

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química**

**Fernanda Lopes Ferreira**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Tontelea micrantha* Mart. ex Schult.  
(CELASTRACEAE)**

**Belo Horizonte  
2019**

UFMG/ICEx/DQ. 1.366<sup>a</sup>

T. 624<sup>a</sup>

**Fernanda Lopes Ferreira**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Tonateleia micrantha* Mart. ex Schult.  
(CELASTRACEAE)**

Tese apresentada ao  
Departamento de Química  
do Instituto de Ciências  
Exatas da Universidade  
Federal de Minas Gerais  
como requisito parcial para  
a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências –  
Química.

**Belo Horizonte  
2019**

Ficha Catalográfica

F383e Ferreira, Fernanda Lopes  
2019 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade  
T biológica de *Tonatelea micrantha* Mart. ex Schult.  
(Celastraceae) [manuscrito] / Fernanda Lopes Ferreira.  
2019.

[iv], 218 f. : il.

Orientadora: Lucienir Pains Duarte.

Coorientadora: Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Produtos naturais -  
Teses 3. Celastraceae - Teses 4. Terpenios - Teses 5.  
Produtos de ação antimicrobiana - Teses 6. Agentes  
antivirais - Teses 7. Atividade antifúngica - Teses 8.  
Agentes antineoplásicos - Teses I. Duarte, Lucienir  
Pains, Orientadora II. Pimenta, Lúcia Pinheiro Santos,  
Coorientadora III. Título.

CDU 043

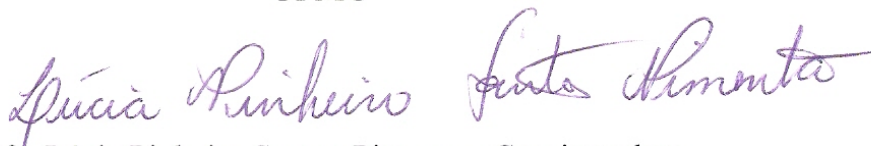
**"Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica de *Tontelea micrantha*  
(Mart. ex Schult.) (CELASTRACEAE)"**

**Fernanda Lopes Ferreira**

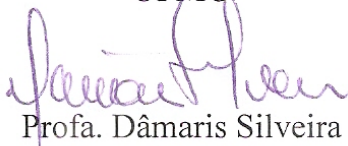
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Lucienir Pains Duarte - Orientadora  
UFMG



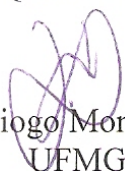
Profa. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta - Coorientadora  
UFMG



Profa. Dâmaris Silveira  
UnB



Profa. Lourdes Campaner dos Santos  
Instituto de Química de Araraquara



Prof. Diogo Montes Vidal  
UFMG



Profa. Rosemeire Brondi Alves  
UFMG



O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob orientação da Professora Doutora Lucienir Pains Duarte e coorientação da Professora Doutora Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

“Cada planta é um livro, com informações preciosas, sobre o desenvolvimento da floresta, seu passado remoto, seu futuro. Destruir a floresta é como incendiar mil Alexandrinas”.

Otto Richard Gottlieb

Dedico este trabalho a meus queridos filhinhos,  
Bernardo e Sofia.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente em minha vida todos os dias e me abençoar com uma família maravilhosa e pessoas especiais, sem as quais esse trabalho não seria possível.

A minha mãe, companheira amiga, ao meu lado todos os dias. Somente com sua presença constante, me trazendo paz, cuidando de mim e dos meus filhinhos, esse doutorado foi possível. Mãezinha amada, te amo pra sempre. MUITÍSSIMO obrigada por tudo!!!

Aos meus filhinhos, Bernardo e Sofia. Meus dois sóis. Não foi fácil pra eles, nem um pouco... foi uma grande luta. Não foi fácil ser mãe de gêmeos tão pequenos e me dividir entre tantos compromissos, que foram muito além da vida acadêmica. Obrigada, meus amores, por terem aceitado, mesmo sem entender (muitas vezes com bastante choro), muitas das minhas presenças ausentes. Meus anjinhos queridos, *I love you to the moon and back*.

Ao meu querido esposo Rodrigo, por estar ao meu lado, pela preciosa colaboração em minhas ausências, pela paciência. Pelo amor e cumplicidade.

Ao meu queridíssimo pai, que junto com minha mãe, venceram lutas difíceis. Um pai maravilhoso e carinhoso. Você e a mamãe foram importantíssimos em minha vida acadêmica. Obrigada por ser tão carinhoso e pela família que somos.

A minha querida orientadora Dra. Lucienir Duarte. Foi minha professora em vários semestres da graduação, me orientou na iniciação científica, TCC, mestrado e doutorado (ufa, chega né). Estivemos juntas em tantos projetos, me viu realizar grandes sonhos, tivemos diversos momentos alegres e superamos outros mais difíceis. Nos tornamos amigas e estaremos conectadas para sempre. Como você é especial para mim!! MUITÍSSIMO obrigada por tudo.

A minha querida coorientadora Dra. Lúcia Pimenta, por sua orientação e por sua alegria. Sua colaboração ultrapassou as esferas acadêmicas. Sempre motivadora e com uma energia contagiosa, sorriso alegre e abraço amigo que me fizeram tão bem, especialmente em momentos mais difíceis durante o período do doutoramento. Sua coorientação foi um presente para mim! MUITÍSSIMO obrigada por tudo.

## Agradecimentos

---

Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica, Pedro Augusto, Pedro Henrique, Louise e Isabel, pela valiosa colaboração no estudo fitoquímico, e pela convivência deliciosa. Amei estar com vocês. Obrigada pela amizade e pelo trabalho excelente que realizaram.

A toda a minha família, em especial as minhas tias Andreia, Maria José e Marilha que cuidaram muitas vezes das crianças, que no início do doutorado ainda eram bebês, todas as vezes que precisei e com tanto carinho.

Aos colegas do NEPLAM pela convivência e trocas de aprendizado durante esses anos. Josana sempre atenciosa com o isolamento dos quinonametídeos, Rafael, craque em RMN, me ajudou várias vezes. Karen, simpatia pura e companhia deliciosa. Mariana sempre prestativa. Shirley foi uma grande companheira. Valtair, Julia, Grasi, Diogo, Acácio, e inúmeros alunos de IC e estagiários que passaram por nosso grupo de pesquisa. Obrigada pessoal.

Ao professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pelo apoio e sugestões no trabalho.

À Dra. Ivana Silva Lula do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução, pela obtenção de vários espectros de RMN e por me ajudado tantas vezes durante meu treinamento no equipamento, sempre com paciência.

Aos professores Dr. José Carlos Magalhães, Dr. Adriano de Paula Sabino, Dra. Clarice Veloso de Carvalho Moura, à Dra. Fernanda Gontijo, às alunas Marcela de Sá Hauck e Maria Cecília de Souza Lelis, pelos testes biológicos.

À professora Dra. Maria Olívia Mercadante Simões, pela coleta e identificação da planta.

À Mirra Angelina do Laboratório de Cromatografia, pelas análises no HPLC e durante meu treinamento no equipamento, sempre com tanto carinho, grande disposição em me ajudar e pela amizade.

À Dra. Vanny Ferraz do Laboratório de Cromatografia, pela execução das análises de cromatografia gasosa.

À Ana Cristina do Laboratório de Infravermelho pela obtenção dos espectros na região do IV.

À professora Dra. Rosemeire Brondi Alves, uma das professoras mais queridas e dedicadas que tive o prazer de ser aluna. Amava suas aulas de Orgânica Avançada e de RMN. Obrigada pelas contribuições na qualificação e por ter aceitado ser da banca, sabemos que não foi fácil pra você.

## Agradecimentos

---

Aos professores Dr. Diogo Montes Vidal, Dra. Dâmaris Silveira, Dra. Lourdes Campaner dos Santos, Dra. Roqueline Rodrigues Silva e Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas pela participação na banca de defesa do meu doutorado e pelas importantes contribuições.

Aos professores da banca de qualificação, Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara e Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, obrigada pelas sugestões e contribuições no trabalho.

Aos meus professores da pós-graduação Dra. Rossimiriam de Freitas, Dra. Rosemeire Brondi Alves, Dr. Adão Aparecido, Dr. Ana Luiza Quadros, Dra. Dayse Carvalho da Silva Martins e Dr. Gilson de Freitas Silva pela contribuição a minha formação acadêmica.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFMG.

Aos funcionários do DQ, pela assistência e apoio técnico.

Ao Departamento de Química e a Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv

## CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1.1	Produtos Naturais.....	1
1.1.2	Triterpenos pentacíclicos.....	3
1.1.3	Família Celastraceae.....	7
1.1.4	<i>Tonatelea micrantha</i> .....	7
1.2	<b>OBJETIVOS</b> .....	9
1.3	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	10
1.3.1	Métodos gerais.....	10
1.3.2	Coleta e identificação do material vegetal.....	12
1.3.3	Preparo dos extratos de <i>Tonatelea micrantha</i> .....	12
1.3.4	Estudo fitoquímico das folhas.....	15
1.3.4.1	Fracionamento do extrato hexânico das folhas (EHF).....	15
1.3.4.2	Fracionamento do sólido do extrato hexânico das folhas (SHF) .....	18
1.3.4.3	Fracionamento do extrato acetato etílico das folhas (EAF) .....	19
1.3.4.4	Análise do sólido do extrato metanólico das folhas (SMF).....	20
1.3.4.5	Fracionamento do extrato metanólico das folhas (EMF) .....	20
1.3.5	Estudo fitoquímico dos galhos.....	23
1.3.5.1	Fracionamento do extrato hexânico dos galhos (EHG).....	23
1.3.5.1.1	Fracionamento do EHG-1.....	23
1.3.5.1.2	Fracionamento do EHG-2.....	25
1.3.5.2	Fracionamento do sólido do extrato hexânico dos galhos (SHG).....	27
1.3.5.3	Fracionamento do extrato clorofórmico dos galhos (ECG).....	29
1.3.5.4	Fracionamento do extrato acetato etílico dos galhos (EAG) .....	33
1.3.5.5	Fracionamento do extrato metanólico dos galhos (EMG).....	35

1.3.6	Estudo fitoquímico das raízes .....	36
1.3.6.1	Fracionamento do extrato hexânico das raízes (EHR) .....	36
1.3.6.2	Fracionamento do extrato clorofórmico das raízes (ECR).....	39
1.3.7	Marcha química para obtenção de alcaloides a partir das raízes de <i>Tontelea micrantha</i> .....	43
1.3.7.1	Fracionamento da fração clorofórmica alcaloídica básica .....	44
1.3.8	Perfil de ácido graxo do óleo extraído de sementes de <i>T. micrantha</i> .....	44
1.3.8.1	Hidrólise e metilação de óleos.....	44
1.3.8.2	Análise no cromatógrafo a gás.....	45
1.4	<b>DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	46
1.4.1	TM01: 1,4- <i>trans</i> -poli-isopreno (guta-percha) .....	47
1.4.2	TM02: esqualeno.....	48
1.4.3	TM03: friedelan-3-ona (friedelina) .....	50
1.4.4	TM04: friedelan-3 $\beta$ -ol (3 $\beta$ -friedelinol) .....	51
1.4.5	TM05: ácido 3,4- <i>seco</i> -friedelan-3-oico .....	52
1.4.6	TM06: 28-hidroxifriedelan-3-ona .....	53
1.4.7	TM07: mistura de ácidos graxos .....	54
1.4.8	TM08: 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol.....	56
1.4.9	TM09: dulcitol .....	57
1.4.10	TM10: 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)][ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina.....	58
1.4.11	TM11: 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina (rutina) .....	60
1.4.12	TM12: epiafzelequina-(4 $\beta$ $\rightarrow$ 8)-epicatequina.....	61
1.4.13	TM13: friedelan-3,21-diona .....	69
1.4.14	TM14: 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona .....	70
1.4.15	TM15: 21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona .....	71
1.4.16	TM16: 30-hidroxifriedelan-3-ona .....	72
1.4.17	TM17: 3-oxo-friedelan-28-al .....	73
1.4.18	TM18: friedel-1-en-3,21-diona e TM13: friedelan-3,21-diona.....	74
1.4.19	TM19: friedelan-1,3,21-triona .....	81
1.4.20	TM20: $\beta$ -sitosterol.....	91
1.4.21	TM21: ácido 3-oxo-friedelan-28-oico.....	92



1.4.22	TM22: 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona.....	93
1.4.23	TM23: 21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona .....	94
1.4.24	TM24: 28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona.....	101
1.4.25	TM25: epicatequina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona).....	102
1.4.26	TM26: 2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano.....	103
1.4.27	TM27: tingenina B .....	113
1.4.28	TM28: netzhualcoiona .....	114
1.4.29	TM29: netzhualcoiondiol.....	115
1.4.30	TM30: salaquinona A.....	116
1.4.31	TM31: ácido ortosfênico .....	117
1.4.32	Discussão dos resultados – Estudo fitoquímico .....	118

## **CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

2.1	Introdução .....	123
2.2	Atividade antimicrobiana .....	126
2.2.1	Metodologia: método da concentração inibitória mínima.....	127
2.2.2	Discussão dos resultados.....	128
2.3	Atividade antiviral contra vírus Zika e vírus Mayaro .....	129
2.3.1	Metodologia.....	129
2.3.1.1	Células VERO .....	129
2.3.1.2	Cultivo dos vírus.....	130
2.3.1.3	Ensaio de citotoxicidade.....	131
2.3.1.4	Atividade antiviral global.....	131
2.3.1.5	Atividade em diferentes estágios da infecção viral.....	132
2.3.1.5.1	Atividade antiviral na etapa da adsorção .....	132
2.3.1.5.2	Atividade antiviral na etapa da penetração.....	133
2.3.1.6	Atividade virucida .....	133
2.3.2	Discussão dos resultados.....	134
2.4	Avaliação da atividade citotóxica.....	138
2.4.1	Metodologia.....	138
2.4.1.1	Cultivo celular .....	138
2.4.1.2	Ensaio de viabilidade celular .....	139
2.4.2	Discussão dos resultados.....	140

2.5	Avaliação da atividade de inibição da enzima Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase cardíaca.....	142
2.5.1	<i>Docking</i> molecular.....	143
2.5.2	Discussão dos resultados.....	143
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	144
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	146
	<b>APÊNDICE</b> .....	155
	Espectros .....	155
	Cromatogramas.....	194
	Tabelas .....	195
	Estruturas químicas dos triterpenos pentacíclicos isolados .....	217
	Estrutura química dos esteroides e flavonoides isolados.....	218

## **ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura Americana)

$\delta$  - Deslocamento químico

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

BHI – *Brain heart infusion* (infusão coração e cérebro)

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG/EM – Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CMC - carboximetilcelulose

DQ – Departamento de Química

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135* (Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HMBC – *Heteronuclear-Multiple-Bond-Correlation Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações)

HSQC – *Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de Quantum Único)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IV – Infravermelho

*J* – Constante de acoplamento

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

MAYV – Mayaro vírus

NOESY – *Two-Dimensional Nuclear-Overhauser Effect Spectroscopy*  
(Espectroscopia do Efeito Nuclear de Overhauser)

qui – Quinteto

$R_f$  – fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de  $^{13}\text{C}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SFB – Soro fetal bovino

TCC – Trabalho de conclusão de curso

TMS – Tetrametilsilano

$t_R$  – Tempo de retenção

TTPC – Triterpenos pentacíclicos

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFP – Unidades formadoras de placas

UV - Ultravioleta

ZIKV – Zika vírus

## RESUMO

O estudo fitoquímico de folhas, galhos e raízes de *Tontelea micrantha* levou ao isolamento/identificação de 31 substâncias. Foram isolados 20 triterpenos pentacíclicos: friedelina (TM03), 3 $\beta$ -friedelinol (TM04), ácido 3,4-seco-friedelanoico (TM05), 28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06), friedelan-3,21-diona (TM13), 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM14), 21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM15), 30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16), 3-oxo-friedelan-28-al (TM17), friedel-1-en-3,21-diona (TM18), friedelan-1,3,21-triona (TM19), ácido 3-oxo-friedelan-28-oico (TM21), 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM22), 21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM23), 28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM24), tingenina B (TM27), netzahualcoiona (TM28), netzahualcoiondiol (TM29), salaquinona A (TM30) e o ácido ortosfênico (TM31). Também foram isolados 4 flavonoides: 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)][ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina (TM10), rutina (TM11), epiafzelequina-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epicatequina (TM12) e a epicatequina (TM25). Além disso foram isolados o esteroide  $\beta$ -sitosterol (TM20) e seu derivado glicosilado, o 3 $\beta$ -glicosil- $\beta$ -sitosterol (TM08), um sesquiterpeno de esqueleto di-hidro-  $\beta$ -agarofurano, 2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano (TM26). Um carboidrato, o dulcitol (TM09), uma mistura de ácidos graxos (TM07), o polímero guta percha (TM01) e o esqualeno (TM02) também foram isolados. As substâncias TM18, TM19 e TM26 são inéditos. O estudo biológico consistiu da avaliação da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), da atividade antiviral contra vírus Zika e vírus Mayaro, da atividade citotóxica e da atividade de inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase cardíaca. O extrato metanólico das folhas apresentou atividade anti-Mayaro pronunciada. Os extratos das folhas e galhos mostraram atividade anti-Zika, sendo que o extrato acetato etílico das folhas e o extrato metanólico das folhas apresentaram inibição da penetração viral em concentrações mais baixas do que 15,6  $\mu$ g/mL. As substâncias TM11, TM21, TM25, TM26, TM29 e o óleo extraído das sementes apresentaram atividade citotóxica moderada frente às linhagens de células de leucemia mieloide aguda (THP-1), mieloide crônica (K562) e células de carcinoma mamário (MDA-MB-231).

**Palavras-chave:** Celastraceae, *Tontelea micrantha*, triterpenos, anti-Zika.

## ABSTRACT

### Phytochemical study and biological evaluation of *Tontelea micrantha* Mart. ex Schult. (Celastraceae)

The phytochemical study of leaves, branches and roots of *Tontelea micrantha* resulted in the isolation/identification of 31 compounds. Among them 20 are pentacyclic triterpenes: friedelin (**TM03**), 3 $\beta$ -friedelinol (**TM04**), 3,4-seco-friedelanoic acid (**TM05**), 28-hydroxyfriedelan-3-one (**TM06**), friedelan-3,21-dione (**TM13**), 21 $\beta$ -hydroxyfriedelan-3-one (**TM14**), 21 $\alpha$ -hydroxyfriedelan-3-one (**TM15**), 30-hydroxyfriedelan-3-one (**TM16**), 3-oxo-friedelan-28-al (**TM17**), friedel-1-en-3,21-dione (**TM18**), friedelan-1,3,21-trione (**TM19**), 3-oxo-friedelan-28-oic acid (**TM21**), 28,29-dihydroxyfriedelan-3-one (**TM22**), 21 $\alpha$ ,30-dihydroxyfriedelan-3-one (**TM23**), 28,30-dihydroxyfriedelan-3-one (**TM24**), tingenin B (**TM27**), netzahualcoyone (**TM28**), netzahualcoyondiol (**TM29**), salaquinone A (**TM30**) and the orthosphenic acid (**TM31**). Four flavonoids were also isolated: 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)][ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopyranoside of quercetin (**TM10**), rutin (**TM11**), epiafzelechin-(4 $\beta$   $\rightarrow$  8)-epicatechin (**TM12**) dimer and epicatechin (**TM25**). In addition, the steroid,  $\beta$ -sitosterol (**TM20**) and its glycosylated derivative, 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (**TM08**), and a  $\beta$ -di-hydroagarofuran sesquiterpene 2,3,6,15-tetra-acetoxy-1,9-dibenzoyloxy-8-oxo- $\beta$ -agarofuran (**TM26**) were isolated. A carbohydrate, dulcitol (**TM09**), a mixture of fatty acids (**TM07**), the gutta percha (**TM01**) polymer and squalene (**TM02**), a precursor of pentacyclic triterpenes, were also isolated. The substances **TM18**, **TM19** e **TM26** are new compounds. The study of the biological activity consisted of the evaluation of the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal), of the antiviral activity against Zika virus and Mayaro virus, of the cytotoxic activity and the study of the inhibition activity of the cardiac Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme. The methanolic leaf extract showed pronounced anti-MAYV activity. Leaf and branch extracts showed anti-ZIKV activity, with the ethyl acetate and methanolic leaf extracts inhibiting viral penetration at lower concentrations of 15.6  $\mu$ g/mL. The compounds **TM11**, **TM21**, **TM25**, **TM26**, **TM29** and the seed oil showed moderate cytotoxic activity against the mammary carcinoma cells (MDA-MB-231) and the acute (THP-1) and chronic myeloid leukemia cells (K562).

**Keywords:** Celastraceae, *Tontelea micrantha*, triterpenes, anti-Zika.

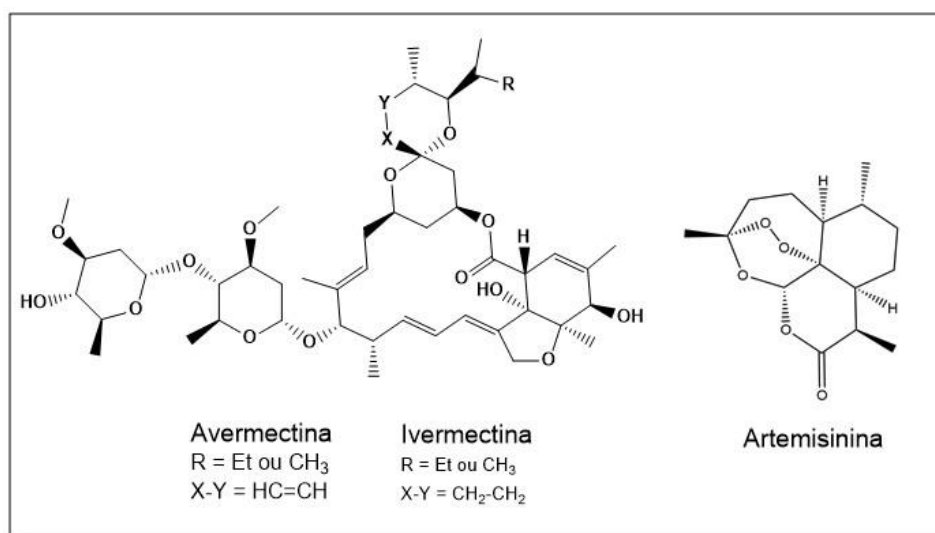
## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Produtos Naturais

O uso das plantas e de suas formulações para o tratamento de várias doenças é uma prática muito antiga que vem sendo repassada ao longo das gerações. Dados atuais mostram que mais de 80% da população de países em desenvolvimento, como a Índia, utilizam preferencialmente a medicina tradicional, incluindo recursos vegetais, excedendo o uso de medicamentos sintéticos (NANDI *et al.*, 2016). Além disso, mais de 100 países têm regulamento para o uso de plantas como medicamentos (SAVOIA, 2012). Mesmo hoje na medicina ocidental, e apesar do progresso na química sintética, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos ainda são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (ROMERO-BENAVIDES *et al.*, 2017). Em torno de 50.000-70.000 espécies são usadas na medicina tradicional ou moderna (NEWMAN e CRAGG, 2016) em todo o mundo. A população da Índia, por exemplo, usa aproximadamente 7.000-7.500 espécies de plantas medicinais, em várias formas de preparações, para tratar várias doenças e incômodos (NANDI *et al.*, 2016).

Produtos naturais representam uma rica fonte de agentes antibióticos, antivirais, anticancerígenos, anti-inflamatórios, imunossupressores, inseticidas, dentre outros (BALTZ, 2019; LIN *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2018). A vantagem dos produtos naturais sobre compostos sintéticos baseia-se no fato de que os produtos naturais evoluíram ao longo de milhões de anos para interagir com sistemas biológicos, e apresentam uma rica diversidade estrutural (HERRMANN *et al.*, 2016). Apesar do avanço da medicina moderna, os produtos naturais ainda têm um papel muito importante na busca por novos fármacos. De acordo com Newman e Cragg (2016) mais de 57% dos medicamentos antitumorais usados clinicamente, entre 1940 e 2014 são produtos naturais ou têm alguma relação com eles. Os fármacos derivados de produtos naturais têm se tornado essenciais para a descoberta de novos agentes antivirais. De 1981 a 2014, mais de 40% dos medicamentos antivirais em uso clínico são produtos naturais ou projetados usando produtos naturais como protótipos.

O Prêmio Nobel de 2015 de Fisiologia ou Medicina foi concedido a William C. Campbell, Satoshi Omura e Youyou Tu, pelas descobertas ligadas a novas terapias contra infecções causadas por vermes, que afetam principalmente a população de países pobres. Omura, um químico de produtos naturais, em parceria com Campbell, um parasitologista da Indústria Farmacêutica Merck, pesquisaram intensamente produtos naturais com atividade anti-helmíntica. A escolha dos produtos naturais como fonte preferida para a triagem inicial foi feita, pois Campbell acredita que a natureza constantemente produz moléculas que não foram pensadas pelos seres humanos. Eles descobriram o princípio ativo avermectina, produzido por bactérias isoladas do solo (Figura 1). A ivermectina, derivado da avermectina e que é mais eficiente que seu precursor, mata larvas dos vermes e tem diminuído radicalmente a incidência de doenças parasitárias, especialmente a oncocercose e elefantíase. Youyou Tu, em uma intensa pesquisa baseando-se na sua crença na medicina chinesa, descobriu o produto natural artemisinina, isolado a partir do extrato em éter dietílico da planta *Artemisia annua*. Artemisinina e alguns de seus derivados são uma classe muito importante de medicamento que diminuem significativamente a taxa de mortalidade de pacientes com malária (SHEN, 2015). Esse Prêmio Nobel tem um importante significado para as pesquisas com produtos naturais e intensifica os interesses nessa área.

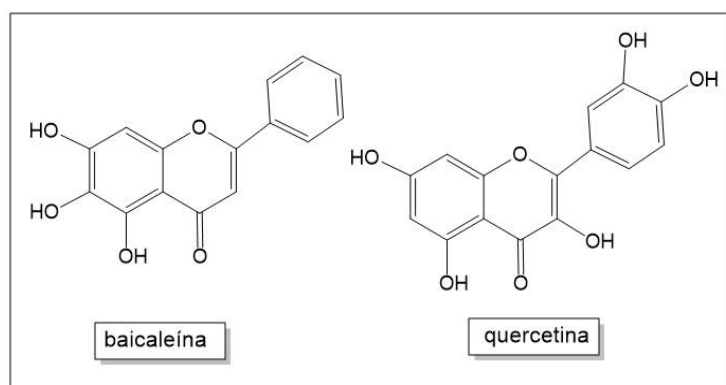


**Figura 1:** Estruturas químicas da avermectina, ivermectina e artemisinina.

Várias doenças reemergentes que demandam novas terapias, bem como o aumento das bactérias e vírus multirresistentes aos tratamentos disponíveis, têm despertado interesse crescente na triagem e desenvolvimento de novos fármacos



atualmente (ZHANG *et al.*, 2019). Por exemplo, o município de Belo Horizonte apresentou, em 2019, uma das maiores epidemias de dengue de sua história (EM, 2019). Apesar de ser uma doença antiga, as vacinas estão ainda sendo testadas e as opções terapêuticas disponíveis são bastante limitadas (DA SILVEIRA, 2019). A dengue é considerada um grave problema de saúde pública no mundo, infectando cerca de 400 milhões de pessoas mundialmente (LIM, 2019). O desenvolvimento de tratamento profilático e terapêutico usando produtos naturais é uma estratégia importante. A baicaleína, um flavonoide de estrutura simples, por exemplo, exerce uma atividade potente contra a adsorção do vírus na célula hospedeira e também inibe a replicação viral. Além disso, vários produtos naturais, como a quercetina, também um flavonoide simples e muito distribuído no reino vegetal, bem como extratos de algas marinhas, têm propriedades anti-dengue significativas (LIN *et al.*, 2014).



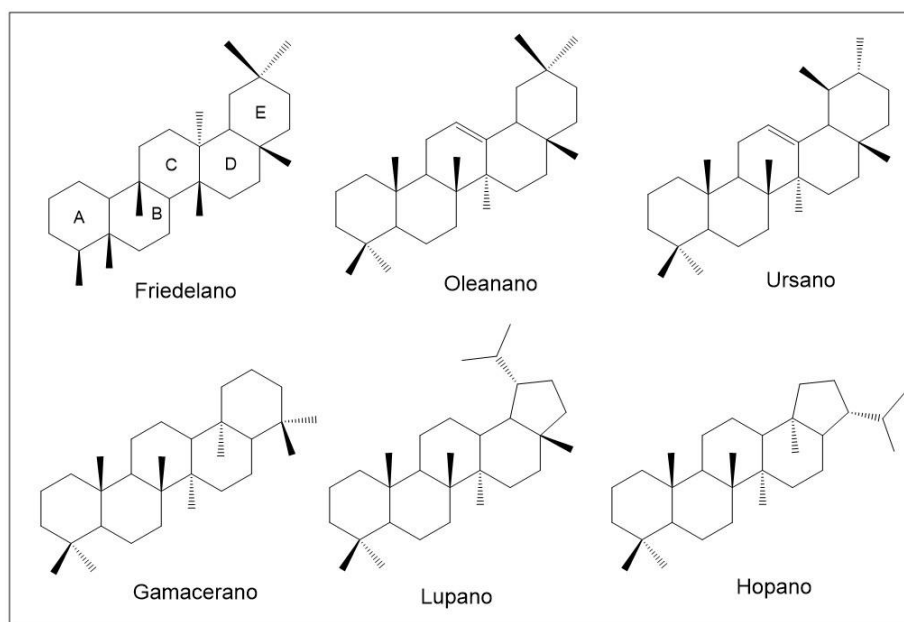
**Figura 2:** Flavonoides com atividade anti-dengue.

Dessa forma, a química de produtos naturais pode fornecer uma valiosa contribuição para o descobrimento de novos agentes para tratar as mais diversas doenças que acometem a população em todo o mundo.

### 1.1.2 Triterpenos pentacíclicos

Entre os produtos naturais, os triterpenos constituem uma classe de metabólitos secundários com mais de 20.000 moléculas identificadas a partir de plantas, animais e fungos. Estruturalmente, os triterpenos pentacíclicos (TTPC) são formados por um esqueleto de 30 átomos de carbono, tendo quatro anéis de seis membros, nomeados de anéis A, B, C e D, e um quinto anel, E, que pode ser de

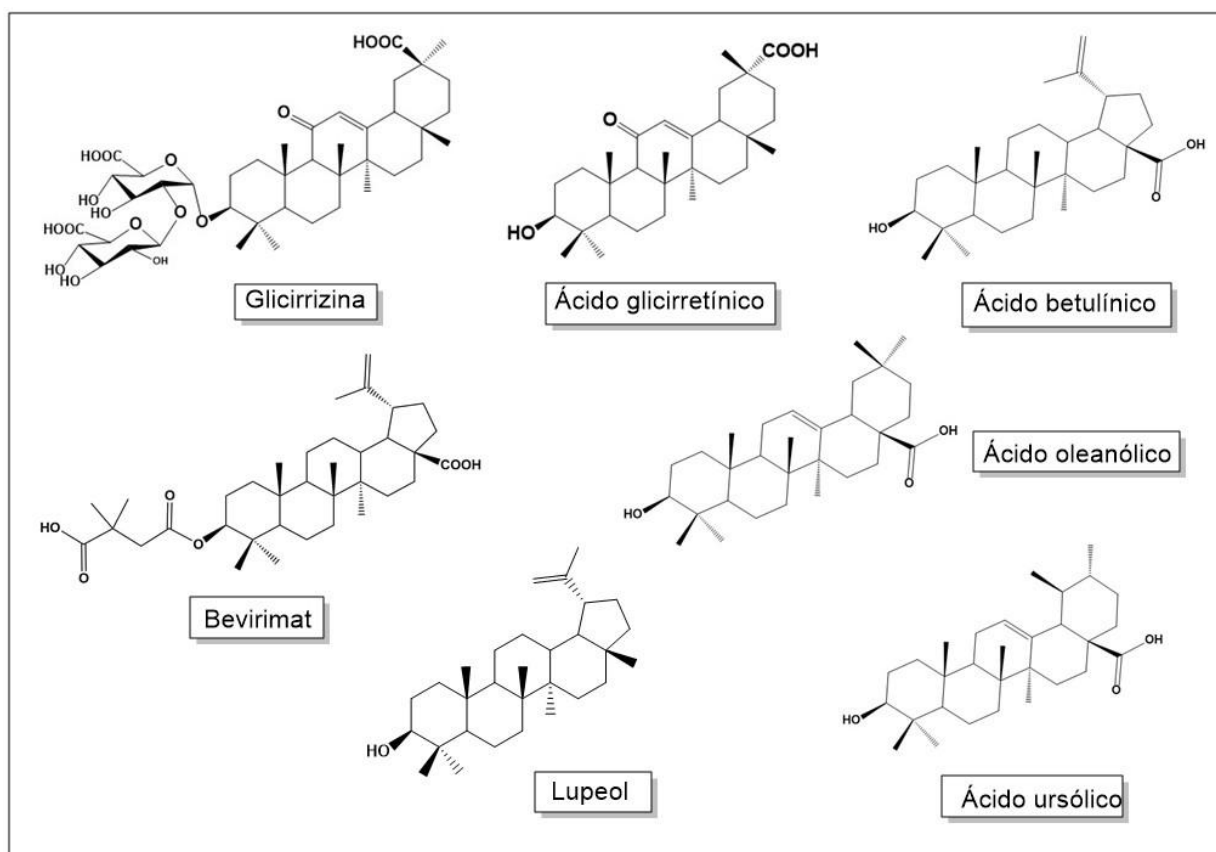
cinco ou seis membros (Figura 3). Eles são classificados de acordo com seu esqueleto, sendo os mais comuns os esqueletos friedelano, oleanano, ursano, gamacerano, lupano e hopano (Figura 3) (XIAO *et al.*, 2018). Eles podem ser encontrados esterificados com ácidos graxos, ácidos livres ou como saponinas, e podem ser os principais metabólitos secundários de plantas, como por exemplo as da família Celastraceae.



**Figura 3:** Alguns esqueletos de triterpenos pentacíclicos.

Diversas atividades biológicas são atribuídas aos triterpenos pentacíclicos, tais como atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antioxidante, analgésica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antitumoral e outros efeitos (GONZÁLEZ-COLOMA *et al.*, 2011; SHAN *et al.*, 2013; MENA REJÓN *et al.*, 2007). Atualmente, a atividade antiviral dos TTPC tem atraído grande atenção. A glicirrizina e o ácido glicirretínico (Figura 4, p. 5), por exemplo, foram intensamente estudados e apresentam inibição de uma variedade de vírus, incluindo o da hepatite B e HIV, além de mostrarem atividade anti-tumoral e anti-inflamatória (PADUCH e SZERSZEN, 2014). O ácido betulínico (Figura 4, p. 5) e vários de seus derivados, incluindo o bevirimat, mostram importante atividade anti-HIV. O bevirimat, ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico, foi o primeiro inibidor da maturação do HIV e esteve em testes clínicos em fase IIa. No entanto, 40–50% dos pacientes apresentaram resistência ao tratamento. Atualmente, outros derivados do bevirimat encontram-se

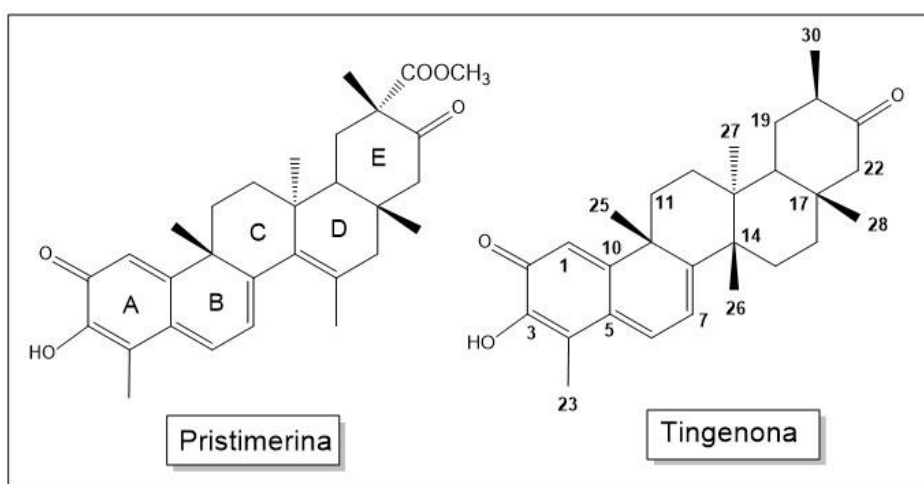
em testes clínicos, mas suas estruturas não são divulgadas ainda (XIAO *et al.*, 2018). O lupeol (Figura 4), encontrado em muitas plantas, apresenta potente atividade anti-inflamatória e anti-cancerígena, exibindo propriedades antimutagênicas e antiangiogênicas, inibindo o crescimento de cânceres altamente metastáticos, diminuindo suas capacidades migratórias. Estudos *in vivo*, mostraram que o lupeol levou à regressão de melanoma em cães (PADUCH e SZERSZEN, 2014). O ácido oleanólico e o ácido ursólico (Figura 4), triterpenos muito encontrados em plantas, têm sido recentemente muito estudados devido a seus efeitos anticâncer para vários tipos de tumores. Esses compostos inibem a proliferação de células tumorais e sua viabilidade, estando envolvidos no processo de apoptose. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que esses triterpenos são promissores agentes anticâncer (PIET e PADUCH, 2019). Além disso, apresentam atividades anti-inflamatórias e antivirais (JUNG *et al.*, 2018).



**Figura 4:** TTPC's com atividade biológica.

Os triterpenos quinonametídeos possuem um padrão de oxidação com carbonila em C-2 e grupo hidroxila em C-3 (Figura 5, p. 6). Além disso, um sistema

de insaturação conjugada estendida envolvendo os anéis A e B, confere características estruturais distintas das demais classes de TTPC (ALVARENGA e FERRO *et al.*, 2006). Até o momento, esses TTPC quinonametídeos foram encontrados apenas em Celastraceae, sendo marcadores taxonômicos dessa família (GOMES *et al.*, 2011), e a eles são atribuídas diversas atividades biológicas. A Pristimerina é isolada de diversas espécies como *Salacia reticulada*, *Salacia impressifolia* (DA SILVA, *et al.*, 2016) e *Tripterygium regelii* (SEO *et al.*, 2016). A tingenona, outro exemplo de quinonametídeo, é muito encontrada em plantas de vários gêneros da família Celastraceae, por exemplo *Austroplenckia populnea* (DUARTE *et al.*, 2002), *Maytenus acanthophylla* (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e *Hippocratea excelsa* (MENA-REJÓN *et al.*, 2007). Diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antimalárica, antioxidante e antivirais, são atribuídas à pristimerina e à tingenona (Figura 5) (DEEB *et al.*, 2014; SEO *et al.*, 2016). Além disso, suas atividades anticâncer são pronunciadas e vários estudos vêm sendo realizados com essas moléculas. Por exemplo, suas atividades citotóxicas contra linhagens tumorais do pulmão apresentaram  $CI_{50}$  em torno de 2 a 5  $\mu M$ , respectivamente (GOMES *et al.*, 2011). Além disso, a pristimerina inibe a proliferação e induz a apoptose em várias linhagens tumorais (adenocarcinoma) do pâncreas (DEEB *et al.*, 2014). A tingenona apresenta inibição da proteína tubulina, que pode ser o modo de ação que justifica a sua atividade citotóxica e antitumoral (MORITA *et al.*, 2008). Estudos de relação estrutura-atividade sugerem que os anéis A e B, que contêm um grupo carbonílico  $\alpha,\beta$  insaturado e ligações duplas conjugadas são essenciais para a atividade anticâncer (GOMES *et al.*, 2011).



**Figura 5:** Pristimerina e Tingenona.

Devido à grande variedade de propriedades farmacológicas apresentadas pelos TTPC e outras classes de metabólitos secundários, é bastante promissor o estudo fitoquímico e farmacológico de espécies da família Celastraceae.

### 1.1.3 Família Celastraceae

A família Celastraceae contém muitas espécies que têm sido estudadas em função de seu uso na medicina tradicional (SILVA *et al.*, 2011). Ela é composta por 98 gêneros e aproximadamente 1.264 espécies, apresentando-se geralmente como árvores ou arbustos (MEDEIROS *et al.*, 2010). As espécies estão distribuídas nas regiões tropical e subtropical, incluindo norte da África, América do Sul e Ásia (SPIVEY *et al.*, 2002). Várias espécies de plantas da família Celastraceae têm um uso tradicional na medicina popular para o tratamento de doenças como distúrbios estomacais, artrite reumatoide e câncer (SPIVEY *et al.*, 2002). *Maytenus ilicifolia* vem sendo utilizada em diversas regiões do Brasil, para o tratamento de úlceras gástricas, inflamações e diarreia. Além disso, algumas espécies têm sido usadas como estimulante do sistema nervoso central e para o tratamento de insônia, demonstrando o potencial farmacológico dessas plantas (FERREIRA *et al.*, 2019).

### 1.1.4 *Tontelea micrantha*

*Tontelea micrantha* (Figura 6, p. 8), uma espécie da família Celastraceae, é conhecida como rufão, e é encontrada no cerrado, especialmente no norte de Minas Gerais (MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2013). O extrato alcoólico das cascas de seu rizoma é usado para o tratamento de problemas renais. O óleo extraído de suas sementes (Figura 7, p. 8) é usado como anti-inflamatório e representa uma significativa fonte de renda de comunidades locais (MERCADANTE-SIMÕES e PAIVA, 2015), sendo atualmente comercializado em mercados de Montes Claros. Até o momento não foram encontrados trabalhos sobre estudo fitoquímico ou de atividade biológica da planta.



**Figura 6:** Fotos de *Tontelea micrantha* (acervo pessoal de Maria.Olívia Mercadante).



**Figura 7:** Fotos do óleo extraído das sementes de *Tontelea micrantha* (foto da autora) vendido em mercados de Montes Claros (MG).

Este trabalho traz o estudo fitoquímico das folhas, galhos e raízes de *T. micrantha*, e a determinação do perfil em ácido graxo do óleo extraído das sementes. Além disso, apresenta a avaliação biológica (atividades antimicrobiana, antiviral, citotóxica e de inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cardíaca) de extratos, substâncias isoladas e do óleo das sementes.

## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é contribuir com o estudo químico e biológico de *Tontelea micrantha*. Para isso, tem-se como objetivos específicos:

- Realizar o estudo fitoquímico de extratos de folhas, galhos e raízes.
- Caracterizar os constituintes químicos isolados.
- Determinar o perfil em ácido graxo do óleo extraído das sementes.
- Estudar as atividades antiviral, antimicrobiana, citotóxica e de inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cardíaca, dos extratos e/ou das substâncias isoladas.

## 1.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 1.3.1 Métodos gerais

#### *Cromatografia em camada delgada*

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada suspensão de sílica gel 60G, em placa de vidro de 0,25 mm de espessura, ativada a 100 °C em estufa. Além disso, foram utilizadas cromatoplasmas pré-fabricadas de sílica gel 60, de 0,2 mm de espessura da Sigma.

#### *Reagentes reveladores*

- Reagente: Vanilina-Ácido perclórico

Utilizou-se solução 1:1 de ácido perclórico a 3 % (v/v) em água e vanilina a 1 % (v/v) em etanol, seguida por aquecimento em estufa a 100 °C. Trata-se de um revelador geral, mas muito utilizado para detecção de triterpenos.

- Reagente NP/PEG

Composto pela solução A (Solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 2 %) e pela solução B (Solução etanólica de polietileno glicol-4000 a 5 %). A cromatoplasma é pulverizada com a solução A, seguida imediatamente da solução B e observada em luz UV. Fluorescências intensas principalmente nas cores laranja e amarelo esverdeado são indicativas da presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas.

- Reagente: Dragendorff

Este revelador é composto por duas soluções. A Solução A (0,85 g de nitrato de bismuto,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , dissolvidos em 50 mL de solução aquosa 20 % de ácido acético) e a solução B (20 mL de solução aquosa 40 % de iodeto de potássio, KI). Combinam-se as duas soluções obtendo-se a solução mãe. A solução para pulverização é preparada adicionando-se a 20 mL da solução mãe, 20 mL de ácido acético glacial e 60 mL de água destilada. Após a pulverização da cromatoplasma,



observa-se o desenvolvimento de coloração alaranjada que indica a presença de alcaloides e outros compostos nitrogenados.

### *Cromatografia em coluna (CC)*

As colunas cromatográficas clássicas foram preparadas utilizando-se como fases estacionárias sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) e sílica 0,040-0,063 mm (230-400 Mesh).

Para o preparo de colunas cromatográficas de exclusão foi utilizado Sephadex LH-20, partículas de 25-100  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Para o preparo do gel, este foi intumescido previamente por 24 horas com o solvente a ser usado.

Para coluna de extrato rico em flavonoides foi utilizada como fase estacionária a poliamida CC6 Macherey-Nagel com tamanho de partícula menor que 0,07 mm. A poliamida foi intumescida previamente por 24 horas com água antes do uso.

### *Solventes e reagentes*

Os solventes utilizados nos métodos cromatográficos foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. A água foi utilizada somente na coluna de adsorção com poliamida. A reutilização dos solventes, quando em mistura, para uma mesma coluna, foi feita após ajuste do índice de refração da luz, utilizando-se um refratômetro marca Briobrix. Solventes deuterados,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  e Piridina- $d_5$ , foram utilizados para obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D, e estão indicados em cada caso.

As temperaturas das faixas de fusão, sem correção, foram medidas em aparelho digital da Microquímica Equipamentos LTDA (MQAPF-302). As massas de extratos, frações e substâncias foram medidas em balança analítica AB104 Mettler Toledo ou balança semi-analítica AL500C Marte.

Os espectros na região do IV foram obtidos utilizando-se espectrômetro Shimadzu IR408 em pastilhas de KBr.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo SHIMADZU, equipado com duas bombas LC-20AT,

detector UV/VIS SPD-20<sup>a</sup>, programa LCsolution v.1.21 (SHIMADZU) e coluna Supelco-54919 (Nucleosil®, C-18, partículas de 5 µm, dimensão 250 x 3,2 mm).

Para cromatografia líquida de média pressão utilizou-se o equipamento Isolera One (Biotage®) equipado com detector UV/VIS, utilizando colunas de sílica SNAP Ultra®.

As análises no cromatógrafo a gás foram realizadas no Departamento de Química, em um equipamento HP7820A (Agilent) equipado com detector por ionização de chamas e coluna Supelcowax-10.

Espectro de massas de alta resolução foi obtido utilizando um espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo líquido de alta resolução, em equipamento MicroTOF QIII (Bruker Daltonics) com fonte de ionização por eletrospray e analisador *time of flight* (HR-ESI-TOF), operando em modo positivo.

Os espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DRX-400, Bruker Avance III HD Nanobay 400 MHz e Bruker Ascend Avance Neo 600 MHz, do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) no DQ da UFMG, operando a temperatura de 300 K. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna, e as constantes de acoplamento ( $J$ ) dadas em Hz.

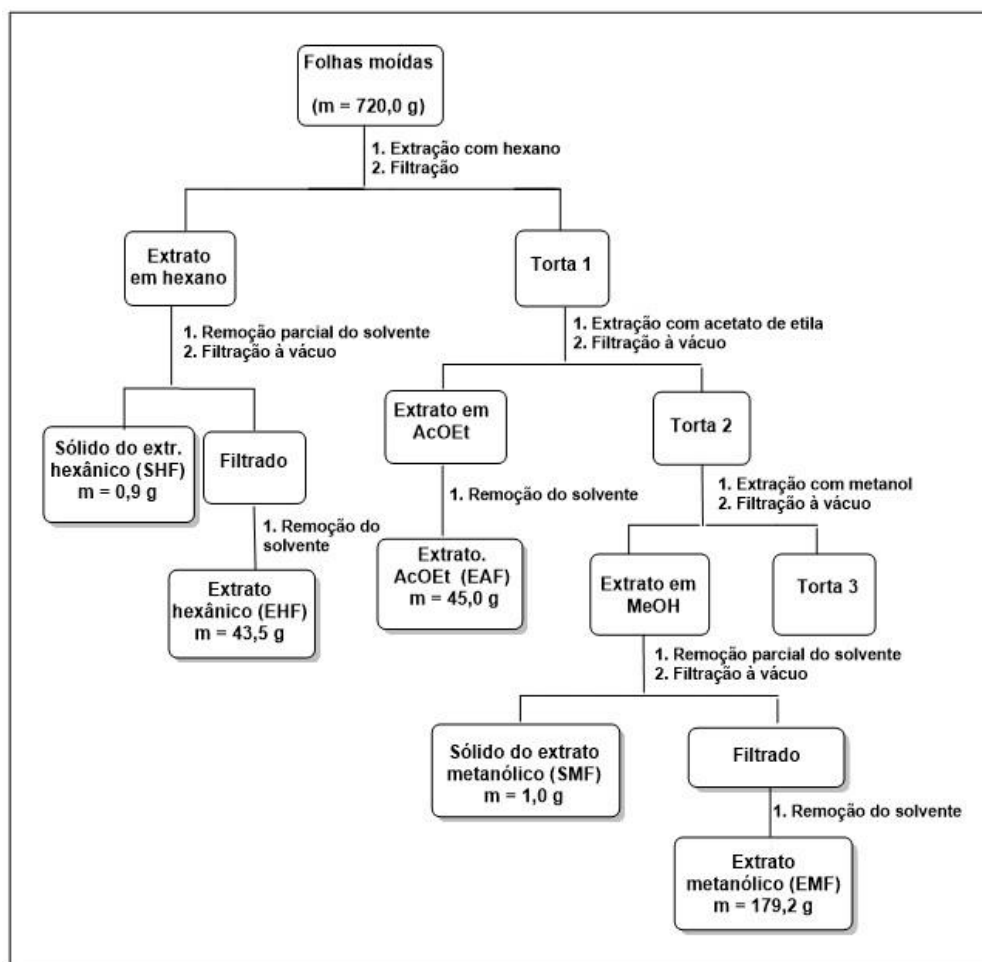
### 1.3.2 Coleta e identificação do material vegetal

Folhas, galhos e raízes de *Tontelea micrantha* foram coletados e identificados pela Professora Doutora Maria Olívia Mercadante Simões, em Montes Claros, Minas Gerais (16°52'15" S, 44°00'58" W). Uma exsicata do material encontra-se depositada no Herbário BHCB do Departamento de Botânica, no ICB/UFMG, sob o número 214.463. Esta coleta teve registro junto ao sistema nacional de gestão do patrimônio genético (SisGen), número de cadastro A7F8C85.

### 1.3.3 Preparo dos extratos de *Tontelea micrantha*

As folhas, galhos e raízes de *T. micrantha* foram secos à temperatura ambiente e moídos em moinho de martelos. As folhas moídas (720,0 g) foram submetidas a extrações exaustivas com hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), em ordem crescente de polaridade. Os galhos (2,6 Kg) e raízes

(1,8 Kg) moídos foram submetidos a extrações exaustivas, com Hex, clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), AcOEt e MeOH, em ordem crescente de polaridade. Durante a remoção do hexano em evaporador rotatório, para os extratos de folhas e galhos, foi observada a formação de sólidos brancos, que foram separados por filtração. Além disso, durante a remoção do metanol, do extrato metanólico das folhas, também ocorreu a precipitação de um sólido branco, que foi igualmente separado por filtração. Após filtração e remoção dos solventes, por destilação a pressão reduzida, foram obtidos os respectivos sólidos e extratos: **SHF** (sólido do extrato hexânico das folhas), **EHF** (extrato hexânico das folhas), **EAF** (extrato acetato de etila das folhas), **SMF** (sólido do extrato metanólico das folhas), **EMF** (extrato metanólico das folhas), **SHG** (sólido do extrato hexânico dos galhos), **EHG** (extrato hexânico dos galhos), **ECG** (extrato clorofórmico dos galhos), **EAG** (extrato acetato de etila dos galhos), **EMG** (extrato metanólico dos galhos), **EHR** (extrato hexânico das raízes), **ECR** (extrato clorofórmico das raízes), **EAR** (extrato acetato de etila das raízes) e **EMR** (extrato metanólico das raízes) (Figuras 8, 9 e 10, p. 13 e 14).



**Figura 8:** Esquema utilizado na preparação dos extratos das folhas de *T. micrantha*.

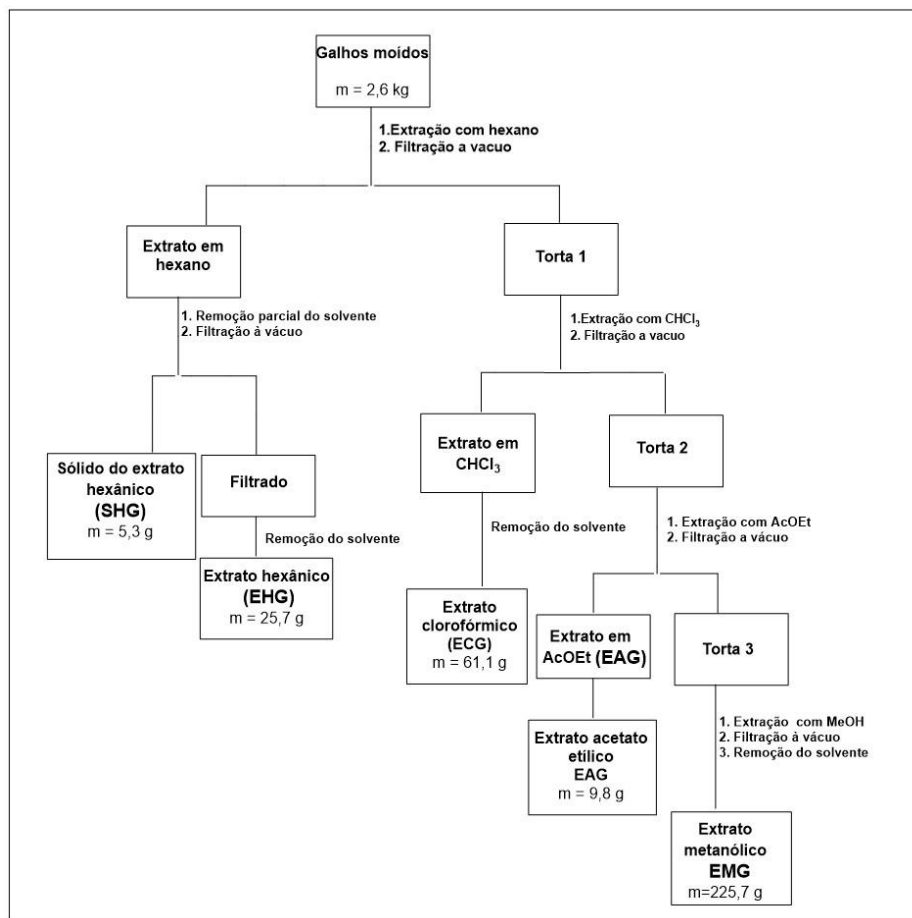


Figura 9: Esquema utilizado na preparação dos extratos dos galhos de *T. micrantha*.

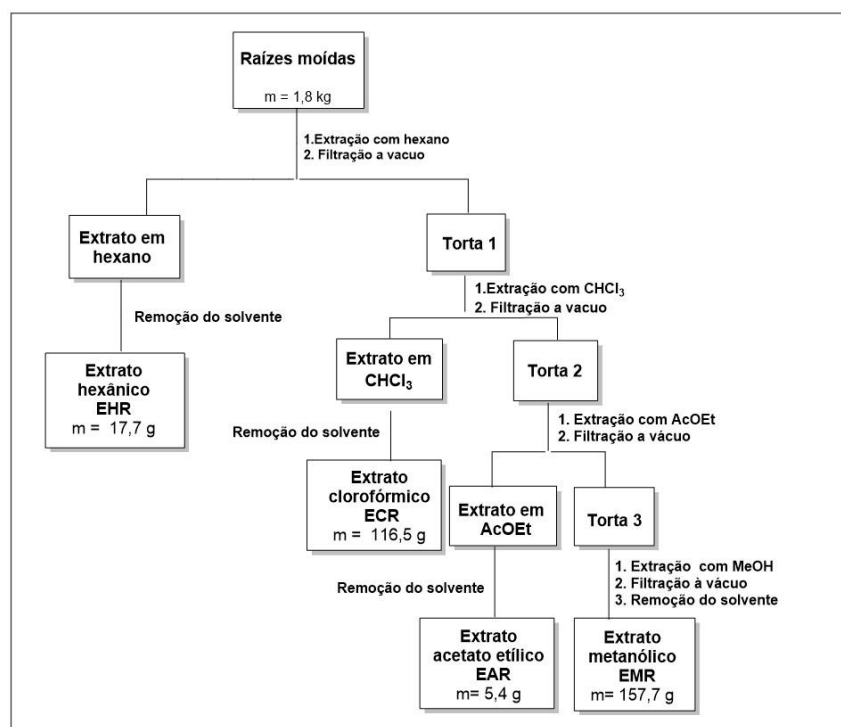


Figura 10: Esquema utilizado na preparação dos extratos das raízes de *T. micrantha*.

Os extratos **EAR** e **EMR** não foram fracionados pois não houve tempo suficiente. Todos os demais extratos foram utilizados para o estudo fitoquímico da planta, utilizando cromatografia em coluna. Todas as substâncias foram isoladas pela primeira vez na espécie *Tonateleia micrantha*.

A notação empregada para codificar as frações obtidas das colunas realizadas no estudo fitoquímico de *T. micrantha*, tem as letras da coluna seguida pela ordem de obtenção das mesmas. As frações recromatografadas foram escolhidas baseando-se em dois critérios: massa e perfil da fração em CCD. As frações cujas massas foram pequenas e que apresentavam perfil muito complexo em CCD não foram trabalhadas. As substâncias isoladas receberam as iniciais “TM” de *Tonateleia micrantha*, seguida pela ordem de isolamento das mesmas.

### 1.3.4 Estudo fitoquímico das folhas

#### 1.3.4.1 Fracionamento do extrato hexânico das folhas (EHF)

A aparência plástica do extrato **EHF** sugeria que guta percha estava presente em grande quantidade, e análise de CCD desse extrato confirmou a presença deste composto. Sendo assim, **EHF** (43,5 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante para separação da guta percha dos demais constituintes, conforme descrito por Oliveira (2012). Como fase estacionária utilizou-se sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) e como fases móveis foram utilizados metanol e clorofórmio. A primeira eluição foi feita com metanol, para arraste dos constituintes de **EHF**, exceto a guta percha que é insolúvel nesse solvente. Na segunda eluição utilizou-se clorofórmio que, então, solubilizou e arrastou a guta percha (**TM01**), obtendo-se 20,3 g desse composto e 15,0 g de **EHF** sem guta. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu confirmar a identidade de **TM01**.

Parte do **EHF** (14,0 g), sem guta percha, foi submetida à coluna cromatográfica (Coluna **HF**: 4,5 cm/1,1 m) utilizando-se 342,5 g de sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). Foram recolhidas 102 frações de 200 mL. Após redução do volume em evaporador rotatório, as frações foram reunidas em grupos, de acordo com o perfil apresentado em cromatoplacas. Os grupos mais promissores foram submetidos à purificação em cromatografia em

coluna e aqueles de perfis muito complexos ou de baixa massa não foram trabalhados.

O esquema do fracionamento do **EHF** é apresentado na Figura 11, p. 18.

**Grupo HF1 (frações 1-6):** apresentou-se como um óleo de cor amarelada (0,4100 g), cuja análise por CCD indicou a presença de uma única mancha de coloração azul. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o óleo como sendo **esqualeno (TM02)**.

**Grupo HF5 (frações 30-38):** apresentou-se como um material sólido em mistura com graxa alaranjada (3,5953 g), cuja análise por CCD revelou mais de quatro manchas roxas e uma amarela. O grupo foi recromatografado (Coluna **HFA**) utilizando-se 120,0 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 88 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HFA56-58** apresentou-se como um sólido cristalino branco (0,0450 g), e a análise por CCD apresentou uma única mancha amarela. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **friedelina (TM03)**. O subgrupo **HFA59-62** apresentou-se como um sólido cristalino branco em mistura com uma graxa amarela. Após sucessivas lavagens com hexano, o sólido (0,0982 g) foi separado. Análise por CCD, com amostras padrões, permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **friedelina (TM03)** e **3 $\beta$ -friedelinol (TM04)**. O subgrupo **HFA63-78** apresentou-se como um sólido branco (2,0404 g), cuja análise por CCD indicou duas manchas roxas e uma amarela. O material foi recromatografado (Coluna **HFB**) utilizando-se 105,6 g de sílica gel (230-400 Mesh), sendo recolhidas 186 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil em CCD. O subgrupo **HFB53-55** apresentou-se com um sólido cristalino branco (0,0120 g), e análise por CCD indicou uma única mancha amarela. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **friedelina (TM03)**. O subgrupo **HFB57-74** apresentou-se com um sólido cristalino branco (0,0858 g), e a análise por CCD revelou uma única mancha roxa. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3 $\beta$ -friedelinol (TM04)**. O subgrupo **HFA79-87** apresentou-se como um sólido cristalino branco (0,0730 g), e a análise por CCD indicou uma única mancha roxa. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico (TM05)**.

**Grupo HF6 (frações 39-45):** apresentou-se como um material sólido (3,5536 g) com graxa alaranjada cuja análise por CCD revelou quatro manchas roxas. O grupo foi recromatografado (Coluna **HFC**) utilizando-se 85,4 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 100 frações de 30 mL cada, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HFC35-45** apresentou-se como um sólido cristalino branco (0,1029 g). A análise de CCD com amostras padrões indicou tratar-se de uma mistura de **friedelina (TM03)** e **3 $\beta$ -friedelinol (TM04)**. O subgrupo **HFC46-67** apresentou-se como um sólido cristalino branco (0,0225 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06)**. O subgrupo **HFC68-84** apresentou-se como um sólido branco (0,1133 g), e análise por CCD evidenciou três manchas roxas. O material foi recromatografado (Coluna **HFD**) utilizando-se 12,8 g de sílica gel (230-400 Mesh), obtendo-se 77 frações de 10 mL. O subgrupo **HFD 53-55** apresentou-se como um sólido branco (0,0453 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , juntamente com a análise por cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas, permitiram identificar o material como sendo uma **mistura de ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico (TM07)**.

Para análise no cromatógrafo a gás para determinação do perfil de ácidos graxos, **TM07** (10 mg) foi primeiramente submetido à metilação, de acordo com metodologia desenvolvida por Vany Ferraz (SANDE *et al.*, 2018), descrita na página 44. A análise no cromatógrafo a gás foi realizada utilizando coluna Supelcowax-10 (30 m x 0,2 mm x 0,2  $\mu\text{m}$ ) com gradiente de temperatura: 120  $^{\circ}\text{C}$ , 0 min, 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 240  $^{\circ}\text{C}$ . Injetor (split de 1/50) a 250  $^{\circ}\text{C}$  e detector a 260  $^{\circ}\text{C}$ . Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (3,0 mL/min) e o volume de injeção foi 1  $\mu\text{L}$ . A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados Supelco37 FAME mix (Supelco cat no 47885-U).

**Grupo HF7 (frações 46-66):** apresentou-se como um material alaranjado composto por um sólido e resíduo de óleo (0,7353 g) e revelou quatro manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **HFE**) utilizando-se 23,0 g de sílica gel (230-400 Mesh), obtendo-se 37 frações de 25 mL. O subgrupo **HFE13-18** apresentou-se como um sólido branco (0,2630 g) que revelou apenas uma mancha roxa em cromatoplaça. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu identificar o sólido como sendo **28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06)**.

Os grupos **HF3**, **HF9** e **HF10** também foram recromatografados, mas nenhuma substância foi isolada.

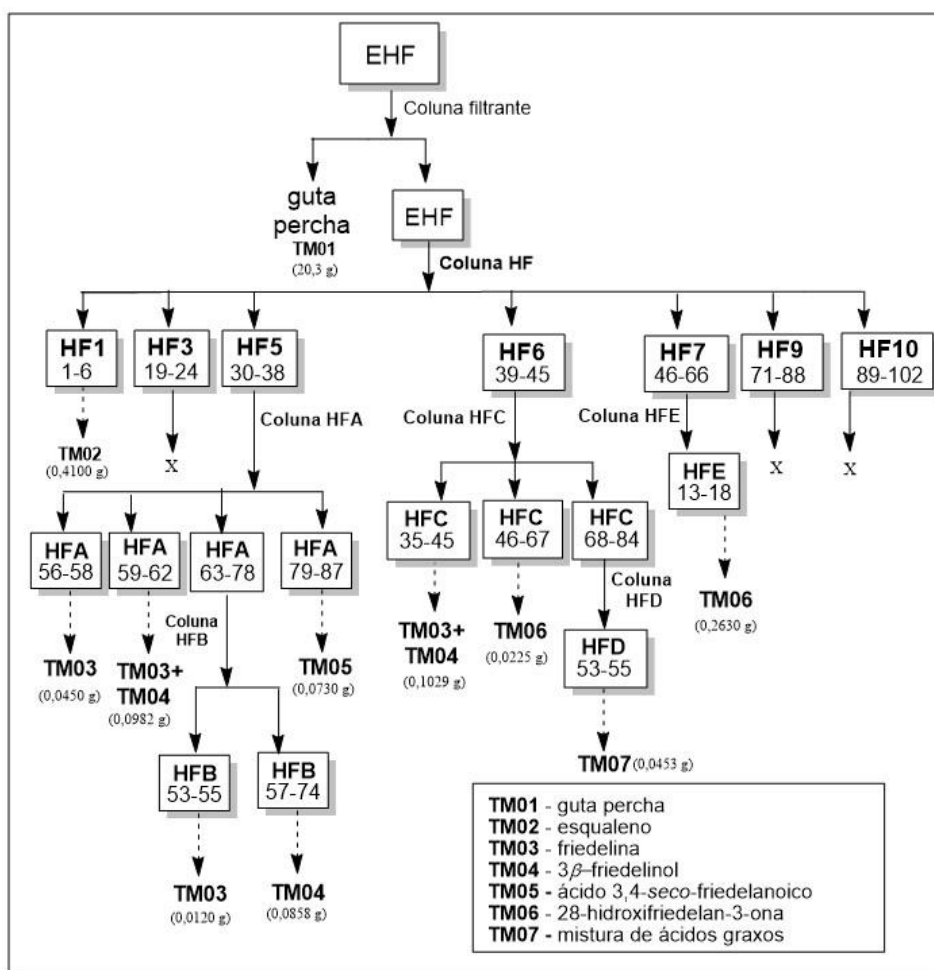


Figura 11: Esquema utilizado no fracionamento do EHF.

#### 1.3.4.2 Fracionamento do sólido do extrato hexânico das folhas (SHF)

O sólido **SHF** (0,9 g) foi obtido durante a remoção parcial do solvente do extrato hexânico e apresentou-se como um sólido amarelado. O material foi submetido à CC (Coluna **SF**) utilizando 61,9 g de sílica gel (70-230 Mesh), sendo recolhidas 101 frações de 20 mL. O grupo **SF32-38** apresentou-se como um sólido branco (0,0627 g) que revelou apenas uma mancha amarela em cromatoplaça. A análise de CCD comparando com amostra padrão permitiu identificar o sólido como sendo **friedelina** (TM03). O grupo **SF39-48** apresentou-se como um sólido branco (0,3240 g) que apresentou duas manchas em cromatoplaça. A análise de CCD



comparando com amostras padrões permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **friedelina (TM03)** e **3 $\beta$ -friedelinol (TM04)**.

### 1.3.4.3 Fracionamento do extrato acetato etílico das folhas (EAF)

O extrato **EAF** (45,0 g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica (Coluna **AF**) utilizando 920,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e foram obtidas 228 frações de 500 mL, que após terem seus volumes reduzidos foram agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplas. Os grupos mais promissores foram submetidos à cromatografia em coluna. O esquema do fracionamento do **EAF** é apresentado na Figura 12, p. 20.

**Grupo AF3 (frações 12-15):** apresentou-se como um material alaranjado composto por um sólido e resíduo de óleo (0,1118 g), e a análise por CCD do grupo indicou três manchas. O grupo foi recromatografado (Coluna **AFA**) utilizando-se 43,7 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 92 frações de 20 mL cada, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **AFA17-21** apresentou-se como um sólido branco (0,0263 g), e cuja análise por CCD comparando com amostras padrões permitiu identificá-lo como sendo **friedelina (TM03)**.

**Grupo AF5 (frações 24-49):** apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura (0,9650 g) e análise por CCD indicou cinco manchas. O grupo foi recromatografado (Coluna **AFB**) utilizando-se 100,5 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 62 frações de 25 mL cada, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **AFB19-21** apresentou-se como uma graxa verde com cristais de sólido aderidos às paredes dos frascos. O material foi então lavado com acetona, e um sólido branco precipitou. Após lavagens sucessivas o sólido foi separado (0,0092 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06)**.

**Grupo AF8 (frações 64-81):** apresentou-se como um material de coloração verde escura, de perfil complexo em CCD. O grupo (4,7072 g) foi recromatografado (Coluna **AFC**) utilizando-se 329,5 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 295 frações de 25 mL cada, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.



coluna cromatográfica (Coluna **MF**: 4,5 cm/1,1 m) utilizando poliamida CC6 (223,2 g) como fase estacionária. A poliamida foi previamente imersa em água mili-Q, por 24 horas. Como fases móveis foram utilizados água, metanol, acetato de etila e clorofórmio, em fase reversa de polaridade, puros ou em misturas. Foram recolhidas 52 frações de 400 mL. Todas as frações tiveram seus volumes reduzidos em evaporador rotatório, e aquelas que ainda apresentavam água foram liofilizadas. Posteriormente, as frações foram reunidas em grupos, de acordo com o perfil apresentado em CCD, reveladas com NP/PEG e/ou vanilina/ácido perclórico. O esquema do fracionamento do **EMF** é mostrado na Figura 13, p. 22.

**Grupo MF2 (frações 6-7):** apresentou-se como um sólido amarelado (0,6716 g) que apresentou manchas fluorescentes em CCD quando revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). O grupo foi submetido a coluna (Coluna **MFA**) de Sephadex LH-20 (344 mL) suspensa em metanol. A eluição foi isocrática empregando esse mesmo solvente, sendo recolhidas 20 frações de 15 mL. O subgrupo **MFA14-16** apresentou-se como um sólido amarelado (0,2349 g) e a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificá-lo como sendo **3-O- $[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow 2)]$  $[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow 6)]$ - $\beta\text{-D-glicopiranosídeo de quercetina (TM10)$ .**

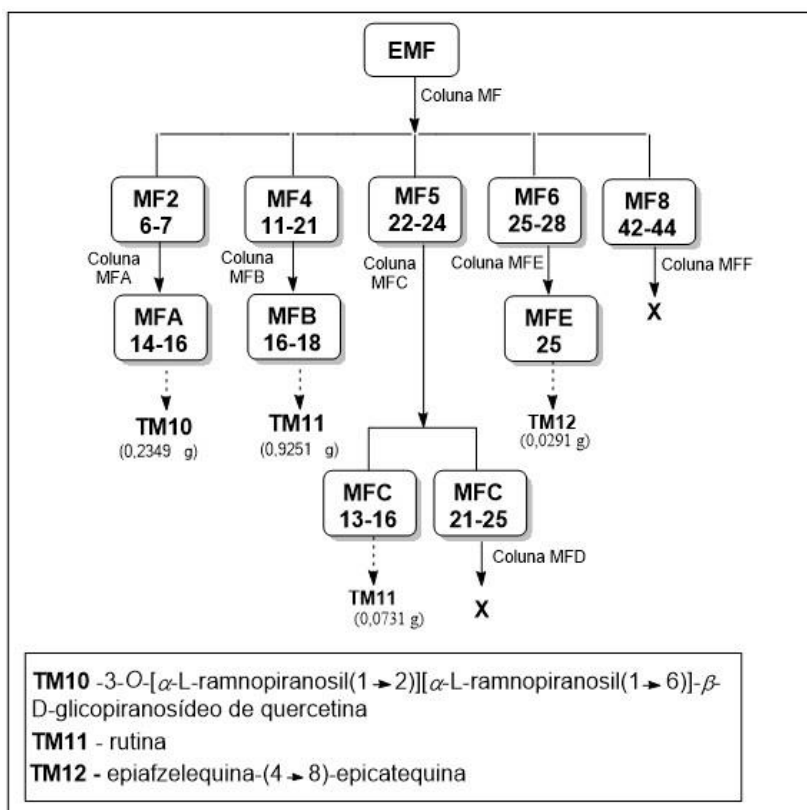
**Grupo MF4 (frações 11-21):** sólido amarelado (2,7086 g) que em CCD revelou apenas uma mancha alaranjada fluorescente (revelador NP/PEG/UV 365nm) e outras duas manchas quando reveladas com mistura vanilina/ácido perclórico. O material foi submetido à coluna (Coluna **MFB**) de Sephadex LH-20 (445 mL) suspensa em metanol. A coluna foi eluída isocriticamente com metanol, e foram obtidas 38 frações de 30 mL. A subfração **MFB16-18** apresentou-se como um sólido amarelado (0,9251 g) cuja análise por CCD mostrou uma mancha fluorescente (NP/PEG/UV). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **rutina (TM11)**.

**Grupo MF5 (frações 22-24):** sólido marrom (0,9732 g) que apresentou três manchas fluorescentes em CCD (revelador NP/PEG/UV 365nm). O material foi submetido à coluna (Coluna **MFC**) de Sephadex LH-20 (344 mL) suspensa em metanol. A coluna foi eluída isocriticamente com metanol, e foram obtidas 25 frações de 15 mL. A partir das subfrações **MFC13-16** foi obtida quantidade adicional

(0,0731 g) de **TM11**. A subfração **MFC21-25** (0,1689 g) foi submetida à purificação em coluna (Coluna **MFD**) de Sephadex LH-20 (85,4 mL) suspensa em metanol e eluída com este solvente, mas não foi possível isolar qualquer substância.

**Grupo MF6 (frações 25-28):** sólido marrom avermelhado (1,1520 g) que apresenta em CCD uma mancha fluorescente (revelador NP/PEG/UV 365nm) e uma mancha vermelha quando revelada com ácido perclórico/vanilina. O material foi submetido à coluna (Coluna **MFE**) de Sephadex LH-20 (445 mL) suspensa em metanol. A coluna foi eluída isocraticamente com metanol, e foram obtidas 30 frações de 15 mL. A subfração **MFE25** apresentou-se como um sólido vermelho cristalino (0,0291 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (TM12)**.

**Grupo MF8 (frações 42-44):** apresentou-se como um material verde escuro (0,4363 g) de perfil complexo em CCD (revelador ácido perclórico/vanilina) e que não apresentou manchas fluorescentes (NP/PEG/UV 365 nm). O grupo foi recromatografado (Coluna **MFF**) utilizando 210 mL de Sephadex LH-20 suspensa em metanol e eluída isocraticamente com o mesmo solvente. Nenhuma substância foi identificada.



**Figura 13:** Esquema utilizado no fracionamento do **EMF**.

Parte do **EMF** foi também submetida a fracionamentos em CC de sílica gel e Sephadex LH-20, na tentativa de serem isolados outros compostos, mas não foi possível obter qualquer substância. Isso demonstrou que para extratos polares ricos em flavonoides, a utilização de cromatografia de adsorção de poliamida é a melhor alternativa. Além disso, algumas frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em colunas analítica e preparativa de C-18, mas não foi possível identificar qualquer substância.

### 1.3.5 Estudo fitoquímico dos galhos

#### 1.3.5.1 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos (EHG)

A aparência plástica do material sugeriu que esse extrato também apresentava guta percha, o que foi confirmado pelo perfil apresentado em CCD comparando com amostra padrão dessa substância. Dessa forma, **EHG** (25,7 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante de sílica gel (70-230 Mesh) (300,8 g) utilizando primeiramente o metanol e em seguida o clorofórmio, como eluentes. As primeiras frações eluídas com metanol apresentaram coloração amarela e foram agrupadas, sendo esse material denominado **EHG-1** (2,2 g). As demais frações foram agrupadas e esse material foi denominado **EHG-2** (20,4 g). Foram obtidos 1,50 g de guta percha. Os extratos **EHG-1** e **EHG-2** foram trabalhados separadamente.

##### 1.3.5.1.1 Fracionamento do EHG-1

Parte do **EHG-1** (1,8 g) foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna **HG**), utilizando-se 170,4 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 212 frações de 30 mL, que foram reunidas em grupos, de acordo com o perfil em CCD. O esquema do fracionamento do **EHG-1** é mostrado na Figura 14, p. 24.

**Grupo HG1 (frações 91-105):** apresentou-se como um sólido branco, com resíduo de óleo amarelado, que indicou três manchas em CCD. O material foi lavado sucessivas vezes com hexano e o sólido foi separado. Análise de CCD revelou duas

manchas, uma amarela e uma roxa e a comparação com padrões permitiu identificar o sólido (0,0370 g) como uma mistura de **friedelina (TM03)** e **3 $\beta$ -friedelinol (TM04)**.

**Grupo HG3 (frações 123-125):** apresentou-se como um sólido amarelado com resíduo oleoso (0,3963 g), que revelou três manchas em CCD. O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **HGA**) utilizando 16,0 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 33 frações de 10 mL. A partir do subgrupo **HGA19-29** foi isolado um sólido branco (0,2832 g), que indicou apenas uma mancha amarela em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de **friedelan-3,21-diona (TM13)**.

**Grupo HG5 (frações 129-130):** apresentou-se como um sólido branco (0,0770 g) que indicou apenas uma mancha em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM14)**.

**Grupo HG6 (frações 131-137):** apresentou-se como um sólido amarelado com resíduo oleoso (0,1399 g), que indicou três manchas em CCD. O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **HGB**) utilizando 17,9 g de sílica gel (230-400 Mesh), obtendo-se 59 frações de 10 mL. A partir do subgrupo **HGB34-41** foi isolado um sólido branco (0,0666 g), que indicou duas manchas em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de uma mistura de **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM15)** e **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**.

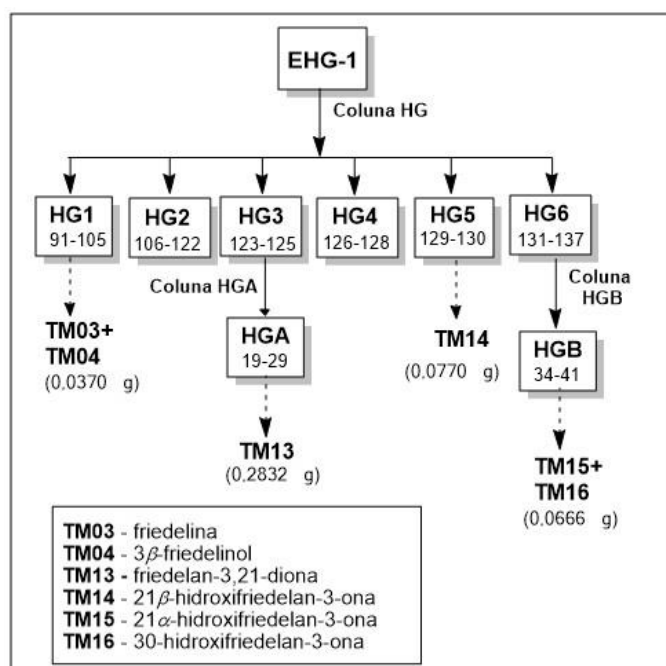


Figura 14: Esquema utilizado no fracionamento do EHG-1.

### 1.3.5.1.2 Fracionamento do EHG-2

Parte do **EHG-2** (14,2 g) foi submetida à coluna cromatográfica (Coluna **HGA**) utilizando-se 619,5 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 65 frações de 250 mL, que foram reunidas em grupos, de acordo com o perfil em CCD. O esquema de fracionamento do **EHG-2** é mostrado na Figura 15, p. 26.

**Grupo HGS3 (frações 31-32):** apresentou-se como um sólido com resíduo graxo verde (5,3332 g) que revelou quatro manchas em CCD. O material foi lavado sucessivas vezes com hexano e o sólido foi separado e recromatografado em CC (Coluna **HGSA**) utilizando 400,1 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 90 frações de 30 mL utilizando hex, AcOEt e MeOH puros ou em gradientes de polaridade. Os subgrupos **HGSA52-59** (1,2002 g) e **HGSA60-84** (1,0802 g) foram recromatografados, separadamente, em CC (Coluna **HGSB** e Coluna **HGSC**, respectivamente). Para a Coluna **HGSB** foram utilizados 80,5 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram recolhidas 157 frações de 10 mL. Para a Coluna **HGSC** foram utilizados 64,3 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram recolhidas 75 frações de 10 mL. A partir do subgrupo **HGSB119-129** foi isolado um sólido branco (0,5988 g), que indicou uma mancha amarela em CCD. A análise de CCD comparando com amostras padrões isoladas indicou tratar-se de **friedelina (TM03)**. A partir do subgrupo **HGSC46-47** foi isolado um sólido branco (0,3253 g), cuja análise por CCD, comparando com amostras padrões já isoladas, indicou tratar-se de mistura de **friedelina (TM03)** e **3 $\beta$ -friedelinol (TM04)**. O subgrupo **HGSC48-52** (0,4500 g) apresentou-se como um sólido branco com um resíduo oleoso esverdeado, que apresentou duas manchas roxas em CCD. O material foi recromatografado em CC (Coluna **HGSD**) utilizando 47,1 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram recolhidas 75 frações de 10 mL. A partir do subgrupo **HGSD26-30** foi isolado um sólido branco (0,2605 g), que indicou duas manchas roxas em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de uma mistura de **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM15)** e **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**. A partir do subgrupo **HGSD38-48** foi isolado um sólido branco (0,0853 g), que indicou uma mancha roxa em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de **30-hidroxifriedelan-3-ona puro (TM16)**.





### 1.3.5.2 Fracionamento do sólido do extrato hexânico dos galhos (SHG)

**SHG** foi obtido durante a remoção parcial do solvente do extrato hexânico dos galhos e apresentou-se como um sólido branco. Este sólido (5,3070 g) foi submetido à CC (Coluna **SGA**) utilizando-se 390,6 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh), e foram obtidas 321 frações de 15 mL, agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplasas. Na Figura 16, p. 28, é mostrado o esquema do fracionamento do **SHG**.

**Grupo SGA1 (frações 136-153):** obtido como um sólido branco (0,0279 g), cuja análise de CCD, comparando com amostras padrões, indicou tratar-se de **friedelina (TM03)**.

**Grupo SGA3 (frações 167-180):** apresentou-se como um sólido branco (0,0626 g) que revelou uma mancha roxa em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de **3-oxo-friedelan-28-al (TM17)**.

**Grupo SGA4 (frações 181-189):** isolado como um sólido branco (2,2008 g) que indicou uma mancha roxa em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se de **friedelan-3,21-diona (TM13)**.

**Grupo SGA5 (frações 190-197):** apresentou-se como um sólido amarelado graxo (0,9573 g) que indicou duas manchas roxas em CCD. O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **SGB**) utilizando 45,1 g de sílica gel (230-400 Mesh), obtendo-se 111 frações de 10 mL. A partir do subgrupo **SGB33-34** foi isolado um sólido branco (0,0180 g), que indicou uma mancha em CCD. A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **friedelan-3,21-diona (TM13)** e **friedel-1-en-3,21-diona (TM18)**. Esse triterpeno insaturado (**TM18**) é inédito na literatura. O subgrupo **SGB35-43** apresentou-se como um sólido graxo amarelado (0,7670 g) que revelou duas manchas em CCD. O material foi submetido a CC (Coluna **SGC**) utilizando 49,3 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram recolhidas 78 frações de 15 mL. A partir da fração **SGC43** foi isolado um sólido branco (0,0052 g), que indicou uma mancha amarela em CCD. A análise de

CCD comparando com amostras padrões indicou tratar-se de **friedelan-3,21-diona (TM13)**. A partir do subgrupo **SGC45-50** foi isolado um sólido branco (0,5350 g), que indicou uma mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais, indicou tratar-se do triterpeno **friedelan-1,3,21-triona (TM19)**. Esse triterpeno é inédito na literatura.

**Grupo SGA6 (frações 198-245):** apresentou-se como um sólido graxo esverdeado (1,1742 g) que indicou quatro manchas roxas em CCD. O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **SGD**) utilizando 65,7 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram recolhidas 81 frações de 15 mL. A partir do subgrupo **SGD40-44** foi isolado um sólido branco, que foi submetido a CC (Coluna **SGE**) utilizando 60,25 g de sílica gel (230-400 Mesh) e sob pressão, sendo recolhidas 39 frações de 10 mL. A partir das subfrações **SGE19-20** foi obtido **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM15)** (0,0391 g) e a partir das subfrações **SGE30-33** foi obtida quantidade adicional (0,0563 g) de **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**.

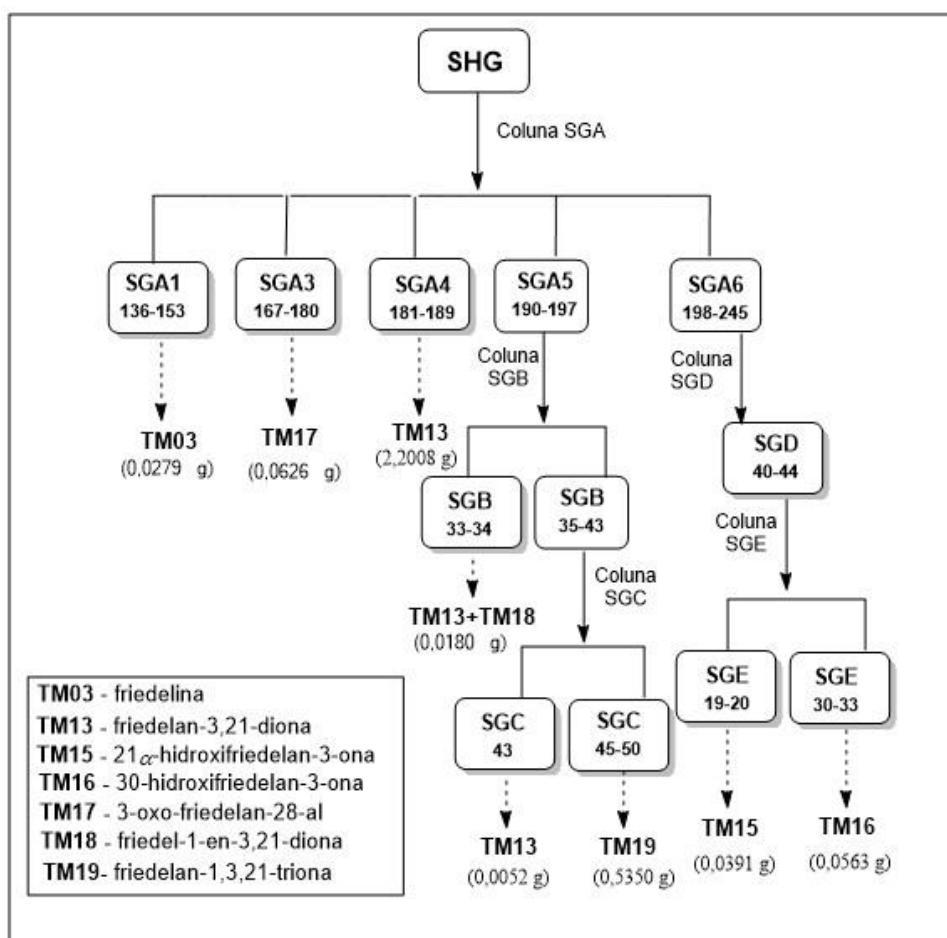


Figura 16: Esquema utilizado no fracionamento do SHG.

### 1.3.5.3 Fracionamento do extrato clorofórmico dos galhos (ECG)

O extrato **ECG** apresentou-se com uma aparência plástica e cor verde e análise de CCD indicou a presença de guta percha. Dessa forma, **ECG** (61,09 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante de sílica gel (70-230 Mesh) para separação da guta percha, usando a mesma metodologia apresentada anteriormente. Foram obtidos 19,69 g desse composto e 41,4 g de **ECG** sem guta. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu confirmar a identidade de **TM01**.

O extrato **ECG** (38,5 g) sem guta percha foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna **CG**: 4,5 cm/1,1 m) utilizando-se 834,1 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram recolhidas 181 frações de 250 mL, que tiveram seus volumes reduzidos em evaporador rotatório. Em seguida, as frações foram agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplasas. O esquema de fracionamento do **ECG** está mostrado na Figura 17, p. 33.

**Grupo CG1 (frações 24-36):** apresentou-se como um sólido amarelado (0,1808 g), que foi recromatografado (Coluna **CGA**) utilizando-se 21,7 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 72 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **CGA10-13** apresentou-se como um sólido branco (0,0254 g). A análise de CCD com amostra padrão e a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiram identificar o sólido como sendo **28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06)**.

**Grupo CG2 (frações 37-38):** apresentou-se como um sólido amarelado (0,2856 g), que indicou três manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **CGB**), utilizando-se aparelho de cromatografia de média pressão equipado com detector UV/VIS (254 e 280 nm), utilizando coluna de sílica SNAP Ultra® (100 g). Como eluentes foram empregados hexano, acetato de etila e metanol, em fluxo de 75 mL/min, e foram obtidas 45 frações de 15 mL. O subgrupo **CGB4-10**, foi lavado com hexano e um sólido branco (0,0349 g) foi separado. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-friedelan-28-al (TM17)**.

**Grupo CG3 (frações 39-46):** apresentou-se como um material sólido com resíduo de óleo amarelado (3,6780 g). Após sucessivas lavagens com hexano foi obtido um sólido branco (2,5991 g). A análise de CCD comparando com amostra padrão e a

análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiram identificar o sólido como sendo **friedelan-3,21-diona (TM13)**.

**Grupo CG4 (frações 47-56):** apresentou-se como um material sólido graxo esverdeado (3,2776 g), que indicou três manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **CGC**) utilizando-se 129,06 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 73 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil em CCD. O subgrupo **CGC28-39** apresentou-se como um sólido branco (2,3621 g). A análise em CCD com amostra padrão e a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiram identificar o sólido como sendo **friedelan-3,21-diona (TM13)**. O subgrupo **CGC 40-46** apresentou-se como um sólido branco (0,0251 g) e identificado como sendo  **$\beta$ -sitosterol (TM20)**, após análise dos seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Grupo CG5 (fração 57):** apresentou-se como um material graxo esverdeado (0,1524 g), que indicou duas manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **CGD**) utilizando-se 13,057 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 28 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **CGD10-12** apresentou-se como um sólido branco (0,0561 g). A análise por CCD com amostra padrão permitiu identificar o sólido como sendo **friedelan-3,21-diona (TM13)**. O subgrupo **CGD13-14** apresentou-se como um sólido branco (0,0405 g), que mostrou uma mancha roxa em CCD. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mostrou tratar-se de uma mistura de  **$21\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM14)** e **friedel-1-en-3,21-diona (TM18)**. Dessa forma, este sólido foi submetido a uma coluna de sílica gel (230-400 Mesh) (Coluna **AgG**) incorporada com nitrato de prata. Para isso, 1,0173 g de  $\text{AgNO}_3$  foram dissolvidos em 10 mL de água destilada e a solução resultante foi misturada a 10,11 g de sílica. A mistura foi então deixada em estufa a 60 °C, na ausência de luz por 3 dias. Após a secagem, a coluna (coberta por papel alumínio) foi empacotada com Hex/ $\text{CHCl}_3$  1:1, em capela com baixa luminosidade. Foram recolhidas 24 frações de 10 mL, mas não houve a separação dos constituintes da mistura.

**Grupo CG6 (fração 58-59):** apresentou-se como um material graxo esverdeado (0,3718 g), que indicou duas manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **CGE**) utilizando-se 38,8625 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 42 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em

CCD. O subgrupo **CGE17-20** apresentou-se como um sólido branco (0,3063 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **friedelan-3,21-diona (TM13)** e **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM14)**.

**Grupo CG7 (fração 60-68):** apresentou-se como um sólido graxo esverdeado (2,9933 g), que indicou duas manchas em CCD. O material foi lavado várias vezes com acetona e o sólido (0,9580 g) foi separado. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06)** e **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM14)**. Essa mistura foi submetida a novos fracionamentos em coluna de sílica gel (Colunas **CGF** e **CGG**) para se obter quantidades adicionais destes triterpenos puros, no entanto, não houve separação.

**Grupo CG8 (fração 69-95):** apresentou-se como um sólido graxo esverdeado (4,5693 g), que revelou duas manchas em CCD. O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **CGH**) utilizando 330,55 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram obtidas 352 frações de 40 mL. A partir do subgrupo **CGH258-260** foi isolado um sólido branco (0,2404 g), que foi identificado como sendo uma mistura de **28-hidroxifriedelan-3-ona (TM06)** e **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM14)** após análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O subgrupo **CGH267-293** apresentou-se como um sólido branco (1,7711 g) e a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificá-lo como sendo uma mistura de **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM15)** e **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**. O subgrupo **CGH294-297** revelou uma mancha em CCD e a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido (0,0593 g) como sendo **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**.

**Grupo CG9 (fração 96-98):** apresentou-se como um sólido graxo esverdeado (0,1504 g), que foi lavado sucessivas vezes com acetona, obtendo-se um sólido branco (0,0672 g). A análise de CCD com amostra padrão e a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiram identificar o sólido como sendo **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**.

**Grupo CG10 (fração 99-104):** apresentou-se como um sólido graxo esverdeado (1,0305 g), que foi recromatografado em CC (Coluna **CGI**) utilizando 99,59 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram obtidas 184 frações de 30 mL. A partir do subgrupo

**CGI80-88** foi isolado um sólido branco (0,2847 g), que mostrou uma mancha em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **ácido 3-oxo-friedelan-28-oico (TM21)**.

**Grupo CG12 (fração 130-136)**: apresentou-se como um sólido graxo esverdeado (0,9670 g), que foi recromatografado em CC (Coluna **CGJ**) utilizando 48,075 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram obtidas 40 frações de 30 mL. A partir do subgrupo **CGJ19-20** foi isolado um sólido branco (0,0151 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM22)** e um segundo triterpeno pentacíclico que não foi possível identificar.

**Grupo CG13 (fração 137-144)**: apresentou-se como um material verde graxo (3,2257 g). O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **CGL**) utilizando 223,11 g de sílica gel (230-400 Mesh) e foram recolhidas 95 frações de 30 mL. O subgrupo **CGL74-77** foi lavado com acetona e um sólido branco foi separado (0,0489 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM23)**. O subgrupo **CGL82-85** foi também lavado com acetona e um sólido branco foi separado (0,0807 g). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM24)**.

**Grupo CG14 (fração 145-152)**: apresentou-se como uma graxa esverdeada (2,3227 g) com perfil complexo em CCD. O grupo foi submetido à CC (Coluna **CGM**) de sílica gel, mas nenhuma substância foi isolada ou identificada.

**Grupo CG15 (fração 153-159)**: apresentou-se como uma graxa esverdeada (1,8736 g) com perfil complexo em CCD. O material foi recromatografado (Coluna **CGN**) utilizando sílica gel (230-400 Mesh), mas não foi possível o isolamento ou identificação de qualquer substância.

**Grupo CG16 (fração 160-168)**: apresentou-se como uma graxa esverdeada (2,2475 g) de perfil complexo em CCD. O grupo foi recromatografado em CC (Coluna **CGO**) utilizando 253,74 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram recolhidas 94 frações de 40 mL. O subgrupo **CGO81-96** foi lavado sucessivas vezes com acetona e um sólido branco foi separado (0,1806 g). A partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e

$^{13}\text{C}$  foi possível identificar o sólido como sendo **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (TM08)**.

**Grupo CG17 (fração 169-181):** apresentou-se como uma graxa esverdeada, que mostrou perfil complexo em CCD. O grupo foi submetido a coluna cromatográfica (Coluna **CGP**) mas não foi possível o isolamento ou identificação de qualquer substância.

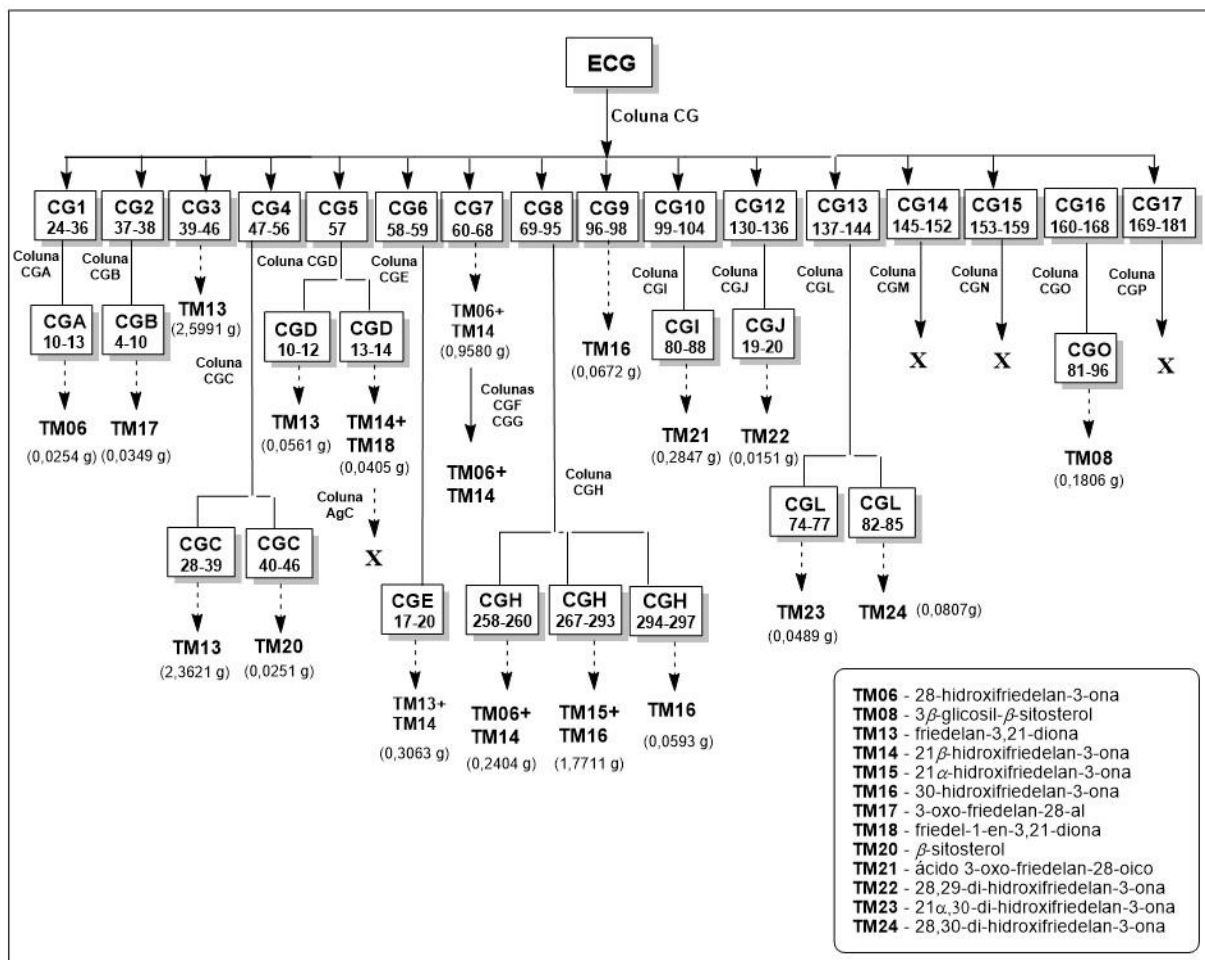


Figura 17: Esquema utilizado no fracionamento do ECG.

### 1.3.5.4 Fracionamento do extrato acetato etílico dos galhos (EAG)

O extrato **EAG** (9,745 g) foi submetido à coluna cromatográfica CC (Coluna **AG**), utilizando-se 568,55 g de sílica gel (70-230 Mesh). Foram recolhidas 125 frações de 125 mL, que tiveram seus volumes reduzidos em evaporador rotatório. Em seguida, as frações foram agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplas. O esquema do fracionamento do **EAG** é mostrado na Figura 18, p. 34.

**Grupo AG3 (frações 53-54):** apresentou-se como um sólido verde graxo (0,0835 g) que indicou quatro manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **AGA**) utilizando-se 10,2 g de sílica gel (70-230 Mesh), e foram obtidas 25 frações de 25 mL. O subgrupo **AGA8** apresentou-se como um sólido branco (0,0231 g). A análise de CCD com amostra padrão e a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiram identificar o sólido como sendo **friedelan-3,21-diona (TM13)**.

**Grupo AG4 (frações 55-71):** apresentou-se como um material verde graxo (0,0631g) com várias manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **AGB**) utilizando sílica gel (70-230 Mesh), mas não foi possível a identificação ou isolamento de qualquer substância.

**Grupo AG5 (frações 72-92):** apresentou-se como um material verde graxo com várias manchas em CCD. O grupo foi submetido à CC (Coluna **AGC**) de sílica gel (70-230 Mesh), no entanto nenhuma substância foi isolada ou identificada.

**Grupo AG7 (frações 97-125):** apresentou-se como um sólido amarelado (2,0752 g) que indicou quatro manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **AGD**) utilizando-se 198,55 g de sílica gel (70-230 Mesh). Foram obtidas 107 frações de 30 mL que foram agrupadas de acordo com o perfil em CCD. O subgrupo **AGD69-75** apresentou-se como um sólido branco (0,0523 g) que foi identificado como sendo **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (TM08)**, a partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

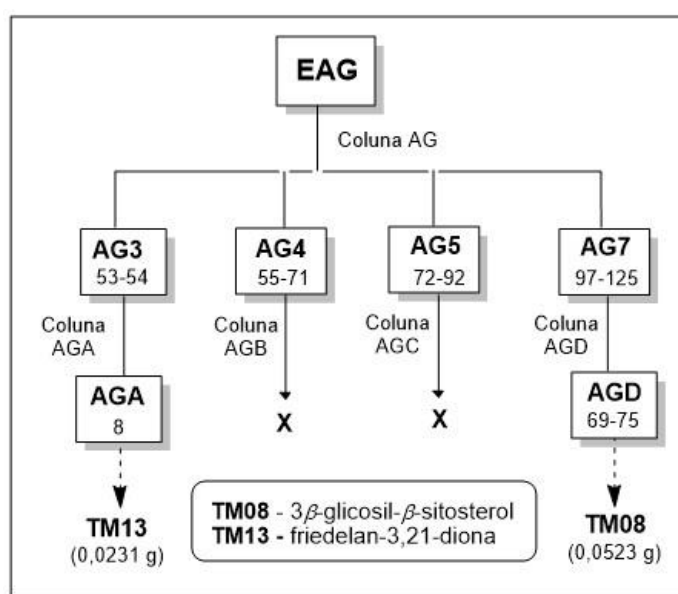


Figura 18: Esquema utilizado no fracionamento do EAG.



### 1.3.5.5 Fracionamento do extrato metanólico dos galhos (EMG)

O extrato **EMG** apresentou-se como um sólido marrom avermelhado e a CCD não apresentou manchas fluorescentes, características de flavonoides, em cromatoplaça revelada com solução NP/PEG e analisada sob luz UV (365 nm).

Parte do **EMG** (60,659 g) foi submetida à coluna cromatográfica (Coluna **MG**: 4,5 cm/0,90 m) utilizando-se 849,467 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram recolhidas 56 frações de 250 mL, que tiveram seus volumes reduzidos em evaporador rotatório. Em seguida, as frações foram agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplaças. O esquema do fracionamento do **EMG** é mostrado na Figura 19, p. 36.

**Grupo MG1 (fração 20-21):** apresentou-se como um sólido branco (0,2305 g) que revelou uma mancha vermelha em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou tratar-se do flavonoide **epicatequina (TM25)**.

**Grupo MG3 (fração 25):** apresentou-se como um sólido esverdeado (0,1529 g) que revelou uma mancha vermelha com rastro em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **MGA**), utilizando-se 7,5 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram obtidas 49 frações de 20 mL que foram agrupadas de acordo com o perfil em CCD. O subgrupo **MGA26-27** apresentou-se como um sólido branco (0,0255 g) e sua CCD revelou apenas uma mancha vermelha. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **epicatequina (TM25)**.

**Grupo MG4 (fração 26):** apresentou-se como um material graxo esverdeado (3,988 g) que indicou duas manchas vermelhas com rastro em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **MGB**) utilizando-se cromatógrafo de média pressão equipado com detector UV/VIS (254 e 280 nm), utilizando coluna de sílica SNAP Ultra® (100 g). Como eluentes foram empregados diclorometano e metanol, em fluxo de 75 mL/min, sendo obtidas 58 frações de 15 mL. Não foi possível o isolamento de qualquer substância.

**Grupo MG5 (fração 27-32):** apresentou-se como um sólido preto (35,8112 g) e em cromatoplaça apresentou apenas rastro quando revelada com ácido perclórico/vanilina e não apresenta fluorescência quando revelada com NP/PEG sob

luz UV/VIS (365 nm). Parte do MG5 (0,3020 g) foi submetida a coluna cromatográfica (Coluna **MGC**) utilizando 189 mL de Sephadex LH-20 suspenso em metanol. A eluição foi isocrática empregando o mesmo solvente. Foram obtidas 30 frações de 30 mL. Não foi isolada qualquer substância.

**Grupo MG6 (fração 33-37):** apresentou-se como um sólido preto (5,6877 g) e perfil em CCD de difícil visualização, pois apresentou apenas rastro, com vários sistemas eluentes tendo sido testados. Apesar disso, parte de MGA6 (3,0 g) foi submetida a coluna cromatográfica (Coluna **MGD**) utilizando 286,3 mL de Sephadex LH-20 suspenso em metanol. A eluição foi isocrática empregando o mesmo solvente. Não foi identificada qualquer substância a partir desse grupo.

Os demais grupos não foram trabalhados por apresentarem baixas massas, perfis complexos em CCD ou baixa solubilidade em solventes orgânicos e água.

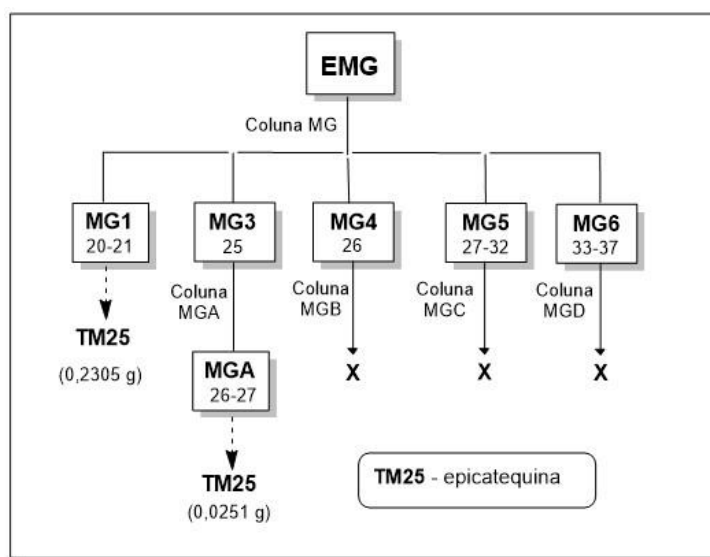


Figura 19: Esquema utilizado no fracionamento do EMG.

### 1.3.6 Estudo fitoquímico das raízes

#### 1.3.6.1 Fracionamento do extrato hexânico das raízes (EHR)

EHR (17,7 g) apresentou-se com uma aparência de borracha de cor alaranjada, e foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna **HR**: 4,5 cm/1,1 m) utilizando 625,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram recolhidas 236 frações de

30 mL, que foram agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplasas. Na Figura 20, p. 39, é mostrado o esquema do fracionamento do **EHR**.

**Grupo HR1 (frações 24-36):** apresentou-se como um sólido graxo alaranjado (4,4569 g). Análise de CCD revelou três manchas e a comparação com padrões indicou a presença de **guta percha (TM01)**, **friedelan-3,21-diona (TM13)** e  **$\beta$ -sitosterol (TM20)**. Dessa forma, esse grupo não foi purificado.

**Grupo HR2 (frações 37-51):** apresentou-se como um sólido branco com resíduo oleoso alaranjado (0,7790 g). O grupo foi recromatografado (Coluna **HRA**) em cromatógrafo de média pressão, utilizando coluna de sílica SNAP Ultra® (100 g). Como eluentes foram empregados hexano, acetato de etila e metanol, em fluxo de 75 mL/min, sendo obtidas 127 frações de 15 mL, que foram agrupadas de acordo com o perfil em CCD. O subgrupo **HRA40-44**, apresentou-se como um sólido branco (0,0263 g) e a partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi possível identificar o sólido como sendo **friedelan-3,21-diona (TM13)**. O subgrupo **HRA73-87**, apresentou-se como um sólido branco (0,1536 g) e a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo  **$\beta$ -sitosterol (TM20)**.

**Grupo HR3 (frações 52-60):** apresentou-se como um material sólido com resíduo de óleo amarelado (1,943 g). O material foi lavado com hexano e o sobrenadante foi separado. Análise de CCD do sólido (0,8952g) apresentou uma mancha roxa e a comparação com amostra padrão indicou tratar-se de  **$\beta$ -sitosterol (TM20)**.

**Grupo HR4 (frações 61-69):** apresentou-se como um material sólido graxo (2,5568 g) que foi recromatografado (Coluna **HRB**) utilizando-se 265,7 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 155 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HRB23-28** foi submetido a CC (Coluna **HRC**) em cromatógrafo de média pressão utilizando coluna de sílica SNAP Ultra® (100 g). Como eluentes foram empregados hexano, acetato de etila e metanol, em fluxo de 75 mL/min. Nenhuma substância foi isolada. O subgrupo **HRB29-35** foi lavado com metanol e um sólido branco (0,1439 g) foi separado. Análise em CCD comparando com amostra padrão indicou tratar-se de **TM20**.

**Grupo HR5 (frações 70-84):** apresentou-se como um sólido alaranjado (1,2522 g) que foi recromatografado (Coluna **HRD**) utilizando-se 162,5 g de sílica gel (230-400

Mesh). Foram recolhidas 50 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HRD20-25** apresentou-se como um sólido branco (0,0521 g) e a partir da análise dos espectros na região do IV e dos espectros de RMN uni e bidimensionais foi possível identificar o sólido como sendo **2,3,6,15-tetraacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano (TM26)**. Esse composto é inédito na literatura.

**Grupo HR6 (frações 85-101):** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,8375 g) que foi recromatografado (Coluna **HRE**) utilizando-se 56,1 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 60 frações de 30 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HRE9-18** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,0887 g) que apresentou uma mancha laranja em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **tingenina B (TM27)**.

**Grupo HR7 (frações 102-154):** apresentou-se como um sólido alaranjado (1,4196 g) que revelou duas manchas em CCD. O grupo foi recromatografado (Coluna **HRF**) utilizando-se 128,0 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 78 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HRF4-6** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,2697 g) que apresentou uma mancha em cromatoplaça. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **netzahualcoiona (TM28)**.

**Grupo HR10 (frações 193-200):** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,3360 g), que apresentou uma mancha em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **netzahualcoiondiol (TM29)**.

**Grupo HR11 (frações 201-207):** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,8998 g) que foi recromatografado (Coluna **HRG**) utilizando-se 95,2 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 112 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. Não foi possível a identificação ou isolamento de substâncias a partir desse grupo.

**Grupo HR12 (frações 208-212):** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,2690 g), que foi purificado em CC (Coluna **HRH**) utilizando-se 45,2 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 67 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **HRH23-30** apresentou-se como um sólido

alaranjado (0,0092 g) que apresentou uma mancha laranja em cromatoplaça. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **netzahualcoiondiol (TM29)**.

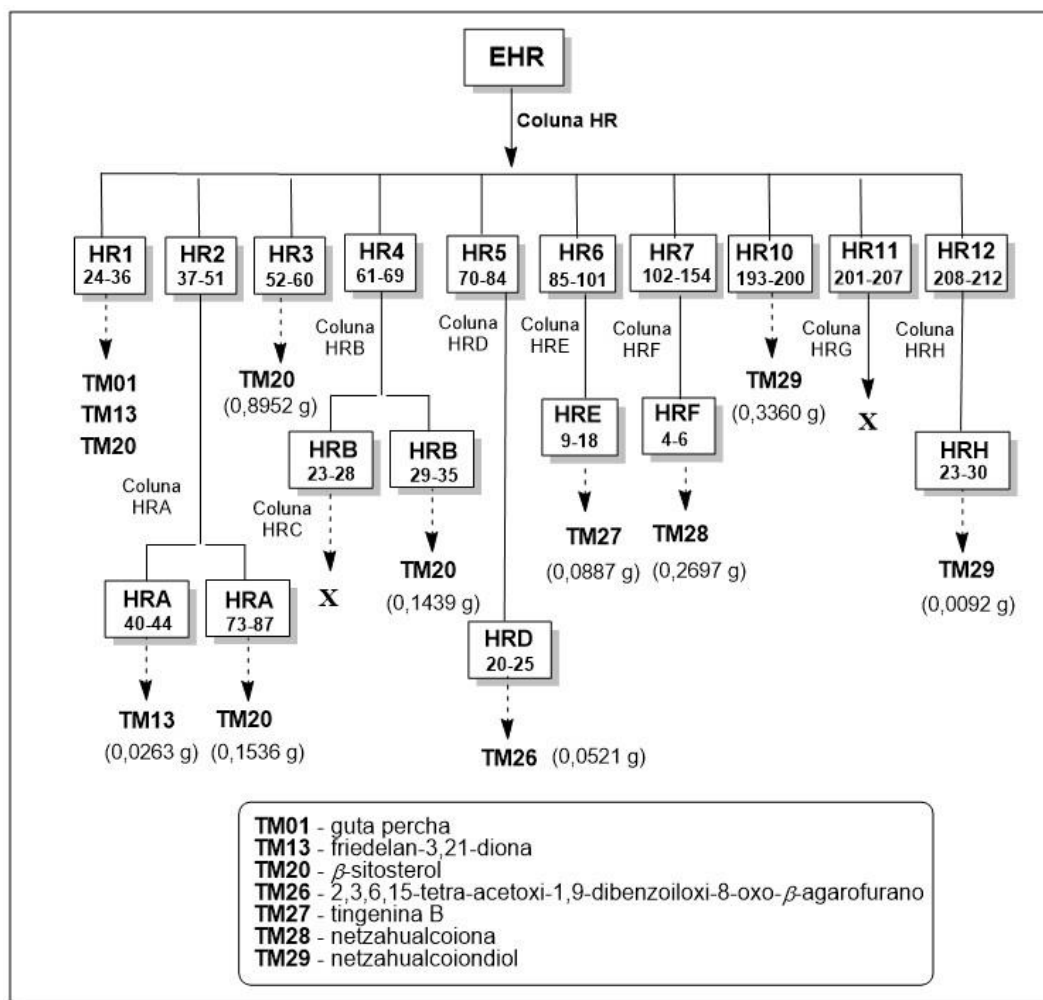


Figura 20: Esquema utilizado no fracionamento do EHR.

### 1.3.6.2 Fracionamento do extrato clorofórmico das raízes (ECR)

O extrato **ECR** apresentou-se com aparência plástica e cor alaranjada. Análise de CCD com amostra padrão indicou a presença de guta percha. Dessa forma, **ECR** (116,5 g) foi submetido à coluna cromatográfica filtrante para separação da guta percha, obtendo-se 78,121 g desse composto e 31,85 g de **ECR** sem guta. Então, parte do **ECR** (30,53 g) sem guta foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna **CR**: 4,5 cm/1,1 m) utilizando 1,675 kg de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram recolhidas 80 frações de 200 mL que tiveram o volume reduzido em evaporador

rotatório e em seguida foram agrupadas, de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplacas. Na Figura 21, p. 42, é mostrado o esquema do fracionamento do ECR.

**Grupo CR2 (frações 7-8):** apresentou-se como um sólido alaranjado graxo que foi recromatografado em CC (Coluna **CRA**) utilizando 39,39 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram obtidas 50 frações de 30 mL. O subgrupo **CRA47** apresentou-se como um sólido branco (0,0166 g) e a partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi possível identificá-lo como sendo uma mistura de **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (TM15)** e **30-hidroxifriedelan-3-ona (TM16)**.

**Grupo CR3 (frações 9-13):** apresentou-se como um sólido alaranjado (3,8111 g). O grupo foi recromatografado (Coluna **CRB**) utilizando 301,91 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram obtidas 116 frações de 30 mL. O subgrupo **CRB54-78** (1,4507 g) foi recromatografado em coluna de sílica gel (230-400 Mesh) (Coluna **CRC**), mas nenhuma substância foi identificada.

**Grupo CR4 (frações 14-16):** apresentou-se como um sólido alaranjado (5,3406 g). O grupo foi recromatografado (Coluna **CRD**) utilizando 348,58 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram obtidas 226 frações de 25 mL. O subgrupo **CRD136-141** foi lavado sucessivas vezes com acetona e um sólido branco (0,1422 g) foi separado. A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu identificar o sólido como sendo **2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano (TM26)**. O subgrupo **CRD142-159** (1,9330 g) foi submetido à purificação em CC (Coluna **CRE**) utilizando 123,23 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram recolhidas 51 frações de 25 mL. O subgrupo **CRE29-32** (0,2250 g) foi analisado em CCD com amostra padrão e, juntamente com a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foi identificado como sendo **2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano (TM26)**.

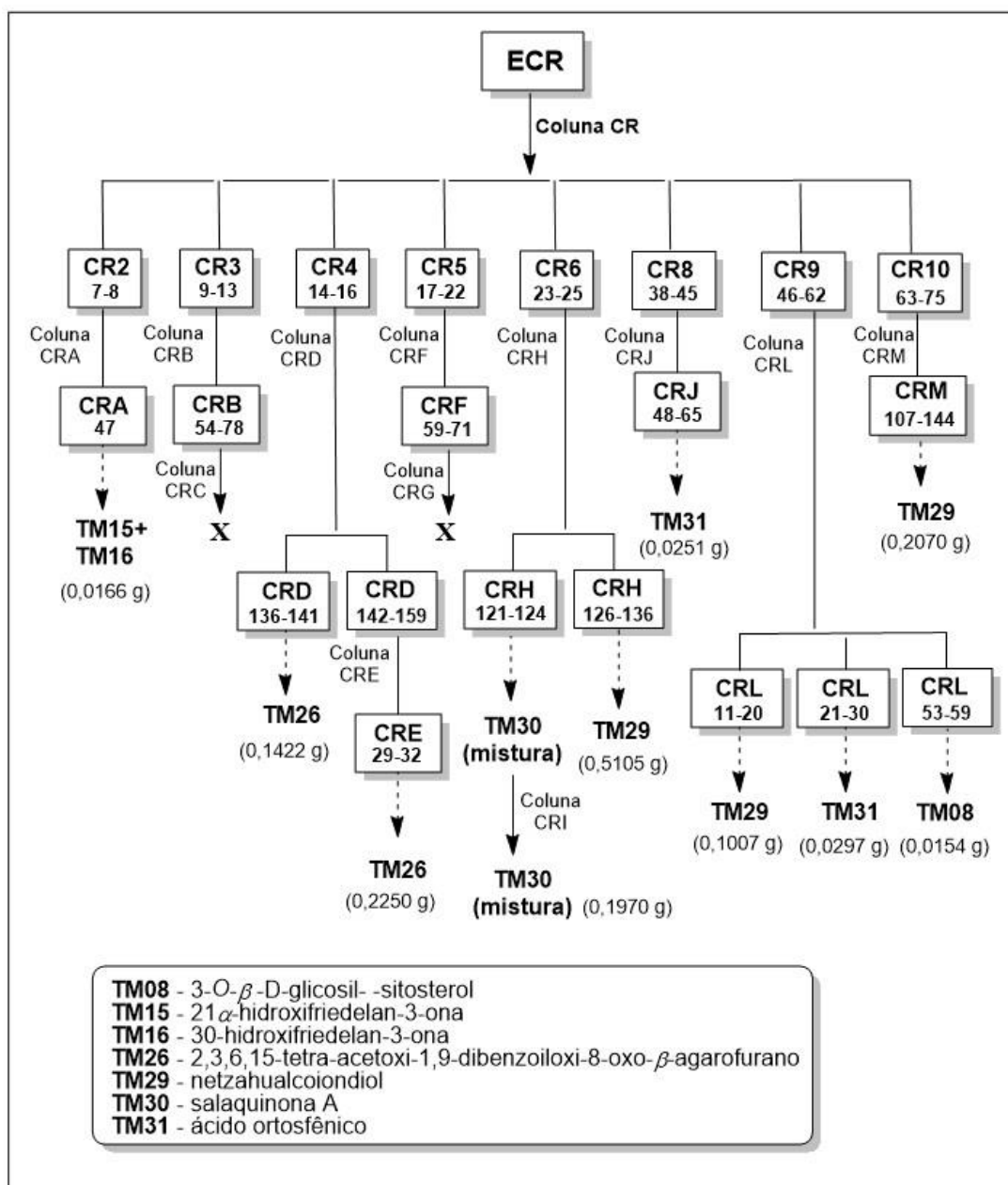
**Grupo CR5 (frações 17-22):** apresentou-se como um sólido alaranjado (2,3817 g). O grupo foi recromatografado (Coluna **CRF**) utilizando 236,0 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram obtidas 109 frações de 30 mL. O subgrupo **CRF59-71** (0,2401 g) apresentou duas manchas em CCD e foi recromatografado em coluna de sílica gel (230-400 Mesh) (Coluna **CRG**), mas nenhuma substância foi identificada.

**Grupo CR6 (frações 23-25):** apresentou-se como um sólido alaranjado (3,9498 g). O grupo foi recromatografado (Coluna **CRH**) utilizando 200,1 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram recolhidas 230 frações de 30 mL. O subgrupo **CRH121-124**, sólido alaranjado (0,1970), apresentou uma mancha em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de dois quinonametídeos de mesmo *rf*, um deles identificado como **salaquinona A (TM30)**. Sendo assim, a mistura foi submetida à purificação em CC (Coluna **CRI**) utilizando sílica gel (230-400 Mesh), sob pressão, mas não foi possível separar os componentes da mistura. Outras tentativas de separação em CC foram realizadas, no entanto, não foi possível obter os quinonametídeos puros e nem identificar o segundo triterpeno. O subgrupo **CRH126-136**, um sólido alaranjado (0,5105 g), apresentou uma mancha em CCD e após análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi identificado como sendo **netzahualcoiondiol (TM29)**.

**Grupo CR8 (frações 38-45):** apresentou-se como um sólido alaranjado (1,4790 g). O grupo foi recromatografado (Coluna **CRJ**) utilizando 121,05 g de sílica gel (230-400 Mesh), e foram recolhidas 70 frações de 30 mL. O subgrupo **CRJ48-65** foi lavado sucessivas vezes com acetona e um sólido branco (0,0251 g) foi separado. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **ácido ortosfênico (TM31)**.

**Grupo CR9 (frações 46-62):** apresentou-se como um sólido alaranjado (0,6820 g). O sólido foi submetido à CC (Coluna **CRL**) utilizando-se 103,6 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 62 frações de 20 mL, que foram agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **CRL11-20** (0,1007 g) apresentou uma mancha em CCD e por meio de comparação com amostra padrão foi identificado como **netzahualcoiondiol (TM29)**. O subgrupo **CRL21-30** foi lavado com acetona e um sólido branco (0,0297 g) foi separado, apresentando uma mancha vermelha em CCD. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e a comparação com amostra padrão em CCD permitiram identificar o sólido como sendo **ácido ortosfênico (TM31)**. O subgrupo **CRL53-59** foi também lavado com acetona e um sólido branco (0,0154 g) foi separado. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e a comparação com amostra padrão em CCD permitiram identificar o sólido como sendo **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (TM08)**.

**Grupo CR10 (frações 63-75):** apresentou-se como um sólido alaranjado (2,9401 g) que foi submetido à CC (Coluna **CRM**) utilizando-se 290 g de sílica gel (230-400 Mesh). Foram recolhidas 150 frações de 30 mL, que foram agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. O subgrupo **CRM107-144** (0,2070 g) apresentou uma mancha em CCD e por meio de comparação com amostra padrão foi identificado como sendo **netzahualcoiondiol (TM29)**.



**Figura 21:** Esquema utilizado no fracionamento do ECR.



### 1.3.7 Marcha química para obtenção de alcaloides a partir das raízes de *Tonatelea micrantha*

Mercadante-Simões e colaboradores (2014) realizaram o estudo histoquímico e do perfil fitoquímico de *T. micrantha*, indicando a presença de alcaloides nas raízes da planta. Motivada nesse trabalho, foi realizada a marcha química dessa parte da planta.

As raízes secas e moídas (1,12 kg) foram desengorduradas com hexano e em seguida submetidas a uma extração exaustiva com clorofórmio para retirar a guta percha, presente em grande quantidade no extrato. A torta foi então submetida à extração exaustiva com mistura etanol/água 8:2 levando a obtenção do extrato polar, que foi então submetido a uma extração ácido/base, de acordo com a metodologia de Cannell (1998). O esquema de extração é mostrado na Figura 22.

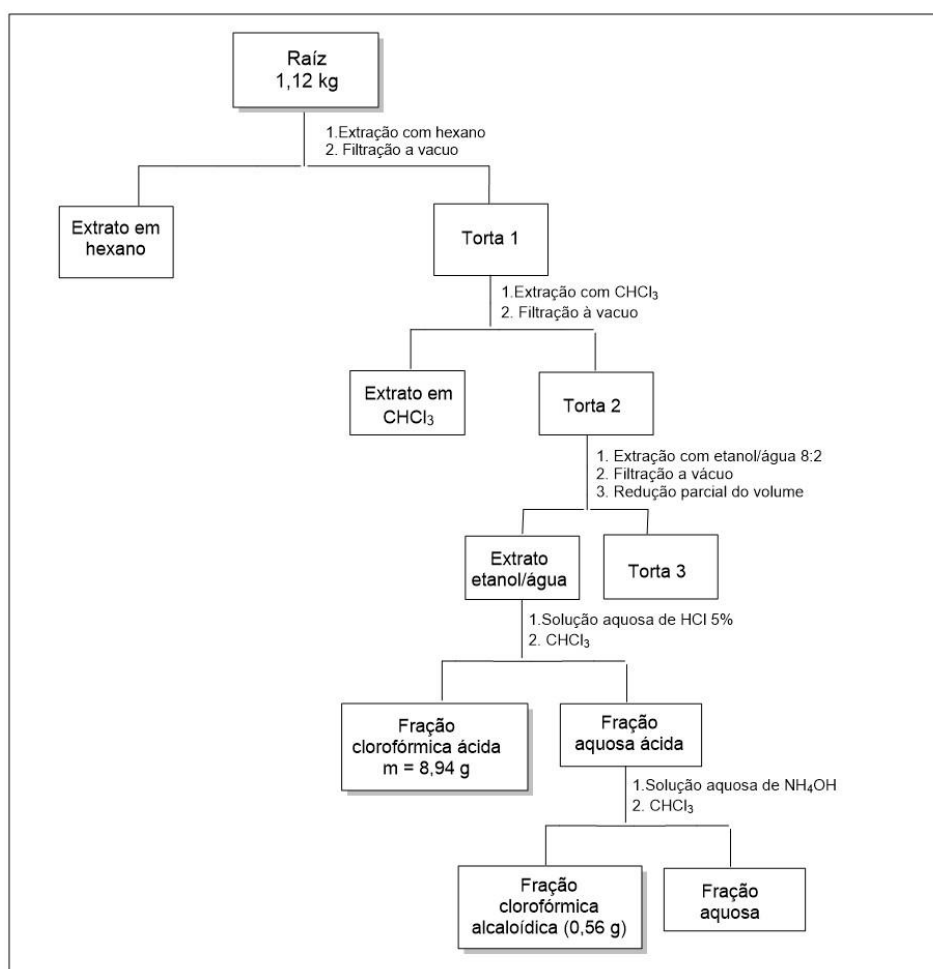


Figura 22: Extração ácido/base de raízes de *T. micrantha*.

### 1.3.7.1 Fracionamento da fração clorofórmica alcaloídica básica

A CCD da fração clorofórmica básica utilizando reagente Dragendorff não apresentou manchas alaranjadas, que são indicativo da presença de alcaloides. Dessa forma, o material (0,5550 g) foi submetido ao fracionamento em coluna (Coluna **MQ**) de sílica gel (230-400 Mesh) (82,43 g) utilizando mistura de hex/AcOEt, MeOH e solução 3% de ácido acético em metanol como eluentes. Foram recolhidas 30 frações de 15 mL. A partir da subfração **MQ8-9** (0,047 g) foi isolado **netzahualcoiendiol (TM29)**.

As demais subfrações apresentaram baixa massa e não foram trabalhadas. Não foi possível obter nenhuma substância da classe dos alcaloides.

### 1.3.8 Perfil de ácido graxo do óleo extraído de sementes de *T. micrantha*

Amostras de óleo de sementes de *T. micrantha* foram analisadas no cromatógrafo a gás para obtenção dos perfis de ácidos graxos. Uma amostra do óleo (**OCP**) foi gentilmente cedida pela Cooperativa de produtores artesanais de uma comunidade de Grão Mogol e a outra amostra do óleo (**OMC**) foi comprada no mercado central de Montes Claros.

#### 1.3.8.1 Hidrólise e metilação de óleos

Em um tubo criogênico de capacidade de 2 mL, cerca de 1 mg do óleo foi misturado com 100 µL de uma solução de hidróxido de sódio 1 mol/L em etanol/água (95:5). Após agitação em vórtex por 10 s, o óleo foi hidrolisado em um forno de micro-ondas doméstico (Eletrolux MT030), à potência 30 % durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionaram-se 400 µL de solução de ácido clorídrico 20 %, uma ponta de espátula de NaCl e 600 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 5 min, uma alíquota de 300 µL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubo de microcentrífuga e seca por evaporação, sendo obtidos os ácidos graxos livres (SANDE *et al.*, 2018).

Posteriormente os ácidos graxos livres foram metilados com 100  $\mu\text{L}$   $\text{BF}_3$ /metanol (14 %), a 60°C durante 10 minutos em banho de água e extraídos com 500  $\mu\text{L}$  de hexano. Em seguida foi realizada análise por cromatografia gasosa.

#### **1.3.8.2 Análise no cromatógrafo a gás**

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent) equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna Supelcowax-10 (30m x 0,2mm x 0,2  $\mu\text{m}$ ) com gradiente de temperatura: 150 °C, 1 min, 10 °C/min até 260 °C; injetor (split de 1/20) a 250 °C e detector a 260 °C. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste (6 mL/min) e volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ . A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME C14-C22 (Supelco cat no 18917).

## 1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

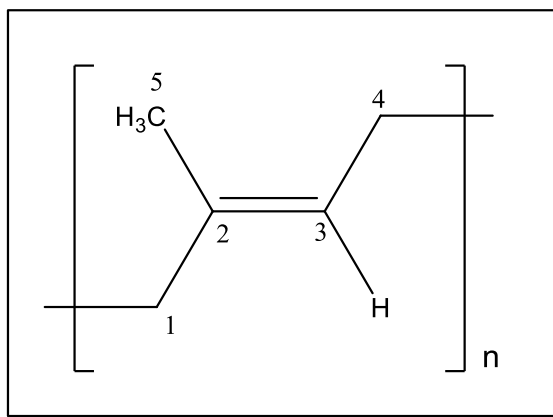
A relação dos compostos isolados no estudo fitoquímico de *T. micrantha* consta na Tabela 1. As estruturas químicas são apresentadas ao longo do capítulo e também no Apêndice, p. 217 e 218.

**Tabela 1:** Relação de compostos isolados a partir de *T. micrantha*

Código	Nome do composto	Código	Nome do composto
TM01	guta percha	TM17	3-oxo-friedelan-28-al
TM02	esqualeno	TM18*	friedel-1-en-3,21-diona
TM03	friedelina	TM19*	friedelan-1,3,21-triona
TM04	3 $\beta$ -friedelinol	TM20	$\beta$ -sitosterol
TM05	ácido 3,4-seco-friedelanoico	TM21	ácido 3-oxo-friedelan-28-oico
TM06	28-hidroxifriedelan-3-ona	TM22	28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona
TM07	mistura de ácidos graxos	TM23	21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona
TM08	3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol	TM24	28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona
TM09	dulcitol	TM25	epicatequina
TM10	3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)] $[\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina	TM26*	2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano
TM11	rutina	TM27	tingenina B
TM12	epiafzelequina-(4 $\beta$ $\rightarrow$ 8)-epicatequina	TM28	netzahualcoiona
TM13	friedelan-3,21-diona	TM29	netzahualcoiondiol
TM14	21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona	TM30	salaquinona A
TM15	21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona	TM31	ácido ortosfênico
TM16	30-hidroxifriedelan-3-ona		

\* Composto inédito

### 1.4.1 TM01: 1,4-*trans*-poli-isopreno (guta-percha)



**TM01** foi isolado de **EHF, EHG, ECG, EHR** e **ECR** em quantidades apreciáveis, apresentando-se como uma goma amarelada solúvel em clorofórmio, sugerindo tratar-se do polímero guta percha, comumente isolado de plantas da família Celastraceae.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 1A, p. 155) de **TM01** apresenta um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  5,12 ( $J= 6,4$  Hz) característico de hidrogênio olefínico. Multipletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  1,98 e  $\delta_{\text{H}}$  2,06 foram atribuídos aos grupos metilênicos C-1 e C-4, respectivamente. O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,60 é referente ao grupo metila C-5.

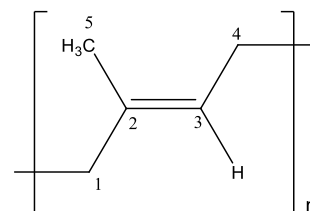
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 2A, p. 155) apresenta 5 sinais de carbono que foram classificados como sendo 1  $\text{CH}_3$ , 2  $\text{CH}_2$ , 1  $\text{CH}$  e 1  $\text{C}$ , a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 3A, p. 156). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  124,25 e  $\delta_{\text{C}}$  134,93 são característicos de átomos de carbono olefínicos e foram atribuídos a C-3 e C-2, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  16,01,  $\delta_{\text{C}}$  26,74 e  $\delta_{\text{C}}$  39,74 foram atribuídos a C-5, C-4 e C-1, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 foram comparados com a literatura (RODRIGUES *et al.*, 2015) (Tabela 2, p. 48), e juntamente com o aspecto físico e o padrão obtido em CCD permitiram confirmar a identificação de **TM01** como sendo 1,4-*trans*-poli-isopreno (guta-percha).

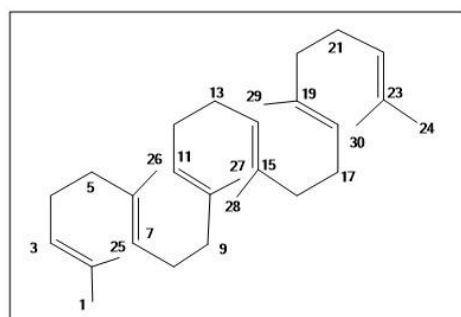
**Tabela 2:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM01** com os dados da literatura para a guta-percha (RODRIGUES *et al.*, 2015)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM01	$\delta_c^*$ ( RODRIGUES <i>et al.</i> , 2015)
1	CH <sub>2</sub>	39,74	39,75
2	C	134,93	134,93
3	CH	124,25	124,26
4	CH <sub>2</sub>	26,74	26,75
5	CH <sub>3</sub>	16,01	16,03

\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz



#### 1.4.2 TM02: Esqualeno



**TM02** foi isolado de **EHF** e apresentou-se como um óleo de cor amarelada, viscoso e solúvel em clorofórmio. A análise por CCD indicou a presença de uma única mancha de coloração azul, usando-se hexano como eluente (revelador: ácido perclórico/vanilina).

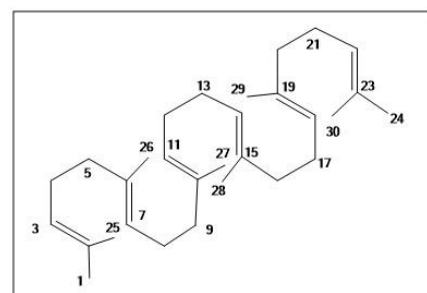
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4A, p. 156) apresenta sinal entre  $\delta_{\text{H}}$  5,10 e 5,15, região referente a sinais de átomos de hidrogênios olefínicos. A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 5A, p. 157) e subespectro DEPT-135 (Figura 6A, p. 157) indica a presença de 15 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 4 CH<sub>3</sub>, 5 CH<sub>2</sub>, 3 CH e 3 C. Esses dados sugeriram a presença do esqualeno, que possui uma estrutura simétrica de 30 átomos de carbono e é um precursor dos

diversos tipos de triterpenos pentacíclicos, sendo comumente isolado de espécies da família Celastraceae. Os sinais nas regiões de carbono em  $\delta_c$  124,30-124,43 e  $\delta_c$  131,25-135,12 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  são referentes a átomos de carbono olefínico. Os simpletos em  $\delta_H$  1,60 e 1,68, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram atribuídos aos átomos de hidrogênio dos grupos metila. Os valores das integrais referentes aos sinais de hidrogênio são coerentes com a estrutura do esqualeno. O sinal em  $\delta_H$  1,26 foi atribuído à graxa presente no composto.

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (RODRIGUES *et al.*, 2015) (Tabela 3) e foi possível confirmar que **TM02** trata-se do **esqualeno**.

**Tabela 3:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM02** com os dados da literatura para o esqualeno (RODRIGUES *et al.*, 2015)

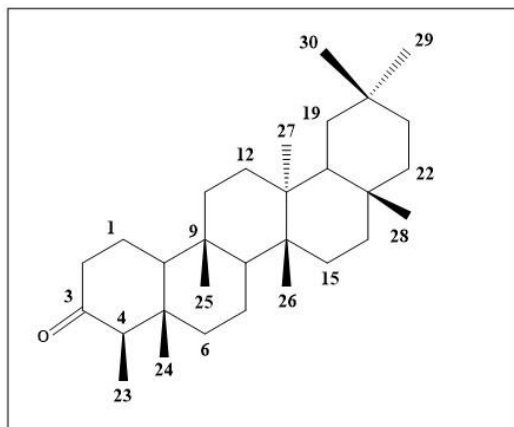
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c'$ de TM02	$\delta_c''$ (RODRIGUES <i>et al.</i> , 2015)
1 e 30	CH <sub>3</sub>	25,69	25,69
2 e 23	C	131,25	131,26
3 e 22***	CH	124,33	124,34
4 e 21	CH <sub>2</sub>	26,79	26,80
5 e 20****	CH <sub>2</sub>	39,74	39,75
6 e 19	C	135,12	135,12
7 e 18***	CH	124,30	124,30
8 e 17	CH <sub>2</sub>	26,69	26,69
9 e 16****	CH <sub>2</sub>	39,76	39,77
10 e 15	C	134,91	134,91
11 e 14	CH	124,43	124,44
12 e 13	CH <sub>2</sub>	28,29	28,30
24 e 25	CH <sub>3</sub>	17,69	17,68
26 e 29*****	CH <sub>3</sub>	16,01	16,01
27 e 28*****	CH <sub>3</sub>	16,05	16,06



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/50 MHz

\*\*\* \*\*\*\* \*\*\*\*\* Sinais intercambiáveis

### 1.4.3 TM03: friedelan-3-ona (friedelina)



**TM03** foi obtido a partir do fracionamento de **EHF**, **SHF**, **EHG**, **SHG** e **EAF** e consistiu de um sólido branco, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 243,4-244,4 °C. Análise por CCD deste sólido mostrou a presença de uma única mancha amarela (revelador: ácido perclórico/vanilina).

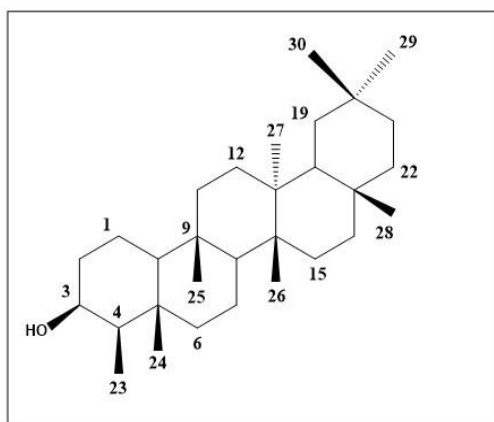
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 7A, p. 158) apresenta sete simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,73,  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,95,  $\delta_{\text{H}}$  1,00,  $\delta_{\text{H}}$  1,01,  $\delta_{\text{H}}$  1,05 e  $\delta_{\text{H}}$  1,18 relativos a sete grupos metila e um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  0,88 ( $J = 6,0$  Hz), associado à outra metila. Este último sinal, característico de metila C-23 em triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994), apresenta-se sobreposto ao simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,87, conforme indicado pela integral destes sinais.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 8A, p. 158) apresenta 30 sinais de carbono, que foram classificados a partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura 9A, p. 159). A presença de sinal de carbono carbonílico próximo a  $\delta_{\text{C}}$  213,0 e um sinal de metila em aproximadamente  $\delta_{\text{C}}$  6,6 é característico de triterpenos friedelanos com carbonila em C-3 e metila em C-23 (MAHATO E KUNDU, 1994). Portanto, o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  213,20 foi atribuído ao carbono carbonílico C-3 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,83 foi atribuído à metila C-23.

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos foram comparados com os da literatura (QUEIROGA *et al.*, 2000) (Tabela 1A, p. 195) e permitiram confirmar que **TM03** trata-se de **friedelina**.



#### 1.4.4 TM04: friedelan-3 $\beta$ -ol (3 $\beta$ -friedelinol)



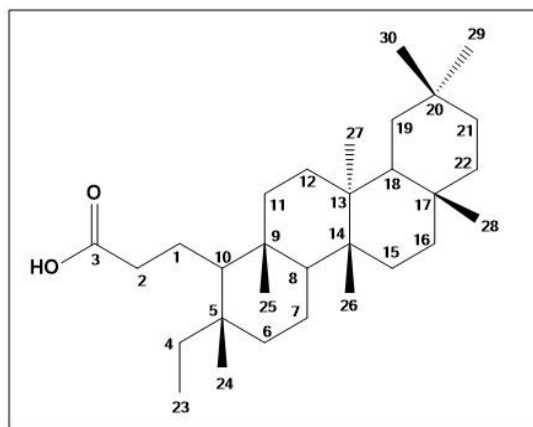
**TM04** foi isolado de **EHF**, **EHG**, **SHG** e apresentou-se como um sólido branco cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 278,2-281,0 °C. A análise por CCD deste sólido indicou uma única mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 10A, p. 159) apresenta os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,17,  $\delta_{\text{H}}$  1,01,  $\delta_{\text{H}}$  1,00,  $\delta_{\text{H}}$  0,99,  $\delta_{\text{H}}$  0,96,  $\delta_{\text{H}}$  0,95,  $\delta_{\text{H}}$  0,94 e  $\delta_{\text{H}}$  0,87 que foram atribuídos a oito grupos metila. O sinal entre  $\delta_{\text{H}}$  3,75-3,74 é referente a hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 11A, p. 160) indica a presença de 30 sinais de carbono. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  11,75 é referente a carbono metílico e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,38 a carbono hidroxilado, atribuídos respectivamente a C-23 e C-3. Estes sinais são característicos de triterpeno de esqueleto friedelano e determinantes para a identificação da estrutura. O subespectro DEPT-135 (Figura 12A, p. 160) permitiu a classificar os átomos de carbono como não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (QUEIROGA *et al.*, 2000) (Tabela 2A, p. 196) e permitiram identificar **TM04** como sendo **friedelan-3 $\beta$ -ol**.

### 1.4.5 TM05: ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico



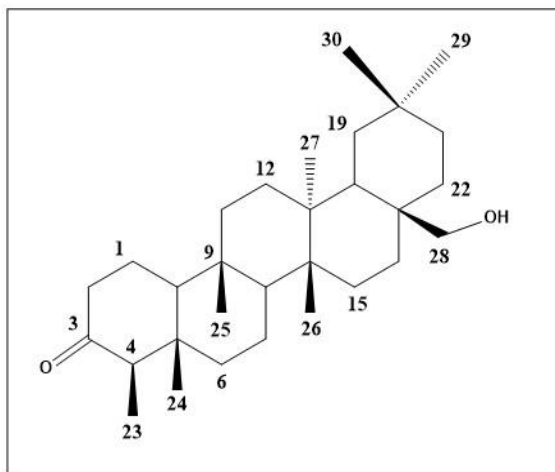
**TM05** foi isolado de **EHF** e apresentou-se como um sólido branco com faixa de fusão de 135,4-137,7 °C. A análise por CCD deste sólido indicou uma única mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 13A, p. 161) mostra a presença de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,79,  $\delta_{\text{H}}$  0,88,  $\delta_{\text{H}}$  0,95,  $\delta_{\text{H}}$  0,98,  $\delta_{\text{H}}$  0,99,  $\delta_{\text{H}}$  1,01,  $\delta_{\text{H}}$  1,17 e  $\delta_{\text{H}}$  1,26 que foram atribuídos a oito grupos metila. O tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,38 (2H,  $J = 8,5$  Hz) foi atribuído aos átomos hidrogênio ligados ao carbono vizinho à carbonila.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 14A, p. 162) indica a presença de 30 sinais de carbono, que foram classificados a partir do subspectro DEPT-135 (Figura 15A, p. 162). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  7,60 refere-se à metila em C-23 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  179,05 a um carbono de carboxila, em C-3. Estes sinais, associados com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  0,79 (H-23), do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sugeriram tratar-se de um triterpeno friedelano com abertura do anel A e formação de um ácido carboxílico.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (VIEIRA-FILHO, 2001) (Tabela 3A, p. 197) e permitiram identificar **TM05** como sendo **ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico**.

### 1.4.6 TM06: 28-hidroxifriedelan-3-ona



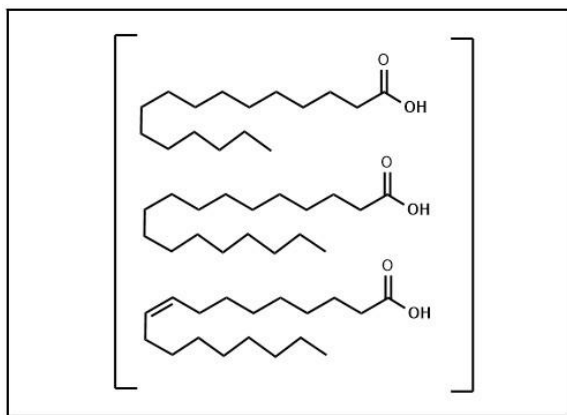
**TM06** foi isolado de **EHF** e apresentou-se como um sólido branco cristalino, faixa de fusão de 241,5-244,0 °C, solúvel em clorofórmio. A análise por CCD deste sólido mostrou uma única mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 16A, p. 162) apresentou seis simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,72,  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,91,  $\delta_{\text{H}}$  0,98,  $\delta_{\text{H}}$  0,99 e  $\delta_{\text{H}}$  1,13, atribuídos à seis metilas. Apresenta ainda um duplete sobreposto em  $\delta_{\text{H}}$  0,88 ( $J = 8,0$  Hz) que foi atribuído a metila C-23. O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (2H) foi relacionado a átomos de hidrogênio de um carbono metilênico hidroxilado.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 17A, p. 163) apresenta 30 sinais de carbono, que foram classificados a partir do subspectro DEPT-135 (Figura 18A, p. 163). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  212,99 foi atribuído a grupo carbonila, o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  68,08 refere-se a um carbono metilênico hidroxilado e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,82 à metila (C-23). Estes sinais sugerem que **TM06** é um triterpeno friedelano hidroxilado com carbonila em C-3.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (RODRIGUES *et al.*, 2015) (Tabela 4A, p. 198) e permitiram identificar **TM06** como sendo **28-hidroxifriedelan-3-ona**.

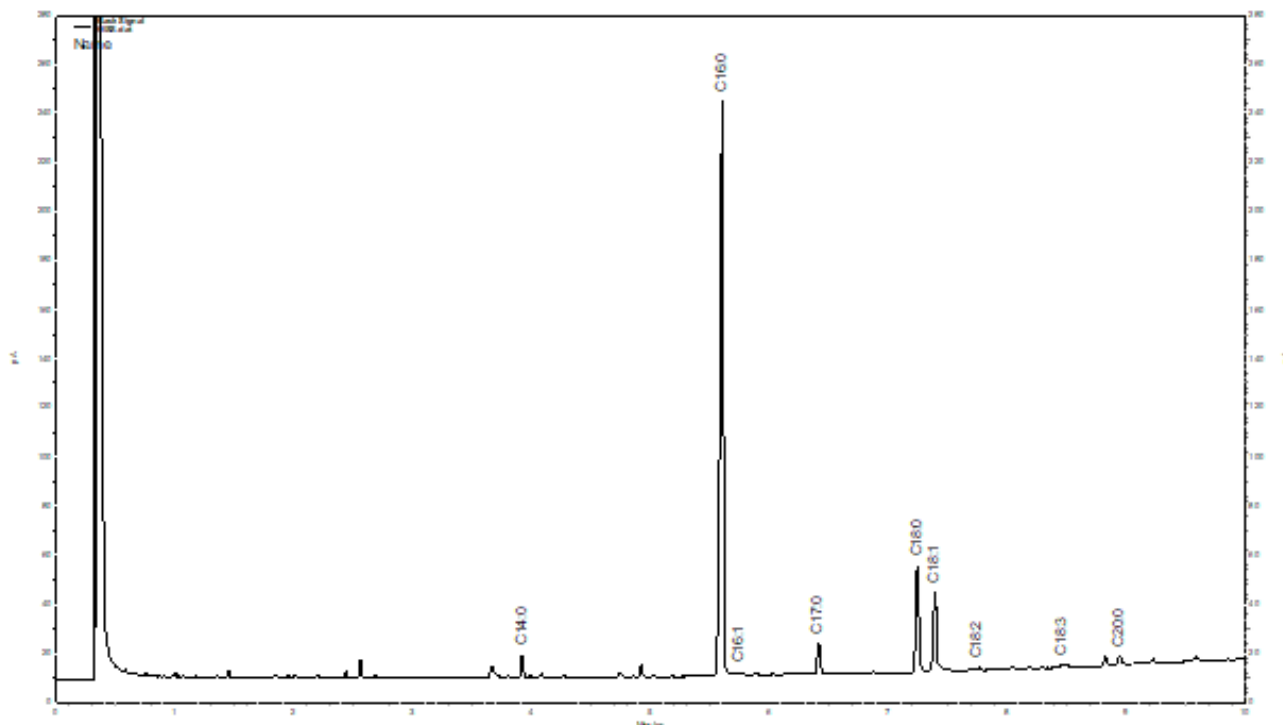
### 1.4.7 TM07: mistura de ácidos graxos



**TM07** foi isolado de **EHF** e apresentou-se como um óleo translúcido.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 19A e 20A, p. 164) apresentam perfil de ácido graxo devido aos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,34 (2H, t,  $J=7,2$  Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono metilênico  $\alpha$ -carboxílicos,  $\delta_{\text{H}}$  1,63 (2H, qui,  $J = 8,0$  Hz) referente a átomos de hidrogênio  $\beta$ -carboxílico e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  0,88 (3H, t,  $J = 6,4$  Hz) referente à metila terminal. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também sugere um ácido graxo, devido ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  179,77 que é referente a C=O e  $\delta_{\text{C}}$  14,24 característico de metila terminal de cadeia alifática. A partir do subspectro DEPT-135 (Figura 21A, p. 165) todos os carbonos foram classificados. Os demais sinais são referentes aos grupos metilênicos da cadeia alifática de **TM07**.

Análise no cromatógrafo a gás revelou que **TM07** é uma mistura composta principalmente por 65% de **ácido palmítico**, 12% de **ácido esteárico** e 11% de **ácido oleico** (Tabela 4, p. 55). Os picos (Figura 23, p. 55) foram comparados com uma mistura padrão de ésteres graxos (Supelco: 47885-U).

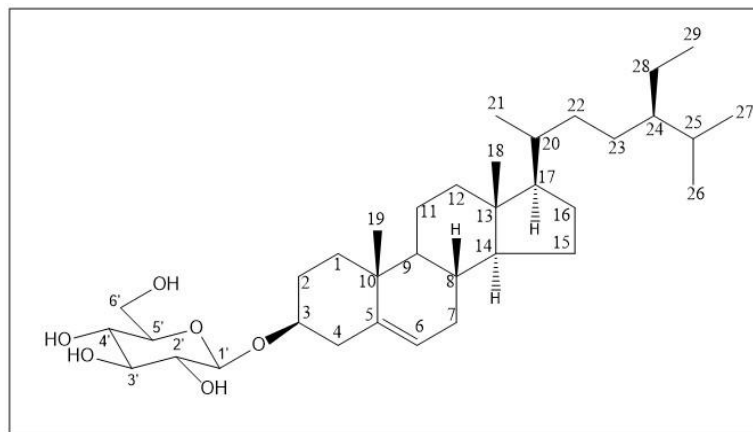


**Figura 23:** Cromatograma de **TM07** obtido pela análise CG-DIC sob condições descritas na página 17.

**Tabela 4:** Perfil de ácido graxo de **TM07**

Ácido graxo	Nome	t <sub>R</sub> (min)	% de Ácidos
C14:0	Ácido mirístico	3,922	2,1
C16:0	ácido palmítico	5,606	65,4
C16:1	ácido palmitoleico	5,748	0,7
C17:0	Ácido margárico	6,419	3,4
C18:0	ácido esterárico	7,248	12,3
C18:1	ácido oleico	7,394	10,5
C18:2	ácido linoleico	7,762	0,6
C18:3	ácido linolênico	8,047	0,5
C20:0	ácido araquídico	8,953	1,4
Outros	-	-	3,1
Total	-	-	100,0

### 1.4.8 TM08: 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol



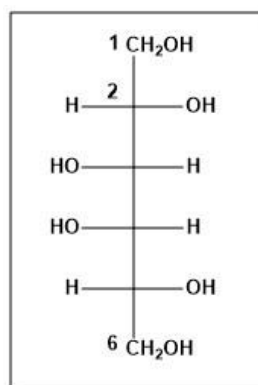
**TM08** foi isolado de **EAF**, **ECG**, **EAG** e **ECR**, e apresentou-se como um sólido branco cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 278,6-280,2 °C.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 22A, p. 165) apresenta sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,67 e  $\delta_{\text{H}}$  0,95 atribuídos a seis grupos metila. Sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  3,55 e  $\delta_{\text{H}}$  4,13 indicam a presença de várias hidroxilas na estrutura. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,30 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 de esteroide.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 23A, p. 166) apresenta 35 sinais, incluindo sinais na região de carbono hidroxilado, sugerindo a estrutura de um esteroide glicosilado. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  102,11 foi atribuído ao carbono anomérico C-1'. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  78,24 foi atribuído ao carbono do esteroide (C-3) ligado a oxigênio e os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  121,73 e  $\delta_{\text{C}}$  140,66 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínico em C-6 e C-5, respectivamente. Todos os sinais de carbono foram classificados por meio da análise do subspectro DEPT-135 (Figura 24A, p. 166).

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (RAI *et al.*, 2006) (Tabela 5A, p. 199) e permitiram identificar **TM08** como sendo **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol**.

### 1.4.9 TM09: dulcitol



**TM09** foi obtido a partir de **SMF** e apresentou-se como um sólido branco com faixa de fusão de 182-184 °C, parcialmente solúvel em metanol. A baixa solubilidade em solventes orgânicos sugeriu tratar-se de um composto polar.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e o subespectro DEPT-135 (Figuras 25A e 26A, p. 167) apresentam 3 sinais na região de carbono hidroxilado, sendo 1  $\text{CH}_2$  e 2  $\text{CH}$ , sugerindo a estrutura de um carboidrato simétrico. Um carboidrato comumente isolado na família Celastraceae é o dulcitol, que foi então utilizado como base para análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM09**. Sendo assim, o sinal em  $\delta$  63,83 foi atribuído a C-1 e C-6,  $\delta$  70,04 foi atribuído a C-3 e C-4 e o sinal em  $\delta$  70,85 é referente a C-2 e C-5.

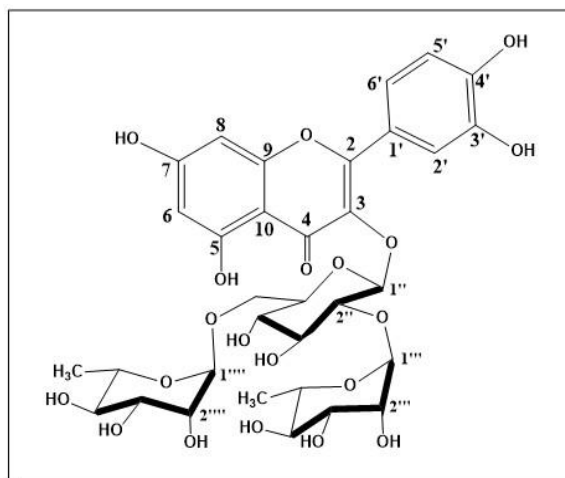
Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com a literatura (FONSECA *et al.*, 2007) (Tabela 5) e permitiram confirmar que **TM09** trata-se do **dulcitol**.

**Tabela 5:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM09** com os dados da literatura para **dulcitol** (FONSECA *et al.*, 2007)

Nº C	Tipo de carbono	$\delta^*$ de TM09	$\delta^*$ (FONSECA <i>et al.</i> , 2007)
1 e 6	$\text{CH}_2$	63,83	63,20
2 e 5	CH	70,85	70,20
3 e 4	CH	70,04	69,59

\* $\text{D}_2\text{O}/100$  MHz

#### 1.4.10 TM10: 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)][ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina



**TM10** foi obtido a partir de **EMF** e apresentou-se como um sólido amarelado com faixa de fusão de 190-191,8 °C, solúvel em metanol e a análise por CCD indicou uma mancha alaranjada fluorescente, usando revelador NP/PEG sob luz ultravioleta.

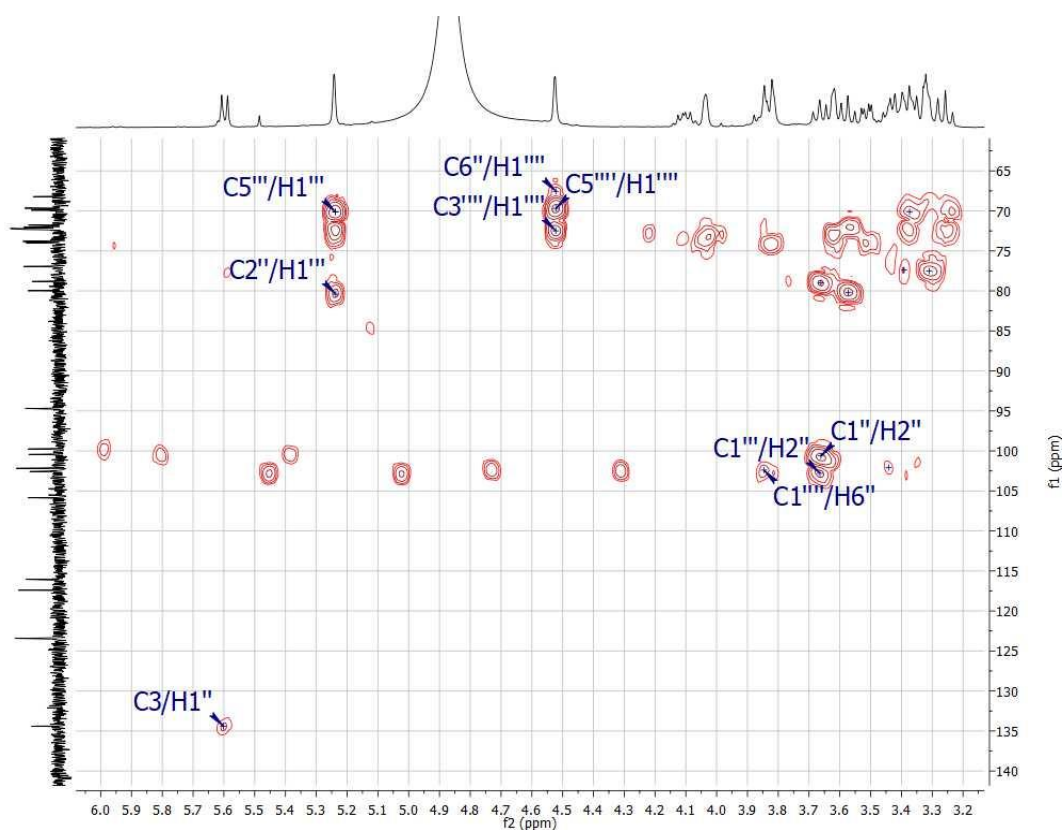
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27A, p. 168) apresenta vários sinais na região de hidrogênios aromáticos e na região de carboidratos, sugerindo a presença de um flavonoide glicosilado. O sinal entre  $\delta_{\text{H}}$  7,61-7,63 (2H) foi atribuído a H-2' e H-6' e o sinal entre  $\delta_{\text{H}}$  6,89-6,92 (1H) a H-5', do esqueleto flavonoídico. Os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,38 (1H,  $J = 2,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (1H,  $J = 2,0$  Hz) foram atribuídos a H-8 e H-6, respectivamente. Estes sinais sugerem a presença da quercetina na molécula. A presença de três sinais característicos de hidrogênio anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,59 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5,24 e  $\delta_{\text{H}}$  4,52 sugerem tratar-se de um trissacarídeo. Além disso, os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,08 (3H,  $J = 6,2$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  1,02 (3H,  $J = 6,3$  Hz) sugerem a presença de duas unidades de ramnose. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28A, p. 168) apresenta 33 sinais que foram classificados a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 29A, p. 169). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  100,44,  $\delta_{\text{C}}$  102,17 e  $\delta_{\text{C}}$  102,57 foram atribuídos aos átomos de carbono anomérico. Dois sinais em  $\delta_{\text{C}}$  17,48 e  $\delta_{\text{C}}$  17,78 são referentes aos grupos  $\text{CH}_3$  de duas unidades de ramnose.

No mapa de contornos HMBC (Figura 24, p. 59), o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  134,40 (C-3) se correlaciona com o sinal do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,59 (H-1''). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  79,98 (C-2'') correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,24 (H-1''') e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  68,22 (C-



6'') correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,52 (H-1'''). Essas correlações confirmam que a conexão da genina com a glicose ocorre em C-3, e que as ramnose estão conectadas à glicose em de C-2'' e C-6''.

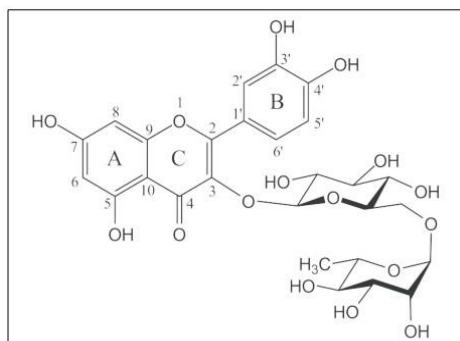
A configuração relativa dos carbonos anoméricos dos carboidratos foi possível a partir da análise das constantes de acoplamentos presentes no espectro de RMN de  $^1H$ . A configuração  $\beta$  da glicose foi evidenciada pela constante de acoplamento relativamente alta ( $J_{H1-H2}$  7,5 Hz) (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). A configuração  $\alpha$  das duas unidades de ramnose foi inferida pela multiplicidade dos sinais de seus hidrogênios anoméricos, pois eram esperados dupletos, e no entanto, foi observada a presença de simpletos, devido ao pequeno valor de  $J$  ( $H_{eq-eq}$  0-5 Hz; SILVERSTEIN *et al.*, 2005) impossibilitando sua determinação.



**Figura 24:** Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM10** em  $CD_3OD$ .

Os dados de RMN de  $^{13}C$  foram comparados com a literatura (SRINROCH *et al.*, 2019) (Tabela 6A, p. 200) e permitiram identificar **TM10** como sendo **3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)] $[\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]**-  **$\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina.**

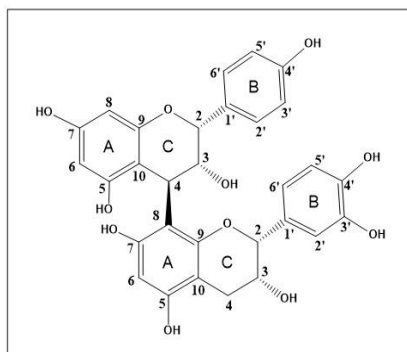
### 1.4.11 TM11: 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina (rutina)



**TM11** foi obtido a partir de **EMF** e apresentou-se como um sólido amarelado com faixa de fusão de 200-201,5 °C, solúvel em metanol. A análise por CCD deste sólido, usando revelador NP/PEG sob luz ultravioleta, indicou apenas uma mancha alaranjada fluorescente.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 30A, p. 169) apresenta vários sinais na região de hidrogênios aromáticos e na região característica de sinais de carboidratos. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 31A, p. 170) apresenta 27 sinais e o subespectro DEPT-135 (Figura 32A, p. 170) permitiu classificá-los como sendo 10 C, 15 CH, 1  $\text{CH}_3$  e 1  $\text{CH}_2$ . A presença de vários sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  68,59 e 78,21, juntamente com os dados de RMN de  $^1\text{H}$ , sugerem a presença de um flavonoide glicosilado. Tendo como base o esqueleto de um flavonoide, foi realizada a análise detalhada do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Um duplete duplo em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 (1H,  $J = 8,5$  e  $2,2$  Hz) foi atribuído a H-6', e os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,67 (1H,  $J = 2,2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (1H,  $J = 8,4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (1H,  $J = 2,1$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,21 (1H,  $J = 2,1$  Hz) foram atribuídos a H-2', H-5', H-8 e H-6, respectivamente, caracterizando a quercetina. A presença de dois sinais de hidrogênios anoméricos em  $\delta_{\text{H}}$  5,11 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz.) e  $\delta_{\text{H}}$  4,52 (1H, d,  $J = 1,7$  Hz) indicaram que **TM11** trata-se de um flavonoide dissacarídeo. O duplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,12 (3H,  $J = 6,2$  Hz) sugere que um dos carboidratos é a ramnose. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  17,89 ( $\text{CH}_3$ ) confirma a presença da ramnose. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os dados da literatura (VENEGAS-CASANOVA *et al.*, 2018) (Tabela 7A, p. 201) e permitiram identificar **TM11** como sendo a **rutina**.

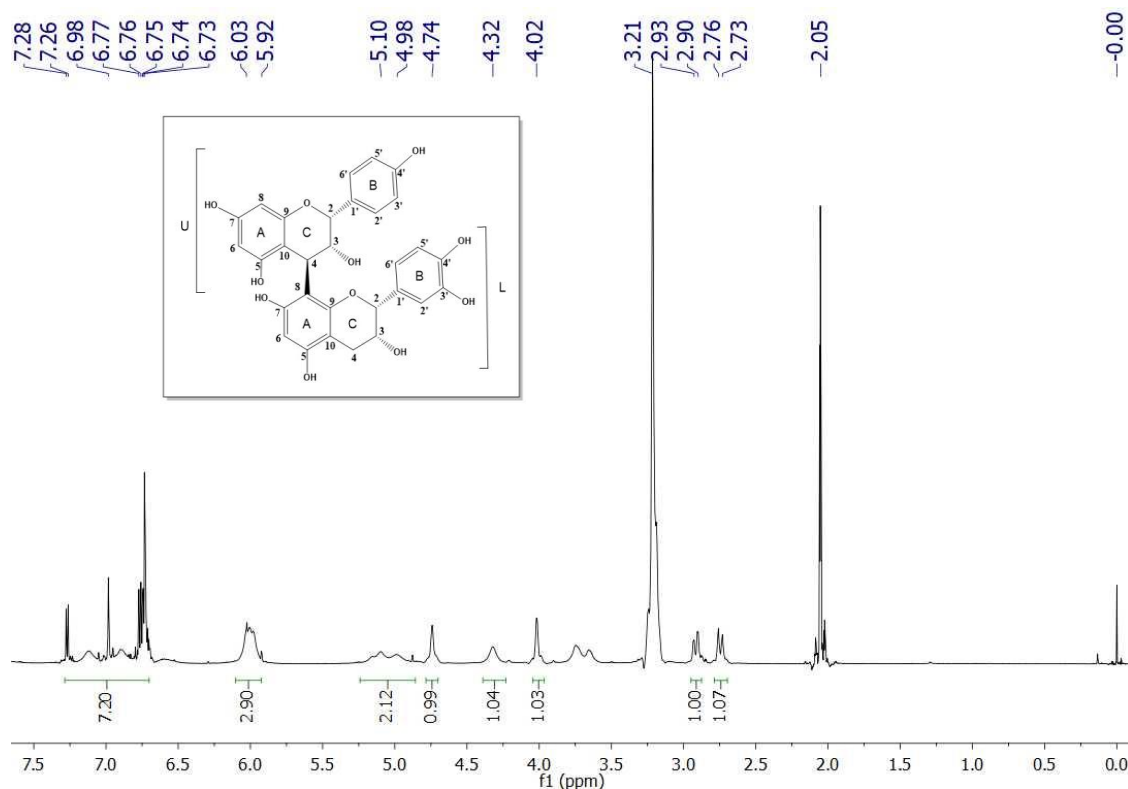
### 1.4.12 TM12: epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina



**TM12** foi obtido a partir de **EMF** e apresentou-se como sólido vermelho com faixa de fusão de 216-218 °C, solúvel em acetona e metanol. A análise por CCD deste sólido indicou uma mancha vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 25, p. 62) apresenta vários sinais na região de hidrogênios aromáticos. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 26, p. 63) apresenta 35 sinais de carbono que foram classificados a partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura 27, p. 63). Os sinais em  $\delta_c$  114,96-115,53 (CH),  $\delta_c$  119,32 (CH),  $\delta_c$  129,19 (CH),  $\delta_c$  131,76 e  $\delta_c$  132,34 (C),  $\delta_c$  145,08-145,40 (C) e  $\delta_c$  155,82-157,66 (C), confirmaram tratar-se de um composto aromático, sugerindo que **TM12** seja um flavonoide dimérico. Procianidinas, especialmente aquelas contendo unidades de epicatequina, são frequentemente isoladas de espécies Celastraceae e, portanto, suas estruturas foram inicialmente a base da análise de **TM12**. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta quatro sinais intensos na região de carbono hidroxilado,  $\delta_c$  79,24 (CH),  $\delta_c$  76,94 (CH),  $\delta_c$  72,92 (CH),  $\delta_c$  66,42 (CH), e dois sinais intensos de carbono alifático em  $\delta_c$  36,90 (CH) e  $\delta_c$  29,01 (CH<sub>2</sub>). Todos esses sinais estão acompanhados por outros de baixa intensidade, mostrando um padrão de duplicidade. Essa duplicação de sinais acontece em flavonoides diméricos devido à presença de isômeros rotacionais, em consequência da ligação interflavonoídica e é mais intensa nos anéis A e C, especialmente no caso de dímeros contendo epicatequina (AGRAWAL, 1989). Os sinais em  $\delta_c$  36,90 e  $\delta_c$  107,05 indicam que a ligação interflavonoídica acontece entre as posições C-4, da unidade superior (U), e C-8 da unidade inferior (L), e os valores são compatíveis para uma série de procianidinas diméricas contendo pelo menos uma unidade de epicatequina (AGRAWAL, 1989), um flavonoide da classe das flavanas, comumente encontrado na família Celastraceae.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  os sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  5,92-6,03 (3H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,28- 6,73 (7H) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio dos anéis A e B, respectivamente. A integração dos sinais referentes ao anel B apontam que as unidades de flavonoides são diferentes. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,73 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  2,90 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  4,02 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  4,32 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  4,74 (1H) e  $\delta_{\text{H}}$  4,98-5,10 (2H), totalizando sete átomos de hidrogênio, são referentes aos anéis C.



**Figura 25:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de **TM12** em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com uma série de procianidinas diméricas e monômeros de flavonoides da classe das flavanas, e a maioria dos valores (Tabela 6, p. 67) são consistentes com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989) para a epicatequina e epiafzelequina, sugerindo que **TM12** seja um dímero dessas unidades. Um dímero dessas flavanas é a **epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina**, e seus dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos átomos de carbono dos anéis C, foram encontrados na literatura (KASHIWADA *et al.*, 1990) e são condizentes com os encontrados para **TM12** (Tabela 6, p. 67). No entanto, não foram encontrados dados completos na literatura para esse dímero. Além disso, os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos anéis A e C da epicatequina e epiafzelequina são coincidentes (Tabela 6, p. 67), dificultando estabelecer qual delas trata-se da unidade U ou L. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  de procianidinas variam muito entre os autores, e são bastante afetados pelo

solvente utilizado, dificultando a comparação por meio desses valores (AGRAWAL, 1989). Dessa forma, partimos para análise de RMN bidimensional (HSQC e HMBC) para atribuição completa e elucidação inequívoca da estrutura de **TM12**.

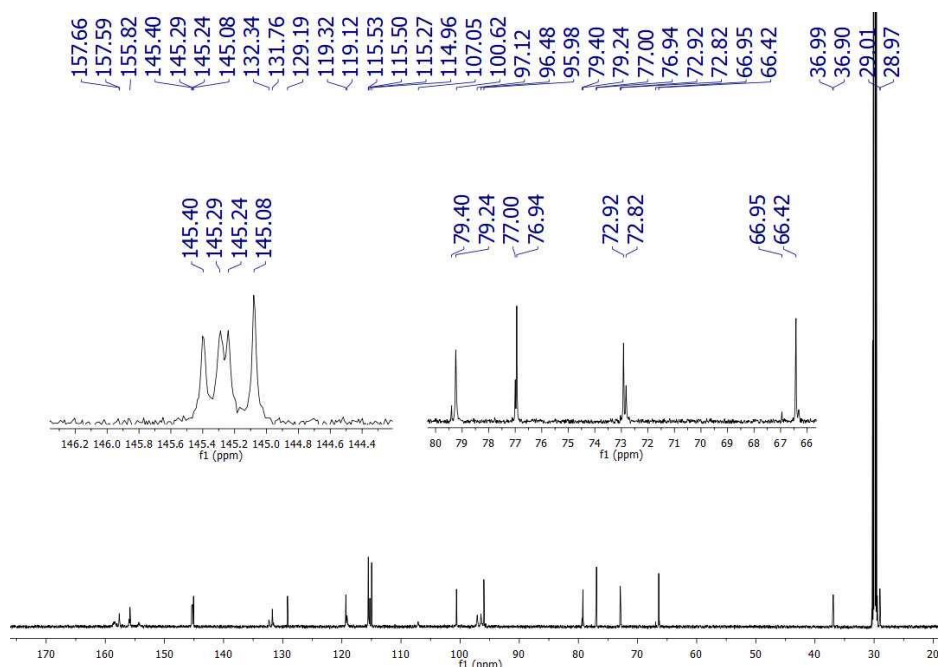


Figura 26: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz) de **TM12** em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

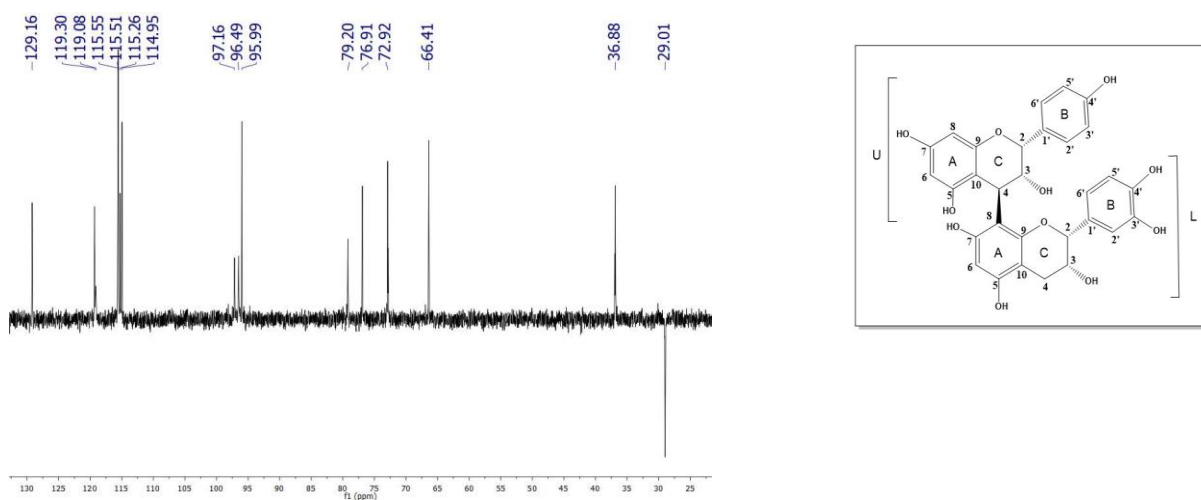
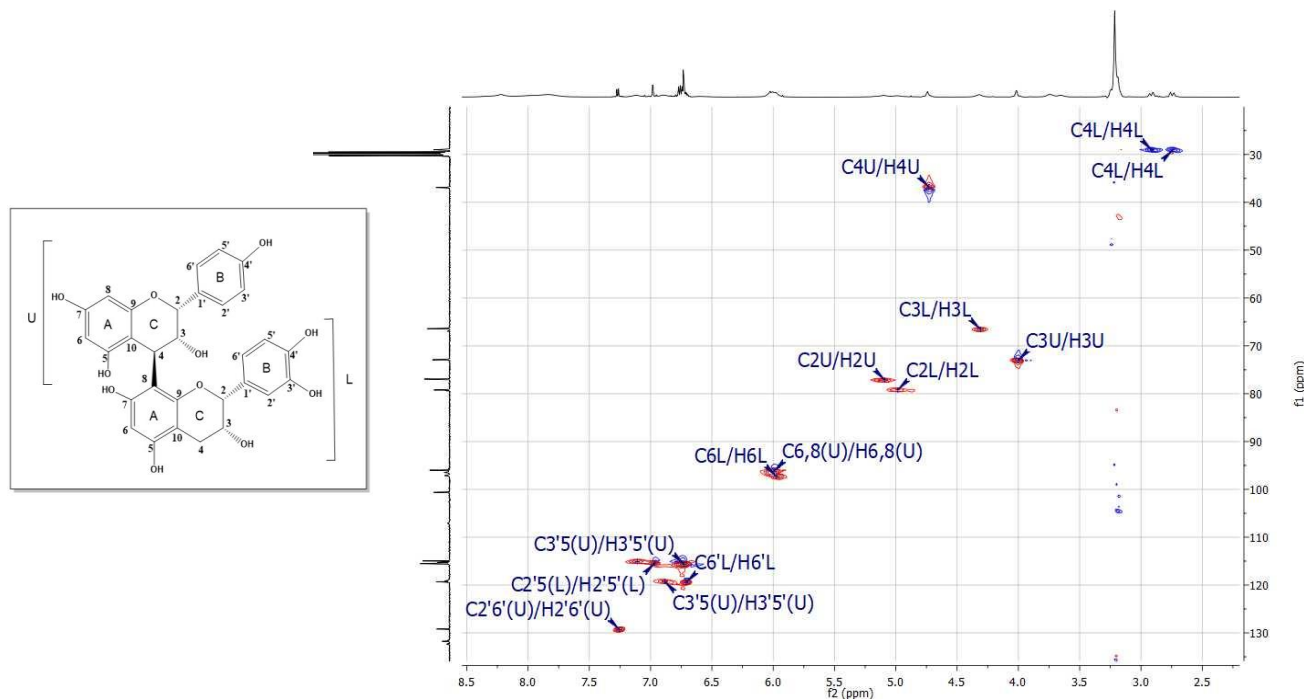


Figura 27: Subspectro DEPT-135 (150 MHz) de **TM12** em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

A partir da análise do mapa de contornos HSQC (Figuras 28 e 29, p. 64 e 65) de **TM12**, todos os sinais de hidrogênio foram correlacionados aos seus respectivos átomos de carbono. E então fez-se a análise detalhada do mapa de contornos HMBC (Figura 30 e 31, p. 66).



**Figura 28:** Mapa de contornos HSQC (600 MHz) de **TM12** em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

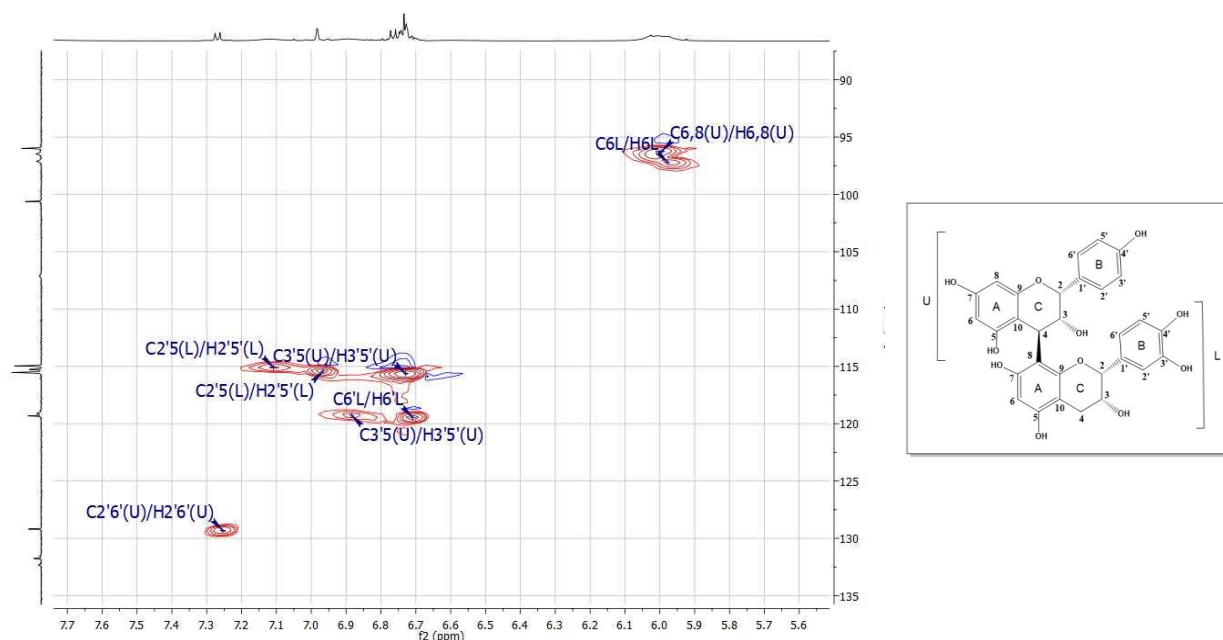
A análise do mapa de contornos HMBC foi feita usando como ponto de partida o sinal em  $\delta_C$  36,90, atribuído a C-4U, pois esse valor é condizente com uma série de procianidinas com ligação interflavonoides na posição  $4\beta \rightarrow 8$ . O sinal de C-4U em  $\delta_C$  36,90 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,02 que foi atribuído a H-3U (Figura 30, p. 66), que por sua vez apresenta correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  76,94 (C-2U),  $\delta_C$  100,62 (C-10U),  $\delta_C$  131,76 (C-1'U) e  $\delta_C$  107,05 (C-8L). Este último sinal, por sua vez, correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,74 (H-4U), confirmando que de fato a ligação interflavonoide acontece entre C-4U e C-8L (Figura 30, p. 66). O sinal de C-10 de procianidinas, utilizando acetona como solvente, é coincidente para as duas unidades dos monômeros (AGRAWAL, 1989) e isso pode ser confirmado pelas correlações de C-10 em  $\delta_C$  100,62 com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  4,74 (H-4U),  $\delta_H$  2,73 (H-4<sub>a</sub>L) e  $\delta_H$  2,90 (H-4<sub>b</sub>L), além de se correlacionar com os sinais entre  $\delta_H$  5,92-6,03 que foram atribuídos a H-6U/L e H8-U (Figuras 30 e 31, p. 66).

O sinal de C-2U em  $\delta_C$  76,94 apresenta correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  4,74 (H-4U),  $\delta_H$  6,73 e  $\delta_H$  6,98 (H-3'5'U) e  $\delta_H$  7,27 (H-2'6'U) (Figura 31, p. 66). Essa última correlação confirma que a unidade superior (U) é a epiafzelequina, pois o sinal em  $\delta_C$  129,19 correspondente a C-2'6' não é observado na epicatequina.

Os sinais de H-4<sub>a</sub>L e H-4<sub>b</sub>L em  $\delta_H$  2,73 e  $\delta_H$  2,90, respectivamente, correlacionam-se com os sinais de carbono em  $\delta_C$  66,42 (C-3L) e  $\delta_C$  79,40 (C-2L). Além disso, H-4<sub>b</sub>L em  $\delta_H$  2,90 (H-3) correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_C$  107,05 (C-8L) (Figura 30, p. 66).

O sinal em  $\delta_H$  4,98 (H-2L) possui correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  132,34 (C-1'L),  $\delta_C$  115,27 (C-2'L) e  $\delta_C$  119,32 (C-6'L) (Figura 31, p. 66). Esta última correlação também confirma que a unidade inferior (L) é de fato a epicatequina, pois o sinal em  $\delta_C$  119,32 não é observado no monômero epiafzelequina. O sinal de H-6'L em  $\delta_H$  6,74 apresenta correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  145,08-145,40 (C-3'4'L). Várias outras correlações de sinais de hidrogênios aromáticos de **TM12** foram observadas e estão listadas na Tabela 7, p. 68.

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D e comparação com dados da literatura, permitiram atribuir os deslocamentos químicos de todos os átomos de carbono (Tabela 7, p. 68) necessários para confirmar que **TM12** trata-se de **epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina**.



**Figura 29:** Expansão do mapa de contornos HSQC (600 MHz) de **TM12** em  $(CD_3)_2CO$ .



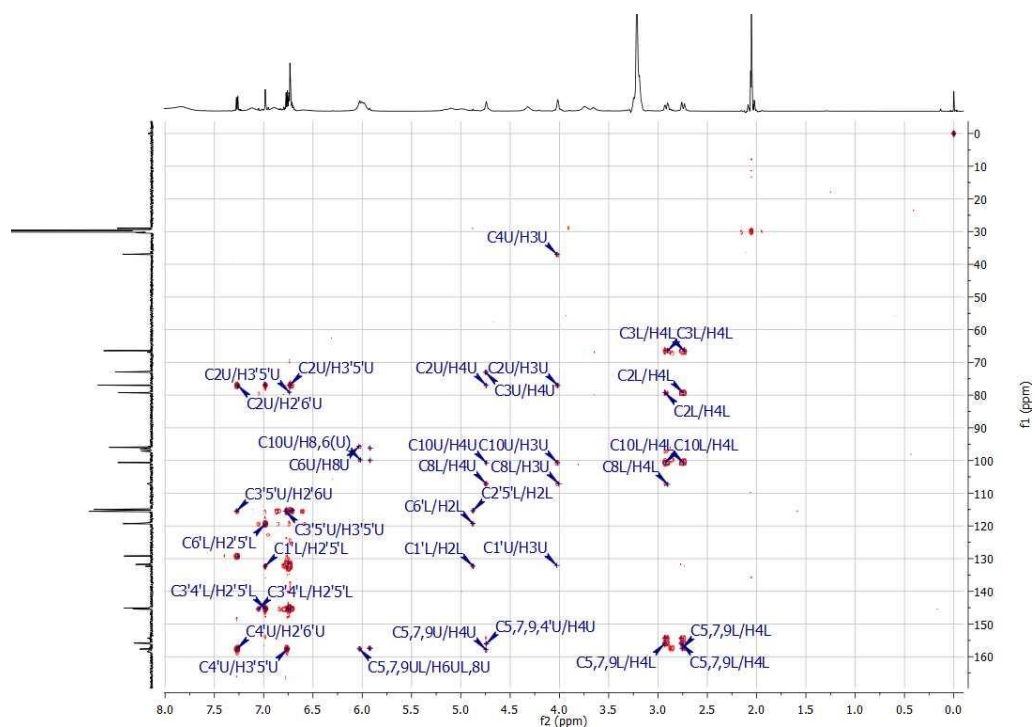


Figura 30: Mapa de contornos HMBC (600 MHz) de **TM12** em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

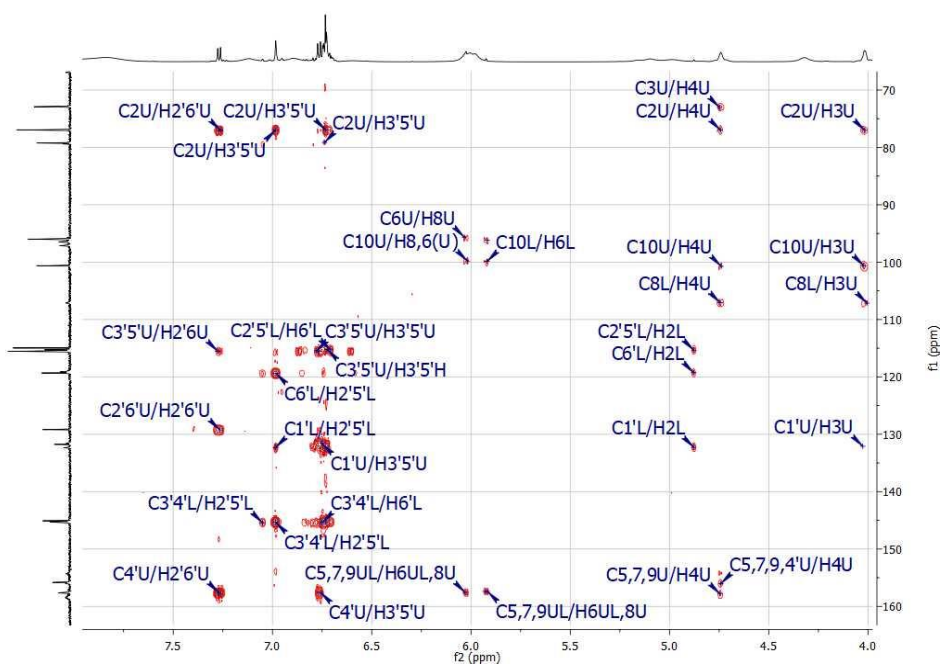
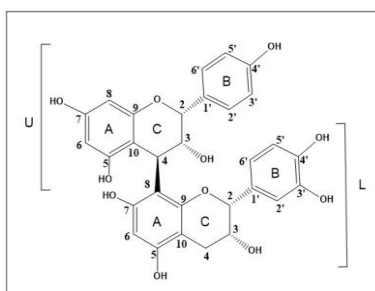


Figura 31: Expansão do mapa de contornos HMBC (600 MHz) de **TM12** em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .





**Tabela 6:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM12** com os dados da literatura (KASHIWADA *et al.*, 1990; AGRAWAL, 1989) para a **epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina, epiafzelequina e epicatequina**

Nº	Tipo de C	$\delta_c^*$ de TM12	$\delta_c^{**}$ (KASHIWADA <i>et al.</i> , 1990)	$\delta_c^{***}$ (AGRAWAL, 1989)		Tipo de C
			epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina	Epiafzelequina	Epicatequina	
2U	CH	76,94	76,7	79,4	-	CH
3U	CH	72,92	72,7	66,3	-	CH
4U	CH	36,90	36,8	29,0	-	CH <sub>2</sub>
5U	C	155,82	-	157,0	-	C
6U	CH	96,48	-	96,4	-	CH
7U	C	157,66	-	157,0	-	C
8U	CH	95,98	-	95,8	-	CH
9U	C	157,66	-	157,0	-	C
10U	C	100,62	-	99,7	-	C
1'U	C	131,76	-	131,3	-	C
2'U	CH	129,19	-	128,9	-	CH
3'U	CH	115,53	-	115,5	-	CH
4'U	C	157,66	-	157,0	-	C
5'U	CH	115,53	-	115,5	-	CH
6'U	CH	129,19	-	128,9	-	CH
2L	CH	79,40	79,0	-	79,4	CH
3L	CH	66,42	66,1	-	66,9	CH
4L	CH <sub>2</sub>	29,01	28,4	-	29,1	CH <sub>2</sub>
5L	C	157,59	-	-	157,4	C
6L	CH	97,12	-	-	96,2	CH
7L	C	157,59	-	-	157,4	C
8L	C	107,05	-	-	95,7	CH
9L	C	157,59	-	-	157,0	C
10L	C	100,62	-	-	99,7	C
1'L	C	132,34	-	-	132,1	C
2'L	CH	114,96	-	-	115,2	CH
3'L	C	145,08-145,40	-	-	145,2	C
4'L	C	145,08-145,40	-	-	145,2	C
5'L	CH	115,27	-	-	115,5	CH
6'L	CH	119,32	-	-	119,4	CH

\* $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/150\text{ MHz}$  \*\* $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{D}_2\text{O}$  (8:2)/25 MHz \*\*\* $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

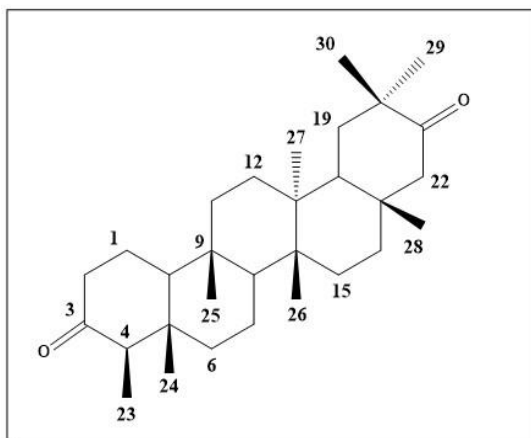
Marcações de mesma cor relacionam  $\delta_c$  parciais de **TM12** com os respectivos valores da literatura para **epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina, epiafzelequina e epicatequina**

**Tabela 7:** Dados de RMN 1D e 2D (600 MHz) de **epiafzelequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (TM12)** em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

Nº	Tipo de C	$\delta_c^*$ de TM12	$\delta_H$	HMBC
<i>Unidade U</i>				
2U	CH	76,94	5,10	3U, 4U, 3'U, 5'U, 2'U, 6'U
3U	CH	72,92	4,02	4U
4U	CH	36,90	4,74	3U
5U	C	155,8	-	4U
6U	CH	96,48	6,00	8U
7U	C	157,66	-	4U
8U	CH	95,98	6,00	6U
9U	C	157,66	-	4U
10U	C	100,62	-	3U, 4U, 6U, 8U
1'U	C	131,76	-	3U, 3'U, 5'U
2'U	CH	129,19	7,27	6'U
3'U*	CH	115,53	6,74	2'U, 6'U, 5'U
4'U	C	157,66	-	2'U, 6'U
5'U*	CH	115,53	6,74	3'U
6'U	CH	129,19	7,27	2'U
<i>Unidade L</i>				
2L	CH	79,40	4,98	4L, 2'L, 5'L, 6'L
3L	CH	66,42	4,32	4L
4L	CH <sub>2</sub>	29,01	2,73 (H <sub>a</sub> ) 2,90 (H <sub>b</sub> )	-
5L	C	157,59	-	4L, 6L
6L	CH	97,12	6,00	-
7L	C	157,59	-	6L
8L	C	107,05	-	3U, 4U
9L	C	157,59	-	4L, 6L
10L	C	100,62	-	4L, 6L
1'L	C	132,34	-	2L, 2'L, 5'L
2'L**	CH	114,96	7,11	2L, 6'L
3'L	C	145,08-145,40	-	2'L, 5'L
4'L	C	145,08-145,40	-	2'L, 5'L
5'L**	CH	115,27	6,98	2L, 6'L
6'L	CH	119,32	6,73	2L, 2'L, 5'L

\* \*\* Sinais intercambiáveis

### 1.4.13 TM13: friedelan-3,21-diona



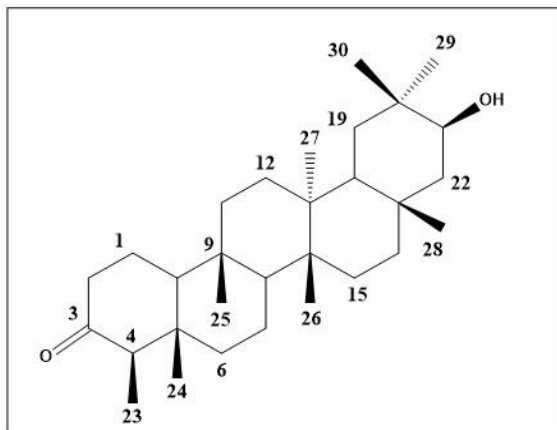
**TM13** foi isolado de **EHG, SHG, ECG, EAG** e **EHR**. Apresentou-se como um sólido branco cristalino, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 227,0-230,6 °C. A análise por CCD deste sólido indicou uma única mancha amarela (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 33A, p. 171) apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,74,  $\delta_{\text{H}}$  0,88,  $\delta_{\text{H}}$  0,89,  $\delta_{\text{H}}$  1,06,  $\delta_{\text{H}}$  1,08,  $\delta_{\text{H}}$  1,15,  $\delta_{\text{H}}$  1,16 e  $\delta_{\text{H}}$  1,17 que foram atribuídos a oito grupos metila, de acordo com a integração dos sinais. O duplete em  $\delta_{\text{H}}$  2,60 ( $J = 12,8$  Hz) e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,39 são referentes a átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono vizinhos à carbonila.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34A, p. 171) apresenta 30 sinais de carbono, que foram classificados a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 35A, p. 172). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  212,85 e  $\delta_{\text{C}}$  218,74 são referentes a dois grupos carbonila, e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,82 à metila em C-23. Estes dados sugerem que **TM13** é um TTPC friedelano contendo duas carbonilas.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (PATRA *et al.*, 1981) (Tabela 8A, p. 202) e permitiram identificar **TM13** como sendo **friedelan-3,21-diona**.

#### 1.4.14 TM14: 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona



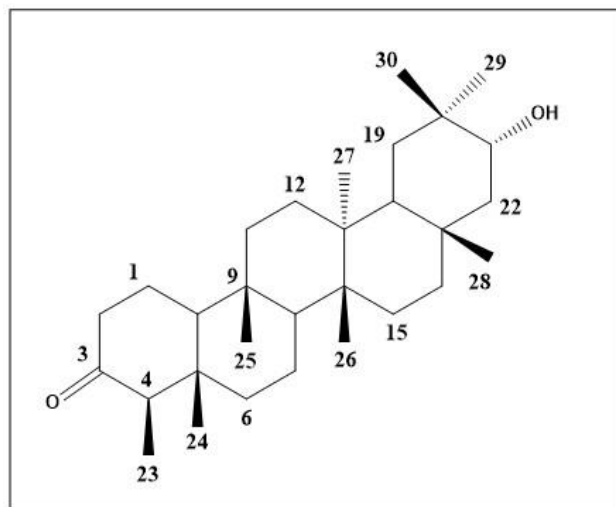
**TM14** foi isolado de **EHG** e apresentou-se como um sólido branco cristalino, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 212,7-215,8 °C. A análise por CCD deste sólido indicou uma única roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 36A, p. 172) apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,73,  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,88,  $\delta_{\text{H}}$  1,02,  $\delta_{\text{H}}$  1,04,  $\delta_{\text{H}}$  1,06,  $\delta_{\text{H}}$  1,08 e  $\delta_{\text{H}}$  1,41 que foram atribuídos a oito grupos metila. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,80 (1H, dd,  $J = 6,0$  e  $1,0$  Hz) é atribuído a um átomo de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 37A, p. 173) apresenta 30 sinais de carbono, que foram classificados a partir do subspectro DEPT-135 (Figura 38A, p. 173). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  213,17 foi atribuído à carbonila em C-3 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,94 foi atribuído à metila em C-23, que são sinais característicos de triterpenos friedelano. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  75,82 (CH) foi atribuído ao carbono hidroxilado.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (NGUYEN e TRAN, 2009) (Tabela 9A, p. 203) e permitiram identificar **TM14** como sendo **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona**.

### 1.4.15 TM15: 21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona



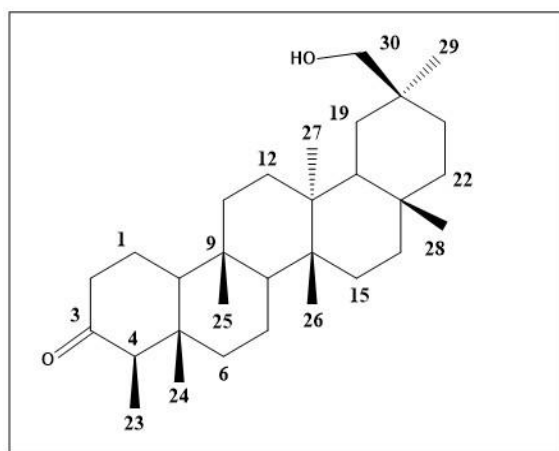
**TM15** foi isolado de **SHG** e apresentou-se como sólido amorfo, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 247,6-249,0 °C. A análise por CCD deste sólido evidenciou a existência de uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 39A, p. 174) apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,72,  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,89,  $\delta_{\text{H}}$  0,91,  $\delta_{\text{H}}$  0,99,  $\delta_{\text{H}}$  1,07,  $\delta_{\text{H}}$  1,11 e  $\delta_{\text{H}}$  1,20 que foram atribuídos a oito grupos metila, sugerindo a presença de um triterpeno pentacíclico. O duplete duplo em  $\delta_{\text{H}}$  3,69 (1H,  $J = 4,3$  e  $12,1$  Hz) é referente a um átomo de hidrogênio na posição axial de carbono contendo o grupo hidroxila.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 40A, p. 174) apresenta 30 sinais, sendo sete não hidrogenados, cinco metínicos, dez metilênicos e oito metilas classificados a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 41A, p. 175). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  74,45 confirma a presença de um átomo de carbono metínico hidroxilado. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  213,26 indicou a presença de um átomo de carbono carbonílico, atribuído a C-3, e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,96 é referente à metila em C-23. Estes sinais confirmam tratar-se de um TTPC friedelano.

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (SETZER *et al.*, 2000) (Tabela 10A, p. 204), permitiram identificar **TM15** como sendo **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona**.

### 1.4.16 TM16: 30-hidroxfriedelan-3-ona



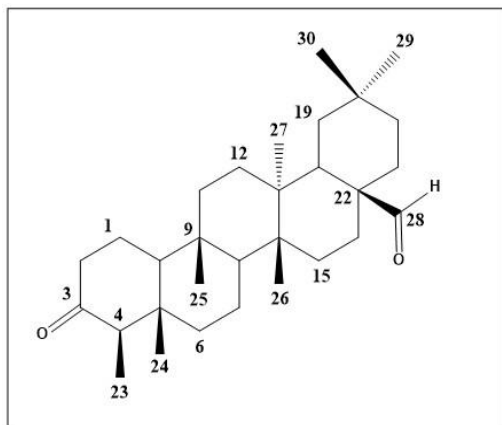
**TM16** foi isolado de **EHG**, **SHG** e **ECG**, um sólido branco amorfo solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 257,3-259,1 °C. Análise de CCD mostrou a presença de uma única mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 42A, p. 175) apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,72,  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,89,  $\delta_{\text{H}}$  0,99,  $\delta_{\text{H}}$  1,00,  $\delta_{\text{H}}$  1,07 e  $\delta_{\text{H}}$  1,15 referentes a sete grupos metila, de acordo com as integrações. Dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,36 ( $J = 10,5$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  3,43 ( $J = 10,5$  Hz) sugerem a presença de dois átomos de hidrogênio, de acordo com as integrações, ligados a um carbono hidroxilado.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 43A, p. 176) apresenta 29 sinais de carbono, sendo um deles com intensidade maior, indicando uma sobreposição de sinais. Com auxílio do subespectro DEPT-135 (Figuras 44A, p. 176) os sinais foram classificados. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,82 juntamente com  $\delta_{\text{C}}$  213,12 sugerem uma estrutura triterpênica da série friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994), que possui carbonila em C-3. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,01 indica a presença de um átomo de carbono hidroxilado na estrutura, que foi classificado como um  $\text{CH}_2$ , a partir do subespectro DEPT-135.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (FERREIRA, 2014) (Tabela 11A, p. 205) e sugeriram que **TM16** trata-se de **30-hidroxfriedelan-3-ona**.

### 1.4.17 TM17: 3-oxo-friedelan-28-al



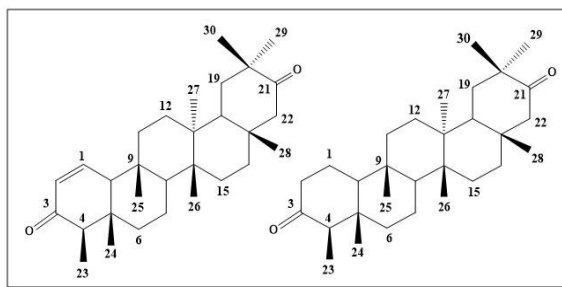
**TM17** foi isolado de **SHG** e **ECG**, apresentou-se como um sólido branco amorfo com faixa de fusão de 180,3-183,0 °C, solúvel em clorofórmio e que indicou a presença de uma única mancha roxa em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45A, p. 177) apresenta sete sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,67, 0,72, 0,84, 0,87, 0,95, 0,98 e 1,07 referentes a sete grupos metila, de acordo com a integração dos sinais. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  9,47 (1H) sugeriu a presença de um grupo CHO.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 (Figuras 46A e 47A, p. 177 e 178) indicam a presença de 30 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 7  $\text{CH}_3$ , 11  $\text{CH}_2$ , 5  $\text{CH}$  e 7  $\text{C}$ . O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,93, característico de um carbono de uma estrutura triterpênica da série friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994), foi atribuído à metila em C-23. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  213,10 e  $\delta_{\text{C}}$  209,14 são relacionados a dois carbonos carbonílicos, sendo este último de carbonila de aldeído.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (LI *et al.*, 2010) (Tabela 12A, p. 206) e indicaram que **TM17** trata-se de **3-oxo-friedelan-28-al**.

### 1.4.18 TM18: friedel-1-en-3,21-diona e TM13: friedelan-3,21-diona



A mistura de **TM18** e **TM13** foi isolada de **SHG**. Apresentou-se como sólido amorfo, solúvel em clorofórmio e evidenciou a existência de duas manchas roxas com  $R_f$  bem próximos, em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). Tentativas de separação foram infrutíferas.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 32, p. 76) apresenta um grande número de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,74 e 1,17, de diferentes intensidades, sugerindo tratar-se de uma mistura. O duplete em  $\delta_{\text{H}}$  2,61 ( $J = 12,9$  Hz) é característico de átomos de hidrogênio vizinhos a carbonila e os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,06 (dd,  $J = 10,2$  e 3,1 Hz) e 6,92 (dd,  $J = 10,2$  e 1,2 Hz), de baixas intensidades, indicam que o composto minoritário da mistura possui ligação insaturada.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 33, p. 76) apresenta 56 sinais de carbono, que foram classificados a partir do subspectro DEPT-135 (Figura 34, p. 77). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  201,68,  $\delta_{\text{C}}$  212,89 e  $\delta_{\text{C}}$  218,64 e  $\delta_{\text{C}}$  218,77 indicam a presença de quatro grupos carbonila. Estes dados, juntamente com a presença dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  6,68 e  $\delta_{\text{C}}$  6,82, sugerem que a mistura é composta por dois triterpenos friedelânicos com carbonila em C-3. Além disso, sinais em  $\delta_{\text{C}}$  130,28 (CH) e  $\delta_{\text{C}}$  148,67 (CH) indicam que um dos compostos apresenta ligação dupla. Considerando a integração dos sinais referentes às metilas C-23 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , pode-se indicar que o composto minoritário corresponde cerca de 15 % da mistura. Os sinais foram listados separadamente de acordo com suas intensidades e a partir da comparação com os dados da literatura foi possível identificar **friedelan-3,21-diona (TM13)** como componente majoritário na mistura (Tabela 8, p. 75). Os dados do composto minoritário foram comparados com os dados dos triterpenos friedel-1-en-3-ona e friedelan-3,21-diona, que permitiram sugerir que **TM18** trata-se de **friedel-1-en-3,21-diona**, um composto inédito (Tabela 8, p. 75).



**Tabela 8:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de **TM13** e **TM18** com os dados da literatura para friedelan-3,21-diona (PATRA *et al.*, 1981) e friedel-1-en-3-ona (MOITEIRO *et al.*, 2001)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de <b>TM13</b>	$\delta_c^{**}$ friedelan-3,21-diona	$\delta_c^*$ de <b>TM18</b>	$\delta_c^{***}$ friedel-1-en-3-ona	Tipo de carbono
1	CH <sub>2</sub>	22,27	22,4	130,28	130,3	CH
2	CH <sub>2</sub>	41,48	41,6	148,67	148,7	CH
3	C	212,89	213,0	201,68	201,4	C
4	CH	58,23	58,2	57,73	57,9	CH
5	C	42,10	42,2	43,70	43,70	C
6	CH <sub>2</sub>	41,22	41,3	39,78	40,0	CH <sub>2</sub>
7	CH <sub>2</sub>	18,28	18,4	17,78	18,6	CH <sub>2</sub>
8	CH	53,36	53,4	52,52	52,5	CH
9	C	37,49	37,5	37,05	36,8	C
10	CH	59,46	59,5	62,15	62,4	CH
11	CH <sub>2</sub>	35,55	35,6	35,03	35,5	CH <sub>2</sub>
12	CH <sub>2</sub>	32,78	32,9	32,48	30,3	CH <sub>2</sub>
13	C	38,20	38,3	38,16	40,1	C
14	C	39,92	40,0	40,0	38,4	C
15	CH <sub>2</sub>	30,62	30,7	30,32	32,3	CH <sub>2</sub>
16	CH <sub>2</sub>	37,02	37,1	37,02	36,1	CH <sub>2</sub>
17	C	33,23	33,3	36,64	30,1	C
18	CH	41,96	42,0	42,00	43,1	CH
19	CH <sub>2</sub>	35,10	35,1	34,61	35,0	CH <sub>2</sub>
20	C	42,74	42,8	42,79	28,2	C
21	C	218,77	218,8	218,64	33,0	C
22	CH <sub>2</sub>	54,96	55,1	54,96	39,3	CH <sub>2</sub>
23	CH <sub>3</sub>	6,82	6,9	6,68	6,6	CH <sub>3</sub>
24	CH <sub>3</sub>	14,66	14,8	13,75	13,8	CH <sub>3</sub>
25	CH <sub>3</sub>	17,74	17,9	17,74	17,9	CH <sub>3</sub>
26	CH <sub>3</sub>	18,46	18,6	19,58	19,8	CH <sub>3</sub>
27	CH <sub>3</sub>	21,20	21,4	20,76	18,6	CH <sub>3</sub>
28	CH <sub>3</sub>	33,56	33,6	33,53	32,2	CH <sub>3</sub>
29	CH <sub>3</sub>	28,81	28,9	28,81	31,8	CH <sub>3</sub>
30	CH <sub>3</sub>	24,98	25,9	24,98	34,9	CH <sub>3</sub>

\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/20 MHz \*\*\*CDCl<sub>3</sub>/75 MHz

Marcações de mesma cor relacionam  $\delta_c$  parciais de **TM18** com os valores da literatura para friedelan-3,21-diona e friedel-1-en-3-ona.

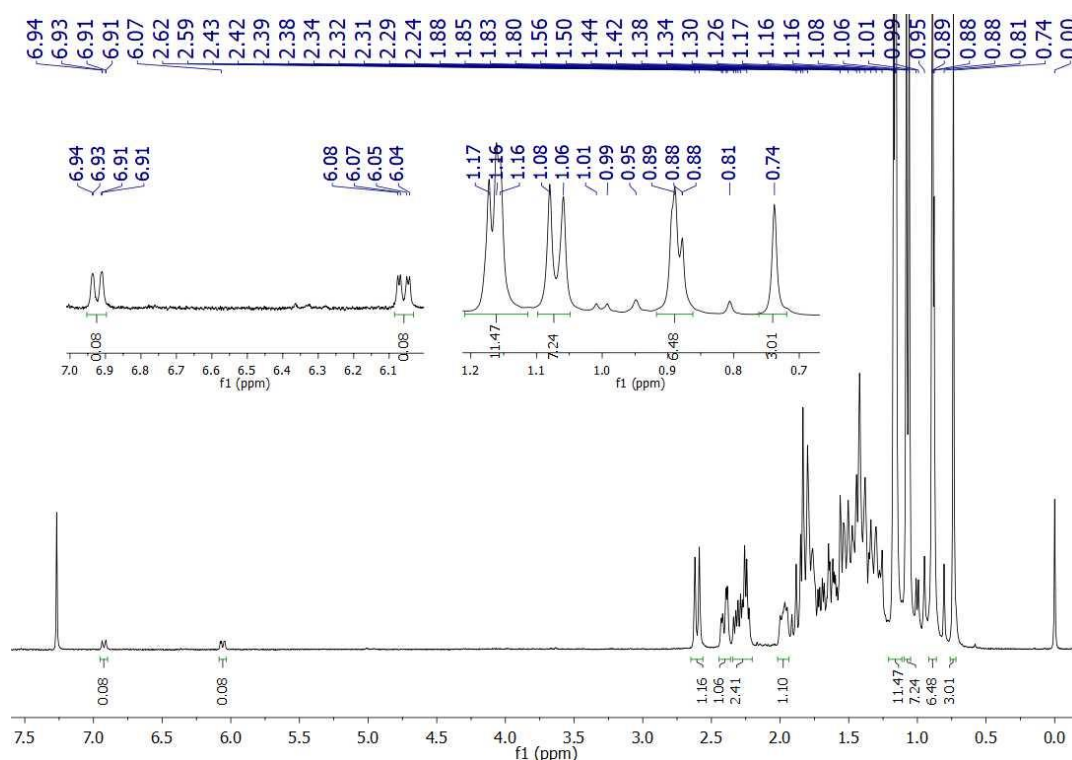


Figura 32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $\text{CDCl}_3$ .

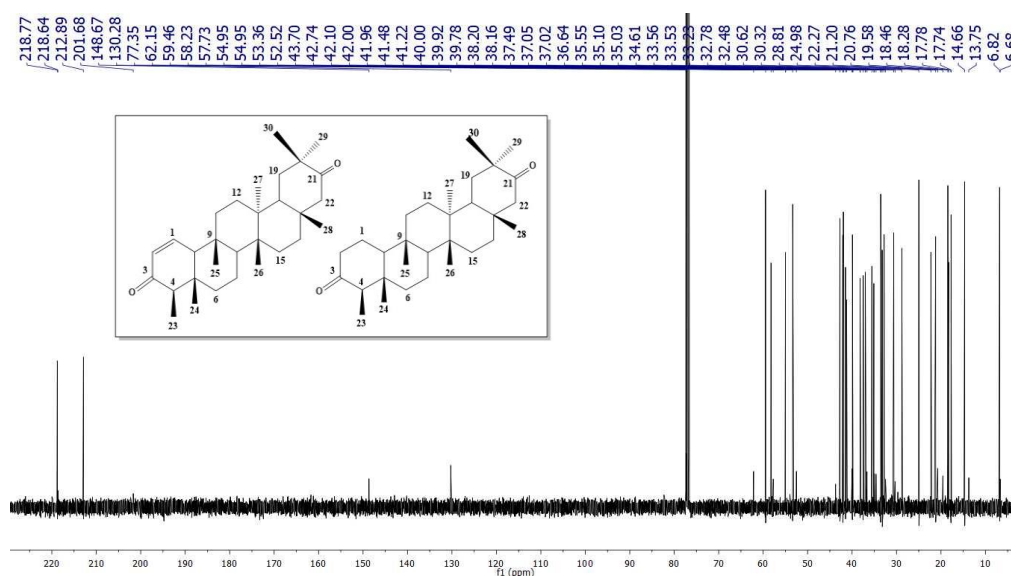
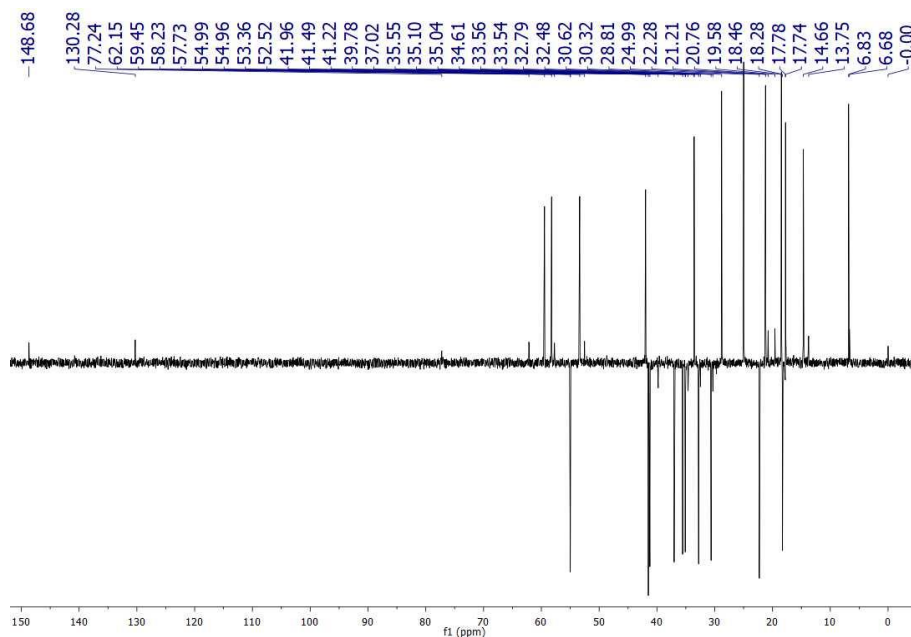


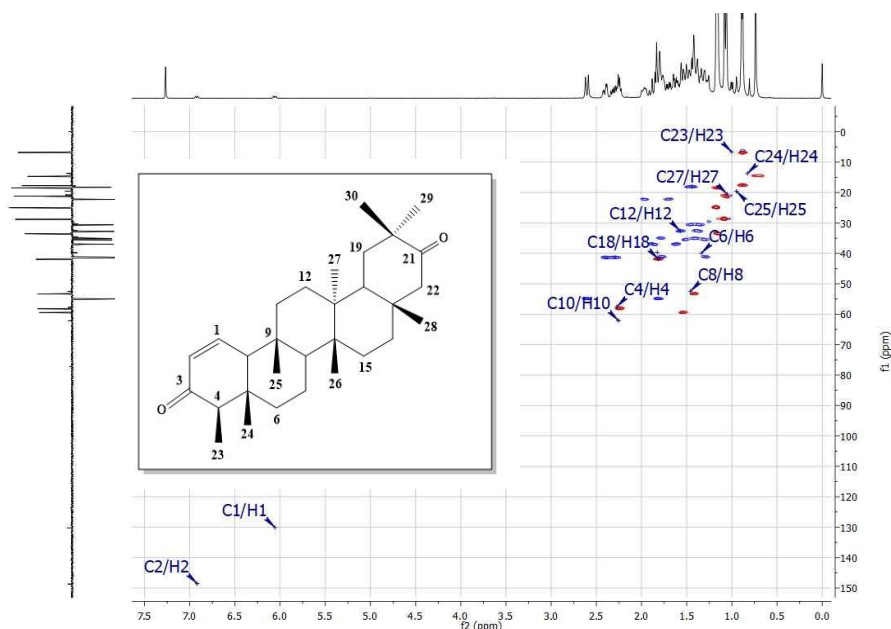
Figura 33: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $\text{CDCl}_3$ .

A fim de confirmar e elucidar inequivocamente a estrutura desse componente minoritário inédito, procedeu-se a análise detalhada dos espectros de RMN uni e bidimensional. Buscaram-se as correlações entre os sinais de menores intensidades, especialmente as correlações dos anéis A e B desse triterpeno. As demais mostravam-se sobrepostas, já que ambos os componentes apresentam carbonila em C-21 e a diferenciação ocorre apenas no anel A.



**Figura 34:** Subspectrum DEPT-135 (100 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $\text{CDCl}_3$ .

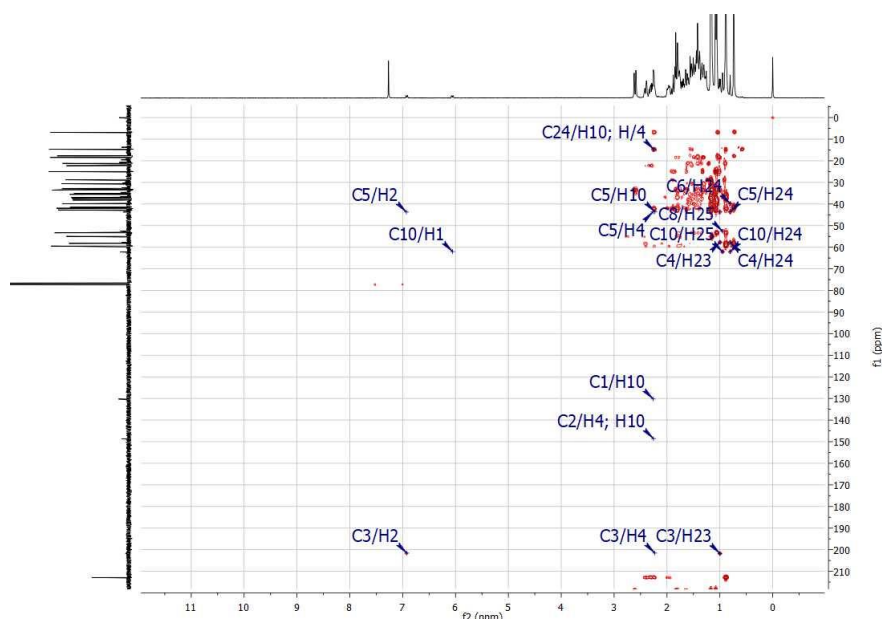
A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 35) da mistura de **TM13** e **TM18** permitiu correlacionar o sinal do carbono C-23 em  $\delta_c$  6,68 com H-23 em  $\delta_H$  1,00. Vários sinais de carbono foram correlacionados aos seus respectivos átomos de hidrogênio.



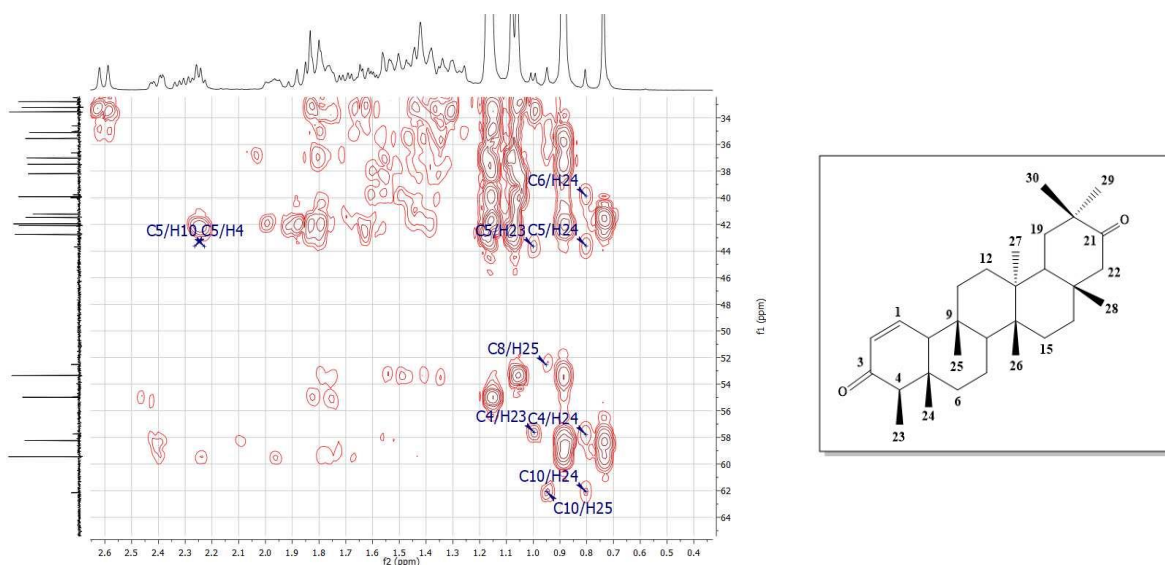
**Figura 35:** Mapa de contornos HSQC (400 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $\text{CDCl}_3$ .

Usando como ponto de partida os valores de C-23/H-23, procedeu-se, então, à análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 36 e 37, p. 78). O sinal de H-23 em  $\delta_H$  1,00 correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_c$  201,68 (C-3),  $\delta_c$  57,73 (C-4) e  $\delta_c$

43,70 (C-5) (Figuras 36 e 37). O sinal de carbono em  $\delta_C$  201,68 (C-3) possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  6,93 (H-2),  $\delta_H$  2,26 (H-4) e  $\delta_H$  1,00 (H-23) (Figura 36). O sinal em  $\delta_C$  43,70 (C-5) correlaciona-se com  $\delta_H$  1,00 (H-23) e  $\delta_H$  0,81 (H-24),  $\delta_H$  6,93 (H-2), e  $\delta_H$  2,26 (H-4) e  $\delta_H$  2,27 (H-10) (Figuras 36 e 37). Por sua vez, o sinal  $\delta_C$  62,15 (C-10) se correlaciona com os sinais em  $\delta_H$  6,07 (H-1),  $\delta_H$  0,81 (H-24) e  $\delta_H$  0,95 (H-25). Além disso, o sinal em  $\delta_H$  0,95 (H-25) correlaciona-se com  $\delta_C$  52,52 (C-8) (Figura 36). As correlações observadas para **TM18** estão apresentadas na Figura 39, p. 79.

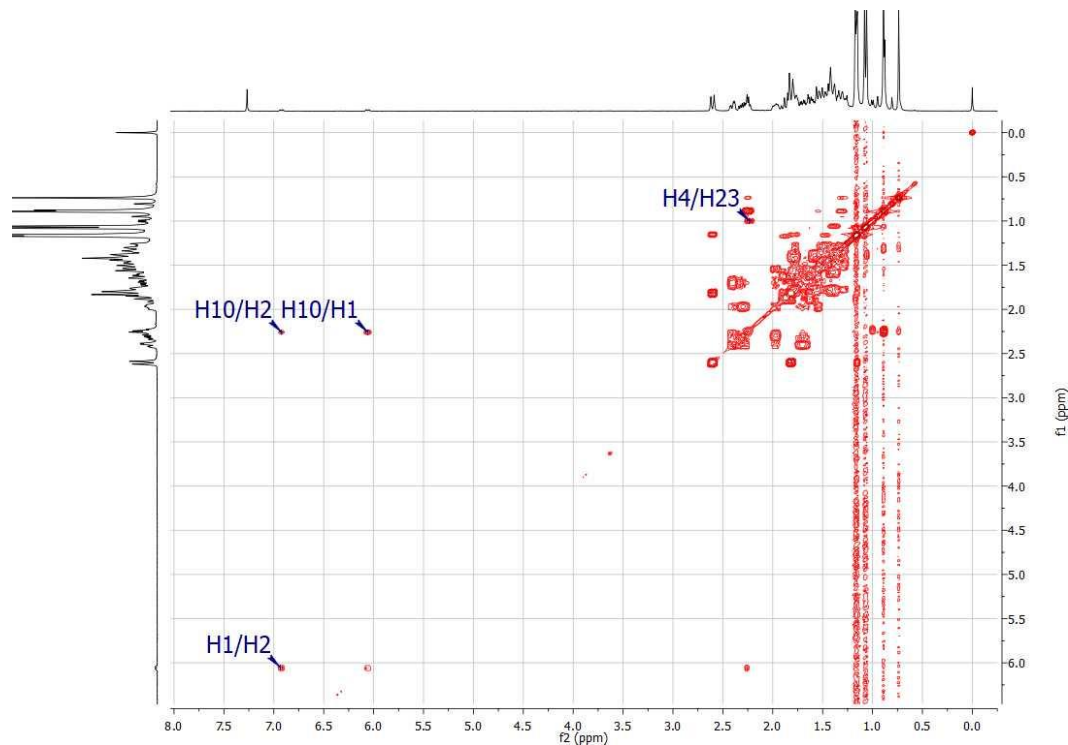


**Figura 36:** Mapa de contornos HMBC (400 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $CDCl_3$ .

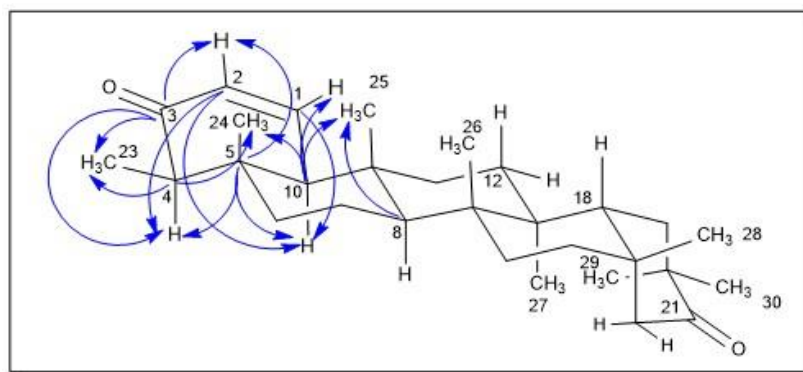


**Figura 37:** Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $CDCl_3$ .

A partir da análise do mapa de contornos COSY (Figura 38) foi possível correlacionar os sinais em  $\delta_H$  6,93 (H-2) com  $\delta_H$  6,06 (H-1),  $\delta_H$  1,00 (H-23) com  $\delta_H$  2,26 (H-4),  $\delta_H$  2,27 (H-10) com  $\delta_H$  6,06 (H-1) e  $\delta_H$  6,93 (H-2).



**Figura 38:** Mapa de contornos COSY (400 MHz) da mistura de **TM13** e **TM18** em  $CDCl_3$ .



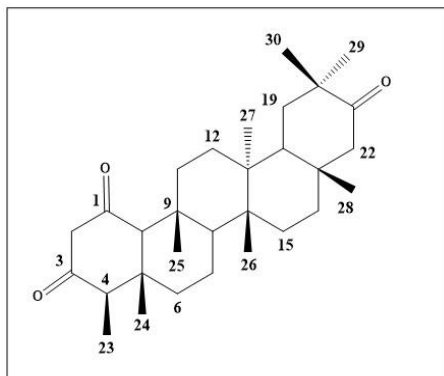
**Figura 39:** Correlações HMBC (400 MHz) observadas para **TM18**.

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D e comparação com os dados da literatura, permitiram atribuir os deslocamentos químicos de todos os átomos de carbono necessários para identificar **TM18** como sendo **friedel-1-en-3,21-diona** (Tabela 9, p. 80), um triterpeno pentacíclico inédito.

**Tabela 9:** Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **friedel-1-en-3,21-diona** em  $\text{CDCl}_3$ 

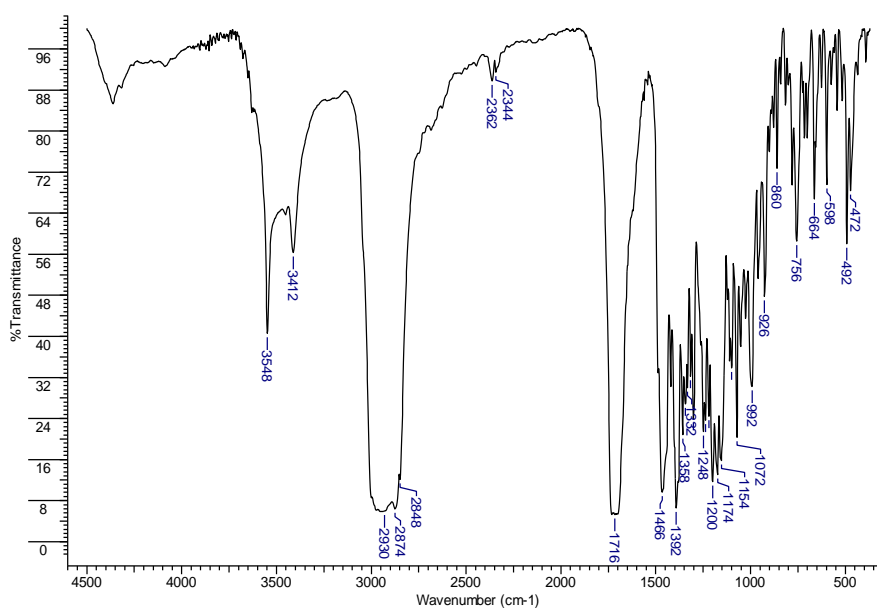
nº C	$\delta_c^*$ TM18	Tipo de C	$\delta_H$	HMBC	COSY
1	130,28	CH	6,06	10	2, 10
2	148,67	CH	6,92	4, 10	1, 10
3	201,68	C	-	2, 4, 23	-
4	57,73	CH	2,26	23, 24	23
5	43,70	C	-	2, 4, 10, 23, 24	-
6	39,78	CH <sub>2</sub>	1.34 e 1,83	24	-
7	17,78	CH <sub>2</sub>	-	-	-
8	52,52	CH	1,46	25	-
9	37,05	C	-	-	-
10	62,15	CH	2,27	1, 24, 25	1, 2
11	35,03	CH <sub>2</sub>	-	-	-
12	32,48	CH <sub>2</sub>	-	-	-
13	38,16	C	-	-	-
14	40,0	C	-	-	-
15	30,32	CH <sub>2</sub>	-	-	-
16	37,05	CH <sub>2</sub>	-	-	-
17	36,62	C	-	-	-
18	42,00	CH	1.81	-	-
19	34,61	CH <sub>2</sub>	-	-	-
20	42,79	C	-	-	-
21	218,64	C	-	-	-
22	54,96	CH <sub>2</sub>	-	-	-
23	6,68	CH <sub>3</sub>	1.00	3, 4, 5	4
24	13,75	CH <sub>3</sub>	0.81	4, 10	-
25	17,74	CH <sub>3</sub>	0,95	-	-
26	19,58	CH <sub>3</sub>	-	-	-
27	20,76	CH <sub>3</sub>	1.07	-	-
28	33,53	CH <sub>3</sub>	-	-	-
29	28,81	CH <sub>3</sub>	-	-	-
30	24,98	CH <sub>3</sub>	-	-	-

### 1.4.19 TM19: friedelan-1,3,21-triona



**TM19** foi isolado de **SHG** e apresentou-se como um sólido branco amorfo solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão de 223,8-226,8 °C, e indicou a presença de uma única mancha roxa em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

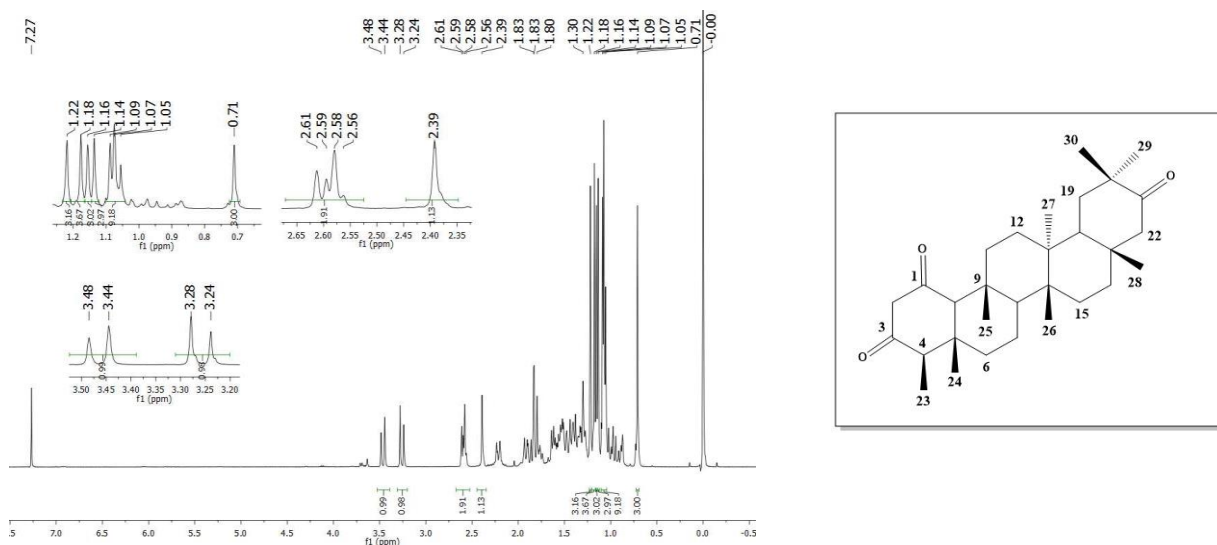
O espectro na região do IV (Figura 40) de **TM19** apresenta bandas em 2930-2848  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, banda larga em 1716  $\text{cm}^{-1}$  referente a estiramento de ligação CO de carbonilas e bandas em 1466 e 1392  $\text{cm}^{-1}$  características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. Além disso, apresenta bandas em 3548 and 3412  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de grupos hidroxilas.



**Figura 40:** Espectro na região do IV da mistura de **TM19** (KBr)  
(Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 41) apresenta oito sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,71,  $\delta_{\text{H}}$  1,05,  $\delta_{\text{H}}$  1,07,  $\delta_{\text{H}}$  1,09,  $\delta_{\text{H}}$  1,14,  $\delta_{\text{H}}$  1,16,  $\delta_{\text{H}}$  1,18 e  $\delta_{\text{H}}$  1,22 referentes a oito grupos metila, conforme indicado pela integração dos sinais. Estes sinais sugerem tratar-se de um triterpeno pentacíclico. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,39 (1H, s) e  $\delta_{\text{H}}$  2,58 (2H, m) são característicos de átomos de hidrogênio ligados a carbono vizinho a carbonila e os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,24 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  3,44 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz) indicam a presença de átomos de hidrogênio ligados a carbono vizinho a grupos eletronegativos.



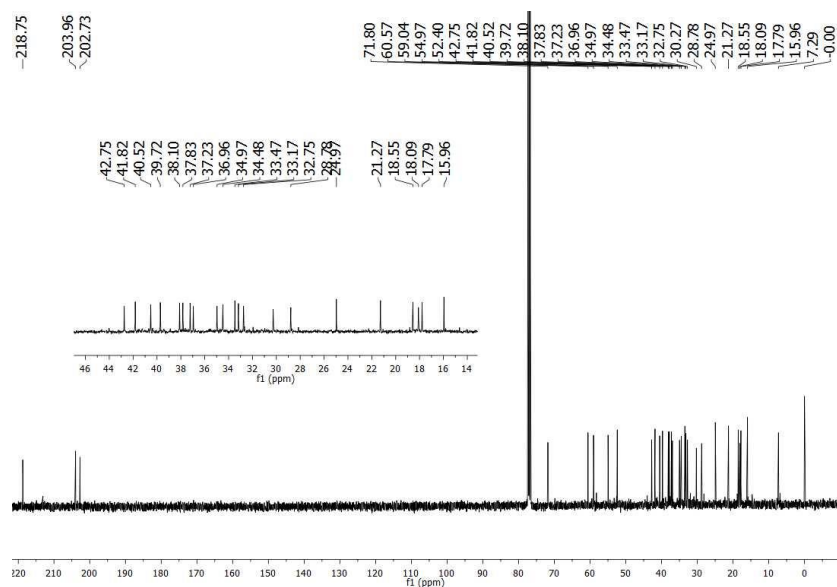
**Figura 41:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM19** em  $\text{CDCl}_3$

(Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

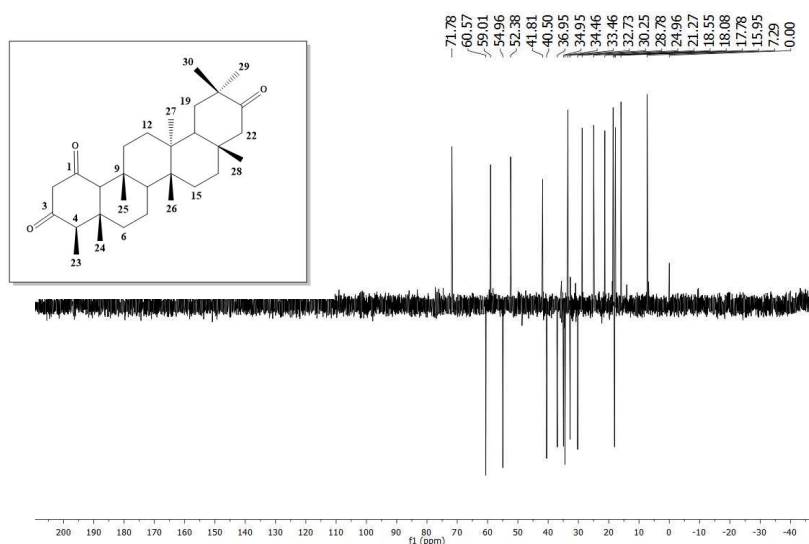
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 42, p. 83) indica a presença de 30 sinais de carbono que foram classificados, por meio do subespectro DEPT-135 (Figura 43, p. 83), como sendo 8  $\text{CH}_3$ , 9  $\text{CH}_2$ , 4  $\text{CH}$  e 9  $\text{C}$ . Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  202,73,  $\delta_{\text{C}}$  203,96 e  $\delta_{\text{C}}$  218,75 indicam a presença de três grupos carbonilas no composto e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  7,29 refere-se à metila C-23 vizinha a grupo  $\text{C}=\text{O}$ . O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  71,80 sugere a presença de carbono hidroxilado. No entanto, após a análise dos espectros de RMN bidimensionais de **TM19**, esse sinal foi atribuído a um carbono metínico vizinho à carbonila. Uma série de TTPC com carbonilas em C-1 e C-3 apresentam C-10 com deslocamento químico nessa região (MAHATO e KUNDU, 1994). Sendo assim, as bandas de grupos hidroxilas observadas no espectro na região do IV estão relacionadas a um equilíbrio ceto enólico, em fase sólida, de um composto  $\beta$  dicetônico.



Não foram encontrados dados de RMN na literatura que fossem similares aos dados experimentais, sendo assim foi realizada a análise detalhada dos espectros de RMN 1D e 2D para elucidação da estrutura de **TM19**, partindo da proposta de um TTPC com carbonila em C-3.



**Figura 42:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM19** em  $\text{CDCl}_3$  (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 43:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM19** em  $\text{CDCl}_3$  (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

A análise do mapa de contornos HSQC (Figuras 44 e 45, p. 86) de **TM19** permitiu correlacionar o sinal do carbono C-23 em  $\delta_{\text{C}}$  7,29 com H-23 em  $\delta_{\text{H}}$  1,05.

Outros sinais de carbono foram correlacionados aos seus respectivos átomos de hidrogênio, após análise detalhada do mapa de contornos HSQC.

Usando como ponto de partida os valores de C-23/H-23, procedeu-se, então, à análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 46 a 49, p. 87 e 88)

O sinal de H-23 em  $\delta_H$  1,05 correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_C$  203,96 (C-3) e  $\delta_C$  59,04 (C-4) (Figuras 46, p. 87).

O sinal de carbono em  $\delta_C$  203,96 (C-3) possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  2,58 (H-4),  $\delta_H$  3,24 (H-2 $\beta$ ) e  $\delta_H$  3,44 (H-2 $\alpha$ ) (Figura 46, p. 87). O sinal de carbono em  $\delta_C$  59,04 (C-4) possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  3,24 (H-2 $\beta$ ),  $\delta_H$  2,39 (H-10),  $\delta_H$  1,05 (H-23) e  $\delta_H$  0,71 (H-24) (Figura 46 e 47, p. 87)

O sinal de H-10 em  $\delta_H$  2,39 correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_C$  202,73 (C-1) que, por sua vez, correlaciona-se com o sinal de  $\delta_H$  3,24 (H-2 $\beta$ ) e  $\delta_H$  3,44 (H-2 $\alpha$ ) (Figura 46 e 49, p. 87 e 88). Estas correlações permitem associar as carbonilas em  $\delta_C$  202,73 e  $\delta_C$  203,96 com C-1 e C-3, respectivamente.

O sinal de C-10 em  $\delta_C$  71,80 possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  3,24 (H-2 $\beta$ ),  $\delta_H$  2,58 (H-4),  $\delta_H$  1,89 (H-6 $\beta$ ),  $\delta_H$  1,22 (H-25) e  $\delta_H$  0,71 (H-24) (Figura 46, p. 87). Os respectivos sinais de carbono foram atribuídos a partir da análise do mapa de contornos HSQC.

O sinal de H-25 em  $\delta_H$  1,22 possui correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  34,48 (C-11),  $\delta_C$  37,23 (C-9),  $\delta_C$  52,40 (C-8) e  $\delta_C$  71,80 (C-10) (Figuras 46, 47 e 48, p. 87 e 88). O sinal de C-8 em  $\delta_C$  52,40 correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,22 (H-25) e  $\delta_H$  1,09 (H-26) (Figura 47, p. 87). O sinal de H-26 em  $\delta_H$  1,09 correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta_C$  32,75 (C-15) e  $\delta_C$  39,72 (C-13), e este, por sua vez, correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,14 (H-27) (Figura 48, p. 88).

O sinal de C-26 em  $\delta_C$  21,27 possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,55 (H-15) e  $\delta_H$  1,33 (H-15) (Figuras 48, p. 88). O sinal de H-15 em  $\delta_H$  1,33 correlaciona-se com o sinal em  $\delta_C$  33,17 (C-17) (Figura 48, p. 88), que por sua vez correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,16 (H-28),  $\delta_H$  1,38 (H-16 $\beta$ ),  $\delta_H$  1,60 (H-19 $\beta$ ),  $\delta_H$  1,79 (H-18), e  $\delta_H$  2,60 (H-22 $\alpha$ ) (Figura 47, p. 87). O sinal de C-19 em  $\delta_C$  36,96 correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,79 (H-18) e  $\delta_H$  1,07 (H-

29), e esse por sua vez correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_c$  24,97 (C-30) (Figura 47, p. 87).

O sinal de H-30 em  $\delta_H$  1,18 correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta_c$  28,78 (C-29),  $\delta_c$  42,75 (C-20) e  $\delta_c$  218,78 (C-21) (Figuras 48 e 49, p. 87 e 88). Por sua vez, C-21 correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,07 (H-29),  $\delta_H$  1,60 (H-19),  $\delta_H$  1,79 (H-22 $\beta$ ) e  $\delta_H$  2,60 (H-22 $\alpha$ ) (Figuras 49, p. 88). O sinal de H-22 $\alpha$  em  $\delta_H$  2,60 correlaciona-se com o sinal em  $\delta_c$  33,47 (C-28) (Figura 46, p. 87). Essas correlações permitiram confirmar a posição da terceira carbonila em C-21.

No mapa de contornos COSY de **TM19** (Figura 50, p. 88), o sinal de hidrogênio H-23 em  $\delta_H$  1,05 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio H-4 em  $\delta_H$  2,58. O sinal de hidrogênio H-2 $\beta$  em  $\delta_H$  3,24 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio H-2 $\alpha$  em  $\delta_H$  3,44. O sinal de hidrogênio H-15 $\beta$  em  $\delta_H$  1,55 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio de H-16 $\beta$  em  $\delta_H$  1,38 e o sinal de hidrogênio H-18 em  $\delta_H$  1,79 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio de H-19 $\beta$  em  $\delta_H$  1,60.

No mapa de correlações NOESY de **TM19** observou-se que o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,05 (H-23) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  2,58 (H-4), em  $\delta_H$  1,89 (H-6 $\beta$ ) e em  $\delta_H$  0,71 (H-24) (Figuras 51 e 52, p. 89).

O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  2,58 (H-4) possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  3,44 (H-2 $\alpha$ ) e em  $\delta_H$  2,39 (H-10) (Figura 51, p. 89). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  2,39 (H-10) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,26 (H-8), que correlaciona-se com o sinal em  $\delta_H$  1,14 (H-27) (Figura 51 e 52, p. 89). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,79 (H-18) correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,09 (H-26) e em  $\delta_H$  1,16 (H-28) (Figura 52, p. 89). Essas correlações estabelecem que os anéis B, C e D do esqueleto friedelânico estão na conformação de cadeira (Figura 53, p. 89).

O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  0,71 (H-24) possui correlação com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,22 (H-25), e em  $\delta_H$  1,89 (H-6 $\beta$ ) (Figura 51, p. 89). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,22 (H-25) possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,49 (H-12 $\beta$ ) e em  $\delta_H$  1,09 (H-26) (Figura 52, p. 89).

O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,18 (H-28) correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,60 (H-19 $\beta$ ), que por sua vez correlaciona-se com o sinal de hidrogênio de H-18 em  $\delta_H$  1,79 (Figura 51 e 52, p. 89). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$



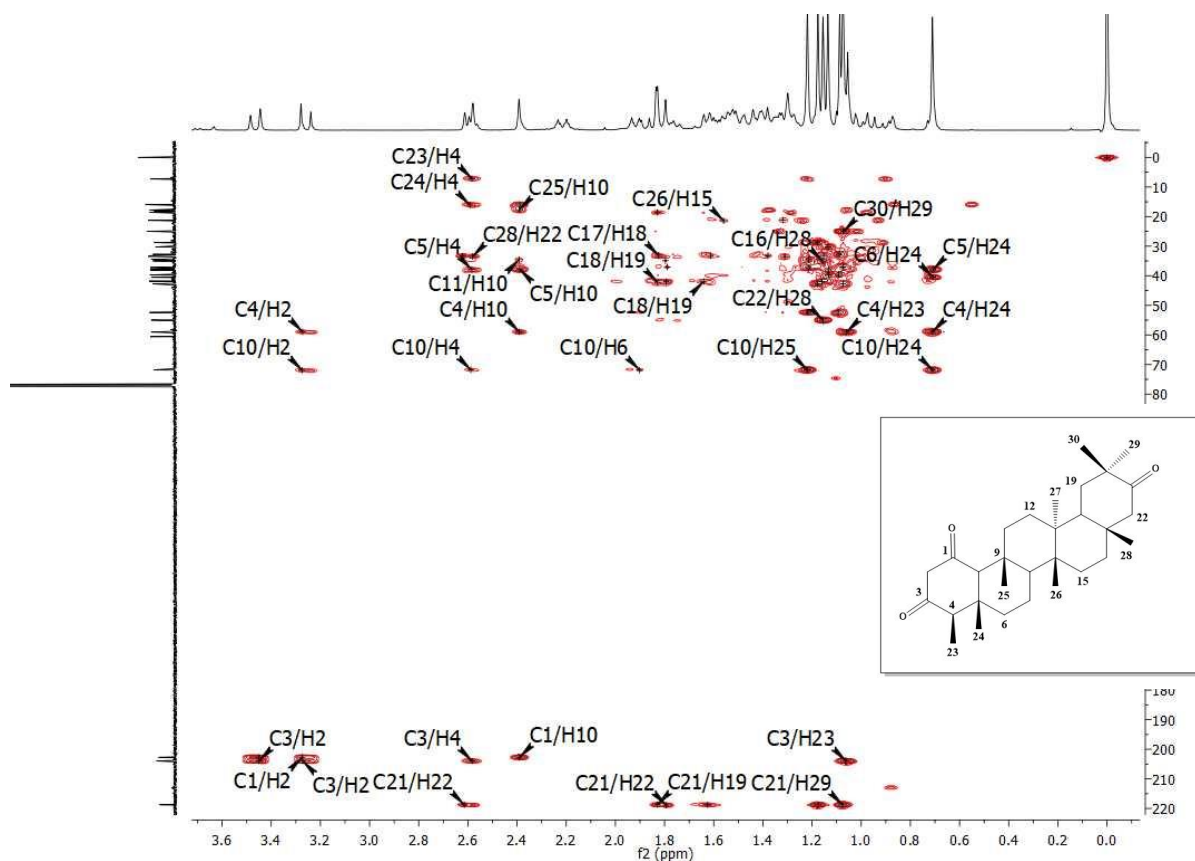


Figura 46: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM19** em  $CDCl_3$  (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

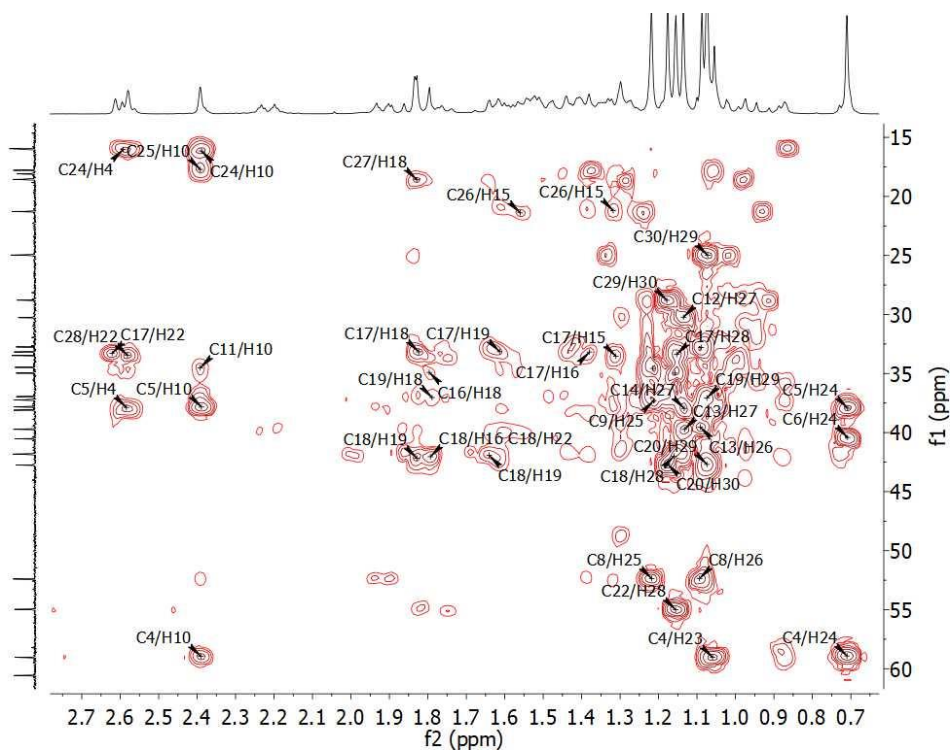


Figura 47: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM19** em  $CDCl_3$

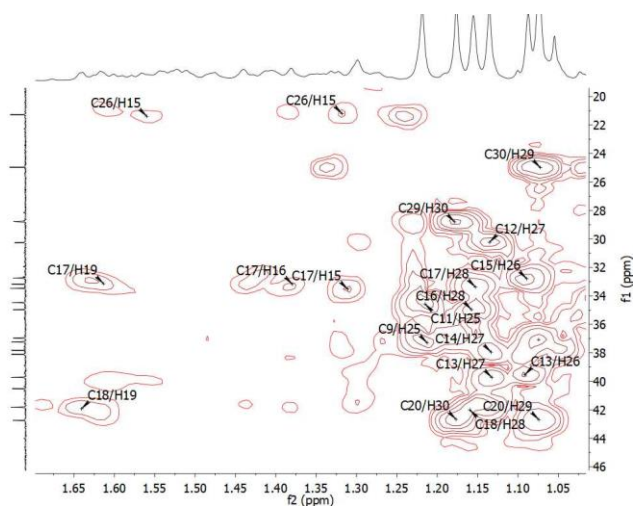


Figura 48: Expansões do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM19** em CDCl<sub>3</sub>.

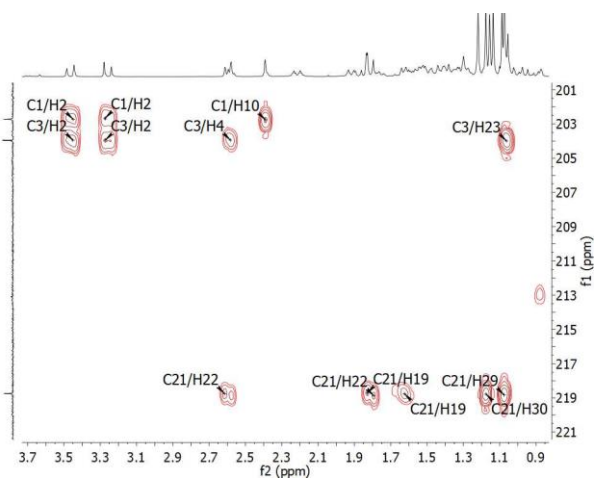


Figura 49: Expansões do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM19** em CDCl<sub>3</sub>.

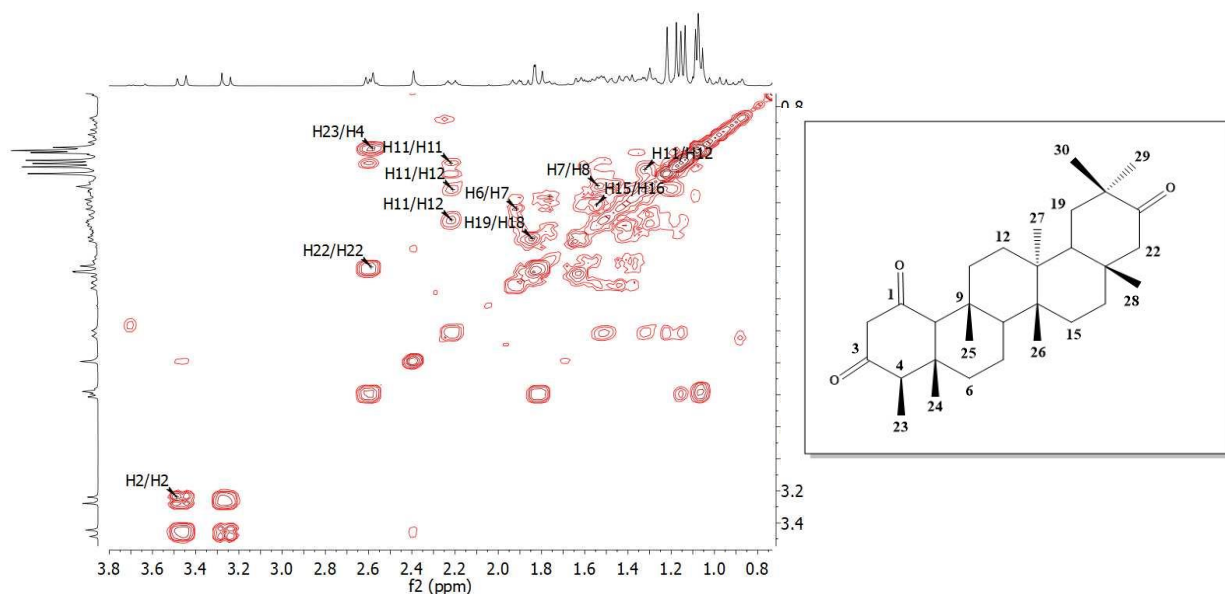
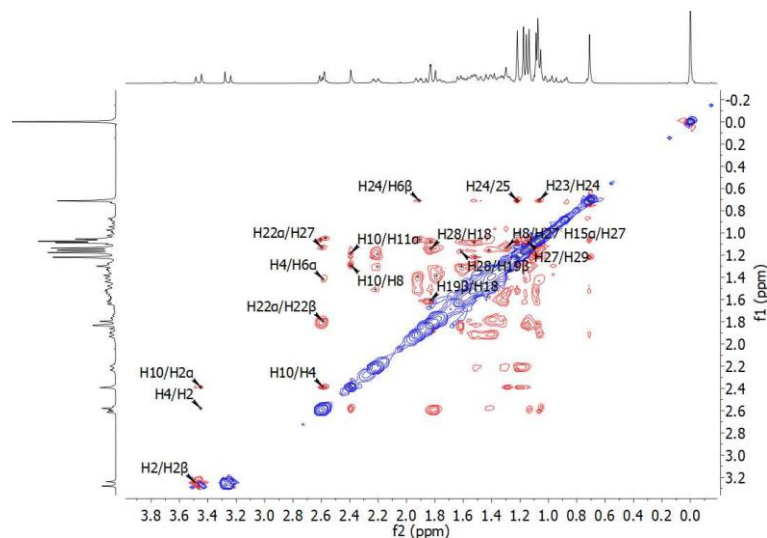
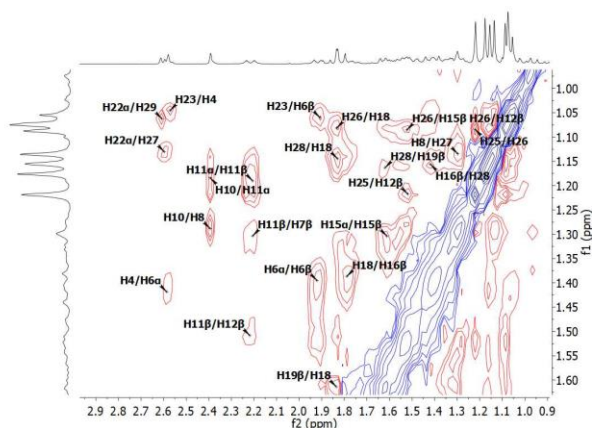


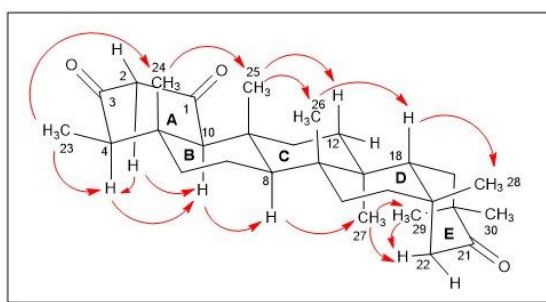
Figura 50: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de **TM19** em CDCl<sub>3</sub>  
(Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 51:** Mapa de contornos NOESY (400 MHz) de **TM19** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 52:** Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz) de **TM19** em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 53:** Correlações NOESY observadas para **TM19**.

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu atribuir os deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 10, p. 90) confirmando que **TM19** trata-se de friedelan-1,3,21-triona, um composto inédito. Sua fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$  foi confirmada por HR-ESI-MS ( $m/z$  477,3221  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calculado: 477,3339).



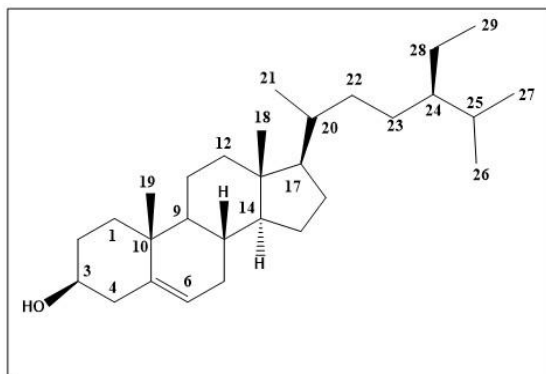
**Tabela 10:** Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de friedelan-1,3,21-triona em CDCl<sub>3</sub>  
(Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019)

Átomo	$\delta_c^*$ TM19	Tipo de C	$\delta_H$	HMBC	COSY	NOESY
1	202,73	C	-	2, 10	-	-
2	60,57	CH <sub>2</sub>	3,24 $\beta$ (eq) 3,44 $\alpha$ (ax)	-	2 -	2 $\alpha$ 2 $\beta$ , 4, 10
3	203,96	C	-	2, 4, 23	-	-
4	59,04	CH	2,58 $\alpha$ (ax)	2, 10, 23, 24	23	2 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 10, 23
5	37,83	C	-	4, 10, 24	-	-
6	40,52	CH <sub>2</sub>	1,38 $\alpha$ (ax) 1,89 $\beta$ (eq)	24 -	6 $\beta$ 6 $\alpha$ , 7 $\beta$	4, 6 $\beta$ 6 $\alpha$ , 23, 24
7	18,09	CH <sub>2</sub>	1,29 $\alpha$ (eq) 1,48 $\beta$ (ax)	- -	- 6 $\beta$ , 8 $\beta$	- 11 $\beta$
8	52,40	CH	1,26 $\alpha$	25, 26	7 $\beta$	10, 27
9	37,23	C	-	25	-	-
10	71,80	CH	2,39 $\alpha$ (ax)	2, 4, 6, 24, 25	-	2 $\alpha$ , 4, 8, 11 $\alpha$
11	34,48	CH <sub>2</sub>	1,8 $\alpha$ (ax) 2,19 $\beta$ (eq)	10, 25 -	11 $\beta$ , 12 $\alpha$ 11 $\alpha$ , 12 $\alpha$ , 12 $\beta$	10, 11 $\beta$ 7 $\beta$ , 11 $\alpha$ , 12 $\beta$
12	30,27	CH <sub>2</sub>	1,29 $\alpha$ (eq) 1,49 $\beta$ (ax)	27 -	11 $\beta$ , 11 $\alpha$ 11 $\beta$	- 11 $\beta$ , 25, 26
13	39,72	C	-	26, 27	-	-
14	38,10	C	-	27	-	-
15	32,75	CH <sub>2</sub>	1,33 $\alpha$ (ax) 1,55 $\beta$ (eq)	26 -	15 $\beta$ 15 $\alpha$ , 16 $\beta$	15 $\beta$ , 27 15 $\alpha$ , 26
16	34,97	CH <sub>2</sub>	1,38 $\beta$ (ax) 1,76 $\alpha$ (eq)	18, 28 -	15 $\beta$ , 16 $\alpha$ 16 $\beta$	18, 28 -
17	33,17	C	-	15, 16, 18, 19, 22, 28	-	-
18	41,82	CH	1,79 $\beta$ (ax)	16, 19, 22, 28	19	19 $\beta$ , 26, 28
19	36,96	CH <sub>2</sub>	1,60 $\beta$ (ax) 1,83 $\alpha$ (eq)	18, 29 -	18 -	18, 28
20	42,75	C	-	29, 30	-	-
21	218,78	C	-	19, 22, 29, 30	-	-
22	54,97	CH <sub>2</sub>	1,79 $\beta$ (eq) 2,60 $\alpha$ (ax)	28 -	22 $\alpha$ 22 $\beta$	22 $\alpha$ 22 $\beta$ , 27, 29
23	7,29	CH <sub>3</sub>	1,05 (eq)	4	4	4, 6 $\beta$ , 24
24	15,96	CH <sub>3</sub>	0,71 (ax)	4, 10	-	6 $\beta$ , 23, 25
25	17,79	CH <sub>3</sub>	1,22 (ax)	10	-	12 $\beta$ , 24,26
26	21,27	CH <sub>3</sub>	1,09 (ax)	15	-	12 $\beta$ , 15 $\beta$ , 18, 25
27	18,55	CH <sub>3</sub>	1,14 (ax)	18	-	8, 15 $\alpha$ , 22 $\alpha$ , 29
28	33,47	CH <sub>3</sub>	1,16 (ax)	22	-	16 $\beta$ , 18, 19 $\beta$
29	28,78	CH <sub>3</sub>	1,07 (ax)	30	-	22 $\alpha$ , 27
30	24,97	CH <sub>3</sub>	1,18 (eq)	29	-	-

\*Solvente: CDCl<sub>3</sub>



### 1.4.20 TM20: $\beta$ -sitosterol



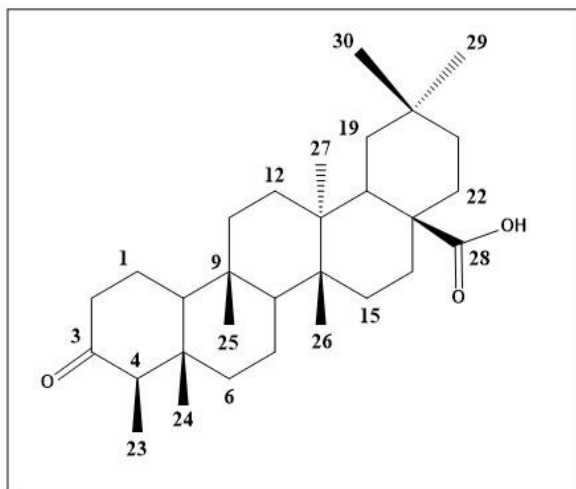
**TM20** foi isolado de **ECG** e apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão de 133,4-134,3 °C e uma única mancha roxa na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 48A, p. 178) apresenta um multiplete centrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,52 atribuído a hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,34 referente a hidrogênio olefínico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 49A, p. 179) apresenta 28 sinais, sendo que um deles com maior intensidade, indicando sobreposição de sinais, totalizando, dessa forma, 29 sinais, sugerindo a presença de esteróide. A partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura 50A, p. 179) foi possível classificar os átomos de carbono, sendo 6  $\text{CH}_3$ , 11  $\text{CH}_2$ , 9  $\text{CH}$  e 3  $\text{C}$ . O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  71,94 foi atribuído ao carbono hidroxilado e os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  121,84 ( $\text{CH}$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  140,90 ( $\text{C}$ ) são referentes a átomos de carbono olefínico. Um esteróide muito comum encontrado em plantas, bem como na família Celastraceae, é o  $\beta$ -sitosterol.

Sendo assim, os dados obtidos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (RODRIGUES *et al.*, 2015) para esse esteróide (Tabela 13A, p. 207) e permitiram confirmar que **TM20** trata-se do  **$\beta$ -sitosterol**.

### 1.4.21 TM21: Ácido 3-oxo-friedelan-28-oico



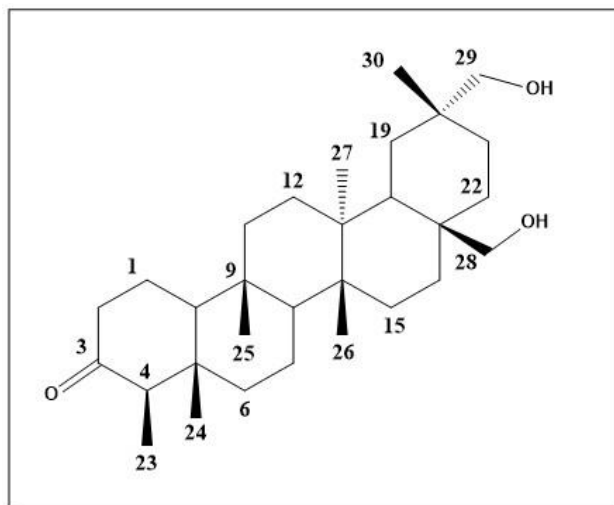
**TM21** foi isolado de **ECG** e apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão de 238,3-239,5 °C e uma única mancha roxa na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 51A, p. 180) apresenta simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,72,  $\delta_{\text{H}}$  0,79,  $\delta_{\text{H}}$  0,81,  $\delta_{\text{H}}$  0,86,  $\delta_{\text{H}}$  0,94 e  $\delta_{\text{H}}$  1,04, além de um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  0,87, e suas integrações sugerem a presença de sete metilas.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 52A, p. 180) apresenta 29 sinais, sendo que o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  37,85 (C) possui intensidade maior, indicando sobreposição de sinais. A partir da análise do subspectro DEPT-135 (Figura 53A, p. 181) foi possível classificar todos os átomos de carbono. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  6,94 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  213,26 sugerem a presença de um triterpeno friedelano e foram atribuídos à metila C-23 e ao carbono carbonílico C-3, respectivamente. Já o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  184,54 indica a presença de um grupo ácido carboxílico.

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subspectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (NOZAKI *et al.*, 1990) (Tabela 14A, p. 208) e permitiram identificar **TM21** como sendo o **ácido 3-oxo-friedelan-28-oico**.

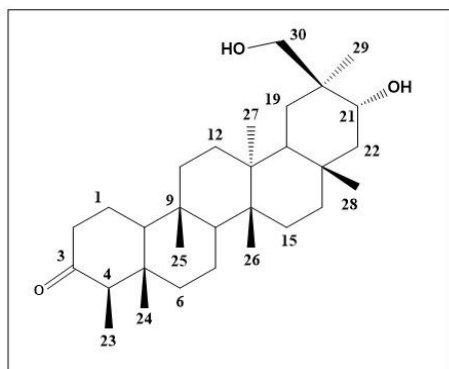
### 1.4.22 TM22: 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona



**TM22** foi identificado em uma mistura isolada de **ECG**, e apresentou-se como um sólido branco, que indica uma única mancha roxa na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

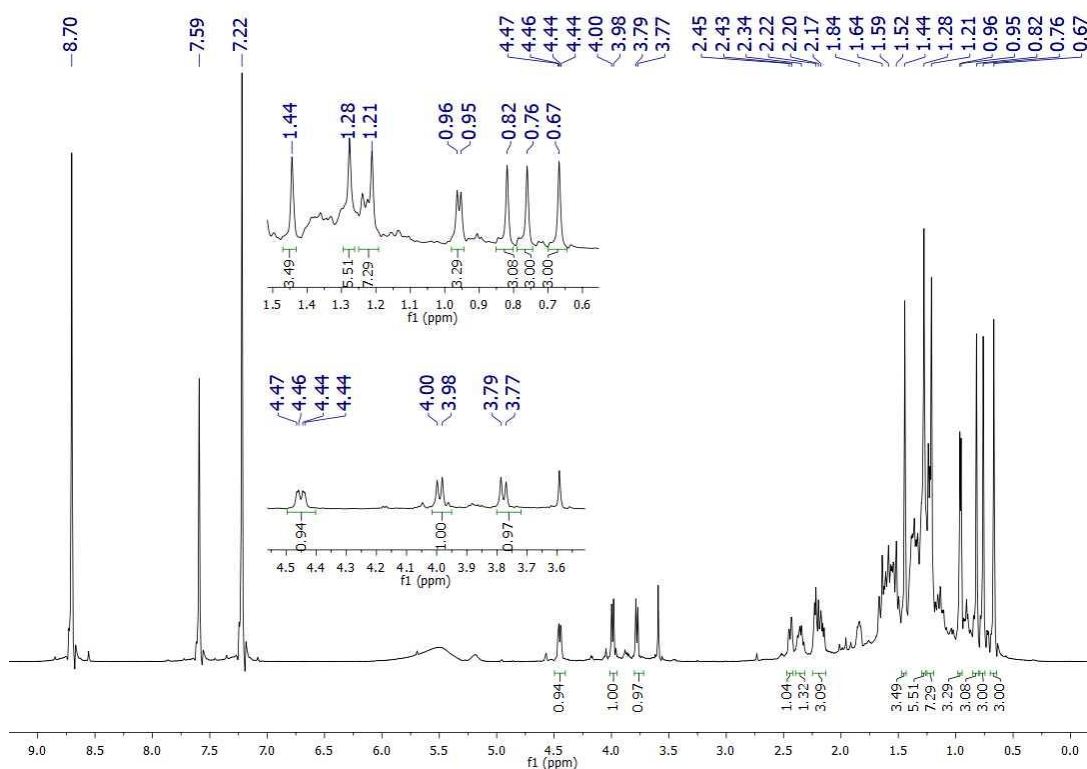
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 54A, p. 181) de **TM22** sugere uma mistura de triterpenos pentacíclicos devido a presença de diversos sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,72 e  $\delta_{\text{H}}$  1,25 indicando grande número de metilas, de acordo com a integração dos sinais. Além disso, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 55A, p. 182) apresenta 59 sinais, que foram classificados de acordo com o subespectro DEPT-135 (Figura 56A, p. 182), sendo que os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  213,20 (C-3, C=O),  $\delta_{\text{C}}$  213,31 (C-3, C=O) e um sinal intenso em  $\delta_{\text{C}}$  6,96 (C-23,  $\text{CH}_3$ ) indicam tratar-se de dois TTPC de esqueleto friedelano. Os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  67,52 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta_{\text{C}}$  74,15 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta_{\text{C}}$  75,95 ( $\text{CH}_2$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  76,56 (CH) são característicos de átomos de carbono ligados a hidroxila. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,73 (1H, d,  $J = 10,9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (1H, d,  $J = 10,9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3,34 (1H, d,  $J = 10,4$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  3,27 (2H,  $J = 10,2$  Hz) referem-se aos átomos de hidrogênio ligados a carbonos hidroxilados.

Os dados foram comparados com os da literatura para uma série de triterpenos de esqueleto friedelano hidroxilados com carbonila em C3, no entanto foi possível identificar apenas um componente da mistura (RODRIGUES *et al.*, 2015) (Tabela 15A, p. 209) como sendo **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona (TM22)**.

1.4.23 TM23: 21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona

**TM23** foi isolado de **ECG**, apresentando-se como um sólido branco, pouco solúvel em solventes orgânicos, com faixa de fusão de 228,3-231,1 °C e uma única mancha roxa na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 54) apresenta simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,67,  $\delta_{\text{H}}$  0,76,  $\delta_{\text{H}}$  0,82,  $\delta_{\text{H}}$  1,21,  $\delta_{\text{H}}$  1,28 e  $\delta_{\text{H}}$  1,44, além de um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  0,95 (3H,  $J = 6,6$  Hz) referentes a sete metilas, de acordo com as integrações. Um duplete duplo em  $\delta_{\text{H}}$  4,45 (1H,  $J = 12,2$  e 4,3 Hz) é referente a hidrogênio na posição axial de carbono hidroxilado. Dois dupletos em 3,76 (1H,  $J = 10,1$  Hz) e 3,90 (1H,  $J = 10,1$  Hz) foram atribuídos a carbono metilênico hidroxilado.



**Figura 54:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM23** em piridina  $d$ -5.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 55, p. 96) possui 28 sinais, sendo que o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  30,35 apresenta intensidade maior, indicando sobreposição de sinais. A partir do subespectro DEPT-135 os sinais foram classificados (Figura 56, p. 96). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  7,24 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  211,92 indicam a presença de um triterpeno friedelano e foram atribuídos à metila C-23 e ao carbono carbonílico C-3, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  69,11 (CH) e  $\delta_{\text{C}}$  71,88 (CH<sub>2</sub>) indicam a presença de dois carbonos hidroxilados.

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (ZHENG-HONG *et al.*, 2009) (Tabela 11, p. 100) e sugeriram que **TM23** trata-se de **21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona**. No entanto, os valores de deslocamentos químicos para os sinais de C-6, C-7, C-17, C-19 e C-28 não estão de acordo com os relatados na literatura. Dessa forma foi feita a análise dos mapas de contornos HSQC e HMBC para confirmação inequívoca da estrutura de **TM23**.

A partir da análise do mapa de contornos HSQC (Figuras 57 e 58, p. 97) de **TM23** foi possível correlacionar o sinal do carbono C-23 em  $\delta_{\text{C}}$  7,24 com H-23 em  $\delta_{\text{H}}$  0,96. Todos os sinais de carbono hidrogenados tiveram suas correlações com os respectivos átomos de hidrogênios observadas. No entanto, a análise descritiva será feita aqui com o objetivo de mostrar especialmente as correlações dos sinais que não coincidiram com aqueles publicados na literatura. Todas as correlações estão listadas na Tabela 11 (p. 100).

Usando como ponto de partida os valores de C-23/H-23 procedeu-se, então, à análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 59 a 62, p. 98 e 99). O sinal de H-23 em  $\delta_{\text{H}}$  0,96 possui correlações com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  57,94 (C-4) e  $\delta_{\text{C}}$  42,03 (C-5) e estes correlacionam-se com o sinal de  $\delta_{\text{H}}$  0,67 (H-24) (Figura 60 e 62, p. 98 e 99). Além disso, o sinal de C-24 em  $\delta_{\text{C}}$  14,70 e o sinal de C-5 em  $\delta_{\text{C}}$  42,03 correlacionam-se com os sinais de H-6 em  $\delta_{\text{H}}$  1,13 e  $\delta_{\text{H}}$  1,61 (Figuras 60 e 61, p. 98 e 99). O sinal de carbono  $\delta_{\text{C}}$  41,16 (C-6) possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1,24 (H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  1,37 (H-8) (Figura 60, p. 98). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  51,37 (C-8) correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  0,81 (H-26) e  $\delta_{\text{H}}$  0,76 (H-25) (Figura 61, p. 99). O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  39,88 (C-20) possui, dentre outras, correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1,53 (H-22) e  $\delta_{\text{H}}$  2,17 (H-19) que, por sua vez, correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  44,65 (C-18) (Figura 60, p. 98). O sinal

de hidrogênio em  $\delta_H$  1,63 (H-18) correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta_C$  32,66 (C-17) e  $\delta_C$  33,49 (C-28). O sinal de C-17 em  $\delta_C$  33,49 possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  2,20 (H-22),  $\delta_H$  1,53 (H-22') e  $\delta_H$  1,28 (H-28) (Figura 60, p. 98).

A partir da análise do mapa de contornos COSY (Figura 63, p. 99) foi possível correlacionar o sinal em  $\delta_H$  1,84 (H-1) com  $\delta_H$  2,36 (H-2) e  $\delta_H$  1,52 (H-10), e o sinal em  $\delta_H$  0,96 (H-23) com  $\delta_H$  2,23 (H-4). O sinal em  $\delta_H$  1,63 (H-18) correlaciona-se com  $\delta_H$  2,17 (H-19), e o sinal em  $\delta_H$  4,45 (H-21) correlaciona-se com  $\delta_H$  1,53 (H-22a) e  $\delta_H$  2,20 (H-22b).

Estas correlações permitem corrigir as atribuições dos deslocamentos químicos da literatura (Tabela 11, p. 100) e indicam que **TM23** trata-se de **21 $\alpha$ ,30-dihidroxifriedelan-3-ona**.

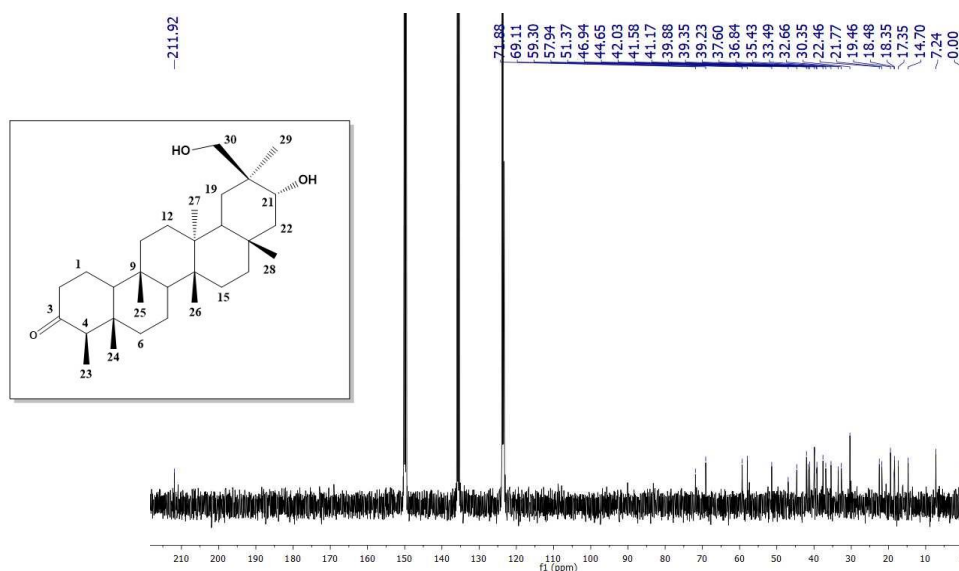


Figura 55: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

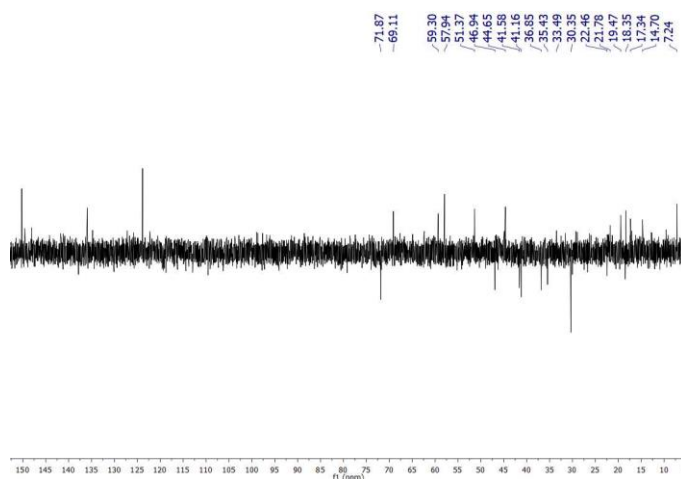


Figura 56: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

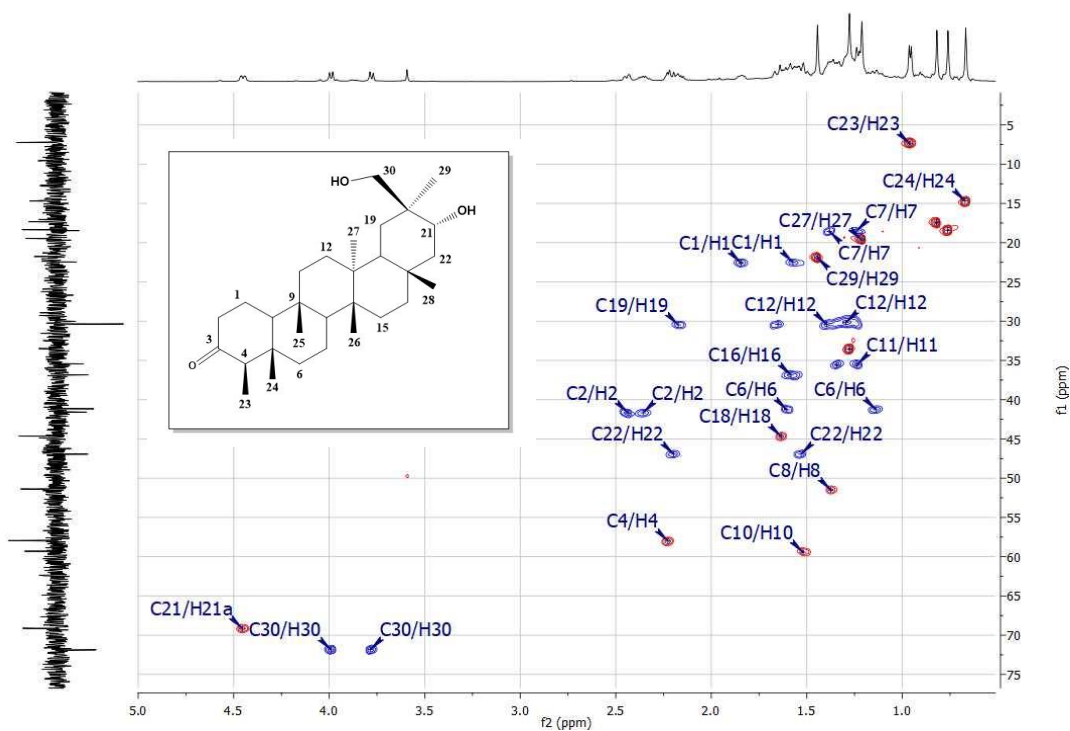


Figura 57: Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

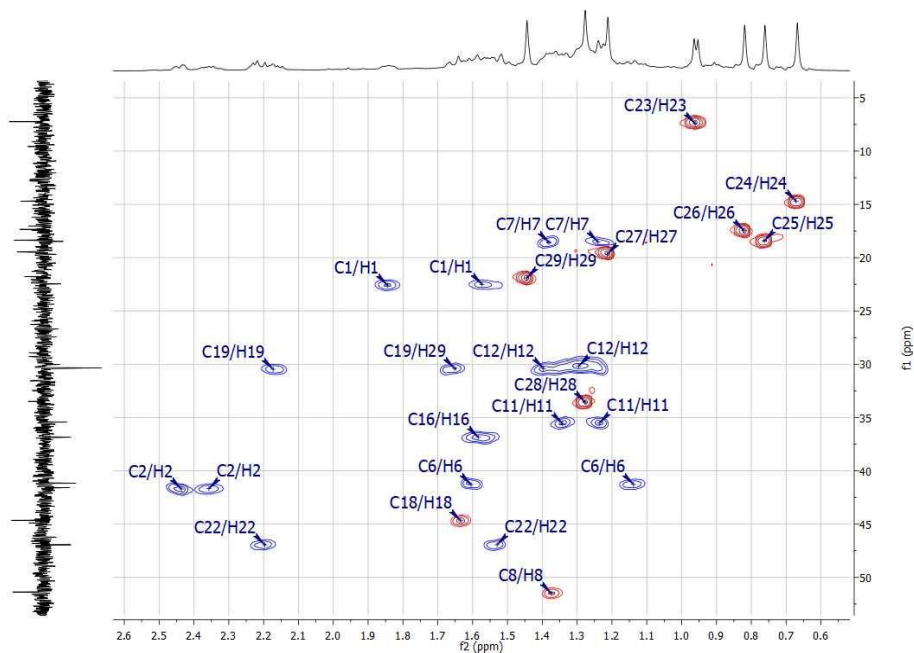


Figura 58: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

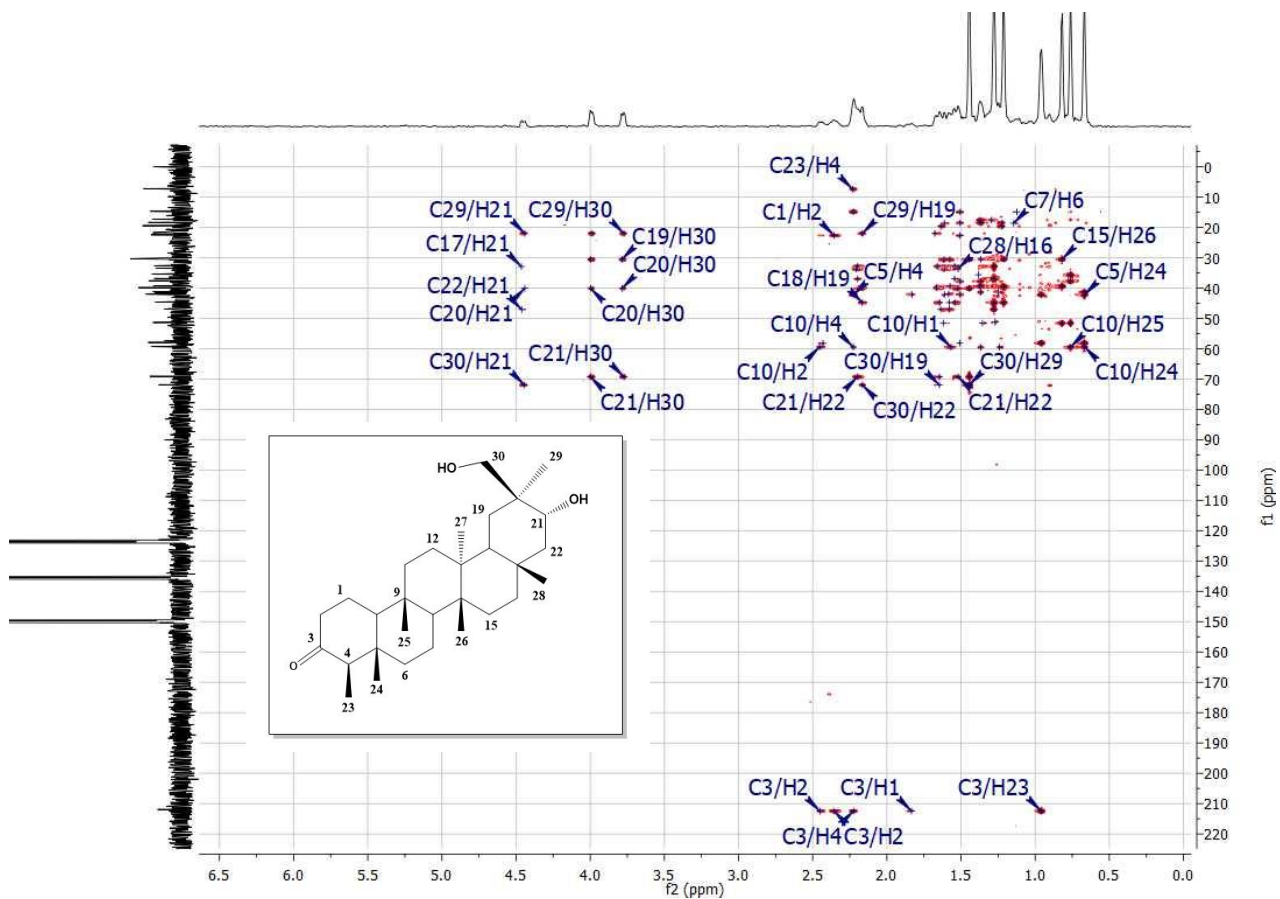


Figura 59: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

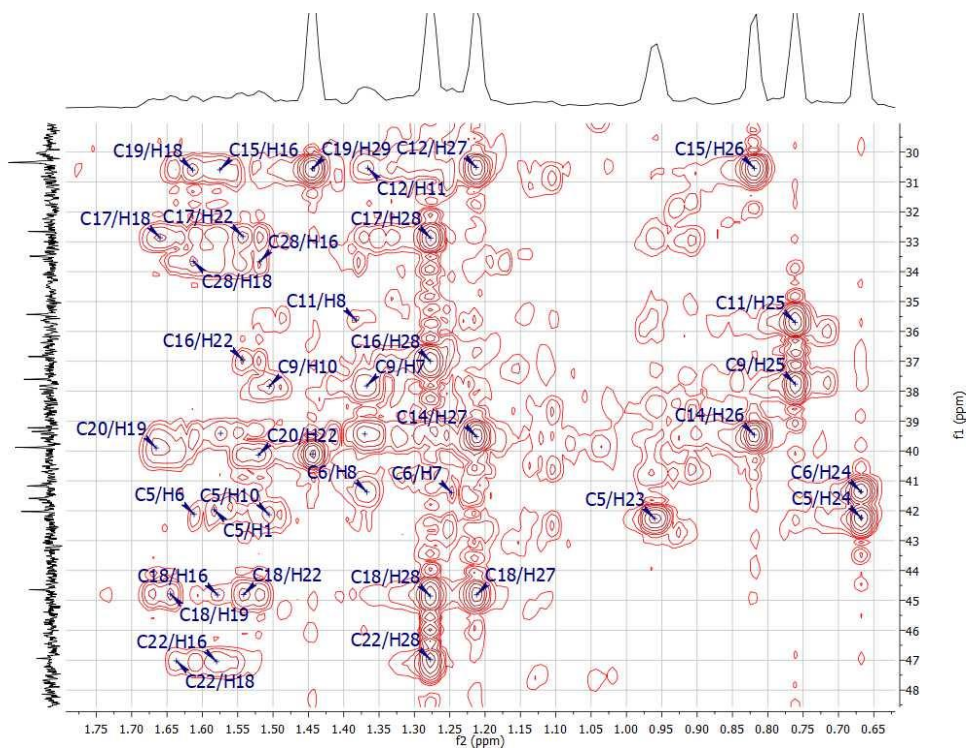


Figura 60: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.



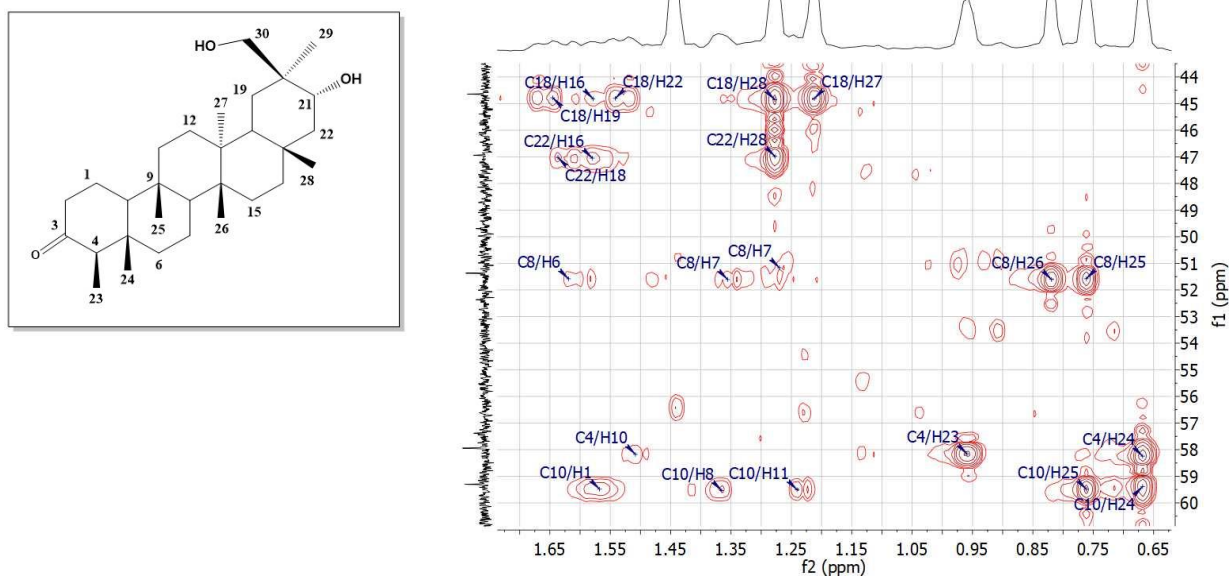


Figura 61: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

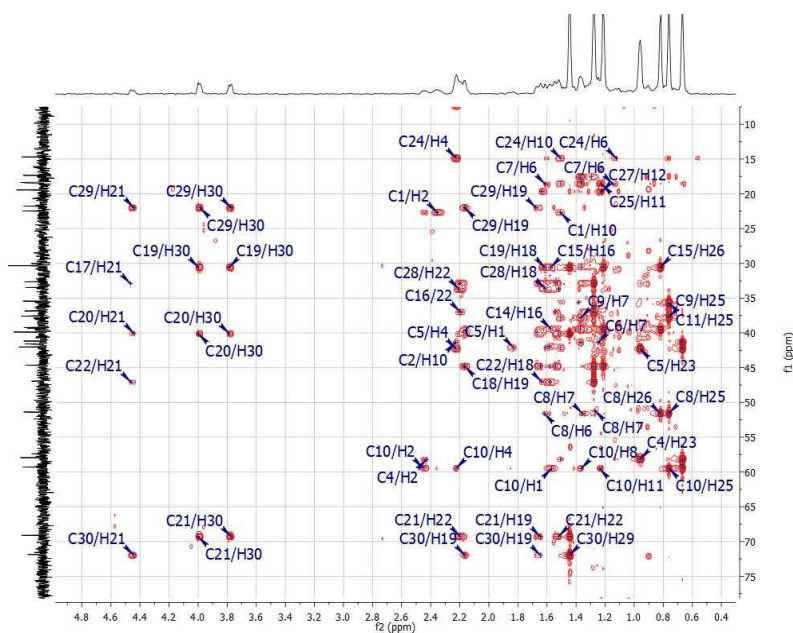


Figura 62: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

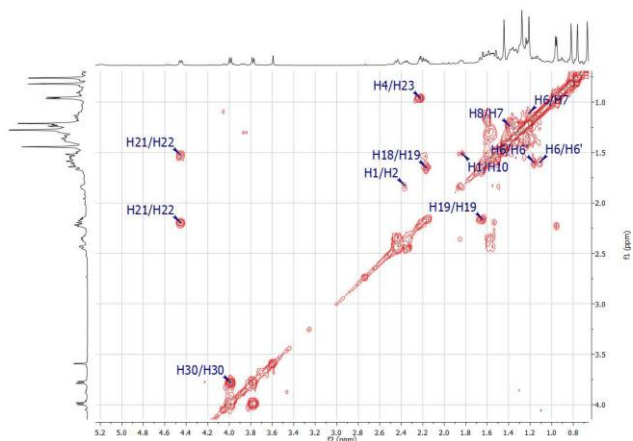


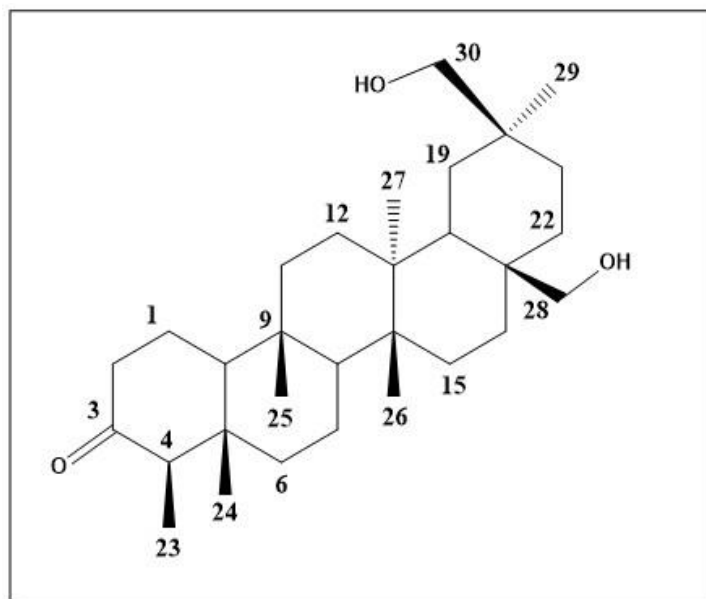
Figura 63: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de **TM23** em piridina *d*-5.

**Tabela 11:** Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **TM23** e dados da literatura para **21 $\alpha$ ,30-di-hidroxfriedelan-3-ona**

n° C	Tipo de C	$\delta_c^*$ TM23	$\delta_H$	HMBC	COSY	$\delta_c^{**}$ (ZHENG-HONG <i>et al.</i> , 2009)
1	CH <sub>2</sub>	22,46	1,57 e 1,84	2, 10	2	22,5
2	CH <sub>2</sub>	41,58	2,36 e 2,44	4	1, 2	41,2
3	C	211,92	-	1, 2, 4, 23	-	211,9
4	CH	57,94	2,23	2, 10, 23, 24	23	58,0
5	C	42,03	-	1, 6, 10, 23, 24	-	42,0
6	CH <sub>2</sub>	41,17	1,13 e 1,61	7, 8, 24	6, 7	18,5
7	CH <sub>2</sub>	18,48	1,24 e 1,38	6, 8	6	33,5
8	CH	51,37	1,37	6, 7, 25, 26	-	51,4
9	C	37,60	-	7, 10, 25	-	37,6
10	CH	59,30	1,52	1, 2, 4, 8, 11, 24, 25		59,3
11	CH <sub>2</sub>	35,43	1,24 e 1,34	8, 25		35,4
12	CH <sub>2</sub>	30,35		11, 27		30,3
13	C	39,23	-	26, 27		39,4
14	C	39,35	-	15, 16, 26, 27		39,2
15	CH <sub>2</sub>	30,35	1,30 e 1,40	16, 26		30,3
16	CH <sub>2</sub>	36,84	1,57	22, 28		36,9
17	C	32,66	-	18, 21, 22, 28		30,0
18	CH	44,65	1,63	16, 19, 22, 27, 28	19	44,7
19	CH <sub>2</sub>	30,35	1,65 e 2,17	18, 29, 30	18	41,6
20	C	39,88	-	19, 21, 22, 30		40,0
21	CH	69,11	4,45	19, 22, 29, 30	22	69,1
22	CH <sub>2</sub>	46,94	1,53 e 2,20	16, 18, 21, 28	21	47,0
23	CH <sub>3</sub>	7,24	0,96	4	4	7,3
24	CH <sub>3</sub>	14,70	0,67	4, 10	-	14,7
25	CH <sub>3</sub>	18,35	0,76	10, 11	-	18,4
26	CH <sub>3</sub>	17,35	0,82	8, 15	-	17,3
27	CH <sub>3</sub>	19,46	1,21	12, 18	-	19,5
28	CH <sub>3</sub>	33,49	1,28	16, 18, 22	-	32,7
29	CH <sub>3</sub>	21,77	1,45	19, 21, 30	-	21,8
30	CH <sub>2</sub>	71,88	3,78 e 3,99	19, 21, 29	30	71,9

\*piridina-d<sub>5</sub>/100 MHz\*\*piridina-d<sub>5</sub>/75 MHz

#### 1.4.24 TM24: 28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona



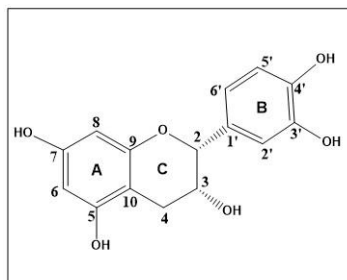
**TM24** foi isolado de **ECG** e apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão de 259-261,5 °C e uma única mancha roxa na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 57A, p. 183) apresenta simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,72,  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,90,  $\delta_{\text{H}}$  0,99,  $\delta_{\text{H}}$  1,14 e um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  0,88 ( $J = 6,96$  Hz) referentes a seis grupos metila. Dois dupletos, em  $\delta_{\text{H}}$  3,54 (1H,  $J = 10,9$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (1H,  $J = 10,8$  Hz), e um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,32 (2H) são atribuídos a dois grupos metilênicos hidroxilados.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 58A, p. 183) possui 30 sinais, que foram classificados a partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura 59A, p. 184). Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  69,13 e  $\delta_{\text{C}}$  73,42 são referentes a dois átomos de carbono metilênicos ligados a hidroxila. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  6,94 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  213,38 foram atribuídos a C-23 e C-3, respectivamente, e são característicos de triterpeno friedelano.

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (PATRA e CHAUDHURI, 1987) (Tabela 16A, p. 210) e permitiram identificar **TM24** como sendo o **28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona**.

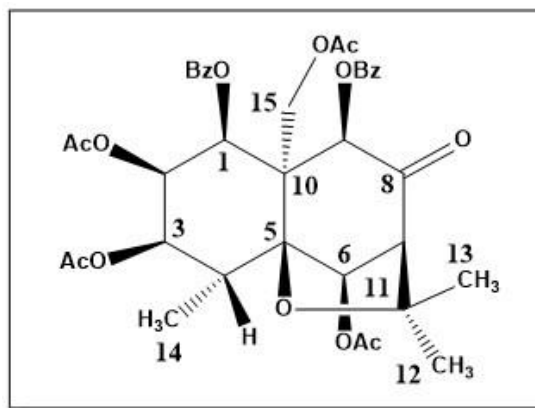
### 1.4.25 TM25: epicatequina (3,3',4',5,7-penta-hidroxiavana)



**TM25** foi obtido a partir de **EMG** e apresentou-se como sólido amarelo claro com faixa de fusão de 226-228 °C. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina).

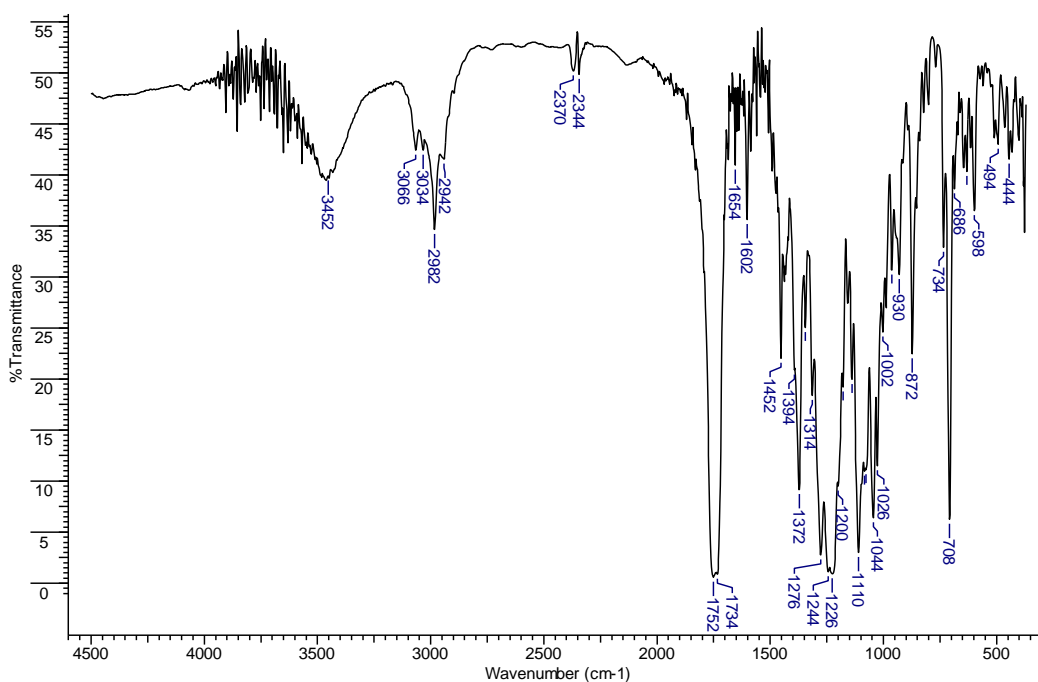
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 60A, p. 184) apresenta vários sinais na região de aromáticos. A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 61A, p. 185) e do subspectro DEPT-135 (Figura 62A, p. 185) permitiu identificar 15 sinais de carbono, sendo sete não hidrogenados, um metilênico e sete metínicos. Os perfis destes espectros sugeriram que **TM25** trata-se de um flavonoide, da classe da flavan-3-ol. Uma flavana muito comum na família Celastraceae é a epicatequina. Com esta estrutura como base foram analisados os espectros, onde os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,91 (1H,  $J = 2,3$  Hz) e 5,94  $\delta_{\text{H}}$  (1H,  $J = 2,3$  Hz) foram atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente, evidenciando o padrão de substituição meta do anel aromático A. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,76 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,79 (1H, dd,  $J = 8,2$  e 1,8 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,97 (1H, d,  $J = 1,6$  Hz) foram atribuídos à H5', H6' e H-2', do anel B, respectivamente. As multiplicidades e constantes de acoplamentos dos sinais desse anel, permitem estabelecer a relação orto entre H-5' e H-6' e a relação meta entre este último e H-2'. Sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,17 e  $\delta_{\text{H}}$  4,81 são atribuídos a H-3 e H-2, respectivamente e dois dupletos duplos em  $\delta_{\text{H}}$  2,73 (1H,  $J = 16,8$  e 3,2 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,86 (1H,  $J = 16,8$  e 4,5 Hz) são referentes a H-4. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  67,51 foi atribuído a C-3 e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  29,29 a C-4. A configuração de C-3 é comprovada pelas constantes de acoplamentos de valores mais baixos de H-4,  $J_{\text{ax-eq}} = 3,2$  Hz e  $J_{\text{eq-eq}} = 4,5$  Hz, respectivamente (Esperado 0-5 Hz, SILVERSTEIN *et al.*, 1994). Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com a literatura (AGRAWAL, 1989) (Tabela 17A, p. 211) e confirmaram que **TM25** trata-se da **epicatequina**.

### 1.4.26 TM26: 2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano



**TM26** foi isolado de **EHR e ECR**, um sólido branco, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 221-225,2 °C.

O espectro na região do IV (Figura 64) de **TM26** apresenta banda de média intensidade em 2982-2942  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, bandas intensas em 1752 e 1734  $\text{cm}^{-1}$  referente a estiramento de ligação CO de carbonilas de ésteres e banda em 1226  $\text{cm}^{-1}$  características de deformação angular de grupo C-O. Além disso, bandas em 3034, 1654 e 708  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de anel aromático monossustituído. A banda em 1372  $\text{cm}^{-1}$  é referente a grupo *gem*-dimetila (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).



**Figura 64:** Espectro na região do IV de **TM26** (KBr).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 65) apresenta vários sinais na região de aromáticos,  $\delta_{\text{H}}$  7,60 (t, 4H,  $J = 14,6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,37 (t, 1H,  $J = 14,8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,15-7,27 (m, 3H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,96 (t, 2H,  $J = 15,5$  Hz), totalizando 10 átomos de hidrogênio de acordo com a integração dos sinais, sugerindo dois grupos fenilas em **TM26**. Sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,45 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  6,01 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  5,49 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  4,93 (1H) e  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (1H), sugerem a presença de átomos de hidrogênio  $\alpha$  a grupos ésteres alifáticos e aromáticos (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Dois simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,58 (3H) e  $\delta_{\text{H}}$  1,50 (3H), além de um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,32 (3H,  $J = 7,9$  Hz) são referentes a três grupos metila. Estes sinais sugerem que **TM26** seja um sesquiterpeno de esqueleto  $\beta$ -agarofurano, comumente isolado de plantas da família Celastraceae (NÚÑEZ *et al.*, 2016).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 66, p.105) possui 33 sinais, sendo que quatro deles se apresentam sobrepostos, observado pela intensidade, totalizando 37 sinais. O subspectro DEPT-135 (Figura 67, p. 105) permitiu classificar todos os sinais. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  197,68 é característico de carbonila de cetona. Sinais em  $\delta_{\text{C}}$  170,41,  $\delta_{\text{C}}$  170,15,  $\delta_{\text{C}}$  169,21,  $\delta_{\text{C}}$  168,79,  $\delta_{\text{C}}$  165,09 e  $\delta_{\text{C}}$  165,07 são referentes a carbonila de ésteres. Sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  128,07-133,14 são característicos de átomos de carbono aromáticos. Além disso, foram observados sete sinais de grupos metila.

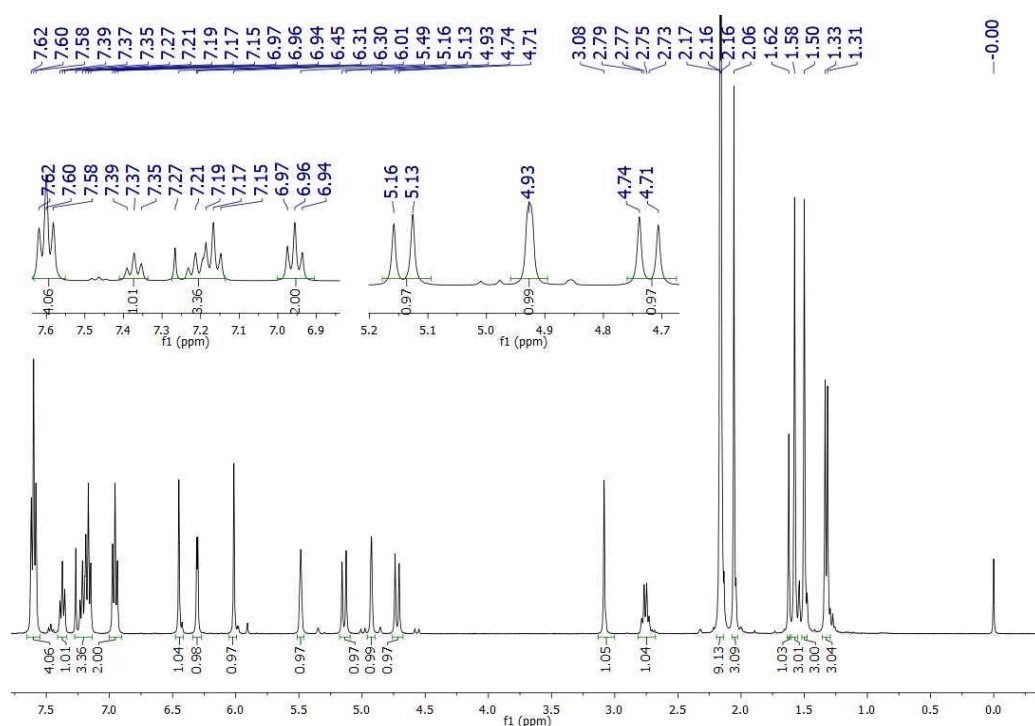


Figura 65: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

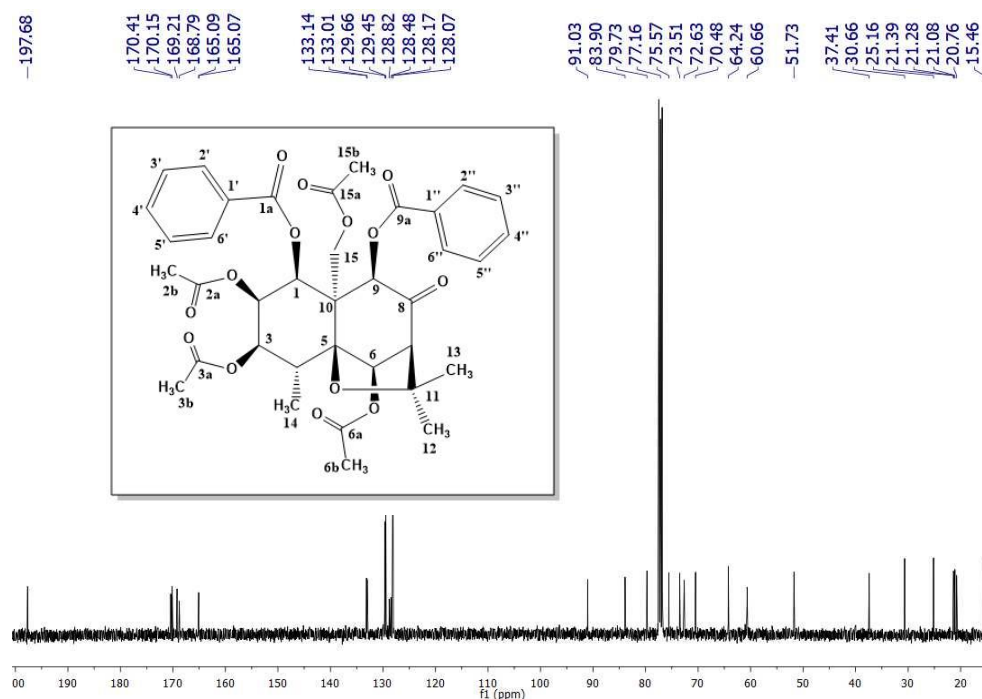


Figura 66: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

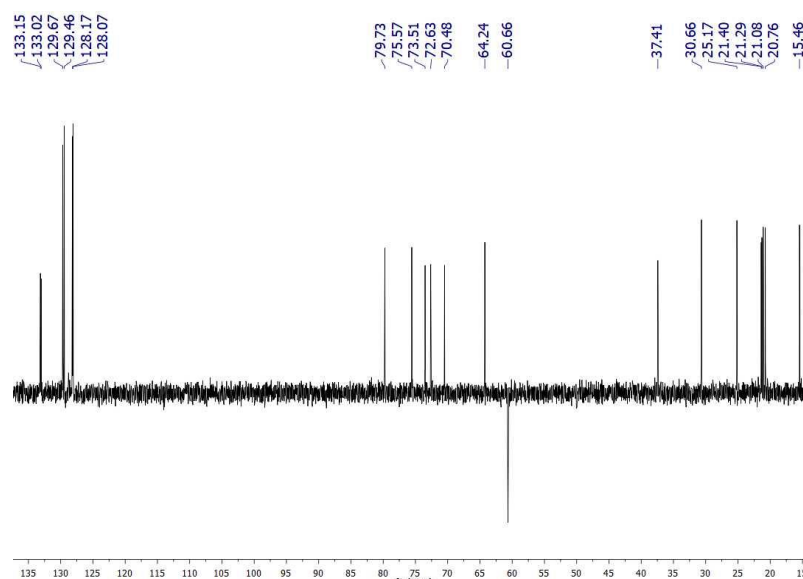


Figura 67: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

Uma busca na literatura indica que **TM26** trata-se de um composto inédito, sendo assim foi realizada a análise detalhada dos espectros de RMN 1D e 2D para elucidação inequívoca de sua estrutura.

A partir da análise do mapa de contornos HSQC (Figura 68, p. 108) de **TM26**, todos os sinais de carbono foram correlacionados aos seus respectivos átomos de hidrogênio. E então fez-se a análise detalhada do mapa de contornos HMBC.

Tendo como base o esqueleto de um sesquiterpeno agarofurano, a análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 69 a 73, p. 108 a 110) foi feita usando como ponto de partida o sinal de C-11, em  $\delta_C$  83,90, além dos sinais em  $\delta_C$  51,73 (C-10) e  $\delta_C$  91,03 (C-5), sendo esses dois últimos carbonos das junções de anel. Estes valores são condizentes com a literatura para uma série de di-hidro- $\beta$ -agarofuranos (NÚÑEZ *et al.*, 2016).

O sinal de C-11 em  $\delta_C$  83,90 possui correlações com os sinais de hidrogênio  $\delta_H$  1,50 e  $\delta_H$  1,58, atribuídos às metilas H-12 e H-13 (Figura 70, p. 109). Além disso, C-11 possui correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  3,08 e  $\delta_H$  6,45, que foram atribuídos a H-7 e H-6, respectivamente (Figuras 70 e 71, p. 109). O sinal de H-6, por sua vez, correlaciona-se com os sinais de carbono de C-10 em  $\delta_C$  51,73, C-5 em  $\delta_C$  91,03 e  $\delta_C$  169,21 (C-6a) (Figura 69 e 71, p. 108 e 109). Além disso, os sinais de hidrogênio de H-6 e H-7 possuem correlações com o sinal de carbono em  $\delta_C$  197,68, atribuído a C-8 (Figura 73, p. 110).

Os sinais de C-8 e C-10 possuem correlações com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  6,01 (H-9), que por sua vez se correlaciona com o sinal de carbono em  $\delta_C$  165,09 (C-9a) (Figuras 71 e 72, p. 109 e 110). Além disso, o sinal de C-9 em  $\delta_C$  79,73 correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  3,08 (H-7),  $\delta_H$  4,72 (H-15) e  $\delta_H$  6,30 (H-1) (Figuras 70 e 71, p. 109). Este, por sua vez, correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_C$  165,07 (C-1a) (Figura 72, p. 110). Os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  4,72 e  $\delta_H$  5,14 (H-15' e H-15'') correlacionam-se com o sinal de carbono em  $\delta_C$  170,41 (C-15a) (Figura 72, p. 110).

Os sinais de carbono de C-1 em  $\delta_C$  72,63 e C-10 em  $\delta_C$  51,73 correlacionam-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  5,49 (H-2), que se correlaciona com os sinais de carbono em  $\delta_C$  168,79 (C-2a),  $\delta_C$  73,51 (C-3) e  $\delta_C$  37,41 (C-4) (Figuras 71 e 72, p. 109 e 110). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,93 (H-3) correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta_C$  170,15 (C-3a) e o sinal em  $\delta_H$  2,76 (H-4) correlaciona-se com  $\delta_C$  15,46 (C-14) (Figuras 70 e 72, p. 109 e 110). As correlações entre os sinais de C-10 em  $\delta_C$  51,73 e C-5 em  $\delta_C$  91,03 com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  2,76 (H-4) corroboram para as atribuições feitas para o sistema bicíclico (Figura 70, p. 109).

Os sinais de carbono em  $\delta_C$  168,79 (C-2a),  $\delta_C$  169,21 (C-6a) e  $\delta_C$  170,15 (C-3a) correlacionam-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  2,16 atribuído à três metilas



desses grupos acetila (C-2b, C-6b e C-3b). Além disso, o sinal de carbono em  $\delta_C$  170,41 (C-15a) correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  2,06 atribuído à metila C-15b (Figura 73, p.110).

Os sinais de carbono em  $\delta_C$  165,07 e  $\delta_C$  165,09, referentes às carbonilas dos grupos benzoila (C-1a e C-9a), possuem várias correlações com sinais de hidrogênios na região de aromáticos,  $\delta_H$  7,60 (H-2'6' e H-2''6''),  $\delta_H$  7,20 (H-3''5''), e com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  6,30 (H-1) e  $\delta_H$  6,01 (H-9) (Figura 72, p. 110).

No mapa de contornos COSY de **TM26** (Figura 74, p. 111), o sinal de hidrogênio H-1, em  $\delta_H$  6,30, correlaciona-se com o sinal de hidrogênio H-2 em  $\delta_H$  5,49, que por sua vez possui correlação com o sinal de H-3 em  $\delta_H$  4,93. Este, por sua vez, correlaciona-se com o sinal de H-4 em  $\delta_H$  2,76, que possui correlação com H-14 em  $\delta_H$  1,32. O sinal de hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  6,45 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio de H-7 em  $\delta_H$  3,08. O sinal de hidrogênio H-4' em  $\delta_H$  7,37 correlaciona-se com o sinal de H-3'5' em  $\delta_H$  7,17 e o sinal de H-4'' em  $\delta_H$  7,20 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio de H-3''5'' em  $\delta_H$  6,96. Estes, por suas vezes, correlacionam-se com o sinal de hidrogênio H-2'6' e H-2''6'' em  $\delta_H$  7,60.

O mapa de correlações NOESY (Figura 75, p. 111) de **TM26** possui correlações do sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  3,08 (H-7) com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,50 (H-13),  $\delta_H$  1,58 (H-12) e  $\delta_H$  6,45 (H-6). Este, por sua vez, correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  1,32 (H-14) e  $\delta_H$  4,72 (H-15). O sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  1,58 (H-12) possui correlação com o sinal em  $\delta_H$  6,01 (H-9), que se correlaciona com o sinal em  $\delta_H$  6,30 (H-1). Este último correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  5,49 (H-2), que se correlaciona, por sua vez, com o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,93 (H-3). Por último, o sinal de H-3 correlaciona-se com os sinais em  $\delta_H$  2,76 (H-4) e  $\delta_H$  1,32 (H-14). As correlações NOESY observadas para **TM26** estão apresentadas na Figura 76, p. 111.

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu atribuir os deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 12, p. 112) confirmando a estrutura inequívoca de **TM26** como sendo **2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano**, um composto inédito na literatura.

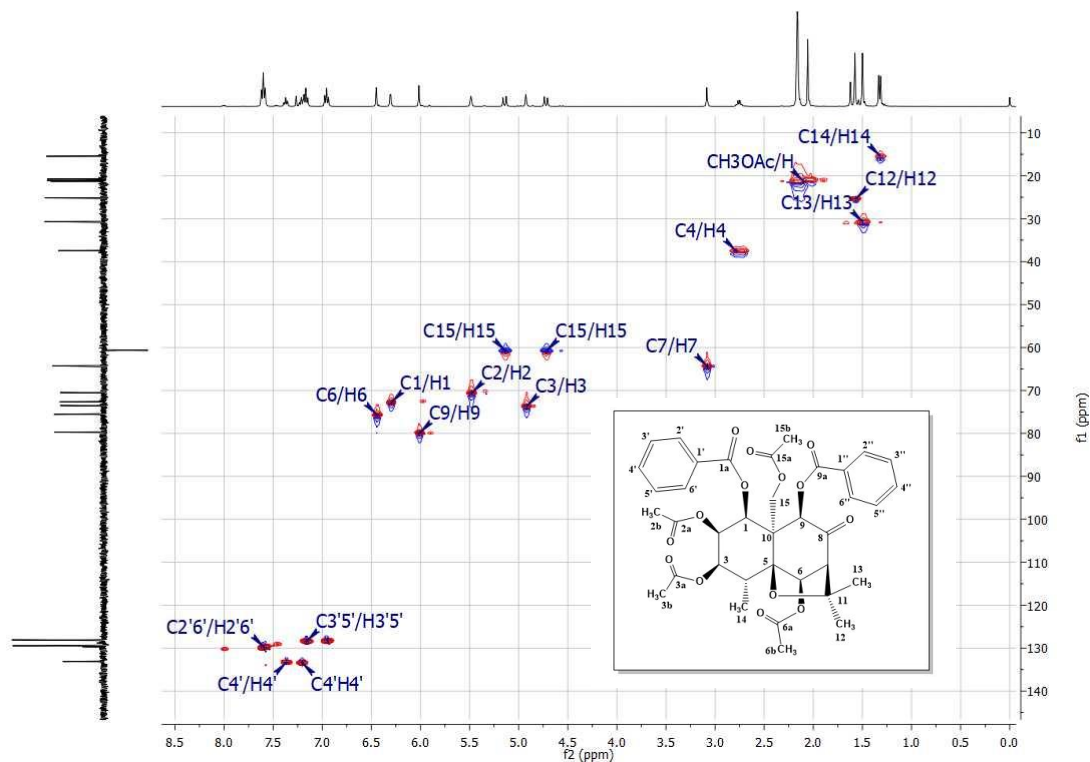


Figura 68: Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **TM26** em CDCl<sub>3</sub>.

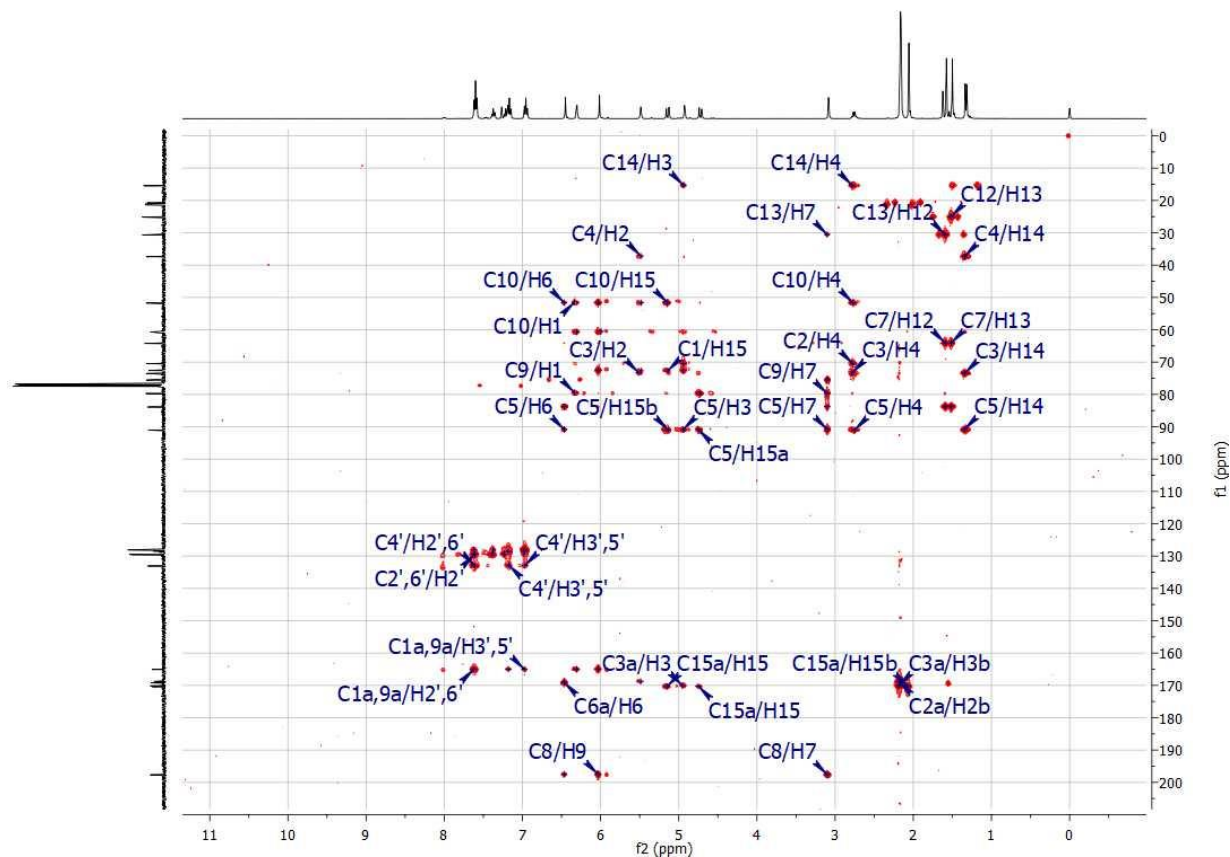


Figura 69: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM26** em CDCl<sub>3</sub>.

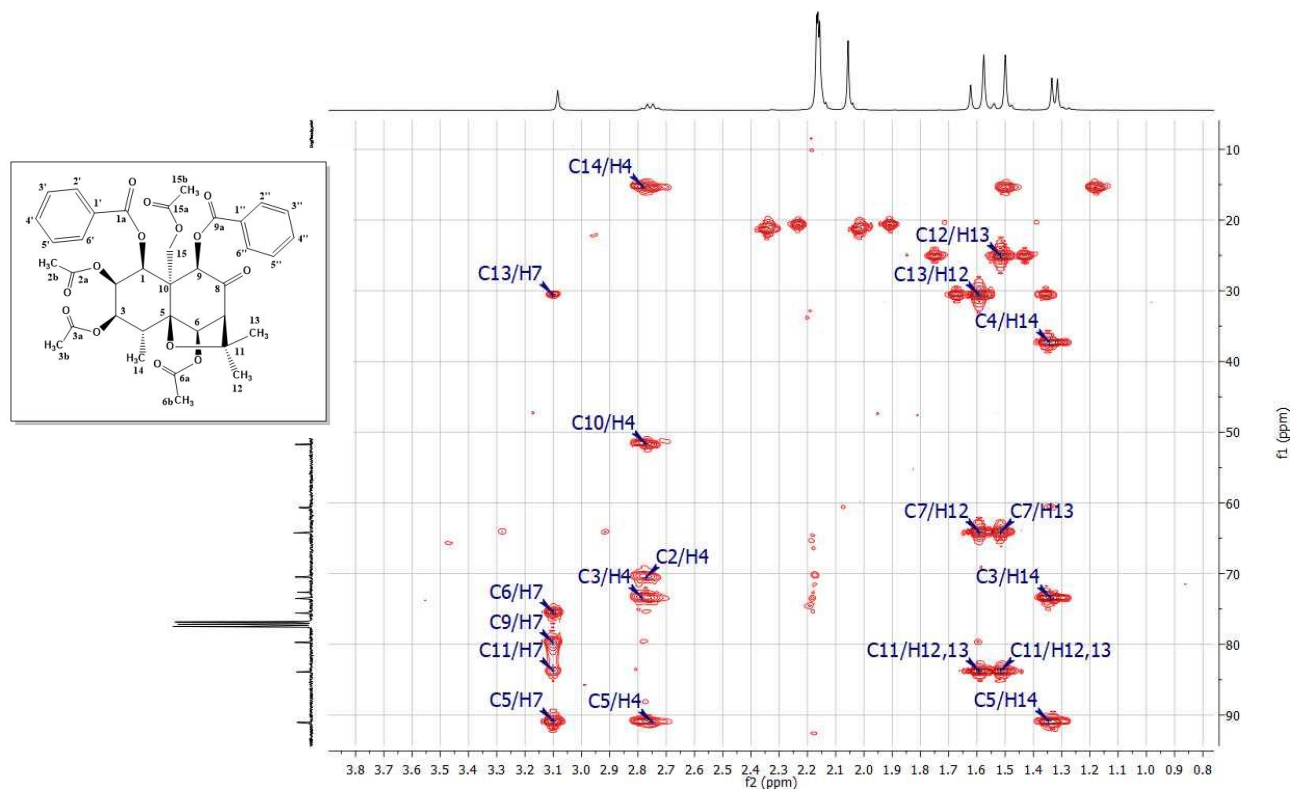


Figura 70: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

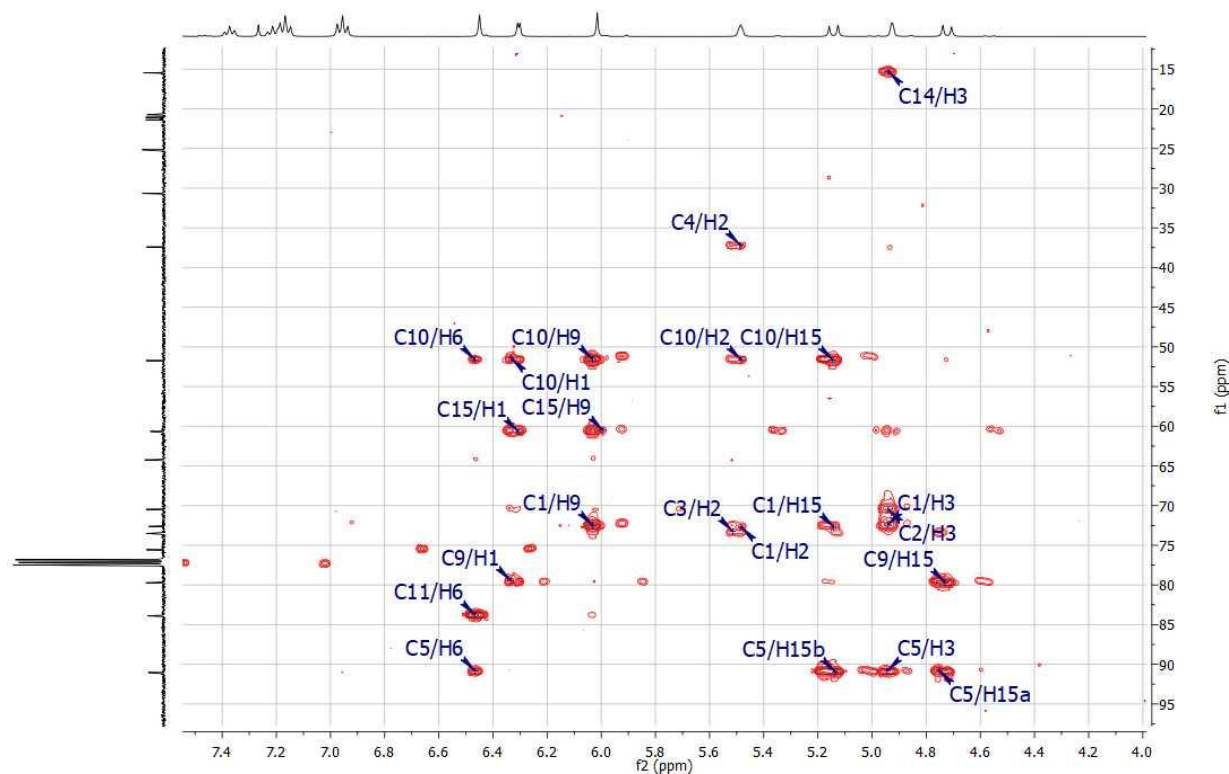


Figura 71: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

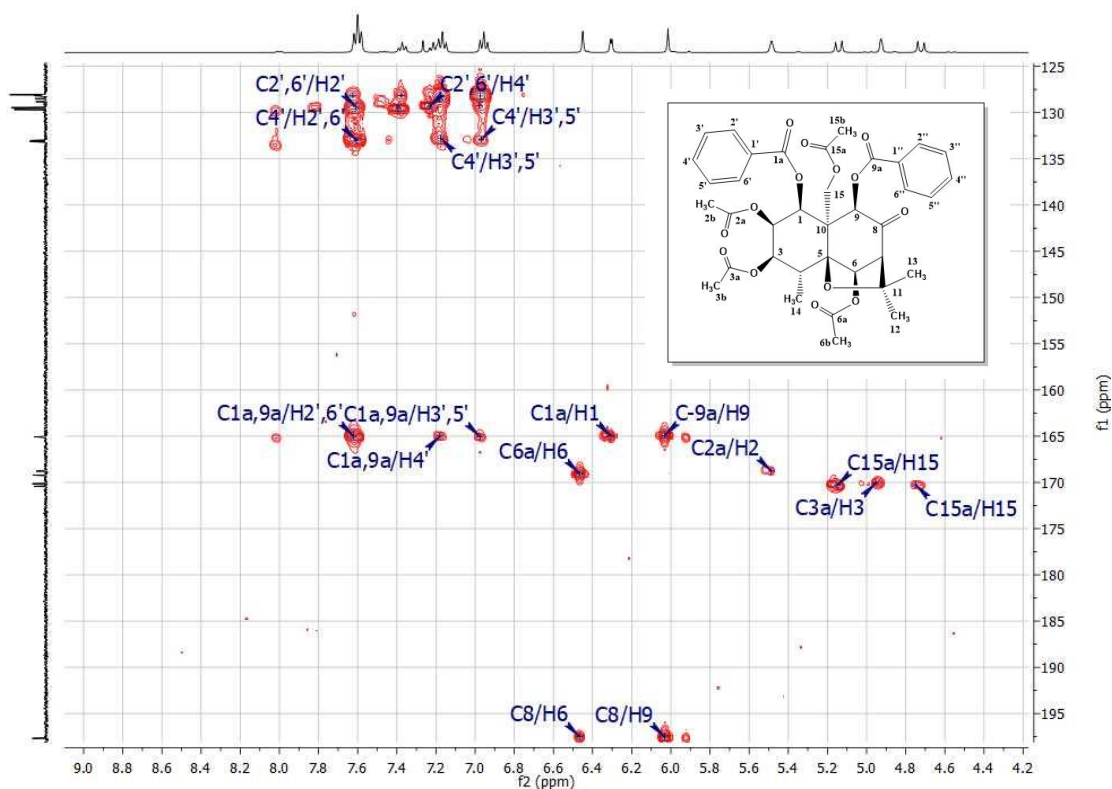


Figura 72: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

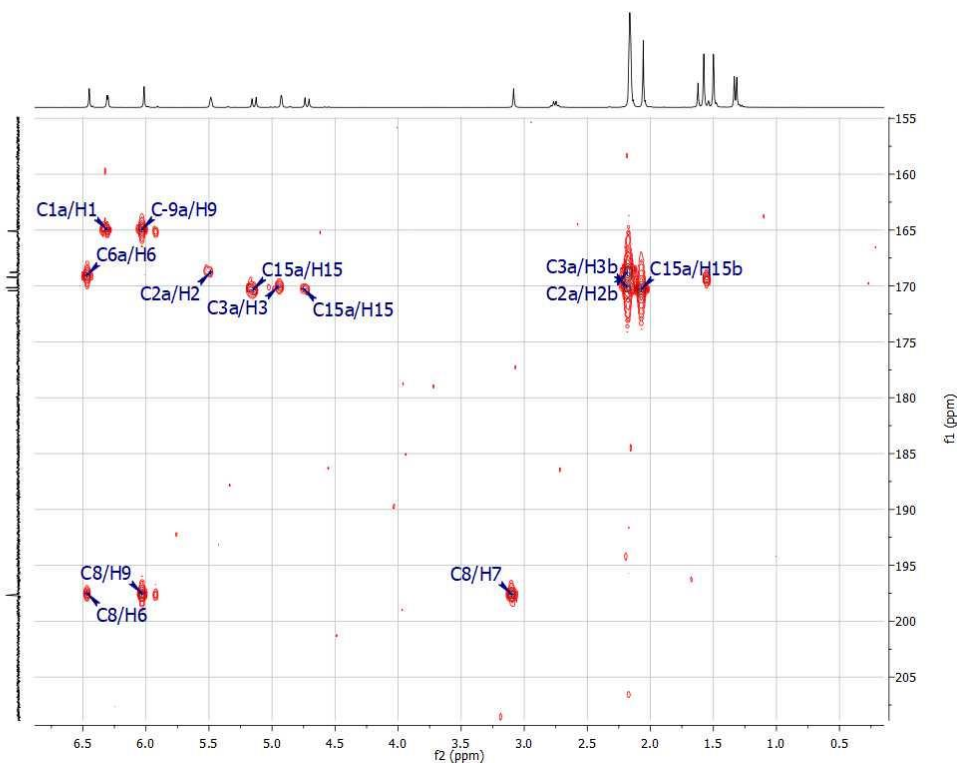


Figura 73: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

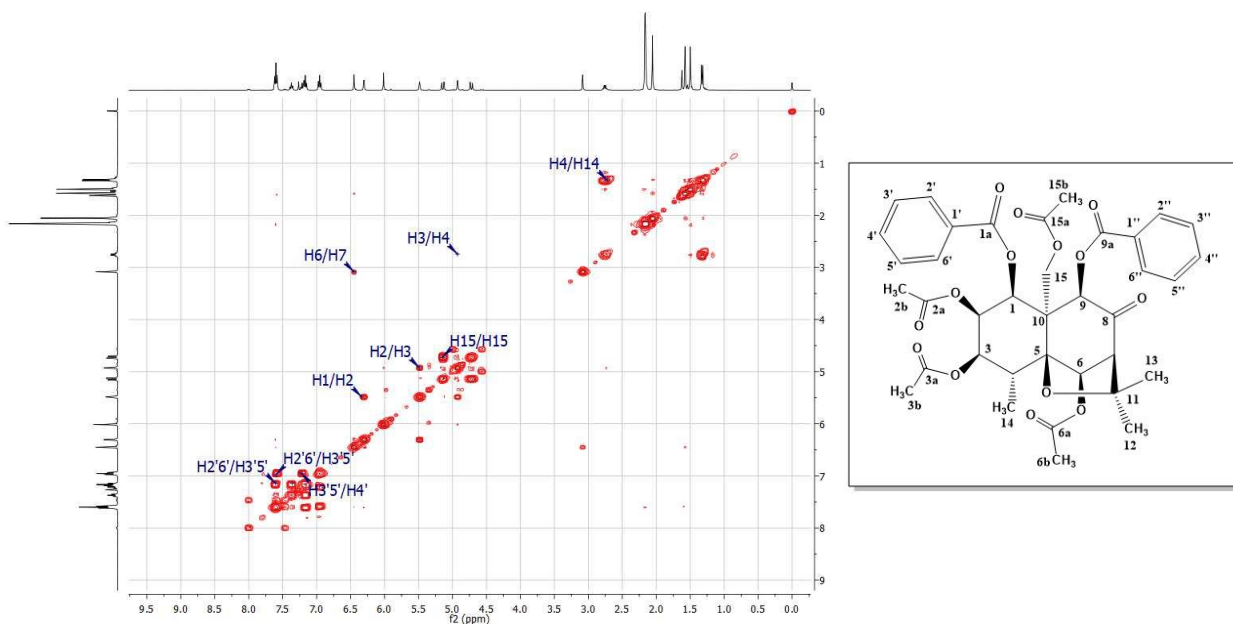


Figura 74: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

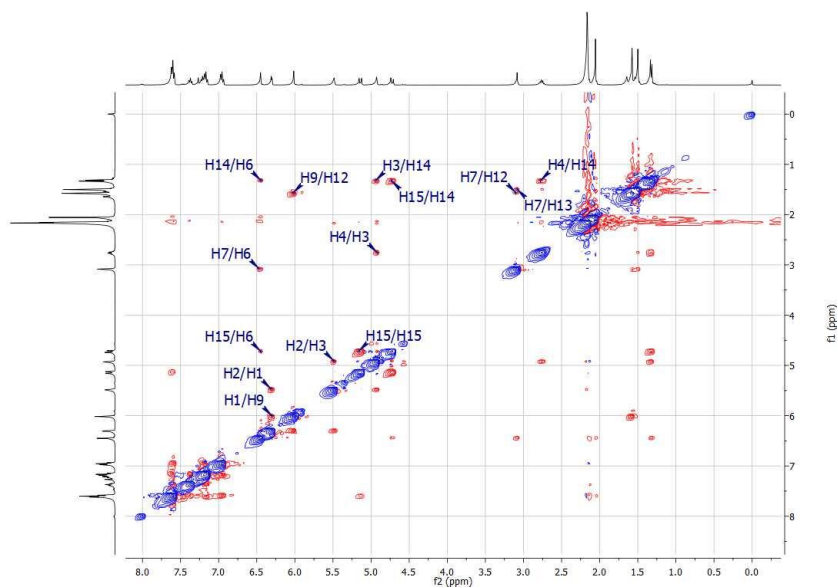


Figura 75: Mapa de contornos NOESY (400 MHz) de **TM26** em  $\text{CDCl}_3$ .

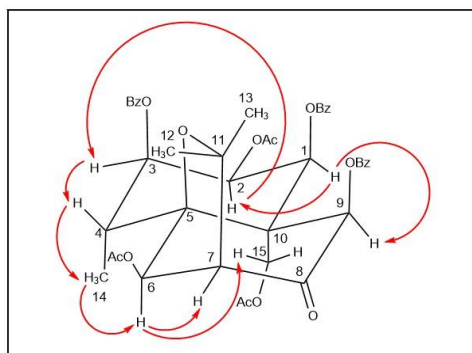


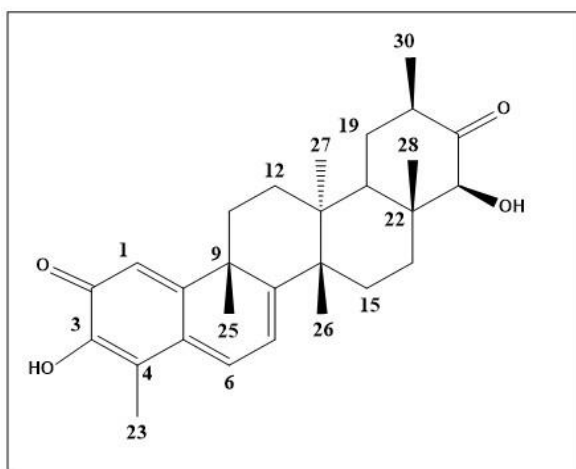
Figura 76: Correlações NOESY (400 MHz) observadas para **TM26**.

**Tabela 12:** Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **TM26**

nº C	Tipo de C	$\delta_c^*$ TM26	$\delta_H$	HMBC	COSY	NOESY
1	CH	72,63	6,30	2, 3, 9, 15	2	2, 9
2	CH	70,48	5,49	3, 4	1, 3	1, 3
3	CH	73,51	4,93	2, 4, 14	2, 4	2, 14
4	CH	37,41	2,76	2, 14	3, 14	14
5	C	91,03	-	3, 4, 6, 7, 14, 15	-	-
6	CH	75,57	6,45	7	7	7, 14, 15
7	CH	64,24	3,08	12, 13	6	6, 12
8	C	197,68	-	6, 7, 9	-	-
9	CH	79,73	6,01	1, 7, 15	-	1, 12
10	C	51,73	-	1, 2, 4, 6, 9, 15	-	-
11	C	83,90	-	6, 7, 12, 13	-	-
12	CH <sub>3</sub>	25,16	1,58	13	-	7, 9
13	CH <sub>3</sub>	30,66	1,50	7, 12	-	
14	CH <sub>3</sub>	15,46	1,32	3, 4	4	3, 4, 6, 15
15	CH <sub>2</sub>	60,66	4,72 e 5,14	1, 9	15	6, 14, 15
2a	C	168,79	-	2, 2b		
3a	C	170,15	-	3, 3b		
6a	C	169,21	-	6, 6b		
15a	C	170,41	-	15, 15b		
2b*	CH <sub>3</sub>	20,76	2,16	-	-	-
3b*	CH <sub>3</sub>	21,08	2,16	-	-	-
6b*	CH <sub>3</sub>	21,28	2,16	-	-	-
15b*	CH <sub>3</sub>	21,39	2,06	-	-	-
1a**	C	165,07	-	1, 2''6'', 4''	-	-
9a**	C	165,09	-	9, 2'6', 3''5''	-	-
1' ***	C	128,48	-	4'', 3''5''	-	-
1'' ***	C	128,82	-	4'', 3''5''	-	-
2'6' ***	CH	129,45	7,60	2'6', 4', 4''	3'5'	-
2''6'' ***	CH	129,66	7,60	2'6', 4', 4''	3'5'	-
3'5' ***	CH	128,07	6,96	2'6', 3'5', 4'	4'	-
3'5'' ***	CH	128,17	7,17	2'6', 3'5', 4'	4'	-
4' ***	CH	133,01	7,37	3'5', 4'	3'5'	-
4'' ***	CH	133,14	7,20	2'6'	3'5'	-

\* \*\* sinais podem estar trocados \*\*\* os pares podem estar trocados

### 1.4.27 TM27: tingenina B



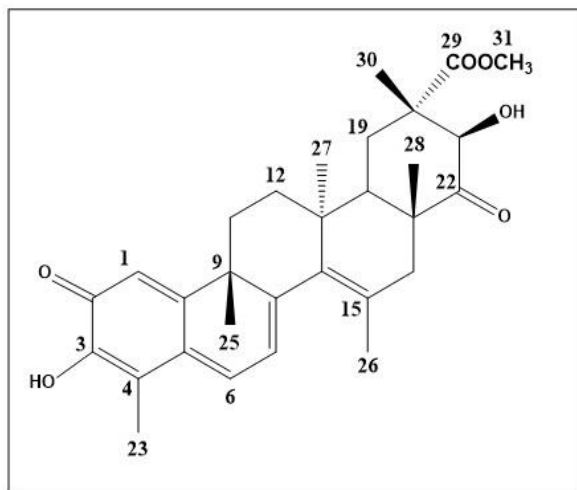
**TM27** foi isolado de **EHR**, um sólido alaranjado com faixa de fusão de 184,4-187,0 °C e uma única mancha vermelha na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 63A, p. 186) apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,05 (d, 1H,  $J = 4,7$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,54 (s, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz), característicos de triterpenos quinonametídeos, e foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-6, H-1 e H-7, respectivamente. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,55 (d, 1H,  $J = 2,8$  Hz) é referente a hidrogênio ligado a carbono oxigenado. Simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,87,  $\delta_{\text{H}}$  0,98,  $\delta_{\text{H}}$  1,37,  $\delta_{\text{H}}$  1,52,  $\delta_{\text{H}}$  2,23 e um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,06 ( $J = 6,2$  Hz) foram atribuídos a seis grupos metila (CEVATEMRE *et al.*, 2016).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 64A, p. 186) apresenta sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  117,29 e  $\delta_{\text{C}}$  168,53, região de carbonos insaturados, confirmando a presença de um triterpeno quinonametídeo. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  213,57 foi atribuído à carbonila em C-21, e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  76,45 a carbono hidroxilado em C-22. Todos os sinais foram classificados a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 65A, p. 187)

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (CEVATEMRE *et al.*, 2016) (Tabela 18A, p. 212) e permitiram identificar **TM27** como sendo a **tingenina B (21 $\beta$ -hidroxitingenona)**.

### 1.4.28 TM28: netzahualcoiona



**TM28** foi isolado de **EHR** e apresentou-se como um sólido alaranjado, com faixa de fusão de 161,8-164,5 °C e uma única mancha vermelha na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

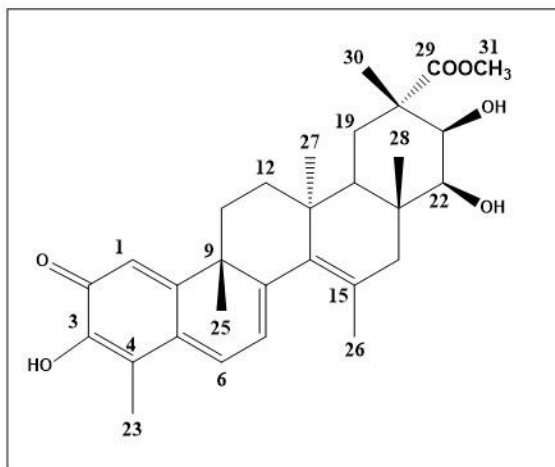
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 66A, p. 187) apresenta sinais em  $\delta_H$  7,18 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz),  $\delta_H$  6,57 (1H) e  $\delta_H$  6,21 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz), característicos de triterpenos quinonametídeos e foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-6, H-1 e H-7, respectivamente. O sinal em  $\delta_H$  4,99 (1H) é referente a um átomo de H ligado a carbono hidroxilado. Simpletos em  $\delta_H$  0,93,  $\delta_H$  1,02,  $\delta_H$  1,29,  $\delta_H$  1,44,  $\delta_H$  1,78,  $\delta_H$  2,26 e  $\delta_H$  3,78, foram atribuídos a sete grupos metila presentes na estrutura de **TM28**.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 67A, p. 188) possui de 30 sinais que foram classificados como sendo 14 C, 5 CH, 4 CH<sub>2</sub> e 7 CH<sub>3</sub> por meio do subspectro DEPT-135 (Figura 68A, p. 188). Sinais na região de carbonos insaturados confirmam uma estrutura quinonametídica. Os sinais  $\delta_C$  213,96,  $\delta_C$  178,28 e  $\delta_C$  175,39 foram atribuídos a três átomos de carbono carbonílicos.

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de <sup>13</sup>C e subspectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (JELLER *et al.*, 2004) (Tabela 19A, p. 213) e permitiram identificar **TM28** como sendo o **netzahualcoiona**.



### 1.4.29 TM29: netzahualcoiendiol



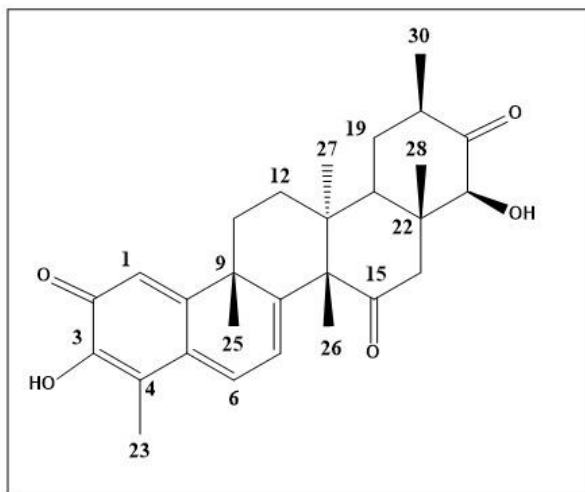
**TM29** foi isolado de **EHR** e **ECR**, um sólido alaranjado com faixa de fusão de 211,5-215,0 °C e uma única mancha vermelha na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 69A, p. 189) sugere tratar-se de um triterpeno quinonametídeo por apresentar sinais em  $\delta_H$  7,19 (d, 1H,  $J = 6,6$  Hz),  $\delta_H$  6,58 (s, 1H) e  $\delta_H$  6,16 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz) atribuídos a H-6, H-1 e H-7, respectivamente. Os sinais em  $\delta_H$  4,17 (1H) e  $\delta_H$  3,53 (1H) são referentes a átomos de H ligados a carbono hidroxilados. Simpletos em  $\delta_H$  0,87,  $\delta_H$  1,29,  $\delta_H$  1,37,  $\delta_H$  1,42,  $\delta_H$  1,72,  $\delta_H$  2,26 e  $\delta_H$  3,72, são atribuídos a sete grupos metila.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 70A, p. 189) possui 30 sinais, que foram classificados a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 71A, p. 190). Sinais entre  $\delta_C$  116,97 e  $\delta_C$  160,15, região de carbonos insaturados, sugerem a presença de um triterpeno quinonametídeo. Os sinais em  $\delta_C$  69,44 (CH) e  $\delta_C$  79,62 (CH) confirmam a presença de átomos de carbono hidroxilados, na estrutura de **TM29**.

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de <sup>13</sup>C e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (JELLER *et al.*, 2004) (Tabela 20A, p. 214) e permitiram identificar **TM29** como sendo o **netzahualcoiendiol**.

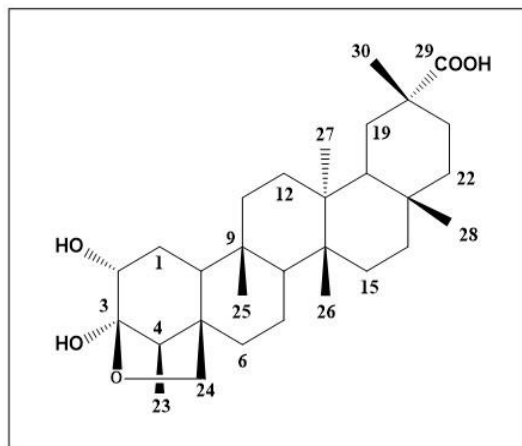
### 1.4.30 TM30: salaquinona A



**TM30** foi identificado em uma mistura isolada de **ECR**. A mistura apresentou-se como um sólido alaranjado, e uma única mancha vermelha na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 72A, p. 190) apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,02 (d,  $J = 7,2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,97,  $\delta_{\text{H}}$  6,53 e  $\delta_{\text{H}}$  6,49 que são característicos de triterpenos quinonametídeos. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,43 (1H, d,  $J = 3,1$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  4,35 (1H) são referentes a átomos de hidrogênio ligados a carbono oxigenado. Vários sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1,01 e  $\delta_{\text{H}}$  2,22, totalizando 36 átomos de hidrogênio, sugerem a presença de 12 grupos metila. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 73A, p. 191) apresenta 55 sinais, sendo que aqueles entre  $\delta_{\text{C}}$  117,31-178,68 são da região de carbonos insaturados, confirmando a presença de uma mistura de dois triterpenos quinonametídeos. Quatro sinais de carbonos não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  213,72,  $\delta_{\text{C}}$  212,49,  $\delta_{\text{C}}$  210,30 e  $\delta_{\text{C}}$  209,86 são referentes a presença de quatro carbonilas. Há ainda dois sinais de carbono hidroxilado, em  $\delta_{\text{C}}$  79,29 (CH) e  $\delta_{\text{C}}$  78,28 (CH). Todos os sinais foram classificados a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 74A, p. 191). Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura para uma série de triterpenos quinonametídeos (MORIKAWA *et al.*, 2003) (Tabela 21A, p. 215) e permitiram identificar um componente como sendo a **salaquinona A (TM30)**. Não foi possível identificar o segundo componente da mistura.

### 1.4.31 TM31: Ácido ortosfênico



**TM31** foi isolado de **ECR** e apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão de 310,8-313,1 °C e que revelou uma mancha roxa em CCD.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 75A, p. 192) mostra sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  4,22 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz), atribuídos aos dois átomos de hidrogênio ligado a carbono oxigenado. Um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,36 (1H) é referente a um sinal de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado. Simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,85,  $\delta_{\text{H}}$  0,94,  $\delta_{\text{H}}$  1,13,  $\delta_{\text{H}}$  1,18 e  $\delta_{\text{H}}$  1,41, além do duplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,21 ( $J=6,9$  Hz) são atribuídos aos seis grupos metila de **TM31**.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 76A, p. 192) possui 29 sinais, sendo que o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  30,4 apresenta intensidade maior, indicando sobreposição. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  181,37 sugeriu a presença de um grupo ácido carboxílico. Os sinais foram classificados a partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura 77A, p. 193).

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 foram comparados com os da literatura (DUAN *et al.*, 2000) (Tabela 22A, p. 216) e permitiram identificar **TM31** como sendo o **ácido ortosfênico**.

### 1.4.32 Discussão dos resultados – Estudo fitoquímico

*Tontelea micrantha* apresentou grande quantidade de **guta percha**, tanto em folhas quanto em galhos e raízes. A gutta percha é um polímero com unidades de 1,4 *trans*-poli-isopreno e apresenta propriedade dual, borracha e plástico, tendo flexibilidade e plasticidade. Com estas propriedades e dureza à temperatura ambiente é um material promissor e tem aplicações em muitos campos, sendo utilizada em tratamentos endodônticos de canal, para preencher espaços vazios da raiz do dente (ZHANG *et al.*, 2008). A gutta percha isolada de *T. micrantha* representa 2,8 % das folhas, sendo 46 % do **EHF**, 0,8 % dos galhos, sendo 5,8 % do **EHG** e 32,2 % do **ECG**, 4,3 % das raízes sendo 67,3 % do **ECR**. É importante realizar pré colunas filtrantes para separação da gutta percha pois durante a purificação do extrato ela pode ser arrastada ao longo de todo o fracionamento em cromatografia de coluna, contaminando e dificultando o isolamento dos metabólitos secundários. A separação da gutta, em coluna filtrante, é baseada na baixa solubilidade do polímero em solventes muito apolares e muito polares, sendo solúvel apenas em solventes de polaridade média, como o clorofórmio.

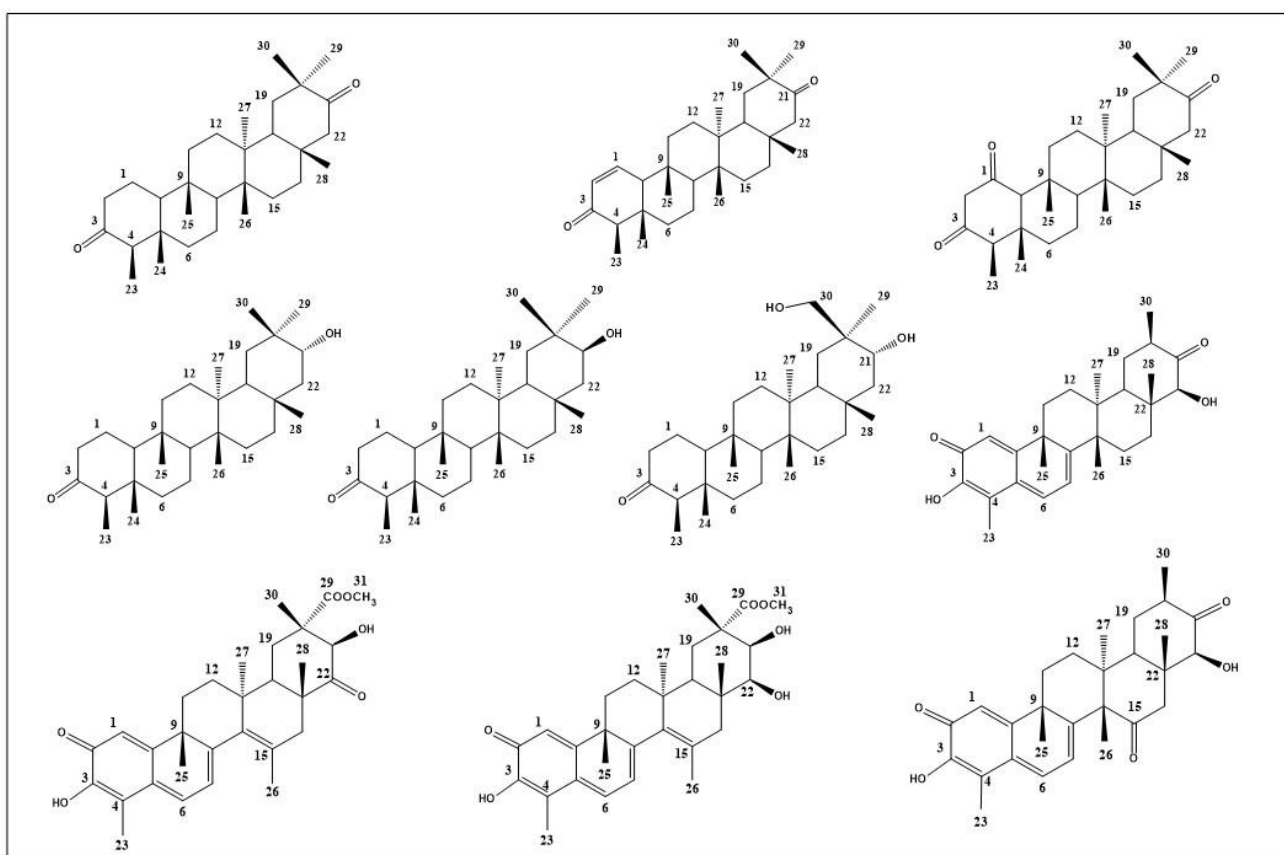
O fracionamento do extrato hexânico das folhas levou ao isolamento de sete substâncias: o polímero **guta percha**, o **esqualeno** (precursor de triterpenos pentacíclicos), uma **mistura de ácidos graxos** compostos principalmente por ácido palmítico (66 %), ácido esteárico (12 %) e ácido oléico (11 %), e os triterpenos pentacíclicos da classe dos friedelanos; **friedelina**, **3 $\beta$ -friedelinol**, **ácido 3,4-seco-friedelanoico** e **28-hidroxfriedelan-3-ona**. O fracionamento do extrato acetato etílico levou ao isolamento de quantidades adicionais de **friedelina** e **28-hidroxfriedelan-3-ona** e do derivado glicosilado de um esteroide, o **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol**. O extrato metanólico das folhas apresentou diversas manchas fluorescentes em CCD quando reveladas com reagente NP/PEG sob luz UV-VIS (365 nm), indicando presença de flavonoides. Optou-se então, por purificar o extrato em coluna de poliamida, em fase reversa de polaridade. Foram isolados os flavonoides **3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)][ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina**, um trissacarídeo da quercetina, **3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina** (rutina), um dissacarídeo de quercetina, o dímero **epiafzelequina-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-epicatequina** e o carboidrato **dulcitol**, comumente isolado

de Celastraceae. Outras substâncias apresentaram uma única mancha fluorescente sob luz UV-VIS (365 nm), indicando estarem aparentemente puras e com *rf* diferentes das anteriormente isoladas, mas devido à baixa massa ou baixas solubilidades nos principais solventes, não foi possível obter espectros de RMN conclusivos. Como havia massa suficiente de **EMF** disponível, ele também foi submetido a colunas de sílica gel e Sephadex LH-20, na tentativa de serem isolados outros metabólitos secundários. Diversos trabalhos, na literatura, apresentam estudos fitoquímicos de extratos polares utilizando primeiramente uma coluna de exclusão de Sephadex, mas não foi possível isolar qualquer substância. Algumas subfrações foram trabalhadas por CLAE com detector UV-VIS, em colunas analíticas e preparativas, mas também não foi possível isolar qualquer substância, devido à baixa massa ou complexidade das subfrações.

O estudo fitoquímico dos galhos levou ao isolamento de maior número de triterpenos pentacíclicos, todos de esqueleto friedelano: **friedelina**, **3 $\beta$ -friedelinol**, **friedelan-3,21-diona**, **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona**, **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona**, **friedelan-1,3,21-triona**, **mistura de friedel-1-en-3,21-diona e friedelan-3,21-diona**, **30-hidroxifriedelan-3-ona**, **28-hidroxifriedelan-3-ona**, **3-oxo-friedelan-28-al**, **ácido 3-oxo-friedelan-28-oico**, **21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona**, **28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona** e **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona** (impuro). Foram isolados também o esteroide  **$\beta$ -sitosterol** e seu derivado glicosilado, o **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol**, além do flavonoide da classe das flavanas, a **epicatequina**.

No estudo fitoquímico das raízes foram trabalhados os extratos hexânico e clorofórmico. Essa parte da planta não fazia parte do projeto inicial, mas como havia disponibilidade do material iniciamos o estudo da mesma. No entanto, não foi realizado o estudo dos extratos acetato etílico e metanólico das raízes, pois não havia tempo suficiente. Desta parte da planta foram isoladas quantidades adicionais de **friedelan-3,21-diona** e  **$\beta$ -sitosterol**, o **ácido ortosfênico**, um sesquiterpeno de esqueleto  **$\beta$ -agarofurano**, **2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano**, e os triterpenos pentacíclicos quinonametídeos, **tingenina B**, **netzahualcoiona**, **netzahualcoiondiol** e a **salaquinona A** (em mistura). Os triterpenos quinonametídeos são marcadores taxonômicos da família Celastraceae e até hoje foram isolados apenas das raízes dessas plantas (CORSINO *et al.*, 2000). Isso sugere que a friedelina, intermediário chave na biossíntese de quinonametídeos, é translocada até as raízes para as transformações biossintéticas.

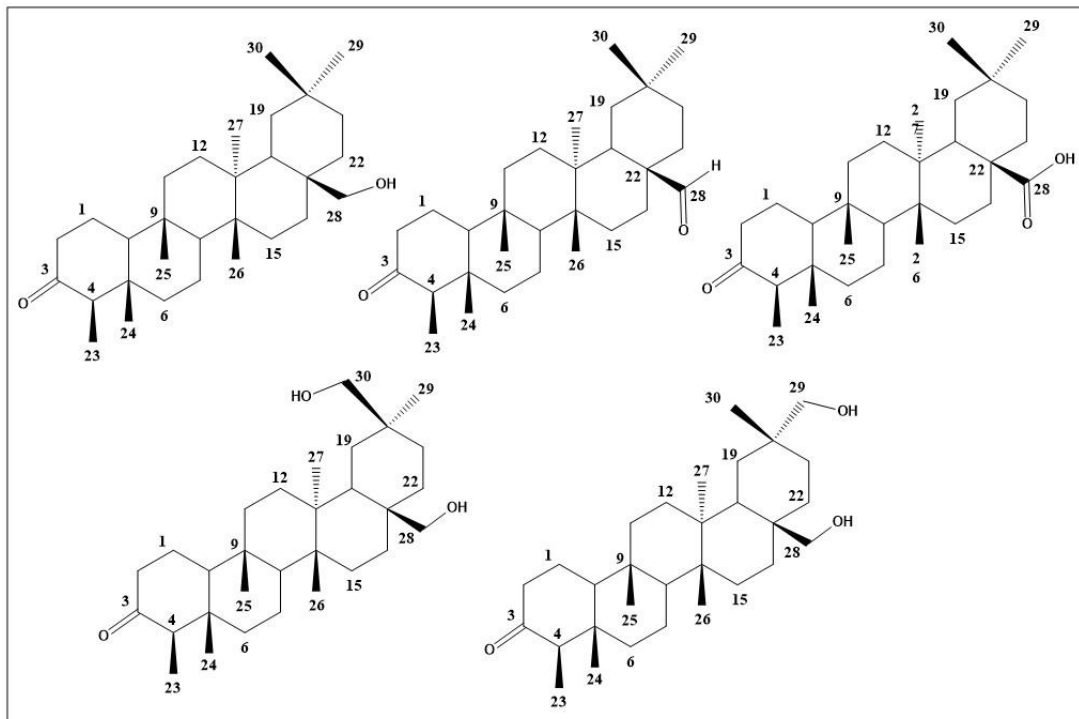
O triterpeno isolado em maior quantidade foi a friedelan-3,21-diona, que representa cerca de 0,3 % (m/m) dos galhos, sendo 1,3 % do **EHG**, 41,5% do **SHG** e 8,8 % do **ECG**. O estudo fitoquímico de *Tontelea micrantha* mostrou que parece haver uma preferência na biossíntese de triterpenos com oxidação no carbono da posição 21, pois foram isolados dez triterpenos com modificação nesse átomo: **friedelan-3,21-diona**, **friedel-1-en-3,21-diona**, **friedelan-1,3,21-triona**, **21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona**, **21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona**, **21 $\alpha$ ,30-di-hidroxifriedelan-3-ona**, **tingenina B**, **netzahualcoiona**, **netzahualcoiondiol** e a **salaquinona A** (Figura 77).



**Figura 77:** Triterpenos pentacíclicos com oxidação em C-21, isolados de *T. micrantha*.

Também foram isolados cinco TTPC com oxidação em C-28, **28-hidroxifriedelan-3-ona**, **3-oxo-friedelan-28-al**, **ácido 3-oxo-28-friedelan-28-oico**, **28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona** e **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona** (Figura 78, p. 121). Esses resultados indicam que em *T. micrantha*, de uma forma geral, prevalece a biossíntese de TTPC com oxidação no anel E. Não foram isolados triterpenos pentacíclicos com oxidação em outros anéis, com exceção do anel A, que apresentou carbonila ou hidroxila em C-3 em todos os TTPC, além de carbonila ou ligação dupla

em C-1 nos compostos inéditos **friedel-1-en-3,21-diona** e **friedelan-1,3,21-triona**. No entanto, triterpenos com oxidação nos anéis A, B, C e D, são muito comuns em plantas da família Celastraceae.



**Figura 78:** Triterpenos pentacíclicos com oxidação em C-28, isolados de *T. micrantha*.

Dentre as substâncias isoladas, **friedelan-1,3,21-triona**, **friedel-1-en-3,21-diona** e **2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano** são inéditos na literatura. E todas as substâncias isoladas são inéditas no gênero *Tontelea*.

Foi realizada a marcha química das raízes para obtenção de alcaloides, pois há relatos na literatura de isolamento dessa classe de substâncias em plantas da família Celastraceae. Um estudo histoquímico de *Tontelea micrantha* (Mercadante-Simões *et al.*, 2014) indicou pequena quantidade de alcaloides em raízes, e isso motivou a busca por essas substâncias. Apesar disso, no entanto, não foi obtido nenhum composto alcaloídico. Do fracionamento em coluna da fração alcaloídica da extração ácido/base foi isolado apenas **netzahualcoiendiol**, um triterpeno quinonametídeo.

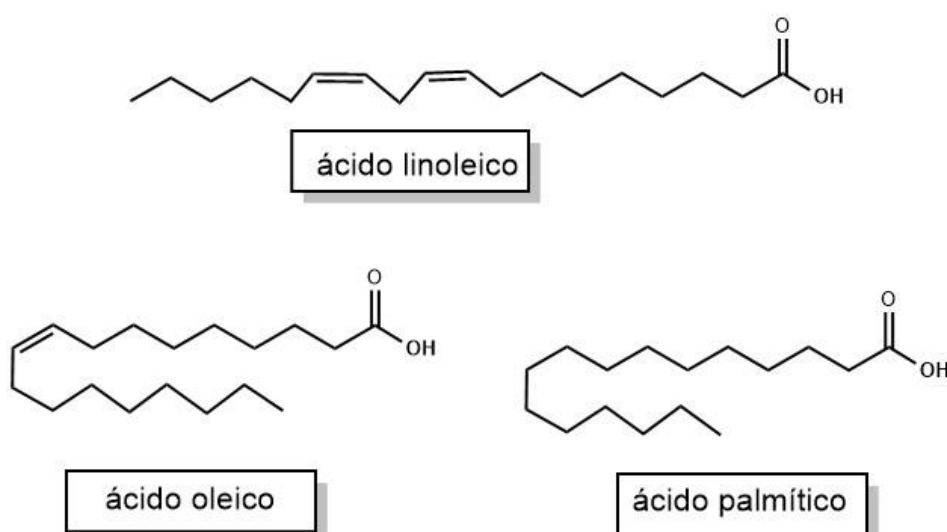
Duas amostras de óleo das sementes de *T. micrantha* foram analisadas no cromatógrafo a gás para avaliação de seus perfis (Figuras 78A e 79A, p. 194), uma vez que este óleo é muito usado como anti-inflamatório pela população de Montes Claros. O óleo comprado no mercado central de Montes Claros e o óleo adquirido

diretamente da Cooperativa de produtores artesanais apresentam o mesmo perfil: 45,2 e 47,1 % de ácido linoleico, 37,8 e 36,5 % de ácido oleico e 11,9 e 11,6 % de ácido palmítico, respectivamente (Tabela 13) (Figura 79). O ácido oleico e o ácido palmítico foram também identificados em uma mistura isolada do extrato hexânico das folhas. O objetivo de conhecer esse perfil era importante, já que prevíamos testes biológicos para esses materiais.

**Tabela 13:** Perfis de ácidos graxos obtidos no cromatógrafo a gás com detector por ionização de chamas

Ácido graxo	Nome	t <sub>R</sub> (min)	% OMC*	% OCP**
C16:0	ácido palmítico	6.321	11,9	11,6
C16:1	ácido palmitoleico	6.560	0,4	0,5
C18:0	ácido esteárico	8.003	3,3	3,0
C18:1	ácido oleico	8.205	37,8	36,5
C18:2	ácido linoleico	8.606	45,2	47,1
C18:3	ácido linolênico	9.128	0,3	0,4
C20:0	ácido araquídico	9.617	0,2	0,2
Outros	-		0,8	0,7
Total	-		100,0	100,0

\* OMC: amostra de óleo obtida no mercado central de Montes Claros; \*\* OCP: amostra de óleo obtida em cooperativas de produtores artesanais de Montes Claros.



**Figura 79:** Ácido graxos majoritários presentes no óleo de sementes de *T. micrantha*.



## 2 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O estudo da atividade biológica neste trabalho compreende:

- Estudo da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica)
- Estudo da atividade antiviral
- Estudo da atividade citotóxica
- Estudo da atividade de inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cardíaca

Os testes antimicrobianos e os testes antivirais foram realizados no Laboratório de Cultura de Células, no Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Alto Paraopeba, Minas Gerais, sob a coordenação do professor José Carlos Magalhães. Os testes antivirais de extratos de *T. micrantha* fizeram parte do trabalho de conclusão de curso da aluna Marcela de Sá Hauck, defendido em 2017. Os resultados dos testes antivirais foram publicados no periódico Journal of the Brazilian Chemical Society (FERREIRA *et al.*, 2019). Os testes antimicrobianos foram publicados no periódico Journal of Pharmaceutical Negative Results (CRUZ *et al.*, 2019).

O teste da atividade citotóxica foi realizado no Laboratório de Hematologia Clínica, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela Dra. Fernanda Gontijo, sob a orientação do professor Dr. Adriano de Paula Sabino.

Os testes da atividade de inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, no trabalho de conclusão de curso da aluna Maria Cecília de Souza Lelis, sob orientação da professora Dra. Clarice Veloso de Carvalho Moura.

### 2.1. Introdução

A descoberta dos antibióticos revolucionou o tratamento de doenças infecciosas e colaborou para o aumento da expectativa de vida das pessoas em todo o mundo. Essas doenças são ainda consideradas como a principal causa de mortalidade no mundo e ao longo da história da humanidade. A diarreia infecciosa e a pneumonia são responsáveis por 40 % das mortes infantis em todo o mundo,

especialmente em regiões subdesenvolvidas e mais de 1,5 milhão de pessoas morrem de complicações de doenças fúngicas invasivas (CRUZ *et al.*, 2019).

Apesar dos avanços da medicina moderna, a resistência bacteriana aos antibióticos mais tradicionais é atualmente um dos maiores e mais consideráveis obstáculos para a saúde pública (SILVA e AQUINO, 2018). Alguns anos depois de um novo antibiótico ser descoberto e introduzido na clínica terapêutica, as cepas patogênicas resistentes evoluem em um mecanismo de proteção do alvo para se evadir dos efeitos dos antimicrobianos (HERRMANN *et al.*, 2016). Por exemplo, existem relatos frequentes de patógenos estafilocócicos que são resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis (TORTORA *et al.*, 2012). Dessa forma, é muito importante a busca por novos agentes antimicrobianos, especialmente por aqueles que possam apresentar um mecanismo de ação inovador que minimizem diretamente a probabilidade de uma resistência preexistente ou, dependendo do alvo celular específico, possam impedir o rápido desenvolvimento de resistência dos patógenos (HERRMANN *et al.*, 2016).

Décadas após a era de ouro dos antibióticos, poucos novos agentes foram descobertos (HERRMANN *et al.*, 2016). Nos últimos 40 anos, apenas duas classes de antibióticos eficazes contra bactérias Gram-negativas foram aprovadas para uso clínico. Além disso, atualmente, existe um arsenal terapêutico escasso para o tratamento de infecções fúngicas (CRUZ *et al.*, 2019).

Situação semelhante acontece com o desenvolvimento de novos antivirais. Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, dependem de uma célula hospedeira para se multiplicarem. Esse fato é importante para o desenvolvimento de drogas antivirais, pois a maioria das drogas que interferem na multiplicação viral também pode interferir com a fisiologia da célula hospedeira (TORTORA, 2012), tornando-se tóxicos para uso clínico. Encontrar um medicamento que tenha ação contra o vírus, sem interferir nas funções basais das células, é apontado como um grande desafio (CRUZ *et al.*, 2019) na busca por antivirais. Além disso, a rápida taxa de mutação dos vírus leva à resistência desses patógenos aos antivirais, dificultando a descoberta de agentes antivirais eficazes e de vacinas (XIAO *et al.*, 2018). De fato poucas drogas antivirais têm sido aprovadas e são efetivas apenas contra um número extremamente pequeno de doenças virais. Muitas das drogas antivirais recentemente desenvolvidas são direcionadas contra o HIV.

Os vírus são responsáveis por um grande número de doenças, incluindo o câncer e síndromes complexas como a doença de Alzheimer e diabetes (LIN *et al.*, 2014). Nos países desenvolvidos, estima-se que pelo menos 60 % de todas as doenças infecciosas são causados por vírus, e cerca de 15 % por bactérias. Além disso, diversas epidemias causadas por vírus re-emergentes, como os surtos da dengue, Zika vírus (ZIKV), vírus ebola e influenza A são um problema de saúde pública (LIM, 2018).

As infecções pelo ZIKV podem ser muito graves e perigosas para as mulheres grávidas, pois podem levar a microcefalia, uma anomalia cerebral que causa má formação do cérebro e cabeça dos recém-nascidos, abortos, natimortos e outras deficiências congênitas. Nos anos de 2015-2016, ocorreu um surto no Brasil causando um aumento de 10 vezes no número de recém-nascidos com microcefalia em comparação com anos anteriores. Outra consequência do ZIKV é o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré, uma rara, mas séria doença autoimune que afeta o sistema nervoso central causando paralisia e deteriorização de neurônios (OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2016; MALTA *et al.*, 2017). Ainda não há tratamento ou medicamentos específicos contra o ZIKV (FERREIRA *et al.*, 2019).

O Mayaro vírus é transmitido por vários mosquitos, incluindo o *Aedes aegypti*, e causa sintomas parecidos com os da febre amarela e chicungunha. Ele é classificado como um vírus emergente, endêmico de região de mata, mas com potencial surgimento em áreas urbanas. Normalmente a infecção evolui sem gravidade, mas há relatos de complicações como hemorragia, problemas neurológicos e até a morte. No entanto, também não há tratamento específico para essa doença (CRUZ *et al.*, 2019).

Sabe-se que existe uma relação entre infecções, especialmente as causadas por vírus, e câncer (CHAN *et al.*, 2016), pois quase tudo o que pode alterar o material genético de uma célula tem o potencial de transformar uma célula normal em uma célula cancerosa (TORTORA, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (NAÇOES UNIDAS BRASIL, 2019) aproximadamente 14 milhões de novos casos de câncer são registrados por ano globalmente, e calcula-se que essas notificações devam subir 70 % até 2038. Atualmente existem muitos medicamentos no mercado para tratar os diferentes tipos de câncer, mas nenhum é totalmente eficaz e seguro (CHAUDHURI e SHARMA, 2017). Além disso, o tratamento ainda é caro e inacessível em muitos países em desenvolvimento. Dessa

forma, é muito importante a pesquisa por novas terapias para o tratamento do câncer.

A insuficiência cardíaca é uma das principais causas de hospitalizações de adultos e tem sido considerada como uma nova epidemia com elevada mortalidade e morbidade, sendo apontada como um problema de saúde pública (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). Os glicosídeos cardioativos são uma classe de esteroides isolados de algumas plantas como *Digitalis purpurea* e *Strophanthus gratus* e são utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca. Esses metabólitos atuam como inibidores da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase cardíaca, que está envolvida nos processos de manutenção do gradiente eletroquímica da célula e nos ciclos de contração e relaxamento cardíaco (KUHLEBRANDT, 2004). A inibição desta enzima é realizada como estratégia para tratar a insuficiência cardíaca. No entanto, apesar da sua eficácia comprovada, os glicosídeos cardioativos apresentam diversos efeitos adversos como distúrbios visuais, arritmias, náuseas e vômitos, sendo importante a busca por novos fármacos capazes de tratar a insuficiência cardíaca (LOPES *et al.*, 2018).

Os triterpenos pentacíclicos, encontrados em abundância em plantas da família Celastraceae (ALVARENGA e FERRO, 2006), apresentam ampla gama de atividades biológicas. Além disso, várias espécies de plantas dessa família já vêm sendo usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças. Sendo assim, é bastante promissor a avaliação de extratos de plantas dessa família, bem como de seus metabólitos secundários isolados, frente a diferentes alvos biológicos.

## 2.2 Atividade antimicrobiana

Foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana e antifúngica os extratos hexânico das folhas (**EHF**), acetato de etila das folhas (**EAF**), metanólico das folhas (**EMF**), hexânico dos galhos (**EHG**), clorofórmico dos galhos (**ECG**) e acetato de etila dos galhos (**EAG**).

Os micro-organismos testados nesse trabalho são originados da *American Type Culture Collection* (ATCC), gentilmente cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando nove bactérias Gram-negativas, (*Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Escherichia coli* ATCC 25922,

*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Klebsiella oxytoca* ATCC 0182, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708), seis bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ATCC 6051 e *Bacillus cereus* ATCC 11778), e quatro espécies de *Candida* (*Candida albicans* ATCC 18804, *C. albicans* 10231, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 34135 e *C. tropicalis* ATCC 28707). Os testes foram realizados utilizando o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

### 2.2.1 Metodologia – método da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração da amostra capaz de inibir pelo menos 50 % do crescimento microbiano e é determinada pela medida da atividade de uma sequência decrescente de concentrações das amostras em um meio nutriente inoculado com a concentração padronizada do micro-organismo em teste.

Foi preparado um pré-inóculo no qual as bactérias e leveduras estocadas foram transferidas, utilizando alça de platina, e inoculadas em tubo de ensaio contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*, Infuso de cérebro e coração). Os tubos foram então incubados em estufa a 37 °C por 18 horas. Em seguida, 500 µL do pré-inóculo foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada comparando-se com o tubo 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão ( $10^8$  UFC/mL), obtendo-se assim, os inóculos bacterianos utilizados no teste.

As amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução estoque com concentração de 50 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição de 40 µL da solução estoque em 960 µL de meio de cultura BHI.

Os testes foram realizados em placa de 96 micropoços, em duplicata. Em cada poço foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI. No primeiro poço foram adicionados também 100 µL da solução de trabalho. Após homogeneização

100 µL foram transferidos para o segundo poço e, assim, sucessivamente. Desprezaram-se os 100 µL finais do último poço. Essa microdiluição forneceu dez concentrações de cada amostra: 500,00, 250,00, 125,00, 62,500, 31,250, 15,625, 7,812, 3,900, 1,950 e 0,970 µg/mL. A seguir, 100 µL do inóculo do micro-organismo a ser testado foram adicionados a cada poço.

Foram realizados dois controles, um para controle de crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução de trabalho (para verificar a viabilidade celular) e o branco, em que não se adicionou o inóculo bacteriano (para se eliminar o efeito da coloração da solução de trabalho). Uma placa controle contendo 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril foi adicionada ao experimento, sendo o controle de esterilidade do meio de cultura BHI. Para as bactérias, o controle positivo utilizado foi a amoxicilina e o cloranfenicol e, para a levedura utilizou-se a nistatina. As primeiras leituras das microplacas foram feitas após montagem do experimento (leitura a 0h) em leitor de placa de Elisa (492 nm). Em seguida as microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C e, após 24 horas, foi realizada nova leitura.

### **2.2.2 Discussão dos resultados**

Todos os extratos de folhas e galhos testados foram inativos frente aos micro-organismos testados, pois apresentaram CIM > 500 µg/mL (Tabela 14, p. 129). De acordo com Mbaveng e colaboradores (2015), a atividade antimicrobiana de potenciais drogas é considerada significativa se o valor da CIM for menor que 10 µg/mL, moderada se  $10 < \text{CIM} < 100$  µg/mL e baixa se  $\text{CIM} > 100$  µg/mL.

**Tabela 14:** Resultados dos testes antimicrobianos para os extratos de folhas e galhos de *Tontelea micrantha*

Microorganismo	Concentração inibitória mínima (µg/mL)								
	EHF	EAF	EMF	EHG	ECG	EAG	AMOX	CLOR	NIS
<i>E. cloacae</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	0,9	-
<i>K. pneumoniae</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	3,9	-
<i>k. oxytoca</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	62,5	-
<i>P. aeruginosa</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	15,6	-
<i>E. coli</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	1,95	-	-
<i>A. baumannii</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	125	-	-
<i>S. flexneri</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,24	-	-
<i>S. enterica typhimurium</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,49	-	-
<i>S. enterica choleraesius</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,24	-	-
<i>S. aureus</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,98	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	1,96	-	-
<i>S. epidermidis</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,49	-	-
<i>S. agalactiae</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,98	-	-
<i>E. faecalis</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	0,98	-	-
<i>B. subtilis</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	-
<i>B. cereus</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	6,25	-	-
<i>C. albicans</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	-	2
<i>C. albicans</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	-	4
<i>C. glabrata</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	-	4
<i>C. krusei</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	-	8
<i>C. tropicalis</i>	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	-	-	2

AMOX: amoxicilina CLOR: cloranfenicol NIS: nistatina (Adaptado de CRUZ *et al.*,2019).

## 2.3 Atividade antiviral contra vírus Zika e vírus Mayaro

Foram submetidos a testes de atividade anti-Zika e anti-Mayaro vírus os extratos **EHF, EAF, EMF, EHG, ECG e EAG**.

### 2.3.1 Metodologia

#### 2.3.1.1 Células VERO

As células de mamífero, VERO, foram utilizadas para avaliações dos antivirais. A linhagem VERO (ATCC CCL-81) é epitelial, derivada de rim de macaco verde africano. O meio de crescimento foi o meio MEM modificado por Dulbecco (DMEM),

suplementado com 5 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) e um coquetel de antibióticos, conforme instruções dos fabricantes. As células foram mantidas a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> e repicadas a cada 3 dias.

### 2.3.1.2 Cultivo dos vírus

Amostra do vírus Zika (ZIKV) foi cedida pela Prof<sup>a</sup>. Cintia Lopes de Brito Magalhães (ICEB/UFOP), o qual foi multiplicado em culturas de células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36. Amostra do vírus Mayaro (MAYV) foi cedido pelo Prof<sup>o</sup> Maurício Lacerda Nogueira, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e multiplicados em células Vero.

Culturas semiconfluentes dessas células foram inoculadas com uma alíquota viral em 4 garrafas de 50 cm<sup>2</sup> e monitoradas, quanto ao aparecimento de efeito citopático desencadeado pelo vírus, comparando-se com uma garrafa controle (não infectada). Por se tratarem-se de vírus que ocasionam lise celular e são liberados no sobrenadante das culturas, o meio foi coletado e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C na centrífuga Hettich, com rotor 320R. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e armazenado em freezer -80 °C, conforme metodologia descrita por Barrows e colaboradores (2016) até o momento dos ensaios.

Para utilização dos vírus, primeiramente foi determinado o título viral/mL, e para tal uma placa de 6 câmaras foi implantada com células VERO (~1x10<sup>6</sup> células /câmara) e ao atingirem 90 % de confluência, foram adicionados 200 µL de diluições seriadas do estoque de vírus, em 5 das câmaras, mantendo-se uma como controle. A placa foi mantida por 1 hora a 37 °C para adsorção do vírus, quando foi removido o inóculo viral, acrescentando-se a cada câmara 2,0 mL de meio de crescimento DMEM semi-sólido acrescido de 2 % (m/v) de carboximetilcelulose (CMC) e 2 % (v/v) de SFB, seguindo nova incubação a 37 °C. Após 48 horas, o meio foi desprezado e as células fixadas em solução PBS (tampão fosfato salino) com 10 % de formaldeído por 30 minutos. Para a revelação, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta 1 % (m/v) por 15 minutos. O título foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP) obtido nas câmaras cujas diluições apresentaram entre 20 e 200 placas de lise viral, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL.



### 2.3.1.3 Ensaio de citotoxicidade

Antes dos testes antivirais, os extratos foram submetidos a um teste de citotoxicidade, a fim de determinar a concentração de trabalho citotóxica para 50 % das células ( $CC_{50}$ ). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  células/100  $\mu$ L/poço) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de meio completo com 2 % (v/v) de SFB e diferentes concentrações dos extratos, dissolvidos em DMSO (2 % em água). A análise foi realizada em triplicata e DMSO foi utilizado como controle negativo. Após 48 horas de incubação foram adicionados 25  $\mu$ L da solução de brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (2 mg/mL em PBS), incubando-as a 37 °C por 90 minutos. Então, 130  $\mu$ L de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de farmazan, mantendo as culturas sob agitação a 150 rpm por 15 minutos. As absorbâncias em cada poço foram determinadas em leitor de placas ( $\lambda = 492$  nm). A  $CC_{50}$  foi calculada de acordo com a expressão  $B/A \times 100$  (A = células não tratadas; B = células tratadas).

### 2.3.1.4 Atividade antiviral global

Os extratos que apresentaram  $CC_{50}$  maior que 100  $\mu$ g/mL foram submetidos aos testes de atividade antiviral *in vitro*. Assim, células VERO foram distribuídas em microplacas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  células/100  $\mu$ L/poço) e incubadas por 24 horas. O meio foi removido e 100  $\mu$ L das diluições seriadas dos extratos (250 – 15,6  $\mu$ g/mL) foram adicionados à placa. Em uma placa espelho, as mesmas diluições de extratos foram misturadas ao inóculo viral calculado para que a infecção tivesse uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 vírus/célula. Ambas as placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C em 5 % de  $CO_2$ . Então, transferiu-se a suspensão da placa espelho para a placa contendo células e incubou-se por 48 horas a 37 °C. Este procedimento foi realizado para garantir uma avaliação adequada do efeito antiviral, investigando a ação dos extratos no vírus e nas células a serem infectadas ao longo do ciclo multiplicativo do vírus. Após 48 horas de infecção, a mesma metodologia do teste de citotoxicidade foi realizada novamente, para estabelecer a concentração antiviral eficaz mediana ( $CE_{50}$ ) que é a concentração capaz de promover a proteção de 50 % das células tratadas da infecção viral. A porcentagem de proteção ( $CE_{50}$ ) foi

calculada usando a absorvância ( $\lambda = 492 \text{ nm}$ ) de cada poço, determinada em um leitor de placas, e foi expressa como  $[(A-B)/(CB)] \times 100$  (A = células tratadas e infectadas, B = células não tratadas e infectadas e C = células não tratadas e não infectadas). Os resultados são médias obtidas a partir das triplicatas. A pesquisa foi feita conforme descrito por Barrows e colaboradores (2016), com algumas modificações.

### **2.3.1.5 Avaliação em diferentes estágios da infecção viral**

Para estabelecer o efeito antiviral, as células e o vírus foram incubados com extratos em diferentes estágios do ciclo de infecção viral. No estágio de adsorção, as células foram pré-tratadas com os extratos antes da infecção viral. No estágio de penetração, as células foram infectadas com o vírus antes da adição dos extratos. O efeito virucida também foi avaliado para verificar se os extratos foram capazes de interagir com o vírus em um estágio anterior à infecção viral das células hospedeiras. Então, o vírus foi incubado com os extratos antes de infectar as células. Os dados apresentados são as médias obtidas a partir das triplicatas.

#### **2.3.1.5.1 Atividade antiviral na etapa da adsorção**

O objetivo nesta etapa foi a análise da interação dos extratos com receptores celulares, uma vez que nesta etapa há o contato prévio dos extratos com as células antecedendo a infecção.

Os extratos, em concentrações seriadas de 250,0 a 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , foram adicionados à monocamada celular (placa de 24 poços,  $5 \times 10^5$  células/poço) e incubadas a 37 °C por 1 hora em estufa com atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ ). Então, as células foram lavadas e infectadas com o ZIKV (MOI = 0,1 vírus/célula). Após o período de 1 hora de adsorção viral, o inóculo contendo vírus não adsorvidos foi removido e as células foram lavadas com PBS e então adicionou-se 1 mL do meio 199 semissólido contendo 2 % (v/v) de SFB e 2 % (v/v) carboximetilcelulose (CMC). O meio semissólido é necessário para evitar a infecção de células de maneira aleatória, uma vez que quando ocorre a lise celular há o extravasamento de vírus para o sobrenadante e com o meio semissólido tal vazamento fica concentrado na

região vizinha à célula lizada, viabilizando então a formação de placas de lise. Após 48 horas, as células foram fixadas com PBS/10 % (v/v) de formaldeído por 30 minutos, lavadas e coradas com cristal violeta 5 % (m/v) por 15 minutos para a revelação.

As placas de lise foram observadas e comparadas com células não tratadas e não infectadas (controle celular), células tratadas com DMSO (20 % em água) e infectadas (controle do solvente), células tratadas com ribavirina 200 µg/mL e infectadas (controle da droga) e apenas células infectadas (controle ZIKV). Ribavirina (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizada como controle negativo pois pode inibir a multiplicação viral na fase intracelular.

### **2.3.1.5.2 Atividade antiviral na etapa da penetração**

O objetivo nesta etapa foi investigar se os extratos poderiam causar o impedimento da penetração do vírus através da membrana celular. Sabe-se que a penetração viral ocorre devido à ação enzimática celular, e sucede a adsorção viral na membrana lipoproteica.

Para isso, células VERO foram distribuídas em placa de 24 poços ( $5 \times 10^5$  células/100 µL/poço), 24 horas antes do ensaio. Então, as células foram infectadas com ZIKV (MOI = 0,1 vírus/célula) sem nenhum tratamento prévio e incubadas a 4 °C por 1 hora. Em seguida, o inóculo de vírus foi removido e as células foram lavadas com PBS. Os extratos, em concentrações seriadas (250,0 a 15,6 µg/mL), foram adicionados, e as células incubadas por 1 hora a 37 °C em atmosfera 5 % de CO<sub>2</sub>. Os extratos foram removidos e as células tratadas com tampão citrato, pH 3,0, por 1 minuto. Em seguida, adicionaram-se o meio 199 semissólido contendo 2 % de SFB, 2 % (m/v) de CMC e o coquetel de antibióticos, sendo a placa de células incubada novamente a 37 °C em atmosfera 5 % de CO<sub>2</sub>. A revelação das placas e grupos controle foram os mesmos descritos no teste da etapa de adsorção.

### **2.3.1.6 Atividade virucida**

Esse ensaio tem o objetivo de investigar se os extratos possuíam efeito virucida, que é a capacidade de interagir com o vírus de maneira que impeça a infecção antes mesmo do contato do vírus com a célula hospedeira.

Os extratos foram adicionados ao inóculo (diluições entre 250,0 a 15,6 µg/mL) a 37 °C por 1 hora. Então os inóculos tratados foram adicionados à placa contendo as células VERO e incubados a 37 °C por 1 hora em estufa com atmosfera 5 % de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o inóculo viral foi removido e adicionou-se meio 199 semissólido contendo 2 % (v/v) de SFB e 2 % (m/v) CMC e, então a placa foi incubada por 48 horas em estufa com atmosfera 5 % de CO<sub>2</sub>. As placas foram fixadas com formaldeído a 10 % em PBS e coradas com cristal violeta 1 % (m/v) por 15 minutos para revelação. Os grupos controle foram os mesmos descritos no teste da etapa de adsorção.

### 2.3.2 Discussão dos resultados

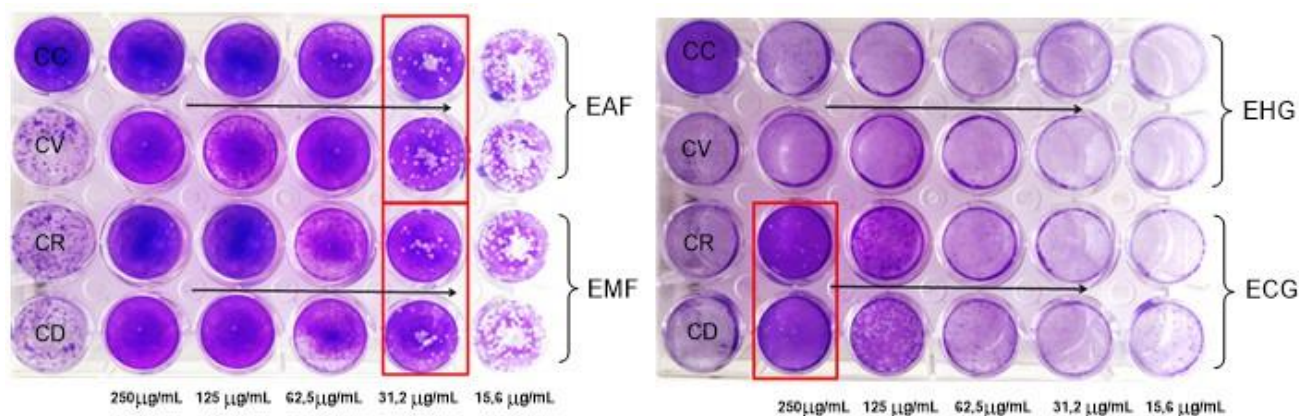
A citotoxicidade para células VERO e a atividade antiviral global contra ZIKV e MAYV foram avaliadas a partir da concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>), concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS). Os valores são apresentados nas Tabelas 15 e 16 (p. 137). Valores de CC<sub>50</sub> maiores do que 100 µg/mL indicam um extrato não tóxico. Por outro lado, valores baixos de CE<sub>50</sub> mostram uma efetiva atividade antiviral. O IS foi calculado pela relação entre a concentração do extrato que reduz a viabilidade celular para 50 % (CC<sub>50</sub>) e concentração necessária para inibir o efeito citopático para 50 % (CE<sub>50</sub>).

**Tabela 15.** Concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) para células Vero, concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) contra ZIKV e índice de seletividade (IS) dos extratos de *T. micrantha* (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019)

Extratos	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
<b>EHF</b>	157,2 ± 14,2	59,1 ± 12,5	2,7
<b>EAF</b>	224,9 ± 23,8	74,2 ± 4,9	3,0
<b>EMF</b>	351,5 ± 22,4	83,1 ± 12,1	4,2
<b>EHG</b>	181,9 ± 12,5	38,7 ± 4,9	4,7
<b>ECG</b>	370,8 ± 43,5	38,5 ± 8,2	9,6
<b>EAG</b>	191,9 ± 37,1	67,3 ± 10,6	2,9

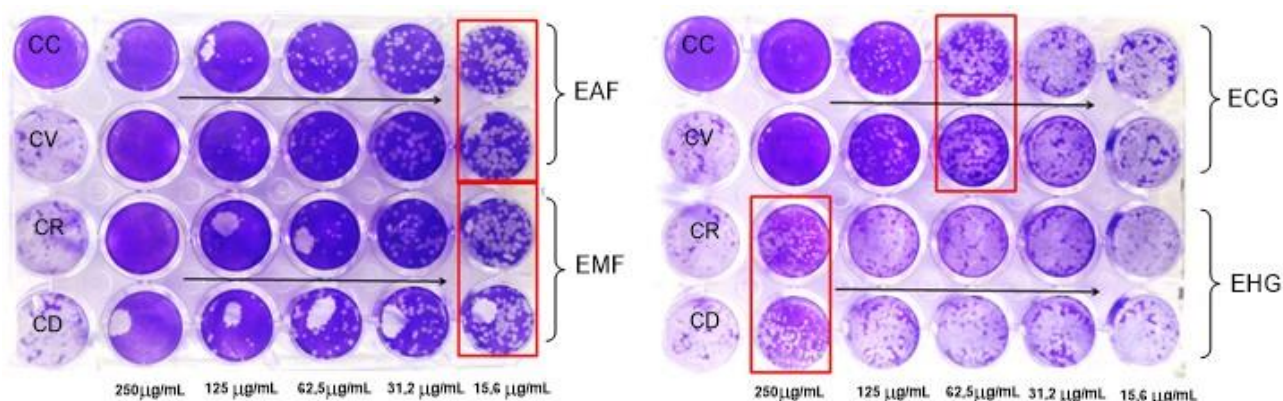
Todos os extratos testados não apresentaram toxicidade frente a células Vero, pois seus valores de  $CC_{50}$  são maiores que  $100 \mu\text{g/mL}$ . Os valores de  $CE_{50}$  variaram de  $38,5$  a  $83,1 \mu\text{g/mL}$ , indicando que os extratos apresentam atividade anti-ZIKV. Os extratos **EMF**, **EHG** e **ECG** apresentaram os maiores IS, indicando importante efeito inibitório viral. Todos os extratos com IS maior que três foram avaliados em diferentes estágios da infecção do ZIKV (adsorção e penetração da partícula viral), assim como os seus efeitos virucida.

No estágio de adsorção, as células Vero foram pré tratadas com os extratos antes da infecção para verificar as interações com receptores celulares. Os extratos **EAF** e **EMF** apresentaram uma atividade mais pronunciada com  $CE_{50}$  de  $31,2 \mu\text{g/mL}$  (Figura 80). Estes valores de concentrações dos extratos de folhas são similares aqueles relatados por Tan e colaboradores (2017) para o medicamento suramina, o qual induz o bloqueio de 80% da adsorção a uma concentração de  $50,0 \mu\text{g/mL}$ . O extrato **ECG** também apresentou uma significativa atividade antiviral na concentração de  $125 \mu\text{g/mL}$ , mostrando placas de lise em menores quantidades quando comparadas com o controle viral não tratado. O extrato **EHG** não apresentou atividade nesse estágio.



**Figura 80.** Efeito dos extratos no estágio de adsorção celular do *Zika vírus*. Diminuição do dano celular por infecção viral devido ao aumento da concentração de extratos EAF, EMF, EHG e ECG. CC (controle celular) = células não tratadas e não infectadas; CV (controle ZIKV) = células infectadas pelo vírus mas não tratadas; CR (controle ribavirina) = células infectadas e tratadas com  $200 \mu\text{g/mL}$  de ribavirina; CD (controle DMSO) = células infectadas e tratadas com DMSO 0,2 % (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

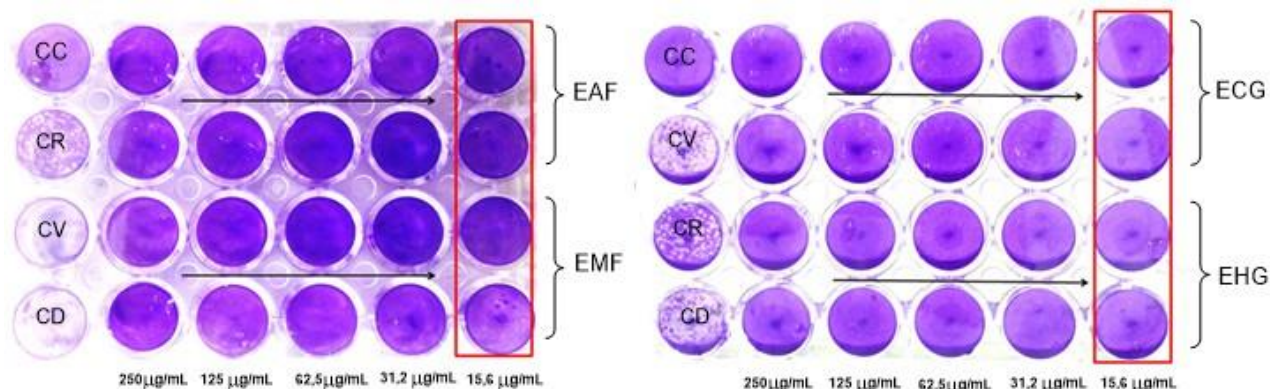
A fim de ser avaliado o estágio da penetração, as células Vero foram infectadas com ZIKV e incubadas a 4 °C por uma hora. Essa etapa foi necessária pois em baixas temperaturas as enzimas responsáveis pela penetração viral são desativadas, causando somente a adsorção na célula. Então, os extratos foram adicionados aos micropoços em diluições seriadas e a temperatura aumentada para 37 °C para reativação das enzimas. Ambos extratos das folhas, **EAF** e **EMF**, protegeram as células, mesmo nas concentrações mais baixas de 15,6 µg/mL (Figura 81) quando comparadas ao controle ribavirina, um antiviral tipo análogo nucleosídeo. O extrato **ECG** parcialmente inibiu a penetração do vírus na concentração de 62,5 µg/mL. O extrato **EHG** promoveu uma proteção parcial somente na concentração mais alta de 250 µg/mL.



**Figura 81.** Efeito dos extratos no estágio da penetração do *Zika virus*. CC (controle celular) = células não tratadas e não infectadas; CV (controle ZIKV) = células infectadas pelo vírus mas não tratadas; CR (controle ribavirina) = células infectadas e tratadas com 200 µg/mL de ribavirina; CD (controle DMSO) = células infectadas e tratadas com DMSO 0,2 % (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

A capacidade para inibir o ciclo da multiplicação viral antes da infecção celular (efeito virucida) foi avaliada pela adição das diluições seriadas dos extratos à suspensão viral (MOI = 0,1 vírus/célula) antes da incubação com as células Vero. Todos os extratos inibiram 100 % da infecção viral mesmo na mais baixa concentração testada (15,6 µg/mL), pois nenhuma placa de lise foi formada em microplacas (Figura 82, p.137).





**Figura 82.** Efeito virucida dos extratos em partículas de *Zika vírus*. CC (controle celular) = células não tratadas e não infectadas; CV (controle ZIKV) = células infectadas pelo vírus mas não tratadas; CR (controle ribavirina) = células infectadas e tratadas com 200 µg/mL de ribavirina; CD (controle DMSO) = células infectadas e tratadas com DMSO 0,2% (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

Esse ensaio demonstra que todos os extratos agem principalmente na partícula viral. Em geral, um agente antiviral eficiente deve inibir a multiplicação viral sem interferir diretamente na célula hospedeira, possibilitando a recuperação da infecção celular e manutenção metabólica. No entanto, a atividade antiviral também foi detectada para os extratos no estágio de adsorção e penetração, implicando na possibilidade de um componente celular no mecanismo.

**Tabela 16.** Concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) para células Vero, concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) contra MAYV e índice de seletividade (IS) dos extratos de *T. micrantha*

Extratos	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
<b>EHF</b>	148,4 ± 12,4	50,1 ± 5,8	2,9
<b>EAF</b>	201,5 ± 33,2	55,8 ± 2,3	3,6
<b>EMF</b>	351,5 ± 22,4	11,4 ± 8,8	30,8
<b>EHG</b>	177,7 ± 12,5	143,7 ± 31,5	1,2
<b>ECG</b>	327,9 ± 43,5	91,0 ± 14,4	3,6
<b>EAG</b>	224,4 ± 37,1	63,7 ± 5,4	3,5
<b>Ribavirina</b>	532,3 ± 42,5	118,8 ± 1,9	4,4

Os extratos **EHF**, **EAF**, **ECG** e **EAG** apresentaram CE<sub>50</sub> variando de 50,1 a 91,0 µg/mL, indicando atividade anti-MAYV em concentrações menores que a

apresentada pelo padrão ribavirina, por outro lado seus IS foram menores, indicando uma atividade global menos eficaz. O extrato **EMF** apresentou importante efeito inibitório viral, com  $CE_{50}$  de 11,4  $\mu\text{g/mL}$  e IS 30,8, indicando atividade maior que a do padrão ribavirina, um antiviral não específico. De acordo com Barros e colaboradores (2011),  $IS \geq 4$  indicam pronunciada atividade antiviral. A maior atividade antiviral contra MAYV de **EMF** pode estar relacionada à presença de flavonoides no extrato, no entanto, é importante um estudo mais detalhado, assim como a investigação nas diferentes etapas da infecção.

As atividades antivirais têm sido relatadas para algumas espécies da família Celastraceae. Kanyara e Njagi (2005) demonstraram que extratos de *Maytenus buchanani* e *M. senegalensis* foram capazes de bloquear a infecção HIV-10, e Kohn e colaboradores (2012) mostraram que extratos de *M. ilicifolia* inibem o herpesvírus. No entanto, essa é a primeira vez que o potencial antiviral foi relatado para o gênero *Tonateleia*.

A avaliação da atividade anti-ZIKV e anti-MAYV dos compostos isolados está sendo atualmente realizada e será publicada futuramente.

## 2.4 Avaliação da atividade citotóxica

As amostras foram submetidas a avaliação da citotoxicidade contra as linhagens tumorais humanas de células de leucemia mieloide aguda (THP-1ATCC-TIB-202), células de leucemia mieloide crônica (K562 ATCC-CRL-3344) e células de carcinoma mamário (MDA-MB-231ATCC-HTB-26). A linhagem normal Wi-26VA4 (células de fibroblastos de pulmão, ATCC- CCL-75) foi utilizada para estabelecer o índice de seletividade.

### 2.4.1 Metodologia

#### 2.4.1.1 Cultivo celular

As linhagens utilizadas foram mantidas congeladas em meio de cultura RPMI1640 com 10 % de soro fetal bovino (SFB), em criotubos com 5 % de DMSO. Para o cultivo, os conteúdos dos criotubos foram descongelados e transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL, contendo 2 mL de meio RPMI-1640 com 10 % SFB.



Em seguida foram submetidos à centrifugação em 800 rpm, por 5 minutos (centrífuga CS-6R, Beckman, EUA), e o sobrenadante foi descartado. A massa celular obtida foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi transferida para uma garrafa plástica de cultivo celular T75 (75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) (Corning Costar Inc., EUA) e mantida em estufa (Thermo elétron, EUA) a 37 °C com atmosfera úmida de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Após a adesão celular realizou-se a manutenção da linhagem, na qual o meio foi trocado a cada 48 horas para garantir a renovação dos nutrientes. A morfologia celular e a formação de monocamada foram observadas com o auxílio de um microscópio invertido (Olympus, CKX 41).

Quando as culturas apresentavam aproximadamente 80 % de confluência fez-se um repique utilizando a solução tripsina-EDTA (0,25 %) para remover as células aderidas ao fundo da garrafa. Posteriormente foram transferidas para tubo de centrífuga de 15 mL e foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI-1640 com 10 % SFB. Esse tubo foi centrifugado por 4 minutos a 800 rpm e seu sobrenadante descartado. A massa celular foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura novo. Desta suspensão de células foram retirados 50 µL e misturados com 50 µL de azul de Tripán para contagem manual de células viáveis em câmara de Neubauer. O azul de Tripán corou o citoplasma de células mortas possibilitando assim a contagem de células inviáveis. Em seguida, a suspensão celular ( $1 \times 10^5$  células/100 µL por poço) foi distribuída em placas de 96 poços (Corning Costar Inc., EUA) para realização do ensaio de viabilidade celular.

#### **2.4.1.2 Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este método é baseado na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase que se encontra ativa apenas em células metabolicamente funcionais. Essa enzima reduz o sal de tetrazólio solúvel de cor amarela em um produto insolúvel de cor violeta, cristais de formazan (CARMICHAEL *et al.*,1987), cuja quantidade pode ser determinada por espectrofotometria (após a solubilização com DMSO), onde a

intensidade da cor resultante da dissolução dos cristais é proporcional à atividade da enzima e, por conseguinte, ao número de células viáveis.

Para avaliação da atividade citotóxica foi feita um plaqueamento de  $1 \times 10^6$  células em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 acrescido de 10 % de SFB. Após o plaqueamento celular, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> em ambiente úmido, para adição das amostras.

Os testes de citotoxicidade foram realizados em quatro diluições seriadas a partir da solução estoque (compostos e controle positivo em DMSO), utilizando RPMI-1640 com 1 % de suplementação de SFB. Cada concentração foi testada em triplicata e cada ensaio foi também repetido em triplicata. Como controle positivo foram utilizados os fármacos citarabina (para a linhagem TPH-1), imatinibe (para a linhagem K562) e etoposídeo (para as linhagens MDA-MB-231). Após incubação de 48 horas, o reagente MTT (100 µL, 5 mg/mL) foi adicionado a cada poço. Após três horas de incubação a 37 °C, adicionaram-se 50 µL de DMSO em cada poço para dissolver os cristais de formazan. A leitura colorimétrica foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm (Espectrofotômetro SpectraMax Plus – Molecular Devices, EUA).

A citotoxicidade foi expressa pelos valores de concentração da amostra que inibe 50 % do crescimento das células (IC<sub>50</sub>) em comparação com as células cultivadas na ausência da amostra (controle negativo). O índice de seletividade foi calculado pela razão entre o IC<sub>50</sub> obtido para as células normais (Wi-26VA4) e o obtido para as linhagens de células tumorais.

## 2.4.2 Discussão dos resultados

Os compostos isolados **TM11**, **TM21**, **TM25**, **TM26**, **TM29** e o óleo extraído de sementes de *Tontelea micrantha* (**OCP**) foram avaliados quanto às suas citotoxicidades frente a linhagens tumorais THP-1, K562 e MDA-MB-231. Os demais compostos não foram avaliados devido à baixa solubilidade em DMSO, ou por já terem sido avaliados frente a essas linhagens tumorais, em outros trabalhos relatados na literatura. Além disso, algumas substâncias não haviam sido isoladas na ocasião desses testes.

Os valores de  $IC_{50}$  e dos índices de seletividades são apresentados nas Tabelas 17 e 18, p. 141 e p. 142. Todas os compostos testados e **OCP** apresentaram citotoxicidades moderadas ( $IC_{50} < 62,50 \mu\text{g/mL}$ ) contra todas as linhagens tumorais, quando comparados aos respectivos padrões ( $IC_{50} < 12,70 \mu\text{g/mL}$ ). Os IS foram menores em todos os casos quando comparados aos medicamentos controles citarabina (IS 4,62), padrão para THP-1, e imatinibe (IS 6,63), padrão para K562, indicando menor eficácia. Por outro lado, as seletividades de todos os compostos testados e **OCP** foram maiores que aquelas do padrão etoposídeo, em todas as linhagens tumorais testadas. O etoposídeo é um medicamento usado no tratamento do câncer para retardar o crescimento de tumores. Para THP-1, os compostos **TM25**, **TM11** e **OCP** apresentaram os maiores IS, cerca de 2,5 vezes maiores que o do etoposídeo. Para K562, **TM11** (IS 1,70) e **TM29** (IS 1,76) apresentaram os maiores IS. E para MDA-MB-231, **TM21** e **TM29** apresentaram índices de seletividade (IS 2,15 e 2,25) cerca de 3 vezes maior que o do etoposídeo (IS 0,71).

**Tabela 17:** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos isolados e do óleo extraído das sementes de *T. micrantha*

Compostos	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	THP-1	K562	MDA-MB-231	WI-26VA4
<b>TM11</b>	31,30 $\pm$ 1,29	32,50 $\pm$ 2,15	39,20 $\pm$ 2,05	55,14 $\pm$ 2,57
<b>TM21</b>	46,92 $\pm$ 3,28	55,90 $\pm$ 4,88	30,45 $\pm$ 2,55	65,60 $\pm$ 3,70
<b>TM25</b>	32,62 $\pm$ 1,68	40,11 $\pm$ 2,87	45,06 $\pm$ 3,02	58,90 $\pm$ 2,50
<b>TM26</b>	62,50 $\pm$ 4,78	59,50 $\pm$ 4,05	60,10 $\pm$ 3,95	72,34 $\pm$ 3,74
<b>TM29</b>	43,15 $\pm$ 2,11	39,25 $\pm$ 1,95	30,68 $\pm$ 2,77	69,02 $\pm$ 2,88
<b>OCP</b>	32,50 $\pm$ 2,05	38,75 $\pm$ 1,80	35,30 $\pm$ 1,95	58,45 $\pm$ 3,10
<b>citarabina</b>	12,70 $\pm$ 1,20	-	-	58,70 $\pm$ 3,76
<b>imatinibe</b>	-	10,50 $\pm$ 1,05	-	69,63 $\pm$ 3,13
<b>etoposídeo</b>	12,04 $\pm$ 2,32	9,11 $\pm$ 1,33	12,00 $\pm$ 0,63	8,63 $\pm$ 0,13
<b>P valor</b>	<0,05 <sup>a</sup>	<0,05 <sup>b</sup>	<0,05 <sup>c</sup>	<0,05 <sup>d</sup>

a: THP-1, citarabina e etoposídeo vs todas as amostras testadas; b: K562, imatinibe e etoposídeo vs todas as amostras testadas; c: MDA-MB-231, etoposídeo vs todas as amostras testadas; d: Wi-26 VA4, citarabina, etoposídeo e imatinibe vs todas as amostras testadas.

**Tabela 18:** Valores de IS obtidos para os compostos isolados e óleo extraído das sementes de *T. micrantha*

Compostos	THP-1	K562	MDA-MB-231
<b>TM11</b>	1,76	1,70	1,41
<b>TM21</b>	1,40	1,17	2,15
<b>TM25</b>	1,81	1,47	1,31
<b>TM26</b>	1,16	1,22	1,20
<b>TM29</b>	1,60	1,76	2,25
<b>OCP</b>	1,80	1,51	1,66
<b>citarabina</b>	4,62	-	-
<b>imatinibe</b>	-	6,63	-
<b>etoposídeo</b>	0,72	0,95	0,71

Os resultados indicam uma atividade citotóxica moderada dos compostos e do óleo extraído das sementes de *T. micrantha*, quando comparados com os padrões. No entanto, estudos de avaliação da atividade citotóxica contra outras linhagens tumorais podem colaborar para a busca de moléculas bioativas mais eficazes para o tratamento do câncer. Além disso, outras substâncias isoladas nesse trabalho e que não foram testadas serão futuramente avaliadas.

## 2.5 Avaliação da atividade de inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase cardíaca

Alguns triterpenos pentacíclicos foram submetidos à avaliação *in silico* da atividade de inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase cardíaca. Foram avaliados 28-hidroxifriedelan-3-ona (**TM06**), friedelan-3,21-diona (**TM13**), 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (**TM14**), 30-hidroxifriedelan-3-ona (**TM16**), friedelan-3-oxo-28-al (**TM17**) e friedelan-1,3,21-triona (**TM19**).

### 2.5.1 *Docking* molecular

Para o estudo de *docking* molecular utilizou-se a estrutura da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, PDB 3A3Y, cocristalizada com a ouabaína obtida do banco de dados *Protein Data Bank* e o *software* Autodock vina. Os compostos avaliados foram preparados e tiveram sua geometria e energia minimizados no programa ChemBioDraw e foram também submetidos a minimização de energia pelo Merck Molecular Force Field (MMFF94). As interações foram avaliadas nos aspectos de menor energia de ligação (Kcal/mol), número de ligações de hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da macromolécula e os compostos testados.

### 2.5.2 Discussão dos resultados

Os TTPC avaliados apresentaram energia de Gibbs muito próximas a do inibidor ouabaína, mas **TM19** exibiu uma energia menor que a do inibidor seletivo, mostrando um bom potencial de inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase cardíaca. Além disso, todos os compostos exibiram interações hidrofóbicas e interagiram com o aminoácido Phe790, constituinte do sítio ativo da enzima. Esses resultados indicam que os TTPC avaliados podem exibir atividade de inibição da enzima.

Dessa forma, foram realizados testes biológicos de dosagem da atividade da enzima na presença dos triterpenos testados. Esses testes bem como os resultados encontrados fazem parte do trabalho de conclusão de curso da aluna Maria Cecília Lelis, defendido em julho de 2019, sob orientação da Professora Doutora Clarice de Carvalho Veloso Moura, da Universidade Federal do Amazonas (LELIS, 2019). Os testes *in vitro* sugeriram que, de forma geral, os TTPC avaliados apresentaram uma tendência gradativa em aumentar a atividade enzimática, em concentrações entre 1-10 µmol/L, seguida por uma tendência gradativa em diminuir a atividade, em concentrações entre 50-200 µmol/L. No entanto, apesar de todos TTPC testados exibirem uma tendência em diminuir a atividade enzimática nas concentrações de 200 µmol/L, não é possível afirmar que há um grau de inibição, pois não houve relevância estatística. A diferença observada entre os resultados das análises *in silico* e *in vitro* pode ocorrer por alguns fatores, como ausência de interferentes no *docking* molecular, como pH, presença de cátions que regulam a atividade enzimática, água, dentre outros.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico de folhas, galhos e raízes de *Tontelea micrantha* (Celastraceae) e o estudo da atividade biológica de extratos e alguns compostos isolados. Foram fracionados, utilizando cromatografia em coluna: sólido do extrato hexânico das folhas (**SHF**), extrato hexânico das folhas (**EHF**), extrato acetato de etila das folhas (**EAF**), extrato metanólico das folhas (**EMF**), sólido do extrato hexânico dos galhos (**SHG**), extrato hexânico dos galhos (**EHG**), extrato clorofórmico dos galhos (**ECG**), extrato acetato de etila dos galhos (**EAG**), extrato metanólico dos galhos (**EMG**), extrato hexânico das raízes (**EHR**) e extrato clorofórmico das raízes (**ECR**). Trinta e uma substâncias foram obtidas e identificadas utilizando métodos espectroscópicos como infravermelho e ressonância magnética nuclear unidimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135) e bidimensional (HSQC, HMBC, COSY, NOESY). O estudo biológico incluiu as avaliações das atividades antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), antiviral, citotóxica e de inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cardíaca.

Foram isolados os seguintes compostos: friedelina,  $3\beta$ -friedelinol, ácido 3,4-seco-friedelanoico, 28-hidroxifriedelan-3-ona, friedelan-3,21-diona,  $21\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona,  $21\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona, friedelan-1,3,21-triona, friedel-1-en-3,21-diona, 30-hidroxifriedelan-3-ona, 3-oxo-friedelan-28-al, ácido 3-oxo-friedelan-28-oico,  $21\alpha, 30$ -di-hidroxifriedelan-3-ona, 28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona, 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona, tingenina B, netzahualcoiona, netzahualcoiondiol, salaquinona A, ácido ortosfênico, 3-O- $[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow 2)]$  $[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow 6)]$ - $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina, 3-O- $[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow 6)]$ - $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina (rutina), epiafzelequina ( $4\beta\rightarrow 8$ )-epicatequina, epicatequina,  $\beta$ -sitosterol,  $3\beta$ -glicosil- $\beta$ -sitosterol, 2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano, dulcitol, mistura de ácidos graxos, guta percha e o esqualeno.

Os triterpenos pentacíclicos friedelan-1,3,21-triona, friedel-1-en-3,21-diona e o sesquiterpeno de esqueleto di-hidro- $\beta$ -agarofurano, 2,3,6,15-tetra-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-8-oxo- $\beta$ -agarofurano, são inéditos. Todas as substâncias foram isoladas pela primeira vez no gênero *Tontelea*.

O estudo da atividade antiviral foi realizado frente a Mayaro e Zika vírus e foram avaliados os extratos de folhas e galhos (**EHF**, **EAF**, **EMF**, **EHG**, **ECG** e **EAG**). O extrato **EMF** apresentou importante efeito inibitório anti-Mayaro com  $CE_{50}$  de 11,4  $\mu\text{g/mL}$  e IS 30,8, indicando atividade maior que a do padrão ribavirina. Todos os extratos das folhas e galhos mostraram atividade anti-Zika, e foram investigados os efeitos dos extratos nas diferentes etapas da infecção e o efeito virucida. Os extratos **EAF** e **EMF** apresentaram inibição da adsorção viral na concentração de 31,2  $\mu\text{g/mL}$  e inibição da penetração viral em concentrações mais baixas do que 15,6  $\mu\text{g/mL}$ .

Os extratos de folhas e galhos foram avaliados frente a nove bactérias Gram-negativas, seis bactérias Gram-positivas e quatro espécies de *Candida*, no entanto não apresentaram atividade.

Os compostos rutina (**TM11**), epicatequina (**TM25**), agarofurano (**TM26**), ácido 3-oxo-friedelan-28-oico (**TM21**), netzahualcoiondiol (**TM29**) e o óleo das sementes (**OCP**) foram avaliados frente às linhagens de células de leucemia mieloide aguda (THP-1), mieloide crônica (K562) e frente às linhagens de células de carcinoma mamário (MDA-MB-231) apresentando atividade moderada.

No estudo da atividade de inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cardíaca, foram avaliados 28-hidroxifriedelan-3-ona (**TM06**), friedelan-3,21-diona (**TM13**), 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (**TM14**), 30-hidroxifriedelan-3-ona (**TM16**), friedelan-3-oxo-28-al (**TM17**) e friedelan-1,3,21-triona (**TM19**). Foi realizado ensaio de *docking* molecular e os resultados indicaram que os TTPC avaliados poderiam exibir atividade de inibição da enzima. Testes *in vitro* de dosagem da atividade da enzima na presença desses triterpenos indicaram que não houve interferência dos TTPC avaliados na atividade enzimática.

Este trabalho colabora para o estudo quimiotaxonômico de espécies da família Celastraceae e mostra que *Tontelea micrantha* é uma importante fonte de metabólitos secundários, especialmente triterpenos pentacíclicos e flavonoides, com potencial atividade biológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, P. K.. Carbon-13 NMR of Flavonoids, 1ª Ed. Elsevier, New York, **1989**.

Albuquerque, D. C. D.; Souza Neto, J. D. D.; Bacal, F., Rohde, L. E. P.; Bernardes-Pereira, S.; Berwanger, O.; Almeida, D. R.. I registro brasileiro de insuficiência cardíaca—aspectos clínicos, qualidade assistencial e desfechos hospitalares. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 104(6), p. 433-442, **2015**.

Alvarenga, N.; Ferro, E. A.. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, p. 239-307, **2006**.

Baltz, R. H.. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46, p. 281-299, **2019**.

Barros, C.; Moura, L.; Brito, L. M.; Matos, O.. Actividade antimicrobiana de extractos e óleos essenciais de coentro, oregão e poejo, e seu potencial para a protecção das culturas em horticultura biológica. 3º Colóquio Nacional de Horticultura e 1º Colóquio Nacional de Produção Animal Biológica, **2011**.

Barrows, N. J.; Campos, R. K.; Powell, S. T.; Prasanth, K. R.; Schott-Lerner, G.; Soto-Acosta, R.; Wu, P. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host & Microbe*, 20(2), p. 259-270, **2016**.

Cannell, R. J. P. Natural Products Isolation, 4. Springer Science & Business Media, **1998**.

Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B.. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47(4), p. 936-942, **1987**.

Cevatemre, B.; Botta, B.; Mori, M.; Berardozi, S.; Ingallina, C.; Ulukaya, E. (2016). The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-biological Interactions*, 260, p. 248-255, **2016**.

Chan, S. L.; Wong, V. W.; Qin, S.; Chan, H. L.. Infection and cancer: the case of hepatitis B. *Journal of Clinical Oncology*, 34(1), p. 83-90, **2016**.



- Chaudhuri, A.; Sharma, S. Natural products effective for management of cancer – Review. *Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 5(2), p. 38-44, **2017**.
- Corsino, J.; Carvalho, P. R. F.; Kato, M. J.; Latorre, L. R.; Oliveira, O. M. M. F.; Araújo, A. R.; Bolzani, V. da S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. *Phytochemistry*, 55(7), p. 741-748, **2000**.
- Cruz, W. S.; Ferraz, A. C.; Lima, W. G.; Moraes, T. F. S.; Ferreira, F. L.; Ferreira, J. M. S.; De Magalhães, J. C.; Duarte, L. P.; Vieira-Filho, S. A.; Magalhães, J. C.. Evaluation of the activity of *Tontelea micrantha* extracts against bacteria, Candida and Mayaro virus. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 9(1), p. 21-26, **2019**.
- da Silva, F. M.; Paz, W. H.; Vasconcelos, L. S. F.; da Silva, A. L.; da Silva-Filho, F. A.; de Almeida, R. A.; Koolen, H. H.. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith collected at the Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, p. 77-80, **2016**.
- da Silveira, E. Vacina da dengue: a corrida pela imunização que envolve pesquisadores brasileiros, japoneses e Americanos. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-46865264>. Acesso em 02-07-2019.
- Deeb, D.; Gao, X.; Liu, Y. B.; Pindolia, K.; Gautam, S. C.. Pristimerin, a quinonemethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- $\kappa$ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 44(5), p. 1707-1715, **2014**.
- Duan, H.; Takaishi, Y.; Momota, H.; Ohmoto, Y.; Taki, T.; Jia, Y.; Li, D.. Triterpenoids from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*, 53(7), p. 805-810, **2000**.
- Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A.; Silva, G. D. F.; Sousa, J. R.; Pinto, A. S. Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, p. 109-112, **2002**.

EM. Casos de dengue já superam epidemia de 2010. Disponível em: [www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/04/16/interna\\_gerais,1046584/casos-de-dengue-em-2019-ja-superam-epidemia-de-2010.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/04/16/interna_gerais,1046584/casos-de-dengue-em-2019-ja-superam-epidemia-de-2010.shtml). Acesso em 15-05-2019.

Ferreira, F.L. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **2014**.

Ferreira, F. L.; Hauck, M. S.; Duarte, L. P.; Magalhães, J. C. D.; da Silva, L. S.; Pimenta, L. P., Vieira Filho, S. A.. Zika Virus activity of the leaf and branch extracts of *Tontelea micrantha* and its hexane extracts phytochemical study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(4), p. 793-803, **2019**.

Fonseca, A. P. N. D. D.; Silva, G. D. F.; Carvalho, J. J.; Salazar, G. D. C. M., Duarte, L. P.; Silva, R. P.; Peres, V.; Jorge, R. M.; Tagliati, C. A., Zani, C. L.; Alves, T. M. A.; Vieira-Filho, S. A.. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Química Nova*, 30 (4), p.842-847, **2007**.

Gomes, J. P.; Cardoso, C. R.; Varanda, E. A.; Molina, J. M.; Fernandez, M. F.; Olea, N.; Vilegas, W.. Antitumoral, mutagenic and (anti) estrogenic activities of tingenone and pristimerin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), p. 963-971, **2011**.

González-Coloma, A.; López-Balboa, C.; Santana, O.; Reina, M.; Fraga, B. M.. Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry Reviews*, 10, p. 245–260, **2011**.

Herrmann, T. L.; Kling, A.; Baumann, S.; Huttel, S.; Petkovic, H.; Muller, R.. Strategies for the Discovery and Development of New Antibiotics from Natural Products: Three Case Studies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, p. 339-363, **2016**.

Jeller, A. H.; Silva, D. H. S.; Lião, L. M.; da Silva Bolzani, V.; Furlan, M.. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. *Phytochemistry*, 65(13), p. 1977-1982, **2004**.

Jung, J.; Seo, J.; Kim, J.; Kim, J. H.. Ursolic acid causes cell death in pc-12 cells by inducing apoptosis and impairing autophagy. *Anticancer Research*, 38(2), p. 847-853, **2018**.

Kanyara, J. N.; Njagi, E. N. M. Anti-HIV-1 activities in extracts from some medicinal plants as assessed in an in vitro biochemical HIV-1 reverse transcriptase assay. *Phytotherapy Research*, 19(4), 287-290, **2005**.

Kashiwada, Y.; Iizuka, H.; Yoshioka, K.; Chen, R. F.; Nanaka, G. I.; Nishioka, I.. Tannins and Related Compounds. XCIII.: Occurrence of Enantiomeric Proanthocyanidins in the Leguminosae Plants, *Cassia fistula* L. and *C. javanica* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38(4), p. 888-893, **1990**.

Kohn, L. K.; Queiroga, C. L.; Martini, M. C.; Barata, L. E.; Porto, P. S. S.; Souza, L.; Arns, C. W.. In vitro antiviral activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba rosaeodora*) against bovine herpesvirus type 5 and avian metapneumovirus. *Pharmaceutical Biology*, 50(10), p. 1269-1275, **2012**.

Kühlbrandt, W.. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. Nature reviews. *Molecular cell biology*, 5(4), p. 282, **2004**.

Lelis, M. C. S.. Efeito de triterpenos pentacíclicos de *Tontelea micrantha* sobre a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase cardíaca. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, **2019**.

Li, Y.Z.; Li, Z.L.; Yin, S.L.; Shi, G.; Liu, M.S.; Jing, Y.K.; Hua, H.M.. Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. *Fitoterapia*, 81, p. 586-589, **2010**.

Lim, S.P., Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antiviral Research*, 163, p. 156-178, **2018**.

Lin, L. T.; Hsu, W. C.; Lin, C. C.. Antiviral Natural Products and Herbal Medicines. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4, p. 24-35, **2014**.

Lopes, R. D.; Rordorf, R.; De Ferrari, G. M.; Leonardi, S.; Thomas, L.; Wojdyla, D. M.; Hanna, M.. Digoxin and mortality in patients with atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(10), p. 1063-1074, **2018**.

Mahato, S. B.; Kundu, A. P.. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37, p. 1517-1575, **1994**.

Malta, J. M. A. S.; Vargas, A.; Leite, P.L.; Percio, J.; Coelho, G.E.; Ferraro, A.H.A.; Cordeiro, T.M.O.; Dias, J.S.D.; Saad, E.. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 26(1), **2017**.

Mbaveng, A. T.; Sandjo, L. P.; Tankeo, S. B.; Ndifor, A. R.; Pantaleon, A., Nagdjuj, B. T.; Kuete, V.. Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. *Springer Plus*, 4(1), p. 823, **2015**.

Medeiros, V. M.; Filho, J. G. S.; Lucio, A. S. S. C.; Tavares, J. F.; Maia, G. L. A.; Lima, E. O.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, M. S.. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from leaves of *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae). *Journal of Essential Oil Research*, 22, p. 466-469, **2010**.

Mena-Rejón, G. J.; Pérez-Espadas, A. R.; Moo-Puc, R. E.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez-Díaz, I. A.; Quijano, L.. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, 70, p. 863-865, **2007**.

Mercadante-Simões, M. O.; Paiva, E. A. S.. Leaf colleters in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural Aspects; C. R. *Biologies*, 336, p. 400-406, **2013**.

Mercadante-Simoes, M. O.; Mazzottini-dos-Santos, H. C.; Nery, L. A.; Ferreira, P. R.; Ribeiro, L. M.; Royo, V. A.; OLIVEIRA, D. A.. Structure, histochemistry and phytochemical profile of the bark of the sobol and aerial stem of *Tontelea micrantha* (Celastraceae-Hippocrateoideae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(3), p. 1167-1179, **2014**.

Mercadante-Simões, M. O.; Paiva, E. A. A.. Anatomy and ultrastructure of the floral nectary of *Tontelea micrantha* (Celastraceae: Salacioideae). *Plant Species Biology*, 31(2), p. 117-124, **2015**.

- Moiteiro, C., Justino, F.; Tavares, R.; Marcelo-Curto, M. J.; Florêncio, M. H.; Nascimento, M. S. J.; Pedro, M.; Cerqueira, F.; Pinto, M. M. M.. Synthetic secofriedelane and friedelane derivatives as inhibitors of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines in vitro. *Journal of Natural Products*, 64(10), p.1273-1277, **2001**.
- Morikawa, T.; Kishi, A.; Pongpiriyadacha, Y.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M.. Structures of New Friedelane-Type Triterpenes and Eudesmane-Type Sesquiterpene and Aldose Reductase Inhibitors from *Salacia chinensis*. *Journal of Natural Products*, 66(9), p. 1191-1196, **2003**.
- Morita, H.; Hirasawa, Y.; Muto, A.; Yoshida, T.; Sekitab, S.; Shirotab, O.. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, p. 1050-1052, **2008**.
- Nações Unidas Brasil. Casos de câncer devem aumentar 70% até 2038, calcula OMS. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/casos-de-cancer-devem-aumentar-70-ate-2038-calcula-oms/> . Acesso em 10 de maio 2019.
- Nandi, K.M.; Garabadu, D.; Singh, T.D.; Singh, V.P.; S. F.; Cardoso, L. G. V.; Carvalho, J. C. T.; Bastos, J. K.. Physicochemical and phytochemical standardization of fruit of *Sesbania grandiflora*. *Der Pharmacia Lettre*, 8(5), p. 297, **2016**.
- Newman. D.J.; Cragg, G.M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, p. 629-661, **2016**.
- Nguyen, V.D; Tran, T.V.. Friedelane triterpenoids from the plant of *Bischofia trifoliata* (Roxb.) Hook. f. growing in Vietnam. *Tap Chi Duoc Hoc*, 49 (3), p. 37-41, **2009**.
- Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirono, S.; Kasai, R.; Chang, J. J.; Lee, K. H. Antitumor agents, 116. Cytotoxic triterpenes from *Maytenus diversifolia*. *Journal of Natural Products*, 53(4), p. 1039-1041, **1990**.
- Núñez, M. J.; Jimenez, I. A.; Mendoza, C. R.; Chavez-Sifontes, M.; Martinez, M. L.; Ichiishi, E.; Tokuda, R.; Tokuda, H.; Bazzocchi, I. L.. Dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae species as anti-tumour-promoting agents: Structure-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 111, p. 95-102, **2016**.

- Oliveira, D. M.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Rissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, p. 661-665, **2006**.
- Oliveira, C. S. D.; Vasconcelos, P. F. D. C. Microcephaly and Zika virus. *Jornal de Pediatria*, 92(2), p. 103-105, **2016**.
- Oliveira, D. M.. Estudo químico, farmacológico e aplicação de métodos computacionais na elucidação estrutural de constituintes químicos de folhas de *Maytenus acanthophylla* REISSEK (CELASTRACEAE). Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. **2012**.
- Paduch, R.; Kandefer-Szerszen, M.. Antitumor and antiviral activity of pentacyclic triterpenes. *Mini Reviews in Organic Chemistry*, 11(3), p. 262-268, **2014**.
- Patra, A.; Mukhopadhyay, A.K.; Mitra, A.K.. Carbon-13 resonance assignments of some friedelanes and taraxasteranes. *Organic Magnetic Resonance*, 17, p. 166, **1981**.
- Patra, A.; Chaudhuri, S. K. Assignment of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of some friedelanes. *Magnetic resonance in chemistry*, 25(2), p. 95-100, **1987**.
- Piet, M. Paduch, R.. Ursolic and oleanolic acids as potential anticancer agents acting in gastrointestinal tract. *Mini Reviews in Organic Chemistry*, 16(1), p. 78-91, **2019**. Disponível em <https://doi.org/10.2174/1570193X15666180612090816>
- Queiroga, C. L.; Silva, G. F.; Dias, P. C.; Possenti, A.; Carvalho, J. E.. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 $\beta$ -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 72, p. 465-468, **2000**.
- Rai, N. P.; Adhikari, B. B.; Paudel, A.; Masuda, K.; Mckelvey, R. D.; Manandhar, M. D.. Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *Journal of Nepal Chemical Society*, 21, p. 1-7, **2006**.

Rodrigues, V. G.; Duarte, L. P.; Silva, R. R.; Silva, G. D.; Mercadante-Simões, M. O.; Takahashi, J. A.; Vieira Filho, S. A.. *Salacia crassifolia* (Celastraceae): chemical constituents and antimicrobial activity. *Quimica Nova*, 38(2), p. 237-242, **2015**.

Romero-Benavides, J.C.; Ruano, A.L.; Silva-Rivas, R.; Veintimilla, P.C.; Jaramillo, S.V.; Moscoso, N. B.. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 129, p. 209-217, **2017**.

Sande, D.; Colen, G.; dos Santos, G. F.; Ferraz, V. P.; Takahashi, J. A.. Production of omega 3, 6, and 9 fatty acids from hydrolysis of vegetable oils and animal fat with *Colletotrichum gloeosporioides* lipase. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), p. 537-545, **2018**.

Savoia, D.. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8), p. 979-990, **2012**.

SDBS. Disponível em [http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)  
Acesso em 05 de Maio, **2017**.

Seo, W. D.; Lee, D. Y.; Park, K. H.; & Kim, J. H.. Downregulation of fungal cytochrome c peroxidase expression by antifungal quinonemethide triterpenoids. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 59(4), p. 281-284, **2016**.

Setzer, W.N.; Setzer, M.C.; Peppers, R.L.; McFerrin, M.B.; Meehan, E.J.; Chen, L.; Bates, R.B.; Nakkiew, P.; Jackes, B.R.. Triterpenoid constituents in the bark of *Balanops australiana*. *Australian Journal of Chemistry*, 53(9), p. 809, **2000**.

Shan, W. G.; Zhang, L. W.; Xiang, J. G.; Zhan, Z. J.. Natural Friedelanes. *Chemical Biodiversity*, 10, p. 1392-1434, **2013**.

Shen, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell*, 163(6), p. 1297-1300, **2015**.

Silva, F. C.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Filho, S. A. V.; Lula, I. S.; Takahashi, J. A.; Sallum, W. S. T.. Chemical constituents from branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and evaluation of antimicrobial activity. *Journal Brazilian Chemical Society*, 22(5), p. 943-949, **2011**.

- Silva, M. O.; Aquino, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 8(4), p. 472-482, **2018**.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Ed LTC, 7ª ed, **2005**.
- Srinroch, C.; Sahakitpichan, P.; Chimnoi, N.; Ruchirawat, S.; Kanchanapoom, T.. Flavonol triglycosides from *Magnolia utilis*. *Phytochemistry Letters*, 29, 57-60, **2019**.
- Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S.. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chemical Society Reviews*, 31, p. 43-59, **2002**.
- Tan, C. W.; Sam, I. C.; Chong, W. L.; Lee, V. S.; Chan, Y. F.. Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection. *Antiviral Research*, 143, p. 186-194, **2017**.
- Tortora, G.; Kunke, B. R.; Case, C. L. Microbiologia. 10 ed. Artmed, **2012**.
- Venegas-Casanova, E. A.; Reyes, S. G. R.; Valencia, J. G. G.; Steve, C. B. K.; Vallejos, Y. F. C.; Campos, J. E. V.; Castillo, S. M. B.; Cuéllar, A. C. New Source of Rutin from the Flowers of *Cordia lutea* (Boraginaceae). *Annual Research & Review in Biology*, p. 1-7, **2018**.
- Vieira-Filho, S.A.; Duarte, L. P.; Santos, M. H.; Silva, G. D. F.; Lula, I. S. Total assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of two 3,4-seco-friedelanes from *Austroplenkia populnea*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39 (12), p. 746-748, **2001**.
- Zhang, C. Y.; Li, M. H.; Chen, G. L.; Guo, M. Q.. In situ headspace analysis of metabolic carbon dioxide of aerobic bacteria for assessing antimicrobial activity of natural products. *Journal of Chromatography A*, **2019**. No prelo. doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.039
- Zheng-Hong, G.; Xi, R.; Wang, X.; Wu, L.; Gao, H.. A new trincallane derivative from *Salacia hainanensis* Chun et How. *Acta pharmaceutica Sinica*, 44(10), p. 1123-1126, **2009**.
- Xiao, S.; Tian, Z.; Wang, Y.; Si, L.; Zhang, L.; Zhou, D.. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. *Medicinal Research Reviews*, 38(3) p. 951-976, **2018**.



## ESPECTROS

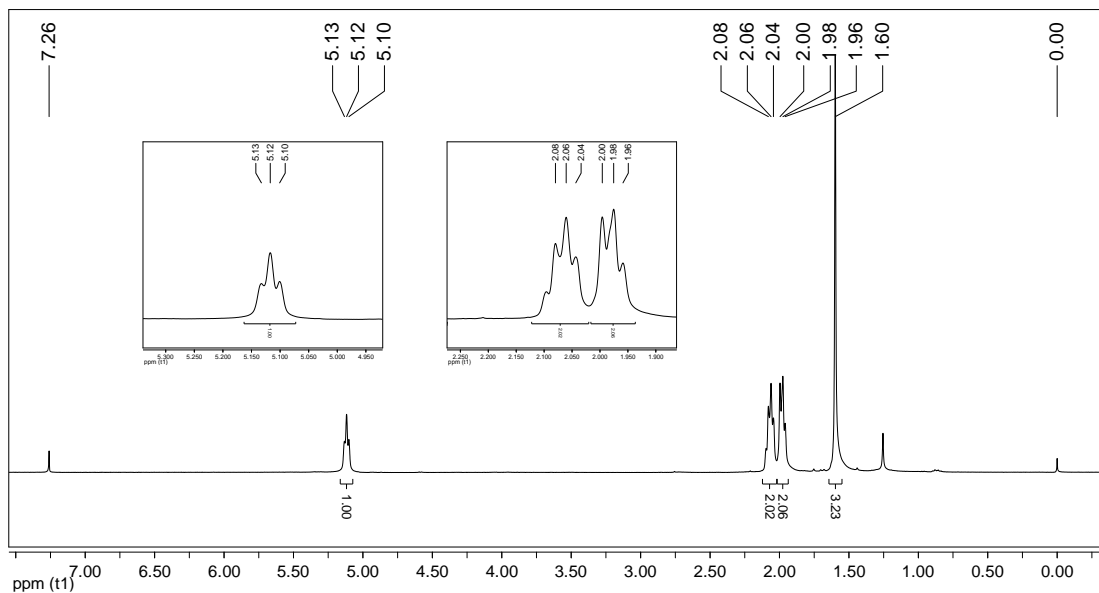
TM01: 1,4-*trans*-poli-isopreno (guta-percha)

Figura 1A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM01** em  $\text{CDCl}_3$  (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

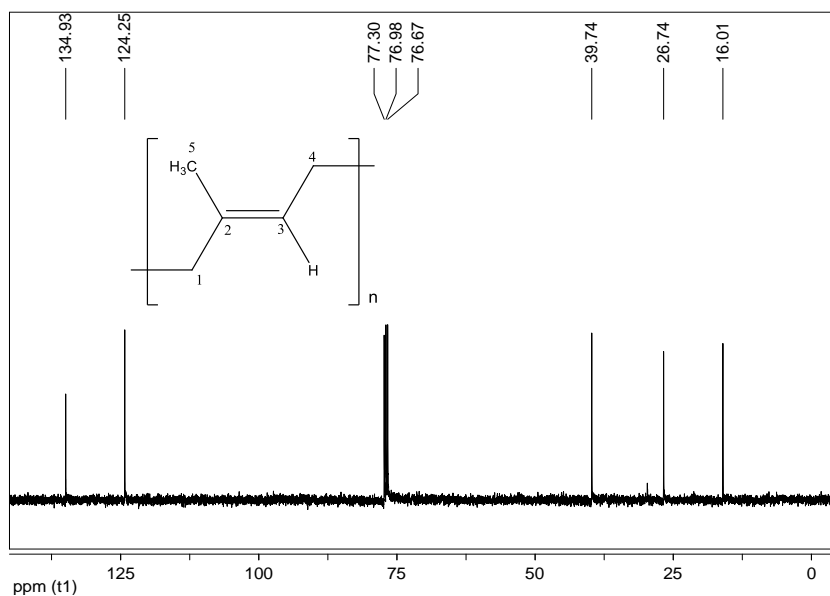
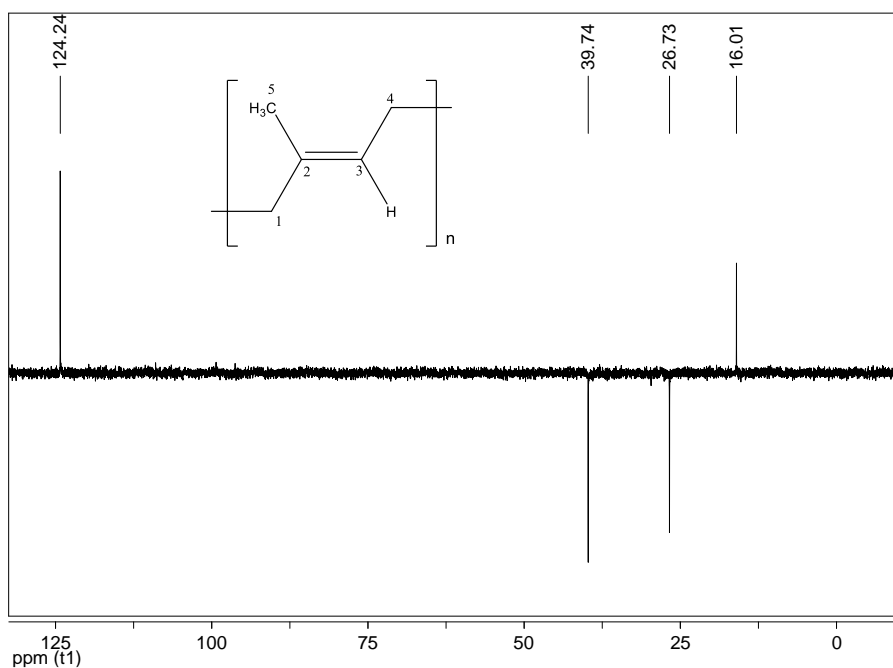
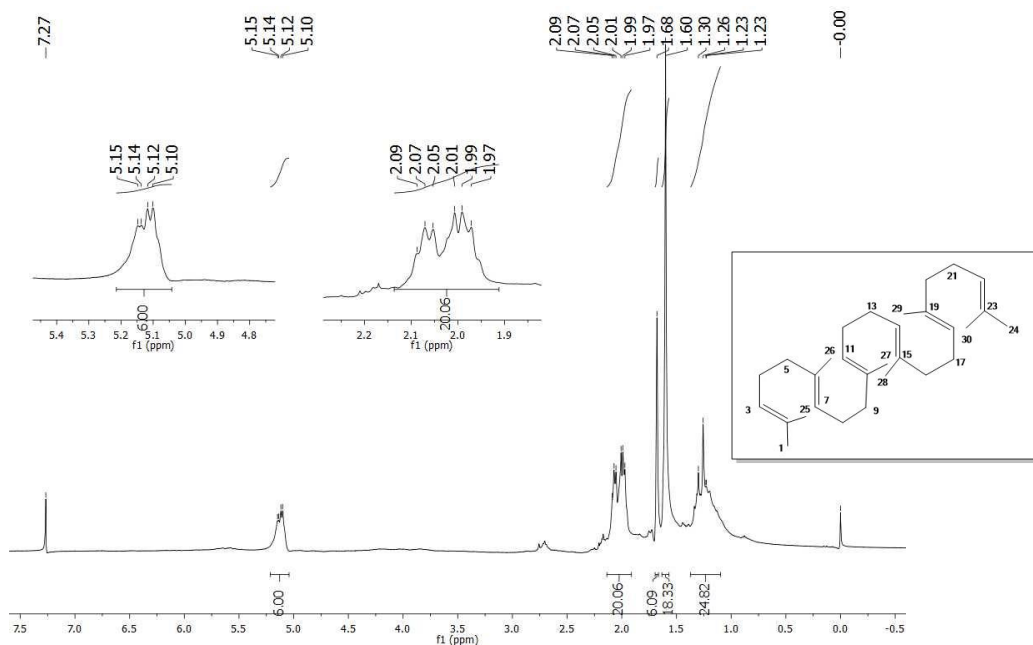


Figura 2A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM01** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

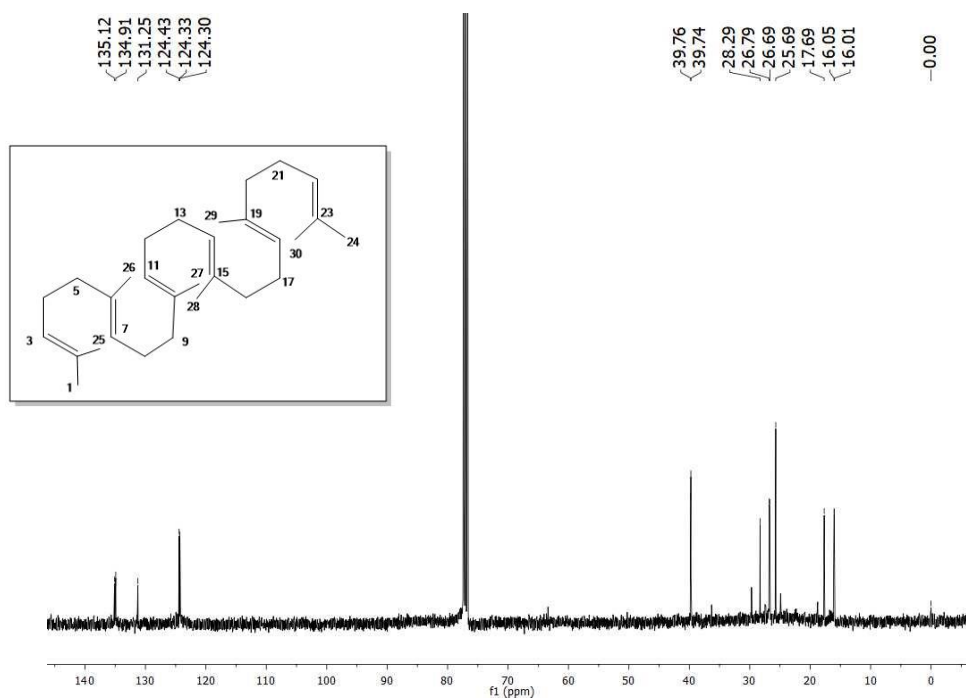


**Figura 3A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM01** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

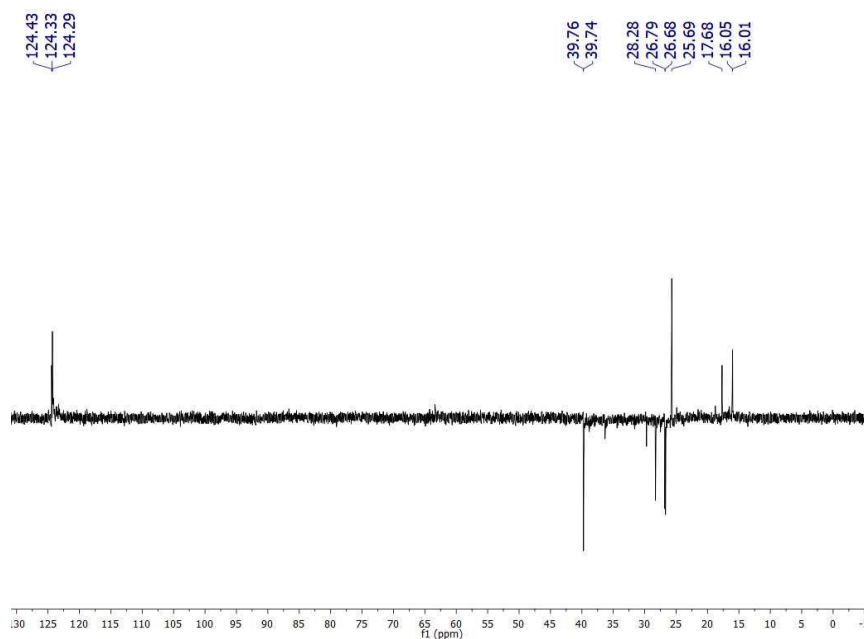
## TM02: esqualeno



**Figura 4A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM02** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 5A:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM02** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 6A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM02** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

### TM03: friedelan-3-ona (friedelina)

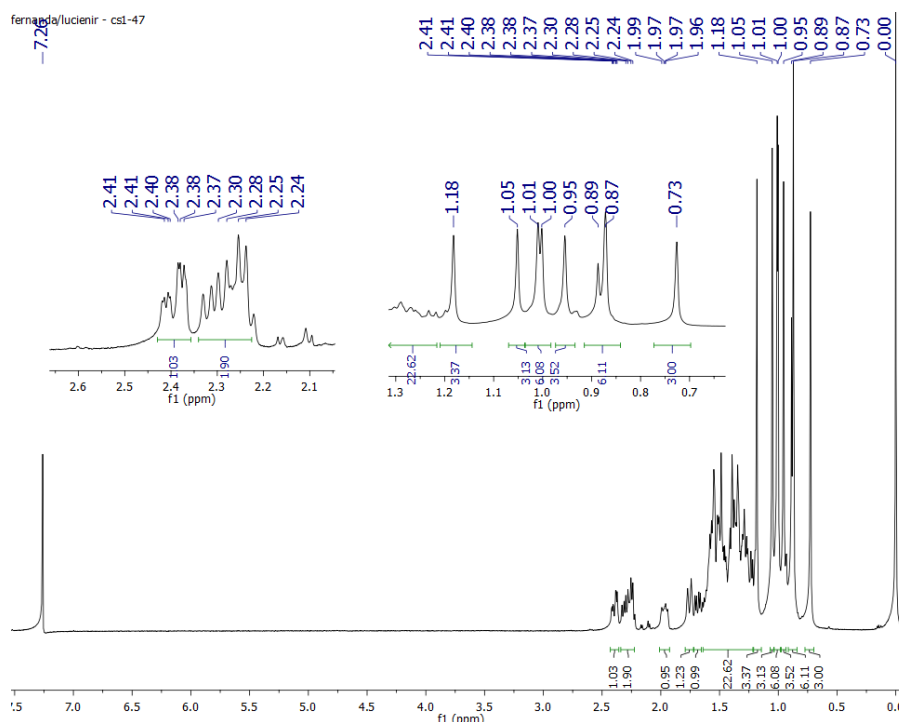


Figura 7A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM03** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

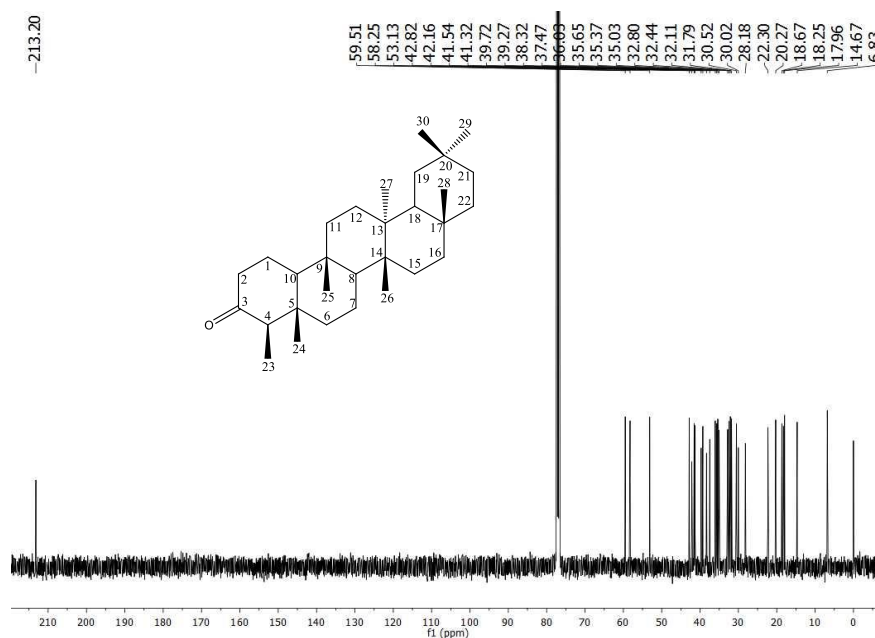
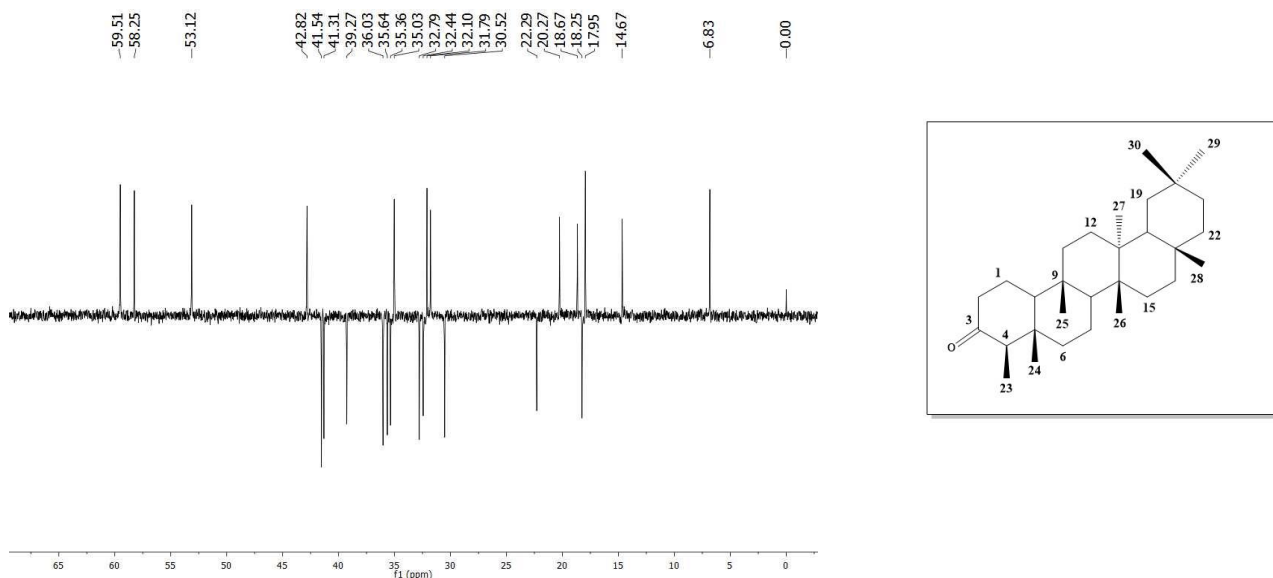
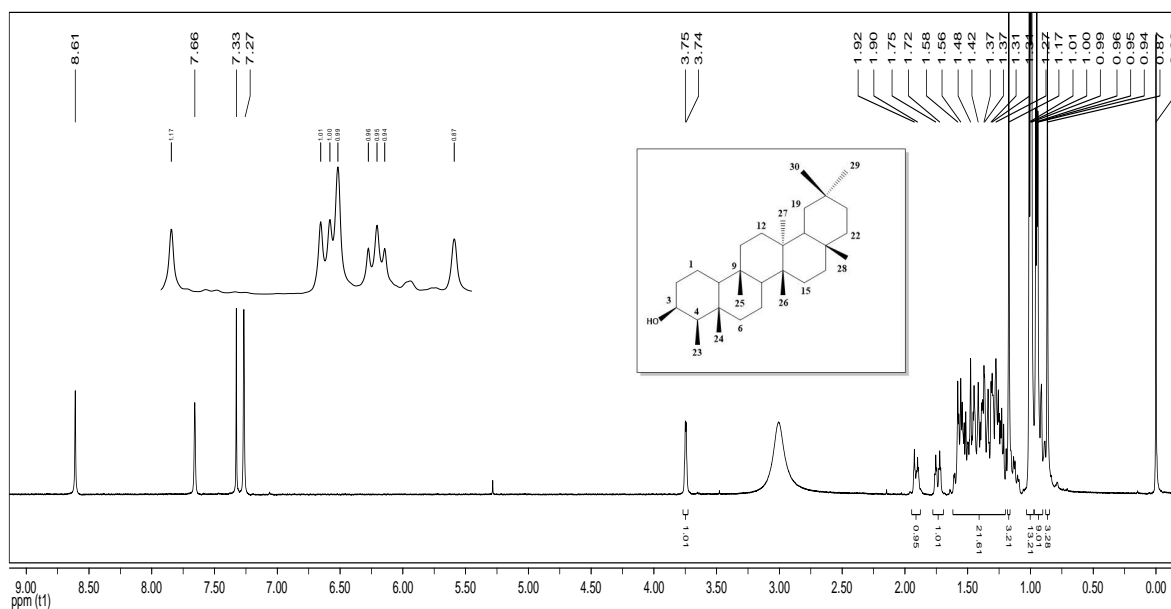


Figura 8A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM03** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

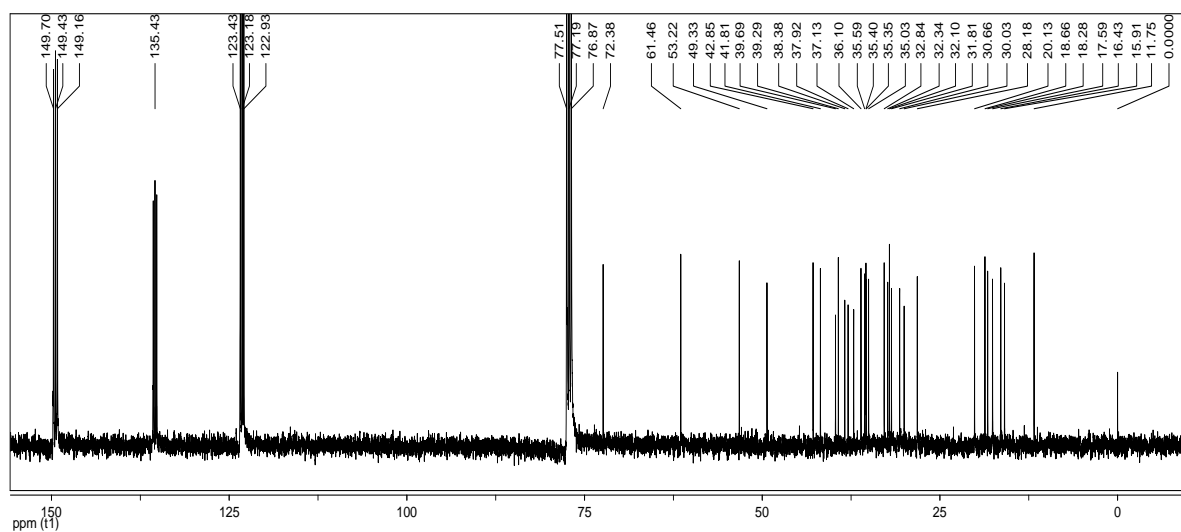


**Figura 9A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM03** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

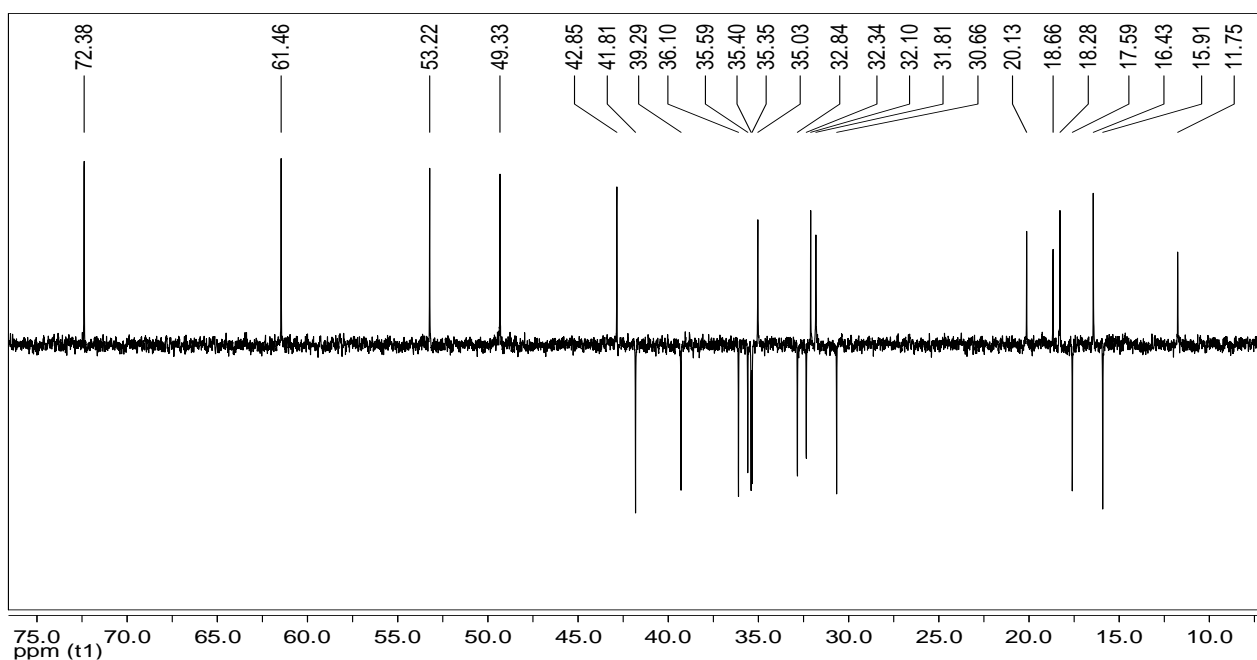
### TM04: friedelan-3 $\beta$ -ol (3 $\beta$ -friedelinol)



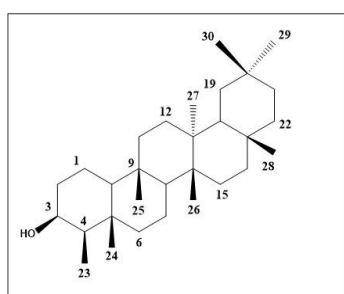
**Figura 10A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM04** em  $\text{CDCl}_3$  + Piridina- $d_5$  (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

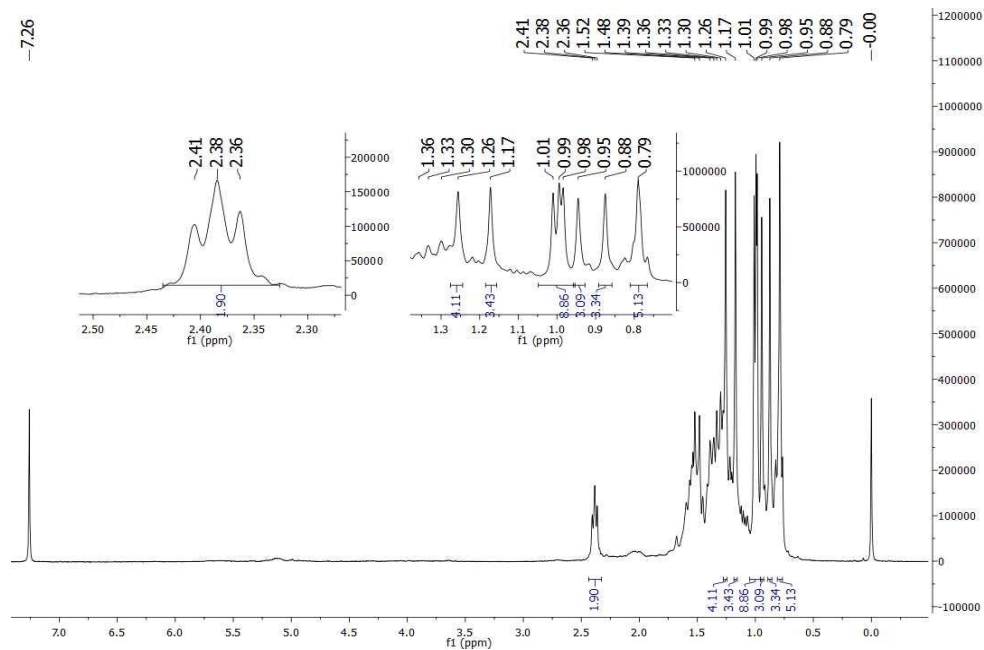


**Figura 11A:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de **TM04** em CDCl<sub>3</sub> + Piridina-*d*<sub>5</sub> (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

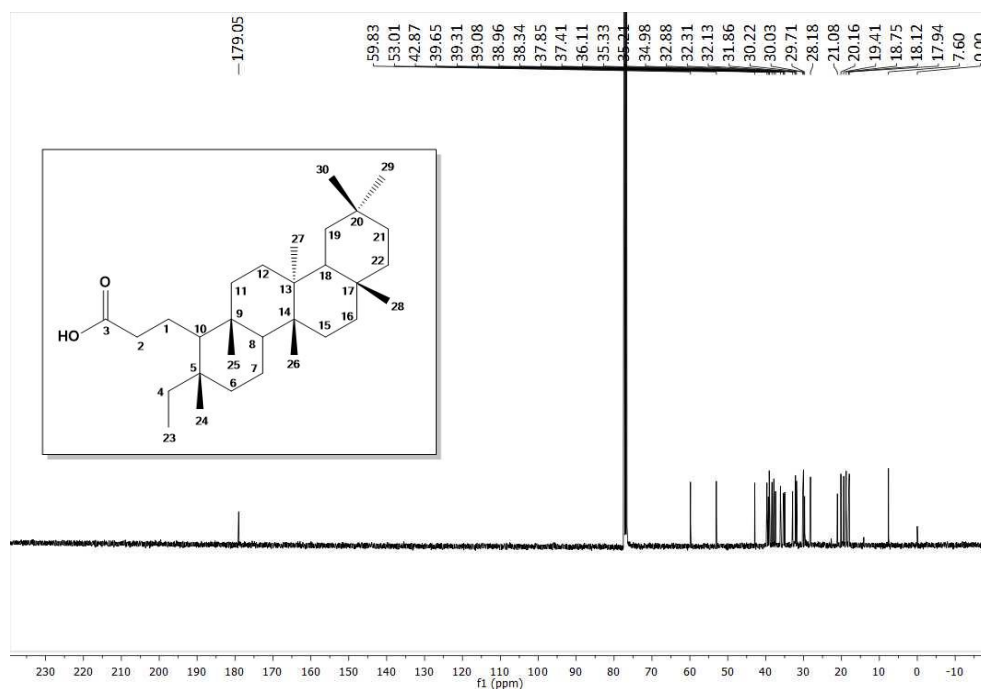


**Figura 12A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM04** em CDCl<sub>3</sub> + Piridina-*d*<sub>5</sub> (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

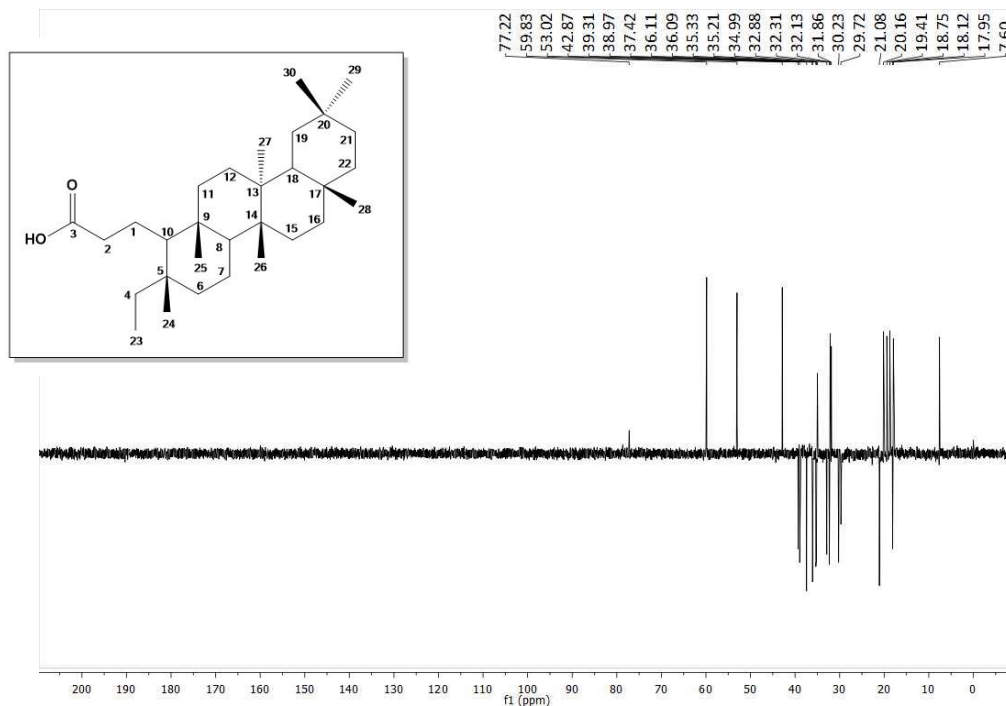


**TM05: ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico**

**Figura 13A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM05** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

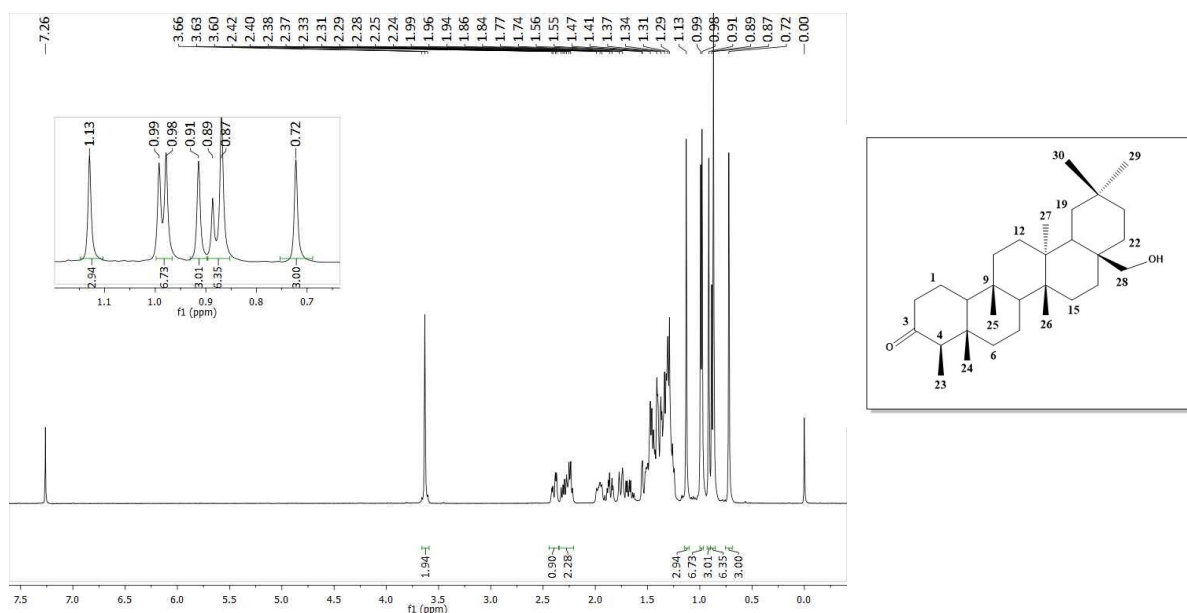


**Figura 14A:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM05** em  $\text{CDCl}_3$ . (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



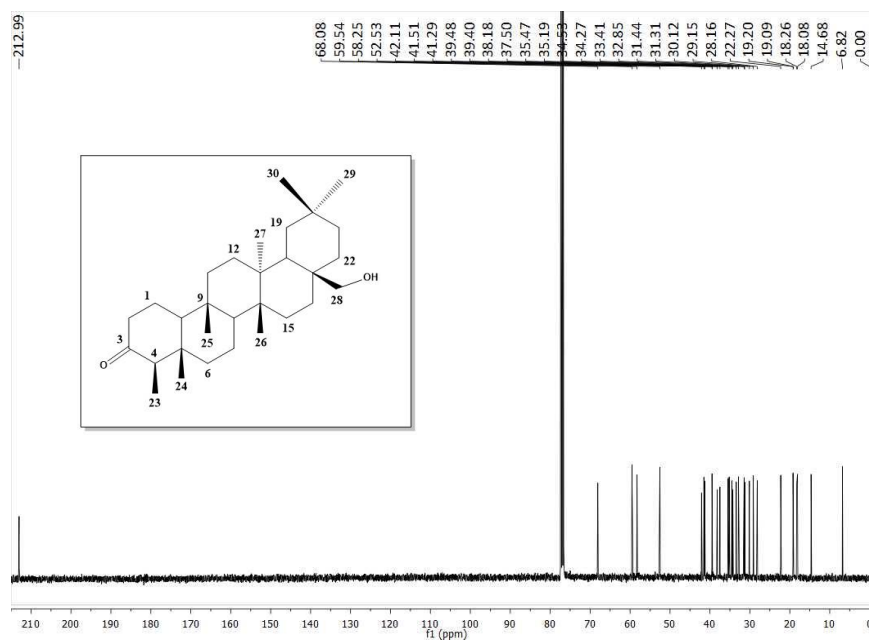
**Figura 15A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM05** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

### TM06: 28-hidroxifriedelan-3-ona

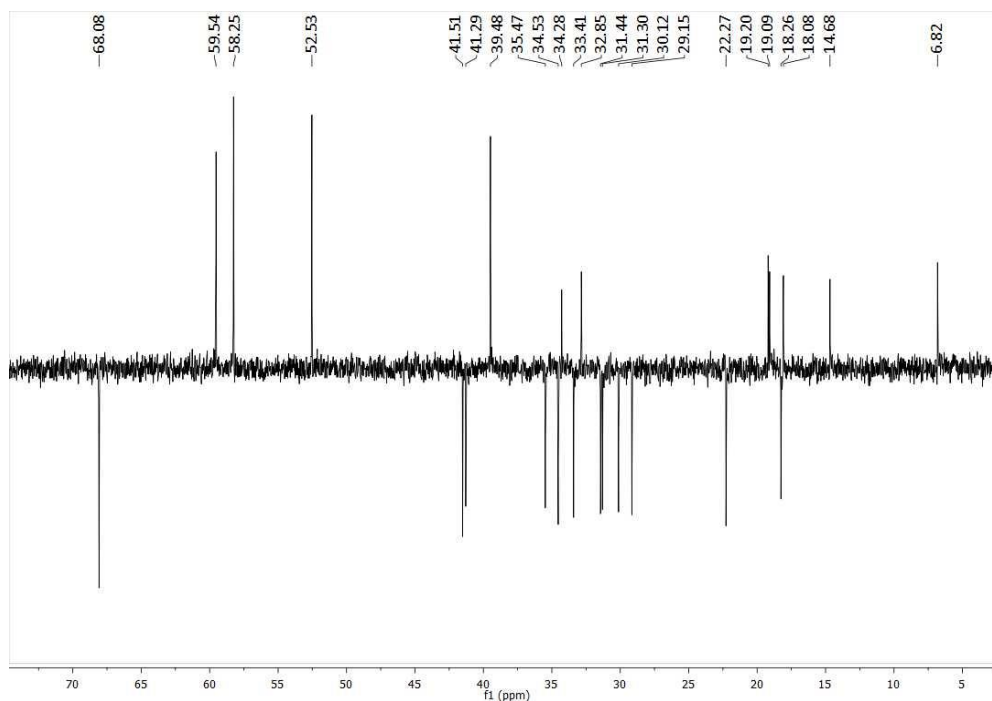


**Figura 16A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM06** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).





**Figura 17A:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM06** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 18A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM06** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

## TM07: mistura de ácidos graxos

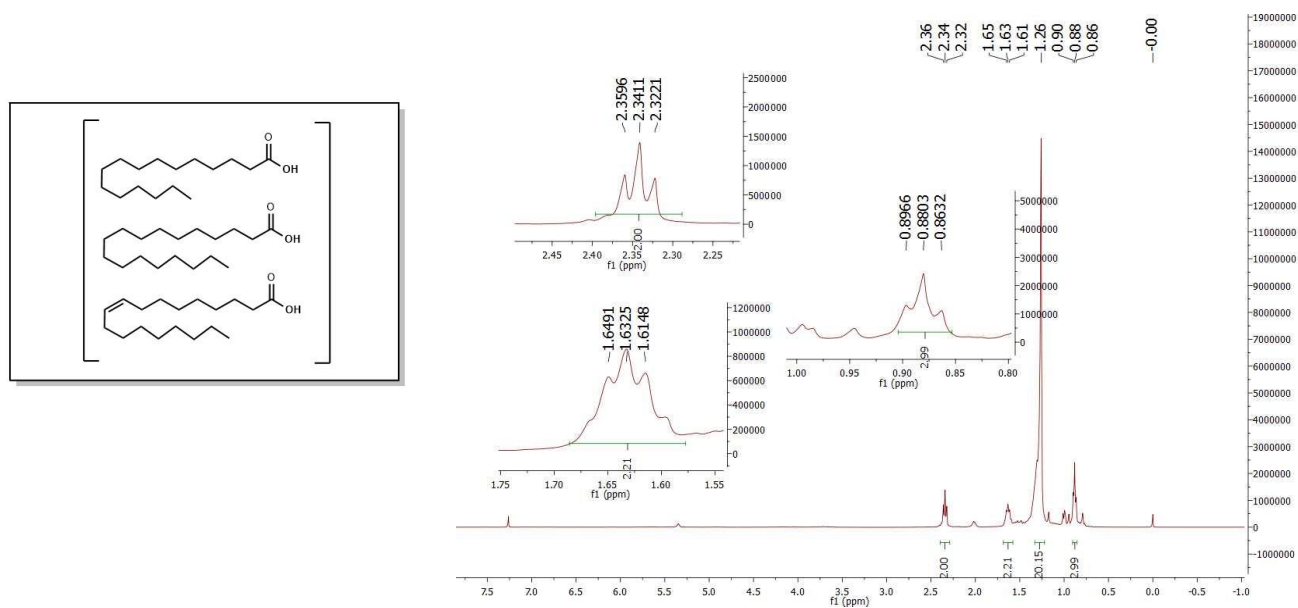


Figura 19A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM07** em  $\text{CDCl}_3$   
(Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

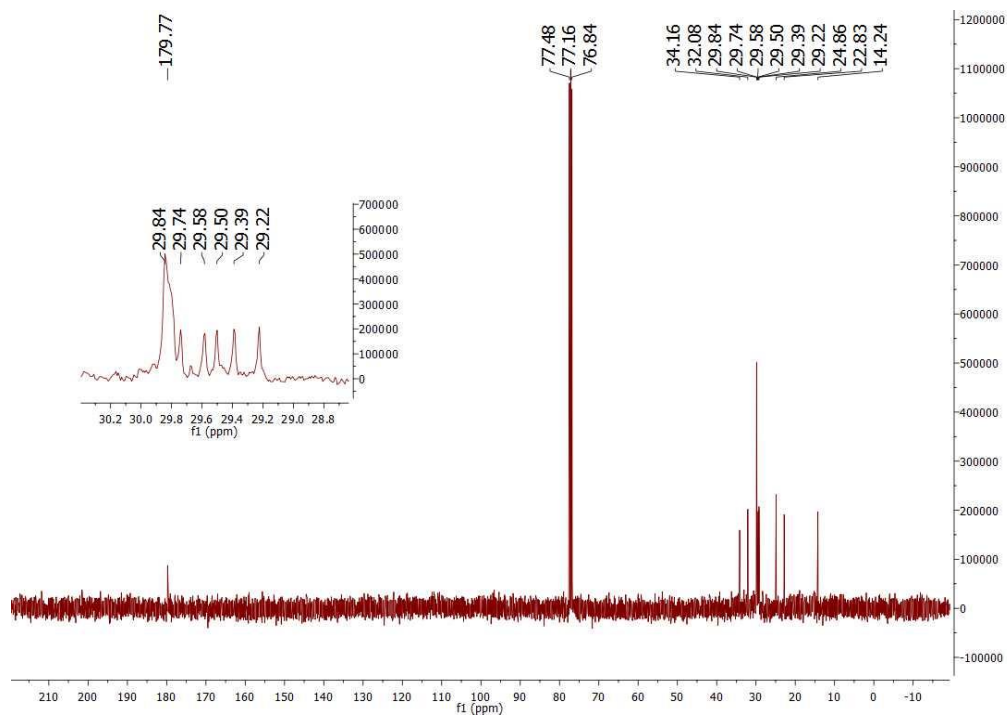


Figura 20A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM07** em  $\text{CDCl}_3$   
(Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

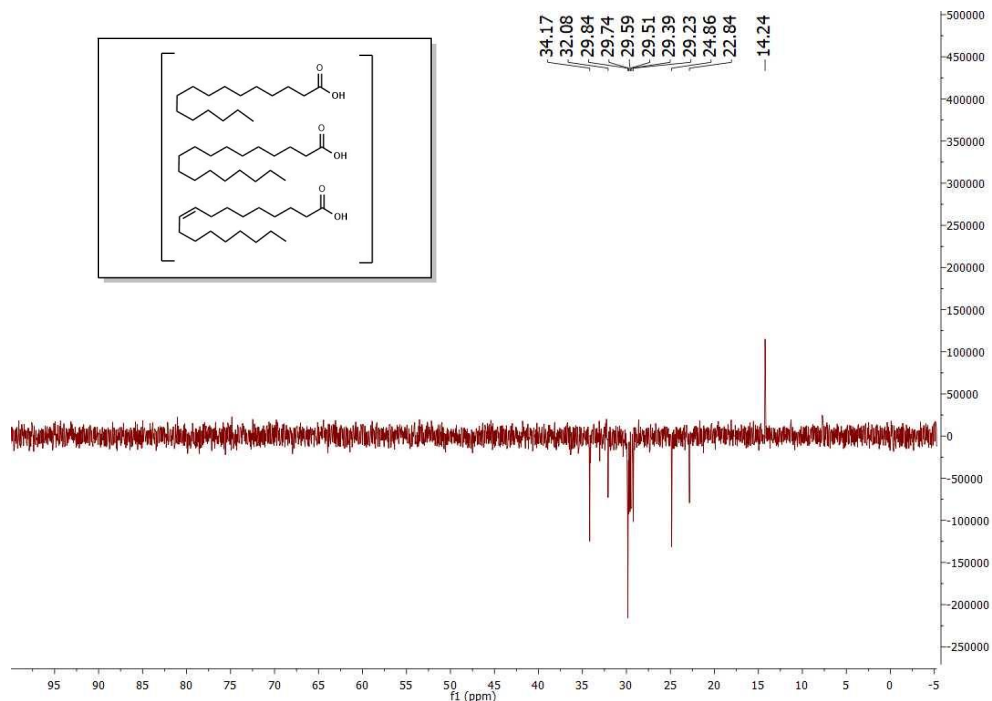


Figura 21A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM07** em  $\text{CDCl}_3$  (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2019).

**TM08: 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol**

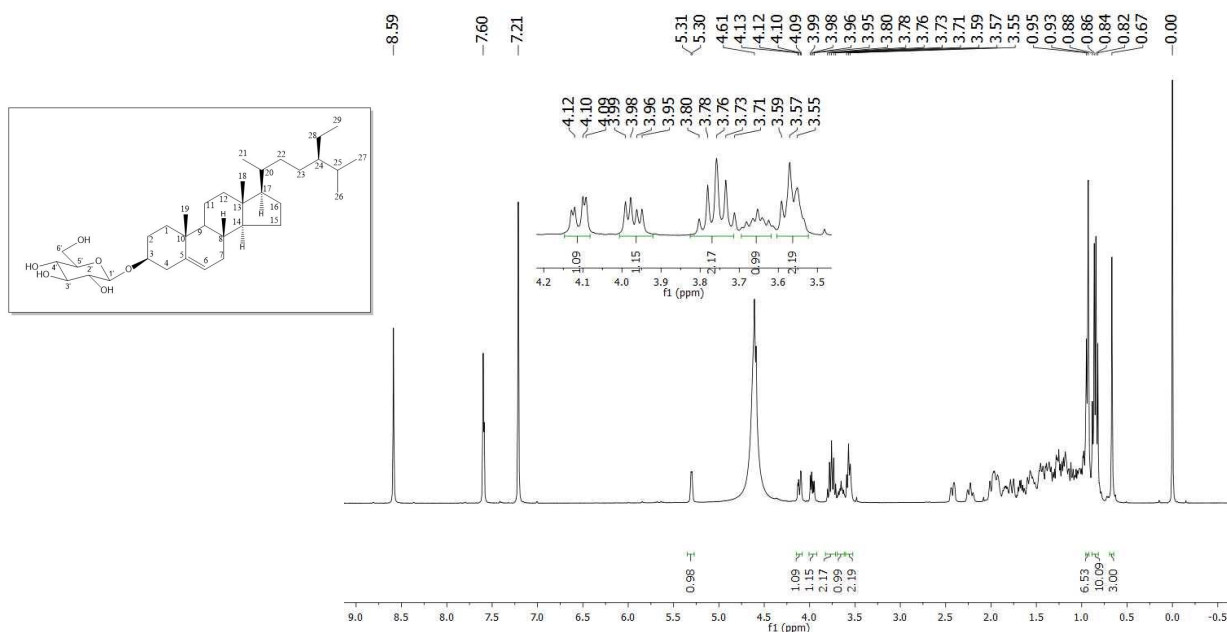


Figura 22A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM08** em  $\text{CDCl}_3$  + Piridina  $d_5$ .

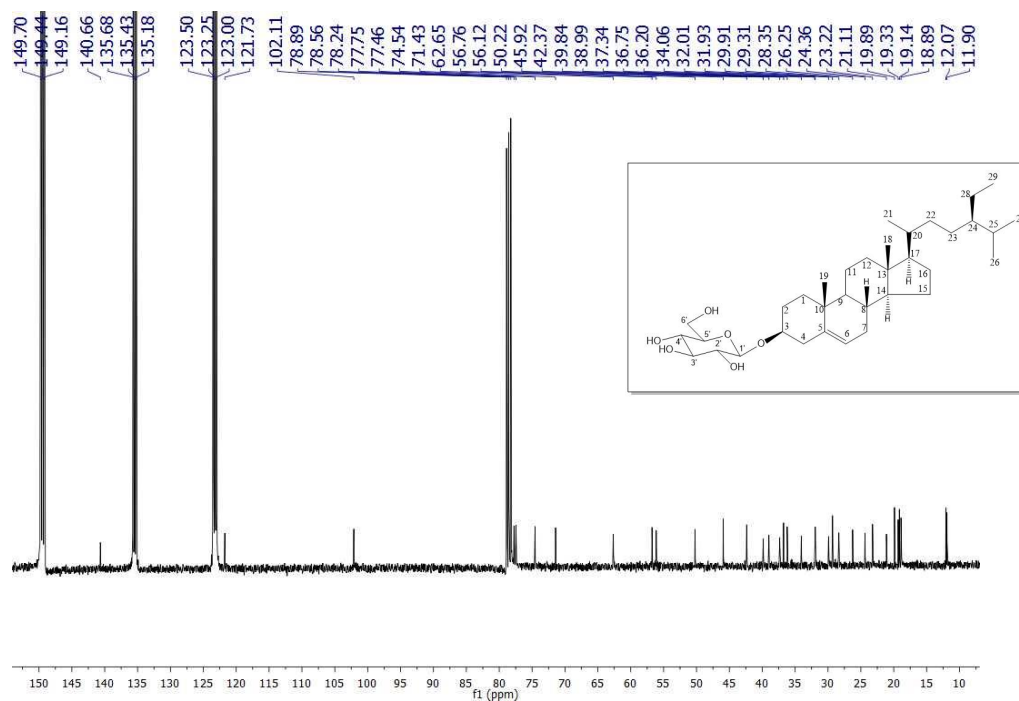


Figura 23A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM08** em  $\text{CDCl}_3$  + Piridina  $d_5$ .

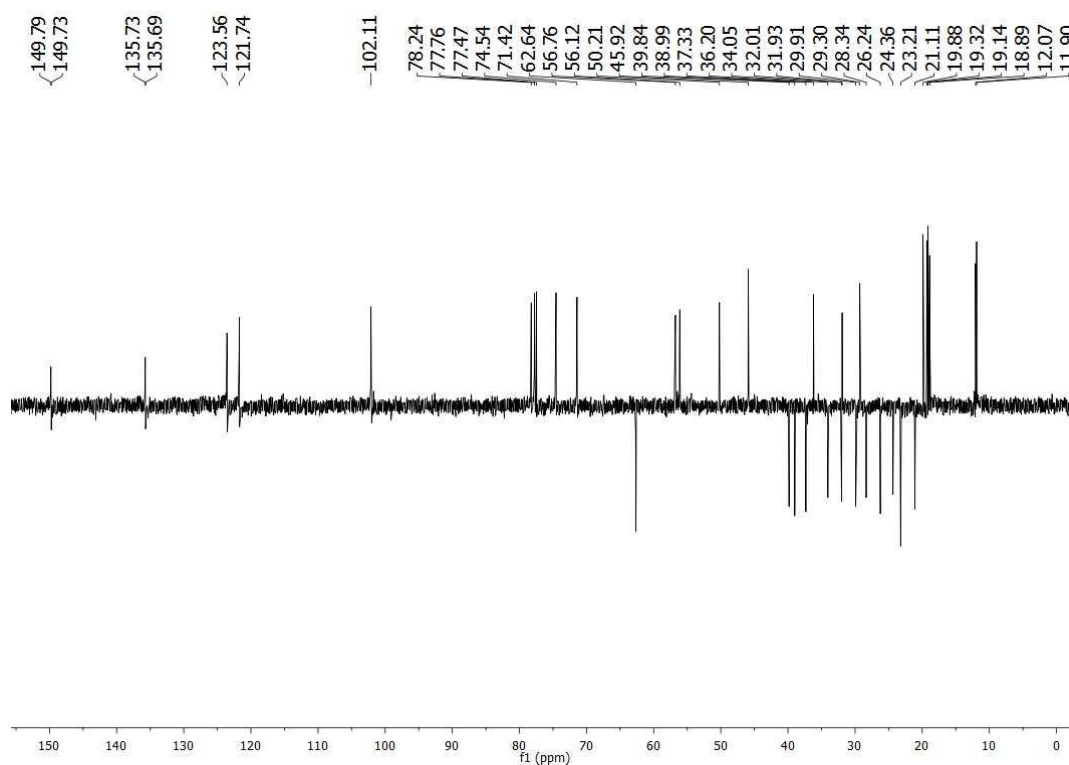
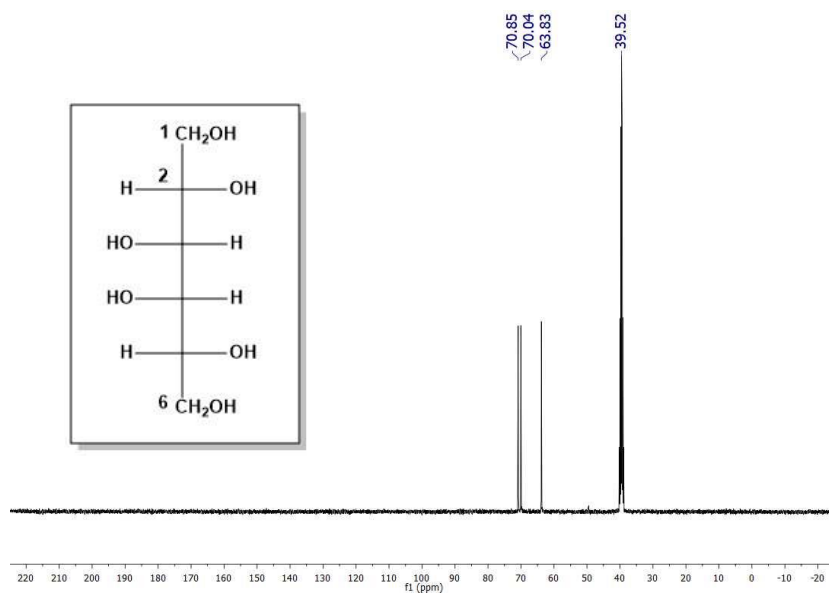
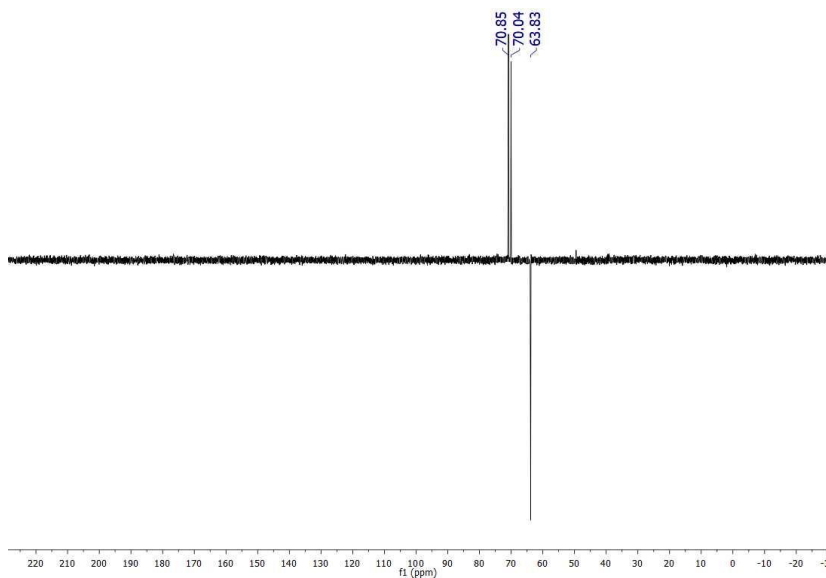
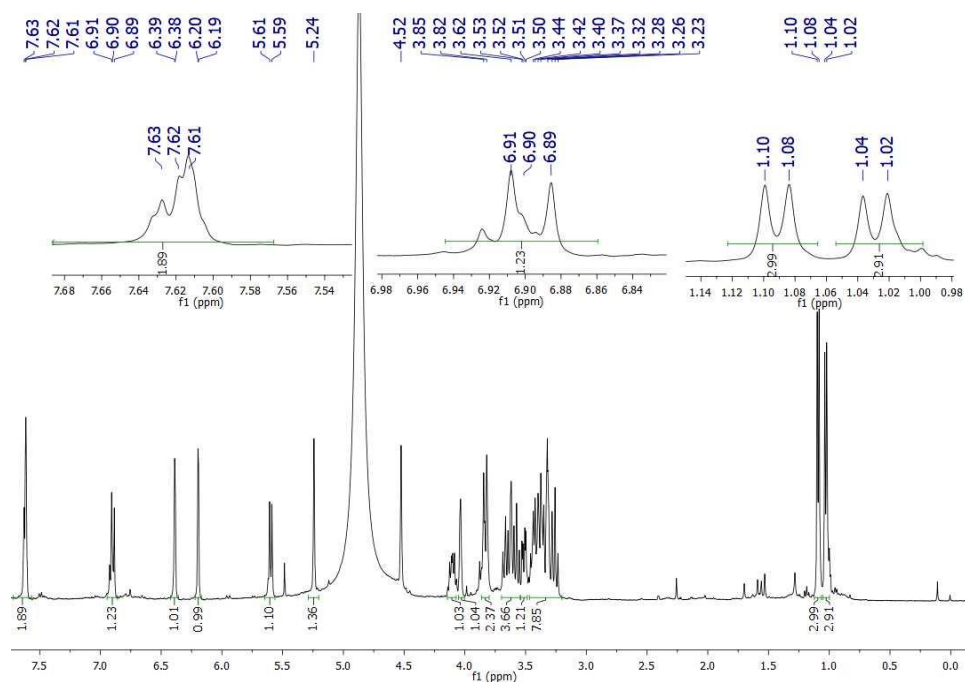


Figura 24A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM08** em  $\text{CDCl}_3$  + Piridina  $d_5$ .

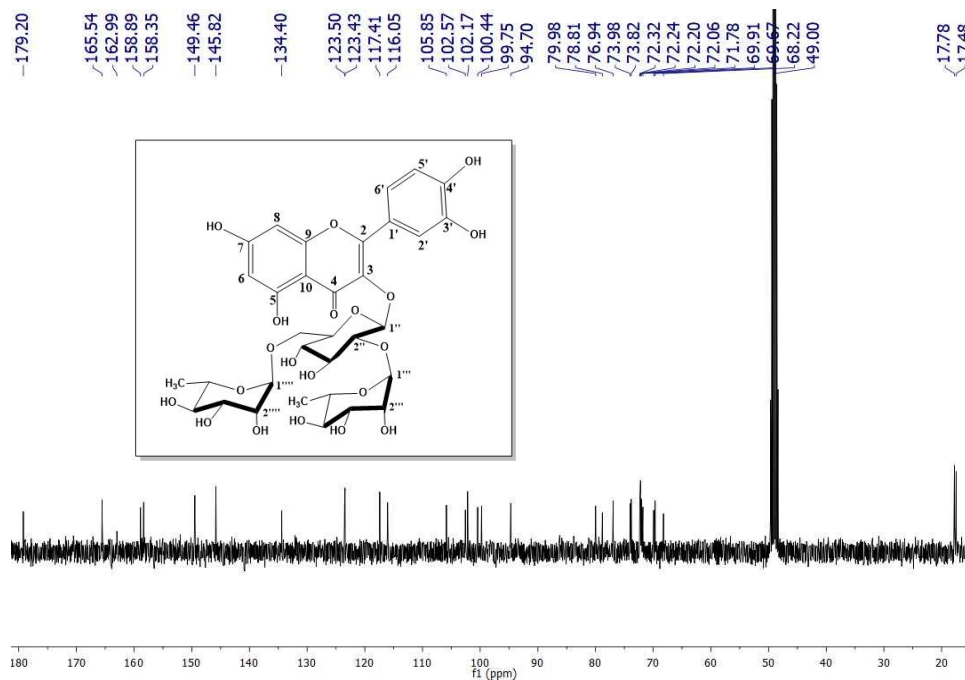
## TM09: dulcitol

Figura 25A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de TM09 em  $\text{DMSO } d_6$ .Figura 26A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de TM09 em  $\text{DMSO } d_6$ .

**TM10: 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)][ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina**



**Figura 27A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM10** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figura 28A:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM10** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

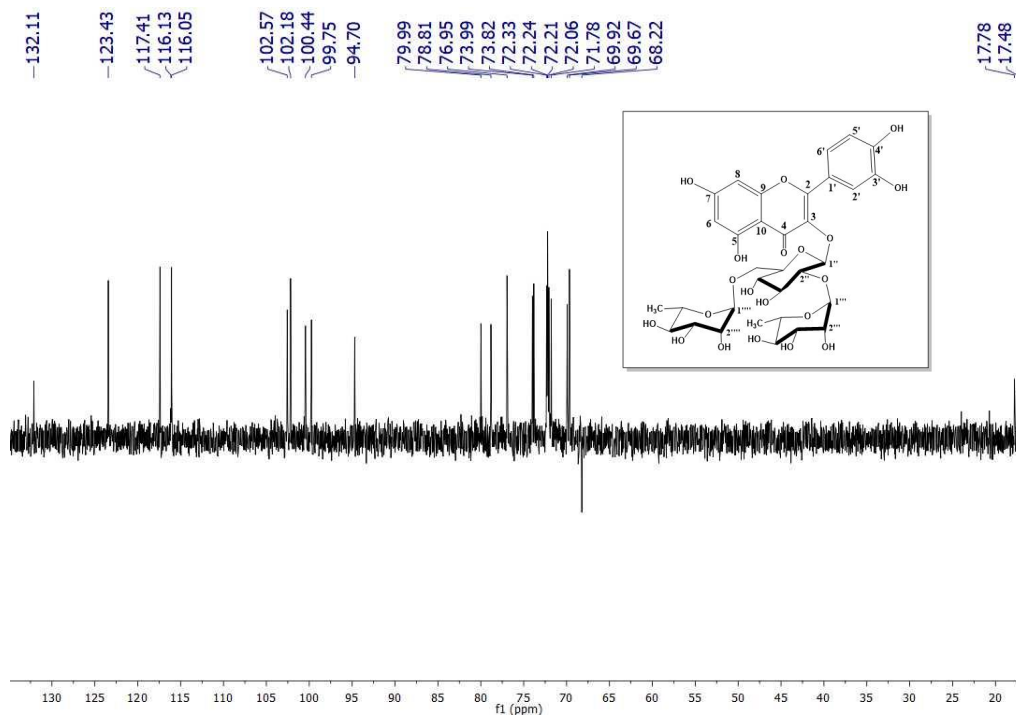


Figura 29A: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **TM10** em CD<sub>3</sub>OD.

**TM11: rutina**

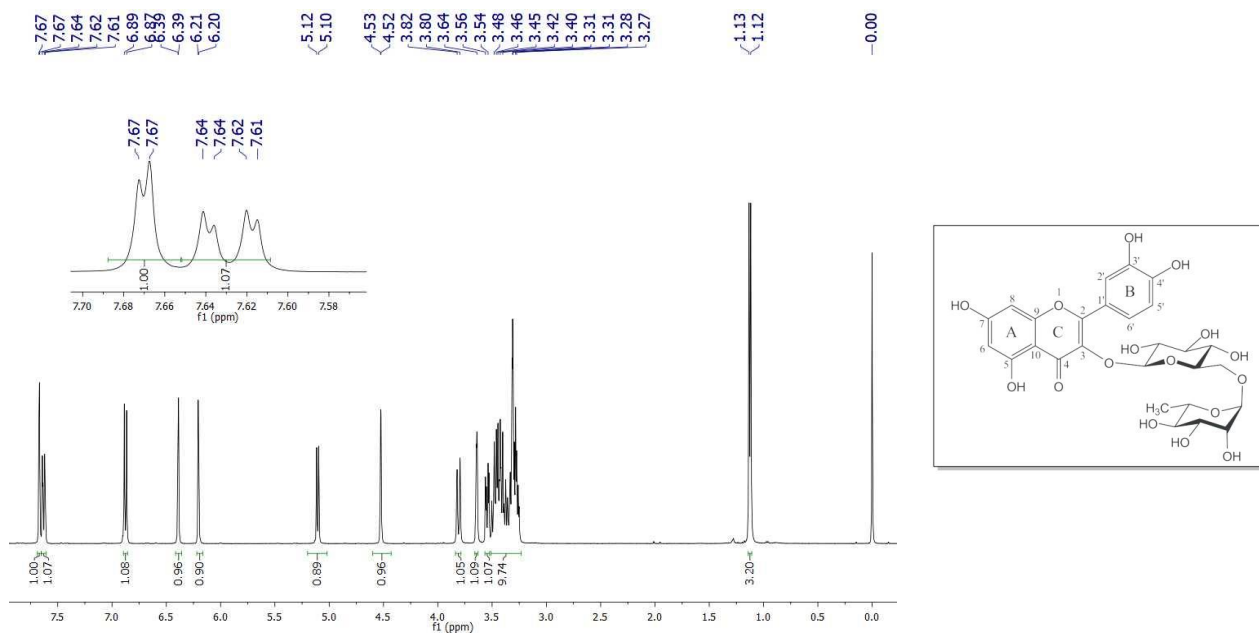


Figura 30A: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de **TM11** em CD<sub>3</sub>OD.

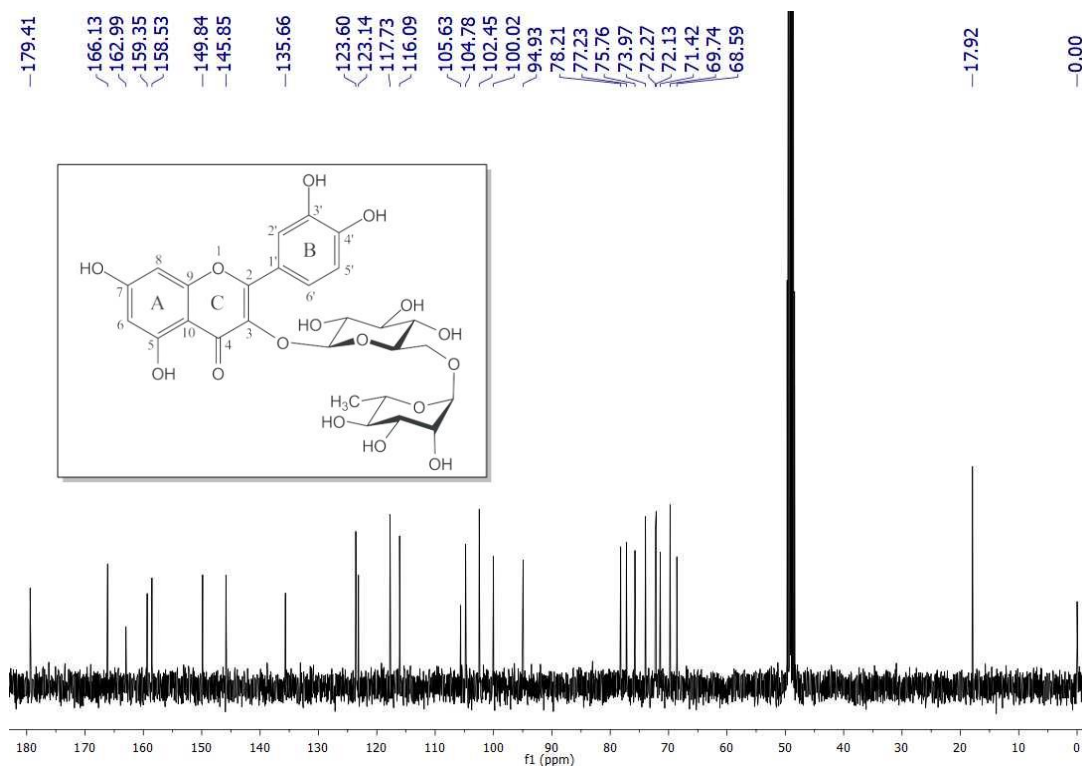


Figura 31A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM11** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

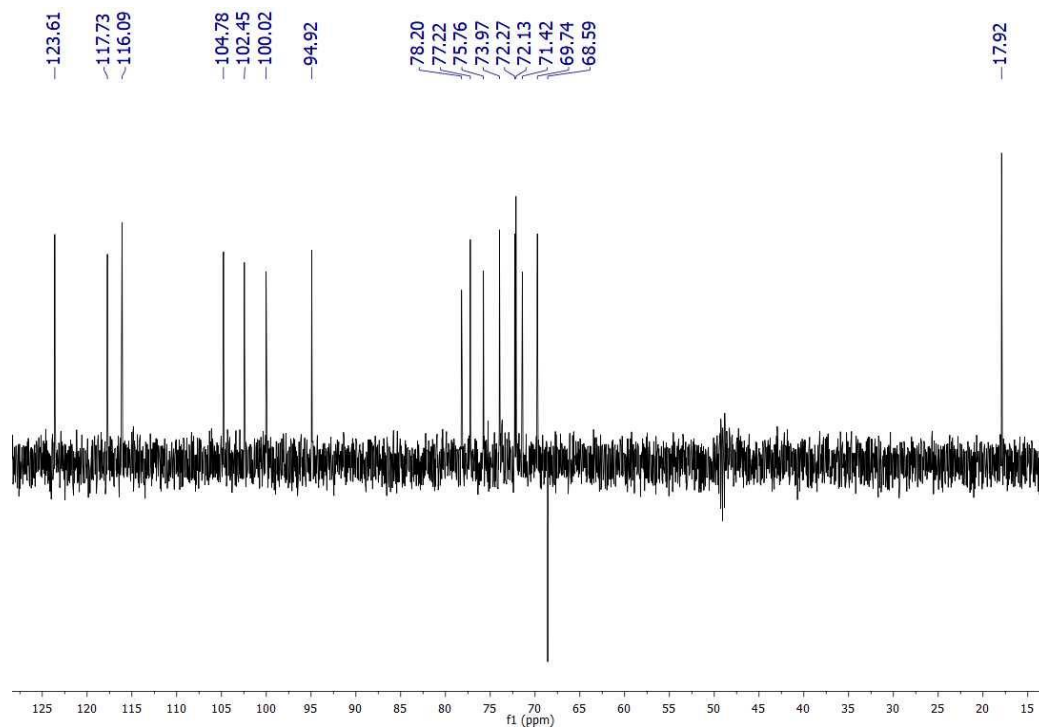


Figura 32A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM11** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



## TM13: friedelan-3,21-diona

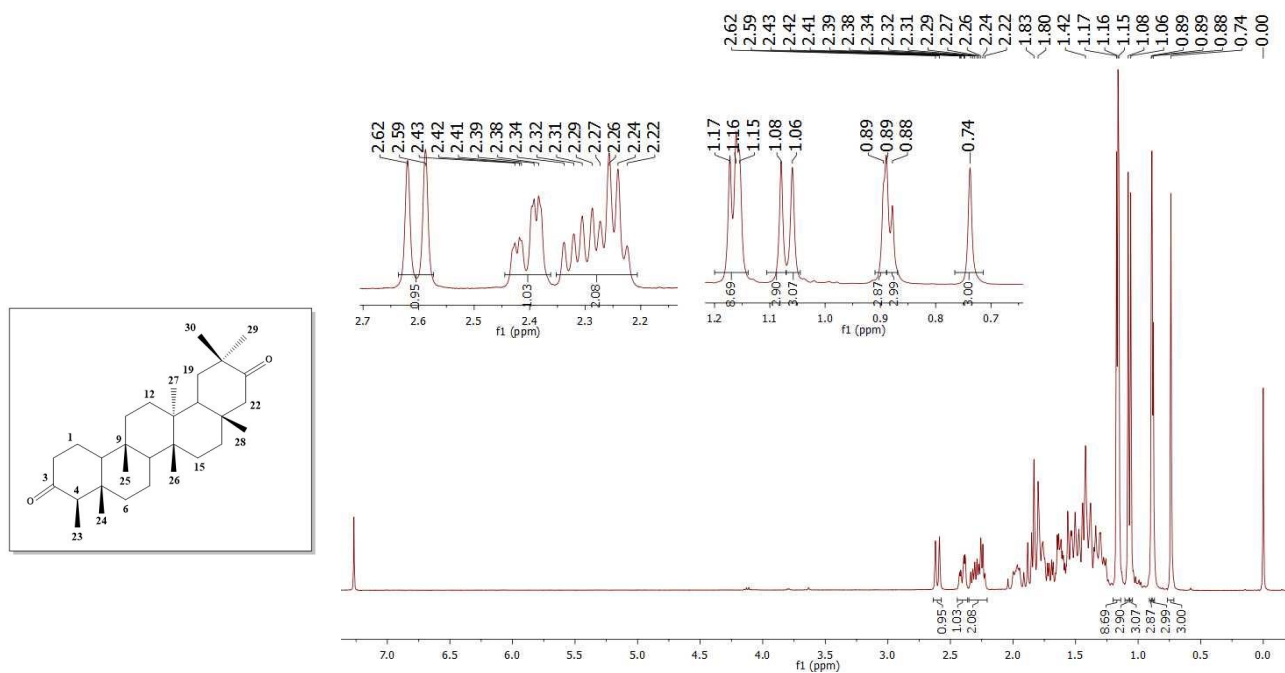


Figura 33A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM13** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

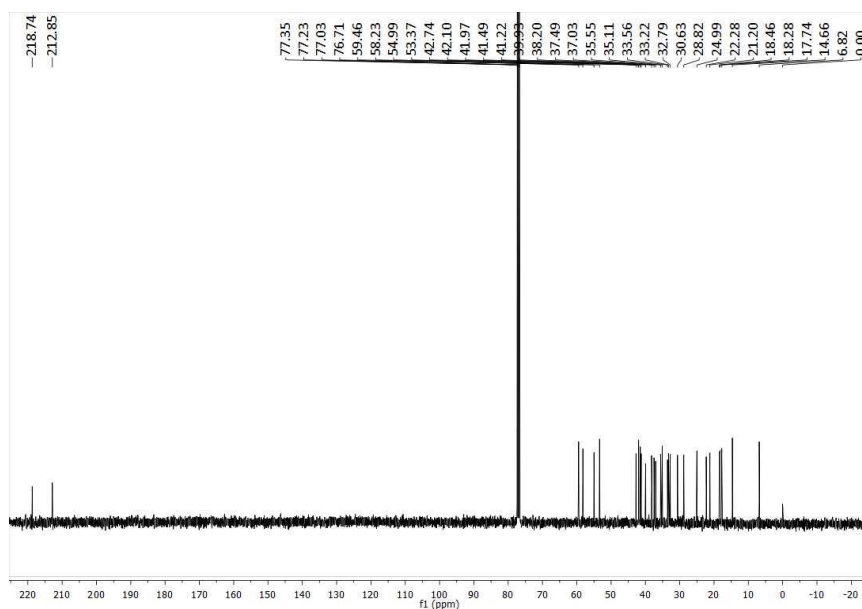
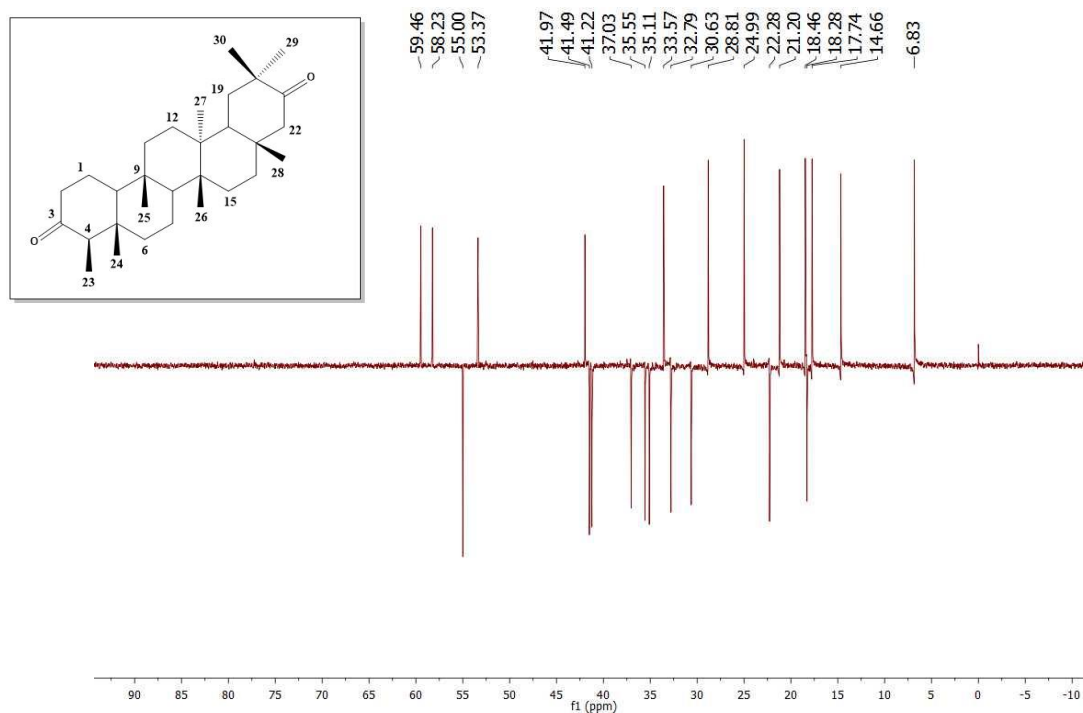
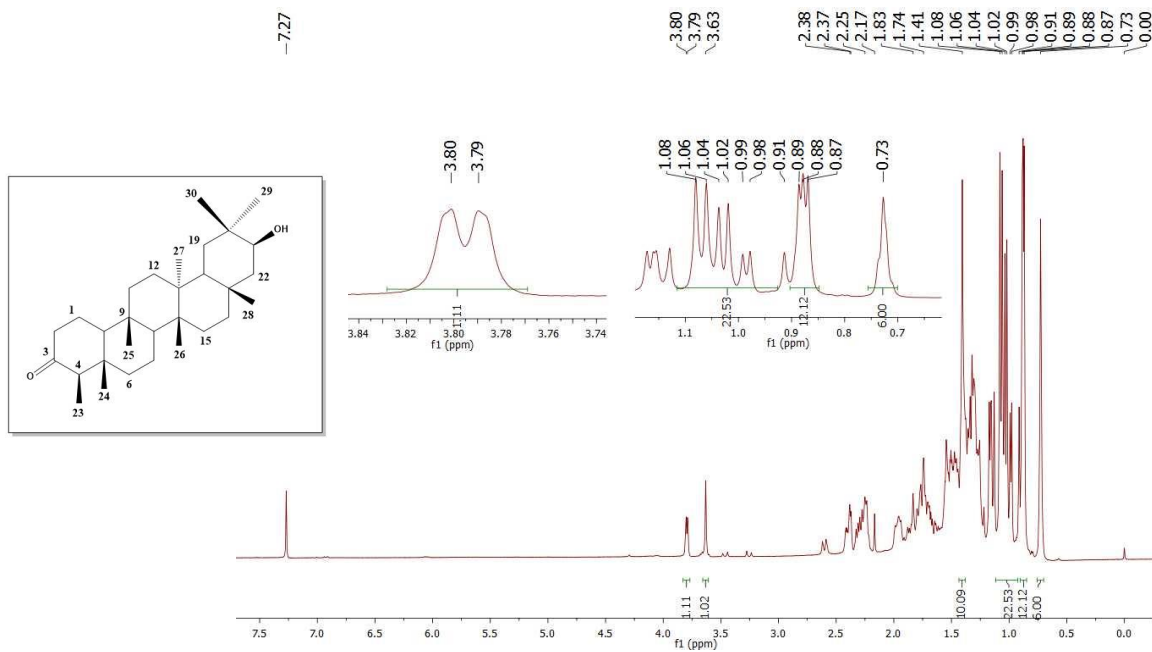


Figura 34A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM13** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

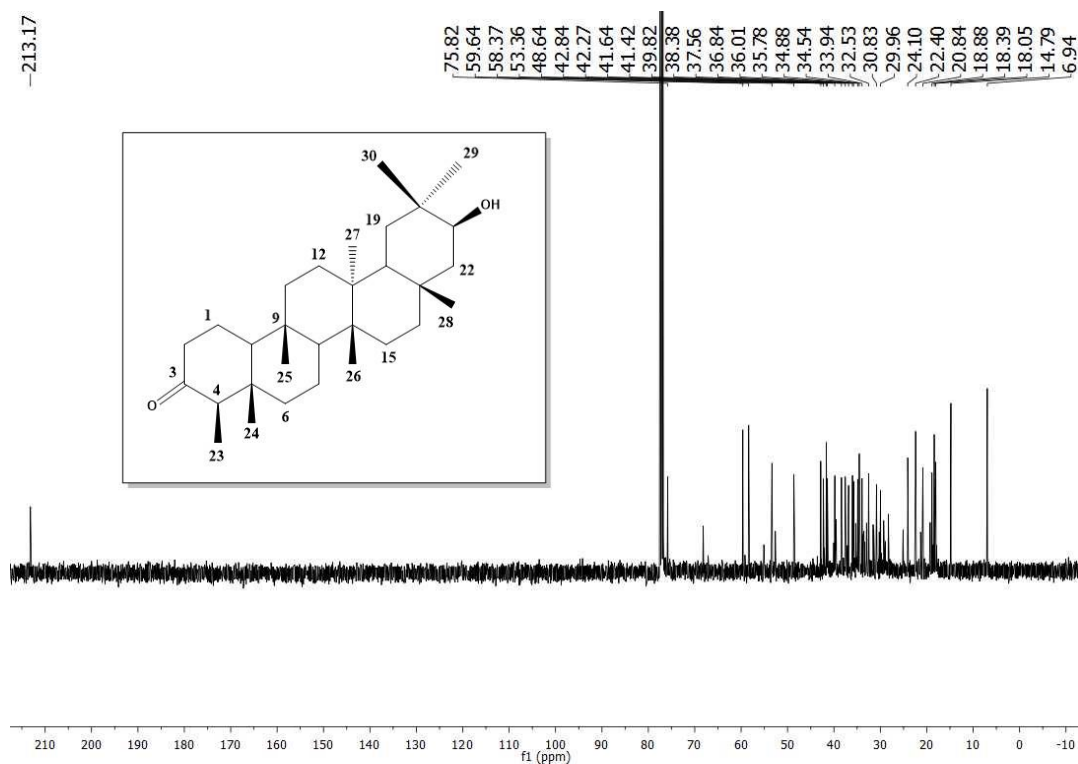


**Figura 35A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM13** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

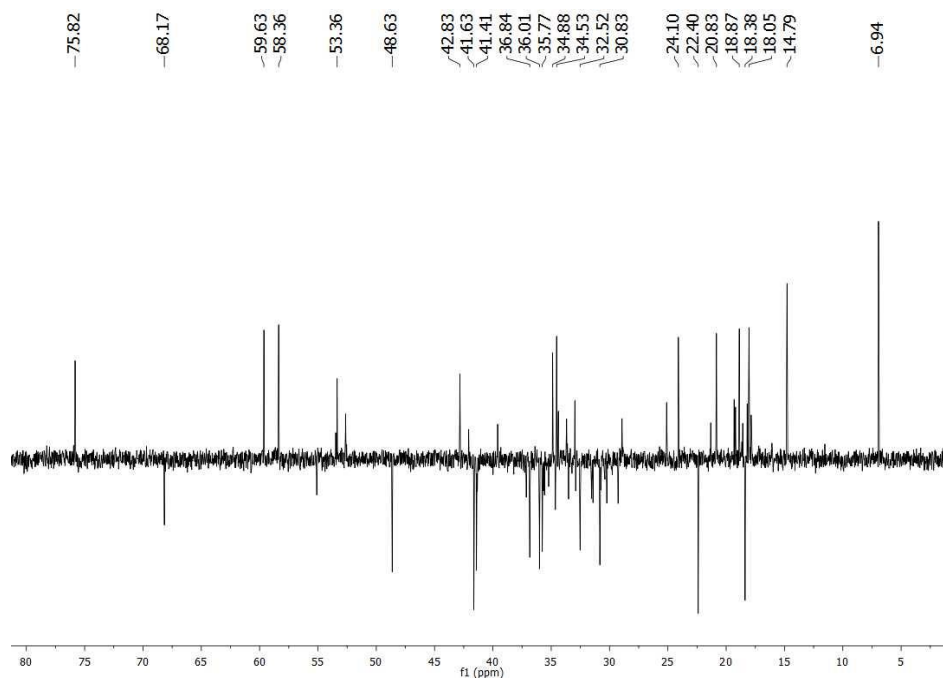
### TM14: 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona



**Figura 36A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM14** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 37A:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM14** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 38A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM14** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

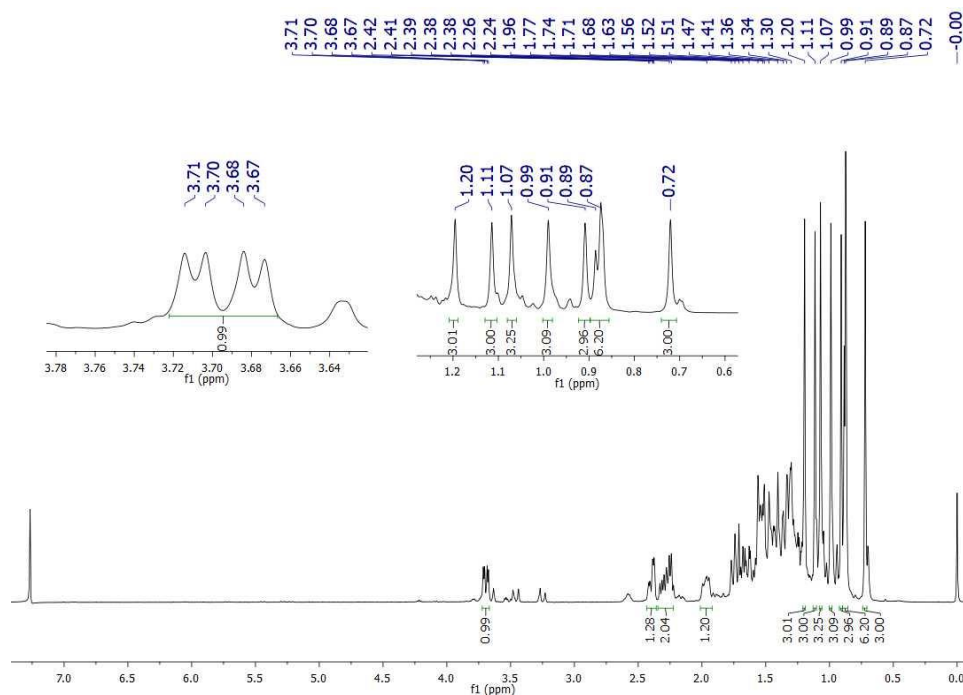
3.11 TM15: 21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona

Figura 39A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM15** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

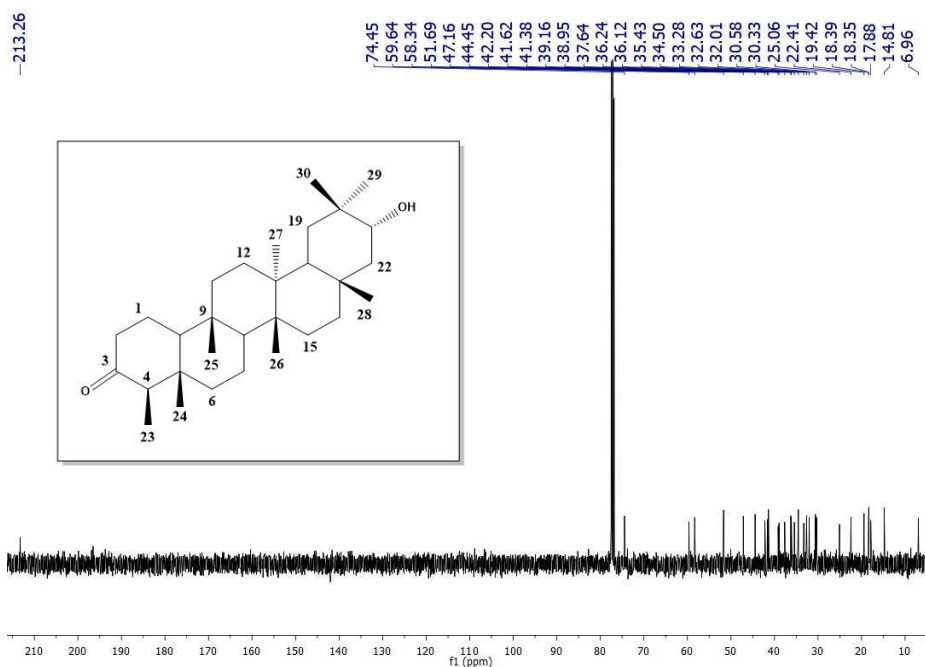


Figura 40A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM15** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

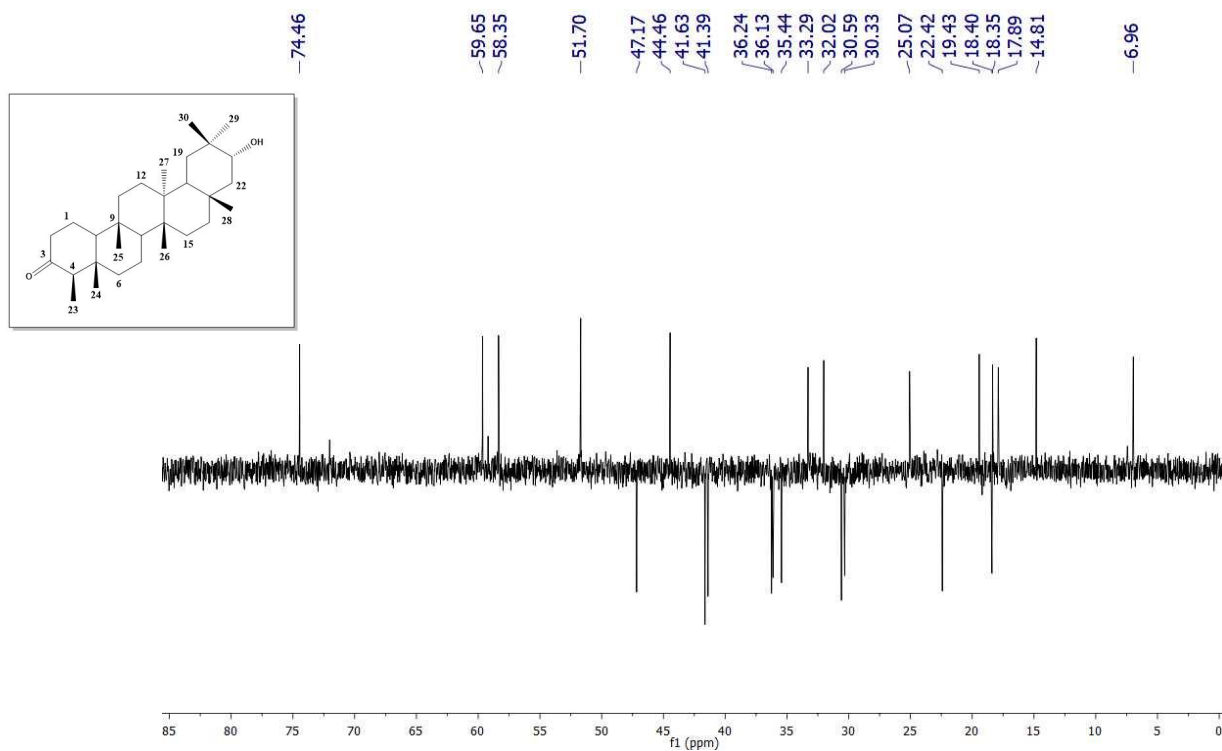


Figura 41A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM15** em  $\text{CDCl}_3$ .  
(Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

### TM16: 30-hidroxifriedelan-3-ona

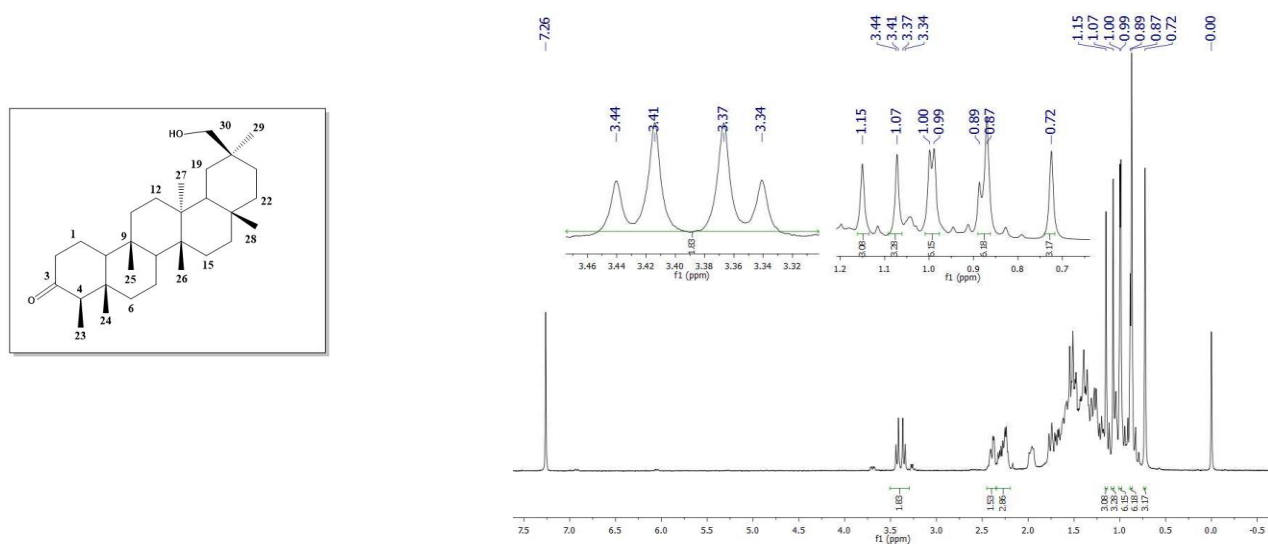


Figura 42A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM16** em  $\text{CDCl}_3$ .  
(Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

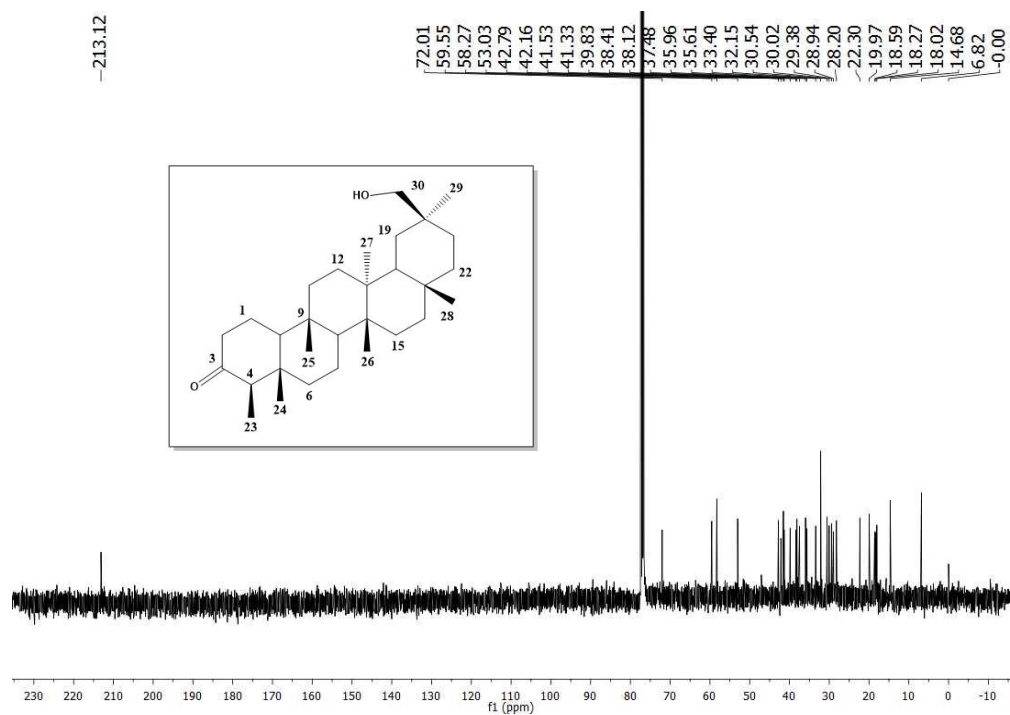


Figura 43A: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de **TM16** em CDCl<sub>3</sub> (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

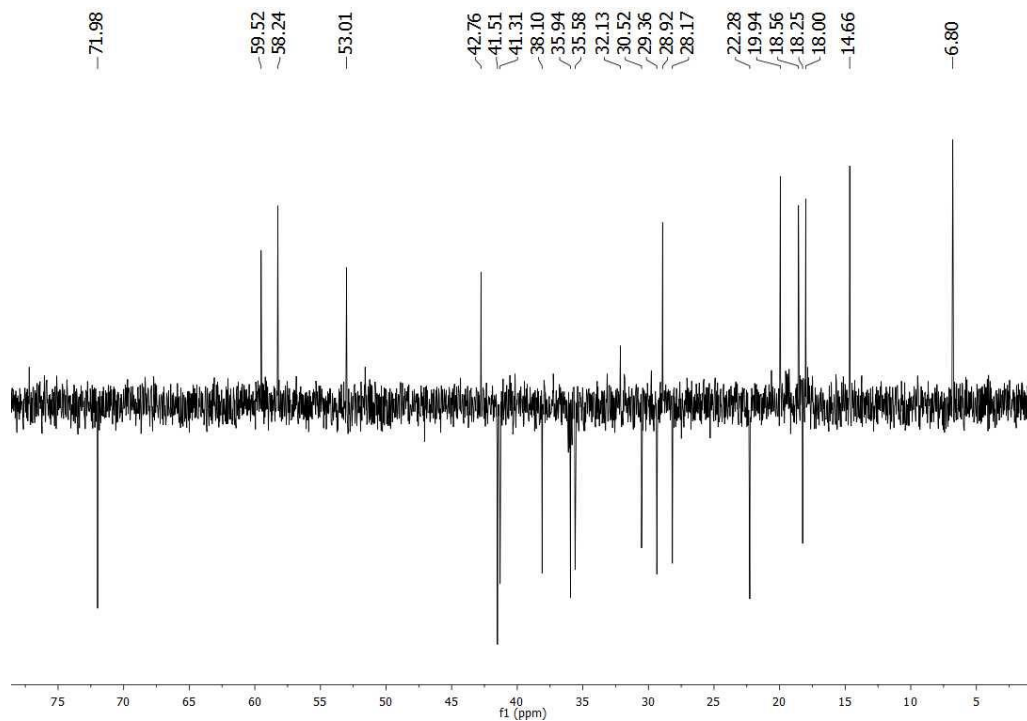
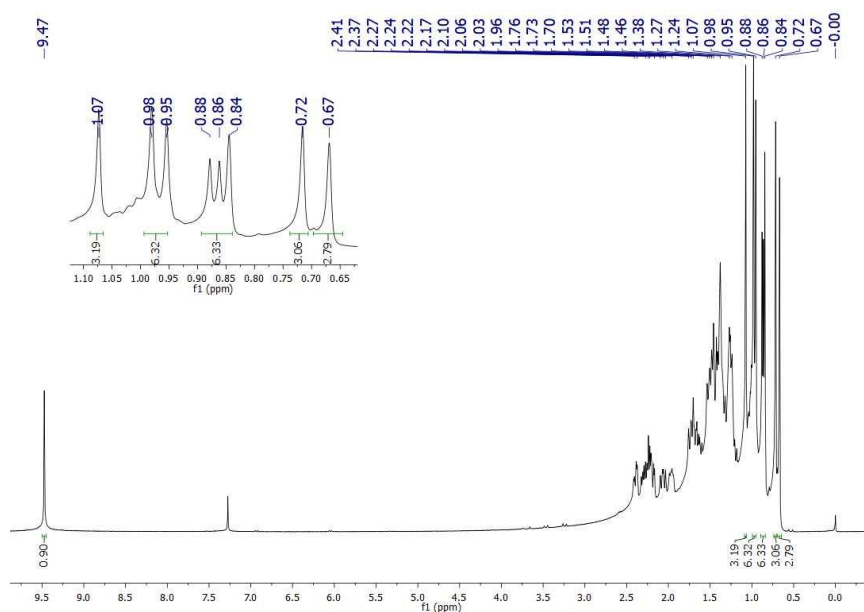
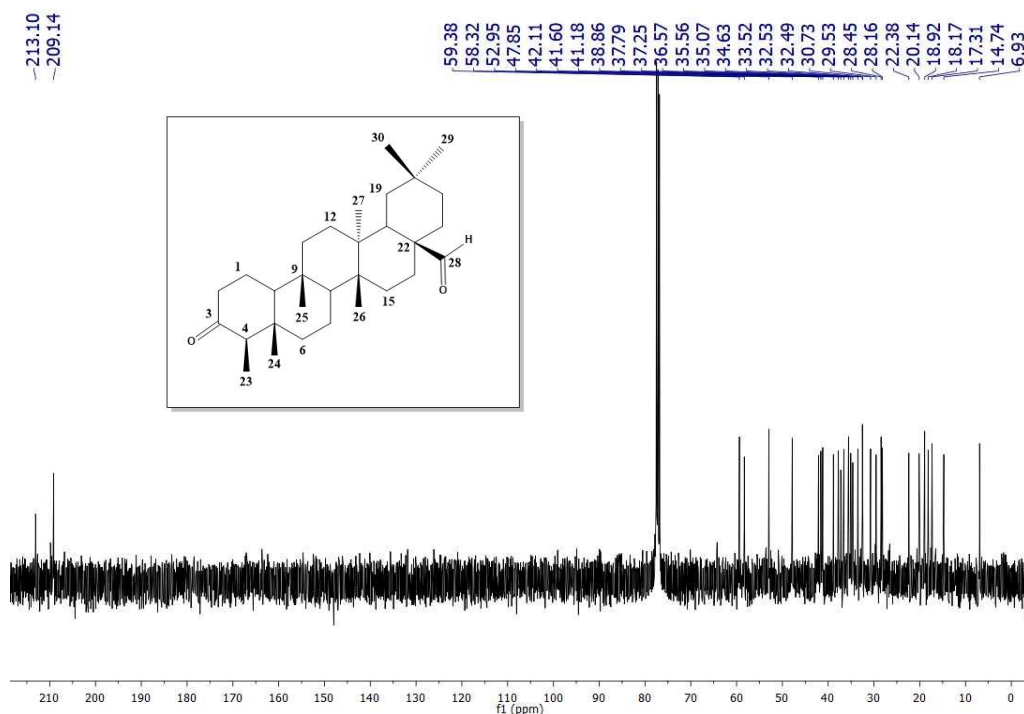


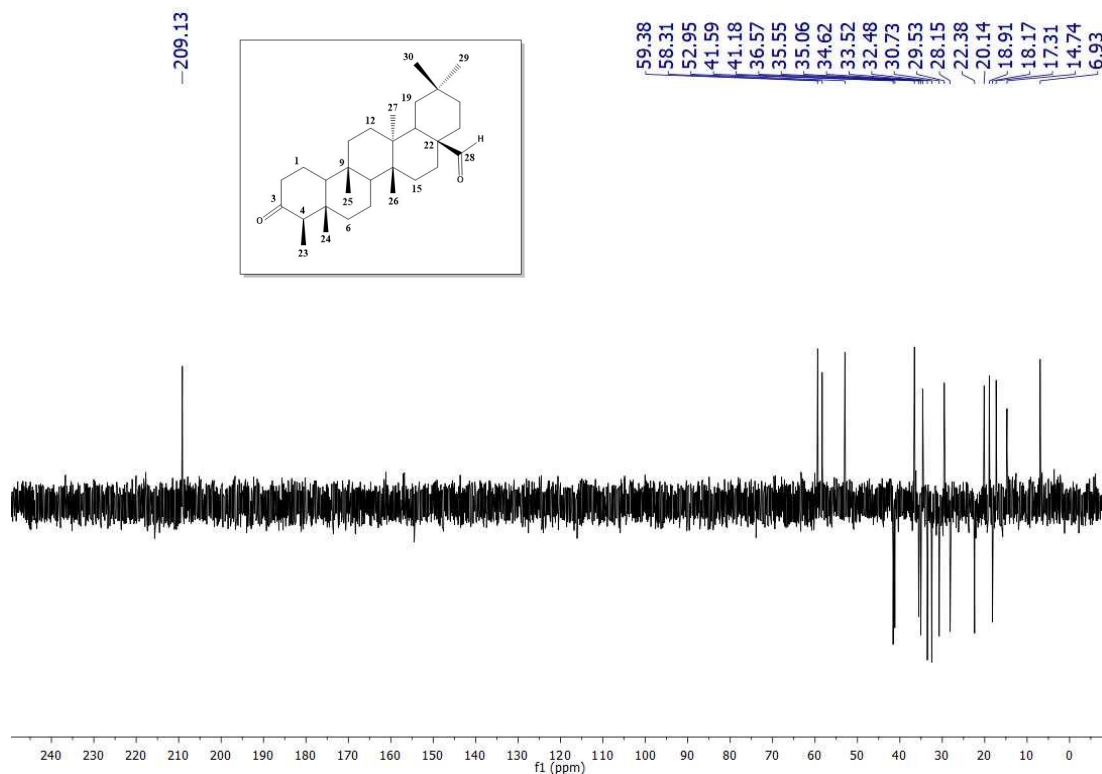
Figura 44A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM16** em CDCl<sub>3</sub> (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

**TM17: 3-oxo-friedelan-28-al**

**Figura 45A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM17** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

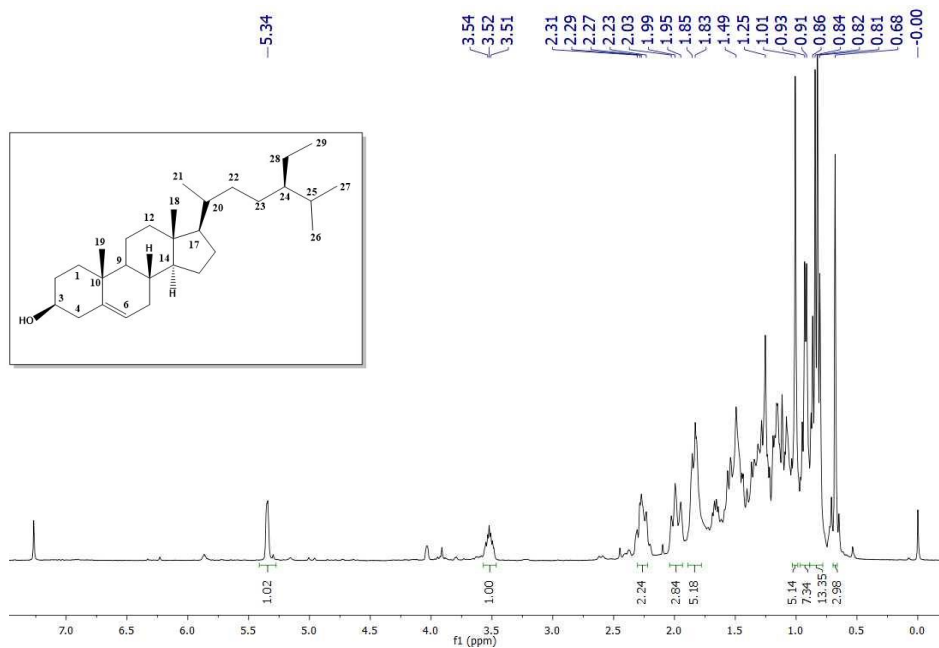


**Figura 46A:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM17** em  $\text{CDCl}_3$  (Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).



**Figura 47A:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM17** em  $\text{CDCl}_3$   
(Reproduzido de FERREIRA *et al.*, 2019).

### TM20: $\beta$ -Sitosterol



**Figura 48A:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM20** em  $\text{CDCl}_3$ .



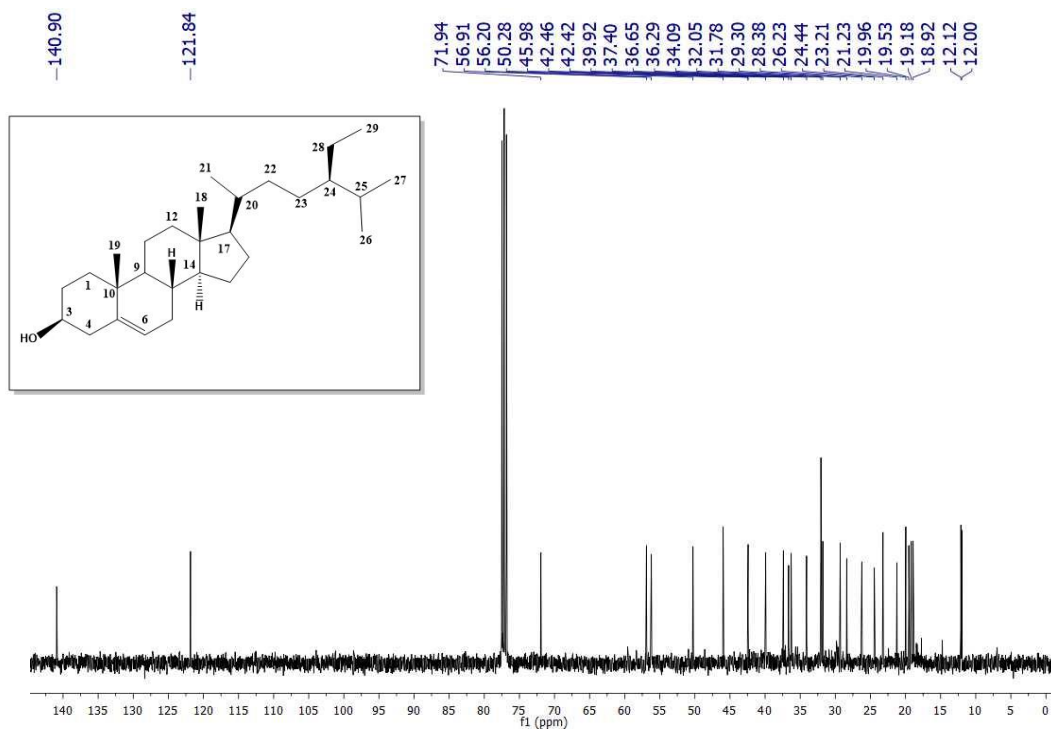


Figura 49A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM20** em  $\text{CDCl}_3$ .

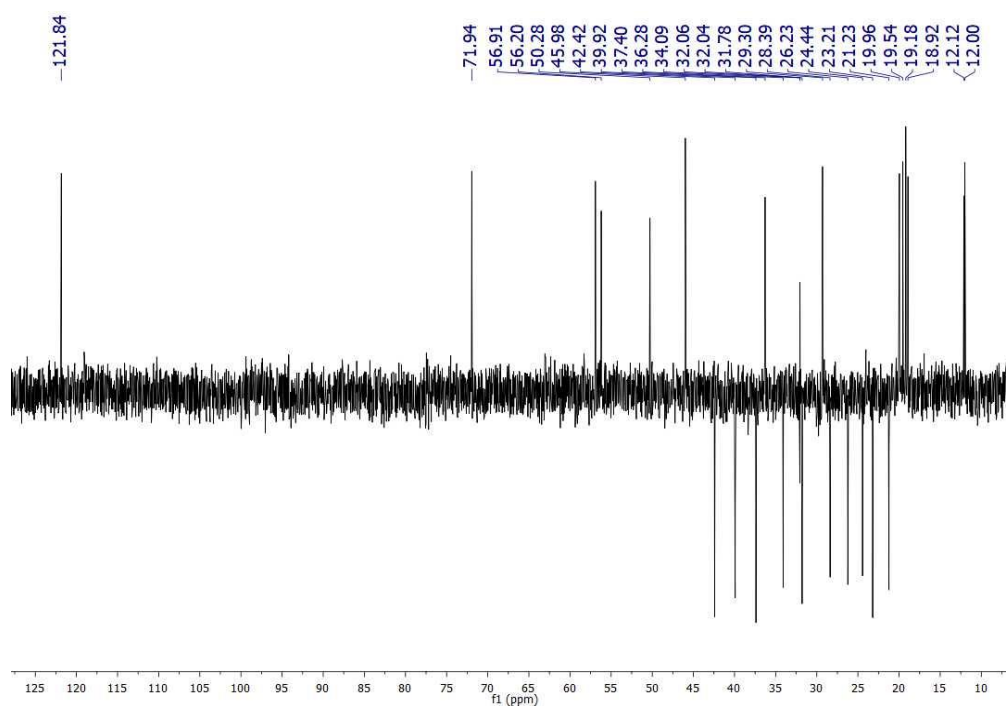
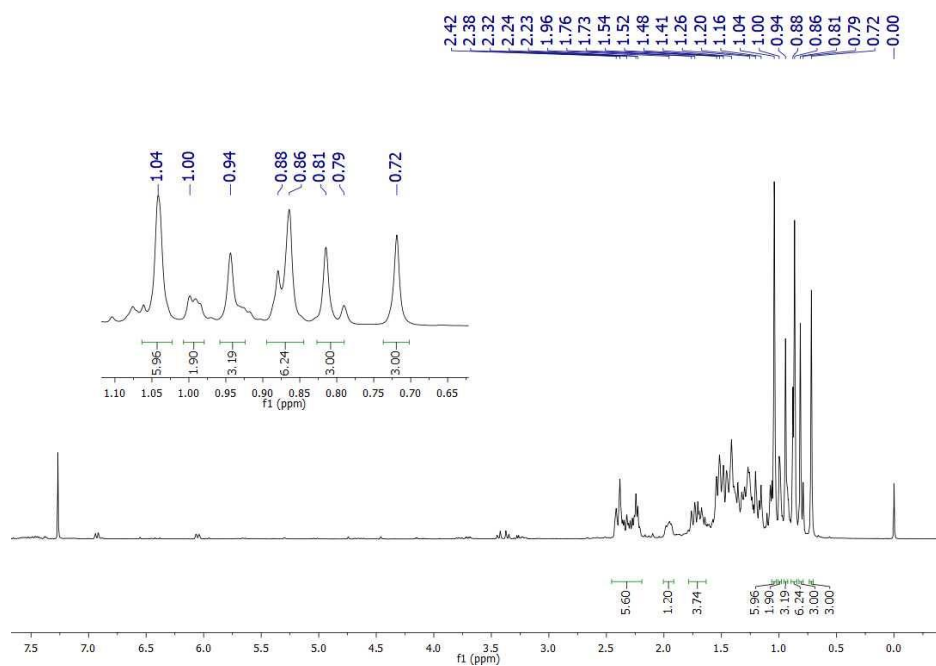
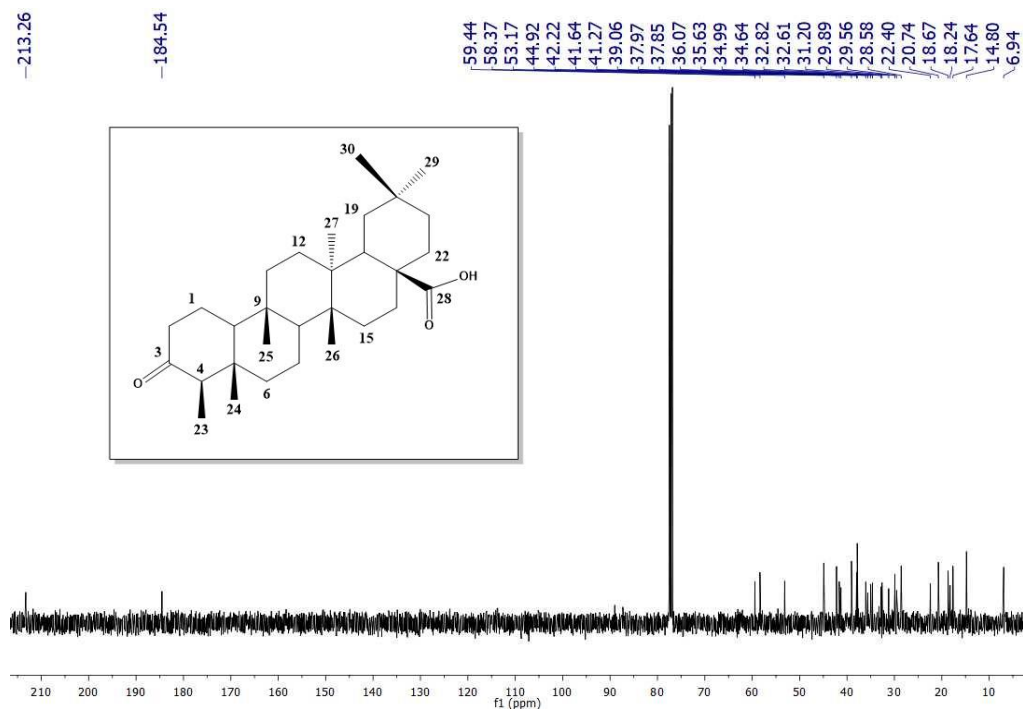


Figura 50A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM20** em  $\text{CDCl}_3$ .

## TM21: ácido 3-oxo-friedelan-28-oico

Figura 51A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de TM21 em  $\text{CDCl}_3$ .Figura 52A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de TM21 em  $\text{CDCl}_3$ .

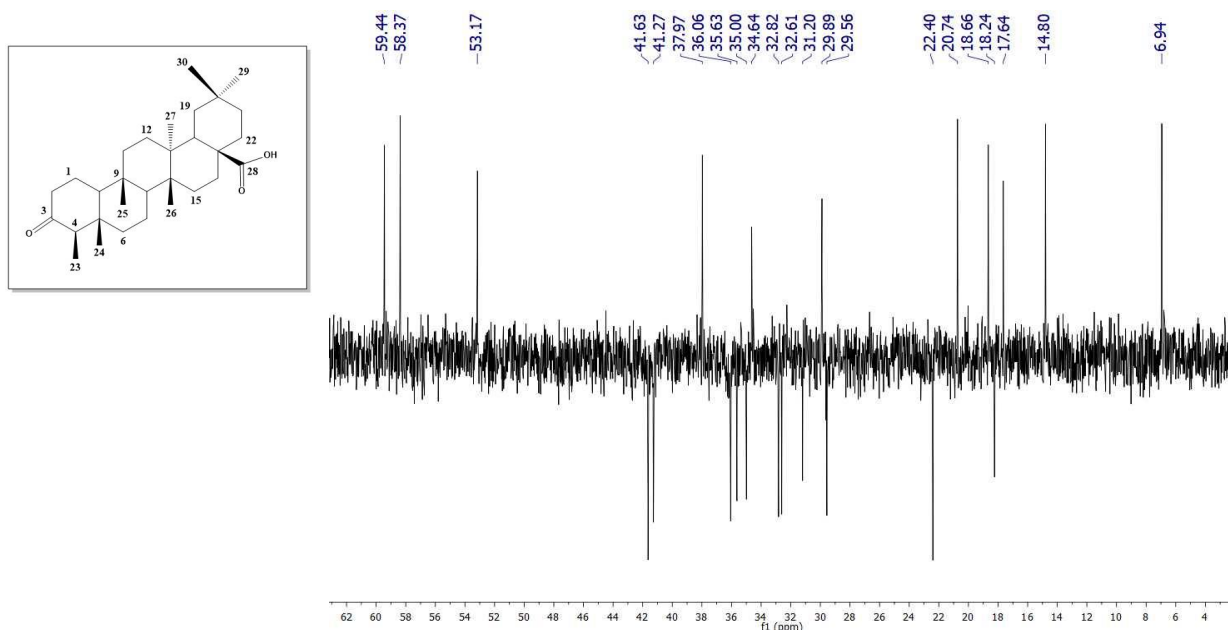


Figura 53A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM21** em  $\text{CDCl}_3$ .

**TM22: 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona**

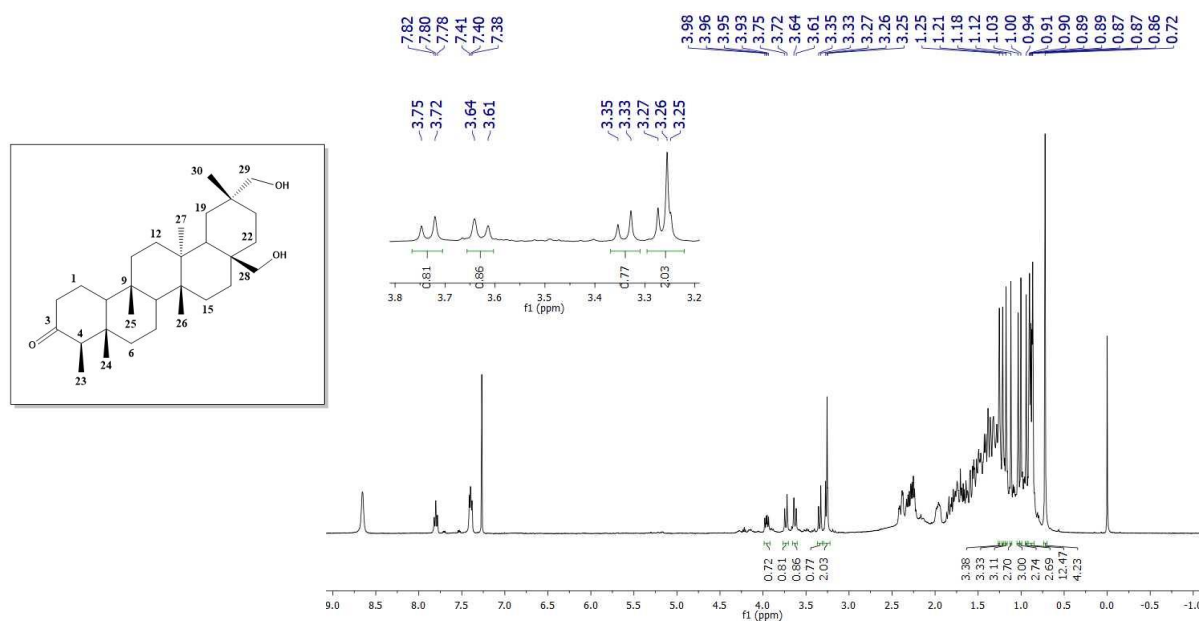


Figura 54A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM22** em  $\text{CDCl}_3$ .

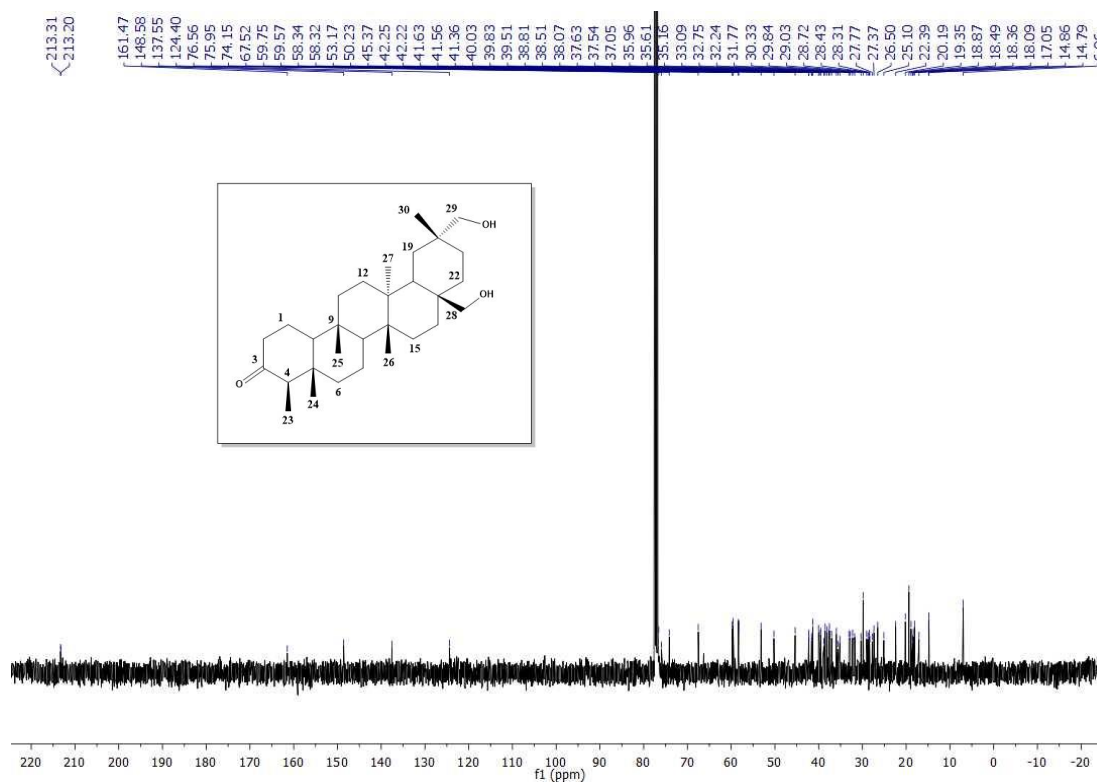


Figura 55A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM22** em  $\text{CDCl}_3$ .

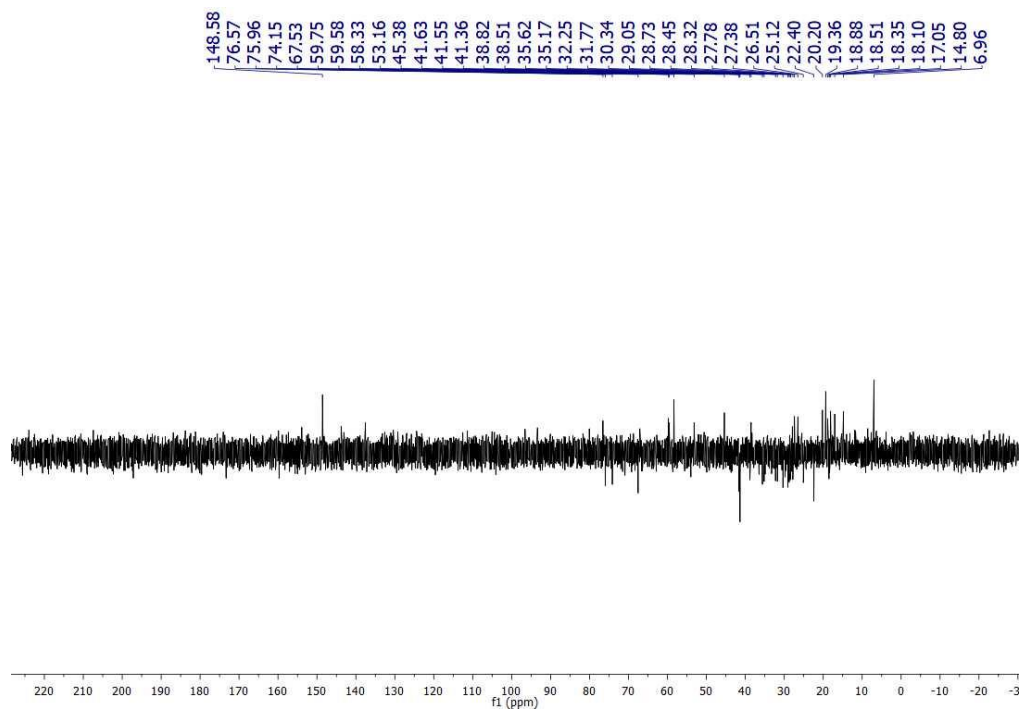


Figura 56A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM22** em  $\text{CDCl}_3$ .

### TM24: 28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona

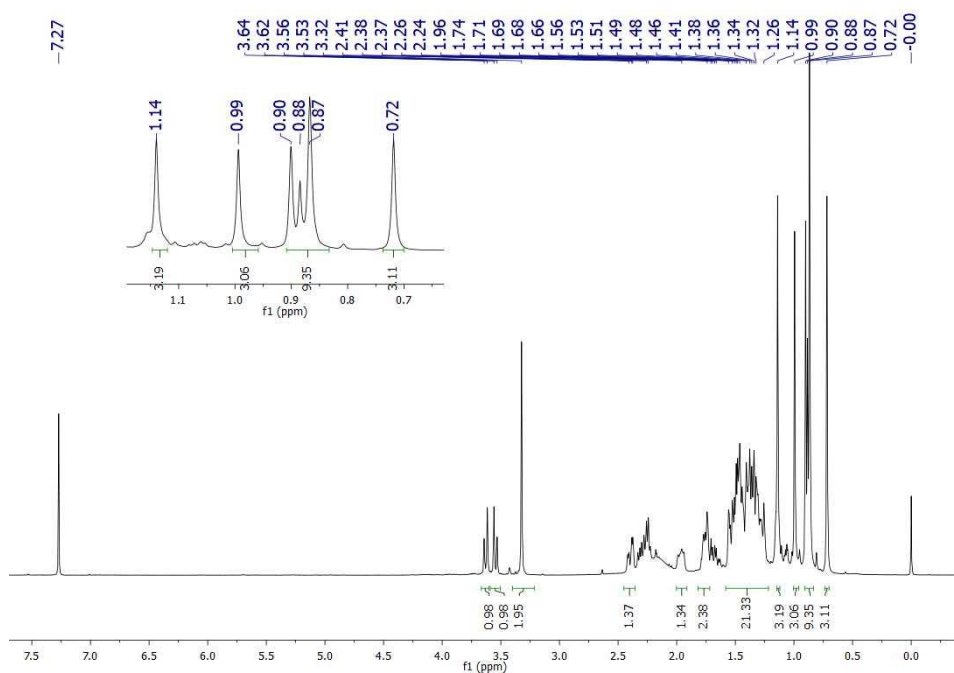


Figura 57A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM24** em  $\text{CDCl}_3$ .

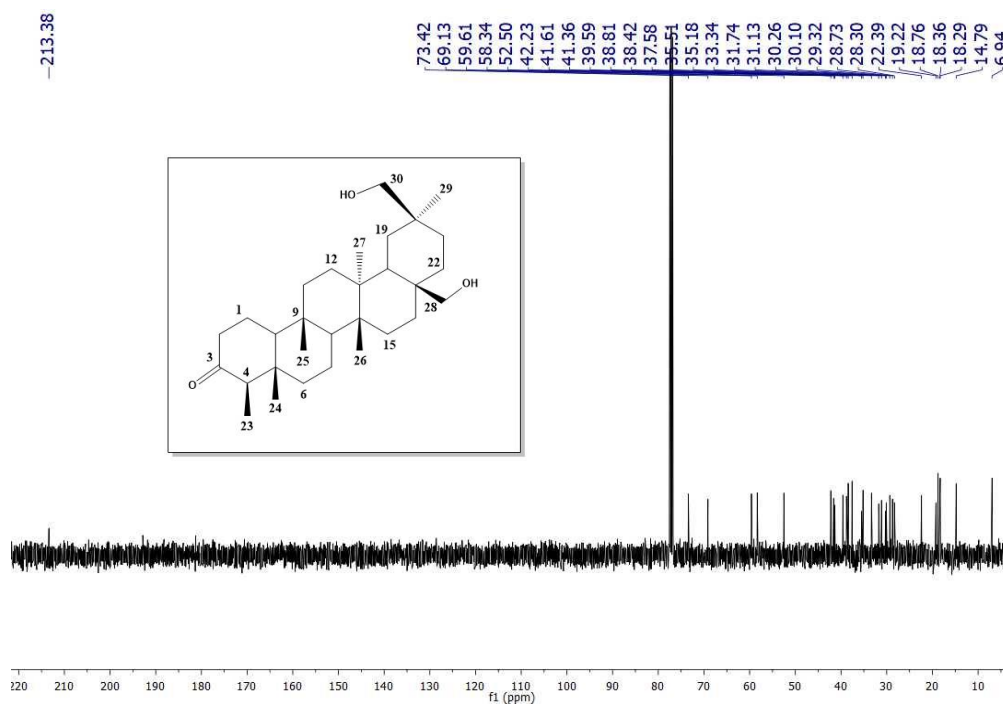


Figura 58A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM24** em  $\text{CDCl}_3$ .

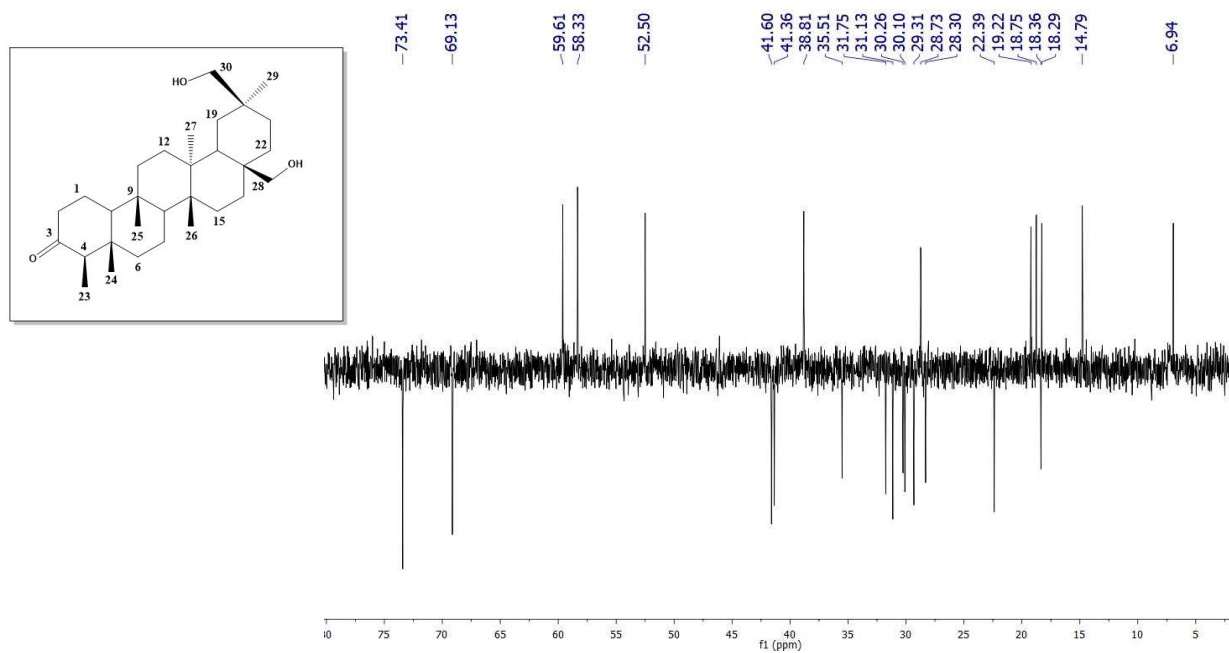


Figura 59A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM24** em  $\text{CDCl}_3$ .

**TM25: epicatequina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavanona)**

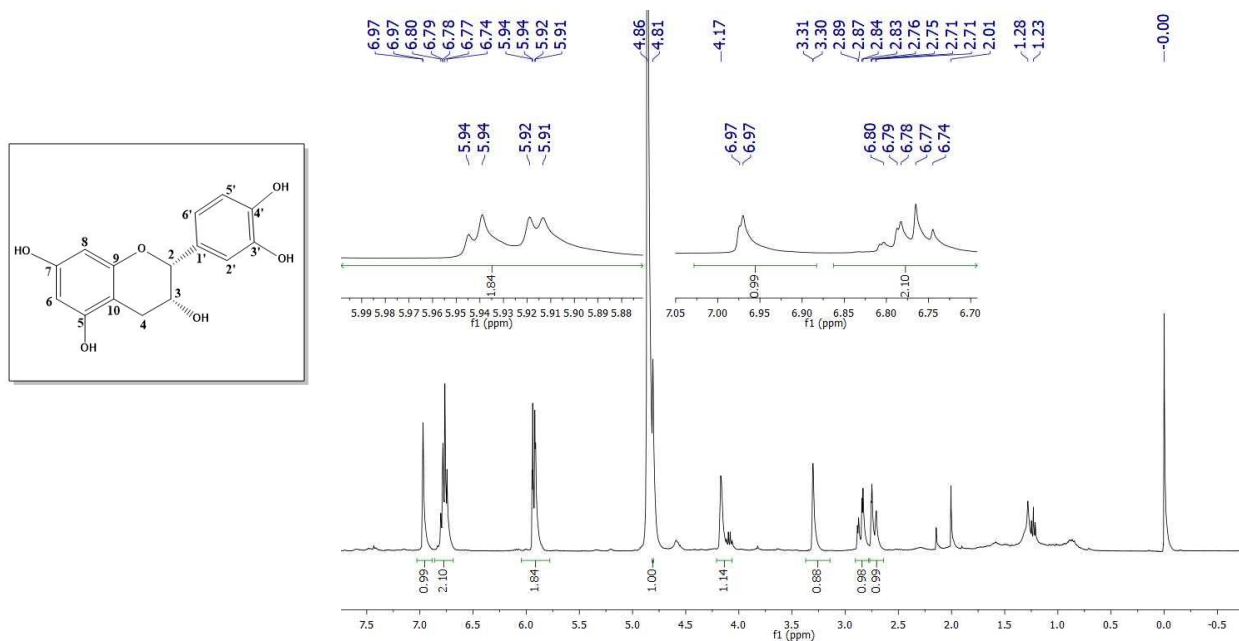


Figura 60A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM25** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

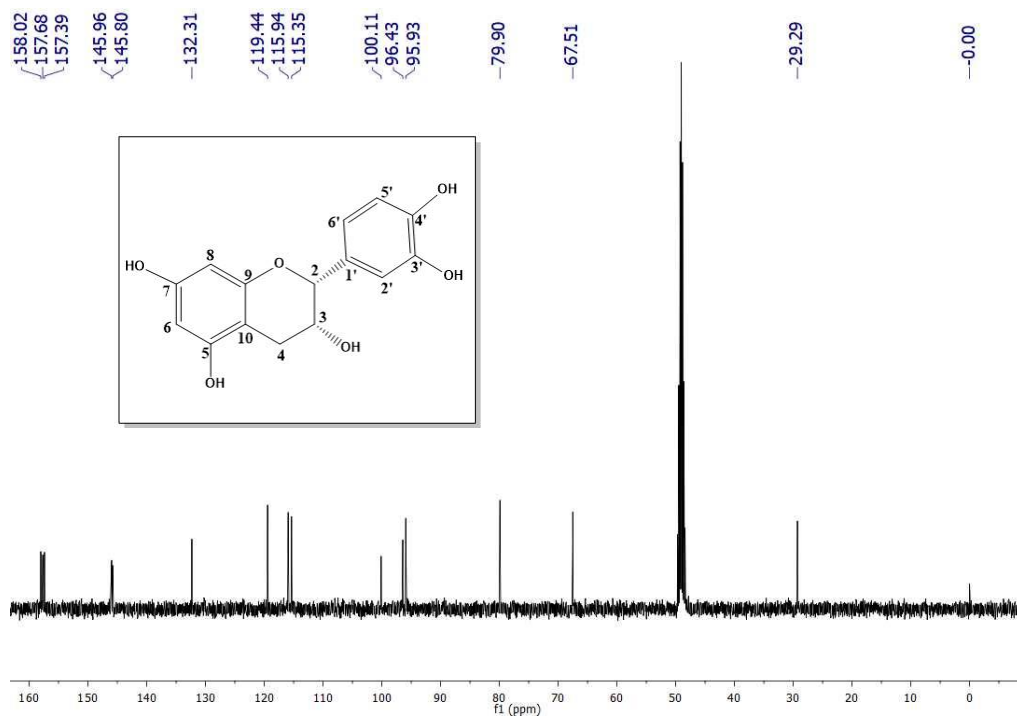


Figura 61A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM25** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

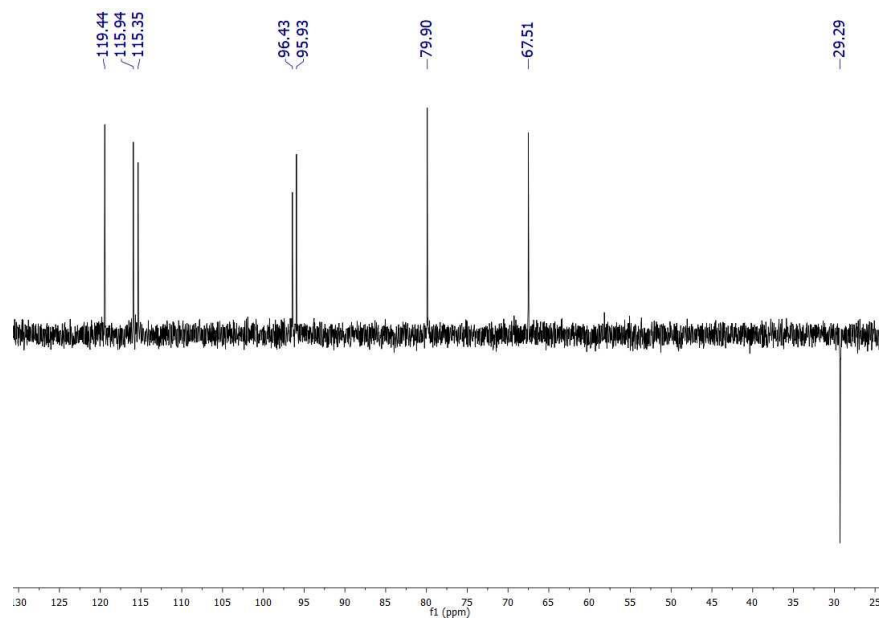
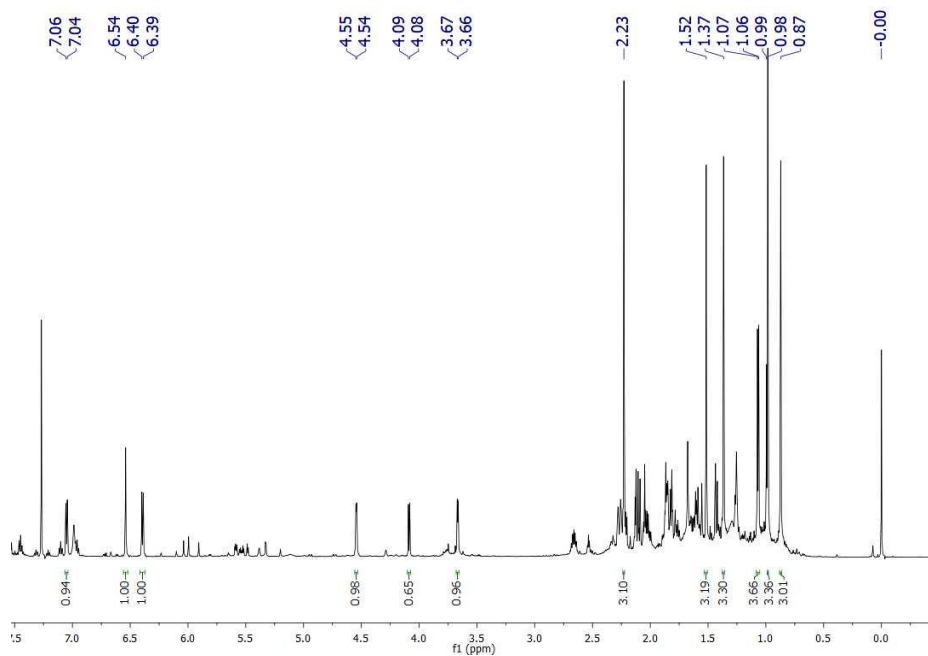
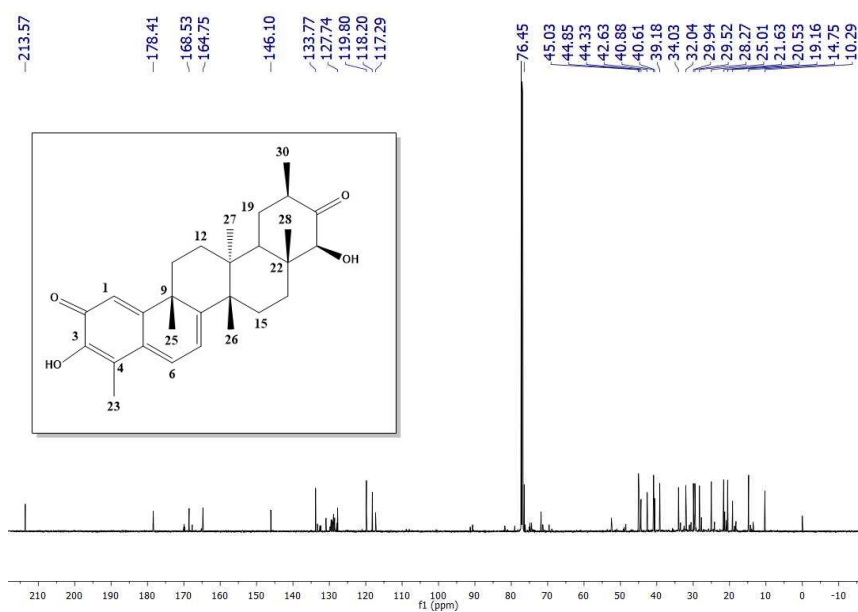


Figura 62A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM25** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

## TM27: tingenina B

Figura 63A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM27** em  $\text{CDCl}_3$ .Figura 64A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM27** em  $\text{CDCl}_3$ .



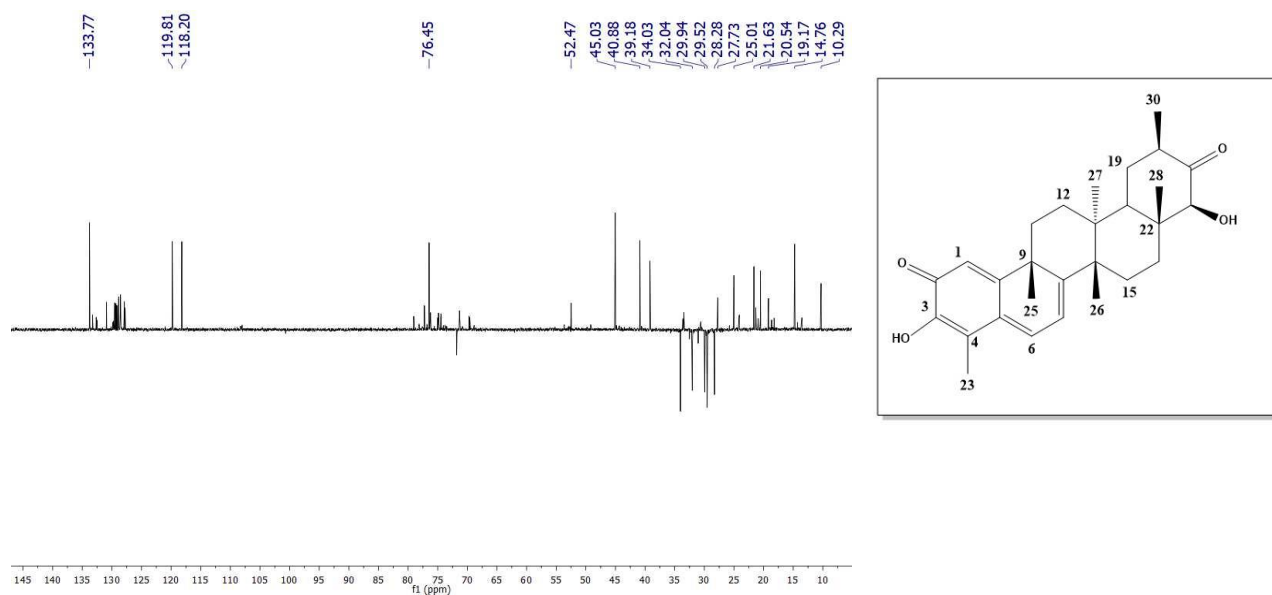


Figura 65A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM27** em  $\text{CDCl}_3$ .

### TM28: netzahualcoiona

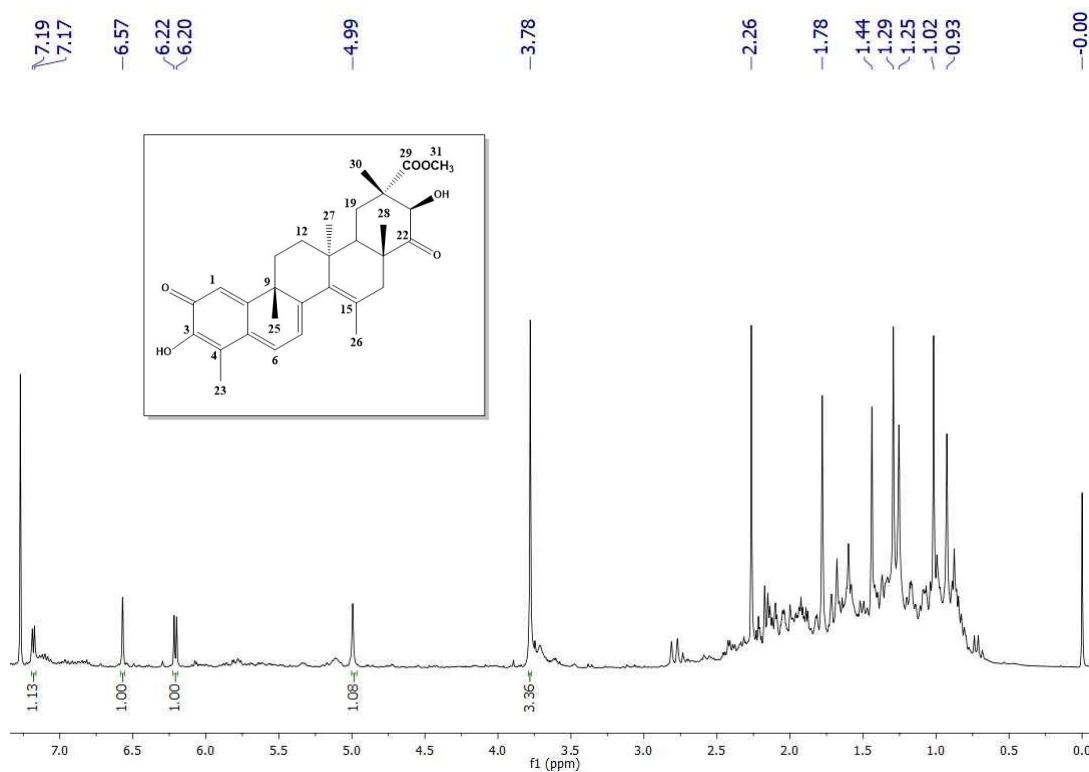


Figura 66A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM28** em  $\text{CDCl}_3$ .

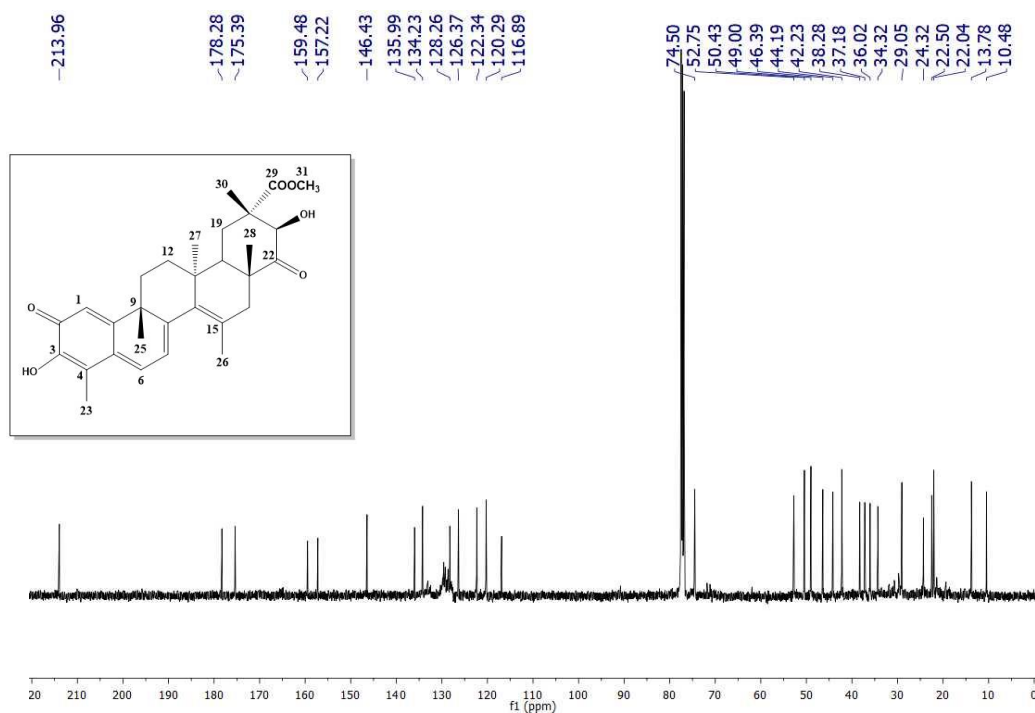


Figura 67A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM28** em  $\text{CDCl}_3$ .

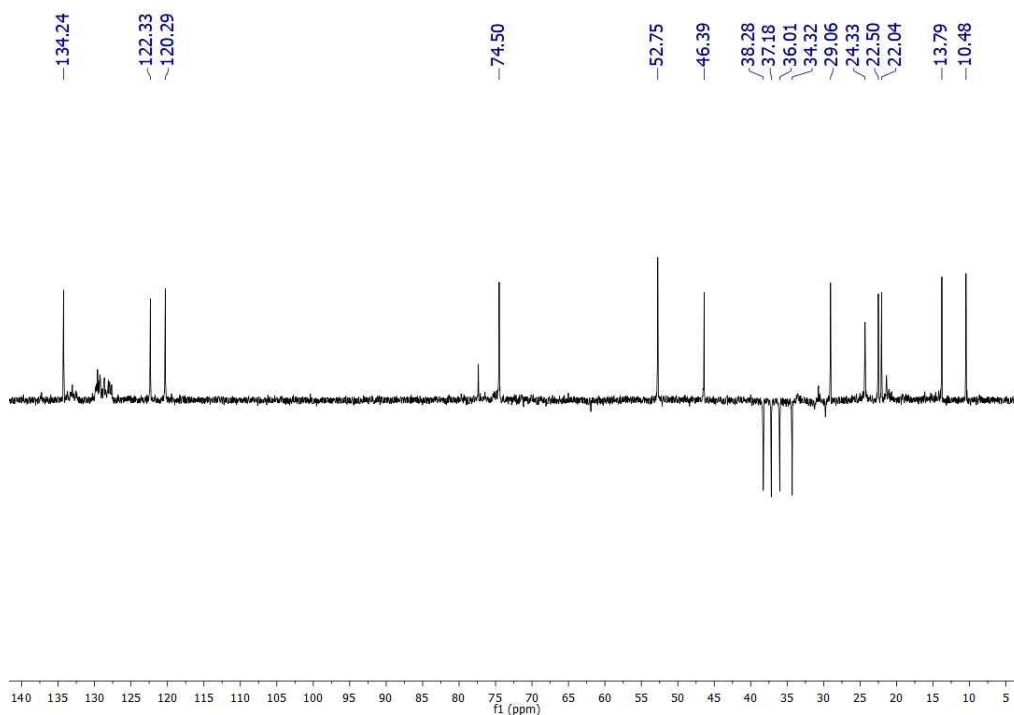


Figura 68A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM28** em  $\text{CDCl}_3$ .

## TM29: netzahualcoiendiol

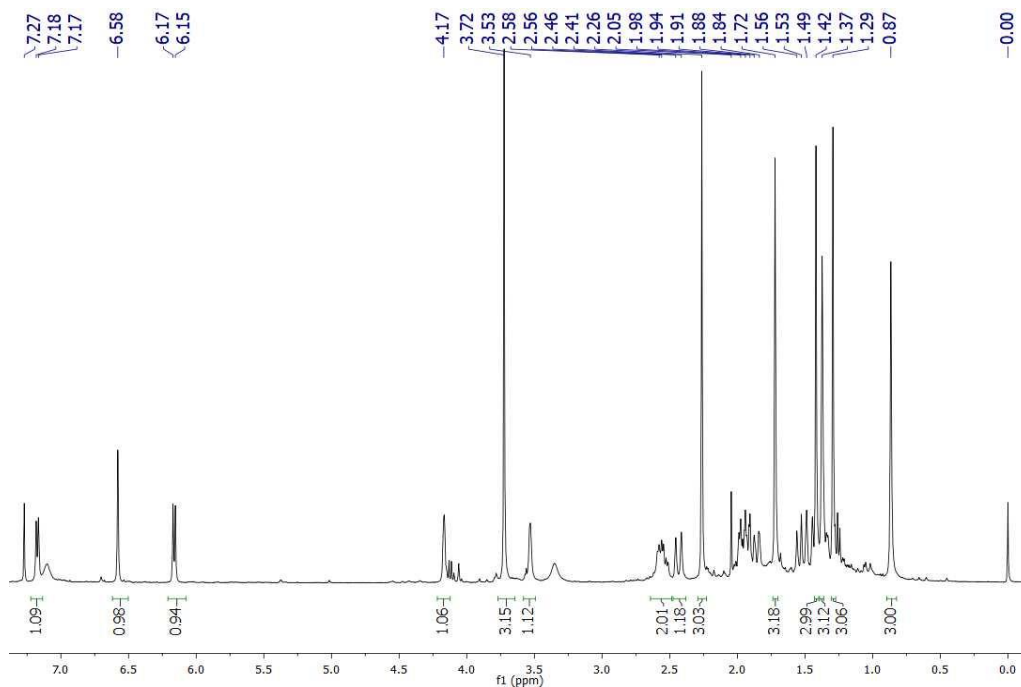


Figura 69A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM29** em  $\text{CDCl}_3$ .

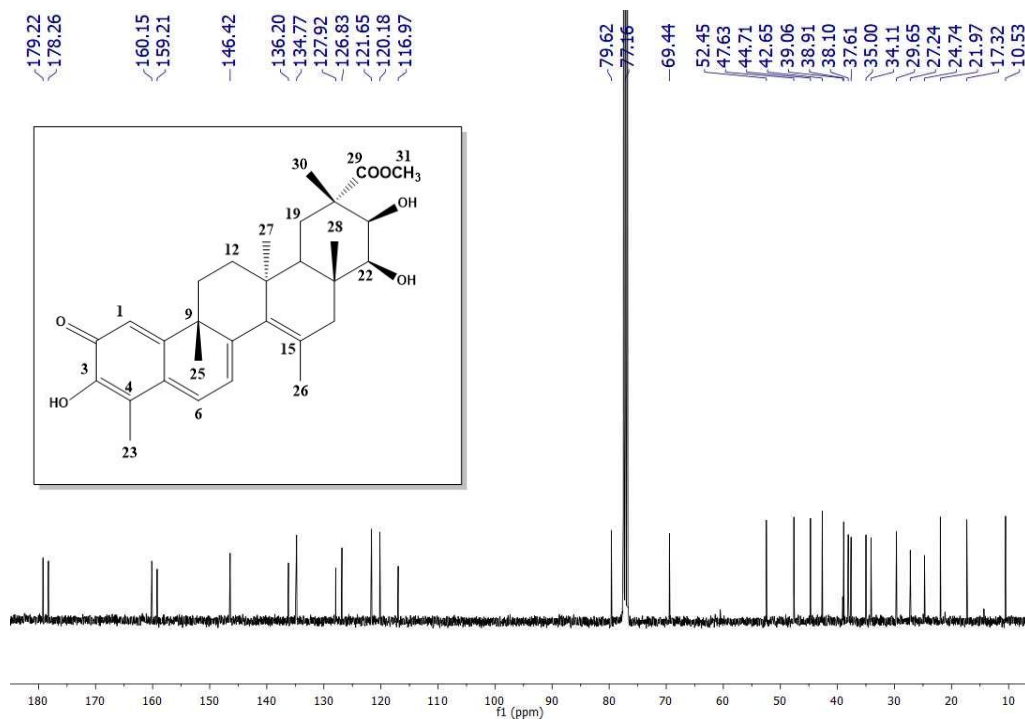


Figura 70A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM29** em  $\text{CDCl}_3$ .

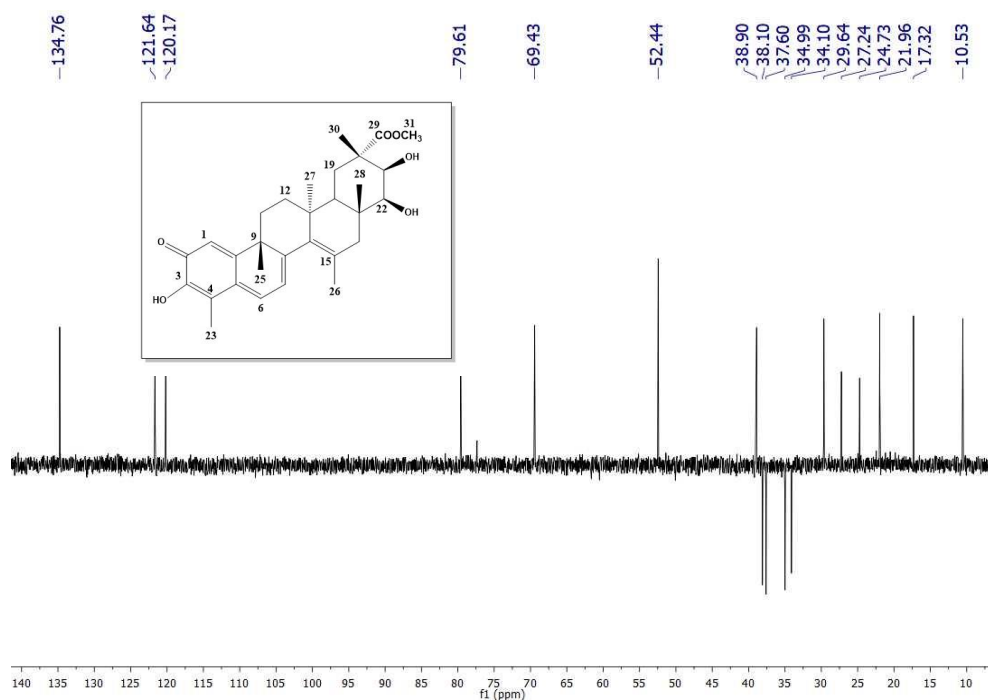


Figura 71A: Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM29** em  $\text{CDCl}_3$ .

### TM30: salaquinona A

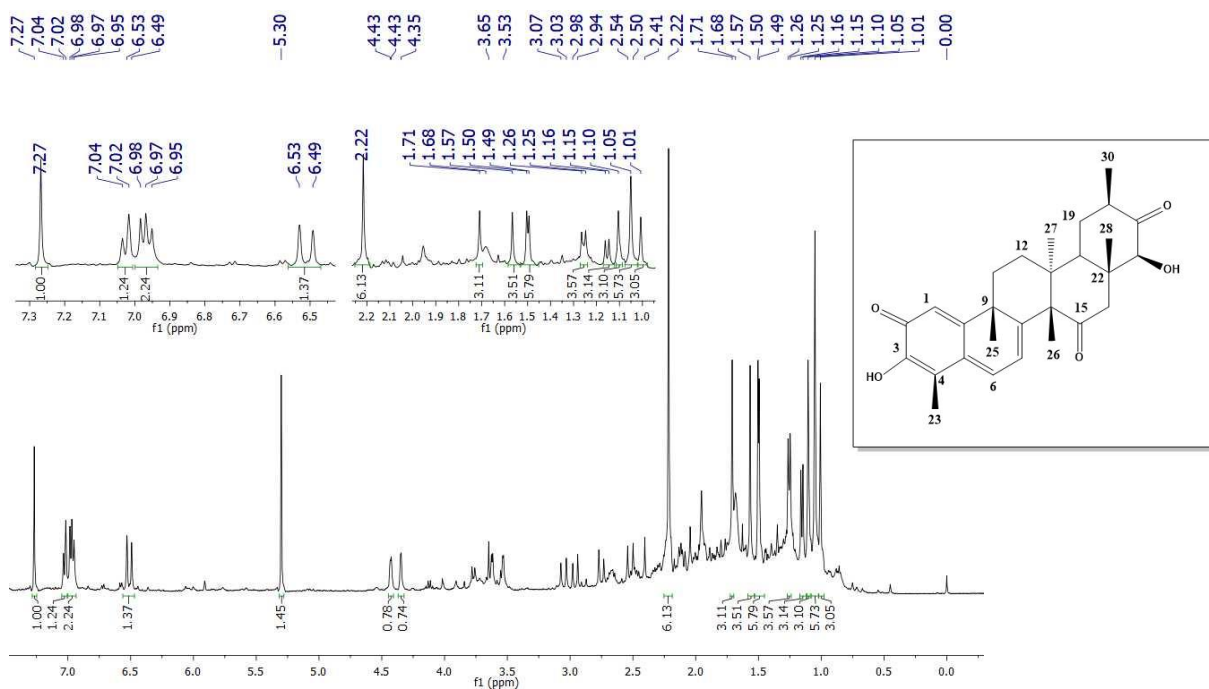


Figura 72A: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **TM30** em  $\text{CDCl}_3$ .

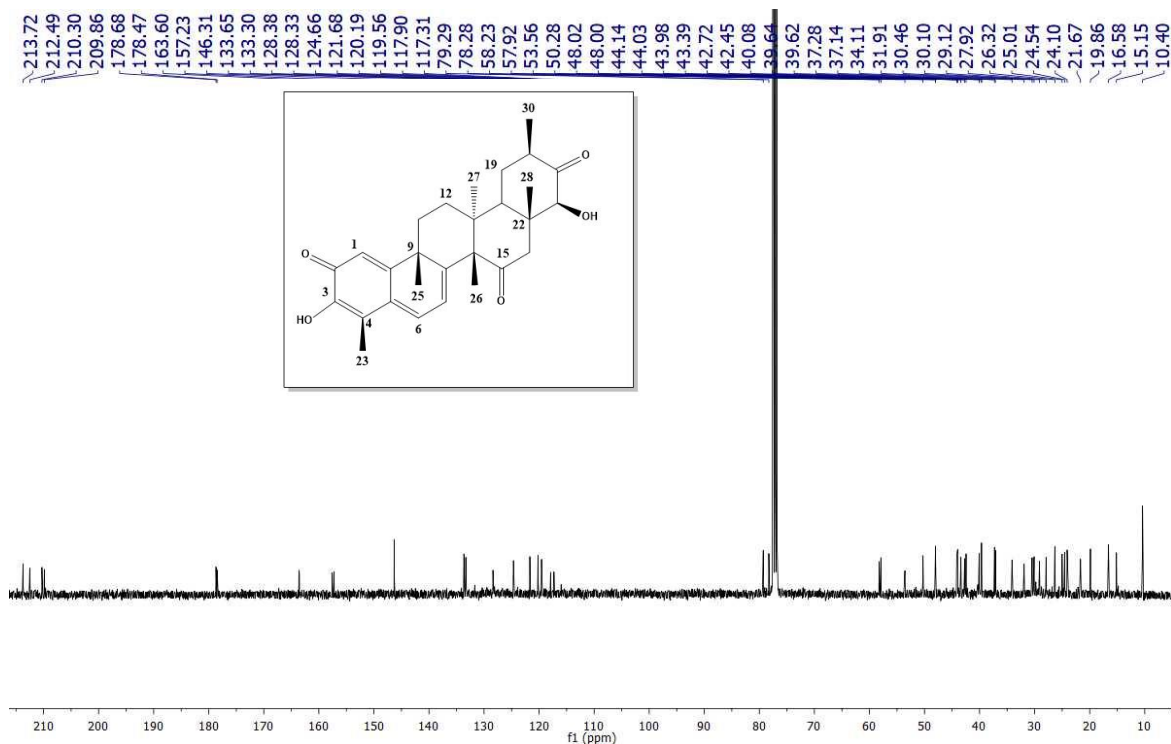


Figura 73A: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **TM30** em  $\text{CDCl}_3$ .

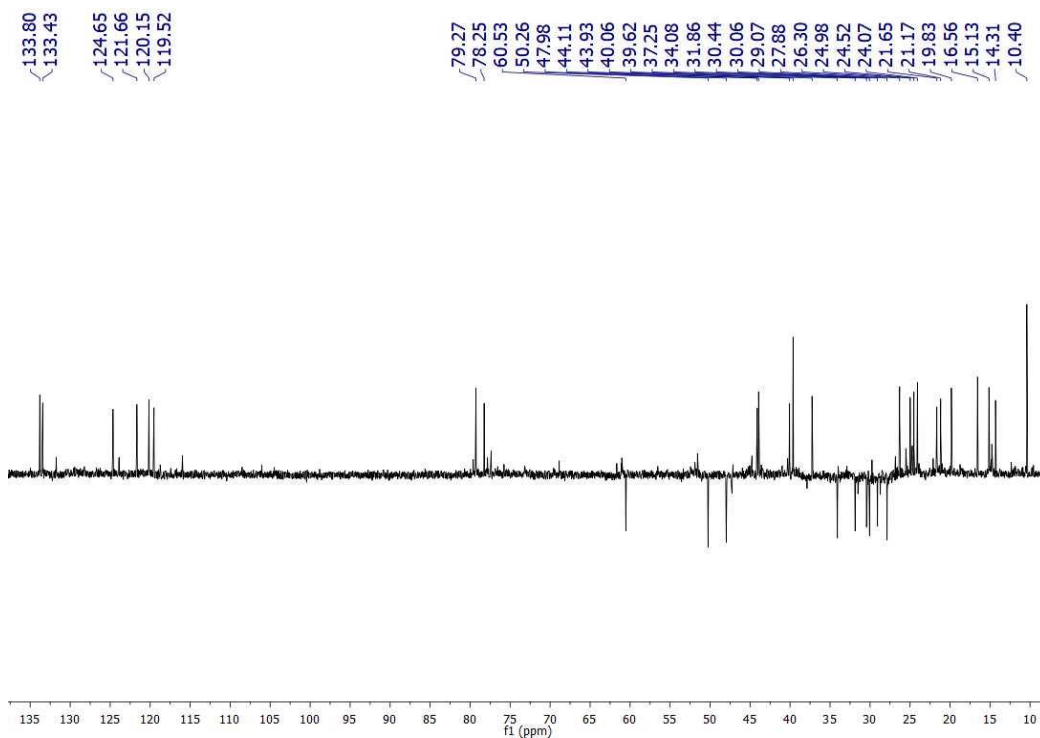
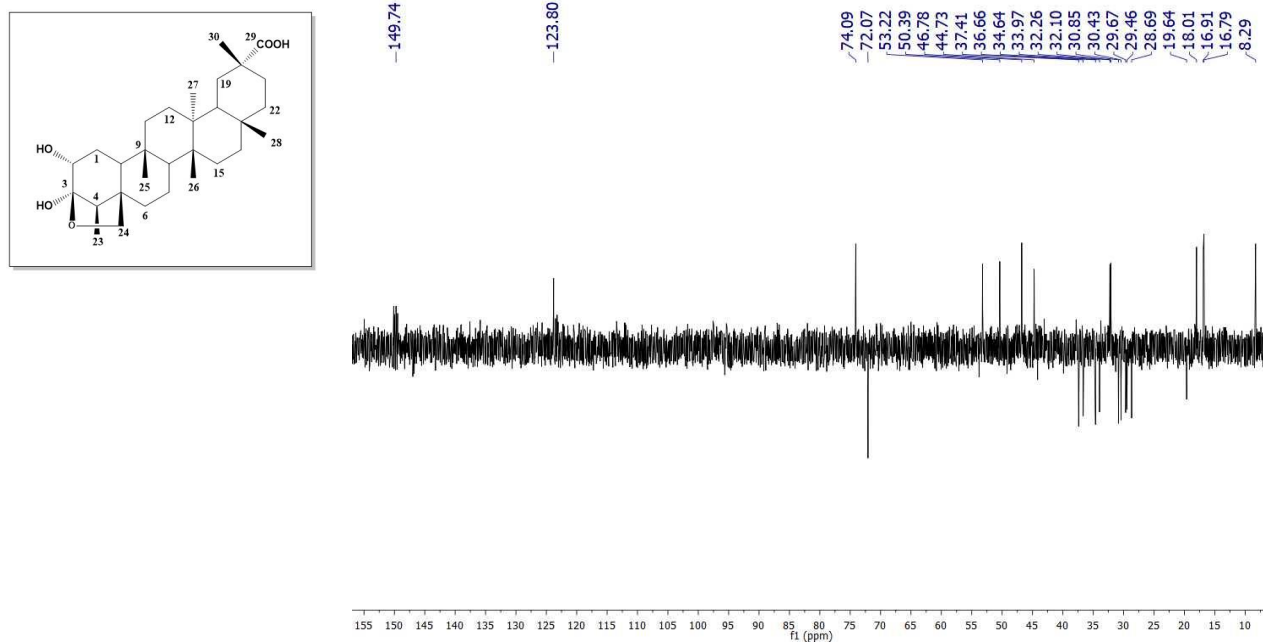


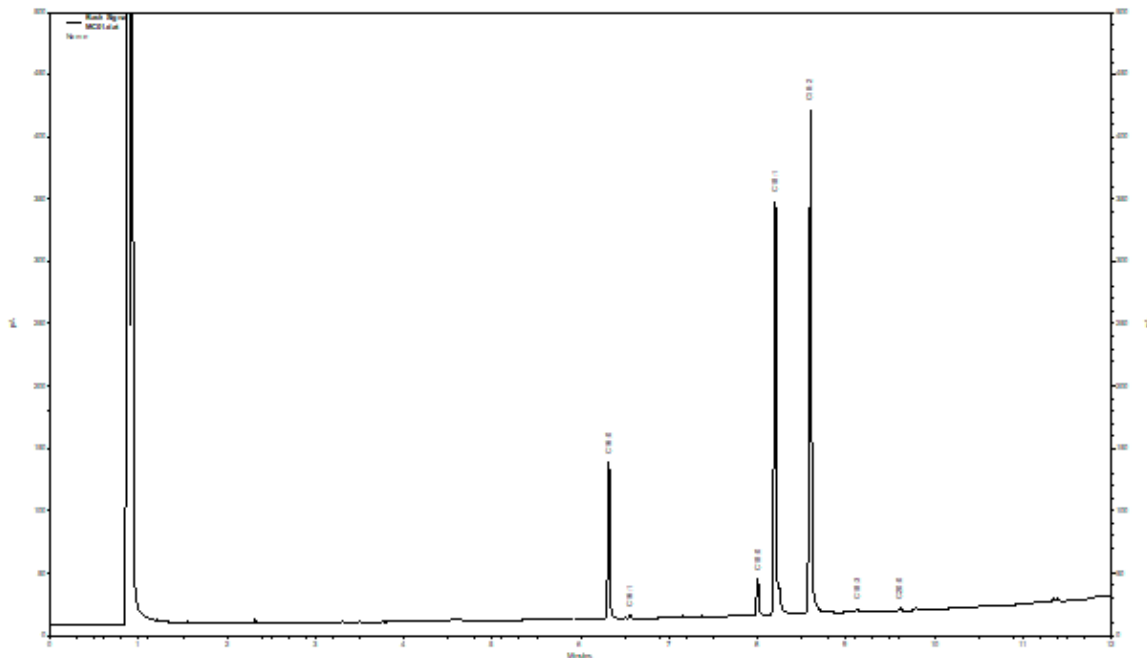
Figura 74A: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM30** em  $\text{CDCl}_3$ .



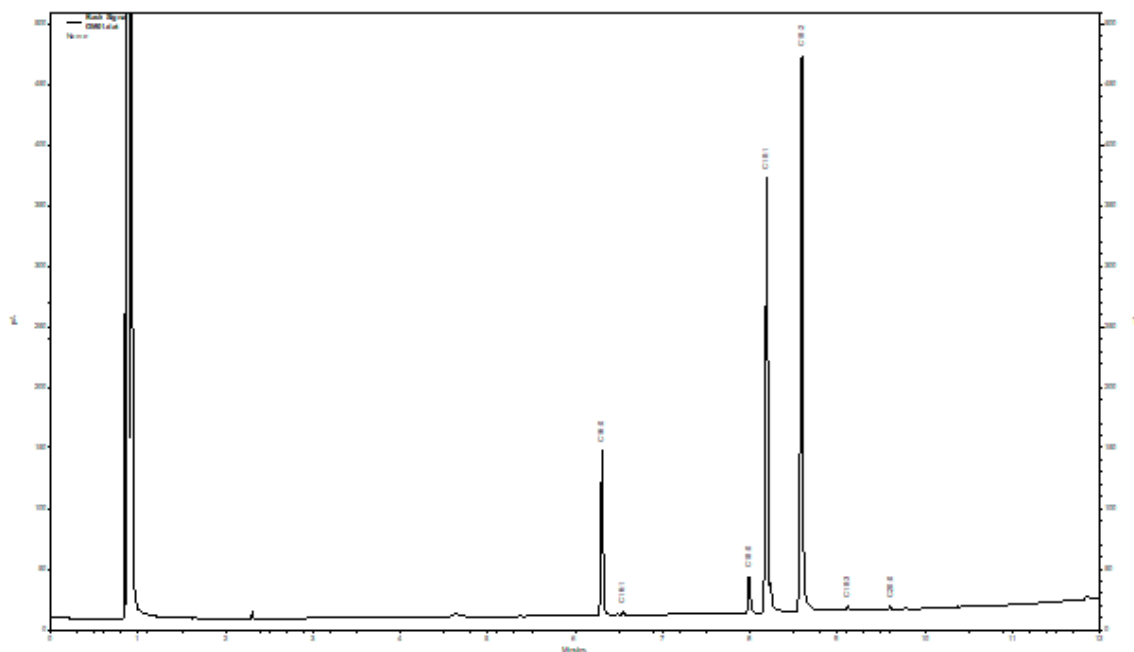


**Figura 77A:** Subspectro DEPT-135 (100 MHz) de **TM31** em piridina  $d_5$ .

## CROMATOGRAMAS

Óleo de sementes de *Tontelea micrantha*

**Figura 78A:** Cromatograma do óleo de sementes de *T. micrantha* vendido no mercado central de Montes Claros (**OMC**).



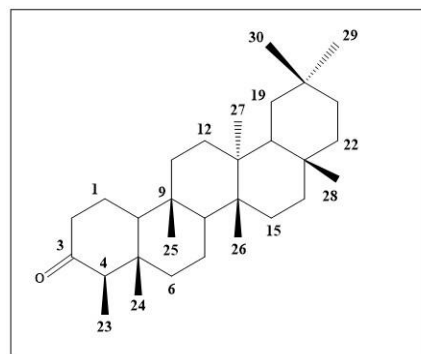
**Figura 79A:** Cromatograma do óleo de sementes de *T. micrantha* da Cooperativa de produtores de uma comunidade local de Montes Claros (**OCP**).



## TABELAS

**Tabela 1A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM03** com os dados da literatura para friedelina (QUEIROGA *et al.*, 2000)

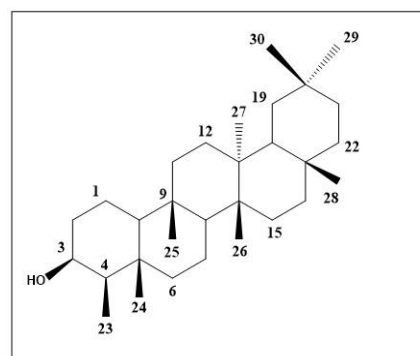
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM03	$\delta_c^{**}$ (QUEIROGA <i>et al.</i> , 2000)
1	CH <sub>2</sub>	22,30	22,3
2	CH <sub>2</sub>	41,54	41,5
3	C	213,20	213,2
4	CH	58,25	58,3
5	C	42,16	42,1
6	CH <sub>2</sub>	41,32	41,3
7	CH <sub>2</sub>	18,25	18,2
8	CH	53,13	53,1
9	C	37,47	37,4
10	CH	59,51	59,4
11	CH <sub>2</sub>	35,65	35,6
12	CH <sub>2</sub>	30,52	30,5
13	C	39,72	39,7
14	C	38,32	38,3
15	CH <sub>2</sub>	32,44	32,4
16	CH <sub>2</sub>	36,03	36,0
17	C	30,02	30,0
18	CH	42,82	42,8
19	CH <sub>2</sub>	35,37	35,3
20	C	28,18	28,1
21	CH <sub>2</sub>	32,80	32,7
22	CH <sub>2</sub>	39,27	39,2
23	CH <sub>3</sub>	6,83	6,8
24	CH <sub>3</sub>	14,67	14,6
25	CH <sub>3</sub>	17,96	17,9
26	CH <sub>3</sub>	20,27	20,2
27	CH <sub>3</sub>	18,67	18,6
28	CH <sub>3</sub>	32,11	32,1
29	CH <sub>3</sub>	35,03	35,0
30	CH <sub>3</sub>	31,79	31,8



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/75 MHz

**Tabela 2A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM04** com os dados da literatura para friedelan-3 $\beta$ -ol (QUEIROGA *et al.*, 2000)

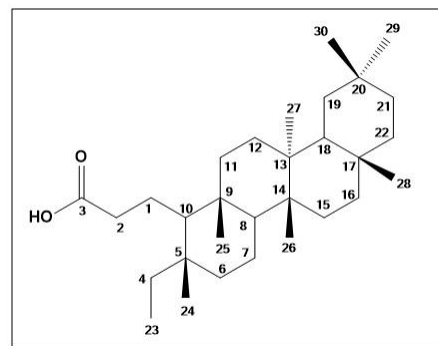
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM04	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (QUEIROGA <i>et al.</i> , 2000)
1	CH <sub>2</sub>	15,91	15,48
2	CH <sub>2</sub>	36,10	36,14
3	CH	72,38	71,87
4	CH	49,33	48,86
5	C	37,92	37,48
6	CH <sub>2</sub>	41,81	41,38
7	CH <sub>2</sub>	17,59	17,18
8	CH	53,22	52,78
9	C	37,13	36,70
10	CH	61,46	61,00
11	CH <sub>2</sub>	35,40	35,16
12	CH <sub>2</sub>	30,66	29,28
13	C	38,38	37,93
14	C	39,69	39,11
15	CH <sub>2</sub>	32,34	32,34
16	CH <sub>2</sub>	35,59	35,68
17	C	30,03	29,62
18	CH	42,85	42,41
19	CH <sub>2</sub>	35,35	34,94
20	C	28,18	27,79
21	CH <sub>2</sub>	32,84	32,41
22	CH <sub>2</sub>	39,29	38,87
23	CH <sub>3</sub>	11,75	11,37
24	CH <sub>3</sub>	16,43	16,04
25	CH <sub>3</sub>	18,28	17,89
26	CH <sub>3</sub>	18,66	18,28
27	CH <sub>3</sub>	20,13	19,73
28	CH <sub>3</sub>	32,10	31,78
29	CH <sub>3</sub>	35,03	34,66
30	CH <sub>3</sub>	31,81	31,44



\*CDCl<sub>3</sub> + piridina *d*<sub>5</sub>/100 MHz    \*\*CDCl<sub>3</sub>/75 MHz

**Tabela 3A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM05** com os dados da literatura para ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (VIEIRA-FILHO, 2001)

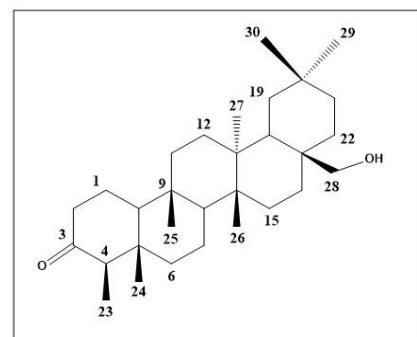
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM05	$\delta_{\text{C}}^*$ (VIEIRA-FILHO, 2001)
1	CH <sub>2</sub>	21,08	21,15
2	CH <sub>2</sub>	37,41	37,24
3	C	179,05	178,78
4	CH <sub>2</sub>	36,08	36,18
5	C	37,85	37,90
6	CH <sub>2</sub>	38,97	39,05
7	CH <sub>2</sub>	18,12	18,16
8	CH	53,01	53,07
9	C	39,08	39,14
10	CH	59,05	59,89
11	CH <sub>2</sub>	35,21	35,28
12	CH <sub>2</sub>	30,22	30,27
13	C	39,65	39,70
14	C	38,34	38,40
15	CH <sub>2</sub>	32,31	32,38
16	CH <sub>2</sub>	36,11	36,15
17	C	30,03	30,07
18	CH	42,87	42,97
19	CH <sub>2</sub>	35,33	35,39
20	C	28,18	28,20
21	CH <sub>2</sub>	32,88	32,95
22	CH <sub>2</sub>	39,31	39,34
23	CH <sub>3</sub>	7,60	7,60
24	CH <sub>3</sub>	19,41	19,50
25	CH <sub>3</sub>	17,94	17,96
26	CH <sub>3</sub>	20,16	20,15
27	CH <sub>3</sub>	18,75	18,74
28	CH <sub>3</sub>	32,13	32,16
29	CH <sub>3</sub>	34,98	34,98
30	CH <sub>3</sub>	31,86	31,88



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz

**Tabela 4A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM06** com os dados da literatura para 28-hidroxifriedelan-3-ona (RODRIGUES *et al.*, 2015)

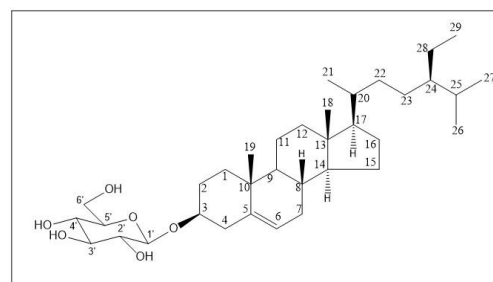
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM06	$\delta_{\text{C}}^*$ ( RODRIGUES <i>et al.</i> , 2015)
1	CH <sub>2</sub>	22,27	22,27
2	CH <sub>2</sub>	41,51	41,51
3	C	212,99	213,13
4	CH	58,25	58,24
5	C	42,11	42,11
6	CH <sub>2</sub>	41,29	41,26
7	CH <sub>2</sub>	18,26	18,25
8	CH	52,53	52,50
9	C	37,50	37,47
10	CH	59,54	59,51
11	CH <sub>2</sub>	35,47	35,45
12	CH <sub>2</sub>	30,12	30,11
13	C	39,40	39,38
14	C	38,18	38,16
15	CH <sub>2</sub>	31,31	31,26
16	CH <sub>2</sub>	29,15	29,14
17	C	35,19	35,18
18	CH	39,48	39,46
19	CH <sub>2</sub>	34,53	34,50
20	C	28,16	28,16
21	CH <sub>2</sub>	31,44	31,40
22	CH <sub>2</sub>	33,41	33,38
23	CH <sub>3</sub>	6,82	6,83
24	CH <sub>3</sub>	14,68	14,67
25	CH <sub>3</sub>	18,08	18,08
26	CH <sub>3</sub>	19,09	19,08
27	CH <sub>3</sub>	19,20	19,20
28	CH <sub>2</sub>	68,08	68,07
29	CH <sub>3</sub>	32,85	32,84
30	CH <sub>3</sub>	34,27	34,26



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz

**Tabela 5A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM08** com os dados da literatura para 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (RAI *et al.*, 2006)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM08	$\delta_c^{**}$ (RAI <i>et al.</i> , 2006)
1	CH <sub>2</sub>	37,33	37,47
2	CH <sub>2</sub>	29,90	30,23
3	CH	78,24	78,57
4	CH <sub>2</sub>	39,84	39,94
5	C	140,66	140,88
6	CH	121,73	121,91
7	CH <sub>2</sub>	32,01	32,17
8	CH	31,93	32,05
9	CH	50,21	50,33
10	C	36,75	36,92
11	CH <sub>2</sub>	21,11	21,28
12	CH <sub>2</sub>	38,98	39,32
13	C	42,36	42,47
14	CH	56,76	56,82
15	CH <sub>2</sub>	24,36	24,50
16	CH <sub>2</sub>	28,34	28,55
17	CH	56,17	56,23
18	CH <sub>3</sub>	11,90	11,99
19	CH <sub>3</sub>	19,32	19,43
20	CH	36,20	36,39
21	CH <sub>3</sub>	18,89	19,02
22	CH <sub>2</sub>	34,05	34,19
23	CH <sub>2</sub>	26,25	26,35
24	CH	45,92	46,03
25	CH	29,30	29,44
26	CH <sub>3</sub>	19,14	19,22
27	CH <sub>3</sub>	19,88	20,00
28	CH <sub>2</sub>	23,22	23,38
29	CH <sub>3</sub>	12,06	12,12
1'	CH	102,11	102,54
2'	CH	74,54	75,29
3'	CH	77,75	78,45
4'	CH	71,42	71,64
5'	CH	77,46	78,05
6'	CH <sub>2</sub>	62,64	62,80

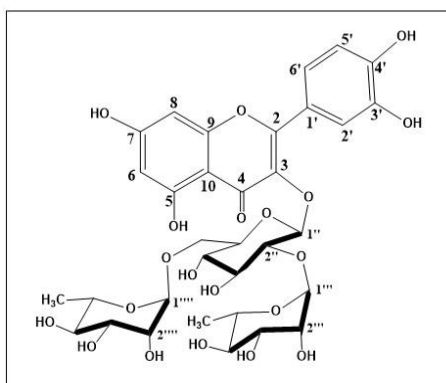


\*CDCl<sub>3</sub> + piridina d<sub>5</sub> /100 MHz \*\*piridina-d<sub>5</sub>/100 MHz

**Tabela 6A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM10** com os dados da literatura para **3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)][ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de quercetina (SRINROCH *et al.*, 2019)**

Nº C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM10	$\delta_{\text{C}}^*$ (SRINROCH <i>et al.</i> , 2019)	Nº C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM10	$\delta_{\text{C}}^*$ (SRINROCH <i>et al.</i> , 2019)
2	C	158,89	158,9	1''	CH	100,44	100,5
3	C	134,40	134,5	2''	CH	79,98	80,0
4	C	179,20	179,3	3''	CH	78,81	78,9
5	C	162,99	163,2	4''	CH	71,78	71,9
6	CH	99,75	99,7	5''	CH	76,94	77,1
7	C	165,54	165,6	6''	CH <sub>2</sub>	68,22	68,3
8	CH	94,70	94,7	1'''	CH	102,57	102,6
9	C	158,35	158,4	2'''	CH	72,20	72,3
10	C	105,85	105,9	3'''	CH	72,32	72,4
1'	C	123,50	123,5	4'''	CH	73,98	74,1
2'	CH	117,41	117,4	5'''	CH	69,91	70,0
3'	C	145,82	145,9	6'''	CH <sub>3</sub>	17,48	17,5
4'	C	149,46	149,5	1''''	CH	102,17	102,3
5'	CH	116,05	116,1	2''''	CH	72,06	72,1
6'	CH	123,43	123,6	3''''	CH	72,20	72,3
				4''''	CH	73,82	73,9
				5''''	CH	69,67	69,7
				6''''	CH <sub>3</sub>	17,78	17,8

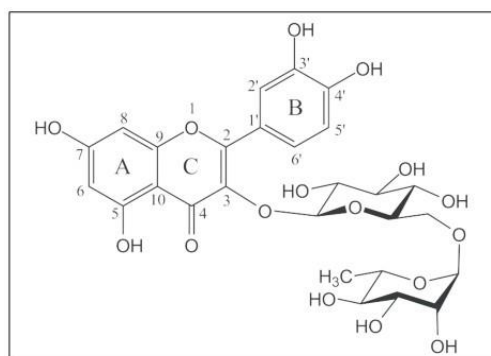
\*CD<sub>3</sub>OD/100 MHz



**Tabela 7A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM11** com os dados da literatura para a **rutina** (VENEGAS-CASANOVA *et al.*, 2018)

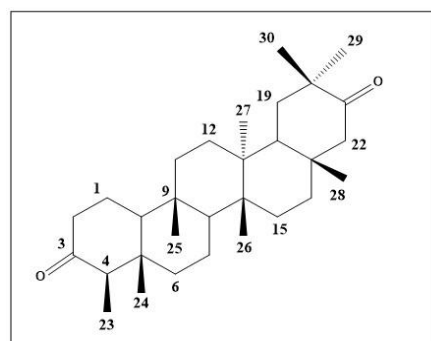
Nº C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM11	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (VENEGAS-CASANOVA <i>et al.</i> , 2018)	Nº C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM11	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (VENEGAS-CASANOVA <i>et al.</i> , 2018)
2	C	158,53	158,5	1''	CH	104,78	104,8
3	C	135,66	135,7	2''	CH	78,21	78,2
4	C	179,41	179,4	3''	CH	73,97	74,0
5	C	162,99	163,0	4''	CH	72,13	72,1
6	CH	100,02	100,0	5''	CH	75,76	75,8
7	C	166,13	166,0	6''	CH <sub>2</sub>	68,59	68,6
8	CH	94,93	94,9	1'''	CH	102,45	102,4
9	C	159,35	159,3	2'''	CH	71,42	71,4
10	C	105,63	105,7	3'''	CH	72,27	72,3
1'	C	123,14	123,2	4'''	CH	77,23	77,2
2'	CH	117,73	117,7	5'''	CH	69,74	69,7
3'	C	145,85	145,8	6'''	CH <sub>3</sub>	17,92	17,9
4'	C	149,84	149,8				
5'	CH	116,09	116,1				
6'	CH	123,60	123,6				

\*CD<sub>3</sub>OD/100 MHz \*\*CD<sub>3</sub>OD/75 MHz



**Tabela 8A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM13** com os dados da literatura para friedelan-3,21-diona (PATRA *et al.*, 1981)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM13	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (PATRA <i>et al.</i> , 1981)
1	CH <sub>2</sub>	22,28	22,4
2	CH <sub>2</sub>	41,49	41,6
3	C	212,85	213,0
4	CH	58,23	58,2
5	C	42,10	42,2
6	CH <sub>2</sub>	41,22	41,3
7	CH <sub>2</sub>	18,28	18,4
8	CH	53,37	53,4
9	C	37,49	37,5
10	CH	59,46	59,5
11	CH <sub>2</sub>	35,55	35,6
12	CH <sub>2</sub>	32,79	32,9
13	C	38,20	38,3
14	C	39,93	40,0
15	CH <sub>2</sub>	30,63	30,7
16	CH <sub>2</sub>	37,03	37,1
17	C	33,22	33,3
18	CH	41,97	42,0
19	CH <sub>2</sub>	35,11	35,1
20	C	42,74	42,8
21	C	218,74	218,8
22	CH <sub>2</sub>	54,99	55,1
23	CH <sub>3</sub>	6,82	6,9
24	CH <sub>3</sub>	14,66	14,8
25	CH <sub>3</sub>	17,74	17,9
26	CH <sub>3</sub>	18,46	18,6
27	CH <sub>3</sub>	21,20	21,4
28	CH <sub>3</sub>	33,22	33,6
29	CH <sub>3</sub>	28,82	28,9
30	CH <sub>3</sub>	24,99	25,9

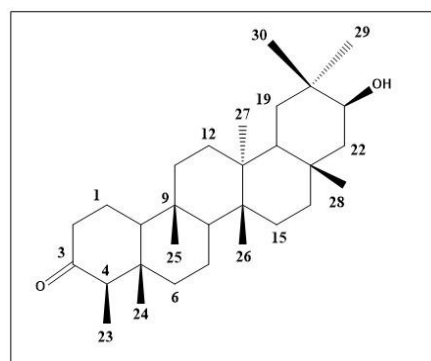


\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/20 MHz



**Tabela 9A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM14** com os dados da literatura para 21 $\beta$ -hidroxifriedelan-3-ona (NGUYEN e TRAN, 2009)

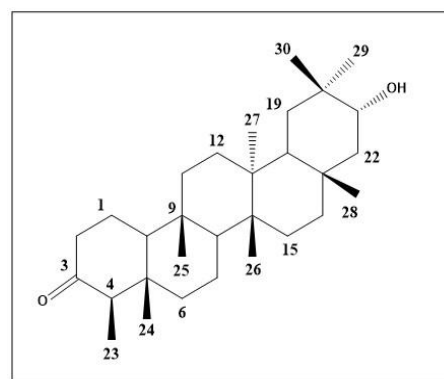
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM14	$\delta_c^{**}$ (NGUYEN e TRAN, 2009)
1	CH <sub>2</sub>	22,40	22,3
2	CH <sub>2</sub>	41,64	41,5
3	C	213,17	213,0
4	CH	58,37	58,2
5	C	42,37	42,1
6	CH <sub>2</sub>	41,42	41,3
7	CH <sub>2</sub>	18,39	18,2
8	CH	53,36	53,2
9	C	37,56	37,4
10	CH	59,64	59,5
11	CH <sub>2</sub>	35,78	35,6
12	CH <sub>2</sub>	30,83	30,7
13	C	39,82	39,7
14	C	38,38	38,2
15	CH <sub>2</sub>	32,53	32,4
16	CH <sub>2</sub>	36,84	36,7
17	C	30,01	29,8
18	CH	42,84	42,7
19	CH <sub>2</sub>	36,01	35,9
20	C	33,94	33,8
21	CH	75,82	75,7
22	CH <sub>2</sub>	48,64	48,5
23	CH <sub>3</sub>	6,94	***
24	CH <sub>3</sub>	14,79	***
25	CH <sub>3</sub>	18,05	17,9
26	CH <sub>3</sub>	20,84	20,7
27	CH <sub>3</sub>	18,88	18,7
28	CH <sub>3</sub>	34,54	34,3
29	CH <sub>3</sub>	34,88	34,7
30	CH <sub>3</sub>	24,10	24,0



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub> \*\*\* Não foram encontrados dados para esses deslocamentos

**Tabela 10A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM15** com os dados da literatura para 21 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona (SETZER *et al.*, 2000)

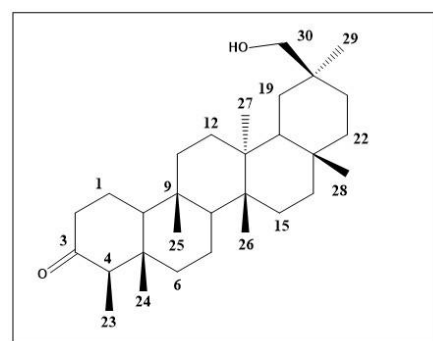
Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM15	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (SETZER <i>et al.</i> , 2000)
1	CH <sub>2</sub>	22,41	22,30
2	CH <sub>2</sub>	41,62	41,50
3	C	213,26	213,2
4	CH	58,34	58,20
5	C	42,20	42,00
6	CH <sub>2</sub>	41,38	41,20
7	CH <sub>2</sub>	18,39	18,00
8	CH	51,69	51,50
9	C	37,64	37,50
10	CH	59,64	59,50
11	CH <sub>2</sub>	35,43	35,30
12	CH <sub>2</sub>	30,33	30,20
13	C	39,16	39,00
14	C	38,95	38,80
15	CH <sub>2</sub>	30,58	30,40
16	CH <sub>2</sub>	36,24	36,10
17	C	32,63	32,50
18	CH	44,45	44,30
19	CH <sub>2</sub>	36,12	35,90
20	C	34,50	34,40
21	CH	74,45	74,30
22	CH <sub>2</sub>	47,16	47,00
23	CH <sub>3</sub>	6,96	6,80
24	CH <sub>3</sub>	14,81	14,60
25	CH <sub>3</sub>	17,88	17,70
26	CH <sub>3</sub>	18,35	18,20
27	CH <sub>3</sub>	19,42	19,30
28	CH <sub>3</sub>	33,28	33,10
29	CH <sub>3</sub>	32,01	31,90
30	CH <sub>3</sub>	25,06	24,90



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/125 MHz

**Tabela 11A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM16** com os dados da literatura para 30-hidroxifriedelan-3-ona (FERREIRA, 2014)

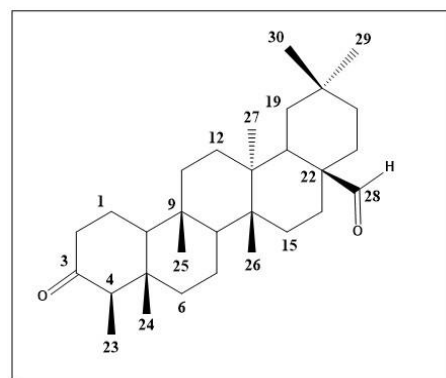
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM16	$\delta_{\text{C}}^*$ (FERREIRA, 2014)
1	CH <sub>2</sub>	22,30	22,36
2	CH <sub>2</sub>	41,53	41,39
3	C	213,12	215,01
4	CH	58,27	58,38
5	C	42,16	42,41
6	CH <sub>2</sub>	41,33	41,34
7	CH <sub>2</sub>	18,27	18,36
8	CH	53,03	53,05
9	C	37,48	37,58
10	CH	59,55	59,53
11	CH <sub>2</sub>	35,61	35,70
12	CH <sub>2</sub>	30,54	30,54
13	C	39,83	39,92
14	C	38,41	38,54
15	CH <sub>2</sub>	32,15	32,18
16	CH <sub>2</sub>	35,96	36,08
17	C	30,02	30,11
18	CH	42,79	42,86
19	CH <sub>2</sub>	30,54	30,50
20	C	33,40	33,42
21	CH <sub>2</sub>	28,20	28,24
22	CH <sub>2</sub>	38,12	38,22
23	CH <sub>3</sub>	6,82	6,67
24	CH <sub>3</sub>	14,68	14,68
25	CH <sub>3</sub>	18,02	18,08
26	CH <sub>3</sub>	19,97	19,94
27	CH <sub>3</sub>	18,56	18,67
28	CH <sub>3</sub>	32,15	32,18
29	CH <sub>3</sub>	28,94	28,99
30	CH <sub>2</sub>	72,01	71,77



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz

**Tabela 12A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM17** com os dados da literatura para 3-oxo-friedelan-28-al (LI *et al.*, 2010)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM17	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (LI <i>et al.</i> , 2010)
1	CH <sub>2</sub>	22,38	22,2
2	CH <sub>2</sub>	41,60	41,5
3	C	213,10	213,0
4	CH	58,32	58,2
5	C	42,11	42,1
6	CH <sub>2</sub>	41,18	41,2
7	CH <sub>2</sub>	18,17	18,0
8	CH	52,95	52,8
9	C	37,25	37,1
10	CH	59,38	59,2
11	CH <sub>2</sub>	35,56	35,4
12	CH <sub>2</sub>	30,73	30,6
13	C	38,86	38,7
14	C	37,79	37,6
15	CH <sub>2</sub>	32,53	32,4
16	CH <sub>2</sub>	35,07	34,9
17	C	47,85	47,7
18	CH	36,57	36,4
19	CH <sub>2</sub>	35,56	35,4
20	C	28,45	28,3
21	CH <sub>2</sub>	32,49	32,4
22	CH <sub>2</sub>	28,16	28,0
23	CH <sub>3</sub>	6,93	6,8
24	CH <sub>3</sub>	14,74	14,6
25	CH <sub>3</sub>	17,31	17,2
26	CH <sub>3</sub>	20,14	20,0
27	CH <sub>3</sub>	18,92	18,8
28	CH	209,14	209,1
29	CH <sub>3</sub>	34,63	34,5
30	CH <sub>3</sub>	29,53	29,4

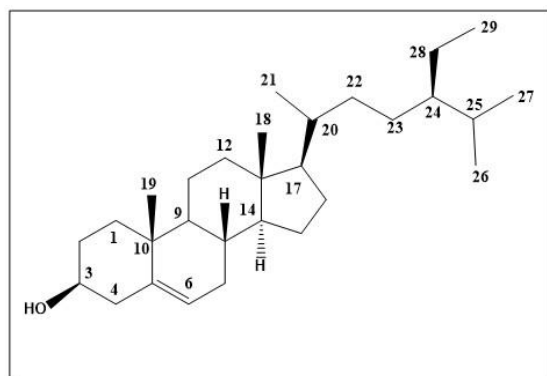


\*CDCl<sub>3</sub> /100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/75 MHz

**Tabela 13A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM20** com os dados da literatura para o  $\beta$ -sitosterol (RODRIGUES *et al.*, 2015)

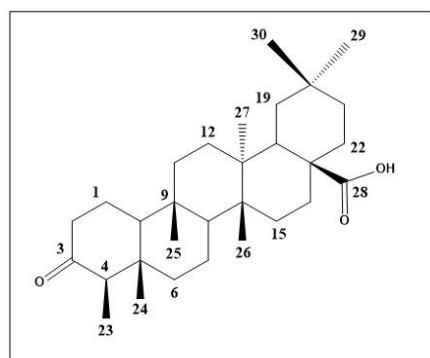
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM20	$\delta_{\text{C}}^*$ (RODRIGUES <i>et al.</i> , 2015)
1	CH <sub>2</sub>	37,40	37,28
2	CH <sub>2</sub>	31,78	31,70
3	CH	71,94	71,84
4	CH <sub>2</sub>	42,42	42,33
5	C	140,90	140,79
6	CH	121,84	121,73
7	CH <sub>2</sub>	32,05	31,94
8	CH	29,30	31,94
9	CH	50,28	50,17
10	C	36,65	36,53
11	CH <sub>2</sub>	21,23	21,11
12	CH <sub>2</sub>	39,92	39,81
13	C	42,42	42,33
14	CH	56,20	56,80
15	CH <sub>2</sub>	24,44	24,32
16	CH <sub>2</sub>	28,38	28,26
17	CH	56,20	56,09
18	CH <sub>3</sub>	12,00	11,87
19	CH <sub>3</sub>	19,18	19,41
20	CH	36,29	36,16
21	CH <sub>3</sub>	18,92	18,80
22	CH <sub>2</sub>	34,09	33,98
23	CH <sub>2</sub>	26,23	26,13
24	CH	45,98	45,88
25	CH	29,30	29,19
26	CH <sub>3</sub>	19,53	19,83
27	CH <sub>3</sub>	19,18	19,05
28	CH <sub>2</sub>	23,21	23,10
29	CH <sub>3</sub>	12,12	12,00

\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz



**Tabela 14A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM21** com os dados da literatura para o ácido 3-oxo-friedelan-28-oico (NOZAKI *et al.*,1990)

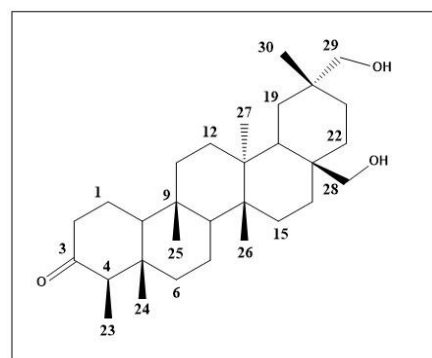
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM21	$\delta_{\text{C}}^{**}$ ( NOZAKI <i>et al.</i> ,1990)
1	CH <sub>2</sub>	22,40	22,23
2	CH <sub>2</sub>	41,64	42,05
3	C	213,26	213,26
4	CH	58,37	58,16
5	C	44,64	44,74
6	CH <sub>2</sub>	41,27	41,47
7	CH <sub>2</sub>	18,24	18,04
8	CH	53,17	52,95
9	C	37,85	37,64
10	CH	59,44	59,21
11	CH <sub>2</sub>	36,07	35,87
12	CH <sub>2</sub>	31,20	31,01
13	C	42,22	41,05
14	C	39,06	38,85
15	CH <sub>2</sub>	29,56	29,31
16	CH <sub>2</sub>	32,61	32,56
17	C	37,85	37,64
18	CH	37,97	37,61
19	CH <sub>2</sub>	35,63	35,41
20	C	28,58	28,39
21	CH <sub>2</sub>	34,99	34,79
22	CH <sub>2</sub>	32,82	32,60
23	CH <sub>3</sub>	6,94	6,79
24	CH <sub>3</sub>	14,80	14,62
25	CH <sub>3</sub>	17,64	17,47
26	CH <sub>3</sub>	20,74	20,56
27	CH <sub>3</sub>	18,67	18,52
28	CH <sub>3</sub>	184,54	184,99
29	CH <sub>3</sub>	29,89	29,69
30	CH <sub>3</sub>	34,64	34,46



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/62,5 MHz

**Tabela 15A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM22** com os dados da literatura para o **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona** (RODRIGUES *et al.*, 2015)

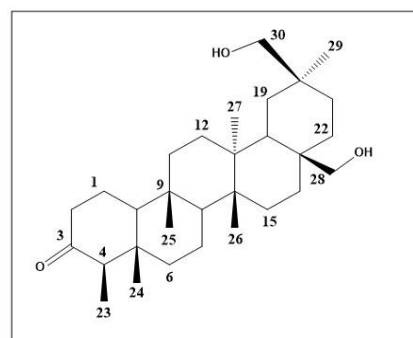
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM21	$\delta_c^*$ ( RODRIGUES <i>et al.</i> , 2015)
1	CH <sub>2</sub>	22,39	22,26
2	CH <sub>2</sub>	41,56	41,51
3	C	213,20	213,07
4	CH	58,32	58,19
5	C	42,22	42,11
6	CH <sub>2</sub>	41,36	41,24
7	CH <sub>2</sub>	18,36	18,23
8	CH	53,17	53,08
9	C	37,54	37,42
10	CH	59,57	59,44
11	CH <sub>2</sub>	35,61	35,52
12	CH <sub>2</sub>	30,33	30,20
13	C	39,83	39,75
14	C	38,07	37,95
15	CH <sub>2</sub>	28,72	28,62
16	CH <sub>2</sub>	31,77	31,90
17	C	35,96	35,98
18	CH	38,51	38,45
19	CH <sub>2</sub>	29,03	29,14
20	C	33,09	33,04
21	CH <sub>2</sub>	28,31	28,36
22	CH <sub>2</sub>	32,24	32,27
23	CH <sub>3</sub>	6,96	6,83
24	CH <sub>3</sub>	14,79	14,65
25	CH <sub>3</sub>	18,09	17,95
26	CH <sub>3</sub>	20,19	20,11
27	CH <sub>3</sub>	18,87	18,75
28	CH <sub>3</sub>	67,53	66,97
29	CH <sub>3</sub>	74,15	73,87
30	CH <sub>3</sub>	26,50	26,48



\*CDCl<sub>3</sub>+pirindina d<sub>5</sub>/100 MHz

**Tabela 16A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM24** com os dados da literatura para o **28,30-di-hidroxifriedelan-3-ona** (PATRA e CHAUDHURI, 1987)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM24	$\delta_{\text{C}}^{**}$ PATRA e CHAUDHURI, 1987)
1	CH <sub>2</sub>	22,39	22,3
2	CH <sub>2</sub>	41,61	41,5
3	C	213,38	212,9
4	CH	58,34	58,3
5	C	42,23	42,1
6	CH <sub>2</sub>	41,36	41,4
7	CH <sub>2</sub>	18,36	18,3
8	CH	52,50	52,5
9	C	37,58	37,5
10	CH	59,61	59,7
11	CH <sub>2</sub>	35,51	35,5
12	CH <sub>2</sub>	30,10	30,0
13	C	39,59	39,6
14	C	38,42	38,4
15	CH <sub>2</sub>	31,13	31,1
16	CH <sub>2</sub>	29,32	29,2
17	C	35,18	35,2
18	CH	38,81	38,9
19	CH <sub>2</sub>	31,74	31,5
20	C	33,34	33,3
21	CH <sub>2</sub>	30,26	30,2
22	CH <sub>2</sub>	28,30	28,3
23	CH <sub>3</sub>	6,94	6,8
24	CH <sub>3</sub>	14,79	14,7
25	CH <sub>3</sub>	18,29	18,2
26	CH <sub>3</sub>	18,76	18,7
27	CH <sub>3</sub>	19,22	19,1
28	CH <sub>2</sub>	69,13	69,0
29	CH <sub>3</sub>	28,73	28,6
30	CH <sub>2</sub>	73,42	73,4



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz

\*\*CDCl<sub>3</sub>/20 MHz

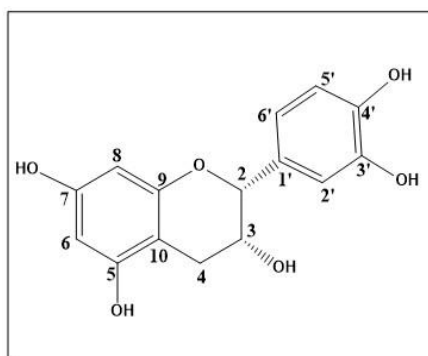


**Tabela 17A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM25** com os dados da literatura para a **epicatequina** (AGRAWAL, 1989)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM25	$\delta_c^{**}$ (AGRAWAL, 1989)
2	CH	79,90	79,4
3	CH	67,51	66,9
4	CH <sub>2</sub>	29,29	29,1
5	C	157,68	157,4
6	CH	96,43	96,2
7	C	158,02	157,4
8	CH	95,93	95,7
9	C	157,39	157,0
10	C	100,11	99,7
1'	C	132,31	132,1
2'	CH	115,35	115,2
3'***	C	145,80	145,2
4'***	C	145,96	145,2
5'	CH	115,94	115,5
6'	CH	119,44	119,4

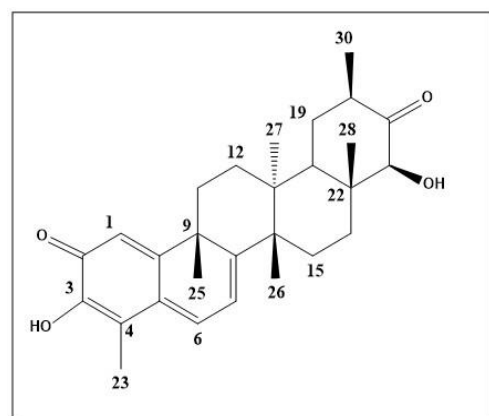
\*CD<sub>3</sub>OD/100 MHz

\*\*acetona d<sub>6</sub> \*\*\* sinais intercambiáveis.



**Tabela 18A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM27** com os dados da literatura para o **tingenina B** (CEVATEMRE *et al.*, 2016)

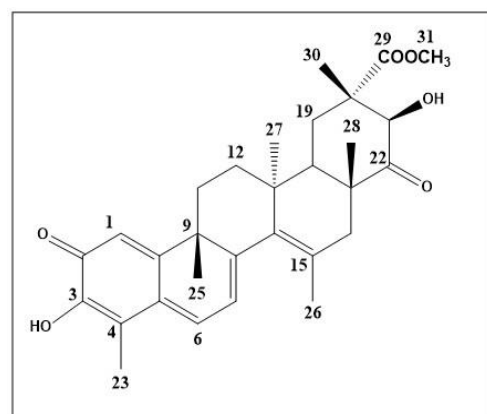
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM27	$\delta_c^*$ ( CEVATEMRE <i>et al.</i> , 2016)
1	CH	119,80	119,8
2	C	178,41	178,2
3	C	146,10	146,1
4	C	117,29	117,4
5	C	127,74	127,7
6	CH	133,77	133,6
7	CH	118,20	118,1
8	C	168,53	168,5
9	C	42,63	42,6
10	C	164,75	164,7
11	CH <sub>2</sub>	34,03	34,0
12	CH <sub>2</sub>	29,94	29,9
13	C	44,33	44,3
14	C	40,61	40,6
15	CH <sub>2</sub>	28,27	28,3
16	CH <sub>2</sub>	29,52	29,5
17	C	44,85	44,8
18	CH	45,03	45,0
19	CH <sub>2</sub>	32,04	32,0
20	CH	40,88	40,9
21	C	213,57	213,5
22	CH	76,45	76,4
23	CH <sub>3</sub>	10,29	10,3
25	CH <sub>3</sub>	39,18	39,1
26	CH <sub>3</sub>	21,63	21,6
27	CH <sub>3</sub>	20,53	20,5
28	CH <sub>3</sub>	25,01	24,9
30	CH <sub>3</sub>	14,75	14,7



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz

**Tabela 19A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM28** com os dados da literatura para o **netzahualcoiona** (JELLER *et al.*, 2004)

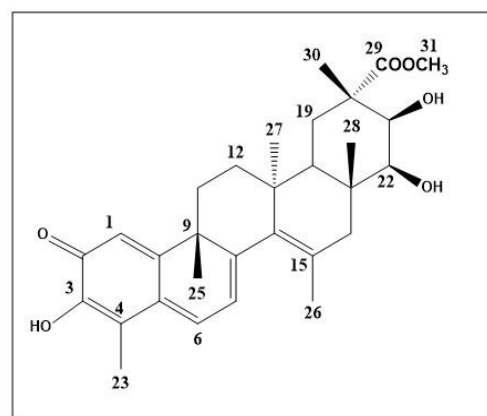
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM28	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (JELLER <i>et al.</i> , 2004)
1	CH	120,29	120,1
2	C	178,28	178,0
3	C	146,43	146,3
4	C	116,89	116,8
5	C	128,26	128,2
6	CH	134,23	134,1
7	CH	122,34	122,2
8	C	159,48	158,4
9	C	44,19	44,1
10	C	157,22	157,1
11	CH <sub>2</sub>	37,18	37,1
12	CH <sub>2</sub>	36,02	35,9
13	C	42,23	42,1
14	C	135,99	135,9
15	C	126,37	126,3
16	CH <sub>2</sub>	38,28	38,2
17	C	49,00	48,9
18	CH	46,39	46,3
19	CH <sub>2</sub>	34,32	34,2
20	C	50,43	50,3
21	CH	74,50	74,4
22	C	213,96	213,7
23	CH <sub>3</sub>	10,48	10,3
25	CH <sub>3</sub>	29,05	28,9
26	CH <sub>3</sub>	22,04	21,9
27	CH <sub>3</sub>	24,32	24,2
28	CH <sub>3</sub>	22,50	22,4
29	C	175,39	175,3
30	CH <sub>3</sub>	13,78	13,6
31	CH <sub>3</sub>	52,75	52,6



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/125 MHz

**Tabela 20A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM29** com os dados da literatura para o **netzahualcoioldiol** (JELLER *et al.*, 2004)

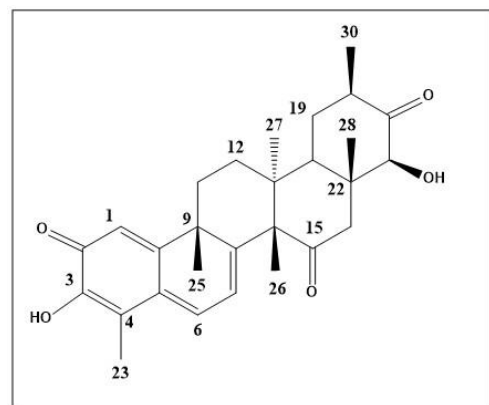
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM29	$\delta_{\text{C}}^*$ (JELLER <i>et al.</i> , 2004)
1	CH	120,18	120,2
2	C	178,26	178,1
3	C	146,42	146,2
4	C	116,97	116,7
5	C	127,92	127,7
6	CH	134,77	134,5
7	CH	121,65	121,5
8	C	159,21	159,0
9	C	44,71	44,5
10	C	160,15	159,9
11	CH <sub>2</sub>	37,61	37,4
12	CH <sub>2</sub>	35,00	34,8
13	C	42,65	42,4
14	C	136,20	136,0
15	C	126,83	126,6
16	CH <sub>2</sub>	38,10	37,9
17	C	39,06	38,9
18	CH	38,91	38,7
19	CH <sub>2</sub>	34,11	33,9
20	C	47,63	47,4
21	CH	69,44	69,2
22	CH	79,62	79,4
23	CH <sub>3</sub>	10,53	10,3
25	CH <sub>3</sub>	29,65	29,5
26	CH <sub>3</sub>	21,97	21,8
27	CH <sub>3</sub>	24,74	24,5
28	CH <sub>3</sub>	27,24	27,0
29	C	179,22	179,0
30	CH <sub>3</sub>	17,32	17,3
31	CH <sub>3</sub>	52,45	52,7



\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/125 MHz

**Tabela 21A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM30** com os dados da literatura para o **salaquinona A** (MORIKAWA *et al.*, 2003)

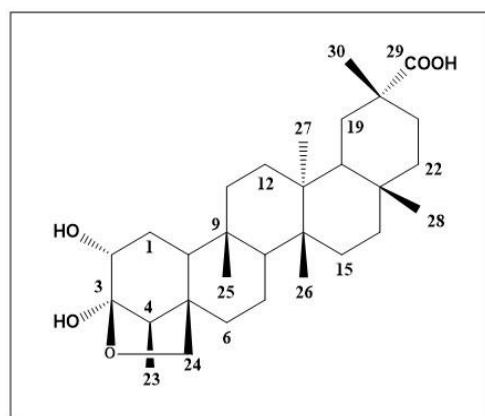
Carbono	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de TM27	$\delta_c^{**}$ (MORIKAWA <i>et al.</i> , 2003)
1	CH	119,56	119,2
2	C	178,47	178,0
3	C	146,31	145,9
4	C	117,31	117,5
5	C	128,38	128,0
6	CH	133,30	132,9
7	CH	124,66	124,3
8	C	157,23	157,1
9	C	42,45	42,5
10	C	163,60	163,1
11	CH <sub>2</sub>	31,91	31,7
12	CH <sub>2</sub>	29,12	28,9
13	C	43,39	43,8
14	C	57,92	58,0
15	C	209,86	209,3
16	CH <sub>2</sub>	48,00	47,8
17	C	48,02	47,8
18	CH	43,98	43,9
19	CH <sub>2</sub>	30,10	30,2
20	CH	40,08	39,9
21	C	212,49	212,0
22	CH	78,28	78,0
23	CH <sub>3</sub>	10,40	10,3
25	CH <sub>3</sub>	39,62	39,4
26	CH <sub>3</sub>	21,67	21,5
27	CH <sub>3</sub>	24,54	24,4
28	CH <sub>3</sub>	25,01	24,8
30	CH <sub>3</sub>	15,15	15,0



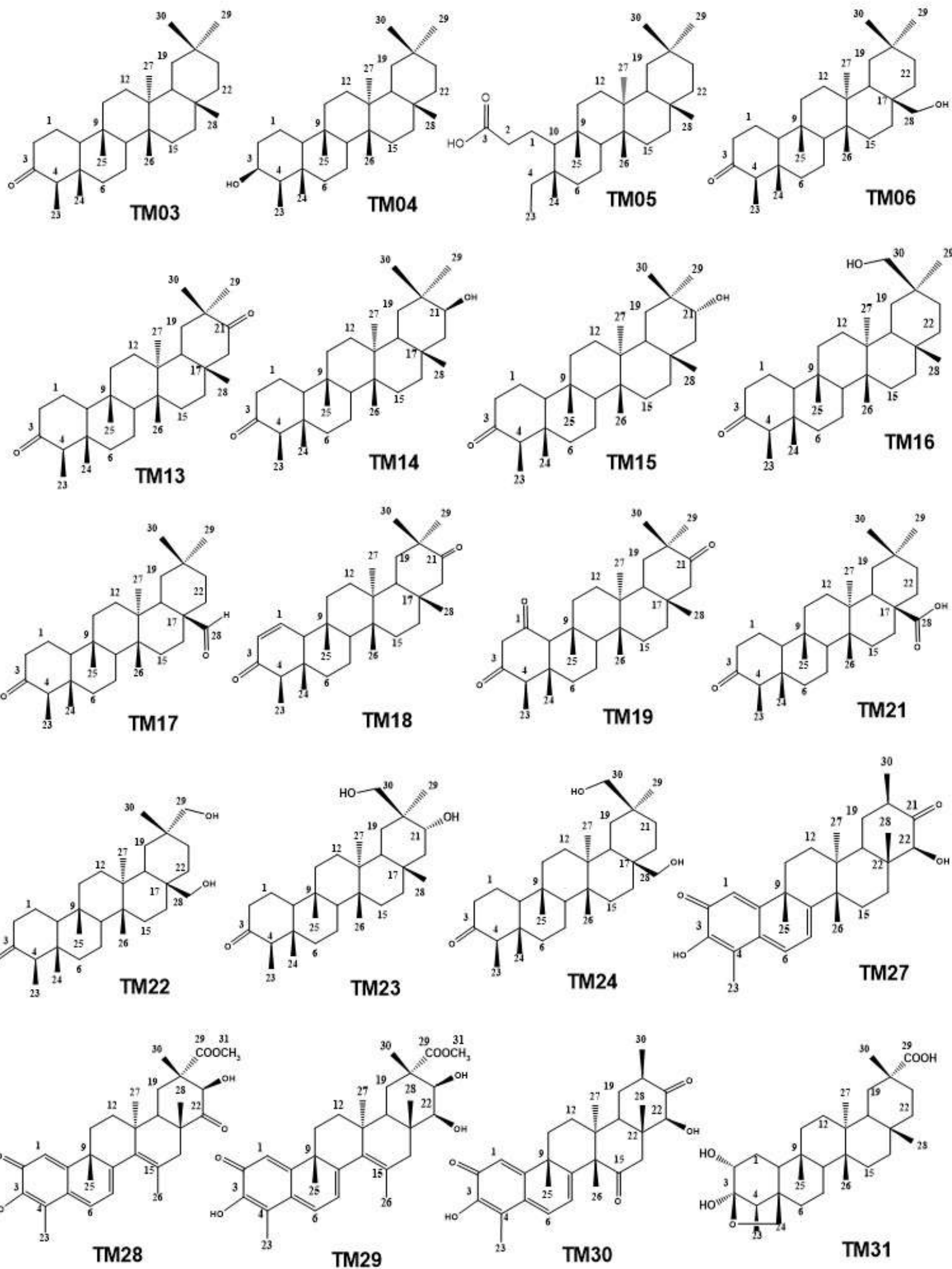
\*CDCl<sub>3</sub>/100 MHz \*\*CDCl<sub>3</sub>/125 MHz

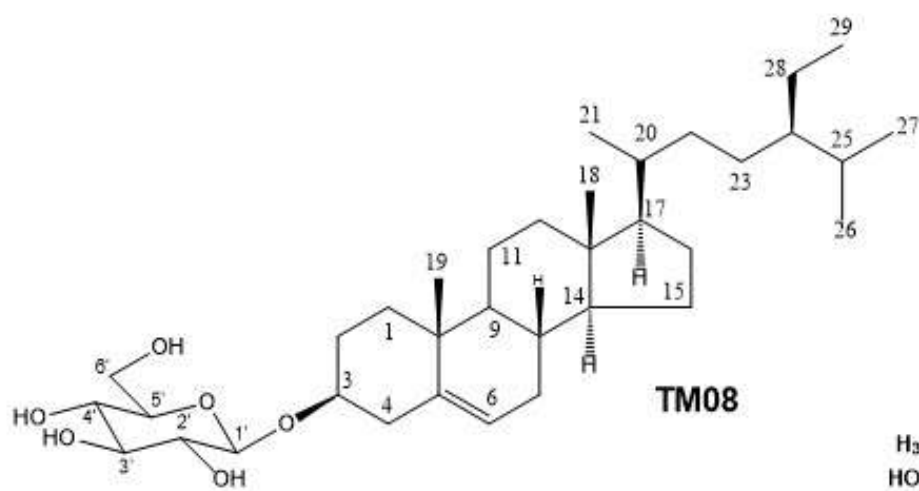
**Tabela 22A:** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **TM31** com os dados da literatura para o **ácido ortosfênico** (DUAN *et al.*, 2000)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de TM31	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (DUAN <i>et al.</i> , 2000)
1	CH <sub>2</sub>	28,70	28,7
2	CH	74,08	74,2
3	C	107,98	108,1
4	CH	46,78	46,8
5	C	47,46	47,5
6	CH <sub>2</sub>	33,98	34,0
7	CH <sub>2</sub>	19,65	19,7
8	CH	50,39	50,4
9	C	37,42	37,5
10	CH	53,22	53,3
11	CH <sub>2</sub>	34,64	34,7
12	CH <sub>2</sub>	29,46	29,5
13	C	39,55	39,6
14	C	39,28	39,3
15	CH <sub>2</sub>	29,67	29,7
16	CH <sub>2</sub>	36,66	36,7
17	C	30,43	30,5
18	CH	44,73	44,8
19	CH <sub>2</sub>	30,43	30,9
20	C	40,67	40,7
21	CH <sub>2</sub>	30,84	30,5
22	CH <sub>2</sub>	37,34	37,4
23	CH <sub>3</sub>	8,29	8,4
24	CH <sub>2</sub>	72,07	72,1
25	CH <sub>3</sub>	16,91	16,9
26	CH <sub>3</sub>	16,79	16,8
27	CH <sub>3</sub>	18,01	18,1
28	CH <sub>3</sub>	32,10	32,1
29	C	181,37	181,3
30	CH <sub>3</sub>	32,26	32,3

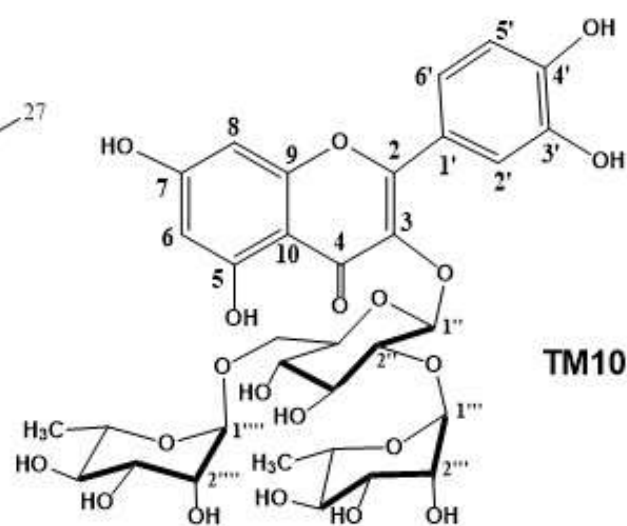


\*piridina d-5/100 MHz \*\* piridina d-5/125 MHz

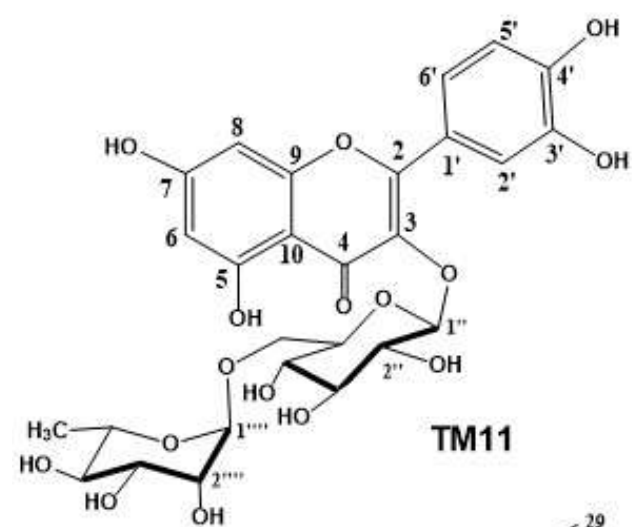




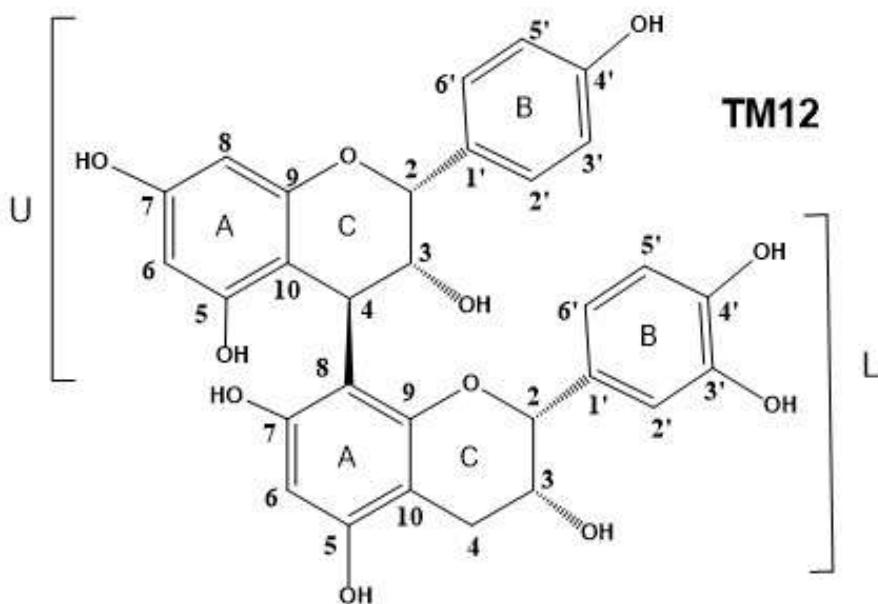
TM08



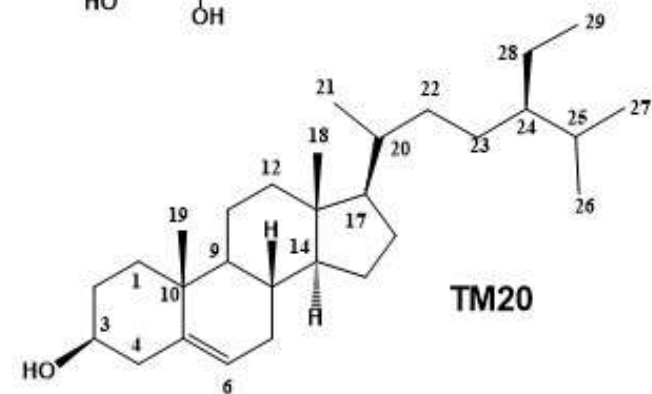
TM10



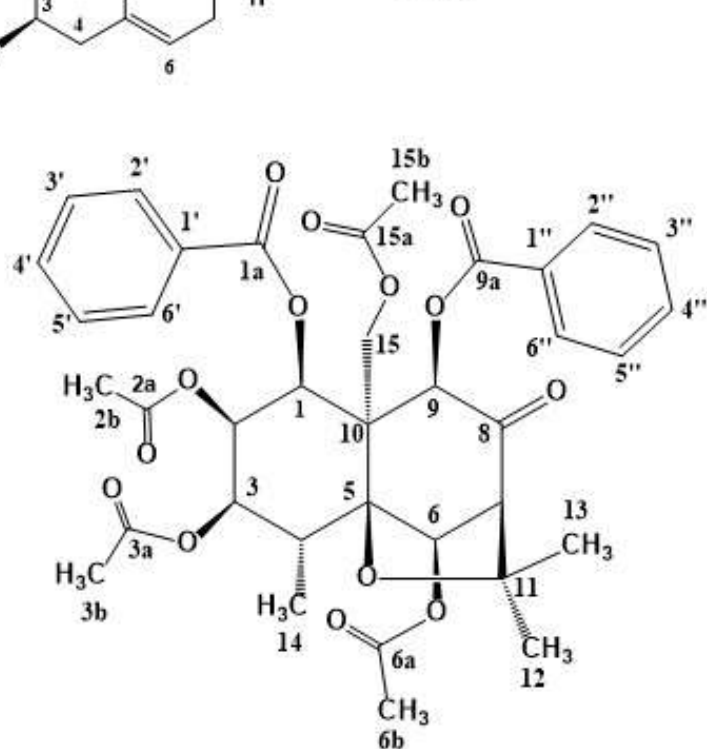
TM11



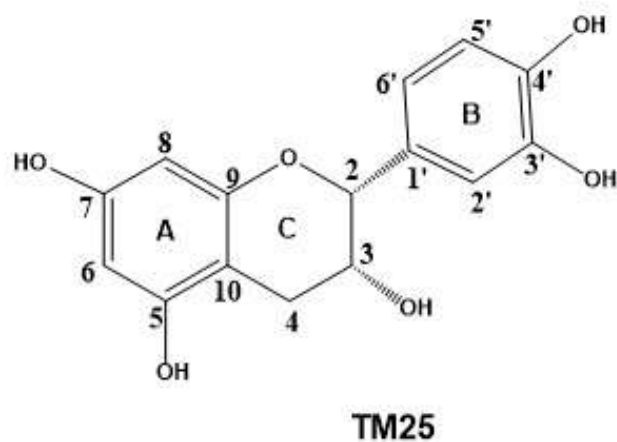
TM12



TM20



TM26



TM25