SARA REGINA DE MARQUI

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

Dissertação apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

ARARAQUARA
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Marqui, Sara Regina de
M357e Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae) / Sara Regina de Marqui. -- Araraquara : [s.n], 2007
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Produtos naturais. 2. Fitoquímica. 3. Substâncias bioativas. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Sara Regina de Marqui
Data de nascimento: 09 de julho de 1981
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: Tabatinga, SP
Estado civil: Solteira
Profissão: Química
Endereço Residencial: Rua Antônio Caldeiras Dantas, nº 483, Centro – Tabatinga, SP
Endereço Profissional: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista - UNESP
Rua Professor Francisco Degni, s/n, Quitandinha – Araraquara
E-mail: saramarq@iq.unesp.br, sararegina@yahoo.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2004 - atual 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

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

2004 Workshp 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

1. Diretoria Regional de Ensino – Região de Araraquara - DREA

2006 EE Comendador Pedro Morganti – Rincão
2006 EE Bento de Abreu – Araraquara
2006 EE Luzia de Abreu – Nova Europa
2005 EE Bento de Abreu – Araraquara
2005 EE Ergília Micelli – Araraquara
2005 EE Luzia de Abreu – Nova Europa
2004 EE Luzia de Abreu – Nova Europa
2004 EE Dorival Alves – Araraquara
2004 EE Abdalla Miguel – Tabatinga

2. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP
Instituto de Química – Unesp de Araraquara

2004-2007 Mestrado em Química Orgânica
Título: Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophylllum flexuosum* (Sapotaceae).
Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Estágios

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

Atividades desenvolvidas no laboratório

1. Ponto de fulgor
2. Determinação de densidade
3. Determinação do teor de álcool na gasolina
4. Determinação de pH

5. Determinação de teor de gasolina no álcool combustível
6. Análise no aparelho IROX - infravermelho
7. Destilação de combustíveis
8. Desenvolvimento do método de resfriamento do aparelho de ponto de fulgor.
9. Práticas cotidianas em laboratórios.

Atividades desenvolvidas no setor administrativo

1. Palestras ministradas em escolas de ensino fundamental e médio.
2. Desenvolvimento do setor administrativo do CEMPEQC.
3. Secretariado.
4. Publicidade e propaganda.
5. Recursos humanos.
6. Prestação de contas.
7. Setor de compras e cotações.
8. Auxiliar administrativo.

2000-2001 Representante Discente do Departamento de Química Analítica

1999 – 2001 Centro de Ciências Unesp Araraquara

Atividades desenvolvidas

1. Elaboração e manutenção de experimentos no laboratório de química
2. Monitoria de visitas de escolas do ensino fundamental e médio
3. Plantão de dúvidas na área de exatas
4. Manutenção de kits da experimentoteca.

LINHAS DE PESQUISA

1. Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae)
2. Desenvolvimento do funcionamento e resfriamento do aparelho de ponto de fulgor.

ÁREAS DE ATUAÇÃO

Professora de Química, Física e Matemática
Monitoria na área de exatas
Apresentações de palestras e workshops
Química Orgânica
Fitoquímica

Secretariado executivo
Administração de empresas

IDIOMAS

Inglês (Intermediário)
Espanhol (Iniciante)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos.

MARQUI, S. R. de; et al. **Lactonas Triterpênicas das folhas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae).** In: Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Águas de Lindóia, 2006.

MARQUI, S. R. de; et al. **Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e busca de drogas potenciais.** In: V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, Águas de Lindóia, 2005.

MARQUI, S. R. de; et al. **Estágio Supervisionado Presencial e Atividades de Formação de Professores: do Rascunho à Arte Final**. In: VI JORNADA DE EDUCAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS DA UNESP. Assis, 2003.

Processos ou Técnicas sem Registro ou Patente.

MARQUI, S. R. de
Desenvolvimento do Método de Resfriamento do Aparelho de Ponto de Fulgor, 2002.

Demais Trabalhos.

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

Participação em eventos.

1. **Sociedade Brasileira de Química**, 2006.
   Lactonas Triterpênicas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae).

2. **Workshop de Pós-Graduação em Química da Unesp**, 2006.
3. **V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**, 2005.
   Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e busca de drogas potenciais.
4. **Workshop de Metrologia Científica e Legal de Massas**, 2004.
5. **VI Jornada da Educação,** 2003.
   Estágio Supervisionado Presencial e Atividades de Formação de Professores: do Rascunho à Arte Final.
6. **Mostra de Tecnologia e de Projetos do IQ – UNESP,** 2003.
7. **Primeiro Curso de Especialização de Inverno,** 2002.
8. **XXXII Semana da Química,** 2002.
9. **VI Jornada Pedagógica,** 2000.
10. **XXX Semana da Química,** 2000.
11. **XII Jornada Científica,** 2002.

Dedicatória

A Deus por tudo que tenho recebido, pelo dom do amor, paciência e dissernimento.

Ao meu avô paterno Pedro de Marqui e minha avó materna Santina Jacoboni (em memória). Obrigada pelo momentos inesquecíveis que passamos juntos. Onde quer que vocês estejam, sei que estão velando por mim.

Aos meus pais José Benedito de Marqui e Aparecida Maria de Fátima Eleotério de Marqui, que com fé em Deus, lutaram para me dar suporte e educação. Em nenhum momento deixaram de acreditar nos meus sonhos. A eles devo tudo o que sou hoje. Agradeço por terem compreendido o distanciamento físico que foi necessário para a realização da minha graduação e mestrado.

Ao meu imão Isaac Rogério de Marqui que a todo momento se preocupava com meu bem estar. Esteve sempre presente em minha vida acadêmica. Ele é fã incondicional do meu trabalho. Tenho-o como exemplo a seguir em minha vida.

A minha avózinha Aparecida Jacoboni de Marqui pelo apoio incondicional, amor e dedicação. Ela nunca negou esforços e incentivos para a realização dos meus objetivos. Tenho-a como segunda mãe, pois me criou desde pequena com muitos mimos e nunca deixando eu desistir. Obrigada pelas incasáveis orações.

A todos meus famíliares que sempre estiveram presentes em minha vida, demonstrando confiança, carinho e dedicação:

Adriana
Alan
Anderson
Cilinho
Francine
Márcia (madrinha)
Moiséis
Rodrigo
Sâmila
Tia Antônia
Tia Celina
Tia Danuzia
Tia Dolores
Tio Esvaldi
Tia Fátima
Tia Fátima (madrinha)
Tio João
Tio José Moreira
Tio Mário
Tio Roberto
Tio Vitório
Vô Felipe

Eu amo muito todos vocês. Sem vocês, pessoas maravilhosas que Deus colocou em minha vida, não tinha cumprido parte de minha missão.

Gratidão Eterna

Sei que o que fez
Sei do que fizeste
Mesmo com tantos ais
Por tudo que me destes

Faz porque gosta de mim
Porque de ti sou parte
Quantos nãos ao invés de sim
Reprovando as minhas artes

Lembro-me quando criança
Das grandes dificuldades
Da falta de tempo que tinhas
Das grandes necessidades

Saías de casa bem cedo
Munido de dignidade
Levando a marmita enrolada
Recheada de honestidade

Fiel aos seus compromissos
Levou-nos à universidade
Sentia-se todo orgulhoso
Por ter os filhos formado

Hoje sou o que sou
Porque voce me ensinou
Outro não escolheria
Pois certamente eu não o amaria
(Autor desconhecido)

Pai e mãe amo vocês, serei eternamente grata a tudo que fizeram por mim.Obrigada.

Agradecimentos Especiais

A minha querida Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva pela orientação, paciência e amizade e principalmente por ter me acolhido de braços abertos quando mais precisei. Não irei esquecer os bons conselhos, sugestões e exigências.

A Luciana Ávila pelos ensinamentos de técnicas necessárias para o desenvolvimento do trabalho no laboratório e pela paciência.

A minha amiga Vera que sempre me deu atenção e apoio emocional (incondicional) em todos os momentos que precisei. Você é para mim a "mãe Vera".

Existem pessoas que aparecem em nossas vidas em momentos turbulentos e adversos. A elas damos o título de amigo pela suavidade e compreensão que nos dedicam. Juntos sorrimos e cantamos enfim compartilhando o que a vida num todo tem nos reservado a cada dia.

Alguns desses seres são como estrelas guias que nós fazem enxergar o melhor caminho e ao nos verem trilhar esse caminho desaparecem sem deixar rastro mas deixando pra sempre em nosso coração a certeza de que estará ali quando mais necessitarmos.

Também temos amigos irmãos que podem sumir por um tempo mas jamais completamente.Uma amizade que nem distância e nem o tempo farão acabar.

Amar um amigo é adotar um irmão ao qual não dotamos defeitos e nem destacamos qualidades banais.

Por isso, agradeço a Deus por sua amizade e por ter me feito encontrar um ser tão admirável quanto você. Obrigada pela atenção, carinho e ensinamentos nos momentos bons e ruins.

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 professores do Departamento de Química Orgânica pela amizade, confiança e aprendizado de conteúdos disciplinares e lição de vida:

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Profa. Dra. Ângela Regina de Araújo

Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira

Profa. Dra. Márcia Nasser Lopes

Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani

Prof. Dr. Wagner Vilegas

A Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi Navickiene da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP de Ribeirão Preto pela disponibilidade de ser Membro da Banca Examinadora da Defesa de Mestrado.

Aos funcionários do NuBBE pela amizade e ajuda incondicional:

Dr. Nivaldo Boralle pela obtenção dos espectros de RMN

Dr. Alberto Camilo Alécio pela orientação no uso de CLAE.

Hélia, técnica do laborátorio.

Aos meus amigos do NuBBE:

André	*Jonas Motta*	*Silvia*
Andréa Nastri	*Luciana Ávila*	*Vânia*
Daniara	*Luís Octávio*	*Viviane*
Douglas	*Maria Amélia*	
Fernando	*Patricia Pauletti*	

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação:

Célia Maria Chicareli Vieira Coelho

Patrícia Freitas

Sandra Pavanelli

As funcionárias da Biblioteca

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.

Demostra 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.

Epígrafe

No príncipio, Deus criou os céus e a terra (Gênesis 1,1).
Deus disse: "Produza a terra plantas, ervas que contenham sementes e árvores frutíferas que dêem fruto segundo a sua espécie e o fruto contenha a sua semente". E assim foi feito. (Gênesis 1,11).

4O Senhor fêz a terra produzir os medicamentos:
O homem sensato não os despreza.
5Uma espécie de madeira não adoçou o amargor da água?
Essa virtude chegou ao conhecimento dos homens.
6O Altíssimo deu-lhes a ciência
Para ser honrado em suas maravilhas;
7E dela se serve para acalmar as dores e curá-las;
O farmacêutico faz misturas agradáveis,
Compõe unguentos úteis à saúde.
E seu trabalho não terminará,
8Até que a paz divina se estenda sobre a face da terra. (Eclesiástico 38, 4-8)

"Maior do que a tristeza de não ter vencido é a vergonha de não ter lutado."
(Rui Barbosa)

RESUMO

A família Sapotaceae é composta de 53 gêneros com aproximadamente 600 espécies. Esta família não é extensivamente estudada e é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais como arbustos e árvores, incluindo espécies comestíveis como *Manilkara zapote* (sapoti), *Pouterie caimito* (abiu), *Chrysophyllum cainito* ("star-apple") e *Synsepalum dulcificum* ("miracle-fruit"). Poucas espécies do gênero *Chrysophyllum* foram investigadas quimicamente, sendo que algumas apresentaram atividades biológicas importantes. Estudos mais recentes têm focalizado os constituintes de frutos comestíveis, buscando antioxidantes polifenólicos e substâncias com atividade antiinflamatória, como triterpenos derivados do ácido oleanólico e do ácido glicirretínico. Algumas espécies são usadas na medicina popular para desordens gástricas e tratamento de úlcera. Outras apresentaram atividade redutora dos níveis de LDL, colesterol e triglicerídeos séricos. O estudo fitoquímico de *Chrysophyllum flexuosum* inclui em um projeto de pesquisa que visa conhecer a composição química das espécies vegetais com potencial atividade biológica. Análise preliminar do extrato bruto das folhas e ramos apresentou atividade antioxidante em teste utilizando CCDC nebulizada com solução de β-caroteno e inibiu a peroxidação lipídica em modelo de lipossomas usando Fe^{2+} como iniciador de reações radicalares. O extrato etanólico de folhas e ramos da espécie *Chrysophyllum flexuosum* foi submetido a partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila, butanol e metanol/água (9:1). Da fração hexânica foram isolados 4 triterpenos pentacíclicos majoritários identificados como: butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**), sendo inédito na literatura, 3-*O*-β-acetil-β-amirina (**2**), 3-*O*-β-acetil-lupeol (**3**) e 3-*O*-β-acetil-α-amirina (**7**), constituindo 1/3 da massa total da fração. Também foram identificados na fração hexânica a α-amirina (**4**), β-amirina (**5**) e lupeol (**6**). Na fração acetato de etila foi identificado o ácido gálico (**8**) como constituinte principal. Através de comparação dos cromatogramas em CLAE das fases FAc, FB e FM em vários comprimentos de onda e fases móveis, observou-se a presença do ácido gálico nas três fases. Conforme observado na literatura, o gênero *Chrysophyllum* apresenta substâncias com atividade antioxidante em potencial, o que foi verificado na espécie em estudo através do teste em CCDC revelada com solução de β-caroteno para as subfrações obtidas da fase em AcOEt do extrato etanólico das folhas e ramos de *Chrysophyllum flexuosum*. O ácido gálico deve ser a substância responsável pela atividade antioxidante observada para o extrato e fração AcOEt. Adiionalmente, a lactona triterpênica butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**) apresentou baixa atividade anticolinesterásica e frente ao fungo patogênico humano *Candida albicans*. Também apresentou moderada atividade frente ao fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans.* A substância **8** apresentou moderada atividade frente ao fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum* e patogênico humano *Cryptococcus neoformans*. Também apresentou baixa atividade anticolinesterásica e frente aos fungos patogênicos humanos *Candida albicans* e *C. Krusei.*

ABSTRACT

The Sapotaceae family is composed of 53 genera with *ca.* 600 species. This family is not extensively studied and is found in tropical and subtropical regions as shrubs and trees, including edible species as *Manilkara zapote* (sapoti), *Pouterie caimito* (abiu), *Chrysophyllum cainito* (star-apple) and *Synsepalum dulcificum* (miracle-fruit). Few species of *Chrysophyllum* genus have been investigated although some present important biological properties. Recent studies have focused on the constituents of edible fruits, searching for antioxidant phenolics and anti-inflammatory compounds, as triterpene derivatives of oleanolic acid and glicerretinic acid. Some species have presented reducing activity on LDL, cholesterol and triglyceride blood levels. The phytochemical study on *Chrysophyllum flexuosum* is included in a research project focusing on the search for bioactiveormolecular compounds from São Paulo flora with potential biological activity. Preliminary analysis of its leaves crude extract by a TLC test nebulized with beta-carotene solution in a liposome model using Fe^{2+} as radicalar reactions initiator, indicated the presence of antioxidant compounds. The ethanol extract from leaves of *Chrysophyllum flexuosum* was submitted to liquid-liquid partition with organic solvents: hexane, ethyl acetate, butanol and methanol/water (9:1), followed by chromatographic procedures. The hexane fraction afforded four pentacyclic triterpenes, including the new butanolide-[1,3]-α-amyrin (**1**), 3-*O*-β-acetyl-β-amyrin (**2**), 3-*O*-β-acetyl-lupeol (**3**); and 3-*O*-β-acetyl-α-amyrin (**7**), comprising *ca.* one third of its total weight. Lupeol (**6**), β-amyrin (**5**); and α-amyrin (**4**) were also identified from the hexane fraction. The ethyl acetate, butanol and methanol fractions using several mobile phases and UV wavelength detection disclosed the presence of gallic acid in the three fractions. As observed in the literature, *Chrysophyllum* genus presents compounds with antioxidant activity, which was confirmed by the results obtained from the TLC analysis. The new triterpene lactone 1 presented moderate MIC (minimum inhibitory concentration) towards acethylcholinesterase (AchE) in the TLC test, whereas gallic acid (**8**) showed moderate activity when bioautographed with phytopathogenic fungi *Cladosporium sphaerospermum*. Both compounds presented moderate inhibitory activity towards human pathogens *Candida albicans*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans.*

SUMÁRIO

1. Introdução 24
1.1. A família Sapotaceae 24
1.2. Atividade Biológica dos Triterpenos 25
1.3. Descrição botânica da familia Sapotaceae 28
1.4. O gênero *Chrysophyllum* 30
1.5. A éspecie *Chrysophyllum flexuosum* 32
2. Objetivos 33
3. Metodologia 33
3.1. Materiais, Equipamentos e Técnicas 33
3.1.1. Moinho de facas e funil de separação 33
3.1.2. Solventes 33
3.1.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e Preparativa 33
3.1.4. Cromatografia em Coluna 34
3.1.5. Rotaevaporador 34
3.1.6. Ultra-som 34
3.1.7. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 34
3.1.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 34
3.2. Ensaios químicos e biológicos 34
3.2.1. Autografia em CCDC com β-caroteno para atividade antioxidante 35
3.2.2. Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrihidrazila (DPPH) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres 35
3.2.3. Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos 36
3.2.4. Detecção da atividade anticolinesterásica 36
3.2.5. Avaliação da atividade antifúngica – fungos patógenos humanos 38
3.3. Procedimentos Experimentais 39
3.3.1. Coleta e identificação do material vegetal 39
3.3.2. Obtenção do extrato bruto 39
3.3.3. Partição do extrato bruto EtOH 39
3.3.4. Avaliação da atividade antioxidante 40
3.3.5. Fracionamento cromatográfico da fração hexânica 41
3.3.6. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila 46
3.3.7. Fracionamento cromatográfico da fração Butanólica e Hidroalcóolica 57
4. Resultados e discussões parciais 58
4.1. Determinação estrutural da substância **1** 58
4.2. Determinação estrutural da substância **2** 60
4.3. D eterminação estrutural da substância **3** 63
4.4. Determinação estrutural das substâncias **4**, **5** e **6** 65
4.5. Determinação estrutural da substância **7** 67

4.6. Determinação estrutural da substância **8** 69
5. Resultados de ensaios químicos e biológicos realizados 70
5.1. Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrihidrazila (DPPH) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres 70
5.2. Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos 71
5.3. Detecção da atividade anticolinesterásica 72
5.4. Avaliação de atividade antifúngica – fungos patógenos humanos 73
6. Conclusões 74
7. Referências 75
8. Anexos 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Triterpenos pentacíclicos de esqueleto lupano extraídos da espécie *Mimusops* e ácido protobásico extraído da espécie *Gambeya*, respectivamente 25
Figura 2: Ácido ursólico e ácido betulínico, respectivamente, que apresentaram atividades citotóxicas e citostática 26
Figura 3: Folhas e frutos de *Mimusops elengi* 28
Figura 4: Folhas e frutos de *Manilkara zapota* 29
Figura 5: Folhas e frutos de *Pouteria caimito* 29
Figura 6: Antocianinas isoladas de espécies de *Chrysophyllum* 30
Figura 7: Folhas e frutos de *Chrysophyllum* spp 31
Figura 8: Flavonóides antioxidantes de espécies de *Chrysophyllum* 32
Figura 9: Redução do radical difenil-picrilhidrazila (DPPH) 35
Figura 10: Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição da AChE 37
Figura 11: Reação da AChE com acetato de 1-naftila e subsequente formação do corante azóico roxo no bioensaio em CCD 38
Figura 12: Cromatogramas obtidos via CLAE da FH1-Y (494,9mg), (coluna analítica "Luna" Phenomenex LC-18, fase móvel MeOH/CH_2Cl_2 9:1, fluxo de 1mL/min, λ 201nm e λ 215nm) 43
Figura 13: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc1-8 (38,3mg) e FAc7-4 (14,2mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm) 48
Figura 14: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc7-5 (38,3mg) e FAc7-6 (10,5mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm) 49
Figura 15: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc7-9 (21,7mg) e FAc7-10 (45,8mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm) 49
Figura 16: Cromatograma obtido via CLAE da FAc7-11 (96,0mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 235nm) 50
Figura 17: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc7-11-Z-2 (6,2mg) e FAc7-11-Z-3 (45,8mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm) 51
Figura 18: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc4-1 (3,8 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 52
Figura 19: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc4-2 (4,9 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 53

Figura 20: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc5-1 (2,9 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 53
Figura 21: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc5-2 (2,0 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 53
Figura 22: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc6-1 (3,5 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 54
Figura 23: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc6-2 (3,5 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 54
Figura 24: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc8-1 (15,8 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 54
Figura 25: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc8-2 (9,1 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 55
Figura 26: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc9-1 (72,6 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 55
Figura 27: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc9-2 (30,0 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 55
Figura 28: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc14-2 (86,0 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 56
Figura 29: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc14-3 (35,0 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm) 56
Figura 30: Estrutura molecular proposta para a substância **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) 58
Figura 31: Algumas correlações de HMBC (H $\rightarrow$ C) da substância **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) 59
Figura 32: Estrutura molecular proposta para a substância **2** (3-*O*-β-acetil-β-amirina) 60
Figura 33: Algumas correlações de HMBC (H $\rightarrow$ C) da substância **2** (3-*O*-β-acetil-β-amirina) 62
Figura 34: Estrutura molecular proposta para a substância **3** (3-*O*-β-acetil-lupeol) 63
Figura 35: Algumas correlações de HMBC (H $\rightarrow$ C) da substância **3** (3-*O*-β-acetil-lupeol) 64
Figura 36: Estruturas moleculares propostas para a: α-amirina (substância **4**), β-amirina (substância **5**) e lupeol (substância **6**) respectivamente 65

Figura 37: Estrutura molecular proposta para a substância **7** (3-*O*-β-acetil-α-amirina) 67
Figura 38: Algumas correlações de HMBC (H⟶ C)da substância **7** (3-*O*-β-acetil-α-amirina) 69
Figura 39: Estrutura molecular proposta para a substância **8** (ácido gálico) 69
Figura 40: Algumas correlações de HMBC da substância **8** (ácido gálico) 70
Figura 41 Atividade sequestradora de radicais livres da substância **8** frente ao DPPH 71
Figura 42: Biautografia da substância **8** (ácido gálico) 72
Figura 43: Biautografia em placa de sílica, detecção da atividade anticolinesterásica 73

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Partição do extrato EtOH bruto 39
Fluxograma 2: Fracionamento cromatográfico da FH1 42
Fluxograma 3: Fracionamento cromatográfico parcial da FH 45
Fluxograma 4: Fracionamento das subfrações com resultados positivos em testes de atividade antioxidante 47
Fluxograma 5: Fracionamento da FA7-11 50
Fluxograma 6: Fracionamento cromatográfico da FAc 57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fases móveis utilizadas na CCDC para o EE e suas sub-frações 41
Tabela 2: Eluição de FH em CC (sílica mesh 70-230) 41
Tabela 3: Eluição de FH1 em CC (sílica mesh 70-230) 42
Tabela 4: Fração obtidas de FH1-1 por CCDP (Hex/AcOEt 9:1) 42
Tabela 5: Frações obtidas da FH1-Y por CLAE preparativo (MeOH/ CH_2Cl_2 (9:1), fluxo 18mL/min, λ 215nm) 43
Tabela 6: Eluição de FH2 em CC (sílica mesh 70-230, gradiente Hex/AcOEt) 44
Tabela 7: Fração obtidas de FH2-9 por CCDP (Hex/AcOEt 9:1) 44
Tabela 8: Eluição de FH3 em CC (sílica mesh 70-230, gradiende Hex/AcOEt) 45
Tabela 9: Frações obtidas de FH4 por CCDP (Hex/AcOEt 8:2) 45
Tabela 10: Frações obtidas de FH4-1 por CCDP (Hex/AcOEt 95:5, 3x) 45
Tabela 11: Eluição de FAc em CC (Sephadex) eluída com MeOH 46
Tabela 12: Eluição de FAc1 em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH 47
Tabela 13: Eluição de FAc7 em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH 48
Tabela 14: CCDP (Hex/AcOEt 86:12:2) da FAc7-11 50
Tabela 15: CC Sephadex (MeOH) da FAc7-11-Z 51
Tabela 16: CCDP (AcOEt/MeOH/H_2O 86:12:2) da FAc7-11-Z-3 52
Tabela 17: Subfrações obtidas das frações FAc (4, 5, 6, 8, 9, 11, 12 e 14) submetidas a coluna C-18 57
Tabela 18: Eluição de FB em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH 57

Tabela 19: Eluição de FM em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH 58
Tabela 20: Dados de RMN da substância **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) [a, b, c, n.a] 60
Tabela 21: Dados de RMN da substância **2** (3-*O*-β-acetil-β-amirina) [a, b, c, n.a] 62
Tabela 22: Dados de RMN da substância **3** (3-*O*-β-acetil-lupeol) [a, b, c, n.a] 64
Tabela 23: Dados de RMN da substância **4** (α-amirina), substância **5** (β-amirina) e substância **6** (lupeol) respectivamente [a, b, c, n.a.] 66
Tabela 24: Dados de RMN da substância **7** (3-*O*-β-acetil-α-amirina) [a, b, c, n.a.] 68
Tabela 25: Dados de RMN da substância **8** (ácido gálico) [a, b, c] 70
Tabela 26: Biautografia das substâncias **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) e **8** (ácido gálico) 71
Tabela 27: Método de microdiluição das substâncias butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**) e ácido gálico (**8**) 74

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1: RMN de ^1H da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 81
Espectro 2: RMN de ^1H ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 81
Espectro 3: RMN de ^{13}C da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 82
Espectro 4: RMN de ^{13}C ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 82
Espectro 5: DEPT 135° da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 83
Espectro 6: DEPT 135° ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 83
Espectro 7: DEPT 90° da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 84
Espectro 8: HMQC da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 84
Espectro 9: HMQC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 85
Espectro 10: HMQC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 86
Espectro 11: HMBC da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 86
Espectro 12: HMBC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 87
Espectro 13: HMBC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 88
Espectro 14: RMN de ^1H da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 88
Espectro 15: RMN de ^1H ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 89
Espectro 16: RMN de ^{13}C da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz) 89
Espectro 17: RMN de ^{13}C ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz) 90
Espectro 18: DEPT 135° da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz) 90
Espectro 19: DEPT 135° ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz) 91
Espectro 20: HMQC da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 91
Espectro 21: HMQC ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 92
Espectro 22: HMBC da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 93
Espectro 23: HMBC ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 93
Espectro 24: HMBC ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz) 94
Espectro 25: RMN de ^1H (integração) da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 94

Espectro 26: RMN de ^{1}H ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 95
Espectro 27: RMN de ^{13}C da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 95
Espectro 28: RMN de ^{13}C ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 96
Espectro 29: DEPT 135° da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 96
Espectro 30: DEPT 135° ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz) 97
Espectro 31: HMQC da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 97
Espectro 32: HMQC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 98
Espectro 33: HMQC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 98
Espectro 34: HMBC da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 99
Espectro 35: HMBC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 99
Espectro 36: HMBC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz) 100
Espectro 37: RMN de ^{1}H da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 100
Espectro 38: RMN de ^{1}H ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 101
Espectro 39: RMN de ^{13}C da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz) 101
Espectro 40: RMN de ^{13}C ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz) 102
Espectro 41: DEPT 135° da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz) 102
Espectro 42: DEPT 135° da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz) 103
Espectro 43: HMQC da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 103
Espectro 44: HMQC ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 104
Espectro 45: HMBC da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 105
Espectro 46: HMBC ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 105
Espectro 47: HMBC ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz) 106
Espectro 48: RMN de ^{1}H da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz) 106
Espectro 49: RMN de ^{13}C da FAc9-2 (D_2O, 125 MHz) 107
Espectro 50: DEPT 135° da FAc9-2 (D_2O, 125 MHz) 107
Espectro 51: HMQC da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz) 108
Espectro 52: HMBC da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz) 108
Espectro 53: HMBC ampliado da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz) 109

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio Deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	Dubleto
dd	Duplo Dubleto
ddl	Duplo Dubleto Largo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dl	Dubleto Largo
DMSO-d_6	Dimetil Sulfóxido Deuterado
D_2O	Água Deuterada
EE	Extrato Etanólico
FAc	Fração Acetato de Etila
FB	Fração n-Butanol
FH	Fração Hexânica
FM	Fração Hidrometanólica
*g*COSY	Correlated Spectroscopy
*g*HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
*g*HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
m	Multipleto
MHz	MegaHertz
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
sl	Singleto Largo
t	Tripleto
δ	Deslocamento Químico
λ	Comprimento de Onda

1. INTRODUÇÃO.

A flora brasileira é a segunda maior área florestal do planeta. Nossas florestas apresentam os maiores índices de biodiversidade e de ecossistemas e o homem tende a beneficiar-se desta situação. Dos diversos biomas brasileiros, estima-se que existam de 40 mil a 55 mil espécies (STASI, 1996).

Dentre os seis principais biomas do Brasil estão o Cerrado e a Mata Atlântica (BDT, 2003a). O Cerrado, cobrindo 22% do terrritório nacional (BDT, 2003b), é formado por diversos tipos de vegetação savânica que diferem entre si pela abundância relativa de espécies rasteiras e de árvores e arbustos (BDT, 2003c), num total de 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 endêmicas dessa área (IBAMA, 2003a). Já a Mata Atlântica, com apenas 7,3% de sua cobertura florestal original, possui ainda cerca de 20.000 espécies de plantas vasculares, sendo 8.000 espécies endêmicas (IBAMA, 2003b).

Assim, tendo como exemplo a devastação da Mata Atlântica, o ritmo atual de extinção das espécies vegetais pode fazer com que um grande número de plantas com propriedades medicinais desapareçam antes de ter seu valor reconhecido.

O potencial de plantas superiores como fontes para novos fármacos é ainda pouco explorado. Entre as 250.000 espécies estimadas de plantas, 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).

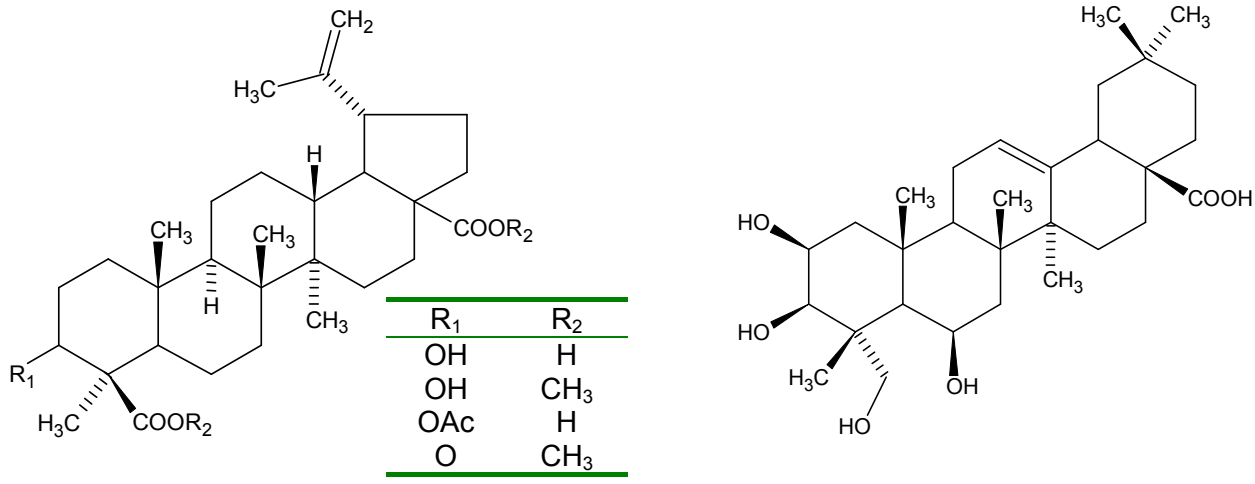
Diversas famílias ainda não investigadas química e farmacologicamente vêm sendo estudadas dentro do Projeto Temático – BIOTA, intitulado “Conservation and sustainable use of the plant biodiversity from cerrado and Atlantic Forest: chemical diversity and prospecting for potencial drugs”, desenvolvido pelo Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBe). A seleção das espécies vegetais é baseada em bioensaios preliminares (antitumoral, antiinflamatório, antioxidante e antifúngico) dos extratos vegetais, visando o estabelecimento de modelo para a preservação, estudo e exploração racional da flora remanescente no Estado de São Paulo.

1.1. A família Sapotaceae.

A família Sapotaceae é composta de 53 gêneros com aproximadamente 600 espécies. Esta família não é extensivamente estudada, sendo os gêneros *Pouteria, Mimusops, Manilkara, Gambeya, Argania, Ormosia, Sideroxylum, Calocarpum, Butyrospermum, Madhuka, Planchonella e Chrysophyllum,* os mais investigados quimicamente em função de relatos de seus usos etnofarmacológicos.

Espécies de *Mimusops* são usadas na medicina popular para desordens gástricas e tratamento de úlcera (SHAH et al., 2003). Estas forneceram triterpenos pentacíclicos de esqueleto

lupano (Figura 1) e ursano com inibição sobre as enzimas β-glucuronidase e α-glucosielase (JAHAN et al., 1995; JAHAN et al., 2000; JAHAN et al., 2001; SEM et al., 1995), além de saponinas triterpênicas derivadas do ácido protobásico (SAHU, 1996; SAHU et al., 1997; LAVAUD et al., 1996). Espécies de *Gambeya* também forneceram ácido protobásico, além de outros triterpenos pentacíclicos: ácido oleanólico, miriântico e de ácidos graxos triterpênicos e esteróides glicosilados (WANDJI et al., 2002; WANDJI et al., 2003). Outras saponinas triterpênicas derivadas do ácido protobásico (Figura 1) foram isoladas das raízes de *Sideroxylon* (NICOLAS et al., 1995; JIANG et al., 1994) e das sementes de *Madhuca butyraceae* (LI et al., 1994; NIGAM et al., 1992). O óleo comestível extraído das sementes de *Argania spinosa*, endêmica do Marrocos, mostrou atividade redutora dos níveis de LDL, colesterol e triglicerídeos séricos, possivelmente relacionadas ao seu conteúdo de ácidos graxos insaturados (BERROUGUI et al., 2003). Esse óleo mostrou ainda a presença de esteróis, álcoois triterpênicos (MORTON, 1987; FARINES et al., 1984a; FARINES et al., 1984b) e saponinas (ALAOUI et al., 2002), enquanto o estudo químico de suas folhas evidenciou a presença de flavonóides glicosilados (TAHROUCH et al., 2000). Os óleos essenciais obtidos pela destilação das folhas de *Argania spinosa* apresentaram álcoois sesquiterpênicos (*epi*-cubenol) como constituintes majoritários, que mostraram atividade antimicrobiana (EL KABOUSS et al., 2002).



R_1	R_2
OH	H
OH	CH_3
OAc	H
O	CH_3

Figura 1: Triterpenos pentacíclicos de esqueleto lupano extraídos da espécie *Mimusops* e ácido protobásico extraído da espécie *Gambeya*, respectivamente.

1.2. Atividade Biológica dos Triterpenos.

Os triterpenos são metabólitos secundários não esteroidais da flora, fauna marinha e terrestre, ocorrendo na forma livre, bem como na forma éter, éster ou glicosídeo. Triterpenos são isoprenóides compostos de 30 átomos de carbono e podem possuir esqueletos carbônicos acíclicos, mono, di, tri, tetra ou pentacíclicos, com posterior modificação da estrutura devido a rearranjos e mudanças de grupos funcionais (MANN et al., 1994a; MANN et al., 1994b). Triterpenos pentacíclicos são constituintes dominantes desta classe e têm sido largamente investigados. Dentro da classe dos triterpenos pentacíclicos existem os esqueletos do tipo

oleanano, taraxerano, friedooleanano, friedelano, ursano, lupano entre outros associados à presença e posicionamento de ligações duplas, grupos metílicos e tamanho dos ciclos (MAHATO et al., 1994).

Mesmo considerando-se as limitadas potencialidades farmacológicas dos triterpenos para atividade antioxidante, a ampla ocorrência a e diversidade estrutural destas substâncias despertaram o interesse nas pesquisas de suas atividades biológicas nos últimos anos. Neste contexto, um grande número de triterpenos com atividades citotóxicas e citostática foram descritos, sendo potenciais substâncias antineoplásicas. Dentre estas substâncias destacam-se vários triterpenos pentacíclicos como o epimadiol, manalidol, saforadiol, ácido ursólico, ácido betulínico (Figura 2) e seus derivados, entre outros (MAHATO et al., 1994).

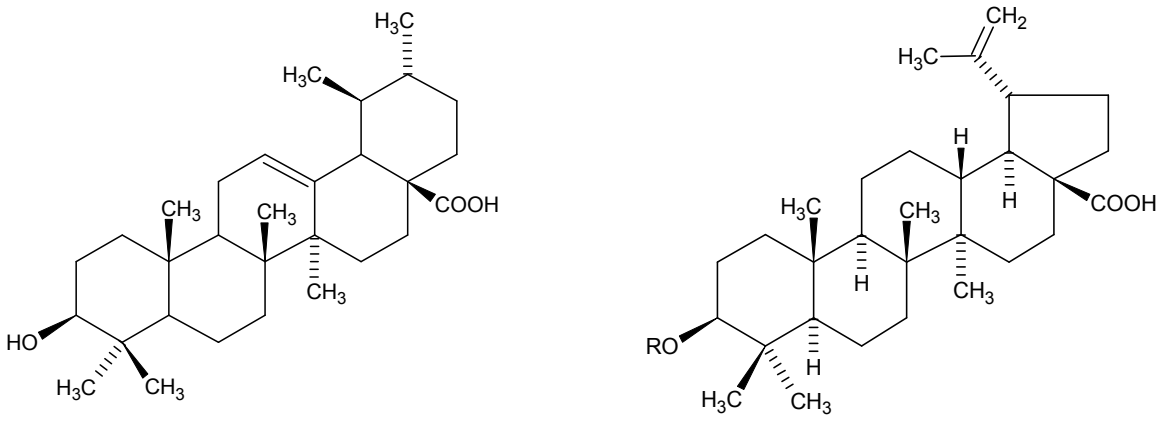


Figura 2: Ácido ursólico e ácido betulínico, respectivamente, que apresentaram atividades citotóxicas e citostática.

O ácido ursólico, também conhecido como urson, prunol, micromerol e malol, é um triterpeno pentacíclico cuja ocorrência natural se dá em um grande número de alimentos vegetais, ervas medicinais e outras plantas (LIU, 1995; THE MERCK INDEX, 1996). Por muito tempo, ele foi considerado farmacologicamente inativo (MEZZETTI et al., 1971). Por causa disto, o ácido ursólico e seus sais alcalinos (ursolato de potássio ou sódio) foram exclusivamente usados como agentes emulsificantes em preparações farmacêuticas, cosméticas e alimentares (MEZZETTI et al., 1971; HARRY et al., 1973). Entretanto, descobriu-se que o ácido ursólico era ativo medicinalmente tanto na forma tópica quanto ingerido. Suas propriedades antiinflamatória tópica, antitumoral (câncer de pele) e antimicrobiana fizeram-no muito utilizado em aplicações dermatológicas (LIU, 1995). Plantas medicinais que contém ácido ursólico (responsável por sua eficiência terapêutica) eram usadas na medicina popular antes de serem conhecidos seus constituintes químicos. Pesquisas científicas atuais que levaram ao isolamento e identificação do ácido ursólico revelaram e confirmaram que vários efeitos farmacológicos, tais como antitumoral, hepatoprotetor, antiinflamatório (oral e tópico), antiúlcera, antimicrobiano, anti-hiperlipidêmico e antiviral podem ser atribuídos ao ácido ursólico (LIU, 1995). O ácido ursólico demonstrou várias atividades biológicas: antiprotease HIV-1 (XU et al., 1996), antiinvasiva nas células humanas de fibrosarcoma metastático (HT 1080), inibição do ciclo celular na fase G1 de células de câncer de mama (MCF-

7), atividade inibitória de tumor de pele (AHN et al., 1998) e atividade antiinflamatória (SAFAYHI et al., 1997).

Atividades biológicas contra microrganismos têm sido relatadas para inúmeros triterpenos, sendo que vários derivados do ácido oleanólico apresentam significativa atividade fungicida apenas quando possuem na estrutura um ácido carboxílico livre nos carbonos C-27 ou C-29 (DAS et al., 1983).

A atividade antiinflamatória de triterpenos foi determinada para diversos derivados do ácido oleanólico e do ácido glicirretínico (DAS et al., 1983). O olean-12-ene-3-β-*0*-diol, com atividade antiinflamatória, antiulcerogênica e antialérgica apresenta menores efeitos colaterais que o ácido glicirretínico. Destacam-se também os triterpenos ácidos: 3-β-acetoxiolean-12-eno-27-óico e 2α, 3α-diidroxi-olean-5,12-dieno-28-óico; 2β,3α-diacetoxi-olean-5,12-dieno-28-óico e 2α,3β-diacetoxi-18-hidroxi-olean-5,12-dieno-28-óico, os quais exibiram atividade antiinflamatória. Assim como o moretenol e o neolupanol, além dos acetatos de taraxasterol e moretenol (MAHATO et al., 1997).

Os derivados do fridelano, ácidos 3-oxofridelan-29-óico, 3-oxofriedelan-28-óico e 28,29-diidroxifriedelan-3-ona exibiram atividade contra células de câncer de pulmão A-549. O ácido 3-oxofriedelan-28-óico mostrou-se também ativo contra células tumorais dos tipos L-1210 e KB (MAHATO et al., 1997). O lupeol foi avaliado por seus efeitos antiinflamatórios e antipiréticos em ratos e camundongos. Ele exerceu efeito significativo em processos inflamatórios agudos e crônicos, mas não possui propriedades analgésicas ou antipiréticas (SINGH et al., 1997). Os triterpenos com esqueletos lupânico e *nor*-lupânico são descritos na literatura como ativos contra o vírus HIV, destacando-se entre eles os ácidos betulínico e platônico. Estudos compararam o efeito do AZT a esses ácidos e aos derivados do ácido betulínico, comprovando uma potente atividade das substâncias com esqueleto lupânico contra o vírus HIV (FUJIOKA et al., 1994). A atividade anti-HIV dessas substâncias parece estar relacionada com os substituintes nas posições 3, 19 e 28. Ao triterpeno ácido betulínico foi relacionada uma atividade antimalárica *in vitro* moderada a boa contra o parasita da malária humana, *Plasmodium falciparum*. A ele foi também atribuída uma grande variedade de atividades biológicas, entre elas atividade antitumoral contra melanoma humano (BRINGMANN et al., 1997). A comparação da atividade anti-HIV do ácido betulínico (MAYAUX et al., 1994) e dos seus derivados (KASHIWADA et al., 1996; EVERS et al., 1996; SOLER et al., 1996; PISHA et al., 1995; FULDA et al., 1999; RECIO et al., 1995; RIBEIRO et al., 2005), do ácido platânico (HOMANS et al., 1970) e do ácido diidrobetulínico (MUKHERJEE et al., 1997) mostra claramente que a esterificação do -OH em C-3 com os grupos acetila (SOLER et al., 1996), benzoíla (PISHA et al., 1995), crotonila (FULDA et al., 1999), sulfonila (RECIO et al., 1995) e succinila (RIBEIRO et al., 2005) conduz a um decréscimo da atividade sugerindo que, quando o grupo -OH em C-3 está livre, as substâncias estruturalmente relacionadas apresentam uma atividade anti-HIV mais acentuada (KASHIWADA et al., 1996; EVERS et al., 1996; SOLER et al., 1996; PISHA et al., 1995; FULDA et al., 1999; RECIO et al., 1995; RIBEIRO et al., 2005). Substituintes na posição 19 aumentam ou diminuem a atividade mostrando que esta porção é importante para uma boa atividade anti-HIV, sendo essencial também o grupo carboxila em C-28 (FUJIOKA et al., 1994). Pesquisas recentemente desenvolvidas têm demonstrado que o ácido

betulínico e alguns dos seus derivados desempenharam um papel relevante como potentes inibidores seletivos da replicação do vírus HIV tipo 1 (MAYAUX et al., 1994; KASHIWADA et al., 1996; EVERS et al., 1996; SOLER et al., 1996), como inibidores de tumores (PISHA et al., 1995; FULDA et al., 1999), como antimaláricos (BRINGMANN et al., 1997), e como agente antiinflamatório (RECIO et al., 1995; RIBEIRO et al., 2005). O ácido betulínico está sendo atualmente utilizado em ensaios pré-clinicos para o tratamento e prevenção de melanomas malignos (PISHA et al., 1995).

1.3. Descrição botânica da familia Sapotaceae.

Plantas da família Sapotaceae são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais como arbustos e árvores. Algumas plantas produzem látex. As folhas são espirais arranjadas ou alternadas. Espécies desta família possuem flores de simetria radial. Alguns gêneros dessa família possuem frutos comestíveis como a *Mimusops, Manilkara, Pouteria.*

Mimusops elengi também conhecida como abricó-da-praia, é encontrada em regiões subtropicais. Ocorre principalmente no litoral porque tolera bem solos arenosos e salinos. A árvore pode chegar a dez metros de altura e é muito usada para ornamentação. O fruto é doce, possuindo casca resistente e polpa farinhosa. Pode ser comido, mas só quando bem maduro. Antes disso, produz um látex branco e pegajoso (Figura 3). Possui elevada concetração de vitamina C. Ele é utilizado na medicina popular como adstringente (SHAH et al., 2003).





Online:
PHUMCHOOSRI, A. ***Mimusops elengi***. Disponível em: <http://toptropicals.com/pics/garden/06/mimusops_elengi2.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

TRADE WINDS FRUIT. ***Mimusops elengi***. Disponível em: <http://www.tradewindsfruit.com/spanish_cherry3.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

Figura 3: Folhas e frutos de *Mimusops elengi.*

Manilkara zapota também conhecida como sapoti, se desenvolve em regiões de clima mais quente, solos profundos, bem drenados e ricos em matéria orgânica. A árvore pode chegar a vinte metros de altura. Os frutos podem ter diferentes formas, como: esférica, ovóide e achatada e a cor da sua casca é castanho-escura. O fruto possui casca marrom, seca, fina e áspera. A polpa é mole e de coloração amarela para marrom (Figura 4). Tem sabor exótico e adocicado, sendo consumido principalmente ao natural, mas pode ser utilizado no preparo de geléia, sorvete,

refresco e xarope. Este é um adstringente poderoso usado em infecções agudas. As sementes são diuréticas. O látex extraído da planta pode ser usado na fabricação de goma de mascar (CORDEIRO, NUNES, 1996).





Online:
CIRAD, G. C. ***Manilkara zapota***. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/_derived/Ficha%20Manilkara%20zapota.htm_txt_gc-sapotille.gif>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

LES FRUITS DE TAHITI ET SES ILES. ***Manilkara zapota***. Disponível em: <http://www.tahitifruits.com/images/originales/images_fruits/Gsapot.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

Figura 4: Folhas e frutos de *Manilkara zapota.*

Pouteria caimito também conhecida como abiu, se desenvolve em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em solos férteis. A árvore pode atingir de 3 a 8 metros. O fruto tem forma arredondada com casca amarela (Figura 5). A polpa é branca e doce (Online:http://pt.wikipedia.org/wiki/Lucuma_caimito; http://www.agrobyte.com.br/frutas_med.htm#Abiu, Data do acesso: 14 de jan de 2007).





Online:
CAPE TRIB. ***Pouteria caimito***. Disponível em: <http://www.capetrib.com.au/images/abiuonplate.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

GAIA YOGA. ***Pouteria caimito***. Disponível em: <http://www.gaiayoga.org/nursery/nursery%20images/abiu-corner69.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

Figura 5: Folhas e frutos de *Pouteria caimito.*

1.4. O gênero *Chrysophyllum.*

Poucas espécies do gênero *Chrysophyllum* foram investigadas quimicamente, sendo que algumas apresentaram atividades biológicas importantes. Estudos recentes mostram que frutos e folhas desse gênero contêm flavonóides e outros polifenóis (antioxidantes naturais) que reduzem a velocidade de processos oxidativos associados a desordens neurodegenerativas, doença coronária (CHD), arteriosclerose e câncer. As atividades antioxidantes de extratos aquosos de plantas não foram estudadas extensivamente, devido à presença de antioxidantes solúveis em água e açúcares, que podem mascarar a atividade de polifenóis. A polaridade e complexidade de extratos aquosos dos frutos dificultam o isolamento de componentes puros como antocianinas e taninos (GORDON, 1996; WANG et al., 1999).

Flavonóides são freqüentemente associados por suas propriedades antioxidantes com a proteção de sistemas biológicos, em especial, membranas lipídicas, contra o estresse oxidativo. A oxidação é um dos maiores causadores de degradação de materiais e alimentos. As espécies com oxigênio reativo, principalmente radicais livres, têm sido reconhecidas como as principais envolvidas em muitas doenças, incluindo as duas maiores causas de morte: câncer e arteriosclerose. Isso tem levado à intensificação de pesquisas relacionadas com as possíveis contribuições de antioxidantes para a prevenção de doenças, já que eles são capazes de remover ou evitar formação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, evitar reações de degradação oxidativa, exercendo papel fundamental na manutenção do equilíbrio entre fatores pró e antioxidantes nos sistemas biológicos (BORING et al., 1994). 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.

As antocianinas, uma subclasse da classe de flavonóides, são pigmentos importantes nas flores e nos frutos (Figura 6). Sendo responsáveis pela coloração vermelho, azul e roxo. A cianidina é a antocianidina mais comum, e o seu 3-glicosídeo é o antioxidante mais frequente em plantas. Glicosilação da antocianidina diminui a atividade antioxidante e hidroxilação aumenta a mesma (WANG et al., 1999).

R_1	R_2	Nome
OH	H	Cianidina
OCH_3	H	Peonidina
OH	OH	Definidina
OCH_3	OH	Petunidina
OCH_3	OCH_3	Malvidina
H	H	pelargonidina

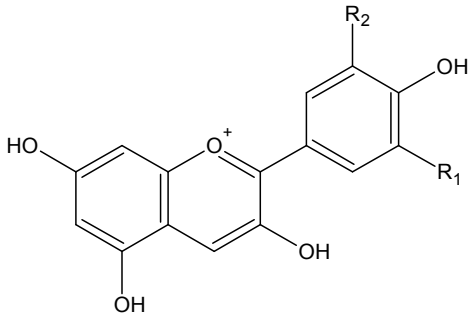


Figura 6: Antocianinas isoladas de espécies de *Chrysophyllum*.

Muitos produtos naturais ou seus derivados têm mostrado atividade marcante na inibição da proliferação de células tumorais. Antocianinas análogas às obtidas de *Chrysophyllum cainito*, por

exemplo, mostraram-se ativas em bioensaios realizados com linhagens de células tumorais (GUNDRAN et al., 2001). O câncer é a segunda maior causa de morte nos Estados Unidos e no Brasil (cerca de 21%) em regiões desenvolvidas, aumentando ainda mais o índice em regiões subdesenvolvidas (LUO et al., 2002; MORTON, 1987). As duas principais formas de reduzir a mortalidade por câncer são a prevenção e a quimioterapia. Produtos naturais derivados de plantas e seus análogos semi-sintéticos forneceram algumas drogas muito eficientes, usadas como antitumorais: paclitaxel (Taxol), vimblastina (Velban), vincristina (Oncovin) entre outras.

Chrysophyllum cainito, geralmente conhecido como "star apple", é uma árvore nativa da América Central. Seus frutos têm forma de pêra e coloração vermelho púrpura ou verde claro. Quando a fruta é cortada à metade, observa-se a forma de uma estrela de oito segmentos, dando origem ao seu nome popular. A polpa é macia com sabor doce e de aroma agradável. A casca não é comestível. Embora as frutas sejam consideradas muito gostosas, elas são de pequena importância comercial comparado com outras frutas da família Sapotaceae (Figura 7). Esta planta contém uma grande variedade de substâncias químicas com atividade antioxidante. A análise nutricional mostrou que frutos "star apple" possuem alcalóides, saponinas, cardenolídeos e bufadienolídeos, flavonóides, taninos, antraquinonas, além de aminoácidos, β-caroteno, ácido ascórbico, α-tocoferol, terpenos e polifenóis (KING, 1959). O acetato de β-amirina e o ácido gentísico foram identificados nas folhas.

Identificaram-se nove componentes antioxidantes nos frutos dessa espécie: (+)-catequina (**1**), (-)-epicatequina (**2**), (+)-galocatequina (**3**), (-)-epigalocatequina (**4**), quercetina (**5**), quercitrina (**6**), isoquercitrina (**7**), miricetrina (**8**), e ácido gálico (Figura 8).









Online:
ARMSTRONG, W. P. ***Chrysophyllum cainito***. Disponível em: <http://waynesword.palomar.edu/images/starap1b.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

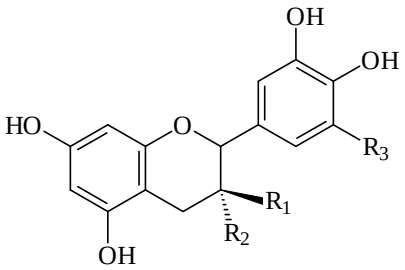
FRUIT LOVER'S NURSERY. ***Chrysophyllum cainito***. Disponível em: <http://www.fruitlovers.com/Starapple4web.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

THE BANANA TREE. ***Chrysophyllum cainito***. Disponível em: <http://www.banana-tree.com/catalog%20images/image408.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

TROPICAL FRUIT PHOTOGRAPHY. ***Chrysophyllum cainito***. . Disponível em: <http://tfphotos.ifas.ufl.edu/Hatian-3.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

Figura 7: Folhas e frutos de *Chrysophyllum* spp.

	R_1	R_2	R_3
1 (+)-catequina	H	H	H
2 (-)-epicatequina	H	OH	H
3 (+)-galocatequina	OH	H	OH
4 (-)-epigalocatequina	H	OH	OH



	R_1	R_2
5 quercetina	OH	H
6 quercitrina	Rha	H
7 isoquercitrina	Glc	H
8 miricetrina	Rha	OH

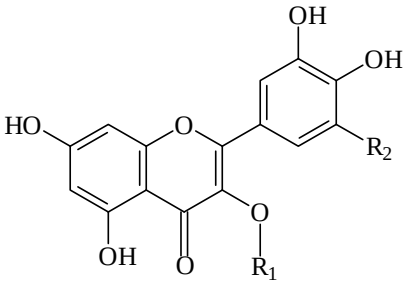


Figura 8: Flavonóides antioxidantes de espécies de *Chrysophyllum.*

Esta planta contém uma grande variedade de substâncias químicas com atividade antioxidante. Além de seus usos culinários, a fruta “star apple” é usada na medicina popular no tratamento de *diabetes mellitus*, inflamações associadas com laringites, pneumonia, além de diarréia, febre e doenças venéreas. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo dos frutos e das folhas está relacionado inversamente a doenças coronárias e câncer (OBASI, 1991). A loção contendo extrato de *Chrysophyllum cainito* mostrou condicionamento na pele e efeitos adstringentes, podendo ser utilizado em cosméticos e sais para banho (PARODI,1997). Extratos alcalinos das folhas podem ser utilizados para saponificação (AINA et al., 1999; et al., 1997).

Avaliações químicas foram realizadas com a casca e polpa dos frutos comestíveis “star apple” africana (*Chrysophyllum albidum*), mostrando quantidades significativas de ácido ascórbico e alguns componentes como os taninos, oxalato, ácido hidrociânico, ácido fítico. Geléias preparadas com polpa dos frutos mostraram-se de boa qualidade para comercialização após armazenagem em condições ambientais tropicais (FOUSSARD-BLANPIN et al., 1965). O óleo das sementes secas de “star apple” africana apresentaram ácidos graxos livres, podendo assim ser usado para a preparação de sabão sólido, resina, pintura, polimento e verniz de madeira (SILVA et al., 2003).

O extrato de *Chrysophyllum perpulchrum* mostrou algumas propriedades farmacodinâmicas para a cardiocrisina, como agente hipotensivo por vasodilatação periférica, inibição de colesterase e antiespasmódico fraco (PRATT et al., 1984).

1.5. A éspecie *Chrysophyllum flexuosum*.

A escolha da espécie *Chrysophyllum flexuosum* para este estudo fitoquímico biomonitorado se deu, principalmente, pelo resultado positivo no teste em CCDC revelada com β-caroteno, indicando a presença de substâncias antioxidantes no extrato etanólico das folhas e ramos desta espécie. Esse 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.

A espécie *Chrysophyllum flexuosum* é encontrada no estado de São Paulo, principalmente na Mata Atlântica. Ela está na lista das espécies ameaçadas de extinção no Brasil.

2. OBJETIVOS.

O trabalho visa realizar o estudo fitoquímico da espécie *Chrysophyllum flexuosum* 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 atividade antioxidante, pretende-se isolar as substâncias bioativas destas espécies.

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

3. METOLOGIA.

3.1. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS.

3.1.1. Moinho de facas e funil de separação.

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

3.1.2. Solventes.

Os solventes utilizados nos processos de extração, fracionamento e isolamento foram grau pA. Synth. Os solventes deuterados utilizados nos processos de RMN foram clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) e água deuterada (D_2O) da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories).

3.1.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e Preparativa.

Nas análises por CCDC foi utilizada 0,25mm de sílica gel 60G (Merck). Já em análises por CCDP utilizou-se camadas de 0,75mm de sílica (5-45 μm). Tanto as placas comparativas como as preparativas foram reveladas com irradiação de luz ultravioleta de 254 e 366 nm (aparelho UV-vis CAMAG), por nebulização de solução de anisaldeído seguida do aquecimento da placa em forno e por imersão em cubas com vapores de iodo.

A recuperação das amostras, após CCDP, foi efetuada através de lavagens da sílica com solventes orgânicos e filtração em placa porosa. O critério de pureza adotado foi a observação de apenas uma mancha em CCDC, variando-se o sistema de eluentes de baixa até alta polaridade.

3.1.4. Cromatografia em Coluna.

Na separação cromatográfica em coluna sob pressão foi utilizada sílica gel 60G (0,063-0,200mm) da Merck, 70-230 mesh para CC "flash". Também foi utulizada para frações mais polares Sephadex LH-20 (25-100μm – Pharmacia Biotech) e sílica derivatizada (C–18).

3.1.5. Rotaevaporador.

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

3.1.6. Ultra-som.

Lavadora ultra-sônica modelo USC-2800 da marca Unique.

3.1.7. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Foi utilizado espectrômetro Brucker AC-200F operando a 200 MHz para ^{1}H e 50MHz para ^{13}C. Também utilizou-se o espectrômetro Varian, INOVA 500 "multi65" operando a 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C (11.7T).

3.1.8. *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).*

Cromatógrafo analítico com sistema ternário Varian Pro Star PS 230 e detector UV-arranjo de diodo modelo PS310.

Coluna analítica "Luna" Phenomenex LC-18 (250mm x 4,60mm).

Cromatógrafo analítico sistema ternário Varian Pro Star modelo PS 230 com auto injetor Varian Pro Star modelo PS 410 e detector UV-arranjo de diodo modelo 330.

Coluna analítica "Luna" Phenomenex LC-18 (250mm x 4,60mm).

Cromatógrafo analítico sistema ternário Shimadzu LC 10 AD com injetor automático SIL 10A Shimadzu, detector de arranjo de diodo SPD-M 10 AVP.

Coluna analítica Supelco LC-18 (250mm x 4,60 mm).

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

Coluna preparativa "Luna" Phenomenex LC-18 (250mm x 21,2mm).

3.2. ENSAIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.

3.2.1. Autografia em CCDC com β-caroteno para atividade antioxidante.

A atividade antioxidante em CCDC revelada com solução de β-caroteno foi realizada por mim no NuBBe – Instituto de Química da Unesp Campus de Araraquara.

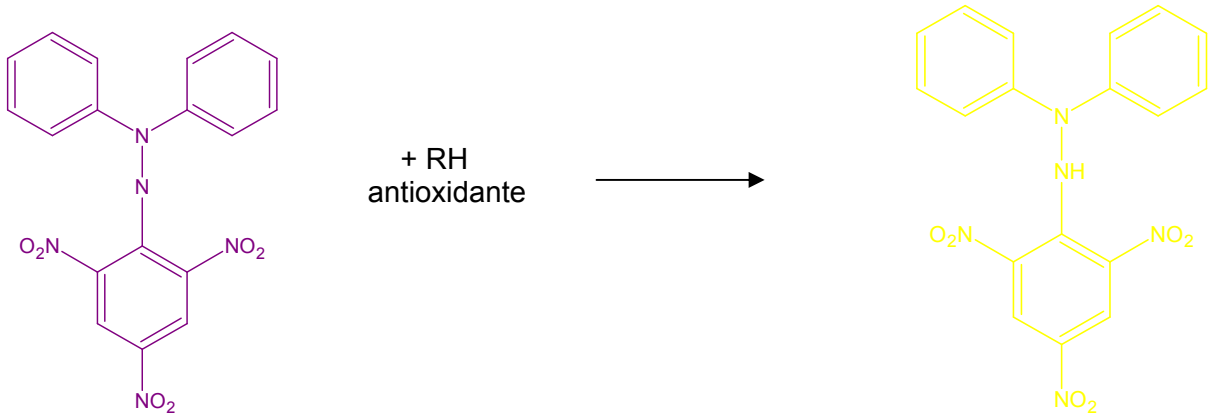
A propriedade antioxidante pode ser detectada nas substâncias com estruturas químicas que têm capacidade de doar um hidrogênio radicalar (reação com quebra homolítica), estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância.

As amostras foram aplicadas em cromatoplacas em duplicata, eluídas com solventes específicos e adequados, escolhidos anteriormente por testes utilizando eluentes de diversas polaridades para que, cada substância existente nas frações e extratos tivesse um Rf entre 0,2 e 0,8. Após completa evaporação do solvente utilizado, uma das placas foi nebulizada com solução de β-caroteno em MeOH (0,02%), permanecendo amarelada e, em seguida expostas à luz. O β-caroteno é oxidado pelo oxigênio atmosférico, numa reação fotoquímica e após cerca de quatro horas percebe-se que a placa de sílica volta à cor original branca, exceto nas áreas onde existam substâncias com atividade antioxidante, verificando-se a permanência da coloração amarela do β-caroteno. Em seguida, a outra placa foi nebulizada com solução de anisaldeído sulfúrico e colocada na estufa para aquecimento. Então comparou-se os Rf das substâncias nas duas placas (PRATT et al., 1984).

3.2.2. *Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picriehidrazila (DPPH) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres.*

A detecção do potencial sequestrador de radicais livres foi realizada por mim com o auxilio da Dra. Patricia Pauletti no NuBBe – Instituto de Química da Unesp Campus de Araraquara,

Em solução, o radical DPPH apresenta cor violeta intensa que é consequência do életron desemparelhado. Esse radical absorve a 517nm e um decréscimo nesse comprimento de onda ocorre pela estabilização do radical através do recebimento de um hidrogênio radicalar da espécie antioxidante, que é indicada pela mudança de cor (Figura 9).



DPPH
(máxima absorção a 517nm)

(DPPH) H reduzido
(diminuição na absorção a 517nm)

Figura 9: Redução do radical difenil-picrielhidrazila (DPPH).

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

3.2.3. *Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos.*

Os ensaios são realizados no laboratório do Instituto Botânico de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marse Young, utilizando como reveladores, soluções de esporos das espécies de fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporoides* e *Cladosporium sphaerospermum.*

Em cromatoplacas (Merck), as amostras foram aplicadas e eluídas em solventes adequados. Após a secagem destas cromatoplacas, uma solução de glicose e sais contendo esporos do fungo foi nebulizada sobre as placas que foram incubadas à temperatura de 25º C em câmara úmida e escura por 2-3 dias. O halo de inibição aparece na placa sobre áreas onde existam substâncias fungitóxicas e este halo 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).

3.2.4. *Detecção da atividade anticolinesterásica.*

O ensaio qualitativo e quantitativo por bioautografia CCD são realizados no laboratório do Instituto Botânico de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marse Young. Este consiste no desenvolvimento de uma cromatoplaca da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (galantamina, Figura 10). Para os ensaios quantitativos (Concentração Inibitória Mínima – CIM) foram aplicadas quantidades conhecidas e em ordem decrescente de massa, do controle e da amostra, objetivando encontrar a menor quantidade inibidora de AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia a placa foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66 U) (Solução A) e o solvente evaporado. A placa cromatográfica foi incubada em câmara úmida fechada a 37º C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a Solução D que é a mistura de 10mL da **solução B** (250mg de acetato de 1-naftila em 100mL de etanol) mais 40mL da **solução C** (400mg do sal Fast Blue B em 160mL de água destilada) (MARSTON, A. et al., 2002).

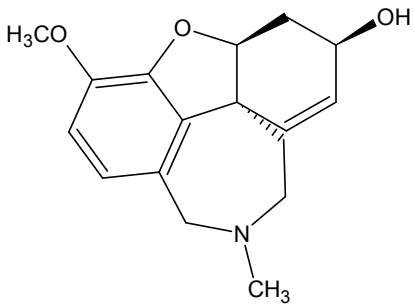


Figura 10: Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição da AChE.

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. 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 11 mostra um esquema das reações que se sucedem até o aparecimento da coloração na cromatoplaca (MARSTON, A. et al., 2002).

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

Soluções:

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

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

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

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

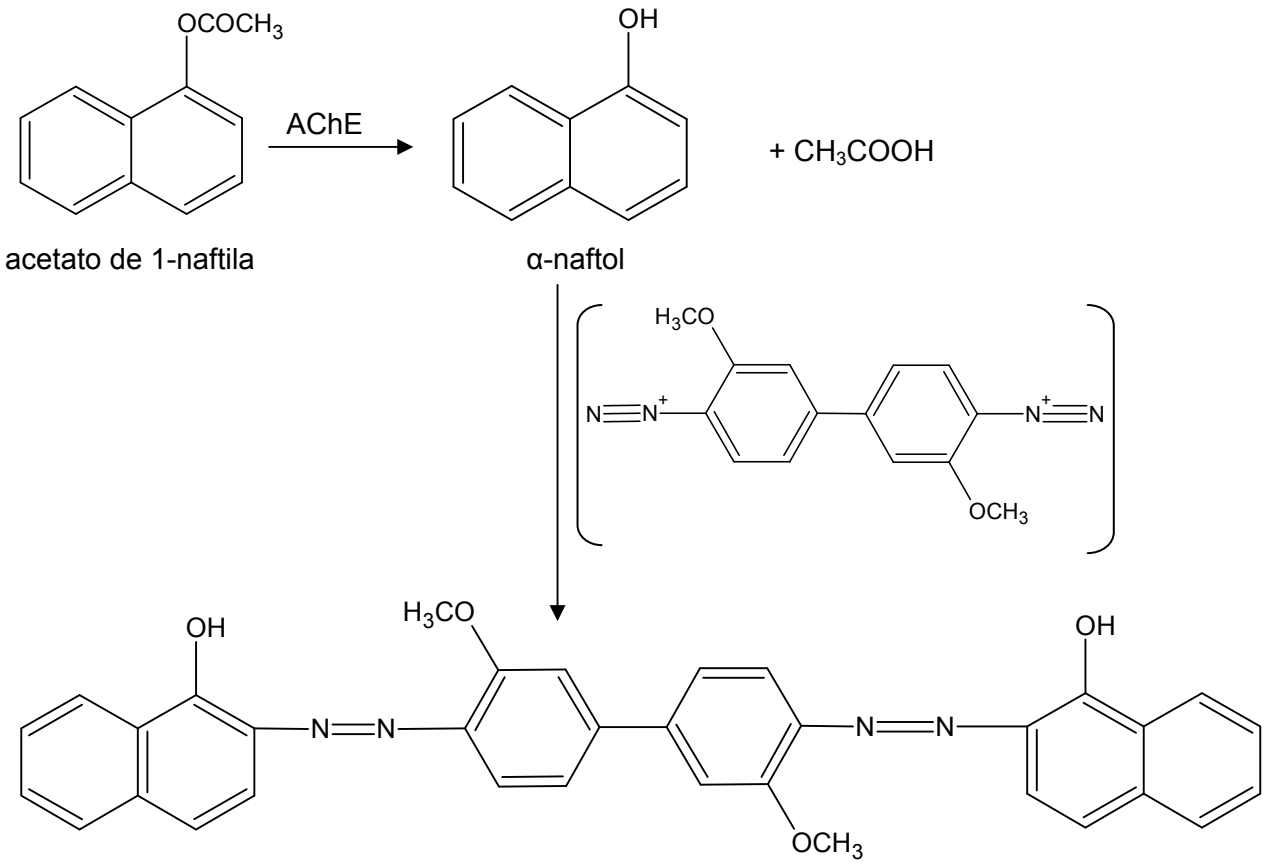


Figura 11: Reação da AChE com acetato de 1-naftila e subsequente formação do corante azóico roxo no bioensaio em CCD.

3.2.5. Avaliação da atividade antifúngica – fungos patógenos humanos.

Os ensaios são realizados no Laboratório Micologia Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara sob a supervisão da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini. A avaliação da atividade antifúngica e determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram realizadas por meio da técnica de microdiluição com adaptações, de acordo com os documentos M27-A e M-A2 do National Committe for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640, suplementado com 2% de glicose (a concentração de MOPS é de 0,165M). Esteriliza-se por filtração em membrana 0,22μm a vácuo. Reserva-se. Prepara-se o ágar duas vezes concentrado: 30g/L. Autoclava-se e mantém-se a 65°C. Mistura-se as duas soluções em ambiente estéril e preparam-se placas deixando altura de 9mm ou uma razão de 20mL por placa de acordo com NATIONAL COMMITTE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, NCCLS, 1997 (1-2) apud MONTEIRO, 2006[1].

O preparo do inóculo é feito através de repiques de 24 a 48h a 30°C. Ressuspende-se uma alçada da amostra em 5mL de solução salina a 85% e realiza-se contagem em câmara de

[1] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. M27-A. 1997.
[2] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. M27-A2. 1997.

Neubauer. Prepara-se a suspensão equivalente a $1x10^6$ – $5x10^6$UFC/mL. O volume da solução a ser inoculada na placa é de 1mL. Incuba-se a 35°C, durante 24 a 48h.

Anfotericina B é utilizada como controle a 16μg/mL.

O resultado é avaliado medindo-se o tamanho dos halos de inibição através da medida total do diâmetro pelo verso da placa.

Microorganismos utilizados: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei, Cryptococcus neoformans.*

Estes ensaios foram realizados sob supervisão da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Gianinni - Faculdade de Fármacia de Araraquara – Deapartamento de Micologia – Unesp.

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.

3.3.1. Coleta e identificação do material vegetal.

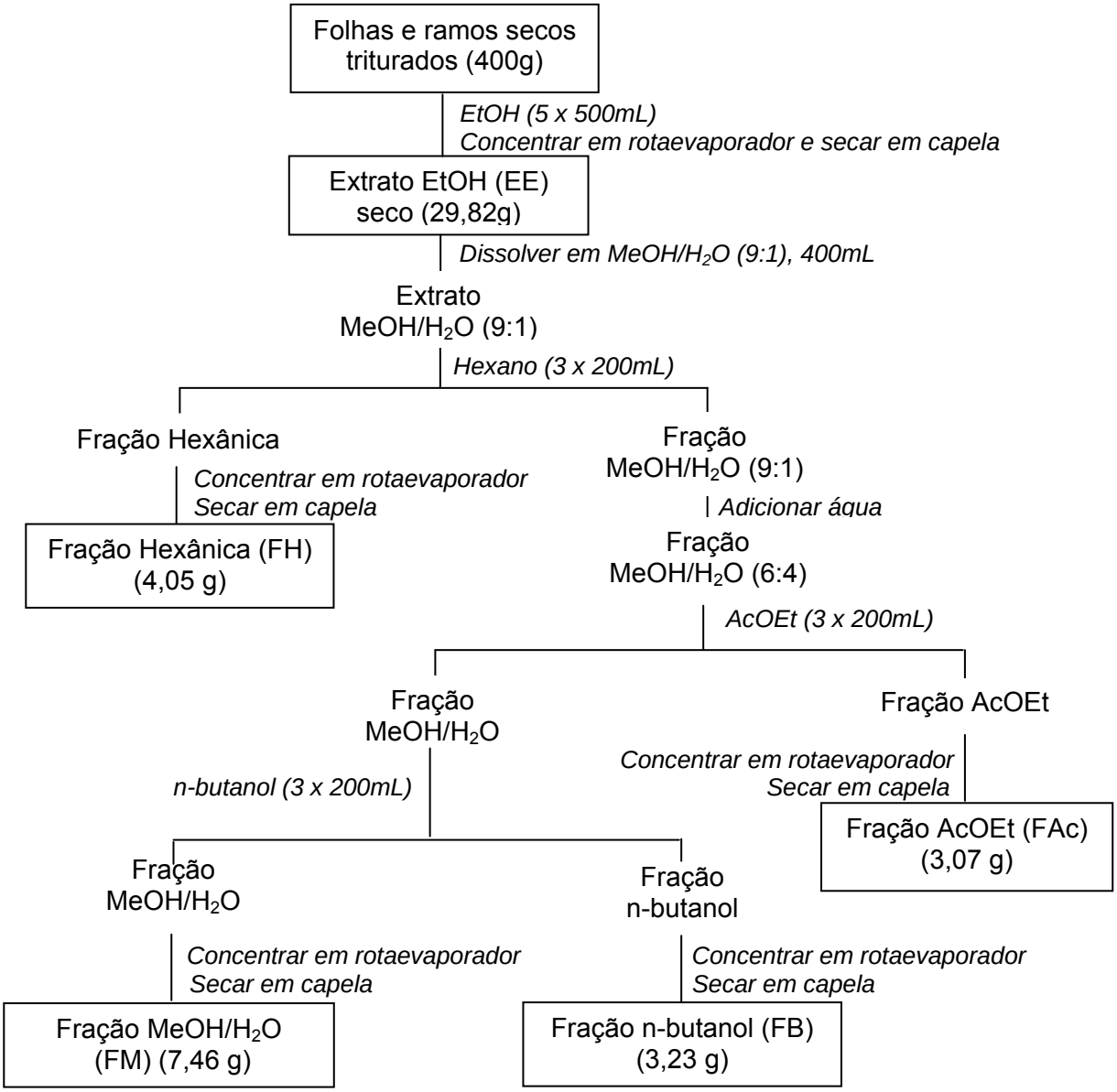
Folhas e ramos de *Chrysophyllum flexuosum* foram coletadas na Reserva da Juréia – Parque Estadual da Serra do Mar, em outubro de 2004, pela Dra. M. Claudia M. Young e identificadas pela Dra. Inês Cordeiro. Excicatas encontram-se depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo.

3.3.2. Obtenção do extrato bruto.

Folhas e ramos de *Chrysophyllum flexuosum* foram secos a temperatura ambiente, triturados em moinho de facas e pesados numa balança analítica, obtendo-se 400g. Estas foram submetidas a 5 extrações com etanol em banho de ultra-som, fornecendo o Extrato Etanólico (EE). Após evaporação do solvente em rotaevaporador e secagem em capela, o EE seco foi pesado, fornecendo 29,82g de extrato bruto.

3.3.3. Partição do extrato bruto EtOH.

Foram separadas duas alíquotas do extrato etanólico seco: a primeira, de 100 mg reservado para contra-prova, e a segunda, de 5 mg para realização de CCDC em placas cromatográficas para comparação com as frações da partição. O restante do extrato foi dissolvido em 400 mL de MeOH/H_2O 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 (FM) (Fluxograma 1). Destas quatro frações foram guardadas alíquotas de 20mg para contra-prova e CCDC.



Fluxograma 1: Partição do extrato EtOH bruto.

3.3.4. Avaliação da atividade antioxidante.

O EE e as frações obtidas da partição (FH, FAc, FB e FM) foram submetidos a análises por CCDC, utilizando-se uma série de eluentes que permitem a visualização dos constituintes de baixa, média e alta polaridade (Tabela 1). Inicialmente foi utilizado como revelador o anisaldeído sulfúrico para a verificação de sistemas de eluição com boa resolução nas placas.

Tabela 1: Fases móveis utilizadas na CCDC para o EE e suas sub-frações.

Fases Móveis	Fração
Hex/AcOEt (9:1)	EE, FH, FAc
Hex/AcOEt (4:1)	EE, FH, FAc
Hex/AcOEt (1:1)	EE, FH, FAc
AcOEt	EE, FH, FAc
Hex/AcOEt (1:4)	EE, FH, FAc
AcOEt/MeOH (4:1)	EE, FH, FAc, FB
AcOEt/MeOH (1:1)	EE, FH, FAc, FB
AcOEt/MeOH (1:9)	EE, FH, FAc, FB
AcOEt/MeOH/H_2O (65:30:5)	EE, FH, FAc, FB, FM

Em seguida, as amostras foram aplicadas em duas cromatoplacas e eluídas simultaneamente na mesma cuba. Os sistemas de eluição utilizados foram aqueles selecionados em função da boa resolução em CCDC revelada com anisaldeído. Após eluição completa e evaporação do solvente, uma placa foi nebulizada com solução de β-caroteno em MeOH (0,02%) e em seguida exposta à luz natural. Durante cerca de 4 horas observou-se o descoramento da placa e a possível permanência de manchas laranjas. Observou-se que as frações FAc, FB e FM deram resultado positivo no teste com β-caroteno. A segunda placa foi revelada com anisaldeído e comparada com a primeira placa.

3.3.5. Fracionamento cromatográfico da fração hexânica.

A FH foi selecionada para o início dos estudos fitoquímicos. Esta fração (1,6 g) foi submetida a CC flash com sílica-gel, que forneceu 8 subfrações (Tabela 2). Esta foram submetidas a CCDC em várias fases móveis.

Tabela 2: Eluição de FH em CC (sílica mesh 70-230).

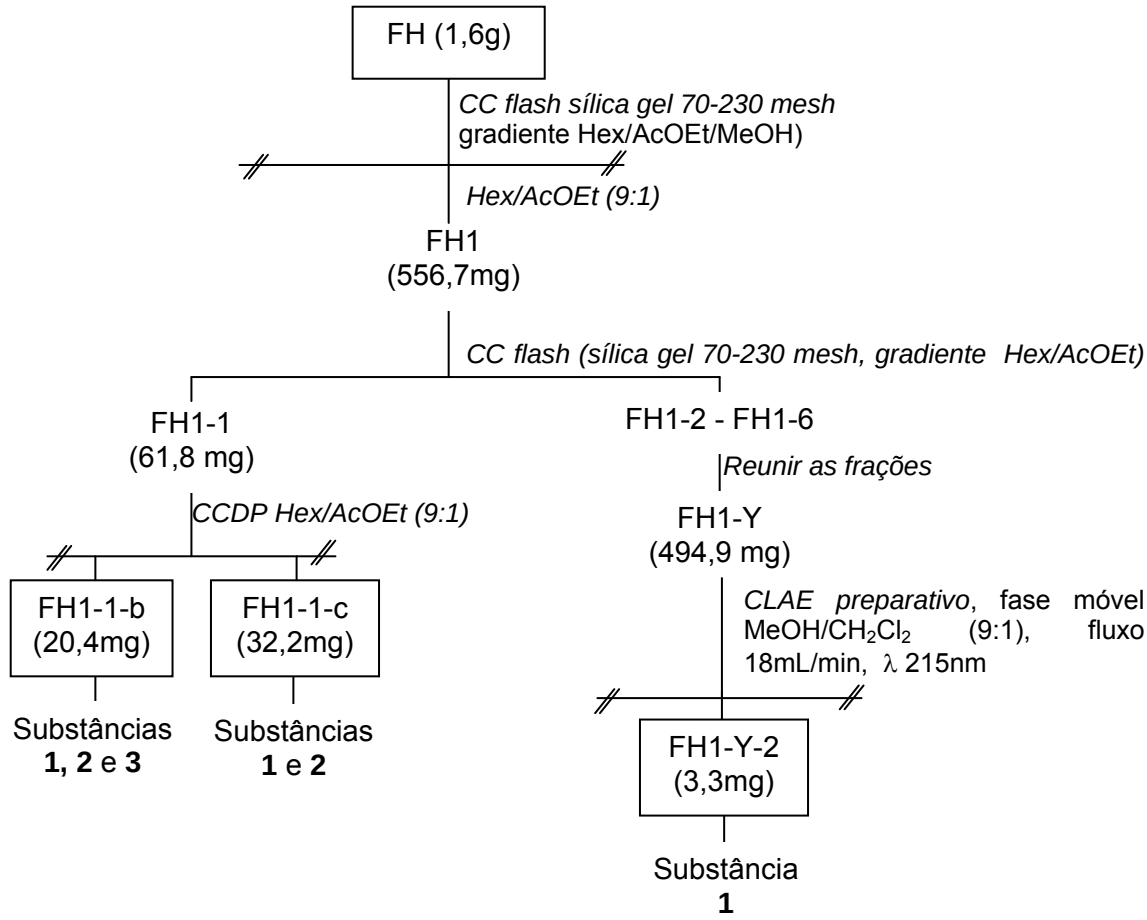
Fração	Eluentes	Volume do Eluente	Massas (mg)
FH1	Hex/AcOEt (9:1)	200mL	556,7
FH2	Hex/AcOEt (4:1)	200mL	73,9
FH3	Hex/AcOEt (7:3)	200mL	115,1
FH4	Hex/AcOEt (3:2)	200mL	62,6
FH5	Hex/AcOEt (1:1)	200mL	33,0
FH6	AcOEt	200mL	79,0
FH7	AcOEt/MeOH (3:2)	200mL	48,9
FH8	MeOH	200mL	552,0

Observou-se que a primeira subfração, denominada FH1, após secagem possuia 1/3 de massa da fração hexânica inicial. Esta apresentou coloração amarela. Após eluição com Hex/AcOEt (9:1) em CCDC, verificou-se a presença de duas manchas separadas que revelaram na coloração roxa com anisaldeído sulfúrico. Com o objetivo de isolar as substâncias aí presentes, esta fração foi aplicada em CC flash com sílica gel eluída com gradiente mais suave de solventes orgânicos (Tabela 3) fornecendo 6 subfrações. No entanto, a análise por CCDC das frações obtidas mostrou que não houve separação das duas manchas referentes às substâncias principais de FH-1.

Tabela 3: Eluição de FH1 em CC (sílica mesh 70-230).

Fração	Massas (mg)	Eluentes
FH1-1	61,8	Hex
FH1-2	118,2	Hex/AcOEt (98:2)
FH1-3	117,9	Hex/AcOEt (97,5:2,5)
FH1-4	133,8	Hex/AcOEt (95:5)
FH1-5	32,2	Hex/AcOEt (92,5:7,5)
FH1-6	1,4	Hex/AcOEt (9:1)

Com bases nas massas obtidas, selecionou-se FH1-1 para separação por CCDP (Hex/AcOEt 9:1) em 3 placas cromatográficas, fornecendo quatro subfrações (Tabela 4). Estas foram submetidas a análise de RMN (^{1}H, ^{13}C, HMQC, HMBC e g-COSY), e as subfrações FH1-1-c e FH1-1-b apresentaram as substâncias **1** (inédita), **2** e **3** (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Fracionamento cromatográfico da FH1.

Tabela 4: Fração obtidas de FH1-1 por CCDP (Hex/AcOEt 9:1).

Fração	Rf	Massas (mg)	RMN de ^{1}H	Substâncias identificadas
FH1-1-a	0,0 a 0,4	5,8	*	
FH1-1-b	0,5	20,4	*	**1**, **2** e **3**
FH1-1-c	0,7	32,2	*	**1** e **2**
FH1-1-d	intermediário	3,0	*	

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^{1}H).

Comparando os espectros de RMN (^{1}H, ^{13}C, HMQC, HMBC e g-COSY) com os dados da literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994) observou que a substância **1** é inédita na

literatura. Com o objetivo de isolar a mesma para determinar sua estrutura, reuniu-se as subfrações de FH1-2 a FH1-6, na fração FH1-Y. A análise CLAE (λ 201nm e λ 215nm) foi realizada utilizando como fase móvel MeOH/CH_2Cl_2 (9:1), fluxo de 1mL/min para verificar sua composição (Figura 12). Devido ao resultado satisfatório a fração foi submetida a CLAE preparativo, λ 215nm, fase móvel MeOH/ CH_2Cl_2 (9:1), fluxo 18mL/min. As frações foram recolhidas (Tabela 5) e analisadas por RMN de ^1H, e FH1-Y-2 apresentou a substância **1**. Essa foi submetida a análises adicionais de RMN (^{13}C, HMQC, HMBC e g-COSY) para determinação estrutural.

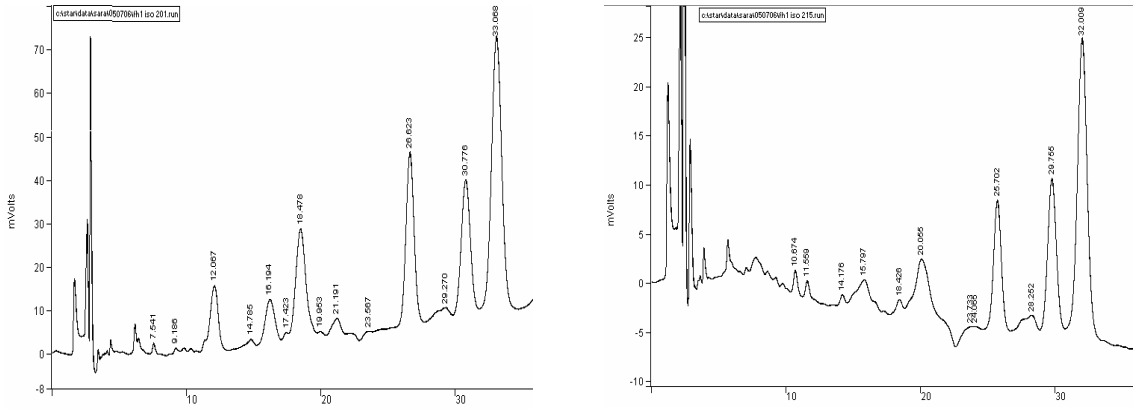


Figura 12: Cromatogramas obtidos via CLAE da FH1-Y (494,9mg), (coluna analítica "Luna" Phenomenex LC-18, fase móvel MeOH/CH_2Cl_2 9:1, fluxo de 1mL/min, λ 201nm e λ 215nm)

Tabela 5: Frações obtidas da FH1-Y por CLAE preparativo (MeOH/ CH_2Cl_2 (9:1), fluxo 18mL/min, λ 215nm).

Fração	Rf (min)	Massas (mg)	RMN de ^1H	Substância identificada
FH1-Y-1	0 a 10	15,7	*	
FH1-Y-2	10,7	4,9	*	**1**
FH1-Y-3	11,6	3,3	*	
FH1-Y-4	15,7	4,6	*	
FH1-Y-5	20,0	4,4	*	
FH1-Y-6	25,7	2,3	*	
FH1-Y-7	28,2	2,9	*	
FH1-Y-8	29,6	16,0	*	
FH1-Y-9	32,0	66,5	*	

* Amostras submetidas a análise por RMN em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^1H).

A FH2 foi submetida a CC flash com sílica gel utilizando o mesmo gradiente de eluentes para FH1 (Tabela 3), e forneceu 73 subfrações. Estas subfrações foram analisadas por CCDC (Hex/AcOEt 8:2) e devido ao perfil cromatográfico, foram reunidas em 14 subfrações (Tabela 6). Estas subfrações foram submetidas a CCDC em diversos eluentes e as frações com melhor resolução foram analisadas por RMN de ^1H. Devido o espectro de RMN de ^1H da fração FH2-9, esta foi submetida a CCDP (Hex/AcOEt 9:1) fornecendo 4 subfrações (Tabela 7). Estas foram analisadas por RMN de ^1H, e escolheu-se a FH2-9-2 para purificação devido ao seu espectro de

RMN de ^{1}H. Análises adicionais por RMN de ^{13}C, HMQC, HMBC e g-COSY permitiram identificar as substâncias **4**, **5** e **6** nesta fração (Fluxograma 3).

Tabela 6: Eluição de FH2 em CC (sílica mesh 70-230, gradiente Hex/AcOEt).

Fração	Massas (mg)	RMN de ^{1}H
FH2-1	8,6	
FH2-2	3,4	
FH2-3	9,9	
FH2-4	3,4	
FH2-5	2,7	
FH2-6	5,0	
FH2-7	7,4	
FH2-8	7,8	*
FH2-9	20,4	*
FH2-10	4,2	*
FH2-11	6,5	
FH2-12	8,2	
FH2-13	12,1	*
FH2-14	6,7	

* Amostras submetidas a análise por RMN em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^{1}H).

Tabela 7: Fração obtidas de FH2-9 por CCDP (Hex/AcOEt 9:1).

Fração	Rf	Massas (mg)	RMN de ^{1}H	Substâncias identificadas
FH2-9-1	0,0 à 0,4	1,5	*	
FH2-9-2	0,5	13,0	*	**4**, **5** e **6**
FH2-9-3	0,7	4,1	*	
FH2-9-4	0,8	1,0	*	

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^{1}H).

A fração FH3 foi submetida a CC flash com sílica gel utilizando o mesmo gradiente de eluentes usado para FH1 (Tabela 3), fornecendo 83 subfrações, que foram analisadas por CCDC (Hex/AcOEt 7:3) e reunidas em 15 subfrações devido à semelhança de seus perfis cromatográficos (Tabela 8). Após a análise por CCDC destas frações em diversos eluentes, escolheu-se as frações com melhor resolução em placa cromatográfica. FH3-2, FH3-3, FH3-4 e FH3-5 foram reunidas na fração FH3-X devido ao perfil cromatográfico semelhante. Após análise por CCDC em vários eluentes, selecionou-se Hex/AcOEt (9:1) para realização de CCDP (Hex/AcOEt 9:1, 3 x). A análise de RMN de ^{1}H das 5 subfrações obtidas evidenciou material graxo.

Tabela 8: Eluição de FH3 em CC (sílica mesh 70-230, gradiende Hex/AcOEt).

Fração	Massas (mg)	RMN de ^{1}H
FH3-1	9,7	*
FH3-2	4,0	*
FH3-3	2,7	*
FH3-4	13,6	*
FH3-5	7,8	*
FH3-6	1,7	
FH3-7	1,9	
FH3-8	1,3	
FH3-9	1,9	
FH3-10	5,5	
FH3-11	8,2	
FH3-12	3,4	
FH3-13	1,6	
FH3-14	1,9	
FH3-15	40,4	

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^{1}H).

As frações FH4, FH5, FH6 e FH7 foram submetidas a CCDC em diversos eluentes e pode-se selecionar as frações com melhor resolução cromatográfica. A FH4 foi submetida a CCDP (Hex/AcOEt 8:2), fornecendo 5 subfrações (Tabela 9) que foram analisadas por RMN de ^{1}H. Observou-se na FH4-1 uma substância de interesse, porém impura, realizando-se novamente CCDP (Hex/AcOEt 95:5, 3 x) que forneceu 6 subfrações (Tabela 10). A análise por RMN de ^{1}H destas subfrações mostrou que a substância de interesse estava na FH4-1-4. Foi realizada análise por RMN (^{1}H, ^{13}C, HMQC, HMBC e g-COSY), que indicou a presença da substância **7** em FH4-1-4 (Fluxograma 3). A FH4-4 foi submetida a CCDP (Hex/AcOEt 7:3) fornecendo 2 subfrações que foram analisadas por RMN de ^{1}H e observou-se a presença de material graxo.

Tabela 9: Frações obtidas de FH4 por CCDP (Hex/AcOEt 8:2).

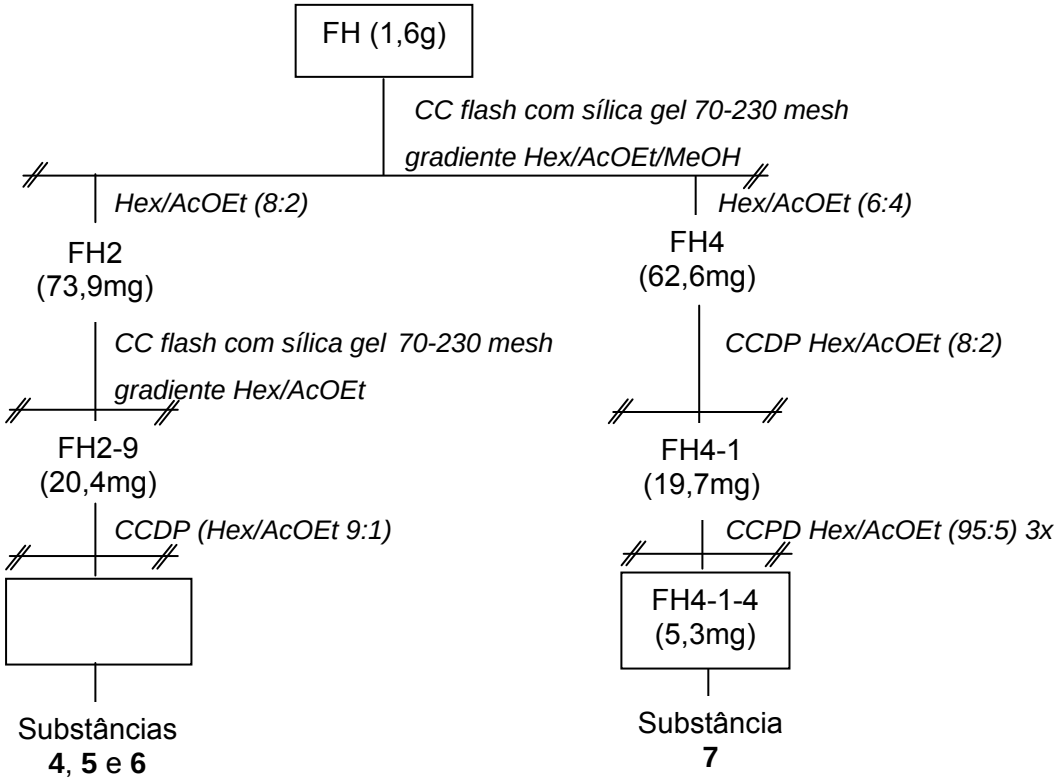
Fração FH4	Rf	Massas (mg)	RMN de ^{1}H
FH4-1	0,0 à 0,2	19,7	*
FH4-2	0,3	5,1	*
FH4-3	0,4	9,8	*
FH4-4	0,5	17,8	*
FH4-5	0,7	9,9	*

* Amostras que foram submetidas a análise em espectrômetro Brucker AC-200F operando a 200 MHz para ^{1}H.

Tabela 10: Frações obtidas de FH4-1 por CCDP (Hex/AcOEt 95:5, 3x).

Fração FH4-1	Rf	Massas (mg)	RMN de ^{1}H	Substâncias identificadas
FH4-1-1	0,0 à 0,2	2,5	*	
FH4-1-2	0,3	2,1	*	
FH4-1-3	0,4	2,2	*	
FH4-1-4	0,5	5,3	*	**7**
FH4-1-5	0,6	4,2	*	
FH4-1-6	0,7	2,6	*	

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^{1}H).



Fluxograma 3: Fracionamento cromatográfico parcial da FH.

A análise de FH7 por CCDP (Hex/AcOEt 7:3) forneceu 7 subfrações (Tabela 13). Sua análise por RMN de ^{1}H indicou a ausência de substâncias de interesse.

3.3.6. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.

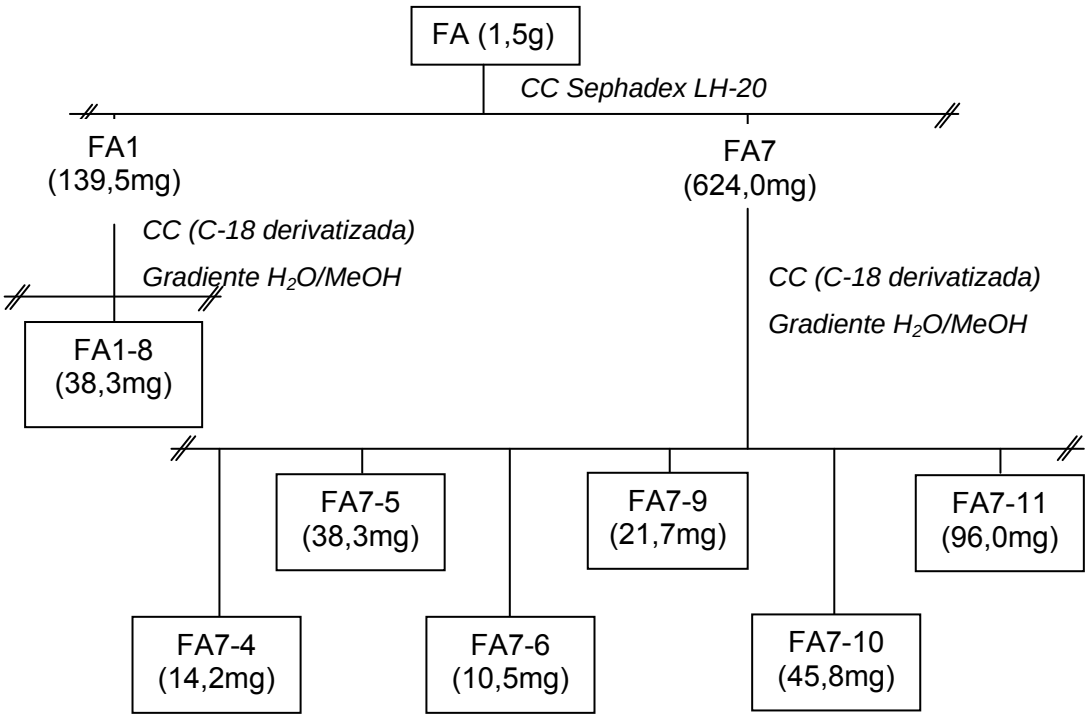
Com objetivo da procura de substâncias com atividade antioxidante nas três frações de partição do extrato bruto: FAc, FB e FM, que se mostraram ativas frente ao teste com β-caroteno, foi escolhida a FAc para prosseguimento do estudo. Esta fração (1,5g) foi submetida a CC (Sephadex LH-20) eluída com MeOH fornecendo 135 subfrações. Estas foram submetidas a análise por CCDC (AcOEt/MeOH 1:1) e reunidas em 14 subfrações devido seu perfil cromatográfico semelhante (Tabela 11).

Tabela 11: Eluição de FAc em CC (Sephadex) eluída com MeOH.

Fração	Massas (mg)	Fração	Massas (mg)
FAc 1	106,8	FAc 8	64,3
FAc 2	284,1	FAc 9	139,5
FAc 3	148,7	FAc 10	51,9
FAc 4	56,6	FAc 11	44,3
FAc 5	21,5	FAc 12	66,3
FAc 6	20,7	FAc 13	44,9
FAc 7	624,0	FAc 14	178,2

Com as frações descritas na tabela acima realizou-se análise por CCDC com diversas fases móveis. Em seguida, realizou-se o teste de atividade antioxidante com β-caroteno em CCDC

(AcOEt/MeOH 1:1). As frações FAc 1 e FAc 7 deram resultado positivo e foram submetidas a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C–18) eluída em gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro (Tabelas 12 e 13) (Fluxograma 4). Em busca de substâncias com atividade antioxidante realizou-se o teste com β-caroteno em CCDC (AcOEt/MeOH 1:1) nas 8 subfrações da FAc 1 e as 14 subfrações da FAc 7 (Tabelas 12 e 13).



Fluxograma 4: Fracionamento das subfrações com resultados positivos em testes de atividade antioxidante.

Tabela 12: Eluição de FAc1 em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH.

Fração	Eluentes	Massas (mg)	Teste com β-caroteno
FAc1-1	H_2O/MeOH (95:5)	6,0	
FAc1-2	H_2O/MeOH (9:1)	3,8	
FAc1-3	H_2O/MeOH (8:2)	3,8	
FAc1-4	H_2O/MeOH (7:3)	3,8	
FAc1-5	H_2O/MeOH (6:4)	4,4	
FAc1-6	H_2O/MeOH (5:5)	4,8	
FAc1-7	H_2O/MeOH (2,5:7,5)	4,3	
FAc1-8	MeOH	38,3	**

** Amostras com atividade antioxidante moderada.

Tabela 13: Eluição de FAc7 em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH.

Fração	Eluentes	Massas (mg)	Teste com β-caroteno
FAc7-1	H_2O/MeOH (95:5)	31,6	
FAc7-2	H_2O/MeOH (9:1)	6,2	
FAc7-3	H_2O/MeOH (8:2)	7,1	
FAc7-4	H_2O/MeOH (7:3)	14,2	**
FAc7-5	H_2O/MeOH (6:4)	38,3	**
FAc7-6	H_2O/MeOH (1:1)	10,5	**
FAc7-7	H_2O/MeOH (4:6)	8,1	
FAc7-8	H_2O/MeOH (3:7)	6,1	
FAc7-9	H_2O/MeOH (2:8)	21,7	***
FAc7-10	H_2O/MeOH (1:9)	45,8	***
FAc7-11	MeOH	96,0	***
FAc7-12	MeOH	16,6	
FAc7-13	MeOH	5,3	
FAc7-14	MeOH	4,3	

** e *** Intensidade moderada e forte, respectivamente, das atividades antioxidantes observadas.

As frações que se mostraram ativas ao teste com β-caroteno foram analisadas em CCDC em diversas fases móveis e submetidas a CLAE (gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 30 min., em comprimentos de onda de λ 240 e λ 254 mn , fluxo de 1mL) para verificação de seu perfil cromatográfico (Figuras 13-16) (Fluxograma 4). Os cromatogramas da subfração da FAc1 e FAc7-11 não apresentaram picos com tempos de retenção que possibilitassem boa resolução.

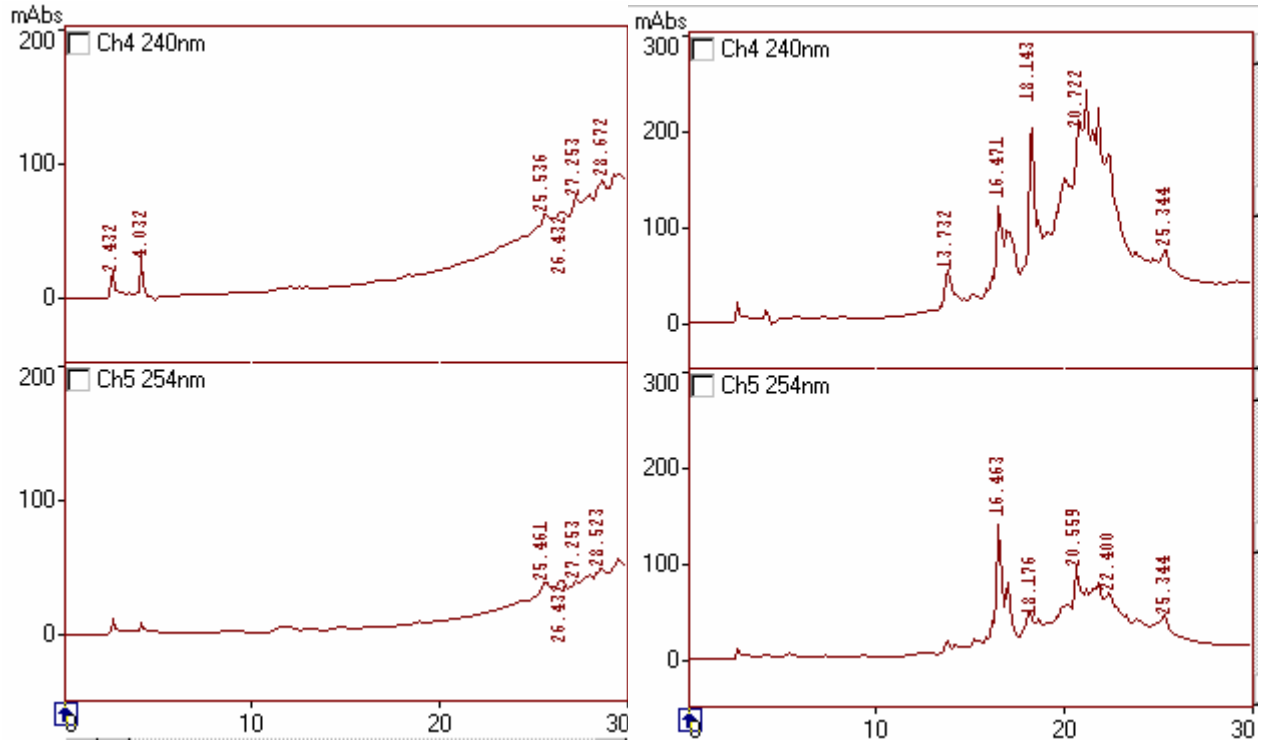


Figura 13: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc1-8 (38,3mg) e FAc7-4 (14,2mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm)

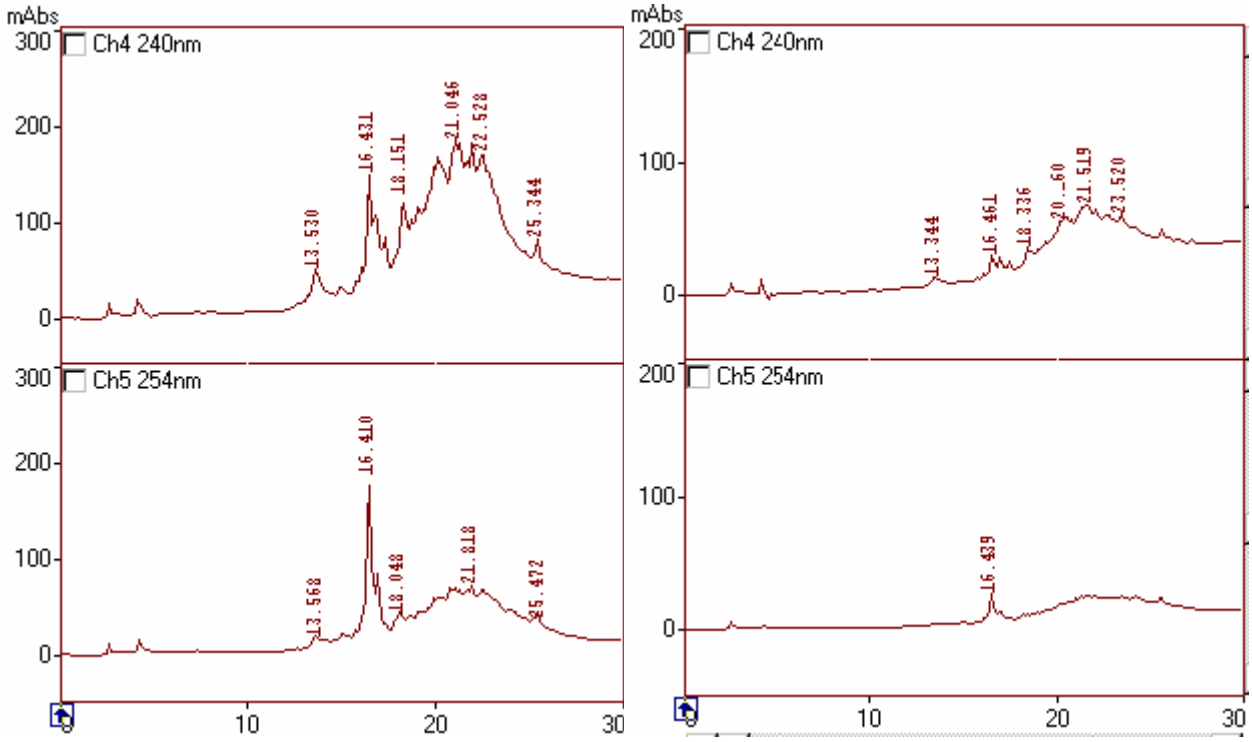


Figura 14: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc7-5 (38,3mg) e FAc7-6 (10,5mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm)

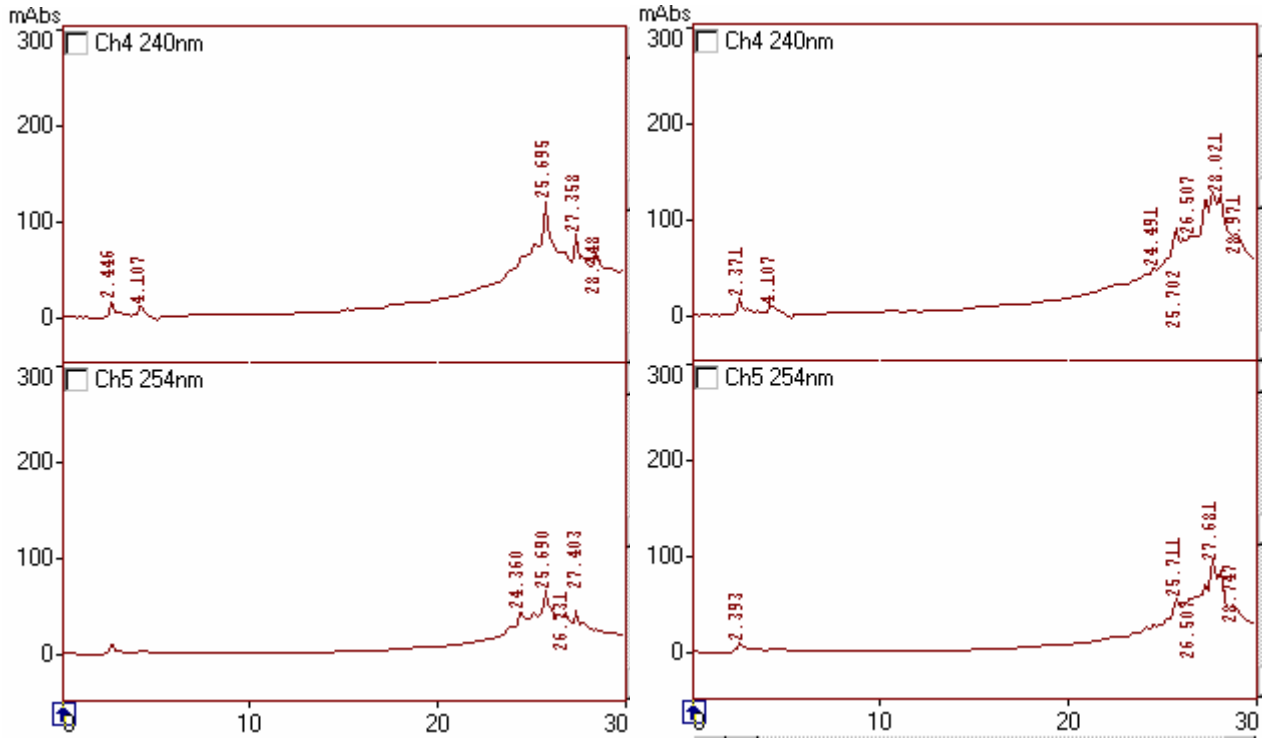


Figura 15: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc7-9 (21,7mg) e FAc7-10 (45,8mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e 254nm)

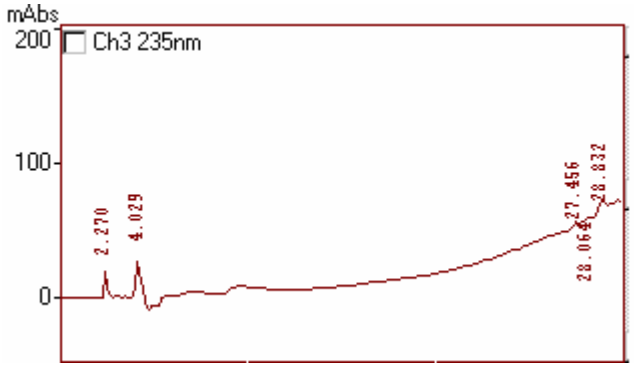
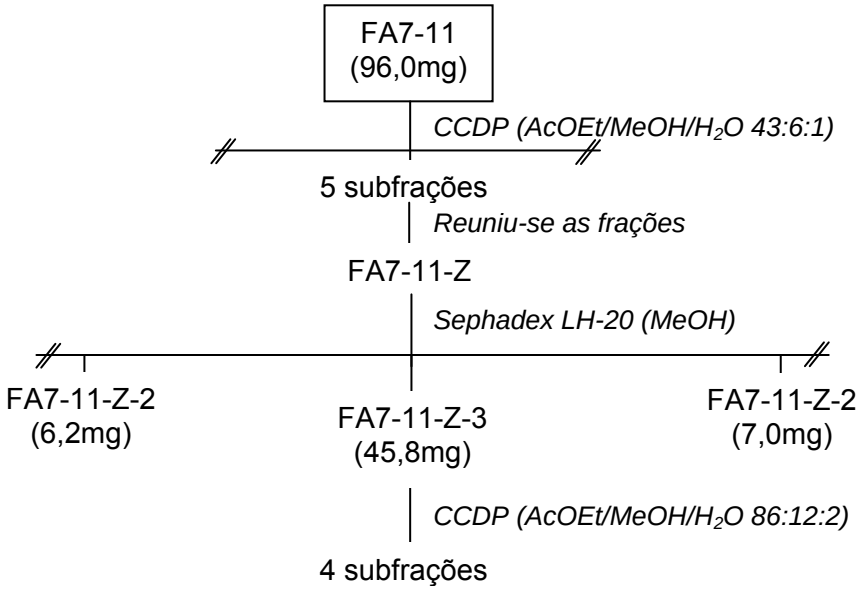


Figura 16: Cromatograma obtido via CLAE da FAc7-11 (96,0mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 235nm)

As frações FAc7-9 e FAc7-10 foram analisadas por RMN de ^1H, mostrando sinais característicos de misturas de triterpenos glicosilados (Fluxograma 4) .

A FAc7-11 foi submetida a CCDP utilizando como fase móvel AcOEt/MeOH/H_2O (86:12:2), fornecendo 5 subfrações (Tabela 14). Estas foram submetidas a análise por RMN de ^1H, observando-se também sinais para misturas de triterpenos glicosilados nas cinco subfrações. Como este método de isolamento não foi eficaz, resolveu-se reunir as 5 subfrações em FAc7-11-2 para nova tentativa de purificação (Fluxograma 5) .



Fluxograma 5: Fracionamento da FA7-11.

Tabela 14: CCDP (Hex/AcOEt 86:12:2) da FAc7-11.

Fração FAc7-11	Rf	Massas (mg)	RMN de ^1H
FAc7-11-1	0,0 até 0,3	18,0	*
FAc7-11-2	0,4	4,0	*
FAc7-11-3	0,5	6,0	*
FAc7-11-4	0,6	7,0	*
FAc7-11-5	0,7	12,0	*

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^1H).

FAc7-11-Z foi submetida a CC Sephadex LH-20 eluida com MeOH e forneceu 5 subfrações (Tabela 18). Estas frações foram analisadas por CLAE (gradiente H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, λ 240 e λ 254nm, fluxo de 1mL) (Figura 17). Verificou-se a atividade antioxidante das mesmas com CCDC nebulizada com solução de β-caroteno, onde 3 subfrações deram resultados positivos (Tabela 18). A fração FAc7-11-Z-3 (45,8mg) foi submetida a CCDP (AcOEt/MeOH/H_2O 86:12:2) e forneceu 4 subfrações (Tabela 19). Estas frações foram analisadas por CLAE (gradiente H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, λ 235 e λ 240, fluxo de 1mL) indicando ainda a presença de misturas em cada fração. Verificou-se a atividade antioxidante das mesmas por CCDC nebulizada com solução de β-caroteno, onde 2 subfrações deram resultados positivos (Tabela 19) (Fluxograma 5).

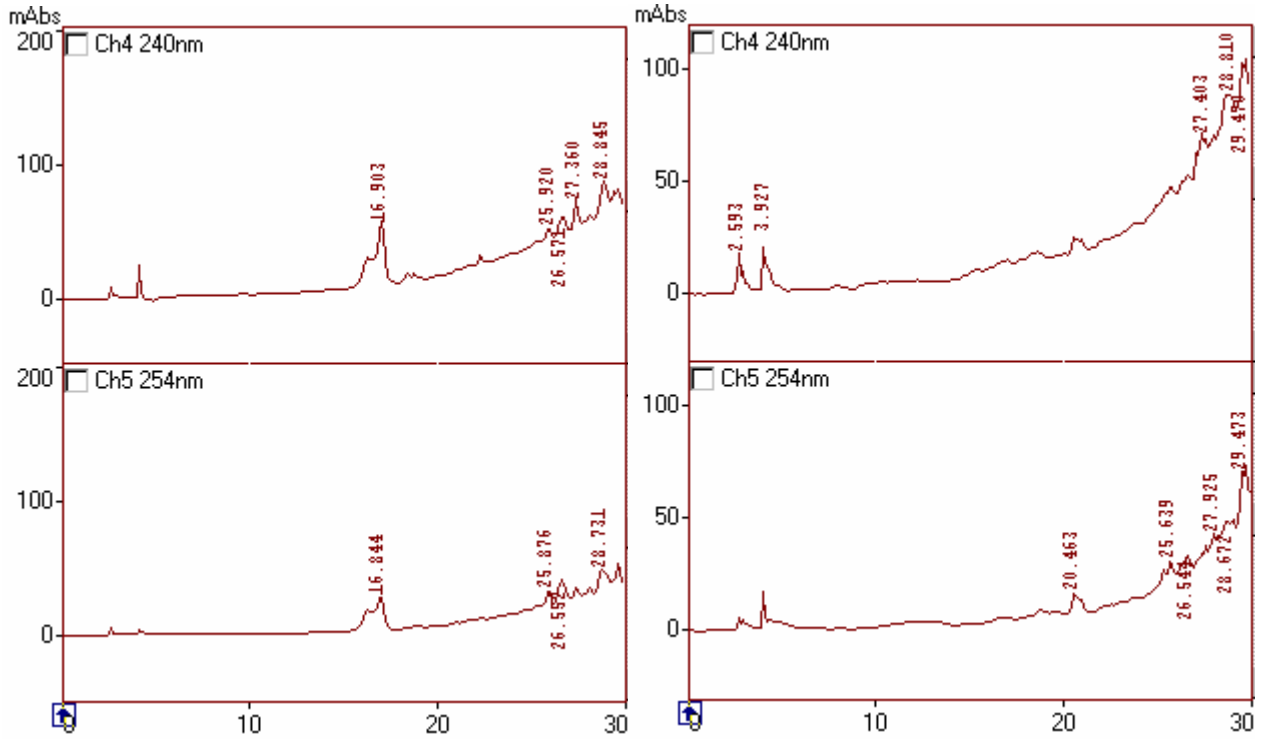


Figura 17: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc7-11-Z-2 (6,2mg) e FAc7-11-Z-3 (45,8mg), (coluna analítica Supelco LC-18, gradiente H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro, fluxo de 1mL/min, λ 240nm e λ 254nm)

Devido ao perfil cromatográfico em CLAE, algumas frações foram submetidas a análise de RMN de HMQC e HMBC (Tabela 15 e 16), apresentando sinais caracteristicos de triterpenos pentacíclicos glicosilados.

Tabela 15: CC Sephadex (MeOH) da FAc7-11-Z.

Fração	Massas (mg)	Atividade antioxidante	RMN de HMQC e HMBC
FAc7-11-Z-1	5,1		
FAc7-11-Z-2	6,2	**	*
FAc7-11-Z-3	45,8	**	
FAc7-11-Z-4	7,0	**	*
FAc7-11-Z-5	4,0		

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^1H).

** Amostras com atividade antioxidante moderada.

Tabela 16: CCDP (AcOEt/MeOH/H_2O 86:12:2) da FAc7-11-Z-3.

Fração	Massas (mg)	Atividade antioxidante	RMN de HMQC e HMBC
FAc7-11-Z-3-1	4,0		
FAc7-11-Z-3-2	5,3	**	
FAc7-11-Z-3-3	6,0	**	*
FAc7-11-Z-3-4	5,5		

* Amostras submetidas a análise em espectrômetro Bruker AC-200F (200 MHz para ^1H).

** Amostras com atividade antioxidante moderada.

As frações FAc2 e FAc3 devido terem semelhanças em análises por CCDC, foram reunidas e submetidas a CC (Sephadex LH-20) eluída com MeOH fornecendo 42 subfrações. Estas foram submetidas a análise de CCDC utilizando como fase móvel AcOEt/MeOH (1:1) e reunidas em 5 subfrações devido ao seu perfil cromatográfico semelhante. Realizou-se CLAE λ 254 e λ 320, mas não apresentaram boa resolução.

As frações FAc1-8, FAc7-4, FAc7-5, FAc7-6, FAc7-9, FAc7-10, FAc7-11, FAc4, FAc5, FAc6, FAc8, FAc9, FAc10, FAc11, FAc12, FAc13 e FAc14 foram submetidas a CLAE (gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro), para a varredura das substâncias presentes. A partir dos cromatogramas, as frações com melhores resoluções foram submetidas a uma coluna C-18 utilizando quatro fases móveis (Tabela 17). As subfrações obtidas foram submetidas a CLAE isocrático (H_2O/MeOH 80:20, H_2O/MeOH 60:40 e H_2O/MeOH 25:75), usando-se detector de UV em 254 nm (Figuras 18-29). Os cromatogramas obtidos com eluente H_2O/MeOH 8:2 foram pouco informativos no geral, enquanto os cromatogramas obtidos com eluente H_2O/MeOH 6:4 e 25:75 mostraram picos com t_r entre 0 e 20 min.

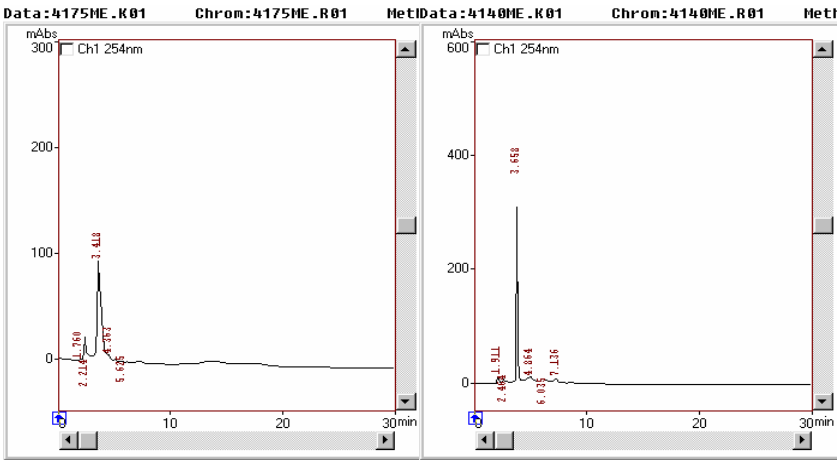


Figura 18: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc4-1 (3,8 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

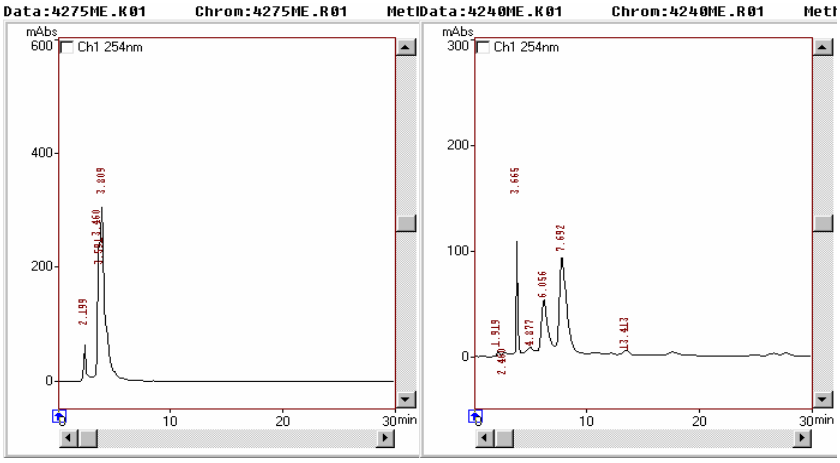


Figura 19: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc4-2 (4,9 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

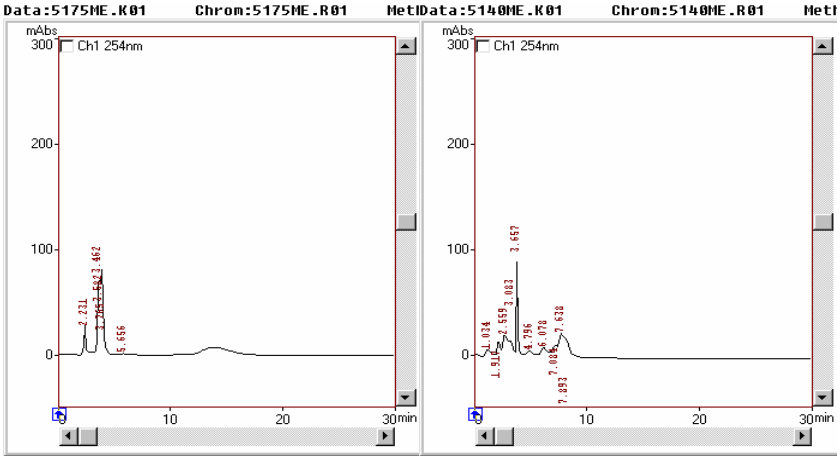


Figura 20: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc5-1 (2,9 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

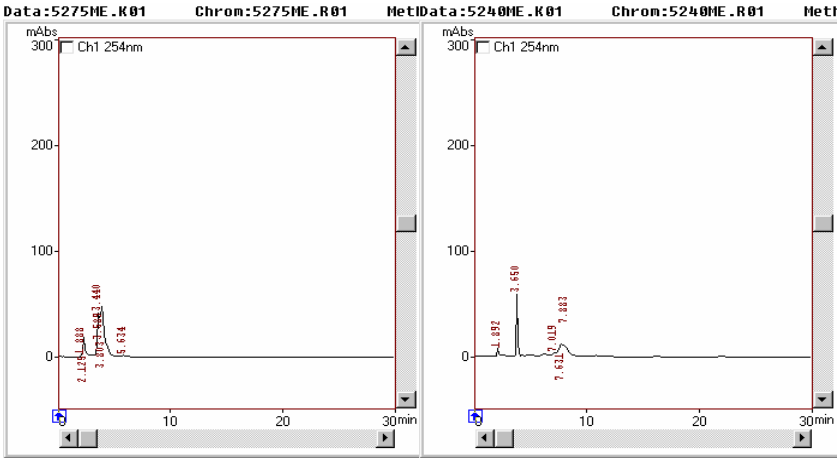


Figura 21: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc5-2 (2,0 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

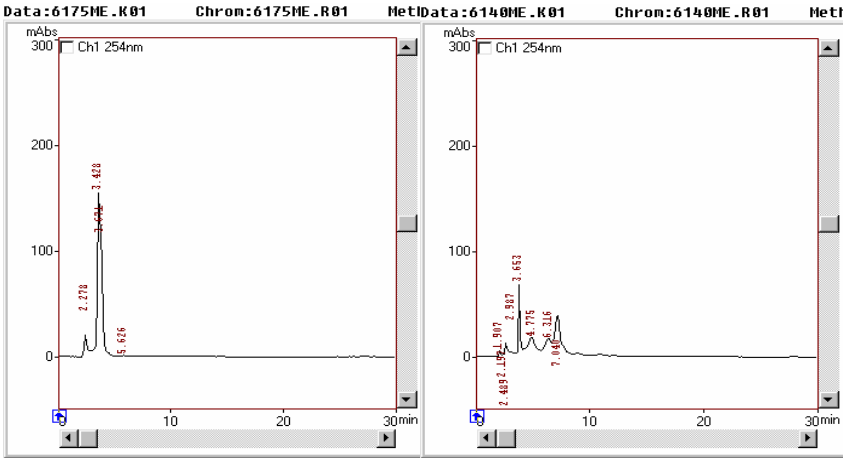


Figura 22: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc6-1 (3,5 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

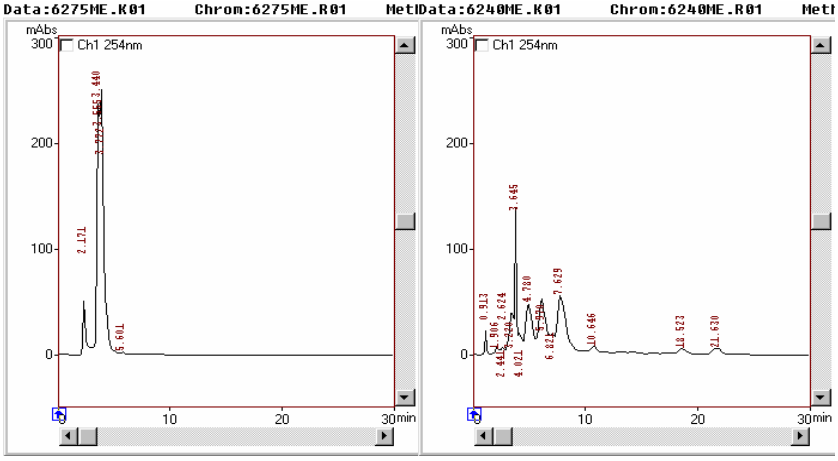


Figura 23: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc6-2 (3,5 mg), (coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

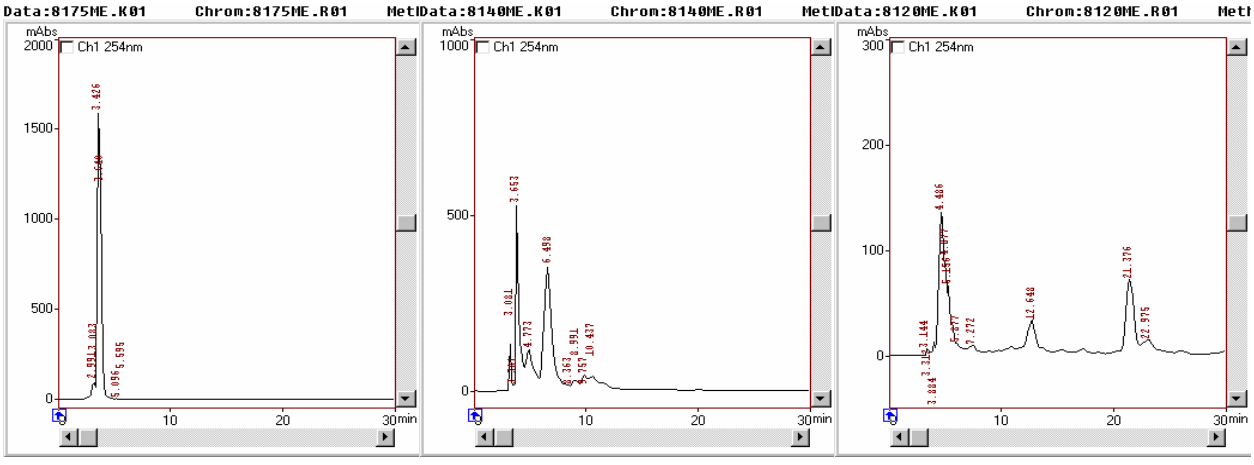


Figura 24: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc8-1 (15,8 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

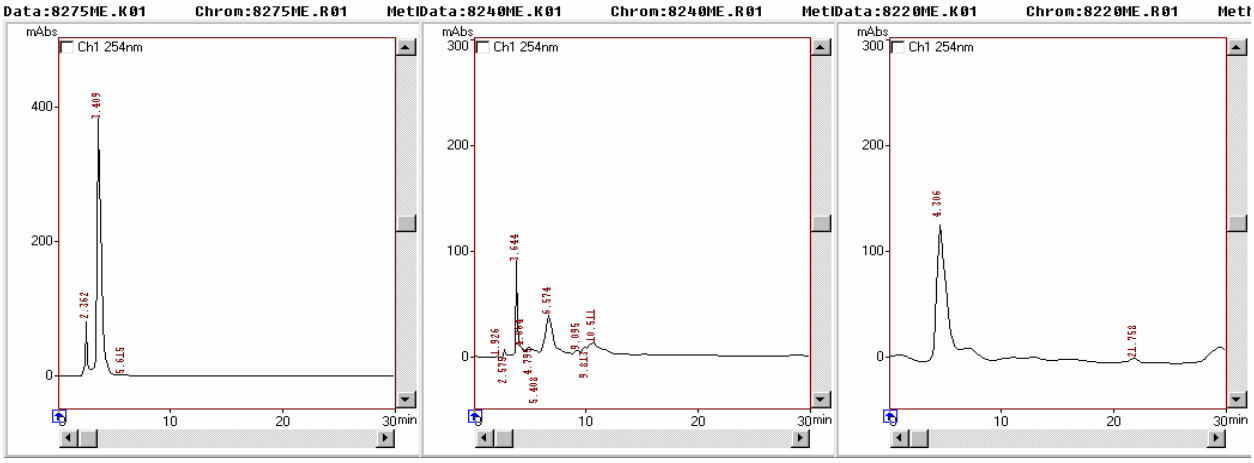


Figura 25: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc8-2 (9,1 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

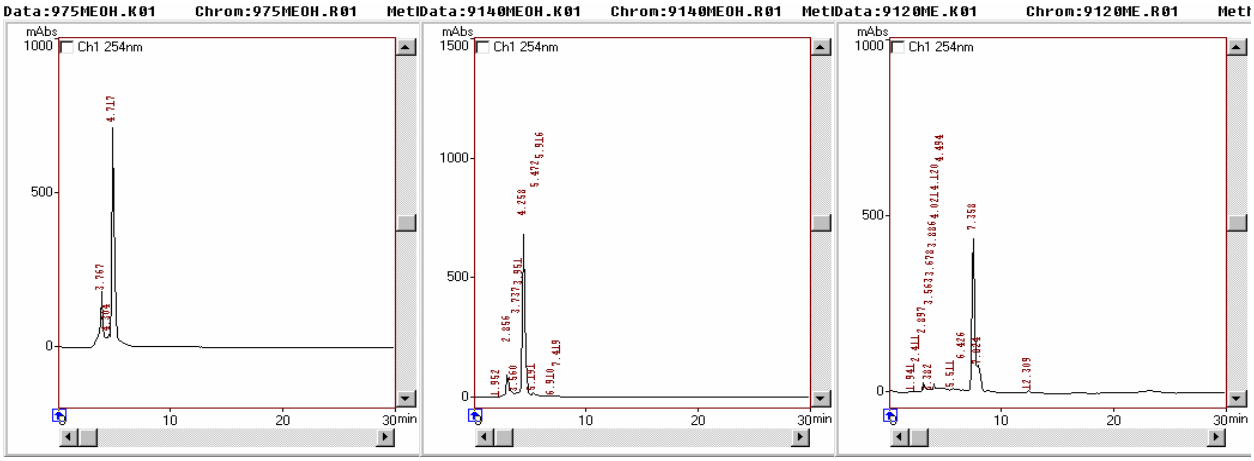


Figura 26: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc9-1 (72,6 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

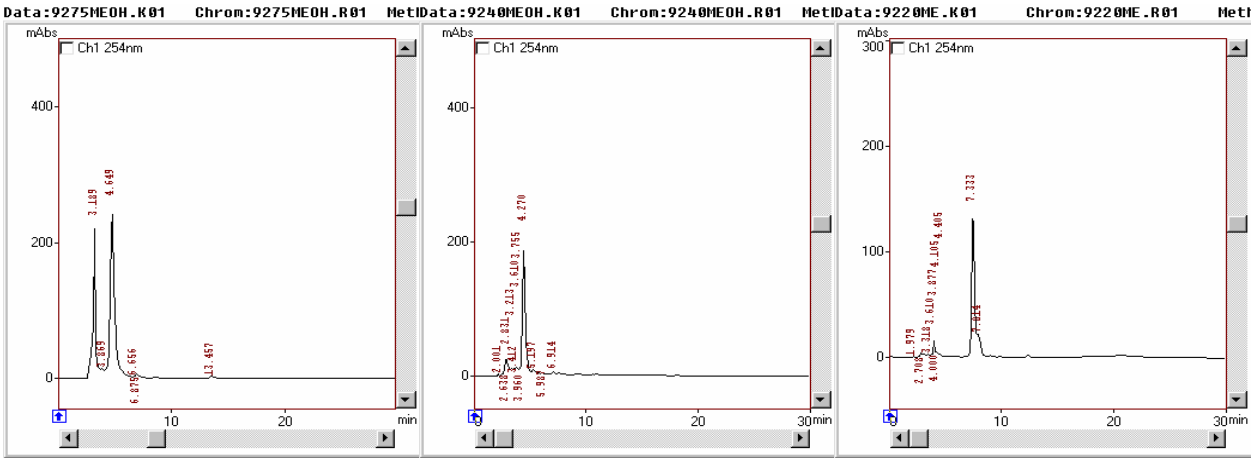


Figura 27: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc9-2 (30,0 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3), H_2O/MeOH (3:2) e H_2O/MeOH (4:1), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

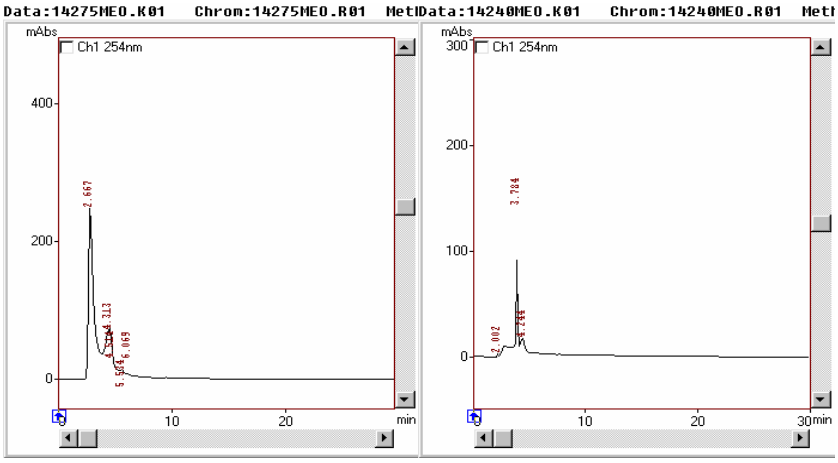


Figura 28: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc14-2 (86,0 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

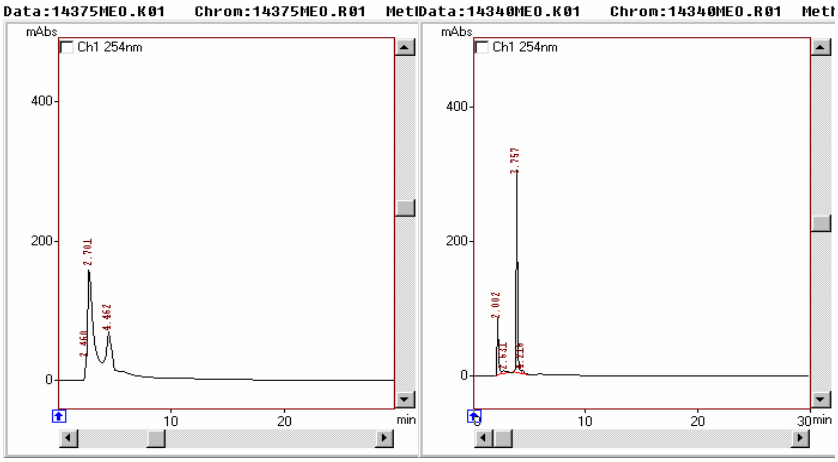


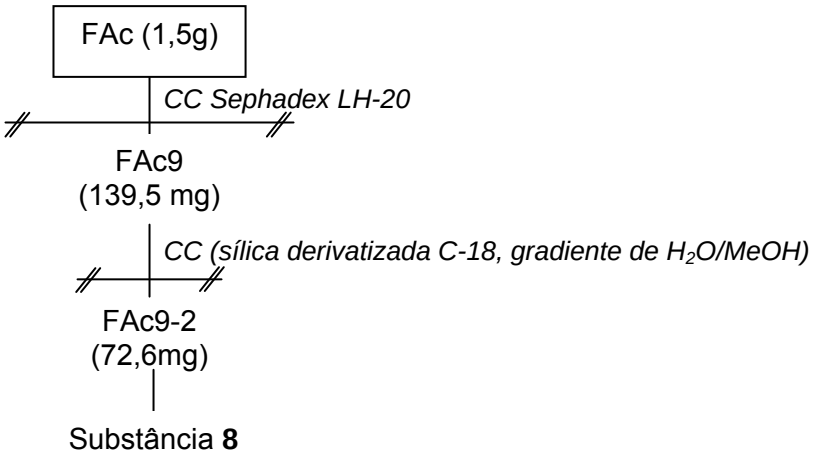
Figura 29: Cromatogramas obtidos via CLAE da FAc14-3 (35,0 mg), coluna analítica Supelco LC-18, fases móveis: H_2O/MeOH (1:3) e H_2O/MeOH (3:2), fluxo de 1mL/min, λ 254nm)

Observou-se que as subfrações obtidas da coluna C-18 (Tabela 17) não apresentaram boa resolução em CLAE. A eluição em modo isocrático com H_2O/MeOH (25:75) mostrou baixa resolução, onde a maioria das amostras eluiam em t_R < 5 minutos, indicando a necessidade do uso de eluente com menor força de eluição. A eluição com H_2O/MeOH (8:2) em algumas amostras mostraram resultados insatisfatórios, pois no tempo de corrida de 30 minutos não foi suficiente para o aparecimento dos picos. Já os cromatogramas obtidos com o uso de H_2O/MeOH (6:4) e alguns cromatogramas obtidos com o uso de H_2O/MeOH (8:2), mostraram melhores resoluções para as amostras sob análise.

Tabela 17: Subfrações obtidas das frações FAc (4, 5, 6, 8, 9, 11, 12 e 14) submetidas a coluna C-18.

H_2O/MeOH (95:5)	H_2O/MeOH (1:1)	MeOH	CH_2Cl_2
FAc 4-1 (3,8 mg)	FAc 4-2 (4,9 mg)	FAc 4-3 (14,1mg)	FAc 4-4 (4,1mg)
FAc 5-1 (2,9 mg)	FAc 5-2 (2,0 mg)	FAc 5-3 (5,2mg)	FAc 5-4 (2,4mg)
FAc 6-1 (3,5 mg)	FAc 6-2 (3,5 mg)	FAc 6-3 (9,4mg)	FAc 6-4 (3,0mg)
FAc 8-1 (15,8 mg)	FAc 8-2 (9,1 mg)	FAc 8-3 (15,0mg)	FAc 8-4 (3,1mg)
FAc 9-1 (72,6 mg)	FAc 9-2 (30,0 mg)	FAc 9-3 (11,8mg)	Fac 9-4 (3,1mg)
FAc 11-1 (7,1mg)	FAc 11-2 (10,3mg)	FAc 11-3 (10,2mg)	Fac 11-4 (5,7mg)
FAc 12-1 (5,4mg)	FAc 12-2 (16,0mg)	FAc 12-3 (11,0mg)	Fac 12-4 (5,1mg)
FAc 14-1 (2,4mg)	FAc 14-2 (86,0 mg)	FAc 14-3 (35,0 mg)	Fac 14-4 (3,2mg)

A análise de FAc9-1 por RMN de ^{1}H, ^{13}C, HMQC, HMBC permitiu a identificação da substância **8**. A análise de FAc9-2 por CLAE-UV e comparação com a FAc9-1 permitiu identificar a presença de substância **8** como constituinte majoritário.



Fluxograma 6: Fracionamento cromatográfico da FAc.

3.3.7. Fracionamento cromatográfico da fração Butanólica e Hidroalcóolica.

Uma alíquota de 20mg das frações FB e FM foram submetidas a CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C –18) e como fase móvel gradiente de H_2O/MeOH (Tabela 18 e 19) para melhor fracionamento da mesma. Estas foram submetidas a CLAE λ 254 e λ 320. Observou-se que o perfil cromatográfico de ambas são semelhantes ao perfil cromatográfico da FAc. Pela comparação do tempo de retenção em CLAE e o perfil do pico, pode-se observar a presença da substância **8** nestas fases como constituinte majoritário .

Tabela 18: Eluição de FB em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro.

Fração	Eluentes
FB1	H_2O/MeOH (95:5)
FB2	H_2O/MeOH (1:1)
FB3	MeOH
FB4	MeOH/CH_2Cl_2 (1:1)

Tabela 19: Eluição de FM em CC (sílica C-18) com gradiente de H_2O/MeOH 95:5 até MeOH puro.

Fração	Eluentes
FM1	H_2O/MeOH (95:5)
FM2	H_2O/MeOH (1:1)
FM3	MeOH
FM4	MeOH/CH_2Cl_2 (1:1)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES PARCIAIS

*4.1. Determinação estrutural da substância **1*** (FH1-2-2).

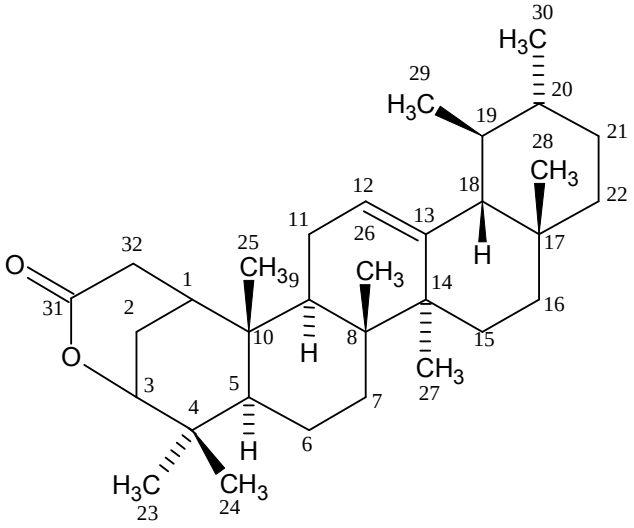


Figura 30: Estrutura molecular proposta para a substância **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina).

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 3-4) apresentou 32 sinais (Tabela 20), característico de esqueleto triterpênico, incluindo sinais em δ 124,4 (C-12) e δ 139,6 (C-13), que caracterizam uma ligação dupla de esqueleto ursano, sendo o sinal em δ 124,4 atribuído a um carbono metínico. Tal fato é confirmado pela correlação direta verificada no experimento de HMQC (Espectros 8-10) deste sinal com o sinal em δ 5,05, atribuído ao hidrogênio olefínico H-12.

O sinal em δ 80,6 é característico de um carbono oximetínico, confirmado pela sua correlação direta verificada no experimento de HMQC (Tabela 20) com o duplo dubleto largo em δ 4,42 (H-3), sugerindo a esterificação de OH-3 pela desproteção observada se comparado a hidrogênio hidroximetínico, por exemplo da α-amirina. Esta suposição pôde ser confirmada ao analisarmos o espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 3-4), em que são observados sinais em δ 80,6 e δ 173,6, atribuídos a C-3 e C-31. A ausência de sinal para o grupo metila de um substituinte acetato em C-3 bem como a presença de um grupo metilênico adicional evidenciado pelos espectros de RMN de ^{1}H (Espectros 1-2) e ^{13}C (Espectros 3-4) (δ_H 2,22 e δ_C 34,8) sugeriu o fechamento do anel lactônico fundido ao anel A pelo grupo acetato em C-3.

Foram observados também nos espectros sinais para carbonos metínicos cujas correlações com sinais de RMN de ^{1}H foram obtidas de experimentos HMQC em: δ 55,3 (δ 0,79), δ 47,7 (δ

1,48), δ 59,1 (δ1,24), δ 39,6 (δ 1,56), e δ 39,7 (δ 1,60); carbonos metilênicos em: δ 24,8 (δ 1,55), δ 18,3 (δ 0,74) , δ 32,9 (δ 1,30), δ 23,4 (δ 1,80), δ 28,1 (0,82), δ 26,6 (δ 0,80), δ 31,3 (δ 1,24) e δ 41,6 (δ 1,18 e δ 1,32) e carbonos metílicos em: δ 28,1 (δ 0,80), δ 16,8 (δ 0,79), δ 15,7 (δ 0,90), δ 16,9 (δ 0,94), δ 23,2 (δ 1,82), δ 28,7 (δ 0,75), δ 17,5 (δ 0,72), δ 21,4 (δ 0,84).

O posicionamento dos grupos metílicos foi conseguido através de análise extensiva dos mapas de contornos obtidos pelo experimento de HMBC (Espectros 11-13), em que são obervadas correlações de C-3 (δ 80,6) e C-5 (δ 55,3) com o H-23 (δ 0,80 e δ 0,82) e H-24 (δ 0,79 e δ 0,94), confirmando a posição dos grupos metílicos em C-23 e C-24. A correlação dos sinais de C-5 (δ 55,3), C-9 (δ 47,7), C-10 (δ 36,8) com o singleto em δ 0,90 (H-25); e a correlação dos sinais em C-7 (δ 32,9), C-8 (δ 40,1), C- 9 (δ 47,7) e C-14 (δ 42,1) com os sinais em δ 0,79 e δ 0,94 (H-26) confirmaram as atribuições dos grupos metílicos em C-25 e C-26. Adicionalmente, foram observadas correlações dos sinais para C-8 (δ 40,1) e C-13 (δ 139,6) com os sinais em δ 1,00 e δ 1,82 (H-27) e do sinal para C-22 (δ 41,6) com o sinal em δ 0,75 (H-28) que confirmaram as atribuições dos grupos metílicos em C-27 e C-28. A correlação dos sinais para C-18, C-19 e C-20 com o sinal em δ 0,72 e do sinal para C-21 (δ 31,3) com o sinal em δ 0,84 (H-30) confirmaram as atribuições dos grupos metílicos em C-29 e C-30. As correlações dos sinais de C-9 (δ 47,7), C-11 (δ 23,4), C-14 (δ 42,1) e C-18 (δ 59,1) com o sinal em δ 5,05 (H-12) confirmam o posicionamento da ligação dupla (Figura 31).

Observou-se também nos espectros de HMBC (Espectros 11-13) as correlações entre o sinal atribuído aos hidrogênios H-32 com os sinais para o carbono metilênico C-2 e carbono carbonílico C-31, corroborando a estrutura proposta para a lactona triterpênica FH1-Y-2 (Tabela 20, Figura 31).

A verificação das correlações nos espectros HMQC (Espectros 8-10) e HMBC (Espectros 11-13), bem como a análise detalhada do espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 3-4) e DEPT 135° (Espectros 5-6) e DEPT 90º (Espectro 7) e comparação com os dados da literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994) permitiram a atribuição dos sinais observados e a identificação do constituinte majoritário da fração FH1-1-c como butanolídeo [1,3]-α-amirina (substância **1**) (Figura 30).

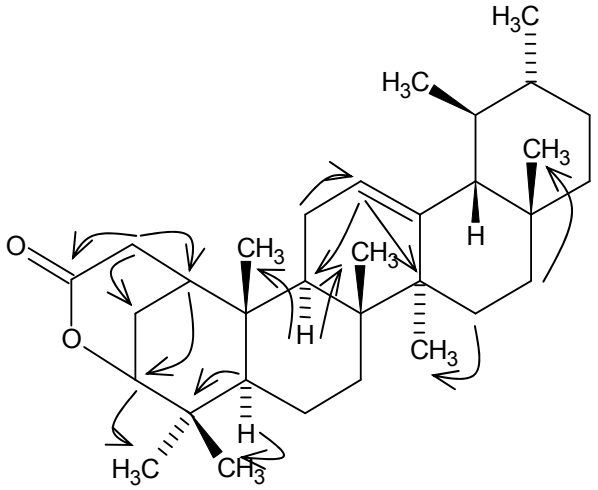


Figura 31: Algumas correlações de HMBC (H → C) da substância **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina).

Tabela 20: Dados de RMN* da substância **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) [a, b, c, n.a].

Posição	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]	HMBC[c]
1	34,8 d	1,55 m	H-32
2	24,8 t	1,55 m	H-32
3	80,6 d	4,42 dd (3,4; 5,4)	H-1; H-5; H-23; H-24
4	37,8 s	-	H-5
5	55,3 d	0,79 m	H-23; H-24; H-25
6	18,3 t	0,74 m	-
7	32,9 t	1,32 m	H-6; H-26
8	40,1 s	-	H-6; H-7; H-9; H-11; H-26; H-27
9	47,7 d	1,48 m	H-12; H-25; H-26
10	36,8 s	-	H-1; H-2; H-5; H-9; H-25; H-26
11	23,4 t	1,79 m	H-9; H-12
12	124,4 d	5,05 t (3,6)	H-11
13	139,6 s	-	H-11; H-27
14	42,1 s	-	H-9; H-12; H-26
15	28,1 t	0,82 m	H-16
16	26,6 t	0,80 m	H-15
17	33,8 s	-	-
18	59,1 d	1,24 m	H-12; H-29
19	39,6 d	1,56m	H-29; H-30
20	39,7 d	1,60 m	H-29; H-30
21	31,3 t	1,24 m	H-19; H-20; H-30
22	41,6 t	1,18; 1,32 m	H-16; H-28
23	28,1 q	0,80 s	H-3; H-5; H-24
24	16,8 q	0,79 s	H-3; H-5
25	15,7 q	0,90 s	H-5; H-9; H-23
26	16,9 q	0,94 s	H-5; H-9
27	23,2 q	1,82 s	H-15
28	28,7 q	0,75 s	H-16
29	17,5 q	0,72 d	-
30	21,4 q	0,84 d	-
31	173,7 s	-	H-32
32	34,8 t	2,22 t (7,3)	-

[a] $CDCl_3$; RMN de ^1H a 500 MHz e RMN de ^{13}C a 125 MHz; [b] as multiplicidades de RMN de ^{13}C foram obtidas por experimentos de DEPT 135º; [c] as atribuições de sinais de RMN de ^1H obtidas por experimentos de HMQC e HMBC; [n.a.] sinais não atribuídos.

*4.2 Determinação estrutural da substância **2**.*

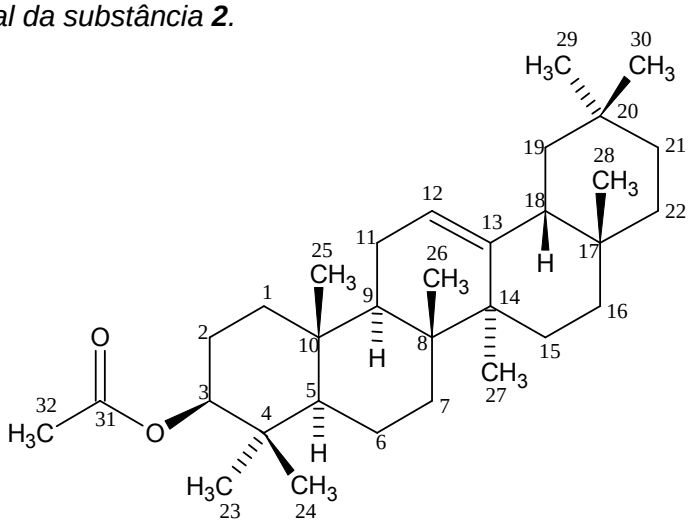


Figura 32: Estrutura molecular proposta para a substância **2** (3-*O*-β-acetil-β-amirina).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 16-17) da subfração FH1-1-b sugeriu a presença de um triterpeno pentacíclico majoritário de esqueleto oleanano, e outros dois minoritários com esqueletos ursano e lupano.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C(Espectros 16-17) mostrou sinais em δ 121,7 (C-12) e δ 145,2 (C-13) que caracterizaram uma ligação dupla, sendo o sinal em δ 121,7 atribuído ao carbono metínico. Tal fato foi confirmado pela correlação direta verificada no experimento de HMQC (Espectros 20-21) deste sinal com um tripleto em δ 5,12 (H-12) (Espectros 14-15) característico de hidrogênio ligado a um carbono metínico sp^2. O sinal observado em δ 80,9, característico de um carbono oximetínico, foi atribuído a C-3 pela sua correlação direta com o sinal em δ 4,44 no experimento de HMQC (Espectros 20-21). Foi observado o sinal em δ 170,9 atribuído ao carbono carbonílico de um grupo acetato em C-3 (Tabela 21).

Foram observados também nos espectros sinais para carbonos metínicos cujas correlações com sinais de RMN de ^{1}H foram obtidas de experimentos HMQC (Espectros 20-21) em: δ 55,3 (δ 0,76), δ 47,5 (δ 1,48) e δ 47,6 (δ 1,28); carbonos metilênicos em δ 38,3 (δ 1,58, δ1,62), δ 28,1 (δ 1,94), δ 18,2 (δ 1,48), δ 32,6 (δ1,30), δ 23,6 (δ 1,56), δ 26,2 (δ 1,06), δ 27,0 (δ 1,76), δ 46,8 (δ 1,48) e carbonos metílicos em: δ 23,7 (δ 0,80), δ 16,4 (δ 0,76), δ 15,7 (δ 0,90), δ 16,9 (δ 0,94), δ 25,8 (δ 1,06), δ 28,4 (δ 0,73), δ 23,7 (δ 1,56), δ 21,2 (δ 1,96).

O posicionamento de alguns grupos metílicos foi conseguido através de análise extensiva dos mapas de contorno obtidos pelo experimento de HMBC (Espectros 22-24), em que são observadas correlações de C-3 (δ 81,0) e C-5 (δ 55,3) com H-23 (δ 0,80) e H-24 (δ 0,76), confirmando a posição do grupo acetato em C-3 e dos grupos metílicos C-23 e C-24. A correlação dos sinais de C-5 (δ 55,3) e C-9 (δ 47,5) com o singleto em δ 0,90 (H-25) e a correlação do sinal em C-15 (δ 26,2) com o sinal em δ 1,06 (H-27) confirmaram as atribuições dos grupos metílicos em C-25 e C-27 (Figura 33).

A verificação das correlações nos espectros HMQC (Espectros 20-21) e HMBC (Espectros 22-24), bem como a análise detalhada do espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 16-17) e DEPT 135° (Espectros 18-19) permitiram a atribuição dos sinais observados e a identificação do constituinte majoritário da fração FH1-1-b como 3-*O*-β-acetil-β-amirina (substância **2**) (Figura 32).

Um dos constituintes minoritários desta fração foi identificado como butanolídeo [1,3]-α-amirina (substância **1**) (Figura 30) através de inspeção de seus dados de RMN, especialmente os sinais para C-12 e C-13 em δ 124,4 e δ 139,6 e o sinal para C-3 em δ 80,6, além da verificação de correlações nos espectros bidimensionais e comparação com os espectros da fração FH1-2-2 que era a fração anterior (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994).

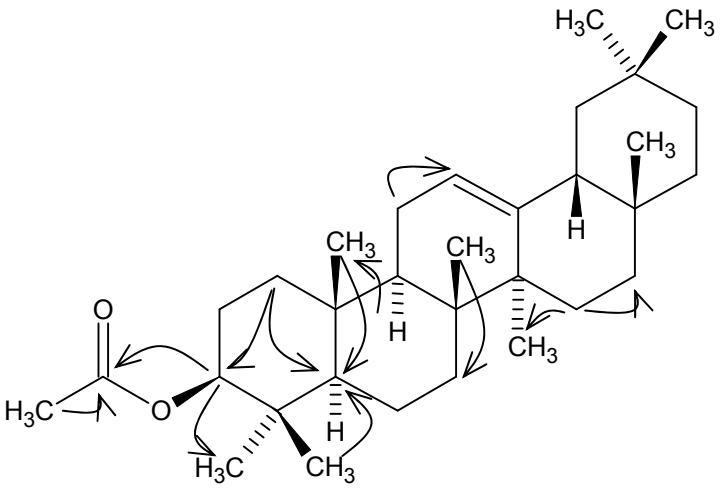


Figura 33: Algumas correlações de HMBC (H → C) da substância **2** (3-*O*-β-acetil-β-amirina).

Tabela 21: Dados de RMN* da substância **2** (3-*O*-β-acetil-β-amirina) [a, b, c, n.a].

Posição	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]	HMBC[c]
1	38,3 t	1,58 m; 1,62 m	H-3, H-9, H-25
2	28,1 t	1,94 m	H-3
3	81,0 d	4,44 ddl (2,0; 6,0)	H-1, H-5, H-23, H-24
4	37,8 s	-	H-3, H-5, H-6, H-24
5	55,3 d	0,76 m	H-1, H-6, H-7, H-9, H-23, H-24, H-25
6	18,2 t	1,48 m	-
7	32,6 t	1,30 m	H-26
8	37,7 s	-	H-6, H-9, H-11, H-26
9	47,5 d	1,48 m	H-1, H-25, H-26
10	37,2 s	-	H-5, H-6, H-9, H-11, H-25
11	23,6 t	1,56 m	H-9
12	121,7 d	5,12 t (3,5)	H-11
13	145,2 s	-	H-15, H-27
14	42,1 s	-	H-15, H-16, H-26
15	26,2 t	1,06 m	-
16	27,0 t	1,76 m	H-15
17	32,5 s	-	-
18	47,6 d	1,28 m	-
19	46,8 t	1,48 m	-
20	31,1 s	-	-
21	34,8 t	n.a.	-
22	37,2 t	n.a.	-
23	23,7 q	0,80 s	H-3, H-5
24	16,4 q	0,76 s	H-3, H-5
25	15,7 q	0,90 s	H-5, H-9
26	16,9 q	0,94 s	-
27	25,8 q	1,06 s	H-15
28	28,4 q	0,73 s	-
29	33,3 q	n.a.	-
30	23,7 q	1,56 s	-
31	171,0 s	-	H-3, H-32
32	21,2 q	1,96 s	-

[a] $CDCl_3$; RMN de ^1H a 500 MHz e RMN de ^{13}C a 125 MHz; [b] as multiplicidades de RMN de ^{13}C foram obtidas por experimentos de DEPT 135º; [c] as atribuições de sinais de RMN de ^1H obtidas por experimentos de HMQC e HMBC; [n.a.] sinais não atribuídos.

*4.3 Determinação estrutural da substância **3**.*

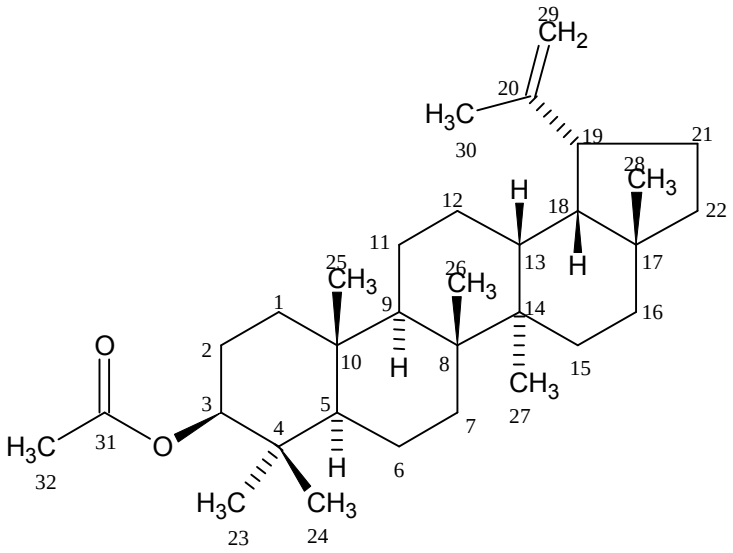


Figura 34: Estrutura molecular proposta para a substância **3** (3-*O*-β-acetil-lupeol).

A análise do espectro de RMN de ^{1}H (Espectros 14-15) e ^{13}C (Espectros 16-17) da fração FH1-1-b sugeriu a presença majotitária da substância **2** e um triterpeno de esqueleto lupano minoritário nesta fração. O espectro de RMN de ^{1}H (Espectros 14-15) mostrou a predominância de sinais na região diamagnética e presença de dubletos na região relativa aos hidrogênios olefínicos.

Observou-se a presença de sinais referentes a seis grupos metílicos terciários em carbonos saturados (δ 0,80, δ 28,1; δ e, δ 15,5; δ 0,90, δ 16,1; δ e, δ 15,9; δ 0,86, δ 14,5; δ 1,30, δ 18,0) através de análise de HMQC (Espectros 20-21), além de um grupo metílico sobre C sp^2 (δ_H 1,96, δ_C 19,2). Na região dos hidrogênios olefínicos observou-se dois dubletos largos (δ 4,50, δ 4,60) atribuídos aos hidrogênios metilênicos isopropenílico. Os sinais em δ 109,3 e δ 150,9 foram atribuídos aos carbonos de uma ligação dupla terminal do grupo isopropenílico, confirmado pelo espectro de DEPT 135º (Espectros 18-19), que evidencia a associação destes sinais a um carbono metilênico e um carbono quaternário, respectivamente. Como não observou um sinal em δ_C 79,0 caracteristico de C-3 hidroximetínico, atribui o sinal em δ_C 80,9 (δ_H 4,44) observado, característico da absorção de um carbono oximetínico ao C-3 (Tabela 22).

A substituição no C-19 por um grupo isopropenílico foi confirmado por correlações a longa distância entre o sinal em δ 150,9 (C-20) e δ 1,28 (H-19) além da correlação do sinal em δ 48,3 (C-19) com δ 4,50 e δ 4,60 (H-29) no espectro de HMBC (Espectro 22-24). A posição do carbono carbinólico acetilado em C-3 (δ 80,9) foi evidenciada por sua correlação com o H-23 (δ 0,80) (Figura 35).

A comparação destes dados com os descritos na literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994) permitiu identificar a substância **3** como 3-*O*-β-acetil-lupeol (Figura 34).

Tabela 22: Dados de RMN* da substância **3** (3-*O*-β-acetil-lupeol) [a, b, c, n.a].

Posição	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]	HMBC[c]
1	38,5 t	1,58 m; 1,62 m	-
2	27,5 t	1,94 m	H-3
3	81,0 d	4,44 dd (4,1; 5,5)	H-23
4	37,7 s	-	H-23
5	55,4 s	n.a.	H-1; H-6; H-23; H-25
6	18,2 t	1,60 m	-
7	34,3 t	n.a.	-
8	40,8 s	-	H-6; H-9
9	50,4 d	1,24 m	-
10	37,2 s	-	H-25
11	20,9 t	1,96 m	-
12	25,1 t	1,06 m	-
13	38,1 d	1,62 m	-
14	42,1 s	-	-
15	27,5 t	1,94 m	H-27
16	34,8 t	n.a.	-
17	43,0 s	-	-
18	48,2 d	1,26 m	-
19	48,3 d	1,28 m	H-29
20	150,9 s	-	H-19; H-30
21	29,8 t	n.a.	-
22	40,0 t	1,30 m	-
23	28,1 q	0,80 s	-
24	15,5 q	n.a.	H-23
25	16,1 q	0,90 s	-
26	15,9 q	n.a.	-
27	14,5 q	0,86 s	-
28	18,0 q	1,30 s	H-22
29	109,3 t	4,50 dl (2,0); 4,60 dl (2,3)	-
30	19,2 q	1,96 s	H-29
31	171,0 s	-	H-32
32	27,8 q	1,94 s	-

[a] $CDCl_3$; RMN de ^1H a 500 MHz e RMN de ^{13}C a 125 MHz; [b] as multiplicidades de RMN de ^{13}C foram obtidas por experimentos de DEPT 135º; [c] as atribuições de sinais de RMN de ^1H obtidas por experimentos de HMQC e HMBC; [n.a.] sinais não atribuídos.

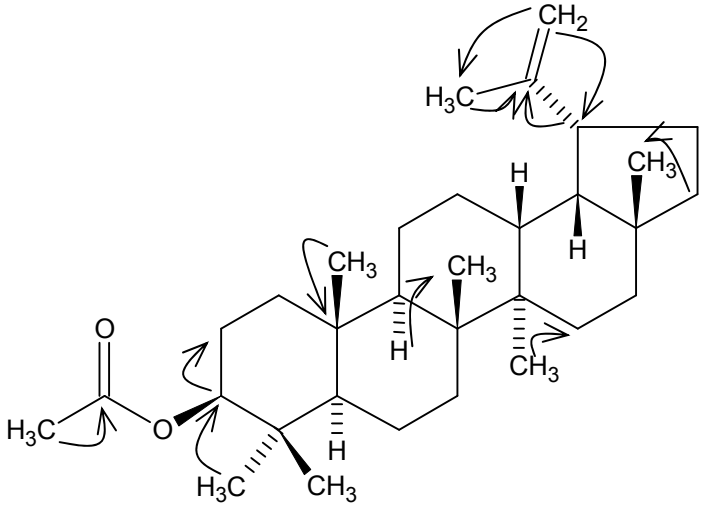
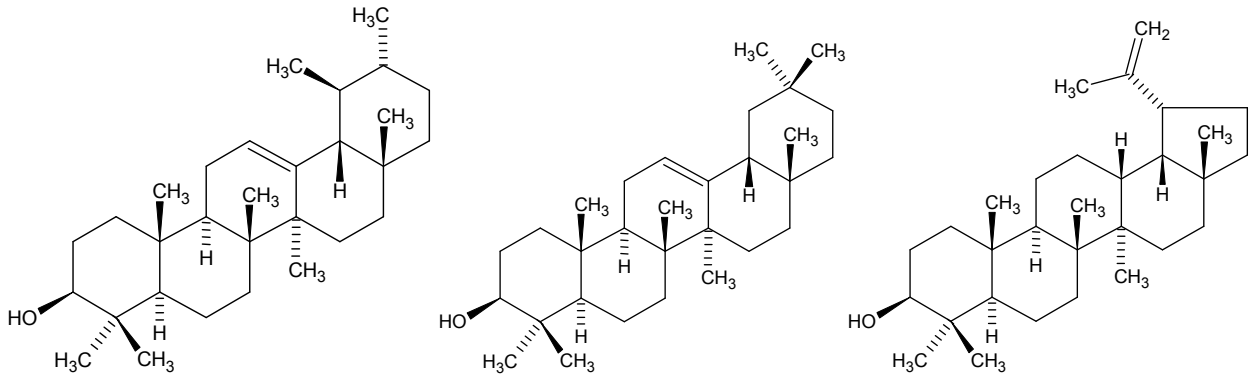


Figura 35: Algumas correlações de HMBC (H → C) da substância **3** (3-*O*-β-acetil-lupeol).

*4.4 Determinação estrutural das substâncias **4**, **5** e **6**.*



4 **5** **6**

Figura 36: Estruturas moleculares propostas para a: α-amirina (substância **4**), β-amirina (substância **5**) e lupeol (substância **6**) respectivamente.

A análise dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C da fração FH2-9-2 sugeriu a presença de três triterpenos pentacíclicos em mistura pela observação de seis sinais referentes a carbonos olefínicos na região de δ 100-150, sinais para carbonos oximetínicos em δ ~79 e a predominância de sinais nas regiões diamagnéticas dos espectros, incluindo diversos singletos para os grupos metílicos.

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C da fração FH2-9-2 (Espectros 25-26) mostraram sinais em δ 124,5 (C-12) e δ 139,6 (C-13), que caracterizam uma ligação dupla e sugeriram, juntamente com a predominancia de sinais nas regiões diamagnéticas o esqueleto ursano para o constituinte majoritário dessa fração. O sinal em δ 124,5 foi atribuído ao carbono metínico pela observação de correlação direta no experimento de HMQC (Espectros 31-33) deste sinal com o sinal em δ 5,06 (H-12), atribuídos a hidrogênios olefínicos. A comparação desses dados como os dados da literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994) indicaram a presença do triterpeno pentacíclico α-amirina (substância **4**) (Figura 36).

A atribuição dos demais sinais majoritários de RMN de ^{13}C auxiliada pela análise dos espectros HMQC (Espectros 31-33) (Tabela 23) e a comparação com dados da literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994) confirma a identificação da α-amirina como constituinte majoritário dessa fração.

A análise dos espectros de ^{1}H e ^{13}C mostrou ainda sinais menos intensos em δ 121,8 (C-12) e δ 145,0 (C-13), que caracterizam uma ligação dupla, sugerindo a presença de carbono metínico pela correlação direta verificada no experimento de HMQC (Espectros 31-33) deste sinal com o sinal em δ 5,12 (H-12), atribuído ao hidrogênio olefínico. A análise detalhada dos espectrso uni e bidimensionais de RMN e a comparação desses dados como os dados da literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994) permitiram deduzir a presença de um triterpeno pentacíclico de esqueleto oleanano, β-amirina (substância **5**) (Figura 36) como constituinte minoritário nessa fração.

Outros sinais minoritários foram ainda observados nos espectros sob análise. Na região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^{1}H encontramos dois dubletos largos (δ 4,50, δ 4,60) associados a um grupo metilênico em isopropenila (Tabela 23). Os sinais em δ 109,3 e δ 152,0 observados no espectro de RMN de ^{13}C foram atribuídos aos carbonos de uma ligação dupla terminal em um grupo isopropenílico, confirmado pelo espectro de DEPT 135º (Espectros 29-30), que evidenciou a associação destes sinais a um carbono metilênico e um carbono quaternário, respectivamente. Esses dados e a observação de um singleto em δ 1,6 no espectro de RMN de ^{1}H, associado a grupo metílico sobre carbono sp^2 sugeriram a presença de triterpeno pentacíclico com esqueleto lupano como constituinte minoritário dessa fração. O sinal em δ 79,0 (δ 3,14), característico da absorção de um carbono hidroximetínico, foi atribuído ao C-3. A comparação dos dados espectrométricos encontrados para esta fração com os descritos na literatura [44-45] confirmaram a presença do lupeol (substância **6**) (Figura 36).

Tabela 23: Dados de RMN* da substância **4** (α-amirina), substância **5** (β-amirina) e substância **6** (lupeol) respectivamente [a, b, c, n.a.].

Posição	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]
1	38,8 t	1,56 m; 1,60 m	38,6 t	1,56 m; 1,60 m	n.a.	n.a.
2	27,3 t	1,54 m	27,3 t	1,54 m	27,4 t	1,54 m
3	79,1 d	3,18 ddl (2,0; 3,5)	79,0 d	3,14 ddl (1,5)	79,0 d	3,14 ddl (5,0)
4	38,9 s	-	38,9 s	-	n.a.	-
5	55,2 d	0,64 m	55,4 d	0,68 m	55,4 d	0,62 m
6	18,4 t	n.a.	18,4 t	n.a.	18,0 t	n.a.
7	33,0 t	0,80 m	32,7 t	0,80 m	34,3 t	1,32 m
8	40,1 s	-	38,9 s	-	n.a.	-
9	47,8 d	1,44 m	47,7 d	1,44 m	50,5 d	1,18 m
10	36,9 s	-	37,2 s	-	n.a.	-
11	23,4 t	0,84 m	23,6 t	1,82 m	21,0 t	0,82 m
12	124,5 d	5,06 t (3,5)	121,8 d	5,12 t (3,5)	25,2 t	n.a.
13	139,6 s	-	145,0 s	-	38,1 d	n.a.
14	42,1 s	-	41,8 s	-	n.a.	-
15	28,1 t	0,92 m	26,2 t	1,04 m	27,5 t	n.a.
16	26,6 t	n.a.	27,0 t	n.a.	35,6 t	n.a
17	33,8 s	-	32,5 s	-	n.a.	-
18	59,1 d	1,24 m	47,3 d	n.a.	48,4 d	n.a.
19	39,6 d	n.a.	46,9 t	n.a.	48,0 d	n.a.
20	39,7 d	n.a.	31,1 s	-	152,0	-
21	31,3 t	n.a.	34,8 t	n.a.	29,9 t	1,20 m
22	41,5 t	1,36 m	38,6 t	n.a.	40,0 t	n.a.
23	28,4 q	0,74 s	28,0 q	0,76 s	28,0 q	0,90 s
24	15,6 q	0,86 s	15,5 q	0,72 s	15,4 q	0,86 s
25	15,7 q	0,72 s	15,6 q	0,72 s	16,1 q	0,70 s
26	16,7 q	0,92 s	16,9 q	0,90 s	15,9 q	0,74 s
27	23,3 q	0,98 s	26,0 q	1,04 s	14,6 q	n.a.
28	28,1 q	0,88 s	28,7 q	0,72 s	n.a.	n.a.
29	17,5 q	0,70 s	33,3 q	0,80 s	109,3 t	4,50 dd (1,5); 4,60 d (2,5)
30	21,4 q	0,84 s	23,7 q	0,78 s	18,1 q	1,6 s

[a] $CDCl_3$; RMN de ^{1}H a 500 MHz e RMN de ^{13}C a 125 MHz; [b] as multiplicidades de RMN de ^{13}C foram obtidas por experimentos de DEPT 135º; [c] as atribuições de sinais de RMN de ^{1}H obtidas por experimentos de HMQC; [n.a.] sinais não atribuídos.

*4.5 Determinação estrutural da substância **7**.*

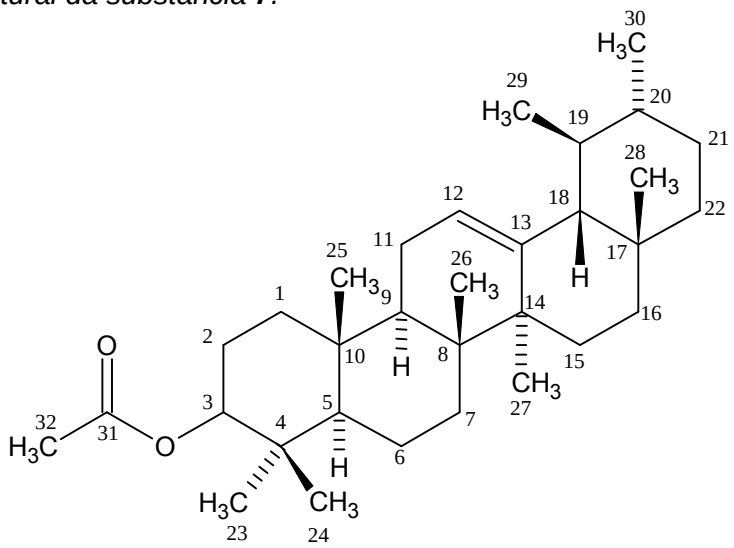


Figura 37: Estrutura molecular proposta para a substância **7** (3-*O*-β-acetil-α-amirina).

O espectro de RMN de ^{13}C da fração FH4-1-4 (Espectros 39-40) apresentou sinais em δ 124,4 e δ 139,7, que caracterizam uma ligação dupla, trissubstituída sendo o sinal em δ 124,4 atribuído ao carbono metínico C-12. Tal fato foi confirmado pela correlação direta verificada no experimento de HMQC (Espectros 43-44) deste sinal com o tripleto em δ 5,06 (H-12), característico de hidrogênio olefínico. Essas análises, além da observação de dois dubletos integrando para três H (δ 0,70 e δ 0,84), atribuídos aos grupos metílicos H-29 e H-30, sugeriram a presença de um triterpeno de esqueleto ursano. O sinal em δ 81,0 é característico de carbono oximetínico, confirmado pela sua correlação direta com o duplo dubleto em δ 4,44 (H-3). O espectro de RMN de ^{13}C mostrou também um sinal em δ 171,0, atribuído ao carbono carbonílico de um grupo acetato em C-3 (Tabela 24).

Foram observados também sinais para carbonos metínicos em: δ 55,3 (δ 0,74); δ 47,7 (δ 1,48), δ 59,1 (δ 1,24); carbonos metilênicos em: δ 38,5 (δ 1,56, δ 1,60); δ 28,1 (δ 1,18); δ 32,9 (δ 1,24, 1,30); δ 23,4 (δ 1,82, 1,96); δ 28,7 (δ 1,18); δ 26,6 (δ 0,9); δ 31,3 (δ 1,32); δ 41,5 (δ 1,18, δ 1,34) e carbonos metílicos em: δ 28,1 (δ 0,74); δ 16,7 (δ 0,79); δ 15,7 (δ 0,90); δ 16,9 (δ 0,93); δ 23,3 (δ 1,00); δ 28,7 (δ 0,72); δ 17,5 (δ 0,70); δ 21,4 (δ 0,84); δ 23,2 (δ 1,96) (Tabela 24).

O posicionamento de alguns grupos metílicos foi conseguido através da análise da análise dos espectros de HMBC (Espectros 45-47), em que são observadas correlações de C-25 (δ 15,7) e C-26 (δ 16,8) com o H-9 (δ 1,48), H-23 (δ 0,74) com C-4 (δ 37,7), H-24 (δ 0,79) com C-5 (δ 55,3) e H-27 (δ 1,00) com C-13 (δ 139,3). Outros grupos metílicos foram atribuídos compararando resultados com dados obtidos da literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994). A correlação do sinal em C-31 (δ 171,0) com o H-32 (δ 1,96) confimando a presença de um carbono metílico ligado a um carbono carboxílico, e as correlações de C-3 (δ 81,0) com H-1 (δ 1,56, δ 1,60), confirmaram a presença do grupo acetato em C-3 (Figura 38).

A comparação dos dados espectrométricos com os descritos na literatura (OLEA et al., 1990; MAHATO et al., 1994), confirmaram a identificação da substância **7** como 3-*O*-β-acetil-α-amirina (Figura 37).

Tabela 24: Dados de RMN* da substância **7** (3-*O*-β-acetil-α-amirina) [a, b, c, n.a.].

Posição	δ_C, mult.	δ_H, mult., J(Hz)	HMBC
1	38,5 t	1,56 m; 1,60 m	H-9
2	28,1 t	1,18 m	-
3	81,0 d	4,44 dd (6,0; 2,0)	H-1
4	37,7 s	-	H-23; H-24
5	55,3 d	0,74 m	H-24; H-25
6	18,3 t	n.a.	-
7	32,9 t	1,24 m; 1,30 m	H-26
8	40,0 s	-	H-7; H-9; H-27
9	47,7 d	1,48 m	H-5; H-25; H-26
10	36,8 s	-	H-9; H-10
11	23,4 t	1,82 m; 1,96 m	-
12	124,4 d	5,06 t (3,5)	-
13	139,3 s	-	H-27
14	42,1 s	-	H-16; H-26; H-27
15	28,7 t	1,18 m	-
16	26,6 t	0,91 m	-
17	33,7 s	-	-
18	59,1 d	1,24 m	-
19	39,7 d	n.a.	H-18
20	39,6 d	n.a.	H-18
21	31,3 t	1,32 m	-
22	41,5 t	1,18 m; 1,34 m	-
23	28,1 q	0,74 s	H-5
24	16,7 q	0,79 s	H-5
25	15,7 q	0,90 s	H-9
26	16,9 q	0,93 s	H-9
27	23,3 q	1,00 s	-
28	28,7 q	0,72 s	-
29	17,5 q	0,70 d	-
30	21,4 q	0,84 d	-
31	171,0 s	-	H-32
32	23,2 q	1,96 s	-

[a] $CDCl_3$; RMN de ^1H a 500 MHz e RMN de ^{13}C a 125 MHz; [b] as multiplicidades de RMN de ^{13}C foram obtidas por experimentos de DEPT 135º; [c] as atribuições de sinais de RMN de ^1H obtidas por experimentos de HMQC; [n.a.] sinais não atribuídos.

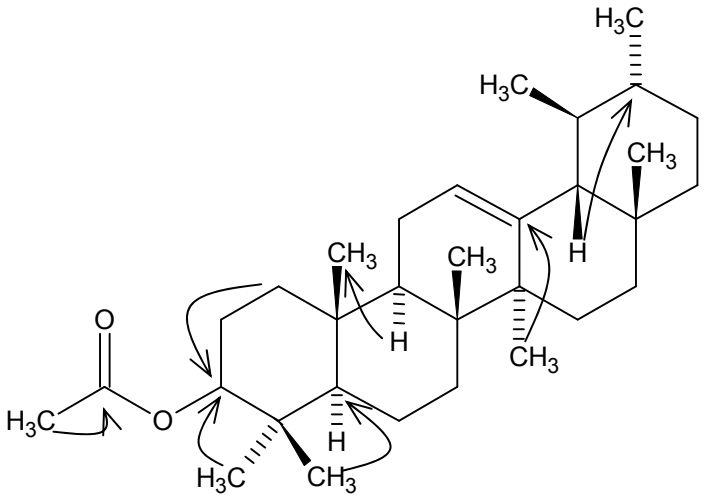


Figura 38: Algumas correlações de HMBC (H → C)da substância **7** (3-*O*-β-acetil-α-amirina).

*4.6 Determinação estrutural da substância **8**.*

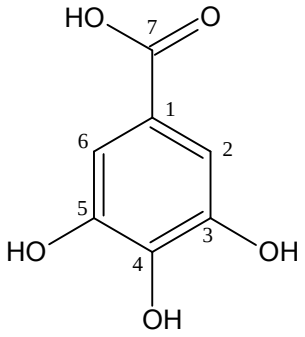


Figura 39: Estrutura molecular proposta para a substância **8** (ácido gálico).

O espectro de RMN de ^{1}H (Espectro 48) da fração FAc9-2 mostrou um sinal majoritário em δ 7,0 (Tabela 25) e o espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 49) mostrou sinais majoritários em: δ 121,3, δ 109,7, δ 145,5, δ 137,9, δ 168,1. O sinal em δ 109,7 mostrou correlação com o sinal em δ 7,0 no espectro do HMQC (Espectro 51) sugerindo uma estrutura molecular aromática simétrica com anel tetrasubstituído para a substância **8**. Observou-se um sinal em δ 145,5 característico de carbonos aromáticos ortoidroxilados, e o sinal em δ 137,9 sugerindo um sistema aromático 3, 4, 5 trioxigenado (Tabela 25).

A análise do espectro de HMBC (Espectros 52-53) mostrou correlações a longa distância do sinal δ 7,0 com os sinais em δ 121,3, δ 145,5, δ 137,9 e δ 168,1, que aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, indicaram a identificação da substância **8** com o ácido gálico (Figura 39).

Tabela 25: Dados de RMN* da substância **8** (ácido gálico) [a, b, c].

Posição	δ_C, mult.[b]	δ_H, mult., J(Hz)[c]	HMBC[c]
1	121,3 s	-	H-2; H-6
2, 6	109,7 d	7,0 s	-
3, 5	145,5 s	-	H-2; H-6
4	137,9 s	-	H-2; H-6
7	168,1 s	-	H-2; H-6

[a] D_2O; RMN de ^1H a 500 MHz e RMN de ^{13}C a 125 MHz; [b] as multiplicidades de RMN de ^{13}C foram obtidas por experimentos de DEPT 135º; [c] as atribuições de sinais de RMN de ^1H obtidas por experimentos de HMQC.

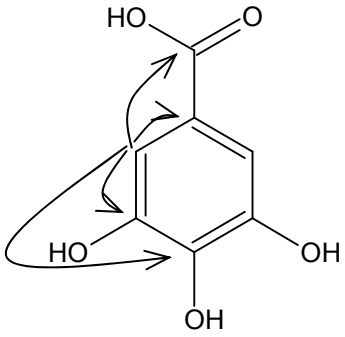


Figura 40: Algumas correlações de HMBC da substância **8** (ácido gálico).

Estudos anteriores realizados em nossoslaboratório com a espécie *Chrysophyllum marginatum* mostraram a ocorrência de ácido gálico como constituinte majoritário do extrato de folhas e ramos, o que corroborou a identificação desta substância também no extrato de *C. flexuosum* neste trabalho.

5. RESULTADOS DE ENSAIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS REALIZADOS.

5.1. *Ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrihidrazila (DPPH) – detecção do potencial sequestrador de radicais livres.*

O EE e as frações obtidas da partição (FH, FAc, FB e FM) foram submetidos a testes para detecção de atividades antioxidante, utilizando placas cromatográficas nebulizadas com solução de β-caroteno. A FH foi submetida a CCDC e analisada com uma série de eluentes que permitem a visualização dos constituintes de baixa, média e alta polaridade. Escolheu-se a fase móvel de melhor resolução e submeteu-se à análise. Após 4h a placa não apresentou a permanência da coloração alaranjada da solução de β-caroteno, indicando que nessa fração não ocorre substância com atividade antioxidante de moderada a fraca, sendo que, após o fracionamento desta fração de partição, não foi possível relacionar a atividade à alguma substância isolada. As frações FAc, FB e FM foram submetidas a análise em CCDC com fase móvel de melhor resolução. Após 4h, observou-se que, as manchas correspondentes às substâncias presentes, quando analisadas de CCDC nebulizada com solução de anisaldeído sulfúrico, ficaram com coloração alaranjadas em análises de CCDC nebulizadas com solução de β-caroteno, mantendo a coloração do mesmo.

A substância **8** (ácido gálico) foi submetida ao teste químico para detecção de atividade sequestradora de radicais livres, utilizando o radical livre estável DPPH. Os resultados são mostrados na Figura 41.

Observou através da Figura 41 que o ácido gálico comparado com o padrão utilizado (Rutina) apresentou atividade antioxidante em potencial em teste de detecção do potencial sequestrador de radicais livres. A atividade do ácido gálico está relacionada com a presença dos substituintes 3,4,5-triidroxílicos, que potencializam a atividade do fenol.

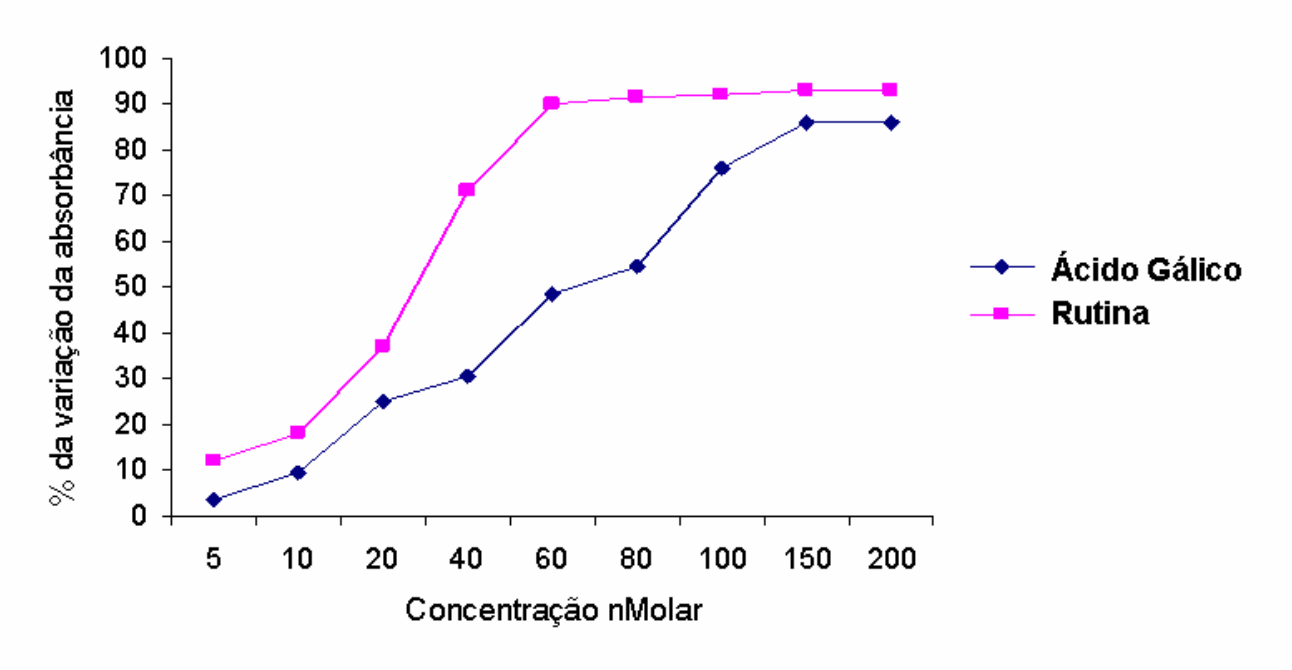


Figura 41: Atividade sequestradora de radicais livres da substância **8** frente ao DPPH.

5.2. *Avaliação da atividade antifúngica – fungos fitopatogênicos.*

As substâncias **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) e **8** (ácido gálico) obtidas das subfrações FH1-8 e FA9-2 respectivamente, mostraram-se inativos quando biautografado com o fungo fitopatogênico *Cladosporium cladosporioides.* A substância **8** apresentou moderada atividade quando biautografada com o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum,* porém a substância **1** mostrou-se inativa (Tabela 26, Figura 42).

Tabela 26: Biautografia das substâncias **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) e **8** (ácido gálico).

Código	Amostra	Quantidade	Eluente	*C.cladosporioides*		*C.sphaerospermum*	
				Rf	Potencial	Rf	Potencial
1	FA9-2	100ug	MeOH:H2O (7:3)	0,71	**	-	i
2	FH1-8	100ug	Hex:AcOEt (9:1)	-	i	-	i

* atividade fraca
** média atividade
*** atividade forte
i inativo

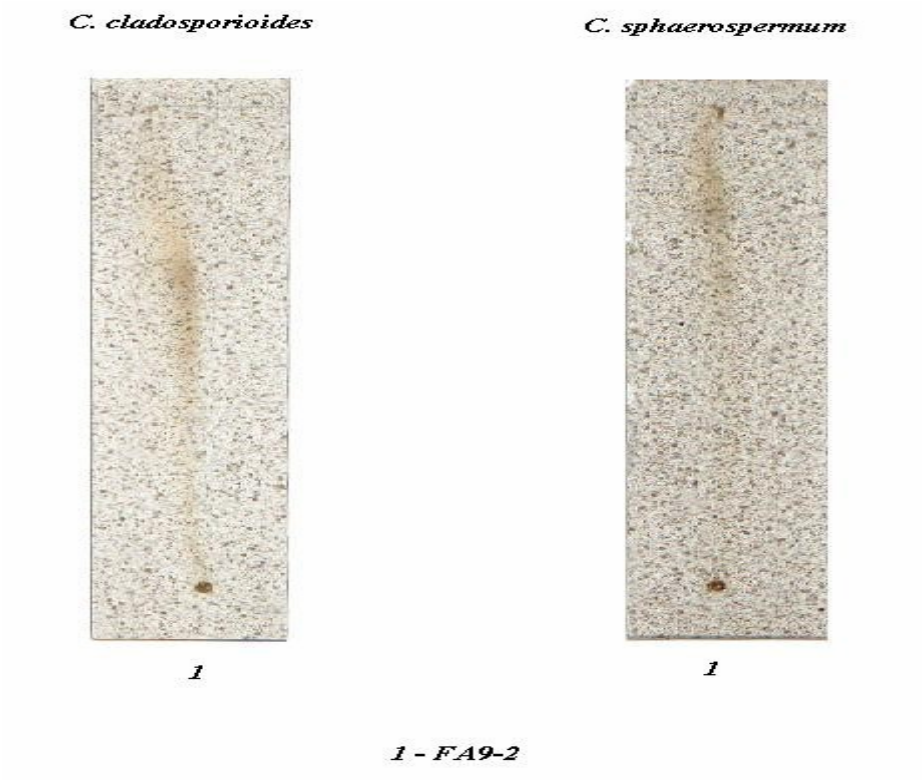


Figura 42: Biautografia da substância **8** (ácido gálico).

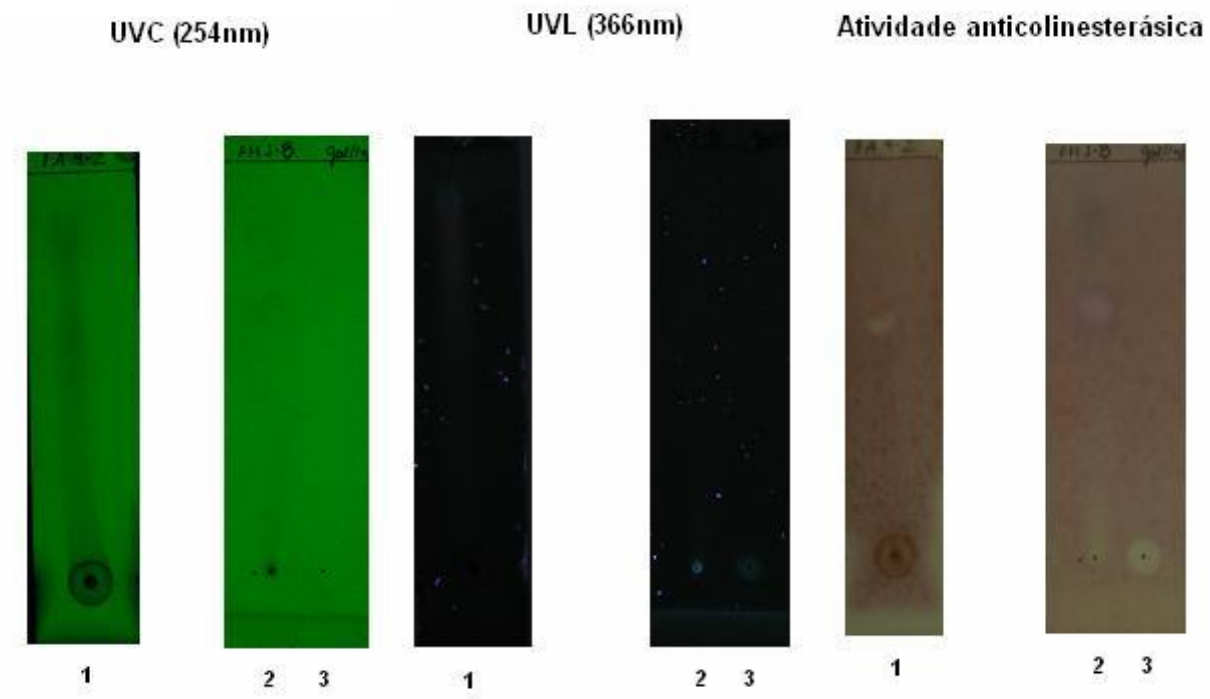
5.3. *Detecção da atividade anticolinesterásica.*

As substâncias **1** (butanolídeo [1,3]-α-amirina) e **8** (ácido gálico) obtidas das subfrações FH1-8 e FA9-2 respectivamente, foram submetidas à análise da atividade anticolinesterásica. Foi utilizado o padrão galantamina (1μg). A quantidade aplicada para as amostras foi de 60μg. O resultado dos Rfs foram:

FH1-8: 0,64

FA9-2: 0,59

Sendo que a atividade da substância **8** foi "mascarada" pela coloração roxa proveniente da substância. Porém a substância **1** apresentou atividade inibitória de AChE moderada conforme análise em CCD (Figura 43).



1. FA9-2
2. FH1-8
3. Galantamina

Figura 43: Biautografia em placa de sílica, detecção da atividade anticolinesterásica.

5.4. *Avaliação de atividade antifúngica – fungos patogênicos.*

As substâncias butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**) e ácido gálico (**8**) obtidas das subfrações FH1-8 e FA9-2 respectivamente, foram submetida a análise de atividade antifúngica através do método de microdiluição em ágar. Observou-se que as duas substâncias mostraram sem atividade perante o fungo *Candida parapsilosis.* O butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**) mostrou baixa atividade frente ao fungo *Candida albicans*, moderada atividade frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* e inativa frente o fungo *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Porém o ácido gálico (**8**) mostrou baixa atividade frente ao fungo *Candida albicans* e *C. Krusei,* moderada atividade frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* e inativa frente ao fungo *Candida parapsilosis* (Tabela 27).

Tabela 27: Método de microdiluição das substâncias butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**) e ácido gálico (**8**).

Fração	substância	Microganismo	CIM* (μg/mL)
FH1-8	butanolídeo [1,3]-α-amirina (**1**)	*Candida albicans*	250
		Candida krusei	sem atividade
		Candida parapsilosis	sem atividade
		Cryptococcus neoformans	125
FA9-2	ácido gálico (**8**)	*Candida albicans*	250
		Candida krusei	250
		Candida parapsilosis	sem atividade
		Cryptococcus neoformans	125

6. CONCLUSÕES.

Foram obtidos sete triterpenos pentacílicos como constituintes majoritários da fase FH, três com esqueleto ursano, dois com esqueleto oleanano e dois com esqueleto lupano. Os triterpenos com esqueleto ursano foram identificados como butanolídeo [1,3]-α-amirina (substância **1**) de estrutura molecular inédita na literatura fitoquímica e constituída de *ca.* 1/3 da fase FH, α-amirina (substância **4**) e 3-*O*-β-acetil-α-amirina (substância **7**). Os triterpenos com esqueleto oleanano foram identificados como 3-*O*-β-acetil-β-amirina (substância **2**) e β-amirina (substância **5**). E os triterpenos de esqueleto lupano foram identificados como 3-*O*-β-acetil-lupeol (substância **3**) e lupeol (substância **6**).

Exceto pela substância **1** os outros triterpenos pentacíclicos tem larga ocorrência no reino vegetal, sendo a importância de sua identificação nos extratos apolares das folhas e ramos de *C. flexuosum* associadas à possibilidade de estabelecimento de novas fontes destas substâncias.

Da FAc foi identificado o ácido gálico (substância **8**) como constituinte majoritário na fase. Através de comparação dos cromatogramas em CLAE das fases FAc, FB e FM e vários comprimentos de onda e fases móveis, observou-se a presença do ácido gálico nas três fases.

Conforme observado na literatura, o gênero *Chrysophyllum* apresenta substâncias com atividade antioxidante em potencial, o que foi verificado na espécie em estudo através do teste em CCDC revelada com solução de β-caroteno para as subfrações obtidas da fase AcOEt do extrato etanólico das folhas e ramos de *Chrysophyllum flexuosum*. A obtenção do ácido gálico a partir da fração AcOEt corroborou a verificação de atividade antioxidante para o extrato bruto das folhas de *C. flexuosum* e para a fração AcOEt.

A substância **1** (lactona triterpênica) apresentou baixa atividade frente ao fungo patogênico humano *Candida albicans* e atividade anticolinesterásica. Também mostrou moderada atividade frente ao fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans*.

A substância **8** (ácido gálico) apresentou baixa atividade frente aos fungos patogênicos humanos *Candida albicans*, *C. krusei* e atividade anticolinesterásica. Também mostrou moderada atividade frente ao fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum* e ao patógeno humano *Cryptococcus neoformans.*

7. REFERÊNCIAS

AHN, K.–S.; HAHM, M. S.; PARK, E. J.; LEE, H.–K.; KIM, I.–H. Corosolic acid isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida* var. psilosois a protein kinase C inhibitor as well as a cytotoxic agent. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 468-470, 1998.

AINA, J. O.; ADESINA, A. A. Suitability of frozen indigenous tropical fruits for jam processing. **Advances in Food Sciences**, v. 21, n. 1/2, p. 15-18, 1999.

AJIWE, V. I. E.; OKEKE, C. A.; NNABUIKE, B.; OGUNLEYE, G. A.; ELEBO, E. Applications of oils extracted from african star apple (*Chrysophyllum africanum*), horse eye bean (*Mucuna sloanei*) and african pear (*Dacryodes edulis*) seeds. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 2/3, p. 259-261, 1997.

ALAOUI, A.; CHARROUF, Z.; SOUFIAOUI, M.; CARBONE, V.; MALORNI, A.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Triterpenoid saponins from the shells of *Argania spinosa* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4600-4603, 2002.

ARMSTRONG, W. P. ***Chrysophyllum cainito***. Disponível em: <http://waynesword.palomar.edu/images/starap1b.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

THE BANANA TREE. ***Chrysophyllum cainito***. Disponível em: <http://www.banana-tree.com/catalog%20images/image408.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

BERROUGUI, H.; ETTAIB, A.; GONZALEZ, M. D. H.; DE SOTOMAYOR, M. A.; BENNANI-KABCHI, N.; HMAMOUCHI, M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in meriones shawi rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 15-18, 2003.

BORING, C. C.; SQUIRES, T. S.; TONG, T. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 44, n. 1, p. 7-26, 1994.

BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L. A.; FRANCOIS, G.; NARAYANAN, A. S. S.; PETERS, K.; PETERS, E. M. Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus,* antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. **Planta Medica**, v. 63, n. 3, p. 255-257, 1997.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck index**. 12th ed. Whitehouse Station: Merck, 1996. p. 1686-1687.

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

CAPE TRIB. ***Pouteria caimito***. Disponível em: <http://www.capetrib.com.au/images/abiuonplate.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

CIRAD, G. C. ***Manilkara zapota***. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/_derived/Ficha%20Manilkara%20zapota.htm_txt_gc-sapotille.gif>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

CORDEIRO, R. V. do A.; NUNES, C. R. A. **Plantas que curam**. São Paulo: Grupo de Comunicação Três, 1996. 390 p.

DAS, M. C.; MAHATO, S. B. Triterpenoids. **Phytochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1071-1095, 1983.

DI STASI, L. C. (Org.) **Plantas medicinais**: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. da UNESP, 1996.

EL KABOUSS, A.; CHARROUF, Z.; FAID, M.; GARNEAU, F.; COLLIN, G. Chemical composition and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Argania spinosa* L. skeels. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 2, p. 147-149, 2002.

EVERS, M.; POUJADE, C.; SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.; LELIEVRE, Y.; GUEGUEN, J. C.; REISDORF, D.; MORIZE, I.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; HENIN, Y.; BOUSSEAU, A.; MAYAUX, J. F.; LE PECQ, J. B.; DEREU, N. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1056-1068, 1996.

FARINES, M.; SOULIER, J.; CHARROUF, M.; CAVE, A. Study of the seed oil from *Argania spinosa* (L.), Sapotaceae 2. Sterols triterpene alcohols and methylsterols. **Revue Française des Corps Gras**, v. 31, n. 11, p. 443-448, 1984a.

FARINES, M.; SOULIER, J.; CHARROUF, M.; SOULIER, R. Study on the seed oil from *Argania spinosa* (L.), Sapotaceae 1. The glyceride fraction. **Revue Francaise des Corps Gras**, v. 31, n. 7/8, p. 283-286, 1984b.

FOUSSARD-BLANPIN, O.; QUEVAUVILLER, A.; POTTIER, J. Cardiochrysin, an alkaloid of *Chrysophyllum perpulchrum*, Sapotaceae. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 23, n. 12, p. 727-731, 1965.

FRUIT LOVER'S NURSERY. ***Chrysophyllum cainito***. Disponível em: <http://www.fruitlovers.com/Starapple4web.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I.-S.; LEE, K.-H. Anti-aids agents. 11. Betulinic acid and platonic acid as anti-HIV principles from *Syzigium-claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 2, p. 243-247, 1994.

FULDA, S.; JEREMIAS, I.; STEINER, H. H.; PIETSCH, T.; DEBATIN, K.-M. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. **International Journal of Cancer**, v. 82, n. 3, p. 435-441, 1999.

GAIA YOGA. ***Pouteria caimito***. Disponível em: <http://www.gaiayoga.org/nursery/nursery%20images/abiu-corner69.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, v. 13, n. 4, p. 265-273, 1996.

GUNDRAN, A. L.; GONZALES, R.; LOPEZ, A. G.; QUIROZ, M. V. B.; ORONCE, M. C.; MUNOZ, D. S.; ROQUE, M. F.; SALES, P. M.; LASAM, L. L. Phytochemical screening of the exorcarp of papaya (*Carica p*apaya), pineapple (*Anonas c*omosus) and star apple (*Chrysophyllum cainito*). In: ACS NATIONAL MEETING, 222nd, 2001, Chicago. **Abstracts of papers**. Washington, DC: American Chemical Society, 2001. p. MEDI-135.

HARRY, R. G. **Cosmetic materials**: their origin, characteristics, uses, and dermatological action. New York: Chemical Publishing, 1973. 479 p.

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.

INFORMAÇÃO científica: biomas. In: BASE DE DADOS TROPICAL. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/sci?sci.biom>. Acesso em: 12 July 2003a.

INFORMAÇÃO científica: flora do cerrado do estado de São Paulo. In: BASE DE DADOS TROPICAL. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/cerrado/flora/sp/>. Acesso em: 12 July 2003b.

INFORMAÇÃO científica: biomas, cerrado. In: BASE DE DADOS TROPICAL. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/sci?sci.biom.cerr>. Acesso em: 12 July 2003c.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros**: cerrado. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>. Acesso em: 12 jul. 2003a.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros**: mata atlântica. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm>. Acesso em: 12 jul. 2003b.

JAHAN, N.; AHMED, W.; MALIK, A. Lupene-type triterpene from *Mimusops elengi.* **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 255-257, 1995.

JAHAN, N.; MALIK, A.; AFZA, N.; CHOUDHARY, M. I.; SHAHZAD-Ul-HASSAN, S. Triterpenes from *Mimusops elengi.* **Zeitschrift fuer Naturforschung B: Chemical Sciences**, v. 55, n. 12, p. 1206-1210, 2000.

JAHAN, N.; MALIK, A.; MUSTAFA, G.; AHMAD, Z.; AHMAD, S.; ANIS, E.; MALIK, S.; SHUJAAT, S.; AFZA, N.; RAHMAN, ATTA-UR. Triterpenes from *Mimusops elengi*. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 3, p. 177-185, 2001.

JIANG, Y. I.; ALI, A. O.; GUILLAUME, D.; WENIGER, B.; ANTON, R. Triterpenoid saponins from the root of *Sideroxylon cubense.* **Phytochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1013-1015, 1994.

KASHIWADA, Y.; HASHIMOTO, F.; COSENTINO, L. M.; CHEN, C. H.; GARRETT, P. E.; LEE, K. H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1016-1017, 1996.

KING, N. M. Preliminary chemical analysis of the leaves of *Chrysophyllum cainito*. **Revista de la Sociedad Venezolana de Química**, n. 30, p. 6-13, 1959.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BECCHI, M.; MISRA, G.; NIGAM, S. K. Saponins from three species of *Mimusops*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 887-893, 1996.

LES FRUITS DE TAHITI ET SES ILES. ***Manilkara zapota***. Disponível em: <http://www.tahitifruits.com/images/originales/images_fruits/Gsapot.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

LI, X. C.; LIU, Y. Q.; WANG, D. Z.; YANG, C. R.; NIGAM, S. K.; MISRA, G. Triterpenoid saponins from *Madhuca butyracea*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 3, p. 827-829, 1994.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 1/2, p. 57-68, 1995.

LUO, X.-D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito L.* (star apple). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1379-1382, 2002.

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

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. Oxiford: Oxford Science Publications, 1994a. 96 p.

MANN, J. Terpenoids. In: MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBONE, J. B. **Natural products**: their chemistry and a biological significance. Essex: Longman, 1994b. cap. 5, p. 289-359.

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

MAYAUX, J.–F.; BOUSSEAU, A.; PAUWELS, R.; HUET, T.; HENIN, Y.; DEREU, N.; EVERS, M.; SOLER, F.; POUJADE, C. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 9, p. 3564-3568, 1994.

MEZZETTI, T.; ORZALESI, G.; BELLAVITA, V. Chemistry of ursolic acid. **Planta Medica**, v. 20, n. 3, p. 244-252, 1971.

MONTEIRO, M. C. M. **Estudo químico dos caules de *Kielmeyera rubriflora Camb.* (*Clusiaceae*)**. 2006. 35 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MORTON, J. F. Star apple. In: _____. **Fruits of warm climates.** Miami: Morton, 1987. p. 408-410. Disponível em: < http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/star_apple.html>. Acesso em: 12 June 2006.

MORTON, J. F.; VOSS, G. L. The argan tree (*Argania sideroxylon*, Sapotaceae), a desert source of edible oil. **Economic Botany**, v. 41, n. 2, p. 221-233, 1987.

MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B. P. Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of Nelumbro nucifera. **Planta Medica**, v. 63, n. 4, p. 367-369, 1997.

NICOLAS, G.; OULAD-ALI, A.; GUILLAUME, D.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; ANTON, R. Triterpenoid saponins from the root of *Sideroxylon foetidissimum.* **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 225-228, 1995.

NIGAM, S. K.; LI, X. C.; WANG, D. Z.; MISRA, G.; YANG, C. R. Triterpenoidal saponins from *Madhuca butyracea.* **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3169-3172, 1992.

OBASI, N. B. B. Analysis of the tasteless seeds of *Chrysophyllum albidum*: nutricional aspects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 56, n. 3, p. 345-349, 1991.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

PARODI, P. W. The french paradox unmasked: the role of folate. **Medical Hypotheses**, v. 49, n. 4, p. 313-318, 1997.

PHUMCHOOSRI, A. ***Mimusops elengi.*** Disponível em: <http://toptropicals.com/pics/garden/06/mimusops_elengi2.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I.-S.; CHAGWEDERA, T. E.; FAMSWORTH, N. R.; CORDELL G. A.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; KINGHOM, A. D.; BROWN, D. M.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; HIEKEN, T. J.; DAS GUPTA, T. K.; PEZZUTO, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human-melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.

PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). **Journal of the Amerian Oil Chemists Society**, v. 61, n. 6, p. 1064-1067, 1984.

RECIO, M. del C.; GINER, R. M.; MANEZ, S.; GUEHO, J.; JULIEN, H. R.; HOSTETTMANN, K.; RIOS, J. L. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from Diospyros leucomelas. **Planta Medica**, v. 61, n. 1, p. 9-12, 1995.

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

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 487-493, 1997.

SAHU, N. P. Triterpenoid saponins of *Mimusops elengi*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 883-886, 1996.

SAHU, N. P.; KOIKE, K.; JIA, Z. H.; NIKAIDO, T. Triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1145-1149, 1997.

SEN, S.; SAHU, N. P.; MAHATO, S. B. Pentacyclic triterpenoids from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 205-207, 1995.

SHAH, P. J.; GANDHI, M. S.; SHAH, M. B.; GOSWAMI, S. S.; SANTANI, D. Study of *Mimusops elengi* bark in experimental gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2/3, p. 305-311, 2003.

SILVA, D. H. S. **Busca de micromoléculas antioxidantes e/ou antiinflamatórios em plantas do cerrado e mata atlântica**. Araraquara: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2003. Relatório do Projeto Capes Processo 0768-02-2, 2003.

SILVA, V. C.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Chemical study of leaves of *Chrysophyllum marginatum* (Hook. & Arn.) Radlk (Sapotaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 493-495, 2006.

SINGH, S.; BANI, S.; SINGH, G. B.; GUPTA, B. D.; BANERJEE, S. K.; SINGH, B. Anti-inflamatory activity of lupeol. **Fitoterapia**, v. 68, n. 1, p. 9-16, 1997.

SOLER, F.; POUJADE, C.; EVERS, M.; CARRY, J.-C.; HENIN, Y.; BOUSSEAU, A.; HUET, T.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; MAYAUX, J-F.; LE PECQ, J-B.; DEREU, N. Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency vírus type 1 entry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1069-1083, 1996.

TAHROUCH, S.; ANDARY, C.; RAPIOR, S.; MONDOLOT, L.; GARGADENNEC, A.; FRUCHIER, A. Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. **Acta Botanica Gallica**, v. 147, n. 3, p. 225-232, 2000.

TRADE WINDS FRUIT. ***Mimusops elengi***. Disponível em: <http://www.tradewindsfruit.com/spanish_cherry3.jpg>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

TROPICAL FRUIT PHOTOGRAPHY. ***Chrysophyllum cainito***. . Disponível em: <http://tfphotos.ifas.ufl.edu/Hatian-3.jpg>. Acesso em: 12 de jan. de 2007.

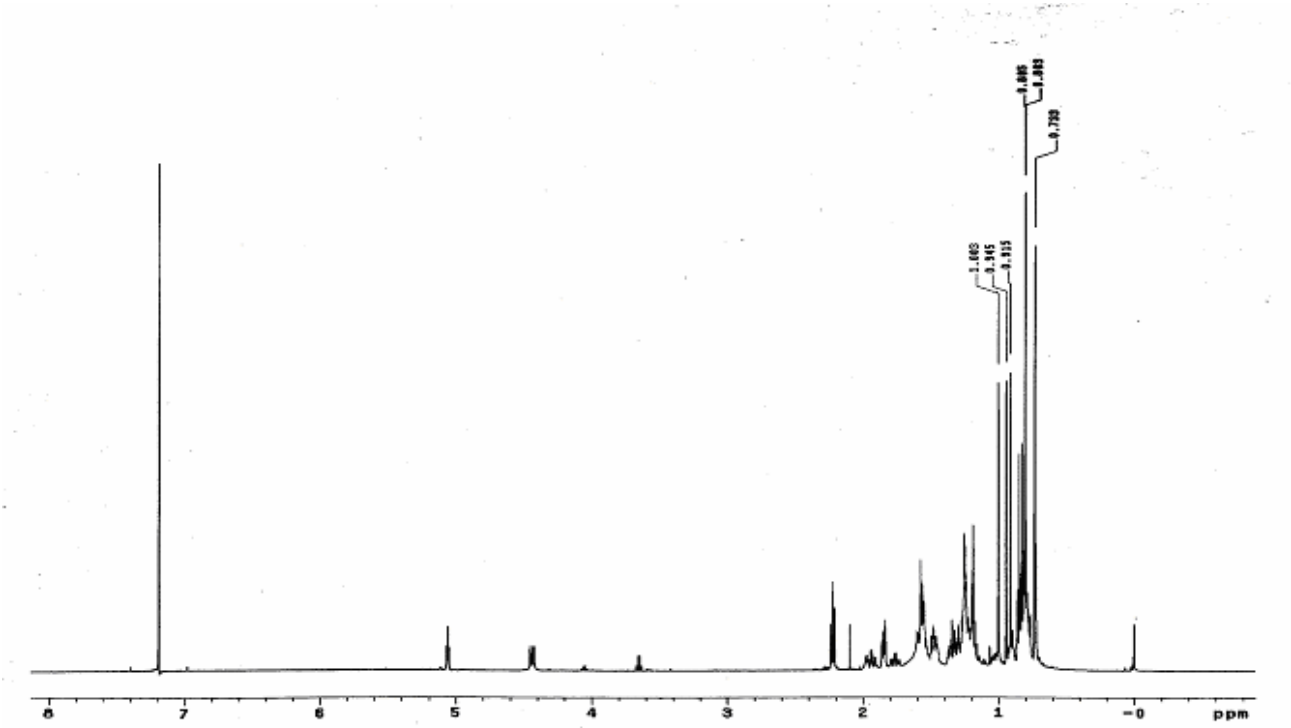
WANDJI, J.; TILLEQUIN, F.; MULHOLLAND, D. A.; WANSI, J.-D.; FOMUM, T. Z.; FUENDJIEP, V.; LIBOT, F.; TSABANG, N. Fatty acid esters of triterpenoids and steroid glycosides from *Gambeya africana*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 822-826, 2002.

WANDJI, J.; TILLEQUIN, F.; MULHOLLAND, D. A.; SHIRRI, J. C.; TSABANG, N.; SEGUIN, E.; VERITE, P.; LIBOT, F.; FOMUM, Z. T. Pentacyclic triterpenoid and saponins from *Gambeya boukokoensis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 4, p. 845-849, 2003.

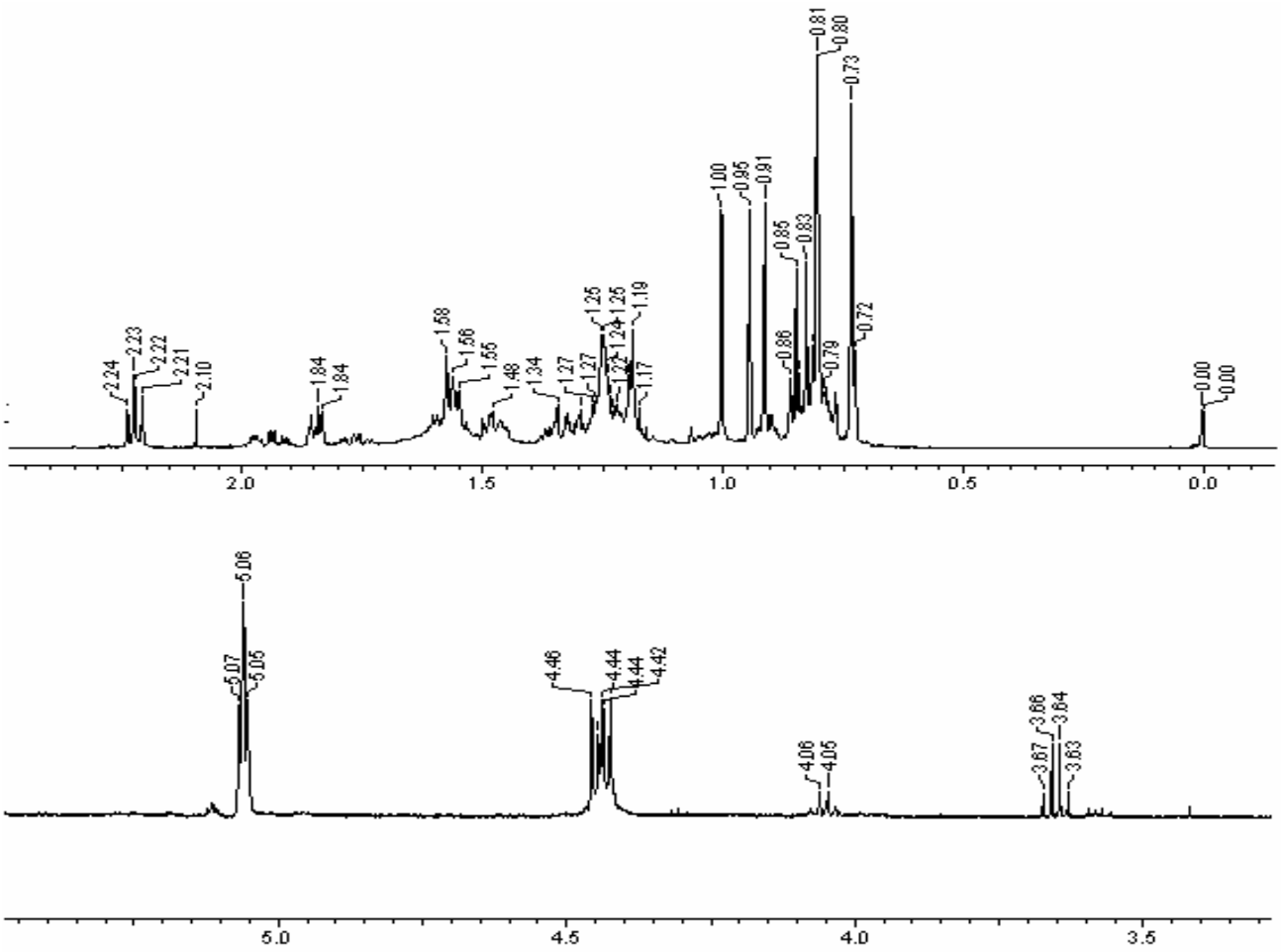
WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y. C.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I.; DEWITT, D. L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 294-296, 1999.

XU, H.-X.; ZENG, F.-Q.; WAN, M.; SIM, K.-Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 7, p. 643-645, 1996.

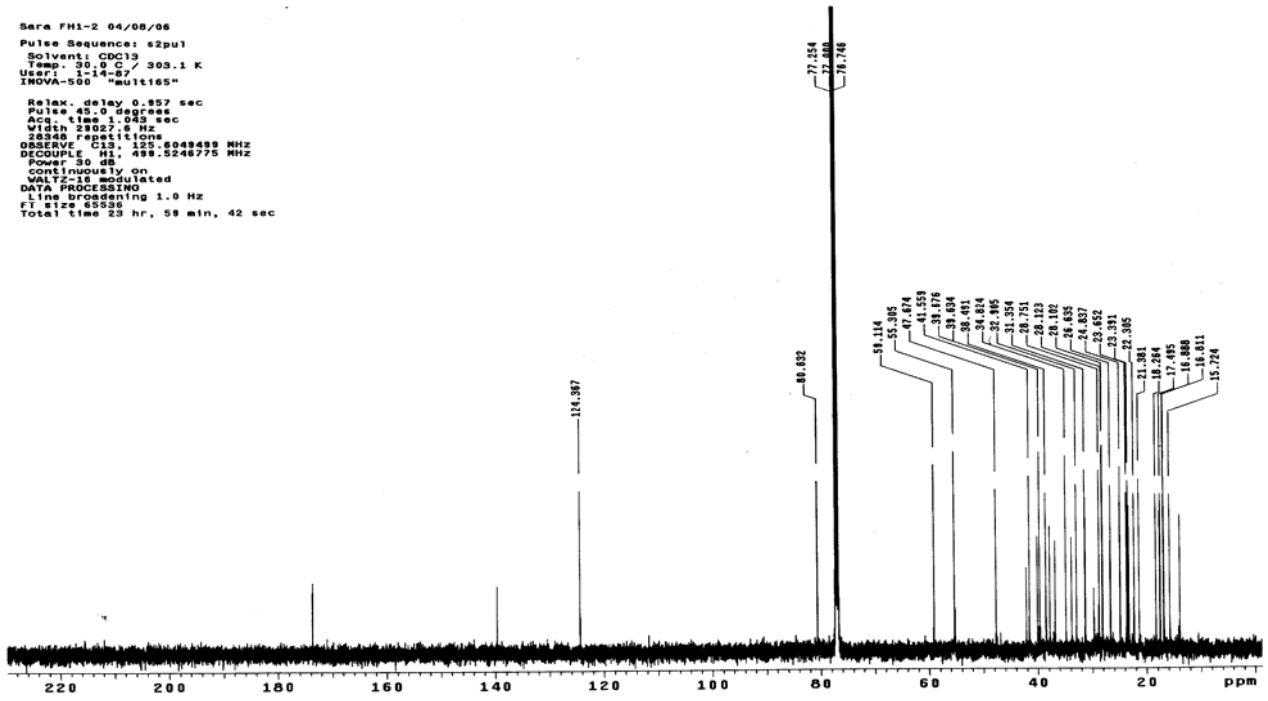
8. ANEXOS



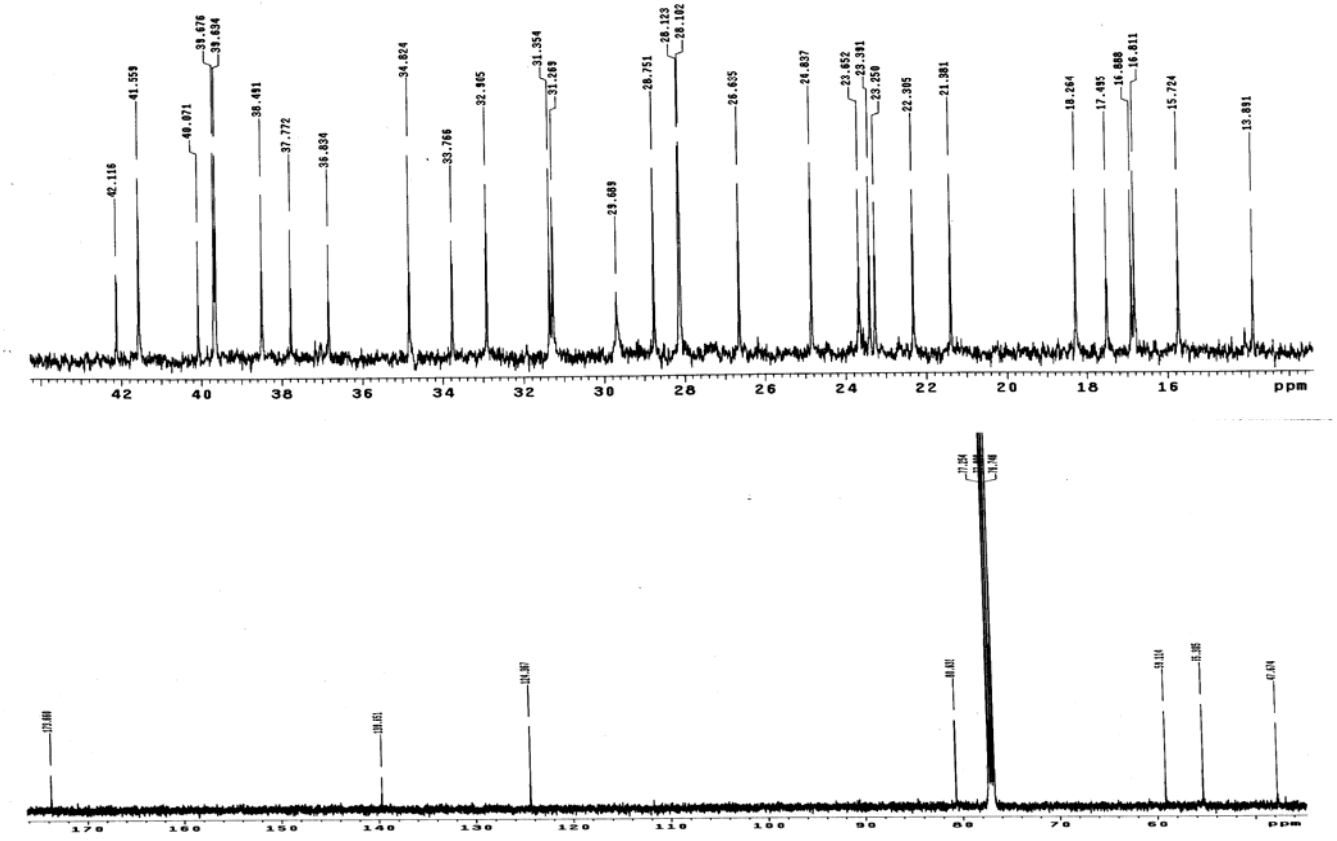
Espectro 1: RMN de ^{1}H da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



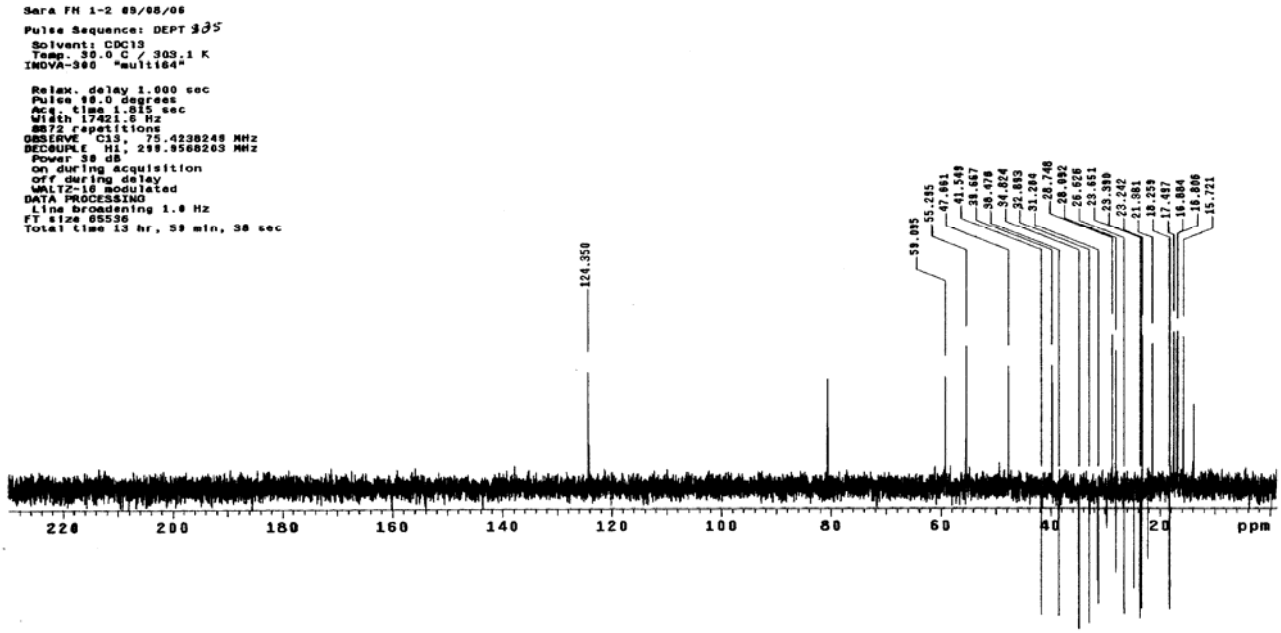
Espectro 2: RMN de ^{1}H ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



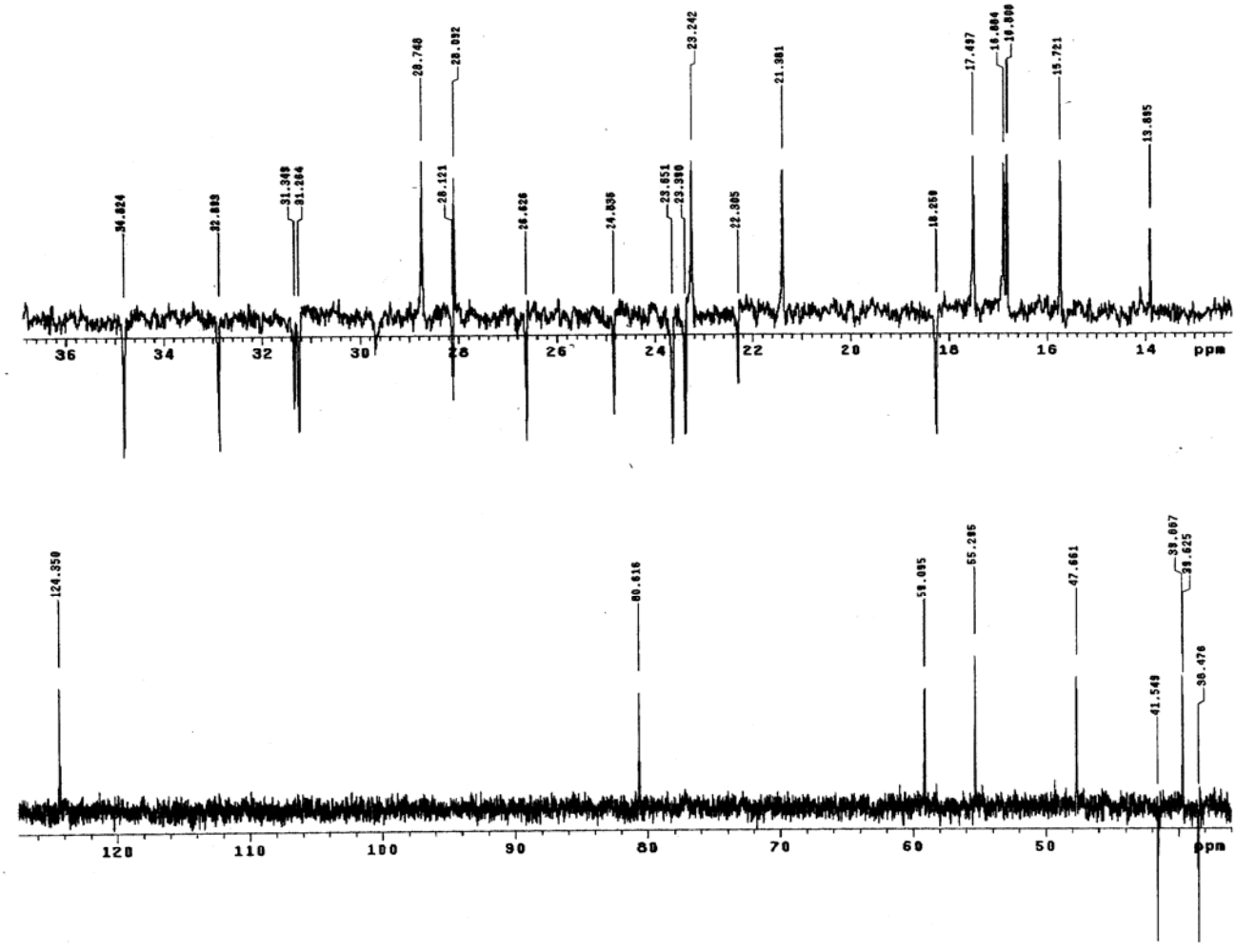
Espectro 3: RMN de ^{13}C da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



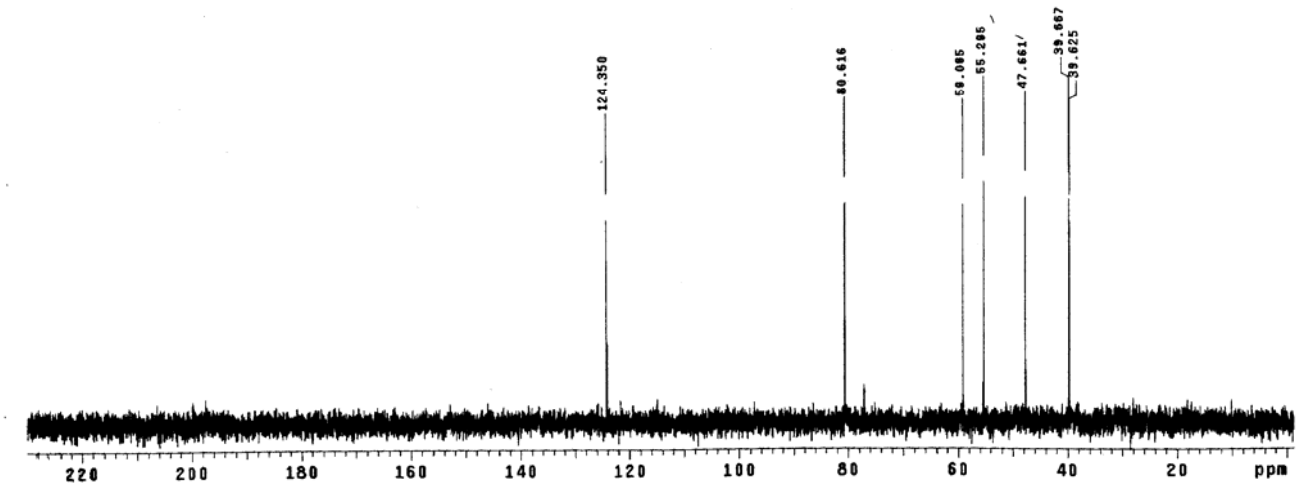
Espectro 4: RMN de ^{13}C ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



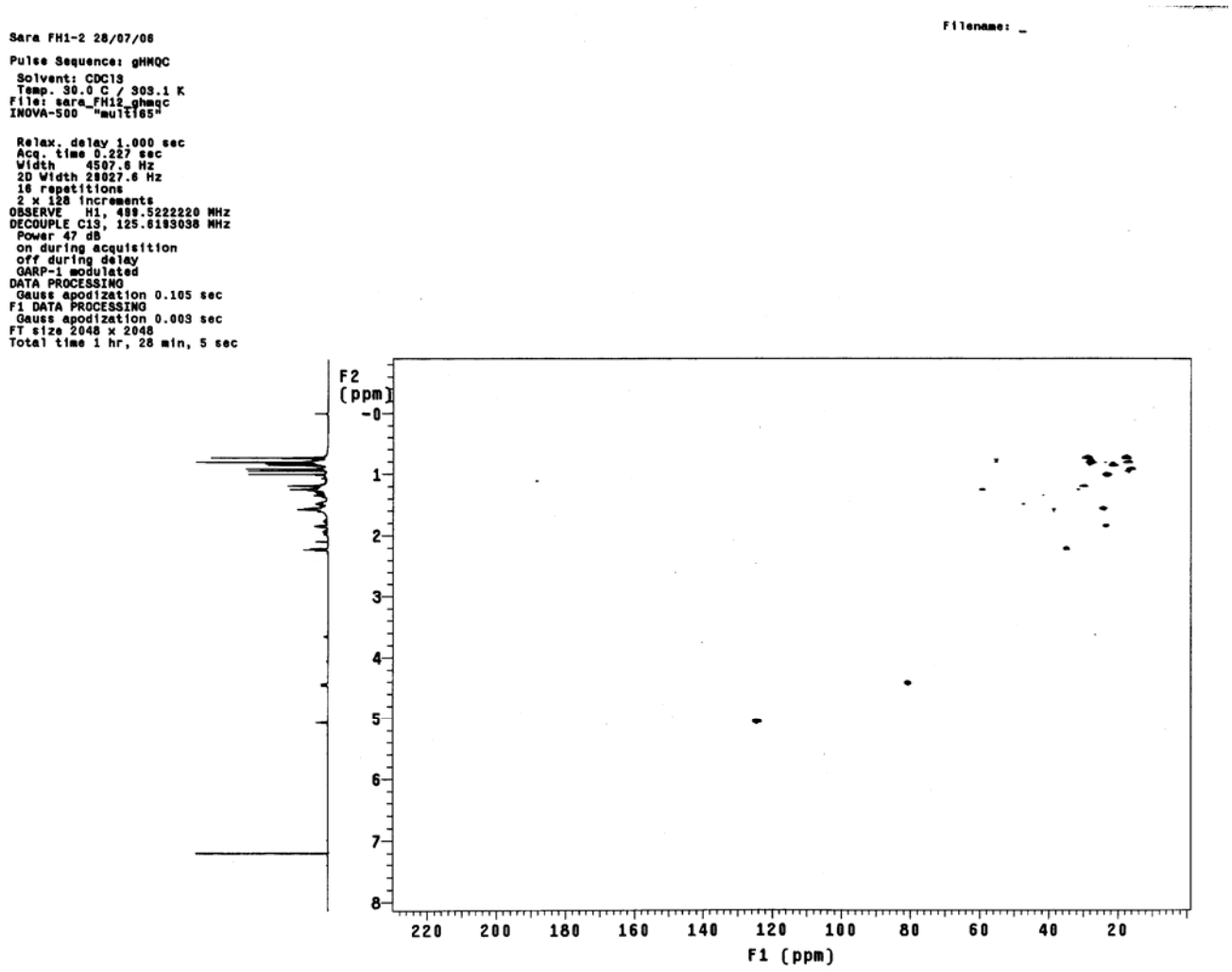
Espectro 5: DEPT 135° da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



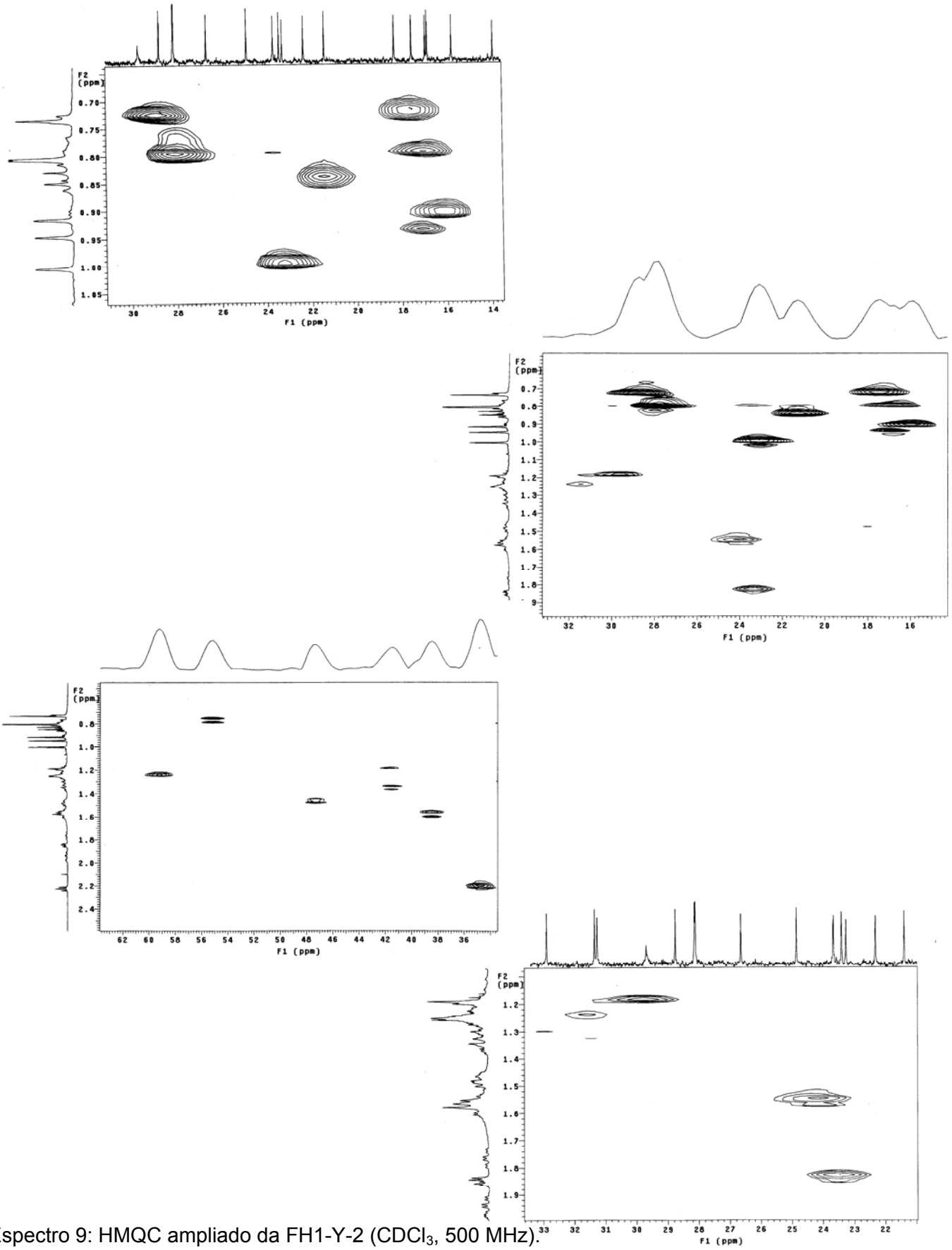
Espectro 6: DEPT 135° ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



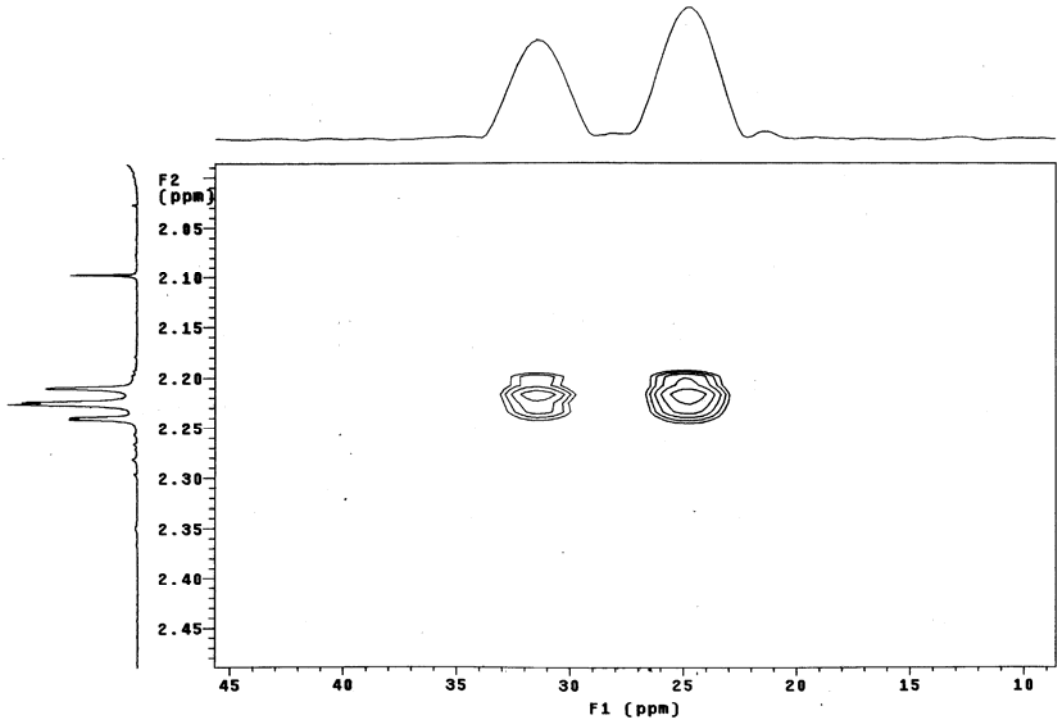
Espectro 7: DEPT 90° da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



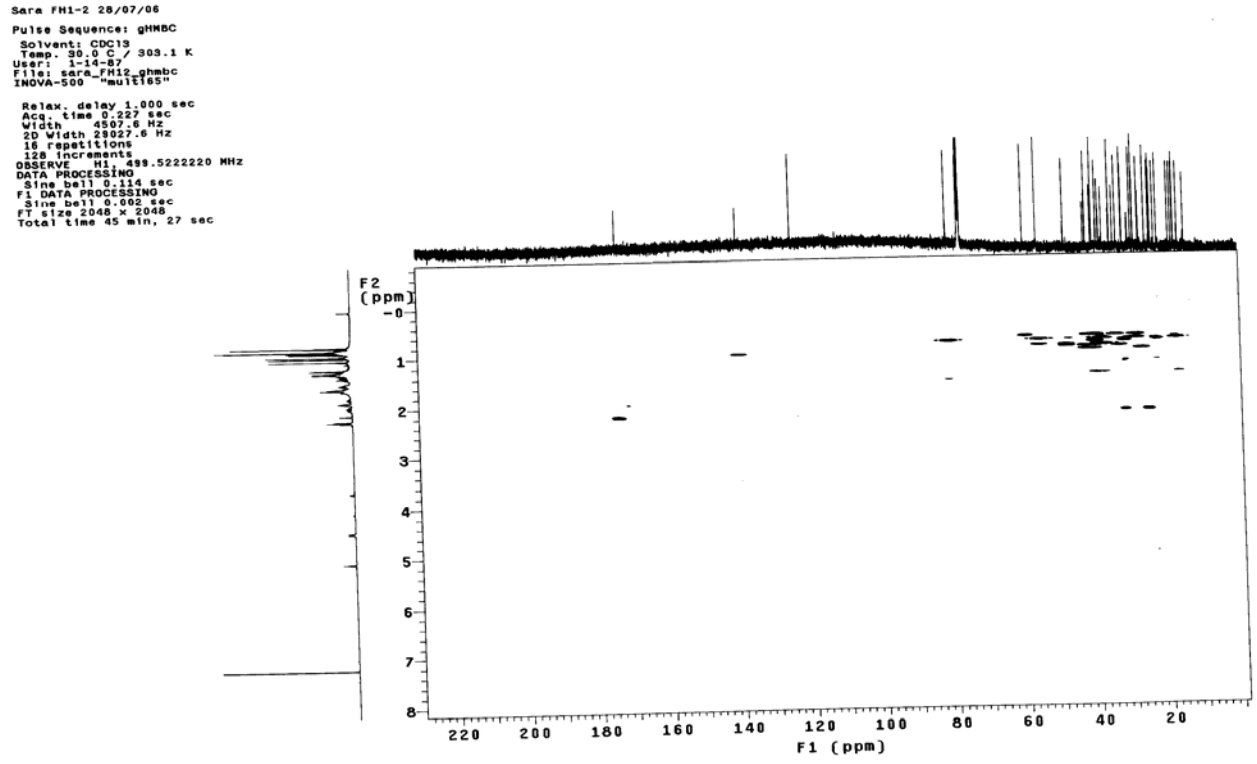
Espectro 8: HMQC da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



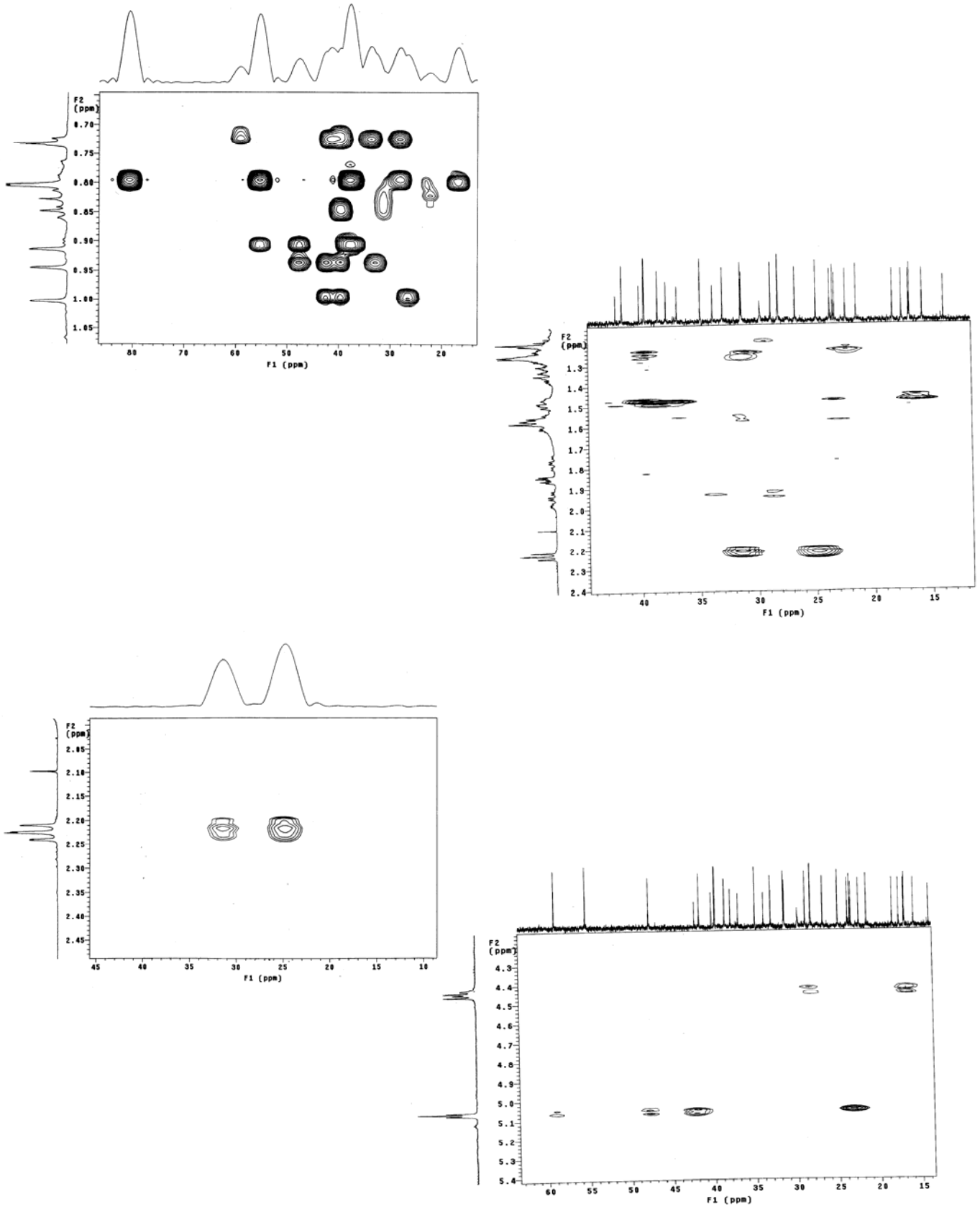
Espectro 9: HMQC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



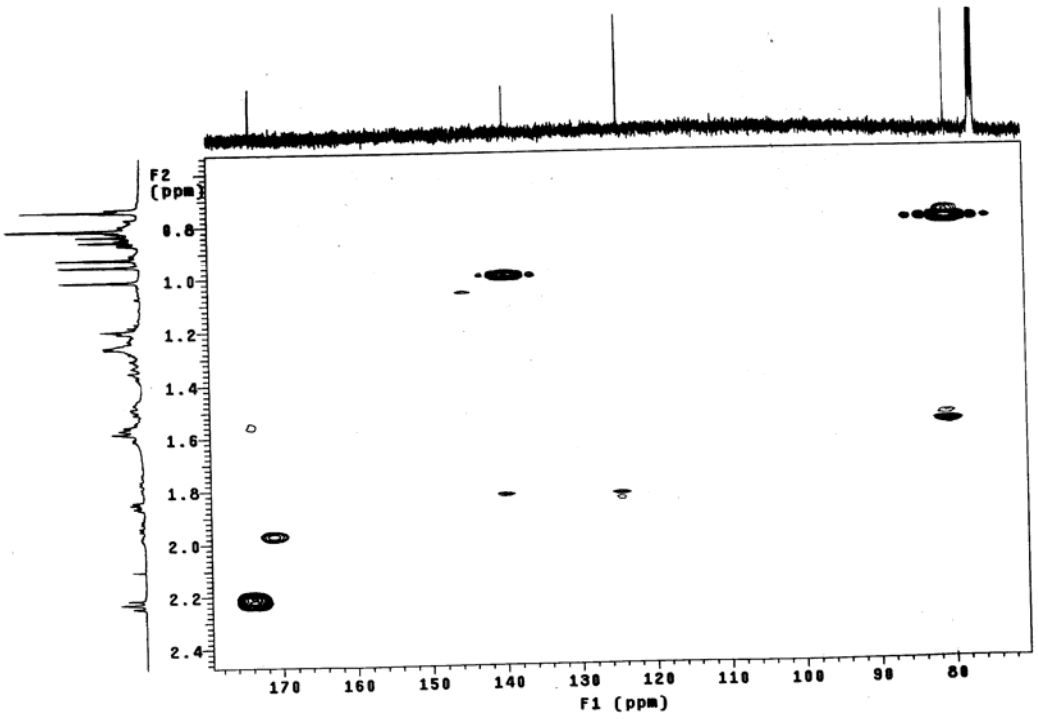
Espectro 10: HMQC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



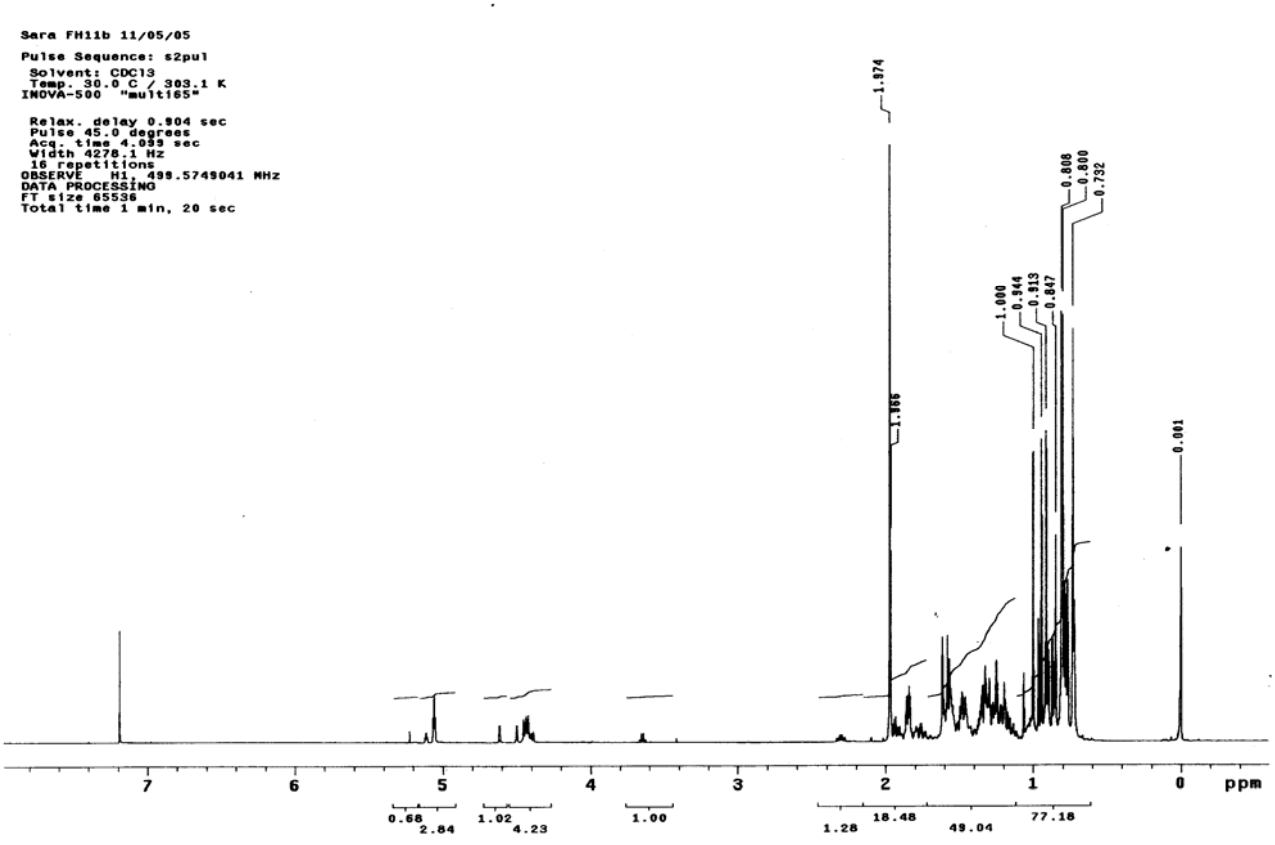
Espectro 11: HMBC da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



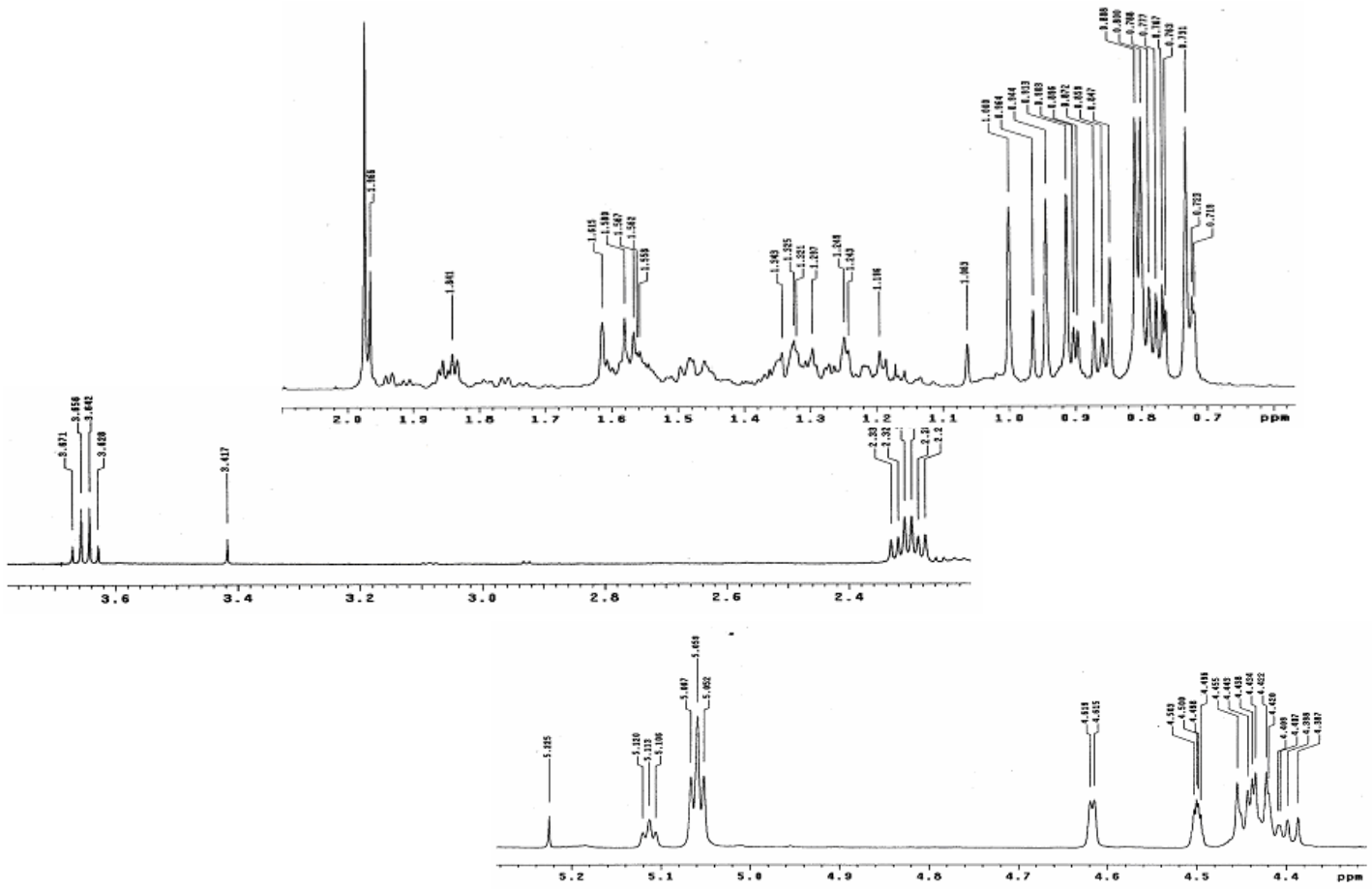
Espectro 12: HMBC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



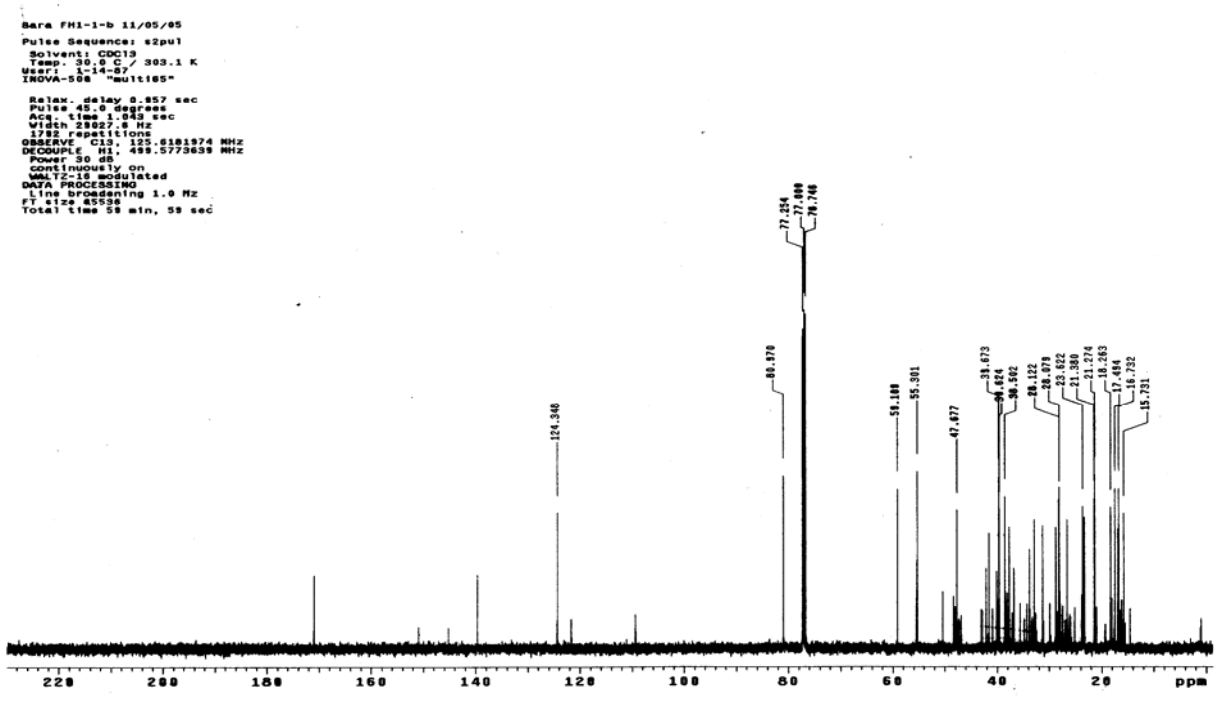
Espectro 13: HMBC ampliado da FH1-Y-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



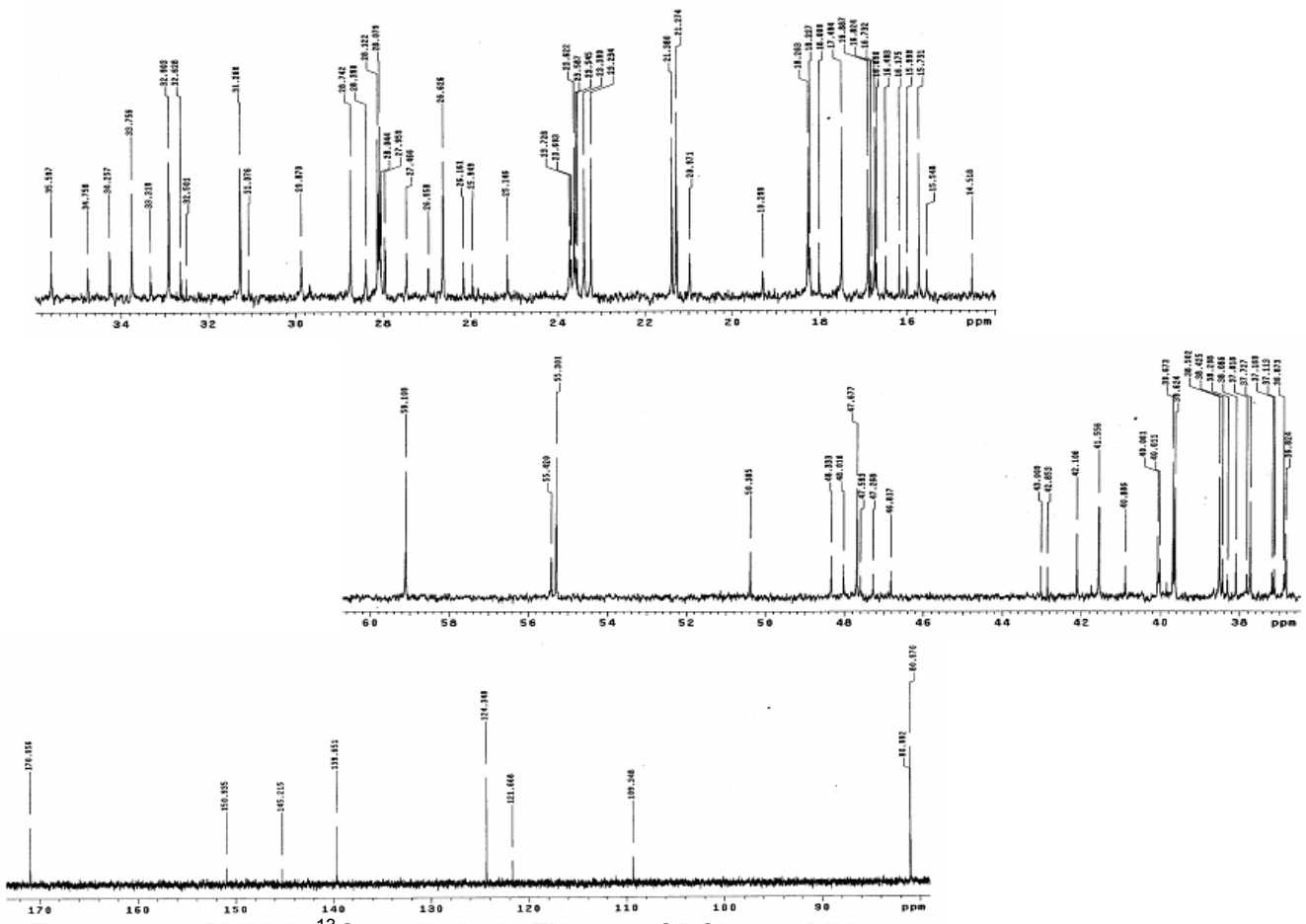
Espectro 14: RMN de ^1H da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



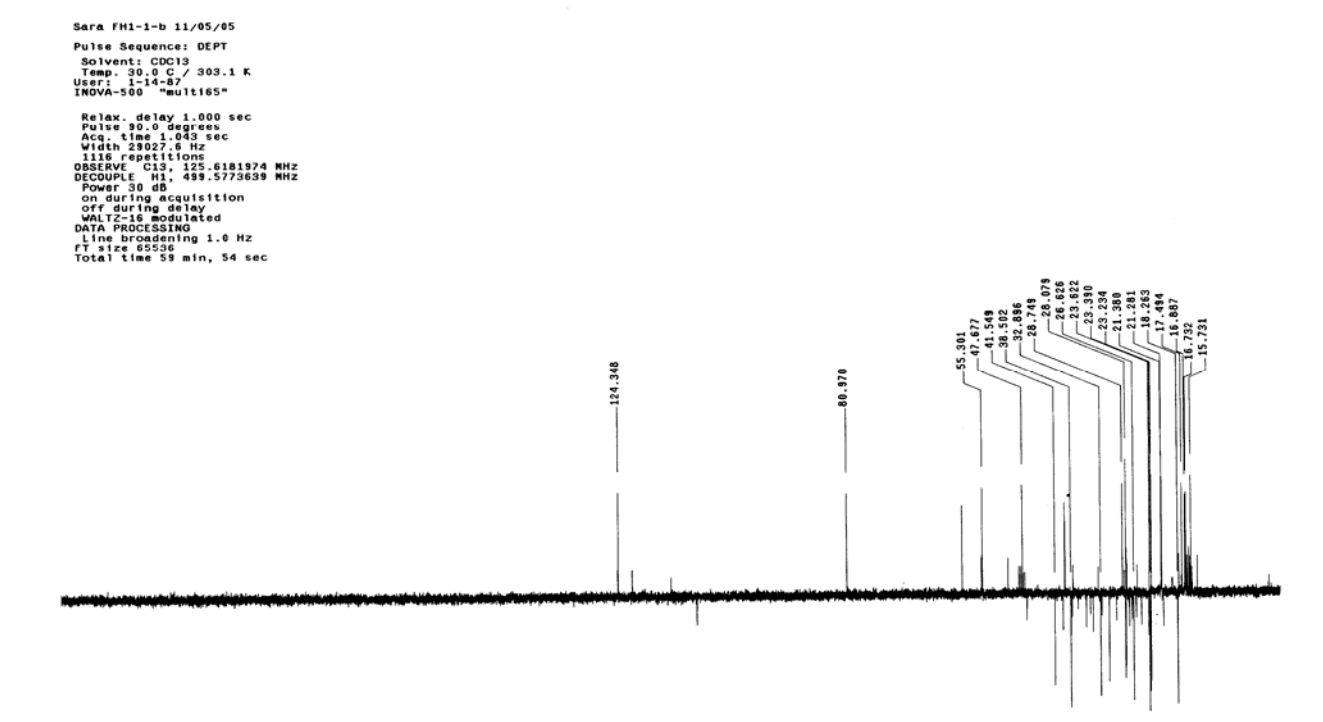
Espectro 15: RMN de ^{1}H ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



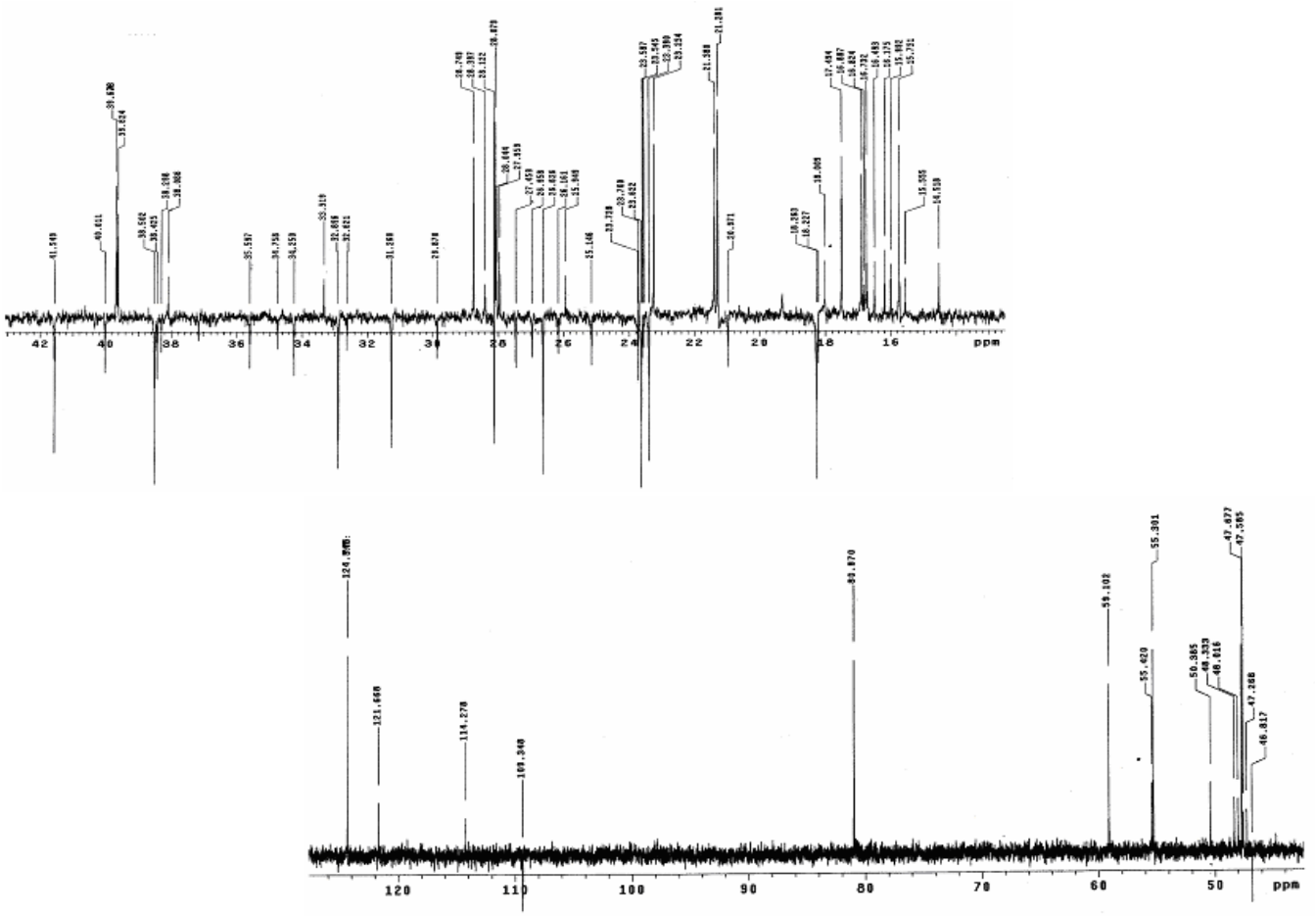
Espectro 16: RMN de ^{13}C da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz).



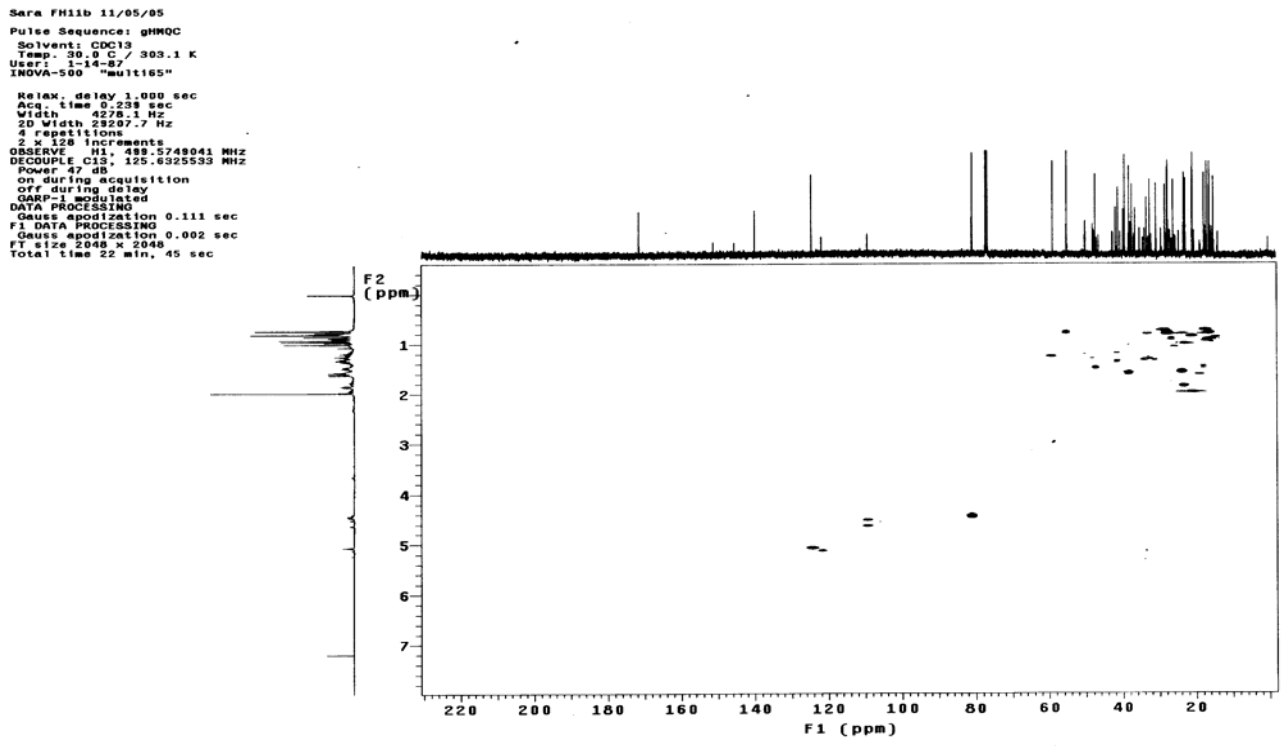
Espectro 17: RMN de ^{13}C ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz).



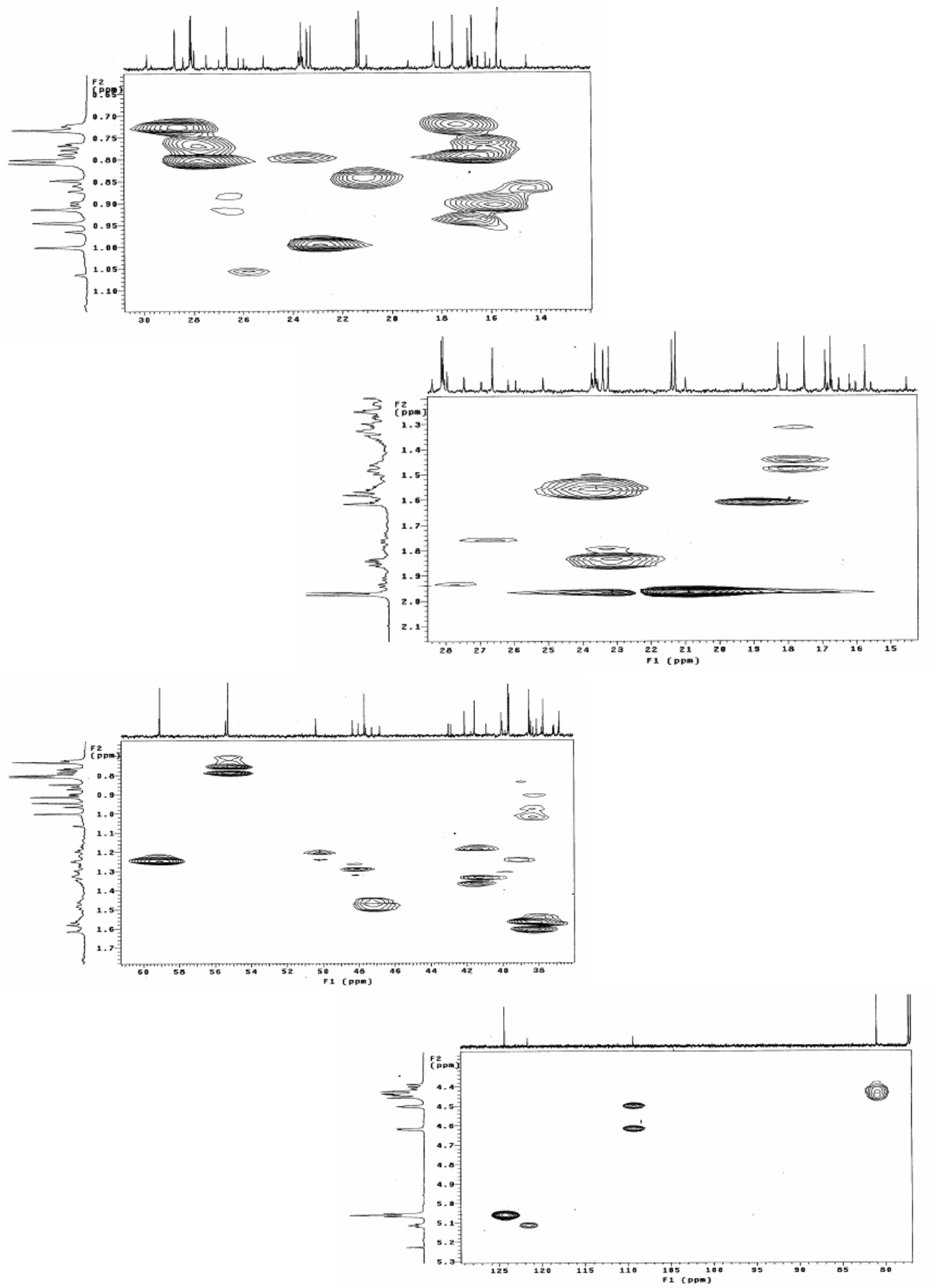
Espectro 18: DEPT 135° da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz).



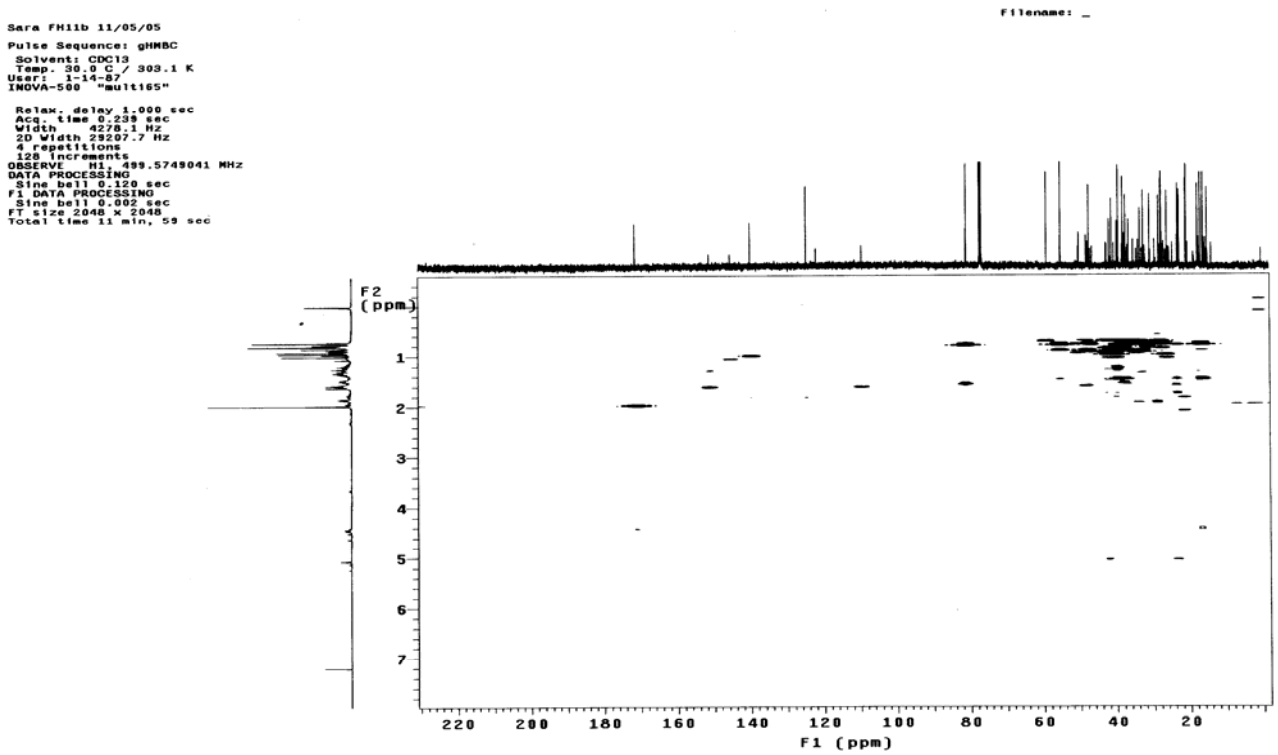
Espectro 19: DEPT 135° ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 125 MHz).



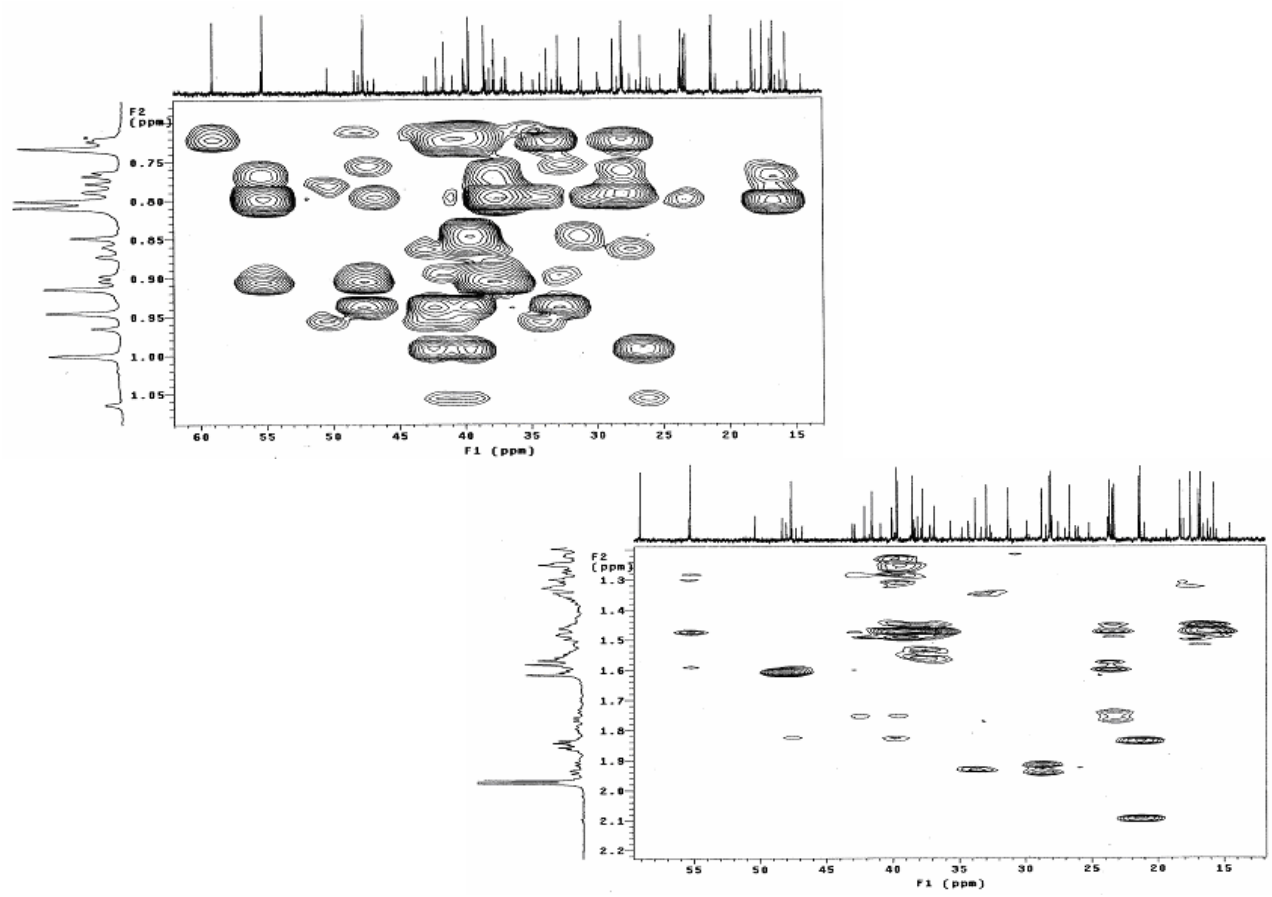
Espectro 20: HMQC da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



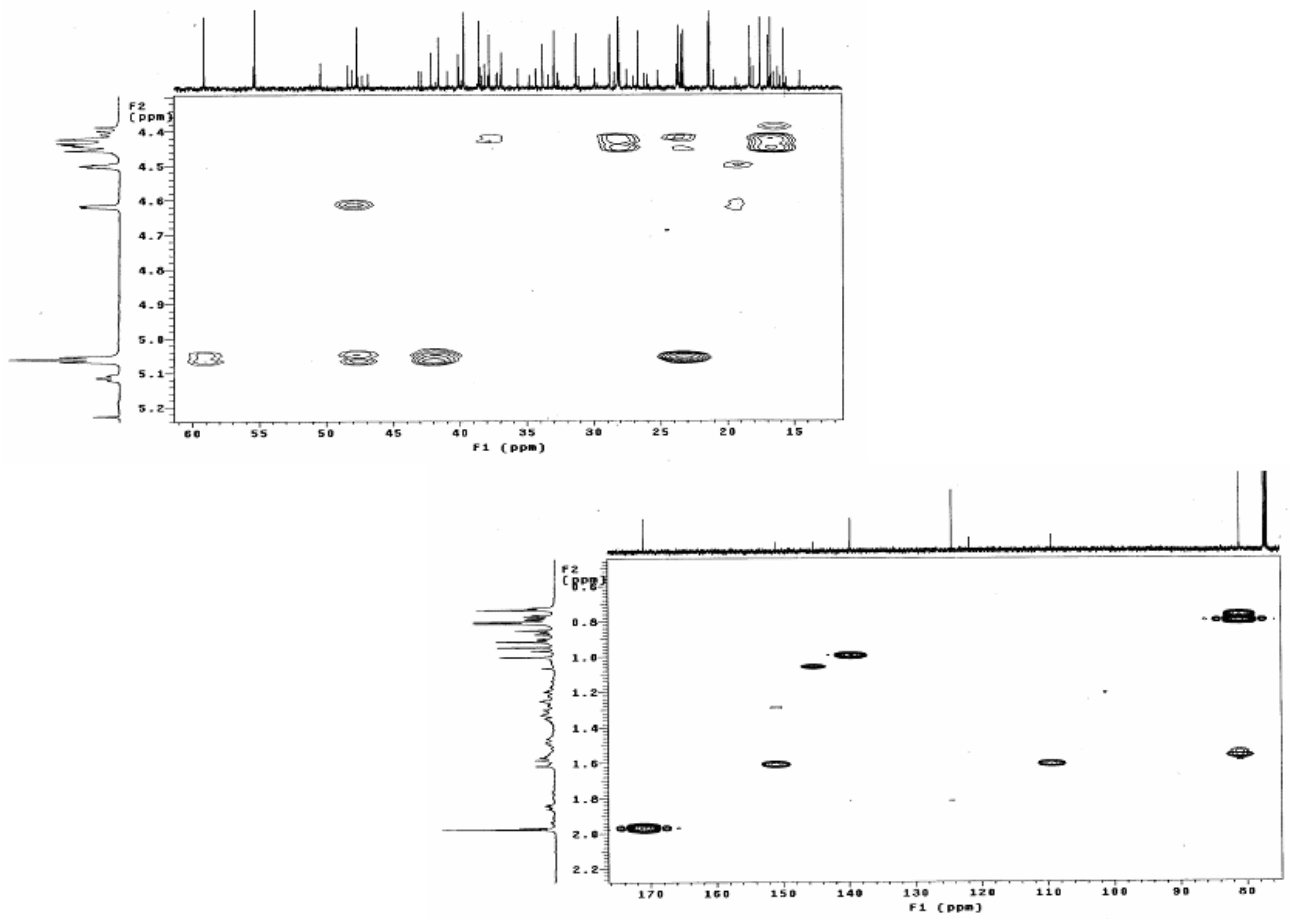
Espectro 21: HMQC ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



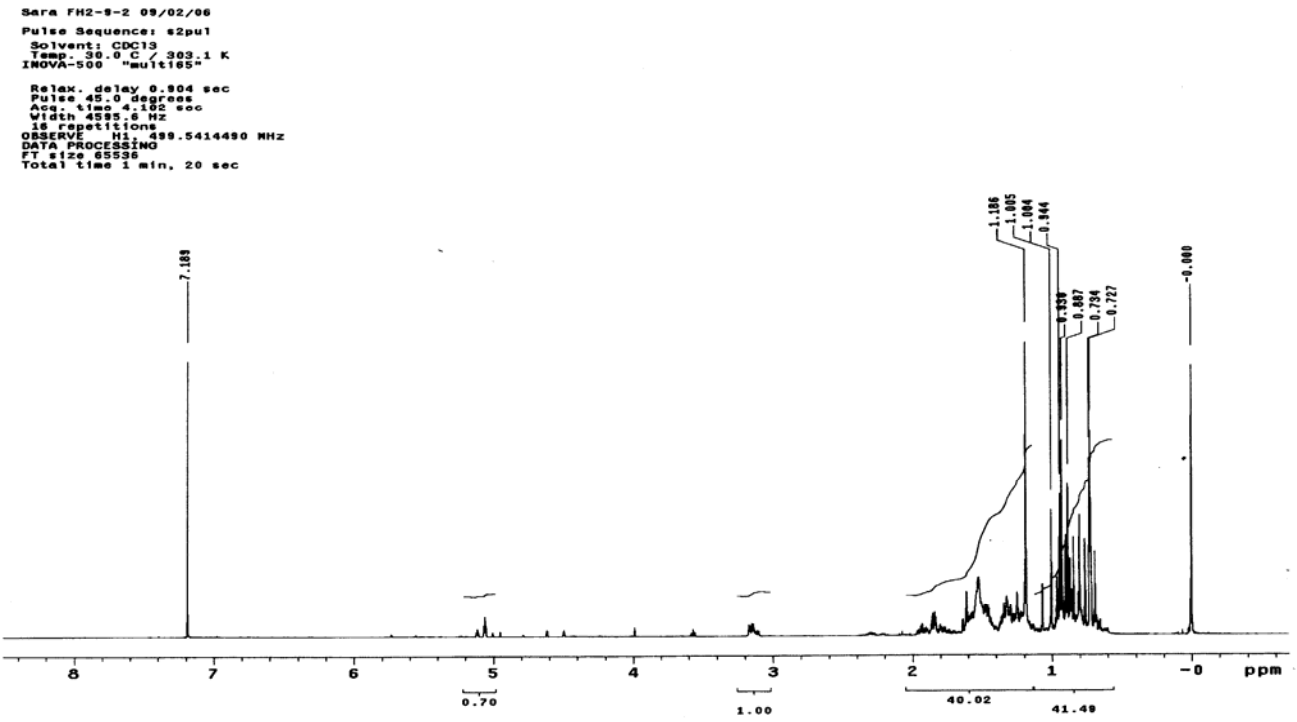
Espectro 22: HMBC da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



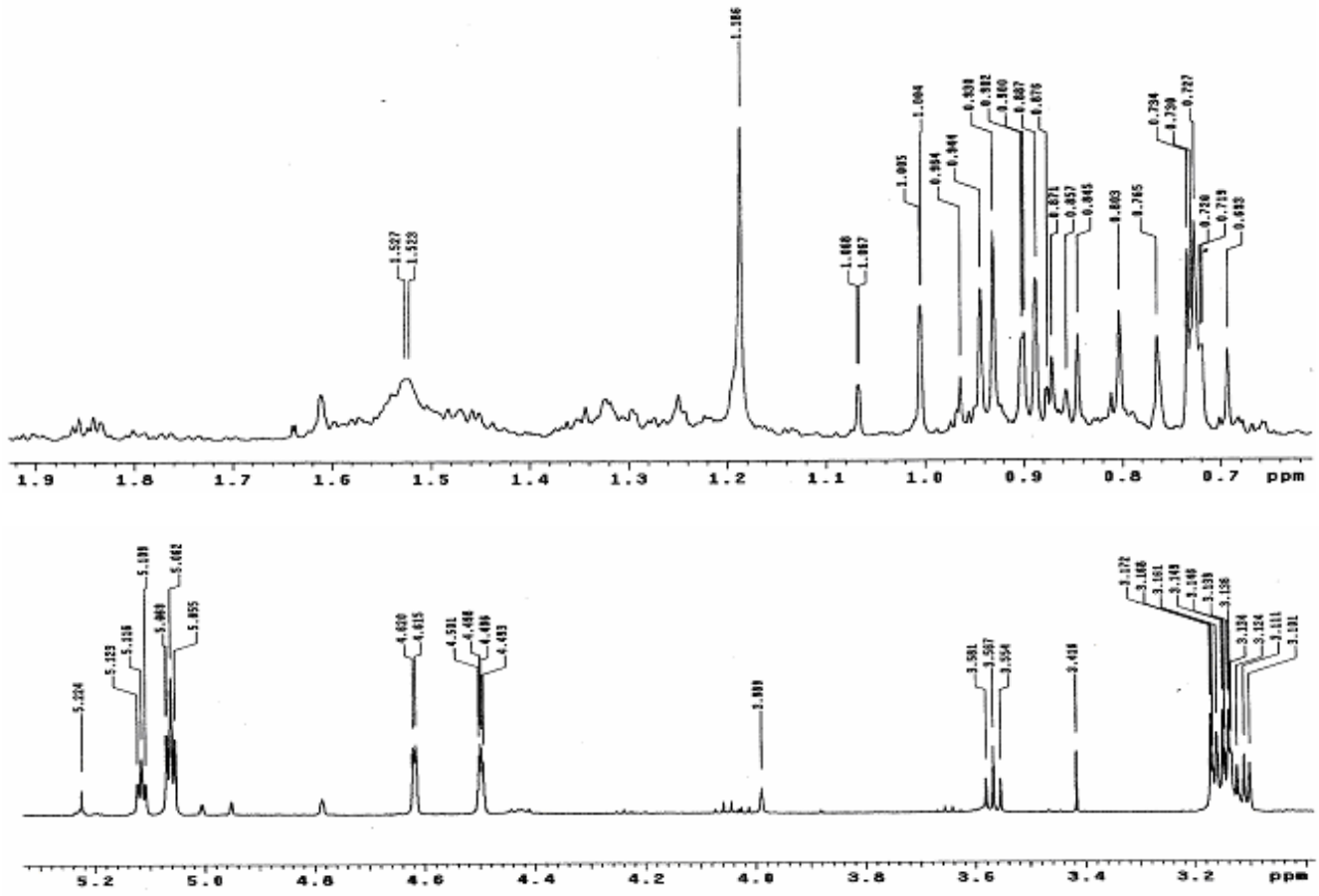
Espectro 23: HMBC ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



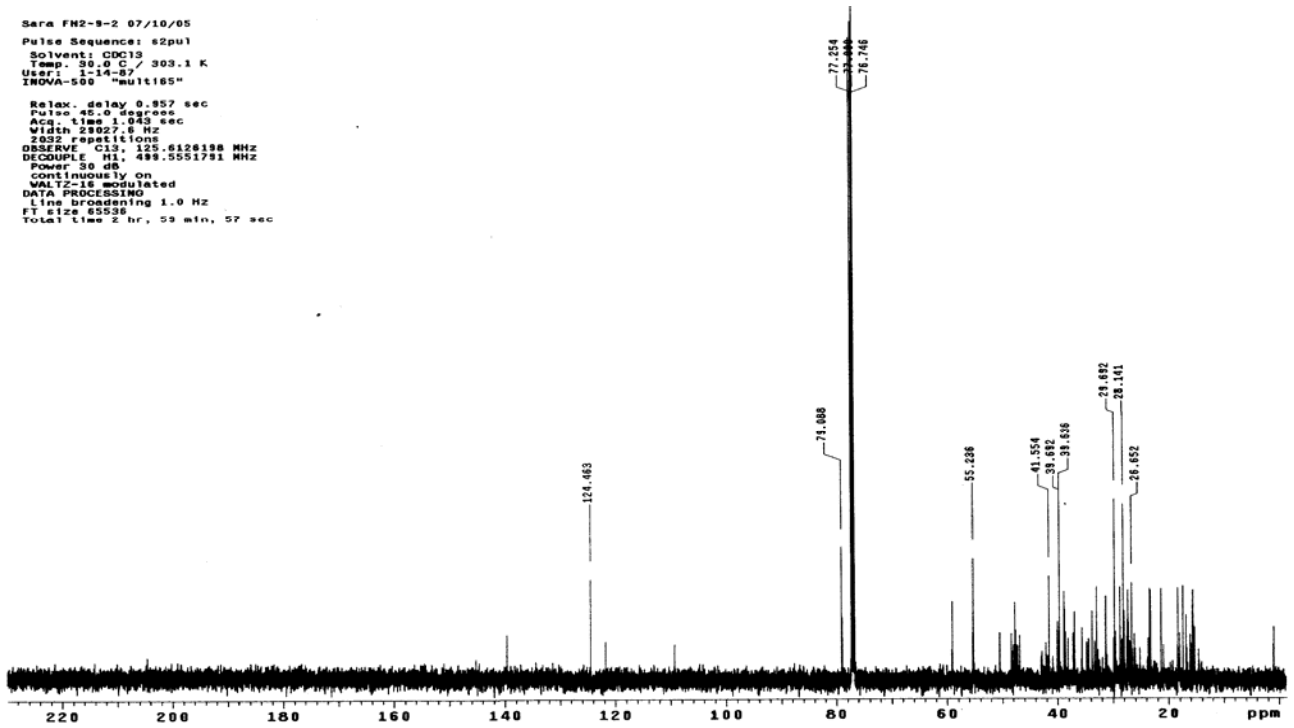
Espectro 24: HMBC ampliado da FH1-1-b ($CDCl_3$, 500 MHz).



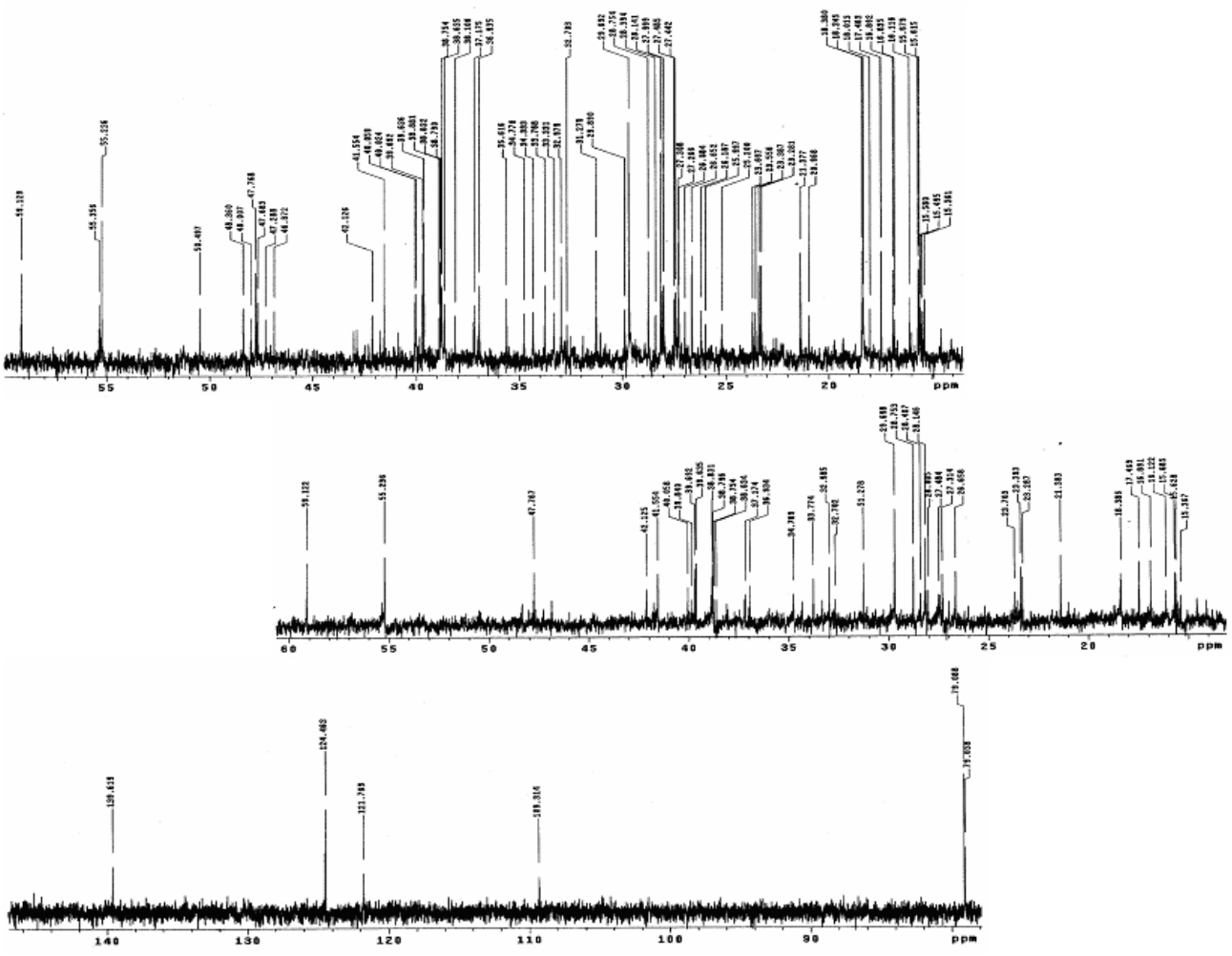
Espectro 25: RMN de ^1H (integração) da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



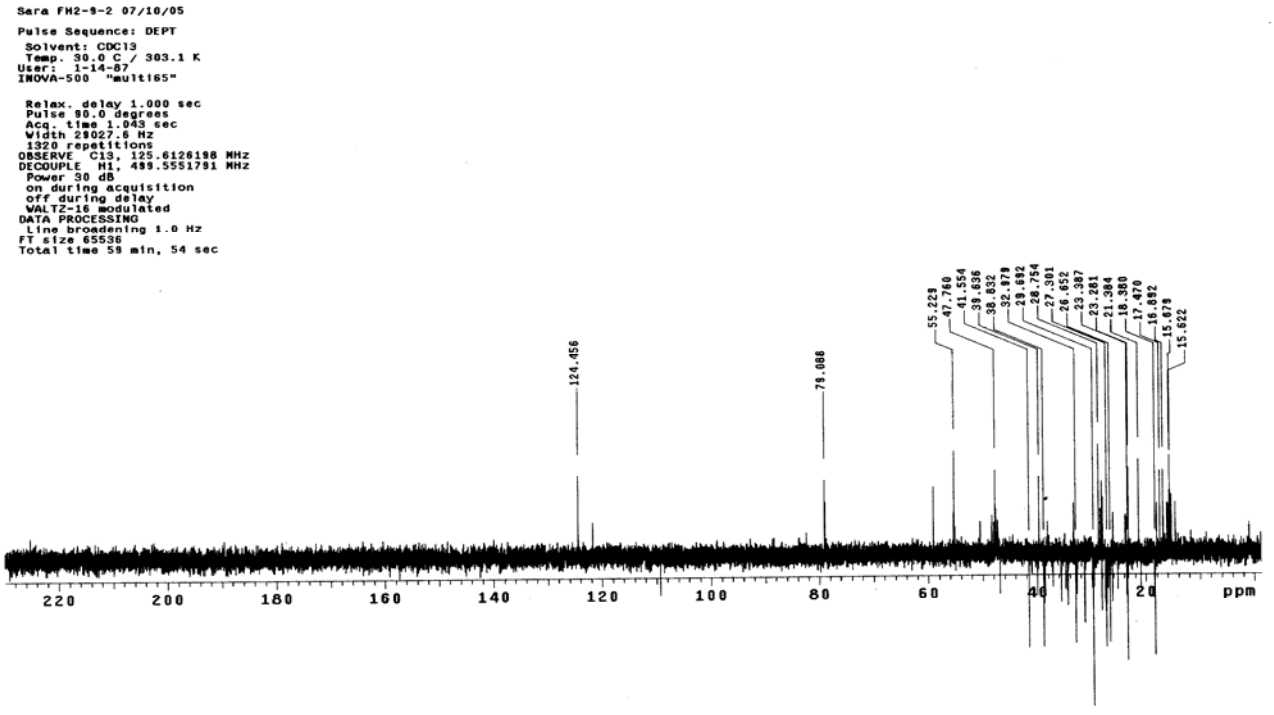
Espectro 26: RMN de ^{1}H ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



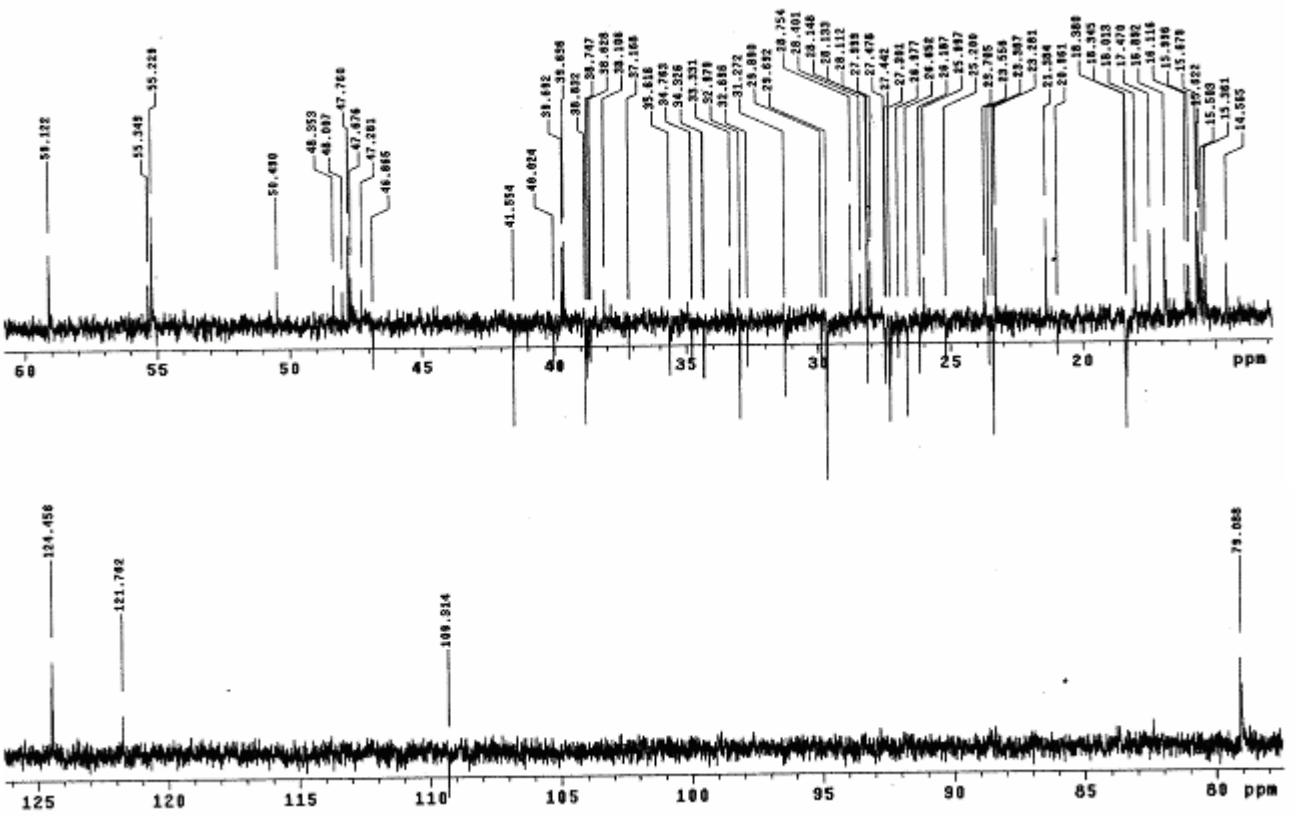
Espectro 27: RMN de ^{13}C da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



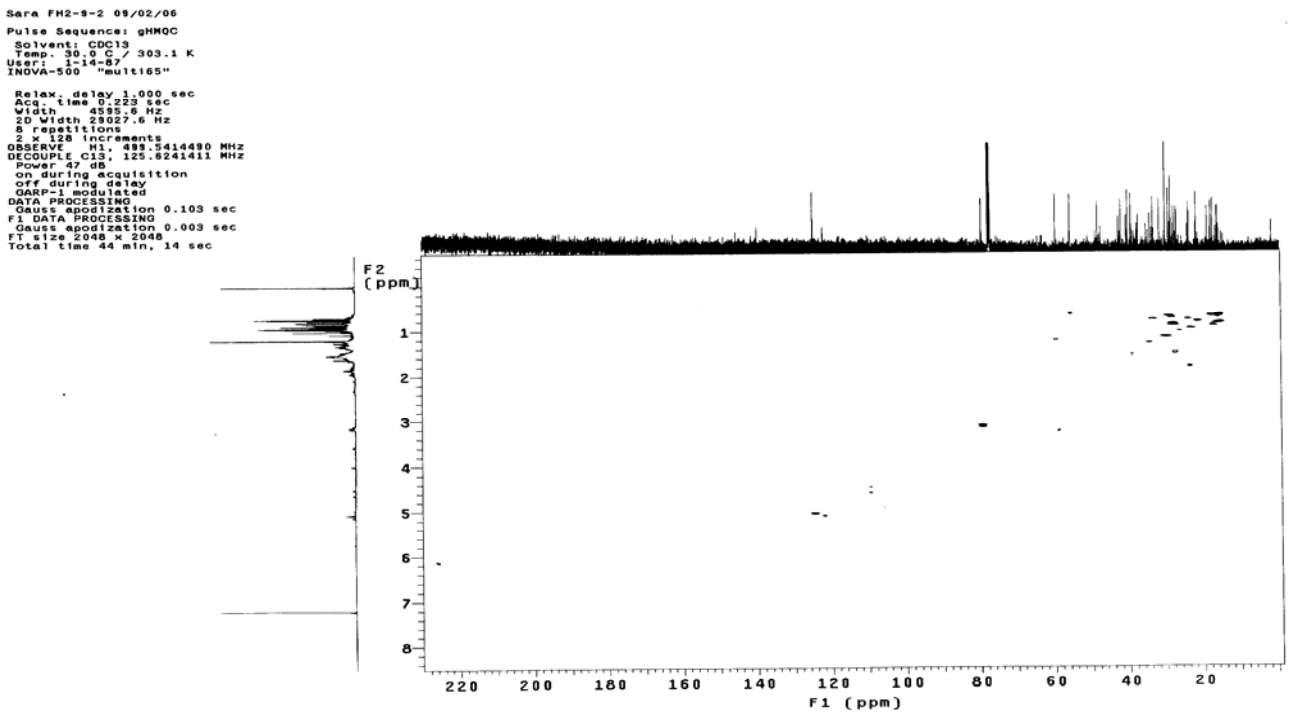
Espectro 28: RMN de ^{13}C ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



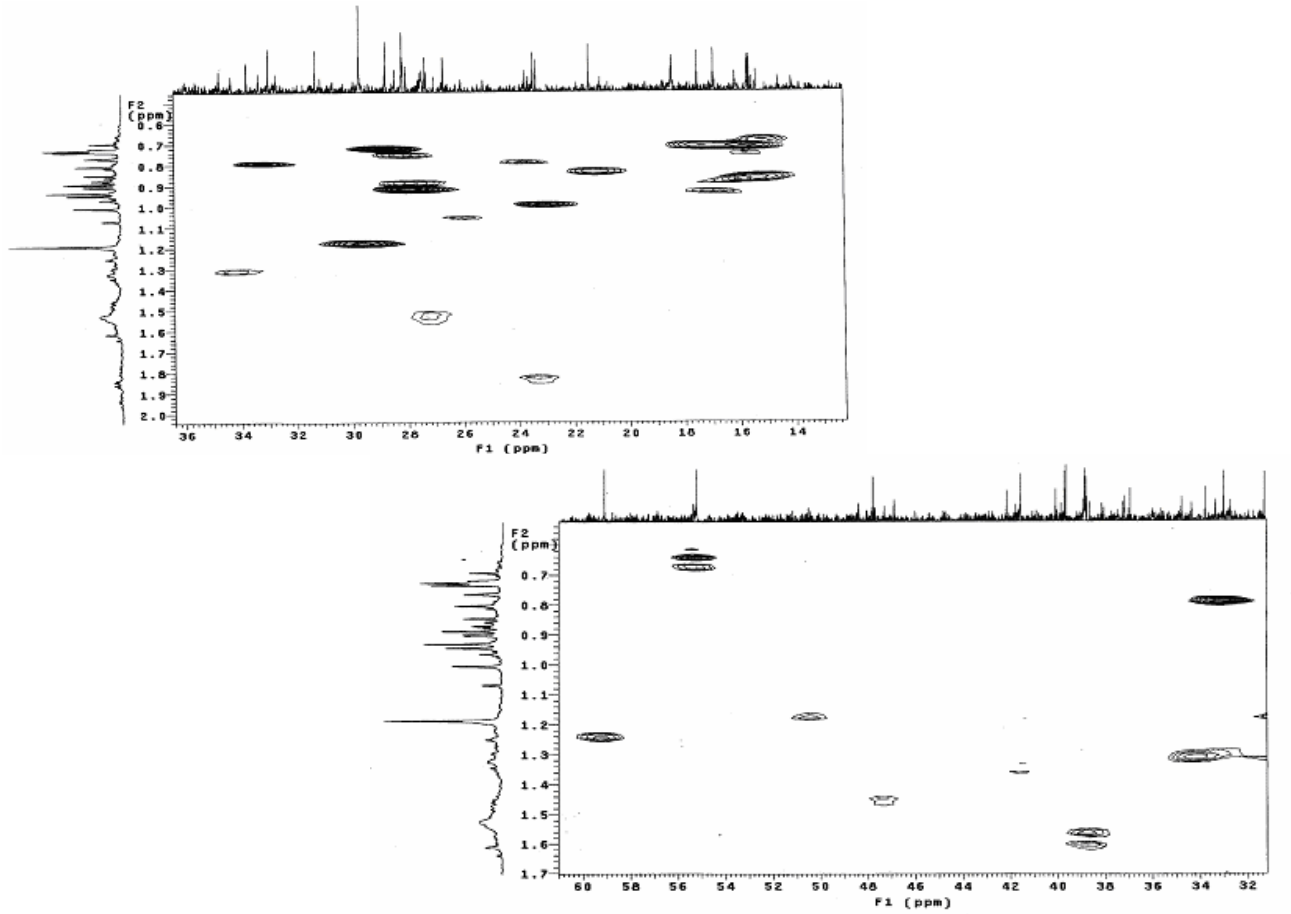
Espectro 29: DEPT 135° da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



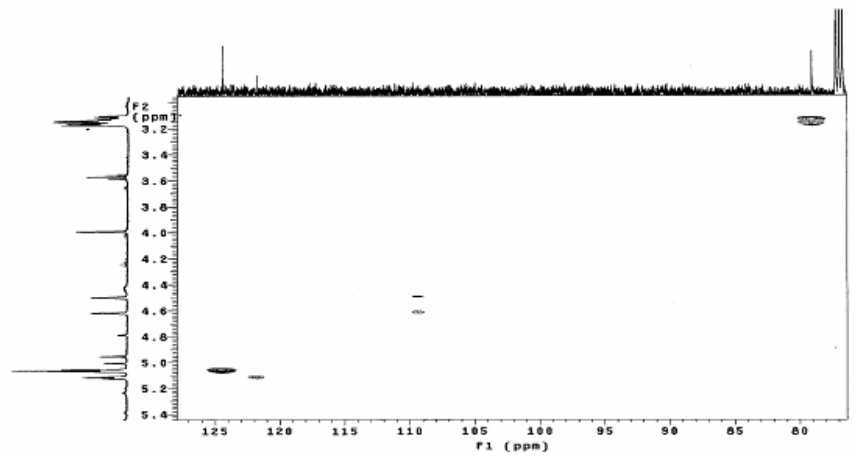
Espectro 30: DEPT 135° ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 125 MHz).



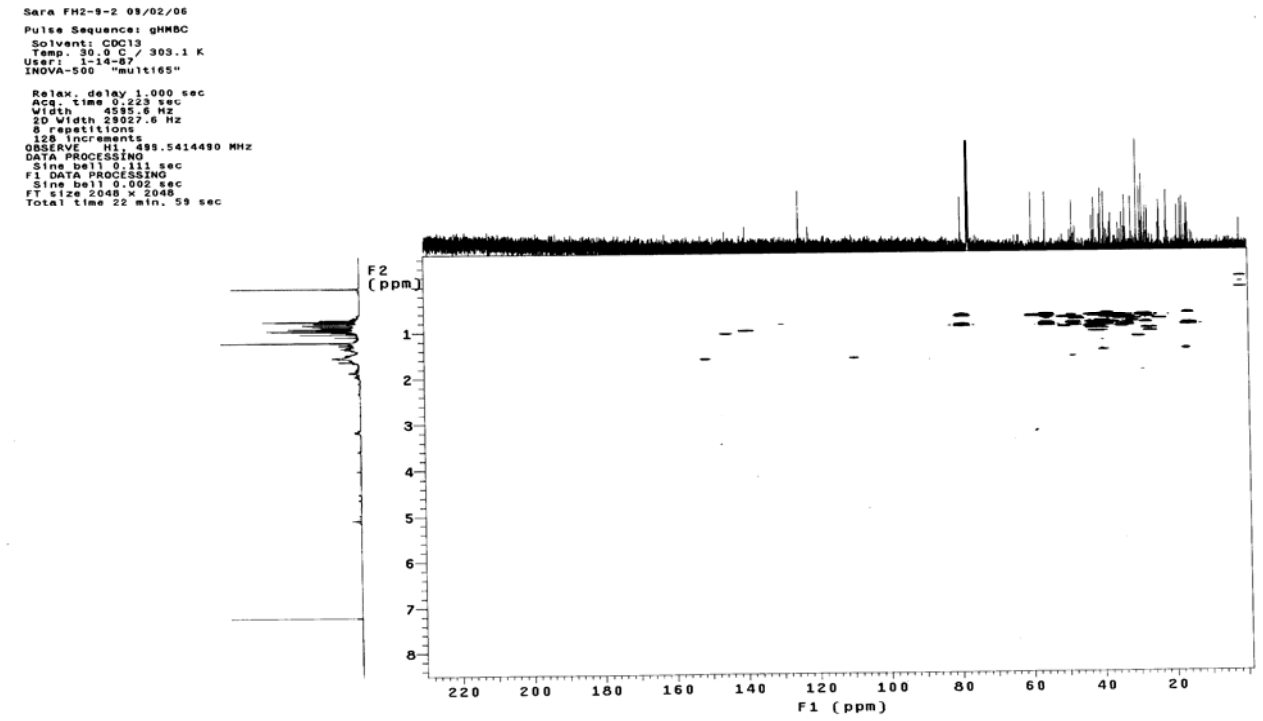
Espectro 31: HMQC da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



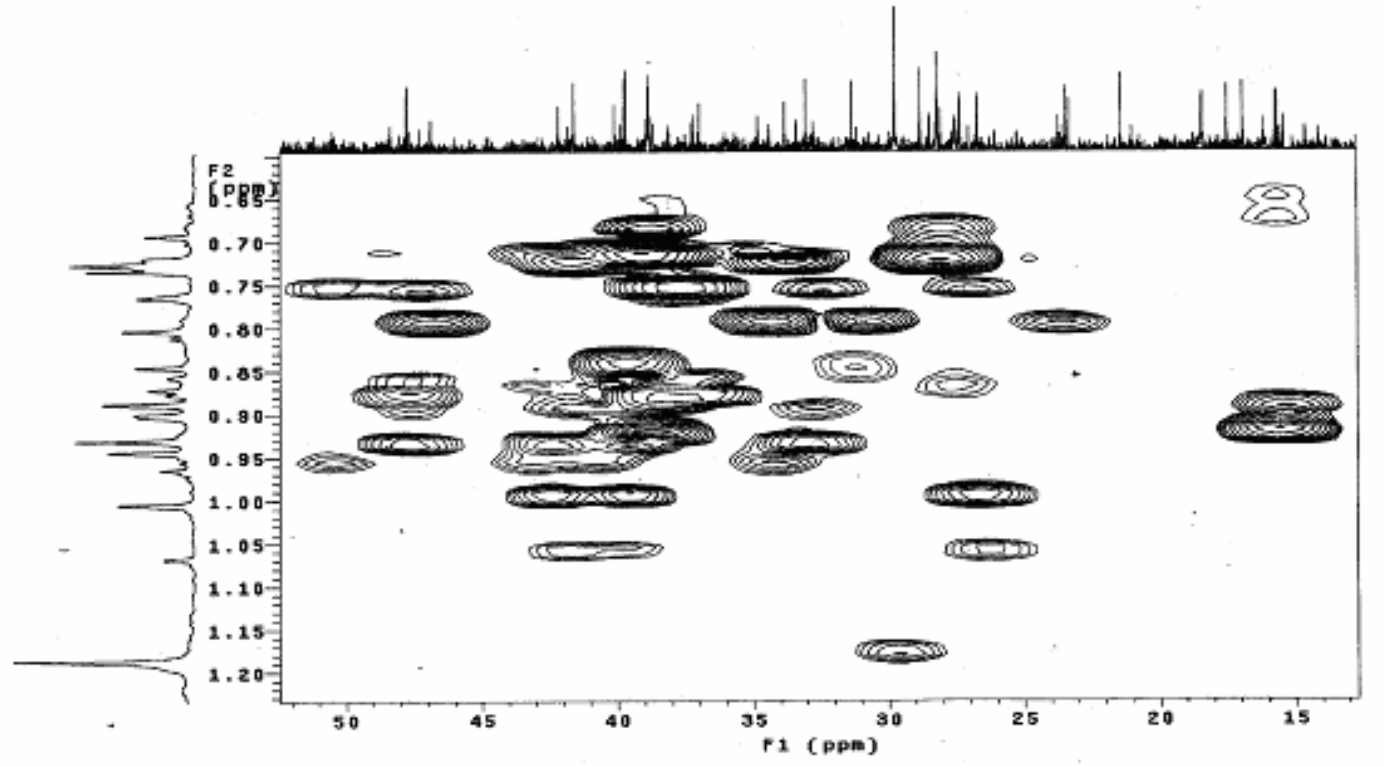
Espectro 32: HMQC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



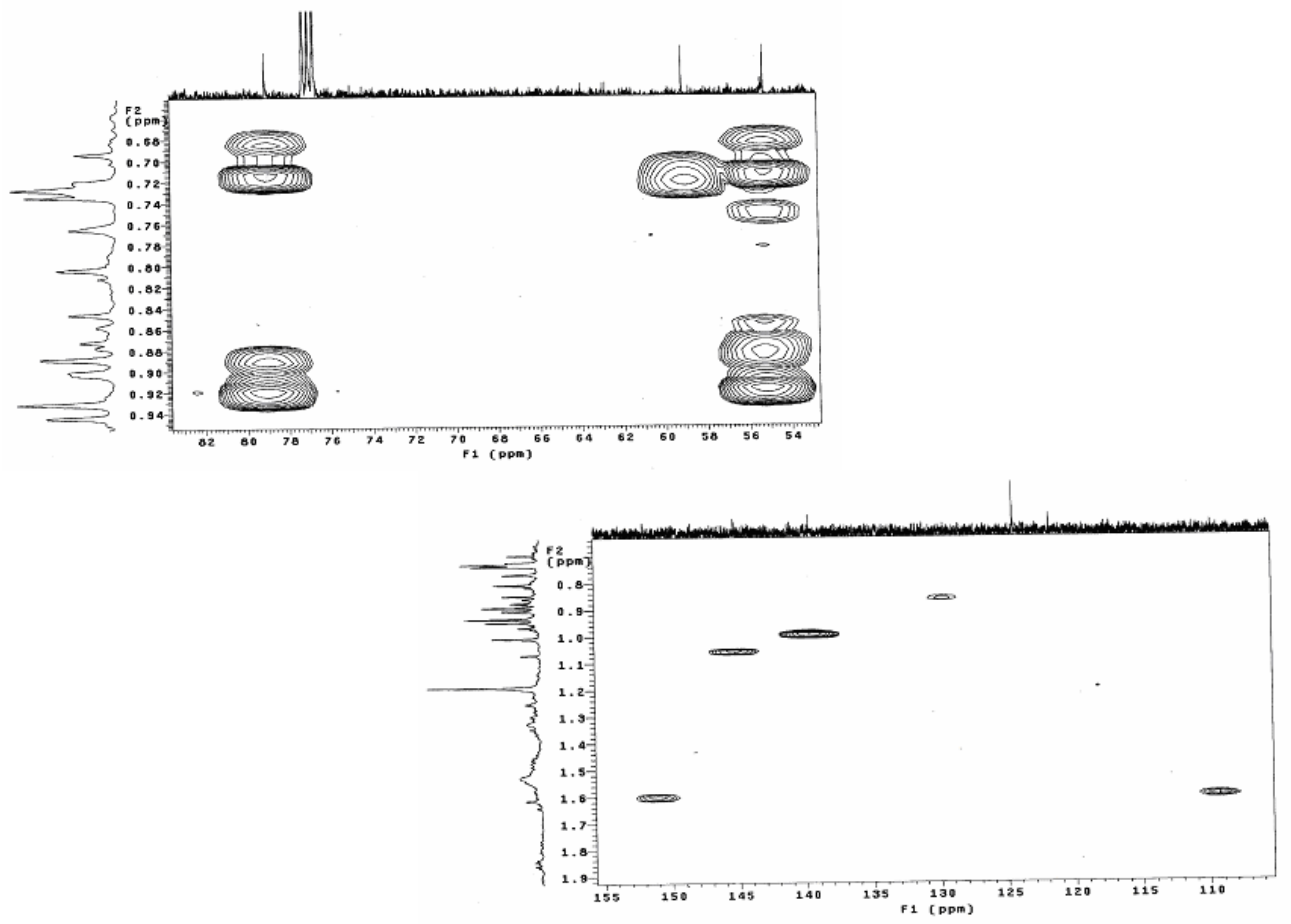
Espectro 33: HMQC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



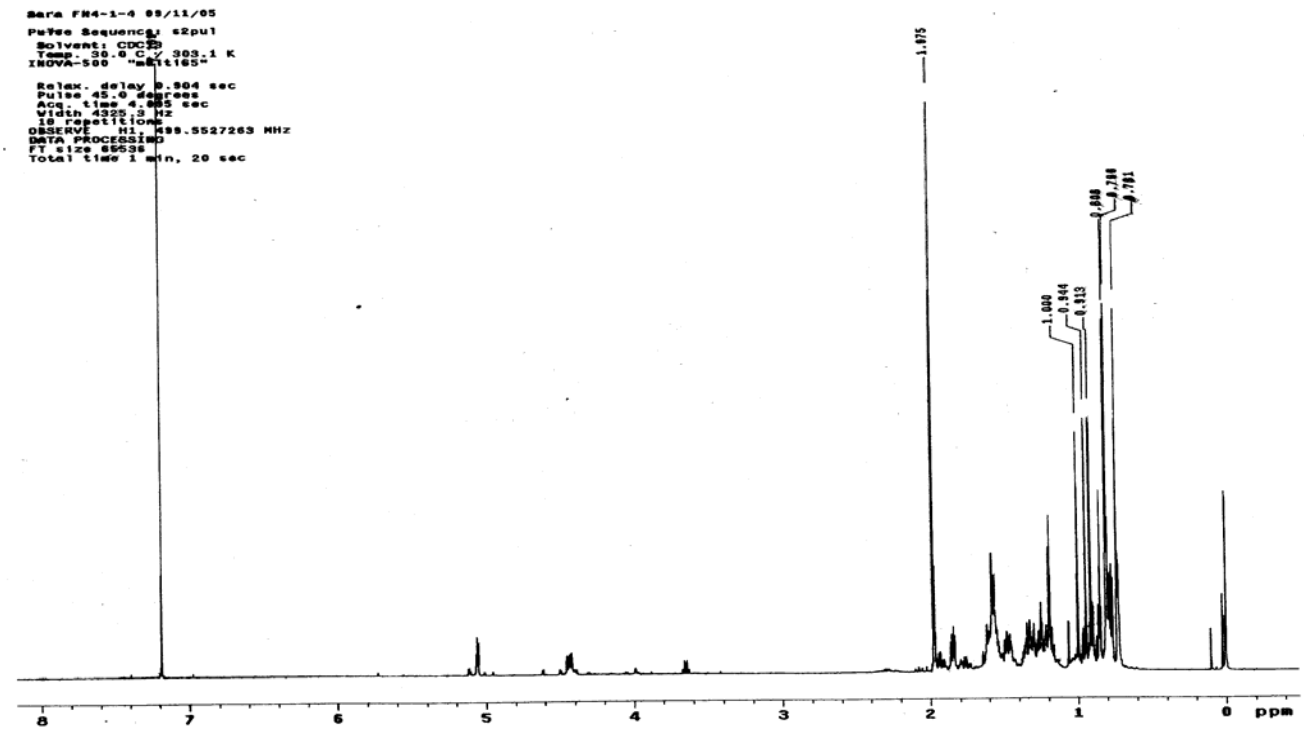
Espectro 34: HMBC da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



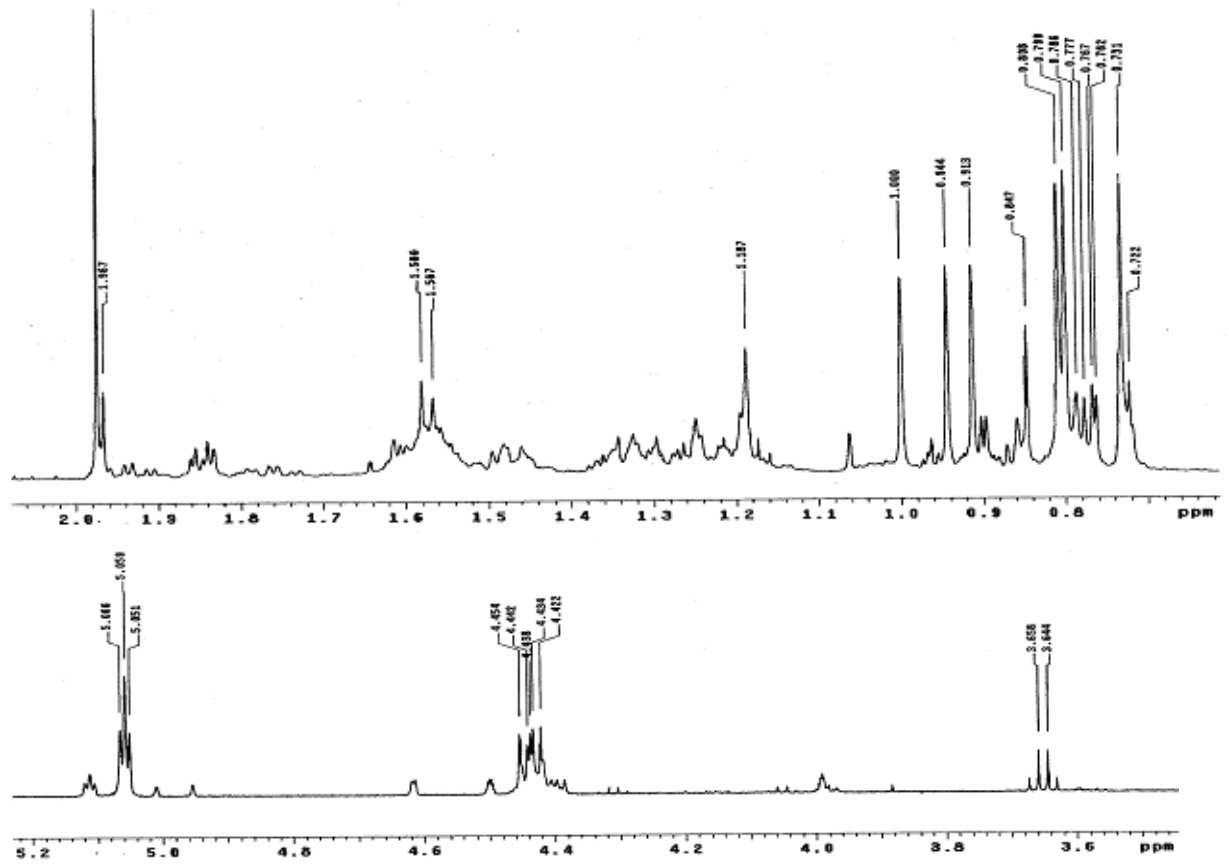
Espectro 35: HMBC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



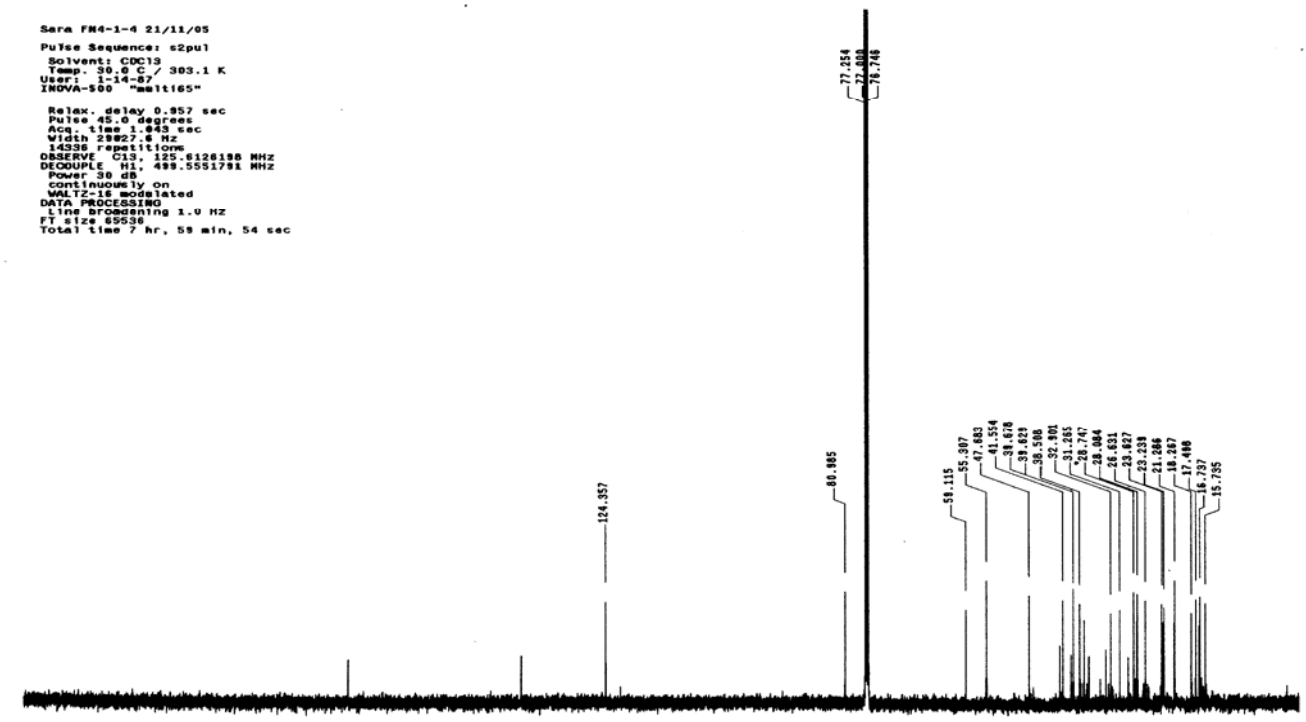
Espectro 36: HMBC ampliado da FH2-9-2 ($CDCl_3$, 500 MHz).



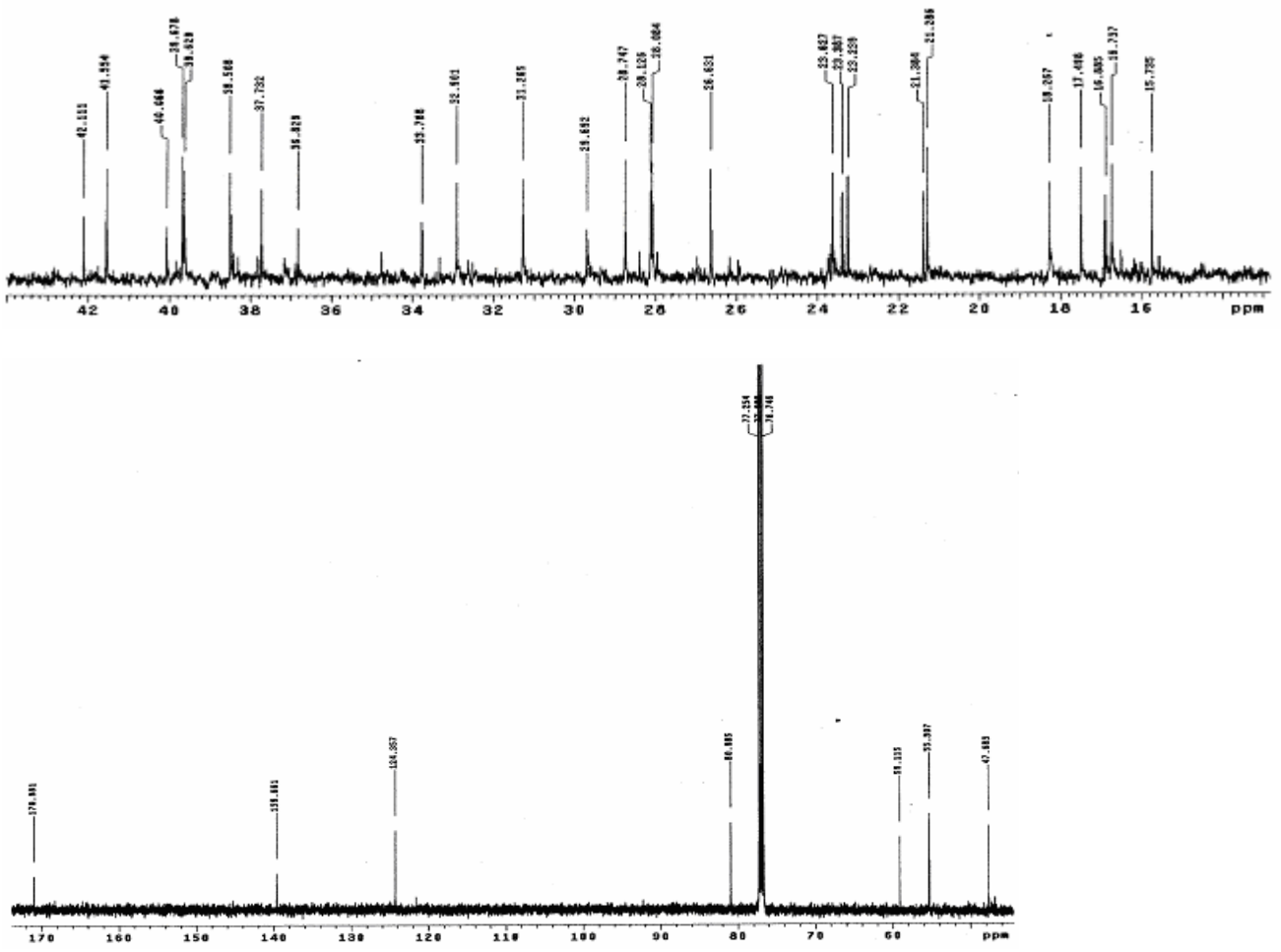
Espectro 37: RMN de ^1H da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



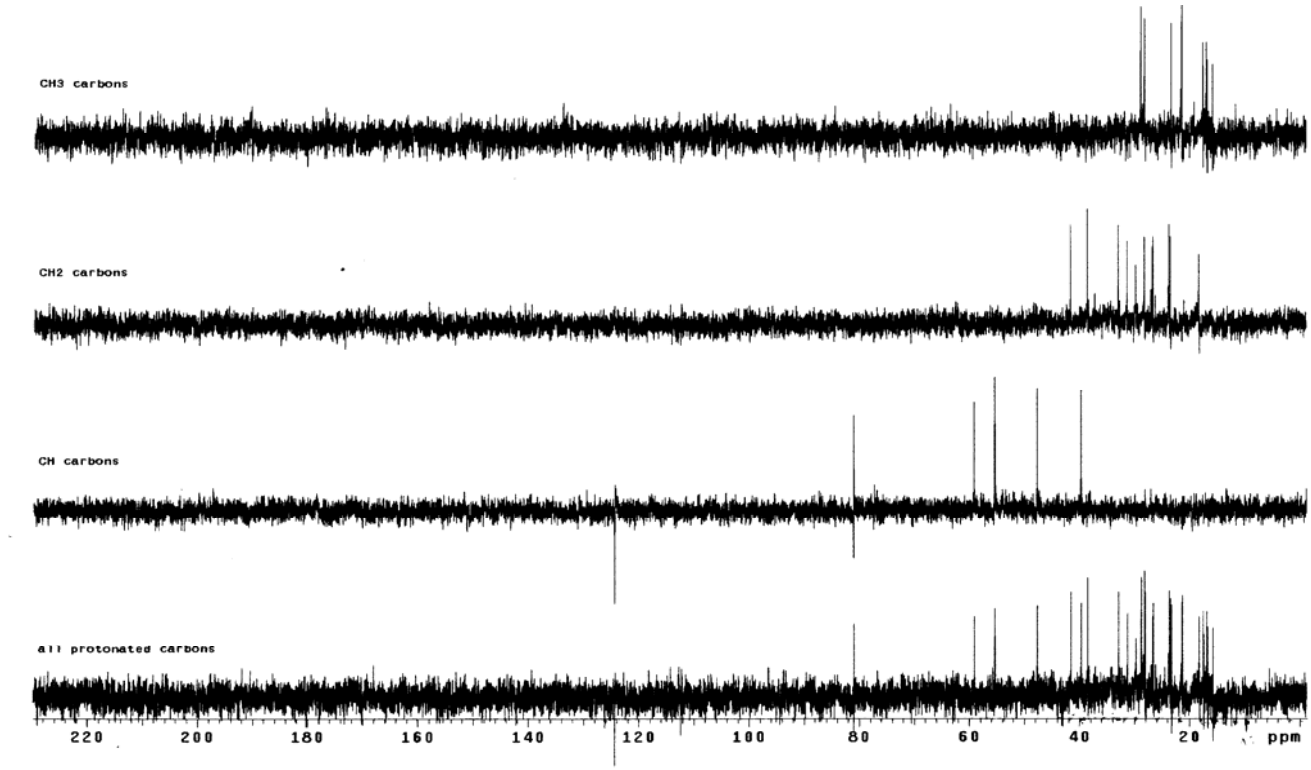
Espectro 38: RMN de ^{1}H ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



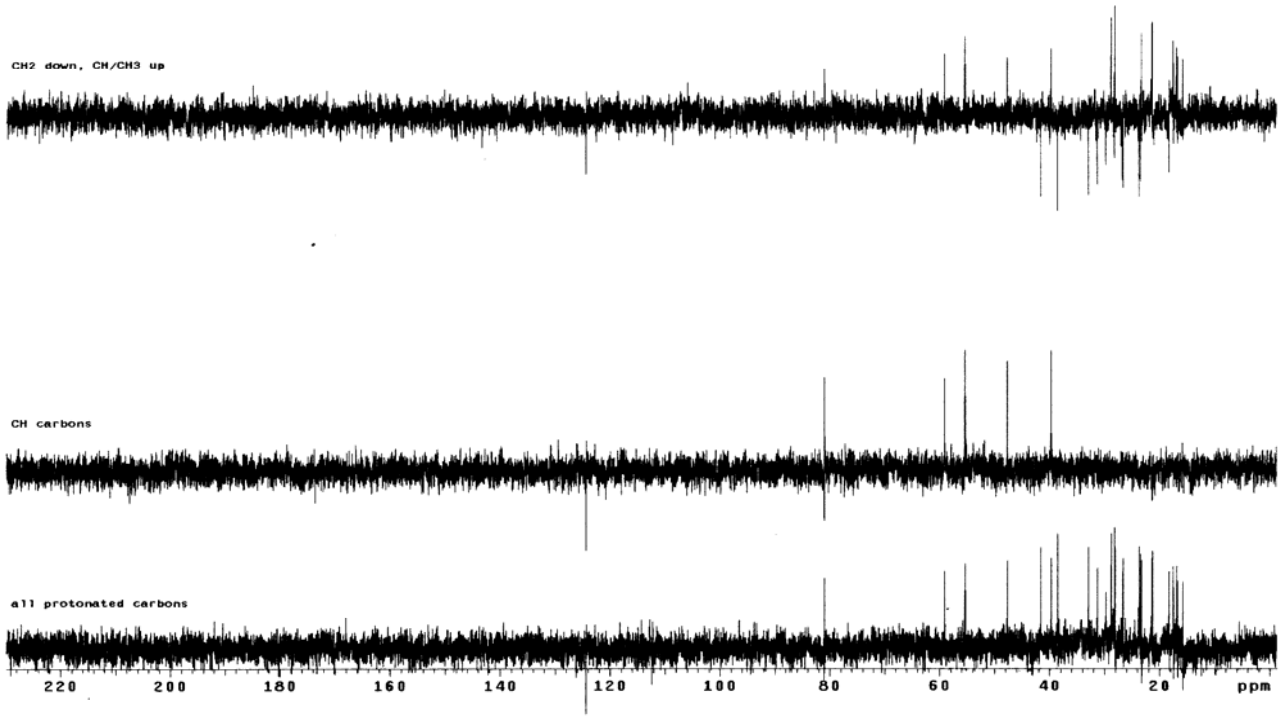
Espectro 39: RMN de ^{13}C da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz).



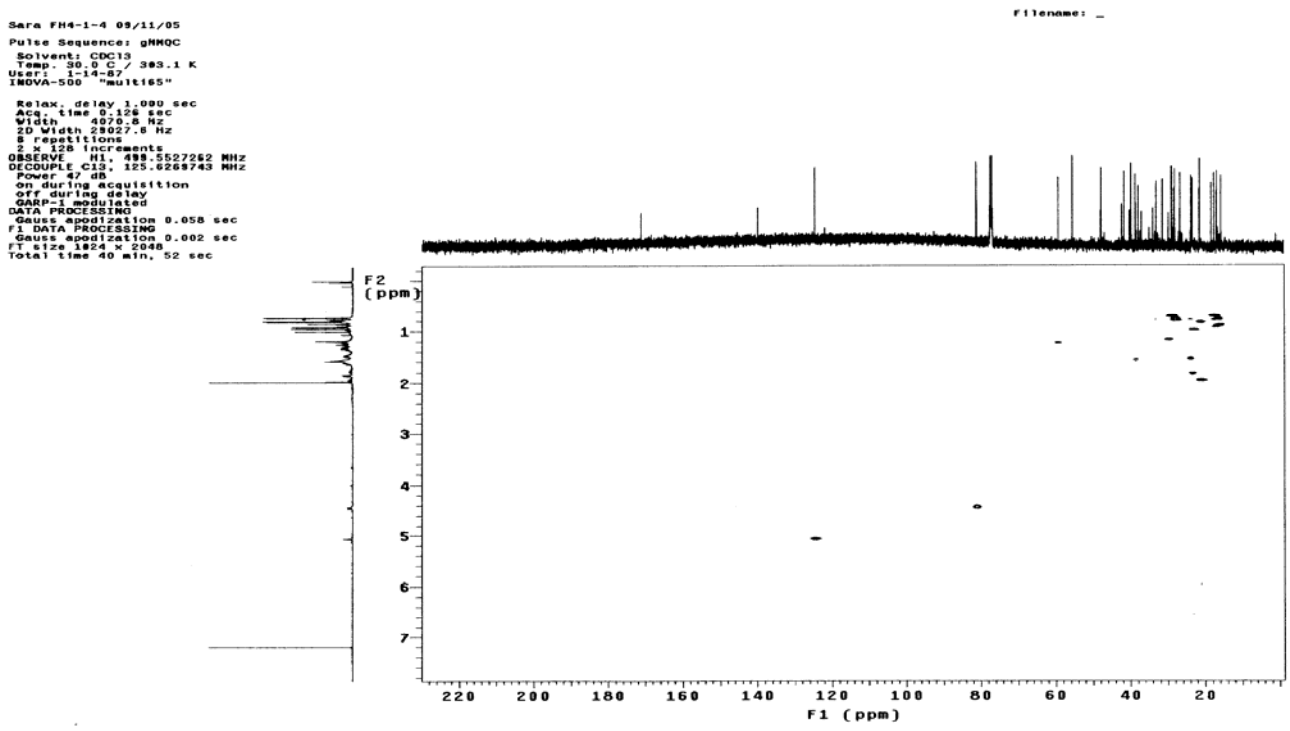
Espectro 40: RMN de ^{13}C ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz).



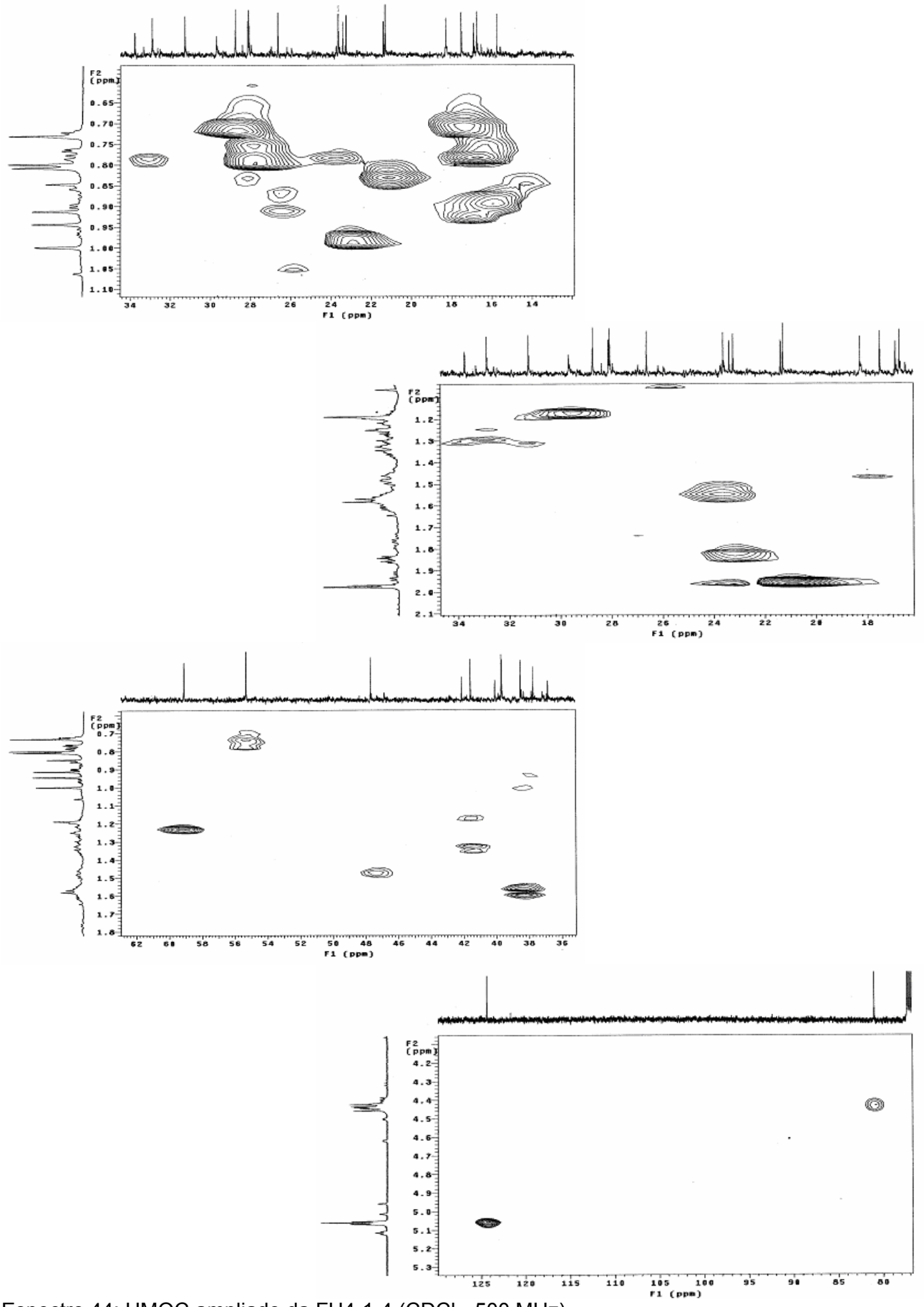
Espectro 41: DEPT 135° da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz).



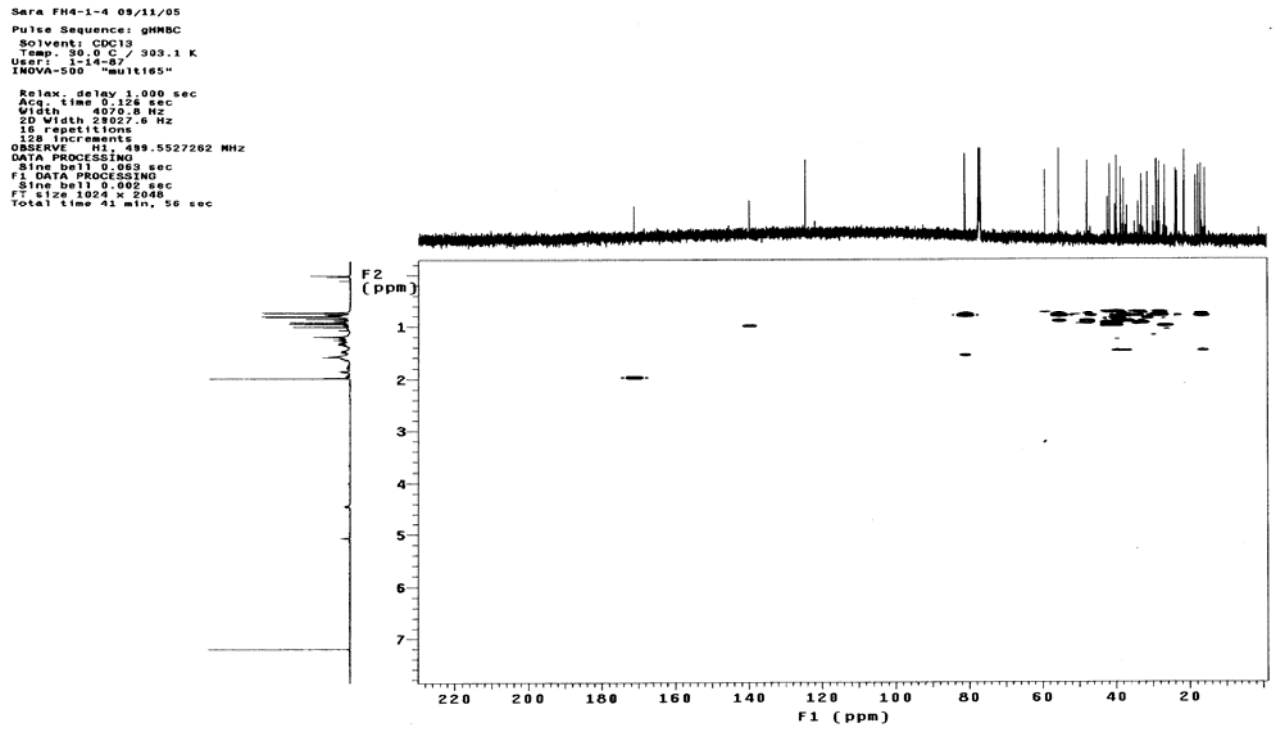
Espectro 42: DEPT 135° da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 125 MHz).



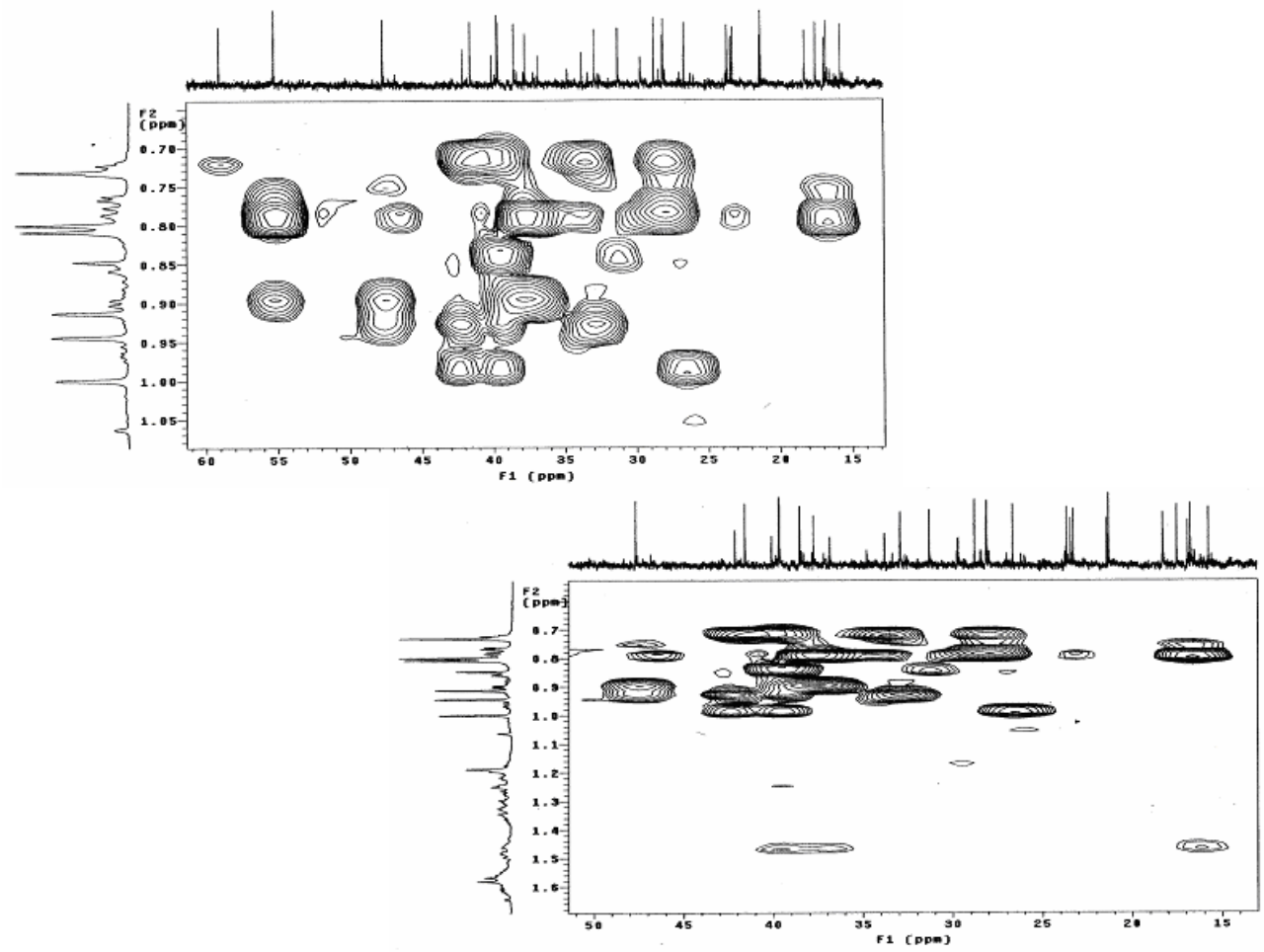
Espectro 43: HMQC da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



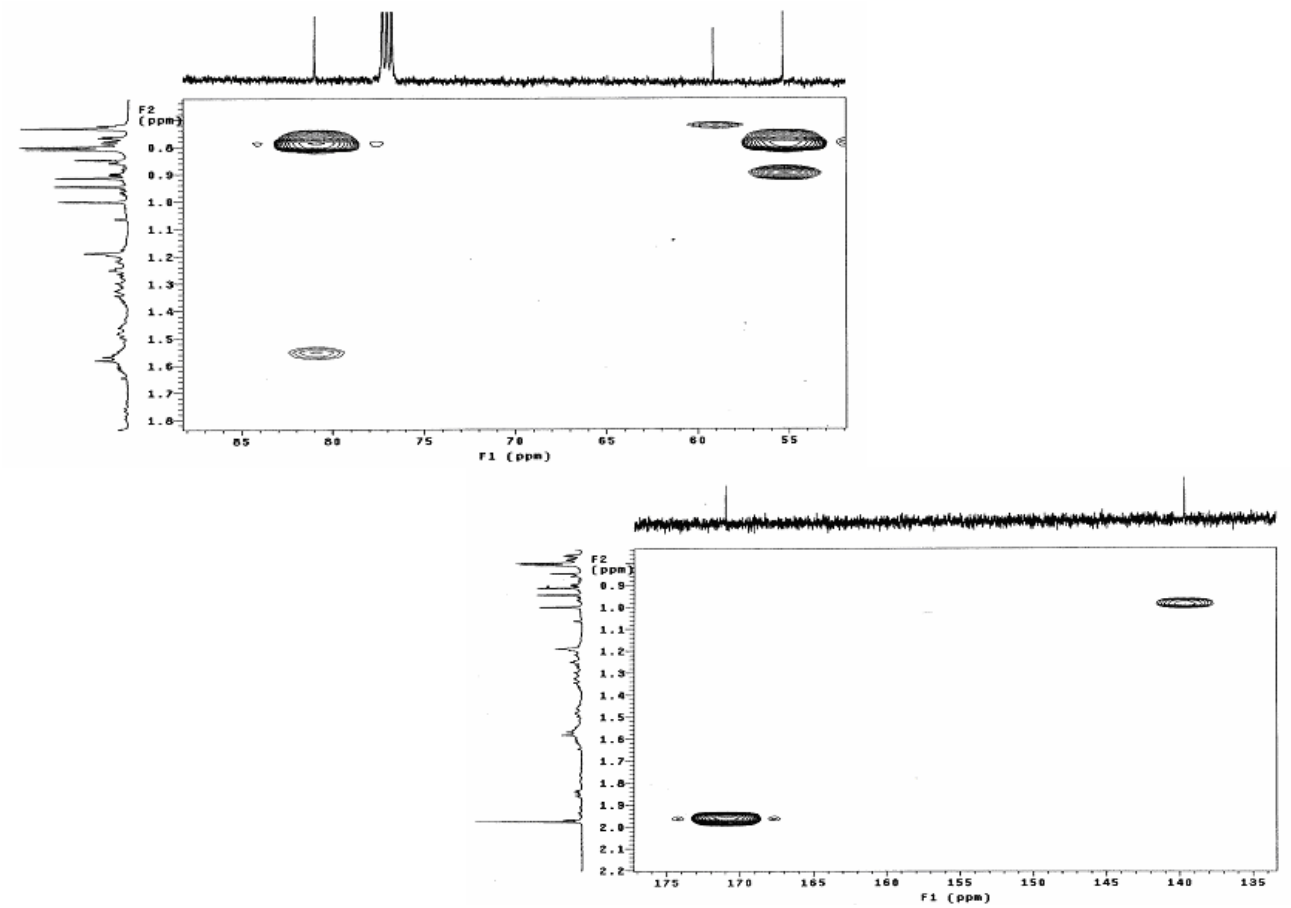
Espectro 44: HMQC ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



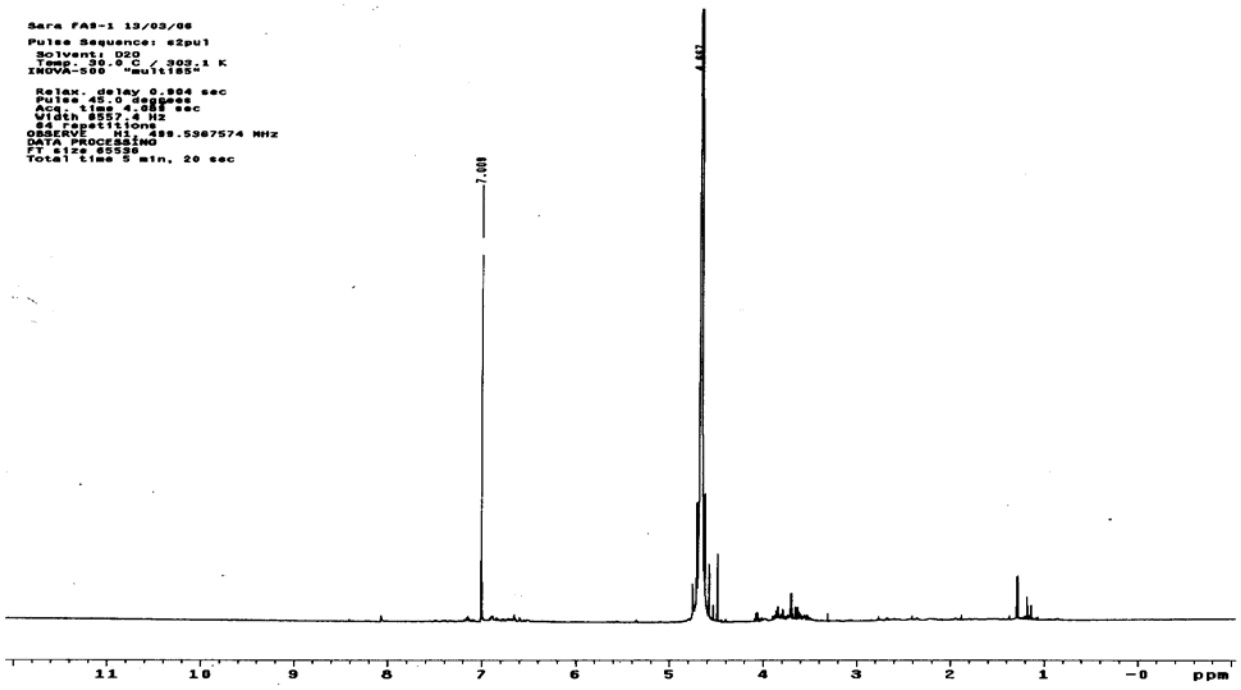
Espectro 45: HMBC da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



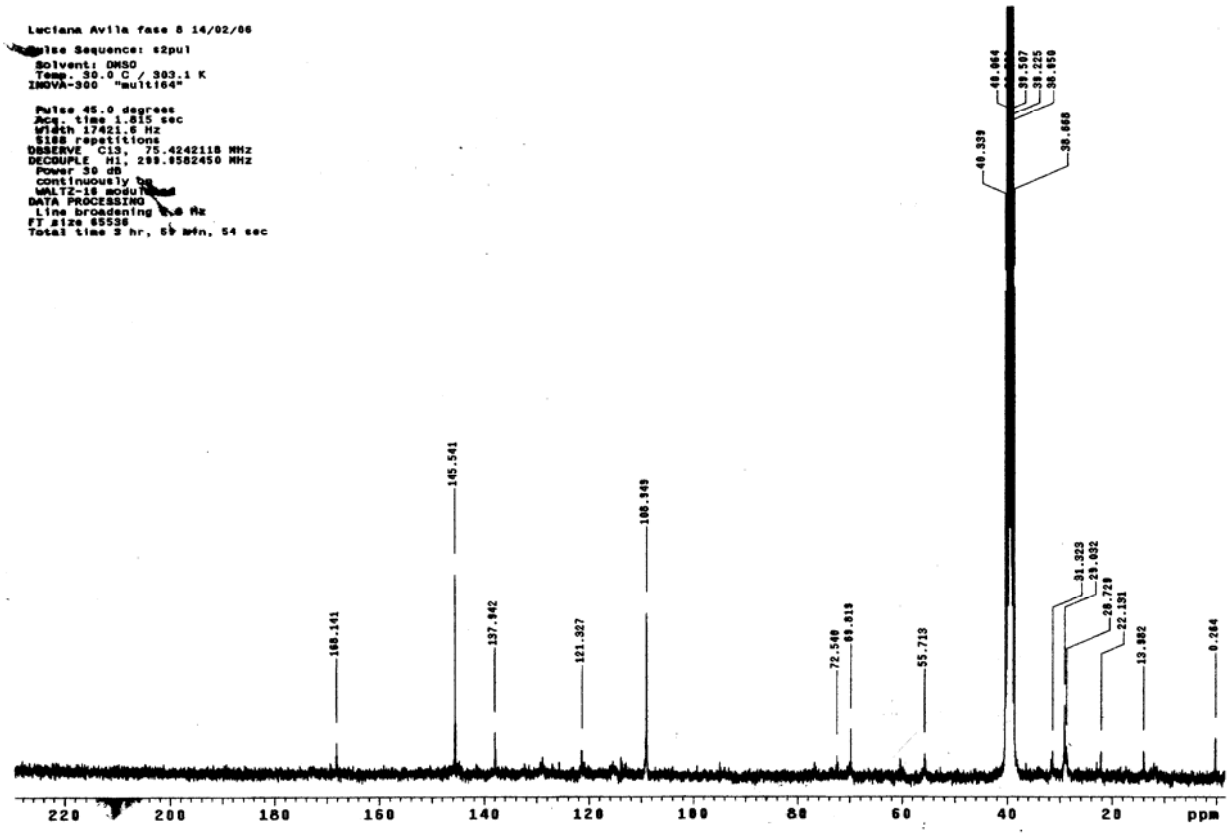
Espectro 46: HMBC ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



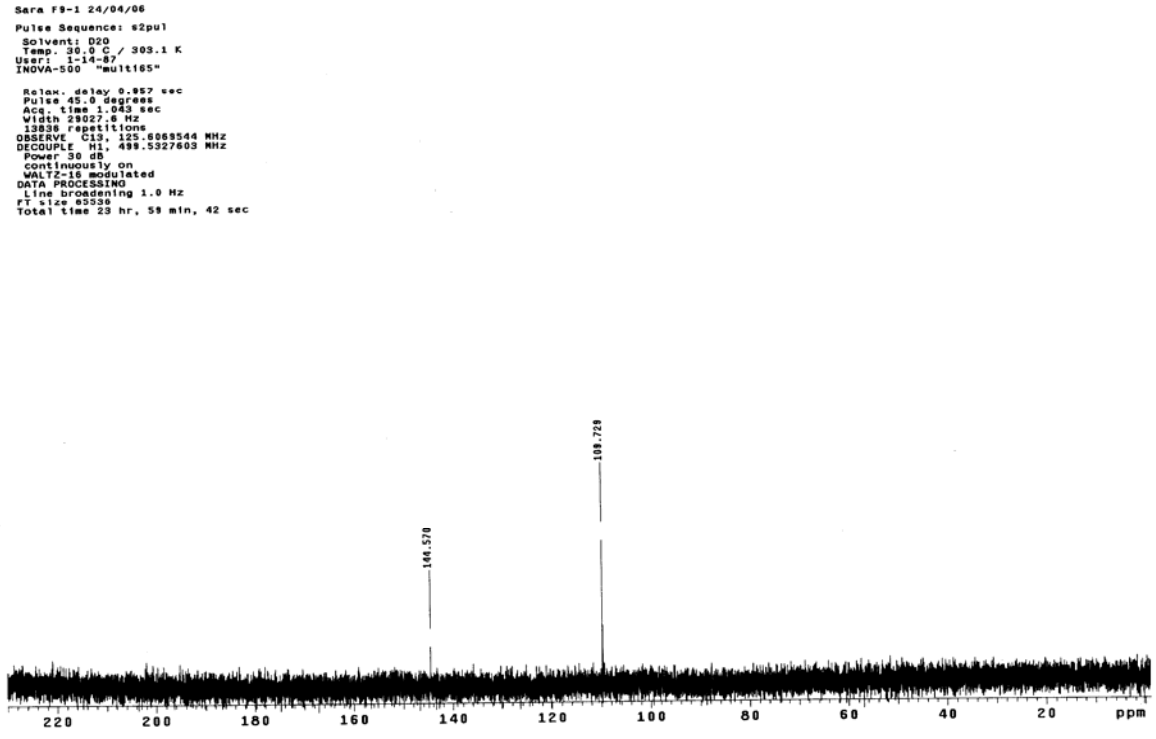
Espectro 47: HMBC ampliado da FH4-1-4 ($CDCl_3$, 500 MHz).



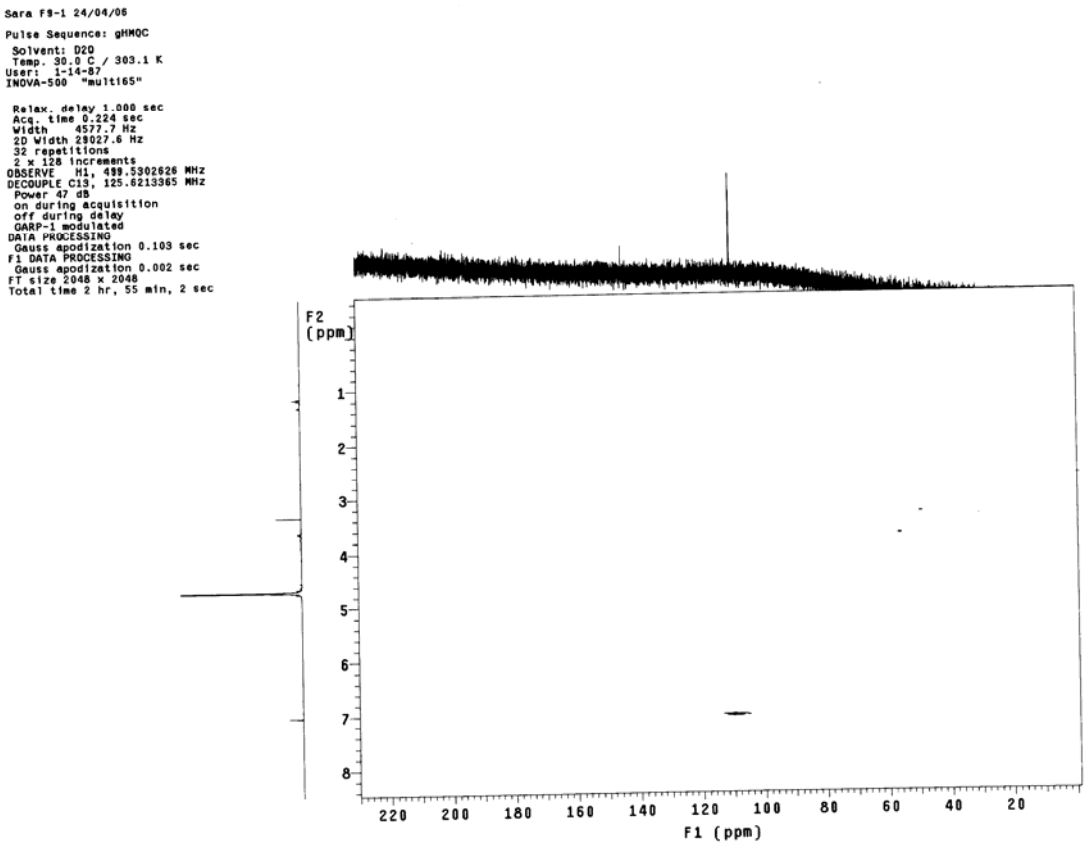
Espectro 48: RMN de ^1H da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz).



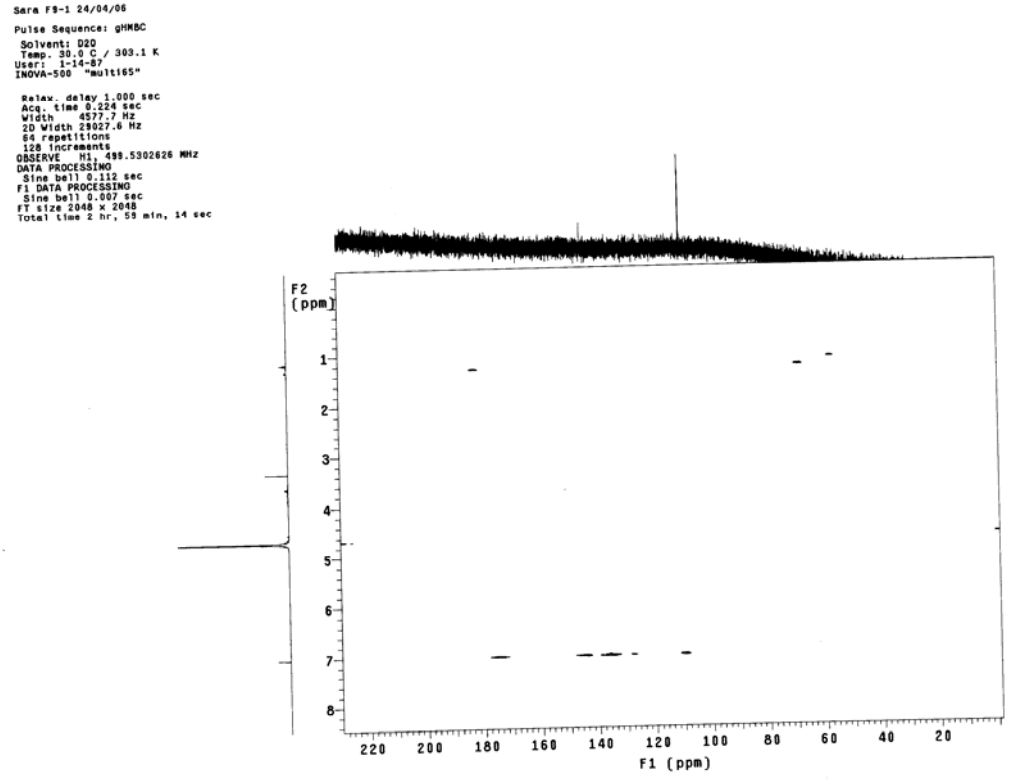
Espectro 49: RMN de ^{13}C da FAc9-2 (D_2O, 125 MHz).



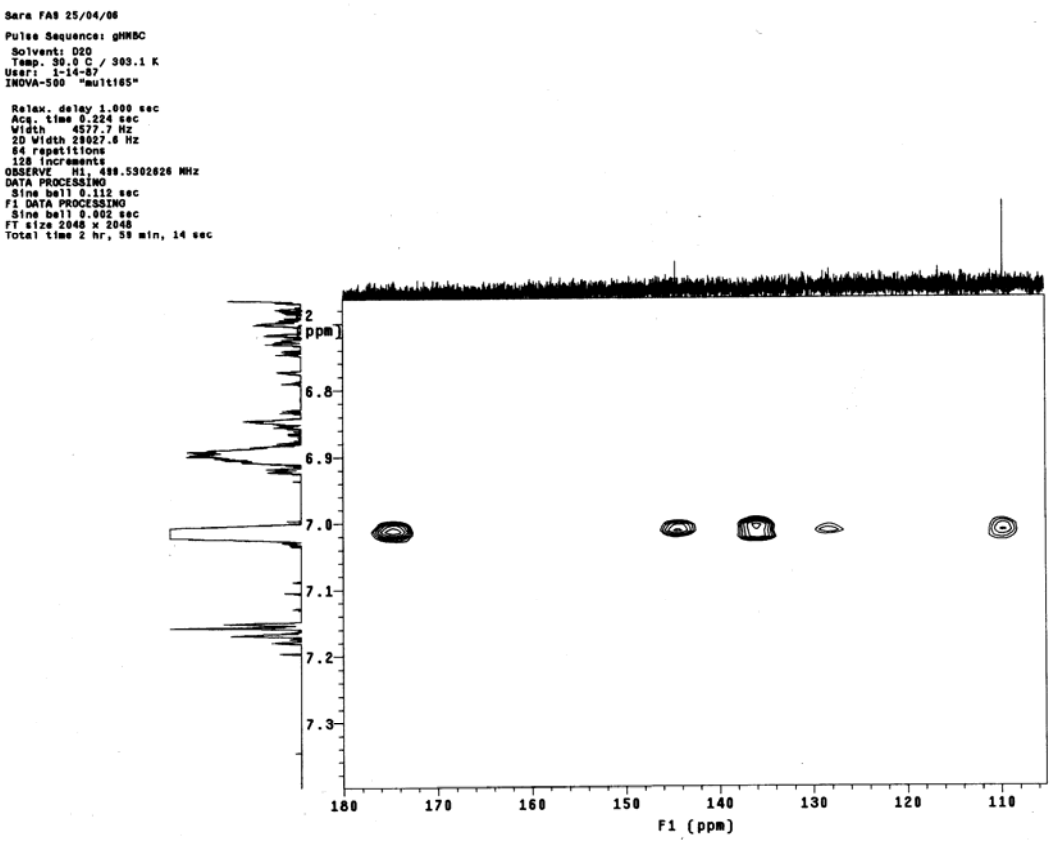
Espectro 50: DEPT 135° da FAc9-2 (D_2O, 125 MHz).



Espectro 51: HMQC da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz).



Espectro 52: HMBC da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz).



Espectro 53: HMBC ampliado da FAc9-2 (D_2O, 500 MHz).