

Ana Lucia Martiniano Nasser

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA:
PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS
SUPERIORES: *Qualea* ssp (Vochysiaceae)

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara
2007

Dados Curriculares

Ana Lucia Martiniano Nasser

Dados Pessoais

Filiação	Ézio Martiniano de Oliveira e Nair Martins de Oliveira
Nascimento	10/02/1968 - Araraquara/SP - Brasil
Carteira de Identidade	18.143.384-9 SSP - SP - 30/10/1995
CPF	141.512.758-19

2004/2007	Doutorado em Química. Instituto de Química de Araraquara-UNESP-Araraquara Título: Uso sustentável da biodiversidade brasileira: Prospecção químico farmacológica em plantas superiores: <i>Qualea</i> ssp (Vochysiaceae) Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas Bolsista FAPESP
-----------	---

2000/2003	Mestrado em Alimentos e Nutrição. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara Título: Identificação de oligômeros presentes em garrafas PET destinadas ao acondicionamento de água mineral e de suco de fruta. Desenvolvimento e validação de método analítico Orientador: Prof ^a Dr ^a Magali Monteiro da Silva
-----------	---

1986/1990	Graduação em Química. Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR
-----------	--

Atuação profissional

1. EEPG Recanto Tio Patinhas
1990 Vínculo: ACT , Enquadramento funcional: Professor II, Regime:
Parcial
2. Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR
1990 Enquadramento funcional: Monitoria , Regime: Parcial
3. Minasa TVP Alimentos e Proteínas S A
1990/1991 Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Parcial

4. EEPG. Prof Antonia Eugênia Martins

1991/1991 Vínculo: ACT , Enquadramento funcional: Professor II, Regime: Parcial

5. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

1991/1995 Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Químico , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

Serviço Técnico Especializado, Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR), Departamento de Farmacologia

Especificação: Estudo fitoquímico e análises instrumentais (HPLC, IV)

6. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

1995/Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Técnico , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

Serviço Técnico Especializado, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica

Especificação: Estudo fitoquímico e análises instrumentais (HPLC, RMN, DCCC)

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- NASSER, A. L. M., LUCILENE P MAZZOLIN, EBERLIN, M. N., Hiruma-Lima C.A, BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Preparative droplet counter-current chromatography for the separation of the new nor-seco-triterpene and pentacyclic triterpenoids from the barks of *Qualea parviflora* Chromatographia, v. 64, p. 695 - 699, 2006.
1. chromatography for the separation of the new nor-seco-triterpene and pentacyclic triterpenoids from the barks of *Qualea parviflora* Chromatographia, v. 64, p. 695 - 699, 2006.

- NASSER, A. L. M., LOPES, LUCIA MARIA XAVIER, EBERLIN, M. N., MONTEIRO, MAGALI. Identification of oligomers in polyethyleneterephthalate bottles for mineral water and fruit juice.
2. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of first series cyclic trimer. Journal Chromatography A, v. 1097, p. 130 - 137, 2005.

- NASSER, A. L. M., LOPES, LUCIA MARIA XAVIER, MONTEIRO, MAGALI
3. Oligômeros em embalagem de PET para água mineral e suco de fruta. Uma revisão. Alimentos e Nutrição, v.16, p. 183 - 194, 2005.

4. NASSER, A. L. M., SANTINI, A. O., E. S. SILVA, PEZZA, H. R., MELIOS, C. B., PEZZA, L. p-Aminobenzoate ion determination in pharmaceutical formulations by using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix. *Talanta*, v. 63, p. 833 - 838, 2004.
5. CARLONI FILHO, JOÃO, SANTINI, ALBERTO OPPERMANN, NASSER, A. L. M., PEZZA, HELENA REDIGOLO, OLIVEIRA, JOSÉ EDUARDO DE, MELIOS, CRISTO BLADIMIRO, PEZZA, L. Potentiometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a silver electrode. *Food Chemistry*, v. 83, p. 297 - 301, 2003.
6. FRANCISCO, MAURÍCIO C, NASSER, A. L. M., LOPES, LUCIA MARIA XAVIER. Tetrahydroisoquinoline alkaloids and 2-deoxyribonolactones from *Aristolochia arcuata*. *Phytochemistry*, v. 62, p.1265 - 1270, 2003.
7. PEZZA, L., SANTINI, A. O., PEZZA, H. R., MELIOS, C. B., FERREIRA, V. J. F., NASSER, A. L. M. Benzoate ion determination in beverages by using a potentiometric sensor immobilized in graphite matrix. *Analytica Chimica Acta*, v. 21046, p.1 - 8, 2001.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. NASSER, A. L. M.; BENAFFATI, A. C.; PAVAN, F.; LEITE, C. Q. F.; BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Esteróide e triterpenóides biologicamente ativos em cascas de *Qualea parviflora* Mart. In: I Simpósio Paulista de Farmacognosia, 2007, Araraquara. I Simpósio Paulista de Farmacognosia, 2007.
2. NASSER, A. L. M.; RINALDI, D; SANTOS, L.S.; EBERLIN, M. N.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Ácido 3,3`-di-*O*-metilelágico e ácido 3,3`-di-*O*-metilelágico-4-*O*-*B*-glicosídeo em espécies de *Qualea* In: II SIMCRO, 2006, São Pedro. II Simposio de Cromatografia, 2006.
3. MAZZOLIN, L. P; NASSER, A. L. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Avaliação do mecanismo de ação antiulcerogênico do extrato metanólico das cascas de *Qualea parviflora* Mart. (Vochysiaceae). Participação dos grupos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador. XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006.
4. NASSER, A. L. M.; OLEA, R. S. G.; MICHELIN, D.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Isolamento de um novo nor-seco-triterpeno e de triterpenos pentacíclicos das cascas de *Qualea parviflora* por DCCC. In: Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006. p.59.

5. BAUAB, T. M.; NASSER, A. L. M.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade antibacteriana de *Qualea* ssp In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. p.01.
6. SILVA, M. A.; NASSER, A. L. M.; SEVERI, J.; SALGADO, H. R. N.; BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Evaluation of the gastrointestinal activity of *Qualea* species. In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. v.41. p.333.
7. NASSER, A. L. M.; OLEA, R. S. G.; CALVO, T. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Triterpenos pentacíclicos isolados das cascas de *Qualea parviflora*. (Vochysiaceae) In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005, Recife. V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005. v. 11-006.
8. NASSER, A. L. M., LOPES, L. M. X., MONTEIRO, M. Identificação de oligômeros em garrafas PET destinadas ao acondicionamento de água mineral e de suco de fruta. In: Congresso Latino Americano de Cromatografia Líquida e Técnicas Afins - COLACRO, 2004, Campos do Jordão. 10 Congresso Latino Americano de Cromatografia Líquida e Técnicas Afins, 2004. p. 351.
9. NASSER, A. L. M.; LOPES, L. M. X.; SILVA, M. M. Oligomers in PET bottles used to pack mineral waters and fruit juice In: V Brazilian Meeting on Chemistry of Foods and Beverages, 2004, São Carlos. V Brazilian Meeting on Chemistry of Foods and Beverages, 2004. p.33.
10. NASSER, A. L. M.; FRANCISCO, M. C.; LOPES, L. M. X. Alcalóides tetraisoquinolínicos e 2-deoxiribonolactonas de *Aristolochia arcuata* Mast. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Calda. , 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2002. PN019.
11. CALVO, T. R.; GRACIOSO, J.; ANDRADE, F. D. P., NASSER, A. L. M.; BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Obtenção rápida dos flavonóides da infusão de *Turnera ulmifolia* por cromatografia em contracorrente de alta velocidade. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Calda. 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002. PN213.
12. NASSER, A. L. M.; LOPES, L. M. X. Aplicação da RMN de 1H-15N GHMBC na determinação estrutural de alcalóides tetraidroisoquinolínicos In: VIII

- Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear, 2001, Rio de Janeiro. VII Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear, 2001. p.265
13. NASSER, A. L. M.; MONTEIRO, Magali. Cyclic oligomers in PET Bottles for fruit juice. In: 4º Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2001, Campinas. 4º Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2001.
14. SANTOS, L. C.; ANDRADE, F. D. P.; DOKKEDA, A. L.; NASSER, A. L. M.; VILEGAS, W.; SANO, P. T.; DEPAW, E. Análise de Sempre Vivas Brasileiras por HPLC-UV e HPLC-ES-MS. In: VII Congresso Latino-Americano de Cromatografia, 1998, Águas de São Pedro. VII Congresso Latino-Americano de Cromatografia, 1998.
15. NASSER, A. L. M.; ANTONIO, M. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonas C-Glicosiladas de *Turnera ulmifolia* L. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1998, Águas de Lindóia. XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1998. p. 121.
16. SANTOS, M. T.; NASSER, A. L. M.; MESIA, S. V.; ATAÍDE, J. R.; LAPA, A. J. Atividade antissecretora gástrica da *Solanum paniculatum* L. e seus extratos semipurificados In: VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1995, Serra Negra. VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1995.
17. CYSNEIROS, R. M., NASSER, A. L. M., LAPA, A. J. Purificação do composto responsável pelo bloqueio do influxo de cálcio presente na *Cecropia glaziovii* Sneth In: VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1995, Serra Negra. VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1995.
18. CYSNEIROS, R. M., NASSER, A. L. M., SOUCCAR, C., LAPA, A. J. Substância(s) moduladora(s) dos canais de cálcio voltagem dependentes presentes na *Cecropia glaziovii* Sneth In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1994, Fortaleza. XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1994.
19. CYSNEIROS, R. M., NASSER, A. L. M., TORRES, L. B. F., LAPA, A. J. Atividade do(s) princípio(s) ativo(s) da *Cecropia glaziovii* Sneth responsáveis pela contração produzida por cálcio no útero despolarizado de rata In: VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1993, Caxambú. VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1993.

Ao Michel, que com amor e harmonia,
constrói minha felicidade. À Ana Izabel
e à Ana Beatriz, que a completam.

Aos meus pais, Nair e Ézio,
pela presença constante e incansável ajuda.

Agradecimentos

A Deus.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, mestre e amigo, pelo estímulo constante, orientação, confiança, amizade e oportunidade.

À Prof^ª. Dr^ª. Lourdes Campaner dos Santos, pela colaboração inestimável e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, pelos espectros de massas obtidos.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela infinda ajuda, amizade e espectros de RMN obtidos.

Ao Prof. Dr. Cosimo Pizza, Dr^ª Sonia Piacente e Dr^ª Virginia Carbone, pelos HPLC-ESI-IT-MS obtidos.

À Prof^ª. Dr^ª Mary Rosa Rodrigues de Marchi e ao Guilherme R Zocolo, pelos GC-IT-MS obtidos.

À Prof^ª. Dr^ª. Clélia Akiko Hiruma-Lima, Prof^ª. Dr^ª. Tais Bauab, Prof^ª. Dr^ª. Herida R. N. Salgado, Prof^ª. Dr^ª. Iracilda Zeppone Carlos, Prof^ª. Dr^ª. Clarice Queico Fujimura Leite, Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida Varanda e a seus queridos orientados Lucilene Patricia Mazzolin, Marcelo A. Silva, Juliana Severi, Camila B. A. Carli, Danielle C. G. Maia, Fernando Rogério Pavan e Fábio Vieira dos Santos pelos ensaios farmacológicos realizados.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica (IQ-UNESP) pela oportunidade e aprendizado.

Aos membros da comissão examinadora pelas valiosas sugestões.

Aos colegas de trabalho, Tâmara Calvo, Miriam Sanommya, Juliana Severi, Marcelo Silva, Marcio Andreo, Clenilson Rodrigues, Daniel Rinaldo, Claudia Nehme, Juliana Rodrigues, Juliana Gomes, Danielle Baldo, Ana Carolina Benfatti, Carolina

Gomes, Adriana Moura, assim como todos os outros, que não pouparam esforços para tornar mais fácil meu trabalho.

A todos os funcionários, graduandos e pós-graduandos dos Departamentos de Química Orgânica, Seção de Pós-Graduação, SAEPE e da Biblioteca, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos do programa BIOTA-FAPESP.

À FAPESP pela bolsa concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BPI	Base Peak Ion
δ	Deslocamento químico
CC	Cromatografia em coluna
CCC	Cromatografia em contracorrente
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
GC-IT-MS	Gas chromatography-ion trap-mass spectrometry
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DCCC	Droplet counter-current chromatography
d.i.	Diâmetro interno
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
EMeOH	Extrato metanólico
FM	Fase móvel
glc	Glicose
GPC	<i>Gel permeation chromatography</i>
<i>g</i> HMBC	Gradient heteronuclear multiple bond correlations
<i>g</i> HMQC	Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence
HPLC-ESI-IT-MS	High-performance liquid chromatography coupled with ion trap-mass spectrometry electrospray interface
HPLC-UV-PDA	High performance liquid chromatography with diode array detector
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Comprimento da coluna
MS	Mass spectrometry
MeOH	Metanol
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy

Qg	<i>Qualea grandiflora</i>
Qm	<i>Qualea multiflora</i>
Qp	<i>Qualea parviflora</i>
rha	rhamnose
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleto
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotos da árvore, folhas e flores, frutos, sementes, cascas e madeira de (a) <i>Qualea grandiflora</i> , (b) <i>Q. multiflora</i> e (c) <i>Q. parviflora</i> (Lorenzi, 1998).....	08
Figura 2. Estruturas dos metabólitos secundários isolados e identificados do EMeOH de <i>Qualea parviflora</i>	12
Figura 3. Estruturas dos metabólitos secundários isolados e identificados do ECHCl ₃ de <i>Qualea parviflora</i>	13
Figura 4: Fluxograma da obtenção dos extratos das cascas de <i>Q. grandiflora</i> (Qg), <i>Q. multiflora</i> (Qm) e <i>Q. parviflora</i> (Qp).....	21
Figura 5. CCDC dos extratos das cascas de <i>Q. grandiflora</i> (Qg), <i>Q. multiflora</i> (Qm) e <i>Q. parviflora</i> (Qp).....	22
Figura 6: CCCD das sub-frações obtidas da CCDP de F16-17.....	25
Figura 7: CCCD das substâncias Qp1-Qp4 isoladas de <i>Q. parviflora</i>	25
Figura 8: Isolamento das substâncias Qp1-Qp4.....	26
Figura 9. Estrutura do triterpenóide pentacíclico Qp3.....	27
Figura 10. Estrutura do <u>triterpenóide</u> pentacíclico Qp2.....	29
Figura 11. Correlações obtidas do experimento de <i>g</i> HMBC de Qp2.....	31
Figura 12. Estrutura do triterpenóide pentacíclico Qp4.....	31
Figura 13. Estrutura do nor-secotriterpeno Qp1.....	33
Figura 14. Principais correlações do experimento de <i>g</i> HMBC de Qp1.....	34
Figura 15: Correlações <i>g</i> NOESY mais significativas de Qp1.....	37
Figura 16. Análises por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos triterpenóides presentes em <i>Q. parviflora</i>	38
Figura 17. Espectro de massa de: (a) MS do íon <i>m/z</i> 477 (Qp1); (b) MS do íon <i>m/z</i> 741 (Qp4); (c) MS ² do íon <i>m/z</i> 741 (Qp4); (d) MS do íon <i>m/z</i> 725 (Qp3); (e) MS ² do íon <i>m/z</i> 725 (Qp3) e (f) MS do íon <i>m/z</i> 519 (Qp2).....	40
Figura 18. Análises por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos triterpenóides presentes em <i>Q. grandiflora</i> e <i>Q. multiflora</i>	42

Figura 19. Fluxograma do fracionamento do EMeOH de <i>Qualea parviflora</i>	44
Figura 20. Estrutura de Qp5.....	45
Figura 21. Estrutura de Qp6.....	47
Figura 22. Correlações de <i>g</i> HMBC e <i>g</i> NOESY para Qp6.....	49
Figura 23. Estrutura de Qp7.....	49
Figura 24. Estrutura de Qp8.....	51
Figura 25. Estrutura de Qp9.....	53
Figura 26. Cromatogramas do EMeOH de <i>Q. parviflora</i> (a), Qp5 (b), Qp6 (c), Qp7 (d) e Qp8 (e) com seus respectivos espectros de UV.....	55
Figura 27: Cromatogramas dos EMeOH de (a) <i>Q. parviflora</i> , (b) <i>Q. multiflora</i> e (c) <i>Q. grandiflora</i>	57
Figura 28. Análise por HPLC/ESI-MS no modo negativo dos triterpenóides e derivados de ácido elágico presentes no EMeOH de <i>Q. parviflora</i> e os cromatogramas para os íons extraídos dos triterpenóides e dos derivados de ácido elágico (<i>m/z</i> 477, 491, 461, 741, 725, 505, 329 e 519).....	59
Figura 29. Espectro de massa de: (a) MS de <i>m/z</i> 491 (Qp5); (b) MS de <i>m/z</i> 461 (Qp6); (c) MS de <i>m/z</i> 505 (Qp7) e (d) MS de <i>m/z</i> 329 (Qp8).....	60
Figura 30. Análises por HPLC/ESI-ITMS no modo negativo dos derivados de ácido elágico presentes em <i>Q. parviflora</i> , <i>Q. grandiflora</i> e <i>Q. multiflora</i>	62
Figura 31. CCDC dos ECHCl ₃ das cascas de Qp, Qg, Qm e as frações obtidas do ECHCl ₃ de <i>Q. parviflora</i>	63
Figura 32. Fluxograma do fracionamento do ECHCl ₃ de <i>Q. parviflora</i>	64
Figura 33. Estrutura de Qp10.....	65
Figura 34. Estrutura de Qp11.....	67
Figura 35. Estrutura de Qp12.....	67
Figura 36. Estrutura de Qp13.....	68
Figura 37. Estrutura de Qp14.....	69
Figura 38. Estrutura de Qp15.....	69
Figura 39. Cromatogramas (a) do perfil do ECHCl ₃ de <i>Q. parviflora</i> , (b) de	

Qp10, (c) de Qp11, (d) de Qp12 e (e) de Qp13.....	71
Figura 40. Espectro de massas obtido do GC-IT-MS de (a) Qp10, (b) Qp12, (c) Qp13 e (d) Qp11.....	72
Figura 41. Cromatograma de GC-IT-MS de (a) Qp, (b) Qm e Qg.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos isolados de espécies da família Vochysiaceae.....	05
Tabela 2: Quantidade obtida dos extratos preparados das três espécies de <i>Qualea</i> em estudo.....	21
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) para os triterpenóide pentacíclicos Qp2-Qp4 em DMSO_{d6}	28
Tabela 4: Dados de RMN (δ) para o nor-secotriterpeno Qp1.....	25
Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C para Qp5 em DMSO_{d6} .	27
Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) para Qp6 em DMSO_{d6}	48
Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) para Qp7 em DMSO_{d6}	50
Tabela 8. Deslocamentos químicos (δ) para Qp8 em DMSO_{d6}	52
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C para Qp9 (DMSO_{d6})....	54
Tabela 10. Dados de RMN ^{13}C (δ) para os triterpenóide pentacíclicos Qp10-Qp15 em CDCl_3	66
Tabela 11. Avaliação do tamanho total de intestino delgado, distância percorrida pelo carvão ativado e peso do intestino de camundongos submetidos ao ensaio de atividade sobre o trânsito intestinal.....	82
Tabela 13. Metabólitos secundários identificados em <i>Q. parviflora</i> , <i>Q. grandiflora</i> e <i>Q. multiflora</i>	89

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de RMN- ¹ H de Qp3 contendo Qp5 e <i>g</i> HMQC	105
Espectro 2: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp3	106
Espectro 3: Experimento de DEPT 135° de Qp3.....	107
Espectro 4: Espectro de EM-ES (-40V) de Qp3.....	108
Espectro 5: Espectro de RMN- ¹ H de Qp2 contendo Qp7.....	109
Espectro 6: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp2.....	110
Espectro 7: Experimento de DEPT 135° de Qp2.....	111
Espectro 8: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp2.....	112
Espectro 9: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp2.....	113
Espectro 10: Espectro de EM-ES (-40V) de Qp2.....	114
Espectro 11: Espectro de RMN- ¹ H e <i>g</i> HMQC de Qp4.....	115
Espectro 12: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp4.....	116
Espectro 13: Experimento de DEPT 135° de Qp4.....	117
Espectro 14: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp4.....	118
Espectro 15: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp4.....	119
Espectro 16: Espectro de EM-ES (-40V) de Qp4.....	120
Espectro 17: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp1.....	121
Espectro 18: Experimento de DEPT 135° de Qp1.....	122
Espectro 19: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp1.....	123
Espectro 20: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp1.....	124
Espectro 21: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp1.....	125
Espectro 22: Experimento <i>g</i> COSY ¹ H/ ¹ H de Qp1.....	126
Espectro 23: Experimento <i>g</i> COSY ¹ H/ ¹ H de Qp1.....	127
Espectro 24: Espectro de RMN- ¹ H de Qp1.....	128
Espectro 25: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp1.....	129
Espectro 26: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp1.....	130
Espectro 27: Espectro de RMN- ¹ H de Qp1.....	131
Espectro 28: Experimento <i>g</i> COSY ¹ H/ ¹ H e <i>g</i> HMBC de Qp1.....	132

Espectro 29: Experimento <i>g</i> NOESY 1D de Qp1.....	133
Espectro 30: Espectro de EM-ES (+40V) de Qp1.....	134
Espectro 31: Espectro de RMN- ¹ H de Qp5.....	135
Espectro 32: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp5.....	136
Espectro 33: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp5.....	137
Espectro 34: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp5.....	138
Espectro 35: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp5.....	139
Espectro 36: Espectro de EM-ES (+40V) de Qp5.....	140
Espectro 37: Espectro de RMN- ¹ H de Qp6.....	141
Espectro 38: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp6.....	142
Espectro 39: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp6.....	143
Espectro 40: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp6.....	144
Espectro 41: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp6.....	145
Espectro 42: Experimento <i>g</i> NOESY 1D de Qp6.....	146
Espectro 43: Espectro de massas (+40V) de Qp5.....	147
Espectro 44: Espectro de RMN- ¹ H de Qp7 contendo Qp2.....	148
Espectro 45: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp7 contendo Qp2.....	149
Espectro 46: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp7.....	150
Espectro 47: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp7.....	151
Espectro 48: Espectro de massas (+40V) de Qp6.....	152
Espectro 49: Espectro de RMN- ¹ H de Qp8.....	153
Espectro 50: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp8.....	154
Espectro 51: Experimento <i>g</i> HMQC de Qp8.....	155
Espectro 52: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp8.....	156
Espectro 53: Espectro de massas (+40V) de Qp8.....	157
Espectro 54: Espectro de RMN- ¹ H de Qp9 contendo Qp8.....	158
Espectro 55: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp9 contendo Qp8.....	159
Espectro 56: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp10.....	160
Espectro 57: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp11.....	161

Espectro 58: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp12 em mistura.....	162
Espectro 59: Experimento <i>g</i> HMBC de Qp12.....	163
Espectro 60: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp13.....	164
Espectro 61: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp14.....	165
Espectro 62: Espectro de RMN- ¹³ C de Qp15.....	166

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ESPECTROS.....	vii
INTRODUÇÃO.....	01
A Família Vochysiaceae.....	04
O gênero <i>Qualea</i>	07
Atividade anti-úlceras gástrica.....	09
OBJETIVOS.....	14
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	15
CAPÍTULO 1	
<i>ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS</i>	
DESENVOLVIMENTO/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES.....	20
Coleta do Material Vegetal.....	20
Preparo dos Extratos.....	20
Estudo químico dos triterpenos e saponinas presentes no EMeOH....	22
DCCC.....	23
A escolha do sistema de solventes.....	23
Fracionamento do EMeOH utilizando DCCC.....	24
Elucidação Estrutural.....	27
Identificação do triterpenóide pentacíclico (Qp3).....	27
Identificação do triterpenóide pentacíclico (Qp2).....	29
Identificação do triterpenóide pentacíclico (Qp4).....	31
Elucidação estrutural do nor-secotriterpeno (Qp1).....	33
Perfil cromatográfico do EMeOH de <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp1-Qp4 em <i>Q. parviflora</i> utilizando HPLC-ESI-IT-MS.....	37
Identificação de Qp1-Qp4 nos EMeOH de <i>Q. grandiflora</i> e <i>Q.</i> <i>multiflora</i>	41

Estudo químico dos derivados de ácido elágico do EMeOH.....	43
Fracionamento do EMeOH utilizando CC de sílica gel.....	43
Identificação Estrutural.....	45
Identificação do derivado de ácido elágico (Qp5).....	45
Identificação do derivado de ácido elágico (Qp6).....	47
Identificação do derivado de ácido elágico (Qp7).....	49
Identificação do derivado de ácido elágico (Qp8).....	51
Identificação de uma mistura de β -sitosterol glicosídeo (Qp9).....	53
Perfil cromatográfico do EMeOH de <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp5-Qp8 em <i>Q. parviflora</i>	54
Perfil cromatográfico dos EMeOH de <i>Q. grandiflora</i> , <i>Q. multiflora</i> e <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp5-Qp8 nestas espécies utilizando HPLC-UV-PDA.....	56
Identificação de triterpenos, saponinas e derivados de ácido elágico em <i>Qualea parviflora</i> utilizando HPLC-ESI-IT-MS.....	58

CAPÍTULO 2

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS CLOROFÓRMICOS

DESENVOLVIMENTO/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES.....	63
Estudo químico dos triterpenos e esteróis presentes no ECHCl ₃ de <i>Qualea parviflora</i>	63
Identificação Estrutural.....	65
Identificação de β -sitosterol (Qp10).....	65
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp11).....	67
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp12).....	67
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp13).....	68
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp14).....	69
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp15).....	69
Perfil cromatográfico do ECHCl ₃ de <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp10-Qp13 em <i>Q. parviflora</i> utilizando GC-IT-MS.....	70

Perfil cromatográfico dos ECHCl ₃ de <i>Q. grandiflora</i> , <i>Q. multiflora</i> e <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp10-Qp13 nestas espécies utilizando GC-IT-MS.....	73
CAPÍTULO 3	
<i>ESTUDO FARMACOLÓGICO</i>	
DESENVOLVIMENTO/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES.....	75
Identificação Estrutural.....	65
Identificação de β-sitosterol (Qp10).....	65
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp11).....	67
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp12).....	67
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp13).....	68
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp14).....	69
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp15)	69
Perfil cromatográfico do ECHCl ₃ de <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp10-Qp13 utilizando GC-IT-MS.....	70
Perfil cromatográfico dos ECHCl ₃ de <i>Q. grandiflora</i> , <i>Q. multiflora</i> e <i>Q. parviflora</i> e a identificação de Qp10-Qp13 utilizando GC-IT-MS....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS.....	92
ESPECTROS.....	105
ANEXO.....	167

RESUMO

Neste projeto foram estudadas as cascas de *Qualea parviflora* Mart., *Q. grandiflora* Mart. e *Q. multiflora* Mart., pertencentes à família Vochysiaceae. Espécies de *Qualea* são utilizadas popularmente para problemas gastrointestinais, como antiinflamatória, analgésica, antiúlcera e antidiarréica. O fracionamento do extrato metanólico de *Q. parviflora* forneceu quatro triterpenóides pentacíclicos (arjunglicosídeo, bellericagenina B, bellericasídeo B e 28-*nor*-17,22-*seco*-2 α ,3 β ,19,22,23-pentaidroxi- Δ^{12} -oleanano, inédito), quatro derivados de ácido elágico (ácido 3, 3'-di-*O*-metilelágico-4-*O*- β -glicopiranosídeo, ácido 3-*O*-metilelágico-4'-rhamnapirosídeo, ácido 3, 3',4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-glicopiranosídeo e ácido 3, 3'-di-*O*-metilelágico e um fitoesterol (β -sitosterol glicosídeo). O fracionamento do extrato clorofórmico de *Q. parviflora* forneceu um fitoesterol (β -sitosterol), cinco triterpenos pentacíclicos (lupenona, lupeol, betulina, ácido *epi*-betulínico e friedelina). Essas substâncias foram descritas pela primeira vez no gênero. Análises por HPLC-ESI-IT-MS, HPLC-UV-PDA e GC-IT-MS de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* usando como padrões substâncias isoladas de *Q. parviflora* mostraram perfis qualitativamente semelhantes, mas com diferentes teores. Ensaios farmacológicos demonstraram que o extrato metanólico de *Q. parviflora* não apresentou efeito tóxico agudo, inibindo a formação de úlceras gástricas e reduzindo a severidade das lesões frente a diversos modelos experimentais, confirmando o uso popular. Os extratos metanólicos de *Q. parviflora* e *Q. grandiflora* mostraram diminuição da motilidade intestinal, o que justifica o uso popular como agentes antidiarréico. Por outro lado, não foram observadas atividades antiinflamatória e analgésica, relatadas popularmente. Ensaios com substâncias isoladas do extrato clorofórmico de *Q. parviflora* demonstraram potencial atividade antituberculose.

Palavras-chave: *Qualea parviflora*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora*, Vochysiaceae, bioatividade.

ABSTRACT

In this project, we studied the bark of the following species: *Qualea parviflora* Mart., *Q. grandiflora* Mart. and *Q. multiflora* Mart., which belong to the Vochysiaceae family. Species of *Qualea* are popularly used for gastrointestinal problems, as antiinflammatory, analgesic, antiulcer and antidiarrheal. The methanolic extract of *Q. parviflora* was fractionated to give four pentacyclic triterpenoids (bellericagenin B, bellericaside B and arjunglucoside I and 28-*nor*-17,22-*seco*-2 α ,3 β ,19,22,23-pentahydroxy- Δ^{12} -oleanane, new), four derivatives of ellagic acid (3,3'-di-*O*-methylellagic acid-4-*O*- β -glucopyranoside, 3-*O*-methylellagic acid-4'-rhamnopyranoside, 3,3',4-tri-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-*D*-glucopyranoside and 3,3'-di-*O*-methylellagic acid) and one sterol (β - sitosterol glucoside). The chloroform extract of *Q. parviflora* was fractionated to give five pentacyclic triterpenoids (lupeol, lupenone, betulin, *epi*-betulinic acid, and friedelin) and one sterol (β - sitosterol). These substances are being described for the first time in genus. HPLC-ESI-IT-MS, HPLC-UV-PDA and GC-IT-MS analyses of *Q. grandiflora* and *Q. multiflora* using isolated substances of *Q. parviflora* as standard have shown similar qualitative profiles, but with different content. The pharmacological results have demonstrated that the methanolic extract of *Q. parviflora* did not present acute toxic effect, but inhibited the formation of gastric ulcers and reduced the severity of gastric injuries demonstrated by diverse experimental models, which indicated that this extract is a powerful gastroprotector showing the healing effect of this species. Methanolic extracts of *Q. parviflora* and *Q. grandiflora* had shown reduction from motility intestinal, which justifies the popular use of it as agent antidiarrheal. On the other hand, no anti inflammatory nor analgesic effect has been observed as is popularly recognized. Assays with substances isolated from chloroform extract has demonstrated potential anti tuberculosis activity.

Keywords: *Qualea parviflora*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora*, Vochysiaceae, bioactivity.

INTRODUÇÃO

A ciência terapêutica data da mais remota antiguidade (Hamburger & Hostettmann, 1991). Desde que começaram a aparecer as enfermidades, os homens trataram de combatê-las como melhor sabiam. A natureza foi, sem dúvida, o primeiro médico, o primeiro remédio, a primeira farmácia que o homem recorreu (Navickiene, 2002).

A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (Viegas *et al.*, 2006).

No Brasil, têm-se relatos da utilização de plantas como fonte de alimentos e medicamentos, desde que os primeiros habitantes aqui chegaram. No entanto, as primeiras informações sobre os hábitos indígenas só começaram a ser propagadas com o início da colonização portuguesa. Tempos depois, os jesuítas descreveram várias plantas comestíveis e medicinais do Brasil. Das plantas medicinais, o padre José de Anchieta relatou uma planta chamada de “erva-bom”, a hortelã pimenta, que era muito utilizada pelos índios contra indigestões, para aliviar nevralgias, reumatismos e doenças nervosas (Soares, 2007) e também a ação emética da ipecacuanha e as propriedades anti-sépticas e cicatrizantes do bálsamo copaíba. Ao padre Fernão Cardim deve-se a divulgação de outras plantas, como o jaborandi, a canafístula, o estramônio e o aloés (Cunha, 2003).

O valor intrínseco de uma planta medicinal está no seu efeito terapêutico. A Organização Mundial de Saúde diz que planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos. As funções fisiológicas dos princípios ativos nas plantas ainda não estão

completamente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa da planta contra agentes externos como doenças, pragas, radiação solar, entre outros. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. O metabolismo secundário não é essencial para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas é essencial para a sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema (Montanari Jr, 2007).

A espécie humana se aproveita de uma fração muito pequena das plantas com as quais sempre conviveu e que a antecedem no planeta Terra. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a serem desvendados (Pinto *et al.*, 2002).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população do planeta, de algum modo, utiliza plantas medicinais como medicamentos. Estima-se, também, que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações da medicina tradicional. Entretanto, com o desconhecimento sobre a biodiversidade das florestas tropicais e equatoriais, torna-se óbvio que o uso dos produtos naturais e plantas medicinais ainda é fragmentário e escasso. Cerca de dois terços das espécies de plantas se encontram nos trópicos. Somente o Brasil possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% de toda a flora mundial, e não menos de 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas (Garcia, 1995). Dentro dessa perspectiva, se esperaria que o Brasil fosse um país privilegiado no mercado mundial de fitoterápicos, no entanto, nosso país não tem uma atuação destacada ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (Yunes *et al.*, 2001). Considerando ainda que cerca de 15 a 17% das plantas tiveram seus usos potenciais corretamente investigados e a imensa flora brasileira é praticamente desconhecida em termos químicos, pode-se imaginar o valor econômico de seu estudo (Garcia, 1995, Calixto, 2000).

A fitoterapia constitui uma forma de tratamento medicinal que vem crescendo no mundo em torno de 15% ao ano (Brasil, 2007). Somente na Alemanha, se

consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa. As plantas medicinais são usadas para o tratamento de resfriados (66%), gripes (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), úlcera estomacal (36%) entre outros. Além da auto-medicação, 70% dos clínicos gerais alemães prescrevem as centenas de ervas licenciadas neste país (Calixto, 2000).

No Brasil, as informações técnicas existentes para a maioria das plantas medicinais ainda são insuficientes para garantir qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas (Arnous *et al.*, 2005). Infelizmente, o estado de arte da maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria brasileira está fundamentado somente no uso popular das plantas sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica, não podendo portanto ser competitivo a nível nacional e muito menos internacional (Yunes *et al.*, 2001).

Algumas características desejáveis das plantas medicinais são sua eficácia, baixo risco de uso, assim como a reprodutibilidade e constância de qualidade. Entretanto, devem ser levados em conta alguns pontos para a formulação dos fitoterápicos, necessitando do trabalho multidisciplinar, para que a espécie vegetal seja selecionada corretamente, o cultivo seja adequado, a avaliação dos teores dos princípios ativos seja feita e para que a manipulação e a aplicação clínica médica ocorram (Arnous *et al.*, 2005).

A domesticação, a produção, os estudos biotecnológicos e o melhoramento genético de plantas medicinais podem oferecer vantagens, uma vez que torna possível obter uniformidade e material de qualidade que são fundamentais para a eficácia e segurança. A necessidade exige e a ciência tem que buscar a unificação do progresso com aquilo que a natureza oferece, respeitando a cultura do povo em torno do uso de produtos ou ervas medicinais para curar os males (Arnous *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que o valor dos produtos naturais das plantas medicinais para a sociedade e para a economia do país é incalculável (Garcia *et al.*, 1995). O estudo das correlações entre a estrutura química dos constituintes ativos e a ação farmacológica levam à descoberta de novas moléculas naturais de elevada

atividade farmacológica (Cunha, 2003). Além disso, muitos dos produtos naturais constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos, tais como procaína, cloroquina, tropicamida, ou de fármacos imprescindíveis como vimblastina, vincristina, podofilotoxina (e os análogos etoposídeo, teniposídeo), taxol e mais recentemente camptotecina e derivados, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente. Depois da descoberta destes medicamentos de origem vegetal, é possível entender a corrida entre algumas indústrias transnacionais pela busca de substâncias biotivas novas (Pinto *et al.*, 2002).

Sendo assim, é necessário que nossos cientistas se envolvam cada vez mais na luta pela preservação da natureza e que façam programas de utilização da biodiversidade, os quais sejam ecológico e economicamente viáveis e estejam amplamente associados às questões sociais de nosso país (Garcia *et al.*, 1995), pois o Brasil não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (Pinto *et al.*, 2002).

A Família Vochysiaceae

A família Vochysiaceae é formada por árvores tropicais e dividida em duas tribos, seis gêneros e aproximadamente 200 espécies. A tribo Erismeeae apresenta dois gêneros, chamados *Erismadelphus* (3 espécies, no oeste africano) e *Erisma* (20 espécies, na América do Sul), enquanto a tribo Vochysyeae é composta de 4 gêneros, chamados *Callisthene* (10 espécies), *Qualea* (60 espécies), *Salvertia* (1 espécie) e *Vochysia* (105 espécies), sendo todas elas neotropical (Mayworm *et al.*, 2000).

Os gêneros da família Vochysiaceae se diferenciam pelas características de suas flores e frutos (Mayworm *et al.*, 2000).

A química da família Vochysiaceae ainda é pouco conhecida. A partir das informações apresentadas na Tabela 1, verifica-se a variedade de metabólitos secundários presentes nas espécies investigadas.

Tabela 1. Metabólitos isolados de espécies da família Vochysiaceae.

Espécie	Substâncias isoladas	Referências
<i>Erisma calcaratum</i> Warm.	ácido tri- <i>O</i> -metilelágico ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metil-4'- <i>O</i> -rutinosilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975 Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Qualea cordata</i> , <i>Q. dichotoma</i> , <i>Q. cryptantha</i> , <i>Q. grandiflora</i> , <i>Q. multiflora</i> e <i>Q. parviflora</i> .	arabinose, galactose, glicose, manose e rhamnose	Mayworm <i>et al.</i> (2000)
<i>Qualea cordata</i> , <i>Q. dichotoma</i> , <i>Q. cryptantha</i> , <i>Q. grandiflora</i> , <i>Q. multiflora</i> e <i>Q. parviflora</i>	ácido palmítico, ácido oléico e ácido láurico	Mayworm & salatino, 2002
<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	Taninos pirogálicos e catequínicos (ácido gálico, pirogalol, pirocatequina) e catecol	Rocha <i>et al.</i> , 1979/80 Rocha <i>et al.</i> , 1979/80; Corrêa <i>et al.</i> , 1985
<i>Qualea labouriauana</i> Paula	(2R)-5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (2R)-5,7,4'-triidroxi-8-metilflavanona (2S, 3S)-3,7,4'-triidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona 2,2'-diidroxi-4,4',6,6'-tetrametoxi-3,3'-dimetilbenzofenona 2,2',4,4'-tetrametoxi-5,5'-dimetilbenzofenona sitosterol	Corrêa <i>et al.</i> , 1981 Corrêa <i>et al.</i> , 1981 Corrêa <i>et al.</i> , 1981 Corrêa <i>et al.</i> , 1981 Corrêa <i>et al.</i> , 1981 Corrêa <i>et al.</i> , 1985
<i>Qualea paraensis</i> Ducke	(2R)-5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6,8-dimetilflavanona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981; Corrêa <i>et al.</i> , 1985
<i>Salvertia convallariodora</i> St. Hil.	7,3',4'-triidroxiflavona 7,3',4'-triidroxiflavona-7-glicosídeo 3'-metoxi-7,4'-diidroxiflavona 3'-metoxi-7,4'-diidroxiflavona-7-glicosídeo ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metilelágico ácido 3,3',4,4'-tetra- <i>O</i> -metilelágico ácido 3'- <i>O</i> -metil-3,4- <i>O</i> , <i>O</i> -metilideno-elágico	Lopes <i>et al.</i> , 1979 Lopes <i>et al.</i> , 1979 Lopes <i>et al.</i> , 1979 Lopes <i>et al.</i> , 1979 Corrêa <i>et al.</i> , 1975 Corrêa <i>et al.</i> , 1975 Corrêa <i>et al.</i> , 1975

	ácido 3',4'-di- <i>O</i> -metil- <i>O</i> , <i>O</i> -metilideno-elágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Vochysia acuminata</i> Bongard	ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Vochysia cinnamomea</i> Pohl.	7,3',4'-triidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	3'-metoxi-7,4'-diidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
<i>Vochysia divergens</i> Pohl.	β -sitosterol	Hess & Monache, 1999
	ácido betulínico	Hess <i>et al.</i> , 1995
	ácido divergióico	Hess <i>et al.</i> , 1995
	ácido 24-hidroxitormêntico	Hess <i>et al.</i> , 1995
	ácido tormêntico	Bortalanza <i>et al.</i> , 2002
<i>Vochysia ferruginea</i> Mart.	ácido 6 β -hidroximaslinico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
<i>Vochysia guianensis</i> Poir.	vochysina	Baudouin <i>et al.</i> , 1983
<i>Vochysia pacifica</i> Cuatrec.	ácido betulínico	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	ácido sericico	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	ácido 24-hidroxitormentico	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	ácido 24-hidroxitormentico, glicosil éster	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	traquelosperogenina B	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	quadranosídeo I	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	nigaichigosídeo F1	Weniger <i>et al.</i> , 2005
<i>Vochysia pyramidalis</i> Mart.	ácido betulínico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
	ácido 4- <i>epi</i> -vismiaefólico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
	ácido 2 α .3 β ,19 α -triidroxí-24-oxo-urs-12-en-28-óico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
<i>Vochysia tucanorum</i> Mart.	7,3',4'-triidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
<i>Vochysia tyrsoides</i> Pohl	ácido tri- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
	ácido tetra- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Vochysia vismiaefolia</i> Spruce	ácido bartogênico	Araújo & Souza, 1990
	ácido vismiaefólico	Araújo & Souza, 1990

O gênero *Qualea*

A biodiversidade do cerrado é muito mais rica do que a rápida visão da paisagem permite supor. Há cinco espécies diferentes de plantas lenhosas, dentre as quais a árvore mais comum é a *Qualea grandiflora* (Figura 1a), conhecida como pau-terra, pau-terra-de-folha-larga, pau-terra-do-cerrado, ariavá. Essa árvore é uma espécie de símbolo do cerrado. De um modo geral, as plantas típicas do cerrado precisam criar mecanismos para sobreviver em solos pobres em nutrientes e muito ácidos, com alto teor de alumínio, e desenvolvem grande capacidade de adaptação para resistir à longa estação seca (Universidade, 2007; Lorenzi, 1998).

As cascas, entrecascas e folhas de *Qualea grandiflora* são usadas como adstringente e antidiarréico (Septímio, 1994), para limpeza de úlceras externas e também contra inflamações (Almeida *et al.*, 1998). Estudos com *Qualea grandiflora* demonstraram atividade antiúlcera gástrica (Hiruma-Lima *et al.*, 2006), atividade analgésica e anticonvulsivante (Gaspi *et al.*, 2006).

Qualea parviflora (Figura 1b) conhecida como pau-terra-de-flor-miudinha, pau-terra-mirim, coatá-quicaúva é utilizada como antiséptico externo e contra azia (Lorenzi, 1998; Pott & Pott, 1994). Estudos com *Qualea multiflora* (Figura 1c) conhecida como cinzeiro, pau-tucano, uva-puva-do-campo, mostraram letalidade aos ovos e caramujo do *Schistosoma mansoni* (Lorenzi, 1998; Souza *et al.*, 1994).

A literatura disponível sobre a composição química de espécies do gênero *Qualea* é bastante restrita.

Lopes *et al.* (1979) identificaram flavonóides nas folhas de Vochysiaceae (*Salvertia convallariodora* St. Hil., *Vochysia cinnamomea* Pohl e *Vochysia tucanorum* Mart.). Entretanto em *Qualea parviflora* Mart. e *Qualea grandiflora* Mart. não foram detectados flavonóides.

Rocha *et al.* (1979/80) verificaram que as cascas de *Qualea grandiflora* apresentaram um teor de 14% de substâncias tânicas em relação ao extrato seco e que estas substâncias eram constituídas por mistura de taninos pirogálicos e catequínicos, entre eles ácido gálico, pirogálico e pirocatequina.

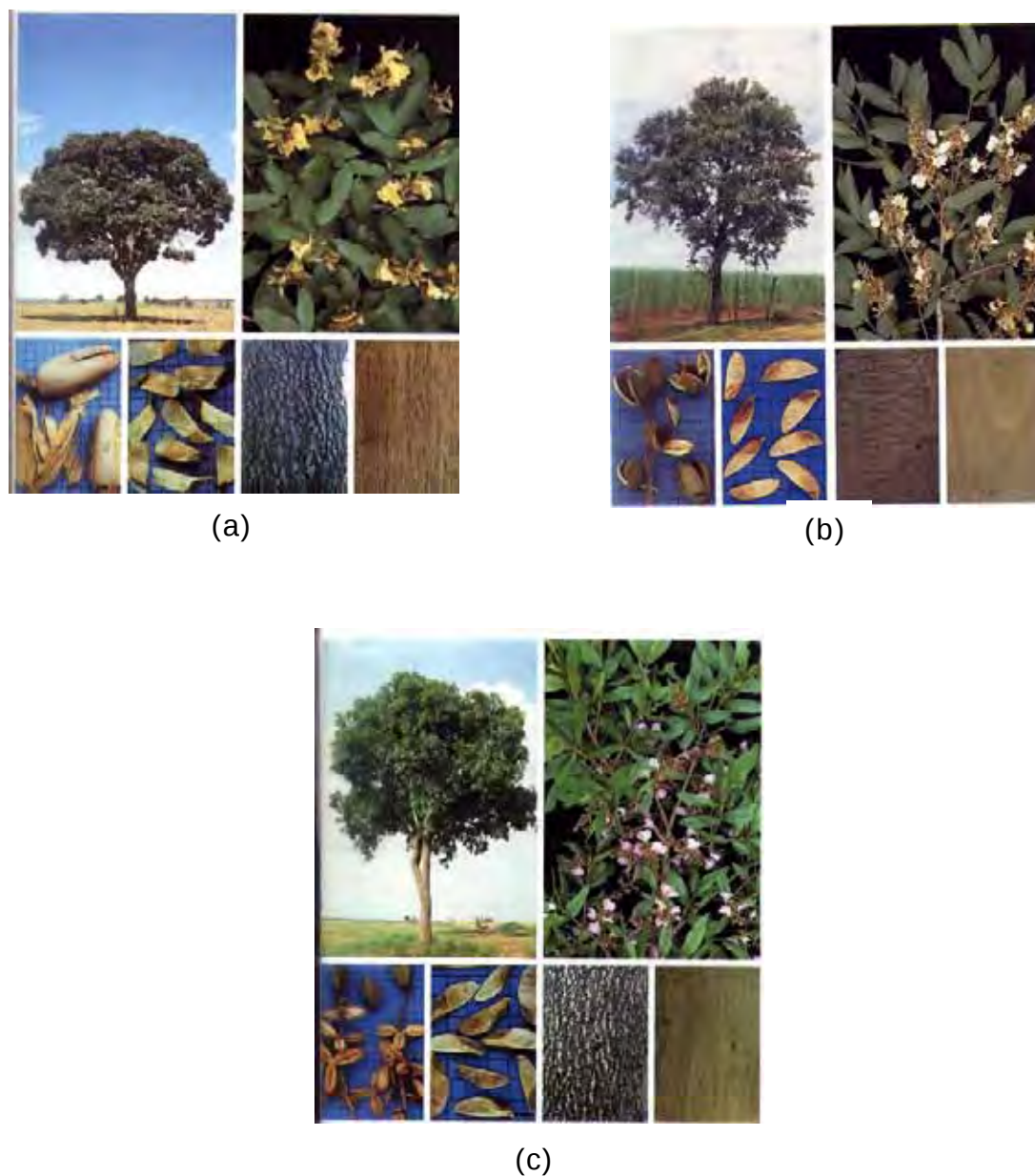


Figura 1: Fotos da árvore, folhas e flores, frutos, sementes, cascas e madeira de (a) *Qualea grandiflora*, (b) *Q. multiflora* e (c) *Q. parviflora* (Lorenzi, 1998).

Corrêa *et al.* (1985) estudaram Vochysiaceae e relataram a presença de flavanonas, 2,2',4,4'-tetrametoxi-5,5'-dimetilbenzofenona e sitosterol no caule de

Qualea labouriouana Paula, de uma flavanona no caule de *Qualea paraensis* Ducke e de ácido gálico, pirogalol e catecol nas cascas de *Qualea grandiflora* Mart.

Pott & Pott (1994) mencionaram a existência de taninos e de corantes amarelos e negros em *Qualea grandiflora*. Os mesmos autores relataram a ocorrência de taninos em *Qualea parviflora*.

Mayworm *et al.* (2000) quantificaram arabinose, galactose, glicose, manose e ramnose em sementes de Vochysiaceae, incluindo *Qualea cordata*, *Qualea dichotoma*, *Qualea cryptantha*, *Qualea grandiflora*, *Qualea multiflora* e *Qualea parviflora*. Arabinose foi o componente predominante em todas as espécies. Os autores sugerem que a distribuição de polissacarídeos são úteis como marcadores taxonômico de Vochysiaceae.

Mayworm & Salatino (2002) verificaram a distribuição de ácidos graxos em sementes de Vochysiaceae, incluindo *Qualea cordata*, *Qualea dichotoma*, *Qualea cryptantha*, *Qualea grandiflora*, *Qualea multiflora* e *Qualea parviflora*. Ácido palmítico e ácido oleico foram os ácidos graxos predominantes na maioria das espécies. Entretanto, *Qualea grandiflora* possui excepcional quantidade de ácido láurico.

Atividade antiúlcera gástrica

Aproximadamente 10% da população ocidental e 10% da asiática são vítimas da úlcera gástrica, o que acarreta altos custos à sociedade, e em alguns casos, é letal (Berstad & Berstad, 1993). Existem vários fatores que promovem o desencadeamento de úlceras gástricas como a utilização freqüente de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINE); a presença da bactéria *Helicobacter pylori* na mucosa do trato gastrointestinal; o hábito de fumar; o constante stress e hábitos alimentares (Lima, 1998).

Dentre os agentes químicos envolvidos nos processos gastrintestinais pode-se citar as prostaglandinas e o óxido nítrico. As prostaglandinas são produtos do metabolismo do ácido aracdônico, as quais são liberadas a partir dos fosfolipídios das membranas celulares pela atividade da fosfolipase A₂, em resposta aos

estímulos químicos, físicos e neuro-hormonais. A citoproteção das mucosas do trato gastrointestinal é dependente das prostaglandinas do tipo E, F e I que estimulam a secreção de muco e bicarbonato, além de aumentar o fluxo sanguíneo, possibilitando assim a remoção de substâncias nocivas à mucosa, aumentando também a demanda de oxigênio e nutrientes para os tecidos (Ganong, 1993). O óxido nítrico, substância endógena, é responsável por promover uma intensa vasodilatação, aumentando assim o fluxo sanguíneo na mucosa, causando dessa forma o aumento na demanda de oxigênio e nutrientes para as células (Konturek *et al.*, 1995).

Um grande agente citoprotetor das mucosas do trato gastrointestinal é o muco. O muco luminal participa somente da lubrificação e proteção da mucosa contra forças mecânicas. O muco aderido à mucosa, constituído por uma camada de glicoproteínas na forma de gel (mucina), é insolúvel em água e protege a mucosa do contato direto do ácido clorídrico e da pepsina (Aires, 1999).

Atualmente muitos produtos são empregados no tratamento de úlceras gástricas, no entanto muitas destas drogas provocam reações colaterais adversas como arritmia, impotência, entre outras. Os extratos de plantas são uma das mais atraentes fontes de novas drogas, pois têm mostrado resultados bastante promissores no tratamento desta doença (Hiruma-Lima *et al.*, 2000; 2001). A medicina popular utiliza um vasto número de plantas e ervas no tratamento de disfunções gástricas assim como, úlceras gástricas (Toma *et al.*, 2002). Assim, esta é uma importante razão para se investigar a atividade antiúlcera de plantas popularmente consumidas a fim de conseguir drogas mais eficiente e menos nocivas à saúde.

Neste sentido, o estudo químico-farmacológico de *Qualea ssp* vem contribuir para o conhecimento sobre este gênero utilizado pela população para o alívio de problemas gastrointestinais. Cabe ressaltar que este trabalho foi baseado na investigação de plantas de vários gêneros, todas incluídas no projeto temático: “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica

em plantas superiores”, incluído no programa Biota/Fapesp (Processo: 02/05503-6).

A Figura 2 apresenta as estruturas dos metabólitos secundários isolados e identificados neste trabalho, do EMeOH de *Qualea parviflora* e a Figura 3 apresenta as estruturas dos metabólitos secundários do ECHCl₃ da mesma planta. Vários destes metabólitos foram também identificados em *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*, com o auxílio de técnicas como HPLC-PDA-UV, HPLC-ESI--IT-MS e GC-IT-MS, os quais serão discutidos neste trabalho.

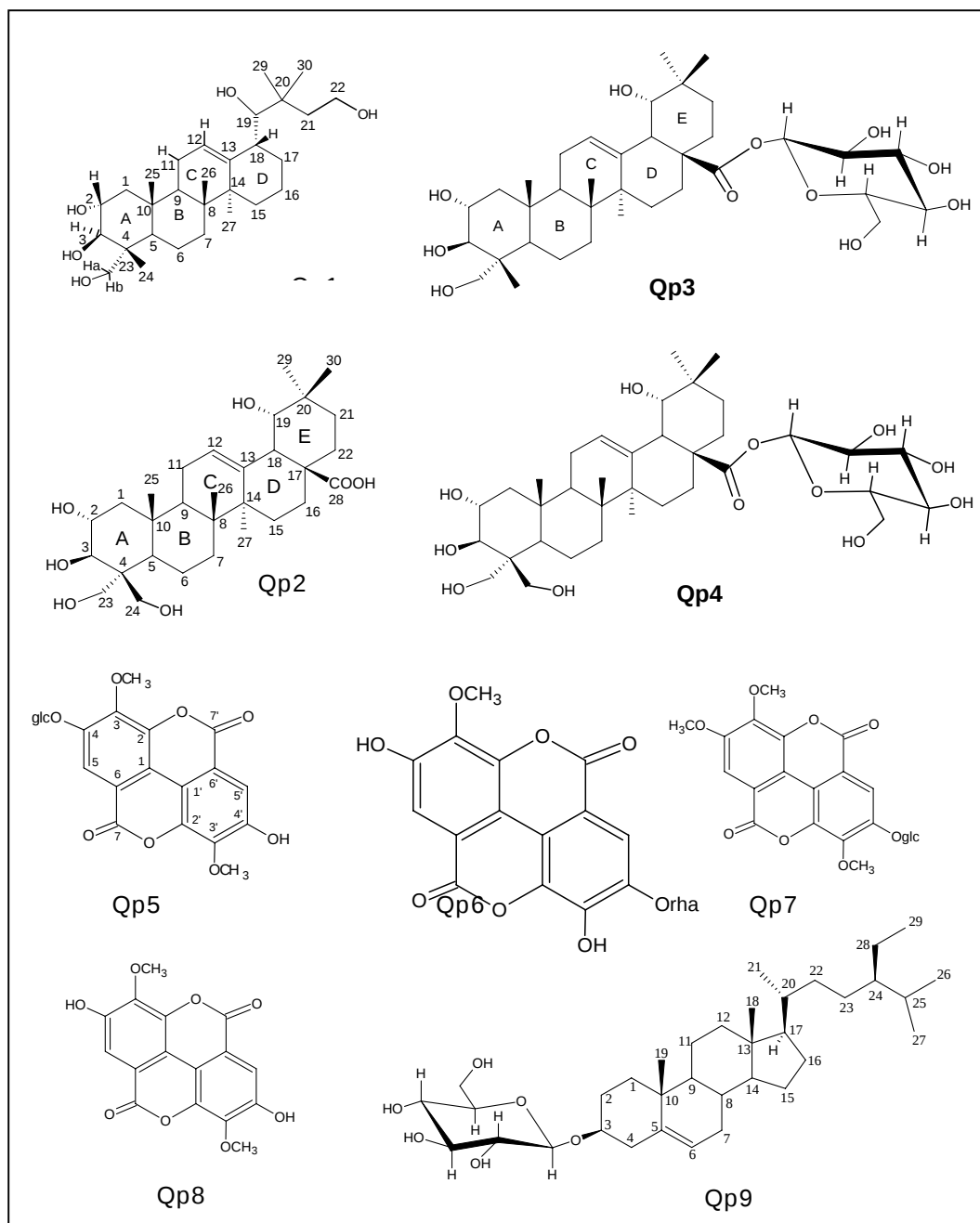


Figura 2. Estruturas dos metabólitos secundários isolados e identificados, neste trabalho, do EMeOH de *Q. parviflora*.

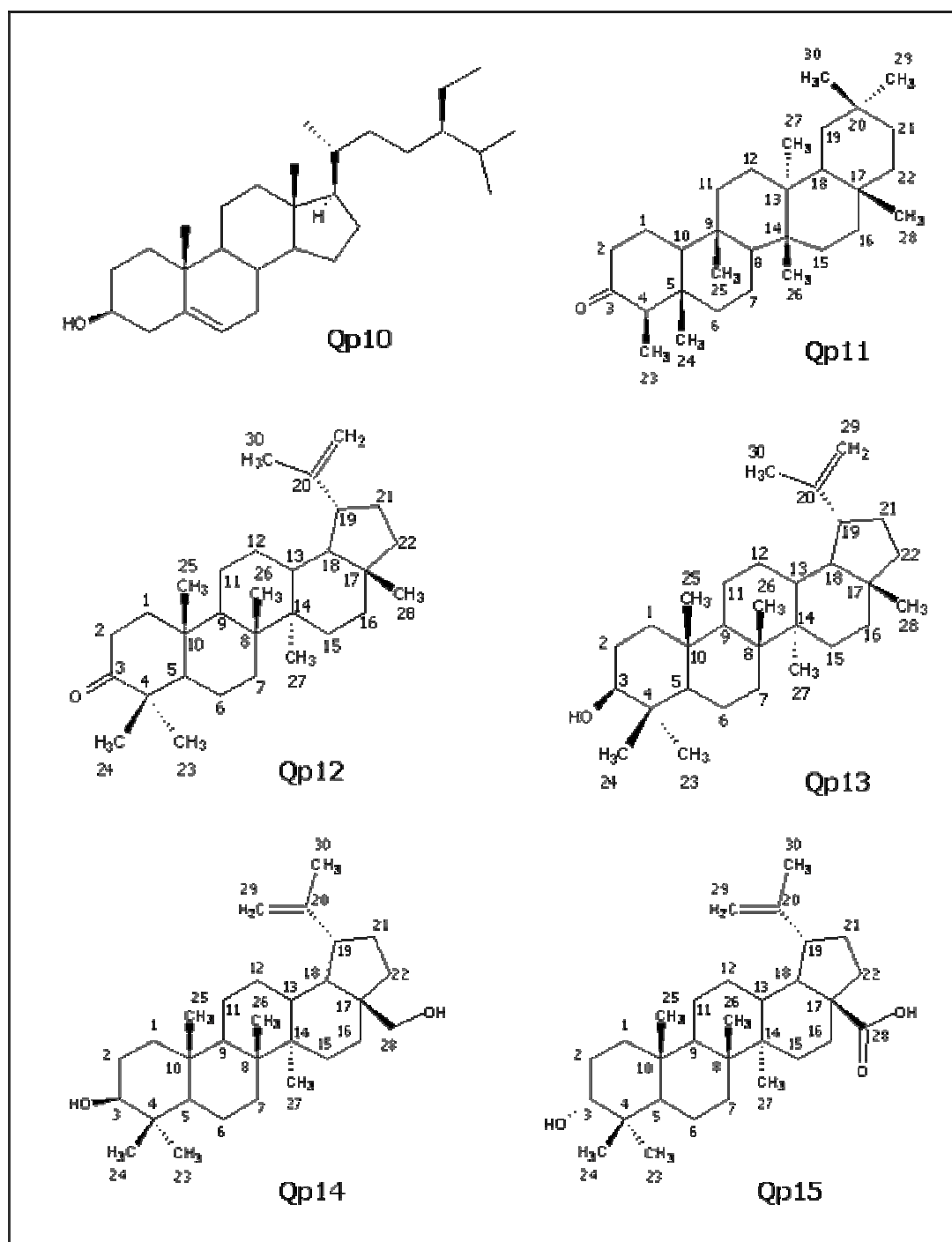


Figura 3. Estruturas dos metabólitos secundários isolados e identificados, neste trabalho, do ECHCl₃ de *Q. parviflora*.

OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Contribuir para o uso sustentável do bioma do Estado de Tocantins, realizando o isolamento e a elucidação estrutural dos constituintes químicos de espécies do Cerrado com propriedades medicinais, bem como a avaliação das potenciais atividades farmacológicas do gênero *Qualea* (Vochysiaceae).

Objetivos específicos:

- Dar continuidade ao estudo integrado químico-farmacológico de plantas medicinais;
- Avaliar o potencial químico-farmacológico de espécies *Qualea parviflora*, *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* (Vochysiaceae).

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Reagentes

Solventes PA: hexano, acetato de etila, ácido acético, clorofórmio, metanol (Synthlab[®]).

Solventes grau HPLC: acetonitrila, clorofórmio, metanol (Merck[®] e Mallinkrodt[®]), ácido trifluoroacético – TFA (Riedel-deHaën) e água purificada em sistema Milli-Q.

Solventes deuterados: CDCl₃, DMSO-d₆ e piridina-d₅ (Aldrich[®]).

Reveladores para CCCD

- i. Luz UV 254-366 nm (Chromatovue[®])
- ii. Anisaldeído / H₂SO₄ (Wagner *et al*, 1984)
- iii. Vapores de iodo sublimado

Equipamentos e Procedimentos

Ressonância Magnética Nuclear

Espectrômetro Varian INOVA 500 de 11.7 T operando a 500 MHz (RMN de ¹H) e 125 MHz (RMN de ¹³C) foi utilizado para a realização dos experimentos de RMN 1D (¹H, ¹³C, DEPT e NOESY) e 2D (¹H-¹H *g*COSY, *g*HMQC e *g*HMBC). Os deslocamentos químicos são dados em d (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Espectrometria de Massas

Espectrômetro de massas Micromass Q-TOF. As condições utilizadas foram: ionização por Electrospray (modo positivo e negativo), temperatura da fonte 100°C, voltagem capilar 3.0 kV e cone de voltagem 40 V. As amostras foram introduzidas na fonte de eletrospray usando uma seringa e fluxo de 8 µL/min. A pressão de He foi mantida constante. Esses experimentos foram realizados no IQ-UNICAMP, em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Jasco) equipado com bomba de solvente quaternária PU-2089, com detector de arranjo de foto diodos (HPLC-UV-PDA), MD-2010, injetor Rheodyne 7125 (Rheodyne®) com um loop de 20 µl. *EZChrom Elite Data System* software foi usado para a detecção e processamento dos dados. Coluna analítica de fase reversa C₁₈, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, apresentando partículas com tamanho de 5 µm e poro com diâmetro interno de 100 Å, e uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4 x 3 mm. A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos com 0,05% de TFA. O programa gradiente foi o seguinte: 16-40% B (30 min), 40-70% B (5 min), 70-100% B (5 min), e 100% B isocrático (5 min). O tempo total da análise foi de 45 min. O fluxo da fase móvel foi de 1.0 mL/min.

Cartuchos de extração em fase reversa (C₁₈ - Waters) foram usados nas etapas de clean up dos extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em discos de 0.45 µm de poro (Millipore®).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas

Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas LCQ DECA (ESI-IT-MS, Thermo Finnigan®). As amostras estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). As análises por HPLC-ESI-IT-MS foram realizadas junto aos grupos do Prof. Cosimo Pizza/ Sonia Piacente da Università degli Studi di Salerno e da Dr^a Virginia Carbone do Instituto di Scienze dell Centro di Spectrometria di Massa Proteomica e Biomoleculare – Itália. Coluna Hypersil BDS C18 column (250mm x 2.1mm, 5µm) foi utilizada. A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos com 0,5% de ácido acético. O programa gradiente foi o seguinte: 10% B isocrático (5 min), 10-66% B (35 min), 66-95% B (10 min), 95% B isocrático (5 min). O tempo total da análise foi de 55 min. O fluxo da fase móvel foi de 200µL/min.

Foi utilizado o modo negativo para a geração e análise dos espectros de massas, sob as seguintes condições: voltagem capilar -4V, voltagem do spray - 5KV, temperatura do capilar 280°C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 100-1500, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS² realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento.

O software *Xcalibur* versão 1.3 (Thermo Finnigan®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

Cromatografia por gotejamento em contracorrente

Cromatógrafo Tokyo Rikakikai CO, equipado com 300 colunas de vidro 2,0 d.i. x 400 mm. Fluxo 10 mL/45 min. A fase móvel utilizada foi a fase inferior (fase orgânica) do sistema CHCl₃/MeOH/H₂O (43: 37: 20; v/v) e a fase estacionária foi a fase superior (fase aquosa). Desse modo, a cromatografia foi desenvolvida no modo descendente. A coleta foi feita em coletor automático programado para coletas de 6 min.

Cromatografia em camada delgada comparativa e preparativa

Foi utilizada sílica gel 60 (Merck) para a Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC) e sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) para a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP). Em ambos os casos foi preparada uma suspensão de sílica em água destilada, a qual foi espalhada sobre placas de vidro usando um espalhador manual de sílica. As espessuras das placas foram de 0,25 mm para as CCDC e de 1,00 mm para as CCDP. Após a preparação das placas, estas foram deixadas em repouso por cerca de 8 horas à temperatura ambiente, e depois em estufa a 120°C por cerca de 30 minutos. Foram usadas também placas compradas

de sílica gel 60 (DC-FERTIGPLATTEN DURASIL – 25UV254 – MARCHEREY - NAGEL), de tamanho 10 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente.

Cromatografia em coluna

Foi utilizada sílica gel 70-230 mesh (Merck) para cromatografia em coluna e sílica gel 60H (Merck) para cromatografia em coluna, sob pressão. A quantidade de sílica empregada foi aproximadamente 20 vezes a quantidade de amostra. As aplicações foram realizadas pela impregnação do extrato em uma pequena quantidade de sílica posteriormente aplicada no topo da coluna. As eluições foram realizadas no modo gradiente de polaridade (CHCl_3 -MeOH). As frações foram coletadas pela observação das manchas eluídas e/ou por frações de 10 mL.

Cromatografia por permeação em gel

Utilizou-se coluna de vidro (1 m x 2,5 cm) preenchida com Sephadex LH20 (Pharmacia) eluída com metanol (0,5 mL/min). As frações com aproximadamente 5 mL foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

Cromatografia gasosa – espectrometria de massa

Cromatógrafo gasoso GC-17A (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu) Quadrupolo QP 5050A e injetor automático AOAC 20i, técnica de ionização por impacto eletrônico com energia de 70eV. Coluna cromatográfica LM-5 (5% fenil, 95% metilpolisiloxano L&M) 15m x 0.2mm d.i.; 0.2 μm de espessura do filme). A temperatura de trabalho da coluna foi otimizada utilizando-se a seguinte programação: 150 a 300°C (8°C/min) permanecendo 10 minutos nesta temperatura; enquanto as temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 250°C e 310°C, respectivamente.

Os gases do sistema foram: ar sintético (291 mL/min) e hidrogênio (33mL/min) para a chama do detector e nitrogênio como make-up (31mL/min) e gás de arraste (1 mL/min). O modo de injeção foi o splitless/split (12s seguido de split 1:20 e o volume de injeção foi de 1 μL). O tempo total da análise foi de 30

minutos. *EZChrom Elite Data System* software foi usado para a detecção e processamento dos dados. Esses experimentos foram realizados no IQ-UNESP, em colaboração com a Prof^a. Dr^a Mary Rosa Rodrigues de Marchi.

Cartuchos de extração em fase normal (Sílica – Waters) foram usados nas etapas de clean up dos extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em discos de 0,45 µm de poro (Millipore[®]).

CAPÍTULO 1

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS

DESENVOLVIMENTO/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES

Coleta do Material Vegetal

As cascas de *Qualea grandiflora* (Qg) foram coletadas na estrada Pedro Afonso, no Estado de Tocantins por Cristiano Borges Pereira em 25 de outubro de 2003; as cascas de *Qualea multiflora* (Qm) foram coletadas na região do cerrado, no Estado de Tocantins pela Dr. Hiruma-Lima em 02 de agosto de 2003 e as cascas de *Qualea parviflora* (Qp) foram coletadas no Porto Nacional, no Estado de Tocantins por Adriane R. Duarte em 10 de dezembro de 2003. A identificação de todas as espécies vegetais foi realizada pela Dr^a. Solange de Fatima Lolis (UNITINS) e catalogadas com o número de exsicata 3379, 4158 e 9226, respectivamente e foram depositadas no herbário da Universidade do Tocantins (HTINS).

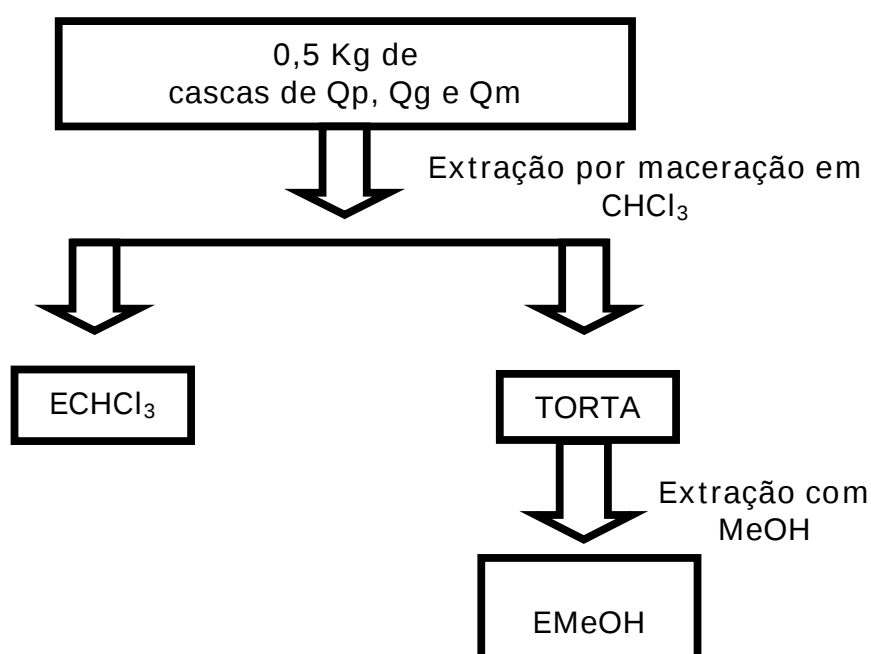
Preparo dos Extratos

As cascas foram secas e trituradas em moinho de facas e em seguida, foram submetidas às extrações por maceração em CHCl_3 e em MeOH, respectivamente. Após a evaporação dos solventes em rotaevaporador foram obtidos os ECHCl₃ e EMeOH (Tabela 2 e Figura 4).

Análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos EMeOH de *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora* juntamente com padrões de catequinas [(+)-catequina, (-)-epicatequina], flavonóides (rutina e quercetina), ácido gálico, galato de metila, lupeol e revelação com reagentes específicos (NP/PEG, anisaldeído sulfúrico, iodo e UV em 254 e 365 nm) indicaram a presença de polifenóis, terpenos, saponinas e taninos. A indicação da presença de saponinas foi verificada pela formação de espuma persistente quando da agitação de uma alíquota do extrato em um tubo de ensaio com água [Simões *et al.*, 1999].

Tabela 2: Quantidade obtida dos extratos preparados das três espécies de *Qualea* em estudo

Espécie	ECHCl ₃ (g)	EMeOH (g)
<i>Qualea parviflora</i> (Qp)	17,3	46,1
<i>Qualea grandiflora</i> (Qg)	18,5	54,3
<i>Qualea multiflora</i> (Qm)	16,9	51,1

Figura 4: Fluxograma da obtenção dos extratos das cascas de *Q. grandiflora* (Qg), *Q. multiflora* (Qm) e *Q. parviflora* (Qp).

Devido à grande quantidade de terpenos presentes em *Qualea parviflora* (Figura 5), optou-se por iniciar o estudo fitoquímico do EMeOH a partir desta espécie.

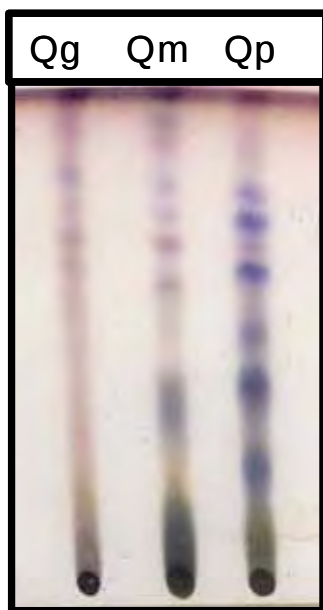


Figura 5. CCDC dos extratos das cascas de *Q. grandiflora* (Qg), *Q. multiflora* (Qm) e *Q. parviflora* (Qp). Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:02 v/v); revelador: anisaldeído sulfúrico.

Estudo químico dos triterpenos e saponinas presentes no EMeOH

Normalmente, a medicinal popular emprega as ervas na forma de extratos brutos de plantas sem nenhuma pré-purificação, isolamento ou determinação estrutural. No entanto, o isolamento é a etapa-chave, pois a maioria dos extratos vegetais são misturas altamente complexas. Existem várias metodologias empregadas no isolamento de constituintes a partir de extratos brutos. No entanto, compostos polares glicosilados podem adsorver irreversivelmente à fase estacionária ou até mesmo sofrer degradação devido à atividade catalítica de alguns suportes sólidos. Ainda, a necessidade de grandes quantidades de material para a realização de ensaios farmacológicos *in vivo*, requer rapidez e eficácia no processo de separação. Dentro deste contexto, avaliou-se o uso da cromatografia

em contra-corrente por gotejamento (DCCC) como método de fracionamento do EMeOH das cascas de *Qualea parviflora*.

DCCC

DCCC é uma técnica cromatográfica por partição líquido-líquido isenta de suporte sólido eliminando, portanto o problema da adsorção irreversível (Foucault, 1991). O equipamento de DCCC é geralmente constituído por 200-600 colunas de vidro verticais, conectadas em série por tubos de teflon. A fase móvel pode ser introduzida no modo ascendente ou descendente, conforme sua densidade em relação à fase estacionária. Geralmente são utilizados sistemas de solventes ternários ou quaternários. Raramente são utilizados sistemas binários, já que a adição de um terceiro ou quarto solvente diminui a diferença de polaridade entre as duas fases, aumentando a seletividade do sistema (Leite *et al.*, 2005).

O sucesso da cromatografia em contra-corrente depende da escolha correta do sistema de solvente, que pode ser realizada através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), partição líquido-líquido ou consulta de listas de solventes otimizados para classes específicas de produtos naturais (Leite *et al.*, 2005).

A escolha do sistema de solventes

Vale ressaltar, que a escolha do sistema de solventes adequado ao isolamento de substâncias de origem natural é o ponto-chave para o sucesso da DCCC (Leitão, 2005). Além disso, para esta técnica, a formação de gotas é fundamental. Os eluentes normalmente utilizados em DCCC, devem ser compostos de um sistema binário, com grande diferença de polaridade e de densidade e ainda solventes auxiliares com polaridades intermediárias. A polaridade das substâncias a serem isoladas determina o tipo de sistema de solventes a ser utilizado (Vieira *et al.*, 1996). Uma lista de solventes otimizados para classes específicas de produtos naturais, tem sido de grande auxílio na escolha do modo e da fase para DCCC (Hostettman *et al.*, 1986). A otimização do sistema de eluentes e a escolha do

modo de eluição (ascendente ou descendente) é feita com base em cromatografia de camada delgada, utilizando-se a fase orgânica como eluente. Caso $R_f > 0.5$, usa-se como fase móvel a orgânica; caso $R_f < 0.5$, a fase móvel será a aquosa (Vieira *et al.*, 1996).

Algumas das vantagens associadas ao uso da DCCC são: a facilidade de operação, o pequeno volume e baixo custo dos solventes utilizados, a possibilidade de injeção de extratos brutos em quantidades relativamente grandes, e principalmente a recuperação completa do material injetado (Vieira *et al.*, 1996).

Fracionamento do EMeOH utilizando DCCC

Durante as separações por DCCC, a primeira etapa a ser realizada é a escolha do sistema de solvente. Assim, o objetivo da nossa análise foi desenvolver um método eficiente para o isolamento em escala preparativa dos terpenos contidos no EMeOH de *Q. parviflora*.

Vários sistemas de solventes em diferentes proporções foram testados, dentre eles o melhor resultado foi obtido com o uso de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43: 37: 20; v/v).

O EMeOH foi submetido à DCCC. Para isso o EMeOH foi solubilizado em 8 mL de fase móvel e 8 mL de fase estacionária. As colunas do sistema inicialmente foram preenchidas com a fase estacionária. Em seguida, o reservatório de injeção foi preenchido com a solução-amostra e então iniciou-se a eluição com a fase móvel. A cromatografia foi desenvolvida no modo descendente ($R_f > 0.5$). A coleta foi feita em coletor automático programado para coletas de 6 minutos.

Foram obtidas 124 frações. As frações 16 e 17 foram solubilizadas em MeOH e obteve-se a formação de cristais puros na parede do tubo (F16c e F17c), porém em pequena quantidade. As frações 16s e 17s, que permaneceram solúveis no MeOH apresentaram impurezas e foram submetidas à CCDP utilizando-se sílica como fase estacionária e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:2, v/v) como fase móvel para fornecer o metabólito Qp1 (10 mg) com uma massa mais expressiva (Figura 6).

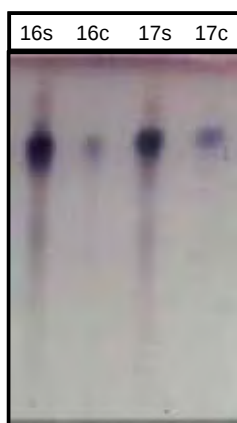


Figura 6: CCCD das sub-frações obtidas da CCDP de F16-17. Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:02, v/v); revelador: anisaldeído sulfúrico.

A fração F23 forneceu o metabólito Qp2 (4 mg), a fração F82 forneceu o metabólito Qp3 (8 mg) e a fração F105-110 forneceu o metabólito Qp4 (17 mg). Na Figura 7 estão apresentadas as análises por CCDC dos metabólitos Qp1- Qp4 isolados neste trabalho.

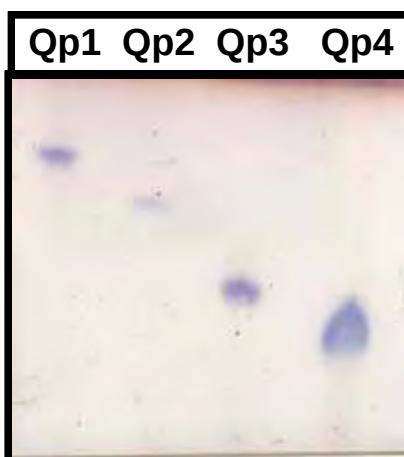


Figura 7: CCCD dos metabólitos Qp1-Qp4 isoladas de *Q. parviflora*. Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:02, v/v); revelador: anisaldeído sulfúrico.

A seguir foi descrito o fluxograma para o isolamento dos constituintes do EMeOH das cascas de *Q. parviflora* (Figura 8).

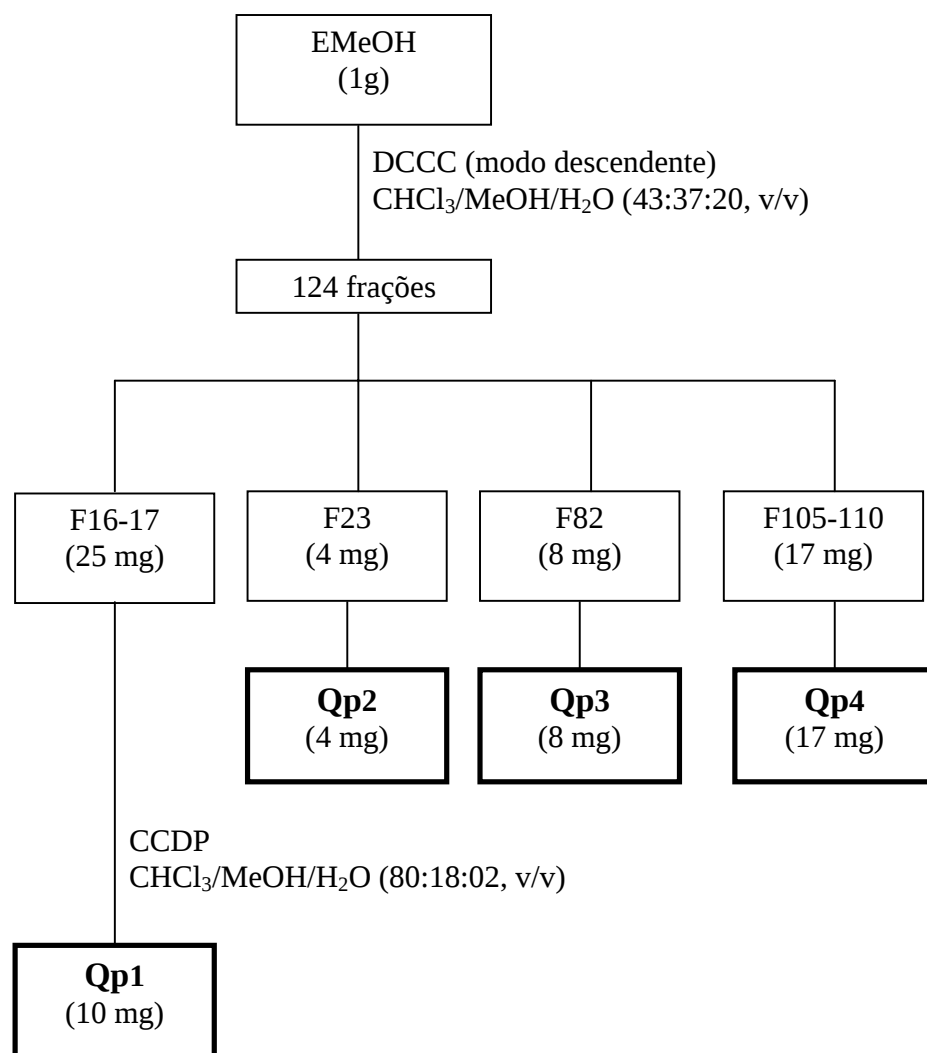


Figura 8: Isolamento dos metabólitos Qp1-Qp4.

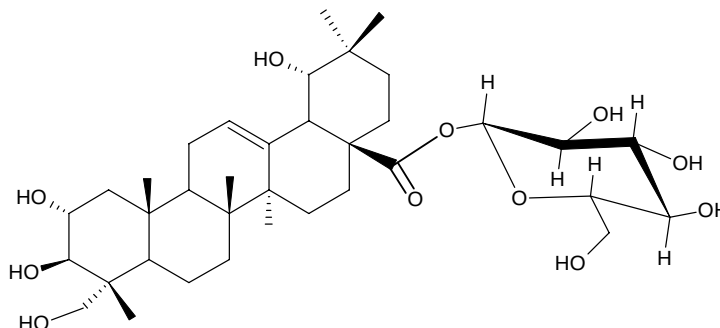
*Elucidação Estrutural*Identificação do triterpenóide pentacíclico (Qp3)

Figura 9. Estrutura do triterpenóide pentacíclico Qp3.

Nos espectros de RMN ^1H e de $g\text{HMQC}$ de Qp3 (Espectro 1; Figura 9) observaram-se seis singletos referentes a unidades metila em 0.53 δ , 0.63 δ , 0.83 δ , 0.86 δ , 0.90 δ e 1.22 δ , além de um sinal de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em 5.21 δ e outro sinal em 5.22 δ , referente ao hidrogênio do carbono anomérico. Observaram-se também sinais referentes à Qp5 (metabólito posteriormente identificado).

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2; Tabela 3) de Qp3 mostrou um total de 36 sinais (carbonos), e o experimento de DEPT 135° (Espectro 3) permitiu identificar esses sinais como seis grupos metila, dez grupos metilênicos, treze grupos metínicos e sete carbonos quaternários. Dois desses sinais são de carbono sp^2 (122.3 δ e 143.2 δ), sugerindo a presença de um triterpeno- Δ^{12} -oleanano (Agrawal & Jain, 1992). Sinais de carbonos em 60.7 δ , 69.5 δ , 63.9 δ , 67.4 δ , 72.4 δ , 76.7 δ (2 sinais), 77.7 δ , 80.0 δ e 94.1 δ , sugerem a presença de dez grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelo experimento de DEPT 135° como dois grupos carbinólicos metilênicos (60.7 δ e 63.9 δ) e oito grupos carbinólicos metínicos [67.4 δ , 69.5 δ , 72.4 δ , 76.7 δ (2 sinais), 77.7 δ e 80.0 δ]. Neste espectro praticamente não foram observados sinais referentes à Qp5.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) para os triterpenóides pentacíclicos Qp2-Qp4 em DMSO- d_6 .

Posição	Qp3	3 *	Qp2	Qp4
1	46.6	46.7	46.5	46.9
2	67.4	67.6	67.3	67.6
3	77.7	77.8	77.2	77.8
4	42.5	42.7	46.4	45.4
5	46.2	46.4	46.7	46.6
6	17.5	17.8	18.5	18.5
7	28.3	28.5	32.4	32.5
8	40.4	39.3	40.4	40.0
9	47.3	47.5	47.5	47.7
10	37.4	37.7	37.2	37.4
11	23.3	23.5	23.4	23.6
12	122.3	122.6	122.1	122.4
13	143.2	143.4	143.5	143.3
14	41.3	41.4	41.1	41.2
15	31.8	32.0	27.2	28.0
16	27.8	28.0	28.4	28.5
17	45.2	45.5	44.7	48.5
18	43.1	43.4	43.2	43.3
19	80.0	80.2	80.1	80.3
20	34.7	35.0	34.8	34.9
21	27.0	27.2	27.9	27.2
22	31.8	32.0	32.2	32.0
23	63.9	64.1	62.5	62.7
24	13.6	13.8	60.6	60.8
25	16.6	16.9	16.6	16.7
26	16.7	16.9	16.4	16.6
27	24.2	24.5	24.1	24.3
28	175.8	176.1	179.1	176.1
29	28.0	28.3	28.0	28.2
30	24.5	24.7	24.5	24.7
Glucose				
1'	94.1	94.3		94.3
2'	72.4	72.5		72.5
3'	76.7	76.7		77.4
4'	69.5	69.6		69.7
5'	76.7	75.8		76.8
6'	60.7	60.8		60.4

*Literatura :Jossang *et al.*, 1996.

O espectro de massas por ESI de Qp3 (Espectro 4) em 40 V, no modo negativo, mostrou principalmente o pico referente a molécula desprotonada em m/z 665 $[M - H]^-$ (100%). A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C obtidos para o triterpeno Qp3 com os dados encontrados na literatura (Jossang *et al.*, 1996) e os obtidos pelo espectro de massas sugerem que o triterpenóide pentacíclico Qp3 é o **β** -*D*-glicopiranosil-2 α ,3 β ,19 α ,23-tetraidroiolean-12-en-28-oato (arjunglicosídeo)

Identificação do triterpenóide pentacíclico (Qp2)

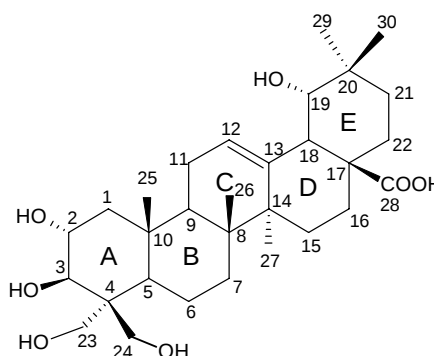


Figura 10. Estrutura do triterpenóide pentacíclico Qp2.

No espectro de RMN ^1H de Qp2 (Espectro 5; Figura 10) observou-se cinco sinais referentes a unidades metila como singletos em 0.63 δ , 0.83 δ , 0.86 δ , 0.91 δ e 1.22 δ , além de um sinal de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em 5.21 δ (s). Observou-se também sinais referentes à Qp7 (metabólito posteriormente identificado).

O espectro de RMN ^{13}C de Qp2 (Espectro 6; Tabela 3) mostrou um total de 30 carbonos, e o experimento de DEPT 135° (Espectro 7) permitiu identificar os carbonos como cinco grupos metila, dez grupos metilênicos, oito grupos metínicos e seis carbonos quaternários. Dois desses sinais são de carbono sp^2 (122.1 δ e 143.5 δ), sugerindo a presença de um triterpeno- Δ^{12} -oleanano (Agrawal & Jain,

1992). Sinais de carbonos em 60.6 δ , 62.5 δ , 67.3 δ , 77.2 δ e 80.1 δ , sugeriram a presença de cinco grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelo experimento de DEPT 135° como dois grupos carbinólicos metilênicos (60.6 δ e 62.5 δ) e três grupos carbinólicos metínicos (67.3 δ , 77.2 δ e 80.1 δ). Neste espectro praticamente não foram observados sinais referentes à Qp7.

No experimento de *g*HMQC de Qp2 (Espectro 8) observou-se a correlação de cinco sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em 3.09 δ (*f*) (H-19), 3.26 δ (H-3), 3.46 δ (H-24a), 3.74 δ (H-24b), 3.60 δ (H-2), 3.36 δ (H-23a) e 3.72 δ (*d*) (H-23b). Devido à sobreposição com sinais da água, não foi possível verificar a multiplicidade dos sinais; contudo, as correlações puderam ser claramente estabelecidas. Além dessas correlações verificou-se 5.22 δ (*s*) com 122.1 δ (C-12), 0.64 δ (*s*) com 16.4 δ (C-26), 0.82 δ (*s*) com 28.0 δ (C-29), 0.86 δ (*s*) com 24.5 δ (C-30), 0.92 δ (*s*) com 16.6 δ (C-25) e 1.22 δ (*s*) com 24.1 δ (C-27).

O experimento *g*HMBC (Espectro 9; Figura 11) de Qp2 apresentou principalmente as correlações dos hidrogênios das metilas com os carbonos do anel triterpênico. Neste espectro observou-se o acoplamento de uma metila em 1.22 δ com os carbonos em 27.2 δ , 41.1 δ e 143.4 δ . Deste modo, atribuiu-se esse sinal à metila C-27 do anel triterpênico. A metila em 0.63 δ correlaciona com os sinais dos carbonos em 32.4 δ , 41.1 δ e 47.5 δ , sugerindo que este sinal corresponde ao C-26. O sinal da metila em 0.92 δ correlaciona com os carbonos em 37.2 δ e 46.7 δ , e foi atribuído ao C-25. O sinal da metila em 0.82 δ mostra correlações com os carbonos em 24.5 δ , 27.9 δ , 34.8 δ e 80.1 δ , e foi atribuído à metila C-29. O sinal em 0.87 δ atribuído a C-30 correlaciona com os sinais dos carbonos em 27.9 δ , 34.8 δ e 80.1 δ . Além dessas correlações verificaram-se também correlações entre 3.09 δ (H-19) com 44.7 δ (C-17), 3.26 δ (H-3) com 62.5 δ (C-23) e 3.72 δ (H-23) com 60.6 δ (C-24) e com 46.4 δ (C-4).

O espectro de massas por ESI de Qp2 (Espectro 10) em 40 V, no modo negativo, mostrou principalmente o pico referente à molécula desprotonada em *m/z* 519 [M - H]⁻ (100%).

A análise dos experimentos g HMBC, espectrometria de massas e a comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C com os da literatura (Mahato *et al.*, 1992) sugerem que o triterpenóide pentacíclico Qp2 é o ácido $2\alpha,3\beta,19\alpha,23,24$ -pentaidroxi-olean-12-en-28-óico (bellericagenina B).

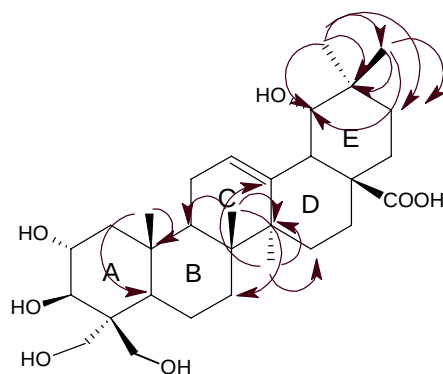


Figura 11. Correlações obtidas do experimento de g HMBC de Qp2.

Identificação do triterpenóide pentacíclico (Qp4)

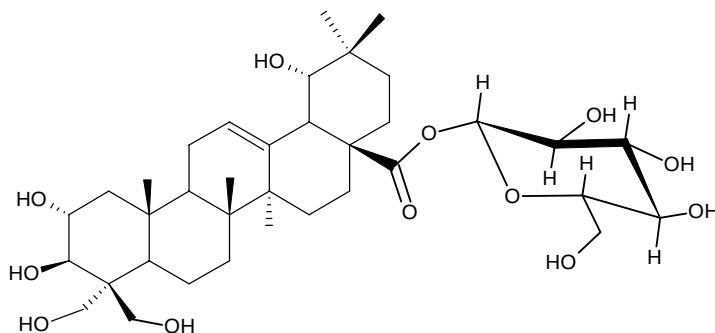


Figura 12. Estrutura do triterpenóide pentacíclico Qp4.

Nos espectros de RMN ^1H e g HMQC de Qp4 (Espectro 11; Figura 12) observaram-se cinco sinais referentes a unidades metila como singletos em 0.59 δ ,

0.83 δ , 0.85 δ , 0.90 δ e 1.20 δ , além de um sinal de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em 5.22 δ e outro sinal em 5.20 δ , referente ao hidrogênio do carbono anomérico.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 12; Tabela 3) de Qp4 mostrou um total de 36 sinais de carbonos, e o experimento de DEPT 135° (Espectro 13) permitiu identificar os carbonos como cinco grupos metila, onze grupos metilênicos, doze grupos metínicos e oito carbonos quaternários. Dois desses sinais são de carbono sp^2 (122.4 δ e 143.3 δ), sugerindo a presença de um triterpeno- Δ^{12} -oleanano (Agrawal & Jain, 1992). Sinais de carbonos em 60.4 δ , 60.8 δ , 62.7 δ , 67.6 δ , 69.7 δ , 72.5 δ , 76.8 δ , 77.4 δ , 77.8 δ , 80.3 δ e 94.3 δ , sugerem a presença de onze grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelo experimento de DEPT 135° como três grupos carbinólicos metilênicos (60.4 δ , 60.8 δ , 62.7 δ) e oito grupos carbinólicos metínicos (67.6 δ , 69.7 δ , 72.5 δ , 76.8 δ , 77.4 δ , 77.8 δ , 80.3 δ e 94.3 δ).

No experimento de *g*HMQC (Espectro 14) de Qp4 observou-se correlações para dez sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em 3.07 δ (H-2'), 3.11 δ (H-19), 3.12 δ (H-3), 3.26 δ (H-3'), 3.20 δ (H-5'), 3.10 δ (H-4'), 3.61 δ (H-2), 3.35 δ (H-23a), 3.72 δ (H-23b), 3.43 δ (H-24a), 3.60 δ (H-24b) e 5.20 δ (H-1'). Além dessas correlações verificaram-se também correlações (Espectro 11) de 5.22 δ (*s*) com 122.1 δ (C-12), 5.20 δ (*s*) com 94.3 δ (C-1'), 0.59 δ (*s*) com 16.6 δ (C-26), 0.83 δ (*s*) com 28.2 δ (C-29), 0.85 δ (*s*) com 24.7 δ (C-30), 0.90 δ (*s*) com 16.7 δ (C-25) e 1.20 δ (*s*) com 24.3 δ (C-27).

O experimento *g*HMBC de Qp4 apresentou correlações dos hidrogênios das metilas com os carbonos do anel triterpênico (Espectro 15). Neste espectro observa-se o acoplamento de uma metila em 1.22 δ com o carbono em 28.0 δ e em 41.2 δ . Deste modo, atribuiu-se esse sinal à metila C-27 do anel triterpênico. Outra metila em 0.59 δ correlaciona com os sinais de carbono nos valores em 32.5 δ , 41.2 δ e 47.7 δ , sugerindo ser este sinal correspondente ao C-26. Outro sinal de metila pôde ser observado em 0.90 δ , que correlaciona com os carbonos em 37.4 δ e 46.6 δ . Esse sinal foi atribuído ao C-25. Outro sinal em 0.83 δ mostra correlações com os carbonos em 24.7 δ , 34.9 δ e 80.3 δ sugerindo ser o sinal em 0.83 δ a metila

C-29. O sinal em 0.85 δ atribuído à C-30 correlaciona com os carbonos em 28.2 δ , 34.9 δ e 80.3 δ . Verificou-se que estas correlações foram muito parecidas com as da substância de Qp2.

O espectro de massas por ESI de Qp4 (Espectro 16) em 40 V, no modo negativo, mostrou principalmente um pico referente à molécula desprotonada em m/z 681 $[M - H]^-$ (100%) e um pico em m/z 519 referente à perda de uma unidade de glicose da molécula desprotonada $[M - \text{glc} - H]^-$.

A análise dos experimentos $g\text{HMBC}$, a comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C com os dados da literatura (Mahato *et al.*, 1992) e os dados obtidos do espectro de massas sugerem que o triterpeno pentacíclico Qp4 é o β -*D*-glucopiranosil-2 α ,3 β ,19 α ,23,24-pentaidroxiolean-12-en-28-oato (bellericasídeo B).

Vale ressaltar que o triterpenóide pentacíclico Qp2 é a aglicona de Qp4.

Elucidação estrutural do nor-secotriterpeno (Qp1)

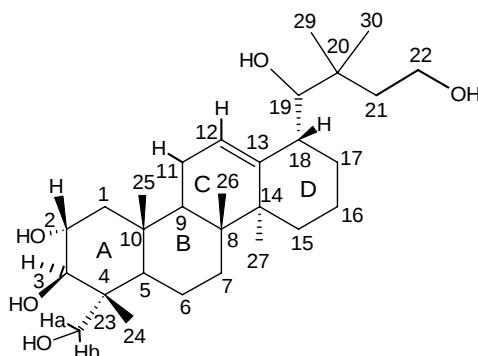


Figura 13. Estrutura do nor-secotriterpeno Qp1.

O espectro de RMN ^{13}C de Qp1 (Espectro 17; Tabela 4; Figura 13) mostrou 29 sinais de carbono, e o experimento de DEPT 135° (Espectro 18) permitiu identificar os carbonos como seis grupos metila, dez metilênicos, sete metínicos e seis carbonos quaternários. Dois desses sinais são de carbono sp^2 (121.6 δ e 144.5 δ), sugerindo a presença de um triterpeno- Δ^{12} -oleanano (Agrawal & Jain,

1992). Sinais de carbonos com deslocamento químico em 60.3 δ , 64.0 δ , 67.5 δ , 75.7 δ e 80.7 δ , sugerem a presença de cinco grupos carbinólicos, dos quais dois grupos carbinólicos metilênicos (60.3 δ e 64.0 δ) e três grupos carbinólicos metínicos (67.5 δ , 75.7 δ e 80.7 δ).

O experimento *g*HMBC realizado em DMSO-*d*₆ apresentou correlações dos hidrogênios das metilas com os carbonos do anel triterpênico (Espectro 19, 20 e 21; Figura 14, Tabela 4). Neste espectro observaram-se os acoplamentos de uma metila em 1.22 δ com os carbonos em 28.1 δ , 39.0 δ , 41.3 δ e 144.5 δ . Deste modo, atribuiu-se esse sinal à metila C-27 do anel triterpênico. Outra metila em 0.68 δ correlaciona com os carbonos os valores em 32.2 δ , 39.0 δ , 41.3 δ e 47.4 δ , sugerindo ser este sinal correspondente ao C-26. Outro sinal de metila pode ser observado em 0.90 δ , que correlaciona com os carbonos em 37.6 δ e 46.2 δ . Esse sinal foi atribuído ao C-25. A metila em 0.53 δ correlaciona com os valores de deslocamentos em 42.5 δ , 46.2 δ , 64.0 δ e 75.7 δ que foi atribuído ao C-24. Outro sinal em 0.82 δ mostra correlações com os carbonos em 24.8 δ , 35.0 δ e 80.7 δ sugerindo ser 0,82 δ a metila C-29. O sinal em 0.87 δ atribuído à C-30 correlaciona com os carbonos em 28.2 δ , 35.0 δ e 80.7 δ . Além das correlações de H-3 (3.17 δ) com o carbono em 67.5 δ atribuído ao C-2, de H-19 (3.09 δ) com o carbono em 44.9 δ atribuído ao C-17 e de H-21 (2.57 δ) com o carbono em 60.3 δ atribuído ao C-22.

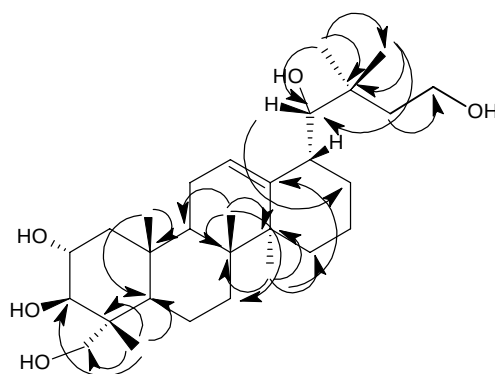


Figura 14. Principais correlações do experimento de *g*HMBC de Qp1.

Tabela 4: Dados de RMN (δ) para o nor-secotriterpeno Qp1.

Posição	Multiplicidade	^{13}C	^{13}C	$^1\text{H}^*$	$g\text{HMBC}$	$g\text{NOESY}$
		DMSO- d_6	Pyr- d_5	DMSO- d_6	DMSO- d_6	DMSO- d_6
1 β	CH ₂	46.6	47.8	1.70		H-1 α , 2, 25
1 α				0.72		
2	CH	67.5	69.2	3.48	H-3	
3	CH	75.7	78.5	3.17	H-23, 24	H-23a, 23b
4	C	42.5	44.0		H-23, 24	
5	CH	46.2	48.3		H-23, 24, 25	
6	CH ₂	17.7	19.0			
7	CH ₂	32.2	33.3		H-26	
8	C	39.0	40.4		H-26, 27	
9	CH	47.4	48.3		H-26	
10	C	37.6	38.9		H-25	
11	CH ₂	23.3	19.0	1.84		H-12, 25, 26
12	CH	121.6	-	5.18		H-11, 18
13	C	144.5	-		H-27	
14	C	41.3	42.6		H-26, 27	
15	CH ₂	28.1	29.5		H-27	
16	CH ₂	27.6	28.7			
17	CH ₂	44.9	47.8		H-19	
18	CH	43.5	45.1	2.98		H-12, 29
19	CH	80.7	81.5	3.09	H-29, 30	
20	C	35.0	36.0		H-29, 30	
21	CH ₂	51.5	52.8	2.57		H-22
22	CH ₂	60.3	61.6	3.43	H-21	
23a	CH ₂	64.0	66.7	3.03	H-24	H-23b, 24
23b				3.29		H-23a, 24
24	CH ₃	13.6	14.6	0.53		H-2, 25
25	CH ₃	16.7	17.6	0.90		H- 2, 24, 26
26	CH ₃	17.2	17.9	0.68		H- 25
27	CH ₃	24.2	24.6	1.22		
28	-	-	-	-	-	-
29	CH ₃	28.2	29.2	0.82	H-30	
30	CH ₃	24.8	25.1	0.87	H-29	

* as multiplicidades não foram incluídas devido à sobreposição de sinais

O experimento de $g\text{COSY}$ (Espectro 22 e 23) mostrou interações entre H-1 α e H-2; H-1 β e H-2; H-2 e H-3; H-11 e H-12; H-18 e H-19; e entre H-21 e H-22, permitindo estabelecer os deslocamentos químicos de ^{13}C para C-11 e C-22 e confirmando o $\delta^{13}\text{C}$ para C-1, C-2, C-3, C-12, C-18, C-19 e C-21 como previamente estabelecido pelo experimento de $g\text{HMBC}$.

O espectro de RMN ^1H de Qp1 registrados em DMSO- d_6 (Espectro 24, Tabela 4) e o experimento de $g\text{HMQC}$ (Espectro 25 e 26) mostraram seis sinais referentes as unidades metila como singletos em 0.53 δ , 0.68 δ , 0.82 δ , 0.87 δ , 0.90 δ e 1.22 δ , além de sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados com deslocamentos químicos em 3.43 δ (H-22), 3.03 δ (*d*) (H-23a), 3.29 δ (*d*) (H-23b), 3.48 δ (H-2), 3.17 δ (*d*) (H-3) e 3.09 δ (*t*) (H-19) δ e um hidrogênio ligado a carbono sp^2 em 5.18 δ (*s*).

O espectro de RMN ^1H de Qp1 registrado em piridina- d_5 (Espectro 27, Tabela 4), mostrou um sinal em 4.19 δ (*d*, $J = 10$ Hz) e outro em 3.73 δ (*d*, $J = 10$ Hz) que foram atribuídos para H-2 e H-3 respectivamente, no anel A. O valor da constante de acoplamento demonstra uma orientação *trans diaxial* sugerindo que o grupo hidroxila no C-2 é α -equatorial (configuração 2α) e no C-3, β -equatorial (configuração 3β). Esses sinais são semelhantes àqueles da substância Qp3, o que sugere uma configuração semelhante. Nos outros anéis ocorreram pequenas variações em relação aos deslocamentos químicos de triterpenos com esqueleto oleanano.

Ainda no espectro RMN de ^1H em piridina- d_5 (Espectro 27) pôde-se verificar dois tripletos em 3.02 δ e 3.99 δ ($J = 5.5$ Hz). Esses mesmos tripletos apresentaram correlações nos experimentos $g\text{COSY}$ e $g\text{HMBC}$ em piridina- d_5 (Espectro 28). Essas correlações indicaram a presença de dois grupos metilênicos com rotação livre, sendo que uma delas com características de deslocamento químico de um grupo metileno carbinol. A ausência de CH_3 -28 e a presença da porção $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$, caracterizam um *nor-28-seco-17,22*-triterpeno.

O experimento de $g\text{NOESY}$ (Espectro 29, Figura 15, Tabela 4) foi fundamental para confirmar a estereoquímica da substância 1. A irradiação em $\delta 5.18$ (H-12) mostrou interações com $\delta 1.84$ (H-11) e $\delta 2.98$ (H-18), sugerindo uma configuração β para H-18, e consequentemente o C-19 em C-18 apresenta-se em α . A irradiação em $\delta 0.53$ (CH_3 -24) mostrou interações com $\delta 3.48$ (H-2) e $\delta 0.90$ (CH_3 -25) sugerindo uma configuração α para o OH em C-2. A irradiação em $\delta 3.17$

(H-3) mostrou interações em δ 3.03 (H-23a), δ 3.29 (H-23b), indicando uma configuração β para o OH em C-3.

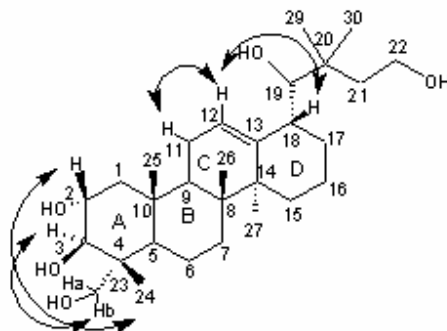


Figura 15: Correlações *g*NOESY mais significativas de Qp1.

O espectro de massas de Qp1 por ESI (Espectro 30) em 40 V, no modo positivo, mostrou um pico base em m/z 479.3734 $[M + H]^+$ (100%), calculado 479.3737 (0.03%).

Pelo conjunto dos espectros da substância Qp1 analisados acima, tem-se que o novo nor-secotriterpeno é o 28-*nor*-17,22-*seco*-2 α ,3 β ,19,22,23-pentaidroxi- Δ^{12} -oleanano.

Perfil cromatográfico do EMeOH de Q. parviflora e a identificação de Qp1-Qp4 em Q. parviflora utilizando HPLC-ESI-IT-MS.

Inúmeros trabalhos descritos na literatura mostram que a espectrometria de massas (MS), na maioria das vezes acoplada a um sistema HPLC, tem se destacado como uma poderosa ferramenta em estudos de biodiversidade (Zeeb *et al.*, 2000). Ela é empregada em aplicações de ordem qualitativa e quantitativa para analitos de baixo e/ou alto peso molecular, encontrados em matrizes complexas que o HPLC é o sistema de separação de escolha e o espectrômetro de massas fornece a seletividade e sensibilidade para gerar a informação quantitativa e/ou a informação estrutural que não pode ser obtida com outros tipos de detectores (Ardrey, 2003).

Desse modo, análises por HPLC-ESI-IT-MS do EMeOH das cascas de *Q. parviflora* foram feitas a fim de traçarmos o perfil cromatográfico da planta. Para isso, uma alíquota do EMeOH (10 mg) foi dissolvida em H₂O (4.0 mL) e filtrada em cartucho Sep-Pak (Sigma, RP 18). Em seguida, o cartucho foi lavado com MeOH (4.0 mL). A fração metanólica foi filtrada em Millex (0,45µm) e analisada por HPLC-ESI-IT-MS (Hypersil BDS C18, 250 x 2.1 mm d.i. x 5 µm). A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos com 0,5% de CH₃COOH. O programa gradiente foi o seguinte: 10% B (5 min), 10-66% B (35 min), 66-95% B (10 min), e 95% B isocrático (5 min). O tempo total da análise foi de 55 min e o fluxo de 200µL/min.

A Figura 16 apresenta a análise por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos triterpenóides presentes no EMeOH de *Q. parviflora* (a) BPI e os cromatogramas para os íons extraídos destes triterpenóides em: (b) m/z 477, (c) m/z 741, (d) m/z 725 e (e) m/z 519. Os tempos de retenção (t_R) para as substâncias Qp1, Qp4, Qp3 e Qp2 foram respectivamente 16.83, 20.80, 21.57 e 27.95 min.

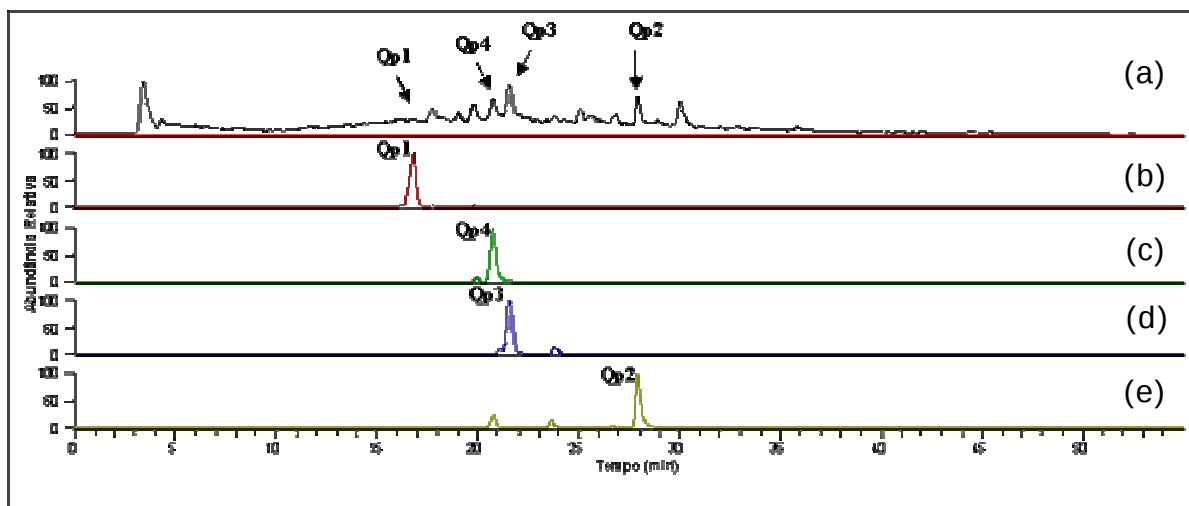


Figura 16. Análises por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos triterpenóides presentes em *Q. parviflora*. BPI (a); cromatograma extraído dos íons (b) m/z 477 (Qp1); (c) m/z 741 (Qp4); (d) m/z 725 (Qp3) e (e) m/z 519 (Qp2).

A Figura 17a exibe o espectro de massas de Qp1, que mostra a presença da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 477 e do seu dímero desprotonado $[2M - H]^-$ em m/z 955. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp1.

A Figura 17b exibe o espectro de massas de Qp4, que mostra o aduto com ácido acético da molécula desprotonada $[M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 741, bem como de seu respectivo aduto do dímero desprotonado $[2M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 1423. A perda de uma unidade de glicose a partir da molécula desprotonada leva ao íon $[M - glc - H]^-$ em m/z 519. A Figura 17c apresenta o espectro MS^2 do íon m/z 741 $[M + CH_3COOH - H]^-$ que produz os íons referentes à molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 681 e à perda da unidade de glicose $[M - glc - H]^-$ em m/z 519. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp4.

A Figura 17d exibe o espectro de massas de Qp3, que mostra o aduto com ácido acético da molécula desprotonada $[M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 725, bem como de seu respectivo aduto do dímero desprotonado $[2M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 1391. A perda de uma unidade de glicose a partir da molécula desprotonada leva ao íon $[M - glc - H]^-$ em m/z 503. A Figura 17e apresenta o MS^2 do íon m/z 725 $[M + CH_3COOH - H]^-$ que produz os íons referentes à molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 665 e à perda da unidade de glicose $[M - glc - H]^-$ em m/z 503. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp3.

A Figura 17f exibe o espectro de massas de Qp2, que mostra o aduto com ácido acético da molécula desprotonada $[M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 579, bem como do dímero da molécula desprotonada $[2M - H]^-$ em m/z 1039 e da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 519. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp2.

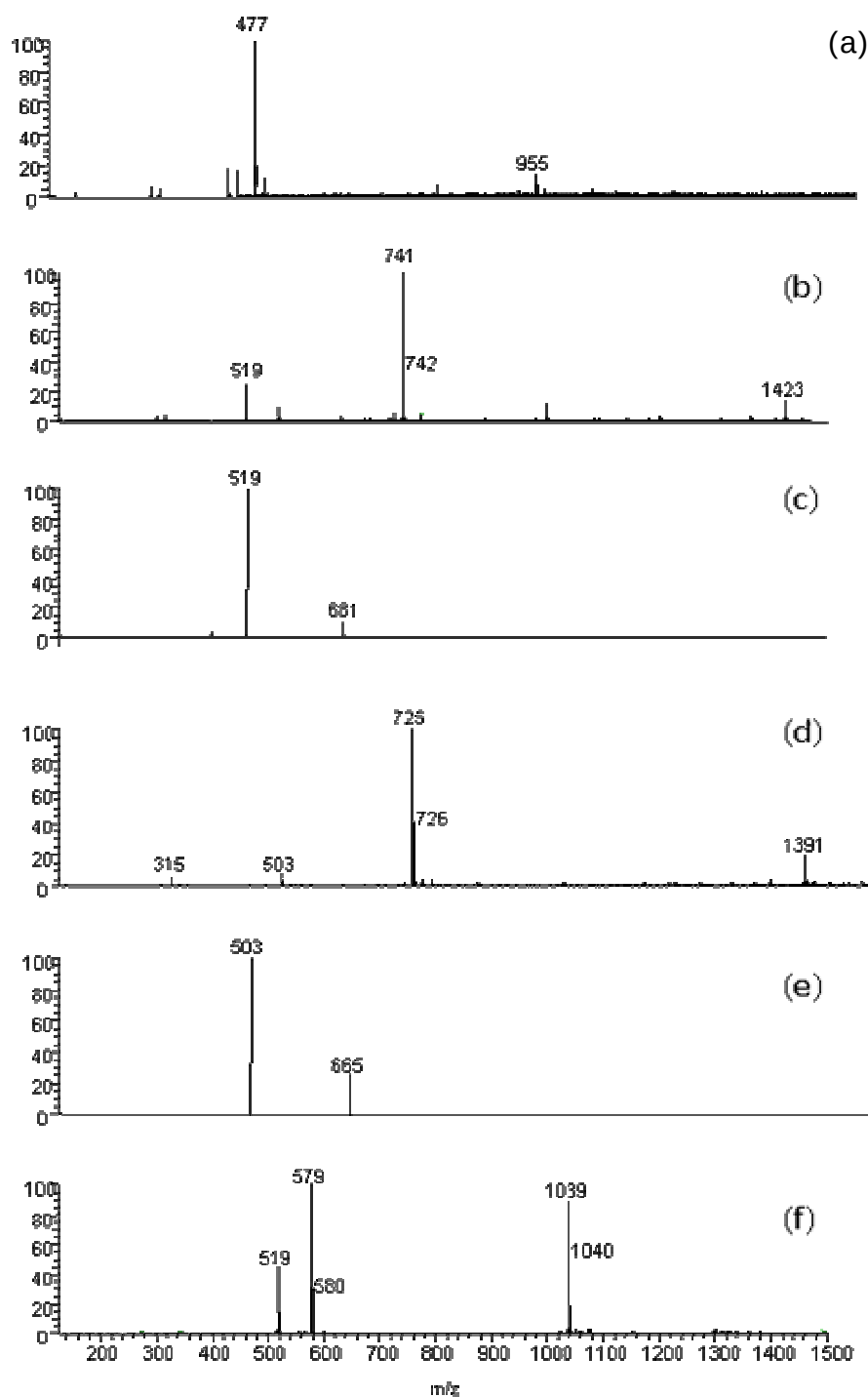


Figura 17. Espectros de massas dos picos com tempo de retenção em: (a) 16.83 min (Qp1); (b) 20.80 (Qp4); (c) MS^2 do íon em m/z 741 de Qp4; (d) 21.57 min (Qp3); (e) MS^2 do íon m/z 725 de Qp3; (f) 27.95 min (Qp2).

Identificação de Qp1-Qp4 nos EMeOH de Q. grandiflora e Q. multiflora

O estabelecimento de um perfil cromatográfico de espécies de um mesmo gênero é uma estratégia para tentar diminuir o tempo de análise de uma espécie vegetal, pois muitas vezes espécies de um mesmo gênero apresentam os mesmos constituintes químicos.

Para isso, uma alíquota do EMeOH (previamente eluídos em cartucho Sep-Pak C₁₈ em água e metanol, respectivamente) das cascas de *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* foram analisados em HPLC-ESI-IT-MS (Figura 18).

A Figura 18 demonstrou que o perfil químico do EMeOH de *Q. parviflora* apresenta teores mais elevados dos metabólitos Qp1–Qp4 que o das outras espécies. Entretanto *Q. grandiflora* e principalmente *Q. multiflora* apresentaram isômeros de Qp1- Qp4, que não foram detectados em *Q. parviflora*. Além disso, em *Q. multiflora* foram detectados os quatro metabólitos (Qp1-Qp4), enquanto que em *Q. grandiflora* não foi detectado Qp4.

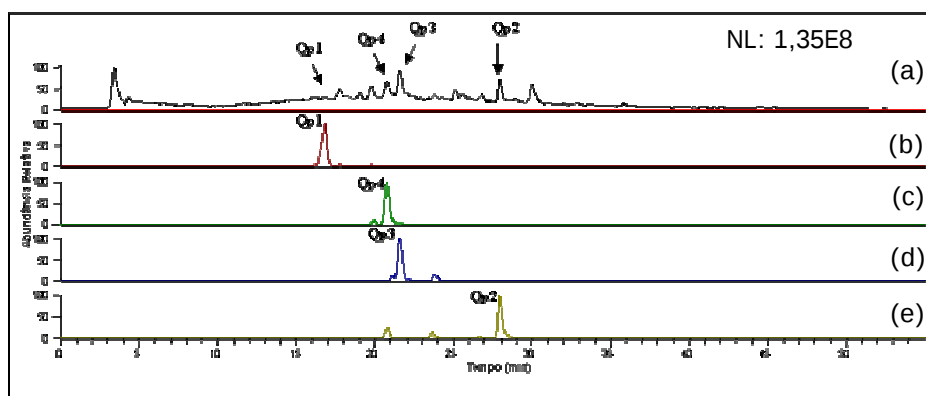
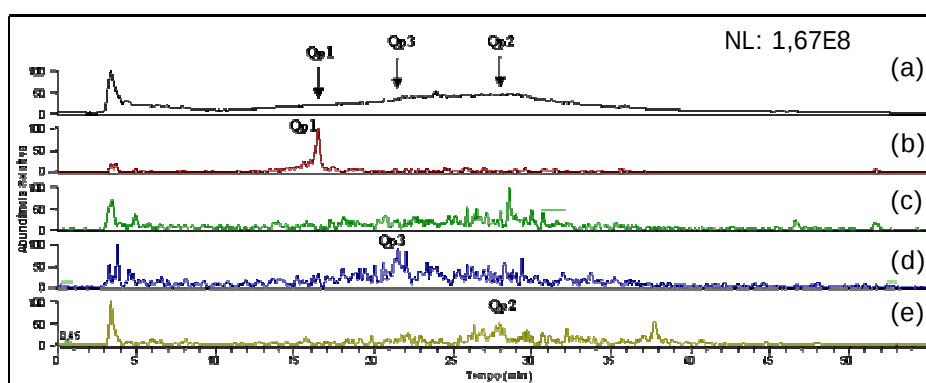
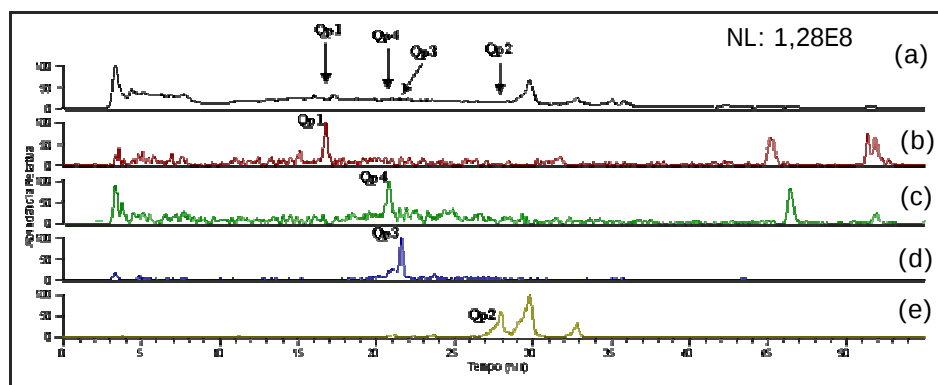
Qualea parviflora*Qualea grandiflora**Qualea multiflora*

Figura 18. Análises por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos triterpenóides presentes em *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*. BPI (a); cromatograma extraído dos íons em: (b) m/z 477 (Qp1); (c) m/z 741 (Qp4); (d) m/z 725 (Qp3) e (e) m/z 519 (Qp2).

Estudo químico dos polifenóis presentes no EMeOH

Além de triterpenos e saponinas, o EMeOH é rico em polifenóis. Mesmo sendo o protocolo de nosso laboratório se iniciar a separação de compostos polares por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20) ou por cromatografia de partição (DCCC ou HSCC), onde a perda por adsorção é bem menor, decidiu-se realizar esta separação em coluna de sílica gel, devido à boa separação obtida dos polifenóis em CCDC.

Fracionamento do EMeOH utilizando CC de sílica gel

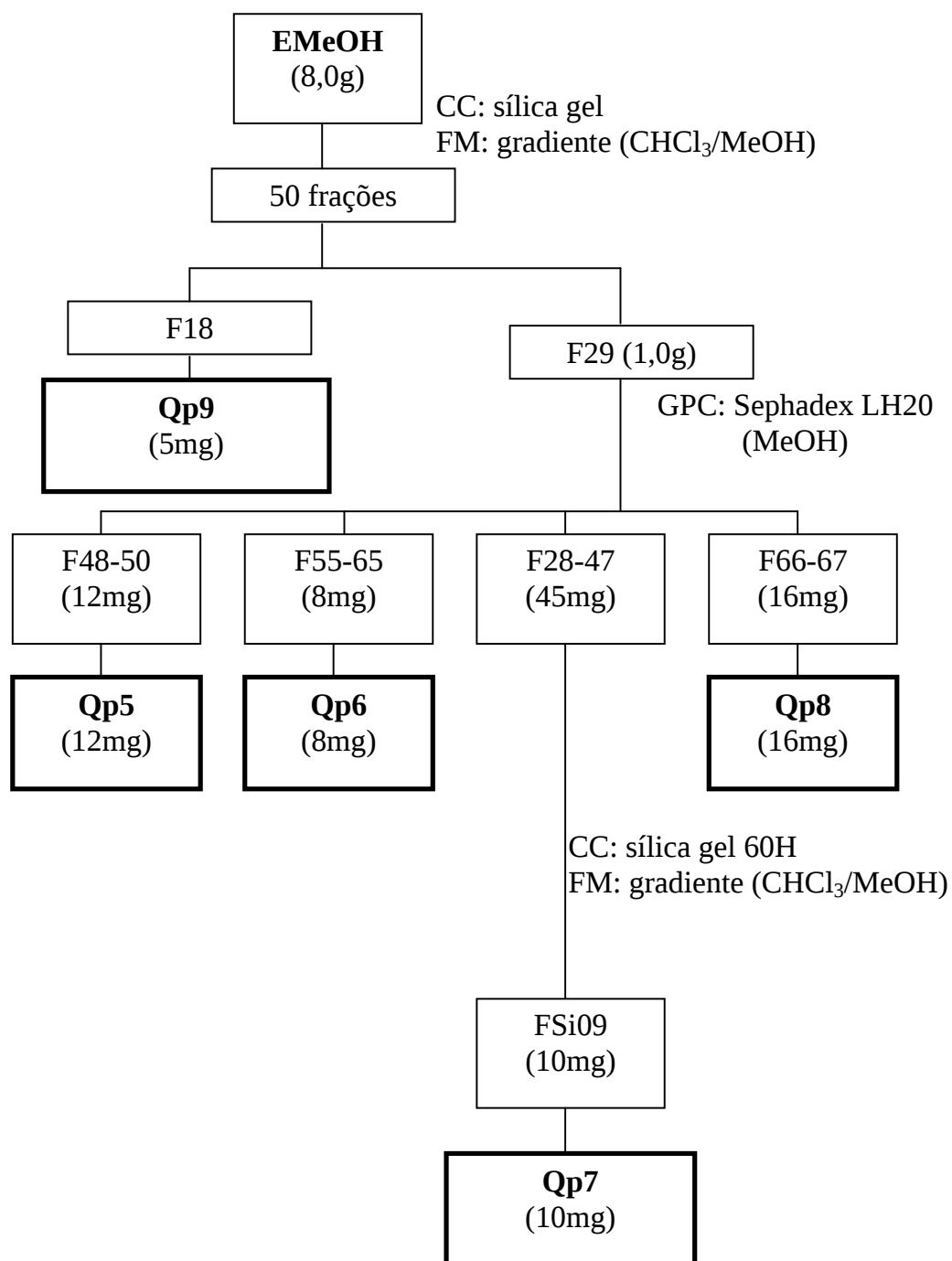
Uma porção do EMeOH (8,0 g) foi fracionada em coluna de sílica gel (32 cm x 3,0 cm d.i.), empregando-se como eluente um gradiente crescente de polaridade ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). Foram obtidas 50 frações de aproximadamente 50 mL cada, as quais foram analisadas por CCCD, empregando como fase móvel a mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:02, v/v). Frações selecionadas foram analisadas também por RMN ^1H .

As frações F1-17 e F-19-28 continham apenas poliisoprenóides e materiais de natureza graxa; as frações F30-50 apresentaram complexa mistura de taninos. Essas frações não foram investigadas.

A fração F18 rendeu Qp9 (5 mg).

A F29 (1.0 g) foi dissolvida em 15 mL de MeOH e submetida à centrifugação. O sobrenadante (~700 mg) foi fracionado em coluna de Sephadex LH-20 (57 cm X 3,0 cm d.i.) empregando como eluente metanol. Foram obtidas 110 sub-frações de 20 mL cada. A sub-fração F48-50 forneceu Qp5 (12mg), F66-67 forneceu Qp8 (16mg), F55-65 forneceu Qp6 (8mg) e F28-47 (45mg) foi submetida à CC sílica 60H sob pressão, rendendo a sub-fração Si09 que forneceu Qp7 (10mg).

A seguir foi descrito o fluxograma para o isolamento dos derivados de ácido elágico e do β -sitosterol glicosídeo do EMeOH das cascas de *Q. parviflora* (Figura 19).

Figura 19. Fluxograma do fracionamento do EMeOH de *Qualea parviflora*.

Identificação Estrutural

Identificação do derivado de ácido elágico (Qp5)

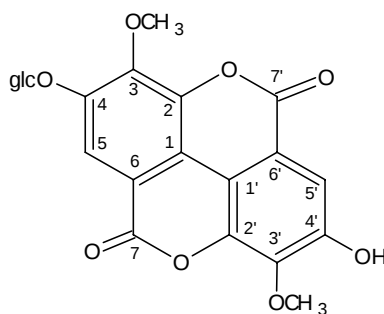


Figura 20. Estrutura de Qp5.

No espectro de RMN ^1H de Qp5 (Figura 20, Tabela 5, Espectro 31) observou-se sinais em 4.04 δ (3H, *s*, 3'-OCH₃), 4.08 δ (3H, *s*, 3-OCH₃), 5.12 δ (1H, *d*, *J*=7.5 Hz, H-1'' da glicose), 7.51 δ (1H, *s*, H-5') e 7.80 δ (1H, *s*, H-5).

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de QP5 (Tabela 5, Espectro 32) apresentaram 22 carbonos. No experimento de *g*HMQC de Qp5 (Tabela 5, Espectro 33) observou-se as correlações dos hidrogênios metoxílicos em 4.04 δ com 60.9 δ (3'-OMe) e em 4.08 δ com 61.6 δ (3-OMe). Verificou-se também as correlações dos hidrogênios aromáticos em 7.51 δ (H-5') com 111.8 δ e em 7.80 δ (H-5) com 111.9 δ . Além da correlação do hidrogênio anomérico em 5.12 δ (H-1'') com 101.4 δ .

No experimento de *g*HMBC de Qp5 (Espectro 34 e 35, Tabela 4) observou-se o acoplamento dos hidrogênios metoxílicos em 4.04 δ com 140.4 δ (C-3') e em 4.08 δ com 141.8 δ (C-3), determinando a posição das metoxilas em C-3' e C-3 respectivamente. Verificou-se também as correlações dos hidrogênios aromáticos em 7.51 δ com 140.4 δ (C-3'), 153.0 δ (C-4'), 110.6 δ (C-6') e 158.5 δ (C-7'), e em 7.80 δ com 114.3 δ (C-1), 141.8 δ (C-3), 151.4 δ (C-4) e 158.4 δ (C-7). Além das

correlações do hidrogênio anomérico em 5.12 δ com 151.4 δ (C-4), confirmando a posição da glicose no C-4.

O espectro de massas de Qp5 por ESI (Espectro 36) em 40 V, no modo positivo, mostrou principalmente o pico referente à molécula protonada em m/z 515.0805 $[M + H]^+$ (100%), calculado 515.0801 (0.04%).

Com base nos dados de RMN de 1H , ^{13}C , $gHMQC$, $gHMBC$, espectrometria de massas e a comparação com dados da literatura (Nawwar, 1982; Pakulski, 1996), determinou-se que Qp5 é o ácido 3, 3'-di-*O*-metilelágico-4-*O*- β -glucopiranosídeo.

Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C para Qp5 em DMSO- d_6 .

Posição	1H	^{13}C	$gHMQC$	$gHMBC$
1	-	114.3	-	H-5,
2	-	140.9	-	-
3	-	141.8	-	H-5, 3-OCH ₃
4	-	151.4	-	H-5, H-1''
5	7.80 (s)	111.9	H-5	-
6	-	112.8	-	-
7	-	158.4	-	H-5
1'	-	111.8	-	-
2'	-	141.6	-	-
3'	-	140.4	-	H-5', 3'-OCH ₃
4'	-	153.0	-	H-5'
5'	7.51 (s)	111.8	H-5'	-
6'	-	110.6	-	H-5'
7'	-	158.5	-	H-5'
3-OMe	4.08 (s)	61.6	3-OCH ₃	-
3'-OMe	4.04 (s)	60.9	3'-OCH ₃	-
Glicose				
1''	5.12 (d, J=7.5 Hz)	101.4	H-1''	-
2''	3.37 (m)	73.3	-	-
3''	3.35 (m)	76.5	-	-
4''	3.23 (m)	69.5	-	-
5''	3.42 (m)	77.3	-	-
6''	3.70 (m)	60.6	-	-

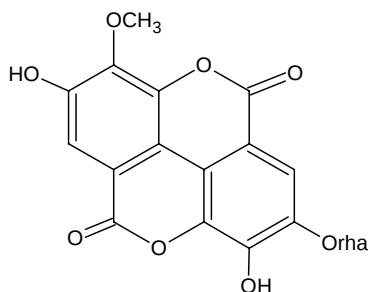
Identificação do derivado de ácido elágico (Qp6)

Figura 21. Estrutura de Qp6.

No espectro de RMN ^1H de Qp6 (Figura 21, Tabela 6, Espectro 37) observou-se sinais em 1.14 δ (*d*, $J=6\text{Hz}$, rhamnose), 4.01 δ (3H, *s*, 3-OCH₃), 5.45 δ (1H, *d*, $J=1.5\text{ Hz}$, H-1''), 7.49 δ (1H, *s*, H-5) e 7.68 δ (1H, *s*, H-5').

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de Qp6 (Tabela 5, Espectro 38) apresentaram 21 carbonos referentes ao derivado de ácido elágico (Qp6). No experimento de *g*HMQC de Qp6 (Tabela 6, Espectro 39) observou-se a correlação do hidrogênio metoxílico em 4.01 δ com 60.9 δ (3-OMe) e verificou-se também a correlação dos hidrogênios aromáticos em 7.49 δ com 111.3 δ (C-5) e em 7.68 δ com 112.0 δ (C-5'), além das correlações dos hidrogênios da rhamnose em 5.45 δ com 100.0 δ (C-1''), 3.56 δ com 69.8 δ (C-5''), 3.98 δ com 69.0 δ (C-2''), 3.34 δ com 71.8 δ (C-4''), 3.82 δ com 70.1 δ (C-3'') e 1.14 δ com 17.8 δ (C-6'').

No experimento de *g*HMBC de Qp6 (Espectro 40 e 41, Figura 19) observou-se a correlação do hidrogênio metoxílico em (4.01 δ) com 140.1 δ (C-3), sugerindo a presença da metoxila no C-3. Observou-se também as correlações dos hidrogênios aromáticos em 7.49 δ com 111.5 δ (C-1), 140.1 δ (C-3), 152.6 δ (C-4) e 158.7 δ (C-7) e em 7.68 δ com 114.4 δ (C-1'), 141.9 δ (C-3'), 146.7 δ (C-4'), e 158.8 δ (C-7'). Além da correlação do hidrogênio anomérico em 5.45 δ com 69.8 (C-2'') e com 69.8 δ (C-4'), indicando a rhamnose em C-4'. Verificou-se também a correlação dos hidrogênios da rhamnose em 1.14 δ com 69.8 δ (C-5'') e com 71.8 δ (C-4'').

No experimento de *g*NOESY de Qp6 (Espectro 42, Figura 22) a irradiação em 5.45δ (H-1'') mostrou correlação com 7.68δ (H-5'), confirmando a substituição da rhamnose na posição C-4'.

O espectro de massas de Qp6 (Espectro 43) em 40 V, no modo positivo, mostrou principalmente o pico referente à molécula protonada em *m/z* 463.0742 [M + H]⁺ (100%), calculado 463.0876. Além do MS² do íon *m/z* 463.0742 produzindo o íon em *m/z* 317.1622 [M – Rha + H]⁺ referente à perda de uma unidade de rhamnose da molécula protonada.

Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) para Qp6 em DMSO-*d*₆

Posição	Multiplicidade	¹ H	¹³ C	<i>g</i> HMQC	<i>g</i> HMBC
1	C	-	111.4	-	H-5
2	C	-	136.3	-	-
3	C	-	140.1	-	3-OCH ₃ , H-5
4	C	-	152.6	-	H-5
5	CH	7.48 (s)	111.3	H-5	-
6	C	-	111.3	-	-
7	C	-	158.7	-	H-5
1'	C	-	114.4	-	H-5'
2'	C	-	114.4	-	-
3'	C	-	141.9	-	H-5'
4'	C	-	146.7	-	H-1'', H-5'
5'	CH	7.68 (s)	112.0	H-5'	-
6'	C	-	113.1	-	-
7'	C	-	158.8	-	H-5'
3-OCH ₃	CH ₃	4.01 (s)	60.9	3-OCH ₃	-
Rhamnose					
1''	CH	5.45 (1H, <i>d</i> , 1.5 Hz)	100.0	H-1''	-
2''	CH	3.98 (1H, <i>dd</i> , 1.5 Hz, 3.5 Hz)	69.0	H-2''	H-1''
3''	CH	3.82 (1H, <i>dd</i> , 3.5 Hz, 9.0 Hz)	70.1	H-3''	-
4''	CH	3.34 (1H, <i>t</i> , 9.0 Hz, 9.5 Hz)	71.8	H-4''	H-6''
5''	CH	3.53 (1H, <i>m</i> , 9.5 Hz, 6.0 Hz)	69.8	H-5''	H-6''
6''	CH ₃	1.14 (<i>d</i> , 6.0 Hz)	17.8	H-6''	-

Com base nos dados de RMN ^1H , ^{13}C , $g\text{HMQC}$, $g\text{HMBC}$, $g\text{NOESY}$, espectrometria de massas e a comparação com dados da literatura (Yazaki, 1976; Guo *et al.*, 2005) determinou-se que Qp6 é o ácido 3-*O*-metilelágico-4'-*O*-rhamnopiranosídeo.

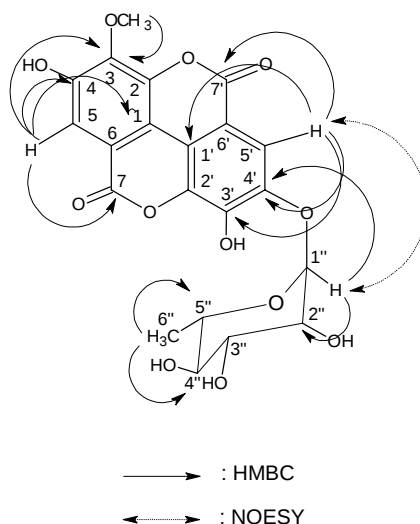


Figura 22. Correlações de $g\text{HMBC}$ e $g\text{NOESY}$ para Qp6.

Identificação do derivado de ácido elágico (Qp7)

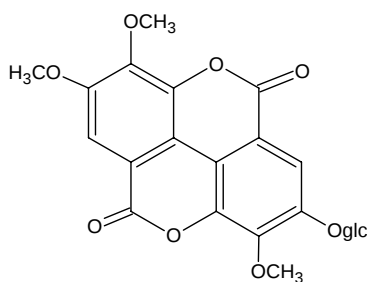


Figura 23. Estrutura de Qp7.

No espectro de RMN ^1H de Qp7 (Figura 23, Tabela 7, Espectro 44) observou-se sinais em 4.00 δ (3H, *s*, 4-OCH₃), 4.04 δ (3H, *s*, 3-OCH₃), 4.09 δ (3H, *s*, 3'-OCH₃), 5.43 δ (1H, *d*, *J*=5 Hz, H-1''), 7.67 δ (1H, *s*, H-5) e 7.84 δ (1H, *s*, H-5'). Sinais

correspondentes ao triterpeno pentacíclico Qp2, identificado previamente foram também observados.

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de Qp7 (Tabela 7, Espectro 45) apresentaram 23 carbonos referentes ao derivado de ácido elágico (Qp7), além de 30 carbonos referentes ao triterpeno pentacíclico Qp2.

Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) para Qp7 em $\text{DMSO}-d_6$

Posição	^1H	^{13}C	$g\text{HMQC}$	$g\text{HMBC}$
1	-	112.9	-	H-5,
2	-	141.2	-	-
3	-	141.0	-	3-OCH ₃ , H-5
4	-	154.4	-	4-OCH ₃
5	7.67 (s)	107.7	H-5	-
6	-	112.7	-	-
7	-	158.2	-	H-5
1'	-	113.7	-	H-5'
2'	-	141.3	-	-
3'	-	141.8	-	3'-OCH ₃ , H-5'
4'	-	151.9	-	H-5'
5'	7.84 (s)	112.4	H-5'	-
6'	-	112.1	-	-
7'	-	158.4	-	H-5'
3-OMe	4.04 (s)	61.4	3-OCH ₃	-
4-OMe	4.00 (s)	56.8	4-OCH ₃	-
3'-OMe	4.09 (s)	61.7	3'-OCH ₃	-
Glicose				
1''	5.43 (dl)	101.3	H-1''	-
2''	3.37 (m)	73.3	-	-
3''	3.30 (m)	76.5	-	-
4''	3.34 (m)	69.5	-	-
5''	3.28 (m)	77.3	-	-
6''	3.70 (m)	60.6	-	-

No experimento de $g\text{HMQC}$ de Qp7 (Tabela 7, Espectro 46) observou-se a correlação dos hidrogênios metoxílicos em 4.00 δ com 56.8 δ (4-OMe), em 4.04 δ com 61.4 δ (3-OMe) e em 4.09 δ com 61.7 δ (3'-OMe). Verificou-se também a correlação dos hidrogênios aromáticos em 7.67 δ com 107.7 δ (C-5) e em 7.84 δ com

112.4 δ (C-5'), além da correlação do hidrogênio anomérico em 5.43 δ com 101.3 δ (C-1'').

No experimento de *g*HMBC de Qp7 (Espectro 47) observou-se o acoplamento dos hidrogênios metoxílicos em 4.00 δ com 154.4 δ (C-4), em 4.04 δ com 141.0 δ (C-3) e em 4.09 δ com 141.8 δ (C-3'), determinando a posição das metoxilas em C-4, C-3 e C-3' respectivamente. Observou-se também as correlações dos hidrogênios aromáticos em 7.67 δ com 112.9 δ (C-1), 141.0 δ (C-3) e 158.2 δ (C-7), e em 7.84 δ com 113.7 δ (C-1'), 141.8 δ (C-3'), 151.9 δ (C-4') e 158.4 δ (C-7').

O espectro de massas por ESI de Qp7 (Espectro 48) em 40 V, no modo positivo, mostrou principalmente o pico referente à molécula protonada em m/z 507.1133 $[M + H]^+$ (100%), calculado 507.1139 (0.06%).

Com base nos dados de RMN 1H , ^{13}C , *g*HMQC, *g*HMBC, espectrometria de massas e a comparação com dados da literatura (Li *et al.*, 1999), determinou-se que Qp7 é o ácido 3, 3',4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo.

Identificação do derivado de ácido elágico (Qp8)

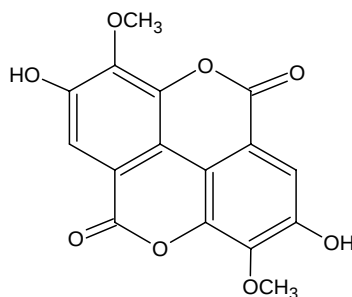


Figura 24. Estrutura de Qp8.

No espectro de RMN 1H de Qp8 (Figura 24, Tabela 8, Espectro 49) observou-se apenas dois singletos, um referente a metoxila em 4.05 δ (6H, 3-OCH₃, 3'-OCH₃) e outro referente a hidrogênio aromático em 7.51 δ (2H, H-5, H-5'). Os

deslocamentos químicos coincidentes bem como a multiplicidade dos hidrogênios metoxílicos indicam que são magneticamente equivalentes, o mesmo ocorre com os hidrogênios aromáticos. A proporção dos hidrogênios metoxílicos e aromáticos (3:1) sugere que para cada metoxila tem-se um hidrogênio aromático.

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de Qp8 (Tabela 8, Espectro 50) mostraram um total de oito carbonos, e o experimento de DEPT 135° permitiu identificar esses carbonos como um metoxílico em 60.9δ , um metínico em 111.5δ (C-5 e C-5') e seis quaternários em 111.6δ (C-1 e C-1'), 141.2δ (C-2 e C-2'), 140.3δ (C-3 e C-3'), 152.3δ (C-4 e C-4'), 112.1δ (C-6 e C-6') e 158.5δ (C-7 e C-7').

Tabela 8. Deslocamentos químicos (δ) para Qp8 em $\text{DMSO}-d_6$

Posição	Multiplicidade	^1H	^{13}C	$g\text{HMQC}$	$g\text{HMBC}$
1 (1')	C	-	111.6		H-5, H-5'
2 (2')	C	-	141.2		
3 (3')	C	-	140.3		H-5, H-5', 3-3'-(OCH_3)
4 (4')	C	-	152.3		H-5, H-5'
5 (5')	CH	7.51	111.5	H-5, H5'	
6 (6')	C	-	112.1		
7 (7')	C	-	158.5		H-5, H-5'
OMe	CH_3	4.05	61.0	3-3'-(OCH_3)	

No experimento de $g\text{HMQC}$ de Qp8 (Espectro 51, Tabela 8) observou-se a correlação de dois sinais referentes a hidrogênio metoxílico em 4.05δ ligado a carbono oxigenado em 60.9δ e a hidrogênio aromático em 7.51δ ligado a carbono metínico em 111.5δ .

No experimento de $g\text{HMBC}$ de Qp8 (Espectro 52, Tabela 8) observou-se o acoplamento do hidrogênio metoxílico em 4.05δ com o carbono em 140.3δ (C-3 e C-3') e do hidrogênio aromático em 7.51δ com os carbonos em 111.6δ (C-1 e C-1'), 140.3δ (C-3 e C-3'), 152.3δ (C-4 e C-4') e 158.5δ (C-7 e C-7').

O espectro de massas por ESI de Qp8 (Espectro 53) em 40 V, no modo positivo, mostrou principalmente o pico referente à molécula protonada em m/z 331.0826 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100%), calculado 331.0454 (3.72%). Além do MS^2 do íon m/z 331.0826 que produziu o íon m/z 316.1004 $[\text{M} - \text{CH}_3 + \text{H}]^+$ referente à perda de

um grupo metila da molécula protonada e do íon m/z 299.1006 (100%) $[M - CH_3 - OH + H]^+$ referente à perda de um grupo metila e de uma hidroxila da molécula protonada.

Com base nos dados de RMN 1H , ^{13}C , $gHMQC$, $gHMBC$, espectrometria de massas e a comparação com dados da literatura (Nawwar, 1982; Sato, 1987; Pakulski, 1996), determinou-se que Qp8 é o ácido 3, 3'-di-*O*-metilelágico.

Cabe mencionar que as substâncias Qp5–Qp8 estão sendo descritas pela primeira vez neste gênero (*Qualea*).

Identificação do fitoesterol (Qp9)

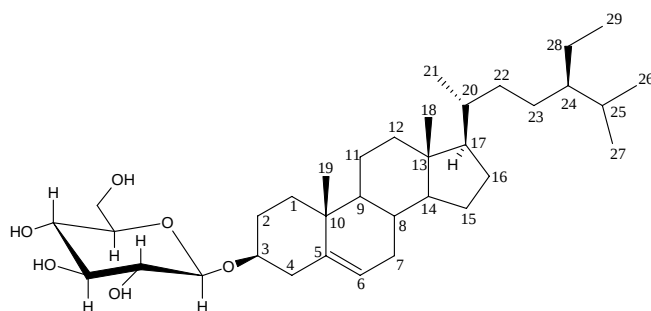


Figura 25. Estrutura de Qp9.

No espectro de RMN 1H de Qp9 (Figura 25, Espectro 54) observou-se sinais intensos na região entre 0.64δ e 1.23δ , correspondentes as metilas, um singleto largo referente ao hidrogênio da dupla ligação em 5.32δ (1H, H-6) e um dubleto referente ao hidrogênio anomérico em 4.22δ (1H, H-1', *d*, $J=8$ Hz). Além de dois singletos, um referente à metoxila em 4.05δ (6H, 3-OCH₃, 3'-OCH₃) e outro referente a hidrogênio aromático em 7.51δ (2H, H-5, H-5') referentes à Qp8.

O espectro de RMN de ^{13}C de Qp9 (Espectro 55, Tabela 9) mostrou sinais referentes a 35 carbonos, que quando comparados com os dados da literatura (Faizi, 2001; Kojima, 1990) permitiram identificar o composto Qp9 como β -sitosterol glicosídeo. Além disso, observamos oito carbonos referentes à Qp8.

Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C para Qp9 (DMSO-d_6)

Posição	^{13}C (Qp9)	Posição	^{13}C (Qp9)
1	36.9	19	19.1
2	29.3	20	35.5
3	76.8	21	18.7
4	38.4	22	33.4
5	140.0	23	25.5
6	121.2	24	45.2
7	31.5	25	28.8
8	31.4	26	19.0
9	49.6	27	19.7
10	36.3	28	22.7
11	20.6	29	11.8
12	38.6	1'	100.8
13	41.9	2'	73.5
14	56.2	3'	76.8
15	23.9	4'	70.2
16	27.8	5'	76.7
17	55.5	6'	61.2
18	11.7		

Perfil cromatográfico do EMeOH de Qp e a identificação de Qp5-Qp8 em Q. parviflora

Análises por HPLC-UV-PDA do EMeOH das cascas de *Q. parviflora* foram feitas a fim de traçarmos o perfil cromatográfico da planta. Para isso, uma alíquota do EMeOH (10 mg) foi dissolvida em H_2O (4.0 mL) e filtrada em cartucho Sep-Pak (Sigma, RP 18). Em seguida, o cartucho foi lavado com MeOH (4.0 mL). As frações aquosa e metanólica foram filtradas em Millex (0,45 μm) e analisadas por HPLC-UV-PDA (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μm). A fração metanólica apresentou um perfil cromatográfico parecido com a da fração aquosa, porém com uma maior resolução. Optou-se então, pela utilização da fração metanólica. A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos com 0,05% de TFA. O programa gradiente foi o seguinte: 16-40% B (30 min), 40-70% B (5 min), 70-100% B (5 min), e 100% B isocrático (5 min). O tempo total da análise foi de 45 min e o fluxo de 1.0 mL/min. A Figura 26 apresentou o cromatograma monitorado em 254 nm para avaliar a presença dos polifenóis presentes em *Q. parviflora* e a identificação dos t_R de Qp5-Qp8 nesta espécie.

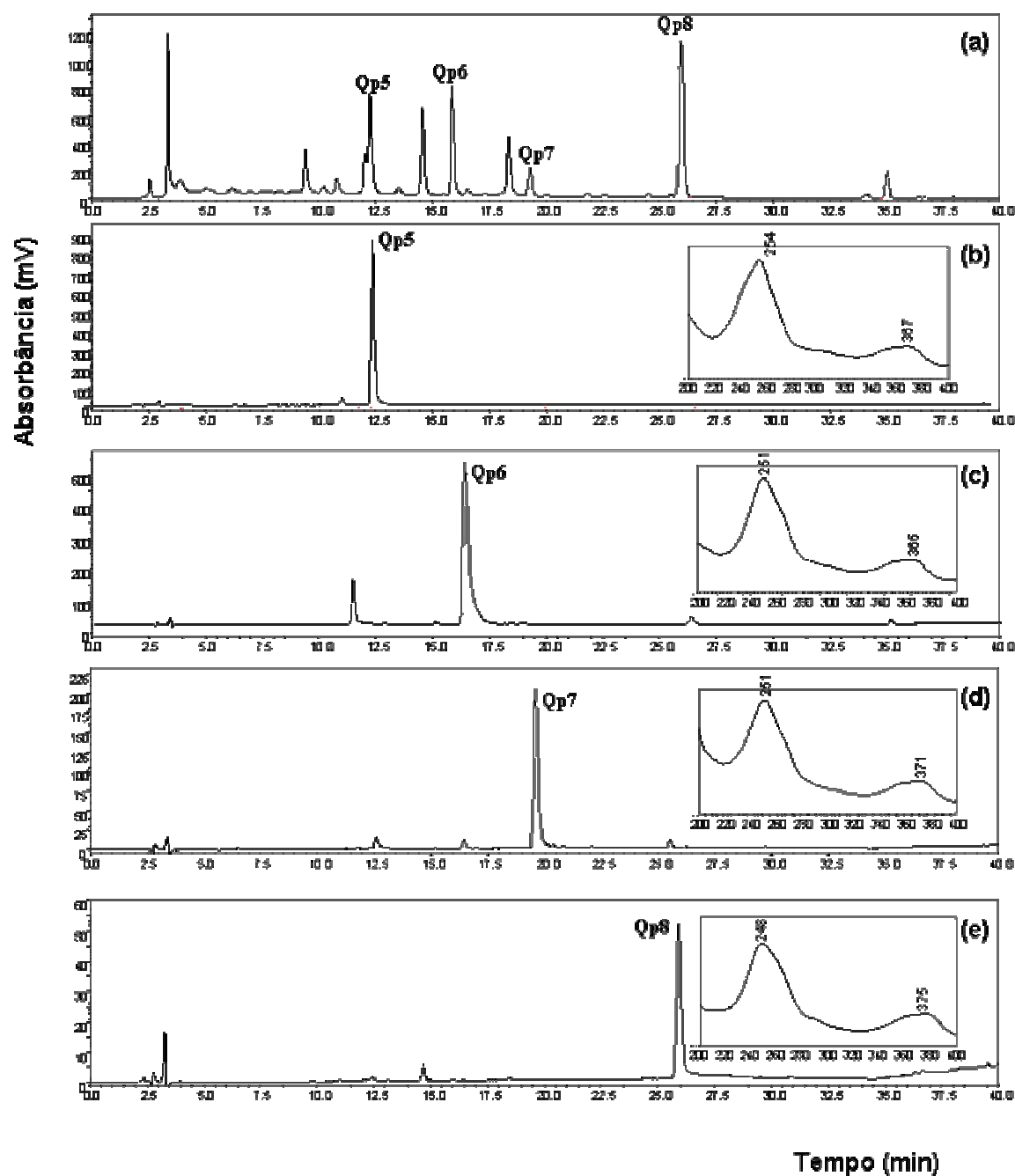


Figura 26. Cromatogramas de HPLC-UV-PDA do EMeOH de *Q.parviflora* (a), Qp5 (b), Qp6 (c), Qp7 (d) e Qp8 (e) com seus respectivos espectros de UV. Condições cromatográficas vide texto, página 54.

Perfil cromatográfico dos EMeOH de Q.grandiflora, Q. multiflora e Q. parviflora e a identificação de Qp5-Qp8 nestas espécies utilizando HPLC-UV-PDA

Novamente, recorreu-se ao estabelecimento do perfil cromatográfico das três espécies em estudo para se determinar quais dos metabólitos isolados e identificados de *Q. parviflora* estavam também presentes em *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*. Para isso, os EMeOH de cada espécie passaram pelo clean-up descrito anteriormente e foram analisados por HPLC-UV-PDA nas mesmas condições.

A partir das estruturas identificadas dos derivados de ácido elágico presentes no EMeOH de *Q. parviflora* foi realizada a identificação dos mesmos derivados nas outras espécies. Para tanto utilizou-se o HPLC-UV-PDA e a identificação foi feita através da comparação dos tempos de retenção (t_R) e dos respectivos espectros de UV, dos picos obtidos para os derivados de ácido elágico em *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* com os t_R dos picos obtidos para os mesmos derivados de ácido elágico cujas estruturas químicas foram previamente identificadas em *Q. parviflora* (Figura 27). Verificou-se que Qp5, Qp6 e Qp8 estavam presentes nas três espécies enquanto que Qp7 não foi detectado em *Q. multiflora*. Observou-se também que o perfil químico de *Q. parviflora*, em relação aos polifenóis, é mais rico do que o das outras espécies, ou seja, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* apresentaram um menor número de constituintes e praticamente todos eles estavam presentes em *Q. parviflora*. Embora não tenha sido realizada a quantificação dos metabólitos, observou-se que existem também variações quantitativas entre as três espécies em estudo.

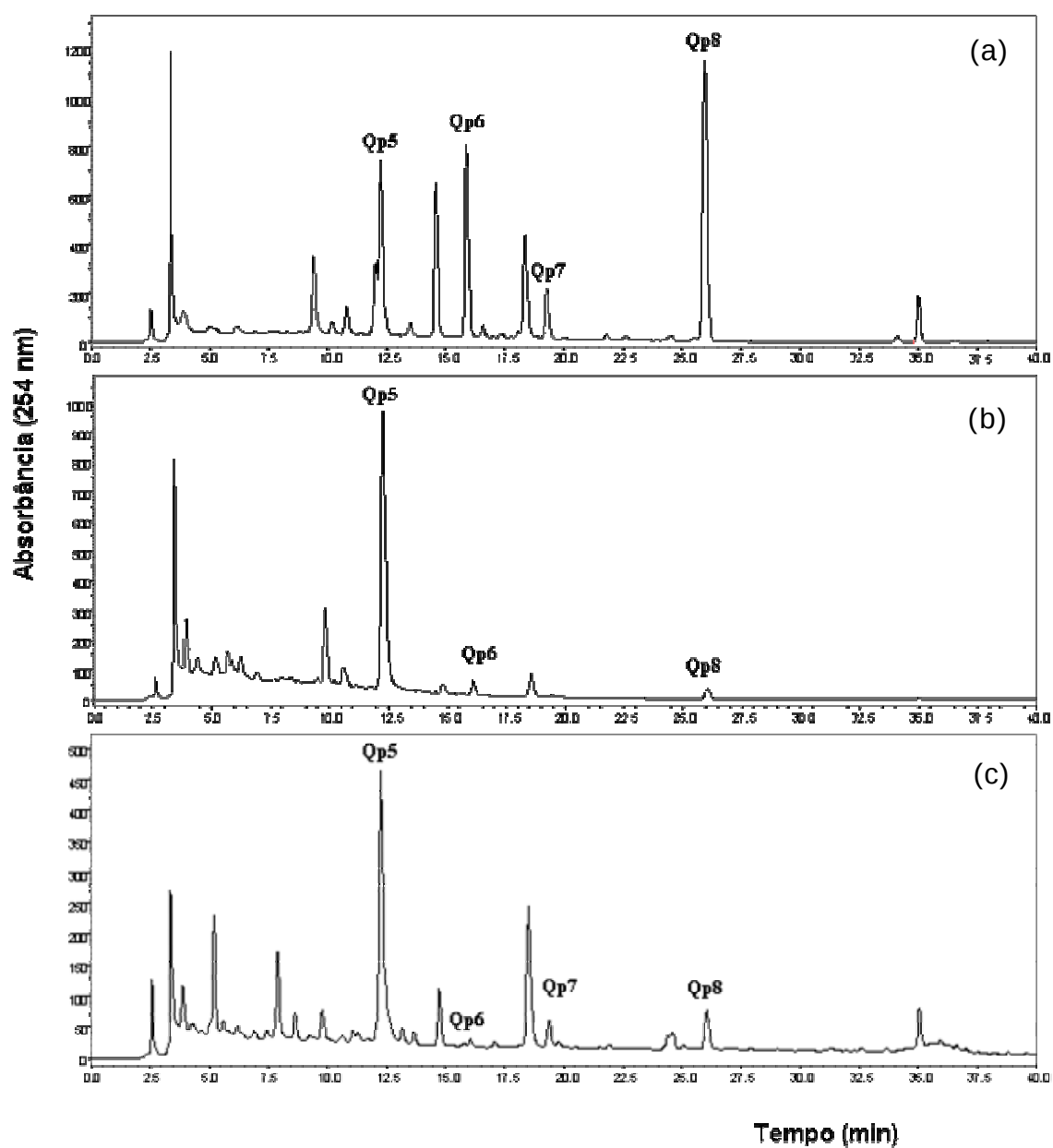


Figura 27: Cromatogramas de HPLC-UV-PDA dos EMeOH de (a) *Q. parviflora*, (b) *Q. multiflora* e (c) *Q. grandiflora*. Condições cromatográficas vide texto, página 54.

Identificação de triterpenos, saponinas e derivados de ácido elágico em Qualea parviflora utilizando HPLC-ESI-IT-MS

A análise por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo (Figura 28) apresenta os triterpenos, saponinas e derivados de ácido elágico presentes no EMeOH de *Q. parviflora* e os cromatogramas extraído dos íons para os triterpenos, saponinas e derivados de ácido elágico a m/z 477, 491, 461, 741, 725, 505, 329 e 519.

Verificou-se que os tempos de retenção 16.83, 17.81, 19.79, 20.80, 21.57, 22.10, 25.15 e 27.95 min são referentes aos íons dos metabólitos Qp1, Qp5, Qp6, Qp4, Qp3, Qp7, Qp8 e Qp2, respectivamente. Pôde-se observar também que existem isômeros do metabólito Qp7 e que o pico com tempo de retenção 22.10 min corresponde a um pico de baixa intensidade. Isso pode ser justificado pela fraca ionização de Qp7 no modo negativo, devido a não apresentar nenhuma hidroxila fenólica (quando comparado aos demais).

A Figura 29 apresenta os espectros de massas dos derivados de ácido elágico (os espectros de massas dos triterpenóides foram apresentados na Figura 17). A Figura 29a exibe o espectro de massas de Qp6, que mostra a presença da molécula desprotonada em m/z 491 $[M - H]^-$, do dímero da molécula desprotonada em m/z 983 $[2M - H]^-$ e do trímero da molécula desprotonada em m/z 1474 $[3M - H]^-$.

A Figura 29b exibe o espectro de massas de Qp5, que mostra a presença da molécula desprotonada em m/z 461 $[M - H]^-$, de seu dímero em m/z 923 $[2M - H]^-$ e de seu trímero em m/z 1384 $[3M - H]^-$.

A Figura 29c exibe o espectro de massas de Qp8, que mostra a presença da molécula desprotonada em m/z 329 $[M - H]^-$ e de seu dímero m/z 658 $[2M - H]^-$.

A Figura 29d exibe o espectro de massas de Qp7, que mostra a presença da molécula desprotonada em m/z 505 $[M - H]^-$, o aduto com ácido acético da molécula desprotonada $[M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 565 e do aduto com ácido acético do dímero em m/z 1070 $[2M + CH_3COOH - H]^-$.

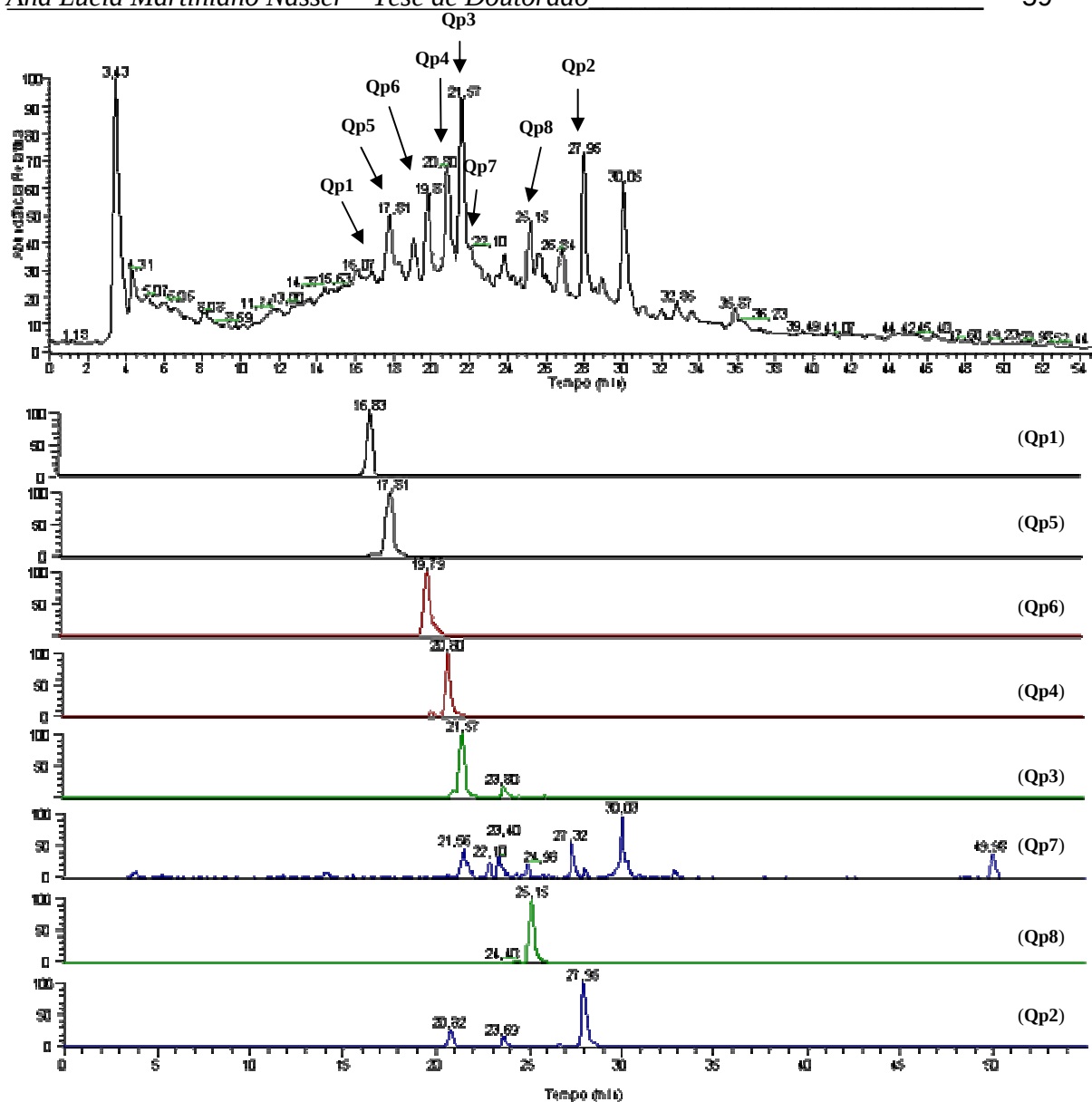


Figura 28. Análise por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos triterpenóides e derivados de ácido elágico presentes no EMeOH de *Q.parviflora* e os cromatogramas para os íons extraídos dos triterpenóides e dos derivados de ácido elágico: m/z 477 (Qp1), 461 (Qp5), 491 (Qp6), 741 (Qp4), 725 (Qp3), 505 (Qp7), 329 (Qp8) e 519 (Qp2).

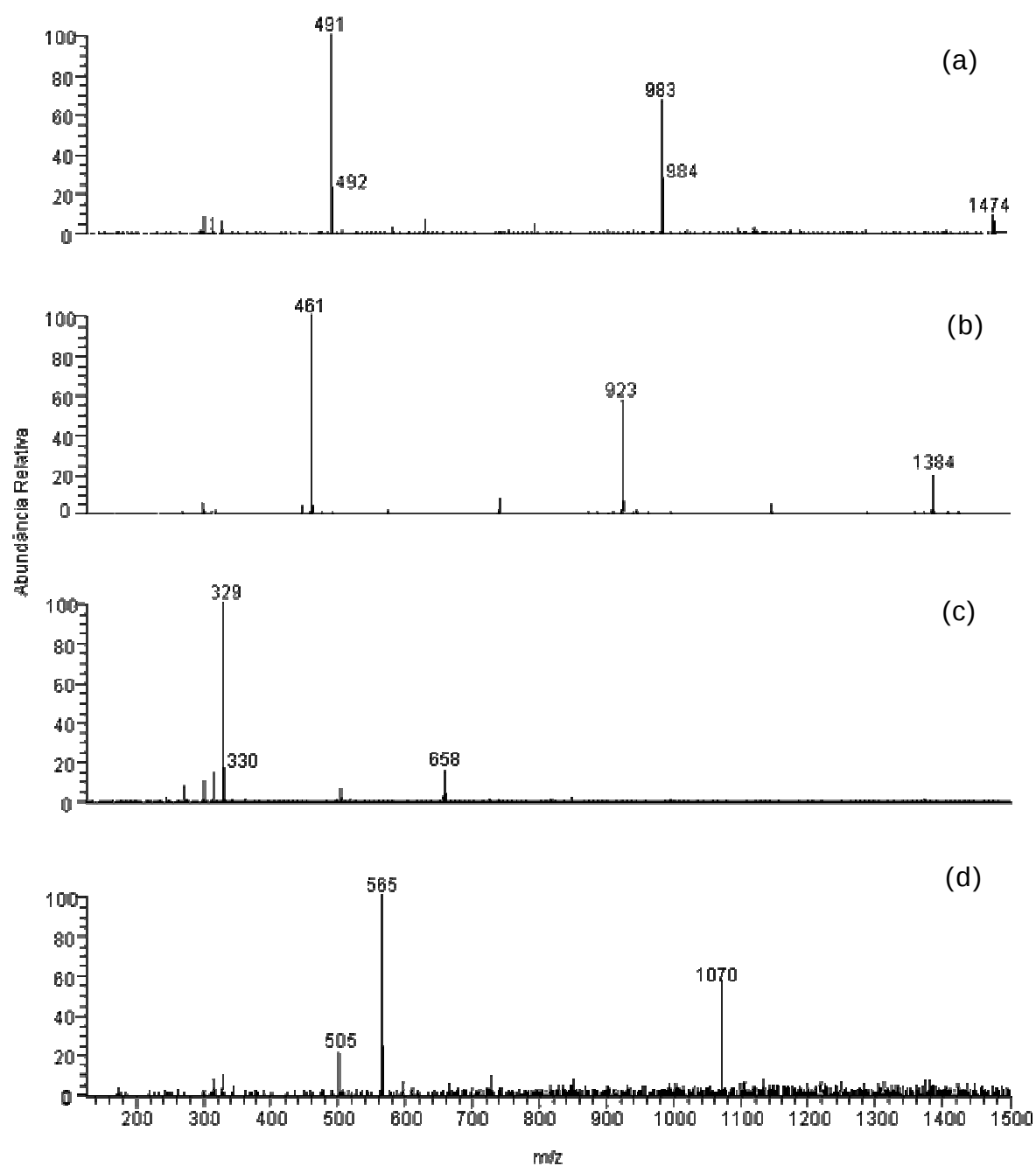


Figura 29. Espectros de massas dos picos com tempo de retenção: (a) 17.81 min (Qp5); (b) 19.79 min (Qp6); (c) 22.10 min (Qp7) e (d) 25.15 min (Qp8).

A Figura 30 demonstra que, dos derivados de ácido elágico identificados em *Qualea parviflora*, apenas Qp7 não foi detectado nas duas outras espécies (*Q. grandiflora* e *Q. multiflora*) por HPLC-ESI-IT-MS, uma vez que Qp7 não apresenta hidroxila fenólica livre como os demais, fato que deve ter influenciado na sua ionização e, conseqüentemente, na detecção no modo negativo. Contudo, a detecção de Qp7 em *Q. grandiflora* (mas não em *Q. multiflora*) pôde ser feita inequivocadamente usando HPLC-UV-PDA através da comparação com o tempo de retenção da substância isolada (Figura 28). Esses experimentos demonstram, portanto, que a escolha racional da técnica adequada é essencial para a correta caracterização dos metabólitos secundários de uma planta.

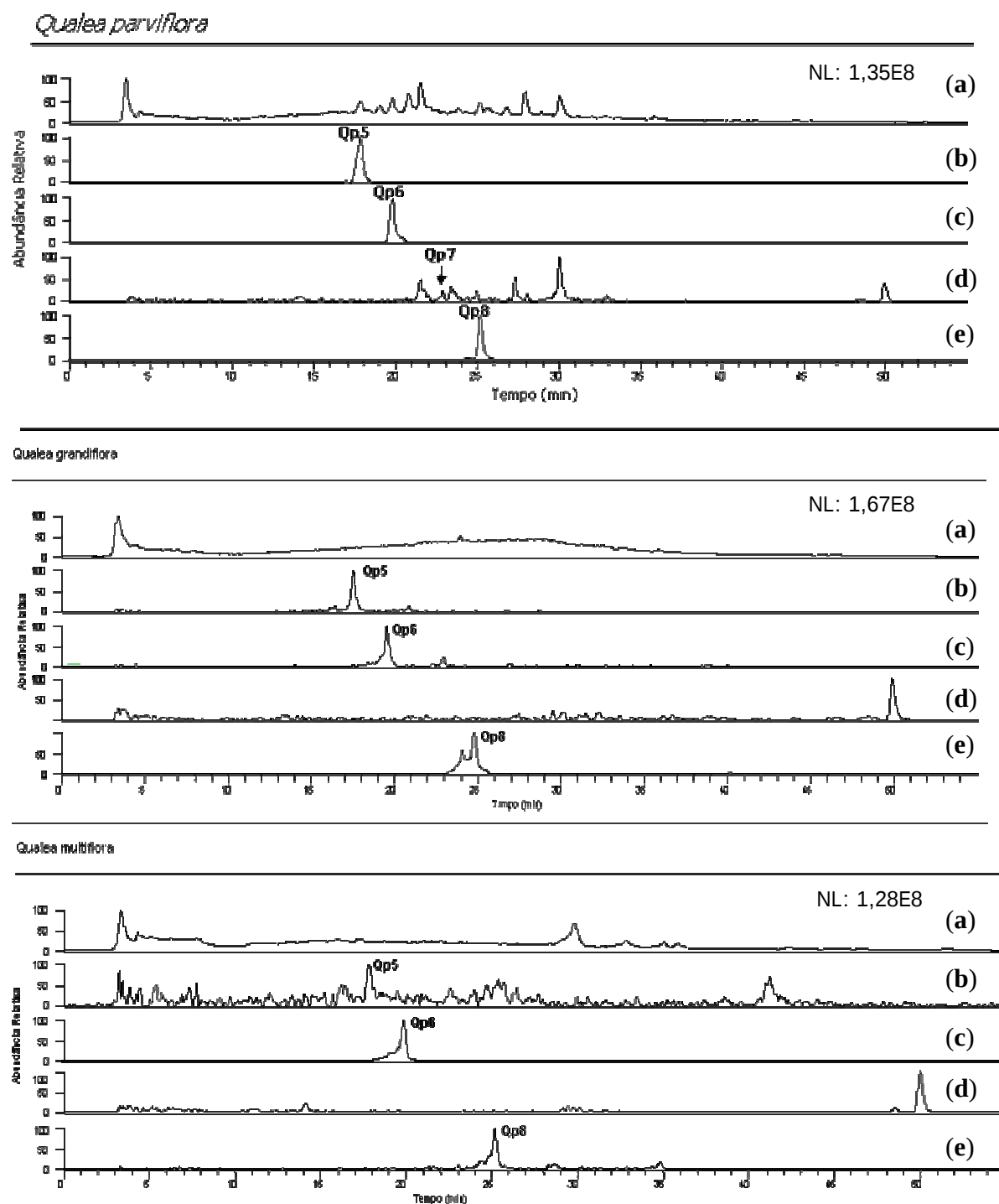


Figura 30. Análises por HPLC-ESI-IT-MS no modo negativo dos derivados de ácido elágico presentes em *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*. (a) BPI e cromatograma extraído dos íons de: (b) m/z 461; (c) m/z 491; (d) m/z 329 e (e) m/z 505.

CAPÍTULO 2

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS CLOROFÓRMICOS

DESENVOLVIMENTO/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES

Estudo químico dos triterpenos e esteróis presentes no ECHCl₃ de Qualea parviflora

Análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos ECHCl₃ de *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* juntamente com padrões de catequinas [(+)-catequina, (-)-epicatequina], flavonóides (rutina e quercetina), ácido gálico, galato de metila, lupeol e revelação com reagentes específicos (NP/PEG, anisaldeído sulfúrico, iodo, UV em 254 e 365 nm) indicaram a presença de esteróides e de terpenóides (manchas arroxeadas).

Uma porção do ECHCl₃ (5,0 g) de *Q. parviflora* foi fracionada em coluna de sílica gel (125g; 10 cm x 4,5 cm d.i.), empregando-se como eluente um gradiente crescente de polaridade Hexano-CHCl₃-MeOH. Foram obtidas oito frações de aproximadamente 500 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDC, empregando-se como fase móvel CHCl₃ (100%) (Figura 31). As frações F5-F8, mais polares, ficaram retidas na base e serão estudadas posteriormente.

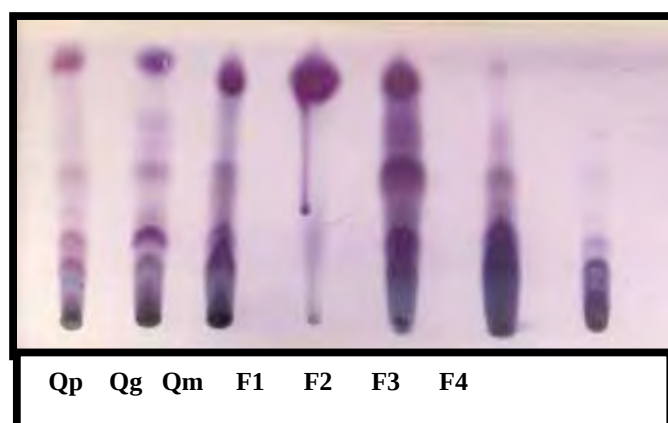


Figura 31. CCDC dos ECHCl₃ das cascas de Qp, Qg, Qm e as frações obtidas do ECHCl₃ de *Q. parviflora*. Fase móvel: CHCl₃ (100%); revelador: anisaldeído sulfúrico.

Análises de F1 permitiram identificar uma mistura rica em Qp10. A fração F2 (670 mg) foi fracionada em coluna de sílica gel 60H (10 cm x 2 cm d.i.), empregando-se como eluente um gradiente crescente de polaridade Hexano-CHCl₃-MeOH. Foram obtidas 110 sub-frações de aproximadamente 15 mL cada. As sub-frações F8-10 forneceram Qp11. A fração F3 (910 mg) foi também fracionada em coluna de sílica gel 60H (10 cm x 2 cm d.i.), empregando-se o mesmo eluente. Foram obtidas 150 sub-frações de aproximadamente 15 mL cada. A sub-fração F15-18, foi submetida à CCDP utilizando sílica gel como fase estacionária e CHCl₃ (100%) como fase móvel para fornecer Qp12. As sub-frações F23-25, F-48-49 e F76-80 forneceram Qp13, Qp14 e Qp15 respectivamente. A Figura 32 apresenta o fluxograma do fracionamento do ECHCl₃ das cascas de *Q. parviflora*.

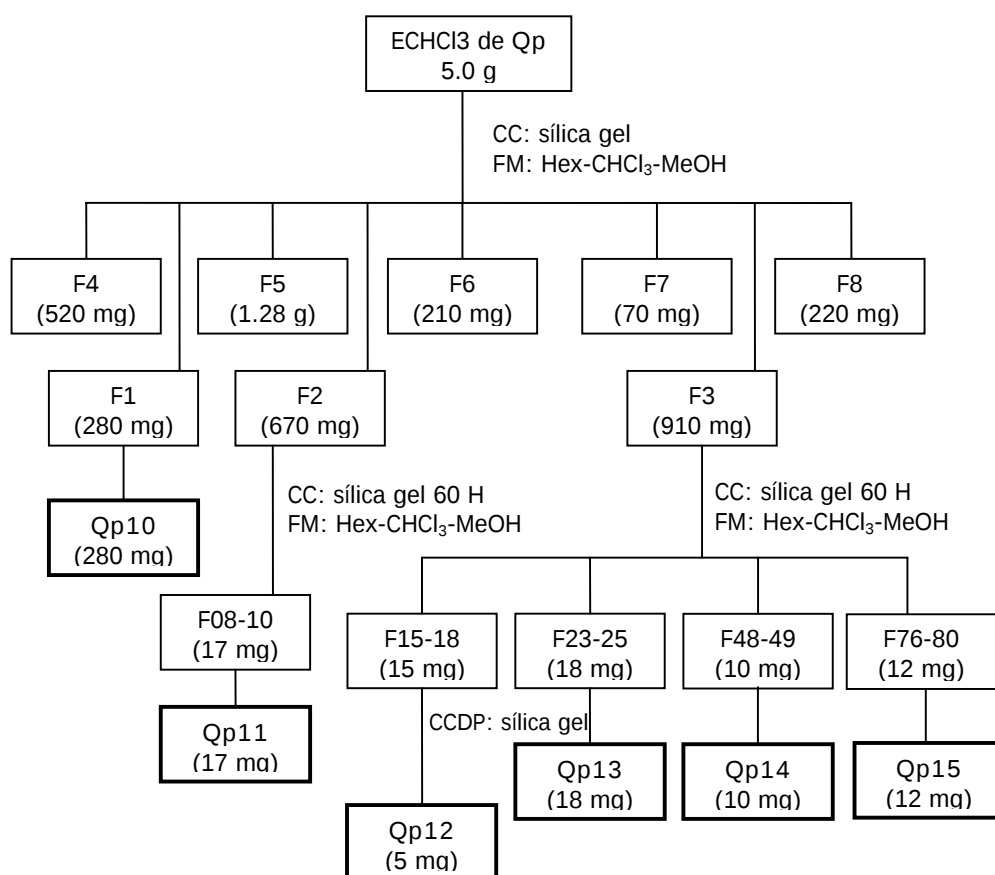


Figura 32. Fluxograma do fracionamento do ECHCl₃ de *Q. parviflora*.

Identificação Estrutural

Identificação de β -sitosterol (Qp10)

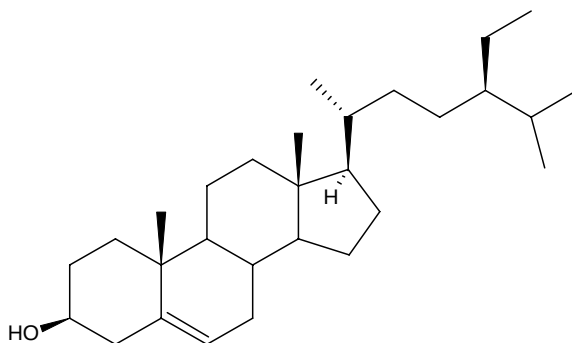


Figura 33. Estrutura de Qp10.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 33, Tabela 10, Espectro 56) apresentou 29 sinais de carbono, dos quais, um grupo carbinólico metínico em 71.8 δ , dois grupos metílicos em 11.9 δ e 12.0 δ e sinais de carbono sp^2 (121.7 δ e 140.8 δ). Estes dados quando comparados com os da literatura (Faizi *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 1990) permitiram identificar o composto Qp10 como β -sitosterol.

Existe uma considerável quantidade de triterpenos ocorrendo frequentemente nas plantas. Estes triterpenos apresentam diversidade ampla quanto ao esqueleto carbônico e à funcionalização. Dentro desta variedade de substâncias, existe uma quantidade significativa de triterpenos que podem ser considerados de estrutura simples, que apresentam como características comuns um grupo funcional oxigenado apenas no carbono três, ou neste carbono e em algum dos grupos metílico, e uma única ligação dupla (Olea, 1990).

Os valores de deslocamento químico de RMN ^{13}C dos átomos de carbono que formam a ligação dupla desses triterpenos simples geralmente são característicos para cada tipo de esqueleto, e sofrem uma variação pouco significativa quando o grupo funcional varia (Olea, 1990).

Desse modo, faremos uma descrição sucinta para a identificação dos triterpenos pentacíclicos simples isolados de *Qualea parviflora*.

Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) para o β -sitosterol (Qp10) e os triterpenos pentacíclicos Qp11-Qp15 em CDCl_3 .

Posição	Qp10	Qp11	Qp12	Qp13	Qp14	Qp15
1	37.3	22.3	39.6	38.7	38.8	33.3
2	31.7	41.5	34.2	27.4	27.4	25.4
3	71.8	213.1	217.8	79.0	79.0	76.3
4	42.4	58.3	48.0	38.9	38.9	37.1
5	140.8	42.2	55.0	55.4	55.4	49.1
6	121.7	41.3	19.7	18.3	18.3	18.3
7	31.9	18.3	33.6	34.3	34.3	34.2
8	31.9	53.1	40.9	40.9	41.0	40.9
9	50.2	37.5	49.8	50.5	50.5	50.3
10	36.5	59.5	36.9	37.2	37.2	37.5
11	21.1	35.7	21.5	21.0	20.9	20.7
12	39.8	30.5	25.2	25.2	25.3	25.5
13	42.3	39.7	38.2	38.1	37.4	38.4
14	56.8	38.3	43.0	42.9	42.8	42.5
15	24.3	32.5	27.5	27.4	27.1	30.6
16	28.2	36.0	35.6	35.6	29.2	32.2
17	56.1	30.0	43.0	43.0	47.8	56.4
18	11.9	42.9	48.3	48.4	48.8	47.0
19	19.4	35.4	48.0	48.0	47.8	49.3
20	36.2	28.2	151.0	151.0	150.5	150.4
21	18.8	32.8	29.9	29.9	29.8	29.7
22	34.0	39.3	40.0	40.0	34.0	37.4
23	26.2	6.8	26.7	28.0	28.0	28.2
24	45.9	14.7	21.0	15.4	15.3	22.1
25	29.2	17.9	15.8	16.1	16.1	15.9
26	19.8	20.3	16.0	16.0	16.0	16.1
27	19.1	18.7	14.5	14.6	14.8	14.8
28	23.1	32.1	18.0	18.0	60.6	181.0
29	12.0	35.0	109.4	109.3	109.7	109.7
30	-	31.8	19.3	19.3	19.1	19.4

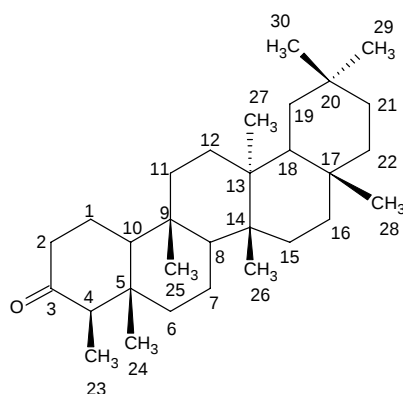
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp11)

Figura 34. Estrutura de Qp11.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 34, Tabela 10, Espectro 57) apresentou 30 sinais de carbono, carbono metílico em 6.8δ (C-23) um grupo carbonila cetônico em 213.1δ (C-3) e nenhum sinal de ligação dupla. Estes dados quando comparados com os da literatura (Gottlieb *et al.*, 1985; Patra *et al.*, 1990; Mahato & Kundu, 1994) permitiram identificar o composto Qp11 como friedelina.

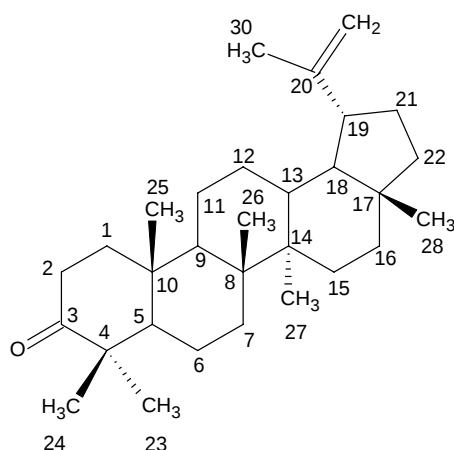
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp12)

Figura 35. Estrutura de Qp12.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 35, Tabela 10, Espectro 58 e 59) apresentou 30 sinais de carbono, um grupo carbonila cetônico em 217.8 δ e sinais de carbono sp^2 (121.7 δ e 140.8 δ), característicos do esqueleto de triterpeno lupano. O experimento de $g\text{HMBC}$ confirmou a presença do grupo carbonila cetônico e os sinais de carbono sp^2 (Espectro 59). Estes dados quando comparados com os da literatura (Mahato & Kundu, 1994, Olea & Roque, 1990) permitiram identificar o composto Qp12 como lupenona.

Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp13)

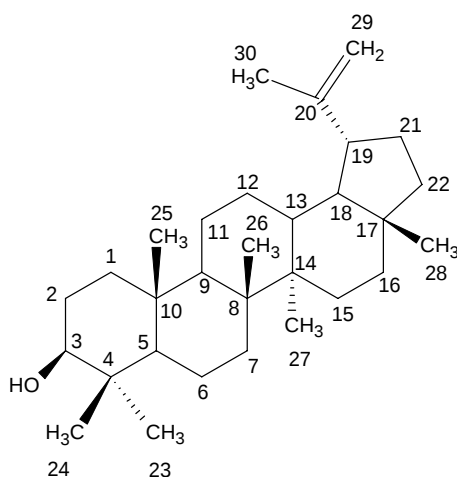


Figura 36. Estrutura de Qp13.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 36, Tabela 10, Espectro 60) apresentou 30 sinais de carbono, dos quais, um grupo carbinólico metínico em 79.0 δ e sinais de carbono sp^2 em 109.3 δ e 151.0 δ , característicos do esqueleto triterpênico do tipo lupano (Olea, 1990). Estes dados quando comparados com os da literatura (Mahato & Kundu, 1994; Burns *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 1985; Souza, *et al.*, 2001; Wenkert *et al.*, 1978) permitiram identificar o composto Qp13 como lupeol.

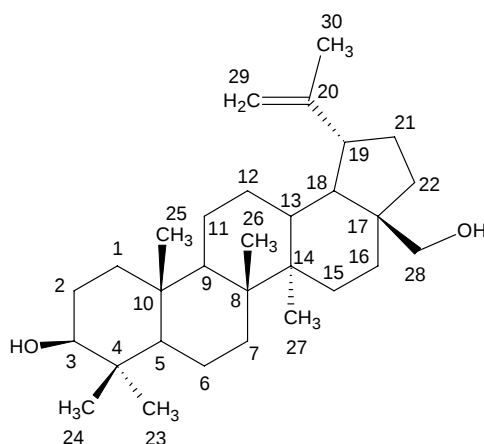
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp14)

Figura 37. Estrutura de Qp14.

O espectro de RMN ¹³C (Figura 37, Tabela 10, Espectro 61) apresentou 30 sinais de carbono, dos quais, um grupo carbinólico metínico em 79.0δ, um grupo carbinólico metilênico em 60.6δ e sinais de carbono sp² em 109.3δ e 151.0δ. Estes dados quando comparados com os da literatura (Mahato & Kundu, 1994; Tinto, *et al.*, 1992) permitiram identificar o composto Qp14 como betulina.

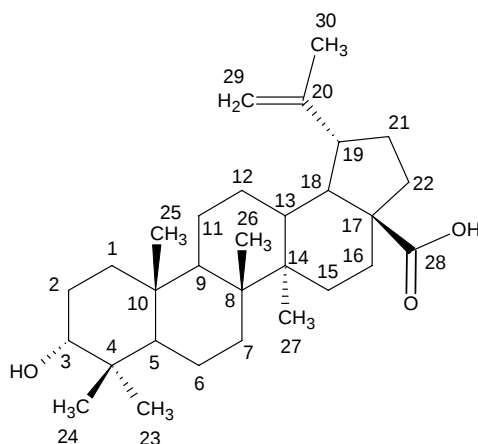
Identificação do triterpeno pentacíclico (Qp15)

Figura 38. Estrutura de Qp15.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 38, Tabela 10, Espectro 62) apresentou 30 sinais de carbono, dos quais, um grupo carbinólico metínico em 76.3 δ , um grupo carboxílico em 181.0 δ e sinais de carbono sp^2 em 109.7 δ e 150.4 δ . Estes dados quando comparados com os da literatura (Ma *et al.*, 2004; Symon *et al.*, 2003; Herz *et al.*, 1972) permitiram identificar o composto Qp15 como ácido *epi*-betulínico.

Perfil cromatográfico do ECHCl₃ de Q. parviflora e a identificação de Qp10-Qp13 utilizando GC-IT-MS

Análises por GC-IT-MS do ECHCl₃ das cascas de *Q. parviflora* foram feitas a fim de traçarmos o perfil cromatográfico da planta. Para isso, uma alíquota do ECHCl₃ (10 mg) foi dissolvida em DCM (4.0 mL) e filtrada em cartucho Sep-Pak (Sigma, Sílica). Em seguida, o cartucho foi lavado com MeOH (4.0 mL). As frações DCM foram filtradas em Millex (0,45 μm) e analisadas por CG-IT-MS (LM-5, 15m x 0.2mm; 0.2 μm). A temperatura de trabalho da coluna foi otimizada, e utilizou-se a seguinte programação: 150 a 300°C (8°C/min) permanecendo 10 minutos nesta temperatura; enquanto as temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 250°C e 310°C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1 μL e o modo de injeção foi o splitless/split (0.12s seguido de split 1:20). O tempo total da análise foi de 30 minutos.

As Figuras 39 e 40 apresentam respectivamente, os cromatogramas e os espectros de massas para a identificação dos metabólitos Qp10-Qp13, obtidos de *Q. parviflora* e que foram utilizados como padrões, na identificação dos mesmos metabólitos presentes no ECHCl₃ de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*.

O perfil cromatográfico de *Q. parviflora* evidencia que os metabólitos (Qp10-Qp13) presentes no ECHCl₃ foram identificados. Os triterpenos Qp14 e Qp15, betulina e ácido *epi*-betulínico, não eluíram nem mesmo em temperaturas elevadas, provavelmente devido à maior polaridade (Qp14 apresenta duas hidroxilas e Qp15 uma hidroxila e um grupo carboxílico).

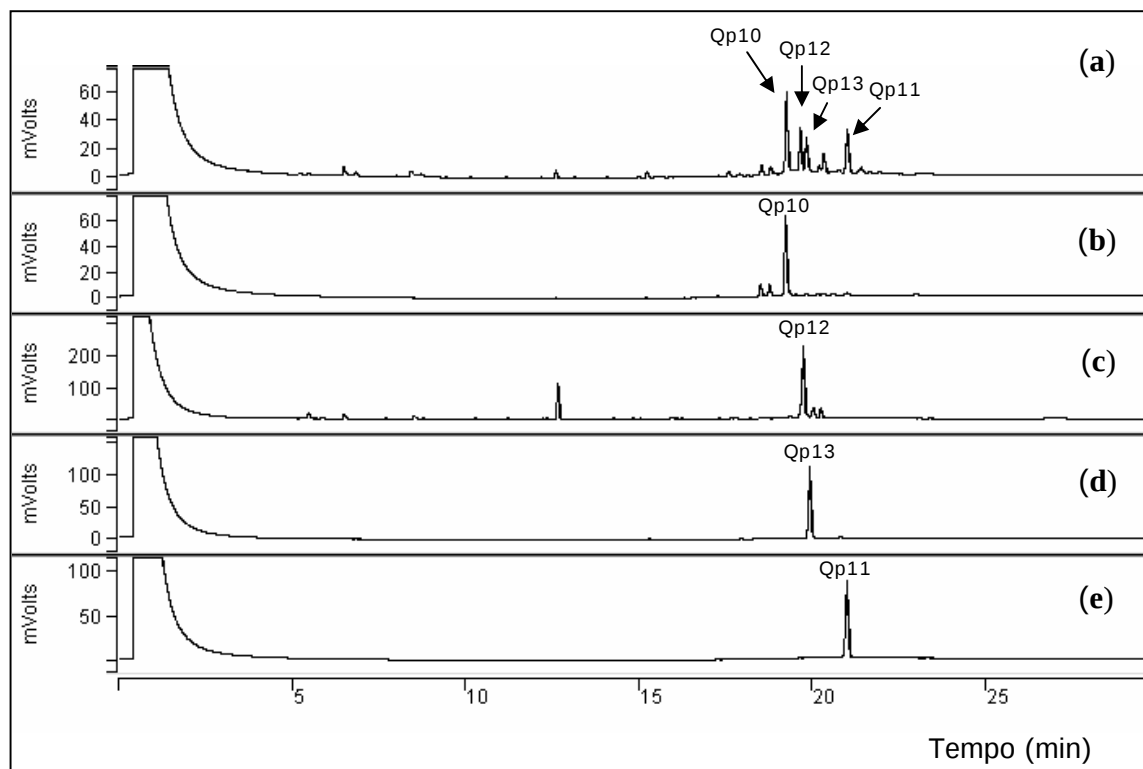


Figura 39. Cromatogramas (a) do perfil do ECHCl_3 de *Q. parviflora*, (b) de Qp10, (c) de Qp12, (d) de Qp13 e (e) de Qp11.

A Figura 40a exibe o espectro de massas de Qp10, que mostra principalmente a presença do íon $[\text{M}]^+$ em m/z 414 e do íon de m/z 329, referente ao fragmento $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{13}]^+$, proveniente da perda da cadeia lateral saturada. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp10.

A Figura 40b exibe o espectro de massas de Qp12, que mostra a presença do íon $[\text{M}]^+$ em m/z 424. O íon em m/z 205, referente ao fragmento $[\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}]^+$, correspondente ao fragmento contendo os anéis A e B de triterpenos lupânicos com grupo carbonila em C-3. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp12 (Modugno *et al.*, 2006; Assimopoulou & Papageorgiou, 2005).

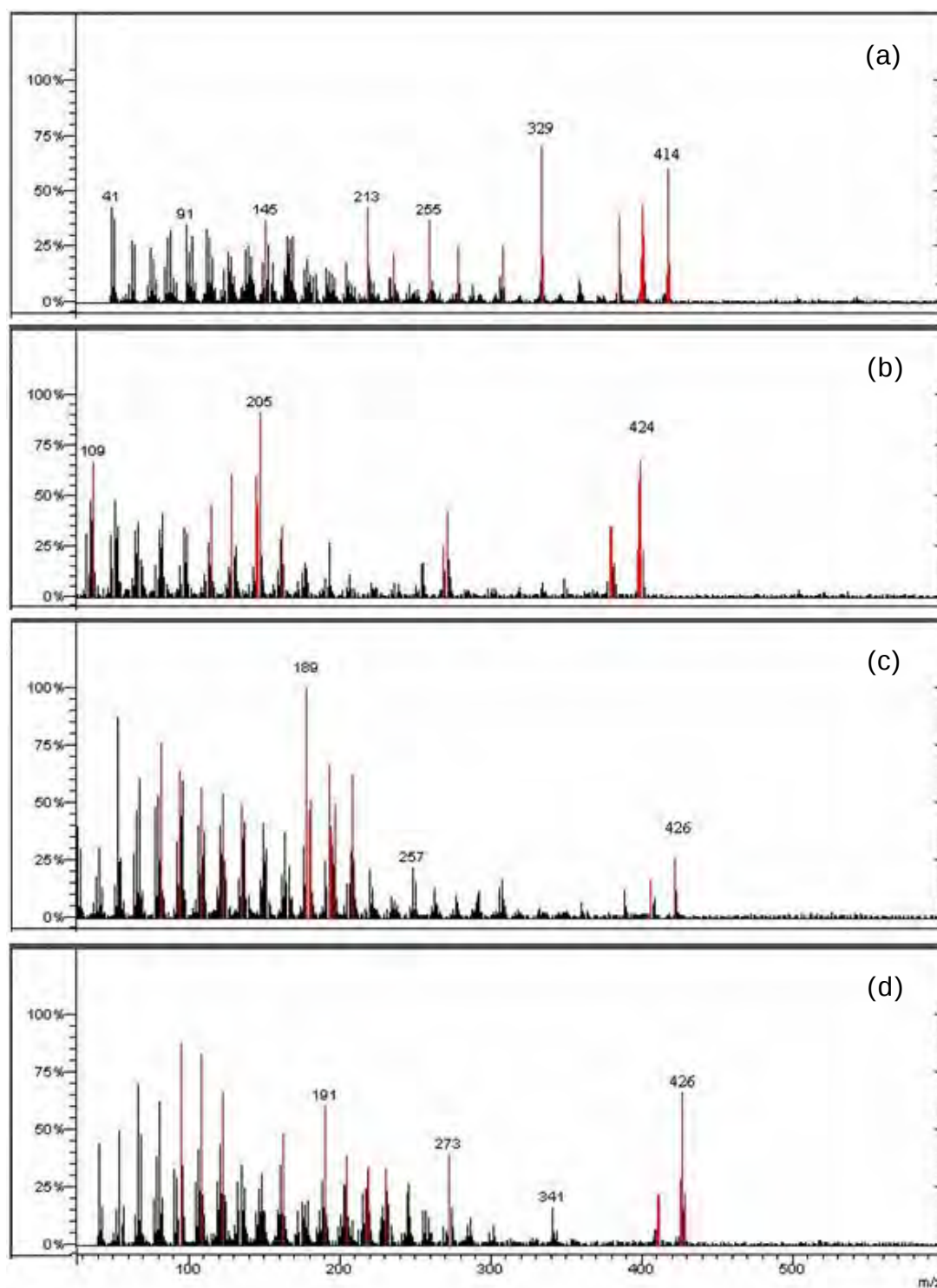


Figura 40. Espectros de massas obtidos por GC-IT-MS de (a) Qp10, (b) Qp12, (c) Qp13 e (d) Qp11.

A Figura 40c exibe o espectro de massas de Qp13, que mostra o íon $[M]^+$ em m/z 426. O íon de m/z 189 referente ao fragmento $[C_{14}H_{21}]^+$, correspondente ao fragmento contendo os anéis D, E e a cadeia lateral insaturada, enquanto que o íon de m/z 207 corresponde ao fragmento $[C_{14}H_{21}O]^+$ contendo os anéis A e B de triterpenos lupânicos com grupo hidroxila em C-3. O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp13 (Modugno *et al.*, 2006; Assimopoulou & Papageorgiou, 2005).

A Figura 40d exibe o espectro de massas de Qp11, que mostra o íon $[M]^+$ em m/z 426 e o de m/z 273 corresponde ao fragmento $[C_{19}H_{29}O]^+$ contendo os anéis A, B e C de triterpeno friedelânicos com grupo carbonila em C-3 (Budzikiewicz *et al.*, 1963). O conjunto desses resultados é coerente com a estrutura de Qp11.

Perfil cromatográfico dos ECHCl₃ de Q. grandiflora, Q. multiflora e Q. parviflora e a identificação de Qp10-Qp13 utilizando GC-IT-MS

O estabelecimento do perfil cromatográfico do ECHCl₃ de *Q. parviflora* foi usado como ponto de partida para a investigação de outras espécies de *Qualea* (*Q. grandiflora* e *Q. multiflora*), pois muitas vezes espécies de um mesmo gênero apresentam os mesmos constituintes químicos.

Para isso, os ECHCl₃ de cada espécie foram submetidos ao clean-up descrito anteriormente e analisados por GC-IT-MS. As substâncias foram identificadas por comparação dos tempos de retenção (t_R) e análise dos respectivos espectros de massas (Figura 41).

Os resultados demonstraram que o perfil químico de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* é semelhante ao de *Q. parviflora*, apresentando substâncias na mesma faixa de tempo de retenção. Embora não tenha sido realizada a quantificação dos metabólitos, observam-se diferenças nos teores dos metabólitos presentes nas espécies em estudo. O ECHCl₃ de *Q. multiflora* apresenta predominantemente, β -sitosterol; o de *Q. grandiflora*, lupeol; enquanto que o ECHCl₃ de *Q. parviflora* apresenta teores mais homogêneos de β -sitosterol, lupenona, lupeol e friedelina.

Esses experimentos confirmam a eficiência dessa técnica para o estudo dessas espécies, sem a necessidade do isolamento e identificação de metabólitos já bem conhecidos.

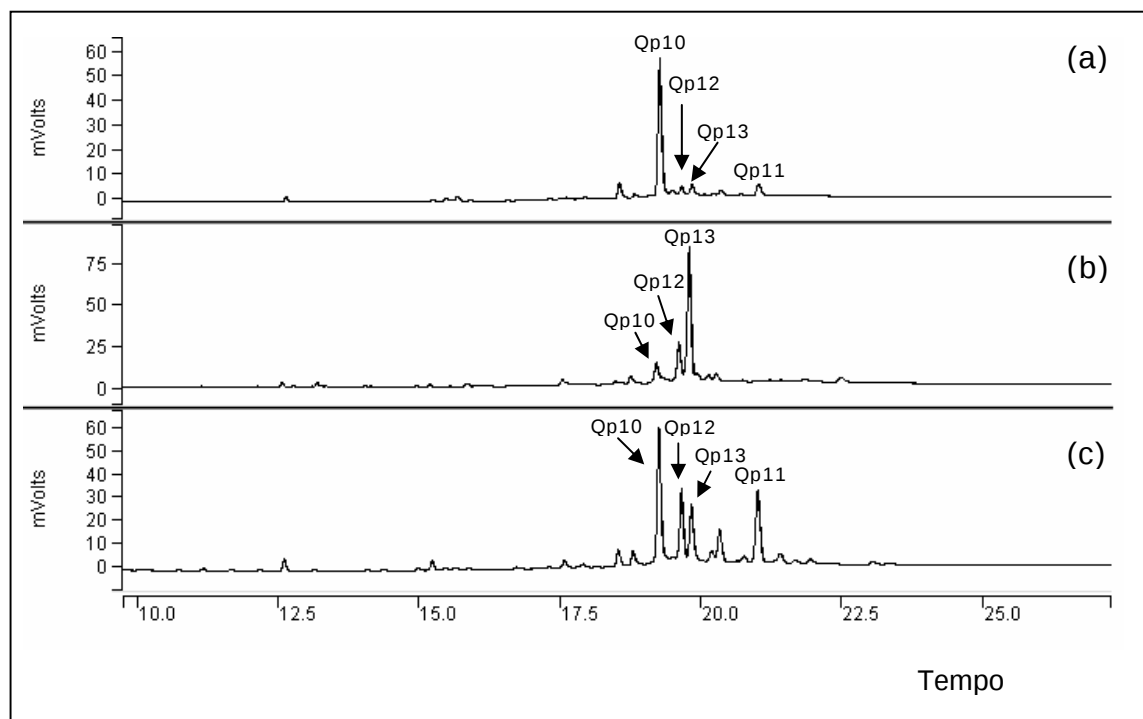


Figura 41. Cromatograma de GC-IT-MS de (a) Qm, (b) Qg e (c) Qp.

CAPÍTULO 3

ESTUDO FARMACOLÓGICO

Tendo em vista que as espécies de *Qualea* são utilizadas popularmente como antiinflamatória (Almeida *et al.*, 1998), analgésica (Gaspi *et al.*, 2006), antiúlcera (Hiruma-Lima *et al.*, 2006) e antidiarréica (Septímio, 1994), e que as informações técnicas existentes são insuficientes para garantir qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas, é extremamente necessária a realização de estudos farmacológicos comprobatórios.

DESENVOLVIMENTO/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES

Ensaio Farmacológicos

Para os ensaios farmacológicos foram utilizados:

- EMeOH de *Qualea parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* (contendo: poliisoprenóides, materiais de natureza graxa, esteróides, terpenos, saponinas, derivados do ácido elágico e taninos). Estes extratos foram obtidos de acordo com o texto (página 20).
- FTSAE (fração rica em: terpenos, saponinas e derivados de ácido elágico). Esta fração foi obtida a partir do fracionamento do EMeOH de *Q. parviflora* em CC sílica gel empregando-se como eluente um gradiente crescente de polaridade (CHCl₃/MeOH), e corresponde às frações de F14-36.
- Qp1-Qp15 referem-se às substâncias puras obtidas de *Q. parviflora*, de acordo com o texto – Estudo Químico
- ECHCl₃ de *Qualea parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*. Estes extratos foram obtidos de acordo com o texto (página 20).

- Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas (25-40g) e ratos *Wistar* machos (150 a 200g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlado. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5 – 11.

Os ensaios farmacológicos de toxicidade aguda, atividade antiinflamatória, analgésica e antiúlcera foram realizados pela pós-graduanda Lucilene Patricia Mazzolin no Laboratório de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma-Lima.

Toxicidade aguda

Toxicidade é a qualidade que caracteriza o grau de virulência de qualquer substância nociva para um organismo vivo ou para uma parte específica desse organismo (Wikipédia, 2007).

Antes de qualquer estudo para avaliação de atividade biológica, a primeira preocupação foi detectar possíveis efeitos tóxicos que por ventura a preparação do EMeOH de *Q. parviflora* pudesse apresentar.

Para isso, a toxicologia aguda do EMeOH de *Q. parviflora* foi avaliada de acordo metodologia descrita por Brito (1994).

O EMeOH foi avaliado em uma dose máxima de 5.000 mg/Kg, que certamente evidenciaria qualquer efeito tóxico existente no extrato. Os resultados mostraram que o EMeOH não apresentou qualquer efeito tóxico agudo aparente

quando analisados os parâmetros: ganho de peso, dano tecidual e mortalidade. Estes resultados foram corroborados ainda com uma triagem hipocrática, por meio da qual, vários eventos comportamentais foram observados. Também não foram observadas diferenças significativas dos mesmos parâmetros quando comparamos o tratamento em machos e fêmeas.

Apesar da não observação de efeito tóxico nos parâmetros avaliados, existe a necessidade de estudos complementares de toxicidade (toxicidade subaguda, crônica, entre outros) para que se possa garantir a segurança de seu uso e a ausência de toxicidade em humanos.

Tendo em vista esses resultados, prosseguimos os ensaios biológicos com o EMeOH de *Q. parviflora*.

Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica

Inflamação ou processo inflamatório é uma resposta dos organismos vivos homeotérmicos à uma agressão sofrida. Analgesia é uma forma de controle da dor (Wikipédia, 2007). Visto, que espécies de *Qualea* são utilizadas popularmente como antiinflamatória e analgésica, prosseguimos os ensaios biológicos com o EMeOH de *Q. parviflora*.

Para a avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do EMeOH de *Q. parviflora* foram utilizados os seguintes modelos experimentais:

- Edema de pata induzido por carragenina - doses utilizadas: 125, 250 ou 500 mg/Kg (Levy, 1969; Henriques *et al.*, 1987)
- Teste de contorções abdominais – dose utilizada: 1000 mg/Kg (Koster *et al.*, 1959)
- Teste da placa quente - doses utilizadas: 125, 250 ou 500 mg/Kg (Woolfe & MacDonald, 1944; Eddy & Leimbach, 1953)

Para a avaliação de uma possível atividade antiinflamatória do EMeOH de *Q. parviflora* utilizou-se o modelo de edema de pata induzido pela carragenina. Neste modelo, o EMeOH não foi capaz de reduzir o edema causado pela

carragenina, no entanto, outros modelos experimentais devem ser realizados antes de se descartar completamente a atividade antiinflamatória.

Para a avaliação da atividade analgésica do EMeOH de *Q. parviflora* utilizou-se o teste de contorções abdominais. Neste teste, o EMeOH não apresentou redução significativa nas contorções abdominais. A fim de evidenciar um efeito analgésico mais específico, foi empregado o teste da placa quente. Este modelo consiste na mensuração da resposta de latência de instalação da dor e é bastante indicado para avaliar a ação analgésica central. Entretanto, também não foi observado nenhum efeito analgésico do EMeOH. O EMeOH de *Q. parviflora* foi encaminhado para avaliação da atividade antiulcerogênica.

Atividade Antiulcerogênica

Úlcera gástrica é uma lesão localizada no estômago com destruição da mucosa da parede deste órgão, atingindo os vasos sanguíneos subjacentes. É causada pela insuficiência dos mecanismos protectores da mucosa contra a acidez gástrica (Wikipédia, 2007).

Para a realização dos ensaios de atividade antiulcerogênica do EMeOH e da fração FTSAE de *Q. parviflora* foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Indução de úlceras pelo uso de HCl/etanol (metodologia baseada na descrição de Mizui & Doteuchi, 1983, com modificações).
- Indução de úlceras pelo uso do etanol absoluto (metodologia descrita por Morimoto *et al.*, 1991).
- Indução de úlceras pelo uso de DAINÉ (metodologia descrita por Puscas *et al.*, 1997, com modificações).
- Determinação da participação dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção (metodologia descrita por Arrieta *et al.*, 2003)

Os ensaios de atividade antiulcerogênica foram realizados no intuito de evidenciar os efeitos gastroprotetores com uma única administração (aguda) do EMeOH de *Q. parviflora*. Para isso, foram selecionados diferentes agentes ulcerogênicos (etanol absoluto, etanol acidificado e droga antiinflamatória não-esteroidal) que conhecidamente são indutores de lesões gástricas no homem. O EMeOH apresentou um potente efeito gastroprotetor em ambos os modelos (etanol absoluto e etanol acidificado) na dose de 500 mg/Kg, sendo esta proteção de 97 e 77%, respectivamente. No modelo úlceras causadas por drogas antiinflamatórias não-esteroidais pudemos também evidenciar o efeito gastroprotetor do EMeOH na dose de 500 mg/Kg (36% de proteção). Estes dados sugerem que a atividade antiulcerogênica esteja relacionada à presença de um ou mais constituintes no EMeOH (taninos, terpenóides, derivados do ácido elágico, poliioprenóides, materiais de natureza graxa, esteróides).

Os resultados promissores deste EMeOH frente aos severos agentes indutores de lesão descritos anteriormente, nos encaminharam para a avaliação dos mecanismos envolvidos nesta efetiva gastroproteção.

Um dos fatores que contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de compostos sulfidrílicos. Estes compostos têm como finalidade básica o fortalecimento de pontes dissulfeto e redução da formação de radicais livres, relacionando-se com a proteção celular (Konturek *et al.*, 1990; Matsuda, 1999). Os efeitos gastroprotetores dos compostos sulfidrílicos incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzido por diversos agentes e circunstâncias, como ocorre com as exposições tóxicas como etanol (Takeuchi *et al.*, 1988). Em contrapartida, a redução dos níveis normais de compostos sulfidrílicos tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (Glavin & Szabo, 1992). Outro fator protetor da mucosa gástrica é o óxido nítrico. Este interage com prostanóides e neuropeptídeos sensitivos, regulando a integridade da mucosa gástrica em ratos. Também participa dos mecanismos de defesa pela regulação do

fluxo sanguíneo da mucosa e da secreção de muco. Para avaliar o mecanismo de ação do efeito gastroprotetor apresentado pelo EMeOH de *Q. parviflora* utilizou-se agentes inibidores destes fatores protetores. O EMeOH na dose de 500 mg/Kg foi testado frente ao NEM (inibidor dos grupamentos sulfidrílicos e observou-se uma reversão da gastroproteção enquanto que frente ao L-name (inibidor da síntese de óxido nítrico) observou-se a persistência da gastroproteção. Estes dados sugerem o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção apresentada pelo EMeOH.

Na tentativa de buscar as substâncias farmacologicamente ativas responsáveis pela ação antiulcerogênica, avaliou-se o efeito antiulcerogênico da fração FTSAE (rica em triterpenos, saponinas e derivados do ácido elágico). Foi constatado que FTSAE não exerceu atividade gastroprotetora nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg. Este resultado indica que o fracionamento do EMeOH de *Q. parviflora* não foi capaz de concentrar os constituintes responsáveis pela ação antiulcerogênica do extrato. Interessantemente, observou-se que na maior dose da FTSAE (200mg/Kg) houve uma tendência ao aumento de lesão gástrica. É bem conhecido que o aumento das lesões gástricas pode estar relacionado às substâncias antiinflamatórias (Ribeiro *et al.*, 2006). Estes resultados são concordantes com aqueles descritos na literatura para espécies contendo derivados do ácido elágico e do ácido oleanólico, cujos derivados são os constituintes majoritários na fração FTSAE. Já foi reportado o efeito antiinflamatório do ácido elágico e de alguns de seus derivados (Vattem & Shetty, 2005; Rahman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004), bem como do ácido oleanólico (Lewis & Hanson, 1991, Otuki *et al.*, 2005 e Giner-Larza *et al.*, 2001).

O conjunto desses experimentos sugere que a atividade antiulcerogênica do EMeOH seja devido à presença de taninos, presentes neste extrato, mas ausentes na fração FTSAE. Assim, é de fundamental importância à avaliação do efeito antiulcerogênico da fração rica em taninos (ainda não estudada), uma vez que

taninos são descritos como agentes antiulcerogênicos (Haslam, 1998; Audi *et al.*, 1999), assim como a avaliação do potencial antiinflamatório da fração FTSAE.

Atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Tais Bauab do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Os antimicrobianos são drogas que têm a capacidade de inibir o crescimento de microorganismos, indicadas, portanto, apenas para o tratamento de infecções microbianas sensíveis. Os extratos de plantas têm sido estudados contra bactérias durante muitos anos e com diferentes metodologias, mas poucos são os estudos que relacionam a atividade antimicrobiana de plantas brasileiras (Sulffedrini, 2004).

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram negativa, sendo provavelmente o agente de infecção crônica mais comum em seres humanos. O *H. pylori* coloniza o estômago e tem sido associado à gastrite, úlcera gástrica e duodenal, câncer e linfoma gástrico (Sousa *et al.*, 2001).

Os ensaios de atividade antimicrobiana contra *H. pylori* foram realizados segundo a metodologia descrita por Chand *et al.*, 1994 e Ellof, 1998.

Os resultados mostraram que o EMeOH (CIM = 75µg/mL) de *Q. parviflora* apresentou atividade antibacteriana maior do que o das substâncias puras Qp1 (CIM = 150µg/mL), Qp3 (CIM = 150µg/mL) e Qp4 (CIM = 250µg/mL). A literatura considera promissoras plantas cujos extratos e/ou frações purificadas com CIM de até 500µg/mL (Cellini *et al.*, 1996). Assim, o resultado relativo ao EMeOH bruto é promissor.

Esses resultados sugerem que pode ocorrer um efeito sinérgico entre os metabólitos presentes no EMeOH ou ainda que a atividade antibacteriana provém dos derivados do ácido elágico, presentes neste extrato. Valencia *et al.* (2001)

relataram uma fraca atividade anti-bacteriana do ácido 3,3'-di-*O*-metilelágico frente a *Staphylococcus aureus* e *S. epidermis*. Entretanto, De Leo *et al.* (2006) demonstraram que, dentre vários triterpenóides oleanânicos testados (arjungenina, arjunglicosídeo, bellericasídeo entre outros), o arjunglicosídeo apresentou atividade anti-*H. pylori* contra três linhagens resistentes a metronidazol.

Atividade sobre a motilidade intestinal

Os ensaios de atividade sobre a motilidade intestinal foram realizados pelos pós-graduandos Marcelo A. Silva e Juliana Severi do Laboratório de Controle Microbiológico do Departamento de Fármacos e Medicamentos, sob a orientação da Pro^{fa}. Dr^a. Herida R. N. Salgado – FCF – UNESP – Araraquara.

A diarreia consiste no aumento do número de evacuações e/ou a presença de fezes amolecidas ou até líquidas nas evacuações. A constipação intestinal é a dificuldade de eliminação das fezes, as quais se tornam ressecadas e na maioria das vezes, com aumento do intervalo entre as evacuações. É um sintoma comum em pessoas que ingerem dieta com pouca fibra alimentar (Wikipédia, 2007).

Para os ensaios de atividade sobre a motilidade intestinal foram utilizados os EMeOH das três espécies de *Qualea*. A metodologia utilizada foi a descrita por Janssen & Jageneau (1957) e Wong & Wai (1981) e os resultados foram expressos na Tabela 11.

Os EMeOH das cascas das três espécies de *Qualea* não apresentaram diferenças significativas entre o peso do intestino do grupo controle e o tratado. Quanto à motilidade intestinal, foi observada diminuição com o uso dos extratos de *Q. parviflora* e *Q. grandiflora*, o que justifica o uso dessas espécies como agentes antidiarréico na medicina popular.

Tabela 11: Avaliação do tamanho total de intestino delgado, distância percorrida pelo carvão ativado e peso do intestino de camundongos submetidos ao ensaio de atividade sobre o trânsito intestinal.

Espécie	x	y	z
<i>Q. grandiflora</i>	59.15	45.50*	2.47
<i>Q. parviflora</i>	60.65	45.55*	2.77
Controle (pl <i>Q. grandiflora</i> e <i>Q. parviflora</i>)	61.90	53.09	2.61
<i>Q. multiflora</i>	58.95	48.70	2.73
Controle polar (pl <i>Q. multiflora</i>)	61.55	46.70	3.05

*p < 0,05

X- Tamanho total do intestino do camundongo (cm);

Y- Média da distância percorrida pelo carvão (cm);

Z- Peso dos intestinos (g).

Atividade imunoestimulante

Os ensaios de atividade imunoestimulante foram realizados pela pós-graduanda Camila B. A. Carli e Danielle C. G. Maia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, sob a orientação da Pro^{fa}. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos– UNESP – Araraquara.

O sistema imune humano possui diferentes células que produzem substâncias destinadas a defender o organismo humano contra agentes infecciosos ou suas toxinas (Loss, 1999).

Para os metabólitos Qp5-Qp8 isolados de *Q. parviflora* e para o ácido elágico, a imunomodulação da resposta inflamatória foi avaliada através da participação de células imunológicas e de seus mediadores (citocinas, compostos intermediários do oxigênio e do nitrogênio), visando à obtenção de um futuro teste

diagnóstico, um agente supressor/potencializador do sistema imune, ou ainda procurando retardar ou interromper o crescimento de células tumorais.

Para isso, as seguintes técnicas foram utilizadas:

- a) A viabilidade celular (metodologia descrita por Mosmann, 1983)
- b) A participação de NO (metodologia descrita por Green *et al*, 1982)
- c) A participação de α -TNF (metodologia descrita por Kovalousky *et al*, 2000)

Os resultados do ensaio de viabilidade celular dos macrófagos peritoneais murinos demonstraram que a substituição dos grupos hidroxila nos compostos Qp1-Qp4 levou à redução da citotoxicidade quando comparada ao padrão de ácido elágico. Este fato sugere que a presença de grupos hidroxila nas posições 3 e 3' do ácido elágico estejam envolvidos na citotoxicidade.

Os resultados do teste de NO demonstraram que o ácido elágico estimulou de maneira significativa a produção NO pelo macrófago peritoneal murino. Entretanto, os derivados de ácido elágico Qp5-Qp8 não estimularam de maneira significativa a produção de NO.

Os resultados dos testes de α -TNF demonstraram que o ácido elágico induziu a produção de citocinas, reforçando a existência de correlação entre a síntese de α -TNF e NO. Entretanto, o mesmo não foi observado para os derivados de ácido elágico Qp5-Qp8.

Dos resultados obtidos pode-se concluir que o ácido elágico apresenta uma atividade citotóxica significativa e um efeito estimulante do sistema imunológico, enquanto que os derivados do ácido elágico Qp5-Qp8, que apresentam as posições C-3 e C-3' substituídas, exibem baixa citotoxicidade e produção de mediadores pelos macrófagos peritoniais. Estes resultados são concordantes com os resultados de Vatterm & Shetty (2005), que destacaram que o ácido elágico possui atividade antiinflamatória, antimutagênica e antioxidante em bactérias e mamíferos. Os mesmos autores relataram que os grupos 3,3'-dihidróxi e os anéis lactônicos são características estruturais essenciais para a atividade inibitória de topoisomerases.

Atividade antituberculose

Os ensaios de atividade antituberculose foram realizados pelo pós-graduando Fernando Rogério Pavan do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, sob a orientação da Pro^{fa}. Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite– UNESP

A tuberculose é uma infecção causada por um microorganismo chamado *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido por bacilo de Koch. A doença costuma afetar os pulmões, mas pode também, ocorrer em outros órgãos do corpo, mesmo sem causar dano pulmonar. Esta doença ocorre em todo mundo. A Organização Mundial de Saúde estimou a presença de 8 milhões de novos casos de tuberculose ativa no mundo somente no ano de 1990, com aproximadamente 2,6 milhões de mortes naquele ano. Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) no início da década de 80, o número de casos da doença aumentou bastante (ABC da Saúde, 2007).

Os testes de atividade anti-tuberculose foram realizados com os metabólitos Qp10-Qp15, com exceção de Qp12, segundo técnica proposta por Palomino *et al.* (2002).

Os resultados demonstraram CIM = 125 µg/mL para β-sitosterol (Qp10), 125 µg/mL para friedelina (Qp11), 250 µg/mL para lupeol (Qp13), 312 µg/mL para betulina (Qp14) e 625 µg/mL para ácido *epi*-betulínico (Qp15).

Valores de MIC menores que 125 µg/mL foram definidos como ativos contra *M. tuberculosis* (Gu *et al.*, 2004), que é comparável ao MIC da droga comercial pirazinamida (20-100 µg/mL). Assim, pode-se concluir que Qp10 e Qp11 mostraram atividade anti-tuberculose promissora.

Atividade mutagênica

Os ensaios farmacológicos foram realizados pelo pós-graduando Fábio Vieira dos Santos no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, sob a orientação da

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida Varanda – UNESP – Araraquara (Santos, 2006).

Agente mutagênico é todo agente físico, químico ou biológico que, em exposição às células, pode causar mutação, ou seja, um dano na molécula de DNA que não é reparado no momento da replicação celular, e é passado para as gerações seguintes (Wikipédia, 2007).

Foram avaliados os extratos EMeOH e ECHCl₃ de *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* empregando-se o teste de Ames (metodologia descrita por Maron & Ames, 1983).

O EMeOH de *Q. grandiflora* apresentou atividade mutagênica apenas para a linhagem TA100 (-S9). Nas demais linhagens nenhuma alteração significativa foi induzida por este extrato. O ECHCl₃ de *Q. grandiflora* se mostrou efetivamente mutagênico nas linhagens TA100 (-S9), TA97a (-S9, +S9) e TA102 (+S9). Estes resultados indicaram a presença de compostos capazes ocasionar danos genéticos por substituição de bases e mutações do tipo *frameshift*. Além disso, esse extrato foi citotóxico nas duas maiores concentrações testadas para as linhagens TA97a (-S9) e TA102(-S9).

Quanto ao EMeOH de *Q. multiflora*, este também se mostrou mutagênico na linhagem TA100 (-S9). Porém, foram verificados indícios de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA97a e TA102, sempre na ausência de metabolização. Já o ECHCl₃ de *Q. multiflora* foi mutagênico para a linhagem TA100 (-S9/ +S9). Na linhagem TA97a (-S9), foram verificados indícios de mutagenicidade nas duas maiores concentrações e não foram evidenciados efeitos citotóxicos para esse extrato.

O EMeOH de *Q. parviflora* não foi mutagênico em nenhuma das condições avaliadas. Porém, nas linhagens TA100 e TA102, esse extrato foi citotóxico (-S9) na maior dose utilizada (22.70 mg/placa). O ECHCl₃ de *Q. parviflora* apresentou indícios de mutagenicidade para a linhagem TA97a (-S9/ +S9) e foi citotóxico na maior dose testada (7.5 mg/placa) para a linhagem TA102 (-S9).

Ensaio *in vivo* empregando o teste do micronúcleo (Hayashi *et al.*, 1990) foram realizados apenas para as espécies *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*, devido à mutagenicidade apresentada no teste de Ames.

O EMeOH de *Q. multiflora* apresentou uma pequena alteração na frequência de micronúcleos induzidos, enquanto que, para *Q. grandiflora* nenhuma alteração foi observada. Nos estudos *in vitro* verificou-se que o extrato de *Q. multiflora*, além da mutagenicidade na linhagem TA100 (-S9), apresentou indícios de mutagenicidade em todas as outras linhagens. Entretanto *Q. grandiflora* não apresentou esses indícios, indicando a possibilidade de diferenças quali ou quantitativas em suas composições químicas. A partir destes resultados verificou-se que as espécies *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* apresentaram mutagenicidade *in vitro* ocasionada tanto por seus ECHCl₃ quanto pelos EMeOH.

Não foram encontrados na literatura dados que reportassem mutagenicidade dos constituintes isolados do EMeOH, entretanto, foram encontrados dados sobre a atividade antimutagênica do ácido elágico (Vattem & Shetty, 2005) e os derivados do ácido elágico são constituintes dos EMeOH de *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*, e estão presentes em diferentes teores. Além disso, em testes específicos para citotoxicidade, Deng *et al.* (2002) e Xu *et al.* (2003), relataram que alguns derivados do ácido elágico apresentam citotoxicidade específica para determinadas linhagens de células tumorais e revelaram que estes compostos são de grande interesse para o uso como quimioterápico no tratamento do câncer.

Também não foram encontrados na literatura dados que reportassem mutagenicidade dos constituintes isolados do ECHCl₃, entretanto foram encontrados dados sobre a atividade citotóxica específica para determinadas linhagens de células tumorais dos ácidos betulínico e *epi*-betulínico (Symon *et al.*, 2003; Núñez *et al.*, 2005; Sami *et al.*, 2006; Gauthier *et al.*, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo deste projeto de pesquisa foi o de estudar quimicamente e avaliar algumas atividades farmacológicas de três espécies de *Qualea* que são utilizadas pela população como medicinais.

O estudo do EMeOH das cascas de *Q. parviflora* resultou no isolamento de triterpenóides pentacíclicos oleanólicos (Qp1-Qp4) e derivados de ácido elágico (Qp5-Qp8), identificados principalmente por meio de RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

O estudo do ECHCl_3 das cascas de *Q. parviflora* resultou no isolamento do esteróide (Qp10), do triterpeno pentacíclico friedelânico (Qp11) e dos triterpenos pentacíclicos lupânicos (Qp12-Qp15).

O emprego de HPLC-ESI-IT-MS revelou que o perfil químico do EMeOH de *Q. parviflora* é mais rico que o das outras espécies. Todas as espécies possuem Qp1-Qp3, sendo que *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* apresentaram também outros isômeros, não detectados em *Q. parviflora*. Qp4 não foi detectado em *Q. grandiflora* (Tabela 13).

Foi verificado que, dos derivados de ácido elágico identificados em *Qualea parviflora*, apenas Qp7 não foi detectado nas duas outras espécies (*Q. grandiflora* e *Q. multiflora*). Isso pode ser explicado pelo fato de Qp7 não apresentar hidroxila fenólica livre como os demais, fato que deve ter influenciado na sua ionização e, consequentemente, na detecção no modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS. A detecção de Qp7 em *Q. grandiflora* (mas não em *Q. multiflora*) pôde ser feita inequivocadamente usando HPLC-UV-PDA.

A utilização de técnica de GC-IT-MS demonstrou que o perfil químico de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* é semelhante ao de *Q. parviflora*, apresentando substâncias na mesma faixa de tempo de retenção. Embora não tenha sido realizada a quantificação dos metabólitos, observam-se diferenças nos teores dos metabólitos presentes nas espécies em estudo. Esses experimentos confirmam a

eficiência dessa técnica para o estudo dessas espécies, sem a necessidade do isolamento e identificação de metabólitos já bem conhecidos (Tabela 13).

Tabela 13. Metabólitos secundários identificados em *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*

Metabólitos secundários	Qp	Qg	Qm
28-nor-17,22-seco-2 α ,3 β ,19,22,23-pentaidroxi- Δ^{12} -oleanano (Qp1)	+	+	+
Bellericagenina B (Qp2)	+	+	+
Arjunglicosídeo (Qp3)	+	+	+
Bellericasídeo B (Qp4)	+	nd	+
Ácido 3, 3'-di-O-metilelágico-4-O- β -glucopiranosídeo (Qp5)	+	+	+
Ácido 3-O-metilelágico-4'-rhamnosídeo (Qp6)	+	+	+
Ácido 3, 3',4-tri-O-metilelágico-4'-O- β -D-glucopiranosídeo (Qp7)	+	+	nd
Ácido 3, 3'-di-O-metilelágico (Qp8)	+	+	+
β -sitosterol glicosídeo (Qp9)	+	nd	nd
β -sitosterol (Qp10)	+	+	+
Friedelina (Qp11)	+	nd	+
Lupenona (Qp12)	+	+	+
Lupeol (Qp13)	+	+	+
Betulina (Qp14)	+	na	na
Ácido <i>epi</i> -betulínico (Qp15)	+	na	na

Nd = não detectado; na = não analisado.

Extratos dessas plantas apresentaram resultados promissores frente a vários ensaios farmacológicos realizados.

O EMeOH de *Q. parviflora* não apresentou qualquer efeito tóxico agudo. Apesar de a medicina popular indicar o uso de infusões de espécies do gênero *Qualea* como antiinflamatório e analgésico, os ensaios realizados com o EMeOH de *Q. parviflora* não evidenciaram essas atividades.

O EMeOH inibiu a formação de úlceras gástricas e reduziu a severidade das lesões gástricas frente a diversos modelos experimentais, apontando para um potente efeito gastroprotetor e cicatrizante desta espécie bem como de *Q. grandiflora*. Este fato confirma a utilização da planta pela medicina popular como antiulcerogênica. Entretanto, foi constatado que o efeito antiulcerogênico da FTSAE não foi tão efetivo quanto aquele observado para o EMeOH. Este resultado sugere que a atividade antiulcerogênica esteja relacionada à presença de taninos no EMeOH, os quais não estão presentes na fração FTSAE.

Os ensaios de atividade antimicrobiana do EMeOH de *Q. parviflora* contra *H. pylori* forneceram resultados promissores. Entretanto, ensaios com as substâncias puras Qp1, Qp3 e Qp4 não conseguiram potencializar esse efeito.

Foi observada diminuição na motilidade intestinal com o uso dos EMeOH de *Q. parviflora* e *Q. grandiflora*, o que justifica o uso dessas espécies como agentes antidiarréicos na medicina popular.

O ácido elágico padrão apresentou atividade citotóxica significativa, e apresentou efeito estimulante do sistema imunológico. Por outro lado, os derivados do ácido elágico Qp5-Qp8, que apresentam as posições C-3 e C-3' substituídas, exibiram baixa citotoxicidade e não estimularam o sistema imunológico.

O β -sitosterol e a friedelina mostraram atividade antituberculose promissora.

Os ensaios de atividade mutagênica demonstraram que as espécies *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* apresentaram mutagenicidade *in vitro* ocasionada tanto por seus ECHCl₃ quanto pelos EMeOH. O EMeOH de *Q. parviflora* não foi mutagênico em nenhuma das condições avaliadas, porém esse extrato foi citotóxico na maior dose utilizada.

Assim, este estudo confirma o uso pela população dessa planta do Cerrado como antiulcerogênica e antidiarréica. Porém, o uso da planta como antiinflamatória e analgésica não foi confirmado em nossos estudos.

Devemos salientar que este trabalho representa uma importante contribuição para o estudo do conhecimento dessas espécies presente no Cerrado do Estado de São Paulo, à medida que apresenta os dados farmacológicos fundamentados pelo estudo fitoquímico.

Esses resultados são de grande importância à população, não só sob o ponto de vista de valorização do conhecimento tradicional da população local, mas também sob o aspecto econômico.

Finalmente, a abordagem interdisciplinar possibilitou uma visão mais ampla e real da temática das plantas medicinais, de suas potencialidades, tanto para a ampliação do saber acadêmico quanto para a validação dos conhecimentos tradicionais.

REFERÊNCIAS

ABC da saúde. Tuberculose pulmonar. Disponível em:

<<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?432>>. Acesso em: 21 jul. 2007.

AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C. ^{13}C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. *Progress in NMR Spectroscopy*, v. 24, p. 1-90, 1992.

AHMAD, V. U.; BANO, S.; MOHAMMAD, F. V. NEPEHINOL: a new triterpene from *Nepeta hindostana*. *Planta Médica*, v. 1, p. 521-523, 1985.

AIRES, M. M.; SANIOTO, D. L. Sistema digestivo: secreção. In: AIRES, M. M. (Org). *Fisiologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 652-680.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, E. C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 304 p.

ARAÚJO, F. W. L.; SOUZA, M. P. Vismiaefolic acid, a new triterpene from *Vochysia vismiaefolia*. *Journal of Natural Products*, v. 53, n. 6, p. 1436-1440, 1990.

ARDREY, R. E. *Liquid chromatography- mass spectrometry: an introduction*. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.

ARNOUS, H. A.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde*, v. 6, n. 2, p. 1, 2005.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILHO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; Role of prostaglandins, Sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica*, v. 69, p. 905-909, 2003.

ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORCIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia species*. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomedical Chromatography*, v. 19, p. 586-605, 2005.

AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, v. 13, p. 264-266, 1999.

BAUDOUIN, G.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M. Isolement, structure et synthèse de la vochysine, pyrrolidinoflavanne de *Vochysia guianensis*. *Journal of Natural Products*, v. 46, n. 5, p. 681-687, 1983.

BERSTAD, K.; BERSTAD, A. Helicobacter-Pylori infection in peptic-ulcer disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 28, n. 7, p. 561-567, 1993.

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 453, p. 203-208, 2002.

BRASIL. Diário Oficial da União. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/far/media/Decreto%205813.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2007.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. Unicamp, 1994. 122 p.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry instructional and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *Journal American Chemical Society*, v. 85, p. 3688-3699, 1963.

BURNS, D.; REYNOLDS, W. F.; BUCHANAN, G.; REESE, P. B.; ENRIQUEZ, R. G. Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, p. 488-493, 2000.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products. *Journal of Antibiotics*, v. 47, p. 1295-1304, 1994.

CELLINI, L.; DICAMPLI, E.; MASULLI, M.; DIBARTOLOMEO, S.; ALLOCATI, N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *Fems Immunology and Medical Microbiology*, v. 13, p. 273-277, 1996.

CORRÊA, D. B.; BIRCHAL, E.; AGUILAR, J. E. V.; GOTTLIEB, O. R. Ellagic acids from Vochysiaceae. *Phytochemistry*, v. 14, p. 1138-1139, 1975.

CORRÊA, D. B.; GUERRA, L. F. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. C-Methyl phenolics from *Qualea* species. *Phytochemistry*, v. 20, p. 305-307, 1981.

CORRÊA, D. B.; GUERRA, L. F. B.; PÁDUA, A. P.; GOTTLIEB, O. R. Ellagic acids from *Callisthene major*. *Phytochemistry*, v. 24, p. 1860-1861, 1985.

CUNHA, A. P. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Rio de Janeiro: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 701 p.

DE LEO, M.; DE TOMMASI, N.; SANOGO, R.; D'ANGELO, V.; GERMANO, M. P.; BISIGNANO, G.; BRACA, A. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytomedicine*, v. 67, p. 2623-2629, 2006.

DENG, J.; MARSHALL, R.; JONES, S. H.; JOHNSON, R. K.; HECHT, S. M. DNA-damaging agents from *Crypteronia paniculata*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 1930-1932, 2002.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 107, n. 4, p. 385-393, 1953.

ELLOF, J. N. A. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. *Planta Medica*, v. 64, p. 711-713, 1998.

FAIZI, S.; ALI, M.; SALEEM, R.; BIBI, I.; BIBI, S. Spectral assignments and reference data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 39, p. 399-405, 2001.

FOUCAULT, A. P. Countercurrent Chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 10, p. 569A-579A, 1991.

GANONG, W. F. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior-pituitary gland. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 14, n. 3, p. 233-249, 1993.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. *Caderno de Saúde Pública*, v. 11, n. 3, p. 491-492, 1995.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 1, p. 19-24, 2006.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; LEBRUN, M.; DUFOUR, P.; PICHETTE, A. Glycosidation of lupine-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorganic & Medical Chemistry*, v. 14, p. 6713-6725, 2006.

GINER-LARZA, E. M.; MANEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R.; RIOS, J. L. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmacology*, v. 428, p. 137, 2001.

GLAVIN, B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB Journal*, v. 6, p. 825-831, 1992.

GOTTLIEB, H. E.; RAMAIAH, P. A.; LAVIE, D. ¹³C NMR signal assignment of friedelin and 3 α -hydroxyfriedelan-2-one. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 616-620, 1985.

GREEN, L. G.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GU, J. Q.; WANG, Y. H.; FRANZBLAU, S. G. Antitubercular constituents of Valeriana laxiflora. *Planta Medica*, v. 70, n. 6, p. 509-514, 2004.

GUO, Q.; YANG, X. A new ellagic acid derivative from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. Pharmazie, v. 60, n. 9, p. 708-710, 2005.

HAMBURGER, M. O.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicines. Phytochemistry, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HASLAM, E. Pratical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambrige: Cambrige University, 1998. 321 p.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Research, v. 245, p. 245-249, 1990.

HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema: a new model for inflammation? Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

HERZ, W.; SANTHANAM, P. S.; WAHLBERG, I. 3-*epi*-betulinic acid, a new triterpenoid from *Picramnia pentandra*. Phytochemistry, v. 11, p. 3061-3063, 1972.

HESS, S. C.; BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E.; CRUZ, R. B.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). Journal of Ethnopharmacology, v. 47, p. 97-100, 1995.

HESS, S. C.; MONACHE, F. D. Divergioic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. Journal Brazilian Chemical Society, v. 10, n. 2, p. 104-106, 1999.

HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; NUNES, D. S.; GRACIOSO, J. S.; RODRIGUEZ, J. C.; HAUN, M. Gastroprotected effect of essential oil from *Croton cajucara*. Journal of Ethnopharmacology, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; ALMEIDA, A. B.; PAULA, A. C. B.; BRASIL, D. D. B.; MULLER, A. H.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. Phytomedicine, v. 8, n. 2, p. 94-100, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. *Qualea grandiflora*, a Brazilian cerrado medicinal plant presents an important antiulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, n. 1/2, p. 207-214, 2006.

HOSTETTMAN, K.; HOSTETTMAN, M.; MARSTON, A. **Preparative chromatography techniques:** applications in natural product isolation. Berlin: Springer, 1986.

JANSSEN, P.; JAGENEAU, A. H. A new series of potent analgesics. Part I: chemical structure and pharmacological activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 9, p. 381-400, 1957.

JOSSANG, A.; SEULEIMAN, M.; MAIDOU, E.; BOODO, B. Pentacyclic triterpenes from *Combretum nigricans*. *Phytochemistry*, v. 41, p. 591, 1996.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2351-2355, 1990.

KONTUREK, P. C.; BRZOWSKI, T.; KWIECIEN, S. Effect of *helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 451, p. 191-202, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, v. 18, p. 412-416, 1959.

KOVALOVSKY, D.; REFOJO, D.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *Journal of Neuroimmunology*, v. 109, p. 23-29, 2000.

LEITÃO, G. G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. *Revista Fitos*, v. 1, n. 2, p. 48-52, 2005.

LEITE, A. C.; CABRAL, E. C.; SANTOS, D. A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografia em contracorrente. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LEVY, L. Carragenan paw edema in the mouse. *Life Sciences*, v. 8, p. 601-606, 1969.

LEWIS, D. A.; HANSON, D. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Progress in Medicinal Chemistry*, v. 28, p. 201-231, 1991.

LI, X.; ELSOHL, H. N.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M. NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 37, p. 856-859, 1999.

LIMA, C. A. H. Atividade antiulcerogênica da desidrocrotonina e do óleo essencial obtidos a partir das cascas de *Croton cajuacara* Benth, uma planta da família Euphorbiaceae. 1998. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; LEITÃO FILHO, H. F. 5-Deoxyflavones from the Vochysiaceae. *Phytochemistry*, v. 18, p. 362, 1979.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 270 p.

LOSS, S. H. Nutrição e imunidade. *Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre*, v. 19, n. 3, p. 388-395, 1999.

MA, Z.; HANO, Y.; QIU, F.; CHEN, Y.; NOMURA, T. Determination of the absolute stereochemistry of lupane triterpenoids by fucofuranoside method and ORD spectrum. *Tetrahedron Letters*, v. 45, p. 3261-3263, 2004.

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

MAHATO, S. B.; NANDY, A. K.; KUNDU, A. K. Pentacyclic triterpenoid sapogenols and their glycosides from *Terminalia bellerica*. *Tetrahedron*, v. 48, p. 2483-2494, 1992.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, 1983.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by Mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol- induced gastric mucosal lesions in rat. *Life Sciences*, v. 65, p. 27-32, 1999.

MAYWORM, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S.; SALATINO, A. Monomer composition of polysaccharides of seed cell walls and the taxonomy of Vochysiaceae. *Phytochemistry*, v. 55, p. 581-587, 2000.

MAYWORM, M. A. S.; SALATINO, A. Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 91-972, 2002.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 33, p. 934-945, 1983.

MODUGNO, F.; RIBECHINI, E.; COLOMBINI, M. P. Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 20, p. 1787-1800, 2006.

MONTANARI JUNIOR, I. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas. CPQBA-UNICAMP, 2002. Disponível em: <<http://cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/producao.htm>>. Acesso em: 29 jul. 2007.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 57, p. 495-505, 1991.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

NAWWAR, M.; BUDDRUS, J.; BAUER, H. Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix-Nilotica*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 7, p. 1755-1758, 1982.

NAVICKIENE, H. M. D. Estudo químico, biológico e biossintético em *Piper tuberculatum*. 2002. 233 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

NÚÑEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I. L. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. *Journal Natural Products*, v. 68, p. 1018-1021, 2005.

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

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. European Journal of Pharmacology, v. 507, p. 253-259, 2005.

PAKULSKI, G.; BUDZIANOWSKI, J. Ellagic acid derivatives and naphthoquinines of *Dionaea muscipula* from “*in vitro*” cultures. Phytochemistry, v. 41, n. 3, p. 775-778, 1996.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, M.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

PATRA, A.; CHAUDHURI, S. K.; RÜBGGER, H. Complete ^{13}C and ^1H spectral assignments of friedelin by inadequate and heteronuclear (^{13}C - ^1H) correlation experiments. Journal Indian Chemical Society, v. 67, p. 394-397, 1990.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, v. 25, n. 1, p. 45, 2002.

POT, A.; POT, V. J. Plantas do Pantanal. Planaltina: EMBRAPA, 1994. 320 p.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASCA, R.; TORRES, J.; MÁRQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. Arzneimittelforschung, v. 47, p. 568-572, 1997.

RAHMAN, A. U.; NGOUNOU, F. N.; CHOUDHARY, M. I.; MALIK, S.; MAKHMOOR, T.; NUR-E-ALAM, M.; ZAREEN, S.; LONTSI, D.; AYAFOR, F.; SONDEGAM, B. L. New antioxidant ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hyloidendron*. Planta Medica, v. 67, p. 335-339, 2001.

RIBEIRO, A. Q.; SERVALHO, G.; CESAR, C. C. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the occurrence of gastric lesions among patients undergoing upper endoscopy in a University Hospital in Brazil. Clinical Sciences, v. 61, n. 5, p. 409-416, 2006.

ROCHA, A. B.; SILVA, J. B.; PANIZZA, S. Substâncias tânicas da casca de *Qualea grandiflora* Martius (Vochysiaceae). Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 2, p. 109-114, 1979/80.

SAMI, A.; TARU, M.; SALME, K.; JARI, Y. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 29, p. 1-13, 2006.

SANTOS, F. V. Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado. 2006. 152 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SATO, T. Spectral differentiation of 3,3'-di-O-methylellagic acid from 4,4'-di-O-methylellagic acid. Phytochemistry, v. 26, n. 7, p. 2124-2125, 1987.

SEPTÍMIO, L. R. Fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado. Brasília: Ministério da Agricultura, 1994.

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

SOARES, A. C. Se bem não fizer, mal também não fará. Disponível em:
<http://cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html>. Acesso em: 29 jul. 2007.

SOUSA, M. B.; LUZ, L. P.; MOREIRA, D. M.; BACHA, O. M.; CHULTZ, R. M. EDELWEISS, M. I. Prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* em crianças avaliadas no Hospital das Clínicas de Porto Alegre. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 132-138, 2001.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). Química Nova, v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA, C. P.; AZEVEDO, M. L.; LOPES, J. L.; SARTI, S. J. Chemoprophylaxis of schistosomiasis: molluscacidal activity of natural products: assays with adult snails and oviposition. Tree Physiology, v. 14, n. 2, p. 165-177, 1994.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YONES, R. N. Screening of bacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, v. 37, p. 379-84, 2004.

SYMON, A. V.; KAPLUN, A. P.; VLASENKOVA, N. K.; GERASIMOVA, G. K.; SHON, L. B.; LITVIN, E. F.; KOZLOVA, L. M.; SURKOVA, E. L.; SHVETS, V. I. Epimerization of hydroxyl group in lupane series triterpenoids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 185-189, 2003.

TAKEUCHI, K.; MEGUMU, O.; HIROMICHI, M.; OKABE, S. Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol. Relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 48, p. 836-839, 1988.

TINTO, W. F.; BLAIR, L. C.; ALLI, A. Lupane triterpenoids of *Salacia cordata*. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 3, p. 395-398, 1992.

TOMA, W.; GRACIOSA, J. D.; ANDRADE, F. D. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, p. 1151-1155, 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL. Tesouros ocultos do cerrado. Disponível em:

<<http://www.dfi.ccet.ufms.br/gaecim/maijunjul96.htm#Tesouros%20ocultos%20no%20cerrado>>. Acesso em: 29 jul. 2007.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry*, v. 29, p. 234-266, 2005.

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

VIEIRA, I. J. C.; LIÃO, E. S. V.; DAVID, V.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES, E. Isolamento de produtos naturais por cromatografia de gotas em contracorrente. *Química Nova*, v. 19, n. 1, p. 21-23, 1996.

WANG, R.; XIE, W.; ZHANG, Z.; XING, D.; MA, C.; DU, L. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 2096-2098, 2004.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. *Plant drug analysis*. Berlin: Springer, 1984.

WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B. H.; VONTHRON-SÉNÉCHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. U.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoid from *Vochysia pacifica* Interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 75-77, 2005.

WENKERT, E.; BADDELEY, G. V.; BURFITT, I. R.; MORENO, L. N. Carbon-13 nuclear resonance spectroscopy of naturally-occurring substances. *Organic Magnetic Resonance*, v. 11, n. 7, p. 337-343, 1978.

WIKIPÉDIA. Agente mutagênico. Disponível em:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Agente_mutag%C3%AAnico>. Acesso em: 21 jul. 2007.

WIKIPÉDIA. Analgesia epidural. Disponível em:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Analgesia_epidural>. Acesso em: 21 jul. 2007.

WIKIPÉDIA. Diarréia. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Diarreia>>. Acesso em: 21 jul. 2007.

WIKIPÉDIA. Inflamação. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Infla%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 21 jul. 2007.

WIKIPÉDIA. Toxicidade. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Toxicidade>>. Acesso em: 21 jul. 2007.

WIKIPÉDIA. Úlcera péptica. Disponível em:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%9Alcera_p%C3%A9ptica>. Acesso em: 21 jul. 2007.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 80, p. 300-306, 1944.

WONG, C. L.; WAY, M. K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 73, p. 11-19, 1981.

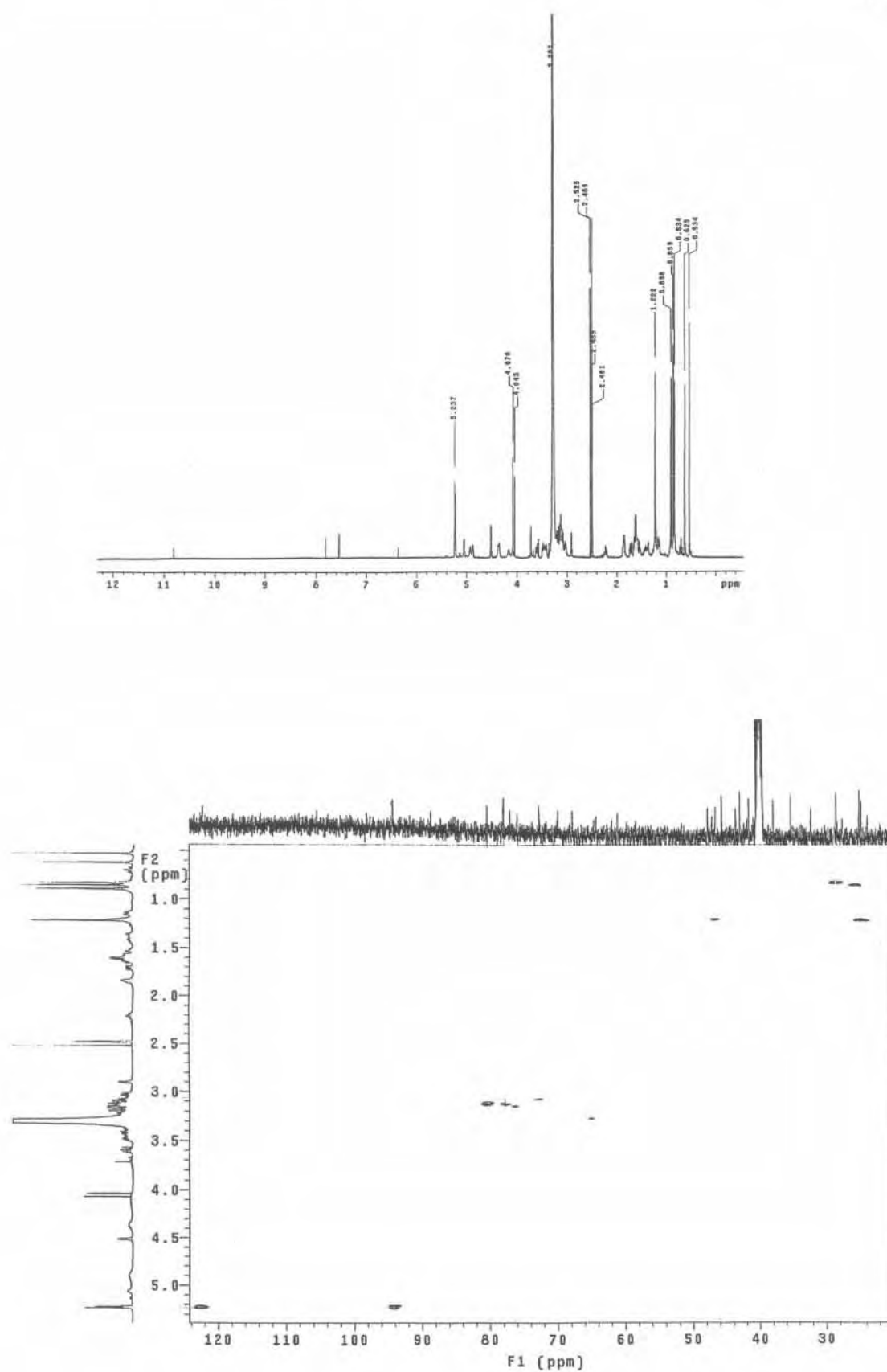
XU, Y.; DENG, J.; MA, J.; CHEN, S.; MARSHALL, R.; JONES, S. H.; JOHNSON, R. K.; HECTH, M. DNA damaging activity of ellagic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1593-1596, 2003.

YAZAKI, Y.; HILLIS, W. E. Polyphenols of *Eucalyptus globulus*, *E. regnans* and *E. deglupta*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1180-1182, 1976.

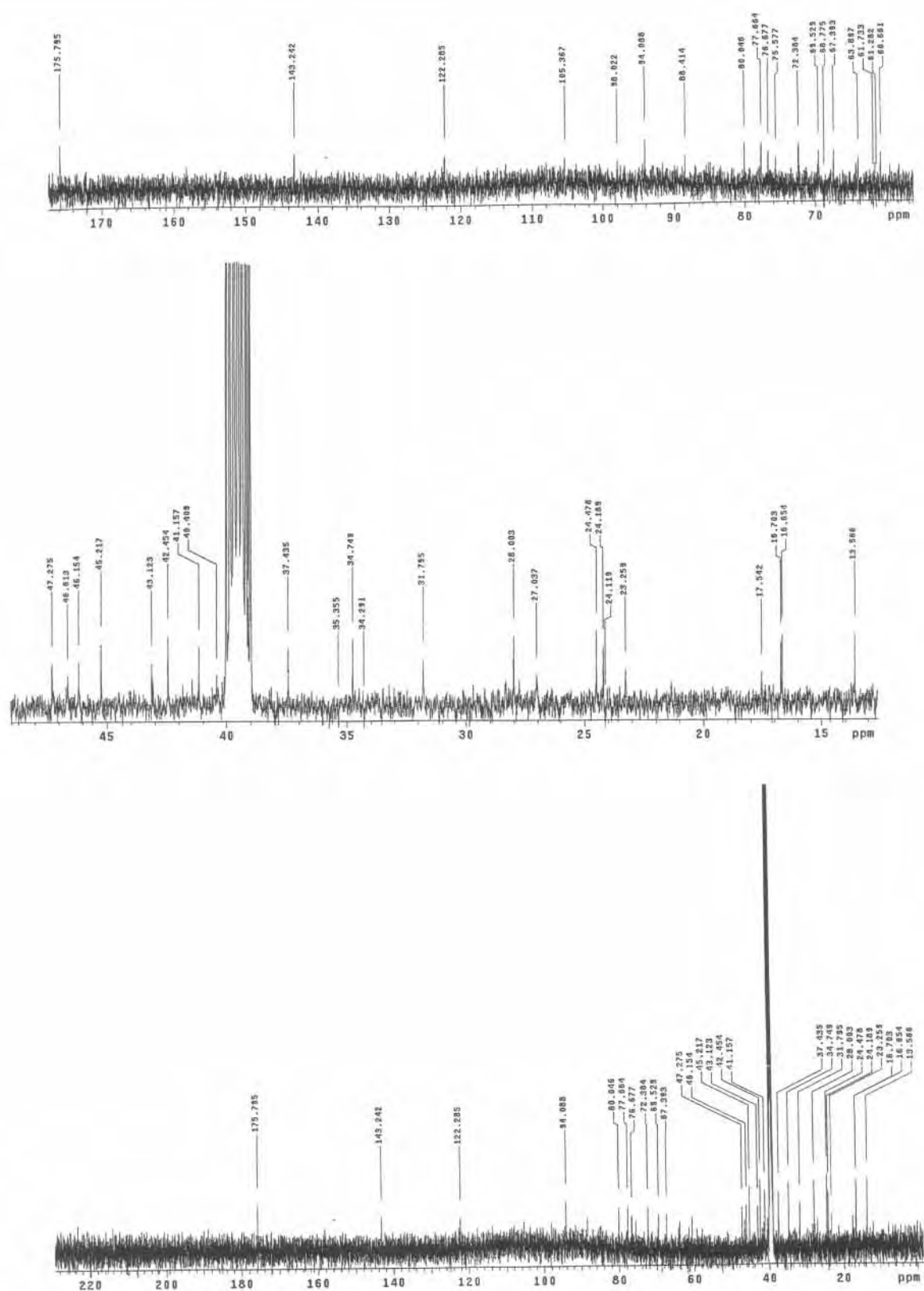
YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001.

ZEEB, D. J.; NELSON, B. C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

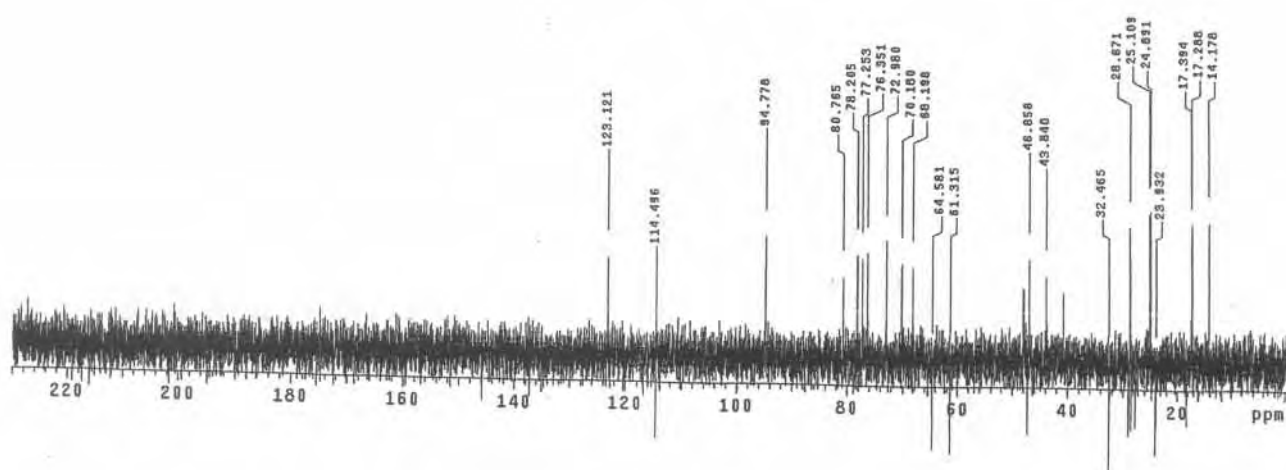
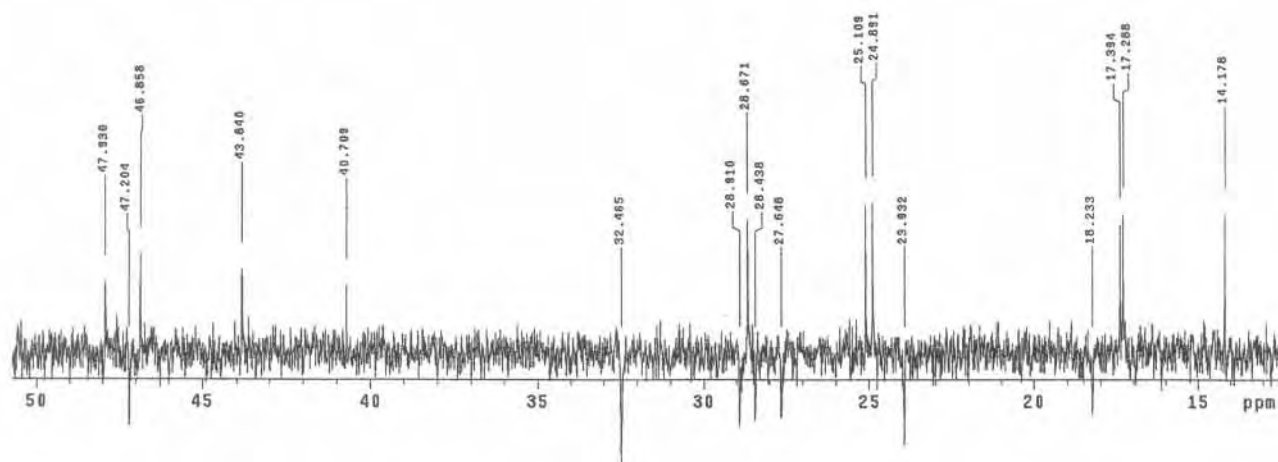
ZUCARO, Y. L.; COMPAGNONE, R. S.; HESS, S. C.; MONACHE, F. D. 6 β -Hydroxymaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 3, p. 241-244, 2000.



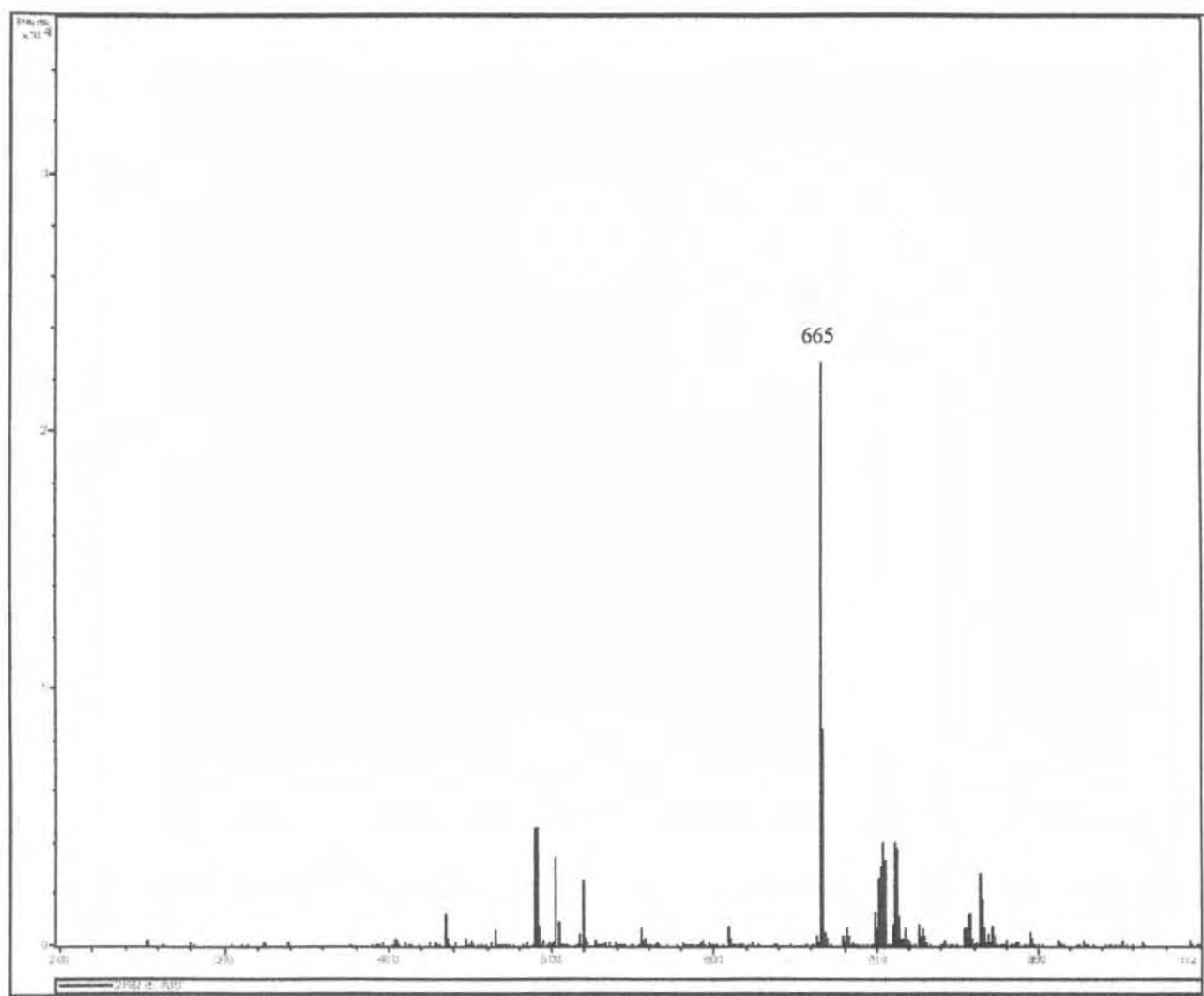
Espectro 1: Espectro de RMN- ^1H de **Qp3** contendo **Qp5** e gHMQC (DMSO- d_6 , 11.7T).



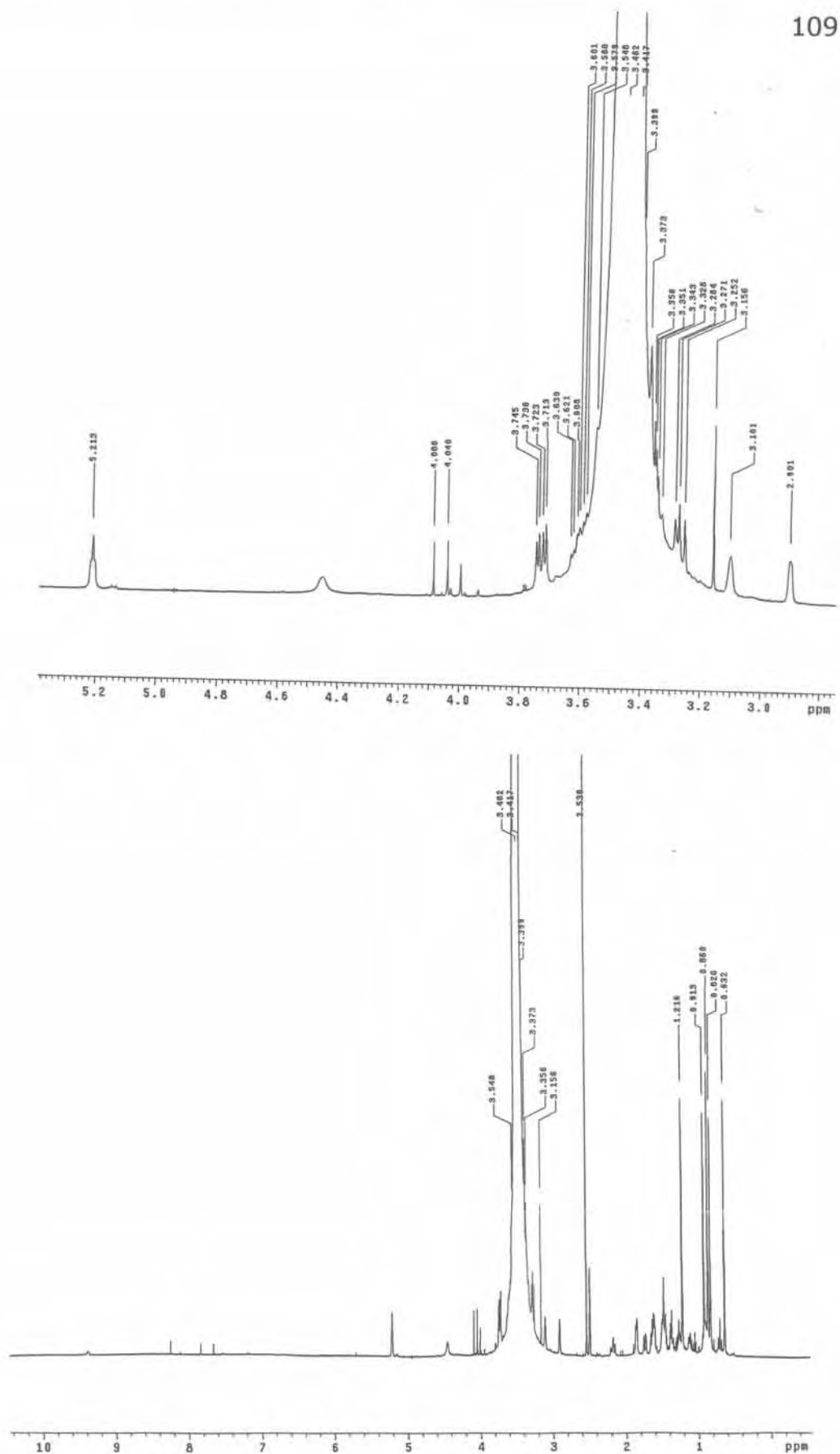
Espectro 2: Espectro de RMN- ^{13}C de Qp3 (DMSO- d_6 , 11.7T).



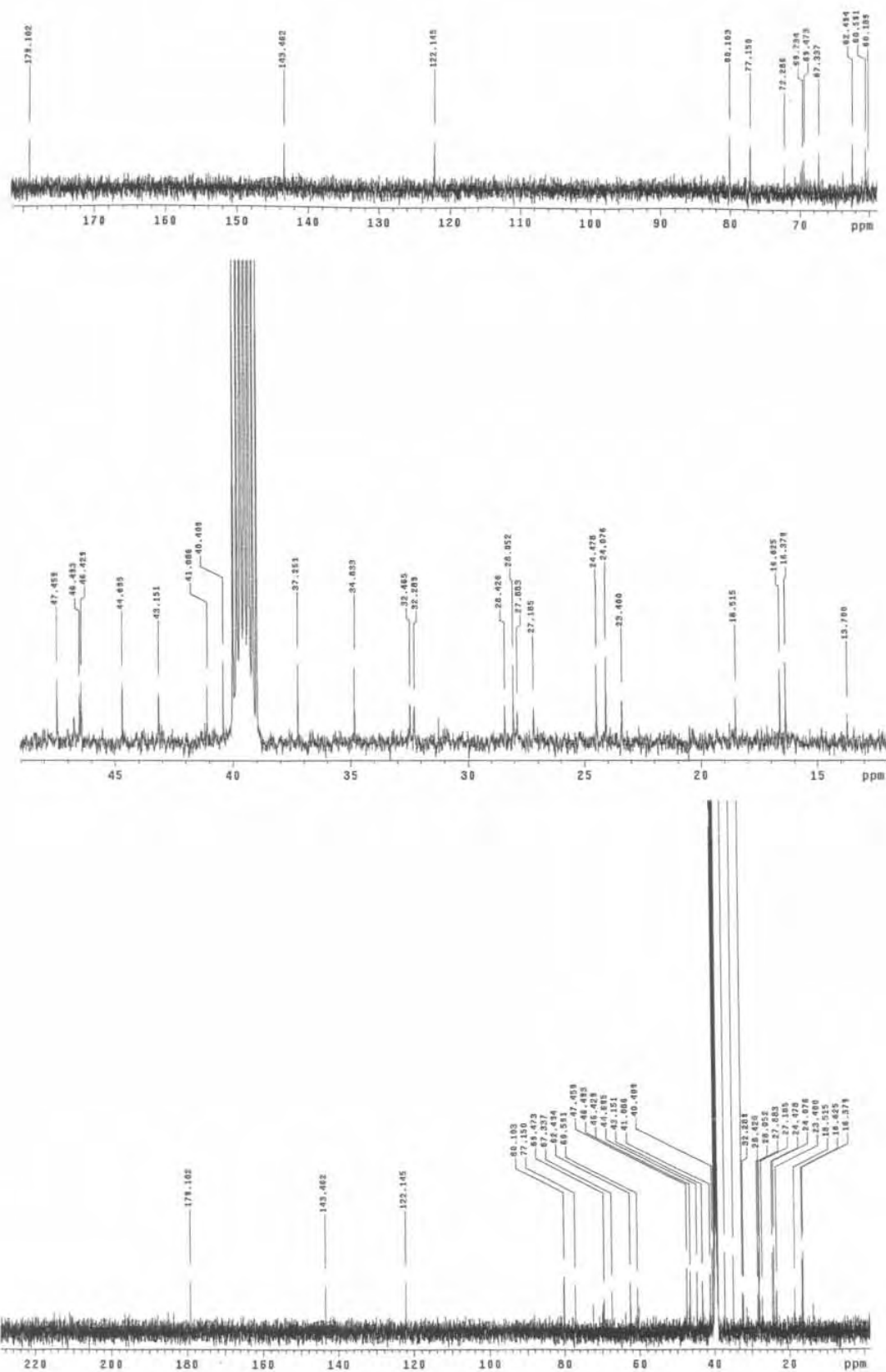
Espectro 3: Experimento de DEPT 135° de **Qp3** (DMSO-d₆, 11.7T).



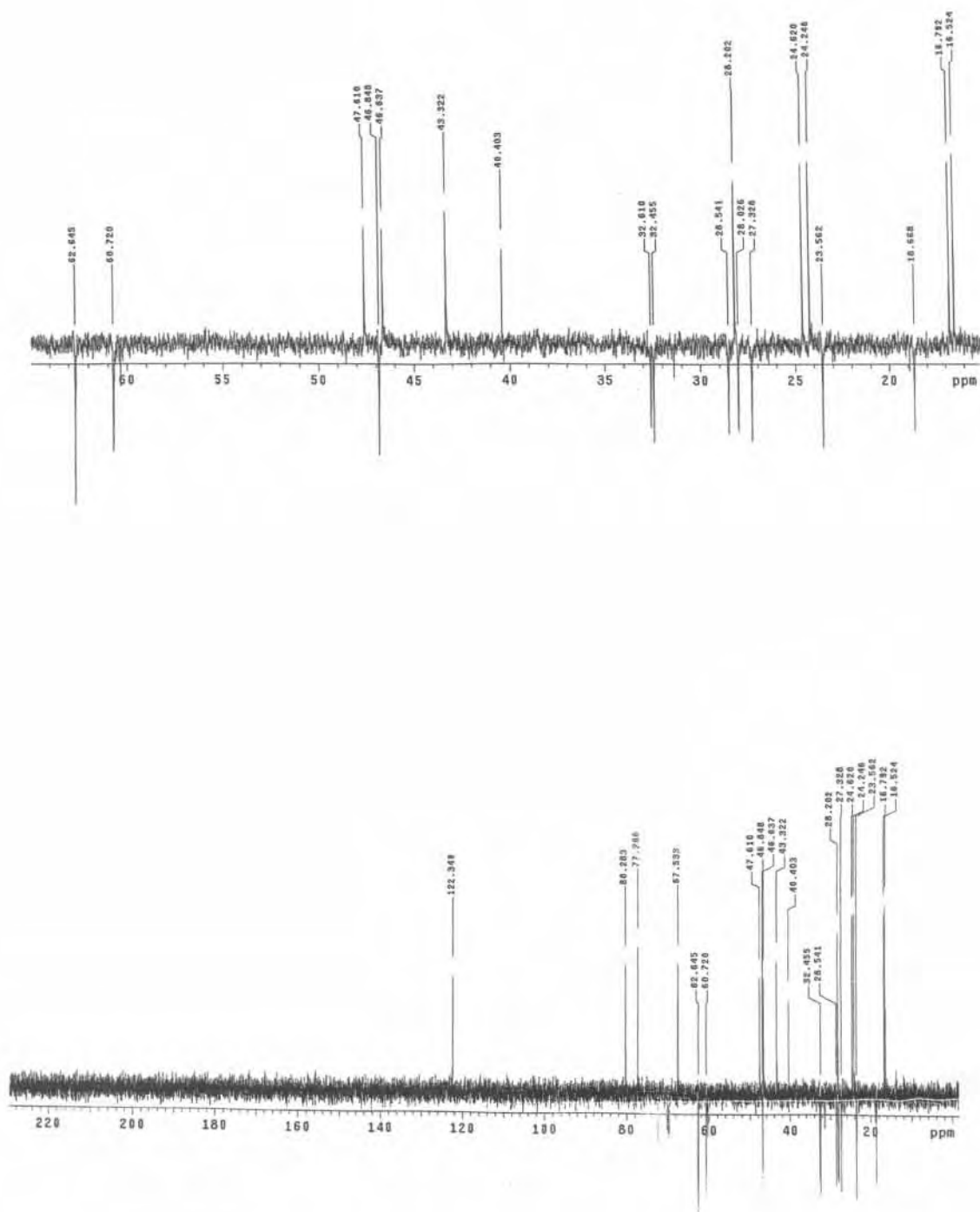
Espectro 4: Espectro de EM-ES (-40V) de **Qp3**.



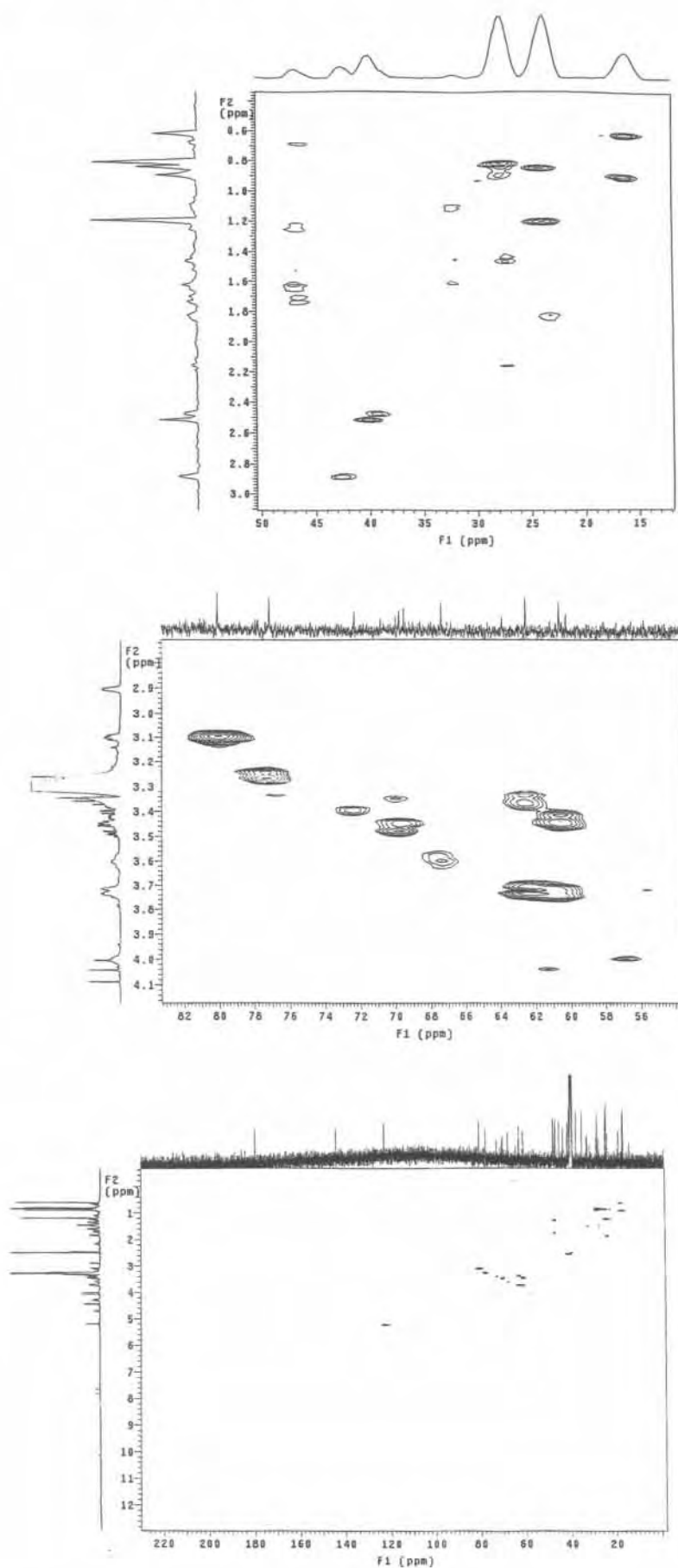
Espectro 5: Espectro de RMN-¹H de **Qp2** contendo **Qp7** (DMSO-d₆, 11.7T).



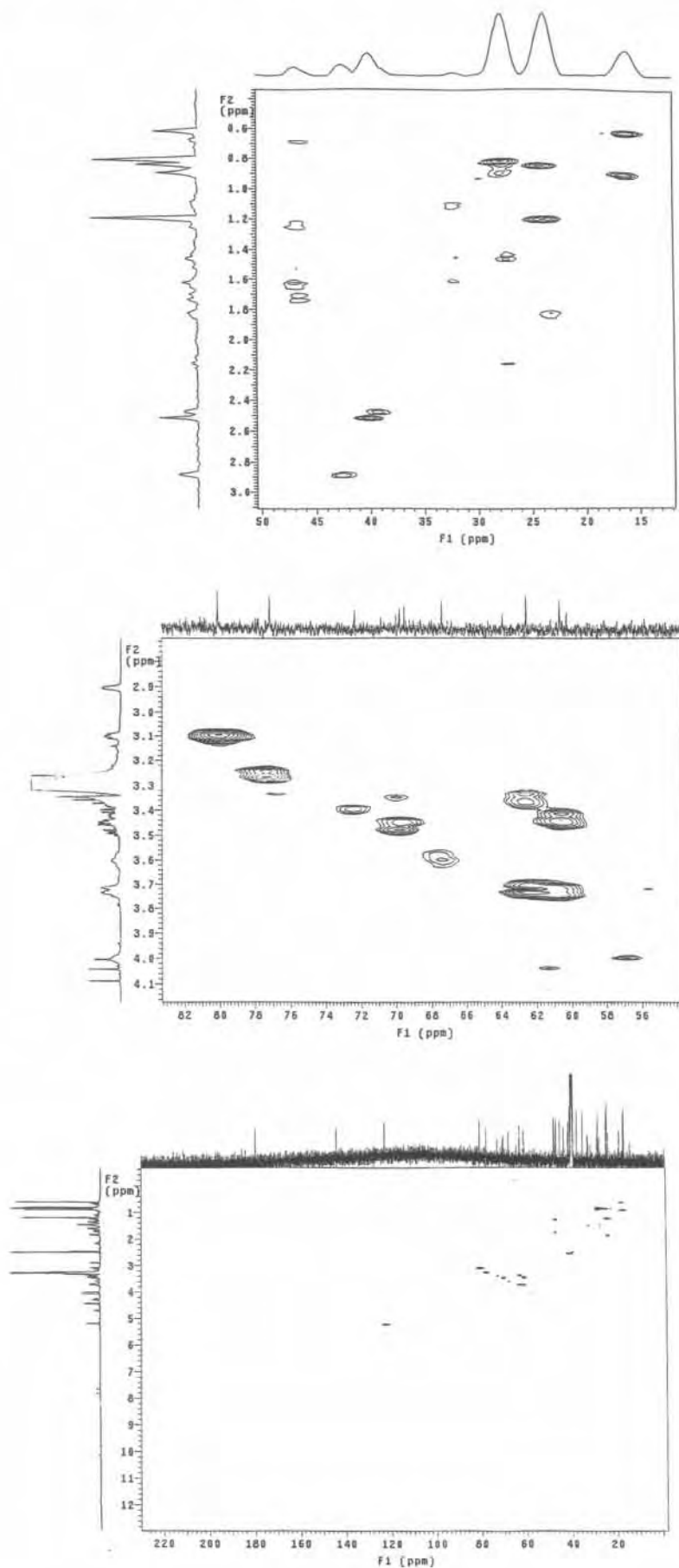
Espectro 6: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp2** (DMSO-d_6 , 11.7T).



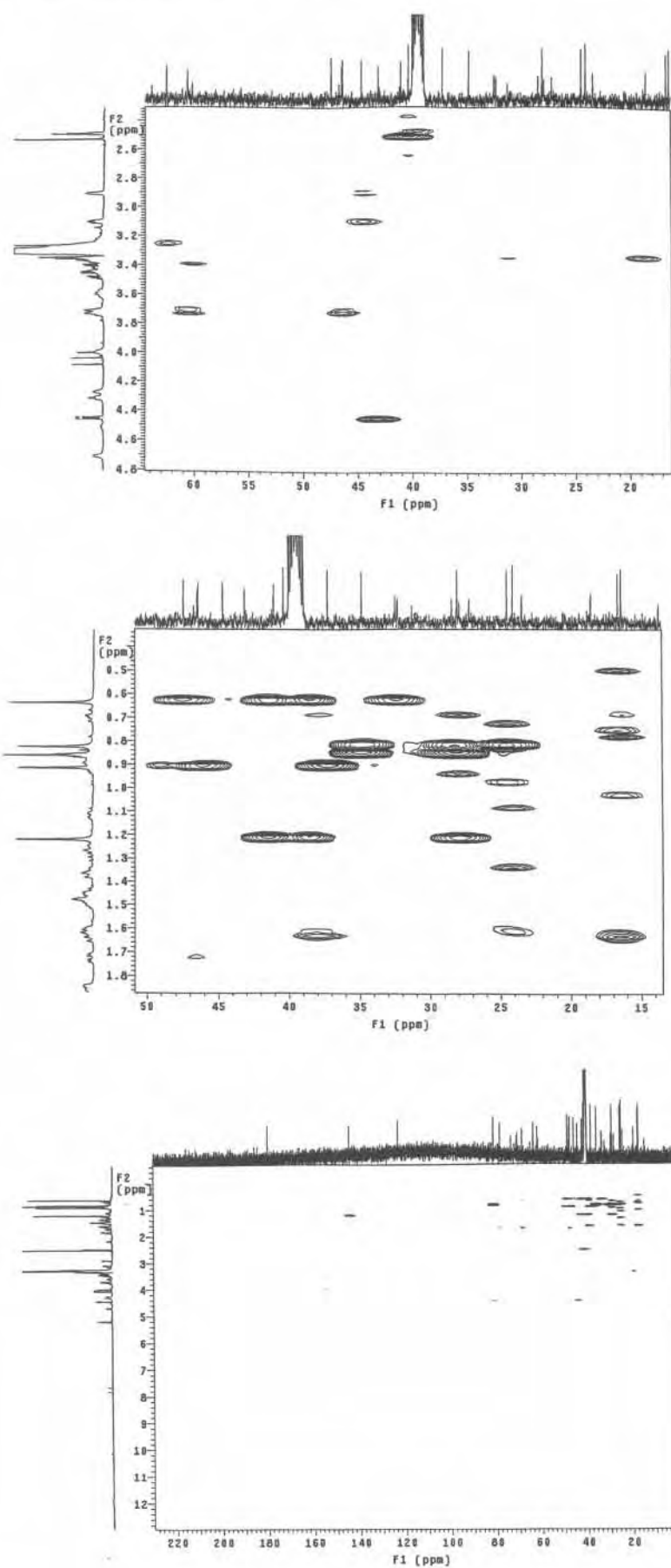
Espectro 7: Experimento de DEPT 135° de **Qp2** (DMSO- d_6 , 11.7T).



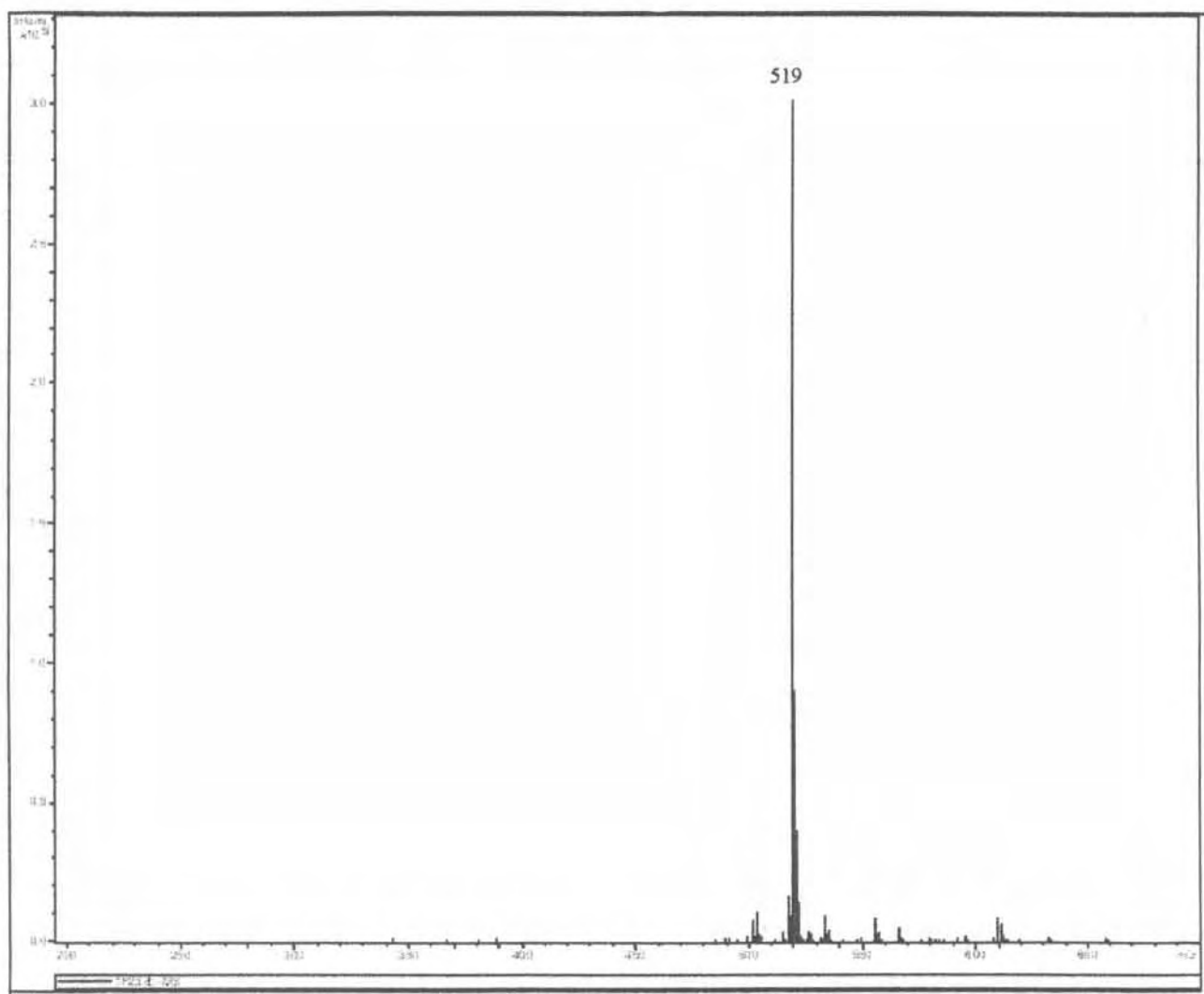
Espectro 8: Experimento gHMQC de **Qp2** (DMSO- d_6 , 11.7T).



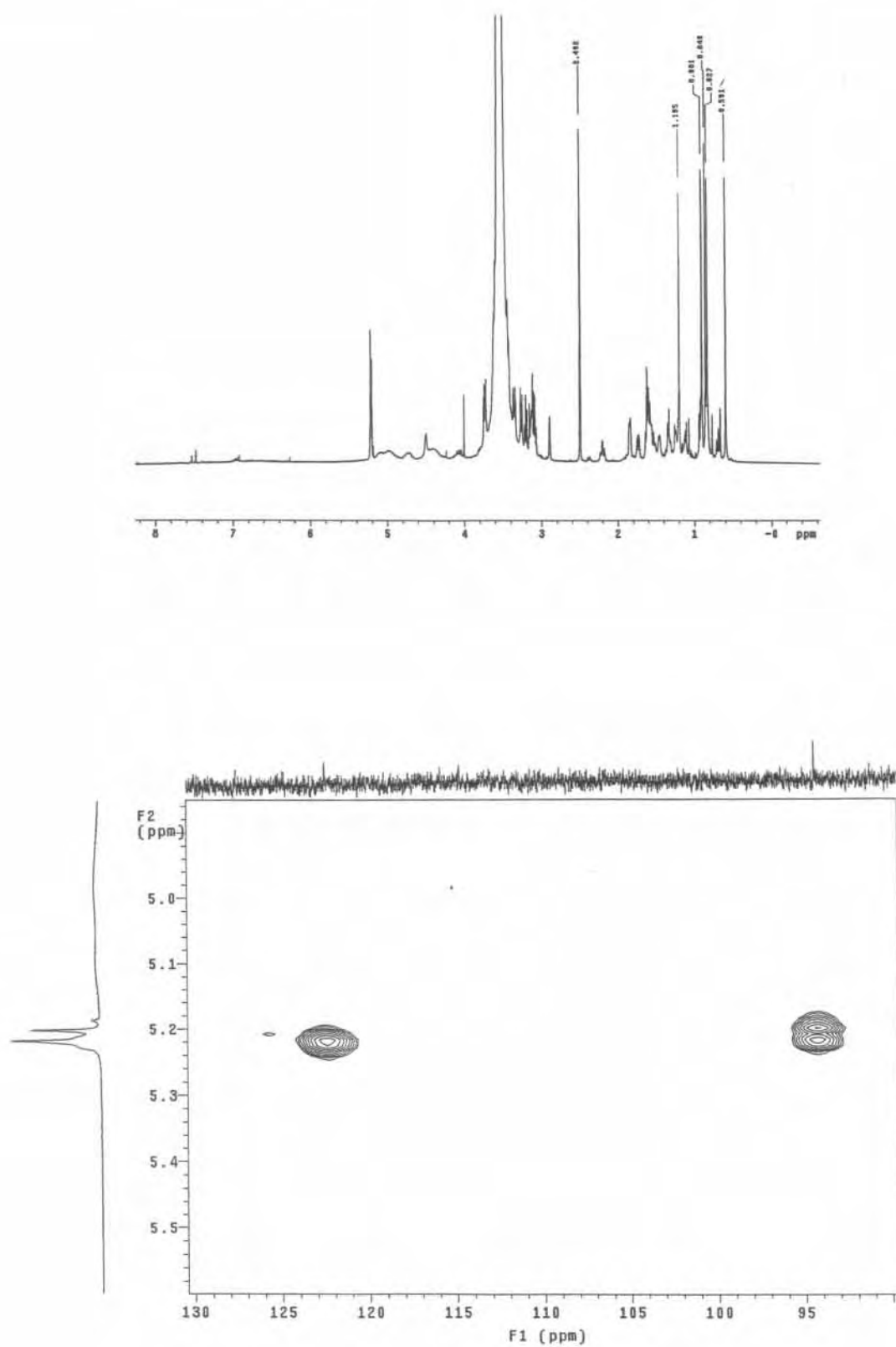
Espectro 8: Experimento gHMQC de **Qp2** (DMSO- d_6 , 11.7T).



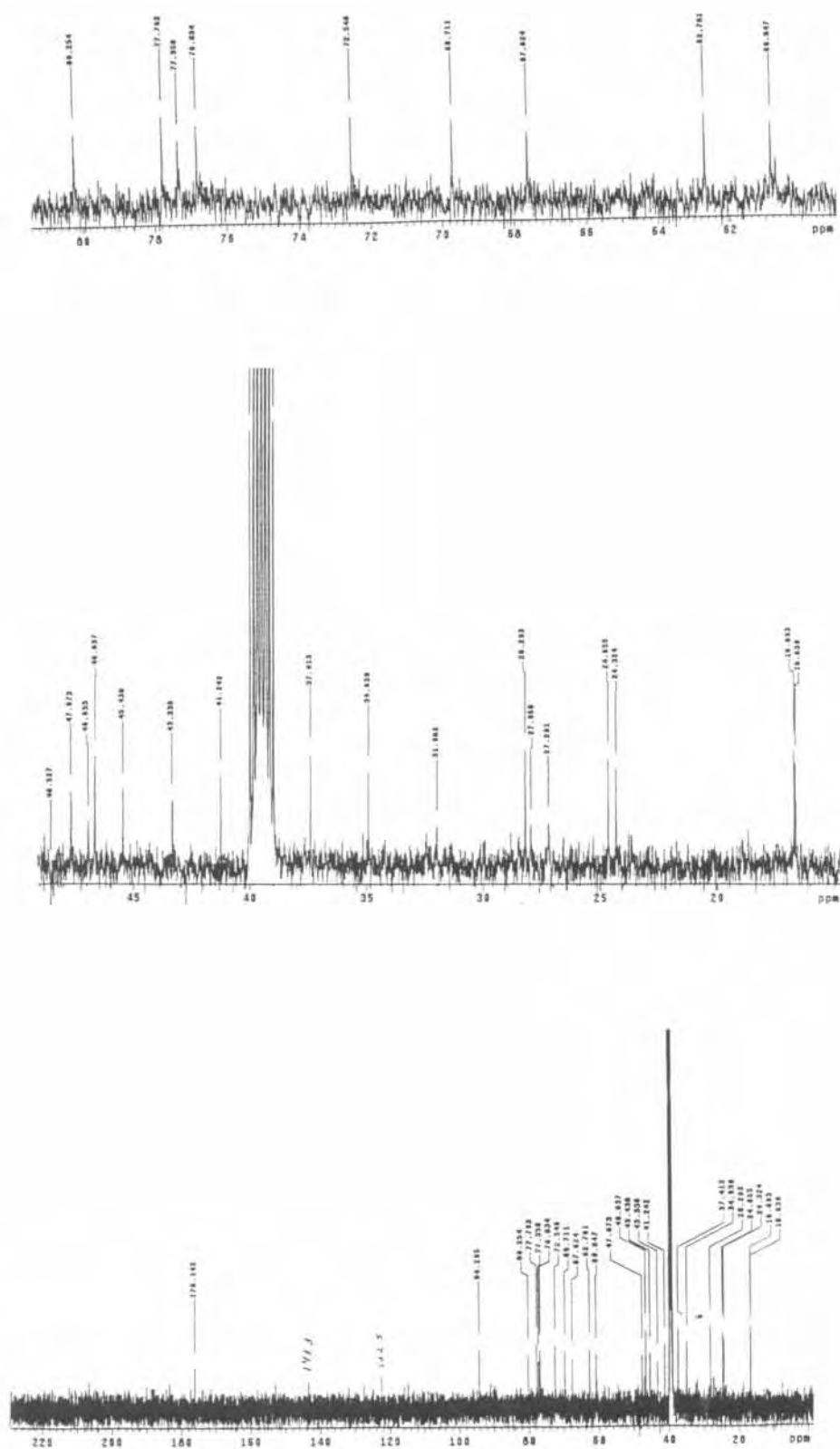
Espectro 9: Experimento gHMBC de **Qp2** (DMSO-d₆, 11.7T).



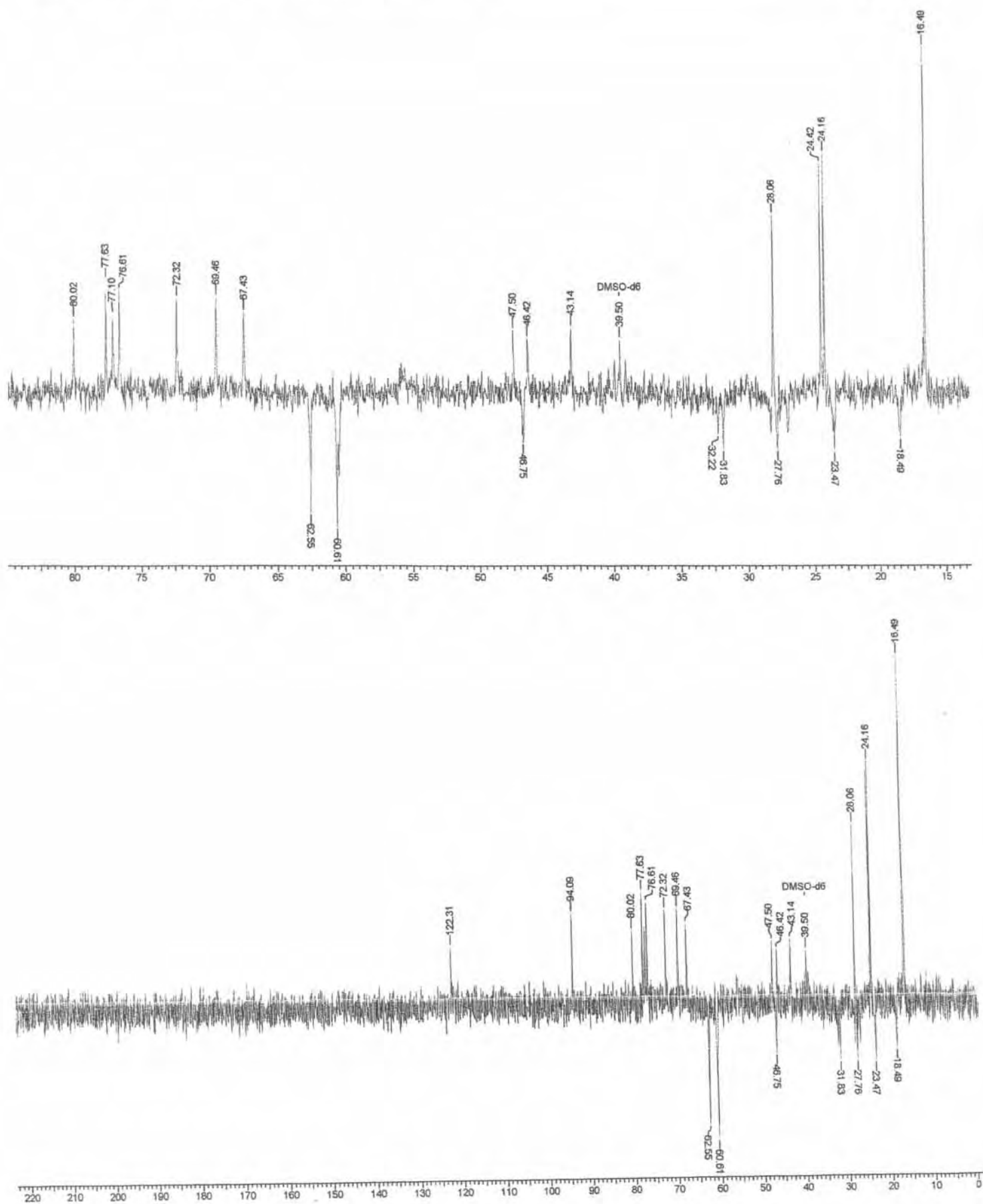
Espectro 10: Espectro de EM-ES (-40V) de **Qp2**.



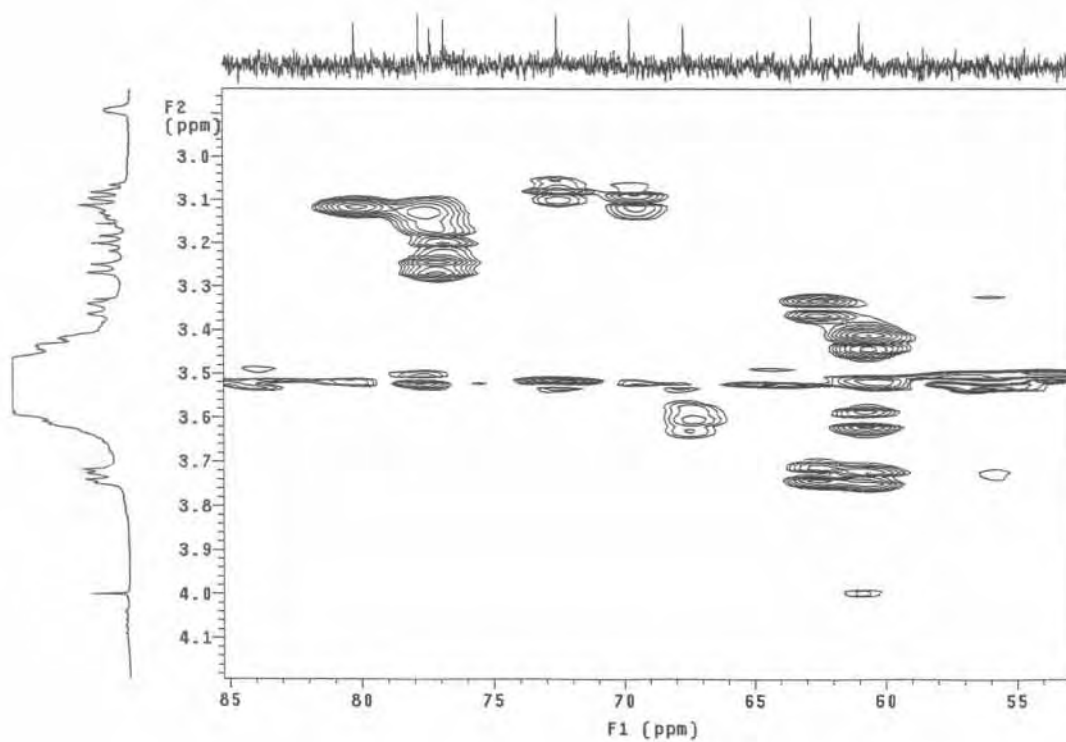
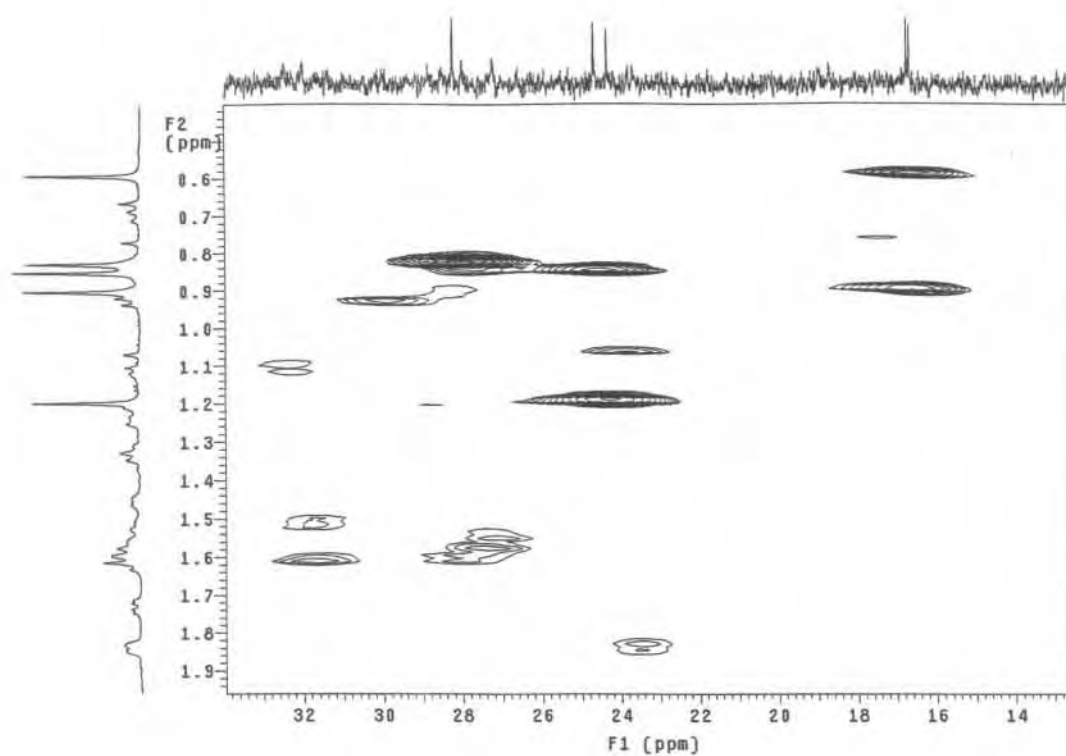
Espectro 11: Espectro de RMN- ^1H e gHMBC de **Qp4** (DMSO- d_6 , 11.7T).



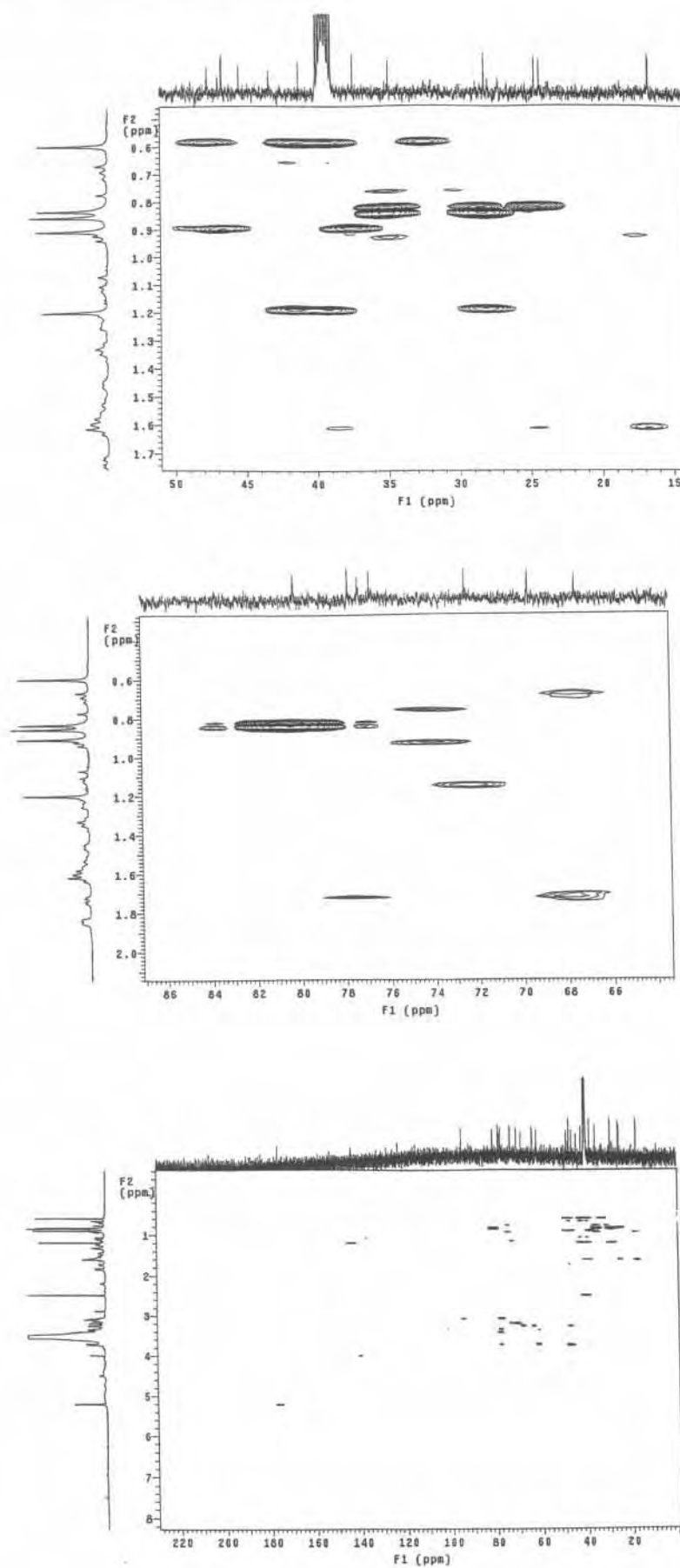
Espectro 12: Espectro de RMN- ^{13}C de Qp4 (DMSO- d_6 , 11.7T).



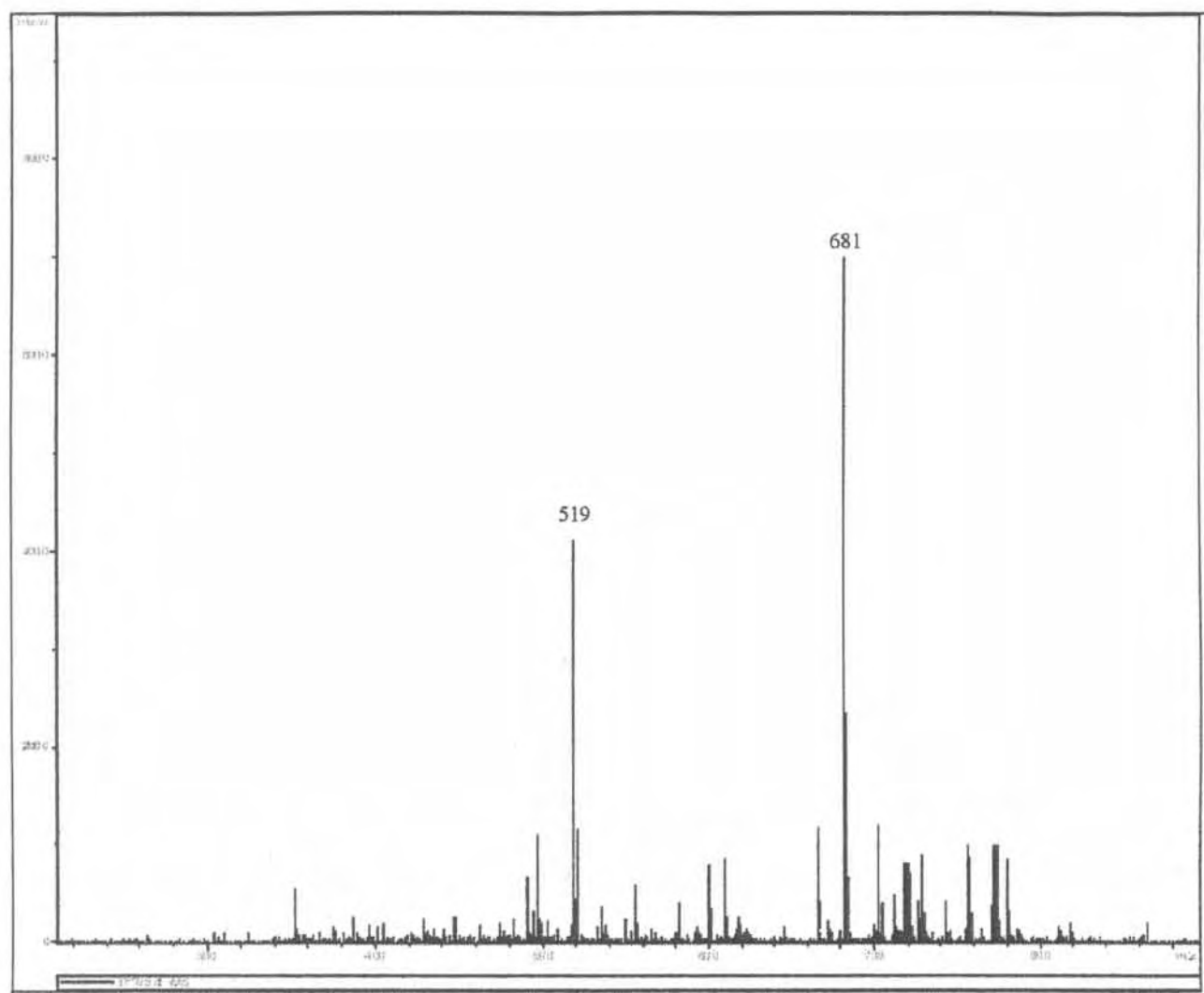
Espectro 13: Experimento de DEPT 135° de **Qp4** (DMSO-d_6 , 11.7T).



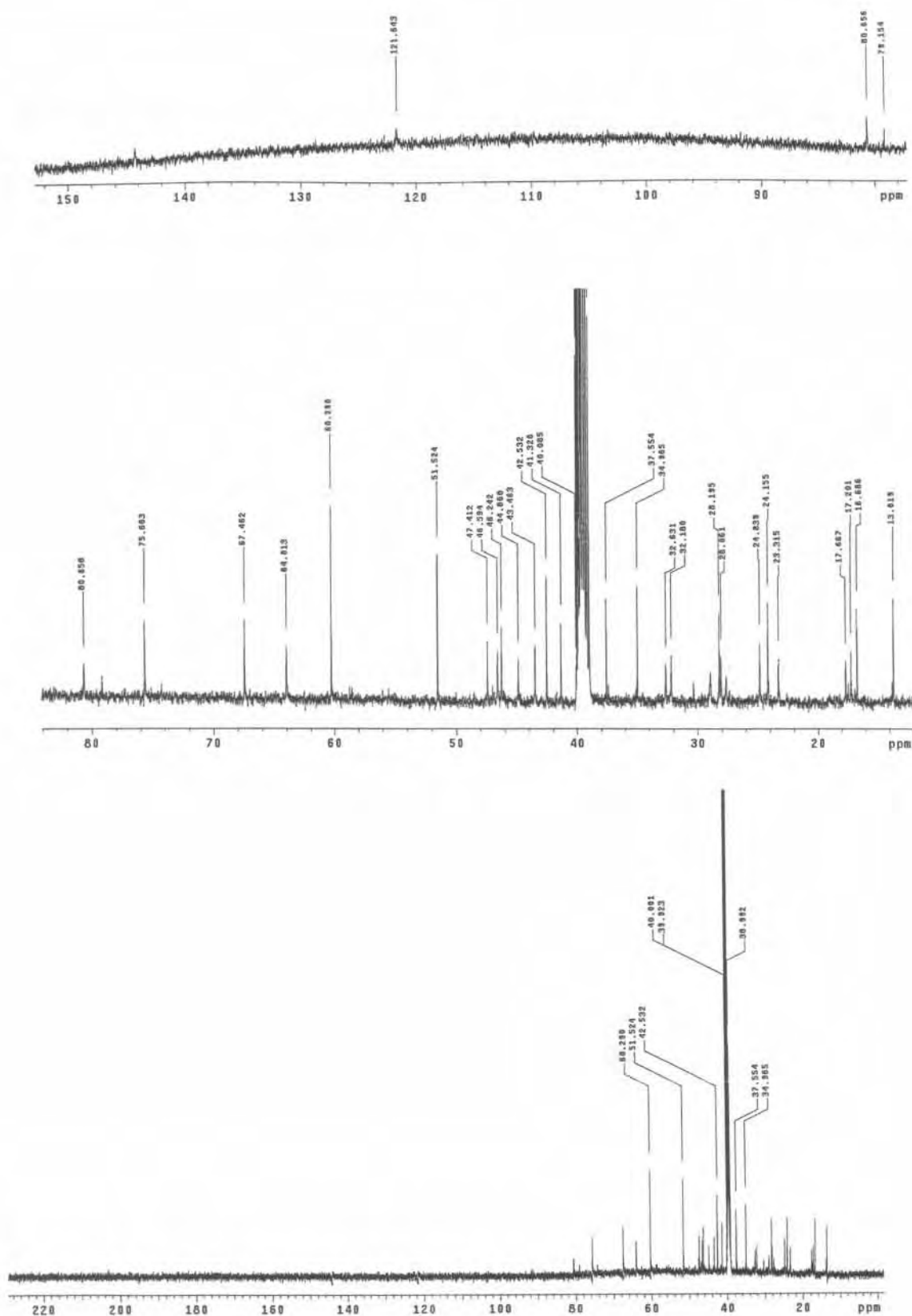
Espectro 14: Experimento *g*HMQC de **Qp4** (DMSO- d_6 , 11.7T).



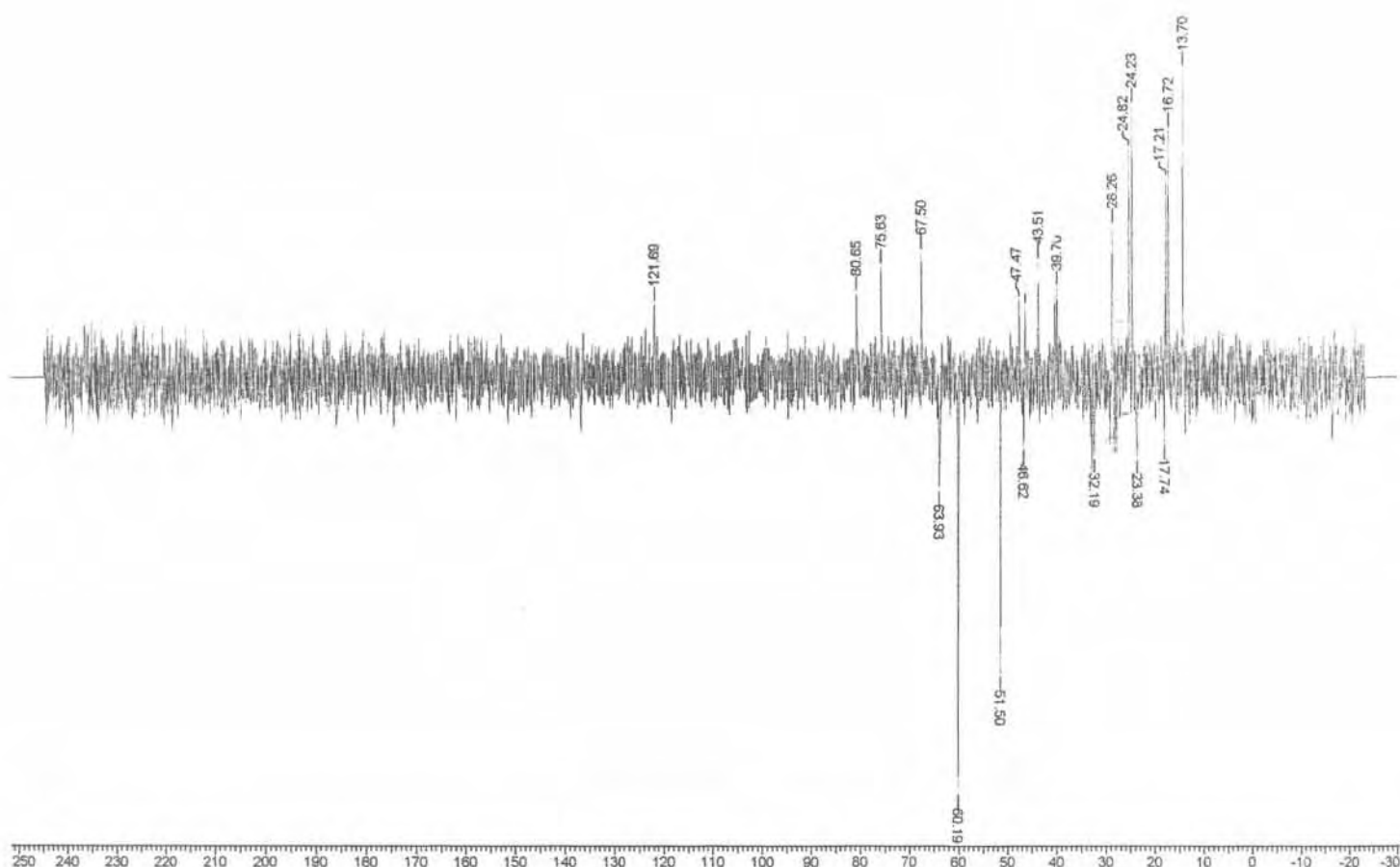
Espectro 15: Experimento gHMBC de **Qp4** (DMSO- d_6 , 11.7T)..



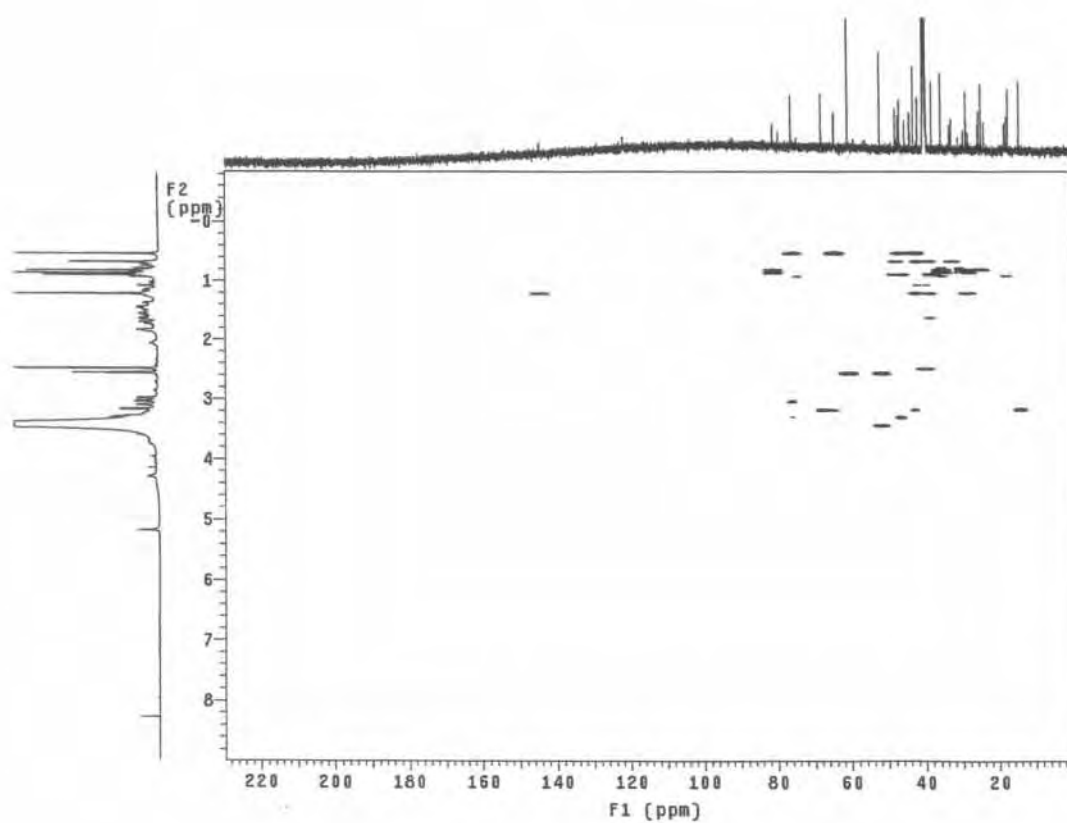
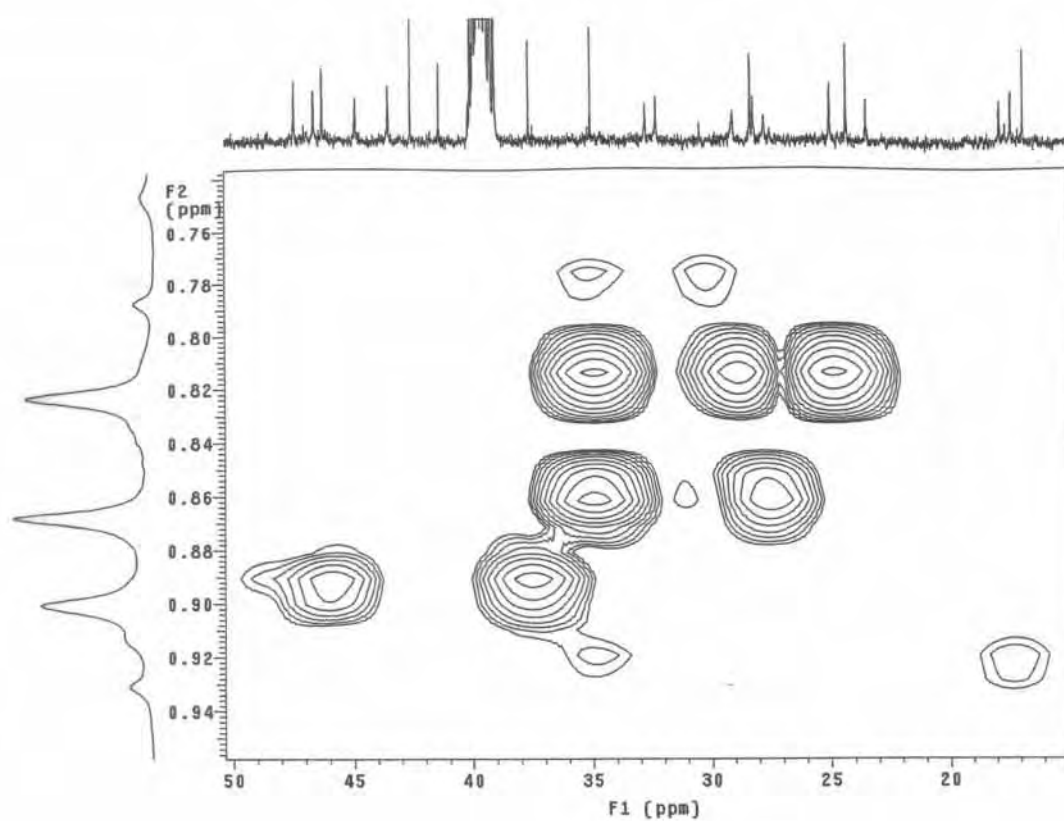
Espectro 16: Espectro de EM-ES (-40V) de Qp4.



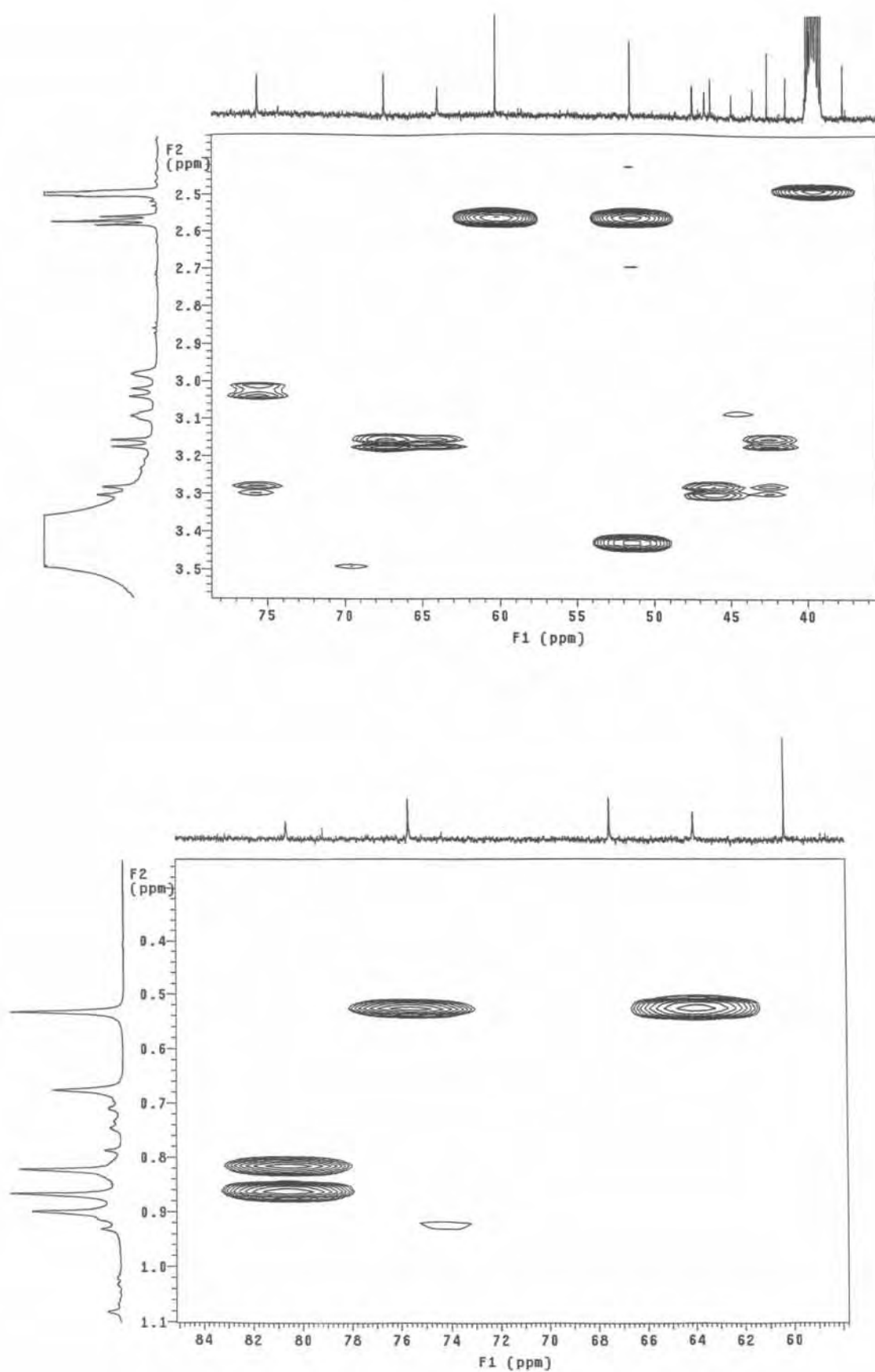
Espectro 17: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp1** (DMSO-d_6 , 11.7T).



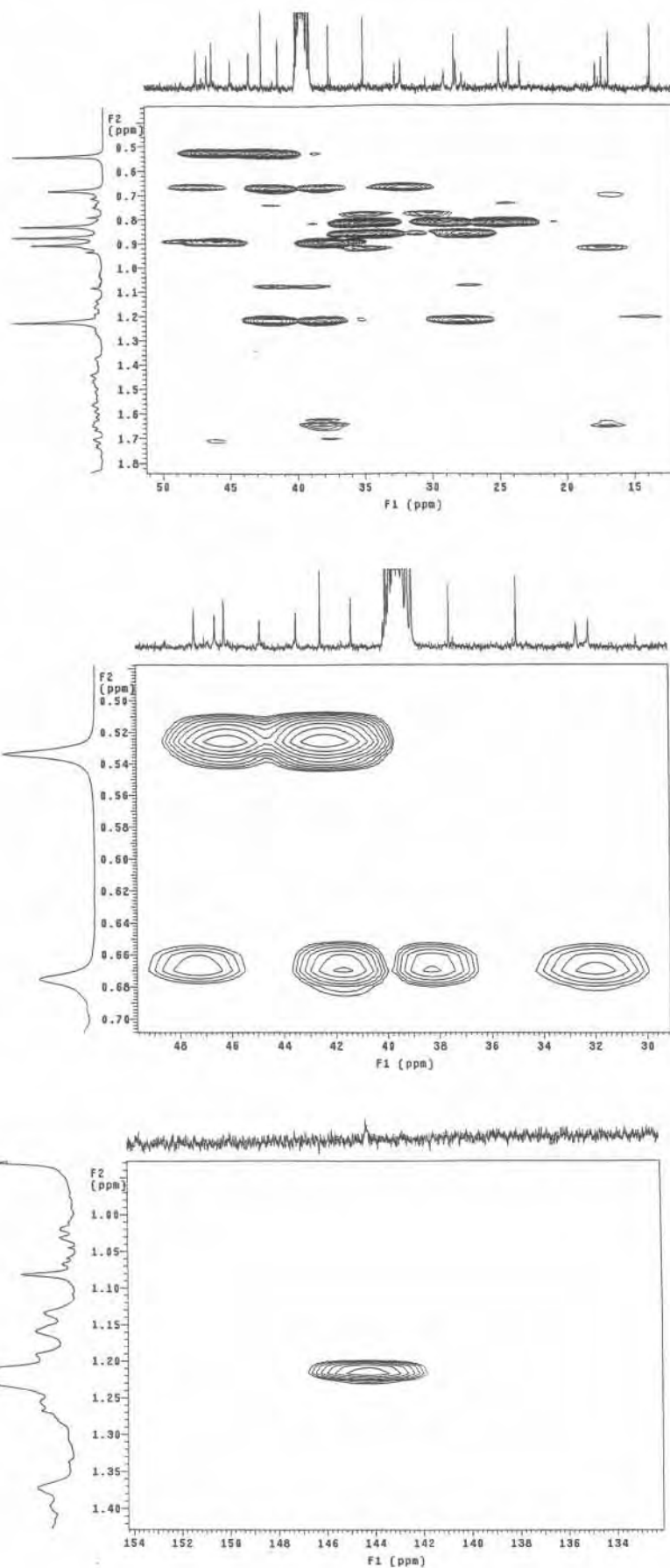
Espectro 18: Experimento de DEPT 135° de **Qp1** (DMSO-d₆, 11.7T).



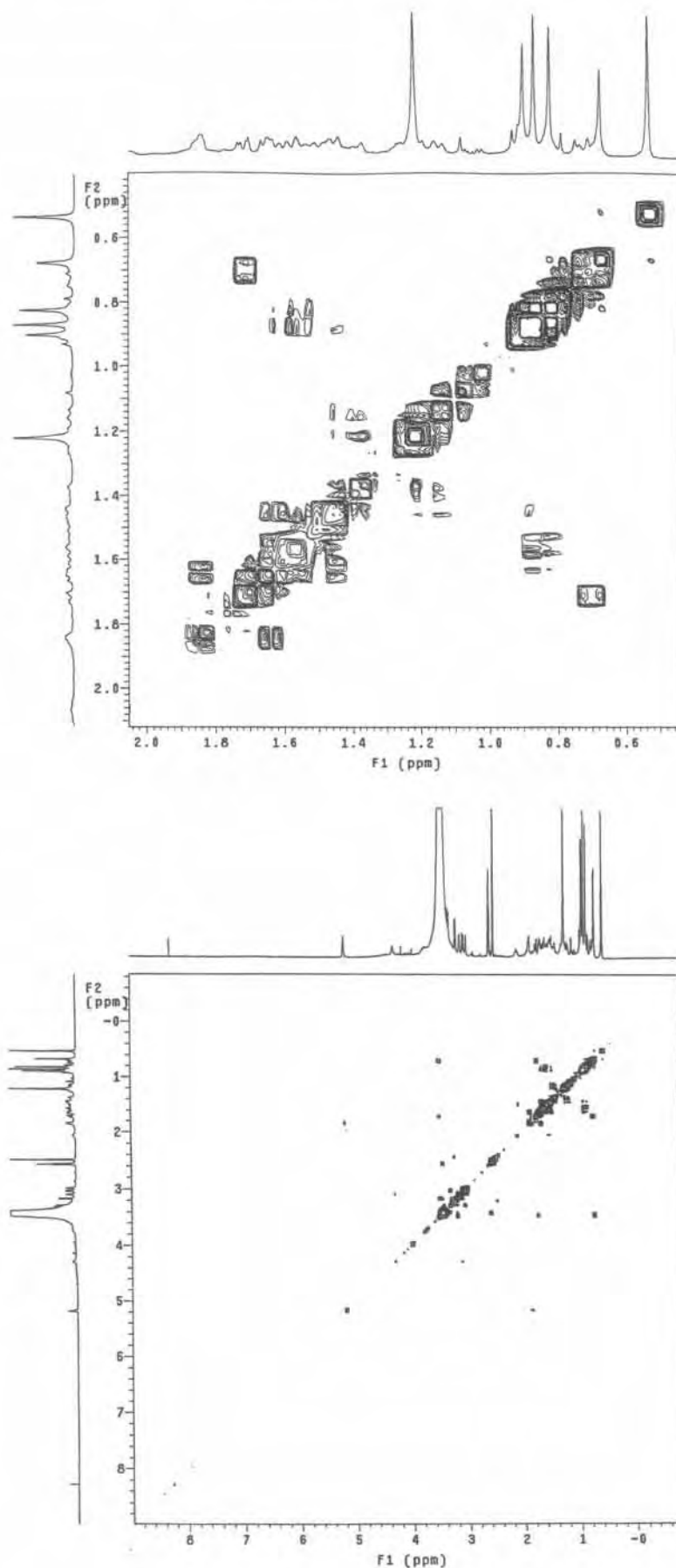
Espectro 19: Experimento $g\text{HMBC}$ de **Qp1** (DMSO-d_6 , 11.7T).



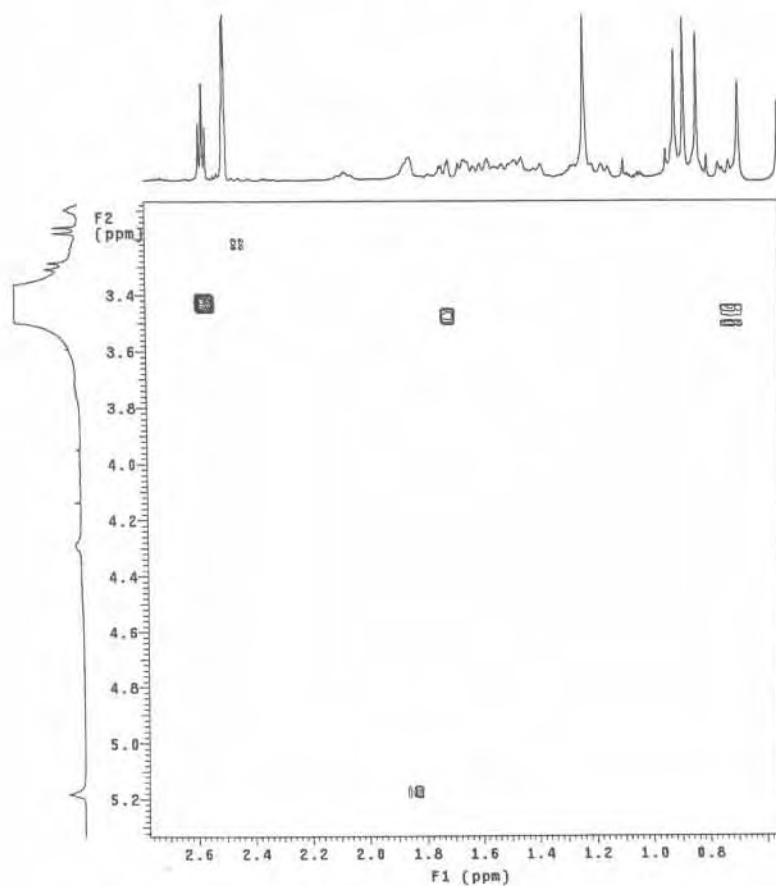
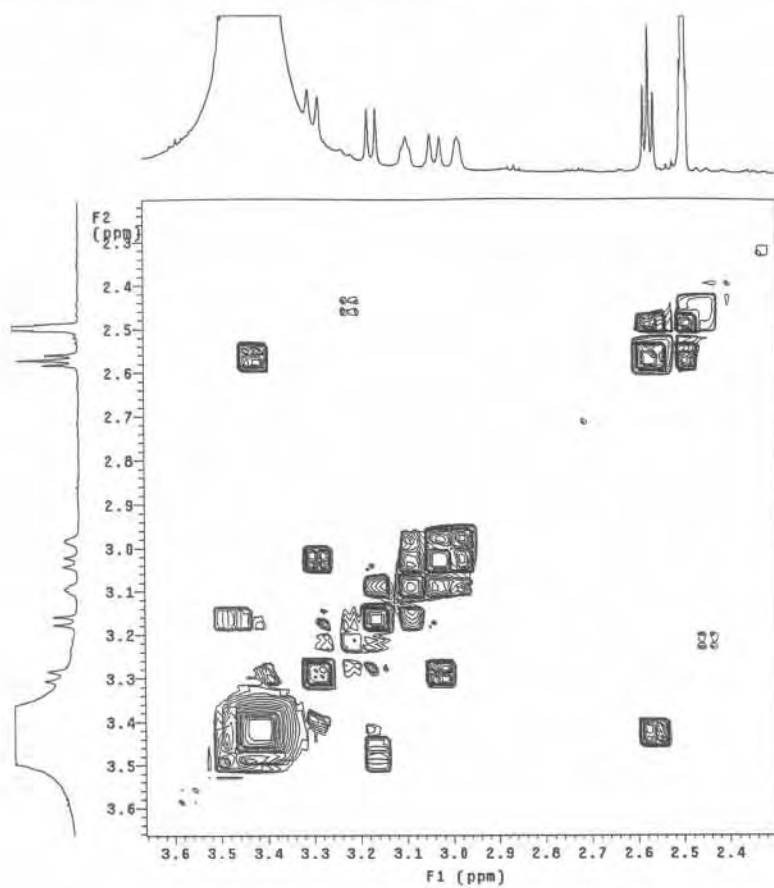
Espectro 20: Experimento gHMBC de **Qp1** (DMSO-d₆, 11.7T).



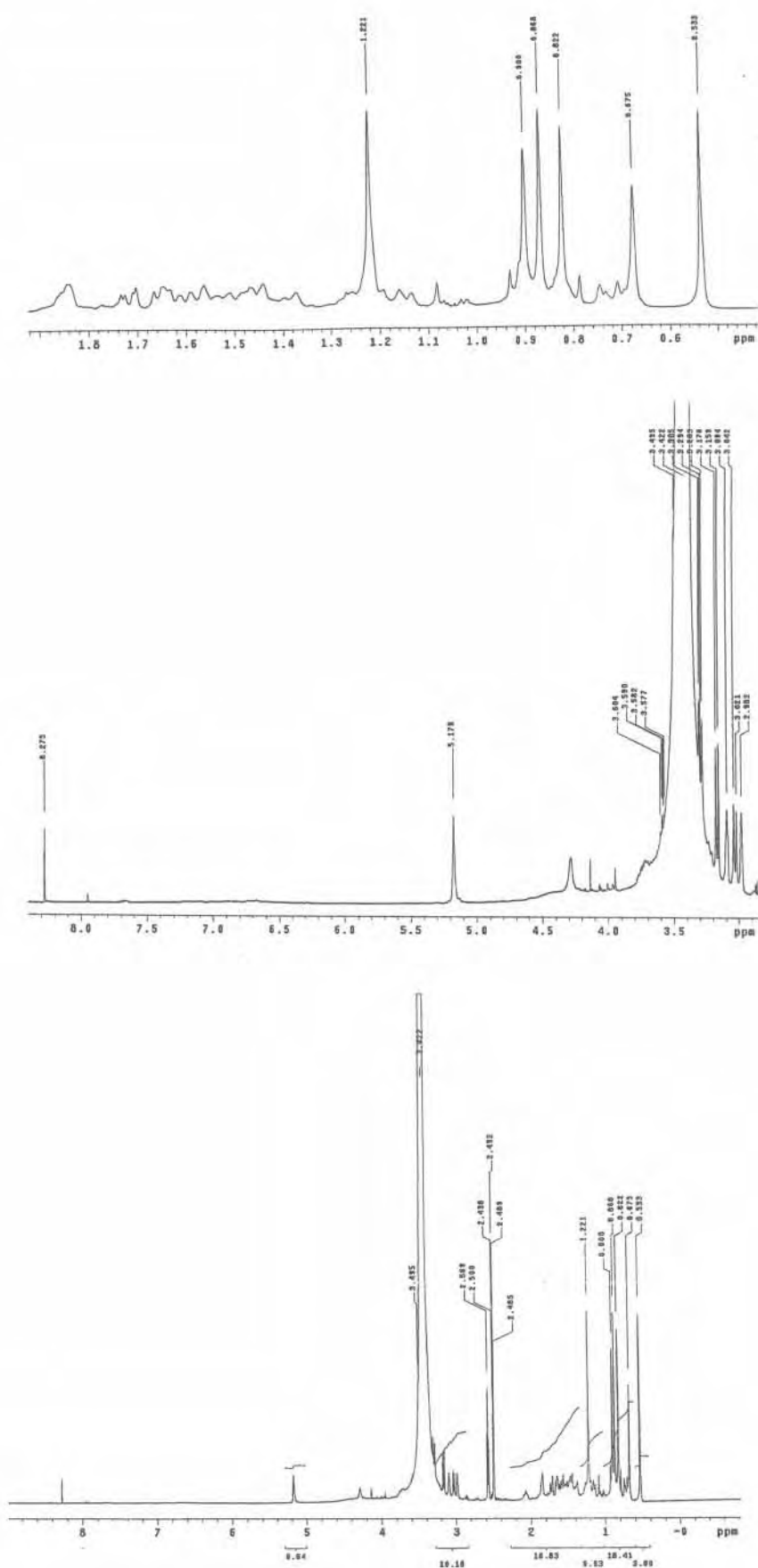
Espectro 21: Experimento gHMBC de **Qp1** (DMSO-d₆, 11.7T).



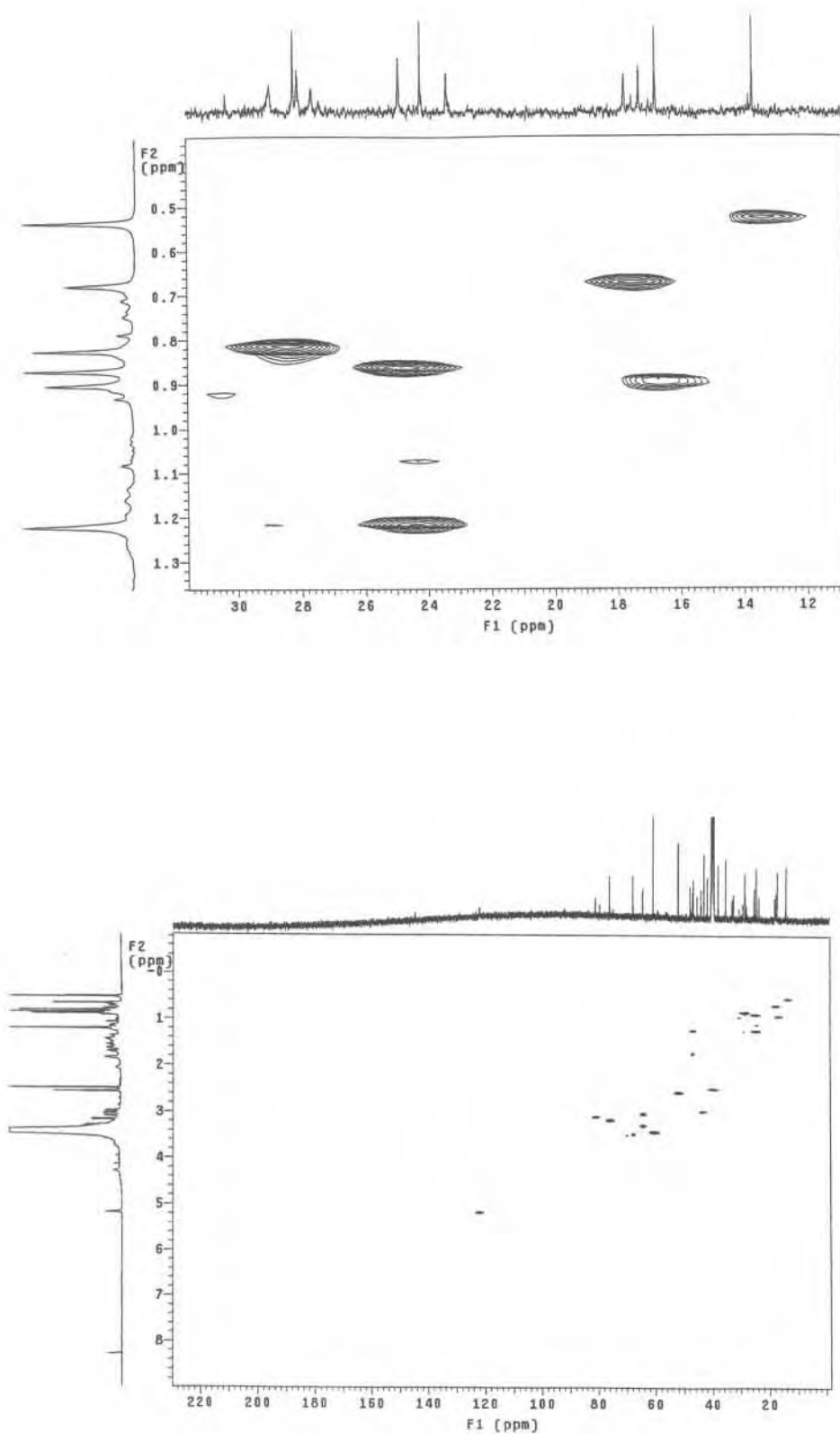
Espectro 22: Experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}/^1\text{H}$ de **Qp1** (DMSO-d_6 , 11.7T).



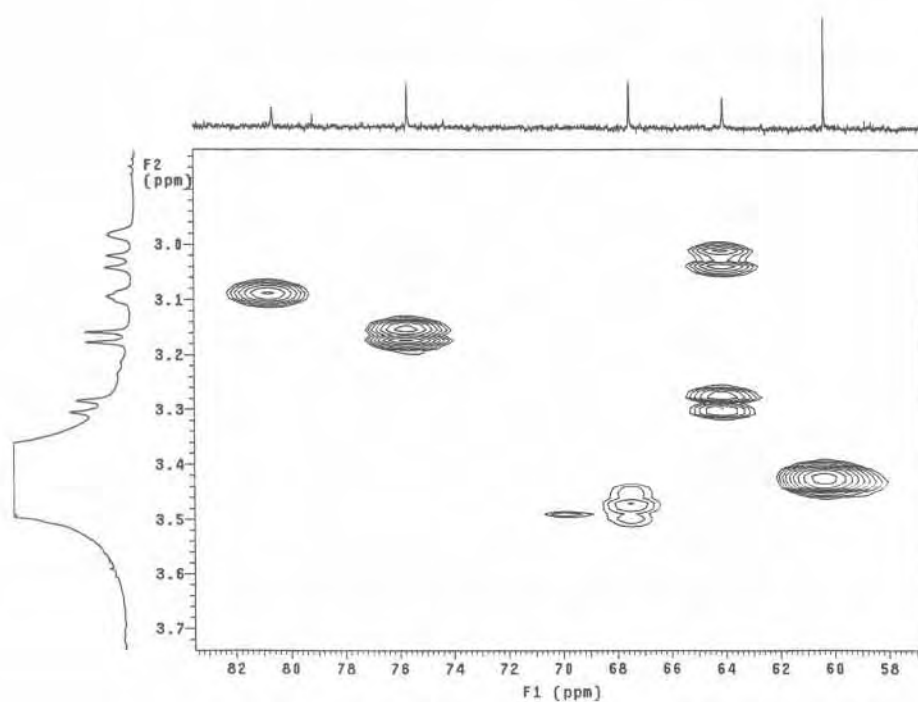
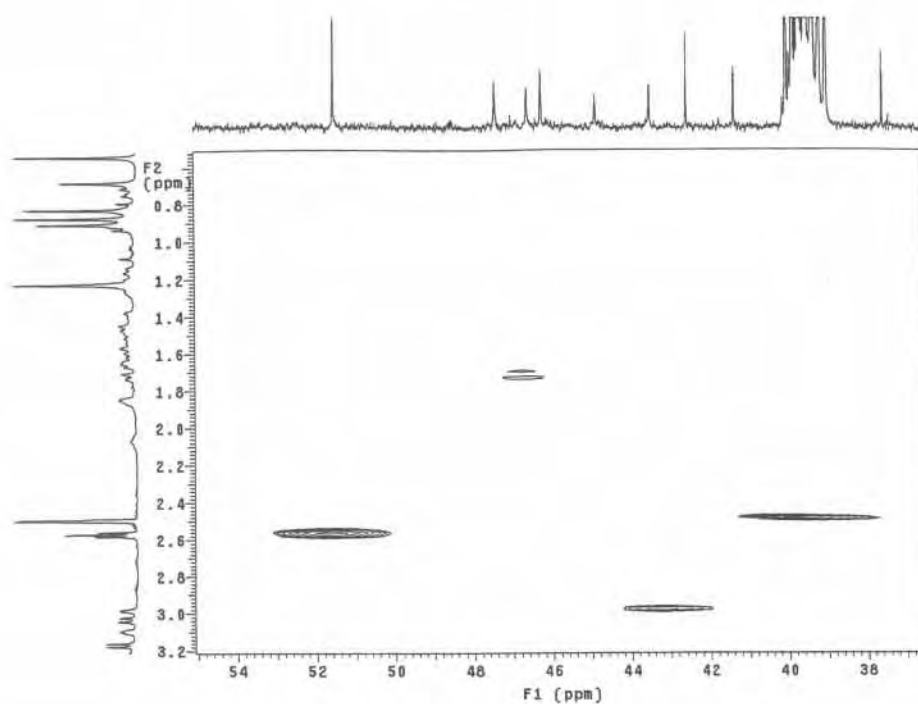
Espectro 23: Experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}/^1\text{H}$ de **Qp1** (DMSO- d_6 , 11.7T).



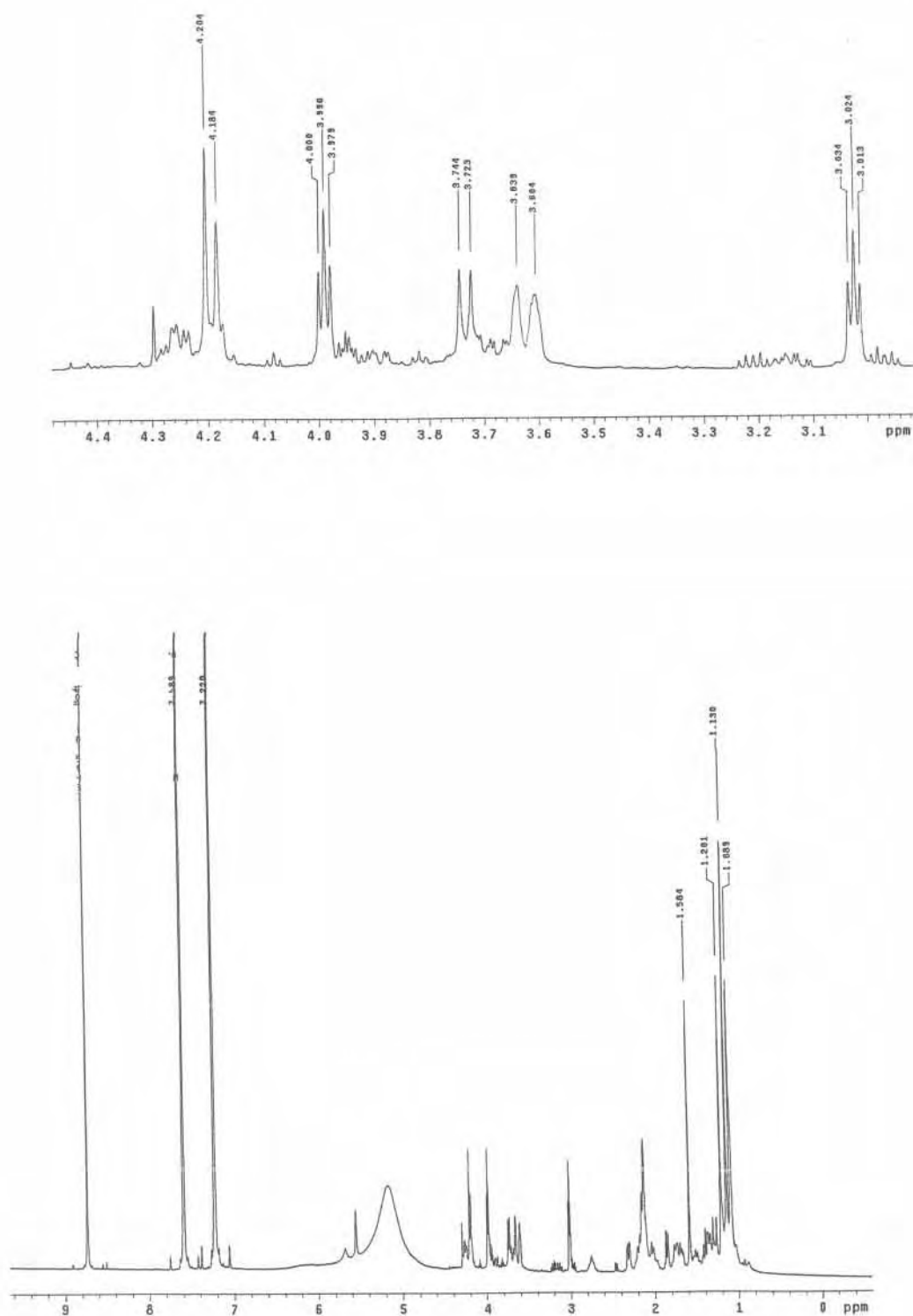
Espectro 24: Espectro de RMN- ^1H de **Qp1** (DMSO-d_6 , 11.7T).



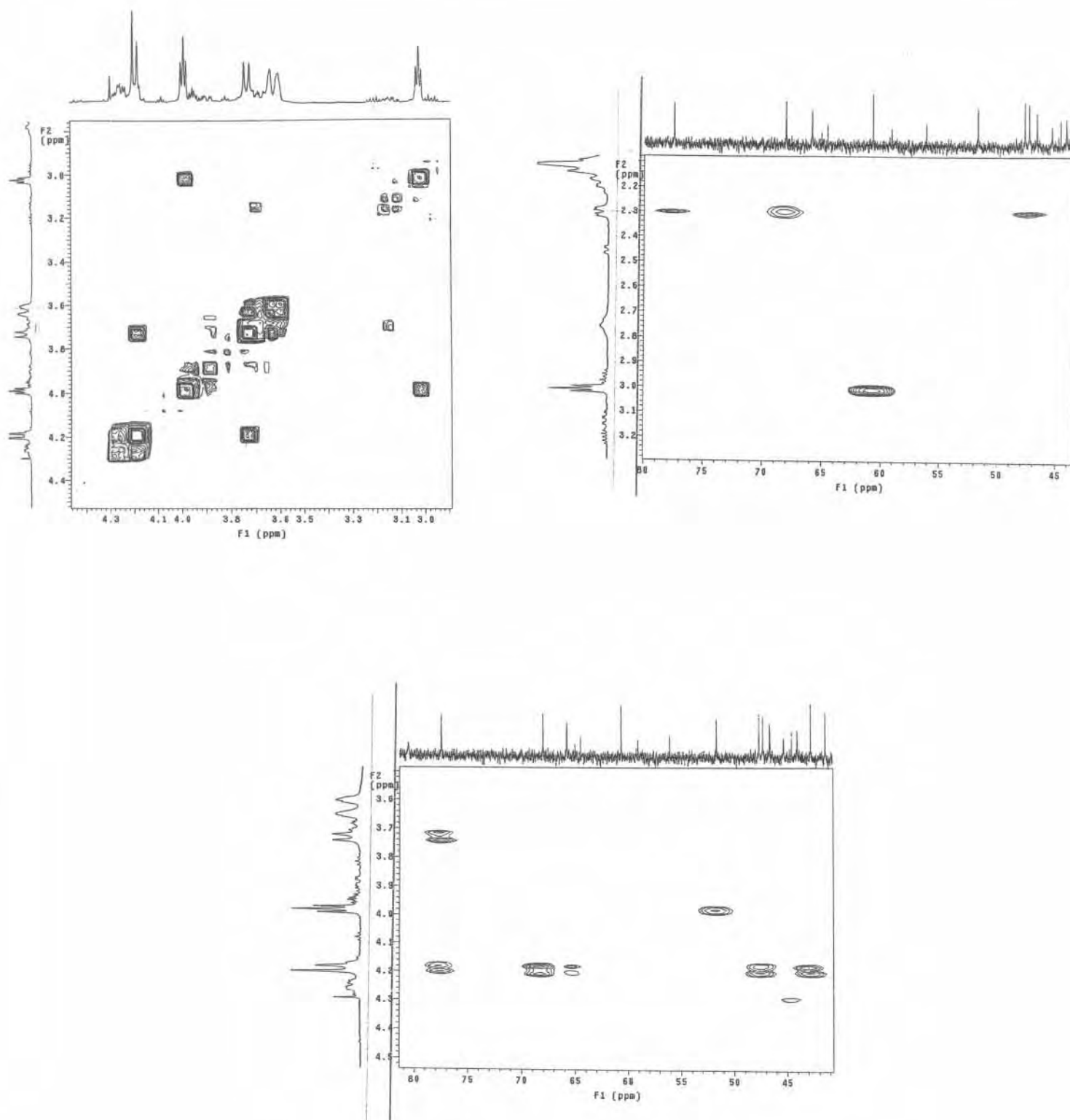
Espectro 25: Experimento gHMQC de **Qp1** (DMSO-d₆, 11.7T).



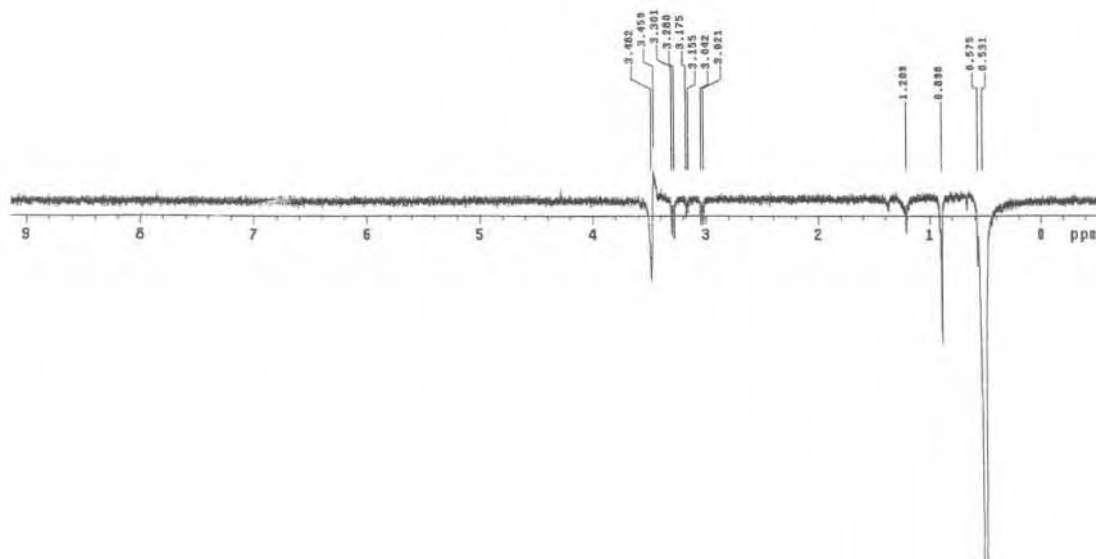
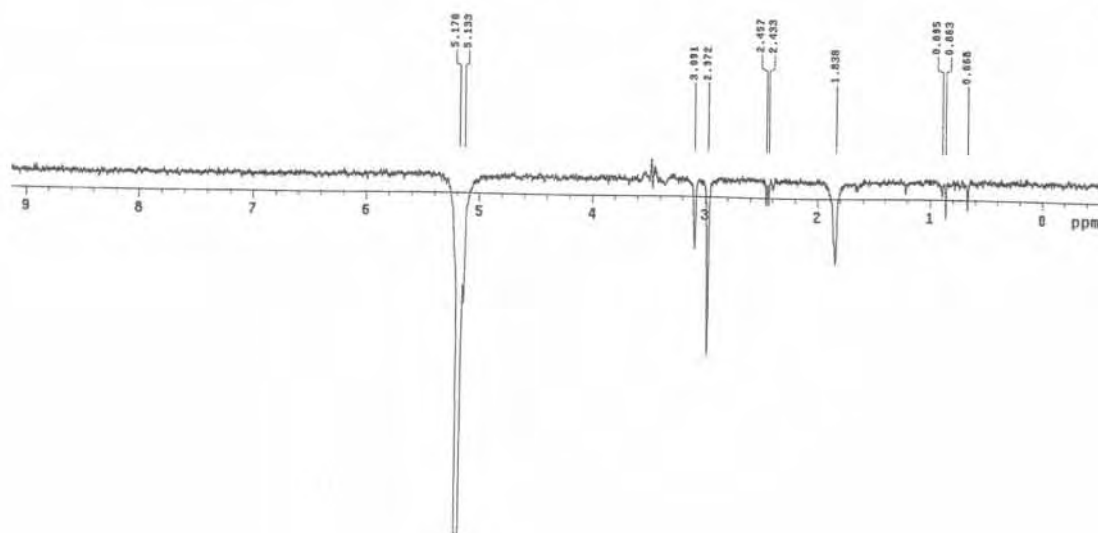
Espectro 26: Experimento gHMQC de **Qp1** (DMSO-d₆, 11.7T).



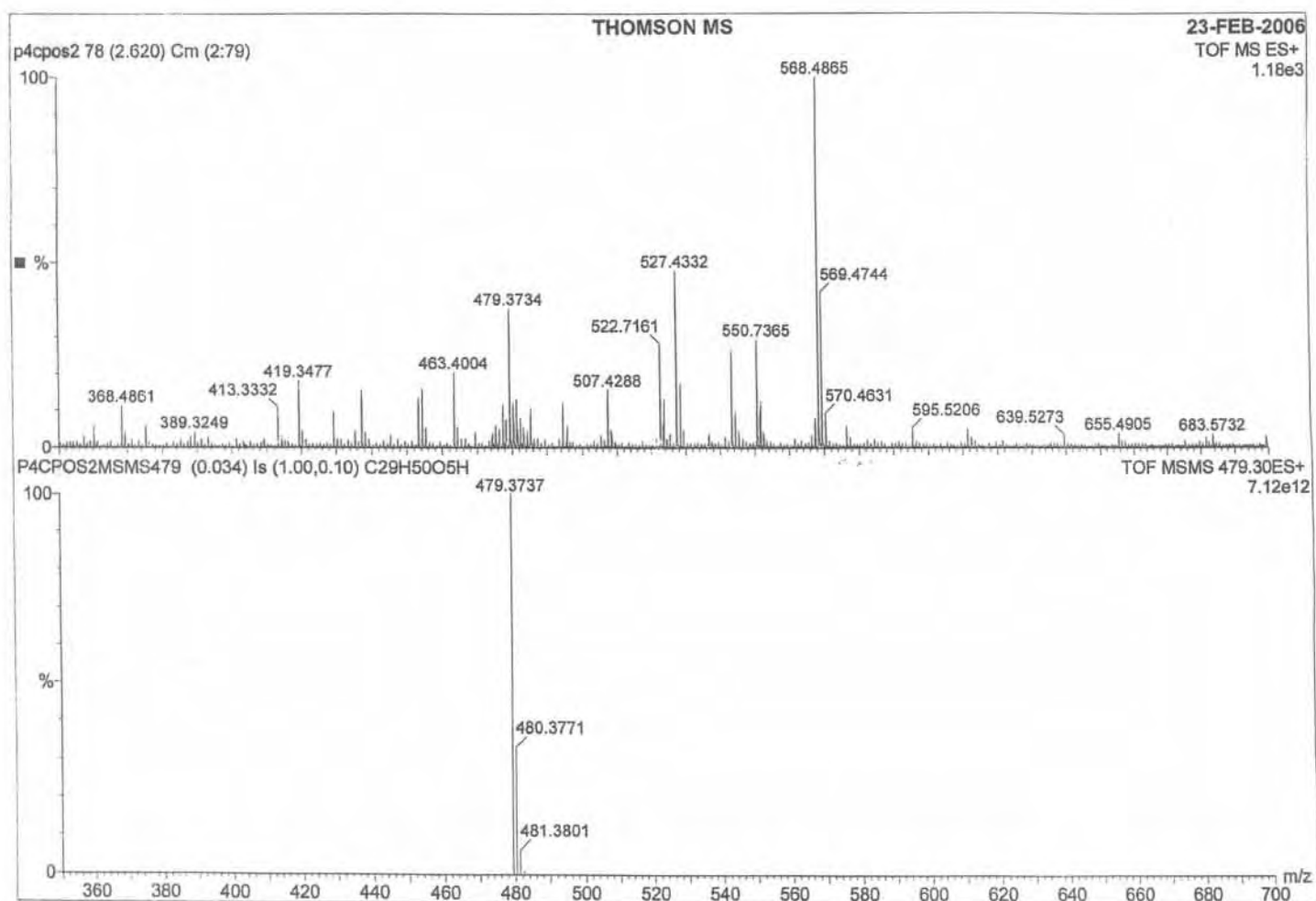
Espectro 27: Espectro de RMN- ^1H de **Qp1** (Py-d_5 , 11.7T).

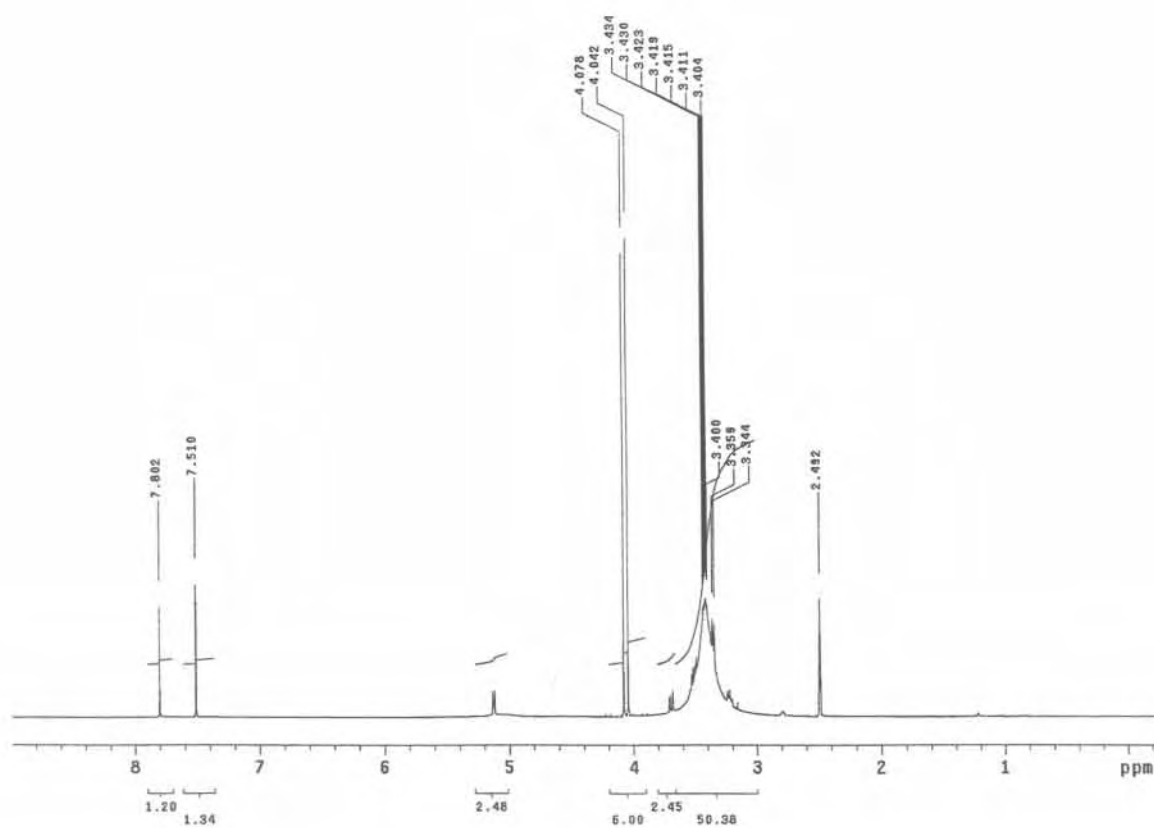


Espectro 28: Experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}/^1\text{H}$ e $g\text{HMBC}$ de **Qp1** (Py- d_5 , 11.7T).

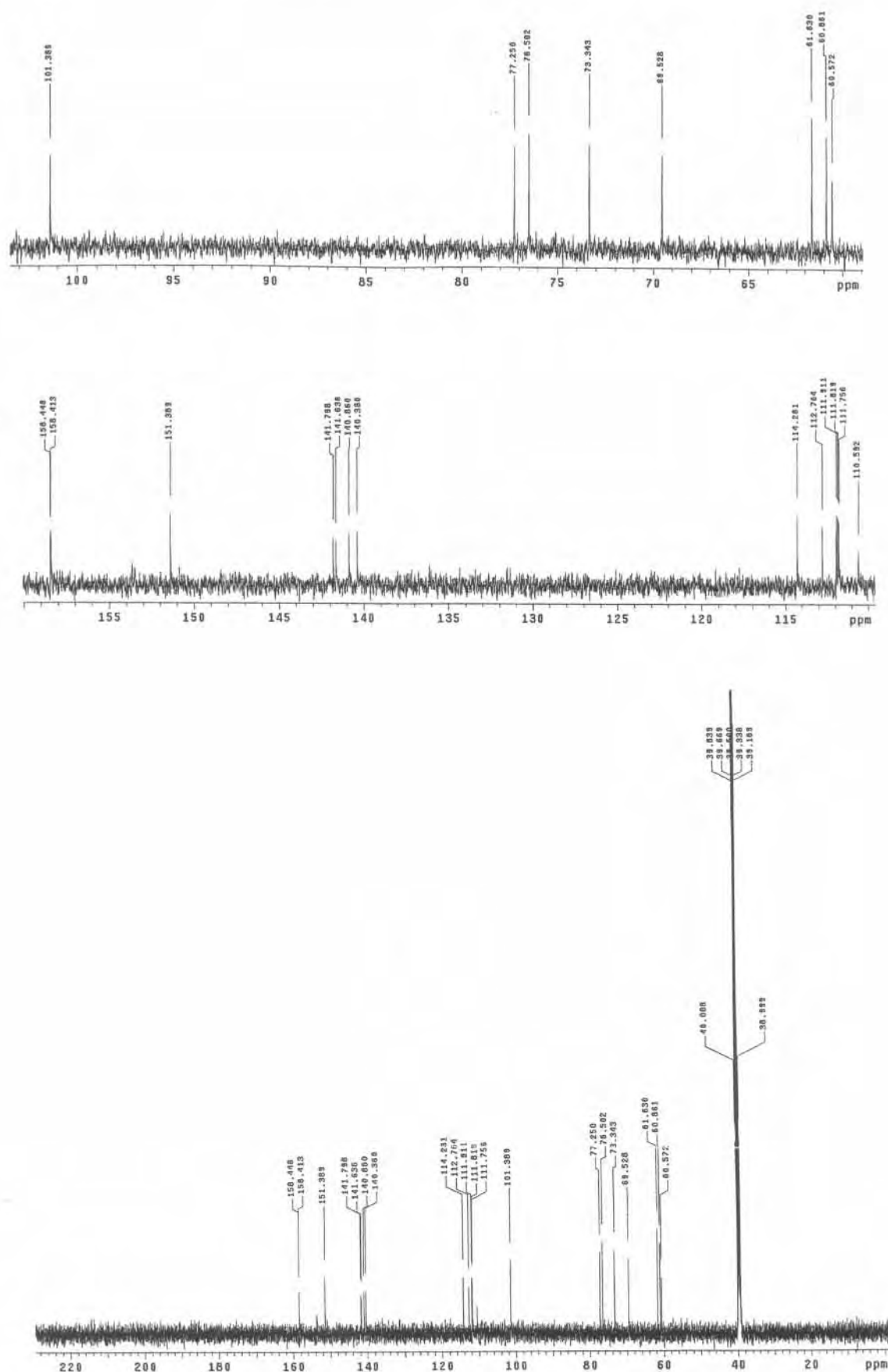


Espectro 29: Experimento $g\text{NOESY}$ 1D de **Qp1** (DMSO-d_6 , 11.7T).

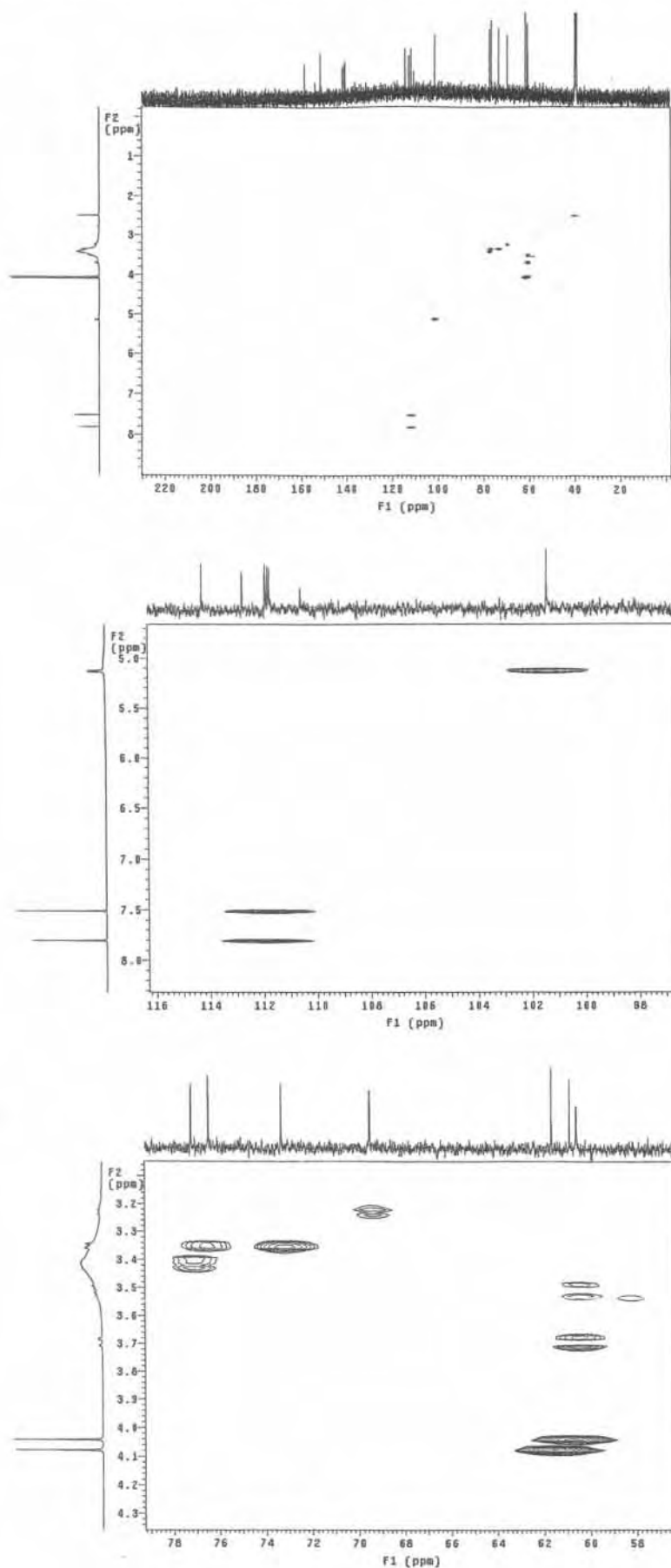
**Espectro 30:** Espectro de EM-ES (+40V) de **Qp1**.



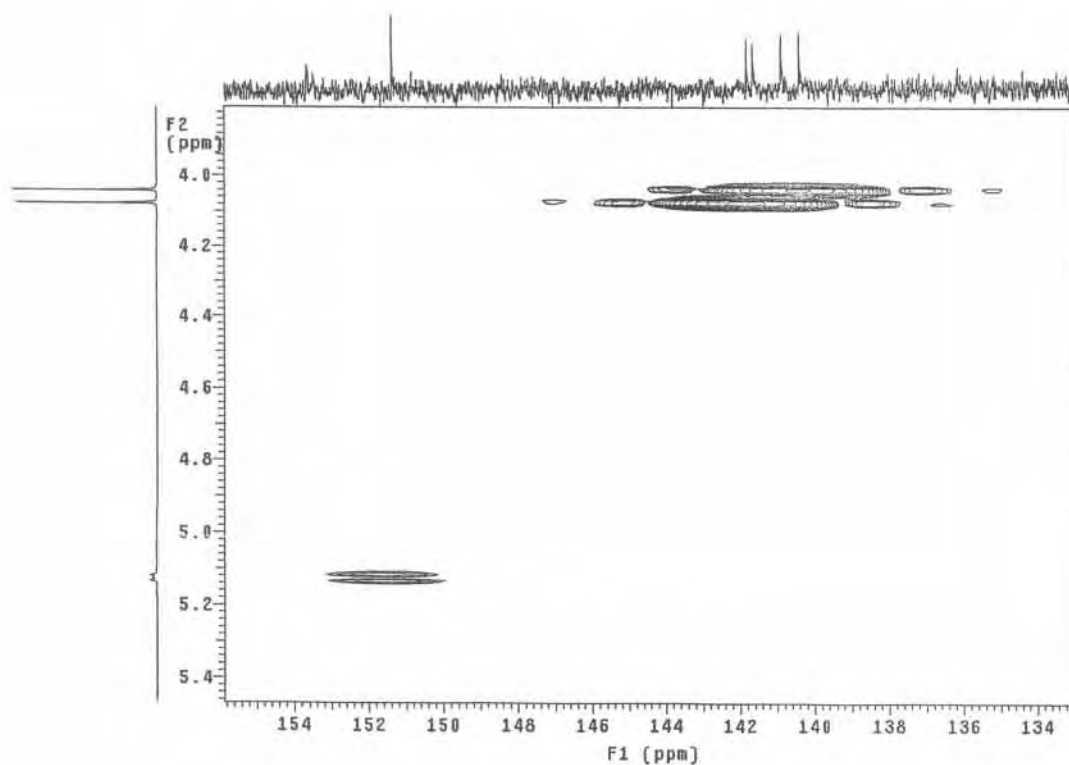
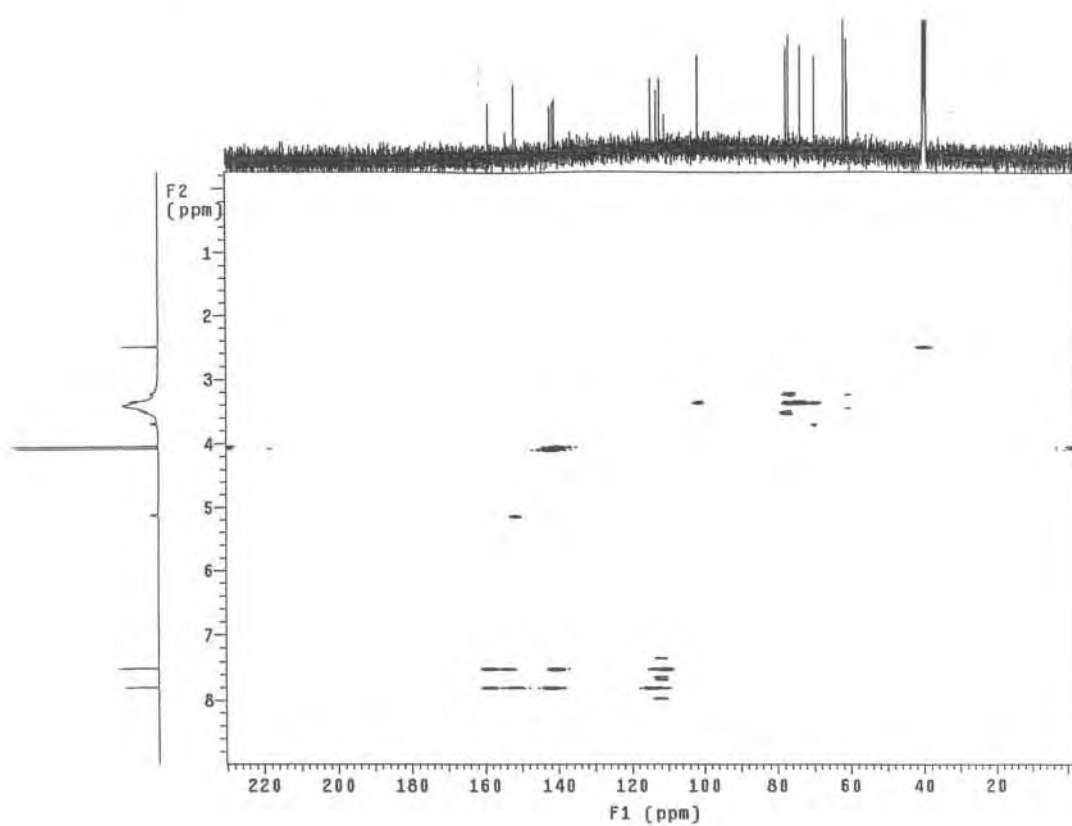
Espectro 31: Espectro de RMN- ^1H de **Qp5** (DMSO-d_6 , 11.7T).



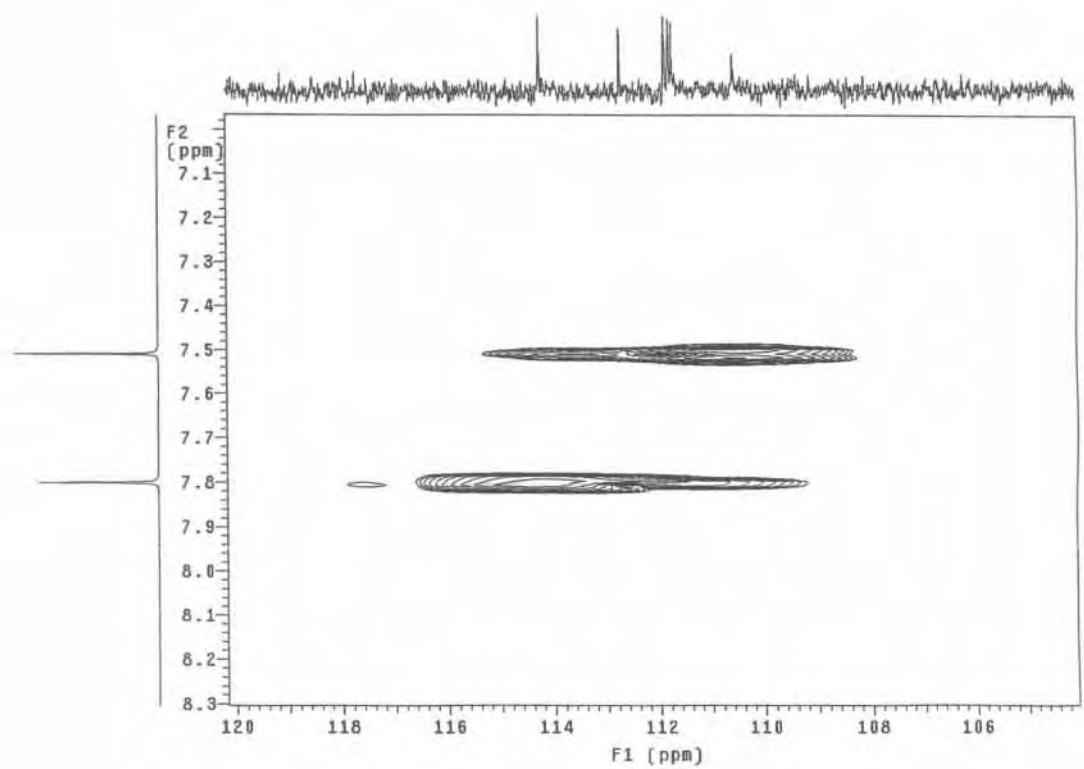
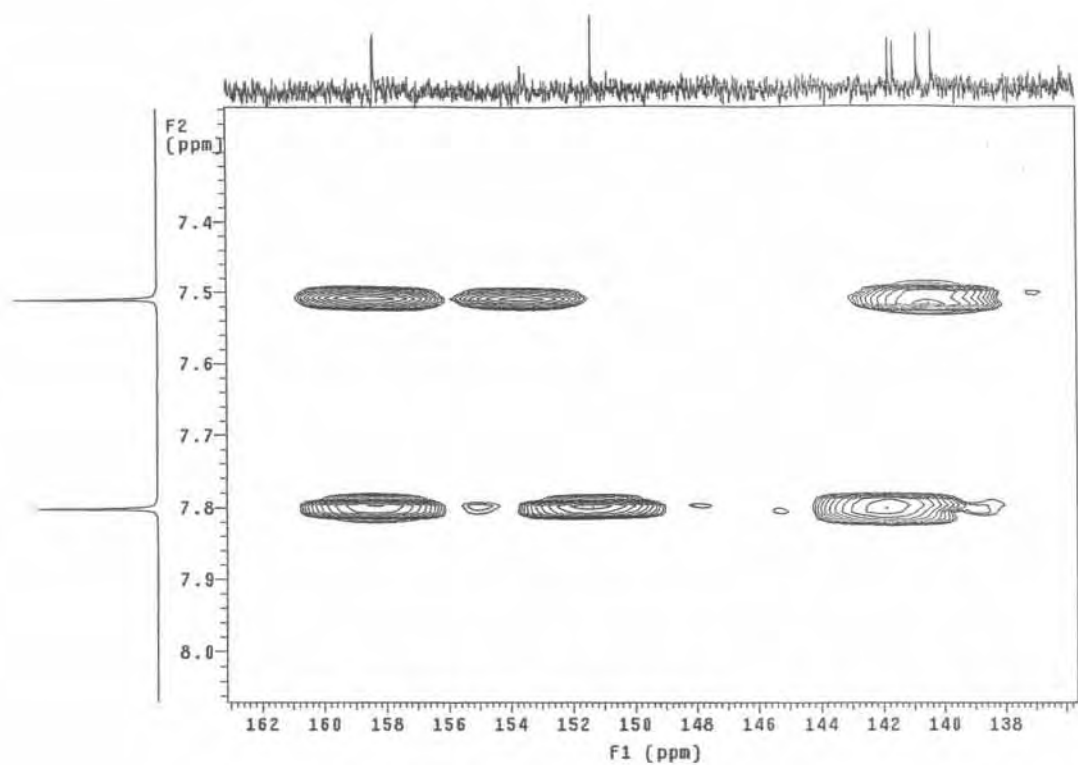
Espectro 32: Espectro de RMN- ^{13}C de Qp5 (DMSO- d_6 , 11.7T).



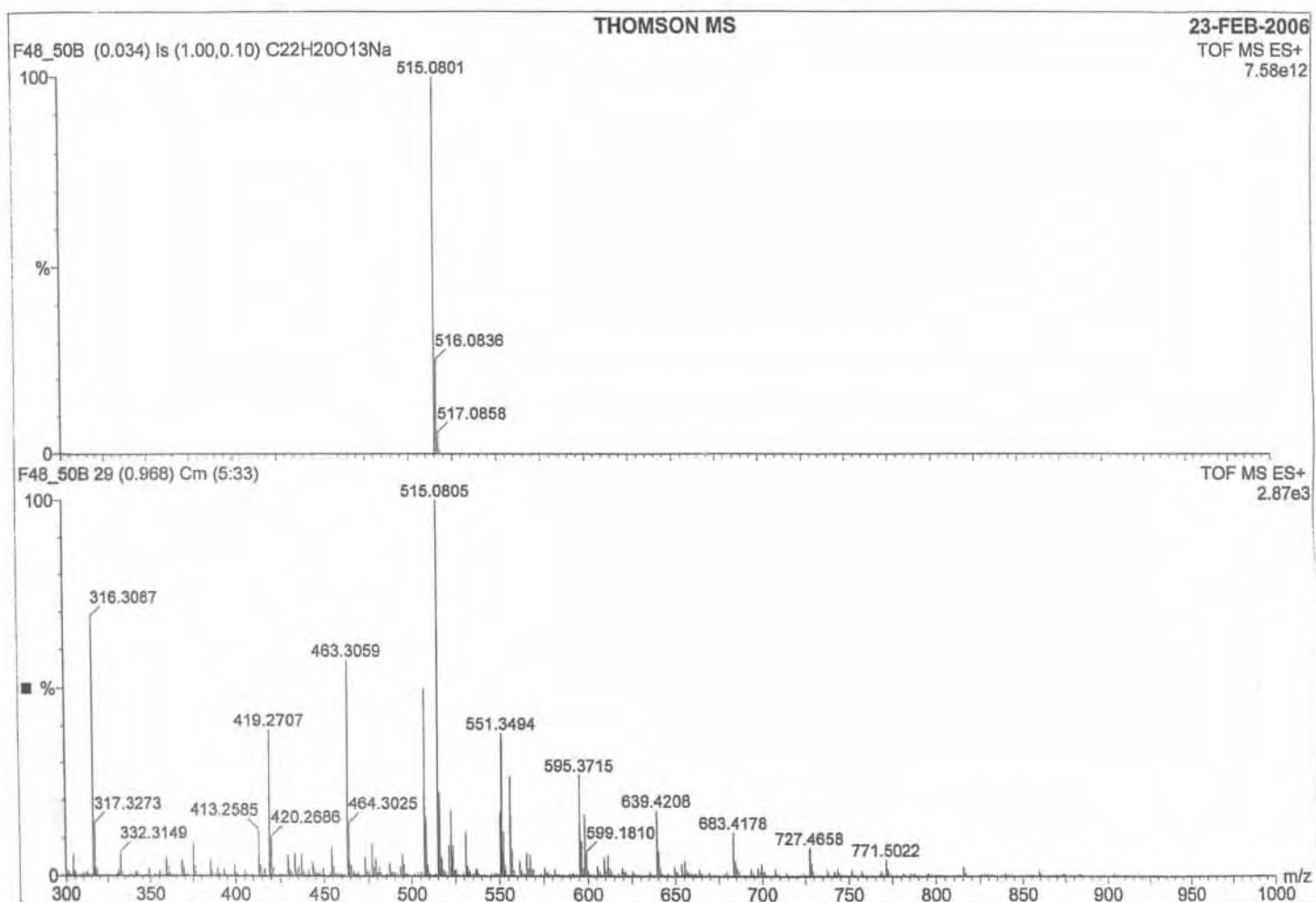
Espectro 33: Experimento gHMQC de **Qp5** (DMSO-d₆, 11.7T).



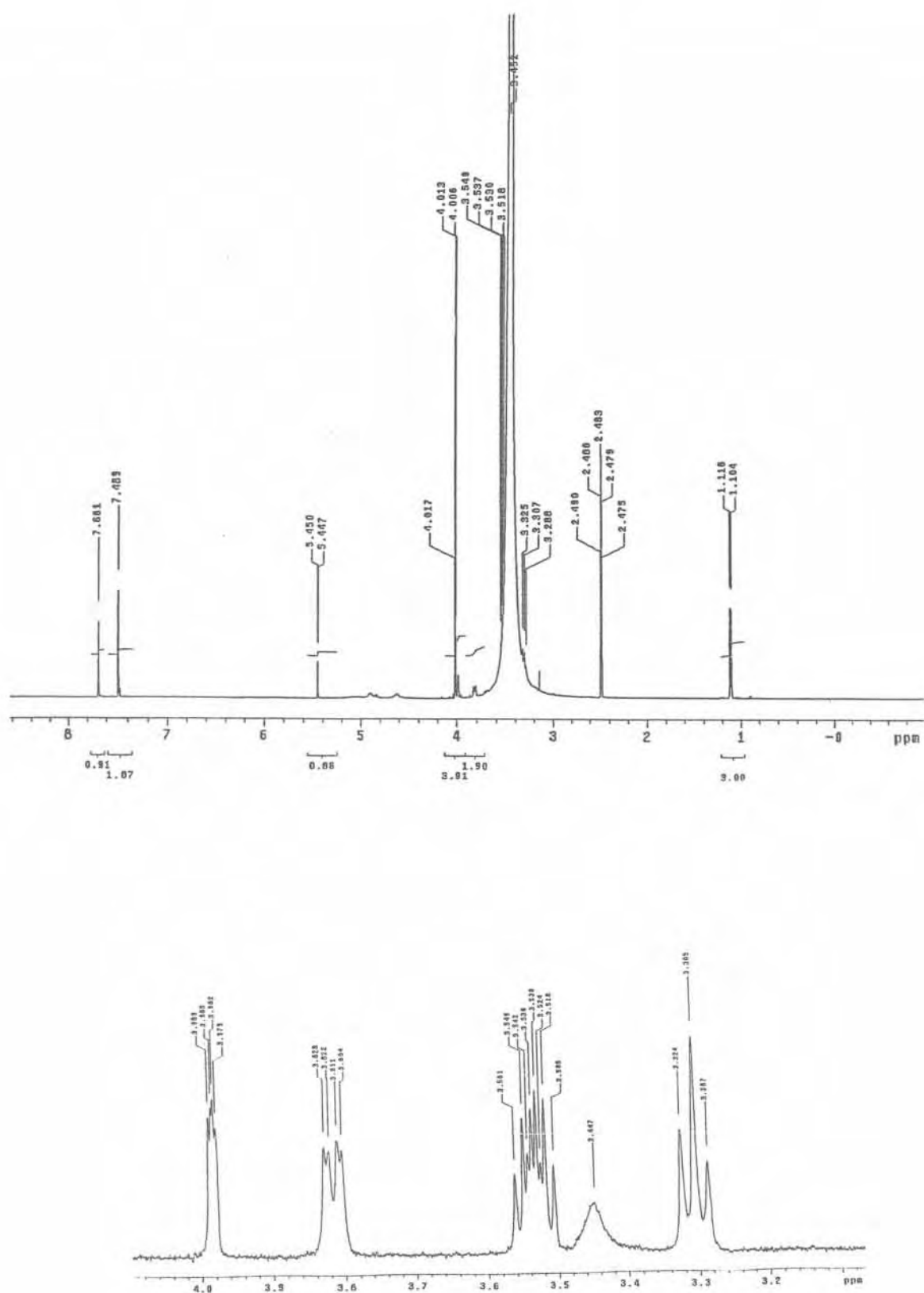
Espectro 34: Experimento gHMBC de **Qp5** (DMSO-d₆, 11.7T).



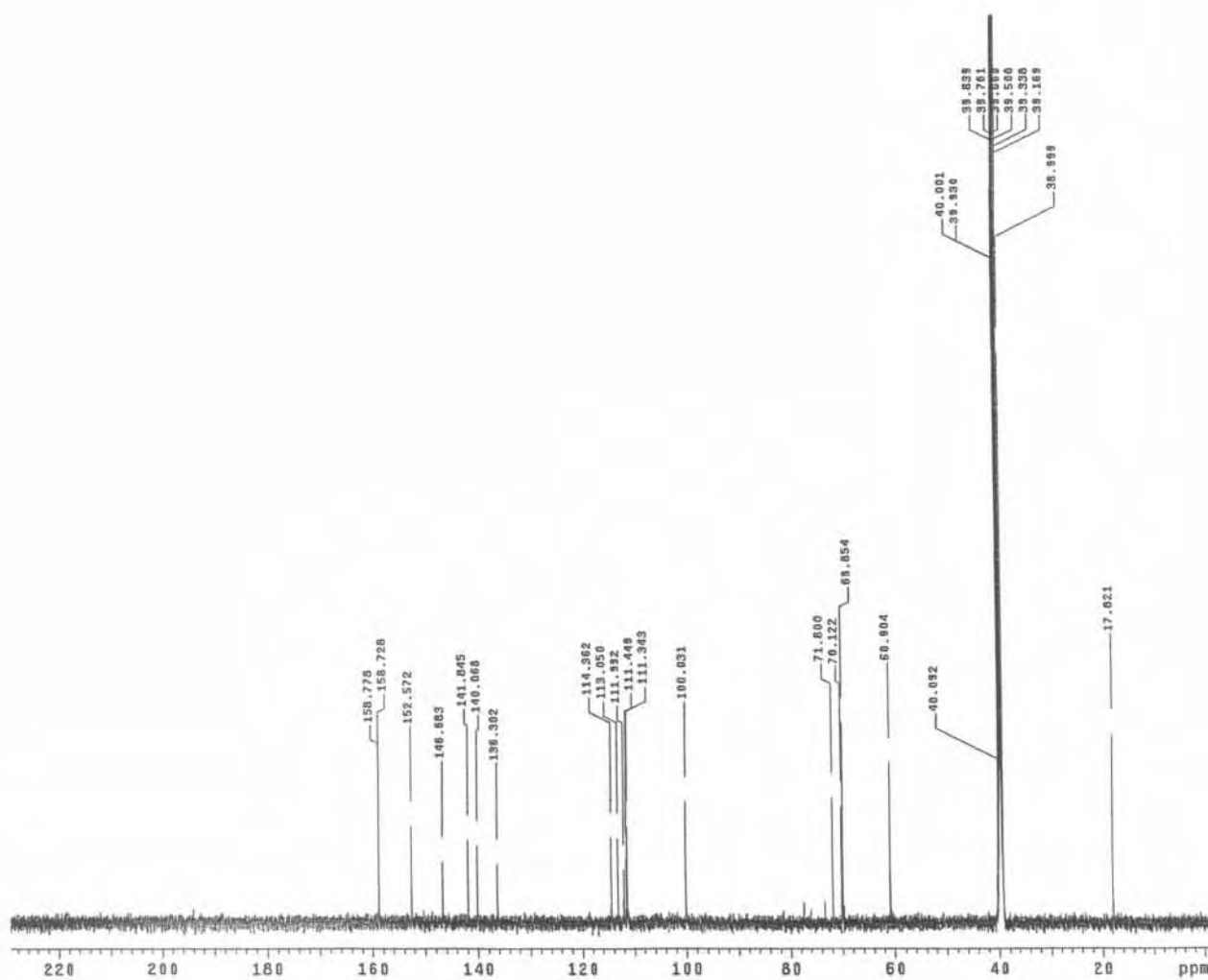
Espectro 35: Experimento g HMBC de **Qp5** (DMSO-d_6 , 11.7T).



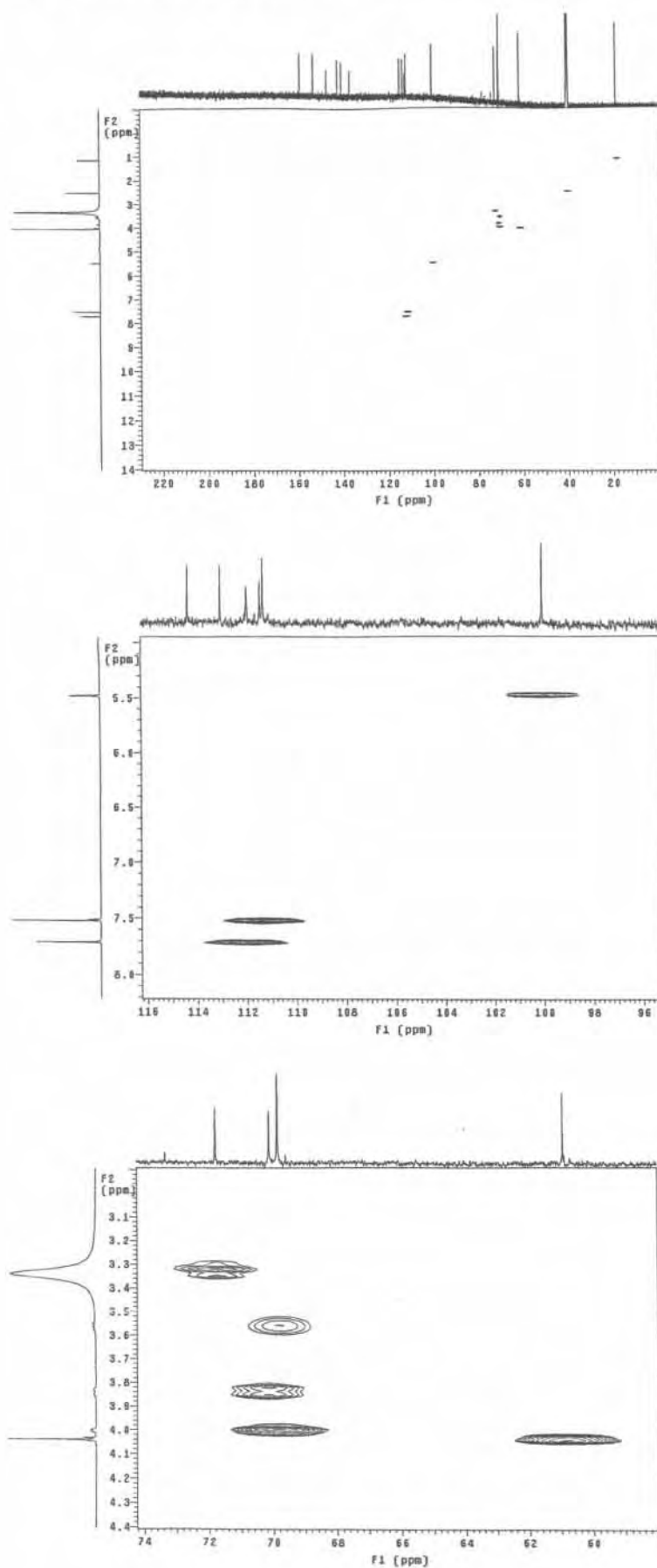
Espectro 36: Espectro de EM-ES (+40V) de Qp5.



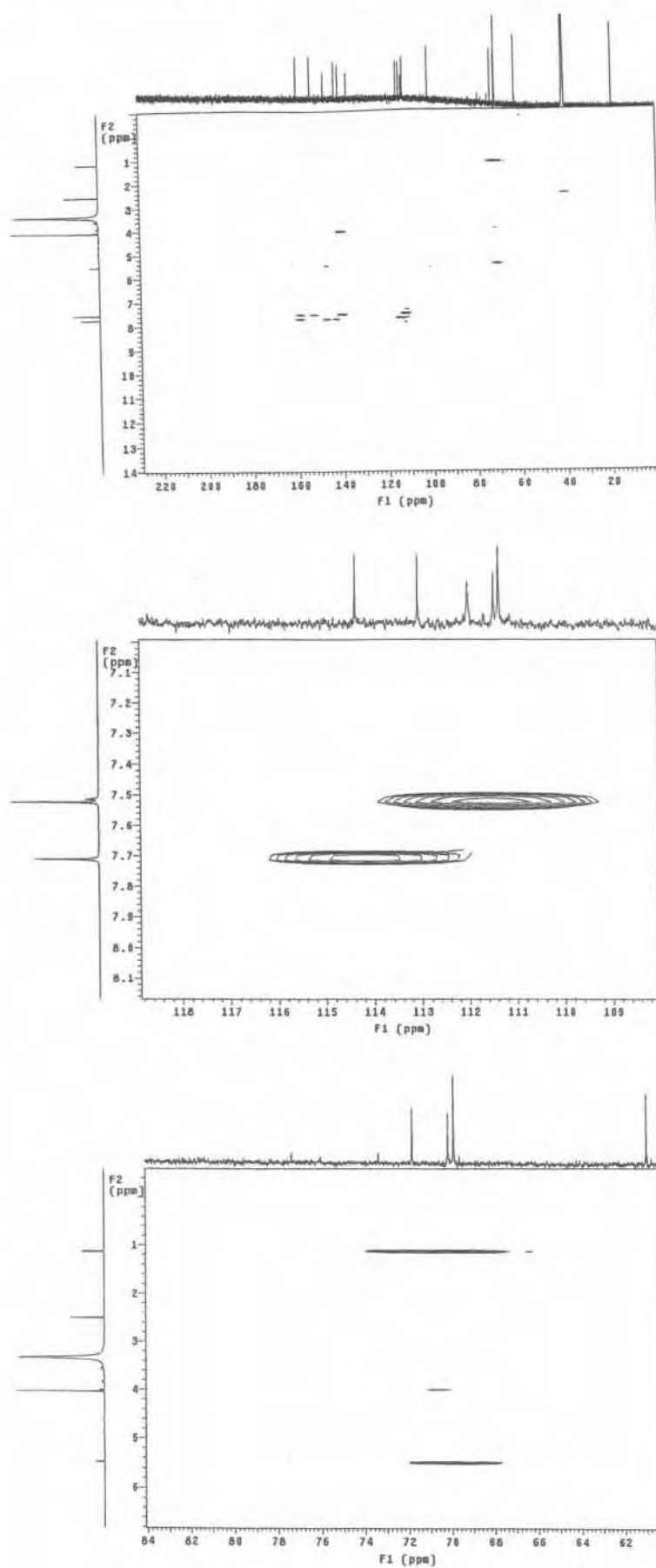
Espectro 37: Espectro de RMN- ^1H de **Qp6** (DMSO-d_6 , 11.7T).



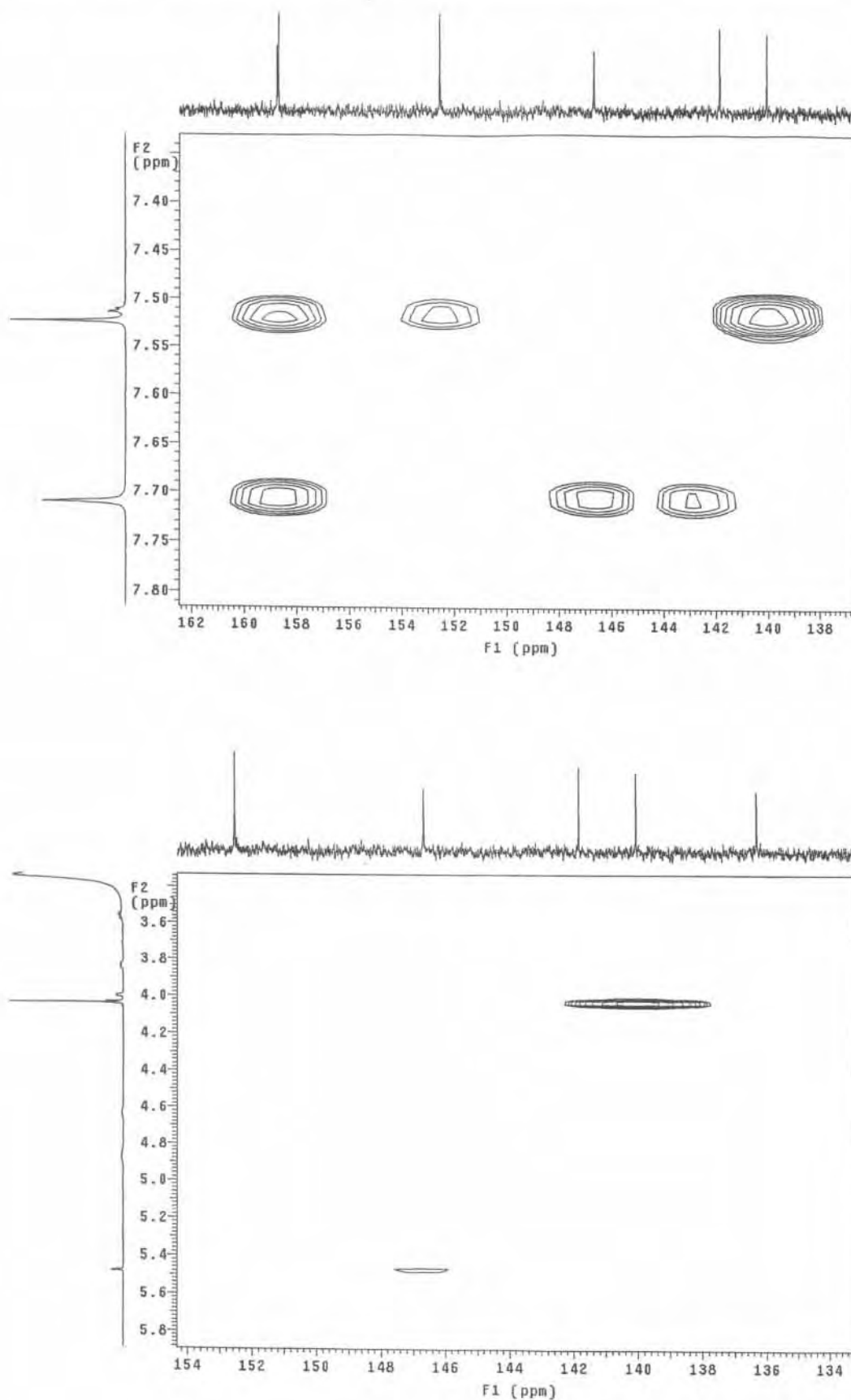
Espectro 38: Espectro de RMN-¹³C de **Qp6** (DMSO-d₆, 11.7T).



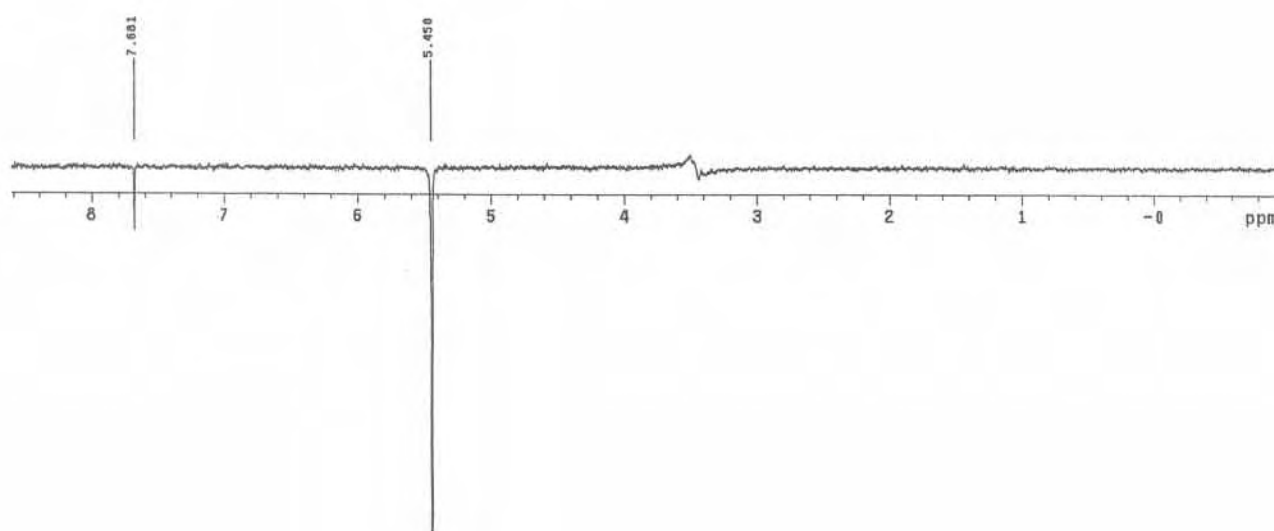
Espectro 39: Experimento gHMQC de **Qp6** (DMSO-d₆, 11.7T).



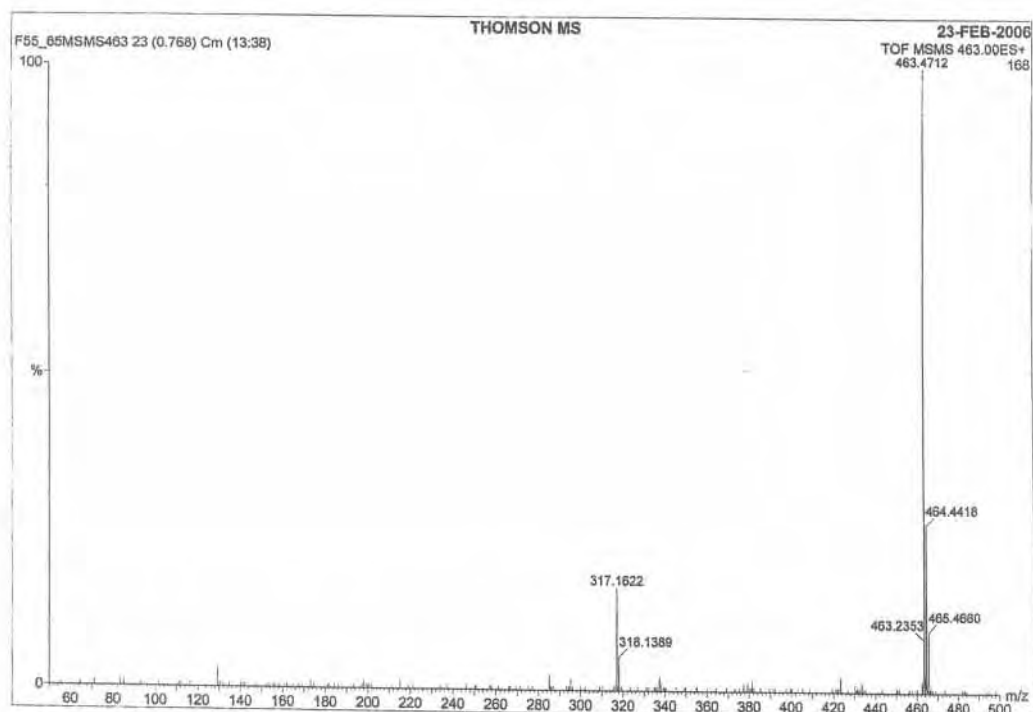
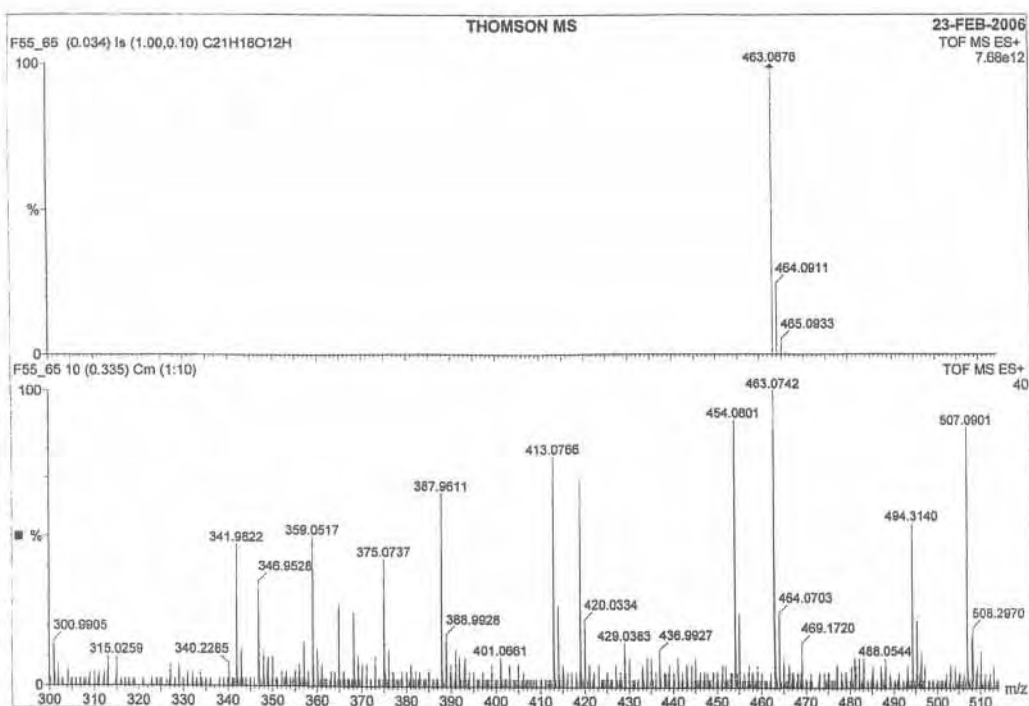
Espectro 40: Experimento g HMBC de **Qp6** (DMSO-d_6 , 11.7T).



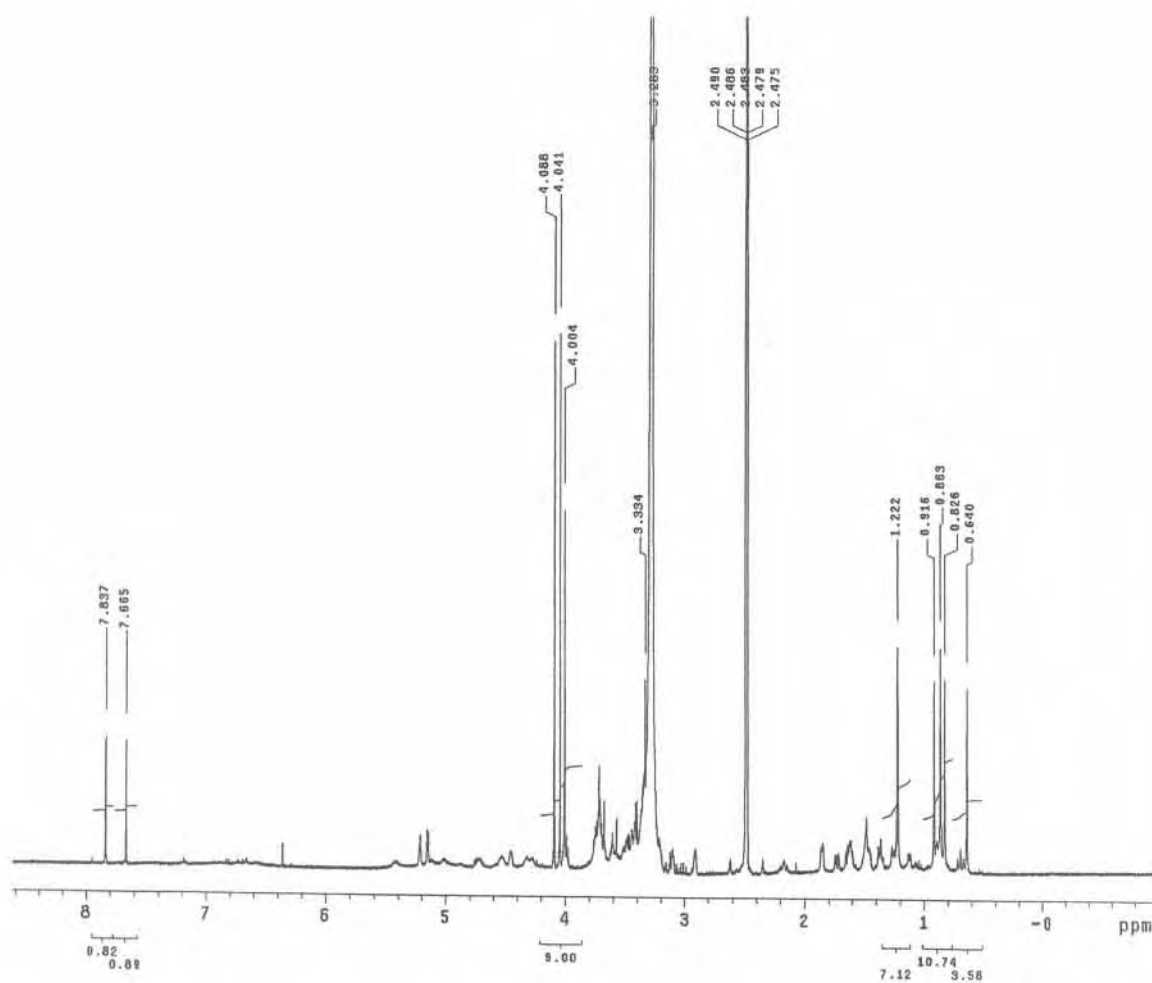
Espectro 41: Experimento g HMBC de **Qp6** (DMSO-d_6 , 11.7T).



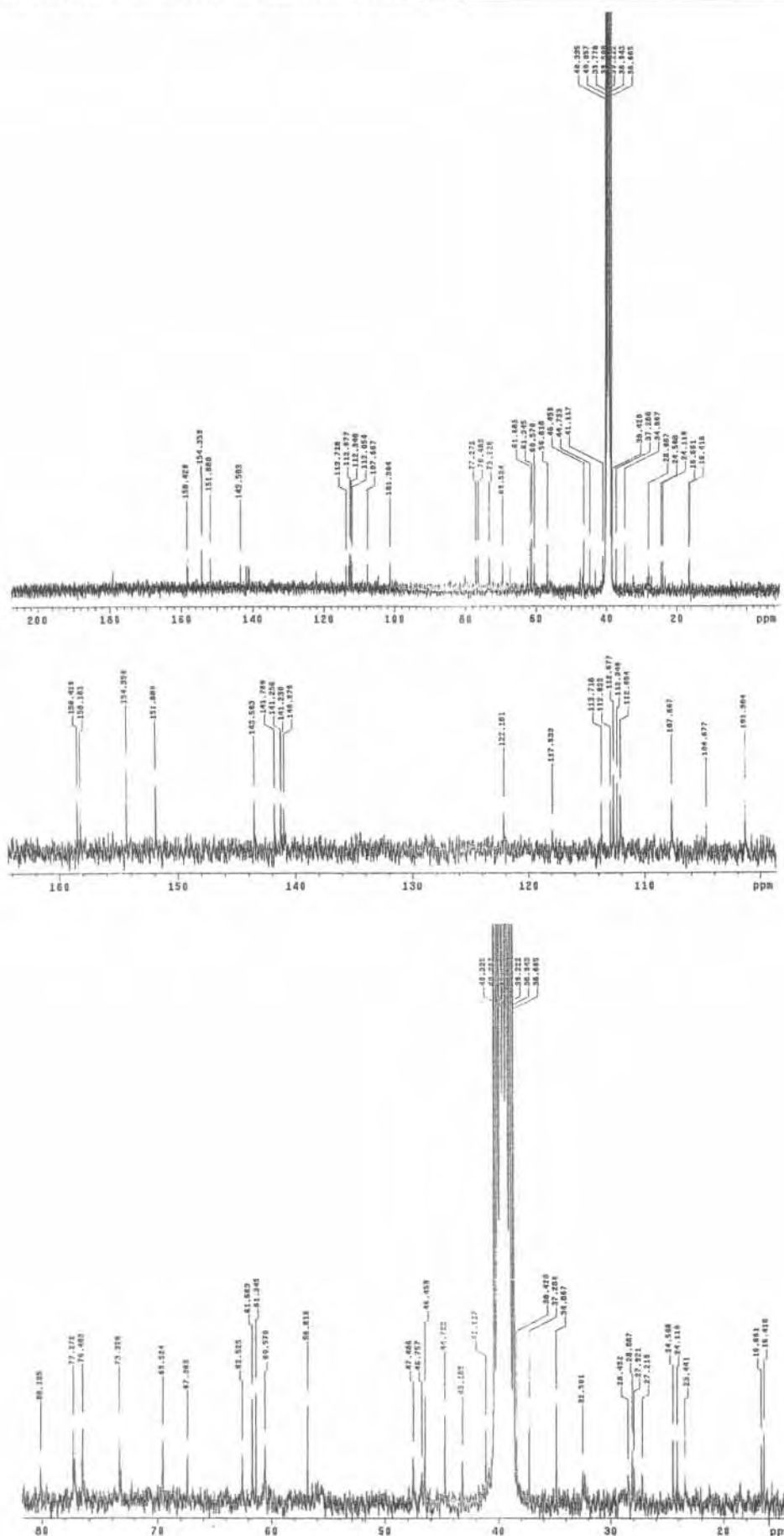
Espectro 42: Experimento *g*NOESY 1D de **Qp6** (DMSO- d_6 , 11.7T).



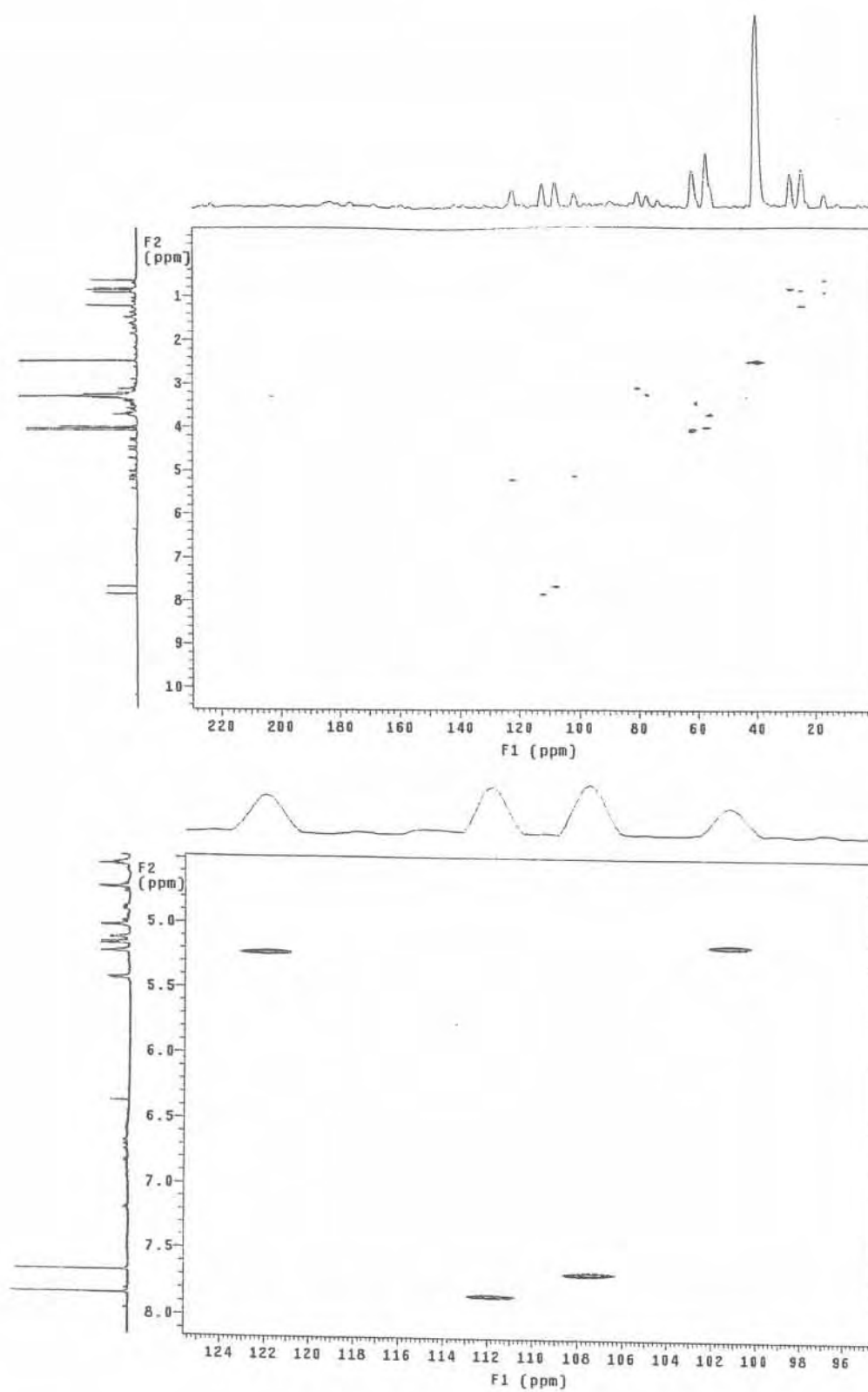
Espectro 43: Espectro de massas (+40V) de **Qp5** e MS² do íon m/z 463.0742.



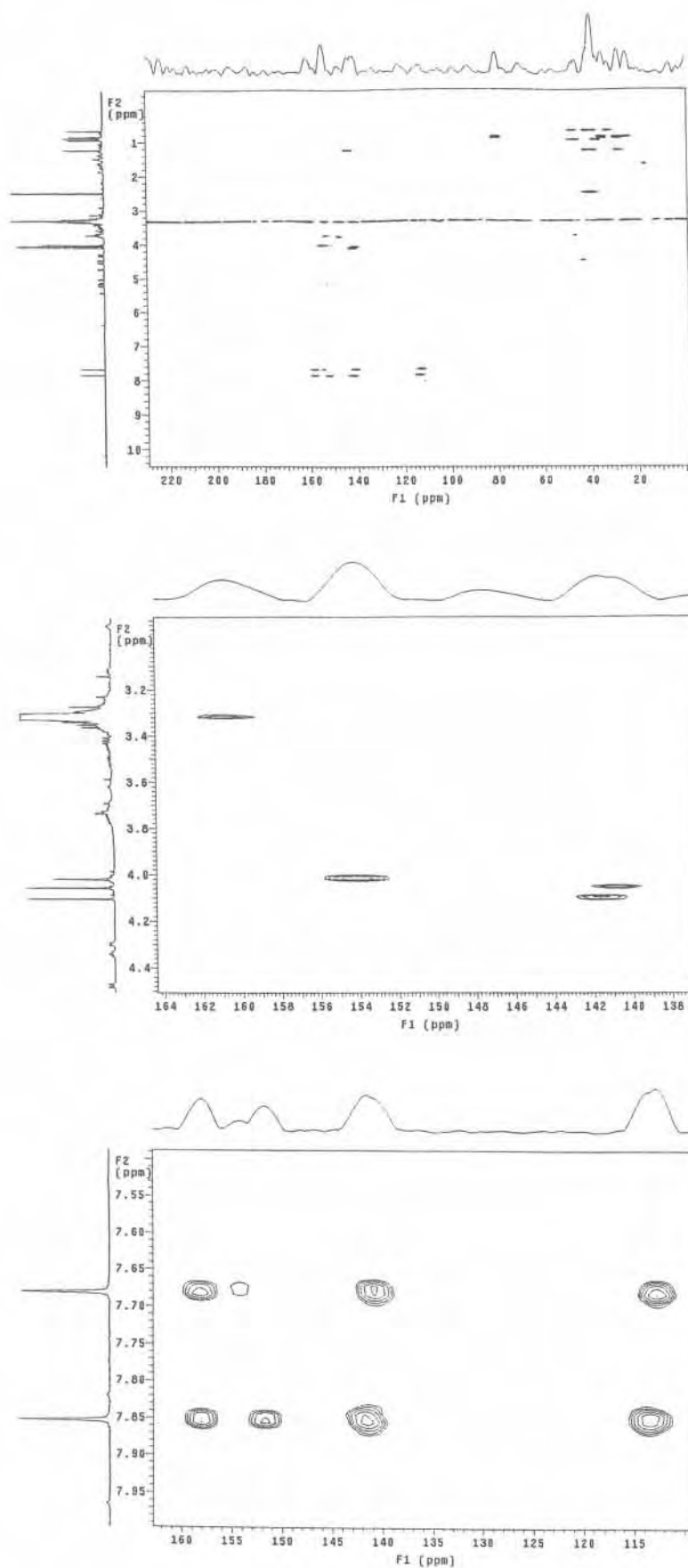
Espectro 44: Espectro de RMN- ^1H de **Qp7** contendo **Qp2** (DMSO-d_6 , 11.7T).



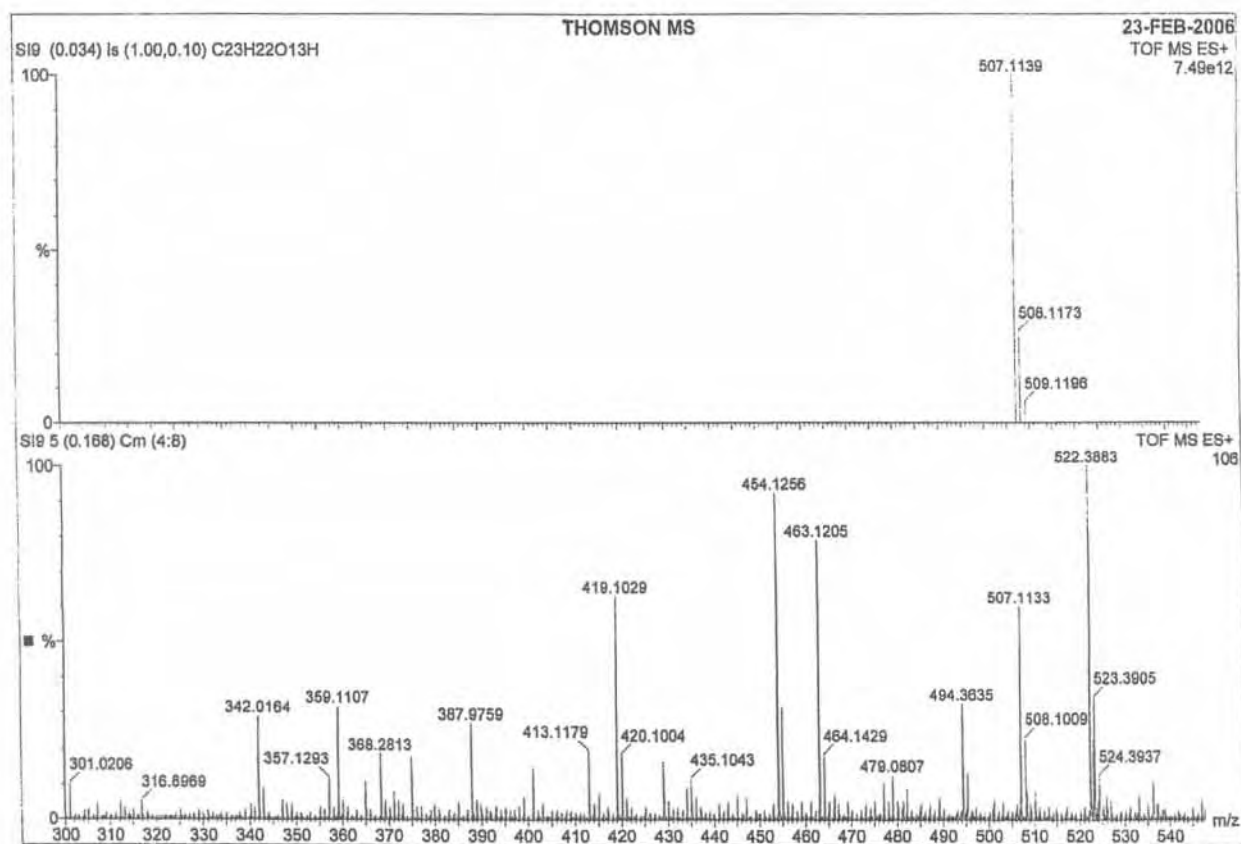
Espectro 45: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp7** contendo **Qp2** (DMSO-d_6 , 11.7T).

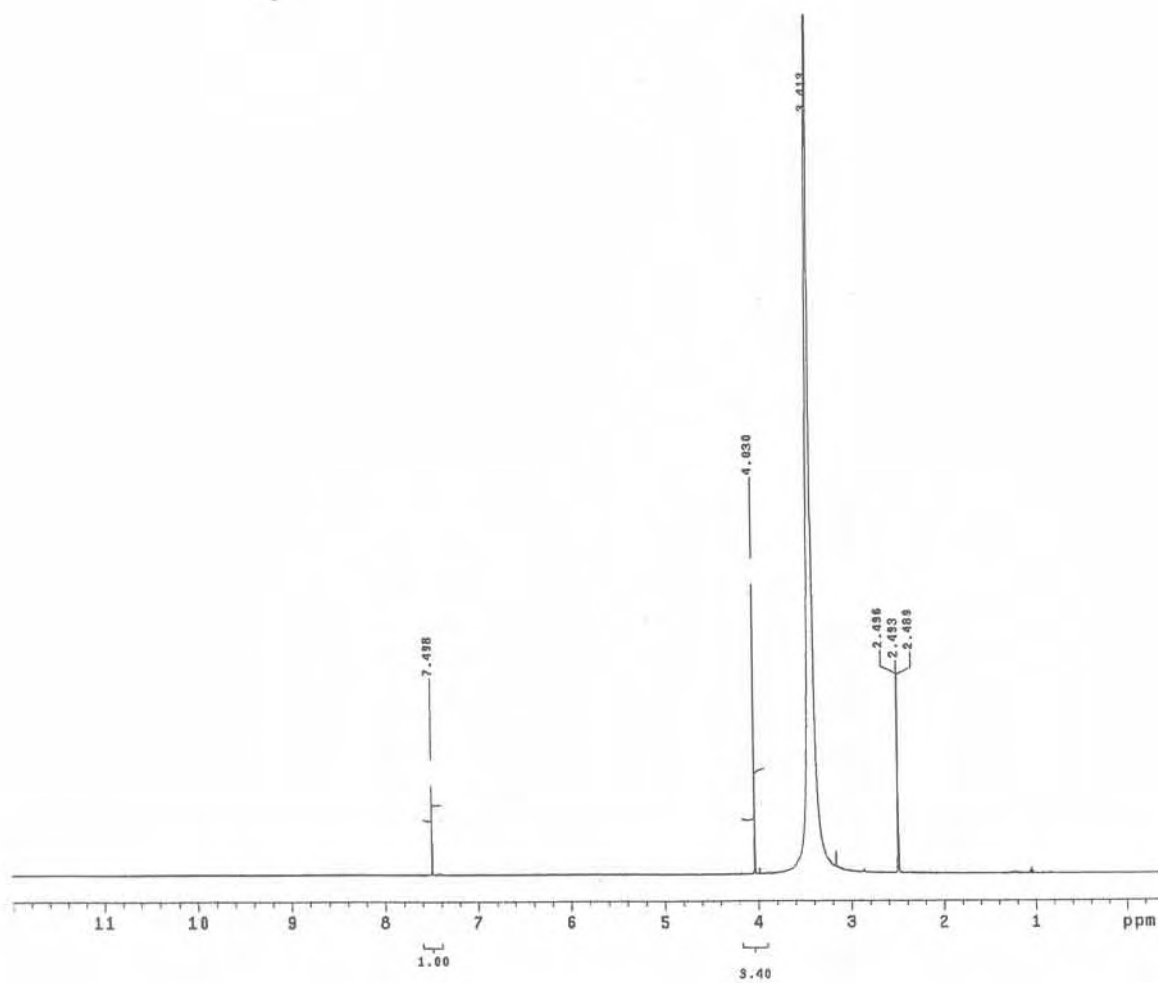


Espectro 46: Experimento gHMQC de **Qp7** (DMSO-d₆, 11.7T).

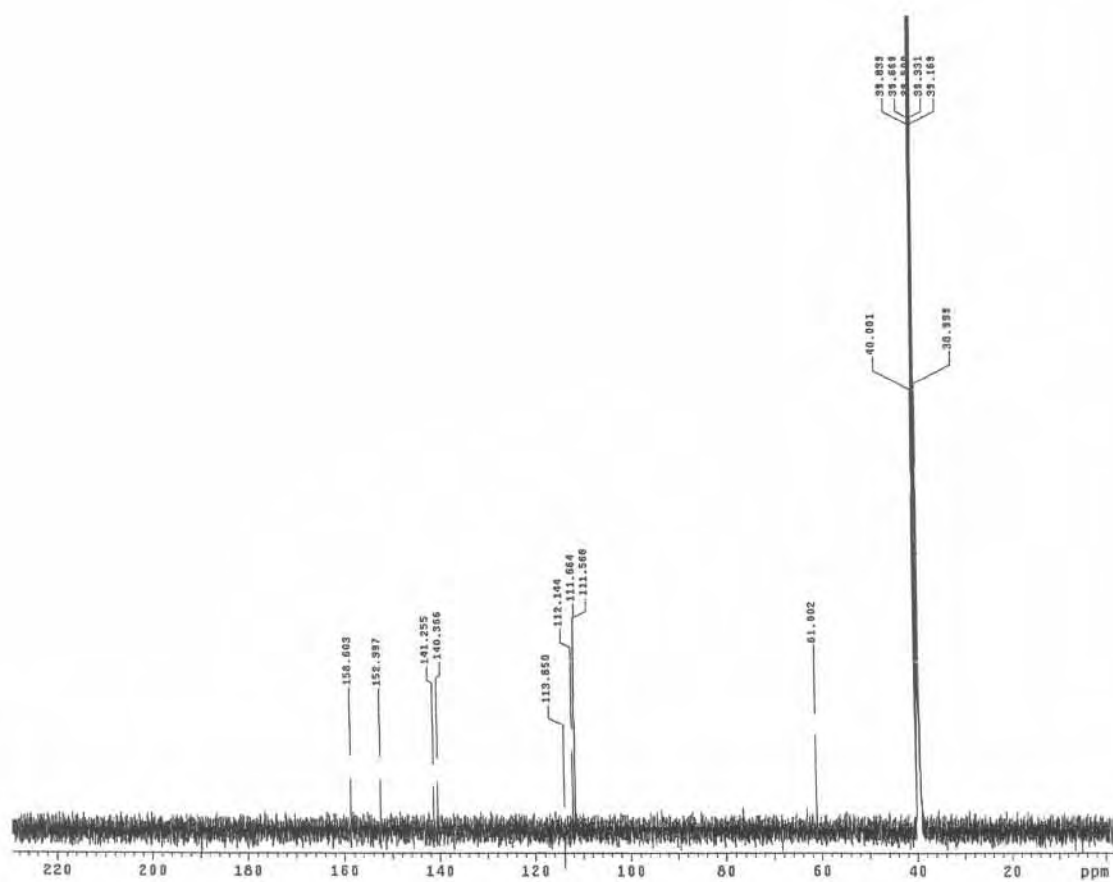
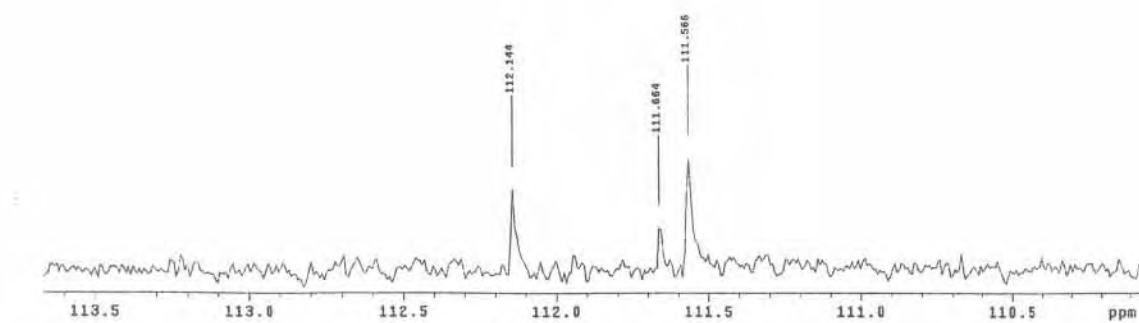


Espectro 47: Experimento gHMBC de **Qp7** (DMSO-d₆, 11.7T).

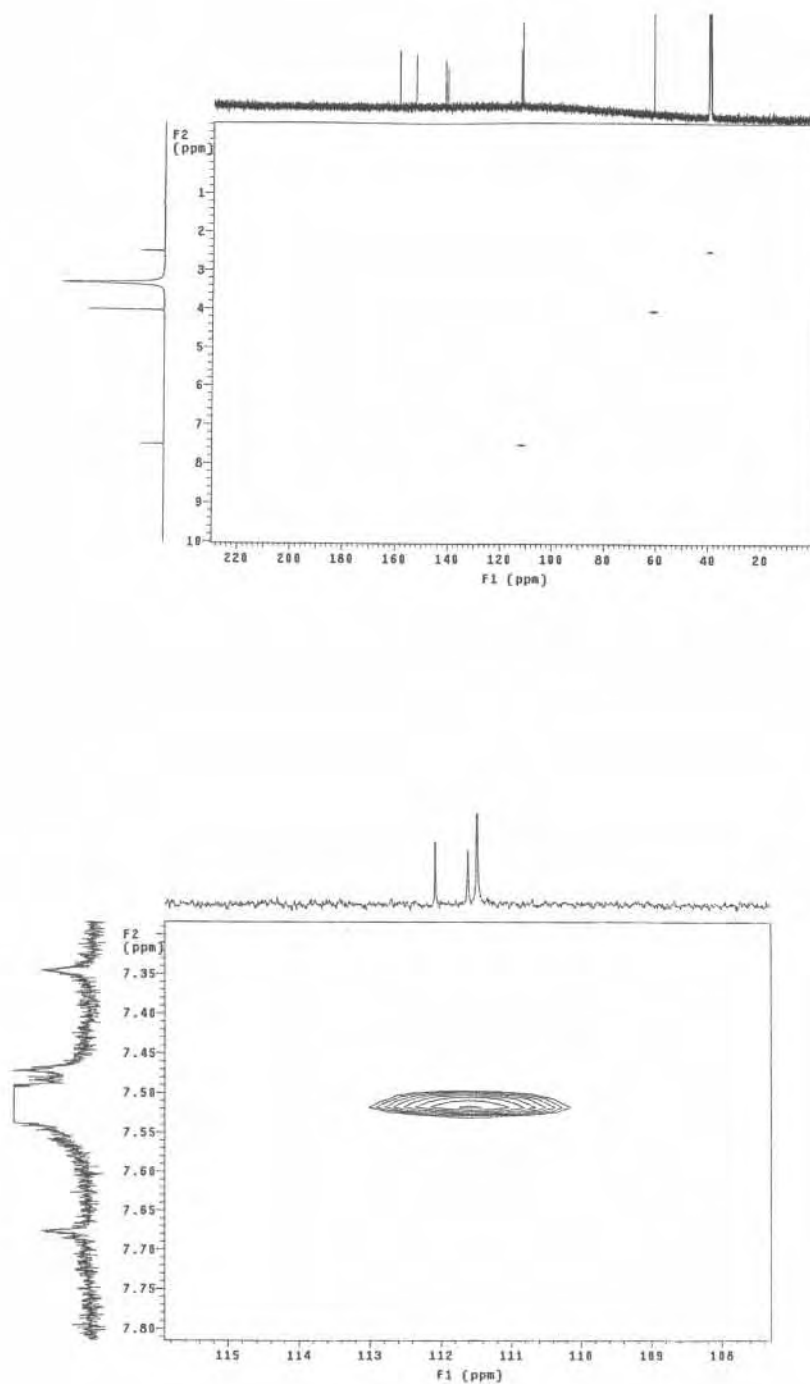
**Espectro 48:** Espectro de massas (+40V) de **Qp6**.



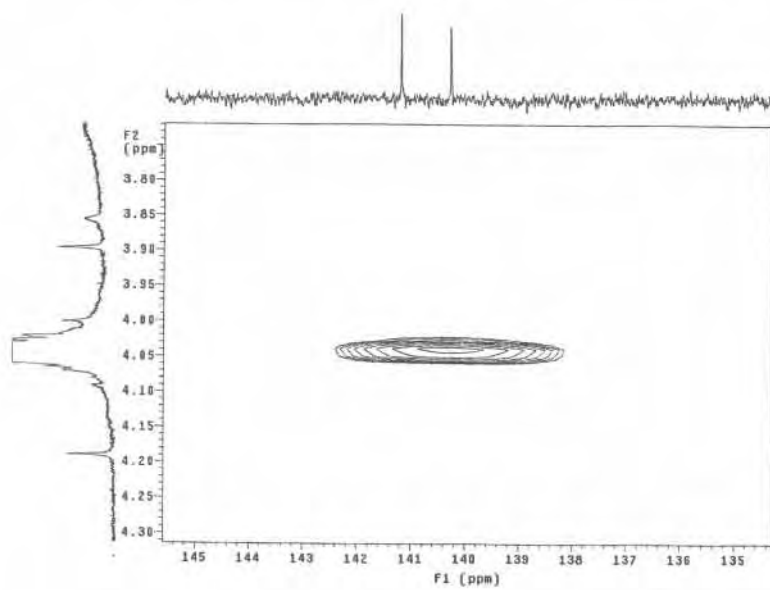
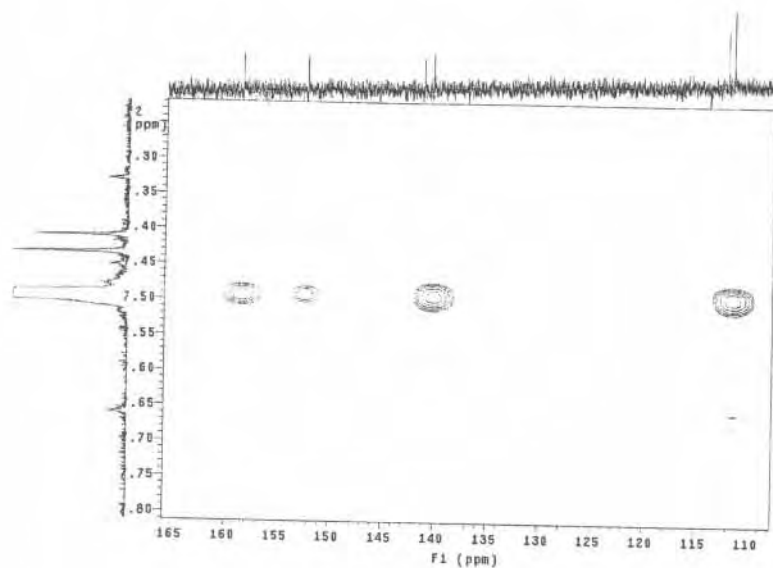
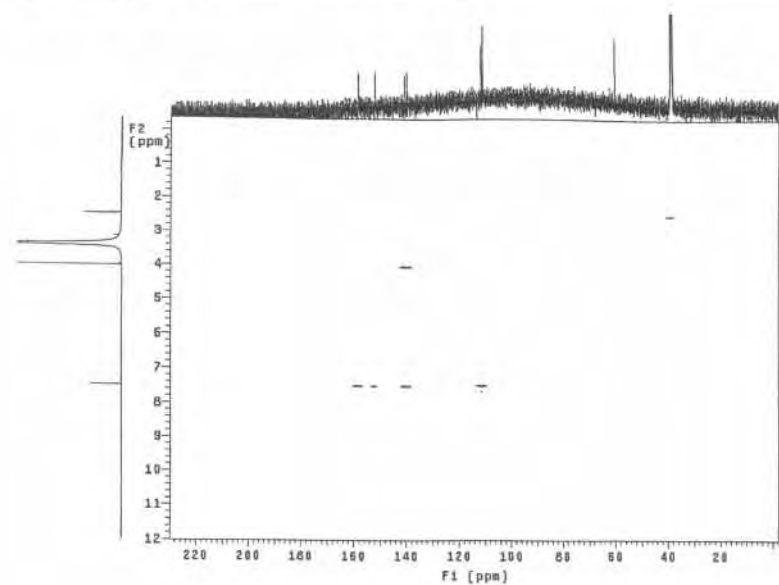
Espectro 49: Espectro de RMN- ^1H de **Qp8** (DMSO-d_6 , 11.7T).



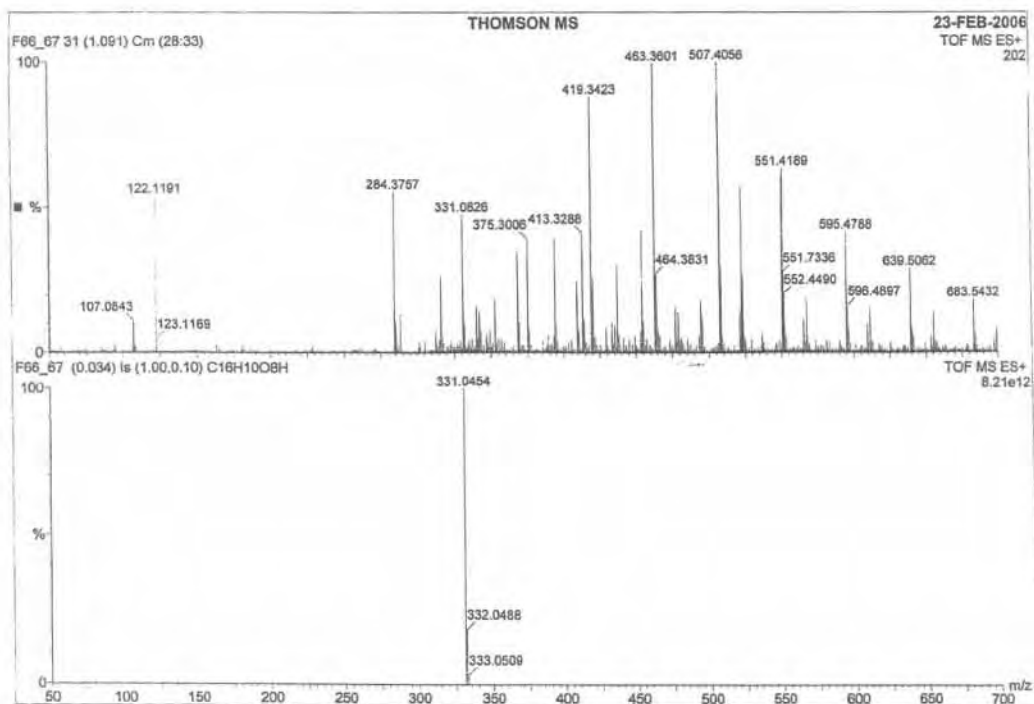
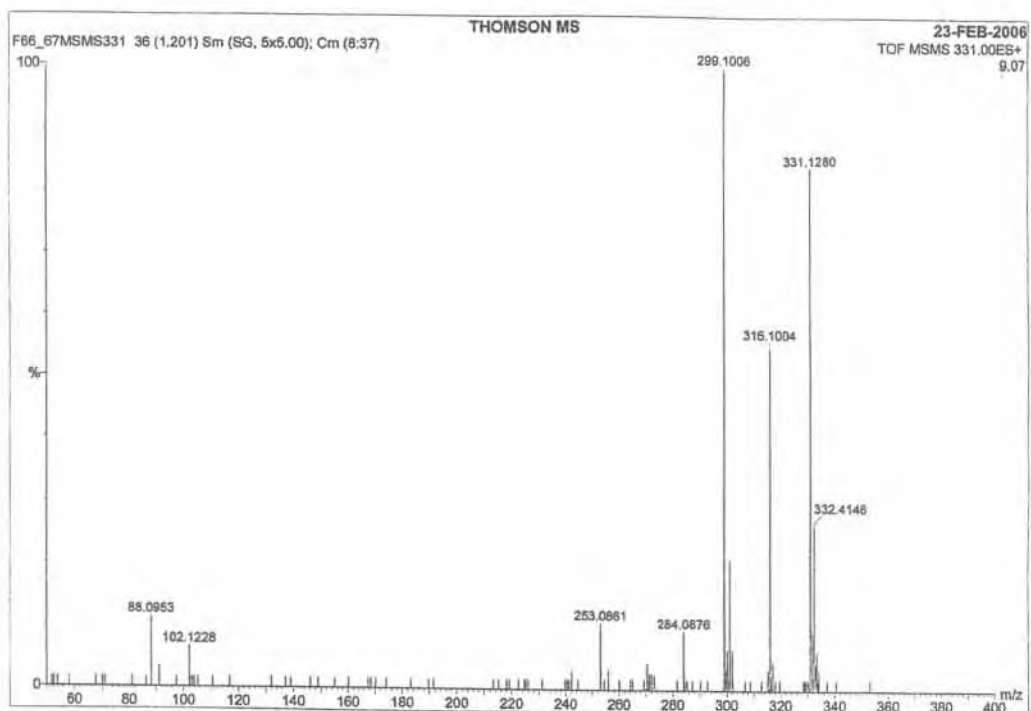
Espectro 50: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp8** (DMSO- d_6 , 11.7T).



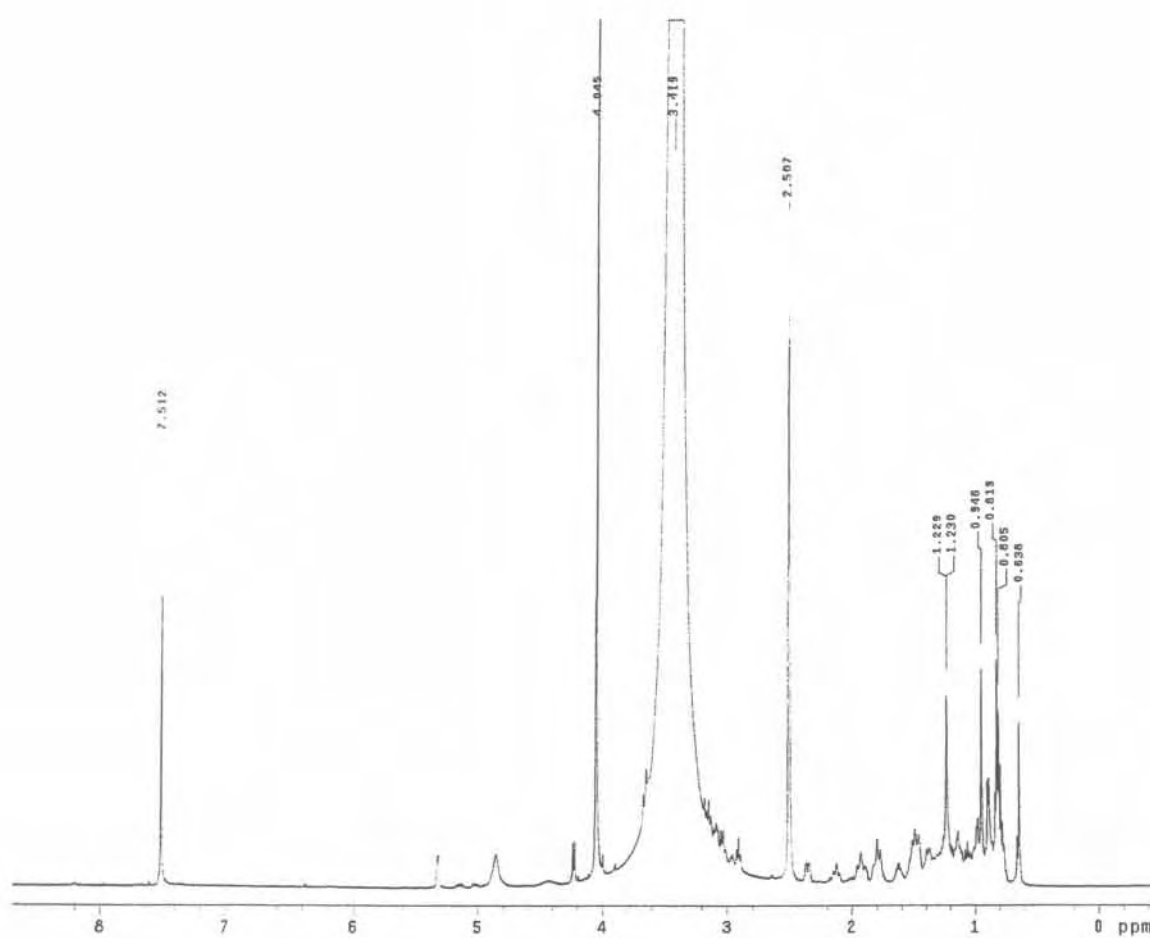
Espectro 51: Experimento gHMQC de **Qp8** (DMSO-d₆, 11.7T).



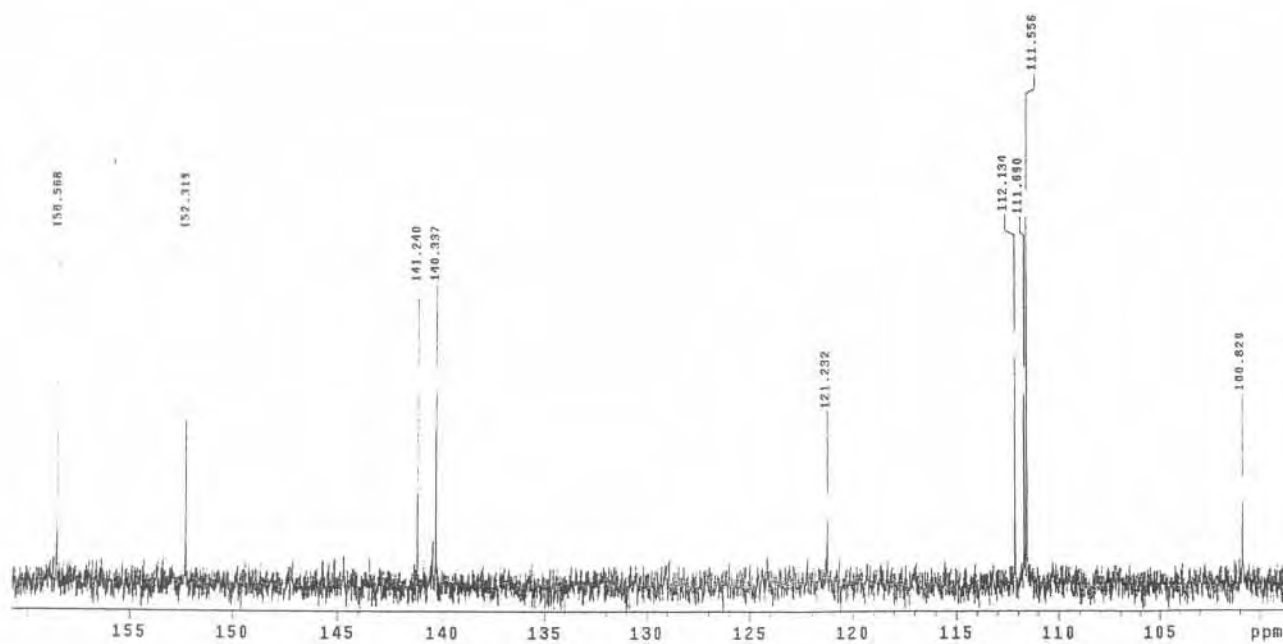
Espectro 52: Experimento gHMBC de **Qp8** (DMSO-d₆, 11.7T).



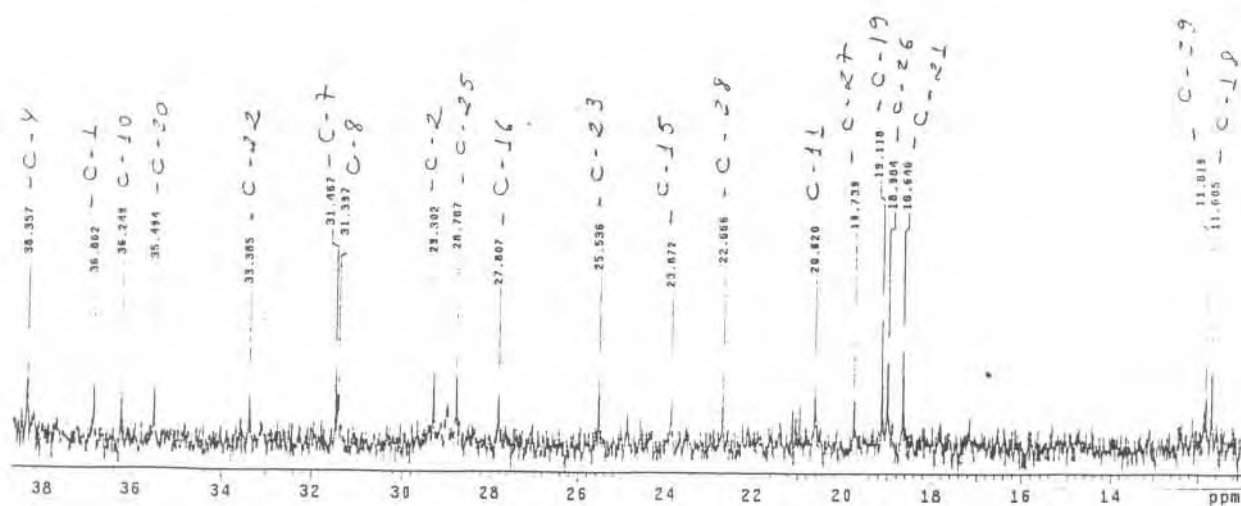
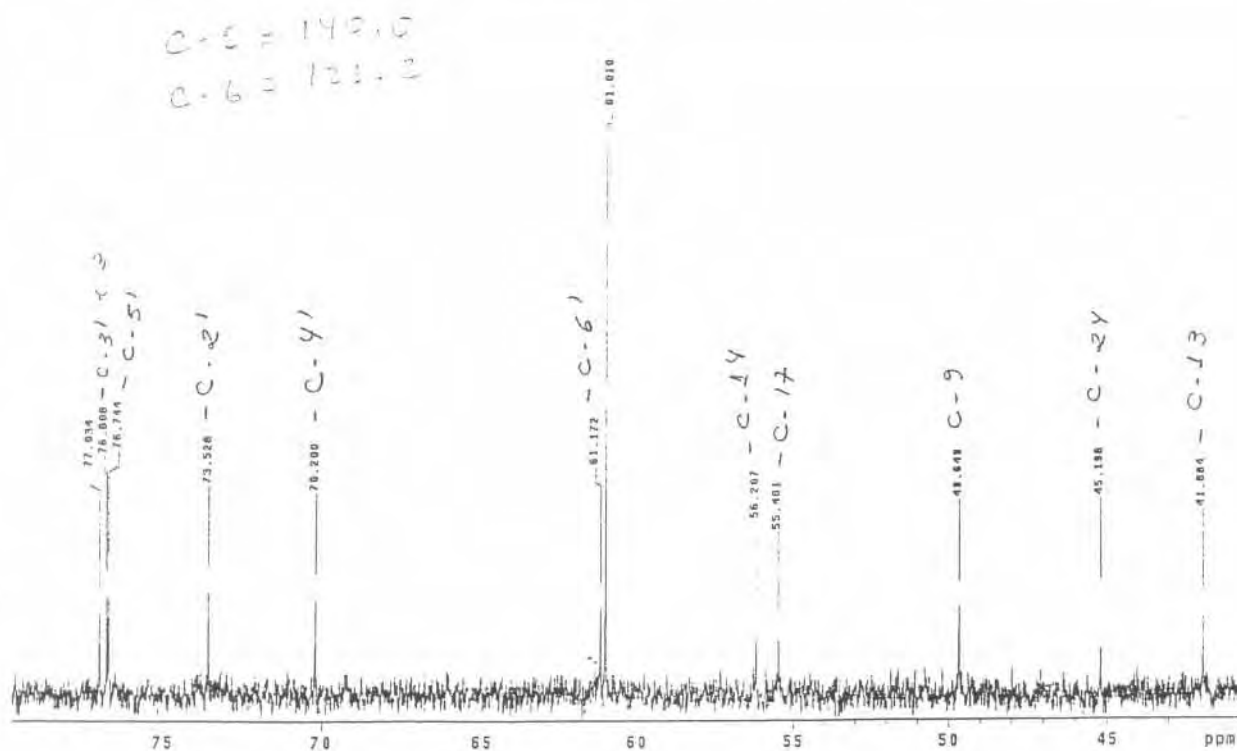
Espectro 53: Espectro de massas (+40V) de **Qp8** e MS2 do íon em m/z 331.0454.



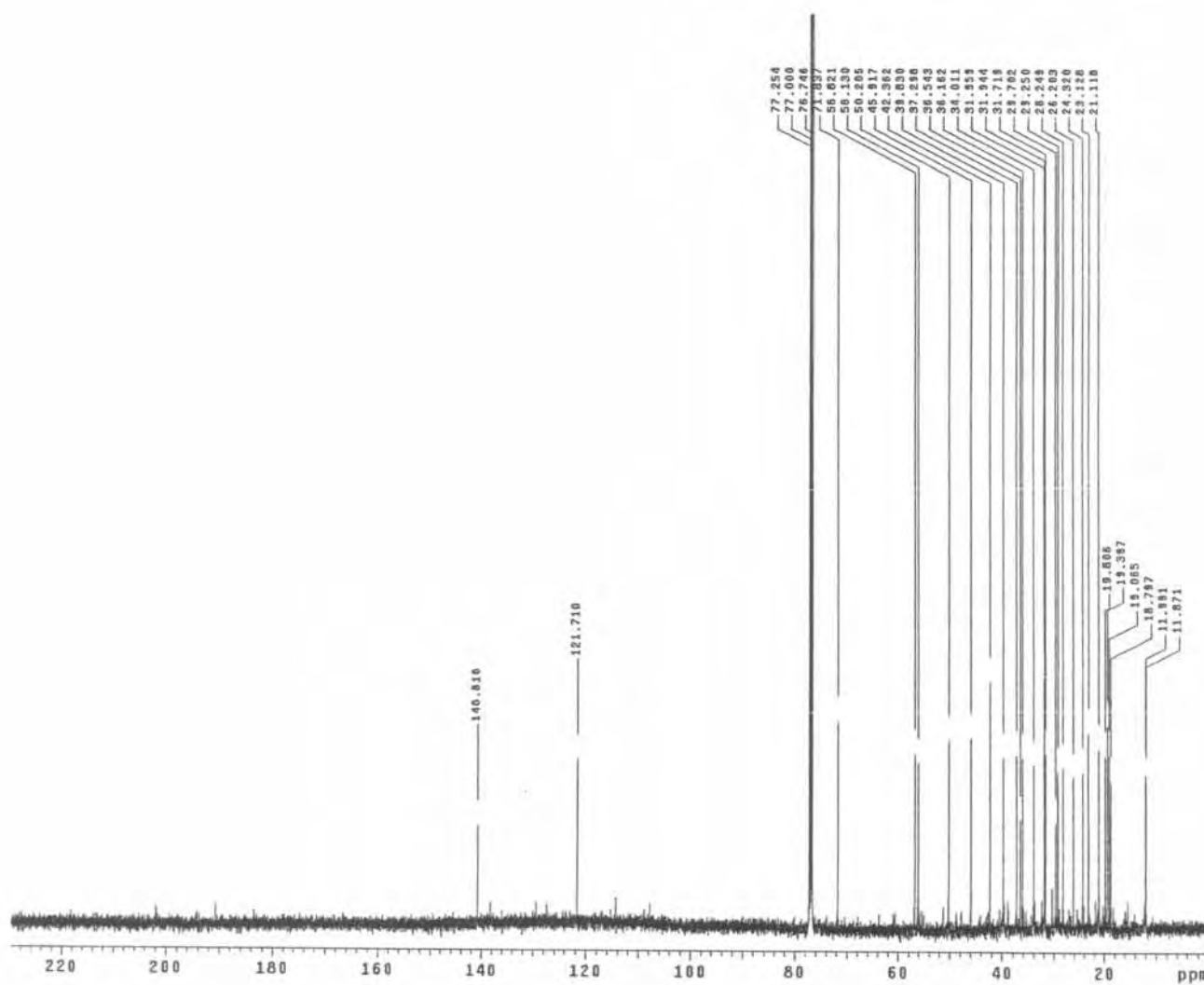
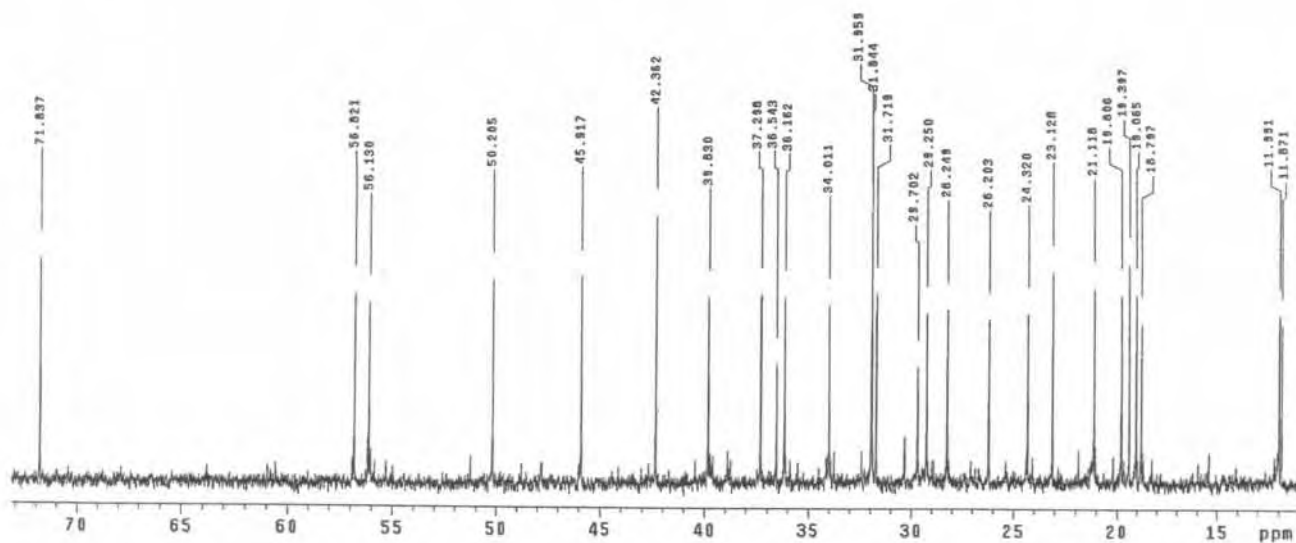
Espectro 54: Espectro de RMN- ^1H de **Qp9** contendo **Qp8** (DMSO- d_6 , 11.7T).



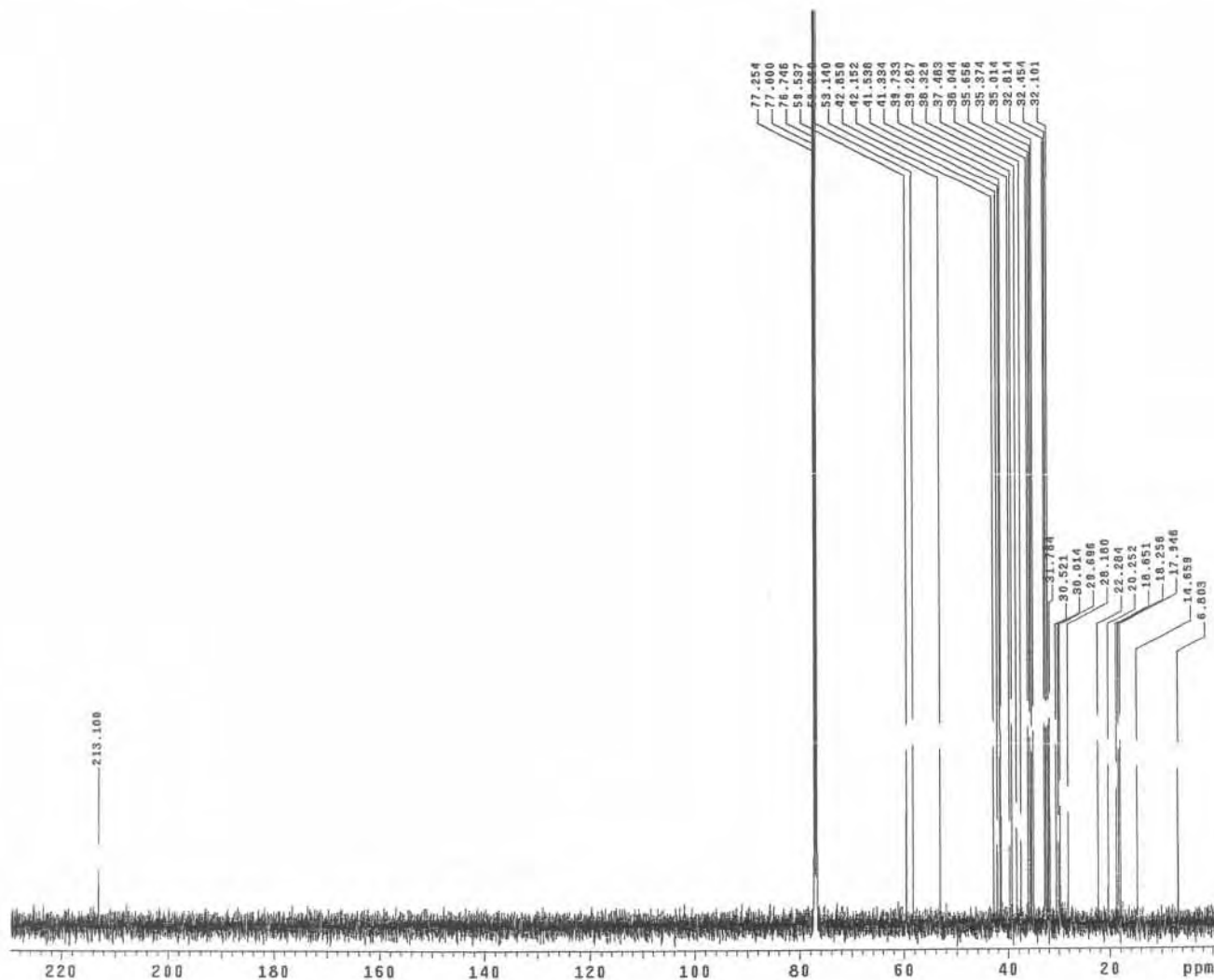
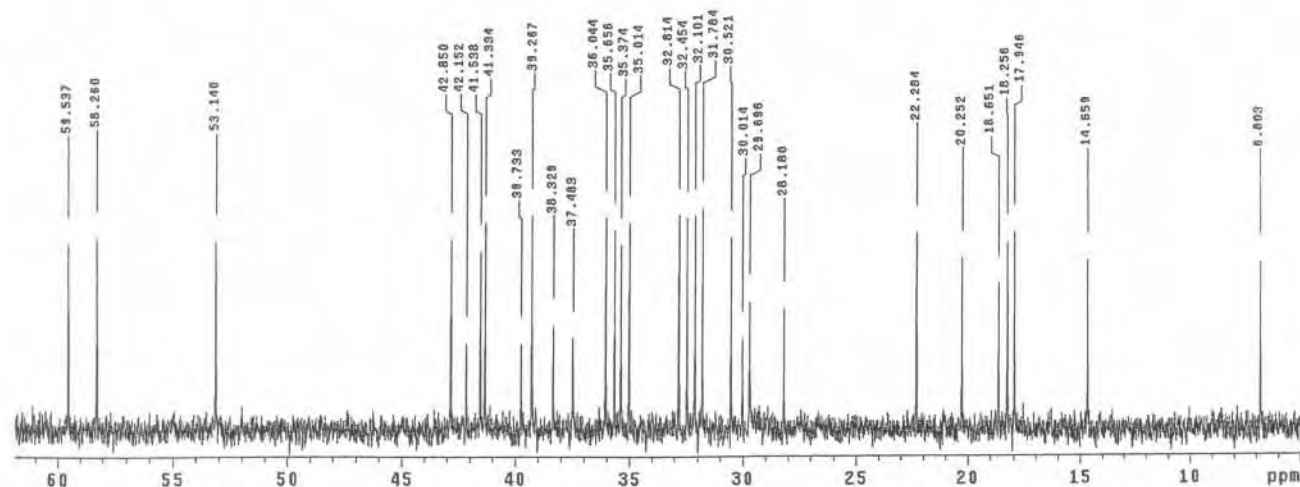
Espectro 55: Espectro de RMN-¹³C de **Qp9** contendo **Qp8** (DMSO-d₆, 11.7T).



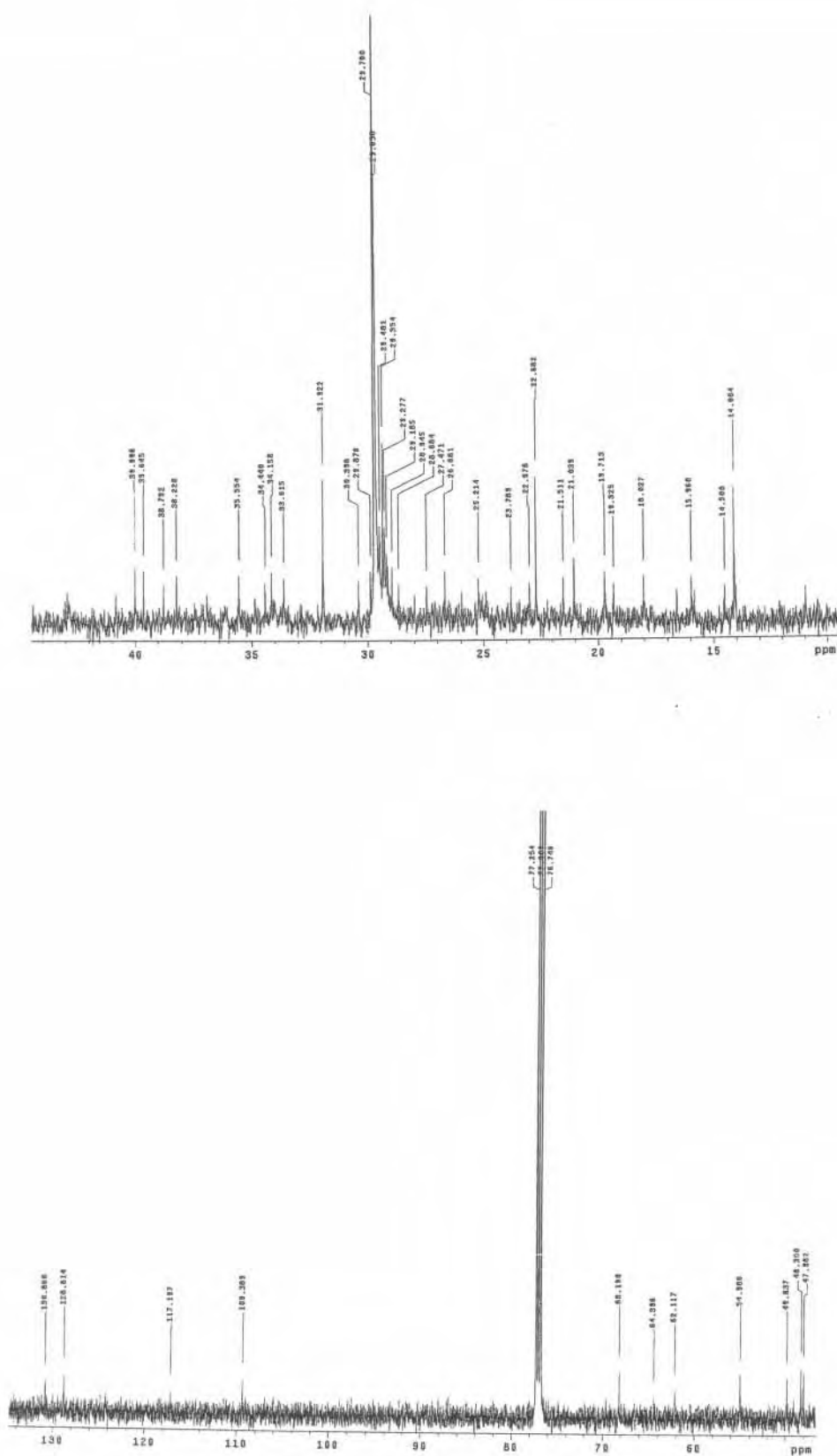
Espectro 55: Espectro de RMN-13C de **Qp9** contendo **Qp8** (DMSO-d₆, 11.7T).



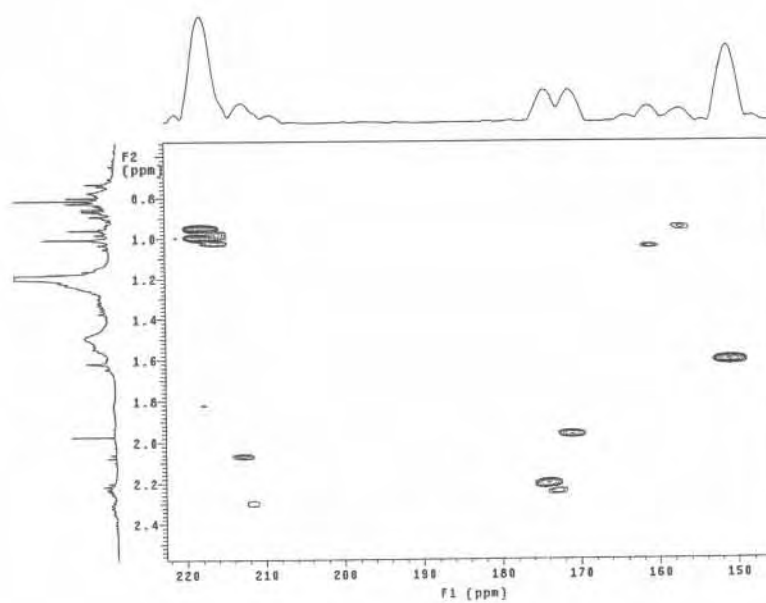
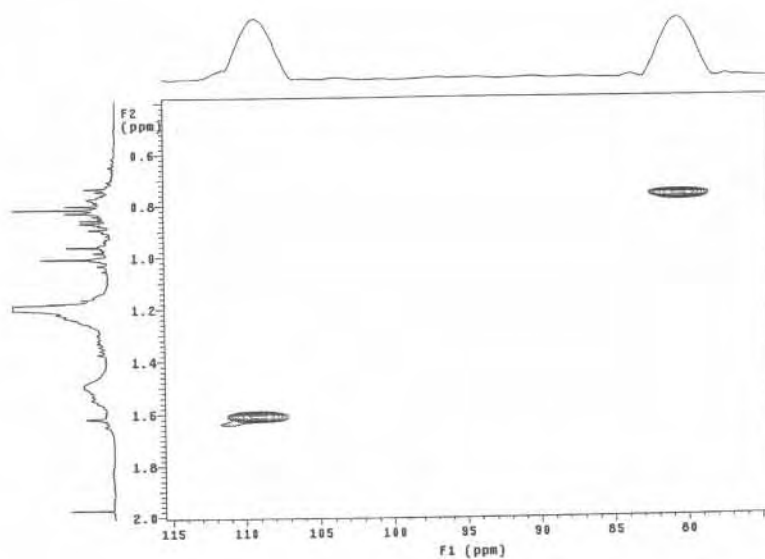
Espectro 56: Espectro de RMN-¹³C de **Qp10** (CDCl₃, 11.7T).



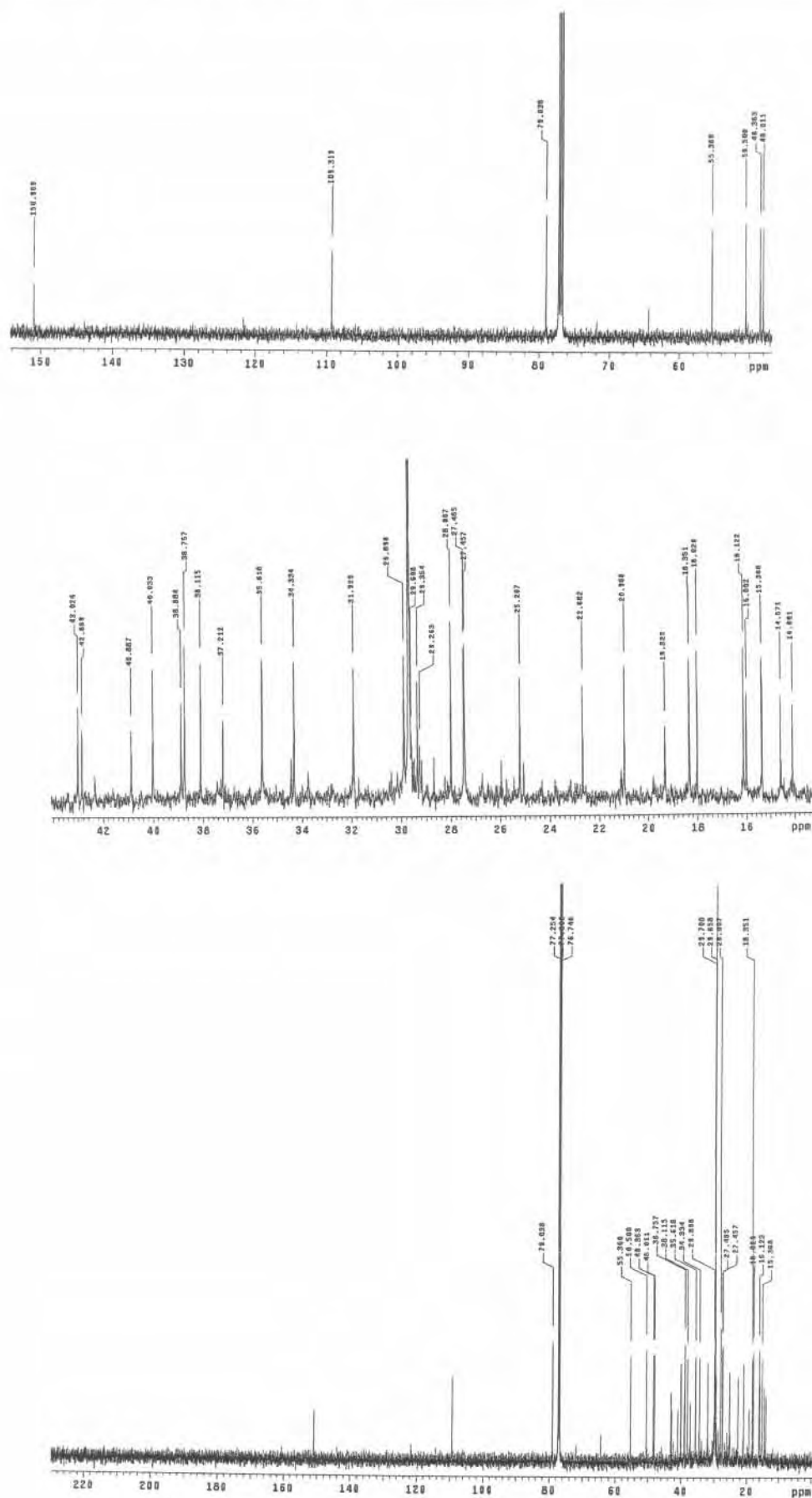
Espectro 57: Espectro de RMN-¹³C de **Qp11** (CDCl₃, 11.7T).



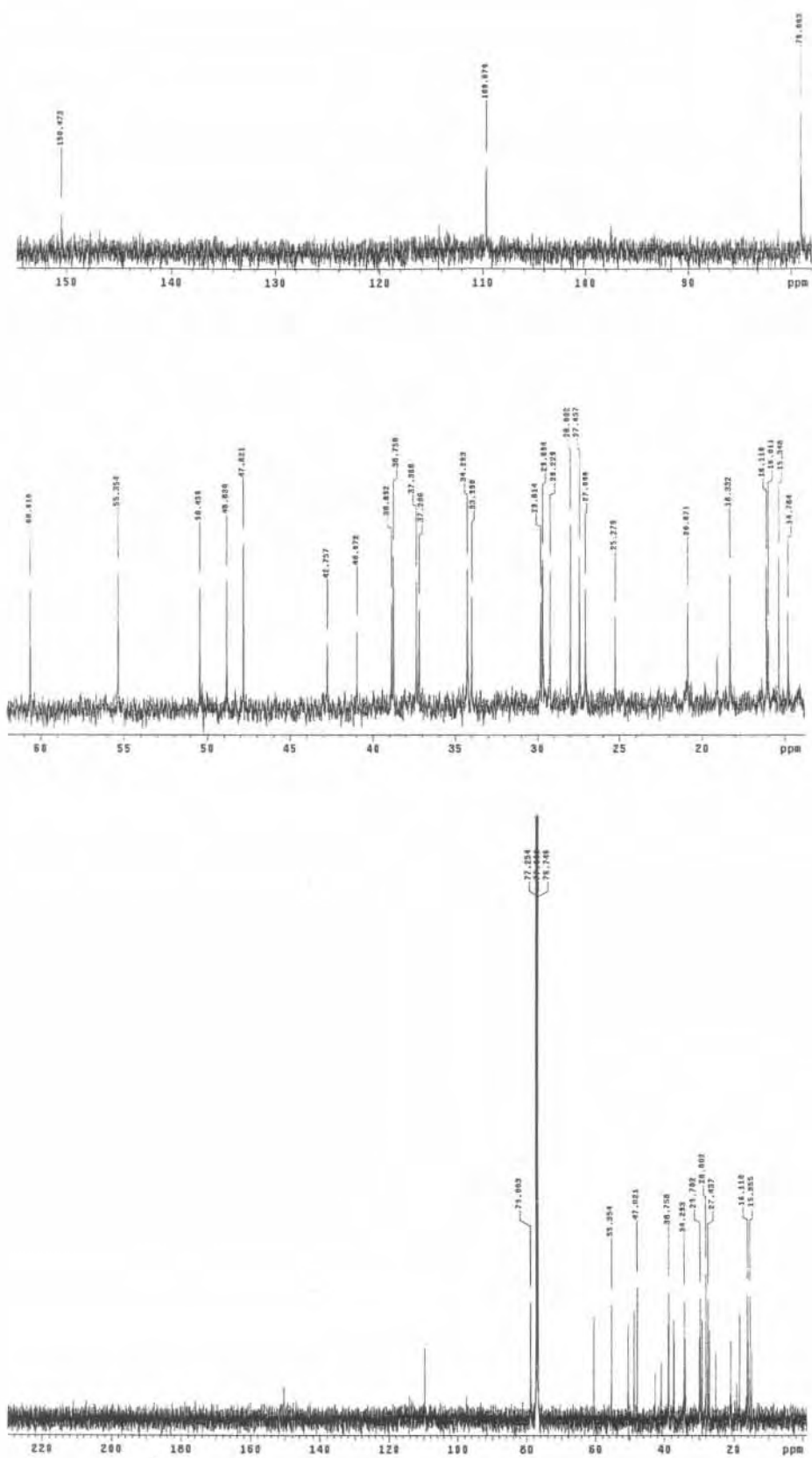
Espectro 58: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp12** em mistura (CDCl_3 , 11.7T).



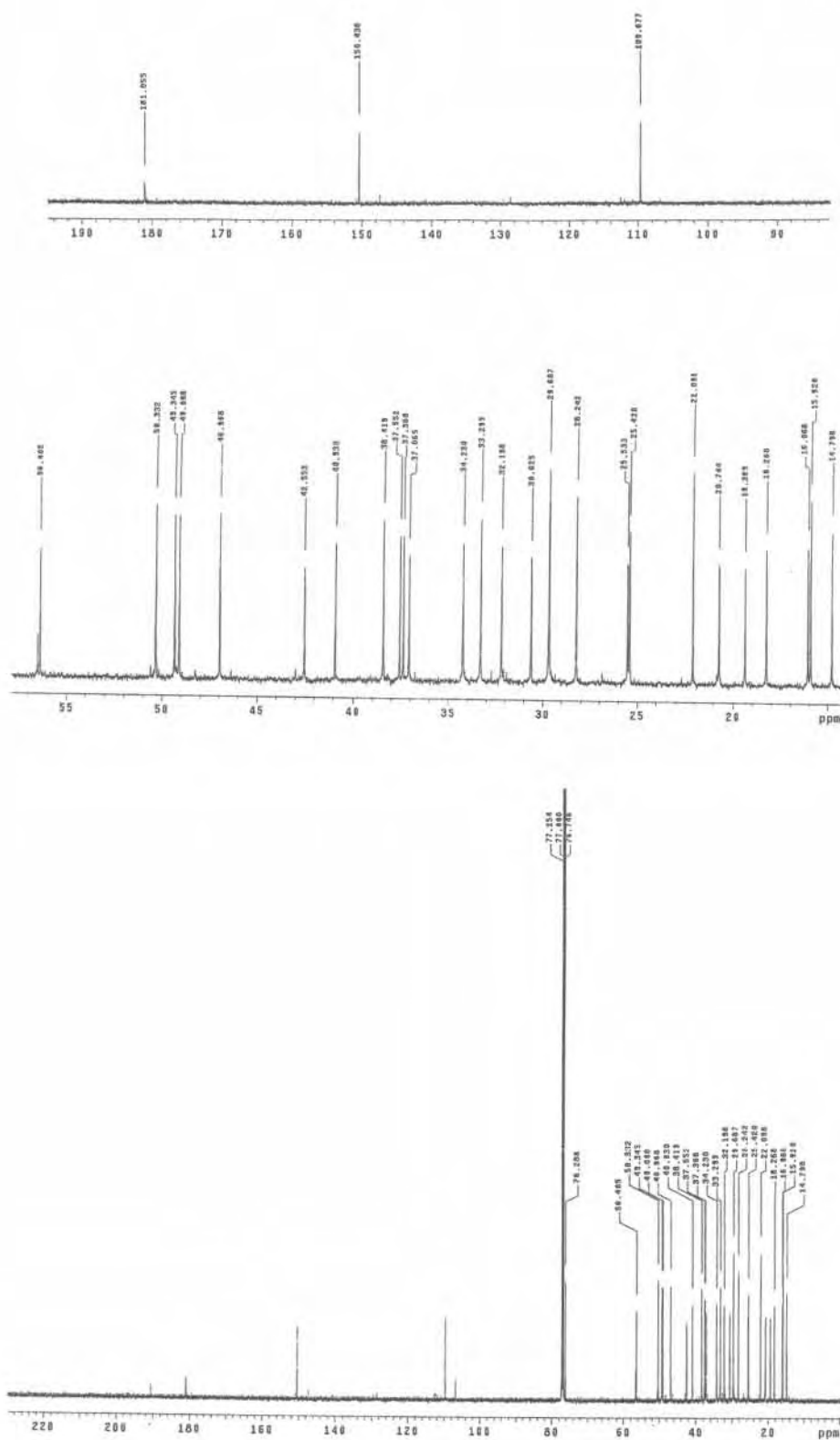
Espectro 59: Experimento gHMBC de **Qp12** (CDCl_3 , 11.7T).



Espectro 60: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp13** (CDCl_3 , 11.7T).

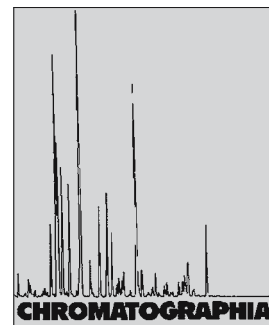


Espectro 61: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp14** (CDCl_3 , 11.7T).



Espectro 62: Espectro de RMN- ^{13}C de **Qp15** (CDCl_3 , 11.7T).

Preparative Droplet Counter-Current Chromatography for the Separation of the New *Nor-Seco-Triterpene* and Pentacyclic Triterpenoids from *Qualea Parviflora*



2006, 64, 695–699

A. L. M. Nasser^{1,✉}, L. P. Mazzolin², C. A. Hiruma-Lima², L. S. Santos³, M. N. Eberlin³, A. R. Monteiro de Souza Brito⁴, W. Vilegas¹

¹ Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, C. Postal 355, 14801-970 Araraquara, SP, Brazil; E-Mail: nasser@mail.iq.unesp.br

² Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

³ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

⁴ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received: 11 July 2006 / Revised: 15 September 2006 / Accepted: 17 September 2006
Online publication: 19 October 2006

Abstract

The methanolic extract of the bark of the medicinal plant *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) contains new *nor-seco*-triterpene and pentacyclic triterpenoids. They were separated in a preparative scale using droplet counter-current chromatography. The optimum solvent used was composed of a mixture of CHCl₃/MeOH/H₂O (43:37:20, v/v) in the descending mode and led to a successful separation of the new compound 28-*nor*-17, 22-*seco*-2 α , 3 β , 19, 22, 23-pentahydroxy- Δ^{12} -oleanane, besides the known triterpenoids bellericagenin B, bellericaside B and arjunglucoside I. Identification was performed by ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR analyses.

Keywords

Thin Layer chromatography
Droplet counter-current chromatography
Nor-seco-triterpene and pentacyclic triterpenoids
Qualea parviflora bark

Introduction

In the search for biologically active compounds from Brazilian plants, we studied the constituents of the bark of *Qualea parviflora* (Vochysiaceae). *Q. parviflora*, popular name “pau-terra-de-flor-miudinha” or “pau-terra-mirim”, is a tree found in the American Continent, in the tropical zone. It is used as antiseptic, antiulcerogenic and against gastrointestinal disorders [1].

Previous studies of this species resulted in the identification of fatty acids

[2] and several polysaccharides in seeds [3]. Oleanane triterpenoids attract widespread interest because they represent an important group of naturally occurring triterpenoids and many of them exhibit pharmacological properties [4]. Reviews have appeared on the antibacterial properties [5, 6], strong hepatoprotective activities [7], significant cytotoxic activity against cultured P-388 cells and significant, albeit less intense, cytotoxic with a variety of cultured human cancer cells [8] from oleanane triterpenoids.

The fractionation of polar extracts from plant origin is often a difficult task. The separation and purification of secondary metabolites using the conventional methods such as column chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC) require several steps resulting in low recoveries of products. Adsorption chromatographic methods almost always led to irreversible adsorption or decomposition of labile substances. To overcome these problems, we have been using droplet counter-current chromatography (DCCC) [9–11]. The separation is based on a liquid-liquid partition chromatographic method, which does not employ solid supporting matrix [12, 13]. This technique has been successfully applied to the analysis and separation of apolar as well as polar natural products [11, 14–17]. The DCCC technique in this special application was able to separate two triterpene components from two further glycosidally bound triterpene in a single chromatographic run. Applicability in a wide range of polarity seems to be the strength of the DCCC methodology in comparison to other CCC techniques. In this case we deal with saponin structures with possible high potential of emulsifying activity. The DCCC as not rapidly moving CCC method seems to be beneficial for this natural product class of saponins [18].

The present paper introduces a method for the separation and purification of 28-*nor*-17, 22-*seco*-2 α , 3 β , 19, 22,

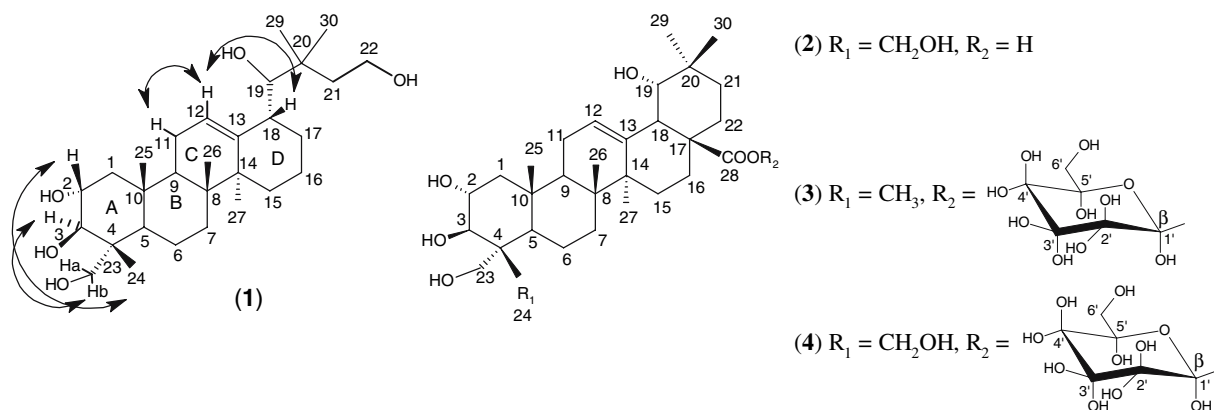


Fig. 1. Structure and gNOESY correlations for the *nor-seco*-triterpene **1** and the pentacyclic triterpenoids **2–4**

23-pentahydroxy- Δ^{12} -oleanane (**1**), bellericagenin B (**2**), bellericaside B (**3**) and arjunglucoside I (**4**) (Fig. 1) from methanolic extract of bark of the *Q. parviflora* using DCCC.

Experimental

Chemicals

All solvents used for DCCC and TLC were of analytical-reagent grade from Merck (Darmstadt, Germany).

Preparation of Methanolic Extract and Sample Solution

Qualea parviflora bark (500 g) were collected at Ypê Garden (Cerrado region) Porto Nacional city [Tocantins State (TO)], Brazil by Adriane R. Duarte. A voucher specimen was identified by Dr. S.F. Lolis from UNITINS, Porto Nacional city and deposited under no. 9226 at UNITINS herbarium.

The air-dried and powdered bark were exhaustively extracted (three times) with chloroform and methanol (48 h, 4 L each) successively at room temperature. Solvents were evaporated at 60 °C under reduced pressure and affording the CHCl_3 extract (4.1 g) and MeOH extract (10.7 g).

Preparation of Two-Phases Solvent System

The solvent system composed of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, v/v) was thoroughly equilibrated overnight in a separatory funnel at room temperature

and the two phases separated shortly before use.

Droplet Counter-Current Chromatography

The DCCC was a Tokyo Rikakikai Eyela model 300 DCCC chromatograph (Tokyo, Japan) with 300 tubes (400 × 2 mm i.d.) connected in series. The solvent system used was $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, v/v) in the descending mode. After the mobile phase front emerged and the hydrostatic equilibrium was established in the column the MeOH extract (1.00 g) was dissolved in 16 mL of a mixture consisting of 8 mL lower phase and 8 mL upper phase of the solvent system $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, v/v) and it was injected with a P.C. Inc. Injection Module with a 16 mL sample injection loop. The flow of the mobile phase was set to 30 mL h^{-1} . We collected 130 fractions of 6 mL each with a Pharmacia Redifrac automated fraction collector (Uppsala, Sweden). The time frame for the presented chromatographic run was one day.

Analyses and Purification of the Compounds by TLC

The collected fractions were analysed by Aldrich TLC plates (Milwaukee, USA) (silica gel on glass, 20 cm × 20 cm, 0.25 mm layer thickness, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80:18:2, v/v) and the spots were visualized by spraying with anisaldehyde reagent, followed by heating at 110 °C for 5 min [19, 20]. Fractions with similar R_F were combined. Fraction 23 gave **2** (R_F 0.7, 4 mg), fraction 82 gave **3** (R_F 0.6, 8 mg) and fractions 105–110

gave **4** (R_F 0.4, 17 mg). Fractions 16–17 were submitted to Aldrich preparative TLC plates (silica gel F254 on glass 20 cm × 20 cm, 0.25 mm layer thickness, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80:18:2, v/v) to give **1** (R_F 0.9, 10 mg) (Fig. 1). Beyond triterpenes and saponins isolated, we got rich fractions in ellagic acid derivatives and tannins.

Structural Identification of the Compounds

The NMR spectra in $[\text{D}_6]\text{H}_2\text{O}$ dimethyl sulfoxide ($\text{DMSO}-d_6$) and pentadeuterated pyridine ($\text{Pyr}-d_5$) were obtained using a Varian INOVA-500 spectrometer (Palo Alto, USA), operating at 500 MHz for ^1H and 126 MHz for ^{13}C and two-dimensional NMR (gHMQC, gHMBC, gCOSY and gNOESY). Chemical shifts were given in δ (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as internal standard.

ESI-MS fingerprints were obtained in both the positive and negative ion modes on a Micromass Q-TOF mass spectrometer (Manchester, UK). Typical ESI-MS conditions were as follow: source temperature 100 °C, desolvation temperature 100 °C, capillary voltage 3.0 kV, and cone voltage 40 V. Sample solutions were introduced into the electrospray source using the syringe pump of the instrument at a flow rate of 8 $\mu\text{L min}^{-1}$ in MeOH.

The spectral data of the four compounds are given as below:

Compound 1: 28-*nor*-17,22-*seco*-2 α , 3 β ,19,22,23-pentahydroxy- Δ^{12} -oleanane. $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_5$. ESI (+)-MS m/z (rel. int.): 479.3734 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100), calculated 479.3737. For ^1H and ^{13}C NMR data see Table 1.

Compound 2: 2 α , 3 β , 19 α , 23, 24-pentahydroxy-olean-12-en-28-oic acid.

Bellericagenin B [5]. $C_{30}H_{48}O_7$. ESI (+)-MS m/z (rel. int.): 519.6943 $[M - H]^-$ (100), calculated 519.6980. For 1H and ^{13}C NMR data see Table 2.

Compound 3: β -D-glucopyranosyl-2 α , 3 β ,19 α ,23,24-tetrahydroxyolean-12-en-28-oate. Arjunglucoside I [21–23]. $C_{36}H_{58}O_{11}$. ESI(-)-MS m/z (rel. int.): 665.8298 $[M - H]^-$ (100) calculated 665.8392. For 1H and ^{13}C NMR data see Table 2.

Compound 4: β -D-glucopyranosyl-2 α , 3 β ,19 α ,23,24-pentahydroxyolean-12-en-28-oate. Bellericaside B [5]. $C_{36}H_{58}O_{12}$. ESI(-)-MS m/z (rel. int.): 681.8343 $[M - H]^-$ (100) calculated 681.8391. For 1H and ^{13}C NMR data see Table 2.

Results and discussion

A series of experiments was performed to determine a suitable two-phase solvent system for DCCC [12–13]. Small amounts of the MeOH extract (10 mg) were dissolved into 2 mL of two immiscible liquid phases consisting of organic solvent and water (e.g. $CHCl_3$ /MeOH/ H_2O and EtOAc/ n -PrOH/ H_2O).

From this mixture, 10 μ L of the upper phase and 10 μ L of lower phase were spotted onto TLC plates and eluted with several solvent systems. After elution, plates were dried and the spots were visualized by spraying with anisaldehyde reagent, followed by heating at 110 $^{\circ}C$ for 5 min to compare the intensity of the spots containing triterpenoids in each phase. TLC analyses allowed to visually estimate the distribution of the triterpenoids between the two phases. The mixture of $CHCl_3$ /MeOH/ H_2O (43:37:20, v/v) gave the best result, with the compounds of interest almost distributed between the two phase (partition coefficient value K of approximately 1). A good chromatographic resolution was obtained with the lower phase of this solvent system, with R_F values of 0.9, 0.7, 0.6 and 0.4 for compounds 1–4, respectively. The relatively high proportion of $CHCl_3$ in the solvent mixture and the R_F values of the compounds indicate the presence of medium polarity triterpenoids in *Q. parviflora*. Thus, the lower phase was chosen as mobile phase and the upper phase was used as stationary phase for the DCCC separation of the MeOH extract of *Q. parviflora*.

The MeOH extract (1.00 g) was injected in DCCC, as described previously.

Table 1. ^{13}C and 1H NMR spectroscopic data for compound 1 (δ)

Position	Multiplicity	^{13}C DMSO- d_6	^{13}C Pyr- d_5	1H DMSO- d_6	gHMQC DMSO- d_6	gHMBC DMSO- d_6	gNOESY DMSO- d_6
1 β	CH ₂	46.6	47.8	1.70	H-1	–	H-1 α , 2, 25
1 α	–	–	–	0.72	–	–	–
2	CH	67.5	69.2	3.48	H-2	H-3	–
3	CH	75.7	78.5	3.17	H-3	H-23, 24	H-23a, 23b
4	C	42.5	44.0	–	–	H-23, 24	–
5	CH	46.2	48.3	–	–	H-23, 24, 25	–
6	CH ₂	17.7	19.0	–	–	–	–
7	CH ₂	32.2	33.3	–	–	H-26	–
8	C	39.0	40.4	–	–	H-26, 27	–
9	CH	47.4	48.3	–	–	H-26	–
10	C	37.6	38.9	–	–	H-25	–
11	CH ₂	23.3	19.0	1.84	–	–	H-12, 25, 26
12	CH	121.6	–	5.18	H-12	v	H-11, 18
13	C	144.5	–	–	–	H-27	–
14	C	41.3	42.6	–	–	H-26, 27	–
15	CH ₂	28.1	29.5	–	–	H-27	–
16	CH ₂	27.6	28.7	–	–	–	–
17	CH ₂	44.9	47.8	–	–	H-19	–
18	CH	43.5	45.1	2.98	H-18	–	H-12, 29
19	CH	80.7	81.5	3.09	H-19	H-29, 30	–
20	C	35.0	36.0	–	–	H-29, 30	–
21	CH ₂	51.5	52.8	2.57	H-21	–	H-22
22	CH ₂	60.3	61.6	3.43	–	H-21	–
23a	CH ₂	64.0	66.7	3.03	H-23a	H-24	H-23b, 24
23b	–	–	3.29	–	H-23b	–	H-23a, 24
24	CH ₃	13.6	14.6	0.53	H-24	–	H-2, 25
25	CH ₃	16.7	17.6	0.90	H-25	–	H-2, 24, 26
26	CH ₃	17.2	17.9	0.68	H-26	–	H-25
27	CH ₃	24.2	24.6	1.22	H-27	–	–
28	–	–	–	–	–	–	–
29	CH ₃	28.2	29.2	0.82	H-29	H-30	–
30	CH ₃	24.8	25.1	0.87	H-30	H-29	–

After the DCCC separation, the collected fractions were monitored by TLC and combined. Two triterpenoid aglycones and two glucosides were separated. Compound 1 (R_F 0.9) was the first substance to be eluted due to its lower polarity when compared to compound 2 (R_F 0.7), that has a COOH group at C-28. Despite their similar polarity, triterpenoid glycosides (3) and (4) were well separated. Compared to 3 (R_F 0.6), triterpenoid glycosides 4 (R_F 0.4) is more polar, since it bears an extra hydroxyl group in C-24, and thus was the last compound to be eluted.

Therefore, our results showed that the used conditions provided a very efficient method for the separation of the triterpenoids from *Q. parviflora*.

Structural Elucidation of Compound 1

Spectroscopic and spectrometric analyses allowed to identify four main compounds (Fig. 1). Compound 1 was obtained as a white solid and showed a bright purple

spot on TLC observed with anisaldehyde reagent.

The ESI-MS exhibited only the deprotonated molecule of m/z 479.3734 $[M + H]^+$ (100), compatible with the molecular formula $C_{29}H_{50}O_5$.

The ^{13}C NMR spectrum showed a total of 29 signals for 1, and a DEPT 135 experiment allowed to identify the signals as belonging to six methyl, ten methylene, seven methine and six quaternary carbons (Table 1). Two of these signals are typical of sp^2 carbons δ 121.6 (C-12) and 144.5 (C-13), suggesting the presence of a Δ^{12} -oleanane triterpene [4]. Carbon signals with chemical shifts at δ 60.3, 64.0 67.5, 75.7 and 80.7 suggested the presence of five carbinolic groups with their multiplicity defined through DEPT 135 experiments as being to two methylenic carbinolic groups (δ 60.3 and 64.0) and three methynic carbinolic groups (δ 67.5, 75.7 and 80.7). The gHMQC experiment allowed to establish the direct 1H - ^{13}C correlations, while the connecting position of the methyl groups was established by using gHMBC and NOESY experiments (Table 1, Fig. 1). Correlations in the gHMBC spectrum were observed between the methyl group

Table 2. ^{13}C NMR chemical shifts (δ) of pentacyclic triterpenoids **2–4** in DMSO-d_6

Position	(2)	(3)	(4)
1	46.5	46.6	46.9
2	67.3	67.4	67.6
3	77.2	77.7	77.8
4	46.4	42.5	45.4
5	46.7	46.2	46.6
6	18.5	17.5	18.5
7	32.4	28.3	32.5
8	40.4	40.4	40.0
9	47.5	47.3	47.7
10	37.2	37.4	37.4
11	23.4	23.3	23.6
12	122.1	122.3	122.4
13	143.5	143.2	143.3
14	41.1	41.3	41.2
15	27.2	31.8	28.0
16	28.4	27.8	28.5
17	44.7	45.2	48.5
18	43.2	43.1	43.3
19	80.1	80.0	80.3
20	34.8	34.7	34.9
21	27.9	27.0	27.8
22	32.2	31.8	32.0
23	62.5	63.9	62.7
24	60.6	13.6	60.8
25	16.6	16.6	16.7
26	16.4	16.7	16.6
27	24.1	24.2	24.3
28	179.1	175.8	176.1
29	28.0	28.0	28.2
30	24.5	24.5	24.7
1'	–	94.1	94.3
2'	–	72.4	72.5
3'	–	76.7	77.4
4'	–	69.5	69.7
5'	–	76.7	76.8
6'	–	60.7	60.4

$\text{CH}_3\text{-24}$ (δ 0.53) and the carbons signals at δ 75.7 (C-3), δ 64.0 (C-23), 46.2 (C-5) and δ 42.5 (C-4); the methyl group $\text{CH}_3\text{-26}$ (δ 0.68) and the carbons signals at δ 39.0 (C-8), δ 47.4 (C-9) and δ 41.3 (C-14); the methyl group $\text{CH}_3\text{-29}$ (δ 0.82, s) and the carbons signals at δ 80.7 (C-19), δ 35.0 (C-20) and δ 24.8 (C-30); the methyl group $\text{CH}_3\text{-30}$ (δ 0.87) and the carbons signals at δ 80.7 (C-19), δ 35.0 (C-20) and δ 28.2 (C-29); the methyl group $\text{CH}_3\text{-25}$ (δ 0.90) and the carbons signals at δ 46.2 (C-5) and δ 37.6 (C-10); the methyl group $\text{CH}_3\text{-27}$ (δ 1.22) and the carbons signals at δ 39.0 (C-8), δ 144.5 (C-13), δ 41.3 (C-14) and δ 28.1 (C-15), the H-3 (δ 3.17) and the carbons signals at δ 67.5 (C-2), the H-19 (δ 3.09) and the carbons signals at δ 44.9 (C-17), and the H-21 (δ 2.57) and the carbons signals at δ 60.3 (C-22).

The $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ gCOSY experiments showed interactions between the signals at δ 0.72 (H α -1) with δ 3.48 (H-2); δ 1.70 (H-1 β) with δ 3.48 (H-2); δ 3.48 (H-2) with δ 3.17 (H-3); δ 1.84 (H-11) with δ

5.18 (H-12); δ 2.98 (H-18) with δ 3.09 (H-19); and δ 2.57 (H-21) with δ 3.43 (H-22). These data, in connection with the gHMQC experiment, helped to establish the ^{13}C NMR chemical shifts for C-11 and C-22 and confirmed the chemical shifts for C-1, C-2, C-3, C-12, C-18, C-19 and C-21.

A series of NMR experiments registered in pentadeuterated pyridine indicated the presence of the terminal $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ unit at C-21/C-22 position. The ^1H NMR spectrum allowed to identify two triplets ($J = 5.5$ Hz) at δ 3.02 and δ 3.99, which were confirmed by gHMBC and gCOSY experiments. The NMR ^1H spectrum also allowed to recognize signals at δ 4.19 (d , $J = 10$ Hz) and at δ 3.73 (d , $J = 10$ Hz), which were assigned to H-3 and H-2, respectively; the coupling constant value agrees with a *trans* diaxial orientation, thus indicating the α -equatorial configuration of the hydroxyl group at C-2 and the β -equatorial configuration of the hydroxyl group at C-3. The absence of the $\text{CH}_3\text{-28}$ and the presence of the $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ portion is characteristic of a *nor*-28-*seco*-17, 22-triterpene.

The gNOESY experiments helped to clarify the relative stereochemistry of compound **1**. Irradiation at δ 5.18 (H-12) showed interactions with the signals at δ 1.84 (H-11) and at δ 2.98 (H-18), thus indicating a β -configuration to H-18 and, hence the C-19 in C-18 was placed in α . Irradiation at δ 0.53 ($\text{CH}_3\text{-24}$) showed interactions with δ 3.48 (H-2) and δ 0.90 ($\text{CH}_3\text{-25}$), suggesting the α -configuration for the OH in C-2. Irradiation at δ 3.17 (C-3) showed interactions with δ 3.03 (H-23a), δ 3.29 (H-23b) thus indicating the β -configuration for the OH in C-3.

Therefore, compound **1** is determined as being 28-*nor*-17, 22-*seco*-2 α , 3 β , 19, 22, 23-pentahydroxy- Δ^{12} -oleanane.

Compounds **2–4** were identified as bellericagenin B (**2**), arjunglucoside I (**3**) and bellericaside B (**4**) by comparison of their physical data with literature values [5, 21–23] (Table 2).

However, these triterpenoids are being described for the first time in *Q. parviflora*.

Conclusions

The results of our studies clearly demonstrate the potential of DCCC for the

preparative isolation of 28-*nor*-17, 22-*seco*-2 α , 3 β , 19, 22, 23-pentahydroxy- Δ^{12} -oleanane (**1**), bellericagenin B (**2**), bellericaside B (**3**) and arjunglucoside I (**4**) from *Q. parviflora* bark in only one step without need of time-consuming clean-up and minimizing the loss of material due to decomposition. In particular, preparative DCCC is a very efficient method for the separation and purification of natural products.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Nivaldo Boralle from the Instituto de Química de Araraquara –SP for recording the NMR spectra, to Roberto Sigfrido Gallegos Olea from the Universidade Federal do Maranhão for the helpful discussions, to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, for supporting this work and to a fellowship to ALMN, and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, for grants to ARMSB and WV.

References

- Grandi TSM, Trindade JA, Pinto MJF, Ferreira LL, Catella AC (1989) Acta Bot Bras 3:185–192
- Mayworm MAS, Salatino A (2002) Biochem Syst Ecol 30:971–972
- Mayworm MAS, Buckeridge MS, Salatino A (2000) Phytochemistry 55:581–587
- Agrawal PK, Jain DC (1992) Prog Nucl Reson Spectrosc 24:1–90
- Mahato SB, Nandy AK, Kundu AK (1992) Tetrahedron 48:2483–2494
- Muhammad I, El-Sayed KA, Mossa JS, Al-Said MS, El-Ferally FS, Mayer AMS (2000) J Nat Prod 63:605–610
- Adnyana K, Tezuka Y, Banskota AH, Tran KQ, Kadota S (2001) J Nat Prod 64:360–363
- Kaneda N, Pezzuto JM, Kinghorn AD, Farnsworth NR (1992) J Nat Prod 55:654–659
- Santos LC, Dachtler M, Andrade FDP, Albert K, Vilegas W (2000) Fresenius J Anal Chem 368:540–542
- Cardoso CAL, Vilegas W (1999) Phytochem Anal 10:60–63
- Santos LC, Vilegas W (2001) J Chromatogr A 915:259–263
- Conway WD (1990) Countercurrent chromatography—apparatus, theory and applications. VCH, New York
- Conway WD, Petroski RJ (1995) Modern countercurrent chromatography. American Chemical Society, Washington
- Ito Y, (1986) CRC Crit Rev Anal Chem 17:65–143
- Maillard M, Marston A, Hostettmann K (1996) In: Ito Y, Conway WD (eds) High-speed counter-current chromatography. Wiley-Interscience, New York
- Yang FQ, Quan J, Zhang TY, Ito Y (1998) J Chromatogr A 803:298–301

17. Cao X, Tian Y, Zhang T, Li X, Ito Y (1999) *J Chromatogr A* 855:709–713
18. Hostettamann K (1980) *Planta Med* 39:1–18
19. Stahl E (1969) *Arzneim Forsch* 19:1892–1895
20. Wagner HM, Bladt S, Zgainski EM (1984) *Plant drug analysis*. Springer, Berlin Heidelberg New York
21. Jossang A, Seuleiman M, Maidou E, Bodo B (1996) *Phytochemistry* 41:591–594
22. Nandy AK, Podder G, Sahu NP, Mahato SB (1989) *Phytochemistry* 28:2769–2772
23. Zhou X, Kasai R, Ohtani K, Tanaka O, Yamasaki K (1992) *Phytochemistry* 31:3642–3644