

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

Josana Pereira dos Santos

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
CONSTITUINTES DAS RAÍZES E GALHOS DE *Salacia crassifolia*
(CELASTRACEAE)**

Belo Horizonte
2019

UFMG/ICEx/DQ. 1.374
T. 630

Josana Pereira dos Santos

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
CONSTITUINTES DAS RAÍZES E GALHOS DE *Salacia crassifolia*
(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.

Orientador: Prof^ª Dra. Lucienir Pains Duarte

Belo Horizonte
2019

Ficha Catalográfica

S194e Santos, Josana Pereira dos
2019 Estudo fitoquímico e da atividade biológica de
T constituintes das raízes e galhos de salacia
crassifolia(celastraceae) [manuscrito]/ Josana Pereira
dos Santos. 2019.
[ix], 170 f. : il.

Orientadora: Lucienir Pains Duarte.

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

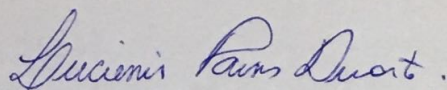
1. Química orgânica - Teses 2. Celastraceae - Teses
3. Produtos naturais - Teses 4. Triterpenos - Teses
5.Acetilcolinesterase - Tese I. Duarte, Lucienir
Pains - Orientador II.Título

CDU 043

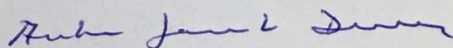
"Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica de Constituintes das Raízes e Galhos de *Salacia crassifolia* (CELASTRACEAE)"

Josana Pereira dos Santos

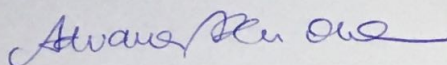
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



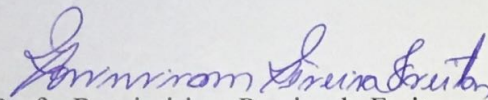
Profa. Lucienir Pains Duarte - Orientadora
UFMG



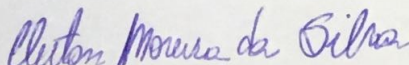
Prof. Antonio Jacinto Demuner
UFV



Profa. Adriana Akemi Okuma
CEFET-MG



Profa. Rosimiriam Pereira de Freitas
UFMG



Prof. Cleiton Moreira da Silva
UFMG

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2019.

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Inêz e ao meu marido, Seabra Junio, por todo amor e paciência.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(Simone de Beauvoir)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente em todos os momentos em minha vida, principalmente nos mais difíceis me mostrando sempre o melhor caminho a seguir. Sinto-me abençoada por tantas graças alcançadas. Sempre colocando anjos da guarda, na forma de amigos, em meu caminho. É hora de tentar agradecer a todos que fizeram parte dessa maratona, e que maratona. Os que sofreram junto comigo, cada angústia cada momento de desespero. Sim, foram muitos momentos de tensão. Em lágrimas, escrevo o que aparentemente seria a parte mais simples de uma tese, mas não está sendo não. Não encontro palavras para agradecer a cada um dos que fizeram desse projeto realidade. Ainda nem acredito que estamos na fase final, sim estamos, se preparem amigos, sei que ainda sofreremos um pouco mais ainda, até a defesa.

Parafraseando o Rafael e a Vanessa, “não há quem conheça a Lucienir, que não queira sempre estar ao seu lado”. Eu agradeço a Deus todos os dias por você existir e pelo ser humano que você é. Vejo em você uma pessoa especial, iluminada, guerreira, amiga, orientadora, um anjo da guarda que veio para fazer a diferença na vida das pessoas. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando isso parecia loucura. Que você continue fazendo a diferença na vida das pessoas nesse mundo tão desumano. Faltam palavras para descrever a gratidão que tenho por não desistir e chegarmos à reta final. Serei eternamente grata por tudo, obrigada!

À minha mãe, uma guerreira, que sempre me apoiou nessa loucura de sair em busca do meu sonho. Ao assumir a responsabilidade de deixar sua filhinha sair do conforto do seu lar, aos 17 anos de idade, porque queria buscar dias melhores. Mesmo sendo criticada por todos, aguentou firme e sempre foi a minha base, minha inspiração. Obrigada mãe por sempre acreditar em mim, inclusive em momentos em que até eu mesma duvidava.

Agradeço ao meu parceiro, marido, amigo, meu Gatinho, Seabra. Sem você não teria conseguido vencer todas as etapas, que alegria chegar em casa depois de um dia cansativo e você sempre feliz e tranquilo, pronto para ouvir minhas lamentações. Obrigada por sempre me apoiar e fazer dos meus sonhos seus sonhos. Eu te amo muito!

A todos da minha família, meu pai, meus irmãos, minhas sobrinhas lindas, minha avó, tios e tias (em especial tia Gilsa e Taninha pelas orações e acolhida), minhas cunhadas, primos que, mesmo não compreendendo a minha ausência, respeitaram a minha escolha e sempre fizeram os nossos momentos inesquecíveis. A minha afilhada, Geovanna que me inspira diariamente a viver intensamente cada momento, você é um ser humano abençoado e desejo

Agradecimentos

que você tenha muita saúde e paz minha princesa. As minhas primas Jeniane e Elaine que participaram de muitos momentos de alegria e tensão nessa jornada, grata pelas orações e carinho. A minha madrinha (*in memoriam*) e família que sempre confiaram em mim e vibravam com as minhas realizações. Aos meus sogros, Marlene e Paulo, e meus cunhados, Ana Paula, Morete e Joice, pelo carinho e apoio. A Dona dos Anjos (Dona Dú), Marly, Mafalda, Maflávia, Sebastião e todos da família Ferreira que me acolheram e sempre me apoiaram, em especial a Dona Dú pelas orações e carinho.

Agradeço aos meus amigos do Departamento de Química, pelo carinho e amizade. A companhia de vocês tornaram meus dias mais agradáveis. Ao Yuri, Tanires, Panta, Leonardo, Breno, sempre dispostos a ajudar com as minhas reações. Aos meus amigos desde a graduação Ana Luisa e Artur, verdadeiros irmãos, quantos momentos compartilhados, grata pela confiança e amizade. A Renata, pelas conversas e café para compartilharmos nosso desespero e alegrias também. Minha amiga Geane, nordestina arretada, você foi muito importante nessa trajetória, sempre disposta a ouvir minhas lamentações, e me fazer sorrir até nos momentos de desespero. Sinto muita saudade de você, que continue brilhando onde quer que esteja.

Agradeço à Dra. Ivana, por esta sempre disposta a ajudar e por contribuir para o entendimento da técnica de RMN. As professoras que contribuíram para a minha formação Rossimíriam, Rosemeire, Patrícia (Diamantina), Cristina (Diamantina), vocês são exemplos a serem seguidos, não imaginam como contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Outra professora excepcional, Roqueline, minha orientadora do mestrado, quanta gratidão, obrigada por me apresentar a família NEPLAM. Aos amigos e colegas da ADVJ (Associação de desenvolvimento dos Vales do Jequitinhonha) e da escola Anita Brina Brandão meu eterno carinho pela amizade e compreensão, vocês fizeram parte desta história.

À família NEPLAM, que alegria e orgulho fazer parte desse grupo. Todos sempre muito prestativos e carinhosos. Alguns já estão em outra fase da vida, mas continuam fazendo parte da minha história no NEPLAM, Fernando, Vanessa, Aline, Vinícius e Débora, obrigada pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento do meu trabalho. À Fernanda, a menina manhosa do laboratório, afinal tudo é sempre mais difícil para ela, obrigada pelo convívio e aprendizado. À Leila, Gregório, Reislá, obrigada pela companhia e momentos de boas risadas compartilhados. À Karen, uma graça, quanta delicadeza, uma energia sempre contagiante, ótimas conversas. Acácio, sempre ouvindo atentamente meus desabafos e compartilhando um café. Ao Valtair, sempre atencioso e disposto a ajudar, obrigada por sempre me salvar com as atividades da escola. Às minhas alunas de IC, Mariana, Janine, Lyrra e Giulia, obrigada pelo

Agradecimentos

comprometimento para o desenvolvimento desse trabalho. Mariana, um doce, calma, prestativa, e uma aluna de IC maravilhosa, e agora colega de doutorado. Sempre pronta para ajudar quem precisar, muitíssimo obrigada por tudo Mari, conte sempre comigo. Senti-me lisonjeada ao ver todos dispostos a me ajudar durante a correria que foi a reta final deste doutorado. Este trabalho não teria sido finalizado sem a ajuda de todos vocês. Grasi, sempre muita sensata e prestativa. Obrigada pela amizade e ensinamentos, nossas conversas me fortaleciam e me faziam acreditar em dias melhores. Muito feliz por compartilhar com você esses últimos anos, a chegada da Lara que trouxe ainda mais alegria para seu lar. Ao Rafael, companheiro, amigo, cúmplice, pessoa que quero levar para a vida. Nossa relação se estende ao nosso espaço de estudo e tenho por ti um carinho imenso. Você no meu casamento, que presente, foi emocionante. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, desde um choro de desespero, uma caminhada para aliviar a tensão, compartilhar uma boa comida e vinho para comemorar. Entre tantas coisas que temos em comum, a nossa turma da pesada supera as expectativas. Os sempre animados: Diogo, Day, Vanderson, Ana, Artur, Grasiely, João e as mais recentes Michelle e Aline, prezam por uma boa comida, bebida e companhia. Vocês alegram meus dias e é sempre uma alegria a companhia de vocês, que possamos desfrutar de muitos momentos juntos.

Agradeço imensamente as minhas irmãs de coração Josana e Eliziana, vocês foram fundamentais na minha caminhada. Escreveria um livro com tanta história que vivemos, é maravilhoso olhar para trás e ver o quanto crescemos profissionalmente e espiritualmente. Rodrigo, sempre disposto a ajudar, e ainda que pense que o tenha abandonado compreende minha ausência. Obrigada pela torcida. Amo muito vocês!

Aos professores Dr. Adriano de Paula Sabino, Dr^a. Fernanda Gontijo, Dr^a. Jacqueline Takahashi, Dr^a. Viviane Alves Gouveia, a aluna Marília Aparecida Fidelis, pelos testes biológicos.

Ao professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo) pelas contribuições e carinho.

Aos membros da banca de qualificação e pré-banca Rossimíriam, Cleiton, Antônio Flávio (Tininha) pelas contribuições ao trabalho.

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

A 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 o desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iii
LISTA DE CONSTITUINTES ISOLADOS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO.....	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	11
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	12
3.1 Métodos gerais.....	12
3.1.1 Solventes e reagentes	12
3.1.2 Instrumentos	12
3.1.3 Métodos cromatográficos	12
3.1.4 Coleta e identificação do material vegetal	13
3.1.5 Preparação dos extratos das raízes de <i>Salacia crassifolia</i>	13
3.1.5.1 Elaboração do extrato hexano/éter etílico (1:1) das raízes (EHE1, primeira coleta)	14
3.1.5.2 Elaboração do extrato hexano/éter etílico (1:1) das raízes (EHE2, segunda coleta).....	16
3.1.5.3 Elaboração do extrato clorofórmico das raízes (EC)	19
3.1.5.4 Elaboração do extrato acetato de etila das raízes (EAE)	21
3.1.5.5 Elaboração do extrato acetônico das raízes (EAC).....	23
3.1.6– Preparação dos extratos dos galhos de <i>Salacia crassifolia</i>	28
3.1.6.1 – Elaboração do extrato hexânico dos galhos (EHGS).....	29
3.1.6.2 – Elaboração do extrato clorofórmico dos galhos (ECGS).....	33
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	36
4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL.....	36
4.1.1 SC01: abruslactona A	36
4.1.2 SC02: urs-12-eno-3 β ,25,30-triol	38
4.1.3 SC03: caripristimerina	42
4.1.4 SC04: β -sitosterol	47
4.1.5 SC05: pristimerina	49
4.1.6 SC06: dispermoquinona	51
4.1.7 SC07: netzahualcoionol	53
4.1.8 SC08: 20-hidroxi-20-epi-tingenona.....	55
4.1.9 SC09: 6-oxo-pristimerol.....	57
4.1.10 SC10: 9 β ,10 β -epoxi-3 β -hidroxi-1 β H,4 β H,5 β H,7 β H,11 α H-guaian-12,8 β -olídeo	59
4.1.11 SC11: 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol	65

4.1.12 SC12: 4'- <i>O</i> -metilepialocatequina	67
4.1.13 SC13: cerebrosídeo.....	69
4.1.14 SC14: lupeol.....	71
4.1.15 SC15: lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol	73
4.1.16 SC16: 21 α -hidroxifriedelan-3-ona	75
4.1.17 SC17: betulina	77
4.1.18 SC18: lup-20(29)-eno-2 α ,3 β -diol	79
4.1.19 SC19: mistura de betulina e ácido betulínico.....	82
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO ESTUDO FITOQUÍMICO	84
CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	85
1 ESTUDO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	85
1.1– INTRODUÇÃO	85
1.2 – METODOLOGIA	87
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	90
2.1 INTRODUÇÃO	90
2.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	91
2.2.1 Cultivo celular	91
2.2.2 Ensaio de viabilidade celular	92
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3 ENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	95
3.1 INTRODUÇÃO	95
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	96
3.2.1 Preparo de amostras	96
3.2.2 Ensaio de toxicidade	98
3.2.2.1 Ensaio de MTT	98
3.2.3 Ensaio de sobrevivência	98
3.2.4 Ensaio de fertilidade	99
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS RELATIVAS AOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA ...	102
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
APÊNDICE A – ESPECTROS.....	115
APÊNDICE B – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS ...	167

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ - Deslocamento químico

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

CC – Coluna cromatográfica

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY – *Correlation Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação)

DQ – Departamento de Química

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

LC/ ESI-QTOF/MS – *liquid chromatography/electrospray ionization-quadrupole/time of flight/mass spectrometer* (Cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas com ionização por electrospray e detector quadrupolo por tempo de voo)

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

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

R_f – fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SFB – Soro fetal bovino

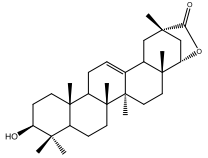
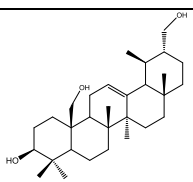
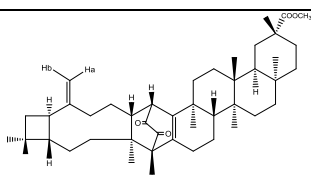
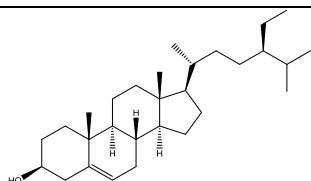
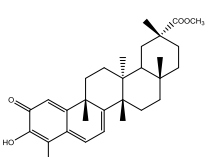
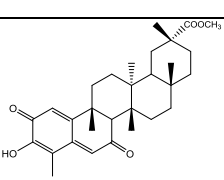
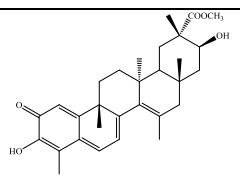
TMS – Tetrametilsilano

TTPC – Triterpeno pentacíclico

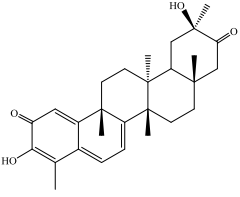
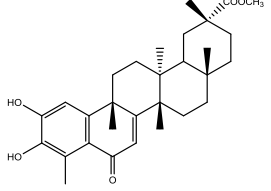
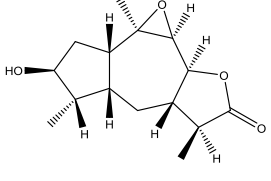
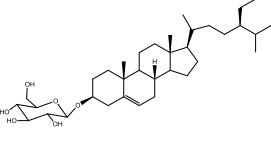
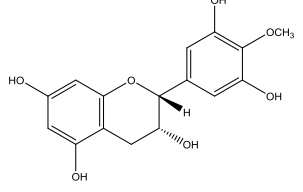
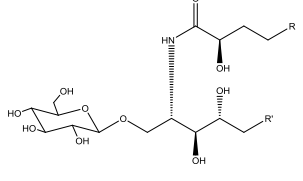
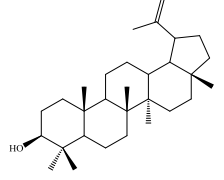
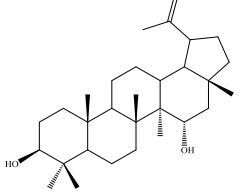
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

AChE – Acetilcolinesterase

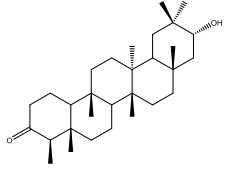
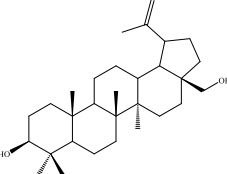
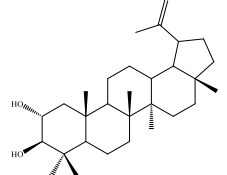
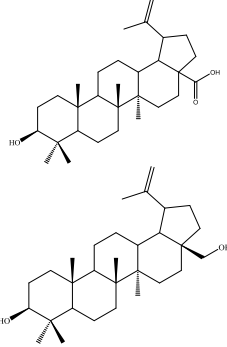
**LISTA DE CONSTITUENTES ISOLADOS das raízes e galhos de
*Salacia crassifolia***

Código	Nome	Estrutura Química	Página
SC01	Abruslactona A		36
SC02	Urs-12-eno-3 β ,25,30-triol		38
SC03	Cariopristimerina		42
SC04	β -Sitosterol		47
SC05	Pristimerina		49
SC06	Dispermoquinona		51
SC07	Netzahualcoionol		53

Lista de constituintes isolados das raízes e galhos de *S. crassifolia*

SC08	20-hidroxi-20-epi-tingenona		55
SC09	6-oxo-pristimerol		57
SC10	9 β ,10 β -epoxi-3 β -hidroxi-1 β H,4 β H,5 α H,7 β H,11 α H-guaian-12,8 β -olídeo		59
SC11	3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol		65
SC12	4'-O-metilepigalocatequina		67
SC13	cerebrosídeo		69
SC14	lupeol		71
SC15	lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol		73

Lista de constituintes isolados das raízes e galhos de *S. crassifolia*

SC16	21 α -hidroxifriedelan-3-ona		75
SC17	betulina		77
SC18	lup-20(29)-eno-2 α ,3 β -diol		79
SC19	Mistura de ácido betulínico e betulina		82

RESUMO

O estudo fitoquímico das raízes e galhos de *Salacia crassifolia* resultou na obtenção e caracterização de uma mistura de betulina (SC17) com ácido betulínico (SC19) e de dezoito compostos: o sesquiterpeno $9\beta,10\beta$ -epoxi- 3β -hidroxi- $1\beta\text{H},4\beta\text{H},5\beta\text{H},7\beta\text{H},11\alpha\text{H}$ -guaian- $12,8\beta$ -olídeo (SC10); os esteroides β -sitosterol (SC04) e 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol (SC11); o flavonoide 4'-*O*-metilepigalocatequina (SC12); um cerebrosídeo (SC13); um dímero cariopristimerina (SC03); os quinonametídeos, dispermoquinona (SC06), netzahualcoionol (SC07), 20-hidroxi-20-epi-tingenona (SC08) e pristimerina (SC05); o triterpeno aromático 6-oxo-pristimerol (SC09); o ursano urs-12-eno- $3\beta,25,30$ -tríol (SC02); o oleanano abruslactona-A (SC01); o friedelano 21α -hidroxifriedelan-3-ona (SC16); os lupanos betulina (SC17), lupeol (SC14), lup-20(29)-eno- $2\alpha,3\beta$ -diol (SC18) e lup-20(29)-eno- $3\beta,15\alpha$ -diol (SC15). As estruturas químicas foram determinadas por métodos espectroscópicos (IV, RMN de 1D e 2D) e difração de raios-X. Das substâncias isoladas, o $9\beta,10\beta$ -epoxi- 3β -hidroxi- $1\beta\text{H},4\beta\text{H},5\beta\text{H},7\beta\text{H},11\alpha\text{H}$ -guaian- $12,8\beta$ -olídeo (SC10) e o urs-12-eno- $3\beta,25,30$ -tríol (SC02) ainda não foram descritos na literatura. Os compostos SC03, SC05, SC08, SC09, SC12 (exceto para atividade citotóxica), SC14, SC15, SC16, SC17 e SC18 foram avaliados em testes de inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade citotóxica *in vitro* e toxicidade utilizando modelo *Caenorhabditis elegans*. Todos os compostos testados apresentaram inibição frente à enzima acetilcolinesterase, sendo que os compostos SC03 (99±9%), SC08 (100±9%) e SC09 (99±8%) apresentaram inibição próxima ou maior do que a do padrão eserina (94±2%). Os compostos apresentaram baixa citotoxicidade frente às linhagens de células de leucemia aguda (THP-1) e crônica (K562) e também frente às células de carcinoma mamário (MDA-MB-231) quando comparadas aos padrões utilizados. No teste de toxicidade utilizando modelo *C. elegans*, nenhum dos compostos testados apresentou toxicidade, uma vez que a taxa de sobrevivência das larvas no estágio L1 foi maior que 90%.

Palavras-chave: Celastraceae, *Salacia crassifolia*, triterpenos, inibição da acetilcolinesterase.

ABSTRACT

The phytochemical study of the roots and branches of *Salacia crassifolia* led to isolation of a betulin-betulinic acid mixture (**SC19**) and eighteen compounds: the sesquiterpene 9β , 10β -epoxy- 3β -hydroxy- 1β H, 4β H, 5β H, 7β H, 11α H-guaian- $12,8\beta$ -olide (**SC10**); the steroids β -sitosterol (**SC04**) and 3-O-D-glycosyl-sitosterol (**SC11**); the flavonoid 4'-O-methylpigallocatechin (**SC12**); a cerebroside (**SC13**); the dimer caryopristimerin (**SC03**); the quinonemethides dispermoquinone (**SC06**), netzahualcoyonol (**SC07**), 20-hydroxy-20-epi-tingenone (**SC08**) and pristimerin (**SC05**); the aromatic triterpene 6-oxo-pristimerol (**SC09**); the ursane urs-12-ene- 3β , 25,30-triol (**SC02**); the oleanane abruslactone A (**SC01**); the friedelane 21α -hidroxifriedelan-3-ona (**SC16**); the lupanes betulin (**SC17**), lupeol (**SC14**), lup-20(29)-en- $2\alpha,3\beta$ -diol (**SC18**) and lup-20(29)-en- $3\beta,15\alpha$ -diol (**SC15**). The chemical structures were determined by spectroscopic methods (IR, 1D and 2D NMR) and X-ray diffraction. **SC10** and **SC02** have not been described in the literature so far. The compounds **SC03**, **SC05**, **SC08**, **SC09**, **SC12** (except for cytotoxicity), **SC14**, **SC15**, **SC16**, **SC17** and **SC18** were evaluated for acetylcholinesterase inhibition, *in vitro* cytotoxic activity and toxicity tests using the *Caenorhabditis elegans* model. All tested compounds inhibited acetylcholinesterase, and compounds **SC03** ($99\pm 9\%$), **SC08** ($100\pm 9\%$) and **SC09** ($99\pm 8\%$) showed inhibition close to or greater than that of the eserine standard ($94 \pm 2\%$). The tested compounds showed low cytotoxicity against the THP-1 (acute myeloid leukemia cells), K562 (chronic myeloid leukemia cells) and MDA-MB-231 (mammary carcinoma cells) cancer cell lines in comparison with the standards. None of the tested compounds and extracts was toxic according to the *C. elegans* assay since the larvae survival rate in stage L1 was higher than 90%.

Keywords: Celastraceae, *Salacia crassifolia*, triterpenes, acetylcholinesterase inhibition.

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO

1 INTRODUÇÃO

Os compostos obtidos a partir de fontes naturais como plantas, animais e microrganismos são conhecidos como produtos naturais (PATRIDGE *et al.*, 2016). Historicamente os produtos naturais têm sido reconhecidos como fonte de inspiração para diversas áreas, tais como química, biologia e medicina (DUECKER; REUSS; HERETSCH, 2019; GERRY; SCHREIBER, 2018). Esses compostos apresentam uma grande variedade estrutural, em parte devido à grande biodiversidade de organismos marinhos e terrestres existentes. Estes organismos conseguem produzir compostos com estruturas químicas com variadas funções químicas e que apresentam diferentes atividades biológicas (BERNARDINI *et al.*, 2018; DAVISON; BRIMBLE, 2019).

Nas plantas, esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários e geralmente, não são considerados essenciais para sobrevivência e reprodução, mas sim fruto da adaptação ao meio ambiente ou de um possível mecanismo de defesa contra predadores, visando auxiliar e melhorar a sobrevivência da planta. Os metabólitos secundários são produzidos a partir de intermediários biossintéticos dos processos celulares básicos, como fotossíntese e diferentes reações químicas, sendo esses processos responsáveis pelas modificações estruturais observadas para esses compostos (BERNARDINI *et al.*, 2018).

Plantas com propriedades terapêuticas são conhecidas como “plantas medicinais”. Essas tiveram seus efeitos descobertos possivelmente por um conhecimento adquirido por tentativa e erro na busca para tratar doenças, sendo esse conhecimento transmitido por gerações (WRIGHT, 2019). O uso dessas plantas é considerado uma das ciências mais antigas de países como a China, Grécia, Egito e Índia. Nas últimas décadas houve um aumento no interesse e uso de plantas medicinais como fonte de novos medicamentos ou seu uso como fitoterápicos (HALBERSTEIN, 2005; JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). Parte desse interesse pode ser atribuída à necessidade de descoberta de novos compostos ativos para o tratamento de doenças que acometem a população no mundo inteiro, como câncer, malária, doenças neurodegenerativas, dentre outras (DAVISON; BRIMBLE, 2019).

Estima-se que um quarto de todos os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e/ou pela Agência Médica Europeia (EMA) foi baseado em compostos isolados de plantas (THOMFORD *et al.*, 2018). Portanto, pode-se dizer que as plantas medicinais contribuíram e continuam contribuindo para descoberta de novos fármacos.

A descoberta da morfina, por exemplo, é considerada como um grande marco para o desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais. A morfina (Figura 1, pág. 3) é um alcaloide, isolado a partir da flor de papoula, utilizado como um potente analgésico (HAMILTON; BASKETT, 2000). Destaque também para medicamentos obtidos para o tratamento do câncer como a vimblastina (Figura 1, pág. 3), isolada da *Catharanthus roseus* (NOBLE, 1990), e o paclitaxel (Figura 1, pág. 3), um diterpeno que foi isolado da casca de *Taxus brevifolia* por Wall e Wani (WANI *et al.*, 1971). Este medicamento após um longo processo de desenvolvimento, foi finalmente aprovado para uso clínico contra o câncer de ovário em 1992 e contra o câncer de mama em 1994 (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Artemisia annua, uma planta utilizada tradicionalmente pela população chinesa para tratar febre, chamou a atenção de pesquisadores e foi estudada com o objetivo de se isolar os seus princípios ativos. Este estudo levou ao isolamento de um sesquiterpeno, a artemisinina (Figura 1, pág. 3), que apresentou alta atividade contra o *Plasmodium falciparum*, parasita responsável pela malária (KLAYMAN, 1985). A descoberta deste sesquiterpeno marcou um excelente momento para estudos de plantas medicinais, uma vez que a sua utilização contribuiu para reduzir a taxa de mortalidade em pacientes que eram acometidos por esta doença (CRAGG; NEWMAN, 2013; CZECHOWSKI *et al.*, 2019). Esse trabalho teve seu reconhecimento e, em 2015, o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido à farmacologista Youyou Tu, pesquisadora membro da Academia de Medicina Tradicional Chinesa, por suas contribuições para a descoberta da artemisinina (CALLAWAY; CYRANOSKI, 2015).

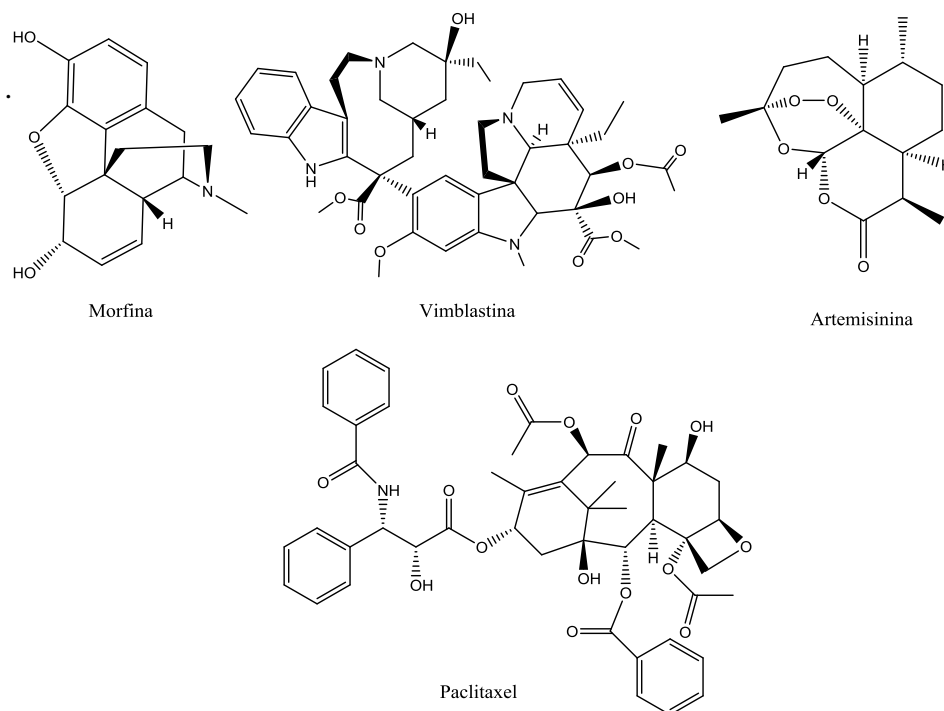


Figura 1: Fármacos obtidos a partir de plantas.

Além dos sesquiterpenos e diterpenos, os triterpenos também se destacam por apresentarem várias atividades biológicas, e pertencem a uma das maiores classes de metabólitos produzidos por plantas (XU *et al.*, 2018). Triterpenos pentacíclicos (TTPCs) são compostos que apresentam em seu esqueleto 30 átomos de carbono, que podem estar dispostos em cinco anéis fundidos de seis membros cada ou quatro anéis de seis membros e o último de cinco (CHUNG, 2019). Em relação ao esqueleto carbônico das estruturas, os TTPCs são divididos em subgrupos sendo os mais comuns: oleanano, ursano, lupano e friedelano, Figura 2 (XIAO *et al.*, 2018).

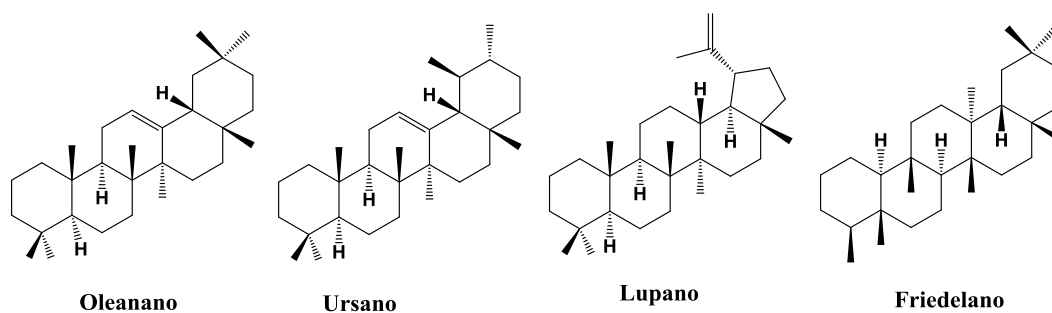


Figura 2: Esqueleto base dos triterpenos pentacíclicos de alguns subgrupos.

Pesquisas realizadas mostram que vários triterpenos apresentam atividade antitumoral, antiviral e atuam na diminuição do colesterol (XIAO *et al.*, 2018; YOUSEF *et al.*, 2018).

Na medicina tradicional, os triterpenos pentacíclicos estão sendo considerados adequados para o desenvolvimento de fármacos, principalmente devido as suas atividades anticancerígenas, e pelo seu potencial no tratamento e prevenção de diabetes e da doença de Alzheimer (HILL; CONNOLLY, 2017; NÚÑEZ *et al.*, 2013).

Atividades anticancerígena e anti-inflamatória têm sido descritas para alguns triterpenos pentacíclicos como o lupeol, celastrol, pristimerina, ácidos betulínico, ursólico e oleanólico (Figura 3), isolados de espécies da família Celastraceae (SALVADOR *et al.*, 2017). Destaque para os quinonametídeos, pristimerina e celastrol, que têm sido objetos de vários estudos que visam avaliar seu potencial como quimiopreventivo e para o tratamento de diferentes tipos de câncer (KASHYAP *et al.*, 2018; LI, JIA-JUN *et al.*, 2019; YOUSEF *et al.*, 2016).

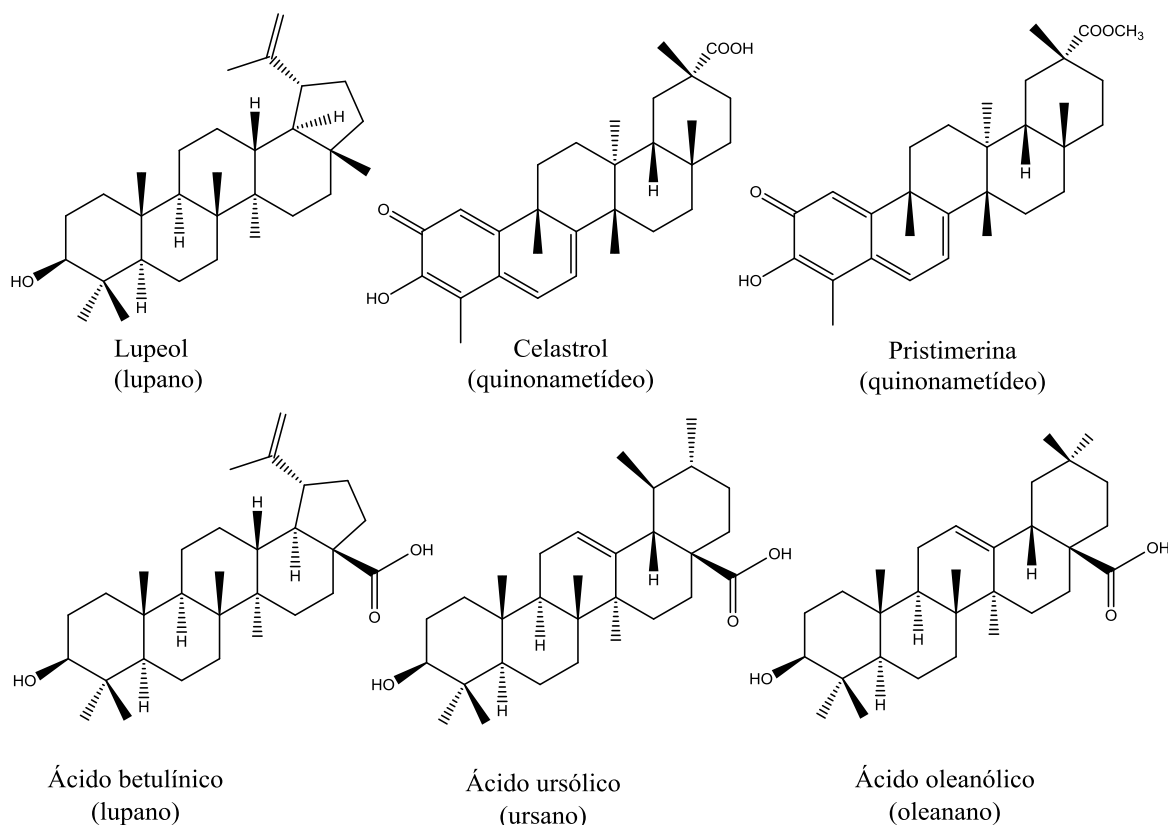


Figura 3: Triterpenos isolados de espécies da família Celastraceae.

A família Celastraceae é composta por aproximadamente 106 gêneros e 1300 espécies, distribuídos extensivamente em regiões tropicais e subtropicais (BUKHARI; JANTAN; SEYED, 2015). No Brasil, essa família é representada principalmente por quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhoferia* Mart. e *Salacia* Mart. (SIMMONS *et al.*, 2008). Dentre as classes de triterpenos já isolados de espécies da família Celastraceae, tem-se compostos que se destacam por apresentar vários tipos de atividade biológica. Dentre eles, têm-se compostos da classe ursano (anticancerígeno) (ZOU *et al.*, 2018), lupano (antineoplásicos), (HILL; CONNOLLY, 2017), oleanano (antidiabetes) (MANNA; SIL, 2012), quinonametídeo (anticancerígeno) (YOUSEF *et al.*, 2018) e friedelano (anti-inflamatório, analgésico e antipirético) (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011). Os quinonametídeos, além de serem biologicamente ativos, são restritos a espécies da família Celastraceae, sendo considerados marcadores taxonômicos desta família (CORSINO *et al.*, 2000).

A partir de espécies do gênero *Salacia* já foram descritos isolamentos de triterpenos de classes variadas. O gênero é composto por cerca de 200 espécies, distribuídas em áreas tropicais de todo o mundo, incluindo Índia, sul da China, e outros países do Sudeste Asiático (RODRIGUES *et al.*, 2019). O gênero *Salacia* é encontrado também no Brasil e em outros países da América do Sul e possui 21 espécies brasileiras. Várias atividades biológicas têm sido atribuídas a espécies desse gênero. Em muitos países, espécies desse gênero são utilizadas como remédio tradicional contra diabetes e como anti-inflamatório (GOMES *et al.*, 2019; TANABE *et al.*, 2019).

Diversos estudos de espécies de *Salacia* levaram ao isolamento de triterpenos da classe friedelano, oleanano, ursano, quinonametídeo e lupano. Como exemplo, cita-se um estudo fitoquímico recente de *Salacia impressifolia* que levou ao isolamento de quinze compostos, sendo seis da classe quinonametídeo (tingenona, pristimerina, 30-hidroxi-pristimerina, isoiguesterina, 22-hidroxitingenona e netzahualcoionol), um friedelano (friedelina), um aromático (regeol A), quatro lupoanos (lupeol, salicilina, 2-oxo-20(29)lupen-3 β -ol, 2 β ,3 β -dihidroxilup-20(29)-eno), um oleanano, um ursano (mistura de α e β -amirina), e um esteroide (β -sitosterol) (DA SILVA *et al.*, 2016) (Figura 4, pág. 7). Rodrigues e colaboradores relatam que o extrato bruto acetato de etila e os quinonametídeos tingenona, pristimerina e 22-hidroxitingenona, isolados do

caule de *S. impressifolia*, exibiram atividade *in vitro* quando testados frente a linhagens celulares de leucemia (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Das raízes e caules de *S. hainanensis* foram isolados quinze metabólitos, sendo dois novos triterpenoides da classe lupano. Os lupoanos isolados desta espécie (lupeol, salacianona e lup-20(29)en-3,16-diol), apresentaram efeitos inibitórios *in vitro* sobre a enzima α -glucosidase (YU *et al.*, 2014) (Figura 4, pág. 7).

Das espécies *Salacia amplifolia* (WANG *et al.*, 2011), *S. reticulada* (BRÜNING; WAGNER, 1978) e *S. kraussi* (FIGUEIREDO; RÄZ; SÉQUIN, 1998) foi descrito o isolamento de vários metabólitos, dentre eles a pristimerina que tem sido objeto de vários estudos, por apresentar diferentes atividades biológicas, como antimalárica (FIGUEIREDO; RÄZ; SÉQUIN, 1998), antifúngica (LUO *et al.*, 2005), anti-inflamatória e antioxidante (JIN *et al.*, 2016; SHAABAN *et al.*, 2018). Também foi descrita a capacidade deste metabólito em inibir o crescimento tumoral de alguns tipos de câncer como de mama, próstata, pâncreas e tumores de mieloma múltiplo (LI, JIA-JUN *et al.*, 2019; WU, HAIYAN *et al.*, 2019).

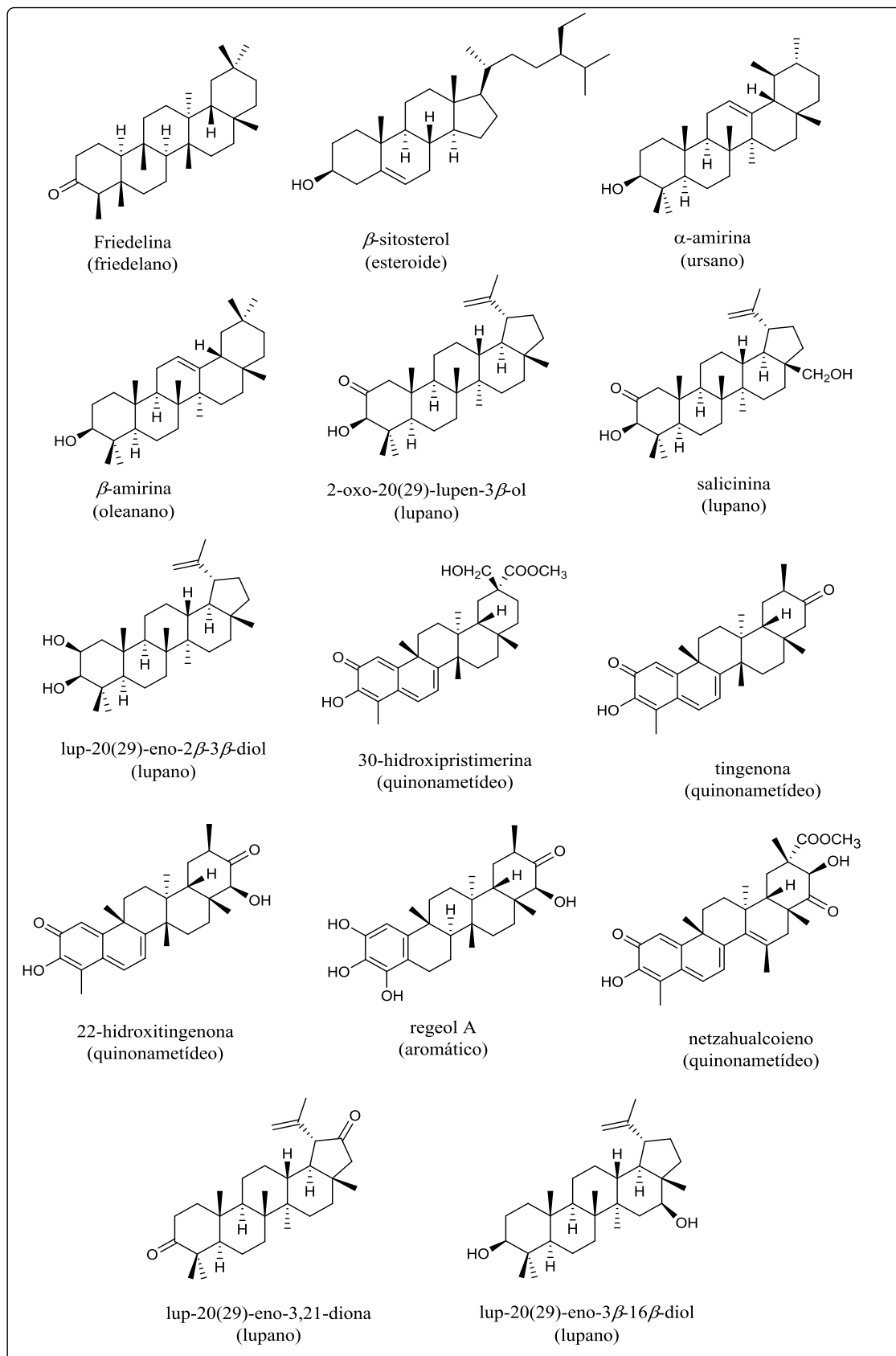


Figura 4: Triterpenos isolados de espécies do gênero *Salacia*.

Na medicina popular *Salacia crassifolia* (Figura 5) é conhecida como "Bacuparido-Cerrado" e é utilizada no tratamento de problemas renais, tosse, dores de cabeça, como cicatrizante e no tratamento da malária (CARNEIRO *et al.*, 2013). Na região de Goiás é utilizada por comunidades tradicionais para o tratamento de câncer, como agente antimicrobiano e anti-inflamatório (ESPINDOLA *et al.*, 2018). Entretanto, há poucos relatos de estudo fitoquímico e das atividades biológicas dessa espécie na literatura.

Dentre os relatos encontrados citam-se o estudo fitoquímico das folhas realizado por Rodrigues e colaboradores que descreveram o isolamento dos compostos 3β -palmitoxi-urs-12-eno, friedelina, 3β -hidroxifriedelano, 3-oxo-28-hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona, ácido 3,4-*seco*-friedelan-3-oico, 3β -hidroxiolean-9(11):12-dieno, mistura de α -amirina e β -amirina, β -sitosterol. Dos compostos isolados ácido 3,4-*seco*-friedelan-3-oico e 28,29-dihidroxifriedelan-3-ona apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* (RODRIGUES *et al.*, 2015) (Figura 6, pág. 10).



Figura 5: Galhos, flores, folhas, frutas e raiz de *S. crassifolia* (Foto: acervo pessoal de Maria Olívia Mercadante-Simões).

Foi encontrado também um estudo de isolamento guiado por bioensaio e avaliação da atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas das raízes dessa planta. Nesse estudo foi descrito o isolamento de quatro triterpenos pentacíclicos (Figura 6, pág. 10), o 11 β -hidroxipristimerina, a pristimerina, o 6-oxopristimerol e a vitideasina, obtidos a partir do extrato hexânico, todos apresentaram atividade citotóxica frente as linhagens testadas (ESPINDOLA *et al.*, 2018).

O estudo realizado durante o mestrado, do extrato hexânico/éter etílico das raízes de *S. crassifolia* levou ao isolamento de seis triterpenos pentacíclicos, sendo dois da classe dos friedelanos, (ácido 2 α ,3 α ,22 β -trihidroxi-21-oxo-29-*nor*-friedelan-24-oico e 3-oxo-29-hidroxifriedelano) e quatro quinonametídeos (pristimerina, cariopristimerina, tingenona e netzahualcoionol) (Figura 4 e 6; págs 7 e 10). Dentre os compostos isolados, dois foram inéditos, o ácido 2 α ,3 α ,22 β -trihidroxi-21-oxo-29-*nor*-friedelan-24-oico e a cariopristimerina, um dímero inédito entre o cariofileno e derivado da pristimerina. O isolamento destes compostos inéditos nos motivou a continuar os estudos com os demais extratos das raízes de *Salacia crassifolia* (SANTOS, *et al.*, 2019).

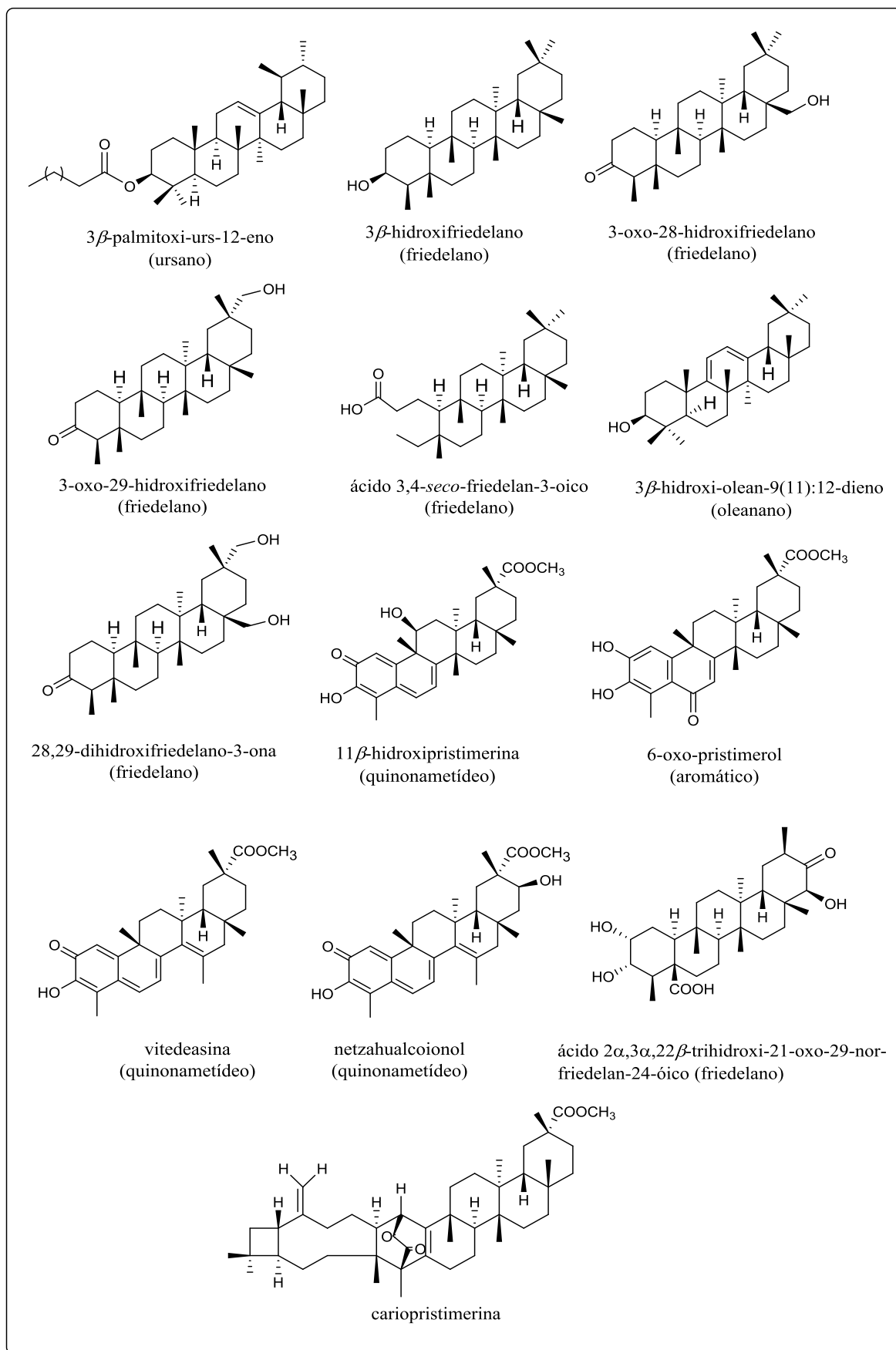


Figura 6: Triterpenos já isolados da *Salacia crassifolia*.

Além disso, nos estudos já relatados sobre as raízes e folhas da *Salacia crassifolia* já foram isolados e descritos triterpenos de diferentes classes, assim essa espécie se mostra promissora como fonte de novos compostos com esqueletos químicos diferentes.

Diante disso, a continuidade do estudo fitoquímico das raízes e o estudo dos galhos, que ainda não foram estudados fitoquimicamente podem contribuir para a descoberta de novos compostos bioativos e para o estudo quimiotaxonômico da família Celastraceae.

2 OBJETIVOS

Contribuir para o estudo fitoquímico de espécies da família Celastraceae, especificamente da espécie *Salacia crassifolia*, visando identificar novos metabólitos bioativos. Neste contexto, o presente trabalho envolveu os seguintes objetivos específicos:

- Dar continuidade ao estudo do extrato hexano/éter etílico das raízes de *S. crassifolia*;
- Realizar o estudo fitoquímico dos extratos acetato etílico e acetônico das raízes;
- Preparar e fracionar os extratos dos galhos;
- Determinar a estrutura química das substâncias isoladas, por meio de estudo detalhado utilizando métodos espectroscópicos, como infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de 1D e 2D e difração de raios X de monocristal;
- Realizar o estudo do potencial biológico das substâncias isoladas e/ou dos extratos, avaliando a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade citotóxica frente a linhagens de células cancerígenas, e toxicidade utilizando *Caenorhabditis elegans*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Métodos gerais

3.1.1 Solventes e reagentes

Os solventes empregados nas análises foram hexano, clorofórmio, diclorometano, acetona, acetato de etila e metanol, sendo que hexano, clorofórmio e acetato de etila foram previamente destilados. Quando necessária a reutilização de misturas de solventes, foi realizado um ajuste de correção da refração da luz medida em refratômetro.

Como revelador de cromatoplasas utilizou-se solução 1:1 de ácido perclórico (a 3% em água) e vanilina (a 1% em etanol).

3.1.2 Instrumentos

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho digital da Microquímica Equipamentos LTDA (MQAPF-302). Para correção das proporções das misturas de solventes foi utilizado o refratômetro modelo Biobrix e as massas dos extratos foram medidas em balança analítica AL500C Marte. As massas das frações e substâncias isoladas foram medidas em balança analítica AB104 Mettler Toledo do NEPLAM do DQ da UFMG.

Para obtenção dos espectros na região do IV foram preparadas pastilhas de KBr, utilizou-se espectrômetro Shimadzu IR408 pertencente ao DQ da UFMG.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker *Avance* DPX-200 ou DRX-400 do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) no DQ da UFMG, operando a 300 K. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz, os solventes empregados estão indicados em cada caso.

3.1.3 Métodos cromatográficos

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60G (7g para 15 mL de água) em placa de vidro de 0,25 mm de espessura (CCD analítica) ativadas a 100 °C em estufa. As colunas cromatográficas (CC) clássicas foram preparadas com

fase estacionária de sílica gel 60 (70-230 ou 230-400 Mesh) ou Sephadex. A cromatografia líquida de média pressão (MPLC) foi realizada no equipamento Biotage® Isolera™ Spektra One, utilizando coluna *SNAP*.

3.1.4 Coleta e identificação do material vegetal

As raízes e galhos de *Salacia crassifolia* (Mart.) G. Don. (Celastraceae) foram coletados pela Professora Doutora Maria Olívia Mercadante-Simões da UNIMONTES, em Montes Claros, Minas Gerais (16°52'15" S, 44°00'58" W). Uma exsicata do material encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica, no ICB/UFMG, sob o número BHCB 144624. O material coletado foi cadastrado junto ao sistema nacional de gestão de patrimônio genético com número A3D535B.

3.1.5 Preparação dos extratos das raízes de *Salacia crassifolia*

Visando o isolamento de maior quantidade dos compostos inéditos isolados no trabalho desenvolvido no mestrado (SANTOS; 2014) e a obtenção de novos extratos, uma nova coleta de raízes de *S. crassifolia* foi realizada em 2015.

Após secagem à temperatura ambiente, as raízes foram fragmentadas em moinho de martelos e obtiveram-se 1200 g de material. Os extratos das raízes pulverizadas foram preparados empregando extração exaustiva por maceração à temperatura ambiente, exceto para o extrato hexano/éter etílico (1:1) que foi obtido utilizando-se aparelho Soxhlet. Os solventes utilizados em ordem crescente de polaridade foram hexano/éter etílico, clorofórmio e acetato de etila. Após filtração e remoção do solvente por destilação à pressão reduzida, foram obtidos os respectivos extratos: hexano/éter etílico (**EHE2**), clorofórmico (**EC**), e acetato etílico (**EAE**) (Figura 7, pág.14).

Frações do extrato hexano/éter etílico (**EHE1**), e o extrato acetônico (**EAC**) que serão descritos neste trabalho foram preparados durante o mestrado (SANTOS, 2014), e não tinham sido fracionados.

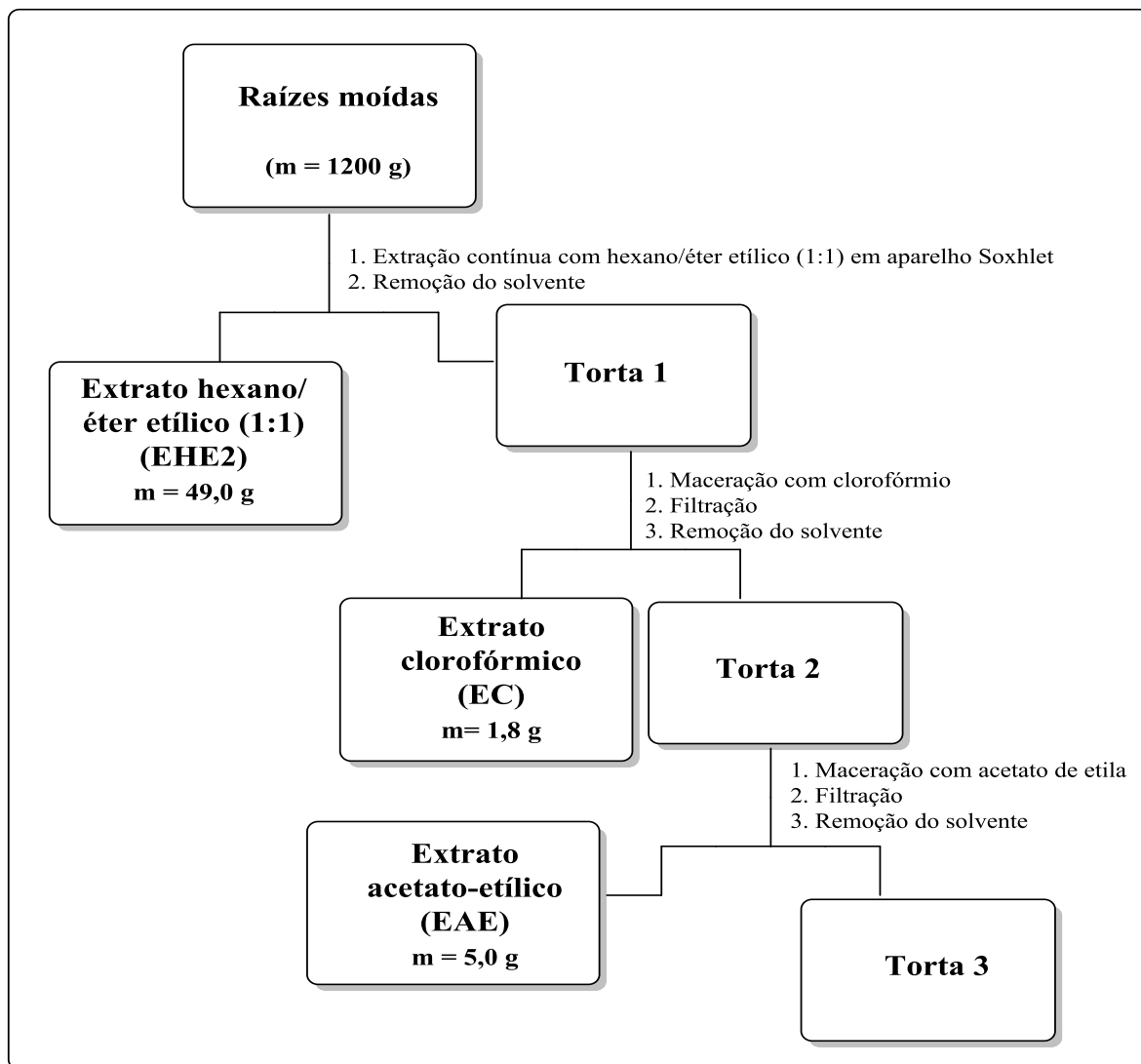


Figura 7: Esquema de obtenção dos extratos de raízes de *Salacia crassifolia*.

3.1.5.1 Elaboração do extrato hexano/éter etílico (1:1) das raízes (EHE1, primeira coleta)

EHE1 (27 g) foi obtido como sólido brilhante de coloração avermelhada intensa. 20 g do extrato foram submetidos à purificação por coluna cromatográfica (Coluna **EH1A**) utilizando 431,5 g de sílica gel 60. Desta coluna foram obtidas 101 frações de 100 mL cada, como eluentes foram utilizados hexano e acetato de etila, puros ou em gradiente de polaridade. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico. Foram obtidos 23 grupos sendo seis não trabalhados durante o

mestrado. Esses seis grupos foram fracionados e refractionados por cromatografia em coluna.

O esquema de fracionamento do extrato EHE1 está apresentado na Figura 8, página 16.

Grupo EH1A1 (frações 68 a 70 - Hex/AcOEt 1:1): O grupo foi obtido como um sólido marrom (691 mg). Na placa de CCD observaram-se várias manchas, sendo que a de maior intensidade tinha uma coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. O material foi então submetido ao fracionamento em CC (Coluna **EH1B**) utilizando-se 60,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram coletadas 125 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações de 7 a 14 foram reunidas em um subgrupo (EH1B.1). Algumas frações, não foram trabalhadas por apresentarem muitas manchas em CCD ou pouca massa, enquanto outras foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento de compostos puros.

As estruturas dos compostos isolados estão apresentadas no apêndice B, pág. 167.

Subgrupo EH1B.1 (frações 7 a 14 - DCM/AcOEt 1:1): Foi obtido como um sólido (18 mg). Após análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C foi possível identificar este sólido como sendo a abruslactona A (**SC01**) impura.

Grupo EH1A2 (frações 71 a 73- Hex/AcOEt 1:1): O grupo foi obtido como um sólido marrom (300,5 mg) e apresentou algumas manchas em CCD, sendo a de maior intensidade de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Esse grupo foi submetido a uma separação por CC (Coluna **EH1C**) utilizando-se 30,0 g de sílica gel 60. Os eluentes foram hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 116 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 59 a 64 foram reunidas em um subgrupo (EH1C.1).

Subgrupo EH1C.1 (frações 59 a 64 - AcOEt): Foi obtido como um sólido cristalino branco (15,1 mg). Quando analisado por CCD apresentou uma única mancha com coloração roxa depois de revelada com vanilina/ácido perclórico. Foi realizada então análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) permitindo identificar o sólido como sendo urs-12-eno-3 β ,25,30-triol (**SC02**).

Assim, do extrato hexano/éter etílico das raízes, obtido durante o trabalho de mestrado, EHE1 obtiveram-se dois compostos, conforme está apresentado na Figura 8.

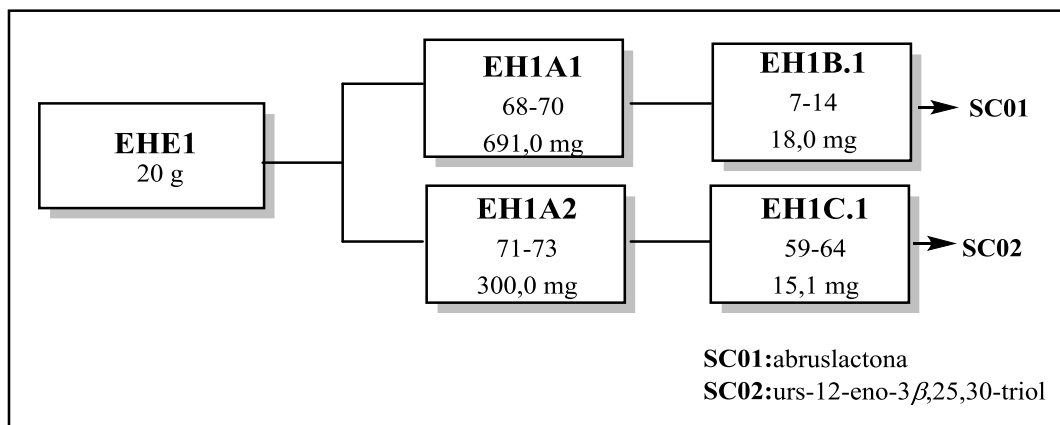


Figura 8: Esquema de fracionamento de alguns grupos do EHE1.

3.1.5.2 Elaboração do extrato hexano/éter etílico (1:1) das raízes (EHE2, segunda coleta)

O extrato hexano/éter etílico (1:1) de raízes **EHE2** (49,0 g) possuía coloração avermelhada intensa. 38,0 g do extrato foram submetidos à separação por coluna cromatográfica (Coluna **EH2A**) utilizando 400 g de sílica gel 60. Desta coluna foram obtidas 108 frações de 100 mL cada e foram utilizados como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em seis grupos. Outras frações não foram trabalhadas por apresentarem muitas manchas em CCD ou pouca massa, enquanto outras foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento de compostos puros.

O esquema de fracionamento do EHE2 está apresentado na Figura 9, página 19.

Grupo EH2A1 (frações 7 a 13 – Hex/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido cristalino de coloração amarela (26,4 mg) e quando analisado por CCD, apresentou uma única mancha, de perfil bem definido com coloração roxa após ser revelada com

vanilina/ácido perclórico. Utilizando os espectros no IV, de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, identificou-se este sólido como sendo caripristimerina (**SC03**).

Grupo EH2A2 (frações 17 a 20 - Hex/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido branco (16,0 mg). Realizou-se análise por CCD comparando o sólido com amostra padrão de β -sitosterol e ambos apresentaram o mesmo perfil na cromatoplaça. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram confirmar que o composto era β -sitosterol (**SC04**).

Grupo EH2A3 (frações 30 a 48 - Hex/AcOEt 7:3): Foi obtido como um sólido alaranjado (8,7 g). Quando analisado por CCD apresentou mais de uma mancha, porém com uma de coloração roxa mais intensa. O sólido então foi submetido a uma separação por CC (Coluna **EH2B**) para purificação. Utilizou-se sílica gel como fase estacionária e os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. O agrupamento das frações 70-92 levou à obtenção de um subgrupo (EH2B.1). Frações com massa muito pequena ou que apresentavam várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Subgrupo EH2B.1 (frações 70 a 92 - Hex/AcOEt 7:3): Foi obtido como um sólido cristalino alaranjado (5,6 g) e apresentou uma única mancha em CCD. Após análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 o sólido foi identificado como pristimerina (**SC05**).

Grupo EH2A4 (frações 49 a 51 - Hex/AcOEt 6:4): Foi obtido como um sólido amarelo (12,0 mg). O sólido foi submetido à análise por CCD e após revelação em vanilina/ácido perclórico observou-se apenas uma mancha vermelha. Após análise de espectros no IV, de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 o sólido foi identificado como dispermoquinona (**SC06**).

Grupo EH2A5 (frações 53 a 54 - Hex/AcOEt 1:1): Foi obtido como um sólido (424,8 mg) de coloração vermelha que, quando analisado por CCD, apresentou várias manchas, porém bem definidas. O sólido então foi submetido a uma purificação por CC

(Coluna **EH2C**). Foram utilizadas 50 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. O agrupamento das frações 22 a 31 e 41 a 61 levou a obtenção de dois subgrupos.

Subgrupo EH2C.1 (frações 22 a 31 - Hex/AcOEt 7:3): Foi obtido como um sólido cristalino de coloração vermelha (13,7 mg). Apresentou uma única mancha de coloração avermelhada em análise por CCD quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Após análise dos espectros no IV, de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 foi elucidado como o netzahualcoionol (**SC07**).

Subgrupo EH2C.2 (frações 41 a 61 - Hex/AcOEt 6:4): Foi obtido como um sólido vermelho (38,1 mg) e apresentou uma única mancha na CCD quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Após análise dos espectros no IV, de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 foi elucidado com 20-hidroxi-20-epi-tingenona (**SC08**).

Grupo EH2A6 (frações 61 a 64 - AcOEt): Esse grupo foi obtido como um sólido de coloração vermelha (1,1 g) e submetido ao fracionamento em CC (Coluna **EH2D**) utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel os eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. O agrupamento foi realizado de acordo com o perfil cromatográfico das frações. As frações 44 a 73 foram agrupadas levando a obtenção de um subgrupo (EH2D.1).

Subgrupo EH2D.1 (frações 44 a 73 - AcOEt/Hex 6:4): Foi obtido como um sólido de coloração alaranjada (708,9 mg) e foi submetido a uma separação por CC (Coluna **EH2E**) utilizando-se 40 g de sílica gel. Os eluentes foram diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas. Foram obtidas 67 frações de aproximadamente 20 mL. Após análise por CCD as frações foram agrupadas obtendo assim dois novos subgrupos (EH2E.1 e EH2E.2).

Subgrupo EH2E.1 (frações 7 a 16 - DCM/AcOEt 7:3): Foi obtido como um sólido de coloração marrom (113 mg). Ao ser submetido à análise por CCD observaram-se três manchas de coloração amarela, roxa e rosa ao se revelar com

vanilina/ácido perclórico. O sólido foi então submetido à purificação em coluna de sílica gel (Coluna **EH2E1**). Utilizaram-se 13 g de fase estacionária e os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade, mas não foi possível o isolamento de nenhum composto puro.

Subgrupo EH2E.2 (frações 33 a 35 - DCM): Foi obtido como um sólido de coloração alaranjada (29,1 mg) e quando submetido à análise por CCD foi observada uma mancha de coloração vermelha. Utilizando os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, foi possível identificar o composto como 6-oxo-pristimerol (**SC09**).

Do fracionamento do **EHE2** obtiveram-se sete compostos puros conforme está apresentado na Figura 9.

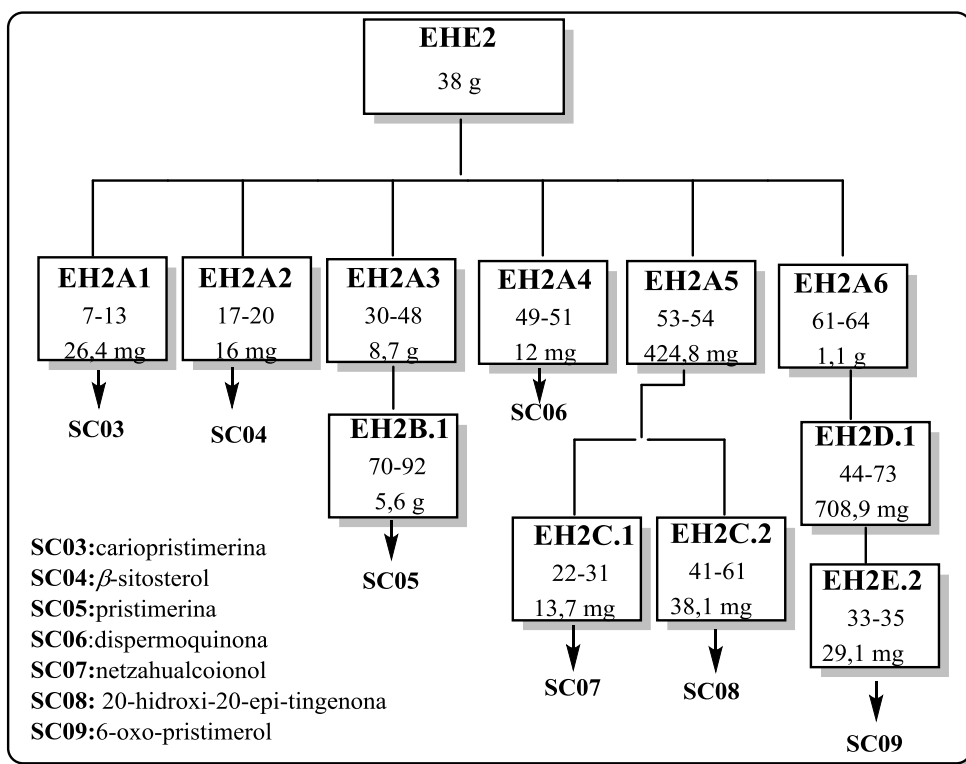


Figura 9: Esquema do fracionamento de EHE2.

3.1.5.3 Elaboração do extrato clorofórmico das raízes (EC)

O extrato clorofórmico das raízes de *S. crassifolia* foi obtido como um sólido de coloração marrom. 1,5 g do extrato foram submetidos à purificação por CC (Coluna **ECA**) utilizando 180,0 g de sílica gel 60. Os eluentes foram diclorometano, acetato de

etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram obtidas 150 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplas, sendo reunidas em três grupos (Figura 10, pág. 21). Frações com pouca massa ou que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Grupo ECA1 (frações 19 a 42 - DCM/AcOEt 9:1): O grupo foi obtido como um sólido avermelhado (118,0 mg), que foi submetido à purificação por CC (Coluna **ECB**) por apresentar manchas bem definidas em CCD. Desta coluna foram obtidas 64 frações de 10 mL e foram utilizados como eluentes: diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico. As frações 6 a 33 foram reunidas em um subgrupo (ECB.1).

Subgrupo ECB.1 (frações 6 a 33 - DCM): Foi obtido como um sólido (61,0 mg) e quando submetido à CCD utilizando vanilina/ácido perclórico como revelador, foram observadas manchas bem definidas. O sólido foi então submetido à separação por CC (Coluna **ECC**). Para a eluição foram utilizados hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram obtidos 26 frações de 20 mL. Após análise por CCD as frações de 7 a 17 foram reunidas em um novo subgrupo.

Subgrupo ECC.1 (frações 7 a 17 - Hex/AcOEt 9:1): Foi obtido como um sólido alaranjado (8,0 mg). Após análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C o sólido foi identificado como pristimerina (**SC05**).

Grupo ECA2 (frações 49 a 54 - DCM/AcOEt 9:1): O grupo foi obtido como um sólido marrom (65,5 mg), sendo submetido ao fracionamento em CC (Coluna **ECD**). Os eluentes foram diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 86 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico e, mesmo com o novo fracionamento, não foi isolado nenhum composto puro.

Grupo ECA3 (frações 55 a 69 - DCM/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido marrom (43,0 mg) e foi submetido a uma separação por CC (Coluna **ECE**) por

apresentar manchas bem definidas em CCD. Foram utilizados hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade como eluentes. Foram coletadas 38 frações de aproximadamente 10 mL. As frações de 17 a 24 foram reunidas em um subgrupo.

Subgrupo ECE.1 (frações 17 a 24 – Hex/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido ceroso (27,0 mg). Espectros no IV e de RMN 1D e 2D foram obtidos e suas análises permitiram identificar o composto como $9\beta,10\beta$ -epoxi- 3β -hidroxi- $1\beta\text{H},4\beta\text{H},5\beta\text{H},7\beta\text{H},11\alpha\text{H}$ -guaian- $12,8\beta$ -olídeo (**SC10**).

Do fracionamento do **EC** foram obtidos dois compostos puros conforme está apresentado na Figura 10.

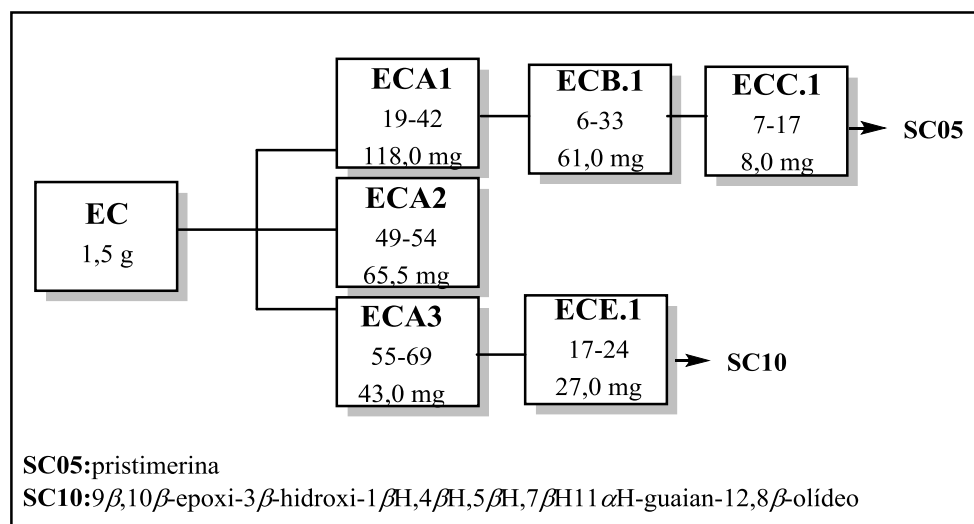


Figura 10: Esquema do fracionamento de EC.

3.1.5.4 Elaboração do extrato acetato de etila (EAE) das raízes

O extrato acetato de etila das raízes de *S. crassifolia* (**EAE**) foi obtido como um sólido de aspecto ceroso (5 g) e submetido a uma separação por CC (Coluna **EAEA**) utilizando 200,0 g de sílica gel 60 e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Desta coluna foram obtidas 113 frações de aproximadamente 150 mL cada. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD, sendo reunidas em 14 grupos. Alguns não foram trabalhados por

apresentarem muitas manchas em CCD ou pouca massa, enquanto outras foram trabalhados, mas não levaram ao isolamento de compostos puros.

Grupo EAEA1 (frações 100 a 107 – AcOEt/MeOH 9:1): Foi obtido como um sólido de coloração avermelhado (2,9 g) e submetido ao fracionamento por cromatografia de média pressão (Coluna **EAEB**) utilizando-se coluna *snap* ultra 100 g. Os eluentes foram clorofórmio e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 120 frações de aproximadamente 15 mL cada. As frações 32 a 34 foram reunidas em um subgrupo (EAEB.1).

Subgrupo EAEB.1 (frações 32 a 34 – CHCl₃): Foi obtido como um sólido de coloração marrom (195 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **EAEC**). Quando analisado por CCD apresentou mais de uma mancha, porém uma de coloração roxa era mais intensa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. O sólido foi submetido à purificação por CC (Coluna **EAEC.1**). Foram utilizados 18 g de sílica gel e os eluentes foram clorofórmio e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 20 frações de aproximadamente 15 mL cada. Após análise por CCD, as frações 10 a 12 foram reunidas em um subgrupo (EAEC.1.1).

Subgrupo EAEC.1.1 (frações 10 a 12 - CHCl₃): O subgrupo foi obtido como um sólido branco (17,5 mg). Quando submetido à CCD foi observada uma mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ¹H e ¹³C, permitiu identificar o composto como sendo o 3-*O*-β-D-glicosil-β-sitosterol (**SC11**).

Não foi possível isolar e identificar compostos a partir das outras frações da coluna **EAEA**. Assim, do extrato acetato de etila das raízes foi possível obter um composto puro (Figura 11, pág. 23).

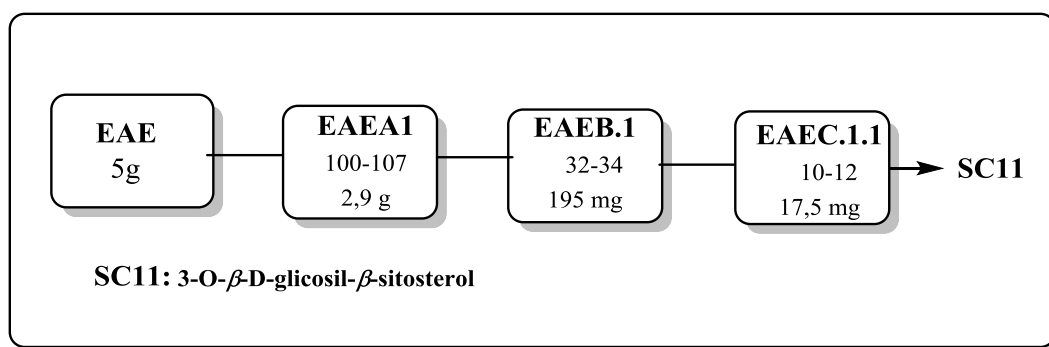


Figura 11: Esquema do fracionamento de EAE.

3.1.5.5 Elaboração do extrato acetônico (EAC) das raízes

O extrato acetônico (EAC) das raízes (42,0 g) foi obtido como um sólido marrom. 40,0 g do sólido foram submetidos à purificação por CC (Coluna **EAA**) utilizando 100,0 g de sílica gel. Desta coluna foram obtidas 97 frações de aproximadamente 100 mL cada e foram utilizados como eluentes, clorofórmio e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. As frações foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico, obtendo assim oito grupos. As frações que apresentavam muitas manchas em CCD ou massas muito pequenas não foram trabalhadas.

O esquema de fracionamento do EAC está apresentado na Figura 12, página 28.

Grupo EAA1 (frações 4 e 5 - CHCl₃): Foi obtido como um sólido amarelo com aspecto ceroso (28,4 mg) e foi submetido a purificação por CC (Coluna **EAB**) utilizando 4,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 23 frações de aproximadamente 10 mL. As frações 18 e 19 foram reunidas em um subgrupo (EAB.1).

Subgrupo EAB.1 (frações 18 e 19 – Hex/CHCl₃ 1:1): Esse subgrupo (5,2 mg) foi submetido à análise por CCD e, após revelação utilizando vanilina/ácido perclórico, observou-se uma mancha de coloração roxa. A análise dos espectros no IV e de RMN de ¹H e ¹³C permitiu identificar o composto como β-sitosterol (**SC04**).

Grupo EAA2 (frações 6 a 10 - CHCl₃/MeOH 9:1): Após a remoção do solvente foi possível obter um sólido amarelo com aspecto ceroso (77,4 mg) que foi submetido à purificação por CC (Coluna **EAC**). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (70-230 Mesh) e como fase móvel os eluentes hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram obtidas 35 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 20 a 36 foram reunidas em um novo subgrupo (EAC.1).

Subgrupo EAC.1 (frações 19 a 20 - CHCl₃): Esse subgrupo foi obtido como um sólido branco (16,1 mg). Fez-se análise por CCD comparando o sólido obtido com uma amostra autêntica de β -sitosterol e ambos apresentaram o mesmo valor de Rf. Foram obtidos espectros no IV e de RMN de ¹H e de ¹³C os quais permitiram concluir que o sólido trata-se do β -sitosterol (**SC04**).

Grupo EAA3 (frações 28 a 29 - CHCl₃/MeOH 1:1): Foi obtido como um sólido (417,4 mg) e submetido ao fracionamento por CC (Coluna **EAD**) utilizando-se 31,0 g de sílica gel 60 (230-400 Mesh). Os eluentes foram hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 64 frações de aproximadamente 20 mL. As frações 9 a 12 foram agrupadas em um subgrupo (EAD.1). As demais frações foram reunidas e lavadas com metanol e posteriormente submetidas a uma nova coluna, mas não foi isolado nenhum composto puro.

Subgrupo EAD.1 (frações 9-12): Esse subgrupo foi obtido como um sólido branco (5,5 mg). Fez-se análise por CCD comparando o sólido obtido com uma amostra autêntica de β -sitosterol e ambos apresentaram o mesmo valor de Rf. Foram obtidos espectros no IV e de RMN de ¹H e de ¹³C os quais permitiram concluir que o sólido trata-se do β -sitosterol (**SC04**).

Grupo EAA4 (frações 30 a 31 - CHCl₃/MeOH 1:1): O grupo foi obtido como um sólido marrom ceroso (95,1 mg), sendo submetido ao fracionamento por CC (Coluna **EAE**) utilizando-se 8,0 g de sílica gel 60 (230-400 Mesh). Os eluentes foram hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em gradiente de polaridade.

Obtiveram-se 42 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 37 a 39 foram reunidas em um subgrupo (EAE.1).

Subgrupo EAE.1 (frações 37-39): Foi obtido como um sólido branco (31,2 mg). Ao ser submetido à CCD observou-se uma mancha de coloração roxa ao ser revelada com vanilina/ácido perclórico. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C , permitiu elucidar o composto como 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol (**SC11**).

Grupo EAA5 (frações 32 a 34 - $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1): Foi obtido como um sólido amarelo (57,9 mg), e após adição de metanol e filtração sob pressão reduzida obteve-se um sólido branco (17,5 mg). Este, quando submetido à análise por CCD, apresentou uma única mancha roxa bem definida. Análise por CCD empregando uma amostra padrão indicou tratar-se do 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol (**SC11**).

Grupo EAA6 (frações 35 a 40 - MeOH): O grupo foi obtido como um sólido marrom (220,4 mg) e submetido a uma purificação por CC (Coluna **EAF**) utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes usados foram diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 45 frações de aproximadamente 20 mL. Após análise por CCD, as frações 17 a 19 foram reunidas em um subgrupo (EAF.1).

Subgrupo EAF.1 (frações 17 a 19 - DCM): Foi obtido como um sólido amarelo claro cristalino (40,4 mg). Ao ser submetido à análise por CCD observou-se uma mancha de cor vermelha ao ser revelada com vanilina/ácido perclórico. Análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C , permitiu identificar o composto como sendo a 4'-*O*-metil-epigallocatequina (**SC12**).

Grupo EAA7 (frações 41 a 50 - MeOH): Foi obtido como um sólido vermelho ceroso (1,2 g) e submetido ao fracionamento utilizando cromatografia de média pressão (Coluna **EAG**) com coluna *snap* ultra 25 g. Os eluentes foram clorofórmio e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 97 frações de aproximadamente 16 mL cada. Após análise por CCD, as frações 40 e 41 e 42-47 foram reunidas em dois subgrupos (EAG1 e EAG2).

Subgrupo EAG1 (frações 40 e 41 – CHCl₃/MeOH 8:2): Foi obtido como um sólido marrom ceroso (87,9 mg) e submetido à purificação por CC (Coluna **EAG1**). Foi utilizada sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes utilizados foram hexano, diclorometano e metanol, puros ou em mistura em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 47 frações de aproximadamente 10 mL. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD. As frações 12 a 20 e 28 a 36 foram agrupadas em dois novos subgrupos (EAG1.1 e EAG1.2).

Subgrupo EAG1.1 (frações 12 a 20 - DCM): Foi obtido como um sólido branco (10,6 mg) que quando submetido à análise por CCD, apresentou uma única mancha roxa bem definida. Análise por CCD empregando uma amostra padrão indicou tratar-se do 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol (**SC11**).

Subgrupo EAG1.2 (frações 28 a 36 - DCM): Foi obtido como um sólido marrom (20,6 mg). O subgrupo quando submetido à análise por CCD, levou a formação de uma mancha de cor rosa quando revelado com vanilina/ácido perclórico. Após análise de RMN 1D foi possível identificar o composto como sendo cerebrosídeo (**SC13**).

Subgrupo EAG2 (frações 42 a 47 – CHCl₃/MeOH 8:2): O sólido obtido deste grupo (405,5 mg) foi submetido à purificação por CC (Coluna **EAG2**). Como fase estacionária foram utilizados 50 mL de sephadex em metanol. A eluição foi isocrática empregando metanol como eluente. Foram recolhidas 44 frações de 20 mL aproximadamente. As frações de 12 a 14 foram reunidas em um novo subgrupo (EAG2.1). As frações 19 e 20 (18,9 mg), 22 a 24 (20,8 mg) e 27 a 31 (11,6 mg) levaram à formação de três sólidos que, quando submetidos à análise por RMN de ¹H e ¹³C, apresentaram sinais característicos de flavonoides, sendo dois deles glicosilados, no entanto, não foi possível identificá-los.

Subgrupo EAG2.1 (frações 12 a 14 - MeOH): Foi obtido como um sólido amarelo claro cristalino (50,4 mg). Ao ser submetido à análise por CCD observou-se uma mancha de cor vermelha ao ser revelada com vanilina/ácido perclórico. A análise

dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C , permitiu identificar o composto como de 4'-*O*-metil-epigallocatequina (**SC12**).

Grupo EAA8 (frações 64 a 79 - MeOH): Foi obtido como um sólido vermelho (3,2 g) e submetido a uma purificação por CC (Coluna **EAH**). Foi realizada uma coluna isocrática, utilizando como fase estacionária 250 mL de sephadex e como fase móvel metanol. Foram coletadas 74 frações de aproximadamente 100 mL cada. As frações de 18 a 25 foram reunidas em um subgrupo (EAH1).

Subgrupo EAH1 (frações 18 a 25 - MeOH): Foi obtido como um sólido vermelho (303,3 mg), que foi submetido a uma nova separação por CC (Coluna **EAH1**) utilizando como fase estacionária 50 mL de sephadex e metanol como fase móvel. Foram recolhidas 21 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações de 8 a 18 foram reunidas em um novo subgrupo (EAH1.1).

Subgrupo EAH1.1 (frações 8 a 18 - MeOH): Esse subgrupo foi obtido como um sólido vermelho (215,4 mg). Ao ser submetido à análise por CCD observaram-se manchas bem definidas de coloração vermelha ao se revelar com vanilina/ácido perclórico. O sólido foi submetido à purificação utilizando CC (**Coluna EAH1.1**). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram diclorometano e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Foram coletadas 41 frações de aproximadamente 20 mL. As frações 24 a 27 foram agrupadas levando ao novo subgrupo EAH.1.1.1.

Subgrupo EAH.1.1.1 (frações 24 a 27 - DCM): Esse subgrupo foi obtido como um sólido amarelo (12,9 mg). Fez-se análise por CCD comparando o sólido obtido com uma amostra autêntica de 4'-*O*-metil-epigallocatequina e ambos apresentaram o mesmo valor de Rf. Foram obtidos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C os quais permitiram concluir que o sólido trata-se do 4'-*O*-metil-epigallocatequina (**SC12**).

Do extrato EAC das raízes obtiveram-se quatro compostos puros conforme está representado na Figura 12, pág. 28.

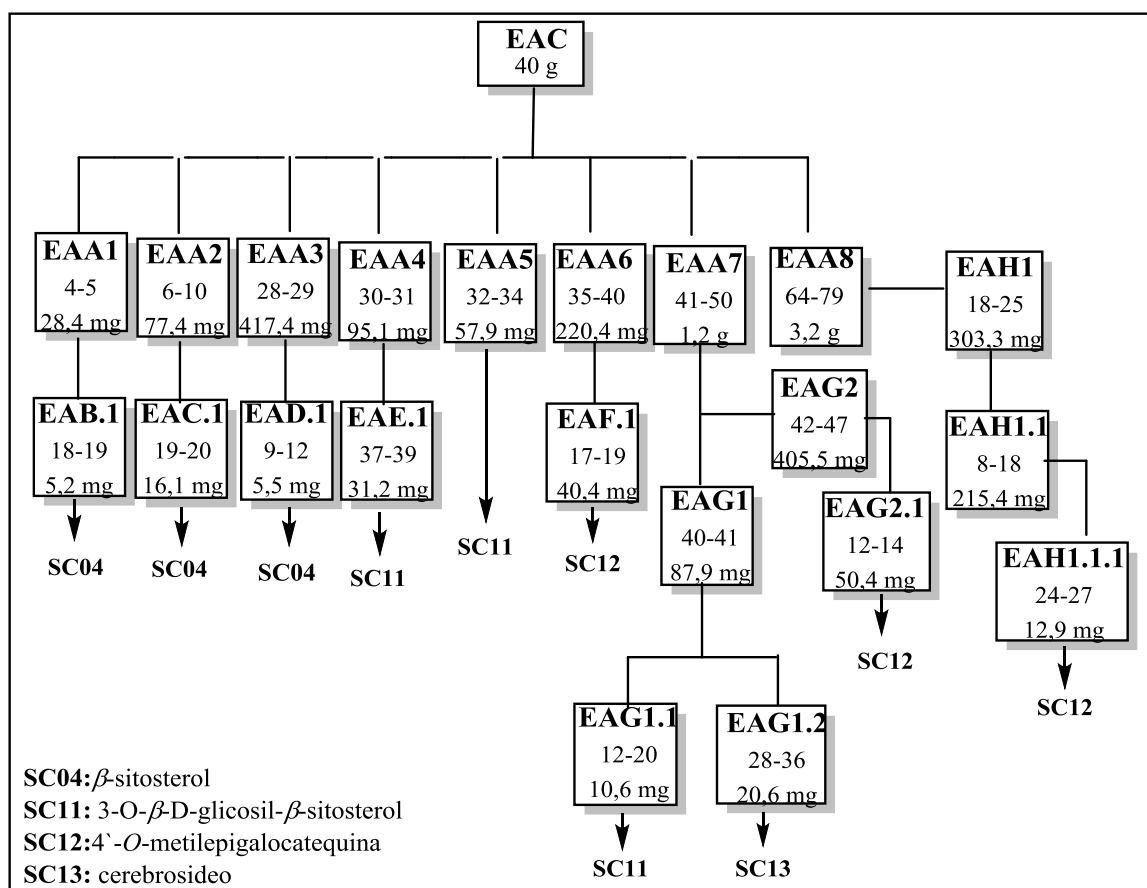


Figura 12: Esquema do fracionamento de EAC.

3.1.6– Preparação dos extratos dos galhos de *Salacia crassifolia*

Após secagem à temperatura ambiente, os galhos de *S. crassifolia* foram submetidos à moagem em moinho de martelos, obtendo-se 620 g de material. Para obtenção dos extratos foi realizada então extração por maceração utilizando solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Após filtração e remoção do solvente por destilação sob pressão reduzida, foram obtidos os respectivos extratos: **EHGS** (extrato hexânico dos galhos), **ECGS** (extrato clorofórmico dos galhos), **EAGS** (extrato acetato de etila dos galhos) e **EMGS** (extrato metanólico dos galhos) (Figura 13, pág.29).

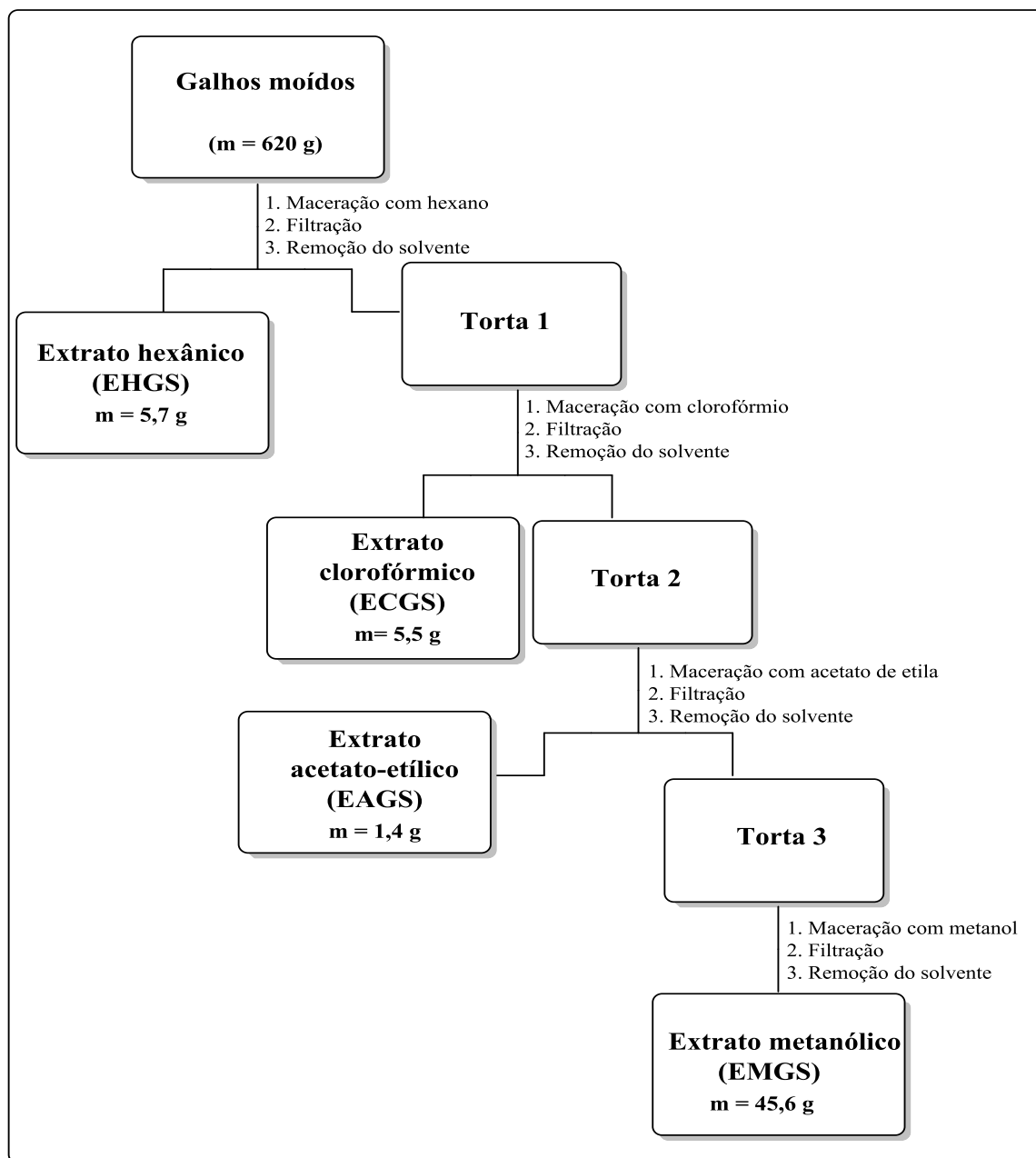


Figura 13: Esquema da obtenção dos extratos de galhos de *S. crassifolia*.

3.1.6.1 – Elaboração do extrato hexânico dos galhos (EHGS)

EHGS (5,7 g) foi obtido como um sólido com aspecto ceroso de coloração verde. Este foi submetido à purificação utilizando coluna cromatográfica (Coluna **EHGA**). Para a fase estacionária foram utilizadas 50 g de sílica gel 60 e, como fase móvel, os eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Desta

coluna foram obtidas 69 frações de aproximadamente 100 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico, obtendo assim seis grupos.

O esquema de fracionamento do EHGS está apresentado na Figura 14 página 33.

Grupo EHGA1 (frações 6 a 7 - Hex/AcOEt 9:1): Após evaporação do solvente observou-se a formação de um sólido branco cristalino (271,2 mg) solúvel em clorofórmio. Quando submetido à análise por CCD observou-se uma única mancha roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 permitiu identificar o sólido como sendo o lupeol (SC14).

Grupo EHGA2 (frações 8 a 11 - Hex/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido branco ceroso (469,1 mg). O material foi então submetido ao fracionamento em CC (Coluna EHGB) utilizando-se 80,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram coletadas 126 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 57 a 62 e 63 a 65 foram agrupadas em dois subgrupos (EHGB.1 e EHGB.2).

Subgrupo EHGB.1 (frações 57 a 62 - AcOEt): Foi obtido como um sólido branco ceroso (189,0 mg). Após lavagem com hexano foi possível a obtenção de um sólido branco cristalino (9,8 mg). Fez-se análise por CCD comparando o sólido obtido com uma amostra autêntica de lupeol e ambos apresentaram o mesmo Rf. Observou-se uma única mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu confirmar a identificação do sólido como sendo lupeol (SC14).

Subgrupo EHGB.2 (frações 63 a 65 - AcOEt): Foi obtido como um sólido branco impuro (116,9 mg). Quando realizada análise por CCD, foi possível observar uma mancha roxa intensa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Foi realizada uma nova purificação por CC (Coluna EHGC) utilizando 15 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 70 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações de 4 a 7 foram reunidas em um novo subgrupo (EHGC.1).

Subgrupo EHGC.1 (frações 4 a 7 - DCM): Foi obtido como um sólido branco (13,5 mg). Quando realizada análise em CCD foi observada uma mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, permitiu identificar o sólido como sendo o β -sitosterol (**SC04**).

Grupo EHGA3 (frações 12 a 13 - Hex/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido branco (491,8 mg). Quando submetido à análise por CCD observaram-se manchas de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Para purificação do sólido foi realizada uma CC (Coluna **EHGD**) utilizando-se 70 g de sílica gel. Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram coletadas 82 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 40 a 47 foram agrupadas (EHGD.1).

Subgrupo EHGD.1 (frações 40 a 47 – Hex/AcOEt 6:4): Após evaporação do solvente observou-se um sólido branco cristalino (63,3 mg). Quando realizada análise em CCD observou uma mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Espectros no IV e de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, permitiu identificar o sólido como sendo lup-20(29)-eno-3 β ,15 α ,diol (**SC15**).

Grupo EHGA4 (fração 14 - Hex/AcOEt 8:2): Após evaporação do solvente foi obtido um sólido branco cristalino (63,2 mg). Quando submetido à cromatografia de camada delgada (CCD) observou-se uma única mancha roxa quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, permitiu identificar o sólido como sendo o 21 α -hidroxifriedelan-3-ona (**SC16**).

Grupo EHGA5 (frações 17 a 19 - Hex/AcOEt 7:3): Após evaporação do solvente observou-se a formação de um sólido branco cristalino (229,5 mg). Quando submetido à cromatografia de camada delgada (CCD) observou-se uma única mancha roxa quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, permitiu identificar o sólido como sendo betulina (**SC17**).

Grupo EHGA6 (frações 20 a 26 - Hex/AcOEt 7:3): Foi obtido como um sólido ceroso de coloração amarela (791,9 mg), sendo o mesmo submetido ao fracionamento por cromatografia de média pressão (Coluna **EHGE**) utilizando-se coluna *snap* ultra 10 g. Os eluentes foram diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Foram obtidas 67 frações de aproximadamente 16 mL cada. As frações 39 a 59 foram reunidas em um subgrupo (EHGE.1).

Subgrupo EHGE.1 (frações 39 a 59 – DCM/AcOEt 1:1): Foi obtido como um sólido branco (369,1 mg). Ao ser submetido à CCD observaram-se manchas bem definidas de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Para a purificação foi realizada uma nova CC (Coluna **EHGF**) utilizando 42 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 101 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações 30 a 48 foram reunidas em um novo subgrupo (EHGF.1).

Subgrupo EHGF.1 (frações 30 a 48 – Hex/AcOEt 7:3): Após evaporação do solvente foi observado um sólido branco cristalino (76,7 mg) solúvel em clorofórmio. Em CCD observou-se uma mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Espectros no IV e de RMN de 1D e 2D foram obtidos e permitiram identificar o composto como lup-20(29)-eno-2 α ,3 β ,diol (**SC18**).

Do extrato EHGS dos galhos obtiveram-se seis compostos puros conforme está apresentado na Figura 14 página 33.

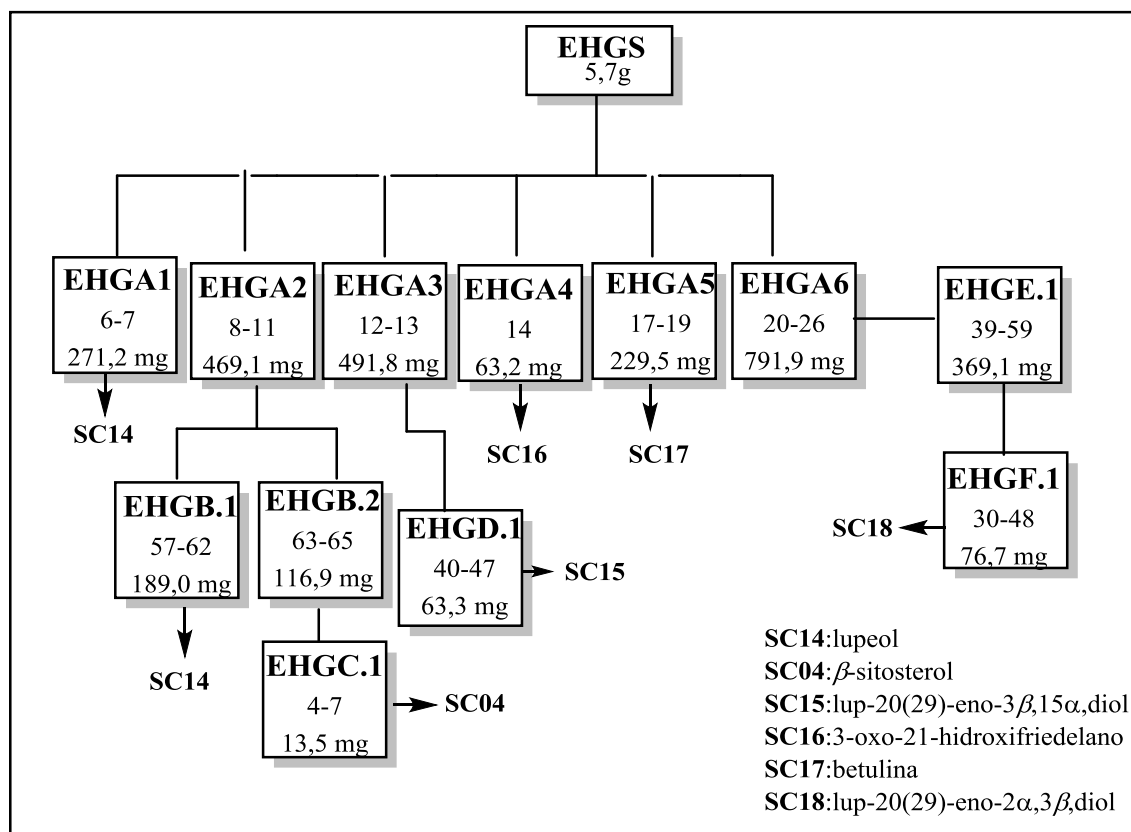


Figura 14: Esquema do fracionamento de EHGS.

3.1.6.2 – Elaboração do extrato clorofórmico dos galhos (ECGS)

ECGS foi fracionado em CC (Coluna ECGA) utilizando-se 5,4 g de amostra e 210 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes empregados foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 95 frações de aproximadamente 100 mL cada. Após análise por CCD, as frações com perfil similar foram reunidas em quatro grupos (Figura 15, pág. 35). Em relação às outras frações, algumas não foram trabalhadas por apresentarem pouca massa ou várias manchas em CCD quando revelada com vanilina/ácido perclórico. As demais frações foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento e identificação de compostos.

Grupo ECGA1 (frações 4 a 5 – Hex/AcOEt 9:1): Foi obtido como um sólido de coloração verde com aspecto ceroso (123,4 mg). Procedeu-se a purificação por CC

utilizando 18 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária. Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 101 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações 15 a 20 foram agrupadas (ECGA1.1).

Subgrupo ECGA1.1 (frações 15 a 20 - Hex/AcOEt 8:2): Foi obtido como um sólido branco cristalino (34,1 mg). Em CCD observou-se uma mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram identificar o sólido como sendo lupeol (**SC14**).

Grupo ECGA2 (frações 11-14): Foi obtido como um sólido branco com aspecto ceroso (100,4 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **ECGB**) com 30 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 124 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações de 9 a 14 foram reunidas em um subgrupo (ECGB.1).

Subgrupo ECGB.1 (frações 9-14): Foi obtido como um sólido branco (40,9 mg). Em CCD observou-se uma mancha de coloração roxa quando revelada com vanilina/ácido perclórico. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram identificar o sólido como sendo uma mistura de 21 α -hidroxifriedelan-3-ona (**SC16**) e lup-20(29)-eno-3 β ,15 α ,diol (**SC15**).

Grupo ECGA3 (frações 15-23): Foi obtido como um sólido verde com aspecto ceroso (678,3 mg) e submetido ao fracionamento utilizando cromatografia de média pressão (Coluna **ECGC**) com coluna *snap* ultra 25 g. Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em gradiente de polaridade. Obtiveram-se 82 frações de aproximadamente 16 mL cada. Após análise por CCD, as frações 18 a 30 foram reunidas em um subgrupo (ECGC.1). Em relação às outras frações, algumas não foram trabalhadas por apresentarem pouca massa ou várias manchas em CCD quando revelada com vanilina/ácido perclórico.

Subgrupo ECGC.1 (frações 18-30): Após evaporação do solvente foi obtido um sólido com aspecto ceroso (212 mg), que foi lavado com hexano e foi possível obter 45 mg de um sólido branco. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram identificar o sólido como sendo uma mistura de betulina (**SC17**) e ácido betulínico (**SC19**).

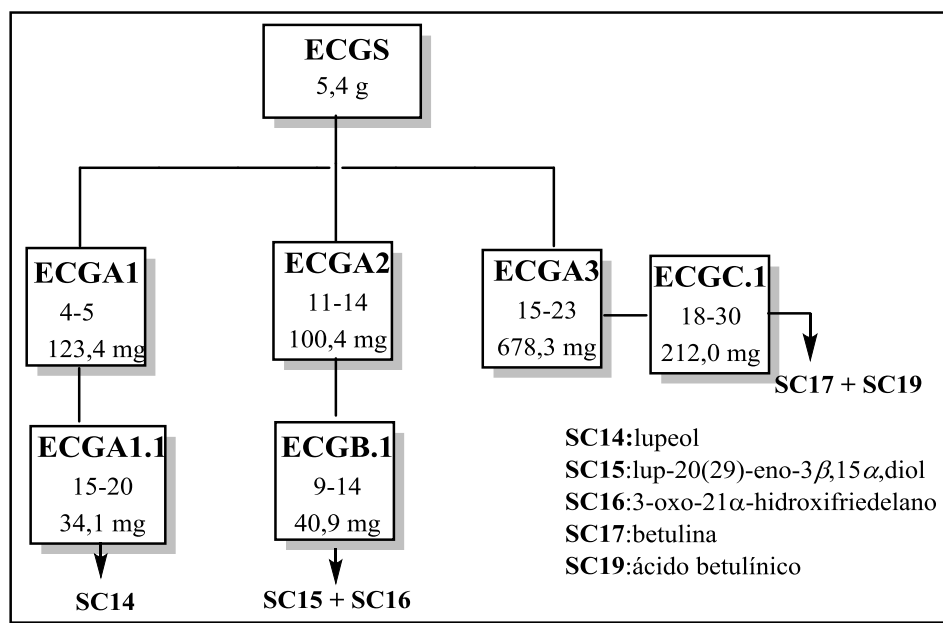


Figura 15: Esquema do fracionamento de EHGS.

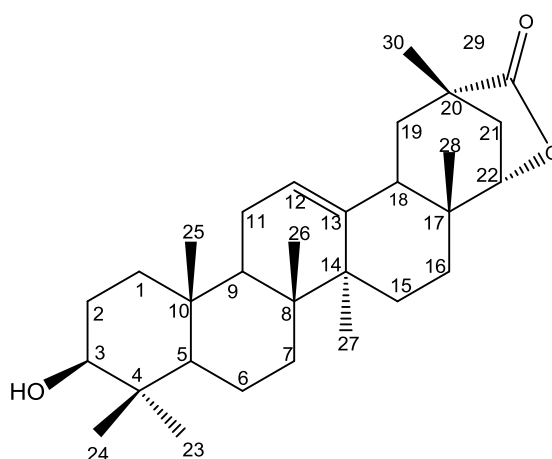
4 Resultados e discussão

Os dezoito compostos isolados de *Salacia crassifolia* (página v-vii e apêndice B, página 167) foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, espectrométricas, temperatura de fusão e, os conhecidos, comparados com dados da literatura. Os compostos **SC03** e **SC10** foram também submetidos a difração de raios-x.

Portanto, na determinação estrutural serão discutidos os dados mais importantes que levaram à identificação destes compostos.

4.1 Determinação estrutural

4.1.1 SC01: abruslactona A



O composto foi isolado do **EHE1** como um sólido, e no espectro no IV (Figura A1, pág. 115) foi observada uma banda intensa em 3488 cm^{-1} , característica de grupo hidroxila além de uma banda de absorção em 1748 cm^{-1} , característica de carbonila.

Observaram-se no espectro de RMN de ^1H (Figura A2, pág. 115) sete sinais referentes a grupos metila em δ_{H} 0,79, 0,87, 0,88, 0,93, 0,94, 0,99 e 1,08. O multipletto entre δ_{H} 4,10–4,15 foi atribuído ao hidrogênio H-22. O dupletto duplo em δ_{H} 3,22 (1H, $J = 11,0$ e $4,6$ Hz) foi atribuído a H-3, e o sinal largo em δ_{H} 5,30 foi atribuído ao H-12. Após análise do mapa de contornos HMBC (Figura A5, pág.117), observou-se que os sinais em δ_{H} 5,40 e entre δ_{H} 7,00-8,10, não apresentavam correlações com os sinais dos átomos de carbonos pertencentes à abruslactona e, portanto, foram atribuídos à impureza, não identificada, contida na amostra.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura A3, pág. 116) permitiu identificar 30 sinais de carbono com intensidade similar e, de acordo com o espectro DEPT-135

(Figura A4, pág. 116), foi possível classificar os tipos de carbono como sendo C, CH₂, CH e/ou CH₃. Esses dados estão de acordo com os sinais característicos de triterpenos pentacíclicos de esqueleto oleanano. O sinal observado em δ_C 182,40 (C-29), característico de carbono carbonílico, juntamente com o sinal em δ_C 83,14 (C-22), permitiram confirmar a presença do grupo γ -lactona. O sinal em δ_C 78,94 foi atribuído a C-3. Os sinais observados em δ_C 124,67 e 140,29 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínicos C-12 e C-13, respectivamente. Os sinais entre 130-166 foram atribuídos à impureza na amostra.

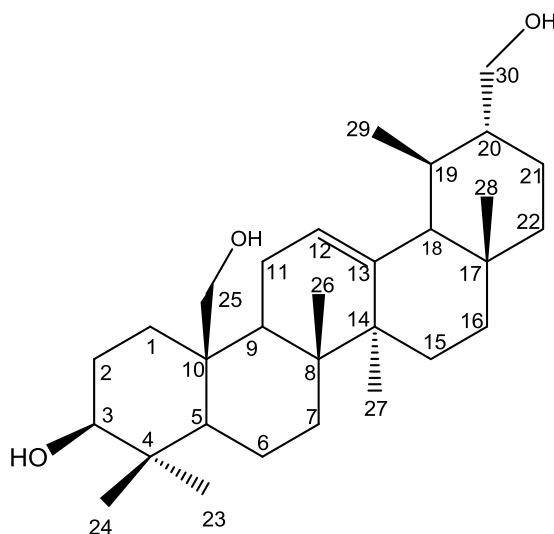
A comparação dos dados de RMN de ¹³C obtidos para **SC01** com aqueles descritos na literatura para abruslactona A (DUARTE, 2000) permitiu concluir que o composto se trata desse triterpeno. Os dados de RMN de ¹³C de **SC01** estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados de RMN de ¹³C de **SC01** (CDCl₃/100 MHz) e dados da literatura para abruslactona A (DUARTE, 2000).

Nº	Tipo de C	δ_C de SC01	δ_C^* (Duarte, 2000)	Nº	Tipo de C	δ_C de SC01	δ_C^* (Duarte, 2000)
1	CH ₂	38,67	38,60	16	CH ₂	24,37	24,31
2	CH ₂	27,23	27,17	17	C	35,30	35,25
3	CH	78,94	78,87	18	CH	43,50	43,42
4	C	38,79	38,74	19	CH ₂	39,90	39,82
5	CH	55,27	55,20	20	C	42,58	42,51
6	CH ₂	18,36	18,31	21	CH ₂	33,88	33,82
7	CH ₂	33,18	33,12	22	CH	83,14	83,11
8	C	39,35	39,28	23	CH ₃	28,13	28,08
9	CH	47,58	47,51	24	CH ₃	15,66	15,62
10	C	37,07	37,00	25	CH ₃	15,66	15,62
11	CH ₂	23,53	23,47	26	CH ₃	17,01	16,96
12	CH	124,67	124,63	27	CH ₃	25,01	24,96
13	C	140,29	140,21	28	CH ₃	24,08	24,04
14	C	39,55	39,51	29	C	182,40	182,42
15	CH ₂	25,24	25,19	30	CH ₃	21,01	20,97

*CDCl₃/100 MHz

4.1.2 SC02: urs-12-eno-3 β ,25,30-triol



O composto **SC02** foi isolado do **EHE1**, como um sólido branco cristalino solúvel em clorofórmio. O espectro no IV (Figura A6, pág.117) apresentou banda larga e intensa entre 3100-3600 cm^{-1} , característica de grupo hidroxila, e bandas em 2860 e 2924 características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A7 e A8, pág. 118) observou-se um sinal em δ_H 5,14 que se refere ao hidrogênio olefínico H-12. Foram observados dois dupletos, um em δ_H 4,04 (d, $J=12,1$ Hz, 1H) e outro em δ_H 4,14 (d, $J=12,1$ Hz, 1H), e também dois dupletos duplos em δ_H 3,57 (dd, $J =10,7$ e 6,4 Hz, 1H) e δ_H 3,75 (dd, $J =10,7$ e 3,3 Hz, 1H), característicos de grupos hidroximetileno, de acordo com a integração desses sinais. O sinal em δ_H 3,31 foi atribuído a H-3 e apresenta-se como um duplete duplo, com constante de acoplamento 11,7 e 4,5 Hz, indicando que o hidrogênio encontra-se na posição axial, logo a hidroxila está na posição equatorial.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figura A9 e A10, pág. 119) indicou um total de 30 sinais de carbono, que foram classificados como sendo seis CH_3 , onze CH_2 , sete CH e seis C. Os sinais observados em δ_C 125,68 (C12) e 138,95 (C13) foram atribuídos a átomos de carbono olefínicos. Estes dados comparados com dados da literatura sugeriram que **SC02** tratava-se de um triterpeno do tipo ursano (SUKUMAR *et al.*, 1995).

Utilizando os valores de deslocamentos químicos em δ_H 5,14 (H-12), δ_C 125,68 (C-12) e 138,95 (C-13) como ponto de partida, procedeu-se, então, a análise detalhada

dos mapas de contornos HMBC, HSQC e COSY, a fim de elucidar a estrutura química de **SC02**.

Na Figura A12 (pág. 121) observou-se correlação do sinal do átomo de hidrogênio H-12 com os sinais de carbono em δ_C 25,23 (C-11), 42,28 (C-14), 48,56 (C-9) e 58,99 (C-18).

A partir do mapa de contornos HSQC (Figura A11, pág. 120) foi possível determinar o deslocamento químico dos sinais dos átomos de hidrogênio H-11 (2,46 e 2,09), H-9 (1,63) e H-18 (1,36).

No mapa de contornos HMBC (Figuras A12 e A13 pág. 121 e 122) observaram-se correlações do sinal de hidrogênio H-18 com os sinais em δ_C 33,66 (C-17), 42,28 (C-14), 125,68 (C-12) e 138,95 (C-13). O sinal de H-18 correlaciona também com os sinais em δ_C 17,12 (C-29), 28,17 (C-16), 28,67 (C-28), 34,06 (C-19), 41,25 (C-22) e 47,29 (C-20).

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura A11, pág. 120) de **SC02** permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos sinais dos átomos de hidrogênio H-20 (δ_H 0,99), H-16 (δ_H 2,02) e H-28 (δ_H 0,82).

No mapa de contornos HMBC, observaram-se correlações do sinal de hidrogênio H-28 com os sinais em δ_C 28,17 (C-16); 33,66 (C-17), 41,25 (C-22) e 58,99 (C-18) (Figuras A12 e A13, Pág. 121 e 122).

Observou-se, no mapa de contornos HMBC, correlação entre o sinal em δ_H 2,02 (H-16) com δ_C 26,67 (C-15) (Figura A13, pág. 122) e no mapa de contornos HSQC os sinais em δ_H 0,99 e 1,86 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-15. Observou-se correlação entre o sinal do átomo de hidrogênio H-15 (1,86) com os sinais em δ_C 28,17 (C-16), 23,72 (C-27) e 42,28 (C-14) (Figura A13, pág. 122). O sinal em δ_H 1,08 foi atribuído ao H-27 a partir do mapa de contornos HSQC (Figura A11, pág. 120). Foi observada correlação de H-27 com os sinais em 26,67 (C-15), 42,28 (C-14) e com 138,95 (C-13). No mapa de contornos HMBC o sinal em δ_C 40,31 (C-8) correlacionou-se com o sinal em δ_H 1,15 (H-26) (Figura A13, pág. 122), observou-se correlações entre o sinal de hidrogênio H-26 com átomos de carbono em δ_C 33,25 (C-7), e em 48,56 (C-9). A partir do mapa de contornos HSQC foram definidos os deslocamentos dos átomos de hidrogênio H-7 e H-9. O sinal de hidrogênio H-9 (1,63), correlaciona-se com átomos de carbono em δ_C 17,41 (C-26), 33,93 (C-1), 41,37 (C-10) e 60,96 (C-25) (Figura A13, pág. 122).

A análise do mapa de contornos HSQC permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio diastereotópicos H-25 (δ_H 4,04; 4,14) (Figura A11, pág. 120). Observaram-se, no mapa de contornos HMBC, correlações dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio diastereotópicos H-25 com os sinais em δ_C 33,93 (C-1), 41,37 (C-10), 48,56 (C-9) e com 55,44 (C-5).

Os sinais em δ_H 0,90 e 2,36 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-1 e o sinal em δ_H 0,86 ao átomo de hidrogênio H-5 a partir do mapa de contornos HSQC (Figura A11, pág. 120).

No mapa de contornos HMBC observou-se correlação entre o sinal do átomo de hidrogênio H-5 (0,86) com os sinais em δ_C 16,08 (C-24) e 28,97 (C-23) (Figura A13, pág. 122).

O sinal de hidrogênio H-24 (0,90) correlaciona-se com os sinais em δ_C 38,94 (C-4), 55,44 (C-5) e com 78,78 (C-3) (Figura A12 e A13, pág. 121 e 122). Na Figura A12 (pág. 121) observou-se correlação do sinal em δ_H 3,30 (H-3) com o sinal em δ_C 28,38 (C-2).

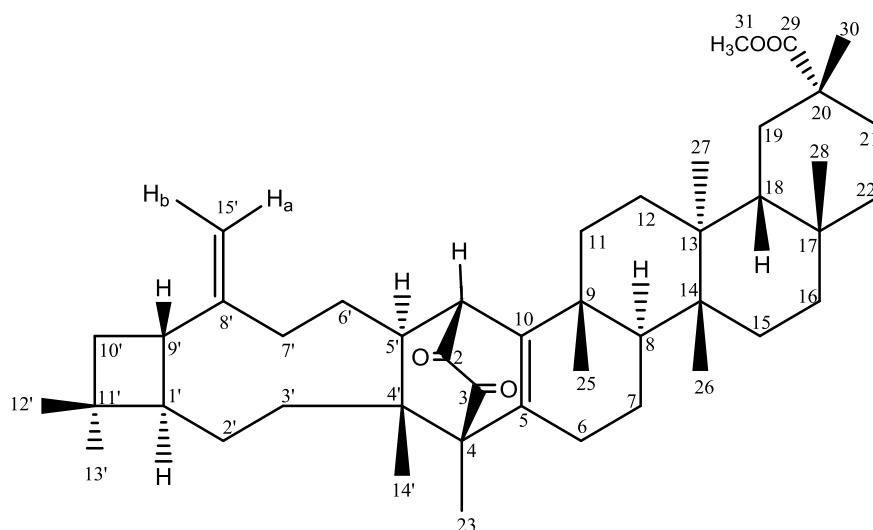
No mapa de contornos COSY (Figura A14, pág. 123) observou-se que o sinal em δ_H 1,72 (H-2) correlaciona-se com os sinais em δ_H 2,36 (H-1) e com o sinal em δ_H 3,30 (H-3). Observaram-se correlações entre os átomos de hidrogênio em δ_H 2,46 (H-11) e 2,09 (H-11) com o átomo de hidrogênio δ_H 1,63 (H-9). O sinal em δ_H 2,02 (H-16) correlaciona-se com átomos de hidrogênio em δ_H 0,99 (H-15). Observaram-se também correlações do átomo de hidrogênio H-20 em δ_H 0,99 com os sinais em δ_H 3,57 e 3,75 atribuídos aos átomos de hidrogênio H-30 (Figura A14, pág. 123).

As análises dos espectros de RMN 1D (1H , ^{13}C e DEPT-135) e 2D (HSQC, HMBC e COSY) permitiram atribuir todos os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono de **SC02**, que estão listados na Tabela 2, pág. 41, e foi possível elucidar **SC02** como urs-12-eno-3 β ,25,30-triol, composto ainda não descrito na literatura.

Tabela 2: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz, CDCl₃ + piridina-d₅) de SC02.

Nº	δ_c SC02	Tipo de C	δ_H SC02	HMBC (H→ C)	COSY
1	33,93	CH ₂	0,90; 2,36	3,5	1,2
2	28,38	CH ₂	1,72; 0,86		
3	78,78	CH	3,30	2,23,24	2
4	38,94	C			
5	55,44	CH	0,86	1,23,24	6
6	18,15	CH ₂	1,36; 1,50		7
7	33,25	CH ₂	1,36; 1,53	5,26	6
8	40,31	C			
9	48,56	CH	1,63	1,10,11,25,26	
10	41,37	C			
11	25,23	CH ₂	2,46; 2,09	8,9,12,13	9,11
12	125,68	CH	5,14	9,11,14,18	11
13	138,95	C			
14	42,28	C			
15	26,67	CH ₂	0,99; 1,86	14,16,27	16
16	28,17	CH ₂	2,02	15	
17	33,66	C			
18	58,99	CH	1,36	12,13,14,16,17,19,20,22,28,29	
19	34,06	CH	1,63		
20	47,29	CH	0,99		
21	25,31	CH ₂	1,50; 1,64	20,30	
22	41,25	CH ₂	1,30; 1,50	18,20	
23	28,97	CH ₃	1,06	3,4,5	
24	16,08	CH ₃	0,90	3,4,5	
25	60,96	CH ₂ OH	4,04; d, J=12,1Hz 4,14; d, J=12,1 Hz	1,5,9,10	
26	17,41	CH ₃	1,15(s)	7,8,9,14	
27	23,72	CH ₃	1,08(s)	8,13,14,15	
28	28,67	CH ₃	0,82(s)	16,18,22	
29	17,12	CH ₃	0,82(s)	20	
30	65,87	CH ₂ OH	3,57; dd, J=10,7 e 3,3 Hz 3,75; dd, J=10,7 e 6,4 Hz	19,20	20

4.1.3 SC03: cariopristimerina



SC03 foi isolado do **EHE2** como um sólido amarelo cristalino solúvel em clorofórmio e se decompôs em 230 °C. No espectro na região do IV (Figura A15, pág. 123) observou-se uma banda em 1728 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação C=O. A banda observada em 1630 cm⁻¹ é característica de ligação dupla C=C.

A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura A16, pág. 124) permitiu observar dez sinais referentes a grupos metila em δ_H 0,73; 0,82; 0,85; 0,87; 0,97; 0,99; 1,09; 1,15; 1,20 e 3,69, sendo o último referente à metila de grupo metoxila. Os sinais em δ_H 4,88 e 5,01 são referentes aos átomos de hidrogênio olefínicos.

Observaram-se no espectro de RMN de ¹³C (Figura A17, pág. 124) 45 sinais de átomos de carbono e a análise do espectro DEPT-135 (Figura A18, pág. 125) permitiu classificar os tipos de carbono como sendo C, CH₂, CH e/ou CH₃. Foram observados três sinais característicos de carbono carbonílico em δ_C 179,17; 192,12 e 193,13.

A partir dos dados de RMN de ^{13}C (Tabela 3, pág. 46) obtidos para **SC03** e comparação com dados da literatura (SANTOS *et. al*; 2019), conclui-se que se tratava do composto cariopristerina isolado durante o trabalho de mestrado. Este composto foi renomeado, uma vez que o nome usado anteriormente, crassifolina, é na verdade de um composto já descrito na literatura pertencente à classe dos alcaloides. Quando isolado pela primeira vez a estrutura de **SC03** foi elucidada utilizando-se técnica de RMN, EM, IV e difração de raios-X. Os dados obtidos anteriormente por raios-X do composto precisaram ser refinados para uma melhor adequação do parâmetro Flack e consequentemente, neste trabalho, a estereoquímica foi corrigida.

A análise do mapa de contornos NOESY (Figura 16) permitiu observar correlações dos átomos de hidrogênio H-31 com o H-27 mostrando assim que ambos estão do mesmo lado. Observaram-se também correlações de H-15 e H-13' com H-31 e H-27, sugerindo um dobramento da molécula. Este dobramento foi confirmado pela análise da estrutura obtida por difração de raios-X (Figura 17, pág. 44).

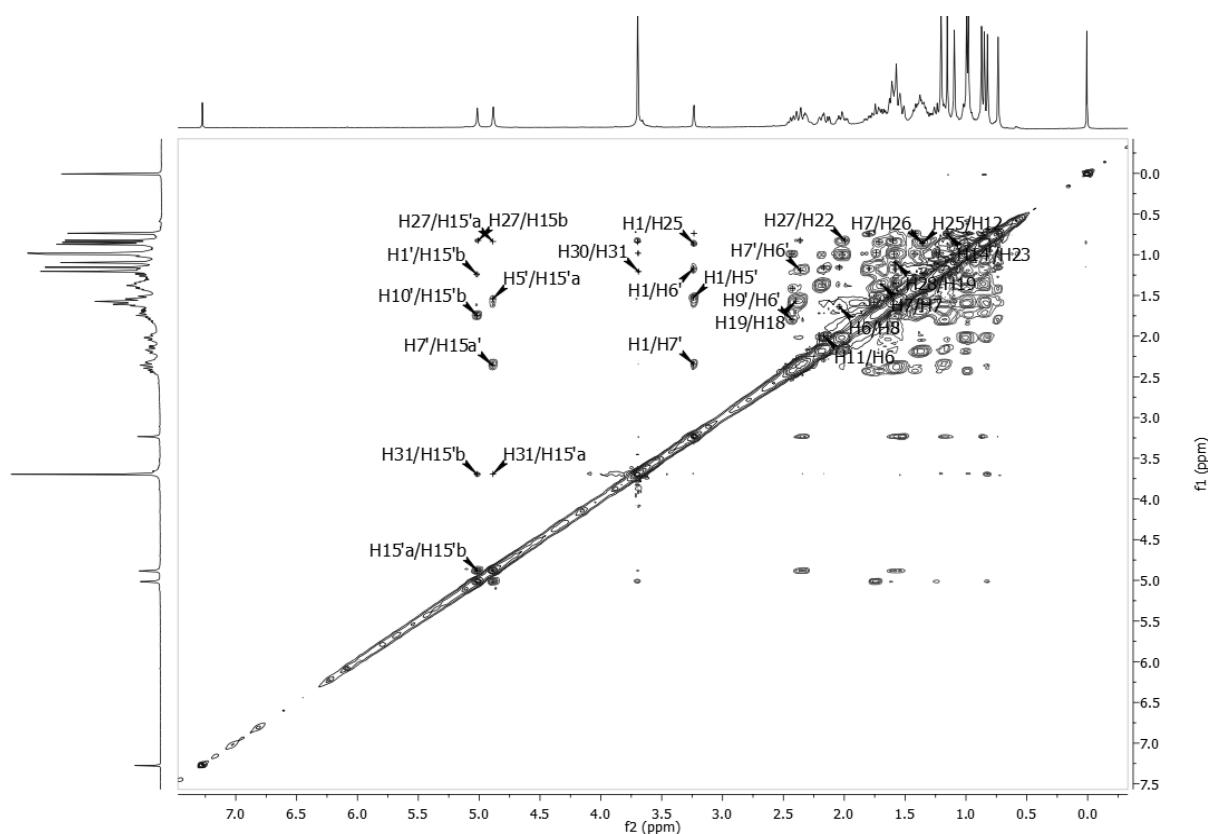


Figura 16: Mapa de contornos de NOESY (400 MHz, CDCl_3) de SC03.

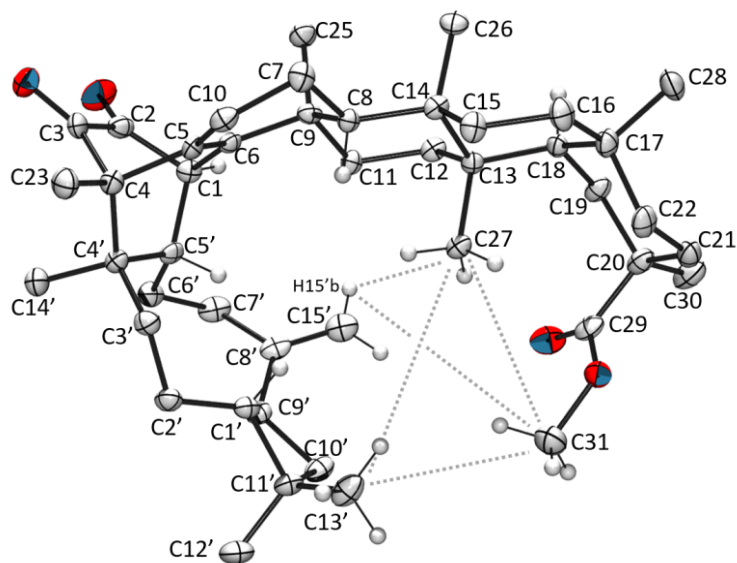
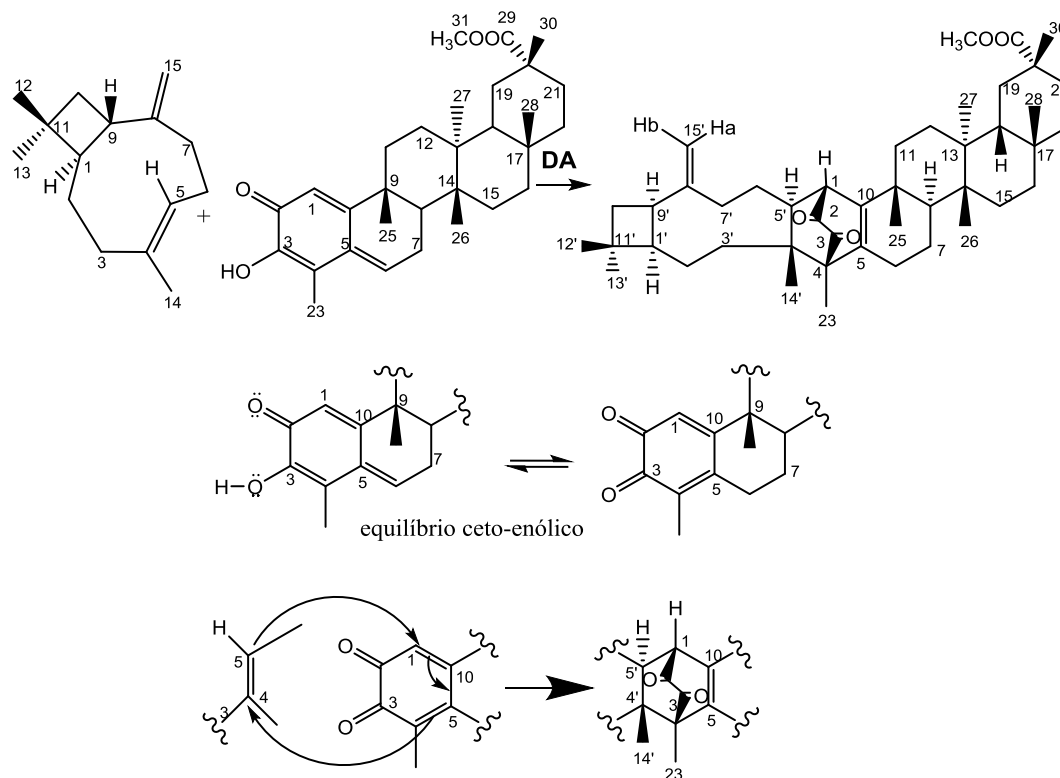


Figura 17: Estrutura cristalina de raios X de **SC03**. As linhas pontilhadas representam as interações relevantes observadas no NOESY.

A proposta de formação de **SC03** está representada no Esquema 1. Nela um derivado de pristimerina a partir do equilíbrio ceto-enólico, reage com o cariofileno via reação Diels-Alder.



Esquema 1: Reação de Diels-Alder e via hipotética de formação de **SC03**.

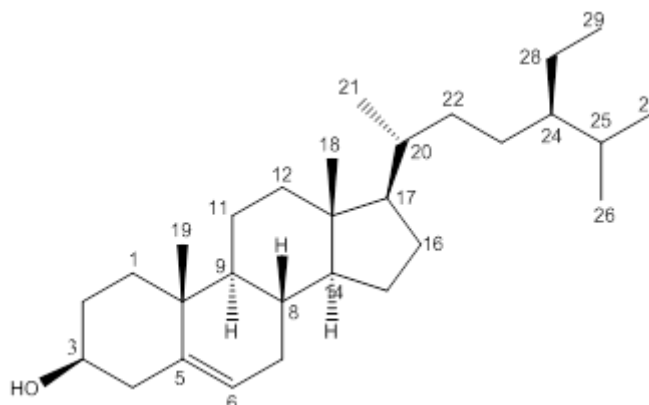
A fim de provar que o composto **SC03** é, de fato, biossintetizado pela planta, e não um artefato formado durante a extração, dois experimentos foram realizados. O primeiro experimento consistiu em uma reação química entre o cariofileno (comercial) e a pristimerina. Ambos os compostos foram submetidos às condições similares empregadas na metodologia de extração. Após 72 h a mistura resultante foi analisada por cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e comparada com os materiais de partida. Não houve presença de nenhum componente diferente dos materiais de partida, indicando que nenhum artefato foi formado durante a preparação do extrato. O segundo experimento consistiu em preparar um novo extrato por maceração (temperatura ambiente, 72 h) e isolamento do composto **SC03**. No entanto, devido às quantidades limitadas de raízes, o extrato foi obtido em pequena quantidade e submetido à análise por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrômetro de Massas (LC/ESI-QTOF/MS), no modo positivo. O pico de massa em m/z 693,4860 (calculado 693,4853) foi observado e atribuído a $C_{45}H_{66}O_4Na$ $[M+Na]^+$, coerente com a fórmula molecular de um aduto de sódio do **SC03**, reforçando a evidência de que esse dímero é biossintetizado pela planta.

Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC03** e dados da literatura para cariopristimerina (SANTOS *et. al.*; 2019).

Nº	δ_c SC03	Tipo de C	δ_c^* (Santos <i>et. al.</i> ; 2019)	Nº	δ_c SC03	Tipo de C	δ_c^* (Santos <i>et. al.</i> ; 2019)
1	49,07	CH	49,02	25	22,34	CH ₃	22,35
2	193,13	C	193,20	26	16,04	CH ₃	15,99
3	192,12	C	192,15	27	17,20	CH ₃	17,19
4	60,52	C	60,48	28	31,86	CH ₃	31,85
5	131,71	C	131,71	29	179,17	C	179,20
6	28,25	CH ₂	28,23	30	31,91	CH ₃	31,95
7	18,31	CH ₂	18,30	31	51,59	O-CH ₃	51,61
8	45,66	CH	45,59	1'	60,81	CH	60,79
9	37,43	C	37,42	2'	24,45	CH ₂	24,42
10	148,80	C	148,80	3'	41,29	CH ₂	41,25
11	30,96	CH ₂	30,90	4'	39,76	C	39,71
12	29,69	CH ₂	29,67	5'	44,39	CH	44,40
13	39,56	C	39,55	6'	25,09	CH ₂	25,06
14	39,33	C	39,30	7'	36,12	CH ₂	36,08
15	28,91	CH ₂	28,85	8'	151,40	C	151,42
16	36,39	CH ₂	36,34	9'	42,52	CH	42,49
17	30,27	C	30,25	10'	36,24	CH ₂	36,34
18	44,53	CH	44,51	11'	34,79	C	34,79
19	30,45	CH ₂	30,43	12'	21,94	CH ₃	21,93
20	40,66	C	40,64	13'	30,00	CH ₃	30,01
21	29,98	CH ₂	29,98	14'	16,70	CH ₃	16,69
22	36,70	CH ₂	36,66	15'	111,77	CH ₂	111,75
23	9,05	CH ₃	9,06				

* CDCl_3 , 100 MHz

4.1.4 SC04: β -Sitosterol



O composto **SC04** foi isolado do **EHE1** e do **EAC**, apresentando-se como um sólido cristalino branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 125-126 °C.

No espectro na região do IV (Figura A19, pág. 125) observaram-se bandas de absorção em: 3408 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, e 2958-2854 cm^{-1} , que correspondem a estiramento simétrico e assimétrico de ligação CH de compostos alifáticos.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A20, pág. 126) observaram-se dois multipletos entre δ_{H} 3,48-3,56 e 5,34-5,36 atribuídos aos átomos de hidrogênio carbinólico H-3 e ao hidrogênio olefínico H-6, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A21 e A22 pág. 126 e 127) permitiu atribuir os sinais com deslocamentos observados em δ_{C} 140,82 (C-5) e 121,73 (C-6) a átomos de carbono da ligação dupla e o sinal em δ_{C} 71,86 foi atribuído ao carbono hidroxilado (C-3).

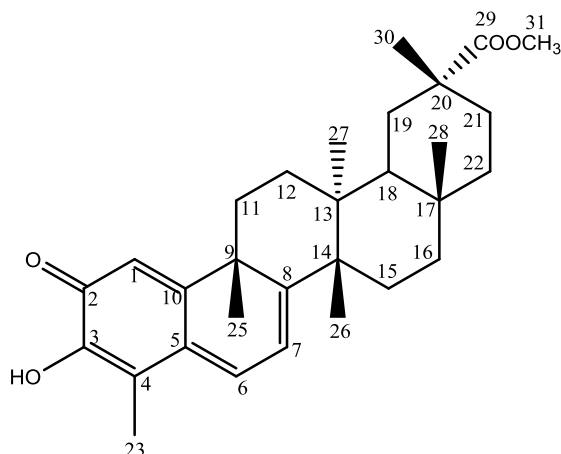
A análise comparativa dos dados de RMN obtido para o composto com os dados descritos na literatura (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003) permitiu identificar **SC04** como sendo β -sitosterol (Tabela 4, pág. 48).

Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C de **SC04** (CDCl_3 , 100 MHz) e dados da literatura para β -sitosterol (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003).

Nº	Tipo de C	δ_{C}^* de SC04	δ_{C}^* (De-Eknamkul, Potduang, 2003)	Nº	Tipo de C	δ_{C}^* de SC04	δ_{C}^* (De-Eknamkul, Potduang, 2003)
1	CH ₂	37,32	37,22	16	CH ₂	28,27	28,22
2	CH ₂	31,74	31,63	17	CH	56,14	56,02
3	CH	71,86	71,80	18	CH ₃	11,89	11,84
4	CH ₂	42,38	42,19	19	CH ₃	19,42	19,39
5	C	140,82	140,72	20	CH	36,18	36,12
6	CH	121,73	121,71	21	CH ₃	18,82	18,76
7	CH ₂	31,95	31,87	22	CH ₂	34,03	33,91
8	CH	31,97	31,87	23	CH ₂	26,21	26,02
9	CH	50,22	50,10	24	CH	45,93	45,81
10	C	36,56	36,48	25	CH	29,26	29,11
11	CH ₂	21,11	21,07	26	CH ₃	19,83	19,80
12	CH ₂	39,84	39,74	27	CH ₃	19,09	19,01
13	C	42,33	42,26	28	CH ₂	23,15	23,04
14	CH	56,84	56,73	29	CH ₃	12,01	11,97
15	CH ₂	24,34	24,29				

* CDCl_3 /125 MHz

4.1.5 SC05: pristimerina



O composto **SC05** foi isolado do **EHE2** como um cristal alaranjado com faixa de fusão de 217-220 °C.

No espectro na região do IV (Figura A23, pág. 127) de **SC05** foram observadas bandas de absorção em: 3348 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento da ligação OH; 2940-2872 cm^{-1} , relacionada aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação CH; 1736 cm^{-1} e 1726 cm^{-1} , características de estiramentos de carbonila; 1654 e 1590 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento de ligação C=C.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A24, pág. 128) observaram-se dois dupletos em δ_{H} 6,34 (d, $J=7,2$ Hz, 1H) e em δ_{H} 7,01 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio olefínicos H-7 e H-6, respectivamente. O simpleto observado em δ_{H} 6,53 foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-1. Esses sinais são característicos de triterpeno quinonametídeo. Observaram-se também sete simpletos em δ_{H} 0,54; 1,10; 1,18; 1,26; 1,45; 2,21 e 3,55, relativos a sete grupos metila, sendo o último característico de átomo de hidrogênio de grupo metoxila. O sinal observado em δ_{H} 6,98 foi atribuído ao átomo de hidrogênio do grupo hidroxila. Já o sinal observado em δ_{H} 2,21 é característico de grupo metila ligado a carbono sp^2 e foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-23, também indicativo de quinonametídeo.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A25 e A26, pág. 128 e 129) indicou 30 sinais de átomos de carbono, que foram classificados como não hidrogenados, metilênicos, metínicos e/ou metílicos.

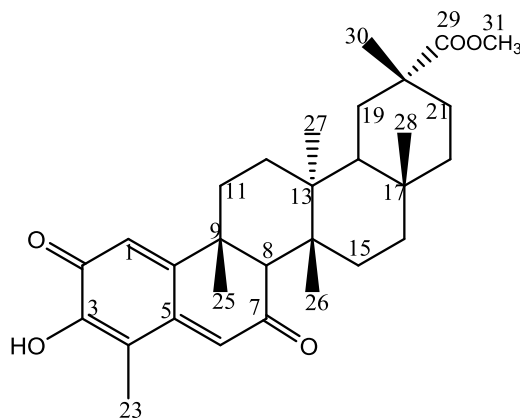
Os dados de RMN de ^{13}C obtidos para **SC05** foram comparados com dados da literatura (KHALID, 2007) e permitiram confirmar que se trata do composto pristimerina. Os dados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C de **SC05** e dados da literatura para pristimerina (KHALID, 2007).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC05	δ_{C^*} (Khalid, 2007)	Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC05	δ_{C^*} (Khalid, 2007)
1	CH	119,59	119,8	16	CH ₂	36,40	36,4
2	C	178,36	178,6	17	C	30,56	30,9
3	C	146,04	146,3	18	CH	44,34	44,4
4	C	117,11	117,4	19	CH ₂	30,92	30,9
5	C	127,45	127,6	20	C	40,43	40,5
6	CH	134,02	134,4	21	CH ₂	29,90	29,9
7	CH	118,14	118,3	22	CH ₂	34,82	34,8
8	C	170,03	170,4	23	CH ₃	10,25	10,3
9	C	42,95	43,0	25	CH ₃	38,28	38,3
10	C	164,76	165,1	26	CH ₃	21,64	21,7
11	CH ₂	33,59	33,6	27	CH ₃	18,34	18,4
12	CH ₂	29,68	29,7	28	CH ₃	31,61	31,7
13	C	39,44	39,5	29	C	178,36	179,1
14	C	45,06	45,1	30	CH ₂	32,69	32,7
15	CH ₂	28,67	28,7	31	CH ₃	51,55	51,7

*CD₂Cl₂ /75 MHz

4.1.6 SC06: dispermoquinona



O composto **SC06** foi isolado do **EHE2** como um sólido cristalino amarelo, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão de 240-242 °C.

Observou-se no espectro na região do IV (Figura A27, pág. 129) de **SC06** bandas de absorção em: 3436 cm^{-1} , relacionada ao estiramento da ligação OH; 2924-2858 cm^{-1} , relacionadas aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação CH.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A28, pág. 130) observaram-se dois simples em δ_{H} 6,36 e 6,40 referentes aos átomos de hidrogênio olefínicos H-6 e H-1 e outro simpleto em δ_{H} 6,93, que foi atribuído ao hidrogênio de grupo hidroxila. Foram observados sete simples em δ_{H} 0,80; 1,10; 1,19; 1,28; 1,29 e 2,11 e 3,64 relativos a sete grupos metila, sendo o último característico de átomos de hidrogênio de grupo metoxila.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A29 e A30, pág. 130 e 131) indicou 30 sinais de carbono, que foram classificados como C, CH_2 , CH e/ou CH_3 . Os sinais em δ_{C} 179,15; 181,18 e 200,44, característicos de carbonila, juntamente com os sinais em δ_{C} 117,20, 119,74, 131,76, 140,96, 146,62 e 162,00, característicos de carbono sp^2 , indicam se tratar de um esqueleto quinonametídeo.

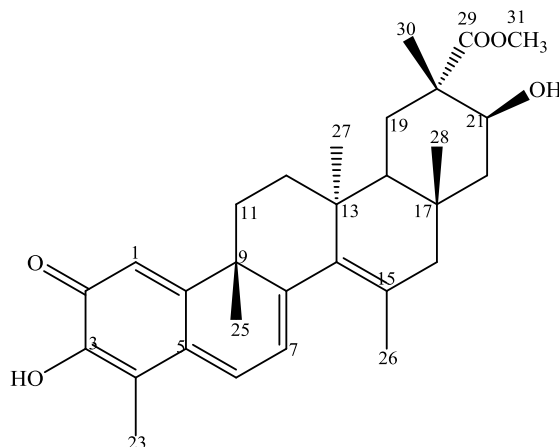
Os dados de RMN de ^{13}C obtidos foram comparados com os dados da literatura (DUARTE, 2000) e confirmaram **SC06** como sendo a dispermoquinona. Os dados estão listados na Tabela 6, pág. 52.

Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC06** e da literatura para dispermoquinona (DUARTE, 2000).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC06	δ_{C}^* (Duarte, 2000)	Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC06	δ_{C}^* (Duarte, 2000)
1	CH	119,74	119,73	16	CH ₂	35,91	35,90
2	C	181,18	181,17	17	C	30,22	30,20
3	C	146,62	146,61	18	CH	43,65	43,64
4	C	117,20	117,19	19	CH ₂	29,87	29,85
5	C	140,96	140,95	20	C	40,56	40,55
6	CH	131,76	131,74	21	CH ₂	30,49	30,47
7	C	200,44	200,41	22	CH ₂	36,10	36,09
8	CH	58,37	58,37	23	CH ₃	10,38	10,35
9	C	41,91	41,90	25	CH ₃	29,22	29,20
10	C	162,00	161,99	26	CH ₃	15,44	15,43
11	CH ₂	27,96	27,96	27	CH ₃	17,05	17,03
12	CH ₂	28,85	28,84	28	CH ₃	31,58	31,56
13	C	39,01	38,55	29	C	179,15	179,13
14	C	39,56	39,00	30	CH ₃	32,16	32,13
15	CH ₂	31,83	31,82	31	CH ₃	51,62	51,59

* $\text{CDCl}_3/100$ MHz

4.1.7 SC07: netzahualcoionol



SC07 apresentou-se como um cristal vermelho com faixa de fusão de 234-236° C.

No espectro na região do IV (Figura A31, pág. 131) de **SC07** observaram-se bandas de absorção em: 3448 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento da ligação do grupo OH; 2930-2870 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH; 1718 cm^{-1} e 1708 cm^{-1} , características de grupos carbonila; 1654 e 1586 cm^{-1} , relacionadas ao estiramentos de ligações C=C.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A32, pág. 132) foi analisado e foram observados sinais em δ_{H} 0,84; 1,22; 1,23; 1,26; 1,28; 1,72; 2,26 e 3,72, sendo o último sinal referente à metila do grupo metoxila. Foram observados dois dupletos em δ_{H} 6,15 (d, 1H, $J=6,8$ Hz) e em δ_{H} 7,16 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz) que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-7 e H-6. Os simpletos observados em δ_{H} 6,57 e 7,06 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-1 e da hidroxila ligada ao átomo de carbono C-3, respectivamente. Os sinais observados, juntamente com o simpleto em δ_{H} 2,26 (H-23), indicam que se trata de esqueleto quinonametídeo, sendo esses sinais característicos dessa classe. Entre δ_{H} 4,17-4,21 foi observado um multipletto, atribuído ao átomo de hidrogênio H-21, e um simpleto aparente em δ_{H} 2,71, atribuído ao átomo de hidrogênio da hidroxila do átomo de C-21.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A33 e A34 pág. 132 e 133) indicou 30 sinais referentes a 30 átomos de carbono, que foram classificados como sendo C, CH_2 , CH e/ou CH_3 . Os sinais observados em δ_{C} 178,12 e 178,92 foram atribuídos aos átomos de carbono carbonílico C-2 e C-29,

respectivamente. Os sinais observados em δ_C 146,28 (C-3) e 68,08 (C-21) são referentes a átomos de carbono não hidrogenado e carbinólico, respectivamente.

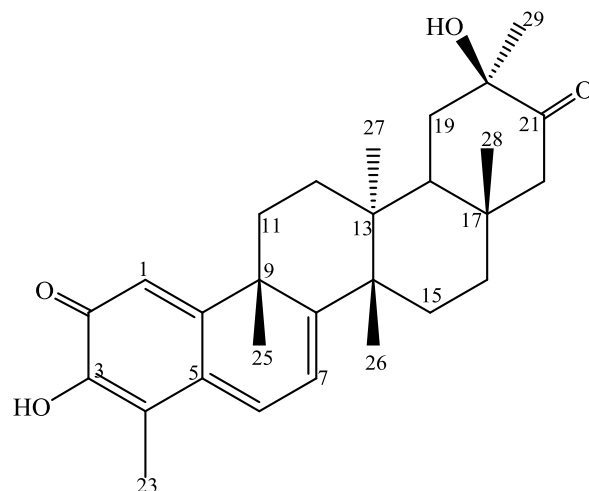
Os dados de RMN de ^{13}C obtidos para **SC07** foram comparados com dados da literatura (SETZER, W. N. *et al.*, 2001) e estão listados na Tabela 7. Foi possível então concluir que **SC07** se tratava do netzahualcoionol.

Tabela 7: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **SC07** com dados da literatura para o netzahualcoionol (SETZER, W. N. *et al.*, 2001).

Nº	Tipo de C	δ_C de SC07	δ_C^* (Setzer, <i>et al.</i> ; 2001)	Nº	Tipo de C	δ_C SC07	δ_C^* (Setzer, <i>et al.</i> ; 2001)
1	CH	120,01	120,0	16	CH ₂	39,10	39,0
2	C	178,12	178,1	17	C	35,26	35,2
3	C	146,28	146,2	18	CH	43,48	43,4
4	C	116,75	116,7	19	CH ₂	43,05	43,0
5	C	127,77	128,0	20	C	48,09	48,1
6	CH	134,65	134,6	21	CH	68,08	68,0
7	CH	121,68	121,6	22	CH ₂	34,38	34,4
8	C	159,11	159,1	23	CH ₃	10,41	10,4
9	C	44,45	44,4	25	CH ₃	29,35	29,3
10	C	159,98	159,9	26	CH ₃	21,93	21,9
11	CH ₂	37,40	37,4	27	CH ₃	24,31	24,3
12	CH ₂	35,78	35,4	28	CH ₃	31,24	31,2
13	C	42,65	42,6	29	C	178,92	178,9
14	C	135,42	135,4	30	CH ₃	13,76	13,7
15	C	128,08	128,0	31	CH ₃	52,19	52,2

*CDCl₃,100MHz

4.1.8 SC08: 20-hidroxi-20-epi-tingenona



SC08 foi obtido como um sólido vermelho cristalino com temperatura de fusão entre 194 - 196 °C.

No espectro na região do IV (Figura A35, pág. 133) de **SC08** observaram-se bandas de absorção em 3444 e 3492 cm^{-1} , características de estiramento de ligação OH. Observaram-se também bandas de absorção em: 1714 cm^{-1} característica de carbonila; e 1638 e 1590 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento de ligação C=C.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A36, pág. 134) de **SC08** observaram-se simples em δ_{H} 0,90; 1,13; 1,25; 1,37; 1,48 e 2,22, referentes a seis grupos metilas. Observaram-se dois dupletos em δ_{H} 7,03 (1H; d; $J=7,1$ Hz) e 6,38 (1H; d; $J=7,1$ Hz) e um simpleto em δ_{H} 6,54, esses sinais foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-6, H-7 e H-1, respectivamente. O simpleto observado em δ_{H} 6,97 foi atribuído ao átomo de hidrogênio da hidroxila ligada ao átomo de carbono C-3. Esses sinais são considerados característicos de compostos com estrutura de quinonametídeos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A37, pág.134) foram observados 28 sinais de átomos de carbono. Utilizando o espectro DEPT-135 (Figura A38, pág. 135) foi possível identificar os átomos de carbono como C, CH_2 , CH e/ou CH_3 . Observaram-se dois sinais de carbono carbonílico em δ_{C} 178,41 (C-2) e 215,08 (C-21). Os sinais observados em δ_{C} 73,71 e 146,09 foram atribuídos aos átomos de carbono C-20 e C-3, respectivamente.

Após análise dos espectros obtidos para o **SC08**, foi possível observar que os dados de RMN de **SC08** apresentavam muitas semelhanças aos de tingenona, um triterpeno da classe dos quinonametídeos comumente isolado das raízes de plantas da família Celastraceae. Foi então realizada uma pesquisa na literatura e, a partir da

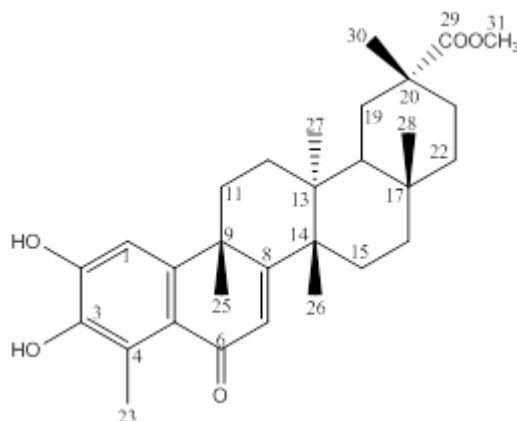
comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **SC08** com os dados da literatura para 20-hidroxi-20-epi-tingenona (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993), conclui-se que se tratava do mesmo composto. Os dados de RMN de ^{13}C de **SC08** e de 20-hidroxi-20-epi-tingenona estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de SC08 e dados da literatura para 20-hidroxi-20-epi-tingenona (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC08	δ_{C}^* (Likhitwitayawuid <i>et. al</i> ; 1993)	Nº	Tipo de C	δ_{C} SC08	δ_{C}^* (Likhitwitayawuid <i>et. al</i> ; 1993)
1	CH	119,68	119,8	15	CH ₂	29,27	29,4
2	C	178,41	178,4	16	CH ₂	35,62	35,7
3	C	146,09	146,2	17	C	36,02	35,9
4	C	117,18	117,1	18	CH	43,30	43,3
5	C	127,74	127,9	19	CH ₂	36,82	36,9
6	CH	133,60	133,3	20	C	73,71	73,7
7	CH	118,34	118,3	21	C	215,08	214,9
8	C	168,94	168,7	22	CH ₂	50,39	50,5
9	C	42,95	42,9	23	CH ₃	10,28	10,3
10	C	164,32	164,2	25	CH ₃	38,48	38,5
11	CH ₂	33,11	33,2	26	CH ₃	23,13	23,3
12	CH ₂	29,80	29,9	27	CH ₃	19,41	19,4
13	C	39,95	40,0	28	CH ₃	33,14	33,2
14	C	44,15	44,2	29	C	28,99	29,0

* CDCl_3 , 125 MHz

4.1.9 SC09: 6-oxo-pristimerol



SC09 foi isolado do extrato hexânico/éter etílico (1:1), obtido como um sólido marrom com temperatura de fusão entre 159-162 °C.

No espectro na região do IV (Figura A39, pág. 135) de **SC09** foram observadas bandas de absorção em: 3426 cm^{-1} , relacionada ao estiramento da ligação OH; 2946-2872 cm^{-1} , relacionadas aos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações CH; 1728 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , características de estiramento de carbonila e 1586 cm^{-1} , relacionada ao estiramento de ligação C=C.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A40, pág. 136) observaram-se sete simpletos em δ_{H} 0,57; 1,08; 1,16; 1,26; 1,50; 2,74 e 3,52 referentes aos grupos metila. O sinal observado em δ_{H} 2,74 é característico de grupo metila ligado a carbono sp^2 . Os simpletos observados em δ_{H} 6,24 e 6,89 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-1 e H-7, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A41 e A42, pág. 136 e 137) permitiu observar 30 átomos de carbono, que foram classificados como sendo C, CH_2 , CH e/ou CH_3 . Observaram-se dois sinais de carbono carbonílico em δ_{C} 178,94 e 187,66, referentes aos átomos de carbono C-29 e C-6, respectivamente. Os sinais observados em δ_{C} 125,97 e 142,25 foram atribuídos aos átomos de carbono C-3 e C-2, respectivamente.

Após análise dos espectros obtidos para o **SC09** foi possível observar que o composto apresentava sinais característicos da pristimerina com algumas modificações nos anéis A e B. Foi então realizada uma pesquisa na literatura e, a partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **SC09** com os dados descritos para 6-oxo-pristimerol

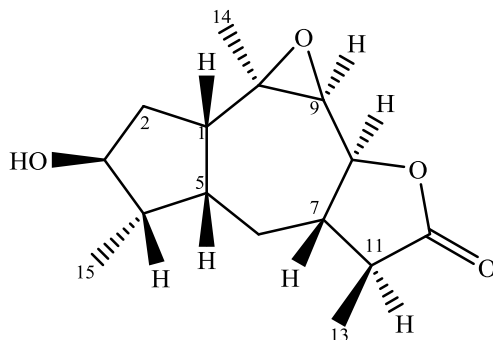
(SHIROTA *et al.*, 1994), conclui-se que se tratava do mesmo composto. Os dados de RMN de ^{13}C de **SC09** e de 6-oxo-pristimerol estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz) de **SC09** e dados da literatura para o 6-oxo-pristimerol (SHIROTA *et al.*, 1994).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC09	δ_{C}^* (Shirota <i>et al.</i> ; 1994)	Nº	Tipo de C	δ_{C} SC09	δ_{C}^* (Shirota <i>et al.</i> ; 1994)
1	CH	108,33	110,0	16	CH ₂	36,42	36,6
2	C	142,25	144,0	17	C	30,51	30,6
3	C	125,97	126,8	18	CH	44,28	44,4
4	C	122,21	122,7	19	CH ₂	30,95	31,1
5	C	150,67	151,4	20	C	39,93	40,1
6	C	187,66	187,3	21	CH ₂	29,79	30,1
7	CH	126,32	126,8	22	CH ₂	34,86	35,1
8	C	149,63	150,7	23	CH ₃	14,08	14,8
9	C	40,46	40,6	25	CH ₃	37,66	37,8
10	C	170,61	170,7	26	CH ₃	20,78	20,9
11	CH ₂	34,16	34,6	27	CH ₃	18,29	18,5
12	CH ₂	29,96	30,2	28	CH ₃	31,59	31,6
13	C	39,00	39,3	29	C	178,94	178,7
14	C	44,53	44,6	30	CH ₃	32,82	32,6
15	CH ₂	28,53	28,9	31	CH ₃	51,49	51,5

* $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz

4.1.10 SC10: 9 β ,10 β -epoxi-3 β -hidroxi-1 β H,4 β H,5 β H,7 β H,11 α H-guaian-12,8 β -olídeo



O composto foi obtido a partir do fracionamento do extrato clorofórmico, como um sólido ceroso solúvel em clorofórmio.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A43, pág. 137) observaram-se dois dupletos em δ_{H} 1,23 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), e em δ_{H} 1,06 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), e um simpleto em δ_{H} 1,41 indicando a presença de três grupos metila. Observaram-se também um dupletos em δ_{H} 4,22 (d, $J 10,3$ Hz, 1H) e um dupletos triplo em δ_{H} 3,92 (dt, $J = 7,9$ e 3,1 Hz, 1H), referente a átomos de hidrogênio desprotegidos. Em δ_{H} 2,80 foi observado um duplo dupletos duplo (ddd, $J = 12,8$; 9,0 e 4,8 Hz) referente a um átomo de hidrogênio.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura A44, pág. 138) e espectro DEPT-135 (Figura A45, pág. 138) permitiu classificar os átomos de carbono como, sendo dois CH_2 , oito CH , dois C e três CH_3 , totalizando 15 sinais, sugerindo tratar-se de um sesquiterpeno. Dentre os sinais de átomos de carbono, um se refere a átomo de carbono carbonílico, em δ_{C} 177,94, e dois a átomos de carbono carbinólico, em δ_{C} 77,26 e 82,27.

Uma primeira análise dos mapas de contornos, COSY, HSQC e HMBC permitiu propor as sequências $\text{CH}_3\text{-CH-CH-CH-CH}$ e $\text{CH-CH}_2\text{-CH-CH-CH}_2\text{-CH}$ para o composto isolado, características de sesquiterpeno da classe de guaianolídeos (WU et al., 2014), o que foi sustentado após análises detalhadas.

Os dados espectrais de **SC10** são similares aos observados para o 9 β ,10 β -epoxi-4 α -hidroxi-1 β H,11 α H-guaian-12,8 α -olídeo, Figura 18, pág. 60 (WU, HAI BO *et al.*, 2014). Tendo como base o esqueleto básico do guaianolídeo procedeu-se, então, a análise detalhada dos espectros de RMN 1D (^1H , ^{13}C e DEPT-135) e 2D (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) de **SC10** a fim de elucidar a estrutura do composto.

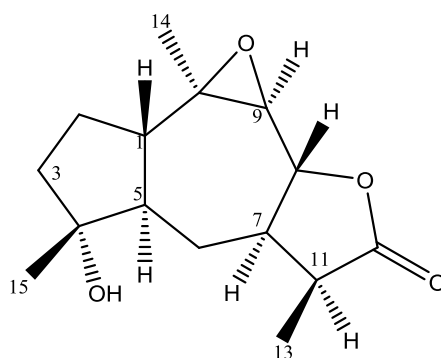


Figura 18: Estrutura química do 9 β ,10 β -epoxi-4 α -hidroxi-1 β H,11 α H-guaian-12,8 α -olídeo (isolado por WU, HAI BO *et al.*, 2014).

Partindo do sinal do carbono carbonílico da lactona, em δ_C 177,94, procedeu-se a análise dos mapas de contornos HMBC (A47, pág. 140) e HSQC (A46, pág. 139 e 140).

O sinal observado em δ_C 177,94 (C-12) correlaciona-se com o sinal do hidrogênio H-11 em δ_H 2,24 e com o sinal em δ_H 1,23 (H-13) (Figura A47, pág. 140). Neste mapa de contornos, observou-se também correlação do sinal dos átomos de hidrogênio H-13 com os sinais de átomos de carbono em δ_C 43,75 (C-7) e δ_C 42,05 (C-11).

No mapa de contornos HMBC (Figura A47, pág. 140), o sinal em δ_C 43,75 (C-7) correlaciona-se com sinais de átomos de hidrogênio em δ_H 4,22 (H-8) e 3,33 (H-9). Observou-se, no mapa de contornos HMBC, correlações entre o sinal do átomo de hidrogênio em δ_H 2,02 (H-7) e os sinais em δ_C 82,27 (C-8), 61,39 (C-9) e 12,53 (C-13). O sinal em δ_H 3,33 (H-9) correlaciona-se com os sinais em δ_C 25,25 (C-14) e 60,86 (C-10) (Figura A47, pág. 140). Observou-se, em seguida, correlações entre o sinal de C-10 e os sinais em δ_H 1,89 e 2,80, que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-2 e H-1, respectivamente (Figura A46, pág. 139).

Na Figura A47, pág. 140, observou-se que o sinal em δ_H 2,80 (H-1) correlaciona-se com sinais em δ_C 44,74 (C-5), 37,39 (C-2) e com 25,63 (C-6). O sinal em δ_C 44,74 (C-5) se correlaciona com o sinal dos átomos de hidrogênio H-15 em δ_H 1,06 e com o sinal em δ_H 1,92 (H-4). Observou-se correlação do sinal do átomo de hidrogênio H-15 com os sinais em δ_C 48,11 (C-4) e 77,26 (C-3).

Todas as correlações observadas nos mapas de contornos HSQC (Figura A46, pág. 139) e HMBC (Figura A47, pág. 140) estão indicadas nas Figuras e na Tabela 11, página 64.

No mapa de contornos COSY (Figura A48, pág. 141) observaram-se correlações entre o sinal em δ_H 2,24 (H-11) e os sinais em δ_H 1,23 (H-13) e com sinal em δ_H 2,02 (H-7). O sinal de hidrogênio H-7 correlaciona-se com os sinais em δ_H 1,67 (H-6) e δ_H 4,22 (H-8). Foram observadas correlações de átomos de hidrogênio H-6 em δ_H 0,70 com o sinal em δ_H 2,02 (H-7) e com o sinal em δ_H 2,06 (H-5). O átomo de hidrogênio H-4 em δ_H 1,92 correlaciona-se com o átomo de hidrogênio H-15 (δ_H 1,06). O sinal em δ_H 1,89 (H-2) correlaciona-se com o sinal em δ_H 3,92 (H-3). Observou-se correlação do átomo de hidrogênio H-1 (δ_H 2,80) com sinal em δ_H 1,89 (H-2) e com sinal em δ_H 2,06 (H-5). Estas correlações permitiram confirmar as atribuições realizadas a partir dos mapas de contornos HSQC e HMBC.

No mapa de contornos NOESY (Figura A49 e A50, pág. 142 e 143) observou-se que o H-13 (δ_H 1,23) correlaciona-se com átomos de hidrogênio em δ_H 2,02 (H-7) e 1,67 (H-6). O sinal em δ_H 1,67 (H-6) correlaciona-se com o sinal em δ_H 1,06 (H-15). O hidrogênio H-15, por sua vez, correlaciona-se com os sinais em δ_H 3,92 (H-3) e 1,92 (H-4). Foi observada correlação do sinal em δ_H 2,24 (H-11) com o sinal em δ_H 4,22 (H-8). O sinal em δ_H 4,22 (H-8) correlaciona-se com sinais em δ_H 1,41 (H-14), 3,33 (H-9) e 0,70 (H-6 α), logo estão do mesmo lado. Observou-se também correlação do hidrogênio H-9 com o sinal em δ_H 1,41 (H-14). Em seguida observou-se que o sinal em δ_H 1,41 (H-14) correlaciona-se com o sinal em δ_H 2,80 (H-1). Por fim, observou-se que o sinal do hidrogênio H-1 correlaciona-se com o sinal em δ_H 2,06 (H-5), indicando estarem do mesmo lado.

Todas as correlações observadas nos mapas de contornos COSY e NOESY estão indicadas nas Figuras A48 (pág. 141), A49 e A50 (pág. 142 e 143) e na Tabela 11 (pág. 64).

No espectro de RMN de ^1H (Figura A43, pág. 137) o sinal em δ_H 3,33 foi atribuído ao H-9 (δ_H 3,33) e foi observado como um simpleto bem definido, embora se esperasse observar um duplete uma vez que o H-9 é vizinho ao H-8. Para conferir essa atribuição realizou-se o experimento de NOE diferencial. No espectro de NOE diferencial observou-se que, ao irradiar o sinal em δ_H 3,33 (H-9) (Figura A51, pág. 143) houve NOE positivo com os sinais em δ_H 4,22 (H-8) e δ_H 1,41 (H-14) confirmando a atribuição do H-9 e também a posição relativa dos respectivos átomos de hidrogênio. Ao se irradiar o sinal em δ_H 4,22 (H-8) observou-se NOE com sinais em δ_H 0,70 (H-6 α), δ_H 2,24 (H-11) e δ_H 3,33 (H-9) como pode ser observado na Figura A52 (pág. 144).

Quando o sinal em δ_H 1,41 (H-14) (Figura A53, pág.144) foi irradiado, os sinais em δ_H 1,89 (H2 α), δ_H 2,80 (H-1) e δ_H 3,33 (H-9) apresentaram NOE positivo.

Apesar de **SC10** ter sido obtido como um sólido ceroso foi possível obter um monocristal, após dissolução em etanol e evaporação lenta do solvente. O cristal obtido foi então submetido a análise de difração de raios-X, sendo confirmada de forma inequívoca sua estrutura química.

O composto cristalizou no grupo de espaço ortorrombico não simétrico P2₁2₁2₁, o que indicou que os cristais obtidos eram enantiomericamente puros. A Figura 19; pág. 63 mostra o ortep de **SC10** indicando que trata-se de uma molécula com quatro anéis condensados. O anel central é uma unidade de sete membros (C1 e C5-C10), com todos os átomos de carbono na hibridação sp³, contendo um átomo de oxigênio (O2), formando um anel de três membros com dois átomos de carbono adjacentes (C9 e C10) do anel central. Os outros dois anéis de cinco membros encontram-se ligados na extremidade do anel central. Um desses anéis é uma lactona (C7, C8, C11, C12 e O3) e o outro é um ciclopentano (C1-C5), ambos na conformação de envelope. No anel do ciclopentano está o grupo hidroxila (O2) em C3, que interage com outros grupos hidroxila de outras moléculas mais próximas, levando a uma cadeia supramolecular formada por ligações de hidrogênio (ver Figura 19, pág. 63). Os principais dados cristalográficos estão listados na Tabela 10, pág. 63.

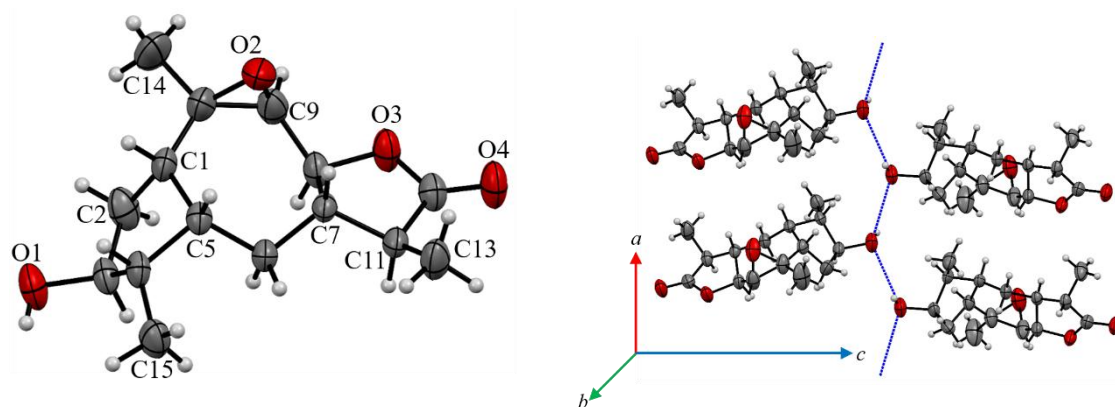


Figura 19: (a) Estrutura cristalina de **SC10** com marcação atômica. Círculos brancos são átomos de hidrogênio. (b) A linha pontilhada azul representa a rede de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila que lideram a formação de uma cadeia supramolecular em sua embalagem cristalina.

Tabela 10: Principais dados cristalográficos de **SC10**

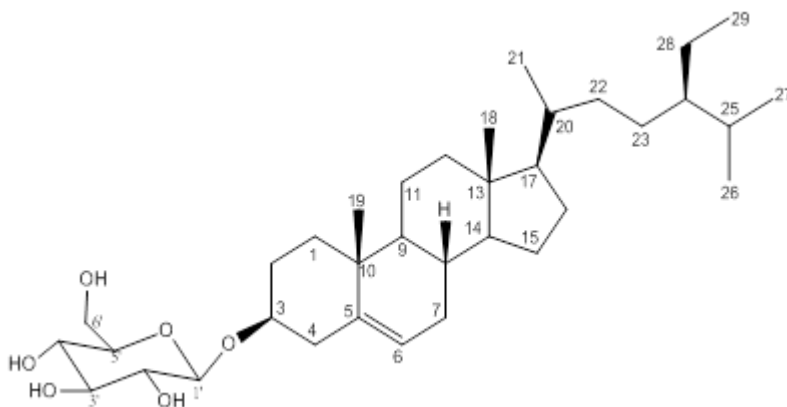
Composto	SC10
Fórmula Química	$C_{15}H_{22}O_4$
Massa molar / $g\ mol^{-1}$	266,32
λ / Å tubo de molibdênio	0,71073
Sistema Cristalino	Ortorrômico
Grupo de Espaço	$P2_12_12_1$
a / Å	5,6629(2)
b / Å	8,4104(3)
c / Å	29,4251(9)
V / Å^3	1401,44(8)
Z	4
T / K	298

Após análise dos espectros de RMN de 1D (1H , ^{13}C , DEPT-135) e 2D (mapa de contornos de HSQC, HMBC, COSY e NOESY) e difração de raios-X foi possível identificar o composto **SC10** como $9\beta,10\beta$ -epoxi- 3β -hidroxi- $1\beta H,4\beta H,5\beta H,7\beta H,11\alpha H$ -guaian- $12,8\beta$ -olídeo, composto inédito, ainda não descrito na literatura.

Tabela 11: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz, CDCl_3) de **SC10**.

Nº	δ_C SC10	Tipo de C	δ_H SC10	HMBC	COSY	NOESY
1	47,00	CH	2,80 (ddd, $J=12,8; 9,0; 4,8$)	2,5,6,10	2,5	5, 14
2	37,39	CH ₂	1,89	1,10	1,3	1,3,14
3	77,26	CH	3,92 (td, $J=7,9; 7,9; 3,1$)	1,15		2,6 α ,15
4	48,11	CH	1,92	3,5,6,15	15	
5	44,74	CH	2,06	3	6	1
6	25,63	CH ₂	0,70 α ; 1,67 β	1,5,7,8,11		2,11 8,13,15
7	43,75	CH	2,02	8,9,13	6, 8,11	
8	82,27	CH	4,22 (d, $J= 10,3$)	6,7, 9		6 α ,9,11,14
9	61,39	CH	3,33	1,10,14		8
10	60,86	C				
11	42,05	CH	2,24	6,7,12,13		8
12	177,94	C				
13	12,52	CH ₃	1,23 (d, $J= 6,9$)	7,11,12	11	6 β ; 7
14	25,24	CH ₃	1,41 (s)	1,9		1,8,9
15	13,72	CH ₃	1,06 (d, $J= 7,0$)	3,4,5		3,6 β

4.1.11 SC11: 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol



SC11 foi isolado do **EAC** como um sólido branco solúvel em clorofórmio.

No espectro na região do IV (Figura A54, pág.145) foram observadas bandas de absorção em: 3424 cm^{-1} (característica de estiramento da ligação OH de hidroxila), $2932\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$ (características de estiramento simétrico e assimétrico das ligações CH de compostos alifáticos) e 1466 e 1380 cm^{-1} (características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos).

No espectro de RMN de ^1H (Figura A55, pág. 145) observou-se um multipletto entre $\delta_{\text{H}} 5,31\text{-}5,32$ que foi atribuído ao átomo de hidrogênio olefínico H-6 em esteroides. Foi observado também um multipletto entre $\delta_{\text{H}} 3,80 - 4,05$ que corresponde ao H-3, um dupletto em $\delta_{\text{H}} 4,52$ (d, J 7,6 Hz, 1H), referente ao hidrogênio anomérico H-1' da molécula de glicose.

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A56 e A57, pág. 146) os tipos de átomos de carbono (C, CH_2 , CH e/ou CH_3) foram definidos. No espectro de RMN de ^{13}C foram observados os sinais em: $\delta_{\text{C}} 101,67$ (característico de carbono anomérico), $62,82$, $71,28$; $73,92$; $76,12$ e $78,87$, indicando a presença de uma molécula de glicose. Os demais sinais foram similares aos encontrados para **SC04**, indicando que a aglicona seria o β -sitosterol.

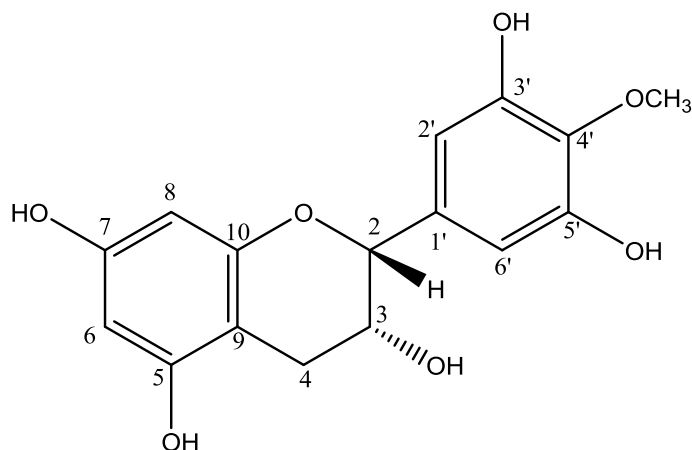
Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (RAI *et al.*, 2006) (Tabela 12, pág. 66) e permitiram identificar **SC11** como sendo 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol.

Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C de **SC11** ($\text{CDCl}_3 + \text{Py-}d_5$) e dados da literatura para 3-*O*- β -D-glicosil- β -sitosterol (RAI *et al.*, 2006).

Nº	Tipo de C	δ_c de SC11	δ_c^* (Rai <i>et al.</i> , 2006)	Nº	Tipo de C	δ_c de SC11	δ_c^* (Rai <i>et al.</i> , 2006)
1	CH ₂	37,29	37,22	21	CH ₃	18,82	18,76
2	CH ₂	29,78	31,63	22	CH ₂	34,00	33,91
3	CH	71,86	71,80	23	CH ₂	26,17	26,02
4	CH ₂	42,38	42,19	24	CH	45,89	45,81
5	C	140,49	140,72	25	CH	29,71	29,11
6	CH	121,92	121,71	26	CH ₃	19,83	19,80
7	CH ₂	31,91	31,87	27	CH ₃	19,08	19,01
8	CH	31,96	31,87	28	CH ₂	23,15	23,04
9	CH	50,19	50,10	29	CH ₃	12,01	11,97
10	C	36,73	36,48	27	CH ₃	19,08	19,01
11	CH ₂	21,07	21,07	28	CH ₂	23,13	23,04
12	CH ₂	39,80	39,74	29	CH ₃	12,01	11,97
13	C	42,35	42,26	1'	CH	101,67	102,54
14	CH	56,77	56,73	2'	CH	73,92	75,29
15	CH ₂	24,31	24,29	3'	CH	78,87	78,45
16	CH ₂	28,27	28,22	4'	CH	71,28	71,64
17	CH	56,09	56,02	5'	CH	76,12	78,05
18	CH ₃	11,87	11,84	6'	CH ₂	62,82	62,80
19	CH ₃	19,33	19,39				
20	CH	36,15	36,12				

*Py-*d*₅

4.1.12 SC12: 4'-O-metilepigalocatequina



O composto **SC12** foi obtido a partir do fracionamento do **EAC** apresentando-se como sólido amarelo claro de ponto de fusão entre 139 – 144 °C, solúvel em MeOH.

No espectro na região do IV (Figura A58, pág. 147) de **SC12** foram observadas: banda larga de absorção em 3370 cm^{-1} correspondente a estiramento da ligação OH, bandas em 1628, 1516 e 1466 cm^{-1} características de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos e banda em 1146 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C-O.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A59, pág. 147) observaram-se três sinais característicos de hidrogênios aromáticos em: δ_{H} 5,94 (d, $J=2,2$ Hz, 1H), 5,95 (d, $J=2,2$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,54 (s, 2H). O perfil do espectro indicou tratar-se de um flavonoide. O simpleto observado em δ_{H} 6,54 indicou tratar-se de um flavonoide substituído nas posições 1', 3', 4' e 5' (REGASINI *et al.*, 2008). Os sinais observados em δ_{H} 2,73 (dd, $J=16,9$ e 3,0 Hz, 1H) e 2,86 (dd, $J=16,9$ e 4,6 Hz, 1H) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio diastereostópicos H-4a e H-4b, respectivamente, reforçando assim que a estrutura se tratava de um flavonoide da classe das catequinas. A presença de um simpleto em δ_{H} 3,79, integrado para três átomos de hidrogênio, evidenciou a existência de um grupo metoxila.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do espectro DEPT-135 (Figuras A60 e A61, pág. 148) permitiu identificar 15 átomos de carbono, sendo oito não hidrogenados, um metilênico e seis metínicos, sendo o sinal em δ 67,40 atribuído ao átomo de carbono ligado a hidroxila (C-3).

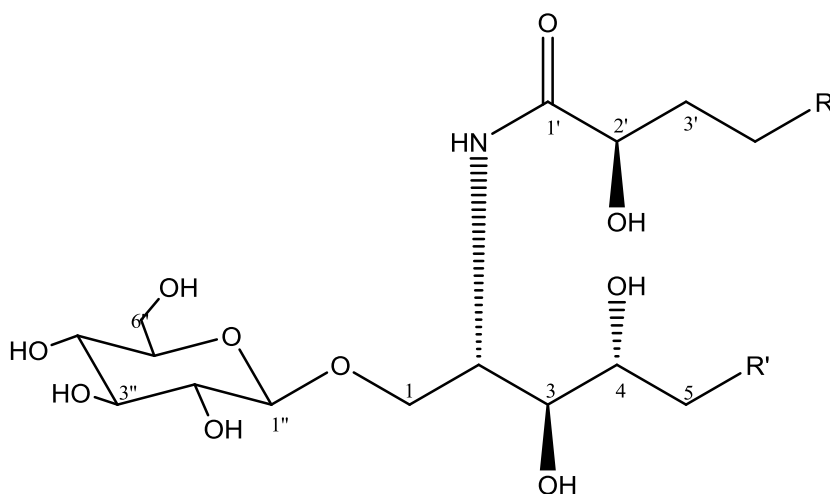
A comparação dos dados de RMN de ^{13}C com a literatura (HUSSEIN *et al.*, 1999) (Tabela 13), permitiu identificar **SC12** como sendo 4'-*O*-metilepigalocatequina.

Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **SC12** e da literatura para 4'-*O*-metilepigalocatequina (HUSSEIN *et al.*, 1999).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC12	δ_{C}^* (Hussein <i>et al.</i> , 1999)
2	CH	79,67	79,6
3	CH	67,40	67,3
4	CH_2	29,17	29,1
5	C	100,14	100,0
6	CH	157,16	157,9
7	C	96,52	96,3
8	CH	157,96	157,5
9	C	95,96	95,8
10	C	157,65	157,1
1'	C	136,59	135,9
2'	CH	107,24	107,1
3'	C	151,35	151,3
4'	C	136,12	136,5
5'	C	151,35	151,3
6'	CH	107,24	107,1
OCH_3	CH_3	60,83	60,76

* CD_3OD /125 MHz

4.1.13 SC13: cerebrosídeo



SC13 foi isolado a partir do fracionamento do extrato acetônico (EAC) como um sólido marrom com ponto de fusão de 169-172 °C.

No espectro na região do IV (Figura A62, pág. 149) foram observadas bandas de absorção em: 3422 cm^{-1} (característica de estiramento da ligação OH de hidroxila), $2924\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ (características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 em compostos alifáticos) e 1462 cm^{-1} referente à deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A63, pág. 149) observou-se sinal integrado para um grande número de hidrogênio em δ_{H} 1,29, característico de átomos de hidrogênio de carbonos metilênicos de cadeia longa. Observou-se um duplete em δ_{H} 4,28 (1H; d, $J= 7,8\text{ Hz}$) que foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1 da molécula de glicose.

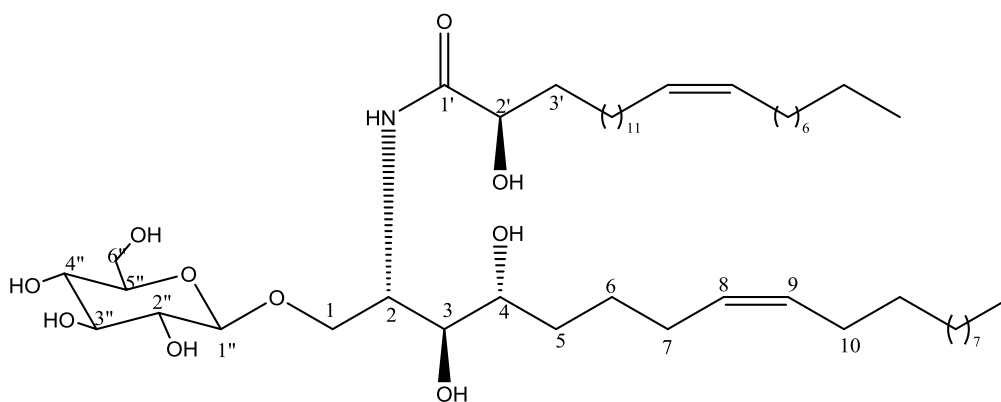
A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura A64, pág. 150) e espectro DEPT-135 (Figura A65, pág. 150) os tipos de átomos de carbono (C, CH_2 , CH e/ou CH_3) foram definidos. No espectro de RMN de ^{13}C foram observados sinais em δ_{C} 104,74 (característico de carbono anomérico), δ_{C} 62,71 (CH_2), 71,62 (CH); 75,06 (CH); 77,94 (CH); 78,06 (CH) todos hidroxilados, indicando a presença de uma molécula de glicose. Um sinal bem desblindado foi observado em δ_{C} 177,17, que foi atribuído a um átomo de carbono carbonílico. Foram observados sinais em δ_{C} 130,80-131,59 característicos de carbonos insaturados, no entanto, não foi possível definir a localização das duplas ligações no composto isolado.

Os dados de RMN de 1D de **SC13** foram comparados com os dados descritos na literatura (CATENI *et al.*, 2014) para compostos da classe dos cerebrosídeos, e conclui-se que se tratava de um composto desta classe. Cerebrosídeos são derivados de ácidos graxos da esfingosina com um único resíduo de açúcar. Os tamanhos das cadeias (R e R') do composto não foram determinadas. Os dados estão listados na Tabela 14.

Tabela 14: Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD) de **SC13** e dados da literatura para (CATENI *et al.*, 2014).

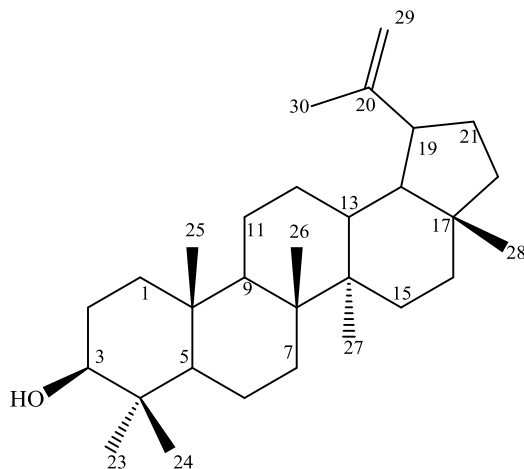
Nº	Tipo de C	δ_c^* (Cateni <i>et al.</i> , 2014)	δ_c de SC13
1	CH ₂	70,6	69,97
2	CH	51,5	51,70
3	CH	76,1	75,67
4	CH	72,6	73,03
1`	C	175,8	177,17
2`	CH	72,6	72,96
3`	CH ₂	35,7	35,78
1''	CH	105,3	104,74
2''	CH	75,2	75,06
3''	CH	78,3	77,94
4''	CH	71,3	71,62
5''	CH	78,6	78,06
6''	CH ₂	62,2	62,71
-CH ₃	-CH ₃	14,6	14,48

*Py- d_5 , 125 MHz



Cerebrosídeo isolado por Cateni e colaboradores (2014).

4.1.14 SC14: lupeol



O composto **SC14** foi isolado do extrato hexânico dos galhos como um sólido branco solúvel em clorofórmio com ponto de fusão de 173 – 175 °C.

No espectro na região do IV (Figura A66, pág. 151) de **SC14** observaram-se bandas de absorção em: 3362 cm⁻¹, característica de estiramento de OH de álcool, 2944 a 2870 cm⁻¹, estiramento de CH de alifáticos e 1640 cm⁻¹, característica de estiramento de ligação C=C.

No espectro de RMN de ¹H (Figura A67, pág. 151) observaram-se sete simpletos em δ_H 0,76; 0,79; 0,83; 0,94; 0,97; 1,03 e 1,68, correspondentes a sete grupos metila. Foram observados também dois simpletos largos em δ_H 4,57 (H-29) e 4,68 (H-29) característicos de átomos de hidrogênio de ligação dupla terminal, sendo esses sinais indicativos de esqueleto lupano. Observou-se também um duplete duplo em δ_H 3,19 (1 H, dd; J= 11,1 e 5,0 Hz) atribuído ao hidrogênio H-3.

A análise do espectro de RMN de ¹³C (Figura A68, pág. 152) e do espectro de DEPT-135 (Figura A69, pág. 152) permitiu identificar 30 sinais e definir os tipos de carbono como C, CH₂, CH₃ e/ou CH. Foram observados sinais em δ_C 109,47 e δ_C 151,11 sendo esses sinais característicos de ligação dupla de triterpenos com esqueleto lupano, os quais foram então atribuídos aos átomos de carbono 29 e 20, respectivamente. Foi observado também um sinal em δ_C 79,16 (C3) relacionado ao carbono hidroxilado.

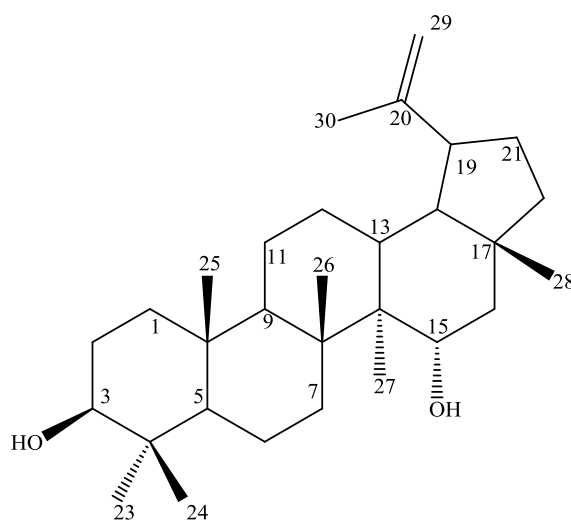
A partir da comparação dos dados obtidos pelo espectro de RMN de ¹³C para o **SC14** com os da literatura para o lupeol (BESERRA *et al.*, 2018) concluiu-se que **SC14** tratava-se desse composto. Os dados de RMN de ¹³C de **SC14** e do lupeol estão apresentados na Tabela 15, pág. 72.

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC14** e dados da literatura para o lupeol (BESERRA *et al.*, 2018).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC14	δ_{C}^* (Beserra <i>et al.</i> , 2018)	Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC14	δ_{C}^* (Beserra <i>et al.</i> , 2018)
1	CH ₂	38,86	38,9	16	CH ₂	35,74	35,8
2	CH ₂	27,60	27,6	17	C	43,15	43,2
3	CH	79,16	79,2	18	CH	48,46	48,5
4	C	39,01	39,0	19	CH	48,14	48,0
5	CH	55,46	55,5	20	C	151,11	151,2
6	CH ₂	18,47	18,5	21	CH ₂	30,00	30,0
7	CH ₂	34,44	34,4	22	CH ₂	40,16	40,2
8	C	40,99	41,0	23	CH ₃	28,14	28,2
9	CH	50,60	50,6	24	CH ₃	15,52	15,6
10	C	37,33	37,3	25	CH ₃	16,13	16,2
11	CH ₂	21,09	21,1	26	CH ₃	16,27	16,3
12	CH ₂	25,30	25,3	27	CH ₃	14,70	14,7
13	CH	38,21	38,2	28	CH ₃	18,15	18,1
14	C	42,99	43,0	29	CH ₂	109,47	109,5
15	CH ₂	27,60	27,7	30	CH ₃	19,46	19,5

* CDCl_3 ,100MHz

4.1.15 SC15: lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol



SC15 foi obtido como um sólido branco cristalino, solúvel em clorofórmio com faixa de fusão de 145 – 148 °C.

No espectro na região do IV (Figura A70, pág. 153) foram observadas bandas de absorção em: 3430 e 1038 cm^{-1} , características de estiramento de OH de álcool, 2946 e 2870 cm^{-1} , bandas de estiramento de CH de alifáticos e, 1642 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C=C.

Foram observados seis sinais no espectro de RMN de ^1H (Figura A71, pág. 153) referentes a sete grupos metilas em δ_{H} 0,76; 0,83; 0,84; 0,96; 1,12 e 1,68. Foram observados também dois simpletos largos em δ_{H} 4,59 (H-29) e 4,69 (H-29), característicos de triterpeno da classe dos lupanos, e dois dupletos duplos em δ_{H} 3,19 (1 H, dd; $J= 11,3$ e 5,0 Hz) e δ_{H} 4,16 (1 H, dd; $J= 10,9$ e 5,1 Hz) atribuídos aos átomos de hidrogênio H-3 e H-15, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A72, pág. 154) observaram-se 30 sinais. A análise em conjunto do espectro de RMN de ^{13}C e do espectro DEPT-135 (Figura A73, pág. 154) permitiu identificar os tipos de carbono como sendo C, CH_2 , CH e/ou CH_3 . Foram observados sinais em δ_{C} 109,78 e δ_{C} 150,50 e, sendo esses sinais característicos de ligação dupla de triterpenos com esqueleto lupano, foram então atribuídos aos átomos de carbono 29 e 20, respectivamente. Foram observados também dois sinais característicos de carbono carbinólicos em δ_{C} 69,83 e 79,07, referentes ao C-3 e C-15, respectivamente.

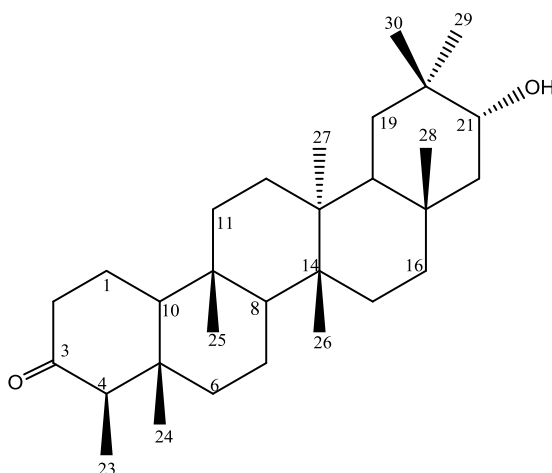
Após análise dos espectros na região do IV e de RMN de ^1H e ^{13}C de **SC15**, foi realizada a comparação dos dados descritos na literatura (TANAKA *et. al.*; 1993) permitindo confirmar a identificação do composto como lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol.

Tabela 16: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC15** e dados da literatura para o composto lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol (TANAKA *et. al.*; 1993).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC15	δ_{C} *(Tanaka <i>et. al.</i> , 1993)	Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC15	δ_{C} *(Tanaka <i>et. al.</i> , 1993)
1	CH ₂	39,07	38,9	16	CH ₂	46,59	46,5
2	CH ₂	27,56	27,4	17	C	43,09	43,0
3	CH	79,07	78,9	18	CH	48,11	48,1
4	C	38,92	38,8	19	CH	47,51	47,4
5	CH	55,06	54,9	20	C	150,50	150,4
6	CH ₂	18,66	18,5	21	CH ₂	30,23	30,1
7	CH ₂	37,77	37,8	22	CH ₂	39,85	39,7
8	C	42,62	42,5	23	CH ₃	28,09	27,9
9	CH	51,10	51,0	24	CH ₃	15,50	15,4
10	C	37,54	37,4	25	CH ₃	16,25	16,1
11	CH ₂	21,14	21,0	26	CH ₃	16,70	16,6
12	CH ₂	25,31	25,2	27	CH ₃	8,15	8,0
13	CH	37,54	37,6	28	CH ₃	19,22	19,2
14	C	48,11	47,9	29	CH ₂	109,8	109,7
15	CH	69,83	69,7	30	CH ₃	19,53	19,4

* CDCl_3 , 75 MHz

4.1.16 SC16: 21 α -hidroxifriedelan-3-ona



O composto **SC16** foi isolado a partir do fracionamento do extrato hexânico dos galhos e obtido como um sólido branco cristalino em forma de agulhas com faixa de fusão de 244-247 °C.

No espectro na região do IV (Figura A74, pág. 155) de **SC16** observou-se banda de absorção em 3520 cm⁻¹ característica de estiramento da ligação OH de hidroxila. A banda de absorção em 1704 cm⁻¹, é característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

Observou-se no espectro de RMN de ¹H (Figura A75, pág. 155) de **SC16** sete simpletos referentes a sete grupos metila em δ_H 0,72; 0,87; 0,91; 0,99, 1,07, 1,11 e 1,20. Em δ_H 0,88 (3H, $J= 4,7$ Hz) foi observado um duplete referente a uma metila e este sinal é característico de triterpeno da classe dos friedelanos e trata-se da metila 23 (MAHATO; KUNDU, 1994). Foi observado também um duplete duplo em δ_H 3,69 (1H, $J=12,1; 4,3$ Hz) associado ao átomo de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado.

A análise dos espectros de RMN de ¹³C (Figura A76, pág. 156) e DEPT-135 (Figura A77, pág. 156) de **SC16** permitiu identificar 30 átomos de carbono, sendo dois sinais mais desblindados, com deslocamento em δ_C 213,10 associado ao carbono carbonílico (C-3), e em δ_C 74,32, atribuído ao átomo de carbono hidroxilado (C-21).

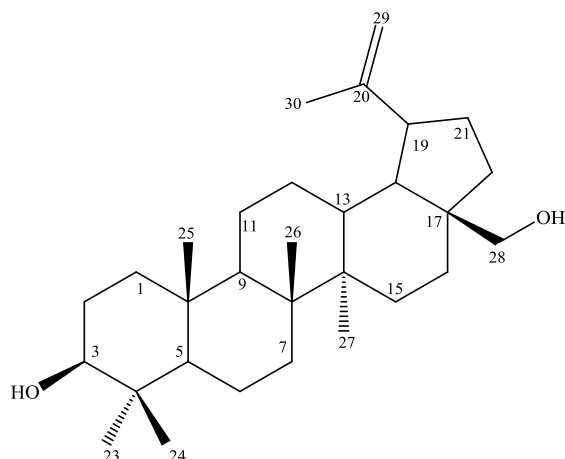
A partir da comparação dos dados de RMN obtidos para o composto **SC16** e dos dados descritos na literatura para o 21 α -hidroxifriedelan-3-ona foi possível confirmar que se trata-se desse composto (SETZER *et al.*, 2000). Os dados de RMN de ^{13}C de **SC16** e de 21 α -hidroxifriedelan-3-ona estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC16** e dados da literatura para o composto 21 α -hidroxifriedelan-3-ona (SETZER *et al.*, 2000).

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC16	δ_{C} *(Setzer <i>et. al</i> ;2000)	Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC16	δ_{C} *(Setzer <i>et. al</i> ;2000)
1	CH ₂	22,29	22,5	16	CH ₂	36,11	36,3
2	CH ₂	41,50	41,7	17	C	32,50	32,7
3	C	213,10	213,4	18	CH	44,33	44,5
4	CH	58,22	58,4	19	CH ₂	35,31	35,4
5	C	42,08	42,2	20	C	34,37	34,5
6	CH ₂	41,26	41,4	21	CH	74,32	74,5
7	CH ₂	18,22	18,4	22	CH ₂	47,05	47,1
8	CH	51,57	51,7	23	CH ₃	6,82	7,04
9	C	37,51	37,7	24	CH ₃	14,68	14,8
10	CH	59,52	59,6	25	CH ₃	18,22	18,4
11	CH ₂	36,00	36,1	26	CH ₃	17,77	17,9
12	CH ₂	30,20	30,4	27	CH ₃	19,29	19,5
13	C	39,05	39,2	28	CH ₃	33,15	33,3
14	C	38,83	39,0	29	CH ₃	24,93	25,1
15	CH ₂	30,47	30,6	30	CH ₃	31,88	32,1

* CDCl_3 , 75 MHz

4.1.17 SC17: betulina



O composto **SC17** foi obtido como um sólido branco com faixa de fusão de 201-202 °C.

No espectro na região do IV (Figura A78, pág. 157) de **SC17** observaram-se bandas de absorção em: 3406 cm^{-1} , característico de estiramento de OH de álcool; 2940 a 2870 cm^{-1} , bandas de estiramento de CH de alifáticos e 1642 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C=C.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A79, pág. 157) observaram-se seis simpletos em δ_{H} 0,76; 0,82; 0,96; 0,98; 1,02 e 1,68, correspondentes a seis grupos metila. Foram observados dois simpletos largos em δ_{H} 4,58 (H-29) e 4,68 (H-29) característicos de átomos de hidrogênio de ligação dupla terminal. Observou-se também um duplete duplo em δ_{H} 3,19 (1 H, dd; $J= 11,2$ e 5,0 Hz) atribuído ao hidrogênio H-3. Os sinais observados em δ_{H} 3,33 (1 H, d; $J= 10,5$ Hz) e 3,80 (1 H, d; $J= 10,5$ Hz) foram atribuídos a H-28.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A80, pág. 158) e espectro de DEPT-135 (Figura A81, pág. 158) foram analisados e observaram-se 30 sinais, classificados como sendo C, CH_2 , CH e/ou CH_3 . Os sinais observados em δ_{C} 150,62 (C) e δ_{C} 109,83 (CH_2) foram associados aos átomos de carbono C-20 e C-29, respectivamente, característicos de triterpenos da classe dos lupanos. Os sinais observados em δ_{C} 79,13 (CH) e 60,69 (CH_2) foram atribuídos a átomos de carbono hidroxilados, C-3 e C-28, respectivamente.

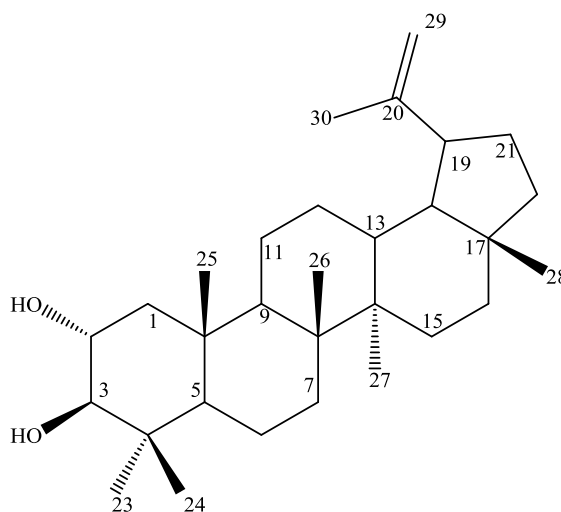
Os dados de RMN de ^{13}C obtidos para **SC17** foram comparados com dados descritos na literatura (YAMASHITA *et al.*, 2019). Os dados estão listados na Tabela 18, sendo possível concluir que o sólido isolado trata-se da betulina.

Tabela 18: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC17** e dados descritos na literatura (YAMASHITA *et al.*, 2019) para a betulina.

Nº	Tipo de C	δ_{C} de SC17	δ_{C}^* (Yamashita <i>et. al;</i> 2019)	Nº	Tipo de C	δ_{C} SC17	δ_{C}^* (Yamashita <i>et. al;</i> 2019)
1	CH ₂	38,85	38,7	16	CH ₂	29,32	29,1
2	CH ₂	27,53	27,4	17	C	47,93	47,8
3	CH	79,13	79,0	18	CH	48,91	48,7
4	C	39,01	38,9	19	CH	47,93	47,8
5	CH	55,44	55,3	20	C	150,62	150,5
6	CH ₂	18,45	18,3	21	CH ₂	29,90	29,7
7	CH ₂	34,38	34,2	22	CH ₂	34,12	34,0
8	C	41,07	40,9	23	CH ₃	28,13	28,0
9	CH	50,55	50,4	24	CH ₃	15,50	15,3
10	C	37,31	37,2	25	CH ₃	16,25	16,1
11	CH ₂	20,98	20,8	26	CH ₃	16,12	16,0
12	CH ₂	25,36	25,2	27	CH ₃	14,91	14,8
13	CH	37,46	37,3	28	CH ₂	60,69	60,6
14	C	42,86	42,7	29	CH ₂	109,83	109,7
15	CH ₂	27,19	27,0	30	CH ₃	16,12	16,1

* CDCl_3 , 150 MHz

4.1.18 SC18: lup-20(29)-eno-2 α ,3 β - diol



SC18 foi obtido como um sólido branco cristalino com temperatura de fusão entre 203-205 °C.

O espectro na região do IV (Figura A82, pág. 159) de **SC18** apresenta bandas de absorção: em 3360 cm⁻¹ característica de estiramento de OH de álcool, em 2946 a 2866 cm⁻¹, estiramento de ligação CH de alifáticos e em 1642 cm⁻¹, característica de estiramento de ligação C=C.

No espectro de RMN de ¹H (Figura A83, pág. 159) observaram-se sete sinais referentes a grupos metilas em δ_H 0,79; 0,80; 0,90; 0,94; 1,01; 1,03 e 1,68. Foram observados dois sinal largo em δ_H 4,57 e 4,69, correspondentes aos átomos de hidrogênio H-29, característicos de triterpenos da classe dos lupanos. Observou-se também um duplete duplo em δ_H 2,03 (1 H, dd; $J= 11,5$ e $3,7$ Hz) referente ao átomo de hidrogênio H-1b e um multiplete entre δ_H 0,82-0,87 referente ao átomo de hidrogênio H-1a. Em δ_H 2,97 (1 H, d; $J= 9,5$ Hz) observou-se um duplete e entre δ_H 3,65-3,69 um multiplete atribuídos aos átomos de H-3 e H-2, respectivamente.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura A84, pág. 160) e espectro de DEPT-135 de **SC18** (Figura A85, pág. 160) observaram-se sete sinais de carbono metílico, dez de carbono metilênico, sete de carbono metínico e seis de carbono não hidrogenados, totalizando trinta sinais. Os sinais observados em δ_C 84,07 e 69,43 foram atribuídos aos átomos de carbono hidroxilados, C-3 e C-2, respectivamente.

Os dados de RMN de ¹³C de **SC18** foram comparados com dados descritos na literatura para o composto lup-20(29)-eno-2 α ,3 β -diol (HISHAM *et al.*, 1996) e

observou-se que alguns valores estavam diferentes dos obtidos para o **SC18**, destacando principalmente os átomos de carbono C-1 e C-19. Diante disso realizou-se uma análise detalhada dos mapas de contornos HSQC, HMBC e COSY (Figuras A86 –A89, págs. 161-164) de **SC18**.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura A86; pág. 161) permitiu correlacionar o sinal de carbono em δ_C 46,90, atribuído ao átomo de carbono C-1, com os sinais de átomos de hidrogênio em δ_H 0,82-0,87 e 2,03. Permitiu também correlacionar o sinal de carbono em δ_C 69,42 com o sinal de hidrogênio entre δ_H 3,65-3,69, sendo esse sinal atribuído ao átomo de carbono C-2. Após análise detalhada das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Figuras A87 e A88, págs. 162 e 163), os demais sinais de carbono foram correlacionados aos seus respectivos átomos de hidrogênio com auxílio do mapa de contornos HSQC (A86, pág. 161).

No mapa de contornos HMBC (Figuras A87 e A88, págs. 162 e 163) observaram-se correlações do sinal entre δ_H 0,82-0,87 (H-1) e 2,03 (H-1) com os sinais em δ_C 17,52 (CH₃), 39,35 (C), 50,53 (CH), 55,56 (CH), 69,42 (CH) e 84,07 (CH). Estes foram atribuídos aos átomos de carbono C-25, C-10, C-9, C-5, C-2 e C-3, respectivamente, o que confirma a atribuição dada para o carbono C-1. Observaram-se correlações do sinal em δ_H 2,97 (H-3) com os sinais em δ_C 16,68, 28,62, 38,70, 46,90 e 69,42, atribuídos aos átomos de carbono C-24, C-23, C-4, C-1 e C-2, respectivamente, reforçando a atribuição feita para o átomo de carbono C-1.

Foram observadas correlações do sinal entre δ_H 2,35-2,40 (H-19) com sinais em δ_C 19,44 (CH₃), 29,99 (CH₂), 38,16 (CH), 48,43 (CH), 109,56 (CH₂) e 151,00 (C) que foram atribuídos aos respectivos sinais de carbono C-30, C-21, C-13, C-18, C-29 e C-20. Estas correlações confirmam a atribuição feita para o átomo de carbono C-19.

No mapa de contornos COSY (Figura A89, pág. 164) observou-se correlação do sinal em δ_H 2,35-2,40 (H-19) com o sinal em δ_H 1,35 (H-18). Observou-se também correlação do sinal em δ_H 2,03 (H-1) com sinal em δ_H 3,68 (H-2).

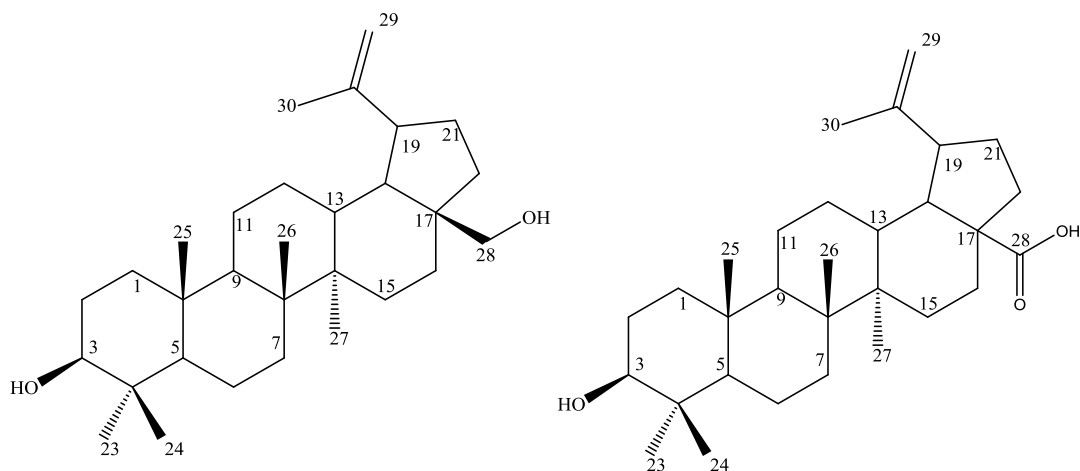
As análises dos mapas de contornos HSQC, HMBC e COSY, permitiram confirmar todos os deslocamentos químicos de H e C para **SC18** (Tabela 19, pág. 81), e concluir que as atribuições da literatura para C-1 e C-19 devem estar equivocadas.

Tabela 19: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **SC18** e comparação com dados da literatura para lup-20(29)-eno-2 α ,3 β -diol (HISHAM *et al.*, 1996).

Nº	Tipo de C	δ_{C}^* (Hisham <i>et. a.</i> , 1996)	δ_{C} de SC18	δ_{H} SC18	HMBC	COSY
1	CH ₂	42,7	46,90	0,82-0,87 (m) 2,03; dd, $J=11,5$ e $3,7$ Hz	2,3,9,10,25 2,3,5,9,10,25	1,2
2	CH	68,7	69,42	3,65-3,69 (m)	1,3	3
3	CH	83,3	84,07	2,97; d, $J=9,5$ Hz	1,2,4,23,24	
4	C	38,2	38,70			
5	CH	55,2	55,56	0,79	23	
6	CH ₂	17,8	17,52	1,40; 1,52	5	
7	CH ₂	34,0	34,32	1,40	26	
8	C	40,7	41,06			
9	CH	49,6	50,53	1,35	12,26	
10	C	39,1	39,35			
11	CH ₂	20,9	21,19	1,26; 1,44	9,12	12
12	CH ₂	24,8	25,17	1,68; 1,07	11,13	
13	CH	37,8	38,16	1,65	12,14,18,27	
14	C	42,7	43,04			
15	CH ₂	27,2	27,56	0,99; 1,68	8,14,16,27	16
16	CH ₂	35,4	35,71	1,37; 1,49	15,18,22,28	
17	C	42,8	43,15			
18	CH	48,3	48,43	1,35	13,16,17	
19	CH	46,3	48,15	2,35-2,40 (m)	13,18,20,21,29,30	18
20	C	150,8	151,00			
21	CH ₂	29,63	29,99	1,92	18,22	22
22	CH ₂	39,79	40,13	1,20; 1,38	28	
23	CH ₃	28,2	28,62	1,01	2,3,4,5,24	24
24	CH ₃	16,3	16,68	0,80	3,4,5,23	
25	CH ₃	17,1	17,52	0,90	1,5,9,10	
26	CH ₃	15,8	16,18	1,03	7,8,9,14	
27	CH ₃	14,3	14,68	0,94	8,13,14,15	
28	CH ₃	18,15	18,15	0,79	16,17,18,22	
29	CH ₂	109,2	109,56	4,57; 4,69	19,20,30	30
30	CH ₃	19,1	19,44	1,68	19,20,29	

* CDCl_3 -MeOH,75MHz

4.19 SC19: mistura de betulina e ácido betulínico



A amostra foi obtida como um sólido branco parcialmente solúvel em clorofórmio. Ao analisar os espectros de RMN de 1D foi possível observar a existência de sinais similares aos observados para o composto **SC17**. No espectro de RMN de ^1H (Figura A90, pág. 165) observaram-se muitos sinais de átomos de hidrogênio sobrepostos na região de δ_{H} 0,79 - 1,68, sugerindo que a amostra se tratava de uma mistura. Os sinais observados em δ_{H} 4,59 e 4,69 foram atribuídos a átomos de hidrogênio de dupla terminal, indicando que a mistura é de triterpenos da classe dos lupanos.

No espectro de RMN de ^{13}C e espectro DEPT-135 (Figuras A91 e A92, pág. 165 e 166) foram observados 56 sinais, sendo alguns deles de maior intensidade sugerindo sobreposição de sinais, indicando que se tratava de uma mistura de dois triterpenos da mesma classe. Foram observados dois sinais em δ_{C} 109,35 e 109,53, sendo estes atribuídos a átomos de carbono C-29. O sinal desblindado, observado em δ_{C} 179,14, é característico de átomo de carbono carbonílico. De posse dos dados de RMN obtidos para a mistura e com os dados descritos na literatura para o ácido betulínico (ZHANG *et al.*, 2005) e para a betulina (YAMASHITA *et al.*, 2019), foi possível identificar que a mistura isolada trata-se desses dois triterpenos. Os dados de RMN de ^{13}C estão listados na Tabela 22, pág. 83.

Tabela 20: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 -Py- d_5 , 100 MHz) de betulina (YAMASHITA *et al.*, 2019) e ácido betulínico (ZHANG *et al.*, 2005) *et. al.*; 2005).

Nº	Tipo de C	δ_c **SC19	Betulina δ_c * (Yamashita <i>et. al.</i> ; 2019)	Tipo de C	δ_c **SC19	Ácido betulínico δ_c *** (Zhang <i>et. al.</i> ; 2005)
1	CH ₂	38,99	38,7	CH ₂	38,99	39,3
2	CH ₂	27,48	27,4	CH ₂	27,50	28,3
3	CH	78,56	79,0	CH	78,52	78,2
4	C	38,88	38,9	C	38,86	38,5
5	CH	55,42	55,3	CH	55,50	55,9
6	CH ₂	18,38	18,3	CH ₂	18,38	18,8
7	CH ₂	34,29	34,2	CH ₂	34,45	34,9
8	C	40,77	40,9	C	40,94	41,2
9	CH	50,66	50,4	CH	50,45	50,2
10	C	37,25	37,2	C	37,32	37,4
11	CH ₂	20,87	20,8	CH ₂	20,95	21,3
12	CH ₂	25,30	25,2	CH ₂	25,67	26,2
13	CH	37,32	37,3	CH	38,30	38,7
14	C	42,52	42,7	C	42,72	42,9
15	CH ₂	27,48	27,0	CH ₂	30,82	30,3
16	CH ₂	29,90	29,1	CH ₂	32,62	32,9
17	C	47,91	47,8	C	56,36	56,7
18	CH	48,81	48,7	CH	47,09	47,8
19	CH	47,93	47,8	CH	49,39	49,7
20	C	150,79	150,5	C	151,14	151,4
21	CH ₂	29,87	29,7	CH ₂	30,82	31,3
22	CH ₂	34,29	34,0	CH ₂	38,86	37,6
23	CH ₃	28,13	28,0	CH ₃	28,13	28,7
24	CH ₃	15,58	15,3	CH ₃	16,16	16,4
25	CH ₃	16,11	16,1	CH ₃	18,97	16,4
26	CH ₃	16,16	16,0	CH ₃	19,11	19,2
27	CH ₃	14,77	14,8	CH ₃	15,58	15,2
28	CH ₂	59,70	60,6	C	179,14	178,9
29	CH ₂	109,53	109,7	CH ₂	109,35	109,9
30	CH ₃	16,14	16,1	CH ₃	19,44	19,8

* CDCl_3 , 150 MHz

** CDCl_3 -Py- d_5 , 100 MHz *** Py- d_5 , 150 MHz

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO ESTUDO FITOQUÍMICO

A partir do estudo fitoquímico das raízes de *Salacia crassifolia* foram isolados e caracterizados treze compostos. Sendo dois esteroides (**SC04**, **SC11**), um flavonoide (**SC12**), um cerebrosídeo (**SC13**), um sesquiterpeno (**SC10**), um dímero (**SC03**) e sete triterpenos pentacíclicos (**SC01**, **SC02**, **SC05**, **SC06**, **SC07**, **SC08** e **SC09**). Dos triterpenos isolados, um pertence a classe dos oleananos (**SC01**), um a classe dos ursanos (**SC02**), um aromático (**SC09**) e quatro quinonametídeos (**SC05**, **SC06**, **SC07** e **SC08**). Dos compostos isolados **SC02** e **SC10** são inéditos. Os quinonametídeos são considerados marcadores taxonômicos de espécies da família Celastraceae, sendo, portanto, restrito a espécies dessa família. A pristimerina (**SC05**) foi o constituinte majoritário do extrato hexânico das raízes e o fracionamento desse extrato levou à obtenção de 5 g do composto puro. A pristimerina tem se destacado por apresentar um grande potencial citotóxico, além de atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimalárica (YOUSEF *et.al*; 2018).

O estudo dos galhos de *Salacia* levou à obtenção de cinco compostos puros. Dos cinco triterpenos isolados quatro (**SC14**, **SC15**, **SC17** e **SC18**) pertencem à classe dos lupanos e um (**SC16**) à classe dos friedelanos. Foi também isolada e identificada uma mistura de betulina (**SC17**) com ácido betulínico (**SC19**). Na literatura são descritos vários estudos com triterpenos com esqueleto lupano por apresentarem variadas atividades biológicas.

O isolamento de triterpenos pentacíclicos de várias classes de *Salacia crassifolia* mostra o grande potencial desta planta para a obtenção de metabólitos diversificados e bioativos.

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

1 ESTUDO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

1.1 – INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma das principais causas de demência que acometem principalmente pessoas com mais de 60 anos (PRINCE *et al.*, 2016). Por se tratar de uma doença que é diagnosticada em sua maioria em idosos, o envelhecimento da população tornou-se uma grande preocupação relacionada à saúde pública mundial. Estima-se que 75% de todos os casos de demência registrados sejam atribuídos a um dos sintomas da doença (TAKIZAWA *et al.*, 2014). Pessoas acometidas com DA sofrem distúrbios neurodegenerativos apresentando declínio cognitivo e de memória, distúrbios comportamentais e danos na coordenação motora. Todos esses sintomas causam limitações, comprometendo a independência para a realização das atividades diárias (SOYER *et al.*, 2017; TARAWNEH; HOLTZMAN, 2012).

Dentre os processos patológicos descritos para progressão da doença, a disfunção colinérgica é a mais estudada e está associada ao declínio cognitivo precoce desenvolvido por pacientes com DA (CRAIG; HONG; MCDONALD, 2011). A hipótese colinérgica surgiu ainda nos anos 70 por uma observação realizada por Bartus e colaboradores onde foi descrito que havia perda prematura dos neurônios colinérgicos em pacientes portadores da doença (BARTUS *et al.*, 1982).

De acordo com essa hipótese, o declínio cognitivo dos pacientes acometidos com DA se deve à diminuição dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central. Esse neurotransmissor é responsável por mediar uma série de funções, inclusive de cognição, e é degradado na fenda sináptica por enzimas colinesterases (COLOVIC *et al.*, 2013). Essas enzimas desempenham o papel fundamental para a restauração da neurotransmissão colinérgica catalisando a hidrólise de ACh em colina e ácido acético (Figura 20, pág. 86). Uma das enzimas envolvidas nesse processo é a acetilcolinesterase (AChE), que é capaz de regular o processo de neurotransmissão e os níveis de acetilcolina na fenda sináptica, porque ela tem a capacidade de catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (VENTURA *et al.*, 2010).

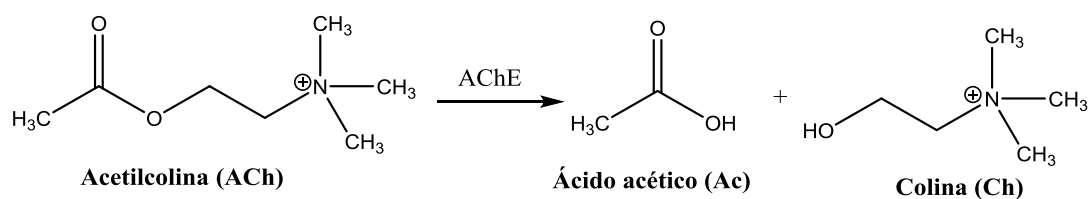


Figura 20: Hidrólise da ACh pela AChE.

Uma das estratégias utilizadas para o tratamento da DA é a terapia com substâncias anticolinesterásicas. Até o momento não foram descritos tratamentos que possam interromper ou reverter a progressão da DA, mas já existem medicamentos para inibir a AChE, aumentando assim a atividade da ACh e moderando os sintomas da doença (SAHOO *et al.*, 2018).

Dentre os medicamentos aprovados para esse fim os mais comuns são o donepezil, a rivastigmina e a galantamina (Figura 21). Dentre os fármacos utilizados, a galantamina é o único obtido a partir de fonte natural, consistindo em um alcaloide extraído de espécies da família Amaryllidaceae (HEINRICH; TEOH, 2004). Além da sua atividade para inibição da AChE, moléculas ativas oriundas de fontes naturais apresentam propriedades farmacológicas adicionais, como por exemplo, atividade antioxidante, permitindo assim que sejam avaliadas como forma preventiva da progressão da DA (AYAZ *et al.*, 2017; SAHOO *et al.*, 2018).

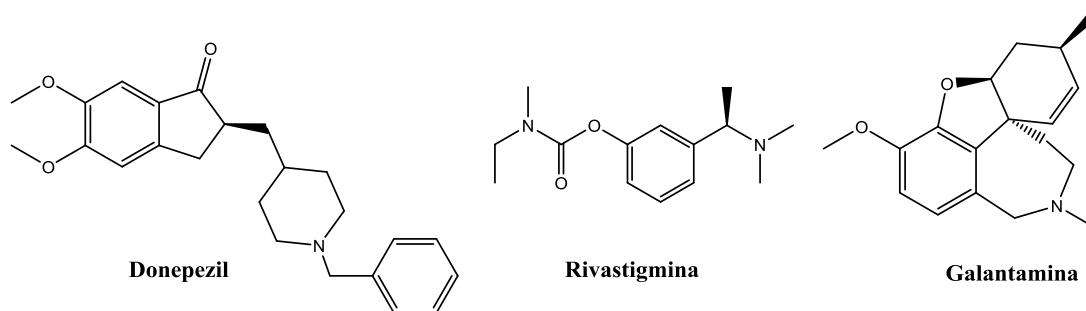


Figura 21: Alguns dos fármacos utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer.

Diante do exposto sabe-se da necessidade de novas terapias para tratamento e prevenção da doença. Vários estudos têm sido realizados visando o isolamento e identificação de substâncias obtidas a partir de fonte natural que sejam aplicáveis ao projeto de desenvolvimento de novos fármacos para DA. Destacam-se substâncias

pertencentes às classes dos alcaloides, terpenos, cumarinas e polifenóis que vem sendo amplamente estudados (HUANG, LING; SU; LI, 2013).

Sabnis e colaboradores (2018) fizeram um levantamento dos pedidos de patentes e de patentes obtidas a partir de produtos naturais tendo como objetivo diagnosticar, prevenir e tratar a doença de Alzheimer. Dentre as classes de metabólitos secundários encontrados nesse levantamento há vários pedidos de patentes de triterpenos pentacíclicos. E entre as classes de triterpenos descritas nesse capítulo destacam-se os ursanos, oleananos, lupanos e quinonametídeos, sendo que para o último tem-se uma patente do uso de compostos e composições contendo o celastrol e pristimerina (SABNIS, 2018).

Diante disso, alguns extratos e compostos obtidos a partir das raízes e galhos de *Salacia crassifolia* foram submetidos a avaliação da atividade de inibição da AChE. O teste foi realizado no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi.

1.2 – METODOLOGIA

A metodologia utilizada para avaliar a inibição da acetilcolinesterase foi descrita por Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) e adaptada por Rhee e colaboradores (RHEE *et al.*, 2001). O teste foi realizado utilizando microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 50 µL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) e 125 µL de ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) – DTNB (3 mM). Para os extratos foram utilizados 25 µL de uma solução com concentração 10 mg/mL (DMSO), já para os compostos puros foram utilizados 25 µL da solução com concentração 1 mg/mL (DMSO) e 25 µL de iodeto de acetiltiocolina – ATCI (15 mM). Como controle negativo utilizou-se DMSO, e eserina (10 mg/mL em DMSO) como inibidor padrão. O controle positivo foi preparado nas mesmas condições que as amostras. Os testes foram feitos em quintuplicata. A absorvância foi medida na faixa de 405 nm a cada 1 min por oito vezes. Após essas leituras foram adicionados nos poços 25 µL de solução da enzima acetilcolinesterase (0,22 U/mL em tampão). A absorvância foi medida novamente na faixa de 405 nm a cada 1 min por 10 vezes. Calculou-se a porcentagem de inibição através da comparação das absorvâncias das amostras com as absorvâncias do branco.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos **EAC**, **EAE**, **EC** e **EME** das raízes, juntamente com os compostos puros **SC03**, **SC05**, **SC08**, **SC09**, **SC12**, **SC14**, **SC15**, **SC16**, **SC17** e **SC18** foram avaliados frente a inibição da enzima AChE.

Dentre os extratos avaliados o clorofórmico (**EC**) e o metanólico (**EME**) apresentaram expressiva atividade de inibição da AChE com 88% e 74%, respectivamente, como pode ser observado na Tabela 21. Para o extrato acetato de etila observou-se que a taxa de inibição foi de 50%.

Os compostos **SC03**, **SC08** e **SC09** apresentaram alta porcentagem de inibição, sendo próxima ou superior a observada para o padrão eserina, com valores entre 99-100%. O **SC05** também foi bem ativo com 84% de inibição. Os demais compostos puros testados (**SC12**, **SC14**, **SC15**, **SC16**, **SC17** e **SC18**) demonstraram taxa de inibição entre 62-75 %.

Tabela 21: Resultados do teste de inibição da enzima AChE em microplaca.

Compostos	% Média de inibição	Compostos	% Média de inibição
EAC	22±1	SC12	75±7
EAE	50±1	SC14	72±7
EC	88±3	SC15	70±6
EME	74±2	SC16	67±7
SC03	99±9	SC17	62±4
SC05	84±8	SC18	75±8
SC08	100±9	Eserina	94±2
SC09	100±8		

Como pode ser observado na Tabela 21 (página 88), todos os compostos testados demonstraram potencial frente a inibição da acetilcolinesterase. Sabe-se que inibidores de acetilcolinesterase interagem com a enzima inibindo a degradação do neurotransmissor acetilcolina.

2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a incidência e a mortalidade devido ao câncer cresceu em todo o mundo. Ainda que tenha aumentado o desenvolvimento tecnológico e farmacêutico para o seu tratamento, o câncer continua a ser um grande problema mundial (SEYED *et al.*, 2016). Vários fatores têm sido descritos para explicar este crescimento. Pode se destacar, entre esses fatores, o envelhecimento e crescimento da população como também a resistência aos métodos convencionais de tratamento (BRAY *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2017). Além de cirurgia e radioterapia, a quimioterapia é um método amplamente utilizado para o tratamento clínico.

Mesmo sendo a forma de tratamento mais aplicada em pacientes acometidos com a doença, sabe-se que os fármacos quimioterápicos danificam também as células saudáveis, aumentando as complicações durante a terapia (CARELLE *et al.*, 2002). Diante do cenário atual é de suma importância desenvolver novas estratégias para tratamento e prevenção dessa doença, que é caracterizada pelo crescimento desordenado das células anormais e responsável pela alta taxa de mortalidade no mundo (SEYED *et al.*, 2016; SHANMUGAM *et al.*, 2016).

Estimou-se que em 2018 haveria 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer em todo o mundo. Dentre os cânceres, os de pulmão e mama são os mais diagnosticados e são as principais causas de morte por câncer (BRAY *et al.*, 2018).

No Brasil estimou-se que, em 2018, 640 mil novos casos de câncer foram diagnosticados, sendo que os cânceres de próstata, pulmão, mama, cólon e reto estão entre os mais incidentes (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019).

Diante deste quadro, faz-se necessária a descoberta de novos compostos ativos que possam contribuir para o tratamento e prevenção do câncer. As plantas têm contribuído para a descoberta de substâncias ativas para o tratamento de vários tipos de câncer. Como exemplo, temos a vimblastina, a vincristina e o paclitaxel, isolados a partir de plantas e que estão entre os quimioterápicos mais eficientes disponíveis para o tratamento do câncer (THOMFORD *et al.*, 2018).

Alguns dos compostos obtidos a partir das raízes e galhos de *Salacia crassifolia* foram submetidos ao teste de citotoxicidade frente a algumas linhagens celulares.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

Os testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Hematologia Clínica, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela Dra. Fernanda Gontijo, sob a orientação do professor Dr. Adriano de Paula Sabino.

Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizadas as seguintes linhagens celulares tumorais, THP-1 (células de leucemia mieloide aguda, ATCC-TIB-202), K562 (células de leucemia mieloide crônica, ATCC- CRL -3344) e MDA-MB-231 (células de carcinoma mamário, ATCC – HTB-26). A citotoxicidade das amostras frente à linhagem Wi-26VA4 (células saudáveis de fibroblastos de pulmão, ATCC- CCL-75) foi usada para estabelecer o índice de seletividade.

2.2.1 Cultivo celular

As linhagens foram mantidas congeladas em criotubos com 5% de DMSO e meio de cultura RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para iniciar 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, e então submetidos à centrifugação a 800 rpm durante 5 minutos (mod. CS- 6R, Beckman, EUA). Em seguida o sobrenadante foi descartado. A massa celular presente no fundo do tubo foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi transferida para uma garrafa plástica de cultivo celular T75 (75 cm², volume de 250 mL) (Corning Costar Inc., EUA) e mantida em estufa (Thermo elétron, EUA) a 37 °C com atmosfera úmida de 5% de CO₂.

Após a adesão celular realizou-se a manutenção da linhagem, no qual o meio foi trocado a cada 48 horas para garantir a renovação dos nutrientes. A morfologia celular e 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-se a solução tripsina-EDTA (0,25%) para remover as células aderidas ao fundo da garrafa. Em seguida as células soltas foram transferidas para tubo de centrífuga de 15 mL e foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI-1640 com 10% SFB. O 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 para misturar 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. Posteriormente à contagem, a suspensão celular (1×10^5 células/100 µL por poço) foi distribuída em placas de 96 poços (Corning Costar Inc., EUA) para realização do ensaio de viabilidade celular.

2.2.2 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliação da citotoxicidade das amostras realizou-se o ensaio de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (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; PARK *et al.*, 1987), cuja quantidade pode ser determinada por espectrofotometria, 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 a avaliação da atividade citotóxica foi feito um plaqueamento de 1×10^6 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 CO₂ em ambiente úmido, para posterior adição das amostras a serem testadas.

Os testes de citotoxicidade foram realizados em quatro diluições seriadas na escala decimal a partir da solução estoque (compostos e controle positivo), utilizando RPMI-1640 com 1% de suplementação de SFB. Cada concentração foi testada em triplicata e cada ensaio foi também repetido em triplicata. Como controles positivos foram utilizados os fármacos citarabina (para a linhagem TPH-1), imatinibe (para a linhagem K562) e etoposídeo (para as linhagens MDA-MB-231). Após uma incubação de 48 horas, o meio em cada poço foi recolhido. Para determinar a viabilidade das células, 100 µL do sal tetrazólico MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e as células foram cultivadas em adicional incubação durante 3 horas. Retirou-se o sobrenadante e aplicaram-se 50 µL de DMSO em cada poço, para solubilizar o produto

insolúvel. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas SpectraMax plus 384 no comprimento de onda de 550 nm. A citotoxicidade foi expressa pelos valores de concentração que inibe 50% do crescimento das células (IC_{50}) na presença e na ausência das amostras e do controle positivo. O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre o IC_{50} obtido para células normais (Wi-26VA4) e o obtido para as linhagens de células cancerígenas.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram avaliadas frente a três linhagens de células tumorais, THP-1 (células de leucemia mieloide aguda), K562 (células de leucemia mieloide crônica) e MDA-MB-231 (células de carcinoma mamário). Os valores de IC_{50} e o índice de seletividade obtidos estão apresentados nas Tabelas 22 e 23 (pág. 94). As amostras que obtiveram menor valor de IC_{50} foram destacadas nas respectivas Tabelas.

Todas as amostras testadas apresentaram citotoxicidade ($IC_{50} \leq 78$) frente a todas as linhagens testadas, mas nenhum dos compostos avaliados apresentou citotoxicidade menor que o controle positivo. Frente à linhagem THP-1, os compostos **SC05** e **SC15** foram os que apresentaram citotoxicidade maior (IC_{50} $30,55 \pm 1,30$ e $32,68 \pm 2,40$, respectivamente). Frente a linhagem K562 o **SC15** foi o mais citotóxico com IC_{50} $39,22 \pm 2,88$ como pode ser observado na Tabela 22, pág. 94. Quando avaliada a seletividade, **SC05** foi mais seletivo para a linhagem de THP-1 e o **SC15** para a linhagem K562.

Quanto a avaliação frente a linhagem MDA-MB-231, os compostos **SC03**, **SC05**, **SC09** e **SC17** apresentaram maior citotoxicidade, como pode ser observado na Tabela 22, pág. 94. Em relação a seletividade os compostos **SC03** e **SC17** foram os mais seletivos com IS= 1,64 e 1,82, respectivamente, Tabela 23, pág.94.

Tabela 22: Valores de IC₅₀ (µM) obtidos para os compostos testados.

Compostos	IC ₅₀ (µM) ± DP *			
	THP-1	K562	MDA-MB-231	WI-26 VA4
SC03	47,20 ± 1,85	48,05 ± 2,95	38,10 ± 2,10	62,32 ± 2,90
SC05	30,55 ± 1,30	46,25 ± 2,75	40,70 ± 1,75	58,74 ± 2,62
SC08	50,70 ± 2,95	55,12 ± 3,05	64,60 ± 3,15	72,70 ± 3,30
SC09	46,16 ± 2,82	41,60 ± 2,53	39,10 ± 2,05	49,08 ± 2,25
SC14	48,16 ± 2,60	62,50 ± 4,10	50,10 ± 3,55	70,50 ± 2,80
SC15	32,68 ± 2,40	39,22 ± 2,88	45,80 ± 2,04	56,68 ± 2,90
SC16	64,85 ± 4,00	78,20 ± 4,20	60,88 ± 3,24	62,45 ± 3,60
SC17	55,52 ± 3,24	68,70 ± 3,22	40,11 ± 2,92	72,90 ± 3,14
SC18	50,15 ± 3,05	46,90 ± 2,18	41,70 ± 3,12	59,25 ± 2,10
Etoposídeo	12,04 ± 2,32	9,11 ± 1,33	12,00 ± 0,63	8,63 ± 0,13
Citarabina	12,70 ± 1,20	ND	ND	58,70 ± 3,76
Imatinibe	ND	10,50 ± 1,05	ND	69,63 ± 3,13
P valor	<0,05 ^a	<0,05 ^b	<0,05 ^c	<0,05 ^d >0,05 ^e

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (DP). ND- Não determinado. 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-26VA4, Etoposídeo vs todas as amostras testadas/ Citarabina vs SC08, SC09, SC17 e SC14/ Imatinibe vs SC03, SC05, SC09, SC15, SC16 e SC18; e: WI-26VA4, Citarabina vs SC03, SC05, SC15, SC16 e SC18/ Imatinibe vs SC08, SC17 e SC14.

Tabela 23: Índice de seletividade obtidos, para os compostos isolados, frente as linhagens testadas.

Composto	Índice de seletividade		
	THP-1	K562	MDA-MB-231
SC03	1,32	1,30	1,64
SC05	1,92	1,27	1,44
SC08	1,43	1,32	1,13
SC09	1,06	1,18	1,26
SC17	1,31	1,06	1,82
SC14	1,46	1,13	1,41
SC15	1,73	1,45	1,24
SC16	0,01	0,80	1,03
SC18	1,18	1,26	1,42
Etoposídeo	0,72	0,95	0,72
Citarabina	5,97	ND	ND
Imatinibe	ND	7,48	ND

3 ENSAIO DE TOXICIDADE EM *CAENORHABDITIS ELEGANS*

3.1 INTRODUÇÃO

O *Caenorhabditis elegans* (Figura 22) é um nematoide de vida livre encontrado principalmente em solo de países de clima temperado, relacionado com regiões onde se tem matéria orgânica em abundância (BRENNER, 1974; FÉLIX; BRAENDLE; CUTTER, 2014). As larvas de *C. elegans* são bem pequenas podendo ser observadas apenas por microscópios. Quando eclodidas, elas apresentam 0,25 milímetros de comprimento e os adultos chegam a 1 milímetro (KOBET *et al.*, 2014). O nematóide tem um ciclo de vida curto, a 25 °C em um período de três dias o ovo evolui a adulto que já reproduz, é hermafrodita com autofertilização, sendo os machos encontrados com baixa frequência na população (LEUNG *et al.*, 2008).



Figura 22: *Caenorhabditis elegans* – hermafrodita adulto. Fonte: <http://www.socmucimm.org/overview-model-organism-c-elegans/>.

O modelo de estudo de toxicidade *in vivo* utilizando *C. elegans* vem se destacando nas últimas décadas, pois apresenta algumas vantagens quando comparado com os modelos tradicionais, que tendem a ser mais trabalhosos, demorados e caros, além das restrições éticas para o seu desenvolvimento (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013). Já o modelo *C. elegans* tem se mostrado bastante eficaz com várias vantagens, como pequeno porte, facilidade de cultivo, baixo custo de manutenção, além de uma reprodução rápida (KENNEDY, 2013). Esse modelo tem contribuído de forma significativa para a ciência, sendo o Nobel de Fisiologia ou

Medicina de 2002 e 2006 concedido aos pesquisadores que desenvolveram seus trabalhos utilizando *C. elegans*. Os ganhadores dos prêmios foram os pesquisadores Brenner, Sulston e Robert Horvitz pelo trabalho sobre morte celular programada e os americanos Craig Mello e Andrew Fire pela descoberta do silenciamento de genes por RNA (FIRE, 2007; MELLO, 2007). Em 2008 o pesquisador Martin Chalfie ganhou o prêmio Nobel de Química pela contribuição ao desenvolvimento da proteína verde fluorescente como ferramenta para visualizar estruturas biológicas em organismos vivos utilizando *C. elegans* (CHALFIE *et al.*, 1994).

O modelo de *C. elegans* tem sido amplamente utilizado para avaliar a toxicidade *in vivo*, pois também possibilita a realização de ensaios em larga escala. Além disso, estudos descrevem que os resultados obtidos para modelos murinos são similares aos resultados obtidos para o modelo *C. elegans* (LI, YU *et al.*, 2013).

Neste trabalho, os extratos e compostos obtidos das raízes e galhos de *Salacia crassifolia* foram submetidos a avaliação de toxicidade utilizando o modelo *C. elegans*.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

O teste de toxicidade foi realizado em parceria com o grupo de pesquisa da professora Dra. Viviane Alves Gouveia, do Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2.1 Preparo de amostras

Os extratos metanólico (**EMGS**), acetato de etila (**EAGS**) e clorofórmico dos galhos (**ECGS**), acetônico (**EAC**), hexânico (**EHR**), metanólico (**EMR**) e clorofórmico das raízes (**ECR**) juntamente com os compostos puros **SC03**, **SC05**, **SC08**, **SC09**, **SC12**, **SC14**, **SC15**, **SC16**, **SC17** e **SC18** foram avaliados frente ao teste de toxicidade em *C. elegans*.

As amostras foram pesadas e solubilizadas em DMSO de forma a se obter soluções na concentração máxima possível. Devido às diferenças de solubilidade neste solvente, foram obtidos valores de concentração distintos para cada amostra.

Na Tabela 24 estão apresentadas as concentrações das soluções estoque de cada composto e extrato, e também a concentração final destas amostras durante os ensaios de toxicidade.

Tabela 24. Concentração das amostras para teste de toxicidade

Amostra	Nome	Solução Estoque (mg mL ⁻¹)	Concentração final no ensaio (µg mL ⁻¹)
SC03	cariopristimerina	10	200
SC05	pristimerina	10	200
SC08	20-hidroxi-20-epi-tingenona	10	200
SC09	6-oxo-pristimerol	10	200
SC12	4'- <i>O</i> -metilepigalocatequina	10	200
SC14	lupeol	10	200
SC15	lup-20(29)-eno-3β,15α-diol	10	200
SC16	21α-hidroxifriedelan-3-ona	10	200
SC17	betulina	10	200
SC18	lup-20(29)-eno-2α,3β - diol	10	200
EHE	ext. hexano/éter etílico das raízes de <i>S. crassifolia</i>	40	800
ECR	ext. clorofórmico das raízes de <i>S. crassifolia</i>	40	800
EMR	ext. metanólico das raízes de <i>S. crassifolia</i>	40	800
EAC	ext. acetônico das raízes de <i>S. crassifolia</i>	40	800
EAGS	ext. acetato de etila dos galhos de <i>S. crassifolia</i>	40	800
ECGS	ext. clorofórmico dos galhos de <i>S. crassifolia</i>	40	800
EMGS	ext. metanólico dos galhos de <i>S. crassifolia</i>	40	800

3.2.2 Ensaio de toxicidade

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL de tampão M9 com 100 (\pm 10) larvas L1 de *C. elegans* e 20 µL das soluções estoque. Todas as exposições foram realizadas a 25 °C durante o período de 24 h. Utilizou-se DMSO como controle negativo. A viabilidade foi avaliada 24 h após a exposição utilizando o ensaio de MTT.

3.2.2.1 Ensaio de MTT

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o teste colorimétrico de metabolização de MTT, a metodologia foi a mesma descrita na página 92.

3.2.3 Ensaio de sobrevivência

Os ensaios de sobrevivência foram realizados em placa de 96 poços contendo 100 µL de tampão M9 suplementado com 5 µL de clorafenicol 34mg/mL e 5 µL de FUDR 50 µg/mL (5-fluoro-2'- deoxiuridina - SIGMA), um inibidor de timidilato sintase para impedir a produção de descendência de *C. elegans* (MITCHELL *et al.*, 1979). A esta solução foram adicionadas as amostras e os nematoides em estágio larval L4 (n=10). As placas foram incubadas a 25 °C e avaliadas quanto a sobrevivência dos vermes por contagem dos indivíduos vivos em esteromicroscópio, a cada 48h, até a morte de todos os nematoides ou durante 20 dias (HUANG, REN E. *et al.*, 2014). O tempo necessário para a morte de 50% da população de *C. elegans* (LT₅₀) foi calculado e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank e Wilcoxon por Kaplan-Meyer utilizando o software GraphPrism, versão 5.01. O valor p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Cada ensaio foi realizado com três réplicas técnicas e três réplicas biológicas independentes (HUANG, REN E. *et al.*, 2014).

3.2.4 Ensaio de fertilidade

Os ensaios de capacidade reprodutiva das larvas no estágio L4 foram realizados em placa de 96 poços contendo 100 μL de tampão M9 suplementado com 5 μL de clorafenicol 34 mg/mL. A esta solução foram adicionados as amostras e os nematoides em estágio larval L4 (n=2). As placas foram incubadas a 25 °C durante 48 h e o tamanho da progênie foi quantificado pela contagem de indivíduos L1 em esteromicroscópio. Cada ensaio foi realizado com duas réplicas técnicas e biológicas independentes. Para a construção de gráficos e análises estatísticas utilizou-se o software GraphPrism, versão 5.01 (two-way ANOVA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise dos ensaios de toxicidade (Figura 23, pág. 100) foi possível observar que no período de 24 horas a taxa de sobrevivência das larvas de *C. elegans* foi superior a 90%, portanto todas as amostras avaliadas apresentaram baixa toxicidade na concentração testada.

A Figura 24, pág. 101, apresenta a taxa de sobrevivência de *C. elegans* após a exposição às amostras no período de até 20 dias, considerado o tempo necessário para a morte de 50% da população das larvas. Observou-se que os compostos **SC17** e **SC18**, e os extratos **ECGS** e **EAC**, provocaram a morte de 50% dos nematoides em estágio larval L4 de *C. elegans* em aproximadamente dois dias. Para o **EMGS** e o composto **SC17** o período necessário para a morte de 50% das larvas foi de três a quatro dias. As demais amostras só induziram a morte de 50% dos nematoides em um período posterior a dezenove dias.

Não foi possível correlacionar estrutura química com a atividade apresentada uma vez que para os compostos com mesmo esqueleto (por exemplo, os compostos com esqueleto lupanos: **SC17**, **SC18**, **SC14** e **SC15**) foram observados comportamentos bem diferentes.

Observou-se, no entanto, que os compostos da classe dos quinonametídeos (**SC05**, **SC08** e **SC09**) não apresentaram toxicidade frente a *C. elegans*.

Foi realizada, também, uma avaliação frente a fertilidade de *C. elegans* no estágio larval L4 após 48 h na presença do controle e das amostras avaliadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25, pág. 101.

Entre os compostos puros avaliados frente a inibição da reprodução no modelo de *C. elegans*, **SC16** mostrou-se o mais ativo para esse fim, inibindo aproximadamente 100% da reprodução. O composto **SC05** inibiu mais de 80% da reprodução dos nematoides em estágio larval L4, seguido do **SC09** que inibiu 30%. Os demais compostos puros avaliados não inibiram a reprodução dos nematoides. Em relação aos extratos avaliados o **EAGS**, **EACR** e **EMGS** foram os que apresentaram maiores taxas de inibição da reprodução, entre 75-90%. Novamente não foi possível relacionar inibição da fertilidade com a estrutura química dos compostos testados.

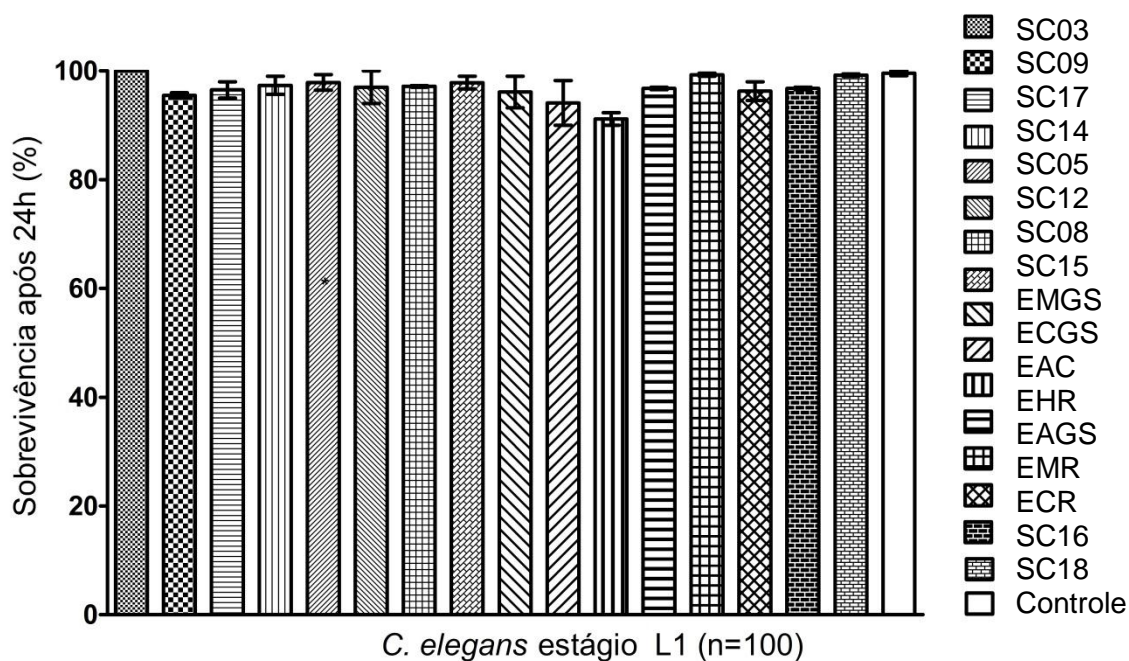


Figura 23: Gráfico de sobrevivência das larvas no estágio L1 de *C. elegans* serem expostas as amostras e controle após 24 h.

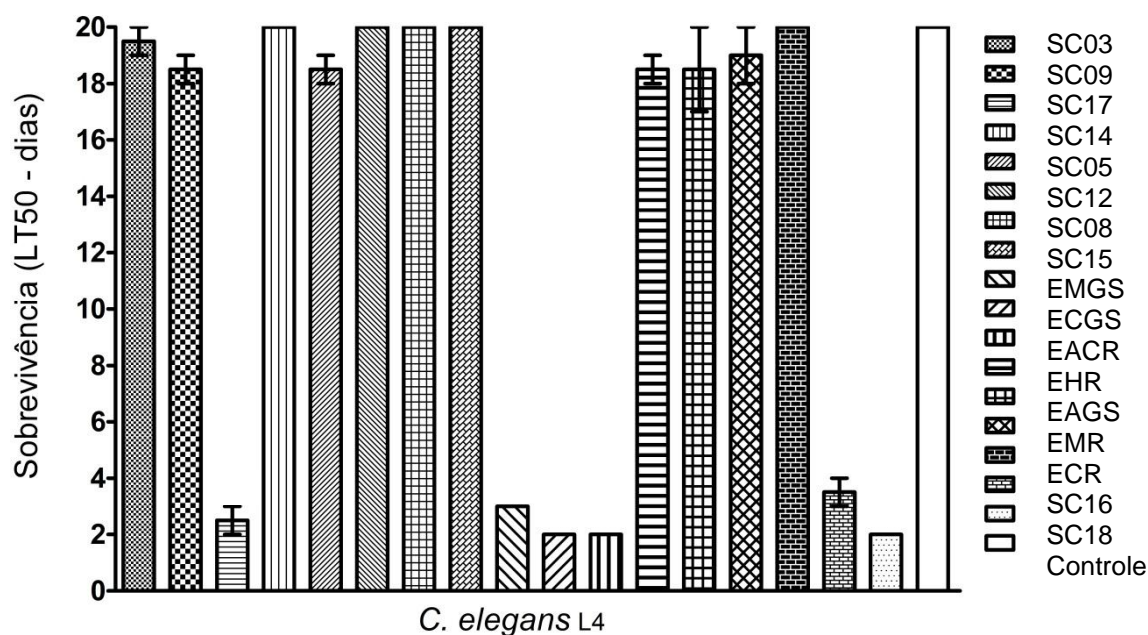


Figura 24: Gráfico com o LT_{50} após as larvas no estágio L4 de *C. elegans* serem expostas as amostras e controle.

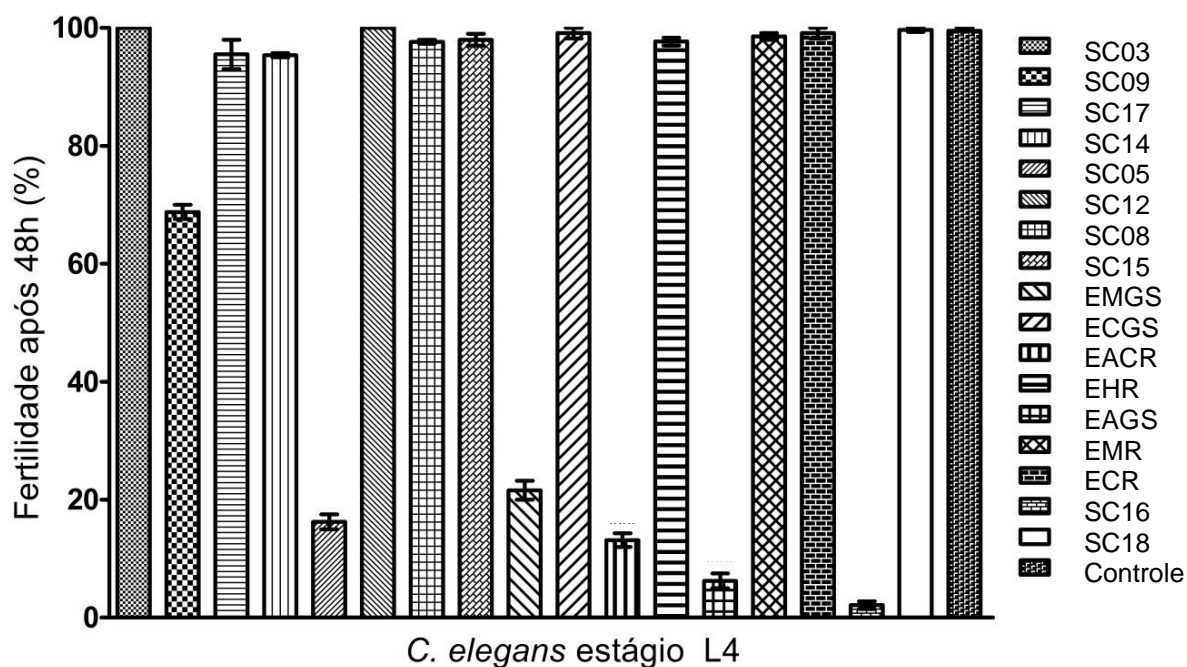


Figura 25: Gráfico de fertilidade após as larvas no estágio L4 de *C. elegans* serem expostas as amostras e controle após 48 h.

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS RELATIVAS AOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Todos os compostos testados apresentaram expressiva atividade como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), essa relacionada com a doença de Alzheimer.

Foram realizados teste *in vitro* para avaliar a citotoxicidade dos triterpenos isolados frente as linhagens de células THP-1 (células de leucemia mieloide aguda), K562 (células de leucemia mieloide crônica) e MDA-MB-231 (células de carcinoma mamário), porém nenhum dos compostos avaliados apresentaram toxicidade expressiva para as linhagens testadas.

No teste de toxicidade utilizando modelo *C. elegans* foi observado que todos os compostos na concentração testada não foram tóxicos, pois a taxa de sobrevivência das larvas no estágio L1 após 24 horas foi maior que 90%. Em relação a sobrevivência após 48 h de exposição, foi possível observar que triterpenos da classe dos lupanos foram mais tóxicos e mataram 50% dos nematoides no período de dois dias. Quando avaliada a fertilidade dos nematoides em estágio larval L4 observou-se que os compostos **SC16** (21 α -hidroxifriedelan-3-ona), pertencente a classe dos friedelanos, e o composto **SC05** (pristimerina), triterpeno da classe dos quinonametídeos, foram os que mais inibiram a reprodução das larvas.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico das raízes e galhos de *Salacia crassifolia* utilizando cromatografia clássica e de média pressão. Foram fracionados os extratos: clorofórmico (EC), acetônico (EA), acetato etílico (EAE) e hexano/éter etílico (1:1) (EHE1 e EHE2) das raízes. O extrato hexano/éter etílico foi obtido a partir de duas coletas distintas. Dos galhos foram fracionados os extratos hexânico (EHGS) e clorofórmico (ECGS). Os compostos isolados tiveram suas estruturas químicas identificadas utilizando as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY e NOE) e difração de raios-X. Para avaliação da atividade biológica dos extratos e compostos isolados foram realizados testes de inibição da enzima acetilcolinesterase, citotoxicidade para três linhagens celulares e toxicidade utilizando modelo *Caenorhabditis elegans*.

A partir do estudo fitoquímico das raízes e galhos de *Salacia crassifolia* foram isolados e caracterizados dezoito compostos: abruslactona A, urs-12-eno-3 β ,25,30-triol, caripristimerina, β -sitosterol, pristimerina, dispermoquinona, netzahualcoionol, 20-hidroxi-20-epi-tingenona, 9 β ,10 β -epoxi-3 β -hidroxi-1 β H,4 β H,5 β H,7 β H,11 α H-guaian-12,8 β -olídeo, 6-oxo-pristimerol, 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol, 4'-O-metilepigalocatequina, cerebrosídeo, lupeol, lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol, 21 α -hidroxifriedelan-3-ona, betulina e lup-20(29)-eno-2 α ,3 α -diol, além da mistura de betulina e ácido betulínico. O sesquiterpeno da classe dos guaianolídeos, 9 β ,10 β -epoxi-3 β -hidroxi-1 β H,4 β H,5 β H,7 β H,11 α H-guaian-12,8 β -olídeo e o triterpeno da classe dos ursanos, urs-12-eno-3 β ,25,30-triol, são inéditos na literatura. Dentre os compostos isolados quatro, pristimerina (**SC05**), dispermoquinona (**SC06**), netzahualcoionol (**SC07**) e 20-hidroxi-20-epi-tingenona (**SC08**), pertencem à classe dos quinonametídeos, considerados marcadores taxonômicos de espécies da família Celastraceae.

No teste de inibição da enzima acetilcolinesterase todos os compostos testados apresentaram expressiva atividade, sendo que os compostos **SC03** (99 \pm 9%), **SC08** (100 \pm 9%) e **SC09** (99 \pm 8%) apresentaram inibição próxima ou maior do que a do padrão eserina (94 \pm 2%). No ensaio de avaliação de citotoxicidade *in vitro* todos os compostos avaliados não apresentaram toxicidade significativa frente as linhagens de THP-1

Conclusão

(células de leucemia mieloide aguda), K562 (células de leucemia mieloide crônica) e MDA-MB-231 (células de carcinoma mamário). Na avaliação de toxicidade utilizando modelo *C. elegans* foi observado que a taxa de sobrevivência das larvas foi maior que 90% permitindo concluir que, na concentração testada, os compostos não foram tóxicos. Quanto à fertilidade das larvas, observou-se que os compostos 21 α -hidroxifriedelan-3-ona (**SC16**), pertencente à classe dos friedelanos, e o composto pristimerina (**SC05**), triterpeno da classe dos quinonametídeos, foram os que mais inibiram a reprodução das larvas em estágio larval L4, não sendo tóxicos para as larvas no estágio L1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONISAMY, Paulrayer; DURAI PANDIYAN, Veeramuthu; IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 8, p. 1070–1077, 2011.

ARVANITIS, Marios; GLAVIS-BLOOM, Justin; MYLONAKIS, Eleftherios. C. *elegans* for anti-infective discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 13, n. 5, p. 769–774, 2013.

AYAZ, Muhammad *et al.* Neuroprotective and anti-aging potentials of essential oils from aromatic and medicinal plants. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 9, n. 30, p. 168, 2017.

BARTUS, R T *et al.* The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, v. 217, n. 4558, p. 408–414, 1982.

BERNARDINI, S *et al.* Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.

BESERRA, Fernando Pereira *et al.* Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes migration, wound closure, and contractile effect in vitro: Possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK pathways. *Molecules*, v. 23, n. 11, 2018.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRENNER, I S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

BRÜNING, Reimar; WAGNER, Hildebert. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: Chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. *Phytochemistry*, v. 17, n. 11, p. 1821–1858, 1978.

BUKHARI, Syed Nasir Abbas; JANTAN, Ibrahim; SEYED, Mohamed Ali. Effects of

Plants and Isolates of Celastraceae Family on Cancer Pathways. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, v. 15, n. 6, p. 681–93, 2015.

CALLAWAY, Ewen; CYRANOSKI, David. Anti-parasite drugs sweep Nobel prize in medicine 2015. *Nature*, v. 526, n. 7572, p. 174–175, 2015.

CARELLE, Nadège *et al.* Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer*, v. 95, n. 1, p. 155–163, 2002.

CARMICHAEL, James *et al.* Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment. *American Association for Cancer Research*, v. 47, p. 936–942, 1987.

CARNEIRO, C. C. *et al.* Assessment of genotoxic, cytotoxic, and protective effects of *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. Don. stem bark fractions in mice. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n. 3, p. 2167–2177, 2013.

CATENI, F *et al.* Lipid metabolites with free-radical scavenging activity from *Euphorbia helioscopia* L. *Chemistry and physics of lipids*, v. 181, p. 90–8, 2014.

CHALFIE, Martin *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v. 263, n. 5148, p. 802–805, 1994.

CHUNG, Pooi Yin. Novel targets of pentacyclic triterpenoids in *Staphylococcus aureus*: A systematic review. *Phytomedicine*, 2019.

COLOVIC, Mirjana B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CORSINO, Joaquim *et al.* Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p. 741–748, 2000.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRAIG, Laura A.; HONG, Nancy S.; MCDONALD, Robert J. Revisiting the

cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 6, p. 1397–1409, 2011.

CZECHOWSKI, Tomasz *et al.* Flavonoid Versus Artemisinin Anti-malarial Activity in *Artemisia annua* Whole-Leaf Extracts. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 984, 2019.

DA SILVA, Felipe M.A. *et al.* Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 68, p. 77–80, 2016.

DAVISON, Emma K.; BRIMBLE, Margaret A. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 52, p. 1–8, 2019.

DE-EKNAMKUL, Wanchai; POTDUANG, Buppachart. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, v. 62, n. 3, p. 389–398, 2003.

DUARTE, Lucienir P. Estudo químico, estrutural e da atividade bacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*. *Universidade Federal de Minas Gerais*, 2000.

DUECKER, Fenja L.; REUSS, Franziska; HERETSCH, Philipp. Rearranged ergostane-type natural products: Chemistry, biology, and medicinal aspects. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 17, n. 7, p. 1624–1633, 2019.

ELLMAN, George L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ESPINDOLA, Laila S. *et al.* Cytotoxic triterpenes from *Salacia crassifolia* and metabolite profiling of Celastraceae species. *Molecules*, v. 23, n. 6, p. 1494, 2018.

FÉLIX, Marie Anne; BRAENDLE, Christian; CUTTER, Asher D. A streamlined system for species diagnosis in *Caenorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) with name designations for 15 distinct biological species. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, e94723, 2014.

FIGUEIREDO, Joaquim Neves; RÄZ, Barbara; SÉQUIN, Urs. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 6, p. 718–723, 1998.

- FIRE, Andrew Z. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 46, n. 37, p. 6966–6984, 2007.
- GERRY, Christopher J.; SCHREIBER, Stuart L. Chemical probes and drug leads from advances in synthetic planning and methodology. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 5, p. 333–352, 2018.
- GOMES, Nelson G.M. *et al.* Flavonoid composition of *Salacia senegalensis* (Lam.) DC. Leaves, evaluation of antidermatophytic effects, and potential amelioration of the associated inflammatory response. *Molecules*, v. 24, n. 14, e2530, 2019.
- HALBERSTEIN, Robert A. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*, v. 15, n. 9, p. 686–699, 2005.
- HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F. In the arms of morpheus: The development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian Journal of Anesthesia*, v. 47, n. 4, p. 367–374, 2000.
- HEINRICH, Michael; TEOH, Hooi Lee. Galanthamine from snowdrop - The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, n. 2–3, p. 147–162, 2004.
- HILL, Robert A.; CONNOLLY, Joseph D. Triterpenoids. *Natural Product Reports*, v. 34, n. 1, p. 90–122, 2017.
- HISHAM, A. *et al.* 20,29-epoxysalacianone and 6 β -hydroxysalacianone, two lupane triterpenes from *Salacia beddomei*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 3, p. 789–794, 1996.
- HUANG, Ling; SU, Tao; LI, Xingshu. Natural products as sources of new lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 13, n. 15, p. 1864–1878, 2013.
- HUANG, Ren E. *et al.* Description of *Caenorhabditis sinicasp.* n. (Nematoda: Rhabditidae), a nematode species used in comparative biology for *C. elegans*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, e110957, 2014.
- HUSSEIN, Ghazi *et al.* Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry*, v. 50, n. 4, p. 689–694, 24 fev. 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *ESTIMATIVA 2018 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019*. Disponível em: <www.inca.gov.br acesso em 24 de outubro de 2019>.

JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.

JIN, Yingli *et al.* Pristimerin attenuates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 38, n. 3, p. 221–227, 2016.

KASHYAP, Dharambir *et al.* Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 128, p. 70–81, 2018.

KENNEDY, Malcolm W. Ascaris - Antigens, Allergens, Immunogenetics, Protein Structures. *Ascaris: The Neglected Parasite*, p. 51–79, 2013.

KHALID, Sami. Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Arkivoc*, v. 2007, p. 129–134, 2007.

KLAYMAN, Daniel L. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science*, v. 228, n. 4703, p. 1049–1055, 1985.

KOBET, Robert A. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: A model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification. *Biomolecules and Therapeutics*, v. 22, n. 5, p. 371–383, 2014.

LEUNG, Maxwell C.K. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, v. 106, n. 1, p. 5–28, 2008.

LI, Jia-Jun *et al.* Anti-Cancer Effects of Pristimerin and the Mechanisms: A Critical Review. *Frontiers in pharmacology*, v. 10, n.746, 2019.

LI, Yu *et al.* Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent. *Toxicology Research*, v. 2, n. 6, p. 403–412, 2013.

LIKHITWITAYAWUID, Kittisak *et al.* Revised structure of 20-hydroxytingenone and ¹³C NMR assignments of 22 β -hydroxytingenone. *Phytochemistry*, v. 34, n. 3, p. 759–763, 1993.

LUO, Du Qiang *et al.* Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. *Pest Management Science*, v. 61, n. 1, p. 85–90, 2005.

MAHATO, Shashi B.; KUNDU, Asish P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517–1575, 1994.

MANNA, Prasenjit; SIL, Parames C. Arjunolic acid: Beneficial role in type 1 diabetes and its associated organ pathophysiology. *Free Radical Research*, v. 46, n. 7, p. 815–830, 2012.

MELLO, Craig C. Return to the RNAi World: Rethinking Gene Expression and Evolution (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, v. 46, n. 37, p. 6985–6994, 2007.

MITCHELL, D. H. *et al.* Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journals of Gerontology*, v. 34, n. 1, p. 28–36, 1979.

NOBLE, R. L. The discovery of the vinca alkaloids - Chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 68, n. 12, p. 1344–1351, 1990.

NÚÑEZ, Marvin J. *et al.* Triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae). *Phytochemistry Letters*, v. 6, n. 1, p. 148–151, 2013.

PARK, J G *et al.* Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer research*, v. 47, n. 22, p. 5875–9, 1987.

PATRIDGE, E *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, p. 204–207, 2016.

PRINCE, Martin *et al.* Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 8, n. 1,

2016.

RAI, N *et al.* Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *Journal of Nepal Chemical Society*, v. 21, p. 1–7, 2006.

REGASINI, Luis Octávio *et al.* Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). *Quimica Nova*, v. 31, n. 4, p. 802–806, 2008.

RHEE, In Kyung *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, v. 915, n. 1–2, p. 217–223, 2001.

RODRIGUES, Ana Carolina B.da C. *et al.* In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 231, p. 516–524, 2019.

RODRIGUES, Vanessa G. *et al.* *Salacia crassifolia* (Celastraceae): Chemical constituents and antimicrobial activity. *Quimica Nova*, v. 38, n. 2, p. 237–242, 2015.

SABNIS, Ram W. Patents on Natural Products for Diagnosing/Preventing/Treating Alzheimer's Disease. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 61, p. 85–141, 2018.

SAHOO, Atish Kumar *et al.* Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 215, p. 42–73, 2018.

SALVADOR, Jorge A.R. *et al.* Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 142, p. 95–130, 2017.

SANTOS, Josana P. *et al.* Caryopristimerin, the First Example of a Sesquiterpene-Triterpene Homo Diels-Alder Adduct, and a New 29-nor-Friedelane from Roots of *Salacia crassifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 7, p. 1558–1565, 2019.

SETZER, W. N. *et al.* Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. *Planta Medica*, v. 67, n. 1, p. 65–69, 2001.

SETZER, William N. *et al.* Triterpenoid Constituents in the Bark of *Balanops australiana*. *Australian Journal of Chemistry*, v. 53, n. 9, p. 809-812, 2000.

SEYED, Mohamed Ali *et al.* A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 4, p. 725–737, 2016.

SHAABAN, Ahmed A. *et al.* Protective effect of pristimerin against LPS-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology*, v. 59, p. 31–39, 2018.

SHANMUGAM, Muthu K. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, v. 40_41, p. 35–47, 2016.

SHIROTA, Osamu *et al.* Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 12, p. 1675–1681, 1 dez. 1994.

SIMMONS, Mark P. *et al.* Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 48, n. 2, p. 745–757, 2008.

SOYER, Zeynep *et al.* Synthesis and molecular docking studies of some 4-phthalimidobenzenesulfonamide derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 13–19, 2017.

SUKUMAR, E. *et al.* An ursane diol from the leaves of *Pristimera grahamii*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 1, p. 275–276, 1995.

TAKIZAWA, Claire *et al.* Epidemiological and economic burden of Alzheimer's disease: A systematic literature review of data across Europe and the United States of America. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 43, n. 4, p. 1271–1284, 2014.

TANABE, Genzoh *et al.* Facile Synthesis of Neokotalanol, a Potent α -glycosidase Inhibitor Isolated from the Ayurvedic Traditional Medicine “*Salacia*”. *ACS Omega*, v. 4, n. 4, p. 7533–7542, 2019.

Referências bibliográficas

TANAKA, Reiko; MASUDA, Kimiyo; MATSUNAGA, Shunyo. Lup-20(29)-en-3 β ,15 α -diol and ocotillo-II from the stem bark of *Phyllanthus flexuosus*. *Phytochemistry*, v. 32, n. 2, p. 472–474, 1993.

TARAWNEH, Rawan; HOLTZMAN, David M. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 5, 2012.

THOMFORD, Nicholas Ekow *et al.* Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, e1578, 2018.

VENTURA, Ana L.M. *et al.* Sistema colinérgico: Revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista de Psiquiatria Clinica*, v. 37, n. 2, p. 74–80, 2010.

WANG, Yan *et al.* Chemical constituents from *Salacia amplifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 39, n. 3, p. 205–208, 2011.

WANI, M. C. *et al.* Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1971.

WRIGHT, Gerard D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. *Microbial Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 55–57, 2019.

WU, Hai Bo *et al.* Eudesmanolides and guaianolides from *Carpesium triste*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 97, n. 1, p. 88–94, 2014.

WU, Haiyan *et al.* Pristimerin induces apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells via G 1 phase arrest and MAPK/ErK1/2 and AKt signaling inhibition. *Oncology Letters*, v. 17, n. 3, p. 3017–3025, 2019.

XIAO, Sulong *et al.* Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. *Medicinal Research Reviews*, v. 38, n. 3, p. 951–976, 2018.

XU, Congcong *et al.* Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in

medicinal plants. *Journal of Separation Science*, v. 41, n. 1, p. 6–19, 2018.

YAMASHITA, Hiroshi *et al.* Four new triterpenoids from the bark of *Euonymus alatus* forma ciliato-dentatus. *Phytochemistry Letters*, v. 31, p. 140–146, 2019.

YOUSEF, Bashir A. *et al.* Pristimerin exhibits *in vitro* and *in vivo* anticancer activities through inhibition of nuclear factor- κ B signaling pathway in colorectal cancer cells. *Phytomedicine*, v. 40, p. 140–147, 2018.

YOUSEF, Bashir A. *et al.* Pristimerin inhibits proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 79, p. 112–119, 2016.

YU, Mei Hua *et al.* Triterpenoids and α -glucosidase inhibitory constituents from *Salacia hainanensis*. *Fitoterapia*, v. 98, p. 143–148, 2014.

YUAN, Renyikun *et al.* Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1401, n. 1, p. 19–27, 2017.

ZHANG, Jian *et al.* Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron Letters*, v. 46, n. 13, p. 2337–2340, 2005.

ZOU, Junjie *et al.* Ursolic Acid in Cancer Treatment and Metastatic Chemoprevention: From Synthesized Derivatives to Nanoformulations in Preclinical Studies. *Current Cancer Drug Targets*, v. 19, n. 4, p. 245–256, 2018.

APÊNDICE A – ESPECTROS

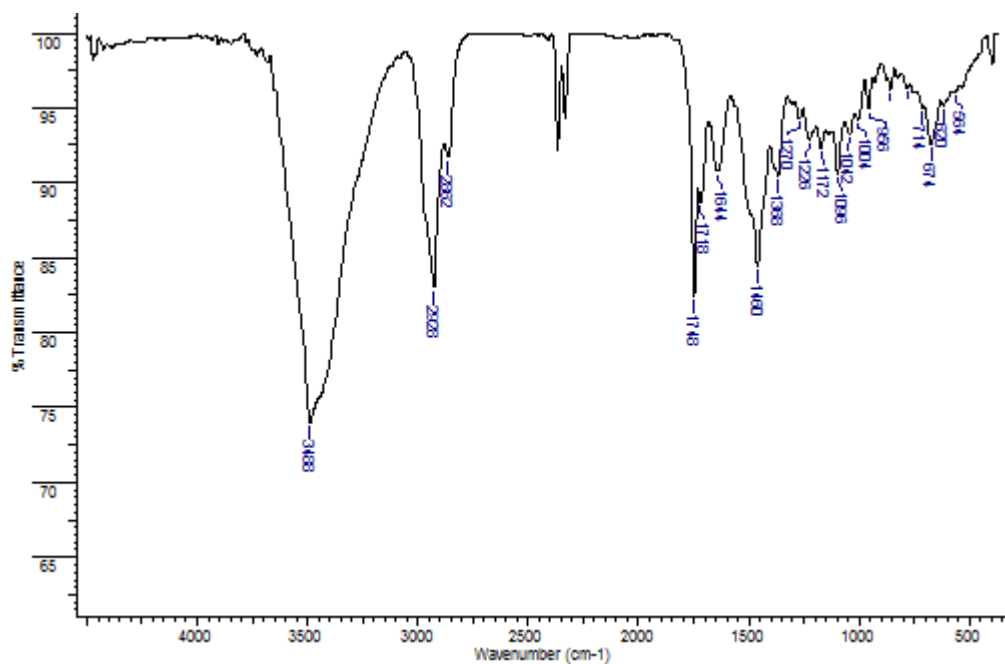


Figura A1: Espectro de absorção na região do IV de SC01 (KBr).

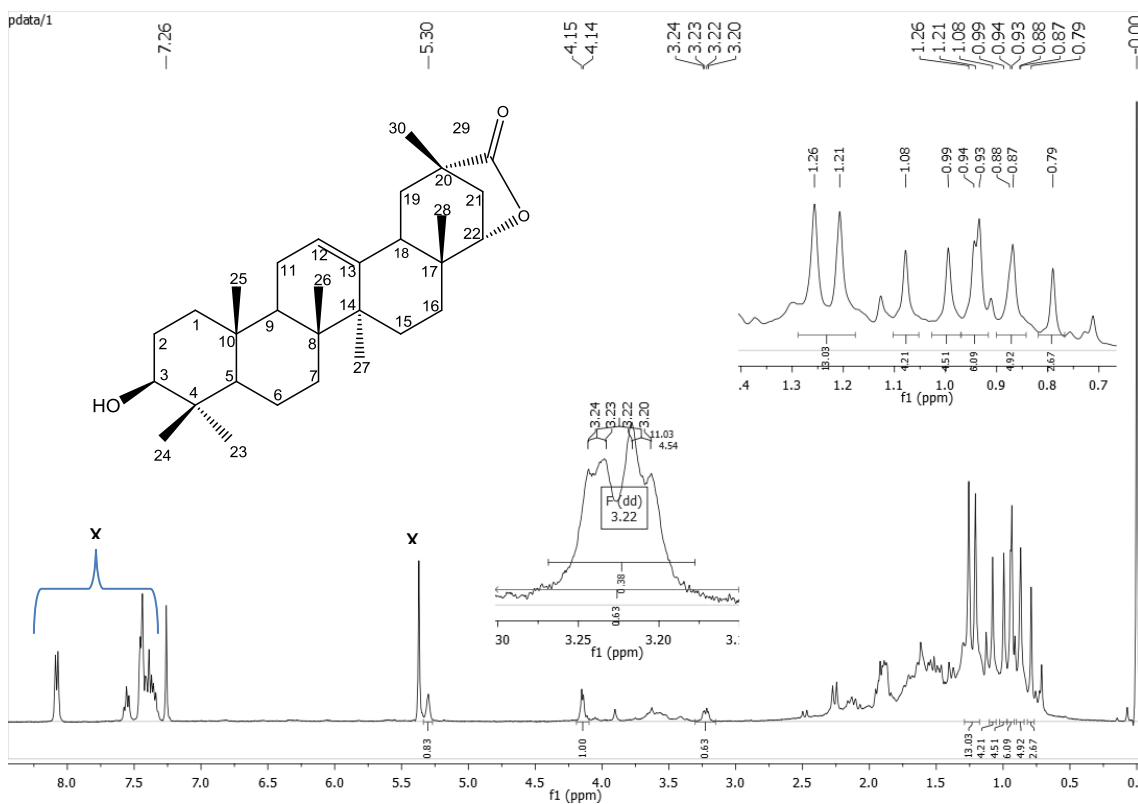


Figura A2: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3). X: impurezas.

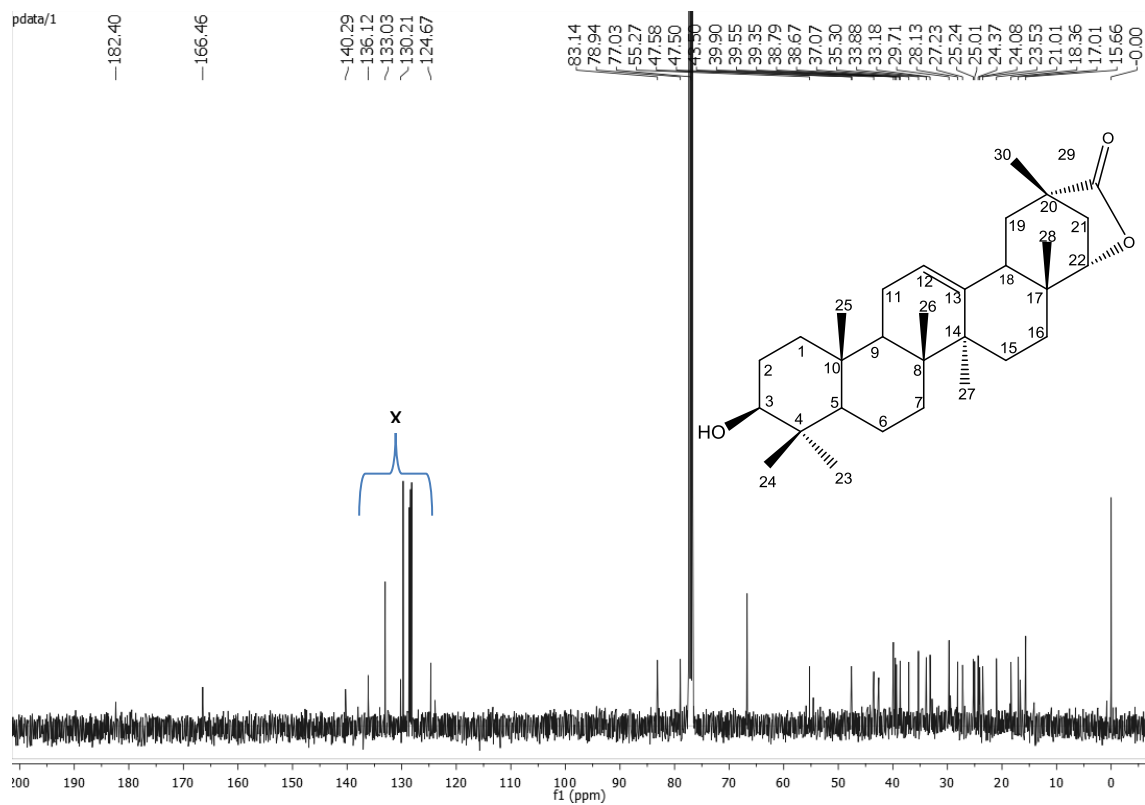


Figura A3: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de SC01 em CDCl_3 . X: impurezas.

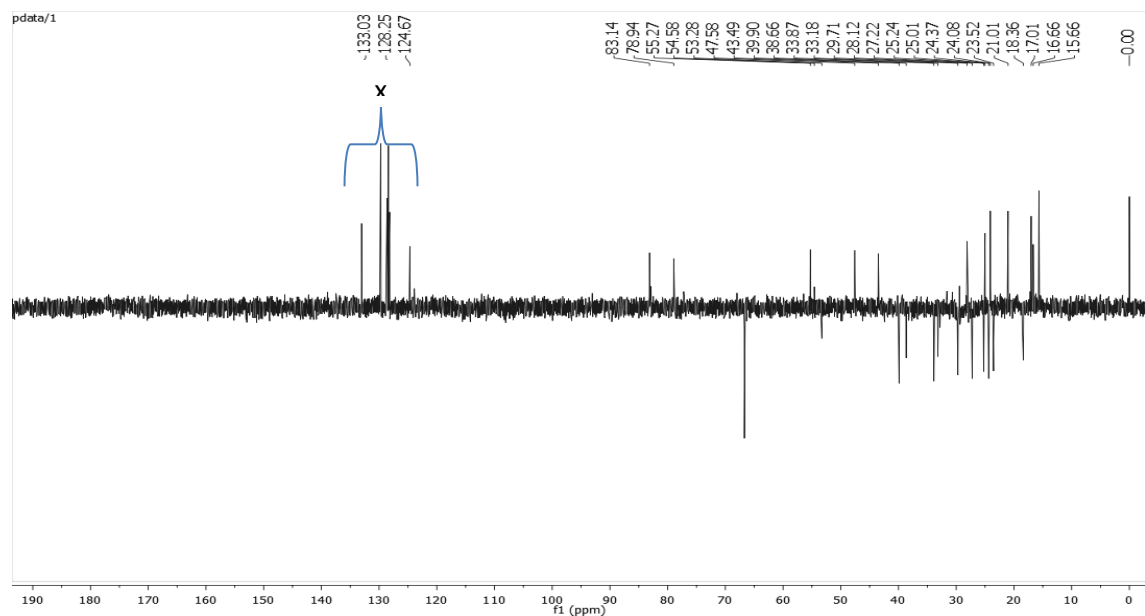


Figura A4: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de SC01 em CDCl_3 . X: impurezas.

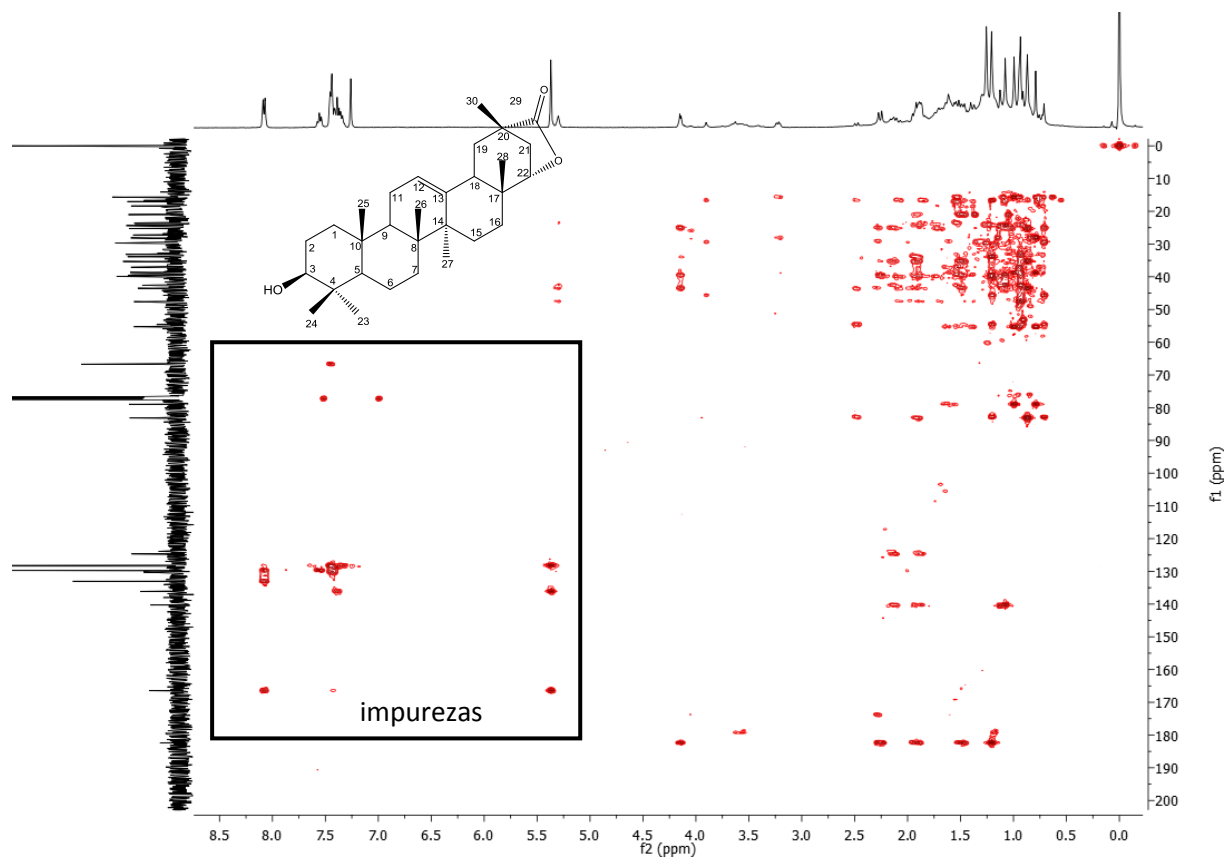


Figura A5: Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) de SC01.

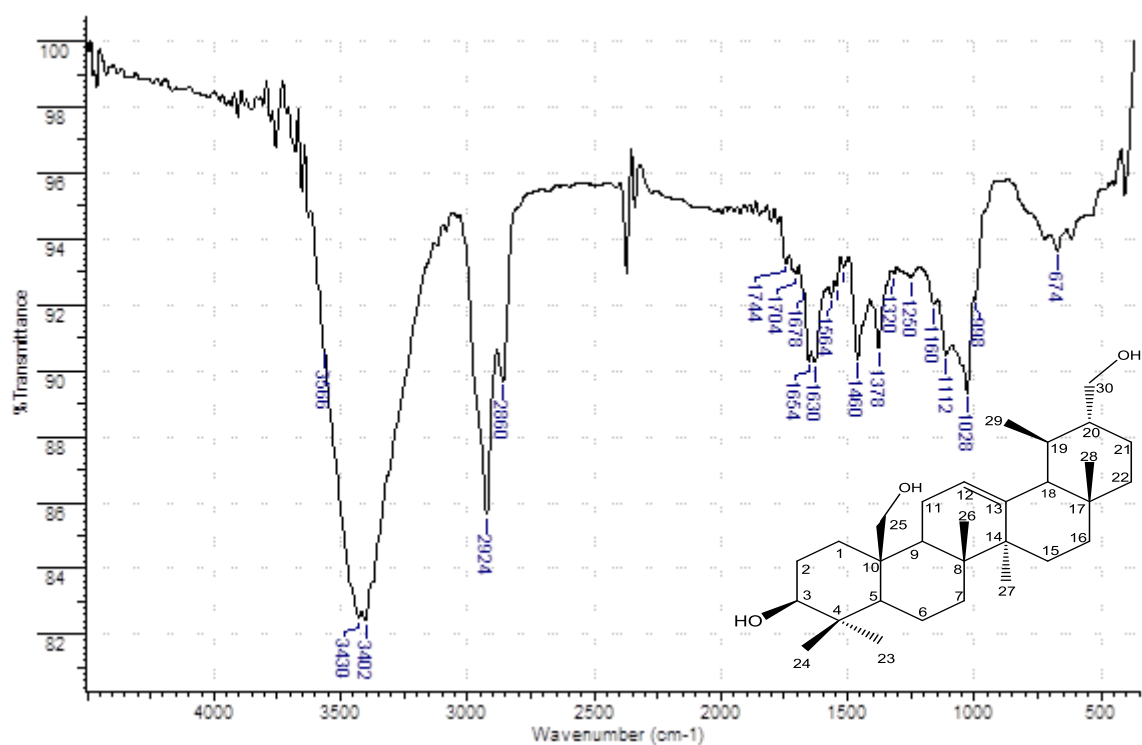


Figura A6: Espectro de absorção na região do IV de SC02 (KBr).

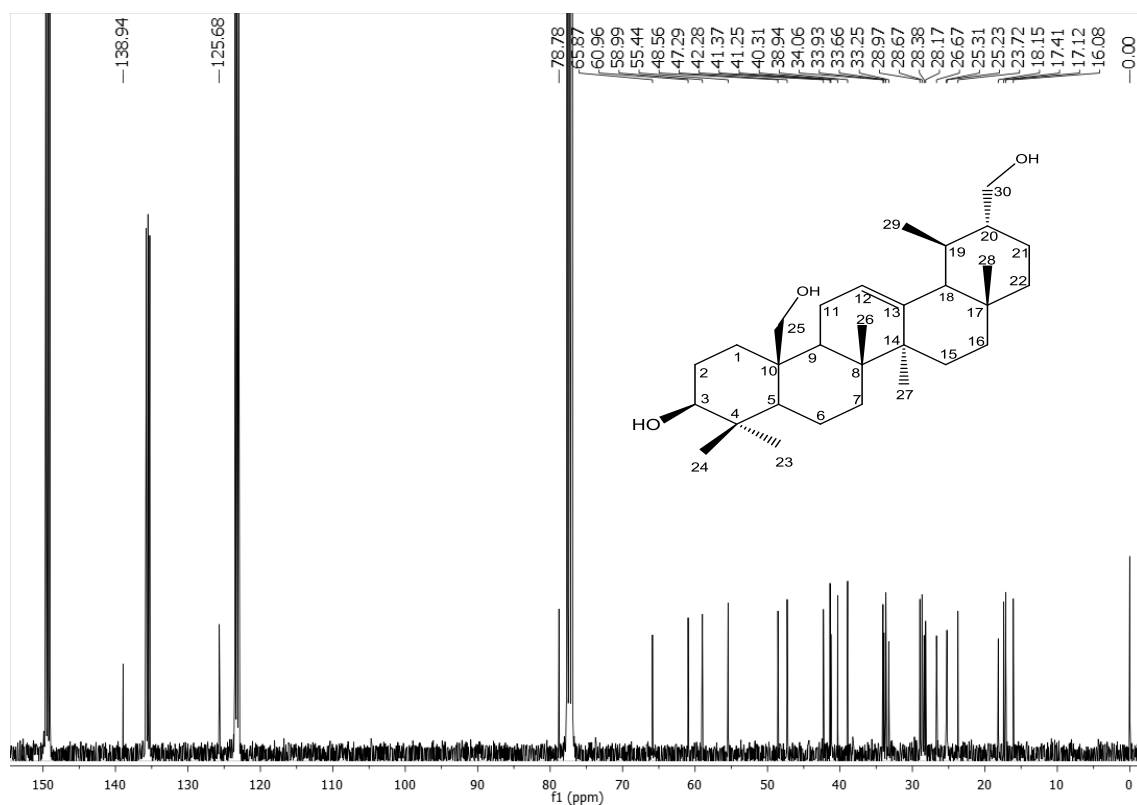


Figura A9: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC02.

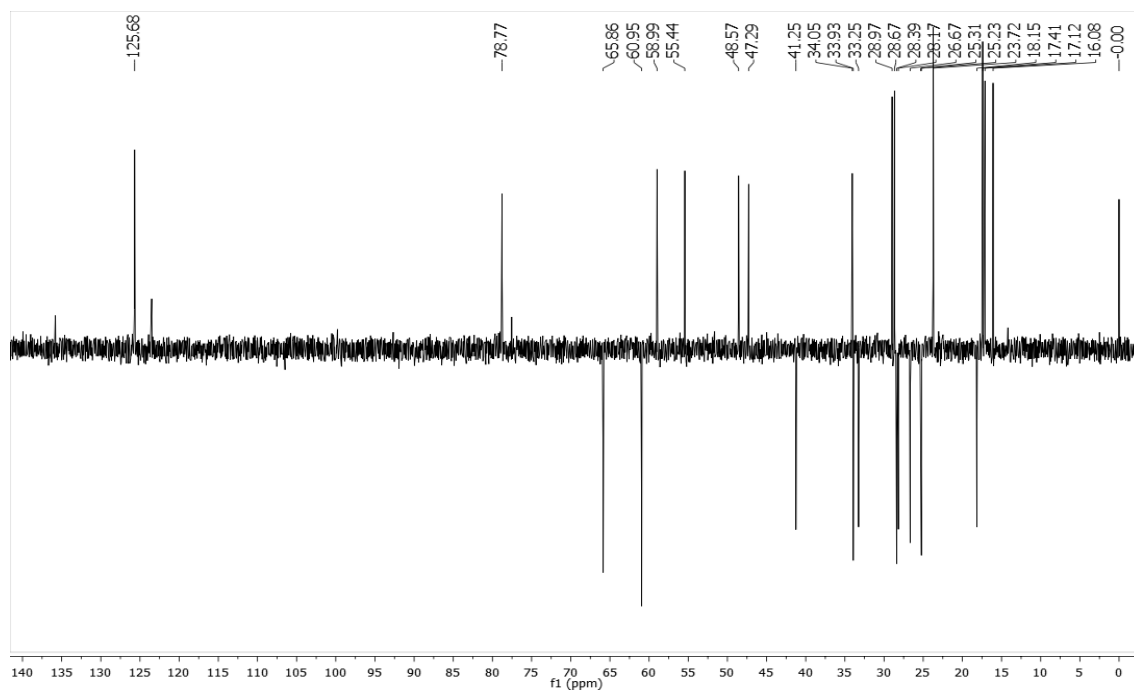


Figura A10: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC02.

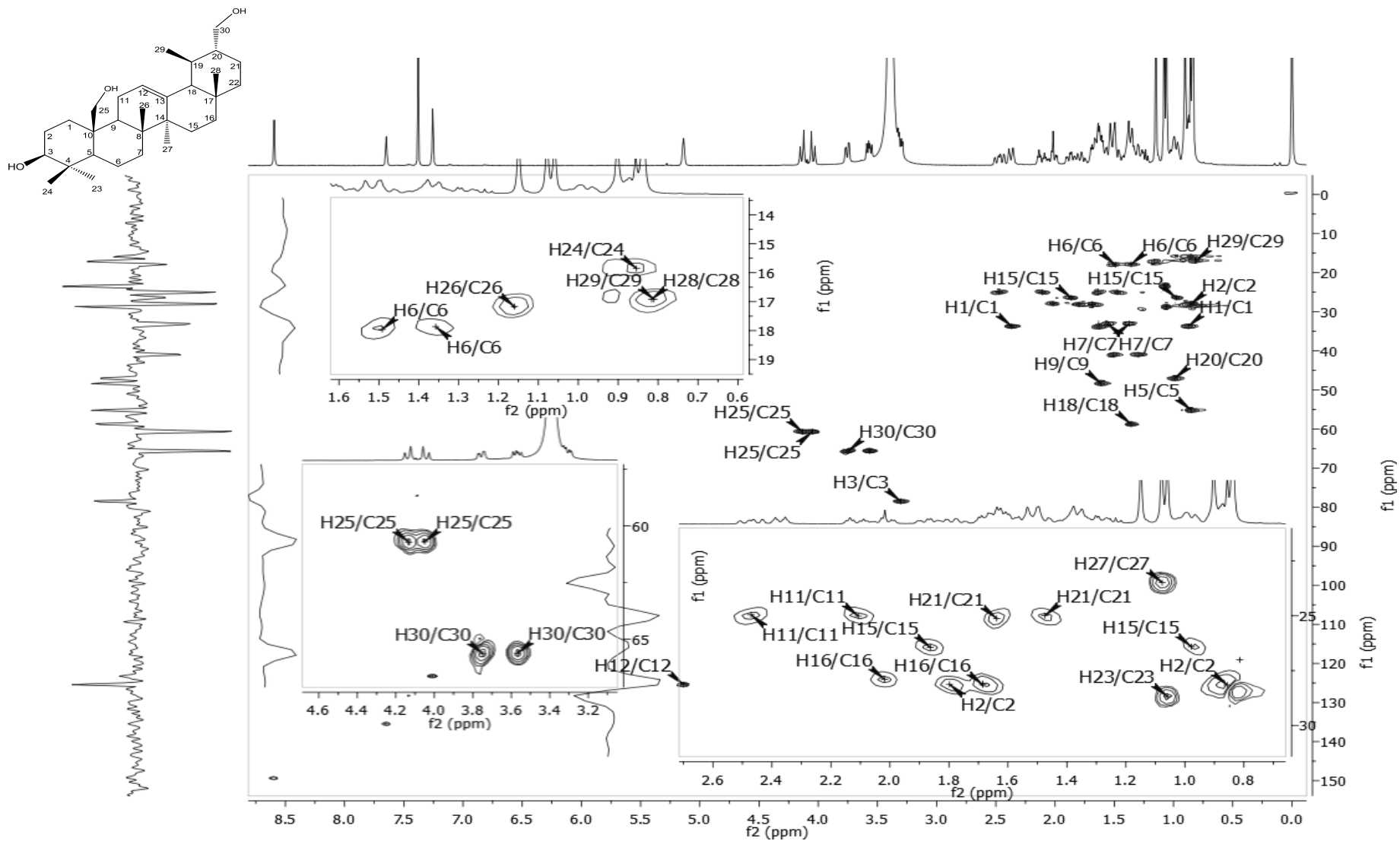
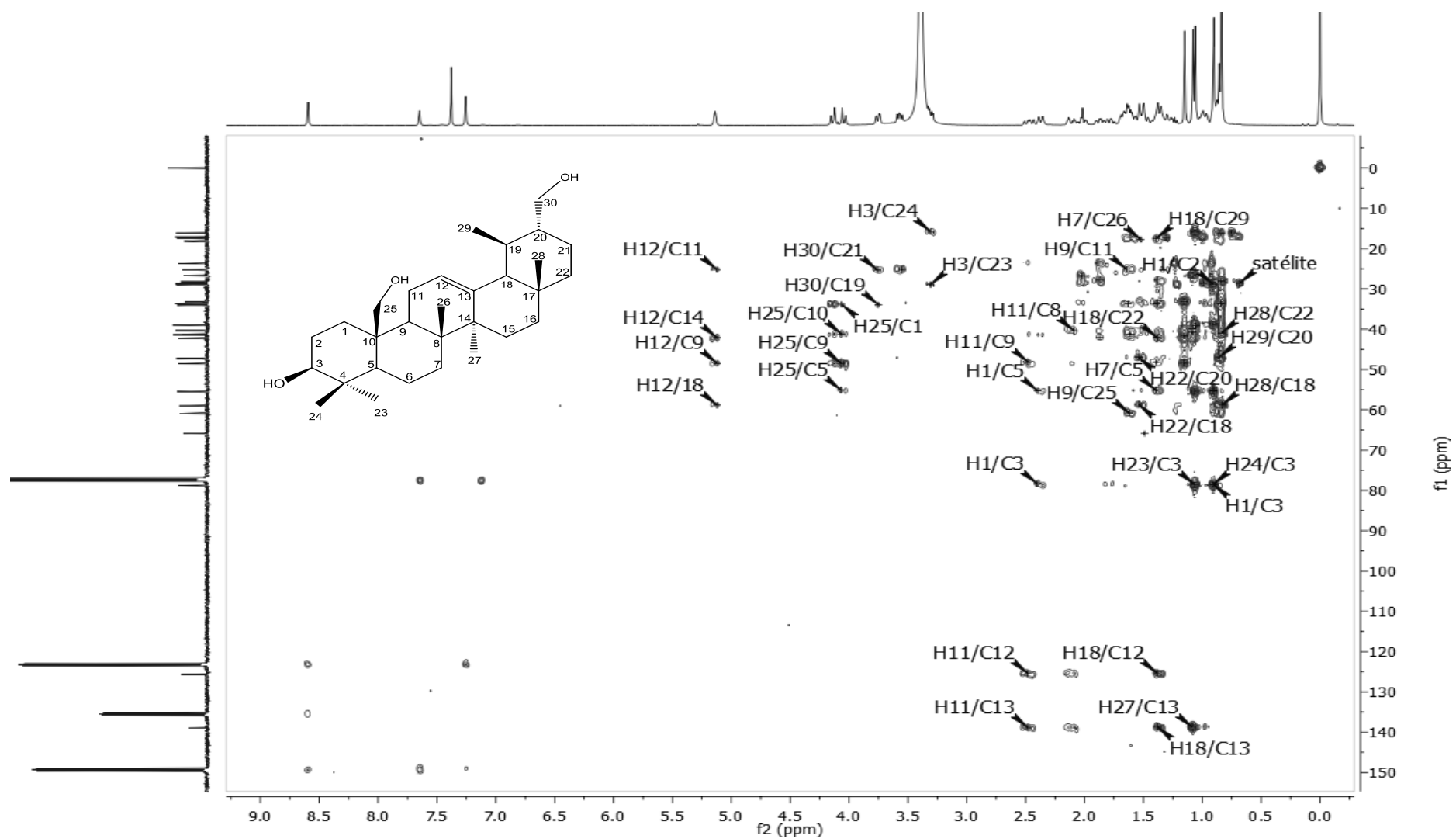


Figura A11: Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC02.



A12: Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC02.

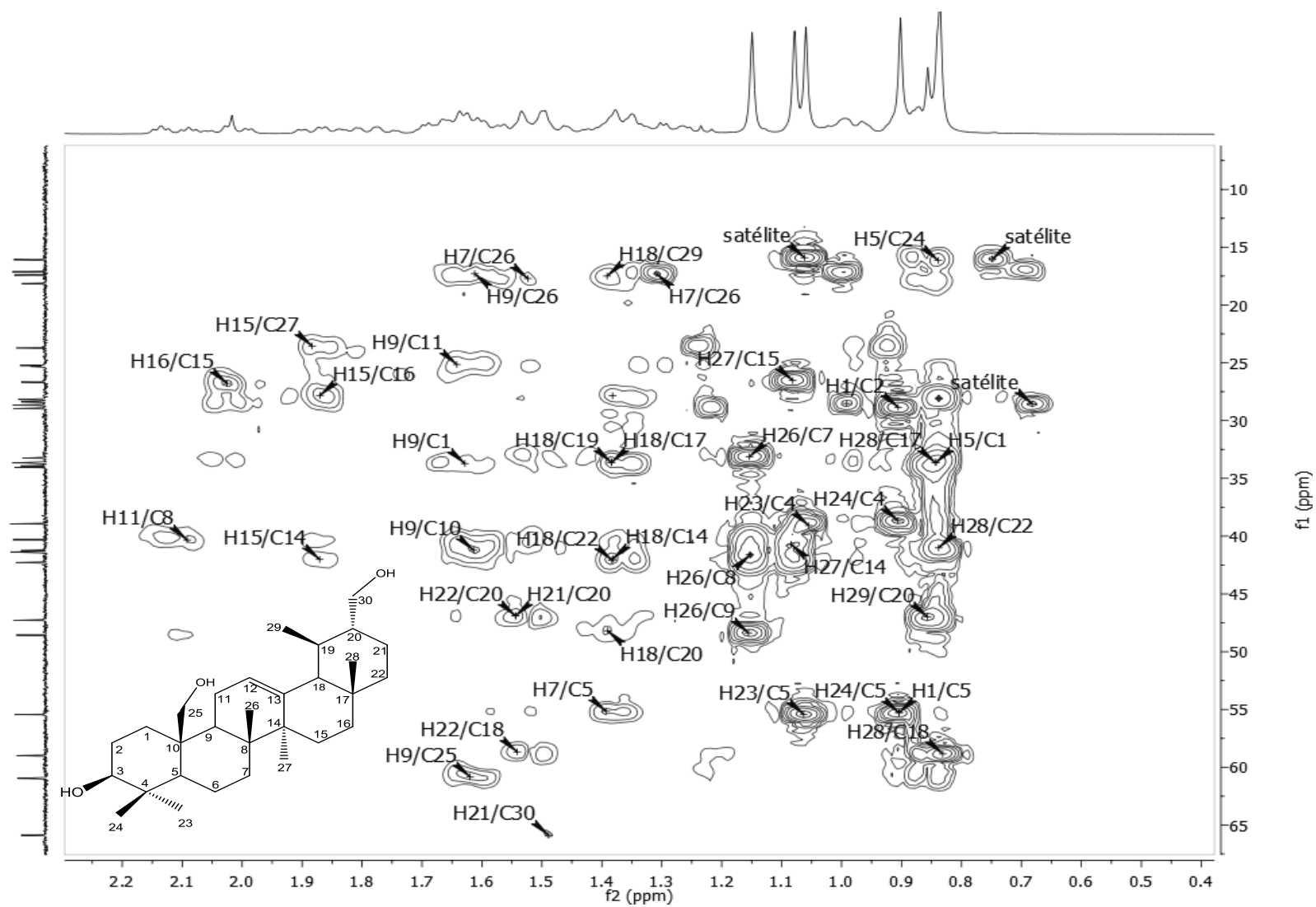


Figura A13: Expansão do Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de **SC02**.

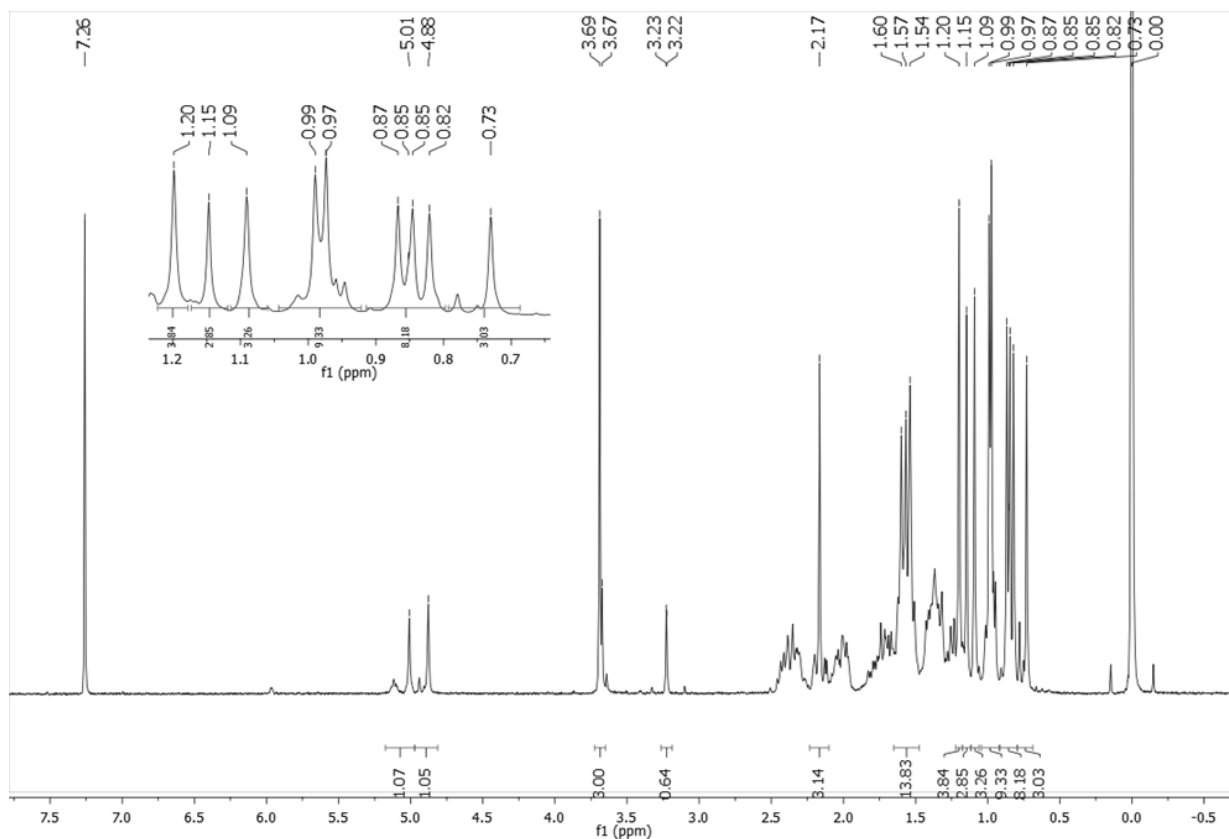


Figura A16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC03.

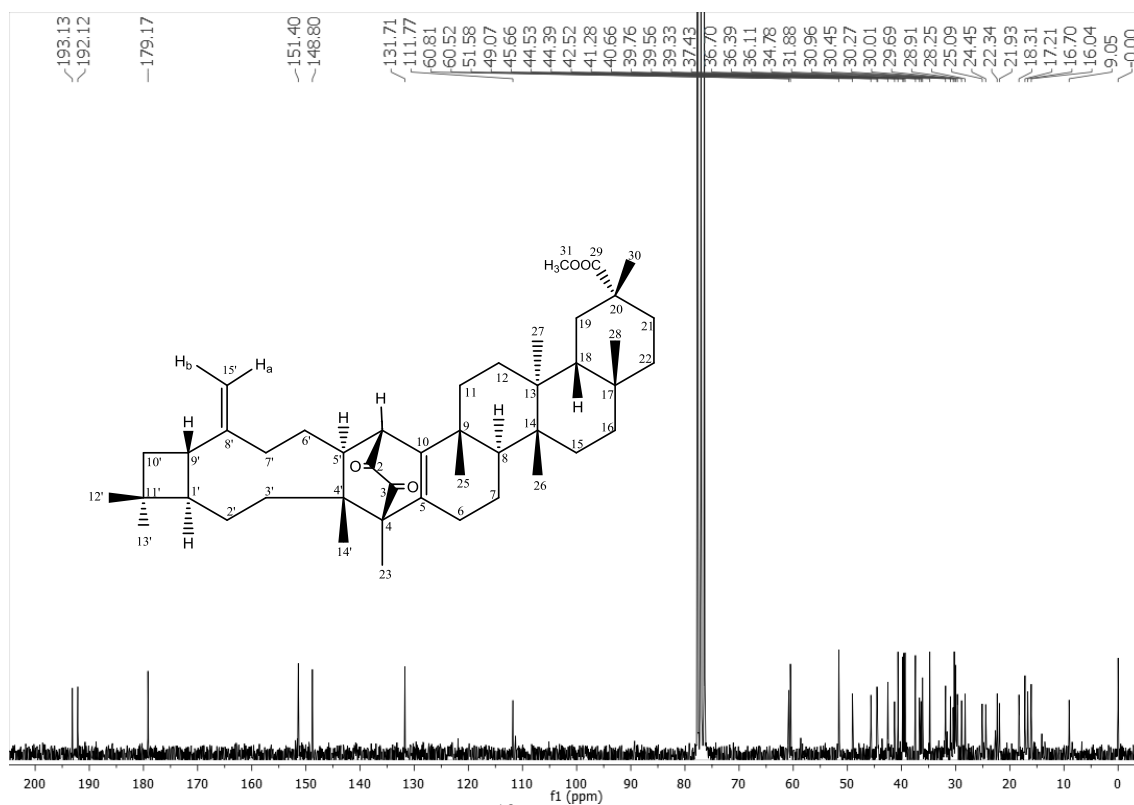


Figura A17: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC03.

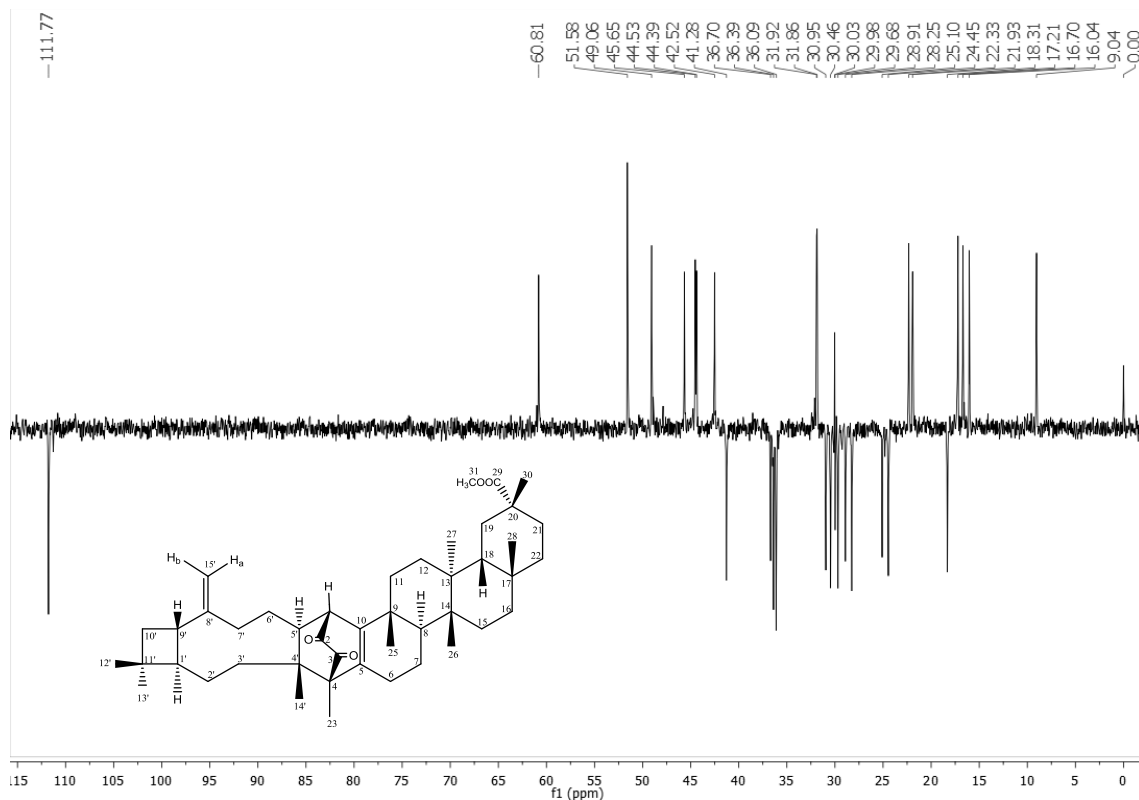


Figura A18: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC03.

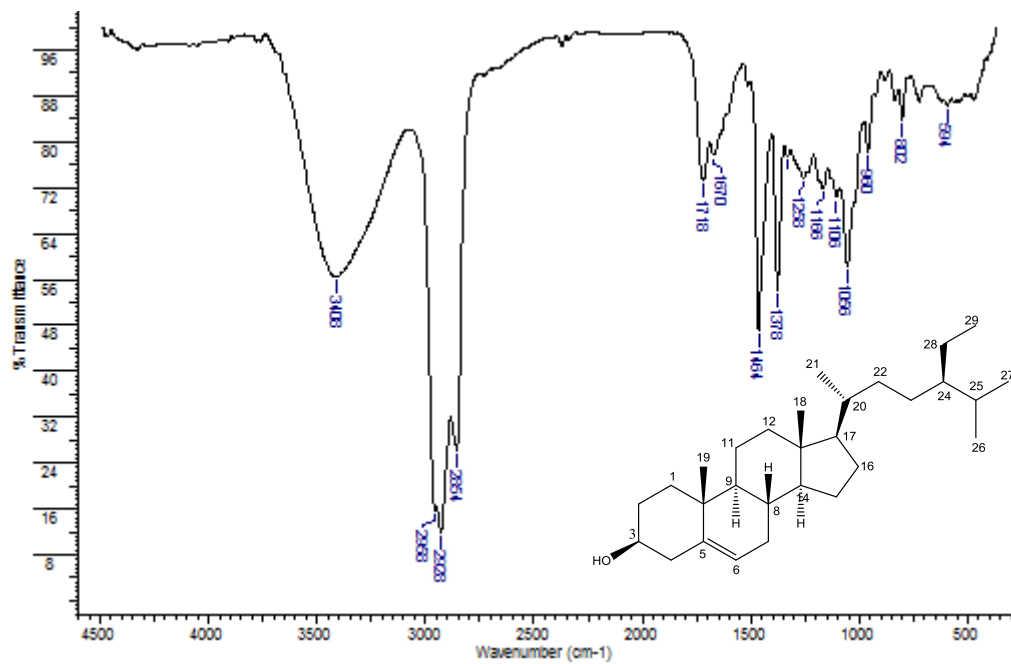


Figura A19: Espectro de absorção na região do IV de SC04 (KBr).

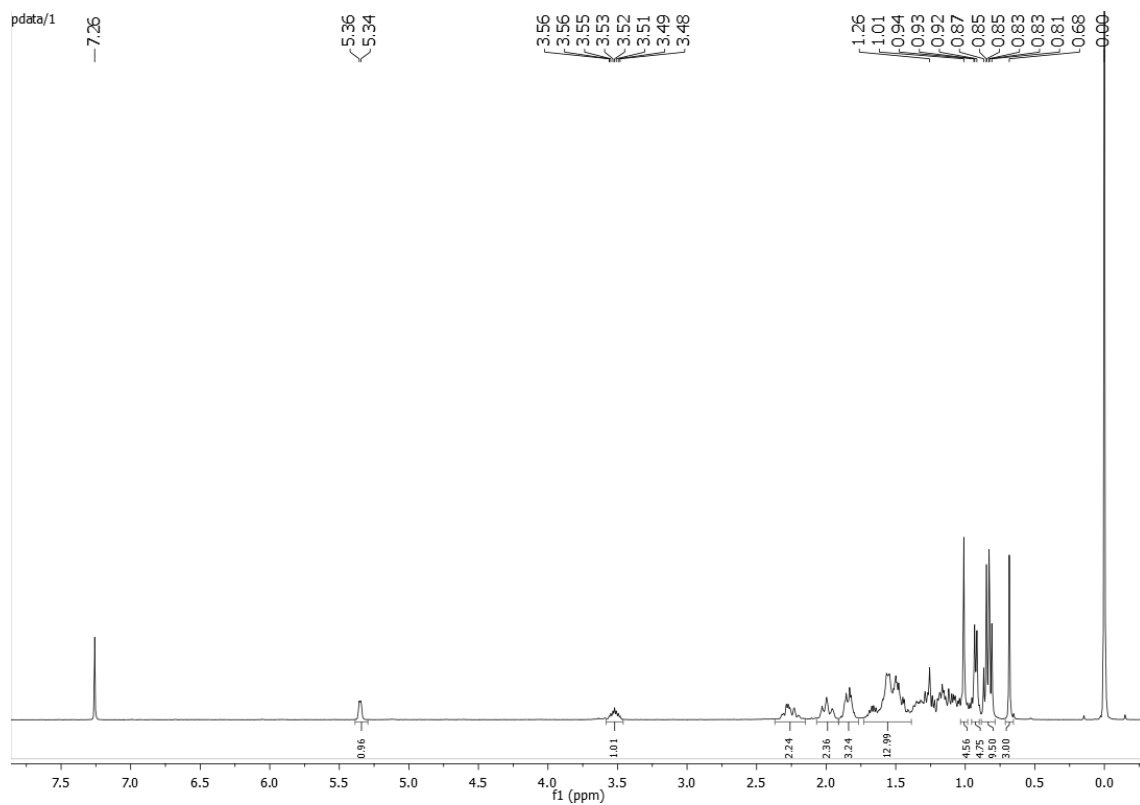


Figura A20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC04.

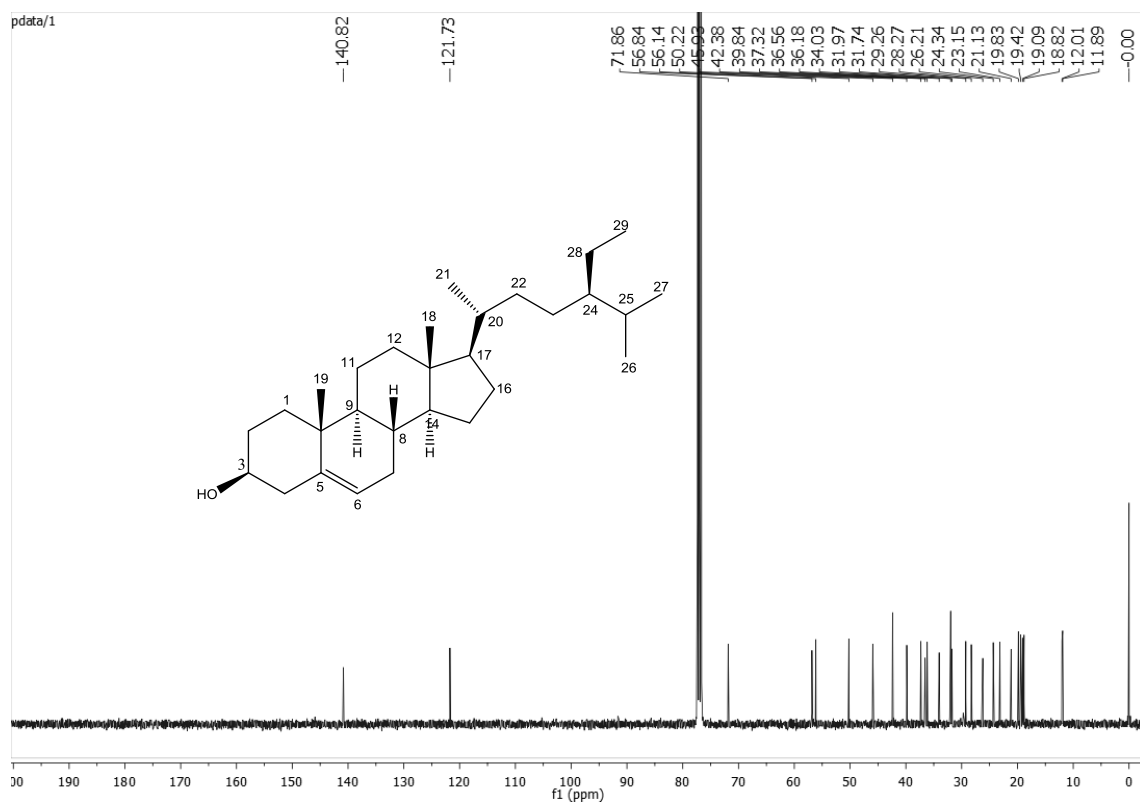


Figura A21: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC04.

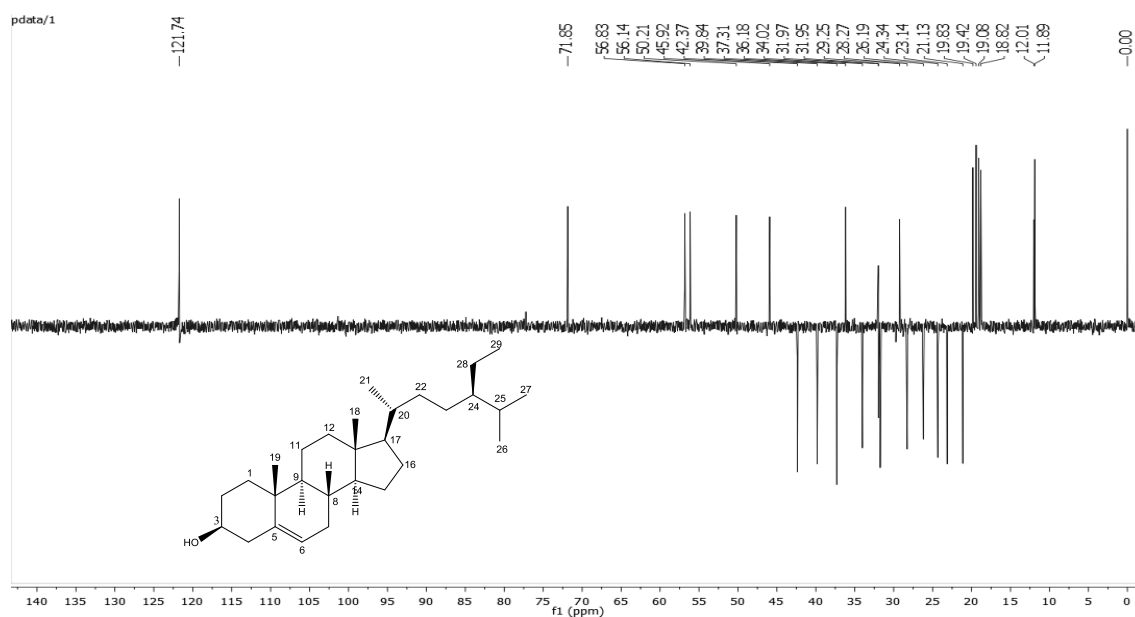


Figura A22: Espectro de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC04.

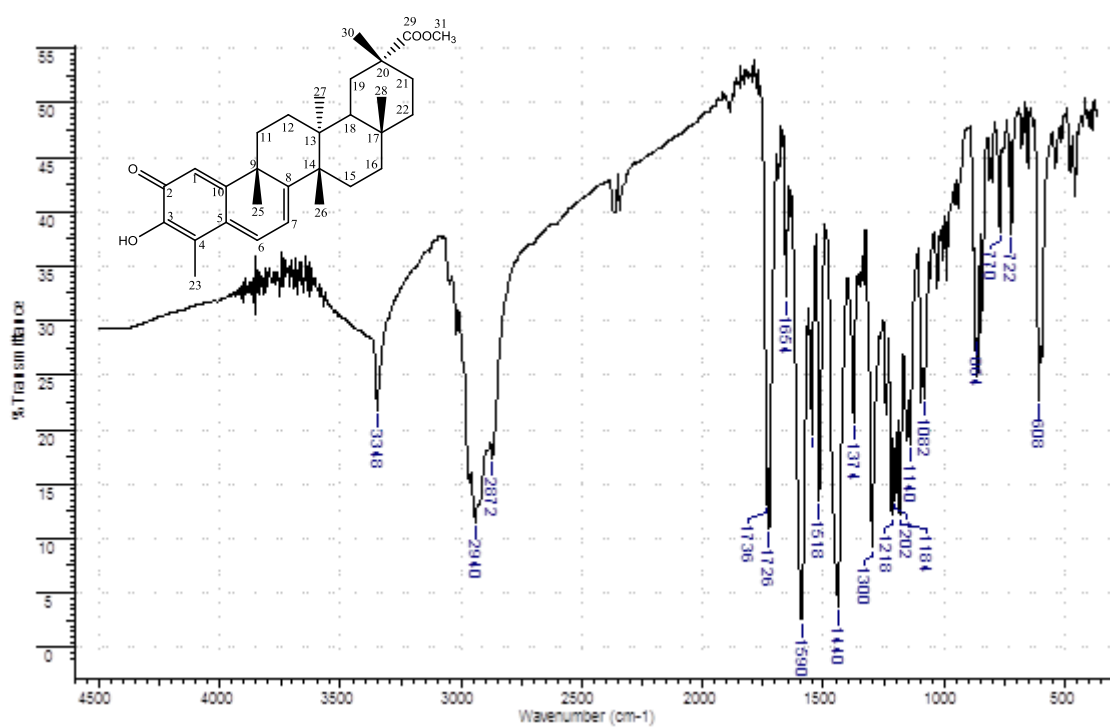


Figura A23: Espectro de absorção na região do IV de SC05 (KBr).

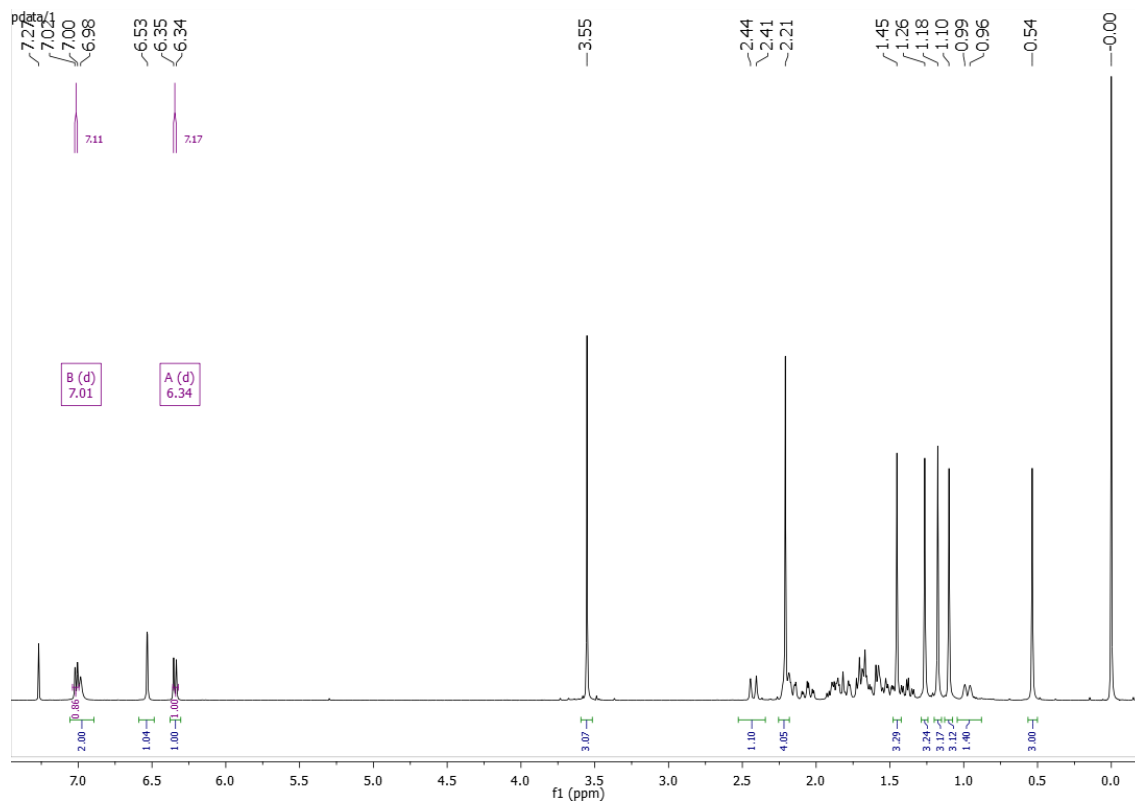


Figura A24: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC05.

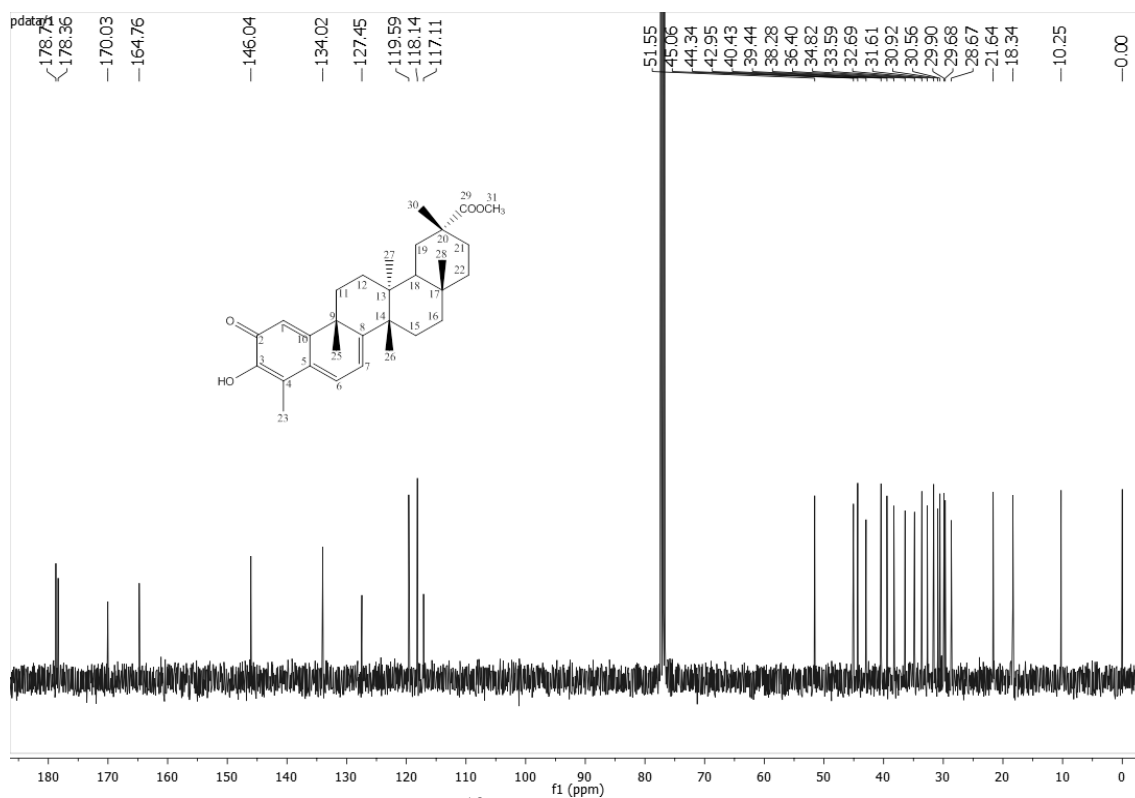


Figura A25: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC05.

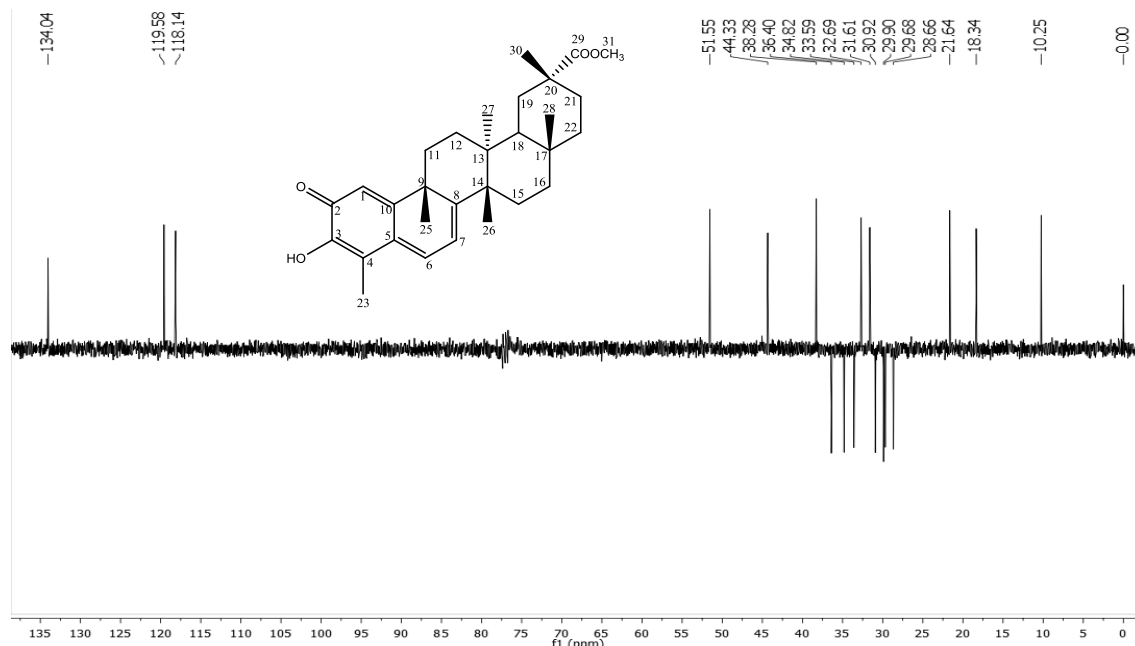


Figura A26: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC05.

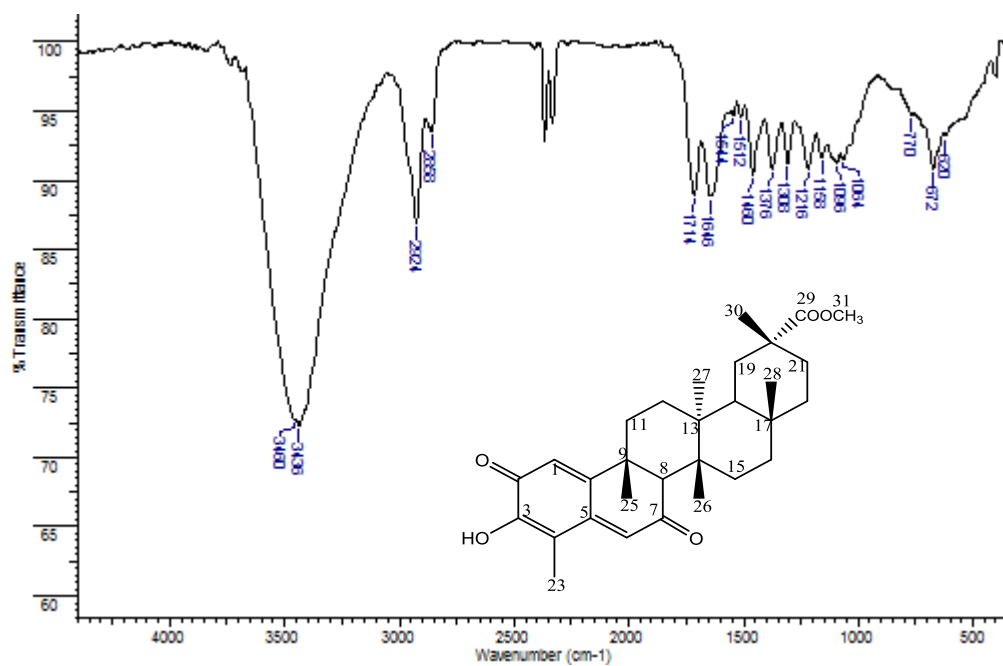


Figura A27: Espectro de absorção na região do IV de SC06 (KBr).

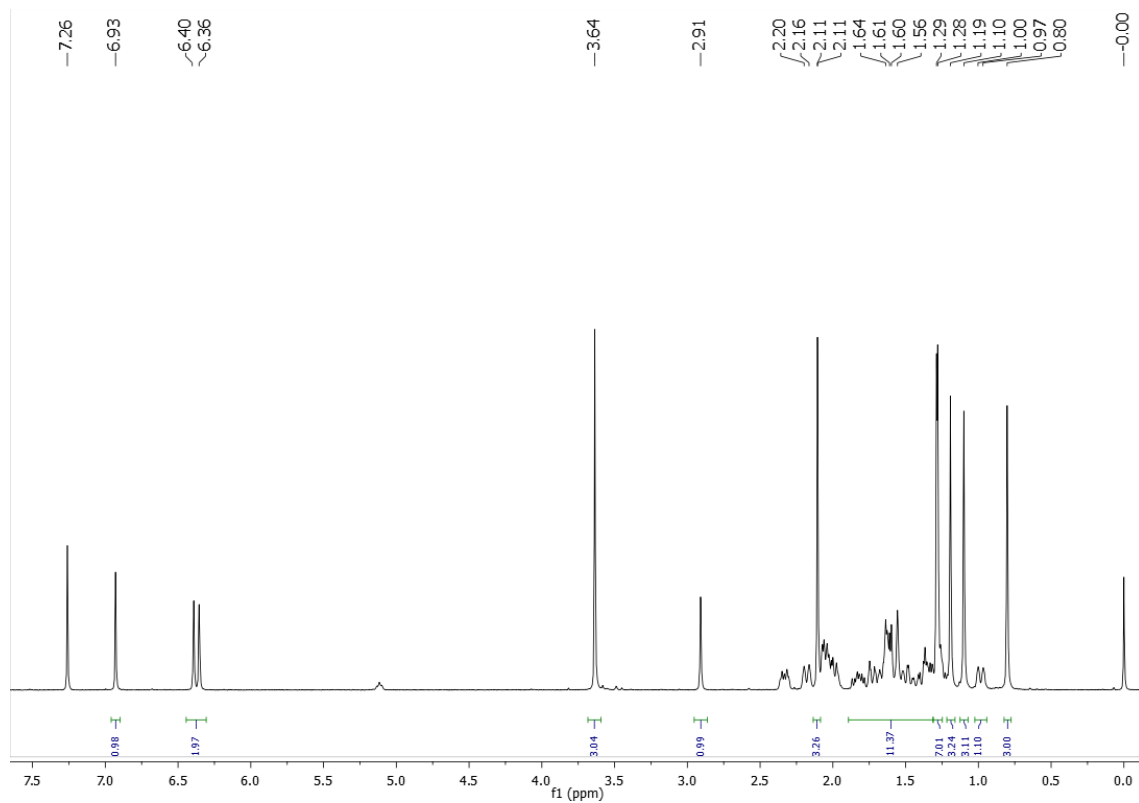


Figura A28: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC06.

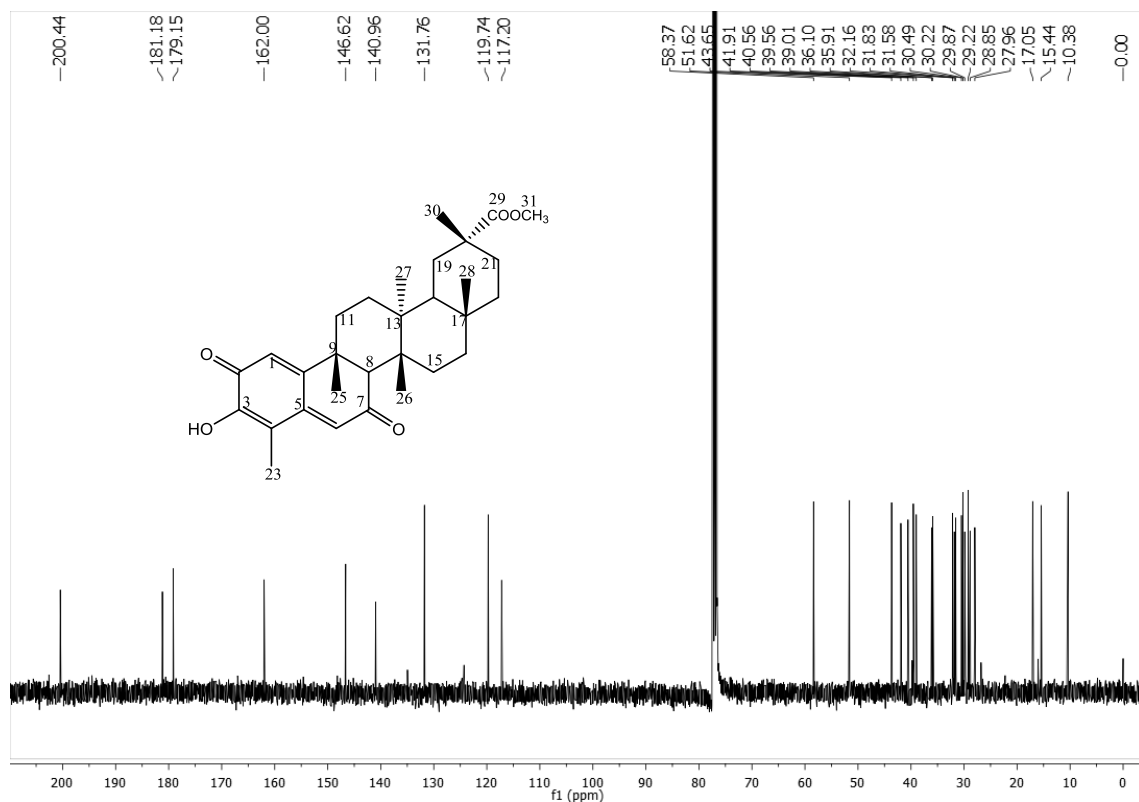


Figura A29: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC06.

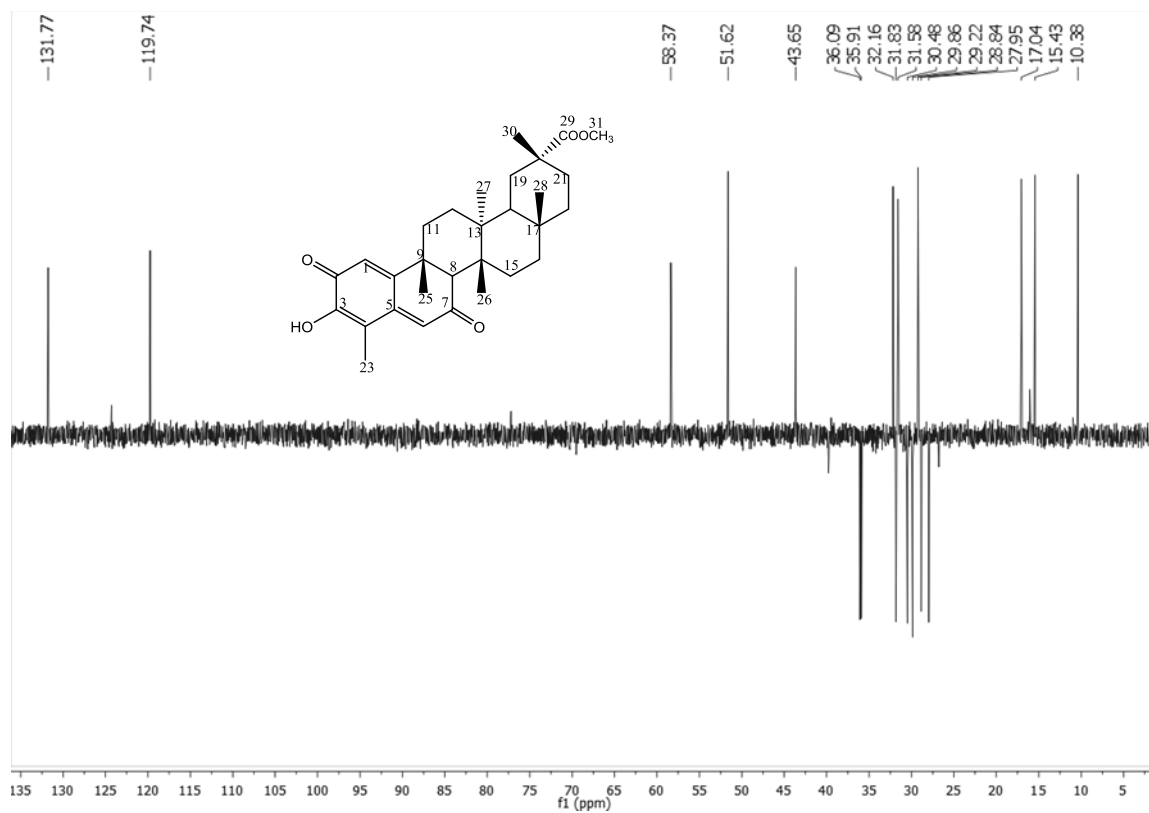


Figura A30: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) de SC06.

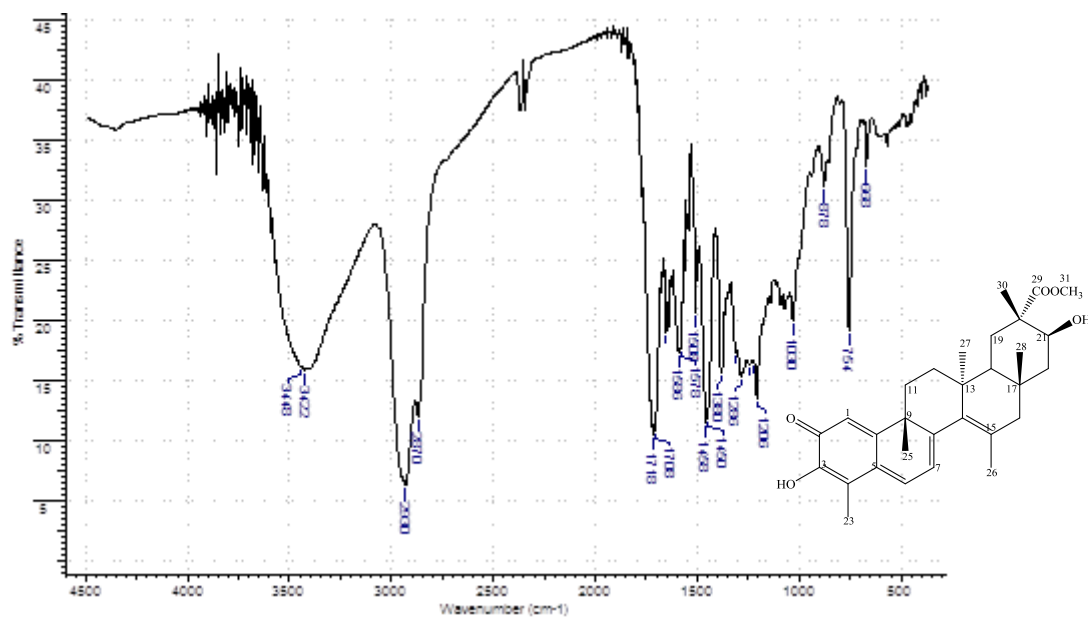


Figura A31: Espectro de absorção na região do IV de SC07 (KBr).

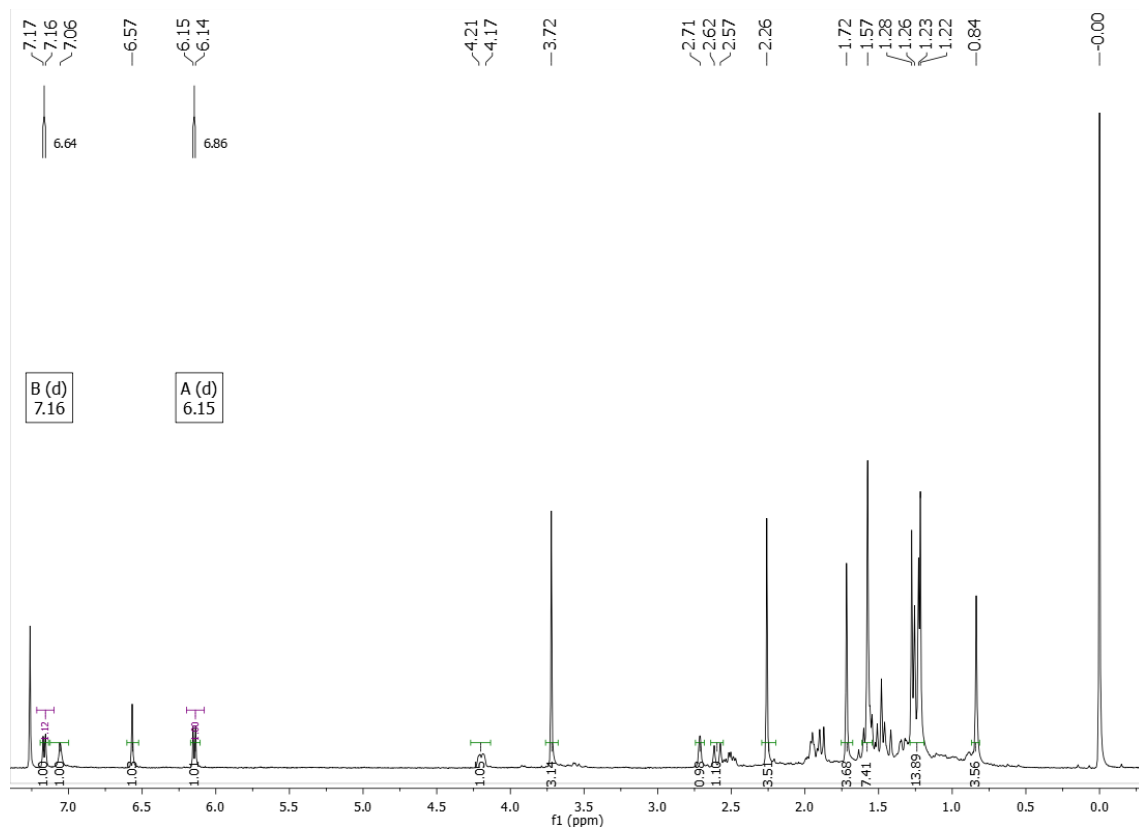


Figura A32: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC07.

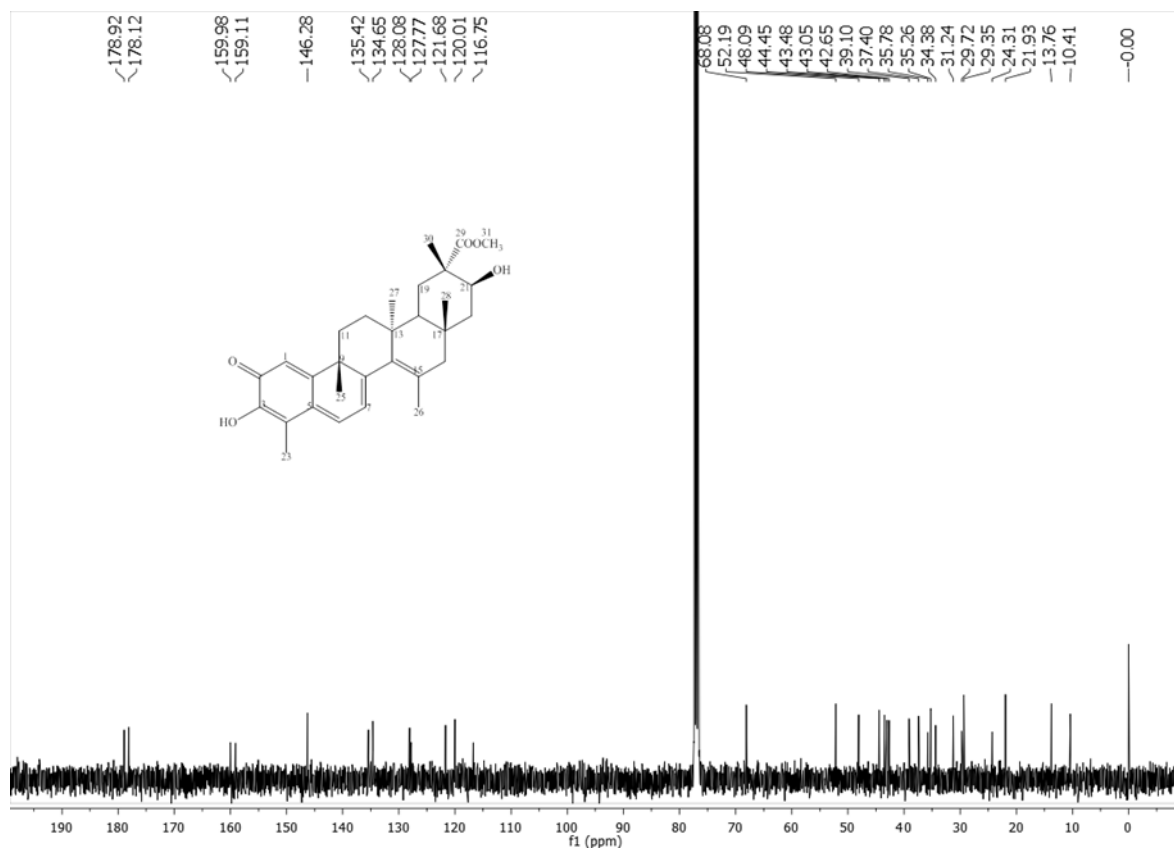


Figura A33: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC07.

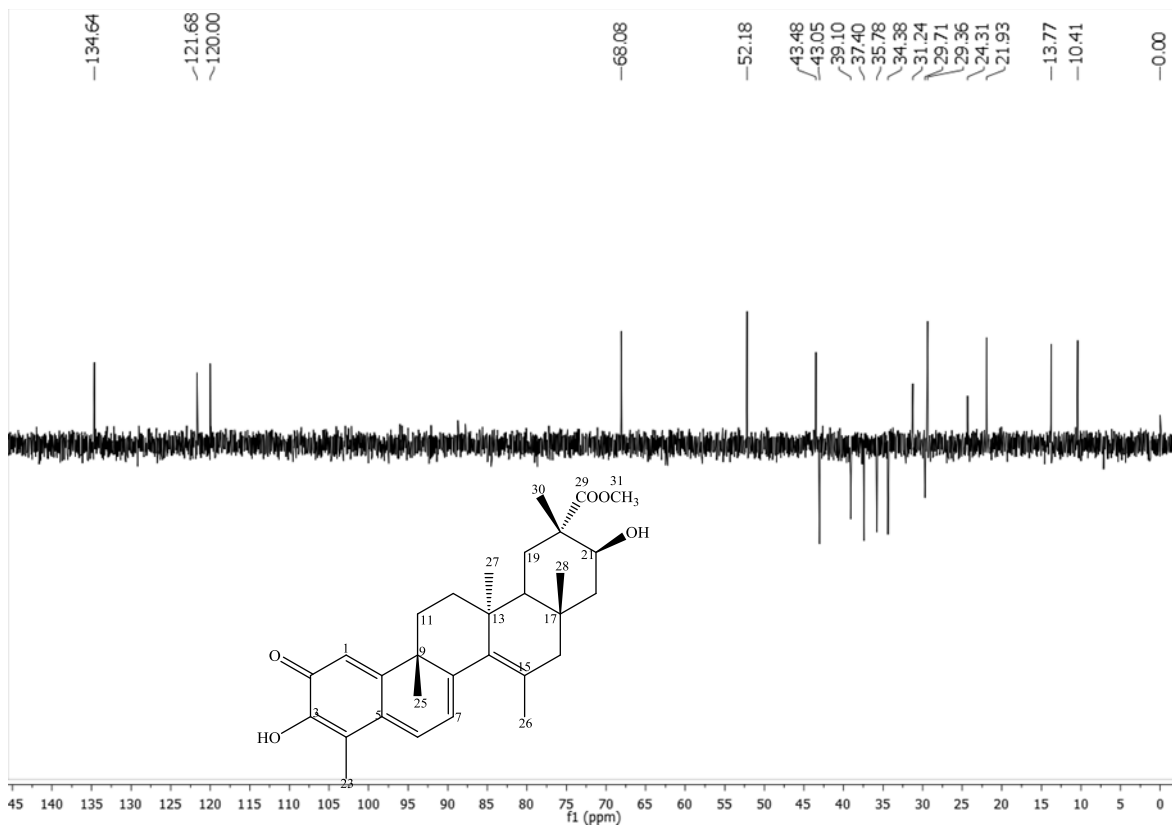


Figura A34: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC07.

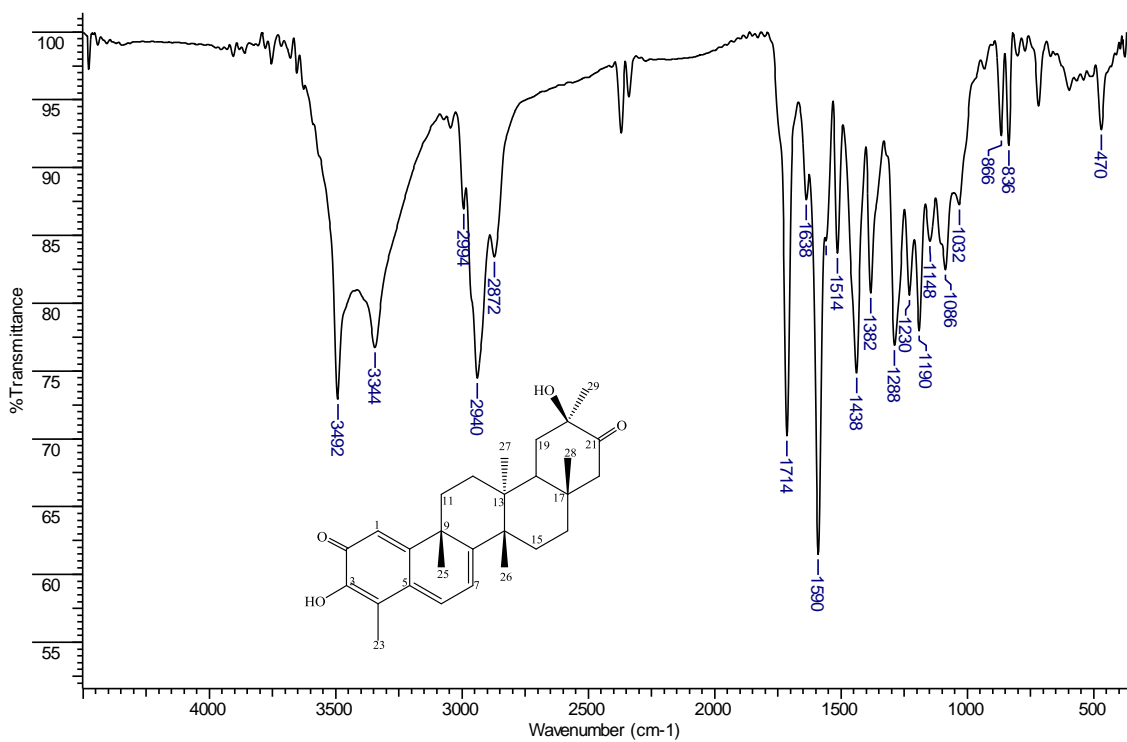


Figura A35: Espectro de absorção na região do IV de SC08 (KBr).

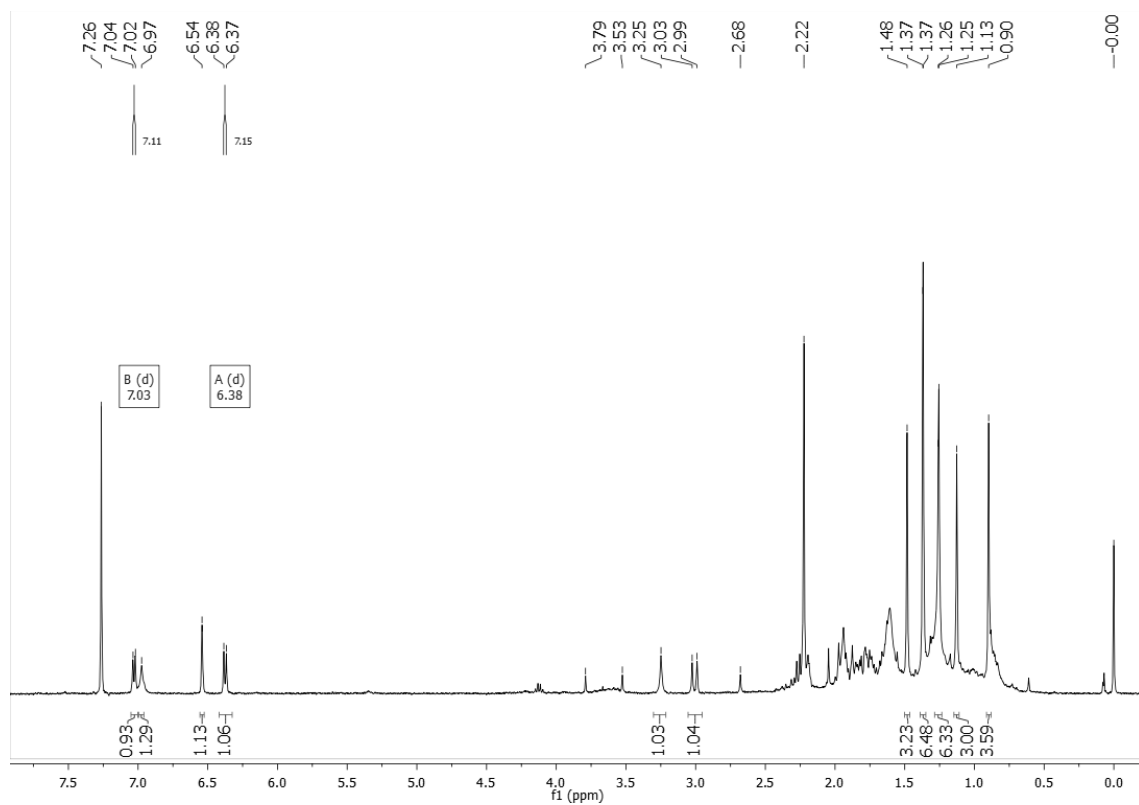


Figura A36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC08.

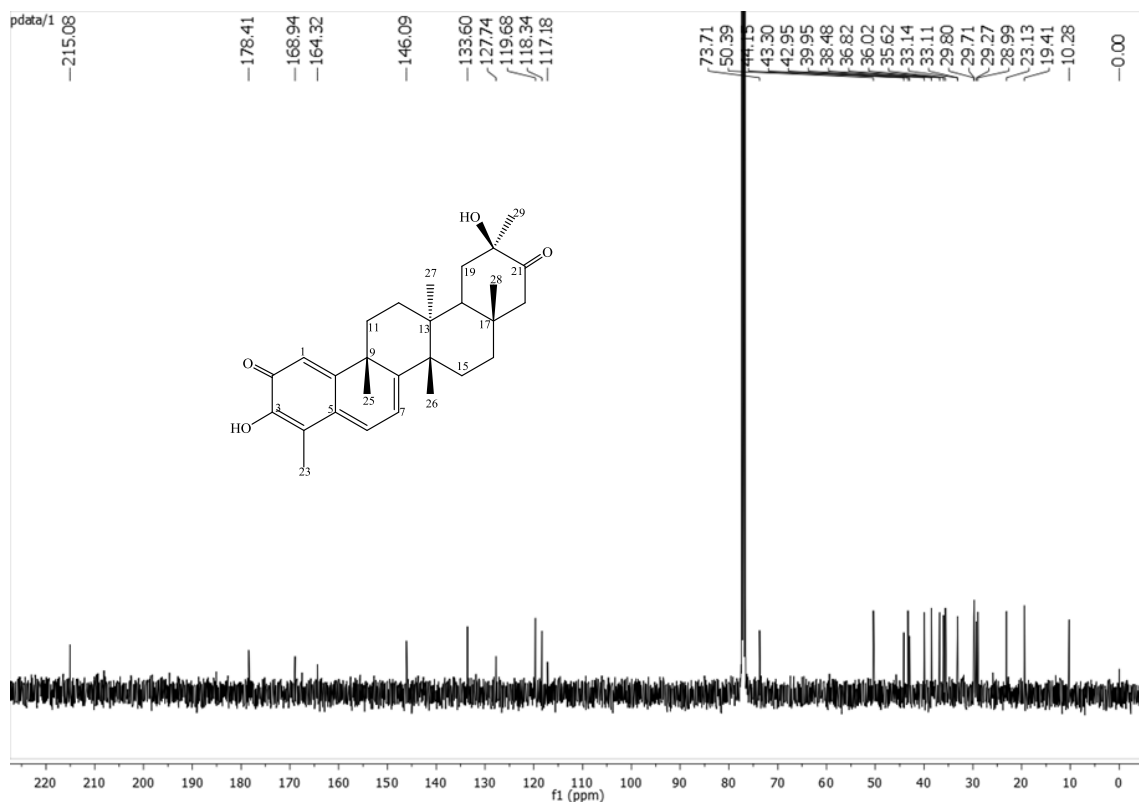


Figura A37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC08.

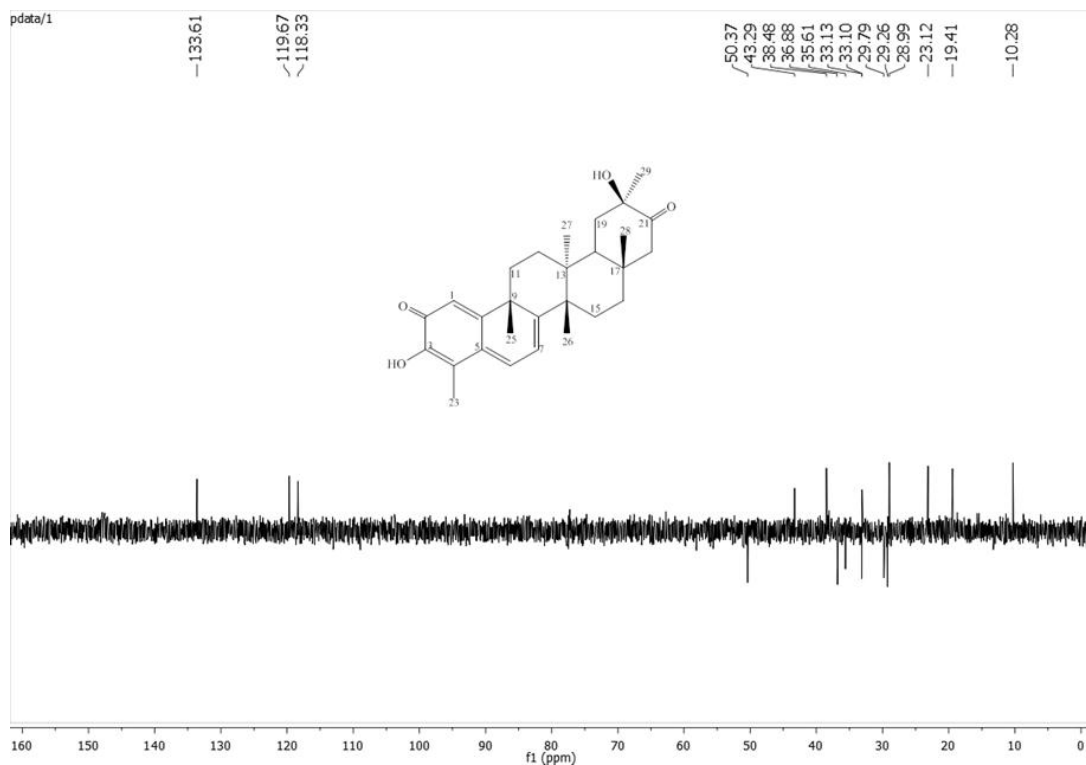


Figura A38: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC08.

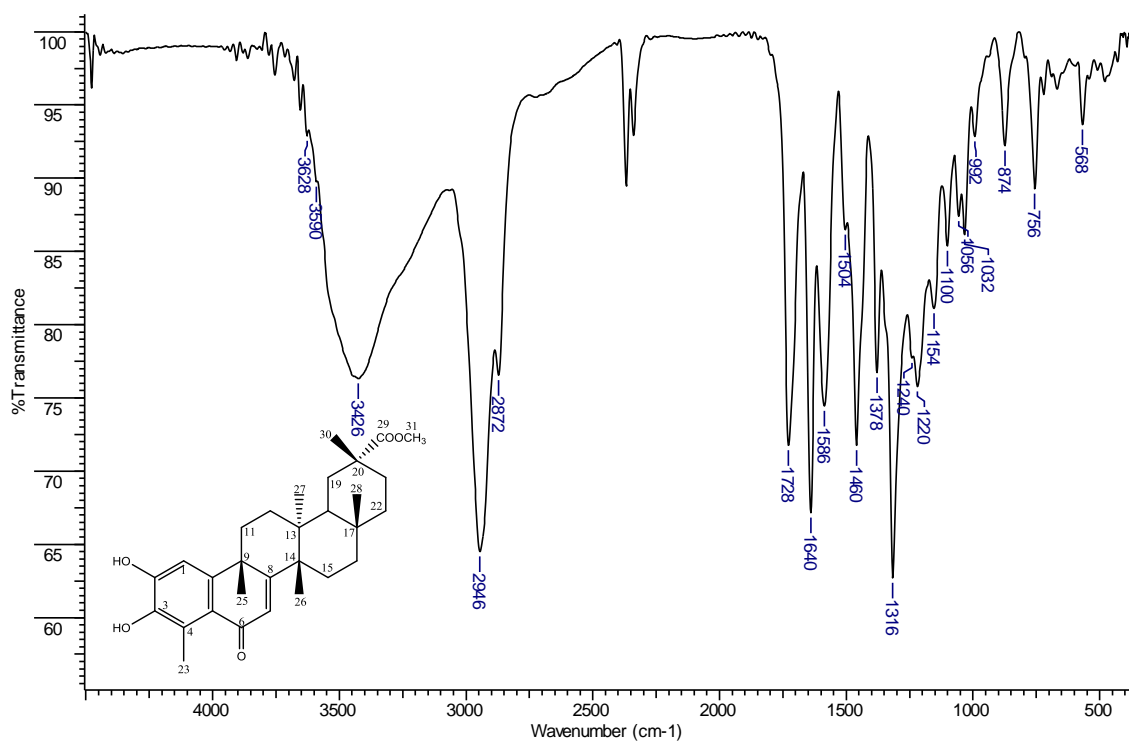


Figura A39: Espectro de absorção na região do IV de SC09 (KBr).

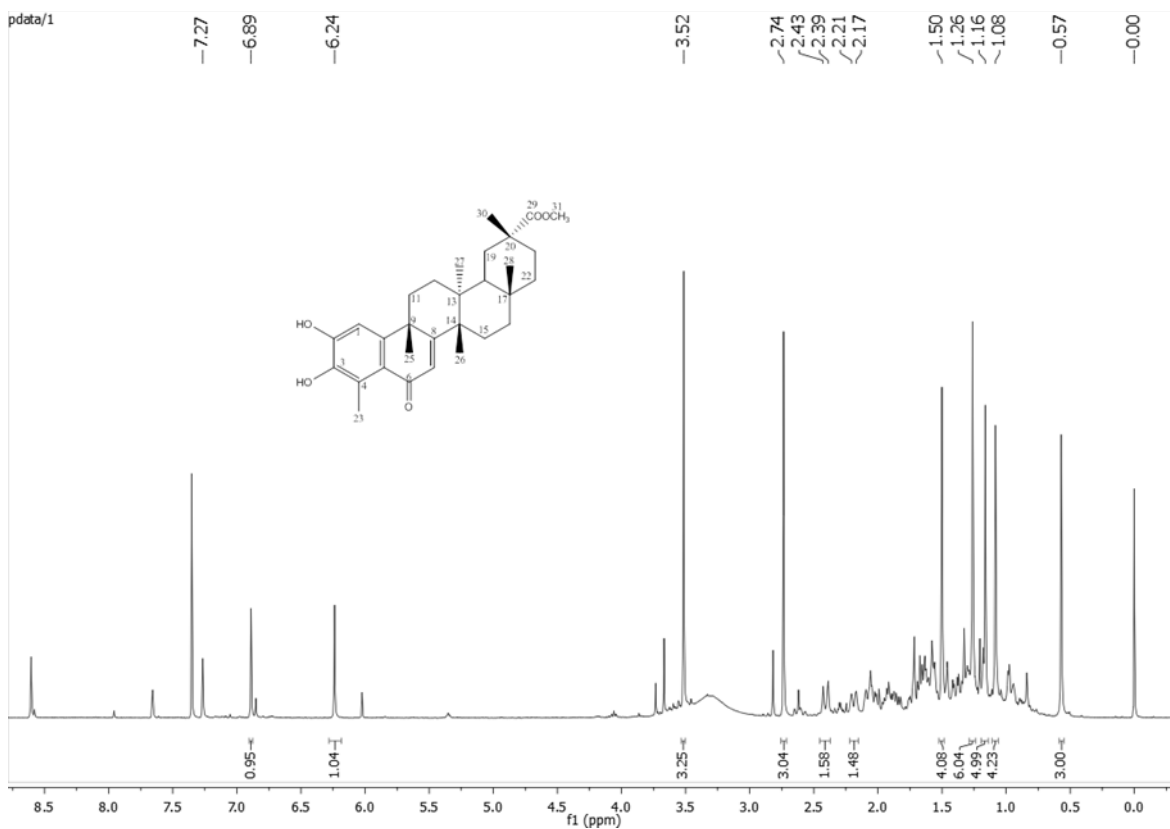


Figura A40: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-}d_5$) de SC09.

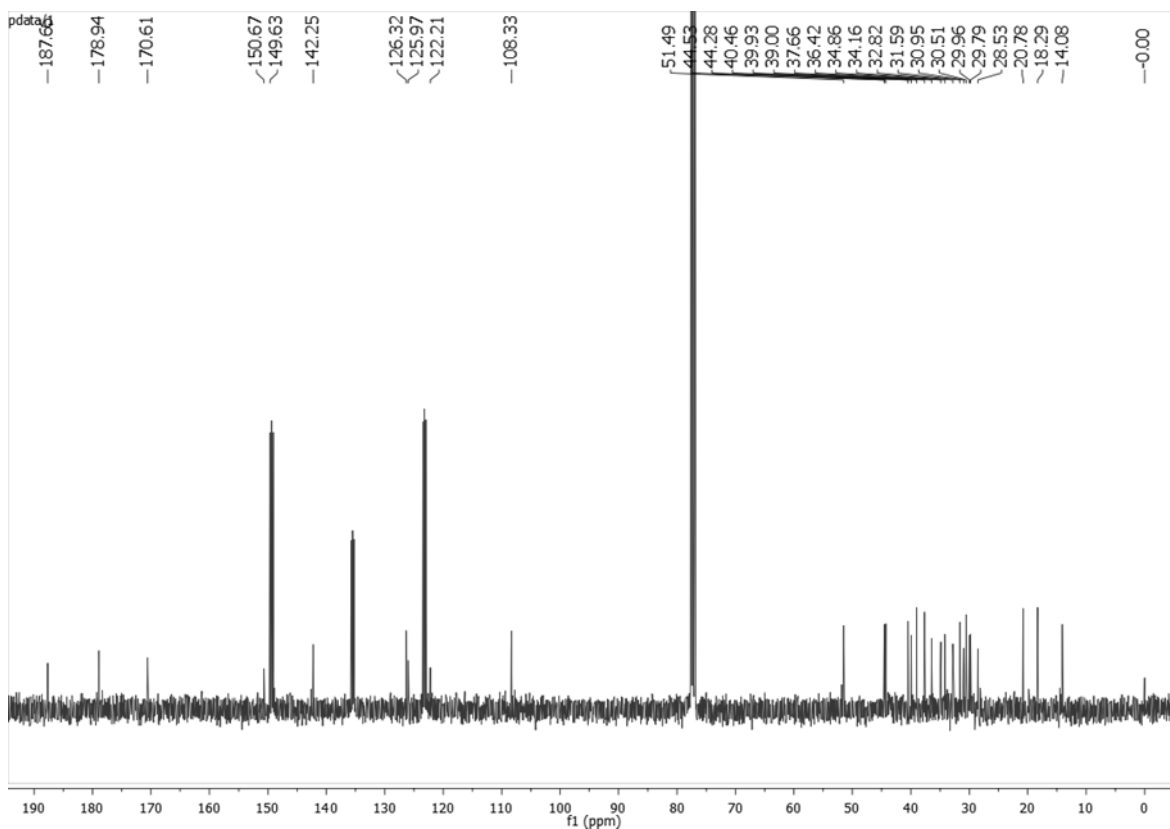


Figura A41: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-}d_5$) de SC09.

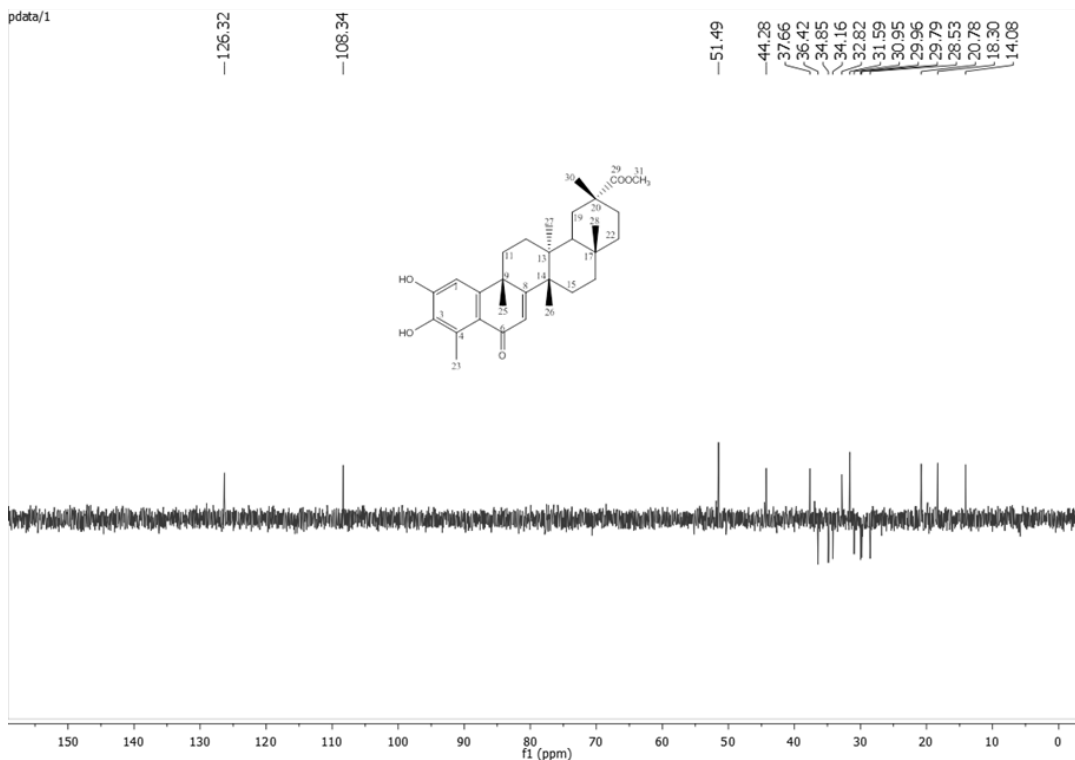


Figura A42: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC09.

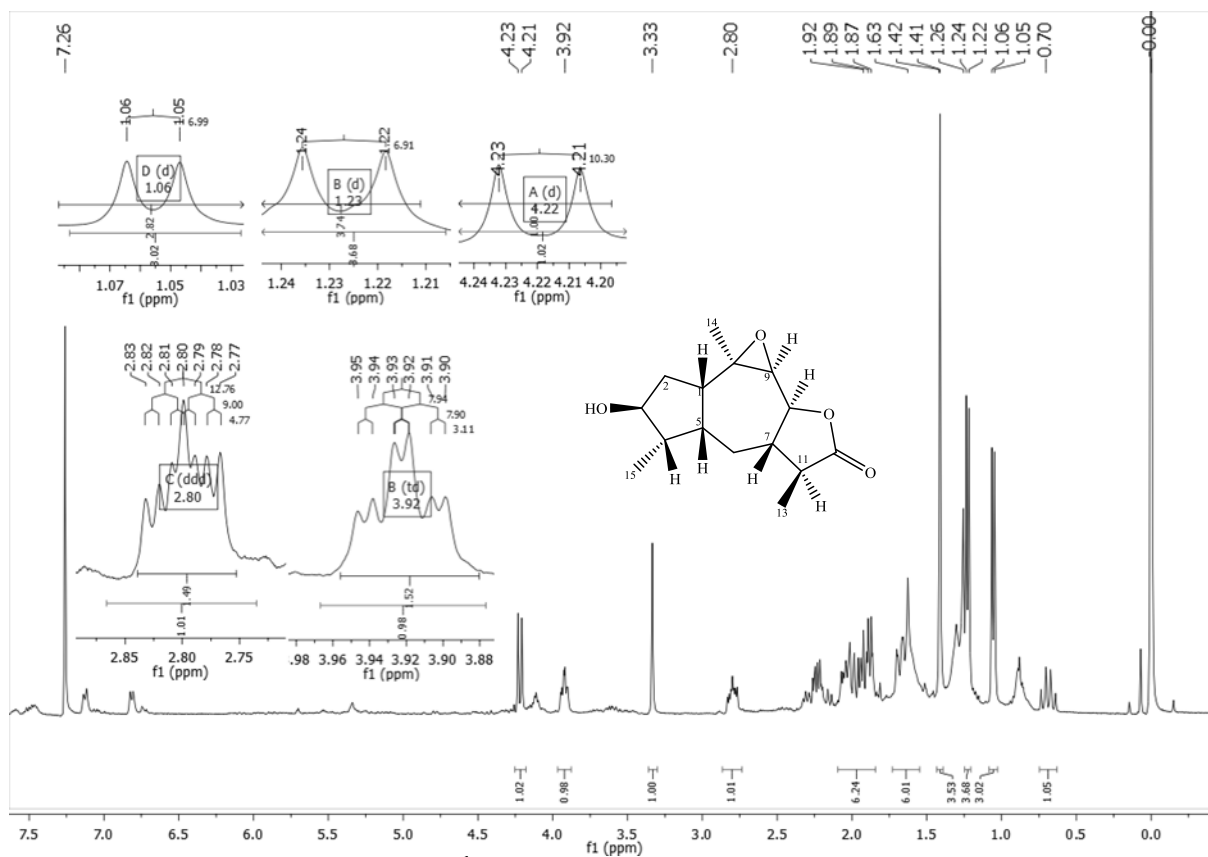


Figura A43: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SC10.

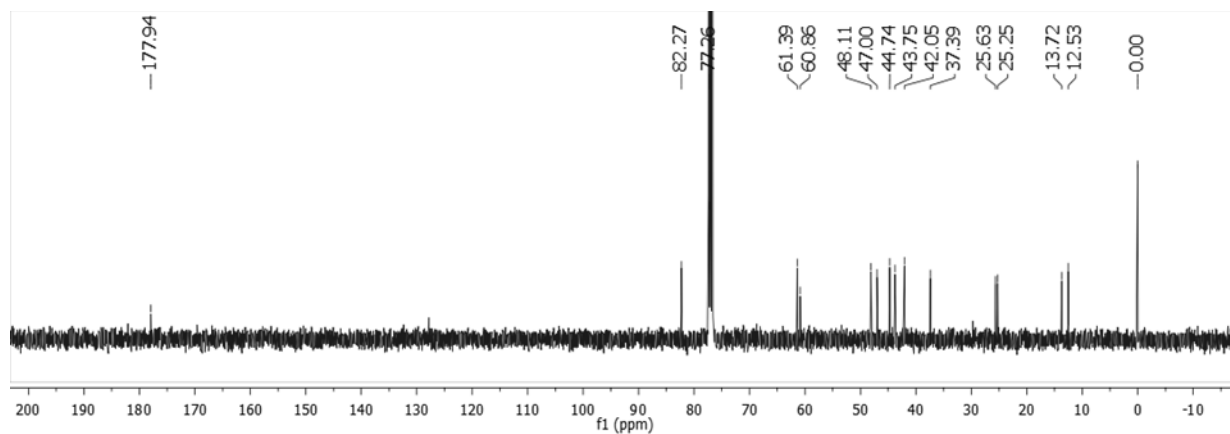


Figura A44: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **SC10**.

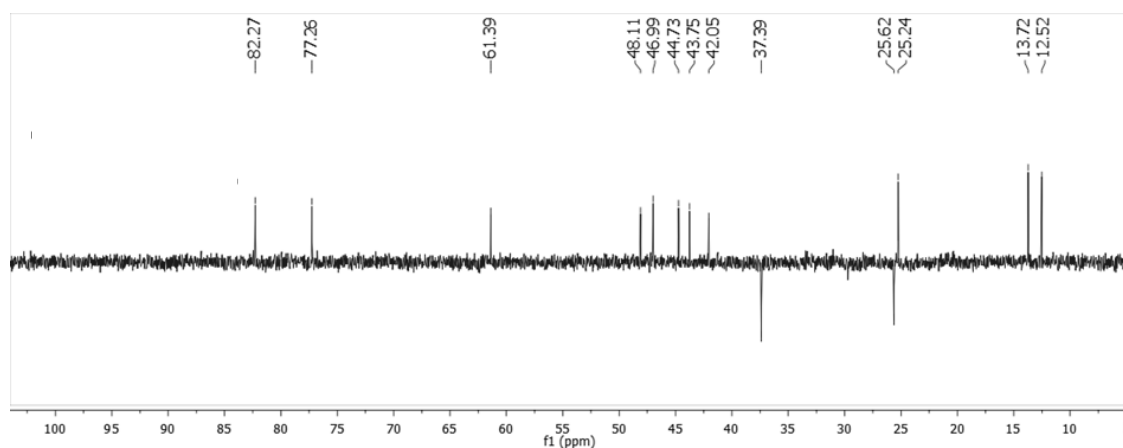
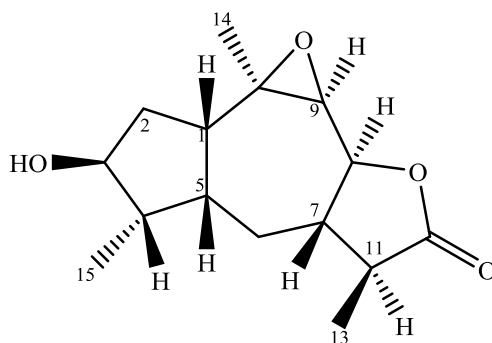


Figura A45: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de **SC10**.



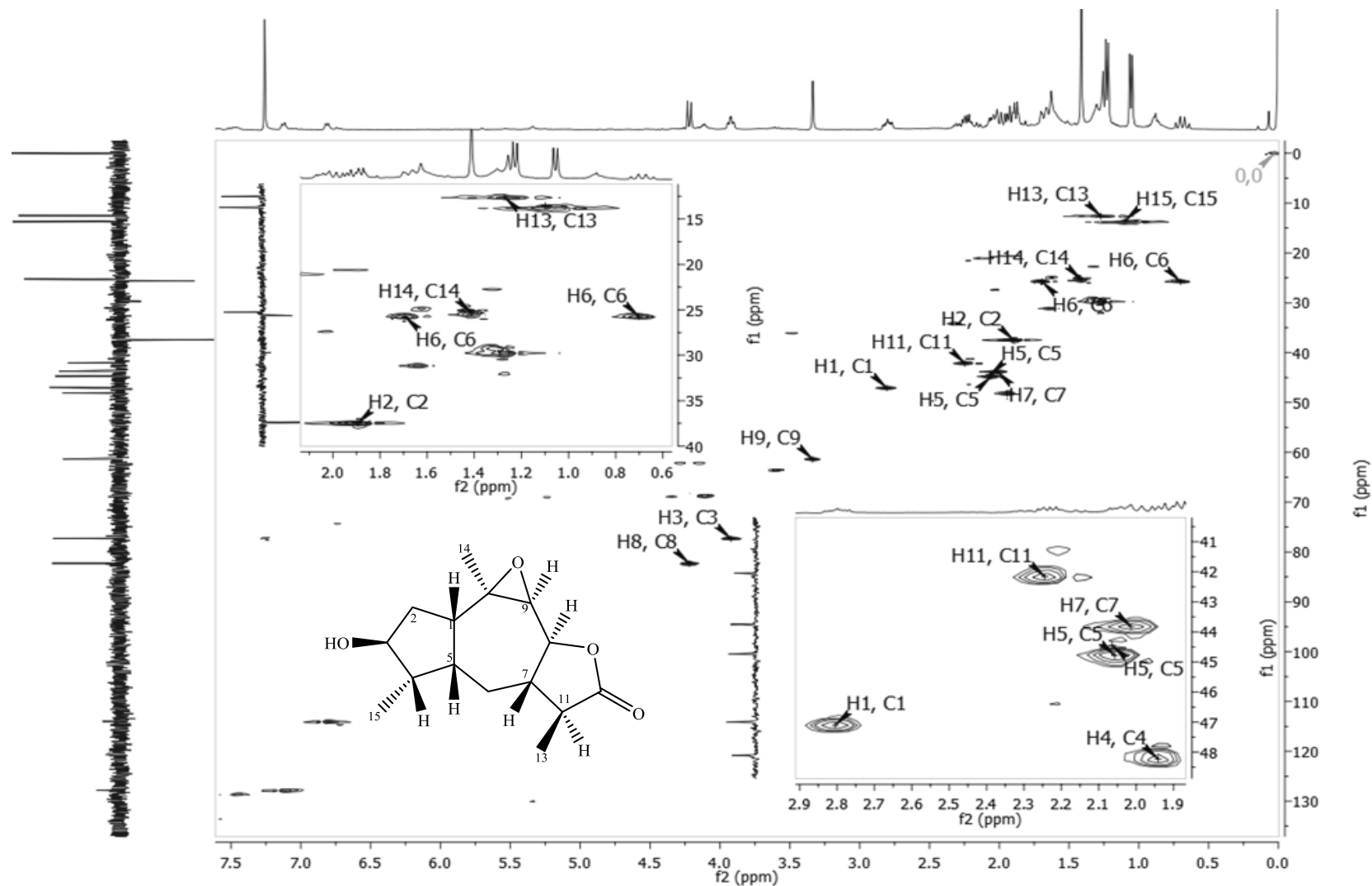


Figura A46: Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl₃) de SC10.

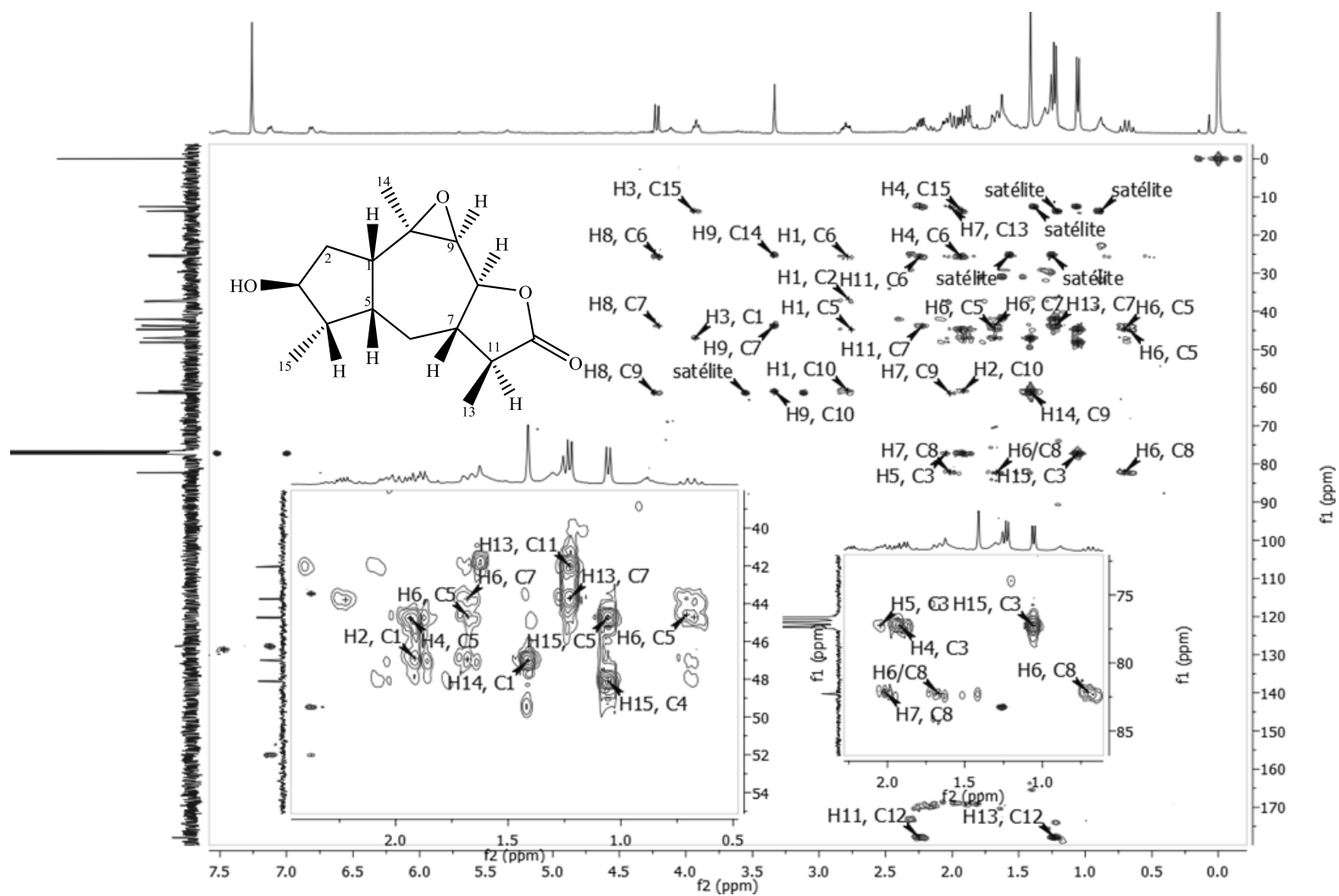


Figura A47: Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl₃) SC10.

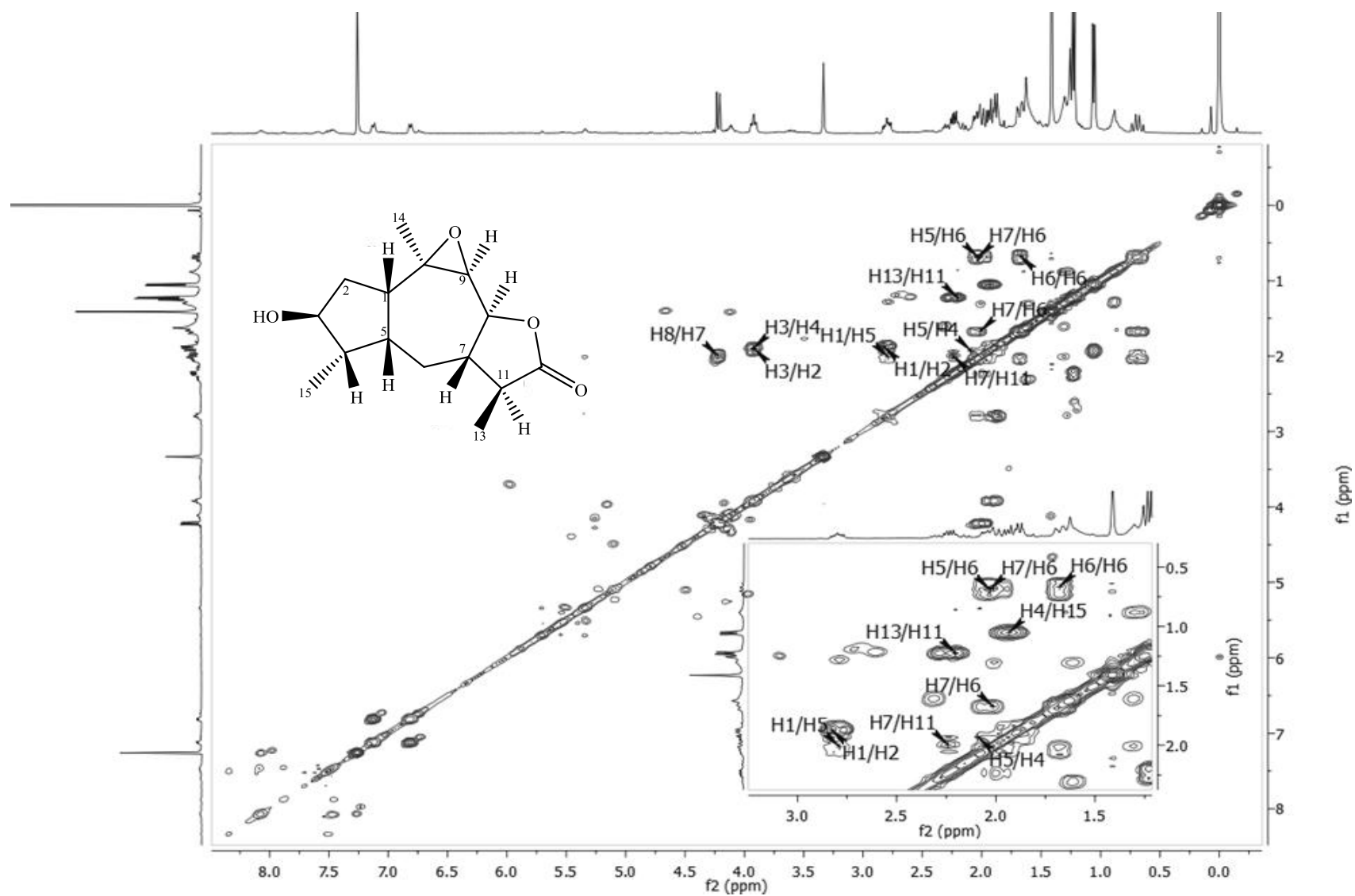


Figura A48: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃) de SC10.

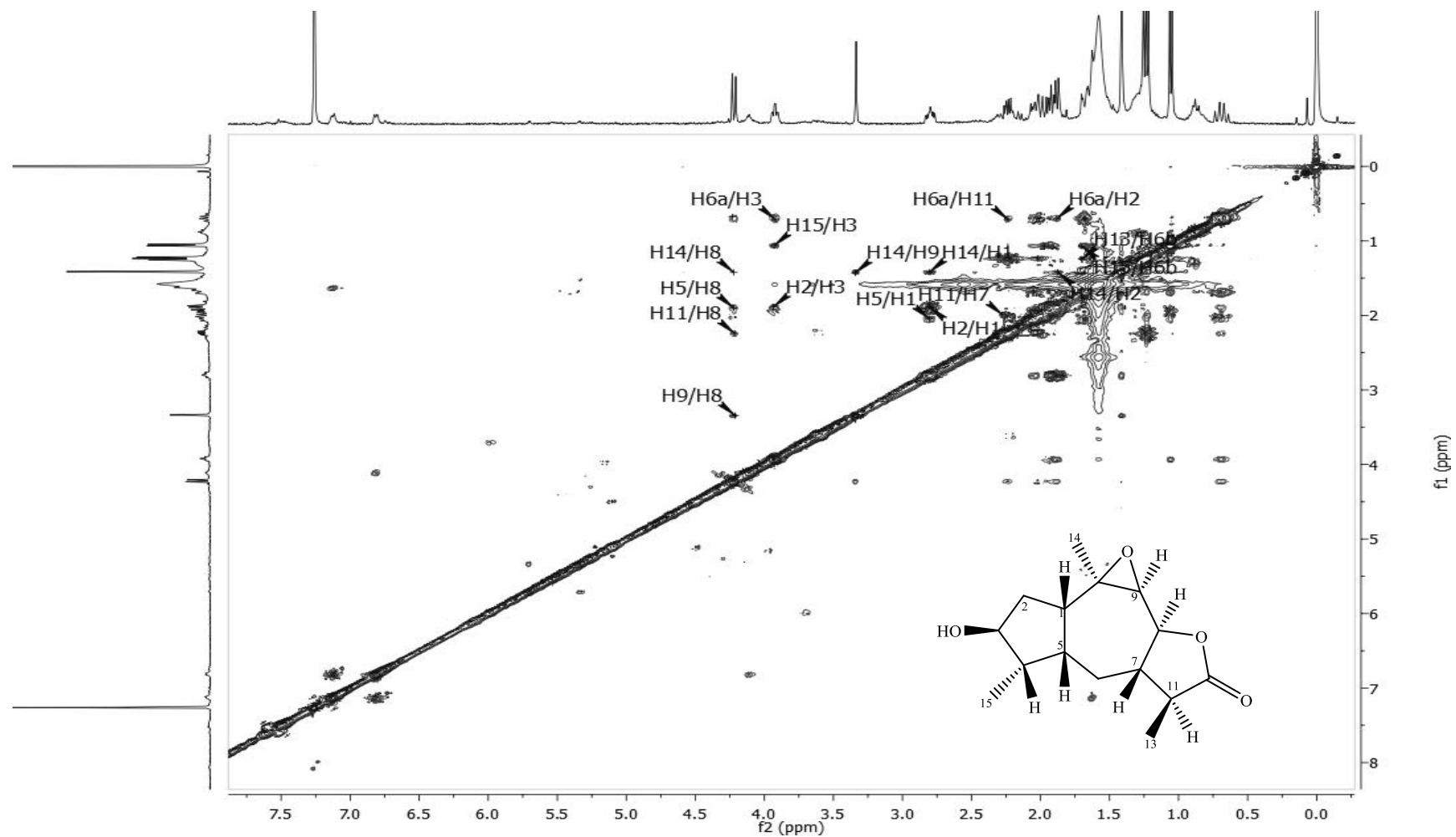


Figura A49: Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl₃) de SC10.

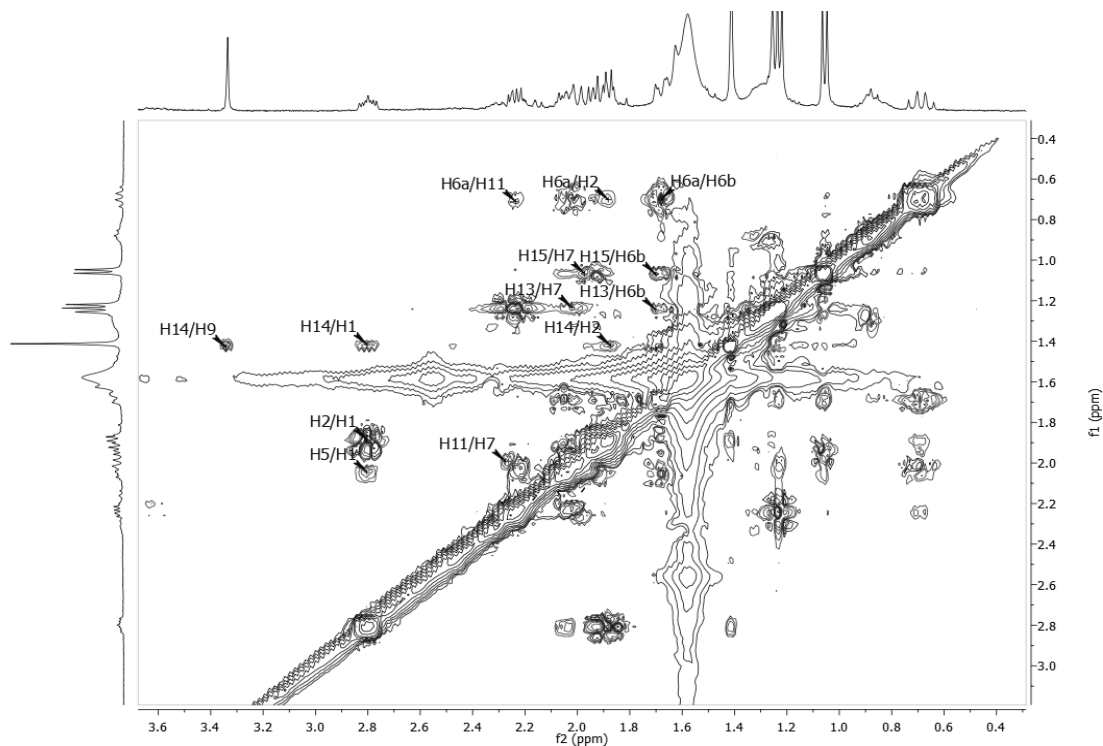


Figura A50: Expansão do Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl_3) de **SC10**.

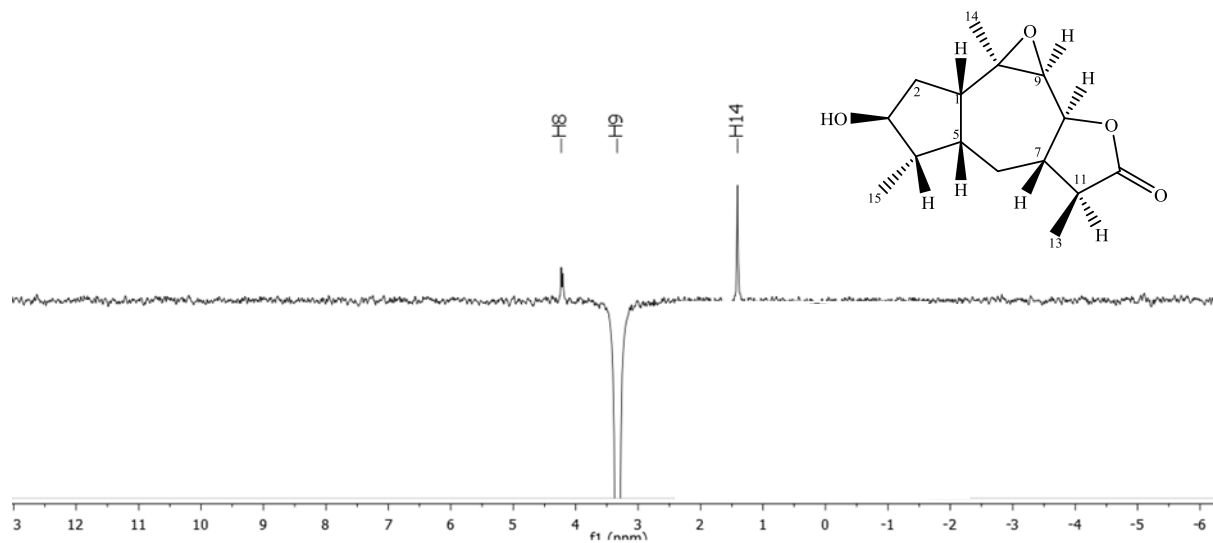


Figura A51: Espectro de NOE diferencial com irradiação do H9 (δ_H 3,33) (400 MHz, CDCl_3) de **SC10**.

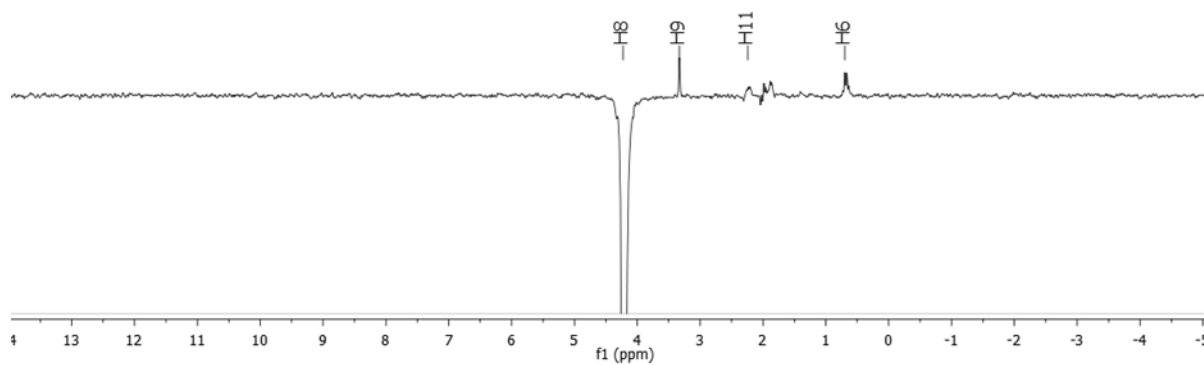


Figura A52: Espectro de NOE diferencial com irradiação do H8 (δ_H 4,22) (400 MHz, $CDCl_3$) de **SC10**.

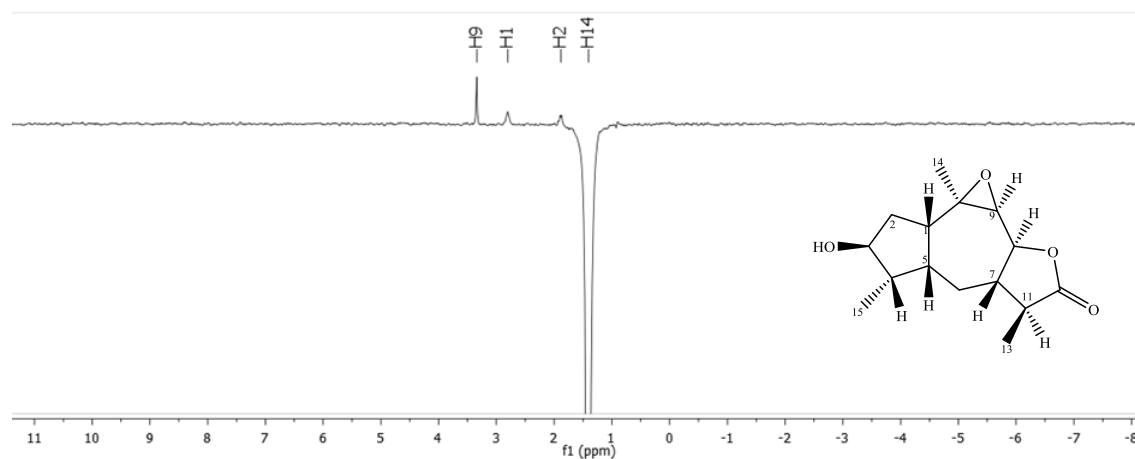


Figura A53: Espectro de NOE diferencial com irradiação do H14 (δ_H 1,41) (400 MHz, $CDCl_3$) de **SC10**.

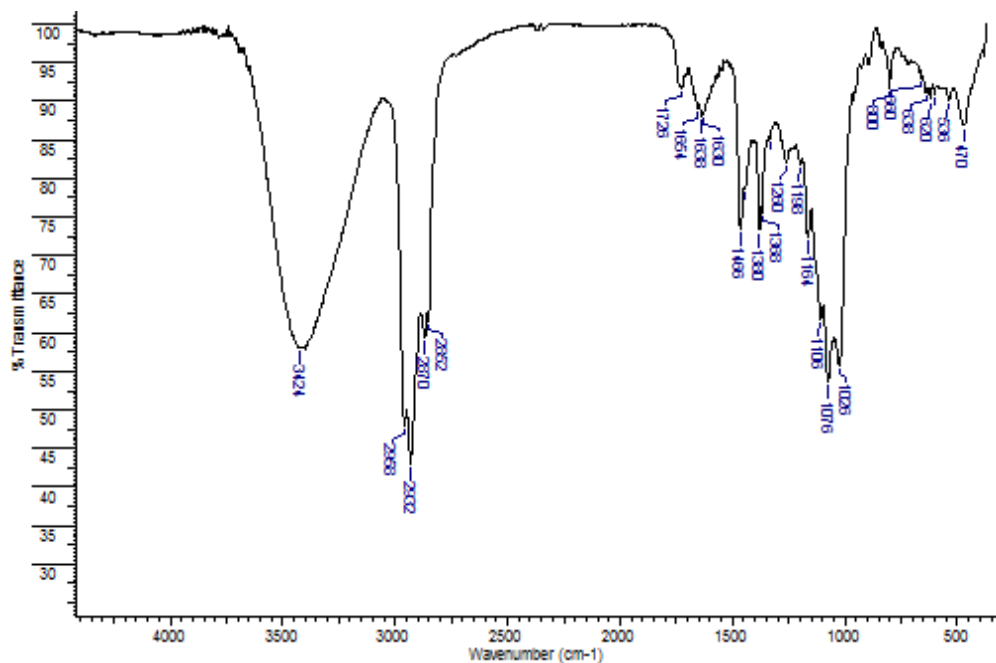


Figura A54: Espectro de absorção na região do IV de SC11(KBr).

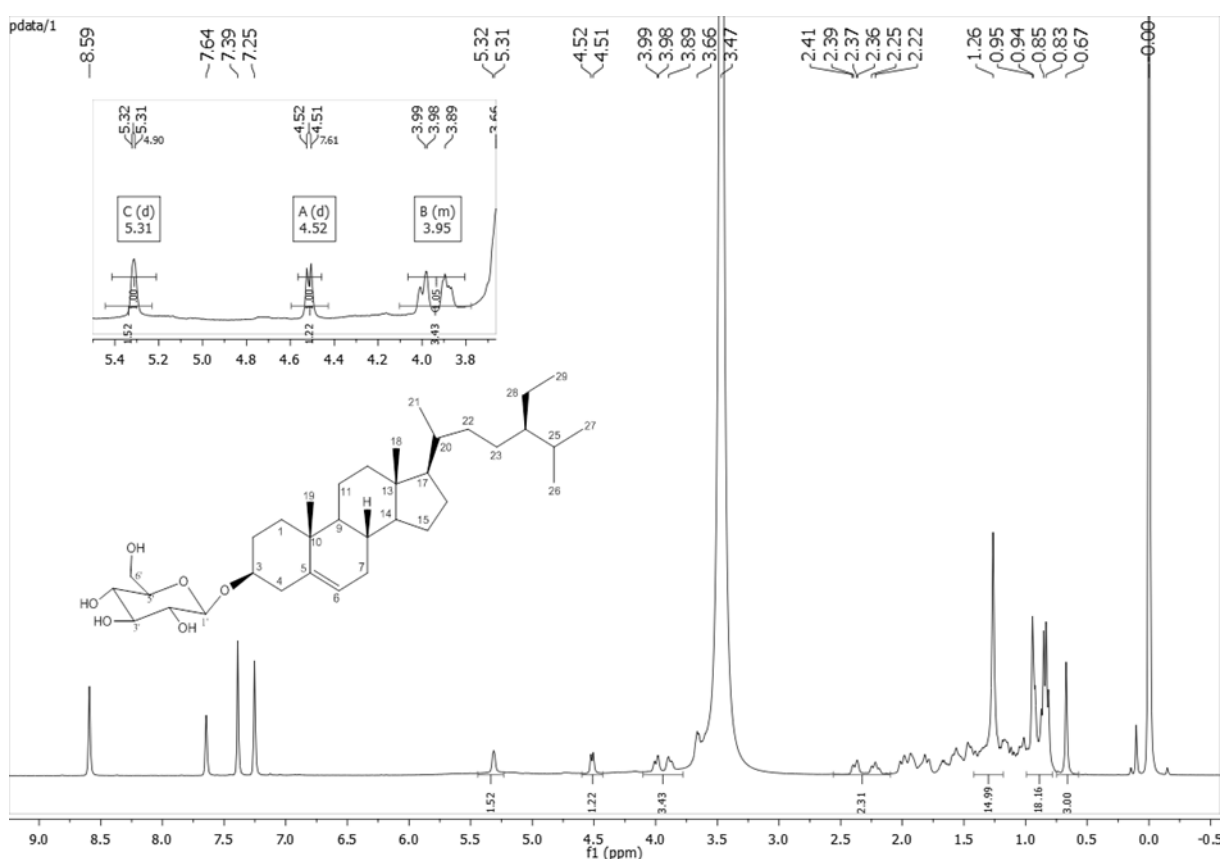


Figura A55: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-}d_5$) de SC11.

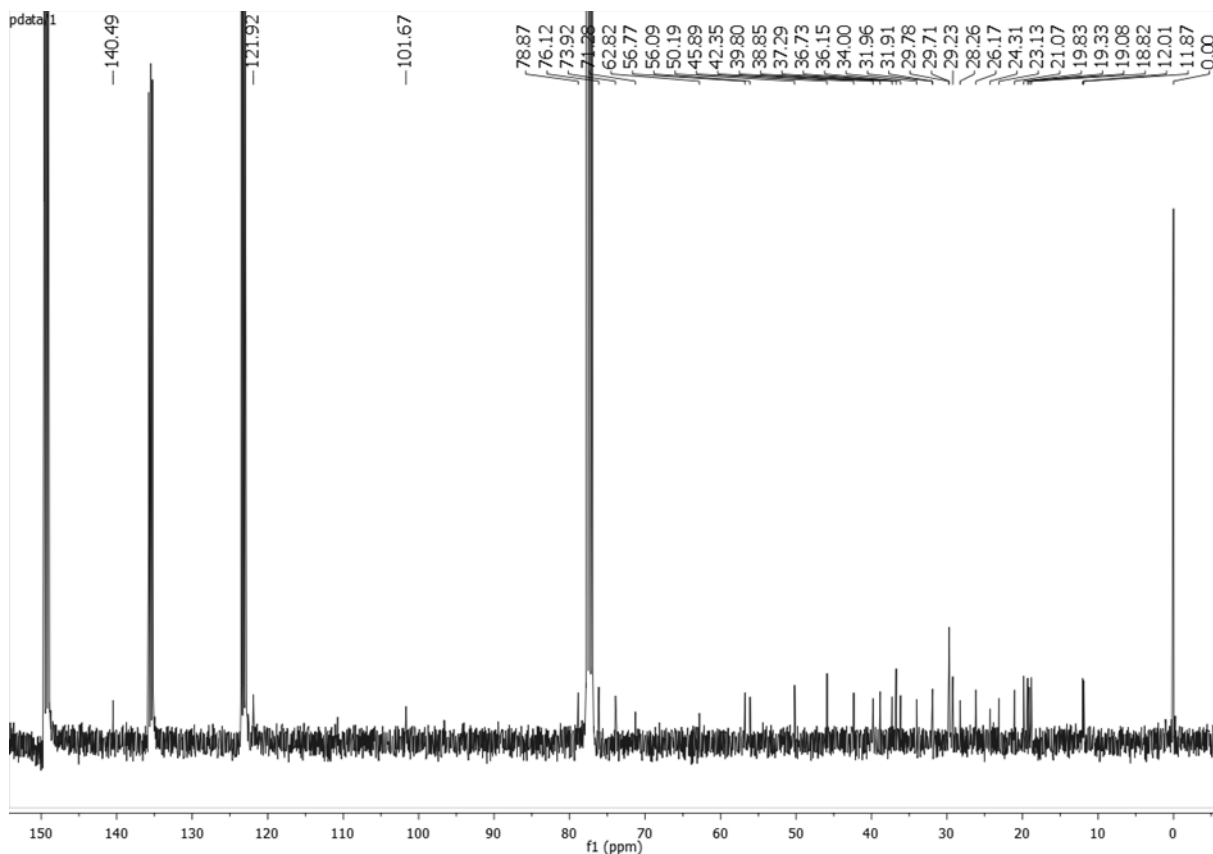


Figura A56: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC11.

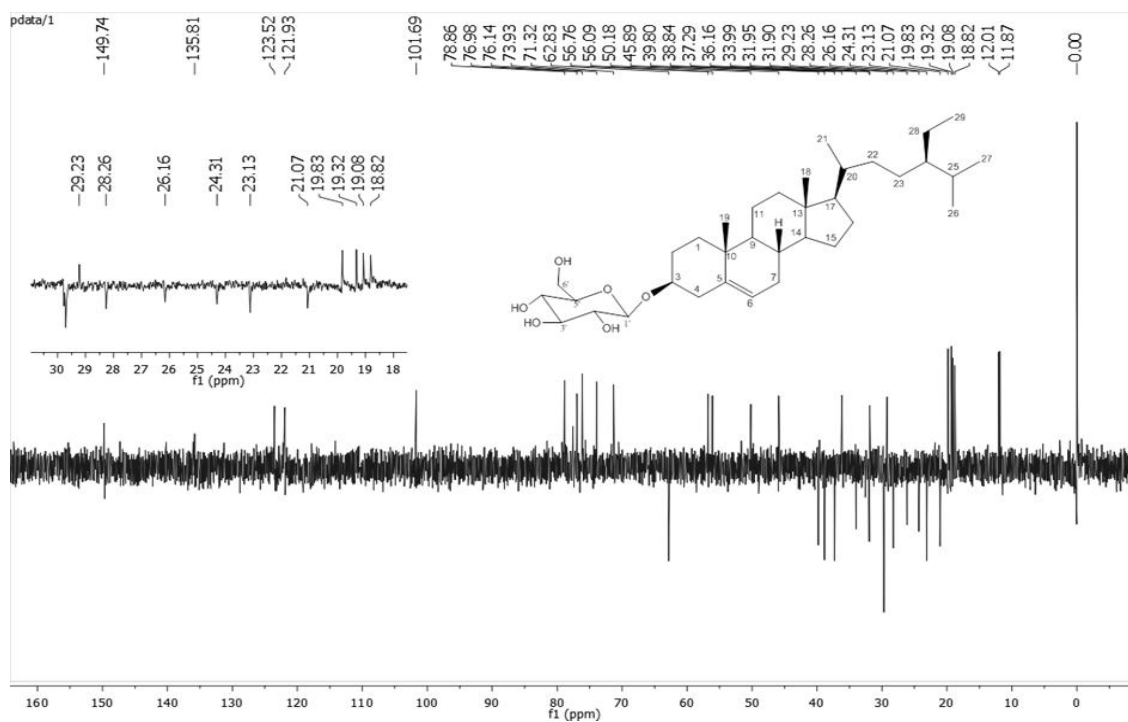


Figura A57: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC11.

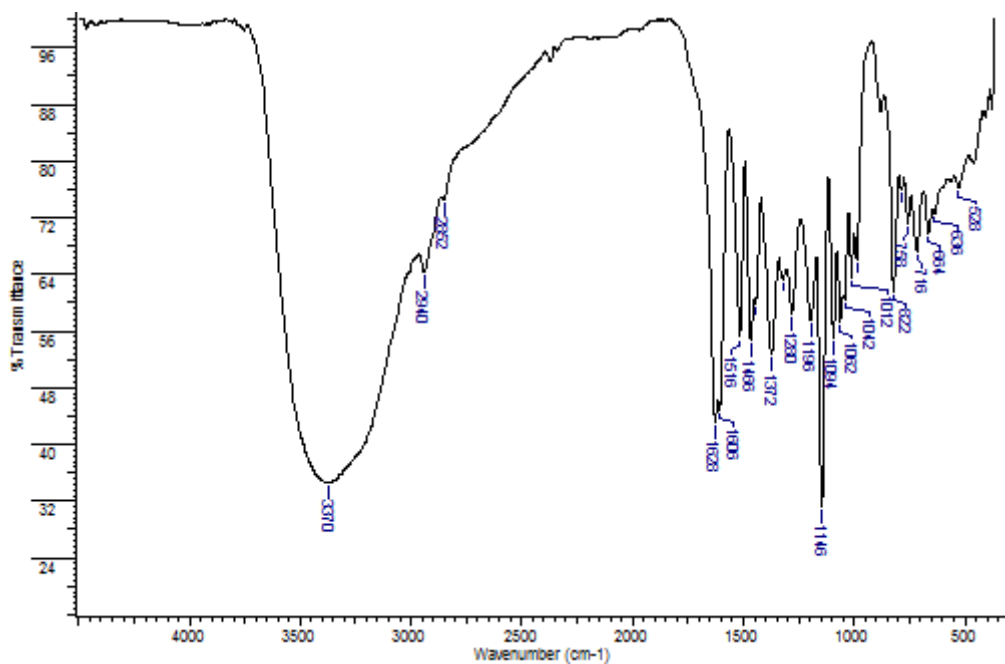


Figura A58: Espectro de absorção na região do IV de SC12 (KBr).

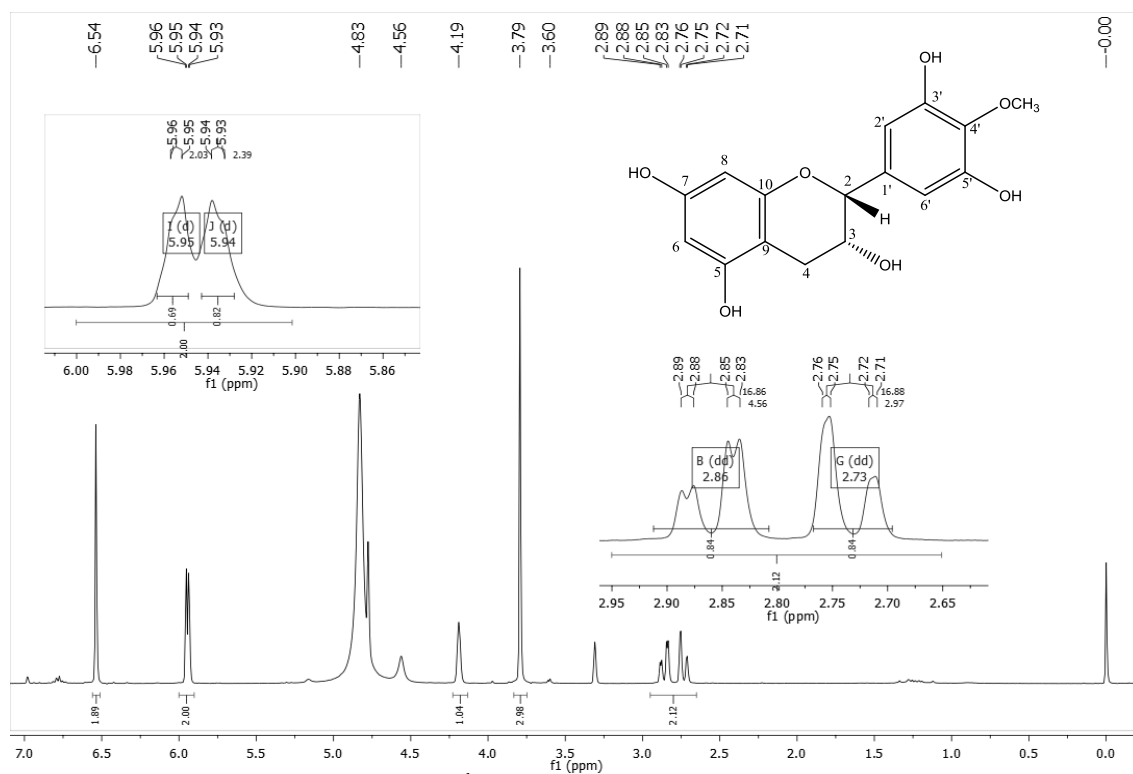


Figura A59: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de SC12.

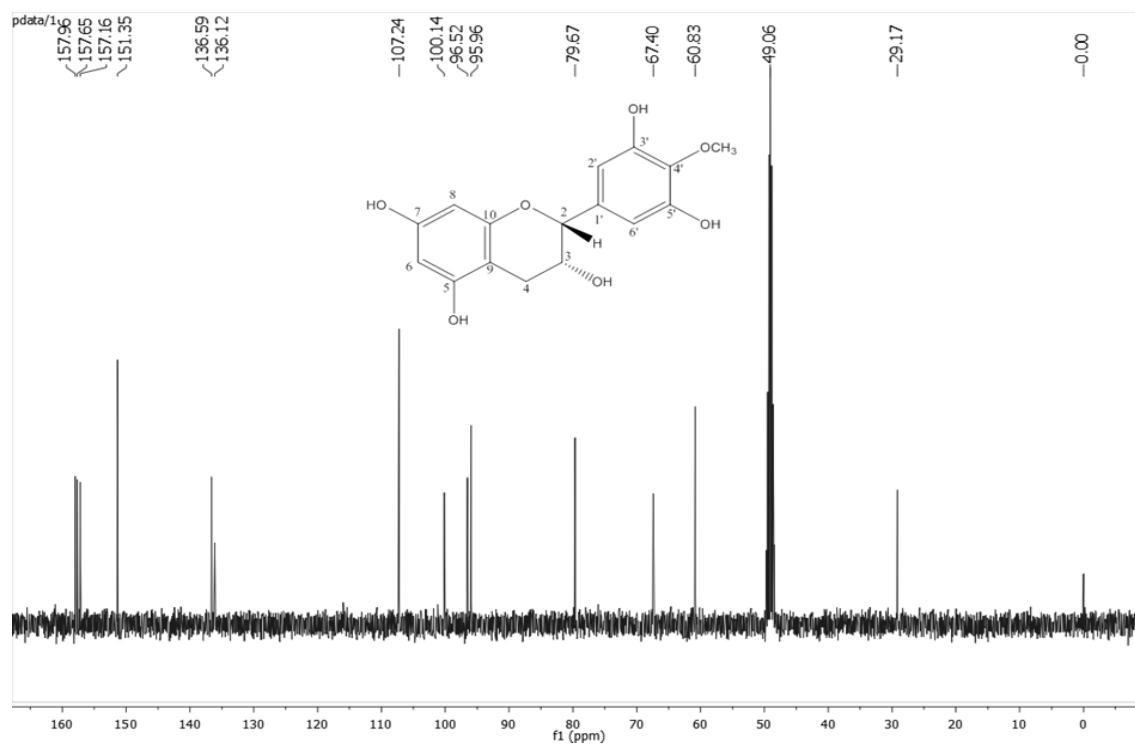


Figura A60: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de **SC12**.

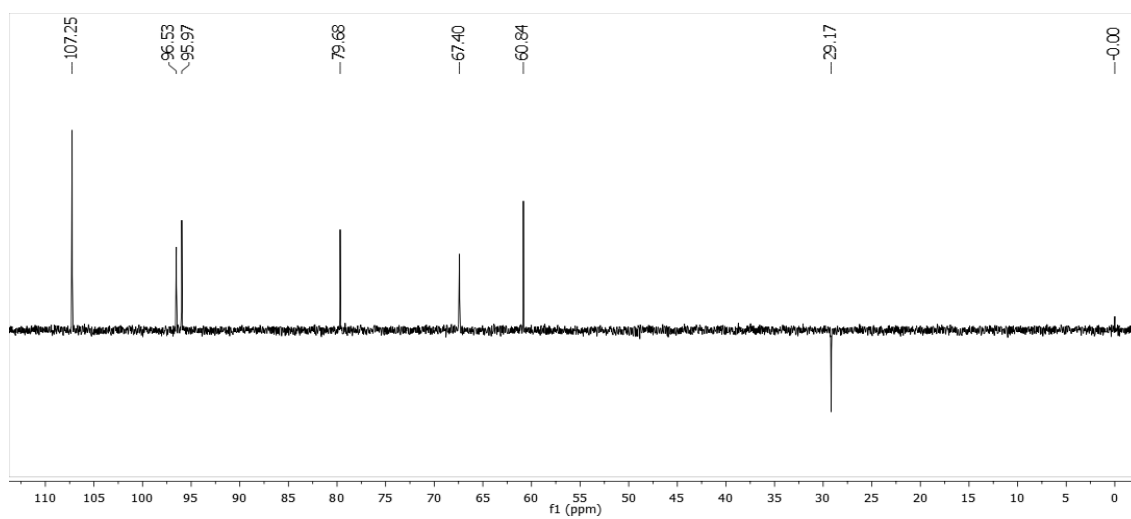


Figura A61: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de **SC12**.

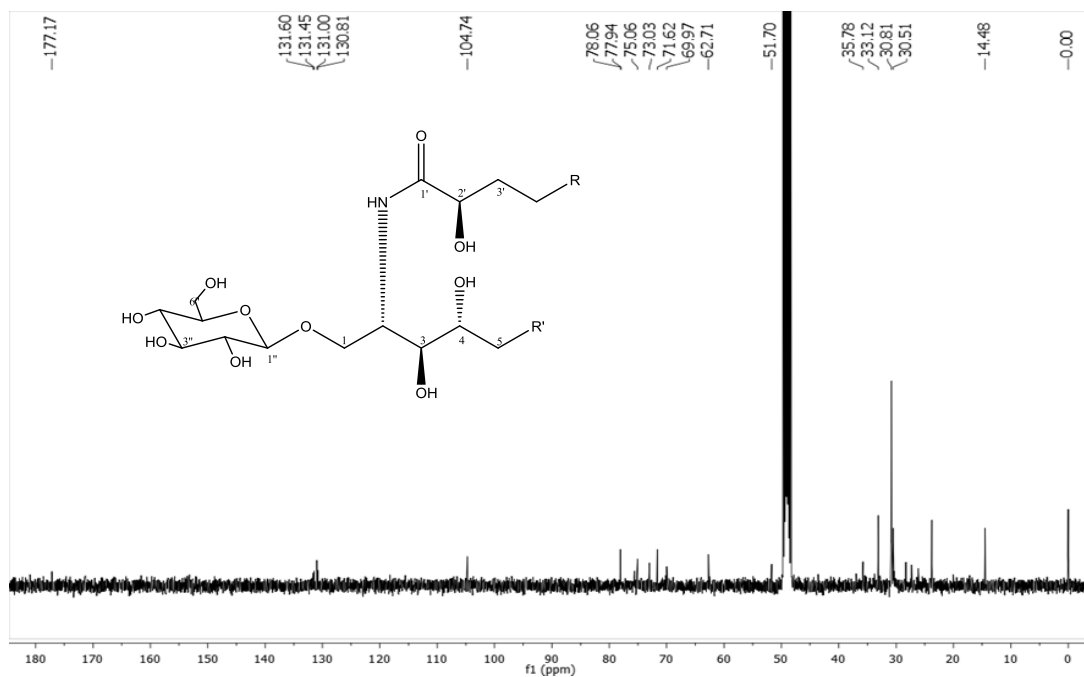


Figura A64: Espectro de RMN de ^{13}C de SC13 (CD_3OD , 100 MHz).

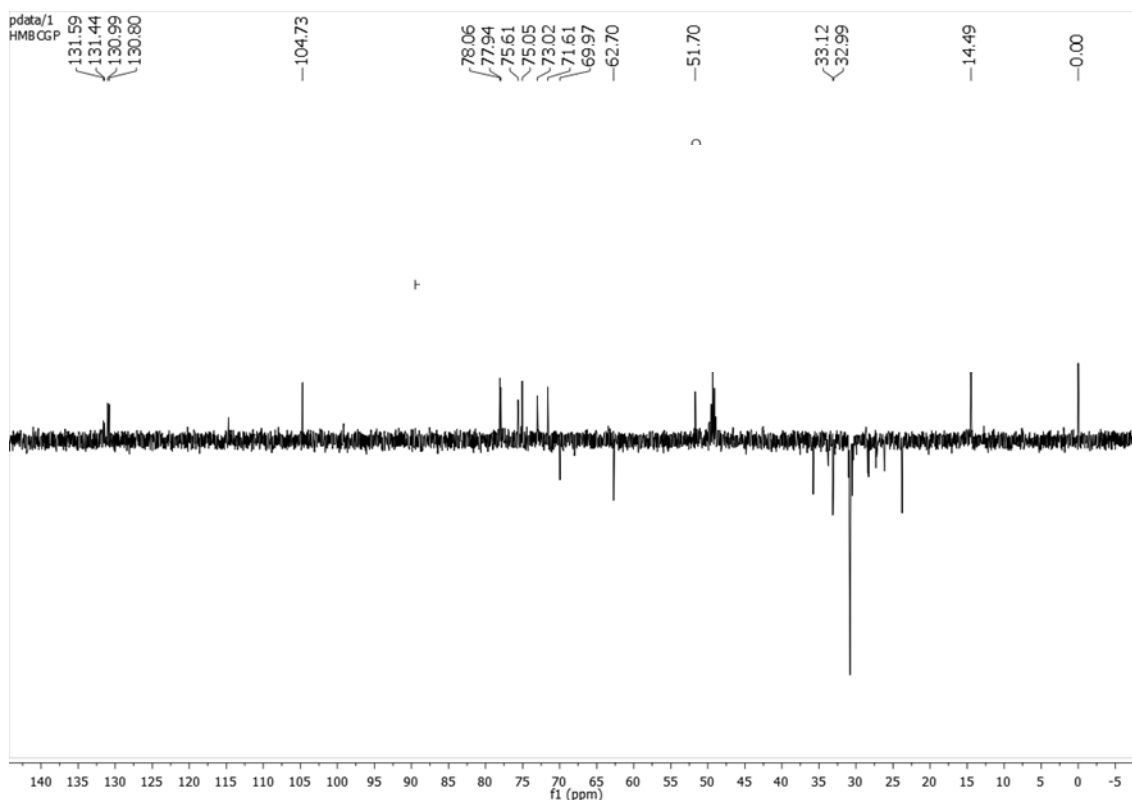


Figura A65: Espectro DEPT-135 de SC13 (CD_3OD , 100 MHz).

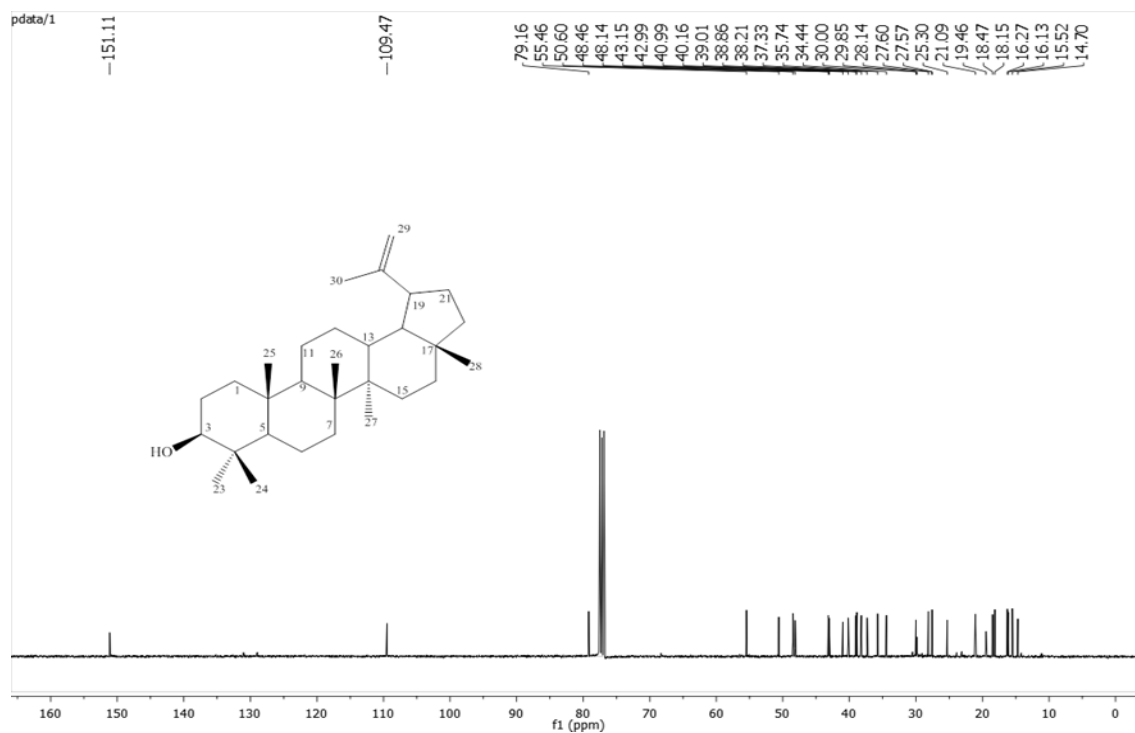


Figura A68: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **SC14**.

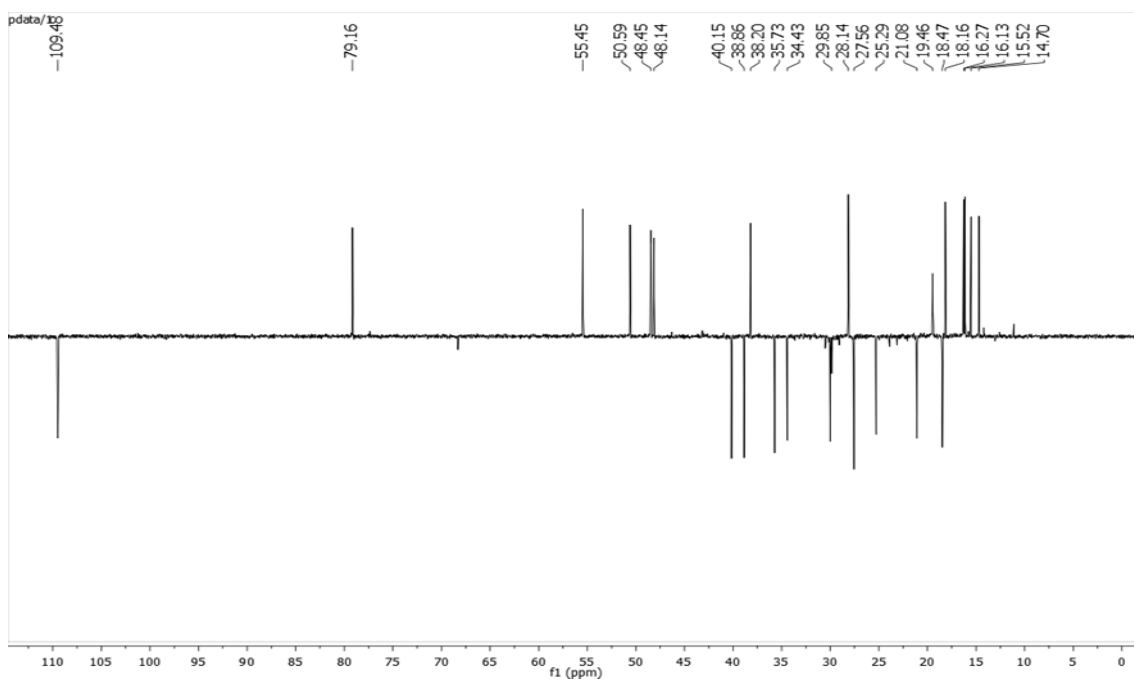


Figura A69: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 MHz) de **SC14**.

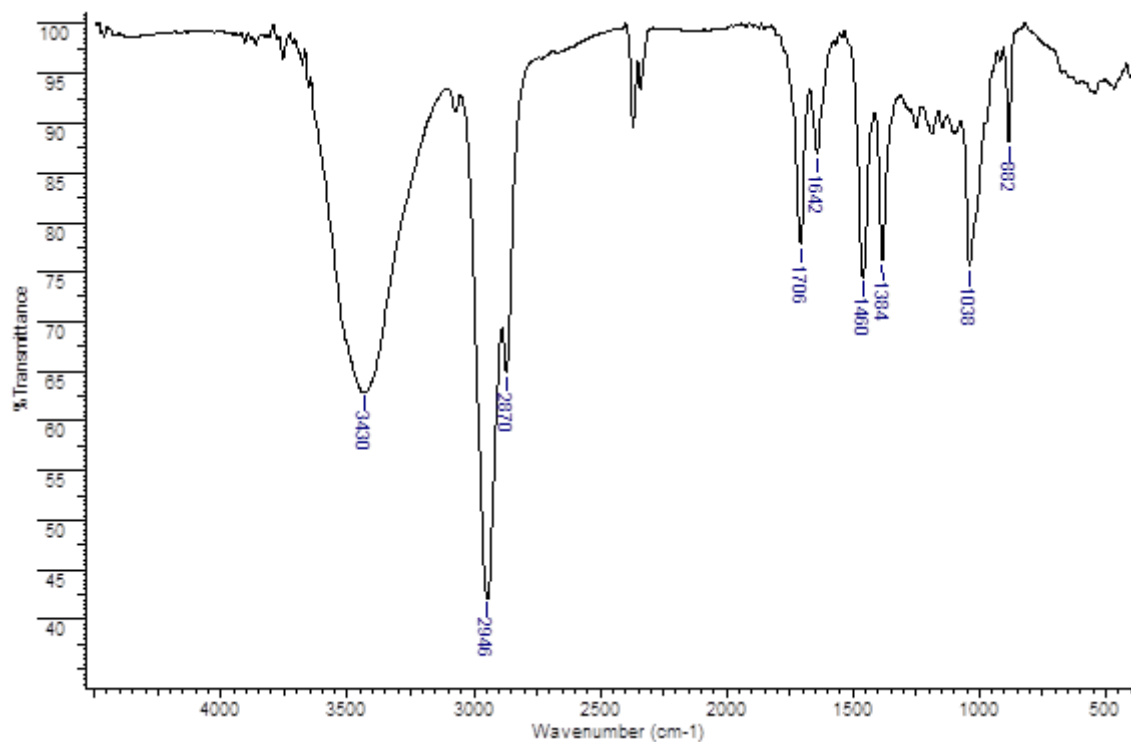


Figura A70: Espectro de absorção na região do IV de SC15 (KBr).

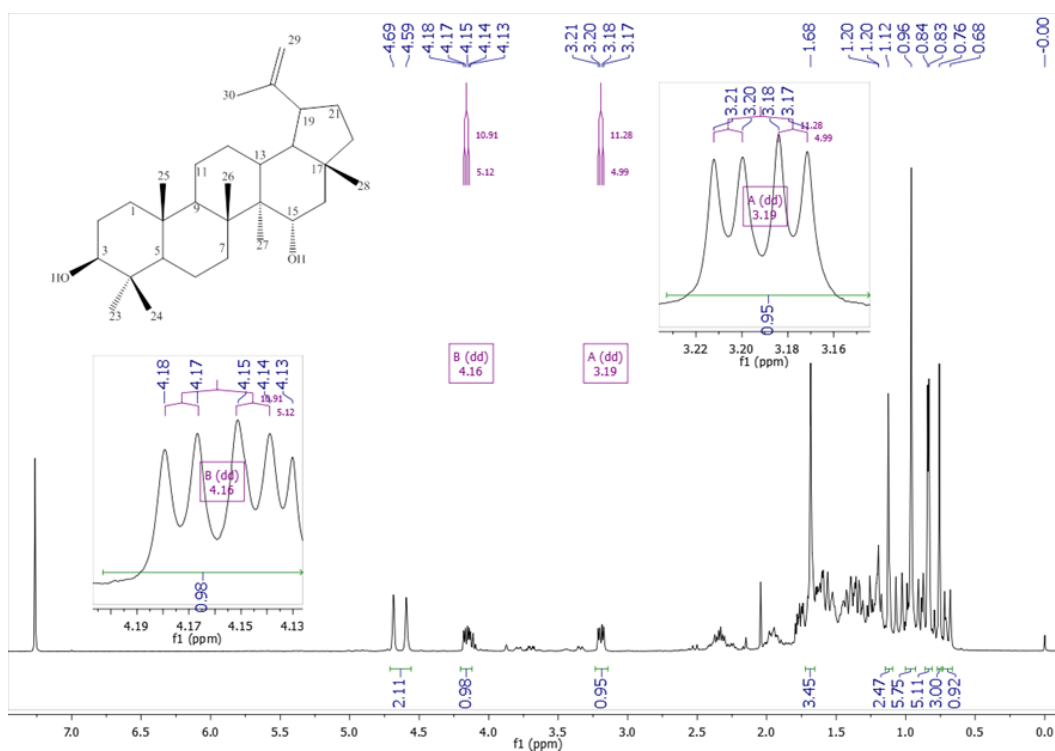


Figura A71: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de SC15.

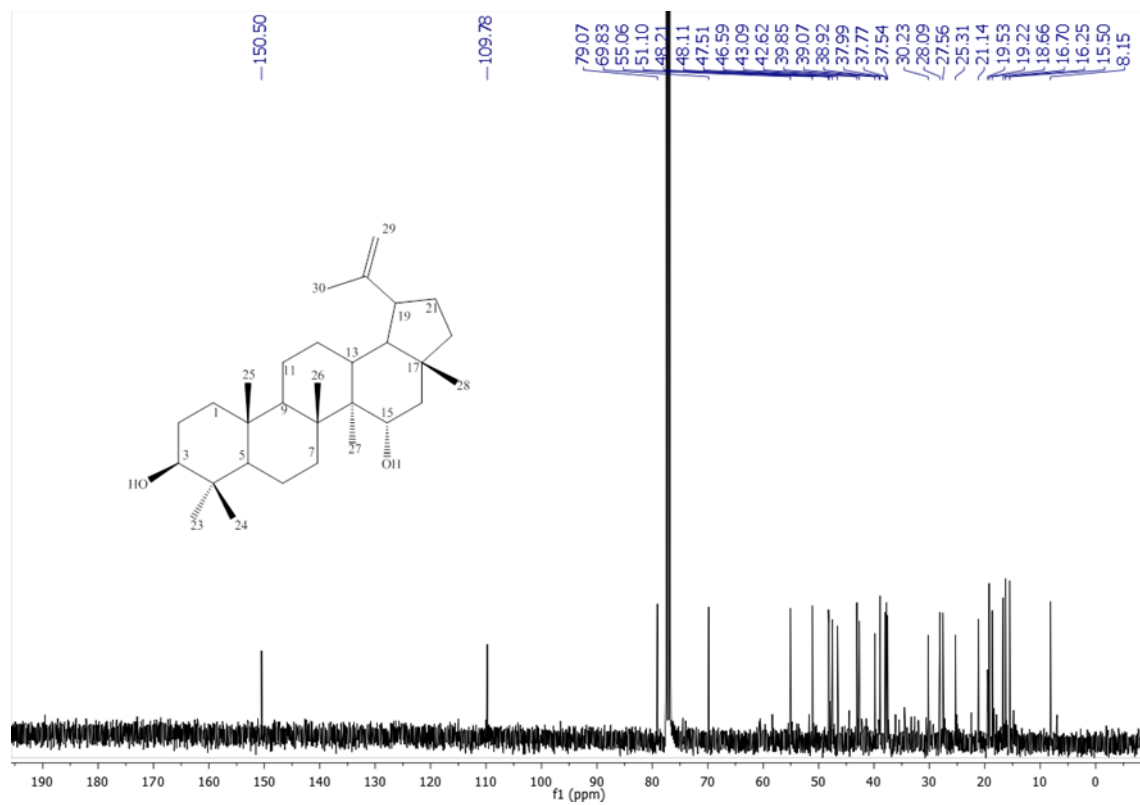


Figura A72: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC15.

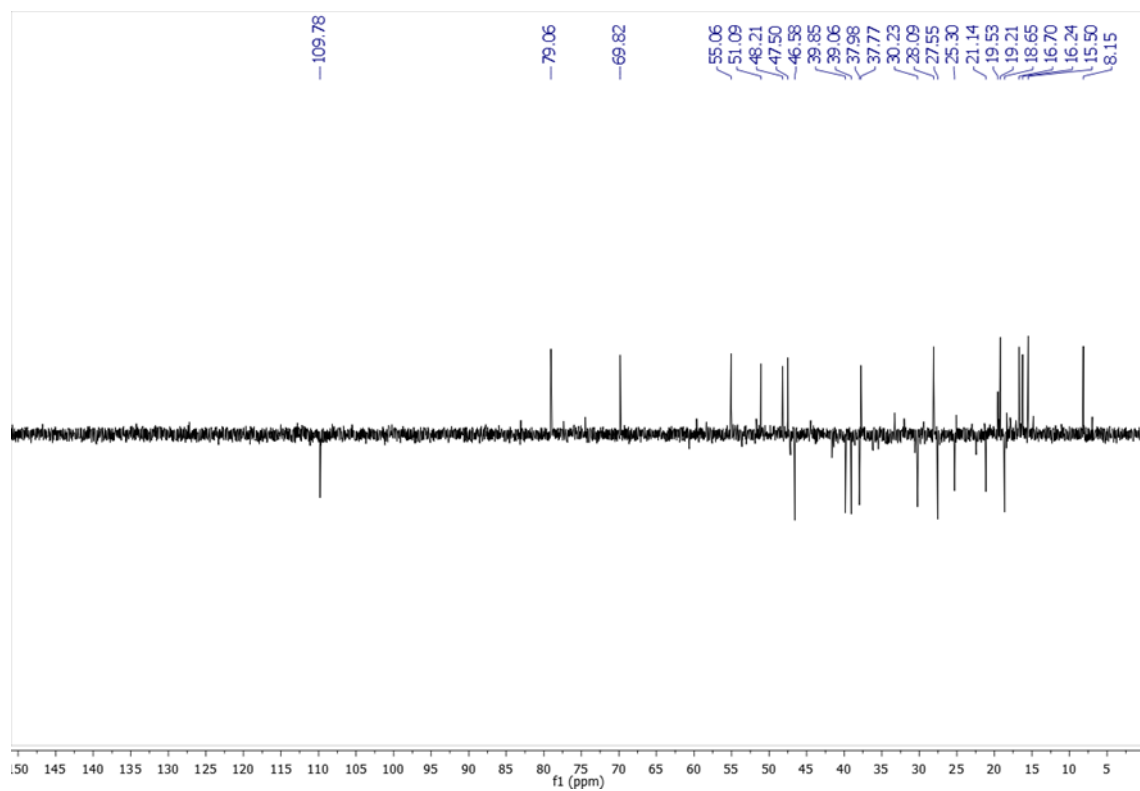


Figura A73: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC15.

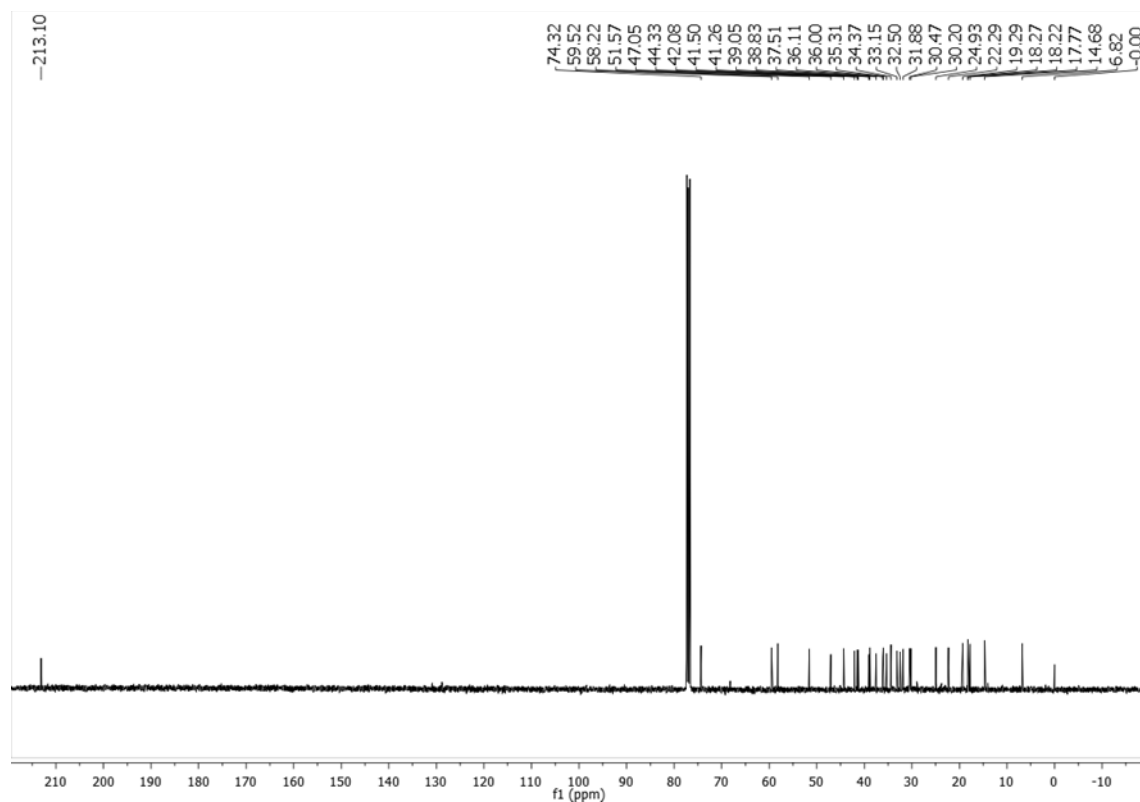


Figura A76: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC16.

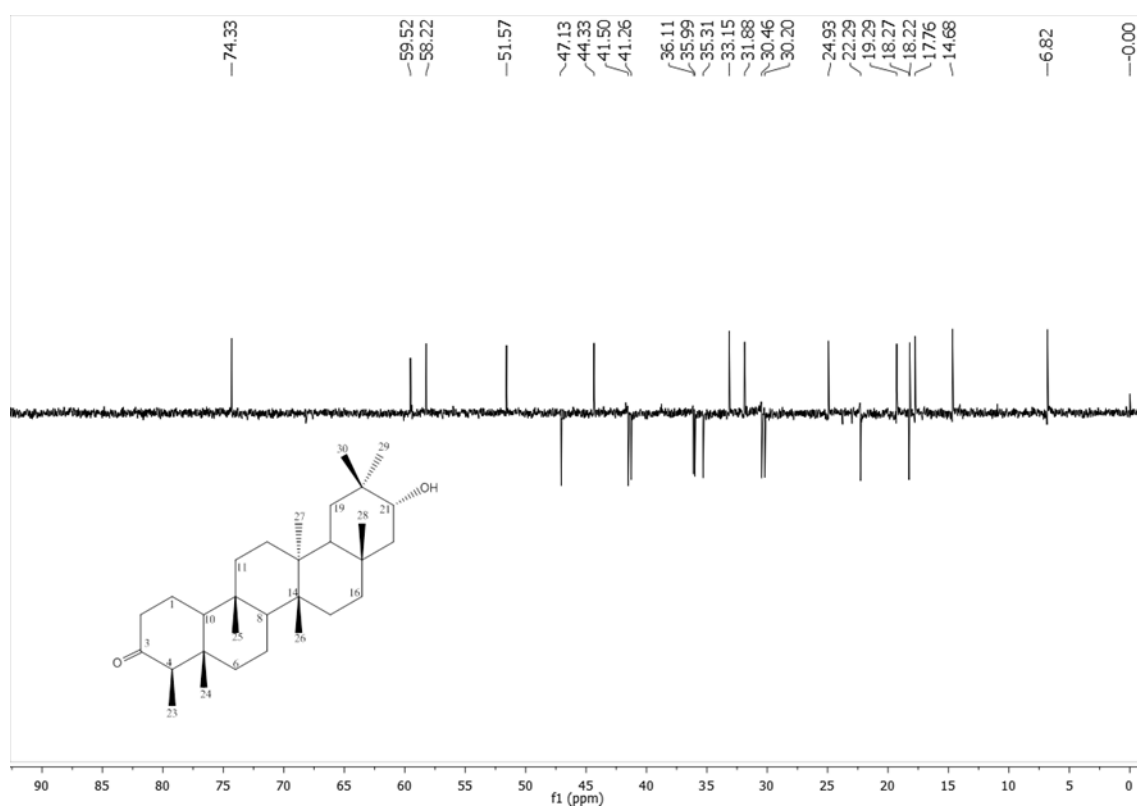


Figura A77: Espectro RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC16.

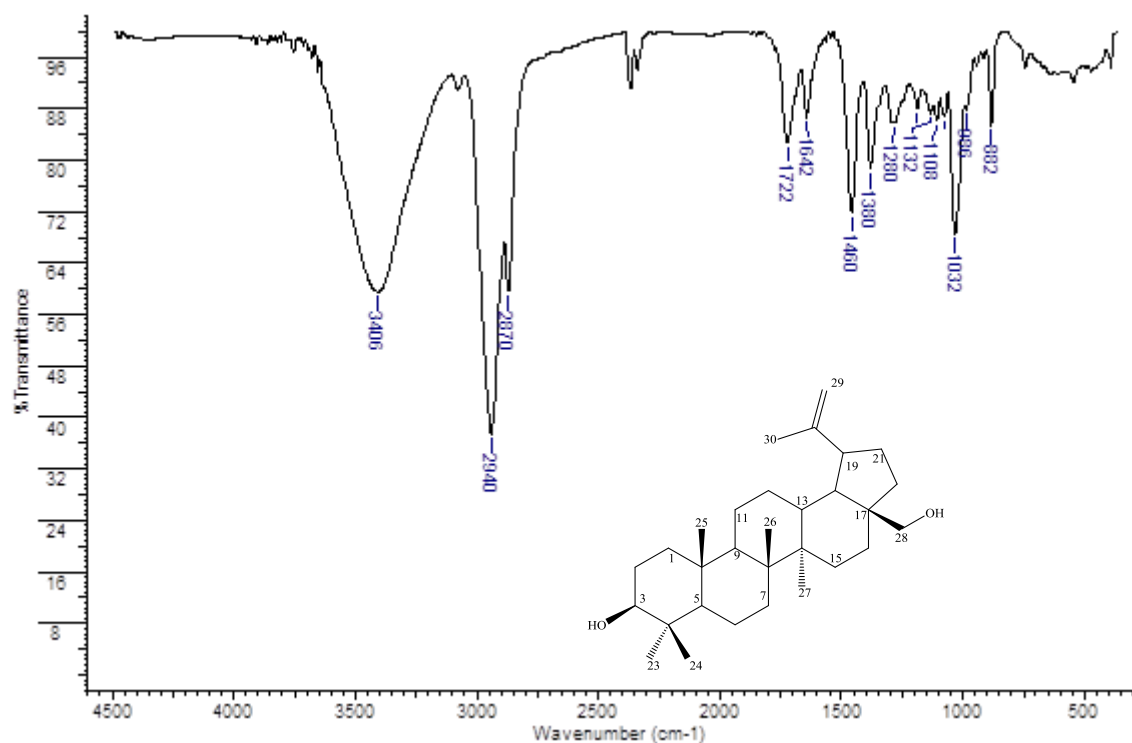


Figura A78: Espectro de absorção na região do IV de SC17 (KBr).

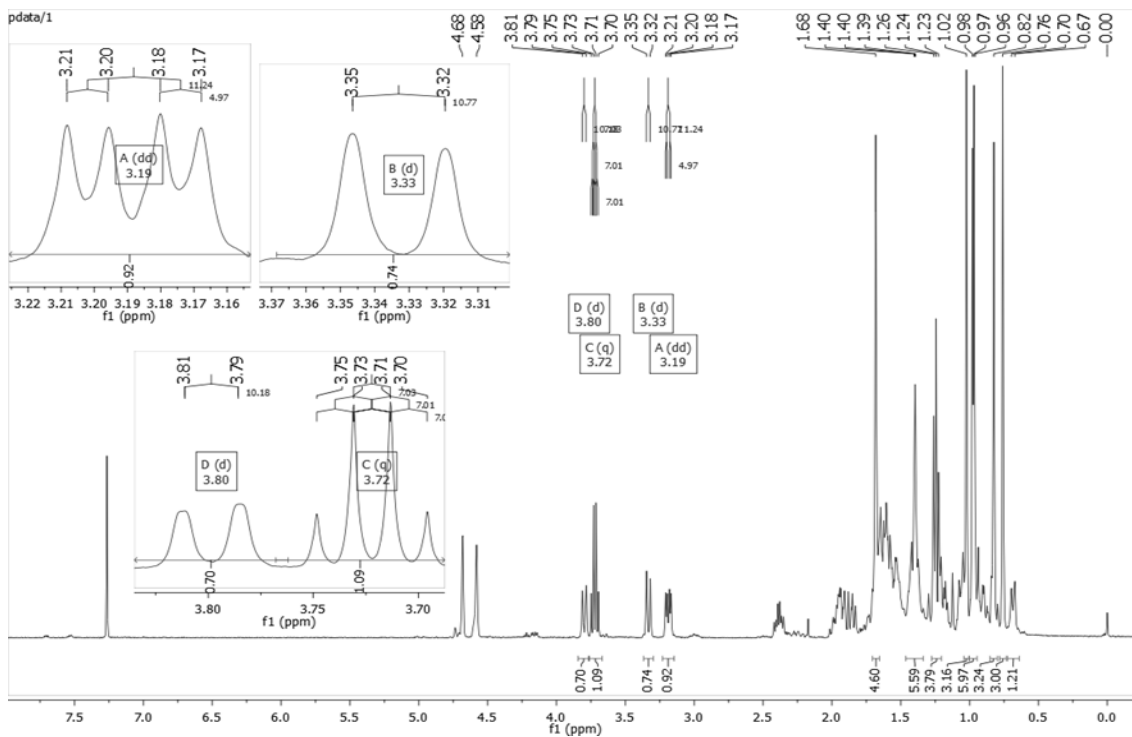


Figura A79: Espectro de RMN de ^1H (100 MHz, CDCl_3) de SC17.

Apêndice

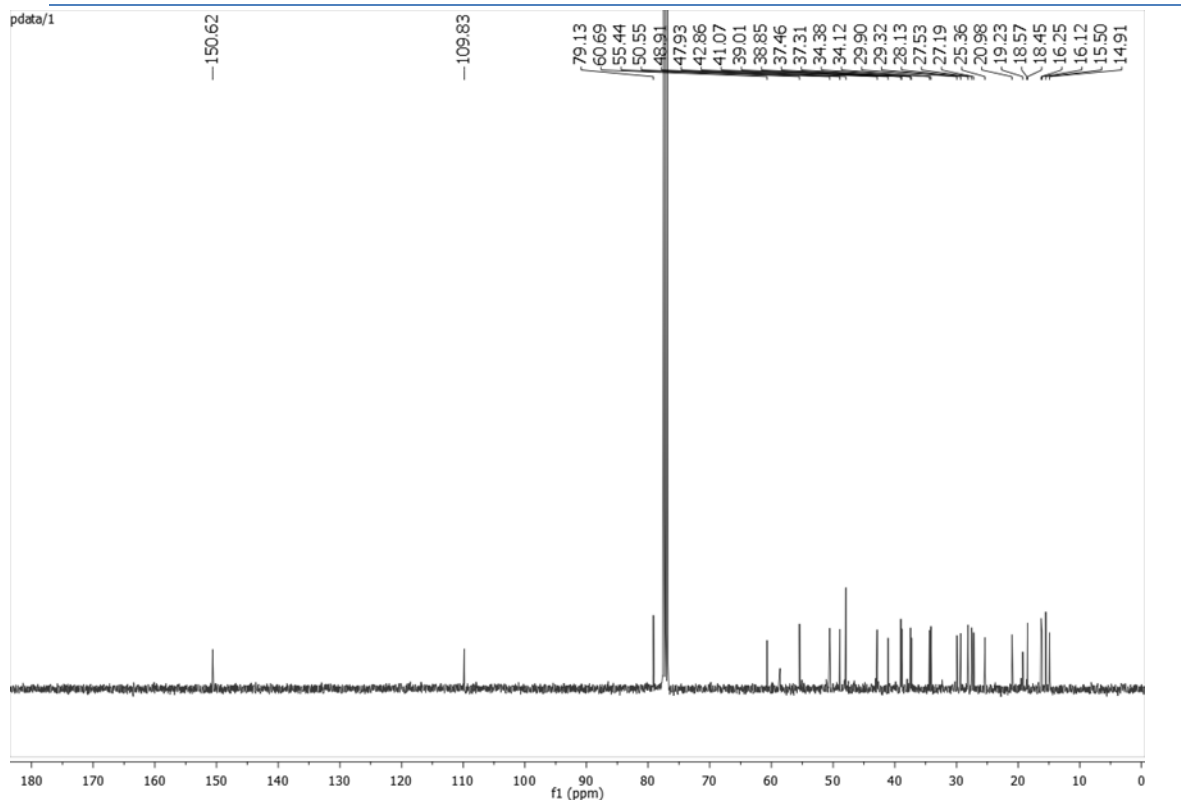


Figura A80: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **SC17**.

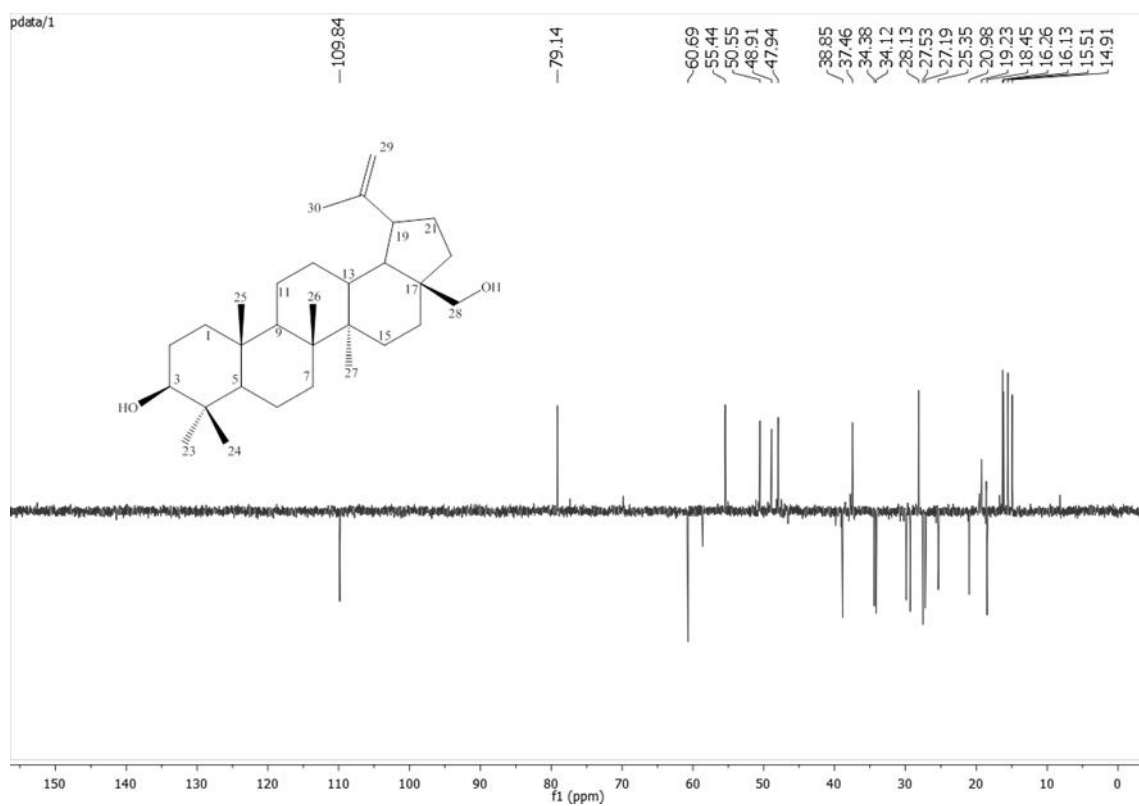


Figura A81: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de **SC17**.

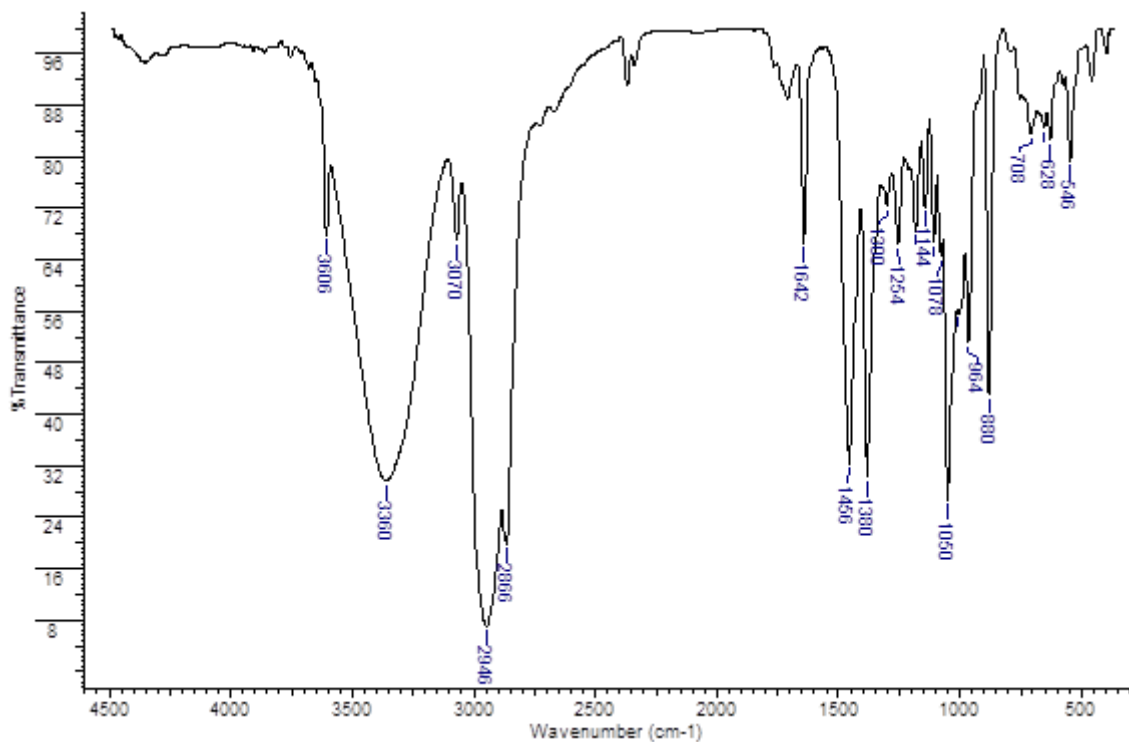


Figura A82: Espectro de absorção na região do IV de SC18 (KBr).

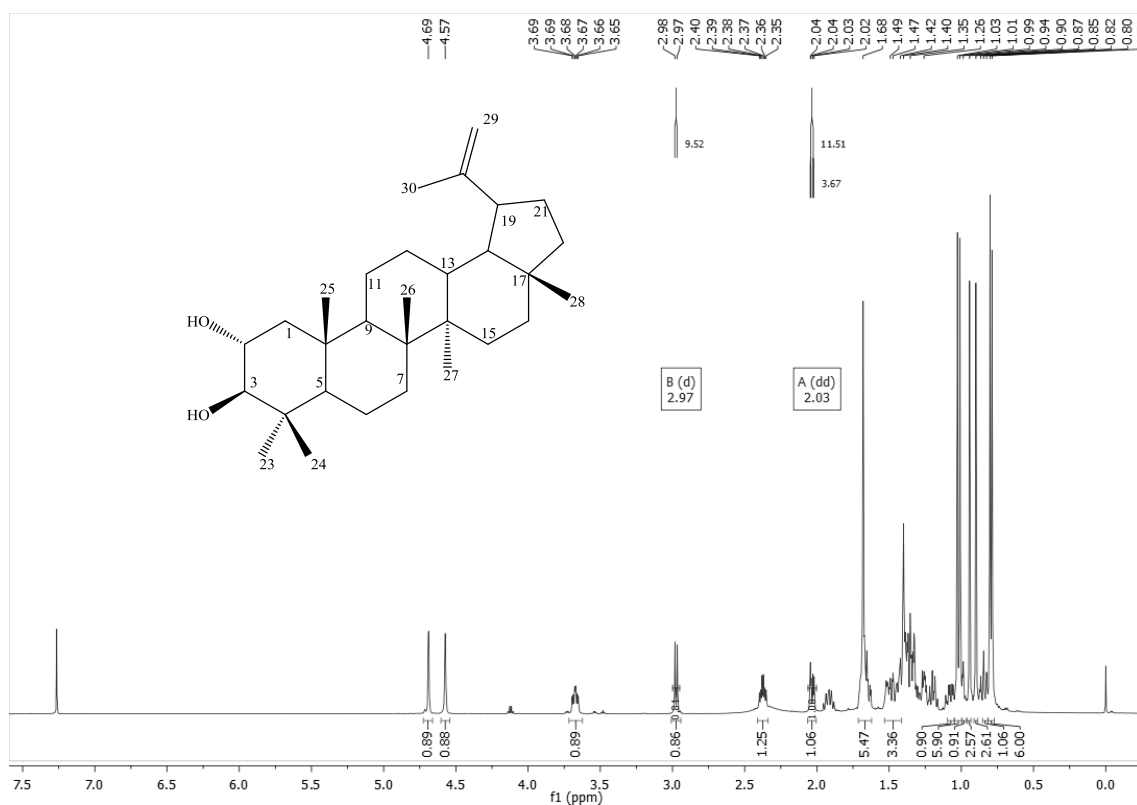


Figura A83: Espectro de RMN de ^1H de SC18 (400 MHz, CDCl_3).

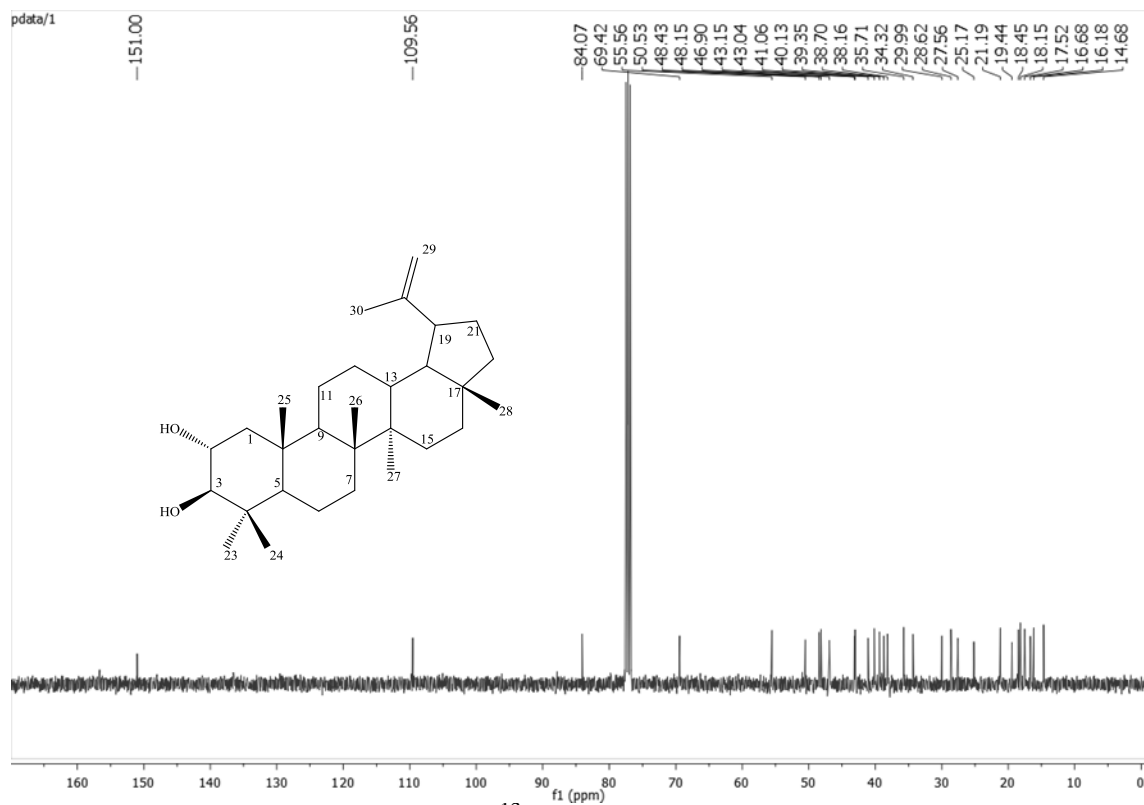


Figura A84: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de SC18.

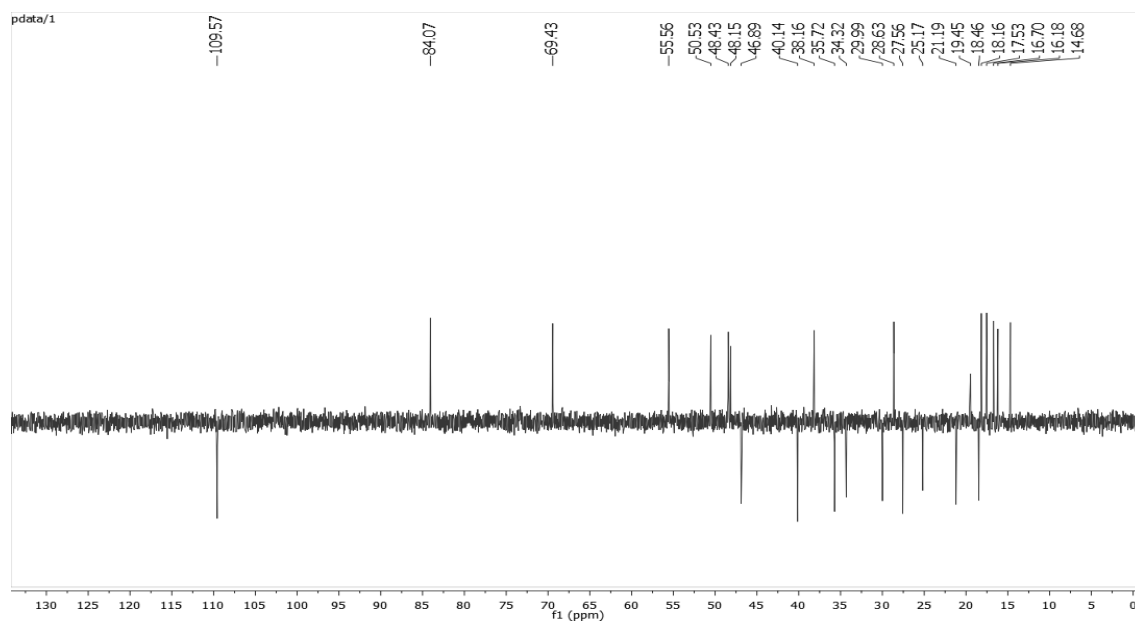


Figura A85: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de SC18.

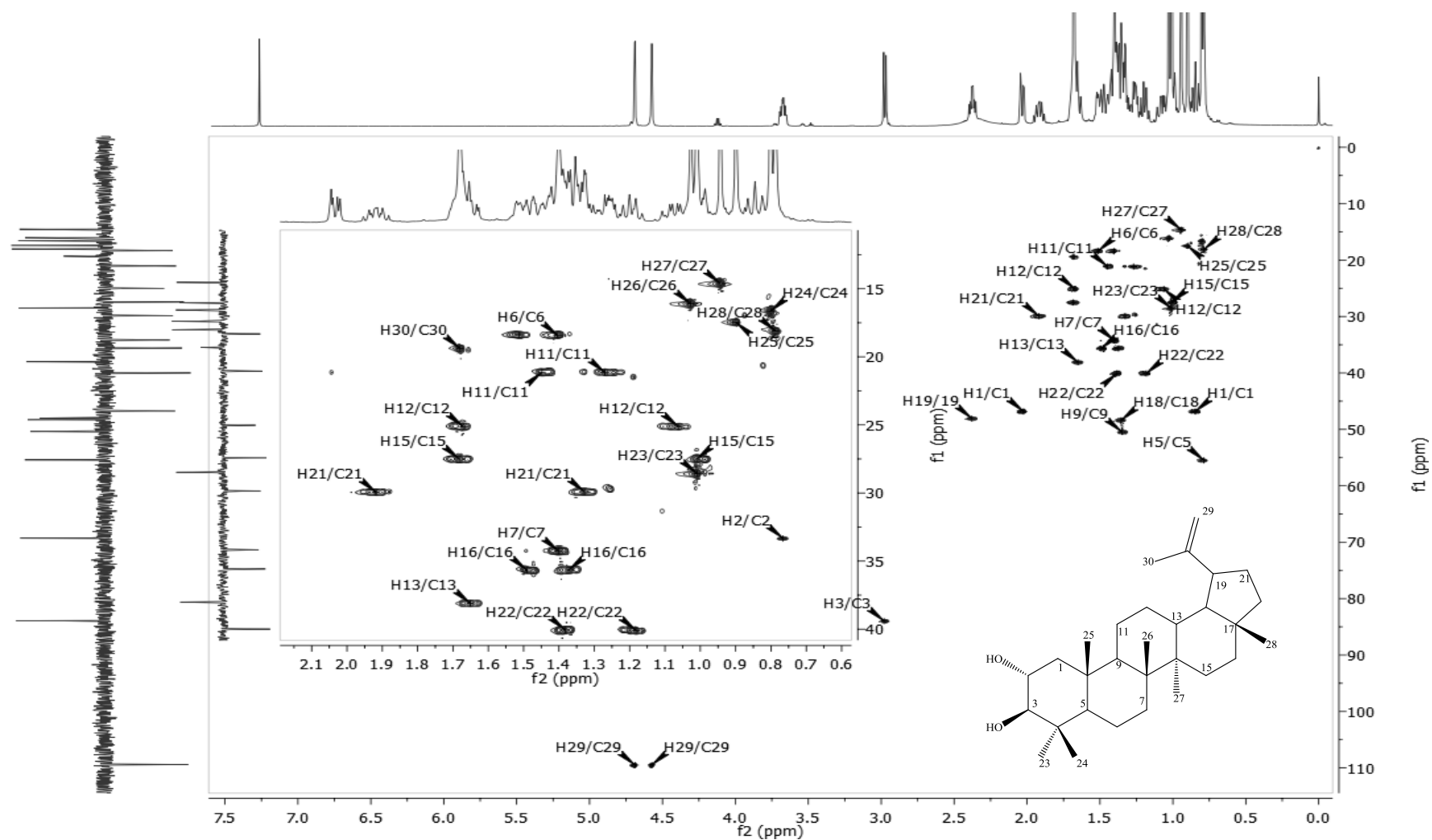


Figura A86: Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3) de SC18.

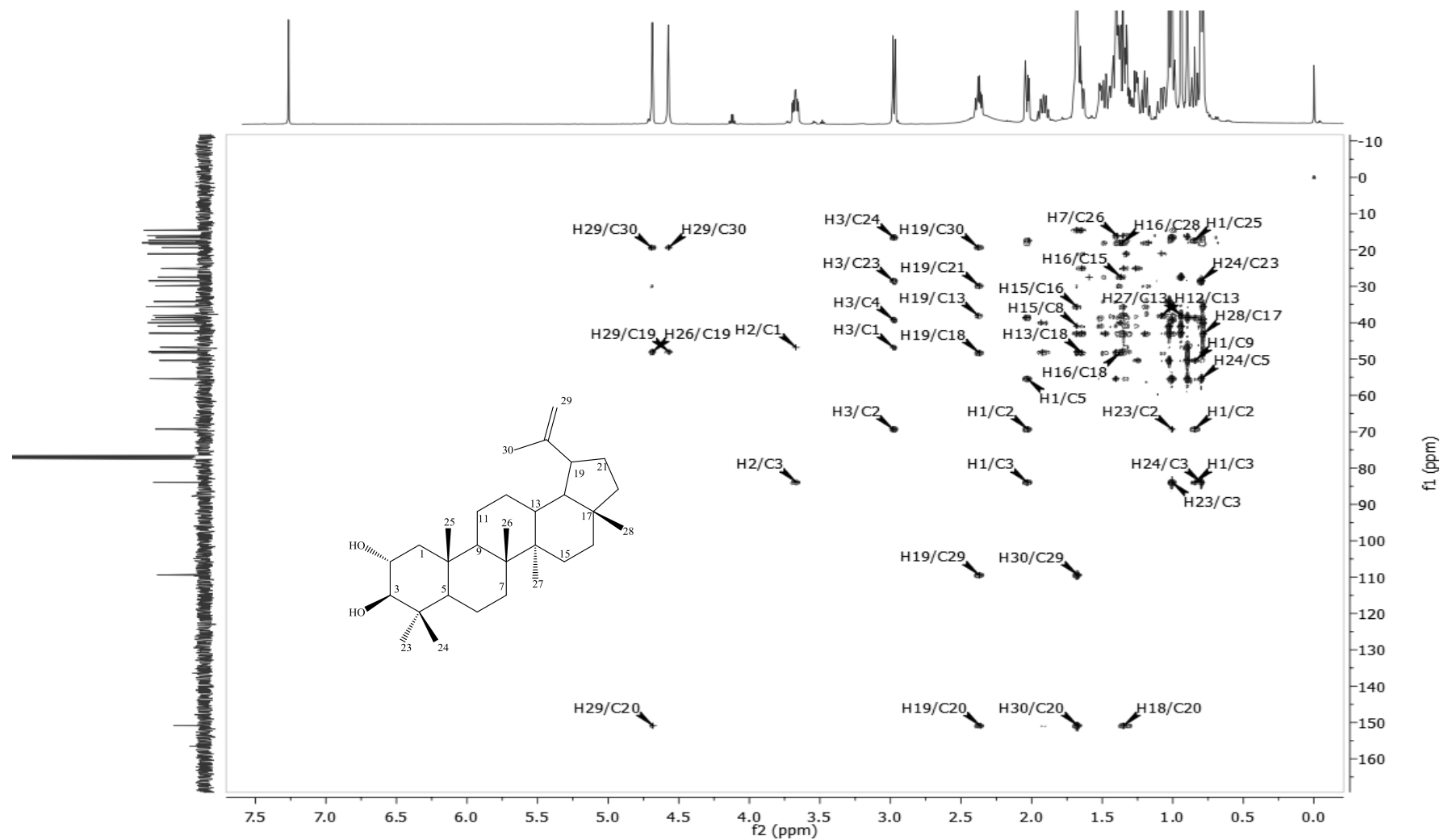


Figura A87: Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl₃) de SC18.

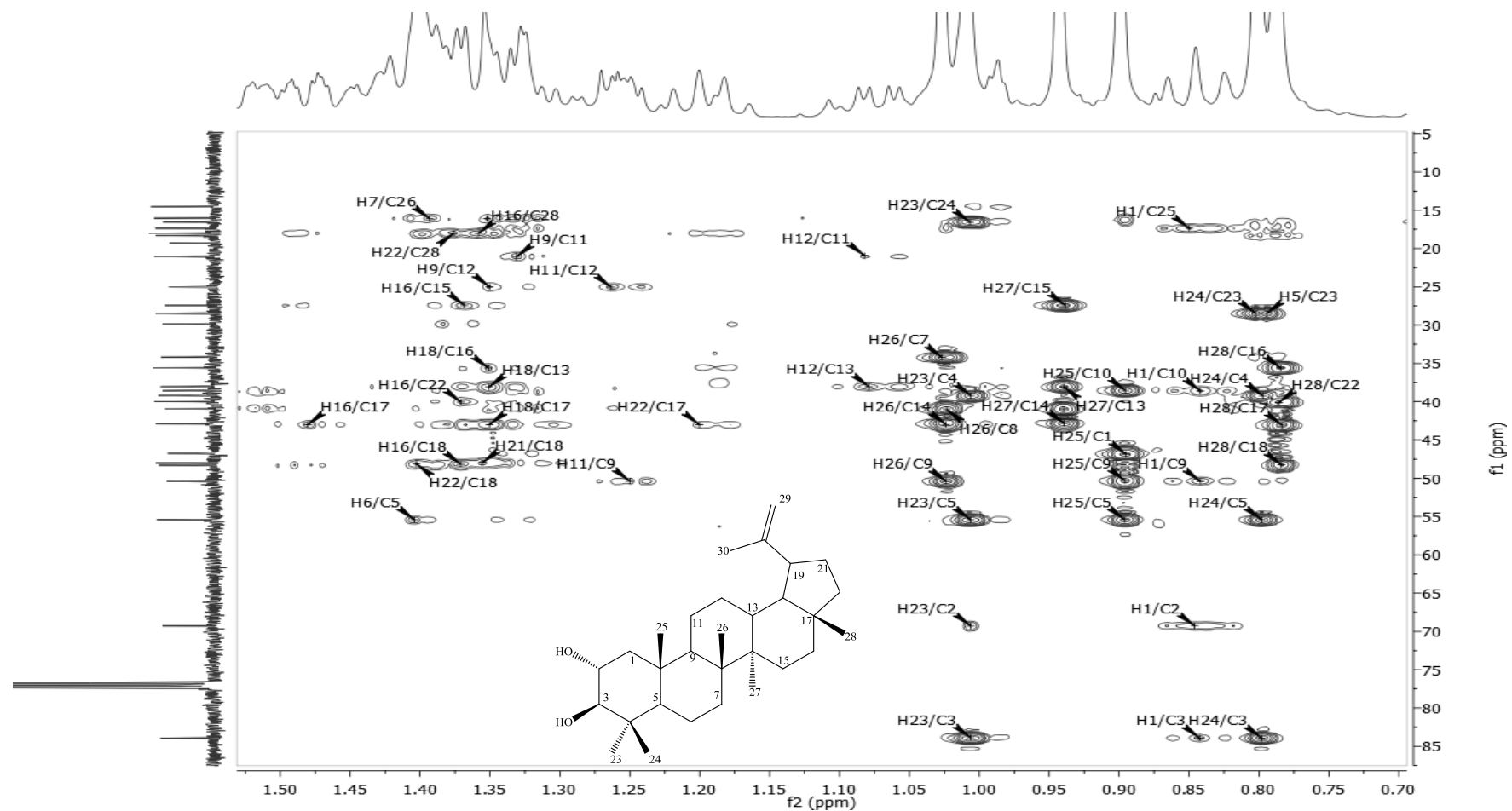


Figura A88: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) de SC18.

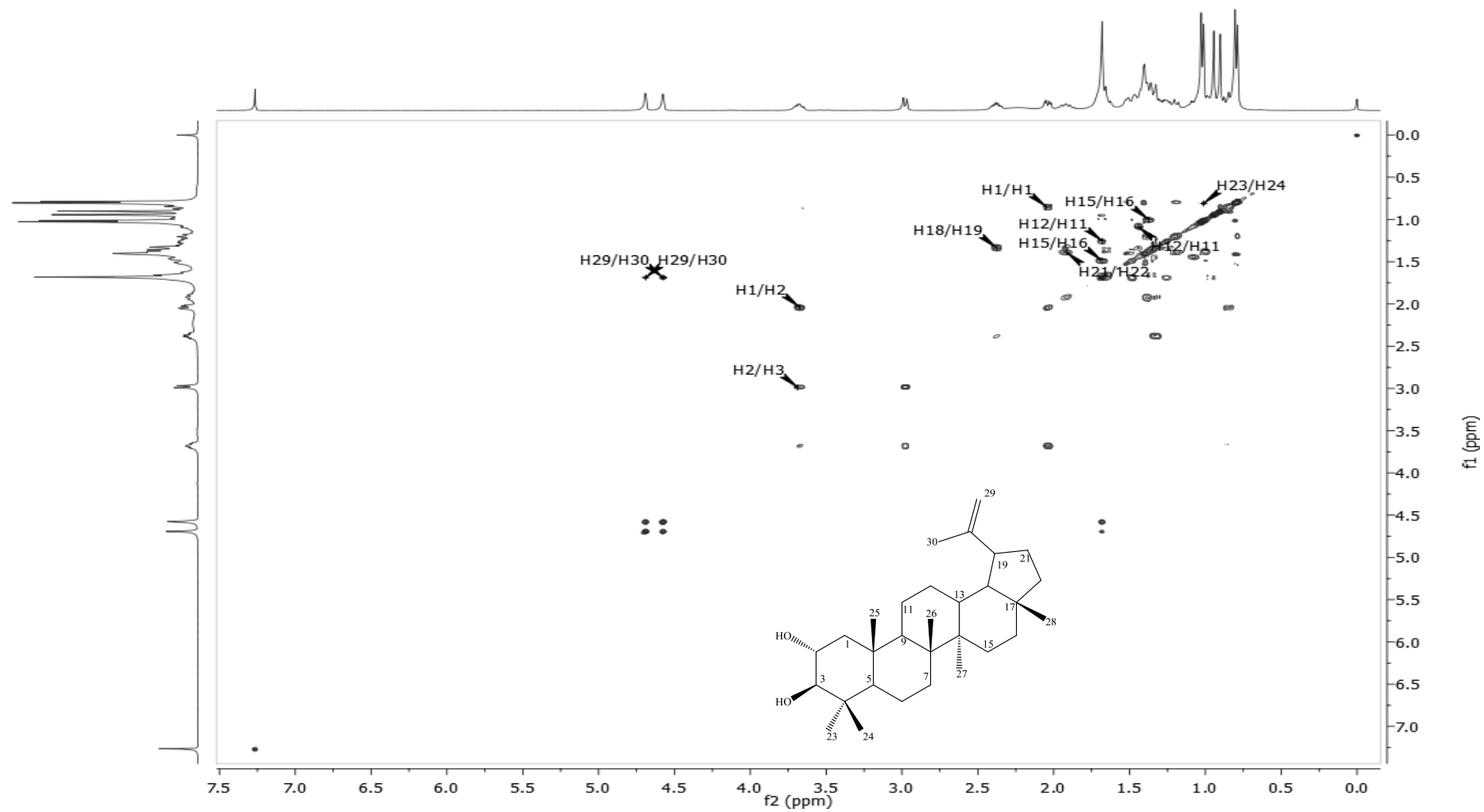


Figura A89: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃) de SC18.

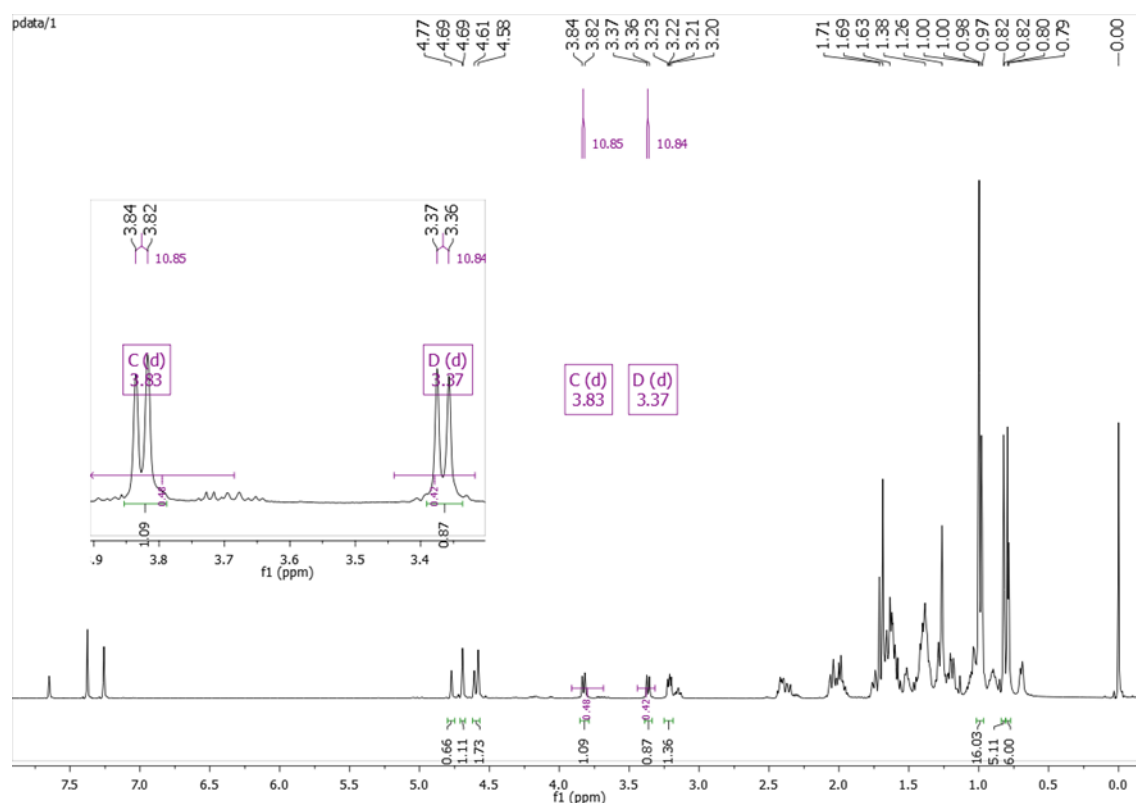


Figura A90: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC19.

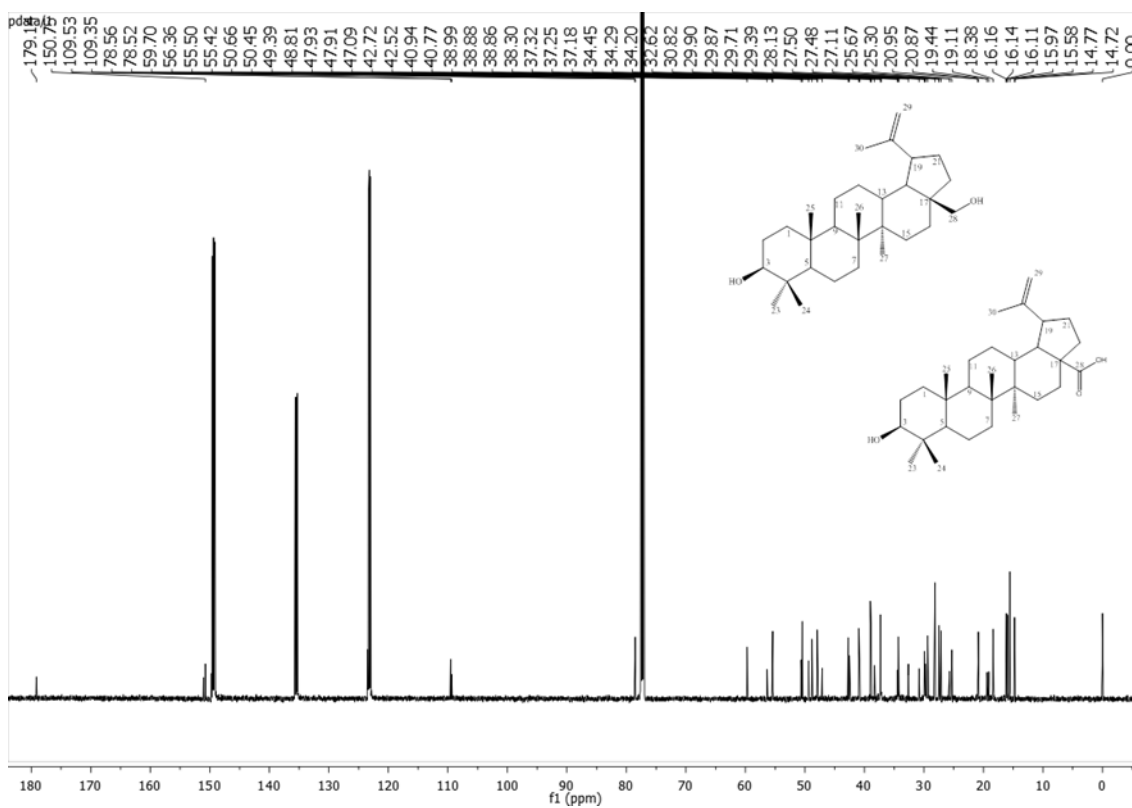


Figura A91: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC19.

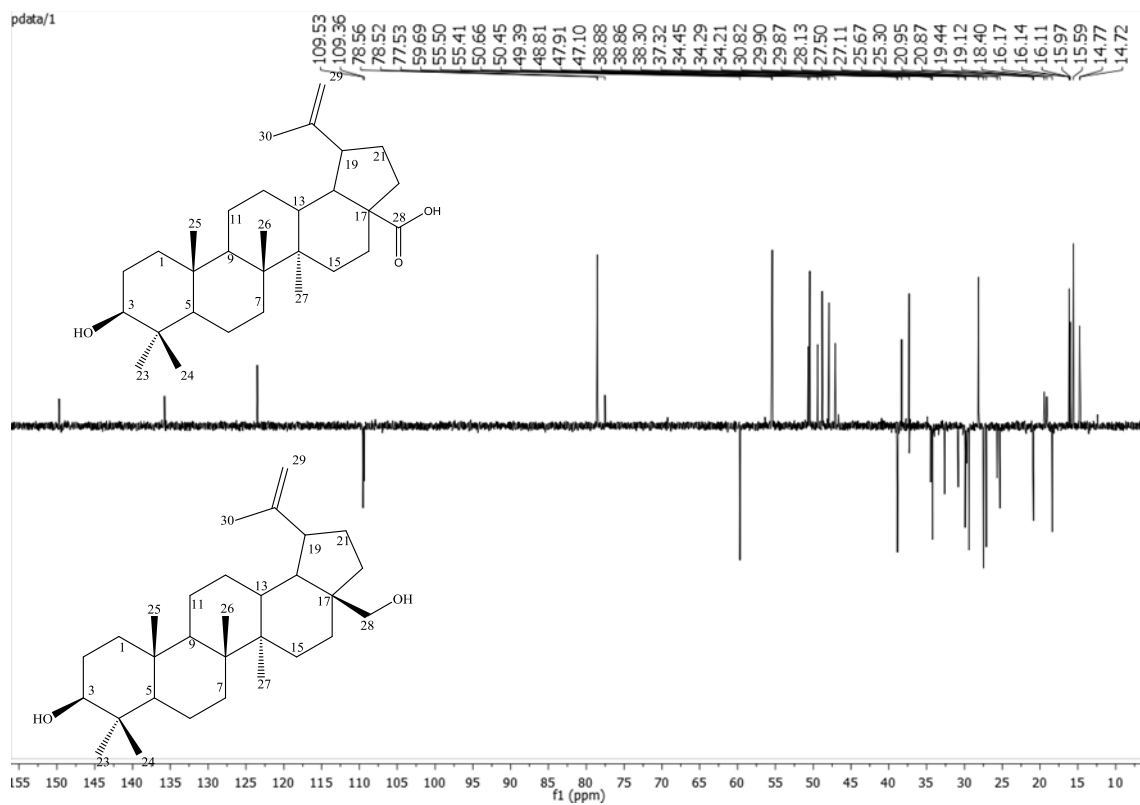
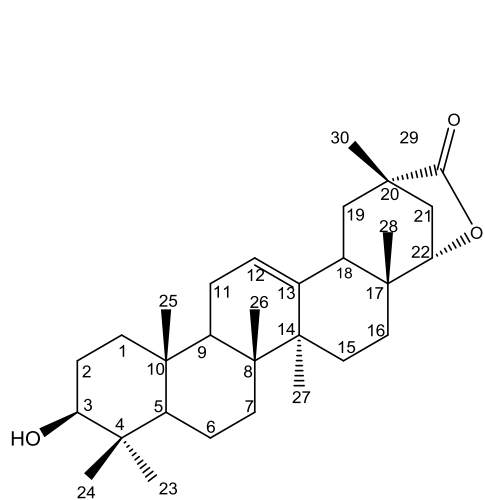


Figura A92: Espectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 + Piridina- d_5) de SC19.

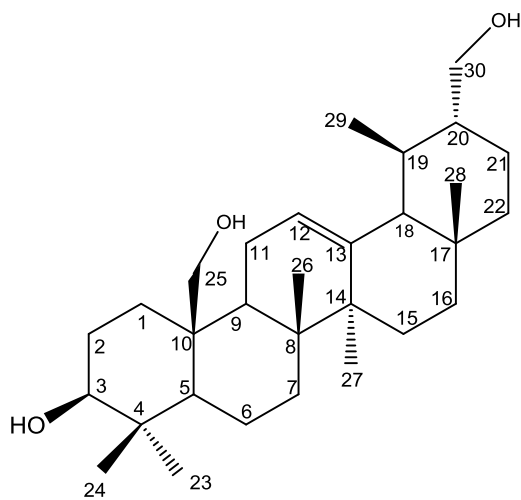
APÊNDICE B – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS

APÊNDICE B: ESTRUTURA QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

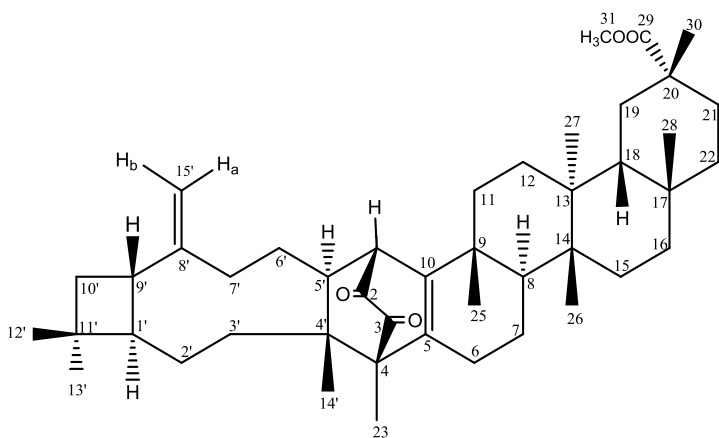
Apêndice B: Estrutura químicas dos compostos isolados



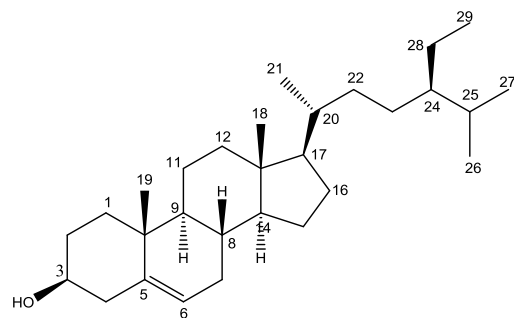
SC01: Abruslactona A



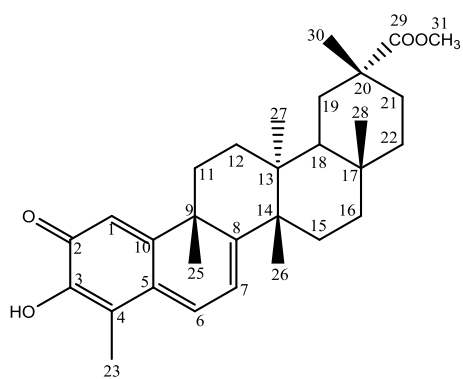
SC02: Urs-12-eno-3β,25,30-triol



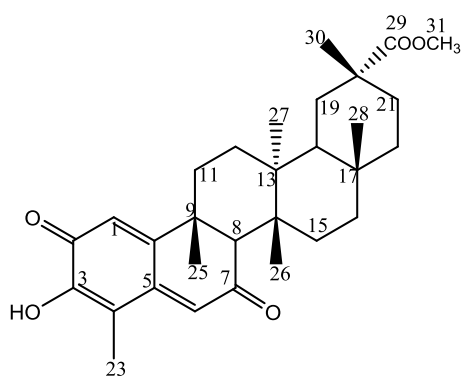
SC03: Cariopristimerina



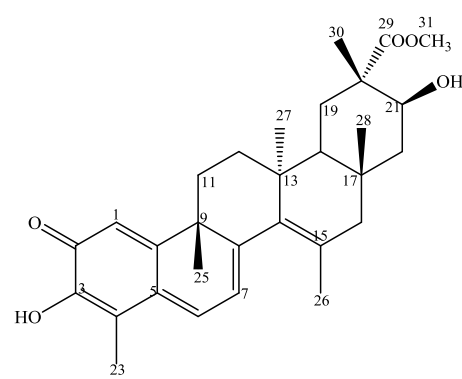
SC04: β-Sitosterol



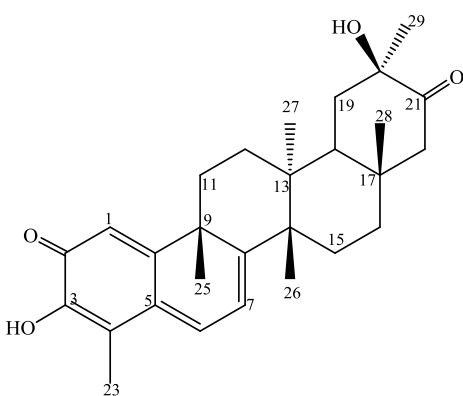
SC05: Pristimerina



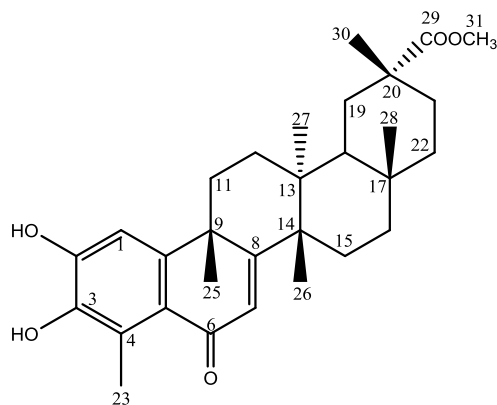
SC06: Dispermoquinona



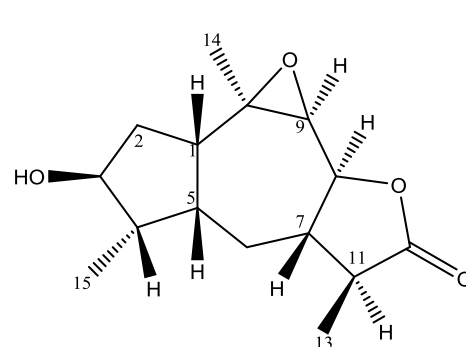
SC07: Netzahualcoionol



SC08: 20-hidroxi-20-epi-tingenona

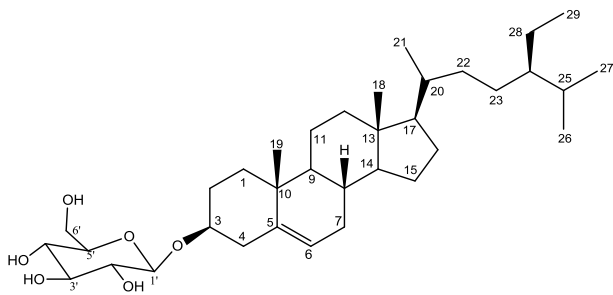


SC09: 6-oxo-pristimerol

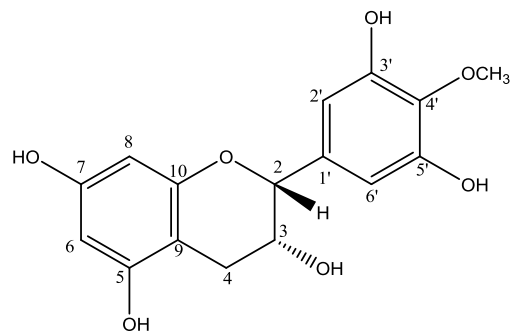


SC10: 9β,10β-epoxi-3β-hidroxi-1βH,4βH,5βH,7βH,11αH-guaian-12,8β-olídeo

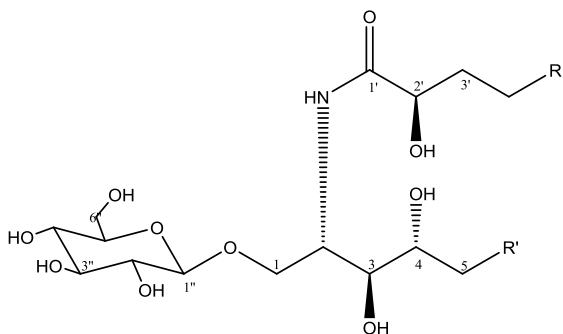
Apêndice B: Estrutura químicas dos compostos isolados



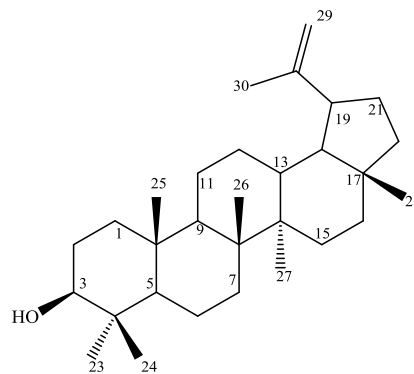
SC11: 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol



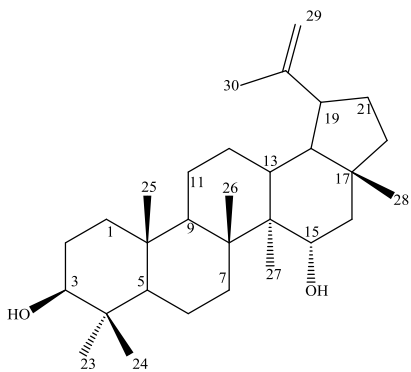
SC12: 4'-O-metilepigalocatequina



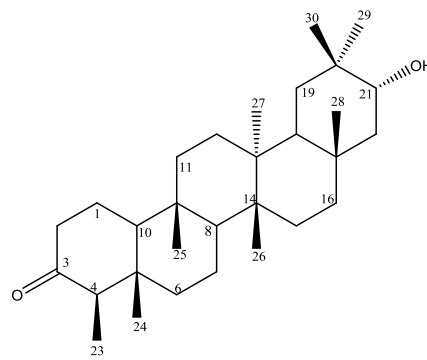
SC13: cerebrosideo



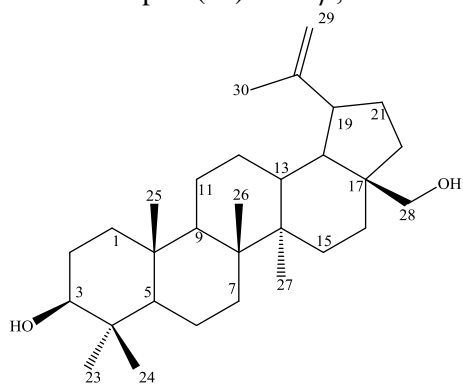
SC14: Lupeol



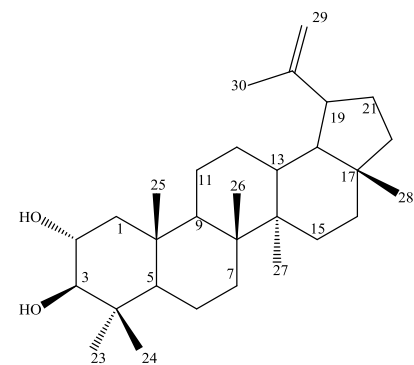
SC15: Lup-20(29)-eno-3 β ,15 α -diol



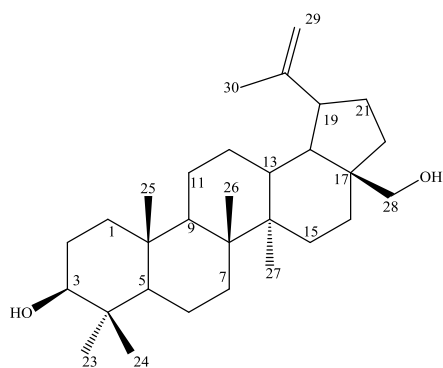
SC16: 21 α -hidroxifriedelan-3-ona



SC17: Betulina



SC18: Lup-20(29)-eno-2 α ,3 β -diol



SC19: Mistura de betulina e ácido betulínico

