

**SARA REGINA DE MARQUI**

Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes  
quimiopreventivos e substâncias de interesse agroquímico

Tese apresentada ao Instituto de Química -  
Campus de Araraquara da Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutora em Química.

*Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva*

**ARARAQUARA**

2011

## CURRICULUM VITAE

### DADOS PESSOAIS

Nome: Sara Regina de Marqui                      Data de nascimento: 09/07/1981  
Nacionalidade: Brasileira                      Naturalidade: Tabatinga, SP  
End. residencial: Rua Antônio Caldeiras Dantas, nº 483, Centro – Tabatinga, SP  
End. profissional: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Rua Professor Francisco Degni, s/n, Quitandinha – Araraquara  
E-mail: [samarq@iq.unesp.br](mailto:samarq@iq.unesp.br), [samarqui@gmail.com](mailto:samarqui@gmail.com)

### FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2007 - atual    Doutorado em Química Orgânica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agrocêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva.

2004 - 2007    Mestrado em Química Orgânica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas em *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae).

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva.

1999 – 2003    Graduação em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2009    Recentes avanços no isolamento e detecção de PN.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2009    Escola de Produtos Naturais: Alcalóides.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2007 Curso de Capacitação em Saneamento Ambiental.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2005 Atividades anímicas e Biodiversidade.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2004 Workshop de Metrologia Científica e Legal de Massas.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2002 Química Forense.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2002 Prática de Leitura e Produção de Texto Científico.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2001 Monitoramento da Qualidade de Combustíveis.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2001 Gestão e Administração do Tempo.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2001 Capacitação e Assistência Técnica a Laboratórios da Rede de Monitoramento de Combustíveis.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2000 Enzima de Uso industrial.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2000 O Profissional do Ensino.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

*Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP  
Instituto de Química – UNESP de Araraquara*

2007-2011 Doutorado em Química Orgânica

Título: Bioprospecção em Espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agrocêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

2004-2007 Mestrado em Química Orgânica

Título: Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae).

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

## **Estágios**

2001-2003 Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis Petróleos e Derivados – CEMPEQC. Convênio com a Agência Nacional do Petróleo – ANP.

2000-2001 Representante Discente do Departamento de Química Analítica

1999 – 2001 Monitora do Centro de Ciências UNESP - Araraquara

## **LINHAS DE PESQUISA**

1. Bioprospecção em Espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroecológico.
2. Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae).
3. Desenvolvimento do funcionamento e resfriamento do aparelho de ponto de fulgor.

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

MARQUI, S. R.; LEMOS, R. R.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. **Química Nova**, v. 31, p. 828-831, 2008.

### **Resumos publicados em anais de congressos**

MARQUI, S. R.; SANTOS, L. A.; SKRZEK, S. C. G.; SILVA, D. H. S.; DURIGAN, S. New antioxidant galloyl rhamnosides from *Inga laurina* (Fabaceae). In: 2nd Brazilian

Conference on Natural Products, 2009, São Pedro. 2nd Brazilian Conference on Natural Products, 2009.

VALLI, M.; DANUELLO, A. C.; MARQUI, S. R.; HONORIO, A. E. ; MAXIMINIANO, C.; PAULA, T. L.; SILVA, D. H. S.; CAMPOS, V. P.; Bolzani, V. S. Síntese e avaliação nematostática de derivados tiopiridínicos e tiopirazinicos. In: 32<sup>a</sup> Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. Síntese e avaliação nematostática de derivados tiopiridínicos e tiopirazinicos, 2009.

MARQUI, S. R.; FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; CAVALHEIRO, A.; Bolzani, V. S.; SILVA, D. H. S. Insecticide potential of plant extracts from Fabaceae towards *Atta sexdens*. In: II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade latino-americana de fitoquímica, 2008, Belo Horizonte. II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade latino-americana de fitoquímica, 2008.

MARQUI, S. R.; FERNANDES, D. C.; DANUELLO, A. C.; COQUEIRO, A.; REGASINI, L. O.; CAVALHEIRO, A.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.. Pterogyne nitens and Alchornea glandulosa extracts as potential nematocide agents towards *Meloidogine incognita* and *M. exigua*. In: II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade latino-americana de fitoquímica, 2008, Belo Horizonte. II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade latino-americana de fitoquímica, 2008.

MARQUI, S. R.; SILVA, D. H. S.; SANTOS, L. A. Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroecológico. In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, 2008, Araraquara. VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, 2008.

MARQUI, S. R.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A.; CASTRO-GAMBOA, I. New triterpene lactone and antioxidant phenolic from *Chrysophyllum flexuosum* collected in the Atlantic Rain Forest of Brazil. In: 50th. Meeting of the Phytochemical Society of Europe, 2007, Cambridge. 50th. Meeting of the Phytochemical Society of Europe, 2007.

MARQUI, S. R.; SANTOS, L. A.; SILVA, D. H. S. Triterpenos pentacíclicos bioativos de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae). In: 16º Encontro da SBQ - Regional, 2007, Franca. 16º Encontro da SBQ - Regional, 2007.

MARQUI, S. R.; SILVA, D. H. S.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S. Lactonas triterpênicas das folhas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae). In: II Mostra Científica, 2006, Araraquara. II Mostra Científica, 2006.

MARQUI, S. R.; SILVA, D. H. S.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S. Lactonas triterpênicas das folhas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

OLIVEIRA, J. K.; FURLAN, E. G. M.; MARQUI, S. R. Estágio supervisionado presencial e atividades de formação de professores: do rascunho à arte final. In: VI Jornada da Educação, 2003, Assis. VI Jornada da Educação, 2003.

### **Apresentações de Trabalho**

MARQUI, S. R.; SILVA, D. H. S. Bioprospecção em espécie de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroquímico. 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

MARQUI, S. R.; JESUS, C. E.; OLIVEIRA, J. E. Combustíveis: do subsolo ao tanque do seu carro. 2003. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

### **Demais Trabalhos.**

1. Difusão do Conhecimento Científico, 2000.
2. Metodologias Alternativas, 2000.
3. Novas Tecnologias de Ensino Fundamental e Médio, 2000
4. Elaboração de Práticas Científicas a serem aplicadas no cotidiano, 1999.

## Participação em eventos.

1. **2nd Brazilian Conference on Natural Products.** New antioxidant galloyl rhamnosides from *Inga laurina* (Fabaceae). 2009. (Congresso)
2. **32ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química.** Síntese e avaliação nematostática de derivados tiopiridínicos e tiopirazinicos. 2009. (Congresso).
3. **IV Workshop do NuBBE.** Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos substâncias de interesse agroecológico. 2009. (Outra).
4. **Workshop 2009 dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia - IQ-UNESP.** 2009. (Outra)
5. **II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade latino-americana de fitoquímica.** Insecticide potential of plant extracts from Fabaceae towards *Atta sexdens*. 2008. (Congresso).
6. **III Workshop do NuBBE.** 2008. (Outra).
7. **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp.** Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroecológicos. 2008. (Outra)
8. **50th. Meeting of the Phytochemical Society of Europe.** New Triterpene Lactone and Antioxidant Phenolics from *Chrysophyllum flexuosum* collected in the Atlantic Rain Forest of Brazil. 2007. (Congresso).
9. **16º Encontro da SBQ - Regional.** Triterpenos pentacíclicos bioativos de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae). 2007. (Encontro).
10. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Lactonas triterpênicas das folhas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae). 2006. (Congresso).
11. **I Workshop Pós-Graduação em Química.** 2006. (Outra).
12. **II Mostra Científica.** Lactonas triterpênicas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae). 2006. (Outra).
13. **V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp.** Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e busca de drogas potenciais. 2005. (Simpósio).
14. **V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp.** 2005. (Simpósio).
15. **Workshop de Metrologia Científica e Legal de Massas.** 2004. (Outra).

16. **VI Jornada da Educação.** Estágio Supervisionado Presencial e Atividades de Formação de Professores: do Rascunho à Arte Final. 2003. (Congresso).
17. **Programa de Palestras para Alunos do Ensino Médio - Ano X - CPEU.** Combustíveis: do subsolo ao tanque do seu carro. 2003. (Seminário).
18. **Mostra de Tecnologia e de Projetos do IQ - Unesp.** Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis Petróleo e Derivados. 2003. (Outra).
19. **Programa de Palestras para Alunos do Ensino Médio - Ano X - CPEU.** Combustíveis: do subsolo ao tanque do seu carro. 2003. (Outra).
20. **Primeiro Curso de Especialização de Inverno.** 2002. (Outra).
21. **XXXII Semana da Química.** 2002. (Outra).
22. **XXX Semana da Química, XXII Jornada Científica, VI Jornada Pedagógica, II Jornada da Pós Graduação e Pesquisa.** 2000. (Outra).

#### **Organização de eventos.**

MARQUI, S. R.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S. Reuniões Mensais do Nubbe. 2009. (Outro).



## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela saúde, fé e perseverança que tem me dado. Aos meus amigos mentores pela orientação espiritual.*

*Ao meu esposo Audrey Donizette Favero pelo amor, carinho e principalmente paciência. Muito obrigada pelo apoio incondicional durante quatro anos de convivência.*

*A meus pais José e Aparecida a quem honro pelo esforço com o qual mantiveram na escola, permitindo-me condições de galgar êxito na sociedade letrada.*

*Ao meu irmão Isaac e minha avozinha Aparecida pelo carinho e atenção.*

*A todos meus familiares que sempre estiveram presentes em minha vida, demonstrando confiança, carinho e dedicação.*

*A todos os professores e professoras do NuBBE que muito contribuíram para a minha formação, dos quais tenho boas lembranças e principalmente à professora Dra. Dulce Helena Siqueira Silva pela sabedoria e dedicação com a qual orientou o meu Doutorado, levando em consideração os problemas que fazem parte do contexto de seus alunos, sendo sensível às diversas situações entraves que lhe foram apresentadas.*

*A meus amigos pelos momentos bons que foram compartilhados. As minhas amigas Vera e Rita que sempre me deram atenção e apoio emocional (incondicional) em todos os momentos que precisei. Obrigada pela atenção, carinho e ensinamentos nos momentos bons e ruins.*

## *Obrigada*

*A vocês, que nos deram a vida  
e nos ensinaram a vivê-la com dignidade,  
não bastaria um obrigado.*

*A vocês, que iluminaram os caminhos  
obscuros com afeto e dedicação  
para que os trilhássemos sem medo e  
cheios de esperanças,  
não bastaria um muito obrigado.*

*A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram  
aos seus sonhos, para que, muitas vezes,  
pudéssemos realizar os nossos.*

*Pela longa espera e compreensão  
durante nossas longas viagens,  
não bastaria um muitíssimo obrigado.*

*A vocês, pais por natureza,  
por opção e amor, não bastaria dizer,  
que não temos palavras para agradecer tudo isso.*

*Mas é o que nos acontece agora,  
quando procuramos arduamente  
uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar.  
Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.*

*Amo vocês!*

## *Agradecimentos*

*Ao Instituto de Química – UNESP e ao NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.*

*Aos funcionários Dr. Nivaldo Boralle pela obtenção dos espectros de RMN, Dr. Alberto Camilo Alécio e Dra. Luciana Polese pela orientação na Quantificação.*

*Aos meus amigos do NuBBE pela troca de informações e conhecimentos.*

*As funcionárias da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca pela orientação e encaminhamento.*

*E a todos que de uma forma ou de outra estiveram presentes durante esta empreitada.*

*Muito obrigada.*

## *Amizade*

*A verdadeira amizade é aquela que está disposta a reconhecer as falhas e imperfeição daqueles que realmente podemos chamar de amigos.*

*Amizade verdadeira se contenta por ter alguém ao seu lado que apesar de às vezes não concordar com o que dizemos ou fazemos está ao nosso lado para nos consolar e aconselhar e o mais importante, para nos encorajar a prosseguir admitindo que todos têm falhas e que pequenos defeitos jamais farão com que nos afastemos dos nossos amigos verdadeiros.*

*Minha grande felicidade é ter ao meu lado um amigo que mostre que erramos e que devemos nos arrepender e que está ao meu lado para me apoiar e ajudar e me corrigir quando precisar.*

*Inestimáveis são os amigos verdadeiros grandes tesouros que devem ser prezados.*

*Zelo e amor demonstram em tudo o que fazem procurando sempre estar fazendo a coisa certa para agradar seus amigos.*

*Amigos são somente aqueles que estão dispostos a se alegrarem mesmo que estejam tristes, para ver o seu amigo sorrir.*

*Demonstra por ações e palavras que realmente é amigo, que quer estar sempre ao nosso lado.*

*Esses amigos tão especiais nos ajudam em todas as ocasiões, fazem coisas por nós que duvidaríamos o que temos de fazer para que essa verdadeira amizade floresça e cresça regularmente é: cultivá-la.*

*"O importante não é somente a vitória de realizarmos nossos sonhos, mas sim a luta e a derrota que tivemos de enfrentar e sempre mantendo a cabeça erguida, decidida, sem querer desistir fácil". (Luiza Pereira)*

## RESUMO

A família Fabaceae é composta de 650 gêneros com aproximadamente 18.000 espécies. É uma família economicamente importante, extensivamente estudada e bem distribuída em regiões tropicais e subtropicais. É conhecida como Leguminosae, associada aos frutos típicos destas plantas, que são legumes com favas. Poucas espécies dos gêneros *Inga* e *Swartzia* foram investigadas quimicamente, sendo que algumas apresentaram atividades biológicas importantes, associadas principalmente à presença de saponinas em *Swartzia* e de antioxidantes polifenólicos em *Inga*, por causa da elevada capacidade sequestradora de radicais livres associadas com várias doenças neurodegenerativas, coronárias (CHD) e câncer. O estudo de *Inga laurina* e *Swartzia langsdorffii* evidenciou a sua composição química bem como seu potencial de atividade biológica, destacando-se atividade antioxidante, antifúngica e nematoestática. O extrato etanólico das folhas de *Swartzia langsdorffii* foi submetido a etapas de fracionamento cromatográfico, incluindo o uso de CLAE para purificação dos constituintes químicos majoritários: os triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico (1) e o lupeol (2), ácido 3-soforosiloleanólico (3) e saponina 3-O-β-D-(6'-metil)-glicopiranosilolean-28-oato de β-glucopiranosila (4), inédita. As substâncias 1, 2 e 4 mostraram-se moderadamente ativas quando bioautografadas com fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As substâncias 3 e 4 mostraram-se moderadamente ativas frente aos fungos patógenos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* em ensaios de microdiluição. Análise preliminar do extrato bruto das folhas e ramos das espécies de *Inga edulis*, *I. laurina* e *I. marginata* apresentaram atividade antioxidante em teste com solução de β-caroteno e inibiram a peroxidação lipídica em modelo de lipossomas usando Fe<sup>2+</sup> como iniciador de reações radicalares. O extrato bruto etanólico de folhas e ramos de *Inga laurina* foi submetido a fracionamento cromatográfico, incluindo o uso de CLAE para purificação dos constituintes químicos majoritários: dodecanoato de 2-hidroxieta (5), ácido gálico (6), galato de metila (7), galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila (8), galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (9), galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (10) e galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxieta (11). As substâncias 8-11 são inéditas e tiveram suas estruturas

determinadas através da análise extensiva dos dados espectrométricos, especialmente RMN 1D e 2D, e EM. As substâncias **6-11** mostraram destacada atividade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH e ABTS, e potencial quimiopreventivo, evidenciado pela indução da enzima quinona-redutase. Esses dados corroboram a importância de estudos de bioprospecção envolvendo técnicas modernas, contribuindo para a exploração racional da biodiversidade brasileira.

## ABSTRACT

Fabaceae family comprises 650 genera with ca. 18.000 species widespread in tropical and subtropical regions. This family is large, economically important and extensively studied. It is also known as Leguminosae, referring to the typical fruit of these plants, which are called legumes. Few species of *Swartzia* and *Inga* genera have been investigated, although some present important biological properties, especially associated with the presence of triterpenes and saponins in *Swartzia* and of antioxidant phenolics in *Inga* species, and their well-known effects on the prevention of oxidative stress-associated diseases as neurodegenerative, coronary heart disease (CHD) and cancer. The phytochemical study on *Inga laurina* e *Swartzia langsdorffii* has focused on the search for bioactive compounds, especially antifungal, antioxidant and antiparasitic, from São Paulo flora. The ethanol extract from leaves of *Swartzia langsdorffii* was submitted to chromatographic procedures, including the use of HPLC, and the hexane fraction afforded pentacyclic triterpenes oleanolic acid (**1**) and lupeol (**2**). The ethyl acetate fraction afforded oleanolic acid 3-sophoroside (**3**) and the methanol/water fraction afforded a new saponin 3-O- $\beta$ -D-(6'-methyl)-glucopyranosyl-28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oleanate (**4**). Compounds **1**, **3** and **4** showed moderate activity when bioautographed with phytopathogenic fungi *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, whereas compounds **3** and **4** showed moderate antifungal activity when bioautographed with human pathogens *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*. Preliminary analysis of *Inga edulis*, *I. laurina* e *I. marginata* leaves crude extract by a TLC test with beta-carotene and by a liposome model using Fe<sup>2+</sup> as radicalar reactions initiator, indicated the presence of antioxidant compounds. The ethanol extract from leaves of *Inga laurina* was submitted to chromatographic procedures, including the use of HPLC and the hexane fraction afforded 2-hydroxy-ethyl dodecanoate (**5**). The ethyl acetate fraction afforded gallic acid (**6**), methyl gallate (**7**) and four new phenolic compounds: 2-rhamnopyranosyl-3,5-dihydroxyphenyl gallate (**8**), 2-rhamnopyranosyl-4,6-dihydroxyphenyl gallate (**9**), 2-(4'-galloyl)rhamnopyranosyl-4,6-dihydroxyphenyl gallate (**10**) and 2-rhamnopyranosyl-4-galloyl -6-hydroxyphenyl gallate (**11**), which had their structures determined by extensive 1D and 2D NMR analysis and MS techniques. Compounds **6-11** showed potent free radical scavenging activities towards DPPH and ABTS, in addition to



chemopreventive potential, as evidenced by their ability to induce quinone reductase detoxifying enzyme. Such data corroborate the importance of bioprospecting studies, involving state-of-the-art techniques, which represents major contributions for the rational exploration of biodiversity in Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias dos metabolismos especiais e suas interligações.....	40
Figura 2. Estrutura do aldeído cinâmico da canela ( <i>Cinnamomum zeyllanicum</i> ) e a vanilina da baunilha ( <i>Vanilla planifolia</i> ), respectivamente.....	40
Figura 3. Estrutura do ácido caféico e o ácido ferúlico, respectivamente.....	41
Figura 4. Via biossintética do ácido chiquímico e do ácido mevalônico.....	42
Figura 5. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ) na mitocôndria até a formação de água (H <sub>2</sub> O). Várias espécies reativas de O <sub>2</sub> são formadas no processo.....	44
Figura 6. Estruturas representativas de classes selecionadas de polifenóis dietéticos.....	47
Figura 7. Isoflavonas (I – V) isoladas da <i>S. polyphylla</i> e saponinas (VI – X) isoladas de <i>Swartzia schomburgkii</i> .....	55
Figura 8. <i>Swartzia langsdorffii</i> : detalhe das folhas; fruto e exemplar adulto.....	56
Figura 9. Algumas saponinas (XI – XII) isoladas de espécies de <i>Swartzia</i> .....	56
Figura 10. Detalhes das folhas e fruto de <i>Inga edulis</i> .....	59
Figura 11. Flavonóides de <i>Inga edulis</i> .....	59
Figura 12. Exemplar adulto de <i>Inga laurina</i> , folhas, flores e fruto.....	60
Figura 13. Derivados de tirosina isolados de <i>Inga laurina</i> .....	61
Figura 14. Exemplar adulto de <i>Inga marginata</i> , folhas, flores e fruto.....	61
Figura 15. Redução do radical 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH).....	72
Figura 16. Redução do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS).....	73
Figura 17. Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição da AChE.....	75
Figura 18. Reação da AChE com acetato de 1-naftila e subseqüente formação do corante azóico roxo no bioensaio em TLC.....	76
Figura 19. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da FAc1 (1,65 g) e FAc2 (261,0 mg). Injetou-se 40 µL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18, gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 40 min, fluxo de 1 mL/min, monitorando em λ 254 nm.....	89
Figura 20. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da FAc3 (84,0 mg) e FAc4 (15,1 mg). Injetou 40 µL em coluna analítica “Luna” Phenomenex LC-18,	

gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 40 min, fluxo de 1 mL/min, monitorando em $\lambda$ 254 nm.....	89
Figura 21. Cromatograma obtido via CLAE-Prep da FAc1-5 (64,0 mg). Foi utilizada coluna preparativa “Luna” Phenomenex C-8 (250 mm x 21,2 mm), modo isocrático de H <sub>2</sub> O/MeOH 55:45 durante 30 min, fluxo de 12 mL/min, monitorando em $\lambda$ 254 nm.....	91
Figura 22. Cromatogramas obtidos via CLAE-DAD da FAc1-5-6, FAc1-5-8 e FAc1-5-9. Injetou-se 40 $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18, gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 30 min, fluxo de 1 mL/min, monitorando em $\lambda$ 254 nm.....	92
Figura 23. Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) para detecção do potencial seqüestrador de radicais livres das sub-frações da FAc... 101	101
Figura 24. Detecção da atividade anticolinesterásica, biautografada em placa de sílica e revelada em $\lambda$ 254 nm e $\lambda$ 366 nm.....	103
Figura 25. Detecção da atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos <i>C. sphaerospermum</i> em placa de sílica, revelada em $\lambda$ 254 nm e $\lambda$ 366 nm e os halos de inibições sobre áreas onde apresentam substâncias fungitóxicas.....	104
Figura 26. Detecção da atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos <i>C. cladosporioides</i> em placa de sílica, revelada em $\lambda$ 254 nm, $\lambda$ 366 nm e os halos de inibições sobre áreas onde apresentam substâncias fungitóxicas.....	104
Figura 27. Ácido oleanólico ( <b>1</b> ) e lupeol ( <b>2</b> ) isolados da fração hexânica de <i>Swartzia langsdorffii</i> .....	107
Figura 28. Ácido 3-soforosiloleanólico ( <b>3</b> ) isolado da fração acetato de etila de <i>Swartzia langsdorffii</i> .....	108
Figura 29. Estrutura molecular proposta para a substância <b>4</b> (3-O- $\beta$ -D-(6'-metil)-glicopiranosilolean-28-oato de $\beta$ -glucopiranosila).	108
Figura 30. Correlações observadas no espectro gHMBC da substância <b>4</b> .....	109
Figura 31. Estrutura molecular proposta para a substância <b>5</b> (dodecanoato de 2-hidroxieta). .....	111
Figura 32. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>5</b> (dodecanoato de 2-hidroxieta). .....	112
Figura 33. Estrutura molecular proposta para a substância <b>6</b> (ácido gálico).....	112

Figura 34. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>6</b> (ácido gálico).....	113
Figura 35. Estrutura molecular proposta para a substância <b>7</b> (galato de metila)..	113
Figura 36. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>7</b> (galato de metila)...	114
Figura 37. Estrutura molecular proposta para a substância <b>8</b> (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila).....	115
Figura 38. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>8</b> (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila).....	116
Figura 39. Estrutura molecular proposta para a substância <b>9</b> (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila).....	117
Figura 40. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>9</b> (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila).....	118
Figura 41. Estrutura molecular proposta para a substância <b>10</b> , galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila.....	118
Figura 42. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>10</b> , galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila.....	119
Figura 43. Estrutura molecular proposta para a substância <b>11</b> galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila.....	120
Figura 44. Algumas correlações de gHMBC da substância <b>11</b> (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila).....	122
Figura 45. Potencial atividade sequestradora de radicais livres das substâncias <b>8, 9, 10 e 11</b> de <i>I. laurina</i> .....	123
Figura 46. Potencial atividade sequestradora de radicais livres das substâncias <b>8, 9, 10 e 11</b> de <i>I. laurina</i> .....	124
Figura 47. Preparação das soluções de trabalho partindo da solução estoque....	125
Figura 48. Cromatograma obtido em modo CLAE analítico da FAc. Amostra (20 µL) aplicada em coluna analítica “Luna” Phenomenex LC-18, gradiente H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até H <sub>2</sub> O/MeOH 55:45 (20 min), seguido de modo isocrático H <sub>2</sub> O/MeOH 55:45 por 30 min, com fluxo de 1 mL/min, λ 254 nm.....	125
Figura 49. Curva analítica para o ácido gálico.....	130
Figura 50. Curva analítica para o galato de metila.....	131
Figura 51. Curva analítica para as substâncias <b>8 e 9</b> .....	132
Figura 52. Curva analítica para as substâncias <b>10 e 11</b> .....	133

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN de $^1\text{H}$ (integração) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	147
Espectro 2. RMN de $^1\text{H}$ ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 2,4) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	147
Espectro 3. RMN de $^1\text{H}$ ampliado ( $\delta$ 3,4 – $\delta$ 4,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	148
Espectro 4. RMN de $^{13}\text{C}$ do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	148
Espectro 5. RMN de $^{13}\text{C}$ ampliado ( $\delta$ 14 – $\delta$ 34) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	149
Espectro 6. RMN de $^{13}\text{C}$ ampliado ( $\delta$ 28,8 – $\delta$ 30,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	149
Espectro 7. RMN de $^{13}\text{C}$ ampliado ( $\delta$ 61 – $\delta$ 73) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	150
Espectro 8. RMN de $^{13}\text{C}$ ampliado ( $\delta$ 80 – $\delta$ 180) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	150
Espectro 9. DEPT 135° do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	151
Espectro 10. DEPT 135° ampliado ( $\delta$ 14 – $\delta$ 70) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	151
Espectro 11. gHMQC do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	152
Espectro 12. gHMQC ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 2,8 para H; $\delta$ 12 – $\delta$ 38 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	152
Espectro 13. gHMQC ampliado ( $\delta$ 3,2 – $\delta$ 4,5 para H; $\delta$ 59 – $\delta$ 65 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	153
Espectro 14. gHMQC ampliado ( $\delta$ 3,8 – $\delta$ 4,6 para H; $\delta$ 73 – $\delta$ 88 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	153
Espectro 15. gHMBC do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	154
Espectro 16. gHMBC ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 2,4 para H; $\delta$ 15 – $\delta$ 40 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	154
Espectro 17. gHMBC ampliado ( $\delta$ 3,4 – $\delta$ 4,3 para H; $\delta$ 60 – $\delta$ 90 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).....	155

Espectro 18. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 4,5 para H; $\delta$ 160 – $\delta$ 188 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	155
Espectro 19. <i>g</i> COSY do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	156
Espectro 20. <i>g</i> COSY ampliado ( $\delta$ 3,1 – $\delta$ 4,6) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	156
Espectro 21. TOCSY 1D (correlação direta do $\delta$ 2,2 com $\delta$ 1,5 e $\delta$ 1,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	157
Espectro 22. TOCSY 1D (correlação direta do $\delta$ 3,6 com $\delta$ 4,1) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	157
Espectro 23. HOMODEC (correlação direta do $\delta$ 7,1 com $\delta$ 3,5 e $\delta$ 1,8) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	158
Espectro 24. HOMODEC ampliado (correlação direta do $\delta$ 3,5 com $\delta$ 4,3, $\delta$ 4,1 e $\delta$ 2,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila ( <b>5</b> ) (CDCl <sub>3</sub> , 11.7 T).....	158
Espectro 25. RMN de <sup>1</sup> H do ácido gálico ( <b>6</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	159
Espectro 26. RMN de <sup>13</sup> C do ácido gálico ( <b>6</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	159
Espectro 27. <i>g</i> HMBC do ácido gálico ( <b>6</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	160
Espectro 28. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,85 – $\delta$ 7,30 para H; $\delta$ 110 – $\delta$ 170 para C) do ácido gálico ( <b>6</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	160
Espectro 29. RMN de <sup>1</sup> H (integração) do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	161
Espectro 30. RMN de <sup>13</sup> C do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	161
Espectro 31. RMN de <sup>13</sup> C ampliado ( $\delta$ 110 – $\delta$ 170) do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	162
Espectro 32. <i>g</i> HMQC do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	162
Espectro 33. <i>g</i> HMQC ampliado ( $\delta$ 3,3 – $\delta$ 4,3 para H; $\delta$ 52 – $\delta$ 80 para C) do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	163
Espectro 34. <i>g</i> HMQC ampliado ( $\delta$ 6,5 – $\delta$ 7,6 para H; $\delta$ 104 – $\delta$ 115 para C) do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	163
Espectro 35. <i>g</i> HMBC do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	164
Espectro 36. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 3,2 – $\delta$ 4,4 para H; $\delta$ 158 – $\delta$ 178 para C) do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	164
Espectro 37. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,5 – $\delta$ 7,6 para H; $\delta$ 110 – $\delta$ 180 para C) do	

galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	165
Espectro 38. gCOSY do galato de metila ( <b>7</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	165
Espectro 39. RMN de <sup>1</sup> H (integração) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6- diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	166
Espectro 40. RMN de <sup>1</sup> H ampliado (δ 3,4 – δ 4,2) do 1-ramnopiranosil-2-galoil- 4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	166
Espectro 41. RMN de <sup>1</sup> H ampliado (δ 5,3 – δ 6,4) do 1-ramnopiranosil-2-galoil- 4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	167
Espectro 42. RMN de <sup>13</sup> C do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	167
Espectro 43. DEPT 90° do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	168
Espectro 44. DEPT 135° do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	168
Espectro 45. gHMQC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	169
Espectro 46. gHMQC ampliado (δ 3,2 – δ 4,4 para H; δ 48 – δ 76 para C) do 1- ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	169
Espectro 47. gHMQC ampliado (δ 3,2 – δ 4,6 para H; δ 68 – δ 76 para C) do 1- ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	170
Espectro 48. gHMQC ampliado (δ 5,2 – δ 7,4 para H; δ 92 – δ 114 para C) do 1- ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	170
Espectro 49. gHMBC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	171
Espectro 50. gHMBC ampliado (δ 3,30 – δ 3,70 para H; δ 14 – δ 22 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	171
Espectro 51. gHMBC ampliado (δ 0,2 – δ 2,0 para H; δ 58 – δ 84 para C) do 1- ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	172
Espectro 52. gHMBC ampliado (δ 3,0 – δ 6,0 para H; δ 66 – δ 78 para C) do 1- ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	172
Espectro 53. gHMBC ampliado (δ 6,1 – δ 7,3 para H; δ 95 – δ 120 para C) do 1- ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	173
Espectro 54. gHMBC ampliado (δ 3,2 – δ 5,8 para H; δ 132 – δ 152 para C) do	



1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	173
Espectro 55. gHMBC ampliado ( $\delta$ 6,2 – $\delta$ 7,2 para H; $\delta$ 135 – $\delta$ 170 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	174
Espectro 56. gHMBC ampliado ( $\delta$ 4,8 – $\delta$ 7,8 para H; $\delta$ 170 – $\delta$ 183 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	174
Espectro 57. gCOSY do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	175
Espectro 58. gCOSY ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 4,0) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	175
Espectro 59. gCOSY ampliado ( $\delta$ 3,0 – $\delta$ 6,5) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	176
Espectro 60. TOCSY 1D do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	176
Espectro 61. NOESY 1D (correlação direta do $\delta$ 1,0 com $\delta$ 3,3, $\delta$ 3,5, $\delta$ 4,8 e $\delta$ 6,9) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	177
Espectro 62. NOESY 1D (correlação direta do $\delta$ 5,3 com $\delta$ 6,9, $\delta$ 4,2 e $\delta$ 0,9) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila ( <b>8</b> ) (CD <sub>3</sub> OD, 11.7 T).....	177
Espectro 63. RMN de <sup>1</sup> H (integração) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	178
Espectro 64. RMN de <sup>1</sup> H ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 3,6) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	178
Espectro 65. RMN de <sup>1</sup> H ampliado ( $\delta$ 3,9 – $\delta$ 6,8) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	179
Espectro 66. RMN de <sup>13</sup> C do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	179
Espectro 67. RMN de <sup>13</sup> C ampliado ( $\delta$ 70,0 – $\delta$ 147) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	180
Espectro 68. gHMQC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	180
Espectro 69. gHMQC ampliado ( $\delta$ 3,4 – $\delta$ 4,2) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	181
Espectro 70. gHMQC ampliado ( $\delta$ 2,8 – $\delta$ 4,2 para H; $\delta$ 67 – $\delta$ 76 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	181



Espectro 71. <i>g</i> HMQC ampliado ( $\delta$ 5,0 – $\delta$ 7,5 para H; $\delta$ 90 – $\delta$ 116 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	182
Espectro 72. <i>g</i> HMBC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	182
Espectro 73. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 0,6 – $\delta$ 1,5 para H; $\delta$ 64 – $\delta$ 76 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	183
Espectro 74. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 4,8 – $\delta$ 5,6 para H; $\delta$ 65 – $\delta$ 79 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	183
Espectro 75. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,0 – $\delta$ 7,2 para H; $\delta$ 92 – $\delta$ 112 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	184
Espectro 76. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,0 – $\delta$ 7,2 para H; $\delta$ 135 – $\delta$ 165 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	184
Espectro 77. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 12,4 – $\delta$ 13,2 para H; $\delta$ 100 – $\delta$ 160 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	185
Espectro 78. <i>g</i> COSY do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	185
Espectro 79. <i>g</i> COSY ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 4,0) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	186
Espectro 80. RMN de $^1\text{H}$ (integração) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	186
Espectro 81. RMN de $^1\text{H}$ ampliado ( $\delta$ 0,9 – $\delta$ 3,7) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	187
Espectro 82. RMN de $^1\text{H}$ ampliado ( $\delta$ 5,0 – $\delta$ 7,0) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	187
Espectro 83. <i>g</i> HMQC do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	188
Espectro 84. <i>g</i> HMQC ampliado ( $\delta$ 3,1 – $\delta$ 5,4 para H; $\delta$ 48 – $\delta$ 76 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	188
Espectro 85. <i>g</i> HMQC ampliado ( $\delta$ 5,0 – $\delta$ 7,4 para H; $\delta$ 92 – $\delta$ 110 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	189
Espectro 86. <i>g</i> HMBC do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	189
Espectro 87. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,0 – $\delta$ 7,2 para H; $\delta$ 90 – $\delta$ 114 para C) do 1-	

(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	190
Espectro 88. gHMBC ampliado ( $\delta$ 12,3 – $\delta$ 13,2 para H; $\delta$ 100 – $\delta$ 160 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T)..	190
Espectro 89. gHMBC ampliado ( $\delta$ 6,75 – $\delta$ 7,30 para H; $\delta$ 135 – $\delta$ 165 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T)..	191
Espectro 90. gHMBC ampliado ( $\delta$ 0,6 – $\delta$ 1,5 para H; $\delta$ 20 – $\delta$ 75 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	191
Espectro 91. gCOSY do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	192
Espectro 92. gCOSY ampliado ( $\delta$ 0,8 – $\delta$ 5,5) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	192
Espectro 93. gCOSY ampliado ( $\delta$ 6,0 – $\delta$ 7,3) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila ( <b>10</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	193
Espectro 94. RMN de <sup>1</sup> H (integração) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	193
Espectro 95. RMN de <sup>1</sup> H ampliado ( $\delta$ 1,0 – $\delta$ 3,5) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	194
Espectro 96. RMN de <sup>1</sup> H ampliado ( $\delta$ 5,4 – $\delta$ 7,1) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	194
Espectro 97. RMN de <sup>13</sup> C do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	195
Espectro 98. gHMQC do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	195
Espectro 99. gHMQC ampliado ( $\delta$ 0,4 – $\delta$ 1,5 para H; $\delta$ 13 – $\delta$ 21 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	196
Espectro 100. gHMQC ampliado ( $\delta$ 3,2 – $\delta$ 5,6 para H; $\delta$ 65 – $\delta$ 78 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	196
Espectro 101. gHMQC ampliado ( $\delta$ 5,2 – $\delta$ 7,2 para H; $\delta$ 92 – $\delta$ 112 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	197
Espectro 102. gHMBC do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	197
Espectro 103. gHMBC ampliado ( $\delta$ 0,6 – $\delta$ 1,5 para H; $\delta$ 65 – $\delta$ 77 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO-d <sub>6</sub> , 11.7 T).....	198

Espectro 104. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 4,8 – $\delta$ 6,1 para H; $\delta$ 64 – $\delta$ 78 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	198
Espectro 105. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,0 – $\delta$ 7,2 para H; $\delta$ 95 – $\delta$ 120 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	199
Espectro 106. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 6,1 – $\delta$ 7,3 para H; $\delta$ 135 – $\delta$ 165 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	199
Espectro 107. <i>g</i> HMBC ampliado ( $\delta$ 12,1 – $\delta$ 13,0 para H; $\delta$ 100 – $\delta$ 160 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	200
Espectro 108. <i>g</i> COSY do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	200
Espectro 109. <i>g</i> COSY ampliado ( $\delta$ 1,0 – $\delta$ 4,0) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	201
Espectro 110. <i>g</i> COSY ampliado ( $\delta$ 4,0 – $\delta$ 7,5) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).....	201

## LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Partição do extrato EtOH bruto de <i>Swartzia langsdorffii</i> .....	80
Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da FH da espécie <i>Swartzia langsdorffii</i> 1ª coleta.....	81
Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da FAc da espécie <i>Swartzia langsdorffii</i> 1ª coleta.....	82
Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico da FHa da espécie <i>Swartzia langsdorffii</i> 1ª coleta.....	82
Fluxograma 5. Fracionamento cromatográfico da FH das folhas de <i>Inga laurina</i> .	88
Fluxograma 6. Fracionamento cromatográfico da FAc das folhas de <i>Inga laurina</i> .....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eventos nosológicos que podem ocorrer com o estímulo exagerado na produção de espécies reativas e falha da defesa antioxidante.....	45
Tabela 2: Parâmetros de validação segundo a ANVISA e o INMETRO.....	70
Tabela 3. Preparo do controle positivo para o teste de formação de $\beta$ -hematina.	74
Tabela 4. Preparo das amostras para o teste de formação de $\beta$ -hematina.....	74
Tabela 5. Massa das folhas e ramos triturados em moinho de facas e do extrato etanólico bruto e fases de partição.....	85
Tabela 6. Fases móveis utilizadas em análise de CCD para o EE e fases de partição.....	85
Tabela 7. Eluição de FH de <i>I. laurina</i> em CC (sílica mesh 70-230).....	86
Tabela 8. Eluição de FH1 em CC (sílica mesh 70-230).....	87
Tabela 9. Fases móveis utilizadas em CCDP para frações FH1-1, FH1-7 até FH1-13.....	87
Tabela 10. Eluição de FAc em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH.....	89
Tabela 11. CLAE preparativo da FAc 1, única injeção de 1,3 g/15 mL, coluna LC-18 (250 mm x 4,60 mm e 5 $\mu$ m), fase móvel H <sub>2</sub> O:MeOH 95:5 até MeOH puro, durante 30 min, fluxo 70 mL/min, monitorando em $\lambda$ 254 nm.....	90
Tabela 12. Eluição de FAc1-3 em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH.....	91
Tabela 13. CLAE preparativo da FAc1-5, coluna C-8 (250 mm x 21,2 mm), fase móvel H <sub>2</sub> O:MeOH 55:45 durante 30 min, fluxo 12 mL/min, monitorando em $\lambda$ 254 nm.....	92
Tabela 14. Frações obtidas da eluição de FAc em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH.....	93
Tabela 15. Frações resultantes da análise por CLAE preparativo da FAc1, coluna C-18 (240 mm x 50 mm e 5 $\mu$ m), gradiente H <sub>2</sub> O:MeOH durante 30 min seguido de 15 min de MeOH puro, fluxo 40 mL/min, em $\lambda$ 254 nm.....	94
Tabela 16. Frações obtidas por CLAE preparativo da FAc1-12, FAc1-13 e FAc1-14, coluna C-18 (240 mm x 50 mm e 5 $\mu$ m), isocrático H <sub>2</sub> O:MeOH 55:45 durante 30 min, fluxo 10 mL/min, monitorando em $\lambda$ 254 nm.....	95

Tabela 17. CC da FAc2 utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações.....	96
Tabela 18. CC da FAc3, FAc4 e FAc5 utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações.....	96
Tabela 19. Eluição de FB em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH.....	97
Tabela 20. CC da FB1 (400 mg) utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações.....	98
Tabela 21. Frações obtidas da eluição de FHa em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH.....	99
Tabela 22. CC da FHa1 (1,2 g) utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H <sub>2</sub> O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 20 sub-frações.....	99
Tabela 23. Extratos e fases de partição avaliados no ensaio in vitro da formação de β-hematina para detecção de atividade antimalárica.....	101
Tabela 24. Extratos e fases de partições avaliados no teste de detecção da atividade anticolinesterásica.....	102
Tabela 25. Extratos e fases de partições de <i>Swartzia langsdorffii</i> avaliados em ensaio com fungos patogênicos humanos em microplacas.....	105
Tabela 26. Avaliação nematoestática de <i>Meloidogyne incognita</i> dos extratos e fases de partições.....	106
Tabela 27. Fases de partição submetidas ao teste de avaliação do potencial inseticida para formigas cortadeiras.....	106
Tabela 28. Dados de RMN de <sup>1</sup> H (11.7 T) e <sup>13</sup> C (11.7 T) da substância <b>4</b> em DMSO-d <sub>6</sub> ; δ (ppm).....	110
Tabela 29. Dados de RMN da substância <b>5</b> (dodecanoato de 2-hidroxietila) <sup>a, b, c</sup> .....	112
Tabela 30. Dados de RMN da substância <b>6</b> (ácido gálico) <sup>a, b</sup> .....	113
Tabela 31. Dados de RMN da substância <b>7</b> (ácido gálico) <sup>a, b</sup> .....	114
Tabela 32. Dados de RMN da substância <b>8</b> (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila) <sup>a, b, c</sup> .....	116

Tabela 33. Dados de RMN da substância <b>9</b> (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila) <sup>a, b</sup> .....	118
Tabela 34. Dados de RMN da substância <b>10</b> o galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila <sup>a, b</sup> .....	120
Tabela 35. Dados de RMN da substância <b>11</b> (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila) <sup>a, b</sup> .....	121
Tabela 36. Preparo da solução estoque e soluções trabalho do ácido gálico <b>6</b> ....	126
Tabela 37. Preparo da solução estoque e soluções trabalho do galato de metila <b>7</b> .....	127
Tabela 38. Preparo da solução estoque e soluções trabalho das substâncias <b>8</b> e <b>9</b> .....	127
Tabela 39. Preparo da solução estoque e soluções trabalho das substâncias <b>10</b> e <b>11</b> .....	128
Tabela 40. Preparo das soluções padrões utilizando as soluções estoque e soluções trabalho.....	129
Tabela 41. Dados de calibração para o ácido gálico.....	130
Tabela 42. Dados de calibração do galato de metila.....	131
Tabela 43. Dados de calibração para as substâncias <b>8</b> e <b>9</b> .....	132
Tabela 44. Dados de calibração das substâncias <b>11</b> e <b>12</b> .....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AChE	Acetilcolinesterase
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCI <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência
<i>D</i>	Dubleto
DA	Doença de Alzheimer
<i>Dd</i>	Duplo Dupleto
<i>Ddl</i>	Duplo Dupleto Largo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<i>DI</i>	Dupleto Largo
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil Sulfóxido Deuterado
D <sub>2</sub> O	Água Deuterada
DPPH	2,2-difenil-picrilhidrazila
EE	Extrato Etanólico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
FAc	Fração Acetato de Etila
FB	Fração n-Butanol
FH	Fração Hexânica
FM	Fração Hidrometanólica
<i>g</i> COSY	Correlated Spectroscopy
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
GSH	glutathiona peroxidase
HIV	Imunodeficiência humana
Hz	Hertz
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LD	Limite de Detecção
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LQ	Limite de Quantificação
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>M</i>	Multipeto
MHz	MegaHertz
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>S</i>	Singleto
<i>SI</i>	Singleto Largo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	superóxido dismutase
<i>T</i>	Tripleto
<i>TI</i>	Tripleto Largo
$\delta$	Deslocamento Químico
$\lambda$	Comprimento de Onda

---



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	38
<b>1.1. Biodiversidade e Bioprospecção</b> .....	38
1.1.1. <u>Metabolismo</u> .....	39
1.1.2. <u>Compostos Fenólicos</u> .....	40
1.1.3. <u>Radicais livres</u> .....	43
1.1.4. <u>Antioxidantes</u> .....	45
1.1.5. <u>Agentes quimiopreventivos</u> .....	48
1.1.6. <u>Doença de Alzheimer (DA)</u> .....	49
1.1.7. <u>Câncer</u> .....	50
1.1.8. <u>Fungos patógenos-humanos</u> .....	51
1.1.9. <u>Malária</u> .....	52
<b>1.2. A família Fabaceae</b> .....	53
1.2.1. <u>O gênero Swartzia</u> .....	53
1.2.1.1. <i>Swartzia langsdorffii</i> .....	55
1.2.2. <u>O gênero Inga</u> .....	56
1.2.2.1. <i>Inga edulis</i> .....	58
1.2.2.2. <i>Inga laurina</i> .....	60
1.2.2.3. <i>Inga marginata</i> .....	61
<b>2. OBJETIVO</b> .....	62
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	62
<b>3.1. Materiais, Equipamentos e Técnicas</b> .....	62
3.1.1. <u>Moinho de facas e funil de separação</u> .....	62
3.1.2. <u>Solventes</u> .....	63
3.1.3. <u>Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e Preparativa</u> .....	63
3.1.4. <u>Cromatografia em Coluna</u> .....	63
3.1.5. <u>Rotaevaporador</u> .....	63
3.1.6. <u>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</u> .....	64
3.1.7. <u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u> .....	64
3.1.8. <u>Polarímetro</u> .....	64
3.1.9. <u>Quantificação</u> .....	64
3.1.9.1. <i>Linearidade e Faixa de Aplicação</i> .....	65
3.1.9.2. <i>Repetitividade (Precisão)</i> .....	66

3.1.9.3. <i>Limite de Detecção (LD)</i> .....	67
3.1.9.4. <i>Limite de Quantificação (LQ)</i> .....	68
3.1.9.5. <i>Exatidão</i> .....	69
3.1.9.6. <i>Sensibilidade</i> .....	69
3.1.9.7. <i>Robustez</i> .....	70
3.1.9.8. <i>Materiais para quantificação</i> .....	71
<b>3.2. Ensaios Químicos</b> .....	71
3.2.1. <u>Autografia em CCDC com <math>\beta</math>-caroteno</u> .....	71
3.2.2. <u>Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) – detecção do potencial seqüestrador de radicais livres</u> .....	71
3.2.3. <u>Ensaio colorimétrico com ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) – detecção do potencial seqüestrador de radicais livres</u> .....	72
3.2.4. <u>Ensaios in vitro da formação de <math>\beta</math>-hematina para detecção de potencial antimalárico</u> .....	73
3.2.5. <u>Detecção da atividade anticolinesterásica</u> .....	75
<b>3.3. Ensaios Biológicos</b> .....	76
3.3.1. <u>Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos: <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i></u> .....	76
3.3.2. <u>Avaliação nematoestática frente à <i>Meloidogyne incognita</i></u> .....	77
3.3.3. <u>Avaliação do potencial inseticida (formigas cortadeiras)</u> .....	77
3.3.4. <u>Ensaio com fungos patogênicos humanos em microplacas</u> .....	78
<b>3.4. Procedimentos Fitoquímicos</b> .....	79
3.4.1. <u><i>Swartzia lansgdorffii</i></u> .....	79
3.4.1.1. <u>Coleta e identificação do material vegetal</u> .....	79
3.4.1.2. <u>Obtenção do extrato bruto</u> .....	79
3.4.1.3. <u>Partição do extrato bruto EtOH</u> .....	80
3.4.1.4. <u>Extração e isolamento dos constituintes químicos de <i>Swartzia lansgdorffii</i> 1ª coleta</u> .....	81
3.4.1.5. <u>Fracionamento Cromatográfico da FH</u> .....	81
3.4.1.6. <u>Fracionamento Cromatográfico da FAc</u> .....	81
3.4.1.7. <u>Fracionamento Cromatográfico da FHa</u> .....	82
3.4.2. <u><i>Inga edulis</i></u> .....	83
3.4.2.1. <u>Partição do extrato bruto EtOH</u> .....	83

3.4.3. <i>Inga marginata</i> .....	83
3.4.3.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	83
3.4.3.2. Obtenção do extrato bruto.....	83
3.4.3.3. Partição do extrato bruto EtOH.....	84
3.4.4. <i>Inga laurina</i> .....	84
3.4.4.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	84
3.4.4.2. Obtenção do extrato bruto.....	84
3.4.4.3. Partição do extrato bruto EtOH.....	84
3.4.4.4. Avaliação da atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno.....	85
3.4.4.5. Fracionamento cromatográfico da FH.....	86
3.4.4.6. Fracionamento cromatográfico da FAc.....	88
3.4.4.7. Fracionamento cromatográfico da FB.....	97
3.4.4.8. Fracionamento cromatográfico da FHa.....	98
<b>3.5. Resultados preliminares dos ensaios químicos</b> .....	100
3.5.1. Avaliação da atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno da <i>I. laurina</i> .....	100
3.5.2. <u>Detecção do potencial seqüestrador de radicais livres usando ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH)</u> .....	100
3.5.3. <u>Ensaio in vitro da formação de <math>\beta</math>-hematina para detecção do potencial antimalárico</u> .....	101
3.5.4. <u>Resultados da detecção da atividade anticolinesterásica</u> .....	102
<b>3.6. Resultados preliminares dos ensaios biológicos</b> .....	103
3.6.1. <u>Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos</u> .....	103
3.6.2. <u>Resultados do ensaio com fungos patogênicos humanos em microplacas</u> .....	105
3.6.3. <u>Avaliação nematoestática de <i>Meloidogyne incógnita</i></u> .....	105
3.6.4. <u>Avaliação do potencial inseticida para formigas cortadeiras</u> .....	106
<b>3.7. Determinação estrutural</b> .....	107
3.7.1. <u>Determinação estrutural das substâncias 1 e 2 das folhas de <i>S. langsdorffii</i></u> .....	107
3.7.2. <u>Determinação estrutural da substância 3 das folhas de <i>S. langsdorffii</i></u> .....	107
3.7.3. <u>Determinação estrutural da substância 4 das folhas de <i>S. langsdorffii</i></u> .....	108
3.7.4. <u>Determinação estrutural da substância 5 de <i>I. laurina</i></u> .....	111
3.7.5. <u>Determinação estrutural da substância 6 de <i>I. laurina</i></u> .....	112

3.7.6. <u>Determinação estrutural da substância 7 de <i>I. laurina</i></u> .....	113
3.7.7. <u>Determinação estrutural da substância 8 de <i>I. laurina</i></u> .....	114
3.7.8. <u>Determinação estrutural da substância 9 de <i>I. laurina</i></u> .....	117
3.7.9. <u>Determinação estrutural da substância 10 de <i>I. laurina</i></u> .....	118
3.7.10. <u>Determinação estrutural da substância 11 de <i>I. laurina</i></u> .....	120
<b>3.8. Resultados de bioatividades</b> .....	122
3.8.1. <u>Avaliação da atividade antifúngica de patógenos humano das substâncias 1-4</u> .....	122
3.8.2. <u>Avaliação antifúngica para fitopatógenos</u> .....	122
3.8.3. <u>Resultado do ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres</u> .....	122
3.8.4. <u>Resultado do ensaio colorimétrico com ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres</u> .....	123
<b>3.9. Quantificação das substâncias 6-11 de <i>I. laurina</i></b> .....	124
3.9.1. <u>Preparação dos padrões</u> .....	124
3.9.2. <u>Substância 6 (ácido gálico)</u> .....	126
3.9.3. <u>Substância 7 (galato de metila)</u> .....	126
3.9.4. <u>Substância 8 (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila) e substância 9 (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila)</u> .....	127
3.9.5. <u>Substância 10 galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila) e substância 11 (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-4,6-hidroxifenila)</u> .....	128
3.9.6. <u>Preparo das soluções padrões para injeção em CLAE</u> .....	128
3.9.7. <u>Gráfico de calibração</u> .....	129
3.9.8. <u>Resultados obtidos para o ácido gálico (7)</u> .....	129
3.9.9. <u>Resultados obtidos para galato de metila (7)</u> .....	130
3.9.10. <u>Substância 8 (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila) e substância 9 (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila)</u> .....	132
3.9.11. <u>Substâncias 10 [galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila] e substância 11 (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila)</u> .....	133
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	134
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	137
<b>ANEXOS</b> .....	147

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo químico de organismos vivos, como plantas e organismos marinhos, vem crescendo, em parte pela importância das substâncias encontradas na descoberta de novos agentes terapêuticos para o homem.

Há muito tempo os produtos naturais são utilizados na cura de doenças do corpo. Cerca de 400 anos antes de Cristo, Hipócrates, o pai da medicina, já dizia “deixe o alimento ser sua medicina e a medicina ser seu alimento” (HASLER, 1998; QUEIROGA, et al., 2010).

Os alquimistas, benzedores, curandeiros e xamãs são ou foram conhecedores do poder curador das plantas encontradas na natureza, cuja sabedoria foi conquistada através da herança do conhecimento e da observação do comportamento de animais preservando o caráter mágico, místico e ritualístico. Os alquimistas tinham três objetivos principais: transformar qualquer metal em ouro, obter o elixir da longa vida e criar o homúnculo (vida humana artificial). O elixir da longa vida seria um remédio universal, que curaria todos os males, além de proporcionar a longevidade a quem o tomasse (DEVIENNE et al., 2004).

A veracidade das propriedades terapêuticas dos vegetais pode ser comprovada através de estudos realizados em laboratórios, com técnicas que envolvem o isolamento de substâncias e testes para a avaliação do potencial ativo dos extratos ou substâncias.

### 1.1. Biodiversidade e Bioprospecção

A flora brasileira é a segunda maior área florestal do planeta, ficando atrás apenas da Rússia. Além disso, nossas florestas apresentam os maiores índices de biodiversidade e de ecossistemas. Nos diversos biomas brasileiros, estima-se que existam de 40 mil a 55 mil espécies (DI STASI, 1996).

O potencial de plantas superiores como fontes para novos fármacos é ainda pouco explorado. Entre as 250.000 espécies estimadas de Angiospermas, somente pequena porcentagem foi investigada quimicamente e a fração delas submetida a ensaios biológicos ou farmacológicos é ainda menor. Cerca de 140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo de plantas superiores, já foram isolados e caracterizados. A maioria, no entanto, ainda não foi avaliada biologicamente

(CALIXTO, 2000; PHILLIPSON, 2001, VIEGAS JUNIOR et al., 2006; CALIXTO, 2003, FOGLIO et al., 2006).

Países como o Brasil, apresentando uma das mais ricas biodiversidades do planeta, tendem a beneficiar-se da mesma. Porém, sabemos muito pouco sobre as plantas e seus usos etnofarmacológico, desta forma dificulta a integração do conhecimento popular com estudos de farmacologia e composição química das espécies, sobre os quais há ainda muito a desvendar.

O estudo de plantas medicinais tem proporcionado inúmeras descobertas importantes para a humanidade na área da medicina e seu desenvolvimento conta com um número cada vez maior de profissionais, em caráter interdisciplinar (SILVA, R. V., 2000).

#### 1.1.1. Metabolismo

O conjunto de reações químicas que compõem o metabolismo nos vegetais pode ser dividido em primários e especiais, dependendo do tipo e função das substâncias produzidas. Metabolismo primário é o conjunto de processos associados a funções essenciais, como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Já no metabolismos especiais são sintetizadas substâncias que a princípio, não possuem função essencial, mas que são responsáveis pela melhor adaptação do vegetal ao seu meio. Com isso, os metabolismos especiais acabam exercendo um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, ou seja, representa uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, sendo sua síntese frequentemente afetada por condições ambientais (PERES, 2007; DI STASI, 1996; GOBBO-NETO et al., 2007).

Dentre os fatores ambientais que influenciam a produção e acúmulo dos metabólitos especiais pode-se citar a sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macro e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Assim sendo, a constância de concentrações de metabólitos especiais praticamente não existe. Para plantas medicinais, outros fatores como condições: de coleta, estabilização e estocagem também podem ter grande influência (GOBBO-NETO et al., 2007).

Os metabólitos especiais podem ser divididos em três grandes grupos em função de suas vias biossintéticas: terpenos, fenólicos e alcalóides (Figura 1), sendo frequentemente também a produção de metabólitos de origem mista, como alcalóides esteroidais, terpenóides fenólicos e outros. Além disso, outras formas de classificação consideram a divisão das substâncias fenólicas em derivados do ácido chiquímico, que leva à produção de arilpropanóides, lignanas, entre outras e derivados da via acetato-malonato, responsável pela produção de acetogeninas, xantonas, etc (SIMÕES et al., 1999; PERES, 2007).



Figura 1. Principais vias do metabolismo especiais e suas interligações.

### 1.1.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Alguns desses compostos, como o aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeyllanicum*) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia*), são inclusive empregados na indústria de alimentos. Esse grupo de compostos é responsável pela proteção das plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias (Figura 2).

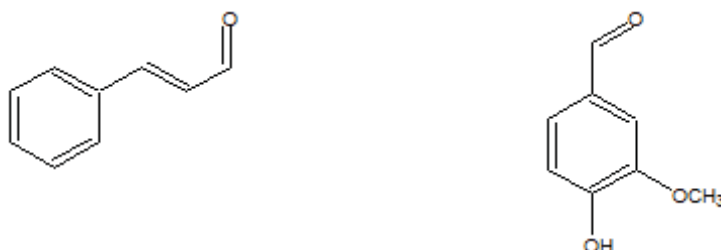


Figura 2. Estrutura do aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeyllanicum*) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia*), respectivamente.

Certas espécies vegetais produzem compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática). Exemplos de compostos

fenólicos com ação alelopática são o ácido caféico e o ácido ferúlico (Figura 3) (PERES, 2007; GOBBO-NETO et al., 2007).

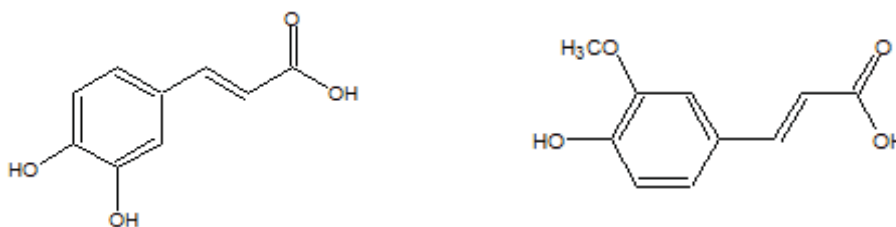


Figura 3. Estrutura do ácido caféico e do ácido ferúlico, respectivamente.

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila. Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas especiais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (Figura 4) (DEWICK, 2001). O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose, ou seja, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. Na via do mevalonato, também designada via da HMG-CoA redutase (3-Hidroxi-3-MetilGlutaril Coenzima-A Redutase), o piruvato continua oxidando até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) e a formação do ácido mevalônico (OOTANI, 2010).



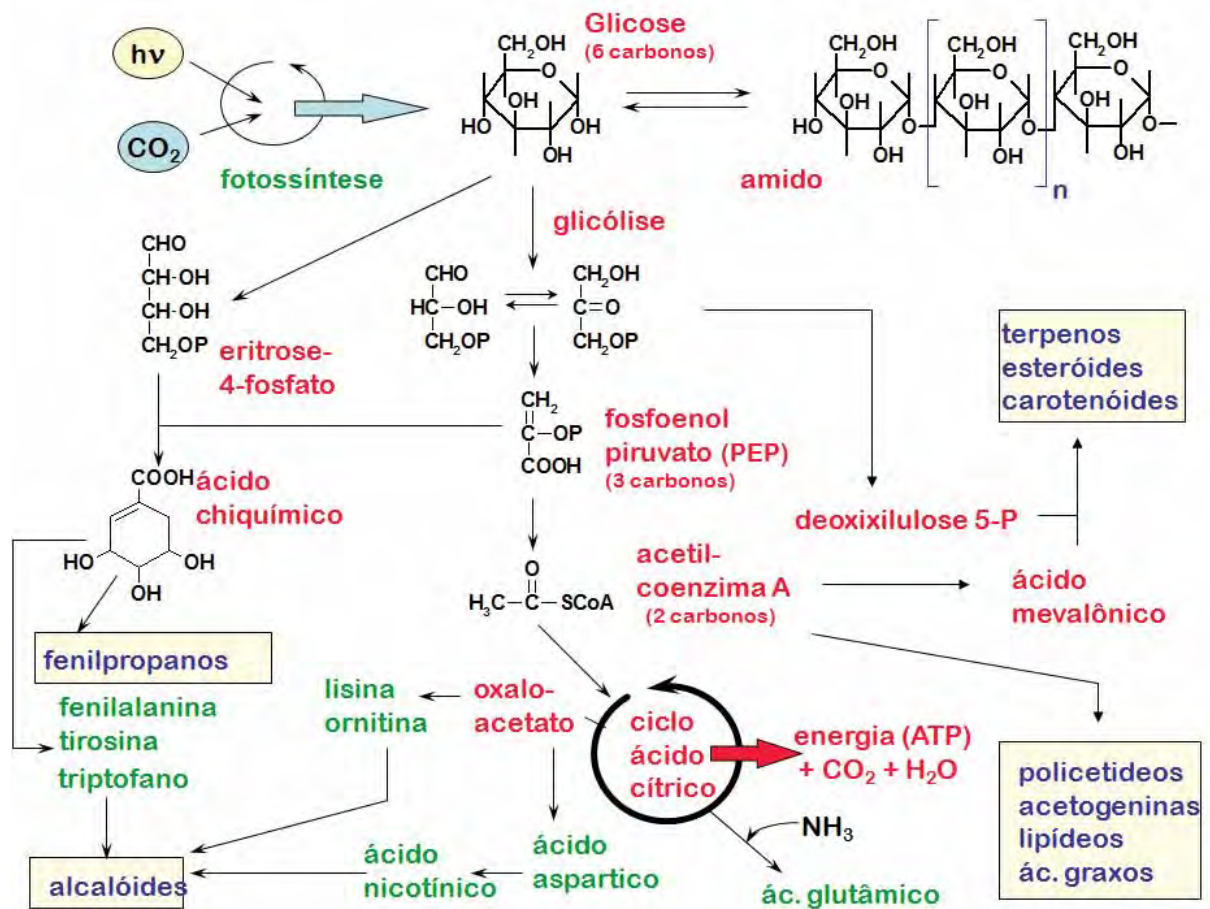


Figura 4. Via biossintética do ácido chiquímico e do ácido mevalônico.

Há vários relatos na literatura apontando os compostos fenólicos como substâncias potencialmente ativas frente a testes químicos e biológicos indicando que essa classe de substâncias é totalmente promissora na descoberta de novos fármacos. Eles são geralmente encontrados e ingeridos pelo homem através de alimentos originários de plantas.

Flavonóides, taninos, antocianinas e outros constituintes fenólicos possuem potencial antioxidante, impedindo o efeito danoso dos radicais livres. Visando a melhoria e sustentação da saúde, é de vital importância o consumo dessas fontes naturais de substâncias para nosso organismo, pois os fenólicos contribuem para a manutenção do equilíbrio pró-oxidante e antioxidante de sistemas biológicos, desempenhando função essencial na prevenção de várias doenças (SIMÕES et al., 1999).

### 1.1.3. Radicais livres

Radicais livres são espécies que contém elétrons desemparelhados. A geração desses radicais pode ocorrer durante o metabolismo. Em condições fisiológicas, de todo o oxigênio molecular captado pelas mitocôndrias e processado na cadeia respiratória, só 1 a 5% escapam e formam oxirradicais. Porém, esta mínima porcentagem é suficiente para dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Podem-se citar como exemplo as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Esses são sequestrados e destruídos por enzimas específicas, como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, protegendo os sistemas biológicos do estresse oxidativo. A superprodução de radicais livres, junto com a vitaminas A, C e E e um nível reduzido das enzimas citadas, contribui com o estresse oxidativo, pois esses radicais podem induzir dano oxidativo em biomoléculas como carboidratos, proteínas lipídeos e DNA, acelerando assim o envelhecimento cutâneo e de membranas lipídicas, e contribuindo para a indução de câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamações (BANERJEE et al., 2005; CERQUEIRA et al., 2007).

As EROs e ERNs participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares. A reatividade destas substâncias com biomoléculas é variável, sendo alguns estáveis e pouco reativos, como por exemplo, o radical superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ , e outros altamente reativos, apresentando velocidade de reação próxima à constante de colisão com moléculas-alvo, sendo o radical hidroxila  $HO^{\bullet}$ , o principal exemplo (CERQUEIRA et al., 2007).

Há também outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) que não são radicais livres por não possuírem elétrons desemparelhados na última camada. O peróxido de hidrogênio é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o  $OH^{\bullet}$  (Figura 5). Por ter vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao  $Fe^{+5}$ . Assim, é altamente tóxico para as células, e essa toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (FERREIRA, 1997; ALVES et al., 2010; BARREIROS et al., 2006). O estado excitado singlete do oxigênio não é um radical, visto não ter os elétrons

desemparelhados, mas reage com uma grande variedade de compostos biológicos, como lipídeos de membrana. Pode ser produzido através da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com  $\text{HOCl}$  ou pela dismutação espontânea do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (VELLOSA et al., 2007).

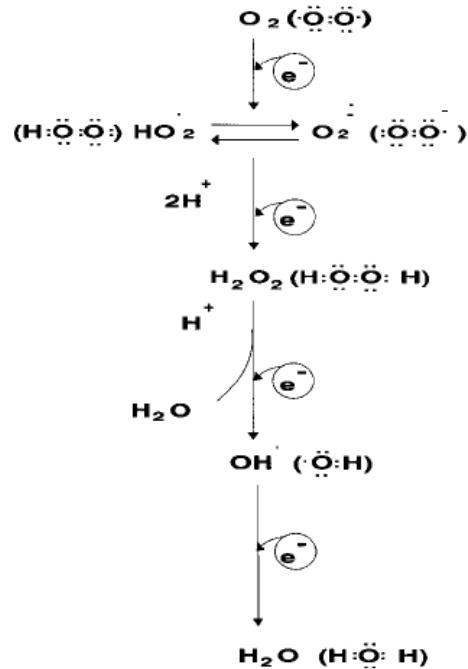


Figura 5. Redução tetraivalente do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Várias espécies reativas de  $\text{O}_2$  são formadas no processo.

Embora as espécies reativas do metabolismo do oxigênio possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante (Tabela 1) (ALVES et al., 2010; BARREIROS et al., 2006).

Tabela 1. Eventos nosológicos que podem ocorrer com o estímulo exagerado na produção de espécies reativas e falha da defesa antioxidante.

---

**Eventos relacionados a espécies reativas de O<sub>2</sub>**

---

Envelhecimento  
 Mutações  
 Câncer  
 Aterosclerose  
 Lesão por toxicidade de O<sub>2</sub> em pulmão e retina  
 Lesão pós-isquemia e reperfusão de cérebro, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins e pulmões  
 Lesão pós-concussão cerebral e pós-hipertensão intracraniana  
 Síndrome demencial  
 Disfunção renal pós-transplante  
 Artrite reumatóide

---

Doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC) como Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson estão associadas em parte com os efeitos deletérios que o desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes, decorrente da produção descontrolada de radicais livres, pode provocar nos sistemas biológicos. Alimentos ricos em substâncias antioxidantes exercem uma função essencial na prevenção destas doenças degenerativas do SNC e de doenças cardiovasculares, câncer, assim como inflamações, envelhecimento cutâneo, pois as substâncias antioxidantes combatem os radicais livres (BANERJEE et al., 2005). Uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (SOUZA et al., 2007).

#### 1.1.4. Antioxidantes

A oxidação é um dos maiores causadores de degradação de materiais e alimentos. As espécies com oxigênio reativo, em particular, radicais livres, têm sido as responsáveis por muitas doenças incluindo as duas maiores causas de morte: câncer e arteriosclerose. Na tentativa de minimizar os efeitos danosos dos radicais livres, organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos de proteção antioxidante que envolvem sistemas enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD) catalase e glutathione peroxidase (GSH) e sistemas antioxidantes compostos por micromoléculas como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides e flavonóides, entre outros (BARREIROS, 2006).

Embora o organismo tenha capacidade de prevenir reações indesejáveis e reparar moléculas e tecidos danificados, estes mecanismos de defesa não são suficientemente abrangentes para reparar todos os danos causados por tais reações, ocorrendo o acúmulo de substâncias prejudiciais ao nosso corpo. Esta situação de desequilíbrio entre a formação de espécies com poder oxidante e a sua destruição denomina-se estresse oxidativo e pode conduzir a um metabolismo anormal, disfunção celular, à perda de funções fisiológicas, a doenças e à morte celular e/ou tecidual.

Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes, já que estes têm propriedades de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (GORDON, 1996).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Isso tem levado à intensificação de pesquisas relacionadas com as possíveis contribuições de antioxidantes, como representado abaixo, onde FI-OH representa um flavonóide, capaz de doar um H radicalar a ERO, inativando-a.



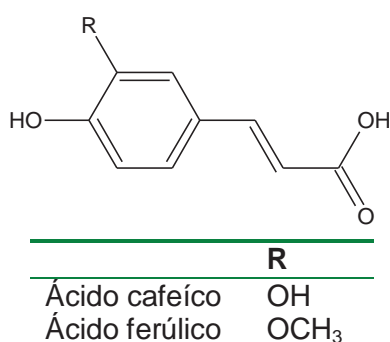
A elevada “capacidade sequestrante” de substâncias é verificada por um grande número testes que medem a atividade antioxidante em vitro como DPPH e ABTS (CAO et al., 1999; HIRAYAMA et al., 1997; OU et al., 2001; RE et al., 1999; ROBARDS et al., 1999).

Antioxidantes fenólicos, além da propriedade sequestradora de radicais, funcionam também algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir as

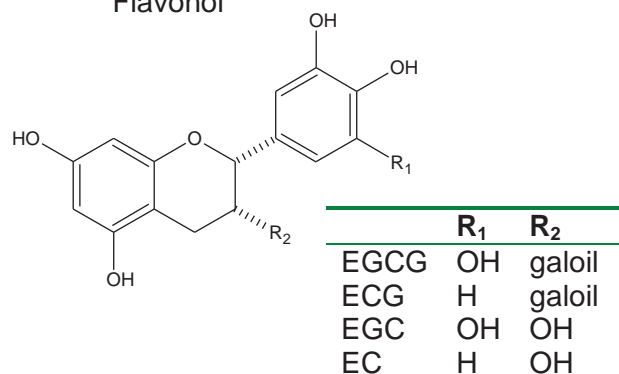
oxidações lipídicas e LDL (lipoproteína de baixa densidade); entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SOARES, 2002; SILVA, E. M. et al., 2007b; SOUZA et al., 2008).

A proteção antioxidante atribuída aos fenólicos pode ser verificada através do nível dos biomarcadores, tais como o malondialdeído que é associado com o peroxidação lipídica (NIELSEN et al., 1997), ou 8-oxo-7,8-dihidroguanina que indica os danos oxidativos das bases do DNA (CADET et al., 2003). Diversos estudos comprovam a capacidade protetora de polifenóis dietéticos (Figura 6) nas doenças coronárias de coração (CHD) (WEISBURGER, 1999), câncer (DUTHIE et al., 2000; YANG et al., 2001), regulação genética (MYHRSTAD et al., 2002), e doenças neurodegenerativas (SUN et al., 1998).

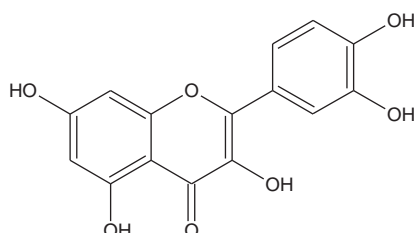
#### Ácidos fenólicos e derivados



#### Flavonol



#### Quercetina



#### Isoflavonoídes

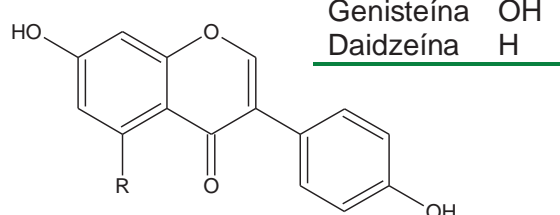


Figura 6. Estruturas representativas de classes selecionadas de polifenóis dietéticos.

Trabalhos sobre medicina preventiva mostram que as substâncias fenólicas são os antioxidantes naturais mais eficientes, estimulando a descoberta de novas substâncias que possam ser incluídas na dieta alimentar, visando à manutenção do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante corporal, evitando assim o estresse oxidativo (RICE-EVANS, 1996).



### 1.1.5. Agentes quimiopreventivos

Vários fatores como envelhecimento, urbanização, uso de tabaco, ausência de atividade física e consumo de comidas calóricas, refinadas e insalubres estão relacionados com números crescentes de indivíduos com doenças crônicas de coração, AVC, diabetes, dentre outras (PINTO et al., 2009). Muitos estudos relacionam um estilo de vida natural e saudável aliado com bioativos naturais introduzidos na dieta reduzem o risco destas doenças crônicas através da quimioprevenção (SILVA, ROGEZ, LARONDELLE, 2007).

A quimioprevenção pode ser entendida como o uso de substâncias químicas a fim de prevenir, retardar ou reverter alguns tipos de doenças (WATTENBERG, 1985). Muitas substâncias quimiopreventivas potenciais estão presentes nos alimentos como polifenóis, isoflavonas, curcumina, arilpropanóides, isocianato, sulforafano, licopeno, ácidos salicílicos, cafeína entre outras. Tais substâncias têm-se mostrado grandes aliadas no tratamento dos linfomas, dos tumores da infância e das neoplasias de células germinativas (KELLOFF et al., 2000; CHUANG et al., 2000).

Os elementos quimiopreventivos podem ser classificados em três grupos de acordo com a etapa da carcinogênese química sobre a qual são eficazes. O primeiro grupo é a inibição do início da carcinogênese. O segundo grupo é composto por agentes bloqueadores, representados por compostos capazes de modular os processos de absorção intestinal, bio-transformação e bioativação microsomal, excreção renal e interação com o material genético de substâncias cancerígenas. O terceiro grupo de quimiopreventivos é composto por agentes supressores que interferem em alguns eventos celulares críticos à promoção e progressão da carcinogênese, prevenindo a evolução de processos celulares malignos (PEZZUTO et al., 2005; WATTENBERG, 1985).

O organismo humano é dotado de um complexo sistema de defesa, e os xenobióticos, que entram no corpo, sofrem uma série de transformações mediadas por enzimas. Existem basicamente dois tipos de enzimas de biotransformação de xenobióticos. As enzimas de fase I, que incluem as enzimas da família do citocromo P-450 dependentes de monoxigenases, geralmente são responsáveis pela ativação dos compostos e, por esse motivo, são chamadas de ativadoras. E as enzimas de fase II, como as glutatonas, quinona redutase, UDP-glucuronosil transferase, dentre

outras, que possuem como principal característica o poder de adição ou conjugação de cofatores endógenos, como glutathione, ácido glucurônico, formando produtos não tóxicos e, por essa razão, também são chamadas de destoxificadoras.

Compostos bioativos podem alterar o metabolismo de carcinogênicos químicos por modificar o sistema endógeno de enzimas descrito acima. Muitos estudos demonstram que compostos bioativos atuam como quimio-protetores, agindo na indução de enzimas que metabolizam os carcinógenos, transformando-os em suas formas menos reativas.

Com relação a estudos de quimioprevenção, são encontrados muitos compostos com essa atividade, e estes são separados em duas classes funcionais. A primeira inclui indutores monofuncionais, que induzem a atividade de enzimas de fase II. A segunda é composta de indutores bifuncionais, com capacidade de induzir à atividade de ambas as enzimas de fase I e II (CUENDET et al., 2006).

A indução de enzimas de fase II pode proteger os sistemas biológicos contra espécies químicas tóxicas e reativas, e estudos recentes demonstram que a elevação dessas enzimas, como a NADPH: quinona-redutase e GST (Glutathione S-transferase) estão correlacionadas com a proteção celular nos estágios iniciais e intermediários contra a carcinogênese induzida por agentes químicos em modelos animais (WATTENBERG, 1985; SONG et al., 1999; CUENDET et al., 2006).

#### 1.1.6. Doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa e está relacionada com a deficiência do neurotransmissor acetilcolina. Uma das formas de tratamento desta doença é inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) responsável pela hidrólise da acetilcolina (MARSTON et al., 2002; VIEGAS et al., 2005; SILVA, E. M. et al., 2007b).

A tacrina é uma droga sintética usada como inibidor reversível da AChE no tratamento da DA e licenciado pelo FDA (Food And Drug Administration). Porém não é seletiva, atuando também em outras enzimas. Possui efeito hepatotóxico e tempo de vida curto no plasma sendo necessárias quatro doses por dia para a terapêutica efetiva. Já o donepezil, outra droga sintética, é mais seletiva, atuando apenas na inibição da AChE. Por possuir um tempo de vida maior é necessária apenas uma dose diária, porém causa disfunções gastrointestinais (SILVA, E. M. et al., 2007b).



Várias espécies vegetais tem sido investigadas como fontes alternativas de inibidores de AChE baseando-se, principalmente, no conhecimento popular como esquecimento, tremedeiras, entre outras (VIEGAS et al. 2005). A galantamina, produto natural isolado de *Galanthus nivalis*, tem sido usada como protótipo para o desenvolvimento de drogas inibidoras de AChE, pois também apresenta efeitos colaterais indesejáveis (MARSTON et al., 2002). Diante deste contexto, a busca por novas drogas menos tóxicas e mais eficientes tornou-se inadiável e programas de bioprospecção têm priorizado o uso de testes colorimétricos simples e reproduzíveis para a descoberta de novos inibidores de AChE.

#### 1.1.7. Câncer

O câncer é o nome dado a doenças que têm crescimento desordenado de células (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2009a e 2009c). Essas células adquirem a capacidade de se desprender e migrar, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, e podendo chegar ao interior de um vaso linfático ou sanguíneo, e assim, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou.

O câncer pode ser causado por fatores internos ou externos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. As causas internas são geneticamente pré-determinadas (hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas) nas maiorias das vezes. As causas externas relacionam-se com o meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural propiciando o contato excessivo a substâncias químicas, irradiação e/ou vírus associados à etiologia do câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2009b).

O uso de produtos naturais como agentes quimiopreventivos, que inibem os eventos iniciais da formação de tumores, tem sido difundido em função da quantidade crescente de resultados positivos sobre a inclusão de alimentos ricos em antioxidantes na dieta (ABEDL-KADER et al., 2000). Adicionalmente, muitos produtos naturais derivados de plantas e seus análogos semi-sintéticos têm mostrado atividade marcante na inibição da proliferação de células tumorais, como por exemplo, algumas drogas muito eficientes: paclitaxel (Taxol), vimblastina (Velban), vincristina (Oncovin) entre outras (BORING et al., 1994; DAVIS et al., 1994).

### 1.1.8. Fungos patógenos-humanos

As infecções causadas por fungos patógenos-humanos têm aumentado a um ritmo alarmante nos últimos 20 anos. Os fungos da espécie *Candida* são um dos principais agentes causadores de doenças, pois a candidemia não só é associada a uma alta mortalidade, mas também estende a duração da internação e aumenta os custos da assistência médica. Dentre os fungos pertencentes a esta espécie o fungo mais freqüente é o *Candida albicans* seguido por de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, enquanto *C. kefyr* e *C. guilliermondii* são encontradas ocasionalmente.

Os fungos são amplamente associados a doenças oportunistas e tem-se observado aumento no número de pacientes com alterações no estado imunológico associados ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), à quimioterapia do câncer e transplante de órgãos e de sangue. Coincidindo com esse aumento de pacientes imunocomprometidos tem ocorrido um aumento da incidência de micoses sistêmicas humanas. *Cryptococcus neoformans*, destacado como o segundo maior responsável por infecções oportunistas em pacientes aidéticos, e *Candida* sp, descrita em 20 a 40% de pacientes com câncer e em aproximadamente 25% dos pacientes que recebem transplantes de medula óssea, são alvos de enorme importância (MARQUI et al., 2008).

As manifestações clínicas da infecção causada por *Cryptococcus neoformans* podem variar de uma colonização assintomática do trato respiratório a ampla disseminação, dependendo da resposta imune do hospedeiro. Alguns fatores de risco como estágio avançado de infecção por HIV, uso de corticóides, linfomas, transplantes e doenças imunossupressoras podem estar associados à disseminação envolvendo o sistema nervoso central (SNC).

As drogas antifúngicas mais comuns são anfotericina B, compostos azólicos como fluconazol e itraconazol e flucitosina (5-fluorocitosina). Essas drogas apresentam efeitos colaterais e podem levar a complicações como por exemplo, o limite da dose de nefrotoxicidade associada a anfotericina B, o rápido desenvolvimento de resistência à flucitosina, interações medicamentosas, modo de ação fungistática mas não fungicida e resistência aos azóis (SCORZONI et al., 2007). Assim, a busca por novos agentes antifúngicos é também de alta relevância em muitos programas de bioprospecção.

### 1.1.9. Malária

A malária é considerada uma doença infecto-parasitária grave transmitida por protozoários do gênero *Plasmodium*, aflige mais de 500 milhões de pessoas no mundo, causando pelo menos um milhão de óbitos anuais, tendo como agravante a resistência do parasita à quimioterapia e a falta de uma vacina eficaz.

Os casos de malária estão localizados principalmente na África, seguido da Índia e do Brasil, estando presente também no sudeste da Ásia, na América Central, América do Sul e na Oceania. No Brasil, a região amazônica concentra mais de 99% da transmissão da malária, representando um dos maiores problemas de saúde pública.

Uma das mais importantes estratégias na busca de novos fármacos é a identificação de novos alvos e a subsequente descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nestes alvos. Um destes alvos é a polimerização de heme (ROSENTHAL, 2003). No vacúolo digestivo ácido, o *Plasmodium* degrada 75% da hemoglobina do hospedeiro e utiliza os seus aminoácidos para a síntese de proteínas. Nesse processo, heme tóxica é liberada, armazenando-se na forma de um polímero inerte chamado hemozoína ou pigmento malárico, em que o grupo propionato do heme liga-se ao  $Fe^{3+}$  da outra unidade de heme. Sendo assim, substâncias capazes de inibir a síntese de hemozoína podem servir de modelos para a terapia da malária (TRIPATHI et al., 2004).

A hemozoína parece ser estruturalmente idêntica à  $\beta$ -hematina que pode formar-se espontaneamente em condições não fisiológicas sem a adição de nenhuma proteína. O conhecimento bioquímico deste processo experimental permitiu o desenvolvimento de um método rápido, barato e eficiente na busca de substâncias que inibam a polimerização do heme. A formação de  $\beta$ -hematina *in vitro* pode ser realizada através de vários procedimentos experimentais como, por exemplo, a incubação de hemina bovina (BAELMANS et al. 2000). Os fármacos disponíveis atualmente, como a quinina, cloroquina e mefloquina, têm eficácia limitada pelo desenvolvimento de resistência do parasita e efeitos colaterais indesejados. A descoberta de novos antimaláricos é, portanto, prioridade em diversos programas de bioprospecção (OSORIO et al., 2007).

## 1.2. A família Fabaceae

A família Fabaceae está dentro do percentual de espécies que tem sido muito estudada fitoquimicamente e vem apresentando muitos resultados positivos. Ela é uma das maiores e mais importantes das famílias vegetais, distribuída em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. É conhecida como Leguminosae (leguminosas) com fruto do tipo vagem. São aproximadamente 18.000 espécies em mais de 650 gêneros (POLHILL et al., 1981; JUDD et al., 1999). A classificação mais moderna da família Fabaceae a divide em três subfamílias: Papilionoideae (ou Faboideae), Caesalpinoideae e Mimosoideae (VEIGA JUNIOR et al., 2002).

Quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* e semelhantes, que fixam o nitrogênio da atmosfera, uma característica ecológica de extrema importância. Também são de grande importância econômica pela produção de alimentos como:

- soja (*Glycine max*)
- ervilha (*Pisum sativum*)
- feijão (*Phaseolus vulgaris*)
- alfafa (*Medicago sativa*)

A ampla ocorrência de flavonóides e isoflavonóides em espécies de Fabaceae têm sido associadas às suas propriedades antifúngicas (GROSVENOR et al., 1996). Os fungos estão envolvidos diretamente ou indiretamente em diversas doenças de plantas e animais, e a ocorrência crescente de micoses oportunistas associadas ao uso de drogas imunossupressoras para o tratamento da AIDS, tem levado à intensificação da procura por novos antifúngicos. Entre 1982 e 1993 cerca de 250 novos compostos antifúngicos foram isolados de plantas, porém pequena parte destes passaram pelas etapas de desenvolvimento para um novo fármaco (GRAYER et al., 1994).

### 1.2.1. O gênero Swartzia

O gênero *Swartzia* pertence à subfamília Caesalpinoideae e inclui 150 espécies, distribuídas pelas Américas do Sul, Central e África. Embora esse gênero tenha um

grande número de espécies, são poucas as que têm sido investigadas quimicamente (ABEDL-KADER et al., 2000). O gênero *Swartzia* é caracterizado pela presença de isoflavonóides, saponinas triterpênicas e diterpenos aromáticos. Espécies deste gênero apresentam constituintes químicos com atividade antimicrobiana, antifúngica, moluscicida e citotóxica o que mostra a importância da investigação adicional sobre aspectos fitoquímicos e/ou farmacológicos destas espécies (MARQUI et al., 2008).

O extrato etanólico da madeira da *Swartzia polyphylla* apresentou significativa inibição da proteína quinase C (PKC) decorrente da presença de isoflavonas (Figura 2). A PKC está envolvida na tradução de sinais, na proliferação e diferenciação celular. É ativada pelo diacilglicerol e ésteres forbóis promotores de tumor, sugerindo que a produção descontrolada de uma forma ativa de PKC talvez resulte no desenvolvimento de câncer. Alguns compostos naturais, que apresentaram inibição da atividade da PKC, demonstraram atividade antineoplásica, indicando que ensaios de inibição da enzima sejam úteis na descoberta de novos agentes antineoplásicos de fontes naturais (DUBOIS et al., 1995 e 1996). Adicionalmente, as saponinas (**6-10**) de *Swartzia schomburgkii* mostraram-se ativas frente a linhagens de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) geneticamente modificadas, indicativos de marcante inibição da proliferação de células tumorais (Figura 7) (ABEDL-KADER et al., 2000).

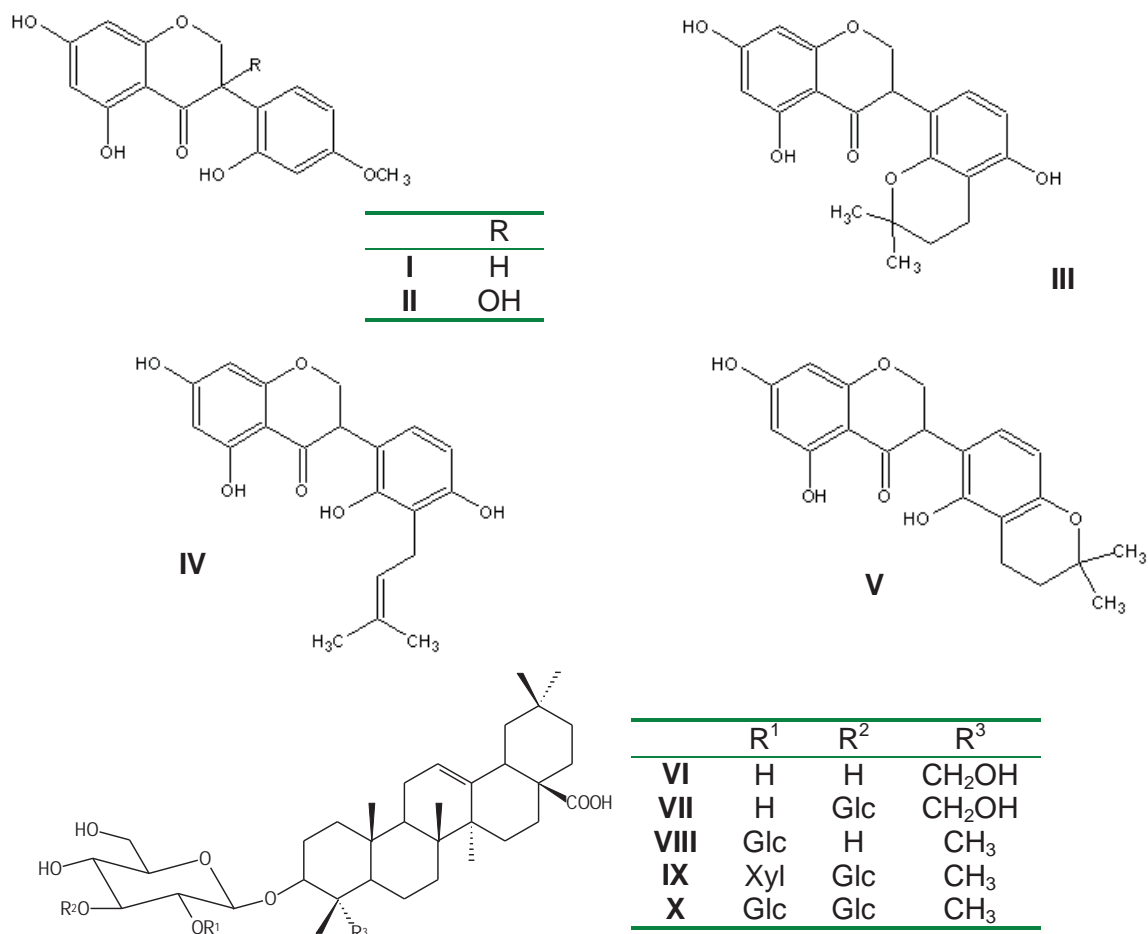


Figura 7. Isoflavonas (I – V) isoladas da *S. polyphylla* e saponinas (VI – X) isoladas de *Swartzia schomburgkii*.

#### 1.2.1.1. *Swartzia langsdorffii*

*Swartzia langsdorffii* é popularmente conhecida como banana-de-papagaio, jacarandá-banana e jacarandá-de-sangue (Figura 8). Na região sudeste é encontrada nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, nas formações florestais do complexo atlântico, principalmente na Serra do Mar (MANSANO et al., 1999). Pode atingir de 8 a 14 metros de altura. A árvore é ornamental, principalmente quando em flor, e seus frutos são muito procurados por várias espécies da fauna, que se alimentam do arilo suculento que envolve parcialmente a semente. Por essa razão, essa árvore é interessante para plantio em áreas degradadas para preservação permanente (LORENZI, 2000; MARQUI, 2008).



Figura 8. *Swartzia langsdorffii*: detalhe das folhas; fruto e exemplar adulto.

Algumas saponinas foram isoladas dos frutos e sementes da *Swartzia langsdorffii*. Estas apresentaram alta atividade moluscicida contra adultos de *Biomphalaria glabrata* (caramujo transmissor da esquistossomose) (Figura 9) (MAGALHÃES et al., 2003).

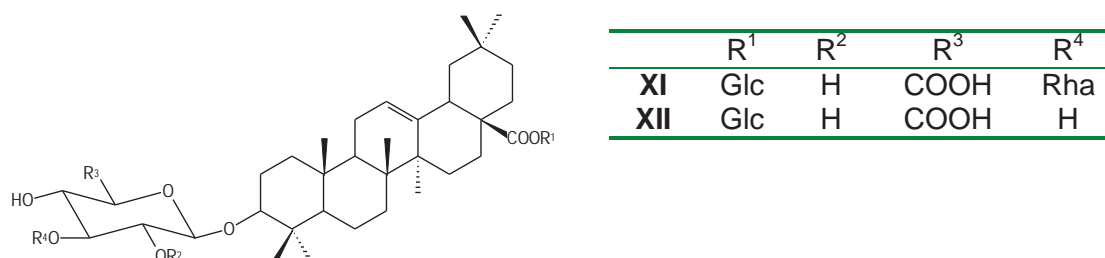


Figura 9. Algumas saponinas (**XI – XII**) isoladas de espécies de *Swartzia*.

O extrato de *S. langsdorffii* destacou-se pela marcante atividade antifúngica frente à fitopatógenos e patógenos humanos. Apesar da existência de potentes agentes antifúngicos como a anfotericina B, o aparecimento de resistência ou multi-resistência de fungos impõe a necessidade de pesquisas permanentes e o desenvolvimento de novas drogas (MARQUI et al., 2008).

### 1.2.2. O gênero *Inga*

O gênero *Inga* pertence à subfamília Mimosoideae e inclui aproximadamente 250 espécies. Nativo da América tropical e subtropical, esse gênero é usado por tribos do oeste da Amazônia para tratar diferentes tipos de doenças.

As sementes de *I. brachystachya* são utilizadas por integrantes da tribo dos Tikunas com a finalidade de reduzir as flatulências e as folhas e raízes de *I. strigillosa* Benth em cicatrização de machucaduras da pele. As flores de *I. cecropietorum* Ducke são utilizadas em compressas por indíginas pertencentes a tribo Makuna para reduzir dores de ouvido. Flores moídas de *I. rubiginosa* (Rich.)



são inaladas por integrantes da tribo Kubeo para descongestionamento nasal quando estão resfriados e a polpa das vagens de *I. pilosule* Rich Macbride são usadas para limpar as secreções das pálpebras. Polpa de frutos de *I. macrophylla* Willd são utilizadas por aborígenes ribeirinhos de Putumayo para limpar os dentes. As flores de *I. myriocephala* Pittier são utilizadas pela tribo Taiwano para fortalecer os cabelos e os ramos e folhas de *I. verna* são usados para curar espinhas e feridas (VIVOT et al. 2001).

Estudos fitoquímicos realizados em espécies do gênero *Inga* identificaram componentes químicos como: saponinas da casca de *I. marginata*, esteróis glicosilados e flavonóides das raízes de *I. edulis*, diferentes ácidos pipecólicos hidroxilados em *I. brenesii*, *I. longispica*, *I. oerstediana* e *I. paterno*, açúcares (particularmente D-frutose e sacarose) de *I. spectabilis*, ácido ascórbico de *I. fagifolia*, altas concentrações de fenólicos em *I. brenesii*, *I. densiflora*, *I. longispica*, *I. mortoniana* e *I. punctata* (VIVOT et al. 2001).

O extrato etanólico de *I. verna* mostrou propriedades inibitórias de xantina-oxidase com produção proporcional de superoxidase, confirmado pelo ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) com inibição de 50% dos radicais livres. Estudos fitoquímicos revelaram o ácido gálico e o ácido elágico presentes no extrato das folhas são os principais responsáveis pela atividade antioxidante (VIVOT et al. 2001; SOUZA et al., 2007).

Na medicina popular, a casca de *I. dulcis* é usada como antipirético, o fruto em lavagens intestinais e feridas. Estudos indicaram o óleo da semente como uma potencial fonte de ácidos como: vernólico, ciclopropenóide, malvático, estercúlico (HOSAMANI et al., 1995). Em teste de inibição de fungos patógenos humanos, as fases de partição acetato de etila e aquosa das folhas mostraram-se ativas frente à *Candida albicans* e *C. krusei* (JOHANN et al., 2007).

O aminoácido L-tirosina, acumulado em folhas jovens de *I. umbellifera*, foi acrescentado à dieta artificial em bioensaios com lagartas *Heliothis virescens*. A L-tirosina inibiu o crescimento da lagarta, funcionando como um aleloquímico. Também foi observado que a espécie acumula flavanóides O-substituídos e procianidinas (taninos condensados) em concentrações maiores que 40% da massa do extrato seco. Estas combinações também são potentes inibidores do crescimento da lagarta *H. virescens* (LOKVAM et al., 2006).



O extrato bruto de folhas e as fases de partição de *I. goldmanii* quando submetidos à bioensaio com a larva *Heliothis virescens* apresentaram defesas químicas três vezes mais inibitória que *I. umbellifera*. Ambas as espécies apresentam misturas complexas de taninos e catequinas. A química de espécies fenólicas difere notadamente na estrutura das unidades monoméricas e na distribuição dos tamanhos do polímero, pronunciando efeitos na bioatividade.

Altas concentrações de polifenóis encontrados em folhas jovens causam a precipitação da proteína, mecanismo importante de inibição do crescimento (LOKVAM et al. 2005).

A casca de *I. uruguensis* é utilizada como hemostático e a resina do fruto como antidontálgica. Seus extratos etanol:água 7:3, acetona e clorofórmio apresentaram triterpenos e esteróides e as frações em acetona e clorofórmio apresentaram terpenos de baixo peso molecular (BERTUCCI et al., 2008).

Neste trabalho foram investigadas três espécies de Inga: *Inga edulis*, *I. laurina* e *I. marginata*, sobre as quais é apresentado breve descrição de suas características e propriedades marcantes.

#### 1.2.2.1. *Inga edulis*

A espécie *Inga edulis* é conhecida como angá, ingá-cipó, ingá-macarrão, ingá-de-macaco, ingá-de-metro ou ingá-rabo-de-mico (Figura 10), e é encontrada na região Amazônica e em toda a orla litorânea desde o Rio Grande do Norte até o norte de Santa Catarina na floresta pluvial Atlântica. Muito comum nas margens de rios e lagos ou em regiões que se alagam com facilidade. Possui copa ampla e baixa. O fruto em forma vagem são comestíveis e possuem muitas sementes que estão envoltas por uma polpa branca flocosa e adocicada e muito apreciada pelas populações da região Amazônica, onde são cultivados em pomares domésticos e amplamente comercializados em feiras livres. Algumas comunidades indígenas utilizam como adstringente, antiartrítica, anti-reumático, antidiarréico e antiinflamatória (LORENZI, 1998).



Figura 10. Detalhes das folhas e fruto de *Inga edulis*.

Há subsequente um número crescente de investigações sobre polifenóis por causa do efeito protetor contra doenças neurodegenerativas, anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas (SILVA, ROGEZ, LARONDELLE, 2007). Estudos fitoquímicos de *I. edulis* mostraram grandes concentrações de polifenóis com atividade antioxidante que foram avaliados em testes de capacidade sequestradora de radicais livres ou habilidade para proteger estruturas biológicas e em análises de ORAC (Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar) que mede a capacidade dos antioxidantes em proteger um substrato quando submetidos aos ataques de radicais e o TEAC (Capacidade Equivalente Antioxidante do Trolox) que mede a “capacidade sequestrante” direta do cátion radicalar ABTS<sup>+</sup> [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)], que estão diretamente relacionados com polifenóis e flavonóides presentes em suas folhas e frutos (SILVA, E. M. et al., 2007b; SOUZA et al., 2007).

Os extratos metanólicos das folhas de *I. edulis* apresentaram polifenóis que foram analisados em diferentes testes *in vitro* como a capacidade sequestradora de radicais livres e proteção de estruturas biológicas (LDL) apresentando alta capacidade antioxidante (SOUZA et al., 2007 e 2008). Esta propriedade pode ser relacionada ao fato das folhas serem ricas em polifenóis, especialmente em flavan-3-ols (+)-catequina e (-)-epicatequina) e flavonóides (miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (Figura 11) (SILVA, E. M. et al., 2007b).

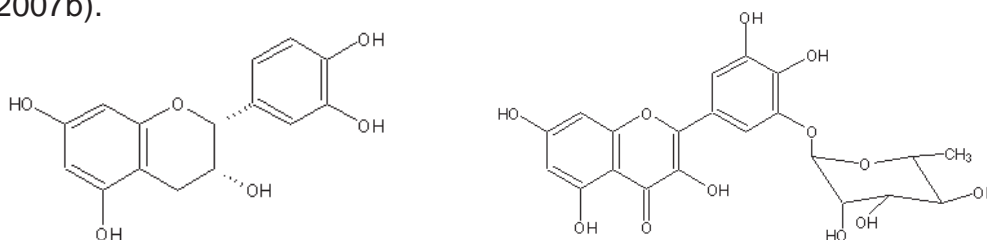


Figura 11. Flavonóides (+)-catequina e quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo isolados de *Inga edulis*.

Três flavonóides foram isolados das raízes de *I. edulis* (5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona; 6,3',4'-trihidroxi-aurona e 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavanona). O interesse pelos flavonóides aumentou consideravelmente por causa da elevada capacidade sequestradora de radicais livres associados com várias doenças. Esses flavonóides de *I. edulis* apresentaram propriedades como: antiinflamatório, antialérgico, antivirótico, anticarcinogênico, inibição da peroxidação lipídica e oxidação de LDL (SOUZA et al., 2007 e 2008)

#### 1.2.2.2. *Inga laurina*

A espécie *Inga laurina* é popularmente conhecida como: ingá-branco, ingá-de-chichica, ingá-de-macaco, ingá-de-praia, ingá-mirim ou ingaí e ocorre em matas úmidas situadas em várzeas (Figura 12) (LORENZI, 2002). Possui ampla distribuição no país, ocorrendo desde a Amazônia até o Nordeste e daí para o sul até o Paraná, em quase todas as formações vegetais. Também na faixa litorânea (restinga) e nos demais países da América Latina, Central e Caribe. Possui copa baixa sendo utilizada como árvore de sombra. Seus frutos em forma vagem são comestíveis e contêm semente envolta por uma polpa flocosa branca e adocicada. Esta espécie é importante para a flora brasileira e na literatura há poucos estudos fitoquímicos (MACEDO et al. 2007).

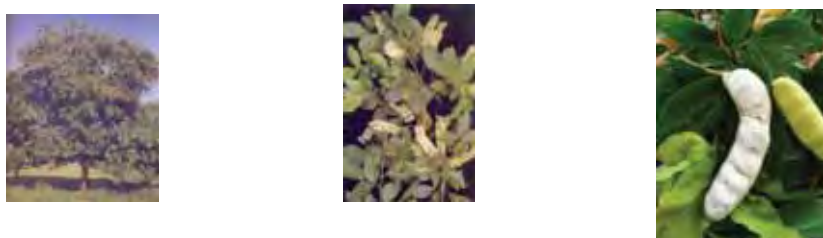


Figura 12. Exemplar adulto de *Inga laurina*, folhas, flores e fruto.

As folhas jovens de *Inga laurina* apresentara altas concentrações de derivados de tirosina esterificados com unidades de ácido gálico (Figura 13). Foram realizados bioensaios com lagartas *Heliothis virescens*, utilizando uma dieta com 10% em massa de tirosina. Foi observado a redução do crescimento da lagarta em 2% do seu comprimento, sendo eficiente no controle biológico destas pragas agrícolas (LOKVAM et al., 2007).

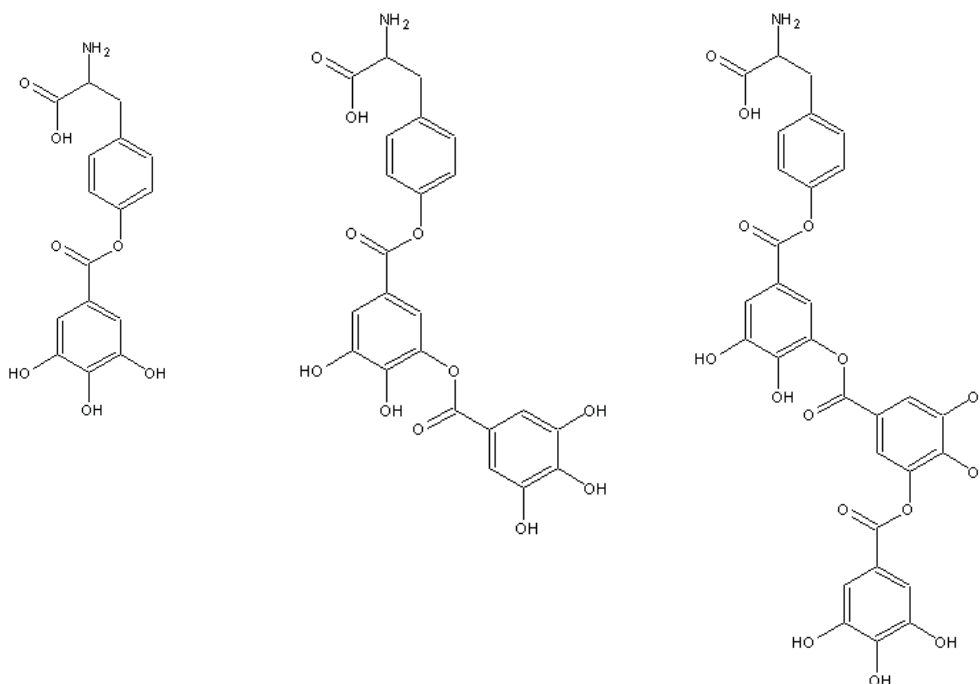


Figura 13. Derivados de tirosina isolados de *Inga laurina*.

O extrato de folhas de *I. laurina* apresentou baixa atividade no ensaio de bioautografia com *Cladosporium cladosporioides*, também apresentou baixa inibição do crescimento da cepa do tipo selvagem (RAD<sup>+</sup>) e tipo mutante (RS321), ambas indicadoras da atividade de reparo a danos do DNA, estimulando a investigação de outras bioatividades para esta espécie (MORENO et al. 2004).

#### 1.2.2.3. *Inga marginata*

A espécie *Inga marginata* é conhecida com ingá-feijão. Essa é encontrada na América Central e do Sul e é amplamente distribuída no território brasileiro em matas ciliares. Seus frutos em forma de vagem são comestíveis e contêm semente envolta por uma polpa flocosa branca e adocicada (Figura 14). Na literatura não há relatos de estudos fitoquímicos e teste biológicos (LORENZI, 2002).



Figura 14. Exemplar adulto de *Inga marginata*, folhas, flores e fruto.

## 2. OBJETIVO

O trabalho visa realizar o estudo fitoquímico de espécie de Fabaceae: *Swartzia langsdorffii* e *Inga laurina* a fim de se isolar e determinar a estrutura química das substâncias presentes nas suas folhas e ramos. Através do fracionamento cromatográfico monitorado por testes para detecção de atividades ligadas à quimioprevenção como: antioxidante, potencialmente antitumoral e além de atividade antifúngica e inseticida, buscando assim substâncias de interesse farmacológico e/ou biológico.

Pretende-se também comparar o perfil cromatográfico das frações obtidas com o extrato bruto das espécies *I. edulis* e *I. marginata*, através do uso de CLAE-UV, CLAE-EM e de substâncias padrão isoladas, identificar os constituintes majoritários das frações analisadas.

Quantificar as substâncias isoladas da espécie *I. laurina*: 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (8), 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (9), 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (10) e 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (11), inéditas na literatura e ácido gálico (6) e galato de metila (7), empregando Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e avaliar a eficiência dos métodos utilizados para isolamento de acordo com os parâmetros de avaliação estabelecidos pela AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA) e INMETRO.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Materiais, Equipamentos e Técnicas

#### 3.1.1. Moinho de facas e funil de separação.

Foi utilizado o moinho de facas da marca Marconi e um funil de separação de 1 L.

### 3.1.2. Solventes.

Os solventes grau p.A Synth foram utilizados nos processos de extração, fracionamento e isolamento. Os solventes deuterados utilizados nos processos de RMN foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e Dimetilssulfóxido ( $\text{DMSO-d}_6$ ) da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories) e TMS, como padrão interno.

### 3.1.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e Preparativa.

Nas análises por CCD foi utilizada sílica gel 60G (Merck) ou placas de alumínio cobertas de sílica-gel (sílica F254, Merck, Darmstadt, Germany), em camadas de 0,25 mm para análise comparativa, e de 0,75 mm para preparativa (5-45  $\mu\text{m}$ ). As placas comparativas foram reveladas por nebulização com solução de anisaldeído seguida de aquecimento em forno (120 °C). Tanto as placas comparativas como as preparativas foram reveladas com irradiação de luz ultravioleta de  $\lambda$  254 e  $\lambda$  366 nm (aparelho UV-vis CAMAG) e/ou por imersão em cubas com vapores de iodo. Efetuou-se a recuperação das amostras após CCDP através de lavagens da sílica com solventes orgânicos e filtração em placa porosa. O critério de pureza adotado foi a observação de mancha única em CCDC, variando o sistema de eluentes.

### 3.1.4. Cromatografia em Coluna.

Na separação cromatográfica em coluna utilizou-se sílica gel 60G (0,063-0,200 mm) da Merck, 70-230 mesh para CC "flash". Para frações mais polares foi utilizado ou octadecilsilano LiChroprep<sup>®</sup> RP-18 40-63  $\mu\text{m}$  da Merck ou gel polimérico Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech).

### 3.1.5. Rotaevaporador.

As concentrações das soluções foram efetuadas em rotaevaporador sob pressão reduzida (Buchi).

### 3.1.6. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Foi utilizado espectrômetro VARION INOVA 500 operando a 11.7 T para  $^1\text{H}$  e 11.7 T para  $^{13}\text{C}$  (11.7 T).

### 3.1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Cromatógrafo analítico sistema ternário Varian Pro Star modelo PS 240 com auto injetor Varian Pro Star modelo PS 410 e detector de arranjo de diodo UV-PDA modelo 330.

Coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu\text{m}$ ).

Cromatógrafo preparativo sistema binário com degaseificador Shimadzu SCL – 10A VP e detector de arranjo de diodo UV SPD-10A VP.

Coluna preparativa C-18 (240 mm x 50 mm e 5  $\mu\text{m}$ ).

Cromatógrafo analítico Shimadzu, bombas LC-10AD, com auto-injetor SIL 10A/CBM 10A, detector Diode-Array modelo SPDM 10AVP

Coluna analítica e preparativa “Luna” Phenomenex (250 mm x 4,6 mm e 250 mm x 21 mm, respectivamente).

Cromatógrafo preparativo sistema ternário Varian Prep Star modelo SD-1 e detector Varian Pro Star UV-VIS modelo 320.

Coluna preparativa “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 21,2 mm).

### 3.1.8. Polarímetro

A rotação óptica foi medida em polarímetro Perkin-Elmer modelo 341 usando lâmpada de sódio (589 nm) a 20°C.

### 3.1.9. Quantificação

A validação de um método é processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento e transferência. Para o registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem



adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI et al. 2004).

Os laboratórios de fitoterápicos necessitam de metodologias que assegurem o controle de qualidade de seus produtos quando os mesmos não constam em farmacopéias ou monografias oficiais.

A resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a norma Q2(R1), “Validation of analytical procedures: text and methodology” do International Conference on Harmonisation - ICH (ICH, 1996) e a Instrução Normativa nº 46, de 10 de junho de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento determinam que para validar uma metodologia, faz-se necessário avaliar os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Por tanto, a validação de metodologias analíticas necessita ser específica, robusta, sensível, precisa e exata, constituindo fundamental importância para o controle de qualidade dos produtos e sendo parte das normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle (PIMENTEL et al., 1996; BARROS et al., 2002).

#### *3.1.9.1. Linearidade e Faixa de Aplicação*

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal (área ou altura do pico) e a concentração da espécie de interesse deve ser determinada a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação é expressa como curva analítica e através dela estimam-se os seus coeficientes, tais como: coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de correlação pela regressão linear da curva analítica. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (RIBANI et al. 2004). Outros guias de validação como o Instituto Nacional de Metrologia,



Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007) sugerem o número mínimo de sete concentrações diferentes para a determinação da linearidade.

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e o valor inferior da substância em exame, geralmente de 80% a 120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos. É normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003).

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através do método de padronização interna, que consiste na preparação das soluções padrão conhecidas da substância de interesse à qual se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar a substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando submetida à cromatografia em fase líquida, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra (RIBANI et al. 2004).

#### 3.1.9.2. Repetitividade (Precisão)

Representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local (RIBANI et al. 2004). A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados. Sugerem-se um mínimo de seis determinações para o cálculo do desvio padrão para cada concentração (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003). O INMETRO recomenda o número de sete determinações.

A precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É avaliada pelo desvio padrão absoluto (população) que utiliza um número significativo de medidas, normalmente maior que 20. Na prática o número de determinações é pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

O  $\bar{x}$  é a medida aritmética das determinações,  $x_i$  é o valor individual de uma medição e  $n$  é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média (IC) que é uma faixa de valores no qual existe uma confiança de se encontrar um certo valor de uma variável, calculada por:

$$IC = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

O  $t_{n-1}$  é o valor crítico da distribuição de Student com n-1 graus de liberdade. Este valor é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão de precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (RIBANI et al. 2004).

$$DPR (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} .100$$

A ANVISA recomenda um valor máximo para o coeficiente de variação de 5%.

### 3.1.9.3. Limite de Detecção (LD)

Representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al. 2004). O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003).

A ANVISA recomenda que, no caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, Absorção Atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes a linha de base. Pode ser determinado pela equação:

$$LD = \frac{DP_a \cdot 3}{IC}$$

A  $DP_a$  é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica (estimado por regressão linear) de, no mínimo, três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação,  $IC$  é a média do coeficiente angular (inclinação) de, no mínimo, três curvas analíticas.

O INMETRO sugere que se calcule o  $LD$  com 95% a 99% de confiança a partir do número de determinações estabelecidos, através da fórmula:

$$LD = t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot (s)$$

O  $t_{(n-1,1-\alpha)}$  é o valor tabelado de Student para  $n-1$  graus de liberdade e  $1 - \alpha$  nível de confiança,  $(s)$  é o desvio padrão das medições em replicata.

#### 3.1.9.4. Limite de Quantificação (LQ)

Representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al. 2004). O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003).

A ANVISA sugere que o LQ seja estabelecido por meio de análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{DP_a \cdot 10}{IC}$$

O  $DP_a$  é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica (estimado por regressão linear) de, no mínimo, três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação,  $IC$  é a medida do coeficiente angular (inclinação) de, no mínimo, três curvas analíticas.

### 3.1.9.5. *Exatidão*

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão (RIBANI et al. 2004). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparação interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

A recuperação (ou fator de recuperação), R, pode ser definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

A recuperação pode ser realizada mediante os ensaios de fortificação: o padrão da substância a ser analisada é adicionado à matriz isenta da substância ou à amostra (RIBANI et al. 2004). A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito acrescido dos intervalos de confiança (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003).

A ANVISA recomenda que a exatidão do método deva ser determinada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada.

### 3.1.9.6. *Sensibilidade*

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (INMETRO). A ANVISA recomenda expressar a sensibilidade do método através do limite de detecção estabelecido. O INMETRO sugere que a sensibilidade seja representada pela inclinação da reta de regressão linear da calibração e determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

### 3.1.9.7. Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração de solventes orgânicos, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, bem como a utilização de equipamentos de marca e modelos diferentes.

Em trabalhos nos quais há mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação das metodologias, sem alteração significativa nos resultados, pode-se dizer que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudança de ambiente e análise (RIBANI et al. 2004).

Para métodos cromatográficos a ANVISA recomenda que se realizem pequenas variações tais como: variação de pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel alterando um parâmetro por vez. O INMETRO sugere o mesmo que a ANVISA recorrendo-se ao teste *Youden*. Este teste permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações.

Na Tabela 2 encontra-se relacionados os parâmetros de validação adotados pelos diferentes órgãos, ANVISA e INMETRO.

Tabela 2. Parâmetros de validação segundo a ANVISA e o INMETRO.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO
Linearidade e Faixa de Aplicação	5 concentrações (80-120%)	7 concentrações (80-120%)
Repetitividade	6 determinações ( $CV \leq 5$ )	7 determinações
Limite de Detecção (LD)	DP do coeficiente linear	Teste <i>t</i> de Student
Limite de Quantificação (LQ)	DP do coeficiente linear	Não específico
Exatidão (Recuperação)	9 determinações (3níveis de concentração: alta média e baixa com 3 réplicas cada)	3 níveis de concentrações: alta, média e baixa com número de réplicas $\geq 7$
Sensibilidade	LD estabelecido	Coeficiente angular da reta de calibração
Robustez	Pequenas alterações das condições do método	Pequenas alterações das condições do método com teste de <i>Youden</i>

### 3.1.9.8. *Materiais para quantificação*

- Frasco (*vial*) com tampa de rosca e septo (capacidade de 2 mL) para injetor automático
- balão volumétrico (capacidade 5 mL)
- micropipeta (capacidade 100, 200 e 1000  $\mu\text{L}$ )
- membrana para filtração de amostras e padrões (Millex HV, 0,45  $\mu\text{m}$  de poro; 13 mm de diâmetro), Marca: Millipore.
- balança com sensibilidade de 0,001 mg

## 3.2. Ensaio Químicos

### 3.2.1. Autografia em CCDC com $\beta$ -caroteno.

A propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas que têm capacidade de doar um hidrogênio radicalar (reação com quebra homolítica), estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância.

As amostras foram aplicadas em cromatoplacas (em duplicata) e eluídas com solventes específicos e adequados para que cada substância existente nas frações e extratos tivesse  $R_f$  entre 0,8 e 0,2. Após completa evaporação do solvente utilizado, as placas foram nebulizadas com solução de  $\beta$ -caroteno em MeOH (0,02%), permanecendo todas amareladas e, em seguida expostas à luz. Após cerca de quatro horas, o  $\beta$ -caroteno é oxidado pelo oxigênio atmosférico, numa reação fotoquímica, voltando a cor original branca na placa de sílica, exceto nas áreas onde existam substâncias com atividade antioxidante, verificando-se a permanência da coloração amarela do  $\beta$ -caroteno.

### 3.2.2. Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) – detecção do potencial seqüestrador de radicais livres.

Realizou-se a detecção do potencial seqüestrador de radicais livres nos laboratórios do NuBBe – Instituto de Química da Unesp Araraquara. Em solução, o radical DPPH apresenta cor violeta intensa, sendo conseqüência do elétron

desemparelhado. Esse radical tem absorção máxima em  $\lambda$  517 nm. O decréscimo nesse comprimento de onda ocorre pelo sequestro do radical através do recebimento de um hidrogênio radicalar da espécie antioxidante provocando sua redução, indicada pela mudança de cor (Figura 15).

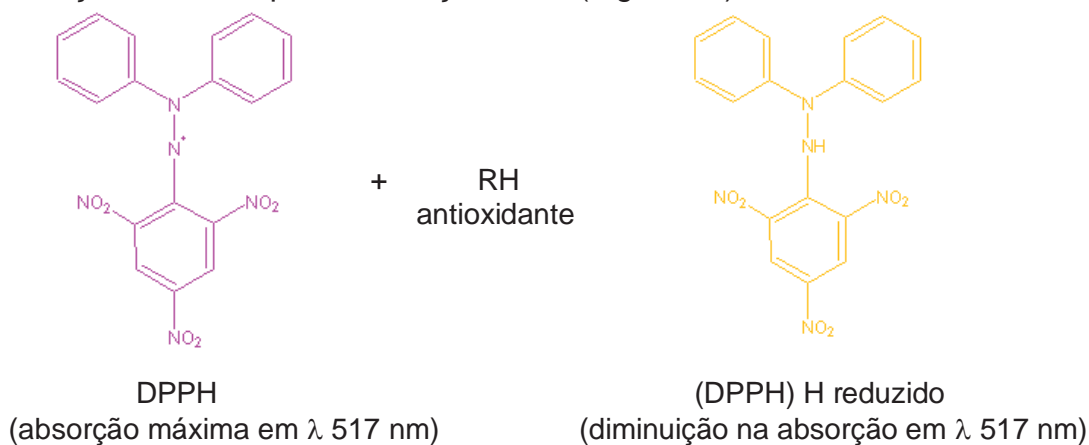


Figura 15. Redução do radical 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH).

A solução 0,004% (2 mL) de DPPH é utilizada como fonte de radicais livres e adicionada a soluções de diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 80 e 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) das amostras a serem testadas. Após 30min de reação, realiza-se a leitura da absorvidade molar destas soluções a 517 nm. O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antioxidante da amostra teste que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar ( $\Delta A$ ) (RIBEIRO et al., 2005).

### 3.2.3. Ensaio colorimétrico com ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) – detecção do potencial seqüestrador de radicais livres.

Realizou-se a avaliação do potencial seqüestrador de radicais livres nos laboratório do NuBBE – Instituto de Química da Unesp Araraquara. O ensaio ABTS está baseado na capacidade sequestradora dos antioxidantes de interagir com o radical de vida longa  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Neste ensaio, ABTS é oxidado a um cátion radical, que é intensamente colorido, por radicais peróxidos ou outros oxidantes (Figura 16). A capacidade antioxidante é determinada através da habilidade da substância teste em reagir diretamente com o radical causando uma diminuição na absorbância a 734 nm (HUANG et al., 2005).

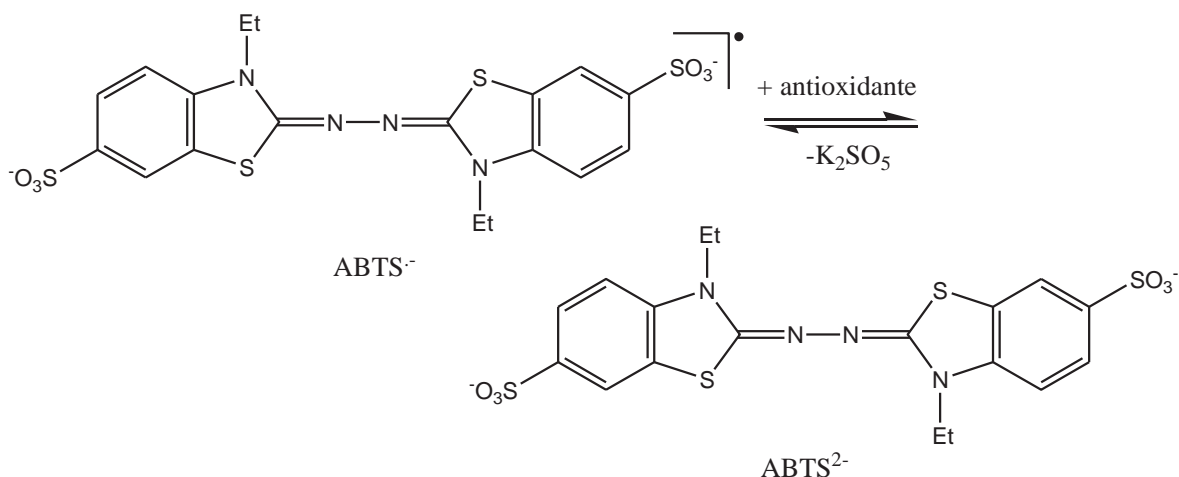


Figura 16. Redução do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS).

A solução 7 mM de ABTS é utilizada como fonte de radicais livres e adicionada a soluções de diferentes concentrações (2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) das amostras a serem testadas. Após 5 min de reação, realiza-se a leitura da absorvidade molar destas soluções a 734 nm. O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antioxidante da amostra teste que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar ( $\Delta A$ ).

#### 3.2.4. Ensaio *in vitro* da formação de $\beta$ -hematina para detecção de potencial antimalárico.

O ensaio de detecção de formação de  $\beta$ -hematina foi realizado nos laboratórios do NuBBE - Instituto de Química Unesp Campus de Araraquara. Foram preparadas as seguintes soluções (Tabela 3):

**Solução de NaOH 0,1 M:** 200 mg de NaOH em 100 mL;

**Acetato de sódio 0,5 M:** 408,1 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 1 L de água;

**Solução estoque de hemina bovina 6,4mM** (PM 616,5): 4,16 mg em 1000  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 M (60 min antes da execução do ensaio), e incubado a 37  $^\circ\text{C}$  protegendo da luz.

Os padrões (controles positivos) foram usados simultaneamente e preparados com:

**Quinina 40 mM** (PM 324,18): 6,48 mg em 500  $\mu\text{L}$  de DMSO;

**Cloroquina 40 mM** (PM 515,9): 10,3 mg em 500  $\mu\text{L}$  de água destilada;

As amostras foram diluídas em tubos de microcentrífuga (Tabela 4).



**Extratos e frações 20 mg/mL:** 7,5 mg em 150 µL de DMSO;

A solução de controle positivo (Tabela 3) e as amostras (Tabela 4) foram preparadas em tubos de microcentrífuga e incubadas a 37 °C por 24 h:

Tabela 3. Preparo do controle positivo para o teste de formação de β-hematina.

	Concentração	Volume (µL)	Concentração final
DMSO	-	50	-
Hemina bovina	6,4 mM	100	1,6 mM
Acetato de sódio	0,5 M	200	-
Ácido acético	17,4 M	50	-

Tabela 4. Preparo das amostras para o teste de formação de β-hematina.

	Concentração	Volume (µL)	Concentração final
Substância (Padrões)	40 mM	50	5 mM
Extrato	20,0 mg/mL	50	2,5 mg/mL
Hemina bovina	6,4 mM	100	1,6 mM
Acetato de sódio	0,5 M	200	-
Ácido acético	17,4 M	50	-

Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados por 15 min (10 g) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se ao precipitado 400 µL de DMSO e colocou-se sob agitação no vortex. Heme que não reagiu foi removida. Centrifugou-se por 15 min e descartou-se novamente o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 400 µL de CH<sub>3</sub>OH para retirar o DMSO. Centrifugou-se novamente por 15 min e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi dissolvido em 1000 µL de NaOH 0,1 M e uma alíquotas de 20 µL foram transferidas para a placa de 96 cavidades. Com o auxílio da pipeta multicanais, adicionou-se 180 µL de NaOH 0,1 M em cada cavidade e a leitura da placa foi realizada em λ 405 nm.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da formação de β-hematina foi empregada a fórmula abaixo, onde A é a absorbância a λ 405 nm (corrigida):

$$\% \text{ inibição da formação de } \beta\text{-hematina} = \frac{(A \text{ controle positivo} - A \text{ amostra}) \times 100}{A \text{ controle positivo}}$$

Os dados obtidos são exportados para o EXCEL onde a média e o desvio padrão são calculados para cada uma das concentrações e o gráfico plotado. A porcentagem de inibição deve ser expressa em % ± SD.

### 3.2.5. Detecção da atividade anticolinesterásica.

O ensaio qualitativo e quantitativo foi realizado por autografia (enzima *in vitro*) em CCD no laboratório do Instituto Botânico de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young. Este consiste no desenvolvimento de uma cromatoplaça da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (galantamina, Figura 17). Para os ensaios quantitativos (Concentração Inibitória Mínima – CIM), aplicaram-se quantidades conhecidas e em ordem decrescente de massa, do controle e da amostra, objetivando encontrar a menor quantidade inibidora de AChE observada visualmente. Para realização do ensaio foram utilizadas:

**Solução A:** Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH = 7,9), a solução estoque será armazenada a 4 °C, no momento do uso será adicionado 0,1% de albumina de soro bovino fração V;

**Solução B:** 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol;

**Solução C:** 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada;

**Solução D:** mistura de 10 mL da **solução B** + 40 mL da **solução C**.

Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi nebulizada com a solução da enzima AChE (6,66 U) (Solução A) e o solvente evaporado. Incubou-se a placa cromatográfica em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 min, e em seguida borrifou-se com a Solução D (MARSTON et al., 2002).

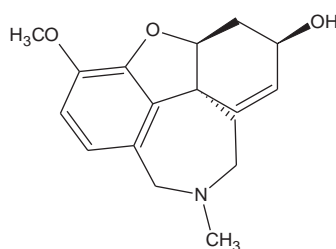


Figura 17. Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição da AChE.

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 min. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. A Figura 18 mostra um esquema das reações que se sucedem até o aparecimento da coloração na cromatoplaça (MARSTON et al., 2002).

Os resultados foram observados e fotografados em câmera Epson e os valores de  $R_f$  foram calculados para os halos onde houve inibição da enzima.

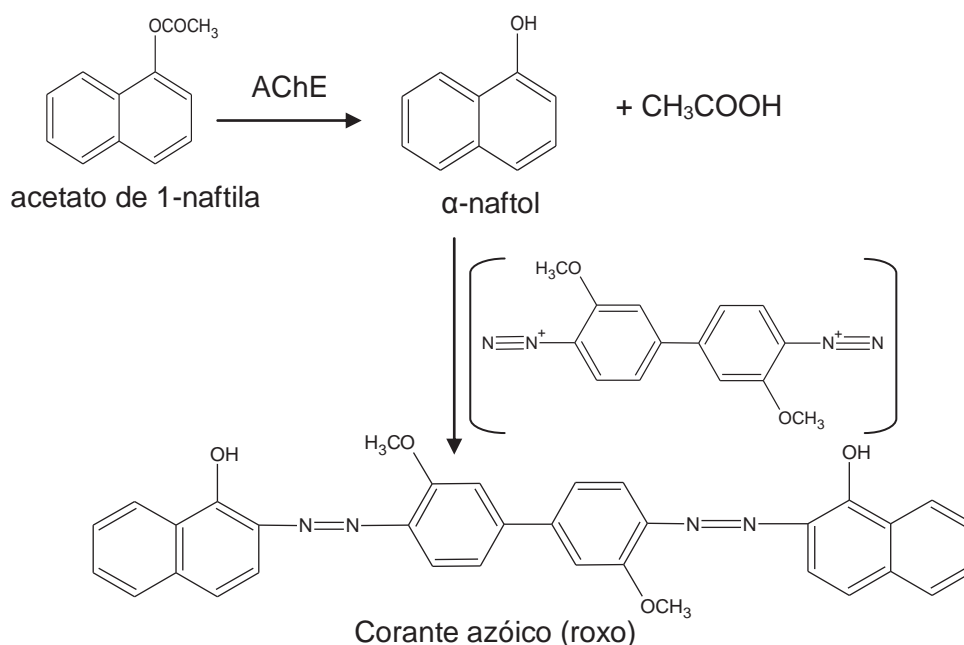


Figura 18. Reação da AChE com acetato de 1-naftila e subsequente formação do corante azóico roxo no ensaio em TLC.

### 3.3. Ensaio Biológicos.

#### 3.3.1. Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos: *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

Os ensaios foram realizados no laboratório do Instituto Botânico de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young. Utilizou-se a técnica de bioautografia em CCD e, como reveladores, soluções de esporos das espécies de fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

As amostras foram aplicadas em cromatoplaças (Merck) e eluídas em solventes adequados para visualização das manchas entre  $R_f$  0,2 e 0,9 aproximadamente. Após a secagem, foram nebulizadas com solução de glicose e sais contendo esporos do fungo, e incubadas a 25 °C em câmara úmida e escura por 2-3 dias. O halo de inibição aparece na placa sobre áreas onde existam substâncias fungitóxicas e pode ser relacionado com a concentração da amostra aplicada,

comparando-se o limite de detecção com os padrões utilizados (os antibióticos nistatina e gentamicina) (HOMANS et al., 1970).

### 3.3.2. Avaliação nematoestática frente a *Meloidogyne incognita*.

Os ensaios foram realizados no Departamento de Nematologia na Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG) sob a supervisão do Dr. Vicente Paulo Campos. Foram utilizados nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*.

As larvas juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* foram obtidas das raízes infestadas de tomateiros e cultivadas em casa de vegetação. Cuidadosamente, essas raízes foram lavadas, cortadas em pedaços de um centímetro, trituradas em liquidificador por 50 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (HUSSEY et al., 1973 modificada por BONETTI et al. 1981). Foi utilizado peneira de 500 mesh para recolher os ovos, que foram transferidos para um béquer de 200mL utilizando pisseta com água destilada.

Preparou-se a câmara de eclosão com uma peneira de malha grossa (0,025 mm) colocada num funil de fundo fechado. Para obtenção de J2, os ovos foram depositados nessa câmara e após 24 horas fez-se um descarte. Após mais 2 dias, fez-se nova coleta de juvenis que foram utilizados no ensaio.

Em placas de 96 cavidades foram depositados 20 µL de suspensão contendo de 20 a 30 nematóides e 100 µL de amostra/cavidade. Realizou-se seis repetições. O controle negativo foi o solvente da amostra (tween 80 a 1%). A placa foi mantida em BOD a 25 °C. Após 24 horas, realizou-se a contagem dos nematóides estáticos e móveis, calculando-se a percentagem para cada caso.

### 3.3.3. Avaliação do potencial inseticida (formigas cortadeiras).

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras. Para execução dos bioensaios, soldados de *Atta sexdens rubropilosa* foram coletados de formigueiros existentes no campus da UFLA e levados ao laboratório. Foram separados 10 indivíduos por placa de Petri de 10 cm de diâmetro, com fundo recoberto com papel filtro. Os insetos foram colocados nas placas sem o uso de CO<sub>2</sub>.

Os extratos (10mg) foram dissolvidos em 3 mL de DMSO e incorporados na dieta artificial (100 mL de água destilada + 5 g de glicose + 0,1 g de lêvedo de cerveja + 1,5 g de agar + 1 g de peptona bacteriológica) (CARREIRO et al., 1997). Esse procedimento foi repetido três vezes (cada placa representando uma parcela), totalizando 30 formigas cortadeiras por tratamento. Decorrida as montagens, cada placa recebeu 0,5 cm<sup>3</sup> de dieta artificial. Para manutenção da viabilidade dos insetos, as placas foram definitivamente transferidas para câmara climática nas condições de temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 12 h. Avaliou-se a porcentagem de mortalidade dos insetos, por um período de 48 horas.

#### 3.3.4. Ensaio com fungos patogênicos humanos em microplacas.

Os microrganismos usados na avaliação de atividade antifúngica foram *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012, crescidos e mantidos em meio de ágar Sabouraud-dextrose por 24 h para as espécies de *Candida* e por 48 h para *Cryptococcus neoformans*, em temperatura ambiente. O método utilizado para avaliação da atividade foi microdiluição em caldo, descrito no documento M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 12 com modificações. O meio usado foi RPMI 1640 com L-glutamina em tampão pH 7,0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165 M, suplementado com glicose 2%. Os extratos, frações ou substâncias puras foram dissolvidos em DMSO em concentrações decrescentes a partir de 250 até 0,4 µg/mL, e adicionados às microplacas de 96 cavidades contendo meio RPMI. As suspensões celulares contendo fungos foram preparadas em solução salina 0,85% e diluídas 1:100 em RPMI até concentração final de 1×10<sup>4</sup> a 5×10<sup>4</sup> unidades formadoras de colônias por mL (CFU/mL). Cada suspensão foi inoculada nas microplacas previamente preparadas com as amostras teste, que foram incubadas com agitação a 37°C por 24 h para *Candida* sp. e 48 h para *Cryptococcus neoformans*. Anfotericina B (0,03 a 16 µg/mL) foi usada como substância controle. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de amostra que inibiu completamente o crescimento do fungo. Pelo método espectrofotométrico, a CIM foi definida como a menor concentração em que a densidade óptica foi reduzida a 90% daquela

observada para a solução controle (sem amostra). Os resultados foram analisados visual e espectrofotometricamente. Amostras que apresentaram CIM menor que 75,0 µg/mL foram consideradas com boa atividade; CIM entre 75,0 e 150,0 µg/mL indicou atividade moderada; CIM entre 150,0 e 250,0 µg/mL indicou atividade fraca e, para CIM maior que 250,0 µg/mL a amostra foi considerada inativa.

### **3.4. Procedimentos Fitoquímicos.**

#### **3.4.1. Swartzia lansgdorffii.**

##### *3.4.1.1. Coleta e identificação do material vegetal.*

*1ª coleta:* Folhas de *Swartzia lansgdorffii* foram coletadas na Reserva da Juréia, Iguape – SP, em outubro de 2004. A identificação foi realizada pela Dra. I. Cordeiro (IBt – SMA, SP) e a excicata (Cordeiro 1913) foi depositada no herbário do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, IBt – SMA São Paulo.

*2ª Coleta:* Folhas, ramos e frutos de *Swartzia lansgdorffii* foram coletados no Instituto de Botânica de São Paulo no dia 26 de março de 2008 e identificados pelo Dr. R. S. Cabral. Excicatas foram depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo.

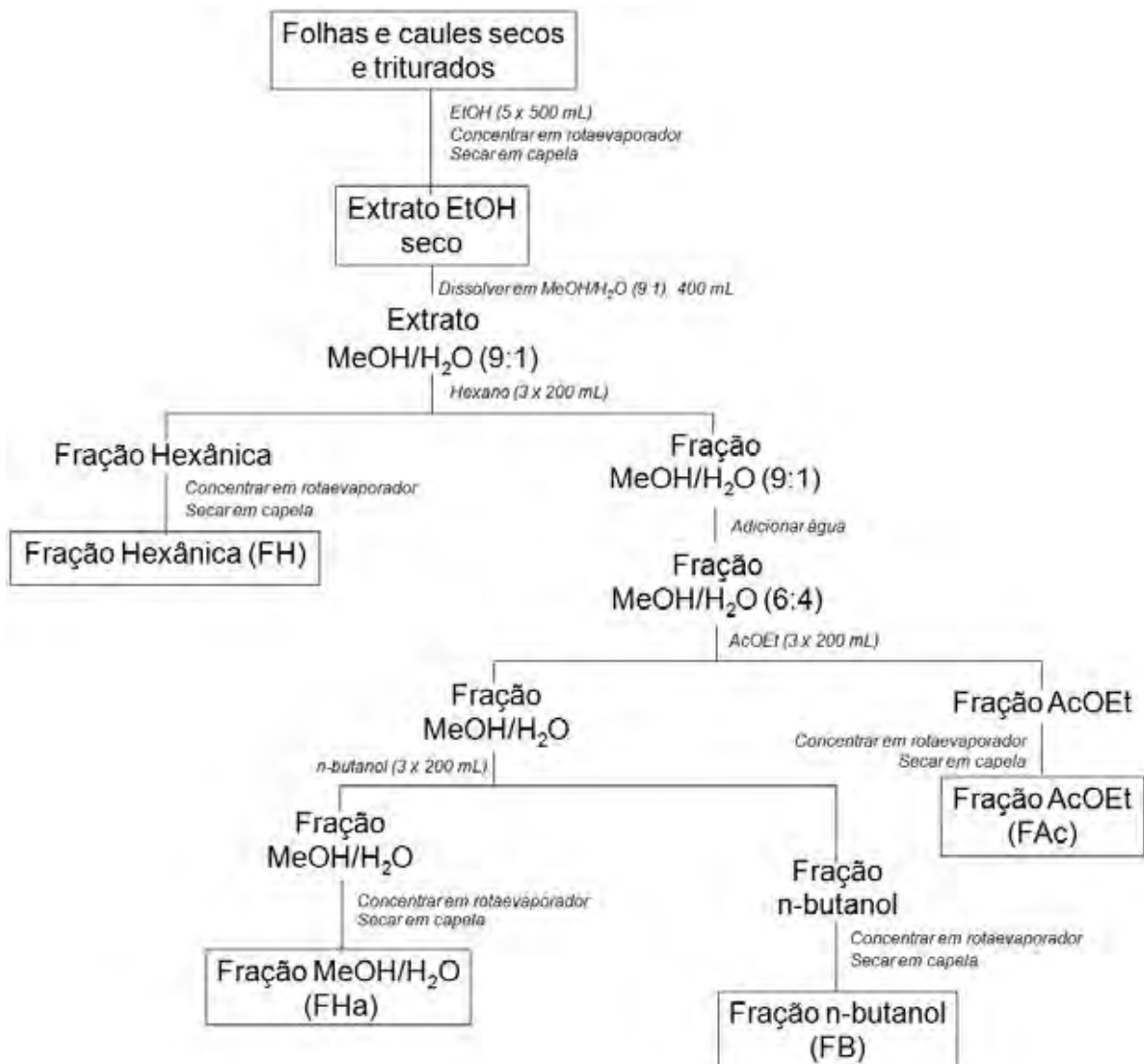
##### *3.4.1.2. Obtenção do extrato bruto.*

Folhas, ramos e frutos de *Swartzia lansgdorffii* foram secos a temperatura ambiente, triturados em moinho de facas e pesados em balança analítica (Tabela 5). Os frutos foram abertos para separar a casca da semente. Foram triturados separadamente (folhas e ramos, sementes e casca) em moinho de facas e pesados em balança analítica. Submeteu-se a 5 extrações com etanol em banho de ultra-som durante 10 min, fornecendo o Extrato Etanólico (EE). Após evaporação do solvente em rotaevaporador e secagem em capela, pesou-se o EE seco (Tabela 5).

##### *3.4.1.3. Partição do extrato bruto EtOH.*

Três alíquotas dos extratos brutos secos citados na Tabela 5 foram separadas: a primeira alíquota de 100 mg reservada para contraprova, a segunda de 5 mg para realização de CCD em placas cromatográficas para comparação com as frações da partição e a terceira de 500 mg para bioensaios.

O restante do extrato de folhas e ramos foi dissolvido em 400 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O e submetido a partição líquido-líquido com solventes orgânicos, fornecendo quatro frações de polaridades crescentes: fração hexânica (FH), fração AcOEt (FAC), fração n-butanol (FB) e fração hidrometanólica (FHa) (Tabela 5) (Fluxograma 1). Destas quatro frações foram guardadas alíquotas de 20 mg para contra-prova, 5 mg para CCD e 100 mg para bioensaios. O mesmo procedimento foi utilizado para a casca e a semente do fruto (Tabela 5).



Fluxograma 1. Partição do extrato EtOH bruto de *Swartzia lansgdorffii*.

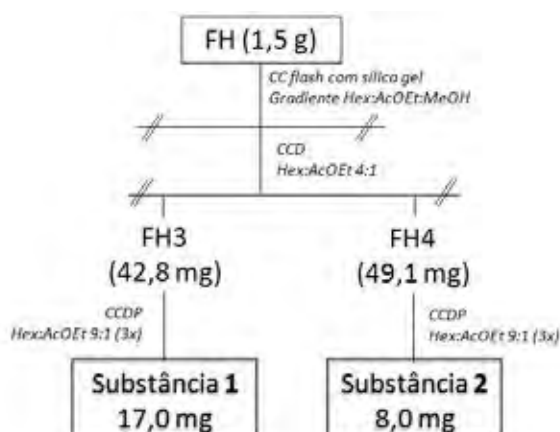


#### 3.4.1.4. Extração e isolamento dos constituintes químicos de *Swartzia langsdorffii* 1ª coleta.

A avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto e das frações obtidas da partição revelou a presença de substâncias bioativas em FAc e FHa.

#### 3.4.1.5. Fracionamento Cromatográfico da FH.

O fracionamento de FH (1,5 g) por cromatografia em coluna (sílica-gel, gradiente Hexano/AcOEt) forneceu 30 subfrações, que foram analisadas por CCD e agrupadas em 4 frações (FH1-FH4). A análise por CCD (Hex/AcOEt 4:1) orientou a seleção de FH3 e FH4, que foram purificadas por CCD preparativa (Hex/AcOEt 9:1, 3 eluições), fornecendo as substâncias 1 (17 mg) e 2 (8 mg) (Fluxograma 2).

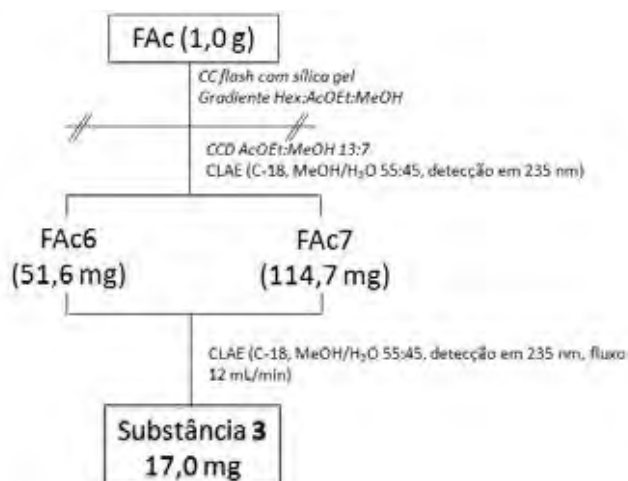


Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da FH da espécie *Swartzia langsdorffii* 1ª coleta.

#### 3.4.1.6. Fracionamento Cromatográfico da FAc.

O fracionamento de FAc (1,0 g) por cromatografia em coluna (sílica-gel, gradiente Hex/AcOEt/MeOH) forneceu 12 frações (FAc1-FAc12). A análise por CCD (AcOEt/MeOH 13:7) e CLAE (C-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 55:45, detecção em 235 nm) e o resultado da avaliação de atividade antifúngica orientaram a seleção de FAc6 e FAc7, que foram reunidas e purificadas por CLAE (C-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 55:45, detecção em 235 nm, fluxo 12 mL/min), fornecendo a substância 3 (17 mg) (Fluxograma 3).

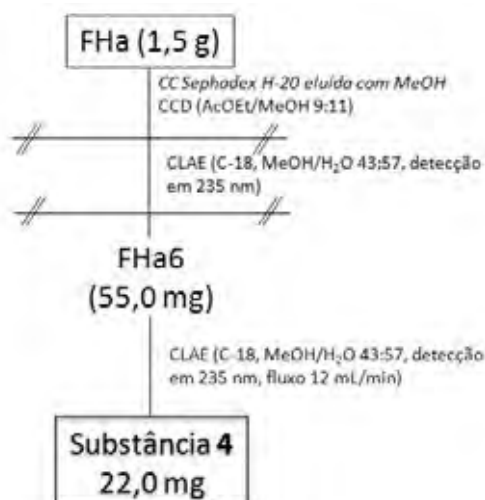




Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da FAc da espécie *Swartzia langsdorffii* 1ª coleta.

#### 3.4.1.7. Fracionamento Cromatográfico da FHa.

O fracionamento de FHa (1,5 g) por cromatografia em coluna (Sephadex LH-20, eluição com MeOH) forneceu 49 subfrações, cuja análise por CCD (AcOEt/MeOH 9:11) orientou seu agrupamento em 9 frações (FHa1-FHa9). A análise das frações reunidas por CLAE (C-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 43:57, detecção em 235 nm) e o resultado da avaliação de atividade antifúngica orientaram a seleção da fração FHa6 (55 mg), que foi purificada por CLAE (C-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 43:57, detecção em 235 nm, fluxo 12 mL/min), fornecendo a substância 4 (22 mg) (Fluxograma 4).



Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico da FHa da espécie *Swartzia langsdorffii* 1ª coleta.

### 3.4.2. Inga edulis.

#### 3.4.2.1. *Partição do extrato bruto EtOH.*

O extrato bruto etanólico seco de *Inga edulis* (940 mg) que estava armazenado na extratoteca do NuBBe foi separado em três alíquotas: a primeira alíquota de 100 mg reservada para contraprova, a segunda de 5 mg para realização de CCD em placas cromatográficas para comparação com as frações da partição e a terceira de 100 mg para bioensaios.

O restante do extrato foi dissolvido em 200 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O e submetido a partição líquido-líquido com solventes orgânicos, fornecendo quatro frações de polaridades crescentes: fração hexânica (FH), fração AcOEt (FAc), fração n-butanol (FB) e fração hidrometanólica (FHa) (Tabela 5) (Fluxograma 1). Destas quatro frações foram guardadas alíquotas de 20 mg para contra-prova, 5 mg para CCD e 100 mg para bioensaios.

### 3.4.3. Inga marginata.

#### 3.4.3.1. *Coleta e identificação do material vegetal.*

A espécie *Inga marginata* foi coletada na Fazenda Berrante - Usina Nova América de Tarumã em 17 de março de 2008 e identificados pela Dra. Giselda Durigan. Excicatas (código FEA3306/FEA3304) foram depositadas na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis.

#### 3.4.3.2. *Obtenção do extrato bruto.*

Folhas e ramos de *I. marginata* foram secos a temperatura ambiente, triturados em moinho de facas e pesados em balança analítica (Tabela 5). Submeteu-se a 5 extrações com etanol em banho de ultra-som durante 10 min, fornecendo o Extrato Etanólico (EE). Após evaporação do solvente em rotaevaporador e secagem em capela, pesou-se o EE seco (Tabela 5).

#### 3.4.3.3. *Partição do extrato bruto EtOH.*

Três alíquotas dos extratos brutos secos citados na Tabela 5 foram separadas: a primeira alíquota de 100 mg reservada para contraprova, a segunda de 5 mg para realização de CCD em placas cromatográficas para comparação com as frações da partição e a terceira de 500 mg para bioensaios.

O restante do extrato foi dissolvido em 400 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O e submetido a partição líquido-líquido com solventes orgânicos, fornecendo quatro frações de polaridades crescentes: fração hexânica (FH), fração AcOEt (FAc), fração n-butanol (FB) e fração hidrometanólica (FHa) (Tabela 5) (Fluxograma 1). Destas quatro frações foram guardadas alíquotas de 20 mg para contra-prova, 5 mg para CCD e 100 mg para bioensaios.

#### 3.4.4. *Inga laurina.*

##### 3.4.4.1. *Coleta e identificação do material vegetal.*

A espécie *Inga laurina* foi coletada na cidade de Assis em 16 de abril de 2008 de 2008 e identificado pela Dra. Giselda Durigan. Excicatas (código FEA 3552) foram depositadas na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis.

##### 3.4.4.2. *Obtenção do extrato bruto.*

Folhas e ramos foram secos a temperatura ambiente, triturados em moinho de facas e pesados em balança analítica. Submeteu-se a 5 extrações com etanol em banho de ultra-som durante 10 min, fornecendo o Extrato Etanólico (EE). Após evaporação do solvente em rotaevaporador e secagem em capela, pesou-se o EE seco (Tabela 5).

##### 3.4.4.3. *Partição do extrato bruto EtOH.*

Três alíquotas dos extratos brutos secos citados na Tabela 3 foram separadas: a primeira alíquota de 100 mg reservada para contraprova, a segunda de 5 mg para

realização de CCD em placas cromatográficas para comparação com as frações da partição e a terceira de 500 mg para bioensaios.

O restante do extrato foi dissolvido em 400 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O e submetido a partição líquido-líquido com solventes orgânicos, fornecendo quatro frações de polaridades crescentes: fração hexânica (FH), fração AcOEt (FAc), fração n-butanol (FB) e fração hidrometanólica (FHa) (Tabela 3) (Fluxograma 1). Destas quatro frações foram guardadas alíquotas de 20 mg para contra-prova, 5 mg para CCD e 100 mg para bioensaios.

Tabela 5. Massa das folhas e ramos triturados em moinho de facas e do extrato etanólico bruto e fases de partição.

<b>Espécies</b>	<b>Seco (g)</b>	<b>EE (g)</b>	<b>FH (g)</b>	<b>FAc (g)</b>	<b>FB (g)</b>	<b>FHa (g)</b>
<i>S. lansgdorffii</i> (folhas) 1 <sup>a</sup> coleta	270	4,4	1,5	1,0	-	1,5
<i>S. lansgdorffii</i> (folhas) 2 <sup>a</sup> coleta	2.500	186,1	30,8	115,8	18,6	6,3
<i>S. lansgdorffii</i> (semente) 2 <sup>a</sup> coleta	59,0	10,7	3,8	1,6	3,7	0,7
<i>S. lansgdorffii</i> (casca) 2 <sup>a</sup> coleta	61,2	2,3	1,0	0,1	0,2	0,1
<i>I. edulis</i>	-	0,9	0,1	0,2	0,3	0,1
<i>I. laurina</i>	261,8	28,3	3,1	12,5	2,2	10,7
<i>I. marginata</i>	164,1	12,2	2,3	6,9	1,7	1,3

#### 3.4.4.4. Avaliação da atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno.

As fases de partição (FH, FAc, FB e FHa) foram submetidas a análises por CCD, utilizando uma série de eluentes que permitem a visualização dos constituintes de baixa, média e alta polaridade (Tabela 6). Selecionaram-se os sistemas de eluições com boa resolução para a avaliação de atividade antioxidante

Tabela 6. Fases móveis utilizadas em análise de CCD para o EE e fases de partição.

<b>Fases Móveis</b>	<b>Extratos/Frações</b>	<b>Fases Móveis</b>	<b>Extratos/Frações</b>
Hex:AcOEt 9:1	EE, FH, FAc	AcOEt:MeOH 9:1	EE, FH, FAc, FB
Hex:AcOEt 4:1	EE, FH, FAc	AcOEt:MeOH 4:1	EE, FH, FAc, FB
Hex:AcOEt 1:1	EE, FH, FAc	AcOEt:MeOH 1:1	EE, FH, FAc, FB
AcOEt	EE, FH, FAc	AcOEt:MeOH 1:9	EE, FH, FAc, FB
Hex:AcOEt 1:4	EE, FH, FAc	AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O 13:6:1	EE, FH, FAc, FB, FHa

As amostras foram aplicadas em duas cromatoplacas e eluídas simultaneamente na mesma cuba. Após evaporação do solvente, a primeira placa foi revelada com irradiação de luz ultravioleta de  $\lambda$  254 e 366 nm (aparelho UV-vis CAMAG) e fotografada. Em seguida, a mesma foi revelada por imersão em cubas com vapor de

iodo e fotografada. Após evaporação do iodo, a placa foi nebulizada com solução de anisaldeído sulfúrico, aquecida em forno e fotografada. A segunda placa foi nebulizada com solução de  $\beta$ -caroteno em MeOH (0,02%) e colocada na presença de luz natural. Durante 4 horas observou-se o descoramento da placa e a possível permanência de manchas laranja. Os Rf das duas placas foram comparados.

#### 3.4.4.5. Fracionamento cromatográfico da FH.

Em busca de substâncias bioativas com baixa polaridade escolheu-se inicialmente a fração hexânica (FH) de *Inga laurina*. Submeteu-se 1,5 g de FH a CC flash com sílica-gel fornecendo 7 sub-frações (Tabela 7). Estas foram analisadas por CCD com diversos eluentes.

Tabela 7. Eluição de FH de *I. laurina* em CC (sílica mesh 70-230).

Frações	Eluentes	Massa (mg)	Frações	Eluentes	Massa (mg)
FH1	Hex:AcOEt 9:1	627,3	FH5	AcOEt:MeOH 7:3	12,4
FH2	Hex:AcOEt 7:3	422,6	FH6	AcOEt:MeOH 1:1	20,2
FH3	Hex:AcOEt 1:1	43,5	FH7	MeOH	25,1
FH4	AcOEt:MeOH 9:1	187,1			

Foi realizado o teste com  $\beta$ -caroteno para as frações da Tabela 7 para verificar a existência de substâncias com atividade antioxidante. Aplicou-se 300 mg da fração FH1 em CC com sílica gel eluída com gradiente brando de solventes orgânicos (Tabela 8) fornecendo 143 sub-frações. Após análise por CCD, foram reunidas em 18 frações. O teste em CCD revelada com  $\beta$ -caroteno mostrou novamente a ausência de atividade antioxidante.

Nova análise por CCD, revelada em  $\lambda$  254 nm e  $\lambda$  366 nm, iodo e anisaldeído evidenciou as frações com melhor perfil cromatográfico para subsequente purificação. Apesar de não detectadas substâncias antioxidantes, verificou-se a presença de uma substância majoritária em destaque. Para seu isolamento, foi aplicado técnicas de cromatografia em camada delgada.

Tabela 8. Eluição de FH1 em CC (sílica mesh 70-230).

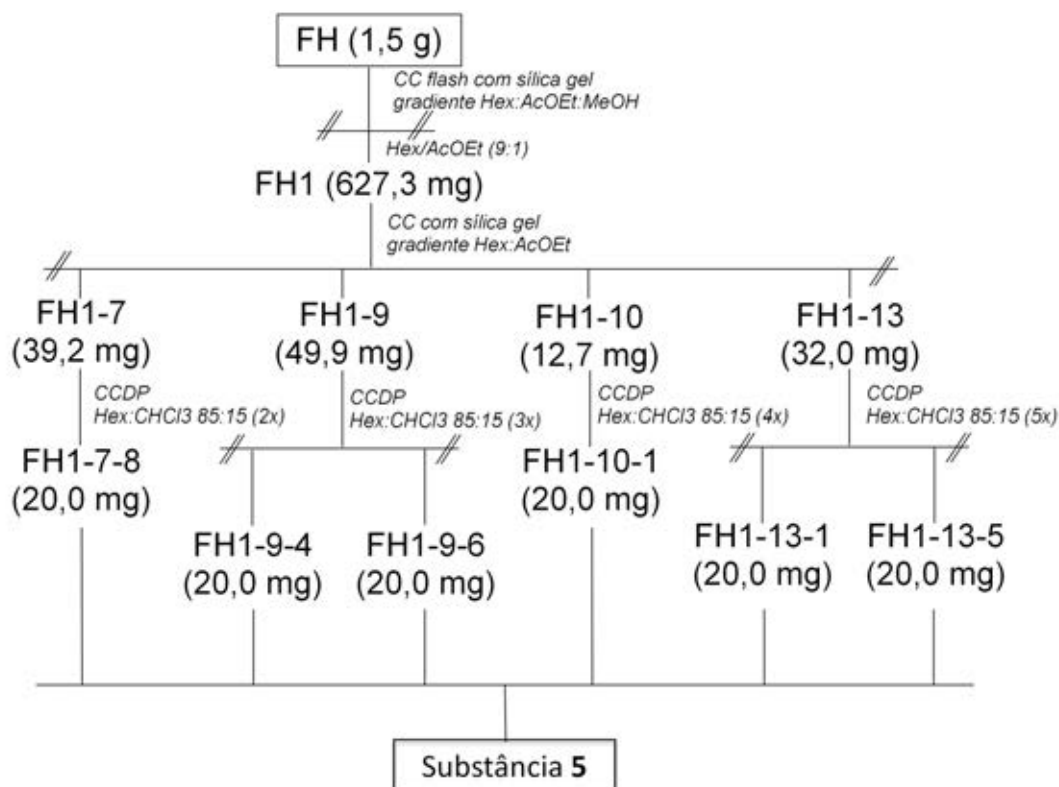
Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FH1-1	17,6	FH1-7	39,2	FH1-13	32,0
FH1-2	3,2	FH1-8	9,1	FH1-14	6,0
FH1-3	6,0	FH1-9	49,9	FH1-15	3,3
FH1-4	1,7	FH1-10	12,7	FH1-16	1,3
FH1-5	7,5	FH1-11	32,8	FH1-17	1,9
FH1-6	8,8	FH1-12	52,1	FH1-18	0,4

As frações da Tabela 8 foram analisadas em CCD para escolha da melhor fase móvel para purificação por CCDP, usando os eluentes mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Fases móveis utilizadas em CCDP para frações FH1-1, FH1-7 até FH1-13.

Frações	Fase Móvel	Frações	Fase Móvel
FH1-1	Hex:CHCl <sub>3</sub> 95:5	FH1-10	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 4x
FH1-7	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 2x	FH1-11	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 4x
FH1-8	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 3x	FH1-12	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 5x
FH1-9	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 3x	FH1-13	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15 eluída 5x

As subfrações obtidas que apresentaram melhor resultado quando reveladas em  $\lambda$  254 nm e  $\lambda$  366 nm, iodo e anisaldeído foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H. A fração FH1-7-8 mostrou-se purificada em CCD e apresentou sinais de hidrogênios alifáticos e oxigenados em  $\delta$  3,6 e  $\delta$  4,1. Em conjunto com os dados de RMN de <sup>13</sup>C, DEPT, *g*HMQC, *g*HMBC e *g*COSY foi possível identificar a substância **5**. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das frações FH1-9-4, FH1-9-6, FH1-10-1, FH1-13-1 e FH1-13-5 mostraram-se idênticos ao espectro de RMN de <sup>1</sup>H da FH1-7-8, sendo associadas também com substância **5**, após comparação com dados cromatográficos (Fluxograma 5), confirmando sua presença como substância majoritária da FH.



Fluxograma 5. Fracionamento cromatográfico da FH das folhas de *Inga laurina*.

As frações FH2 (422,6 mg) e FH4 (187,1 mg) foram escolhidas para dar continuidade ao estudo fitoquímico em função de sua massa e perfil cromatográfico. Foram submetidas a CC utilizando sílica gel (mesh 70-230), obtendo 15 e 11 sub-frações, respectivamente. A análise destas sub-frações por CCD revelando em  $\lambda$  254 nm e  $\lambda$  366 nm e iodo e não apresentaram substâncias que revelassem neste comprimento de onda ou com vapor de iodo.

#### 3.4.4.6. Fracionamento cromatográfico da FAc.

Em busca de substâncias com atividade antioxidante, selecionou-se a FAc para prosseguimento do estudo fitoquímico por mostrar-se ativa em teste com  $\beta$ -caroteno. Submeteu-se 2,6 g de FAc a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH 100% fornecendo 5 sub-frações (Tabela 10).

Tabela 10. Eluição de FAc em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH.

Frações	Fase Móvel	Massa (mg)	Frações	Fase Móvel	Massa (mg)
FAc 1	H <sub>2</sub> O:MeOH 95:5	1.650,0	FAc4	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:3	15,1
FAc 2	H <sub>2</sub> O:MeOH 3:1	261,0	FAc5	MeOH	65,3
FAc 3	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	84,0			

Com o objetivo de conhecer o perfil cromatográfico em diversos comprimentos de onda e a procura das substâncias com atividade antioxidante detectada na análise com DPPH, as frações da Tabela 10 foram submetidas à análise por CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 40  $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18, eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 40 min, fluxo de 1 mL/min. Após a corrida manteve-se a fase móvel em MeOH puro por mais 10 min para limpeza (Figura 19-20). As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/1,5 mL.

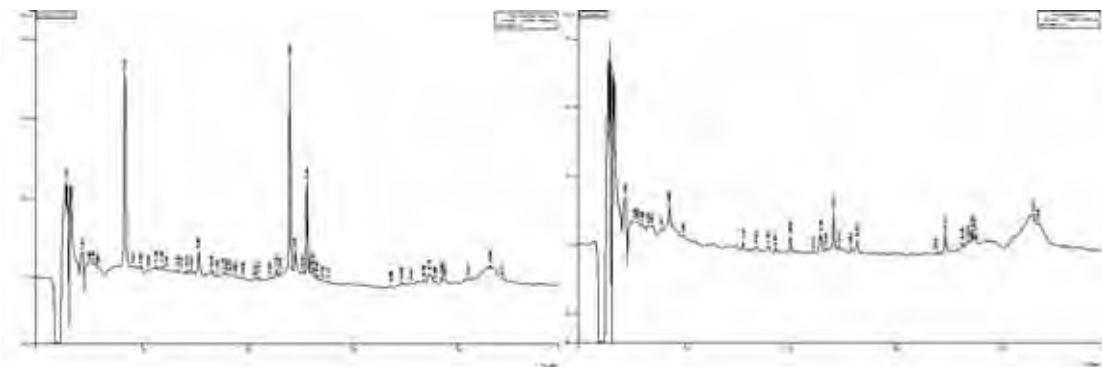


Figura 19. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da FAc1 (1,65 g) e FAc2 (261,0 mg). Injetou-se 40  $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18, gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 40 min, fluxo de 1 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm.

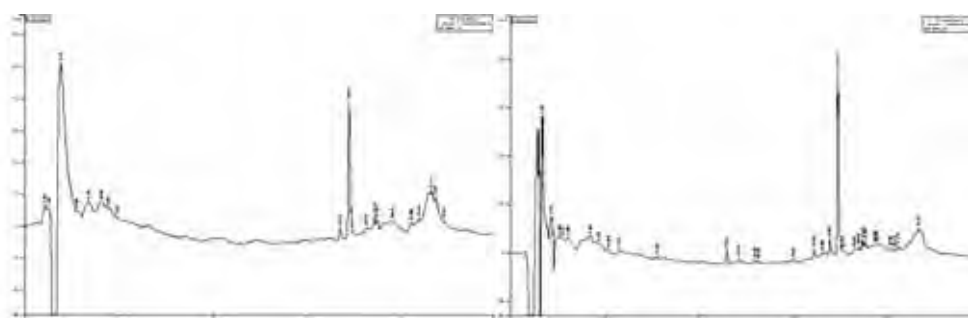


Figura 20. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da FAc3 (84,0 mg) e FAc4 (15,1 mg). Injetou 40  $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex LC-18, gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 40 min, fluxo de 1 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm.

As substâncias presentes na fração FAc5 não foram eluídas durante o gradiente exploratório, mas apenas na limpeza da coluna. Desta forma não houve boa resolução da mesma nas condições estabelecidas.



Escolheu-se a fração FAc 1 para fracionamento por apresentar melhor atividade antioxidante e maior massa. Observando o perfil cromatográfico em  $\lambda$  254 nm (Figura 19), percebeu-se que as bandas de absorção das substâncias apresentavam-se bem definidas e separadas quando analisadas no gradiente exploratório, durante 40 min de análise. Monitorando em outros comprimentos de onda, não foram observadas outras bandas de absorção. As condições de análise do gradiente exploratório em CLAE analítico (Varian) foram reproduzidas em CLAE preparativo (Shimadzu). Realizou-se uma única injeção na concentração de 1,3 g/15 mL, utilizando coluna C-18 (250 mm x 50 mm e 5  $\mu$ m), fase móvel H<sub>2</sub>O:MeOH 95:5 até MeOH puro, durante 30 min, fluxo 70 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm (Tabela 11).

Tabela 11. CLAE preparativo da FAc 1, única injeção de 1,3 g/15 mL, coluna LC-18 (250mm x 50 mm e 5  $\mu$ m), fase móvel H<sub>2</sub>O:MeOH 95:5 até MeOH puro, durante 30 min, fluxo 70 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm.

Frações	Massa (mg)	t <sub>R</sub> (min)	Frações	Massa (mg)	t <sub>R</sub> (min)
Volume Morto	14,2	-	FAc 1-3	392,6	-
FAc 1-1	630,0	8,1	FAc1-4	59,1	19,9
FAc 1-2	75,2	8,3	FAc1-5	64,0	21,0
FAc 1 entre 2 e 3	28,3	-	Limpeza da Coluna	21,8	-

Para analisar a separação obtida, submeteu-se as frações da Tabela 11 em CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 1 mg/1,5 mL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min em MeOH 100%. A re-análise das frações coletadas por CLAE mostrou que as frações FAc1-2 e FAc1-4 mostraram-se puras. A análise por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, gHMBC, gHMBC e gCOSY, permitiu a identificação das substâncias **6** e **8** a última sendo inédita na literatura (Fluxograma 6).

A fração FAc1-3 apresentou mistura de substâncias e foi submetida a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 5 sub-frações. (Tabela 12).

Tabela 12. Eluição de FAc1-3 em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH.

Frações	Fase Móvel	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)	Rf (min)
FAc1-3-1	H <sub>2</sub> O:MeOH 95:5	92,8	FAc 1-3-4	H <sub>2</sub> O:MeOH 3:2	22,0
FAc1-3-2	H <sub>2</sub> O:MeOH 4:1	71,1	FAc1-3-5	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	103,9
FAc1-3-3	H <sub>2</sub> O:MeOH 7:3	87,3	FAc1-3-6	MeOH	53,0

As frações da Tabela 12 foram analisadas em CLAE-DAD para verificar o isolamento das substâncias. Observou-se que a fração FAc1-3-1 apresentou um único pico de absorção pelo espectro de UV. As análises por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, gHMQC, gHMBC, gCOSY permitiram a identificação da substância **7** (Fluxograma 6).

A fração FAc1-5 apresentou mistura de substâncias. Submeteu-se a CLAE analítico para estabelecer uma condição em busca do isolamento das substâncias presentes. Utilizou-se coluna Phenomenex C-8 eluída no modo isocrático H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 com fluxo de 1 mL/min durante 30 min e observou-se boa separação das substâncias presentes (Figura 21). Submeteu-se a fração FAc1-5 a CLAE preparativo monitorando em λ 254 nm utilizando coluna preparativa “Luna” Phenomenex C-8 eluída com H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45, fluxo de 12 mL/min durante 30 min (Tabela 13).

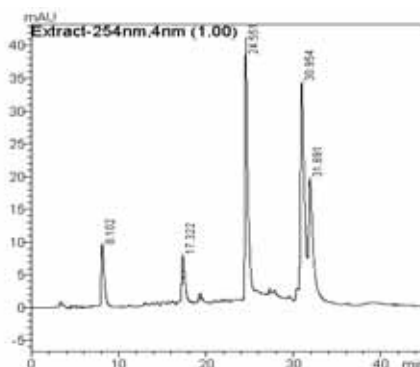


Figura 21. Cromatograma obtido via CLAE-Prep da FAc1-5 (64,0 mg). Foi utilizada coluna preparativa “Luna” Phenomenex C-8 (250 mm x 21,2 mm), modo isocrático de H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 durante 30 min, fluxo de 12 mL/min, monitorando em λ 254 nm.

Tabela 13. CLAE preparativo da FAc1-5, coluna C-8 (250 mm x 21,2 mm), fase móvel H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 durante 30 min, fluxo 12 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm.

Frações	Massa (mg)	t <sub>R</sub> (min)	Frações	Massa (mg)	t <sub>R</sub> (min)
Volume Morto	3,2	-	FAc1-5-7	2,0	2
FAc1-5-1	4,1	-	FAc1-5 entre 7 e 8	0,6	-
FAc1-5-2	1,9	-	FAc1-5-8	3,7	15
FAc1-5-3	2,1	-	FAc1-5 entre 8 e 9	1,6	-
FAc1-5-4	1,2	-	FAc1-5-9	9,8	17
FAc1-5 entre 4 e 5	8,4	-	FAc1-5-10	2,7	-
FAc1-5-5	0,5	-	FAc1-5-11	1,8	-
FAc1-5-6	3,5	13	FAc1-5-12	14,2	-
FAc1-5 entre 6 e 7	0,9	-	Limpeza da coluna	27,5	-

A análise por CLAE-DAD mostrou que as frações FAc1-5-6, FAc1-5-8 e FAc1-5-9 apresentavam-se puras pelo espectro de UV (Figura 22). A análise por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, gHMQC, gHMBC, gCOSY permitiu a identificação das substâncias **9**, **10** e **11** (inéditas na literatura) (Fluxograma **6**).

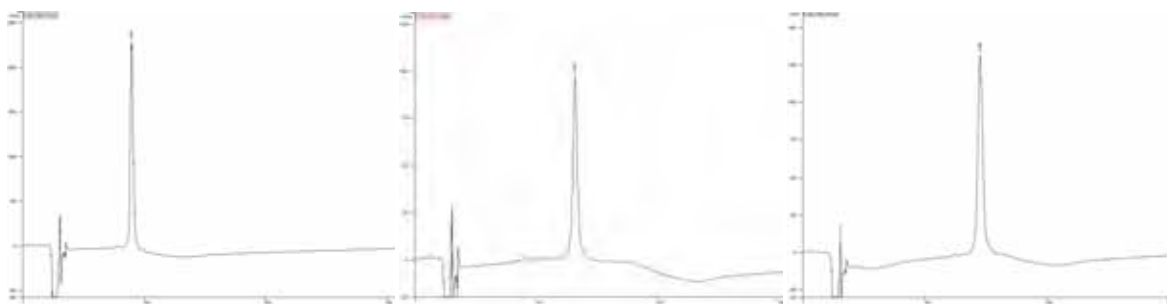
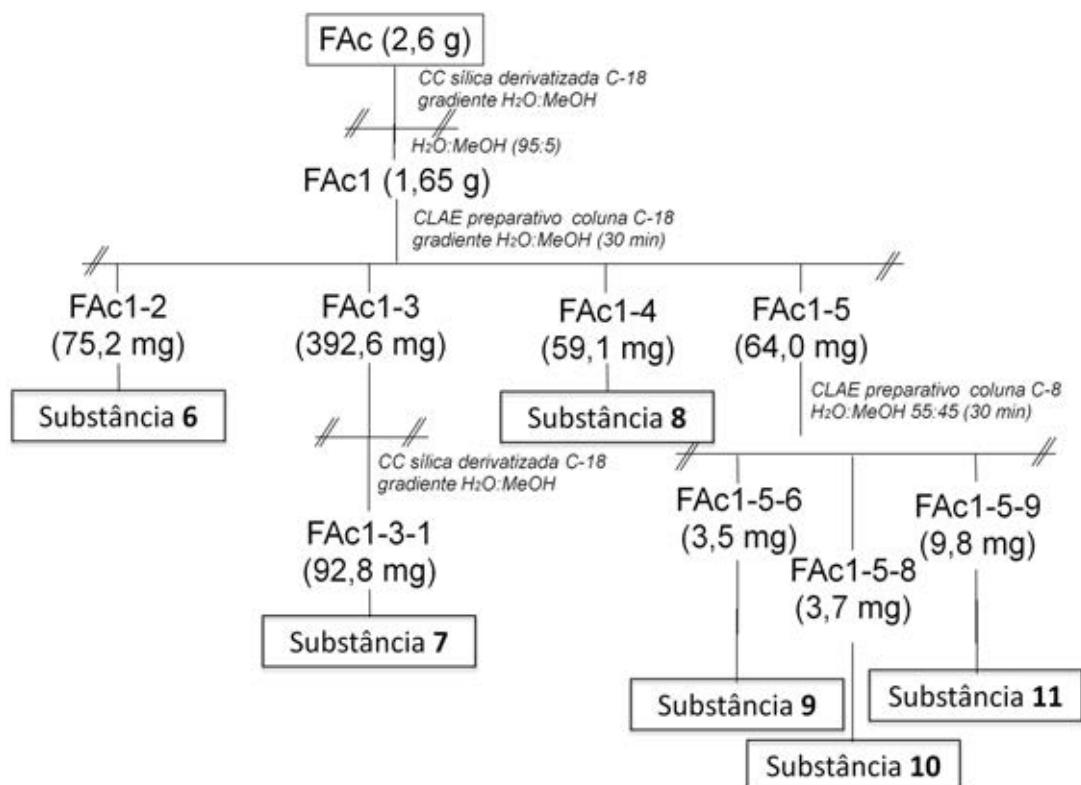


Figura 22. Cromatogramas obtidos via CLAE-DAD da FAc1-5-6, FAc1-5-8 e FAc1-5-9. Injetou-se 40  $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18, gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 30 min, fluxo de 1 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm.



Fluxograma 6. Fracionamento cromatográfico da FAc das folhas de *Inga laurina*.

Para realização de bioensaio das substâncias inéditas identificadas foram realizados novamente processos de fracionamento devido à pouca massa obtida anteriormente. A massa obtida da FAc através da partição líquido-líquido foi de 12,5 g. No primeiro fracionamento utilizou 2,6 g. Para o segundo fracionamento foi submetido 9,5 g a CC sobre sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 5 sub-frações (Tabela 14).

Tabela 14. Frações obtidas da eluição de FAc em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH.

Frações	Fase Móvel	Massa (mg)	Frações	Fase Móvel	Massa (mg)
FAc 1	H <sub>2</sub> O:MeOH 95:5	6.650,0	FAc4	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:3	312,2
FAc 2	H <sub>2</sub> O:MeOH 3:1	771,4	FAc5	MeOH	572,2
FAc 3	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	435,7			

Desta forma, a fração FAc1 foi submetida a CLAE preparativo (Shimadzu). Foi realizada uma única injeção na concentração de 6,6 g/15 mL, utilizando coluna C-18 (250 mm x 50 mm e 5 µm), fase móvel H<sub>2</sub>O:MeOH 95:5 até MeOH puro, durante 30 min, mantendo mais 15 min com MeOH puro, fluxo 40 mL/min, monitorando em λ 254 nm. Cada fração foi coletada por 2 min de análise, totalizando 15 frações

(Tabela 15). Devido às polaridades das substâncias presentes nesta fração serem muito próximas, foi utilizado este método para separar as substâncias presentes em conjuntos de polaridades similares.

Tabela 15. Frações resultantes da análise por CLAE preparativo da FAc1, coluna C-18 (240 mm x 50 mm e 5  $\mu$ m), gradiente H<sub>2</sub>O:MeOH durante 30 min seguido de 15 min de MeOH puro, fluxo 40 mL/min, em  $\lambda$  254 nm.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FAc1-1	4,3	FAc1-6	149,0	FAc1-11	677,5
FAc1-2	4,7	FAc1-7	158,0	FAc1-12	450,5
FAc1-3	209,6	FAc1-8	227,1	FAc1-13	385,7
FAc1-4	1,707,1	FAc1-9	321,9	FAc1-14	135,4
FAc1-5	380,5	FAc1-10	738,7	FAc1-15	142,8

As frações da Tabela 15 foram analisadas por CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 1 mg/1,5 mL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, seguido de MeOH por 15 min. As frações FAc1-12, FAc1-13 e FAc1-14 apresentaram misturas de substâncias e através da análise dos espectros de UV pode-se identificar a presença das substâncias **8, 9, 10 e 11**.

As frações FAc1-12, FAc1-13 e FAc1-14 foram submetidas a CLAE analítico para estabelecer uma condição em busca do isolamento das substâncias presentes. Foi utilizada coluna Phenomenex C-18 (250 mm x 21,2 mm e 5  $\mu$ m) eluída no modo isocrático H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 com fluxo de 1 mL/min durante 30 min. Observou-se boa separação das substâncias presentes nas três frações. Estas foram submetidas a CLAE preparativo monitorando em  $\lambda$  254 nm utilizando coluna preparativa “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 21,2 mm e 5  $\mu$ m) eluída com H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45, fluxo de 10 mL/min durante 30 min (Tabela 16).

Tabela 16. Frações obtidas por CLAE preparativo da FAc1-12, FAc1-13 e FAc1-14, coluna C-18 (240 mm x 50 mm e 5  $\mu$ m), isocrático H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 durante 30 min, fluxo 10 mL/min, monitorando em  $\lambda$  254 nm.

Frações FAc1-12	Massa (mg)	Rf (min)	Frações FAc1-13	Massa (mg)	Rf (min)
Volume Morto	10,4	-	Volume Morto	17,6	-
FAc1-12-1	51,5	-	FAc1-13-1	37,2	-
FAc1-12-2	120,0	-	FAc1-13-2	19,0	-
FAc1-12-3	39,1	-	FAc1-13-3	114,7	20,0
FAc1-12-4	78,0	20,0	FAc1-13-4	80,8	21,3
FAc1-12 entre 4 e 5	17,8	-	FAc1-13 entre 4 e 5	21,8	-
FAc1-12-5	24,7	21,2	FAc1-13-5	33,3	21,8
Limpeza	107,6	-	Limpeza	77,1	-

Frações FAc1-14	Massa (mg)	Rf (min)	Frações FAc1-14	Massa (mg)	Rf (min)
Volume Morto	6,6	-	FAc1-14-4	21,0	21,6
FAc1-14-1	35,6	-	FAc1-14-5	11,2	22,2
FAc1-14-2	7,4	20,5	FAc1-14-6	27,8	22,2
FAc1-14-3	16,3	20,5	Limpeza	151,8	-

As frações da Tabela 16 foram analisadas por CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 1 mg/1,5 mL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min de MeOH 100%. As frações FAc1-12-4, FAc1-13-3, FAc1-13-4, FAc1-14-4 apresentaram um único pico. As comparações dos espectros de UV destas subfrações com os espectros de UV das substâncias inéditas. Mostraram absorções similares e desta forma submeteram-se as subfrações à análise por RMN de <sup>1</sup>H. Observaram-se sinais de hidrogênios semelhantes às substâncias isoladas anteriormente. As frações foram encaminhadas para análises de RMN de <sup>13</sup>C, gHMQC, gHMBC e gCOSY para análise detalhada de suas estruturas, através de qual pode identificar as substâncias **8**, **9**, **10** e **11**, inéditas na literatura.

A fração FAc2 (250 mg) foi submetida a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada C-18 eluída em gradiente de de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações (Tabela 17).

Tabela 17. CC da FAc2 utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FAc2-1	2,1	FAc2-6	3,9	FAc2-11	23,4
FAc2-2	7,0	FAc2-7	5,9	FAc2-12	17,9
FAc2-3	85,7	FAc2-8	7,6	FAc2-13	14,2
FAc2-4	13,0	FAc2-9	12,8	FAc2-14	8,6
FAc2-5	5,3	FAc2-10	14,6	FAc2-15	44,9

As frações obtidas (Tabela 17) foram submetidas a CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 1 mg/1,5 mL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min de MeOH. Observou-se que as frações FAc2-6, FAc2-9 e FAc2-11 mostraram-se puras e foram submetidas a análise por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A FAc2-6 apresentou sinais semelhantes a FAc1-2, permitindo a identificação da substância **6**. A FAc2-9 apresentou sinais semelhantes a FAc1-3-1 permitindo a identificação da substância **6**. A FAc2-11 apresentou sinais de hidrogênios e carbonos semelhantes aos apresentados pelas substâncias **8**, **9**, **10** e **11**.

As frações FAc3 (520,0 mg), FAc4 (320,0 mg) e FAc5 (600,0 mg) foram submetidas a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada C-18 eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações (Tabela 18).

Tabela 18. CC da FAc3, FAc4 e FAc5 utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FAc3-1	0,4	FAc4-1	1,1	FAc5-1	2,4
FAc3-2	9,5	FAc4-2	0,8	FAc5-2	3,3
FAc3-3	12,6	FAc4-3	24,5	FAc5-3	15,5
FAc3-4	77,8	FAc4-4	43,4	FAc5-4	87,7
FAc3-5	9,2	FAc4-5	22,9	FAc5-5	33,3
FAc3-6	2,7	FAc4-6	5,2	FAc5-6	39,9
FAc3-7	1,6	FAc4-7	2,2	FAc5-7	33,0
FAc3-8	1,9	FAc4-8	1,3	FAc5-8	11,0
FAc3-9	2,1	FAc4-9	3,0	FAc5-9	4,5
FAc3-10	3,8	FAc4-10	3,1	FAc5-10	5,7
FAc3-11	5,1	FAc4-11	5,8	FAc5-11	6,3
FAc3-12	5,8	FAc4-12	6,0	FAc5-12	5,3
FAc3-13	14,3	FAc4-13	8,5	FAc5-13	6,3
FAc3-14	15,0	FAc4-14	8,7	FAc5-14	6,9
FAc3-15	12,9	FAc4-15	12,5	FAc5-15	7,9
Limpeza	37,0	Limpeza	41,4	Limpeza	616,3

As frações obtidas da Tabela 18 foram analisadas por CLAE-DAD para verificação do perfil cromatográfico das frações obtidas e análise dos espectros de UV das substâncias presentes. Não foi observada presença de substância com absorção característica de aromáticos, assim o estudo fitoquímico destas frações de FAc não foi continuado.

#### 3.4.4.7. Fracionamento cromatográfico da FB.

Continuando a busca por substâncias com atividade antioxidante, escolheu-se FB para estudo fitoquímico, por mostrar-se ativa em teste com  $\beta$ -caroteno e DPPH. Submeteu-se 2,0 g a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 5 sub-frações (Tabela 19).

Tabela 19. Eluição de FB em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH.

Frações	Fase Móvel	Massa (mg)	Frações	Fase Móvel	Massa (mg)
FB1	H <sub>2</sub> O:MeOH 95:5	423,9	FB4	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:3	99,8
FB2	H <sub>2</sub> O:MeOH 3:1	466,7	FB5	MeOH	654,2
FB3	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	84,9			

Com o objetivo de conhecer o perfil cromatográfico para a detecção de substâncias antioxidantes, as frações FB1-FB5 foram submetidas à análise por CLAE-UV-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 40  $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m), eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 30 min, fluxo de 1 mL/min. Após a corrida manteve-se a fase móvel em MeOH puro por mais 15 min para limpeza. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/1,5 mL.

A subfração FB1 (400 mg) foi submetida a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações (Tabela 20).



Tabela 20. CC da FB1 (400 mg) utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 15 sub-frações.

Frações	Massa (mg)	Fase Móvel	Frações	Massa (mg)	Fase Móvel
FB1-1	2,2	95:5	FB1-9	2,9	11:9
FB1-2	247,8	9:1	FB1-10	2,3	1:1
FB1-3	14,8	17:3	FB1-11	2,5	9:11
FB1-4	12,4	4:1	FB1-12	2,0	2:3
FB1-5	2,3	3:1	FB1-13	2,5	3:7
FB1-6	2,7	7:3	FB1-14	1,9	1:4
FB1-7	2,9	13:7	FB1-15	1,9	1:9
FB1-8	3,0	3:2	FB1Limpeza	2,8	MeOH

As frações FB1-1 a FB1-15 (Tabela 20) foram analisadas por em CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 1 mg/1,5 mL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min de MeOH 100%. Foram observadas várias substâncias aromáticas que absorvem em  $\lambda$  254 nm com massa insuficiente para isolamento das mesmas, desta forma não prosseguiu os estudos fitoquímicos nesta fração.

As frações FB2 (466,7 mg), FB3 (84,9 mg) e FB4 (99,8 mg) foram também submetidas a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada C-18 eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH 100%. Foram obtidas 15, 16 e 15 sub-frações, respectivamente. Estas foram analisadas em CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm, utilizando coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min de MeOH. Foram observadas várias substâncias aromáticas que absorvem em  $\lambda$  254 nm com massa insuficiente para isolamento das mesmas, desta forma não prosseguiu os estudos fitoquímicos na fração FB.

#### 3.4.4.8. Fracionamento cromatográfico da FHa.

Em busca de substâncias com atividade antioxidante, escolheu-se a FHa para prosseguimento do estudo fitoquímico. Submeteu-se 10,0 g a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 5 sub-frações (Tabela 21).

Tabela 21. Frações obtidas da eluição de FHa em CC (sílica derivatizada C-18) com gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH.

Frações	Fase Móvel	Massa (mg)	Frações	Fase Móvel	Massa (mg)
FHa1	H <sub>2</sub> O:MeOH 95:5	4.213,0	FHa4	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:3	153,8
FHa2	H <sub>2</sub> O:MeOH 3:1	1.395,8	FHa5	MeOH	51,3
FHa3	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	1212,6			

Com o objetivo de conhecer o perfil cromatográfico em diversos comprimentos de onda e a procura das substâncias com atividade antioxidante, as frações da Tabela 21 foram submetidas à análise por CLAE-UV-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 40  $\mu$ L em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m), eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 30 min, fluxo de 1 mL/min. Após a corrida manteve-se a fase móvel em MeOH puro por mais 15 min para limpeza. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/1,5 mL.

A subfração FHa1 (4,2 g) foi submetida a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 20 sub-frações (Tabela 22).

Tabela 22. CC da FHa1 (1,2 g) utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C-18) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH fornecendo 20 sub-frações.

Frações	Massa (mg)	Fase Móvel	Frações	Massa (mg)	Fase Móvel
FHa1-1	2,7	19:1	FHa1-11	135,2	9:11
FHa1-2	6,6	9:1	FHa1-12	84,8	2:3
FHa1-3	372,4	17:3	FHa1-13	72,7	7:13
FHa1-4	448,4	4:1	FHa1-14	76,7	3:7
FHa1-5	219,2	3:1	FHa1-15	82,2	1:3
FHa1-6	155,4	7:3	FHa1-16	79,6	1:4
FHa1-7	295,1	13:7	FHa1-17	27,2	3:17
FHa1-8	295,7	3:2	FHa1-18	21,0	1:9
FHa1-9	381,8	11:9	FHa1-19	13,7	1:19
FHa1-10	322,8	1:1	FHa1-20	34,2	MeOH

As frações da obtidas (Tabela 22) foram submetidas em CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm. Injetou-se 1 mg/1,5 mL em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min de MeOH. Foram observadas várias substâncias aromáticas que absorvem em  $\lambda$  254 nm com massa insuficiente para isolamento das mesmas, desta forma não prosseguiu os estudos fitoquímicos nesta fração.

As frações FHa2 (1.395,8 mg), FHa3 (1.212,6 mg) e FB4 (153,8 mg) foram também submetidas a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada C-18 eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH 100%. Foram obtidas 20, 17 e 16 sub-frações, respectivamente. Estas foram analisadas em CLAE-DAD monitorando em  $\lambda$  254 nm, utilizando coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5  $\mu$ m) eluída em gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1 mL/min, durante 30 min, mantendo mais 15 min de MeOH. Foram observadas várias substâncias aromáticas que absorvem em  $\lambda$  254 nm com massa insuficiente para isolamento das mesmas, desta forma não prosseguiu os estudos fitoquímicos na fração FHa.

### **3.5. Resultados preliminares dos ensaios químicos.**

#### **3.5.1. Avaliação da atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno da *I. laurina*.**

O EE e as fases de partição FAc, FB e FHa da espécie *Inga laurina* foi avaliada com teste em CCD revelada com  $\beta$ -caroteno para potencial atividade antioxidante. O resultado positivo indicou a presença de substâncias com atividade antioxidantes no extrato. Apresentou também atividade inibitória de peroxidação lipídica avaliada em lipossomas e atividade inibitória de cicloxigenases I e II, sugerindo a presença de substâncias que atuem nos processos inflamatórios (PRATT et al., 1984).

#### **3.5.2. Detecção do potencial seqüestrador de radicais livres usando ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH).**

As sub-frações obtida da FAc (Tabela 10) da espécie *I. laurina* foram submetidas ao ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) para detecção do potencial seqüestrador de radicais livres (Figura 23), com o objetivo de confirmar os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante com  $\beta$ -caroteno em CCD.

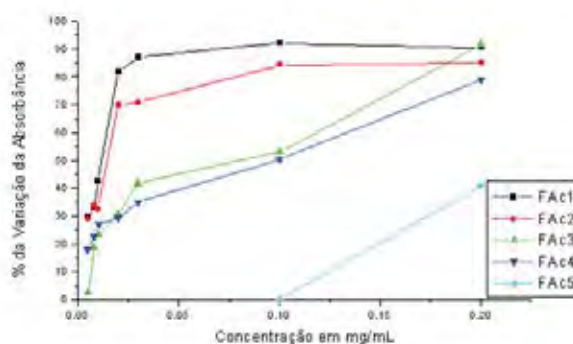


Figura 23. Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) para detecção do potencial seqüestrador de radicais livres das sub-frações da FAc.

A fração FAc5 apresentou baixa atividade antioxidante se for comparada com as frações FAc3 e FAc4 que apresentaram moderada atividade ou com as frações FAc1 e FAc2 que apresentaram forte atividade antiradicalar.

### 3.5.3. Ensaio *in vitro* da formação de $\beta$ -hematina para detecção do potencial antimalárico.

Foram avaliados os extratos e as fases de partições das espécies *I. edulis*, *I. laurina*, *I. marginata* e *S. langsdorffii*, buscando a inibição de formação de  $\beta$ -hematina para a detecção de potencial antimalárico (Tabela 23).

Tabela 23. Extratos e fases de partição avaliados no ensaio *in vitro* da formação de  $\beta$ -hematina para detecção de atividade antimalárica.

Extratos/Frações	% de inibição	Extratos/Frações	% de inibição
<i>I. edulis</i> (EE)	ni*	<i>I. marginata</i> (FH)	80,1
<i>I. edulis</i> (FH)	67,4	<i>I. marginata</i> (FAc)	61,6
<i>I. edulis</i> (FAc)	37,9	<i>I. marginata</i> (FB)	ni*
<i>I. edulis</i> (FB)	7,6	<i>I. marginata</i> (FHa)	ni*
<i>I. edulis</i> (FHa)	ni*	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FH) 1ª coleta	65,1
<i>I. laurina</i> (EE)	47,5	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FAc) 1ª coleta	ni*
<i>I. laurina</i> (FH)	71,8	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FHa) 1ª coleta	ni*
<i>I. laurina</i> (FAc)	90,9	Quinina	63,4
<i>I. laurina</i> (FB)	67,5	Cloroquina	74,9
<i>I. marginata</i> (EE)	51,8		

ni\* = não houve inibição

Foi verificado com os resultados da Tabela 23 que a fase hexânica (FH) da *S. langsdorffii*, a fase hexânica (FH) e a fase butanólica (FB) da *I. laurina*, e a fase hexânica (FH) de *I. edulis* apresentaram porcentagem de inibição maior que o

padrão quinina, apresentando bom pontencial antimalárico. Já a fase acetato de etila (FAc) da *I. laurina* e a fase hexânica de *I. marginata* apresentaram porcentagem de inibição maior que o padrão Cloroquina, podendo ser considerada uma potencial fonte de substâncias com atividade antimalárica.

### 3.5.4. Resultados da detecção da atividade anticolinesterásica.

Avaliou-se em CCD os extratos e as fases de partição das espécies *Inga edulis*, *I. laurina* e *I. marginata* para detecção da atividade anticolinesterásica. Os números expressos na Figura 24 estão diretamente relacionados com os extratos e as fases de partição da Tabela 24.

Tabela 24. Extratos e fases de partições avaliados no teste de detecção da atividade anticolinesterásica.

Número	Extrato/Fase de partição	Rf do halo de inibição da reação enzimática
1	<i>I. marginata</i> (EE)	0,84
2	<i>I. edulis</i> (EE)	ni*
3	<i>I. laurina</i> (EE)	ni*
4	<i>I. marginata</i> (FH)	0,69
5	<i>I. marginata</i> (FAc)	ni*
6	<i>I. marginata</i> (FB)	ni*
7	<i>I. marginata</i> (FHa)	ni*
8	<i>S. langsdorffii</i> (FH) 1ª coleta	0,42
9	<i>S. langsdorffii</i> (FAc) 1ª coleta	ni*
10	<i>S. langsdorffii</i> (FHa) 1ª coleta	ni*
11	<i>I. edulis</i> (FH)	ni*
12	<i>I. edulis</i> (FAc)	ni*
13	<i>I. edulis</i> (FB)	ni*
14	<i>I. edulis</i> (FHa)	ni*
15	<i>I. laurina</i> (FH)	ni*
16	<i>I. laurina</i> (FAc)	ni*
17	<i>I. laurina</i> (FB)	ni*
18	<i>I. laurina</i> (FHa)	ni*

ni\* = não houve inibição

O teste consiste no aparecimento de manchas brancas (indicação de inibição da reação enzimática) sobre um fundo de coloração roxa, indicando que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Conforme observado na Figura 24 o extrato bruto (EB) de *I. marginata* de número 1 (Rf = 0,84), a fase hexânica (FH) de *I. marginata* de número 4 (Rf = 0,69) e a fase hexânica (FH) de *S. langsdorffii* de número 8 (Rf = 0,42) mostraram-se ativas, inibindo a reação enzimática.

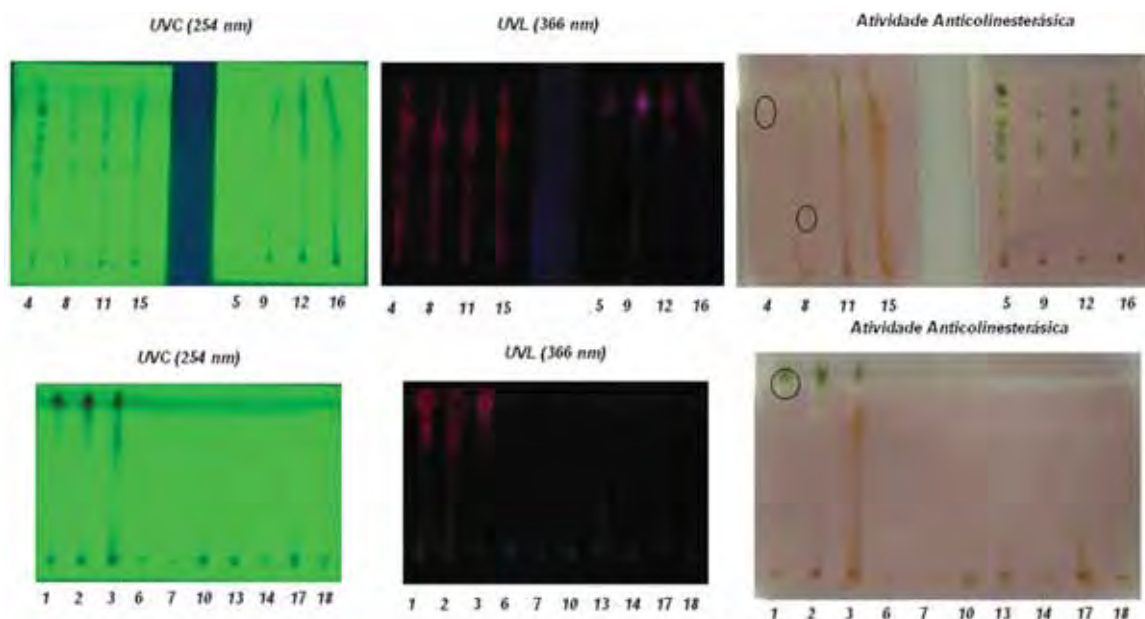


Figura 24. Detecção da atividade anticolinesterásica, biautografada em placa de sílica e revelada em  $\lambda$  254 nm e  $\lambda$  366 nm.

### 3.6. Resultados preliminares dos ensaios biológicos.

#### 3.6.1. Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos.

Avaliaram em CCD os extratos e as fases de partição das espécies *I. edulis*, *I. laurina*, *I. marginata* e *S. langsdorffii* para detecção da atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* (Figura 25) e *C. cladosporioides* (Figura 26). Os números expressos na Figura 25 e Figura 26 estão diretamente relacionados com os extratos e as fases de partições da Tabela 24.



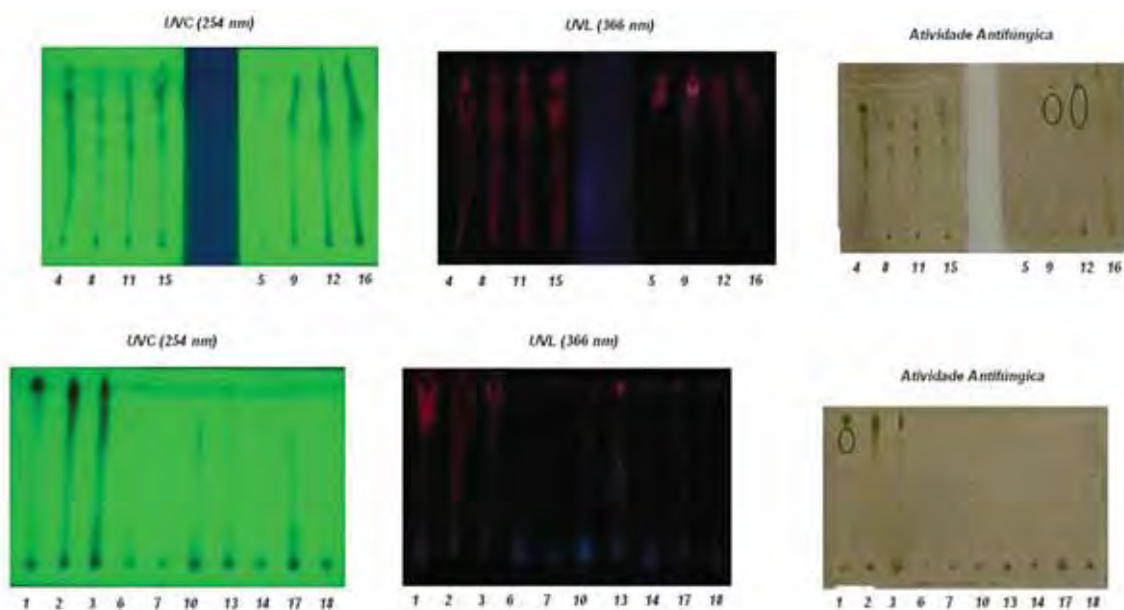


Figura 25. Detecção da atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos *C. sphaerospermum* em placa de sílica, revelada em  $\lambda$  254 nm e  $\lambda$  366 nm e os halos de inibições sobre áreas onde apresentam substâncias fungitóxicas.

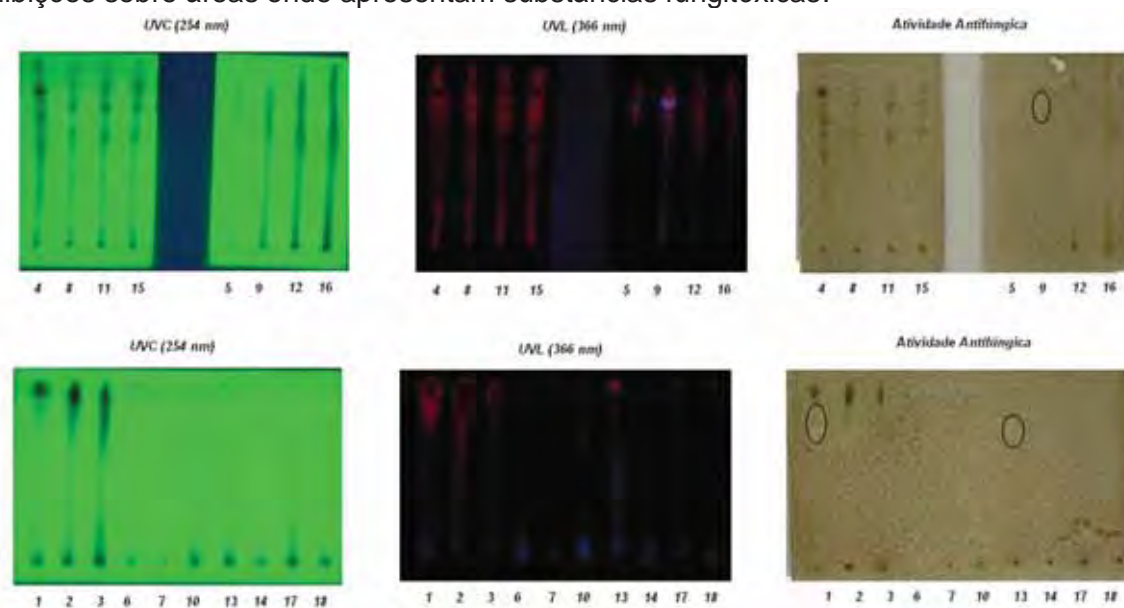


Figura 26. Detecção da atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos *C. cladosporoides* em placa de sílica, revelada em  $\lambda$  254 nm,  $\lambda$  366 nm e os halos de inibições sobre áreas onde apresentam substâncias fungitóxicas.

O teste consiste no aparecimento de halos de inibição em placa de sílica sobre áreas que apresentam substâncias fungitóxicas. Esses halos podem ser relacionados com as concentrações das amostras aplicadas se forem comparado os limites de detecção com os padrões utilizados (antibióticos nistatina e gentamicina). Nas Figuras 25-26, verificou-se que o extrato bruto (EB) de *I. marginata* de número 1, a fase acetato de etila (FAC) de *S. langsdorffii* de número 9 apresentaram baixa atividade frente aos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporoides*.

Observou-se na Figura 25 que a fração acetato de etila (FAc) da *I. edulis* de número 12, apresentou baixa atividade frente ao fungo *C. sphaerospermum*. Observou-se que na Figura 26 a fração butanólica (FB) da *I. edulis* de número 13, apresentou baixa atividade frente ao fungo *C. cladosporoides*.

### 3.6.2. Resultados do ensaio com fungos patogênicos humanos em microplacas.

O extrato de *S. langsdorffii* foi avaliado em ensaio antifúngico, apresentando resultado positivo (CIM 125,0 mg/mL) obtido frente às linhagens de fungos patogênicos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, indicando atividade antifúngica moderada. A avaliação das fases de partição, FAc e FHa (CIM 125,0 mg/mL), confirmou a bioatividade observada inicialmente e orientou a escolha das frações promissoras para purificação das substâncias bioativas (Tabela 25).

Tabela 25. Extratos e fases de partições de *Swartzia langsdorffii* avaliados em ensaio com fungos patogênicos humanos em microplacas.

<b>Extrato/Fase de partição</b>	<b>CIM</b>	<b>Atividade</b>
<i>S. langsdorffii</i> (EE) 1ª coleta	250,0 mg/mL	Inativa
<i>S. langsdorffii</i> (FH) 1ª coleta	250,0 mg/mL	Inativa
<i>S. langsdorffii</i> (FAc) 1ª coleta	125,0 mg/mL	Moderada
<i>S. langsdorffii</i> (FHa) 1ª coleta	125,0 mg/mL	Moderada

### 3.6.3. Avaliação nematoestática de *Meloidogyne incognita*.

Avaliaram os extratos e as fases de partição das espécies *I. edulis*, *I. laurina*, *I. marginata* e *S. langsdorffii* frente a *Meloidogyne incognita*, nematodo que infesta milho, café, soja, entre outras lavouras. Realizou-se após 24 horas a contagem dos nematóides estáticos e móveis (Tabela 26).



Tabela 26. Avaliação nematoestática de *Meloidogyne incognita* dos extratos e fases de partições.

Extratos/Frações	% Estática	Extratos/Frações	% Estática
<i>I. edulis</i> (EE)	0	<i>I. laurina</i> (FHa)	11
<i>I. edulis</i> (FH)	13	<i>S. langsdorffii</i> folhas (EE) 2ª coleta	36
<i>I. edulis</i> (FAC)	0	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FH) 2ª coleta	15
<i>I. edulis</i> (FB)	0	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FAC) 2ª coleta	18
<i>I. edulis</i> (FHa)	40	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FB) 2ª coleta	4
<i>I. laurina</i> (EE)	12	<i>S. langsdorffii</i> folhas (FHa) 2ª coleta	46
<i>I. laurina</i> (FH)	0	<i>S. langsdorffii</i> casca (FH) 2ª coleta	22
<i>I. laurina</i> (FAC)	1	<i>S. langsdorffii</i> casca (FAC) 2ª coleta	95
<i>I. laurina</i> (FB)	27	<i>S. langsdorffii</i> casca (FB) 2ª coleta	58
<i>I. laurina</i> (FHa)	100	<i>S. langsdorffii</i> casca (FHa) 2ª coleta	100
<i>I. laurina</i> (EE)	13	<i>S. langsdorffii</i> semente (FH) 2ª coleta	13
<i>I. laurina</i> (FH)	0	<i>S. langsdorffii</i> semente (FAC) 2ª coleta	85
<i>I. laurina</i> (FAC)	11	<i>S. langsdorffii</i> semente (FB) 2ª coleta	4
<i>I. laurina</i> (FB)	17	<i>S. langsdorffii</i> semente (FHa) 2ª coleta	21

Observou-se que a fração hidroalcoólica (FHa) da *Inga laurina*, a fração acetato de etila (FAC) da *S. langsdorffii*, a fração hidroalcoólica (FHa) da casca do fruto de *S. langsdorffii* e a fração acetato de etila (FAC) da semente do fruto de *S. langsdorffii* mostraram-se nematoestáticas frente *Meloidogyne incognita*, sendo uma fonte potencial de substâncias para o combate dessa praga agrícola.

#### 3.6.4. Avaliação do potencial inseticida para formigas cortadeiras.

As fases de partição da *S. langsdorffii*, *I. edulis* e *I. laurina* apresentaram resultados positivos no ensaio da avaliação do potencial inseticida para formigas cortadeiras conforme mostra a Tabela 27.

Tabela 27. Fases de partição submetidas ao teste de avaliação do potencial inseticida para formigas cortadeiras.

Frações	Nº de formigas mortas	Mortalidade (%)
<i>I. edulis</i> (FH)	26	87%
<i>I. edulis</i> (FAC)	24	80%
<i>I. edulis</i> (FHa)	10	34%
<i>I. laurina</i> (FH)	29	97%
<i>I. laurina</i> (FAC)	23	77%
<i>I. laurina</i> (FB)	24	80%
<i>I. laurina</i> (FHa)	29	97%
<i>S. langsdorffii</i> (FH) 1ª coleta	26	87%
<i>S. langsdorffii</i> (FAC) 1ª coleta	28	94%

As frações FHa e FH de *I. laurina* e FAc de *S. langsdorffii* 94% apresentaram os melhores resultados, matando respectivamente 97%, 97% e 94% das formigas testadas. Resultados moderados foram observados pelas frações FH de *S. langsdorffii* e *I. edulis*, FAc de *I. edulis* e *I. laurina*, e FB de *I. laurina* que mataram de 77 a 87% das formigas.

### 3.7. Determinação estrutural

#### 3.7.1. Elucidação estrutural das substâncias 1 e 2 das folhas de *S. langsdorffii*

As substâncias **1** e **2** foram obtidas como sólidos amorfos e seus dados de EM obtidos por ionização por *eletrospray* e de RMN uni e bidimensionais, bem como comparação com dados da literatura, permitiram identificá-las como os triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico (**1**) e lupeol (**2**), amplamente distribuídos no reino vegetal (Figura 27) (MARQUI et al., 2008).

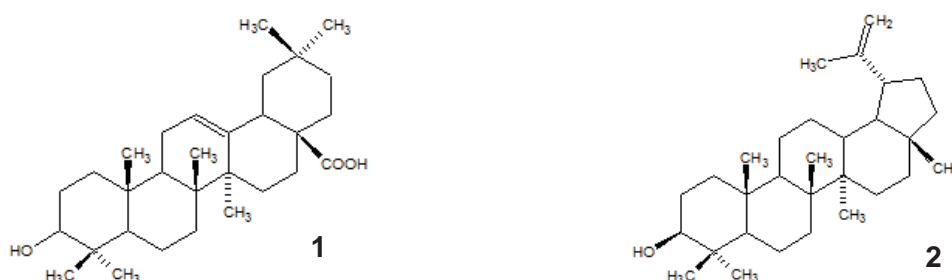


Figura 27. Ácido oleanólico (**1**) e lupeol (**2**) isolados da fração hexânica de *Swartzia langsdorffii*.

#### 3.7.2. Elucidação estrutural da substância 3 das folhas de *S. langsdorffii*

A substância **3** foi obtida como sólido amorfo e seu espectro de massas mostrou um pico em  $m/z$  779 (100%) que pode ser atribuído ao íon  $[M-H]^+$ . Este valor é compatível com a fórmula molecular  $C_{42}H_{68}O_{13}$ , sugere, unido aos sinais observados nos espectros de RMN 1D e 2D, a estrutura de uma saponina triterpênica com duas unidades de glicose. Os dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  evidenciaram uma aglicona com esqueleto oleanano, através dos sinais em  $\delta_C$  123,6 e 145,2, atribuídos a C-12 e C-13 e a presença de duas unidades glicosídicas, em função dos sinais para dois hidrogênios ( $\delta_H$  4,37 e 4,56) e dois carbonos anoméricos ( $\delta_C$  106,3 e 103,1). O

experimento gHMBC indicou correlações entre H-1' e C-3 e entre H-1'' e C-2', que evidenciaram a posição da ligação da aglicona com uma unidade glicosídica, bem como da ligação interglicosídica, e permitiram identificar a substância **3** com o ácido 3-soforosiloleanólico, anteriormente isolado de *S. schomburgkii* (Figura 28) (ABEDL-KADER et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2003; MARQUI et al., 2008).

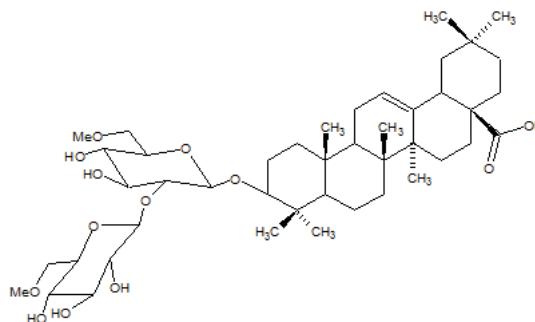


Figura 28. Ácido 3-soforosiloleanólico (**3**) isolado da fração acetato de etila de *Swartzia langsdorffii*.

### 3.7.3. Determinação estrutural da substância **4** das folhas de *S. langsdorffii*

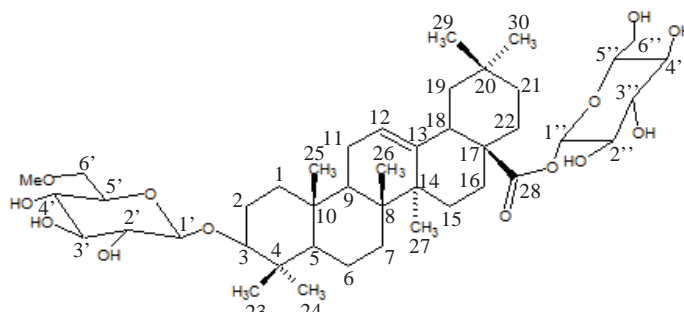


Figura 29. Estrutura molecular proposta para a substância **4** (3-O-β-D-(6'-metil)-glicopiranosilolean-28-oato de β-glucopiranosila).

A substância **4** foi obtida como sólido amorfo, com  $[\alpha]_D^{30} +31$  (MeOH, *c* 0,021) e seu espectro de massas mostrou um íon  $[M-H]^+$  em *m/z* 793 (100), enquanto o espectro de massas de alta resolução mostrou sinal do íon  $[M]^+$  em *m/z* 794,4788, compatível com a fórmula molecular  $C_{43}H_{70}O_{13}$  (massa calculada 794,4816) que sugere, unido aos sinais observados nos espectros de RMN 1D e 2D, a estrutura de uma saponina (Figura 30). Absorções na região de infravermelho em  $1.736\text{ cm}^{-1}$  indicaram a presença de um grupo carbonílico de éster. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** mostrou sinais para sete metilas alifáticas ( $\delta_H$  0,8 a 1,1), sinais para hidrogênios hidroximetínicos ( $\delta_H$  3,0 e 4,5), além de outros sinais entre  $\delta_H$

1,0 e 2,5 sugerindo a estrutura de um triterpeno glicosilado (saponina) (Tabela 28). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou sinais em  $\delta_{\text{C}}$  121,7 e 143,4 atribuídos aos carbonos C-12 e C-13 respectivamente, sugerindo o esqueleto oleanano para a substância **4**; um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  175,3, compatível com uma carboxila que foi atribuído ao carbono C-28 e sinais em  $\delta_{\text{C}}$  94,1 (C-1') e 105,3 (C-1''), que mostraram correlação com os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,23 ( $J = 7,5$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  4,13 ( $J = 7,5$  Hz) no mapa de correlações gHMQC, que permitiu sugerir a presença de duas unidades glicosídicas em **4**. Observou-se ainda neste mapa de contorno um sinal em  $\delta_{\text{CH}_3}$  53,4 correlacionado ao singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,1, correspondente ao grupo metoxila, além de sinais para carbonos metínicos em  $\delta_{\text{CH}}$  40,7 (C-18) e 47,1 (C-9), correlacionados ao duplo dubleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  2,73 e ao multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,48, que permitiram sua atribuição a H-18 e H-9, respectivamente. O experimento gHMBC mostrou correlações dos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,23 e 4,13, atribuídos aos hidrogênios anoméricos, com os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  175,3 (C) e 87,8 (CH) que foram atribuídos à carboxila do C-28 e ao C-3, respectivamente, evidenciando as posições de substituição das duas unidades glicosídicas na aglicona triterpênica (Figura 30). Adicionalmente, este experimento mostrou a correlação entre o sinal em  $\delta_{\text{CH}_2}$  67,0 (C-6''), e o singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,1, permitindo a proposta de metilação na hidroxila em C-6''. A análise detalhada deste mapa mostrou correlações entre os hidrogênios metílicos e carbonos a 2 ou 3 ligações, o que, em conjunto com a comparação dos seus dados espectrométricos com a literatura, permitiu confirmar a estrutura proposta para a substância **4**, o 3-O- $\beta$ -D-(6'-metil)-glicopiranosilolean-28-oato de  $\beta$ -glucopiranosila (Figura 29), inédita na literatura (MARQUI et al., 2008).



Figura 30. Correlações observadas no espectro gHMBC da substância **4**.

Tabela 28. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (11.7 T) e  $^{13}\text{C}$  (11.7 T) da substância **4** em DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  (ppm).

C/H	$\delta_{\text{C}}$ , mult. <sup>b</sup>	$\delta_{\text{H}}$ , mult., J (Hz) <sup>c</sup>	gHMBC <sup>c</sup>
1	38,2 (CH <sub>2</sub> )	0,74 (m), 1,32 (m)	H-23, H-25
2	27,2 (CH <sub>2</sub> )	1,48 (m), 1,85 (m)	H-25
3	87,8 (CH)	3,02 (ddl)	H-1'', H-23, H-24
4	38,7 (C)	-	H-24
5	55,0 (CH)	0,71 (m)	H-23, H-24, H-25
6	17,8 (CH <sub>2</sub> )	1,23 (m), 1,78 (m)	-
7	31,8 (CH <sub>2</sub> )	1,85 (m)	H-26
8	39,0 (C)	-	H-27
9	47,1 (CH)	1,48 (m)	H-26
10	36,3 (C)	-	H-25
11	22,4 (CH <sub>2</sub> )	1,78 (dl), 1,95 (m)	-
12	121,7 (CH)	5,16 (tl)	-
13	143,4 (C)	-	H-27
14	41,3 (C)	-	H-26, H-27
15	27,2 (CH <sub>2</sub> )	1,23 (m), 1,95 (m)	H-27
16	23,0 (CH <sub>2</sub> )	0,98 (m), 1,85 (m)	-
17	45,9 (C)	-	-
18	40,7 (CH)	2,73 (ddl)	-
19	45,6 (CH <sub>2</sub> )	1,08 (m), 1,60 (m)	H-30
20	30,3 (C)	-	H-29, H-30
21	33,1 (CH <sub>2</sub> )	0,98 (m)	-
22	32,1 (CH <sub>2</sub> )	0,74 (m)	-
23	27,6 (CH <sub>3</sub> )	0,96 (s)	H-24
24	16,7 (CH <sub>3</sub> )	0,68 (s)	H-23
25	15,2 (CH <sub>3</sub> )	0,86 (s)	-
26	16,5 (CH <sub>3</sub> )	0,75 (s)	-
27	25,5 (CH <sub>3</sub> )	1,08 (s)	-
28	175,3 (C)	-	H-1'
29	32,8 (CH <sub>3</sub> )	0,87 (s)	-
30	23,4 (CH <sub>3</sub> )	0,86 (s)	H-29
1'	94,1 (CH)	5,23 (d, 7,5)	-
2'	72,4 (CH)	3,1 (m)	-
3'	76,8 (CH)	3,22 (m)	-
4'	69,6 (CH)	3,12 (m)	-
5'	77,7 (CH)	3,14 (m)	-
6'	60,7 (CH <sub>2</sub> )	3,42 (m), 3,62 (m)	-
1''	105,3 (CH)	4,13 (d, 7,5)	-
2''	73,9 (CH)	2,95 (tl)	-
3''	76,7 (CH)	3,14 (m)	-
4''	72,1 (CH)	3,11 (m)	-
5''	74,1 (CH)	3,21 (tl)	-
6''	67,0 (CH <sub>2</sub> )	3,40 (m), 3,62 (m)	-
OMe	53,4 (CH <sub>3</sub> )	3,1 (s)	H-6''

<sup>a</sup> DMSO- $d_6$  e RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as multiplicidades de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidas por experimentos de DEPT 135° e 90°; <sup>c</sup> as atribuições de sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidas por experimentos de gHMBC e gHMBC.

### 3.7.4. Determinação estrutural da substância **5** de *I. laurina*.

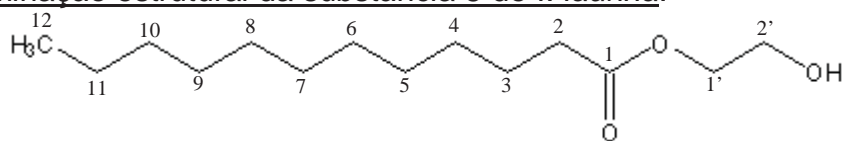


Figura 31. Estrutura molecular proposta para a substância **5** (dodecanoato de 2-hidroxieta).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração FH1-7-8 mostrou sinais de hidrogênios hidroximetilênicos em  $\delta$  3,6 (Espectro 3). Verificou-se no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  sinais para uma cadeia alifática e uma carboxila (Espectros 4-7) (Tabela 29).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou ainda um tripleto em  $\delta$  0,8 (Espectros 1-2) que no espectro de gHMQC correlaciona com carbono metílico em  $\delta$  14,1, associados ao grupo metila terminal (Espectro 12). Também foi observado um multipletto em  $\delta$  1,2 (Espectro 2) que correlaciona diretamente com carbonos metilênicos em  $\delta$  22,6,  $\delta$  29,1,  $\delta$  29,2,  $\delta$  29,3,  $\delta$  29,4,  $\delta$  29,6,  $\delta$  31,9 (Espectro 12); um tripleto aparente em  $\delta$  1,6 (Espectro 2) com o carbono metilênico em  $\delta$  24,9 (Espectro 12), um tripleto em  $\delta$  2,2 (Espectro 2) com o carbono metilênico em  $\delta$  34,2 (Espectro 12); um tripleto em  $\delta$  4,1 (Espectro 3) com o carbono metilênico em  $\delta$  63,3 (Espectro 13); um tripleto em  $\delta$  3,6 (Espectro 3) com o carbono metilênico em  $\delta$  61,6 (Espectro 13) (Tabela 29) (Figura 32), sugerindo estrutura de ácido carboxílico de cadeia longa esterificado com uma unidade de etilenoglicol.

Observou-se no espectro de gHMBC correlações a longa distância do sinal em:  $\delta$  1,2 com os sinais em  $\delta$  24,9;  $\delta$  1,6 com  $\delta$  34,2;  $\delta$  2,2 com  $\delta$  24,9 (Espectro 16) e com uma carboxila em  $\delta$  173,8 (Espectro 18). Também foi verificado no espectro de gHMBC correlações a longa distância do sinal em  $\delta$  4,1 com o sinal de carboxila em  $\delta$  173,8 (Espectro 18). Verificou-se no espectro de TOCSY 1D a correlação do sinal em  $\delta$  4,1 com  $\delta$  3,6 (Espectro 22), desprotegido pela presença de uma hidroxila terminal (Tabela 29) (Figura 32).

O espectro de gCOSY mostrou a correlação direta do hidrogênio  $\delta$  3,6 com o  $\delta$  4,1 mostrando a proximidade dos hidrogênios (Espectro 20), também foi observado à correlação dos sinais  $\delta$  1,6 com  $\delta$  1,2 e o sinal em  $\delta$  1,2 com  $\delta$  0,8 (Espectro 19).

O espectro de TOCSY 1D mostrou correlação direta do sinal em  $\delta$  2,2 com  $\delta$  1,6 e  $\delta$  1,2 (Espectro 21) e o sinal  $\delta$  3,6 com  $\delta$  4,1 (Espectro 22).

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 $^\circ$ , gHMQC, gHMBC, gCOSY e TOCSY 1D permitiram identificar a substância **5** como dodecanoato de 2-hidroxieta (Figura 31), inédito na literatura.

Tabela 29. Dados de RMN da substância **5** (dodecanoato de 2-hidroxieta)<sup>a, b, c</sup>.

C/H	$\delta_{\text{C}}$ , mult. <sup>b</sup>	$\delta_{\text{H}}$ , mult., J (Hz) <sup>c</sup>	gHMBC <sup>c</sup>
1	173,8 (C)	-	H-1', H-2
2	34,2 (CH <sub>2</sub> )	2,2 (t, 8)	H-3
3	24,9 (CH <sub>2</sub> )	1,6 (t, 8)	H-2
4-10	29,1-29,6 (CH <sub>2</sub> )	1,2 (m)	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11
11	22,6 (CH <sub>2</sub> )	1,2 (m)	H-9, H-10
12	14,1 (CH <sub>3</sub> )	0,8 (t, 7)	H-10, H11
1'	63,3 (CH <sub>2</sub> )	4,1 (t, 5)	H-2'
2'	61,6 (CH <sub>2</sub> )	3,6 (t)	H-1'

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as multiplicidades de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidas por experimentos de DEPT 135 $^\circ$ ; <sup>c</sup> as atribuições de sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.

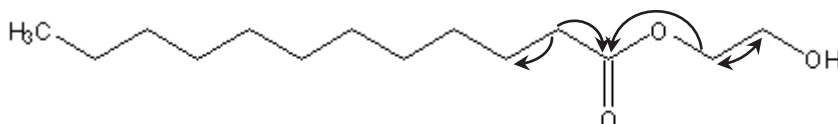


Figura 32. Algumas correlações de gHMBC da substância **5** (dodecanoato de 2-hidroxieta).

### 3.7.5. Determinação estrutural da substância **6** de *I. laurina*.

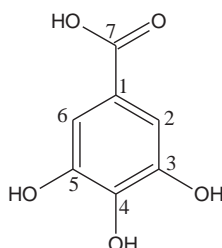


Figura 33. Estrutura molecular proposta para a substância **6** (ácido gálico).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração FAc1-2 mostrou um sinal majoritário em  $\delta$  7,1 (Espectro 25) e o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou sinais majoritários em:  $\delta$  110,4,  $\delta$  122,1,  $\delta$  139,5,  $\delta$  146,3,  $\delta$  170,6 (Espectro 26) (Tabela 30). O sinal em  $\delta$  7,1 mostrou correlação direta com o sinal em  $\delta$  110,4 no espectro gHMQC sugerindo uma estrutura molecular aromática simétrica com anel tetrasubstituído para a substância **6**. Observou-se um sinal em  $\delta$  146,3 característico de carbono aromático *orto*-diidroxilado e o sinal em  $\delta$  139,5 sugerindo um sistema aromático 3, 4, 5 trioxigenado (Espectro 26) (Tabela 30).

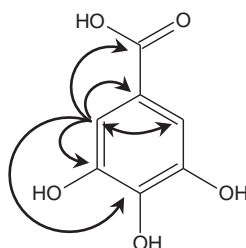


Tabela 30. Dados de RMN da substância **6** (ácido gálico) <sup>a, b</sup>.

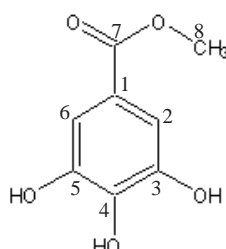
C/H	$\delta_c$ , mult. <sup>b</sup>	$\delta_H$ , mult., J (Hz) <sup>c</sup>	gHMBC <sup>c</sup>
1	122,1 (C)	-	H-2, H-6
2, 6	110,4 (CH)	7,1 (s)	H-2, H-6
3, 5	146,3 (C)	-	H-2, H-6
4	139,5 (C)	-	H-2, H-6
7	170,6 (C)	-	H-2, H-6

<sup>a</sup> Solvente: CD<sub>3</sub>OD; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as atribuições de sinais de RMN de <sup>1</sup>H obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC; <sup>c</sup> as atribuições de sinais de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.

A análise do espectro de gHMBC mostrou correlações a longa distância do sinal  $\delta$  7,1 com os sinais em  $\delta$  122,1,  $\delta$  139,5,  $\delta$  146,3 e  $\delta$  170,6 (Espectros 27-28) (Figura 34), que aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, indicaram a identificação da substância **6** como ácido gálico (Figura 33).

Figura 34. Algumas correlações de gHMBC da substância **6** (ácido gálico).

### 3.7.6. Determinação estrutural da substância **7** de *I. laurina*.

Figura 35. Estrutura molecular proposta para a substância **7** (galato de metila).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração FAc1-3-1 mostrou um sinal em  $\delta$  7,1 integrando para 2H e um sinal em  $\delta$  3,8 integrando para 3H (Espectro 29) (Tabela 31). O espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostrou sinais em:  $\delta$  52,0,  $\delta$  110,1,  $\delta$  121,4,  $\delta$  139,9, 146,4,  $\delta$  169,0 (Espectros 30-31). Os sinais em  $\delta$  52,0 e  $\delta$  110,1 mostraram correlação direta com os singletos em  $\delta$  3,8 e  $\delta$  7,1 (Espectros 33-34), respectivamente, no espectro do gHMQC sugerindo uma estrutura molecular aromática simétrica com anel tetrasubstituído para a substância **7**, similar à substância **6** (Tabela 30).

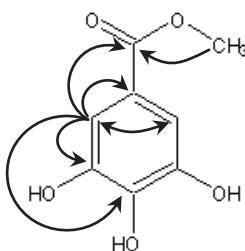


Tabela 31. Dados de RMN da substância **7** (galato de metila) <sup>a, b</sup>.

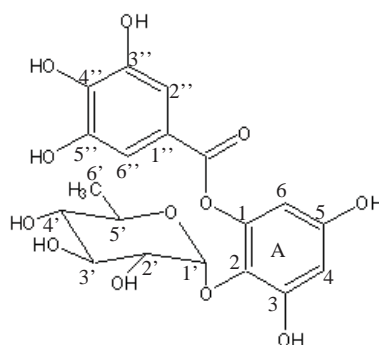
C/H	$\delta_C$ , mult. <sup>b</sup>	$\delta_H$ , mult., J (Hz) <sup>c</sup>	gHMBC <sup>c</sup>
1	121,4 (C)	-	H-2, H-6
2, 6	110,1 (CH)	7,1 (s)	H-2, H-6
3, 5	146,4 (C)	-	H-2, H-6
4	139,9 (C)	-	H-2, H-6
7	169,0 (C)	-	H-2, H-6, H-8
8	52,0 (CH <sub>3</sub> )	3,8 (s)	-

<sup>a</sup> Solvente: CD<sub>3</sub>OD; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as atribuições de sinais de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC; <sup>c</sup> as atribuições de sinais de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.

A análise do espectro de gHMBC mostrou correlação a longa distância do sinal em  $\delta$  3,8 com o carbono em  $\delta$  169,0 indicando a esterificação da função ácida (Espectro 36) (Figura 36), que aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, indicaram a identificação da substância **7** como galato de metila (Figura 35).

Figura 36. Algumas correlações de gHMBC da substância **7** (galato de metila).

### 3.7.7. Determinação estrutural da substância **8** de *I. laurina*.

Figura 37. Estrutura molecular proposta para a substância **8** (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila).

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da substância **8** mostraram sinais característicos de substâncias fenólicas. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H mostrou dois dubletos em posição meta em  $\delta$  6,2 (2Hz) e  $\delta$  6,4 (2Hz) (Espectro 39-41) que

apresentaram correlação direta verificada no experimento de *g*HMQC com sinais de carbonos metínicos em  $\delta$  99,8 e  $\delta$  94,7, respectivamente (Espectro 42-43). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou sinais de carbonos quaternários em:  $\delta$  136,3,  $\delta$  158,4,  $\delta$  163,1 e  $\delta$  165,8 (Espectro 42-43). O experimento *g*HMBC mostrou correlações do dubleto em  $\delta$  6,2 com os sinais em  $\delta$  94,7 (Espectro 53),  $\delta$  163,1 e  $\delta$  165,8, (Espectro 55) e o dubleto em  $\delta$  6,4, com os sinais em  $\delta$  99,8 (Espectro 53),  $\delta$  158,4 e  $\delta$  165,8 (Espectro 55) (31) (Figura 38), caracterizando anel aromático tetraoxigenado A.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também mostrou um singlete em  $\delta$  7,0 (Espectro 39) e o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou sinais em:  $\delta$  109,6,  $\delta$  121,9,  $\delta$  137,9,  $\delta$  146,8,  $\delta$  179,6 (Espectro 42). O sinal em  $\delta$  7,0 mostrou correlação direta com o sinal em  $\delta$  109,6 no espectro do *g*HMQC sugerindo uma estrutura molecular aromática simétrica com anel tetrasubstituído (Espectro 48). Observou-se um sinal em  $\delta$  146,8 característico de carbonos aromáticos *orto*-diidroxilados, e o sinal em  $\delta$  137,9 sugerindo um sistema aromático 3'', 4'', 5'' trioxigenado (Espectro 42). A análise do espectro de *g*HMBC mostrou correlações a longa distância do sinal  $\delta$  7,0 com os sinais em  $\delta$  109,6 e  $\delta$  121,9 (Espectro 53),  $\delta$  137,9 e  $\delta$  146,8 (Espectro 55), que aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, indicaram a identificação de uma unidade de ácido gálico (Tabela 32). O experimento *g*HMBC mostrou também a correlação a longa distância do sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,4 com a carboxila em  $\delta$  179,6, sugerindo a esterificação do ácido gálico com a hidróxide em C1 do anel A (Espectro 46, Tabela 32, Figura 38).

Observou-se ainda no espectro de  $^1\text{H}$  sinais para H hidroximetínicos, um dubleto em  $\delta$  5,3 (1Hz) característico do hidrogênio anomérico (Espectro 41), e um dubleto em  $\delta$  1,0 que, em conjunto com os sinais em ca.  $\delta$  70,  $\delta$  17,6 e  $\delta$  103,6 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , sugeriram a presença de uma unidade de ramnose (Espectro 39). A configuração  $\alpha$  do açúcar foi definida com base na constante de acoplamento do hidrogênio anomérico  $\delta$  5,3 (1Hz) (Espectro 41). A unidade de ramnose foi confirmada com base nos dados encontrados na literatura (MARKHAN et al., 1978). O experimento *g*HMBC mostrou correlação a longa distância do sinal do hidrogênio anomérico em  $\delta$  5,3 com a carbono quaternário em  $\delta$  136,3 evidenciando a ligação

éter C1'-O-C2 entre a ramnose e o anel aromático tetraoxigenado (Espectro 54, Tabela 32, Figura 38).

A verificação das correlações nos espectros gHMQC e gHMBC, bem como a análise detalhada do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $90^\circ$  e DEPT  $135^\circ$  e a comparação com os dados da literatura para sub-estruturas similares permitiram a atribuição dos sinais observados e determinação estrutural da substância **8** como galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila, inédita na literatura (Figura 37).

Tabela 32. Dados de RMN da substância **8** (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila)  
a, b, c.

C/H	$\delta_{\text{C}}$ , mult. <sup>b</sup>	$\delta_{\text{H}}$ , mult., J (Hz) <sup>c</sup>	gHMBC <sup>c</sup>
1	158,4 (C)	-	H-6
2	136,3 (C)	-	H-1'
3	163,1 (C)	-	H-4
4	99,8 (CH)	6,2 (d, 2)	H-6
5	165,8 (C)	-	H-6, H-4
6	94,7 (CH)	6,4 (d, 2)	H-4
1'	103,6 (CH)	5,3 (d, 1)	-
2'	71,8 (CH)	4,2 (dd, 1,5)	H-1', H-4'
3'	72,0 (CH)	3,8 (dd, 3,5)	H-1', H-4'
4'	73,3 (CH)	3,3 (t, 9,5)	H-2', H-3', H-6'
5'	72,1 (CH)	3,5 (dd, 6)	H-1', H-1', H-6'
6'	17,6 (CH <sub>3</sub> )	1,0 (d, 6)	H-4'
1''	121,9 (C)	-	H-2'', H-6''
2'', 6''	109,6 (CH)	7,0 (s)	H-2'', H-6''
3'', 5''	146,8 (C)	-	H-2'', H-6''
4''	137,9 (C)	-	H-2'', H-6''
7''	179,6 (C)	-	H-6

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as multiplicidades de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidas por experimentos de DEPT  $90^\circ$  e DEPT  $135^\circ$ ; <sup>c</sup> as atribuições de sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.

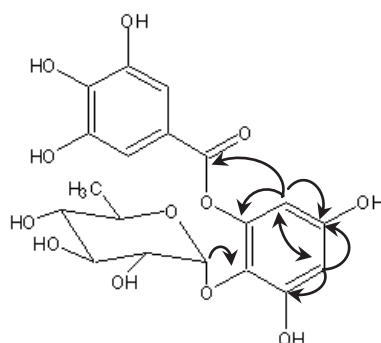


Figura 38. Algumas correlações de gHMBC da substância **8** (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila).

### 3.7.8. Determinação estrutural da substância 9 de *I. laurina*.

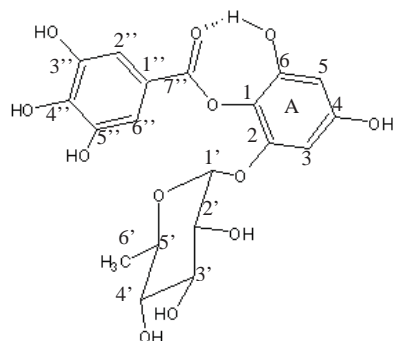


Figura 39. Estrutura molecular proposta para a substância **9** (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **9** apresentaram sinais similares aos da substância **8** (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila) com exceção das posições das hidroxilas livres, ligadas aos carbonos C6 e C4 no anel aromático tetraoxigenado A, em função das posições da glicosilação em C-2 e de esterificação com ácido gálico em C-1 do anel A (Espectros 66-70) (Tabela 33).

Adicionalmente, observou-se um sinal de hidrogênio em  $\delta$  12,7 que no experimento *g*HMBC mostrou correlação a longa distância com os carbonos  $\delta$  99,2 e  $\delta$  162,0, associado a hidroxila quelada (Espectro 80) (AGRAWALL et al., 1989) e sugerindo a ligação entre o carbono carboxílico ( $\delta$  162,0) e a hidroxila em C6 (Figura 40) confirmando a esterificação da hidroxila em C1 com a unidade de ácido gálico.

O experimento *g*HMBC mostrou ainda a correlação entre C2 e o hidrogênio anomérico H-1', evidenciando a ligação da unidade de ramnose em C2 (Tabela 33).

A verificação das correlações nos espectros *g*HMQC e *g*HMBC, bem como a análise detalhada do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e a comparação com os dados da literatura das subunidades de ácido gálico e ramnose permitiram a atribuição dos sinais observados e a determinação estrutural da substância **9** como galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (Figura 39), inédita na literatura.

Tabela 33. Dados de RMN da substância **9** (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila) <sup>a, b</sup>.

C/H	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult., J (Hz) <sup>b</sup>	gHMBC <sup>b</sup>
1	157,0 (C)	-	H-3
2	134,2 (C)	-	H-1'
3	94,2 (CH)	6,4 ( <i>d</i> , 2)	H-5
4	165,0 (C)	-	H-5, H-3
5	99,2 (CH)	6,2 ( <i>d</i> , 2)	H-3, OH-6
6	162,0 (C)	-	H-5, OH-6
1'	102,6 (CH)	5,2 ( <i>d</i> , 1,5)	-
2'	70,7 (CH)	4,0 ( <i>m</i> )	-
3'	71,1 (CH)	3,5 ( <i>m</i> )	H-1'
4'	72,0 (CH)	3,1 ( <i>m</i> )	-
5'	71,4 (CH)	3,3 ( <i>m</i> )	-
6'	18,2 (CH <sub>3</sub> )	0,8 ( <i>d</i> , 6,5)	-
1''	120,4 (C)	-	H-2'', H-6''
2'', 6''	108,6 (CH)	6,9 ( <i>s</i> )	H-2'', H-6''
3'', 5''	146,4 (C)	-	H-2'', H-6''
4''	137,0 (C)	-	H-2'', H-6''
7''	158,0 (C)	-	H-2'', H-6''

<sup>a</sup> DMSO-d<sub>6</sub>; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as atribuições de sinais de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.

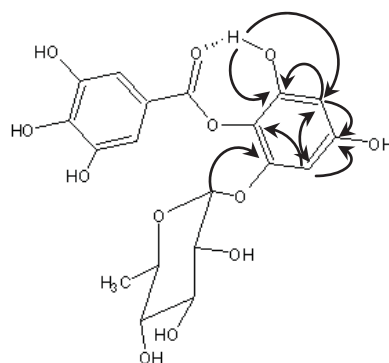


Figura 40. Algumas correlações de gHMBC da substância **9** (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila).

### 3.7.9. Determinação estrutural da substância **10** de *I. laurina*.

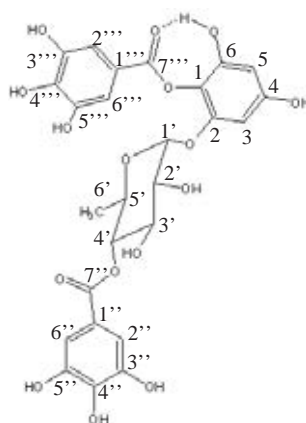


Figura 41. Estrutura molecular proposta para a substância **10**, galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **10** apresentaram sinais similares aos da substância **9**. Foram observados sinais para uma unidade de ramnose e uma unidade de ácido gálico, ambas ligadas respectivamente aos carbonos C2 e C1 do anel aromático tetraoxigenado A (Espectros 83-88) (Tabela 34). Também foi observada a ligação da hidroxila quelada em C6 ( $\delta$  12,7) com o carbono carboxílico ( $\delta$  162,0) (Espectros 83-85, Tabela 34, Figura 42).

Adicionalmente, foram observados sinais para mais uma unidade galoila nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , bem como a desproteção do sinal para H-4' da unidade de ramnose, observado em  $\delta$  5,0, diferente do valor observado na literatura ( $\delta$  3,1) (Espectro 85) (MARKHAN et al., 1978). Essa desproteção se deve à presença do substituinte galoila ligado ao carbono C-4' da ramnose, o qual tem capacidade eletroatratora e provocou a desblindagem de H-4' (Tabela 34) (Figura 42).

A correlação entre C2 ( $\delta$  135,4) e o hidrogênio anomérico ( $\delta$  5,0) evidenciou a ligação da unidade de ramnose ao anel aromático A através de C2 (Tabela 34).

A verificação das correlações nos espectros *g*HMQC e *g*HMBC, bem como a análise detalhada do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e a comparação com os dados da literatura para sub-estruturas similares permitiram a atribuição dos sinais observados e a determinação estrutural da substância **10** como galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila, inédita na literatura (Figura 41).

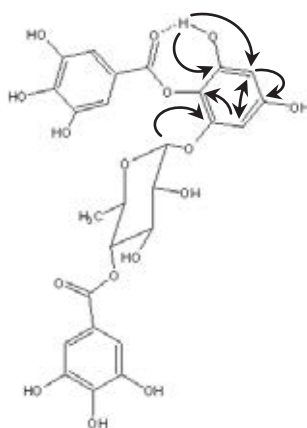


Figura 42. Algumas correlações de *g*HMBC da substância **10**, galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila.

Tabela 34. Dados de RMN da substância **10** o galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila <sup>a, b</sup>.

C/H	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult., J(Hz) <sup>b</sup>	gHMBC <sup>b</sup>
1	156,0 (C)	-	H-3
2	135,4 (C)	-	H-1'
3	93,4 (CH)	6,4 ( <i>d</i> , 2Hz)	H-5
4	163,1 (C)	-	H-5
5	98,4 (CH)	6,2 ( <i>d</i> , 2Hz)	OH-6
6	161,0 (C)	-	OH-6
1'	102,2 (CH)	5,0 ( <i>d</i> , 2Hz)	-
2'	68,8 (CH)	3,3 ( <i>m</i> )	-
3'	69,2 (CH)	3,5 ( <i>m</i> )	H-1'
4'	73,6 (CH)	5,0 ( <i>m</i> )	-
5'	67,5 (CH)	4,3 ( <i>m</i> )	H-1', H-6'
6'	16,5 (CH <sub>3</sub> )	0,9 ( <i>d</i> , 6Hz)	-
1''	120,0 (C)	-	H-2'', H-6''
2'', 6''	108,6 (CH)	6,95 ( <i>s</i> )	H-2'', H-6''
3'', 5''	145,0 (C)	-	H-2'', H-6''
4''	138,0 (C)	-	H-2'', H-6''
7''	165,0 (C)	-	H-2'', H-6''
1'''	120,0 (C)	-	H-2''', H-6'''
2''', 6'''	107,6 (CH)	6,9 ( <i>s</i> )	H-2''', H-6'''
3''', 5'''	145,0 (C)	-	H-2''', H-6'''
4'''	137,0 (C)	-	H-2''', H-6'''
7'''	157,0 (C)	-	H-2''', H-6'''

<sup>a</sup> DMSO-d<sub>6</sub>; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as atribuições de sinais de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.

### 3.7.10. Determinação estrutural da substância **11** de *I. laurina*.

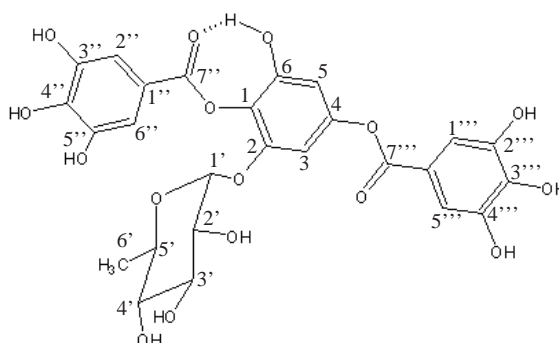


Figura 43. Estrutura molecular proposta para a substância **11** galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da subfração FAc1-5-9 apresentaram similares aos da substância **10**. Foram observados sinais de uma unidade de ramnose e uma unidade de ácido gálico, ligadas respectivamente aos carbonos C2 e C1 do anel aromático tetraoxigenado A (Espectros 97-100) (Tabela 35). Também foi observada

a ligação da hidroxila quelada em C6 ( $\delta$  12,7) com o carbono carboxílico ( $\delta$  162,0) (Espectro 100) (Tabela 35) (Figura 44).

Além destes, foram observados sinais para uma unidade de ácido gálico adicional nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo o sinal em  $\delta$  165,0, associado ao carbono carboxílico C7'''.

O espectro de gHMBC mostrou também a correlação a longa distância do sinal de hidrogênio H-5 ( $\delta$  6,2) com a carboxila C7''' ( $\delta$  165,0) na hidroxila em C-4 do anel A, evidenciando a esterificação da unidade de ácido gálico adicional (Espectro 109) (Tabela 35) (Figura 44).

A verificação das correlações nos espectros gHMQC e gHMBC, bem como a análise detalhada dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e a comparação com os dados da literatura das subunidades de ácido gálico e ramnose permitiram a atribuição dos sinais observados e a determinação estrutural da substância **11** como galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila, inédita na literatura (Figura 43).

Tabela 35. Dados de RMN da substância **11** (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila) <sup>a, b</sup>.

C/H	$\delta_{\text{C}}$ , mult.	$\delta_{\text{H}}$ , mult., J(Hz) <sup>b</sup>	gHMBC <sup>b</sup>
1	135,3 (C)	-	H-1'
2	156,0 (C)	-	H-3
3	161,2 (C)	-	OH-6
4	98,3 (CH)	6,2 ( <i>d</i> , 2Hz)	OH-6
5	164,0 (C)	-	H-5
6	93,4 (CH)	6,4 ( <i>d</i> , 2Hz)	H-5
1'	98,2 (CH)	5,5 ( <i>d</i> , 1,5Hz)	-
2'	71,8 (CH)	3,3 ( <i>m</i> )	-
3'	68,4 (CH)	3,8 ( <i>m</i> )	H-1'
4'	69,6 (CH)	3,7 ( <i>m</i> )	-
5'	70,6 (CH)	3,3 ( <i>m</i> )	H-1', H-6'
6'	17,5 (CH <sub>3</sub> )	0,9 ( <i>d</i> , 6Hz)	-
1''	119,0 (C)	-	H-2'', H-6''
2'', 6''	107,9 (CH)	6,9 ( <i>s</i> )	H-2'', H-6''
3'', 5''	145,0 (C)	-	H-2'', H-6''
4''	136,5 (C)	-	H-2'', H-6''
7''	177,4 (C)	-	H-2'', H-6''
1'''	119,0 (C)	-	H-2''', H-6'''
2''', 6'''	108,6 (CH)	6,95 ( <i>s</i> )	H-2''', H-6'''
3''', 5'''	145,5 (C)	-	H-2''', H-6'''
4'''	138,5 (C)	-	H-2''', H-6'''
7'''	165,0 (C)	-	H-2''', H-6'''

<sup>a</sup> DMSO-d<sub>6</sub>; RMN em 11.7 T; <sup>b</sup> as atribuições de sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidas por experimentos de gHMQC e gHMBC.



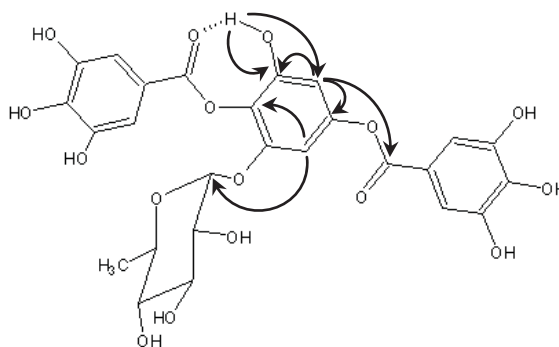


Figura 44. Algumas correlações de gHMBC da substância **11** (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila).

### 3.8. Resultados de bioatividades.

#### 3.8.1. Avaliação da atividade antifúngica de patógenos humano das substâncias 1-4.

As substâncias purificadas **1-4** foram avaliadas por suas propriedades antifúngicas frente às linhagens de fungos patogênicos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. As saponinas **3** e **4** mostraram-se moderadamente ativas (CIM 100,0 mg/mL), enquanto a substância **1** se mostrou fracamente ativa (CIM 200,0 mg/mL) e **2** foi inativa frente aos fungos patogênicos (MARQUI et al., 2008).

#### 3.8.2. Avaliação antifúngica para fitopatógenos.

As substâncias **1-4** foram também avaliadas por bioautografia frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As substâncias **1**, **3** e **4** mostraram-se moderadamente ativas, com halos de inibição de 11, 12 e 15 mm respectivamente, enquanto **2** mostrou-se inativa, confirmando a tendência observada anteriormente da atividade antifúngica do ácido oleanólico e seus derivados (MARQUI et al., 2008).

#### 3.8.3. Resultado do ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres.

Nos ensaios colorimétricos com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) para detecção de atividade antioxidante, foram testadas as substâncias inéditas **8**, **9**, **10** e **11** de *I.*

*laurina*. Foi observado que as substâncias **8** e **11** apresentaram potencial seqüestrador de radicais livres comparadas com o padrão utilizado rutina. Já as substâncias **9** e **10** apresentaram moderada atividade perante o seqüestro de DPPH, conforme observado no gráfico que relaciona a concentração das substâncias com a porcentagem da variação da absorbância (Figura 45). A atividade das substâncias estão relacionadas com a presença do ácido gálico que possuem substituintes 3, 4, 5-triidroxílicos, potencializando a atividade das substâncias fenólicas.

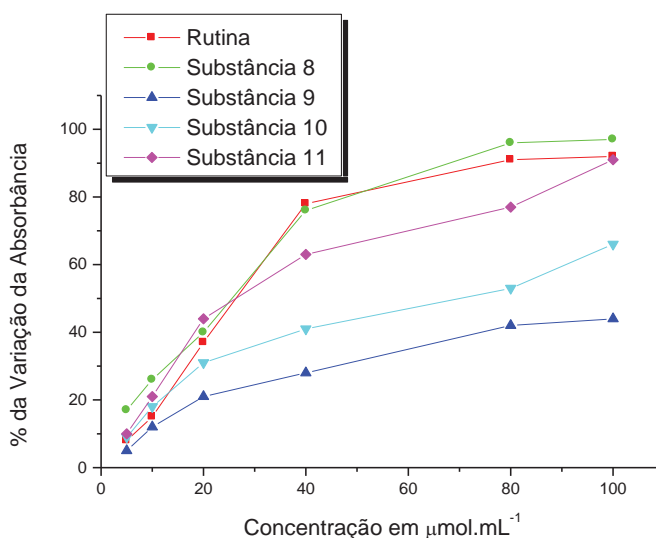


Figura 45. Potencial atividade sequestradora de radicais livres das substâncias **8**, **9**, **10** e **11** de *I. laurina*.

#### 3.8.4. Resultado do ensaio colorimétrico com ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres.

No ensaio colorimétrico com 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) para detecção de atividade antioxidante, foram testadas as substâncias **8**, **9**, **10** e **11** de *I. laurina*. Foi observado que as substâncias **8** e **11** apresentaram potencial atividade, reagindo com maior intensidade com radical ABTS comparado com o padrão utilizado rutina. Já as substâncias **9** e **10** apresentaram moderada atividade comparado com o padrão, reagindo com menor intensidade com o radical ABTS (Figura 43). A atividade das substâncias está relacionada com a presença de substituintes hidroxílicos, potencializando a atividade das substâncias fenólicas.

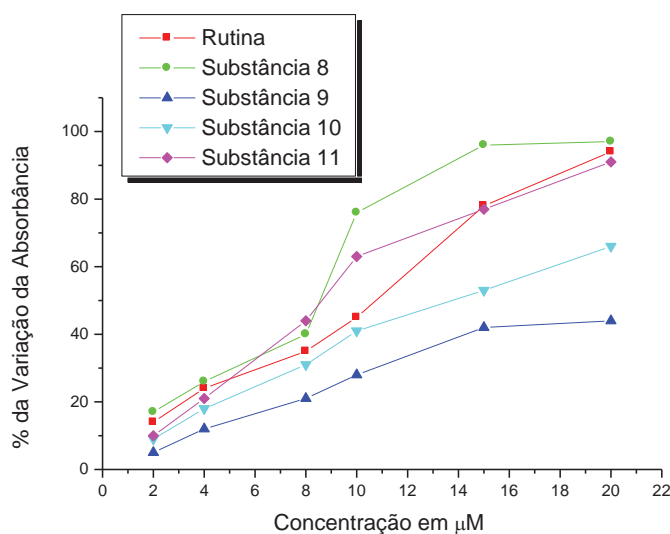


Figura 46. Potencial atividade sequestradora de radicais livres das substâncias **8**, **9**, **10** e **11** de *I. laurina*.

### 3.9. Quantificação das substâncias 6-11 de *I. laurina*

Em vista dos resultados de bioatividade atrativos, considerou-se importante quantificar as substâncias fenólicas presentes no extrato de *I. laurina*, visando contribuir para sua possível aplicação. Pesou  $7 \times 10^{-1}$  mg de FAc em balança analítica, dissolveu em 1,0 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 e filtrou-se em membrana de filtração de solventes (Nylon, 47 mm de diâmetro; 0,45 µm, Marca: Sigma-Aldrich e *vial* com tampa de rosca e septo (2,0 mL).

#### 3.9.1. Preparação dos padrões.

Os padrões galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila (**8**), galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**9**), galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**10**) e galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila (**11**), ácido gálico (**6**) e galato de metila (**7**) foram preparados por diluição a partir de uma solução estoque. Foi utilizado desta forma o padrão externo.

Foi pesado 1mg de cada substância padrão em balança analítica e dissolvida em 1,0 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45. Foi utilizada membrana para filtração e *vial* com tampa de rosca e septo de 2,0 mL. Através dessas soluções preparou as soluções estoque.

Partindo das soluções estoques foram realizadas 6 diluições sucessivas, chamadas soluções de trabalho com o auxílio de balões volumétricos de 10 mL e 5 mL (Figura 44).

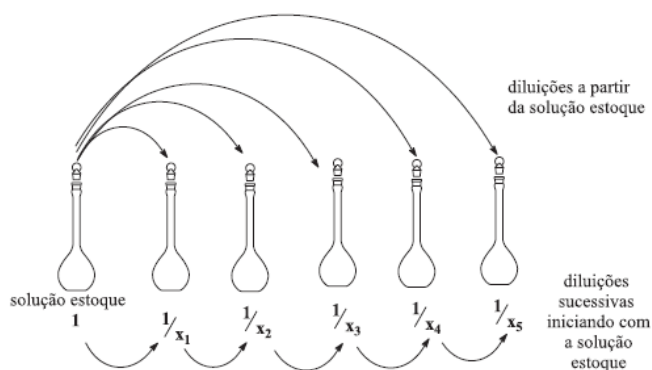


Figura 47. Preparação das soluções de trabalho partindo da solução estoque.

A fração FAc foi submetida a CLAE analítico monitorando em  $\lambda$  254 nm, utilizando coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (25 cm x 4,6 mmd x 5  $\mu$ m) eluída com diversos gradientes e isocráticos para observação do perfil cromatográfico. A melhor resolução cromatográfica foi obtida com sistema de gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 (20 min), seguido de sistema isocrático H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 por 30 min, com fluxo de 1 mL/min. Dessa forma foi estabelecida a condição cromatográfica para a quantificação (Figura 45).

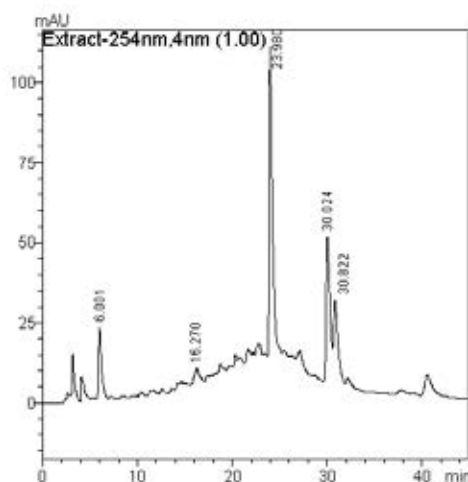


Figura 48. Cromatograma obtido em modo CLAE analítico da FAc. Amostra (20  $\mu$ L) aplicada em coluna analítica “Luna” Phenomenex LC-18, gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 (20 min), seguido de modo isocrático H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 por 30 min, com fluxo de 1 mL/min,  $\lambda$  254 nm.

### 3.9.2. Substância 6 (ácido gálico).

Foi pesado 1 mg da fração contendo o ácido gálico, dissolveu em 1,0 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 e filtrou em micro-membrana. Uma alíquota (271 µL) desta solução foi separada com o auxílio de uma micropipeta e transferido para um balão volumétrico (5,0 mL). Completou-se o volume do balão com H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45, fornecendo a solução estoque ( $3,2 \times 10^{-4}$  mM).

Partindo da solução estoque foram preparadas 6 diluições, soluções trabalho (Tabela 36), resultando em soluções com 7 concentrações distintas.

Tabela 36. Preparo da solução estoque e soluções trabalho do ácido gálico 6.

	<b>Solução estoque (µL)</b>	<b>Solvente (µL)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
Solução estoque	-	4729	$5,42 \times 10^{-2}$
Solução 2	856	144	$4,64 \times 10^{-2}$
Solução 3	715	285	$3,88 \times 10^{-2}$
Solução 4	570	430	$3,09 \times 10^{-2}$
Solução 5	429	571	$2,33 \times 10^{-2}$
Solução 6	286	714	$1,55 \times 10^{-2}$
Solução 7	142	858	$7,75 \times 10^{-3}$

### 3.9.3. Substância 7 (galato de metila).

Foi pesado 10,2 mg da fração contendo o galato de metila, dissolveu em 5,0 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 e filtrou em micro-membrana, fornecendo a solução estoque ( $1,1 \times 10^{-2}$  mM).

Partindo da solução estoque foram preparada 6 diluições, soluções trabalho (Tabela 37), resultando em soluções com 7 concentrações distintas.

Tabela 37. Preparo da solução estoque e soluções trabalho do galato de metila 7.

	<b>Solução estoque (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Solvente (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
Solução estoque	-	5.000	$2,05 \times 10^{-1}$
Solução 2	857	143	$1,76 \times 10^{-1}$
Solução 3	714	286	$1,46 \times 10^{-1}$
Solução 4	572	428	$1,17 \times 10^{-1}$
Solução 5	428	572	$8,78 \times 10^{-2}$
Solução 6	285	715	$5,85 \times 10^{-2}$
Solução 7	143	857	$2,92 \times 10^{-2}$

3.9.4. Substância 8 (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila) e substância 9 (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila).

Através de análises em CLAE utilizando coluna C-18 em vários sistemas de eluição (gradiente e isocrático), pode-se observar que as substâncias 8 e 9 apresentavam tempos de retenção muito próximos. Dessa forma, para minimizar erros, essas foram quantificadas em mistura (Figura 45).

Foi pesado 1 mg da fração contendo as duas substâncias (8 e 9), dissolveu em 1 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 e filtrou em micro-membrana. Uma alíquota (792  $\mu\text{L}$ ) desta solução foi separada com o auxílio de uma micropipeta e colada em balão volumétrico (5,0 mL). Completou-se o volume do balão com H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45, fornecendo a solução estoque ( $1,8 \times 10^{-4}$  mM).

Partindo da solução estoque foram preparadas 6 diluições, soluções trabalho (Tabela 38), resultando em soluções com 7 concentrações distintas.

Tabela 38. Preparo da solução estoque e soluções trabalho das substâncias 8 e 9.

	<b>Solução estoque (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Solvente (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
Solução estoque	-	4208	$1,58 \times 10^{-1}$
Solução 2	855	145	$1,35 \times 10^{-1}$
Solução 3	717	283	$1,13 \times 10^{-1}$
Solução 4	572	428	$9,06 \times 10^{-2}$
Solução 5	428	572	$6,78 \times 10^{-2}$
Solução 6	285	715	$4,52 \times 10^{-2}$
Solução 7	143	857	$2,26 \times 10^{-2}$

3.9.5. Substância 10 galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila) e substância 11 (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-4,6-hidroxifenila).

Através de análises em CLAE utilizando coluna C-18 em vários sistemas de eluições (gradiente e isocrático), pode-se observar que as substâncias **10** e **11** apresentavam tempos de retenção muito próximos. Dessa forma, para minimizar erros, essas foram quantificadas em mistura (Figura 45).

Foi pesado 3 mg da fração contendo as duas substâncias **10** e **11**, dissolveu em 3 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45 e filtrou em micro-membrana. Uma alíquota (2,5 mL) desta solução foi separada com o auxílio de uma micropipeta e colocada em balão volumétrico (5 mL). Completou-se o volume do balão com H<sub>2</sub>O:MeOH 55:45, fornecendo a solução estoque ( $4,2 \times 10^{-4}$  mM).

Partindo da solução estoque foram preparadas 6 diluições, soluções trabalho (Tabela 39), resultando em soluções com 7 concentrações distintas.

Tabela 39. Preparo da solução estoque e soluções trabalho das substâncias **10** e **11**.

	<b>Solução estoque</b> ( $\mu\text{L}$ )	<b>Solvente</b> ( $\mu\text{L}$ )	<b>Concentração</b> (mg/mL)
Solução estoque	-	2500	$5,00 \times 10^{-1}$
Solução 2	857	143	$4,30 \times 10^{-1}$
Solução 3	715	285	$3,59 \times 10^{-1}$
Solução 4	571	429	$2,86 \times 10^{-1}$
Solução 5	424	576	$2,13 \times 10^{-1}$
Solução 6	285	715	$1,43 \times 10^{-1}$
Solução 7	143	857	$7,17 \times 10^{-2}$

3.9.6. Preparo das soluções padrões para injeção em CLAE.

Cada solução estoque (200  $\mu\text{L}$ ) (Tabelas 36, 37, 38 e 39) foi transferida com micropipeta para um *vial* de 2,0 mL, obtendo assim uma mistura com as 6 substâncias padrão, denominada Padrões 1. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções de 2-7, conforme a Tabela 40 abaixo.

Tabela 40. Preparo das soluções padrões utilizando as soluções estoque e soluções trabalho.

	<b>Substâncias 8 e 9 (mg/mL)</b>	<b>Substâncias 10 e 11 (mg/mL)</b>	<b>Substância 6 (mg/mL)</b>	<b>Substância 7 (mg/mL)</b>
Padrões 1	$5,42 \times 10^{-2}$	$2,05 \times 10^{-1}$	$1,58 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-1}$
Padrões 2	$4,64 \times 10^{-2}$	$1,76 \times 10^{-1}$	$1,35 \times 10^{-1}$	$4,30 \times 10^{-1}$
Padrões 3	$3,88 \times 10^{-2}$	$1,46 \times 10^{-1}$	$1,13 \times 10^{-1}$	$3,59 \times 10^{-1}$
Padrões 4	$3,09 \times 10^{-2}$	$1,17 \times 10^{-1}$	$9,06 \times 10^{-2}$	$2,86 \times 10^{-1}$
Padrões 5	$2,33 \times 10^{-2}$	$8,78 \times 10^{-2}$	$6,78 \times 10^{-2}$	$2,13 \times 10^{-1}$
Padrões 6	$1,55 \times 10^{-2}$	$5,85 \times 10^{-2}$	$4,52 \times 10^{-2}$	$1,43 \times 10^{-1}$
Padrões 7	$7,75 \times 10^{-3}$	$2,92 \times 10^{-2}$	$2,26 \times 10^{-2}$	$7,17 \times 10^{-2}$

### 3.9.7. Gráfico de calibração.

O método de calibração utilizado foi o padrão externo utilizando as substâncias **6-11**. Os sete padrões e a fração FAc foram analisados em cromatograma obtido via CLAE analítico em triplicatas, utilizando coluna analítica “Luna” Phenomenex LC-18, em modo gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 até H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 (20 min), seguido de modo isocrático de H<sub>2</sub>O/MeOH 55:45 por 30 min, com fluxo de 1 mL/min, detecção em  $\lambda$  254 nm e volume de injeção 20  $\mu$ L. Em seguida, foram construídas curvas de resposta com os valores médios das relações de área das substâncias no eixo das ordenadas e os respectivos valores de concentrações no eixo das abscissas.

### 3.9.8. Resultados obtidos para o ácido gálico (7).

Como pode ser observada na Figura 46, a curva analítica para o ácido gálico apresentou boa linearidade no intervalo de concentração utilizado (0,01 à 0,06 mg/mL). O valor do coeficiente de correlação (R)<sup>2</sup> obtido foi de 0,992 e está de acordo com o critério mínimo aceitável pela ANVISA que deve ser maior que 0,990.



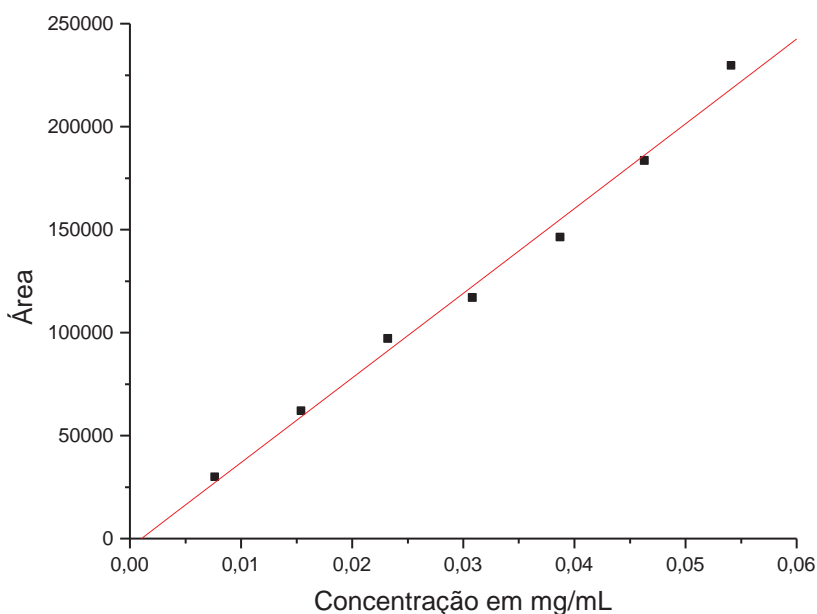


Figura 49. Curva analítica para o ácido gálico.

A partir dos parâmetros analíticos obtidos das curvas de calibração foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pelo método IUPAC (Tabela 41). A sensibilidade do método obtida foi de  $9,6 \times 10^5$  que corresponde ao coeficiente angular da reta (inclinação da curva) (RIBANI et al., 2004).

Tabela 41. Dados de calibração para o ácido gálico.

Composto	Equação da reta $y = ax + b$	Coefficiente de correlação ( $R^2$ )	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)	DP
Ácido gálico	$y = 963.313,28x + 14.384,16$	0,992	$3,27 \times 10^{-3}$	$1,09 \times 10^{-2}$	4500,44

A área de absorção no UV do ácido gálico presente na fração acetato de etila (Figura 45) foi de 141.783,0. Comparando com os dados obtidos na curva analítica dos padrões pode-se observar a presença de 0,035 mg/mL de ácido gálico para cada 0,7 mg/mL de fração FAc que equivale a 5%.

### 3.9.9. Resultados obtidos para galato de metila (7).

Como pode ser observada na Figura 47, a curva analítica para o galato de metila apresentou boa linearidade no intervalo de concentração utilizado (0,03 à 0,21

mg/mL). O valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,994 e está de acordo com o critério mínimo aceitável pela ANVISA que deve ser maior que 0,990.

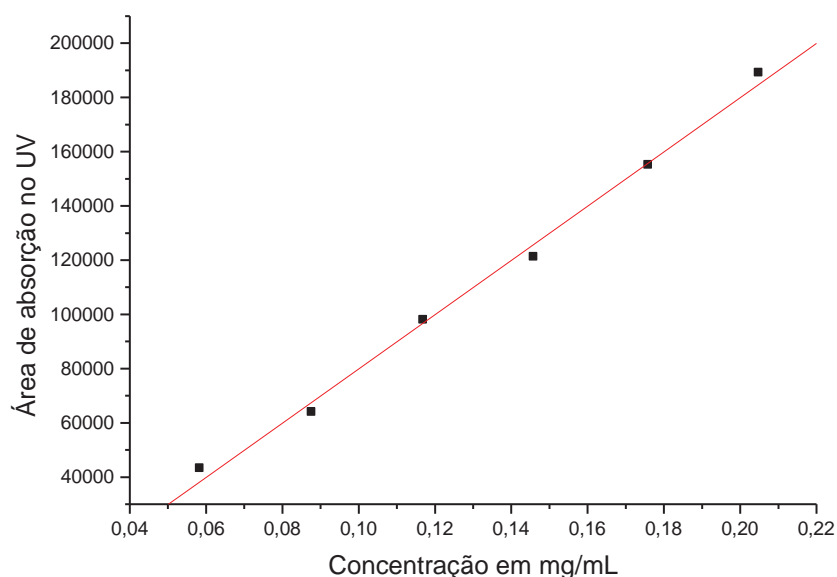


Figura 50. Curva analítica para o galato de metila.

A partir dos parâmetros analíticos obtidos das curvas de calibração foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pelo método IUPAC (Tabela 42). A sensibilidade do método obtida foi de  $10 \times 10^5$  que corresponde ao coeficiente angular da reta (inclinação da curva) (RIBANI et al., 2004).

Tabela 42. Dados de calibração do galato de metila.

Composto	Equação da reta $y = ax + b$	Coeficiente de correlação ( $R^2$ )	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)	DP
Galato de metila	$y = 999970,55x + 20108,94$	0,995	0,045	0,15	14.533,01

A área de absorção no UV do galato de metila presente na fração acetato de etila (Figura 45) foi de 112.473,63. Comparando com os dados obtidos na curva analítica dos padrões pode-se observar a presença de 0,131 mg/mL de galato de metila para cada 0,7 mg/mL de fração FAc que equivale a 18,7%.

3.9.10. Substância 8 (galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila) e substância 9 (galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila).

Como pode ser observada na Figura 48, a curva analítica para as substâncias 8 e 9 apresentaram boa linearidade no intervalo de concentração utilizado (0,02 à 0,16 mg/mL). O valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,994 e está de acordo com o critério mínimo aceitável pela ANVISA que deve ser maior que 0,990.

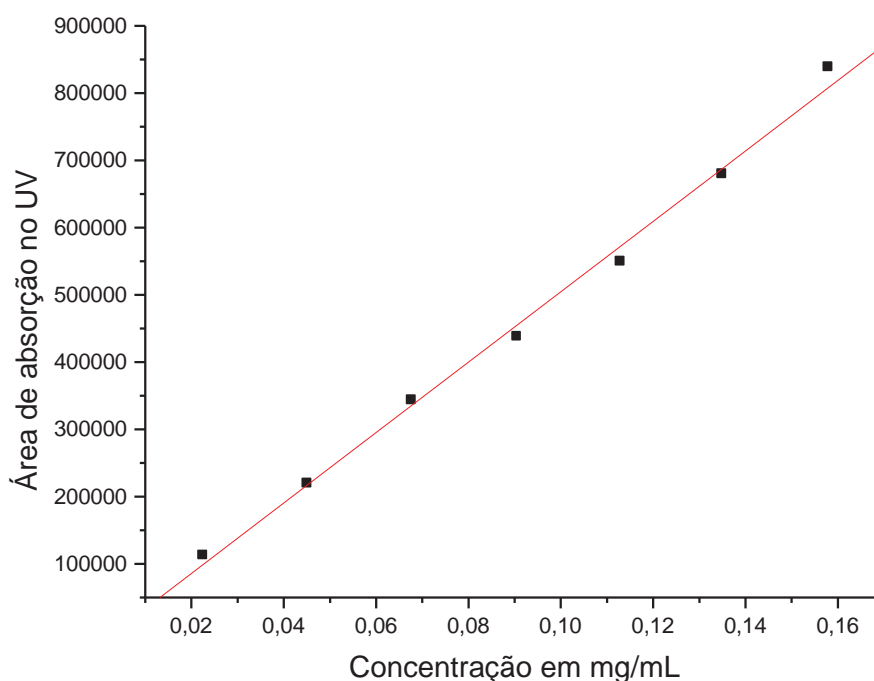


Figura 51. Curva analítica para as substâncias 8 e 9.

A partir dos parâmetros analíticos obtidos das curvas de calibração foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pelo método IUPAC (Tabela 43). A sensibilidade do método obtida foi de  $5,2 \times 10^6$  que corresponde ao coeficiente angular da reta (inclinação da curva) (RIBANI et al., 2004).

Tabela 43. Dados de calibração para as substâncias 8 e 9.

Compostos	Equação da reta $y = ax + b$	Coeficiente de correlação ( $R^2$ )	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)	DP
Substâncias 8 e 9	$y = 5.234.447,0x + 18.893,8$	0,994	0,01	0,04	19.471,8

A área de absorção no UV das substâncias **8** e **9** presente na fração acetato de etila (Figura 45) foi de 878.408,2. Comparando com os dados obtidos na curva analítica dos padrões pode-se observar a presença de 0,171 mg/mL das substâncias **8** e **9** para cada 0,7 mg/mL da fração FAc que equivale a 24,3%.

3.9.11. Substâncias **10** [galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila] e substância **11** (galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila).

Como pode ser observada na Figura 49, a curva analítica das substâncias **11** e **12** apresentaram boa linearidade no intervalo de concentração utilizado (0,1 à 0,6 mg/mL). O valor do coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,991 e está de acordo com o critério mínimo aceitável pela ANVISA que deve ser maior que 0,990.

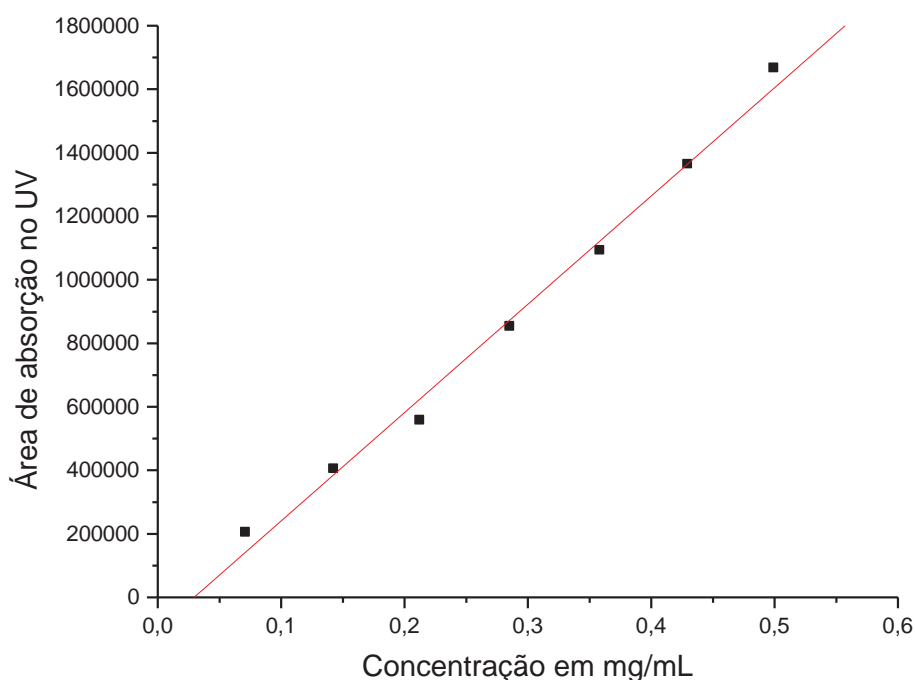


Figura 52: Curva analítica para as substâncias **10** e **11**.

A partir dos parâmetros analíticos obtidos das curvas de calibração foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pelo método IUPAC (Tabela 44). A sensibilidade do método obtida foi de  $3,4 \times 10^6$  que corresponde ao coeficiente angular da reta (inclinação da curva) (RIBANI et al., 2004).

Tabela 44: Dados de calibração das substâncias 11 e 12.

Compostos	Equação da reta $y = ax + b$	Coefficiente de correlação (R) <sup>2</sup>	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)	DP
Substâncias 10 e 11	$y = 3.410.900,0x + 100.491,6$	0,991	0,09	0,3	101.824,1

A área de absorção no UV das substâncias 11 e 12 presente na fração FAc (Figura 45) foi de 629.357,0. Comparando com os dados obtidos na curva analítica dos padrões pode-se observar a presença de 0,21 mg/mL das substâncias 10 e 11 para cada 0,7 mg/mL de fração FAc que equivale a 30%.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação de bioatividade dos extratos brutos das folhas de *Swartzia langsdorffii* e das espécies *Inga laurina*, *I. edulis* e *I. marginata*, bem como de suas fases de partição orientou a seleção das frações bioativas para investigação fitoquímica detalhada na busca por substâncias antifúngicas e antioxidantes. Adicionalmente, as fases de partição (FH, FAc, FB e FHa) obtidas das espécies *I. edulis*, *I. laurina* e *S. langsdorffii* apresentaram resultado positivo na avaliação do potencial inibidor para formigas cortadeiras, o que sugere a presença de substâncias com atividade inseticida nestas frações.

Essas frações e extratos, bem como amostras adicionais, obtidas dos frutos de *S. langsdorffii*, foram também avaliadas quanto ao seu potencial inibitório frente ao nematodo *Meloidogyne incognita*, importante praga que infesta culturas de milho, café, soja, tomate, dentre outras. A fração hidroalcoólica (FHa) de *I. laurina*, a fração acetato de etila (FAc) de *S. langsdorffii*, a fração hidroalcoólica (FHa) da casca do fruto de *S. langsdorffii* e a fração acetato de etila (FAc) da semente do fruto de *S. langsdorffii* mostraram-se nematoestáticas, sendo uma fonte potencial de substâncias para o controle desta praga agrícola, que afeta culturas importantes economicamente.

A atividade inibidora de formação de hemozoína, indicativa de atividade antimalárica, foi também avaliada, destacando-se a fase hexânica (FH) de *S. langsdorffii*, as fases hexânica (FH), acetato de etila (FAc) e butanólica (FB) de *I. laurina*, e a fase hexânica (FH) de *I. edulis*, como fontes promissoras de substâncias

com potencial antimalárico por terem apresentado atividade inibidora de formação de hemozoína maior que as substâncias padrão quinina ou cloroquina.

As frações e extratos obtidos das espécies em estudo foram ainda avaliados por seu potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase (AChE), alvo importante na busca por agentes terapêuticos para tratamento da Doença de Alzheimer. O extrato bruto (EB), e a fase hexânica (FH) de *I. marginata*, bem como a fase hexânica (FH) de *S. langsdorffii* apresentaram atividade inibitória de AChE no ensaio de bioautografia em CCD, representando fontes potenciais de substâncias para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para DA.

O estudo fitoquímico da espécie *S. langsdorffii* forneceu os triterpenos pentacíclicos lupeol (**1**) e o ácido oleanólico (**2**) da fase hexânica, enquanto as fases acetato de etila e hidroalcoólica forneceram as saponinas ácido 3-O- $\beta$ -glicopiranosil-(1  $\rightarrow$  2) - $\beta$ -D-glicopiranosil-oleanólico (**3**) e 3-O- $\beta$ -D-(6'-metil)glicopiranosil-28-O- $\beta$ -D-glicopiranosiloleanólico (**4**), inédito na literatura.

As substâncias **1-4** foram avaliadas por suas propriedades antifúngicas em testes de microdiluição e leitura espectrofotométrica. As saponinas **3** e **4** mostraram-se moderadamente ativas, enquanto a substância **1** mostrou-se fracamente ativa e **2** foi inativa frente aos fungos patogênicos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. As substâncias **1-4** foram também avaliadas por bioautografia frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As substâncias **1**, **3** e **4** mostraram-se moderadamente ativas, enquanto **2** mostrou-se inativa, confirmando a tendência observada na literatura de atividade antifúngica do ácido oleanólico e seus derivados. A descoberta de novos antifúngicos tem alta relevância para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, em vista do alto índice de infecções fúngicas oportunistas e o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos em uso clínico, o que justifica o esforço continuado na busca de agentes antifúngicos de fontes naturais.

A avaliação preliminar de atividade antioxidante por teste em CCD revelada com solução de  $\beta$ -caroteno das espécies de *Inga* utilizadas neste trabalho orientou a escolha do extrato bruto e fases de partição de *Inga laurina* para estudo fitoquímico. A fração hexânica forneceu a substância **5**, com estrutura alifática esterificada inédita na literatura, determinada como dodecanoato de 2-hidroxietila. Sua presença foi detectada em diversas sub-frações, sendo constituinte majoritário da fração

hexânica. Da fração acetato de etila foram obtidas as substâncias **6** e **7**, identificadas como ácido gálico e galato de metila, respectivamente, além de quatro derivados de ácido gálico glicosilados inéditos na literatura (**8** - **11**). As substâncias **8**, **9**, **10** e **11** foram purificadas por CLAE em fase reversa e submetidas a análise extensiva por RMN uni e bidimensional, bem como EM, que possibilitaram sua determinação estrutural como galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila (**8**), galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**9**), galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**10**) e galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila (**11**). As substâncias **8** e **9** são isoméricas, diferindo apenas na posição de esterificação e glicosilação do anel fenólico tetraoxigenado central. As substâncias **10** e **11** são também isoméricas, diferindo do par **8/9** pela presença de uma unidade galoíla adicional. As substâncias **6-11** mostraram destacada atividade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH e ABTS.

A quantificação das substâncias **6-11** através da obtenção das curvas analíticas por CLAE evidenciou a presença de teores significativos na fração FAc, da qual foram isoladas, com 5% de ácido gálico (**6**) e 18,7% do galato de metila (**7**). Os pares isoméricos **8/9** e **10/11** foram quantificados em conjunto, sendo observada a presença de 24,3% das substâncias **8** e **9** na fração FAc, e 30% das substâncias **10** e **11** na fração FAc. Desta forma podemos concluir que a espécie *I. laurina*, em especial a fração FAc do extrato etanólico, é uma fonte atrativa de substâncias com potencial atividade antioxidante, merecendo investigação adicional de outras propriedades biológicas associadas ao estresse oxidativo para possível aplicação no desenvolvimento de agentes terapêuticos.

De maneira global, os dados obtidos neste trabalho corroboram a importância de estudos de bioprospecção envolvendo técnicas modernas, contribuindo para a exploração racional da biodiversidade brasileira.

## REFERÊNCIAS

ABEDL-KADER, M. S.; BAHLER, B. D.; MALONE, S.; WERKHOVEN, M. C. M.; WISSE, J. H.; NEDMANN, K. M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive saponins from *Swartzia schomburgkii* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1461-1464, 2000.

AGRAWALL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989. 564 p.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUÑOZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 271-275, 2000.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERTUCCI, A.; HARETCHE, F.; OLIVARO, C.; VÁZQUEZ, A. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 21-25, 2008.

BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

BORING, C. C.; SQUIRES, T. S.; TONG, T. Cancer statistics, CA. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 44, p. 7-26, 1994.



CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, p. 5-23, 2003.

CALIXTO, J. B. Biopirataria: a diversidade biológica na mira da indústria farmacêutica. **Ciência Hoje**, v. 28, n. 167, p. 36-43, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 50-62, 1999.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JÚNIOR, M.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908. **Antonie van Leeuwenhoek: International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 71, p. 243-248, 1997.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHUANG, S. E.; KUO, M. L.; HSU, C. H.; CHEN, C. R.; LIN, J. K.; LAI, G. M.; HSIEH, C. Y.; CHENG, A. L. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 2, p. 331-335, 2000.

CUENDET, M.; OTEHAM, C. P.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 460-463, 2006.

DAVIS, D. L.; DINSE, G. E.; HOEL, D. G. Decreasing cardiovascular-disease and increasing cancer among whites in the United-States from 1973 through 1987 - good news and bad news. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 431-437, 1994.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 6, p. 11-14, 2004.

DEWICK, P. M. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. v. 1, cap. 2, p. 7-10.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p.

DUBOIS, J. L.; SNEDEN, A. T. Dihydrolicoisoflavone, a new isoflavone from *Swartzia polyphylla*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 4, p. 629-632, 1995.

DUBOIS, J. L.; SNEDEN, A. T. Ferreirinol, a new 3-hydroxyisoflavone from *Swartzia polyphylla*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 9, p. 902-903, 1996.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 79-106, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, v. 13, p. 265-273, 1996.

GRAYER, R. J.; HARBORNE, J. B. A survey of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v. 37, p. 19-42, 1994.

GROSVENOR, P. W.; GRAY, D. O. Colutequinone and colutehydroquinone, antifungal isoflavonoids from *Colutea arborescen*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 377-380, 1996.

HASLER, C. M. A new look at an ancient concept. **Chemistry Industry**, n. 2, p. 84-89, 1998.

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 237-241, 1997.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography A: Including Electrophoresis, Mass Spectrometry and other Separation and Detection Methods**, v. 51, p. 327-329, 1970.

HOSAMANI, K. M. A minor source of vernolic, malvalic and sterculic acids in *Pithecolobium dulce* (syn. *Inga dulcis*) seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 4, p. 489-492, 1995.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é o câncer?** Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322)>. Acesso em: 13 jan. 2010a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que causa o câncer?** Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322)>. Acesso em: 13 jan. 2010b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Como é o processo de carcinogênese?** Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=319](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319)>. Acesso em: 13 jan. 2010c.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p. 632-637, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 576 p.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 467-471, 2000.

LOKVAM, J.; KURSAR, T. A. Divergence in structure and activity of phenolic defenses in young leaves of two co-occurring *Inga* species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 1109-1115, 2005.

LOKVAM, J.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LEE, J. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Allelochemic function for a primary metabolite: the case of L-tyrosine hyperproduction in *Inga umbellifera* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 93 n. 8, p. 1109-1115, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 352 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 384 p.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SANTOS, C. C.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, L. A. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 713-718, 2003.

MANSANO, V. F.; TOZZI, A. M. G. A. Distribuição geográfica, ambiente preferencial e centros de diversidade dos membros da tribo Swartzieae na região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 249-257, 1999.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. C-13 NMR studies of flavonoids III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, n. 9, p. 1389-1397, 1978.

MARQUI, S. R.; LEMOS, R. B.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; YOUNG, M. C. M.; TORRES, L. M. B. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 828-831, 2008.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MORENO, P. R. H.; AGRIPINO, D. G.; LIMA, M. E. L.; SILVA, M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest - Ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2004.

MYHRSTAD, M. C. W.; CARLSEN, H.; NORDSTROM, O.; BLOMHO, R.; MOSKAUG, J. O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the c-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 386-393, 2002.

NIELSEN, F.; MIKKELSEN, B. B.; NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1209-1214, 1997.

OOTANI, M. A. **Atividade inseticida, antifúngica e herbitóxica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus***. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2010.

OSORIO, L.; PÉREZ, L. P.; GONZÁLEZ, I. J. Evaluación de la eficacia de los medicamentos antimaláricos en Tarapacá, Amazonas colombiano. **Biomédica**, v. 27, n.1, p. 133-140, 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PERES, L. E. P. **Metabolitos secundário**. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2010.

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER II, J. W.; PARK, E. J.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; GILLS, J.; BHAT, K.; GRUBJERIC, S.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y. M.; YU, R.; LANTVIT, D. D.; KINGHORN, A. D. Characterization of natural product chemopreventive agents. In: \_\_\_\_\_. **Cancer chemoprevention: strategies for cancer chemoprevention**. Totowa: Humana Press, 2005. v. 2, cap. 1, p 3-37.

PHILIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the *Leguminosae*. **Advances in Legume Systematics**, v. 1, p. 1-25, 1981.

POTTERAT, O. Antioxidant and free radical scavengers of natural origin. **Current Organic Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 415-440, 1997.

PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). **Journal of the Amerian Oil Chemist's Society**, v. 61, p. 1064-1067, 1984.

QUEIROGA, V. P.; GONDIM, T. M. S.; FIRMINO, P. T.; SILVA, A. C.; QUEIROGA, D. A. N. Colheita manual e diferentes formas de aproveitamento de grãos de gergelim. **Revista Agroambiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 110-117, 2010. Disponível em:  
<<http://www.ufrr.br/revista/index.php/agroambiente/article/viewPDFInterstitial/348/301>>. Acesso em: 28 fev. 2010.

RE, R.; PELLIGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. B.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; YOSHIDA, M.; SILVA, D. H. S. A new neolignan and antioxidant phenols from nectandra grandiflora. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3b, p. 526-530, 2005.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3735-3744, 2003.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compound against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.

SILVA, C. H. T. P.; CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; TAFT, C. A. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the desing of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. **Journal and Molecular Graphics an Modeling**, v. 25, p. 169-175, 2006.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, n. 55, p. 381-387, 2007.

SILVA, E. M.; POMPEU, D. R.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. **Separation and Purification Technology**, n. 53, p. 274-280, 2007a.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007b.

SILVA, R. V. **Estudo biomonitorado das folhas de *Piper arboreum* Aublet (Peperaceae)**. 2000. 191 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. 821 p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.



SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLEA, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 1276-1280, 2007.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, n. 106, p. 331-339, 2008.

SUN, A. Y.; CHEN, Y. M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Journal of Biomedical Science**, v. 5, p. 401-414, 1998.

TRIPATH, A. K.; KHAN, S. I.; WALKER, L. A.; TEKWANI, B. L. Spectrophotometric determination of hemozoin  $\beta$ -hematin formation *in vitro* assay. **Analytical Biochemistry**, v. 325, n. 1, p. 85-91, 2004.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, n. 2, v. 4, p. 119-130, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIDAL, B. **História da química**. 70. ed. Lisboa: Biblioteca Básica da Ciência, 1986. 106 p.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S. B.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184-4190, 2005.



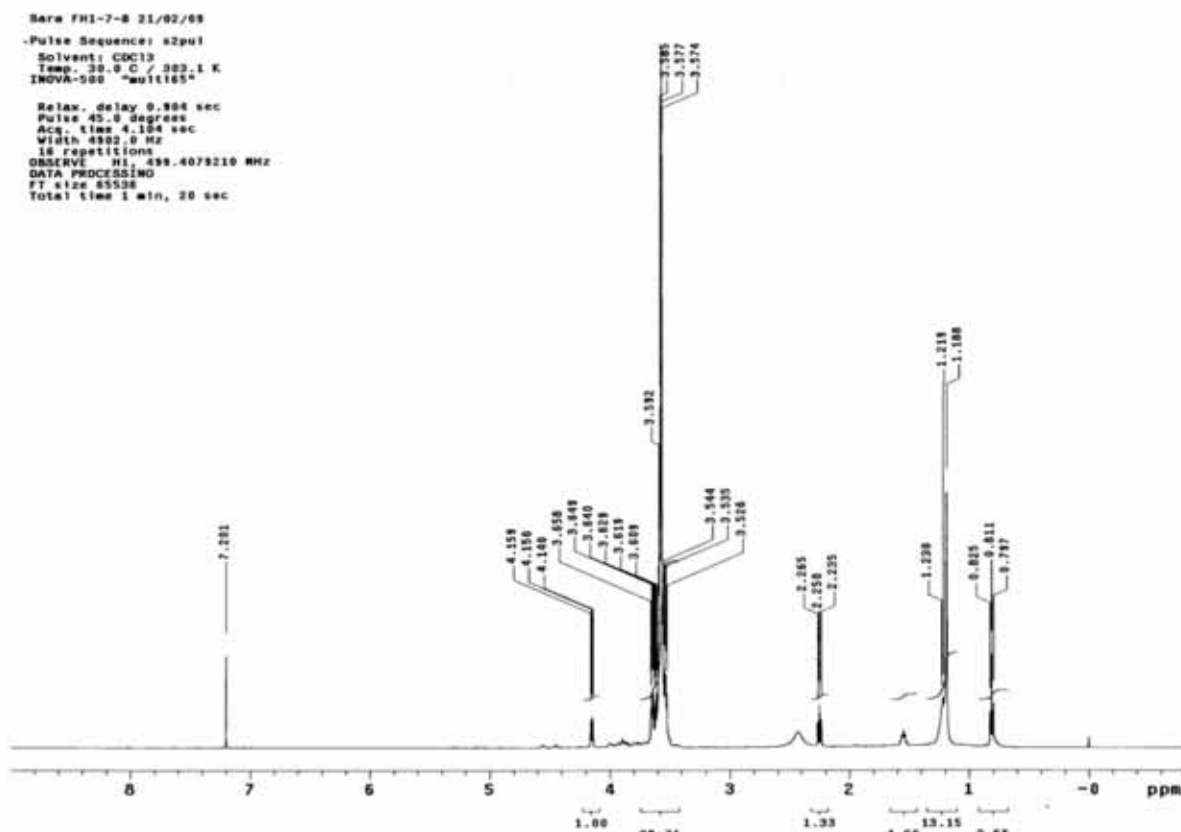
VIVOT, E.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, M. C.; CRUAÑES, M. J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN G. S.; MARTÍNEZ, E.; SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 76, p. 65-71, 2001.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.

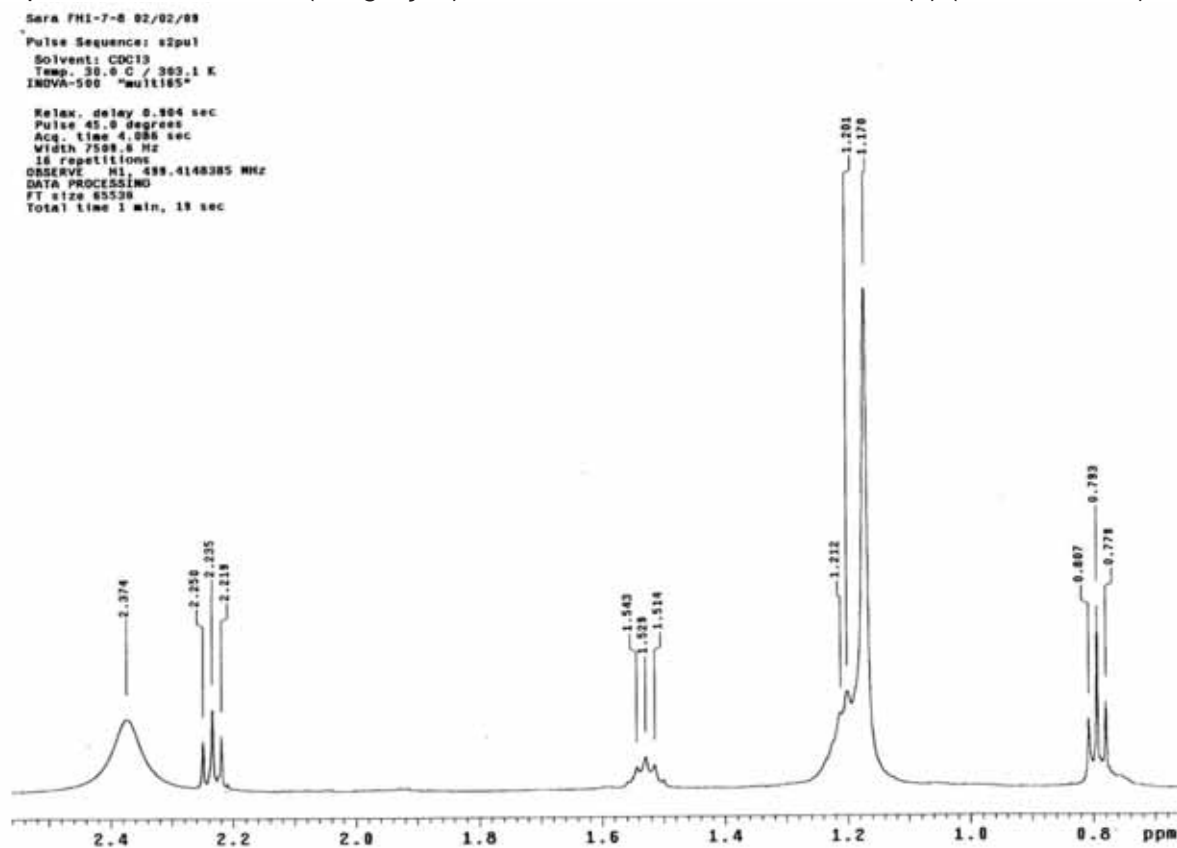
WEISBURGER, J. H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 943-948, 1999.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

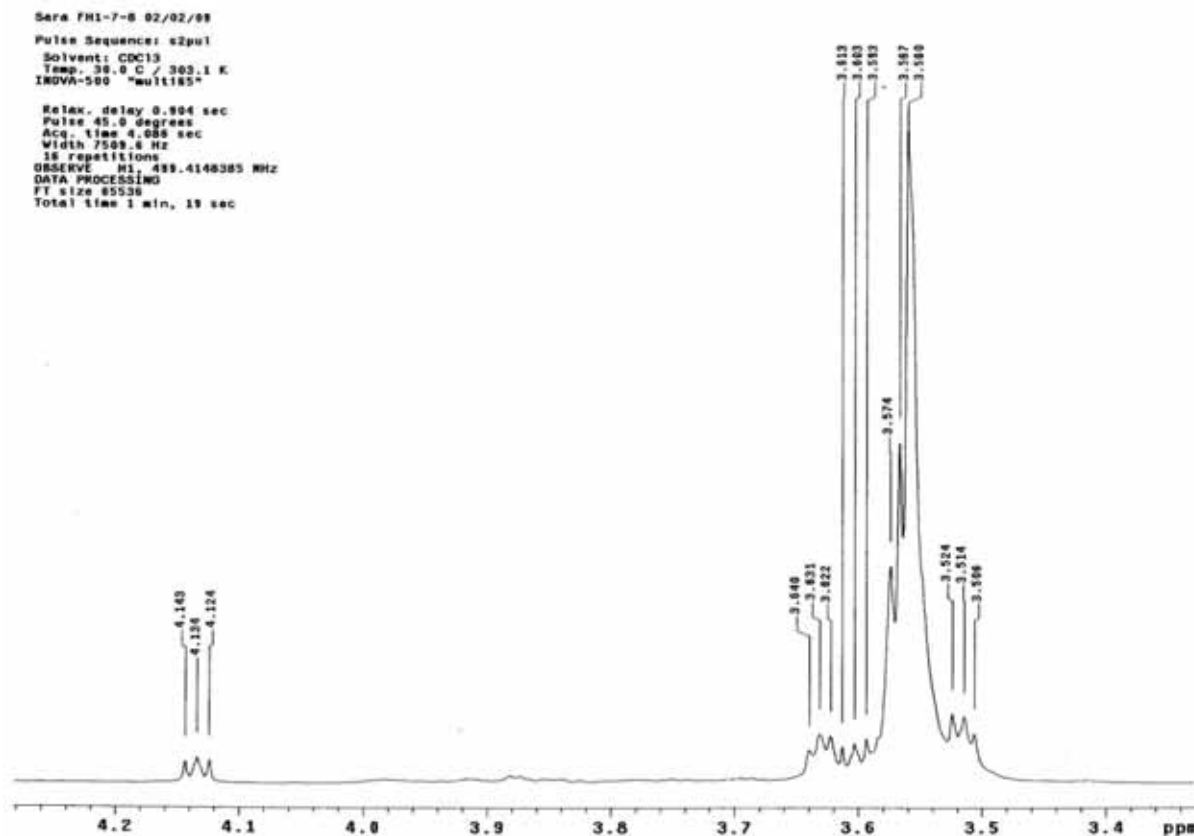
## ANEXOS



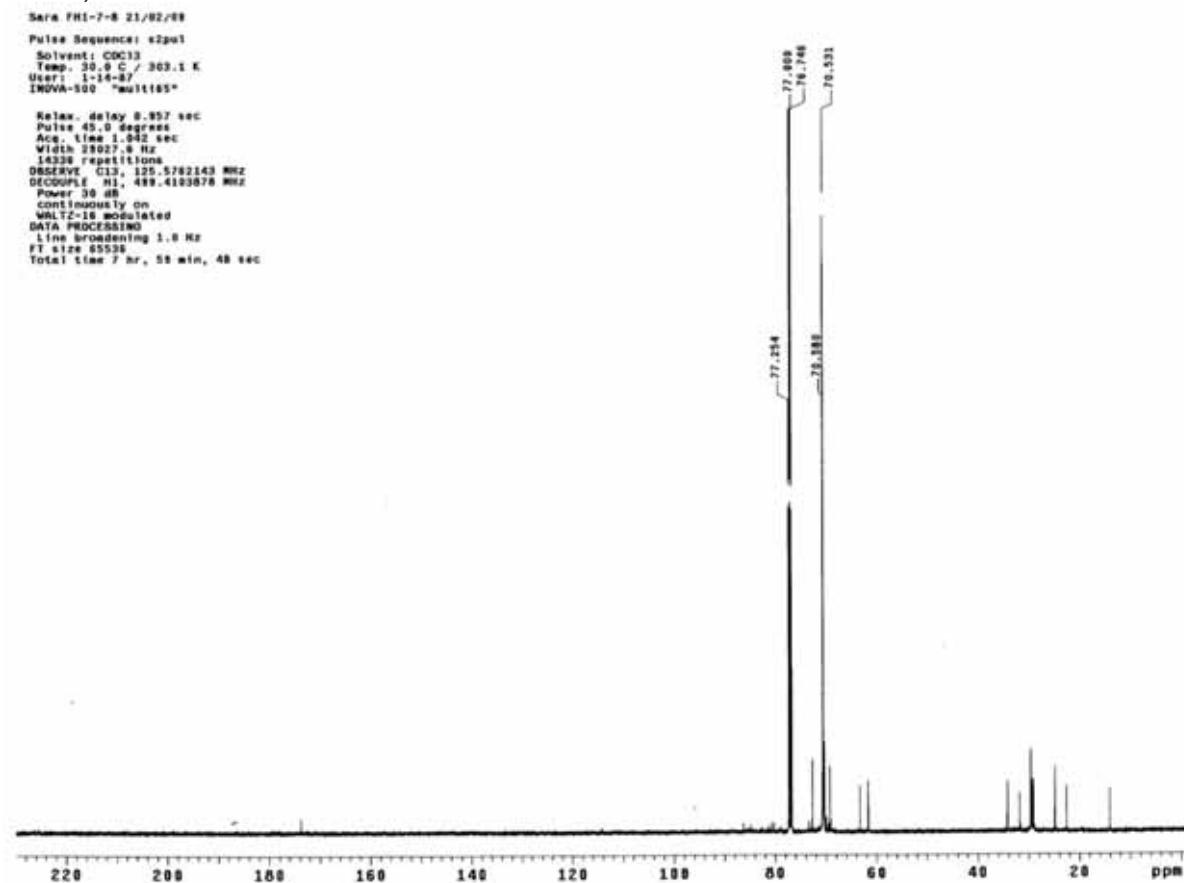
Espectro 1. RMN de  $^1\text{H}$  (integração) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).



Espectro 2. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  2,4) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

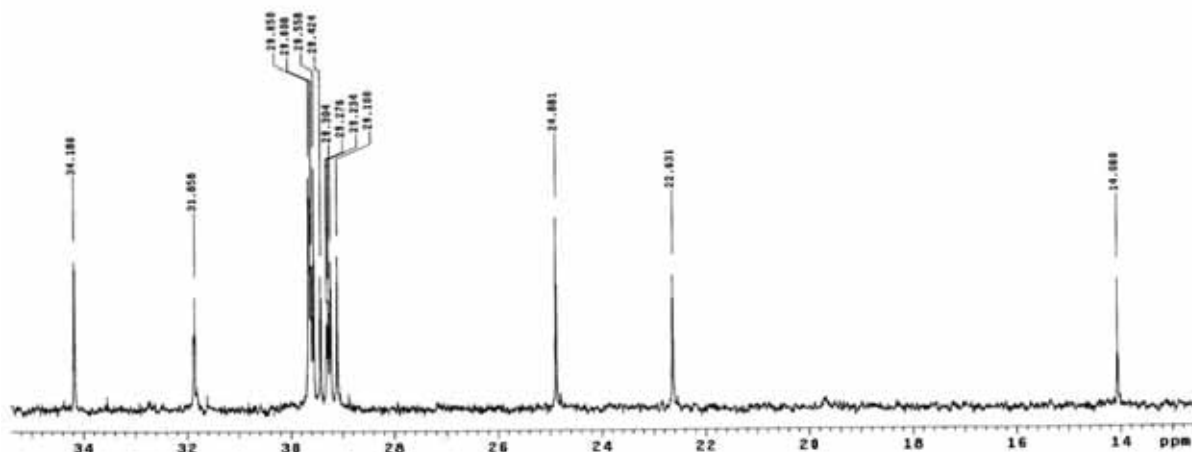


Espectro 3. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  3,4 –  $\delta$  4,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).



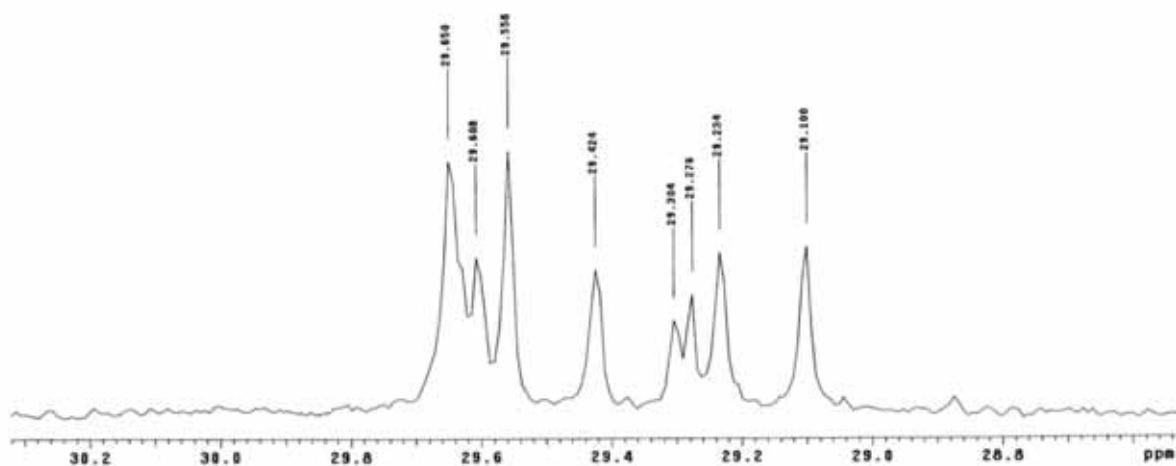
Espectro 4. RMN de  $^{13}\text{C}$  do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

Sere FHI-7-B 21/02/09  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: CDCl3  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 0.957 sec  
 Pulse 45.0 degree  
 Acq. time 1.042 sec  
 Width 28927.0 Hz  
 14336 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.5762143 MHz  
 DECOUPLE H1, 499.4103878 MHz  
 Power 30 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 45536  
 Total time 7 hr, 59 min, 48 sec

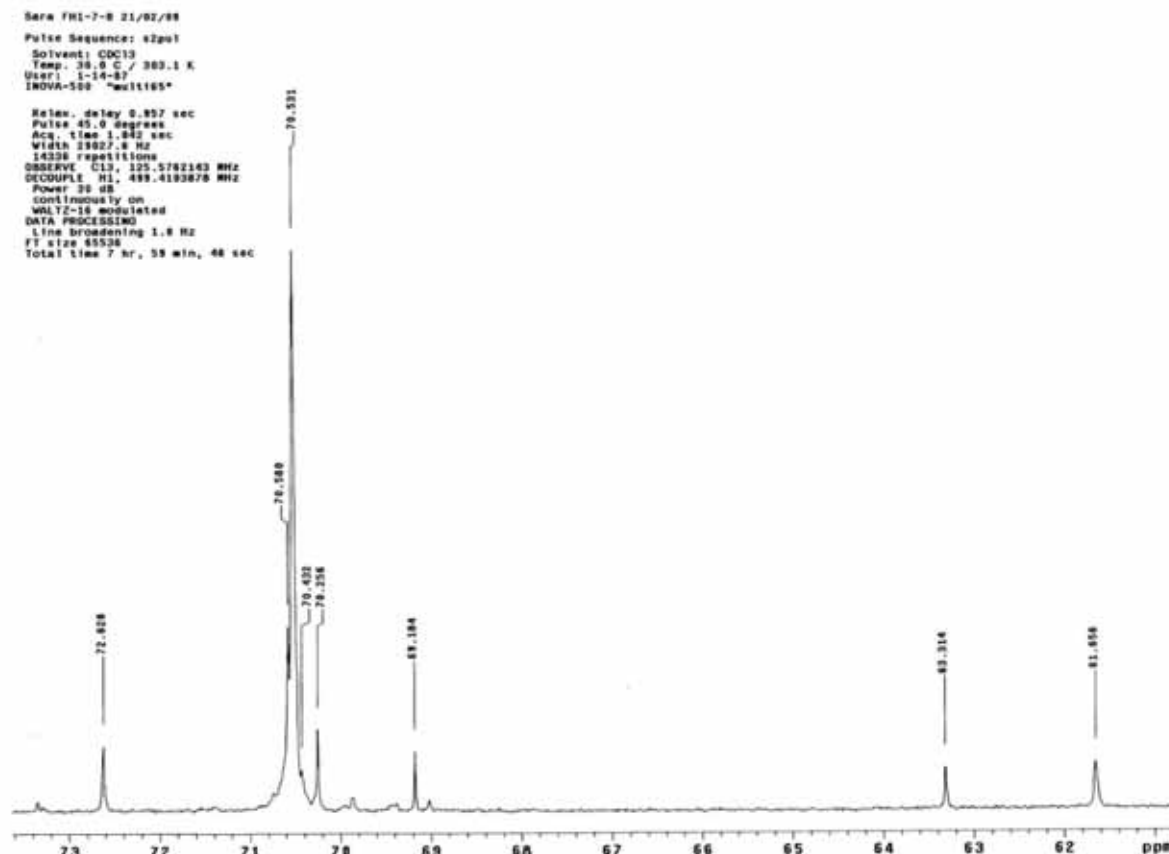


Espectro 5. RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado ( $\delta$  14 –  $\delta$  34) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

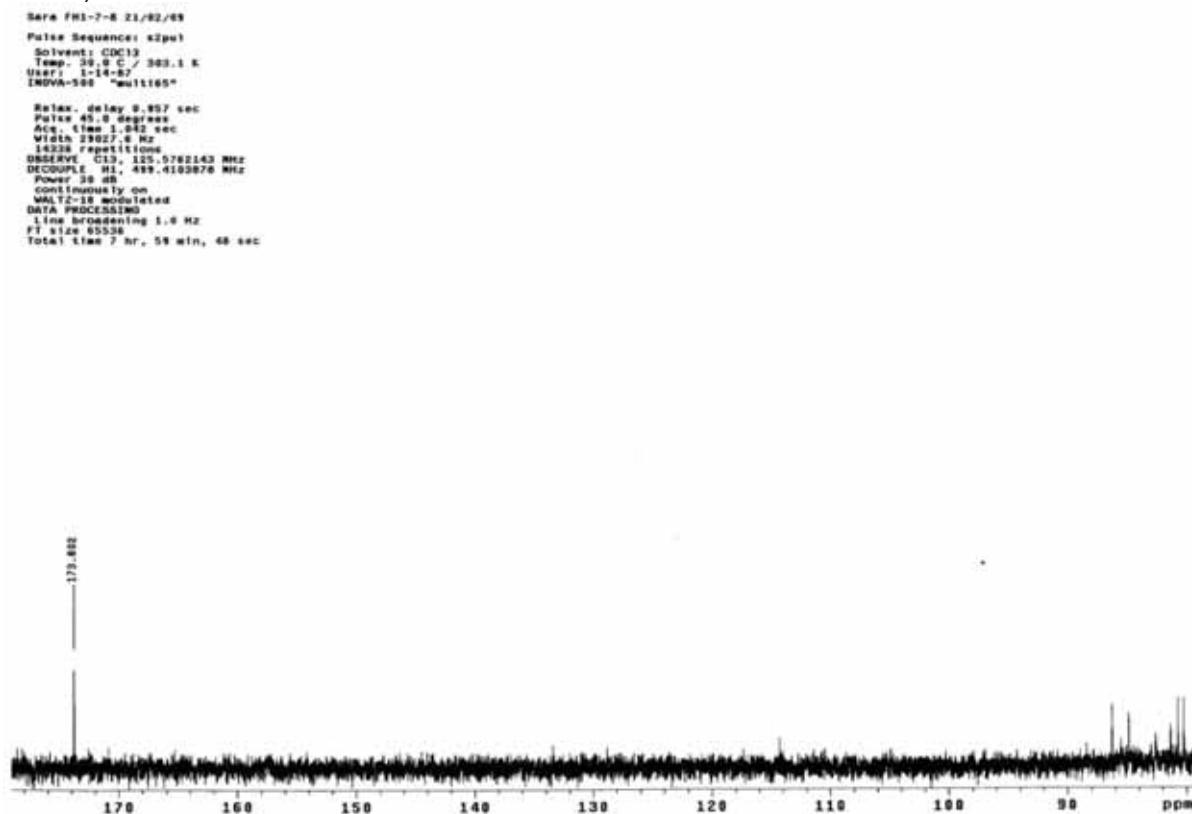
Sere FHI-7-B 21/02/09  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: CDCl3  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 0.957 sec  
 Pulse 45.0 degree  
 Acq. time 1.042 sec  
 Width 28927.0 Hz  
 14336 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.5762143 MHz  
 DECOUPLE H1, 499.4103878 MHz  
 Power 30 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 45536  
 Total time 7 hr, 59 min, 48 sec



Espectro 6. RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado ( $\delta$  28,8 –  $\delta$  30,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

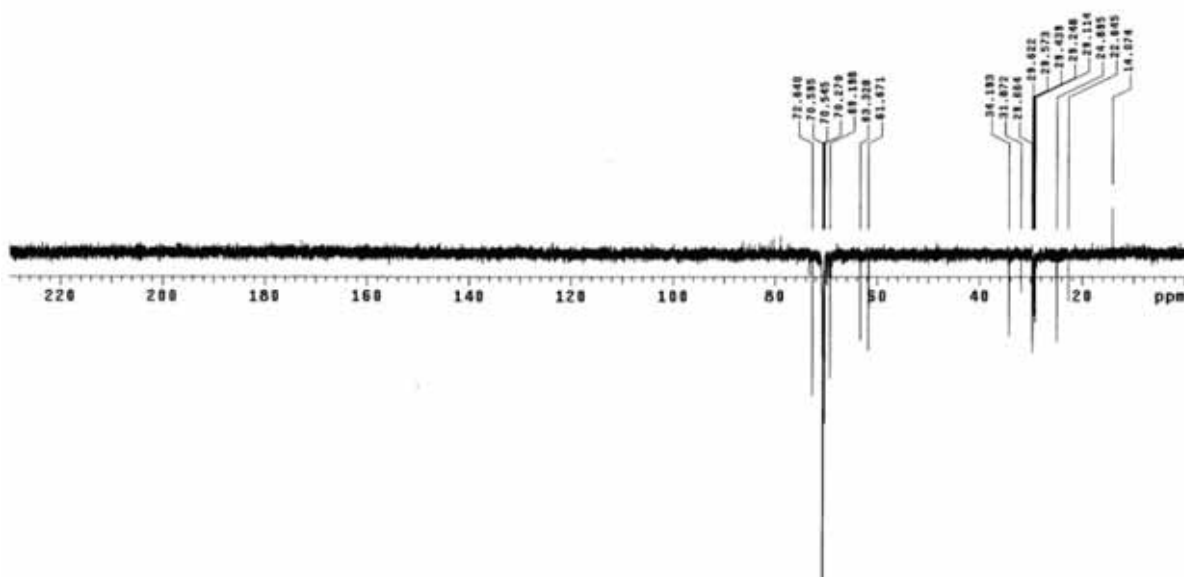


Espectro 7. RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado ( $\delta$  61 –  $\delta$  73) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

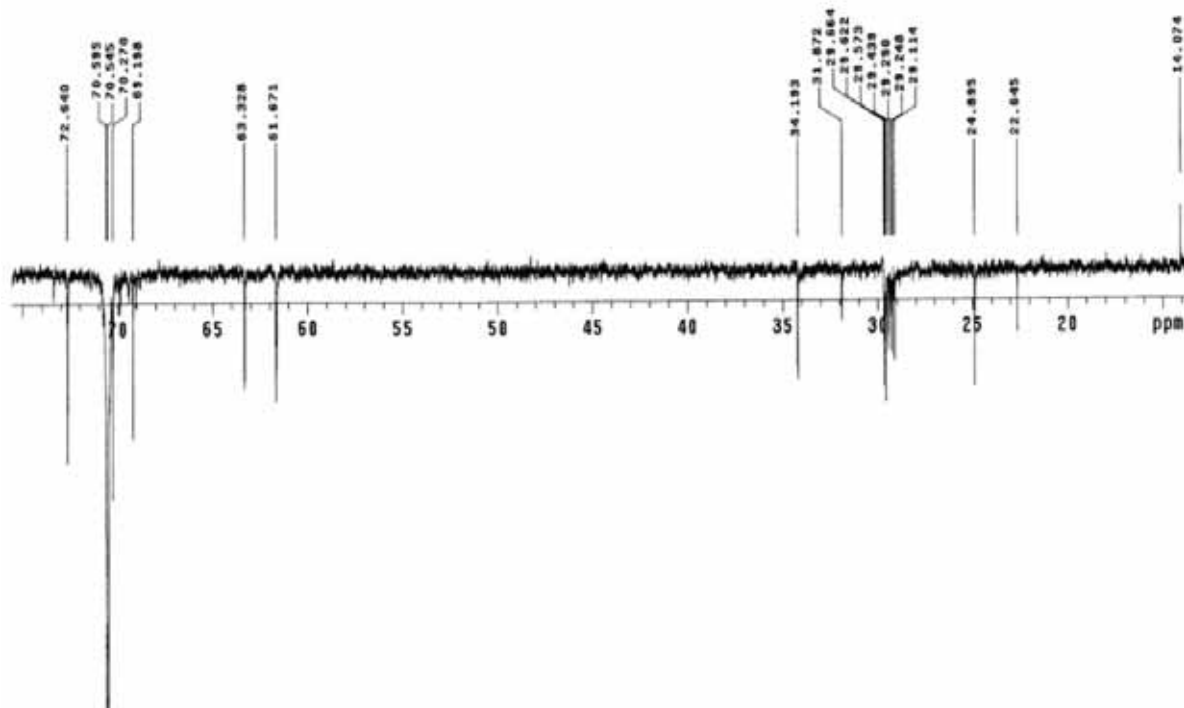


Espectro 8. RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado ( $\delta$  80 –  $\delta$  180) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

Sam FHI-7-8 21/02/08  
 Pulse Sequence: DEPT135  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 30.0 degrees  
 Acq. time 1.042 sec  
 Width 29027.6 Hz  
 3000 repetitions  
 OBSERVE CH3 125.5702125 MHz  
 DECOUPLE H1 499.4103878 MHz  
 Power 30 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 85536  
 Total time 3 hr, 20 min, 48 sec



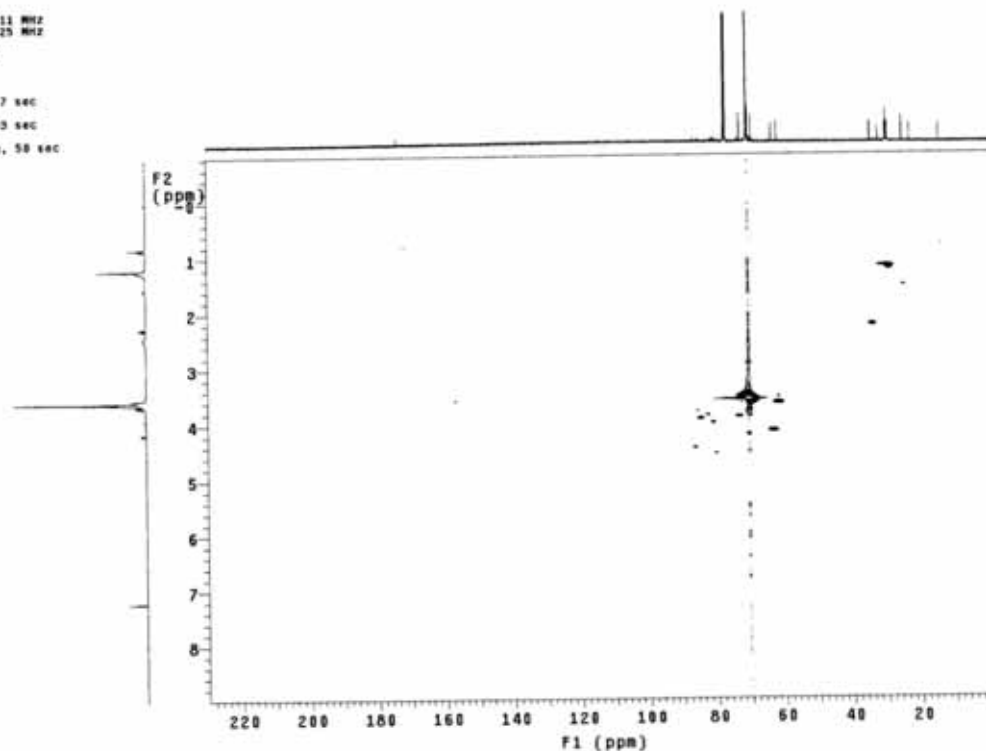
Espectro 9. DEPT 135° do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).



Espectro 10. DEPT 135° ampliado ( $\delta$  14 –  $\delta$  70) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

Sera FHI-7-8 21/02/09  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: I-14-B7  
 INOVA-500 "multis5"

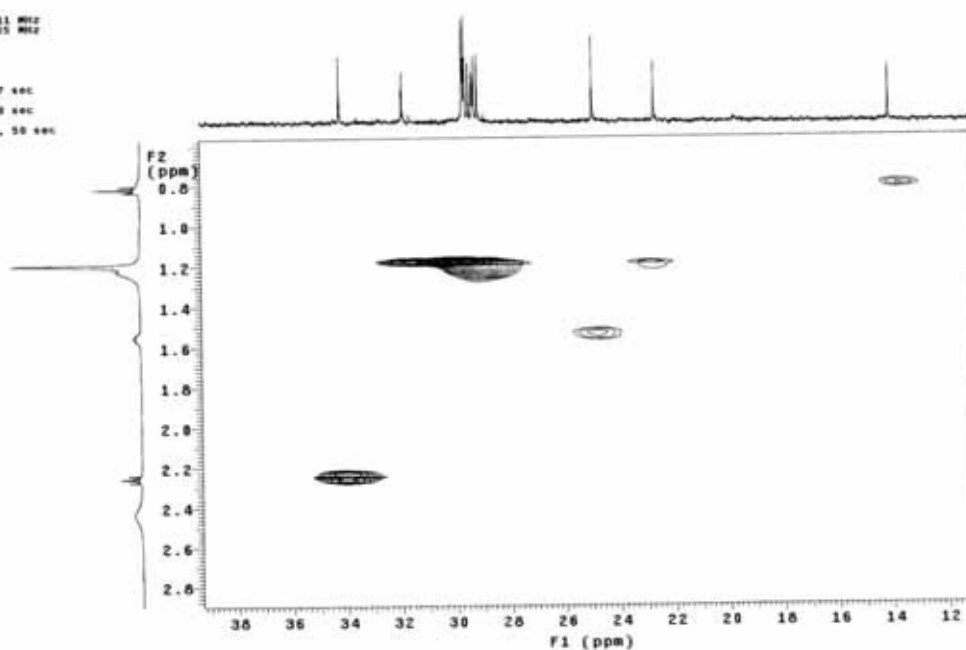
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.200 sec  
 Width 4902.0 Hz  
 2D Width 28027.8 Hz  
 16 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.8079211 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5805625 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.007 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 1048 x 2048  
 Total time 1 hr, 26 min, 50 sec



Espectro 11. gHMOC do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

Sera FHI-7-8 21/02/09  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: I-14-B7  
 INOVA-500 "multis5"

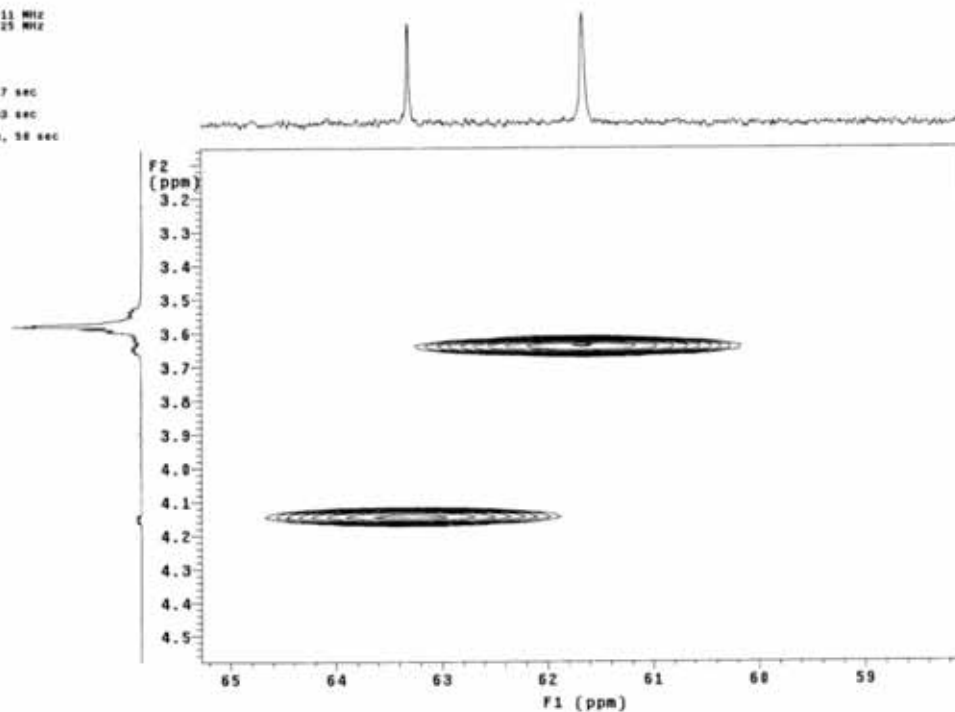
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.200 sec  
 Width 4902.0 Hz  
 2D Width 28027.8 Hz  
 16 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.8079211 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5805625 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.007 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 1048 x 2048  
 Total time 1 hr, 26 min, 50 sec



Espectro 12. gHMOC ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  2,8 para H;  $\delta$  12 –  $\delta$  38 para C) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

Sara FHI-7-8 21/02/09  
 Pulse Sequence: gHMQC  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 "multis5"

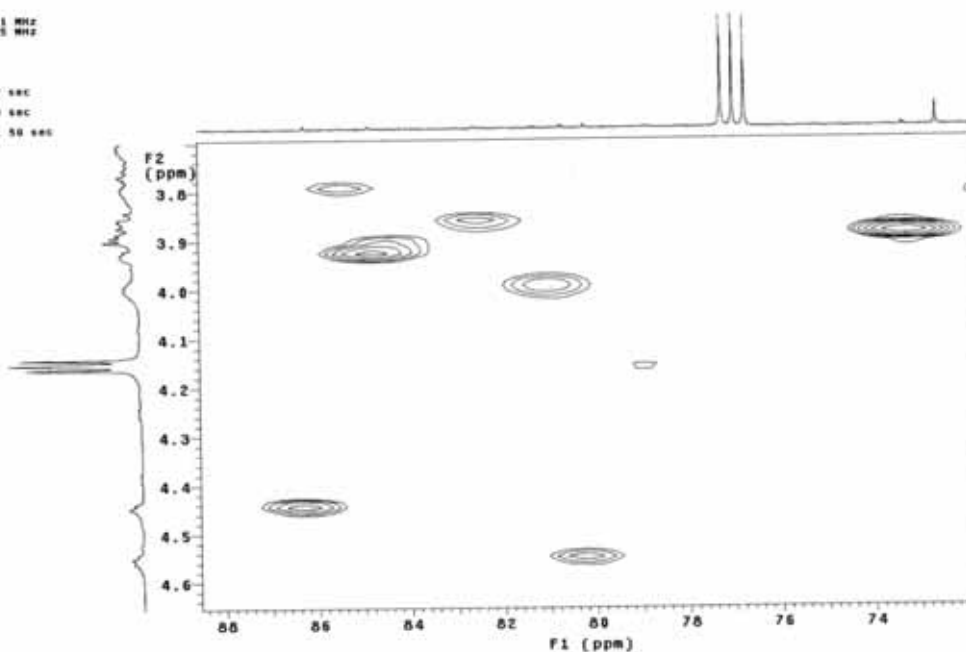
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.208 sec  
 Width 4902.0 Hz  
 2D Width 28927.6 Hz  
 18 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4079211 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5905425 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.097 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 28 min, 50 sec



Espectro 13. gHMQC ampliado ( $\delta$  3,2 –  $\delta$  4,5 para H;  $\delta$  59 –  $\delta$  65 para C) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

Sara FHI-7-8 21/02/09  
 Pulse Sequence: gHMQC  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 "multis5"

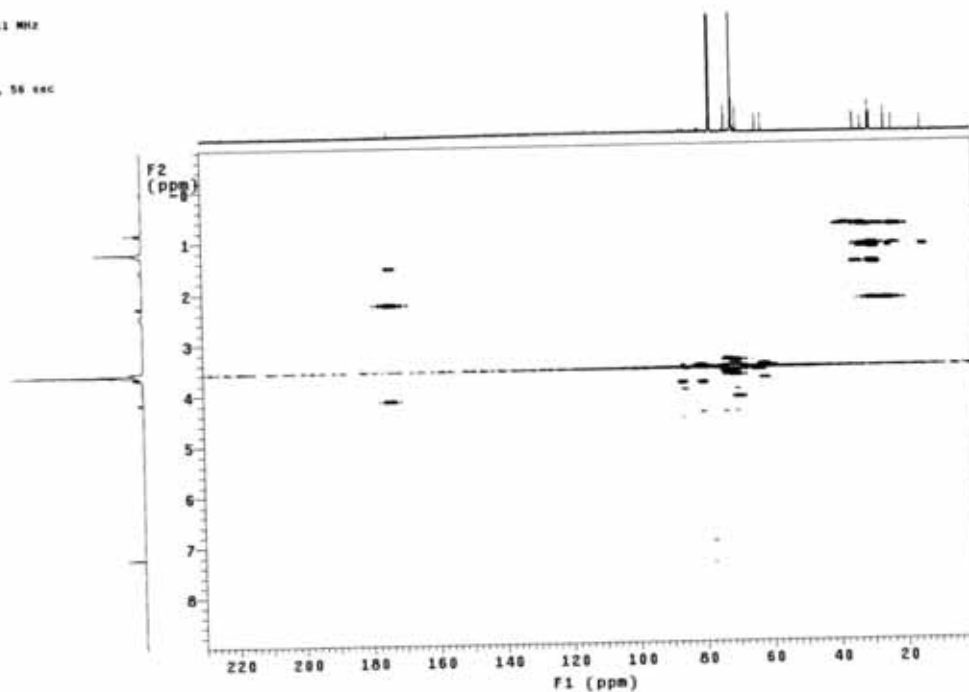
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.208 sec  
 Width 4902.0 Hz  
 2D Width 28927.6 Hz  
 18 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4079211 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5905425 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.097 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 28 min, 50 sec



Espectro 14. gHMQC ampliado ( $\delta$  3,8 –  $\delta$  4,6 para H;  $\delta$  73 –  $\delta$  88 para C) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

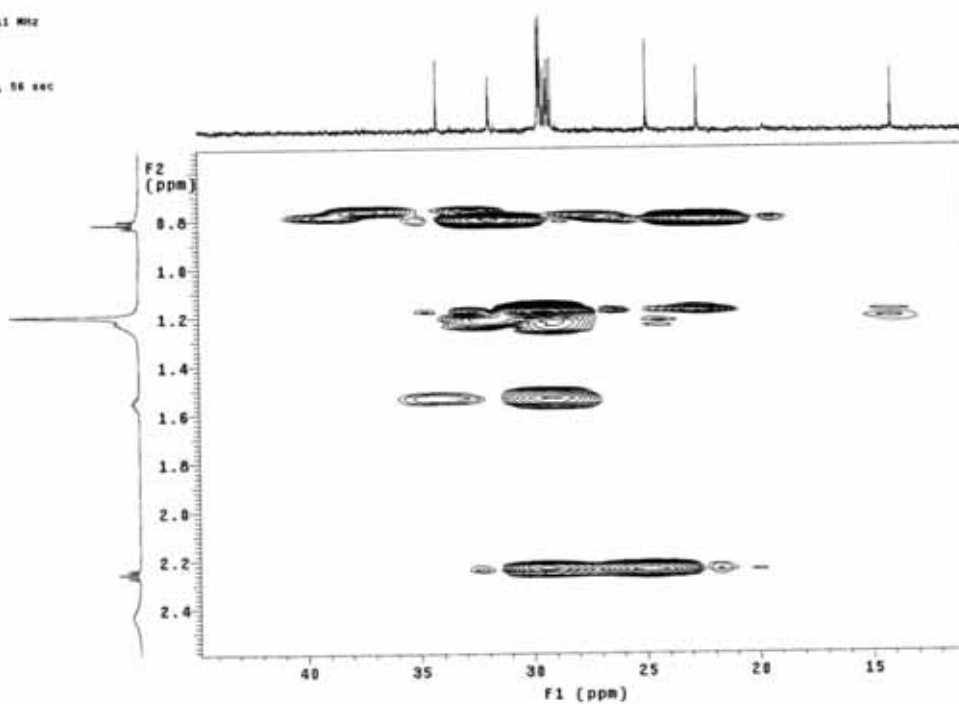


Sara FHI-7-8 21/02/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: CDCl3  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-16-07  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.209 sec  
 Width 4892.0 Hz  
 2D width 28927.0 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4078211 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.104 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 28 min, 56 sec



Espectro 15. gHMBC do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

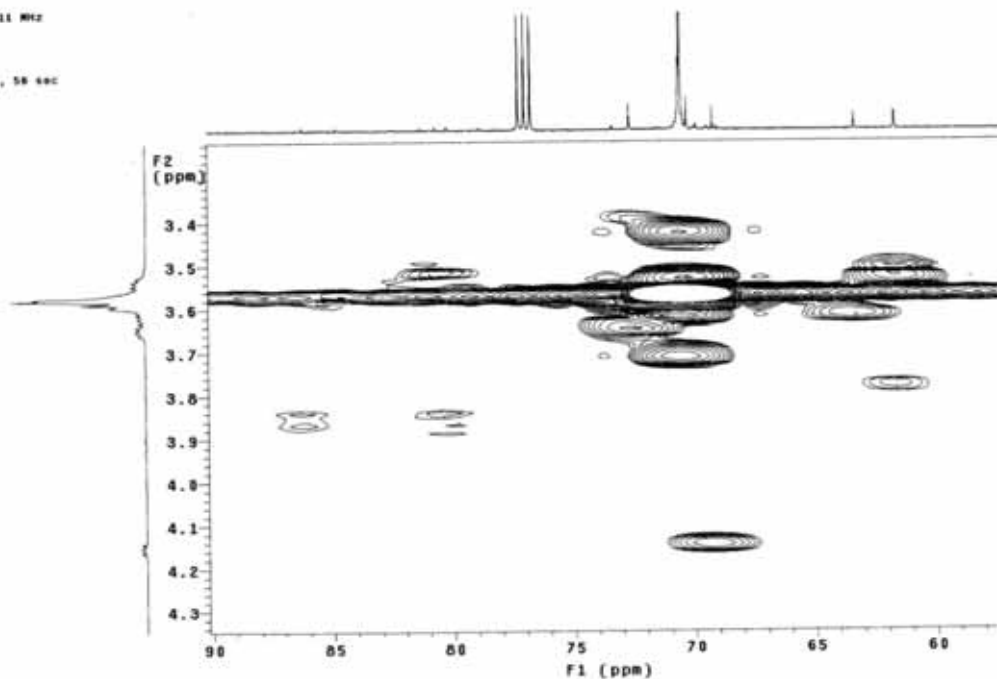
Sara FHI-7-8 21/02/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: CDCl3  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-16-07  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.209 sec  
 Width 4892.0 Hz  
 2D width 28927.0 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4078211 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.104 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 28 min, 56 sec



Espectro 16. gHMBC ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  2,4 para H;  $\delta$  15 –  $\delta$  40 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

Sara FHI-7-8 21/02/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: CDCl<sub>3</sub>  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 INOVA-500 "multisat"

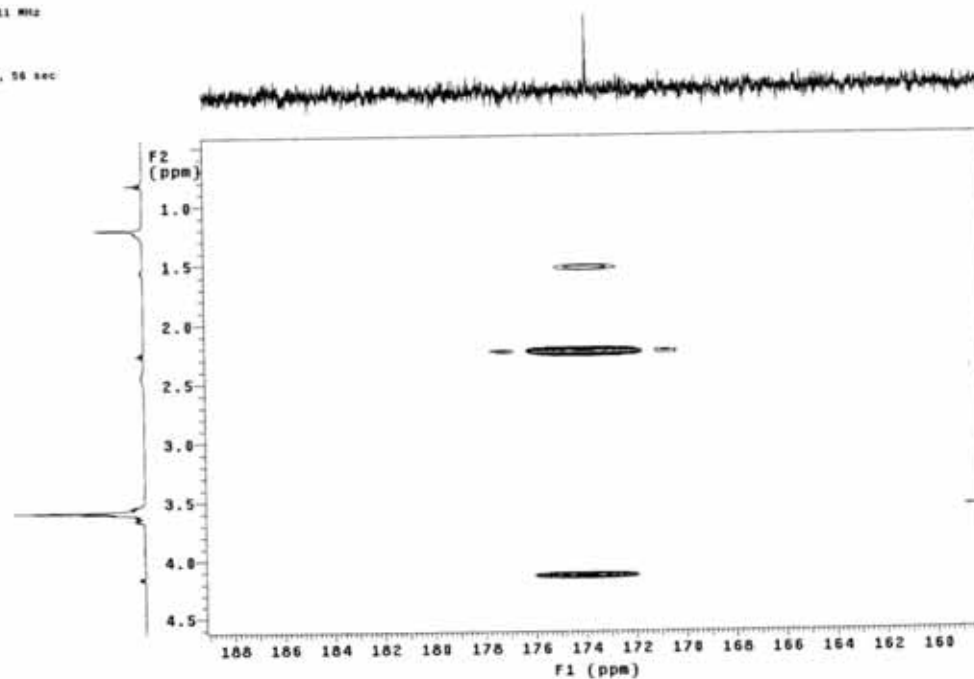
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.289 sec  
 Width 4992.0 Hz  
 F2 Width 29927.8 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1 499.4079211 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.104 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.083 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 26 min, 56 sec



Espectro 17. gHMBC ampliado ( $\delta$  3,4 –  $\delta$  4,3 para H;  $\delta$  60 –  $\delta$  90 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

Sara FHI-7-8 21/02/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: CDCl<sub>3</sub>  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 INOVA-500 "multisat"

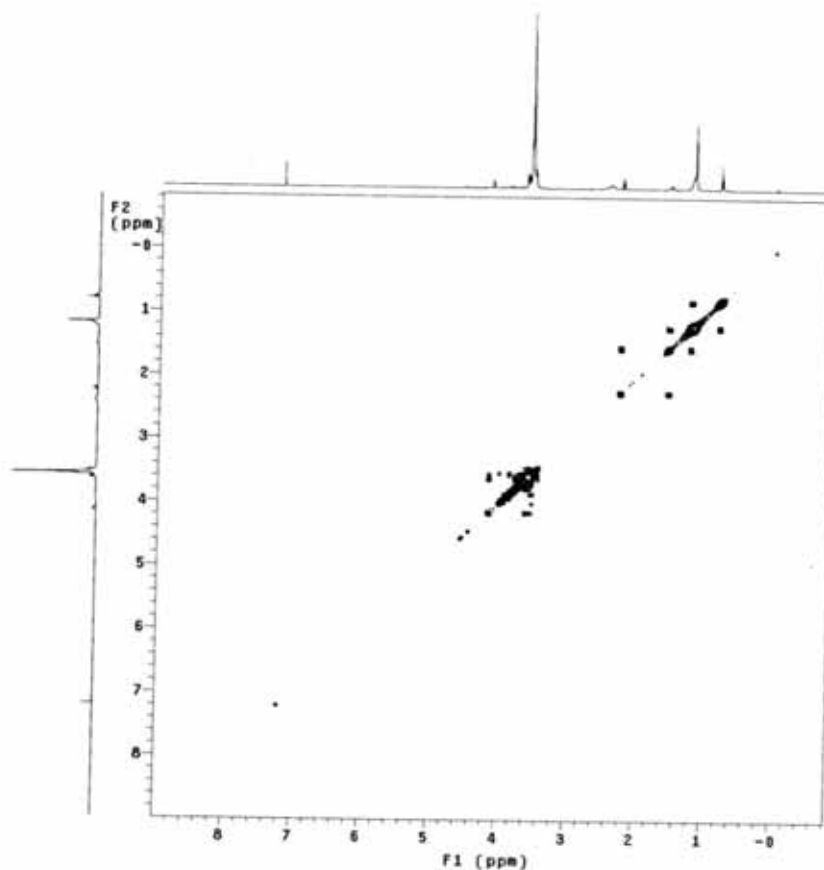
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.289 sec  
 Width 4992.0 Hz  
 F2 Width 29927.8 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1 499.4079211 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.104 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.083 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 26 min, 56 sec



Espectro 18. gHMBC ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  4,5 para H;  $\delta$  160 –  $\delta$  188 para C) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) (CDCl<sub>3</sub>, 11.7 T).

Sera FHI-7-S 21/02/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 29.9 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

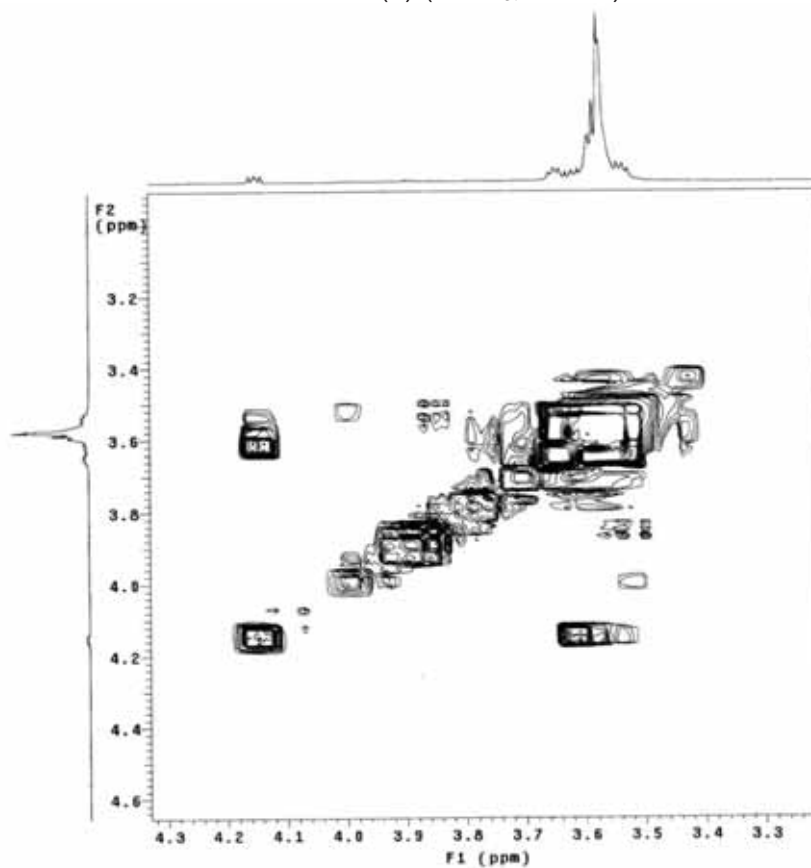
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.209 sec  
 Width 4902.0 Hz  
 2D Width 4902.0 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.4678211 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sg. sine bell 0.104 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sg. sine bell 0.018 sec  
 FT size 2848 x 2048  
 Total time 42 min, 28 sec



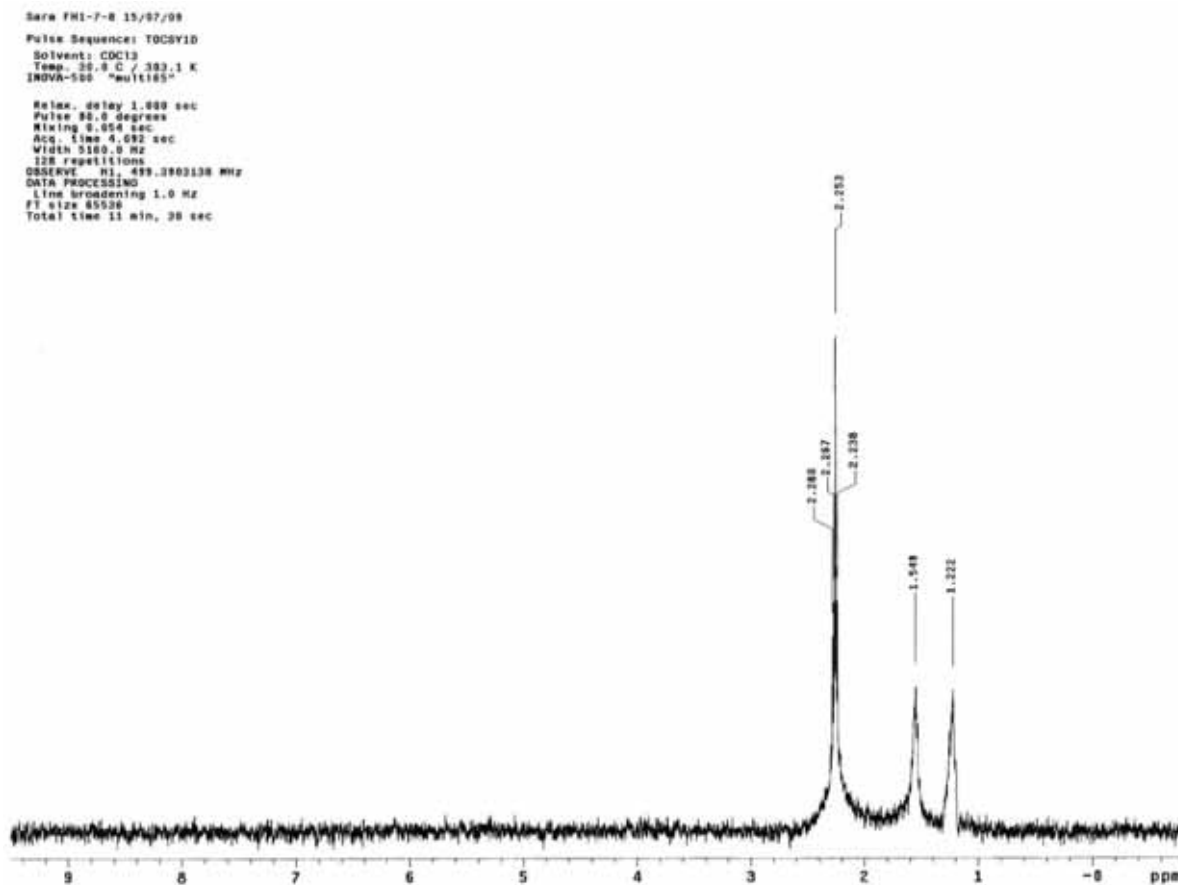
Espectro 19. gCOSY do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

Sera FHI-7-S 21/02/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: CDCl3  
 Temp. 29.9 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

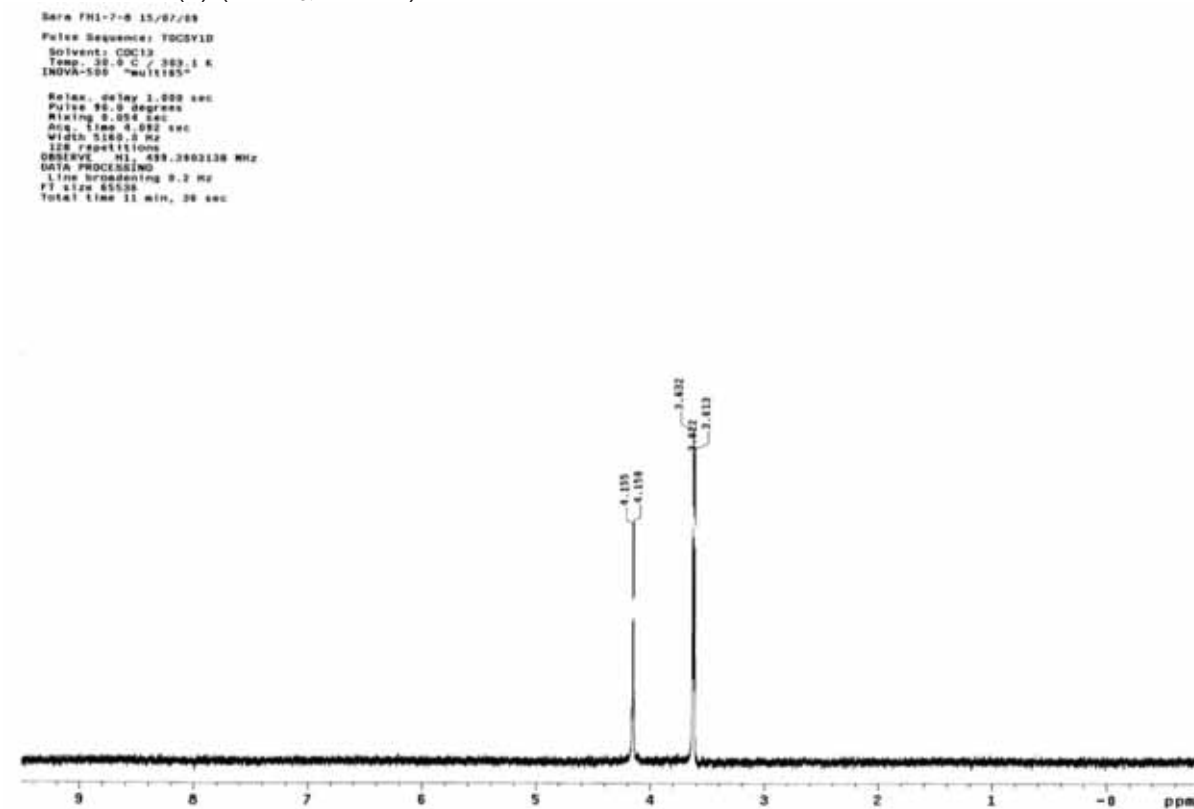
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.209 sec  
 Width 4902.0 Hz  
 2D Width 4902.0 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.4678211 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sg. sine bell 0.104 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sg. sine bell 0.018 sec  
 FT size 2848 x 2048  
 Total time 42 min, 28 sec



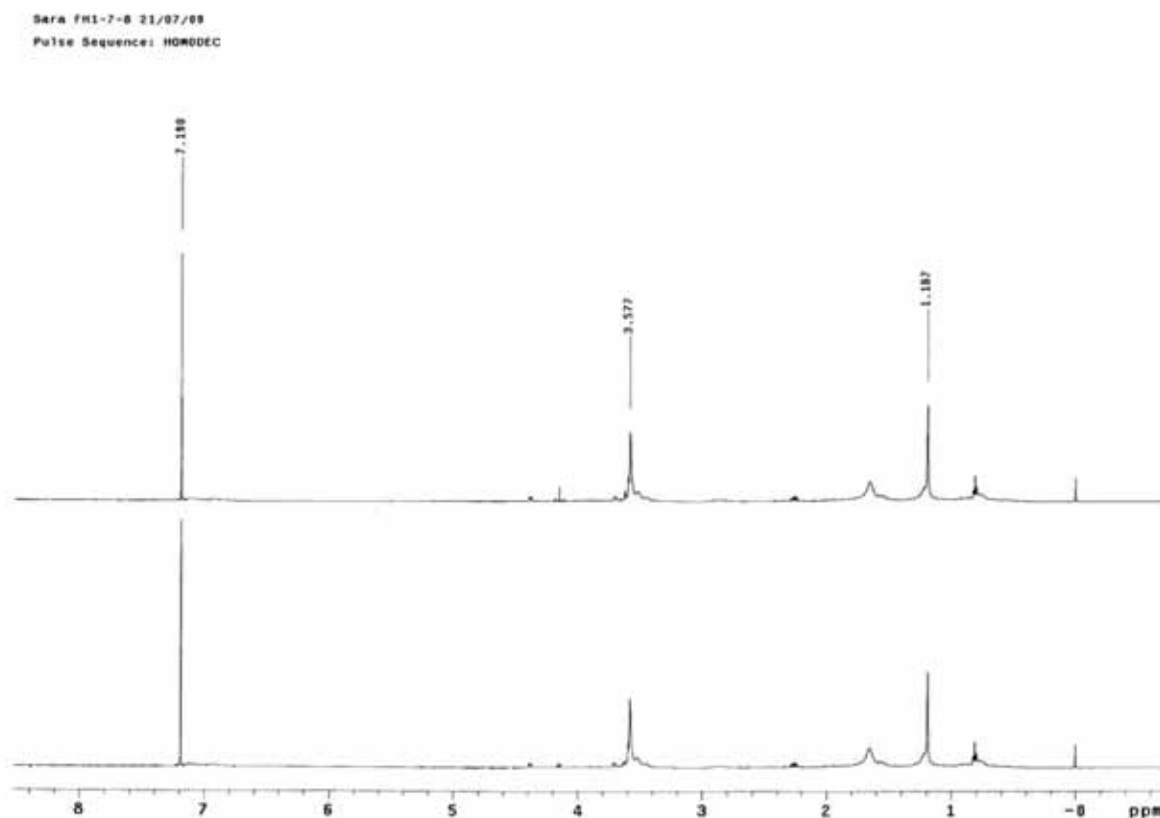
Espectro 20. gCOSY ampliado ( $\delta$  3,1 –  $\delta$  4,6) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).



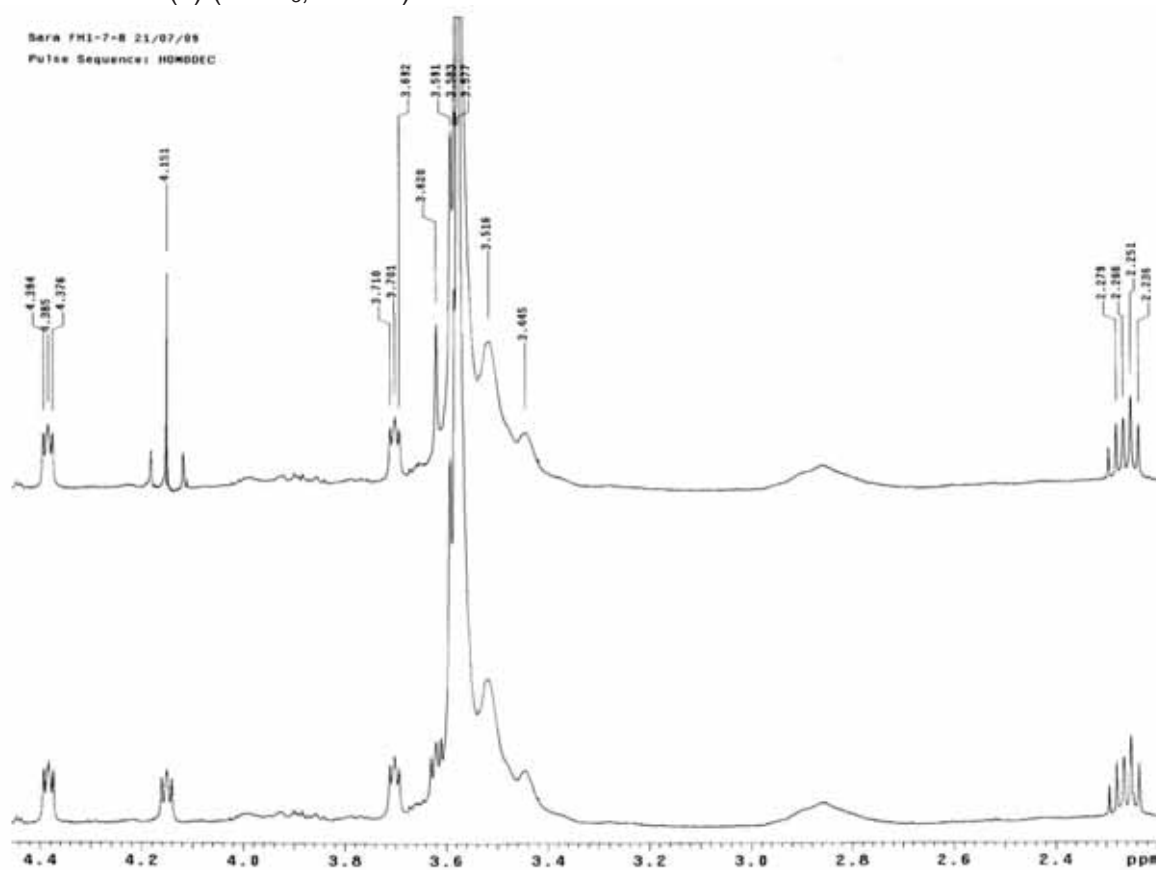
Espectro 21. TOCSY 1D (correlação direta do  $\delta$  2,2 com  $\delta$  1,5 e  $\delta$  1,2) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).



Espectro 22. TOCSY 1D (correlação direta do  $\delta$  3,6 com  $\delta$  4,1) do dodecanoato de 2-hidroxieta (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

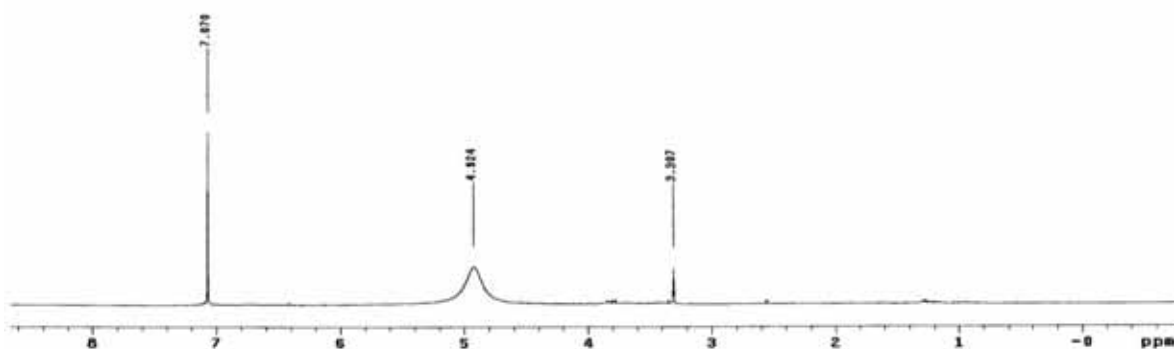


Espectro 23. HOMODEC (correlação direta do  $\delta$  7,1 com  $\delta$  3,5 e  $\delta$  1,8) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).



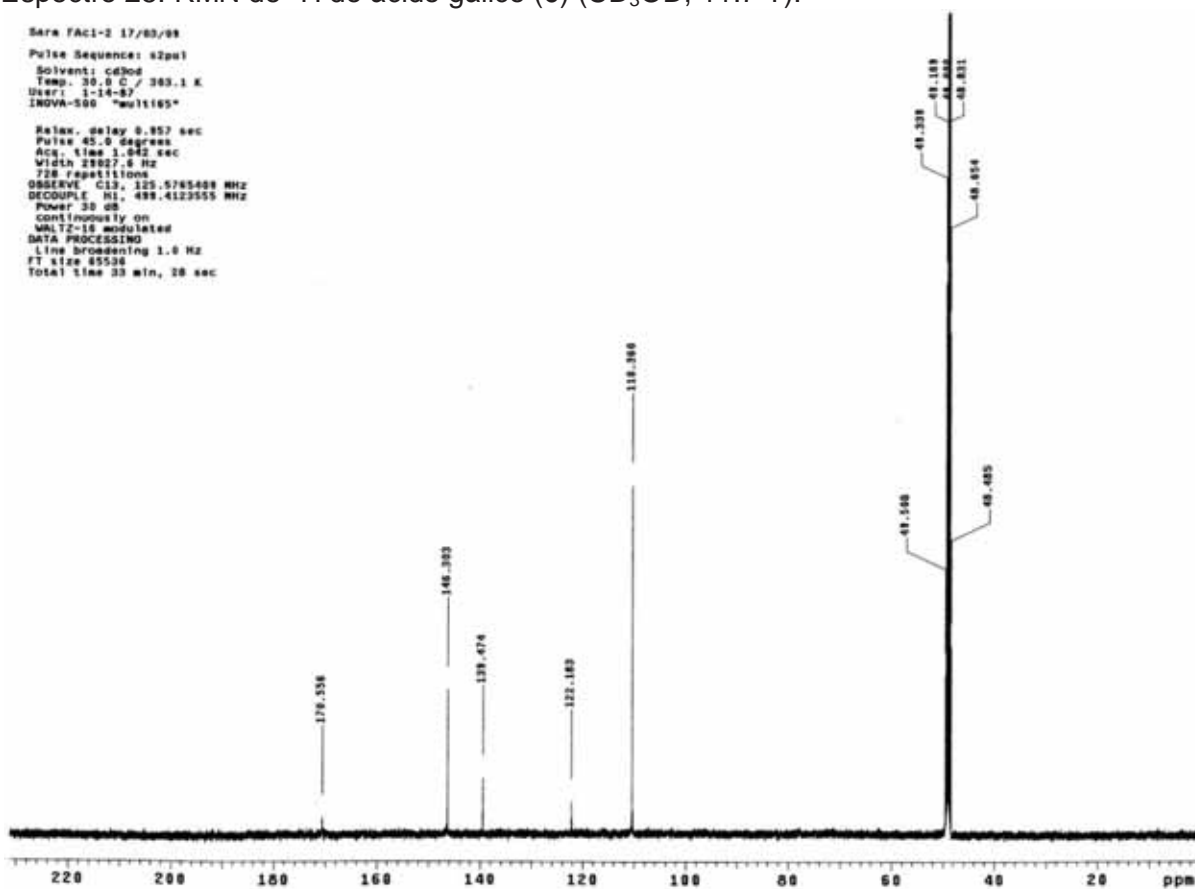
Espectro 24. HOMODEC ampliado (correlação direta do  $\delta$  3,5 com  $\delta$  4,3,  $\delta$  4,1 e  $\delta$  2,2) do dodecanoato de 2-hidroxietila (**5**) ( $\text{CDCl}_3$ , 11.7 T).

Sara FAC1-2 17/03/09  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 0.804 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 4.988 sec  
 Width 4724.6 Hz  
 IS repetitions  
 OBSERVE N1, 499.4080583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 85528  
 Total time 1 min, 20 sec



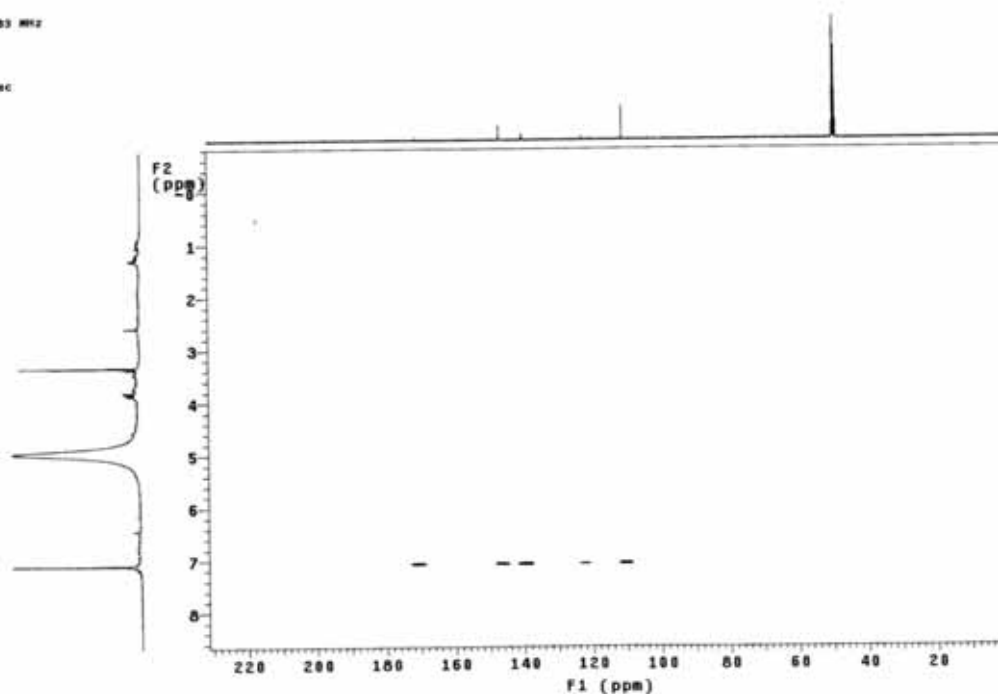
Espectro 25. RMN de  $^1\text{H}$  do ácido gálico (6) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FAC1-2 17/03/09  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 0.857 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.042 sec  
 Width 28027.4 Hz  
 728 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.5785408 MHz  
 DECOUPLE N1, 499.412355 MHz  
 Power 30 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 45530  
 Total time 33 min, 20 sec



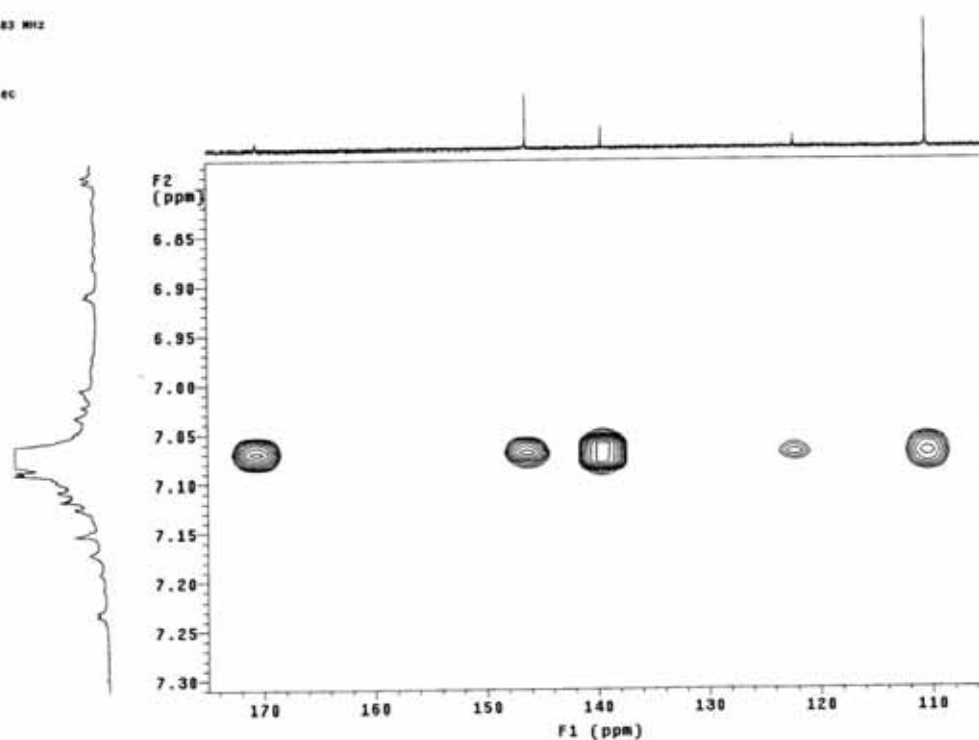
Espectro 26. RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido gálico (6) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sere FACI-2 17/03/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 20.0 C / 303.1 K  
 User: j-14-07  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.217 sec  
 Width 4724.8 Hz  
 2D Width 29927.6 Hz  
 4 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE N1 499.4089583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.100 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 11 min, 47 sec

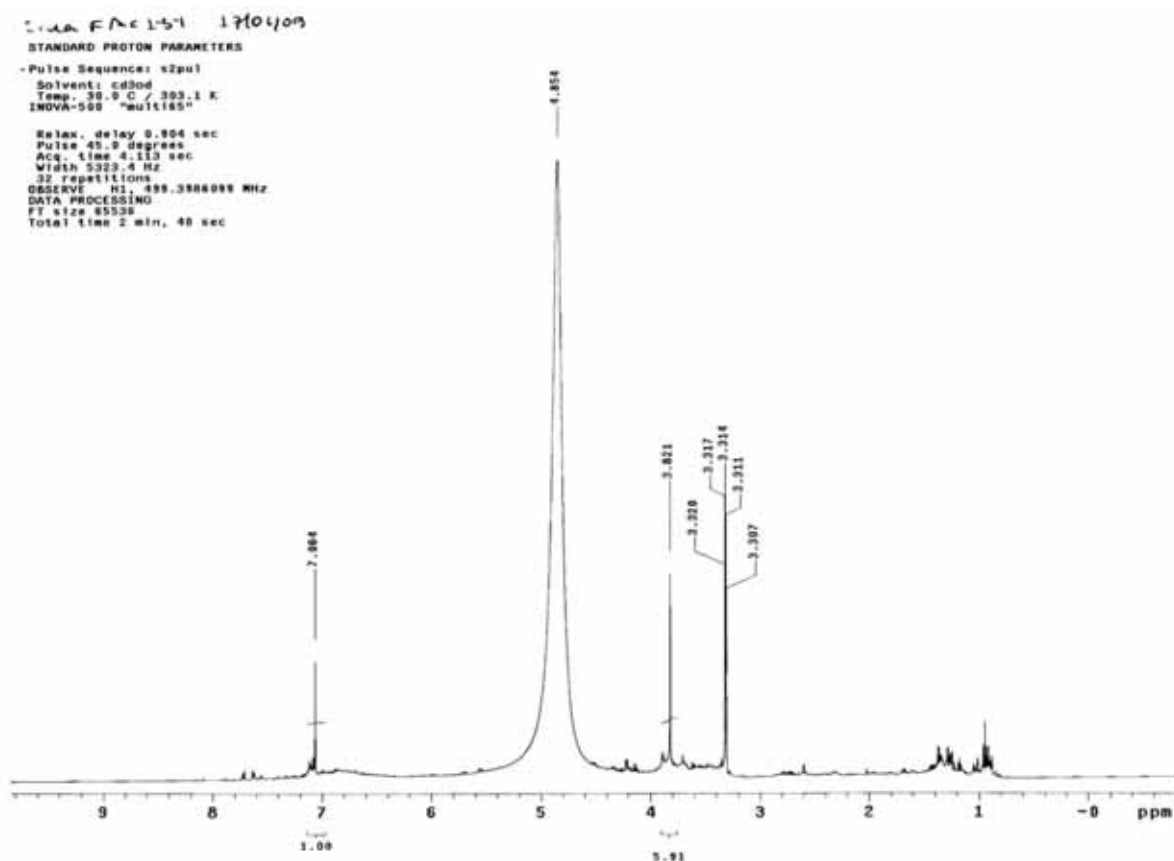


Espectro 27. gHMBC do ácido gálico (6) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

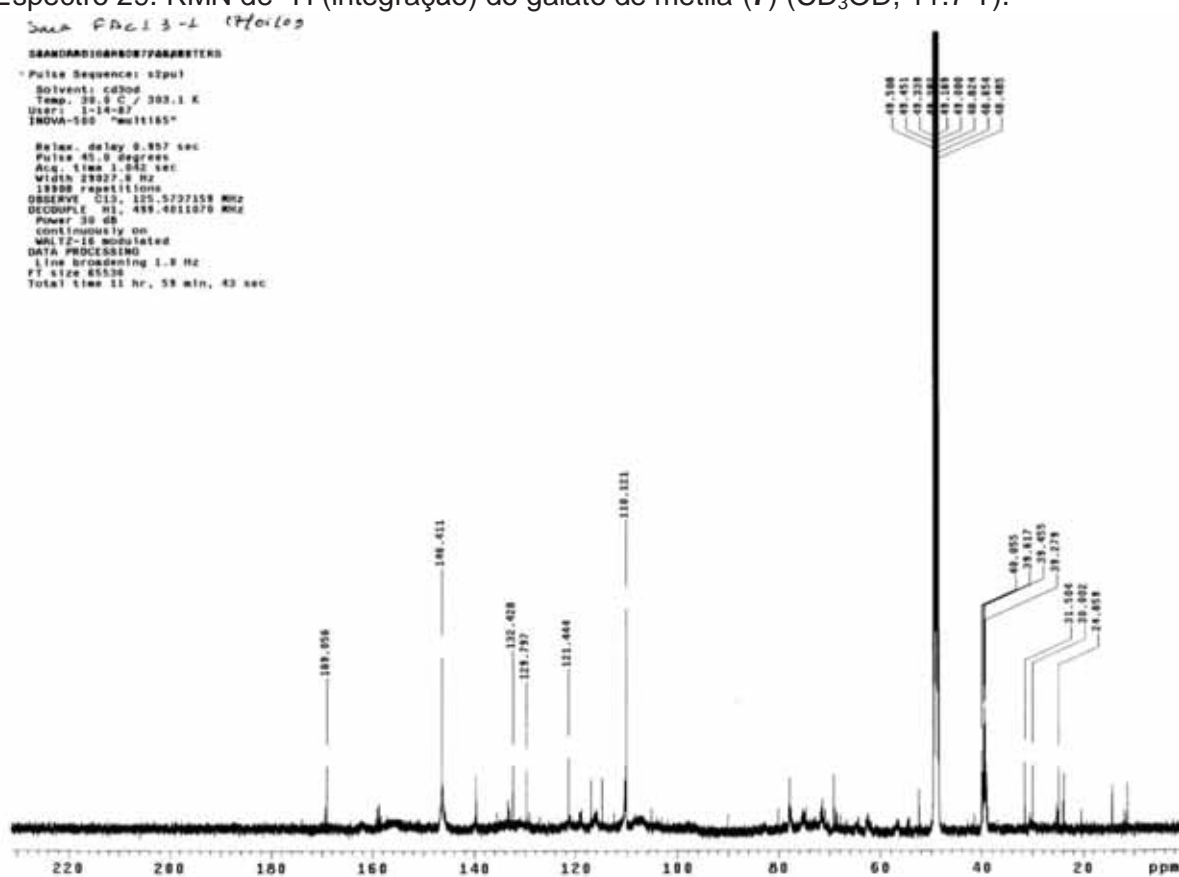
Sere FACI-2 17/03/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 20.0 C / 303.1 K  
 User: j-14-07  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.217 sec  
 Width 4724.8 Hz  
 2D Width 29927.6 Hz  
 4 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE N1 499.4089583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.100 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 11 min, 47 sec



Espectro 28. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,85 –  $\delta$  7,30 para H;  $\delta$  110 –  $\delta$  170 para C) do ácido gálico (6) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

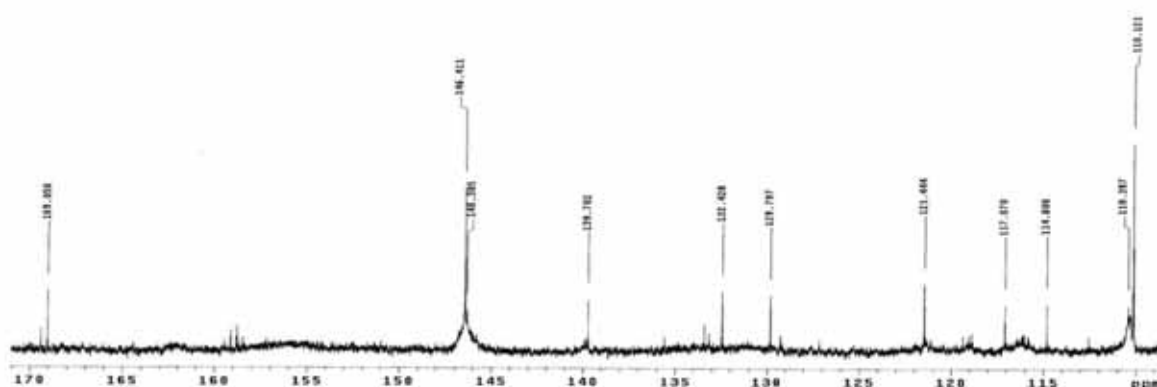
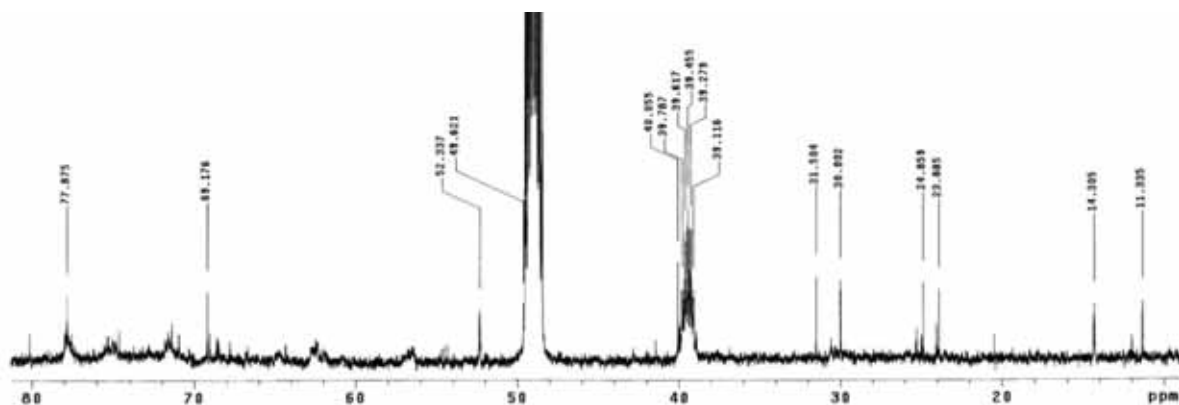


Espectro 29. RMN de  $^1\text{H}$  (integração) do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).



Espectro 30. RMN de  $^{13}\text{C}$  do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).



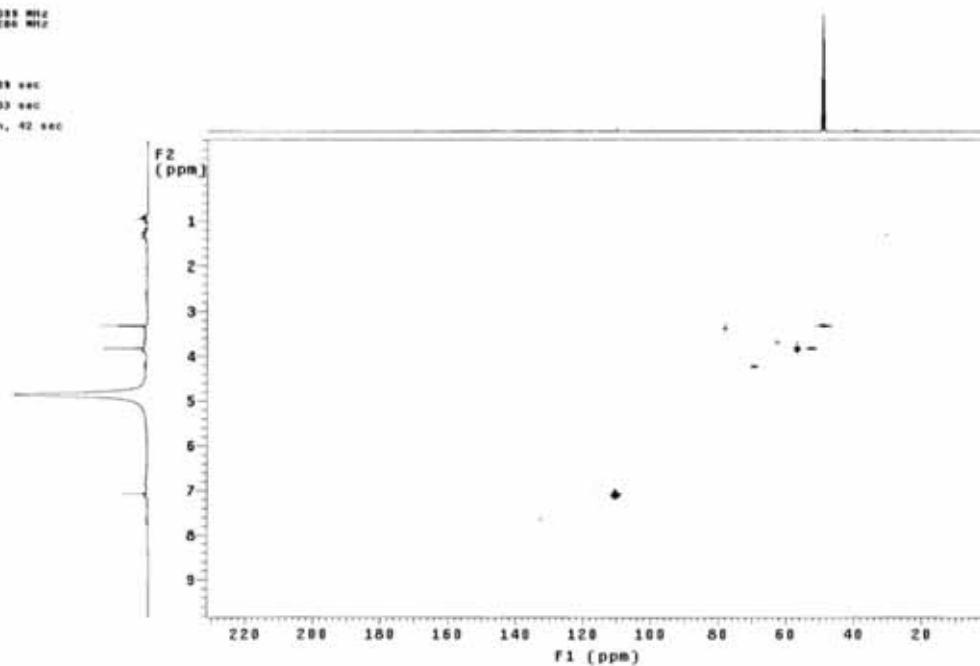


Espectro 31. RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado ( $\delta$  110 –  $\delta$  170) do galato de metila (**7**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

```

Data FACS-3-1 17/06/99
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: cd3od
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: s-19-87
INOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.192 sec
Width 3323.4 Hz
SD Width 28827.6 Hz
18 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE F1, 499.386039 MHz
DECOUPLE C13, 125.980284 MHz
Power 17 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modified
DATA PROCESSING
Gauss optimization 9.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss optimization 9.000 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 25 min, 42 sec
  
```



Espectro 32. gHMQC do galato de metila (**7**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FACI-3-1 17/06/09

Pulse Sequence: gHMOC

Solvent: cd3od

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INDVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.192 sec

Width 5323.4 Hz

2D Width 28627.6 Hz

16 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 499.386000 MHz

DECOUPLE C13, 125.5862286 MHz

Power 47 dB

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

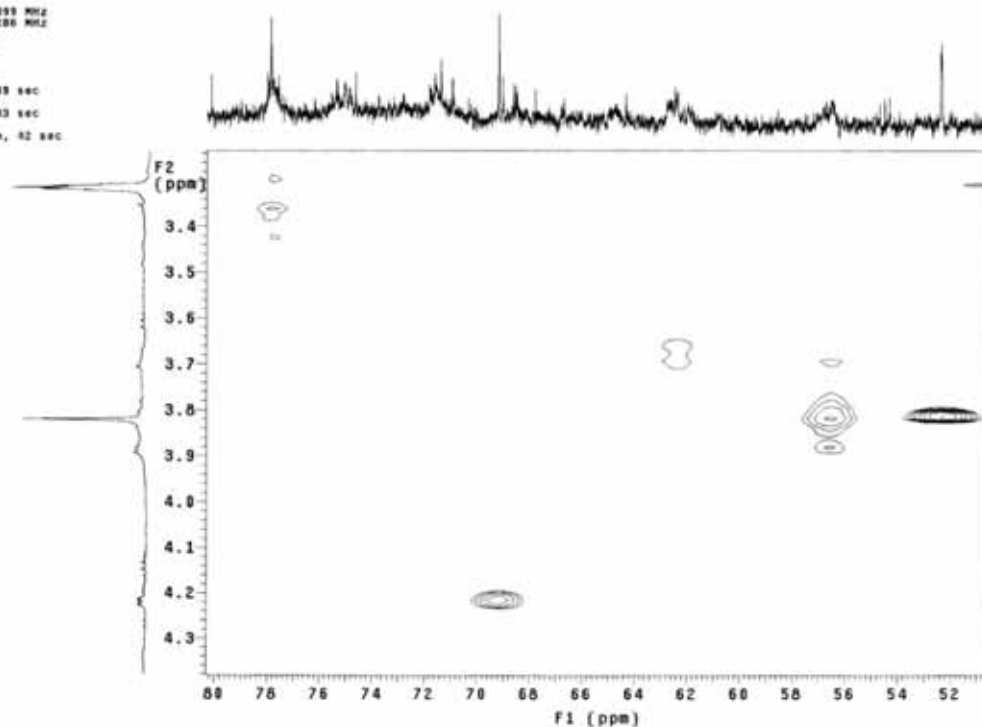
Gauss apodization 0.089 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.003 sec

FT size 1048 x 2048

Total time 1 hr, 25 min, 42 sec



Espectro 33. gHMOC ampliado ( $\delta$  3,3 –  $\delta$  4,3 para H;  $\delta$  52 –  $\delta$  80 para C) do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FACI-3-1 17/06/09

Pulse Sequence: gHMOC

Solvent: cd3od

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INDVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.192 sec

Width 5323.4 Hz

2D Width 28627.6 Hz

16 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 499.386000 MHz

DECOUPLE C13, 125.5862286 MHz

Power 47 dB

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

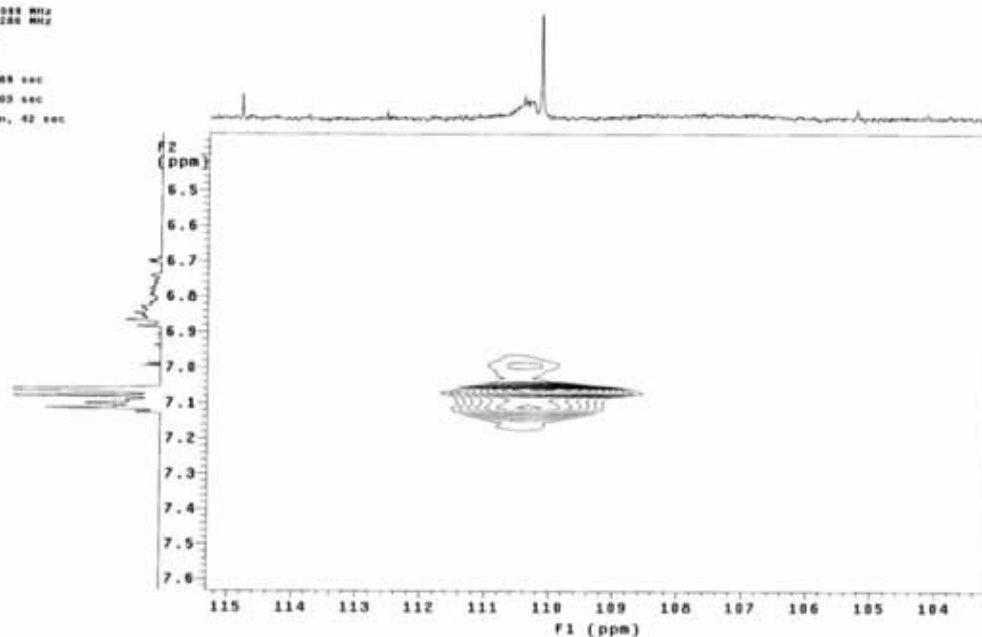
Gauss apodization 0.089 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.003 sec

FT size 1048 x 2048

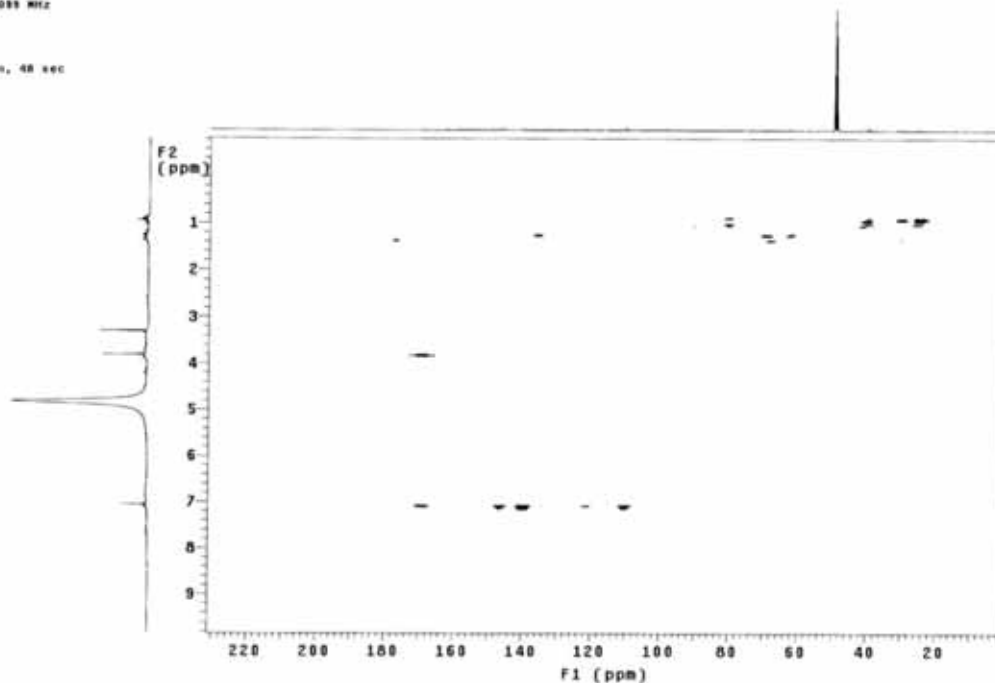
Total time 1 hr, 25 min, 42 sec



Espectro 34. gHMOC ampliado ( $\delta$  6,5 –  $\delta$  7,6 para H;  $\delta$  104 –  $\delta$  115 para C) do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FACI-3-1 17/06/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 INOVA-500 "multis"

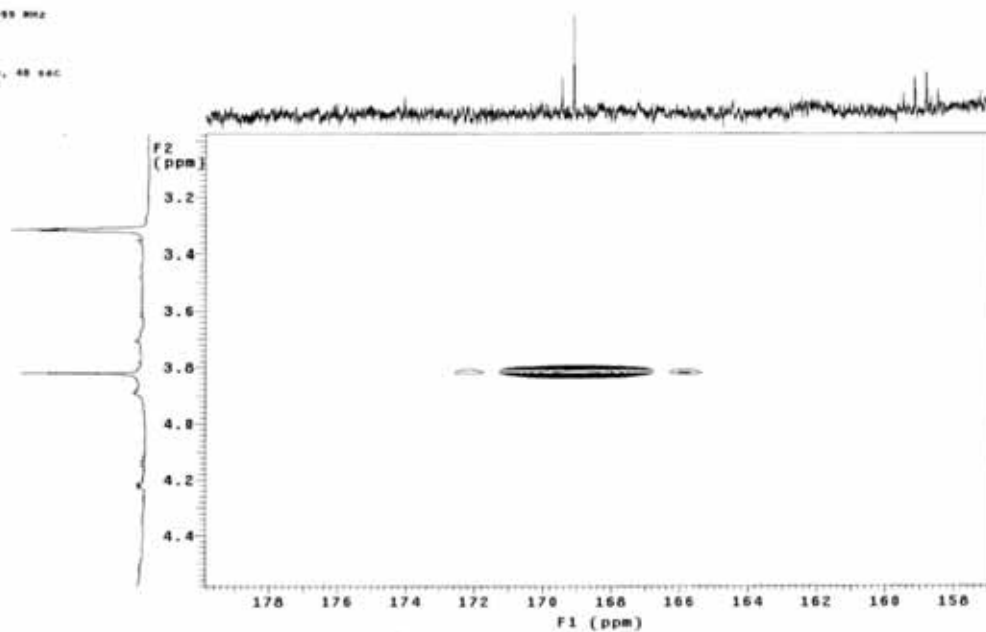
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.192 sec  
 Width 5222.4 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.386000 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.300 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.003 sec  
 F1 size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 27 min, 48 sec



Espectro 35. gHMBC do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FACI-3-1 17/06/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 INOVA-500 "multis"

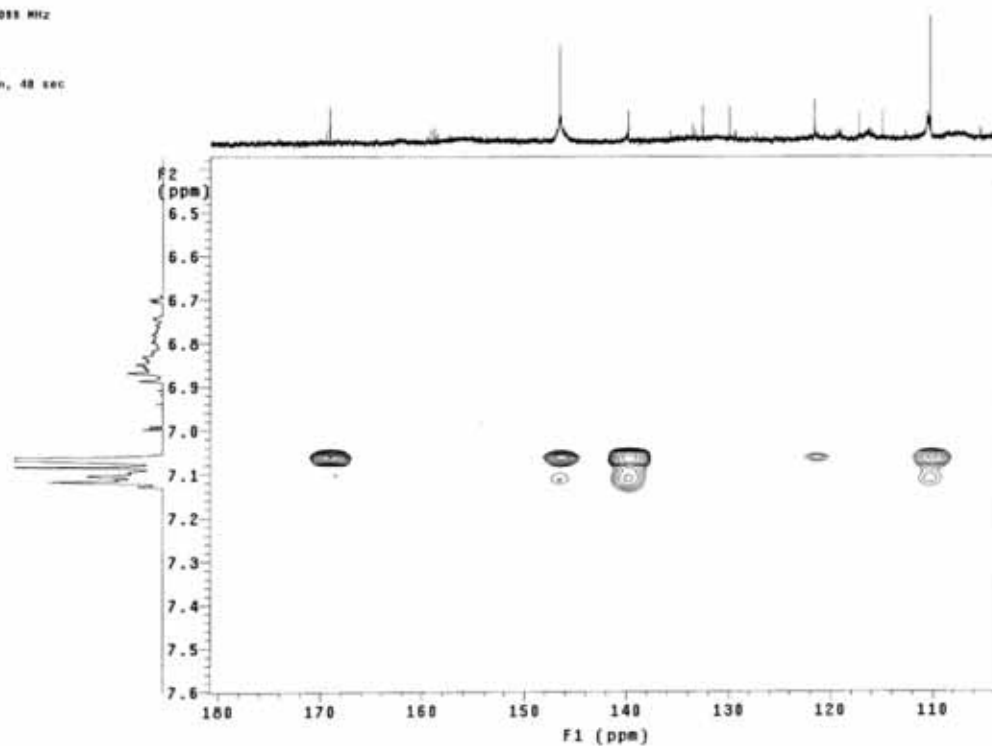
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.192 sec  
 Width 5222.4 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.386000 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.300 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.003 sec  
 F1 size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 27 min, 48 sec



Espectro 36. gHMBC ampliado ( $\delta$  3,2 –  $\delta$  4,4 para H;  $\delta$  158 –  $\delta$  178 para C) do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sera FAc1-3-1 17/06/99  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 "multis5"

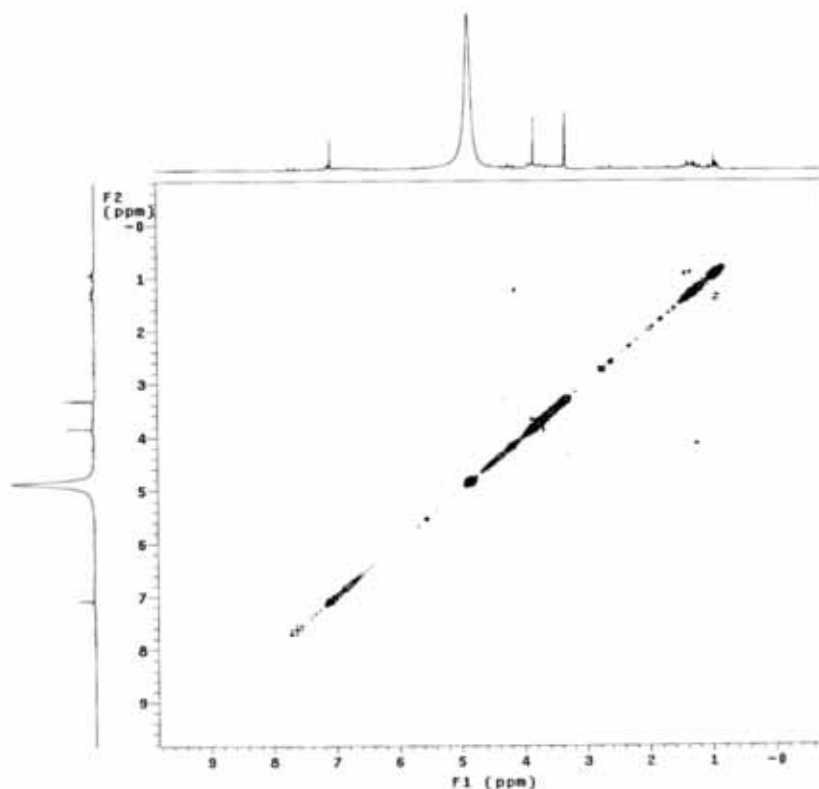
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.182 sec  
 Width 5323.4 Hz  
 2D Width 2927.4 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.3986093 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.098 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.093 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 27 min, 48 sec



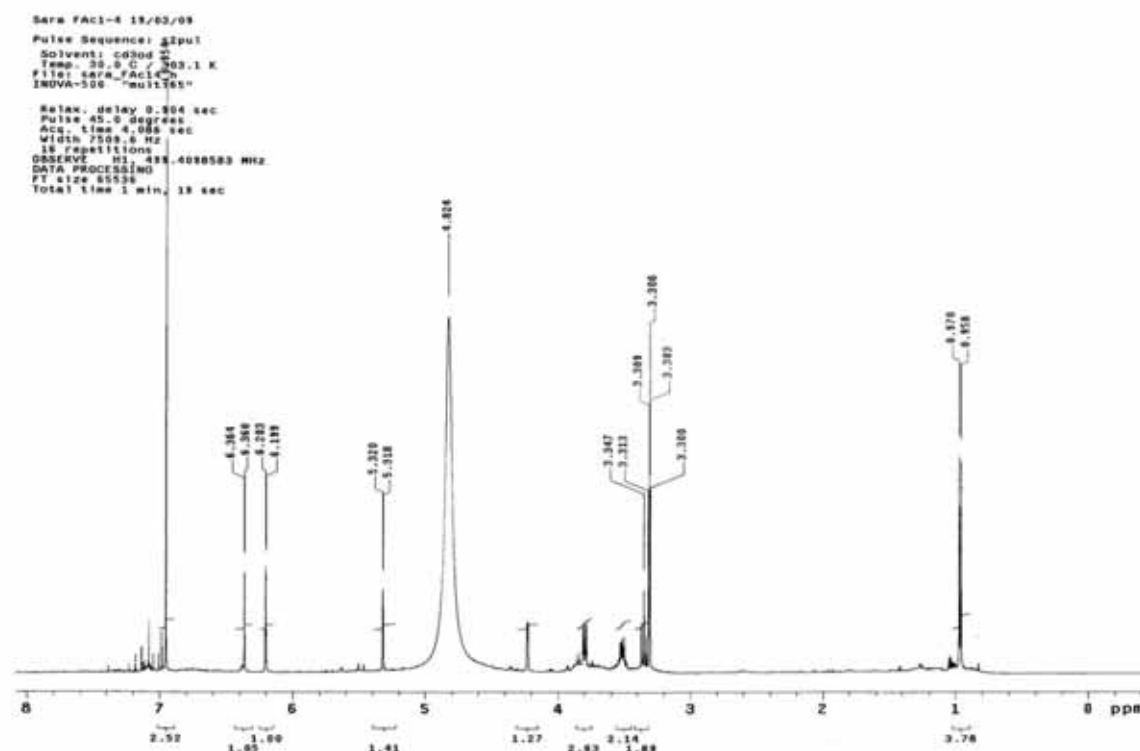
Espectro 37. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,5 –  $\delta$  7,6 para H;  $\delta$  110 –  $\delta$  180 para C) do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sera FAc1-3-1 17/06/99  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 "multis5"

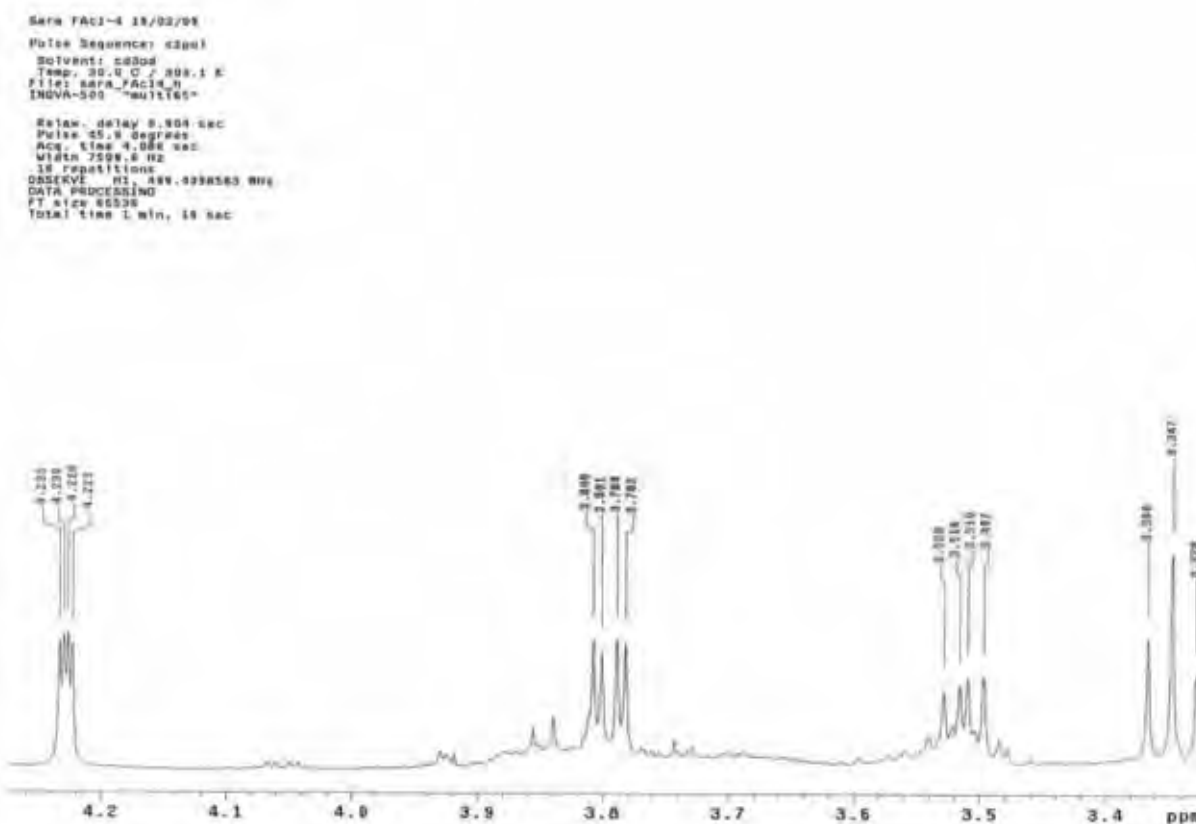
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.182 sec  
 Width 5323.4 Hz  
 2D Width 5323.4 Hz  
 8 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.3986093 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.098 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.014 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 21 min, 5 sec



Espectro 38. gCOSY do galato de metila (7) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).



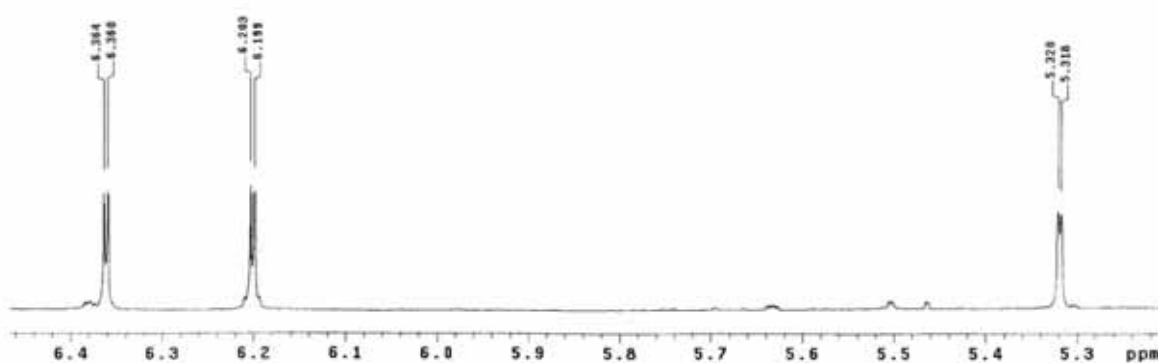
Espectro 39. RMN de  $^1\text{H}$  (integração) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-dihidroxifenila (**8**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).



Espectro 40. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  3,4 –  $\delta$  4,2) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-dihidroxifenila (**8**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FA1-4 19/03/09  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 File: sara\_FA14\_3  
 INOVA-500 "multis" "

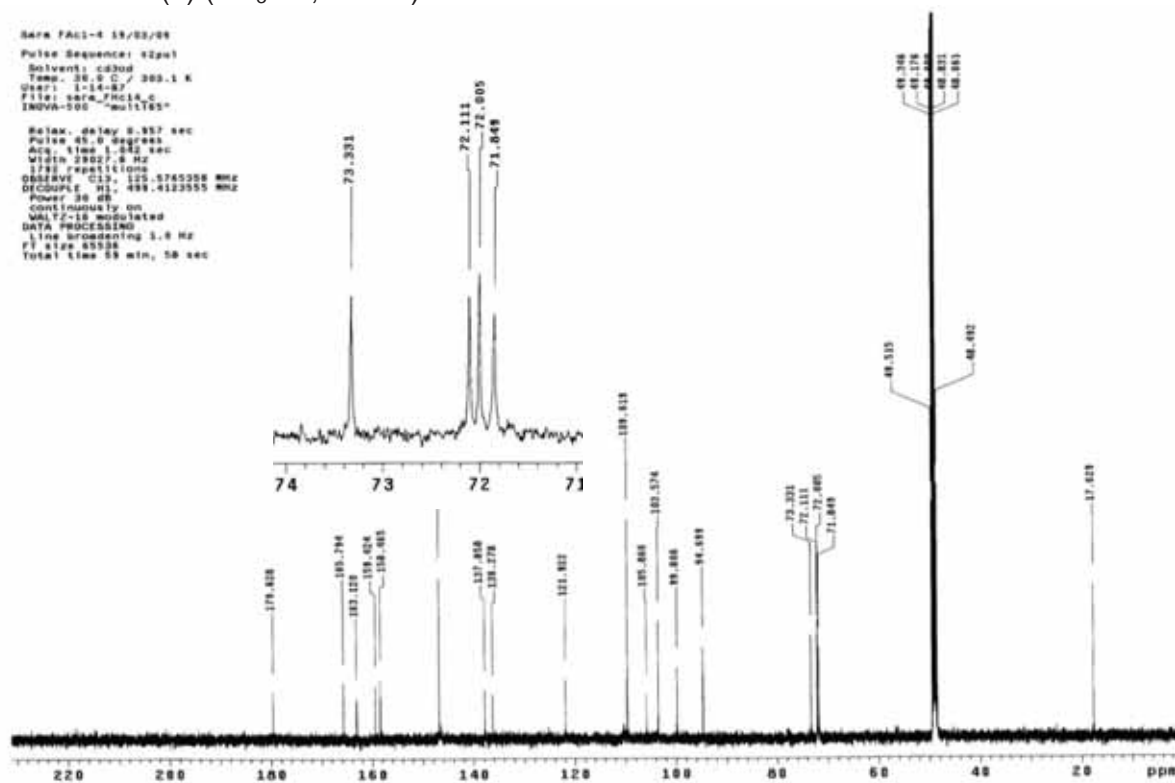
Relax. delay 0.304 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 4.388 sec  
 Width 7508.6 Hz  
 16 repetitions  
 OBSERVE N1, 499.4098563 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 65536  
 Total time 1 min, 19 sec



Espectro 41. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  5,3 –  $\delta$  6,4) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

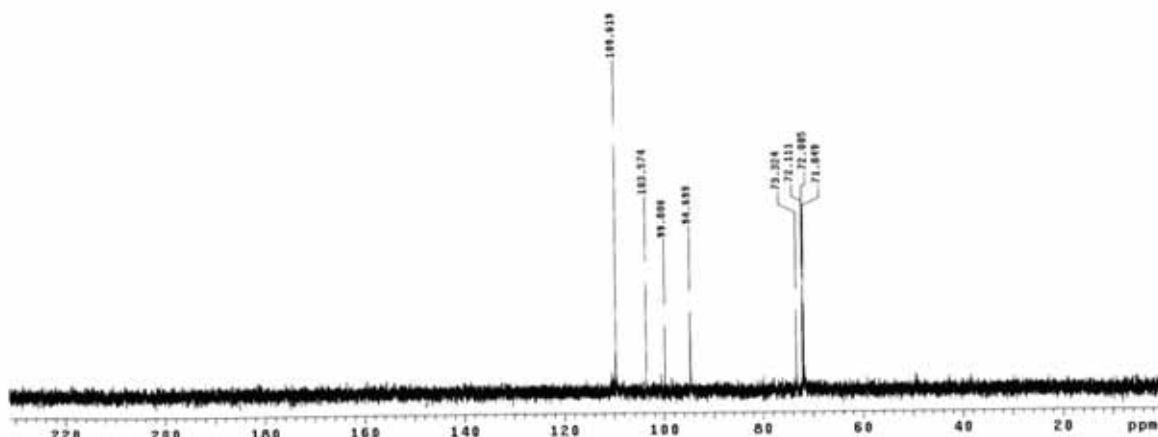
Sara FA1-4 19/03/09  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 File: sara\_FA14\_3  
 INOVA-500 "multis" "

Relax. delay 0.957 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.842 sec  
 Width 23227.8 Hz  
 1782 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.6765358 MHz  
 DECOUPLE N1, 499.4123555 MHz  
 Power 30 dB  
 CONTINUUM by on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 65536  
 Total time 53 min, 50 sec



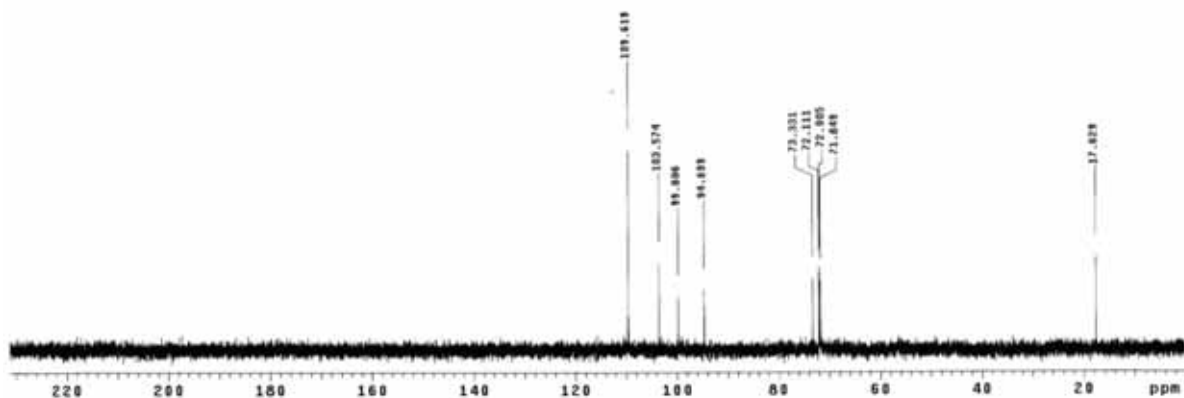
Espectro 42. RMN de  $^{13}\text{C}$  do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

Sara FACI-4 18/03/08  
 Pulse Sequence: DEPT 90  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: i-14-87  
 File: sara\_facia\_dept  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 90.0 degree  
 Acq. time 1.042 sec  
 Width 28027.0 Hz  
 400 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.5785358 MHz  
 DECOUPLE H1, 499.4123555 MHz  
 Power 30 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 65536  
 Total time 27 min, 48 sec



Espectro 43. DEPT 90° do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

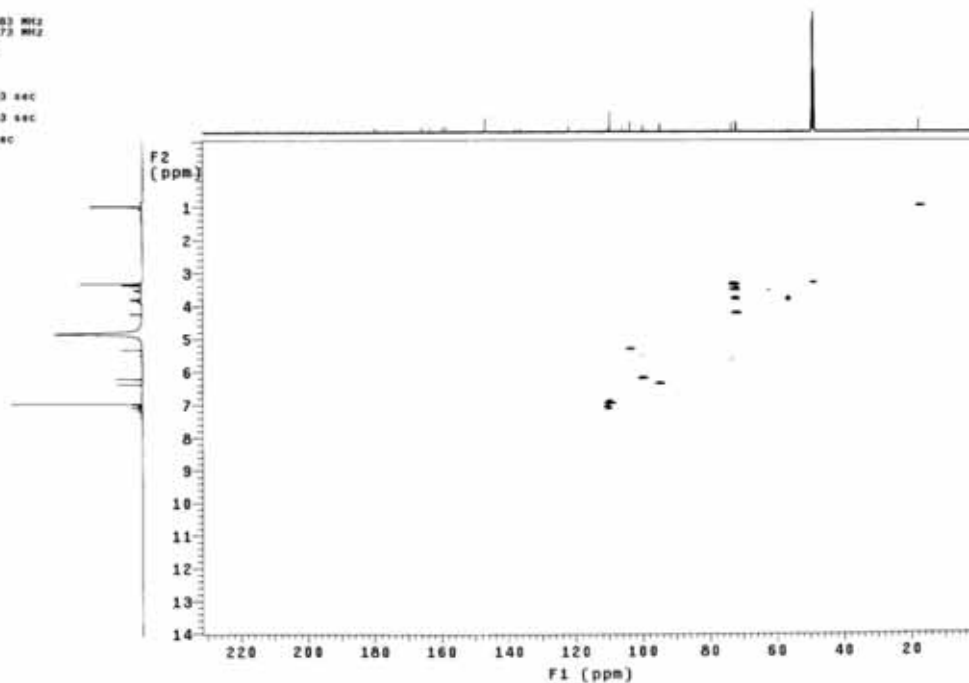
Sara FACI-4 19/03/08  
 Pulse Sequence: DEPT 135  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: i-14-87  
 File: sara\_facia\_dept  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 90.0 degree  
 Acq. time 1.042 sec  
 Width 28027.0 Hz  
 400 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.5785358 MHz  
 DECOUPLE H1, 499.4123555 MHz  
 Power 30 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 65536  
 Total time 27 min, 48 sec



Espectro 44. DEPT 135° do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FACI-4 18/03/08  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 File: sara\_fac14\_gmhc  
 INOVA-500 "multif5"

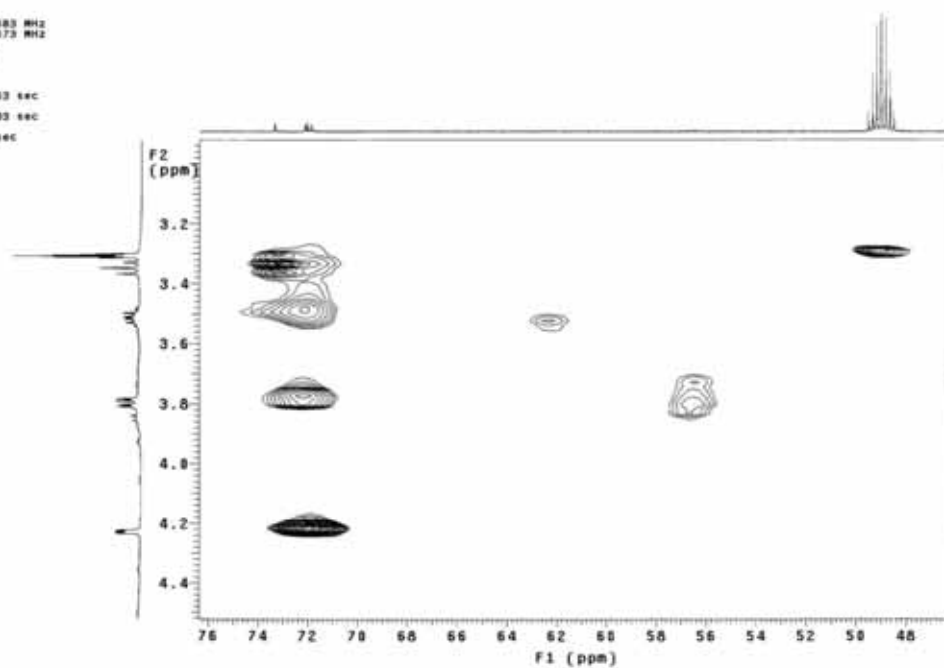
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7509.6 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 8 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE F1, 439.408000 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.591073 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 41 min, 14 sec



Espectro 45. gHMOC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FACI-4 18/03/08  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: cd3od  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 File: sara\_fac14\_gmhc  
 INOVA-500 "multif5"

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7509.6 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 8 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE F1, 439.408000 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.591073 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 41 min, 14 sec



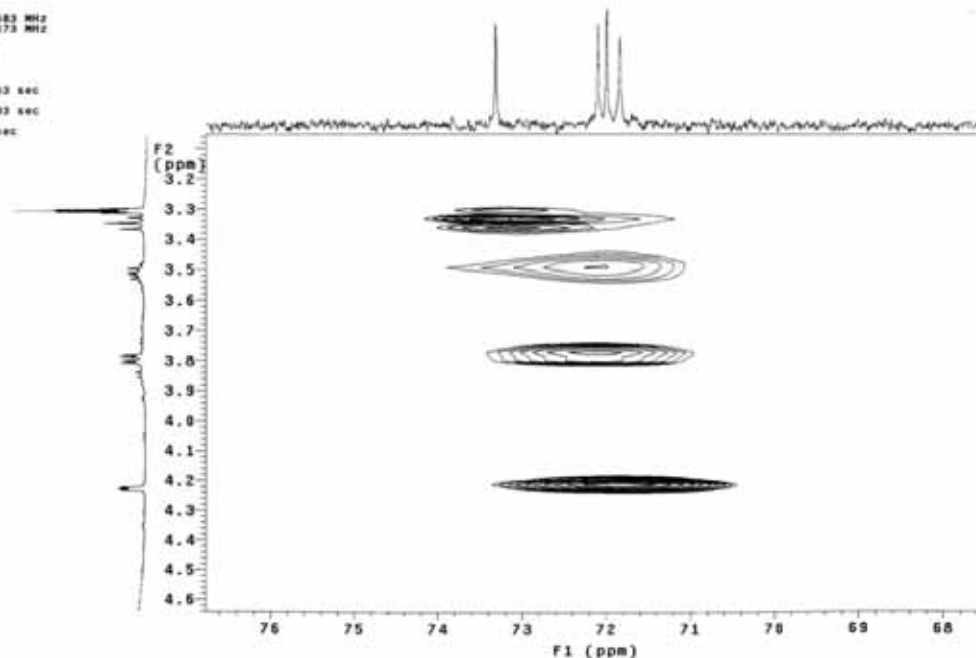
Espectro 46. gHMOC ampliado ( $\delta$  3,2 –  $\delta$  4,4 para H;  $\delta$  48 –  $\delta$  76 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).



Sara FACI-4 18/02/98  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 File: sara\_FACI4\_gmwec  
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7508.8 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 8 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4086583 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5810573 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated

DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 41 min, 14 sec

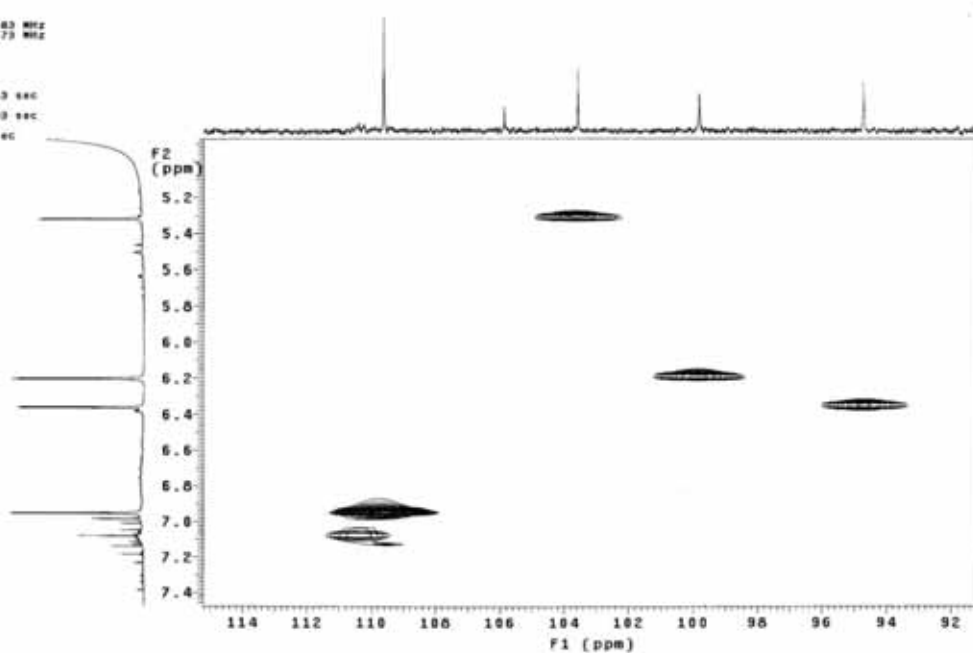


Espectro 47. gHMOC ampliado ( $\delta$  3,2 –  $\delta$  4,6 para H;  $\delta$  68 –  $\delta$  76 para C) do 1-ranmopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FACI-4 18/02/98  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-87  
 File: sara\_FACI4\_gmwec  
 INOVA-500 "multis5"

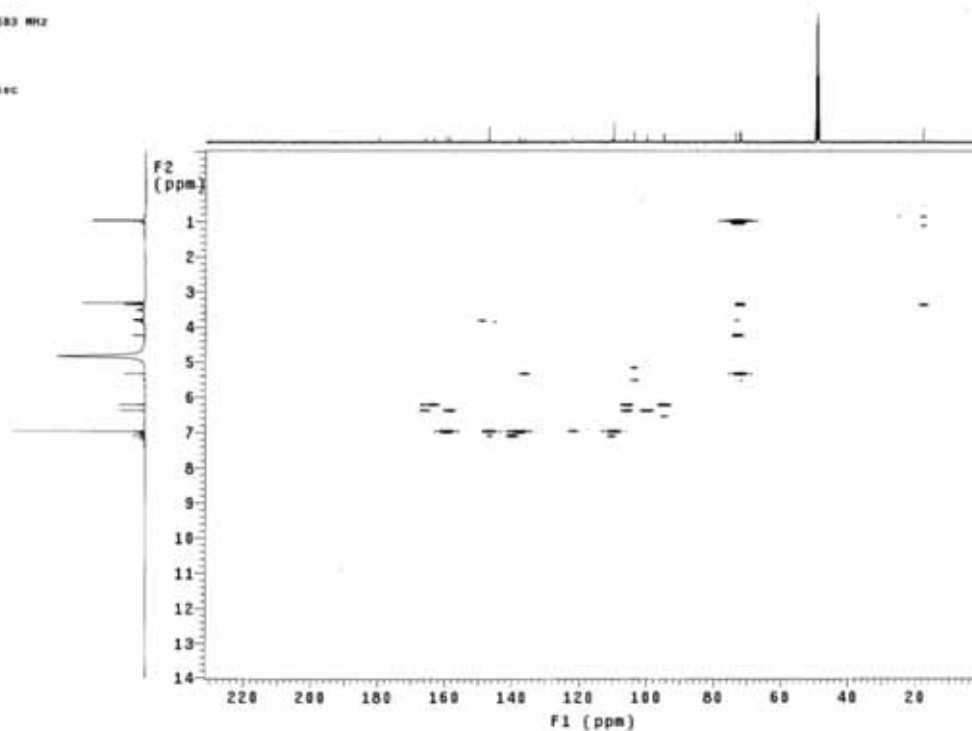
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7508.8 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 8 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4086583 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5810573 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated

DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 41 min, 14 sec



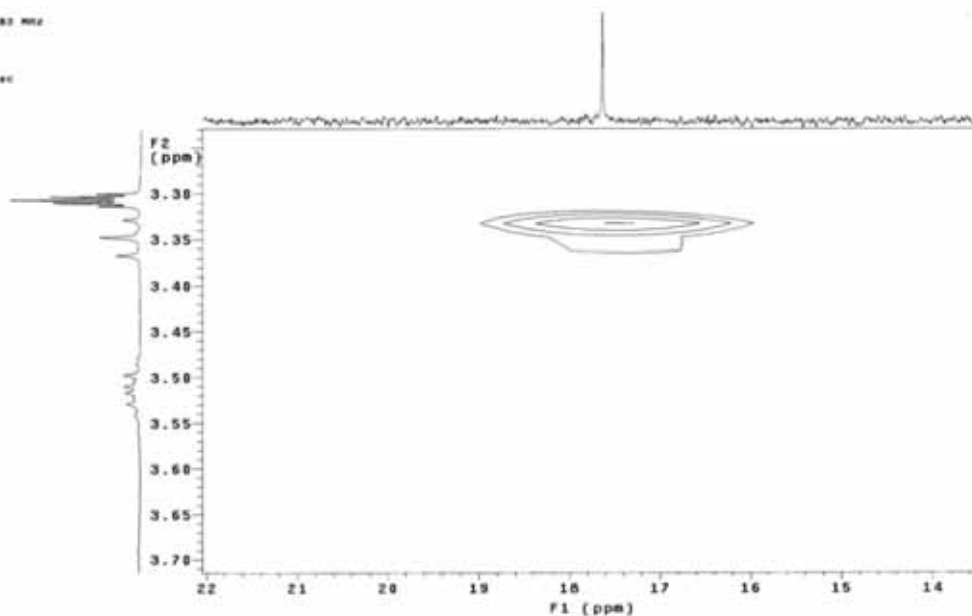
Espectro 48. gHMOC ampliado ( $\delta$  5,2 –  $\delta$  7,4 para H;  $\delta$  92 –  $\delta$  114 para C) do 1-ranmopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sera FAc1-4 19/03/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 File: sera\_FAc14\_gmhc  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 16 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.408583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 42 min, 18 sec



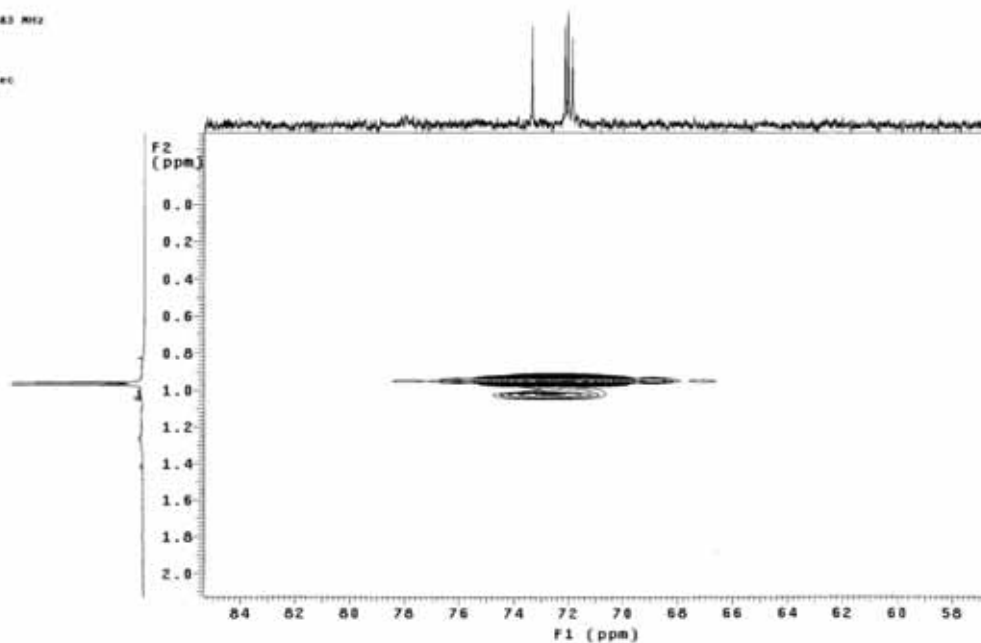
Espectro 49. gHMBC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sera FAc1-8 19/03/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: 1-14-07  
 File: sera\_FAc14\_gmhc  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 16 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.408583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 42 min, 18 sec



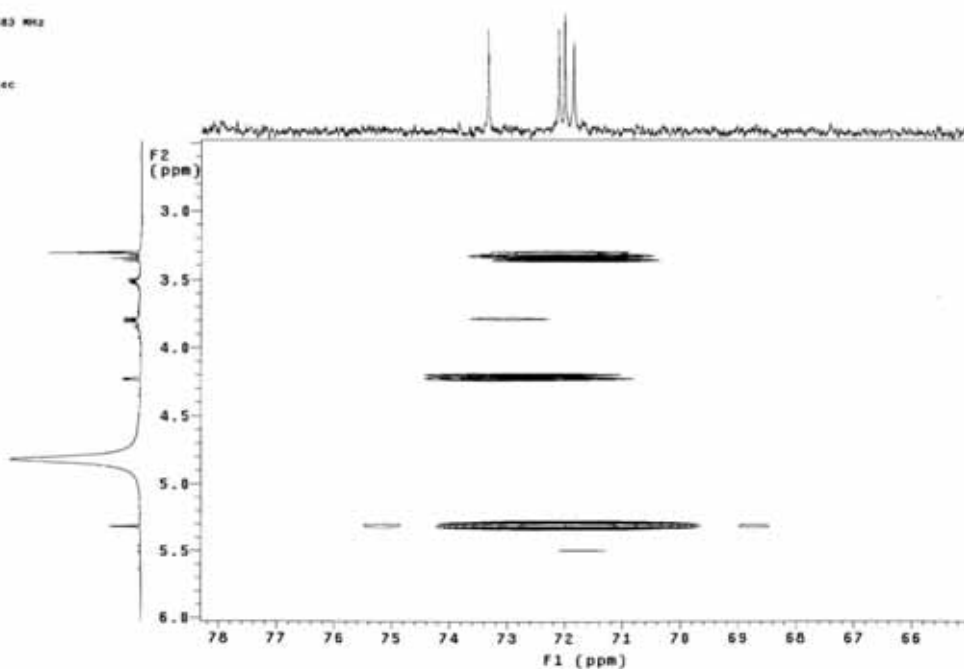
Espectro 50. gHMBC ampliado ( $\delta$  3,30 –  $\delta$  3,70 para H;  $\delta$  14 –  $\delta$  22 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FAC1-4 18/03/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: i-14-87  
 File: sara\_FAC14\_gmhc  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 F2 Width 24027.6 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.408563 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.068 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 42 min, 18 sec



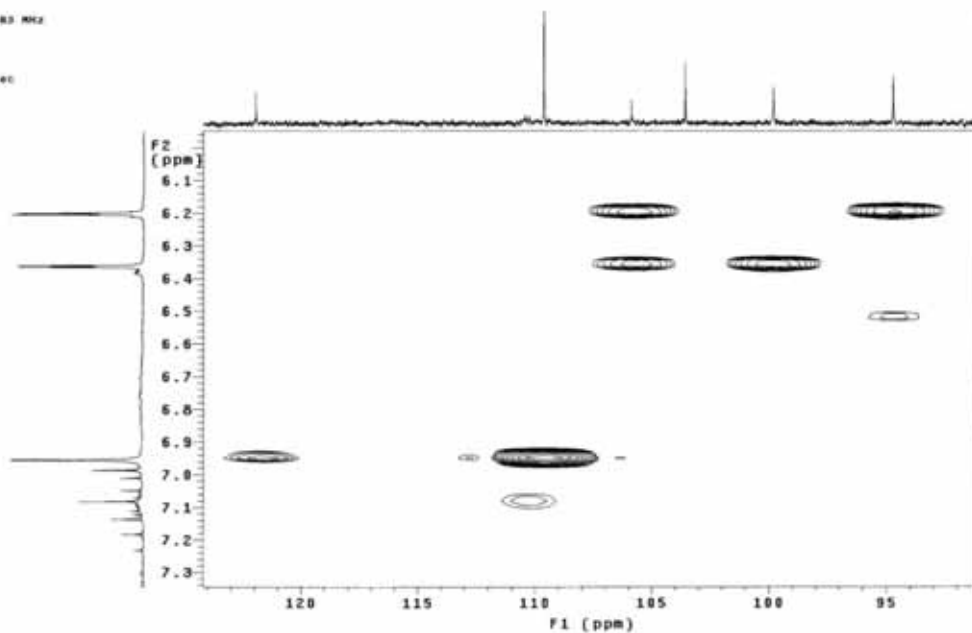
Espectro 51. gHMBC ampliado ( $\delta$  0,2 –  $\delta$  2,0 para H;  $\delta$  58 –  $\delta$  84 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FAC1-4 18/03/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: i-14-87  
 File: sara\_FAC14\_gmhc  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 F2 Width 24027.6 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.408563 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.068 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 42 min, 18 sec



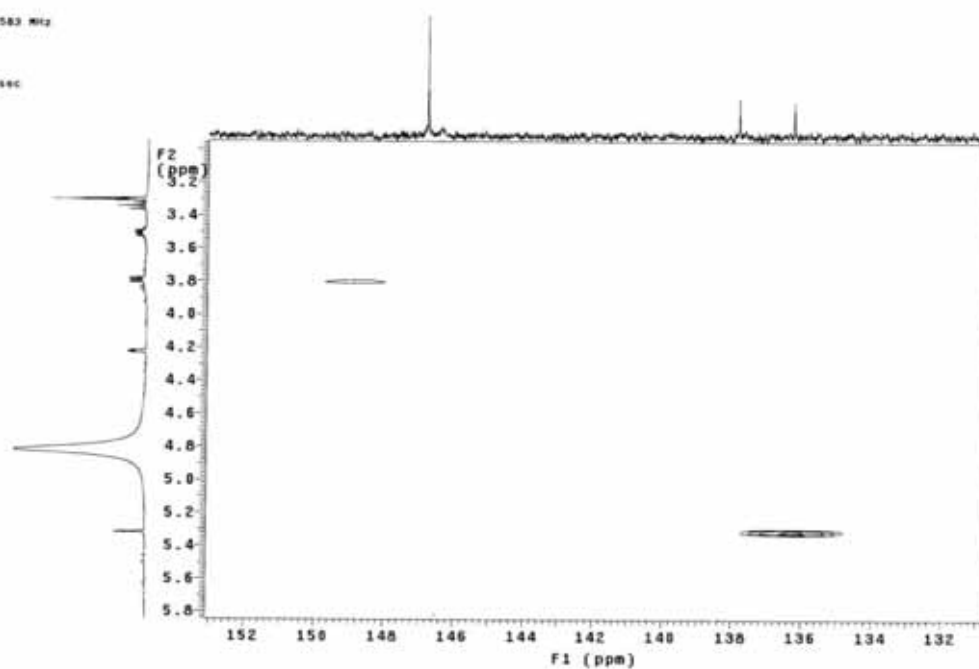
Espectro 52. gHMBC ampliado ( $\delta$  3,0 –  $\delta$  6,0 para H;  $\delta$  66 –  $\delta$  78 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FACI-4 18/03/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: i-18-02  
 File: sara\_faci4\_gmhc  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7508.8 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 18 Repetitions  
 128 Increments  
 OBSERVE F1: 499.4880583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.088 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.082 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 42 min, 18 sec



Espectro 53. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,1 –  $\delta$  7,3 para H;  $\delta$  95 –  $\delta$  120 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

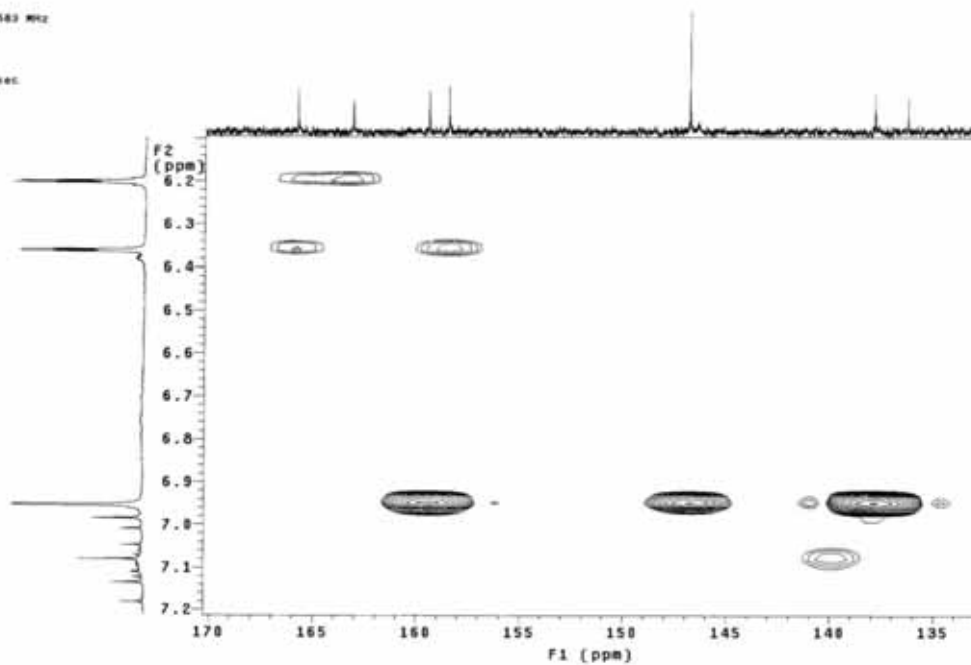
Sara FACI-4 18/03/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: i-18-02  
 File: sara\_faci4\_gmhc  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7508.8 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 18 Repetitions  
 128 Increments  
 OBSERVE F1: 499.4880583 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.088 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.082 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 42 min, 18 sec



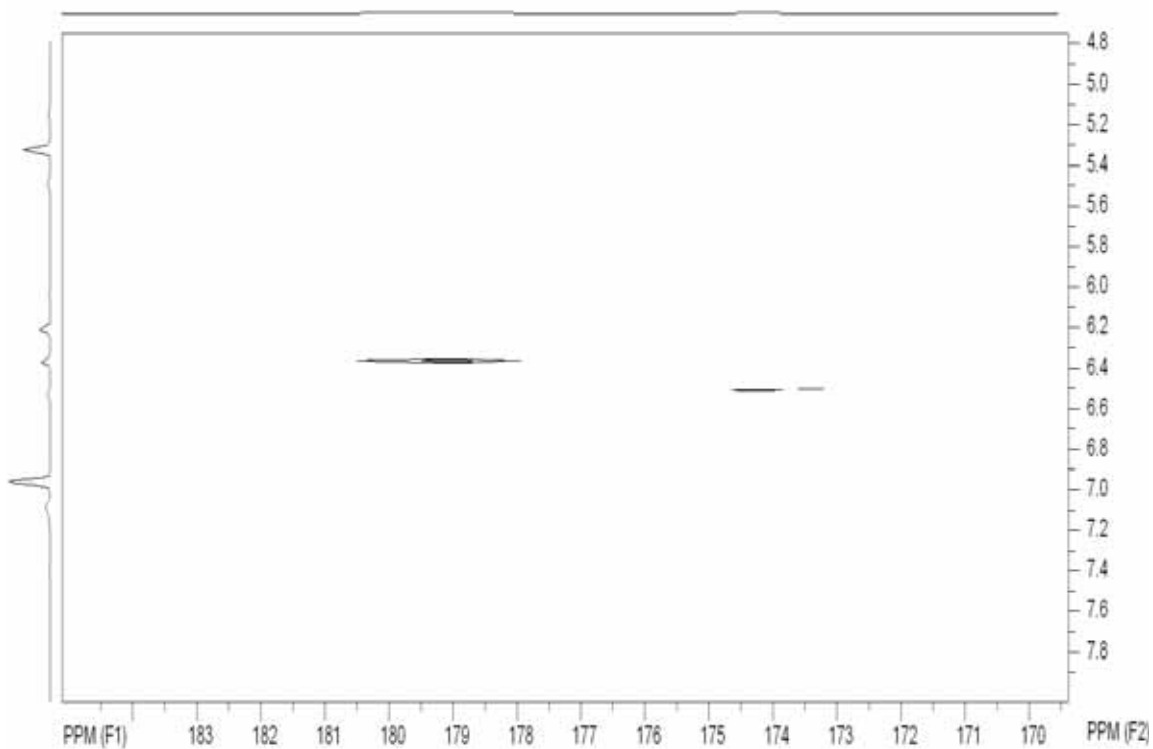
Espectro 54. gHMBC ampliado ( $\delta$  3,2 –  $\delta$  5,8 para H;  $\delta$  132 –  $\delta$  152 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sera FACI-4 18/03/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 30.0 C / 300.1 K  
 User: 1-14-07  
 File: sera\_faci4\_gmhc  
 INOVA-500 "multis" "

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 WIDEN 2300.0 Hz  
 2D Width 2302.4 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1 400.469850 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 F2 size 2048 x 2048  
 TOTAL time 42 min, 18 sec



Espectro 55. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,2 –  $\delta$  7,2 para H;  $\delta$  135 –  $\delta$  170 para C) do 1-ranopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).



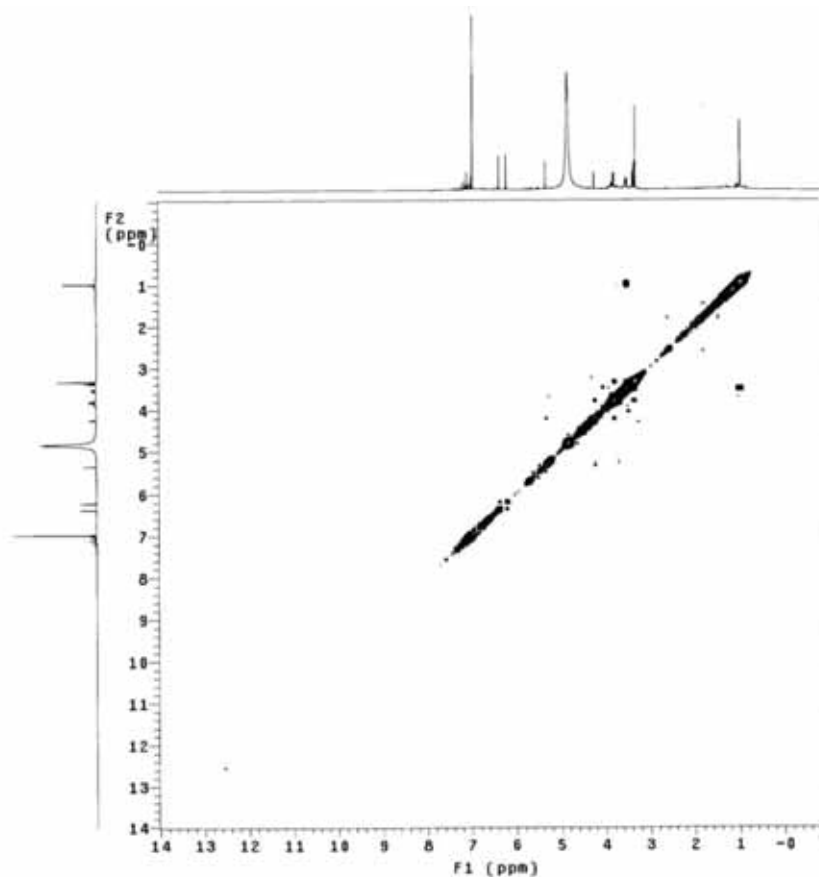
Espectro 56. gHMBC ampliado ( $\delta$  4,8 –  $\delta$  7,8 para H;  $\delta$  170 –  $\delta$  183 para C) do 1-ranopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11.7 T).

```

Sara FACI-4 19/03/08
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: cd3od
Temp: 30.0 C / 303.1 K
File: sara_faci4_gcosy
INOVA-300 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.138 sec
Width 7500.0 Hz
F2 Width 7500.0 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE F1: 499.4096563 MHz
DATA PROCESSING
Ss. sine bell 0.068 sec
F1 DATA PROCESSING
Ss. sine bell 0.010 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min, 3 sec

```



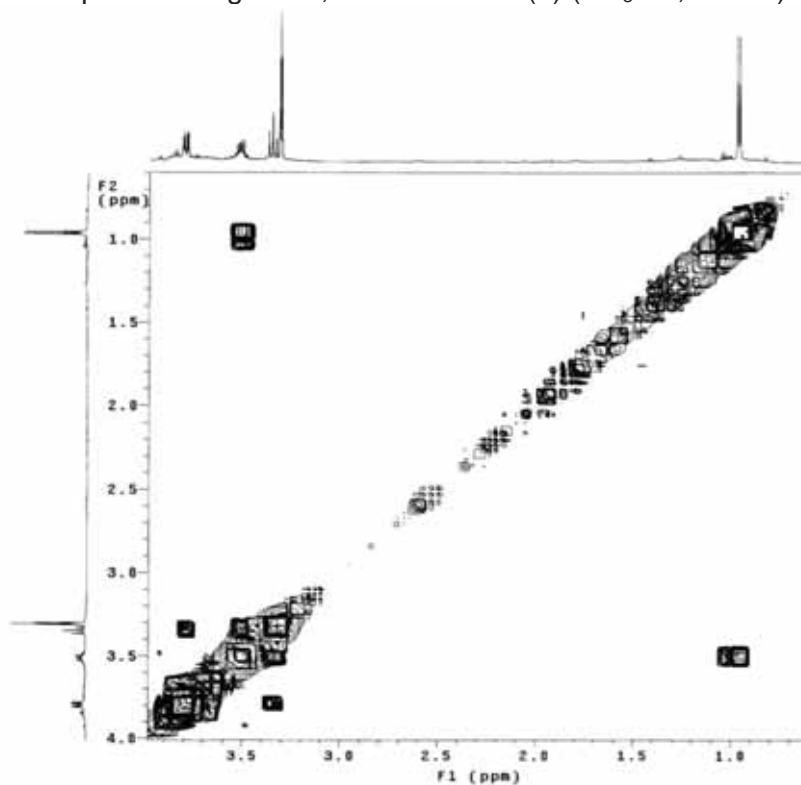
Espectro 57. gCOSY do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-dihidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

```

Sara FACI-4 19/03/08
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: cd3od
Temp: 30.0 C / 303.1 K
File: sara_faci4_gcosy
INOVA-300 "multis5"

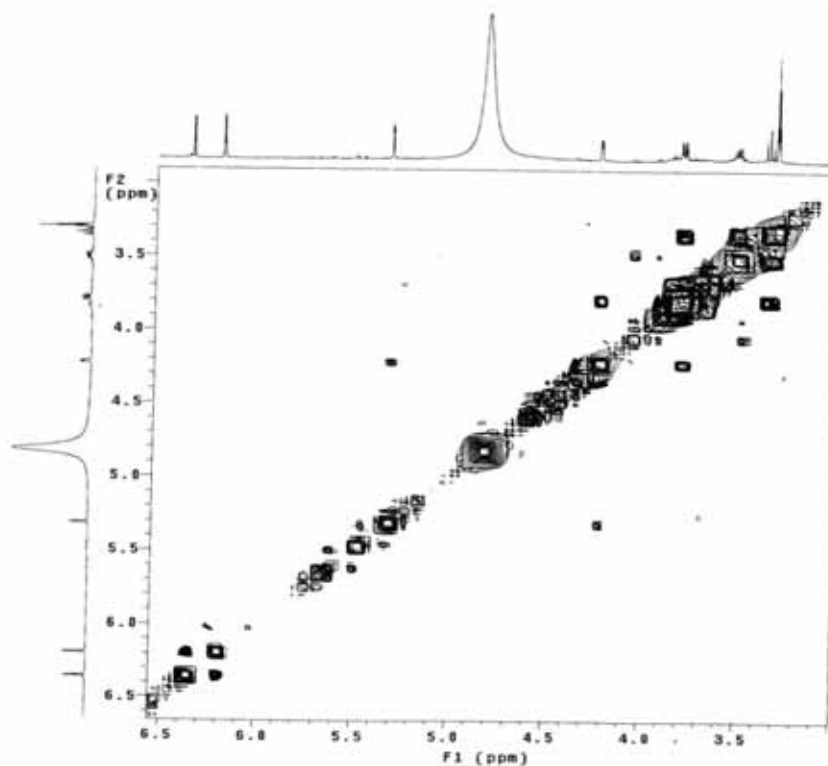
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.138 sec
Width 7500.0 Hz
F2 Width 7500.0 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE F1: 499.4096563 MHz
DATA PROCESSING
Ss. sine bell 0.068 sec
F1 DATA PROCESSING
Ss. sine bell 0.010 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min, 3 sec

```



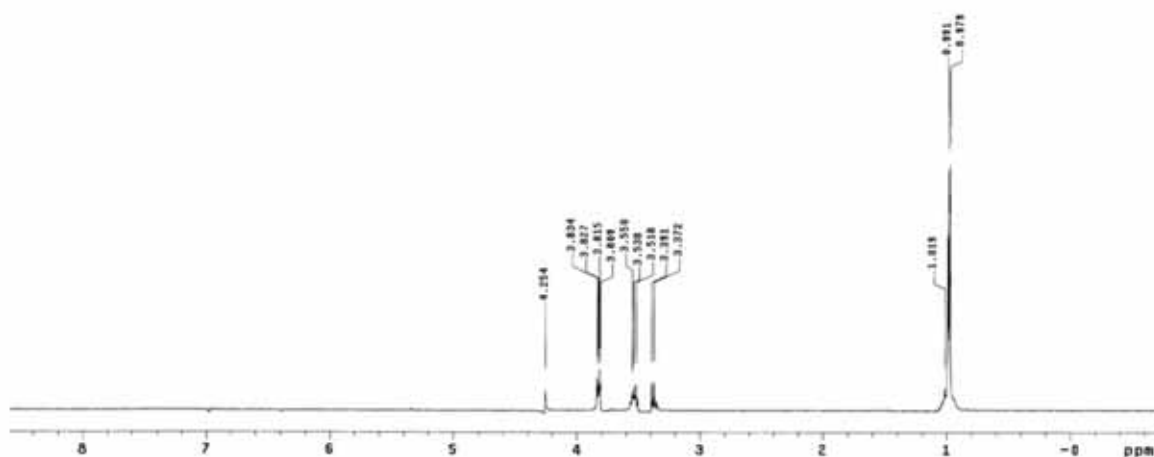
Espectro 58. gCOSY ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  4,0) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-dihidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FAC1-4 18/05/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 29.9 C / 303.1 K  
 File: sara\_FAC18\_grosy  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.134 sec  
 Width 7589.8 Hz  
 DQ Width 7589.8 Hz  
 # Repetitions  
 8  
 128 Increments  
 OBSERVE F1: 499.408058 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sx. time 0.011 0.008 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sx. time 0.011 0.010 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 20 min, 3 sec



Espectro 59. gCOSY ampliado ( $\delta$  3,0 –  $\delta$  6,5) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

Sara FAC 1-4 14/04/09  
 Pulse Sequence: TOCSY1D  
 Solvent: cd3od  
 Temp: 29.9 C / 303.1 K  
 File: sara\_FAC14\_tocsy1d  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 90.0 degrees  
 Mixing 2.100 sec  
 Acq. time 4.998 sec  
 Width 4850.1 Hz  
 # Repetitions  
 32  
 OBSERVE F1: 499.4042268 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 85536  
 Total time 3 min, 11 sec



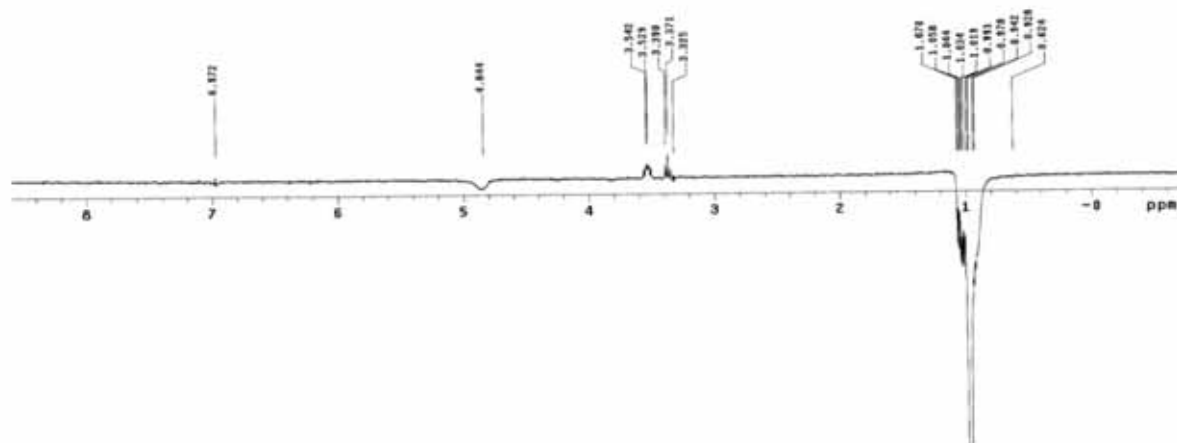
Espectro 60. TOCSY 1D do 1-ramnopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

```

Sara FAC 1-8 14/04/08
Pulse Sequence: NOESY1D
Solvent: cd3od
Temp: 30.0 C / 303.1 K
File: sara_facia_noesy1d1
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Mixing 1.000 sec
Acq. Time 4.000 sec
Width 4050.1 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1 499.4942200 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 85536
Total time 7 min, 0 sec

```



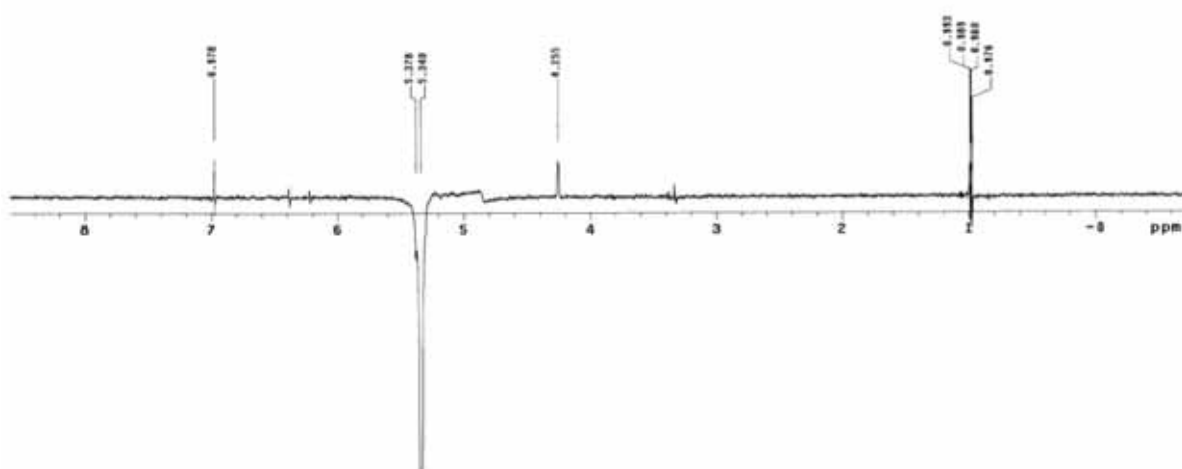
Espectro 61. NOESY 1D (correlação direta do  $\delta$  1,0 com  $\delta$  3,3,  $\delta$  3,5,  $\delta$  4,8 e  $\delta$  6,9) do 1-ranopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

```

Sara FAC 1-8 14/04/08
Pulse Sequence: NOESY1D
Solvent: cd3od
Temp: 30.0 C / 303.1 K
File: sara_facia_noesy1d2
INOVA-500 "multis5"

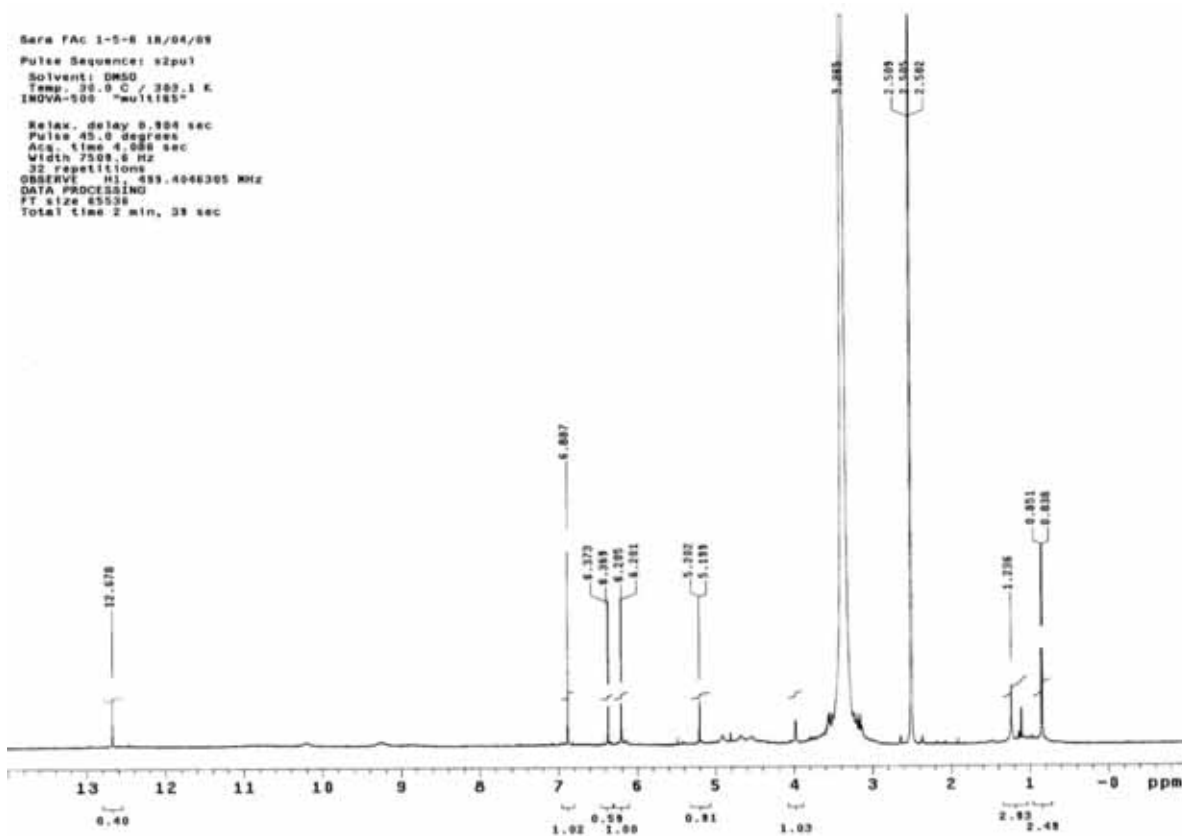
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Mixing 1.000 sec
Acq. Time 4.000 sec
Width 4050.1 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1 499.4942200 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 85536
Total time 3 min, 32 sec

```

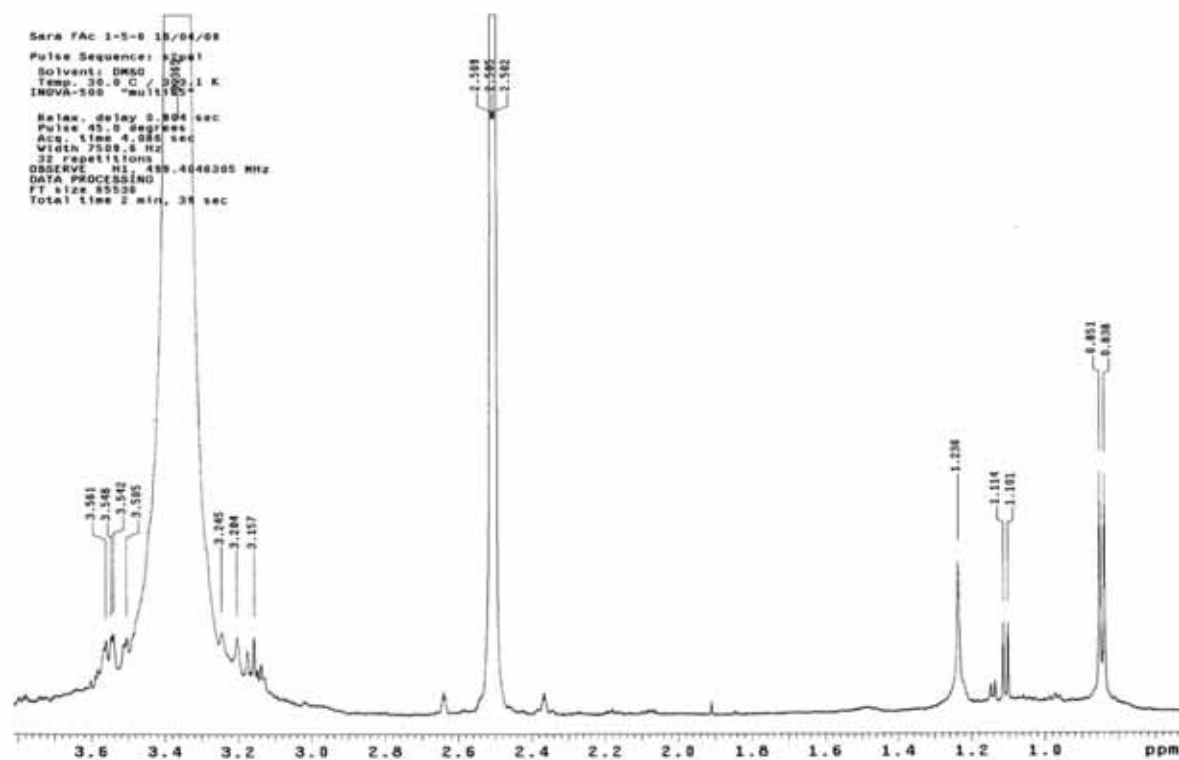


Espectro 62. NOESY 1D (correlação direta do  $\delta$  5,3 com  $\delta$  6,9,  $\delta$  4,2 e  $\delta$  0,9) do 1-ranopiranosil-2-galoil-4,6-diidroxifenila (**8**) (CD<sub>3</sub>OD, 11.7 T).

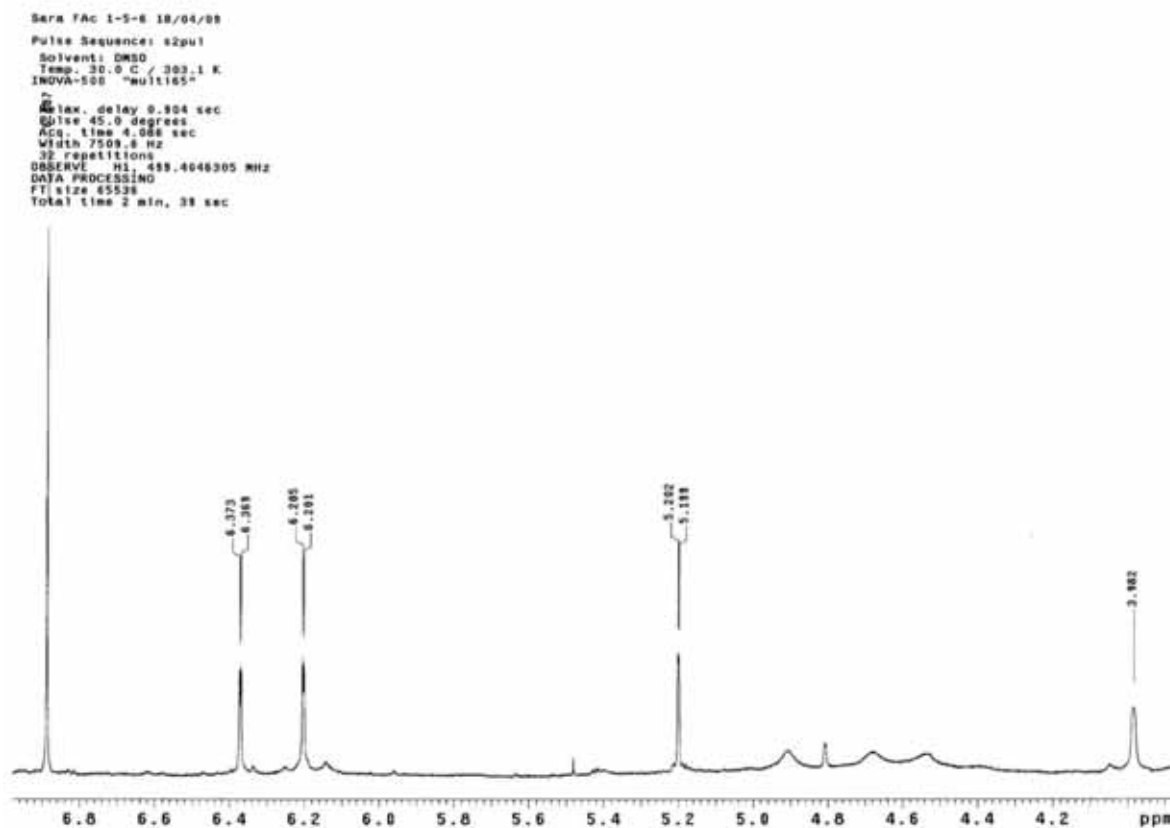




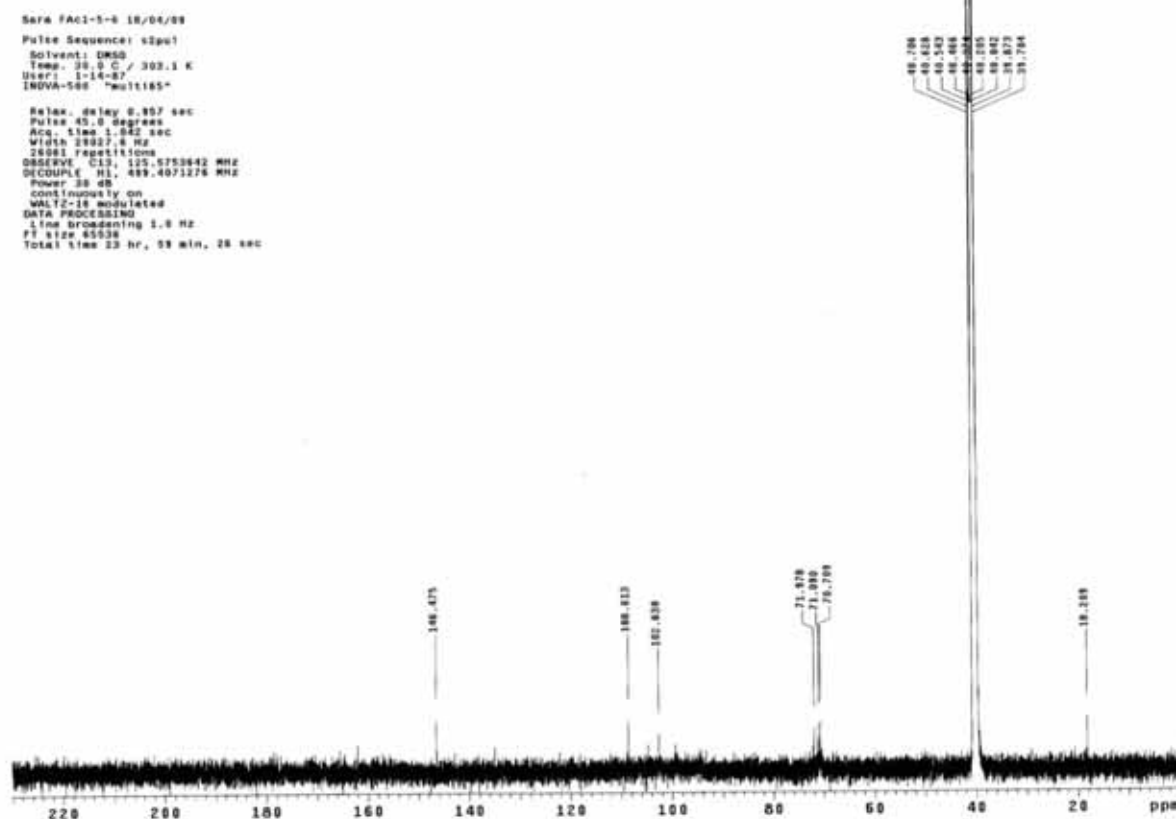
Espectro 63. RMN de  $^1\text{H}$  (integração) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-dihidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



Espectro 64. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  3,6) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-dihidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



Espectro 65. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  3,9 –  $\delta$  6,8) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



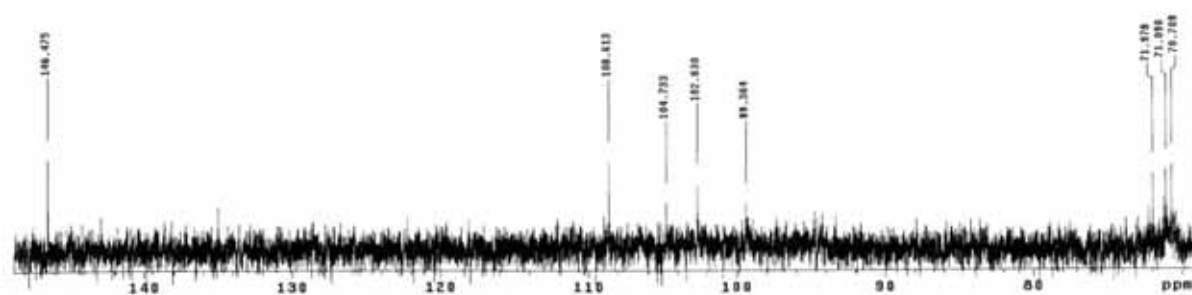
Espectro 66. RMN de  $^{13}\text{C}$  do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

```

Sara FAc1-5-6 18/04/08
Pulse Sequence: g2pul
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: i-14-87
INOVA-500 "multis"

Relax. delay 0.937 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 23027.6 Hz
26881 repetitions
OBSERVE C13, 125.1370862 MHz
DECOUPLE H1, 499.4971576 MHz
Power 20 dB
continuous on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 23 hr, 59 min, 20 sec

```



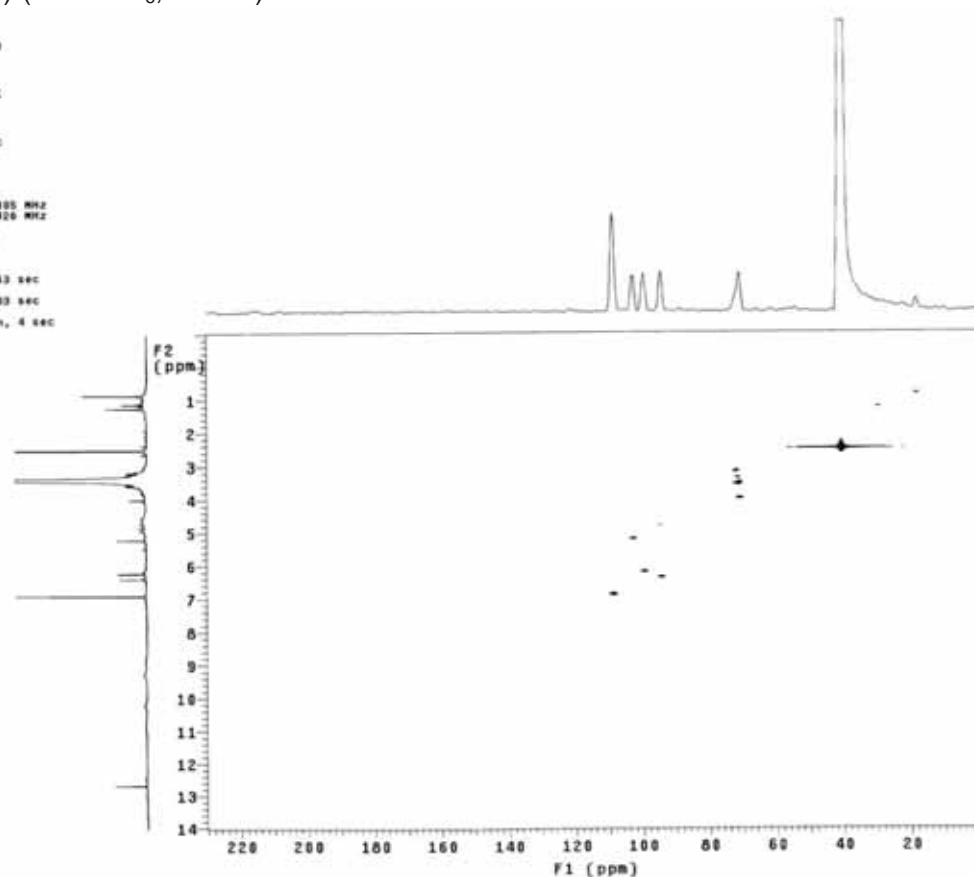
Espectro 67. RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado ( $\delta$  70,0 –  $\delta$  147) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

```

Sara FAc 1-5-6 18/04/08
Pulse Sequence: gnmqc
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: i-14-87
INOVA-500 "multis"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.126 sec
Width 7508.6 Hz
20 Width 23027.6 Hz
33 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE n1, 499.4948385 MHz
DECOUPLE C13, 125.1370862 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 3248 x 2048
Total time 2 hr, 43 min, 4 sec

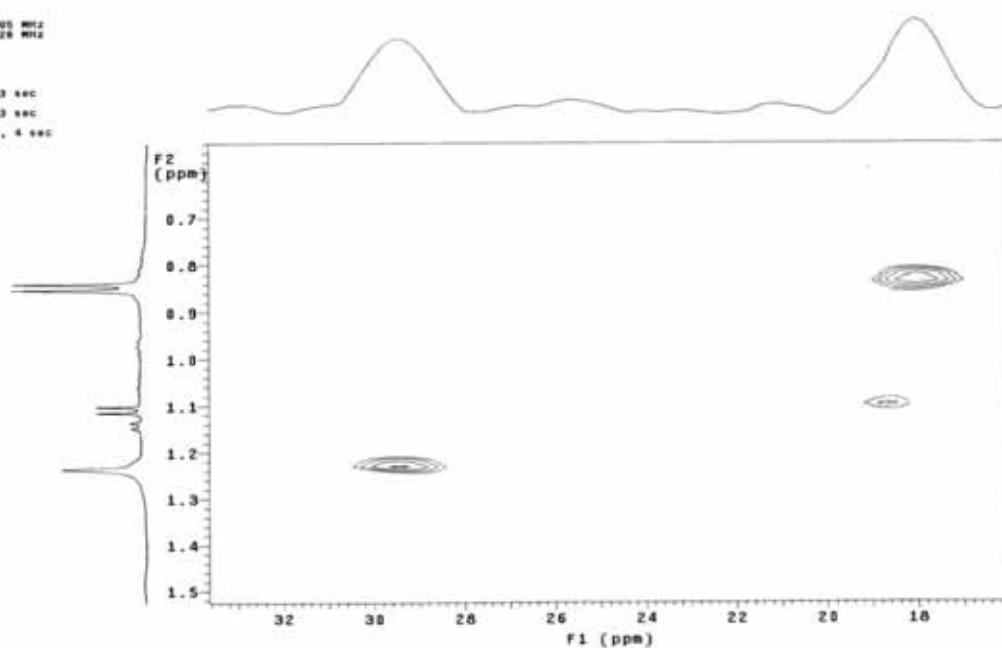
```



Espectro 68. gHMQC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FAC 1-5-8 18/04/09  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: j-14-87  
 INOVA-500 "multis5"

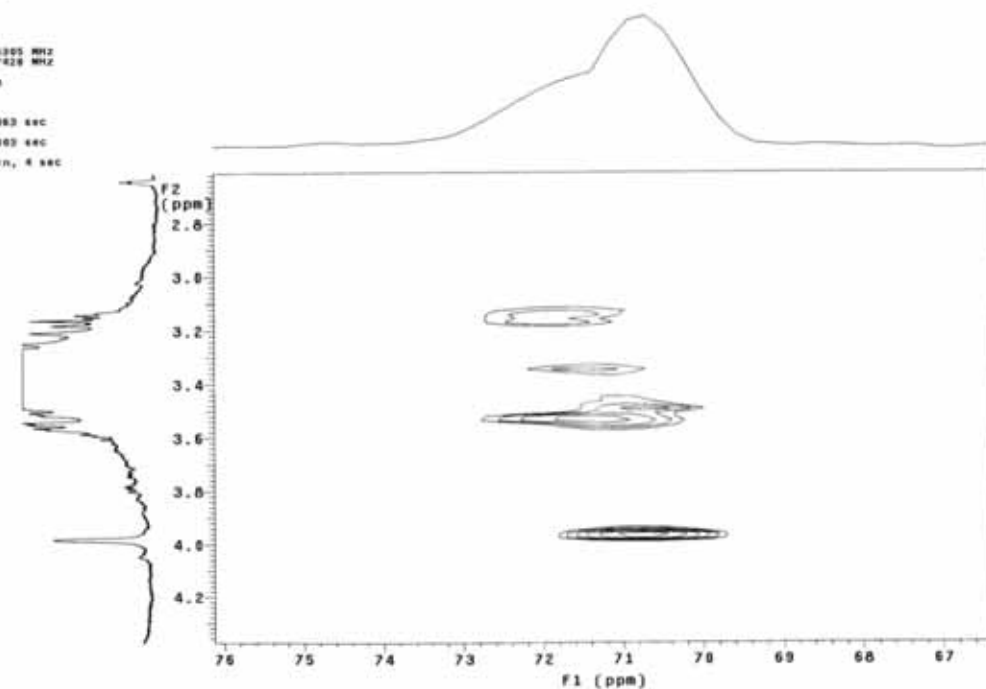
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 SD Width 25027.8 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.404800 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5897428 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2568 x 2568  
 Total time 2 hr, 43 min, 4 sec



Espectro 69. gHMOC ampliado ( $\delta$  3,4 –  $\delta$  4,2) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FAC 1-5-8 18/04/09  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 User: j-14-87  
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 SD Width 25027.8 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.404800 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5897428 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2568 x 2568  
 Total time 2 hr, 43 min, 4 sec

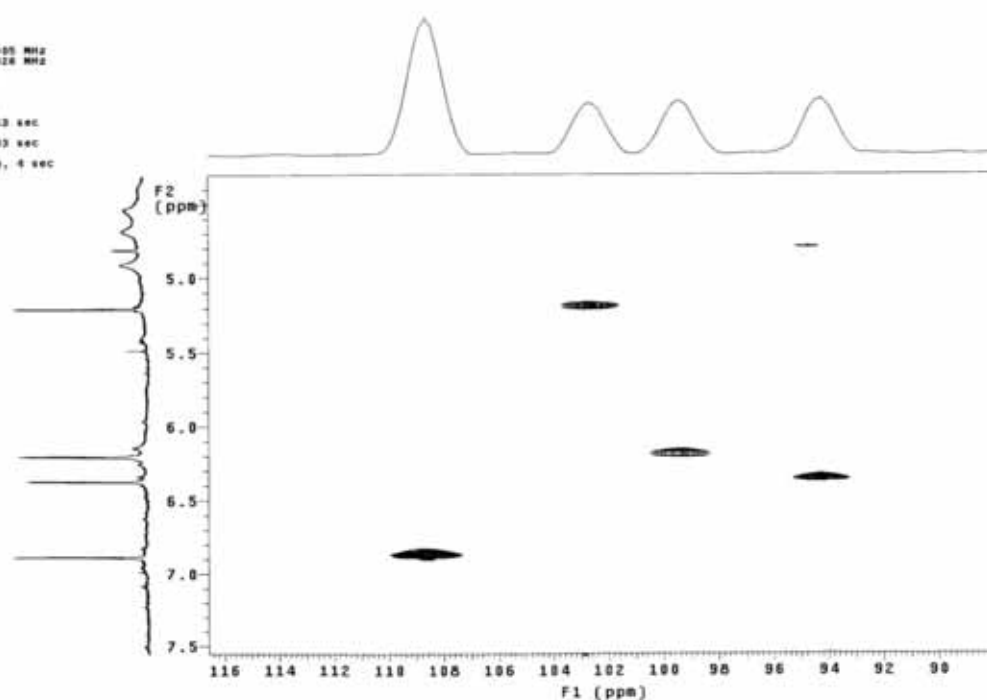


Espectro 70. gHMOC ampliado ( $\delta$  2,8 –  $\delta$  4,2 para H;  $\delta$  67 –  $\delta$  76 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC 1-5-8 18/04/08

Pulse Sequence: gHMBC  
Solvent: DMSO  
Temp. 30.0 C / 303.1 K  
User: 1-18-87  
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec  
Acq. time 0.136 sec  
Width 7588.6 Hz  
2D Width 29027.8 Hz  
35 repetitions  
2 x 128 increments  
OBSERVE H1, 499.4848305 MHz  
DECOUPLE C19, 125.2687428 MHz  
Power 47 dB  
on during acquisition  
off during delay  
GARP-1 modulated  
DATA PROCESSING  
Gauss Apodization 0.063 sec  
F1 DATA PROCESSING  
Gauss Apodization 0.063 sec  
FT size 2048 x 2048  
Total time 2 hr, 43 min, 4 sec

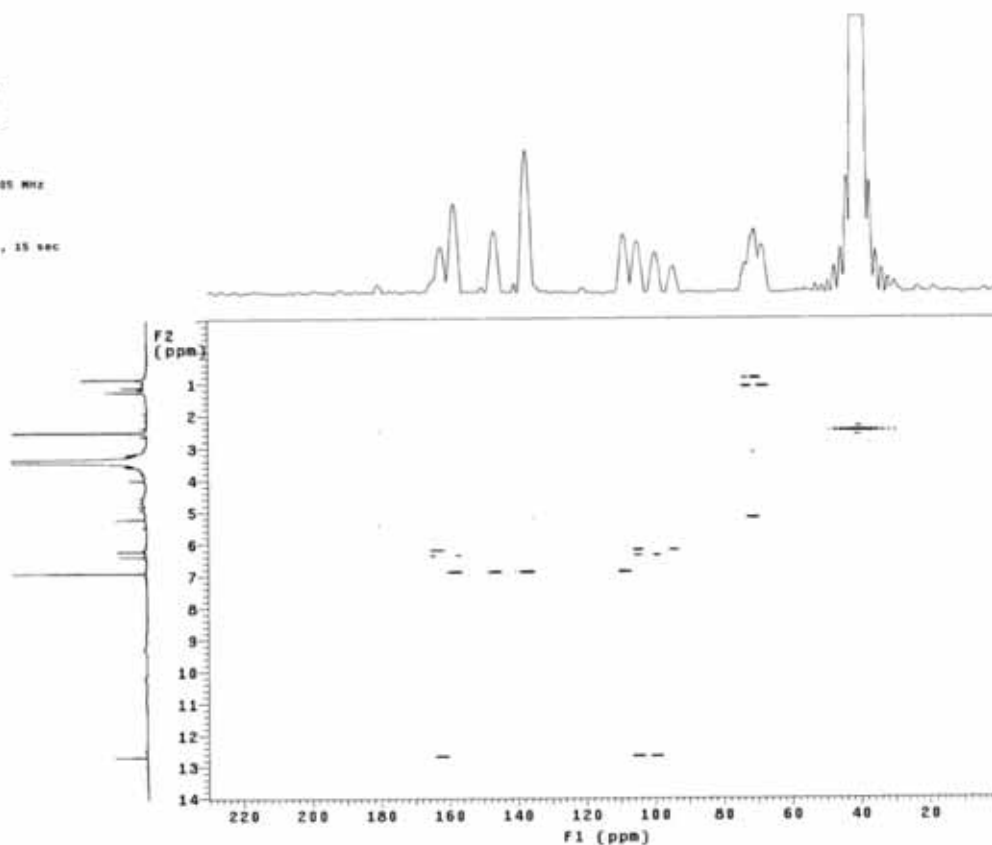


Espectro 71. gHMBC ampliado ( $\delta$  5,0 –  $\delta$  7,5 para H;  $\delta$  90 –  $\delta$  116 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-8 18/04/08

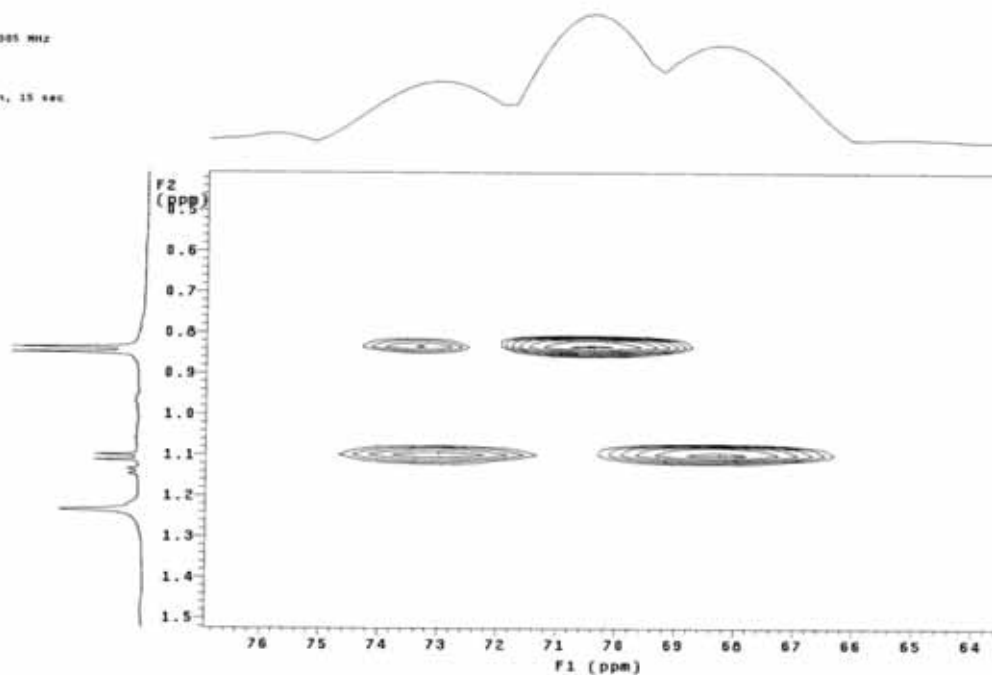
Pulse Sequence: gHMBC  
Solvent: DMSO  
Temp. 30.0 C / 303.1 K  
User: 1-18-87  
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec  
Acq. time 0.136 sec  
Width 7588.6 Hz  
2D Width 29027.8 Hz  
68 repetitions  
128 increments  
OBSERVE H1, 499.4848305 MHz  
DATA PROCESSING  
Sine bell 0.063 sec  
F1 DATA PROCESSING  
Sine bell 0.063 sec  
FT size 2048 x 2048  
Total time 2 hr, 47 min, 15 sec



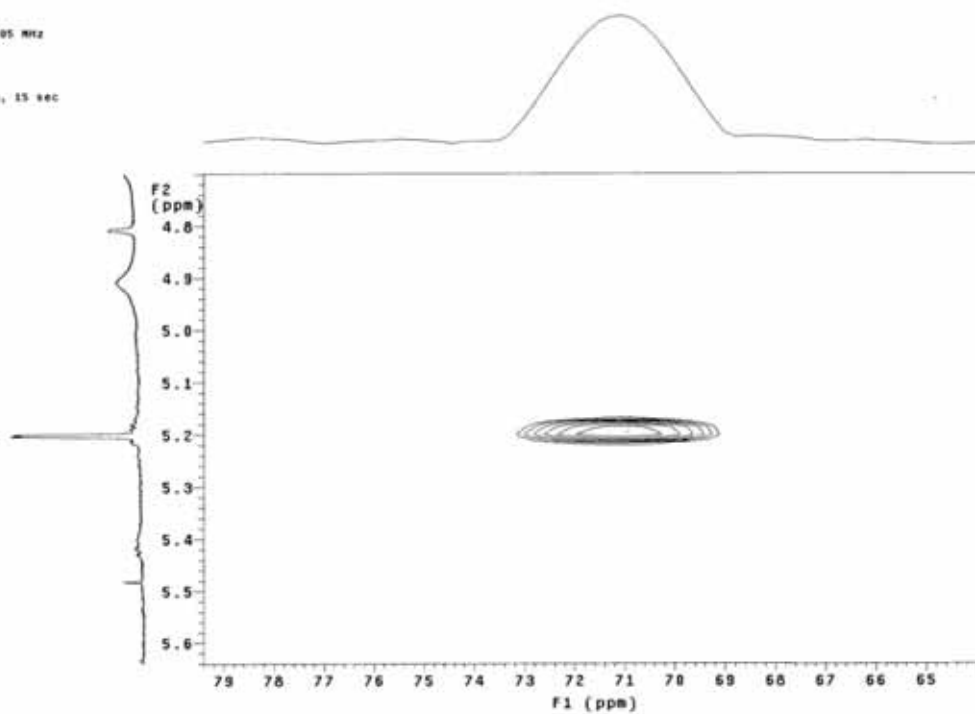
Espectro 72. gHMBC do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FACI-5-S 18/04/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 20.0 C / 283.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7558.8 Hz  
 2D Width 29227.6 Hz  
 64 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.4046305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.068 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr, 47 min, 15 sec



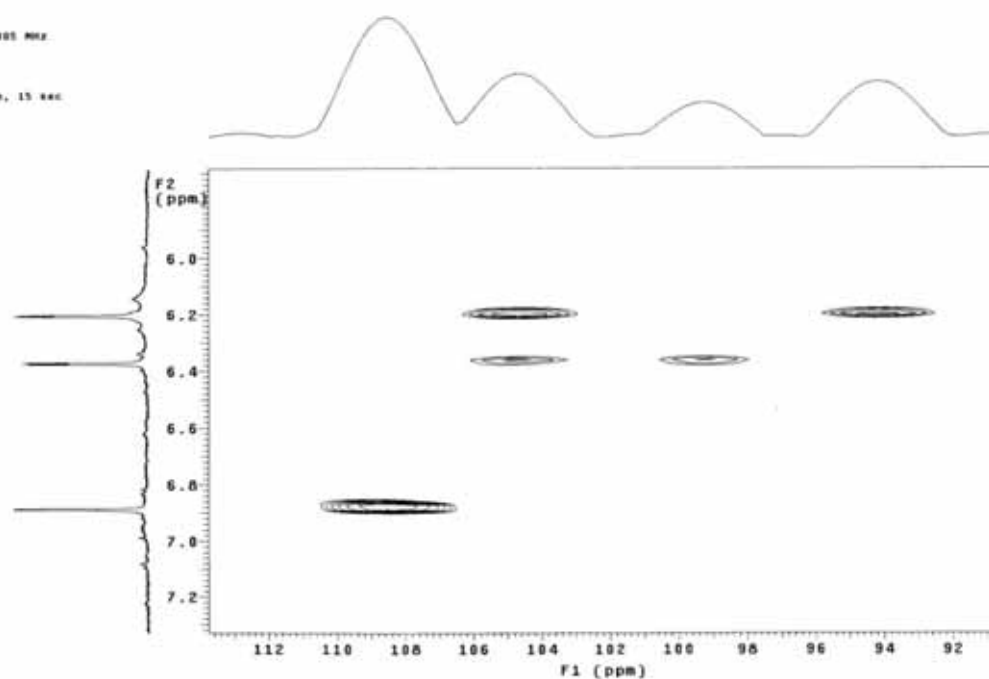
Espectro 73. gHMBC ampliado ( $\delta$  0,6 –  $\delta$  1,5 para H;  $\delta$  64 –  $\delta$  76 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FACI-5-S 18/04/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 20.0 C / 283.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7558.8 Hz  
 2D Width 29227.6 Hz  
 64 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.4046305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.068 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr, 47 min, 15 sec



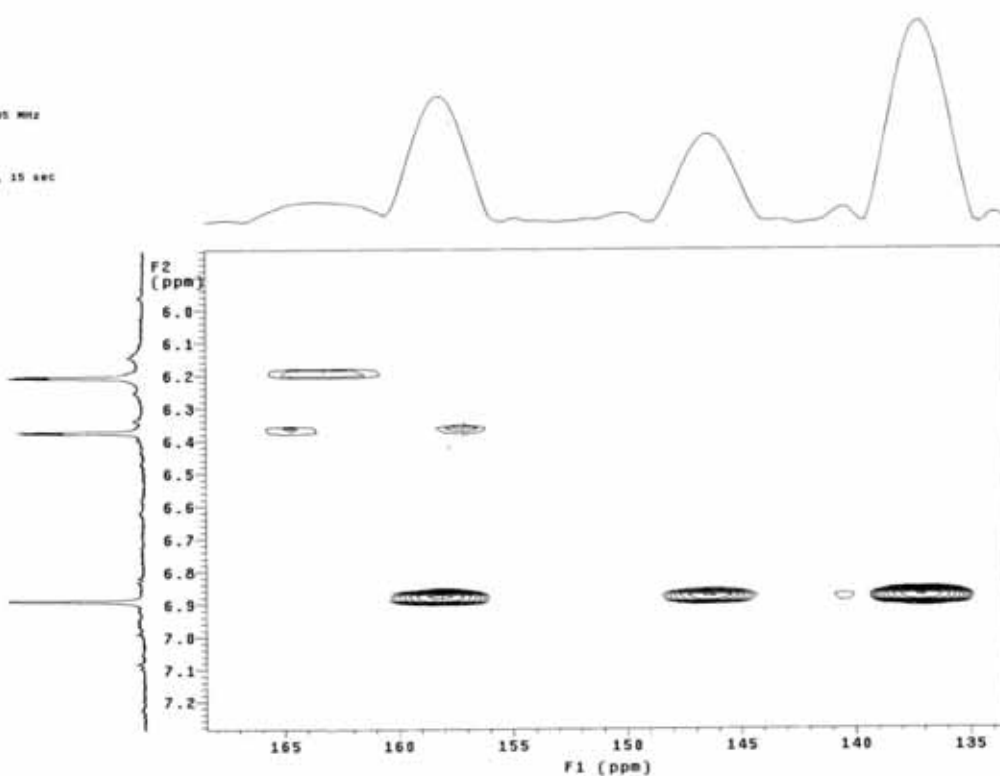
Espectro 74. gHMBC ampliado ( $\delta$  4,8 –  $\delta$  5,6 para H;  $\delta$  65 –  $\delta$  79 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-S-8 18/04/88  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp.: 30.8 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7589.6 Hz  
 ID Width 2927.6 Hz  
 SS repetitions  
 88  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.404305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.066 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.062 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr., 37 min., 15 sec.



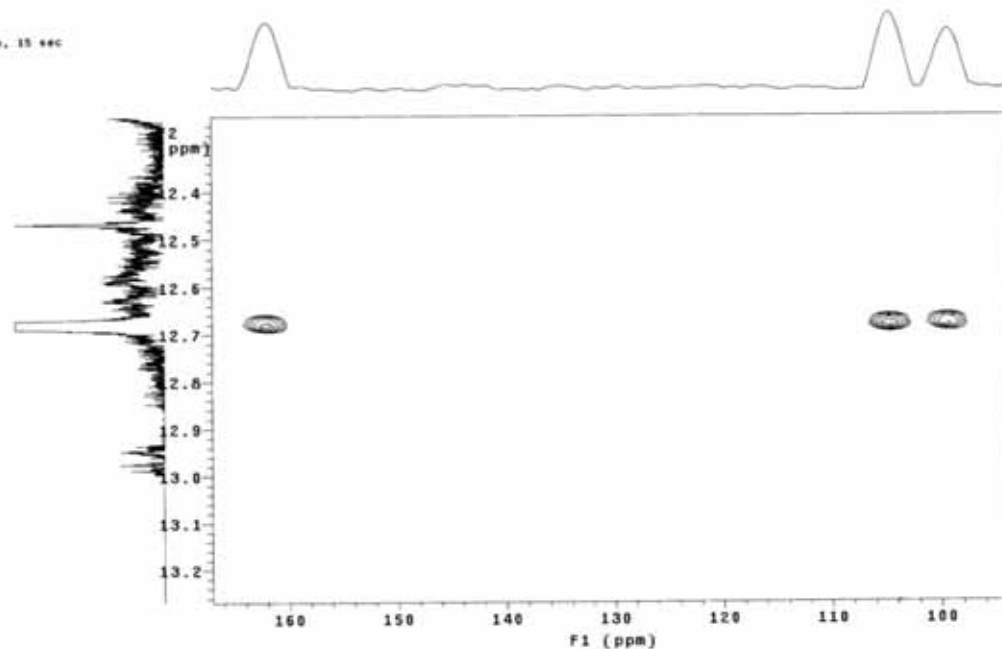
Espectro 75. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,0 –  $\delta$  7,2 para H;  $\delta$  92 –  $\delta$  112 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-S-8 18/04/88  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp.: 30.9 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.136 sec  
 Width 7589.6 Hz  
 ID Width 2927.6 Hz  
 SS repetitions  
 88  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.404305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.066 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.062 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr., 47 min., 15 sec.



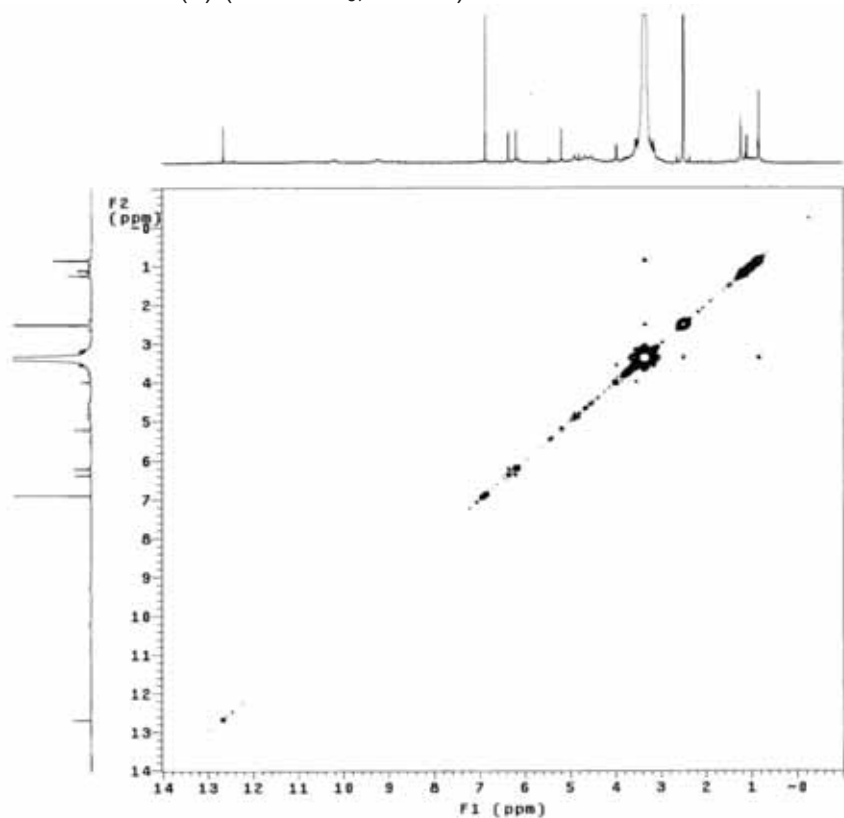
Espectro 76. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,0 –  $\delta$  7,2 para H;  $\delta$  135 –  $\delta$  165 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-8 18/04/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multisat"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 66 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4048300 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 TOTAL time 2 hr, 47 min, 15 sec



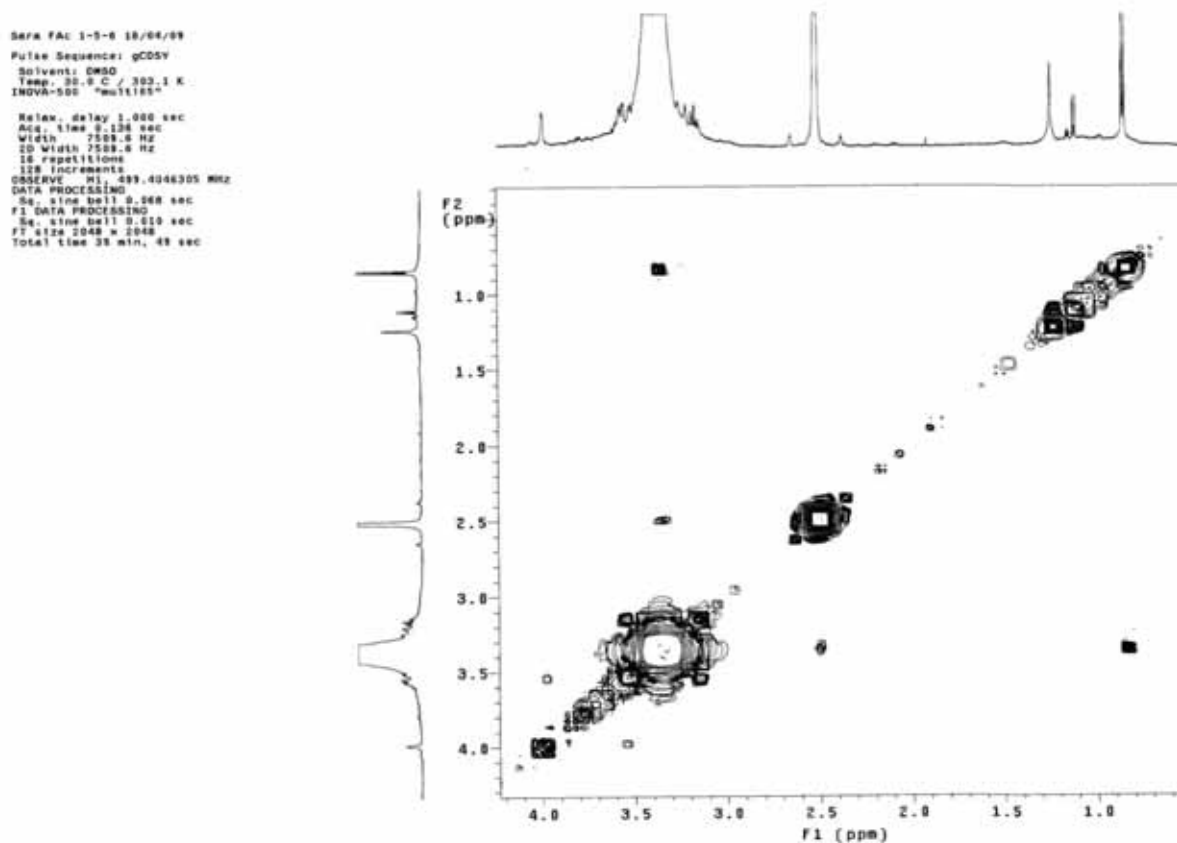
Espectro 77. gHMBC ampliado ( $\delta$  12,4 –  $\delta$  13,2 para H;  $\delta$  100 –  $\delta$  160 para C) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC 1-5-8 18/04/08  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multisat"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.138 sec  
 Width 7500.0 Hz  
 2D Width 7500.0 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4048300 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.010 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 39 min, 48 sec

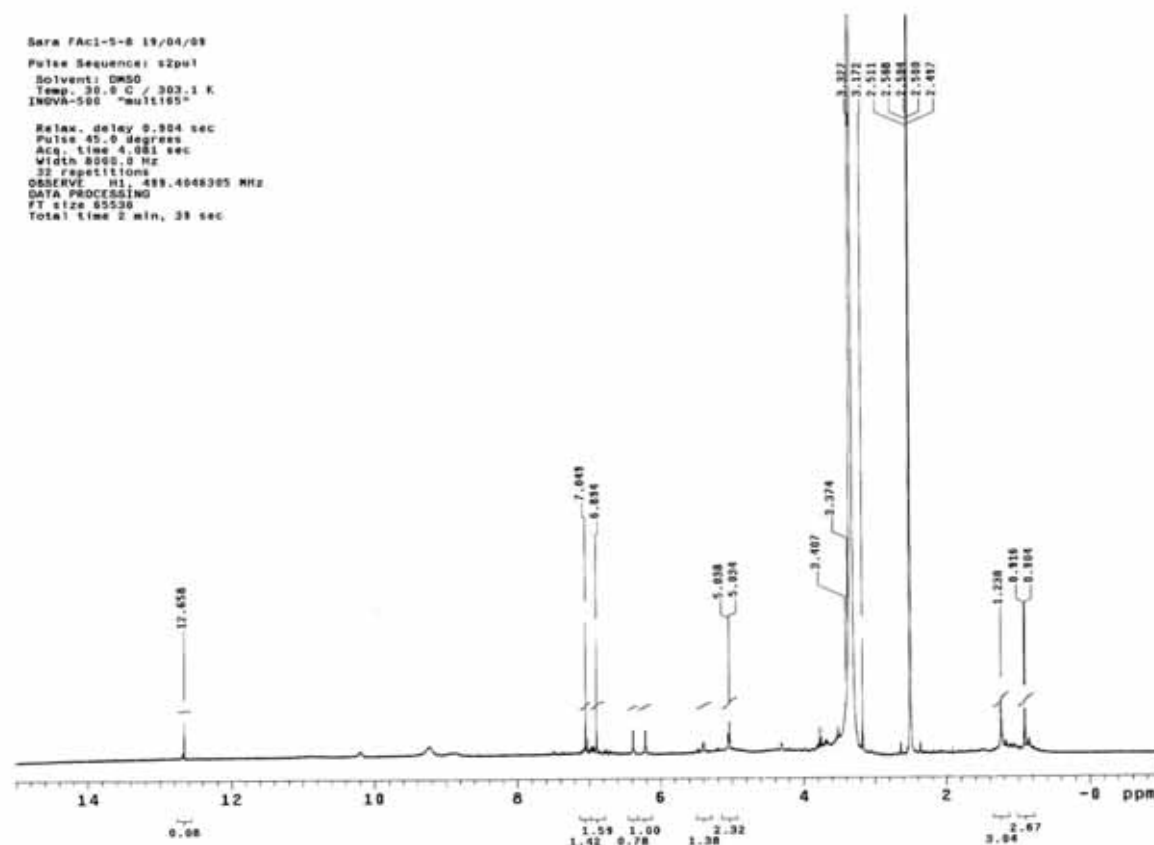


Espectro 78. gCOSY do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**9**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

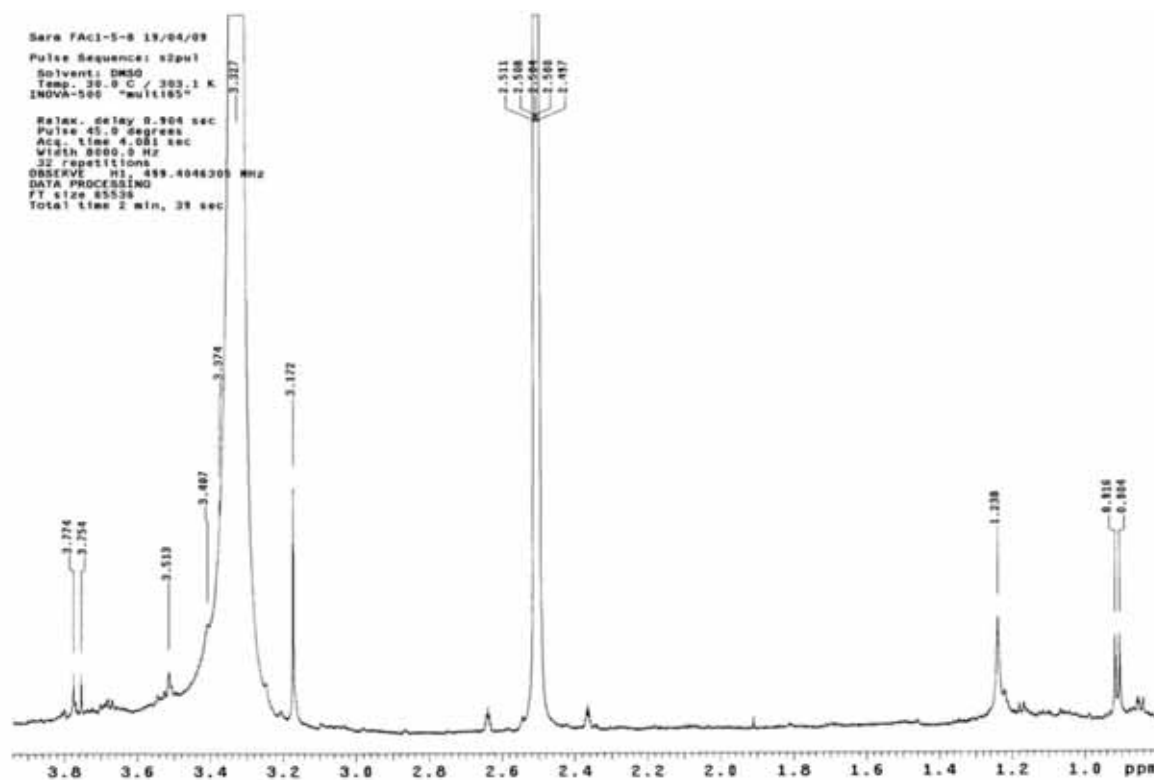




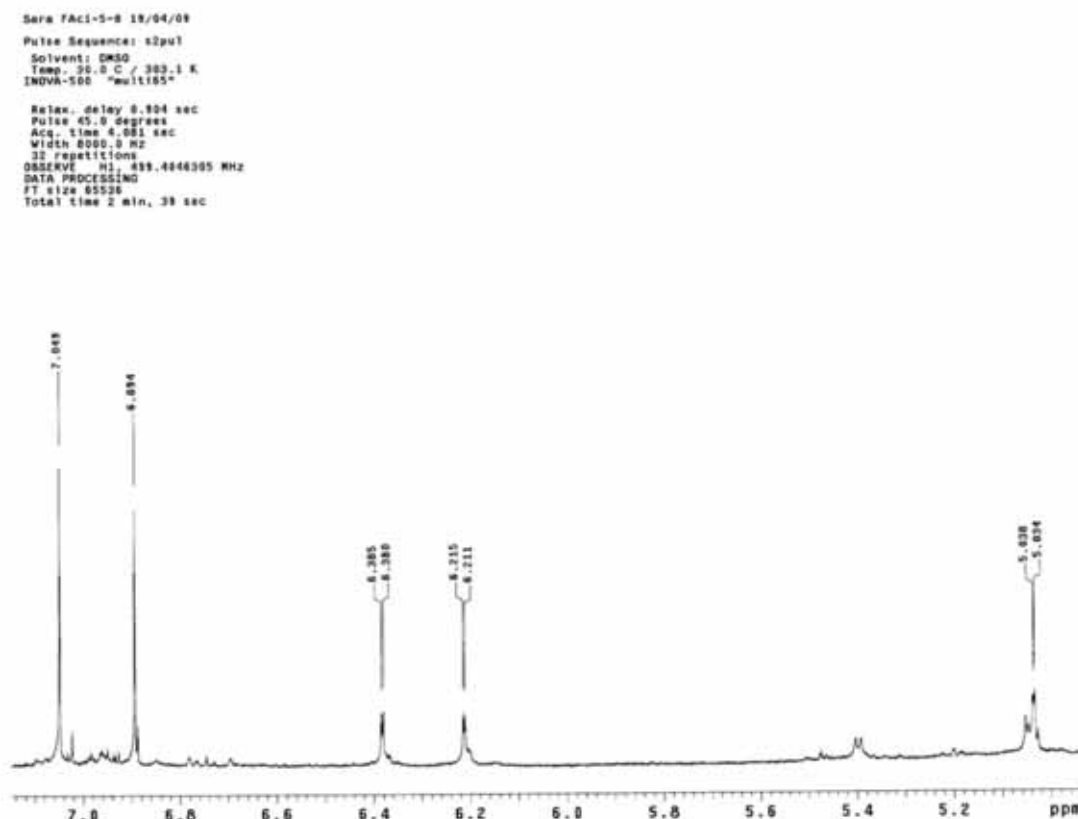
Espectro 79. gCOSY ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  4,0) do 1-ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (9) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



Espectro 80. RMN de  $^1\text{H}$  (integração) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (10) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



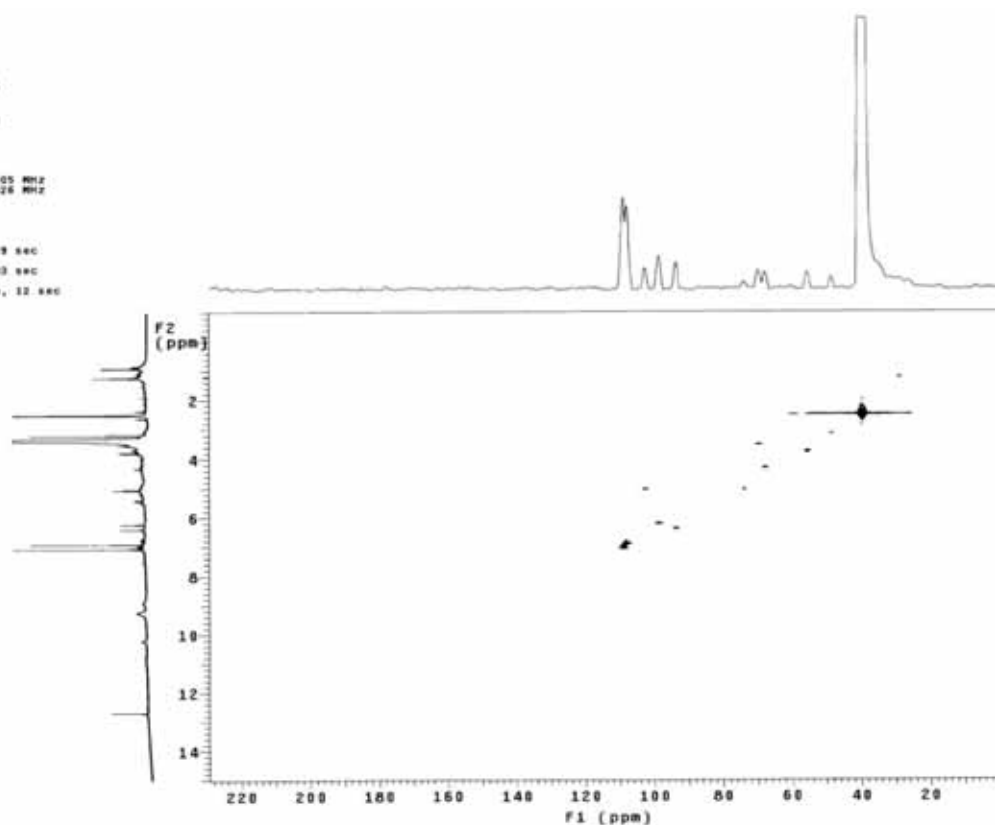
Espectro 81. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  0,9 –  $\delta$  3,7) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



Espectro 82. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  5,0 –  $\delta$  7,0) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-B 18/04/08  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

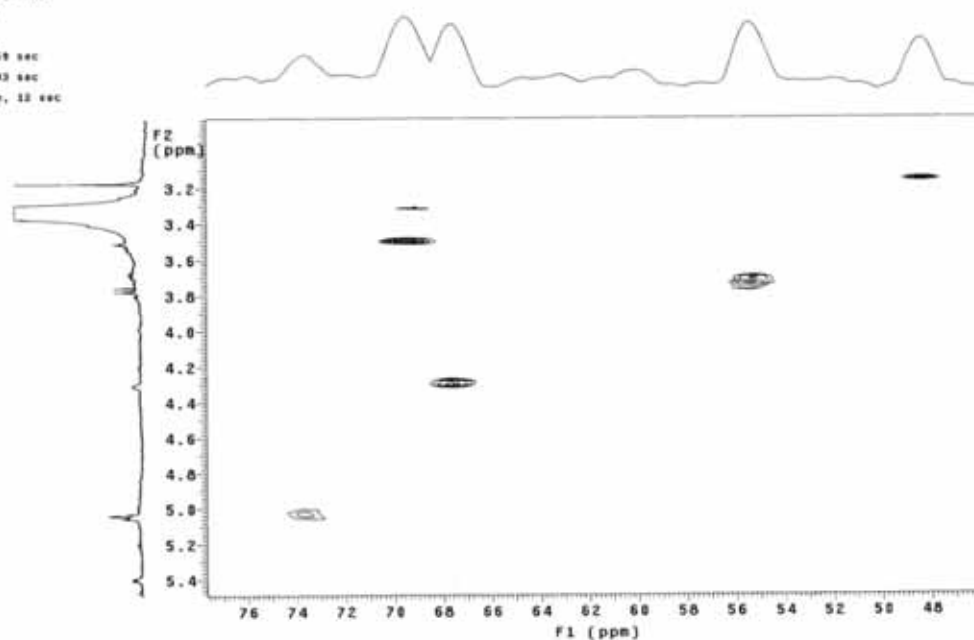
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 F0 width 28027.6 Hz  
 44 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.904305 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5897426 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GMRP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.059 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr., 23 min., 12 sec



Espectro 83. gHMOC do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

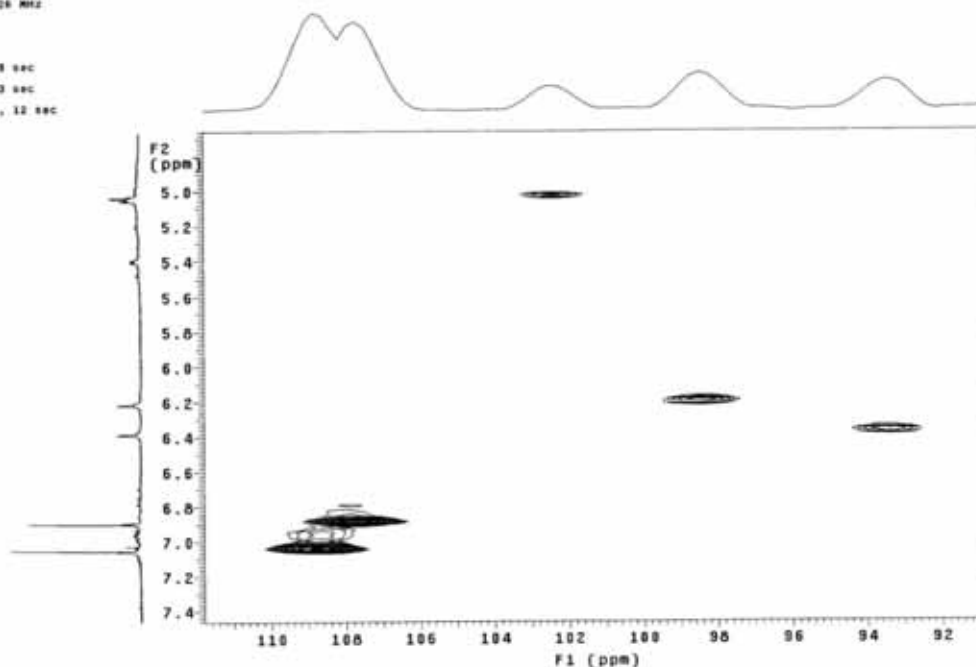
Sara FAC1-5-B 18/04/08  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 F0 width 28027.6 Hz  
 44 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.904305 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5897426 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GMRP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.059 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr., 23 min., 12 sec



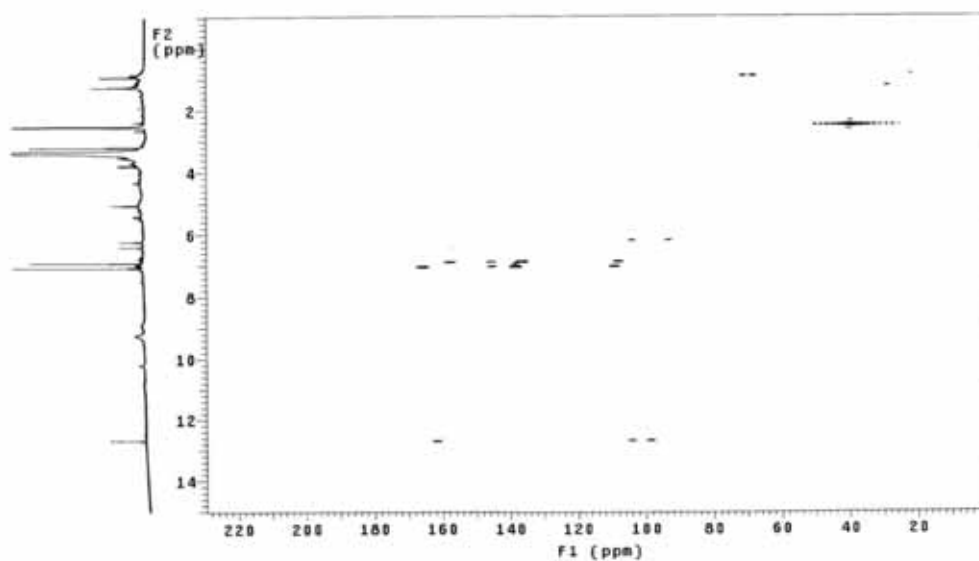
Espectro 84. gHMOC ampliado ( $\delta$  3,1 –  $\delta$  5,4 para H;  $\delta$  48 –  $\delta$  76 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-S-B 19/04/99  
 Pulse Sequence: gHMQC  
 Solvent: DMSO  
 Temp.: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis185"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 3.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 64 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4248395 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.2697428 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GMP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.503 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.503 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr, 23 min, 12 sec



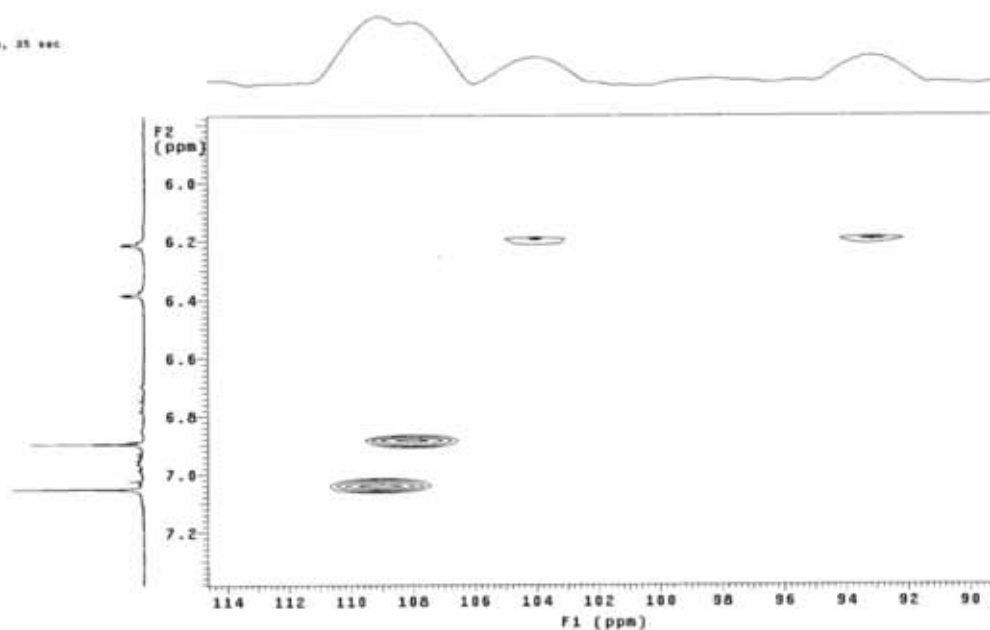
Espectro 85. gHMQC ampliado ( $\delta$  5,0 –  $\delta$  7,4 para H;  $\delta$  92 –  $\delta$  110 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-S-B 19/04/99  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp.: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis185"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 3.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 128 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4248395 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.063 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr, 31 min, 35 sec



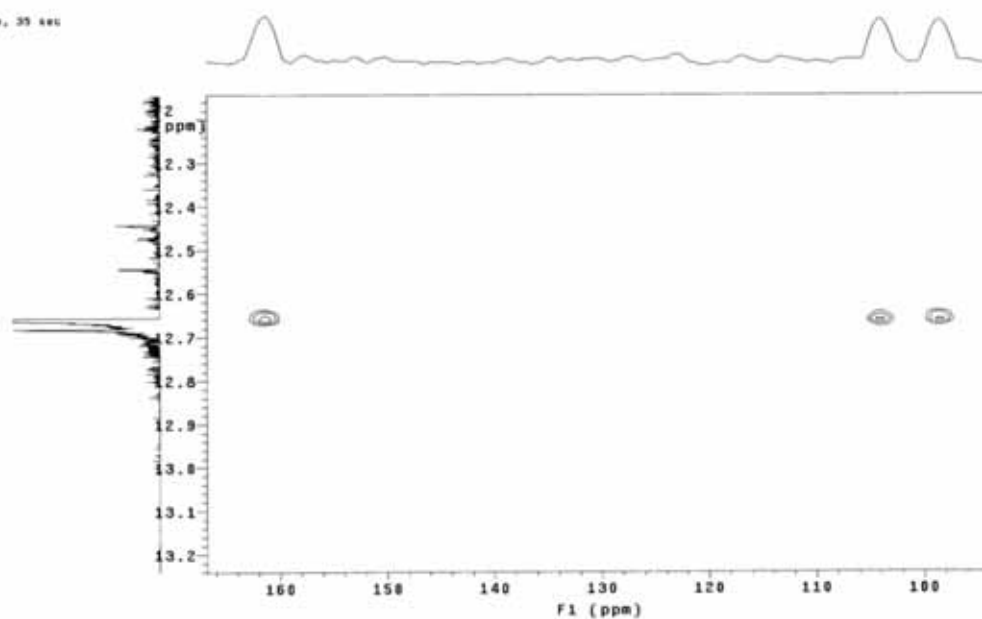
Espectro 86. gHMBC do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-5-B 18/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis125"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 128 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.404800 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr, 31 min, 35 sec



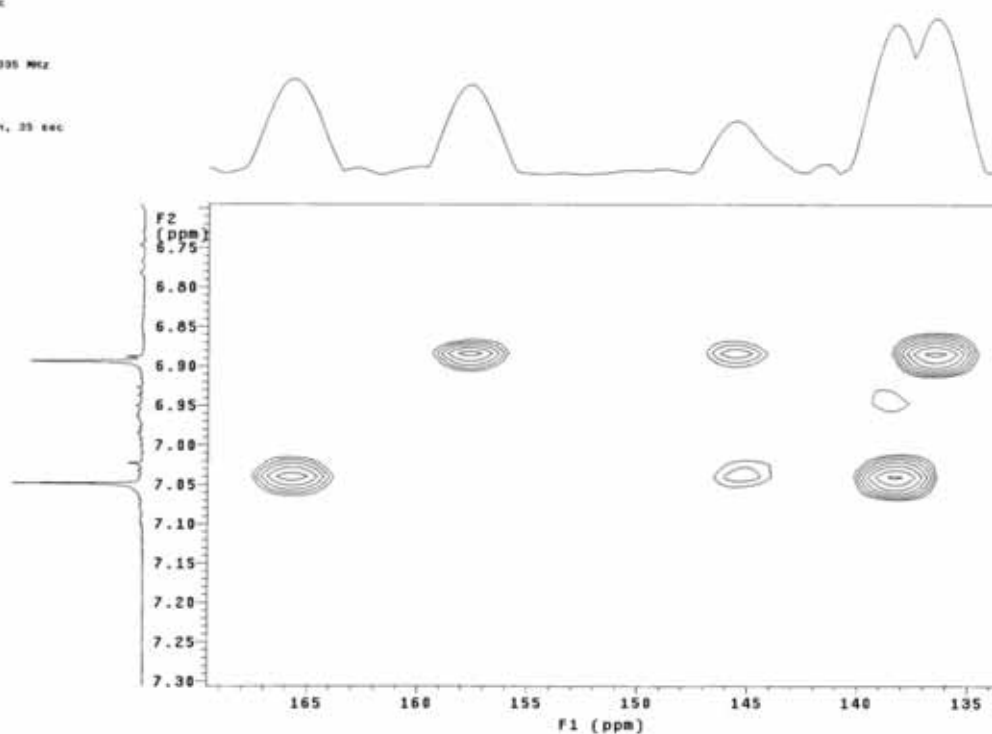
Espectro 87. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,0 –  $\delta$  7,2 para H;  $\delta$  90 –  $\delta$  114 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-5-B 18/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis125"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 28027.6 Hz  
 128 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1 499.404800 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.004 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.000 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr, 31 min, 35 sec



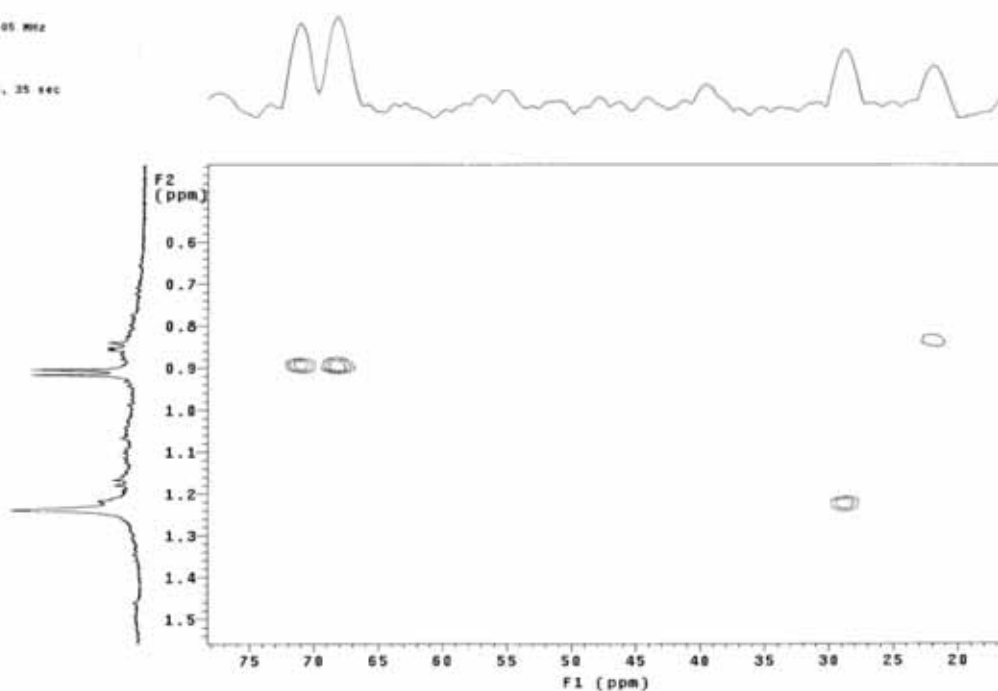
Espectro 88. gHMBC ampliado ( $\delta$  12,3 –  $\delta$  13,2 para H;  $\delta$  100 –  $\delta$  160 para C) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sere FACI-5-B 19/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 28927.6 Hz  
 128 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1, 499.4040305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 5 hr, 31 min, 35 sec



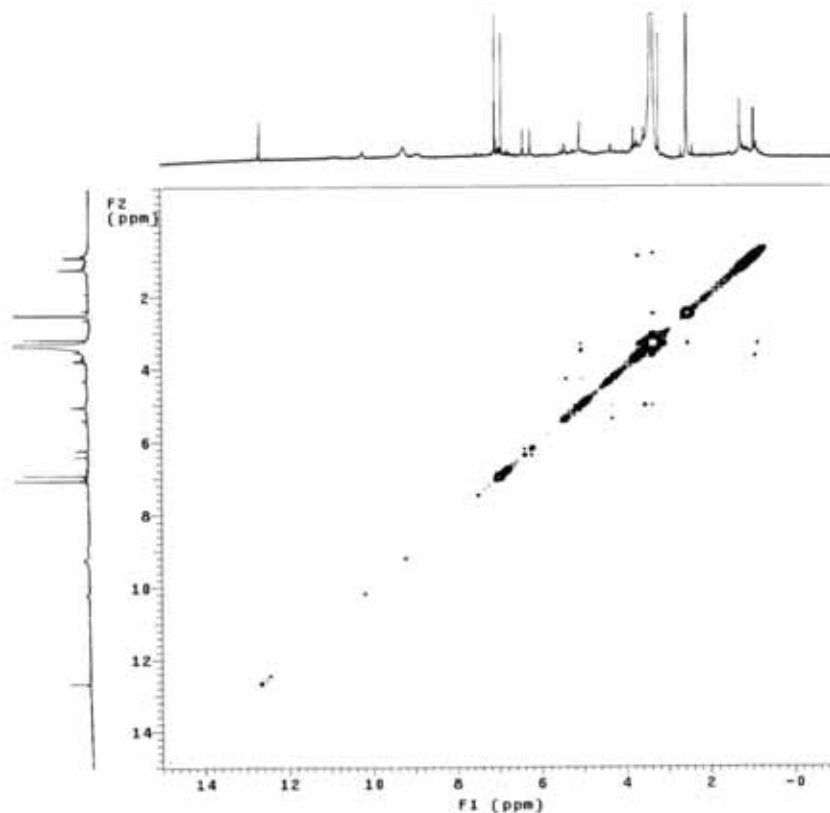
Espectro 89. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,75 –  $\delta$  7,30 para H;  $\delta$  135 –  $\delta$  165 para C) do 1-(4'-galoi)ramnopiranosil-2-galoi-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sere FACI-5-B 19/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 28927.6 Hz  
 128 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1, 499.4040305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 Total time 5 hr, 31 min, 35 sec



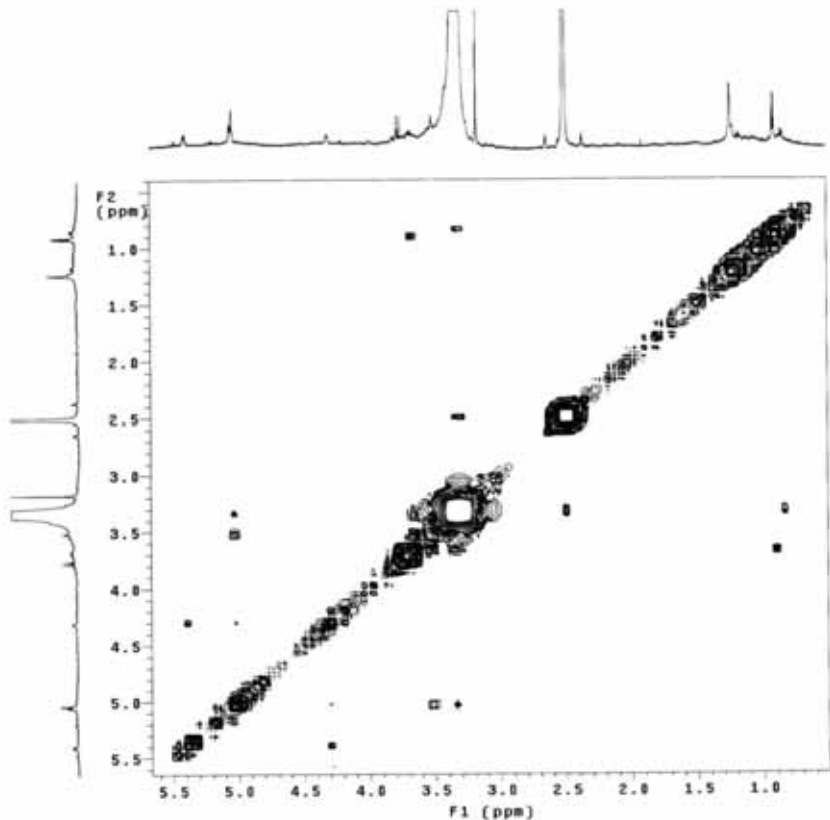
Espectro 90. gHMBC ampliado ( $\delta$  0,6 –  $\delta$  1,5 para H;  $\delta$  20 –  $\delta$  75 para C) do 1-(4'-galoi)ramnopiranosil-2-galoi-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FACI-5-B 19/04/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 283.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 IS Width 8000.0 Hz  
 IS repetitions  
 IS increments  
 OBSERVE: H1, 499.4046305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Ss. time bet1 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Ss. time bet1 0.009 sec  
 FT size 1048 x 1048  
 Total Time 38 min, 31 sec



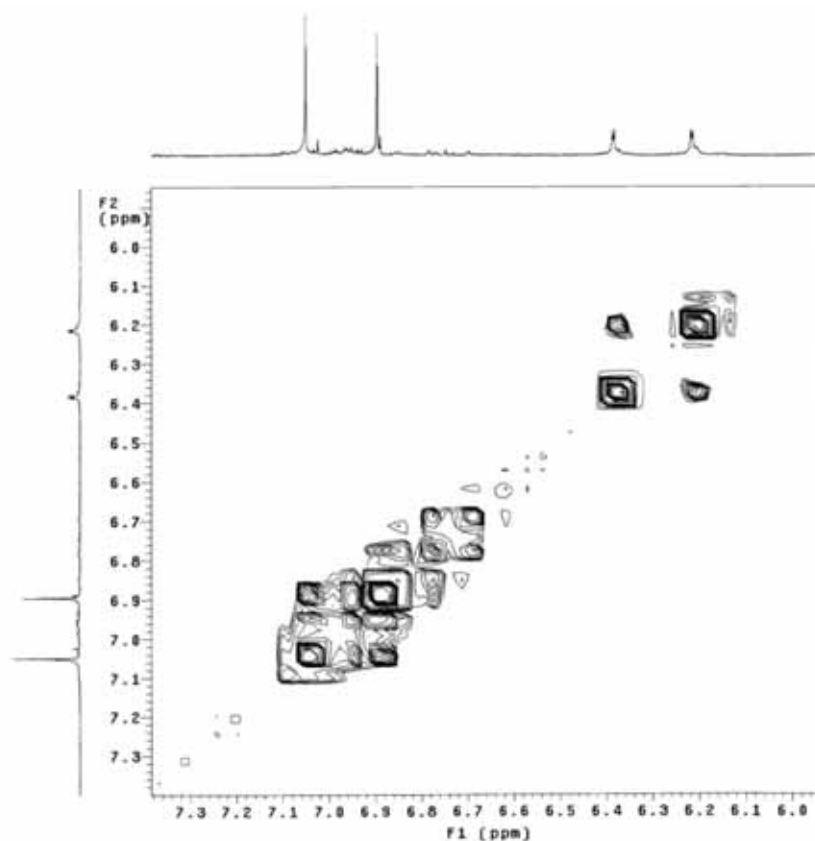
Espectro 91. gCOSY do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-dihidroxifenila (**10**) (DMSO-d<sub>6</sub>, 11.7 T).

Sera FACI-5-B 19/04/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 283.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 IS Width 8000.0 Hz  
 IS repetitions  
 IS increments  
 OBSERVE: H1, 499.4046305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Ss. time bet1 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Ss. time bet1 0.009 sec  
 FT size 1048 x 1048  
 Total time 38 min, 31 sec

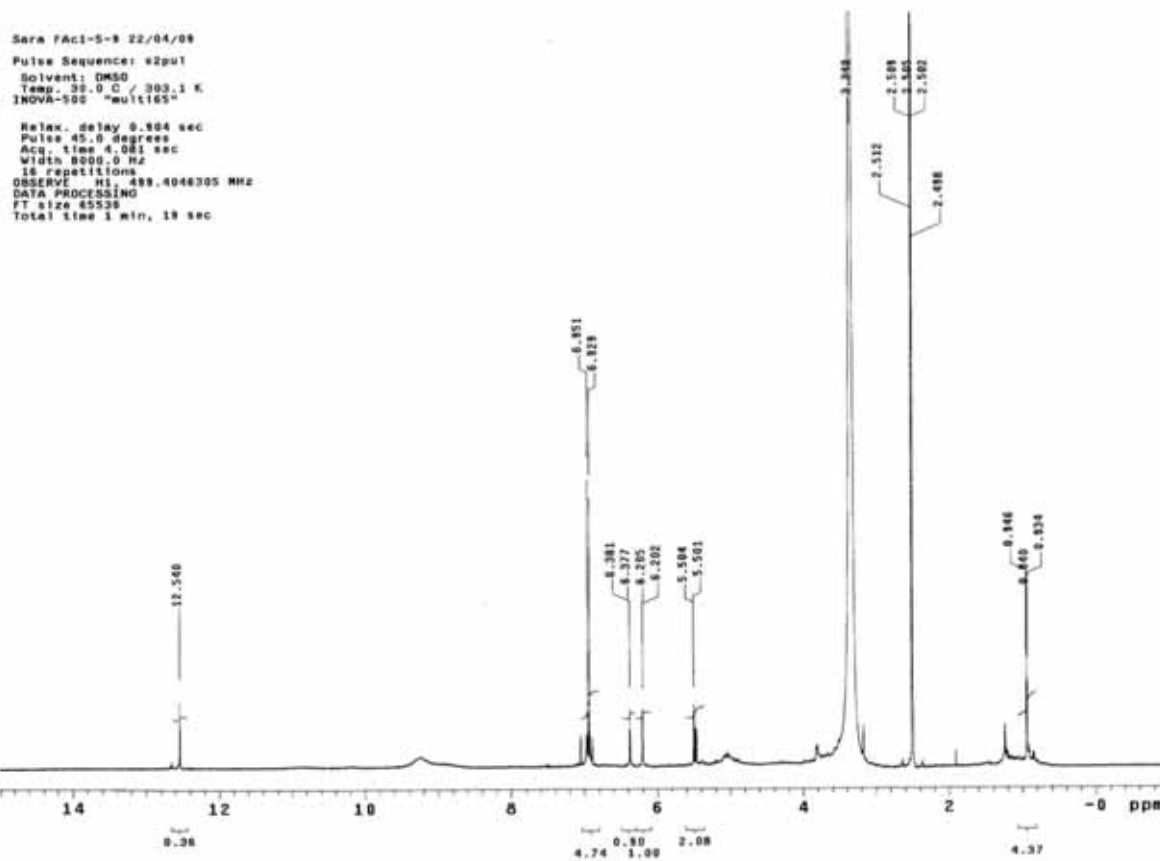


Espectro 92. gCOSY ampliado ( $\delta$  0,8 –  $\delta$  5,5) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-dihidroxifenila (**10**) (DMSO-d<sub>6</sub>, 11.7 T).

Sara FACI-5-8 18/04/08  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 SS Width 8000.0 Hz  
 18 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE HI: 499.404305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Ss. time in1: 0.304 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Ss. time in1: 0.089 sec  
 FT size 1248 x 1248  
 Total time 38 min, 31 sec

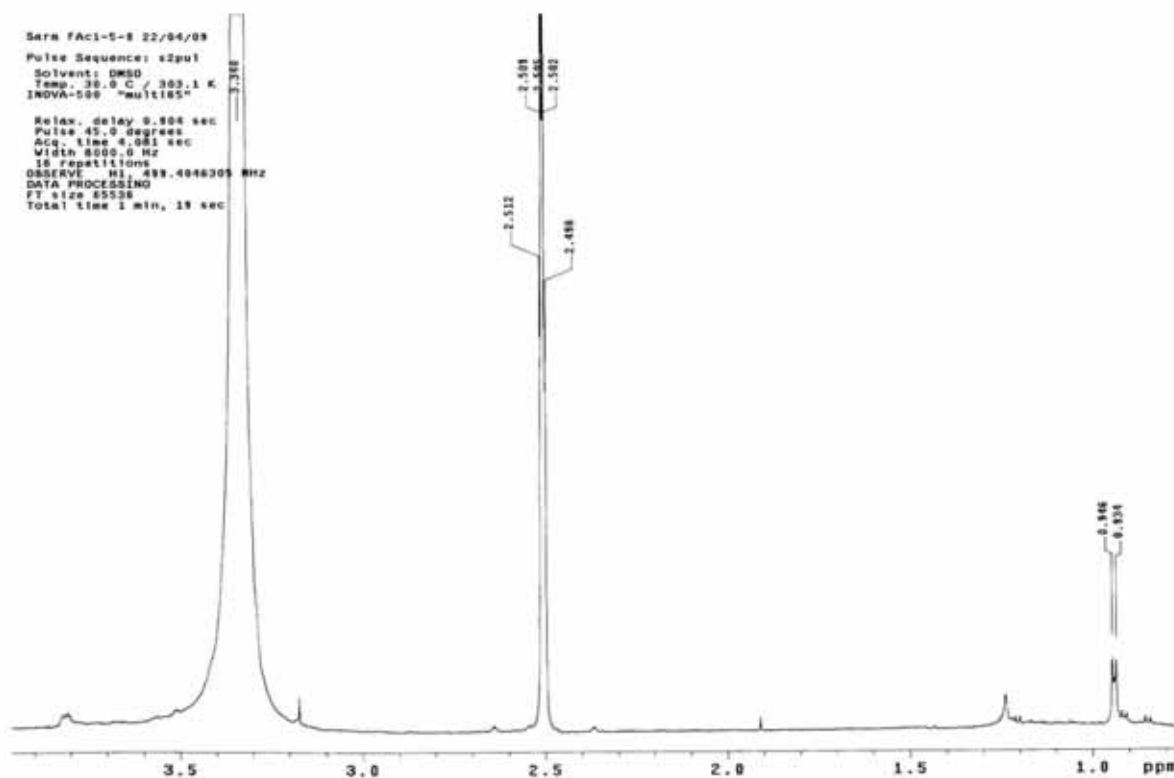


Espectro 93. gCOSY ampliado ( $\delta$  6,0 –  $\delta$  7,3) do 1-(4'-galoil)ramnopiranosil-2-galoil-3,5-diidroxifenila (**10**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

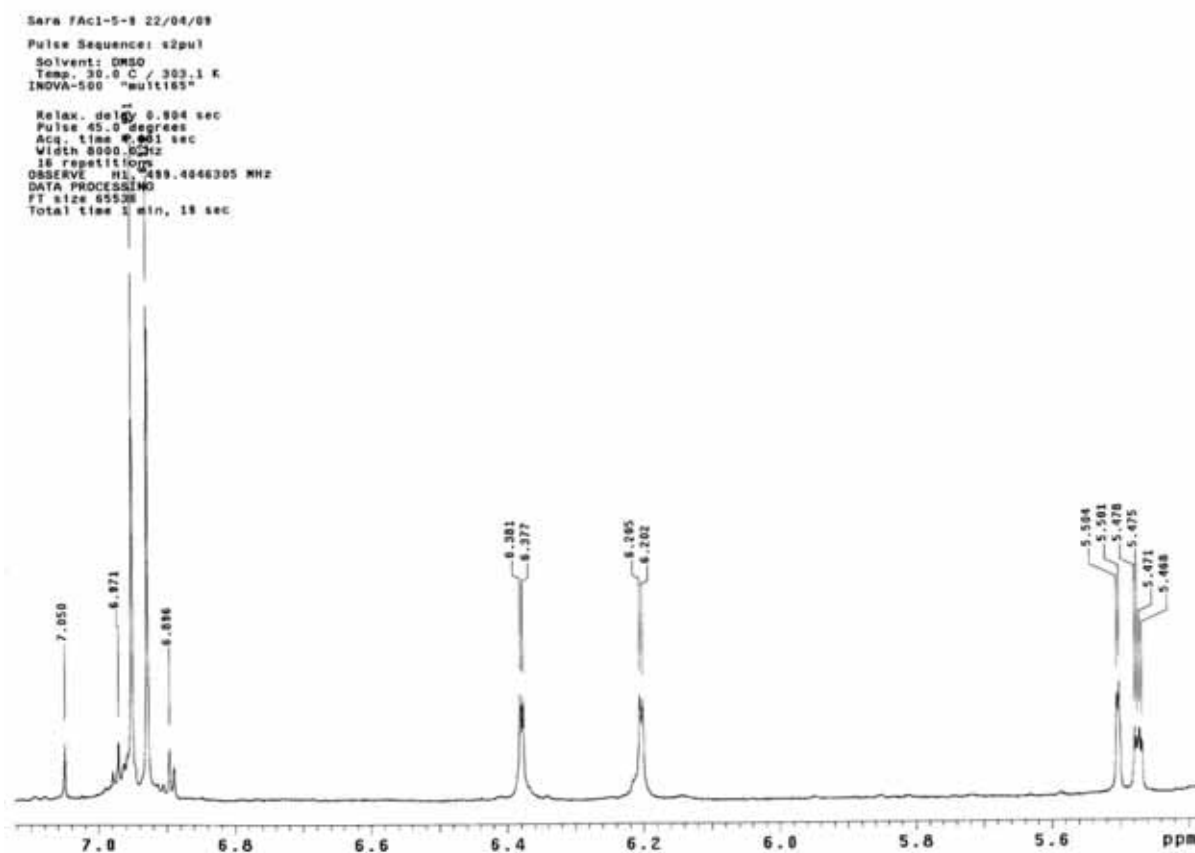


Espectro 94. RMN de  $^1\text{H}$  (integração) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

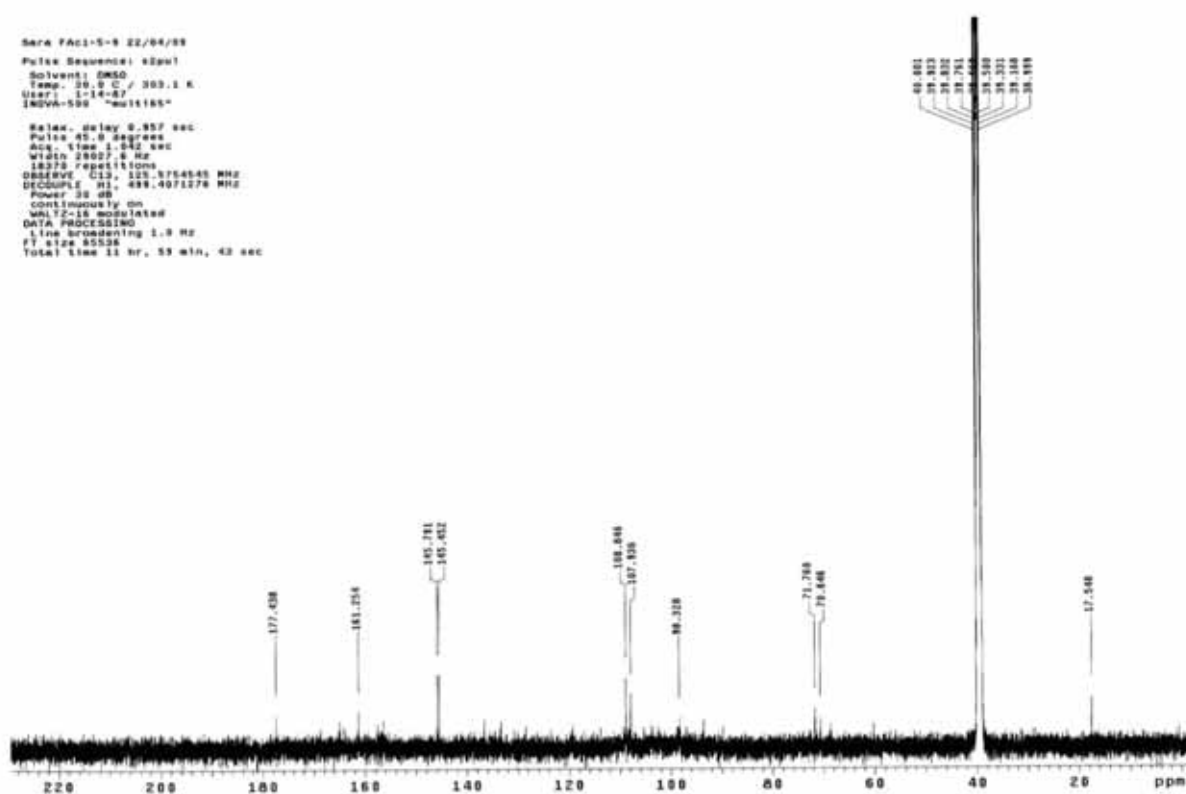




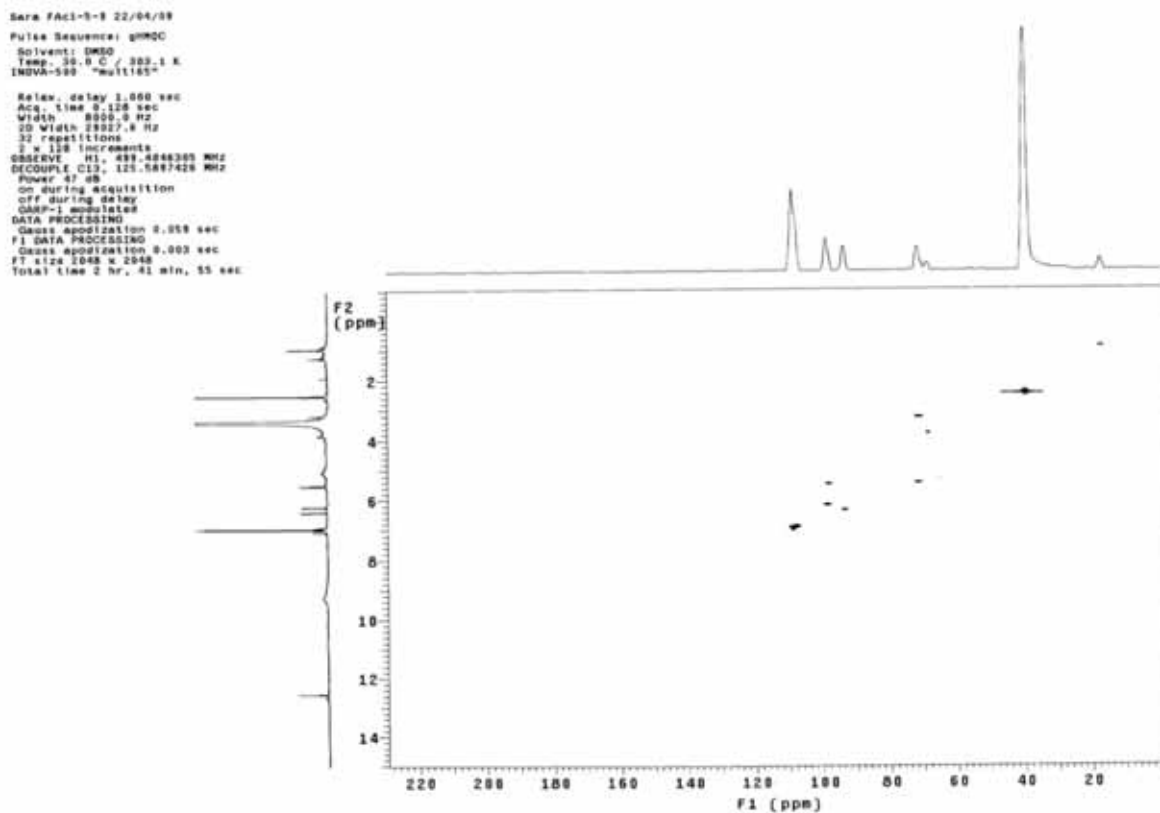
Espectro 95. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  1,0 –  $\delta$  3,5) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



Espectro 96. RMN de  $^1\text{H}$  ampliado ( $\delta$  5,4 –  $\delta$  7,1) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



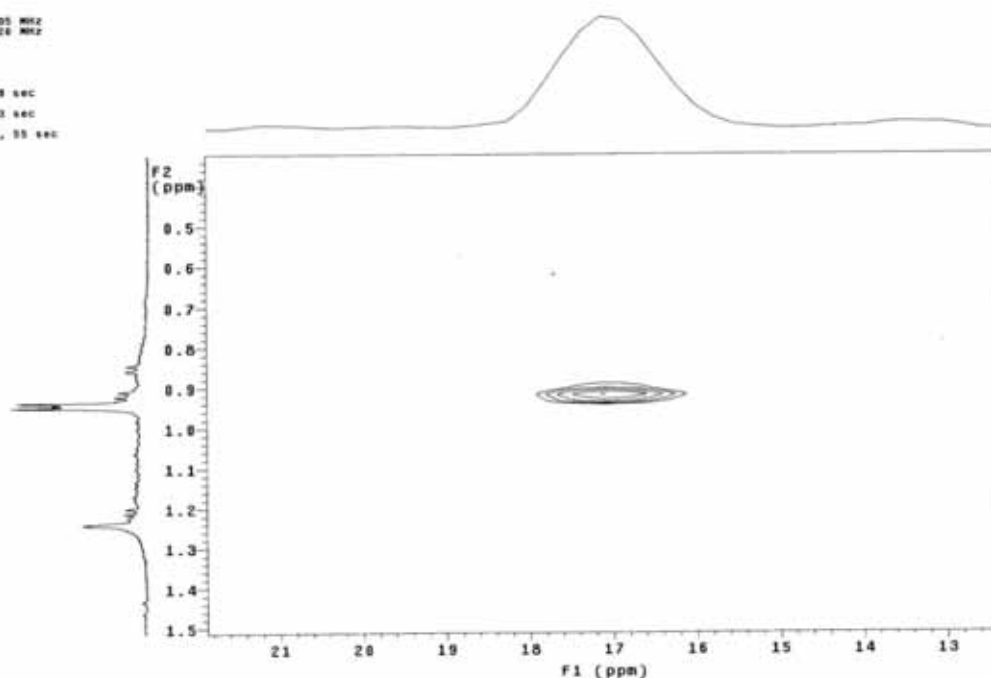
Espectro 97. RMN de  $^{13}\text{C}$  do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).



Espectro 98. gHMOC do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-S-9 22/04/99  
 Pulse Sequence: gHMQC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

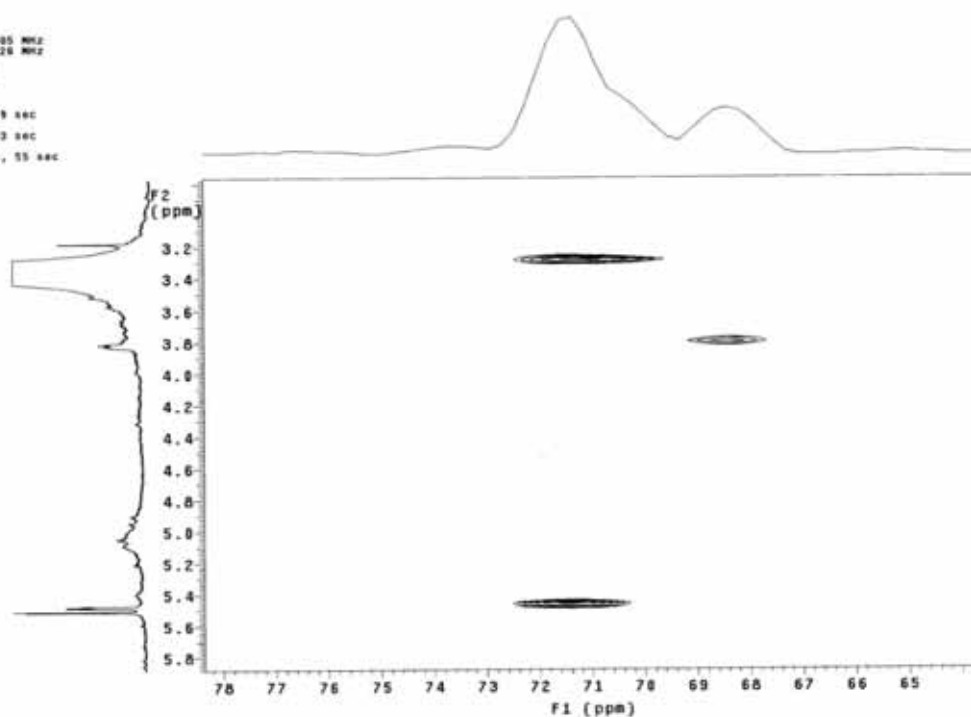
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 SD Width 29027.8 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4046305 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5697428 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.959 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr, 41 min, 55 sec



Espectro 99. gHMQC ampliado ( $\delta$  0,4 –  $\delta$  1,5 para H;  $\delta$  13 –  $\delta$  21 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-S-9 22/04/99  
 Pulse Sequence: gHMQC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

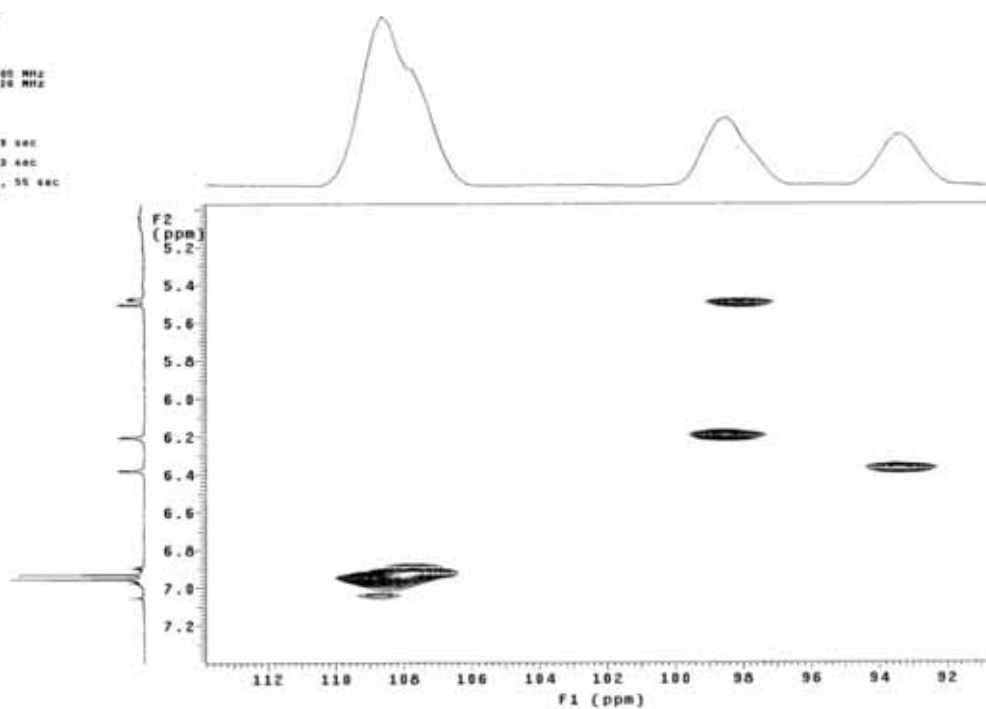
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 SD Width 29027.8 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE H1, 499.4046305 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.5697428 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.959 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr, 41 min, 55 sec



Espectro 100. gHMQC ampliado ( $\delta$  3,2 –  $\delta$  5,6 para H;  $\delta$  65 –  $\delta$  78 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-5-9 22/04/09  
 Pulse Sequence: gHMOC  
 Solvent: DMSO  
 Temp.: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

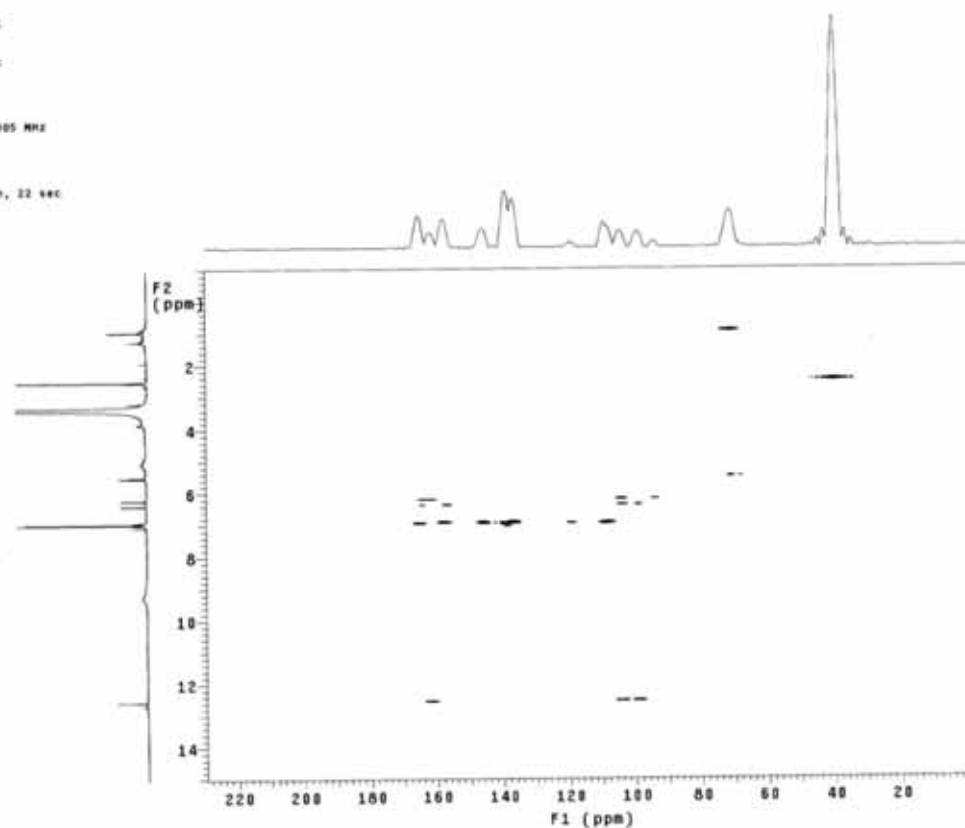
Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 2.128 sec  
 Width 8800.0 Hz  
 2D Width 28627.6 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 128 increments  
 OBSERVE N1, 499.4048200 MHz  
 DECOUPLE C13, 125.587420 MHz  
 Power 47 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.053 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.003 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 2 hr, 41 min, 55 sec



Espectro 101. gHMOC ampliado ( $\delta$  5,2 –  $\delta$  7,2 para H;  $\delta$  92 –  $\delta$  112 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

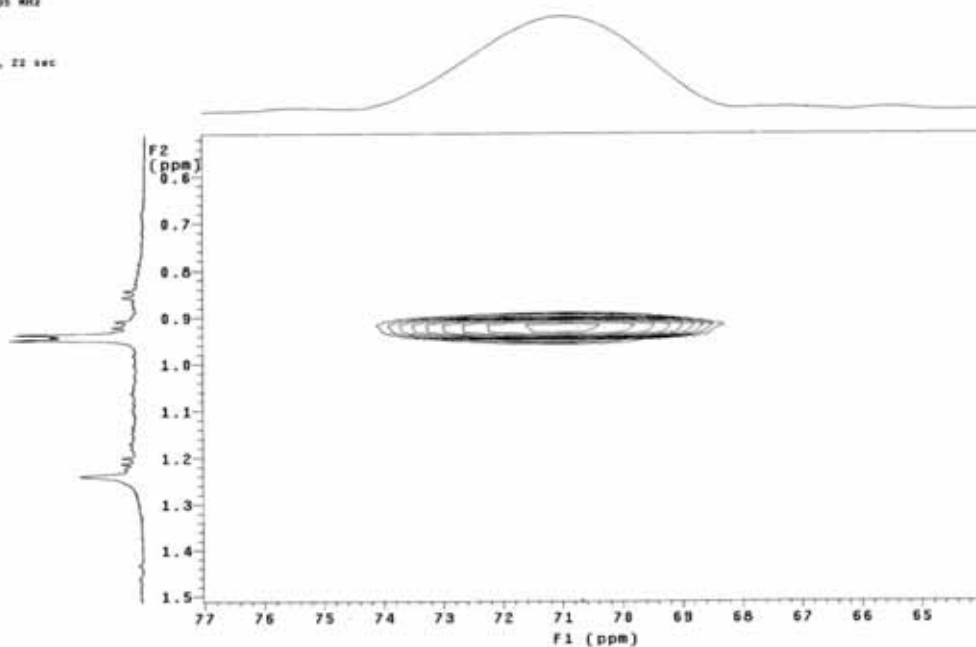
Sara FACI-5-9 22/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp.: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 2.128 sec  
 Width 8800.0 Hz  
 2D Width 28627.6 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE N1, 499.4048200 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.084 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.092 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 23 min, 22 sec



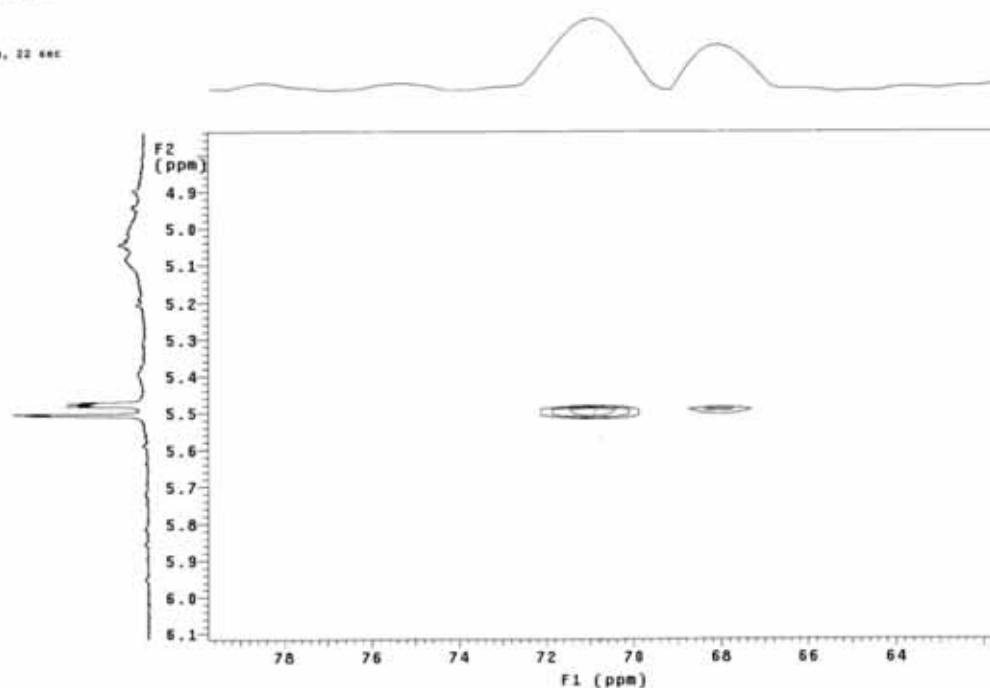
Espectro 102. gHMBC do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-5-8 22/04/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multispec"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4046305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 23 min, 22 sec



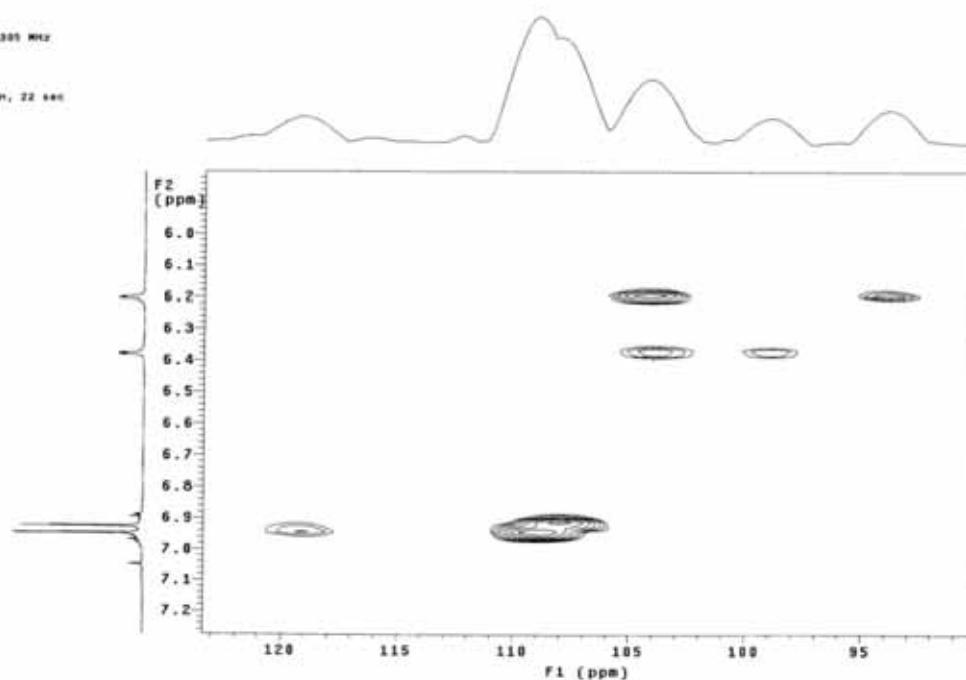
Espectro 103. gHMBC ampliado ( $\delta$  0,6 –  $\delta$  1,5 para H;  $\delta$  65 –  $\delta$  77 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FACI-5-8 22/04/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp. 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multispec"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 2D Width 29027.6 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4046305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 23 min, 22 sec



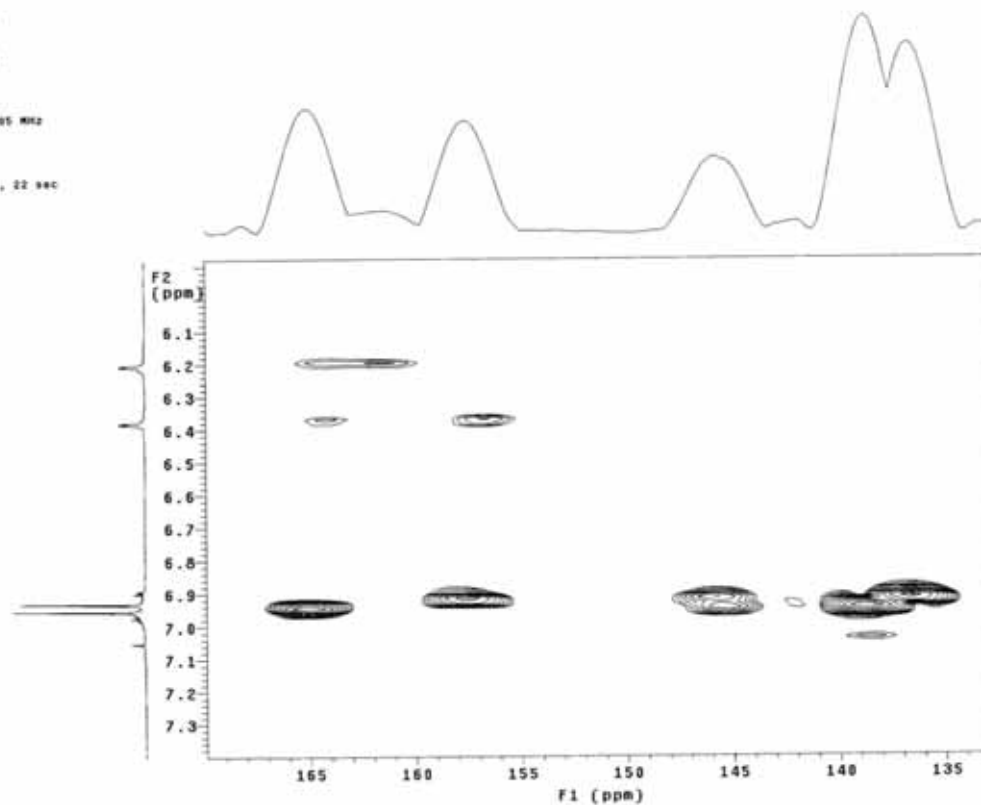
Espectro 104. gHMBC ampliado ( $\delta$  4,8 –  $\delta$  6,1 para H;  $\delta$  64 –  $\delta$  78 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FAc1-5-9 22/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 CD Width 29027.6 Hz  
 CD repetitions  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1: 499.4048305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.084 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 1948 x 2048  
 Total time 1 hr, 23 min, 22 sec



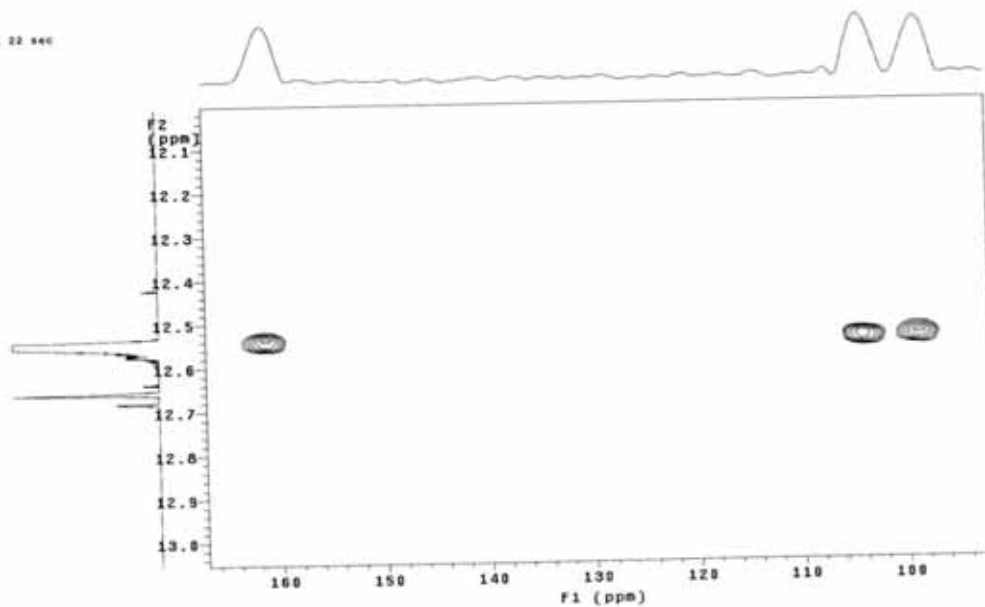
Espectro 105. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,0 –  $\delta$  7,2 para H;  $\delta$  95 –  $\delta$  120 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sera FAc1-5-9 22/04/09  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 CD Width 29027.6 Hz  
 CD repetitions  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE H1: 499.4048305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.084 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 23 min, 22 sec



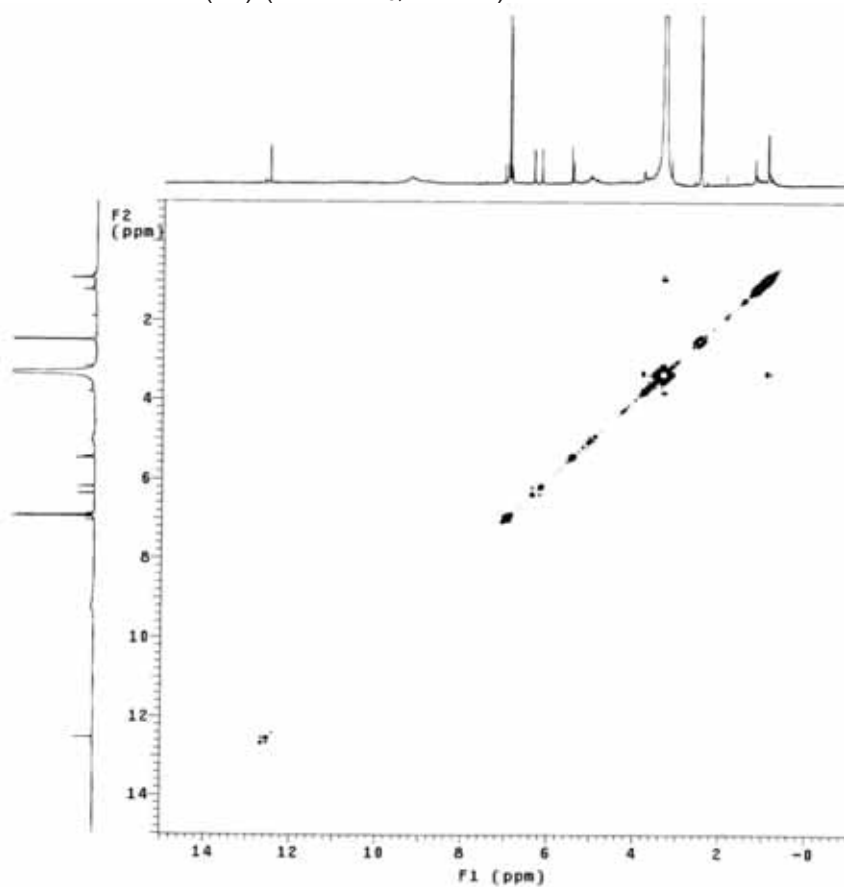
Espectro 106. gHMBC ampliado ( $\delta$  6,1 –  $\delta$  7,3 para H;  $\delta$  135 –  $\delta$  165 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-9 22/04/08  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multispec"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 2.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 CD Width 28627.0 Hz  
 32 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1 499.404305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.002 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 1 hr, 23 min, 22 sec



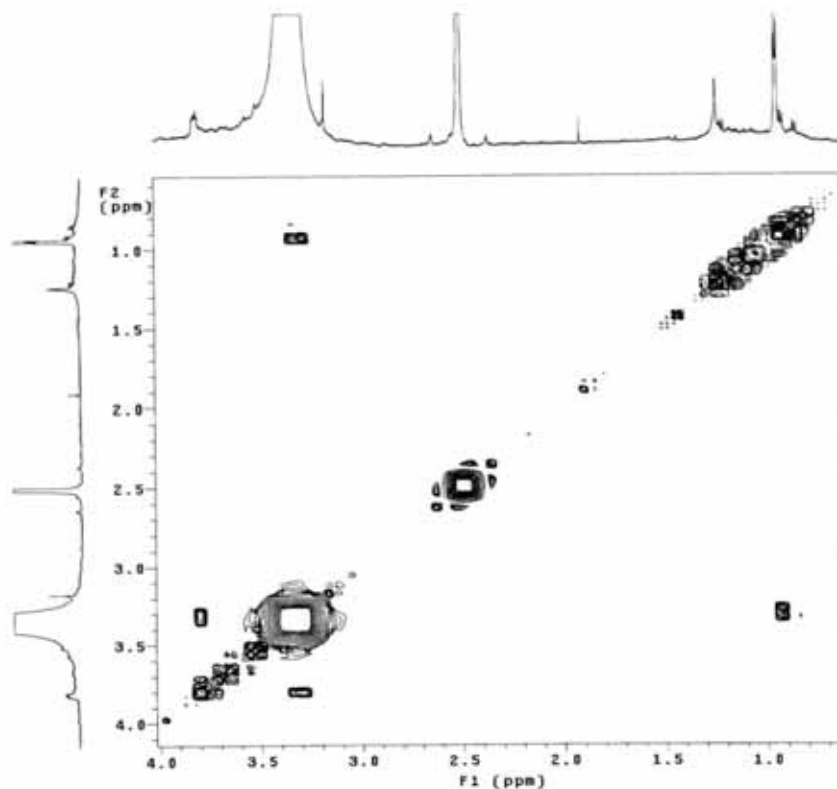
Espectro 107. gHMBC ampliado ( $\delta$  12,1 –  $\delta$  13,0 para H;  $\delta$  100 –  $\delta$  160 para C) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-9 22/04/08  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multispec"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 CD Width 8000.0 Hz  
 16 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1 499.404305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.010 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 39 min, 31 sec



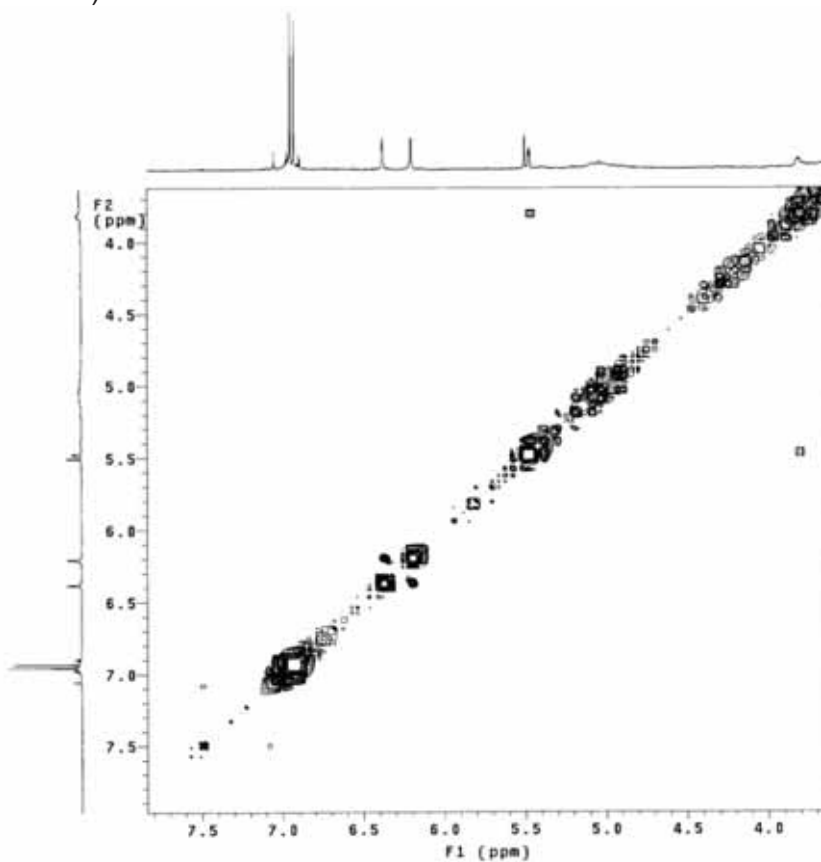
Espectro 108. gCOSY do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-8 22/04/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 F2 Width 8000.0 Hz  
 16 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4048305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sg. sine ball 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sg. sine ball 0.016 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 39 min, 31 sec



Espectro 109. gCOSY ampliado ( $\delta$  1,0 –  $\delta$  4,0) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).

Sara FAC1-5-8 22/04/09  
 Pulse Sequence: gCOSY  
 Solvent: DMSO  
 Temp: 30.0 C / 303.1 K  
 INOVA-500 "multis"
   
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8000.0 Hz  
 F2 Width 8000.0 Hz  
 16 repetitions  
 128 increments  
 OBSERVE F1: 499.4048305 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sg. sine ball 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sg. sine ball 0.016 sec  
 FT size 2048 x 2048  
 Total time 39 min, 31 sec



Espectro 110. gCOSY ampliado ( $\delta$  4,0 –  $\delta$  7,5) do 1-ramnopiranosil-2,5-digaloil-3-hidroxifenila (**11**) (DMSO- $d_6$ , 11.7 T).