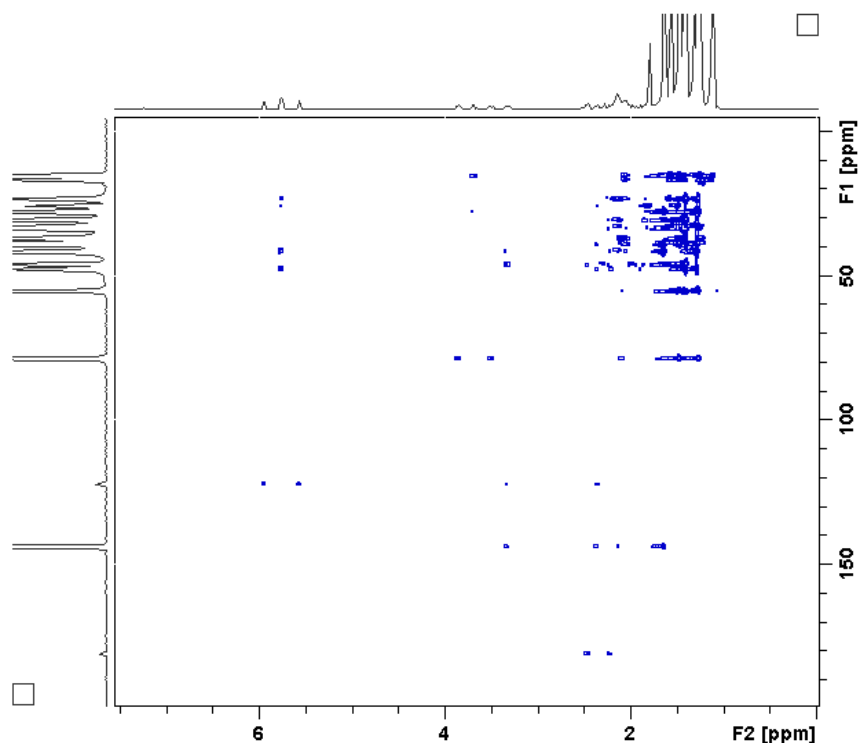


**Figura 40.** Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

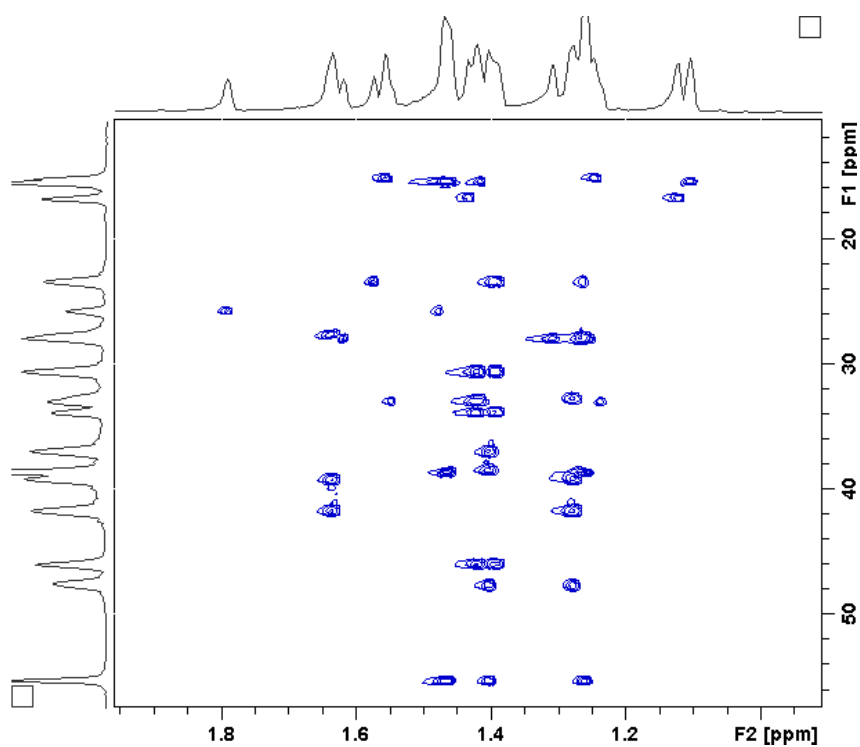


**Figura 41.** Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

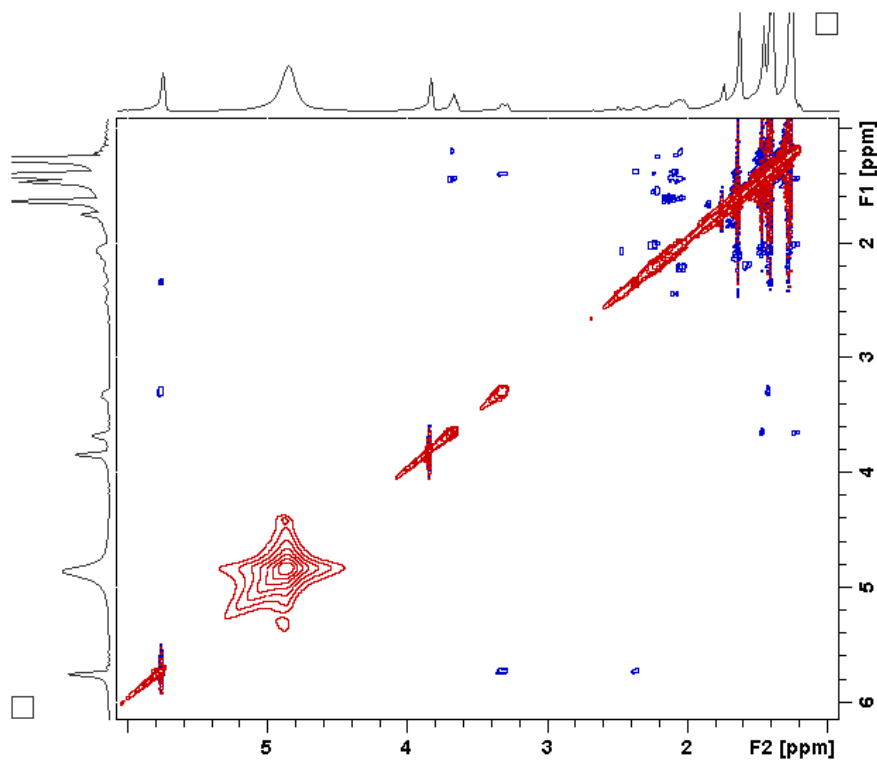
A análise do espectro HMBC (Figuras 42 e 43, p. 69) foi responsável pela união dos fragmentos definidos pela análise do espectro COSY, devido às interações observadas entre átomos de carbono não hidrogenados. A análise do espectro NOESY (Figuras 44 a 46, p. 70-71) permitiu extrair informações relacionadas com a estereoquímica da molécula. A montagem completa da estrutura da ZTC10 está descrita na figura 47 (p. 72).



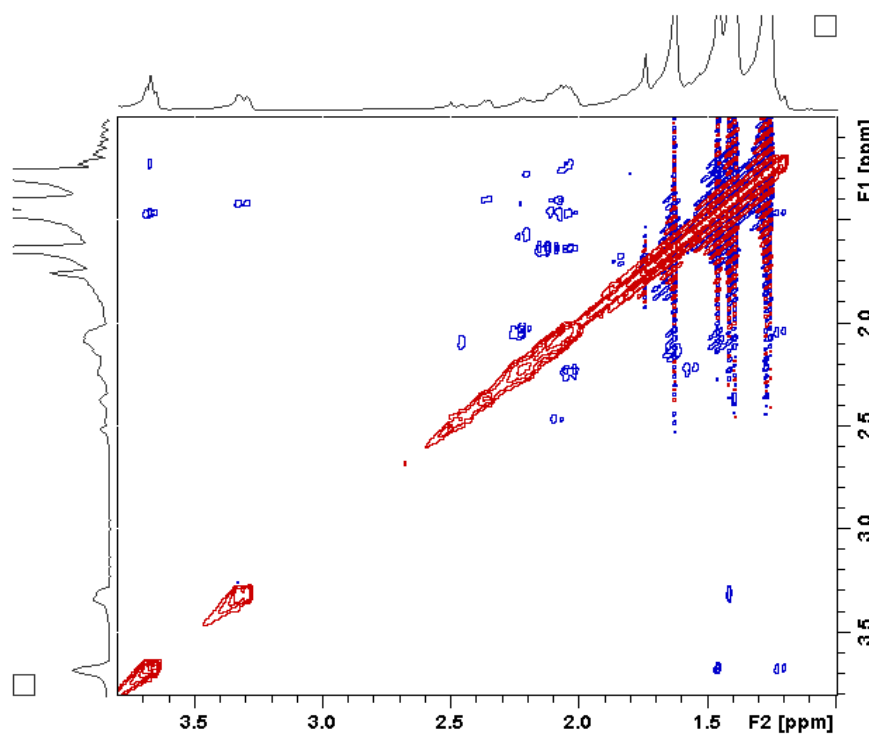
**Figura 42.** Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



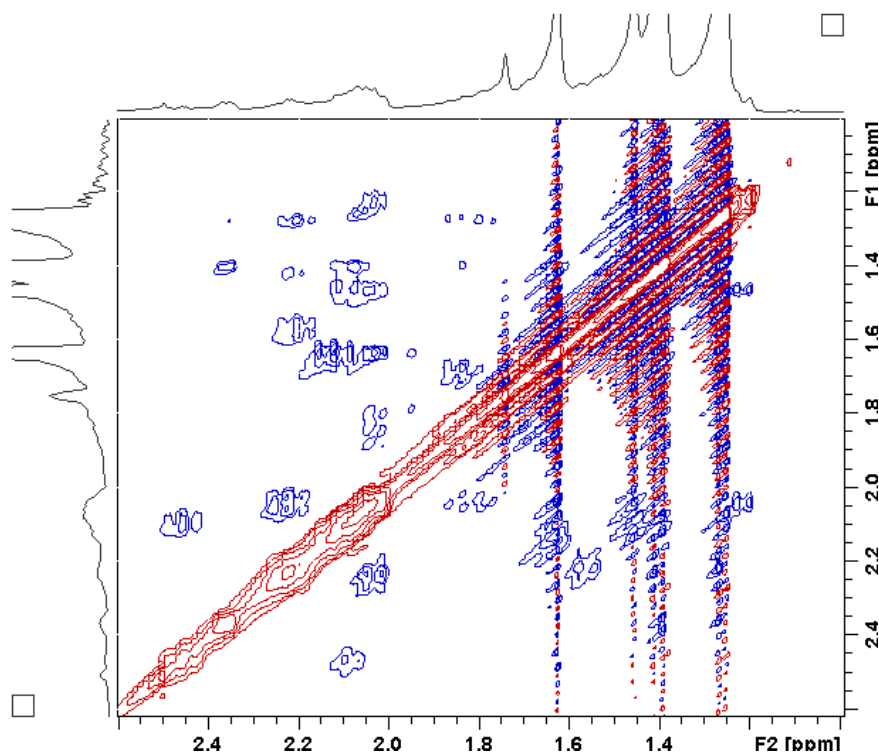
**Figura 43.** Expansão (1) do Espectro de RMN 2D HMBC de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



**Figura 44.** Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

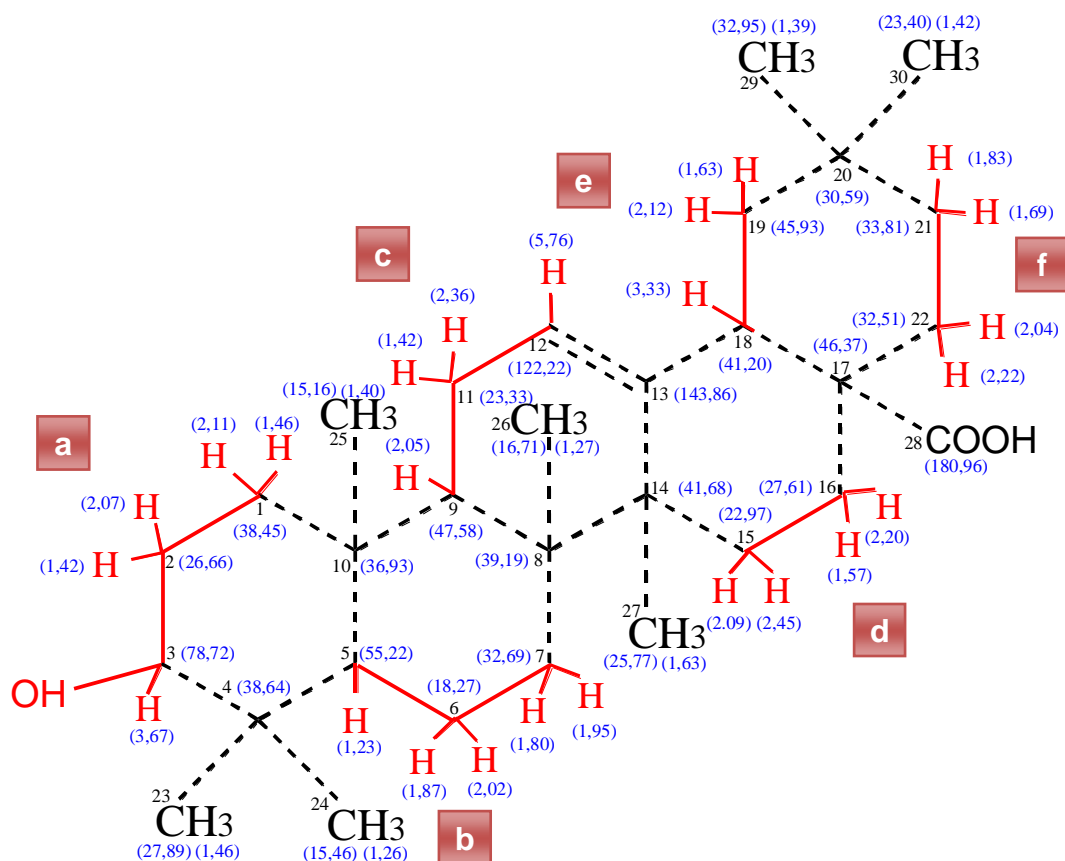


**Figura 45.** Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1



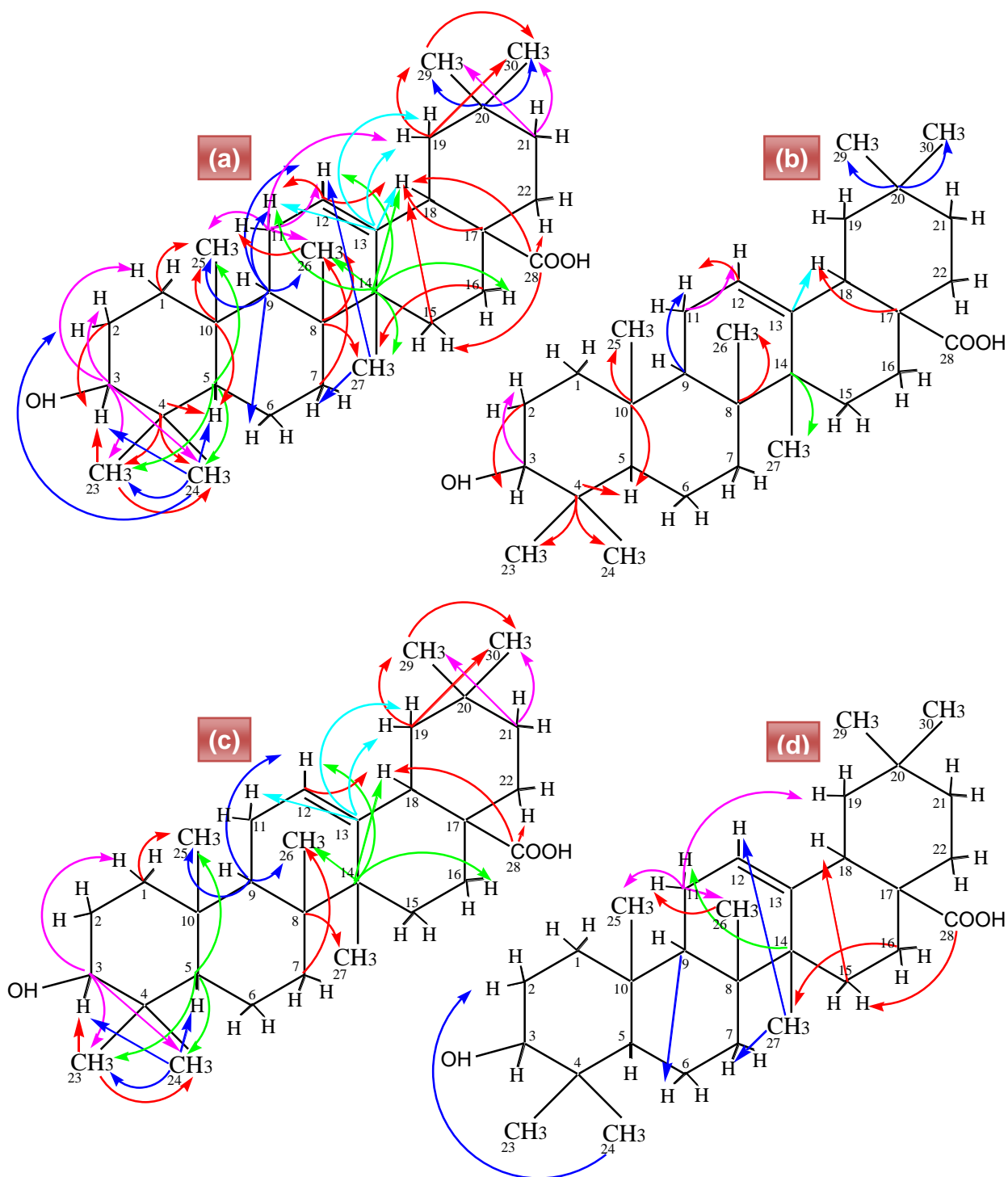
**Figura 46.** Expansão (2) do Espectro de RMN 2D NOESY de ZTC10, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

A figura 47, p. 72, refere-se à montagem estrutural do composto ZTC10 através de dados de RMN bidimensionais e mostra alguns fragmentos (a-f) em vermelho montados com base nas correlações observadas no espectro COSY (Figura 48) e a ligação destes em linhas pontilhadas, sugeridas através das correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY (Figuras 49 e 50), e com base nos principais valores de  $^2\text{-}^3J_{\text{H,H}}$  e  $^4\text{-}^6J_{\text{C,H}}$ .

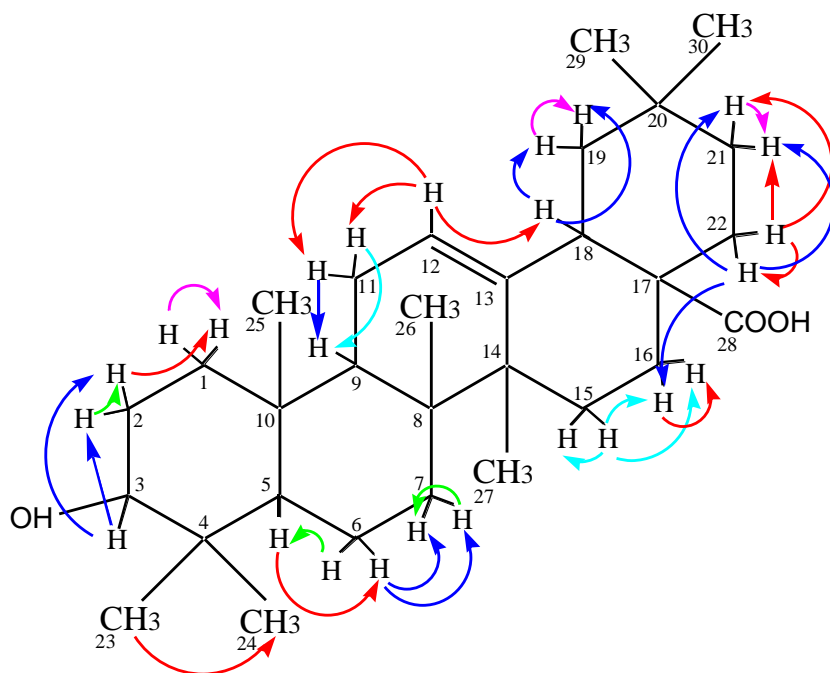


**Figura 47.** Montagem Estrutural da ZTC10

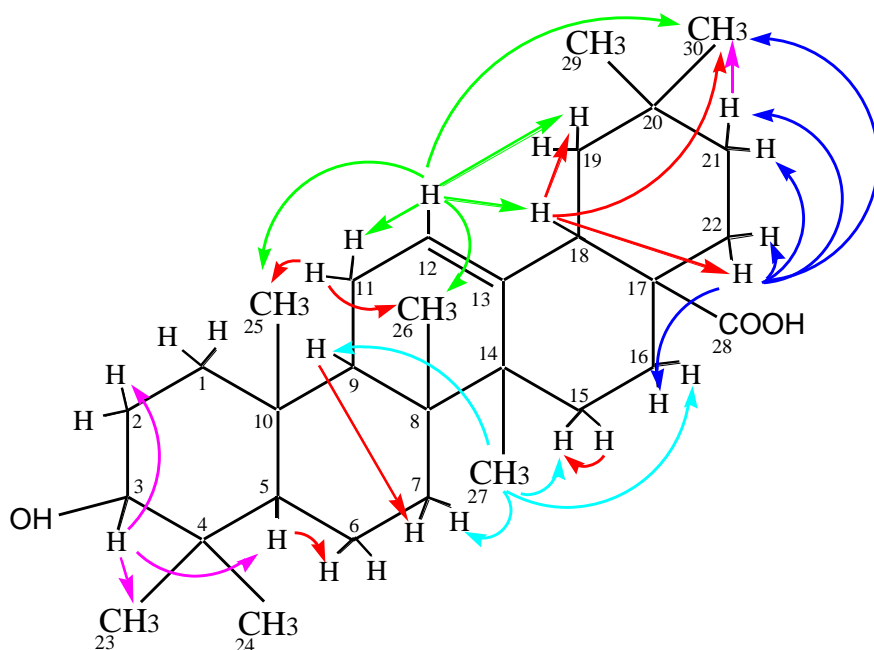




**Figura 48.** Correlações Observadas no Espectro HMBC de ZTC10.  
 (a)  ${}^2\text{-}4 J_{\text{C,H}}$ ; (b)  ${}^2 J_{\text{C,H}}$ ; (c)  ${}^3 J_{\text{C,H}}$ ; (d)  ${}^4 J_{\text{C,H}}$ .



**Figura 49.** Correlações Observadas no Espectro COSY de ZTC10



**Figura 50.** Correlações Observadas no Espectro NOESY de ZTC10

Determinados os fragmentos a-f (Figuras 47 e 48, p. 72-73), partiu-se para definição de como estes estão interligados através dos carbonos não hidrogenados, sendo utilizado para isso as correlações observadas no espectro HMBC (Figuras 47 e 49, p. 72-74),  $^{2-3}J_{C,H}$ . Partindo-se do fragmento a observa-se que: o C<sub>3</sub> ( $\delta$  78,72) está correlacionado com os hidrogênios de duas metilas, C<sub>23</sub> ( $\delta_H$  1,46) e C<sub>24</sub> ( $\delta_H$

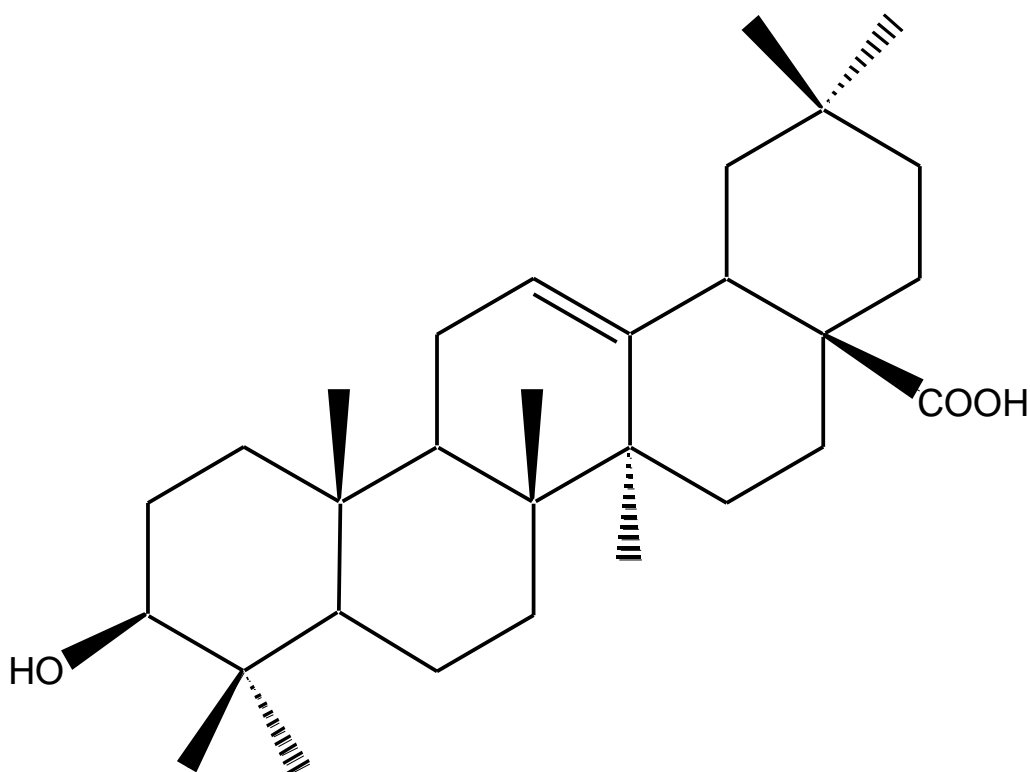
1,26), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C<sub>4</sub> (δ 38,64), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono C<sub>4</sub> (δ 38,64) e que este está ligado ao C<sub>3</sub> (δ 78,72); o C<sub>4</sub> (δ 38,64) também mostra correlação com o H (δ 1,23) do C<sub>5</sub> (δ 55,22), e este H (δ 1,23) mostra correlação com o C<sub>10</sub> (δ 36,93), o qual está correlacionado com o H (δ 1,40) da metila C<sub>25</sub> (δ 15,16), cujos hidrogênios estão correlacionados com o C<sub>1</sub> (δ 38,45). Isto confirma que o fragmento **a** está ligado através do C<sub>3</sub> (δ 78,72) ao C<sub>4</sub> (δ 38,24), que por sua vez está ligado às metilas C<sub>23</sub> (δ 27,89) e C<sub>24</sub> (δ 15,46) e ao C<sub>5</sub> (δ 55,22), o qual está ligado ao C<sub>10</sub> (δ 36,93), que está ligado a metila C<sub>25</sub> (δ 15,16) e ao fragmento **a**, através do C<sub>1</sub> (δ 38,45), fechando o primeiro ciclo. O NOESY mostra ainda que a metila C<sub>23</sub> (δ 27,89) está espacialmente próxima ao hidrogênio carbinólico H (δ 3,67), pois há correlação do H (δ 3,67) carbinólico, que se encontra na posição axial, com o H (δ 1,46) desta metila, na posição equatorial (estas posições são definidas no espectro de <sup>1</sup>H pelo sinal em δ 3,67 na forma de um duplo duplete (dd) que mostra o acoplamento do H-3 carbinólico com os hidrogênios H-2,  $J^2=7,20$  Hz e  $J^3=13,20$  Hz, sendo que a correlação espacial com o H-2 (δ 2,07) confirmada pelo espectro NOESY);

Observando-se agora o fragmento **b**, os hidrogênios do C<sub>6</sub> (δ 18,27) e do C<sub>7</sub> (δ 32,69) correlacionam com o C<sub>9</sub> (δ 32,66) (a correlação do C<sub>7</sub> (δ 32,69) é confirmada pelo NOESY), sendo que o C<sub>7</sub> (δ 32,69) mostra ainda correlação com duas metilas C<sub>26</sub> (δ 16,71) e C<sub>27</sub> (δ 25,77), que são as mesmas e únicas correlações do C<sub>8</sub> (δ 39,19); logo, considerando que o C<sub>9</sub> (δ 32,66) está correlacionado com C<sub>6</sub> (δ 18,27), C<sub>7</sub> (δ 32,69) e com a metila C<sub>25</sub> (δ 15,16), ligada ao C<sub>10</sub> (δ 36,93), e ainda com a metila C<sub>26</sub> (δ 16,71), ligada ao C<sub>8</sub> (δ 39,19), conclui-se que o fragmento **b** está ligado ao C<sub>8</sub> (δ 39,19) através do C<sub>7</sub> (δ 32,69), e o C<sub>8</sub> (δ 39,19) liga-se a metila C<sub>26</sub> (δ 16,71) e ao C<sub>9</sub> (δ 32,66), o qual está ligado ao C<sub>10</sub> (δ 36,93), fechando o segundo ciclo.

Considerando o fragmento **c**, observa-se que o H (δ 5,76) do C<sub>12</sub> (δ 125,13), identificado como carbono vinílico, bastante desprotegido, mostra correlação com o C<sub>14</sub> (δ 41,68) quaternário, que está correlacionado também com o C<sub>11</sub> (δ 23,33) e com as mesmas metilas do C<sub>8</sub> (δ 39,19), a C<sub>26</sub> (δ 16,71) e a C<sub>27</sub> (δ 25,77); observando-se ainda que o C<sub>13</sub> (δ 143,86) é altamente desprotegido, devido à ligação dupla, e estando este correlacionado com os hidrogênios do C<sub>11</sub> (δ 23,33) e

do C<sub>18</sub> ( $\delta$  41,20), confirma-se então que o fragmento **c** está fundido através do C<sub>12</sub> ( $\delta$  125,13) ao C<sub>13</sub> ( $\delta$  143,86), o qual está ligado ao C<sub>14</sub> ( $\delta$  41,68), que liga-se ao C<sub>8</sub> ( $\delta$  39,19), sendo este ligado a metila C<sub>26</sub> ( $\delta$  16,71) e ao C<sub>9</sub> ( $\delta$  32,66), fechando o terceiro ciclo.

Os outros fragmentos e as demais ligações estão mostradas na figura 47. Todas as correlações observadas nos espectros HMBC, COSY e NOESY, que proporcionaram a determinação estrutural da substância ZTC10, identificada como sendo um triterpeno da classe oleanólica, conhecido como Ácido Oleanólico (rotação específica  $[\alpha]_D^{26,6} = +273^\circ$ , CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3:1) (Figura 51), estão nas figuras 48 (p. 73), 49 (p. 74) e 50 (p. 74), respectivamente.



**Figura 51.** Estrutura do (+)-Ácido Oleanólico (ZTC10)

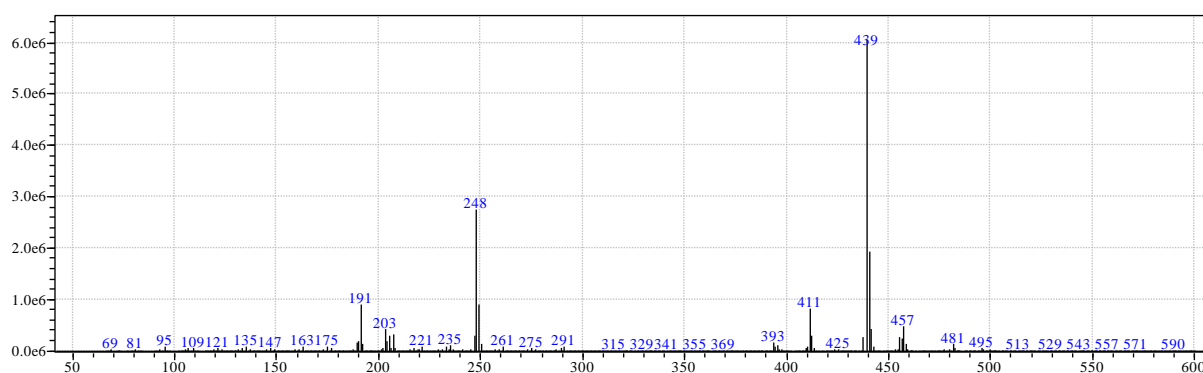
Os valores dos deslocamentos dos sinais mostrados nos espectros unidimensionais e bidimensionais e suas respectivas correlações também constam na tabela 12 (p. 77).

**Tabela 12.** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra ZTC10. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

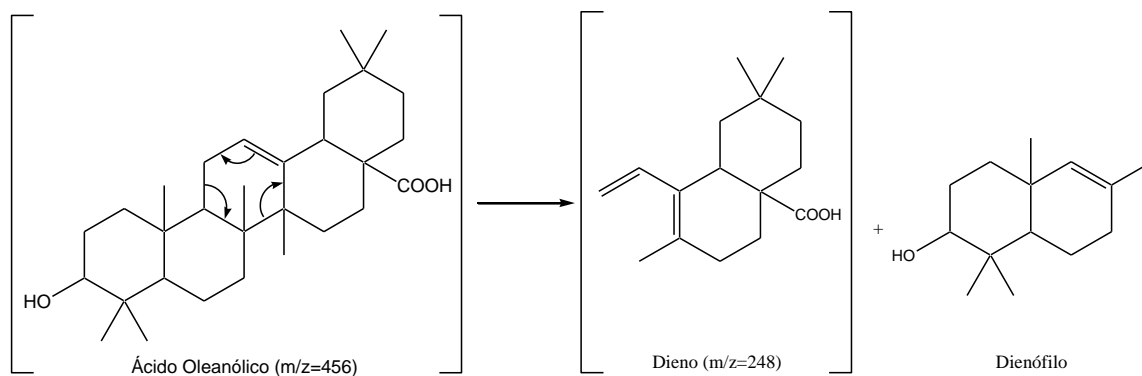
$^{13}\text{C}$		$\delta\text{C}^{13}$	$^1\text{H}$ $\delta\text{H}^1$	HMBC		COSY		NOESY	
Carbonos				$\delta\text{H}^1$	$\delta\text{H}_a$	$\delta\text{H}_b$	$\delta\text{H}_a$	$\delta\text{H}_b$	
1	$\text{CH}_2$	38,45	1,46; 2,11	1,40 (H-25)	2,11 (H-1); [1,46 (H-1)]	1,46 (H-1); [2,11 (H-1)]; 2,07 (H-2)]			
2	$\text{CH}_2$	26,66	1,42; 2,07	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); [1,42(H-2)]	1,46 (H-1); 1,42 (H-2); 3,67 (H-3); [2,07 (H-2); 3,67 (H-3)]			
3	CH	78,72	3,67dd ( $J=13,0$ e $7,0$ Hz)	2,11 (H-1); 2,07 (H-2); 1,46 (H-23); 1,26 (H-24)	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); 1,42 (H-2)	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); 1,23 (H-5); 1,46 (H-23)	
4	C	38,64		1,23 (H-5); 1,46 (H-23); 1,26 (H-24)					
5	CH	55,22	1,23	1,46 (H-23); 1,26 (H-24); 1,40 (H-25)	1,23 (H-5)	1,87 (H-2); 2,02 (H-6)	1,23 (H-5)	2,02 (H-6)	
6	$\text{CH}_2$	18,27	1,87; 2,02		1,87 (H-6); [2,02 (H-6)]	1,23 (H-5); [1,23 (H-5); 1,80 (H-7); 1,95 (H-7)]			
7	$\text{CH}_2$	32,69	1,80; 1,95	1,27 (H-26)	1,80 (H-7); [1,95 (H-7)]	2,02 (H-6); 1,95 (H-7); [2,02 (H-6); 1,80 (H-7)]			
8	C	39,19		1,27 (H-26); 1,63 (H-27)					
9	CH	47,58	2,05	1,87 (H-6); 2,36 (H-11); 5,76 (H-12); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26)	2,05 (H-9)	1,42 (H-11); 2,36 (H-11)	2,05 (H-9)	1,80 (H-7)	
10	C	36,93		1,23 (H-5); 1,40 (H-25)					
11	$\text{CH}_2$	23,33	1,42; 2,36	5,76 (H-12); 2,12 (H-19); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26)	1,42 (H-11); [2,36 (H-11)]	2,05 (H-9); 5,76 (H-12); [2,05 (H-9); 5,76 (H-12)]	2,36 (H-11)	1,40 (H-25); 1,27 (H-26)	
12	CH	122,22	5,76t ( $J=3,40$ Hz)		5,76 (H-12)	1,42 (H-11); 2,36 (H-12); 3,33 (H-18)	5,76 (H-12)	1,63 (H-11); 2,36 (H-11); 3,33 (H-18); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26); 1,42 (H-30)	
13	C	143,86		2,36 (H-11); 3,33 (H-18); 1,63 (H-19); 2,12 (H-19)					
14	C	41,68		2,36 (H-11); 5,76 (H-12); 2,20 (H-16); 3,33 (H-18); 1,27 (H-26); 1,63 (H-27)					
15	$\text{CH}_2$	22,97	2,09; 2,45	3,33 (H-18)	2,09 (H-15); 2,45 (H-15)	2,45 (H-15); [ 2,09 (H-15); 1,57 (H-16); 2,20 (H-16)]	2,45 (H-15)	2,09 (H-15)	
16	$\text{CH}_2$	27,61	1,57; 2,20	1,63 (H-27)	1,57 (H-16); [2,20 (H-16)]	2,20 (H-16); 2,45 (H-15); 2,22 (H-22); [2,45 (H-15); 1,57 (H-16)]			
17	C	46,37		3,33 (H-18)					
18	CH	41,20	3,33		3,33 (H-18)	1,63 (H-19); 2,12 (H-19)	3,33 (H-18)	1,63 (H-19); 2,22 (H-22); 1,42 (H-30)	
19	$\text{CH}_2$	45,93	1,63; 2,12	1,39 (H-29); 1,42 (H-30)	1,63 (H-19); [2,12 (H-19)]	3,33 (H-18); 2,12 (H-19); [3,33 (H-18); 1,63 (H-19)];			
20	C	30,59		1,39 (H-29); 1,42 (H-30)					
21	$\text{CH}_2$	33,81	1,69; 1,83	1,39 (H-29); 1,42 (H-30)	1,83 (H-21); [1,69 (H-21)]	1,69 (H-21); 2,04 (H-22); 2,22 (H-22); [1,83 (H-21); 2,04 (H-22); 2,22 (H-22)]	1,83 (H-21)	1,42 (H-30)	
22	$\text{CH}_2$	32,51	2,04; 2,22		2,04 (H-22); [2,22 (H-22)]	1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,22 (H-22); [1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,04 (H-21)]	2,22 (H-22)	1,57 (H-16); 1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,04 (H-22); 1,42 (H-30)	
23	$\text{CH}_3$	27,89	1,46s	3,67 (H-3); 1,26 (H-24)	1,46 (Me-23)	1,26 (Me-24)			
24	$\text{CH}_3$	15,46	1,26s	1,42 (H-2); 3,67 (H-3); 1,23 (H-5); 1,46 (H-23)	1,26 (Me-24)	1,46 (Me-23)			
25	$\text{CH}_3$	15,16	1,40s						
26	$\text{CH}_3$	16,71	1,27s	1,42 (H-11)					
27	$\text{CH}_3$	25,77	1,63s	1,80 (H-7); 5,76 (H-12)			1,63 (H-27)	1,95 (H-7); 2,05 (H-9); 2,09 (H-15); 2,20 (H-16)	
28	C	180,96		2,45 (H-15); 3,33 (H-18); 2,22 (H-22)					
29	$\text{CH}_3$	32,95	1,39s	1,42 (H-30)					
30	$\text{CH}_3$	23,40	1,42s						

- Espectrometria de Massas (EM)

O espectro de massas (Figura 52) da substância codificada como ZTC10, identificada como Ácido Oleanólico, obtido por ionização química no modo positivo, indicou o peso molecular de  $M = 456$  u com fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ . O espectro mostra o pico  $M+1 = 457$  u. O íon molecular sofre uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder (Figura 53), sendo mostrado no espectro o pico  $M-208 = 248$  u, que é característico dessa classe de compostos (BUDZIKIEWICZ et al., 1964).



**Figura 52.** Espectro de Massas ( $m/z$ ) do Ácido Oleanólico (ZTC10)



**Figura 53.** Fragmentação do Ácido Oleanólico do Tipo Retro-Diels-Alder.

### 3.12 Metodologia das Quantificações da ZTC9 e ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) da Folha de *Z. tuberculosa* pelo Método de RMN $^1\text{H}$ .

Das frações da partição do extrato ZTB das folhas da *Z. tuberculosa*, que foram submetidas aos bioensaios, a fração clorofórmica (extrato semi-bruto), identificada como ZTP2, mostrou atividade inibitória da linfoproliferação *in vitro*, por este motivo foi tomada para fracionamento. Deste fracionamento foram isoladas duas substâncias, codificadas como ZTC9 e ZTC10, que podem ser os princípios ativos e por esta razão foram quantificadas.

Na quantificação (Fluxograma 3, p. 81) foi utilizada uma amostra de 500 mg da ZTP2 (Fluxograma 1, p. 22), que após solubilizada em Acetona/Clorofórmio 3:1 com auxílio do ultrassom, foi submetida a filtração em carvão ativo para a remoção da clorofila (CASTILHO et al., 2008).

O carvão ativado foi adicionado ao extrato solubilizado e após duas horas filtrou-se a mistura em funil de Buchner a vácuo. O líquido filtrado foi concentrado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida a 35 °C e deste concentrado sem clorofila (358 mg) foram utilizados 60 mg para a preparação de 12 amostras para a quantificação. Inicialmente, foram preparadas 4 soluções, duas para a preparação das seis amostras para a quantificação da ZTC9 e duas para a preparação das seis amostras para quantificação da ZTC10. Para diminuir o erro na quantificação, foram preparadas seis amostras com volume de 1 mL cada.

Para a quantificação da ZTC9 a primeira solução (S1) foi de concentração 10 mg.mL<sup>-1</sup> partindo de 30 mg da fração ZTP2 desclorofilada, solubilizada em 3 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1) e a segunda solução (S2) foi de concentração 5 mg.mL<sup>-1</sup> partindo de 10 mg de ZTC9 pura, solubilizada em 2 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1). Estas duas soluções serviram de base para a preparação de seis amostras com volume de 1 mL cada (as amostras que não chegaram ao volume de 1 mL foram completadas com solvente), de acordo com os dados a seguir:

- Amostra 1: 0,5 mL (S1) + 0,5 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1)
- Amostra 2: 0,5 mL (S1) + 0,1 mL (S2) + 0,4 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1)
- Amostra 3: 0,5 mL (S1) + 0,2 mL (S2) + 0,3 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1)

- Amostra 4: 0,5 mL (S1) + 0,3 mL (S2) + 0,2 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1)
- Amostra 5: 0,5 mL (S1) + 0,4 mL (S2) + 0,1 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1:1)
- Amostra 6: 0,5 mL (S1) + 0,5 mL (S2)

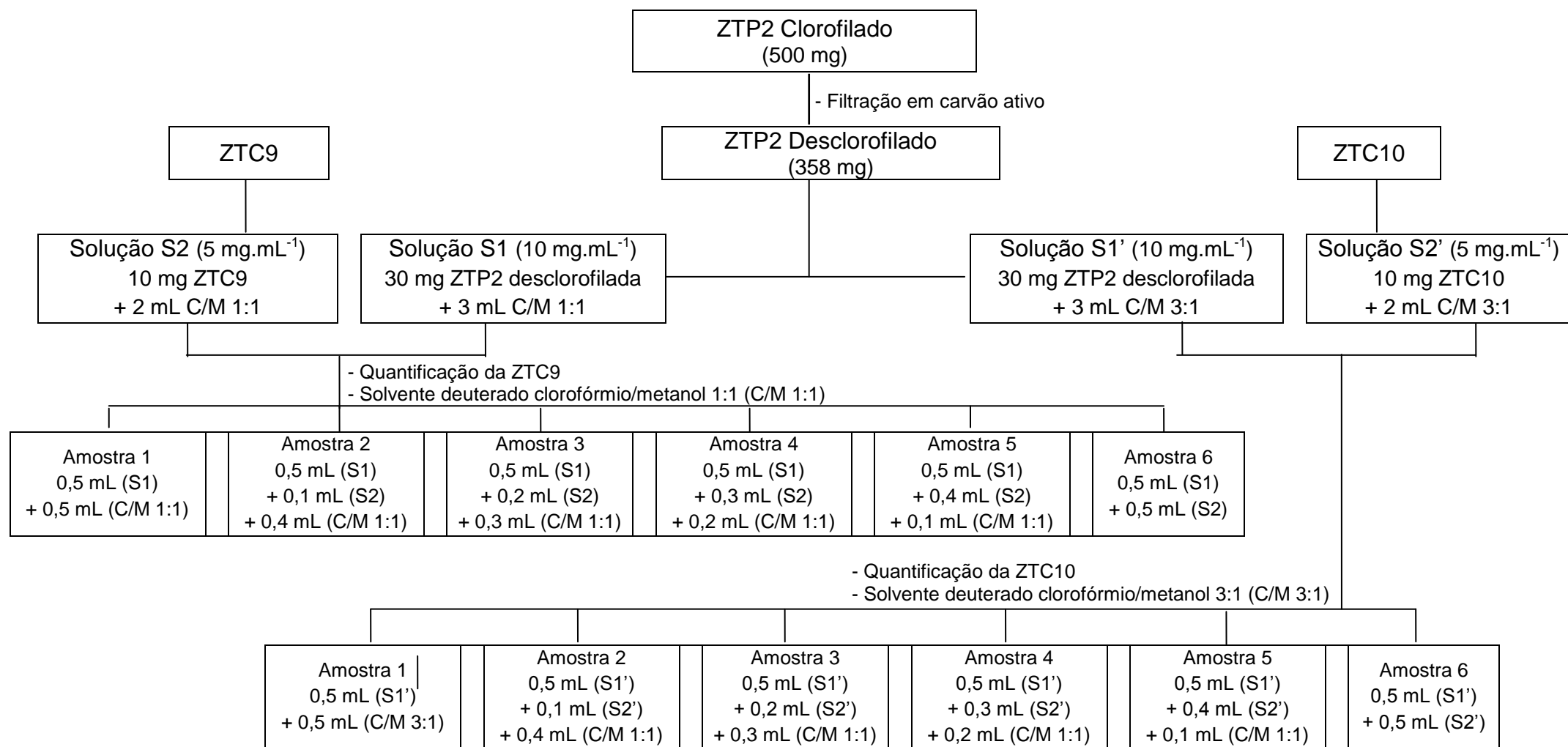
Para a quantificação da ZTC10 a primeira solução (S1') foi de concentração 10 mg.mL<sup>-1</sup> partindo de 30 mg da fração ZTP2 desclorofilada, solubilizada em 3 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1) e a segunda solução (S2') foi de concentração 5 mg.mL<sup>-1</sup> partindo de 10 mg de ZTC10 pura, solubilizada em 2 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1), de acordo com os dados abaixo:

- Amostra 1': 0,5 mL (S1') + 0,5 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1)
- Amostra 2': 0,5 mL (S1') + 0,1 mL (S2') + 0,4 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1)
- Amostra 3': 0,5 mL (S1') + 0,2 mL (S2') + 0,3 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1)
- Amostra 4': 0,5 mL (S1') + 0,3 mL (S2') + 0,2 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1)
- Amostra 5': 0,5 mL (S1') + 0,4 mL (S2') + 0,1 mL de solvente (CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1)
- Amostra 6': 0,5 mL (S1') + 0,5 mL (S2')

Todas as amostras foram submetidas a RMN <sup>1</sup>H e seus espectros foram registrados em aparelho equipado com uma sonda de 5 mm. Para cada amostra, 16 varreduras foram gravadas com os seguintes parâmetros: 32K pontos de dados, com largura do pulso de 9.0 µs (ângulo de 90°); tempo de aquisição 3,958 s e relaxamento de 1 s, sendo uma largura espectral de 2564 Hz. Transformada de Fourier com LB de 1,5 Hz (ZTC9) e LB de 0,3 Hz (ZTC10).

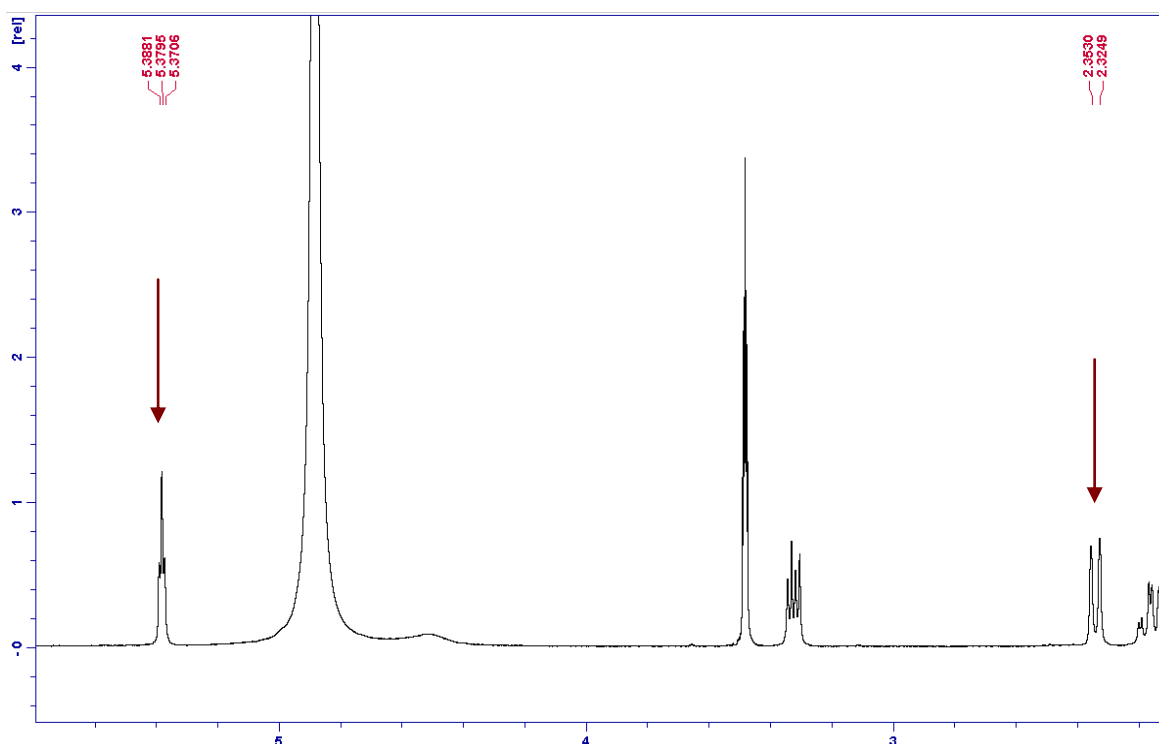


**Fluxograma 3:** Metodologia das Quantificações da ZTC9 e ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) da Folha de *Z. tuberculosa* pelo Método de RMN  $H^1$ .

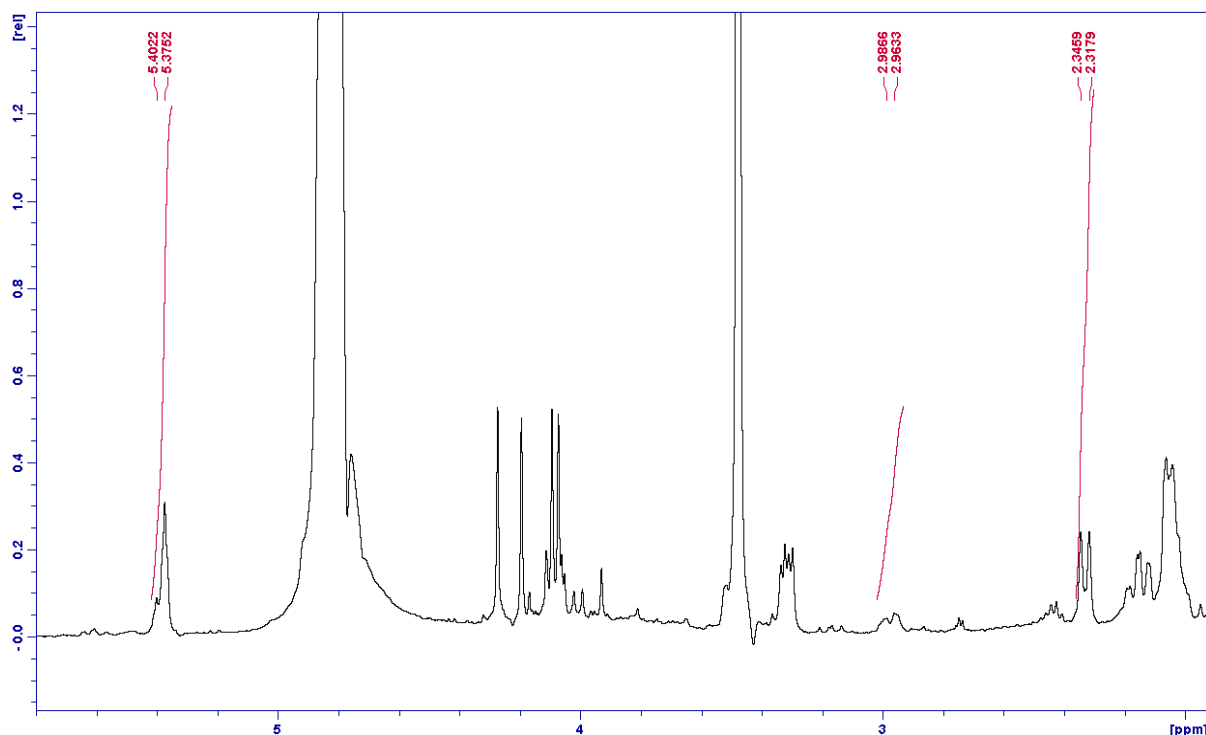


### 3.13 Resultados das Quantificações da ZTC9 e ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) da Folha de *Z. tuberculosa* pelo Método de RMN $H^1$ .

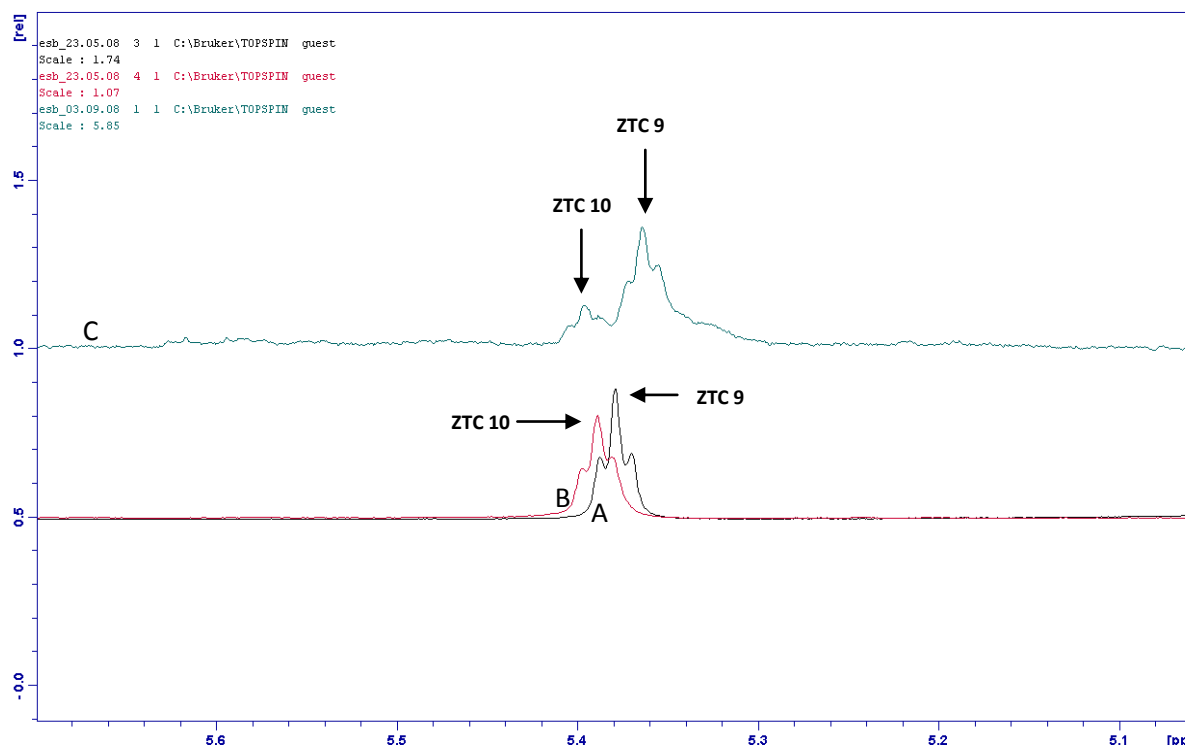
Nos espectros das amostras que foram submetidas à RMN  $H^1$ , os sinais dos prótons selecionados para a quantificação da ZTC9 (Figuras 54 e 55, p. 82-83) foram  $\delta$  5,38 (sinal da ZTC9 ligeiramente sobreposto ao sinal da ZTC10, mas bem distintos um do outro, como mostrado no espectro de RMN  $H^1$  do extrato semi-bruto) (Figura 56, p. 83); e  $\delta$  2,97 (sinal da ZTC10, usado como referencial nas integrações);  $\delta$  2,33 (sinal da ZTC9) e os sinais dos prótons selecionados para a quantificação da ZTC10 (Figuras 57 e 58, p. 84) foram  $\delta$  5,39 (sinal da ZTC10);  $\delta$  2,96 (sinal da ZTC10);  $\delta$  2,32 (sinal da ZTC9, usado como referencial nas integrações).



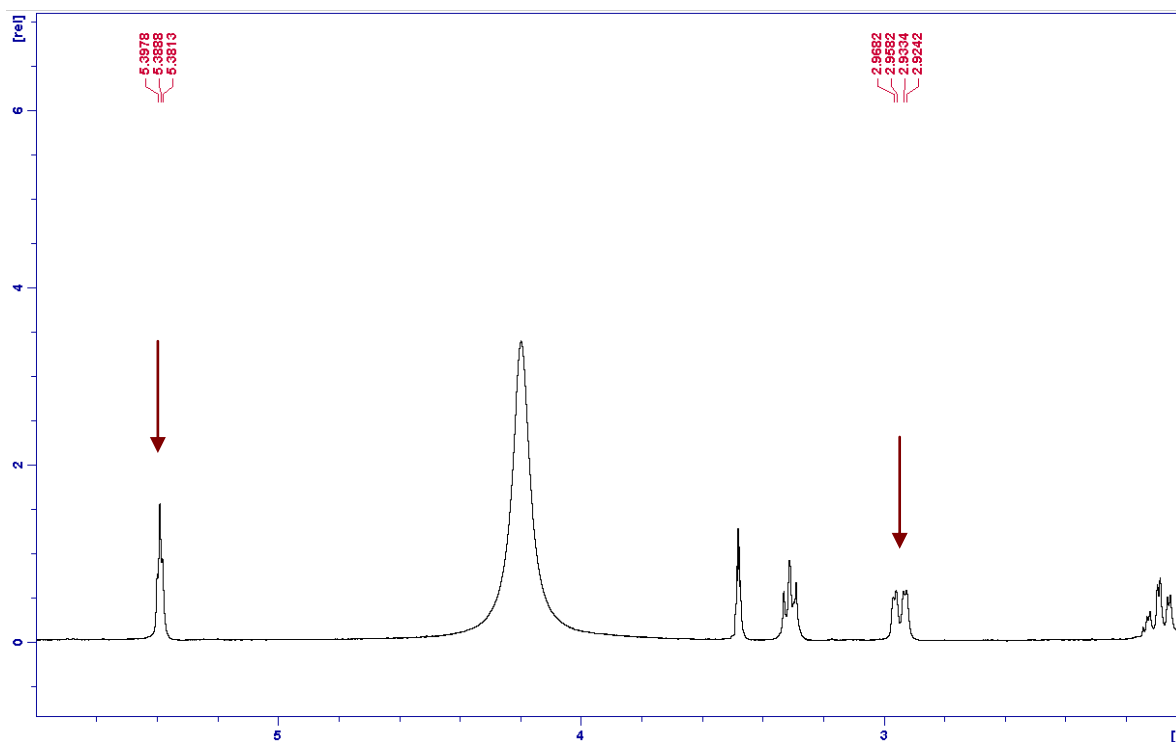
**Figura 54.** Espectro de RMN  $H^1$  de ZTC9 (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC9), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



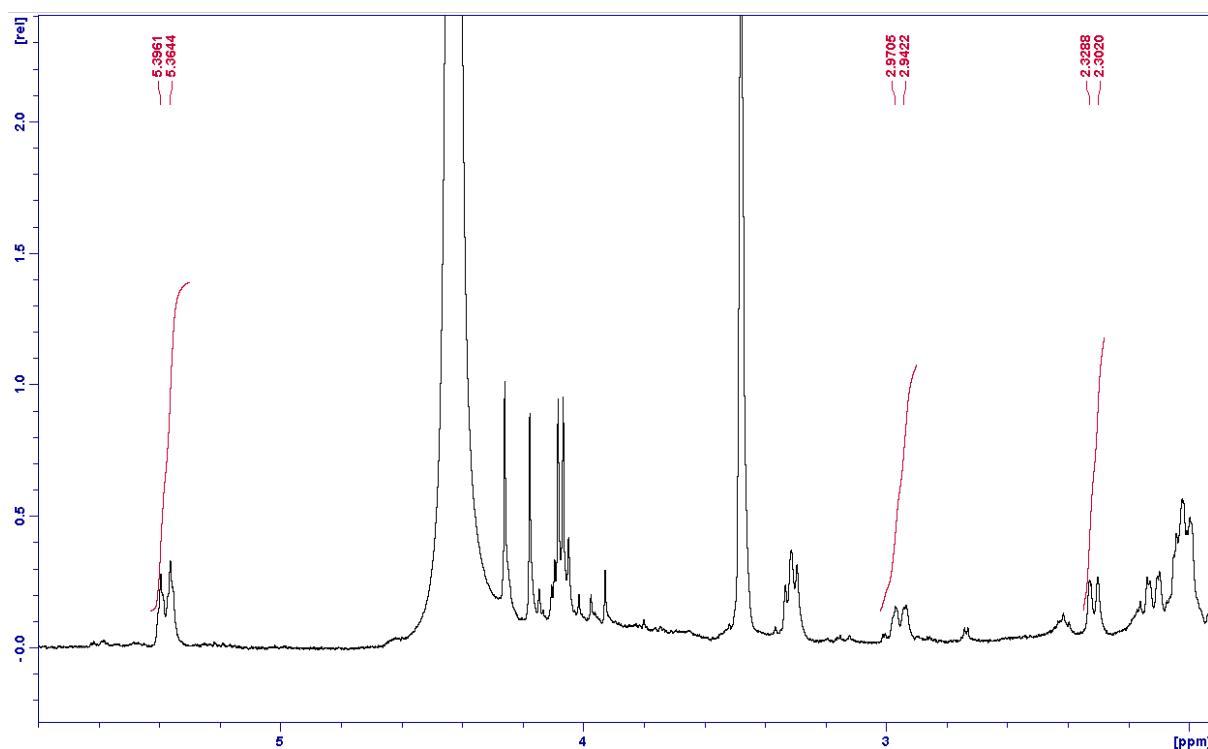
**Figura 55.** Espectro de RMN  $H^1$  da Fração Clorofórmio (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC9), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



**Figura 56.** Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  de ZTC9 (A), ZTC10 (B) e Fração Clorofórmica (C), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1

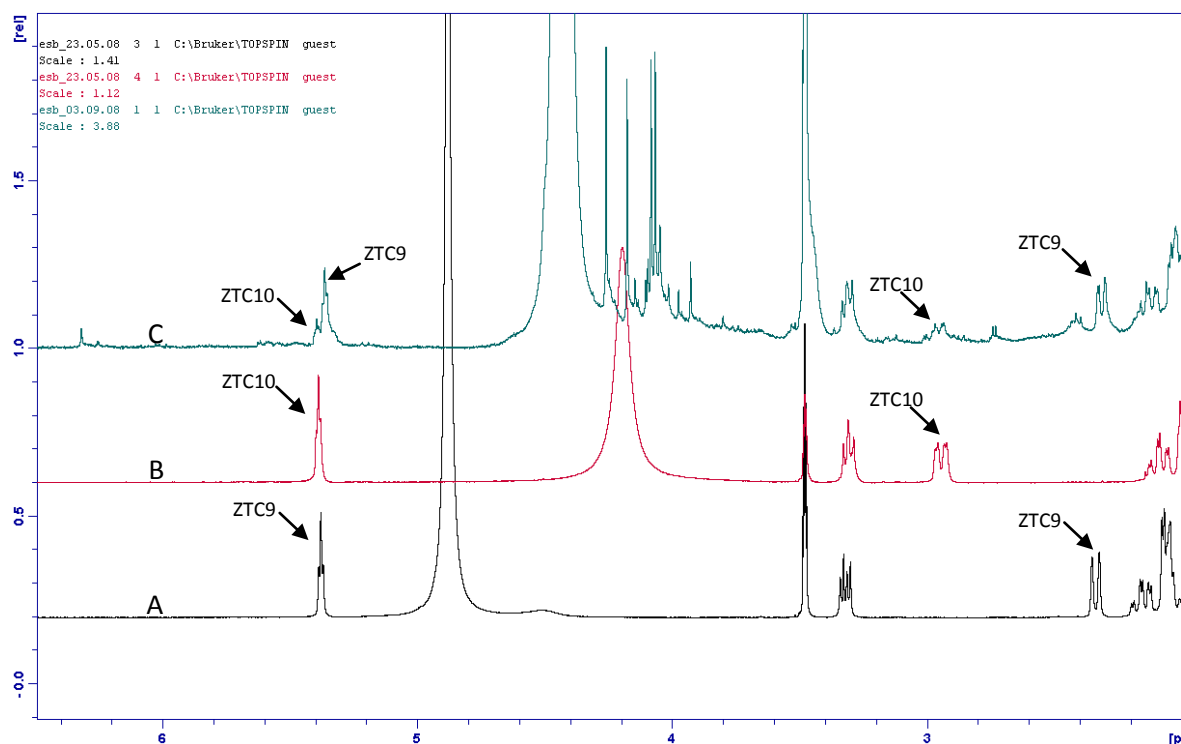


**Figura 57.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> de ZTC10 (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC10), Solvente CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1



**Figura 58.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> da Fração Clorofórmio (Deslocamentos dos Picos Escolhidos para a Quantificação de ZTC10), Solvente CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3:1

Estes sinais foram escolhidos porque estavam mais bem diferenciados e não demonstravam sobreposição de sinais, quando comparados os espectros de RMN  $^1\text{H}$  da ZTC9, ZTC10 e extrato semi-bruto (Figura 59). Para as análises quantitativas foram utilizadas as áreas das bases destes sinais escolhidos, após as correções iterativas das suas respectivas fases e linhas de bases (CASTILHO et al., 2008; HAZEKAMP, 2007).



**Figura 59.** Espectro de RMN  $\text{H}^1$  de ZTC9 (A), ZTC10 (B) e Extrato Semi-Bruto (C) (Fração Clorofórmica), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

### 3.13.1 Resultado da Quantificação da Substância ZTC9 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmica da Partição) das Folhas de *Z. tuberculosa*.

Das seis amostras preparadas para a quantificação da ZTC9 a primeira (amostra 1) continha apenas o extrato semi-bruto sem clorofila (5 mg de ZTP2 sem clorofila) e as cinco outras amostras com a mesma quantidade desse extrato semi-bruto sem clorofila (5 mg de ZTP2) adicionada de diferentes quantidades da substância codificada como ZTC9 (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg). Nestas seis amostras a ZTC9 foi quantificada através de dois sinais ( $\delta$  5,38 e  $\delta$  2,33) (Tabela 13, p. 86; Figuras 60 a 72, p. 88-94), utilizando-se a fórmula  $M_\delta$  para calcular a média das

diferenças das integrações de cada um desses sinais, e em seguida a regra de três simples para se obter a massa ( $X_{\delta}$ ) da ZTC9 em cada sinal. Em cada amostra (1 - 6) as integrações dos sinais em  $\delta$  5,38 e  $\delta$  2,33 foram codificadas como  $I_1 - I_6$ , respectivamente. Por fim, somando as duas massas e dividindo-as por dois (Média aritmética), têm-se a massa final em mg e a percentagem em massa (%), sendo esta comparada à massa do extrato semi-bruto sem clorofila utilizado (5 mg). Sabendo-se ainda que a ZTC9 foi identificada como sendo o Ácido Ursólico ( $C_{30}H_{48}O_3$ ), de massa molecular (MM) igual a 456 u, pode-se calcular também a sua concentração ([ ]) em  $\text{mol.L}^{-1}$  (CASTILHO et al., 2008; HAZEKAMP, 2007; HOEK et al., 2001).

**Tabela 13.** Quantificação da ZTC9

<b>Código</b>	<b>Medidas das Integrações dos Sinais</b>		
<b>(I)</b>	<b>ZTC9 (<math>\delta=5,38</math>)</b>	<b>ZTC9 (<math>\delta=2,33</math>)</b>	<b>ZTC10 (<math>\delta=2,97</math>)</b>
$I_1$	1,7157	1,7101	1
$I_2$	1,9493	2,3866	1
$I_3$	2,4838	2,6164	1
$I_4$	3,1125	2,8433	1
$I_5$	3,1685	3,4289	1
$I_6$	3,6261	3,7858	1

Média das diferenças das integrações ( $M_{\delta}$ ) dos sinais ( $\delta$  5,38 e  $\delta$  2,33):

$$M_{\delta} = \frac{(I_2 - I_1) + (I_3 - I_2) + (I_4 - I_3) + (I_5 - I_4) + (I_6 - I_5)}{5}$$

$$M_{\delta 5,38} = \frac{0,2336 + 0,5345 + 0,6287 + 0,0560 + 0,4576}{5} = 0,38$$

$$M_{\delta 2,33} = \frac{0,6765 + 0,2298 + 0,2269 + 0,5856 + 0,3569}{5} = 0,42$$

Massa da ZTC9 nos sinais quantificados ( $\delta$  5,38 e  $\delta$  2,33), obtida por regra de três simples:

(I) ----- Massa (mg)

0,38 ----- 0,5 mg

1,7157 -----  $X_{\delta 5,38}$

$$X_{\delta 5,38} = 2,26 \text{ mg}$$

0,42 ----- 0,5 mg

1,7101 -----  $X_{\delta 2,33}$

$$X_{\delta 2,33} = 2,04 \text{ mg}$$

Determinação da média aritmética das duas massas:

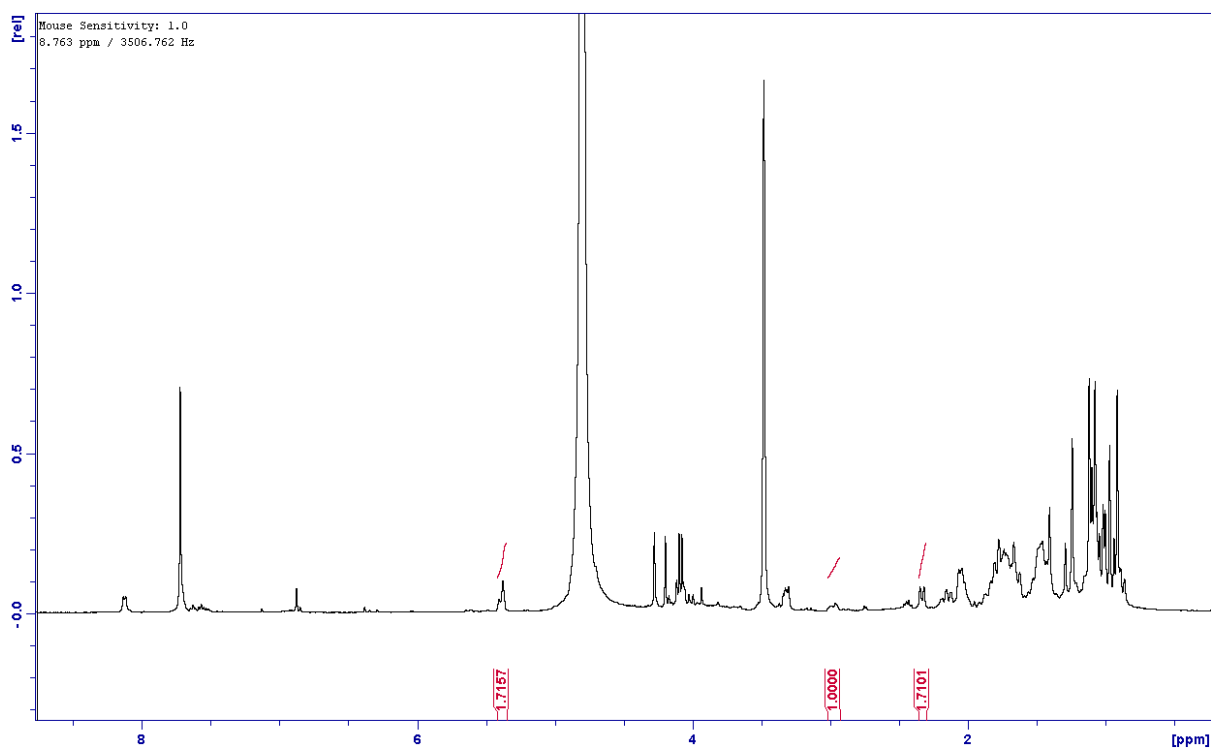
$$\frac{X_{\delta 5,38} + X_{\delta 2,33}}{2} = \frac{2,26 + 2,04}{2} = 2,15 \text{ mg}$$

O valor acima calculado corresponde a 43 % de ZTC9, em massa, no extrato clorofórmico (ZTP2).

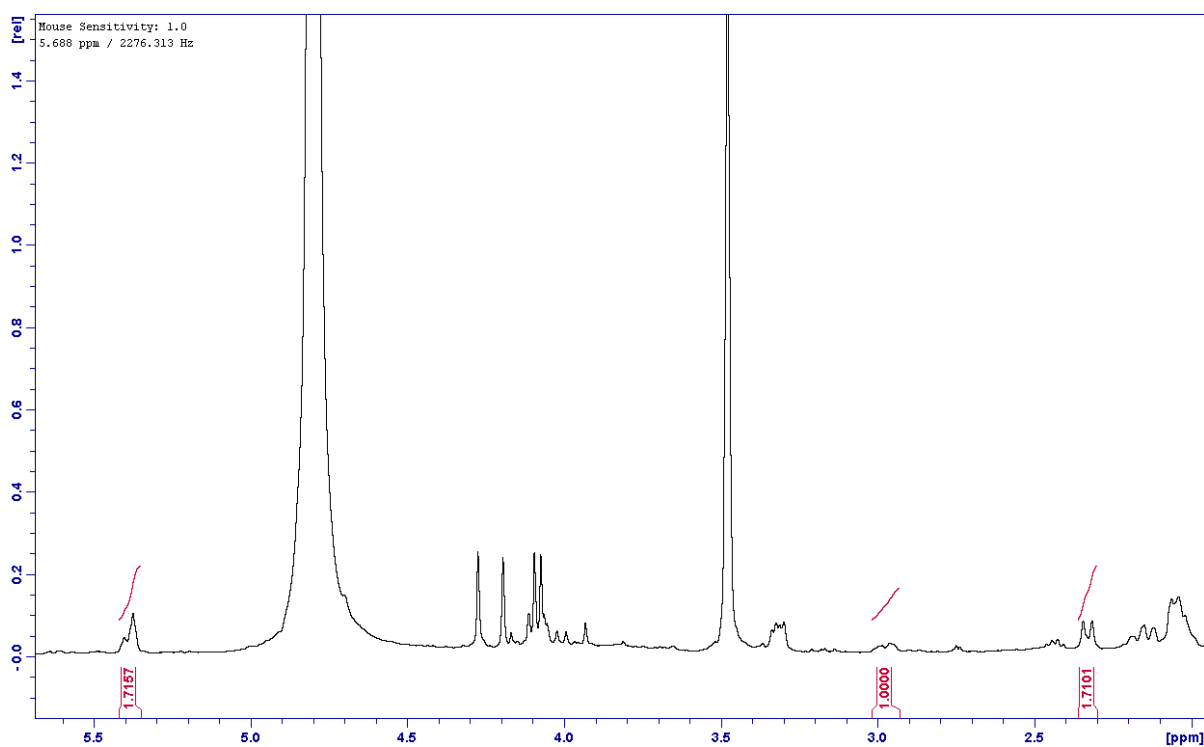
Determinação da concentração em mols.L<sup>-1</sup> ([ ]) da ZTC9 (Ácido Ursólico):

$$[ ] = \frac{X \text{ (g)}}{MM \text{ (mol)} \cdot V \text{ (L)}}$$

$$[ ] = \frac{2,15 \cdot 10^{-3}}{456 \times 1 \cdot 10^{-3}} = 4,71 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

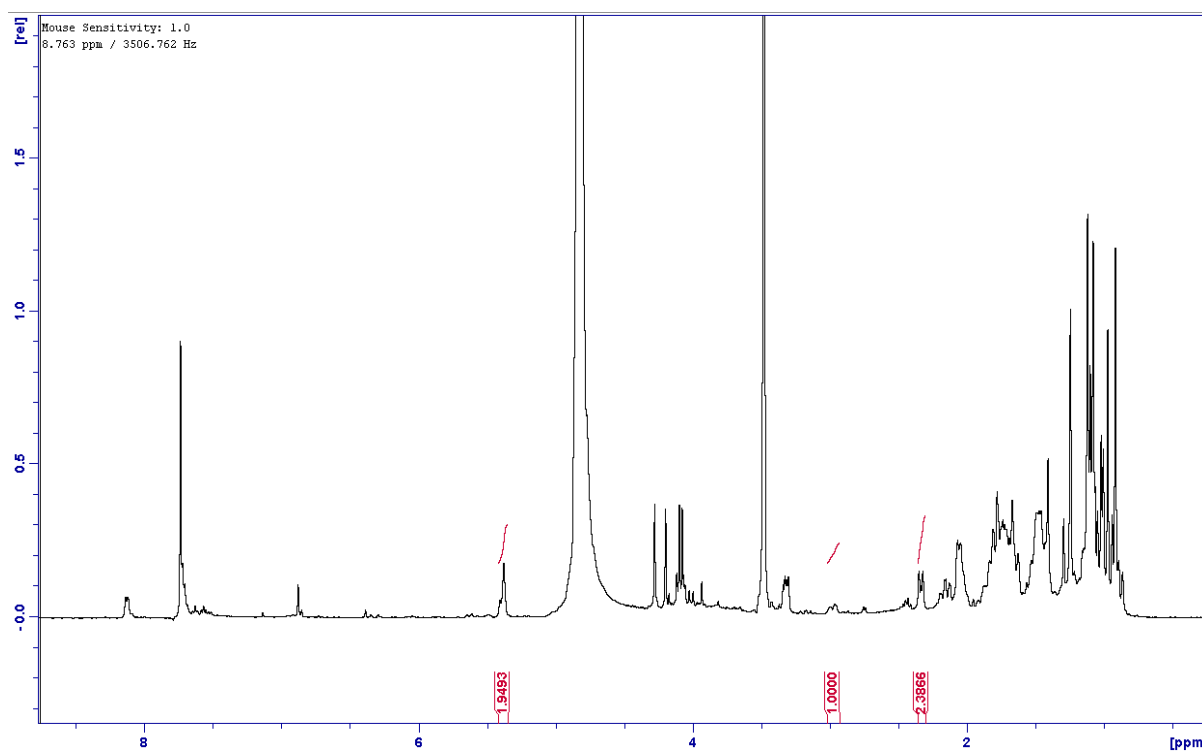


**Figura 60.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 1), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1

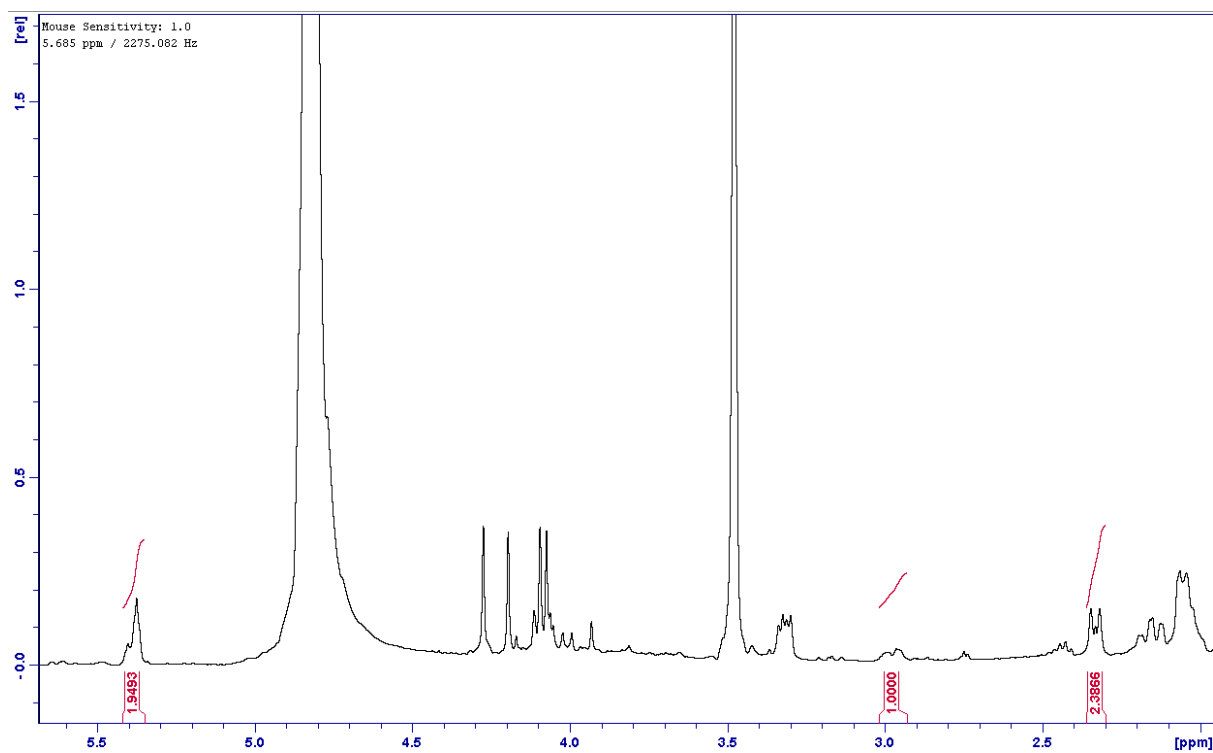


**Figura 61.** Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 1), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1

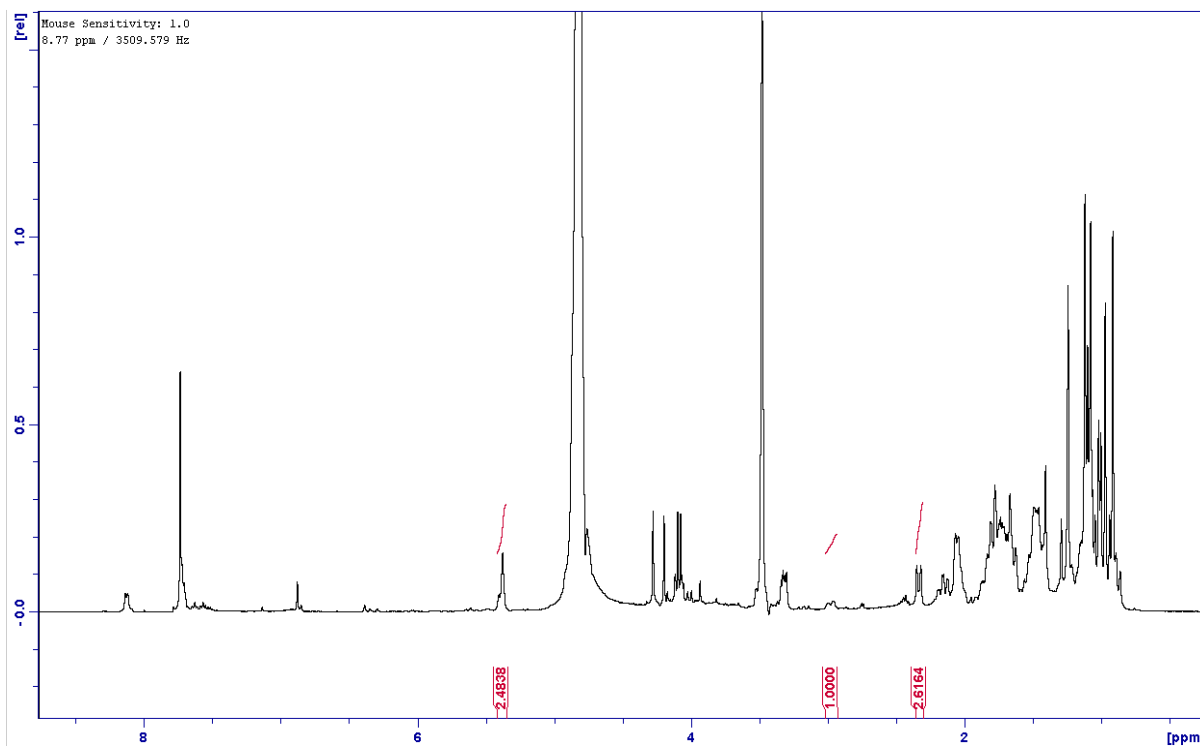




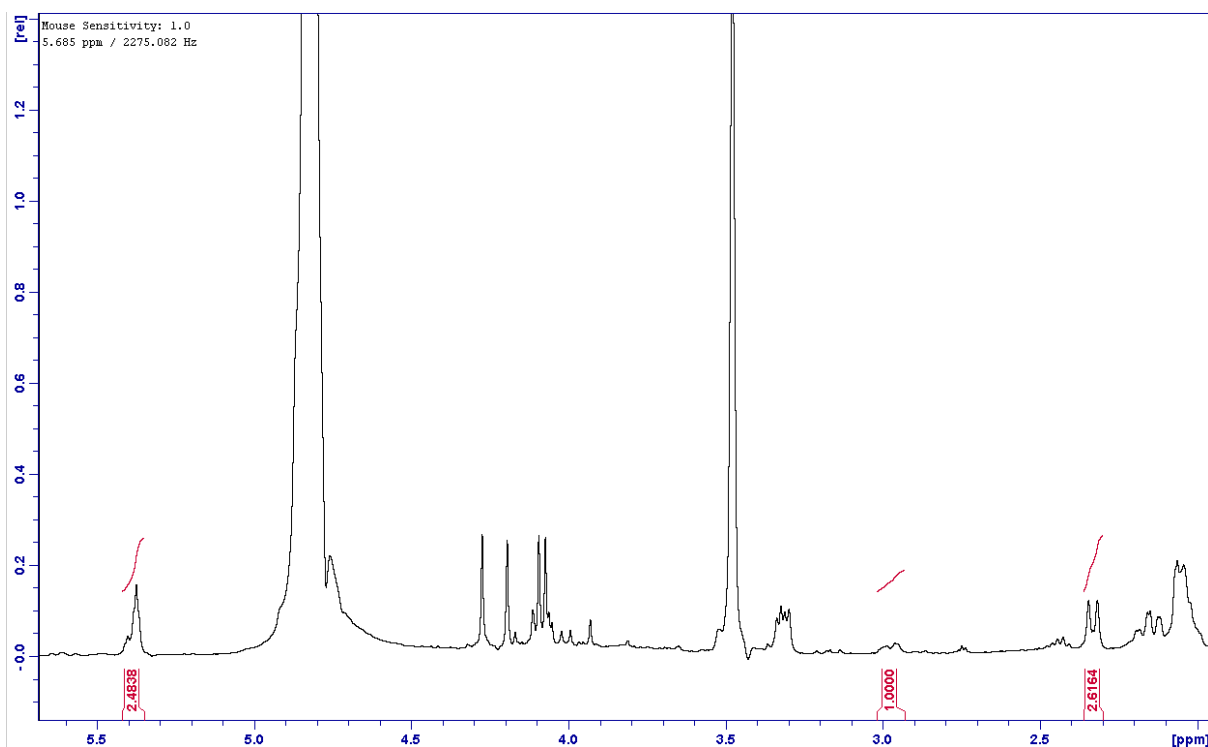
**Figura 62.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 2), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



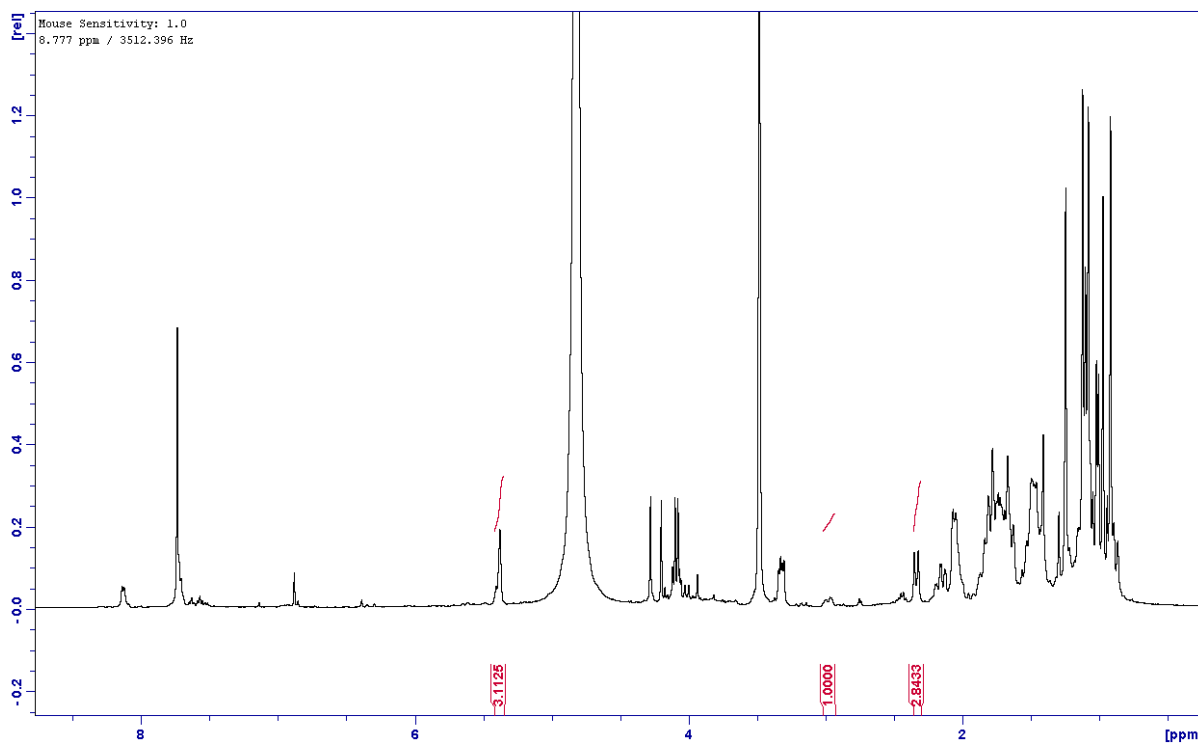
**Figura 63.** Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 2), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



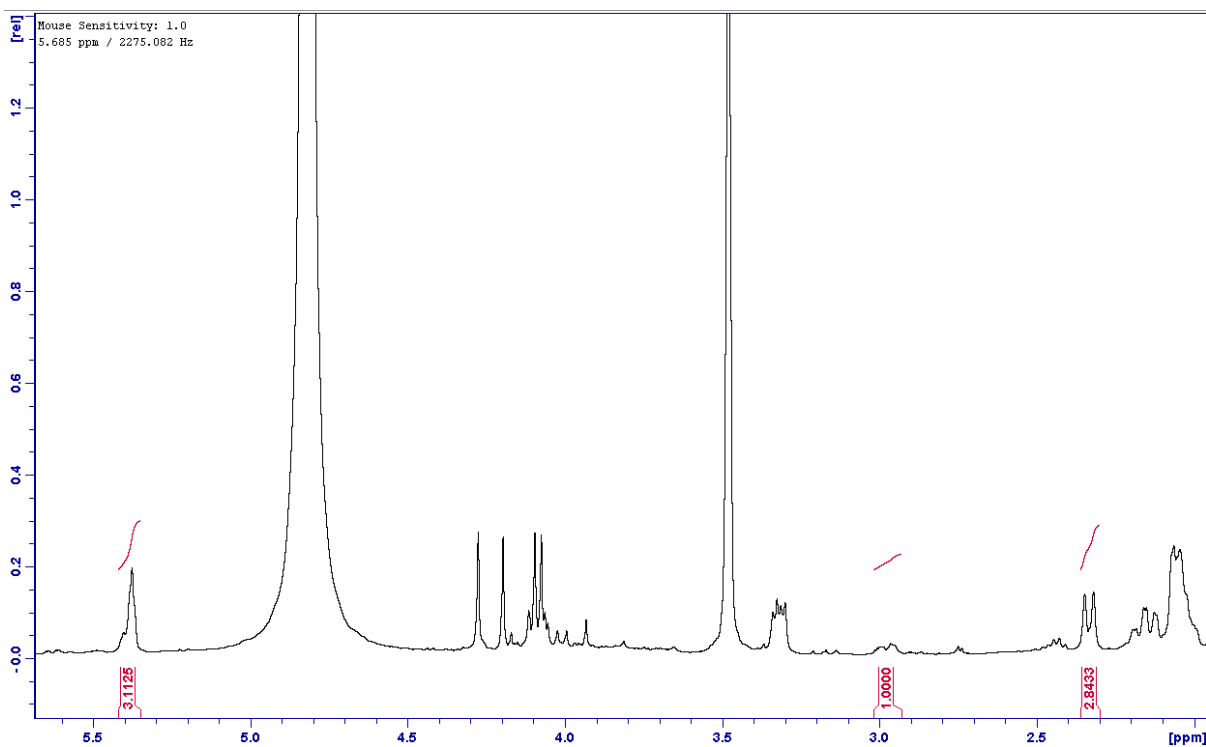
**Figura 64.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 3), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



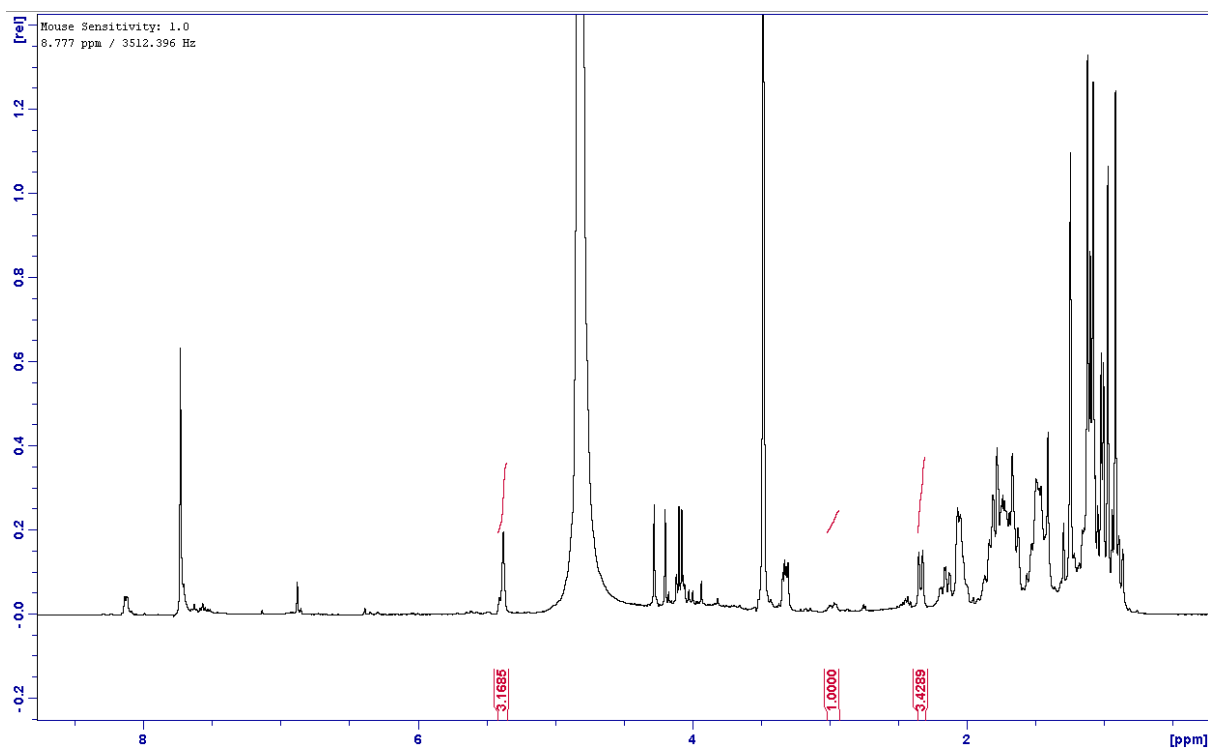
**Figura 65.** Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 3), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



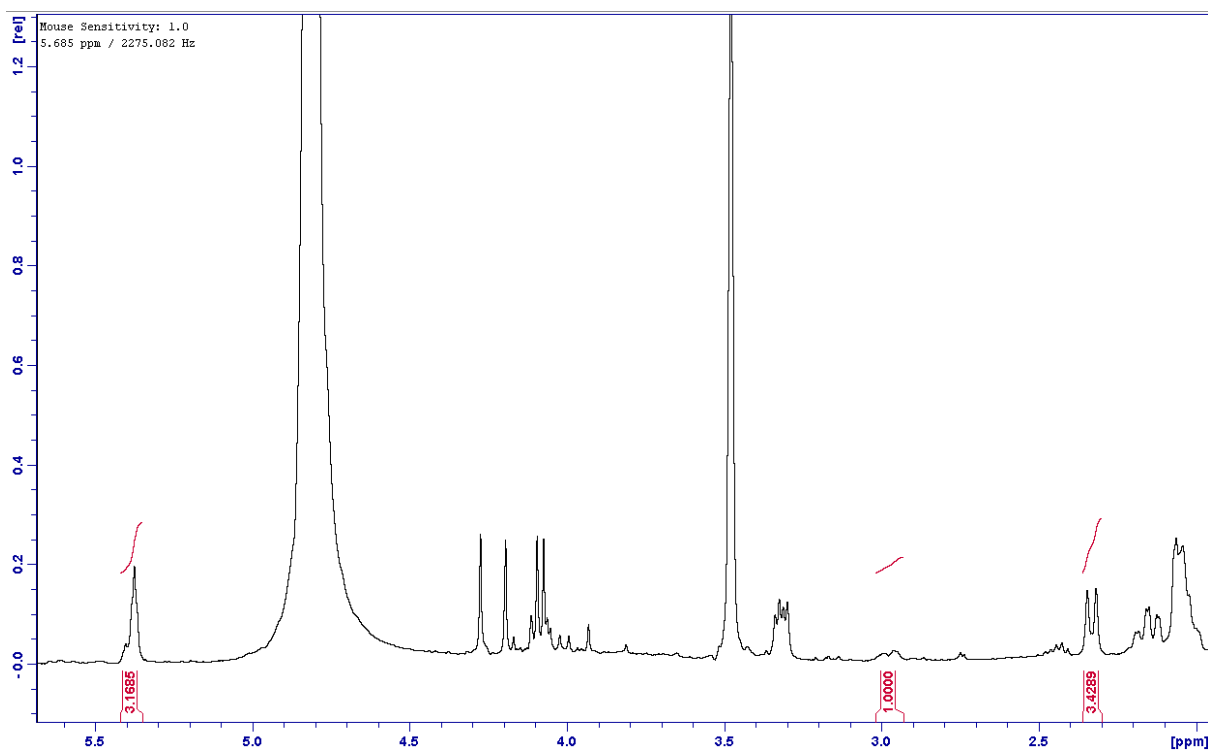
**Figura 66.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 4), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



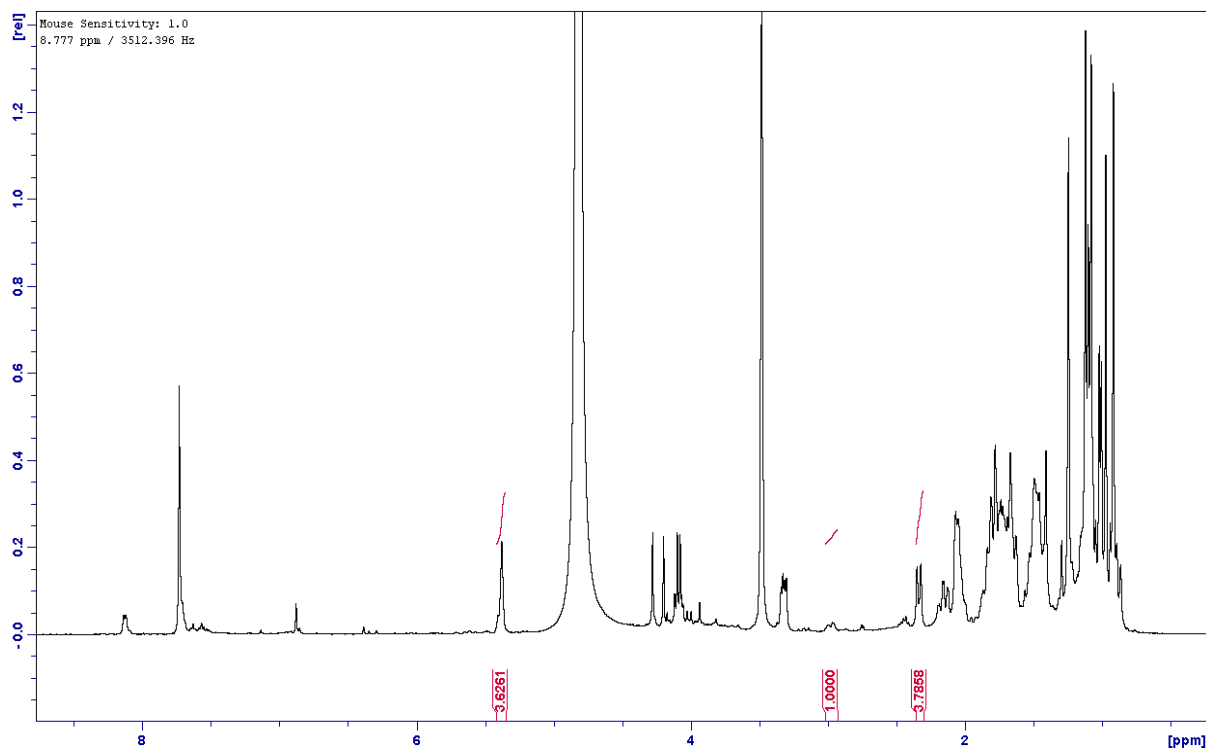
**Figura 67.** Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 4), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



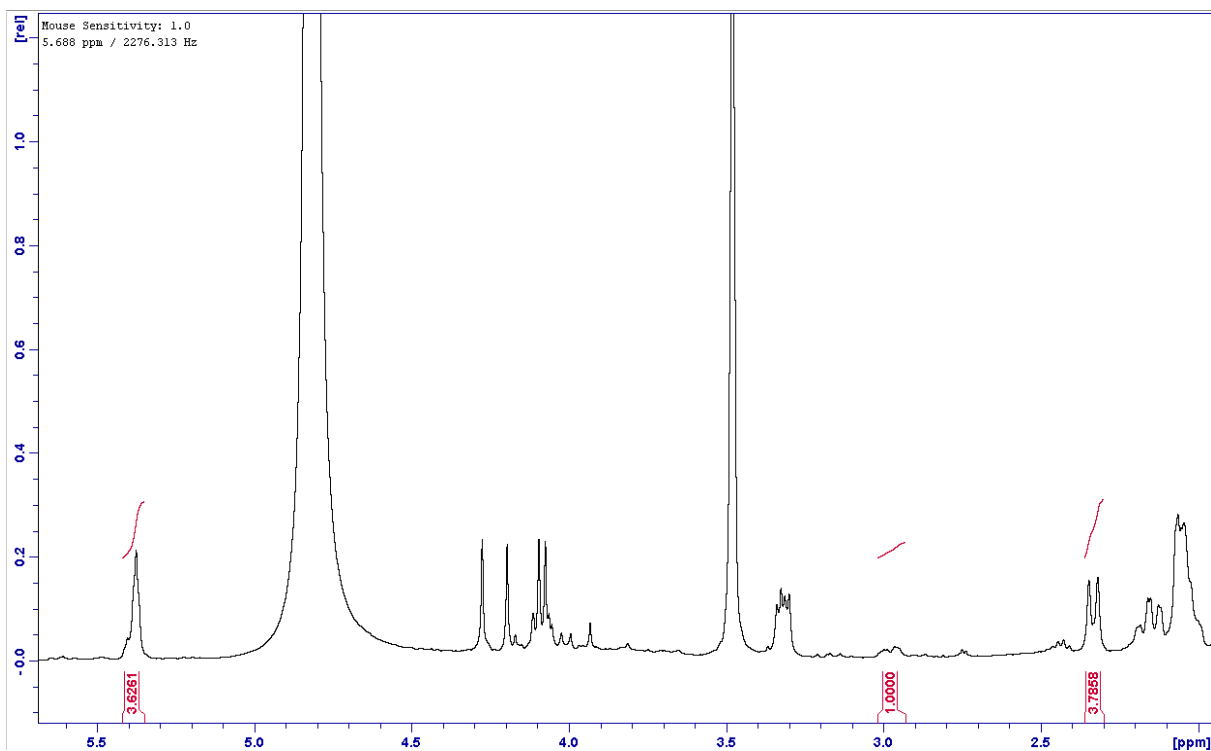
**Figura 68.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 5), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



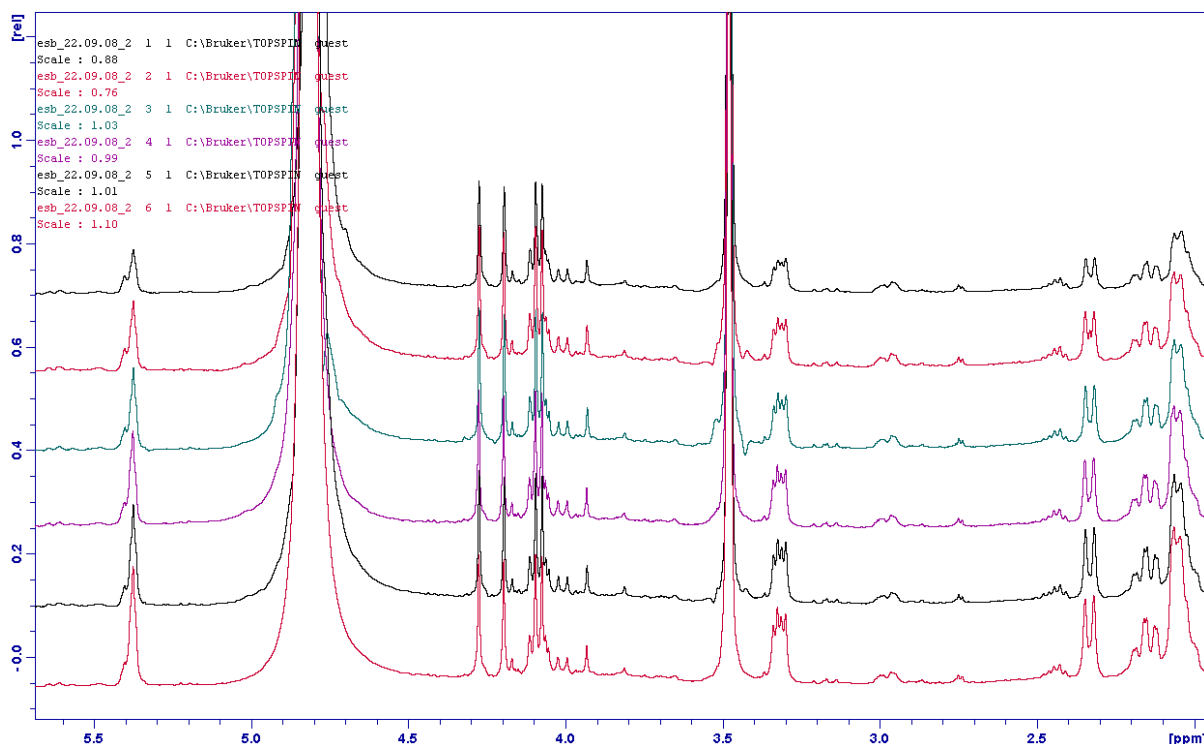
**Figura 69.** Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 5), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



**Figura 70.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 6), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



**Figura 71.** Quantificação da ZTC9, Expansão do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 6), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1



**Figura 72.** Quantificação da ZTC9, Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Amostra 1-6), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  1:1

### 3.13.2 Resultado da Quantificação da Substância ZTC10 no Extrato Semi-Bruto (Fração Clorofórmio da Partição) das Folhas de *Z. tuberculosa*.

Das seis amostras preparadas para a quantificação da ZTC10 a primeira (amostra 1) continha apenas o extrato semi-bruto sem clorofila (5 mg de ZTP2 sem clorofila) e as cinco outras amostras com a mesma quantidade desse extrato semi-bruto sem clorofila (5 mg) adicionada de diferentes quantidades da substância codificada como ZTC10 (0,5;1,0;1,5;2,0;2,5 mg). Nestas seis amostras a ZTC10 foi quantificada através de dois sinais ( $\delta$  5,39 e  $\delta$  2,96) (Tabela 14, p. 95; Figuras 73 a 85, p. 97-103), utilizando-se a fórmula  $M_\delta$  para calcular a média das diferenças das integrações de cada um desses sinais, e em seguida a regra de três simples para se obter a massa ( $X_\delta$ ) da ZTC10 em cada sinal. Em cada amostra (1 - 6) as integrações dos sinais em  $\delta$  5,39 e  $\delta$  2,96 foram codificadas como  $I_1 - I_6$ , respectivamente. Por fim, somando as duas massas e dividindo-as por dois (Média aritmética), têm-se a massas final em mg e a percentagem em massa (%), sendo esta comparada à massa do extrato semi-bruto sem clorofila utilizado (5 mg). Sabendo-se ainda que a

ZTC10 foi identificada como sendo o Ácido Oleanólico ( $C_{30}H_{48}O_3$ ), de massa molecular (MM) igual a 456 u, têm-se também a sua concentração ([ ]) em  $\text{mol.L}^{-1}$  (CASTILHO et al., 2008; HAZEKAMP, 2007; HOEK et al., 2001).

**Tabela 14.** Quantificação da ZTC10

Código	Medidas das Integrações dos Sinais		
(I)	ZTC10 ( $\delta=5,39$ )	ZTC10 ( $\delta=2,96$ )	ZTC9 ( $\delta=2,32$ )
$I_1$	0,9430	0,5903	1
$I_2$	1,1008	0,7438	1
$I_3$	1,2021	0,9008	1
$I_4$	1,2805	0,9787	1
$I_5$	1,4977	1,1589	1
$I_6$	1,8474	1,3224	1

Média das diferenças das integrações ( $M_{\delta}$ ) dos sinais ( $\delta$  5,39 e  $\delta$  2,96):

$$M_{\delta} = \frac{(I_2 - I_1) + (I_3 - I_2) + (I_4 - I_3) + (I_5 - I_4) + (I_6 - I_5)}{5}$$

$$M_{\delta 5,39} = \frac{0,1578 + 0,1013 + 0,0784 + 0,2172 + 0,3497}{5} = 0,18$$

$$M_{\delta 2,96} = \frac{0,1535 + 0,1570 + 0,0779 + 0,1802 + 0,1635}{5} = 0,15$$

Massa da ZTC10 nos sinais quantificados ( $\delta$  5,39 e  $\delta$  2,96), obtida por regra de três simples:

(I) ----- Massa (mg)

0,18 ----- 0,5 mg

0,9430 -----  $X_{\delta 5,39}$

$X_{\delta 5,39} = 2,62 \text{ mg}$

$$\begin{array}{rcl} 0,15 & \text{-----} & 0,5 \\ 0,5903 & \text{-----} & X_{\delta 2,96} \end{array}$$

$$X_{\delta 2,96} = 1,97 \text{ mg}$$

Determinação da média aritmética das duas massas:

$$\frac{X_{\delta 5,39} + X_{\delta 2,96}}{2} = \frac{2,62 + 1,97}{2} = 2,30 \text{ mg}$$

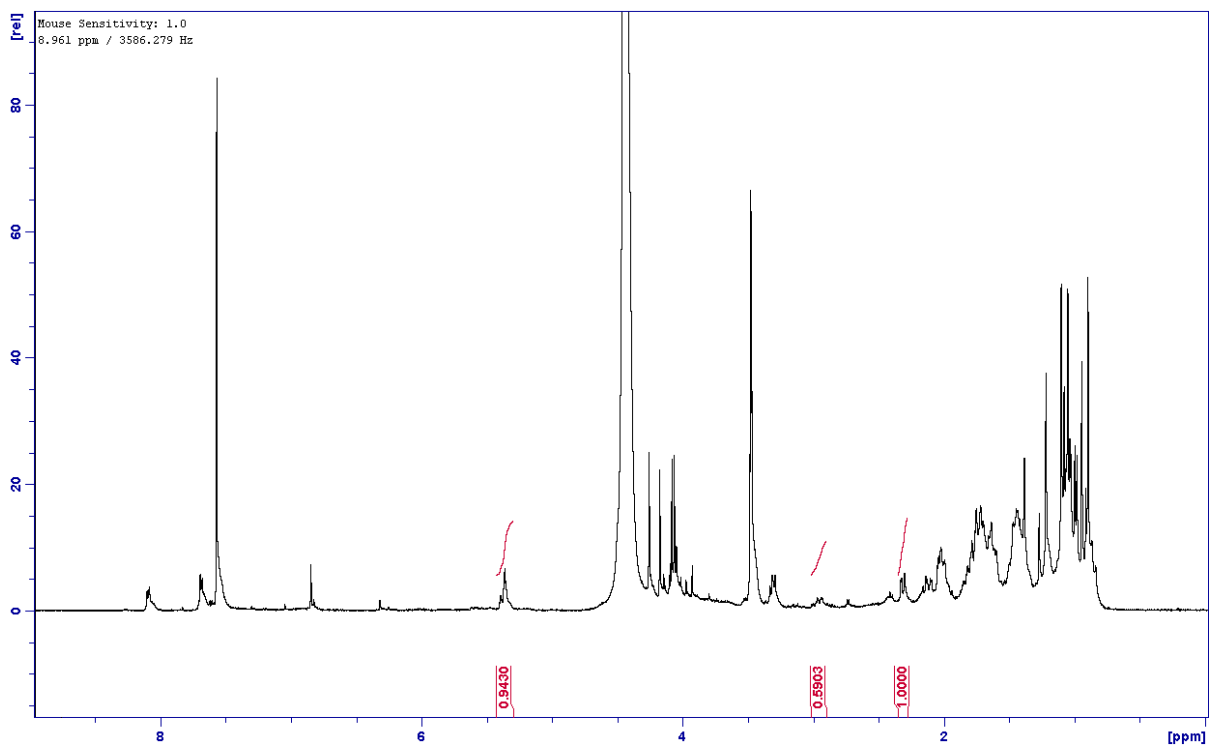
O valor acima calculado corresponde a 45,9 % de ZTC10, em massa, no extrato clorofórmico (ZTP2).

Determinação da concentração em  $\text{mols.L}^{-1}$  ([ ]) da ZTC10 (Ácido Oleanólico):

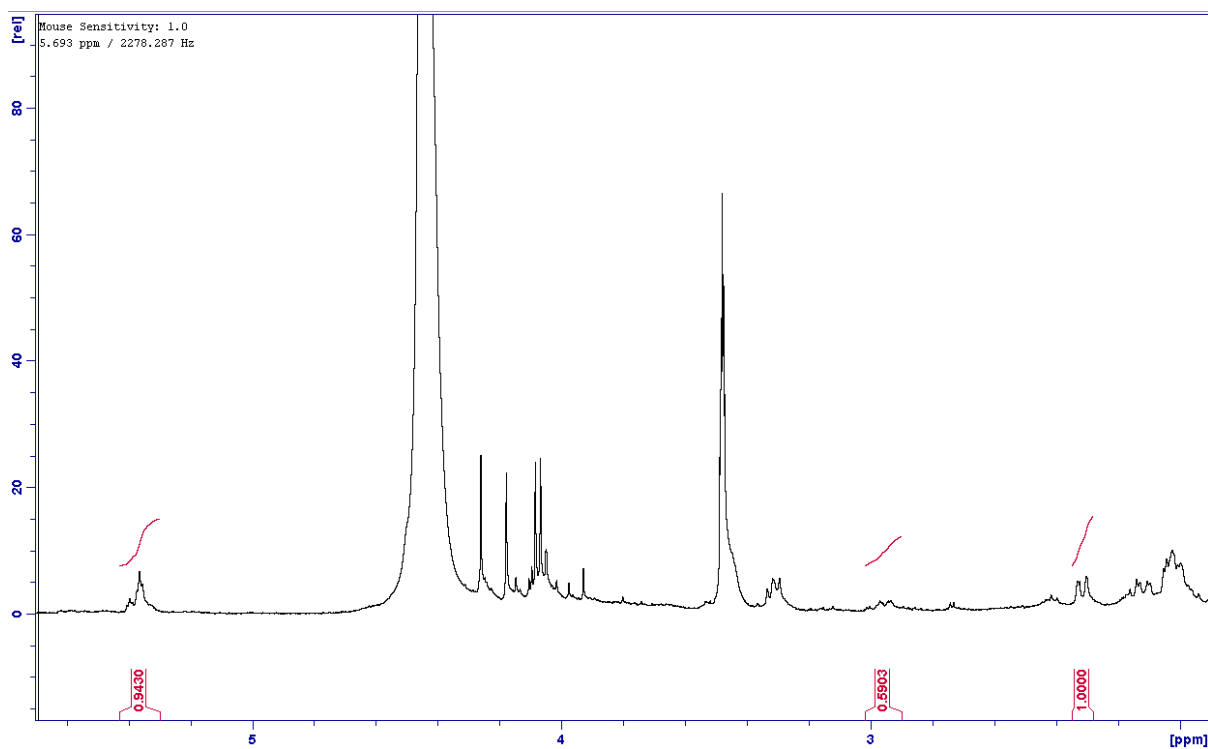
$$[ ] = \frac{X \text{ (g)}}{\text{MM (mol)} \cdot V \text{ (L)}}$$

$$[ ] = \frac{2,30 \cdot 10^{-3}}{456 \times 1 \cdot 10^{-3}} = 5,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

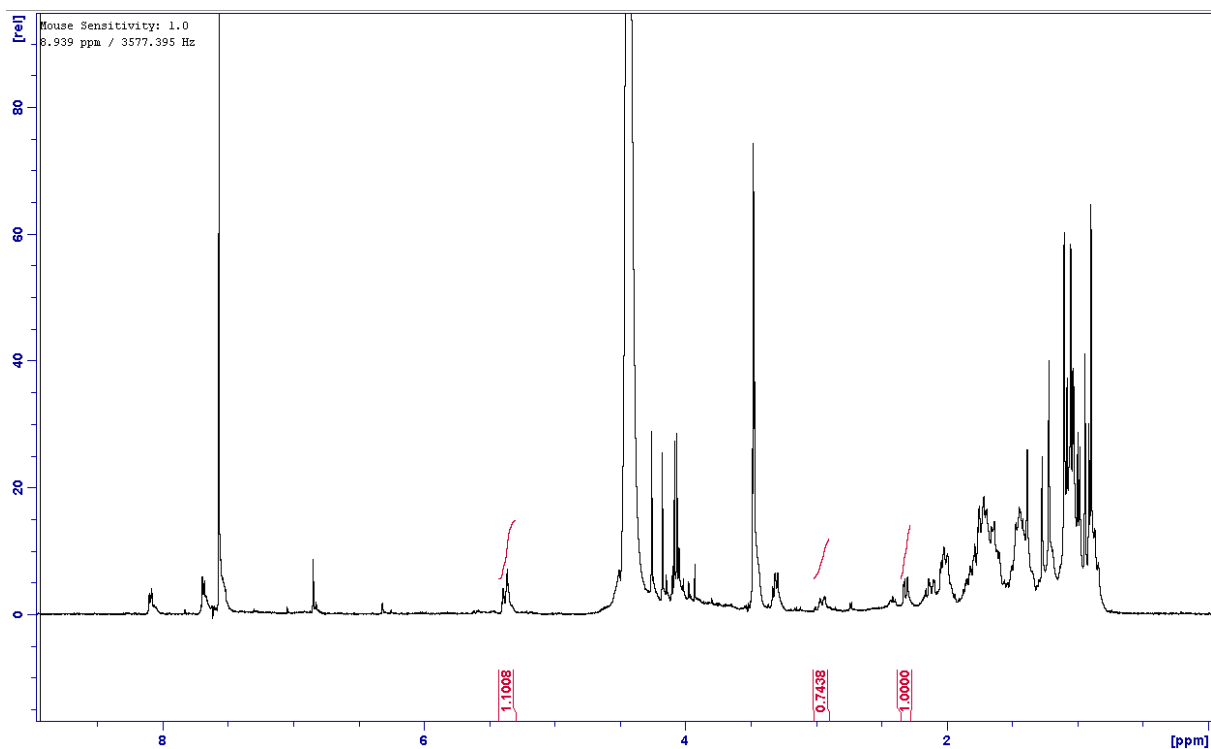




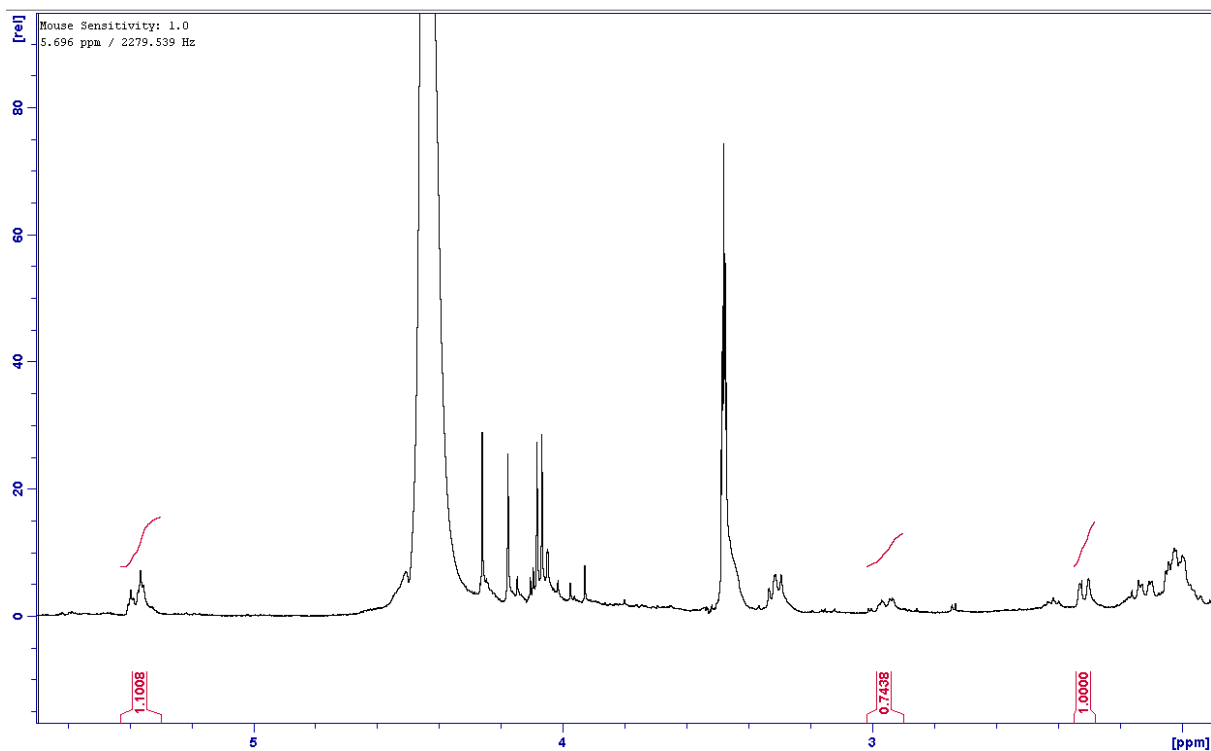
**Figura 73.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 1), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



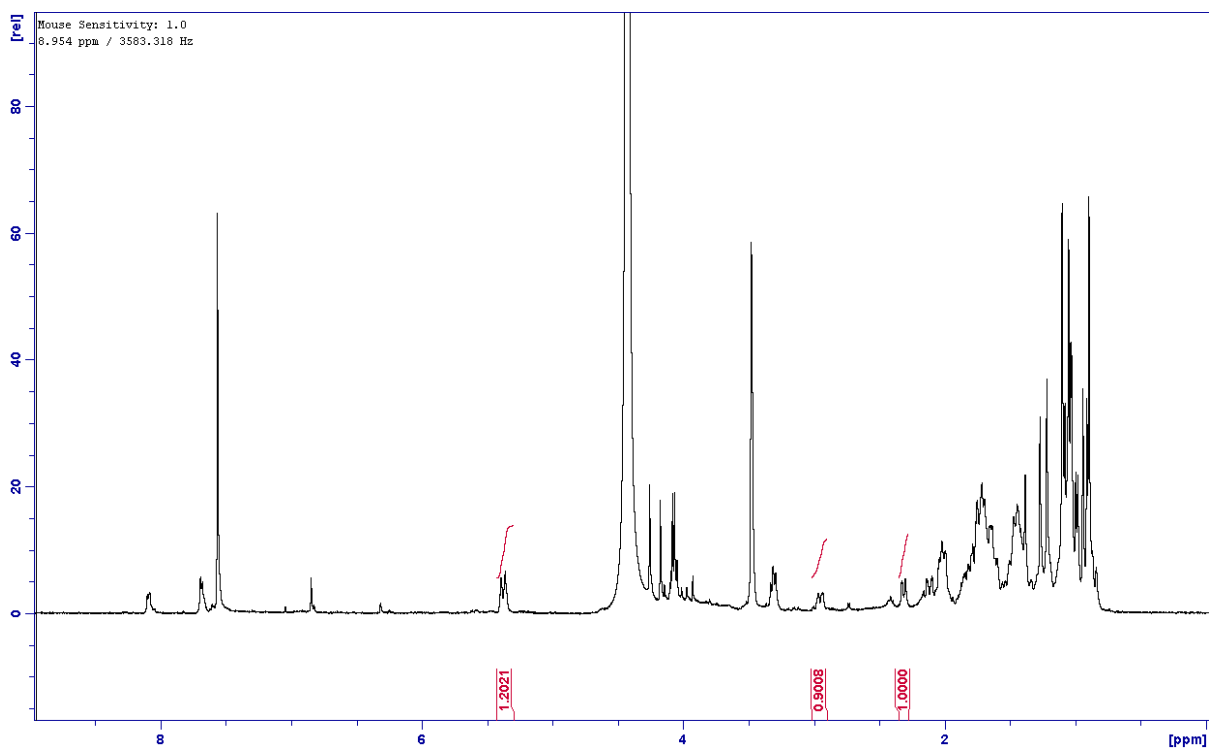
**Figura 74.** Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 1), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



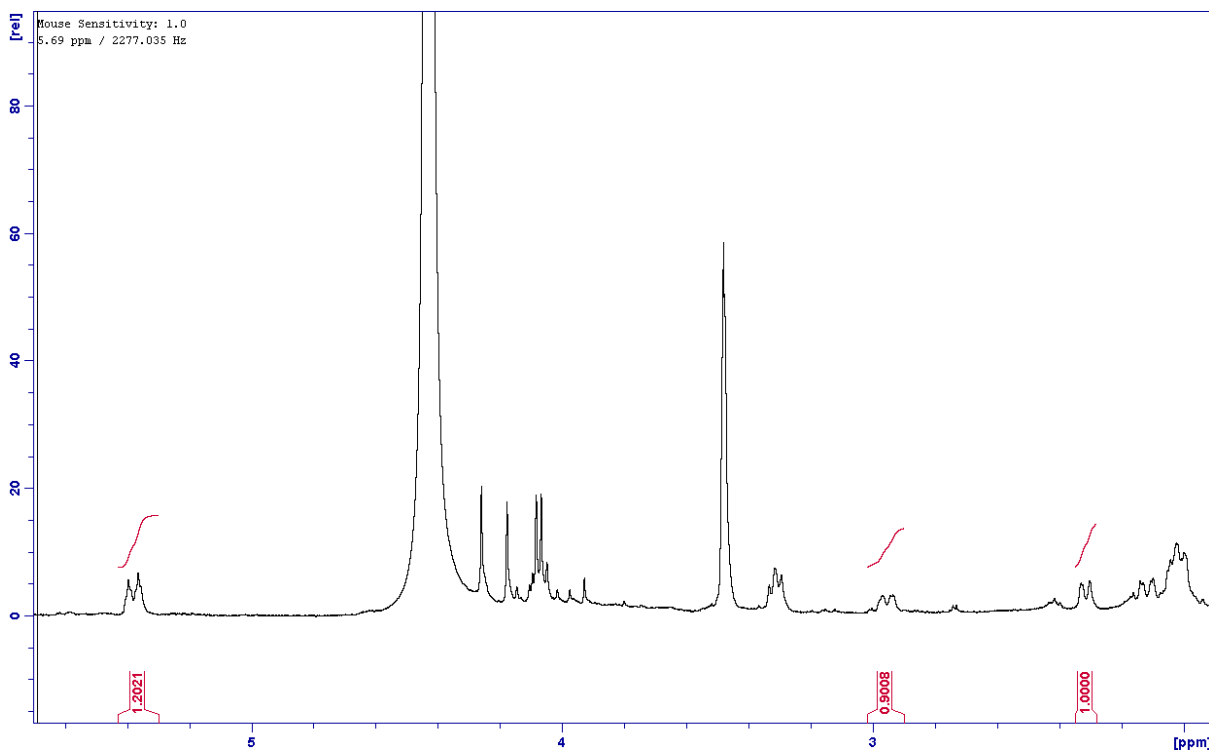
**Figura 75.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 2), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



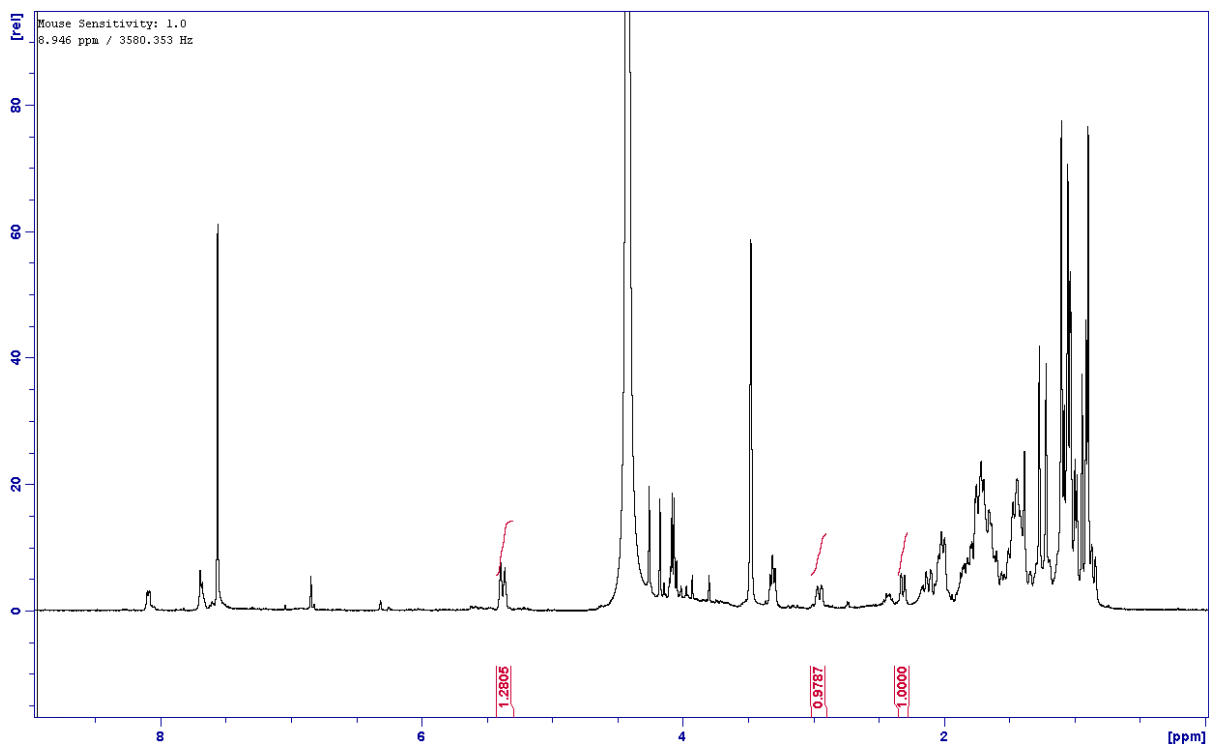
**Figura 76.** Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 2), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



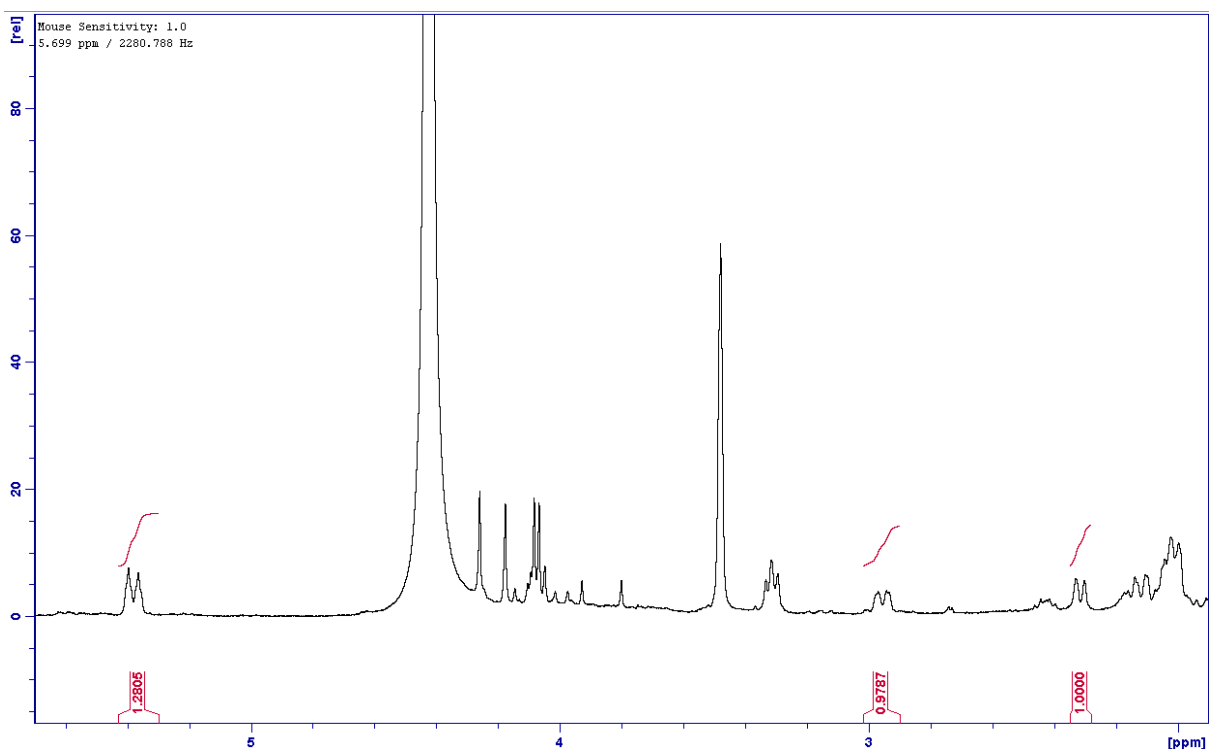
**Figura 77.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 3), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



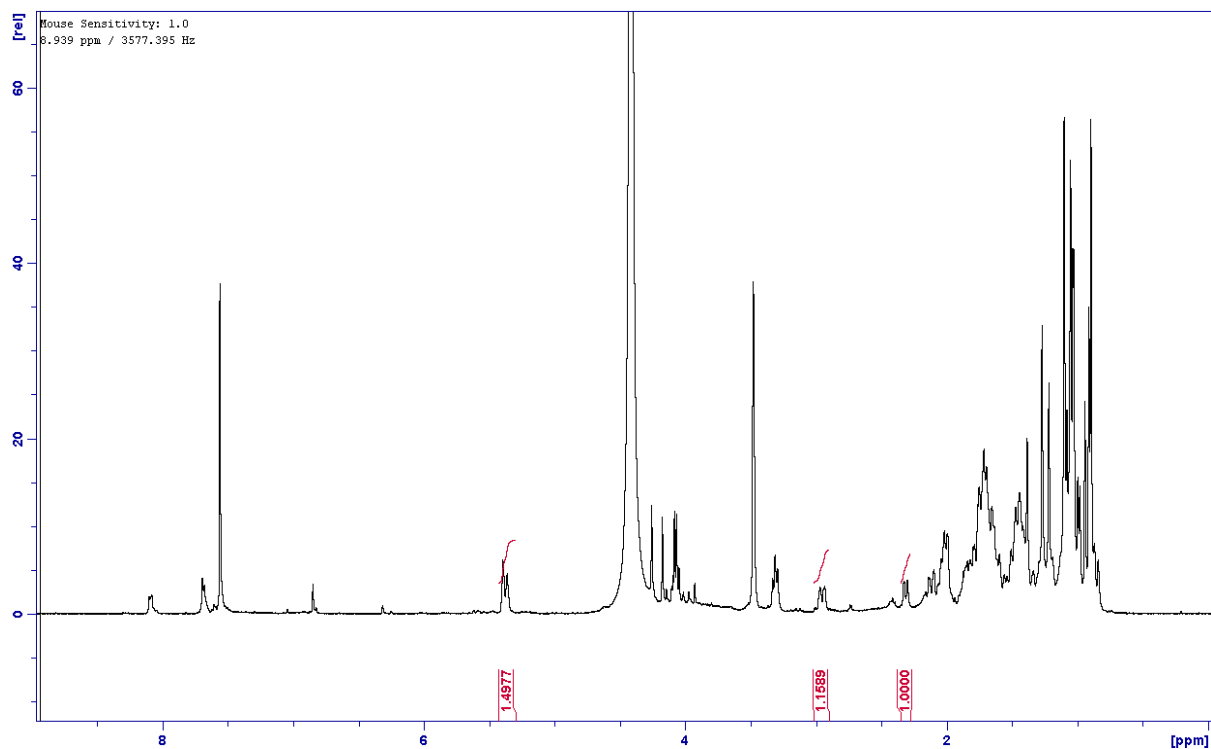
**Figura 78.** Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 3), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



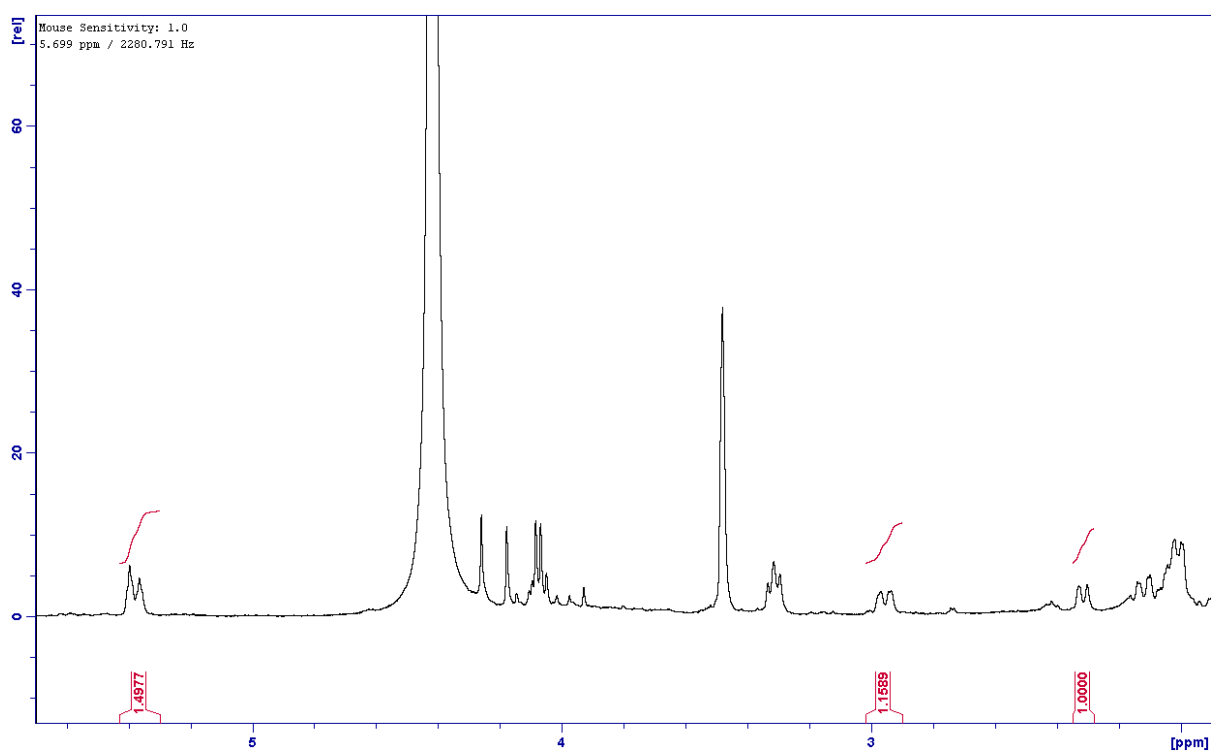
**Figura 79.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 4), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



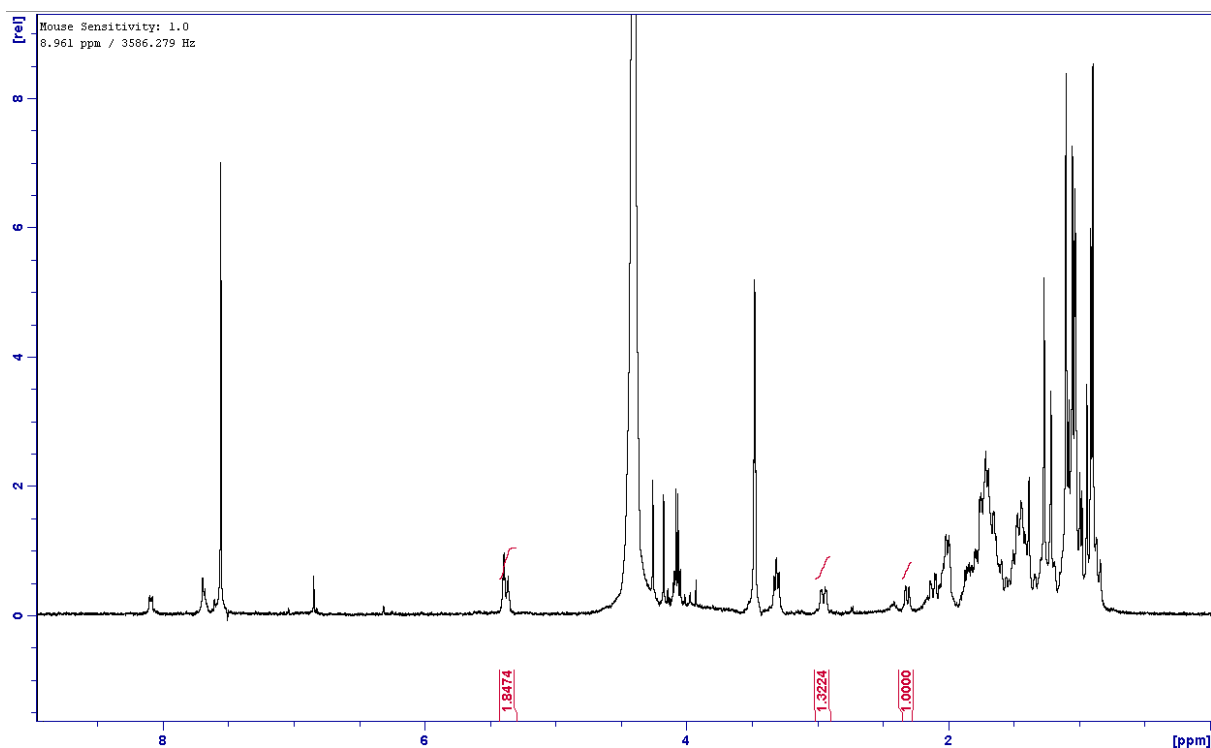
**Figura 80.** Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 4), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



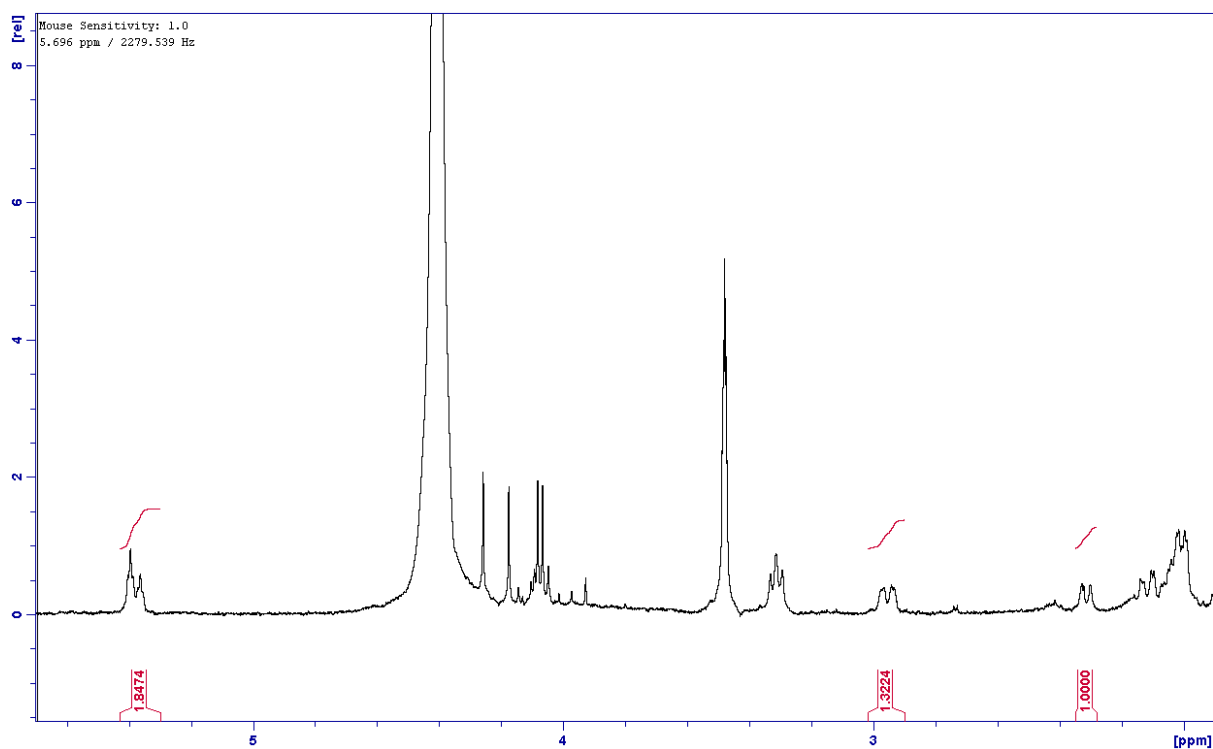
**Figura 81.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 5), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



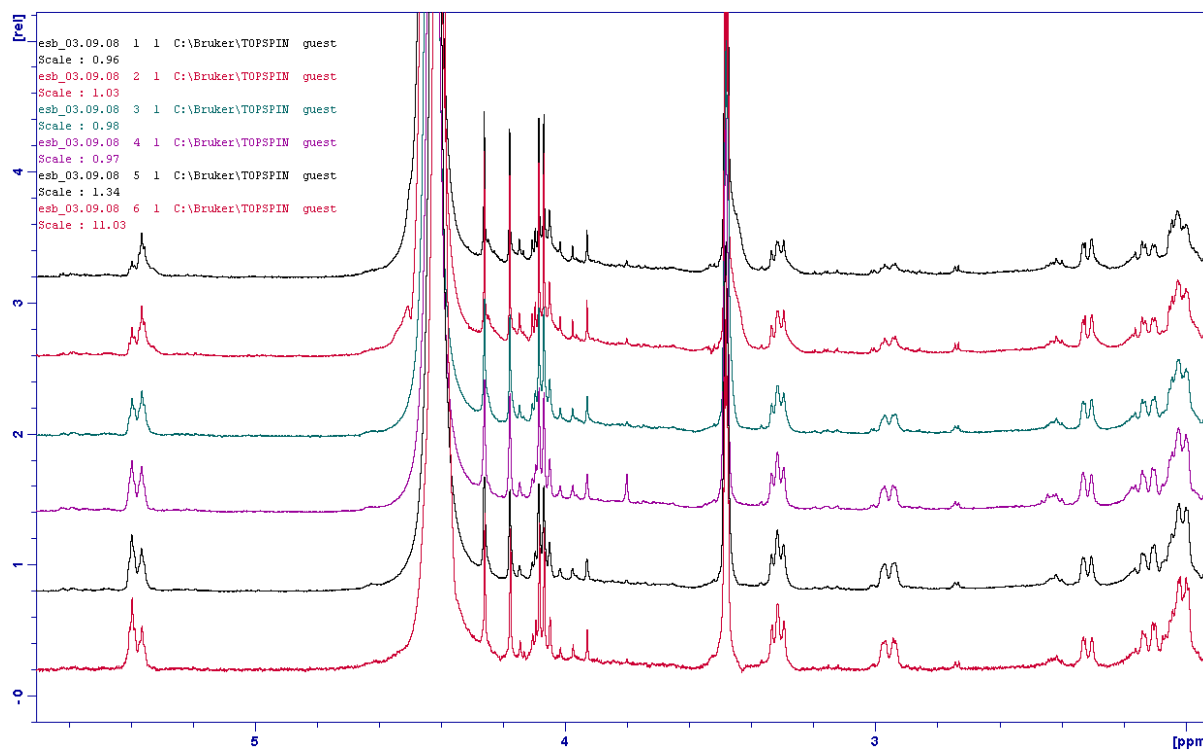
**Figura 82.** Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 5), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



**Figura 83.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 6), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



**Figura 84.** Quantificação da ZTC10, Expansão do Espectro de RMN  $H^1$  (Amostra 6), Solvente  $CDCl_3/MeOD$  3:1



**Figura 85.** Quantificação da ZTC10, Espectro de RMN  $\text{H}^1$  (Amostra 1-6), Solvente  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  3:1

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Da fração ativa ZTP2 da partição do extrato ZTB foram isoladas duas substâncias em quantidades significativas, codificadas como ZTC9 e ZTC10.

A ZTC9 foi identificada, através da análise dos espectros obtidos na região do Infravermelho e métodos de RMN unidimensionais e bidimensionais, como sendo um triterpeno da classe ursânica conhecido como Ácido Ursólico, rotação ótica específica  $[\alpha]_D^{26,6} = +242^\circ$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1), peso molecular de  $M = 456$  u, e fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ .

A ZTC10 foi identificada, através da análise dos espectros obtidos na região do Infravermelho e métodos de RMN unidimensionais e bidimensionais, como sendo um triterpeno da classe oleanólica conhecido como Ácido Oleanólico, rotação ótica específica  $[\alpha]_D^{26,6} = +273^\circ$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3:1), peso molecular de  $M = 456$  u, e fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ .

A fração clorofórmica (ZTP2), da partição do extrato etanólico bruto (ZTB) das folhas da *Zeyheria tuberculosa*, foi a fração ativa na inibição da linfoproliferação, por isso escolhida para fracionamento neste trabalho, promovendo 99,28% de atividade inibidora na concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Apesar da ausência de resultados dos ensaios da fração ZTP2 e dos produtos isolados quanto à atividade tripanocida, os dados da literatura mostram que o Ácido Ursólico é ativo contra as cepas Y e CL de *Trypanossoma cruzi*.

A quantificação das substâncias ZTC9 e ZTC10 isoladas do extrato semi-bruto sem clorofila (ZTP2) das folhas de *Zeyheria tuberculosa* mostrou que a ZTC9 (Ácido Ursólico) se encontra nesta fração numa concentração de  $4,71 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , o que constitui 43% da fração ZTP2 sem clorofila, ativa na inibição da linfoproliferação. Já a ZTC10 (Ácido Oleanólico) se encontra nesta fração numa concentração de  $5,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , o que constitui 45,9% da fração ZTP2 sem clorofila. Logo, tem-se que 88,9% da fração ZTP2 sem clorofila, com atividade inibitória da linfoproliferação, constitui-se dos Ácidos Ursólico e Oleanólico.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, Simone. **Avaliação da microbiota fúngica e da presença de micotoxinas em amostras de plantas medicinais irradiadas adquiridas no comércio varejista e atacadista.** São Paulo-SP, 2007. 103p. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, autarquia associada à Universidade de São Paulo.

ARAUJO, D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 996-999, 2005.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. The use of *Allium cepa* test as a bioindicator of genotoxicity of medicinal plants infusions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BARBOSA, L. C. A. **Espectrometria no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** Viçosa, Ed. UFV, 2007.

BASTOS, Maria Lysete de Assis. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana “in vitro e in vivo” e Estudo Químico Biomonitorado de *Piper hayneanum* C.DC. (Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur. (Bignoniaceae).** Maceió-AL, 2008. 250p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

BENTO, Edson de Souza. **Applications of MD and NMR magnetization transfer experiments to structural analysis.** London, 1997. 149p. Tese (Doutorado) - Queen Mary and Westfield College, University of London.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. In: **Ciências Farmacêuticas.** Itajaí/Santa Catarina, ed. Universidade do Vale do Itajaí, 2003. 239p.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D. H. **Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry.** San Francisco, London, Amsterdam, Ed. Holden – Day, 1964. v. 2, p. 122 – 123.

CALIXTO, J. B. Twenty-Five of research on medicinal plants in Latin America. **Journal Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131-134, 2007.

CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R. Novas Técnicas de RMN e os Deslocamentos Químicos dos Átomos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da Isoflavana Duartina. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 89-94, 1993.

CASTILHO, P. C.; GOUVEIA, S. C.; RODRIGUES, A. I. Quantification of Artemisinin in *Artemisia annua* Extracts by  $^1\text{H}$ -NMR. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 329-334, 2008.

COSTA, José Fernando Oliveira. **Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora de extratos de plantas do semi-árido brasileiro.** Salvador-BA, 2004. 79p. Dissertação (Mestrado)

– Faculdade de Medicina, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade da Bahia.

COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 11-15, 2008.

DEVI, K. P.; RAM, M. S.; SREEPRIYA, M.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVAKI, T. Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induced toxicity in splenic lymphocytes - an in vitro study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 105-108, 2003.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.

ESTEVAN, Charles dos Santos. **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. Maceió-AL, 2006. 192p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

FACCIONE, M.; FERREIRA, D. T.; BRAZ-FILHO, R.; POMINI, A. M. Synthesis of Asperphenamate and Aurantiamide Benzoate for Structural Revision. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2004.

FERREIRA, M.; FIGUEREDO LUZ, H. Ipê Felpudo (*Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur.): Essência Nativa Pioneira com Grande Potencial Silvicultural. **Revista Scientia Forestalis**, n.31, p.13-21, 1985.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. 1. ed. Lisboa, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. Plants Used Against Cancer – An Extension of the Work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 347-377, 2000.

GUIMARÃES, E. C. B. T.; RODRIGUES, C. R.; DIAS, L. R. S.; DOMELLAS, C. B.; CASTRO, H. C.; CABRAL, L. M.; SANTOS, T. C. Developing and Validating Analytical Methods for the Chemical Quality Control of Phytotherapies Containing Artichoke Dry Extracts. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 64-77, 2007.

HAMBURGER, M.; HOSETTMANN, K. Bioactivity: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 12, p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE J. B. Classes and functions of secondary products. In: Walton N. J.; Brown D. E. **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London, Imperial College, 1999. p. 1-25.

HAZEKAMP, A. **Cannabis; extracting the medicine**. 1. ed. Amsterdam, Ed. Print Partners Ipskamp B. V., 2007. p. 52-62.

HOEK, A. C.; HERMANS-LOKKERBOL, C. J.; VERPOORTE, R. An Improved NMR Method for the Quantification of  $\alpha$ -Acids in Hops and Hop Products. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 53-57, 2001.

HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo, Ed. Bookman, 2002. v. 1.

INSTITUTE OF MEDICAL STATISTICS (IMS). Mercado farmacêutico brasileiro, vendas, 1992. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P. E.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. Porto Alegre /Florianópolis, Ed. UFRGS/ UFSC, 2003. p. 20-30.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MULLER, A.; WAGNER, H. Análise de Naftoquinonas em Extratos Brutos de Raízes de *Zeyheria Montana* M. (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 175-177, 1999.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIERIA, P. C.; FERNANDES, M.F.; FILHO, E. R.; FRÜHAUF, M.; BARANANO, A. G. Triterpenos Ursânicos e Oleânicos do Caule de *Eugenia florida* DC. **Revista de Pesquisa e Pós-Graduação**, v. 1, p. 13-20, 2000.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KOSKELA, Harri. **Some Aspects of Polarisation Transfer in NMR Spectroscopy**. Oulun Yliopisto, 2005. 120p. Dissertação (Mestrado) - Faculty of Science, University of Oulun.

KUTNEY, J.P.; HANSSEN, H.W. 5,6,7-Trimethoxyflavone and 5,6,7,8-Tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3298, 1971.

LEITE, J. P. V.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Isolamento Biomonitorado de uma Substância Tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o Ácido Ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 77-87, 2001.

LUCCHESE, A.M. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Recife, Ed. Associação Plantas do Nordeste, 2006. v. 4.

MACEDO JUNIOR, F. C. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2007.

MACHADO, S. R.; GREGÓRIO E. A.; GUIMARÃES E. Ovary Peltate Trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): Developmental Ultrastructure and Secretion in Relation to Function. **Annals of Botany**, v. 97, p. 357–369, 2006.

MACKIN,, G.; SHAKA, A. J. Phase-Sensitive Two-Dimensional HMQC and HMQC-TOCSY Spectra Obtained Using Double Pulsed-Field-Gradient Spin Echoes. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 118, p. 247–255, 1996.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. In Vitro Activity of Rutaceae Species Against the Trypomastigote forme *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 335-340, 2000.

MAGANHA, J.; ROCHA, E. de S.; BRANDÃO, M. A. F.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. de O. Embryo Development Alteration in Rats Treated With Lapachol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 927-934, 2006.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.  $^{13}\text{C}$  RMN spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.

MALHEIROS, A.; SCHUQUEL, I. T. A.; VIDOTTI, G. J. Atribuição Inequívoca de Deslocamentos Químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Plumierídeo Isolado da *Allamanda Cathartica*. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 457-459, 1996.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Belo-Horizonte, UFC. 2ª ed, 1997.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds, 1993. In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN M. F. Human medicinal agents from plants. **American chemical Society**, San Francisco, 1996. v. 9, p. 112-137.

NIERO R.; MALHEIROS A. Triterpenos e sua importância químico-medicinal, 2007. In Yunes R.A.; Cechinel Filho V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1. ed. Itajaí, Ed. UNIVALI, 2007. p. 237-258.

PARELLA, T. Pulsed field gradients: a new tool for routine NMR. **Magnetic Resonance Chemical**, v. 36, p. 467-495, 1998.

PATWARDHAN, B.; KALBAG, D.; PATKI, P. S.; NAGSAMPAGI, B. A. Search of immunomodulatory agents: a review. **Indian Drugs**, v. 28, p. 348-358, 1990.

PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; NUCCI, G. Desafios da Química Analítica Frente às Necessidades da Indústria Farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. S107-S111, 2005.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.

PINTO, A. C.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Current status, challenges and trends on natural products in brazil. **Química Nova**, v. 25, 2002.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. de A. ; TAVARES, J. F. ; SOUZA, F. H. T. ; DIAS, C. da S. ; CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis*

Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008.

REIF, B.; KOCK, M.; KERSSEBAUM, R.; KANG, H.; FENICAL, W.; GRIESINGER C. Adequate, a new set of experiments to determine the constitution of small molecules at natural abundance. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 118, p. 282–285, 1996.

RICCIO, R.; BIFULCO, G.; CIMINO, P.; BASSARELLO, C.; PALOMA, L. G.; Stereochemical analysis of natural products. Approaches relying on the combination of NMR spectroscopy and computational methods. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, p. 295–308, 2003.

RUBEL, Rosália. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. Curitiba, 2006. 191p. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

RUDNICK, G. **Farmacologia Clínica: Série Incrivelmente Fácil**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Guanabara Koogan S. A., 2003.

SHOOLERY, J. **A Basic Guide to NMR**. 1. ed. Palo Alto - California, Ed. Varian Associates, 1972.

SILVA, A. A. G.; FIGUEIREDO, M. A. S. de. Manifestações estomatológicas em pacientes receptores de transplante renal sob terapia imunossupressora – Avaliação clínica de um ano. **Revista Odonto Ciência**, v. 25, p. 49-75, 1998.

SILVA, Daniel de Melo. **Estudo químico e de atividades biológicas da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoneaceae)**. Maceió, 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

SILVA, J. B. P.; MALVESTITI, I.; HALLWASS, F.; RAMOS, M. N.; LEITE, L. F. C. da C.; BARREIRO, E. J. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN <sup>1</sup>H: o caso dos 3-aril (1,2,4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 492-496, 2005.

SILVA, Mavíael José da. **Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear na elucidação estrutural de dois compostos químicos obtidos a partir de *Derris sp* e *Euphorbia tirucalli* L.** Maceió, 2002. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

SILVEIRA, J. C. da; GOTTLIEB, O. R.; OLIVEIRA, G. G. de. Chemistry of Brazilian Bignoniaceae. 1. Zeyherol, a Dilignol from *Zeyhera digitalis*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 8, p. 1829-1830, 1975.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6. ed. USA, Ed. John Wiley & Sons, 1998.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis, Eds. UFRGS/UFSC, 2003.

STITES, P. D.; TERR, A. I.; PARSOLW, T. C. **Imunologia Médica**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Guanabara Koogan S. A., 2000.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da Segurança Clínica de um Fitoterápico Contendo *Myroxylon toluifera*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, Própolis e Mel em Voluntários Saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 447-454, 2006.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Copyright, 2005.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 25-42, 2007.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPARATO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551 – 555, 2003.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M. da C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 1-16, 2005.

ZIDKO, Alexsandro. **Coléopteros (insecta) associados às estruturas reprodutivas de espécies florestais arbóreas nativas no estado de São Paulo. Piracicaba, 2002.** 59p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

WEINBERG, D.; MARIA DE L.; GOTTLIEB, O. R.; DE OLIVEIRA, G. G. The chemistry of Brazilian Bignoniaceae. Part 2. Naphthoquinones from *Zeyheria tuberculosa*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 570, 1976.

WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 4. ed. Maidenhead - Berkshire - England, Ed. McGRAW-HILL Book Company (UK) Limited, 1987.

***Zeyheria tuberculosa***, disponível em: <[http://www.achetudoeregiao.com.br/Arvores/Zeyheria\\_tuberculosa.htm](http://www.achetudoeregiao.com.br/Arvores/Zeyheria_tuberculosa.htm)>, acessado em novembro de 2007.

